



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1826138 B

(45) 授权公告日 2012.05.23

(21) 申请号 200480021178.9

(22) 申请日 2004.07.20

(30) 优先权数据

60/489,032 2003.07.22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.01.23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/023143 2004.07.20

(87) PCT申请的公布数据

W02005/010048 EN 2005.02.03

(73) 专利权人 舍林股份公司

地址 德国柏林

(72) 发明人 理查德·哈金斯 德博拉·帕克斯

戈登·帕里 雷娜特·帕里

道格拉斯·施奈德

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5877397 A, 1999.03.02, 全文.

WO 01/44291 A2, 2001.06.21, 第43页第35
行至第45页第2行、第29页至第33页11行、第
29-33页.

审查员 王大鹏

权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图 4 页

(54) 发明名称

RG1 抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及针对 RG1 多肽的抗体、和抗原结合性抗体片段。本发明还涉及将抗体、和抗体片段用于诊断性和治疗性应用的方法。

1. 一种分离的人抗体,其与 RG1 多肽结合,所述 RG1 多肽具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,其中所述抗体包括:

a) 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:26 的轻链可变区和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 的重链可变区,或

b) 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:29 的轻链可变区和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 的重链可变区。

2. 权利要求 1 的抗体,其中所述重链可变区具有氨基酸序列 SEQ ID NO:27。

3. 权利要求 1 的抗体,其中所述重链可变区具有氨基酸序列 SEQ ID NO:28。

4. 权利要求 1 的抗体,其中所述重链可变区具有氨基酸序列 SEQ ID NO:30。

5. 权利要求 1 的抗体,其中所述重链可变区具有氨基酸序列 SEQ ID NO:31。

6. 权利要求 1 的分离的人抗体,其中所述抗体包括:

a) 轻链 CDR3 序列,其包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸残基 110-117;

b) 重链 CDR3 序列,其包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸残基 117-132;

c) 轻链 CDR1 序列和 CDR2 序列,其中所述序列分别包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸残基 44-55 以及 SEQ ID NO:26 的氨基酸残基 71-77;和

d) 重链 CDR1 序列和 CDR2 序列,其中所述序列分别包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸残基 50-54 以及 SEQ ID NO:27 的氨基酸残基 69-84。

7. 权利要求 1 的分离的人抗体,其中所述抗体包括:

a) 轻链 CDR3 序列,其包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸残基 110-117;

b) 重链 CDR3 序列,其包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸残基 117-126;

c) 轻链 CDR1 序列和 CDR2 序列,其中所述序列分别包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸残基 44-55 以及 SEQ ID NO:96 的氨基酸残基 71-77;和

d) 重链 CDR1 序列和 CDR2 序列,其中所述序列分别包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸残基 50-54 以及 SEQ ID NO:30 的氨基酸残基 69-84。

8. 一种包括权利要求 1、6 或 7 之一的抗体的免疫缀合物,其中所述抗体与一种分子缀合,所述分子为治疗剂或可检测的标记物。

9. 权利要求 8 的免疫缀合物,其中所述治疗剂是一种细胞毒剂。

10. 权利要求 9 的免疫缀合物,其中所述细胞毒剂选自蓖麻毒素、阿霉素、柔红霉素、泰素™(紫杉醇)、溴化乙锭、丝裂霉素、足叶乙甙、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、二羟基蒽醌二酮(Dihydroxy anthracin dione)、放线菌素 D、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、蓖麻毒素、相思豆毒蛋白、糖皮质激素和放射性同位素所构成的组。

11. 权利要求 9 的免疫缀合物,其中所述细胞毒剂是一种放射性同位素,其选自由⁴⁶Sc、⁴⁷Sc、⁴⁸Sc、⁷²Ga、⁷³Ga、⁹⁰Y、⁶⁷Cu、¹⁰⁹Pd、¹¹¹Ag、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、²¹¹Bi、²¹²Bi、²¹³Bi 和 ²¹⁴Bi 构成的组。

12. 权利要求 8 的免疫缀合物,其中所述可检测的标记物是放射性标记、酶、生色团、或荧光剂。

13. 权利要求 12 的免疫缀合物,其中所述可检测的标记物是放射性标记,其选自由⁴³Sc、⁴⁴Sc、⁵²Fe、⁵⁵Co、⁶⁸Ga、⁶⁴Cu、⁸⁶Y、^{94m}Tc、¹¹¹In、和 ^{99m}Tc 构成的组。

14. 权利要求 8 的免疫缀合物,其中所述抗体与所述治疗剂或可检测的标记物的缀合

利用一种螯合剂,所述螯合剂选自由 p-SCN- 苄基 -DPTA 和其功能衍生物、1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -N,N',N'',N''' - 四乙酸 (DOTA) 和其功能衍生物、以及 1,4,7- 三氮杂环壬烷 -N,N',N'' - 三乙酸 (NOTA) 和其功能衍生物构成的组。

15. 权利要求 14 的免疫缀合物,其中所用的螯合剂是环己基 -DTPA (CHX-A'' -DTPA) 或 MX-DTPA (1B4M-DTPA)。

16. 权利要求 1、6 或 7 之一的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

17. 结合具有氨基酸序列 SEQ ID NO :2 的 RG1 多肽的多肽,其中所述结合 RG1 多肽的多肽包含权利要求 1、6 或 7 之一的抗体的抗原结合区。

18. 权利要求 8-15 之一的免疫缀合物在制备用于治疗或诊断前列腺癌的药物组合物中的用途。

19. 权利要求 8-15 之一的免疫缀合物在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于选择性破坏一种表达具有氨基酸序列 SEQ ID NO :2 的人 RG1 多肽的细胞。

20. 有效量的权利要求 1-7 或 16 之一的抗体在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于抑制表达具有氨基酸序列 SEQ ID NO :2 的人 RG1 多肽的细胞。

21. 治疗有效量的权利要求 8-15 之一的免疫缀合物在制备用于治疗人类患者中的前列腺癌的药物组合物中的用途,其中所述癌症与具有氨基酸序列 SEQ ID NO :2 的 RG1 多肽的表达相关。

22. 权利要求 18 或 21 的用途,其中所述前列腺癌是进展性的转移性前列腺癌。

RG1 抗体及其用途

[0001] 本申请要求在 2003 年 7 月 22 日提交的美国临时申请 No. 60/489,032 的优先权,在此通过引用将其并入本申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及新的针对多肽 RG1 的抗体, RG1 在前列腺和其他的肿瘤细胞中被优先表达。特别地,本发明涉及这些抗体用于癌症以及癌症转移灶的治疗和检测的用途。

背景技术

[0003] 前列腺癌是一种男性经常发生的疾病,其中发现约三分之一 45 岁以上年龄的男性都患有前列腺癌。目前存在遗传的和环境的病因的证据,大多数病例可能是两种因素的组合的结果。对家族性癌症的研究已经表明遗传易感性在所有前列腺癌患者的约 5-10% 患者以及约 45% 年龄小于 55 岁的男性病例中发挥着作用。

[0004] 目前存在前列腺癌以多步骤疾病的形式发生的证据,其中一种前驱病变是前列腺上皮内瘤形成 (PIN)。疾病的早期是雄激素依赖性的,而晚期是激素非依赖性的。临床上经常可以检测出被称为良性前列腺增生症的前列腺增生性病变,但它可能不是癌症发生过程中的一个阶段。但是,它经常与前列腺癌相关。前列腺的癌症常常是多灶的、通常缓慢生长的、和异质的癌症。晚期的癌症经常转移到淋巴结和骨骼。

[0005] 通过体格检查和通过前列腺特异抗原 (PSA) 的血清水平一般可以诊断前列腺癌。根治性前列腺切除术是局灶病变的治疗选择。目前用睾丸切除术或 GnRH (促性腺激素释放激素) 治疗所诱导的雄激素去除和抗雄激素治疗治疗进展性的转移性疾病。但是,进展性的疾病 (advanced disease) 几乎常常都变为激素抵抗,并且不能治愈进行性疾病 (progressive disease)。另外,存在与根治性前列腺切除术和雄激素去除治疗相关的严重的副作用。这些副作用包括高危的与根治性前列腺切除术相关的尿失禁和阳痿以及与雄激素去除治疗相关的骨折和骨质疏松。

[0006] 因此,存在对用于治疗早期和晚期的前列腺癌的新的治疗方法的大量需求。也存在对新的诊断试剂的显著需求,因为诊断试剂显著地影响着治疗方案。例如,如果疾病已经进展到超出了前列腺并已经转移到了淋巴结,那么就不再进行根治性前列腺切除术,因为它对进展性疾病没有任何作用,反而可能带来显著的不必要的副作用。一种能检测体内转移灶的试剂将具有重大价值。

[0007] 已经证实在前列腺癌中存在着特异蛋白表达的变化,包括 p53 在晚期前列腺癌中的异常表达、降低了水平的 TGF- β 受体、降低了水平的 E-cadherin、C-Cam (一种细胞粘附分子)、和一些整联蛋白。在晚期的雄激素非依赖性的肿瘤中,癌基因 bcl-2 的表达被明显地增高,并且高水平表达 bcl-2 的患者的预后是相当的差。虽然已经很好地证明了先前提及的基因表达的变化,但是已经鉴定出已被证实是疾病的病因的基因的表达没有发生变化。因此,鉴定出其表达与前列腺肿瘤的存在或发生相关的新蛋白将是有益的,它能作用为定向于前列腺癌诊断和治疗的组合物的分子靶点。

[0008] 多肽 RG1 (见美国专利 5,871,969) 是细胞外基质蛋白 Mindin/F-spondin 家族的一种同系物。已证实 RG1 多肽在前列腺组织内高表达 (见 W098/45442), 以及它应当是一种用于前列腺癌的诊断和治疗以及其中有 RG1 表达的其他癌症的有用的靶点。

发明内容

[0009] 本发明提供了对 RG1 多肽具有高度选择性的抗体、或其抗原结合性抗体片段、或其变体, 它可被应用于检测与疾病状态例如前列腺癌、肾癌、结肠或卵巢癌相关的 RG1 表达的方法, 或应用于对这些疾病状态的治疗。

[0010] 为了这些目标, 本发明的一个目的是提供与 RG1 多肽 (SEQ ID NO:2) 中的一个表位特异性结合的分离的抗体、或其抗原结合性抗体片段、或其变体。特别优选的是以小于或等于 $1 \mu\text{M}$ 的解离常数 (K_D) 与 RG1 多肽的表位结合的人抗体, 更优选的是 K_D 小于或等于 100nM , 以及最优选的是 K_D 小于或等于 10nM 。

[0011] 根据本发明的更加优选的实施方式, 提供了分离的抗体和其抗原结合性抗体片段, 其包括一种包括 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0012] 也提供了分离的抗体和其抗原结合性抗体片段, 其包括一种包括 SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的重链可变区。一个特别优选的实施方式是一种人抗体, 它包括一个具有 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区和一个具有 SEQ ID

[0013] NO:27 或 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的重链可变区。第二个特别优选的实施方式是一种人抗体, 它包括一个具有 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的轻链可变区和一个具有 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的重链可变区。

[0014] 在本发明的另一个方面中, 可以预期具有与上述的氨基酸序列具有 80% 序列相同性的氨基酸序列的轻链可变区和重链可变区也属于本发明的范围之内。

[0015] 也提供了编码上述的抗体的轻链和重链可变区的核苷酸序列。优选的是一种包括由包括 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:23 的核苷酸序列编码的轻链可变区的抗体。也优选的是一种包括由包括 SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24 或 SEQ ID NO:25 编码的重链可变区的抗体。

[0016] 根据本发明的这个方面的某些优选的实施方式, 抗体与可检测的标记物结合, 用于作为施用给体外细胞、离体细胞和体内细胞、或多细胞生物体的诊断试剂的用途。特别优选的是一种与放射性标记、酶、生色团或荧光剂结合的抗体。特别优选的检测方法是免疫闪烁法和正电子发射断层术, 其中用于免疫闪烁法的抗体将与放射性同位素例如 ^{111}In 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 结合, 或用于正电子发射断层的抗体将与 ^{43}Sc 、 ^{44}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 或 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 结合。

[0017] 在本发明的另一个方面中, 提供了与治疗剂例如蓖麻毒素或放射性同位素缀合的抗体, 抗体用于施用给体外细胞、离体细胞和体内细胞、或多细胞生物体。在这个方面优选的是细胞毒的治疗剂。特别优选的治疗剂将是与放射性同位素例如 ^{90}Y 和 ^{177}Lu 缀合的抗体。在这个方面的某些优选的实施方式中, 给人患者施用这些结合抗体, 用于治疗以 RG1 表达为特征的疾病状态例如前列腺癌以及特别是进展性的转移性前列腺癌。

[0018] 在本发明的另一个方面, 通过使用螯合剂完成 RG1 抗体或其抗原结合性片段与可检测的标记物或细胞毒剂的缀合, 螯合剂选自 $p\text{-SCN-}$ 苯基 -DTPA 和其衍生物、1,4,7,

10- 四氮杂环十二烷 -N, N' , N'' , N'' ' - 四乙酸 (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N, N' , N'' , N'' ' -tetracetic acid, DOTA) 和其衍生物、以及 1,4,7- 三氮杂环壬烷 -N, N' , N'' - 三乙酸 (1,4,7-triazacyclononane-N, N' , N'' -triacetic acid, NOTA) 和其衍生物所构成的组。

[0019] 本发明的另一个方面是一种用于治疗与 RG1 多肽表达相关的疾病状态例如前列腺的方法,其使用了本发明的免疫缀合物。

[0020] 本发明的另一个方面是一种用于检测与 RG1 多肽表达相关的疾病状态例如前列腺癌的方法,其使用了本发明的免疫缀合物。

[0021] 在本发明的另一个方面中,提供了多肽和抗独特型的抗体,它们可被用于刺激免疫应答。

[0022] 通过下面的描述,本发明的其他目的、特点、优点和方面对于那些熟练的技术人员将是显而易见的。但是要明白仅仅是以举例说明的方式给出了下面的描述和具体的实施例,它们说明了本发明的优选实施方式。通过阅读下面的描述和通过阅读本说明书的其他部分,在所阐述的发明的精神和范围内的各种变化和修饰对于本领域人员将是显而易见的。

附图说明

[0023] 图 1 :¹¹¹In 标记的 RG1 抗体的生物分布 :用 ¹¹¹In 放射性标记三种 RG1 抗体 (A、B 和 C)、非特异的 hIgG1 对照抗体和 Proscint™。给带瘤 (LNCaP) 的裸鼠静脉内施用放射性标记的抗体 (比活性 :0.3mCi/mg)。在注射后 6、24、120 和 150 个小时将每组 12 只动物杀死 (每个时间点 3 只动物),并监测放射性标记在肿瘤、血液和肝脏内的蓄积 (见实施例 11)。

[0024] 图 2 :⁹⁰Y 标记的 RG1 抗体的抗肿瘤作用 :给带 LNCaP 肿瘤的动物注射 ⁹⁰Y 标记的抗体 (抗 RG1 抗体 B 和 C 或非特异的 IgG1,比活性为 0.5mCi/mg)。腹腔内施用单次剂量的 125 μ Ci ⁹⁰Y 标记的 RG1 抗体 (B、C)。在第 32 天杀死小鼠,切下肿瘤并称重 (见实施例 12)。

[0025] 图 3 :人单克隆抗体 B 的链可变区的氨基酸序列,包括突变的重链可变区。V_L (SEQ ID NO :26)、V_H (SEQ ID NO :27)、V_H-2m (SEQ ID NO :28)。

[0026] 图 4 :人单克隆抗体 C 的链可变区的氨基酸序列,包括突变的重链可变区。V_L (SEQ ID NO :29)、V_H (SEQ ID NO :30)、V_H-3m (SEQ ID NO :31)。

具体实施方式

[0027] 定义

[0028] 在说明书、实施例和所附的权利要求书的用途中,除非另有说明,下面的术语具有所说明的含义。

[0029] “rg1”指的是具有 SEQ ID NO :1 所展示的序列的多核苷酸,以及编码具有 SEQ ID NO :2 所展示的 RG1 的氨基酸序列的多肽的多核苷酸,以及编码 RG1 变体、衍生物和片段,以及变体和衍生物的片段的多核苷酸。Rg1 也指的是那些由 RNA 构成的多核苷酸,以及为编码 SEQ ID NO :2 所展示的多肽序列的多核苷酸的互补链的多核苷酸。

[0030] “RG1”指的是具有 SEQ ID NO :2 所展示的氨基酸序列的多肽、其变体和衍生物、和 SEQ ID NO :2 的片段、及其变体和衍生物。当指的是 SEQ ID NO :2 多肽时,术语“变体”、“片

段”和“衍生物”意味着一种基本上保留了与 SEQ ID NO :2 多肽相同的生物学和 / 或免疫学活性的多肽。

[0031] “生物学活性”指的是天然存在的 RG1 多肽的结构性、调节性或生物化学功能。

[0032] “免疫学活性”指的是 (1) 天然的、重组的或合成的 RG1、或其任何片段诱导合适的动物或细胞中的特异的免疫应答以及与特异抗体结合的能力, 或 (2) RG1 的抗体与 RG1 体内结合以及触发针对表达 RG1 的组织或肿瘤的增强了的细胞免疫应答的能力。

[0033] “天然存在的 RG1”指的是还没有被遗传学加工的人类细胞所产生的 RG1 以及特异地预期多肽的翻译后修饰所生成的各种 RG1 形式都属于术语所指的范围之内, 翻译后修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化、酰化和裂解。

[0034] “天然 RG1”或“nRG1”指的是处于其天然构象的 RG1。

[0035] “多核苷酸”通常指的是任何的多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸, 它们可以是未修饰的 RNA 或 DNA 或修饰的 RNA 或 DNA。因此, 例如, 多核苷酸在此指的是单链和双链 DNA (DNA 是单链和双链区的混和物)、单链和双链 RNA (RNA 是单链和双链区的混和物)、包括 DNA 和 RNA 的杂交分子 (DNA 和 RNA 可以是单链的或更常见的是双链的或单链和双链区的混和物) 等等。另外, 多核苷酸在此指的是包括 RNA 或 DNA 或 RNA 和 DNA 的三链区。这些区域内的链可以来自相同的分子或来自不同的分子。这些区域可以包括一个或多个分子的所有区域, 但更常见的是仅仅包括一些分子的一个区域。三螺旋区域的其中一个分子是一种寡核苷酸。

[0036] 术语“多核苷酸”在此包括含有一个或多个修饰碱基的上述的 DNA 或 RNA。因此, 具有因为稳定性或其他的原因而被修饰的骨架的 DNA 或 RNA 是在术语“多核苷酸”在此所指的范围之内。此外, 包括稀有碱基例如次黄嘌呤核苷或修饰碱基例如氘标记碱基的 DNA 或 RNA (仅举两例), 都是在此所用的术语多核苷酸。

[0037] 要明白为了实现本领域人员已知的多种有用的目的, 已经对 DNA 和 RNA 进行了大量的修饰。在此所采用的术语“多核苷酸”包括这些多核苷酸的化学地、酶地、或代谢地修饰的形式, 以及病毒和细胞包括简单和复杂细胞的特征性的 DNA 和 RNA 的化学形式等等。

[0038] “寡核苷酸”指的是相对短的多核苷酸。术语常常指的是单链的脱氧核糖核苷酸, 但它还可以指的是单链或双链的核糖核苷酸、RNA:DNA 杂合体 and 双链 DNA, 等等。通常可以用化学方法例如那些在自动化的寡核苷酸合成器中所应用的方法合成寡核苷酸, 例如单链的 DNA 探针寡核苷酸。但是, 可以用多种其他的方法制备寡核苷酸, 这些方法包括体外重组 DNA 介导的技术和通过 DNA 在细胞和生物体中表达的方法。“寡核苷酸”或“低聚体”或多核苷酸“片段”、“部分”或“节段”指的是至少约 10 个核苷酸以及最多约 60 个核苷酸的多核苷酸序列, 优选的是约 15 到 30 个核苷酸、以及更优选的是约 20-25 个核苷酸。

[0039] “多肽”在此包括下面所述的所有多肽。多肽的基本结构是熟知的并且在本领域的多种教科书和其他的文献中已经将其描述。在上下文中, 术语在此指的是任何包括两个或多个在直链上彼此经肽键连接在一起的氨基酸的多肽或蛋白。术语在此指的是短链 (它在本领域也常被称作为肽、寡肽和低聚体) 和长链 (它在本领域一般被称作为蛋白, 它有多种类型)。

[0040] 要明白多肽常常含有 20 种常被称作为 20 种天然存在的氨基酸的氨基酸以外的氨基酸, 在给定的多肽中, 多个氨基酸包括末端的氨基酸都可以被修饰, 或通过天然过程例如

糖基化和其他的翻译后修饰,或通过本领域熟知的化学修饰技术进行修饰。常见的修饰包括糖基化、脂质连接、硫酸化、谷氨酸残基的 γ 羧化、羟基化和 ADP 核糖基化,在绝大多数基础教科书中都描述了这些修饰以及其他的修饰,例如 I. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, New York, 1993。可以获得多个关于这个主题的详尽的综述,例如 Wold, F., in *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp1-12, 1983; Seifter et al., *Meth. Enzymol* 182:626-646, 1990 and Rattan et al., *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62, 1992 所提供的综述。

[0041] 要明白多肽并非一直都是完全线性的,这一点是熟知的并且上面都有所提及的。例如,作为泛素化的结果,多肽可以有分支的,并且它们可以是环型的,可有或没有分支,这通常是翻译后事件的结果,翻译后事件包括天然加工事件和非天然存在的人为操作所实现的事件。通过非翻译的天然过程和通过完全合成的方法都能合成环型的、分支的和分支环型的多肽。

[0042] 在多肽的任何地方都可以存在修饰,包括肽链骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。事实上,在天然存在的和合成的多肽中,经共价修饰对多肽的氨基或羧基、或两个基团的阻断是常见的,并且这些修饰都可以出现在本发明的多肽中。例如,在蛋白裂解处理之前,在大肠杆菌中所制备出的多肽的氨基末端的残基几乎常常都是 N-甲酰甲硫氨酸。

[0043] 出现在多肽中的修饰常常是多肽是如何被制备的一种体现。例如,对于通过在宿主中表达所克隆的基因制备出的多肽,通过宿主细胞翻译后的修饰能力以及在多肽氨基酸序列中所存在的修饰信号都可以确定出大部分的修饰的性能和程度。例如,熟知的是糖基化通常不会发生在细菌宿主例如大肠杆菌中。因此,当需要糖基化时,应当在糖基化宿主中表达多肽,这通常是真核细胞。昆虫细胞通常可以进行与哺乳动物细胞相同的翻译后的糖基化,因此,已经发展出昆虫表达系统以有效地表达具有天然模式的糖基化等等的哺乳动物蛋白。类似的考虑适用于其他的修饰。

[0044] 一般而言,术语多肽在此包括所有的这些修饰,特别是那些出现在在宿主细胞内表达多核苷酸所合成的多肽中的修饰。

[0045] “衍生物”指的是分别来源于天然存在的 rgl、RG1 或来源于与 RG1 结合的抗体的多核苷酸或多肽,通过化学修饰例如泛素化、标记(例如放射性核素、各种酶的修饰)、PEG 化(聚乙二醇衍生化)或通过在人类蛋白中正常不会存在的氨基酸例如鸟氨酸的插入或取代(或编码这样的一种氨基酸的核苷酸的取代)。

[0046] “编码多肽的多核苷酸”在此包括多核苷酸,它包含编码本发明的多肽,特别是编码具有 SEQ ID NO:2 所展示的氨基酸序列的 RG1 多肽的核苷酸序列。该术语包括那些包含编码多肽的单一连续区域或不连续区域(例如,被内含子所阻断的)连同其他区域的多核苷酸。

[0047] 多肽“片段”、“部分”、或“节段”是一段至少约 5 个氨基酸长的氨基酸残基、常常是至少约 7 个氨基酸长、常见的是至少约 9 到 13 个氨基酸长、以及在不同的实施方式中,是至少约 17 个以上氨基酸长。“片段”指的是具有与上面所提及的 RG1 多肽、或 RG1 的抗体、及其变体或衍生物的氨基酸序列的部分序列但不是全部序列完全相同的氨基酸序列的多肽。

[0048] “缺失”被定义为一种多核苷酸或氨基酸序列的变化，其中相应地有一个或多个多核苷酸或氨基酸残基是不存在的。

[0049] “插入”或“添加”是多核苷酸或氨基酸序列的变化，与天然存在的多肽或氨基酸相比，它相应地造成了一个或多个多核苷酸或氨基酸残基的添加。

[0050] “取代”是相应地由不同的多核苷酸或氨基酸对一个或多个多核苷酸或氨基酸的取代所造成的。

[0051] 术语多核苷酸或多肽的“变体”在此是被如下描述的，以及在本说明书的其他地方被更详细地描述。

[0052] 多核苷酸的变体是一种在多核苷酸序列上不同于另一种参照多核苷酸的多核苷酸。差异通常是被限定的，使得参照的和变体的多核苷酸序列总体上是极为相似的，并且在多个区域上都是相同的。

[0053] 变体的多核苷酸序列的变化可以是沉默 (silent) 变化。也就是说，它们不变更多核苷酸编码的氨基酸。如果变更被限定于这种类型的沉默变化，变体将编码具有与参照氨基酸序列相同的氨基酸序列的多肽。也如下面所提及的，变体的多核苷酸序列的变化可以变更参照多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列。如下所讨论的，这些多核苷酸的变化可以造成参照序列编码的多肽中的氨基酸取代、添加、缺失、融合和截断。

[0054] 多肽的变体是一种在氨基酸序列上不同于另一种参照多肽的多肽。差异通常是被限定的，使得参照的和变体的序列总体上是极为相似的，并且在多个区域上都是相同的。变体和参照多肽在氨基酸序列上的差异可以是一个或多个氨基酸取代、添加、缺失、融合和截断，可以以任何的组合形式出现。通过利用遗传密码中的“多余信息”可以合成或选择出编码这些相同或相似多肽的重组变体。可以引入各种密码子取代例如产生各种限制性内切酶位点的沉默变化，以优化克隆到质粒或病毒载体内或在特殊的原核或真核系统内的表达。也可以引入突变以修饰多肽的性能，以改变配体结合的亲和力、链间亲和力、或多肽降解或转换速度。

[0055] 如在此所讨论的那样，预期多肽、抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的较小变异都在本发明所包含的范围之内，假定氨基酸序列的较小变异保留了原始序列的至少 80%、更优选的至少 85%、90%、95% 和最优选的 99% 的序列。特别地，预期保守氨基酸取代属于本发明的范围之内。保守区域是那些在其侧链有所相关的氨基酸家族内发生的取代。遗传学编码的氨基酸通常被分成以下几种家族：(1) 酸性氨基酸（天冬氨酸、谷氨酸）；(2) 碱性氨基酸（赖氨酸、精氨酸、组氨酸）；(3) 非极性氨基酸（丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸）；和 (4) 不带电荷的极性氨基酸（甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸）。更优选的家族是：丝氨酸和苏氨酸是脂酰羟基家族；天冬酰胺和谷氨酰胺是含酰胺家族；丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸是脂酰家族；和苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸是芳香家族。例如，预计异亮氨酸或缬氨酸对亮氨酸、谷氨酸对天冬氨酸、丝氨酸对苏氨酸的孤立的取代、或一种结构相关的氨基酸对一种氨基酸的相似的取代不会对所形成的分子的结合力或性能造成重要影响是合乎情理的，特别是如果取代没有涉及框架位置内的氨基酸时。通过比较多肽衍生物和未修饰多肽的比活性可以容易地确定出氨基酸变化是否形成了功能性多肽。对于本应用的目的，本发明包括保持了对 RG1 表位的结合亲和力 (K_D) 小于 $1 \mu M$ 的权利要求的抗体的变体。

[0056] 用下面的术语描述两种或多种多核苷酸或氨基酸序列之间的序列关系：“参照序列”、“比较窗”、“序列相同性”、“序列相同性百分比”、“基本上相同性”、“相似性”、和“同源的”。“参照序列”是用作为序列比较的基础的给定序列；参照序列可以是更大的序列的亚组，例如，全长 cDNA 或序列列表内所给出的基因序列的节段，或者参照序列可以包括完整的 cDNA 或基因序列。参照序列通常是至少 18 个核苷酸或 6 个氨基酸长度，经常是至少 24 个核苷酸或 8 个氨基酸长度，以及常常是至少 48 个核苷酸或 16 个氨基酸长度。因为两个多核苷酸或氨基酸序列中的每个序列都可以 (1) 包括一个在两个分子之间是相似的序列（即完整的核苷酸或氨基酸序列的一部分）；和 (2) 还可以包括在两个多核苷酸或氨基酸序列之间是有分歧的序列，所以通常通过比较两个分子在“比较窗”之上的序列进行两个（或多个）分子之间的序列比较，以鉴定并比较序列的局部区域的相似性。“比较窗”在此指的是一个至少 18 个连续核苷酸位点或 6 个氨基酸的概念性节段，其中多核苷酸序列或氨基酸序列可以与至少 18 个连续核苷酸或 6 个氨基酸序列的参照序列比较，并且其中对于两个序列的最佳排列，当与参照序列（没有包括添加或缺失）比较时，比较窗内的多核苷酸序列的部分可以包括 20% 或小于 20% 的添加、缺失、取代、等等（即缺口）。通过 Smith 和 Waterman 的局部同源性算法 *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981)、通过 Neddleman 和 Wunsch 的同源性排列算法 *J. Mol. Biol.* 48:443(1970)、通过 Pearson 和 Lipman 的搜索相似性方法 *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 85:2444(1988)、通过计算机化实现的算法 (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)、Geneworks、或 MacVector 软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA、和 TFasta)、或通过观察、和所选择的各种方法生成的最佳排列（即生成了比较窗之上的最高百分比的同源性）可以进行用于排列比较窗的序列的最佳排列。

[0057] 术语“序列相同性”意思是两个多核苷酸或氨基酸序列在比较窗之上是相同的（即以核苷酸对核苷酸或残基对残基为基础）。通过比较两种在比较窗之上最佳排列的序列，确定出在两个序列中出现相同核酸碱基（例如，A、T、G、U 或 I）或残基的位点的数目以得到匹配位点的数目、用匹配位点的数目除以比较窗内的位点的总数目（即窗口大小）、并用 100 乘以结果得到序列相同性的百分比，计算出术语“序列相同性百分比”。术语“基本上相同性”在此表示一个多核苷酸或氨基酸序列的一种特征，其中当与参照序列在至少 18 个核苷酸（6 个氨基酸）位点的比较窗之上，经常是在至少 24-48 个核苷酸（8-16 个氨基酸）的比较窗之上进行比较时，多核苷酸或氨基酸包括具有至少 85% 序列相同性、优选地至少 90 到 95% 序列相同性、更常见的至少 99% 序列相同性的序列，其中通过在比较窗之上比较参照序列和可能包含缺失或添加的序列计算出序列相同性百分比，这些序列所包括的缺失或添加是参照序列的 20% 或小于 20%。参照序列可以是更大序列的亚组。当被用于描述多肽时，通过比较一个多肽的氨基酸序列及保守氨基酸取代与第二个多肽的序列可以确定出术语“相似性”。当被用于描述多核苷酸时，术语“同源的”表示当具有合适的核苷酸插入或缺失的两个多核苷酸或其指定序列被最佳排列并被比较时，两者的至少 70% 的核苷酸、常从约 75% 到 99% 的核苷酸、和更优选的至少约 98 到 99% 的多核苷酸都是相同的。

[0058] “抗体”或“抗原结合性抗体片段”指的是一种完整抗体、或它的能与完整抗体竞争特异结合的片段。当解离常数小于或等于 $1\ \mu\text{M}$ ，优选的是小于或等于 100nM 和最优选的是小于或等于 10nM 时，认为抗体或抗原结合性抗体片段与抗原特异结合。通过本领域已知

的方法可以测定出结合力,一个实例是应用 BIAcore™ 设备。抗体片段包括完整抗体的一个部分、优选地包括完整抗体的抗原结合区或可变区。结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、和 Fv 片段;双特异性体;线性抗体;单链抗体分子;以及抗体片段所形成的多特异性抗体(C. A. K. Borrebaeck, editor(1995)AntibodyEngineering(Breakthroughs in Molecular Biology),Oxford University Press ;R. Kontermann & S. Duebel, editors(2001)Antibody Engineering(SpringerLaboratory Manual),Springer Verlag)。除“双特异性”或“双功能性”抗体以外的抗体都被理解为是具有相同的结合位点。

[0059] “表位”包括任何能特异地与免疫球蛋白或 T 细胞受体结合的蛋白决定簇。表位的决定簇通常是由化学活性的表面分子簇构成的,例如氨基酸或糖侧链,并且这些决定簇常常具有特异的三维结构特征和特异的电荷特征。如果在用本领域人员熟知的任一种方法实施的竞争性结合检测中,一种抗体表现出与第二种抗体竞争,那么就认为这两种抗体是“与相同的表位结合的”。

[0060] “重组”或“重组 DNA 分子”指的是非天然存在的多核苷酸序列,或通过序列的两个彼此分离的节段的人为组合所制成的多核苷酸序列。经“重组产生的”意思是常常通过化学合成方法或通过多核苷酸的分离片段的人为处理例如通过遗传加工技术所实现的人为组合。通常进行这样的处理以用一个编码相同的或保守氨基酸的多余密码子取代另一个密码子,同时常常引入或去除序列识别位点。同样地,通过进行这样的处理将多核苷酸节段与所需的功能结合在一起,以生成单一的遗传实体,它包括在常见的天然形式中所没有发现的所需功能的组合。通过设计可以包含限制性内切酶识别位点、调节序列、控制序列、或其他有用的特性。“重组 DNA 分子”包括克隆和表达载体。“重组”也可以指的是编码多肽的并用重组 DNA 技术所制备的多核苷酸。

[0061] “分离的”意思是“经人为地”从它的天然状态中所变更的,即如果它是天然存在的,那么它已经被改变或已经将其从其原始环境中取出,或者是上述两者。例如,以其天然状态天然地出现在活体动物中的天然存在的多核苷酸或多肽不是“分离的”,但是与其天然状态的共存物质分开的相同的多核苷酸或多肽却是“分离的”,如在此所应用的术语。例如,对于多核苷酸,术语分离的意思是与天然存在的染色体和细胞分开多核苷酸。多核苷酸和多肽可以存在于例如不是天然存在的组合物的组合物例如培养基剂型、用于例如往细胞内引入多核苷酸或多肽的溶液、用于化学或酶反应的组合物或溶液,并且其中所剩下的分离的多核苷酸或多肽也属于在此所应用的术语的含义之内。

[0062] “基本上纯化的”和“基本上均质的”可交换地使用,并用于描述 RG1 多肽或其片段、或编码相同多肽的多核苷酸节段,其中这些多肽或多核苷酸是与天然伴行成分相互分开的。RG1 多肽或其片段、或编码相同多肽的 DNA 节段基本上没有天然伴随成分,当它与在它的天然状态中所伴行的自然污染物分开时。因此,化学合成的或是在不同于其天然来源细胞的细胞系统中合成的多肽将基本上没有天然伴随成分。相似地,化学合成的或是在不同于其天然来源细胞的细胞系统中合成的多核苷酸将基本上没有天然伴随成分。

[0063] “聚合酶链反应”或“PCR”指的是一种方法,其中如在 1987 年 7 月 28 日提交的美国专利 No. 4, 683, 195 种所述的扩增 DNA 的特异部分。一般而言,必须得到相关的多肽片段的末端或超出该末端的序列信息,这样可以设计出寡核苷酸引物;这些引物将彼此指向,并且在序列上与所扩增的模板的反向链是相同的或相似的。两个引物的 5' 末端核苷酸将与扩

增材料的末端相同。可以用 PCR 从总的基因组 DNA、从总的细胞 RNA 所转录的 cDNA、质粒序列等中扩增出特异的 DNA 序列（常见于 Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, 1987; Erlich, ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989）。

[0064] “严格性”通常出现在从约 T_m （解链温度）-5℃（探针的 T_m 以下 5℃）到约 T_m 以下 20℃到 25℃的范围内。本领域人员明白可以用严格杂交鉴定或检测出相同的多核苷酸序列或鉴定或检测出相似的或相关的多核苷酸序列。术语“严格条件”在此意思是仅仅当序列之间具有至少 95% 以及优选地至少 97% 相同性时才会发生杂交。

[0065] “杂交”在此应当“包含”任何的经碱基配对将一条多核苷酸链与互补链结合在一起的方法（Coombs, J., Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York, N. Y., 1994）。

[0066] “治疗有效剂量”指的是缓解了疾病状态的症状或状况的多肽或其抗体、拮抗剂、或抑制剂包括反义分子和核酶的量。当一个剂量减慢或终止了肿瘤或转移灶的生长，或发现其缩小了肿瘤或转移灶的大小、使得导致了对象的寿命被延长时，那么就认为该剂量是治疗癌症或其转移灶的治疗有效剂量。如果一个剂量导致了患者的总体生活质量的改善即减轻疼痛，那么也认为该剂量是治疗有效的。通过在细胞培养物或实验动物中的标准的药理学方法可以确定出这些化合物的治疗疗效和毒性，例如 ED_{50} （在 50% 人群中治疗有效的剂量）和 LD_{50} （使得 50% 人群致死的剂量）。治疗和毒性作用之间的剂量比值是治疗指数，它可被表示为比值 ED_{50}/LD_{50} 。

[0067] “治疗”在此覆盖了对患者的疾病状态的治疗，这些疾病状态包括以增高了水平的 RG1 为特征的疾病状态，例如前列腺癌或进展性的转移性前列腺癌。

具体实施方式

[0068] 抗体

[0069] 本发明涉及与 RG1 多肽特异性结合的，特别是与具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2 的 RG1 多肽特异性结合的抗体、其抗原结合性抗体片段、以及抗体和片段的变体。这些抗体例如可以是多克隆的或单克隆的抗体。更优选的是单克隆的抗体。仍更优选的是嵌合的或人源化的抗体，以及仍更优选的是人抗体。

[0070] 预期在本发明所属范围之内的抗体、抗原结合性抗体片段、以及抗体和片段的变体以小于或等于 $1\ \mu\text{M}$ 的解离常数 (K_D) 与 RG1 多肽的一个表位结合。更优选的是以小于或等于 100nM 的 K_D 与 RG1 多肽结合的抗体。最优选的是以小于或等于 10nM 的 K_D 与 RG1 多肽结合的抗体。预期也在本发明所属范围之内是识别并与下面所述的抗体结合的表位相同的表位结合的抗体，利用本领域熟知的技术通过竞争结合研究可以确定这些抗体。

[0071] 本发明的抗体、抗原结合性抗体片段、以及抗体和片段的变体由一种轻链可变区和一种重链可变区构成。在这个方面的本发明的优选实施方式中的是抗体、其抗原结合性抗体片段、或其变体，其包括一种与氨基酸序列 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:29 具有至少 80%、更优选的至少 90%、仍更优选的至少 95%、和仍更优选的 99% 序列相同性的轻链可变区。也优选的实施方式是抗体、其抗原结合性抗体片段、或其变体，其包括一种与氨基酸序列 SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 具有至少 80%、更优选的至少 90%、仍更优选的至少 95%、和仍更优选的 99% 序列相同性的重链可变区（见图

3 和 4)。

[0072] 本发明的特别优选的实施方式是抗体、其抗原结合性抗体片段、或其变体,包括一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :26 或 SEQ ID NO :29 的轻链可变区,它们相应地是由核苷酸序列 SEQ ID NO :20 和 23 编码的。

[0073] 也特别优选的实施方式是抗体、其抗原结合性抗体片段、或其变体,包括一种具有选自 SEQ ID NO :27、28、30 或 31 的氨基酸序列的重链可变区,它们相应地是由核苷酸序列 SEQ ID NO :21、22、24 和 25 编码的。

[0074] 在这个方面的更优选的实施方式是抗体、或其抗原结合性抗体片段、或其变体,包括一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :26 的轻链可变区以及还包括一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :27 或 SEQ ID NO :28 的重链可变区,和第二种抗体包括一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :29 的轻链可变区以及还包括具有一种氨基酸序列 SEQ ID NO :30 或 SEQ ID NO :31 的重链可变区。

[0075] 最优选的是人抗体、或其抗原结合性抗体片段、或其变体,如下:(1) 一种抗体,其包括一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :26 的轻链可变区和一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :27 的重链可变区,(b) 一种抗体,其包括一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :26 的轻链可变区和一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :28 的重链可变区,(c) 一种抗体,其包括一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :29 的轻链可变区和一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :30 的重链可变区,(d) 一种抗体,其包括一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :29 的轻链可变区和一种具有氨基酸序列 SEQ ID NO :30 的重链可变区。

[0076] 抗体生产

[0077] 可以将 RG1 多肽、片段或衍生物、或表达它们的细胞用作为免疫原以生成它们的抗体 (Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY(1989))。可以用本领域已知的各种方法生产这些抗体和片段 (C.A.KBorrebaeck, editor(1995)Antibody Engineering(Breakthroughs in MolecularBiology);Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editors(2001)Antibody Engineering(Springer Laboratory Manual), SpringerVerlag)。

[0078] 通过往动物体内直接注射多肽或通过给动物(优选的是非人的动物)施用多肽都可以得到所生成的抗 RG1 的抗体。然后所得到的抗体本身将与多肽结合。通过这种方式,也可以用甚至仅仅编码多肽的一个片段的序列生成与整个天然多肽结合的抗体。然后这些抗体可被用于从表达多肽的组织中分离出多肽。不需要使用纯化的 RG1 蛋白或 RG1 肽生成 RG1 的抗体的可选择的方法包括 DNA 免疫接种法,其中利用编码 RG1 的 DNA 生成表达载体或病毒,并用该载体或病毒转染或感染宿主的组织细胞,使得在用于生成抗体的动物中表达 RG1 ;或基于细胞的免疫接种法,其中在免疫接种过程中使用体外形成的表达 RG1 的细胞株。

[0079] 利用任何技术都可以制备单克隆抗体,它们提供了用连续细胞培养所产生的抗体。实例包括用杂交瘤技术 (Kohler and Milstein, Nature 256 :495-497,1975)、人 B 细胞杂交瘤技术 (Kozbor et al., Immunology Today 4 :72,1983) 和 EBV 杂交瘤技术生产人单克隆抗体 (Cole et al., inMonoclonal Antibodies and Cancer, Alan R.Liss, Inc., 77-96,1985)。对于使用表达 RG1 的细胞株的基于细胞的免疫接种法,可以用消减免疫接

种使得动物对亲代细胞株产生免疫耐受 (Sleister, H. M. and Rao, A. G., J. Immunological Methods 261 :213-220, 2002)。

[0080] 另外,发展出了用于生产“嵌合抗体”的技术,可以使用将小鼠抗体基因剪接到人抗体基因中以得到具有合适的抗原特异性和生物学活性的分子的技术 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-6855, 1984 ;Neuberger et al., Nature 312 :604-608, 1984 ;Takeda et al., Nature 314 :452-454, 1985)。同样的,所述的用于生产单链抗体的技术 (美国专利 No. 4, 946, 778) 可适用于生产 RG1 特异的单链抗体。

[0081] 此外,用在美国专利 Nos. 5, 877, 397 和 5, 569, 825 中所述的方法可以生产“人”抗体,在此将其全部内容一同并入参考,或通过应用异种小鼠TM,如在 Mendez et al. Nature Genetics 15 :146-156, 1997 中所述的那样。利用噬菌体展示技术也可以生成这些抗体 (Rader et al., Current Opinion in Biotechnology 8 :155-168, 1997 ;Aujame et al., Human Antibodies 8 :155-168, 1997)。人抗体的生成是非常吸引人的,因为预计这些抗体可使得人对小鼠或小鼠来源的单克隆抗体的内在的免疫原性的和过敏性的应答最小化。在实施例 4 中描述了识别 RG1 多肽 (SEQ ID NO :2) 的表位的人抗体的生成。

[0082] 通过体内诱导淋巴细胞群中的生产或通过筛选重组免疫球蛋白库或高特异性结合试剂的名单也可以生成抗体,如在 Orlandi et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :3833-3837, 1989 和 Winter 及 Milstein (Nature 349 :293-299, 1991) 所阐述的那样。

[0083] 也可以生成含有 RG1 的特异结合位点的抗体片段。使用抗体片段而不是整个抗体常常具有优点,因为更小尺寸的片段可以导致更快的清除,并且也可以更好地接近实体肿瘤。

[0084] 这些片段包括但不限于 $F(ab')_2$ 片段,它可以通过胃蛋白酶消化抗体分子而生成,和 Fab 片段,它可以通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫键桥而生成。同样地,可以构建 Fab 表达库,使得容许对具有所需特异性的单克隆 Fab 片段的快速的和容易的鉴定 (Huse et al., Science 256 :1270-1281, 1989)。从大肠杆菌和各种真核细胞的表达系统中都可以表达并分泌 Fab、Fv 和 ScFv 抗体片段,这使得可以生产大量的这些抗体。同样地,可以从大肠杆菌中定向地回收 $Fab'-SH$ 片段,并化学地结合形成 $F(ab')_2$ 片段 (Carter et al., Bio Technology 10 :163-167 (1992))。用于生产抗体片段的其他技术对于本领域人员是已知的。也包括单链 Fv 片段 (scFv)、微型双功能抗体 (diabody)、微抗体 (minibody) 和其他的基因工程加工的抗体片段 (见美国专利 No. 5, 576,1894 和 5, 587, 458 ;Hudson et al. Nature Medicine 9 :129-133, 2003)。Fv 和 sFv 片段是具有完整的结合位点并缺少恒定区的抗体种类的实例,因此,它们在体内应用中更可能表现出非特异结合力的减低,并特别优选地用作为显像剂 (C. A. K Borrebaeck, editor (1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press ;R. Kontermann & S. Duebel, editors (2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag)。抗体片段也可以是“线性抗体”。例如,如在美国专利 No. 5, 641, 870 中所述的抗体。这些线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0085] 预期在此所述的抗体或抗体片段的变体也属于本发明的范围之内,利用用于保守和非保守突变的任一种技术和指南都可以制备出这些变体,例如美国专利 No. 5, 364, 934。变异包括编码抗体的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,造成了与天然抗体序列相比

时的氨基酸序列的变化。这些预期属于本发明范围内的变异的应用包括那些导致 (1) 对蛋白裂解或氧化灭活的易感性的降低 ; (2) 对形成蛋白复合物的结合亲和力或对抗原的结合亲和力的变更 ; (3) 体内清除或生物分布的变更 ; (4) 抗体同种型或同种异型的变化 ; (5) 抗体的功能特性例如 Fc 受体结合力的变化 ; (6) 减少或增加了免疫原性的表位序列的变更 ; 和 (7) 这些类似物的生理化学或功能特性的其他变化的应用。通过使得在 RG1 抗体和同源蛋白之间高度同源的区域所造成的氨基酸序列变化的数目最小化, 可以找出确定插入、取代或缺失氨基酸残基而没有反向地影响所需活性的指导。通过系统地进行序列的氨基酸插入、缺失或取代并测试所形成的变体的天然序列所表现出的活性, 可以确定出所容许的变异。

[0086] 一种取代变体的特别优选的类型包含取代亲代抗体 (例如人抗体) 的一个更高可变区的残基。一般而言, 相对于从中生成变体的亲代抗体, 所选定的用于进一步发展的所形成的变体将具有改良的生物学性能。用于生成这些取代变体的便利方法包含使用噬菌体展示的亲和力突变 (Schier R., J. Mol. Biol., 263 :551-67, 1996)。然后如在此所述的筛选变体的生物学活性 (例如结合亲和力) (见实施例 4)。为了鉴定出能成为用于修饰的较好的候选者的高变区的残基, 可以进行丙氨酸扫描诱变以鉴定出对抗原结合起到重要作用的高变区的残基。在一种或多种相关检测中具有更优性能的抗体可用于进一步的发展。

[0087] 可用在此所给出的 RG1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2) 选择出用于生成抗体的 RG1 多肽的特异区域。本领域人员要明白, 抗体所定向的 RG1 多肽的区域或表位可以随着预期应用的不同而不同。例如, 预期用于检测前列腺细胞上的膜结合的 RG1 的免疫检测法中的抗体应当定向于 RG1 多肽上的可接近的表位。利用各种本领域已知的其他方法可以容易地鉴定出表现出免疫原性结构的 RG1 多肽的区域以及其他的区域和结构域, 这些方法是例如 Chou-Fasman、Garnier-Robson、或 Jameson-Wolf 分析。含有这些残基的片段特别地适用于生成抗 RG1 抗体。有用的片段包括但不限于序列 PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO :8) ; HSSDYSMWKRNQYVS (SEQ ID NO :10) ; DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEQ ID NO :11) ; 和 NEIVDSASVPET (SEQ ID NO :12)。在实施例 4 中描述了针对这些区域的多克隆抗体的生成。

[0088] 识别 RG1 的表位的抗体的用途

[0089] 本发明的抗体、抗原结合性抗体片段、和其变体在诊断性检测法、显像方法学、和用于治疗癌症的治疗性方法中可能是特别有用的, RG1 在这些癌症中是过量表达的, 包括前列腺癌、肾癌、结肠癌和卵巢癌。

[0090] 本发明提供了各种用于检测 RG1 多肽和用于诊断癌症例如前列腺癌的免疫学检测法。这些检测法通常包括一种或多种能识别并结合 RG1 多肽的 RG1 抗体。最优选的抗体将与 RG1 选择性结合, 且不会与非 RG1 的多肽结合 (或弱结合)。检测法包括本领域熟知的各种免疫学检测格式, 包括但不限于各种类型的放射免疫检测法、酶联免疫吸附检测法等等。另外, 本发明也提供了能检测前列腺癌的免疫显像方法, 包括但不限于利用标记的 RG1 抗体的放射闪烁显像方法。这些检测法在癌症例如前列腺癌的检测、监测和预后上可能是临床有用的。

[0091] 可以采用上述的抗体通过将抗体连接到用于经亲和色谱法的分离和 / 或纯化的固相支持物上, 分离或鉴定出表达多肽的克隆, 或纯化本发明的多肽。

[0092] 另外, 可以利用细胞分选和纯化技术用 RG1 抗体分离 RG1 阳性细胞。具体的, 利用

基于抗体的细胞分选或亲和纯化技术,可以用 RG1 抗体从异种移植的肿瘤组织、从培养物的细胞等中分离出前列腺癌细胞。本发明的 RG1 抗体的其他用途包括生成模拟 RG1 多肽的抗独特型抗体。

[0093] 可以用 RG1 抗体检测是否存在前列腺癌或肿瘤转移。可以用 RG1 抗体检测在各种生物学样本包括血清、前列腺和其他组织活检样本中是否存在这些含 RG1 的细胞。另外,可以在多种显像方法中使用 RG1 抗体,例如使用 ^{99m}Tc (或其他同位素) 缀合的抗体的免疫闪烁法。例如,可以用与一种最近描述的使用 ^{111}In 结合的抗 PSMA 抗体的显像方案相似的显像方案检测复发性和转移性前列腺癌 (Sodee et al., Clin. Nuc. Med. 21 :759-766, 1997)。可以使用的其他的检测方法是正电子发射断层 (见 Herzoget et al., J. Nucl. Med. 34 :2222-2226, 1993)。

[0094] 本发明的 RG1 抗体可以被可检测的标记物标记,或可以与第二种分子例如细胞毒剂结合,并可被用于将第二种分子靶向于 RG1 阳性细胞 (Vitetta, E. S. et al., Immunotoxin Therapy, in DeVita, Jr., V. T. et al., eds, Cancer :Principles and Practice of Oncology, 4th ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636, 1993)。细胞毒剂的实例包括但不限于蓖麻毒素、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、溴化乙锭、丝裂霉素、足叶乙甙、替尼泊苷 (tenoposide)、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、二羟基炭疽菌素二酮 (Dihydroxy anthracin dione)、放线菌素 D、白喉毒素、Epothilones、假单胞菌外毒素 (PE)A、PE40、相思豆毒蛋白、糖皮质激素和其他的化疗药物、以及放射性同位素。用抗体与一种具有所需的抗肿瘤细胞学活性的合适的细胞因子、化学因子、干扰素、或生长因子的遗传的或化学的融合都可以生成细胞毒的或抗增殖的靶向的融合蛋白 (Asgeirsdottir et al., Biochem. Pharmacol. 15 :1729-1739, 2003)。合适的可检测的标记物包括但不限于放射性同位素、荧光化合物、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合剂或酶。用于免疫治疗或用于用作为可检测的标记物的合适的放射性同位素包括下面的同位素:镅-124、镅-125、砷-74、钡-103、钡-140、铍-7、铍-106、铍-107、镅-109、镅-115m、钙-45、钷-139、钷-141、钷-144、铯-137、铬-51、钴-56、钴-57、钴-58、钴-60、钴-64、铊-169、镧-152、钆-153、金-195、金-199、铪-175、铪-181、铟-111、碘-123、碘-131、铈-192、铁-55、铁-59、氮-85、铅-210、镭-177、镭-54、汞-197、汞-203、钼-99、钼-147、镎-237、镍-63、铈-95、钷-185+191、钷-103、钷-195m、镭-143、钷-147、钷-233、镭-2226、镭-186、铷-86、钷-103、钷-106、钷-44、钷-46、钷-75、银-110m、银-111、钠-22、铈-85、铈-89、铈-90、硫-35、钷-182、钷-99m、钷-125、钷-132、钷-170、钷-204、钷-228、钷-232、锡-113、钷-44、钷-185、钷-48、钷-49、钷-169、钷-88、钷-90、钷-65、和钷-95。

[0095] 利用一种螯合剂完成对抗体的放射性标记,螯合剂与抗体共价连接,在螯合剂内插入有放射性核素。优选的螯合剂可见于 Srivastava et al. Nucl. Med. Bio. 18 :589-603, 1991 和 McMurtry et al., J. Med. Chem. 41 :3546-3549, 1998。或来源于 H. Chong, K. et al., J. Med. Chem. 45 :3458-3464, 2002 所发表的所谓的 NOTA 螯合剂,在此将其全部内容一同并入参考。特别优选地用于放射性同位素与 RG1 抗体结合的螯合剂是双功能螯合剂 p-SCN-Benzyl-DTPA (Brechtel et al. Inorg. Chem. 25 :2772-2781, 1986) 的衍生物,例如,环己基-DTPA (CHX-A''-DTPA, Wu et al., Bioorg. Med. Chem. 10 :1925-1934, 1997) 和 MX-DTPA (1B4M-DTPA, McMurtry et al., J. Med. Chem., 41 :3546-3549, 1998), 以及 1,4,7-三

氮杂环壬烷-N,N',N''-三乙酸 (NOTA) (Chong et al. J. Med. Chem. 45 :3458-3464, 2002)。用 Nikula et al. Nucl. Med. Biol. 3 :387-390, 1995 的方法可以完成结合。特别优选的用作用于免疫闪烁法的可检测的标记物是放射性同位素 ^{111}In 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。用于正电子发射断层优选的可检测的标记物是 ^{43}Sc 、 ^{44}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 和 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 。对于免疫治疗,可以使用发射 β 射线的放射性同位素 ^{46}Sc 、 ^{47}Sc 、 ^{48}Sc 、 ^{72}Ga 、 ^{73}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、和 ^{188}Re ,以及发射 α 射线的放射性同位素 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 和 ^{214}Bi 。优选的是 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{72}Ga 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 和 ^{212}Bi ,特别优选的是 ^{90}Y 和 ^{177}Lu 。

[0096] 前列腺癌和其他癌症的免疫治疗

[0097] 本发明提供了各种用于治疗前列腺癌和其他癌症的免疫治疗的方法,包括抗体治疗、体内疫苗和离体免疫治疗方法。其他癌症包括肾癌、结肠癌和卵巢癌。在一种方法中,本发明提供了可被全身使用以治疗前列腺癌的 RG1 抗体。例如,可以将未结合的 RG1 抗体引入到患者体内,使得抗体与前列腺癌细胞上、内或与之相关的 RG1 结合,并介导细胞和肿瘤的破坏,作用机理可以包括补体介导的细胞裂解、抗体依赖性细胞的细胞毒性、变更 RG1 的生理功能、和 / 或抑制配体结合或信号传导途径。如上所述的,也可以治疗性地使用与细胞毒剂例如蓖麻毒素或放射性同位素结合的 RG1 抗体,以将细胞毒剂直接转运到带有 RG1 的前列腺肿瘤细胞,并据此破坏肿瘤细胞。

[0098] 利用 RG1 抗体的前列腺癌免疫治疗可以遵循从已经被成功地应用于其他类型癌症的各种方法中所生成的教训,其他类型的癌症包括但不限于结肠癌 (Arlen et al., Crit. Rev. Immunol. 18 :133-138, 1998)、多发性骨髓瘤 (Ozaki et al., Blood 90 :3179-3186, 1997; Tsunenari et al., Blood 90 :2437-2444, 1997)、胃癌 (Kasprzyk et al., Cancer Res. 52 :2771-2776, 1992)、B 细胞淋巴瘤 (Funakoshi et al., Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19 :93-101, 1996)、白血病 (Zhong et al., Leuk. Res. 20 :581-589, 1996)、结直肠癌 (Moun et al., Cancer Res. 54 :6160-6166, 1994; Velders et al., Cancer Res. 55 :4398-4403, 1995)、和乳腺癌 (Shepard et al., J. Clin. Immunol. 11 :117-127, 1991)。

[0099] 本发明还提供了配制成的含有 RG1 多肽或其片段的疫苗。肿瘤抗原在抗癌症治疗中所用的用于产生体液和细胞介导的免疫的疫苗中的用途在本领域是熟知的,并且利用人的 PSMA 和啮齿类动物的 PAP 免疫原的肿瘤抗原已经被应用于前列腺癌 (Hodge et al., Int. J. Cancer 63 :231-237, 1995; Fong et al., J. Immunol. 159 :3113-3117, 1997)。通过采用 RG1 多肽、或其片段、或编码 RG1 的核酸分子以及能表达并合适地呈递 RG1 免疫原的重组载体可以容易地实践这些方法。

[0100] 例如,可以用病毒基因转运系统转运编码 RG1 的核酸分子。在本发明的这个部分的实践中可以使用的各种病毒基因转运系统包括,但不限于牛痘、禽痘、金丝雀痘、腺病毒、流感病毒、骨髓灰质炎病毒、腺伴随病毒、慢病毒、和新培斯病毒 (Restifo, in Curr. Opin. Immunol. 8 :658-663, 1996)。利用将编码 RG1 多肽或其片段的裸 DNA 引入到患者体内 (即经肌肉内注射) 以诱导抗肿瘤应答,也可以使用非病毒的转运系统。在一个实施方式中,可以采用全长的人 rg1 cDNA。在另一个实施方式中,可以采用人 rg1 cDNA 的片段。在另一个实施方式中,可以采用编码特异的 T 淋巴细胞 (CTL) 表位的 rg1 核酸分子。用特异的算法 (例如 Epimer, 布朗大学) 可以确定 CTL 表位,以鉴定出在 RG1 多肽内能与特异的

HLA 等位基因最佳结合的肽。

[0101] 也可以采用各种离体策略。一种方法包含用树突状细胞呈递作为人免疫系统的抗原的 RG1 多肽的用途。树突状细胞表达 I 型和 II 型 MHC、B7 辅助刺激因子、和 IL-12, 因此它是非常专门的抗原呈递细胞。在前列腺癌中, 用前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 肽致敏的自体树突状细胞正被用于 I 期临床试验, 以刺激前列腺癌患者的免疫系统 (Tjoa et al., Prostate 28 :65-69, 1996 ;Murphy et al., Prostate 29 :371-380, 1996)。可以用树突状细胞给具有 I 型和 II 型 MHC 分子的 T 细胞呈递 RG1 多肽。在一个实施方式中, 用能与 MHC 分子结合的 RG1 多肽致敏自体树突状细胞。在另一个实施方式中, 用完整 RG1 多肽致敏树突状细胞。仍是另一个实施方式包含利用本领域已知的各种加工载体的遗传加工使得 rg1 基因在树突状细胞内的过度表达, 这些加工载体例如是腺病毒 (Arthur et al., Cancer Gene Ther. 4 :17-25, 1997)、逆转录病毒 (Henderson et al., Cancer Res. 56 :3763-3770, 1996)、慢病毒、腺伴随病毒、DNA 转染 (Ribas et al., Cancer Res. 57 :2865-2869, 1997)、和肿瘤来源的 RNA 转染 (Ashley et al., J. Exp. Med. 186 :1177-1182, 1997)。

[0102] 在抗癌症治疗中, 抗独特型抗 RG1 抗体也可被用作为一种用于诱导针对表达 RG1 多肽的细胞的免疫应答的疫苗。具体地, 抗独特型抗体的生成在本领域是熟知的, 并且它可以被容易地适用于生成模拟 RG1 多肽上的一个表位的抗独特型抗 RG1 抗体 (见, 例如, Wagner et al., Hybridoma 16 :33-40, 1997 ;Foon et al., J. Clin. Invest. 96 :334-342, 1995 ;Herlyn et al., Cancer Immunol Immunother 43 :65-76, 1996)。如当前其他的定向于肿瘤抗原的抗独特型抗体所实践的那样, 这样一种抗独特型抗体可被用于抗独特型治疗。

[0103] 可以采用遗传免疫接种方法生成定向于表达 RG1 的癌症细胞的预防性或治疗性的体液和细胞免疫应答。利用在此所述的编码 RG1 的 DNA 分子, 可以将包括编码 RG1 多肽 / 免疫原以及合适的调节序列的构建体直接注射到个体的肌肉或皮肤内, 这样肌肉或皮肤的细胞可以摄取构建体并表达所编码的 RG1 多肽 / 免疫原。RG1 多肽 / 免疫原可以被表达为细胞表面的多肽或被分泌。RG1 多肽 / 免疫原的表达引起针对前列腺癌的预防性或治疗性的体液和细胞免疫的生成。可以使用本领域已知的各种预防性和治疗性的遗传免疫接种法 (其综述, 见在因特网网址 [www. genweb. Com](http://www.genweb.Com) 中所发表的信息和参考文献)。

[0104] 用于鉴定与 RG1 结合的试剂的检测法

[0105] 本发明也涉及可被用于鉴定与 RG1 结合的试剂 (即抗体、肽等) 的检测法和方法。具体地, 通过 RG1 配体或其他试剂或成分与 RG1 结合的能力和 / 或抑制 / 刺激 RG1 活性的能力可以鉴定与 RG1 结合的试剂。

[0106] 如上所述, 用含有作为抗原区的肽免疫接种合适的哺乳动物对象, 得到抗体, 预计 RG1 多肽的这些部分是抗体的靶点。在竞争结合研究中使用这些试剂以鉴定出第二代抑制试剂并阻断 RG1 活性。

[0107] 与 RG1 多肽结合的试剂例如 RG1 抗体可被用于调控 RG1 的活性, 用于将抗肿瘤药物靶向于合适的哺乳动物, 或用于鉴定阻断与 RG1 相互作用的试剂。通过使用与 RG1 结合的试剂可以靶向于或鉴定表达 RG1 的细胞。

[0108] 如何使用 RG1 结合试剂依赖于 RG1 结合试剂的性质。例如, RG1 结合试剂可被用于: 将结合的毒素例如白喉毒素、霍乱毒素、蓖麻毒素或假单胞菌外毒素转运给表达 RG1 的

细胞 ;调控 RG1 活性 ;直接杀死表达 RG1 的细胞 ;或筛选鉴定出竞争性结合试剂。例如, RG1 抑制试剂可被用于直接抑制表达 RG1 的细胞的生长,而 RG1 结合试剂可被用作诊断性试剂。

[0109] 药物组合物和给药

[0110] 本发明也涉及药物组合物,它可以包括单独的 rg1 多核苷酸、RG1 多肽、抗体、激动剂、拮抗剂、或抑制剂、或组合有至少一种其他的试剂例如稳定化合物,可以用任何无菌的、生物兼容的药用载体施用药物组合物,药用载体包括但不限于盐水、缓冲盐、葡萄糖、和水。在混和有赋形剂或药用可接受载体的药物组合物中,这些分子中的任何一种都可以被单独地施用给患者,或联合其他的试剂、药物或激素一起施用给患者药用可接受载体。在本发明的一个实施方式中,药用可接受载体是药用的惰性物质。

[0111] 本发明也涉及药物组合物的给药。口服或肠外途径实现这样的给药。肠外送药的方法包括局部、动脉内(直接到肿瘤)、肌肉内、皮下、髓内、鞘内、脑室内、静脉内、腹腔内、或鼻内给药。除了活性成分以外,这些药物组合物可以含有合适的药用可接受载体,包括可促进将活性化合物加工到制剂内的可药用使用的赋形剂和辅料。在最新版的 Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.) 中可找到更多的关于剂型和给药的技术的内容。

[0112] 利用本领域熟知的药用可接受载体可以配制成适用于口服给药的剂量的用于口服给药的药物组合物。这些载体能使得药物组合物被制剂为能被患者消化的片剂、药丸、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、膏剂、悬浮液等。

[0113] 通过活性化合物和固体赋形剂的组合可以得到用于口服使用的药用制剂,在按需加入合适的辅料之后,任意地碾磨所形成的混和物和加工颗粒的混和物以得到片剂或锭剂核。合适的赋形剂是碳水化合物或蛋白填充剂例如糖包括乳糖、蔗糖、甘露糖、或山梨糖 ;来自玉米、小麦、水稻、马铃薯、或其他植物的淀粉 ;纤维素例如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、或羧甲基纤维素钠 ;以及树胶包括阿拉伯树胶和西黄蓍树胶。如果需要,可以加入分解剂或增溶剂,例如交联的聚乙烯吡咯酮、琼脂、海藻糖、或其盐,例如海藻酸钠。

[0114] 给锭剂核提供合适的涂层例如浓缩的糖溶液,它也可以包含阿拉伯树胶、滑石粉。聚乙烯吡咯酮、聚羧乙烯凝胶、聚乙二醇和 / 或二氧化钛、漆溶液、和合适的有机溶剂或溶剂混和物。可以给片剂或锭剂涂层加上染料或色素,用于产品识别或描绘活性化合物的量即剂量。

[0115] 可以口服使用的药用剂型包括用凝胶制成的 push-fit 胶囊、以及用凝胶制成的软的、密封的胶囊以及一种涂层例如甘油或山梨糖。Push-fit 胶囊可以含有与填充剂或结合剂例如乳糖或淀粉、润滑剂例如滑石粉或硬脂酸镁以及任意的稳定剂混和的活性成分。在软胶囊中,活性成分可以溶解或悬浮在合适的液体中,例如脂肪油、液体石蜡、或液体聚乙二醇,有或没有稳定剂。

[0116] 用于肠外给药的药用剂型包括活性化合物的水溶液。对于注射,本发明的药物组合物可以制剂于水溶液中,优选地是在生理兼容的缓冲液例如 Hank 溶液、Ringer 溶液、或生理缓冲盐水中。水性注射悬浮液可以含有增加悬浮液的粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。另外,活性化合物的悬浮液可被制成为合适的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油例如麻油、或合成的脂肪酸酯例如油酸乙酯或甘油三

酯、或脂质体。任意地，悬浮液也可以含有合适的稳定剂或增加化合物的溶解性的试剂，以容许制备高度浓缩的溶液。

[0117] 对于局部或鼻部给药，在制剂中使用了适用于所需穿透的特殊屏障的穿透剂。这些穿透剂在本领域通常是已知的。

[0118] 试剂盒

[0119] 本发明还涉及药用包装和试剂盒，包括一个或多个装满前面所提及的本发明的组合物的一种或多种成分的容器。与这些容器在一起的可以是政府部门所给出的通知形式，它规定了药用的或生物学的产品的生产、使用或销售，反映了施用给人的产品的生产、使用或销售的部门的批准。生产和储存

[0120] 可以以本领域已知的方式生产本发明的药物组合物，例如通过传统的混和、溶解、颗粒化、制锭、碾磨、乳化、包囊化、装填或冻干过程的方式。

[0121] 药物组合物可以被提供为一种盐，并且可以由多种酸形成，这些酸包括但不限于盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。盐在水或其他的质子溶剂中可能具有更高的溶解性，其中它们是相应的游离碱形式。在其他情况中，优选的制剂可以是一种亲脂性粉末，在使用之前将其与缓冲液联合，其中该粉末含有 1mM 50mM 组氨酸、0.1% -2% 蔗糖、2% -7% 甘露糖，pH 范围为 4.5 到 5.5。

[0122] 在已经制备出制剂于可药用载体中的包括本发明的化合物的药物组合物之后，将它们放置在合适的容器中，并被标记为用于所适用病变的治疗。对于施用 RG1，这些标记将包括施用的量、频率和方法。治疗有效剂量

[0123] 适用于本发明的药物组合物包括组合物，其中含有实现预期目的即治疗以 RG1 表达为特征的特殊的疾病状态的有效量的活性成分。对有效剂量的确定是在本领域人员的能力范围之内。

[0124] 对于任何化合物，最初可以在细胞培养物检测中例如肿瘤细胞或可以在动物模型通常是小鼠、兔、狗或猪中估计出治疗有效剂量。也可用动物模型得到所需的浓度范围和给药途径。然后可以用这些信息确定出施用给人的剂量和途径。

[0125] 治疗有效剂量指的是缓解症状或状况的蛋白或其抗体、拮抗剂、或抑制剂的量。用细胞培养物或实验动物中的标准药学方法可以确定出这些化合物的治疗疗效和毒性，例如 ED_{50} （在人群的 50% 中治疗有效的剂量）和 LD_{50} （使得人群的 50% 致死的剂量）。治疗和毒性作用之间的剂量比值是治疗指数，它可被表示为比值 ED_{50}/LD_{50} 。表现出较大的治疗指数的药物组合物是优选的。从细胞培养物检测和动物研究中得到的数据可用于制定出人类应用的剂量范围。这些化合物的剂量优选地是处于包括 ED_{50} 且具有很小的或没有毒性的循环浓度的范围之内。在这个范围内的剂量的不同依赖于所采用的剂量形式、患者的严重程度、和给药途径。

[0126] 每个医生都结合所治疗的患者的情况选择实际的剂量。调整剂量和给药方式以提供活性部分的有效水平或保持所需的作用。可以被考虑到的其他因素包括疾病状态的严重程度例如肿瘤大小和位置；患者的年龄、体重和性别；饮食、给药的时间和频率、药物组合、反应的敏感性、和对治疗的耐受性 / 反应性。根据特殊制剂的半衰期和清除率，可以每 3 到 4 天、每周、或每两周一次施用长时间作用的药物组合物。

[0127] 根据给药的途径，正常剂量的量可以从 0.1 到 100,000 微克不等，最高到约 1g

的总剂量。在文献中提供了特殊剂量的指导和给药方法,见美国专利 Nos. 4,657,760; 5,206,344;或 5,225,212。本领域人员将采用与蛋白或其抑制剂有所不同的多核苷酸的剂型。相似地,多核苷酸或多肽的转运将特异于特殊的细胞、状况、位置等。放射性标记的抗体的优选的比活性的范围可以从 0.1 到 10mCi/mg 蛋白 (Riva et al., Clin. Cancer Res. 5: 3275s-3280s, 1999; Wong et al., Clin. Cancer Res. 6: 3855-3863, 2000; Wagner et al., J. Nuclear Med. 43: 267-272, 2002)。

[0128] 在下面的实施例中进一步地描述了本发明。所提供的实施例只被用于参照具体实施方式来说明本发明。这些实例虽然举例说明了本发明的某些特异的部分,但是它并没有限制或限定所阐述的发明的范围。

[0129] 除非有不同的详细说明,都用本领域人员熟知的和常规的标准技术实施所有的实施例。可以如在标准的实验手册中所述的那样实施下面实施例的常规的分子生物学技术,例如 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989。

[0130] 实施例 1: 人 rg1 多核苷酸的鉴定

[0131] 通过查询 Incyte's **LifeSeq®** 数据库将 rg1 鉴定为一种在前列腺中表达的基因。利用 Incyte 提供的用于搜索数据库的目的的“Protein Function”工具,通过对数据库注释搜索,鉴定出其核苷酸序列。发现核苷酸序列是在经注释的数据库的细胞粘附分子的分类中,并被描绘为 f-spondin 的同源物。对 rg1 多核苷酸序列在数据库的一组文库中的分布的电子 Northern 分析发现 rg1 在前列腺文库中是高水平表达的,而在大量的其他组织文库中是较低水平表达的,包括来自正常和肿瘤组织的组织文库。

[0132] 在将一组数据库中的 rg1 克隆装配成连续的多核苷酸序列之后,编辑连续序列,在预先装配的多核苷酸中鉴定出全长的编码序列。该序列编码与 f-spondin 和与 Mindin-2 同源的蛋白。从用于实验研究的 Incyte 中得到 Incyte 克隆 1640796、1712252、和 1880265,以及克隆 3360733 被鉴定为含有最 5' 端的核苷酸序列。将这个克隆完全测序,它含有完全的所预计的 RG1 蛋白的编码序列。在 SEQ ID NO: 1 中显示了该序列。

[0133] 实施例 2: Rg1 mRNA 表达

[0134] 利用 Taqman 检测法 (Perkin-Elmer), 用半定量 PCR 确定出 rg1 mRNA 在各种来自正常和肿瘤组织的样本中以及在细胞株中的表达。根据从斯坦福大学医学院泌尿外科得到的改良的 Gleason 分级系统,已经将前列腺正常、良性和肿瘤组织样本分级。用标准方法从这些组织样本中分离到 RNA。来自其他肿瘤和正常组织的 RNA 购自商业化来源,包括 Clontech 和 Biochain。前列腺肿瘤细胞株 (PC3、LNCaP 和 DU145) 来自美国典型培养物保藏中心,并利用含血清的培养基用标准方法将其培养繁殖。在裸鼠中建立起来源于这些细胞株的异种移植的肿瘤,并在植入近 4-6 周后,从小鼠中收集这些肿瘤。用标准方法从肿瘤中分离到 RNA。

[0135] 用引物: CGC GCA TAG CTC CGA CTA C (SEQ ID NO: 3) 和 GCCGCG TCC GCA AAG (SEQ ID NO: 4) 和 Taqman 探针: 6-FAM-AGGAAGAAC CAG TAC GTC AGTAAC GGG CTG-Tamra (SEQ ID NO: 5) 进行基于 Taqman 的 PCR 分析。

[0136] 用 Perkin Elmer 的引物表达软件设计并用 Synthetic Genetics 合成这些引物和探针。用前列腺 RNA 进行 PCR 反应 30-40 个循环,并将其定量以生成用于相互比较的标准

曲线。这个分析证实在前列腺中检测到最高丰度的 rg1mRNA, 以及在一些其他组织中检测到显著更低水平的 rg1mRNA。

[0137] 实施例 3 : 在 BHK 细胞中的 RG1 的生产

[0138] 克隆 : 从 Incyte 质粒 3360733 中得到 RG1 编码区。在标准 PCR 反应 PCR 扩增编码序列中, 引物为 SST115 (5' -TCCCTCTAGAGCCACCATGGAAAACCCAGCCCGGC-3') (SEQ ID NO : 6) 和 SST113 (5' -AAGGCATCACGTGTTAGACGCAGTTATCAGGGACG-3') (SEQ ID NO : 7), PCR 反应使用了 1x Pfu Turbo 聚合酶缓冲液 (Stratagene, LaJolla, CA) / 200 μ M 各种 dNTP / 0.2U Pfu Turbo 聚合酶 (Stratagene)。PCR 扩增条件如下 : 95°C 下 3 分钟, (95°C 下 15 秒, 60°C 下 30 秒, 72°C 下 2 分钟) $\times$ 35, 72°C 下 7 分钟。用 QIAquick PCR 柱 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化所形成的 PCR 扩增产物, 并用 XbaI 和 PmII 限制性内切酶消化得到 1010bp 的片段, 利用 BI0101GeneClean 试剂盒 (Vista, CA) 将该片段从 1% 琼糖脂凝胶中纯化出来。将所纯化的片段连接到 (利用 Epicentre Fast Link 试剂盒, (Epicenter, Madison, WI)) 经 XbaI 和 PmII 消化的非细胞致病的 Sindbis 表达载体中 (Agapov et al, 1998, PNAS 95 : 12989-12994), 并转化到 DH5 α 感受态细胞内 (Life Technologies, Gaithersburg, CA) 以及在含有氨苄西林 (100 μ g/ml) 的 LB 琼脂平板上进行选择。在含有氨苄西林的 LB 培养基中生长出氨苄西林耐药性克隆, 经序列分析显示它含有所插入的 RG1 编码序列。这个质粒被命名为 pPEG6。

[0139] 表达 : 根据产品说明书, 利用 Lipofectamine Plus 试剂 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 用两微克 pPEG6 转染 $1-3 \times 10^5$ 个牛仓鼠肾脏细胞 (BHK 细胞)。在转染之后, 将细胞在加有胎牛血清的 DMEM 培养基中孵育 24-48 个小时, 此时将细胞从 1 份分为 10 份, 并通过加入嘌呤霉素 (终浓度 2.5 μ g/ml) 和含有血清的 DMEM 开始选择含有质粒的细胞。在细胞汇合之后 (加入博来霉素 4-5 天后), 用 PBS 洗涤细胞, 将细胞从 1 份分为 10 份, 加入含血清的 DMEM 和 5 μ g/ml 嘌呤霉素。在 2-3 天之后, 用没有血清的 DMEM 和 5 μ g/ml 嘌呤霉素置换培养基, 再生长 2-3 天, 用使用 RG1 抗体的 Western 分析检测在培养基中是否存在 RG1 蛋白。可检测到 1 μ g/ml 水平的 RG1 蛋白。

[0140] 纯化 : 将被转染为稳定地过度表达并分泌 RG1 蛋白到培养基内的幼仓鼠肾细胞 (BHK) 培养在含有胎牛血清的培养基中。当在次融合时, 将细胞转换到无血清的培养基中 24-48 个小时。收集培养基, 离心去除细胞并储存在 -80°C。在纯化之前将培养基迅速融化并保存在冰中。加入蛋白酶抑制剂, 并用冷的 20mM 乙酸钠缓冲液 (pH 6.5) 将培养基稀释 10 倍, 在整个纯化过程中都要保持在 4°C。以 0.5ml/min 的流速将所稀释的样本装柱到 Q-Sepharose 阴离子交换柱中, 然后用相同的缓冲液冲洗。在收集成分的同时, 用线性 NaCl 梯度 (0-80% 1M NaCl 的缓冲液溶液, 每分钟 0.5%) 进行洗脱。用 SDS PAGE 和 Western 印迹法确定出所洗脱的 RG1 在接近 75mM 的 NaCl 中。汇总含有 RG1 的部分, 用超滤法浓缩, 并在 Superdex75 凝胶过滤柱中进一步纯化。将所纯化的 BHK-RG1 用作生成特异于天然的 RG1 (nRG1) 蛋白的人单克隆抗体的免疫原, 以及用作为筛选和描绘这些抗体的抗原。

[0141] 实施例 4 : 抗体的生成

[0142] 多克隆抗体 : 形成了抗来源于 RG1 蛋白序列的 5 种合成的多肽序列的兔多克隆抗血清。选择这些序列是因为它们在蛋白表面的预期位点, 使得生成更可能识别表面表位的抗血清。用氨基丁酸 (Abu) 置换半胱氨酸残基, 这有助于合成。下面列出了五种肽的特异

的氨基酸序列、在 RG1 蛋白上的位点以及命名。

[0143]	命名	位置	氨基酸序列
[0144]	1C	28-46	PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO :8)
[0145]	2C	46-64	TFTGKWSQTAFPKQYPLFR (SEQ ID NO :9)
[0146]	3C	77-91	HSSDYSMWRKNQYVS (SEQ ID NO :10)
[0147]	4C	188-210	DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEQ ID NO :11)
[0148]	5C	263-274	NEIVDSASVPET (SEQ ID NO :12)

[0149] 肽经附加的羧基末端的半胱氨酸与钥孔戚血蓝素 (KLH) 共价结合,并被用作为一种免疫原。相似地,制备牛血清白蛋白 (BSA) 缀合物,用于经 ELISA 分析抗血清的滴度。

[0150] 用每种肽免疫都接种两只动物。在弗氏完全佐剂 (0.5mg/ 动物) 中进行最初的免疫接种,随后在 3 周的间隔内用肌肉内应用的 0.25mg/ 动物的弗氏不完全佐剂强化。抽取定期测试的血样,并用 ELISA 测定抗特异的 BSA- 肽缀合物的抗体滴度,并与免疫接种前的血清进行比较。抗肽 1C 和 3C 的抗血清表现出是有活性的。抗肽 2C 的抗血清不能识别 RG1 多肽。没有测试抗肽 4C 和 5C 的抗血清。

[0151] 单克隆抗体:通过用 RG1 肽和在大肠杆菌中所表达的 6- 组氨酸标记的 RG1 融合蛋白免疫转基因小鼠生成了抗 RG1 的单克隆抗体。用骨髓瘤细胞融合这些动物的脾细胞生成了杂交瘤细胞。用 ELISA 筛选所形成的杂交瘤,筛选出产生针对 RG1 肽和蛋白的抗体的杂交瘤。

[0152] 通过对含有断裂的小鼠重链和小鼠 κ 轻链位点的转基因小鼠的免疫接种也能制备出具有对天然 RG1 的特异性的人单克隆抗体 (美国专利 No. 5,877,397)。用在稳定的、转染的 BHK 细胞株中所产的纯化 RG1 蛋白免疫来自 C57BL/6J 近交系 (Medarex) 的转基因小鼠 (见实施例 3)。

[0153] 将抗原与弗氏完全佐剂 (Sigma, F5881) 混和用于方案 1 中的第一次和第二次的免疫接种,在此之后将抗原与弗氏不完全佐剂 (Sigma, F5506) 混和。对于第二种方案,弗氏完全佐剂被用于第一次免疫接种,在此之后使用弗氏不完全佐剂。通过使用乳化针头,每只小鼠都接受了 100 μ LPBS 中的与佐剂按 1 : 1 混和的 25 μ g 天然 RG1 (nRG1)。将 0.2mL 所制备的抗原注射到小鼠的腹腔内。

[0154] 杂交瘤制备:将 P3X63ag8.653 骨髓瘤细胞株 (ATCC CRL1580, lotF-15183) 用于融合。融化原始的 ATCC 瓶,并培养增殖细胞。从该次增殖中制备出冷冻瓶的种子储存物。将细胞保持培养 3-6 个月,每周分瓶两次。将来自 P388D1 (ATCC, TIB-63FL) 的上清液用作用于杂交瘤的条件培养基。简单地,细胞生长并增殖到 200ml。静止培养物生长 ~ 7 天。倒出已耗尽的上清液,并将其过滤通过 0.2 μ m 无菌滤器。使用该细胞株 3-6 个月,然后融化一个新瓶的细胞。

[0155] 含有 5% FBS (Hyclone, #AKE11828) 的 DMEM (Cellgro#10013271、10013270) 和 P/S (Cellgro#, 30002029) 被用于培养骨髓瘤和 P388D1 细胞。将其他的培养基添加物加入到杂交瘤生长培养基中,它们包括 5% Origen-Hybridoma 克隆因子 (IGEN#, 36684、36908)、5% P388D1 条件培养基 (11/15/00、12/21/00DH)、10% FCS (Hyclone, #AKE11828)、 β 巯基乙醇 (Gibco#1076640)、Genetacin (Gibco#1079874)、Hepes (Cellgro-#25060041) 和 HAT (Sigma, H 0262 ; 1.0×10^{-4} M 次黄嘌呤、 4.0×10^{-7} M 氨基嘌呤、 1.6×10^{-5} M 胸腺嘧啶核苷)、或

HT (Sigma, H0137 ; 1.0×10^{-4} M 次黄嘌呤、 1.6×10^{-5} M 胸腺嘧啶核苷)。

[0156] 利用 PEG 和标准方法将脾细胞与骨髓瘤细胞融合。将所形成的杂交瘤平铺到 50 个 96 孔板内,每孔种植 200 μ L 用于第一次融合。在融合后 10-12 天时进行对人 IgG、 κ 抗体的最初的 ELISA 筛选。然后用 6-His 捕获 ELISA 筛选人 IgG、 κ 阳性孔。该筛选导致从 3 种融合种分离到 8 种人抗体:三种 IgM、一种 IgG3、和四种 IgG1 亚型抗体。

[0157] 首先将来自具有抗原结合性抗体的孔中的杂交瘤转移到 24 孔板中,再次重新筛选特异性。用限制性稀释亚克隆天然的 RG1 特异性杂交瘤,以保证单克隆性。通过将细胞冷冻在 IGEN 冷冻培养基中,保存在发育过程的一些阶段上的与天然 RG1 (nRG1) 结合的产抗体的杂交瘤。冷冻来自这些细胞株的培养基并用于如下面所述的抗体的纯化。确定出 8 种抗体的 4 种具有能保证进一步研究的足够多的特异性的抗体。

[0158] 抗体的纯化:利用蛋白 G 琼脂糖亲和层析法从细胞条件培养基中纯化出如上所述的四种抗 RG1 的人单克隆抗体。用离心和过滤去除培养基的细胞。将培养基流经蛋白 G 柱。然后将柱在 PBS 中洗涤以去除未缀合的物质。用 100mM 甘氨酸 (pH 2.5) 洗脱所缀合的抗体,并往洗脱部分中加入 10% v/v 1M Tris (pH 8) 进行快速中和。汇集含有抗体的洗脱部分,经 PBS 透析,用 SDS PAGE 测试纯度,并用 ELISA 检测抗原结合活性。

[0159] 抗体的筛选:利用一些不同的检测方法进行抗体的筛选:

[0160] A. hIgG γ κ ELISA 筛选:用 1 μ g/ml 抗人 IgG κ 或抗人 IgG κ 的 PBS 溶液 (50 μ l/孔) 包被 96 孔微量滴定板 (Falcon, #3912) 过夜。抽吸板,并用含有 5% 小鸡血清的 0.05% Tween20 PBS 溶液在室温下封闭板 (100 μ l/孔),然后用 PBS-tween 洗涤三次。将用于筛选的杂交瘤上清液按 1:2 稀释于封闭缓冲液中,并在室温下孵育 1 个小时 (100 μ l/孔)。在孵育之后,在加入 100 μ l/孔的第二抗体 (HRP 抗人 IgG Fc (Jackson, #109-036-098) 或 HRP 抗人 IgG κ (Sigma, #A-7164)) 之前,将板在封闭缓冲液中洗涤三次。在室温下孵育第二抗体 1 个小时,然后将板在封闭缓冲液中洗涤 2 次。用 10ml 含有 80 μ l ABTS (Sigma, #A1888)、8 μ l H_2O_2 /板的柠檬酸磷酸缓冲液 (pH 4.0) 将板显像,并在 $A_{415-490nm}$ 下进行读数。

[0161] B. RG1 结合 ELISA:用 0.5-1 μ g/ml 纯化天然 RG1 蛋白的 PBS 溶液 (50 μ l/孔) 在 4 $^{\circ}$ C 下包被 96 孔微量滴定板过夜。抽吸板,然后加入 100 μ l/孔 PBS-Tween+5% 小鸡血清封闭反应,随后在室温下孵育 1 个小时。然后将板在封闭缓冲液中洗涤 3 次。然后以 50 μ l/孔往每个孔内加入系列稀释的样本 (血清、杂交瘤上清液、纯化单克隆抗体等),在室温下孵育 1 个小时,然后在封闭缓冲液中洗涤 3 次。然后用 HRP 抗人 IgG Fc 第二抗体的封闭缓冲液溶液在室温下孵育孔 1 个小时,然后如前洗涤 3 次。用上述的底物将板显像,并用 96 孔板读板器测定 A_{405nm} 。

[0162] C. 捕获 ELISA 方法:为了确定单克隆抗体与天然构象的 RG1 蛋白的结合,使用了捕获 ELISA 格式。在 BHK 细胞中表达含有 6 个组氨酸表达标记的 RG1 蛋白 (6His-RG1),并将其用作抗原。依照标准方法利用 NiNTA 琼脂糖亲和层析法从条件培养基中纯化出 6His-RG1。

[0163] 用 1.5 μ g/ml 浓度的纯化 6His-RG1 的 PBS 加上 0.2% BSA 溶液 (PBS/BSA, 100 μ l/孔) 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜将纯化 6His-RG1 捕获于 96 孔 NiNTA 板之上 (Qiagen NiNTA HisSorb)。用含有 0.05% Tween20 的 PBS (PBST) 洗涤板 3 次。用 PBS/BSA 稀释样本 (杂交瘤上清液、血清、纯化单克隆抗体等),并将样本在板中室温下孵育 1-2 个小时 (50 μ l/孔),然后用

PBST 洗涤 3 次。将第二抗体 (HRP 标记的山羊抗人 IgGFc) 在 PBS/BSA 中稀释到 1 : 5000, 以 50 μ l/孔加入到板中,并在室温下孵育 1 个小时。

[0164] 用 PBST 洗涤板 3 次,并如在 ELISA 中的那样显像。用 ELISA 板读板器测定在 405nm 中的吸光度。

[0165] D. BIAcore 表面等离子共振 (SPR) 检测法:利用 SPR 进一步筛选亲代杂交瘤上清液,使得通过亲和力将克隆定性分级。利用标准的胺结合和 60 μ g/ml 抗体的乙酸溶液 (pH 4.0) 以及经 HEPES 缓冲的盐水 (HBS) 的流动相将兔抗人 IgGFc (Pierce, 31142) 固定到感受器芯片上 (Biacore, BR-1000-12)。杂交瘤培养基以 5 μ l/min 的速度流经表面,使得抗体被捕获到表面上,然后用 HBS 洗涤到基线水平。然后将纯化的、天然的 BHK-RG1 蛋白 (400nM) 流经表面并用 SPR 测定结合力。在注射结束之后,将 HBS 流经表面以测定抗体:RG1 复合物的解离。SPR 测定值对时间的斜率是解离速度的指示,斜率越大,解离速度越快,因此抗体的亲和力就越低。

[0166] 实施例 5:抗体的 Western 印迹法分析

[0167] 用 Western 印迹测试抗血清对 RG1 的特异性。在 COS 细胞瞬时表达的 RG1 上、LNCaP 细胞分泌的天然 RG1 上和从所转染的幼仓鼠肾细胞 (BHK) 生成的 RG1 上测试 RG1 特异性的抗血清 (上面的那些所生成的抗序列 1C 和 3C 的抗血清)。在从 LNCaP 肿瘤、LNCaP 细胞、PC3 肿瘤、PC3 细胞和一些人前列腺肿瘤的临床样本中制备的裂解液中进一步测试 RG1 特异性抗血清。将细胞和组织裂解在去污剂缓冲液中。在煮沸 5 分钟之后,将 10 μ l 每种裂解液装入到 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中以分离蛋白。然后将分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上。通过在存在同源和异源肽时的结合验证 RG1 抗体的结合特异性。RG1 特异性抗血清可以检测出在除 PC-3 细胞和 PC-3 肿瘤以外的所有样本中的蛋白。

[0168] 对特异于天然 RG1 的人单克隆抗体的 Western 印迹法分析证实这些抗体只在非还原的条件下才能识别印迹中的 RG1。这说明这些单克隆抗体与 RG1 的更天然的形式结合。

[0169] 实施例 6:对 LNCaP 细胞分泌的天然 RG1 蛋白的纯化

[0170] 通过 Western 印迹法分析发现培养生长的 LNCaP 细胞能分泌天然 RG1 蛋白。为了纯化天然蛋白,将细胞在缺乏血清的培养基中生长 48 个小时。收集这个无血清的条件培养基,离心去除所有细胞,超滤浓缩近 50 倍。然后用 20mM 乙酸钠缓冲液 (pH 6.5) 将所浓缩的培养基稀释 10 倍,并将其装入到 Q-琼脂糖阴离子交换柱中。柱洗脱液由氯化钠梯度 (每分钟 0.5%) 构成,收集 2.0ml 级份。如 Western 印迹和 SDS PAGE 所确定的那样,洗脱的 RG1 蛋白是在近 75mM NaCl 水平。天然 RG1 蛋白以比在细菌中所表达的 6 组氨酸-RG1 融合蛋白稍微更小的分子量移动,可能是因为它缺少融合肽。

[0171] 实施例 7:对前列腺和前列腺癌转移灶中表达的 RG1 的免疫组化染色

[0172] 用 LifeSpan Biosciences, Inc. 确定出 RG1 蛋白在各种人体组织中的表达,包括肾脏、肺、胰腺、肌肉、脑和前列腺、以及淋巴结和骨转移灶。附加的前列腺组织来自斯坦福大学斯坦福学院的泌尿外科,并在 Berlex 进行测试。利用标准方法将组织切片脱蜡。用多克隆抗体 RG1-3C 作为第一抗体,以及检测系统由使用载体 ABC-AP 试剂盒 (AK5002) 和载体红色底物试剂盒 (SK5002) 所构成。作为阴性对照,在缺少第一抗体时进行染色。

[0173] 检查了 RG1 在来自一些患者的前列腺肿瘤和正常前列腺组织中的表达。在所有病例中,在前列腺肿瘤样本中都看到了代表 RG-1 表达的强染色。正常前列腺组织中的 RG-1

表达有所不同,从几乎没有直至明显染色。

[0174] 也用免疫组化在已知含有前列腺肿瘤转移灶的淋巴结和骨骼样本中检测 RG1 的表达。正常的淋巴结或骨骼都没有显示出染色。

[0175] 实施例 8 :RG1 抗体的测序

[0176] 用标准方法确定如在上述的实施例 4 中所生成并纯化的两种人 RG1 抗体 (C 和 B) 的核苷酸序列。B 的轻链可变区的核苷酸序列被命名为 SEQ ID NO :20 以及 B 的重链可变区的核苷酸序列被命名为 SEQ ID NO :21。C 的轻链可变区的核苷酸序列被命名为 SEQ ID NO :23 以及 C 的重链可变区的核苷酸序列被命名为 SEQ ID NO :24。

[0177] 确定出这些链的可变区的相应的预测的氨基酸序列,并将其命名为 SEQ ID NO :26 (B 的轻链);SEQ ID NO :27 (B 的重链);SEQ ID NO :29 (C 的轻链);SEQ ID NO :30 (C 重链)。见图 3 和 4。

[0178] 实施例 9 :RG1 抗体的结合常数的确定

[0179] 用 BIAcore 确定出单克隆抗体与天然 RG1 蛋白结合的动力学常数 (K_D 、 K_a 和 K_d),其中利用了一种捕获格式,其中可溶性的天然 RG1 蛋白与固定在感受器芯片上的单克隆抗体结合。利用标准的胺结合方法将免疫纯的兔抗人 IgGfc (Pierce, 31142) 共价地固定到感受器芯片 CM5 (Biacore, BR-1000-12) 上。按 $5 \mu\text{l}/\text{min}$ 的速度使用稀释在 10mm 乙酸 (pH4.0) 中的 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗体。HBS-EP (Biacore, BR-1001-88) 被用作为流动相。用乙醇胺封闭未反应的位点。用 HBS 将单克隆抗体稀释到 200nM,每个循环以 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ 的速度注射 $50 \mu\text{l}$ 。BHK-RG1 的系列稀释物 (12.5-400nM) 与固定的单克隆抗体结合。在完成 $20 \mu\text{l}/\text{min}$ 共 8 分钟的抗原注射之后,马上测定解离动力学。在每个循环之后,用 $25 \mu\text{l}$ 10mm 甘氨酸 (pH 1.8) 再生表面,然后用 HBS 洗涤。

[0180] 通常地,进行 5 种浓度和培养基对照的测试。利用产品产家所提供的软件 (BIAevaluation 3.0) 将数据安装到 1 : 1Langmuir 模型中,计算出动力学常数。平衡常数是在纳摩尔范围内,具有较好的解离速率 (10^{-4}s^{-1})。表 1 显示了 4 种人抗体的动力学常数。

[0181] 表 1 :人 RG-1 抗体 A、B、C 和 D 的动力学常数。通过将从 BIAcore 研究所得到的数据安装到 1 : 1Langmuir 模型中确定出这些抗体的动力学常数。 K_a :结合速率 ($1/\text{s}$); K_d :解离速率 ($1/\text{s}$); K_D :亲和力 (M)。

[0182]

单克隆抗体	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
A	2.3×10^4	1.9×10^{-4}	8.9×10^{-9}
B	2.9×10^4	2.3×10^{-4}	8.4×10^{-9}
C	2.5×10^4	8.4×10^{-4}	3.36×10^{-8}
D	3.17×10^4	2.95×10^{-4}	9.27×10^{-8}

[0183] 实施例 10 :对 RG1 抗体的放射性标记

[0184] 螯合剂与 RG1 抗体的结合 :利用采用自 Nikula et al, Nucl. Med. Biol., Vol. 22, No. 3, pp. 387-390, 1995 的方法将双功能的螯合剂 p-SCN-Benzyl-DTPA (Macrocylics, Inc.) 共价地连接到抗体上。在使用之前,要使得本过程中所用的所有试剂和设备都没有金

属,以避免螯合剂的失活。用低金属试剂、高纯度 (MilliQ) 水和经处理去除了微量金属的 Chelex 制备所有的溶液。用 10mM EDTA 冲洗所有的设备,然后用 MilliQ 水充分冲洗。

[0185] 在利用 AKTA 层析系统上的 Pharmacia 26/10 脱盐柱将缓冲液更换为 50mM 碳酸盐缓冲液、150mM NaCl (pH 8.5) 之前,首先用 1mM EDTA 在室温下处理纯化的单克隆抗体 (-20mg) 1 个小时,以去除所有的金属。汇集含抗体的部分并用超滤 (Centricon 30) 将其浓缩到近 2mg/ml。在无水 DMSO 中新鲜制备 100mg/ml p-SCN-Benzyl-DTPA 储存液。将 50-100 倍摩尔过量的 DTPA 用于结合反应,容许该反应在室温下进行过夜。然后反应混和物被缓冲液更换为 50mM 乙酸钠、150mM NaCl (pH 6.5) (放射性标记缓冲液),并经超滤浓缩到至少 3mg/ml。该缓冲液中的抗体缀合物在 4℃ 下可稳定数周。用 BCA 确定蛋白浓度,并用 ELISA 验证抗原结合活性。

[0186] RG1 抗体的放射性标记:用 ^{90}Y 或 ^{111}In 在无金属的条件下放射性标记 DTPA 缀合的抗体,以用于带瘤动物的体内研究。通常地,将 10mg 抗体缀合物与 10mCi [^{90}Y]Cl₃ 或 [^{111}In]Cl₃ (PerkinElmer Life Sciences) 在室温下混和 1 个小时,在厚厚的屏护后面将其轻轻地混和。将 EDTA 加到 1mM,并在室温下孵育 10 分钟。然后将反应混和物在已在无金属的 PBS 中预平衡的 Pharmacia 26/10 脱盐柱中跑柱,以将放射性标记的抗体与未结合的 ^{90}Y 分离,并更换缓冲液。收集 1ml 成分,并汇集含抗体的部分。用 BCA 确定蛋白浓度。利用针对 ^{90}Y 的液相闪烁计数仪和针对 ^{111}In 的 γ 计数仪确定出 1 μl 样本中的总放射性。

[0187] 比活性被计算为每 mg 蛋白的 mCi,通常是在 0.25 到 1.0mCi/mg 的范围内。根据 Nikula et al, Nucl. Med. Biol. 22:387-390, 1995 用瞬时薄层色谱法 (ITLC) 确定出放射学纯度。通常的,大于 98% 的放射性与蛋白相关。用 ELISA 确定出放射性缀合物对未结合的标准抗体的抗原结合活性 (^{90}Y 缀合物),或利用对固定的 RG1 蛋白的固相放射免疫结合检测确定出放射性缀合物对未结合的标准抗体的抗原结合活性 (^{111}In 缀合物)。在所有情况中,放射性缀合物与未结合抗体的抗原结合力没有区别。

[0188] 实施例 11: ^{111}In 标记的 RG1 抗体的肿瘤特异性蓄积

[0189] 通过给 5-6 周大的雄性无胸腺裸鼠的侧腹部皮下注射 1×10^{-7} 个基质胶中的 LNCaP 细胞建立肿瘤异种移植。当肿瘤达到 150-400mm³ 体积时 (肿瘤细胞移植后近 4-6 周),进行生物分布研究。给四组 12 只带有 LNCaP 异种移植的小鼠静脉内施用 ^{111}In 标记的人 RG1 抗体 (C、B、A) 和非特异性人 IgG1 对照抗体 (比活性, 0.3mCi/mg)。在切除肿瘤之前,经心脏穿刺将小鼠放血。去除血液、肿瘤和所有的主要器官,在分析天平上称重,并在 γ 计数仪上计数放射性。通过累计在血液、单个器官和剩余尸体中所测定到的放射性确定全身清除率。所有数据都进行放射性同位素衰减的纠正。结果表示为每克组织的注射剂量的百分比。RG1 特异性抗体显示出高度的肿瘤特异性蓄积 (见图 1)。

[0190] 实施例 12: ^{90}Y 标记的 RG1 抗体对肿瘤生长的抑制

[0191] 通过给 5-6 周大的雄性无胸腺小鼠的侧腹部皮下注射 1×10^{-7} 个基质胶中的 LNCaP 细胞建立肿瘤异种移植。当肿瘤达到 50-350mm³ 体积时 (肿瘤细胞植入后 5 周),开始治疗。将带瘤动物平等地分配到四个治疗组 (n = 13/组)。给带 LNCaP 异种移植的小鼠单次腹腔内注射施用放射性标记的抗体 B、C 和非特异性 IgG1 (125 μCi /动物)。第四个治疗组给予腹腔内注射盐水。在注射后 32 天内,监测 ^{90}Y 标记的 RG1 特异性抗体对 LNCaP 来源的肿瘤的生长作用。同时,杀死动物和取出并称量肿瘤。通过监测体重确定健康状况。

当与在⁹⁰Y标记的非特异性抗体或载体对照所注射的动物中看到的结果比较时,⁹⁰Y标记的特异性人RG1抗体的单次给药产生了对肿瘤生长的显著抑制(见图2)。

[0192] 实施例13:RG1抗体在CHO细胞内的克隆和表达

[0193] 诱变:进行对编码抗RG1抗体B和C的可变区的野生型cDNA的定向诱变,生成在人体内更常被表达的同种异型体。用QuickChang®多点定向诱变方法(Stratagene)进行诱变,用TOPO/BVH和TOPO/CVH(Medarex)作为模板。用引物(GGGGAGGCTTGGTACAACCTGGGGGGTCCCTGAG;SEQ ID NO:14)和(GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAG;SEQ ID NO:15)把点突变H13Q、M90T和M92V引入至B cDNA内(BVH_3m),以及把H13Q、M90T引入到C cDNA内(CVH_2m)。用DNA序列分析确认突变,突变分别造成了具有序列SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:25的突变的重链可变区。SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:31分别给出了这两种重链可变区的预测的氨基酸序列。

[0194] 表达载体的构建:表达载体pIE_SRY1fa(Medarex)含有分别编码人IgG1(fa单倍体)和κ链的CH和CL区的cDNA。为了容许将C和B轻链可变区克隆到pIE_SRY1fa的框架内,用引物对BVKF(GGGAAGCTTGCCACCATGGAAACCCAGCG;SEQ ID NO:16)和BVKR(CAGTCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCC;SEQ ID NO:17)分别往BVL和CVL cDNA的5'和3'末端引入相互兼容的HindIII/Bsiw位点(下划线部分)。将所形成的PCR生成的VL cDNA克隆到pIE_SRY1fa的HindIII/Bsiw位点以形成pIE/BVL和CVL。用相同的策略构建出将VH(包括BVH、BVH_3m、CVH和CVH_2m)融合到pIE/BVL和CVL的框架内。简单地,用引物对CVH_F(GTCAGGATGCGGCCGCCACCATGGAGTTTGTGCTGAGCT;SEQ ID NO:18)和CVH_R(ACCGATGGGCCCTTGGTGGA;SEQ ID NO:19)将NotI/ApaI位点引入到PCR扩增的VH cDNA的末端。用NotI/ApaI消化PCR产物,并将其插入到pIE/BVL和pIE/CVL的CH区的上游,保证相应pIE衍生物中的VH区是在具有CH区的框架内。最终的构建体被命名为pIE/B、pIE/B_3m、pIE/C和pIE/C_2m。已经用DNA序列分析验证了所有的插入。

[0195] DG44和DXB11细胞的转染和选择/扩增:在转染前1天,将加有F12培养基和5%FCS的约4x10⁶个DG44和DXB11细胞平铺在P100皿中。利用Lipfectamine 2000(hvitrogen)和24μg线性质粒DNA(pIE/B_3m或pIE/C_2m)/P100进行转染。在转染后4个小时更换培养基。转染后应用选择条件近24个小时。

[0196] 首先用含有5%经透析的FBS、2Mm L-谷氨酰胺和G428(400μg/ml),但缺乏核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的MEM培养基进行选择。达到约90%细胞融合时,将细胞分成4xP100皿,并用加有不同浓度的甲氨蝶呤的G418进行辅助选择。在1周后,在存在辅助选择培养基时,将存活细胞按100个细胞/板平铺到96孔板内。用测定重组抗体表达的ELISA筛选存活克隆。用存在渐增浓度的甲氨蝶呤时的连续选择扩增10个表现出最高表达水平的克隆的基因拷贝数目,所选的克隆适合于用于制备原始细胞库的无血清培养基。

[0197] * * * * *

[0198] 在此将在上面说明书中所提及的所有文献和专利一同并入参考。虽然参照于本发明的具体实施方式已经描述了本发明,但本领域人员应当明白只要不脱离本发明的真实的精神和范围都可以进行各种改变以及可以取代等价物。另外,可以对本发明的目的、精神和范围进行修饰以适应于特殊的情况、材料、物质的组成、方法、方法步骤。所有的这些修饰都被认为是在所附的权利要求书的范围之内。

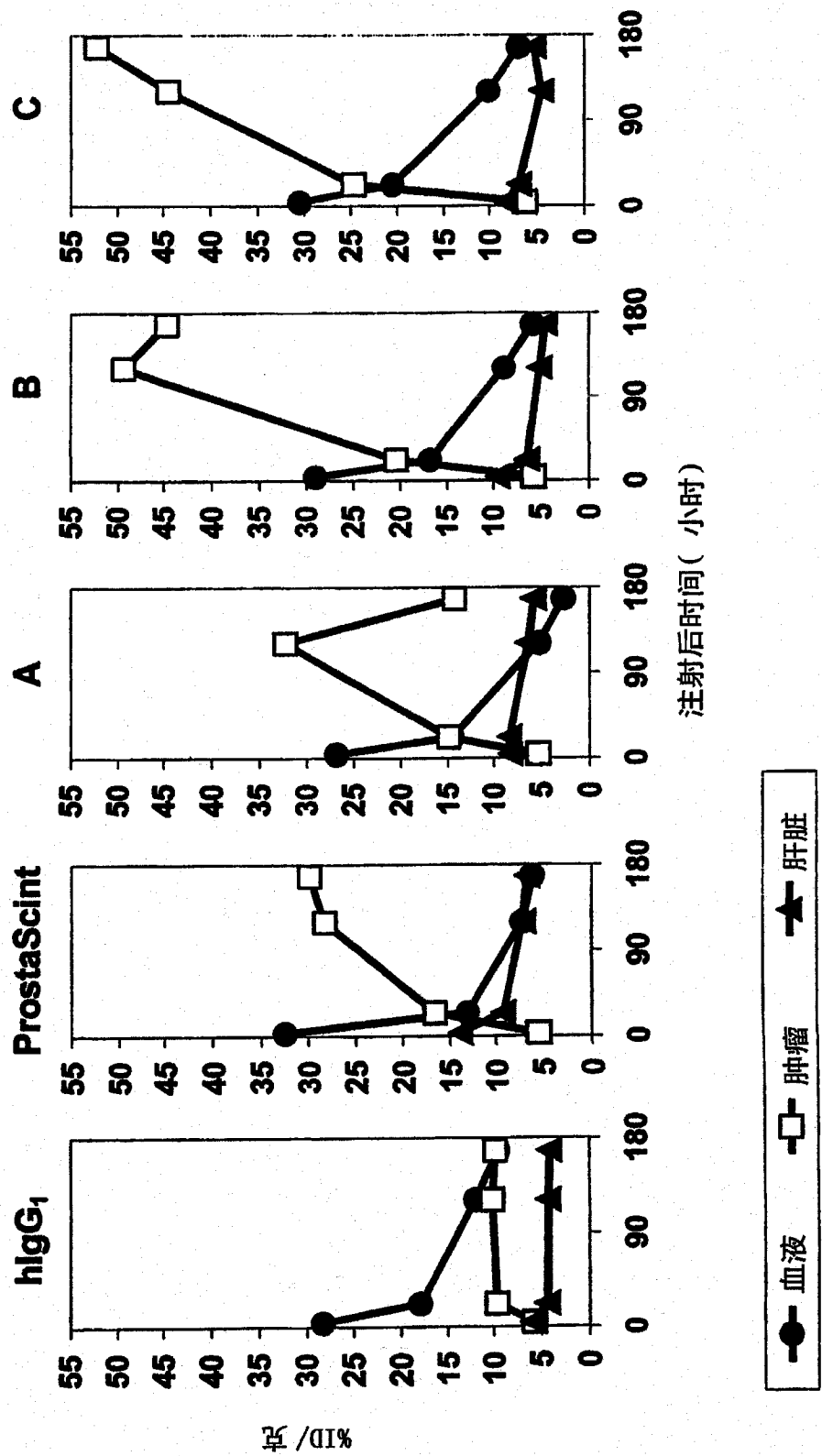


图1

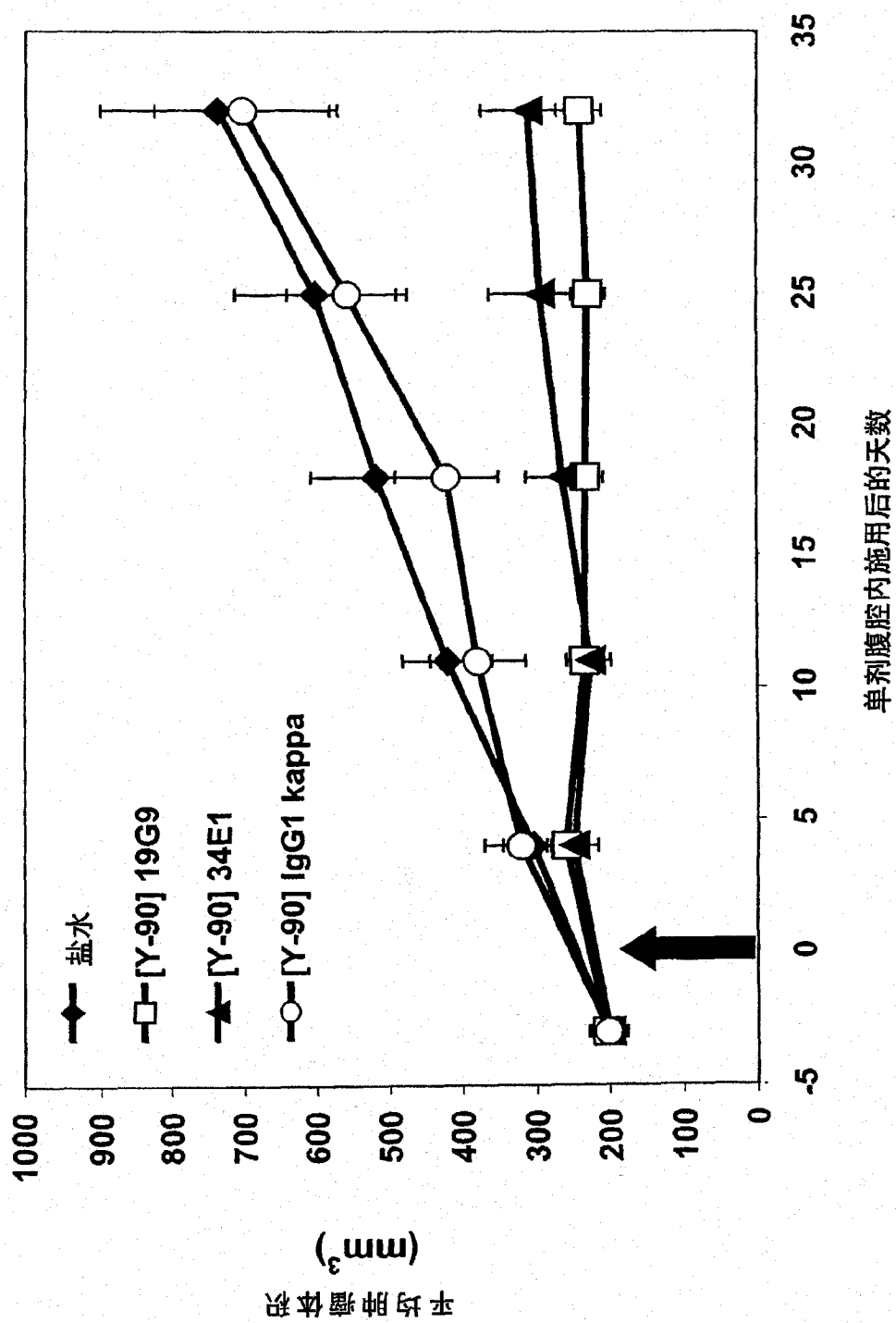


图2

huMAb B 可变区序列

V_L

1 METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTL[.]SLSPGERATL[.]SCRASQSVS 50
 51 SSYLAWYQQKPGQAPRL[.]LIYGASSRATG[.]IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE 100
 101 PEDFAVYYCQQYSSSLT[.]FGGGTKVEIK 150

V_H

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGGTFSS 50
 51 YVMHWLRQAPGKGLEWVS[.]VIGTGGVTHYADSVKGR[.]FTISRDNAKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDMAMYYCARWGYYGSGSYENDAFDIWGQ[.]TMVTVSSASTK 150

B_{3M}, V_H (突变以黑体表示)

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLV**Q**PGGSLRLSCAGSGGTFSS 50
 51 YVMHWLRQAPGKGLEWVS[.]VIGTGGVTHYADSVKGR[.]FTISRDNAKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDTAVYYCARWGYYGSGSYENDAFDIWGQ[.]TMVTVSSASTK 150

各个可变区的CDR序列(1、2和3)以下划线示出。

图 3

HuMAb C 可变区序列

 V_L

```

1  METPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPG TSLSPGERATLSCRASQSVS 50
      .               .               .               .
51  SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE 100
      .               .               .               .
101 PEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK 150

```

 V_H

```

1  MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSS 50
      .               .               .               .
51  YVMHWVRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTNYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQ 100
      .               .               .               .
101 MNSLRAEDMAVYYCARWGDWDDAFDIWGQGTMTVTVSSASTK 144

```

 C_{2m} , V_H (突变以黑体表示)

```

1  MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSS 50
      .               .               .               .
51  YVMHWVRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTNYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQ 100
      .               .               .               .
101 MNSLRAEDTAVYYCARWGDWDDAFDIWGQGTMTVTVSSASTK 144

```

各个可变区的CDR序列(CDR1、2和3)以下划线示出。

图 4