



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102985113 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201180020416. 4

C07K 16/30(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 02. 22

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/307, 338 2010. 02. 23 US

61/308, 791 2010. 02. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 10. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/025642 2011. 02. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/106297 EN 2011. 09. 01

(73) 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 P. 波拉基斯 J. 阿桑迪

R. 法尔斯坦 R. F. 凯利

K. 麦卡特切昂

(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.

A61K 47/48(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

(56) 对比文件

黄长征等. “内皮素受体 B 在黑素瘤中的表达及内皮素 3 对黑素瘤细胞 A375 的体外促生长效应”. 《中华皮肤科杂志》. 2007, 第 40 卷 (第 7 期), 第 419-421 页.

审查员 王斯婷

权利要求书2页 说明书94页

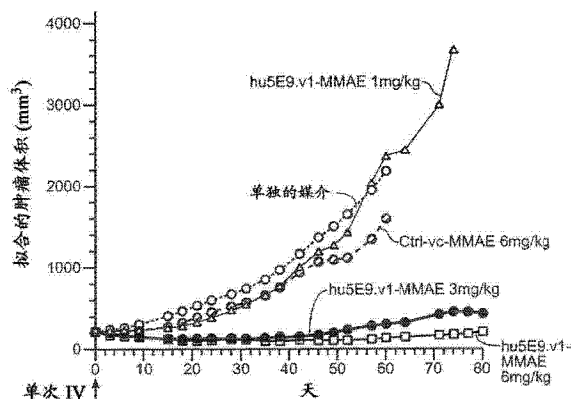
序列表9页 附图6页

(54) 发明名称

用于肿瘤诊断和治疗的组合物和方法

(57) 摘要

本发明致力于可用于诊断和治疗哺乳动物中的肿瘤的物质组合物及使用那些物质组合物来诊断和治疗哺乳动物中的肿瘤的方法。



1. 分离的抗体,其结合 TAT419 多肽 SEQ ID NO:2 且包含:
 - (a) SEQ ID NO:7 的 CDR-L1 序列;
 - (b) SEQ ID NO:8 的 CDR-L2 序列;
 - (c) SEQ ID NO:9 的 CDR-L3 序列;
 - (d) SEQ ID NO:10 的 CDR-H1 序列;
 - (e) SEQ ID NO:11 的 CDR-H2 序列;和
 - (f) SEQ ID NO:12 的 CDR-H3 序列。
2. 权利要求 1 的抗体,其是抗体片段。
3. 权利要求 1 的抗体,其是嵌合或人源化抗体。
4. 权利要求 1 的抗体,其与细胞毒剂偶联,其中所述细胞毒剂选自毒素、抗生素、放射性同位素和溶核酶。
5. 权利要求 4 的抗体,其中所述细胞毒剂是毒素,其中所述毒素选自美登木素生物碱、加利车霉素和 auristatin。
6. 权利要求 5 的抗体,其中所述 auristatin 为单甲基 auristatin E(MMAE)。
7. 权利要求 1-3 任一项的抗体,其与 MC-val-cit-PAB-MMAE 偶联。
8. 权利要求 1 的抗体,其在细菌中或在 CHO 细胞中产生。
9. 权利要求 1 的抗体,其诱导其所结合的细胞死亡。
10. 权利要求 1 的抗体,其抑制其所结合的细胞增殖。
11. 权利要求 9 或 10 的抗体,其中所述细胞是人黑素瘤癌细胞或人多发性骨髓瘤癌细胞。
12. 分离的抗体,其包含重链序列 SEQ ID NO:4 和轻链序列 SEQ ID NO:3。
13. 分离的抗体,其包含重链序列 SEQ ID NO:14 和轻链序列 SEQ ID NO:13。
14. 分离的抗体,其包含 VL 序列 SEQ ID NO:5 和 VH 序列 SEQ ID NO:6。
15. 分离的抗体,其包含 VL 序列 SEQ ID NO:15 和 VH 序列 SEQ ID NO:16。
16. 分离的抗体,其包含 VL 序列 SEQ ID NO:15 和 VH 序列 SEQ ID NO:17。
17. 权利要求 12-16 任一项的抗体,其与 MC-val-cit-PAB-MMAE 偶联。
18. 产生权利要求 1 的抗体的细胞。
19. 分离的核酸,其编码权利要求 1 的抗体。
20. 权利要求 1 或权利要求 7 或权利要求 17 的抗体在制备用于抑制过表达 TAT419 多肽 SEQ ID NO:2 或其胞外域的细胞增殖的药物中的用途,其中所述抑制包括使所述细胞接触权利要求 1 或权利要求 7 或权利要求 17 的抗体,其中所述抗体与所述 TAT419 多肽结合引起所述细胞的增殖抑制。
21. 用于治疗患有癌性肿瘤的哺乳动物的药物组合物,其中所述癌性肿瘤包含过表达 TAT419 多肽 SEQ ID NO:2 或其胞外域的细胞,所述药物组合物包含权利要求 1-17 任一项的抗体。
22. 权利要求 21 的药物组合物,其中所述细胞是人黑素瘤癌细胞或人多发性骨髓瘤癌细胞。
23. 权利要求 1 的抗体在制备用于测定怀疑含有 TAT419 蛋白质的样品中所述蛋白质存在情况的试剂或试剂盒中的用途,其中所述测定包括使所述样品暴露于权利要求 1 的抗体

并测定所述抗体与所述样品中所述蛋白质的结合,其中所述抗体与所述蛋白质结合表明所述样品中存在所述蛋白质,其中所述 TAT419 蛋白质包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或其胞外域。

24. 权利要求 23 的用途,其中所述抗体被可检测地标记。

25. 权利要求 1 的抗体在制备用于诊断哺乳动物中癌症存在情况的试剂或试剂盒中的用途,其中所述诊断包括使从所述哺乳动物得到的组织细胞的测试样品与权利要求 1 的抗体接触并检测所述抗体与测试样品中 TAT419 蛋白质间复合物的形成,其中有复合物形成表明所述哺乳动物中存在癌症,其中所述 TAT419 蛋白质包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或其胞外域。

26. 权利要求 20 的用途,其中所述细胞是人黑素瘤癌症细胞或人多发性骨髓瘤癌症细胞。

27. 权利要求 23 或 24 的用途,其中所述样品包含怀疑表达所述蛋白质的细胞,且所述细胞是人黑素瘤癌细胞或人多发性骨髓瘤癌细胞。

用于肿瘤诊断和治疗的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2010 年 2 月 23 日提交的流水号为 61/307,338 的美国临时专利申请和 2010 年 2 月 26 日提交的流水号为 61/308,791 的美国临时专利申请的权益,通过述及将这两件申请完整收入本文。

技术领域

[0003] 本发明致力于可用于诊断和治疗哺乳动物中的肿瘤的物质组合物,及使用那些物质组合物来诊断和治疗哺乳动物中的肿瘤的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 恶性肿瘤(癌)是在美国位居心脏病之后的第二位致死原因(Boring et al., CA Cancer J. Clin. 43:7(1993))。癌的特征为衍生自正常组织的异常或肿瘤性细胞的数量增加,所述细胞增殖形成肿瘤块;这些赘生性肿瘤细胞侵入邻近组织;及产生恶性细胞,所述恶性细胞最终经血液或淋巴系统传播到局部淋巴结并经称为转移的过程传播到远处。在癌性状态,细胞在正常细胞不生长的条件下增殖。癌自身表现为多种形式,特征为不同程度的侵袭力和进攻性。

[0006] 在寻找癌症诊断和治疗的有效细胞靶物的尝试中,研究人员试图鉴定在一种或多种特定类型的癌细胞的表面上与一种或多种正常非癌性细胞相比特异性表达的跨膜多肽膜相关多肽。通常,此类膜相关多肽在癌细胞的表面上比在非癌性细胞的表面上表达的量更大。此类肿瘤相关细胞表面抗原多肽的鉴定导致了经基于抗体的疗法特异性靶向破坏癌细胞的能力。在这点上,注意到基于抗体的疗法已经证明在某些癌症的治疗中是非常有效的。例如,HERCEPTIN®和RITUXAN®(都来自 Genentech Inc., South San Francisco, California)是已经分别成功用于治疗乳腺癌和非何杰金氏(Hodgkin)淋巴瘤的抗体。更具体的说,HERCEPTIN®是从重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体,其选择性结合人表皮生长因子受体 2(HER2)原癌基因的胞外结构域。HER2 蛋白过表达在 25-30% 的原发性乳腺癌中观察到。RITUXAN®是遗传工程嵌合鼠/人单克隆抗体,其针对在正常的和恶性的 B 淋巴细胞的表面上发现的 CD20 抗原。这两种抗体都是在 CHO 细胞中重组生产的。

[0007] 尽管在哺乳动物癌症疗法中有了上述进展,对于能够分别检测哺乳动物中肿瘤的存在和有效抑制肿瘤性细胞生长的另外的诊断和治疗剂仍然存在很大的需要。因此,本发明的目标之一是鉴定在一种或多种类型的癌细胞上与正常细胞上或其它不同癌细胞上相比表达更大量的细胞膜相关多肽,及使用那些多肽及其编码核酸来生成可用于哺乳动物中的癌症的治疗性处理和诊断性检测的物质组合物。

[0008] 发明概述

[0009] 在本说明书中,申请人首次描述了如下所述的细胞多肽(及其编码核酸或其片段)的鉴定,所述细胞多肽在一种或多种类型癌细胞表面上表达的程度高于它们在一种或多种类型正常非癌细胞表面上表达的程度。这些多肽在本文中称为肿瘤相关抗原性靶多肽

(Tumor-associated Antigenic Target polypeptides, “TAT”多肽),它们有望充当哺乳动物中癌症治疗和诊断的有效靶物。

[0010] 因此,在本发明的一个实施方案中,本发明提供了分离的核酸分子,其具有编码肿瘤相关抗原性靶多肽或其片段(“TAT”多肽)的核苷酸序列。

[0011] 在某些方面,所述分离的核酸分子包含与下述各项具有至少约 80% 的核酸序列同一性,或者至少约 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性的核苷酸序列:

[0012] (a) 编码

[0013] 具有本文所公开的氨基酸序列的全长 TAT 多肽、

[0014] 本文所公开的缺少信号肽的 TAT 多肽氨基酸序列、

[0015] 本文所公开的有或没有信号肽的跨膜 TAT 多肽的胞外域、或

[0016] 本文所公开的全长 TAT 多肽氨基酸序列的任何其它具体定义的片段的 DNA 分子;或者

[0017] (b) (a) 的 DNA 分子的互补分子 (complement)。

[0018] 在其它方面,所述分离的核酸分子包含与下述各项具有至少约 80% 的核酸序列同一性,或者至少约 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性的核苷酸序列:

[0019] (a) 包含

[0020] 本文所公开的全长 TAT 多肽 cDNA 的编码序列、

[0021] 本文所公开的缺少信号肽的 TAT 多肽的编码序列、

[0022] 本文所公开的有或没有信号肽的跨膜 TAT 多肽的胞外域的编码序列、或

[0023] 本文所公开的全长 TAT 多肽氨基酸序列的任何其它具体定义的片段的编码序列的 DNA 分子;或者

[0024] (b) (a) 的 DNA 分子的互补分子。

[0025] 本文的另一个方面提供了分离的核酸分子,其包含如下核苷酸序列,所述核苷酸序列编码跨膜域删除的或跨膜域灭活的 TAT 多肽,或者与此类编码核苷酸序列互补,其中,本文中公开了此类多肽的跨膜域。因此,设想了本文中所描述的 TAT 多肽的可溶性胞外域。

[0026] 在其它方面,本发明致力于分离的核酸分子,其与下述各项杂交:

[0027] (a) 编码

[0028] 具有本文所公开的全长氨基酸序列的 TAT 多肽、

[0029] 本文所公开的缺少信号肽的 TAT 多肽氨基酸序列、

[0030] 本文所公开的有或没有信号肽的跨膜 TAT 多肽的胞外域、或

[0031] 本文所公开的全长 TAT 多肽氨基酸序列的任何其它具体定义的片段的核苷酸序列,或者

[0032] (b) (a) 的核苷酸序列的互补分子。

[0033] 在这点上,本发明的一个实施方案致力于本文所公开的全长 TAT 多肽编码序列的片段或其互补序列,它们可用作例如杂交探针,所述杂交探针可用作例如诊断探针、PCR 引物、反义寡核苷酸探针,或者用于编码全长 TAT 多肽的片段,可任选编码包含抗 TAT 多肽抗体的结合位点的多肽。此类核酸片段的长度通常为至少约 5 个核苷酸,或者长度为至少约

6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990 或 1000 个核苷酸,其中在此语境中,术语“约”意指所述核苷酸序列长度加上或减去所述长度的 10%。此外,此类核酸片段经常包含衍生自 TAT 多肽全长编码序列或其互补序列的连续核苷酸。注意到 TAT 多肽编码核苷酸序列或其互补序列的新片段可以常规方式确定,即使用多种众所周知的序列对比程序中的任一种将 TAT 多肽编码核苷酸序列与其它已知核苷酸序列对比,并确定哪个(些)TAT 多肽编码核苷酸序列或其互补序列是新的。本文设想了 TAT 多肽编码核苷酸序列或其互补序列的所有此类新片段。还设想了由这些核苷酸分子片段编码的 TAT 多肽片段,优选那些包含抗 TAT 多肽抗体的结合位点的 TAT 多肽片段。

[0034] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的 TAT 多肽,其由上文鉴定的任何分离的核酸序列编码。

[0035] 在某一个方面,本发明涉及分离的 TAT 多肽,其包含与选自如下任一具有至少约 80% 的氨基酸序列同一性,或者至少约 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0036] 具有本文所公开的全长氨基酸序列的 TAT 多肽、

[0037] 本文所公开的缺少信号肽的 TAT 多肽氨基酸序列、

[0038] 本文所公开的有或没有信号肽的跨膜 TAT 多肽的胞外域、

[0039] 由本文所公开的任何核酸序列编码的氨基酸序列、

[0040] 本文所公开的全长 TAT 多肽氨基酸序列的任何其它具体定义的片段。

[0041] 在又一个方面,本发明涉及分离的 TAT 多肽,其包含与编码

[0042] (a) 具有本文所公开的全长氨基酸序列的 TAT 多肽、

[0043] (b) 本文所公开的缺少信号肽的 TAT 多肽氨基酸序列、

[0044] (c) 本文所公开的有或没有信号肽的跨膜 TAT 多肽的胞外域、

[0045] (d) 本文所公开的任何核酸序列编码的氨基酸序列、或

[0046] (e) 本文所公开的全长 TAT 多肽氨基酸序列的任何其它具体定义的片段的 DNA 分子的互补序列杂交的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0047] 在一个具体的方面,本发明提供了分离的 TAT 多肽,其没有 N- 末端信号序列和/或没有起始甲硫氨酸,且由编码上文所述氨基酸序列的核苷酸序列所编码。本文还描述了用于产生它的方法,其中所述方法包括:在适于表达 TAT 多肽的条件下培养包含如下载体的宿主细胞,所述载体包含适宜的编码核酸分子,并从细胞培养物回收 TAT 多肽。

[0048] 本发明的另一个方面提供了分离的 TAT 多肽,其是跨膜域删除的或跨膜域灭活的。本文还描述了用于产生它的方法,其中所述方法包括:在适于表达 TAT 多肽的条件下培养包含如下载体的宿主细胞,所述载体包含适宜的编码核酸分子,并从细胞培养物回收 TAT 多肽。

[0049] 在本发明的其它实施方案中,本发明提供了包含编码任何本文所述多肽的 DNA 的载体。还提供了包含任何此类载体的宿主细胞。举例而言,所述宿主细胞可以是 CHO 细胞、大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞或酵母细胞。还提供了用于产生任何本文所述多肽的方法,包括在适于表达期望多肽的条件下培养宿主细胞并从细胞培养物回收期望多肽。

[0050] 在其它实施方案中,本发明提供了分离的嵌合多肽,其包含与异源(非 TAT)多肽融合的任何本文所述 TAT 多肽。此类嵌合分子的例子包括与异源多肽诸如例如表位标签序列或免疫球蛋白 Fc 区融合的任何本文所述 TAT 多肽。

[0051] 在另一个实施方案中,本发明提供了抗体,其结合,优选特异性结合任何前述或后述多肽。任选的是,所述抗体是单克隆抗体、抗体片段、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、或竞争性抑制抗 TAT 多肽抗体与其各自抗原性表位结合的抗体。本发明的抗体可任选偶联生长抑制剂或细胞毒剂诸如毒素包括例如美登木素生物碱 (maytansinoid) 或加利车霉素 (calicheamicin)、抗生素、放射性同位素、溶核酶 (nucleolytic enzyme) 或诸如此类。本发明的抗体可任选在 CHO 细胞或细菌细胞中产生,且优选抑制其所结合的细胞生长或增殖或者诱导其所结合的细胞死亡。为了诊断目的,本发明的抗体可以被可检测地标记,附着于固相支持物,等等。

[0052] 在本发明的其它实施方案中,本发明提供了包含编码任何本文所述抗体的 DNA 的载体。还提供了包含任何此类载体的宿主细胞。举例而言,所述宿主细胞可以是 CHO 细胞、大肠杆菌细胞或酵母细胞。还提供了用于产生任何本文所述抗体的方法,包括在适于表达期望抗体的条件下培养宿主细胞并从细胞培养物回收期望的抗体。

[0053] 在又一个实施方案中,本发明涉及物质组合物,其包含与载体组合的:如本文所述的 TAT 多肽、如本文所述的嵌合 TAT 多肽、或如本文所述的抗 TAT 抗体。任选的是,所述载体是药学可接受的载体。

[0054] 在又一个实施方案中,本发明涉及制品,其包括容器及该容器中容纳的物质组合物,其中所述物质组合物可包含如本文所述的 TAT 多肽、如本文所述的嵌合 TAT 多肽、或如本文所述的抗 TAT 抗体。该制品可任选还包括附于所述容器的标签或所述容器中包括的包装插页,其涉及所述物质组合物在肿瘤的治疗性处理或诊断性检测中的用途。

[0055] 本发明的另一个实施方案致力于如本文所述的 TAT 多肽、如本文所述的嵌合 TAT 多肽、或如本文所述的抗 TAT 多肽抗体用于制备药物的用途,所述药物可用于治疗对所述 TAT 多肽、嵌合 TAT 多肽、或抗 TAT 多肽抗体有响应的状况。

[0056] 本发明的其它实施方案致力于任何分离的抗体,其包含本文所公开的 CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 序列中的一种或多种,或是与任何此类抗体结合相同表位的任何抗体。

[0057] 本发明的另一个实施方案致力于用于抑制表达 TAT 多肽的细胞生长的方法,其中该方法包括使所述细胞接触与所述 TAT 多肽结合的抗体,且其中所述抗体与所述 TAT 多肽的结合引起所述表达 TAT 多肽的细胞的生长抑制。在优选的实施方案中,所述细胞是癌细胞,且所述抗体与所述 TAT 多肽的结合引起表达所述 TAT 多肽的所述细胞死亡。任选的是,所述抗体是单克隆抗体、抗体片段、嵌合抗体、人源化抗体、或单链抗体。本发明方法中所采用的抗体可任选偶联生长抑制剂或细胞毒剂诸如毒素包括例如美登木素生物碱或加利车霉素、抗生素、放射性同位素、溶核酶或诸如此类。本发明方法中所采用的抗体可任选在 CHO

细胞或细菌细胞中产生。

[0058] 本发明的又一个实施方案致力于治疗性处理具有癌性肿瘤的哺乳动物的方法,所述癌性肿瘤包含表达 TAT 多肽的细胞,其中该方法包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的结合所述 TAT 多肽的抗体,由此所述肿瘤得到有效的治疗性处理。任选的是,所述抗体是单克隆抗体、抗体片段、嵌合抗体、人源化抗体或单链抗体。本发明方法中所采用的抗体可任选偶联生长抑制剂或细胞毒剂诸如毒素包括例如美登木素生物碱或加利车霉素、抗生素、放射性同位素、溶核酶或诸如此类。本发明方法中所采用的抗体可任选在 CHO 细胞或细菌细胞中产生。

[0059] 本发明的又一个实施方案致力于测定怀疑含有 TAT 多肽的样品中该 TAT 多肽的存在的方法,其中该方法包括使所述样品暴露于(或使所述样品接触)结合所述 TAT 多肽的抗体,并测定或检测所述样品中所述抗体与所述 TAT 多肽的结合,其中此类结合的存在表明所述样品中存在所述 TAT 多肽。任选的是,所述样品可包括怀疑表达 TAT 多肽的细胞(可以是癌细胞)。本发明方法中所采用的抗体可任选被可检测地标记、附着于固相支持物,或诸如此类。

[0060] 本发明的又一个实施方案致力于诊断哺乳动物中肿瘤的存在的方法,其中该方法包括检测 (a) 从所述哺乳动物获得的组织细胞的测试样品中和 (b) 相同组织来源或类型的已知正常非癌性细胞的对照样品中编码 TAT 多肽的基因的表达水平,其中所述 TAT 多肽在测试样品中的表达水平高于对照样品表明获取该测试样品的哺乳动物中存在肿瘤。

[0061] 本发明的又一个实施方案致力于诊断哺乳动物中肿瘤的存在的方法,其中该方法包括 (a) 使包含从所述哺乳动物获得的组织细胞的测试样品接触结合 TAT 多肽的抗体,并 (b) 检测所述测试样品中所述抗体和所述 TAT 多肽之间复合物的形成,其中复合物的形成表明所述哺乳动物中存在肿瘤。任选的是,所采用的抗体被可检测地标记,附着于固相支持物,或诸如此类,和 / 或所述组织细胞的测试样品是从怀疑具有癌性肿瘤的个体获得的。

[0062] 本发明的又一个实施方案致力于治疗或预防与改变的,优选提高的 TAT 多肽表达或 TAT 多肽活性有关的细胞增殖性紊乱(病症)的方法,该方法包括给需要此类治疗的受试者施用有效量的 TAT 多肽的拮抗剂。优选的是,所述细胞增殖性紊乱是癌症,且所述 TAT 多肽的拮抗剂是抗 TAT 多肽抗体或反义寡核苷酸。细胞增殖性紊乱 TAT 多肽的有效治疗或预防可以是直接杀死表达 TAT 多肽的细胞或抑制其生长的结果,或者通过拮抗 TAT 多肽的细胞生长促进活性。

[0063] 本发明的又一个实施方案致力于使抗体与表达 TAT 多肽的细胞结合的方法,其中该方法包括在适于所述抗体与所述 TAT 多肽结合的条件下使表达 TAT 多肽的细胞接触所述抗体,并容许它们之间的结合。在优选的实施方案中,所述抗体用可定性和 / 或定量测定所述抗体结合所述细胞的位置和 / 或量的分子或化合物标记。

[0064] 本发明的又一个实施方案致力于将细胞毒剂或诊断剂递送至表达 TAT 多肽的细胞的方法,其中该方法包括提供与结合所述 TAT 多肽的抗体偶联的细胞毒剂或诊断剂以形成抗体-药剂偶联物,并使所述细胞暴露于所述抗体-药剂偶联物。任选的是,所述抗体是单克隆抗体、抗体片段、嵌合抗体、人源化抗体、或单链抗体。

[0065] 本发明的其它实施方案致力于 TAT 多肽、编码 TAT 多肽的核酸或包含该核酸的载体或宿主细胞、或抗 TAT 多肽抗体在制备可用于 (i) 癌症或肿瘤的治疗性处理或诊断性检

测或(ii)细胞增殖性紊乱(病症)的治疗性处理或预防的药物中的用途。

[0066] 本发明的另一个实施方案致力于抑制癌细胞生长的方法,其中所述癌细胞的生长至少部分依赖于TAT多肽的生长促进效果(其中所述TAT多肽可以是由癌细胞自身表达的,或者是由产生对癌细胞具有生长促进效果的多肽的细胞表达的),其中该方法包括使所述TAT多肽接触结合所述TAT多肽的抗体,由此拮抗所述TAT多肽的生长促进活性,继而抑制所述癌细胞的生长。优选完全抑制癌细胞的生长。甚至更优选的是,所述抗体与所述TAT多肽的结合诱导所述癌细胞的死亡。任选的是,所述抗体是单克隆抗体、抗体片段、嵌合抗体、人源化抗体或单链抗体。本发明方法中所采用的抗体可任选偶联生长抑制剂或细胞毒剂诸如毒素包括例如美登木素生物碱或加利车霉素、抗生素、放射性同位素、溶核酶或诸如此类。本发明方法中所使用的抗体可任选在CHO细胞或细菌细胞中产生。

[0067] 本发明的又一个实施方案致力于治疗性处理哺乳动物中的肿瘤的方法,其中所述肿瘤的生长至少部分依赖于TAT多肽的生长促进效果,其中所述方法包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的结合所述TAT多肽的抗体,由此拮抗所述TAT多肽的生长促进活性并使所述肿瘤得到有效的治疗性处理。任选的是,所述抗体是单克隆抗体、抗体片段、嵌合抗体、人源化抗体或单链抗体。本发明方法中所采用的抗体可任选偶联生长抑制剂或细胞毒剂诸如毒素包括例如美登木素生物碱或加利车霉素、抗生素、放射性同位素、溶核酶或诸如此类。本发明方法中所采用的抗体可任选在CHO细胞或细菌细胞中产生。

[0068] 在其它实施方案中,本发明致力于如下这套本申请或未来申请可能的权利要求:

[0069] 1. 分离的核酸,其具有与下述各项具有至少80%核酸序列同一性的核苷酸序列:

[0070] (a)DNA分子,其编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列;

[0071] (b)DNA分子,其编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列,缺少其相关信号肽;

[0072] (c)DNA分子,其编码SEQ ID NO:2所示多肽的胞外域,具有其相关信号肽;

[0073] (d)DNA分子,其编码SEQ ID NO:2所示多肽的胞外域,缺少其相关信号肽;

[0074] (e)SEQ ID NO:1所示核苷酸序列;

[0075] (f)SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的全长编码序列;或

[0076] (g)(a),(b),(c),(d),(e)或(f)的互补序列。

[0077] 2. 分离的核酸,其具有:

[0078] (a)核苷酸序列,其编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列;

[0079] (b)核苷酸序列,其编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列,缺少其相关信号肽;

[0080] (c)核苷酸序列,其编码SEQ ID NO:2所示多肽的胞外域,具有其相关信号肽;

[0081] (d)核苷酸序列,其编码SEQ ID NO:2所示多肽的胞外域,缺少其相关信号肽;

[0082] (e)SEQ ID NO:1所示核苷酸序列;

[0083] (f)SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的全长编码区;或

[0084] (g)(a),(b),(c),(d),(e)或(f)的互补序列。

[0085] 3. 分离的核酸,其与下述任一项杂交:

[0086] (a)核酸,其编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列;

[0087] (b)核酸,其编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列,缺少其相关信号肽;

[0088] (c)核酸,其编码SEQ ID NO:2所示多肽的胞外域,具有其相关信号肽;

[0089] (d)核酸,其编码SEQ ID NO:2所示多肽的胞外域,缺少其相关信号肽;

- [0090] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列；
- [0091] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区；或
- [0092] (g) (a), (b), (c), (d), (e) 或 (f) 的互补序列。
- [0093] 4. 权利要求 3 的核酸, 其中所述杂交在严格条件下发生。
- [0094] 5. 权利要求 3 的核酸, 其长度为至少约 5 个核苷酸。
- [0095] 6. 表达载体, 其包含权利要求 1、2 或 3 的核酸。
- [0096] 7. 权利要求 6 的表达载体, 其中所述核酸与控制序列可操作连接, 所述控制序列受到用该载体转化的宿主细胞的识别。
- [0097] 8. 宿主细胞, 其包含权利要求 7 的表达载体。
- [0098] 9. 权利要求 8 的宿主细胞, 其是 CHO 细胞、大肠杆菌细胞或酵母细胞。
- [0099] 10. 用于生产多肽的方法, 包括在适于表达所述多肽的条件下培养权利要求 8 的宿主细胞, 并从细胞培养物回收所述多肽。
- [0100] 11. 分离的多肽, 其与下述各项具有至少 80% 的氨基酸序列同一性：
- [0101] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽；
- [0102] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽, 缺少其相关信号肽；
- [0103] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域, 具有其相关信号肽；
- [0104] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域, 缺少其相关信号肽；
- [0105] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽；或
- [0106] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽。
- [0107] 12. 分离的多肽, 其具有：
- [0108] (a) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列；
- [0109] (b) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列, 缺少其相关信号肽序列；
- [0110] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列, 具有其相关信号肽序列；
- [0111] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列, 缺少其相关信号肽序列；
- [0112] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列；或
- [0113] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的氨基酸序列。
- [0114] 13. 嵌合多肽, 其包含与异源多肽融合的权利要求 11 或 12 的多肽。
- [0115] 14. 权利要求 13 的嵌合多肽, 其中所述异源多肽是表位标签序列或免疫球蛋白的 Fc 区。
- [0116] 15. 分离的抗体, 其结合与下述各项具有至少 80% 氨基酸序列同一性的多肽：
- [0117] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽；
- [0118] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽, 缺少其相关信号肽；
- [0119] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域, 具有其相关信号肽；
- [0120] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域, 缺少其相关信号肽；
- [0121] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽；或
- [0122] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽。
- [0123] 16. 分离的抗体, 其结合具有下述任一项的多肽：
- [0124] (a) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列；
- [0125] (b) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列, 缺少其相关信号肽序列；

- [0126] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,具有其相关信号肽序列;
- [0127] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,缺少其相关信号肽序列;
- [0128] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列;或
- [0129] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的氨基酸序列。
- [0130] 17. 权利要求 15 或 16 的抗体,其是单克隆抗体。
- [0131] 18. 权利要求 15 或 16 的抗体,其是抗体片段。
- [0132] 19. 权利要求 15 或 16 的抗体,其是嵌合或人源化抗体。
- [0133] 20. 权利要求 15 或 16 的抗体,其与生长抑制剂偶联。
- [0134] 21. 权利要求 15 或 16 的抗体,其与细胞毒剂偶联。
- [0135] 22. 权利要求 21 的抗体,其中所述细胞毒剂选自毒素、抗生素、放射性同位素和溶核酶。
- [0136] 23. 权利要求 21 的抗体,其中所述细胞毒剂是毒素。
- [0137] 24. 权利要求 23 的抗体,其中所述毒素选自美登木素生物碱、加利车霉素和 auristatin。
- [0138] 25. 权利要求 23 的抗体,其中所述毒素是美登木素生物碱。
- [0139] 26. 权利要求 15 或 16 的抗体,其在细菌中产生。
- [0140] 27. 权利要求 15 或 16 的抗体,其在 CHO 细胞中产生。
- [0141] 28. 权利要求 15 或 16 的抗体,其诱导与其结合的细胞死亡。
- [0142] 29. 权利要求 15 或 16 的抗体,其被可检测地标记。
- [0143] 30. 分离的核酸,其具有编码权利要求 15 或 16 的抗体的核苷酸序列。
- [0144] 31. 表达载体,其包含与控制序列可操作连接的权利要求 30 的核酸,所述控制序列由用该载体转化的宿主细胞识别。
- [0145] 32. 宿主细胞,其包含权利要求 31 的表达载体。
- [0146] 33. 权利要求 32 的宿主细胞,其是 CHO 细胞、大肠杆菌细胞或酵母细胞。
- [0147] 34. 用于生产抗体的方法,包括在适于表达所述抗体的条件下培养权利要求 32 的宿主细胞,并从细胞培养物回收所述抗体。
- [0148] 35. 物质组合物,其包含与载体组合的:
- [0149] (a) 权利要求 11 的多肽;
- [0150] (b) 权利要求 12 的多肽;
- [0151] (c) 权利要求 13 的嵌合多肽;
- [0152] (d) 权利要求 15 的抗体;或
- [0153] (e) 权利要求 16 的抗体。
- [0154] 36. 权利要求 35 的物质组合物,其中所述载体是药学可接受的载体。
- [0155] 37. 制品,其包括:
- [0156] (a) 容器;及
- [0157] (b) 所述容器中容纳的权利要求 35 的物质组合物。
- [0158] 38. 权利要求 37 的制品,还包括附于所述容器的标签或所述容器中包括的包装插页,其涉及所述物质组合物用于癌症的治疗性处理或诊断性检测的用途。
- [0159] 39. 抑制细胞生长的方法,所述细胞表达与如下任一项具有至少 80% 氨基酸序列

同一性的蛋白质：

[0160] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽；

[0161] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽，缺少其相关信号肽；

[0162] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，具有其相关信号肽；

[0163] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，缺少其相关信号肽；

[0164] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽；或

[0165] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽，

[0166] 所述方法包括使所述细胞接触结合所述蛋白质的抗体，由此所述抗体与所述蛋白质的结合引起所述细胞的生长抑制。

[0167] 40. 权利要求 39 的方法，其中所述抗体是单克隆抗体。

[0168] 41. 权利要求 39 的方法，其中所述抗体是抗体片段。

[0169] 42. 权利要求 39 的方法，其中所述抗体是嵌合或人源化抗体。

[0170] 43. 权利要求 39 的方法，其中所述抗体与生长抑制剂偶联。

[0171] 44. 权利要求 39 的方法，其中所述抗体与细胞毒剂偶联。

[0172] 45. 权利要求 44 的方法，其中所述细胞毒剂选自毒素、抗生素、放射性同位素和溶核酶。

[0173] 46. 权利要求 44 的方法，其中所述细胞毒剂是毒素。

[0174] 47. 权利要求 46 的方法，其中所述毒素选自美登木素生物碱、加利车霉素和 auristatin。

[0175] 48. 权利要求 46 的方法，其中所述毒素是美登木素生物碱。

[0176] 49. 权利要求 39 的方法，其中所述抗体在细菌中产生。

[0177] 50. 权利要求 39 的方法，其中所述抗体在 CHO 细胞中产生。

[0178] 51. 权利要求 39 的方法，其中所述细胞是癌细胞。

[0179] 52. 权利要求 51 的方法，其中使所述癌细胞进一步暴露于放射处理或化疗剂。

[0180] 53. 权利要求 51 的方法，其中所述癌细胞选自乳腺癌细胞、结肠直肠癌细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、中枢神经系统癌细胞、肝癌细胞、膀胱癌细胞、胰腺癌细胞、宫颈癌细胞、黑素瘤细胞和白血病细胞。

[0181] 54. 权利要求 51 的方法，其中所述癌细胞与相同组织来源的正常细胞相比更大量的表达所述蛋白质。

[0182] 55. 权利要求 39 的方法，其引起所述细胞死亡。

[0183] 56. 权利要求 39 的方法，其中所述蛋白质具有：

[0184] (a) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列；

[0185] (b) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，缺少其相关信号肽序列；

[0186] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列，具有其相关信号肽序列；

[0187] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列，缺少其相关信号肽序列；

[0188] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列；或

[0189] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的氨基酸序列。

[0190] 57. 治疗性处理具有癌性肿瘤的哺乳动物的方法，所述癌性肿瘤包含表达与下述任一项具有至少 80% 氨基酸序列同一性的蛋白质的细胞：

- [0191] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽；
- [0192] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽，缺少其相关信号肽；
- [0193] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，具有其相关信号肽；
- [0194] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，缺少其相关信号肽；
- [0195] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽；或
- [0196] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽，
- [0197] 所述方法包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的结合所述蛋白质的抗体，由此有效治疗所述哺乳动物。
- [0198] 58. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体是单克隆抗体。
- [0199] 59. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体是抗体片段。
- [0200] 60. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体是嵌合或人源化抗体。
- [0201] 61. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体与生长抑制剂偶联。
- [0202] 62. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体与细胞毒剂偶联。
- [0203] 63. 权利要求 62 的方法，其中所述细胞毒剂选自毒素、抗生素、放射性同位素和溶核酶。
- [0204] 64. 权利要求 62 的方法，其中所述细胞毒剂是毒素。
- [0205] 65. 权利要求 64 的方法，其中所述毒素选自美登木素生物碱、加利车霉素和 auristatin。
- [0206] 66. 权利要求 64 的方法，其中所述毒素是美登木素生物碱。
- [0207] 67. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体在细菌中产生。
- [0208] 68. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体在 CHO 细胞中产生。
- [0209] 69. 权利要求 57 的方法，其中使所述肿瘤进一步暴露于放射处理或化疗剂。
- [0210] 70. 权利要求 57 的方法，其中所述肿瘤是乳腺肿瘤、结肠直肠肿瘤、肺肿瘤、卵巢肿瘤、中枢神经系统肿瘤、肝肿瘤、膀胱肿瘤、胰腺肿瘤或宫颈肿瘤。
- [0211] 71. 权利要求 57 的方法，其中所述肿瘤的癌性细胞与相同组织来源的正常细胞相比更大量的表达所述蛋白质。
- [0212] 72. 权利要求 57 的方法，其中所述蛋白质具有：
- [0213] (a) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列；
- [0214] (b) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，缺少其相关信号肽序列；
- [0215] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列，具有其相关信号肽序列；
- [0216] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列，缺少其相关信号肽序列；
- [0217] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列；或
- [0218] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的氨基酸序列。
- [0219] 73. 测定怀疑含有某种蛋白质的样品中该蛋白质的存在的方法，其中所述蛋白质与下述任一项具有至少 80% 的氨基酸序列同一性：
- [0220] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽；
- [0221] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽，缺少其相关信号肽；
- [0222] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，具有其相关信号肽；
- [0223] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，缺少其相关信号肽；

- [0224] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽 ;或
- [0225] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽,
- [0226] 所述方法包括使所述样品暴露于结合所述蛋白质的抗体,并测定所述样品中所述抗体与所述蛋白质的结合,其中所述抗体与所述蛋白质的结合表明所述样品中存在所述蛋白质。
- [0227] 74. 权利要求 73 的方法,其中所述样品包含怀疑表达所述蛋白质的细胞。
- [0228] 75. 权利要求 74 的方法,其中所述细胞是癌细胞。
- [0229] 76. 权利要求 73 的方法,其中所述抗体被可检测地标记。
- [0230] 77. 权利要求 73 的方法,其中所述蛋白质具有 :
- [0231] (a) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列 ;
- [0232] (b) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列,缺少其相关信号肽序列 ;
- [0233] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,具有其相关信号肽序列 ;
- [0234] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,缺少其相关信号肽序列 ;
- [0235] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列 ;或
- [0236] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的氨基酸序列。
- [0237] 78. 诊断哺乳动物中肿瘤的存在的方法,所述方法包括测定从所述哺乳动物获得的组织细胞的测试样品中及相同组织来源的已知正常细胞的对照样品中编码与下述任一项具有至少 80% 氨基酸序列同一性的蛋白质的基因的表达水平 :
- [0238] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽 ;
- [0239] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽,缺少其相关信号肽 ;
- [0240] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域,具有其相关信号肽 ;
- [0241] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域,缺少其相关信号肽 ;
- [0242] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽 ;或
- [0243] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽,
- [0244] 其中所述蛋白质在测试样品中的表达水平高于对照样品表明获取测试样品的哺乳动物中存在肿瘤。
- [0245] 79. 权利要求 78 的方法,其中测定编码所述蛋白质的基因的表达水平的步骤包括在原位杂交或 RT-PCR 分析中使用寡核苷酸。
- [0246] 80. 权利要求 78 的方法,其中测定编码所述蛋白质的基因的表达水平的步骤包括在免疫组化或 Western 印迹分析中使用抗体。
- [0247] 81. 权利要求 78 的方法,其中所述蛋白质具有 :
- [0248] (a) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列 ;
- [0249] (b) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列,缺少其相关信号肽序列 ;
- [0250] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,具有其相关信号肽序列 ;
- [0251] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,缺少其相关信号肽序列 ;
- [0252] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列 ;或
- [0253] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的氨基酸序列。
- [0254] 82. 诊断哺乳动物中肿瘤的存在的方法,所述方法包括使从所述哺乳动物获得的组织细胞的测试样品接触结合与下述任一项具有至少 80% 的氨基酸序列同一性的蛋白质

的抗体：

[0255] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽；

[0256] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽，缺少其相关信号肽；

[0257] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，具有其相关信号肽；

[0258] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，缺少其相关信号肽；

[0259] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽；或

[0260] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽，

[0261] 并检测测试样品中所述抗体和所述蛋白质之间复合物的形成，其中复合物的形成表明所述哺乳动物中存在肿瘤。

[0262] 83. 权利要求 82 的方法，其中所述抗体被可检测地标记。

[0263] 84. 权利要求 82 的方法，其中所述组织细胞的测试样品从怀疑具有癌性肿瘤的个体获得。

[0264] 85. 权利要求 82 的方法，其中所述蛋白质具有：

[0265] (a) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列；

[0266] (b) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，缺少其相关信号肽序列；

[0267] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列，具有其相关信号肽序列；

[0268] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列，缺少其相关信号肽序列；

[0269] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列；或

[0270] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的氨基酸序列。

[0271] 86. 治疗或预防与某种蛋白质的表达或活性增高有关的细胞增殖性紊乱的方法，所述蛋白质与下述任一项具有至少 80% 的氨基酸序列同一性：

[0272] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽；

[0273] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽，缺少其相关信号肽；

[0274] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，具有其相关信号肽；

[0275] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，缺少其相关信号肽；

[0276] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽；或

[0277] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽，

[0278] 所述方法包括给需要此类治疗的受试者施用有效量的所述蛋白质的拮抗剂，由此有效治疗或预防所述细胞增殖性紊乱。

[0279] 87. 权利要求 86 的方法，其中所述细胞增殖性紊乱是癌症。

[0280] 88. 权利要求 86 的方法，其中所述拮抗剂是抗 TAT 多肽抗体或反义寡核苷酸。

[0281] 89. 使抗体与细胞结合的方法，所述细胞表达与下述任一项具有至少 80% 氨基酸序列同一性的蛋白质：

[0282] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽；

[0283] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽，缺少其相关信号肽；

[0284] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，具有其相关信号肽；

[0285] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域，缺少其相关信号肽；

[0286] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽；或

[0287] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽，

[0288] 所述方法包括使所述细胞接触结合所述蛋白质的抗体,并允许所述抗体与所述蛋白质的结合发生,由此使所述抗体结合所述细胞。

[0289] 90. 权利要求 89 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。

[0290] 91. 权利要求 89 的方法,其中所述抗体是抗体片段。

[0291] 92. 权利要求 89 的方法,其中所述抗体是嵌合或人源化抗体。

[0292] 93. 权利要求 89 的方法,其中所述抗体与生长抑制剂偶联。

[0293] 94. 权利要求 89 的方法,其中所述抗体与细胞毒剂偶联。

[0294] 95. 权利要求 94 的方法,其中所述细胞毒剂选自毒素、抗生素、放射性同位素和溶核酶。

[0295] 96. 权利要求 94 的方法,其中所述细胞毒剂是毒素。

[0296] 97. 权利要求 96 的方法,其中所述毒素选自美登木素生物碱、加利车霉素和 auristatin。

[0297] 98. 权利要求 96 的方法,其中所述毒素是美登木素生物碱。

[0298] 99. 权利要求 89 的方法,其中所述抗体在细菌中产生。

[0299] 100. 权利要求 89 的方法,其中所述抗体在 CHO 细胞中产生。

[0300] 101. 权利要求 89 的方法,其中所述细胞是癌细胞。

[0301] 102. 权利要求 101 的方法,其中使所述癌细胞进一步暴露于放射处理或化疗剂。

[0302] 103. 权利要求 101 的方法,其中所述癌细胞选自乳腺癌细胞、结肠直肠癌细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、中枢神经系统癌细胞、肝癌细胞、膀胱癌细胞、胰腺癌细胞、宫颈癌细胞、黑素瘤细胞和白血病细胞。

[0303] 104. 权利要求 103 的方法,其中所述癌细胞与相同组织来源的正常细胞相比更大量地表达所述蛋白质。

[0304] 105. 权利要求 89 的方法,其引起所述细胞死亡。

[0305] 106. 权利要求 1-5 或 30 任一项的核酸在制备用于癌症的治疗性处理或诊断性检测的药物中的用途。

[0306] 107. 权利要求 1-5 或 30 任一项的核酸在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0307] 108. 权利要求 1-5 或 30 任一项的核酸在制备用于治疗或预防细胞增殖性紊乱(病症)的药物中的用途。

[0308] 109. 权利要求 6、7 或 31 任一项的表达载体在制备用于癌症的治疗性处理或诊断性检测的药物中的用途。

[0309] 110. 权利要求 6、7 或 31 任一项的表达载体在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0310] 111. 权利要求 6、7 或 31 任一项的表达载体在制备用于治疗或预防细胞增殖性紊乱(病症)的药物中的用途。

[0311] 112. 权利要求 8、9、32 或 33 任一项的宿主细胞在制备用于癌症的治疗性处理或诊断性检测的药物中的用途。

[0312] 113. 权利要求 8、9、32 或 33 任一项的宿主细胞在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0313] 114. 权利要求 8、9、32 或 33 任一项的宿主细胞在制备用于治疗或预防细胞增殖性紊乱(病症)的药物中的用途。

[0314] 115. 权利要求 11-14 任一项的多肽在制备用于癌症的治疗性处理或诊断性检测的药物中的用途。

[0315] 116. 权利要求 11-14 任一项的多肽在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0316] 117. 权利要求 11-14 任一项的宿主细胞在制备用于治疗或预防细胞增殖性紊乱的药物中的用途。

[0317] 118. 权利要求 15-29 任一项的抗体在制备用于癌症的治疗性处理或诊断性检测的药物中的用途。

[0318] 119. 权利要求 15-29 任一项的抗体在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0319] 120. 权利要求 15-29 任一项的抗体在制备用于治疗或预防细胞增殖性紊乱的药物中的用途。

[0320] 121. 权利要求 35 或 36 任一项的物质组合物在制备用于癌症的治疗性处理或诊断性检测的药物中的用途。

[0321] 122. 权利要求 35 或 36 任一项的物质组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0322] 123. 权利要求 35 或 36 任一项的物质组合物在制备用于治疗或预防细胞增殖性紊乱的药物中的用途。

[0323] 124. 权利要求 37 或 38 任一项的制品在制备用于癌症的治疗性处理或诊断性检测的药物中的用途。

[0324] 125. 权利要求 37 或 38 任一项的制品在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0325] 126. 权利要求 37 或 38 任一项的制品在制备用于治疗或预防细胞增殖性紊乱的药物中的用途。

[0326] 127. 用于抑制细胞生长的方法,其中所述细胞的生长至少部分依赖与下述任一项具有至少 80% 氨基酸序列同一性的蛋白质的生长促进作用:

[0327] (a) SEQ ID NO:2 所示多肽;

[0328] (b) SEQ ID NO:2 所示多肽,缺少其相关信号肽;

[0329] (c) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域,具有其相关信号肽;

[0330] (d) SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域,缺少其相关信号肽;

[0331] (e) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽;或

[0332] (f) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽,

[0333] 所述方法包括使所述蛋白质接触与所述蛋白质结合的抗体,由此抑制所述细胞的生长。

[0334] 128. 权利要求 127 的方法,其中所述细胞是癌细胞。

[0335] 129. 权利要求 127 的方法,其中所述蛋白质由所述细胞表达。

[0336] 130. 权利要求 127 的方法,其中所述抗体与所述蛋白质的结合拮抗所述蛋白质的细胞生长强化活性。

[0337] 131. 权利要求 127 的方法,其中所述抗体与所述蛋白质的结合诱导所述细胞死亡。

[0338] 132. 权利要求 127 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。

[0339] 133. 权利要求 127 的方法,其中所述抗体是抗体片段。

- [0340] 134. 权利要求 127 的方法,其中所述抗体是嵌合或人源化抗体。
- [0341] 135. 权利要求 127 的方法,其中所述抗体与生长抑制剂偶联。
- [0342] 136. 权利要求 127 的方法,其中所述抗体与细胞毒剂偶联。
- [0343] 137. 权利要求 136 的方法,其中所述细胞毒剂选自毒素、抗生素、放射性同位素和溶核酶。
- [0344] 138. 权利要求 136 的方法,其中所述细胞毒剂是毒素。
- [0345] 139. 权利要求 138 的方法,其中所述毒素选自美登木素生物碱、加利车霉素和 auristatin。
- [0346] 140. 权利要求 138 的方法,其中所述毒素是美登木素生物碱。
- [0347] 141. 权利要求 127 的方法,其中所述抗体在细菌中产生。
- [0348] 142. 权利要求 127 的方法,其中所述抗体在 CHO 细胞中产生。
- [0349] 143. 权利要求 127 的方法,其中所述蛋白质具有:
- [0350] (a)SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列;
- [0351] (b)SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列,缺少其相关信号肽序列;
- [0352] (c)SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,具有其相关信号肽序列;
- [0353] (d)SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,缺少其相关信号肽序列;
- [0354] (e)SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列;或
- [0355] (f)SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的氨基酸序列。
- [0356] 144. 治疗性处理哺乳动物中的肿瘤的方法,其中所述肿瘤的生长至少部分依赖与下述任一项具有至少 80% 氨基酸序列同一性的蛋白质的生长促进作用:
- [0357] (a)SEQ ID NO:2 所示多肽;
- [0358] (b)SEQ ID NO:2 所示多肽,缺少其相关信号肽;
- [0359] (c)SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域,具有其相关信号肽;
- [0360] (d)SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域,缺少其相关信号肽;
- [0361] (e)SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的多肽;或
- [0362] (f)SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的多肽,
- [0363] 所述方法包括使所述蛋白质接触与所述蛋白质结合的抗体,由此有效治疗所述肿瘤。
- [0364] 145. 权利要求 144 的方法,其中所述蛋白质由所述肿瘤的细胞表达。
- [0365] 146. 权利要求 144 的方法,其中所述抗体与所述蛋白质的结合拮抗所述蛋白质的细胞生长促进活性。
- [0366] 147. 权利要求 144 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。
- [0367] 148. 权利要求 144 的方法,其中所述抗体是抗体片段。
- [0368] 149. 权利要求 144 的方法,其中所述抗体是嵌合或人源化抗体。
- [0369] 150. 权利要求 144 的方法,其中所述抗体与生长抑制剂偶联。
- [0370] 151. 权利要求 144 的方法,其中所述抗体与细胞毒剂偶联。
- [0371] 152. 权利要求 144 的方法,其中所述细胞毒剂选自毒素、抗生素、放射性同位素和溶核酶。
- [0372] 153. 权利要求 151 的方法,其中所述细胞毒剂是毒素。

- [0373] 154. 权利要求 153 的方法,其中所述毒素选自美登木素生物碱、加利车霉素和 auristatin。
- [0374] 155. 权利要求 153 的方法,其中所述毒素是美登木素生物碱。
- [0375] 156. 权利要求 144 的方法,其中所述抗体在细菌中产生。
- [0376] 157. 权利要求 144 的方法,其中所述抗体在 CHO 细胞中产生。
- [0377] 158. 权利要求 144 的方法,其中所述蛋白质具有:
- [0378] (a)SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列;
- [0379] (b)SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列,缺少其相关信号肽序列;
- [0380] (c)SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,具有其相关信号肽序列;
- [0381] (d)SEQ ID NO:2 所示多肽的胞外域的氨基酸序列,缺少其相关信号肽序列;
- [0382] (e)SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列;或
- [0383] (f)SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的全长编码区所编码的氨基酸序列。
- [0384] 159. 分离的抗体,其与权利要求 15 至 29 任一项的抗体结合相同表位。
- [0385] 160. 权利要求 159 的抗体,其是单克隆抗体。
- [0386] 161. 权利要求 159 的抗体,其是抗体片段。
- [0387] 162. 权利要求 159 的抗体,其是嵌合或人源化抗体。
- [0388] 163. 权利要求 159 的抗体,其与生长抑制剂偶联。
- [0389] 164. 权利要求 159 的抗体,其与细胞毒剂偶联。
- [0390] 165. 权利要求 164 的抗体,其中所述细胞毒剂选自毒素、抗生素、放射性同位素和溶核酶。
- [0391] 166. 权利要求 164 的抗体,其中所述细胞毒剂是毒素。
- [0392] 167. 权利要求 166 的抗体,其中所述毒素选自美登木素生物碱、加利车霉素和 auristatin。
- [0393] 168. 权利要求 166 的抗体,其中所述毒素是美登木素生物碱。
- [0394] 169. 权利要求 159 的抗体,其在细菌中产生。
- [0395] 170. 权利要求 159 的抗体,其在 CHO 细胞中产生。
- [0396] 171. 权利要求 159 的抗体,其诱导其所结合的细胞死亡。
- [0397] 172. 权利要求 159 的抗体,其被可检测地标记。
- [0398] 173. 权利要求 159 的抗体,其包含权利要求 15 至 29 的任何抗体的至少一个互补决定区。
- [0399] 174. 产生结合 TAT 多肽的单克隆抗体的杂交瘤细胞。
- [0400] 175. 鉴定如下所述抗体的方法,所述抗体结合权利要求 15 至 29 的任何抗体结合的表位,所述方法包括测定测试抗体阻断权利要求 15 至 29 的任何抗体结合的能力,其中所述测试抗体在相等抗体浓度阻断权利要求 15 至 29 的任何抗体与 TAT 多肽结合达至少 40% 的能力表明所述测试抗体能够结合所述任何抗体所结合的表位。
- [0401] 阅读本说明书后,本发明的其它实施方案对于本领域技术人员而言将是显而易见的。
- [0402] 附图简述
- [0403] 图 1 显示了 TAT419cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1),其中 SEQ IDNO:1 是本文中

称作“DNA96945”的克隆。推定的起始和终止密码子标有下划线。

[0404] 图 2 显示了自图 1 中所示 SEQ ID NO:1 的编码序列推导的 TAT419 多肽氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。

[0405] 图 3 显示了鼠 5E9 单克隆抗体的全长轻链 (SEQ ID NO:3) 和鼠 5E9 单克隆抗体的可变轻链 (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列。

[0406] 图 4 显示了鼠 5E9 单克隆抗体的全长重链 (SEQ ID NO:4) 和鼠 5E9 单克隆抗体的可变重链 (SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列。

[0407] 图 5 显示了人源化 hu5E9. v1 抗体的全长轻链 (SEQ ID NO:13) 和人源化 hu5E9. v1 抗体的可变轻链 (SEQ ID NO:15) 的氨基酸序列。

[0408] 图 6 显示了人源化 hu5E9. v1 抗体的全长重链 (SEQ ID NO:14) 和人源化 hu5E9. v1 抗体的可变重链 (SEQ ID NO:16) 的氨基酸序列。

[0409] 图 7 显示了人源化 hu5E9. v2 抗体的可变重链 (SEQ ID NO:17) 的氨基酸序列。

[0410] 图 8 显示了各种浓度的 PBS (PBS)、vc-MMAE 毒素偶联的对照抗体 (其不结合活细胞表面上的 TAT419 多肽) (Ctrl-vc-MMAE)、和 vc-MMAE 毒素偶联的鼠 5E9 单克隆抗体 (5E9-vc-MMAE) 对 UACC257X2. 2 细胞的体外杀伤。

[0411] 图 9 显示了用各种浓度的 hu5E9. v1-vc-MMAE (hu5E9. v1-MMAE)、单独的媒介 (媒介)、或 MMAE 偶联的对照抗体 (其不结合 TAT419 多肽) (Ctrl-vc-MMAE) 处理对裸鼠中 UACC257X2. 2 异种移植物的体内治疗功效。

[0412] 优选实施方案的详述

[0413] I. 定义

[0414] 术语“TAT 多肽”和“TAT”在用于本文时且后面紧跟着数值名称时指各种多肽, 其中完整名称 (即 TAT/ 数值) 指本文描述的特定多肽序列。术语“TAT/ 数值多肽”和“TAT/ 数值”, 其中术语“数值”作为实际数值名称提供, 在用于本文时涵盖天然序列多肽、多肽变体和天然序列多肽的片段和多肽变体 (本文中有进一步定义)。本文中描述的 TAT 多肽可从多种来源分离, 诸如人组织类型或其它来源, 或者通过重组或合成方法制备。术语“TAT 多肽”指本文中公开的每一种个别的 TAT/ 数值多肽。本说明书中涉及“TAT 多肽”的所有公开内容适用于各自的以及共同的每一种多肽。例如, 关于多肽的制备、纯化、衍生、针对该多肽的抗体的形成、针对该多肽的 TAT 结合寡肽的形成、针对该多肽的 TAT 结合有机分子的形成、施用、含有该多肽的组合物、用该多肽治疗疾病、等等的描述适用于本发明的具体的每一种多肽。术语“TAT 多肽”还包括本文中公开的 TAT/ 数值多肽的变体。在一个实施方案中, TAT419 多肽序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0415] “天然序列 TAT 多肽”包括与衍生自自然界的相应 TAT 多肽具有相同氨基酸序列的多肽。此类天然序列 TAT 多肽可从自然界分离, 或者可通过重组或合成手段生成。术语“天然序列 TAT 多肽”明确涵盖天然存在的截短或分泌形式的特定 TAT 多肽 (例如胞外结构域序列)、该多肽的天然存在变体形式 (例如可变剪接形式) 和天然存在的等位变体。在本发明的某些实施方案中, 本文中公开的天然序列 TAT 多肽是包含附图中所示全长氨基酸序列的成熟或全长天然序列多肽。起始和终止密码子 (如果指示的话) 在图中以粗体和下划线显示。附图中以“N”或“X”指示的核酸残基是任何核酸残基。然而, 尽管附图中公开的 TAT 多肽据显示以本文中指派为图中第 1 位氨基酸的甲硫氨酸残基开始, 可以想到且有可能的

是,可采用位于图中第 1 位氨基酸上游或下游的其它甲硫氨酸残基作为 TAT 多肽的起始氨基酸残基。

[0416] TAT 多肽“胞外结构域”或“ECD”指基本上不含跨膜结构域和胞质结构域的 TAT 多肽形式。通常, TAT 多肽 ECD 具有少于 1% 的所述跨膜结构域和 / 或胞质结构域, 优选具有少于 0.5% 的所述结构域。可以理解, 为本发明 TAT 多肽鉴定的任何跨膜结构域是依照本领域常规用于鉴定该种类型疏水性结构域的标准鉴定的。跨膜结构域的精确边界可以变化, 但最有可能是本文中最初鉴定的结构域任一末端不超过约 5 个氨基酸。因此, 任选的是, TAT 多肽的胞外结构域可含有实施例或说明书中鉴定的跨膜结构域 / 胞外结构域边界任一侧的约 5 个或更少氨基酸, 而且本发明设想了具有或没有相关信号肽的此类多肽及编码它们的核酸。

[0417] 本说明书和 / 或附图中可能显示了本文中所公开的各种 TAT 多肽的“信号肽”的大致位置。然而, 应当注意, 信号肽的 C- 末端边界可以变化, 但最有可能是本文中最初鉴定的信号肽 C- 末端边界任一侧不超过约 5 个氨基酸, 其中信号肽的 C- 末端边界可依照本领域常规用于鉴定该种类型氨基酸序列元件的标准鉴定(例如 Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6(1997) 和 von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690(1986))。此外, 还认识到, 在有些情况中, 从分泌多肽上切除信号序列不是完全统一的, 导致超过一种分泌种类。本发明设想了这些成熟多肽, 其中信号肽在本文中所鉴定的信号肽 C- 末端边界任一侧不超过约 5 个氨基酸以内的切除, 及编码它们的多核苷酸。

[0418] “TAT 多肽变体”意指与本文中所公开的全长天然序列 TAT 多肽序列、缺乏本文中所公开的信号肽的 TAT 多肽序列、具有或没有本文中所公开的信号肽的 TAT 多肽胞外结构域、或本文中所公开的全长 TAT 多肽序列的任何其它片段(诸如那些由只呈现全长 TAT 多肽的完整编码序列一部分的核酸编码的片段) 具有至少约 80% 的氨基酸序列同一性的本文中所定义的 TAT 多肽, 优选活性 TAT 多肽。此类 TAT 多肽变体包括例如其中全长天然氨基酸序列的 N- 或 C- 末端添加或删除一个或多个氨基酸残基的 TAT 多肽。通常, TAT 多肽变体与本文中所公开的全长天然序列 TAT 多肽序列、缺乏本文中所公开的信号肽的 TAT 多肽序列、具有或没有本文中所公开的信号肽的 TAT 多肽胞外结构域、或本文中所公开的全长 TAT 多肽序列的任何其它特别限定片段具有至少约 80% 的氨基酸序列同一性, 或者至少约 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的氨基酸序列同一性。通常, TAT 变体多肽的长度为至少约 10 个氨基酸, 或者长度为至少约 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600 个氨基酸或更多。任选的是, TAT 变体多肽与天然 TAT 多肽序列相比具有不超过一个保守氨基酸替代, 或者与天然 TAT 多肽序列相比具有不超过 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸替代。

[0419] 关于本文中所鉴定的 TAT 多肽序列的“百分比 (%) 氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后, 且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时, 候选序列中与特定 TAT 多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。可以本领域技术范围内的多种方式进行测定百分比氨基酸序列同一性目的的序列对比, 例如使用公众可得到的计算机软件, 诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或

Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可决定测量对比的适宜参数,包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然而,为了本发明,%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 获得的,其中美国专利 No. 7, 160, 985 (通过述及收入本文) 中提供了 ALIGN-2 程序的完整源代码。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech 公司编写,其所示源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局 (US Copyright Office, Washington D. C., 20559), 并以美国版权注册号 TXU510087 注册。公众可通过 Genentech 公司 (South San Francisco, California) 得到 ALIGN-2 程序,或者可从源代码编译。ALIGN2 程序应当编译成在 UNIX 操作系统,优选数码 UNIX V4.0D 上使用。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不变。

[0420] 在采用 ALIGN-2 用于氨基酸序列比较的情况中,给定氨基酸序列 A 相对于 (to)、与 (with)、或针对 (against) 给定氨基酸序列 B 的 %氨基酸序列同一性(或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定氨基酸序列 B 的某一 %氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列 A) 如下计算:

[0421] 分数 X/Y 乘 100

[0422] 其中 X 是由序列对比程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 对比中评分为相同匹配的氨基酸残基数,且其中 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。可以领会,若氨基酸序列 A 的长度与氨基酸序列 B 的长度不相等,则 A 相对于 B 的 %氨基酸序列同一性将不等于 B 相对于 A 的 %氨基酸序列同一性。

[0423] “TAT 变体多核苷酸”或“TAT 变体核酸序列”意指编码本文中所定义的 TAT 多肽,优选活性 TAT 多肽且与编码本文中所公开的全长天然序列 TAT 多肽序列、本文中所公开的缺乏信号肽的全长天然序列 TAT 多肽序列、本文中所公开的具有或没有信号肽的 TAT 多肽胞外结构域、或本文中所公开的全长 TAT 多肽序列的任何其它片段(诸如那些由只呈现全长 TAT 多肽的完整编码序列一部分的核酸编码的片段)的核苷酸序列具有至少约 80% 核酸序列同一性的核酸分子。通常,TAT 变体多核苷酸与编码本文中所公开的全长天然序列 TAT 多肽序列、本文中所公开的缺乏信号肽的全长天然序列 TAT 多肽序列、本文中所公开的具有或没有信号序列的 TAT 多肽胞外结构域、或本文中所公开的全长 TAT 多肽序列的任何其它片段的核酸序列具有至少约 80% 的核酸序列同一性,或者至少约 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的核酸序列同一性。变体不涵盖天然核苷酸序列。

[0424] 通常,TAT 变体多核苷酸的长度为至少约 5 个核苷酸,或者长度为至少约 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990 或 1000 个核苷酸,其中在此语境中,术语“约”意指所述核苷酸序列长度加上或减去所述长度的 10%。

[0425] 关于本文中所鉴定的 TAT 编码核酸序列的“百分比 (%) 核酸序列同一性”定义为

对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,候选序列中与 TAT 目的核酸序列中的核苷酸相同的核苷酸的百分率。可以本领域技术范围内的多种方式进行测定百分比核酸序列同一性目的的序列对比,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。然而,为了本发明,%核酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 获得的,其中美国专利 No. 7, 160, 985 (通过述及收入本文)中提供了 ALIGN-2 程序的完整源代码。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech 公司编写,其源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局 (US Copyright Office, Washington D. C., 20559),并以美国版权注册号 TXU510087 注册。公众可通过 Genentech 公司 (South San Francisco, California) 得到 ALIGN-2 程序,或者可从源代码编译。ALIGN2 程序应当编译成在 UNIX 操作系统,优选数码 UNIX V4.0D 上使用。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不变。

[0426] 在采用 ALIGN-2 来比较核酸序列的情况中,给定核酸序列 C 相对于 (to)、与 (with)、或针对 (against) 给定氨基酸序列 D 的 %核酸序列同一性(或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定核酸序列 D 的某一 %核酸序列同一性的给定核酸序列 C) 如下计算:

[0427] 分数 W/Z 乘 100

[0428] 其中 W 是由序列对比程序 ALIGN-2 在该程序的 C 和 D 对比中评分为相同匹配的核苷酸数,且其中 Z 是 D 中的核苷酸总数。可以领会,若核酸序列 C 的长度与核酸序列 D 的长度不相等,则 C 相对于 D 的 %核酸序列同一性将不等于 D 相对于 C 的 %核酸序列同一性。

[0429] 在其它实施方案中,TAT 变体多核苷酸是编码 TAT 多肽且能够与编码本文中所公开的全长 TAT 多肽的核苷酸序列杂交,优选在严格杂交和洗涤条件下杂交的核酸分子。TAT 变体多肽可以是那些由 TAT 变体多核苷酸编码的变体多肽。

[0430] 术语“全长编码区”在涉及编码 TAT 多肽的核酸使用时指编码本发明全长 TAT 多肽的核苷酸序列(常常在附图中起始和终止密码子(含)之间显示)。术语“全长编码区”在涉及 ATCC 保藏核酸使用时指插入保藏在 ATCC 的载体中的 cDNA 的 TAT 多肽编码部分(常常在附图中起始和终止密码子(含)之间显示)。

[0431] “分离的”,在用于描述本文中所公开的各种 TAT 多肽时,意指已经鉴定且与 / 由其天然环境的成分分开和 / 或回收的多肽。其天然环境的污染性成分指通常会干扰该多肽的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将多肽纯化至 (1) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度,或 (2) 根据使用考马斯蓝或优选银染色的非还原或还原条件下的 SDS-PAGE,达到同质。既然 TAT 多肽天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的多肽包括重组细胞内的原位多肽。然而,分离的多肽通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0432] “分离的”TAT 多肽编码核酸或其它多肽编码核酸指已经鉴定且与该多肽编码核酸的天然来源中通常与之相关的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。分离的多肽编码核酸分子不同于在自然界中发现它时的形式或状况。分离的多肽编码核酸分子因此与存在于天然细胞中时的特定多肽编码核酸分子有区别。然而,分离的多肽编码核酸分子包括通常表达该多肽的细胞中所包含的多肽编码核酸分子,例如当所述核酸分子在所述细胞中的染色体定位不同于它在天然细胞中的染色体定位时。

[0433] 术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的 DNA 序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0434] 若一条核酸与另一条核酸序列处于功能性相互关系中,则它是“可操作连接”的。例如,若前序列 (presequence) 或分泌前导序列 (secretory leader) 的 DNA 表达成参与多肽分泌的前蛋白质 (preprotein),则它与多肽的 DNA 可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与该序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的位置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。通常,“可操作连接”意味着相连的 DNA 序列是相邻的,而且在分泌前导的情况中意味着相邻且处于阅读状态。然而,增强子不必相邻。连接可通过在方便的限制性位点处的连接反应来实现。如果没有此类位点,那么依照常规实践使用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0435] 杂交反应的“严格性”可以容易的由本领域普通技术人员确定,而且通常根据探针长度、洗涤温度、和盐浓度凭经验计算。通常,较长的探针要求较高的温度以正确退火,而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于当互补链存在于低于其解链温度的环境中时变性 DNA 重新退火的能力。探针和可杂交序列之间的期望同源性程度越高,可使用的相对温度也越高。结果是,推断出较高相对温度将趋向于使反应条件更为严格,而较低温度也就较不严格。关于杂交反应严格性的另外细节和解释,参见 Ausubel 等人,《Current Protocols in Molecular Biology》,Wiley Interscience Publishers,1995。

[0436] “严格条件”或“高严格性条件”,如本文中所定义的,可如下鉴别:(1) 采用低离子强度和高温进行洗涤,例如 0.015M 氯化钠 /0.0015M 柠檬酸钠 /0.1% 十二烷基硫酸钠, 50°C;(2) 在杂交过程中采用变性剂,诸如甲酰胺,例如 50%(v/v) 甲酰胺及 0.1% 牛血清清蛋白 /0.1%Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 /50mM 磷酸钠缓冲液 pH 6.5,含 750mM 氯化钠, 75mM 柠檬酸钠, 42°C;或 (3) 在采用 50% 甲酰胺, 5x SSC (0.75M NaCl, 0.075M 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠 (pH 6.8), 0.1% 焦磷酸钠, 5x Denhardt 氏溶液, 超声波处理的鲑鱼精 DNA (50 μ g/ml), 0.1%SDS, 和 10% 硫酸右旋糖苷的溶液中于 42°C 杂交过夜,以及于 42°C 在 0.2x SSC (氯化钠 / 柠檬酸钠) 中洗涤 10 分钟,接着在含 EDTA 的 0.1x SSC 中于 55°C 进行 10 分钟高严格性洗涤。

[0437] “中等严格条件”可以如 Sambrook 等人,《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》,New York, Cold Spring Harbor Press, 1989 所述鉴别,包括使用比上文所述较不严格的洗涤溶液和杂交条件(例如温度、离子强度和 %SDS)。中等严格条件的一个例子是于 37°C 在含: 20% 甲酰胺, 5x SSC (150mM NaCl, 15mM 柠檬酸三钠), 50mM 磷酸钠 (pH 7.6), 5x Denhardt 氏溶液, 10% 硫酸右旋糖苷, 和 20mg/ml 变性剪切的鲑鱼精 DNA 的溶液中温育过夜,接着在 1x SSC 中于约 37-50°C 洗涤滤膜。技术人员将认识到如何根据需要调整温度、离子强度等以适应诸如探针长度等因素。

[0438] 术语“表位标记的”在用于本文时指包含与“标签多肽”融合的 TAT 多肽或抗 TAT 抗体的嵌合多肽。标签多肽具有足够残基以提供表位而可制备针对其的抗体,但又足够短使得其不干扰与其融合的多肽的活性。标签多肽优选还是相当独特的,使得所述抗体基本上不与其它表位发生交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少 6 个氨基酸残基且通常在约 8 个到约 50 个氨基酸残基之间(优选在约 10 个到约 20 个氨基酸残基之间)。

[0439] “有活性的”或“活性”为了本发明指保留天然或天然存在 TAT 的生物学和 / 或免疫学活性的 TAT 多肽形式,其中“生物学”活性指由天然或天然存在 TAT 引起的,诱导针对天然或天然存在 TAT 所具有的抗原性表位的抗体生成的能力以外的生物学功能(或是抑制性的或是刺激性的),而“免疫学”活性指诱导针对天然或天然存在 TAT 所具有的抗原性表位的抗体生成的能力。

[0440] 术语“拮抗剂”以最广义使用,包括部分或完全阻断、抑制、或中和本文中所公开的天然 TAT 多肽的生物学活性的任何分子。类似的,术语“激动剂”以最广义使用,包括模拟本文中所公开的天然 TAT 多肽的生物学活性的任何分子。合适的激动剂或拮抗剂分子明确包括激动性或拮抗性抗体或抗体片段、天然 TAT 多肽的片段或氨基酸序列变体、肽、反义寡核苷酸、有机小分子等。用于鉴定 TAT 多肽的激动剂或拮抗剂分子的方法可包括使 TAT 多肽接触候选激动剂或拮抗剂分子并测量通常与 TAT 多肽有关的一种或多种生物学活性的可检测变化。

[0441] “处理”或“治疗”或“缓和”指治疗性处理及预防性或防范性措施二者,其中目标是预防或减缓(减轻)所针对的病理学状况或紊乱。需要治疗的受试者包括早就患有紊乱的受试者以及倾向于患上紊乱的受试者或要预防紊乱的受试者。如果在依照本发明的方法接受治疗量的抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子后,患者在如下一项或多项中显示出可观察和 / 或可测量的降低或消失,那么受试者或哺乳动物成功“治疗”了表达 TAT 多肽的癌症:癌细胞数减少或癌细胞消失;肿瘤体积缩小;癌细胞浸润到周围器官中,包括癌传播到软组织和骨中受到抑制(即一定程度的减缓,优选停止);肿瘤转移受到抑制(即一定程度的减缓,优选停止);肿瘤生长受到一定程度的抑制;和 / 或与特定癌症有关的一种或多种症状得到一定程度的减轻;发病率和死亡率降低;及生命质量提高。就抗 TAT 抗体或 TAT 结合寡肽可预防癌细胞生长和 / 或杀死现有癌细胞而言,它可能是抑制细胞的和 / 或毒害细胞的。这些体征或症状的减轻还可以由患者感受到。

[0442] 用于评估疾病的成功治疗和改善的上述参数可以容易地通过内科医师所熟悉的常规流程来测量。对于癌症治疗,可通过例如评估疾病进展时间(time to disease progression, TTP)和 / 或测定响应速率(response rate, RR)来测量功效。转移可通过分期测试(staging test)来测定,及通过骨扫描及钙水平和其它酶的测试以测定是否传播到骨。还可进行 CT 扫描以查明是否传播到骨盆及该区域中的淋巴结。分别使用胸腔 X 射线和通过已知方法进行的肝酶水平测量来分别查明是否转移到肺和肝。用于监测疾病的其它常规方法包括经直肠超声检查(TRUS)和经直肠针吸活组织检查(TRNB)。

[0443] “长期”施用指以与短期模式相反的连续模式施用药剂,从而将初始治疗效果(活性)维持较长的一段时间。“间歇”施用指并非连续不间断进行的处理,而是本质上是循环的处理。

[0444] 对于癌症的治疗、减轻症状、或诊断而言,“哺乳动物”指归入哺乳类的任何动物,包括人、家畜和牲畜,及动物园、运动或宠物动物,诸如犬、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔等。优选的是,哺乳动物指人。

[0445] “联合”一种或多种其它治疗剂的施用包括同时(共同)施用和任意次序的连续施用。

[0446] “载体”在用于本文时包括药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂,它们在所采用的

剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常,生理学可接受的载体是 pH 缓冲水溶液。生理学可接受载体的来自包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸盐的缓冲剂;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐相反离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如 **TWEEN®**、聚乙二醇 (PEG) 和 **PLURONICS®**。

[0447] “固相”或“固体支持物”意指本发明的抗体、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子可粘着或附着其上的非水性基质。本文中所涵盖的固相的例子包括那些部分或完全由玻璃(例如可控孔径玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和聚硅氧烷(silicone)制成的固相。在某些实施方案中,根据语境,固相可包括测定板的孔;在其它实施方案中,它指纯化柱(例如亲和层析柱)。此术语还包括离散颗粒的不连续固相,诸如美国专利 4,275,149 中所述。

[0448] “脂质体”指由各种类型脂质、磷脂和/或表面活性剂构成的,可用于对哺乳动物递送药物(诸如 TAT 多肽、针对其的抗体或 TAT 结合寡肽)的小囊泡。与生物膜的脂质排列相似,脂质体的成分通常排列成双层形式。

[0449] “小”分子或有机“小”分子在本文中定义为分子量小于约 500 道尔顿。

[0450] 本文中所公开的多肽、抗体、TAT 结合寡肽、TAT 结合有机分子、或其激动剂或拮抗剂的“有效量”指足以实现明确规定的目的的量。“有效量”可凭经验且以常规方式,联系所述的目的来确定。

[0451] 术语“治疗有效量”指在受试者或哺乳动物中有效“治疗”疾病或紊乱的抗体、多肽、TAT 结合寡肽、TAT 结合有机分子或其它药物的量。在癌症的情况中,药物的治疗有效量可减少癌细胞数;缩小肿瘤体积;抑制(即一定程度的减缓,优选停止)癌细胞浸润到周围器官中;抑制(即一定程度的减缓,优选停止)肿瘤转移;一定程度的抑制肿瘤生长;和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多种症状。参见本文中“治疗”的定义。就药物可预防现存癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的程度而言,它可以是抑制细胞的和/或毒害细胞的。

[0452] 抗 TAT 抗体、TAT 多肽、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子的“生长抑制量”指能够在体外或在体内抑制细胞,尤其是肿瘤,例如癌细胞生长的量。抗 TAT 抗体、TAT 多肽、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子为了抑制肿瘤性细胞生长的“生长抑制量”可凭经验且以常规方式来确定。

[0453] 抗 TAT 抗体、TAT 多肽、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子的“细胞毒性量”指能够在体外或在体内引起细胞,尤其是肿瘤,例如癌细胞破坏的量。抗 TAT 抗体、TAT 多肽、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子为了抑制肿瘤性细胞生长的“细胞毒性量”可凭经验且以常规方式来确定。

[0454] 术语“抗体”以最广义使用,明确覆盖例如单一抗 TAT 单克隆抗体(包括激动性、拮抗性和中和性抗体)、具有多表位特异性的抗 TAT 抗体组合物、多克隆抗体、单链抗 TAT 抗体、及抗 TAT 抗体的片段(见下文),只要它们展现出期望生物学或免疫学活性。术语“免疫球蛋白”(Ig) 在本文中与抗体可互换使用。

[0455] “分离的”抗体指已经鉴定且与 / 由其天然环境的一种成分分开和 / 或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至(1)根据 Lowry 方法的测定,抗体重量超过 95%,最优选重量超过 99%,(2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)根据使用考马斯蓝或优选银染色的还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE,达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0456] 基本的 4 链抗体单元是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的异四聚体糖蛋白(IgM 抗体由 5 个基本的异四聚体单元及称作 J 链的另外多肽组成,因此包含 10 个抗原结合位点;而分泌型 IgA 抗体可聚合形成包含 2-5 个基本的 4 链单元及 J 链的多价装配物)。在 IgG 的情况中,4 链单元通常是约 150,000 道尔顿。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而两条重链通过一个或多个二硫键彼此相连,二硫键的数目取决于重链的同种型。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫键。每条重链在 N- 末端具有一个可变区(V_H),接着是三个(对于 α 和 γ 链)或四个(对于 μ 和 ϵ 同种型)恒定区(C_H)。每条轻链在 N- 末端具有一个可变区(V_L),接着是其另一端的一个恒定区(C_L)。 V_L 与 V_H 排列在一起,而 C_L 与重链的第一恒定区(C_{H1})排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。成对的一个 V_H 和一个 V_L 一起形成一个抗原结合位点。关于不同类别抗体的结构和性质,参见例如《Basic and Clinical Immunology》,第 8 版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr 和 Tristram G. Parslow 编, Appleton&Lange, Norwalk, CT, 1994, 第 71 页和第 6 章。

[0457] 来自任何脊椎动物物种的轻链,根据其恒定区氨基酸序列,可归入两种截然不同类型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。根据其重链(C_H)恒定区氨基酸序列,免疫球蛋白可归入不同的类别或同种型。有五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,分别具有称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。根据 C_H 序列和功能的较小差异, γ 和 α 类可进一步分为亚类,例如人类表达下列亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0458] 术语“可变的”指可变区中的某些区段在抗体序列中差异广泛的实情。V 结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,变异性并非均匀分布于可变区跨越的 110 个氨基酸。事实上,V 区由 15-30 个氨基酸,称作框架区(KR)的相对不变异的区段及将框架区分开的每个长度为 9-12 个氨基酸,称作“高变区”的极度变异的较短区域构成。天然重链和轻链的可变区各自包含四个 FR,它们大多采取 β - 折叠构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β - 折叠结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过 FR 非常接近的保持在一起,并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见 Kabat 等人,《Sequences of Proteins of Immunological Interest》,第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)中抗体的参与。

[0459] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同,除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变外。单克隆抗体是高

度特异的,针对单一抗原性位点。另外,与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性,单克隆抗体的优越性体现在它们在合成时可未受到其它抗体的污染。修饰语“单克隆”不能解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,可用于本发明的单克隆抗体可通过最初由 Kohler et al., Nature, 256:495(1975) 描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组 DNA 方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备(参见例如美国专利 4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991) 和 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991) 中描述的技术从噬菌体抗体库分离。

[0460] 单克隆抗体在本文中包括“嵌合”抗体,以及此类抗体的片段,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,只要它们展现出期望生物学活性(参见美国专利 4,816,567 和 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类动物(如旧大陆猴类(Old World Monkey)、猿等)的可变区抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化(primatized)”抗体。

[0461] “完整抗体”指包含抗原结合位点以及 C_L和至少重链恒定区 C_H1、C_H2 和 C_H3 的抗体。恒定区可以是天然序列恒定区(例如人天然序列恒定区)或其氨基酸序列变体。优选的是,完整抗体具有一项或多项效应器功能。

[0462] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂和 Fv 片段;双抗体(diabody);线性抗体(参见美国专利 5,641,870,实施例 2;Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0463] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称作“Fab”片段,和一个残余“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。Fab 片段由一条完整轻链及一条重链的可变区(V_H)和第一恒定区(C_H1)组成。每个 Fab 片段对于抗原结合是单价的,即它具有一个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生一个较大 F(ab')₂片段,它粗略相当于两个通过二硫键相连的 Fab 片段,具有二价抗原结合活性且仍能够交联抗原。Fab' 片段因在 C_H1 结构域的羧基末端增加了少数残基而与 Fab 片段有所不同,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 是本文中对其中恒定区半胱氨酸残基携带游离硫醇基的 Fab' 的称谓。F(ab')₂抗体片段最初是作为成对 Fab' 片段生成的,在 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0464] Fc 片段包含通过二硫键保持在一起的两条重链的羧基末端部分。抗体的效应器功能是由 Fc 区中的序列决定的,该区还是受到在某些类型细胞上发现的 Fc 受体(FcR)识别的部分。

[0465] “Fv”是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此片段由紧密、非共价结合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中散发出六个高变环(重链和轻链各 3 个环),贡献出抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变区(或只包含对抗原特异的三个 CDR 的半个 Fv)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力低于完整结合位点。

[0466] “单链 Fv”，也可缩写为“sFv”或“scFv”，是包含连接成一条多肽链的抗体 V_H 和 V_L 结构域的抗体片段。优选的是，sFv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽接头，使得 sFv 形成抗原结合期望的结构。关于 sFv 的综述参见 Plückthun, 《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》, vol. 113, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315, 1994; Borrebaeck 1995, 见下文。

[0467] 术语“双抗体”指通过在 V_H 和 V_L 结构域之间使用短接头(约 5-10 个残基)构建 sFv 片段(见上一段)而制备的小型抗体片段, 由于接头短, 使得 V 结构域实行链间而非链内配对, 导致二价片段, 即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv 片段的异二聚体, 其中两种抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同多肽链上。双抗体更完整的描述于例如 EP 404, 097; WO 93/11161; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)。

[0468] 非人(例如啮齿类)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人抗体的序列的嵌合抗体。在极大程度上, 人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用具有期望抗体特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中, 将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外, 人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常, 人源化抗体包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变区, 其中整个或基本上整个高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环, 且整个或基本上整个 FR 是人免疫球蛋白序列的 FR。人源化抗体任选还包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc), 通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329(1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0469] “物种依赖性抗体”, 例如哺乳动物抗人 IgE 抗体, 指对来自第一哺乳动物物种的抗原的结合亲和力强于对来自第二哺乳动物物种的该抗原的同系物的结合亲和力的抗体。通常, 物种依赖性抗体“特异性结合”人类抗原(即具有不超过约 $1 \times 10^{-7}M$, 优选不超过约 $1 \times 10^{-8}M$, 最优选不超过约 $1 \times 10^{-9}M$ 的结合亲和力(Kd)), 但是对来自第二非人哺乳动物物种的该抗原的同系物具有比其对人类抗原的结合亲和力弱至少约 50 倍, 或至少约 500 倍, 或至少约 1000 倍的结合亲和力。物种依赖性抗体可以是上文定义的各种类型抗体, 但是优选人源化抗体或人抗体。

[0470] 术语“依照 Kabat 的可变域残基编号”或“依照 Kabat 的氨基酸位置编号”及其变体指 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 中的抗体编辑用于重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用此编号系统, 实际的线性氨基酸序列可包含较少或另外的氨基酸, 对应于可变域 FR 或 CDR 的缩短或插入。例如, 重链可变域可包含 H2 残基 52 后的单一氨基酸插入(依照 Kabat 为残基 52a)及重链 FR 残基 82 后的插入残基(例如依照 Kabat 为残基 82a、82b 和 82c 等)。给定抗体的 Kabat 残基编号可通过将抗体序列与“标准”Kabat 编号序列对比同源区来确定。

[0471] 短语“基本上相似”或“基本上相同”在用于本文时表示两个数值(通常一个涉及本发明的抗体而另一个涉及参照/比较抗体)之间足够高的相似程度, 以致本领域技术人员

将认为在用所述数值(例如 Kd 值)所测量的生物学特性背景内两个数值之间的差异具有很小的或没有生物学和 / 或统计学显著性。作为参照 / 比较抗体的数值的函数,所述两个数值之间的差异优选小于约 50%,优选小于约 40%,优选小于约 30%,优选小于约 20%,优选小于约 10%。

[0472] “结合亲和力”通常指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明,在用于本文时,“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体与抗原)之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力通常可用解离常数 (Kd) 来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量,包括本文中所描述的。低亲和力抗体通常缓慢的结合抗原且趋于容易解离,而高亲和力抗体通常更快速的结合抗原且趋于保持更长时间的结合。本领域知道测量结合亲和力的多种方法,其中任一种都可用于本发明的目的。下文描述了具体的示例性实施方案。

[0473] 在一个实施方案中,依照本发明的“Kd”或“Kd 值”是通过如下测定法所述使用 Fab 型式的目的抗体及其抗原进行的放射性标记抗原结合测定法 (RIA) 来测量的:通过在存在未标记抗原的滴定系列的条件下,用最小浓度的 ^{125}I 标记抗原平衡 Fab,然后用抗 Fab 抗体包被的平板捕捉结合的抗原来测量 Fab 对抗原的溶液中的结合亲和力 (Chen, et al., J Mol Biol 293:865-881(1999))。为了确定测定条件,用 50mM 碳酸钠 (pH 9.6) 中的 $5\mu\text{g/ml}$ 捕捉用抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) 包被微量滴定板 (Dynex) 过夜,随后用 PBS 中的 2%(w/v) 牛血清清蛋白在室温(约 23°C) 封闭 2-5 小时。在非吸附平板 (Nunc#269620) 中,将 100pM 或 26pM [^{125}I]- 抗原与连续稀释的目的 Fab 混合(例如与 Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599(1997) 中抗 VEGF 抗体, Fab-12 的评估一致)。然后将目的 Fab 保温过夜;不过,保温可持续更长时间(例如 65 个小时)以保证达到平衡。此后,将混合物转移至捕捉板以进行室温保温(例如 1 小时)。然后除去溶液,并用含 0.1%Tween-20 的 PBS 洗板 8 次。平板干燥后,加入 $150\mu\text{l}$ / 孔闪烁液 (MicroScint-20;Packard),然后在 Topcount 伽马计数器 (Packard) 上对平板计数 10 分钟。选择各 Fab 的给出小于或等于最大结合之 20% 的浓度用于竞争性结合测定法。依照另一实施方案, Kd 或 Kd 值是通过表面等离子共振测定法使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 在 25°C 使用固定化抗原 CM5 芯片在约 10 个响应单位 (RU) 测量的。简而言之,依照供应商的说明书用盐酸 N- 乙基 -N'-(3- 二甲基氨基丙基)- 碳化二亚胺 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 将抗原稀释至 $5\mu\text{g/ml}$ (约 $0.2\mu\text{M}$),然后以 $5\mu\text{l}$ / 分钟的流速注入以获得约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后,注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,在 25°C 以约 $25\mu\text{l}$ / 分钟的流速注入在含 0.05%Tween-20 的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对一朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (Kd) 以比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 计算。参见例如 Chen, Y., et al., J Mol Biol 293:865-881(1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定,即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (a stop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用经搅拌的比色杯的测量,在存在浓度渐

增的抗原的条件下,测量 PBS, pH 7.2 中的 20nM 抗抗原抗体(Fab 形式)在 25° C 的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm 带通(band pass))的升高或降低。

[0474] 依照本发明的“结合速率”(on-rate, rate of association, association rate)或“ k_{on} ”也可通过上文所述相同的表面等离子共振技术使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 在 25° C 使用固定化抗原 CM5 芯片在约 10 个响应单位 (RU) 来测定。简而言之,依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 将抗原稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M),然后以 5 μ l/分钟的流速注入以获得约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后,注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,在 25° C 以约 25 μ l/分钟的流速注入在含 0.05%Tween-20 的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对一朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (Kd) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., J Mol Biol 293:865-881 (1999)。然而,如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6 M^{-1}S^{-1}$, 那么结合速率优选使用荧光淬灭技术来测定,即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用经搅拌的比色杯的测量,在存在浓度渐增的抗原的条件下,测量 PBS, pH 7.2 中的 20nM 抗抗原抗体(Fab 形式)在 25° C 的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm 带通)的升高或降低。在一个实施方案中,依照本发明的“Kd”或“Kd 值”是通过如下测定法所述使用 Fab 型式的抗体和抗原分子进行的放射性标记抗原结合测定法 (RIA) 来测量的:通过在存在未标记抗原的滴定系列的条件下,用最小浓度的 ^{125}I 标记抗原平衡 Fab,然后用抗 Fab 抗体包被的平板捕捉结合的抗原来测量 Fab 对抗原的溶液中的结合亲和力 (Chen, et al., J Mol Biol 293:865-881 (1999))。为了确定测定条件,用 50mM 碳酸钠 (pH 9.6) 中的 5 μ g/ml 捕捉用抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) 包被微量滴定板 (Dynex) 过夜,随后用 PBS 中的 2%(w/v) 牛血清清蛋白在室温 (约 23° C) 封闭 2-5 小时。在非吸附平板 (Nunc#269620) 中,将 100pM 或 26pM [^{125}I]-抗原与连续稀释的目的 Fab 混合 (与 Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997) 中抗 VEGF 抗体, Fab-12 的评估一致)。然后将目的 Fab 保温过夜;不过,保温可持续更长时间 (例如 65 个小时) 以保证达到平衡。此后,将混合物转移至捕捉板以进行室温保温 1 小时。然后除去溶液,并用含 0.1%Tween-20 的 PBS 洗板 8 次。平板干燥后,加入 150 μ l/孔闪烁液 (MicroScint-20; Packard),然后在 Topcount 伽马计数器 (Packard) 上对平板计数 10 分钟。选择各 Fab 的给出小于或等于最大结合之 20% 的浓度用于竞争性结合测定法。依照另一实施方案, Kd 或 Kd 值是通过表面等离子共振测定法使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 在 25° C 使用固定化抗原 CM5 芯片在约 10 个响应单位 (RU) 测量的。简而言之,依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 将抗原稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M),然后以 5 μ l/分钟的流速注入以获得约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后,注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,在 25° C 以约 25 μ l/分钟的流速注

入在含 0.05%Tween-20 的 PBS(PBST) 中两倍连续稀释的 Fab(0.78nM 至 500nM)。使用简单一对朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_d) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., J Mol Biol 293:865-881(1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定, 即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用经搅拌的比色杯的测量, 在存在浓度渐增的抗原的条件下, 测量 PBS, pH 7.2 中的 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 在 25° C 的荧光发射强度(激发 =295nm ;发射 =340nm, 16nm 带通) 的升高或降低。

[0475] 在一个实施方案中, 依照本发明的“结合速率” (on-rate, rate of association, association rate) 或 “ k_{on} ” 是通过上文所述相同的表面等离子共振技术使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 在 25° C 使用固定化抗原 CM5 芯片在约 10 个响应单位 (RU) 测定的。简而言之, 依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 将抗原稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M), 然后以 5 μ l/ 分钟的流速注入以获得约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后, 注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量, 在 25° C 以约 25 μ l/ 分钟的流速注入在含 0.05%Tween-20 的 PBS(PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_d) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., J Mol Biol 293:865-881(1999)。然而, 如果根据上文表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 那么结合速率优选使用荧光淬灭技术来测定, 即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用经搅拌的比色杯的测量, 在存在浓度渐增的抗原的条件下, 测量 PBS, pH7.2 中的 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 在 25° C 的荧光发射强度(激发 =295nm ;发射 =340nm, 16nm 带通) 的升高或降低。

[0476] 短语“实质性降低”或“实质性不同”在用于本文时表示两个数值(通常一个涉及本发明的抗体而另一个涉及参照/比较抗体)之间足够高的差异程度, 以致本领域技术人员将认为在用所述数值(例如 K_d 值、HAMA 反应)所测量的生物学特性背景内两个数值之间的差异具有统计学显著性。作为参照/比较抗体的数值的函数, 所述两个数值之间的差异优选大于约 10%, 优选大于约 20%, 优选大于约 30%, 优选大于约 40%, 优选大于约 50%。

[0477] “抗原”是抗体可选择性结合的预定抗原。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或其它天然发生的或合成的化合物。优选的是, 靶抗原是多肽。就本文目的而言, “受体人框架”是包含衍生自人免疫球蛋白框架或人共有框架的 VL 或 VH 框架之氨基酸序列的框架。“衍生自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架包含与之相同的氨基酸序列, 或者可包含预先存在的氨基酸序列变化。当存在预先存在的氨基酸变化时, 优选存在不超过 5 个, 优选 4 个或更少, 或者 3 个或更少预先存在的氨基酸变化。当 VH 中存在预先存在的氨基酸变化时, 优选那些变化只位于 71H、73H 和 78H 中的三个、两个或一个位置;

例如,位于那些位置的氨基酸残基可以是 71A、73T 和 / 或 78A。在一个实施方案中,VL 受体人框架在序列上与 VL 人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0478] 本发明的抗体可能能够竞争对第二抗体所结合的相同表位的结合。若单克隆抗体在标准体外抗体竞争结合分析中在相同抗体浓度阻断其它单克隆抗体的结合达 40% 或更多,则认为各单克隆抗体共享“相同表位”。

[0479] “人共有框架”是代表人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列选集中最常见的氨基酸残基的框架。通常,所述人免疫球蛋白 VL 或 VH 选集来自可变区序列亚型。通常,所述序列亚型是如 Kabat 等人所述的亚型。在一个实施方案中,对于 VL,所述亚型是如 Kabat 等人所述的亚型 κ I。在一个实施方案中,对于 VH,所述亚型是如 Kabat 等人所述的亚型 III。

[0480] “VH 亚型 III 共有框架”包含获自 Kabat 等人所述的可变重链亚型 III 中的氨基酸序列的共有序列。

[0481] “VL 亚型 I 共有框架”包含获自 Kabat 等人所述的可变轻链 κ 亚型 I 中的氨基酸序列的共有序列。

[0482] “未修饰的人框架”是具有与受体人框架相同的氨基酸序列的人框架,例如在受体人框架中没有人到非人的氨基酸替代。

[0483] “改变的高变区”就本文目的而言是其中包含一个或多个(例如 1 个至约 16 个)氨基酸替代的高变区。

[0484] “未修饰的高变区”就本文目的而言是具有与衍生它的非人抗体相同的氨基酸序列的高变区,即其中没有了一个或多个氨基酸替代的高变区。

[0485] 术语“高变区”、“HVR”、“HV”或“CDR”在用于本文时指抗体可变域中序列上高度可变且 / 或形成结构上确定的环的区域。通常,抗体包含 6 个高变区:三个在 VH 中(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),三个在 VL 中(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。本文使用且包括许多高变区的叙述。Kabat 互补决定区(CDR)是以序列可变性为基础的,而且是最常用的(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia 改为指结构环的位置(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。“接触”高变区是以可获得复杂晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些高变区中每一个的残基。除非另有说明,将采用 Kabat 编号。高变区的位置通常如下:第 24-34 位氨基酸(CDR-L1)、第 49-56 位氨基酸(CDR-L2)、第 89-97 位氨基酸(CDR-L3)、第 26-35A 位氨基酸(CDR-H1)、第 49-65 位氨基酸(CDR-H2)和第 93-102 位氨基酸(CDR-H3)。

[0486] 高变区还可包括如下“延伸的高变区”:VL 中的氨基酸 24-36(L1) 和氨基酸 46-56(L2)。对于这些定义中的每一个,可变域残基是依照文献 Kabat 等人(见上文)所述编号的。

[0487] “框架”或“FR”残基是可变区中除了如本文所定义的高变区残基以外的那些残基。

[0488] “人抗体”是具有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列且 / 或使用本文所公开的用于制备人抗体的任何技术制备的抗体。人抗体的这种定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0489] “亲和力成熟的”抗体指在其一个或多个 CDR 中具有导致抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的一处或多处改变的抗体。优选的亲和力

成熟的抗体将具有纳摩尔或甚至皮摩尔水平的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知流程生成。Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783(1992) 描述了经由通过 VH 和 VL 结构域改组的亲和力成熟。下列文献描述了 CDR 和 / 或框架残基的随机诱变:Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813(1994); Schier et al., *Gene* 169:147-155(1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155:1994-2004(1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9(1995); 及 Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992)。

[0490] “阻断性”抗体或“拮抗性”抗体指抑制或降低其所结合的抗原的生物学活性的抗体。优选的阻断性抗体或拮抗性抗体基本上抑制或完全抑制抗原的生物学活性。

[0491] “TAT 结合寡肽”指结合, 优选特异性结合本文中所描述的 TAT 多肽的寡肽。TAT 结合寡肽可使用已知寡肽合成方法而化学合成, 或者可使用重组技术来制备和纯化。TAT 结合寡肽的长度通常是至少约 5 个氨基酸, 或者长度为至少约 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100 个氨基酸或更多, 其中能够结合, 优选特异性结合本文所述 TAT 多肽的此类 TAT 结合寡肽可使用众所周知的技术无需过多实验就得以鉴定。在这点上, 注意到用于对寡肽库筛选能够特异性结合多肽靶物的寡肽的技术是本领域众所周知的(参见例如美国专利 5, 556, 762, 5, 750, 373, 4, 708, 871, 4, 833, 092, 5, 223, 409, 5, 403, 484, 5, 571, 689, 5, 663, 143; PCT 公开号 WO 84/03506 和 WO 84/03564; Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81:3998-4002(1984); Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82:178-182(1985); Geysen et al., in *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149(1986); Geysen et al., *J. Immunol. Meth.*, 102:259-274(1987); Schoofs et al., *J. Immunol.*, 140:611-616(1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378; Lowman, H. B. et al. (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352:624; Marks, J. D. et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A. S. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363; Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668。

[0492] “TAT 结合有机分子”指不同于本文中所定义的寡肽或抗体, 而结合, 优选特异性结合本文所述 TAT 多肽的有机分子。TAT 结合有机分子可使用已知方法来鉴定和化学合成(参见例如 PCT 公开号 WO 00/00823 和 W000/39585)。TAT 结合有机分子的大小通常是小于约 2000 道尔顿, 或者大小小于约 1500、750、500、250 或 200 道尔顿, 其中能够结合, 优选特异性结合本文所述 TAT 多肽的此类有机分子可使用众所周知的技术无需过多实验就得以鉴定。在这点上, 注意到用于对有机分子库筛选能够结合多肽靶物的分子的技术是本领域众所周知的(参见例如 PCT 公开号 WO 00/00823 和 W000/39585)。

[0493] “结合”目的抗原, 例如肿瘤相关多肽抗原靶物的抗体、寡肽或其它有机分子指以足够亲和力结合该抗原, 使得该抗体、寡肽或其它有机分子可作为诊断剂和 / 或治疗剂用于靶向表达该抗原的细胞或组织且不显著与其它蛋白质发生交叉反应的分子。在此类实施方案中, 根据荧光激活细胞分选 (FACS) 分析或放射免疫沉淀 (RIA) 的测定, 抗体、寡肽或其

它有机分子结合“非靶物”蛋白质的程度将小于该抗体、寡肽或其它有机分子对其特定靶物蛋白质的结合的约 10%。对于抗体、寡肽或其它有机分子对靶分子的结合,术语“特异结合”或“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶物上的表位或对其“特异”意味着可测量的不同于非特异相互作用的结合。特异结合可通过例如测定分子的结合并与对照分子的结合比较来测量,所述对照分子通常是结构相似但没有结合活性的分子。例如,特异结合可通过与对照分子的竞争来测定,所述对照分子与靶物相似,例如过量的未标记靶物。在这种情况下,若经标记靶物与探针的结合受到过量未标记靶物的竞争性抑制,则指示特异结合。术语“特异结合”或“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶物上的表位或对其“特异”在用于本文时可展现出例如对靶物的 K_d 为至少约 $10^{-4}M$,或至少约 $10^{-5}M$,或至少约 $10^{-6}M$,或至少约 $10^{-7}M$,或至少约 $10^{-8}M$,或至少约 $10^{-9}M$,或至少约 $10^{-10}M$,或至少约 $10^{-11}M$,或至少约 $10^{-12}M$ 或 $10^{-12}M$ 以上。在一个实施方案中,术语“特异结合”指这样的结合,其中分子结合特定多肽或特定多肽上的表位,而基本上不结合任何其它多肽或多肽表位。

[0494] “抑制表达 TAT 多肽的肿瘤细胞生长”的抗体、寡肽或其它有机分子或“生长抑制性”抗体、寡肽或其它有机分子指对表达或过表达适宜 TAT 多肽的癌细胞导致可测量的生长抑制的分子。TAT 多肽可以是在癌细胞表面上表达的跨膜多肽,或者可以是由癌细胞生成和分泌的多肽。与适宜对照相比,优选的生长抑制性抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子将表达 TAT 的肿瘤细胞的生长抑制超过 20%,优选约 20% 至约 50%,甚至更优选超过 50%(例如约 50% 至约 100%),所述对照通常是未用所测试抗体、寡肽或其它有机分子处理的肿瘤细胞。在一个实施方案中,可在细胞培养物中在约 0.1 至 30 $\mu g/ml$ 或约 0.5nM 至 200nM 的抗体浓度测量生长抑制作用,其中生长抑制作用是在肿瘤细胞暴露于抗体后 1-10 天测定的。肿瘤细胞体内生长抑制作用可以多种方式测定,诸如下文实施例部分所述。若以约 1 $\mu g/kg$ 至约 100mg/g 体重施用抗 TAT 抗体导致在距首次施用抗体约 5 天至 3 个月内,优选约 5 至 30 天内肿瘤体积缩小或肿瘤细胞增殖降低,则该抗体在体内是生长抑制性的。

[0495] “诱导凋亡”的抗体、寡肽或其它有机分子指根据膜联蛋白 V 结合、DNA 断裂、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破裂、和 / 或膜囊形成(称作凋亡小体)的测定,诱导程序性细胞死亡的分子。所述细胞通常是过表达 TAT 多肽的细胞。优选的是,所述细胞是肿瘤细胞,例如前列腺、乳腺、卵巢、胃、子宫内膜、肺、肾、结肠、膀胱肿瘤细胞。有多种方法可用于评估与凋亡有关的细胞事件。例如,可通过膜联蛋白结合来测量磷脂酰丝氨酸(PS)易位;可通过 DNA 梯化(laddering)来评估 DNA 断裂;可通过亚二倍体细胞的任何增加来评估伴随着 DNA 断裂的核 / 染色质浓缩。优选的是,诱导凋亡的抗体、寡肽或其它有机分子是在膜联蛋白结合测定法中导致对膜联蛋白结合的诱导相对于未处理细胞提高约 2 至 50 倍,优选约 5 至 50 倍,最优选约 10 至 50 倍的分子。

[0496] 抗体“效应器功能”指那些可归于抗体 Fc 区(天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区)的生物学活性,且随抗体同种型而变化。抗体效应器功能的例子包括: C1q 结合和补体依赖性细胞毒性; Fc 受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体(例如 B 细胞受体)的下调; 和 B 细胞激活。

[0497] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指其中结合到某些细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的 Fc 受体(FcR)上的分泌型 Ig 使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞,随后用细胞毒素杀死靶细

胞的细胞毒性形式。所述抗体“武装”(arm)细胞毒性细胞,而且是此类杀伤作用绝对必需的。介导 ADCC 的主要细胞,NK 细胞,只表达 $Fc\gamma RIII$,而单核细胞表达 $Fc\gamma RI$ 、 $Fc\gamma RII$ 和 $Fc\gamma RIII$ 。Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92(1991) 中第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性,可进行体外 ADCC 测定法,诸如美国专利 5,500,362 或 5,821,337 中所述。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外,可在体内评估目的分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如 Clynes et al., *PNAS(USA)* 95:652-656(1998) 中所公开的。

[0498] “Fc 受体”或“FcR”描述与抗体 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外,优选的 FcR 是与 IgG 抗体结合的 FcR (γ 受体),包括 $Fc\gamma RI$ 、 $Fc\gamma RII$ 和 $Fc\gamma RIII$ 亚类的受体,包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。 $Fc\gamma RII$ 受体包括 $Fc\gamma RIIA$ (“活化受体”)和 $Fc\gamma RIIB$ (“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,区别主要在于其胞质结构域。活化受体 $Fc\gamma RIIA$ 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体 $Fc\gamma RIIB$ 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见综述 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997))。FcR 的综述参见 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991);Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34(1994);de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341(1995))。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR,包括未来将会鉴定的 FcR。该术语还包括新生儿受体(neonatal receptor),FcRn,它负责将母体的 IgG 转移给胎儿(Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587(1976) 和 Kim et al., *J. Immunol.* 24:249(1994))。

[0499] “人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并执行效应器功能的白细胞。优选的是,该细胞至少表达 $Fc\gamma RIII$ 并执行 ADCC 效应器功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞,优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可以从天然来源分离,例如血液。

[0500] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指存在补体时靶细胞的溶解。经典补体途径的激活是由补体系统第一组分(C1q)结合与其关联抗原结合的(适宜亚型的)抗体起始的。为了评估补体激活,可进行 CDC 测定法,例如 Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163(1996) 中所述。

[0501] 术语“癌症”和“癌性”指或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理状况。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、及白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、肺癌包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌包括胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝的癌、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤和 B 细胞淋巴瘤、脑癌、以及头和颈癌,及相关转移。

[0502] 术语“细胞增殖性紊乱”和“增殖性紊乱”指与一定程度的异常细胞增殖有关的紊乱。在一个实施方案中,所述细胞增殖性紊乱指癌症。

[0503] “肿瘤”在用于本文时指所有肿瘤性细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。

[0504] “诱导细胞死亡”的抗体、寡肽或其它有机分子指引起可存活细胞变得不能存活的

分子。所述细胞指表达 TAT 多肽的细胞,优选与同一组织类型的正常细胞相比过表达 TAT 多肽的细胞。TAT 多肽可以是在癌细胞表面上表达的跨膜多肽,或者可以是由癌细胞生成和分泌的多肽。优选的是,所述细胞是癌细胞,例如乳腺、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰或膀胱的癌细胞。体外细胞死亡可在不存在补体或免疫效应细胞时测定,以区分由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 诱导的细胞死亡。因此,用于细胞死亡的测定法可使用热灭活血清(即不含补体)在不存在免疫效应细胞时进行。为了确定抗体、寡肽或其它有机分子是否能够诱导细胞死亡,可相对于未处理细胞来评估膜完整性的丧失,它是通过碘化丙啶(propidium iodide) (PI)、锥虫蓝(参见 Moore et al. Cytotechnology 17:1-11(1995))或 7AAD 的摄取来评估的。优选的诱导细胞死亡的抗体、寡肽或其它有机分子是在 PI 摄取测定法中在 BT474 细胞中诱导 PI 摄取的分子。

[0505] “表达 TAT 的细胞”指或在细胞表面上或以分泌形式表达内源或转染的 TAT 多肽的细胞。“表达 TAT 的癌”指包含在细胞表面上存在 TAT 多肽或生成和分泌 TAT 多肽的细胞的癌。“表达 TAT 的癌”任选在其细胞表面上生成足够水平的 TAT 多肽,使得抗 TAT 抗体、寡肽或其它有机分子可与其结合并对癌产生治疗效果。在另一个实施方案中,“表达 TAT 的癌”任选生成和分泌足够水平的 TAT 多肽,使得抗 TAT 抗体、寡肽或其它有机分子拮抗剂可与其结合并对癌具有治疗效果。对于后者,所述拮抗剂可以是降低、抑制或阻止肿瘤细胞生成和分泌分泌型 TAT 多肽的反义寡核苷酸。“过表达”TAT 多肽的癌指与同一组织类型的非癌性细胞相比,在其细胞表面上具有显著更高水平的 TAT 多肽或生成和分泌显著更高水平的 TAT 多肽的癌。此类过表达可以是由基因扩增或者是由转录或翻译提高引起的。可在诊断或预后测定法中通过评估细胞表面上存在的或细胞分泌的 TAT 蛋白质水平的升高(例如通过免疫组织化学测定法,使用针对分离的 TAT 多肽制备的抗 TAT 抗体,所述多肽可使用重组 DNA 技术从编码 TAT 多肽的分离的核酸制备;FACS 分析;等)来确定 TAT 多肽过表达。或者/另外,可测量细胞中编码 TAT 多肽的核酸或 mRNA 的水平,例如通过荧光原位杂交,使用对应于编码 TAT 的核酸或其互补链的基于核酸的探针(FISH;参见 WO 98/45479,公开于 1998 年 10 月);Southern 印迹;Northern 印迹;或聚合酶链式反应 (PCR) 技术,诸如实时定量 PCR (RT-PCR)。还可使用基于抗体的测定法,通过测量生物学流体诸如血清中的脱落抗原来研究 TAT 多肽过表达(还可参见例如美国专利 4,933,294,授权于 1990 年 6 月 12 日;WO 91/05264,公开于 1991 年 4 月 18 日;美国专利 5,401,638,授权于 1995 年 3 月 28 日;Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80(1990))。除了上述测定法,熟练从业人员还可利用多种体内测定法。例如,可将患者体内细胞暴露于任选用可检测标记物例如放射性同位素标记的抗体,并且可评估抗体与患者体内细胞的结合,例如通过外部扫描放射性或通过分析取自事先已暴露于所述抗体的患者的活组织检查切片。

[0506] 在用于本文时,术语“免疫粘附素”指将异源蛋白质(“粘附素”)的结合特异性与免疫球蛋白恒定区的效应器功能联合起来的抗体样分子。在结构上,免疫粘附素包括不同于抗体的抗原识别和结合位点(即是“异源”的)、具有期望结合特异性的氨基酸序列和免疫球蛋白恒定区序列的融合物。免疫粘附素分子的粘附素部分通常是至少包含受体或配体的结合位点的连续(contiguous)氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定区序列可从任何免疫球蛋白获得,诸如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 亚型、IgA (包括 IgA-1 和 IgA-2)、

IgE、IgD 或 IgM。

[0507] 词“标记物”在用于本文时指与抗体、寡肽或其它有机分子直接或间接偶联从而产生“经标记”抗体、寡肽或其它有机分子的可检测化合物或组合物。标记物可以是自身就可检测的(例如放射性同位素标记物或荧光标记物),或者在酶标记物的情况中,可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0508] 术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或防止细胞的功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括:放射性同位素,例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和 Lu 的放射性同位素;化疗剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;和毒素,诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和 / 或变体;及下文披露的各种抗肿瘤药或抗癌药。下文记载了其它细胞毒剂。杀肿瘤药引起肿瘤细胞的破坏。

[0509] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类(alkylating agents),诸如塞替派(thiotepa)和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺(cyclophosphamide);磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates),诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类(aziridines),诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedepa)和乌瑞替派(uredepa);乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);番荔枝内酯类(acetogenins)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol), **MARINOL®**); β -拉帕醌(lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙素类(colchicines);白桦脂酸(betulinic acid);喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物托泊替康(topotecan) (**HYCAMTIN®**), CPT-11(伊立替康(irinotecan), **CAMPTOSAR®**);乙酰喜树碱、东莨菪亭(scopoletin)和 9-氨基喜树碱);苔藓抑素(bryostatin);callystatin;CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);鬼臼毒素(podophyllotoxin);鬼臼酸(podophyllinic acid);替尼泊苷(teniposide);隐藻素类(cryptophycins)(特别是隐藻素 1 和隐藻素 8);多拉司他汀(dolastatin);duocarmycin(包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);pancratistatin; sarcodictyin;海绵抑素(spongistatin);氮芥类(nitrogen mustards),诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝脲类(nitrosoureas),诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,诸如烯二炔类抗生素(enediyne)(例如加利车霉素(calicheamicin),尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II(参见例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)));

蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括 dynemicinA; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®**多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨蝶呤 (methotrexate) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、蝶罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷 (azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡萄糖内酯 (aceglatone); 醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defosfamide); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃坡霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); 二胺硝吡啶 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verrucarin) A、杆孢菌素 (roridin) A 和蛇行菌素 (anguidin)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀

(mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) (“Ara-C”); 塞替派 (thiotepa); 类紫杉醇类 (taxoids), 例如 **TAXOL®** 帕利他塞 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、**ABRAXANE™** 不含克列莫佛 (Cremophor)、清蛋白改造纳米颗粒剂型帕利他塞 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和 **TAXOTERE®** 多西他塞 (doxetaxel) (**Rhône-Poulenc** Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**); 6- 硫鸟嘌呤 (thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 铂类似物, 诸如顺铂 (cisplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春碱 (vinblastine) (**VELBAN®**); 铂 (platinum); 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine) (**ONCOVIN®**); 奥沙利铂 (oxaliplatin); 亚叶酸 (leucovorin); 长春瑞滨 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**); 能灭瘤 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); 伊本膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄酸类 (retinoids), 诸如视黄酸 (retinoic acid); 卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**); 任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物; 以及两种或多种上述物质的组合, 诸如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 联合 5-FU 和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

[0510] 该定义还包括起调节、降低、阻断或抑制可促进癌生长的激素效果作用的抗激素剂, 且常常是系统或全身治疗的形式。它们自身可以是激素。例子包括抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂类 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、**EVISTA®** 雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4- 羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、那洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 **FARESTON®** 托瑞米芬 (toremifene); 抗孕酮类; 雌激素受体下调剂类 (ERD); 起抑制或关闭卵巢作用的药剂, 例如促黄体生成激素释放激素 (LHRH) 激动剂, 诸如 **LUPRON®** 和 **ELIGARD®** 醋酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate)、醋酸戈舍瑞林 (goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林 (buserelin acetate) 和曲普瑞林 (triptorelin); 抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡米特 (bicalutamide); 其它抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡米特 (bicalutamide); 及抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂, 诸如例如 4(5)- 咪唑、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、**AROMASIN®** 依西美坦 (exemestane)、福美坦 (formestane)、法偈唑 (fadrozole)、**RIVISOR®** 伏氯唑 (vorozole)、**FEMARA®** 来曲唑 (letrozole) 和 **ARIMIDEX®** 阿那曲唑 (anastrozole)。另外, 化疗剂的这种定义包括二膦酸盐类 (bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐 (clodronate) (例如 **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**)、**DIDROCAL®** 依替膦酸盐 (etidronate)、NE-58095、**ZOMETA®** 唑来膦酸 / 唑来膦酸盐 (zoledronic acid/zoledronate)、**FOSAMAX®** 阿伦膦酸盐 (alendronate)、**AREDIA®** 帕米膦酸盐 (pamidronate)、**SKELID®** 替鲁膦酸盐 (tiludronate) 或 **ACTONEL®** 利塞膦酸盐 (risedronate); 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似

物);反义寡核苷酸,特别是那些抑制涉及粘着细胞增殖的信号传导途经中的基因表达的反义寡核苷酸,诸如例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R);疫苗,诸如 THERATOPE®疫苗和基因疗法疫苗,例如 ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和 VAXID®疫苗;LURTOTECAN®拓扑异构酶 1 抑制剂;ABARELIX® rmRH; lapatinib ditosylate(ErbB-2 和 EGFR 双重酪氨酸激酶小分子抑制剂,也称为 GW572016);及任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物。

[0511] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞,尤其是表达 TAT 的癌细胞生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著降低 S 期的 TAT 表达细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(处于 S 期以外的位置)的药剂,诸如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药剂。经典的 M 期阻断剂包括长春药类(vincas)(长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine))、紫杉烷类(taxanes)、和拓扑异构酶 II 抑制剂诸如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。那些阻滞 G1 的药剂也溢出进入 S 期停滞,例如 DNA 烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和 ara-C。更多信息可参见《The Molecular Basis of Cancer》,Mendelsohn 和 Israel 编,第 1 章,题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antieoplastic drugs”,Murakaini 等人,WB Saunders, Philadelphia, 1995,尤其是第 13 页。紫杉烷类(帕利他塞(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel))都是衍生自紫杉树的抗癌药。衍生自欧洲紫杉的多西他赛(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)是帕利他塞(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。帕利他塞和多西他赛促进由微管蛋白二聚体装配成微管并通过防止解聚使微管稳定,导致对细胞有丝分裂的抑制。

[0512] “多柔比星(Doxorubicin)”是蒽环类抗生素。多柔比星的完整化学名是(8S-顺式)-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- α -L-来苏-吡喃己糖基)氧基]-7,8,9,10-四氢-6,8,11-三羟基-8-(羟基乙酰基)-1-甲氧基-5,12-萘二酮。(8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione

[0513] 术语“细胞因子”指由一种细胞群释放的、作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子中包括生长激素,诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素类,诸如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH);肝生长因子;成纤维细胞生长因子;促乳素;胎盘催乳激素;肿瘤坏死因子- α 和- β ;穆勒氏(Mullerian)抑制性物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子,诸如 NGF- β ;血小板衍生生长因子;转化生长因子(TGF),诸如 TGF- α 和 TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,诸如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),诸如巨噬细胞 CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞 CSF(GM-CSF)和粒细胞 CSF(G-CSF);白介素(IL),诸如 IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12;肿瘤坏死因子,诸如 TNF- α 或 TNF- β ;及其它多肽因子,包括 LIF 和

kit 配体 (KL)。在用于本文时,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

[0514] 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗用产品的商品包装中的说明书,它们包含有关涉及此类治疗用产品应用的适应征、用法、剂量、施用、禁忌症和 / 或警告的信息。

[0515] II. 本发明的组合物和方法

[0516] A. 抗 TAT 抗体

[0517] 在一个实施方案中,本发明提供了可在本文中用作治疗剂和 / 或诊断剂的抗 TAT 抗体。例示性的抗体包括多克隆的、单克隆的、人源化的、双特异性的、和异源偶联的抗体。

[0518] 1. 多克隆抗体

[0519] 多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂来生成。将相关抗原(尤其在使用合成肽时)与在待免疫的物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的。例如,可使用双功能或衍生化试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(经半胱氨酸残基的偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺(经赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 、或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, 其中 R 和 R^1 是不同的烃基,将抗原与匙孔藻血蓝蛋白 (KLH)、血清清蛋白、

[0520] 牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂偶联。

[0521] 通过将例如 $100\text{ }\mu\text{g}$ 或 $5\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白质或偶联物(分别用于兔或小鼠)与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混和,并将溶液皮内注射于多个部位,由此将动物针对抗原、免疫原性偶联物或衍生物进行免疫。一个月后,通过多个部位的皮下注射,用弗氏完全佐剂中肽或偶联物初始量的 1/5-1/10 对动物进行强化免疫。7-14 天后,采集动物的血液,并测定血清的抗体滴度。对动物进行强化直到滴度达到稳定的高水平。偶联物还可在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物来制备。同样,适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。

[0522] 2. 单克隆抗体

[0523] 单克隆抗体可以通过最初由 Kohler et al., Nature 256:495 (1975) 描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组 DNA 方法来制备(美国专利 4,816,567)。

[0524] 在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物,诸如仓鼠,以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞,所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。免疫后,分离淋巴细胞,然后使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合,形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。

[0525] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养,所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞(也称作融合配偶)生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的选择性培养基通常将含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷 (HAT 培养基),这些物质阻止缺乏 HGPRT 的细胞生长。

[0526] 优选的融合配偶骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持选择的抗体生成细胞稳定的高水平生成抗体、并对针对未融合亲本细胞进行选择的选择性培养基敏感的骨髓瘤细胞。优选的骨髓瘤细胞系是鼠源骨髓瘤系,诸如可从 Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California, USA) 购得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的细胞系,以及可从 American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) 购得的 SP-2 及衍生物,

例如 X63-Ag8-653 细胞。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已有描述(Kozbor, J. Immunol. 133:3001(1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[0527] 可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养基测定针对抗原的单克隆抗体的生成。优选的是,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,诸如放射性免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

[0528] 单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson et al., Anal. Biochem. 107:220(1980) 中记载的 Scatchard 分析来测定。

[0529] 一旦鉴定得到生成具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞,所述克隆可通过有限稀释流程进行亚克隆,并使用标准方法进行培养(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。适于这一目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养,例如通过将细胞 i. p. 注射到小鼠中。

[0530] 可通过常规抗体纯化流程,诸如例如亲和层析(例如使用蛋白 A 或蛋白 G-Sepharose)或离子交换层析、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析等,将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清适当分开。

[0531] 编码单克隆抗体的 DNA 易于通过常规流程分离并测序(例如使用能够特异性结合编码鼠源抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。以杂交瘤细胞作为此类 DNA 的优选来源。一旦分离,可将 DNA 置于表达载体中,然后将该表达载体转染到不另外产生抗体蛋白质的宿主细胞中,诸如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(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。关于编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述性论文包括 Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262(1993) 和 Plückthun, Immunol. Revs. 130:151-188(1992)。

[0532] 在另一个实施方案中,可从使用 McCafferty et al., Nature 348:552-554(1990) 所述技术构建的噬菌体抗体文库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson et al., Nature 352:624-628(1991) 和 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597(1991) 分别描述了使用噬菌体文库分离鼠源和人源抗体。后续出版物描述了通过链改组(Marks et al., Bio/Technology 10:779-783(1992)),以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse et al., Nuc. Acids Res. 21:2265-2266(1993)),生成高亲和力(nM 范围)的人源抗体。由此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替换方法。

[0533] 可以修饰编码抗体的 DNA 以生成嵌合或融合抗体多肽,例如通过用人重链和轻链恒定区(C_H 和 C_L)序列替代同源鼠源序列(美国专利 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851(1984)),或通过融合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽(异源多肽)的整个或部分编码序列。非免疫球蛋白多肽序列可替代抗体的恒定区,或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变区,产生嵌合二价抗体,它包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点以及对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

[0534] 3. 人抗体和人源化抗体

[0535] 本发明的抗 TAT 抗体还可包括人源化抗体或人抗体。非人(例如鼠源)抗体的人源化形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合子序列)。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体)中的互补决定区(CDR)残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠或兔的 CDR 残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的 Fv 框架残基用相应的非人残基替换。人源化抗体还可包含在受体抗体或输入的 CDR 或框架序列中没有发现的残基。通常,人源化抗体包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变区,其中整个或基本上整个 CDR 区对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区,且整个或基本上整个 FR 区是人免疫球蛋白共有序列的 FR 区。人源化抗体最好还包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区(Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329(1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992))。

[0536] 用于将非人抗体人源化的方法在本领域是众所周知的。通常,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变区。人源化可基本上依照 Winter 及其同事的方法进行(Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988)),通过用啮齿类 CDR 序列替代相应的人抗体序列。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 4,816,567),其中基本上少于整个人可变区用来自非人物种的相应序列替代。在实践中,人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

[0537] 当抗体意图在于人类治疗性用途时,用于制备人源化抗体的人可变区的选择,包括轻链和重链,对于降低抗原性和 HAMA 应答(人抗小鼠抗体)非常重要。根据所谓的“最适(best-fit)”方法,用啮齿类抗体可变区序列对已知的人可变区序列的整个文库进行筛选。鉴定与啮齿类最接近的人 V 结构域序列,并接受其中的人框架区(FR)用于人源化抗体(Sims et al., J. Immunol. 151:2296(1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901(1987))。另一种方法使用由轻链或重链特定亚型的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285(1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623(1993))。

[0538] 更为重要的是,抗体在人源化后保持对抗原的高结合亲和力以及其它有利的生物学特性。为了实现这一目的,依照一种优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,且为本领域熟练技术人员所熟悉。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像能够分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合,从而获得所需抗体特征,诸如对靶抗原的亲和力提高。通常,高变区残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

[0539] 设想了人源化抗 TAT 抗体的各种形式。例如,人源化抗体可以是抗体片段,诸如 Fab,任选偶联有一种或多种细胞毒剂以生成免疫偶联物。或者,人源化抗体可以是完整的

抗体,诸如完整的 IgG1 抗体。

[0540] 作为人源化的替代方法,可生成成人抗体。例如,现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成成人抗体完整全集的转基因动物(例如小鼠)。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因集(array)转移到此类种系突变小鼠中将导致在抗原攻击后生成成人抗体。参见例如 Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551(1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258(1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33(1993); 美国专利 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669(都是 GenPharm 的); 5,545,807; 及 WO 97/17852。

[0541] 或者,噬菌体展示技术(McCafferty et al., Nature 348:552-553(1990))可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)区基因全集生成成人抗体和抗体片段。根据这种技术,将抗体V区基因克隆到丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因的读码框中,并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,以抗体的功能特性为基础进行选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因的选择。由此,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行,综述参见例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。V 基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson et al., Nature 352:624-628(1991) 从衍生自免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库分离得到大量不同的抗噁唑酮抗体。可基本上依照 Markset al., J. Mol. Biol. 222:581-597(1991) 或 Griffith et al., EMBO J. 12:725-734(1993) 所述技术,由未免疫人供体构建 V 基因全集,并分离针对大量不同抗原(包括自身抗原)的抗体。还可参见美国专利 5,565,332 和 5,573,905。

[0542] 如上所述,还可通过体外激活 B 细胞(参见美国专利 5,567,610 和 5,229,275)来生成成人抗体。

[0543] 4. 抗体片段

[0544] 在某些情况中,使用抗体片段而非完整抗体是有利的。片段的体积较小,容许快速清除,并且可导致对实体瘤的进入提高。

[0545] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如 Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992); Brennan et al., Science 229:81(1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。Fab、Fv 和 scFv 抗体片段都可在大肠杆菌中表达和由大肠杆菌分泌,由此容许容易的生成大量的这些片段。可从上文讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段,并通过化学方法偶联形成 $F(ab')_2$ 片段(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167(1992))。依照另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养物分离 $F(ab')_2$ 片段。包含补救受体结合表位残基、具有延长的体内半衰期的 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段描述于美国专利 5,869,046。用于生成抗体片段的其它技术对熟练从业人员是显而易见的。在其它实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见 WO 93/16185; 美国专利 5,571,894; 和美国专利 5,587,458。Fv 和 scFv 是具有完整结合位点且缺乏恒定区的唯一种类;因此,它们适合于在体内使用过程中降低非特异性结合。

可构建 scFv 融合蛋白以生成效应物蛋白质位于 scFv 氨基末端或羧基末端的融合。参见《Antibody Engineering》, Borrebaeck 编, 见上文。抗体片段还可以是“线性抗体”, 例如美国专利 5, 641, 870 中描述的抗体。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0546] 5. 双特异性抗体

[0547] 双特异性抗体指对至少两种不同表位具有结合特异性的抗体。例示性的双特异性抗体可结合本文所述 TAT 蛋白的两种不同表位。其它此类抗体可将 TAT 结合位点与针对另一种蛋白质的结合位点联合起来。或者, 可以将抗 TAT 臂与结合白细胞上触发分子诸如 T 细胞受体分子(例如 CD3)或 IgG 的 Fc 受体 (Fc γ R) 诸如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16) 的臂联合起来, 从而将细胞防御机制聚焦和定位于表达 TAT 的细胞。双特异性抗体还可用于将细胞毒剂定位于表达 TAT 的细胞。这些抗体拥有 TAT 结合臂及结合细胞毒剂(例如肥皂草毒蛋白 (saporin)、抗干扰素 - α 、长春花生物碱 (vinca alkaloid)、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段(例如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。

[0548] WO 96/16673 描述了双特异性抗 ErbB2/ 抗 Fc γ RIII 抗体, 美国专利 5, 837, 234 公开了双特异性抗 ErbB2/ 抗 Fc γ RI 抗体。双特异性抗 ErbB2/Fc α 抗体显示于 WO 98/02463。美国专利 5, 821, 337 教导了双特异性抗 ErbB2/ 抗 CD3 抗体。

[0549] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生成基于两种免疫球蛋白重链 - 轻链对的共表达, 其中两种链具有不同的特异性 (Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配, 这些杂交瘤 (四源杂交瘤 (quadroma)) 生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦, 且产物产量低。WO 93/08829 及 Traunecker et al., EMB J. 10:3655-3659 (1991) 中公开了类似的流程。

[0550] 根据一种不同的方法, 将具有所需结合特异性(抗体 - 抗原结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。优选的是, 融合使用包含至少部分铰链、C_H2 和 C_H3 区的免疫球蛋白重链恒定区。优选的是, 在至少一种融合物中具有包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区 (C_H1)。将编码免疫球蛋白重链融合物以及, 如果需要, 免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体, 并共转染到合适的宿主细胞中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供期望双特异性抗体的最佳产量的实施方案中, 这为调整三种多肽片段的相互比例提供了更大的灵活性。然而, 在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率对期望链组合的产量没有显著影响时, 有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个载体。

[0551] 在本方法的一个优选实施方案中, 双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链, 和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链 - 轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径, 因此发现这种不对称结构便于将所需双特异性复合物 (compound) 与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法公开于 WO 94/04690。关于生成双特异性抗体的其它细节参见例如 Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)。

[0552] 根据美国专利 5, 731, 168 中描述的另一种方法, 可改造一对抗体分子之间的界面, 将从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含至少部分 C_H3

结构域。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生针对大侧链的相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

[0553] 双特异性抗体包括交联或“异源偶联”抗体。例如,异源偶联物中的一种抗体可与亲合素偶联,另一种抗体与生物素偶联。例如,此类抗体建议用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利 4,676,980),及用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360、WO 92/200373 和 EP 03089)。可使用任何便利的交联方法制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的,并且连同许多交联技术一起公开于美国专利 4,676,980。

[0554] 文献中还描述了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan et al., Science 229:81(1985) 描述了通过蛋白水解切割完整抗体以生成 $F(ab')_2$ 片段的方法。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB) 衍生物。然后将 Fab' -TNB 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab' -硫醇,并与等摩尔量的另一种 Fab' -TNB 衍生物混合,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

[0555] 最近的进展使得从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH 片段变得更加容易,这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225(1992) 描述了生成完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子。每个 Fab' 片段由大肠杆菌分泌,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达 ErbB2 受体的细胞和正常人 T 细胞,以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳腺癌靶标的溶解活性。还描述了从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原而形成单体,然后重新氧化而形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。由 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993) 描述的“双抗体(diabody)”技术提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的 V_H 和 V_L , 所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 $Fv(scFv)$ 二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber et al., J. Immunol. 152:5368(1994)。

[0556] 设想了具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt et al., J. Immunol. 147:60(1991)。

[0557] 6. 异源偶联抗体

[0558] 异源偶联抗体也在本发明的范围之内。异源偶联抗体由两种共价连接的抗体构成。此类抗体建议例如用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利 4,676,980)及用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360;WO 92/200373;EP03089)。设想了可在体外使用合成蛋白质化学的已知方法制备抗体,包括那些涉及交联剂的方法。例如,可使用二硫化物交换反

应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。适于此目的的试剂的例子包括亚氨基硫醇酯 / 盐 (iminothiolate) 和 4- 巯基丁亚氨酸甲酯 (methyl-4-mercaptobutyrimidate) 及例如美国专利 4,676,980 中所公开的。

[0559] 7. 多价抗体

[0560] 多价抗体可以比二价抗体更快地受到表达该抗体所结合抗原的细胞的内化(和/或异化)。本发明的抗体可以是可容易地通过编码抗体多肽链的核酸的重组表达而生成、具有三个或更多抗原结合位点的多价抗体(不同于 IgM 类)(例如四价抗体)。多价抗体可包含二聚化结构域和三个或更多抗原结合位点。优选的二聚化结构域包含(或由其组成)Fc 区或交联区。在这种情况下,抗体将包含 Fc 区及 Fc 区氨基末端的三个或更多抗原结合位点。本文中优选的多价抗体包含(或由其组成)三个至约八个,但优选四个抗原结合位点。多价抗体包含至少一条多肽链(且优选两条多肽链),其中所述多肽链包含两个或多个可变区。例如,多肽链可包含 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, 其中 VD1 是第一可变区,VD2 是第二可变区,Fc 是 Fc 区的一条多肽链,X1 和 X2 代表氨基酸或多肽,而 n 是 0 或 1。例如,多肽链可包含:VH-CH1-柔性接头-VH-CH1-Fc 区链;或 VH-CH1-VH-CH1-Fc 区链。本文中的多价抗体优选还包含至少两条(且优选四条)轻链可变区多肽。本文中的多价抗体可包含例如约两条至约八条轻链可变区多肽。本文设想的轻链可变区多肽包含轻链可变区,且任选还包含 CL 结构域。

[0561] 8. 效应器功能的工程改造

[0562] 可能希望在效应器功能方面修饰本发明的抗体,例如为了增强抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可通过在抗体 Fc 区中引入一个或多个氨基酸替代来实现。或者/另外,可在 Fc 区中引入半胱氨酸残基,从而使得在该区中形成链间二硫键。如此生成的同二聚体抗体可具有改善的内化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。参见 Caron et al., J. Exp. Med. 176:1191-1195(1992) 和 Shopes, B., J. Immunol. 148:2918-2922(1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如 Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565(1993) 中描述的异双功能交联剂来制备。或者,抗体可改造成具有双重 Fc 区,由此可具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)。为了提高抗体的血清半衰期,可如例如美国专利 5,739,277 中所述将补救受体结合表位掺入抗体(尤其是抗体片段)。在用于本文时,术语“补救(salvage)受体结合表位”指 IgG 分子(例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃或 IgG₄)Fc 区中负责提高 IgG 分子体内血清半衰期的表位。

[0563] 9. 免疫偶联物

[0564] 本发明还关于包含偶联有细胞毒剂的抗体的免疫偶联物,所述细胞毒剂诸如化疗剂、生长抑制剂、毒素(如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射偶联物)。

[0565] 上文已经描述了可用于生成此类免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白(ricin)A 链、相思豆毒蛋白(abrin)A 链、蒴莲根毒蛋白(modeccin)A 链、 α -帚曲毒素(sarcin)、油桐(*Aleutites fordii*)毒蛋白、香石

竹 (dianthin) 毒蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (crotonin)、肥皂草 (*saponaire officinalis*) 抑制物、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素 (trichothecenes)。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备, 诸如 N- 琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯 (诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (诸如双 (对-叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (诸如双 (对-重氮苯甲酰基) 乙二胺)、二异氰酸酯 (诸如甲苯 2, 6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物 (诸如 1, 5-二氟-2, 4-二硝基苯) 的双功能衍生物。例如, 可如 Vitetta et al., Science 238:1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO 94/11026。

[0566] 本文还设想了抗体与一种或多种小分子毒素诸如加利车霉素 (calicheamicin)、美登木素生物碱类 (maytansinoids)、单端孢霉素 (trichothecene) 和 CC1065, 及这些毒素具有毒素活性的衍生物的偶联物。

[0567] 美登素和美登木素生物碱类

[0568] 在一个优选的实施方案中, 本发明的抗 TAT 抗体 (全长或片段) 与一个或多个美登木素生物碱分子偶联。

[0569] 美登木素生物碱类是通过抑制微管蛋白多聚化来发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素最初从东非灌木齿叶美登木 (*Maytenus serrata*) 分离得到 (美国专利 3, 896, 111)。随后发现某些微生物也生成美登木素生物碱类, 诸如美登醇和 C-3 美登醇酯 (美国专利 4, 151, 042)。例如下列美国专利公开了合成美登醇及其衍生物和类似物: 4, 137, 230; 4, 248, 870; 4, 256, 746; 4, 260, 608; 4, 265, 814; 4, 294, 757; 4, 307, 016; 4, 308, 268; 4, 308, 269; 4, 309, 428; 4, 313, 946; 4, 315, 929; 4, 317, 821; 4, 322, 348; 4, 331, 598; 4, 361, 650; 4, 364, 866; 4, 424, 219; 4, 450, 254; 4, 362, 663; 及 4, 371, 533, 明确将其公开内容收入本文作为参考。

[0570] 美登木素生物碱-抗体偶联物

[0571] 在改进其治疗指数的尝试中, 已经将美登素和美登木素生物碱类与特异结合肿瘤细胞抗原的抗体偶联。例如下列专利公开了包含美登木素生物碱类的免疫偶联物及其治疗用途: 美国专利 5, 208, 020; 5, 416, 064; 及欧洲专利 EP0425235B1, 明确将其公开内容收入本文作为参考。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) 记载了包含与针对人结肠直肠癌的单克隆抗体 C242 连接的称为 DM1 的美登木素生物碱的免疫偶联物。发现该偶联物具有针对培养的结肠癌细胞的高度细胞毒性, 而且在体内肿瘤生长测定法中显示抗肿瘤活性。Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) 记载了其中美登木素生物碱经二硫化物接头与结合人结肠癌细胞系上抗原的鼠抗体 A7 或结合 HER-2/neu 癌基因的另一种鼠单克隆抗体 TA. 1 偶联的免疫偶联物。在体外在人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 上测试了 TA. 1-美登木素生物碱偶联物的细胞毒性, 该细胞系每个细胞表达 3×10^5 个 HER-2 表面抗原。药物偶联物达到了与游离美登木素生物碱药物相似程度的细胞毒性, 这可通过增加每个抗体分子偶联的美登木素生物碱分子数目来提高。A7-美登木素生物碱偶联物在

小鼠中显示低系统性细胞毒性。

[0572] 抗 TAT 多肽抗体 - 美登木素生物碱偶联物(免疫偶联物)

[0573] 抗 TAT 抗体 - 美登木素生物碱偶联物可通过将抗 TAT 抗体与美登木素生物碱分子化学连接且不显著削弱抗体或美登木素生物碱分子的生物学活性来制备。每个抗体分子偶联平均 3-4 个美登木素生物碱分子在增强针对靶细胞的细胞毒性中显示功效,且对抗体的功能或溶解度没有负面影响,尽管预计甚至一个分子的毒素 / 抗体也将较之裸抗体的使用增强细胞毒性。美登木素生物碱类在本领域是众所周知的,而且可通过已知技术合成或从天然来源分离。例如美国专利 5,208,020 和上文提及的其它专利及非专利发表物中公开了合适的美登木素生物碱类。优选的美登木素生物碱类是美登醇和美登醇分子的芳香环或其它位置经过修饰的美登醇类似物,诸如各种美登醇酯。

[0574] 本领域知道许多连接基团可用于制备抗体 - 美登木素生物碱偶联物,包括例如美国专利 5,208,020 或欧洲专利 0425235B1;Chari et al.,Cancer Research 52:127-131(1992);及 2004 年 10 月 8 日提交的美国专利申请 No. 10/960,602 中所公开的,明确将其公开内容收入本文作为参考。包含接头成分 SMCC 的抗体 - 美登木素生物碱偶联物可以如 2004 年 10 月 8 日提交的美国专利申请 No. 10/960,602 中所公开的来制备。连接基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳定基团,正如上文所述专利中所公开的,优选二硫化物和硫醚基团。本文描述和例示了别的连接基团。

[0575] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和美登木素生物碱的偶联物,所述偶联剂诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。特别优选的偶联剂包括 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)(Carlsson et al.,Biochem. J. 173:723-737(1978))和 N-琥珀酰亚氨基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP),由此提供二硫键连接。

[0576] 根据连接的类型,可将接头附着于美登木素生物碱分子的多个位置。例如,可使用常规偶联技术通过与羟基的反应来形成酯键。反应可发生在具有羟基的 C-3 位置、经羟甲基修饰的 C-14 位置、经羟基修饰的 C-15 位置、和具有羟基的 C-20 位置。在一个优选的实施方案中,在美登醇或美登醇类似物的 C-3 位置形成键连接。

[0577] Auristatin 和多拉司他汀

[0578] 在有些实施方案中,免疫偶联物包含与多拉司他汀类(dolastatins)或多拉司他汀肽类似物及衍生物、auristatin 类偶联的本发明抗体(美国专利 No. 5,635,483;5,780,588)。多拉司他汀类和 auristatin 类已经显示出干扰微管动力学、GTP 水解、及核和细胞分裂(Woyke et al(2001)Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)且具有抗癌(US 5,663,149)和抗真菌活性(Pettit et al(1998)Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。多拉司他汀或 auristatin 药物模块(moiety)可经由肽药物模块的 N(氨基)末端或 C(羧基)末端附着于抗体(WO 02/088172)。

[0579] 例示性的 auristatin 实施方案包括 N- 末端连接的单甲基 auristatin 药物模块 DE 和 DF (即 MMAE 和 MMAF), 披露于 Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004, 明确将其公开内容完整收入本文作为参考。

[0580] 典型的是, 基于肽的药物模块可通过在两个或多个氨基酸和 / 或肽片段之间形成肽键来制备。此类肽键可依照例如肽化学领域众所周知的液相合成法来制备 (参见 E. Schröder and K. Lübke, The Peptides, volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press)。auristatin/ 多拉司他汀药物模块可依照以下文献中的方法来制备: US 5,635,483; US 5,780,588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863; 及 Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784。

[0581] 加利车霉素

[0582] 另一种感兴趣的免疫偶联物包括偶联有一个或多个加利车霉素分子的抗 TAT 抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度生成双链 DNA 断裂。关于加利车霉素家族偶联物的制备参见美国专利 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; 5,877,296 (都属于美国 Cyanamid 公司)。可用的加利车霉素结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基- γ_1^I 、PSAG 和 θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998); 及上述授予美国 Cyanamid 公司的美国专利)。可与抗体缀合的另一种抗肿瘤药物是 QFA, 它是一种抗叶酸药物。加利车霉素和 QFA 都具有胞内作用位点, 且不易穿过质膜。因此, 这些试剂经由抗体介导的内化的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒效果。

[0583] 其它细胞毒剂

[0584] 可与本发明的抗 TAT 抗体偶联的其它抗肿瘤剂包括 BCNU、链佐星 (streptozocin)、长春新碱 (vincristine)、5-氟尿嘧啶、美国专利 5,053,394、5,770,710 中记载的统称为 LL-E33288 复合物的试剂家族、及埃斯波霉素类 (esperamicins) (美国专利 5,877,296)。

[0585] 可用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白 (ricin) A 链、相思豆毒蛋白 (abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白 (modeccin) A 链、 α -帚曲霉素 (sarcin)、油桐 (*Aleutites fordii*) 毒蛋白、香石竹 (dianthin) 毒蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (croton)、肥皂草 (*saponaire officinalis*) 抑制物、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素 (trichothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公开的 WO 93/21232。

[0586] 本发明还设想了抗体和具有核酸降解活性的化合物 (如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶, 诸如脱氧核糖核酸酶; DNA 酶) 之间形成的免疫偶联物。

[0587] 为了选择性破坏肿瘤, 抗体可包含高度放射性原子。多种放射性同位素可用于生

成放射偶联的抗 TAT 抗体。实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。在将偶联物用于诊断时,可包含放射性原子用于闪烁照相研究,例如 $\text{Tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ,或是包含自旋标记物用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像, MRI),诸如碘-123、碘-131、镓-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0588] 可以已知方式将放射性或其它标记物掺入偶联物。例如,可生物合成肽,或是通过化学氨基酸合成法合成肽,其中使用涉及例如氟-19 代替氢的合适氨基酸前体。可经肽中的半胱氨酸残基来附着标记物,诸如 $\text{Tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 。可以经赖氨酸残基来附着钇-90。IODOGEN 法(Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978)) 可用于掺入碘-123。《Monoclonal Antibodies in Immunoscinigraphy》(Chatal, CRC Press, 1989) 详细记载了其它方法。

[0589] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒剂的偶联物,所述偶联剂诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP)、琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异硫氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如 Vitetta et al., Science 238:1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 W094/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头 (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); 美国专利 5,208,020)。

[0590] 本发明的化合物明确涵盖但不限于用以下交联试剂制备的 ADC: BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMC S、sulfo-GMB S、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC 和 sulfo-SMPB、及 SVSB ((4-乙烯基砜)苯甲酸琥珀酰亚氨基酯,可从例如 Pierce Biotechnology 公司 (Rockford, IL, U.S.A) 购买)。参见 2003-2004 Applications Handbook and Catalog 第 467-498 页。

[0591] 或者,可通过例如重组技术或肽合成来制备包含抗 TAT 抗体和细胞毒剂的融合蛋白。DNA 的长度可包含各自编码偶联物两个部分的区域,或是彼此毗邻或是由编码接头肽的区域分开,该接头肽不破坏偶联物的期望特性。

[0592] 在又一个实施方案中,可将抗体与“受体”(诸如链霉亲和素)偶联从而用于肿瘤预先靶向,其中对患者施用抗体-受体偶联物,接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶联物,然后施用与细胞毒剂(如放射性核苷酸)偶联的“配体”(如亲合素)。

[0593] 10. 免疫脂质体

[0594] 本文中所公开的抗 TAT 抗体还可配制成免疫脂质体。“脂质体”指由各种类型脂质、磷脂和/或表面活性剂构成的,可用于对哺乳动物递送药物的小囊泡。与生物膜的脂质排列相似,脂质体的成分通常排列成双层形式。含有抗体的脂质体可通过本领域已知方法来制备,诸如 Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 及

WO 97/38731, 公开于 1997 年 10 月 23 日中所述。循环时间延长的脂质体披露于美国专利 5, 013, 556。

[0595] 可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂类组合物通过反相蒸发法生成特别有用的脂质体。将脂质体挤过具有设定孔径的滤器, 产生具有期望直径的脂质体。可如 Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) 中所述, 将本发明抗体的 Fab' 片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联。任选在脂质体中包含化疗剂。参见 Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)。

[0596] B. TAT 结合寡肽

[0597] 本发明的 TAT 结合寡肽指结合, 优选特异性结合本文所述 TAT 多肽的寡肽。TAT 结合寡肽可以使用已知的寡肽合成方法学化学合成, 或者可使用重组技术制备和纯化。TAT 结合寡肽的长度通常是至少约 5 个氨基酸, 或者长度为至少约 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100 个氨基酸或更长, 其中此类寡肽能够结合, 优选特异性结合本文所述 TAT 多肽。TAT 结合寡肽无需过多试验就可使用公知技术来鉴定。在这点上, 注意到用于对寡肽文库筛选能够特异性结合多肽靶物的寡肽的技术是本领域公知的(参见例如美国专利 5, 556, 762, 5, 750, 373, 4, 708, 871, 4, 833, 092, 5, 223, 4 09, 5, 403, 484, 5, 571, 689, 5, 663, 143; PCT 公开号 WO 84/03506 和 WO 84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth. 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol. 140:611-616 (1988); Cwirla, S. E. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378; Lowman, H. B. et al., (1991) Biochemistry 30:10832; Clackson, T. et al., (1991) Nature 352:624; Marks, J. D. et al., (1991), J. Mol. Biol. 222:581; Kang, A. S. et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8363; Smith, G. P., (1991) Current Opin. Biotechnol. 2:668)。

[0598] 在这点上, 噬菌体展示是一种可以筛选大型寡肽文库来鉴定那些文库中能够特异性结合多肽靶物的成员的公知技术。噬菌体展示是将变体多肽作为与外壳蛋白的融合蛋白展示在噬菌体颗粒表面的一种技术 (Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science 249:386)。噬菌体展示的效用在于, 可以对选择性随机化蛋白质变体(或随机克隆 cDNA) 的大型文库迅速且有效地分选那些以高亲和力结合靶分子的序列。在噬菌体上展示肽 (Cwirla, S. E. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378) 或蛋白质 (Lowman, H. B. et al., (1991) Biochemistry 30:10832; Clackson, T. et al., (1991) Nature 352:624; Marks, J. D. et al., (1991) J. Mol. Biol. 222:581; Kang, A. S. et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8363) 文库已经用于对数百万多肽或寡肽筛选具有特异结合特性的那些多肽或寡肽 (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol. 2:668)。分选随机突变体的噬菌体文库需要构建和扩充大量变体的策略, 使用靶受体进行亲和纯化的流程, 及评估结合富集的结果的手段。参见美国专利 5, 223, 409, 5, 403, 484, 5, 571, 689 和 5, 663, 143。

[0599] 尽管大多数噬菌体展示方法已经使用丝状噬菌体, λ 类 (lambdoid) 噬菌体展示系统 (WO 95/34683; US 5,627,024)、T4 噬菌体展示系统 (Ren et al., Gene 215:439 (1998); Zhu et al., Cancer Research 58(15):3209-3214 (1998); Jiang et al., Infection & Immunity 65(11):4770-4777 (1997); Ren et al., Gene 195(2):303-311 (1997); Ren, Protein Sci. 5:1833 (1996); Efimov et al., Virus Genes 10:173 (1995)) 和 T7 噬菌体展示系统 (Smith and Scott, Methods in Enzymology 217:228-257 (1993); US 5,766,905) 也是已知的。

[0600] 现在已经对基础噬菌体展示概念开发了很多其它改进和变通。这些改进增强了展示系统对肽文库筛选与选定靶分子的结合及展示功能性蛋白质的能力, 所述功能性蛋白质具有对这些蛋白质筛选期望特性的潜力。已经开发了用于噬菌体展示反应的组合反应装置 (WO 98/14277), 而且噬菌体展示文库已经用于分析和控制生物分子相互作用 (WO 98/20169; WO 98/20159) 和受约束 (constrained) 螺旋肽的特性 (WO 98/20036)。WO 97/35196 描述了分离亲和配体的方法, 其中使噬菌体展示文库接触第一种溶液和第二种溶液以选择性分离结合的配体, 在第一种溶液中配体将结合靶分子, 而在第二种溶液中亲和配体将不会结合靶分子。WO 97/46251 描述了这样一种方法, 即用亲和纯化的抗体生物淘选随机噬菌体展示库, 然后分离结合的噬菌体, 随后使用微量板的孔进行淘选过程以分离高亲和力结合的噬菌体。已经报道了金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 蛋白 A 作为亲和标签的使用 (Li et al., (1998) Mol. Biotech. 9:187)。WO 97/47314 描述了底物扣除文库用于区别酶特异性的用途, 其中使用可以是噬菌体展示库的组合文库。WO 97/09446 描述了使用噬菌体展示选择适用于洗涤剂的酶的方法。美国专利 5,498,538, 5,432,018 和 WO 98/15833 中描述了选择特异性结合的蛋白质的其它方法。

[0601] 产生肽文库和筛选这些文库的方法还公开于美国专利 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, 和 5,723,323。

[0602] C. TAT 结合有机分子

[0603] TAT 结合有机分子指本文所定义的寡肽或抗体以外, 结合、优选特异性结合本文所述 TAT 多肽的有机分子。TAT 结合有机分子可以使用已知方法学来鉴定和化学合成 (参见例如 PCT 公开号 WO 00/00823 和 WO 00/39585)。TAT 结合有机分子的大小通常小于约 2000 道尔顿, 或者其大小小于约 1500、750、500、250 或 200 道尔顿, 其中此类能够结合、优选特异性结合本文所述 TAT 多肽的有机分子无需过多实验就可使用公知技术来鉴定。在这点上, 注意到用于对有机分子文库筛选能够结合多肽靶物的分子的技术是本领域公知的 (参见例如 PCT 公开号 WO 00/00823 和 WO 00/39585)。TAT 结合有机分子可以是例如醛、酮、肟、腙、缩氨基脲 (semicarbazone)、卡巴肼 (carbazide)、伯胺、仲胺、叔胺、N-取代的肼、酰肼、醇、醚、硫醇、硫醚、二硫化物、羧酸、酯、酰胺、脲、氨基甲酸酯 (carbamate)、碳酸酯 (carbonate)、缩酮、硫缩酮 (thioketal)、缩醛、硫缩醛、芳基卤、芳基磺酸酯 (aryl sulfonate)、烷基卤、烷基磺酸酯 (alkyl sulfonate)、芳香族化合物、杂环化合物、苯胺、烯烃、炔烃、二醇、氨基醇、噁唑烷、噁唑啉、噻唑烷、噻唑啉、烯胺、磺酰胺 (sulfonamide)、环氧化物、吡丙啶 (aziridine)、异氰酸酯 (isocyanate)、磺酰氯、重氮化合物、酰基氯 (acid chloride) 等。

[0604] D. 筛选具有期望特性的抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽和 TAT 结合有机分子

[0605] 上文已经描述了用于产生结合 TAT 多肽的抗体、寡肽和有机分子的技术。根据需要,可进一步选择具有某些生物学性质的抗体、寡肽或其它有机分子。

[0606] 可通过本领域公知的方法,例如使用内源性或在用 TAT 基因转染后表达 TAT 多肽的细胞,来评估本发明抗 TAT 抗体、寡肽或其它有机分子的生长抑制效果。例如,可将适宜的肿瘤细胞系和 TAT 转染细胞用不同浓度的本发明抗 TAT 单克隆抗体、寡肽或其它有机分子处理几天(例如 2-7 天),并用结晶紫或 MTT 染色,或者通过一些其它比色测定法来分析。测量增殖的另一种方法是通过比较在存在或缺乏本发明的抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子时所处理细胞的 ^3H - 胸苷摄取。处理后,收获细胞并在闪烁计数器中对掺入 DNA 的放射性的量进行测量。适宜的阳性对照包括用已知抑制所选细胞系生长的生长抑制性抗体处理该细胞系。可以本领域知道的多种方法来测定体内肿瘤细胞的生长抑制。优选的是,肿瘤细胞是过表达 TAT 多肽的细胞。优选的是,与未处理的肿瘤细胞相比,抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子将在体外或在体内抑制表达 TAT 的肿瘤细胞的细胞增殖达约 25-100%,更优选约 30-100%,甚更优选约 50-100% 或 70-100%,在一个实施方案中,抗体浓度为约 0.5-30 $\mu\text{g/ml}$ 。可在细胞培养物中在抗体浓度为约 0.5-30 $\mu\text{g/ml}$ 或约 0.5nM 至 200nM 时测量生长抑制,其中在使肿瘤细胞暴露于抗体后 1-10 天测量生长抑制。如果以约 1 $\mu\text{g/g}$ 至约 100mg/kg 体重施用抗 TAT 抗体导致在自首次施用抗体起约 5 天至 3 个月内、优选约 5 至 30 天内肿瘤体积缩小或肿瘤细胞增殖降低,那么该抗体是体内生长抑制性的。

[0607] 为了选择诱导细胞死亡的抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子,可相对于对照评估膜完整性的丧失,这由例如碘化丙啶 (PI)、锥虫蓝或 7AAD 摄取来指示。PI 摄取测定法可在缺乏补体和免疫效应细胞时进行。将表达 TAT 多肽的肿瘤细胞与单独的培养基或含有适宜的抗 TAT 抗体(例如约 10 $\mu\text{g/ml}$)、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子的培养基一起温育。将细胞温育 3 天的时间段。每次处理后,清洗细胞并等分 (aliquot) 到 35mm 带滤盖的 (strainer-capped) 的 12x75 试管中(每支试管 1ml,每个处理组 3 支试管)用于去除细胞团块。然后向试管加入 PI (10 $\mu\text{g/ml}$)。使用 **FACSCAN®** 流式细胞仪和 **FACSCONVERT®** CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 分析样品。可选择那些通过 PI 摄取确定为诱导统计学显著水平的细胞死亡的抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子作为诱导细胞死亡的抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子。

[0608] 为了筛选结合 TAT 多肽上目的抗体所结合的表位的抗体、寡肽或其它有机分子,可进行常规的交叉阻断测定法,诸如 Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) 中所描述的。此测定法可用于确定测试抗体、寡肽或其它有机分子是否与已知的抗 TAT 抗体结合相同的位点或表位。或者 / 另外,可通过本领域已知的方法进行表位作图 (mapping)。例如,可通过诸如丙氨酸扫描来诱变抗体序列以鉴定接触残基。首先对突变体抗体测试与多克隆抗体的结合以确保正确折叠。在不同的方法中,可在竞争测定法中使用对应于 TAT 多肽不同区的肽,使用几种测试抗体或者一种测试抗体和具有已表征或已知表位的抗体。

[0609] E. 依赖抗体的酶介导的前体药物疗法 (ADEPT)

[0610] 通过将抗体与前体药物活化酶偶联,本发明的抗体还可用于 ADEPT,所述前体药物活化酶将前体药物(例如肽基化疗剂,参见 WO 81/01145)转变为活性抗癌药。参见例如 WO

88/07378 和美国专利 4,975,278。

[0611] 可用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶组分包括能够以这样一种方式作用于前体药物从而将其转变为更有活性的细胞毒性形式的任何酶。

[0612] 可用于本发明方法的酶包括但不限于可将含磷酸盐 / 酯的前体药物转变为游离药物的碱性磷酸酶 ; 可将含硫酸盐 / 酯的前体药物转变为游离药物的芳基硫酸酯酶 ; 可将无毒 5- 氟胞嘧啶转变为抗癌药 5- 氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶 ; 可将含肽的前体药物转变为游离药物的蛋白酶, 诸如沙雷氏菌蛋白酶 (*serratia protease*)、嗜热菌蛋白酶 (*thermolysin*)、枯草杆菌蛋白酶 (*subtilisin*)、羧肽酶和组织蛋白酶 (诸如组织蛋白酶 B 和 L); 可转化含 D- 氨基酸替代的前体药物的 D- 丙氨酰羧肽酶 ; 可将糖基化前体药物转变为游离药物的碳水化合物切割酶, 诸如 β - 半乳糖苷酶和神经氨酸酶 ; 可将用 β - 内酰胺衍生的药物转变为游离药物的 β - 内酰胺酶 ; 及可将在其氨基氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转变成游离药物的青霉素酰胺酶, 诸如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者, 可使用具有酶活性的抗体, 本领域也称作“抗体酶”, 将本发明的前体药物转变为游离活性药物 (参见例如 Massey, *Nature* 328:457-458 (1987))。可如本文所述制备抗体 - 抗体酶偶联物, 用于将抗体酶递送至肿瘤细胞群。

[0613] 可通过本领域众所周知的技术将本发明的酶与抗 TAT 抗体共价结合, 诸如使用上文所讨论的异双功能交联剂。或者, 可使用本领域众所周知的重组 DNA 技术构建包含与本发明酶的至少功能活性部分连接的本发明抗体的至少抗原结合区的融合蛋白 (参见例如 Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984))。

[0614] F. 全长 TAT 多肽

[0615] 本发明还提供了新鉴定并分离的核苷酸序列, 其编码本申请中称为 TAT 多肽的多肽。具体的说, 已经鉴定并分离了编码多种 TAT 多肽的 cDNA (部分或全长), 正如下文实施例进一步详细公开的。

[0616] 正如下文实施例所公开的, 多个 cDNA 克隆已经保藏于 ATCC。那些克隆的实际核苷酸序列可以由熟练技术人员使用本领域常规方法通过对所保藏克隆测序来容易的测定。预测的氨基酸序列可使用常规技术从核苷酸序列确定。对于本文所述 TAT 多肽及编码核酸, 在有些情况中, 申请人已经鉴定了认为是根据那时可获得的序列信息最好的可鉴定读码框。

[0617] G. 抗 TAT 抗体和 TAT 多肽变体

[0618] 除了本文所述抗 TAT 抗体和全长天然序列 TAT 多肽, 设想了可制备抗 TAT 抗体和 TAT 多肽变体。抗 TAT 抗体和 TAT 多肽变体可通过将适宜的核苷酸改变引入编码 DNA 和 / 或通过合成期望抗体或多肽来制备。本领域技术人员将领会, 氨基酸改变可改变抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的翻译后加工, 诸如改变糖基化位点的数目或位置或者改变膜锚定特征。

[0619] 可在本文所述抗 TAT 抗体和 TAT 多肽中进行变异, 例如使用例如美国专利 5,364,934 所述的保守和非保守突变的任何技术和指导方针。变异可以是编码抗体或多肽的一个或多个密码子的替代、删除或插入, 其导致氨基酸序列相对于天然序列抗体或多肽的改变。任选的是, 变异是通过抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的一个或多个结构域中至少一个氨基酸为任何其它氨基酸所替代。通过比较抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的序列与同源已知蛋白质分子的序列, 并将高同源区中进行的氨基酸序列改变的数目最少化, 可发现确定哪些氨基

酸残基可插入、替代或删除而不会对期望活性有不利影响的方针。氨基酸替代可以是将一种氨基酸用具有相似结构和 / 或化学特性的另一种氨基酸替代的结果,诸如用丝氨酸替代亮氨酸,即保守氨基酸替代。插入或删除可任选在约 1 个至 5 个氨基酸的范围内。可通过在序列中系统进行氨基酸插入、替代或删除,并对所得变体测试由全长或成熟天然序列展示的活性来确定可容许的变异。

[0620] 本文提供了抗 TAT 抗体和 TAT 多肽的片段。例如,在与全长天然抗体或蛋白质比较时,此类片段可在 N- 末端或 C- 末端截短,或者可缺少内部残基。某些片段缺少对于抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的期望生物学活性不是至关重要的氨基酸残基。

[0621] 抗 TAT 抗体和 TAT 多肽片段可通过多种常规技术中的任一种来制备。期望肽片段可化学合成。一种备选方法牵涉通过酶促消化产生抗体或多肽片段,例如通过用已知在由特定氨基酸残基限定的位点处切割蛋白质的酶处理蛋白质,或者通过用合适的限制酶消化 DNA,并分离期望片段。还有一种合适的技术牵涉分离并通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增编码期望抗体或多肽片段的 DNA 片段。限定 DNA 片段期望末端的寡核苷酸在 PCR 中用作 5' 和 3' 引物。优选的是,抗 TAT 抗体和 TAT 多肽片段与本文所公开的天然抗 TAT 抗体或 TAT 多肽共享至少一种生物学和 / 或免疫学活性。

[0622] 在具体实施方案中,感兴趣的保守替代见表 1 标题“优选替代”下所示。如果此类替代导致生物学活性的改变,那么可引入表 1 中称为“例示替代”的更实质性改变,或者如下文关于氨基酸类别进一步所述的,并筛选产物。

[0623] 表 1

[0624]

原始残基	例示替代	优选替代
Ala(A)	val;leu;ile	val
Arg(R)	lys;gln;asn	lys
Asn(N)	gln;his;asp;lys;arg	gln
Asp(D)	glu;asn	glu
Cys(C)	ser;ala	ser
Gln(Q)	asn;glu	asn
Glu(E)	asp;gln	asp
Gly(G)	pro;ala	ala

[0625]

His(H)	asn;gln;lys;arg	arg
Ile(I)	leu;val;met;ala;phe; 正亮氨酸	leu

Leu (L)	正亮氨酸 ;ile;val;met;ala;phe	ile
Lys (K)	arg;gln;asn	arg
Met (M)	leu;phe;ile	leu
Phe (F)	trp;leu;val;ile;ala;tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	val;ser	ser
Trp (W)	tyr;phe	tyr
Tyr (Y)	trp;phe;thr;ser	phe
Val (V)	ile;leu;met;phe;ala; 正亮氨酸	leu

[0626] 对抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的功能或免疫学身份的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来完成：(a) 替代区域的多肽主链的结构，例如作为折叠片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。根据共同的侧链特性，天然存在残基可如下分组：

[0627] (1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0628] (2) 中性、亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0629] (3) 酸性的：Asp、Glu；

[0630] (4) 碱性的：His、Lys、Arg；

[0631] (5) 影响侧链取向的残基：Gly、Pro；和

[0632] (6) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

[0633] 非保守替代将需要用这些类别之一中的一个成员交换另一个类别的。还可以将此替代残基引入保守替代位点，或者更优选的是，引入剩余的（非保守）位点。

[0634] 变异可使用本领域知道的方法来进行，诸如寡核苷酸介导的（定点）诱变、丙氨酸扫描、及 PCR 诱变。可对克隆的 DNA 进行定点诱变（Carter et al., Nucl. Acids Res. 13:4331(1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res. 10:6487(1987)）、盒式诱变（Wells et al., Gene 34:315(1985)）、限制性选择诱变（restriction selection mutagenesis）（Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317:415(1986)）或其它已知技术以产生抗 TAT 抗体或 TAT 多肽变体 DNA。

[0635] 还可采用扫描氨基酸分析来鉴定沿着连续序列的一个或多个氨基酸。在优选的扫描用氨基酸中有相对较小的中性氨基酸。此类氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。丙氨酸通常是这组中的优选扫描用氨基酸，因为它消除了 β -碳上的侧链，而且不大可能改变变体的主链构象（Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085(1989)）。丙氨酸通常也是优选的，因为它是最常见的氨基酸。另外，常常在隐蔽位置和暴露位置都能发现它

(Creighton, The Proteins, W. H. Freeman & Co., N. Y.; Chothia, J. Mol. Biol. 150:1 (1976))。如果丙氨酸替代不产生足够量的变体,那么可使用等排(isoteric)氨基酸。

[0636] 任何不涉及保持抗 TAT 抗体或 TAT 多肽正确构象的半胱氨酸残基也可被替代,通常用丝氨酸,以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反,可向抗 TAT 抗体或 TAT 多肽中添加半胱氨酸键以改善其稳定性(特别是当抗体是抗体片段诸如 Fv 片段时)。

[0637] 特别优选的一类替代变体牵涉替代亲本抗体的一个或多个高变区残基(例如人源化或人抗体)。通常,选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。产生此类替代变体的一种便利方法牵涉使用噬菌体展示进行的亲和力成熟。简而言之,将数个高变区位点(例如 6-7 个位点)突变,在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上,作为与各个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性(例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合有重要贡献的高变区残基。或者/另外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和人 TAT 多肽之间的接触点可能是有益的。此类接触残基及邻近残基是依照本文详述技术进行替代的候选位点。一旦产生此类变体,如本文所述对该组变体进行筛选,可选择在一种或多种相关测定法中有优良特性的抗体用于进一步的开发。

[0638] 编码抗 TAT 抗体的氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域已知的多种方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况中),或者通过对早期制备的变体或非变体形式的抗 TAT 抗体进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0639] H. 对抗 TAT 抗体和 TAT 多肽的修饰

[0640] 对抗 TAT 抗体和 TAT 多肽的共价修饰包括在本发明的范围内。一种类型的共价修饰包括使抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的靶氨基酸残基与有机衍生化试剂反应,该有机衍生化试剂能够与抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的选定侧链或者 N- 或 C- 末端残基起反应。用双功能试剂进行的衍生化可用于例如使抗 TAT 抗体或 TAT 多肽与不溶于水的支持基质或表面交联,以用于抗 TAT 抗体的纯化方法,反之亦然。常用的交联剂包括例如 1,1- 双(重氮-乙酰基)-2- 苯乙烷、戊二醛、N- 羟基琥珀酰亚胺酯例如与 4- 叠氮水杨酸形成的酯、同双功能亚氨酸酯包括二琥珀酰亚胺酯诸如 3,3'- 二硫代双(琥珀酰亚氨基丙酸酯)、双功能马来酰亚胺诸如双-N- 马来酰亚胺-1,8- 辛烷和诸如甲基-3-[(对-叠氮苯基)二硫代]丙酰亚胺酯等试剂。

[0641] 其它修饰包括谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基分别脱酰胺为谷氨酰胺和天冬酰胺残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α - 氨基的甲基化(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), N- 末端胺的乙酰化,及任何 C- 末端羧基的酰胺化。

[0642] 本发明范围内所包括的对抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的另一类共价修饰包括改变抗体或多肽的天然糖基化样式。“改变天然糖基化样式”在本文中意图指删除一个或多个在天然序列抗 TAT 抗体或 TAT 多肽中发现的碳水化合物模块(moiety)(或是通过消除潜在糖基化位点,或是通过以化学和/或酶促手段删除糖基化),和/或添加一个或多个在天然序列抗

TAT 抗体或 TAT 多肽中不存在的糖基化位点。另外,此短语包括天然蛋白质糖基化中的质的改变,牵涉所存在的多种碳水化合物模块的本质和比例的改变。

[0643] 抗体和其它多肽的糖基化通常或是 N-连接的或是 O-连接的。N-连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸)是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。由此,多肽中这些三肽序列其中任一的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖类 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。

[0644] 向抗 TAT 抗体或 TAT 多肽中添加糖基化位点通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利地完成(用于 N-连接的糖基化位点)。这种改变还可通过向原始抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于 O-连接的糖基化位点)。可任选通过 DNA 水平的变化来改变抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的氨基酸序列,特别是通过在预先选择的碱基处突变编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的 DNA,从而产生将翻译成期望氨基酸的密码子。

[0645] 增加抗 TAT 抗体或 TAT 多肽上糖模块的数目的另一种方法是通过使糖苷与多肽化学或酶促偶联。本领域对此类方法有描述,例如 1987 年 9 月 11 日公开的 WO 87/05330,和 Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)。

[0646] 去除抗 TAT 抗体或 TAT 多肽上存在的糖模块可通过化学或酶促方法来实现,或者通过编码充当糖基化靶物的氨基酸残基的密码子的突变替代。化学脱糖基化技术是本领域已知的,而且描述于例如 Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys. 259:52 (1987) 和 Edge et al., Anal. Biochem. 118:131 (1981)。酶促切割多肽上的糖模块可通过使用多种内切和外切糖苷酶来实现,如 Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138:350 (1987) 所述。

[0647] 对抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的另一类共价修饰包括,以美国专利 4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192 或 4,179,337 所述方式,将抗体或多肽与多种非蛋白质性质的聚合物之一连接,例如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇或聚氧亚烷 (polyoxyalkylene)。抗体或多肽还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物递送系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed., 1980。

[0648] 还可以形成嵌合分子的方式修饰本发明的抗 TAT 抗体或 TAT 多肽,所述嵌合分子包含与另一种异源多肽或氨基酸序列融合的抗 TAT 抗体或 TAT 多肽。

[0649] 在一个实施方案中,此类嵌合分子包括带有标签多肽的抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的融合物,所述标签多肽提供了抗标签抗体可选择性结合的表位。表位标签通常位于抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的氨基或羧基末端。此类表位标记形式的抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的存在可使用针对所述标签多肽的抗体来检测。而且,表位标签的提供使抗 TAT 抗体或 TAT 多肽易于使用抗标签抗体或另一类结合所述表位标签的亲合基质通过亲和纯化来纯化。多种标签多肽及其各自抗体是本领域公知的。例子包括多组氨酸 (poly-his) 或多-组氨酸-甘氨酸 (poly-his-gly) 标签;流感 HA 标签多肽及其抗体 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165 (1988)); c-myc 标签及其抗体 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 和 9E10 抗体 (Evan

et al., *Molecular and Cellular Biology* 5:3610-3616(1985)); 及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标签及其抗体 (Paborsky et al., *Protein Engineering* 3(6):547-553(1990))。其它标签多肽包括 Flag 肽 (Hopp et al., *BioTechnology* 6:1204-1210(1988)); KT3 表位肽 (Martin et al., *Science* 255:192-194(1992)); α -微管蛋白表位肽 (Skinner et al., *J. Biol. Chem.* 266:15163-15166(1991)); 及 T7 基因 10 蛋白肽标签 (Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6393-6397(1990))。

[0650] 在一个备选实施方案中, 嵌合分子可包括抗 TAT 抗体或 TAT 多肽与免疫球蛋白或免疫球蛋白特定区域的融合物。对于二价形式的嵌合分子(也称为“免疫粘附素”), 此类融合物可以是与 IgG 分子 Fc 区的融合。Ig 融合物优选包含用可溶形式(跨膜结构域删除或失活)的抗 TAT 抗体或 TAT 多肽置换 Ig 分子内至少一个可变区的替代。在一个特别优选的实施方案中, 免疫球蛋白融合物包含 IgG1 分子的铰链区、CH₂区和 CH₃区, 或者铰链区、CH₁区、CH₂区和 CH₃区。关于免疫球蛋白融合物的制备还可参见 1995 年 6 月 27 日授权的美国专利 5,428,130。

[0651] I. 抗 TAT 抗体和 TAT 多肽的制备

[0652] 下面的描述主要涉及通过培养用包含编码抗 TAT 抗体和 TAT 多肽的核酸的载体转化或转染的细胞来制备抗 TAT 抗体和 TAT 多肽。当然设想了可采用本领域公知的备选方法来制备抗 TAT 抗体和 TAT 多肽。例如, 可使用固相技术通过直接肽合成来生成适宜的氨基酸序列或其部分(参见例如 Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA, 1969; Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154(1963))。体外蛋白质合成可使用手工技术或通过自动化来进行。自动化合成可例如使用 Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) 依照制造商的说明书来完成。抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的多个部分可分开化学合成, 并使用化学或酶促方法组合以生成期望的抗 TAT 抗体和 TAT 多肽。

[0653] 1. 编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的 DNA 的分离

[0654] 编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的 DNA 可以从 cDNA 文库获得, 所述 cDNA 文库从认为具有所述抗 TAT 抗体或 TAT 多肽 mRNA 且以可检测水平表达它的组织制备。因此, 人的抗 TAT 抗体或 TAT 多肽 DNA 可以方便地从以人组织制备的 cDNA 文库获得。抗 TAT 抗体或 TAT 多肽编码基因也可从基因组文库或通过已知的合成流程(例如自动化核酸合成)获得。

[0655] 可以用设计用于鉴定目的基因或由其编码的蛋白质的探针(诸如至少约 20-80 个碱基的寡核苷酸)筛选文库。用选定探针筛选 cDNA 或基因组文库可使用标准流程进行, 诸如 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 所述。分离编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的基因的一种备选方法是使用 PCR 方法学 (Sambrook et al., 见上文; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)。

[0656] 用于筛选 cDNA 文库的技术是本领域公知的。选作探针的寡核苷酸序列应该足够长且足够明确 (unambiguous), 使得假阳性降到最低。寡核苷酸优选是标记的, 使得它在与所筛选文库中的 DNA 杂交时可检测出。标记方法是本领域公知的, 包括使用放射标记物, 像 ³²P-标记的 ATP、生物素化或酶标记。杂交条件, 包括中等严格性和高度严格性, 见 Sambrook et al., 见上文。

[0657] 在此类文库筛选方法中鉴定的序列可以与保藏的和公共数据库诸如 GenBank 或其它私有数据库序列中可得到的其它已知序列比较和对比。所述分子限定区域内的或跨越全长序列的序列同一性(或是在氨基酸水平上或是在核苷酸水平上)可使用本领域知道的和本文描述的方法来测定。

[0658] 具有蛋白质编码序列的核酸可通过使用本文首次公开的推断的氨基酸序列筛选选定的 cDNA 或基因组文库来获得,并且必要时,使用 Sambrook et al., 见上文所述常规引物延伸流程来检测可能不会逆转录为 cDNA 的 mRNA 的前体和加工的中间产物。

[0659] 2. 宿主细胞的选择和转化

[0660] 将宿主细胞用本文所述用于抗 TAT 抗体或 TAT 多肽生成的表达或克隆载体转染或转化,并在为了诱导启动子、选择转化子、或扩增编码期望序列的基因而恰当调整的常规营养培养基中培养。培养条件,诸如培养基、温度、pH 等等,可以由本领域技术人员无需过多实验就选择。通常,用于使细胞培养物生产力最大化的原理、方案和实用技术可参见 Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed., IRL Press, 1991 和 Sambrook et al., 见上文。

[0661] 真核细胞转染和原核细胞转化的方法是普通技术人员所知道的,例如 CaCl_2 、 CaPO_4 、脂质体介导的和电穿孔。根据所用宿主细胞,转化使用对此类细胞适宜的标准技术进行。采用氯化钙的钙处理,如 Sambrook et al., 见上文所述,或电穿孔通常用于原核细胞。用根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的感染用于某些植物细胞的转化,如 Shaw et al., Gene 23:315 (1983) 和 1989 年 6 月 29 日公开的 W0 89/05859 所述。对于没有此类细胞壁的哺乳动物细胞,可采用 Graham and van der Eb, Virology 52:456-457 (1978) 的磷酸钙沉淀法。哺乳动物细胞宿主系统转染的一般情况参见美国专利 4,399,216。进入酵母的转化通常依照 Van Solingen et al., J. Bact. 130:946 (1977) 和 Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:3829 (1979) 的方法来进行。然而,也可使用用于将 DNA 导入细胞的其它方法,诸如核显微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞的融合、或聚阳离子例如 polybrene、聚鸟氨酸。关于用于转化哺乳动物细胞的多种技术见 Keown et al., Methods in Enzymology 185:527-537 (1990) 和 Mansour et al., Nature 336:348-352 (1988)。

[0662] 适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞包括原核生物、酵母、或高等真核细胞。合适的原核生物包括但不限于真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科,诸如大肠杆菌。多种大肠杆菌菌株是公众可获得的,诸如大肠杆菌 K12 菌株 MM294 (ATCC 31,446); 大肠杆菌 X1776 (ATCC 31,537); 大肠杆菌菌株 W3110 (ATCC 27,325) 和 K5772 (ATCC 53,635)。其它合适的原核生物宿主细胞包括肠杆菌科,诸如埃希氏菌属 (*Escherichia*) 例如大肠埃希氏菌 (大肠杆菌) (*E. coli*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 例如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、和志贺氏菌属 (*Shigella*), 以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*) 诸如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD 266,710 中公开的地衣芽孢杆菌 41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 诸如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。这些例子是例示性的而非限制性的。菌株 W3110 是一个特别优选的宿主或亲本宿主,因为它是用

于重组 DNA 产物发酵的常用宿主菌株。优选的是,宿主细胞分泌最小量的蛋白水解酶。例如,菌株 W3110 可以修饰,在编码对宿主而言内源的蛋白质的基因中产生遗传突变,此类宿主的例子包括大肠杆菌 W3110 菌株 1A2,其具有完整基因型 tonA ;大肠杆菌 W3110 菌株 9E4,其具有完整基因型 tonA ptr3 ;大肠杆菌 W3110 菌株 27C7(ATCC 55, 244),其具有完整基因型 tonA ptr3phoA E15(argF-lac)169degPompT kan^r;大肠杆菌 W3110 菌株 37D6,其具有完整基因型 tonA ptr3phoAE15(argF-lac)169degP ompT rbs7ilvG kan^r;大肠杆菌 W3110 菌株 40B4,它是具有非卡那霉素抗性 degP 删除突变的菌株 37D6 ;及具有 1990 年 8 月 7 日授权的美国专利 4, 946, 783 中公开的突变型周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。或者,体外克隆方法,例如 PCR 或其它核酸聚合酶反应也是合适的。

[0663] 全长抗体、抗体片段及抗体融合物蛋白质可在细菌中制备,特别是在不需要糖基化和 Fc 效应器功能时,诸如当治疗用抗体与细胞毒剂(例如毒素)偶联且免疫偶联物自身显示出肿瘤细胞破坏的效力时。全长抗体在循环中具有较长半衰期。大肠杆菌中的制备更快且更加省钱。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如 US 5, 648, 237 (Carter 等人), US 5, 789, 199 (JoIy 等人), 和 US 5, 840, 523 (Simmons 等人), 它们描述了用于优化表达和分泌的翻译起始区 (TIR) 和信号序列,在此收入这些专利作为参考。表达后,从大肠杆菌细胞糊在可溶性级分中分离抗体,并且可例如根据同种型通过蛋白 A 或 G 柱来纯化。最终的纯化可以与用于纯化例如在 CHO 细胞中表达的抗体的方法类似的进行。

[0664] 除了原核生物以外,真核微生物,诸如丝状真菌或酵母也是编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是常用的低等真核宿主微生物。其它的包括粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach and Nurse, *Nature* 290:140 (1981); EP139, 383, 1985 年 5 月 2 日 公开);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*) 宿主(美国专利 4, 943, 529; Fleer et al., *Bio/Technology* 9:968-975 (1991)) 诸如例如乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.* 154(2):737-742 (1983))、脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) (ATCC12, 424)、保加利亚克鲁维酵母(*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、威克克鲁维酵母(*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、果蝇克鲁维酵母(*K. drosophilum*) (ATCC 36, 906; Van den Berg et al., *Bio/Technology* 8:135 (1990))、耐热克鲁维酵母(*K. thermotolerans*)、和马克思克鲁维酵母(*K. marxianus*);亚罗酵母属(*Yarrowia*) (EP 402, 226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183, 070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.* 28:265-278 (1988));假丝酵母属(*Candida*);瑞氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244, 234);粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*) (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5259-5263 (1979));许旺酵母属(*Schwanniomyces*) 诸如许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*) (EP 394, 538, 1990 年 10 月 31 日公开);和丝状真菌诸如例如脉孢菌属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*) (WO 91/00357, 1991 年 1 月 10 日公开)、和曲霉属(*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉(*A. nidulans*) (Balance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:284-289 (1983); Tilburn et al., *Gene* 26:205-221 (1983); Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474 (1984)) 和黑曲霉(*A. niger*) (Kelly and Hynes, *EMBO J.* 4:475-479 (1985))。甲基营养型酵母 (Methylotropic yeast) 适于本发明,包括但不限于能够在甲醇上生长

的、选自以下属的酵母：汉逊氏酵母属 (*Hansenula*)、假丝酵母属 (*Candida*)、克勒克氏酵母属 (*Kloeckera*)、毕赤氏酵母属 (*Pichia*)、糖酵母属 (*Saccharomyces*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*)、和红酵母属 (*Rhodotorula*)。作为这类酵母的例子的具体物种列表可参见 C. Anthony, *The Biochemistry of Methylophilic*, 269 (1982)。

[0665] 适用于表达糖基化抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括昆虫细胞诸如果蝇 S2 和夜蛾 Sf9, 以及植物细胞诸如棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、烟草的细胞培养物。。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许的昆虫宿主细胞, 它们来自诸如草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (毛虫)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (蚊子)、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* (蚊子)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (果蝇)、和家蚕 *Bombyx mori* 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染, 例如苜蓿尺蠖 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 (*Bombyx mori*) NPV 的 Bm-5 株, 而且此类病毒可依照本发明用作本文的病毒, 特别是用于转染草地夜蛾细胞。

[0666] 然而, 对脊椎动物细胞最感兴趣, 而且通过培养(组织培养)脊椎动物细胞来繁殖已经成为常规流程。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾系 (293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.* 36:59); 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216); 小鼠塞托利 (sertoli) 细胞 (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.* 23:243-251); 猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34); 牛鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞 (Mather et al., 1982, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68); MRC5 细胞; FS4 细胞; 和人肝癌系 (Hep G2)。

[0667] 用上述用于抗 TAT 抗体或 TAT 多肽生成的表达或克隆载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子、或扩增编码期望序列的基因而恰当调整的常规营养培养基中培养。

[0668] 3. 复制型载体的选择和使用

[0669] 可以将编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的核酸 (例如 cDNA 或基因组 DNA) 插入复制型载体用于克隆 (DNA 扩增) 或表达。多种载体是公众可得到的。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可以通过多种方法将适宜的核酸序列插入载体。通常, 使用本领域已知的技术将 DNA 插入适宜的限制性内切酶位点。载体构件通常包括但不限于下列一种或多种: 信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。包含一种或多种这些构件的合适载体的构建采用技术人员已知的标准连接技术。

[0670] TAT 不仅可以直接重组生产, 而且可以作为与异源多肽的融合多肽, 所述异源多肽可以是在成熟蛋白质或多肽的 N- 末端具有特定切割位点的信号序列或其它多肽。通常, 信号序列可以是载体的构件, 或者它可以是插入载体的编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的 DNA 的一部分。信号序列可以是原核信号序列, 选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp、或热稳定的肠毒素 II 前导序列。为了酵母分泌, 信号序列可以是例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列 (包括糖酵母和克鲁维酵母的 α - 因子前导序列, 后者见美国专利 5, 010, 182)、

或酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母葡糖淀粉酶前导序列(1990年4月4日公开的EP 362, 179)、或1990年11月15日公开的W090/13646中描述的信号。在哺乳动物细胞表达中,可以使用哺乳动物信号序列来指导蛋白质的分泌,诸如来自相同或相关物种的分泌型多肽的信号序列,以及病毒分泌前导序列。

[0671] 表达和克隆载体都包含能够使载体在一种或多种选择的宿主细胞中复制的核酸序列。众所周知多种细菌、酵母、和病毒的此类序列。来自质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适合于酵母,而各种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV、或 BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。

[0672] 表达和克隆载体通常将包含选择基因,也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a) 赋予抗生素或其它毒素抗性,例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤、或四环素;(b) 补足营养缺陷;或(c) 提供不能由复合培养基获得的关键营养物,例如编码芽孢杆菌 D- 丙氨酸消旋酶的基因。

[0673] 适于哺乳动物细胞的选择标志的一个例子是能够鉴定有能力摄取编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的核酸的细胞的选择标志,诸如 DHFR 或胸苷激酶。在采用野生型 DHFR 时,适宜的宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的 CHO 细胞系,其制备和繁殖如 Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980) 所述。适用于酵母的选择基因为存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因(Stinchcomb et al., 1979, Nature 282:39;Kingsman et al., 1979, Gene 7:141;Tschemper et al., 1980, Gene 10:157)。trp1 基因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株,例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1 提供了选择标志(Jones, 1977, Genetics 85:12)。

[0674] 表达和克隆载体通常包含与编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的核酸序列可操作连接的启动子以指导 mRNA 合成。受到多种潜在宿主细胞识别的启动子是众所周知的。适用于原核宿主的启动子包括 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统(Chang et al., Nature 275:615(1978);Goeddel et al., Nature 281:544(1979))、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel, Nucleic acids Res. 8:4057(1980);EP 36, 776)、和杂合启动子诸如 tac 启动子(deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25(1983))。用于细菌系统的启动子还将包含与编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的 DNA 可操作连接的 Shine-Dalgarno(S. D.) 序列。

[0675] 适用于酵母宿主的启动子序列的例子包括 3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073(1980))或其它糖酵解酶(Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149(1968);Holland, Biochemistry 17:4900(1978))的启动子,诸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶、和葡糖激酶。

[0676] 作为具有由生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步描述于 EP 73, 657。

[0677] 在哺乳动物宿主细胞中由载体转录抗 TAT 抗体或 TAT 多肽受到例如由病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公开的UK 2, 211, 504)、腺病毒(诸如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和猿猴病毒 40(SV40) 基因组获

得的启动子、由异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子、及由热休克启动子的控制,倘若此类启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0678] 可通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的 DNA 的转录。增强子是 DNA 的顺式作用元件,通常大约 10 至 300bp,作用于启动子以增加转录。已知来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、 α -胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而,通常使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括 SV40 复制起点晚期一侧的增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。增强子可以剪接到载体中,位于抗 TAT 抗体或 TAT 多肽编码序列的 5' 或 3' 位置,但是优选位于启动子的 5' 位点。

[0679] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人、或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还将包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。此类序列通常可以由真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5' 端和偶尔的 3' 端获得。这些区域包含在编码抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的 mRNA 的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。

[0680] 适合在改动后在重组脊椎动物细胞培养物中合成抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的其它方法、载体和宿主细胞见 Gething et al., Nature 293:620-625(1981); Mantei et al., Nature 281:40-46(1979); EP 117,060; 和 EP 117,058。

[0681] 4. 培养宿主细胞

[0682] 可以在多种培养基中培养用于生成本发明抗 TAT 抗体或 TAT 多肽的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10 (Sigma)、极限必需培养基(MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基(DMEM, Sigma)适于培养宿主细胞。另外,可以使用下列文献中描述的任何培养基作为宿主细胞的培养基:Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58:44; Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102:255; 美国专利 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 或 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或 U. S. Patent Re. 30,985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素、运铁蛋白、或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁、和磷酸盐)、缓冲剂(诸如 HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如 GENTAMYCIN™ 药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适当浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件诸如温度、pH 等即先前为表达而选择用于宿主细胞的,这对于普通技术人员而言是显然的。

[0683] 5. 检测基因扩增/表达

[0684] 基因的扩增和/或表达可以在样品中直接测量,例如根据本文提供的序列,使用适宜的标记探针,通过常规的 Southern 印迹、对 mRNA 转录定量的 Northern 印迹(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205(1980))、点印迹(DNA 分析)或原位杂交。或者,可采用能识别特定双链体的抗体,所述双链体包括 DNA 双链体、RNA 双链体、及 DNA-RNA 杂合双链体或 DNA-蛋白质双链体。继而可标记抗体,并可进行测定法,其中将双链体结合到表面上,从而在双链体在表面上形成时,可检测与双链体结合的抗体的存在。

[0685] 或者,为了直接对基因产物的表达定量,可通过免疫学方法测量基因表达,诸如细胞或组织切片的免疫组化染色和细胞培养物或体液的测定法。可用于免疫组化染色和/或样品液体测定法的抗体可以是单克隆的或多克隆的,而且可以在任何哺乳动物中制备。方

便的是,可针对天然序列 TAT 多肽或针对基于本文提供的 DNA 序列的合成肽或针对与 TAT DNA 融合且编码特定抗体表位的外源序列来制备抗体。

[0686] 6. 纯化抗 TAT 抗体和 TAT 多肽

[0687] 可以从培养液或从宿主细胞裂解物中回收各种形式的抗 TAT 抗体和 TAT 多肽。如果是膜结合的,那么可使用合适的去污剂溶液(例如 Triton-X100)或通过酶促裂解使其从膜释放。抗 TAT 抗体和 TAT 多肽表达中所采用的细胞可通过多种物理或化学手段破裂,诸如冻融循环、超声处理、机械破裂、或细胞溶解剂。

[0688] 可能期望从重组细胞蛋白质或多肽纯化抗 TAT 抗体和 TAT 多肽。下面的流程是合适纯化流程的例示:在离子交换柱上的分级;乙醇沉淀;反相 HPLC;在硅土或阳离子交换树脂诸如 DEAE 上的层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;使用例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤;蛋白 A Sepharose 柱以除去污染物诸如 IgG;及结合抗 TAT 抗体和 TAT 多肽的表位标记形式的金属螯合柱。可采用多种蛋白质纯化方法,此类方法是本领域已知的,并描述于例如 Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)。纯化步骤的选择将取决于例如所用生成方法的性质和所产生的具体抗 TAT 抗体或 TAT 多肽。

[0689] 在使用重组技术时,可以在细胞内、在周质空间中生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,通过例如离心或超滤清除宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167, 1992 描述了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的流程。简单地说,在存在乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 时使细胞糊融化约 30 分钟。可以通过离心除去细胞碎片。如果将抗体分泌到培养基中,那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器,例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元浓缩来自此类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括蛋白酶抑制剂诸如 PMSF 来抑制蛋白水解,而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

[0690] 可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析、和亲和层析来纯化由细胞制备的抗体组合物,优选的纯化技术是亲和层析。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体 (Lindmark et al., 1983, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13)。蛋白 G 推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss et al., 1986, *EMBO J.* 5:1567-1575)。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能够获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。对于包含 C_{H3} 结构域的抗体而言,可使用 Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土上的层析、肝素 SEPHAROSE™ 上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀。

[0691] 在任何初步的纯化步骤后,包含目的抗体和污染物的混合物可以使用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液,优选在低盐浓度(例如约 0-0.25M 盐)进行低 pH 疏水相互作用层析。

[0692] J. 药用配制剂

[0693] 可如下制备依照本发明使用的抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽、TAT 结合有机分子和/或 TAT 多肽的治疗用配制剂,即以冻干剂型或水溶液的形式,将具有期望纯度的抗体、

多肽、寡肽或有机分子与任选的药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed., 1980)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的, 包括缓冲剂, 诸如醋酸盐、Tris、磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸的缓冲剂; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵; 氯化己烷双胺; 苯扎氯铵、苯索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽; 蛋白质, 诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其它碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 诸如 EDTA; 张力调节剂 (tonicifier), 诸如海藻糖和氯化钠; 糖类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 表面活性剂, 诸如聚山梨醇酯; 成盐相反离子, 诸如钠; 金属复合物 (例如 Zn-蛋白质复合物); 和 / 或非离子表面活性剂, 诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。所述抗体的配制剂优选包含浓度为 5-200mg/ml, 优选 10-100mg/ml 的抗体。

[0694] 本文中的配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性化合物, 优选活性互补且彼此没有不利影响的。例如, 除了抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽或 TAT 结合有机分子之外, 可能还期望在一种配制剂中含有另一种抗体, 例如结合 TAT 多肽上不同表位的第二抗 TAT 抗体, 或针对一些其它靶物诸如影响特定癌生长的生长因子的抗体。或者 / 另外, 所述组合物还可包含化疗剂、细胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂和 / 或心脏保护剂。合适的是, 此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

[0695] 所述活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中 (例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚 (甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊)、在胶状药物递送系统中 (例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed., 1980。

[0696] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质, 该基质是定型产品的形式, 例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶 (例如聚 (2-羟乙基-甲基丙烯酸酯) 或聚 (乙烯醇))、聚交酯 (美国专利 3, 773, 919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRONDEPOT™ (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体) 及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0697] 用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0698] K. 使用抗 TAT 抗体、TAT 结合寡肽和 TAT 结合有机分子的诊断和治疗

[0699] 为了测定癌中的 TAT 表达, 可利用多种诊断测定法。在一个实施方案中, 可通过免疫组化 (IHC) 来分析 TAT 多肽过表达。可对来自肿瘤活组织检查的石蜡包埋组织切片进行 IHC 测定法, 并给予如下 TAT 蛋白质染色强度标准:

[0700] 得分 0: 未观察到染色或者在少于 10% 的肿瘤细胞中观察到膜染色。

[0701] 得分 1+: 在超过 10% 的肿瘤细胞中检测到微弱的 / 刚刚可察觉的膜染色。所述细胞只在其部分膜上有染色。

[0702] 得分 2+ :在超过 10% 的肿瘤细胞中观察到微弱至中等的完全膜染色。

[0703] 得分 3+ :在超过 10% 的肿瘤细胞中观察到中等至强烈的完全膜染色。

[0704] 那些 TAT 多肽表达得分 0 或 1+ 的肿瘤可鉴定为未过表达 TAT,而那些得分 2+ 或 3+ 的肿瘤可鉴定为过表达 TAT。

[0705] 或者 / 另外,可对福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织进行 FISH 测定法诸如 **INFORM®**(由 Ventana, Arizona 销售)或 **PATHVISION®**(Vysis, Illinois) 以测定肿瘤中 TAT 过表达的程度(如果有的话)。

[0706] 还可使用体内诊断测定法来评估 TAT 过表达或扩增,例如通过施用结合待检测分子且标记有可检测标记物(例如放射性同位素或荧光标记物)的分子(诸如抗体、寡肽或有机分子),然后对患者进行外部扫描以定位所述标记物。

[0707] 如上文所述,本发明的抗 TAT 抗体、寡肽和有机分子具有多种非治疗性应用。本发明的抗 TAT 抗体、寡肽和有机分子可用于表达 TAT 多肽的癌症的诊断和分级(例如在放射成像中)。抗体、寡肽和有机分子还可用于从细胞中纯化或免疫沉淀 TAT 多肽,用于 TAT 多肽的体外检测和定量例如在 ELISA 或 Western 印迹中,作为纯化其它细胞的一个步骤从混合细胞群中杀死和消除表达 TAT 的细胞。

[0708] 现在,根据癌症的分级,癌症的治疗牵涉下列疗法中的一种或它们的组合:手术去除癌性组织,放疗和化疗。抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子疗法对于不能很好耐受化疗的毒性和副作用的老年患者和放疗具有有限效用的转移性疾病可能是尤其想要的。本发明的靶向肿瘤的抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子可用于在疾病的最初诊断时或在复发期间减轻表达 TAT 的癌症。对于治疗性应用,可单独使用抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子,或者用于与例如激素、抗血管发生剂(antiangiogen)或放射标记的化合物,或者与手术、冷冻疗法和 / 或放疗的联合疗法。抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子的治疗可与其它形式的常规疗法联合施用,与常规疗法连续、在之前或之后施用。化疗药物诸如 **TAXOTERE®**多西他塞(doxetaxel)、**TAXOL®**帕利他塞(paclitaxel)、雌莫司汀(estramustine)和米托蒽醌(mitoxantrone)用于治疗癌症,特别是低风险(good risk)的患者。在本发明治疗或减轻癌症的方法中,可给癌症患者施用抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子并联合一种或多种前述化疗剂的治疗。具体而言,设想了与帕利他塞及改良的衍生物的联合疗法(参见例如 EP 0600517)。将抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子与治疗有效剂量的化疗剂一起施用。在另一个实施方案中,联合化疗施用抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子以提高化疗剂例如帕利他塞的活性和功效。Physicians' Desk Reference (PDR) 公开了已经在多种癌症的治疗中使用的这些药剂的剂量。这些前述化疗药物在治疗上有有效的剂量给药方案和剂量将取决于所治疗的具体癌症、疾病的程度、及有本领域技术的内科医师所熟悉的其它因素、且可以由内科医师确定。

[0709] 在一个具体的实施方案中,将包含与细胞毒剂偶联的抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子的偶联物施用于患者。优选的是,与 TAT 蛋白质结合的免疫偶联物由细胞内化,导致免疫偶联物在杀死其所结合的癌细胞方面的治疗功效提高。在一个优选的实施方案中,细胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。此类细胞毒剂的例子上文已有描述,包括美登木素生物碱类、加利车霉素、核糖核酸酶及 DNA 内切核酸酶。

[0710] 将抗 TAT 抗体、寡肽、有机分子或其毒素偶联物依照已知方法施用给人类患者,诸

如静脉内施用,例如作为推注(bolus)或一段时间的连续输注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入路径。优选静脉内或皮下施用抗体、寡肽或有机分子。

[0711] 抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子的施用可联合其它治疗方案。联合施用包括使用分开的配制剂或单一的药用配制剂的共施用,及任意顺序的连续施用,其中优选有一段时间所有两种(或多种)活性剂同时发挥其生物学活性。优选的是,此类联合疗法导致协同治疗效果。

[0712] 可能还期望将一种或多种抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子的施用与针对与特定癌症有关的另一种肿瘤抗原的抗体的施用联合。

[0713] 在另一个实施方案中,本发明的治疗性处理方法涉及(一种或多种)抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子与一种或多种化疗剂或生长抑制剂的联合施用,包括不同化疗剂的混合物(cocktail)的联合施用。化疗剂包括磷酸雌莫司汀(estramustine phosphate)、泼尼莫司汀(prednimustine)、顺铂、5-氟尿嘧啶、美法仑(melphalan)、环磷酰胺、羟基脲和羟基脲紫杉烷(hydroxyureataxane)(诸如帕利他塞和多西他塞(doxetaxel))和/或蒽环类(anthracycline)抗生素。此类化疗剂的制剂和剂量给药方案可依照制造商的说明书使用或由熟练从业人员根据经验确定。此类化疗的制备和剂量给药方案还可参阅 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams&Wilkins, Baltimore, MD(1992)。

[0714] 抗体、寡肽或有机分子可与抗激素化合物以此类分子的已知剂量联合,所述抗激素化合物例如抗雌激素化合物,诸如他莫昔芬(tamoxifen);抗孕酮化合物,诸如奥那司酮(onapristone)(见 EP 616,812);或抗雄激素化合物,诸如氟他米特(flutamide)。当待治疗癌症是雄激素非依赖性癌症时,患者可能先前已经接受过抗雄激素疗法,并在癌症变成雄激素非依赖性时,可以给患者施用抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子(任选以及本文所述其它药剂)。

[0715] 有时,还给患者共施用心脏保护剂(以预防或降低与疗法有关的心肌功能障碍)或一种或多种细胞因子可能也是有益的。除了上述治疗方案,在抗体、寡肽或有机分子疗法之前、同时、或之后,可给患者进行手术去除癌细胞和/或放疗。任何上述共施用药剂的合适剂量就是那些目前所使用的剂量,而且可由于该药剂与抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子的联合作用(协同作用)而降低。

[0716] 为了预防或治疗疾病,施用的剂量和模式可以由内科医师依照已知标准来选择。抗体、寡肽或有机分子的适宜剂量将取决于如上定义的待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和进程、是为了预防还是治疗目的施用抗体、寡肽或有机分子、先前的疗法、患者的临床史及对抗体、寡肽或有机分子的响应、及主治医师的判断。恰当的将抗体、寡肽或有机分子一次性或在一系列治疗中施用给患者。优选的是,将抗体、寡肽或有机分子通过静脉内输注或通过皮下注射来施用。根据疾病的类型和严重程度,约 $1 \mu\text{g/kg}$ 至约 50mg/kg 体重(例如约 $0.1\text{--}15\text{mg/kg/剂}$)的抗体可作为初始候选剂量施用给患者,无论是例如通过一次或多次分开的施用,或是通过连续输注。剂量给药方案可包括施用约 4mg/kg 的初始加载剂量,后续约 2mg/g 抗 TAT 抗体的每周维持剂量。然而,其它剂量方案也可使用。根据上述因素,典型的每日剂量可在约 $1 \mu\text{g/kg}$ 到 100mg/kg 或更大的范围内施用。对于持续几天或更长时间的重复施用,根据状况,维持治疗直到发生对疾病症状的期望遏制。这种疗法的进展可容

易地通过常规方法和测定法,并基于内科医师或其它本领域技术人员知道的标准来监测。

[0717] 除了将抗体蛋白质施用给患者,本申请设想通过基因疗法来施用抗体。编码抗体的核酸的此类施用涵盖在表述“施用治疗有效量的抗体”中。关于使用基因疗法来产生胞内抗体的用途参见例如 1996 年 3 月 14 日公开的 W096/07321。

[0718] 有两种主要方法使核酸(任选包含在载体中)进入患者的细胞,即体内和回体(ex vivo)。对于体内递送,通常在需要抗体的部位将核酸直接注射到患者体内。对于回体治疗,采集患者的细胞,将核酸导入这些分离的细胞,并将经过修饰的细胞或是直接施用于患者,或是例如装入多孔膜内并植入患者体内(参见例如美国专利 4,892,538 和 5,283,187)。有多种技术可用于将核酸导入活细胞。这些技术根据是将核酸转移至预期宿主的体外培养细胞还是体内细胞而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖苷、磷酸钙沉淀法等。常用于回体递送基因的载体是逆转录病毒载体。

[0719] 目前优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体(诸如腺病毒、I 型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒)和基于脂质的系统(可用于脂质介导的基因转移的脂质有例如 DOTMA、DOPE 和 DC-Chol)进行的转染。关于目前已知的基因标记和基因治疗方案的综述参见 Anderson et al., Science 256:808-813(1992)。还可参见 WO 93/25673 及其引用的参考文献。

[0720] 本发明的抗 TAT 抗体可以是本文中“抗体”定义所涵盖的不同形式。因此,抗体包括全长或完整抗体,抗体片段,天然序列抗体或氨基酸变体,人源化的、嵌合的或融合抗体,免疫偶联物,及其功能性片段。在融合抗体中,抗体序列与异源多肽序列融合。可在 Fc 区中修饰抗体以提供期望的效应器功能。如本文各章节中更为详细讨论的,凭借适宜的 Fc 区,结合在细胞表面上的裸抗体可诱导细胞毒性,例如经由抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC),或通过在补体依赖性细胞毒性中募集补体,或一些其它机制。或者,在期望消除或降低效应器功能从而使副作用或治疗并发症降至最低时,可使用某些其它 Fc 区。

[0721] 在一个实施方案中,抗体与本发明抗体竞争对相同表位的结合或基本上结合相同表位。还设想了具有本发明抗 TAT 抗体的生物学特征的抗体,明确包括体内肿瘤靶向和任何细胞增殖抑制或细胞毒性特征。

[0722] 本文详细描述了生成上述抗体的方法。

[0723] 本发明抗 TAT 抗体、寡肽和有机分子可用于治疗哺乳动物中表达 TAT 的癌症或减轻所述癌症的一种或多种症状。此类癌症包括前列腺癌、泌尿道癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌和卵巢癌,更具体的有前列腺腺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌腺癌、肺的腺癌、肺的鳞状细胞癌和胸膜间皮瘤。癌症涵盖任何前述的转移癌。本发明的抗体、寡肽或有机分子能够结合哺乳动物中表达 TAT 多肽的癌细胞的至少一部分。在一个优选的实施方案中,所述抗体、寡肽或有机分子在体外或在体内在结合细胞上的 TAT 多肽时有效破坏或杀死表达 TAT 的肿瘤细胞或抑制此类肿瘤细胞的生长。此类抗体包括裸抗 TAT 抗体(未与任何药剂偶联)。具有细胞毒性或细胞生长抑制特性的裸抗体可以进一步与细胞毒剂合作(harness),使得它们在破坏肿瘤细胞上更有效。可以通过例如将抗体与细胞毒剂偶联形成本文所述免疫偶联物,而赋予抗 TAT 抗体以细胞毒性特性。细胞毒剂或生长抑制剂优选是小分子。优选毒素诸如加利车霉素或美登木素生物碱类及其类似物或衍生物。

[0724] 本发明提供了包含本发明抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子及载体的组合物。为了治

疗癌症的目的,可以将组合物施用于需要此类治疗的患者,其中组合物可包含一种或多种呈现为免疫偶联物或裸抗体的抗 TAT 抗体。在另一个实施方案中,组合物可包含这些抗体、寡肽或有机分子并联合其它治疗剂诸如细胞毒剂或生长抑制剂,包括化疗剂。本发明还提供了包含本发明抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子及载体的配制剂。在一个实施方案中,该配制剂是包含药学可接受载体的治疗用配制剂。

[0725] 本发明的另一个方面是编码抗 TAT 抗体的分离核酸。本发明包含编码重链和轻链二者,尤其是高变区残基的核酸,编码天然序列抗体以及所述抗体的变体、修饰和人源化型式的链。

[0726] 本发明还提供了可用于治疗哺乳动物中表达 TAT 多肽的癌症或减轻所述癌症的一种或多种症状的方法,包括给哺乳动物施用治疗有效量的抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子。抗体、寡肽或有机分子治疗用组合物可由内科医师指导,短期或长期或间断施用。还提供了抑制表达 TAT 多肽的细胞生长和杀死这样的细胞的方法。

[0727] 本发明还提供了包含至少一种抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子的试剂盒和制品。包含抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子的试剂盒可用于例如表达 TAT 的细胞的杀伤测定法,从细胞中纯化或免疫沉淀 TAT 多肽。例如,为了分离和纯化 TAT,试剂盒可包含与珠子(例如 sepharose 珠子)偶联的抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子。可以提供包含抗体、寡肽或有机分子的试剂盒,用于 TAT 的体外检测和定量,例如在 ELISA 或 Western 印迹中。可用于检测的此类抗体、寡肽或有机分子可以与标记物诸如荧光或放射标记物一起提供。

[0728] L. 制品和试剂盒

[0729] 本发明的另一个方面是包含可用于治疗表达 TAT 的癌症的物质的制品。制品包括容器和所述容器上或与其相连的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。容器可用各种材料制成,诸如玻璃或塑料。容器中装有有效治疗癌症状况的组合物,而且可具有无菌存取口(例如容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小管)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子。标签或包装插页指示该组合物用于治疗癌症。标签或包装插页进一步包含给癌症患者施用抗体、寡肽或有机分子组合物的说明书。另外,制品还可包括第二容器,其中装有药学可接受的缓冲剂,诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer)溶液和右旋糖溶液。它还可包括商业和用户立场上所需的其它物质,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0730] 还提供了可用于多种目的的试剂盒,例如用于表达 TAT 的细胞的杀伤测定法,用于从细胞中纯化或免疫沉淀 TAT 多肽。为了分离和纯化 TAT,试剂盒可包含与珠子(例如 sepharose 珠子)偶联的抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子。可以提供包含抗体、寡肽或有机分子的试剂盒,用于 TAT 多肽的体外检测和定量,例如在 ELISA 或 Western 印迹中进行的。与制品相同,试剂盒包括容器和所述容器上或与其相连的标签或包装插页。容器中装有包含至少一种本发明抗 TAT 抗体、寡肽或有机分子的组合物。可包括另外的容器,其中装有例如稀释剂和缓冲剂、对照抗体。标签或包装插页可提供对组合物的描述以及用于预期体外或诊断用途的说明书。

[0731] M. TAT 多肽和编码 TAT 多肽的核酸的用途

[0732] 编码 TAT 多肽的核苷酸序列(或其互补序列)在分子生物学领域具有多种应用,包括用作杂交探针,用于染色体和基因作图,及用于生成反义 RNA 和 DNA 探针。编码 TAT 的核

酸还可用于通过本文所述重组技术来制备 TAT 多肽,其中那些 TAT 多肽可用于例如制备本文所述抗 TAT 抗体。

[0733] 全长天然序列 TAT 基因或其部分可作为杂交探针用于 cDNA 文库以分离全长 TAT cDNA 或分离与本文所公开的天然 TAT 序列具有期望序列同一性的其它 cDNA (例如那些编码 TAT 的天然存在变体或来自其它物种的 TAT 的 cDNA)。任选的是,探针的长度为约 20 个到约 50 个碱基。杂交探针可衍生自全长天然核苷酸序列的至少部分新的区域,其中那些区域不需要过多试验就可以确定,或者来自包含天然序列 TAT 的启动子、增强子元件和内含子的基因组序列。举例来说,筛选方法将包括使用已知 DNA 序列分离 TAT 基因的编码区以合成约 40 个碱基的选定探针。杂交探针可用多种标记物标记,包括放射性核苷酸,诸如 ^{32}P 或 ^{35}S ,或酶标记物,诸如通过亲合素 / 生物素偶联系统与探针偶联的碱性磷酸酶。具有与本发明 TAT 基因的序列互补的序列的标记探针可用于筛选 cDNA、基因组 DNA 或 mRNA 文库以确定探针与此类文库的哪些成员杂交。下面的实施例更详细的描述了杂交技术。使用本文所公开的方法,本申请中公开的任何 EST 序列可类似地用作探针。

[0734] 编码 TAT 的核酸的其它有用片段包括反义或有义寡核苷酸,包括能够结合靶 TAT mRNA (有义) 或 TAT DNA (反义) 序列的单链核酸序列 (或是 RNA 或是 DNA)。依照本发明,反义或有义寡核苷酸包含 TAT DNA 编码区的片段。此类片段通常包含至少约 14 个核苷酸,优选约 14 至 30 个核苷酸。根据编码给定蛋白质的 cDNA 序列来衍生反义或有义寡核苷酸的能力描述于例如 Stein and Cohen, Cancer Res. 48:2659, 1988 和 van der Krol et al., BioTechniques 6:958, 1988。

[0735] 反义或有义寡核苷酸与靶核酸序列的结合导致双链体的形成,其通过多种手段之一阻断靶序列的转录或翻译,所述手段包括双链体的降解增强、转录或翻译的过早终止、或其它手段。此类方法涵盖在本发明中。反义寡核苷酸因此可用于阻断 TAT 蛋白质的表达,其中那些 TAT 蛋白质可能在哺乳动物中起诱导癌症的作用。反义或有义寡核苷酸还包括具有经过修饰的糖-磷酸二酯骨架 (或其它糖键 (linkage), 诸如 WO 91/06629 中所述) 的寡核苷酸,且其中此类糖键对内源核酸酶有抗性。具有抗性糖键的此类寡核苷酸在体内是稳定的 (即能够抵抗酶促降解),但保留了能够结合靶核苷酸序列的序列特异性。

[0736] 用于反义结合的优选基因内位点包括掺入基因可读框 (ORF) 的翻译起始密码子 (5' -AUG/5' -ATG) 或终止密码子 (5' -UAA, 5' -UAG 和 5' -UGA/5' -TAA, 5' -TAG 和 5' -TGA) 的区域。这些区域指 mRNA 或基因中涵盖从翻译起始或终止密码子起任一方向 (即 5' 或 3') 的约 25 个至约 50 个毗连核苷酸的部分。用于反义结合的其他优选区域包括: 内含子; 外显子; 内含子-外显子连接处; 可读框 (ORF) 或“编码区”, 即翻译起始密码子和翻译终止密码子之间的区域; mRNA 的 5' 帽, 其包含经由 5' -5' 三磷酸键与 mRNA 的最 5' 端残基连接的 N7-甲基化鸟苷残基, 包括 5' 帽结构自身以及与帽相邻的前 50 个核苷酸; 5' 非翻译区 (5' UTR), 即 mRNA 中从翻译起始密码子起 5' 方向的部分, 因此包括 mRNA 中 5' 帽位点和翻译起始密码子之间的核苷酸或基因上的相应核苷酸; 和 3' 非翻译区 (3' UTR), 即 mRNA 中从翻译终止密码子起 3' 方向的部分, 因此包括 mRNA 中翻译终止密码子和 3' 末端之间的核苷酸或基因上的相应核苷酸。

[0737] 可用于抑制 TAT 蛋白质表达的优选反义化合物的具体例子包括包含经修饰骨架或非天然核苷间键的寡核苷酸。具有经修饰骨架的寡核苷酸包括那些在骨架中保留磷原

子的以及那些在骨架中没有磷原子的寡核苷酸。为了本说明书的目的,而且有时候在本领域内参考,在其核苷间骨架中没有磷原子的经修饰寡核苷酸也可认为是寡核苷酸。优选的经修饰寡核苷酸骨架包括例如具有正常 3'-5' 键的硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯 (aminoalkylphosphotriester)、甲基和其它烃基磷酸酯包括 3'-亚烃基磷酸酯 (3'-alkylene phosphonate)、5'-亚烃基磷酸酯 (5'-alkylene phosphonate) 和手性磷酸酯、亚磷酸酯、氨基磷酸酯包括 3'-氨基氨基磷酸酯 (3'-amino phosphoramidate) 和氨烃基氨基磷酸酯 (aminoalkylphosphoramidate)、硫羰氨基磷酸酯 (thionophosphoramidate)、硫羰烃基磷酸酯 (thionoalkylphosphonate)、硫羰烃基磷酸三酯 (thionoalkylphosphotriester)、硒代磷酸酯 (selenophosphate) 和溴代磷酸酯 (bromo-phosphate), 它们的 2'-5' 连接类似物, 及那些具有反向极性的类似物, 其中一个或多个核苷酸间键是 3' 到 3'、5' 到 5'、或 2' 到 2' 键。具有反向极性的优选寡核苷酸在最 3' 端核苷酸间键包含单一 3' 到 3' 键, 即可以是无碱基(核碱基缺失或以羟基取代)的单一反向核苷残基。多种盐、混合盐和游离酸的形式也包括在内。教导含磷键的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,594,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697; 和 5,625,050, 在此收入每一项作为参考。

[0738] 其中不含磷原子的优选经修饰寡核苷酸骨架具有由短链烃基或环烃基核苷间键、混合杂原子和烃基或环烃基核苷间键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键形成的骨架。这些包括那些具有吗啉代键(部分由核苷的糖部分形成); 硅氧烷骨架; 硫化物、亚砷和砷骨架; 甲酰基 (formacetyl) 和硫代甲酰基 (thioformacetyl) 骨架; 亚甲基甲酰基 (formacetyl) 和硫代甲酰基 (thioformacetyl) 骨架; 核糖乙酰基骨架; 含烯骨架; 氨基磺酸酯 (sulfamate) 骨架; 亚甲基亚氨基和亚甲基胍基 (methylenedihydrazino) 骨架; 磺酰胺 (sulfonamide) 骨架; 酰胺骨架; 及其它具有混合 N、O、S 和 CH₂ 组成部分的骨架。教导此类寡核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269; 和 5,677,439, 在此收入每一项作为参考。

[0739] 在其它优选的反义寡核苷酸中, 核苷酸单元的糖和核苷间键, 即骨架, 用新基团取代。保持碱基单元以与适宜的核酸靶化合物杂交。已显示出具有卓越杂交特性的这样一种寡聚化合物, 即寡核苷酸模拟物, 称为肽核酸 (PNA)。在 PNA 化合物中, 寡核苷酸的糖骨架以含酰胺骨架取代, 特别是氨乙基甘氨酸骨架。核碱基得到保留并直接或间接结合骨架酰胺部分的氮杂氮原子。教导 PNA 化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利 5,539,082; 5,714,331; 和 5,719,262, 在此收入每一项作为参考。PNA 化合物的更多教导可参见 Nielsen et al., 1991, Science 254:1497-1500。

[0740] 优选的反义寡核苷酸掺入了硫代磷酸酯 (phosphorothioate) 骨架和 / 或杂原子骨架, 特别是 -CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (称为亚甲基 (甲基亚氨基) 或 MMI 骨

架)、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、上述美国专利 5,489,677 中描述的 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (其中天然磷酸二酯骨架表示为 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$)、及上述美国专利 5,602,240 的酰胺骨架。上述美国专利 5,034,506 的具有吗啉代骨架结构的反义寡核苷酸也是优选的。

[0741] 经修饰的寡核苷酸还可以包含一种或多种取代糖模块。优选的寡核苷酸在 2' 位置包含如下之一: OH; F; O-烷基, S-烷基, 或 N-烷基; O-烯基, S-烯基, 或 N-烯基; O-炔基, S-炔基, 或 N-炔基; 或 O-烃基 -O-烃基, 其中烷基、烯基和炔基可以是取代的或未取代的 C_1 到 C_{10} 烷基或 C_2 到 C_{10} 烯基和炔基。特别优选的是 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 、和 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, 其中 n 和 m 是 1 到约 10。其它优选的反义寡核苷酸在 2' 位置包含如下之一: C_1 到 C_{10} 低级烃基, 取代的低级烃基, 烯基, 炔基, 烃芳基, 芳烃基, O-烃芳基或 O-芳烃基, SH, SCH_3 , OCN , Cl, Br, CN, CF_3 , OCF_3 , SOCH_3 , SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , 杂环烃基, 杂环烃芳基, 氨烷基氨基 (aminoalkylamino), 聚烷基氨基 (polyalkylamino), 取代的甲硅烷基, RNA 切割基团 (cleaving group), 报道基团 (reporter group), 嵌入剂, 用于提高寡核苷酸的药动学性质的基团, 或用于提高核苷酸的药效学性质的基团, 及具有相似性质的其它取代基。优选的修饰包括 2'-甲氧基乙氧基 (2'- $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, 也称作 ' -O-(2-甲氧基乙基) 或 2'-MOE) (Martin et al., 1995, Helv. Chim. Acta 78:486-504) 即烃氧基烃氧基 (alkoxyalkoxy)。进一步优选的修饰包括 2'-二甲氨基氧基乙氧基, 即 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基团, 也称作 2'-DMAOE, 如下文实施例所述, 和 2'-二甲氨基乙氧基乙氧基 (本领域也称作 2'-O-二甲氨基乙氧基乙基或 2'-DMAEOE), 即 ' -O-(CH_2)₂-O-(CH_2)₂-N(CH_3)₂。

[0742] 进一步优选的修饰包括锁定核酸 (Locked Nucleic Acid, LNA), 其中 2'-羟基与糖环的 3' 或 4' 碳原子相连, 由此形成双环糖模块。键优选是桥接 2' 氧原子和 4' 碳原子的亚甲基 (methylene) ($-\text{CH}_2-$)_n 基团, 其中 n 是 1 或 2。LNA 及其制备参见 WO 98/39352 和 WO 99/14226。

[0743] 其它优选的修饰包括 2'-甲氧基 (2'- $-\text{O}-\text{CH}_3$), 2'-氨丙氧基 (2'- $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2'-烯丙基 (2'- $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 2'-O-烯丙基 (2'- $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$) 和 2'-氟 (2'-F)。2'-修饰可以在阿拉伯糖 (arabino) (上) 位或核糖 (ribo) (下) 位。优选的 2'-阿拉伯糖修饰是 2'-F。也可在寡核苷酸上的其它位置进行类似的修饰, 特别是 3' 末端核苷酸的糖的 3' 位置或在 2'-5' 连接的寡核苷酸中和 5' 末端核苷酸的 5' 位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物, 诸如用环丁基模块取代呋喃戊糖基 (pentofuranosyl) 糖。教导此类经过修饰的糖结构的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 和 5,700,920, 在此完整收入每一项作为参考。

[0744] 寡核苷酸还可包括核碱基 (本领域内通常简称为“碱基”) 修饰或替代。在用于本文时, “未修饰的” 或 “天然的” 核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤 (A) 和鸟嘌呤 (G), 及嘧啶碱基胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C) 和尿嘧啶 (U)。经过修饰的核碱基包括其它合成的和天然的核碱基, 诸如 5-甲基胞嘧啶 (5-me-C), 5-羟甲基胞嘧啶, 黄嘌呤, 次黄嘌呤, 2-氨基腺嘌呤, 腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基和其它烃基衍生物, 腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其它烃

基衍生物, 2- 硫尿嘧啶, 2- 硫胸腺嘧啶和 2- 硫胞嘧啶, 5- 卤代尿嘧啶和胞嘧啶, 5- 丙炔基 ($-C \equiv C-CH_3$ 或 $-CH_2-C \equiv CH$) 尿嘧啶和胞嘧啶及嘧啶碱基的其它炔基衍生物, 6- 偶氮 (azo) 尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶, 5- 尿嘧啶(假尿嘧啶), 4- 硫尿嘧啶, 8- 卤代、8- 氨基、8- 巯基 (thiol)、8- 硫代烃基 (thioalkyl)、8- 羟基和其它 8- 取代的腺嘌呤和鸟嘌呤, 5- 卤代特别是 5- 溴、5- 三氟甲基和其它 5- 取代的尿嘧啶和胞嘧啶, 7- 甲基鸟嘌呤和 7- 甲基腺嘌呤, 2-F- 腺嘌呤, 2- 氨基 - 腺嘌呤, 8- 氮杂鸟嘌呤和 8- 氮杂腺嘌呤, 7- 脱氮鸟嘌呤和 7- 脱氮腺嘌呤和 3- 脱氮鸟嘌呤和 3- 脱氮腺嘌呤。进一步修饰的核碱基包括三环嘧啶, 诸如吩噻嗪胞苷 (1H- 嘧啶 [5, 4-b] [1, 4] 苯丙噻嗪 -2(3H)- 酮), 吩噻嗪胞苷 (1H- 嘧啶 [5, 4-b] [1, 4] 苯丙噻嗪 -2(3H)- 酮), G- 夹环 (G-clamp) 诸如取代的吩噻嗪胞苷(例如 9-(2- 氨基乙氧基)-H- 嘧啶 [5, 4-b] [1, 4] 苯丙噻嗪 -2(3H)- 酮), 呋唑胞苷 (2H- 嘧啶 [4, 5-b] 呋唑 -2- 酮), 吡啶并呋唑胞苷 (H- 吡啶 [3', 2': 4, 5] 吡咯 [2, 3-d] 嘧啶 -2- 酮)。经修饰的核碱基还可包括那些其中嘌呤或嘧啶碱基用其它杂环, 例如 7- 脱氮 - 腺嘌呤、7- 脱氮鸟嘌呤、2- 氨基吡啶和 2- 吡啶酮取代的核碱基。更多核碱基包括美国专利 3, 687, 808 中公开的那些; The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley&Sons, 1990 中公开的那些; 和 Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613 中公开的那些。这些核碱基中的某些特别可用于提高本发明寡聚化合物的结合亲和力。这些包括 5- 取代的嘧啶, 6- 氮杂嘧啶和 N-2、N-6 和 O-6 取代的嘌呤, 包括 2- 氨基丙基腺嘌呤, 5- 丙炔基尿嘧啶和 5- 丙炔基胞嘧啶。5- 甲基胞嘧啶取代已显示出将核酸双链体的稳定性提高 $0.6-1.2^\circ C$ (Sanghvi et al., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) 而且是优选的碱基取代, 甚至在与 2'-O- 甲氧基乙基糖修饰结合时更加优选。教导经修饰核碱基的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利 3, 687, 808, 以及美国专利 4, 845, 205; 5, 130, 302; 5, 134, 066; 5, 175, 273; 5, 367, 066; 5, 432, 272; 5, 457, 187; 5, 459, 255; 5, 484, 908; 5, 502, 177; 5, 525, 711; 5, 552, 540; 5, 587, 469; 5, 594, 121, 5, 596, 091; 5, 614, 617; 5, 645, 985; 5, 830, 653; 5, 763, 588; 6, 005, 096; 5, 681, 941; 和 5, 750, 692, 在此收入每一项作为参考。

[0745] 与寡核苷酸化学连接的反义寡核苷酸的另一种修饰是提高寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一种或多种模块或偶联物 (conjugate)。本发明的化合物可包含与功能基团诸如伯羟基或仲羟基共价连接的偶联基团 (conjugate group)。本发明的偶联基团包括嵌入剂、报道分子、多胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、提高寡聚体药效学性质的基团、和提高寡聚体药动学性质的基团。典型的偶联基团包括胆固醇、脂质、阳离子脂质、磷脂、阳离子磷脂、生物素、吩噻嗪、叶酸 (folate)、菲啶、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素、和染料。在本发明的内容中, 提高药效学性质的基团包括提高寡聚体摄取、提高寡聚体对降解的抗性、和 / 或增强与 RNA 的序列特异性杂交的基团。在本发明的内容中, 提高药动学性质的基团包括提高寡聚体摄取、分布、代谢或排泄的基团。偶联物模块包括但不限于脂质模块, 诸如胆固醇模块 (Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556), 胆酸 (Manoharan et al., 1994, Bioorg. Med. Chem. Let. 4:1053-1060), 硫醚例如己基 -S- 三苯甲基硫醇 (tritylthiol) (Manoharan et al., 1992, Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:306-309; Manoharan et al., 1993, Bioorg. Med. Chem. Let. 3:2765-2770), 硫代

胆固醇 (Oberhauser et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20:533-538), 脂肪族链例如十二烷二醇或十一烷基残基 (Saison-Behmoaras et al., 1991, EMBO J. 10:1111-1118; Kabanov et al., 1990, FEBS Lett. 259:327-330; Svinarchuk et al., 1993, Biochimie 75:49-54), 磷脂例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基-铵 1,2-二-0-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯 (Manoharan et al., 1995, Tetrahedron Lett. 36:3651-3654; Shea et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18:3777-3783), 多胺或聚乙二醇链 (Manoharan et al., 1995, Nucleosides&Nucleotides 14:969-973), 或醋酸金刚烷 (Manoharan et al., 1995, Tetrahedron Lett. 36:3651-3654), 棕榈基模块 (Mishra et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta 1264:229-237), 或十八烷胺或己氨基-羰基-氧胆固醇模块。本发明的寡核苷酸还可与活性药物物质偶联, 例如阿司匹林 (aspirin)、华法林 (warfarin)、苯基丁氮酮 (phenylbutazone)、布洛芬 (ibuprofen)、舒洛芬 (suprofen)、芬布芬 (fenbufen)、酮洛芬 (ketoprofen)、(S)-(+)-普拉洛芬 (pranoprofen)、卡洛芬 (carprofen)、丹磺酰肌氨酸 (dansylsarcosine)、2,3,5-三碘苯甲酸、氟芬那酸 (flufenamic acid)、亚叶酸 (folinic acid)、苯并噻二嗪 (benzothiadiazide)、氯噻嗪 (chlorothiazide)、二氮草杂~~革~~ (diazepine)、吲哚美辛 (indomethacin)、巴比妥酸盐 (barbiturate)、头孢菌素 (cephalosporin)、磺胺药 (sulfa drug)、抗糖尿病药 (antidiabetic)、抗菌药 (antibacterial) 或抗生素。寡核苷酸-药物偶联物及其制备参见美国系列申请 09/334,130 (1999 年 6 月 15 日提交) 和美国专利 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928; 和 5,688,941, 在此收入每一项作为参考。

[0746] 不必对给定化合物中的所有位置作均一的修饰, 事实上可以在单一化合物中甚至在寡核苷酸内的单一核苷处掺入超过一种上述修饰。本发明还包括作为嵌合化合物的反义化合物。在本发明的内容中, “嵌合的” 反义化合物或 “嵌合物” 指包含两个或多个在化学上不同的区的反义化合物, 特别是寡核苷酸, 每个区由至少一个单体单元构成, 在寡核苷酸化合物的情况中即为核苷酸。这些寡核苷酸通常包含至少一个区, 其中寡核苷酸经过修饰而赋予该寡核苷酸以提高的对核酸酶降解的抗性、提高的细胞摄取、和 / 或提高的对靶核酸的结合亲和力。寡核苷酸的额外区可充当能够切割 RNA:DNA 或 RNA:RNA 杂合物的酶的底物。举例而言, RNA 酶 H 是切割 RNA:DNA 双链体的 RNA 链的细胞内切核酸酶。因此, RNA 酶 H 的活化导致对 RNA 靶物的切割, 由此大大提高寡核苷酸对基因表达的抑制效率。因此, 在使用嵌合寡核苷酸时, 与杂交于相同靶区的硫代磷酸酯脱氧寡核苷酸相比, 用较短的寡核苷酸通常获得相当的结果。本发明的嵌合反义化合物可形成为如上所述的两种或多种寡核苷酸、经修饰的寡核苷酸、寡核苷和 / 或寡核苷酸模拟物的复合结构。优选的嵌合反义寡核苷酸在 3'-末端掺入至少一个 2' 修饰的糖 (优选 $-O-(CH_2)_2-O-CH_3$) 以赋予核酸酶抗性, 及

具有至少 4 个相连 2'-H 糖的区域以赋予 RNA 酶 H 活性。此类化合物在本领域也称为杂合物 (hybrid) 或接合物 (gapmer)。优选的接合物 (gapmer) 在由具有至少 4 个相连 2'-H 糖的至少一个区分隔的 3'-末端和 5'-末端具有 2' 修饰的糖 (优选'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) 的区, 且优选掺入硫代磷酸酯骨架键。教导此类杂合物结构的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利 5,013,830;5,149,797;5,220,007;5,256,775;5,366,878;5,403,711;5,491,133;5,565,350;5,623,065;5,652,355;5,652,356; 和 5,700,922, 在此完整收入每一项作为参考。

[0747] 依照本发明使用的反义化合物可方便且常规的通过众所周知的固相合成技术来制备。有多家销售商销售用于此类合成的设备, 包括例如 Applied Biosystems (Foster City, Calif.)。另外 / 或者, 可采用本领域已知的用于此类合成的任何其它手段。众所周知使用类似技术来制备寡核苷酸, 诸如硫代磷酸酯和烃基化衍生物。本发明的化合物还可与其它分子、分子结构或化合物的混合物混合、胶囊化、偶联或以其它方式关联成例如脂质体, 受体靶向分子, 口服的、直肠的、局部的或其它剂型以帮助摄取、分布和 / 或吸收。教导此类摄取、分布和 / 或吸收辅助剂型的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利 5,108,921;5,354,844;5,416,016;5,459,127;5,521,291;5,543,158;5,547,932;5,583,020;5,591,721;4,426,330;4,534,899;5,013,556;5,108,921;5,213,804;5,227,170;5,264,221;5,356,633;5,395,619;5,416,016;5,417,978;5,462,854;5,469,854;5,512,295;5,527,528;5,534,259;5,543,152;5,556,948;5,580,575; 和 5,595,756, 在此收入每一项作为参考。

[0748] 有义或反义寡核苷酸的其它例子包括那些与有机模块, 诸如 W090/10048 中描述的那些, 及提高寡核苷酸对靶核酸序列的亲力的其它模块, 诸如聚-(L-赖氨酸) 共价连接的寡核苷酸。而且, 嵌入剂, 诸如玫瑰树碱 (ellipticine) 和烷化剂或金属络合物可附着于有义或反义寡核苷酸以调整反义或有义寡核苷酸对靶核苷酸序列的结合特异性。

[0749] 可通过任何基因转移方法将反义或有义寡核苷酸导入包含靶核酸序列的细胞, 包括例如 CaPO₄介导的 DNA 转染、电穿孔、或通过使用基因转移载体诸如埃巴二氏病毒 (Epstein-Barr virus)。在一种优选的流程中, 将反义或有义寡核苷酸插入合适的逆转录病毒载体。使包含靶核酸序列的细胞在体内或回体接触重组逆转录病毒载体。合适的逆转录病毒载体包括但不限于那些衍生自鼠逆转录病毒 M-MuLV 的那些, N2 (衍生自 M-MuLV 的逆转录病毒), 或命名为 DCT5A、DCT5B 和 DCT5C 的双拷贝载体 (见 WO 90/13641)。

[0750] 还可通过与配体结合分子形成偶联物将有义或反义寡核苷酸导入包含靶核苷酸序列的细胞, 如 WO 91/04753 中所述。合适的配体结合分子包括但不限于细胞表面受体、生长因子、其它细胞因子、或结合细胞表面受体的其它配体。优选的是, 与配体结合分子的偶联基本不干扰所述配体结合分子结合其相应分子或受体的能力或者阻断有义或反义寡核苷酸或其偶联物型式进入细胞。

[0751] 或者, 可通过形成寡核苷酸-脂质复合物将有义或反义寡核苷酸导入包含靶核酸序列的细胞, 如 WO 90/10448 中所述。有义或反义寡核苷酸-脂质复合物优选在细胞内由内源脂肪酶解离。

[0752] 反义或有义 RNA 或 DNA 分子的长度通常是至少约 5 个核苷酸, 或者长度为至少约 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40,

45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 或 1000 个核苷酸, 其中在此内容中术语“约”指所述核苷酸序列长度加或减该长度的 10%。

[0753] 还可将探针用于 PCR 技术以产生用于鉴定密切相关的 TAT 编码序列的序列池。

[0754] 编码 TAT 的核苷酸序列还可用于构建杂交探针, 用于给编码该 TAT 的基因作图和用于给患遗传性紊乱的个体作遗传分析。可使用已知技术将本文提供的核苷酸序列定位于染色体和染色体特定区域, 诸如原位杂交、针对已知染色体标志的连锁分析、和筛选文库的杂交。

[0755] 当 TAT 的编码序列编码结合另一种蛋白质的蛋白质时(例如当 TAT 是受体时), 可以在测定法中使用 TAT 以鉴定参与结合相互作用的其它蛋白质或分子。通过此类方法, 可鉴定受体 / 配体结合相互作用的抑制物。参与此类结合相互作用的蛋白质还可用于筛选结合相互作用的肽或小分子抑制物或激动剂。同样, 受体 TAT 还可用于分离相关配体。可设计筛选测定法以发现模拟天然 TAT 或 TAT 受体的生物学活性的领先化合物。此类筛选测定法将包括适应高通量筛选化学文库的测定法, 使它们特别适用于鉴定小分子药物候选物。所设想的小分子包括合成的有机或无机化合物。可以多种形式进行测定法, 包括本领域已经很好表征的蛋白质 - 蛋白质结合测定法、生物化学筛选测定法、免疫测定法和基于细胞的测定法。

[0756] 编码 TAT 的核酸或其修饰形式还可用于生成转基因动物或“敲除”动物, 它们继而可用于开发和筛选治疗上有用的试剂。转基因动物(例如小鼠或大鼠)指具有包含转基因的细胞的动物, 其中将转基因导入动物或产前的动物前体(ancestor), 例如胚胎阶段。转基因指整合到发育成转基因动物的细胞的基因组中的 DNA。在一个实施方案中, 可依照已建立的技术用编码 TAT 的 cDNA 克隆编码 TAT 的基因组 DNA, 并将该基因组序列用于生成转基因动物, 所述转基因动物包含表达编码 TAT 的 DNA 的细胞。用于生成转基因动物, 特别是诸如小鼠或大鼠等动物的方法在本领域已经是常规的, 参见例如美国专利 4, 736, 866 和 4, 870, 009。通常, 用组织特异性增强子使 TAT 转基因的掺入靶向特定细胞。包含在胚胎阶段导入动物种系的编码 TAT 的转基因拷贝的转基因动物可用于检验编码 TAT 的 DNA 表达提高的效果。此类动物可作为测试动物用于测试认为针对例如与其过表达有关的病理状况赋予保护的试剂。依照本发明的这个方面, 用制剂治疗动物, 与携带转基因的未处理动物相比病理状况的发病率下降将表明对该病理状况的潜在治疗性干预。

[0757] 或者, TAT 的非人同源物可用于构建 TAT “敲除”动物, 它由于编码 TAT 的内源基因和导入该动物胚胎干细胞的改变的编码 TAT 的基因组 DNA 之间同源重组而具有缺陷的或改变的编码 TAT 的基因。例如, 编码 TAT 的 cDNA 可依照已建立的技术用于克隆编码 TAT 的基因组 DNA。可以将编码 TAT 的基因组 DNA 的一部分删除或用另一基因替代, 所述另一基因诸如可用于监测整合的、编码选择标志的基因。通常, 载体中包含数千碱基未改变的侧翼 DNA (5' 和 3' 末端都有)(关于同源重组载体的描述参见例如 Thomas

andCapecchi, 1987, Cell 51:503)。将载体导入胚胎干细胞系(例如通过电穿孔),并选择其中所导入DNA与内源DNA发生同源重组的细胞(参见例如Li et al., 1992, Cell 69:915)。然后将所选细胞注射到动物(例如小鼠或大鼠)的胚泡中以形成聚集嵌合体(参见例如Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152)。然后可将嵌合胚植入合适的假孕雌性代孕动物,并使胚胎足月产生“敲除”动物。在其生殖细胞中包含同源重组DNA的后代可通过标准技术鉴定,并用于繁殖其中动物的所有细胞都包含同源重组DNA的动物。敲除动物可以根据例如由于缺乏TAT多肽而具有抵御某些病理状况的能力和形成了病理状况而得到鉴定。

[0758] 编码TAT多肽的核酸还可用于基因疗法。在基因疗法应用中,将基因导入细胞以实现治疗上有效的基因产物的体内合成,例如用于替代缺陷基因。“基因疗法”包括常规基因疗法和施用基因治疗剂两种,前者通过一次处理获得持续的效果,后者涉及一次或反复施用治疗上有效的DNA或mRNA。反义RNA和DNA可作为治疗剂用于在体内阻断某些基因的表达。已经显示可以将短反义寡核苷酸输入它们在其中起抑制剂作用的细胞,尽管由于细胞膜对它们的摄取有限,因而它们的胞内浓度低(Zamecnik et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146)。可以修饰寡核苷酸以提高它们的摄取,例如通过用不带电荷的基团取代它们带负电荷的磷酸二酯基团。

[0759] 有多种技术可用于将核酸导入活细胞。这些技术根据是将核酸转移到体外的培养细胞中,还是体内的预期宿主的细胞中而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖苷、磷酸钙沉淀法等。目前优选的体内基因转移技术包括使用病毒(通常是逆转录病毒)载体的转染和病毒外壳蛋白-脂质体介导的转染(Dzau et al., 1993, Trends in Biotechnology 11:205-210)。在有些情况中,期望与靶向靶细胞的试剂一起提供核酸来源,所述试剂诸如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异的抗体、靶细胞上受体的配体等。在采用脂质体时,结合与胞吞有关的细胞表面膜蛋白的蛋白质可用于靶向和/或促进摄取,例如对特定细胞类型有向性的衣壳蛋白或其片段、在循环中经历内化的蛋白质的抗体、靶向胞内定位并增强胞内半衰期的蛋白质。受体介导的胞吞的技术参见例如Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432; 和Wagner et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414。关于基因标记和基因疗法方案的综述见Anderson et al., 1992, Science 256:808-813。

[0760] 本文所述编码TAT多肽的核酸分子或其片段可用于染色体鉴定。在这点上,鉴定新染色体标志的需求在增加,因为根据实际的序列数据,现在只有相对较少的染色体标记试剂可用。本发明的每种TAT核酸分子都可用作染色体标志。

[0761] 本发明的TAT多肽和核酸分子还可在诊断上用于组织分型,其中本发明的TAT多肽可能在一种组织中与另一种组织相比,优选在患病组织中与相同组织类型的正常组织相比差异表达。TAT核酸分子可用于生成探针,用于PCR、Northern分析、Southern分析、和Western分析。

[0762] 本发明涵盖筛选化合物以鉴定那些模拟TAT多肽(激动剂)或阻止TAT多肽产生效果(拮抗剂)的化合物的方法。用于拮抗剂药物候选物的筛选测定法设计成鉴定与本文鉴定的基因所编码的TAT多肽结合或复合,或者以其它方式干扰所编码多肽与其它细胞蛋

白质相互作用的化合物,包括例如抑制细胞表达 TAT 多肽。此类筛选测定法包括适应高通量筛选化学文库的测定法,使得它们特别适用于鉴定小分子药物候选物。

[0763] 可以多种形式进行测定法,包括本领域已经完善的蛋白质-蛋白质结合测定法、生物化学筛选测定法、免疫测定法和基于细胞的测定法。

[0764] 用于拮抗剂的所有测定法的共同之处在于它们需要使药物候选物接触本文鉴定的核酸所编码的 TAT 多肽,其条件和时间足以使这两种组分相互作用。

[0765] 在结合测定法中,相互作用指结合,所形成的复合物可在反应混合物中分离或检测。在一个具体的实施方案中,将本文鉴定的基因所编码的 TAT 多肽或药物候选物通过共价或非共价附着固定在固相上,例如微量滴定板上。非共价附着通常通过用 TAT 多肽溶液包被固相表面并干燥来实现。或者,对待固定的 TAT 多肽特异的固定化抗体例如单克隆抗体可用于将它锚定到固相表面上。测定法如下进行,将可以用可检测标记物标记的非固定化组分加到固定化组分例如包含锚定组分的包被表面上。在反应完成时,例如通过清洗除去未反应的组分,并检测锚定到固相表面上的复合物。若最初的非固定化组分携带可检测标记物,检测出固定到表面上的标记物表明发生了复合作用。若最初的非固定化组分不携带标记物,可例如通过使用特异性结合已固定复合物的标记抗体来检测复合作用。

[0766] 如果候选化合物与本文鉴定的基因所编码的特定 TAT 多肽相互作用但不结合,那么它与该多肽的相互作用可通过用于检测蛋白质-蛋白质相互作用的公知方法来测定。此类测定法包括传统方法,诸如例如交联、免疫共沉淀、和通过梯度或层析柱的共纯化。另外,可以如 Chevray and Nathans, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5789-5793 所公开的,使用 Fields 及其同事 (Fields and Song, 1989, Nature (London) 340:245-246; Chien et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582) 描述的基于酵母的遗传系统来监测蛋白质-蛋白质相互作用。许多转录激活物,诸如酵母 GAL4,由两个空间上离散的模块结构域组成,一个起 DNA 结合结构域的作用,另一个起转录激活结构域的功能。上述出版物中描述的酵母表达系统(通称为“双杂交系统”)利用了此特性,采用两种杂合蛋白质,在一个中将靶蛋白质与 GAL4 的 DNA 结合结构域融合,而在另一个中将候选激活蛋白质与激活结构域融合。GAL1-lacZ 报道基因在 GAL4 激活的启动子控制下的表达依赖于 GAL4 活性经由蛋白质-蛋白质相互作用的重建。用 β -半乳糖苷酶的显色底物检测包含相互作用多肽的菌落。使用双杂交技术鉴定两种特定蛋白质之间的蛋白质-蛋白质相互作用的完整试剂盒 (MATCHMAKER™) 可从 Clontech 购买。此系统还可延伸到对参与特定蛋白质相互作用的蛋白质结构域的作图以及指出对这些相互作用至关重要的氨基酸残基。

[0767] 干扰本文鉴定的基因所编码的 TAT 多肽与其它胞内或胞外组分相互作用的化合物可如下测试:通常在足以使两种产物相互作用和结合的条件和时间条件下制备包含基因产物及胞内或胞外组分的反应混合物。为了测试候选化合物抑制结合的能力,在缺乏和存在测试化合物时进行反应。另外,可以向第三份反应混合物中加入安慰剂,作为阳性对照。如上所述监测混合物中存在的 TAT 多肽和胞内或胞外组分之间的结合(复合物形成)。对照反应物中形成复合物但含有测试化合物的反应混合物中没有形成复合物表明,测试化合物干扰 TAT 多肽与其反应配偶体的相互作用。

[0768] 为了测定拮抗剂,可将 TAT 多肽与要筛选特定活性的化合物一起加到细胞中,在存在 TAT 多肽时该化合物抑制目的活性的能力表明,该化合物是 TAT 多肽的拮抗剂。或

者,可如下检测拮抗剂,将 TAT 多肽和潜在的拮抗剂与膜结合的 TAT 多肽受体或重组受体在适于竞争性抑制测定法的条件下组合。TAT 多肽可进行标记,诸如通过放射性标记,使得与受体结合的 TAT 多肽分子的数目可用于测定潜在拮抗剂的效力。编码受体的基因可通过本领域技术人员知道的多种方法来鉴定,例如配体淘选和 FACS 分选。Coligan et al., 1991, Current Protocols in Immun. 1(2):Chapter 5。优选的是,采用表达克隆,其中从对 TAT 多肽有响应的细胞制备多腺苷酸化 RNA,将从此 RNA 构建的 cDNA 文库分成几个集合,并用于转染 COS 细胞或对 TAT 多肽没有响应的其它细胞。使在载玻片上培养的转染细胞暴露于经过标记的 TAT 多肽。可通过多种手段来标记 TAT 多肽,包括碘化或包含位点特异性蛋白质激酶的识别位点。固定和温育后,将载玻片进行放射自显影分析。鉴定阳性集合,制备子集,并用相互作用的子集进行再次转染和再次筛选过程,最后产生编码推定受体的单个克隆。

[0769] 作为受体鉴定的备选方法,可使经标记的 TAT 多肽与表达受体分子的细胞膜或提取制备物光亲和性相连。通过 PAGE 解析交联物质并对 X-射线胶片曝光。可切下包含受体的标记复合物,解离成肽片段,并进行蛋白质微量测序。从微量测序获得的氨基酸序列可用于设计一组简并寡核苷酸探针,用于筛选 cDNA 文库以鉴定编码推定受体的基因。

[0770] 在用于拮抗剂的另一种测定法中,在存在候选化合物时将表达受体的哺乳动物细胞或膜制备物与经过标记的 TAT 多肽一起温育。然后测量所述化合物增强或阻断此相互作用的能力。

[0771] 潜在拮抗剂的更具体的例子包括结合免疫球蛋白与 TAT 多肽的融合物的多肽,特别是抗体,包括但不限于多克隆和单克隆抗体及抗体片段,单链抗体,抗独特型抗体,和嵌合的或人源化型式的此类抗体或片段,以及人抗体和抗体片段。或者,潜在的拮抗剂可以是密切相关的蛋白质,例如识别受体但不起作用,由此竞争性抑制 TAT 多肽的作用的突变形式的 TAT 多肽。

[0772] 另一种潜在的 TAT 多肽拮抗剂是使用反义技术制备的反义 RNA 或 DNA 构建物,其中例如反义 RNA 或 DNA 分子通过与靶 mRNA 杂交并防止蛋白质翻译来起直接阻断 mRNA 翻译的作用。反义技术可用于通过与反义 DNA 或 RNA 形成三股螺旋来控制基因表达,二者都基于多核苷酸与 DNA 或 RNA 的结合。例如,将编码本文成熟 TAT 多肽的多核苷酸序列的 5' 编码部分用于设计长度为约 10-40 个碱基对的反义 RNA 寡核苷酸。将 DNA 寡核苷酸设计成与基因中参与转录的区互补(三股螺旋-参见 Lee et al., 1979, Nucl. Acids Res. 6:3073; Cooney et al., 1988, Science 241:456; Dervan et al., 1991, Science 251:1360),由此防止转录和产生 TAT 多肽。反义 RNA 寡核苷酸与 mRNA 在体内杂交并阻断 mRNA 分子翻译成为 TAT 多肽(反义 -Okano, 1991, Neurochem. 56:560; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)。上述寡核苷酸还可递送至细胞,使得反义 RNA 或 DNA 可在体内表达以抑制 TAT 多肽的生成。在使用反义 DNA 时,优选衍生自靶基因核苷酸序列的翻译起始位点(例如约 -10 到 +10 位置之间)的寡脱氧核糖核苷酸。

[0773] 潜在的拮抗剂包括结合 TAT 多肽的活性位点、受体结合位点、或生长因子或其它相关结合位点,由此阻断 TAT 多肽的正常生物学活性的小分子。小分子的例子包括但不限于小肽或肽样分子,优选可溶性肽,和合成的非肽基有机或无机化合物。

[0774] 核酶是能够催化对 RNA 的特异性切割的酶性 RNA 分子。核酶通过与互补靶 RNA 发生序列特异性杂交,随后进行内切核酸水解 (endonucleolytic) 切割来起作用。可通过已知技术来鉴定潜在 RNA 靶物内的特定核酶切割位点。更多细节参见例如 Rossi, 1994, *Current Biology* 4:469-471 和 PCT 公开号 W097/33551 (1997 年 9 月 18 日公开)。

[0775] 用于抑制转录的三股螺旋结构中的核酸分子应当是单链的且由脱氧核苷酸组成。设计这些寡核苷酸的碱基组成,使得它通过 Hoogsteen 碱基配对原则促进三股螺旋形成,这通常需要在双链体的一条链上有大段嘌呤或嘧啶。更多细节参见例如 PCT 公开号 W097/33551, 见上文。

[0776] 这些小分子可通过上文讨论的一种或多种筛选测定法和 / 或通过本领域技术人员公知的任何其它筛选技术来鉴定。

[0777] 分离的编码 TAT 多肽的核酸在本文中可用于使用本领域公知的技术且如本文所述来重组生成 TAT 多肽。继而,所生成的 TAT 多肽可用于使用本领域公知的技术且如本文所述来生成抗 TAT 抗体。

[0778] 本文鉴定的特异性结合 TAT 多肽的抗体以及通过上文公开的筛选测定法鉴定的其它分子可以以药用组合物的形式施用,用于治疗多种紊乱(病症),包括癌症。

[0779] 如果 TAT 多肽在胞内,而且使用完整抗体作为抑制剂,那么优选使抗体内化。然而,还可以用脂转染或脂质体将抗体或抗体片段递送到细胞中。在使用抗体片段时,优选特异性结合靶蛋白质的结合结构域的最小抑制性片段。例如,根据抗体的可变区序列,可以设计保留与靶蛋白质序列结合能力的肽分子。此类肽可以化学合成和 / 或通过重组 DNA 技术生成。参见例如 Marasco et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893。

[0780] 本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的一种以上的活性化合物,优选那些活性互补且彼此没有不利影响的。或者 / 另外,所述组合物还可包含增强其功能的药剂,诸如例如细胞毒剂、细胞因子、化疗剂、或生长抑制剂。合适的是,此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

[0781] 提供下列实施例仅仅为了例示目的,而非意图以任何方式限制本发明的范围。

[0782] 在此完整收入本说明书中引用的所有专利和文献作为参考。

实施例

[0783] 实施例 1 :使用 **GeneExpress®** 绘制组织表达图谱

[0784] 分析包含基因表达信息的私有数据库 (**GeneExpress®**, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD), 试图鉴定其表达在特定目的人肿瘤组织中较之其它人肿瘤和 / 或正常人组织显著且可检测地上调的多肽(及其编码核酸)。具体而言,使用可通过 Gene Logic 公司 (Gaithersburg, MD) 获得的、与 **GeneExpress®** 数据库一起使用的软件或 Genentech 公司编写和开发的、与 **GeneExpress®** 数据库一起使用的私有软件进行 **GeneExpress®** 数据库的分析。分析中阳性命中的评估基于若干标准,包括例如组织特异性、肿瘤特异性、及正常的基础组织和 / 或正常的增殖组织中的表达水平。使用这种 mRNA 表达分析,确定了编码 TAT419 多肽的 mRNA 在人黑素瘤组织中较之相应的正常人皮肤组织有显著、可再现且可检测地过表达。

[0785] 实施例 2:原位杂交

[0786] 原位杂交是用于细胞或组织制备物内核酸序列检测和定位的有力且通用的技术。它可用于例如鉴定基因表达的部位,分析转录的组织分布,鉴定和定位病毒感染,跟踪特定 mRNA 合成的变化,及帮助染色体作图。

[0787] 原位杂交遵循 Lu and Gillett, Cell Vision 1:169-176(1994) 中的优化版本方案进行,使用 PCR 生成的 ^{33}P 标记核糖核酸探针 (riboprobe)。简而言之,将甲醛固定、石蜡包埋的人组织切片,脱石蜡,在蛋白酶 K (20g/ml) 中于 37°C 除蛋白质 15 分钟,并如 Lu and Gillett, 同上所述进一步处理以进行原位杂交。从 PCR 产物生成 ^{33}P -UTP 标记的反义核糖核酸探针,并于 55°C 杂交过夜。将载玻片浸入 Kodak NTB2 核示踪乳液 (nuclear track emulsion) 并曝光 4 周。

[0788] ^{33}P -核糖核酸探针合成

[0789] 将 $6.0\mu\text{l}$ (125mCi) ^{33}P -UTP (Amersham BF 1002, SA<2000Ci/mmol) 快速真空干燥。向含干燥 ^{33}P -UTP 的每个管中加入以下成分: $2.0\mu\text{l}$ 5x 转录缓冲液, $1.0\mu\text{l}$ DTT (100mM), $2.0\mu\text{l}$ NTP 混合物 (2.5mM: $10\mu\text{l}$ 每种 10mM GTP, CTP&ATP+ $10\mu\text{l}$ H_2O), $1.0\mu\text{l}$ UTP (50 μM), $1.0\mu\text{l}$ Rnasin, $1.0\mu\text{l}$ DNA 模板 (1 μg), $1.0\mu\text{l}$ H_2O , $1.0\mu\text{l}$ RNA 聚合酶 (对于 PCR 产物,经常是 T3=AS, T7=S)。将管于 37°C 温育 1 小时。加入 $1.0\mu\text{l}$ RQ1DNA 酶,然后于 37°C 温育 15 分钟。加入 $90\mu\text{l}$ TE (10mM Tris pH 7.6/1mM EDTA pH 8.0), 将混合液转移到 DE81 纸上。将剩余溶液加到 Microcon-50 超滤单元中,用程序 10 旋转 (6 分钟)。将过滤单元倒置在第二个管上,并用程序 2 旋转 (3 分钟)。在最后的旋转回收后,加入 $100\mu\text{l}$ TE。将 $1\mu\text{l}$ 终产物转移到 DE81 纸上,并在 6ml Biofluor II 中计数。

[0790] 将探针在 TBE/尿素凝胶上电泳。将 $1-3\mu\text{l}$ 探针或 $5\mu\text{l}$ RNA Mrk III 加到 $3\mu\text{l}$ 上样缓冲液中。在 95°C 加热块上加热 3 分钟后,将探针立即置于冰上。冲洗凝胶孔,加入样品,并在 180-250 伏特电泳 45 分钟。将凝胶包裹在 saran 包装纸中,并在 -70°C 冷柜中用增光屏对 XAR 胶片曝光 1 小时至过夜。

[0791] ^{33}P -杂交

[0792] A. 冷冻切片的预处理

[0793] 从冷柜中取出载玻片,放在铝盘上,并于室温融化 5 分钟。将盘在 55°C 温箱中放置 5 分钟以减少冷凝 (condensation)。将载玻片在通风橱中在冰上在 4% 低聚甲醛中固定 10 分钟,并在 0.5x SSC (25ml 20x SSC+975ml SQ H_2O) 中于室温清洗 5 分钟。在 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K (12.5 μl 10mg/ml 储液在 250ml 预热的无 RNA 酶的 RNA 酶缓冲液中稀释) 于 37°C 除蛋白质 10 分钟后,将切片在 0.5x SSC 中于室温清洗 10 分钟。将切片在 70%、95%、100% 乙醇中脱水,每次 2 分钟。

[0794] B. 石蜡包埋切片的预处理

[0795] 将载玻片脱石蜡,放置在 SQ H_2O 中,并在 2x SSC 中于室温漂洗两次,每次 5 分钟。将人胚胎或甲醛组织的切片在 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K (500 μl 10mg/ml 在 250ml 无 RNA 酶的 RNA 酶缓冲液中稀释, 37°C 15 分钟) 或 8x 蛋白酶 K (100 μl 在 250ml RNA 酶缓冲液中稀释, 37°C 30 分钟) 中除蛋白质。随后在 0.5x SSC 中漂洗,并如上所述进行脱水。

[0796] C. 预杂交

[0797] 将载玻片放置在衬有 Box 缓冲液 (4x SSC, 50% 甲酰胺) 所饱和的滤纸的塑料盒中。

[0798] D. 杂交

[0799] 将每个载玻片的 1.0×10^6 cpm 探针和 $1.0 \mu\text{l}$ tRNA (50mg/ml 储液) 于 95°C 加热 3 分钟。将载玻片在冰上冷却, 每个载玻片加 $48 \mu\text{l}$ 杂交缓冲液。漩涡振荡后, 向载玻片上的 $50 \mu\text{l}$ 预杂交液中加入 $50 \mu\text{l}$ ^{33}P 混合液。将载玻片于 55°C 温育过夜。

[0800] E. 清洗

[0801] 用 $2\times$ SSC, EDTA (400ml $20\times$ SSC+16ml 0.25M EDTA, $V_f=4\text{L}$) 于室温进行 2 次 10 分钟清洗, 随后于 37°C 用 RNA 酶 A ($500 \mu\text{l}$ 10mg/ml 在 250ml RNA 酶缓冲液中稀释 $=20 \mu\text{g/ml}$) 处理 30 分钟。将载玻片用 $2\times$ SSC, EDTA 于室温清洗 2 次 10 分钟。严格清洗条件如下: 55°C , $0.1\times$ SSC, EDTA (20ml $20\times$ SSC+16ml EDTA, $V_f=4\text{L}$), 2 小时。

[0802] F. 寡核苷酸

[0803] 对本文所公开的多种 DNA 序列进行原位分析。获取用于这些分析的寡核苷酸使其与附图所示核酸(或其互补序列)互补。

[0804] G. 结果

[0805] 对于 TAT419, 在大多数测试的正常组织中观察到弱表达或观察不到表达。相反, 在大多数测试的人黑素瘤细胞和组织中观察到强且定量可再现的 TAT419 表达。

[0806] 实施例 3: 为检测癌性肿瘤中 TAT 多肽的上调而进行的微阵列分析

[0807] 常常包含数以千计的基因序列的核酸微阵列可用于鉴定患病组织中较之其正常对应物差异表达的基因。为了使用核酸微阵列, 将来自测试和对照组织样品的测试和对照 mRNA 样品逆转录并标记以产生 cDNA 探针。然后将 cDNA 探针与固定在固相支持物上的核酸阵列杂交。阵列的设置使得阵列各成员的序列和位置是已知的。例如, 可将已知在某些疾病状态表达的基因选集排列到固相支持物上。标记探针与特定阵列成员的杂交指示衍生该探针的样品表达该基因。若来自测试(疾病组织)样品的探针的杂交信号大于来自对照(正常组织)样品的探针的杂交信号, 则在疾病组织中过表达的一种或多种基因得到鉴定。此结果的意义是在患病组织中过表达的蛋白质不仅可用作疾病状况存在的诊断标志物, 而且可用作疾病状况治疗的治疗靶。

[0808] 核酸杂交和微阵列技术的方法学是本领域众所周知的。在本实施例中, 用于杂交的核酸和探针的特定制备物、载玻片和杂交条件都详细描述于 2001 年 3 月 30 日提交的 PCT 专利申请流水号 PCT/US01/10482, 在此收入作为参考。

[0809] 在本实施例中, 对衍生自多种人组织的癌性肿瘤研究其相对于来自不同组织类型的癌性肿瘤和 / 或非癌性人组织上调的基因表达, 试图鉴定那些在特定癌性肿瘤中过表达的多肽。在某些实验中, 获取同一组织类型(常常来自同一患者)的癌性人肿瘤组织和非癌性人肿瘤组织并分析 TAT 多肽表达。另外, 获取来自多种不同人肿瘤中任一种的癌性人肿瘤组织并与通过合并上皮起源(包括肝、肾和肺)的非癌性人组织制备的“普遍的”上皮对照样品进行比较。从合并的上皮组织分离的 mRNA 代表来自各种不同上皮组织的所表达基因产物的混合物, 由此提供卓越的阴性对照, 对其可定量比较上皮起源的肿瘤中的基因表达水平。使用合并对照样品的微阵列杂交实验在双色分析中产生线性曲线图。然后用双色分析中产生的线的斜率标准化后的各次实验中的比率(测试: 对照检测)。然后将各次实验的标准化比率进行比较并用于鉴定基因表达的聚簇。因此, 合并的“普遍对照”样品不仅容许在简单的两样品比较中进行有效的相对基因表达判定, 它还容许进行若干实验之间的多样

品比较。

[0810] 在本实验中,使用来自本文所述 TAT 多肽编码核酸序列的核酸探针创建微阵列并使用来自多种肿瘤组织的 RNA 与其杂交。将基于标准化后的比率:实验比率的数值指定为“截留比率”。只有此截留比率以上的数值判定为是显著的。根据与每次实验有关的噪声或散射的量评估比率的显著性,但是通常使用 1.8 倍—2 倍或更大的比率截留来鉴定在肿瘤样品中较之相应的正常组织和 / 或合并的正常上皮普遍对照相对过表达的候选基因。以这种方式鉴定为在肿瘤样品中相对过表达的基因的比率在 2 倍—40 倍或甚至更大范围间变化。通过比较,在以每种颜色标记同一 RNA 并与自身杂交的对照实验中,事实上所有基因的信号超过背景,观察到的比率显著小于 1.8 倍。这表明超过 1.8 倍比率的实验噪声是极低的,而且观察到的 1.8 倍或更大的倍数变化是预计代表所分析和所比较的样品间真实的、可检测的且可再现的表达差异。

[0811] 来自这些实验的数据证明了 TAT419 多肽在人黑素瘤肿瘤组织及衍生细胞系中较之正常对应人组织或细胞和 / 或合并的正常上皮对照组织二者都有显著的、可检测的和可再现的过表达。如上所述,这些数据证明了本发明的 TAT419 多肽不仅可用作人体中一种或多种癌性肿瘤存在的诊断标志物,而且还可用作治疗那些过表达 TAT419 多肽的癌性肿瘤的治疗靶。

[0812] 实施例 4:结合 TAT419 多肽的抗体的制备

[0813] 此实施例例示了能特异性结合 TAT419 的单克隆抗体的制备。

[0814] 用于生成单克隆抗体的技术是本领域已知的,且描述于例如 Goding, 同上。可采用的免疫原包括纯化的 TAT、含 TAT 的融合蛋白、和在细胞表面上表达重组 TAT 的细胞。熟练技术人员无需过度实验就可做出免疫原的选择。

[0815] 使用在完全弗氏佐剂中乳化的 TAT 免疫原通过 1-100 微克量的皮下或腹膜内注射免疫小鼠诸如 Balb/c。或者,将免疫原在 MPL-TDM 佐剂(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)中乳化并注射到动物的后爪垫中。10 至 12 天后用在选定佐剂中乳化的追加免疫原对已免疫小鼠进行加强免疫。此后,持续数周,还可通过追加免疫注射对小鼠进行加强免疫。可通过眼窝后放血定期从小鼠获取血清样品,用于在 ELISA 测定法中测试以检测抗 TAT 抗体。

[0816] 在检测到合适的抗体滴度后,抗体呈“阳性”的动物可进行最后的 TAT 静脉内注射。3 至 4 天后,处死小鼠并收获脾细胞。然后将脾细胞与选定的鼠骨髓瘤细胞系融合(使用 35% 聚乙二醇),诸如 P3X63AgU. 1,可从 ATCC, No. CRL 1597 获取。融合产生杂交瘤细胞,然后可分配到 96 孔组织培养板中,其中装有 HAT (次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷)培养基以抑制未融合细胞、骨髓瘤杂合体 and 脾细胞杂合体的增殖。

[0817] 根据对 TAT 的反应性在 ELISA 中对杂交瘤细胞进行筛选。分泌针对 TAT 的期望单克隆抗体的“阳性”杂交瘤细胞的确定在本领域技术范围内。

[0818] 阳性杂交瘤细胞可腹膜内注射到同基因 Balb/c 小鼠中以生成含有抗 TAT 单克隆抗体的腹水。或者,可在组织培养瓶或滚瓶中培养杂交瘤细胞。腹水中生成的单克隆抗体的纯化可使用硫酸胺沉淀后续凝胶排阻层析来完成。或者,可采用基于抗体与蛋白 A 或蛋白 G 结合的亲和层析。

[0819] 使用上文所述技术,产生了多种分开的且不同的杂交瘤细胞系,每一种都产生了

结合 TAT419 多肽的单克隆抗体。使用众所周知的且常规采用的技术,诸如 Western 印迹、ELISA 分析、表达 TAT419 多肽的细胞的 FACS 分选分析(经转染在细胞表面上表达 TAT419 多肽的细胞和某些表达 TAT419 多肽的人黑素瘤肿瘤细胞系二者)和 / 或免疫组织化学分析,由这些杂交瘤系产生的单克隆抗体是功能性的,即它们显示出结合 TAT419 多肽。

[0820] 实施例 5 :抗 TAT419 鼠单克隆抗体 5E9 的轻链和重链(及可变轻链和可变重链)的分子克隆

[0821] 如上所述生成的抗 TAT419 鼠单克隆抗体之一在本文中称作 5E9。此实施例演示了编码鼠抗 TAT419 单克隆抗体 5E9 可变区的 cDNA 分子的制备。正向 PCR 引物设计成它们对编码鼠单克隆抗体 5E9VL 和 VH 区核苷酸序列开头的 mRNA 特异。正向引物设计成头 8-9 个 N 端氨基酸的大部分可能的密码子会与 PCR 引物杂交。

[0822] 连同上文寡核苷酸引物使用表达抗 TAT419 鼠单克隆抗体的杂交瘤细胞作为抗体 mRNA 的来源。使用 Chomczynski and Sacchi 1987 Anal. Biochem. 162:156 记载的规程自 1×10^8 个细胞分离总 RNA。使用 RT-PCR 用上文简并 N 端引物连同设计成与轻链恒定域 (CL) 和重链恒定域 1 (CH1) 中在物种间高度保守的一个区域退火的反向引物扩增轻链可变域 (VL) 和重链可变域 (VH)。

[0823] 正向引物对 VL 和 VH 区的 N 端氨基酸序列特异。LC 和 HC 反向引物设计成分别与轻链恒定域 (CL) 和重链恒定域 1 (CH1) 中在物种间高度保守的一个区域退火。使用常规测序方法测定插入物的多核苷酸序列。鼠 5E9 单克隆抗体的全长轻链 (SEQ ID NO:3) 和全长重链 (SEQ ID NO:4) 序列分别显示于图 3 和 4。鼠 5E9 单克隆抗体的 VL (SEQ ID NO:5) 和 VH (SEQ ID NO:6) 氨基酸序列分别显示于图 3 和 4。对这些氨基酸序列的进一步表征显示了鼠抗 TAT419 5E9 单克隆抗体的各个 CDR 区的下述氨基酸序列:CDR-L1 (KSSQSLDSDGKTYLN, SEQ ID NO:7), CDR-L2 (LVSKLDS, SEQ ID NO:8), CDR-L3 (WQGTHFPYT; SEQ ID NO:9), CDR-H1 (GYTFTSYWMQ; SEQ ID NO:10), CDR-H2 (TIYPGDGDTSYAQKFKG; SEQ ID NO:11), 和 CDR-H3 (WGYAYDIDN; SEQ ID NO:12)。

[0824] 随后将扩增的抗体轻链和重链 VL 和 VH cDNA 克隆入 pRK 哺乳动物细胞表达载体 (Shields et al 2000 J. Biol. Chem. 276:659-604)。使用 EcoRV 和 KpnI 的位点将扩增的可变轻链 VL cDNA 克隆入含有人卡帕恒定域的 pRK 哺乳动物细胞表达载体 (pRK. LPG3. HumanKappa; Genentech, South San Francisco, CA)。使用 BsiWI 和 ApaI 的位点将扩增可变重链 VH cDNA 插入编码全长人 IgG1 恒定域的 pRK 哺乳动物细胞表达载体 (pRK. LPG4. HumanHC; Genentech)。

[0825] 实施例 6 :免疫组化分析

[0826] 如上所述制备针对 TAT419 多肽的抗体,并如下用于免疫组化分析。首先将组织切片在丙酮 / 乙醇中固定 5 分钟(冰冻或石蜡包埋的)。然后在 PBS 中清洗切片,随后用亲合素和生物素 (Vector 试剂盒) 封闭 10 分钟,每次封闭后在 PBS 中清洗。然后将切片用 10% 血清封闭 20 分钟,随后吸干以去除过量溶液。然后将一抗以 $10 \mu\text{g/ml}$ 的浓度加到切片上达 1 小时,随后在 PBS 中清洗切片。然后将生物素化的二抗(抗一抗)加到切片上达 30 分钟,随后在 PBS 中清洗切片。然后将切片暴露于 Vector 试剂盒的试剂达 30 分钟,随后在 PBS 中清洗切片。然后将切片暴露于二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine) (Pierce) 达 5 分钟,随后在 PBS 中清洗。然后将切片用 Mayers 苏木精复染,盖上盖玻片并观察。免疫组化分析

还可如 Sambrook et al., 《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 和 Ausubel et al., 《Current Protocols of Molecular Biology》, Unit 3.16, John Wiley and Sons 1997 中所述进行。

[0827] 来自这些分析的结果证明了这些分析中采用的单克隆抗体在大约 90% 测试的所有独立原代人黑素瘤癌症样品中鉴定出可观察的 TAT419 表达, 其中它们中大约 65% 显示出中等 (2+) 到高 (3+) 的 TAT419 多肽表达。

[0828] 实施例 7: 鼠单克隆抗体的人源化

[0829] 此实施例证明了将针对 TAT419 的鼠抗体 5E9 的方法的适用性。

[0830] TAT419 的胞外域在大肠杆菌 (不糖基化的) 中及作为免疫粘附素 (Fc 融合物) 在 CHO (糖基化的) 细胞中表达并通过常规手段纯化。表达抗体 5E9 的鼠杂交瘤通过用自大肠杆菌衍生的重组 TAT419 胞外域免疫小鼠获得并通过 ELISA 中其结合 TAT419 包被板的能力鉴定。

[0831] 鼠 5E9 可变域的克隆

[0832] 使用标准方法从生成 5E9 的杂交瘤细胞提取总 RNA。用对重链和轻链的简并引物通过 RT-PCR 扩增轻链可变域 (VL) 和重链可变域 (VH)。正向引物对 VL 和 VH 区的 N 端氨基酸序列特异。LC 和 HC 反向引物分别设计成与轻链恒定域 (CL) 和重链第一恒定域 (CH1) (它们在物种间高度保守) 中的区域退火。使用常规测序方法测定目的多核苷酸序列。

[0833] 高变区直接移植到受体人共有框架上

[0834] 用于此项工作的噬菌粒是单价 Fab-g3 展示载体, 其由单个 phoA 启动子控制下的两个可读框组成。第一个可读框由 stII 信号序列及与其融合的受体轻链的 VL 和 CH1 结构域组成, 第二个可读框由 stII 信号序列及与其融合的受体重链 VH 和 CH1 结构域及之后的噬菌体次要外壳蛋白 P3 组成。

[0835] 将来自鼠 5E9 的 VL 和 VH 结构域与人 VL κ I (huKI) 和人 VH 亚组 III (huIII) 共有序列进行比对。为生成 CDR 移植物, 将来自 5E9 的高变区移植到 huKI 和 huIII 共有受体框架中, 以生成直接的 CDR- 移植物, 5E9- 移植物。在 VL 结构域中, 将下述区移植至人共有受体: 第 24-34 位 (L1)、第 50-56 位 (L2) 和第 89-97 位 (L3)。在 VH 结构域中, 移植了第 26-35 位 (H1)、第 49-65 位 (H2) 和第 93-102 位 (H3)。MacCallum 等人 (MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)) 分析了抗体与抗原复合物的晶体结构, 发现重链的第 49 和 93 位是接触区的一部分, 因此在对抗体人源化时 CDR-H2 和 CDR-H3 的限定中包括这些位置似乎是合理的。

[0836] 使用分别针对每个高变区的各寡核苷酸通过 LC 和 HC 表达载体的 Kunkel 诱变生成 IgG 形式的“5E9- 移植物”。还使用 Kunkel 诱变产生提高亲和力或稳定性的氨基酸变化。通过 DNA 测序鉴定正确的克隆。

[0837] 高变区的随机化

[0838] 使用仍维持鼠高变区序列的偏向性的温和随机化策略 (soft randomization strategy), 将序列多样性分别引入 5E9- 移植物的每一个高变区。这是使用 Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994) 最早记载的中毒寡核苷酸合成策略 (poisoned oligonucleotide synthesis strategy) 而实现的。对于待突变高变区内的一个给定位置, 对编码野生型氨基酸的密码子用 70:10:10:10 核苷酸混合物下毒, 在每个位置导致平

均 50% 的突变率。

[0839] 温和随机化寡核苷酸模仿鼠高变区序列并涵盖直接高变区移植物所限定的相同区。VH 结构域 H2 起点(第 49 位)处的氨基酸位置的序列多样性通过使用密码子 RGC 限制为 A、G、S 或 T。

[0840] 为避免再选出野生型 CDR 移植序列,通过 Kunkel 诱变将终止密码子(TAA)引入 5E9- 移植物的每个 CDR 的中部,导致 6 种不同模板,各自在不同 CDR 中引入了终止密码子。将随机化寡核苷酸用于引入多样性以及用于修复相应模板中的终止密码子。

[0841] 噬菌体文库的生成

[0842] 将如上所述设计用于在每个高变区中引入多样性的随机化寡核苷酸集合分别在含 660ng 寡核苷酸, 50mM Tris pH7.5, 10mM MgCl₂, 1mM ATP, 20mM DT T, 和 5U 多核苷酸激酶的 20 μ l 反应中于 37° C 磷酸化 1 小时。

[0843] 将致力于在单一 CDR 中引入多样性的每种磷酸化寡核苷酸集合(pool)与含相应终止密码子的 20 μ g Kunkel 模板混合。在 50mM Tris pH7.5, 10mM MgCl₂ 以 500 μ l 终体积进行反应,导致寡核苷酸与模板的比率为 3。将混合液退火, 90° C 4 分钟, 50° C 5 分钟, 然后在冰上冷却。然后填充退火后的模板(250 μ l), 其通过添加 1 μ l 100mM ATP, 10 μ l 25mM dNTP(dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 各 25mM), 15 μ l 100mM DT T, 25 μ l 10X TM 缓冲液(0.5M Tris pH7.5, 0.1M MgCl₂), 2400U T4 连接酶, 和 30U T7 聚合酶并于室温温育 3 小时来实现。然后清洁填充后的产物,电穿孔到 SS320 细胞中并在存在 M13/K07 辅助噬菌体时扩增,如 Sidhu et al., Methods in Enzymology 328:333-363(2000) 所述。库容量的范围为 1-2x 10⁹ 个独立克隆。将来自初始库的随机克隆测序以评估文库质量。

[0844] 噬菌体选择

[0845] 为进行噬菌体选择,将 CHO 衍生的 TAT419 胞外域(2 μ g/ml)在 PBS 中在 MaxiSorp 微量滴定板(Nunc)上于 4° C 固定过夜。将板用酪蛋白封闭剂(Pierce)封闭至少 1 小时。从培养物上清液收获噬菌体并重悬于含 0.5%BSA 和 0.05%Tween 20 的 PBS(PBSBT)。在噬菌体选择后,将微量滴定板用含 0.05%Tween 20 的 PBS(PBST) 彻底清洗,并通过将孔用 100mM HCl 温育 30 分钟来洗脱所结合的噬菌体。将噬菌体用 1M Tris pH8 中和,并使用 XL1-Blue 细胞和 M13/K07 辅助噬菌体扩增,在 2YT, 50 μ g/ml 羧苄青霉素中于 37° C 培养过夜。将从含靶物的孔洗脱的噬菌体的滴度与从不含靶物的孔回收的噬菌体的滴度进行比较以评估富集情况。

[0846] Fab 和 IgG 生成

[0847] 为表达 Fab 蛋白质供亲和力测量,将终止密码子引入噬菌体展示载体中重链与 g3 之间。将克隆转化到大肠杆菌 34B8 细胞中并在完全 C. R. A. P. 培养基中于 30° C 进行培养(Presta et al. Cancer Res. 57:4593-4599(1997))。通过离心收获细胞,重悬于 PBS, 100 μ M PMSF, 100 μ M 苯甲脒, 2.5mM EDTA, 并用微量流化仪(microfluidizer)破碎。通过蛋白 G 亲和层析纯化 Fab。

[0848] 为了筛选目的,首先在 293 细胞中生成 IgG 变体。使用 FuGene 系统将编码 VL 和 VH 的载体(25 μ g)转染入 293 细胞。将 500 μ l of FuGene 与 4.5ml 不含 FBS 的 DMEM 培养基混合,并于室温温育 5 分钟。将每条链(25 μ g)添加至此化合物,并于室温温育 20 分钟,然后转移至五个 T-150 烧瓶,于 37° C 在 5%CO₂ 中转染过夜。次日除去含有转染混合物的

培养基,并更换成 23ml 含有 0.1ml/L 痕量元素 (A0934) 和 10mg/L 胰岛素 (A0940) 的 PS04 培养基。将细胞再温育 5 天,之后以 1000rpm 5min 收获培养液,并使用 0.22 μ m 低蛋白质结合滤器无菌过滤。每 125ml 培养液添加 2.5ml 0.1%PMSF 之后,样品可保存于 4° C。使用蛋白 G 亲和层析纯化 IgG。

[0849] 亲和力测定

[0850] 通过 Scatchard 分析及使用 BIAcore™-2000 或 A100 通过表面等离子共振实施亲和力测定。

[0851] BIAcore 2000

[0852] 将 TAT419 胞外域(糖基化的)固定化(大约 100–500RU,在 10mM 乙酸钠 pH 4.8 中,在 CM5 传感器芯片上),5E9 抗体变体充当分析物(以 30 μ l/分的流速注射,使用在 PBST 中 2 倍连续稀释液,4–1000nM)。对每份样品分析 4 分钟结合和 10 分钟解离。每次注射后,将芯片用 10mM 甘氨酸 pH 1.7 再生。

[0853] 结果和讨论

[0854] 用于人源化的人受体框架基于共有人 κ I VL 域和共有人亚组 III VH 域。将 5E9 的 VL 和 VH 域与人 VL κ I 和亚组 III 域进行比对;鉴定每个互补决定区 (CDR) 并移植入人受体框架以生成可表达成 IgG 的 CDR 移植物(5E9–移植物)。

[0855] 生成了 Fab 展示噬菌体文库,其中分开将多样性引入 5E9–嫁接物的每个 CDR 并针对 CHO 衍生的 TAT419 胞外域淘选。在所有 6 个文库中在第二轮之后观察到富集。在第 6 轮之后,自每个文库挑取克隆进行 DNA 序列分析,并揭示了六个 CDR 每个中所靶向的序列变化。这些自文库鉴定的序列变化可代表产生结合改善的变体的变化或仅仅指示对 TAT419 胞外域结合没有影响的位置处的氨基酸变化。

[0856] 将数个选定克隆表达成 Fab 并通过 Biacore 表征对 TAT419 胞外域的结合。所有克隆结合细胞表面上的 TAT419,而且大多数克隆以相对于 5E9–移植物大大改善的亲和力结合。

[0857] 在本文中称作 hu5E9. v1 的人源化抗 TAT419 抗体,具有图 5(SEQ ID NO:13) 所示全长轻链氨基酸序列、图 6(SEQ ID NO:14) 所示全长重链氨基酸序列、图 5(SEQ ID NO:15) 所示 VL 氨基酸序列、和图 6(SEQ ID NO:16) 所示 VH 氨基酸序列,显示出比鼠 5E9 更高的亲和力结合细胞表面上的 TAT419,而且因此选择作为先导候选,用于进一步开发。hu5E9. v1 的各个 CDR 序列如下:CDR-L1(KSSQSLLSDSGKTYLN, SEQ ID NO:7), CDR-L2(LVSKLDS, SEQ ID NO:8), CDR-L3(WQGTHFPYT;SEQ ID NO:9), CDR-H1(GYTFTSYWMQ;SEQ ID NO:10), CDR-H2(TIYPGDDTSYAQKFKG;SEQ ID NO:11),和 CDR-H3(WGYAYDIDN;SEQ ID NO:12)。

[0858] 还鉴定了在本文中称作 hu5E9. v2 的第二种人源化抗 TAT419 抗体,其具有与 hu5E9. v1 相同的 VL 序列 (SEQ ID NO:15) 和图 7(SEQ ID NO:17) 所示 VH 氨基酸序列。

[0859] 实施例 8:结合分析和 TAT419 表位作图

[0860] 各种抗 TAT419 抗体的结合亲和力可使用 Pharmacia **BIAcore**® 3000 (BIAcore AB, Uppsala, Sweden) 通过表面等离子共振于室温测定(参见例如 Morton et al 1998Methods in Enzymology, 295, 268–294)。经由伯胺基团将各种抗 TAT419 抗体固定化至传感器芯片 (CM5)。通过以 5ml/min 注射 20ml 0.025M N-羟基琥珀酰亚胺和 0.1M N-乙基-N' (二甲基氨基丙基) 碳二亚胺的混合物来活化羧甲基化传感器芯片表面基质。以 5ml/

min 注射 5-10ml 抗 TAT419 抗体在 10mM 乙酸钠 pH 4.5 中的 10mg/ml 溶液。偶联后,通过注射 20ml 1M 乙醇胺 pH 8.5 来封闭芯片上未被占据的位点。运行缓冲液是含有 0.05% 聚山梨酯 20 的 PBS。对于动力学测量,在流动室上以流速 30ml/min 注射各种抗 TAT419 抗体在运行缓冲液中的 2 倍连续稀释液 3 分钟,并容许结合的材料解离 20 分钟。通过注射 20ml 10mM 甘氨酸·HCl (pH 1.5) 来再生结合表面。活化但不进行抗体固定化的 1 号流动室用作参照室。材料对 1 号流动室有可忽略的非特异性结合。为了计算表观结合亲和力,使用 1:1 结合模型使用整体拟合分析数据。同时拟合结合和解离速率常数 (BIA evaluation software)。

[0861] 通过标准竞争性结合分析来测定上文所述各种单克隆抗体所结合的 TAT419 表位 (Fendly et al 1990 Cancer Research 50:1550-1558)。使用 PANDEX™ Screen Machine 来量化荧光,在经改造而表达 TAT419 多肽的完整细胞上通过直接荧光来进行抗体的交叉封闭研究。

[0862] 使用已建立的规程,将各单克隆抗体与异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联 (Wofsy et al 1980 Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Eds. Mishel and Schiigi San Francisco: W. J. Freeman Co.)。将作为测试样品的表达 TAT419 的细胞的汇合单层胰酶消化,洗涤一次,并以 1.75×10^6 个细胞/ml 重悬于含 0.5% 牛血清清蛋白 (BSA) 和 0.1% NaN_3 的冷 PBS 中。加入终浓度 1% 的胶乳 (latex) 颗粒 (IDC, Portland, OR) 以减少 PANDEX™ 平板膜的堵塞。将 20 μ l 细胞悬浮液和 20 μ l 纯化的单克隆抗体 (100 μ g/ml 至 0.1 μ g/ml) 加入 PANDEX™ 平板孔中并在冰上温育 30 分钟。将 20 μ l 预定稀释度的 FITC 标记的单克隆抗体加入各孔中,温育 30 分钟,洗涤,并用 PANDEX™ Screen Machine 量化荧光。只有在对自身的阻断等于对第二种单克隆抗体的阻断时才认为这些单克隆抗体共享某一表位。在此实验中,在本文中称作 5E9 和 3C3 的鼠单克隆抗体各自指派细胞表面上表达的 TAT419 多肽的不同表位。使用此测定法,本领域普通技术人员可鉴定与本文所述那些单克隆抗体结合相同表位的其它单克隆抗体。

[0863] 还进行了结合分析以鉴定表位的大致位置。在 293 细胞中表达几种 TAT419 衍生肽。使用本文所述各种鼠抗 TAT419 单克隆抗体进行 Western 印迹。来自这些分析的结果证明了 5E9 鼠抗 TAT419 抗体识别及结合表达全长 TAT419 多肽的 293 细胞,而第二种独立的鼠抗 TAT419 单克隆抗体不识别也不结合表达删除了其 N 端一段的 TAT419 多肽的 293 细胞,提示鉴定出了两个分开的、不同的表位。

[0864] 更具体地,某些本文中测试的鼠抗 TAT419 单克隆抗体显示出结合位于本文 SEQ ID NO:2 所示 TAT419 序列第 27 个和第 64 个氨基酸之间的表位。此外,其它鼠抗 TAT419 单克隆抗体 (包括鼠 5E9 单克隆抗体及其各种人源化形式) 显示出结合位于本文 SEQ ID NO:2 所示 TAT419 多肽序列第 65 个和第 101 个氨基酸之间的表位。

[0865] 实施例 9: 抗 TAT419 抗体被表达 TAT419 多肽的细胞内在化

[0866] 用在其表面上表达 TAT419 的细胞来调查抗 TAT419 抗体的细胞内在化。为了调查结合至 TAT419 的抗体的命运,将表达 TAT419 的黑素瘤细胞系的样品与各种抗 TAT419 抗体一起在冰上温育 1 小时,然后为了用二抗染色而固定。二抗为用于 5E9 鼠单克隆抗体和其它测试的抗 TAT419 鼠单克隆抗体的抗鼠 Cy3,或用于鼠单克隆抗体的嵌合形式的抗人 Cy3。使用解卷积显微镜 (Deconvolution Microscope) 对表达 TAT419 的细胞观察到显著的鼠单克隆抗体对质膜的染色,指示抗体-细胞表面蛋白复合物的形成。

[0867] 对于连续方法,参见“Internalization studies”in Polson et al., Blood 110(2):616-23(2007),第618页。在使用解卷积显微术(放大60倍)显现时,免疫荧光显示了细胞表面染色和内在化。不表达TAT419的对照细胞没有显示质膜染色。将这些观察结果与在冰上保持1小时,然后转移至37°C 2小时的细胞比较。使用表达TAT419的细胞,对鼠5E9和3C3抗TAT419抗体都观察到显著的质膜染色和内部细胞染色,指示抗体-细胞表面蛋白复合物移动到细胞自身内。温育过夜后观察到进一步的抗体/TAT419复合物摄取。

[0868] 5E9对质膜的染色以4°C温育进行1小时,然后固定细胞,并用二抗“Cy3小鼠”处理。在2小时之后或者在于37°C温育过夜,接着固定并用二抗(secondary antibody)处理之后证明了内在化。

[0869] 在8孔腔式载玻片(Nalge Nunc Intl.)中接种细胞(约100,000个细胞/孔)并于37°C/5%CO₂温育24-48小时。以生长培养基中2-5ug/ml添加抗TAT419抗体与蛋白酶抑制剂(50ug/ml亮肽酶素和5ug/ml胃酶抑素)一起过夜或2小时。这些蛋白酶抑制剂防止一抗降解,容许检测溶酶体中的抗体。为了活体标记,将细胞与抗体一起于室温温育45分钟。然后清洗所有细胞,在3%低聚甲醛中固定10分钟,用0.05%皂苷透化5-10分钟并于室温通过PBS+1%BSA封闭非特异性抗体结合位点20分钟。然后将细胞与用Alexa-488标记的二抗(Molecular Probes)一起于37°C温育1小时,清洗,然后取出腔插件以暴露带有细胞的载玻片。将载玻片通过应用VectaShield来封固,其中用DAPI标记核(Vector Laboratories),然后放置在盖玻片下并用透明指甲油密封。

[0870] 来自这些分析的结果证明了本文中描述的各种抗TAT419抗体(包括鼠5E9单克隆抗体及其各种人源化形式)结合活细胞表面上的TAT419多肽,而且迅速内在化入细胞并在抗体添加至细胞后不到20小时内定位于细胞的溶酶体。因此,本文中描述的抗TAT419抗体是用于表达TAT419多肽的肿瘤的毒素偶联的肿瘤疗法的卓越候选物。

[0871] 实施例10:偶联有毒素的结合TAT419的抗体的制备

[0872] 抗体-药物偶联物(ADC),即免疫偶联物,在癌症治疗中用于局部递送细胞毒剂或细胞抑制剂(即用于杀死或抑制肿瘤细胞的药物)的用途(Payne(2003)Cancer Cell 3:207-212;Syrigos and Epenetos(1999)Anticancer Research 19:605-614;Niculescu-Duvaz and Springer(1997)Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172;US 4,975,278)容许将药物部分靶向递送至肿瘤,并在那儿进行细胞内积累,而系统施用这些未经偶联的药物试剂可能在试图消除的肿瘤细胞以外导致不可接受的对正常细胞的毒性水平(Baldwin et al. (1986) Lancet(1986年5月15日)pp. 603-05;Thorpe(1985)“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,in Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications,Pinchera et al.(编),pp.475-506)。由此试图获得最大功效及最小毒性。设计和改进ADC的努力聚焦于单克隆抗体(mAb)的选择性以及药物连接和药物释放特性。多克隆抗体和单克隆抗体皆有报道可用于这些策略(Rowland et al. (1986)Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。这些方法中所使用的药物包括道诺霉素(daunomycin)、多柔比星(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)和长春地辛(vindesine)(Rowland et al. (1986)见上文)。抗体-毒素偶联物中所使用的毒素包括细菌毒素诸如白喉毒素、植物毒素诸如蓖麻毒蛋

白、小分子毒素诸如格尔德霉素 (geldanamycin) (Mandler et al. (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、美登木素生物碱类 (EP 1391213; Liu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、和加利车霉素 (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342)。

[0873] 在本发明的抗体-药物偶联物 (ADC) 中, 将抗体 (Ab) 经接头 (L) 与一个或多个药物部分 (D) 缀合, 例如每个抗体偶联约 1 个至约 20 个药物部分。可采用本领域技术人员知道的有机化学反应、条件和试剂通过数种路径来制备具有通式:

[0874] $Ab-(L-D)_p$

[0875] 的 ADC, 包括: (1) 抗体的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应, 形成 Ab-L, 随后与药物部分 D 反应; 和 (2) 药物部分的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应, 形成 D-L, 随后与抗体的亲核基团反应。本文还描述了用于制备 ADC 的其它方法。

[0876] 接头可以由一种或多种接头组分构成。例示性的接头组分包括 6-马来酰亚胺己酰基 ("MC")、马来酰亚胺丙酰基 ("MP")、缬氨酸-瓜氨酸 ("val-cit")、丙氨酸-苯丙氨酸 ("ala-phe")、对氨基苄氧羰基 ("PAB")、4-(2-吡啶基硫代) 戊酸 N-琥珀酰亚氨基酯 ("SPP")、4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1 羧酸 N-琥珀酰亚氨基酯 ("SMCC")、和 (4-碘-乙酰基) 氨基苯甲酸 N-琥珀酰亚氨基酯 ("SIAB")。本领域知道别的接头组分, 本文也描述了一些。

[0877] 在有些实施方案中, 接头可包含氨基酸残基。例示性的氨基酸接头构件包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性的二肽包括: 缬氨酸-瓜氨酸 (vc 或 val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸 (af 或 ala-phe)。例示性三肽包括: 甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸 (gly-val-cit) 和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸 (gly-gly-gly)。包含氨基酸接头组分的氨基酸残基包括那些天然存在的氨基酸, 以及次要的氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物, 诸如瓜氨酸。氨基酸接头构件可以在它们的特定酶 (例如肿瘤相关蛋白酶, 组织蛋白酶 B、C 和 D, 或纤溶酶蛋白酶) 的酶促切割的选择性方面进行设计和优化。

[0878] 抗体的亲核基团包括但不限于: (i) N 末端氨基; (ii) 侧链氨基, 例如赖氨酸; (iii) 侧链巯基, 例如半胱氨酸; 和 (iv) 糖基化抗体中糖的羟基或氨基。氨基、巯基、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、羧酸肼、和芳基酰肼是亲核的, 能够与接头部分上的亲电子基团反应而形成共价键, 而接头试剂包括: (i) 活性酯类, 诸如 NHS 酯、HOBt 酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物; (ii) 烷基和苯甲基卤化物, 诸如卤代乙酰胺; (iii) 醛类、酮类、羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原的链间二硫键, 即半胱氨酸桥。可通过还原剂诸如 DTT (二硫苏糖醇) 处理使抗体具有与接头试剂缀合的反应活性。每个半胱氨酸桥理论上将形成两个反应性硫醇亲核体。可经由赖氨酸与 2-亚氨基硫烷 (Traut 氏试剂) 的反应, 导致胺转变为硫醇, 从而将额外亲核基团引入抗体。可以通过引入一个、两个、三个、四个或更多个半胱氨酸残基 (例如制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的突变型抗体) 而将反应性硫醇基引入抗体 (或其片段)。

[0879] 还可通过修饰抗体来生成本发明的抗体-药物偶联物, 即引入可与接头试剂或药物上的亲核取代基反应的亲电子部分。可用例如高碘酸盐氧化剂氧化糖基化抗体的糖, 从

而形成可与接头试剂或药物部分的胺基团反应的醛或酮基团。所得亚胺 Schiff 碱基可形成稳定的键,或者可用例如硼氢化物试剂还原而形成稳定的胺连接。在一个实施方案中,糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏高碘酸钠的反应可在蛋白质中生成羰(醛和酮)基团,它可与药物上的适宜基团反应(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中,包含 N 末端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质可与偏高碘酸钠反应,导致在第一个氨基酸处生成醛(Geoghegan&Stroh, Bioconjugate Chem. 3:138-146 (1992); US 5362852)。此类醛可与药物部分或接头亲核体反应。

[0880] 或者,可通过例如重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒剂的融合蛋白。DNA 的长度可包含各自编码偶联物两个部分的区域,或是彼此毗邻或是由编码接头肽的区域分开,该接头肽不破坏偶联物的期望特性。

[0881] 在又一个实施方案中,可将抗体与“受体”(诸如链霉亲和素)偶联从而用于肿瘤预先靶向,其中对患者施用抗体-受体偶联物,接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶联物,然后施用与细胞毒剂(例如放射性核苷酸)偶联的“配体”(例如亲合素)。

[0882] 通过将毒素与纯化的抗体连接来生成抗体-药物偶联物的具体技术是本领域众所周知且常规采用的。例如,可如下实现纯化的单克隆抗体与毒素 DM1 的偶联。将纯化的抗体用 4-(2-吡啶基硫代)戊酸 N-琥珀酰亚氨基酯衍生化以引入二硫代吡啶基。用 SPP(2.3ml 乙醇中的 5.3 个摩尔当量)处理 44.7ml 含 NaCl (50mM) 和 EDTA (1mM) 的 50mM 硫酸钾缓冲液 (pH 6.5) 中的抗体 (376.0mg, 8mg/mL)。在氩气下于环境温度温育 90 分钟后,将反应混合液通过用 35mM 柠檬酸钠, 154mM NaCl 和 2mM EDTA 平衡的 Sephadex G25 柱凝胶过滤。然后合并并检测含有抗体的级分。将抗体-SPP-Py (337.0mg, 带可释放的 2-硫代吡啶基团) 用上文 35mM 柠檬酸钠缓冲液 pH6.5 稀释至终浓度 2.5mg/ml。然后向抗体溶液中加入 3.0mM 二甲基乙酰胺 (DMA, 在最终的反应混合液中为 3%v/v) 中的 DM1 (1.7 个当量, 16.1 摩尔)。让反应在氩气下于环境温度进行 20 小时。将反应液加载至用 35mM 柠檬酸钠, 154mM NaCl, pH 6.5 平衡的 Sephacryl S300 凝胶过滤柱 (5.0cm x 90.0cm, 1.77L)。流速为 5.0ml/min, 收集了 65 份级分 (各 20.0ml)。合并并检测各级分, 其中通过测量 252nm 和 280nm 处的吸光度来测定每个抗体分子连接的 DM1 药物分子的数目 (p')。

[0883] 为例示目的, 还可如下实现纯化的单克隆抗体与毒素 DM1 的偶联。将纯化的抗体用 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚氨基酯 (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) 衍生化以引入 SMCC 接头。用 7.5 个摩尔当量的 SMCC (20mM, 在 6.7mg/ml DMSO 中) 处理 50mM 磷酸钾/50mM 氯化钠/2mM EDTA, pH 6.5 中的 20mg/ml 抗体。在氩气下于环境温度搅动 2 小时后, 将反应混合液通过用 50mM 磷酸钾/50mM 氯化钠/2mM EDTA, pH 6.5 平衡的 Sephadex G25 柱过滤。合并并检测含有抗体的级分。将抗体-SMCC 用 50mM 磷酸钾/50mM 氯化钠/2mM EDTA, pH 6.5 稀释至终浓度 10mg/ml, 并与 DM1 (1.7 个当量, 假设 5 个 SMCC/一个抗体, 7.37mg/ml) 在二甲基乙酰胺中的 10mM 溶液反应。将反应液在氩气下于环境温度搅动 16.5 小时。然后将偶联反应混合液通过用 1x PBS pH6.5 平衡的 Sephadex G25 凝胶过滤柱 (1.5x 4.9cm) 过滤。然后通过 252nm 和 280nm 处的吸光度来测量 DM1/抗体比率 (p)。

[0884] 此外, 可以用双马来酰亚胺试剂 BM(PEO)₄ (Pierce Chemical) 修饰所选抗体上的游离半胱氨酸, 在抗体的表面上留下未反应的马来酰亚胺基团。这可如下来实现, 将

BM(PEO)4 在 50% 乙醇 / 水混合液中溶解至浓度 10mM, 以 10 倍摩尔过量加至在磷酸盐缓冲盐水中以大约 1.6mg/ml (10 微摩尔) 的浓度含有抗体的溶液, 并让其反应 1 小时。通过在 30mM 柠檬酸盐 pH 6 及 150mM NaCl 缓冲液中凝胶过滤来除去过量的 BM(PEO)4。将大约 10 倍摩尔过量的 DM1 溶于二甲基乙酰胺 (DMA) 并加至抗体-BMPEO 中间体。也可采用二甲基甲酰胺 (DMF) 来溶解药物部分试剂。让反应混合液反应过夜, 然后在 PBS 中凝胶过滤或透析以除去未反应的药物。通过在 PBS 中的 S200 柱上凝胶过滤来除去高分子量聚集体并供应纯化的抗体-BMPEO-DM1 偶联物。

[0885] 通常通过抗体的众多赖氨酸残基将细胞毒性药物与抗体偶联。还可通过目的抗体中存在的或改造引入的硫醇基来实现偶联。例如, 已经通过遗传工程技术将半胱氨酸残基引入蛋白质以形成供配体共价附着的位点 (Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al. (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al. (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; 美国专利 No. 6, 248, 564)。一旦目的抗体中存在游离的半胱氨酸残基, 可以将毒素连接至该位点。举例而言, 将溶于 DMSO 的药物接头试剂, 马来酰亚胺己酰基-单甲基 auristatin E (MMAE) 即 MC-MMAE、马来酰亚胺己酰基-单甲基 auristatin F (MMAF) 即 MC-MMAF、MC-val-cit-PAB-MMAE 或 MC-val-cit-PAB-MMAF 在乙腈和水中稀释至已知浓度, 并加至冷却的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的半胱氨酸衍生抗体。约 1 小时后, 加入过量的马来酰亚胺以淬灭反应并覆盖任何未反应的抗体硫醇基基团。通过离心超滤将反应混合液浓缩, 通过 PBS 中的 G25 树脂的洗脱将偶联有毒素的抗体纯化和脱盐, 在无菌条件下通过 0.2 μ m 滤器过滤, 并冷冻供贮存。

[0886] 另外, 本发明的抗 TAT419 抗体可使用下述技术偶联至 auristatin 和 dolostatin 毒素 (诸如 MMAE 和 MMAF)。用过量的 100mM 二硫苏糖醇 (DTT) 处理溶于 500mM 硼酸钠和 500mM 氯化钠 pH 8.0 的抗体。于 37° C 温育约 30 分钟后, 通过 Sephadex G25 树脂上的洗脱更换缓冲液并用含 1mM DTPA 的 PBS 洗脱。通过溶液在 280nm 处的吸光度测定还原的抗体浓度, 并通过与 DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) 的反应及 412nm 处的吸光度测定硫醇浓度, 由此检查硫醇 / 抗体值。使溶于 PBS 中的还原的抗体在冰上变冷。

[0887] 将溶于 DMSO 的药物接头试剂 (1) 马来酰亚胺己酰基-单甲基 auristatin E (MMAE) 即 MC-MMAE, (2) MC-MMAF, (3) MC-val-cit-PAB-MMAE, 或 (4) MC-val-cit-PAB-MMAF 在乙腈和水中稀释至已知浓度, 并加至冷却的 PBS 中的还原的抗体。约 1 小时后, 加入过量的马来酰亚胺以淬灭反应并覆盖任何未反应的抗体硫醇基基团。通过离心超滤将反应混合液浓缩, 通过 PBS 中的 G25 树脂的洗脱将偶联的抗体纯化和脱盐, 在无菌条件下通过 0.2 μ m 滤器过滤, 并冷冻供贮存。

[0888] 如描述的那样制备本文所述毒素偶联的抗 TAT419 抗体, 并使用标准 FACS 分析来测试以确定与毒素的偶联影响抗体结合表达 TAT419 的细胞表面上 TAT419 多肽的能力。来自这些分析的结果证明了将抗体与毒素偶联时没有观察到对 TAT419 多肽的结合的损失。

[0889] 实施例 11: 体外肿瘤细胞杀伤测定法

[0890] 表达目的 TAT419 多肽的哺乳动物细胞可使用标准表达载体和克隆技术获得。或

者,表达目的 TAT419 多肽的许多肿瘤细胞系是可公开获得的,例如通过 ATCC,而且可使用标准 ELISA 或 FACS 分析进行常规鉴定。然后可将抗 TAT419 多肽单克隆抗体(及其毒素偶联衍生物)用于测定法中以测定所述抗体在体外杀伤表达 TAT419 多肽的细胞的能力。

[0891] 例如,如上所述获取表达目的 TAT419 多肽的细胞并分配到 96 孔皿中。在一项分析中,在 4 天的整个细胞温育期间都包括抗体/毒素偶联物(或裸抗体)。在第二项独立的分析中,将细胞与抗体/毒素偶联物(或裸抗体)一起温育 1 小时,然后清洗并在缺乏抗体/毒素偶联物的条件下温育 4 天。在又一项独立分析中,可以用毒素偶联的抗 TAT419 抗体处理经遗传工程改造而在其细胞表面上表达 TAT419 多肽的细胞(和不表达 TAT419 多肽的对照细胞),并进行比较。然后使用 Promega (Cat#G7571) 的 CellTiter-Glo 发光细胞存活力测定法测量细胞存活力。未处理细胞充当阴性对照。

[0892] 在第一项实验中且特别是对于本发明而言,对各种浓度的某些抗 TAT419 抗体(包括鼠 5E9 鼠单克隆抗体及其 hu5E9.v1 和 hu5E9.v2 人源化形式)的 ADC MC-vc-PAB-MMAE 毒素偶联物测试了结合及杀伤表达 TAT419 多肽的黑素瘤细胞系 526mel、537mel、888mel、928mel、1300mel、A375、A2058、COL0829、G361、Hs-294-T、Malme3m、SK23、SKmel5、SKmel5-RC、SKmel28、WM-266-4、UACC257、和 UACC257-NCI60 的能力。更具体地,在体外用 PBS (作为阴性对照)、不结合 TAT419 多肽的对照抗体的 MC-vc-PAB-MMAE 毒素偶联物(作为阴性对照)、或抗 TAT419-MC-vc-PAB-MMAE 毒素偶联抗体任一测试表达 TAT419 细胞。这些分析的结果证明了所有测试的偶联有毒素的抗 TAT419 抗体(包括 5E9、hu5E9.v1 和 hu5E9.v2)能够对在表面上表达 TAT419 多肽的细胞诱导显著的、TAT419 靶物特异性的细胞杀伤,而对阴性对照没有观察到特异性细胞杀伤。

[0893] 作为来自这项研究的结果的一个具体示例性实施例,如上所述在体外用各种浓度的 PBS (作为阴性对照)、不结合 TAT419 多肽的对照抗体的 MC-vc-PAB-MMAE 毒素偶联物(Ctrl-vc-MMAE)、或 5E9-MC-vc-PAB-MMAE 毒素偶联的抗体(5E9-vc-MMAE)处理 UACC257X2.2 细胞(其在其细胞表面上表达 TAT419 多肽)。来自这些分析的数据显示于图 8,并且证明了 5E9-vc-MMAE 毒素偶联的抗体能够杀伤在其细胞表面上表达 TAT419 的细胞。用在细胞表面上表达不同量的 TAT419 多肽的不同细胞系获得的比较数据证明了细胞杀伤的效率与细胞表面上 TAT419 表达的量成比例。

[0894] 这些数据证明了这些测定法中采用的各种抗 TAT419 抗体(包括 5E9、hu5E9.v1 和 hu5E9.v2)能够结合细胞表面上的 TAT419 多肽及诱导其所结合的那些细胞死亡。

[0895] 实施例 12:体内肿瘤细胞杀伤测定法-腹膜内人异种移植物肿瘤模型

[0896] 可通过处理植入有人肿瘤(所谓的异种移植物)的 NCR 裸鼠来测量抗体-药物偶联物的体内功效。这些研究使用人黑素瘤细胞系和经由植入肿瘤样品而在小鼠中繁殖的人肿瘤。在该研究中,用一剂 3mg/kg 经尾静脉 IV 处理每组 10 只小鼠(每只都具有黑素瘤肿瘤,大约 100-200mm³),3 周时重复。整个测试期进行肿瘤测量,接着收集肿瘤样品,然后进行福尔马林固定或快速冷冻,以进行“TaqMan®”分析及组织学检查。

[0897] i. p. 植入通过在裸鼠中连续传代建立的肿瘤和人黑素瘤细胞系,并在研究期间测量生长。一旦肿瘤达到合适的尺寸,给处理组的小鼠服用抗体-药物偶联物。异种移植物肿瘤生长迟滞是相当于媒介对照或对照抗体的功效的特征。总之,这些结果证明了抗 TAT419 药物偶联物在体内肿瘤生长模型中的特异性和功效。在注射后第 0、2、7、10、13、17、20、24

和 27 天测量每只小鼠中的肿瘤体积以测定每种处理在缩小肿瘤体积方面的功效。另外,在处理约 30 天里每天测定 % 动物存活。

[0898] 这些体内分析的结果证明了仅用媒介处理的小鼠或用非 TAT419 特异的毒素偶联的抗体处理的小鼠在治疗后显示出很少的可观察到的肿瘤进展降低。这些结果证明了不结合 TAT419 多肽的抗体,即使偶联有毒素,不提供特异性的(或甚至非特异性的)治疗效果。相反,在用 vc-MMAE 偶联的抗 TAT419 抗体(包括 5E9、hu5E9. v1 和 hu5E9. v2)处理时,测试组中的大多数动物在处理后展现出肿瘤进展显著且明显的可再现的降低,证明了抗 TAT419 抗体药物偶联物对具有表达 TAT419 多肽的肿瘤的动物提供特异性的体内治疗效果。

[0899] 更具体地,图 9 显示了自一个此类实验获得的数据,其中分析了 hu5E9. v1 人源化抗体的 vc-MMAE 偶联物的体内治疗功效。如上所述在裸鼠中繁殖自 UACC257X2. 2 人黑素瘤细胞系(在细胞表面上表达 TAT419 多肽的细胞)衍生的异种移植物,然后如上所述用单独的媒介、MMAE 偶联的对照抗体(其不结合 TAT419 多肽)、或各种量的 hu5E9. v1-vc-MMAE 处理小鼠。来自这些分析的数据证明了 hu5E9. v1-vc-MMAE 毒素偶联的抗体能够杀伤在细胞表面上表达 TAT419 的细胞。其它数据证明了其它毒素偶联的抗 TAT419 抗体(包括 5E9 和 hu5E9. v2)也能够以靶物特异性和剂量依赖性方式抑制裸鼠中自表达 TAT419 的多种不同黑素瘤细胞系衍生的异种移植物肿瘤的生长。

[0900] 这些数据清楚地证明了抗 TAT419 抗体-药物偶联物提供特异性的、显著的且可再现的体内治疗效果来治疗表达 TAT419 多肽的肿瘤。

[0901] 认为前述书面说明足以使本领域技术人员能够实践本发明。本发明并不限于所保藏构建物的范围,因为所保藏实施方案意图作为本发明某些方面的单一例示,而且功能上相当的任何构建物都在本发明的范围内。本文中的材料保藏并非承认本文中所包含的书面说明不足以能够实践本发明的任何方面,包括其最佳模式,也不能解释为将权利要求的范围限制于它所描述的具体例示。实际上,根据上面的描述,除了本文所显示和描述的,本发明的多种修饰对于本领域技术人员是显而易见的,而且在所附权利要求的范围内。

[0001]

序列表

<110> 基因泰克公司 (GENENTECH, INC.)

<120> 用于肿瘤诊断和治疗的组合物和方法

<130> P4412R1-W0

<150> US 61/308,791

<151> 2010-02-26

<150> US 61/307,338

<151> 2010-02-23

<160> 17

<210> 1

<211> 1453

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```

gcacatcggtt tgcagatcc gagaggctct gaaactgcgg agcggccacc 50
ggacgccttc tggagcaggt agcagcatgc agcgcctcc aagtcgtgc 100
ggacgcgcc tggatgcgt ggttcctgc tgcggcctgt cgcggatctg 150
gggagaggag agaggctcc cgcctgacag ggccactccg ctttgcgaa 200
ccgcagagat aatgacgcca cccactaaga ccttatggcc caagggtcc 250
aacgccagtc tggcgcggtc gtggcaccti gcggagggtc cttaaggaga 300
caggacggca ggaatccgc cagcaccat ctcctctccc ccgtgccaa 350
gacccatcga gatcaaggag actttcaaat acatcaaac ggttgtgtcc 400
tgcttctgti tctgtctgg gatcatcgg aatccacac ttctgagaat 450
tatctacaag aacaagtgca tgcgaacgg tcccaatctc ttgacgcca 500
gcttggctct gggagacctg ctgcacatcg tcatgacat cctatcaat 550
gtctacaagc tcttgccaga ggactggcca ttggagctg agatgtgtaa 600
gctggtgctt ttcatacaga aagcctccgt gggatcact gtctgagtc 650
tatgtgctct gagtatgac agatacgag ctgtgtctc ttggagiaga 700
attaaaggaa ttgggttcc aaaaatgaca gcagtacaaa ttgtttgat 750
ttgggtgttc tctgtgttc tggctgtccc tgaagcata ggttttgata 800
taattacgat ggactacaaa ggaagttaic tgcgaatctg ctgcttcat 850
ccgttcaga agacagcttt catgcagttt tacaagacag caaagattg 900
giggctgttc agttctatt tctgtttgcc atiggccatc actgcattt 950
tttatacact aatgacctgt gaaatgtga gaaagaaaag tggcatgcag 1000
attgctttaa atgatcacct aaagcagaga cgggaagtgg ccaaacctg 1050
cttttgctg gtcttctgt ttgcctctg ctggttccc ctacacctca 1100
gcaggattct gaagtcact ctttataatc agaatgatcc caatagatgt 1150
gaactttga gctttctgtt ggtattggac tatattggtc tcaacatggc 1200
ttactgaat tctgcatta acccaattgc tctgtatttg gtgagcaaaa 1250
gattcaaaa ctgctttaag tcatgcttat gctgctgggt ccagtcaatt 1300
gaagaaaaac agtccttga gaaaagcag tctgcttaa agtcaaaagc 1350
taatgatcc ggatgaca acttccgttc cagtaataaa tacagtcct 1400
cttgaagaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1450

```

[0002]

```

aaa 1453
<210> 2
<211> 442
<212> PRT
<213> 人

<400> 2
Met Gln Pro Pro Pro Ser Leu Cys Gly Arg Ala Leu Val Ala Leu
 1          5          10          15

Val Leu Ala Cys Gly Leu Ser Arg Ile Trp Gly Glu Glu Arg Gly
 20          25          30

Phe Pro Pro Asp Arg Ala Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ala Glu Ile
 35          40          45

Met Thr Pro Pro Thr Lys Thr Leu Trp Pro Lys Gly Ser Asn Ala
 50          55          60

Ser Leu Ala Arg Ser Leu Ala Pro Ala Glu Val Pro Lys Gly Asp
 65          70          75

Arg Thr Ala Gly Ser Pro Pro Arg Thr Ile Ser Pro Pro Pro Cys
 80          85          90

Gln Gly Pro Ile Glu Ile Lys Glu Thr Phe Lys Tyr Ile Asn Thr
 95          100         105

Val Val Ser Cys Leu Val Phe Val Leu Gly Ile Ile Gly Asn Ser
110          115         120

Thr Leu Leu Arg Ile Ile Tyr Lys Asn Lys Cys Met Arg Asn Gly
125          130         135

Pro Asn Ile Leu Ile Ala Ser Leu Ala Leu Gly Asp Leu Leu His
140          145         150

Ile Val Ile Asp Ile Pro Ile Asn Val Tyr Lys Leu Leu Ala Glu
155          160         165

Asp Trp Pro Phe Gly Ala Glu Met Cys Lys Leu Val Pro Phe Ile
170          175         180

Gln Lys Ala Ser Val Gly Ile Thr Val Leu Ser Leu Cys Ala Leu
185          190         195

Ser Ile Asp Arg Tyr Arg Ala Val Ala Ser Trp Ser Arg Ile Lys
200          205         210

Gly Ile Gly Val Pro Lys Trp Thr Ala Val Glu Ile Val Leu Ile
215          220         225

Trp Val Val Ser Val Val Leu Ala Val Pro Glu Ala Ile Gly Phe
230          235         240

Asp Ile Ile Thr Met Asp Tyr Lys Gly Ser Tyr Leu Arg Ile Cys
245          250         255

Leu Leu His Pro Val Gln Lys Thr Ala Phe Met Gln Phe Tyr Lys
260          265         270

Thr Ala Lys Asp Trp Trp Leu Phe Ser Phe Tyr Phe Cys Leu Pro
275          280         285

Leu Ala Ile Thr Ala Phe Phe Tyr Thr Leu Met Thr Cys Glu Met
290          295         300

Leu Arg Lys Lys Ser Gly Met Gln Ile Ala Leu Asn Asp His Leu
305          310         315

Lys Gln Arg Arg Glu Val Ala Lys Thr Val Phe Cys Leu Val Leu
320          325         330

Val Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Leu His Leu Ser Arg Ile Leu
335          340         345

Lys Leu Thr Leu Tyr Asn Gln Asn Asp Pro Asn Arg Cys Glu Leu
350          355         360

```

[0003]

```

Leu Ser Phe Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ile Gly Ile Asn Met Ala
365 370 375
Ser Leu Asn Ser Cys Ile Asn Pro Ile Ala Leu Tyr Leu Val Ser
380 385 390
Lys Arg Phe Lys Asn Cys Phe Lys Ser Cys Leu Cys Cys Trp Cys
395 400 405
Gln Ser Phe Glu Glu Lys Gln Ser Leu Glu Glu Lys Gln Ser Cys
410 415 420
Leu Lys Phe Lys Ala Asn Asp His Gly Tyr Asp Asn Phe Arg Ser
425 430 435
Ser Asn Lys Tyr Ser Ser Ser
440
<210> 3
<211> 219
<212> PRT
<213> 人
<400> 3
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
1 5 10 15
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30
Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
35 40 45
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75
Phe Thr Leu Lys Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90
Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
110 115 120
Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
125 130 135
Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
140 145 150
Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
155 160 165
Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
170 175 180
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
185 190 195
Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile
200 205 210
Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
215
<210> 4
<211> 448
<212> PRT
<213> 人
<400> 4
Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

```

[0004]

```

Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
    35                                40                                45
Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr
    50                                55                                60
Ala Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Tyr
    65                                70                                75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
    80                                85                                90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile
    95                                100                               105
Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
   110                               115                               120
Thr Lys Gly Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp
   125                               130                               135
Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
   140                               145                               150
Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser
   155                               160                               165
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
   170                               175                               180
Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser
   185                               190                               195
Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
   200                               205                               210
Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
   215                               220                               225
Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
   230                               235                               240
Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
   245                               250                               255
Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
   260                               265                               270
Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
   275                               280                               285
His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr
   290                               295                               300
Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
   305                               310                               315
Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
   320                               325                               330
Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
   335                               340                               345
Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
   350                               355                               360
Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro
   365                               370                               375
Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
   380                               385                               390
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
   395                               400                               405
Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu
   410                               415                               420
Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn

```

[0005]

```

                                425                430                435
His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
                                440                445

<210> 5
<211> 112
<212> PRT
<213> 人

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

Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
  20              25              30

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

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

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
  65              70              75

Phe Thr Leu Lys Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
  80              85              90

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
  95              100             105

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
  110

<210> 6
<211> 109
<212> PRT
<213> 人

<400> 6
Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
  1              5              10              15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
  20              25              30

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

Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr
  50              55              60

Ala Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Tyr
  65              70              75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
  80              85              90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile
  95              100             105

Asp Asn Trp Gly

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<400> 7
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu
  1              5              10              15

Asn

<210> 8
<211> 7
<212> PRT

```

[0006]

```

<213> 人
<400> 8
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人
<400> 9
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人
<400> 10
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln
5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人
<400> 11
Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人
<400> 12
Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile Asp Asn
5

<210> 13
<211> 219
<212> PRT
<213> 人
<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30
Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro
35 40 45
Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90
Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

```

[0007]

```

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215
<210> 14
<211> 448
<212> PRT
<213> 人
<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Ala Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Thr Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile
95 100 105
Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110 115 120
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
125 130 135
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
140 145 150
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
155 160 165
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
170 175 180
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
185 190 195
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
200 205 210
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
215 220 225
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

```

[0008]

290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
305	310	315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
320	325	330
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
335	340	345
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
350	355	360
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
365	370	375
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
380	385	390
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		
395	400	405
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
410	415	420
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
425	430	435
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
440	445	
<210> 15		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 15		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
1	5	10
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu		
20	25	30
Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro		
35	40	45
Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp		
50	55	60
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp		
65	70	75
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr		
80	85	90
Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln		
95	100	105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
110		
<210> 16		
<211> 109		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 16		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
1	5	10
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr		
20	25	30
Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
35	40	45
Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr		
50	55	60

[0009]

```

Ala Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Thr Asp Lys Ser
      65                      70                      75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
      80                      85                      90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile
      95                      100                     105

Asp Asn Trp Gly

<210> 17
<211> 109
<212> PRT
<213> 人

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
  1              5              10              15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
      20              25              30

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

Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr
      50              55              60

Ala Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser
      65              70              75

Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
      80              85              90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile
      95                      100                     105

Asp Asn Trp Gly

```

GCATCTGGTTTGTCTAGATCCGAGAGGCTCTGAAACTGCGGAGCGGCCACCGGACGCCTTCTGGA
GCAGGTAGCAGCATGCAGCCGCCTCCAAGTCTGTGCGGACGCGCCCTGGTTGCGCTGGTTCTTG
CCTGCGGCCTGTGCGGGATCTGGGGAGAGGAGAGAGGCTTCCCGCTGACAGGGCCACTCCGCT
TTTGCAAACCGCAGAGATAATGACGCCACCCACTAAGACCTTATGGCCCAAGGGTTCCAACGCC
AGTCTGGCGCGGTCGTTGGCACCTGCGGAGGTGCCTAAAGGAGACAGGACGGCAGGATCTCCGC
CACGCACCATCTCCCCTCCCCCGTGCCAAGGACCCATCGAGATCAAGGAGACTTTCAAATACAT
CAACACGGTTGTGTCTTGCCTTGTGTTCTGTGCTGGGGATCATCGGGAACCTCCACACTTCTGAGA
ATTATCTACAAGAACAAGTGCATGCGAAACGGTCCCAATATCTTGATCGCCAGCTTGGCTCTGG
GAGACCTGCTGCACATCGTCATTGACATCCCTATCAATGTCTACAAGCTGCTGGCAGAGGACTG
GCCATTTGGAGCTGAGATGTGTAAGCTGGTGCCTTTCATACAGAAAGCCTCCGTGGGAATCACT
GTGCTGAGTCTATGTGCTCTGAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTAGAATTA
AAGGAATTGGGGTTCCAAAATGGACAGCAGTAGAAATTGTTTTGATTTGGGTGGTCTCTGTGGT
TCTGGCTGTCCCTGAAGCCATAGGTTTTGATATAATTACGATGGACTACAAAGGAAGTTATCTG
CGAATCTGCTTGCTTCATCCCGTTCAGAAGACAGCTTTCATGCAGTTTACAAAGACAGCAAAAG
ATTGGTGGCTGTTCAAGTTTCTATTTCTGCTTGCCATTGGCCATCACTGCATTTTATACACT
AATGACCTGTGAAATGTTGAGAAAGAAAAGTGGCATGCAGATTGCTTTAAATGATCACCTAAAG
CAGAGACGGGAAGTGGCCAAAACCGTCTTTTGCCCTGGTCTTGTCTTTGCCCTCTGCTGGCTTC
CCCTTCACCTCAGCAGGATTCTGAAGCTCACTCTTTATAATCAGAATGATCCCAATAGATGTGA
ACTTTTGAGCTTTCTGTTGGTATTGGACTATATTGGTATCAACATGGCTTCACTGAATTCCTGC
ATTAACCCAATTGCTCTGTATTTGGTGAGCAAAAGATTCAAAAAGTCTTTAAGTCATGCTTAT
GCTGCTGGTGCCAGTCATTTGAAGAAAACAGTCCTTGGAGGAAAAGCAGTCGTGCTTAAAGTT
CAAAGCTAATGATCACGGATATGACAACCTCCGTTCCAGTAATAAATACAGCTCATCTTGAAAG
AA (SEQ ID NO:1)

图 1

MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPDRATPLLQTAEIMTPPTKTLWPKGSNASLAR
SLAPAEVPGDRTAGSPPTISPPPCQGPPIEIKETFKYINTVVVSCLVFVLGIIGNSTLLRIIYK
NKC MRNGPNILIASLALGDL LHIVIDIPINVKLLAEDWPFGAEMCKLVPF IQASVGITVLSL
CALSIDRYRAVASWSRIKGIGVPKWTAVEIVLIWVSVVLAVPEAIGFDIITMDYKGSYLRICL
LHPVQKTA FMQFYKTAKDWLFSFYFCLPLAITAFFYTLMTCEMLRKKSGMQIALNDHLKQORRE
VAKTVFCLVLV FALCWLPLHLSRILKLTLYNQNDPNRCELLSFLLVLDYIGINMASLNSCINPI
ALYLVSKRFKNCFKSCLCCWCQSFEKQSL EEKQSCLKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS
(SEQ ID NO:2)

信号序列。

氨基酸 1-26。

跨膜域。

氨基酸 101-121, 137-157, 177-197, 216-236, 275-295, 323-343, 362-382

N-糖基化位点。

氨基酸 59-62, 119-122

cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白质激酶磷酸化位点。

氨基酸 302-305

酪氨酸激酶磷酸化位点。

氨基酸 424-430

N-肉豆蔻酰化位点。

氨基酸 57-62, 115-120, 170-175, 306-311, 371-376

7 次跨膜受体同源性。

氨基酸 118-386

图 2

鼠 5E9 的全长轻链

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVP
DRFTGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSE
QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYE
RHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:3)

鼠 5E9 的 VL

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVP
DRFTGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:5)

图 3

鼠 5E9 的全长重链

QVQLLQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFSTSYWVQWVKQRPQGQGLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGKATLTDDKYSSAYMQLSSLASEDSAVYYCARWGYAYDIDNWGQGTITVTVSSASTKGPSVYP
LAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSST
WPSQSIITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIAPPKIKDVLMI
SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEF
KCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTN
NGKTELNYKNTEPVLDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSTRTPGK
(SEQ ID NO:4)

鼠 5E9 的 VH

QVQLLQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFSTSYWVQWVKQRPQGQGLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGKATLTDDKYSSAYMQLSSLASEDSAVYYCARWGYAYDIDNWG (SEQ ID NO:6)

图 4

hu5E9.v1 的全长轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLDSDGKTYLNWLQOKPGKAPKRLIYLVSKLDSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCWQGTHTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

hu5E9.v1 的 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLDSDGKTYLNWLQOKPGKAPKRLIYLVSKLDSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCWQGTHTFPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:15)

图 5

hu5E9.v1 的全长重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMQWVRQAPGKGLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRATLSTDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGYAYDIDNWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:14)

hu5E9.v1 的 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMQWVRQAPGKGLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRATLSTDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGYAYDIDNWG (SEQ ID NO:16)

图 6

hu5E9.v2 的 VH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMQWVRQAPGQGLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCARWGYAYDIDNWG (SEQ ID NO:17)

图 7

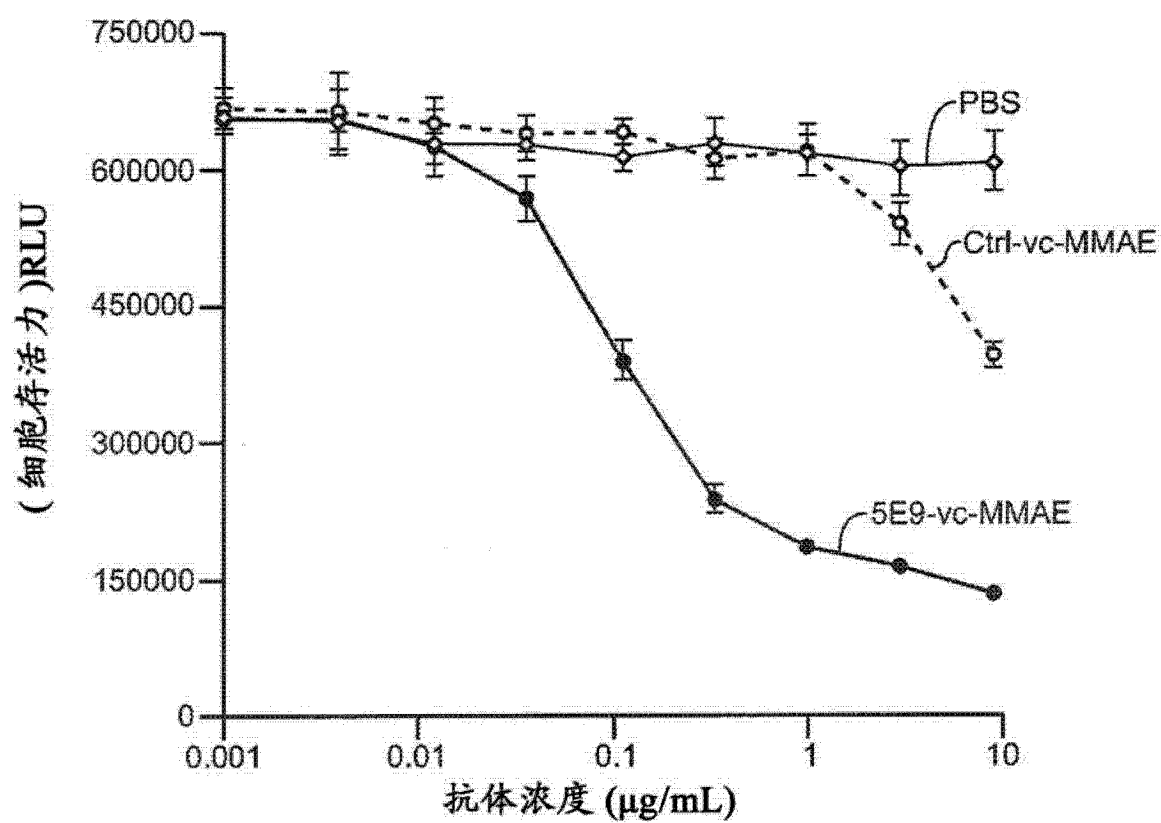


图 8

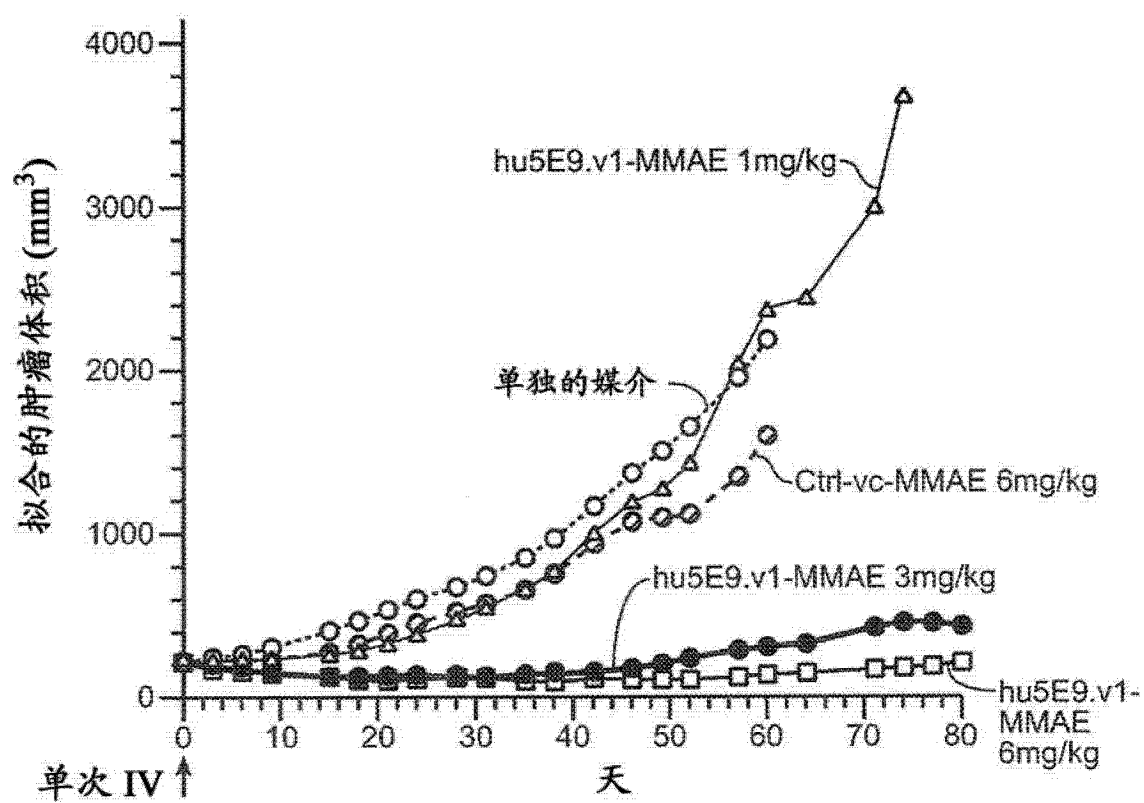


图 9