



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110770252 A

(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201780078161.4

(22)申请日 2017.10.17

(30)优先权数据

1617564.8 2016.10.17 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2017/050522 2017.10.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/074978 EN 2018.04.26

(83)生物保藏信息

PTA-124525 2017.10.12

PTA-124526 2017.10.12

PTA-124527 2017.10.12

PTA-124528 2017.10.12

PTA-124529 2017.10.12

PTA-124530 2017.10.12

(71)申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡市

申请人 新加坡保健服务集团有限公司
新加坡国立大学

(72)发明人 T·K·萨巴齐 D·P·雷恩

黄丽安 许欣瑜 刘爱华

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 徐迅 崔佳佳

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书9页 说明书67页 附图94页

(54)发明名称

抗p53抗体

(57)摘要

本发明涉及一种制备抗体的方法，所述抗体对突变型p53多肽的特异性优于野生型p53多肽，包括使用肽或多肽作为免疫原，所述肽或多肽包括：(i)抗原序列，包含突变型p53多肽的氨基酸序列，所述突变型p53多肽的氨基酸序列包括突变和与该突变紧邻的至少一个氨基酸，和(ii)支架序列，用于提供溶剂可接近构型的抗原序列，特别是其中所述支架序列是硫氧还蛋白。在具体的实施方式中，产生了针对包含R175H、R248Q或R273H的突变型p53的抗体。还公开了所述抗体在诊断、预后和分类患者组中的用途，还包括抗体在癌症成像和治疗中的用途。

R175H

MSDKIHLTDQDFDTDVLEADGAILVDFKA
10 20 30
EWCQFQGQG 40 RHEKTEVYV 50 CPHKXCSD 60
S 70 E 80 V 90 V 100 C 110 V 120 E 130 S 140
PCEMIAPILDK 150 EADTQGELTVAKELNIDQ 160
PQATAPKYSI 170 GIPITLLYF 180 QEVAAATEV 190
LSEQQLKEKFL 200 DAVLAG 210 S 220 S 230 S 240 S 250 S 260 S 270 S 280 S 290 S 300
终止

图 1A

R248Q

MSDKIHLTDQDFDTDVLEADGAILVDFKA
10 20 30
EWCQFQGQG 40 RHEKTEVYV 50 CPHKXCSD 60
S 70 E 80 V 90 V 100 C 110 V 120 E 130 S 140
PCEMIAPILDK 150 EADTQGELTVAKELNIDQ 160
PQATAPKYSI 170 GIPITLLYF 180 QEVAAATEV 190
LSEQQLKEKFL 200 DAVLAG 210 S 220 S 230 S 240 S 250 S 260 S 270 S 280 S 290 S 300
终止

图 1B

R273H

MSDKIHLTDQDFDTDVLEADGAILVDFKA
10 20 30
EWCQFQGQG 40 RHEKTEVYV 50 CPHKXCSD 60
S 70 E 80 V 90 V 100 C 110 V 120 E 130 S 140
PCEMIAPILDK 150 EADTQGELTVAKELNIDQ 160
PQATAPKYSI 170 GIPITLLYF 180 QEVAAATEV 190
LSEQQLKEKFL 200 DAVLAG 210 S 220 S 230 S 240 S 250 S 260 S 270 S 280 S 290 S 300
终止

图 1C

1. 一种制备抗体的方法,其特征在于,所述抗体对突变型p53多肽的特异性优于野生型p53多肽,包括使用肽或多肽作为免疫原,所述肽或多肽包括: (i) 抗原序列,包含突变型p53多肽的氨基酸序列,所述突变型p53多肽包括突变和与该突变紧邻的至少一个氨基酸,和 (ii) 支架序列,用于提供溶剂可接近构型的抗原序列。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述支架序列衍生自包含溶剂可接近序列的肽或多肽,并且所述抗原序列被插入所述肽或多肽的溶剂可接近序列,或取代所述肽或多肽的溶剂可接近序列的全部或部分。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述包含溶剂可接近序列的肽或多肽是硫氧还蛋白,并且所述溶剂可接近序列是硫氧还蛋白的活性位点序列。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其特征在于,用作免疫原的肽或多肽在抗原序列和支架序列之间另外包含一个或多个接头序列。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,用作免疫原的肽或多肽包含至少两个突变型p53多肽的氨基酸序列。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,用作免疫原的肽或多肽在至少两个突变型p53多肽的氨基酸序列之间另外包含接头序列。

7. 如权利要求5或6所述的方法,其特征在于,所述至少两个突变型p53多肽的氨基酸序列是不相同的。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其特征在于,所述突变型p53多肽的氨基酸序列包含至少5个氨基酸。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其特征在于,所述突变型p53多肽在DNA结合结构域(DBD)中包含突变。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其特征在于,所述突变型p53多肽包含选自以下之一的突变:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C和R337H。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,其特征在于,所述突变型p53多肽包含SEQ ID NO:3到16之一的氨基酸序列或由其组成。

12. 一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段是通过权利要求1-11中任一项所述的方法获得或可获得的。

13. 一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段对突变型p53多肽的特异性高于对野生型p53多肽的特异性。

14. 如权利要求13所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述突变型p53多肽在DNA结合结构域(DBD)中包含突变。

15. 如权利要求13至14所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述突变型p53多肽包含选自以下之一的突变:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C和R337H。

16. 如权利要求13至15中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述突变型p53多肽包含SEQ ID NO:3到16之一的氨基酸序列或由其组成。

17. 一种任选分离的抗体或抗原结合片段或其变体,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R175H p53多肽,具有氨基酸序列i)至vi) :

- i) LC-CDR1:QSLLNSGNQKSX₁ (SEQ ID NO:31) ;
- ii) LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;
- iii) LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) ;
- iv) HC-CDR1:GX₂TFTEYLT (SEQ ID NO:32) ;
- v) HC-CDR2:IX₃PX₄X₅GX₆T (SEQ ID NO:33) ;
- vi) HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27) ;

其中序列i) 至 vi) 中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一种氨基酸取代, 其中X₁=Y或N; X₂=F或Y; X₃=D或N; X₄=N或Y; X₅=N或S; 和X₆=V或G。

18. 如权利要求17所述的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 所述LC-CDR1是QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19) 或QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23) 之一。

19. 如权利要求17或18所述的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 所述HC-CDR1是GFTFTEYLT (SEQ ID NO:25) 或GYTFTEYLT (SEQ ID NO:29) 之一。

20. 如权利要求17至19中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 所述HC-CDR2是IDPNNGVT (SEQ ID NO:26) 或INPYSGGT (SEQ ID NO:30) 之一。

21. 如权利要求17至20中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

- LC-CDR1:QSLLNSGNQKSX₁ (SEQ ID NO:31) ;
- LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;
- LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) ;

其中X₁=Y或N。

22. 如权利要求21所述的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

- LC-CDR1:QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19) ;
- LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;
- LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) 。

23. 如权利要求21所述的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

- LC-CDR1:QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23) ;
- LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;
- LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) 。

24. 如权利要求17至23中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

- HC-CDR1:GX₂TFTEYLT (SEQ ID NO:32) ;
- HC-CDR2:IX₃PX₄X₅GX₆T (SEQ ID NO:33) ;
- HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27) ;

其中X₂=F或Y; X₃=D或N; X₄=N或Y; X₅=N或S; 和X₆=V或G。

25. 如权利要求24所述的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

- HC-CDR1:GFTFTEYLT (SEQ ID NO:25) ;

HC-CDR2:IDPNNGVT (SEQ ID NO:26) ;

HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27) 。

26. 如权利要求24所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1:GYTFTEYT (SEQ ID NO:29) ;

HC-CDR2:INPYSGGT (SEQ ID NO:30) ;

HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27) 。

27. 一种分离的轻链可变区多肽,其特征在于,包含以下CDR:

LC-CDR1:QSLLNSGNQKSX₁ (SEQ ID NO:31) ;

LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;

LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) ;

其中X₁=Y或N。

28. 如权利要求27所述的分离的轻链可变区多肽,其特征在于,所述LC-CDR1是QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19) 或QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23) 之一。

29. 一种分离的重链可变区多肽,其特征在于,包含以下CDR:

HC-CDR1:GX₂TFTEYT (SEQ ID NO:32) ;

HC-CDR2:IX₃PX₄X₅GX₆T (SEQ ID NO:33) ;

HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27) ;

其中X₂=F或Y;X₃=D或N;X₄=N或Y;X₅=N或S;和X₆=V或G。

30. 如权利要求29所述的分离的重链可变区多肽,其特征在于,所述HC-CDR1是GFTFTEYT (SEQ ID NO:25) 或GYTFTEYT (SEQ ID NO:29) 之一。

31. 如权利要求29或30所述的分离的重链可变区多肽,其特征在于,所述HC-CDR2是IDPNNGVT (SEQ ID NO:26) 或INPYSGGT (SEQ ID NO:30) 之一。

32. 如权利要求27或28所述的分离的轻链可变区多肽,与如权利要求29至31中任一项所述的重链可变区多肽组合。

33. 一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R175H p53多肽,且包含轻链和重链可变区序列,其中:

所述轻链包含LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3,与以下LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性,LC-CDR1:QSLLNSGNQKSX₁ (SEQ ID NO:31) 、QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19) 或QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23) 之一;LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) ;和

所述重链包含HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3,与以下HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性,HC-CDR1:GX₂TFTEYT (SEQ ID NO:32) 、GFTFTEYT (SEQ ID NO:25) 或GYTFTEYT (SEQ ID NO:29) ;HC-CDR2:IX₃PX₄X₅GX₆T (SEQ ID NO:33) 、IDPNNGVT (SEQ ID NO:26) 或INPYSGGT (SEQ ID NO:30) 之一;HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27) ;其中X₁=Y或N;X₂=F或Y;X₃=D或N;X₄=N或Y;X₅=N或S;和X₆=V或G。

34. 一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R175H p53多肽,且包含轻链和重链可变区序列,其中:

所述轻链序列与SEQ ID NO:18或22(图24)或SEQ ID NO:237或94(图49)所示的轻链序

列具有至少85%的序列同一性,和;

所述重链序列与SEQ ID NO:24或28(图25)或SEQ ID NO:239、240或241(图50)所示的重链序列具有至少85%的序列同一性。

35.一种任选分离的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R175H p53多肽,是双特异性抗体或双特异性抗原结合片段,包括(i)如权利要求17至34中任一项所述的抗原结合片段或多肽,和(ii)能够结合除R175H p53多肽之外的多肽的抗原结合片段。

36.一种任选分离的体外复合物,其特征在于,包含如权利要求17至35中任一项所述的与R175H p53多肽结合的抗体、抗原结合片段或多肽,或其片段。

37.一种任选分离的抗体或抗原结合片段或其变体,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R248Q p53多肽,具有氨基酸序列i)至vi):

- i) LC-CDR1:QSLLYSDGKY (SEQ ID NO:41) ;
- ii) LC-CDR2:LVS (SEQ ID NO:42) ;
- iii) LC-CDR3:WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43) ;
- iv) HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46) ;
- v) HC-CDR2:IX₇PKNGGT (SEQ ID NO:52) ;
- vi) HC-CDR3:AKX₈GGX₉DDY (SEQ ID NO:53) ;

其中序列i)至vi)中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一种氨基酸取代,其中X₇=H或D;X₈=M或Q;和X₉=Y或F。

38.如权利要求37所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述HC-CDR2是IHPKNGGT (SEQ ID NO:47)或IDPKNGGT (SEQ ID NO:50)之一。

39.如权利要求37或38所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述HC-CDR3是AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48)或AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51)之一。

40.如权利要求37至39中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

LC-CDR1:QSLLYSDGKY (SEQ ID NO:41)
LC-CDR2:LVS (SEQ ID NO:42)
LC-CDR3:WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)。

41.如权利要求37至40中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46) ;
HC-CDR2:IX₇PKNGGT (SEQ ID NO:52) ;
HC-CDR3:AKX₈GGX₉DDY (SEQ ID NO:53) ;
其中X₇=H或D;X₈=M或Q;和X₉=Y或F。

42.如权利要求41所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46) ;
HC-CDR2:IHPKNGGT (SEQ ID NO:47) ;
HC-CDR3:AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48) 。

43. 如权利要求41所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1: GYTFTDYY (SEQ ID NO:46) ;
HC-CDR2: IDPKNGGT (SEQ ID NO:50) ;
HC-CDR3: AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51) 。

44. 一种分离的轻链可变区多肽,其特征在于,包含以下CDR:

LC-CDR1: QSLLYSDGKY (SEQ ID NO:41)
LC-CDR2: LVS (SEQ ID NO:42)
LC-CDR3: WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43) 。

45. 一种分离的重链可变区多肽,其特征在于,包含以下CDR:

HC-CDR1: GYTFTDYY (SEQ ID NO:46) ;
HC-CDR2: IX₇PKNGGT (SEQ ID NO:52) ;
HC-CDR3: AKX₈GGX₉DDY (SEQ ID NO:53) ;
其中X₇=H或D; X₈=M或Q; 和X₉=Y或F。

46. 如权利要求45所述的分离的重链可变区多肽,其特征在于,所述HC-CDR2是IHPKNGGT (SEQ ID NO:47) 或IDPKNGGT (SEQ ID NO:50) 之一。

47. 如权利要求45或46所述的分离的重链可变区多肽,其特征在于,所述HC-CDR3是AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48) 或AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51) 之一。

48. 如权利要求44所述的分离的轻链可变区多肽,与如权利要求45至47中任一项所述的重链可变区多肽组合。

49. 一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R248Q p53多肽,且包含轻链和重链可变区序列,其中:

所述轻链包含LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3,与以下LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性:QSLLYSDGKY (SEQ ID NO:41) ;LC-CDR2:LVS (SEQ ID NO:42) ;LC-CDR3:WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43) ;和

所述重链包含HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3,与以下HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46) ;HC-CDR2:IX₇PKNGGT (SEQ ID NO:52) 、IHPKNGGT (SEQ ID NO:47) 或IDPKNGGT (SEQ ID NO:50) 之一;HC-CDR3:AKX₈GGX₉DDY (SEQ ID NO:53) 、AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48) 或AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51) 之一;其中X₇=H或D; X₈=M或Q; 和X₉=Y或F。

50. 一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R248Q p53多肽,且包含轻链和重链可变区序列,其中:

所述轻链序列与SEQ ID NO:40或44(图28)或SEQ ID NO:251或252(图57)所示的轻链序列具有至少85%的序列同一性,和;

所述重链序列与SEQ ID NO:45或49(图29)或SEQ ID NO:253或254(图58)所示的重链序列具有至少85%的序列同一性。

51. 一种任选分离的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R248Q p53多肽,是双特异性抗体或双特异性抗原结合片段,包括(i)如权利要求37至50中任一项所述的抗原结合片段或多肽,和(ii)能够结合除R248Q p53多肽之外的多肽的

抗原结合片段。

52. 一种任选分离的体外复合物,其特征在于,包含如权利要求37至51中任一项所述的与R248Q p53多肽结合的抗体、抗原结合片段或多肽,或其片段。

53. 一种任选分离的抗体或抗原结合片段或其变体,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R273H p53多肽,具有氨基酸序列i)至vi) :

- i) LC-CDR1:QSIVHNNGDTY (SEQ ID NO:59) ;
- ii) LC-CDR2:KVS (SEQ ID NO:60) ;
- iii) LC-CDR3:FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61) ;
- iv) HC-CDR1:GFSFSDYY (SEQ ID NO:63) ;
- v) HC-CDR2:ISVGGTYT (SEQ ID NO:64) ;
- vi) HC-CDR3:VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65) ;

其中序列i)至vi)中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一种氨基酸取代。

54. 如权利要求53所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

LC-CDR1:QSIVHNNGDTY (SEQ ID NO:59)
LC-CDR2:KVS (SEQ ID NO:60)
LC-CDR3:FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61)。

55. 如权利要求53或54所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1:GFSFSDYY (SEQ ID NO:63)
HC-CDR2:ISVGGTYT (SEQ ID NO:64)
HC-CDR3:VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65)。

56. 一种分离的轻链可变区多肽,其特征在于,包含以下CDR:

LC-CDR1:QSIVHNNGDTY (SEQ ID NO:59)
LC-CDR2:KVS (SEQ ID NO:60)
LC-CDR3:FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61)。

57. 一种分离的重链可变区多肽,其特征在于,包含以下CDR:

HC-CDR1:GFSFSDYY (SEQ ID NO:63)
HC-CDR2:ISVGGTYT (SEQ ID NO:64)
HC-CDR3:VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65)。

58. 如权利要求56所述的分离的轻链可变区多肽,与如权利要求57所述的重链可变区多肽组合。

59. 一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R273H p53多肽,且包含轻链和重链可变区序列,其中:

所述轻链包含LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3,与以下LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性:QSIVHNNGDTY (SEQ ID NO:59) ;LC-CDR2:KVS (SEQ ID NO:60) ;LC-CDR3:FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61) ;和

所述重链包含HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3,与以下HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3具有至少

85%的总体序列同一性:GFSFSDYY (SEQ ID NO:63) ;HC-CDR2:ISVGGTYT (SEQ ID NO:64) ;HC-CDR3:VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65)。

60. 一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R273H p53多肽,且包含轻链和重链可变区序列,其中:

所述轻链序列与SEQ ID NO:58 (图32) 或SEQ ID NO:247 (图53) 所示的轻链序列具有至少85%的序列同一性,和;

所述重链序列与SEQ ID NO:62 (图33) 或SEQ ID NO:248 (图54) 所示的重链序列具有至少85%的序列同一性。

61. 一种任选分离的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段能够结合R273H p53多肽,是双特异性抗体或双特异性抗原结合片段,包括(i)如权利要求53至60中任一项所述的抗原结合片段或多肽,和(ii)能够结合除R273H p53多肽之外的多肽的抗原结合片段。

62. 一种任选分离的体外复合物,其特征在于,包含如权利要求53至61中任一项所述的与R273H p53多肽结合的抗体、抗原结合片段或多肽,或其片段。

63. 如权利要求17-35、权利要求37-51或权利要求53-61中任一项所述的抗体、抗原结合片段或多肽,与药物部分或可检测部分缀合。

64. 一种嵌合抗原受体 (CAR) ,其特征在于,包含权利要求17-35、权利要求37-51或权利要求53-61中任一项所述的抗原结合片段或多肽。

65. 一种细胞,其特征在于,含有如权利要求64所述的嵌合抗原受体 (CAR) 。

66. 一种组合物,其特征在于,包含权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61或权利要求63至65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞,和至少一种药学上可接受的载体。

67. 一种分离的核酸,其特征在于,编码权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61、权利要求63或权利要求64中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物或嵌合抗原受体 (CAR) 。

68. 一种载体,其特征在于,包含权利要求67所述的核酸。

69. 一种宿主细胞,其特征在于,包含权利要求68所述的载体。

70. 一种制备如权利要求17-35、权利要求37-51、权利要求53-61、权利要求63或权利要求64中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物或嵌合抗原受体 (CAR) 的方法,其特征在于,包括在适合于表达编码所述抗体、抗原结合片段、多肽或缀合物的载体的条件下,培养如权利要求69所述的宿主细胞,并回收所述抗体、抗原结合片段、多肽或缀合物。

71. 如权利要求17-35、权利要求37-51、权利要求53-61或权利要求63-65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞,其特征在于,用于治疗或医疗方法。

72. 如权利要求17-35、权利要求37-51、权利要求53-61或权利要求63-65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞,其特征在于,用于治疗癌症。

73. 一种如权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61或权利要求63至65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞的用途,其特征

在于,用于制备用于治疗癌症的药物。

74. 一种治疗癌症的方法,其特征在于,包括向患有癌症的患者施用如权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61或权利要求63至65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞。

75. 一种方法,其特征在于,包括使含有或疑似含有突变型p53多肽的样品与权利要求17-35、权利要求37-51、权利要求53-61或权利要求63-65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞接触,并检测所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR或细胞与突变型p53多肽的复合物的形成。

76. 一种诊断受试者的疾病或病症的方法,其特征在于,所述方法包括将来自受试者的样品与如权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61或权利要求63至65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞进行体外接触,并检测所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR或细胞与突变型p53多肽的复合物的形成。

77. 一种选择或分类受试者以便用突变型p53多肽靶向剂治疗的方法,其特征在于,所述方法包括将来自受试者的样品与如权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61或权利要求63至65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞进行体外接触,并检测所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR或细胞与突变型p53多肽的复合物的形成。

78. 如权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61或权利要求63至65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞的用途,其特征在于,用于体外或体内检测突变型p53多肽。

79. 如权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61或权利要求63至65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞的用途,其特征在于,用于作为体外或体内诊断或预后的试剂。

80. 如权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61或权利要求63至65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞的用途,其特征在于,用于在体内检测、定位或成像癌症的方法。

81. 一种用于体内检测、定位或成像癌症的方法,其特征在于,包括向对象施用如权利要求17至35、权利要求37至51、权利要求53至61或权利要求63至65中任一项所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞,并检测所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞。

82. 一种疫苗,其特征在于,包含如权利要求1至11中任一项所定义的免疫原。

83. 如权利要求1至11中任一项所定义的免疫原,其特征在于,用于抗癌症的疫苗接种的方法。

84. 如权利要求1至11中任一项所定义的免疫原的用途,其特征在于,用于制备用于抗癌症的疫苗接种药物。

85. 一种抗癌症的疫苗接种对象的方法,其特征在于,包括向对象施用如权利要求1至11中任一项所定义的免疫原,从而给对象接种抗癌症的疫苗。

86. 如权利要求86至85中任一项所述的癌症疫苗、使用的免疫原,用途或方法,其特征在于,所述癌症是包含表达突变型p53多肽的或包含编码突变型p53多肽的核酸的一种或多

种细胞的癌症。

抗p53抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及针对突变型p53多肽的抗体及其制备方法。

背景技术

[0002] 进化的过程使得免疫反应得以完善,以便进行高度特异性的识别事件,可以抵抗几乎所有类型的外源性抗原(Flajnik和Kasahara,Nat Rev Gene (2010) 11 (1) :47-59)。在脊椎动物中,T淋巴细胞和B淋巴细胞均已形成受体,这些受体经历抗原诱导的选择性重排,以检测可能在类似物种的高度相关抗原蛋白中发生的最轻微的变异(Cooper和Alder,Cell (2006) 124 (4) :815-822),从而建立了抵御外来入侵的屏障。这种先天能力已经被利用来产生大量针对具有细微结构变异的高度相似蛋白质的抗体(Lo等人,2014Microbiol.Spectr.2,AID-0007-2012)。此外,还制备抗体以检测细微的翻译后修饰,例如对靶氨基酸残基的磷酸化、泛素化和乙酰化,这使得对各种生理和病理过程的机制进行理解。然而,由于亲本蛋白质上的侧翼区域的高度同源性,对单个氨基酸变化(常被认为是由于癌症基因组中的错义突变)的检测体现出对产生选择性抗体的显著挑战。虽然已经尝试制备不与未突变的天然蛋白质交叉反应的突变特异性抗体,但迄今为止大多数努力都是不成功的(Bondgaard等,Modern Pathology (2014) 27:1590-1598)。

[0003] 虽然针对表面抗原如EGFR、PD-1等的mAb已成功用于临床治疗(Martinelli等,2009Clinical and Experimental Immunology 158 (1) :1-9;Philips和Atkins 2014,Int Immunol 27 (1) :39-46),针对核抗原的mAb通常面临有效越过细胞膜的挑战。然而,最近的研究表明抗核抗原的抗体确实可以是治疗有效的(Hong和Zeng,2012Cancer Res 72 (11) :3715),这表明该方法将来可能会成功。

[0004] p53是所有癌症类型中突变最多的基因,超过50%的肿瘤表现出其某种形式的遗传改变(Forbes等,2015Nucleic Acids Res 43,D805-D811)。p53中的大多数突变被发现在跨越约200个氨基酸的中心DNA结合结构域(DBD)中,并且占所有鉴定到的p53突变的约90%。由于p53在保护基因组中的多功能作用,几乎所有DBD突变都会导致野生型p53功能的丧失,这对于肿瘤抑制和对治疗的有效反应至关重要(Vousden和Lu,Nat Rev Cancer (2002) 2 (8) :594-604; Freed-Pastor和Prives,Genes Dev (2012) 26 (12) :1268-1286)。除了野生型功能的丧失之外,p53中的突变还导致两种主要现象,其有助于癌症的发展并且还抑制针对治疗的有效反应。一个是当p53的突变等位基因与野生型等位基因共存时发生的显性阴性(DN)效应,从而形成导致剩余野生型p53功能减弱的异寡聚体(Kern等,Science (1992) 256:827-830)。此外,当野生型p53等位基因由于杂合性丧失而丢失时,单独存在突变型p53等位基因,特别是在癌症的后期阶段,导致癌细胞对突变体p53蛋白成瘾以存活,这是由于促进存活和侵入性质的突变体p53获得新的致癌功能(GOF)(Sabapathy,Front Oncol (2015) 5:276)。突变型p53在这些过程中的因果作用已经通过降低其表达或使其功能失活来证明,其中DN和GOF功能都可以重新获得,从而使癌细胞对治疗处理变得更加敏感(Lee等,Cancer Cell (2012) 22:751-764)。虽然这些数据揭示了靶向突变体p53的令人兴奋

的可能性,但对突变体p53成功失活仍存在若干挑战。最重要的是,值得注意的是,尽管p53中的所有突变都明确导致其野生型活性的丧失,并且在大多数情况下会导致DN效应,但GOF特性似乎对某些突变体具有选择性,而不是全部(Lee等,Cancer Cell (2012) 22:751-764; Hanel等,Cell Death Diff (2013) 20:898-909),这强调了靶向突变体p53需要更复杂的方法来选择性地检测和灭活每个单独的p53突变体。

[0005] 了解突变体p53的生物学特征成为揭示突变体p53在癌症发生和治疗反应中的作用的基础。虽然人们对突变体p53如何发挥其促生存功能的认知取得了重大进展,但仍存在局限性。例如,并非所有突变在功能上都相似(Sabapathy,2015Front.Oncol.5:276),并且在p53的反式激活和寡聚化结构域中发现的突变(在某些群体中非常常见)(Achatz等,2007Cancer Lett.245:96-102)需要进一步评估。

[0006] 目前的技术利用仅表达突变蛋白而不含野生型蛋白的敲入小鼠模型或人肿瘤细胞系,这可能不完全反映突变蛋白与野生型蛋白共存的作用。

[0007] 几十年来已经尝试产生针对突变体p53的抗体,并且可获得针对p53的突变体(PAb240)或野生型(PAb246)构象的单克隆抗体(mAb)(Gannon等,EMBO J (1990) 9 (5) :1595-1602)。然而,这些抗体不具有足够的特异性并且表现出交叉反应性,并且需要非常选择性的条件来检测正确的构象,因此限制了它们的使用。

[0008] Vojtesek和Lane,J Cell Sci (1993),105 (3) :607-612描述了针对人p53的氨基末端区域命名为D0-1的抗体,其显示出对人p53的高水平特异性而没有任何与小鼠p53的交叉反应性。

[0009] 发明概述

[0010] 在第一方面,本发明提供了一种制备抗体的方法,相比于野生型p53多肽,所述抗体是突变型p53多肽特异性的,包括使用肽或多肽作为免疫原,所述肽或多肽包括:(i)抗原序列,包含突变型p53多肽的氨基酸序列,所述突变型p53多肽的氨基酸序列包括突变和与该突变紧邻的至少一个氨基酸,和(ii)支架序列,用于以溶剂可接近的构型提供抗原序列。

[0011] 在一些实施方式中,所述支架序列衍生自包含溶剂可接近序列的肽或多肽,并且所述抗原序列被插入所述肽或多肽的溶剂可接近序列,或取代所述肽或多肽的溶剂可接近序列的全部或部分。在一些实施方式中,所述包含溶剂可接近序列的肽或多肽是硫氧还蛋白,并且所述溶剂可接近序列是硫氧还蛋白的活性位点序列。在一些实施方式中,用作免疫原的肽或多肽在抗原序列和支架序列之间另外包含一个或多个接头序列。在一些实施方式中,用作免疫原的肽或多肽包含至少两个突变型p53多肽的氨基酸序列。在一些实施方式中,用作免疫原的肽或多肽在至少两个突变型p53多肽的氨基酸序列之间另外包含接头序列。在一些实施方式中,所述至少两个突变型p53多肽的氨基酸序列是不相同的。在一些实施方式中,所述突变型p53多肽的氨基酸序列包括至少5个氨基酸。在一些实施方式中,所述突变型p53多肽在DNA结合结构域(DBD)包含突变。在一些实施方式中,突变型p53多肽包含选自R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C和R337H之一的突变。在一些实施方式中,突变型p53多肽包含SEQ ID N0:3到16之一的氨基酸序列或由其组成。

[0012] 在另一方面,本发明提供了一种抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段是通过本发明制备抗体的方法获得的或可获得的。

[0013] 在另一方面,本发明提供了一种抗体或抗原结合片段,相比于野生型p53多肽,所述抗体或抗原结合片段是突变型p53多肽特异性的。

[0014] 在一些实施方式中,所述突变型p53多肽在DNA结合结构域(DBD)包含突变。在一些实施方式中,突变型p53多肽包含选自R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C和R337H之一的突变。在一些实施方式中,突变型p53多肽包含SEQ ID NO:3到16之一的氨基酸序列或由其组成。

[0015] 在另一方面,本发明提供了一种任选分离的抗体或抗原结合片段或其变体,所述抗体或抗原结合片段能够结合R175H p53多肽,具有氨基酸序列i)至vi) :

[0016] i) LC-CDR1:QSLLNSGNQKSX₁ (SEQ ID NO:31) ;

[0017] ii) LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;

[0018] iii) LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) ;

[0019] iv) HC-CDR1:GX₂TFTEYLT (SEQ ID NO:32) ;

[0020] v) HC-CDR2:IX₃PX₄X₅GX₆T (SEQ ID NO:33) ;

[0021] vi) HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27) ;

[0022] 其中序列i)至vi)中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一种氨基酸取代,其中X₁=Y或N;X₂=F或Y;X₃=D或N;X₄=N或Y;X₅=N或S;和X₆=V或G。

[0023] 在一些实施方式中,LC-CDR1是QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19) 或QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23) 之一。在一些实施方式中,HC-CDR1是GFTFTEYLT (SEQ ID NO:25) 或GYTFTEYLT (SEQ ID NO:29) 之一。在一些实施方式中,HC-CDR2是IDPNNGVT (SEQ ID NO:26) 或INPYSGGT (SEQ ID NO:30) 之一。

[0024] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

[0025] LC-CDR1:QSLLNSGNQKSX₁ (SEQ ID NO:31) ;

[0026] LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;

[0027] LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) ;

[0028] 其中X₁=Y或N。

[0029] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

[0030] LC-CDR1:QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19) ;

[0031] LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;

[0032] LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) 。

[0033] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

[0034] LC-CDR1:QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23) ;

[0035] LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20) ;

[0036] LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21) 。

[0037] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

[0038] HC-CDR1:GX₂TFTEYLT (SEQ ID NO:32) ;

[0039] HC-CDR2:IX₃PX₄X₅GX₆T (SEQ ID NO:33)；

[0040] HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)；

[0041] 其中X₂=F或Y;X₃=D或N;X₄=N或Y;X₅=N或S;和X₆=V或G。

[0042] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

[0043] HC-CDR1:GFTFTEYLT (SEQ ID NO:25)；

[0044] HC-CDR2:IDPNNGVT (SEQ ID NO:26)；

[0045] HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)。

[0046] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

[0047] HC-CDR1:GYTFTEYLT (SEQ ID NO:29)；

[0048] HC-CDR2:INPYSGGT (SEQ ID NO:30)；

[0049] HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)。

[0050] 在另一方面,本发明提供了一种分离的轻链可变区多肽,包含以下CDR:

[0051] LC-CDR1:QSLLNSGNQKSX₁ (SEQ ID NO:31)；

[0052] LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20)；

[0053] LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)；

[0054] 其中X₁=Y或N。

[0055] 在一些实施方式中,LC-CDR1是QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19) 或QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23) 之一。

[0056] 在另一方面,本发明提供了一种分离的重链可变区多肽,包含以下CDR:

[0057] HC-CDR1:GX₂TFTEYLT (SEQ ID NO:32)；

[0058] HC-CDR2:IX₃PX₄X₅GX₆T (SEQ ID NO:33)；

[0059] HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)；

[0060] 其中X₂=F或Y;X₃=D或N;X₄=N或Y;X₅=N或S;和X₆=V或G。

[0061] 在一些实施方式中,HC-CDR1是GFTFTEYLT (SEQ ID NO:25) 或GYTFTEYLT (SEQ ID NO:29) 之一。在一些实施方式中,HC-CDR2是IDPNNGVT (SEQ ID NO:26) 或INPYSGGT (SEQ ID NO:30) 之一。

[0062] 在另一方面,本发明提供了一种如本文所述的分离的轻链可变区多肽与如本文所述的重链可变区多肽的组合。

[0063] 在另一方面,本发明提供了一种抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合R175H p53多肽,包含轻链和重链可变区序列,其中:

[0064] 所述轻链包含LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3,与以下LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性,LC-CDR1:QSLLNSGNQKSX₁ (SEQ ID NO:31)、QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19) 或QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23) 之一;LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20);LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21);和

[0065] 所述重链包含HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3,与以下HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性,HC-CDR1:GX₂TFTEYLT (SEQ ID NO:32)、GFTFTEYLT (SEQ ID NO:25) 或GYTFTEYLT (SEQ ID NO:29);HC-CDR2:IX₃PX₄X₅GX₆T (SEQ ID NO:33)、IDPNNGVT (SEQ ID

NO:26) 或INPYSGGT (SEQ ID NO:30) 之一;HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27) ;其中X₁=Y或N;X₂=F或Y;X₃=D或N;X₄=N或Y;X₅=N或S;和X₆=V或G。

[0066] 在另一方面,本发明提供了一种抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合R175H p53多肽,包含轻链和重链可变区序列,其中:

[0067] 所述轻链序列与SEQ ID NO:18或22(图24)或SEQ ID NO:237或94(图49)所示的轻链序列具有至少85%的序列同一性,和;

[0068] 所述重链序列与SEQ ID NO:24或28(图25)或SEQ ID NO:239、240或241(图50)所示的重链序列具有至少85%的序列同一性。

[0069] 在另一方面,本发明提供了一种任选分离的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合R175H p53多肽,是双特异性抗体或双特异性抗原结合片段,包括(i)如本文所述的抗原结合片段或多肽,和(ii)能够结合除R175H p53多肽之外的多肽的抗原结合片段。

[0070] 在另一方面,本发明提供了一种任选分离的体外复合物,所述体外复合物包括与R175H p53多肽或其片段结合的如本文所述的抗体、抗原结合片段或多肽。

[0071] 在另一方面,本发明提供了一种任选分离的抗体或抗原结合片段或其变体,所述抗体或抗原结合片段能够结合R248Q p53多肽,具有氨基酸序列i)至vi):

[0072] i) LC-CDR1:QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41) ;

[0073] ii) LC-CDR2:LVS (SEQ ID NO:42) ;

[0074] iii) LC-CDR3:WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43) ;

[0075] iv) HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46) ;

[0076] v) HC-CDR2:IX₇PKNGGT (SEQ ID NO:52) ;

[0077] vi) HC-CDR3:AKX₈GGX₉DDY (SEQ ID NO:53) ;

[0078] 其中序列i)至vi)中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一种氨基酸取代,其中X₇=H或D;X₈=M或Q;和X₉=Y或F。

[0079] 在一些实施方式中,HC-CDR2是IHPKNGGT (SEQ ID NO:47) 或IDPKNGGT (SEQ ID NO:50) 之一。在一些实施方式中,HC-CDR3是AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48) 或AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51) 之一。

[0080] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

[0081] LC-CDR1:QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)

[0082] LC-CDR2:LVS (SEQ ID NO:42)

[0083] LC-CDR3:WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43) 。

[0084] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

[0085] HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46) ;

[0086] HC-CDR2:IX₇PKNGGT (SEQ ID NO:52) ;

[0087] HC-CDR3:AKX₈GGX₉DDY (SEQ ID NO:53) ;

[0088] 其中X₇=H或D;X₈=M或Q;和X₉=Y或F。

[0089] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的重链

可变区：

- [0090] HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)；
- [0091] HC-CDR2:IHPKNGGT (SEQ ID NO:47)；
- [0092] HC-CDR3:AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48)。

[0093] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的重链可变区：

- [0094] HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)；
- [0095] HC-CDR2:IDPKNGGT (SEQ ID NO:50)；
- [0096] HC-CDR3:AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51)。

[0097] 在另一方面,本发明提供了一种分离的轻链可变区多肽,包含以下CDR:

- [0098] LC-CDR1:QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)
- [0099] LC-CDR2:LVS (SEQ ID NO:42)
- [0100] LC-CDR3:WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)。

[0101] 在另一方面,本发明提供了一种分离的重链可变区多肽,包含以下CDR:

- [0102] HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)；
- [0103] HC-CDR2:IX₇PKNGGT (SEQ ID NO:52)；
- [0104] HC-CDR3:AKX₈GGX₉DDY (SEQ ID NO:53)；
- [0105] 其中X₇=H或D;X₈=M或Q;和X₉=Y或F。

[0106] 在一些实施方式中,HC-CDR2是IHPKNGGT (SEQ ID NO:47) 或IDPKNGGT (SEQ ID NO:50) 之一。在一些实施方式中,HC-CDR3是AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48) 或AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51) 之一。

[0107] 在另一方面,本发明提供了一种如本文所述的分离的轻链可变区多肽与如本文所述的重链可变区多肽的组合。

[0108] 在另一方面,本发明提供了一种抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合R248Q p53多肽,包含轻链和重链可变区序列,其中:

[0109] 所述轻链包含LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3,与以下LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性,LC-CDR1:QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41) ;LC-CDR2:LVS (SEQ ID NO:42) ;LC-CDR3:WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43) ;和

[0110] 所述重链包含HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3,与以下HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性,HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46) ;HC-CDR2:IX₇PKNGGT (SEQ ID NO:52) 、IHPKNGGT (SEQ ID NO:47) 或IDPKNGGT (SEQ ID NO:50) 之一;HC-CDR3:AKX₈GGX₉DDY (SEQ ID NO:53) 、AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48) 或AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51) 之一;其中X₇=H或D;X₈=M或Q;和X₉=Y或F。

[0111] 在另一方面,本发明提供了一种抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合R248Q p53多肽,包含轻链和重链可变区序列,其中:

[0112] 所述轻链序列与SEQ ID NO:40或44(图28)或SEQ ID NO:251或252(图57)所示的轻链序列具有至少85%的序列同一性,和;

[0113] 所述重链序列与SEQ ID NO:45或49(图29)或SEQ ID NO:253或254(图58)所示的重链序列具有至少85%的序列同一性。

[0114] 在另一方面,本发明提供了一种任选分离的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合R248Q p53多肽,是双特异性抗体或双特异性抗原结合片段,包括(i)如本文所述的抗原结合片段或多肽,和(ii)能够结合除R248Q p53多肽之外的多肽的抗原结合片段。

[0115] 在另一方面,本发明提供了一种任选分离的体外复合物,所述体外复合物包括与R248Q p53多肽或其片段结合的如本文所述的抗体、抗原结合片段或多肽。

[0116] 在另一方面,本发明提供了一种任选分离的抗体或抗原结合片段或其变体,所述抗体或抗原结合片段能够结合R273H p53多肽,具有氨基酸序列i)至vi) :

[0117] i) LC-CDR1:QSVHNNGDTY (SEQ ID NO:59) ;

[0118] ii) LC-CDR2:KVS (SEQ ID NO:60) ;

[0119] iii) LC-CDR3:FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61) ;

[0120] iv) HC-CDR1:GFSFSDYY (SEQ ID NO:63) ;

[0121] v) HC-CDR2:ISVGGTYT (SEQ ID NO:64) ;

[0122] vi) HC-CDR3:VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65) ;

[0123] 其中序列i)至vi)中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一种氨基酸取代。

[0124] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

[0125] LC-CDR1:QSVHNNGDTY (SEQ ID NO:59)

[0126] LC-CDR2:KVS (SEQ ID NO:60)

[0127] LC-CDR3:FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61)。

[0128] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段具有至少一个包含以下CDR的重链可变区:

[0129] HC-CDR1:GFSFSDYY (SEQ ID NO:63)

[0130] HC-CDR2:ISVGGTYT (SEQ ID NO:64)

[0131] HC-CDR3:VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65)。

[0132] 在另一方面,本发明提供了一种分离的轻链可变区多肽,包含以下CDR:

[0133] LC-CDR1:QSVHNNGDTY (SEQ ID NO:59)

[0134] LC-CDR2:KVS (SEQ ID NO:60)

[0135] LC-CDR3:FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61)。

[0136] 在另一方面,本发明提供了一种分离的重链可变区多肽,包含以下CDR:

[0137] HC-CDR1:GFSFSDYY (SEQ ID NO:63)

[0138] HC-CDR2:ISVGGTYT (SEQ ID NO:64)

[0139] HC-CDR3:VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65)。

[0140] 在另一方面,本发明提供了一种如本文所述的分离的轻链可变区多肽与如本文所述的重链可变区多肽的组合。

[0141] 在另一方面,本发明提供了一种抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合R273H p53多肽,包含轻链和重链可变区序列,其中:

[0142] 所述轻链包含LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3,与以下LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3具有

至少85%的总体序列同一性,LC-CDR1:QSIVHNNGDTY (SEQ ID NO:59) ;LC-CDR2:KVS (SEQ ID NO:60) ;LC-CDR3:FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61) ;和

[0143] 所述重链包含HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3,与以下HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3具有至少85%的总体序列同一性,HC-CDR1:GFSFSDYY (SEQ ID NO:63) ;HC-CDR2:ISVGGTYT (SEQ ID NO:64) ;HC-CDR3:VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65) 。

[0144] 在另一方面,本发明提供了一种抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合R273H p53多肽,包含轻链和重链可变区序列,其中:

[0145] 所述轻链序列与SEQ ID NO:58 (图32) 或SEQ ID NO:247 (图53) 所示的轻链序列具有至少85%的序列同一性,和;

[0146] 所述重链序列与SEQ ID NO:62 (图33) 或SEQ ID NO:248 (图54) 所示的重链序列具有至少85%的序列同一性。

[0147] 在另一方面,本发明提供了一种任选分离的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合R273p53多肽,是双特异性抗体或双特异性抗原结合片段,包括(i)如本文所述的抗原结合片段或多肽,和(ii)能够结合除R273H p53多肽之外的多肽的抗原结合片段。

[0148] 在另一方面,本发明提供了一种任选分离的体外复合物,所述体外复合物包括与R273H p53多肽或其片段结合的如本文所述的抗体、抗原结合片段或多肽。

[0149] 在另一方面,本发明提供了一种与药物部分或可检测部分缀合的如本文所述的抗体、抗原结合片段或多肽。

[0150] 在另一方面,本发明提供了一种嵌合抗原受体(CAR),包含如本文所述的抗原结合片段或多肽。

[0151] 在另一方面,本发明提供了一种细胞,包含如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)。

[0152] 在另一方面,本发明提供了一种组合物,包括如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞和至少一种药学上可接受的载体。

[0153] 在另一方面,本发明提供了一种分离的核酸,所述核酸编码如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物或嵌合抗原受体(CAR)。

[0154] 在另一方面,本发明提供了一种包含如本文所述核酸的载体。

[0155] 在另一方面,本发明提供了一种包含如本文所述载体的宿主细胞。

[0156] 在另一方面,本发明提供了一种制备如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物或嵌合抗原受体(CAR)的方法,包括在适合的条件下培养宿主细胞,所述适合的条件为适合表达编码所述抗体、抗原结合片段、多肽或缀合物的载体,并且适合提取所述抗体、抗原结合片段、多肽或缀合物的条件。

[0157] 在另一方面,本发明提供了一种如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞,用于治疗或医学治疗方法。

[0158] 在另一方面,本发明提供了一种如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞,用于制备用于医学治疗方法的药物。

[0159] 在另一方面,本发明提供了一种治疗疾病的方法,所述方法包括向患有疾病的患者施用如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体(CAR)或细胞。

[0160] 在另一方面,本发明提供了一种如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、

嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞, 用于治疗或预防癌症。

[0161] 在另一方面, 本发明提供了一种如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞, 用于制备用于治疗或预防癌症的药物。

[0162] 在另一方面, 本发明提供了一种治疗癌症的方法, 包括向患有癌症的患者施用如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞。

[0163] 在另一方面, 本发明提供了一种预防癌症或预防癌症复发的方法, 所述方法包括向患者施用如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞, 所述患者被认为具有患癌的风险或癌症复发的风险。

[0164] 在另一方面, 本发明提供了一种方法, 任选地为体外方法, 包括使含有或疑似含有突变型 p53 多肽的样品与如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞接触, 并检测所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR 或细胞与突变型 p53 多肽的复合物的形成。

[0165] 在另一方面, 本发明提供了一种诊断受试者的疾病或病症的方法, 所述方法包括在体外将来自受试者的样品与如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞接触, 并检测所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR 或细胞与突变型 p53 多肽的复合物的形成。

[0166] 在另一方面, 本发明提供了一种选择或分类受试者以便用突变型 p53 多肽靶向剂治疗的方法, 所述方法包括在体外使来自受试者的样品与如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞接触, 并检测所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR 或细胞与突变型 p53 多肽的复合物的形成。

[0167] 在另一方面, 本发明提供了如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞的用途, 用于体外或体内检测突变型 p53 多肽。

[0168] 在另一方面, 本发明提供了如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞的用途, 用作体外或体内诊断或预后的试剂。

[0169] 在另一方面, 本发明提供了如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞的用途, 用于在体内检测、定位或成像癌症的方法。

[0170] 在另一方面, 本发明提供了一种用于体内检测、定位或成像癌症的方法, 包括向受试者施用如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞, 并检测所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR) 或细胞。

[0171] 在另一方面, 本发明提供了一种疫苗, 任选地是癌症疫苗, 所述疫苗包含如本文所述的免疫原。

[0172] 在另一方面, 本发明提供了一种如本文所述的免疫原, 用于疫苗接种的方法, 任选地是针对癌症的。

[0173] 在另一方面, 本发明提供了如本文所述的免疫原的用途, 用于制备一种药物, 所述药物用于接种受试者, 任选地是抗癌的。

[0174] 在另一方面, 本发明提供了一种接种受试者的方法, 任选地是抗癌的, 包括向受试者施用如本文所述的免疫原, 从而使受试者接种了抗癌的疫苗。

[0175] 在根据本发明的各个方面的一些实施方式中, 所述癌症是包含表达突变型 p53 多肽的或包含编码突变型 p53 多肽的核酸的一种或多种细胞的癌症。所述突变型 p53 多肽可以

对应于选择的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、嵌合抗原受体 (CAR)、细胞或免疫原。

[0176] 描述

[0177] 突变型p53多肽和野生型p53多肽

[0178] p53肿瘤抑制因子是由TP53基因在人体内编码的蛋白质。p53在细胞对DNA损伤和其他基因组畸变的反应中起着至关重要的作用。

[0179] p53的激活引起细胞周期停滞、DNA修复或凋亡。编码p53的基因的突变涉及于多种癌症的发生和进展 (Muller和Vousden, *Cancer Cell* (2014) 25:304–317)。

[0180] 某些p53突变,包括热点突变 (R175H、R248W和R273H),不仅导致p53依赖性肿瘤抑制活性的丧失,而且还导致获得致癌活性。

[0181] 如本文所提及的野生型p53多肽可包含给定动物的p53的参比氨基酸序列或由其组成。p53的参比氨基酸序列可以从本领域技术人员已知的数据库中检索到。这些数据库包括GenBank、EMBL、DDBJ、UniProt、Swiss-Prot、TrEMBL、蛋白质信息资源、蛋白质数据库、Ensembl和InterPro。

[0182] 所述动物可以是哺乳动物。在一些实施方式中,所述动物可以是人。在一些实施方式中,所述动物可以是非人哺乳动物(例如兔、豚鼠、大鼠、小鼠或其他啮齿动物(包括啮齿目中的任何动物)、猫、狗、猪、绵羊、山羊、牛(包括奶牛,例如奶牛,或牛科中的任何动物)、马(包括马科中的任何动物)、驴和非人类灵长类动物)。

[0183] 在一些实施方式中,野生型p53多肽可包含UniProtKB-P04637 (P53_HUMAN) 的氨基酸序列或由其组成:

[0184] MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPSQAMDDMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPE
AAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSPLSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ
LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPY
EPPEVGSDCTTIHYNYMCNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEENLRKGEPH
HELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSK
KGQSTSRRHKKLMFKTEGPDS (SEQ ID NO:1)

[0185] 突变型p53多肽是氨基酸序列与野生型p53多肽的氨基酸序列不同的多肽,例如,野生型p53多肽氨基酸序列的一个或多个氨基酸的插入、缺失或取代所得到的多肽。

[0186] 突变型p53多肽的产生可能是由于编码p53多肽的DNA的遗传突变,所述遗传突变导致多肽氨基酸序列的改变。p53的突变在本领域中是已知的,并且描述于例如Muller和Vousden, *Cancer Cell* (2014) 25:304–317中,其通过引用整体并入本文-参见例如305到308页的表1。

[0187] 本发明特别涉及能够结合突变型p53多肽的抗体,所述突变型p53多肽仅与野生型p53多肽的差异非常微妙,并且所述抗体不显示与野生型p53多肽的显著结合。

[0188] 在一些实施方式中,所述抗体能够结合突变型p53多肽,所述突变型p53多肽与野生型p53多肽相差10个氨基酸或更少,例如5、4、3或2个氨基酸或更少。在一些实施方式中,抗体能够结合突变型p53多肽,所述突变型p53多肽与野生型p53多肽相差一个氨基酸。

[0189] 即,本发明提供了能够识别p53的单个氨基酸突变体的抗体。

[0190] 在一些实施方式中,突变型p53多肽中与野生型p53的氨基酸序列不同的一个或多个氨基酸位于DNA结合结构域的序列中。

[0191] p53的DNA结合结构域在进化上是保守的,并且技术人员能够通过参考例如人野生型p53多肽的DNA结合结构域的序列来鉴定给定野生型p53多肽的DNA结合结构域。人野生型p53多肽的DNA结合结构域对应于SEQ ID NO:1的101-306位(参见例如Freed-Pastor和Prives,Genes and Development (2012) 26:1268-1286),具有以下序列:

[0192] KTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQH
MTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNYMCNSSCMG
GMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELPPGSTKR (SEQ ID NO:2)

[0193] 已经鉴定了在p53的DNA结合结构域内的九个p53突变位点,对应于SEQ ID NO:1中编号的位置248、273、175、176、179、220、245、249、282,以及进一步鉴定出的位点337。在一些实施方式中,本发明的抗体特异性结合的突变型p53多肽包括相对于野生型p53的序列中的第248、273、175、176、179、220、245、249、282和337中的一个或多个位点的氨基酸差异。在一些实施方式中,所述突变型p53多肽包括相对于野生型p53的序列中的第248、273、175、176、179、220、245、249、282和337中的一个或多个位点的氨基酸差异。

[0194] 在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合特定的、已知的突变型p53多肽。在一些实施方式中,本发明所述的抗体可以能够结合p53多肽,所述p53多肽包括对应于SEQ ID NO:1编号的以下氨基酸取代之一:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C、R337H。

[0195] 在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合包含以下序列之一或由以下序列之一组成的突变型p53多肽:

	突变	序列 (相对于野生型 p53 的突变残基显示为粗体, 带下划线)	SEQ ID NO:
[0196]	R175H	MEEPQSDPSVE <big>P</big> PLSQETFSDLW <big>K</big> LLPENNVL <big>S</big> PLPSQAMDDLMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAA <big>P</big> TPAAPAPAPAPS <big>W</big> PLSSS	SEQ ID NO: 3

[0197]

	VPSQKTYQGSYGFRFLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRHCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	
R248Q	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPAPSPLSSS VPSQKTYQGSYGFRFLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRHCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNQRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	SEQ ID NO: 4
R273H	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPAPSPLSSS VPSQKTYQGSYGFRFLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRHCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVHVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	SEQ ID NO: 5
R248W	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPAPSPLSSS VPSQKTYQGSYGFRFLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRHCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNWRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL	SEQ ID NO: 6

	RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	
G245S	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPLSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGRVARAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGSMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	SEQ ID NO: 7
[0198]	R273C	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPLSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGRVARAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVCVCACPGDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS
R282W	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPLSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGRVARAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDWRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	SEQ ID NO: 9
	R249S	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPLSQAMDDMLSPD

[0199]

	DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAAPTPAAPAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNRSPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHIELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	NO: 10
G245D	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAAPTPAAPAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGMNRSPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHIELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	SEQ ID NO: 11
C176F	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAAPTPAAPAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNRSPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHIELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	SEQ ID NO: 12
H179Y	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAAPTPAAPAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRCPHYERCSDSGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS	SEQ ID NO: 13

	SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	
H179R	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPLSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHRERCSDSGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	SEQ ID NO: 14
Y220C	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPLSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPCEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	SEQ ID NO: 15
R337H	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPPENNVLSPLSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGREHF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRRHKKLMFK TEGPDS	SEQ ID NO: 16

[0201] 本领域技术人员不难确定在其他物种的p53多肽的氨基酸序列中的等同突变,例如,通过序列比对。

[0202] 根据人野生型p53多肽 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列编号的给定p53突变包括在其

他物种,例如,小鼠或大鼠中与p53同源蛋白质中的等同突变。

[0203] 例如,本文提及的“R175H”包括p53小鼠同源物氨基酸序列172位的等同精氨酸至组氨酸突变(即R172H)-参见例如,Olive等,2004Cell 119,847-860,其全部内容在此引入作为参考。类似地,本文提及的“R175H p53多肽”包括含有p53小鼠同源物的等同R172H突变多肽的多肽。

[0204] 免疫原

[0205] 根据本文所述的方法产生本发明所述的抗体,使用免疫原产生。

[0206] 在本发明中,免疫原是肽或多肽分子。如本文所用,“肽”是通过肽键连接的两个或更多个氨基酸单体的链。肽通常具有约2至50个氨基酸的长度。“多肽”是两种或更多种肽的聚合物链。多肽通常具有大于约50个氨基酸的长度。

[0207] 在本发明的方法中,通过使用包含以下物质的肽或多肽作为免疫原的方法产生抗体:(i)抗原序列,包含突变型p53多肽的氨基酸序列,所述突变型p53多肽的氨基酸序列包括突变和该突变任一侧的至少一个氨基酸,和(ii)支架序列,用于以溶剂可接近的构型提供抗原序列。

[0208] 抗原序列

[0209] 抗原序列包含突变型p53多肽的氨基酸序列或由其组成,用本发明方法产生的抗体能够与所述突变型p53多肽结合。

[0210] 抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列包含所述突变;也就是说,抗原序列包括突变型p53多肽相对于野生型p53多肽的氨基酸序列的突变位置。

[0211] 抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列另外包括紧邻所述突变的至少一个氨基酸。也就是说,所述序列包括紧邻突变p53多肽氨基酸序列中突变位置的上游(即N-末端氨基酸残基)或下游(即C-末端)的氨基酸残基。因此,突变在其发生在突变型p53多肽中的氨基酸紧邻序列的背景下呈现。

[0212] 举例说明,参考上文SEQ ID N0:1所示的R175H突变体p53,突变型p53多肽的氨基酸序列至少包含“RH”或“HC”。

[0213] 在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可以包含紧邻突变位点上游的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸。在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可以包含紧邻突变位点下游的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸。在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可以包含紧邻突变位点上游的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸,和紧邻突变位点上游的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸。

[0214] 在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可以包含紧邻突变位点上游的不多于25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、12个、11个或10个氨基酸,或由其组成。在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可以包含紧邻突变位点下游的不多于25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、12个、11个或10个氨基酸,或由其组成。在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可以包含紧邻突变位点上游的不多于25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、12个、11个或10个氨基酸,或由其组成,

和紧邻突变位点上游的不多于25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、12个、11个或10个氨基酸,或由其组成。

[0215] 在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可以包含紧邻突变位点上游的1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个、1-11个、1-12个、1-13个、1-14个、1-15个或1-20个氨基酸,或由其组成。在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可以包含紧邻突变位点下游的1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个、1-11个、1-12个、1-13个、1-14个、1-15个或1-20个氨基酸,或由其组成。在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可以包含紧邻突变位点上游的1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个、1-11个、1-12个、1-13个、1-14个、1-15个或1-20个氨基酸,或由其组成,和紧邻突变位点下游的1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个、1-11个、1-12个、1-13个、1-14个、1-15个或1-20个氨基酸。

[0216] 在一些实施方式中,所述抗原序列的突变型p53多肽的氨基酸序列可包含紧邻突变位点上游和下游的7-11、3-7或2-5个氨基酸,或由其组成。

[0217] 突变型p53多肽的氨基酸序列(包括突变和上游/下游氨基酸)可以包含至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个或30个氨基酸,或由其组成。在一些实施方式中,所述突变型p53多肽的氨基酸序列可包含不多于50个、45个、40个、35个、30个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、12个、11个或10个氨基酸,或由其组成。在一些实施方式中,所述突变型p53多肽的氨基酸序列可以是2-50个、5-40个、5-30个、5-25个、5-20个、5-15个、8-30个、8-25个、8-20个、8-15个、10-30个、10-25个、10-20或10-15个氨基酸的长度。在一些优选的实施方式中,所述突变型p53多肽的氨基酸序列长度可以是5-20个或8-20个氨基酸。

[0218] 在一些实施方式中,免疫原的抗原序列包含多于一个拷贝的突变。即,在一些实施方式中,抗原序列包含两个或更多个突变型p53多肽的氨基酸序列。在抗原序列包含多个突变型p53多肽的氨基酸序列的实施方式中,每个突变型p53多肽的氨基酸序列可以根据本文所述的实施方式独立地界定。

[0219] 举例来说,参考上述SEQ ID N0:1所示的R175H突变体p53,包含一个以上R175H突变型p53多肽的氨基酸序列的抗原序列可包含序列“QHMTEVVRHCPHHERCSDgsgTEVVRHCPHER”(SEQ ID N0:90)(小写字母表示柔性丝氨酸/甘氨酸接头序列)。显然,该序列包含突变型p53多肽的两个氨基酸序列;(1)QHMTEVVRHCPHHERCSD和(2)TEVVRHCPHER。

[0220] 在一些实施方式中,所述抗原序列包含1个、2个、3个、4个、5个或6个突变型p53多肽的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述抗原序列包含至少2个、3个或4个突变型p53多肽的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述抗原序列包含不超过6个、5个、4个或3个突变型p53多肽的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述抗原序列包含2个或3个突变型p53多肽的氨基酸序列,或由其组成。

[0221] 在抗原序列包含一个以上突变型p53多肽的氨基酸序列的实施方式中,每个突变型p53多肽的氨基酸序列可以是相同的。在一些实施方式中,抗原序列可包含不同突变型p53多肽的氨基酸序列。在一些实施方式中,每个突变型p53多肽的氨基酸序列可以是不同的。

[0222] 在抗原序列包含一个以上突变型p53多肽的氨基酸序列的一些实施方式中,所述抗原序列在突变型p53多肽的氨基酸序列之间另外包含接头序列。接头序列在下文中描述。

[0223] 支架序列

[0224] 免疫原还包含支架序列,用于以溶剂可接近的构型提供抗原序列。

[0225] 通过以溶剂可接近的构型提供抗原序列,支架序列提供了产生针对免疫原的抗原序列的抗体的机会。具体地,这种构型允许抗体物理接触抗原序列。

[0226] 可以基于免疫原的氨基酸序列确定或预测支架序列是否以溶剂可接近的构型提供抗原序列。

[0227] 可以基于氨基酸序列或基于氨基酸序列的三维结构预测溶剂可接近的和/或不可接近的氨基酸或氨基酸序列。溶剂可接近性可以例如通过计算可及表面积(ASA)来预测,如Ali等人,Current protein and Peptide Science,2014,15(3)中所述,其通过引用整体并入本文。例如,可以使用Shrake-Rupley(滚动探针)算法、Z层积分、交叉、成对重叠的线性组合(LCPO)或功率图来计算ASA。用于预测氨基酸序列的ASA的工具包括人工神经网络(ANN)、支持向量机(SVM)和马尔可夫链模型(MCM)。可用于预测可溶性的软件包括ASAview、ACCpro、PDBePISA、CCP4、GETAREA、DSSP、ProtSA、NACCESS、ACCESS、POPS-R、SERF、NetSurfP、ASAP、SANN和SABLE。ACCPro5.1实现了一维递归神经网络算法。

[0228] 在一些实施方式中,支架序列衍生自包含溶剂可接近序列的肽或多肽。

[0229] 在一些实施方式中,通过插入或替换肽或多肽的溶剂可接近序列的全部或部分,以提供溶剂可接近构型的抗原序列。应理解,在此类实施方式中,支架序列被抗原序列中断。

[0230] 在一些实施方式中,所述抗原序列可以在源自支架序列的肽或多肽的溶剂可接近序列内的两个氨基酸之间被插入。在一些实施方式中,抗原序列可以被插入以替代溶剂可接近序列的一个或多个残基。

[0231] 对于一些肽/多肽,已知或已预测了溶剂可接近和/或不可接近的氨基酸或氨基酸序列,并且本领域技术人员可参考本领域技术人员已知的数据库(包括ASAview)进行鉴定。也可以基于肽/多肽的氨基酸序列,或基于肽/多肽的氨基酸序列的三维结构,使用上文描述的工具,预测出溶剂可接近的和/或不可接近的氨基酸或氨基酸序列。

[0232] 任何合适的支架序列都可用于本发明所述的免疫原中。在一些实施方式中,可以选择支架序列,以使得:

[0233] a) 插入支架序列中的抗原序列呈现在折叠的支架序列的表面上;和/或

[0234] b) 支架序列的折叠和/或三维结构基本上不被抗原序列改变或破坏;和/或

[0235] c) 支架序列使得免疫原能够被高表达和/或易于纯化;和/或

[0236] d) 支架序列是免疫原性的。

[0237] 技术人员能够容易地鉴定具有上述性质的支架序列,例如,通过使用基于算法的氨基酸序列/蛋白质结构预测,参考数据库或经验分析来分析支架/免疫原序列。

[0238] 在一些实施方式中,支架序列所源自的包含溶剂可接近序列的肽/多肽是硫氧还蛋白。硫氧还蛋白结构和功能被描述于Collet和Messens, Antioxid Redox Signal (2010) 13:1205-1216,其通过引用整体并入本文。巴雷尔等,Protein Expr Purif (2004) 33(1): 153-159(通过引用整体并入本文)描述了将氨基酸序列插入细菌硫氧还蛋白的活性位点以

产生对插入的氨基酸序列特异的抗体。

[0239] 在一些实施方式中,所述硫氧还蛋白包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,或其片段,所述片段具有至少20个氨基酸(任选地具有至少30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个或100个氨基酸)、与其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性(例如,在比对后),并且具有活性位点基序Cys-Gly-Pro-Cys (SEQ ID NO:91) :

[0240] MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAECGPKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPFTA
PKYGIRGIPPTLLLKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA (SEQ ID NO:17)

[0241] 在一些实施方式中,硫氧还蛋白的溶剂可接近序列是活性位点序列。硫氧还蛋白的活性位点序列对应于基序Cys-Gly-Pro-Cys,其在不同来源的硫氧还蛋白中是保守的。在一些实施方式中,将抗原序列插入或替换该序列的全部或部分。在一些实施方式中,抗原序列被插入在活性位点序列的N-末端Cys残基之后,或在Gly残基之后,或在Pro残基之后。在一些实施方式中,抗原序列被插入在紧邻硫氧还蛋白的氨基酸序列中活性位点序列的N末端Cys残基上游的位置。在一些实施方式中,抗原序列被插入在紧邻硫氧还蛋白的氨基酸序列中活性位点序列的C末端Cys残基下游的位置。

[0242] 在一些实施方式中,所述支架序列包含SEQ ID NO:17或由SEQ ID NO:17组成。在一些实施方式中,所述支架序列包含与SEQ ID NO:17具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,或包含具有至少20个氨基酸(任选地为至少30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个或100个氨基酸)的片段,或由其组成。

[0243] 在一些实施方式中,所述支架序列可包含一个或多个额外的氨基酸,以促进免疫原的抗原序列的表面定向和/或溶剂暴露。在一些实施方式中,支架可以包含在抗原序列的任一末端处的氨基酸残基,以促进在免疫原序列中提供的抗原序列的表面定向和/或溶剂暴露。

[0244] 作为说明,参考图1A中所示的R175H免疫原(即SEQ ID NO:80),免疫原的支架(SEQ ID NO:80的第1至35位和第91至165位)包含与抗原序列插入位置相邻的额外的脯氨酸残基,使得抗原序列通过脯氨酸残基侧接于免疫原的序列(SEQ ID NO:80的第35和91位)。

[0245] 接头序列

[0246] 免疫原可在氨基酸序列之间包含一个或多个接头序列。如上所述,免疫原可在抗原序列内突变型p53多肽的氨基酸序列之间包含接头序列。

[0247] 在一些实施方式中,免疫原可在抗原序列和支架序列之间另外包含一个或多个接头序列。在抗原序列插入或取代全部或部分支架序列的实施方式中,可以在抗原序列的一个或两个“末端”提供接头序列。举例来说,免疫原可包含以下结构:

[0248] [支架序列]-{接头}-[抗原序列]-{接头}-[支架序列]

[0249] 接头序列是本领域技术人员已知的,并且描述于例如Chen等,Adv Drug Deliv Rev (2013) 65 (10) :1357-1369,其全部内容通过引用并入本文。

[0250] 在一些实施方式中,接头序列可以是柔性接头序列。优选地,柔性接头序列允许通过接头序列连接的氨基酸序列的相对移动,增强所述序列与抗原结合分子的可及性。柔性接头是本领域技术人员已知的,并且在Chen等人,Adv Drug Deliv Rev (2013) 65 (10) :

1357-1369中鉴定了几种,在此引入作为参考。柔性接头序列通常包含高比例的甘氨酸和/或丝氨酸残基。

[0251] 在一些实施方式中,所述接头序列包含至少一个甘氨酸残基和/或至少一个丝氨酸残基。在一些实施方式中,所述接头序列由甘氨酸和丝氨酸残基组成。在一些实施方式中,所述接头序列包含交替的甘氨酸和丝氨酸残基,或由其组成(即“GSGS”(SEQ ID NO: 92)……等)。在一些实施方式中,所述接头序列的长度为1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个、1-15个或1-20个氨基酸。

[0252] 在本发明所述的抗原序列内的多个突变型p53多肽序列之间提供的柔性接头序列使得突变型p53多肽序列之间的灵活的相对排列。在一些实施方式中,突变型p53多肽序列之间的接头序列包含甘氨酸和丝氨酸残基,或由其组成。在一些实施方式中,所述接头序列包含交替的甘氨酸和丝氨酸残基,或由其组成。在一些实施方式中,所述接头序列包含长度为1-2个、1-3个、1-4个或1-5个氨基酸的交替甘氨酸和丝氨酸残基,或由其组成。在一些实施方式中,突变型p53多肽序列之间的接头序列包含序列GSG(SEQ ID NO:89),或由其组成。

[0253] 除了抗原序列、支架序列和任何接头序列之外,免疫原还可以包含其他氨基酸或氨基酸序列。例如,免疫原可包含氨基酸序列以促进所述免疫原的表达、折叠、运输、加工或纯化。例如,免疫原可任选地在N-或C-末端包含编码His(例如6XHis)、Myc GST、MBP、FLAG、HA、E或生物素标签的序列。

[0254] 免疫原的示例性实施方式

[0255] 本发明提供了一种免疫原,包括:(i)抗原序列,包含R175H突变型p53多肽的氨基酸序列,所述R175H突变型p53多肽包括R175H突变和该突变任一侧的至少一个氨基酸,和(ii)支架序列,用于以溶剂可接近构型提供抗原序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含R175H突变型p53多肽之外的序列;在一些实施方式中,所述免疫原包括例如2个、3个、4个或5个这样的序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含抗原序列,所述抗原序列包含不同长度的R175H突变型p53多肽(包括R175H突变)的序列。在一些实施方式中,所述抗原序列包含长度为5至22个、7至20个或9至18个氨基酸的R175H突变型p53多肽的序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含抗原序列,所述抗原序列包含以下一种或多种:QHMTEVVRHCPHHERCSD(SEQ ID NO:77)、TEVVRHCPHHER(SEQ ID NO:78)和VRHCPHHER(SEQ ID NO:79)。在一些实施方式中,所述免疫原包含含有SEQ ID NO:77、78和79的抗原序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含含有SEQ ID NO:77、78和79的抗原序列,并且包含如上文所述的位于SEQ ID NO:77、78和79之间的接头序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含含有SEQ ID NO:77、78和79的抗原序列,以及抗原序列和支架序列之间的接头序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含以下序列或由以下序列组成:

[0256] MSDKI IHL TDDSFDTDVLKADGAILVDFWAECGP GSGSGQHMTEVVRHCPHHERCSDGSGTEVVRHCPHHERGSGVRHCPHHERGSGSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNP GTAPKYGIRGIP TLLL FKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:80)

[0257] 本发明提供了一种免疫原,包括:(i)抗原序列,包含R248Q突变型p53多肽的氨基酸序列,所述R248Q突变型p53多肽包括R248Q突变和该突变任一侧的至少一个氨基酸,和(ii)支架序列,用于以溶剂可接近构型提供抗原序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含R248Q突变型p53多肽之外的序列;在一些实施方式中,所述免疫原包括例如2个、3个、4个或

5个这样的序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含抗原序列,所述抗原序列包含不同长度的R248Q突变型p53多肽(包括R248Q突变)的序列。在一些实施方式中,所述抗原序列包含长度为10至22个、12至20个或15至18个氨基酸的R248Q突变型p53多肽的序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含抗原序列,所述抗原序列包含以下一种或多种:SCMGGMNQRPILTIIITLED (SEQ ID NO:81)、MGGMNQRPILTIIITLED (SEQ ID NO:82) 和 NSSCMGGMNQRPILT (SEQ ID NO:83)。在一些实施方式中,所述免疫原包含含有SEQ ID NO:81、82和83的抗原序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含含有SEQ ID NO:81、82和83的抗原序列,并且包含如上文所述的位于SEQ ID NO:81、82和83之间的接头序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含含有SEQ ID NO:81、82和83的抗原序列,以及抗原序列和支架序列之间的接头序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含以下序列或由以下序列组成:

[0258] MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPGSGSGSCMGGMNQRPILTIIITLEDGSGMGGMNQRPILTIITLEDGSGGNSSCMGGMNQRPILTGSGSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNP GTAPKYGIRGIPTLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:84)

[0259] 本发明提供了一种免疫原,包括:(i)抗原序列,包含R273H突变型p53多肽的氨基酸序列,所述R273H突变型p53多肽的氨基酸序列包括R273H突变和该突变任一侧的至少一个氨基酸,和(ii)支架序列,用于以溶剂可接近构型提供抗原序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含R273H突变型p53多肽之外的序列;在一些实施方式中,所述免疫原包括例如2个、3个、4个或5个这样的序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含抗原序列,所述抗原序列包含不同长度的R273H突变型p53多肽(包括R273H突变)的序列。在一些实施方式中,所述抗原序列包含长度为5至20个、6至18个或10至15个氨基酸的R273H突变型p53多肽的序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含抗原序列,所述抗原序列包含以下一种或多种:RNSFEVHVCA (SEQ ID NO:85)、NLLGRNSFEVHVCAC (SEQ ID NO:86) 和GRNSFEVHVCACP (SEQ ID NO:87)。在一些实施方式中,所述免疫原包含含有SEQ ID NO:85、86和87的抗原序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含含有SEQ ID NO:85、86和87的抗原序列,并且包含如上文所述的位于SEQ ID NO:85、86和87之间的接头序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含含有SEQ ID NO:85、86和87的抗原序列,以及抗原序列和支架序列之间的接头序列。在一些实施方式中,所述免疫原包含以下序列或由以下序列组成:

[0260] MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPGSGSGRNSFEVHVCAGSGNLLGRNSFEVHVCACGSGGRNSFEVHVCACP GSGSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNP GTAPKYGIRGIPTLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:88)

[0261] 产生抗体的方法

[0262] 本发明提供了产生抗体的方法。所述方法通常涉及将物质引入动物中,所述物质被动物的免疫系统识别为外来的(即非宿主的),引起动物选择性地产生能够结合该物质的抗体。

[0263] 用于引发免疫应答的物质在本文中被称为免疫原。所述免疫原可包含抗原或由抗原组成,或可被加工成抗原。如本文所用,“抗原”是指能够通过刺激适应性免疫应答(特别是B淋巴细胞介导的(体液)适应性免疫应答)来刺激抗体产生的分子。如本文所用,术语“抗原性”是指分子通过刺激适应性免疫应答(特别是B淋巴细胞介导的适应性免疫应答)来刺激抗体产生的能力。

[0264] 在本发明中,免疫原可以是肽或多肽分子。

[0265] 动物免疫系统产生能够与抗原特异性结合的抗体的能力,可被用于生产各种研究、诊断和治疗应用中的目标分子的检测抗体。

[0266] 通过动物免疫产生抗体的方法是本领域熟知的,并且被描述于例如《抗体:实验室手册》,第二版,2014年;Edward A.Greenfield,冷泉港实验室出版社,其全部内容在此引入作为参考。特别地,第6章提供了用于产生抗体的动物免疫的详细描述。

[0267] 抗体的产生涉及用免疫原攻击动物以刺激抗原特异性抗体的产生,然后可以从动物中回收抗原特异性抗体。

[0268] 如本文所用,“产生”抗体是指产生抗体的过程,其可以包括以下中的一个或多个步骤:例如制备用于免疫的免疫原、免疫动物、形成杂交瘤、收集抗体、针对于靶标的结合进行筛选、抗体同种化、纯化抗体或标记抗体。

[0269] 在本发明的方法中,通过用免疫原免疫动物来产生抗体。根据本发明的方法,任何能够响应免疫原产生抗体的动物都是可用的。应当理解,本发明的方法不是用于诊断或治疗疾病的方法,也不是外科手术的方法。在一些实施方式中,所述动物可以是非人哺乳动物(例如兔、豚鼠、大鼠、小鼠或其他啮齿动物(包括啮齿目中的任何动物)、猫、狗、猪、绵羊、山羊、牛(包括奶牛,例如奶牛,或牛科中的任何动物)、马(包括马科中的任何动物)、驴和非人灵长类动物)。特别地,所述动物可以是小鼠(例如小家鼠(*Mus musculus*))、大鼠(例如褐家鼠(*Rattus norvegicus*))或恒河猴(*Macaca mulatta*)。在特定实施方式中,所述动物是小鼠。

[0270] 在本方法中,通过免疫将免疫原施用于动物。

[0271] 可以通过任何合适的方法,用本发明的免疫原免疫动物,例如描述于《抗体:实验室手册》,第二版,2014年;Edward A.Greenfield,冷泉港实验室出版社(在此引入作为参考)中的哪些方法,特别是在第6章。可以用适当的方法制备用于免疫的物质。例如,免疫原肽/多肽可以在无菌盐水中稀释,并且可以与佐剂(例如完全或不完全弗氏佐剂和/或CpG)组合以形成稳定的乳液。用于个体免疫的免疫原的适当的量可以由本领域技术人员容易地确定,例如,参考《抗体:实验室手册》,第二版,2014年;Edward A.Greenfield,冷泉港实验室出版社(在此引入作为参考)。用于免疫的合适的体积和浓度也可由本领域技术人员确定。

[0272] 本发明所述的抗体的制备方法可以包括筛选抗体产量的步骤;例如,在给药后的适当时间段,可以从动物获得样品(例如血液样品)并分析抗体产量。用于检测和定量抗体产量的免疫测定法是本领域技术人员公知的,并且例如描述于《抗体:实验室手册》,第二版,2014年;Edward A.Greenfield,冷泉港实验室出版社,2014(在此引入作为参考),特别是在第15章。例如,可以从所述动物收集血液、血浆、血清或腹水样品,并且通过例如ELISA或流式细胞术进行分析。

[0273] 可以通过本领域技术人员已知的方法分析通过本发明所述的方法产生的抗体与突变型p53多肽和/或野生型p53多肽的结合情况。例如,可以通过ELISA、免疫印迹(例如蛋白质印迹)、流式细胞术、免疫组织化学、免疫沉淀、表面等离振子共振(BIAcore)、生物层干涉测定法进行分析。

[0274] 分析还可以包括对由所述方法产生的抗体的表位的分析,并且可以包括为了确定

抗体的同一性(例如序列)的分析。这种分析可以包括抗体测序,例如通过质谱法。

[0275] 在一些实施方式中,产生抗体的方法可包括分离能够结合突变型p53多肽的抗体。在一些实施方式中,一种或多种抗体是从动物中分离的。可以从例如动物的血液、血浆、血清或腹水中回收抗体。在一些实施方式中,可以从用本发明所述的免疫原免疫的动物中获得的细胞中分离抗体。在一些实施方式中,所述细胞是B淋巴细胞。在一些实施方式中,可以从体外培养的B淋巴细胞的细胞培养上清液中分离抗体。

[0276] 本发明中,在给药后的适当时间,可以直接从动物中获得的血液或血清中回收多克隆抗体。

[0277] 在一些实施方式中,从产生一种或多种能够结合突变型p53多肽的抗体的杂交瘤中获得抗体。在一些实施方式中,所述抗体获自杂交瘤培养物的细胞培养上清液。在一些实施方式中,所述抗体获自用杂交瘤免疫的动物的血液、血浆、血清或腹水,所述杂交瘤产生一种或多种能够结合目标突变型p53多肽的抗体。

[0278] 从含有抗体的样品(例如细胞、细胞提取物、细胞培养基、血液、血浆、血清、腹水)中分离(即纯化)抗体的方法是本领域技术人员公知的,并且详细描述于《抗体:实验室手册》,第二版,2014年;Edward A.Greenfield,冷泉港实验室出版社(在此引入作为参考),特别是在第10章。所述方法包括,例如离子交换层析、基于A蛋白或G蛋白的纯化、凝胶电泳、透析和基于靶结合的亲和纯化。

[0279] 在一些实施方式中,本发明的方法包括产生杂交瘤,所述杂交瘤产生一种或多种能够结合目标突变型p53多肽的抗体。所述方法包括融合能够产生一种或多种抗体的细胞与骨髓瘤细胞以产生杂交瘤,所述抗体能够与从动物分离的目标突变型p53多肽结合。

[0280] 特别地,本发明的方法用于产生能够结合突变型p53多肽的单克隆抗体。这通过用本发明所述的免疫原免疫动物,然后从分离自动物的细胞产生单克隆杂交瘤来实现,所述杂交瘤产生单一类型(即单一特异性)的抗体,其能够结合突变型p53多肽。

[0281] 杂交瘤形成的方法是本领域技术人员公知的,并且例如描述于《抗体:实验室手册》,第二版,2014年;Edward A.Greenfield,冷泉港实验室出版社(在此引入作为参考),特别是在第7章。简而言之,根据本发明免疫动物,刺激适应性免疫应答,从动物中分离B淋巴细胞并与合适的骨髓瘤细胞系融合以产生杂交瘤。可以使用本领域技术人员已知的方法对B淋巴细胞和骨髓瘤细胞进行融合。例如,可以通过在聚乙二醇(PEG)中共离心来融合细胞。融合后,通过在组织培养板中有限稀释至每孔大约一个细胞铺板细胞,并体外培养。可以使用本领域已知的选择性培养基(例如含有次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)的培养基)通过培养选择杂交瘤,其中未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞不能生长或存活。

[0282] 通过本发明方法产生的抗体可以使用本领域技术人员已知的方法大规模生产。杂交瘤可以使用标准的细胞培养方法在体外培养中繁殖,或在例如作为宿主动物的腹水中的体内培养中繁殖。在一些实施方式中,本发明的方法包括通过体外细胞培养繁殖杂交瘤。在一些实施方式中,所述方法包括通过向宿主动物注射杂交瘤来体内繁殖杂交瘤。

[0283] 本发明所述的抗体也可以重组产生,如下文所述。例如,编码单克隆抗体的多核苷酸可以从产生抗体的B细胞或杂交瘤细胞中分离(例如通过使用特异性扩增编码重链和轻链的基因的寡核苷酸引物的逆转录PCR(RT-PCR)),并且可以确定抗体和多核苷酸的序列。当被转染到宿主细胞(例如大肠杆菌、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细

胞,且所述细胞不被转染时不会产生免疫球蛋白)中时,编码重链和轻链的分离的多核苷酸可以被克隆到合适的表达载体中,所述表达载体产生单克隆抗体。

[0284] 抗体

[0285] 与野生型p53多肽相比,本发明的抗体对突变型p53多肽具有更强的特异性。

[0286] 所述抗体可以能够结合特定的突变型p53多肽,并且可能不能结合野生型p53多肽。“不能结合”是指抗体基本上不显示与肽/多肽结合,或者不显示与肽/多肽的显著结合,例如,高于非特异性结合水平。

[0287] 如本文所用,对给定多肽/肽“具有特异性”的抗体显示出与多肽/肽的特异性结合。“特异性结合”是指不是非特异性的相互作用。特异性结合由非共价相互作用介导,例如范德华力、静电相互作用、氢键和疏水相互作用。本发明的抗体优选显示与突变型p53多肽的特异性结合,相比于野生型p53和/或其他不同的p53突变体具有更强的特异性。

[0288] 抗体与给定肽/多肽具有相对于另一种参比肽/多肽具有更强的特异性是指抗体与给定肽/多肽的结合的亲和力大于抗体与参比肽/多肽结合的亲和力。表现出与给定肽/多肽的结合的“更大亲和力”的抗体,相比于其与参比肽/多肽的结合强度,其与给定肽/多肽具有更大的结合强度。与本发明的抗体与野生型p53和/或其他不同的p53突变体结合的亲和力相比,本发明的抗体可以以更大的亲和力与抗体特异性的突变型p53多肽结合。

[0289] 抗体对其抗原的亲和力是指抗体与抗原结合的强度。抗体亲和力可以通过本领域技术人员熟知的方法确定。这些方法包括,例如,通过SPR测定法用纯化的抗原进行体外分析。结合可以用以下术语表示:“结合速率” k_{on} ,表示抗体/抗原复合物形成的速度的常数;“解离速率” k_{off} ,表示抗体/抗原复合物解离的速度的常数;以及平衡解离常数 K_D ,根据公式 $K_D = K_{off}/K_{on}$ 计算。

[0290] 可以定量测定抗体与肽/多肽结合的亲和力。在一些实施方式中,与参比肽/多肽相比,对给定肽/多肽显示出更大亲和力的抗体与给定肽/多肽的结合的 K_D 值或EC50值小于抗体与参比肽/多肽的结合的所述值。

[0291] “交叉反应性”是指抗体结合一种以上肽/多肽的能力。也就是说,显示与两种或更多种肽/多肽结合的抗体被认为对那些肽/多肽是“交叉反应的”。本发明所述的抗体优选对野生型p53和/或除了所述抗体特异性的突变型p53多肽之外的其他p53突变体显示低交叉反应性或无交叉反应性。“非交叉反应性”是指抗体表现出低交叉反应性、没有交叉反应性或基本上不与相应的肽/多肽结合。

[0292] 与对野生型p53多肽的亲和力相比,本发明所述的抗体对给定的突变型p53多肽显示出更大的亲和力。在一些实施方式中,与对人野生型p53多肽的亲和力相比,所述抗体对给定的人突变型p53多肽显示出更大的亲和力。在一些实施方式中,相比于对不包括以下突变的p53肽/多肽的亲和力,所述抗体对包括对应于以下突变之一的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,所述突变为:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C和R337H。在一些实施方式中,相比于对包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或其片段的肽/多肽的亲和力,抗体可以显示出对包含以下氨基酸序列或其包含突变的片段的肽/多肽更大的亲和力:SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。

[0293] 与其他突变型p53多肽相比,本发明所述的抗体可以对给定的突变型p53多肽显示

出更大的亲和力。在一些实施方式中,与对人p53多肽的其他突变体的亲和力相比,所述抗体对给定的人突变型p53多肽显示出更大的亲和力。

[0294] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于R175H的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0295] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含R175H突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0296] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于R248Q突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0297] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含R248Q突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0298] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于R273H的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0299] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含R273H突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0300] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于R248W的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0301] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含R248W突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0302] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于G245S的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0303] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含G245S突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0304] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于R273C的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突

变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0305] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含R273C突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0306] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于R282W的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0307] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含R282W突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0308] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于R249S的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0309] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含R249S突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0310] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于G245D的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0311] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含G245D突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0312] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于C176F的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、H179Y、H179R、Y220C或R337H。

[0313] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含C176F突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0314] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于H179Y的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179R、Y220C或R337H。

[0315] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含H179Y突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、

3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0316] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于H179R的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、Y220C或R337H。

[0317] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含H179R突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0318] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于Y220C的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、Y220C或R337H。

[0319] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含Y220C突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0320] 在一些实施方式中,所述抗体对包含对应于R337H的突变的p53肽/多肽显示出更大的亲和力,相比于与对不包含所述突变的p53肽/多肽,或包含对应于以下一种或多种突变的肽/多肽:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、Y220C或R337H。

[0321] 在一些实施方式中,抗体可显示出对包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列、或由其组成,或其包含R337H突变的片段的多肽/肽的更大的亲和力,相比于包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15之一所示的氨基酸序列或由其组成的多肽/肽。

[0322] 本发明特别涉及能够结合突变型p53多肽的抗体,其不能与野生型p53多肽结合。也就是说,本发明涉及与突变型p53多肽特异性结合的抗体,其不与野生型p53多肽交叉反应(即不结合)。

[0323] 本发明还涉及能够结合给定的特定p53突变体并且不能结合p53的其他不同突变体的抗体。也就是说,本发明涉及与给定的特定p53突变体特异性结合,并且不与p53的其他不同突变体交叉反应(即不结合)的抗体。

[0324] 在一些实施方式中,抗体可能能够结合给定的突变型p53多肽,并且可能不能结合另一种突变型p53多肽。

[0325] 抗体是否能够结合给定分子可以通过本领域技术人员熟知的方法确定。例如,所述方法包括通过免疫测定的分析,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀、蛋白质印迹、免疫荧光方法等,以及其他方法,例如表面等离子共振(SPR)测定和荧光共振能量转移(FRET)。

[0326] 抗体结合给定肽或多肽的能力可以通过检测抗体和肽/多肽之间的相互作用来确定,所述的相互作用比抗体和对照肽/多肽之间的非特异性相互作用具有更大的亲和力。对照肽/多肽可以是不与抗体特异性结合的已知的肽或多肽,或已经确定的肽或多肽。

[0327] 在一些实施方式中,抗体结合给定肽或蛋白质的能力可以通过观察抗体和肽/多肽之间的相互作用来确定,所述的相互作用比抗体与阴性对照肽/多肽之间的非特异性相

互作用更强、更稳定、持续时间更长,或者具有更低的平衡解离常数(K_D)。

[0328] 在一些实施方式中,抗体与不相关靶标的结合程度小于抗体与靶标结合的约10%,其通过例如ELISA、SPR、生物层干涉测量法或通过RIA测定。或者,结合的特异性可以反映在结合亲和力方面,其中本发明所述的抗体与其同源突变型p53多肽结合,其 K_D 至少比所述抗体对于另一个靶分子(例如其他突变型p53多肽和/或野生型p53多肽)的 K_D 大0.1个数量级(即 0.1×10^n ,其中n是表示数量级的整数)。这可以任选地为至少0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5或2.0中的一个。

[0329] 在本发明的一些实施方式中,所述方法产生能够在突变型p53多肽的全长氨基酸序列的背景下结合抗原序列的抗体。也就是说,在一些实施方式中,所述方法产生可以通过与抗原序列结合而与突变型p53多肽结合的抗体。

[0330] 与抗体结合的肽/多肽内的位点可由本领域技术人员使用本领域熟知的各种方法测定,包括抗体-抗原复合物的X射线共结晶分析、肽扫描、诱变作图、通过质谱法氢-氘交换分析、噬菌体展示、竞争性ELISA和基于蛋白水解的“保护”方法。此类方法描述于例如Gershoni等,BioDrugs,2007,21 (3) :145-156中,其通过引用整体并入本文。

[0331] 优选地,抗体与突变型p53多肽的结合是特异性的,其 K_D 为 $1\mu M$ 或更低,优选为 $\leq 100nM$ 、 $\leq 75nM$ 、 $\leq 50nM$ 、 $\leq 40nM$ 、 $\leq 30nM$ 、 $\leq 20nM$ 、 $\leq 15nM$ 、 $\leq 12.5nM$ 、 $\leq 10nM$ 、 $\leq 9nM$ 、 $\leq 8nM$ 、 $\leq 7nM$ 、 $\leq 6nM$ 、 $\leq 5nM$ 、 $\leq 4nM$ 、 $\leq 3nM$ 、 $\leq 2nM$ 、 $\leq 1nM$ 或 $\leq 500pM$ 之一。抗体对其靶标的结合亲和力通常根据其解离常数(K_D)来描述。结合亲和力可以通过本领域已知的方法测定,例如通过ELISA、表面等离子体共振(SPR;参见例如Hearty等,Methods Mol Biol (2012) 907:411-442)、生物层干涉测量法(参见例如Lad等,(2015) J Biomol Screen 20 (4) :498-507),或用抗体和抗原分子的Fab形式进行放射性标记的抗原结合试验(RIA)。

[0332] 本发明所述的抗体可以以分离和/或纯化的形式提供。

[0333] “抗体”包括其片段或衍生物,或合成的抗体或合成的抗体片段。

[0334] 鉴于如今与单克隆抗体技术相关的技术,可以制备针对大多数抗原的抗体。抗原结合部分可以是抗体的一部分(例如Fab片段)或合成的抗体片段(例如单链Fv片段[ScFv])。可以通过已知技术制备来选择抗原的合适的单克隆抗体,例如在“单克隆抗体:技术手册”,H Zola(CRC出版社,1988)和“单克隆杂交瘤抗体:技术与应用”,J G R Hurrell(CRC出版社,1982年)中公开的那些。Neuberger等人(1988,第8届国际生物技术研讨会第2部分,792-799)讨论了嵌合抗体。

[0335] 单克隆抗体(mAb)可用于本发明的方法,并且是特异性靶向抗原上的单个表位的均一抗体群。

[0336] 多克隆抗体可用于本发明的方法。单特异性多克隆抗体是优选的。可以使用本领域熟知的方法制备合适的多克隆抗体。

[0337] 也可以使用/提供抗体的抗原结合片段,例如Fab和Fab₂片段,因为它们可以是基因工程抗体和抗体片段。抗体/片段的可变重(V_H)结构域和可变轻(V_L)结构域参与抗原识别,这是在早期蛋白酶消化实验中首先被认识到的事实。通过啮齿动物抗体的“人源化”对此进一步的进行了确认。啮齿动物来源的可变结构域可以与人源恒定结构域融合,使得所得抗体保留啮齿动物亲本抗体的抗原特异性(Morrison等(1984) Proc.Natl.Acad.Sd.美国81,6851-6855)。

[0338] 抗原特异性是由可变结构域赋予的并且与恒定结构域无关,这一点从涉及抗体片段的细菌表达的实验中得知,所述抗体片段均含有一个或多个可变结构域。这些分子包括Fab样分子(Better等(1988) *Science* 240, 1041);Fv分子(Skerra等(1988) *Science* 240, 1038);单链Fv(ScFv)分子,其中V_H和V_L配偶结构域通过柔性寡肽连接(Bird等(1988) *Science* 242, 423;Huston等(1988) *Proc.Natl.Acad.Sd.美国*85, 5879)和包含分离的V结构域的单结构域抗体(dAb)(Ward等(1989) *Nature* 341, 544)。在Winter&Milstein(1991) *Nature* 349, 293-299中可以找到保留其特异性结合位点的抗体片段合成中涉及的技术的综述。

[0339] “ScFv分子”是指其中V_H和V_L配偶结构域共价连接的分子,例如,通过灵活的寡肽链接。

[0340] Fab、Fv、ScFv和dAb抗体片段都可以在大肠杆菌中表达和分泌,因此可以容易地产生大量的所述片段。

[0341] 全抗体和F(ab')₂片段是“二价的”。“二价”是指所述抗体和F(ab')₂片段具有两个抗原结合位点。相反,Fab、Fv、ScFv和dAb片段是单价的,仅具有一个抗原结合位点。如本领域所熟知的,还可以使用噬菌体展示技术制备合成抗体。

[0342] 本申请还提供了任选分离的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合给定的突变型p53多肽,是双特异性抗体/抗原结合片段,包含(i)本发明所述的抗原结合片段或多肽,和(ii)能够结合给定的突变型p53多肽以外的多肽的抗原结合片段。

[0343] 在一些实施方式中,能够结合给定的突变型p53多肽之外的多肽的抗原结合片段可能能够结合另一种不同的突变型p53多肽。

[0344] 本发明所述的双特异性抗体的抗原结合片段或双特异性抗原结合片段可以是能够结合抗原的多肽的任何片段。在一些实施方式中,抗原结合片段包含至少三个轻链CDR(即LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3)和三个重链CDR(即HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3),其一起确定抗体或抗原结合片段的抗原结合区。在一些实施方式中,抗原结合片段可包含抗体或抗原结合片段的轻链可变结构域和重链可变结构域。在一些实施方式中,抗原结合片段可包含抗体或抗原结合片段的轻链多肽和重链多肽。

[0345] 本发明所述的双特异性抗体和双特异性抗原结合片段可以以任何合适的形式提供,例如Kontermann MAbs 2012, 4 (2) :182-197,其全部内容通过引用并入本文。例如,双特异性抗体或双特异性抗原结合片段可以是双特异性抗体缀合物(例如IgG2、F(ab')₂或CovX-Body)、双特异性IgG或IgG样分子(例如IgG、scFv₄-Ig、IgG-scFv、scFv-IgG、DVD-Ig、IgG-sVD、sVD-IgG、2合1-IgG、mAb²或Tandemab常规LC)、不对称双特异性IgG或IgG样分子(例如kih IgG、kih常规LC、CrossMab、kih IgG-scFab、mAb-Fv、电荷对或SEED体)、小双特异性抗体分子(例如双抗体(Db)、dsDb、DART、scDb、tandAbs、串联scFv(taFv)、串联dAb/VHH、三体、三头、Fab-scFv或F(ab')₂-scFv₂)、双特异性Fc和C_H3融合蛋白(例如taFv-Fc、Di-双抗体,scDb-C_H3、scFv-Fc-scFv、HCAb-VHH、scFv-kih-Fc或scFv-kih-C_H3),或双特异性融合蛋白(例如scFv₂-白蛋白、scDb-白蛋白、taFv-毒素、DNL-Fab₃、DNL-Fab₄-IgG、DNL-Fab₄-IgG-细胞因子₂)。特别参见Kontermann MAbs 2012, 4 (2) :182-19中的图2。

[0346] 本领域技术人员能够设计和制备本发明所述的双特异性抗体和双特异性抗原结合片段。产生双特异性抗体的方法包括抗体或抗体片段的化学交联,例如,可还原的二硫化

物或不可还原的硫醚键,例如描述于Segal和Bast,2001.双特异性抗体的产生,Current Protocols in Immunology.14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16的,其全部内容通过引用并入本文。例如,3-(2-吡啶二巯基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDP)可用于化学交联,例如,Fab片段通过铰链区SH-基团,产生二硫键连接的双特异性F(ab)₂异二聚体。用于产生双特异性抗体的其他方法包括融合产生抗体的杂交瘤,例如:用聚乙二醇制备能够分泌双特异性抗体的四倍体细胞,例如描述于D.M.和Bast,B.J.2001.双特异性抗体的产生,《最新免疫学方法》(Current Protocols in Immunology).14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16的。

[0347] 本发明所述的双特异性抗体和双特异性抗原结合片段也可以通过重组产生,通过表达例如编码抗原结合分子多肽的核酸构建体,例如描述于抗体工程:方法和步骤,第二版(Humana出版社,2012年),第40章:双特异性抗体的产生:双抗体和串联scFv(Hornig和Färber-Schwarz),或法国的,如何制备双特异性抗体,Methods Mol Med.2000;40:333-339,两者的全部内容在此引入作为参考。例如,编码两个抗原结合片段的轻链和重链可变结构域的DNA构建体(即能够结合突变型p53多肽的抗原结合片段的轻链和重链可变结构域,以及能够结合另一种靶蛋白的抗原结合片段的轻链和重链可变区),并且包括编码在抗原结合片段之间的合适的接头或二聚化结构域的序列,可以通过分子克隆技术制备。此后,可以通过在合适的宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞)中表达(例如体外)构建体来产生重组双特异性抗体,然后可以任选地纯化表达的重组双特异性抗体。

[0348] 抗体可以通过亲和力成熟过程产生,其中产生修饰的抗体,其与未修饰的亲本抗体相比,具有抗体对抗原的亲和力的改善。亲和力成熟的抗体可以通过本领域已知的方法产生,例如Marks等,Rio/Technology 10:779-783(1992);巴尔巴斯等,Proc Natl Acad Sci.美国91:3809-3813(1994);Schier等,Gene 169:147-155(1995);Yelton等,J. Immunol.155:1994-2004(1995);Jackson等,J. Immunol.154(7):3310-159(1995);和Hawkins等,J. Mol. Biol.226:889-896(1992)。

[0349] 本发明所述的抗体优选地表现出与给定的突变型p53多肽的特异性结合。特异性结合靶分子的抗体优选地以更高的亲和力结合靶标,和/或以比结合其他靶标更长的持续时间结合靶标。与其他突变型p53多肽和野生型p53多肽相比,本发明的抗体可以与给定的突变型p53多肽以更大的亲和力结合。

[0350] 抗体、片段或多肽可显示基本上不与野生型p53多肽,例如,人p53多肽结合。这是针对如本文所述的突变型p53多肽的抗体的意外特征,其可以与野生型p53多肽氨基酸序列仅存在单个氨基酸残基的不同。也就是说,预期能够结合多肽的抗体将显示出对仅存在单个氨基酸不同的另一多肽的交叉反应性。对p53的单个氨基酸突变体具有特异性的本发明抗体可用于区分突变体与野生型p53,因此具有广泛的用途,例如用于研究、治疗和诊断应用。

[0351] 如本文所用,“基本上没有结合”是指不显著大于阴性对照抗体(例如针对与野生型p53多肽无关的靶标的抗体,或已知不结合野生型p53多肽的抗体)的结合水平的结合。在一些实施方式中,本发明所述的抗体在给定的测定中或在给定的浓度下,表现出与野生型p53多肽(例如人野生型p53多肽)的结合,的结合情况≤500%、≤400%、≤300%、≤250%、≤200%、≤150%或≤100%的阴性对照抗体(例如针对与野生型p53多肽无关的靶标的抗体,或已知不与野生型p53多肽结合的抗体)与野生型p53多肽的结合情况。结合可以通过本

领域技术人员熟知的技术测定,包括ELISA、SPR、生物层干涉测量法、流式细胞术或放射免疫测定(RIA)。

[0352] 在一些实施方式中,本发明所述的抗体可以能够抑制肿瘤生长或癌症进展。在一些实施方式中,本发明所述的抗体可以显示抗癌活性。在一些实施方式中,肿瘤生长或癌症进展的抑制可以是在体内的。“抑制”可以是减少或控制肿瘤生长,或减少或控制癌细胞的数量。可以体内评估肿瘤生长或癌症进展的抑制,例如在如本文所述的癌症的动物模型中。

[0353] 与不进行治疗,或用阴性对照抗体进行治疗相比,用本发明所述的抗体/片段进行治疗后,检测出肿瘤细胞的减少和/或肿瘤体积的减小,则可以确定抗癌活性。

[0354] 在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合R175H p53多肽,例如,如SEQ ID NO:3所示,或其包含R175H突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合R248Q p53多肽,例如,如SEQ ID NO:4所示,或其包含R248Q突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合R273H p53多肽,例如,如SEQ ID NO:5所示,或其包含R273H突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合R248W p53多肽,例如,如SEQ ID NO:6所示,或其包含R248W突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合G245S p53多肽,例如,如SEQ ID NO:7所示,或其包含G245S突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合R273C p53多肽,例如,如SEQ ID NO:8所示,或其包含R273C突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合R282W p53多肽,例如,如SEQ ID NO:9所示,或其包含R282W突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合R249S p53多肽,例如,如SEQ ID NO:10所示,或其包含R249S突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合G245D p53多肽,例如,如SEQ ID NO:11所示,或其包含G245D突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合C176F p53多肽,例如,如SEQ ID NO:12所示,或其包含C176F突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合H179Y p53多肽,例如,如SEQ ID NO:13所示,或其包含H179Y突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合H179R p53多肽,例如,如SEQ ID NO:14所示,或其包含H179R突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合Y220C p53多肽,例如,如SEQ ID NO:15所示,或其包含Y220C突变的片段。在一些实施方式中,本发明所述的抗体能够结合R337H p53多肽,例如,如SEQ ID NO:16所示,或其包含R337H突变的片段。

[0355] 在一些实施方式中,本发明所述的抗体对特定突变型p53多肽是特异性的。即,在一些实施方式中,抗体仅能够结合特定突变型p53多肽,并且不能结合除所述突变型p53多肽之外的p53多肽,例如野生型p53多肽或其他突变型p53多肽。

[0356] 在一些实施方式中,本发明的抗体能够结合人p53多肽的给定突变体,并且不能结合野生型人p53多肽。在一些实施方式中,所述抗体能够结合包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H之一的突变的p53肽/多肽,并且不能结合不包含所述突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,并且不能与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽/多肽或其片段结合。

[0357] 本发明所述的抗体可能能够结合给定的突变型p53多肽,并且可能不能结合其他突变型p53多肽。在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合人p53多肽的给定突变体,并且

可能不能结合人p53多肽的其他突变体。

[0358] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于R175H的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0359] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于R248Q的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0360] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于R273H的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0361] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于R248W的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0362] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于G245S的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0363] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于R273C的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0364] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于R282W的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、

R273C、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0365] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于G245S的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0366] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于G245D的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、C176F、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0367] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于C176F的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、H179Y、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、13、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0368] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于H179Y的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179R、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0369] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于H179R的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0370] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于Y220C的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、

6、7、8、9、10、11、12、13、14或16之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0371] 在一些实施方式中,所述抗体可能能够结合包含对应于R337H的突变的p53肽/多肽,并且可能不能结合不包含所述突变或者包含对应于R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、Y220C或R337H中的一个或多个突变的p53肽/多肽。在一些实施方式中,抗体可能能够结合包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的肽/多肽或其包含突变的片段,或由其组成的肽/多肽,并且可能不能结合包含SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15之一所示的氨基酸序列或由其组成的肽/多肽。

[0372] 本发明抗体能够结合的本发明突变型p53多肽的片段包含所述的突变。在一些实施方式中,本发明抗体能够结合的本发明突变型p53多肽的片段可以包含至少3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个或50个氨基酸。在一些实施方式中,所述片段可以由突变型p53多肽的氨基酸序列的5至300个、5至250个、5至200个、5至150个、5至100个、5至75个、5至50个、5至40个、5至30个、5至20或5至10个氨基酸组成。

[0373] 在一些实施方式中,可以通过参考抗体结合的突变型p53多肽的表位来定义本发明所述的抗体。在一些实施方式中,所述抗体可以结合线性表位,所述线性表位由连续的氨基酸序列(即氨基酸一级序列)组成。在一些实施方式中,所述抗体可以与构象表位结合,所述构象表位由氨基酸序列中的不连续的氨基酸序列组成。所述不连续的氨基酸序列的氨基酸可以位于突变型p53多肽的不同区域,并且当序列折叠时(例如在其天然结构中)位于非常接近的位置。

[0374] 在一些实施方式中,能够结合R175H p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:3的位置100至250、110至240、120至230、130至220、140至210、150至200、160至190,或170至180之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0375] 在一些实施方式中,能够结合R248Q p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:4的位置173至323、183至313、193至303、203至293、213至283、223至273、233至263,或243至253之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0376] 在一些实施方式中,能够结合R273H p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:5的位置198至348、208至338、218至328、228至318、238至308、248至298、258至288,或268至278之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0377] 在一些实施方式中,能够结合R248W p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:6的位置173至323、183至313、193至303、203至293、213至283、223至273、233至263,或243至253之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0378] 在一些实施方式中,能够结合G245S p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:7的位置170至320、180至310、190至300、200至290、210至280、220至270、230至260,或240至250之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0379] 在一些实施方式中,能够结合R273C p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:8的位置198至348、208至338、218至328、228至318、238至308、248至298、258至288,或268至278之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0380] 在一些实施方式中,能够结合R282W p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:9的位置207至357、217至347、227至337、237至327、247

至317、257至301、267至297,或277至287之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0381] 在一些实施方式中,能够结合R249S p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:10的位置174至324、184至314、194至304、204至294、214至284、224至274、234至264,或244至254之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0382] 在一些实施方式中,能够结合G245D p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:11的位置170至320、180至310、190至300、200至290、210至280、220至270、230至260,或240至250之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0383] 在一些实施方式中,能够结合C176F p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:12的位置101至251、111至241、121至231、131至221、141至211、151至201、161至191,或171至181之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0384] 在一些实施方式中,能够结合H179Y p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:13的位置104至254、114至244、124至234、134至224、144至214、154至204、164至194,或174至184之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0385] 在一些实施方式中,能够结合H179R p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:14的位置104至254、114至244、124至234、134至224、144至214、154至204、164至194,或174至184之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0386] 在一些实施方式中,能够结合Y220C p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:15的位置145至295、155至285、165至275、175至265、185至255、195至245、205至235,或215至225之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0387] 在一些实施方式中,能够结合R337H p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:16的位置262至412、272至402、282至392、292至382、302至372、312至362、322至352,或332至342之一的氨基酸序列,或由其组成。

[0388] 在一些实施方式中,能够结合R175H p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:3的位置175至179的氨基酸序列(即HCPHH(SEQ ID NO:68))或由其组成,或包含对应于SEQ ID NO:3的位置175(即H)和位置177至179的氨基酸序列(即PHH(SEQ ID NO:69))或由其组成,或包含对应于SEQ ID NO:3的位置175(即H)和位置178至179的氨基酸序列(即HH(SEQ ID NO:70))或由其组成。即,在一些实施方式中,能够结合R175H p53多肽的抗体可以结合如下表位:

[0389]	表位	SEQ ID NO:3的相应位置
	HCPHH	175至179
	H...PHH	175和177至179
	H...HH	175和178至179

[0390] 在一些实施方式中,能够结合R248Q p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:4的位置247至249的氨基酸序列(即NQR(SEQ ID NO:71))或由其组成,或包含对应于SEQ ID NO:4的位置215至216(即SV(SEQ ID NO:72))和位置233至234的氨基酸序列(即HY(SEQ ID NO:73))或由其组成,或包含对应于SEQ ID NO:4的位置249至250的氨基酸序列(即RP(SEQ ID NO:74))或由其组成。即,在一些实施方式中,能够结合R248Q p53多肽的抗体可以结合如下表位:

[0391]	表位	SEQ ID NO:4的相应位置
--------	----	------------------

NQR	247至249
SV...HY	215至216和233至234
RP	249至250

[0392] 在一些实施方式中,能够结合R273H p53多肽的抗体可能与多肽的表位结合,所述多肽的表位包含对应于SEQ ID NO:5的位置272至273的氨基酸序列(即VH (SEQ ID NO:75))或由其组成。

[0393] 在一些方面,所述抗体是克隆抗R175H p53抗体克隆4H5或MH 4H5。抗R175H p53抗体克隆4H5和MH 4H5包含以下CDR序列:

[0394] 轻链:

[0395] LC-CDR1:QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19)

[0396] LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20)

[0397] LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)

[0398] 重链:

[0399] HC-CDR1:GFTFTEYLT (SEQ ID NO:25)

[0400] HC-CDR2:IDPNNGVT (SEQ ID NO:26)

[0401] HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)

[0402] 对于本文所述的所有抗体,CDR是根据VBASE2CDR预测工具定义的(Retter等, Nucleic Acids Research (2005) 33 (数据库发表):D671-674,通过引用整体并入本文)。

[0403] 在一些方面,所述抗体是克隆抗R175H p53抗体克隆7B9或MH 7B9。抗R175H p53抗体克隆7B9和MH 7B9包含以下CDR序列:

[0404] 轻链:

[0405] LC-CDR1:QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23)

[0406] LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20)

[0407] LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)

[0408] 重链:

[0409] HC-CDR1:GYTFTEYLT (SEQ ID NO:29)

[0410] HC-CDR2:INPYSGGT (SEQ ID NO:30)

[0411] HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)

[0412] 在一些方面,所述抗体是克隆抗R175H p53抗体克隆10C8或MH 10C8。抗R175H p53抗体克隆10C8和MH 10C8包含以下CDR序列:

[0413] 轻链:

[0414] LC-CDR1:QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23)

[0415] LC-CDR2:GAS (SEQ ID NO:20)

[0416] LC-CDR3:QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)

[0417] 重链:

[0418] HC-CDR1:GYTFTEYLT (SEQ ID NO:29)

[0419] HC-CDR2:INPYSGGT (SEQ ID NO:30)

[0420] HC-CDR3:ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)

[0421] 在本发明所述的各个方面的一些实施方案中,其中HC-CDR2是INPYSGGT (SEQ ID

NO:30)的,该序列可以包含在序列INPYSGGTV中(SEQ ID NO:76)。在一些实施方式中,HC-CDR2是INPYSGGTV(SEQ ID NO:76)。

[0422] 本发明所述的抗R175H p53抗体可包含克隆4H5、7B9或10C8的CDR或SEQ ID NO:18或22之一;和SEQ ID NO:24或28。

[0423] 本发明所述的抗R175H p53抗体可包含克隆MH 4H5、MH 7B9或MH 10C8的CDR或SEQ ID NO:237或238之一;和SEQ ID NO:239、240或241。

[0424] 图24、25、49和50显示了抗R175H p53抗体克隆的V_L和V_H链的氨基酸序列。图27、51和52中显示了编码核苷酸序列。

[0425] 抗R175H p53抗体可具有V_L和/或V_H链,所述V_L和/或V_H链包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:18、22、237和238中;或24、28、239、240或241中的一个或多个的V_L和/或V_H氨基酸序列具有高百分比序列同一性,或与如图24、25、49和50中之一所示的氨基酸序列具有高百分比序列同一性。例如,本发明所述的抗体包括与R175H p53多肽结合并具有V_L或V_H链的抗体,所述V_L或V_H链包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:18、22、237、238、24、28、239、240或241之一所示的V_L或V_H链氨基酸序列,或与图24、25、49和50之一所示的氨基酸序列具有至少70%,更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%的序列同一性。

[0426] 在一些方面,所述抗体是克隆抗R248Q p53抗体克隆3G11或MH 3G11。抗R248Q p53抗体克隆3G11和MH 3G11包含以下CDR序列:

[0427] 轻链:

[0428] LC-CDR1:QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)

[0429] LC-CDR2:LVS (SEQ ID NO:42)

[0430] LC-CDR3:WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)

[0431] 重链:

[0432] HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)

[0433] HC-CDR2:IHPKNGGT (SEQ ID NO:47)

[0434] HC-CDR3:AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48)

[0435] 在一些方面,所述抗体是克隆抗R248Q p53抗体克隆4H2或MH 4H2。抗R248Q p53抗体克隆4H2和MH 4H2包含以下CDR序列:

[0436] 轻链:

[0437] LC-CDR1:QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)

[0438] LC-CDR2:LVS (SEQ ID NO:42)

[0439] LC-CDR3:WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)

[0440] 重链:

[0441] HC-CDR1:GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)

[0442] HC-CDR2:IDPKNGGT (SEQ ID NO:50)

[0443] HC-CDR3:AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51)

[0444] 本发明所述的抗R248Q p53抗体可包含克隆3G11或4H2的CDR,或SEQ ID NO:40或44之一;和SEQ ID NO:45或49。

[0445] 本发明所述的抗R248Q p53抗体可包含克隆MH 3G11或MH 4H2的CDR,或SEQ ID

NO:251或252之一;和SEQ ID NO:253或254。

[0446] 图28、29、57和58显示了抗R248Q p53抗体克隆的V_L和V_H链的氨基酸序列。图31、59和60中显示了编码核苷酸序列。

[0447] 抗R248Q p53抗体可具有V_L和/或V_H链,所述V_L和/或V_H链包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:40、44、251和252;或45、49、253或254中的一个或多个的V_L和/或V_H氨基酸序列具有高百分比序列同一性,或与如图28、29、57和58中之一所示的氨基酸序列具有高百分比序列同一性。例如,本发明所述的抗体包括与R248Q p53多肽结合并具有V_L或V_H链的抗体,所述V_L或V_H链包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:40、44、251、252、45、49、253或254之一所示的V_L或V_H链氨基酸序列,或与图28、29、57和58之一所示的氨基酸序列具有至少70%,更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%的序列同一性。

[0448] 在一些方面,所述抗体是克隆抗R273H p53抗体克隆13E4或MH 13E4。抗R273H p53抗体克隆13E4和MH 13E4包含以下CDR序列:

[0449] 轻链:

[0450] LC-CDR1:QSVHNNGDTY (SEQ ID NO:59)

[0451] LC-CDR2:KVS (SEQ ID NO:60)

[0452] LC-CDR3:FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61)

[0453] 重链:

[0454] HC-CDR1:GFSFSDYY (SEQ ID NO:63)

[0455] HC-CDR2:ISVGGTYT (SEQ ID NO:64)

[0456] HC-CDR3:VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65)

[0457] 本发明所述的抗R273H p53抗体可包含克隆13E4的CDR,或SEQ ID NO:58和62之一。

[0458] 本发明所述的抗R273H p53抗体可包含克隆MH 13E4的CDR,或SEQ ID NO:247和248之一。

[0459] 图32、33、53和54中显示了抗R273H p53抗体克隆的V_L和V_H链的氨基酸序列。图34、55和56中显示了编码核苷酸序列。

[0460] 抗R248Q p53抗体可具有V_L和/或V_H链,所述V_L和/或V_H链包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:58、247、62和248中的一个或多个的V_L和/或V_H氨基酸序列,或与如图32、33、53和54中之一所示的氨基酸序列具有高百分比序列同一性。例如,本发明所述的抗体包括与R273H p53多肽结合并具有V_L或V_H链的抗体,所述V_L或V_H链包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:58、247、62和248之一所示的V_L或V_H链氨基酸序列,或与图32、33、53和54之一所示的氨基酸序列具有至少70%,更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%的序列同一性。

[0461] 在本发明所述的抗体中,六个CDR序列中的一个或两个或三个或四个可以变化。变体可以在六个CDR序列中的一个或两个中具有一个或两个氨基酸取代。

[0462] 轻链和重链CDR也可以特别用于与许多不同的框架区结组。因此,具有LC-CDR1-3或HC-CDR1-3的轻链和/或重链可具有替代的框架区。合适的框架区是本领域熟知的,并且描述于例如M.Lefranc和G.Lefranc (2001) “免疫球蛋白事实手册”,学术出版社,通过引用

并入本文。

[0463] 本发明所述的抗体可以被可检测地标记或至少能够被检测。例如，所述抗体可以用放射性原子或有色分子或荧光分子或可以以任何其他方式容易地检测的分子标记。合适的可检测分子包括荧光蛋白、荧光素酶、酶底物和放射性标记。结合部分可以用可检测标记直接标记，或者可以间接标记。例如，结合部分可以是未标记的抗体，其可以被另一种本身标记的抗体检测。或者，第二抗体可以与生物素结合，并且标记的链霉抗生物素蛋白与生物素的结合用于间接标记第一抗体。

[0464] 嵌合抗原受体

[0465] 本发明提供了能够与突变型p53多肽结合的嵌合抗原受体 (CAR)。所述CAR包含本发明所述的抗原结合片段或多肽。

[0466] 嵌合抗原受体 (CAR) 是提供抗原结合和T细胞活化功能的重组受体。例如，在Dotti等, Immunol Rev (2014) 257 (1) 中综述了CAR结构和工程改造, 该文献通过引用整体并入本文。

[0467] 本文提供了本发明所述的抗原结合片段作为嵌合抗原受体 (CAR) 的抗原结合结构域。在一些实施方式中, 根据本文所述的抗体、抗原结合片段或多肽的任何实施方式, 所述CAR包含V_L结构域和V_H结构域。因此, 本发明所述的CAR结合的抗原是如本文所述的突变型p53多肽。

[0468] CAR可与共刺激配体、嵌合共刺激受体或细胞因子组合以进一步增强T细胞效力、特异性和安全性 (Sadelain等, 嵌合抗原受体 (CAR) 设计的基本原理. Cancer Discov. 2013年4月; 3 (4) : 388-398. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0548, 特别地通过引用并入本文)。

[0469] 本发明还提供了包含本发明所述的CAR的细胞。本发明所述的CAR可用于产生靶向肿瘤的T细胞, 例如, 靶向表达CAR特异性的突变型p53多肽的肿瘤细胞的T细胞。

[0470] 将CAR工程改造入T细胞可以在培养期间、体外进行, 用于转导和扩增, 例如在用于过继性T细胞疗法的T细胞扩增期间发生。转导可以使用多种方法, 但是需要稳定的基因转导以在克隆扩增和持久的T细胞中实现持续的CAR表达。

[0471] 除了本文所述的突变型p53多肽特异性决定元件外, 可以进一步改造CAR分子以表达共刺激性胞内结构域, 例如衍生自CD28和肿瘤坏死因子受体超家族成员9 (TNFRSF9; 4-1BB) 的那些, 以在遇到肿瘤细胞时促进T细胞的增殖和持久性 (Nishio和Dotti, OncoImmunology 4:2, e988098; 2015年2月)。

[0472] CAR通常在单一嵌合蛋白中将抗原结合结构域与CD3- ζ 链或Fc γ RI蛋白的细胞内结构域组合。CAR的结构特征被描述于Sjouke等, (第二代嵌合抗原受体的药理学. Nature Reviews Drug Discovery, 499-509页, (2015) doi:10.1038/nrd4597)。CAR通常具有与跨膜结构域和胞内结构域连接的细胞外抗原结合结构域。任选的铰链或间隔区可以使结合部分和跨膜结构域之间被间隔开, 并且可以充当柔性接头。

[0473] 根据本发明, CAR的抗原识别结构域是或者衍生自能够结合突变型p53多肽的抗体、抗原结合片段或多肽, 如本文所述。

[0474] 铰链或间隔区可以是柔性结构域, 允许结合部分在不同方向上取向。铰链或间隔区可以源自IgG1或免疫球蛋白的CH₂CH₃区。

[0475] 跨膜结构域可以是跨越细胞膜的疏水性 α 螺旋。通常使用与胞内结构域相关的跨

膜结构域。

[0476] 胞内结构域负责抗原结合后的受体聚集/二聚化以及启动对细胞的信号转导。一种常用的跨膜结构域是CD3- ζ 跨膜和胞内结构域。来自一种或多种共刺激蛋白受体(例如CD28、4-1BB、OX40、ICOS)的胞内结构域可任选地掺入CAR的细胞质尾部以提供额外的共刺激信号传导,这在抗肿瘤活性方面可能是有益的。

[0477] 在一个实施方式中,CAR包含具有抗原识别结构域、跨膜结构域和细胞质结构域的胞外结构域。可以使用与CAR中的一个结构域天然相关的跨膜结构域,或者可以通过氨基酸取代选择或修饰跨膜结构域以避免这些结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以尽量减少与受体复合物其他成员的相互作用。

[0478] 可以将细胞质结构域设计为自身包含CD28和/或4-1BB信号传导结构域,或者与任何其他所需的细胞质结构域组合。可以设计细胞质结构域以进一步包含CD3- ζ 的信号传导结构域。例如,CAR的细胞质结构域可包括但不限于CD3- ζ 、4-1BB和CD28信号传导模块及其组合。

[0479] 本发明还提供了CAR T细胞,其包含能够结合本发明所述的突变型p53多肽的抗原结合片段作为CAR。

[0480] 本发明的CAR T细胞可以通过将包含所需CAR(例如包含抗突变体p53、CD8a铰链和跨膜结构域,以及人4-1BB和CD3 ζ 信号传导结构域的CAR)的体外慢病毒载体导入细胞来产生。本发明的CAR T细胞能够在体内复制,引起长期持久性,可产生持续的肿瘤控制。

[0481] 在一个实施方式中,本发明涉及施用表达CAR的基因修饰的T细胞,所述CAR能够结合突变型p53多肽,用于使用淋巴细胞输注治疗患有癌症或具有患癌症风险的患者。优选地,在治疗中使用自体淋巴细胞输注。从需要治疗的患者收集自体PBMC,并使用本文所述和本领域已知的方法激活和扩增T细胞,然后将其输注回患者体内。

[0482] 检测突变型p53多肽的方法

[0483] 如本文所述的抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞可用于涉及抗体或抗原结合片段与突变型p53多肽的结合的方法中。此类方法可涉及检测抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞和突变型p53多肽的结合复合物。因此,在一个实施方式中,提供了一种方法,所述方法包括使含有或疑似含有突变型p53多肽的样品与如本文所述的抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞接触并检测抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞和突变型p53多肽结合的复合物的形成。

[0484] 在本发明的一些方面,提供了一种体外复合物,其包含与突变型p53多肽结合(即形成复合物)的本发明的抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞,其中抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞对所述突变型p53多肽(或包含所述突变的片段)是特异性的。

[0485] 合适的方法形式是本领域熟知的,包括免疫测定,例如夹心测定,ELISA。所述方法可以包括用可检测的标记物,例如荧光、发光或放射性标签标记抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞,或突变型p53多肽,或两者,所述可检测的标记物为。突变型p53多肽的表达可以通过免疫组织化学(IHC)测定,例如通过活组织检查获得的组织样品。

[0486] 特别地,本发明的抗突变型p53抗体可用于如本文所例示的通过免疫印迹、免疫荧光、免疫沉淀、免疫组织化学和体内成像进行分析。

[0487] 这种方法可以提供诊断或预测评估需要检测和/或定量突变型p53多肽的疾病或

病症的方法的基础。这些方法可以在患者样品上体外进行,或者在对患者样品进行处理后进行。一旦收集样品,在体外诊断或预后评估的方法中就不再需要患者的参与,因此所述方法可以是不在人体或动物体上实施的方法。

[0488] 所述方法可涉及检测患者样品中突变型p53多肽的存在。

[0489] 所述方法可涉及确定患者样品中存在的突变型p53多肽的量。在一些实施方式中,所述方法可以进一步包括将确定的量与标准值或参比值进行比较,作为以达到诊断目的的过程的一部分。其他诊断测试可以与本文描述的那些一起使用,以增强诊断或预后的准确性或确认通过使用本文描述的测试获得的结果。

[0490] 样品中突变型p53多肽的检测可用于以下目的,诊断患者的癌症状况、诊断患癌的倾向性或提供癌症状况的预后(预测)。诊断或预后可以涉及现有的(先前诊断的)癌症状况,其可以是良性的或恶性的,可以涉及疑似的癌症状况,或者可以涉及筛查患者的癌症状况(可以是预先未确诊的)。

[0491] 样品中突变型p53多肽的检测可以指示患者可以对抗突变体p53抗体、片段、多肽、缀合物、CAR或细胞的治疗作出反应。样品中给定突变型p53多肽的存在可以为用给定的抗突变体p53抗体、片段、多肽、缀合物、CAR或细胞进行治疗选择患者。因此,本发明的抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞可以为用抗突变体p53抗体疗法治疗选择患者。

[0492] 样品可以是从任何组织或体液中取得的。所述样品可包含或可源自:一定量的血液;来自个体血液的一定量血清,其可包括去除纤维蛋白凝块和血细胞后获得的血液的流体部分;组织样本或活组织检查样品;或从所述个体分离的细胞。

[0493] 本发明所述的方法优选体外进行。术语“体外”旨在包括培养细胞的实验,而术语“体内”旨在包括用完整多细胞生物进行的实验。

[0494] 本发明还提供了本发明所述的抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞,其用于癌症(例如肿瘤)的检测、定位或成像方法,例如在体内。

[0495] 本发明所述的抗体、片段、多肽、缀合物、CAR或细胞可以用可检测标记(例如产生信号的标记)直接或间接地进行适当标记,例如放射性同位素或非同位素实体,以用于检测。放射性同位素包括碘¹²³、碘¹²⁵、碘¹²⁶、碘¹³¹、碘¹³³、溴⁷⁷、锝^{99m}、铟¹¹¹、铟^{113m}、镓⁶⁷、镓⁶⁸、钌⁹⁵、钌⁹⁷、钌¹⁰³、钌¹⁰⁵、汞²⁰⁷、汞²⁰³、铼^{99m}、铼¹⁰¹、铼¹⁰⁵、钪⁴⁷、碲^{121m}、碲^{122m}、碲^{125m}、铥¹⁶⁵、铥¹⁶⁷、铥¹⁶⁸、铜⁶⁷、氟¹⁸、钇⁹⁰、钯¹⁰⁰、铋²¹⁷和锑²¹¹。非同位素实体可选自酶(例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶,β-半乳糖苷酶、荧光素酶)、染料、半抗原、发光剂如放射性发光剂、化学发光剂(例如吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺)、生物发光、荧光(例如荧光素、罗丹明、曙红和NDB、绿色荧光蛋白(GFP)、稀土螯合物如铕(Eu)、铽(Tb)和钐(Sm)、四甲基罗丹明、德克萨斯红、4-甲基伞形酮、7-氨基-4-甲基香豆素、Cy3、Cy5)或磷光剂、抗体、受体和配体如生物素、亲和素、链霉亲和素或洋地黄毒苷。

[0496] 检测技术是本领域技术人员公知的,并且可以选择与标记试剂相对应。合适的技术包括寡核苷酸标签的PCR扩增、质谱、荧光或颜色的检测(例如通过报告蛋白酶促转化底物),或检测放射性时。

[0497] 在一些实施方式中,所述方法包括将抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞施用于受试者(例如,诊断患有或疑似患有癌症的患者)并检测所述抗体、抗体片段、多肽、缀合物、CAR或细胞。在一些实施方式中,所述方法包括检测来自抗体、抗体片段、多肽、缀合

物、CAR或细胞的信号。在一些实施方式中,所述方法包括将信号转换为图像。

[0498] 本发明还提供了使用本发明所述的抗体、片段、多肽、缀合物、CAR或细胞为使用突变型p53多肽作靶向剂治疗选择/分类受试者的方法。在一些实施方式中,基于检测突变型p53多肽或编码突变型p53多肽的核酸的存在(例如在从个体获得的样品中),选择受试者用于本发明所述的治疗,或鉴定受试者将受益于此类治疗。

[0499] 治疗应用

[0500] 可以提供本发明所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR和细胞以及包含这些试剂的组合物用于医学治疗方法。可以向患有需要治疗的疾病或病症的受试者提供治疗。所述疾病或病症可能是癌症。

[0501] 在一些实施方式中,所述癌症可包含表达突变型p53多肽的细胞。在一些实施方式中,所述癌症可包括表达突变型p53多肽的细胞,其中所述突变型p53多肽对本发明所述的抗突变体p53抗体、片段或多肽是特异性的。

[0502] 例如,表达突变型p53多肽的此类肿瘤细胞可以通过用本发明的抗体、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)或使用抗体-药物缀合物直接杀死。

[0503] 所述治疗可以旨在预防癌症的发展或进展。因此,所述抗体、抗原结合片段、多肽或缀合物可用于配制药物组合物或药物,并且可以预防性地治疗受试者以防止疾病状态的发展。这可以在疾病状态的症状发作之前进行,和/或可以施用于被认为具有更高的癌症发展或进展风险的受试者。

[0504] 抗体、抗原结合片段或多肽的施用优选为“治疗有效量”,这足以显示对个体的益处。施用的实际剂量、施用的速率和时间步骤将取决于所治疗疾病的性质和严重程度。治疗的处方(例如关于剂量等的决定)由全科医生和其他医生负责,并且通常考虑待治疗的病症、个体患者的状况、递送的部位、给药方法和从业者已知的其他因素。上述技术和方案的实例可以参见雷明顿的制药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第20版,发表于2000年,Lippincott、Williams和Wilkins。

[0505] 抗体缀合物

[0506] 本发明还提供了抗体缀合物,其包含与化学部分缀合的本发明所述的抗体、抗原结合片段或多肽。

[0507] 在一些实施方式中,所述化学部分可以是用于提供治疗效果的部分。在一些实施方式中,所述化学部分可以是药物部分(例如细胞毒性剂)。在一些实施方式中,所述药物部分可以是如下文所述的化学治疗药物。

[0508] 在一些实施方式中,所述化学部分可以是可检测的部分。合适的部分和用于其检测的手段是本领域技术人员公知的,包括上文所述的放射性同位素或非同位素实体。

[0509] 制备药学上有用的组合物和药物

[0510] 本发明所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR和细胞可以配制成临床使用的药物组合物,并且可以包含药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。

[0511] 本发明还提供了制备药学上有用的组合物的方法,这种制备方法可包括选自以下的一个或多个步骤:分离如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、CAR或细胞;和/或将分离的如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、CAR或细胞与药学上可接受的载体、佐剂、赋形

剂或稀释剂混合。

[0512] 例如,本发明的另一方面涉及配制或生产用于治疗癌症的药物或药物组合物的方法,所述方法包括将如本文所述的抗体、抗原结合片段、多肽、CAR或细胞与药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂或稀释剂混合以配制药物组合物或药物。

[0513] 组合物可以单独施用或与其它治疗组合施用,根据待治疗的病症同时或依次施用。

[0514] 在本说明书中,本发明的抗体、抗原结合片段、多肽、CAR或细胞和化学治疗剂可以同时或依次施用。

[0515] 在一些实施方式中,用本发明的抗体、抗原结合片段、多肽、CAR或细胞治疗可伴随化学疗法。

[0516] 同时施用是指将抗体、抗原结合片段、多肽、CAR或细胞和治疗剂一起施用(例如作为含有两种药剂的药物组合物(组合制剂)来施用),或者在彼此之后立即施用,并且任选地通过相同的途径施用(例如施用于同一动脉、静脉或其他血管)。

[0517] 依次施用是指在另一种药剂的单独施用之后,在给定的时间间隔后施用抗体、抗原结合片段、多肽、CAR或细胞中的一种。尽管在一些实施方式中是这种情况,但不要求两种药剂通过相同的途径给药。所述时间间隔可以是任何时间间隔。

[0518] 癌症

[0519] 癌症可以是任何不需要的细胞增殖(或任何通过不需要的细胞增殖表现出来的疾病)、肿瘤或癌变,或者不希望的细胞增殖、肿瘤或癌变的风险或易感性。所述癌症可以是良性或恶性的,可以是原发性的或继发性的(转移性的)。所述肿瘤或癌变可以是细胞的任何异常生长或增殖,并且可以位于任何组织中。组织的实例包括肾上腺、肾上腺髓质、肛门、阑尾、膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、盲肠、中枢神经系统(包括或不包括脑)小脑、子宫颈、结肠、十二指肠、子宫内膜、上皮细胞(例如肾上皮细胞)、胆囊、食道、神经胶质细胞、心脏、回肠、空肠、肾、泪腺、喉、肝、肺、淋巴、淋巴结、淋巴母细胞、上颌骨、纵隔、肠系膜、子宫肌层、鼻咽、网膜、口腔、卵巢、胰腺、腮腺、周围神经系统、腹膜、胸膜、前列腺、唾液腺、乙状结肠、皮肤、小肠、软组织、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、舌、扁桃体、气管、子宫、外阴、白细胞。

[0520] 待治疗的肿瘤可以是神经系统或非神经系统肿瘤。神经系统肿瘤可能起源于中枢神经系统或外周神经系统,如胶质瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、神经纤维瘤、室管膜瘤、神经鞘瘤、神经纤维肉瘤、星形细胞瘤和少突神经胶质瘤。非神经系统癌症/肿瘤可能起源于任何其他非神经组织,例如黑色素瘤、间皮瘤、淋巴瘤、骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、慢性粒细胞白血病(CML)、急性髓性白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、肝癌、表皮样癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、胸腺癌、NSCLC、血液癌和肉瘤。在一些实施方式中,所述癌症可以是乳腺癌。

[0521] 在一些实施方式中,所述癌症是编码或表达突变型p53肽或多肽的癌症。在一些实施方式中,所述癌症是编码或表达包含DNA结合结构域(DBD)中的突变的突变体p53肽/多肽的癌症。

[0522] 在一些实施方式中,所述癌症是编码或表达突变型p53肽/多肽的癌症,所述突变型p53肽/多肽在位点248、273、175、176、179、220、245、249、282或337中的一个或多个位点

处包含相对于野生型p53序列的氨基酸差异。

[0523] 在一些实施方式中,所述癌症是编码或表达包含一种或多种以下突变的突变型p53肽/多肽的癌症:R175H、R248Q、R273H、R248W、G245S、R273C、R282W、R249S、G245D、C176F、H179Y、H179R、Y220C和R337H。

[0524] 可以通过本领域技术人员熟知的任何合适的方法(例如,基于对生物样品的分析)来确定编码或表达突变型p53肽/多肽的癌症。

[0525] 编码突变型p53多肽的癌症可以在检测编码突变的核酸的基础上被鉴定,例如,通过DNA测序等。表达突变型p53多肽的癌症可以通过检测突变型p53肽/多肽的表达来鉴定。表达可以是基因表达或蛋白质表达。基因表达可以通过例如检测编码突变型p53肽/多肽的mRNA确定,例如通过定量实时PCR(qRT-PCR)。蛋白质表达可以通过例如检测突变型p53肽/多肽确定,例如通过基于抗体的方法,例如通过蛋白质印迹、免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术、ELISA。

[0526] 本文中,“编码或表达突变型p53肽/多肽的癌症”包括编码或表达突变型p53肽/多肽的任何细胞。在一些实施方式中,所述细胞可以是肿瘤细胞。

[0527] 化学疗法/放射疗法

[0528] 化学疗法和放射疗法分别指用药物或用电离辐射(例如使用X射线或 γ 射线的放射疗法)治疗癌症。

[0529] 药物可以是化学实体,例如小分子药物、抗生素、DNA嵌入剂、蛋白质抑制剂(例如激酶抑制剂)或生物制剂,例如抗体、抗体片段、核酸或肽适体、核酸(例如DNA、RNA)、肽、多肽或蛋白质。所述药物可以配制成药物组合物或药物。制剂可包含一种或多种药物(例如一种或多种活性药剂)以及一种或多种药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

[0530] 治疗可包括施用一种以上的药物。药物可以单独施用或与其它治疗组合施用,根据待治疗的病症同时或依次施用。例如,化学疗法可以是涉及施用两种药物的共同疗法,其中一种或多种药物可以用于治疗癌症。

[0531] 所述化学疗法可以通过一种或多种给药途径给药,所述给药途径例如肠胃外、静脉注射、口服、皮下、皮内或瘤内。

[0532] 可以根据治疗方案施用化学疗法。治疗方案可以是化学疗法施用的预定时间表、计划、方案或时间表,其可以由医生或医师准备并且可以定制以适合需要治疗的患者。

[0533] 所述治疗方案可以指示以下的一种或多种:施用于患者的化学疗法类型;每种药物或辐射的剂量;施用之间的时间间隔;每次治疗的时间长短;任何疗程假期的数量和性质(如果有的话)等。对于联合治疗,可以提供单一治疗方案,其指示每种药物的施用方式。

[0534] 化学治疗药物和生物制剂可选自:烷化剂(例如顺铂、卡铂、氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺);嘌呤或嘧啶抗代谢物(例如硫唑嘌呤或巯嘌呤);生物碱和萜类化合物(例如长春花生物碱(例如长春新碱、长春碱,长春瑞滨、长春地辛)、鬼臼毒素、依托泊苷、替尼泊苷、紫杉醇如紫杉醇(TaxolTM)、多西紫杉醇);拓扑异构酶抑制剂如I型拓扑异构酶抑制剂喜树碱伊立替康和拓扑替康,或II型拓扑异构酶抑制剂安吖啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷);抗肿瘤抗生素(例如蒽环类抗生素),例如放线菌素、多柔比星(阿霉素TM)、表柔比星、博来霉素、雷帕霉素;基于抗体的药物,如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIM-3抗体、抗CTLA-4、抗4-1BB、抗GITR、抗CD27、抗BLTA、抗OX43、抗VEGF、抗TNF α 、抗IL-2、抗GpIIb/

IIIa、抗CD-52、抗CD20、抗RSV、抗HER2/neu (erbB2)、抗TNF受体、抗EGFR抗体、单克隆抗体或抗体片段(实例包括:西妥昔单抗、帕尼单抗、英夫利昔单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗(Avastin®)、阿昔单抗、达利珠单抗、吉妥珠单抗、阿仑单抗、利妥昔单抗(Mabthera®)、帕利珠单抗、曲妥珠单抗、依那西普、阿达木单抗、尼莫珠单抗);EGFR抑制剂如厄洛替尼、西妥昔单抗和吉非替尼;抗血管生成剂如贝伐单抗(Avastin®);癌症疫苗如Sipuleucel-T(Provenge®)。

[0535] 其他化学治疗药物可选自:13-顺式维甲酸、2-氯脱氧腺苷、5-氮杂胞苷5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、白蛋白结合型紫杉醇(Abraxane)、Accutane®、Actinomycin-D Adriamycin®、Adrucil®、Afinitor®、Agrylin®、Ala-Cort®、阿地白介素、阿仑单抗、ALIMTA、阿利维A酸、Alkaban-AQ®、Alkeran®、全反式维甲酸、 α 干扰素、六甲蜜胺、氨甲蝶呤、氨磷汀、氨基谷氨酰胺、阿那格雷、Anandron®、阿那曲唑、阿糖胞苷、Aranesp®、Aredia®、Arimidex®、Aromasin®、Arranon®、三氧化二砷、天冬酰胺酶、ATRA Avastin®、氮杂胞苷、BCG、BCNU、苯达莫司汀、贝伐单抗、贝沙罗汀、BEXXAR®、比卡鲁胺、BiCNU、Blenoxane®、博来霉素、硼替佐米、白消安、Busulfex®、钙甲酰四氢叶酸、Campath®、Camptosar®、喜树碱-11、卡培他滨、Carac™、卡铂、卡莫司汀、Casodex®、CC-5013、CCI-779、CCNU、CDDP、CeeNU、Cerubidine®、西妥昔单抗、苯丁酸氮芥、顺铂、嗜橙菌因子、克拉屈滨、可的松、Cosmegen®、CPT-11、环磷酰胺、Cytadren®、Cytarabine Cytosar-U®、Cytoxan®、地西他滨、放线菌素、阿法达贝泊汀、达沙替尼、道诺霉素、柔红霉素、盐酸柔红霉素、柔红霉素脂质体、DaunoXome®、地塞米松、地西他滨、Delta-Cortef®、Deltasone®、地尼白介素、地芬太罗(Diftitox)、DepoCyt™、地塞米松、醋酸地塞米松、地塞米松磷酸钠、地塞米松、右旋唑烷、DHAD、DIC、迪奥克斯(Diodex)、多西紫杉醇、Doxil®、多柔比星、阿霉素脂质体、Droxia™、DTIC、DTIC-Dome®、Duralone®、Eligard™、Ellence™、Eloxatin™、Elspar®、Emcyt®、表柔比星、阿法依泊汀、西妥昔单抗、埃罗替尼、欧文氏菌L-天冬酰胺酶、雌莫司汀、Ethyol Etopophos®、依托泊苷、依托泊苷磷酸盐、Eulexin®、依维莫司、Evista®、依西美坦、Faslodex®、Femara®、非格司亭、氟尿苷、Fludara®、氟达拉滨、Fluoroplex®、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、亚叶酸、FUDR®、氟维司群、吉非替尼、吉西他滨、奥佐米星、Gleevec™、Gliadel® Wafer、戈舍瑞林、粒细胞-集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、Herceptin®、地塞米松、Hexalen®、六甲基三聚氰胺、HMM、Hycamtin®、Hydrea®、Hydrocort Acetate®、氢化可的松、氢化可的松磷酸钠、氢化可的松琥珀酸钠、磷酸氢化可的松、羟基脲、替伊莫单抗、鼠源单抗替伊莫单抗、Idamycin®、伊达霉素、Ifex®、IFNa、异环磷酰胺、IL-11、IL-2、甲磺酸伊马替尼、咪唑甲酰胺、干扰素 α 、干扰素 α -2b(PEG结合物)、白细胞介素-2、白细胞介素-11、内含子A®(干扰素 α -2b)、Iressa®、伊立替康、异维A酸、伊沙匹隆、Ixempra™、门冬酰胺酶、Lanacort®、拉帕替尼、L-天冬酰胺酶、

LCR、来那度胺、来曲唑、甲酰四氢叶酸、苯丁酸氮芥、LeukineTM、亮丙瑞林、长春新碱、LeustatinTM、脂质体Ara-C、Liquid Pred[®]、洛莫司汀、L-PAM、L-溶肉瘤素、Lupron[®]、Lupron Depot[®]、Matulane[®]、地塞米松、盐酸氮芥、氮芥盐酸盐、Medralone[®]、Medrol[®]、Megace[®]、甲地孕酮、醋酸甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、美司钠、MesnexTM、甲氨蝶呤、甲氨蝶呤钠、甲基强的松龙、Meticorten[®]、丝裂霉素、丝裂霉素C、米托蒽醌、M-Prednisol[®]、MTC、MTX、Mustargen[®]、芥子碱、Mutamycin[®]、Myleran[®]、MylocelTM、Mylotarg[®]、Navelbine[®]、奈拉滨、Neosar[®]、NeulastaTM、Neumega[®]、Neupogen[®]、Nexavar[®]、Nilandron[®]、尼鲁米特、Nipent[®]、氮芥、Novaldex[®]、Novantrone[®]、奥曲肽、醋酸奥曲肽、Oncospar[®]、Oncovin[®]、Ontak[®]、OnxalTM、奥普雷克金(Oprevelkin)、Orapred[®]、Orasone[®]、奥沙利铂、紫杉醇、紫杉醇蛋白结合、帕米膦酸盐、帕尼单抗、Panretin[®]、Paraplatin[®]、Pediapred[®]、PEG干扰素、培门冬酶、聚乙二醇非格司亭、PEG-INTRONTM、PEG-L-天冬酰胺酶、PEMETREXED、喷司他丁、左旋苯丙氨酸氮芥、Platinol[®]、Platinol-AQ[®]、泼尼松龙、泼尼松、Prealone[®]、丙卡巴肼、PROCRIT[®]、Proleukin[®]、Prolifeprospan 20 with Carmustine Implant Purinethol[®]、雷洛昔芬、Revlimid[®]、Rheumatrex[®]、Rituxan[®]、利妥昔单抗、Roferon-A[®] (干扰素α-2a)、Rubex[®]、柔红霉素盐酸盐、Sandostatin[®] Sunostatin LAR[®]、沙格司亭、Solu-Cortef[®]、Solu-Medrol[®]、索拉非尼、SPRYCELTM、STI-571、链脲佐菌素、SU11248、舒尼替尼、Sutent[®]、他莫昔芬、Tarceva[®]、Targretin[®]、Taxol[®]、Taxotere[®]、Temodar[®]、替莫唑胺、替西罗莫司、替尼泊昔、TESPA、沙利度胺、Thalomid[®]、TheraCys[®]、硫鸟嘌呤、Thioguanine Tabloid[®]、硫代磷酰胺、Thioplex[®]、噻替派、TICE[®]、Toposar[®]、托泊替康、托瑞米芬、Torisel[®]、托西莫单抗、曲妥珠单抗、Treanda[®]、维甲酸、TrexallTM、Trisenox[®]、TSPA、TYKERB[®]、VCR、VectibixTM、Velban[®]、Velcade[®]、VePesid[®]、Vesanoid[®]、ViadurTM、Vidaza[®]、长春碱、长春碱硫酸盐、Vincasar Pfs[®]、长春新碱、长春瑞宾、长春瑞滨酒石酸盐、VLB、VM-26、伏立诺他、VP-16、Vumon[®]、Xeloda[®]、Zanosar[®]、ZevalinTM、Zinecard[®]、Zoladex[®]、唑来膦酸、伏立诺他、Zometa[®]。

[0536] 给药途径

[0537] 根据本发明方面的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR、细胞和其他治疗剂、药物和药物组合物可以被配制以用于通过多种途径给药，包括但不限于肠胃外、静脉内、动脉内、肌肉内、皮下、皮内、瘤内和口腔。抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR、细胞和治疗剂可以被配制为流体或固体形式。可配制流体制剂用于通过注射施用于人体或动物体的选定区域。

[0538] 剂量方案

[0539] 可以提供所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR或细胞的多种剂量。一次或多次或每次剂量可以伴随另一种治疗剂的同时或顺序给药。

[0540] 多次剂量之间可以有预定的时间间隔，其可以被选择为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22

天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30或31天,或1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月。举例来说,可以每7天、14天、21天或28天(正负3天、2天或1天)给予一次剂量。

[0541] 试剂盒

[0542] 在本发明的一些方面,提供了一种试剂盒。在一些实施方式中,所述试剂盒可具有至少一个容器,其具有预定量的本发明所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR或细胞。所述试剂盒可以以药物或药物组合物的形式提供所述抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR或细胞,并且可以与施用于患者的说明书一起提供以治疗特定的疾病或病症。可以配制所述抗体、抗原结合片段或多肽,以便适合注射或输注到肿瘤或血液中。

[0543] 在一些实施方式中,所述试剂盒可以进一步包含至少一个容器,其具有预定量的另一种治疗剂(例如化学治疗剂)。在此类实施方案中,所述试剂盒还可包含第二药物或药物组合物,使得两种药物或药物组合物可同时或分开放用,以使它们提供针对特定疾病或病症的组合治疗。还可以配制治疗剂以使其适合注射或输注到肿瘤或血液中。

[0544] 对象

[0545] 用本发明所述的抗体、抗原结合片段、多肽、缀合物、CAR或细胞治疗的对象可以是任何动物或人。所述对象优选为哺乳动物,更优选为人。所述对象可以是非人哺乳动物,但更优选是人。所述对象可以是男性或女性。所述对象可以是患者。对象可能已被诊断患有需要治疗的疾病或病症,或疑似患有此类疾病或病症。

[0546] 序列同一性

[0547] 用于确定氨基酸或核苷酸序列同一性百分比的比对可以以本领域技术人员已知的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,例如ClustalW 1.82、T-coffee或Megalign (DNASTAR) 软件。使用此类软件时,优选使用默认参数,例如使用间隙罚分和延伸罚分。ClustalW 1.82的默认参数是:蛋白质间隙开放罚分=10.0,蛋白质间隙延伸罚分0.2,蛋白质阵列=Gonnet,蛋白质/DNA ENDGAP=-1,蛋白质/DNA GAPDIST=4。

[0548] 重组制备

[0549] 本发明所述的方法中使用的免疫原和本发明所述的抗体、片段、多肽、缀合物和CAR可以根据本领域技术人员已知的重组生产方法制备。

[0550] 目标肽/多肽可以通过化学合成制备,例如,液相或固相合成。例如,肽/多肽可以使用例如Chandrudu等,Molecules (2013) ,18:4373-4388中描述的方法合成,4373-4388,其全部内容通过引用并入本文。

[0551] 本发明所述的免疫原、抗体、片段、多肽、缀合物和CAR可以通过重组表达制备。适用于重组制备的分子生物学技术是本领域熟知的,例如Green和Sambrook,分子克隆:实验室手册(第4版),冷泉港出版社,2012中提出的那些,其全部内容在此引入作为参考。

[0552] 可以从核苷酸序列进行表达。所述核苷酸序列可以包含在载体中。如本文所用的“载体”是用作将外来遗传物质转移到细胞中的载体的寡核苷酸分子(DNA或RNA)。所述载体可以是用于在细胞中表达外源遗传物质的表达载体。此类载体可包括与编码待表达序列的核苷酸序列可操作地连接的启动子序列。载体还可包括终止密码子和表达增强子。本领域已知的任何合适的载体、启动子、增强子和终止密码子可用于本发明所述的载体中表达肽或多肽。在一些实施方式中,所述载体可以是质粒、MAC、病毒等。在一些实施方式中,所述载体可以是真核表达载体,例如包含在真核细胞中表达来自载体的蛋白质所必需的元件的载

体。在一些实施方式中,所述载体可以是哺乳动物表达载体,例如包含巨细胞病毒(CMV)或SV40启动子以驱动蛋白质表达的载体。

[0553] 术语“可操作地连接”可以包括选择的核苷酸序列和调节核苷酸序列(例如启动子和/或增强子)以这样的方式共价连接的情况,即将核苷酸序列的表达置于调节序列的影响或控制下(从而形成表达盒)。因此,如果调节序列能够影响核苷酸序列的转录,则调节序列与所选择的核苷酸序列可操作地连接。然后可以将得到的转录物翻译成所需的肽或多肽。

[0554] 对于本发明所述的重组制备,可以使用任何适于表达多肽的细胞。所述细胞可以是原核生物的或真核生物的。在一些实施方式中,所述细胞是原核细胞,例如古细菌或细菌的细胞。在一些实施方式中,所述细菌可以是革兰氏阴性细菌,例如肠杆菌科细菌,例如大肠杆菌。

[0555] 在一些实施方式中,所述细胞是真核细胞,例如酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞,例如CHO、HEK、HeLa或COS细胞。

[0556] 在一些情况下,所述细胞不是原核细胞,因为一些原核细胞不允许与真核细胞相同的折叠或翻译后修饰。此外,在真核生物中可能具有非常高的表达水平,并且使用适当的标签可以更容易地从真核生物中纯化蛋白质。还可以使用特定的质粒,其促进蛋白质分泌到培养基中。

[0557] 制备可涉及经修饰以表达肽或多肽的真核细胞的培养或发酵。所述培养或发酵可以在生物反应器中进行,所述生物反应器具有适当的营养物供应、空气/氧气和/或生长因子。通过从细胞中分配培养基/发酵液、提取蛋白质含量、分离单个蛋白质以分离分泌的肽或多肽,可以收集分泌的蛋白质。培养、发酵和分离技术是本领域技术人员熟知的,并且描述于例如Green和Sambrook,分子克隆:实验室手册(第4版;如上引入作为参考)。

[0558] 生物反应器包括一个或多个可以培养细胞的容器。生物反应器中的培养可以连续进行,具有连续流入反应器的反应物和连续流出反应器的细胞。或者,所述培养可以分批进行。生物反应器监测和控制环境条件,例如pH、氧气、流入和流出的流速,以及容器内的搅拌,从而为培养的细胞提供最佳条件。

[0559] 在培养表达免疫原、抗体、片段、多肽、缀合物或CAR的细胞后,优选分离目的肽/多肽。可以使用用于从本领域已知的细胞培养物中分离蛋白质的任何合适方法。为了从培养物中分离肽/多肽,可能需要首先将培养的细胞与含有目标肽/多肽的培养基分离。如果目标肽/多肽是从细胞分泌的,则可以通过离心将细胞与含有分泌的目的肽/多肽的培养基分离。如果目标肽/多肽收集在细胞内,则必须在离心之前破坏细胞,例如使用超声处理、快速冻融或渗透裂解。离心将产生含有培养的细胞或培养的细胞的细胞碎片的沉淀,以及含有培养基和目标肽/多肽的上清液。

[0560] 然后可能需要从上清液或培养基中分离目标肽/多肽,其可含有其他蛋白质和非蛋白质组分。从上清液或培养基中分离蛋白质组分的常用方法是通过沉淀。不同溶解度的蛋白质在不同浓度的沉淀剂如硫酸铵中沉淀。例如,在低浓度的沉淀剂下,提取水溶性蛋白。因此,通过添加不同增加的浓度的沉淀剂,可以区分不同溶解度的蛋白质。随后可以使用透析从分离的蛋白质中除去硫酸铵。

[0561] 用于区分不同蛋白质的其他方法是本领域已知的,例如离子交换色谱法和分子筛色谱法。这些可以用作沉淀的替代物,或者可以在沉淀之后进行。

[0562] 一旦从培养物中分离出目的肽/多肽,可能需要或必须浓缩肽或多肽。许多浓缩蛋白质的方法是本领域已知的,例如超滤或冷冻干燥。

[0563] 疫苗接种

[0564] 用于在本发明的方法中产生针对突变型p53多肽的抗体的免疫原也可用作疫苗。所述免疫原可用于产生与p53突变相关的癌症的免疫力。

[0565] 因此,本发明提供了一种包含如本文所述的任何实施方式的免疫原的疫苗,利用该免疫原接种疫苗的方法和将该免疫原用作疫苗的用途。

[0566] 疫苗的/疫苗接种中使用的免疫原可以包含p53突变,用于产生对包含相同突变的癌症的免疫力。例如,包含含有R175H的抗原序列的免疫原可用于针对癌症的疫苗接种方法,所述癌症包含表达R175H p53的细胞或包含编码R175H p53的核酸的一种或多种细胞。

[0567] 在一些实施方式中,多种不同的免疫原可用于本发明所述的疫苗或疫苗接种中。在一些实施方式中,疫苗/疫苗接种可以使用包含p53的不同突变的免疫原,因此可用于接种以抵抗包含一种以上p53突变的癌症和/或包含不同p53突变的癌症。

[0568] 本领域技术人员能够容易地确定用于疫苗的合适制剂和根据本发明的疫苗接种方案,例如,通过参考疫苗(第6版)Plotkin等,2012,Elsevier Saunders,其全部内容通过引用并入本文。

[0569] 疫苗接种和相关用途的方法包括防治性和/或预防性治疗。例如,被认为有发展癌症风险或在治疗后有复发或复发风险的受试者可以被施用如本文所述的疫苗。这种给药可发生在受试者被认为不患有癌症的情况下。风险状态和癌症状态的评估可由合格的合格医师进行。这些方法可以降低癌症发展、生长、转移或复发的可能性。

[0570] ***

[0571] 本发明包括所述方面和优选特征的组合,除非明显不允许或明确避免这种组合。

[0572] 这里使用的章节标题仅用于组织目的,不应解释为限制所描述的主题。

[0573] 现在将参考附图通过示例说明本发明的各个方面和实施方式。其他方面和实施方式对于本领域技术人员而言是显而易见的。本文中提到的所有文献都通过引用并入本文。

[0574] 在整个说明书中,包括随后的权利要求,除非上下文另有要求,否则词语“包括”和诸如“包含”和“含有”的变体将被理解为暗示包括所述整数或步骤,或整数或步骤的组,但不排除任何其他整数或步骤,或整数或步骤的组。

[0575] 必须注意,如说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”,“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另有明确说明。范围在本文中可以表示为从“约”一个特定值,和/或到“约”另一个特定值。当表达这样的范围时,另一个实施方式包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,将理解该特定值形成另一个实施方式。

[0576] 附图简述

[0577] 现在将参考附图讨论说明本发明原理的实施方式和实验,其中:

[0578] 图1A至1C.用于产生对p53突变体特异的抗体的免疫原的氨基酸序列。(1A)用于产生抗R175H p53抗体的免疫原的序列(SEQ ID NO:80)。将长度不同的突变体p53序列的三个拷贝插入TrxA的活性位点,每个突变体具有一个突变。(1B)用于产生抗R248Q p53抗体的免疫原的序列(SEQ ID NO:84)。(1C)用于产生抗R273H p53抗体的免疫原的序列(SEQ ID NO:

88)。突变体p53的氨基酸序列被突出显示(浅灰色),并标出突变体残基(深灰色)。柔性的Gly/Ser接头序列加下划线。用于纯化的C-末端6-His标签以斜体显示。

[0579] 图2A至2C.用于产生p53突变体特异性抗体的免疫原的3D结构的预测瑞士模型。(2A)用于产生抗R175H p53抗体的免疫原的预测结构。(2B)用于产生抗R248Q p53抗体的免疫原的预测结构。(2C)用于产生抗R273H p53抗体的免疫原的预测结构。标出了对应于硫氧还蛋白和抗原序列的结构,突变也是如此。

[0580] 图3A至3C.在IPTG诱导之前(0小时)和诱导4小时之后,从表达(3A)TrxR175H、(3B)TrxR248Q和(3C)TrxR273H的大肠杆菌菌株BL21 (DE3)中分离的总蛋白质、可溶性蛋白质和不溶性蛋白质的SDS-PAGE (16%)照片。箭头指示预期表达的蛋白质。MW=蛋白质分子量梯度(Precision Plus ProteinTM All BlueStandards,伯乐公司)。

[0581] 图4A和4B.纯化的(4A)TrxR175H和(4B)TrxR248Q的质谱,显示指定分子量的主要蛋白质实体。

[0582] 图5A至5C.图表显示了p53突变体特异性抗体的ELISA筛选结果。将小鼠用(5A)TrxR175H,(5B)TrxR248Q和(5C)TrxR273H进行免疫,用ELISA对从小鼠的脾产生的单个杂交瘤克隆获得的细胞培养物上清液针对所报告的完整蛋白质和肽片段进行筛选。

[0583] 图6A至6C.显示p53突变体特异性抗体的ELISA筛选结果的条形图。将小鼠用(6A)TrxR175H,(6B)TrxR248Q和(6C)TrxR273H进行免疫,用ELISA对从小鼠的脾产生的单个杂交瘤克隆获得的细胞培养物上清液针对所报告的完整蛋白质和肽片段进行筛选。

[0584] 图7A至7C.用于确定抗突变型p53抗体结合的表位的噬菌体展示实验的结果的序列比对。由产生(7A)抗R175H抗体(SEQ ID NO:77和93-101) (7B)抗R248Q抗体(SEQ ID NO:102-110)和(7C)抗R273H抗体(SEQ ID NO:111-119)的杂交瘤的细胞培养上清液捕获的肽的序列。共有序列被显示出。

[0585] 图8A和8B.用于确定抗突变型p53抗体结合的表位的噬菌体展示实验的结果的序列比对。由产生(8A)抗R175H抗体(SEQ ID NO:77、93和120-135)和(8B)抗R248Q抗体(SEQ ID NO:102、103和136-144)的杂交瘤的细胞培养上清液捕获的肽的序列。共有序列被显示出。

[0586] 图9A至9D.显示用于测定抗R175H抗体克隆的表位的丙氨酸扫描ELISA的结果的表格和柱状图。(9A)4H5 (SEQ ID NO:145-159),(9B)7B9 (SEQ ID NO:79和145-159)和(9C)10C8 (SEQ ID NO:145-159)和(9D)抗R273H抗体克隆13E4 (SEQ ID NO:160-173)。围绕突变热点(His 175和His 273)的单个丙氨酸取代的13-聚体肽用于确定突变体抗体与突变体p53结合所需的关键氨基酸残基。在与TMB底物温育5分钟后,在650nm处测量吸光度。显示了单个丙氨酸取代的肽的光密度读数。用于抗体结合的关键残基是标出的基序。

[0587] 图10.显示通过抗体识别的关键残基的丙氨酸扫描分析鉴定的抗体表位的序列(SEQ ID NO:174)。

[0588] 图11.显示使用突变型p53特异性抗体的免疫印迹结果的照片。用编码指定的p53突变体或野生型p53多肽的质粒瞬时转染p53缺失的H1299细胞,并将蛋白质裂解物用于用指定的抗体进行直接免疫印迹。D01是检测所有形式的人p53的小鼠mAb,CM1是针对人p53的兔多克隆抗体。

[0589] 图12.显示使用突变型p53特异性抗体的免疫沉淀测定结果的照片。用编码指定的

p53突变体或野生型p53多肽的质粒瞬时转染p53缺失的H1299细胞,并将蛋白质裂解物用于免疫沉淀测定。D01是检测所有形式的人p53的小鼠mAb,CM1是针对人p53的兔多克隆抗体。用两种p53突变体特异性mAb进行Pull-down实验,并随后用CM1抗体进行免疫印迹实验,并用相反的顺序进行用CM1进行的拉下(Pull-down)实验和用突变体特异性mAb进行的免疫印迹实验。

[0590] 图13.显示了用于分析图14和15中的p53特异性抗体的细胞系的p53突变状态的表格。

[0591] 图14.显示使用突变型p53特异性抗体的免疫印迹结果的照片。将指定细胞系的蛋白质裂解物用于指定抗体的直接免疫印迹。A549和MCF-7是携带野生型p53的细胞系,其在没有或有UV照射的情况下使用以诱导内源性p53表达。

[0592] 图15.显示使用突变型p53特异性抗体的免疫沉淀测定结果的照片。将指定细胞系的蛋白质裂解物用于使用指定抗体的免疫沉淀测定。A549和MCF-7是携带野生型p53的细胞系,其在没有或有UV照射的情况下使用以诱导内源性p53表达。用两种p53突变体特异性mAb进行拉下实验,并随后用CM1抗体进行免疫印迹实验,并用相反的顺序进行用CM1进行的拉下实验和用突变体特异性mAb进行的免疫印迹实验。

[0593] 图16.显示免疫荧光分析的结果的照片。用编码所示p53突变体或野生型p53多肽的质粒瞬时转染p53缺失的H1299细胞,并进行免疫荧光分析。

[0594] 图17A和17B.显示免疫荧光分析的结果的照片。(17A) 使用所示抗体将指定的细胞系用于免疫荧光分析。(17B) 在表达R248Q或R248W突变型p53多肽的p53缺失的H1299细胞中的R248Q mAb。细胞核由Dapi染色突出显示。

[0595] 图18A和18B.使用突变体特异性抗p53抗体的免疫组织化学分析相关的照片。(18A) 人结肠肿瘤样品的序列分析,以确定p53 (SEQ ID NO:175-186) 的突变状态,和(18B) 使用所示抗p53抗体对石蜡包埋的肿瘤样品的染色。

[0596] 图19.显示使用R175H突变体特异性抗p53抗体的人肿瘤芯片的结果的照片。将来自三阴性乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和肺癌的人肿瘤芯片用R175H突变体p53特异性mAb和pan-p53mAb D07染色。双阳性是指被D07和突变体特异性mAb染色的样品,单阳性仅被D07染色。没有样品仅具有突变体特异性mAb染色而没有D07染色。

[0597] 图20A和20B.显示肿瘤样品中的p53序列,并通过免疫组织化学染色抗p53抗体和抗R175H抗体的色谱图。人抗体三阴性乳腺癌样品用抗p53 (D07和11D1) 抗体和抗R175H p53 抗体染色。(20A) 样品B41、B89和B98显示R175H抗体阳性染色,以及抗p53抗体D07和11D1染色。序列显示样品包含R175H突变(CAG-下划线) (SEQ ID NO:187-189)。(20B) 样品B27仅显示抗p53抗体D07和11D1的阳性染色染色(而没有抗R175H抗体染色),并且样品B52的未被任何抗p53抗体染色。序列显示B27和B57在第175位(CGC-下划线)不包含突变(SEQ ID NO:190和191)。

[0598] 图21.总结了通过免疫组织化学分析人肿瘤芯片的结果的表。

[0599] 图22.显示了来自不同物种的p53的氨基酸序列比对,其中含有R175 (SEQ ID NO: 192-214)、R248或R273 (SEQ ID NO:215-235) 残基(由箭头表示)和周围残基的区域用下划线显示,其显示了跨物种的高度保守性,表明突变体特异性mAb可以在所有物种中发挥作用。

[0600] 图23A至23D.显示对应于R175H突变(即R172H)的小鼠分析结果的照片。来自所示基因型的小鼠胚胎成纤维细胞用于与抗R175H特异性单克隆抗体的(23A)直接免疫印迹(IB)或(23B)免疫沉淀(IP)、(23C)免疫荧光、或(23D)免疫组织化学分析。针对小鼠p53的多克隆抗体CM5用于在免疫沉淀研究中的I.B.。R246S突变型MEF来自敲入不同的热点突变体的小鼠品系。

[0601] 图24.抗R175H p53抗体克隆4H5、7B9和10C8的轻链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0602] 图25.抗R175H p53抗体克隆4H5、7B9和10C8的重链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0603] 图26.表格总结了抗R175H p53抗体克隆4H5、7B9和10C8的轻链和重链CDR,并示出了共有序列。

[0604] 图27.抗R175H p53抗体克隆4H5、7B9和10C8的重链和轻链可变结构域序列的核苷酸和编码的氨基酸序列。

[0605] 图28.抗R248Q p53抗体克隆3G11和4H2的轻链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0606] 图29.抗R248Q p53抗体克隆3G11和4H2的重链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0607] 图30.表格总结了抗R248Q p53抗体克隆3G11和4H2的轻链和重链CDR,并示出了共有序列。

[0608] 图31.抗R248Q p53抗体克隆3G11和4H2的重链和轻链可变结构域序列的核苷酸和编码的氨基酸序列。

[0609] 图32.抗R273H p53抗体克隆13E4的轻链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0610] 图33.抗R273H p53抗体克隆13E4的重链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0611] 图34.抗R273H p53抗体克隆13E4的重链和轻链可变结构域序列的核苷酸和编码的氨基酸序列。

[0612] 图35.显示了使用4H5、7B9和10C8杂交瘤细胞培养上清液从R172H小鼠胸腺淋巴瘤原代细胞系、T47D、WiDr和DKO细胞中提取物的免疫印迹结果的照片。

[0613] 图36A至36C.显示用来自克隆(36A)4H5、(36B)7B9和(36C)10C8的杂交瘤细胞培养物上清液与表达和不表达R175H突变体p53蛋白的细胞的免疫荧光分析结果的照片。

[0614] 图37.显示使用来自克隆4H5、7B9和10C8的杂交瘤细胞培养上清液分析小鼠肠组织切片(p53敲除或辐射,p53 R172H阳性)的结果的照片。

[0615] 图38.显示XenoLight CF750共轭4H5mAb靶向肿瘤的照片。在静脉注射100ug XenoLight CF750标记的4H5mAb后第6、24、48、72小时和第7天对小鼠通过IVIS成像。用荧光素酶基因转染源自P53^{R172H/R172H}小鼠的小鼠肿瘤细胞,并用于建立肿瘤模型。

[0616] 图39.显示使用3G11和4H2杂交瘤细胞培养上清液从TKO和HCC70细胞中提取物的免疫印迹结果的照片。

[0617] 图40A和40B.显示表达R248Q p53的细胞和不表达R248Q p53的细胞与来自克隆

(40A) 3G11 (40B) 4H2的杂交瘤细胞培养上清液的免疫荧光分析结果的照片。

[0618] 图41. 显示使用13E4杂交瘤细胞培养上清液对T47D和MB468细胞的提取物的免疫印迹结果的照片。

[0619] 图42. 显示表达R273H p53的细胞 (WiDr) 和不表达R273H p53的细胞 (T47D) 与来自克隆13E4的杂交瘤细胞培养上清液的免疫荧光分析结果的照片。

[0620] 图43. 显示由XenoLight CF750共轭13E4mAb肿瘤靶向的照片。在静脉内注射100ug XenoLight CF750标记的13E4mAb72小时后对小鼠通过IVIS成像。将用荧光素酶基因转染的p53-R273H突变体HT29肿瘤细胞系用于建立肿瘤模型。

[0621] 图44. 显示使用纯化的小鼠FV-人IgG1嵌合的4H5、7B9和10C8抗体对小鼠肠组织切片 (p53敲除或辐射, p53 R172H阳性) 的分析结果的照片。

[0622] 图45. 显示抗R175H抗体在体内控制R175H阳性癌症的生长的分析结果的图表。携带荧光素酶的SKBR-3细胞用于建立人异种移植癌模型, 并且将用抗R175H抗体 (a175; 虚线) 治疗对肿瘤生长的影响与IgG对照 (IgG, 实线) 进行比较。

[0623] 图46A至46E. 注射有对应于p53的 (46A和46B) R175H、(46C和46D) R273H或 (46E和46F) R248Q突变体的免疫原的小鼠对对应于p53突变体或野生型人p53的肽的抗体响应的ELISA分析的结果的图表。从免疫的小鼠的血清进行分析, 分析能够与对应于p53的突变体 (46A) R175H、(46C) R273H、或 (46E) R248Q和全长野生型人p53 (WT HP53; 46B, 46D和46E) 的肽结合的抗体。

[0624] 图47A至47C. 显示响应于用p53的对应于 (47A) R175H、(47B) R248Q或 (47C) R273H突变体的免疫原的抗原接种反应而产生的抗原的能力, 以识别表达对应于突变型p53多肽的细胞的免疫荧光分析的结果。

[0625] 图48. 显示抗R175H抗体对SKBR细胞生长的影响的图表。给小鼠注射 5×10^6 SKBR荧光素酶报告细胞, 并用100 μ l对R175H突变体p53 (a175) 或同种型对照抗体 (IgG) 特异的单克隆抗体定期注射 (用箭头表示注射)。通过荧光素酶活性的分析测定SKBR细胞生长。

[0626] 图49. 小鼠人嵌合抗R175H p53抗体克隆MH 4H5、MH 7B9和MH 10C8的轻链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0627] 图50. 小鼠人嵌合抗R175H p53抗体克隆MH 4H5、MH 7B9和MH 10C8的重链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0628] 图51. 小鼠人嵌合抗R175H p53抗体克隆MH 4H5、MH 7B9和MH 10C8的轻链可变结构域序列的核苷酸和编码的氨基酸序列。

[0629] 图52. 小鼠人嵌合抗R175H p53抗体克隆MH 4H5、MH 7B9和MH 10C8的重链可变结构域序列的核苷酸和编码的氨基酸序列。

[0630] 图53. 小鼠人嵌合抗R273H p53抗体克隆MH 13E4的轻链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0631] 图54. 小鼠人嵌合抗R273H p53抗体克隆MH 13E4的重链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0632] 图55. 鼠人嵌合抗R273H p53抗体克隆MH 13E4的轻链可变结构域序列的核苷酸和编码的氨基酸序列。

[0633] 图56. 小鼠人嵌合抗R273H p53抗体克隆MH 13E4的重链可变结构域序列的核苷酸

和编码的氨基酸序列。

[0634] 图57. 小鼠人嵌合抗R248Q p53抗体克隆MH 3G11和MH 4H2的轻链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0635] 图58. 小鼠人嵌合抗R248Q p53抗体克隆MH 3G11和MH 4H2的重链可变结构域序列。CDR加下划线并单独显示。

[0636] 图59. 小鼠人嵌合抗R248Q p53抗体克隆MH 3G11和MH 4H2的轻链可变结构域序列的核苷酸和编码的氨基酸序列。

[0637] 图60. 小鼠人嵌合抗R248Q p53抗体克隆MH 3G11和MH 4H2的重链可变结构域序列的核苷酸和编码的氨基酸序列。

[0638] 图61. 条形图显示ELISA分析的结果,证实嵌合小鼠人抗体克隆MH 4H5、MH 7B9和MH 10C8与R175H p53的特异性结合。平均OD450读数被绘制出。嵌合抗p53 R175H抗体(MH 4H5、MH 7B9、MH 10C8)抗体产生0.1和1ng/μl浓度之间的阳性信号。该图中显示的数据是1ng/μl抗体浓度。所有嵌合抗p53 R175H抗体仅特异性识别和检测人p53 R175H全长蛋白而不是人p53 R273H全长蛋白、人p53野生型全长蛋白或小鼠p53野生型全长蛋白(单个星号)。商业抗p53抗体(1c12)被包括以作为阳性对照抗体。(n=3)。

[0639] 图62. 显示嵌合小鼠人抗体克隆MH 4H5、MH 7B9和MH 10C8与R175H p53的特异性结合的Western印迹结果。人细胞系:H1299 (p53缺失)、MCF7、A549 (两种野生型p53)、SKBR3 (p53 R175H)、A431和SW480 (两种p53 R273H) 在此实验中被测试。所有嵌合抗p53 R175H抗体仅识别和检测内源性人p53 R175H蛋白(SKBR3)而非人p53 R273H或人p53野生型蛋白(黑色箭头)。以1ng/μl浓度测试所有抗体。

[0640] 图63. 显示用MH 7B9检测人细胞系中的内源p53蛋白的代表性图像。将细胞固定在4%多聚甲醛中,然后包埋在石蜡中。使用以下人细胞系进行免疫组织化学测定:H1299 (p53缺失)、MCF7 (野生型p53)、SKBR3 (p53 R175H) 和A431 (p53 R273H)。照片显示用1.67ng/μl的MH 7B9抗体对所有细胞系的染色。所有嵌合抗p53 R175H抗体仅特异性识别并染色表达内源性人p53 R175H蛋白的细胞核(SKBR3 (左上图))。

[0641] 图64. 显示ELISA分析结果的条形图,证实嵌合小鼠人抗体克隆MH 13E4与R273H p53的特异性结合。平均OD450读数被绘制出。该图中显示的数据是1ng/μl抗体浓度。MH 13E4仅特异性识别并检测到人p53 R273H全长蛋白而不是人p53 R175H全长或人p53野生型全长蛋白(单个星号)。

[0642] 图65. 显示嵌合小鼠人抗体克隆MH 13E4与R273H p53的特异性结合的Western印迹结果。人细胞系:H1299 (p53缺失)、MCF7、A549 (两种野生型p53)、SKBR3 (p53 R175H)、A431 和SW480 (两种p53 R273H) 在此实验中被测试。MH 13E4仅特异性识别和检测内源性人p53 R273H蛋白(A431和SW480)而非人p53 R175H或人p53野生型蛋白(黑色箭头)。以1ng/μl浓度测试MH 13E4。

[0643] 图66. 显示用MH 13E4检测人细胞系中的内源p53蛋白的代表性图像。将细胞固定在4%多聚甲醛中,然后包埋在石蜡中。使用以下人细胞系进行免疫组织化学测定:H1299 (p53缺失)、MCF7 (野生型p53)、SKBR3 (p53 R175H) 和A431 (p53 R273H)。照片显示用5ng/μl的MH 13E4抗体对所有细胞系的染色。MH 13E4抗体仅特异性识别并染色表达内源性人p53 R175H蛋白的细胞核(A431 (右上图))。

[0644] 图67. 显示ELISA分析结果的条形图,证实嵌合小鼠人抗体克隆MH 3G11和MH 4H2与R248Q p53的特异性结合。平均OD450读数被绘制出。嵌合抗p53R248Q抗体以1ng/μl的浓度使用,而3G11和4H2杂交瘤上清液以纯净浓度进行测试。MH 3G11和MH 4H2均仅特异性识别和检测人p53 R248Q全长蛋白,而非人p53 R175H全长、人p53 R273H全长、人p53野生型全长和小鼠p53野生型全长蛋白(单个星号)。杂交瘤上清液和商业抗p53抗体(1C12)被包括以作为阳性对照抗体。(n=3)。

[0645] 图68. 显示用MH 13E4在体内检测到R273H突变体p53的图像。在p53^{R273H}突变体HT29荷瘤小鼠的静脉内注射100μg荧光标记的R273H特异性mAb MH 13E4或IgG对照抗体。在抗体注射后72小时,通过IVIS Spectrum体内成像系统对小鼠的mAb的运输情况进行成像。

[0646] 图69. 显示用MH 4H5和MH 7B9在体内检测到R175H突变体p53的图像。在p53^{R175H}克隆32荷瘤小鼠的静脉内注射100μg荧光标记的R175H特异性mAb、MH 4H5或MH 7B9或IgG对照。在抗体注射后6小时、24小时、第2天、第3天和第7天,通过IVIS Spectrum体内成像系统对小鼠的mAb的运输情况进行成像。生物发光指示克隆32肿瘤的位置。

[0647] 图70. 显示用MH 4H5检测到体内自发产生的鼠R172H突变体p53的图像。向携带肿瘤突变体p53^{R172H}小鼠静脉内注射100μg荧光标记的R175H特异性mAb MH 4H5。在注射抗体后第2天和第3天,通过IVIS Spectrum体内成像系统对小鼠成像。

[0648] 图71A和71B. 通过用mAb 13E4处理显示抑制HT29异种移植肿瘤生长的示意图和图像。(71A) 实验时间表的示意图。(71B) 显示通过测量平均光子强度确定的肿瘤大小的图像。

[0649] 图72A至72D. 显示通过用mAb 13E4处理抑制HT29异种移植肿瘤生长的示意图、条形图、图像和图表。(72A) 实验时间表的示意图。(72B) 显示实验结束时肿瘤质量的条形图。(72C和72D) 显示通过测量平均光子强度确定的肿瘤大小的图像和图表。

[0650] 图73A和73B. 显示针对鼠p53 R172H阳性癌症的抗p53突变体R175抗体的治疗效果的示意图和条形图。(74A) 实验时间表的示意图。(74B) 显示实验结束时肿瘤质量的条形图。

[0651] 图74A至74F. 显示TrxR175H免疫接种能够产生能够结合突变体p53 R175蛋白的抗体的能力示意图、图表、图像和条形图。(74A) 实验时间表的示意图。(74B) 显示通过ELISA测定的来自免疫小鼠的血清与指定抗原的结合能力的图表。(74C和74D) 显示来自免疫小鼠的血清结合表达p53突变体R175H的细胞(74C) 而不是p53阴性TKO细胞(74D) 的能力。(74E) 显示从用TrxR175H免疫的小鼠获得的血清的p53突变体R175H反应性的图像。(74F) 显示通过流式细胞术测定的用指定抗原免疫的小鼠的脾细胞中不同免疫细胞亚群的百分比的条形图。

实施例

[0652] 发明人在以下实施例中描述了针对P53的DBD区域点突变体的单克隆抗体的制备和表征。抗体显示对个体p53热点突变具有高度特异性,并且证明了抗体在各种生物化学和组织学测定中的效用。

[0653] 实施例1:免疫原的设计和制备

[0654] 使用大量方案产生针对特定p53突变体的抗体的尝试尚未完全成功,因为可能缺乏突变表位的有效表达,导致对突变型p53多肽缺乏特异性。

[0655] 因此,本发明人利用具有突出结构的TrxA蛋白,其中具有突变体p53突变的三个拷

贝(即R175H、R248Q或R273H),其具有侧接突变的长度可变的氨基酸序列。将突变型p53多肽氨基酸序列插入具有将抗原序列和TrxA序列分开的柔性Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:236)侧翼接头的TrxA的活性位点。还在每个突变体p53序列之间插入较短的Gly-Ser-Gly接头。

[0656] TrxA是大肠杆菌表达系统中广泛使用的融合伴侣,用于增强蛋白质表达水平、溶解度和热稳定性,其中活性位点(Cys33-Gly34-Pro35-Cys36)(SEQ ID NO:91)从蛋白质结构突出,伸入溶液中(LaVallie等,2000Methods Enzymol 326:322-340; Young等,2012Biotechnol.J.7:620-634)。在编码该活性位点的DNA序列上存在限制性(RsrII)位点为内部肽融合提供了插入点,其可以存在于TrxA的表面上,并且已经通过将抗原插入TrxA支架上的溶剂可接近环内而成功地用于产生抗体。(Barre11等,2004Protein Expr.Purif.33:153-159)。

[0657] 携带克隆到pJexpress404载体中的突变体p53(R175H、R273H和R248Q)三肽序列的TrxA支架获自DNA2.0(Menlo Park, CA, USA)。编码序列设计具有C末端His6标签,以通过固定化金属亲和层析(IMAC)和使用大肠杆菌中优选密码子,以促进蛋白质纯化。通过DNA测序验证合成编码片段的正确性。

[0658] 用于产生抗体的免疫原的氨基酸序列示于图1A至1C中。

[0659] 同源性建模预测将突变型p53抗原序列插入TrxA支架的活性位点提供了一种可行的呈递策略,以增加肽序列的免疫原性,其中突变型p53抗原序列延伸远离TrxA蛋白,突变的残基暴露在溶剂可接近环中。显示了瑞士模型预测的TrxR175H、TrxR248Q和TrxR273H免疫原的3D结构(图2A至2C),揭示了暴露的、溶剂可接近的突变型p53抗原区域。

[0660] 使用大肠杆菌宿主菌株BL21(DE3)trxB(Novagen, Merck Millipore, 达姆施塔特, 德国)表达重组Trxp53突变体构建体。用于测定蛋白质溶解度的小规模表达研究如Liew等, 2014Biochimie 89, 21-29所述进行。对于大规模纯化, 分别通过天然和变性IMAC回收可回收的可溶性和不溶性肽, 其在柱上重折叠, 并收集于磷酸盐缓冲液中, 如Liew等, 2014所述。使用BCA测定法(Pierce, Rockford, IL, USA)进行蛋白质定量, 并通过SDS-PAGE分析评估纯度。

[0661] 在大肠杆菌中诱导TrxR175H免疫原的表达, 并且预期TrxR175H为~18.8kDa, 其以可溶形式和不溶形式表达(图3A), 其中较高部分被划分为不溶性级分。纯化的TrxR175H的质谱分析显示实际分子量为约18,700Da, 其与缺失第一个甲硫氨酸残基的情况一致(计算质量~18,707Da)(图4A)。先前的报道显示, 在其氨基酸序列的第二位含有Ser残基的TrxA融合蛋白允许第一个甲硫氨酸(131Da)的有效切割, 所述切割可能是由大肠杆菌中的内源性甲硫氨酸氨肽酶完成的(Liew等, 2007)。类似地, TrxR273H主要在不溶性级分的包涵体中表达, 预期大小为~18,200Da(图3C)。发现TrxR248Q被分至不溶性蛋白质级分, 并在SDS-PAGE上意外地向的较低分子量15kDa位置迁移(图3B), 并且质谱分析显示质量为17,352Da(图4B)。通过DNA测序验证构建体的编码序列, 并且可以通过固定化金属亲和层析(IMAC)纯化表达的蛋白质, 这表明位于TrxR248W的羧基末端的His6标签是完整的并且全长蛋白质被翻译, 并且表明较低分子量可能是大肠杆菌蛋白酶意外蛋白水解切割的结果, 如已经证实的(Carrio等, 1999Biochim.Biophys.Acta 1434, 170-176; Corchero等, 1997Biochem.Biophys.Res.Commun.237, 325-330), 其在N末端的Ala202的下游, 并且对应于166残基的蛋白

质部分及其钠盐形式(17,324/17,347Da)。无论如何,大肠杆菌蛋白酶的意外水解突出了将抗原序列嵌套在TrxA内而不是融合蛋白的末端区域的明显优势。

[0662] 实施例2:鉴定针对特定p53突变体的p53单克隆抗体的初步筛选

[0663] 用Trxp53突变体肽接种三组(每组五只)8周龄Balb/c雌性小鼠(生物资源中心,新加坡)。用Sigma佐剂系统(Sigma)腹膜内进行第一次免疫,然后以3周的间隔进行五次腹膜内和皮下注射。在第四次免疫后一周,使用刺血针(MEDIpoint国际公司)通过颊部采血从每只小鼠取血。将血液样品以1600rpm离心10分钟并吸出血清并在4℃下储存,用于随后针对全长R175H、R273H和R248Q突变型p53蛋白作酶联免疫吸附测定(ELISA)分析。

[0664] 选择具有最高血清抗体滴度的小鼠作为融合的脾供体。被选择的小鼠(每个p53突变一只)最终接受一次增强的注射,其通过静脉内注射不含佐剂的Trxp53突变体肽。小鼠骨髓瘤SP2/0细胞系被用作融合伴侣。融合前一周,将细胞在RPMI(Gibco)和10%FBS中培养,直至它们在对数期达到>70%的融合。在无菌条件下取出免疫小鼠的脾细胞。根据制造商的方案,使用ClonaCell-HY杂交瘤克隆试剂盒(STEMCELL科技公司)进行杂交瘤细胞的生成、选择和克隆。

[0665] 分别用含R175H、R273H和R248Q突变的重组全长p53蛋白包被的96孔板通过ELISA选择分泌抗突变体p53mAb的杂交瘤克隆。硫氧还蛋白肽被用作阴性对照。

[0666] 在ELISA板上测试从单个杂交瘤孔收集的上清液。使用10%胎牛血清(FCS)进行封闭和抗体稀释。含有0.05%吐温20的PBS被用于洗涤。洗涤后,使用1:5000缀合有HRP(Biorad)的羊抗鼠IgG在含有10%FCS的PBST中检测IgG。平板用1×TMB ELISA底物溶液(Sigma)进行显色。用EnVision读板器(Perkin Elmer)在650nm处测量吸光度。

[0667] 针对每个突变,呈现来自至少三只独立小鼠的数据。使用突变型或野生型p53蛋白或突变型p53肽片段的初始ELISA筛选显示,对于识别突变型p53的产生抗体的每个杂交瘤,所述抗体对各突变具有特异性并且不与野生型p53蛋白交叉反应(图5A-5C)。与肽片段相比,抗体对整个突变型p53蛋白更敏感。

[0668] 进一步证实特异性而使用所有肽和突变蛋白进行的进一步分析也表明,产生针对R175H突变型p53的单克隆抗体的三个杂交瘤克隆是高度特异性的(克隆7B9、10C8和4H5),并且不与R248Q或R273H突变体蛋白和肽交叉反应(图6A)。用针对R248Q(克隆4H2和3G11)和R273H(克隆13E4)的克隆获得了类似的结果(图6B和6C)。

[0669] 为了确定各个杂交瘤克隆靶向的表位,使用针对三种p53突变体的抗体进行肽噬菌体展示分析。

[0670] 使用在pIII外壳蛋白的NH2末端编码随机12-聚体肽(2.7×10^9 个序列)的M13噬菌体文库(新英格兰生物实验室)。将50nm纯化的抗体包被在96孔maxisorp板(Nunc)上。将孔在封闭缓冲液(PBS,0.5%吐温20,2%BSA)中在室温下孵育1小时,用洗涤缓冲液(PBS,1%吐温20,2%BSA)洗涤,并在室温下与 4×10^{10} 噬菌体用洗涤缓冲液孵育。用0.2M甘氨酸(pH 2.2)洗脱结合的噬菌体,并用1M Tris(pH9.1)中和。根据制造商的说明扩增洗脱的噬菌体。

[0671] 选择步骤重复三个循环。选择来自最后一轮的噬菌体噬菌斑,如制造商所述进行扩增并测序。展示于所选噬菌体上的肽是从DNA测序结果的分析中推导出的。通过使用Clustal Omega多序列比对工具从肽序列的比对确定共有序列,获得各个抗体靶向的表位。

[0672] 对于针对R175H突变型p53的杂交瘤,共有序列为“HCPHH”,其中第一个组氨酸是替

代野生型p53中精氨酸残基的突变(图7A)。来自所有针对R175H突变体p53的杂交瘤的几乎所有克隆都捕获了该序列(图8A)。对于克隆3G11,R248Q抗体克隆的共有序列是“SV...HY”(第215-216位和第233-234位;图8A),对于克隆4H2,共有序列是“RP”(第249-250位;图7B)。抗R273H克隆13E4的共有序列是“VH”(第272-273位;图7C)。

[0673] 为了确定表位的关键氨基酸,化学合成了两组分别丙氨酸取代的13氨基酸肽并从Bio Basic公司获得,分别对应于R175H突变型p53蛋白的Met169至Arg181(MTEVVRHCPHHER)和R273H突变型p53蛋白的Arg267至Gly 279(RNSFEVHVCACP)。将肽与N末端生物素缀合,并在96孔链霉抗生物素蛋白包被的ELISA板(Pierce, Thermo Scientific)上以10ug/ml单独温育1小时。洗涤三轮后,将板分别用抗R175H 10C8、4H5和7B9和抗R273H 13E4以1ug/ml在4℃温育过夜。在洗涤后,将板在37℃下与二抗小鼠IgG-HRP温育1小时。温育后,将板洗涤三次,然后施加可溶性HRP底物5分钟,用Envision读板仪(Perkin Elmer)测定650nm处的吸收值。

[0674] 丙氨酸扫描R175H抗体克隆4H5、7B9和10C8的结果显示于图9A-9C中,R273H抗体克隆13E4的结果显示在图9D中。如果p53肽序列中的突变不支持测试mAb的反应性但支持其他抗体的反应性,那么它们被鉴定为对mAb表位至关重要。

[0675] 给BALB/c小鼠单次0.25mL腹膜内(IP)注射不完全弗氏佐剂(Sigma Chemical公司)。14天后,给小鼠注射单次IP注射 4×10^5 的体积为0.5mL的杂交瘤细胞,然后每天通过检查它们是否腹胀确定腹水的发展。在注射杂交瘤细胞后7至10天,将小鼠麻醉并通过腹部穿刺术用18-22号针头通过重力流动无菌离心管从麻醉的小鼠无菌收集腹水。将手指压力轻轻地施加到腹部,并根据需要改变小鼠的位置以便于移除腹水。对每个笼子的小鼠收集腹水。根据制造商的说明书,使用小鼠mAb同种型试剂盒(Roche)从杂交瘤上清液中测定抗体克隆的同种型。腹水以1:10的比例用PBS稀释,IgG通过蛋白G柱层析(GE医疗)纯化。通过5ml含有0.2M Tris-甘氨酸pH2.7的洗脱缓冲液从柱上洗脱抗体。洗脱的级分用0.05mM PBS, pH7.4透析。在还原条件下通过SDS-PAGE确认纯化的抗体。

[0676] 实施例3:通过生物化学方法评估mAb针对特定p53热点突变体的特异性

[0677] 通过评估p53热点突变体特异性抗体在免疫印迹测定中的有效性,首次尝试确定其特异性。将用六种常见热点p53突变(R175H、R245S、R248Q和R248W、R249S、R273H和R282W)稳定表达或瞬时转染的p53缺失H1299细胞用于初始分析。

[0678] 将50μg细胞裂解物加载到4-12% Bis-Tris SDS聚丙烯酰胺预制凝胶(Invitrogen)的每个孔中。使用的蛋白质标记物是Precision Plus Protein™ Standards Dual Colour

[0679] (伯乐公司,赫拉克勒斯,加拿大)。SDS-PAGE凝胶在60伏(V)的恒定电压下运行直至蛋白质条带超过浓缩胶,之后凝胶在100V连续运行直至染料前沿到达底部。对于免疫印迹,在iBlot™干转系统(Invitrogen)上进行电压20-25V 10分钟的蛋白质转膜至硝酸纤维素膜上。用PBST(含有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲盐水(PBS)(伯乐公司,赫拉克勒斯,加拿大)将膜洗涤三次,每次10分钟,在PBST缓冲液中使用4%脱脂牛奶封闭非特异性结合1小时,同时轻轻搅拌。随后,用PBST将膜洗涤三次,每次10分钟。在加入杂交瘤上清液之前,除去洗涤步骤后过量的PBST。将一抗在4℃温和搅拌下孵育过夜。将膜用PBST洗涤三次,每次10分钟,以去除未结合的一抗。使用含10%FCS的PBST中的1:5000缀合HRP的羊抗小鼠IgG

(伯乐公司)进行检测。将二抗在室温下温和搅拌孵育1小时。在使用Clarity western印迹ECL底物(伯乐公司)显色之前,以上述方式洗掉未结合的二抗。使用Odyssey Fc (Licor)进行光密度分析。

[0680] 所有三种突变体特异性抗体都能够检测出其在H1299细胞中表达的相应突变型p53蛋白,而检测不出大量表达的其他突变型或野生型p53,如使用pan-p53抗体D01所确定的(图11)。

[0681] 特别重要的是,发现抗R248Q抗体不能检测到密切相关的R248W突变体,其在相同残基处包含不同的突变,显示了抗体非常高的特异性。

[0682] 还使用p53突变体特异性抗体进行免疫沉淀分析,然后用抗p53兔抗体CM1检测,这再次显示抗体特异性地仅结合各自的突变蛋白(图12)。用CM1抗体进行反向免疫沉淀,然后用突变体特异性抗体进行免疫印迹也得到类似的结果,具有极高的特异性(图12)。

[0683] 发明人接下来确定了这些mAb在表达野生型蛋白质或各种热点突变体的大量人肿瘤细胞系中识别内源性p53的能力(图13)。用突变特异性mAb直接免疫印迹能够仅检测肿瘤细胞系中各自的突变体p53蛋白,尽管所有细胞系都表达了大量的各种突变体p53,或通过D01抗体检测到的通过紫外线照射诱导的野生型p53(图14),证实了抗体的特异性。

[0684] 内源蛋白的免疫沉淀表明R175H特异性抗体具有相同的趋势(图15,左图)。当用pan-p53CM1抗体进行初次免疫沉淀后,R248Q和R273H抗体在用于免疫印迹检测时也能够特异性地检测它们各自的突变蛋白(图15,中图和右图)。然而,当直接用于免疫沉淀,然后用CM1进行免疫检测时,这两种抗体也检测到一些其他p53突变体,可能是由于在测试条件下的非特异性结合。尽管如此,直接免疫印迹和用pan-p53抗体免疫沉淀的高水平特异性突出了这些抗体对其各自突变体p53抗原的特异性。

[0685] 实施例4:免疫荧光分析中mAb针对特定p53热点突变体的特异性

[0686] 为了通过免疫荧光染色测试突变体特异性抗体的特异性,本发明人再次使用过表达野生型p53或各种p53突变体的H1299细胞,或表达内源突变体p53蛋白的肿瘤细胞系。

[0687] 96孔板上的固定的转染细胞用0.4% Triton X-100透化持续20分钟。用PBS冲洗后,用5% BSA的PBSTritonX (PBSTX) 封闭细胞20分钟,然后在杂交瘤上清液中于4℃温育过夜。使用1:1000缀合山羊Alexaflor 488的驴抗小鼠IgG (生物技术公司-Life technologies) 在含有1% BSA的PBSTX中检测。然后,用DAPI对细胞进行复染色,并用Incell分析仪(GE医疗) 观察。

[0688] 用突变特异性抗体观察到明显的核染色模式,其仅检测到它们各自的突变蛋白的过表达(图16)或在肿瘤细胞系中检测到内源状态(图17A和17B),尽管所有细胞表达各种通过用D01或CM1抗体染色测定的p53大量形式。

[0689] 如通过免疫印迹和免疫沉淀分析所观察到的,针对R248Q突变体的抗体极其特异,并且不能检测相关的R248W突变蛋白(图17B)。

[0690] 实施例5:使用针对特定p53热点突变体的mAb通过免疫组织化学分析人肿瘤样品

[0691] 为了确定p53突变体特异性抗体在石蜡包埋组织中的有效性,本发明人通过免疫组织化学(IHC) 分析分析了大量人肿瘤样品。首先,使用突变体特异性抗体检查通过DNA测序(图18A) 证实的具有已知p53突变的一系列肿瘤样品。

[0692] 来自具有p53 R273H基因型的HT29异种移植小鼠模型的小鼠肿瘤切片和由

p53R172H突变细胞系产生的肿瘤切片由分子和细胞生物学研究所的高级分子病理学实验室(AMPL)加工成石蜡块。然后将5μm的蜡切片嵌入载玻片(Leica生物系统)上并在50℃热板上干燥1小时。将切片在二甲苯(ChemTech贸易公司)中脱石蜡,并通过百分比下降的乙醇(ChemTech贸易公司)再水化于水中。用标靶恢复液pH9(Dako)加热组织切片用于抗原暴露,然后在PBS中漂洗。用含有2% (v/v) 过氧化氢(Merck) 的PBS封闭内源性过氧化物酶30分钟,用PBS冲洗。用含有10% (v/v) 山羊血清(Dako) 的PBS封闭切片1小时,然后与生物素化的一抗克隆在4℃下孵育过夜。将切片用水洗涤,然后在PBS中漂洗,然后用链霉抗生物素蛋白-HRP抗体(BioLegend)检测。然后使用3,3-二氨基联苯胺作为底物显现抗原-抗体相互作用,并且在脱水并镶嵌于Cytoseal 60合成树脂(Richard-Allan ScientificTM,Fisher Scientific)中之前用苏木精轻轻复染切片。使用AxioImager(蔡氏公司)光学显微镜在明视场下对载玻片成像,并用AxioVision Rel 4.8软件(卡尔蔡氏公司)分析。

[0693] 与免疫荧光分析的情况一样,三种突变体特异性抗体对p53中的相应突变样品染色,但不是具有野生型p53或其他突变的样品(图18B),证明了IHC实验的特异性。

[0694] 本发明人通过用这些抗体染色进一步评估了来自结肠、乳腺(三阴性)、肺、前列腺和肾肿瘤的几种肿瘤芯片。显示了适合于IHC染色的pan-p53抗体染色(D07)和R175H特异性抗体的代表性结果(图19)。出现三组样品:一组被D07和R175H mAb染色;一个只对D07阳性;最后一组对两种抗体均为阴性(图21)。D07染色的最高水平是在三阴性乳腺癌、肺癌和结肠癌组中,证实了先前的数据表明这些癌症具有更高的p53突变率(Olivier等,2004IARC Sci Publ 157:247-270),因此抗p53抗体染色呈阳性。在第一组中的R175H-mAb染色反映D07,表明两种抗体都识别该组中的相同细胞。对一些样品进行测序以确定p53突变状态,并发现所有被两种抗体染色的样品都携带R175H突变。相比之下,被D07染色的样本仅在p53的其他残基中具有突变但在R175上没有突变,并且对于两种抗体均为阴性的样品在p53中没有突变。

[0695] 将人三阴性乳腺癌样品B41、B89、B98、B27和B52用抗p53抗体D07、11D1或抗R175H抗体染色,用于通过免疫组织化学分析。包含R175H突变(CAG下划线)的肿瘤样品B41、B89和B98对所有三种抗体染色呈阳性(图20A)。不包含R175H突变(CGC-下划线)的肿瘤样品B27仅被抗p53抗体D07和11D1(而不是抗R175H抗体)染色,并且样品B52未被任何抗p53抗体染色(图20B)。

[0696] 这些数据共同表明这些突变体特异性抗体在石蜡包埋的临床样品中的特异性。

[0697] 实施例6:人p53突变体特异性抗体与等效小鼠突变体的有效性的比较

[0698] 最后,发明人研究了抗体是否能够检测相应的小鼠突变。对应于此处研究的三种突变的人序列在小鼠p53中高度同源(图22),并且R175残基周围的序列与等同的小鼠R172残基相似(Olive等,2004Cell 119,847-860)。因此,本发明人利用来自R172H小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF),其含有与人R175H等同的突变(Lang等,2004Cell 119,861-872),或具有等同于人R4249S的无关突变R246S的MEF(Lee等,2012Cancer Cell 22,751-764)。

[0699] 直接免疫印迹表明抗R175H抗体能够仅检测来自R172H MEF的突变体p53,但不能检测来自R246S或野生型MEF的突变体p53,尽管后者的细胞表达如pan-p53抗体CM5所确定的显著量的p53(图23A)。用R175H特异性抗体进行免疫沉淀,然后进行免疫印迹也证明抗体确实是特异性的并且可以检测小鼠R172H突变蛋白(图23B)。本发明人还通过免疫荧光(图23C)和IHC(图23D)分析测试了R175H特异性抗体的能力,其证实了其特异性,突出了这些抗

体在不同物种中的效用。

[0700] 用于IHC分析的免疫染色在福尔马林固定石蜡包埋(FFPE) 5 μ m切片上进行。使用Dako Tris/EDTA标靶恢复液pH9进行抗原恢复。用DAKO 10%山羊血清进行封闭。二抗是Dako EnvisionTM+/HRP。使用DAKO液体DAB+进行显影。使用具有40 \times 物镜的Zeiss AxioImager直立显微镜捕获图像。

[0701] 实施例7:单克隆抗突变型p53抗体

[0702] 7.1 R175H突变型p53抗体克隆4H5、7B9和10C8

[0703] 如实施例1中所述,通过用包含插入TrxA活性位点序列的三拷贝R175H p53突变的免疫原免疫小鼠来产生抗R175H p53小鼠单克隆抗体(参见图1A)。

[0704] 获得产生抗R175H p53小鼠单克隆抗体的杂交瘤克隆。测定了轻链和重链可变结构域序列的氨基酸序列,并显示于图24和25中。编码抗体的轻链和重链可变结构域序列的DNA序列显示在图27中。

[0705] 使用VBASE2预测CDR(Retter等,Nucleic Acids Research(2005) 33(数据库专辑):D671-674,在此引入作为参考。

[0706] 7.2 R248Q突变型p53抗体克隆3G11和4H2

[0707] 如实施例1中所述,通过用包含插入TrxA活性位点序列的三拷贝R248Q p53突变的免疫原免疫小鼠来产生抗R248Q p53小鼠单克隆抗体(参见图1B)。

[0708] 获得产生抗R248Q p53小鼠单克隆抗体的杂交瘤克隆。测定了轻链和重链可变结构域序列的氨基酸序列,并显示于图28和29中。编码抗体的轻链和重链可变结构域序列的DNA序列显示在图31中。

[0709] 如上使用VBASE2预测CDR。

[0710] 7.3 R273H突变体p53抗体克隆13E4

[0711] 如实施例1中所述,通过用包含插入TrxA活性位点序列的三拷贝R273H p53突变的免疫原免疫小鼠来产生抗R273H p53小鼠单克隆抗体(参见图1C)。

[0712] 获得产生抗R273H p53小鼠单克隆抗体的杂交瘤克隆。测定了轻链和重链可变结构域序列的氨基酸序列,并显示于图32和33中。编码抗体克隆13E4的轻链和重链可变结构域序列的DNA序列示于图34中。

[0713] 如上使用VBASE2预测CDR。

[0714] 实施例8:单克隆抗突变体p53抗体的表征

[0715] 8.1 R175H突变体p53抗体克隆4H5、7B9和10C8

[0716] 使用杂交瘤克隆4H5、7B9和10C8的细胞培养上清液对获自R172H小鼠胸腺淋巴瘤细胞系细胞、T47D细胞、WiDr细胞和DKO细胞的细胞提取物进行蛋白质印迹分析。结果如图35所示。来自每个克隆的抗体对R175H突变型p53具有特异性。

[0717] 利用表达R175H突变体p53的构建体转染的R172H小鼠胸腺淋巴瘤细胞系、TKO细胞、C6细胞、H1299细胞、T47D细胞和H1299细胞,使用杂交瘤克隆4H5、7B9和10C8的细胞培养上清液进行免疫荧光分析。结果显示在图36A至36C中。来自每个克隆的抗体对小鼠R172H突变体p53具有特异性。

[0718] 抗体4H5、7B9和10C8识别的表位在图10中的人R175H p53的背景下显示。

[0719] 使用杂交瘤克隆4H5、7B9和10C8的细胞培养上清液,通过免疫组织化学(IHC)分析

从p53敲除小鼠或经辐射的R172H p53阳性小鼠获得的小鼠肠组织切片,进一步研究抗体克隆识别R175H p53的能力。结果如图37所示。通过IHC,抗体能够检测小鼠肠组织切片中的R172H突变体p53。

[0720] 进一步分析抗体克隆4H5在体内目测观察和监测R175H阳性癌症的能力。用荧光素酶基因转染源自P53^{R172H/R172H}小鼠的小鼠肿瘤细胞,并用于建立肿瘤模型。给小鼠静脉内注射100 μ g的XenoLight CF750标记的抗R175H突变型p53抗体克隆4H5,并在注射后6小时、24小时、72小时和7天通过IVIS分析成像。实验结果如图38所示。该抗体被证明适合于体内目测观察和监测肿瘤。

[0721] 8.2 R248Q突变型p53抗体克隆3G11和4H2

[0722] 使用杂交瘤克隆3G11和4H2的细胞培养上清液对获自TKO细胞和具有R248Q突变的HCC70细胞的细胞提取物进行蛋白质印迹分析。结果如图39所示。该抗体对R248Q突变型p53具有特异性。

[0723] 对TKO细胞、HCC70细胞和OVCAR3细胞(其具有R248Q突变),使用杂交瘤克隆3G11和4H2的细胞培养上清液进行免疫荧光分析。结果显示在图40A和40B中。来自每个克隆的抗体对R248Q突变型p53具有特异性。

[0724] 通过肽噬菌体展示(图8B和7B)分析抗体克隆3G11和4H2识别的表位。抗体识别的表位在图10中的人R248Q p53的背景中显示。

[0725] 8.3 R273H突变型p53抗体克隆13E4

[0726] 使用杂交瘤克隆13E4的细胞培养上清液对获自T47D细胞和MB468细胞(其具有R273H突变)的细胞提取物进行蛋白质印迹分析。结果如图41所示。来自克隆13E4的抗体对R273H突变体p53具有特异性。

[0727] 对T47D细胞和表达R273H突变型p53的WiDr细胞,使用杂交瘤克隆13E4的细胞培养上清液进行免疫荧光分析。结果如图42所示。来自克隆13E4的抗体对R273H突变型p53具有特异性。

[0728] 13E4抗体识别的表位在图10中的人R273H p53的背景中显示。

[0729] 进一步分析抗体克隆13E4体内目测观察和监测R273H阳性癌症的能力。用荧光素酶基因转染p53-R273H突变体HT29肿瘤细胞系的细胞,并用于建立肿瘤模型。给小鼠静脉内注射100 μ g的XenoLight CF750标记的抗R273H突变型p53抗体克隆13E4,并在注射后72小时通过IVIS分析成像。实验结果如图43所示。该抗体被证明适合于体内目测观察和监测肿瘤。

[0730] 实施例9:嵌合小鼠Fv-人IgG1Fc抗突变型p53抗体

[0731] 制备小鼠Fv-人IgG1Fc嵌合形式的抗突变型p53抗体。

[0732] 将重链和轻链的可变区从亲本4H5、7B9、10C8、3G11、4H2和13E4小鼠单克隆抗体克隆克隆到各自含有人IgG1恒定区的pTT5载体中。

[0733] 将小鼠-人嵌合重链和轻链质粒以每一百万细胞1 μ g总质粒的量共转染到HEK293-6e细胞中,每 μ g质粒使用2 μ L 293-fectin转染试剂。收获含有分泌的嵌合抗体的培养物上清液,并在转染后4至6天使用G蛋白琼脂糖珠纯化。

[0734] 使用用1M Tris (pH9.0) 中和的0.1M甘氨酸-HCl (pH2.7) 将嵌合抗体从珠上洗脱,并透析到PBS中。

[0735] 确定嵌合抗体能够通过ELISA识别它们各自的突变体p53(测试浓度1ng/ μ L)。

[0736] 还通过IHC分析从经辐射的R172H p53阳性小鼠获得的小鼠肠组织切片,研究了小鼠-Fv-人IgG1Fc嵌合形式的抗R175H p53抗体克隆4H5、7B9和10C8识别R175H p53的能力。结果如图44所示。嵌合形式的抗体能够通过IHC检测小鼠肠组织切片中的R172H突变体p53。

[0737] 实施例10:抗p53突变体抗体在体内治疗癌症的能力的分析

[0738] 本发明人研究了单克隆抗突变体p53抗体在体内治疗癌症的能力。

[0739] 简而言之,给小鼠注射携带荧光素酶基因的 5×10^6 SKBR3细胞(人乳腺癌细胞)。SKBR3细胞携带p53中的R175H突变(参见例如图13)。荧光素酶基因通过检测荧光素酶活性允许体内监测肿瘤生长。小鼠注射SKBR-3细胞4天后,用100 μ l抗R175H抗体或100 μ l IgG抗体对照处理小鼠。每四天重复注射(如图45中的箭头所示)。在整个实验中通过测量荧光素酶发光监测肿瘤生长。结果显示于图45中,如通过与对照处理组相比降低的荧光素酶活性水平所证明,其显示用抗R175H抗体处理的小鼠中的抗癌作用。

[0740] 实施例11:分析免疫原用于产生对突变型p53多肽的免疫应答的能力

[0741] 本发明人还研究了实施例1中描述的免疫原用作疫苗的能力,用于刺激针对p53突变多肽的免疫应答。

[0742] 用免疫原免疫小鼠组,并通过ELISA分析多克隆抗体应答以确定免疫原是否可用作疫苗以触发抗体应答。

[0743] 结果显示在图46A-46E中。用不同突变型p53免疫原进行的免疫显示诱导抗体的产生,所述抗体对对应于相应p53突变体的肽具有高度特异性(图46A、46C和46E),并且显示与野生型人p53的最小相互作用(图46B、46D和46F)。这些结果表明突变型p53免疫原能够引发抗体反应,并且该免疫对各自的p53突变体具有特异性。

[0744] 发明人接下来研究了响应免疫原免疫产生的抗体是否能够识别突变型p53多肽。从注射了实施例1中描述的R175H、R248Q或R273H免疫原的小鼠获得血清,并分析通过免疫荧光分析识别突变型p53多肽的能力。结果显示于图47A-47C中,其证明响应于免疫原免疫的小鼠中产生的抗体能够识别相应的突变型p53多肽。

[0745] 实施例12:结论

[0746] 本发明人成功地产生了针对DBD区域中三种常见的p53热点突变-R175H、R248Q和R273H的p53突变体特异性抗体(Vikhanskaya等,Nucleic Acids Res (2007) 35:2093-2104)。对抗体进行了表征,并证明了它们在各种生物化学和组织学测定中的实用性,以及它们在体内治疗癌症的有用性。

[0747] 本发明人首次制备了能够特异性结合p53的单点突变体的抗体,其不与野生型p53交叉反应,所述抗体使用免疫原培养,其中通过提供多拷贝的含有突变的区域来增强抗原表达,并且通过使用TrxA作为融合伴侣,将其从蛋白质结构伸入到溶液中。该方法一致地引起针对几种p53突变体的mAb克隆的产生,其具有高特异性和选择性。

[0748] 本实验实施例证明了在p53中发现的三种最常见的热点突变,即R175H、R248Q和R273H的抗体的产生。针对这些突变体产生的mAb在免疫印迹、免疫沉淀、免疫荧光和免疫组织化学等多种技术中辨别预期抗原和其他突变或野生型p53蛋白的能力方面是特异性的。本发明人还证明了在体内人异种移植癌症小鼠模型中抑制包含相应p53突变的肿瘤细胞生长的能力。

[0749] 此外,抗体能够检测其他物种(如小鼠)中的相应突变,如R175H突变所证明的,因

此,鉴于跨物种的序列保守性,其应该适用于其他小鼠突变体(参见例如图22),从而被证明是基础研究的宝贵工具。

[0750] 突变体特异性抗体是有用的工具,用于剖析野生型和突变体p53蛋白在同一细胞甚至可能在单细胞水平中以及癌细胞的克隆进化过程中的单独和组合作用。

[0751] 突变体特异性mAb用于人类肿瘤样本的IHC分析的实用性强调了这些mAb在确定p53状态的病理分析中是非常有用的工具,其可以容易地实施并且与DNA测序技术相比具有显著的成本效益。

[0752] 在本实施例中使用的TrxA呈递系统将可用于制备具有临床实用性的针对p53中的其他突变的mAb,并且还可用于制备针对肿瘤抑制因子和癌基因中发现的其他突变的mAb。能够区分仅有单个氨基酸不同的蛋白质的单克隆抗体在临幊上可用作诊断和治疗剂。

[0753] 此外,本发明人已证明免疫原用于疫苗接种策略的有用性,证明了其诱导能够识别p53突变体的抗体应答的能力。

[0754] 在治疗中,这种突变体特异性抗体可能非常安全,因为它们在不携带突变的患者的正常细胞中不会产生任何副作用。预计此类抗体优于目前可获得的针对在疾病中过表达或失调的蛋白质的一般抗体。

[0755] 实施例13:突变体特异性抗p53抗体在体内对肿瘤生长的作用

[0756] 本发明人接下来研究了单克隆p53突变体特异性抗体的施用对体内癌细胞生长的影响。

[0757] 简而言之,SCID小鼠在其侧腹皮下注射 5×10^6 荧光素酶标记的SKBR细胞(其携带p53中的R175H突变-参见例如图13))。从第4天起,每4天静脉内注射100 μ l R175H突变型p53特异性单克隆抗体(a175)或同种型对照抗体(IgG)。通过测量荧光素酶活性监测肿瘤生长。

[0758] 实验结果如图48所示。在用对R175H突变体p53特异的单克隆抗体处理的小鼠中观察到强烈的抗癌作用。

[0759] 实施例14:小鼠-人嵌合抗p53突变体抗体的制备

[0760] 本发明人制备了嵌合小鼠-人类形式的抗R175H抗体克隆4H5、7B9和10C8、抗R273H抗体克隆13E4和抗R248Q抗体克隆3G11和4H2。

[0761] 将编码亲本小鼠单克隆抗体的可变重链和轻链的DNA从亲本小鼠单克隆抗体克隆到各自含有人恒定区的分离的pTT5载体中。将小鼠-人嵌合重链和轻链质粒以每 1×10^6 细胞1 μ g总质粒共转染到HEK293-6e细胞中,每微克质粒使用2 μ l 293-fectin转染试剂。

[0762] 转染后4-6天,收获含有分泌的小鼠-人嵌合抗体的细胞培养上清液,并使用G蛋白琼脂糖珠纯化抗体。使用用1M Tris (pH9.0) 中和的0.1M甘氨酸-HCl (pH2.7) 将嵌合小鼠-人抗体从珠上洗脱,并用PBS作透析。

[0763] 小鼠-人嵌合抗体包含小鼠Fv和人Fc。

[0764] 小鼠-人嵌合抗p53突变体R175H抗体克隆VL序列显示于图49和51中,VH序列显示于图50和52中。

[0765] 小鼠-人嵌合抗p53突变体R273H抗体克隆13E4VL序列显示于图53和55中,VH序列显示于图54和56中。

[0766] 小鼠-人嵌合抗p53突变体R248Q抗体克隆VL序列显示于图57和59中,VH序列显示于图58和60中。

- [0767] 实施例15:小鼠-人嵌合抗p53突变体抗体的表征
- [0768] 小鼠-人嵌合抗p53 R175H抗体
- [0769] 通过ELISA分析小鼠人嵌合抗p53 R175H抗体与R175H突变型p53的结合。
- [0770] 结果如图61所示。嵌合抗p53 R175H抗体 (MH 4H5、MH 7B9、MH 10C8) 产生0.1至1ng/μl浓度的阳性信号,仅与人p53 R175H全长蛋白,而非人p53R273H全长、人p53野生型全长,或小鼠p53野生型全长蛋白结合。包括商业抗p53抗体 (1C12) 作为阳性对照抗体。
- [0771] 还通过蛋白质印迹分析其结合,结果显示于图62中。通过蛋白质印迹检测人细胞系中变性的内源性p53 (抗体以1ng/μl的浓度使用) 证实了嵌合抗p53 R175H抗体 (MH 4H5、MH 7B9、MH 10C8) 的特异性。抗体仅检测到来自携带p53中的R175H突变的SKBR3细胞系的p53,而不是来自p53缺失的H1299细胞系、野生型p53细胞系MCF7和A549,或R273H细胞系A431和SW480的p53。
- [0772] 通过免疫组织化学分析结合固定在4%多聚甲醛中并包埋在石蜡中的不同癌细胞系,进一步分析抗体与R175H突变体p53特异性结合的能力。显示小鼠人嵌合抗p175H抗体仅染色SKBR3细胞。使用MH 7B9的分析的代表性图像显示于图63中。
- [0773] 小鼠-人嵌合抗p53 R273H抗体
- [0774] 通过ELISA分析小鼠人嵌合抗p53 R273H抗体13E4与R273H突变型p53的结合。
- [0775] 结果如图64所示。嵌合抗p53 R273H抗体MH13E4与人p53 R273H全长蛋白结合的能力远高于其与硫氧还蛋白、人p53 R175H全长和人p53野生型全长蛋白的结合。
- [0776] 还通过蛋白质印迹分析其结合,结果显示于图65中。通过蛋白质印迹检测人细胞系中变性的内源性p53 (抗体以1ng/μl的浓度使用) 证实了MH13E4的特异性,其仅检测到具有p53中R273H突变的A431和SW480细胞系的p53,而非来自p53缺失的H1299细胞系、野生型p53细胞系MCF7和A549,也不是R175H细胞系SKBR3的p53。
- [0777] 通过免疫组织化学分析结合固定在4%多聚甲醛中并包埋在石蜡中的不同癌细胞系,进一步分析抗体与R273H突变体p53特异性结合的能力。发现MH 13E4仅染色具有R273H突变的细胞 (即A431细胞) -参见图66。
- [0778] 小鼠-人嵌合抗p53 R248Q抗体
- [0779] 通过ELISA分析小鼠人嵌合抗p53 R248Q抗体与R248Q突变型p53的结合。在实验中使用抗体的终浓度为1ng/μl。
- [0780] 结果如图67所示。发现嵌合抗p53 R248Q抗体 (MH 3G11和MH 4H2) 与全长R248Q p53结合,而不与全长R175H或R273H p53或全长野生型人或小鼠p53结合。包括商业抗p53抗体 (1C12) 作为阳性对照抗体。
- [0781] 实施例16:抗p53突变体抗体作为体内肿瘤成像的诊断性抗体的评估
- [0782] 发明人接下来研究了抗p53突变体抗体是否可用于体内肿瘤成像。
- [0783] 简而言之,将100μg荧光标记的R273H特异性mAb MH 13E4 (或荧光标记的IgG对照) 静脉内注射到携带HT29肿瘤 (其中具有p53中的R273H突变) 的小鼠中。在抗体注射后72小时,使用IVIS Spectrum体内成像系统对小鼠的mAb的运输情况进行成像。
- [0784] 结果如图68所示。MH 13E4在裸鼠中特异性检测到R273H突变体p53阳性HT29异种移植肿瘤。
- [0785] 在另一个实验中,向携带R175H突变体p53-阳性克隆32肿瘤的小鼠静脉内注射100

μg 荧光标记的R175H特异性mAb MH 4H5或MH 7B9。在抗体注射后6小时和24小时以及第2、3和7天,使用IVIS Spectrum体内成像系统对小鼠的mAb的运输情况进行成像。克隆32细胞表达荧光素酶,因此可以通过检测荧光素酶活性来分析肿瘤细胞的位置。

[0786] 结果如图69所示。MH 4H5和MH 7B9抗体检测到R175H突变型p53并在肿瘤中保留长达7天。通过在与抗体相同的位置检测荧光素酶来证明抗体对肿瘤细胞的特异性。

[0787] 在进一步的实验中,研究了抗p53突变体R175H抗体是否能够检测到自发产生的R175H p53肿瘤。在小鼠p53中具有R172H突变的小鼠的静脉内注射100 μg 荧光标记的R175H特异性mAb MH 4H5。突变体p53^{R172H}小鼠对携带鼠p53中R172H突变的肿瘤的自发发展高度敏感。在抗体注射后第2天和第3天,使用IVIS Spectrum体内成像系统对小鼠的mAb的运输情况进行成像。

[0788] 结果如图70所示。MH 4H5能够检测自发发生的突变小鼠p53 R172H肿瘤。

[0789] 实施例17:抗p53突变体抗体在体内治疗癌症的评价

[0790] 本发明人接下来研究了抗p53突变体抗体是否可用作体内癌症的治疗。

[0791] 抗p53突变体R175H抗体

[0792] 在第一个实验中,在HT29-荧光素酶异种移植肿瘤模型中分析施用单克隆抗体13E4的治疗效果。简言之,在第0天,用 5×10^6 HT29-1uc细胞皮下接种裸Balb/c小鼠($n=3$),然后在第3、7、11、14、18和21天静脉内注射15mg/kg对照IgG或13E4mAb。在第28天分析小鼠。通过测量平均光子强度来确定肿瘤生长。

[0793] 治疗方案的示意图显示于图71A中。实验结果如图71B所示。与用IgG对照抗体处理的小鼠相比,用13E4mAb处理的小鼠显示出81.62%肿瘤大小的抑制。

[0794] 在第二个实验中,在HT29-荧光素酶异种移植肿瘤模型中分析施用单克隆抗体13E4的治疗效果。简而言之,在第0天,在每个侧腹上用 5×10^6 HT29-1uc细胞皮下接种裸Balb/c小鼠($n=3$),然后在第4、7、11、14、18、21、25、28、32和35天静脉内注射10mg/kg对照IgG或13E4mAb。在第7、14、21、28和35天分析小鼠。在通过表达荧光素酶的HT29肿瘤细胞的发光成像接种后每周测量肿瘤体积。在实验结束时,从小鼠切除肿瘤并记录肿瘤的质量。

[0795] 治疗方案的示意图示于图72A,实验结果显示于图72B、72C和72D中。与用IgG对照抗体处理的小鼠相比,用13E4mAb处理的小鼠显示出87.3%肿瘤大小的抑制,并且肿瘤质量比从用对照IgG处理的小鼠获得的肿瘤的重量小约2.5倍。图72D显示13E4对肿瘤生长的抑制随时间的变化。

[0796] 在进一步的实验中,分析了抗p53突变体R175H抗体4H5抑制自发发生的鼠p53突变体R172H阳性癌症生长的能力。简而言之,从p53^{R172H}突变小鼠产生小鼠肿瘤细胞系克隆32。在第0天,将 3×10^6 克隆32细胞注射到同系B6小鼠中,并且在第3、6、9、12、15、18、21和24天对小鼠静脉内注射100 μg 4H5、7B9(对R175H特异的mAb)、13E4(对R273H特异)和11D10(对人和小鼠p53都有反应)。在第25天处死小鼠用于分析和肿瘤测量。

[0797] 治疗方案的示意图示于图73A中,实验结果显示于图73B中。4H5(R175HmAb)处理的小鼠中肿瘤重量的平均值比对照IgG处理组中的肿瘤重量小75%。7B9(R175H mAb)、13E4(R273H mAb)、11D10(p53mAb)对同系小鼠肿瘤的重量没有显示出显著影响。

[0798] 实施例18:用于产生p53突变体抗体的免疫原作为候选疫苗的评估

[0799] 本发明人接下来研究了用于产生本发明的p53突变体特异性抗体的免疫原是否能

够接种受试者以抵御p53突变体癌症的发展。

[0800] 在第0、21、42、63和84天,向野生型BALB/C或B6小鼠和突变体p53^{R172H}小鼠注射TrxR175H蛋白(参见实施例1)。每次注射后7天收集血清,并通过ELISA、细胞染色和蛋白质印迹分析。用于ELISA分析的抗原是硫氧还蛋白(Trx)、Trx-R175H蛋白或全长R175H突变体p53蛋白。在第87天,将p53 R175H阳性肿瘤细胞注射到小鼠中。

[0801] 实验程序的示意图示于图74A中。ELISA分析的结果显示于图74B中,并显示在指定时间点(第一次和第二次免疫后)获得的血清与TrxR175H蛋白和全长R175H突变体p53蛋白反应。

[0802] 图74C和74D显示了SKBR3细胞(其含有R175H突变)和TK0细胞(p53缺失)与来自10只不同小鼠(M#1-M#10)的第一次和第二次取血获得的血清的染色结果。TrxR175H免疫小鼠血清中的抗体显示对表达p53^{R175H}的SKBR3细胞而不是p53敲除的TK0细胞的阳性染色。

[0803] 图74E显示了用针对来自SKBR3细胞的细胞裂解物的TrxR175H免疫小鼠的血清中抗p53^{R175H}抗体的反应性的蛋白质印迹分析结果。血清以1:1000稀释度使用。泳道A-E含有来自5只不同小鼠的血清,泳道F是含有抗体D01的阳性对照。结果显示,在第二次注射后,所有分析的小鼠都含有对全长R175H突变体p53蛋白特异的抗体。

[0804] 图74F显示用Trx、TrxR175H或PBS免疫后不同免疫细胞亚群的细胞水平分析结果。在第5次注射后第3天,处死小鼠并通过流式细胞术分析脾细胞。在p53^{R172H/R172H}突变小鼠中,与PBS相比,发现通过用TrxR175H或Trx免疫增加T细胞的百分比。

[0805] 总之,ELISA、细胞染色、蛋白质印迹和流式细胞术数据证明TrxR175H可以有效地引发对突变体R175H p53的T细胞和B细胞反应。

R175H

图 1A

R248Q

图1B

R273H

图1C

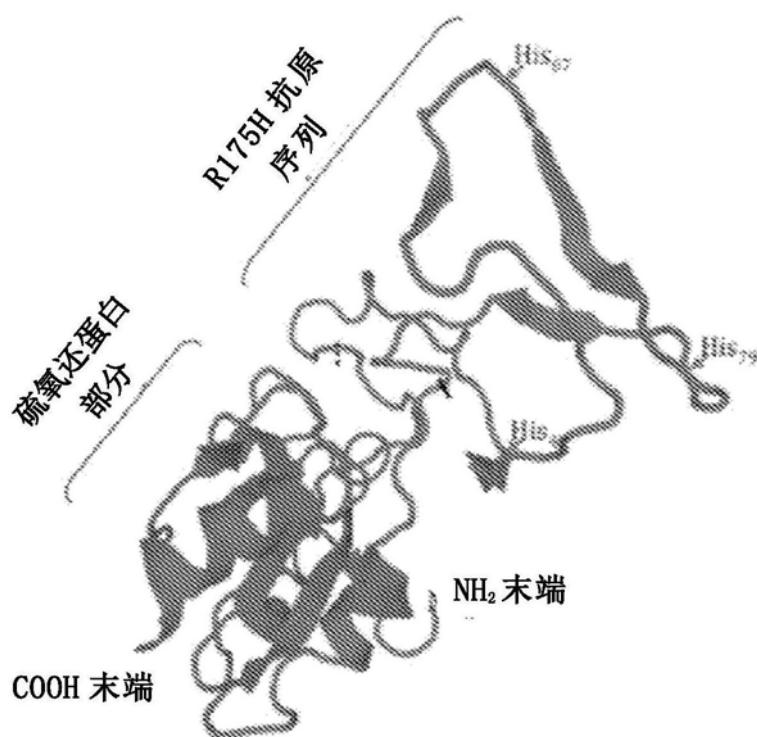


图2A

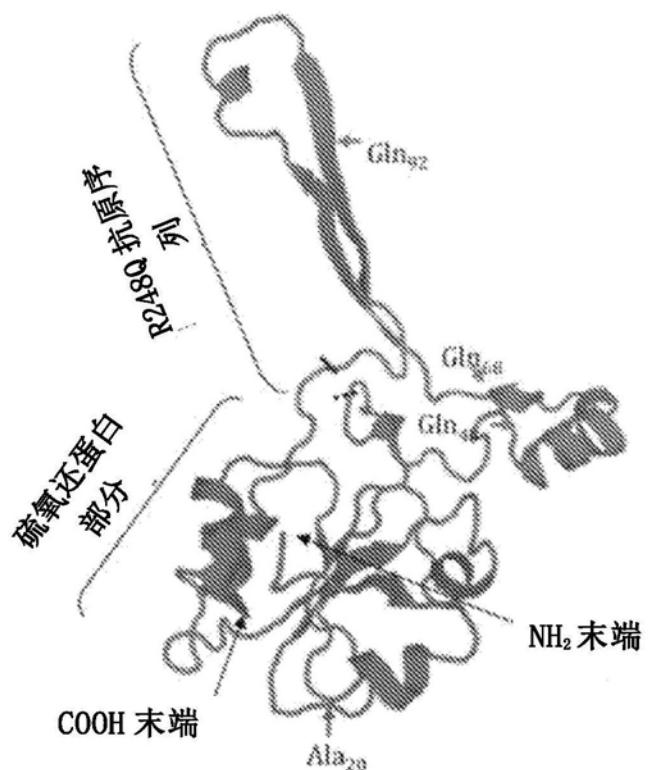


图2B

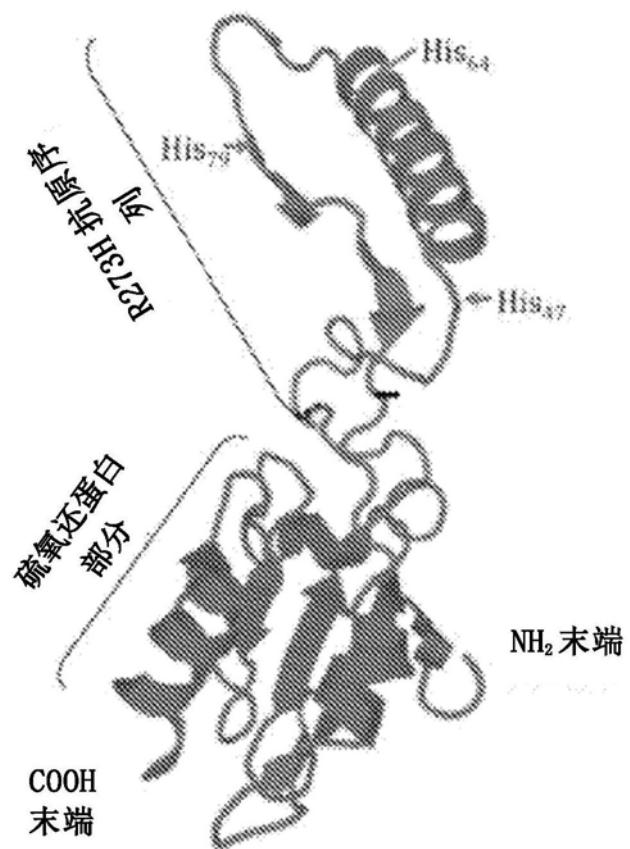


图2C

R175H

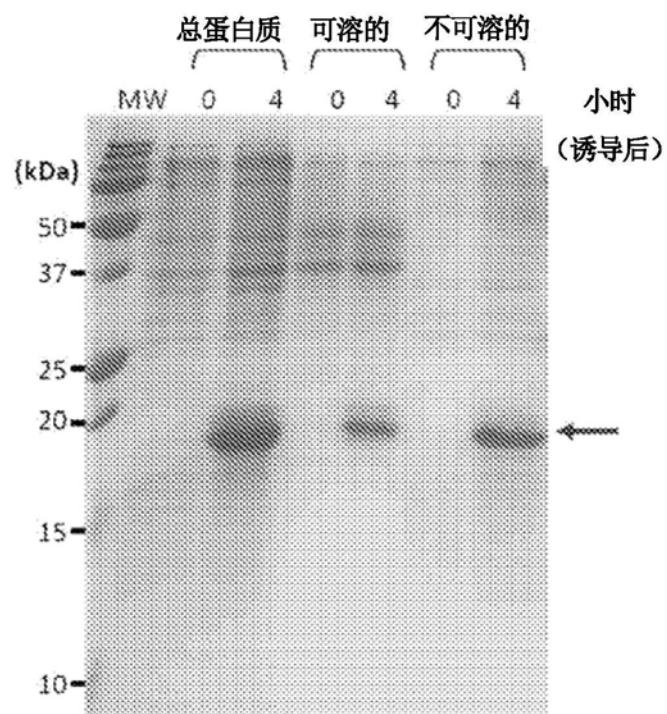


图3A

R248Q

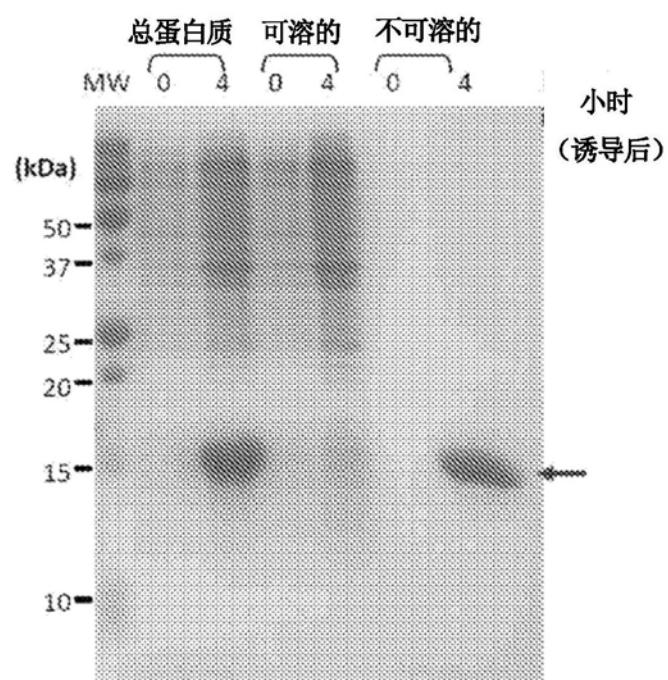


图3B

R273H

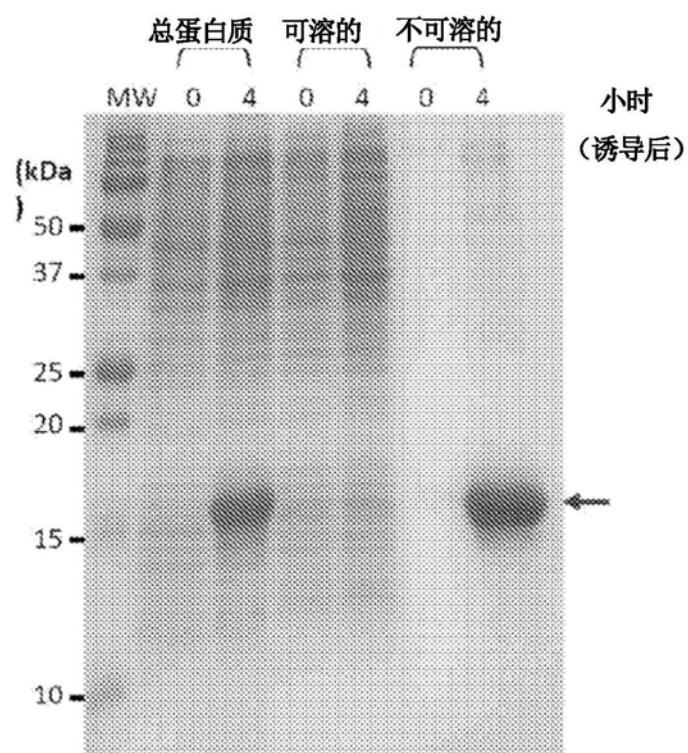


图3C

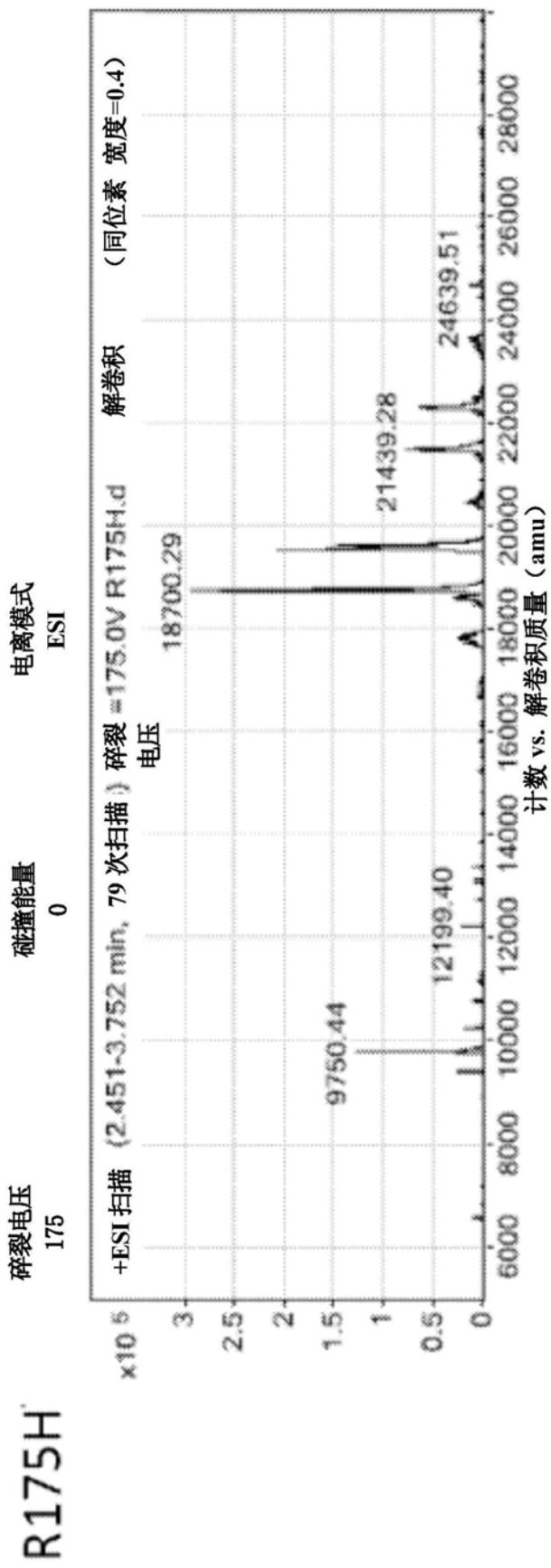


图4A

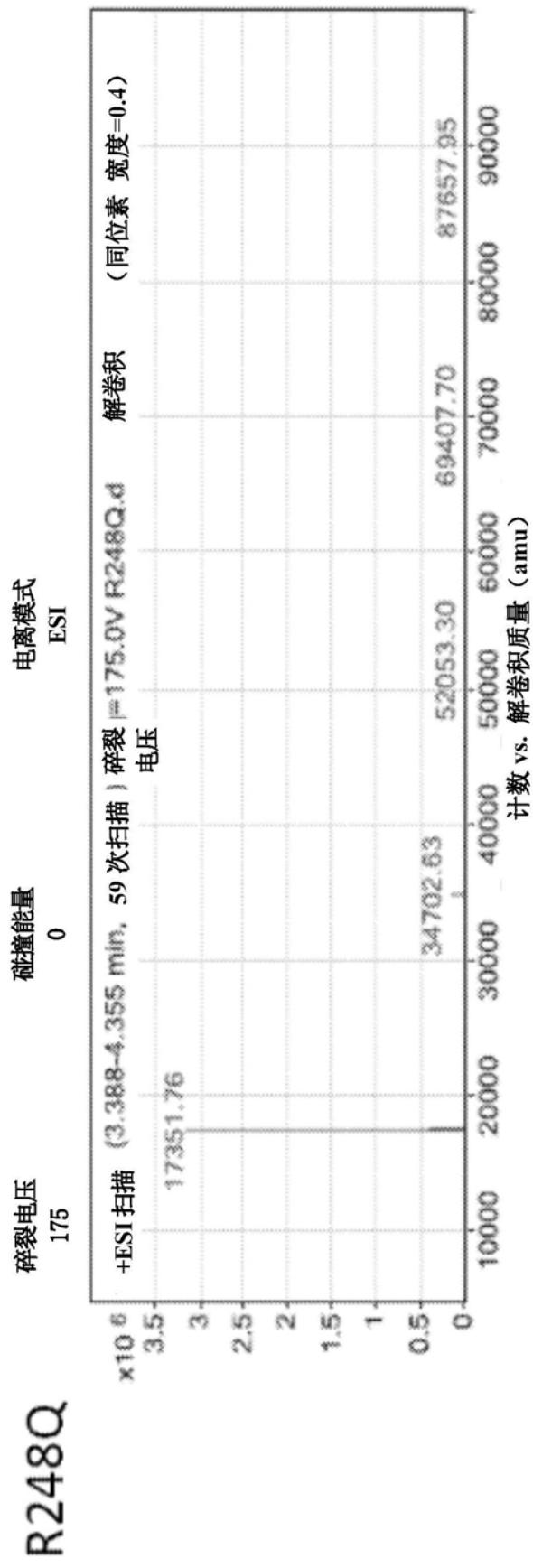


图4B

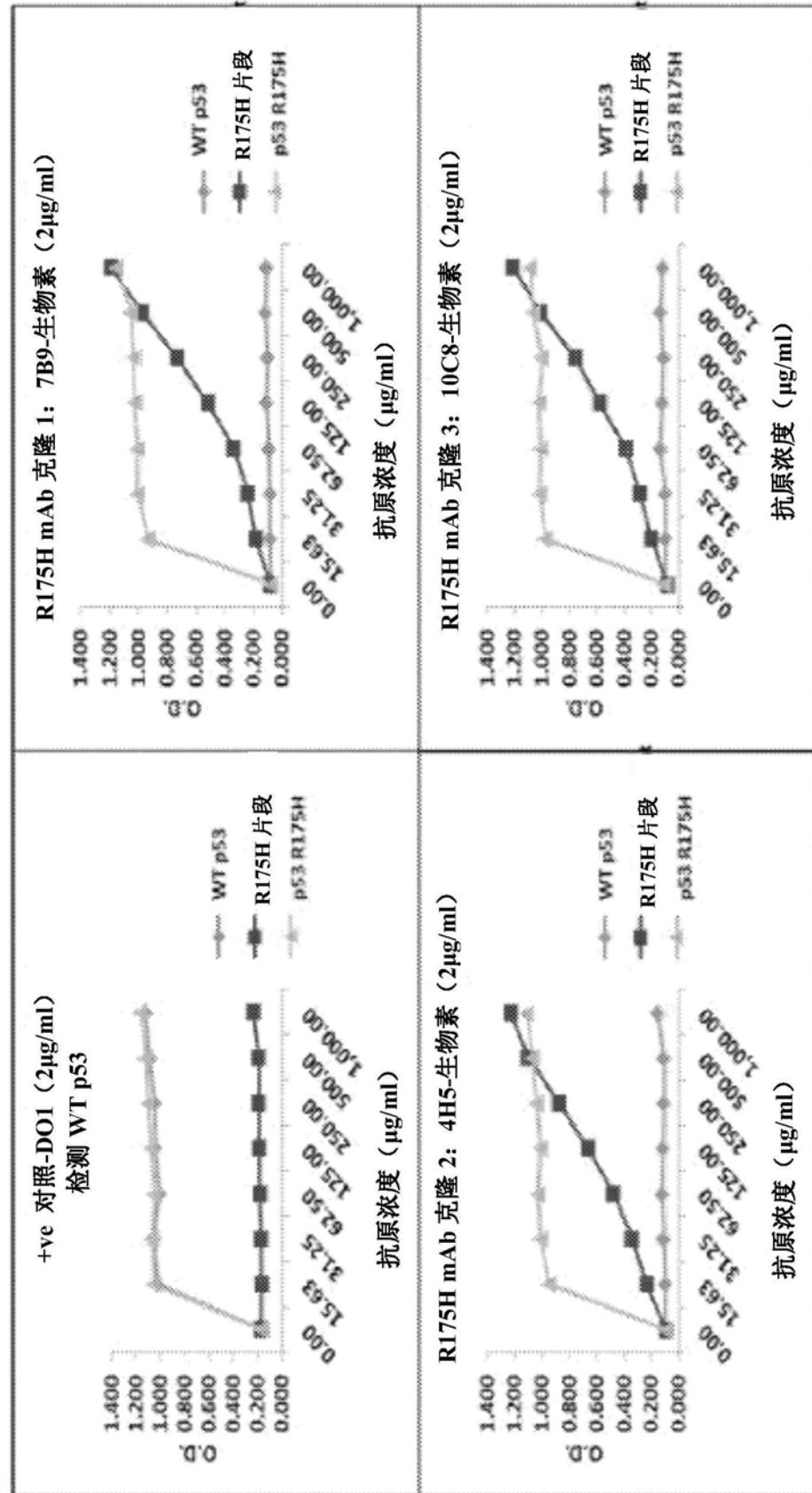
α -R175H

图5A

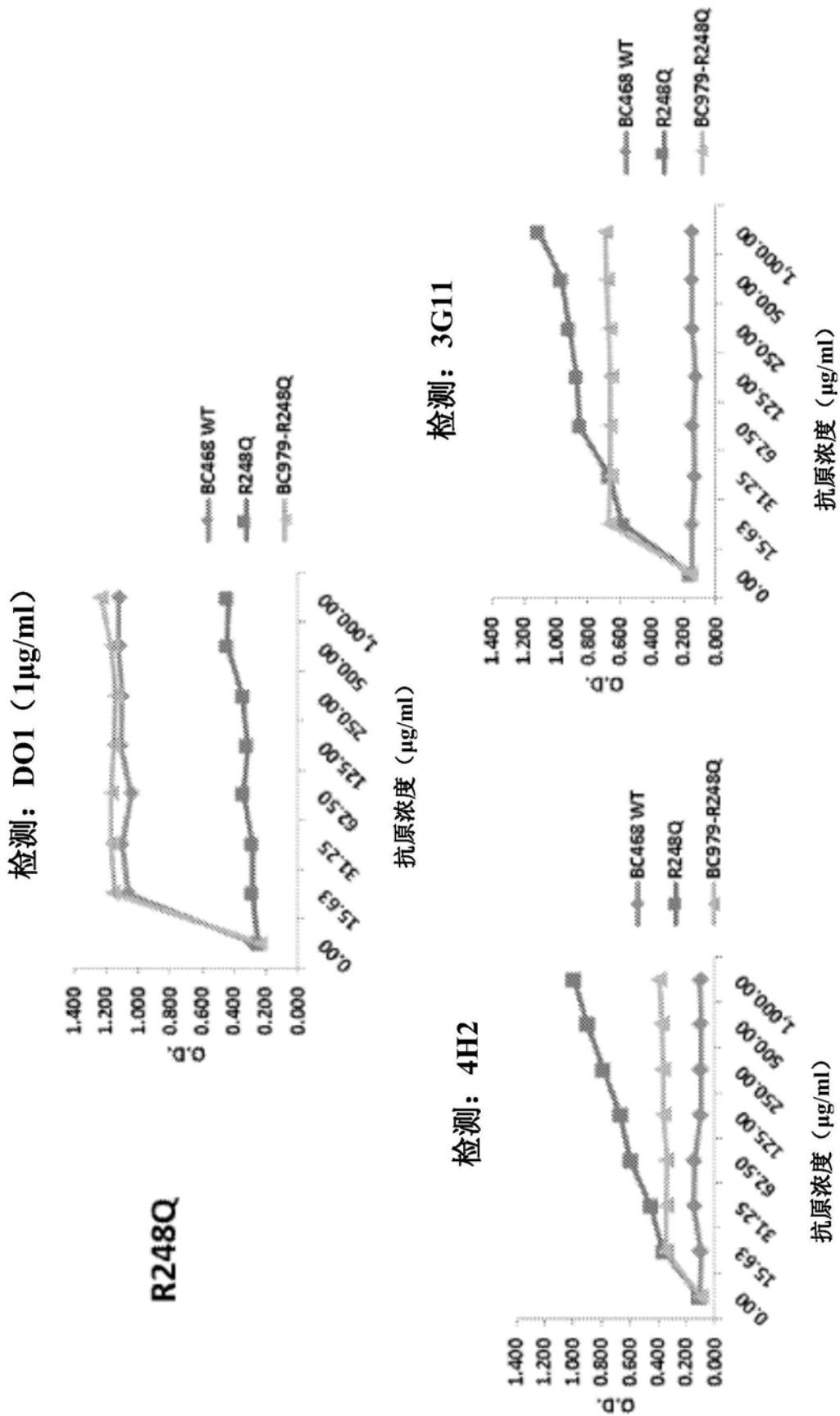


图5B

R273H

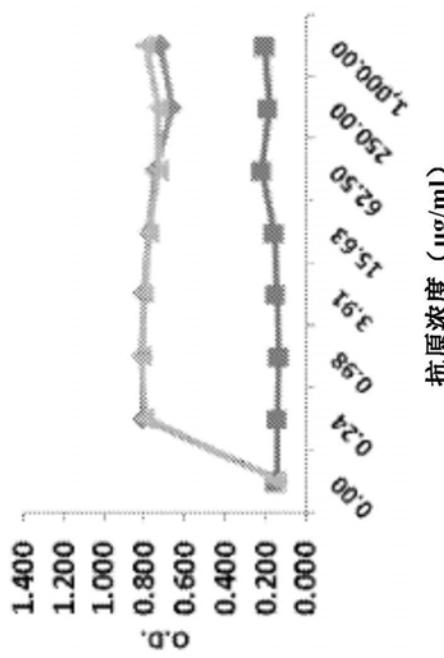
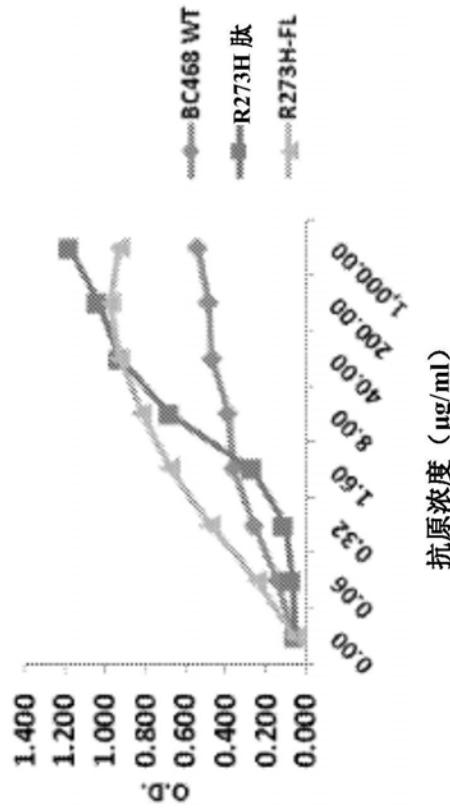
检测: DO1-生物素 (2 μ g/ml)检测: 13E4-生物素 (1 μ g/ml)

图5C

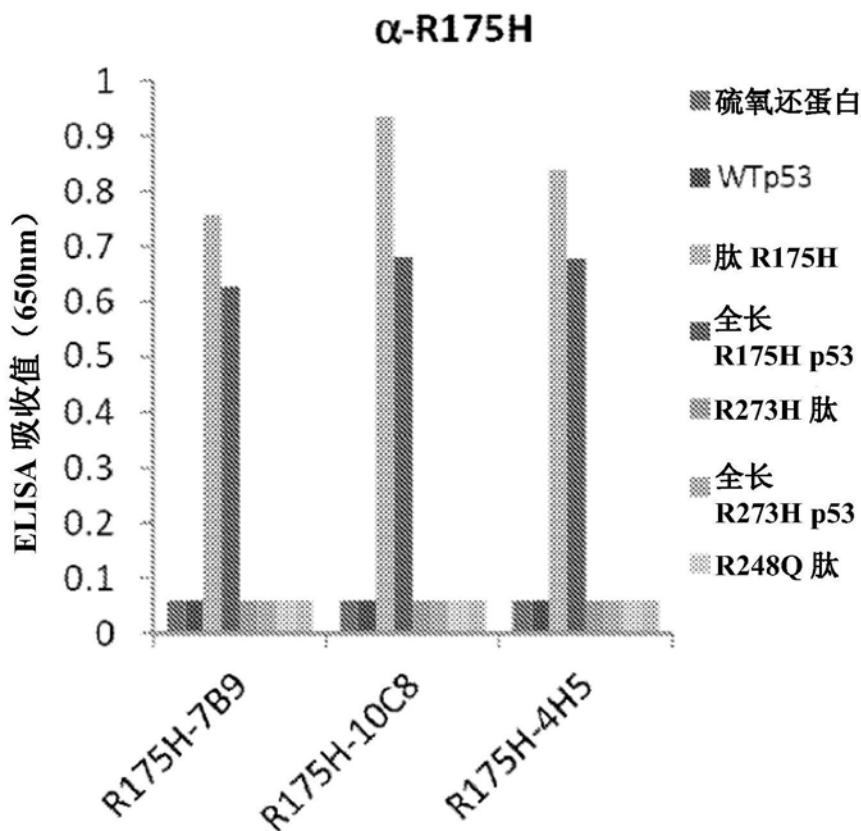


图6A

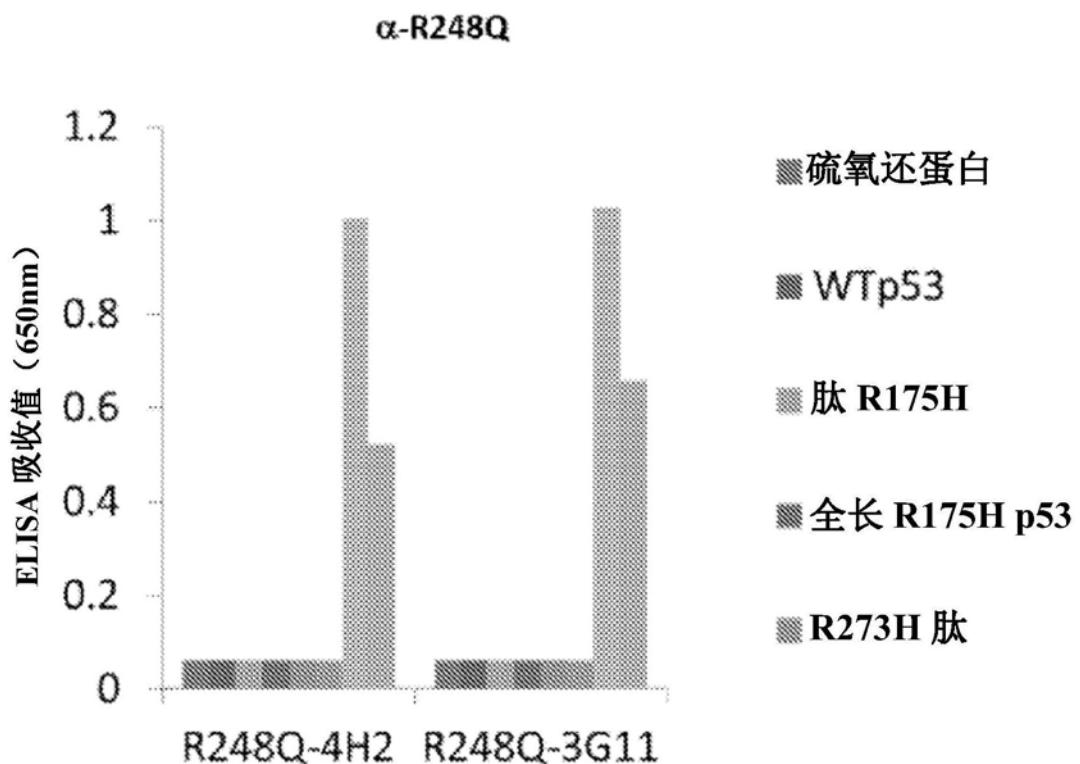


图6B

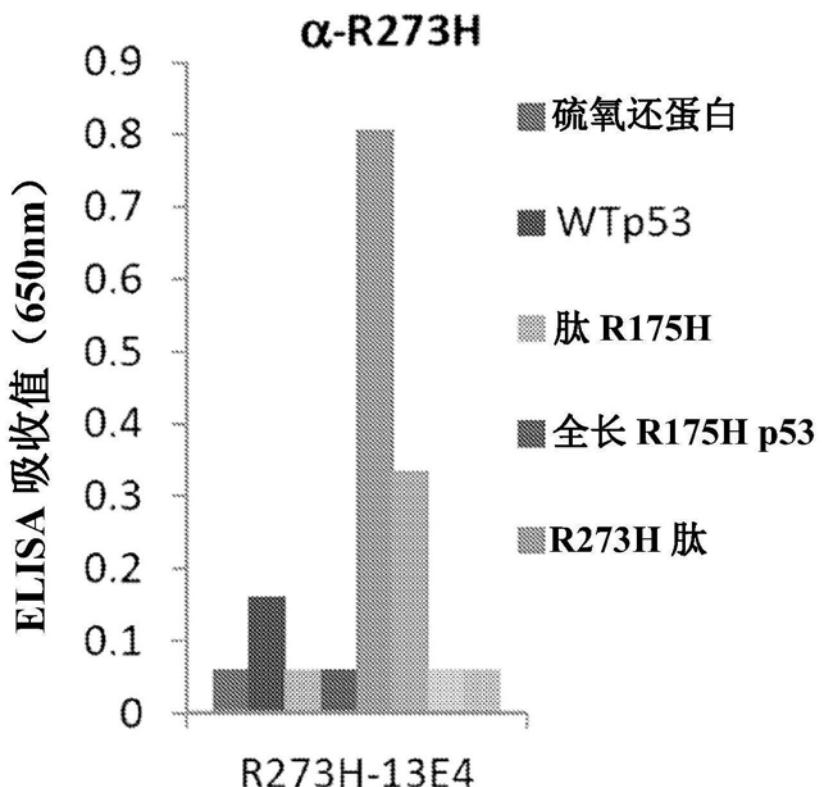


图6C

抗 R175H mAbs

10C8

WTp53	QHMTEVVRRCPHHERCSD
R175H	QHMTEVVRHCPHHERCSD
6	----GGVLHLPLHHTRN--
3	----ADNHEPHPLACD-
4	-----T-RHQPHHSLPPR
8	-----T-PHQPHHSFTP
7	---VSTGVHYPHHSA----
2	---VDMHHYPHHYKD---
5	-----ILASHRPHHYGY-
1	---LCTPLLNPIHHL---

共有序列: **167QHMTEVVRHCPHHERCSD184**
10C8, 7B9, 4H5 表位

图7A

抗 R248Q mAbs

4H2

WTp53	GMNRRPILTIITLEDS
R248Q	GMNQRPILTITLEDS
1	-----ELWQNVRPFLWV-----
2	-----SRPADHWPRHNE---
3	-----SSRPMAHWPIKV-----
4	-----VSSRPSSHWPI-----
5	---SNTPHWPGRPGL-----
6	-----INTPRDWAYGGL-----
7	-----FNQPPRSGRVI-----

共有序列: 245 GMNQRP ILTITLEDS 260
4H2 表位

图7B

抗 R273H mAbs

13E4

WTp53	----GRNSFEVRVCAC-----
R273H	----GRNSFEVHVCAC-----
4	----GK-TYSYHMQLYT-----
3	-----YHVGGILGRLFM
5	----YNTFPYHLGYTL-----
2	---DNASSSKVHHGH-----
1	-----TFVHGNTWTIVN-
6	---TNTMHAVHHPL-----

共有序列: 267RNSFEVHVCACPGR280
13E4 表位

图7C

抗 R175H mAbs

7B9

4H5	WTp53	R175H	WTp53	R175H
QHMTEVVRCPHHERCSD	QHMTEVVRCPHHERCSD	8	QHMTEVVRCPHHERCSD	8
----YNQTHPRHHQEQY-	----GAPEVHHPAHQQA--	9	----KTLSHAPHHSKER--	2
----HSPV-HTPHGSGK--	----TPHQPHHSFTPRT	7	----DSHFLHYPHHSN---	3
----STPGHSPHQHN--	----STPVHTPHHAHY--	5	----ESTIGHSPHQHN--	5
----SGSLQHHRPHPRN---	1	1	----STPVHTPHHAHY--	6
			----SGSLQHHRPHPRN---	10

共有序列: 167QHMTEVVVRHCPHHERCSD184

10C8, 7B9, 4H5表位

抗 R248Q mAbs

3G11

WTp53	GMNRRPILTHITLED S
R248Q	GMNQRPILTHTLED S
1	----- SSTHYSWSLMDA
2	----- GPSCHYCFTGLP ----
3	----- GPSCHYCFTGLP ----
4	WSVPPGRHIHYS-----
5	WSVPPGRHIHYS-----
10	----- FSVP SG HYIRAN-----
8	----- FSVRPFHYAQDN-----
7	----- FSVP FDRIQETP -----
9	----- FSVRPYDPQIEN-----
6	----- HSVWYAN GSVKT -----

共有序列: **215**SVVVVPYEPPEVGSDCTTHYN **235**
3G11表位

图8B

R175H 的 4H5 丙氨酸扫描

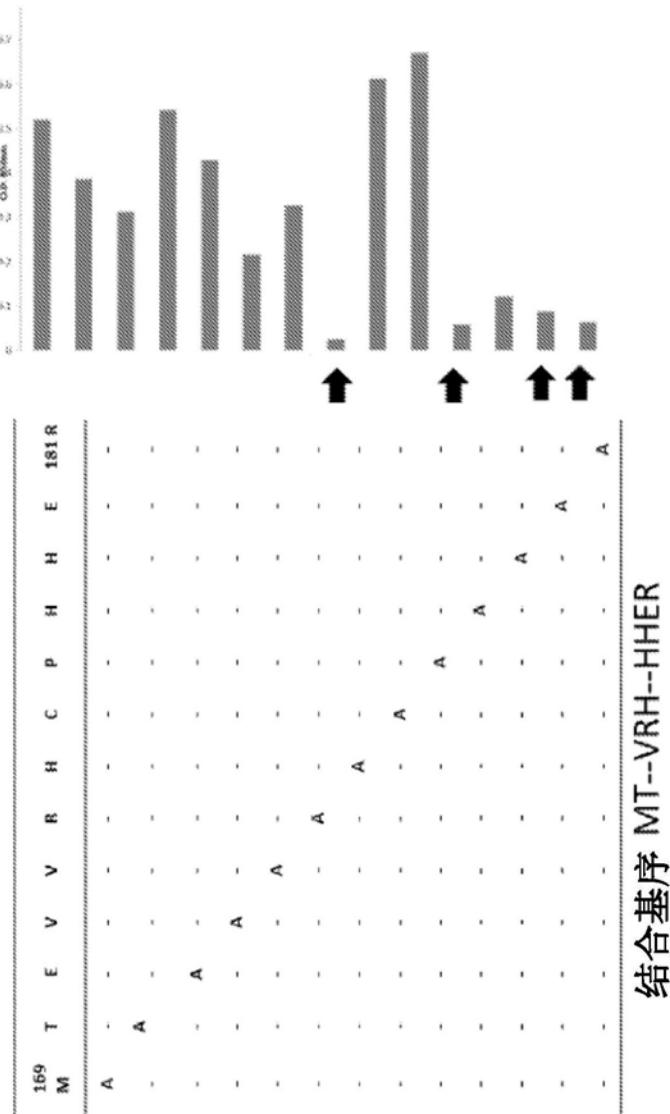


图9A

R175H 的 7B9 丙氨酸扫描

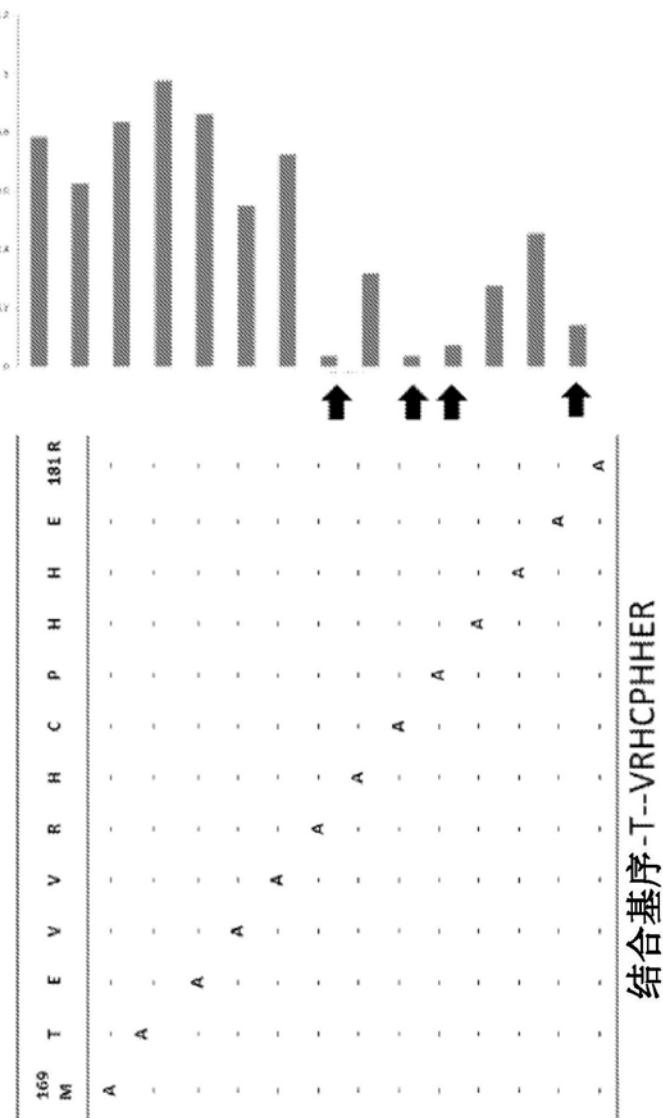


图9B

R175H 的 10C8 丙氨酸扫描

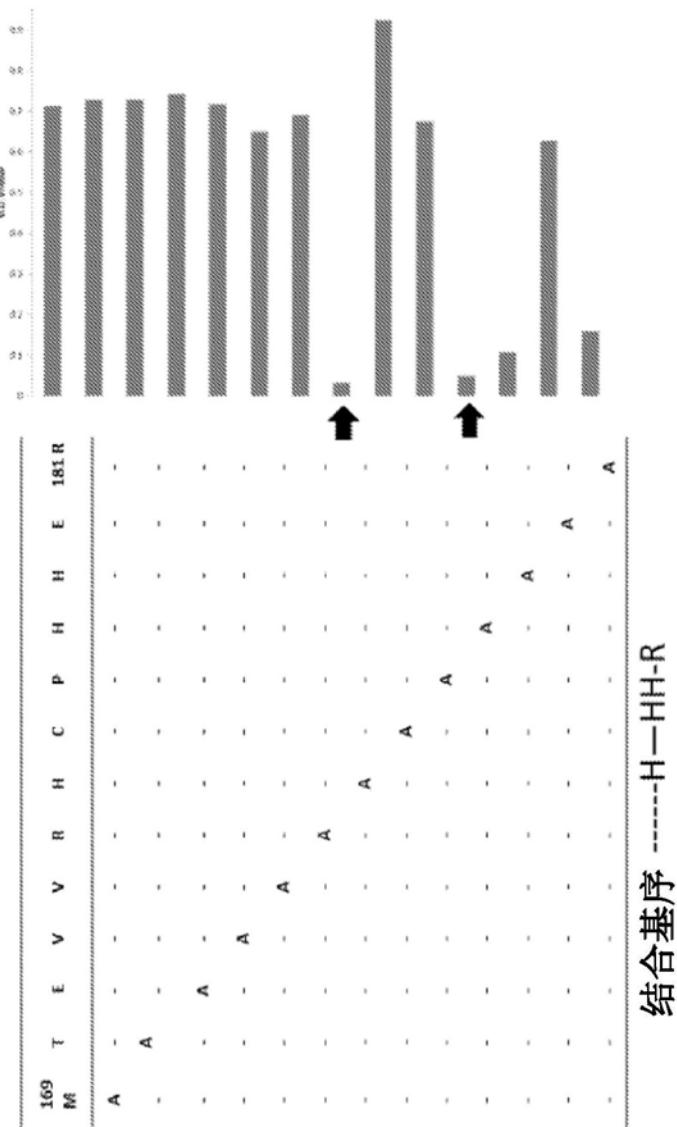


图9C

R273H 的 13E4 丙氨酸扫描

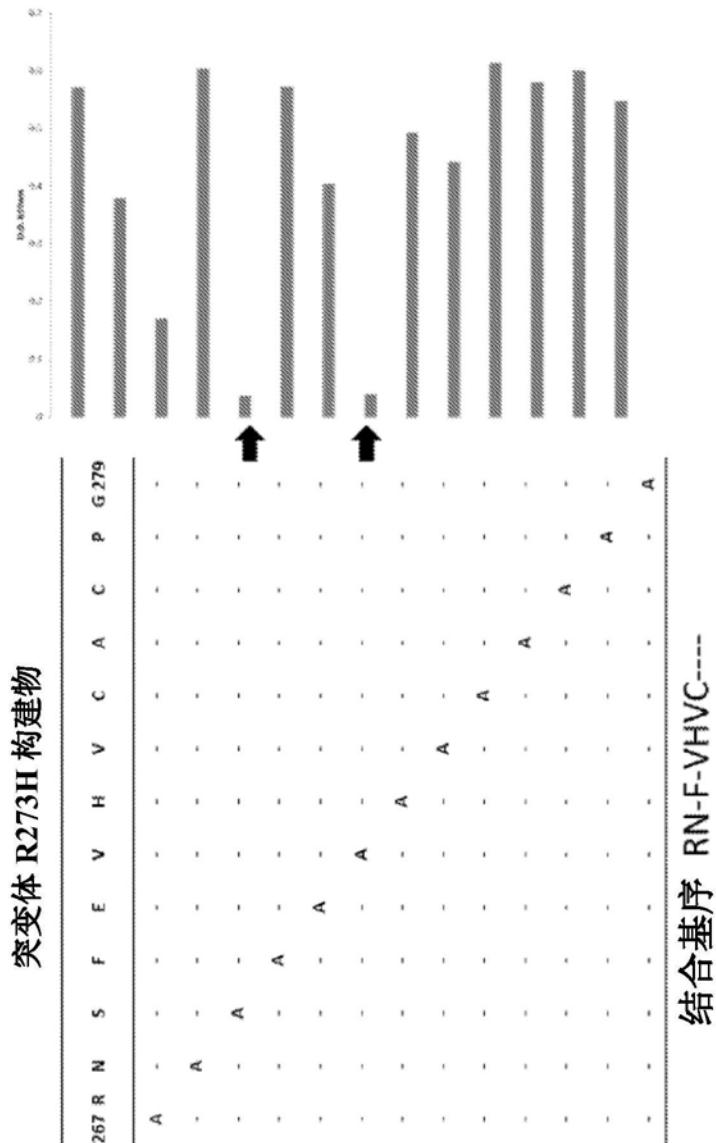


图9D

MEEPOQSDPSV EPLSQETFS DLWKLLENN VLSPLPSQAM DDLMLSPDDI EQWFTEDPGP DEAPRMPEAA PPVAPAPAAAP TPAAPAPAPS WPLSSVPSQ 100
KTYQGSYGFR LGFLHSGTAK SVTCYSPAL NKMFCQLAKT CPVQLWVDST PPPGTIRVRAAM AYKQSQHMT EVVNRCPHIE RCSOSDGLAP PQHLIRVEGN 200
R175H
R273H
R248Q
LRVEYLDNRN TFRHSVVVVPY EPPEVGSDDCT THYNYMCNS SCMGGMNQRP ILTITLED SGNLGRNSF **EVH**YCACPGR DRRTEENLR KKGEPIIHELP 300
PGSTKRALPN NTSSSPQPKK KPLDGEYFTL QIRGRERFEM FRELNEALEL KDAOQAGKEPG GSRAHSSHLK SKKGQSTSRIH KKLMEKTEGP DSD 393

图10

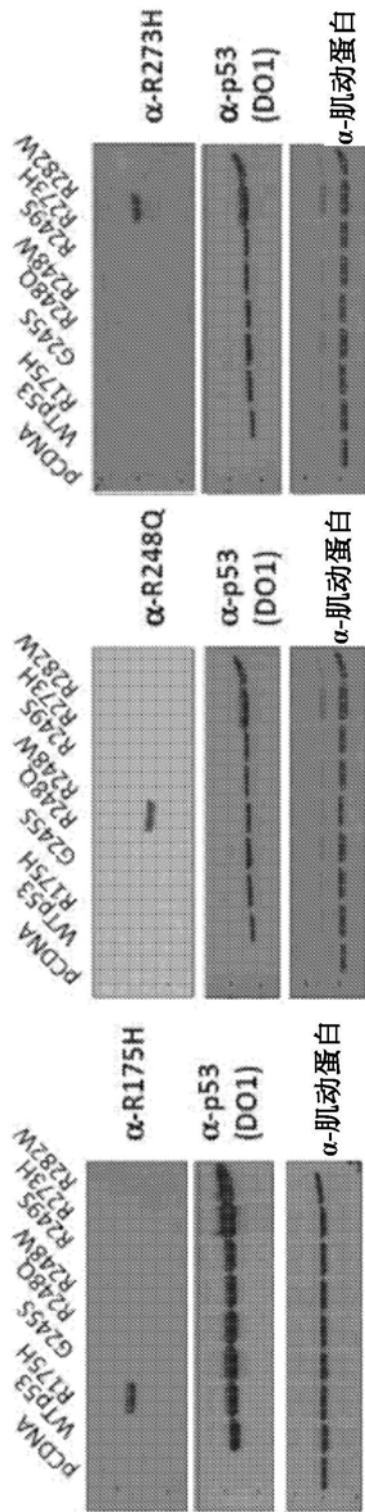


图11

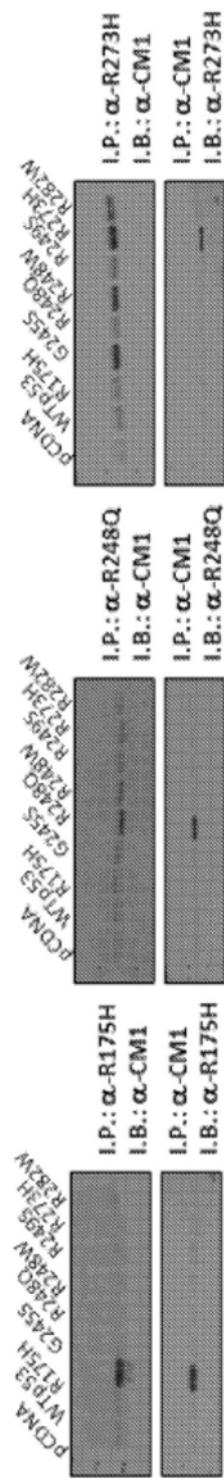


图12

研究中使用的细 胞系	p53 状态
A549, MCF-7, HCT116, MRC5, RKO, U2OS	野生型
AU565	R175H
SKBR3	R175H
HEC-1A	R248Q
RD	R248W
786-O	R248W
PLC-PRF/15	R249S
KNS-62	R249S
SW480	R273H
A431	R273H

图13

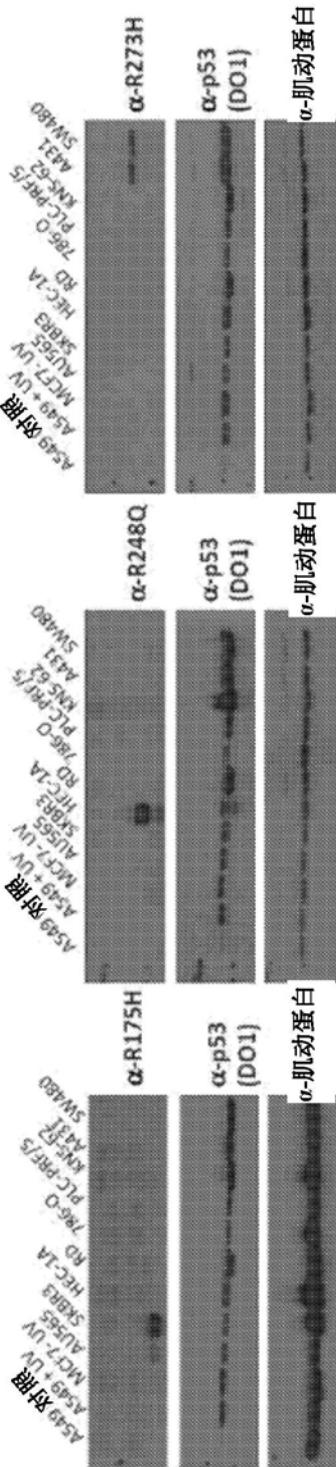


图14

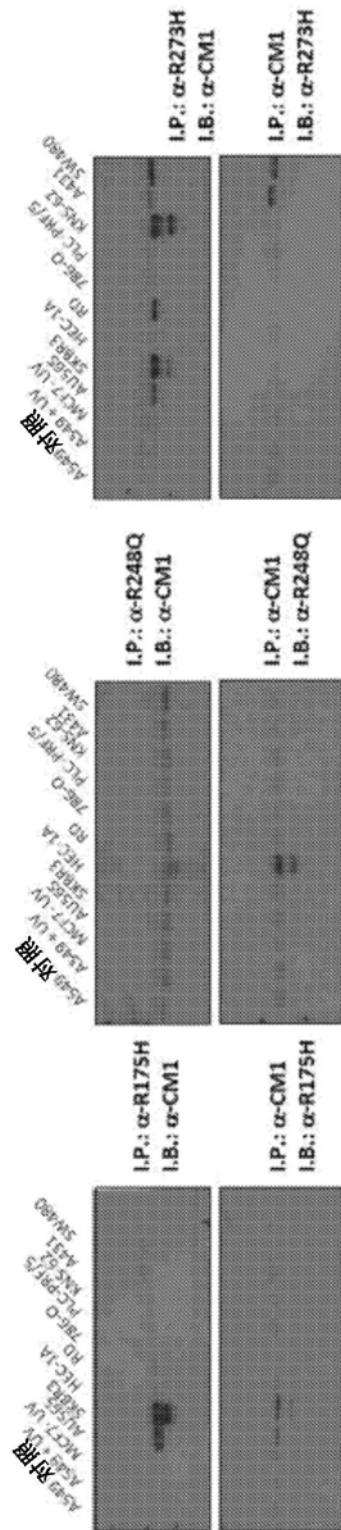


图15

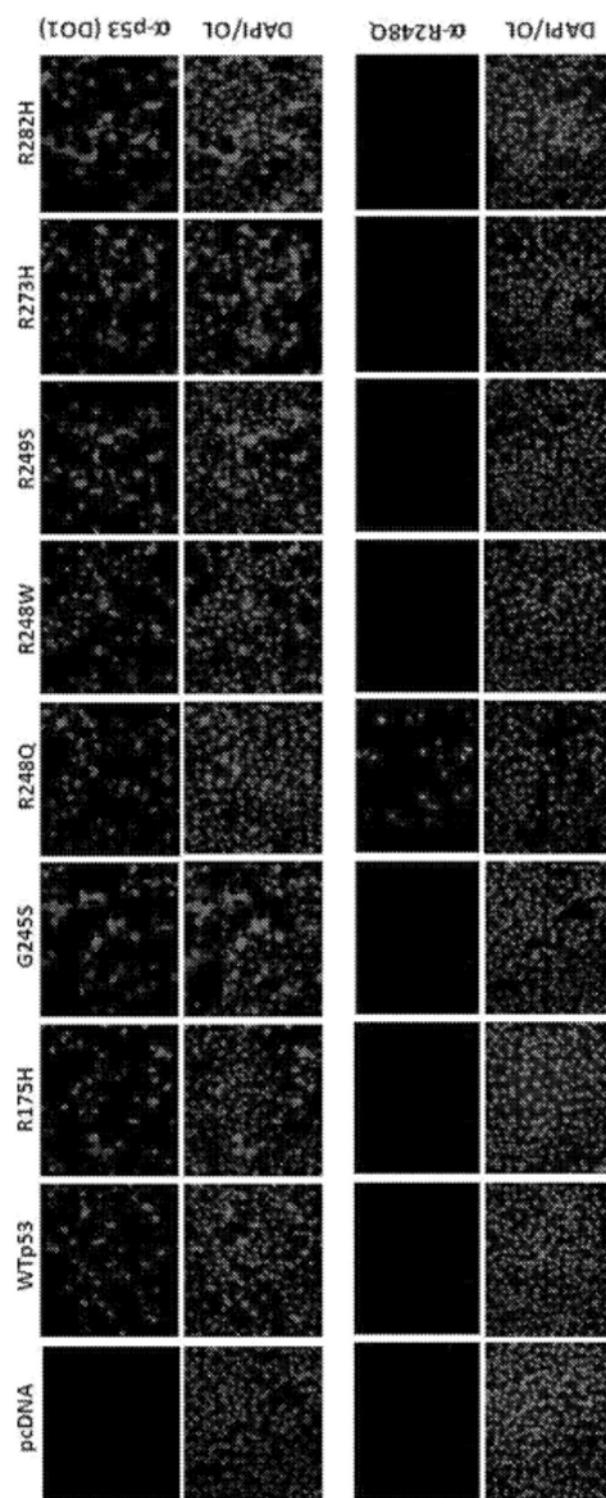


图16

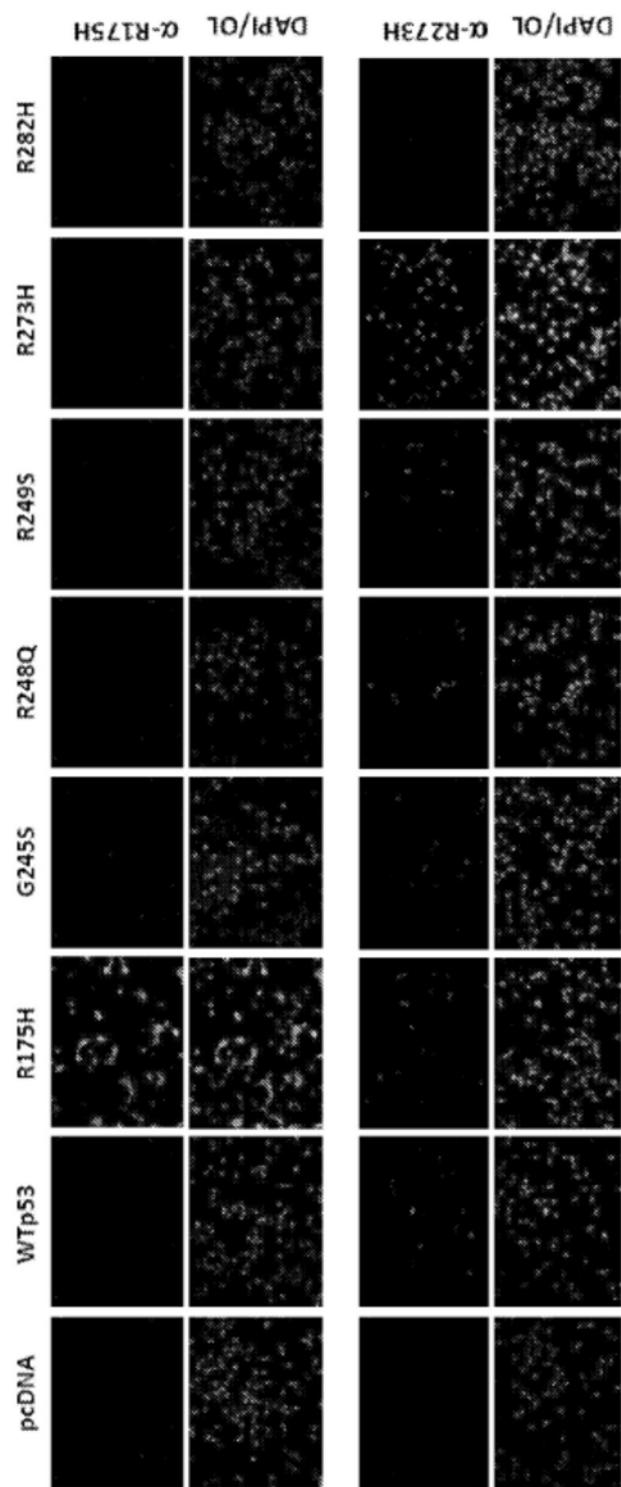


图16 (续)

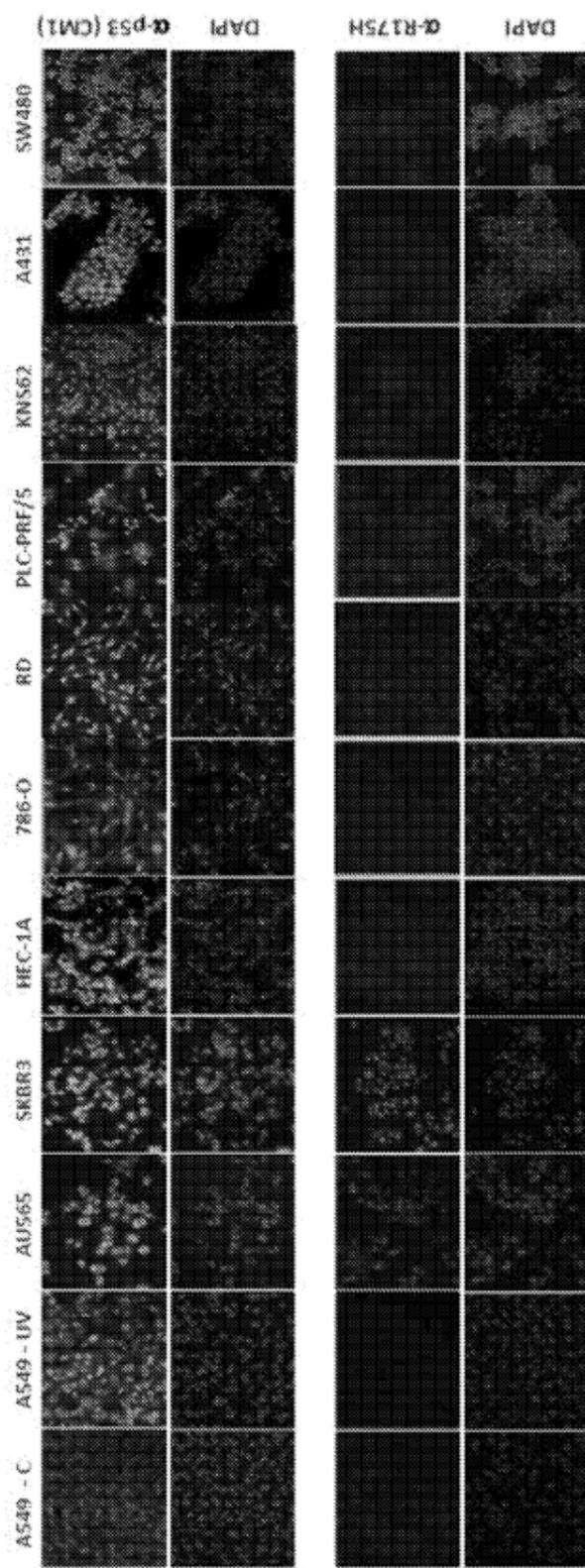


图17A

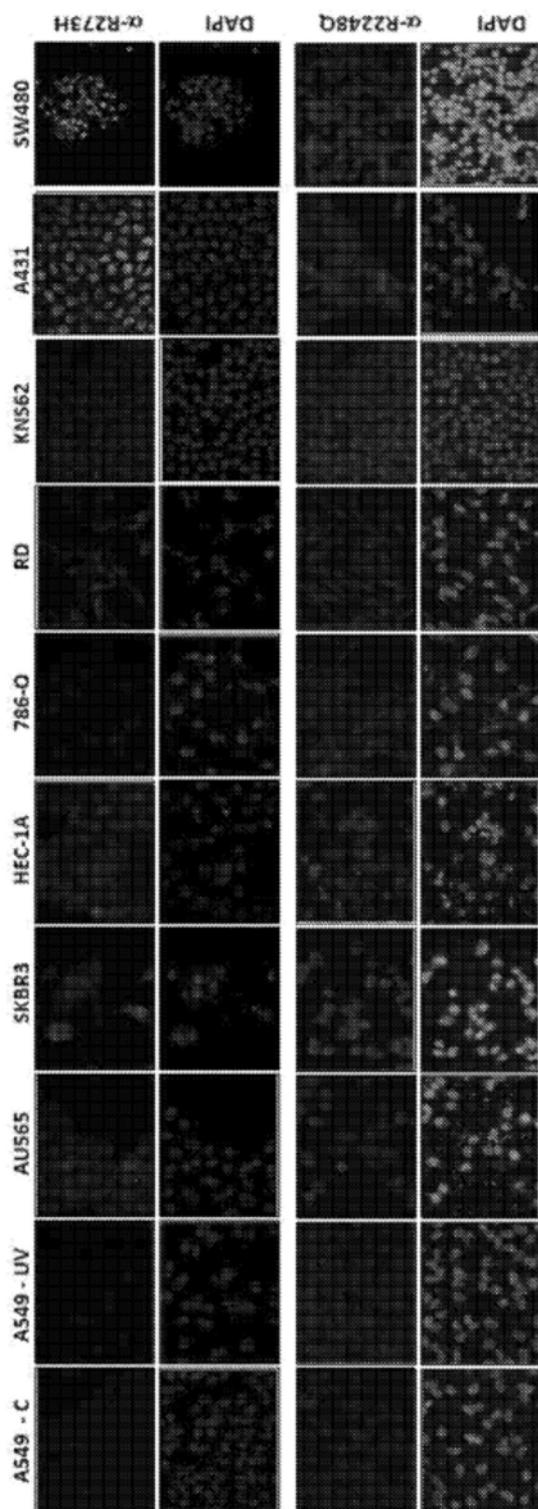


图17A(续)

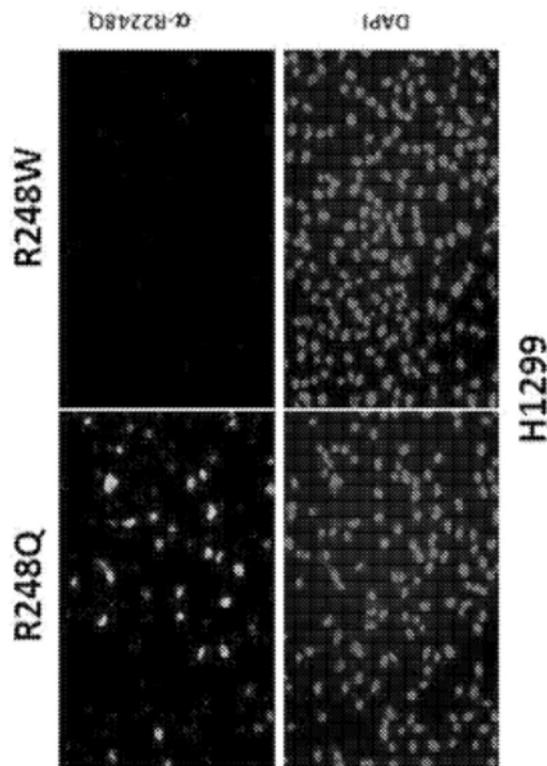


图17B

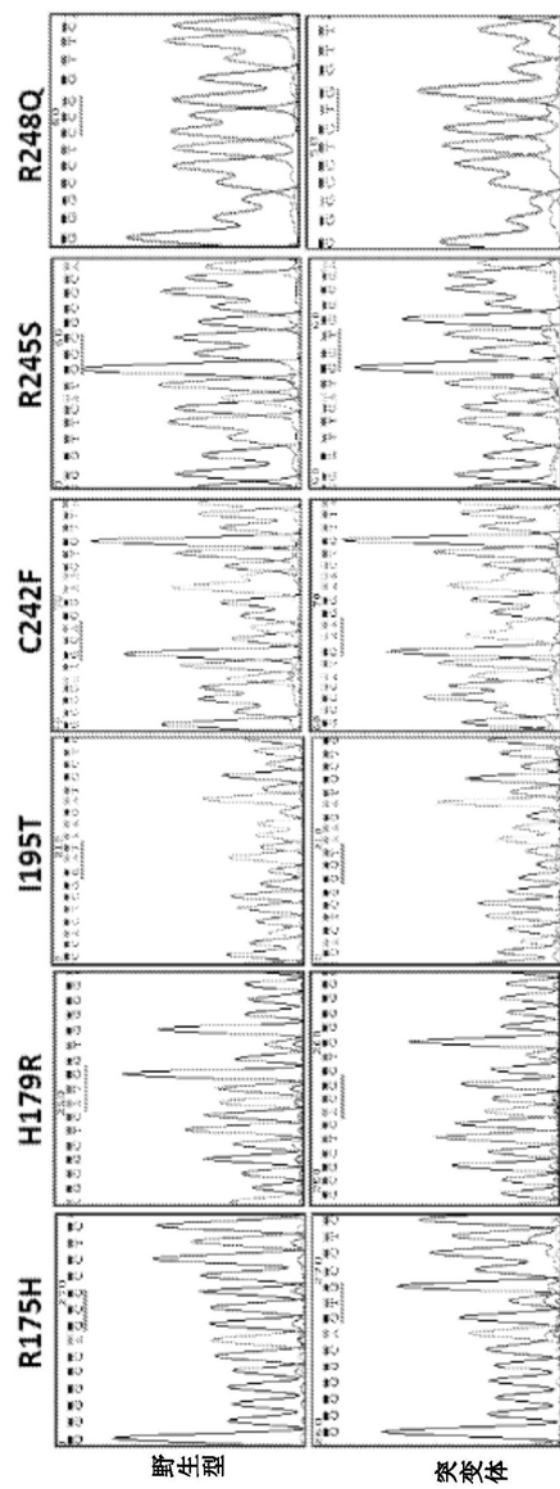


图18A

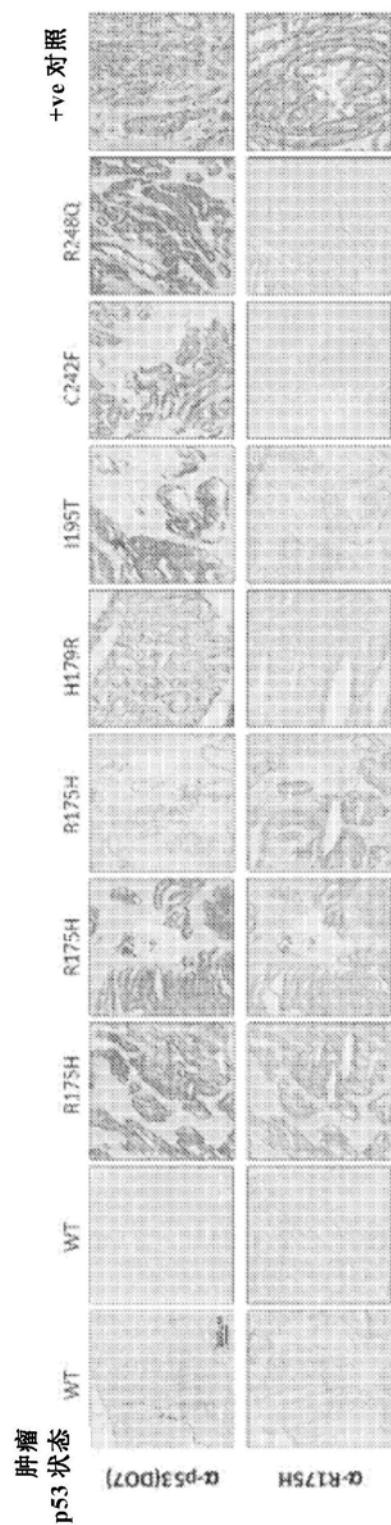


图18B

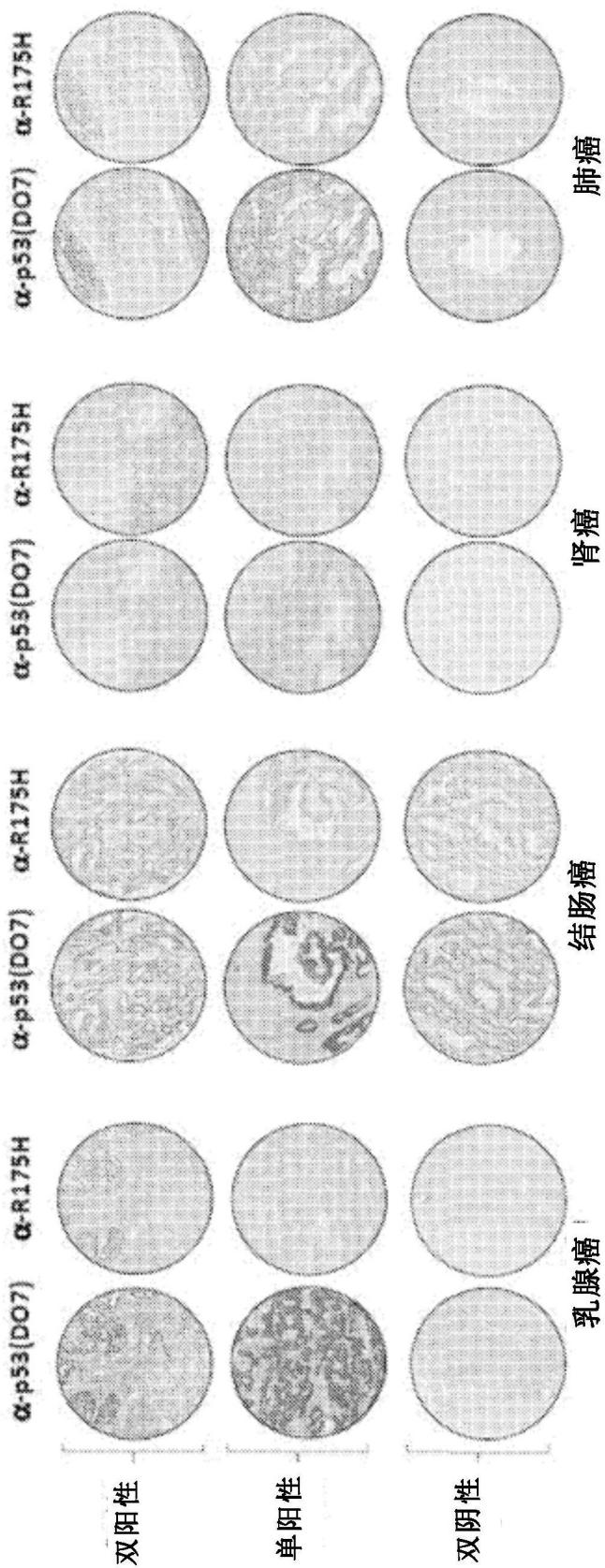


图19

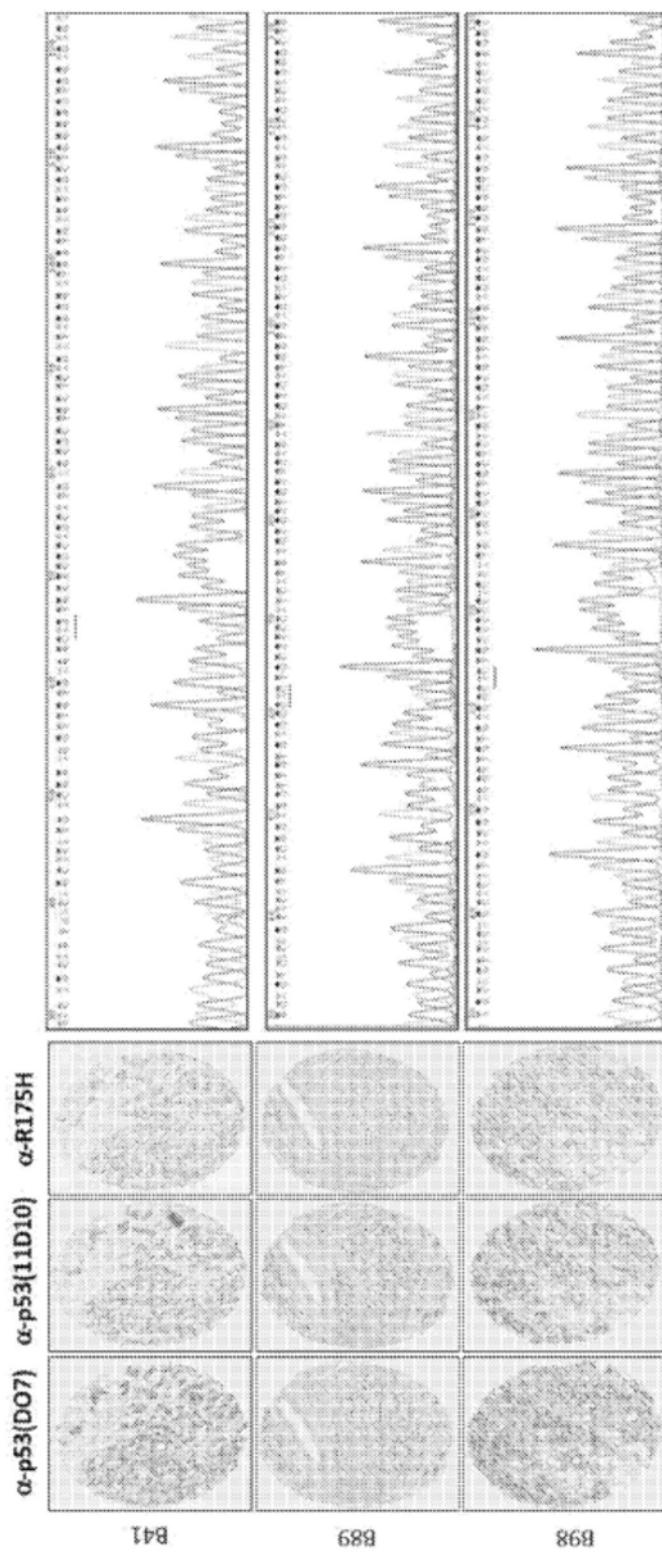


图20A

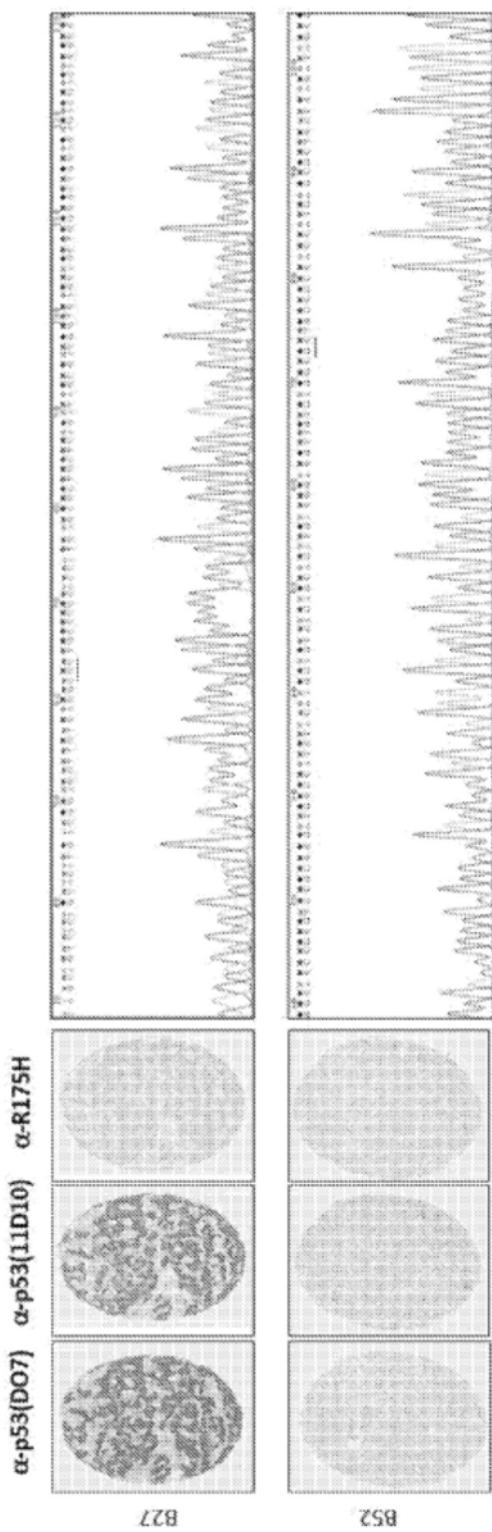


图20B

通过免疫组织化学分析人肿瘤芯片的组合数据

研究中使 用的 TMA*	总样品数 =n	α -pan- p53 ⁺ (DOI)		α - R175H ⁺ n (%)	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
结肠	99	60 (60)	5	5	
乳腺	102	72 (70)	5	5	
肺	169	114 (67)	8	8	
前列腺	231	27 (11)	0	0	
肾	196	68 (34)	3	3	

*: TMA: 肿瘤芯片

图21

R175

P53_HUMAN	MTEVVVRCPHHERCSD-SDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	226
P53_CERAE	MTEVVVRCPHHERCSD-SDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	226
P53_MACMU	MTEVVVRCPHHERCSD-SDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	226
P53_MACFU	MTEVVVRCPHHERCSD-SDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	226
P53_MACFA	MTEVVVRCPHHERCSD-SDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	226
P53_TUPGB	VTEVVVRCPHHERCSD-SDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	226
P53_MARMO	MTEVVVRCPHHERCSD-SDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	224
P53_RABIT	MTEVVVRCPHHERCSD-SDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	223
P53_DELLE	MTEVVVRCPHHERCSDYSDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	220
P53_PIG	MTEVVVRCPHHERSSDYSRG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	219
P53_CANFA	VTEVVVRCPHHERCSDSSDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	214
P53_FELCA	MTEVVVRCPHHERCPDSSDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	219
P53_CAVPO	MTEVVVRCPHHERCSD-SDG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	224
P53_SHEEP	MTEVVVRCPHHERSSDYSRG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPESPEI	215
P53_MESAU	MTEVVVRCPHHERSSE-GDG-LAPPOQLIRVEGNMHAEYLLDDKQTFRHSVVVPPPEVG	229
P53_CRIGR	MTEVVVRCPHHERSSE-GDS-LAPPOQLIRVEGNLRLAEYLLDDKQTFRHSVVVPPPEVG	226
P53_BOVIN	MTEVVVRCPHHERSSDYSRG-LAPPOQLIRVEGNLRLVEYLLDDRNTFRHSVVVPPESPEID	219
P53_BOSIN	MTEVVVRCPHHERSSDYSRG-LAPPOQLIRVEGNLRLAEYLLDDRNTFRHSVVVPPESPEID	219
P53_RAT	MTEVVVRCPHHERCSD-GDG-LAPPOQLIRVEGNPYAAYEYLLDDRQTFRHSVVVPPPEVG	224
P53_MOUSE	<u>MTEVVVRCPHHERCSD-GDG-LAPPOQLIRVEGNLYPEYLEDRQTFRHSVVVPPPEAG</u>	220
P53_HORSE	MTEVVVRCPHHERCSDSSDG-LAPPOQLIRVEGNLRLAEYLLDDRNTFRHSVVVPPPEVG	177
P53_EQUAS	MTEVVVRCPHHERCSDSSDG-LAPPOQLIRVEGNLRCGGGTDG-LAPAQHLIRVEGNPOQARYHDDETTKRHSVVVPPPEVG	102
P53_CHICK	VAEVVVRCPHHERSVEPGED-AAPPSPHLMVEGNLQAYYMEDVNSGRHSVCVYEGPQVG	212
P53_XENLA	VAEVVVKRCPHHERSVEPGED-AAPPSPHLMVEGNLQAYYMEDVNSGRHSVCVYEGPQVG	201
P53_ONCMY	VADVVVRCPHHQSTSENNEG-PAPRGLHLVRVEGNQNSEYMEDGNTLRLHSVLUVPEPPQVG	215
P53_DANRE	VAEVVVRCPHHERTPDG-DN-LAPAGHLIRVEGNQORANYREDNITLRLHSVUVPEAPQLG	194
P53ICTPU	VAEVVVRCPHHERSNDSSDG-PAPPGLLIRVEGNSRAVYQEDGNTQAHSSVVVPPQVG	202
P53_XIPMA	VGEVVVKRCPHHQ-SEDLSDN-KS---HLIRVEGSQLAQYFEDPNTRRHSVTVYERPQLG	189
P53_XIPHE	VGEVVVKRCPHHQ-SEDLSDN-KS---HLIRVEGSQLAQYFEDPNTRRHSVTVYERPQLG	189

图22

R273

P53_HUMAN	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	286
P53_CERAE	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	286
P53_MACMU	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	286
P53_MACFU	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	286
P53_MACEA	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	286
P53_TUPGB	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	286
P53_MARMO	SECTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	284
P53_RABIT	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	283
P53_DELLE	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	280
P53_PIG	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	279
P53_CANFA	SDYTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	274
P53_FELCA	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	279
P53_CAVPO	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	284
P53_SHEEP	SECTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	275
P53_MESAU	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	289
P53_CRIGR	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	286
P53_BOVIN	SECTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	279
P53_BOSIN	SDYTTIHYKYMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	279
P53_RAT	SEYTTIHYKYMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	284
P53_MOUSE	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	280
P53_HORSE	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	237
P53_EQUAS	SDCTTIHYNMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRDRTEE	162
P53_CHICK	SDCTTIVLYNFMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRRCFEVRVCACPGDRDRKIEE	272
P53_XENLA	TECTTIVLYNFMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRRCFEVRVCACPGDRDRTEE	261
P53_ONCMY	SECTTIVLYNFMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRRCFEVRVCACPGDRDRKTEE	275
P53_DANRE	AEWTTVLLNYMCNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRRCFEVRVCACPGDRDRKTEE	254
P53_ICTPU	SQSTTIVLYNFMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRRCFEVRVCACPGDRDRKTEE	262
P53_XIPMA	SEMTTILLSFMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRRCFEVRVCACPGDRDRKTEE	249
P53_XIPHE	SEMTTILLSFMCMNSSCMGGMMNRRPILTITLEDSSGNVLGRRCFEVRVCACPGDRDRKTEE	249

图22(续)

R248

P53_HUMAN	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_CERAE	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_MACMU	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_MACFU	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_MACFA	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_TUPGB	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_MARMO	SECTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_RABIT	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_DELLE	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_PIG	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_CANFA	SDYTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_FELCA	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_CAVPO	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_SHEEP	SECTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_MEASU	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDPSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_CRIGR	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDPSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_BOVIN	SECTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSCGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_BOSIN	SECTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSCGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_RAT	SDYTTIHYRKYMCNNSCMGGMNRRPILTIITLEDSCGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_MOUSE	SEYTTIHYRKYMCNNSCMGGMNRRPILTIITLEDSCGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_HORSE	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_EQUAS	SDCTTIHYNMCMNSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNVLGRNSFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_CHICK	SDCTTVLYNFMCNSSCMGGMNRRPILTIITLEGGQQQLLGRRCFEVRVCACPGDRKIEE
P53_XENLA	TECTTVLYNFMCNSSCMGGMNRRPILTIITLEPOQLLIGRRCFEVRVCACPGDRRRTEE
P53_ONCMY	SECTTVLYNFMCNSSCMGGMNRRPILTIITLEQEGQLLGRRSFEVRVCACPGDRKTEE
P53_DANRE	AEWTTVLLNYMCNSSCMGGMNRRPILTIITLEQEGQLLGRRSFEVRVCACPGDRKTEE
P53ICTPU	SQSTTVLYNFMCNSSCMGGMNRRPILTIITLEQDGHLIGRRTFEVRVCACPGDRKTEE
P53_XIPMA	SEMTTILLSFMCNSSCMGGMNRRPILTIITLETEGEVILGRRCEFEVRVCACPGDRKTEE
P53_XIPHE	SEMTTILLSFMCNSSCMGGMNRRPILTIITLETEGEVILGRRCEFEVRVCACPGDRKTEE

图22 (续)

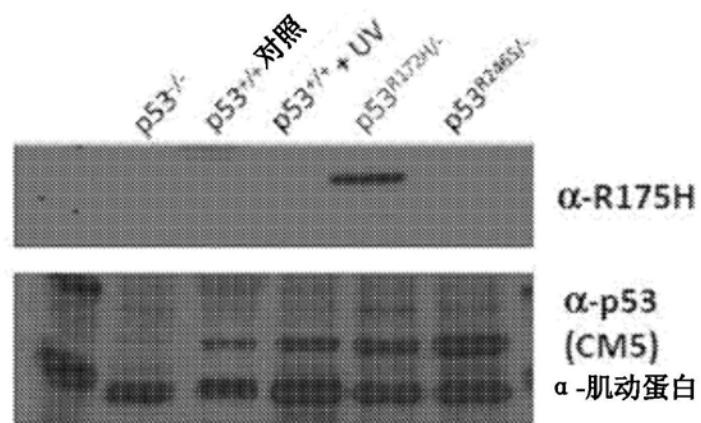


图23A

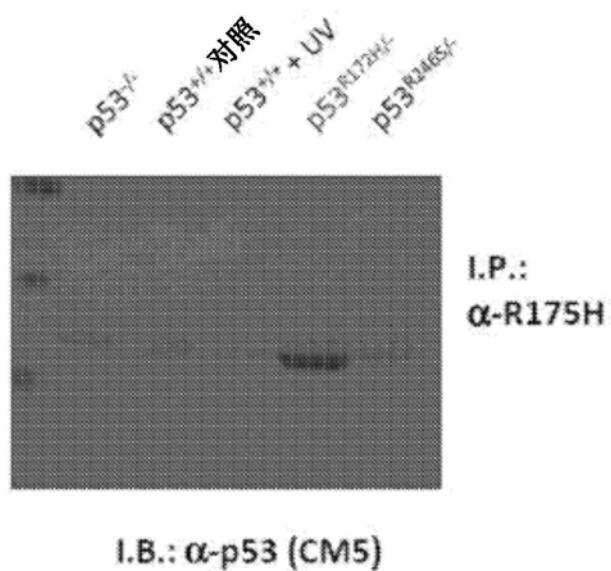


图23B

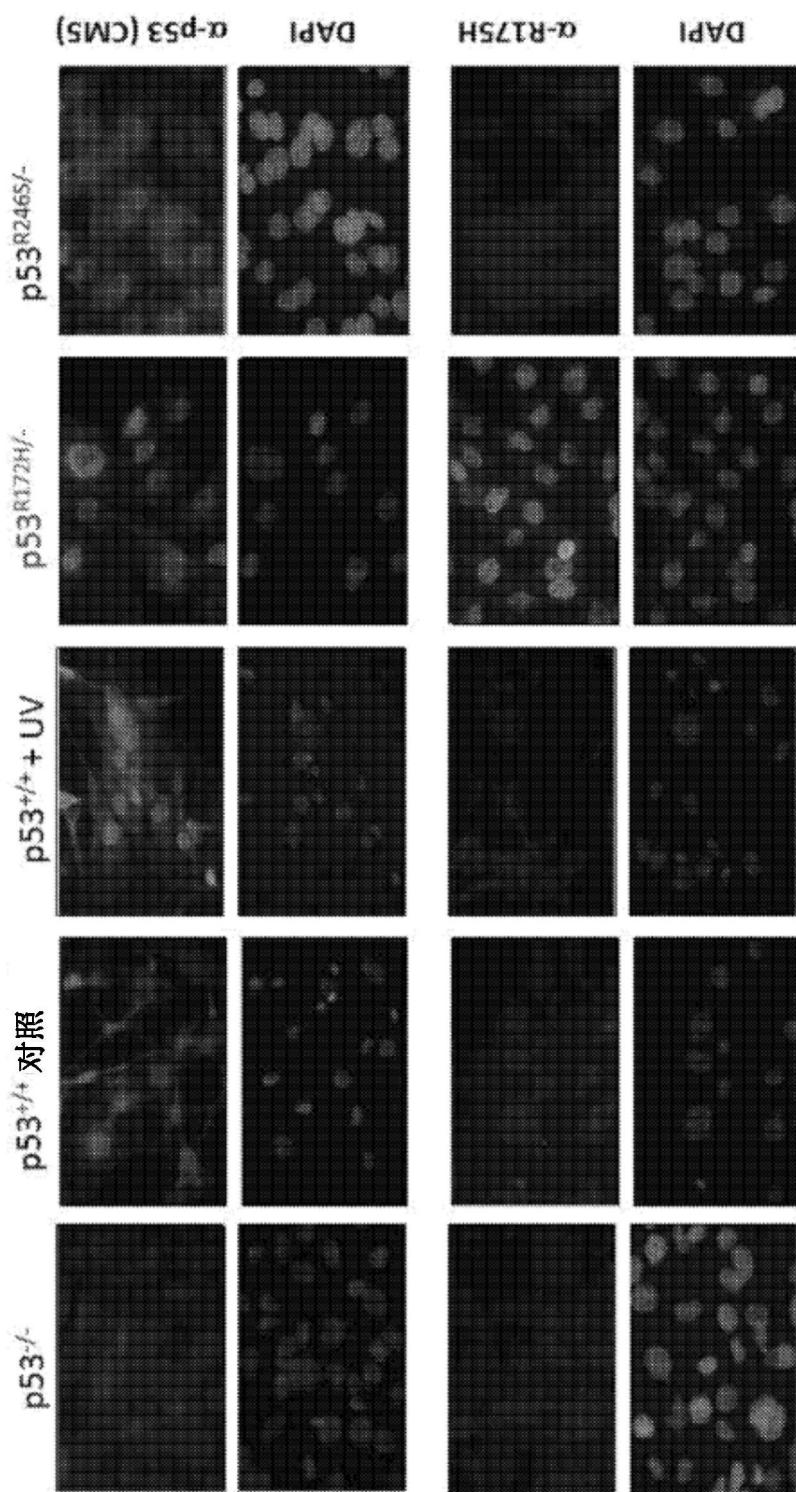


图23C

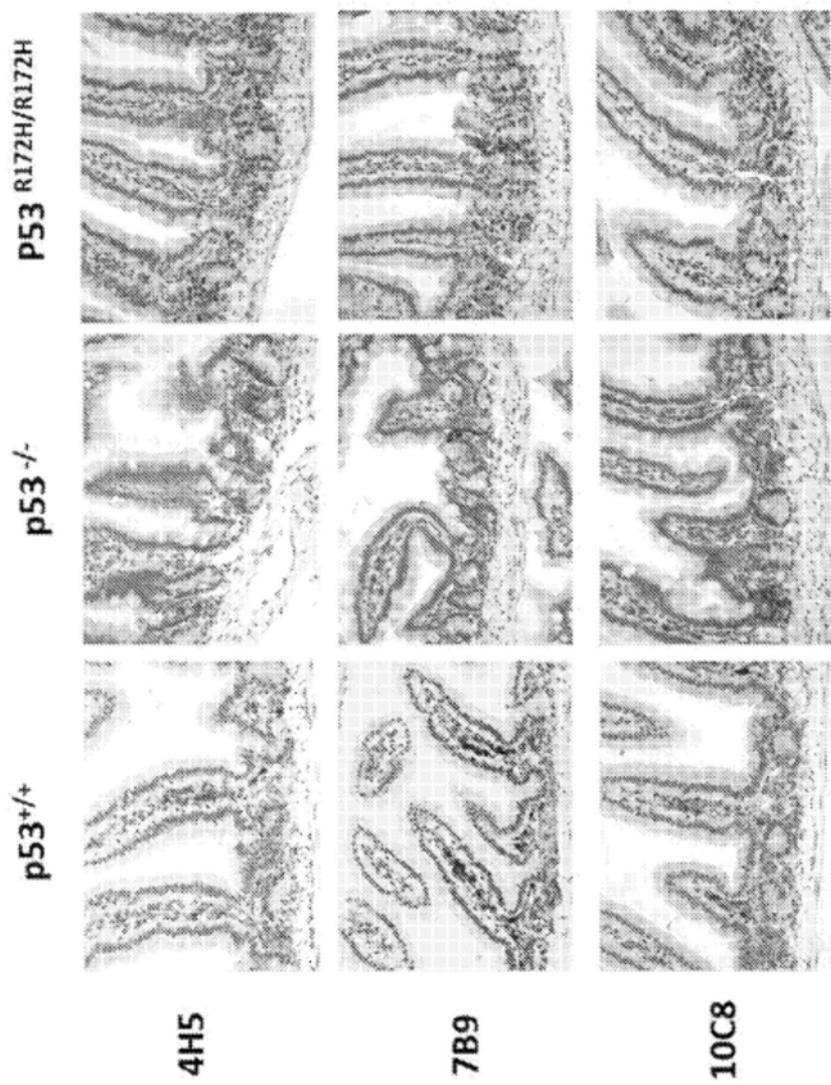


图23D

抗 R175H 克隆 4HS

DIVLTQSTSSLSVSAGERVTLCKSSQSLLNSGNQKSYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRE
SGVPDRFTGSGSETDFTLTISSVQPEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO:18)

LC-CDR1: QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19)
LC-CDR2: GAS (SEQ ID NO:20)
LC-CDR3: QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)

抗 R175H 克隆 7B9

DIVMTQSPSSLSVSGGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
ESGVVPDRFAGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGGTKLELK (SEQ ID
NO:22)

LC-CDR1: QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23)
LC-CDR2: GAS (SEQ ID NO:20)
LC-CDR3: QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)

抗 R175H 克隆 10C8

DIVMTQSPSSLSVSGGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
ESGVVPDRFAGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGGTKLELK (SEQ ID
NO:22)

LC-CDR1: QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23)
LC-CDR2: GAS (SEQ ID NO:20)
LC-CDR3: QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)

图24

抗 R175H 克隆 4H5

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGFTF**EY**TMHWMKQSHGRSLEWIGRIDPNNGVTVY
NQKFKVKATLTVDRSSSTAYLELRLSLTSEDSAVYY**CARWGGDYY**VTGGGTTLTVSS (SEQ ID
NO:24)

HC-CDR1: GFTF**EY** (SEQ ID NO:25)

HC-CDR2: IDPNNGV**T** (SEQ ID NO:26)

HC-CDR3: ARWGGD**YV** (SEQ ID NO:27)

抗 R175H 克隆 7B9

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTF**EY**TMHWMKQSHGKSLEWIGRIN**PYSGGT**TVY
NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRLSLTSD**DSAVYY****CARWGGDYY**VTGGGTTLTVSS (SEQ
ID NO:28)

HC-CDR1: GYTF**EY** (SEQ ID NO:29)

HC-CDR2: IN**PYSGGT** (SEQ ID NO:30)

HC-CDR3: ARWGGD**YV** (SEQ ID NO:27)

抗 R175H 克隆 10C8

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTF**EY**TMHWMKQSHGKSLEWIGRIN**PYSGGT**TVY
NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRLSLTSD**DSAVYY****CARWGGDYY**VTGGGTTLTVSS (SEQ
ID NO:28)

HC-CDR1: GYTF**EY** (SEQ ID NO:29)

HC-CDR2: IN**PYSGGT** (SEQ ID NO:30)

HC-CDR3: ARWGGD**YV** (SEQ ID NO:27)

图25

抗 R175H 克隆	CDR 1	CDR 2	CDR 3
轻链			
4H5	QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19)	GAS (SEQ ID NO:20)	QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)
7B9	QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23)	GAS (SEQ ID NO:20)	QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)
10C8	QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23)	GAS (SEQ ID NO:20)	QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)
共有序列	QSLLNSGNQKSX, (SEQ ID NO:31) 其中 $X_1 = Y$ or N	GAS (SEQ ID NO:20)	QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)
重链			
4H5	GFTFTEYLT (SEQ ID NO:25)	IDPNNGVTT (SEQ ID NO:26)	ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)
7B9	GYTFTEYLT (SEQ ID NO:29)	INPYSGGT (SEQ ID NO:30)	ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)
10C8	GYTFTEYLT (SEQ ID NO:29)	INPYSGGT (SEQ ID NO:30)	ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)
共有序列	$GX_2TFTEYLT$ (SEQ ID NO:32) 其中 $X_2 = F$ or Y	$IX_3PX_4X_5GX_6T$ (SEQ ID NO:33) 其中 $X_3 = D$ or N ; $X_4 = N$ or Y ; $X_5 = N$ or S ; 并且 $X_6 = V$ or G	ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)

图26

轻链可变结构域抗 R175H 克隆 4H5

>4H5_aa_L
 DIVLTQSTSSLSVSAGERVTLCKSSQSLLNSGNQKSYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRE
 SGVPDRFTGSGSETDFTLISSVQPEDLAVYYCQNDHSYPLTFAGTKLELK [SEQ ID
 NO:18]

>4H5_ntd_L
 GATATTGTGCTCACCCAATCTACATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCTGGAGAGAGGGTCA
 CTTTGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAATCAAAAGAGTTACTTG
 GCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGGCCCTCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCA
 CTAGGGAATCTGGGTCCCTGATCGCTCACAGGCAGTGGATCTGAAACCGATTTCAC
 TCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAGAATGATC
 ATAGTTATCCGCTCACGTTGGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO: 34]

抗 R175H 克隆 7B9

>7B9_aa_L
 DIVMTQSPSSLSVSGGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
 ESGVPDRFAGSGSGTDFTLISSLVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGGTKELEK [SEQ ID
 NO:22]

>7B9_ntd_L
 GATATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGGAGGGAGAAGGTCA
 CTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAATCAAAAGAGCAACTTG
 GCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGGCCCTCTAAATTGTTGATCTATGGGGCATCCA
 CTAGGGAATCTGGGTCCCTGATCGCTTCGCAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCAC
 TCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAAAATGATC
 ATAGTTATCCGCTCACGTTGGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO: 35]

抗 R175H 克隆 10C8

>10C8_aa_L
 DIVMTQSPSSLSVSGGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
 ESGVPDRFAGSGSGTDFTLISSLVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGGTKELEK [SEQ ID
 NO: 22]

>10C8_ntd_L
 GATATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGGAGGGAGAAGGTCA
 CTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAATCAAAAGAGCAACTTG
 GCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGGCCCTCTAAATTGTTGATCTATGGGGCATCCA
 CTAGGGAATCTGGGTCCCTGATCGCTTCGCAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCAC
 TCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAAAATGATC
 ATAGTTATCCGCTCACGTTGGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO: 36]

图27

重链可变结构域**抗 R175H 克隆 4H5**

>4H5_aa_H
 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGFTFTEYTMHWMKQSHGRSLEWIGRIDPNNGVTY
 NQKFKVKATLTVDRSSSTAYLELRLSLTSEDSAVYYCARWGGDYVTGGTTLTVSS [SEQ ID NO: 24]

>4H5_ntd_H
 GAGGTTCAAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGA
 TATCTTGCAAGACTTCCGGATTACATTCACTGAATACACCATGCACTGGATGAAACAG
 AGCCATGGAAGGAGGCCCTTGAGTGGATCGACGTATTGATCCTAACATGGTGTTACTGT
 TTATAACCAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCACATTGACTGTGGACAGGTCCCTCCAGCAC
 GCCTATCTGGAGCTCCGCAGCTGACGTCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA
 GATGGGGTGGTGACTACGTACGGGGGAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 37]

抗 R175H 克隆 7B9

>7B9_aa_H
 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWMKQSHGRSLEWIGRINPYSGGTY
 NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRLSLTSDDSAVYYCARWGGDYVTGGTTLTVSS [SEQ ID NO: 28]

>7B9_ntd_H
 GAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAG
 ATATCCTGCAAGACTTCTGGCTACACTTCACTGAATACACCATGCACTGGATGAAAGCA
 GAGCCATGGAAGAGGCCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAAATCCTTATAGTGGTGGTACTG
 TCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAGTCCCTCCAGCAC
 AGCCTATATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGATGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA
 GATGGGGTGGTGACTACGTACGGGGGAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 38]

抗 R175H 克隆 10C8

>10C8_aa_H
 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWMKQSHGRSLEWIGRINPYSGGTY
 NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRLSLTSDDSAVYYCARWGGDYVTGGTTLTVSS [SEQ ID NO: 28]

>10C8_ntd_H
 GAGGTGCAGCTTCAGCAGTCGGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAG
 ATATCCTGCAAGACTTCTGGCTACACTTCACTGAATACACCATGCACTGGATGAAAGCA
 GAGCCATGGAAGAGGCCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAAATCCTTATAGTGGTGGTACTG
 TCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAGTCCCTCCAGCAC
 AGCCTATATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGATGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA
 GATGGGGTGGTGACTACGTACGGGGGAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 39]

图27 (续)

抗 R248Q 克隆 3G11

DIVLTQTPLTLSVTIGQPASISCKSNQSLYSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV
PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTHFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:40)

LC-CDR1: QSLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)
LC-CDR2: LVS (SEQ ID NO:42)
LC-CDR3: WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)

抗 R248Q 克隆 4H2

DIVITQSPLTLSVTIGQPASISCKSDQSLYSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSELDSGV
PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTHFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:44)

LC-CDR1: QSLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)
LC-CDR2: LVS (SEQ ID NO:42)
LC-CDR3: WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)

图28

抗 R248Q 克隆 3G11

DVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYVKWVKQSPGQSLEWIGDIHPKNGGTN
YNQFKFKGAALTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCAKMGGYDDYWGQGTTTVSS
(SEQ ID NO:45)

HC-CDR1: GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)
HC-CDR2: IHPKNGGT (SEQ ID NO:47)
HC-CDR3: AKMGGYDDY(SEQ ID NO:48)

抗 R248Q 克隆 4H2

QVQLKQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYLKWVRQSHGKSLEWIGDIDPKNGGTNY
NQKFKFKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAKQGGFDDYWGQGTTTVSS (SEQ
ID NO:49)

HC-CDR1: GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)
HC-CDR2: IDPKNGGT (SEQ ID NO:50)
HC-CDR3: AKQGGFDDY(SEQ ID NO:51)

图29

抗 R248Q 克隆	CDR 1	CDR 2	CDR 3
轻链			
3G11	QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)	LVS (SEQ ID NO:42)	WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)
4H2	QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)	LVS (SEQ ID NO:42)	WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)
共有序列	QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)	LVS (SEQ ID NO:42)	WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)
重链			
3G11	GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)	IHPKNGGT (SEQ ID NO:47)	AKMGGYDDY(SEQ ID NO:48)
4H2	GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)	IDPKNGGT (SEQ ID NO:50)	AKQGGFDDY(SEQ ID NO:51)
共有序列	GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)	IX ₇ PKNGGT (SEQ ID NO:52) 其中 X ₇ = H或 D	AKX ₈ GGX ₉ DDY (SEQ ID NO:53) 其中 X ₈ = N或 Q 并且 X ₉ = Y或 F

图30

轻链可变结构域抗 R248Q 克隆 3G11

>3G11_aa_L
 DIVLTQPLTSLVTIGQPASISCKSNQSLYSDGKTYLNWLLQRPGQSPKR~~LIYLVSKLDGV~~
 PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG~~LYC~~WQGTHFPLTFGAGTKLELK [SEQ ID NO:40]

>3G11_ntd_L
 GATATTGTGCTGACACAGACTCCACTCACTTGTCCGGTTACCATGGACAACCAGCCTC
 CATCTCTTGCAAGTCAAATCAGAGCCTCTTATATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTG
 GTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCTTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGG
 ACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTGAA
 AATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATT
 TTCCTCTACGTTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO: 54]

抗 R248Q 克隆 4H2

>4H2_aa_L
 DIVITQSPLTSLVTIGQPASISCKSDQSLYSDGKTYLNWLLQRPGQSPKR~~LIYLVSELDGV~~
 PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG~~LYC~~WQGTHFPLTFGAGTKLELK [SEQ ID NO:44]

>4H2_ntd_L
 GACATTGTGATCACACAGTCTCCACTCACTTGTCCGGTTACCATGGACAACCAGCCTC
 CATCTCTTGCAAGTCAGATCAGAGCCTCTTATATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTG
 GCTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCTTAATCTATCTGGTGTCTGA~~ACTG~~
 GACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTGA
 AAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACAT
 TTCCTCTACGTTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO: 55]

图31

重链可变结构域抗 R248Q 克隆 3G11

>3G11_aa_H
 DVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYYVKWVKQSPGQSLEWIGDIHPKNGGTN
 YNQKFKGKAALTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCAKMGGYDDYWGQGTTLVSS
 [SEQ ID NO:45]

>3G11_ntd_H
 GATGTGCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGA
 TGTCCCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACTATGTGAAGTGGGTGAAGCAG
 AGTCCTGGACAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTCTAAGAACGGTGGTACTAA
 CTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCATTGACTGTGGACAAATCCTCCAGCACA
 GCCTACATGCAGCTAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTCTGTGCAA
 AATGGGAGGCTACGACGACTACTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 [SEQ ID NO: 56]

抗 R248Q 克隆 4H2

>4H2_aa_H
 QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYYLKWVRQSHGKSLEWIGDIHPKNGGTN
 YNQKFKGKAALTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAKQGGFDDYWGQGTTLVSS [SEQ
 ID NO:49]

>4H2_ntd_H
 CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAG
 ATGTCCCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACTATCTGAAGTGGTGAGGCA
 GAGTCATGGAAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATAGATCCAAAGAATGGTGTTACT
 AATTACAACCAGAAAGTTAACAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAATCCTCCAGCAC
 AGCCTACATGCAGCTAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA
 AACAGGGGGGGTTCGACGACTACTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 [SEQ ID NO: 57]

图31 (续)

抗 R273H 克隆 13E4

DIVMTQSPLSLPVNLGDQVSLSCRSSQSIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHLPLTFGSGTKLELK (SEQ ID NO:58)

LC-CDR1: QSIVHNNGDTY (SEQ ID NO:59)
 LC-CDR2: KVS (SEQ ID NO:60)
 LC-CDR3: FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61)

图32

抗 R273H 克隆 13E4

EVQLLETGGDLVTPGGSLKLS
CAASGFSFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISVGGTYTFY
SDNVKGRFVISRDNARKNLHLEMNSLKSEDAAMYYCVRDGNDGKFLGYWGQGTFVT
S (SEQ ID NO:62)

HC-CDR1: GFSFSDYY (SEQ ID NO:63)
HC-CDR2: ISVGGTYT (SEQ ID NO:64)
HC-CDR3: VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65)

图33

抗 R273H 克隆 13E4轻链可变结构域

>13E4_aa_L
DIVMTQSPLSLPVNLGDQVSLSCRSSQSIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHLPLTFGSGTKLELK [SEQ ID NO:58]

>13E4_ntd_L
GATATTGTGATGACACAATCTCCACTCTCCTGCCTGTCAATCTTGGAGATCAAGTCTC
CCTCTTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATAATGGAGACACCTATTTAGAATG
GTACCTACAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGAT
TTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAA
GATCAGCAGAGTGAGGCTGAGGATCTGGGAATTATTACTGCTTCAAGGTTCACATC
TTCCGCTCACGTTGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO: 66]

重链可变结构域

>13E4_aa_H
EVQLLETGGDLVTPGGSLKLS
CAASGFSFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISVGGTYTFY
SDNVKGRFVISRDNARKNLHLEMNSLKSEDAAMYYCVRDGNDGKFLGYWGQGTFVT
S (SEQ ID NO:62)

>13E4_ntd_H
GAAGTGCAGCTGTTGGAGACTGGGGGAGACTTAGTGACGCCCTGGAGGGTCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGCTTCAGTGACTATTATGTATTGGGTTGCCA
GACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACTATTAGTGTGGTACATACACC
TTCTATTCAGACAATGTGAAGGGGAGATTCGTCATCTCCAGAGACAATGCCAGGAAAAA
TCTGCATCTGGAAATGAACAGTCTGAAGTCTGAGGGACGCAGCCATGTATTACTGTGAA
GAGATGGCAACGATGGAAAATTCTTGGGTACTGGGGCCAGGGGACTTCGTCACTGT
CACT [SEQ ID NO: 67]

图34

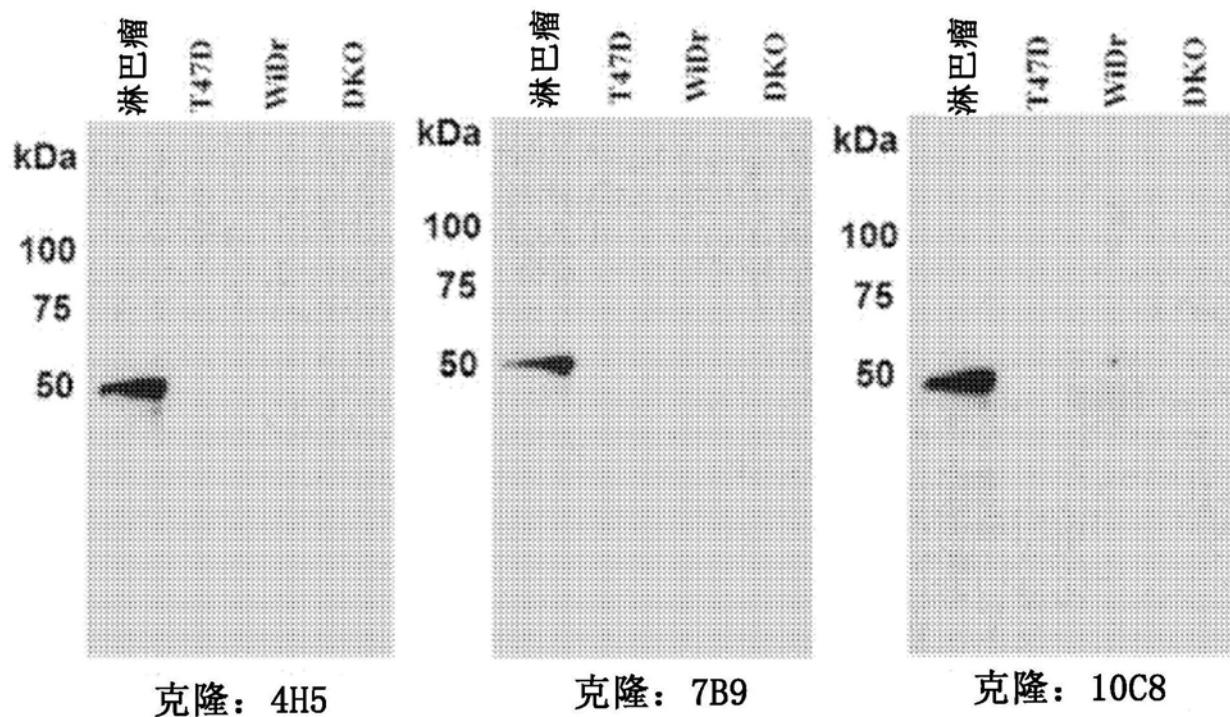


图35

克隆： 4H5

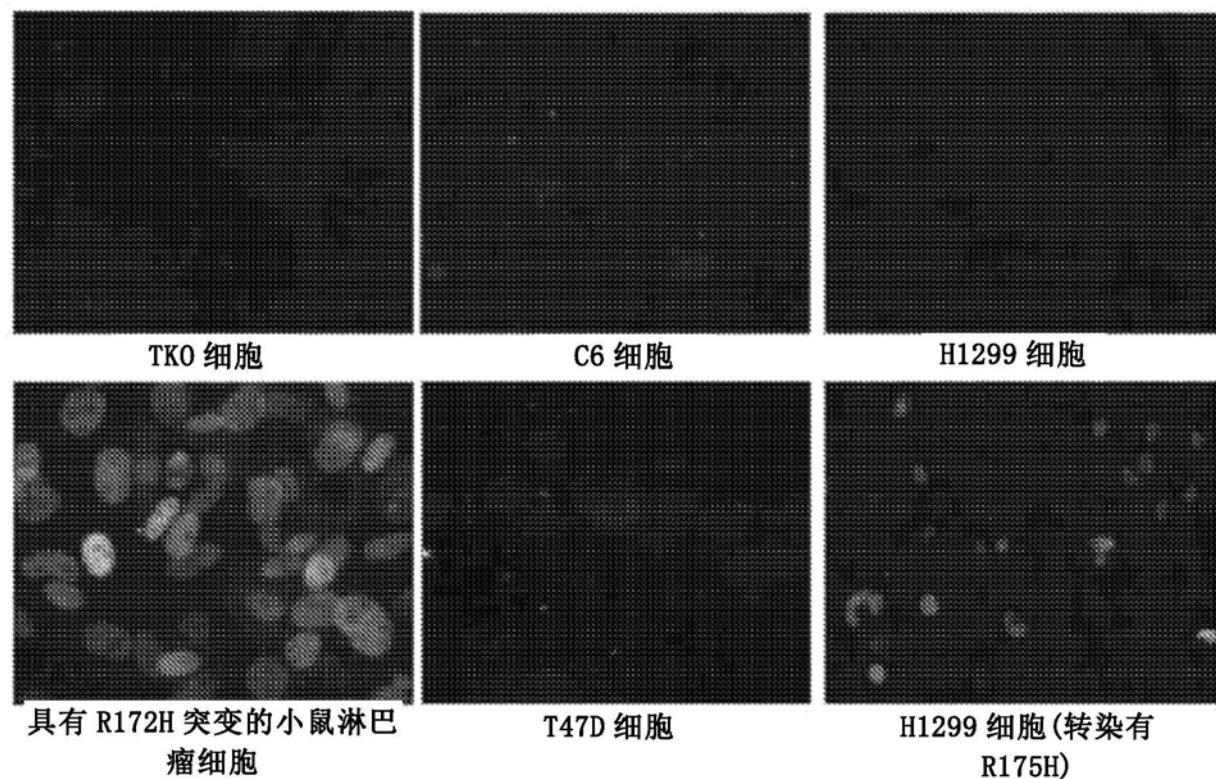


图36A

克隆：7B9

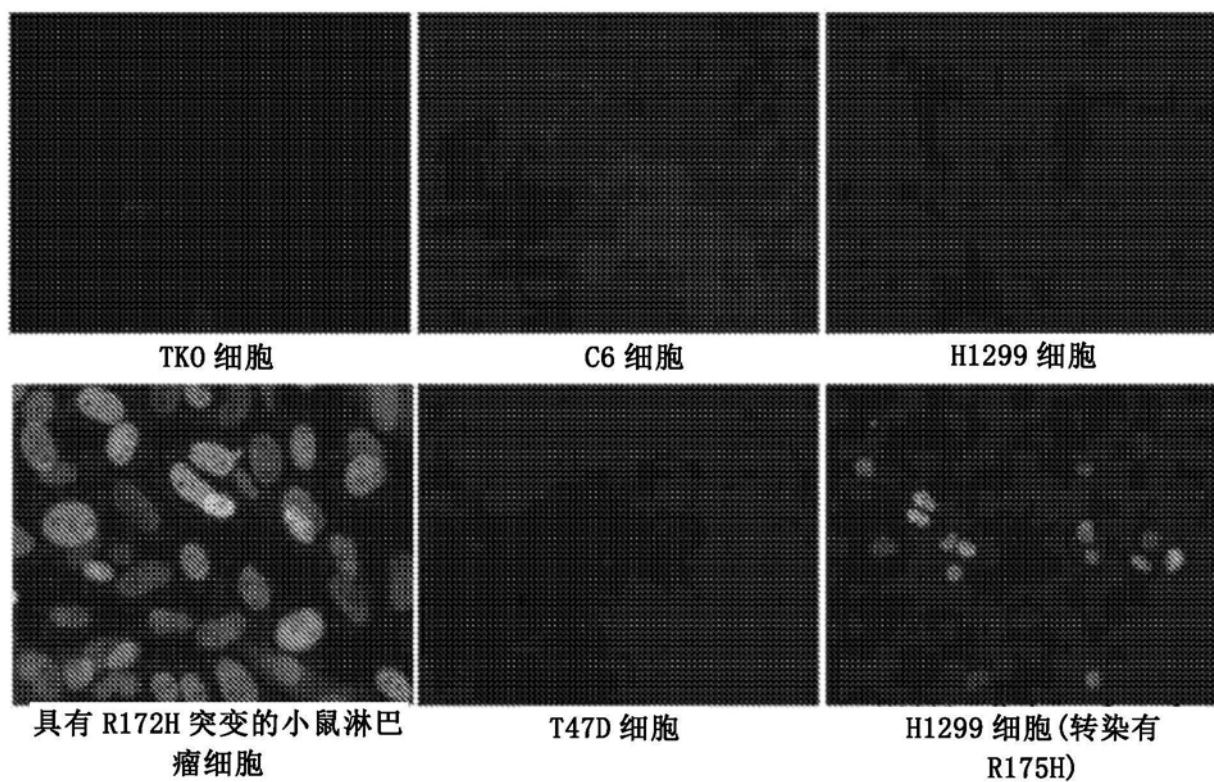


图36B

克隆：10C8

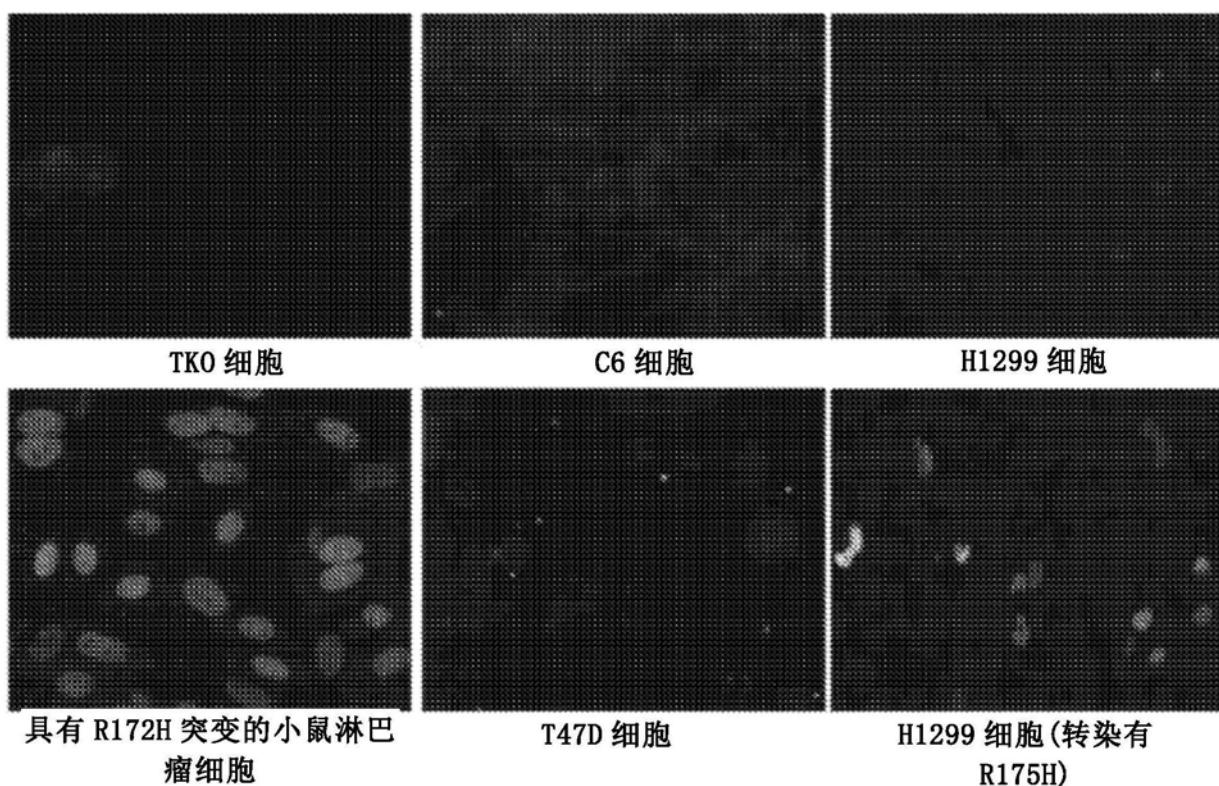


图36C

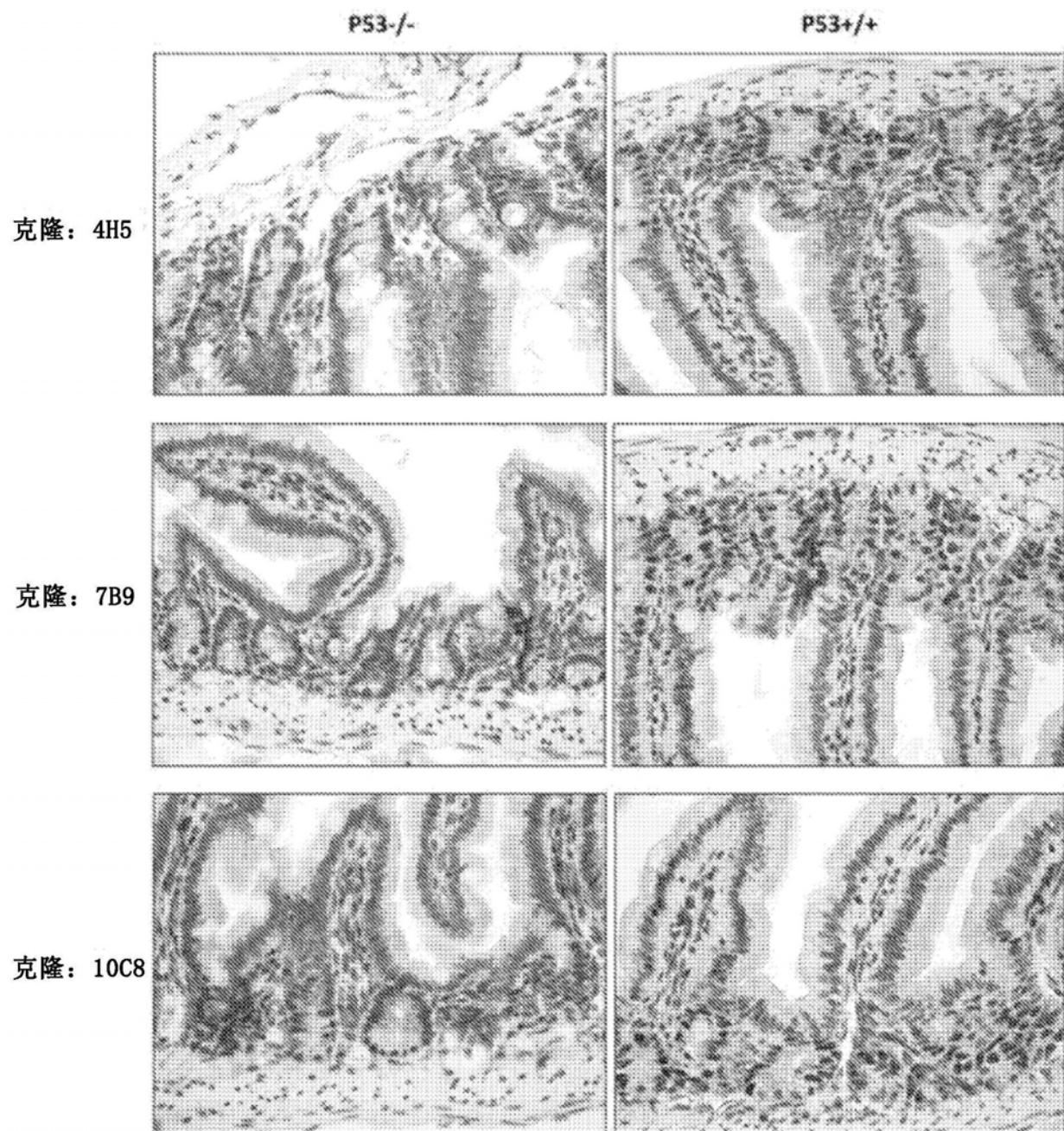


图37

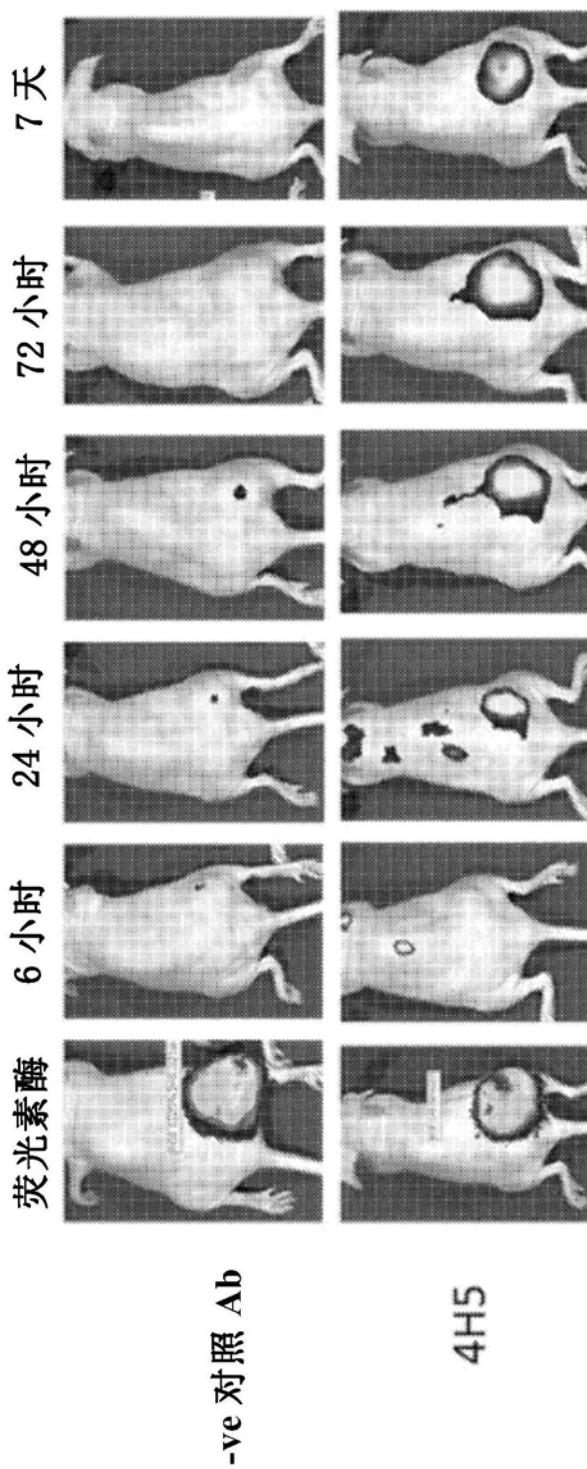


图38

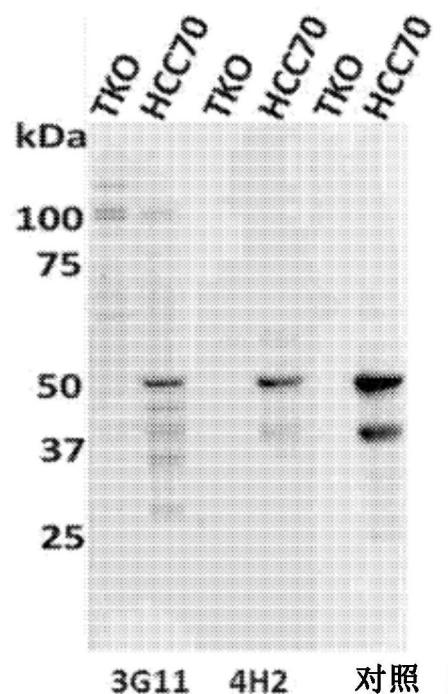


图39

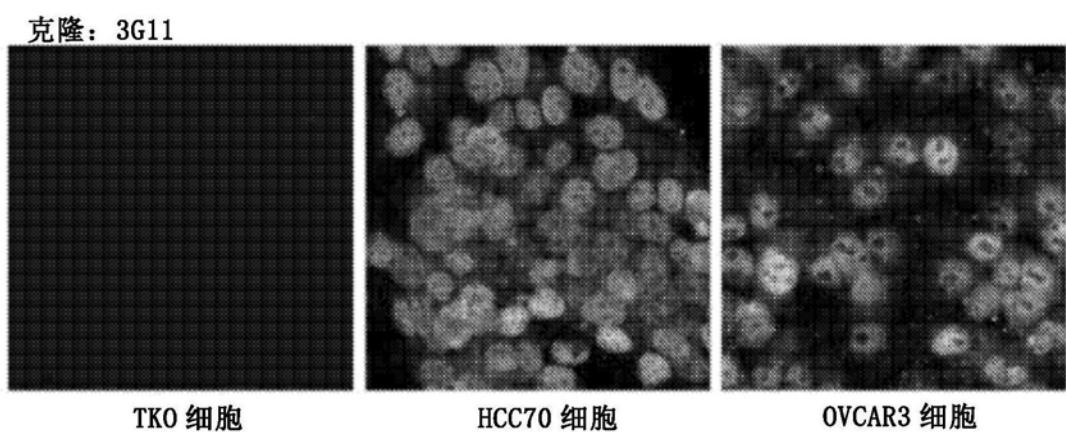


图40A

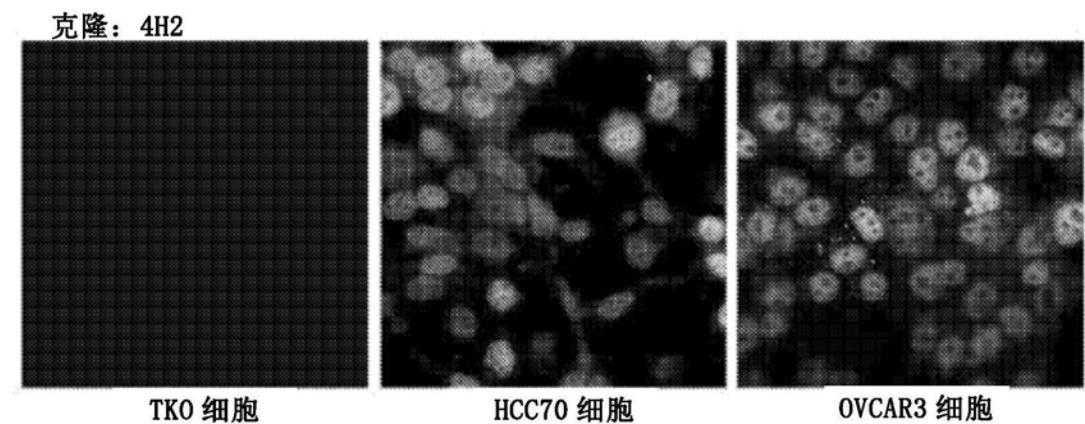


图40B

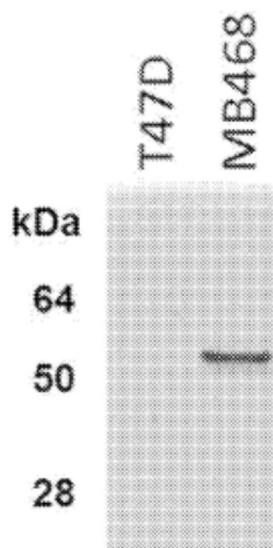


图41

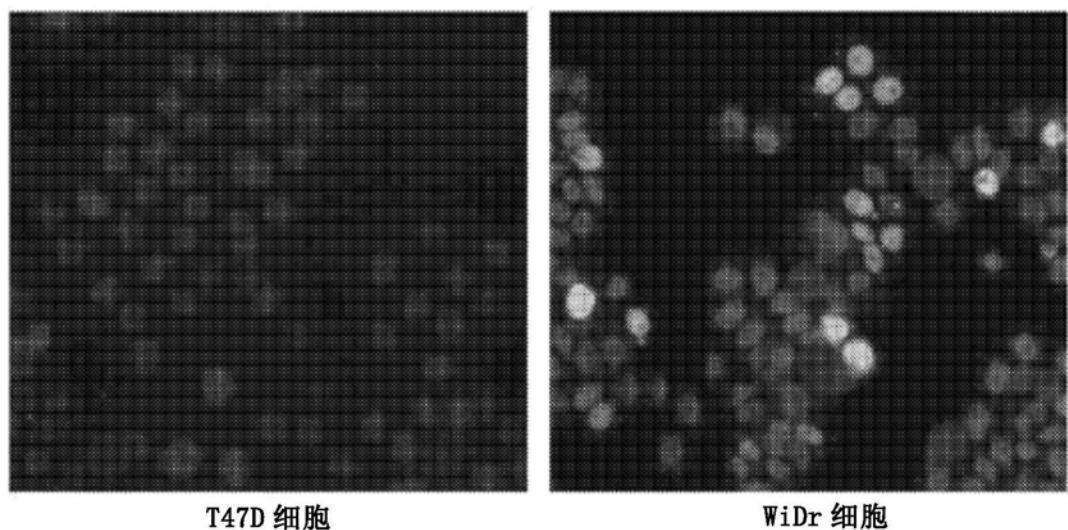


图42

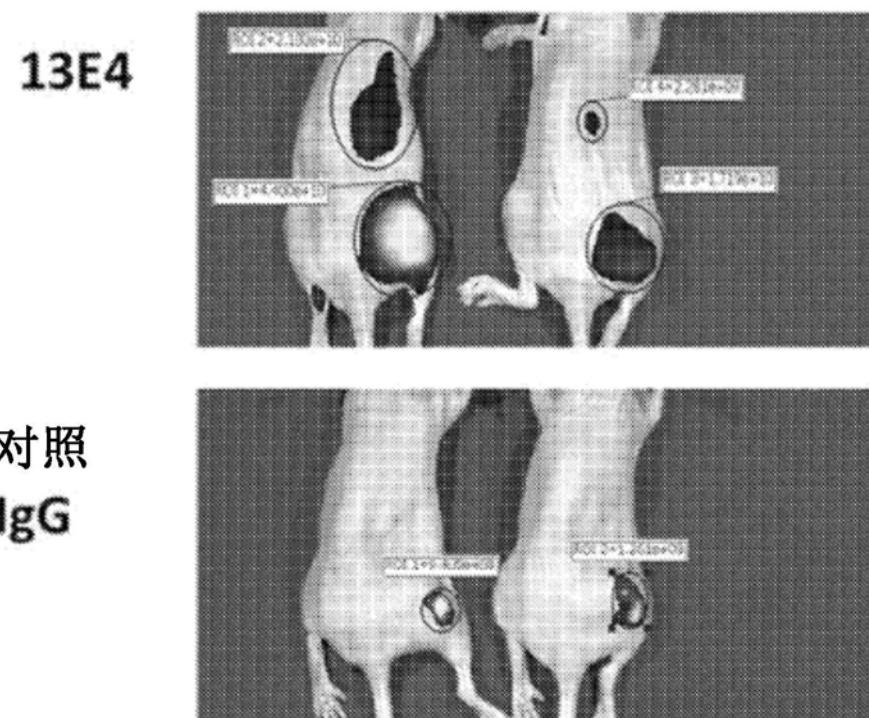


图43

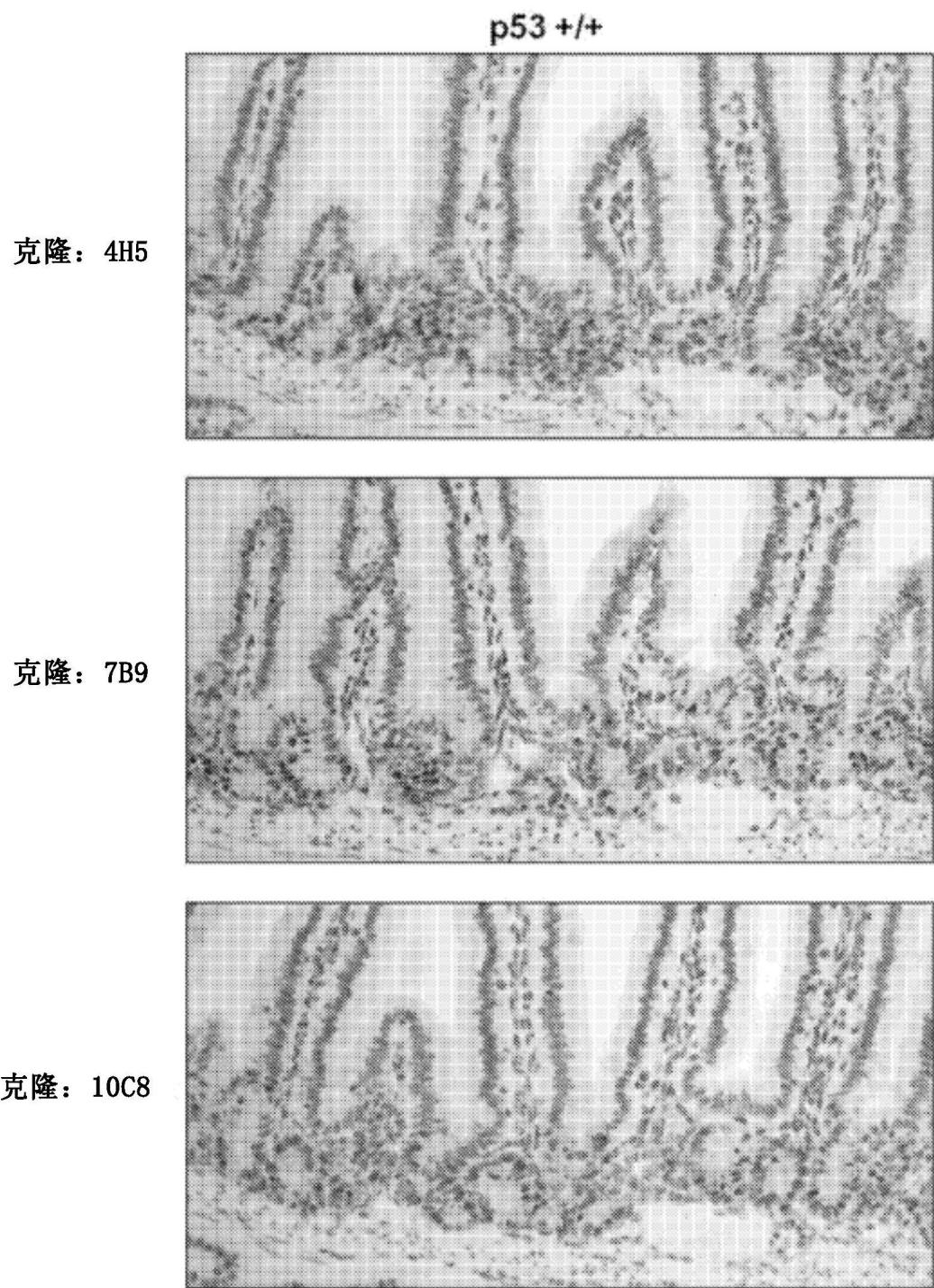


图44

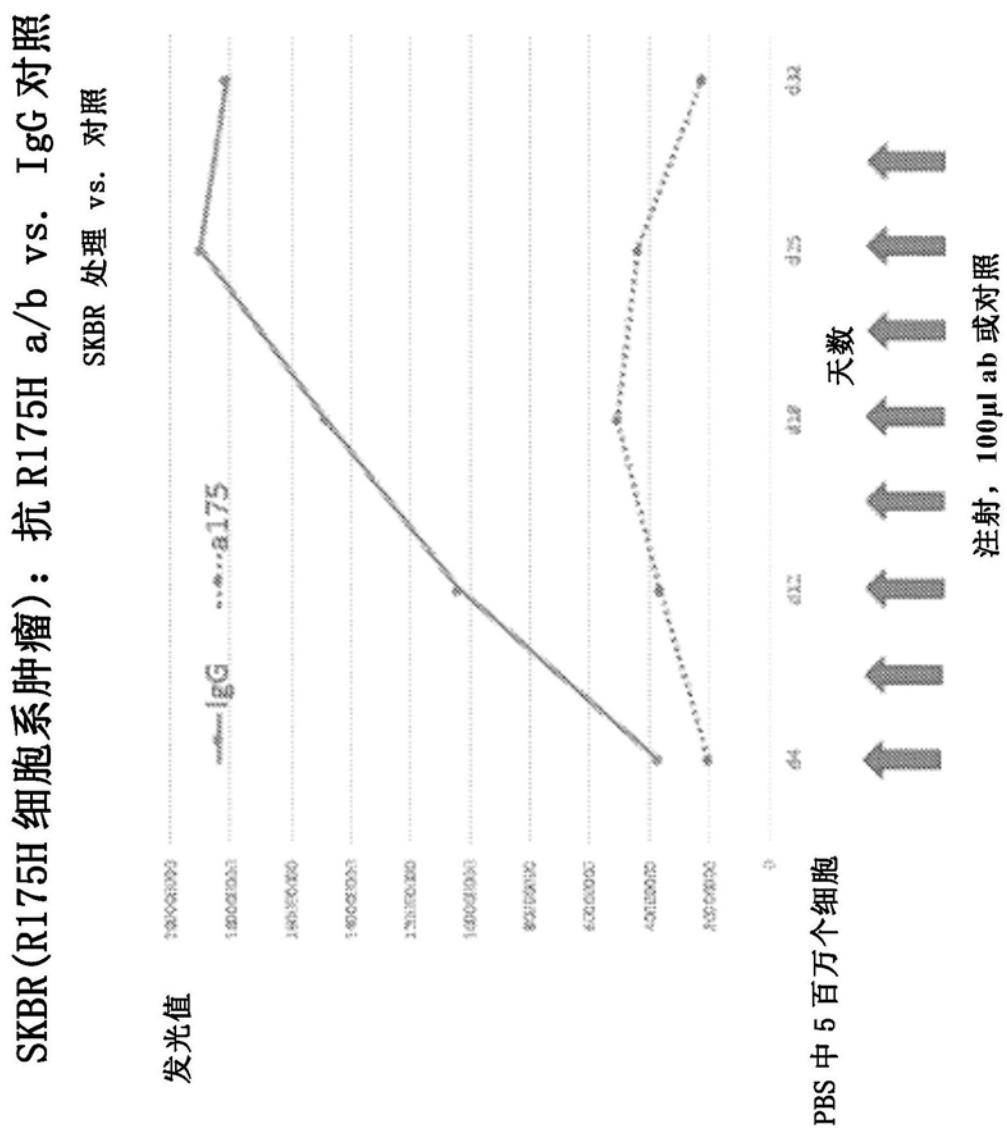


图45

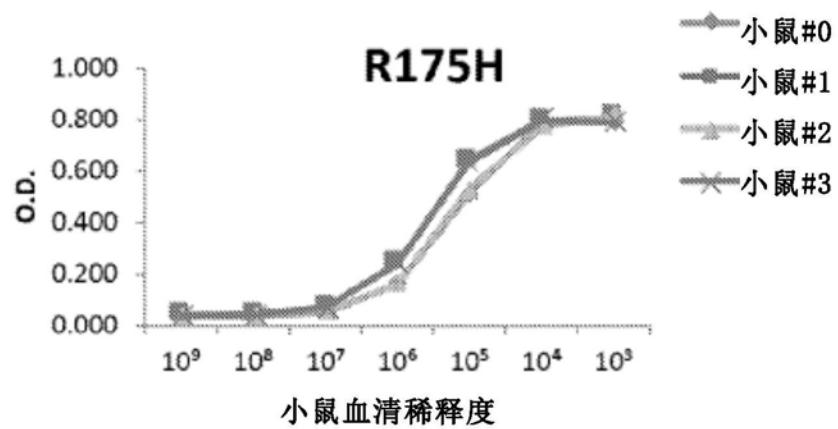


图46A

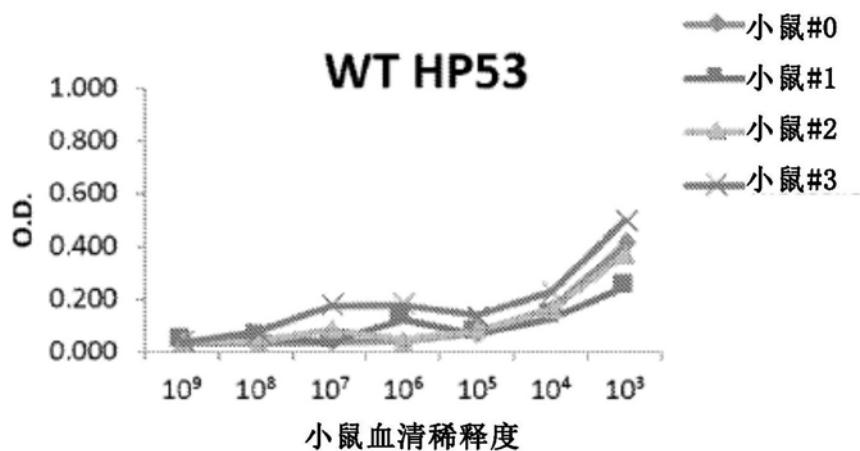


图46B

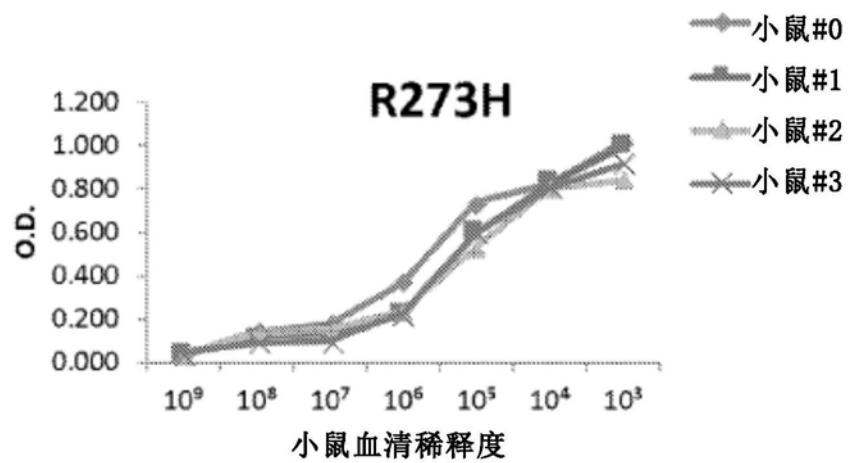


图46C

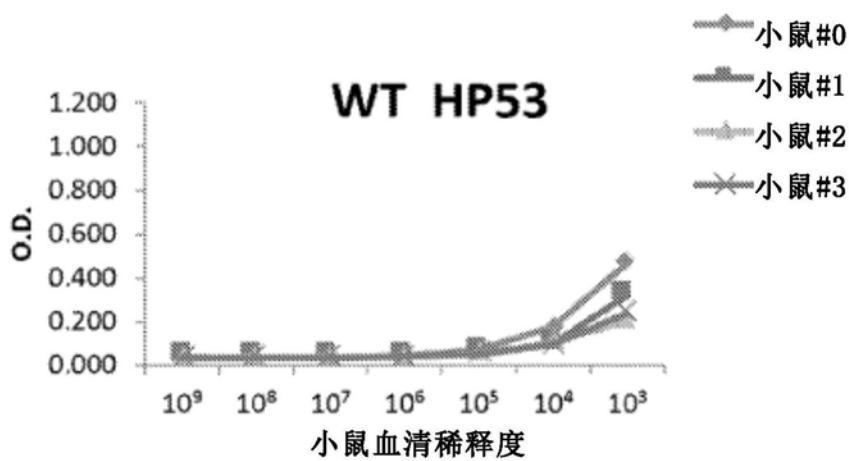


图46D

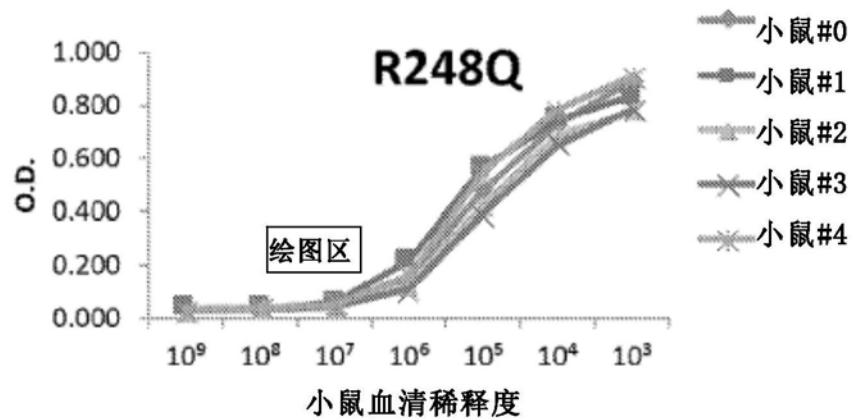


图46E

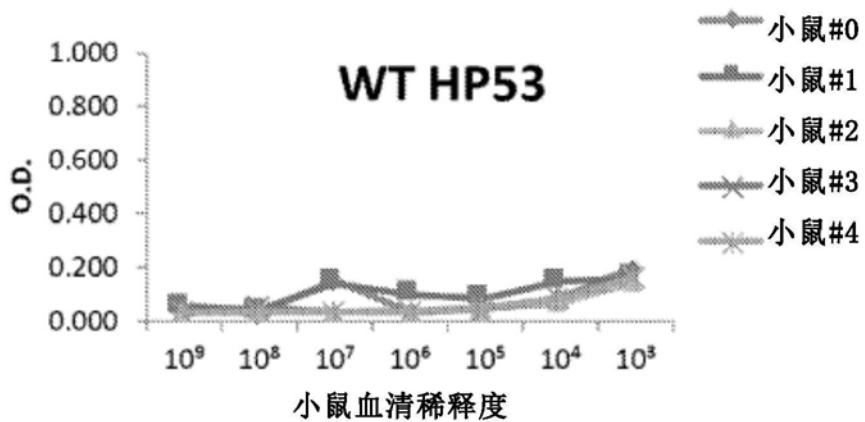
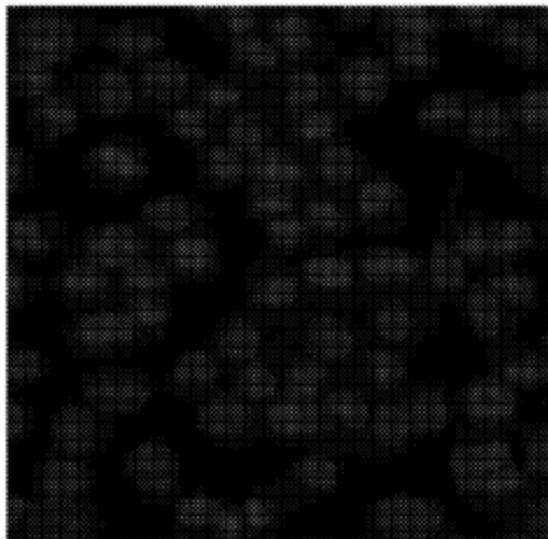


图46F

R175H



R175H 阳性细胞的正常血清

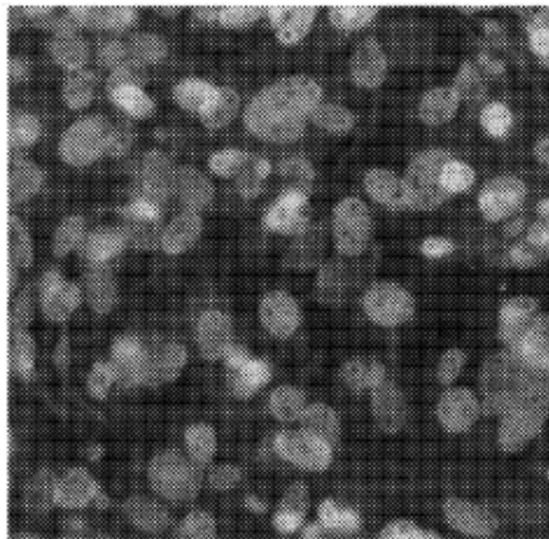
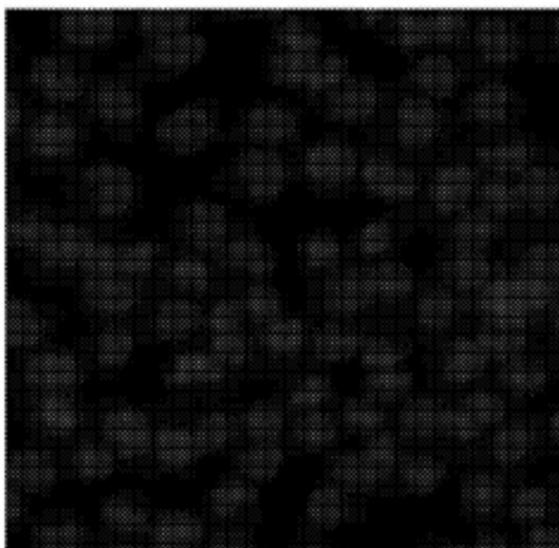
R175H 阳性细胞的 R175H
小鼠血清

图47A

R248Q



R248Q 阳性细胞的正常血清

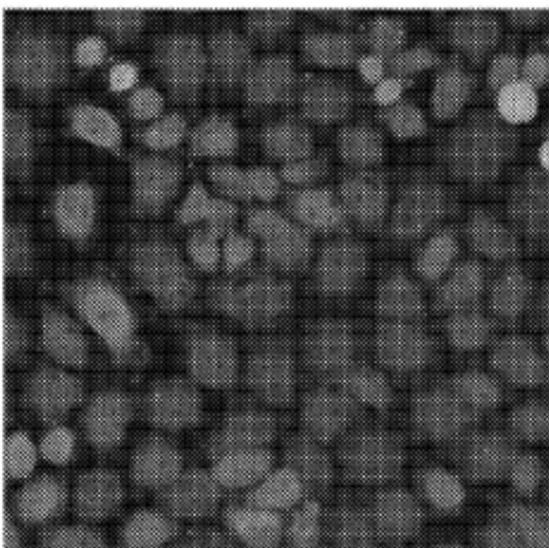
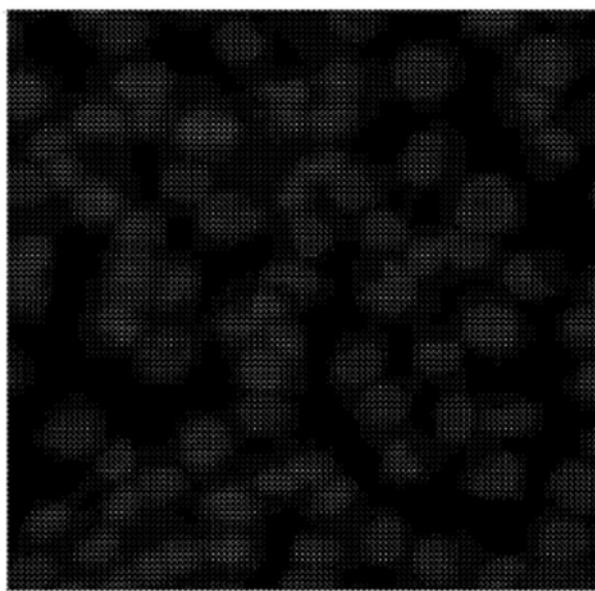
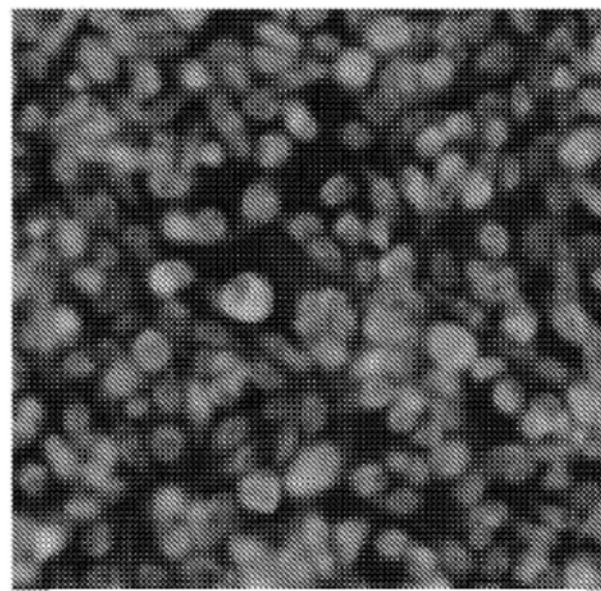
R248Q 阳性细胞的 R248Q
小鼠血清

图47B

R273H



R273H 阳性细胞的正常血清



R273H 阳性细胞的 R273H 小鼠血清

图47C

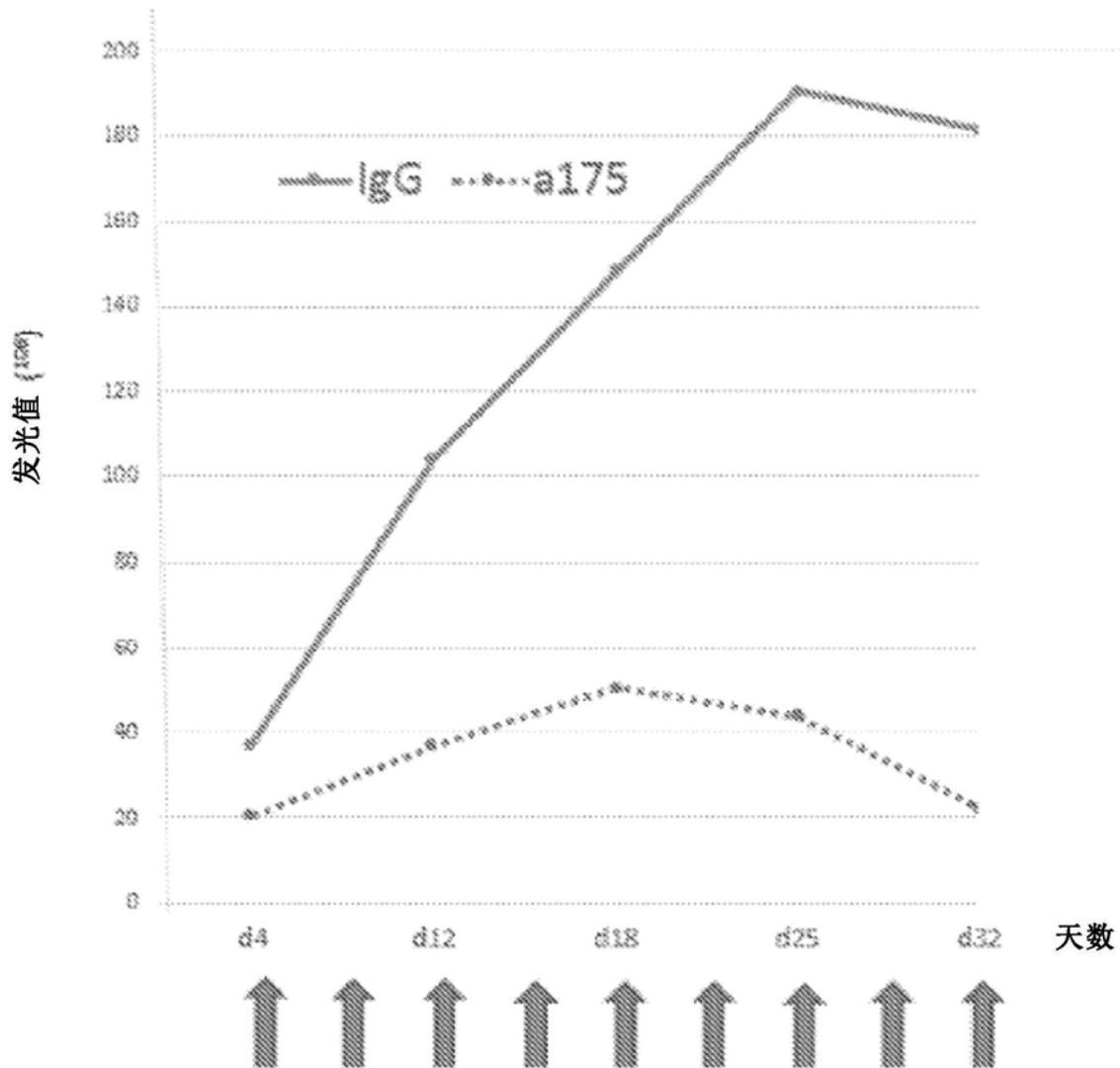


图48

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 4H5

DIVLTQSTSSLSVSAGERVTLSCKSSQSLLNSGNQKSYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRE
SGVPDRFTGSGSETDFTLTISSVQPEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO:237)

LC-CDR1: QSLLNSGNQKSY (SEQ ID NO:19)
LC-CDR2: GAS (SEQ ID NO:20)
LC-CDR3: QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 7B9

DIVMTQSPSSLSVSGGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
ESGVVPDRFAGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGGTKLELK (SEQ ID
NO:238)

LC-CDR1: QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23)
LC-CDR2: GAS (SEQ ID NO:20)
LC-CDR3: QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 10C8

DIVMTQSPSSLSVSGGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
ESGVVPDRFAGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGGTKLELK (SEQ ID
NO:238)

LC-CDR1: QSLLNSGNQKSN (SEQ ID NO:23)
LC-CDR2: GAS (SEQ ID NO:20)
LC-CDR3: QNDHSYPLT (SEQ ID NO:21)

图49

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 4H5

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGFTFTEYTMHWMKQSHGRSLEWIGRIDPNNGVTY
NQKFKVKATLTVDRSSSTAYLELRLSLTSEDSAVYYCARWGGDYVTGGGTTLTVSS (SEQ ID
NO:239)

HC-CDR1: GFTFTEY (SEQ ID NO:25)

HC-CDR2: IDPNNGVT (SEQ ID NO:26)

HC-CDR3: ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 7B9

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWMKQSHGKSLEWIGRINPYSGGTY
NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRLSLTSDDSAVYYCARWGGDYVTGGGTTLTVSS (SEQ
ID NO:240)

HC-CDR1: GYTFTEY (SEQ ID NO:29)

HC-CDR2: INPYSGGT (SEQ ID NO:30)

HC-CDR3: ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 10C8

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWMKQSHGKSLEWIGRINPYSGGTY
NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRLSLTSDDSAVYYCARWGGDYVTGGGTTLTVSS (SEQ
ID NO:241)

HC-CDR1: GYTFTEY (SEQ ID NO:29)

HC-CDR2: INPYSGGT (SEQ ID NO:30)

HC-CDR3: ARWGGDYV (SEQ ID NO:27)

图50

轻链可变结构域小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 4H5

>MH 4H5_aa_L
 DIVLTQSTSSLSVSGERVTLSCKSSQSLLNSGNQKSYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRE
 SGVPDRFTGSGSETDFTLTISSVQPEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELK [SEQ ID NO:237]

>MH 4H5_ntd_L
 GATATTGTGcTCaCCaATCTACATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCTGGAGAGAGGGTCAC
 TTTGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAATCAAAAGAGTTACTTGG
 CCTGGTACCAGCAGAAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCAC
 TAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTCACAGGCAGTGGATCTGAAACCGATTCAC
 CTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTGTCAAATGATCA
 TAGTTATCCGCTCACGTTGGTGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO:242]

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 7B9

>MH 7B9_aa_L
 DIVMTQSPSSLSVSGGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
 ESGVPDRFAGSGSGTDFLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGGTKLELK [SEQ ID NO:238]

>MH 7B9_ntd_L
 GATATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGGAGGAGAGAAGGTCA
 CTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAATCAAAAGAGCAACTTG
 GCCTGGTACCAGCAGAAAACCAGGGCAGCCTCCTAAATTGTTGATCTATGGGGCATCCA
 CTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCGCAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTCAC
 TCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAAATGATC
 ATAGTTATCCGCTCACGTTGGTGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO:243]

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 10C8

>MH 10C8_aa_L
 DIVMTQSPSSLSVSGGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
 ESGVPDRFAGSGSGTDFLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGGTKLELK [SEQ ID NO:238]

>MH 10C8_ntd_L
 GATATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGGAGGAGAGAAGGTCA
 CTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAATCAAAAGAGCAACTTG
 GCCTGGTACCAGCAGAAAACCAGGGCAGCCTCCTAAATTGTTGATCTATGGGGCATCCA
 CTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCGCAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTCAC
 TCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAAATGATC
 ATAGTTATCCGCTCACGTTGGTGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO:243]

图51

重链可变结构域**小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 4H5**

>MH 4H5_aa_H

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGFTFEYTMHWMKQSHGRSLEWIGRIDPNNGVTVY
NQKFKVKATLTVDRSSSTAYLELRLSLTSEDSAVYYCARWGGDYVTGGGTTLVSS [SEQ ID
NO:239]

>MH 4H5_ntd_H

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
TATCTGCAAGACTTCCGGATTCACATTCACTGAATACACCATGCACTGGATGAAACAG
AGCCATGGAAGGAGCCTTGAGTGGATCGGACGTATTGATCCTAACAAATGGTGTACTGT
TTATAACCAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCACATTGACTGTGGACAGGTCCTCCAGCAC
GCCTATCTGGAGCTCCGCAGTCTGACGCTTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA
GATGGGGTGGTGAACAGTCACGGGGGGAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA [SEQ
ID NO:244]

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 7B9

>MH 7B9_aa_H

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFEYTMHWMKQSHGRSLEWIGRINPYSGGTVY
NQKFKKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSDDSAVYYCARWGGDYVTGGGTTLVSS [SEQ
ID NO:240]

>MH 7B9_ntd_H

GAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
ATATCCTGCAAGACTTCTGGCTACACTTCACTGAATACACCATGCACTGGATGAAAGCA
GAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTTATAGTGGTGGTACTG
TCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAGTCCTCCAGCAC
AGCCTATATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGATGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA
GATGGGGTGGTGAACAGTCACGGGGGGAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA [SEQ
ID NO:245]

小鼠-人嵌合抗 R175H 克隆 10C8

>MH 10C8_aa_H

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFEYTMHWMKQSHGRSLEWIGRINPYSGGTVY
NQKFKKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSDDSAVYYCARWGGDYVTGGGTTLVSS [SEQ
ID NO:241]

>MH 10C8_ntd_H

GAGGTGCAGCTTCAGTCAGTCGGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
ATATCCTGCAAGACTTCTGGCTACACTTCACTGAATACACCATGCACTGGATGAAAGCA
GAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTTATAGTGGTGGTACTG
TCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAGTCCTCCAGCAC
AGCCTATATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGATGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA
GATGGGGTGGTGAACAGTCACGGGGGGAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA [SEQ
ID NO:246]

小鼠-人嵌合抗 R273H 克隆 13E4

DIVMTQSPLSLPVNLGDQVSLSCRSSQSIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKRVEAEDLGIYYCFQGSHLPLTFGSGTKLELK (SEQ ID
 NO:247)

LC-CDR1: QSIVHNNGDTY (SEQ ID NO:59)
 LC-CDR2: KVS (SEQ ID NO:60)
 LC-CDR3: FQGSHLPLT (SEQ ID NO:61)

图53

小鼠-人嵌合抗 R273H 克隆 13E4

EVQLLETGGDLVTPGGSLKLSACAASGFSFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISVGGTYTFY
 SDNVKGRFVISRDNARKNLHLEMNSLKSEDAAMYYCVRDGNDGKFLGYWGQQGTFVTVT
 S (SEQ ID NO:248)

HC-CDR1: GFSFSDYY (SEQ ID NO:63)
 HC-CDR2: ISVGGTYT (SEQ ID NO:64)
 HC-CDR3: VRDGNDGKFLG (SEQ ID NO:65)

图54

小鼠-人嵌合抗 R273H 克隆 13E4 轻链可变结构域

>MH 13E4_aa_L
 DIVMTQSPLSLPVNLGDQVSLSCRSSQSIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKRVEAEDLGIYYCFQGSHLPLTFGSGTKLELK [SEQ ID
 NO:247]

>MH 13E4_ntd_L
 GATATTGTGATGACACAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAATCTTGGAGATCAAGTCTC
 CCTCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATAATGGAGACACCTATTTAGAATG
 GTACCTACAGAAACCAGGCCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGAT
 TTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAA
 GATCAGCAGAGTGGAGGGCTGAGGATCTGGGAATTATTACTGCTTCAAGGTTCACATC
 TTCCGCTCACGTTGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO:249]

图55

小鼠-人嵌合抗 R273H 克隆 13E4 重链可变结构域

>MH 13E4_aa_H

EVQLLETGGDLVTPGGSLKLS
CAASGFSFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISVGGTYTFY
SDNVKGRFVISRDNARKNLHLEMNSLKSEDAAMYYCVRDGNDGKFLGYWGQGTFVT
S [SEQ ID NO:248]

>MH 13E4_ntd_H

GAAGTGCAGCTGTTGGAGACTGGGGGAGACTTAGTGACGCC
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA
GACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCA
TTCTATTCA
GAGACAATGTGAAGGGGAGATT
TCTGCATCTGGAAATGAACAGTCTGAAGTCTGAGGGACGCAG
GAGATGGCAACGATGGAAA
CACTGTCTCT [SEQ ID NO:250]

图56

小鼠-人嵌合抗 R248Q 克隆 3G11

DIVLTQPLTLSVTIGQPASISCKSNQSLLYSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDGV
PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTHFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:251)

LC-CDR1: QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)

LC-CDR2: LVS (SEQ ID NO:42)

LC-CDR3: WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)

小鼠-人嵌合抗 R248Q 克隆 4H2

DIVITQSPLTLSVTIGQPASISCKSDQSLLYSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVELDGV
PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTHFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:252)

LC-CDR1: QSLLYSDGKTY (SEQ ID NO:41)

LC-CDR2: LVS (SEQ ID NO:42)

LC-CDR3: WQGTHFPLT (SEQ ID NO:43)

图57

小鼠-人嵌合抗 R248Q 克隆 3G11

DVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYVKWVKQSPGQSLEWIGDIIHPKNGGTN
YNQKFKGKAALTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCAKMGGYDDYWGQGTTLVSS
(SEQ ID NO:253)

HC-CDR1: GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)

HC-CDR2: IHPKNGGT (SEQ ID NO:47)

HC-CDR3: AKMGGYDDY (SEQ ID NO:48)

小鼠-人嵌合抗 R248Q 克隆 4H2

QVQLKQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYLKWVRQSHGKSLEWIGDIIDPKNGGTNY
NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAKQGGFDDYWGQGTTLVSS (SEQ
ID NO:254)

HC-CDR1: GYTFTDYY (SEQ ID NO:46)

HC-CDR2: IDPKNGGT (SEQ ID NO:50)

HC-CDR3: AKQGGFDDY (SEQ ID NO:51)

图58

小鼠-人嵌合抗 R248Q 克隆 3G11 轻链可变结构域

>MH 3G11_aa_L

DIVLTQTPLTLSVTIGQPASISCKSNQSLYSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDGV
PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTHFPLTFGAGTKLELK [SEQ ID NO:251]

>MH 3G11_ntd_L

GATATTGTGCTGACACAGACTCCACTCACTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTC
CATCTCTTGCAAGTCAAATCAGAGCCTCTTATATAGTGTGGAAAGACATATTTGAATTG
GTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGG
ACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAA
AATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATT
TTCCTCTCACGTTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO:255]小鼠-人嵌合抗 R248Q 克隆 4H2 轻链可变结构域

>MH 4H2_aa_L

DIVITQSPLTLSVTIGQPASISCKSDQSLYSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSELDGV
PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTHFPLTFGAGTKLELK [SEQ ID NO:252]

>MH 4H2_ntd_L

GACATTGTGATCACACAGTCTCCACTCACTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTC
CATCTCTTGCAAGTCAGATCAGAGCCTCTTATATAGTGTGGAAAGACATATTTGAATTG
GCTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTGAACCTG
GACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGA
AAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACAT
TTTCCTCTCACGTTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA [SEQ ID NO:256]

图59

小鼠-人嵌合抗 R248Q 克隆 3G11 重链可变结构域**>MH 3G11_aa_H**

DVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYVKWVKQSPGQSLEWIGDIHPKNGGTN
 YNQKFKGKAALTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCAKMGGYDDYWQQGTTLVSS
 [SEQ ID NO:253]

>MH 3G11_ntd_H

GATGTGCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
 TGTCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACTATGTGAAGTGGGTGAAGCAG
 AGTCCTGGACAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTCATCCTAAGAACGGTGGTACTAA
 CTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCGATTGACTGTGGACAAATCCTCCAGCACA
 GCCTACATGCAGCTAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTCTGTGCAA
 AATGGGAGGCTACGACGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 [SEQ ID NO:257]

小鼠-人嵌合抗 R248Q 克隆 4H2 重链可变结构域**>MH 4H2_aa_H**

QVQLKQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYLKWVRQSHGKSLEWIGDIDPKNGGTNY
 NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAKQGGFDDYWQQGTTLVSS [SEQ
 ID NO:254]

>MH 4H2_ntd_H

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 ATGTCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACTATCTGAAGTGGGTGAGGCA
 GAGTCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATAGATCCCAGAACATGGTGGTACT
 AATTACAACCAGAAGTTAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAATCCTCCAGCAC
 AGCCTACATGCAGCTAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA
 AACAGGGGGGGTTCGACGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 [SEQ ID NO:258]

图60

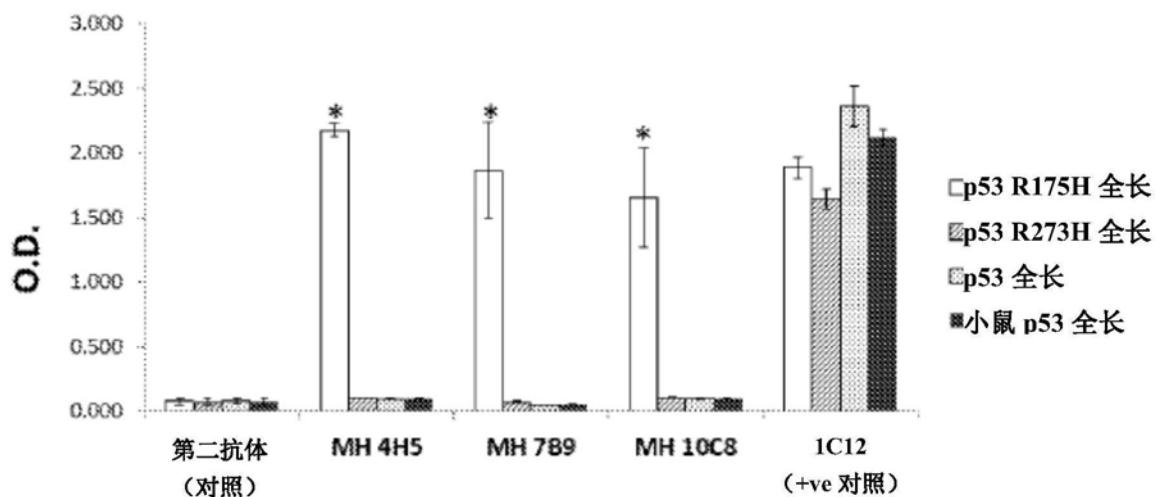


图61

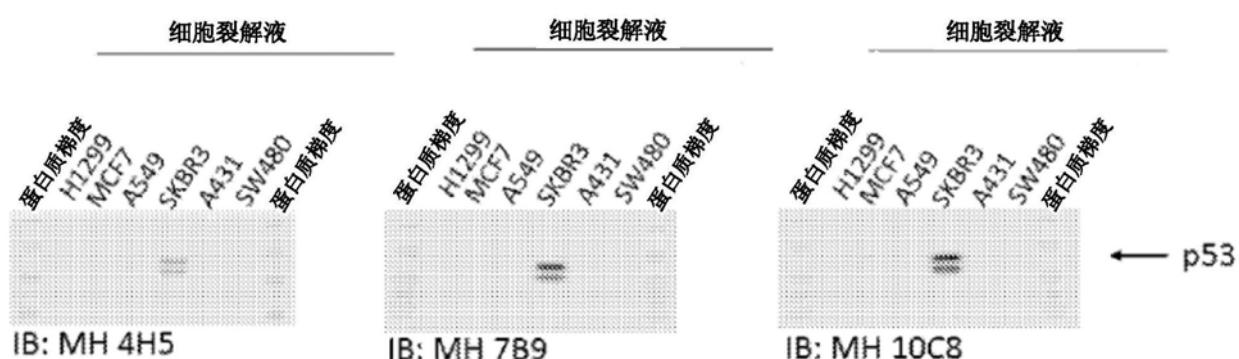


图62

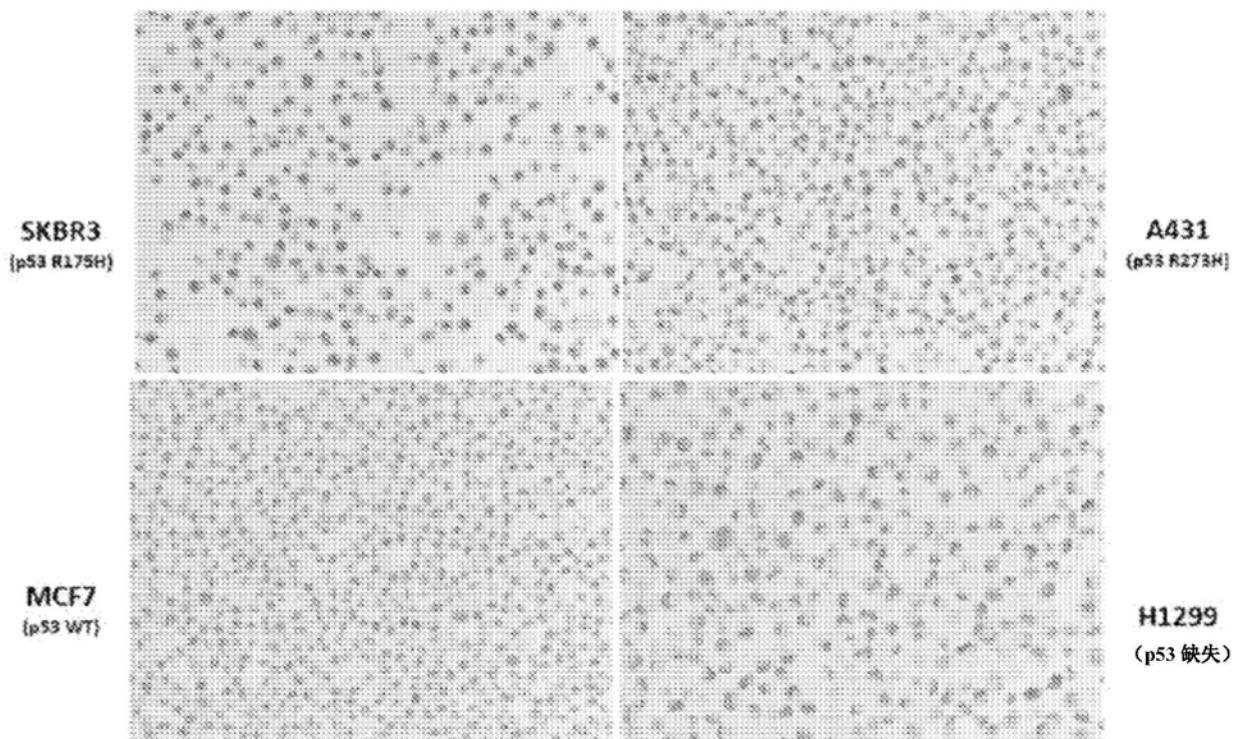


图63

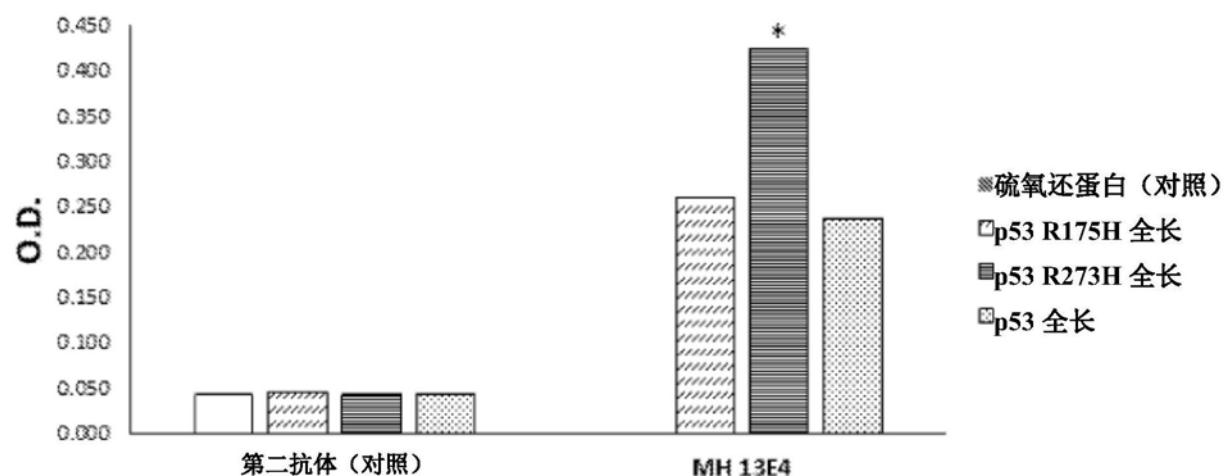


图64

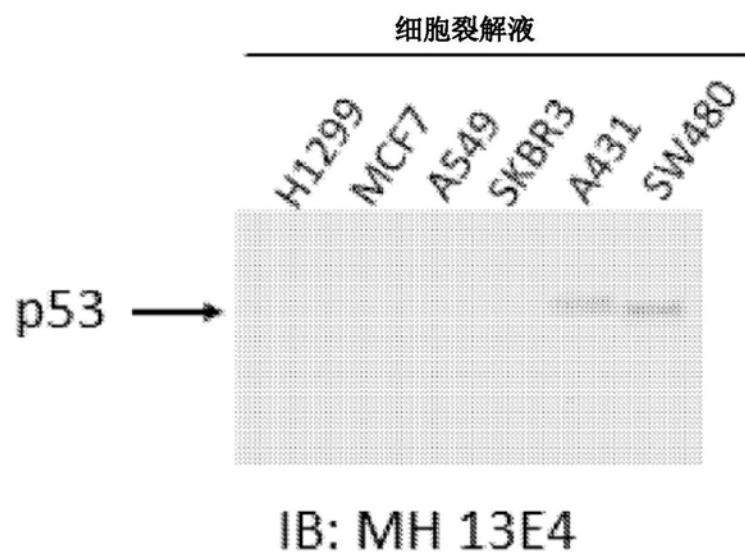


图65

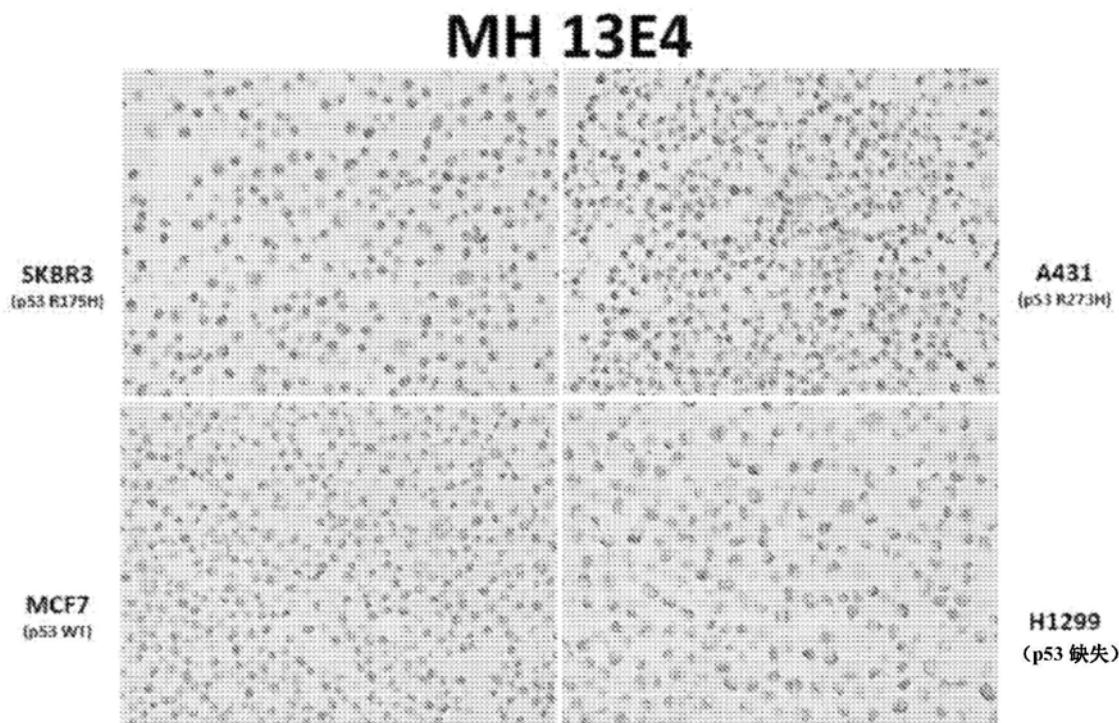
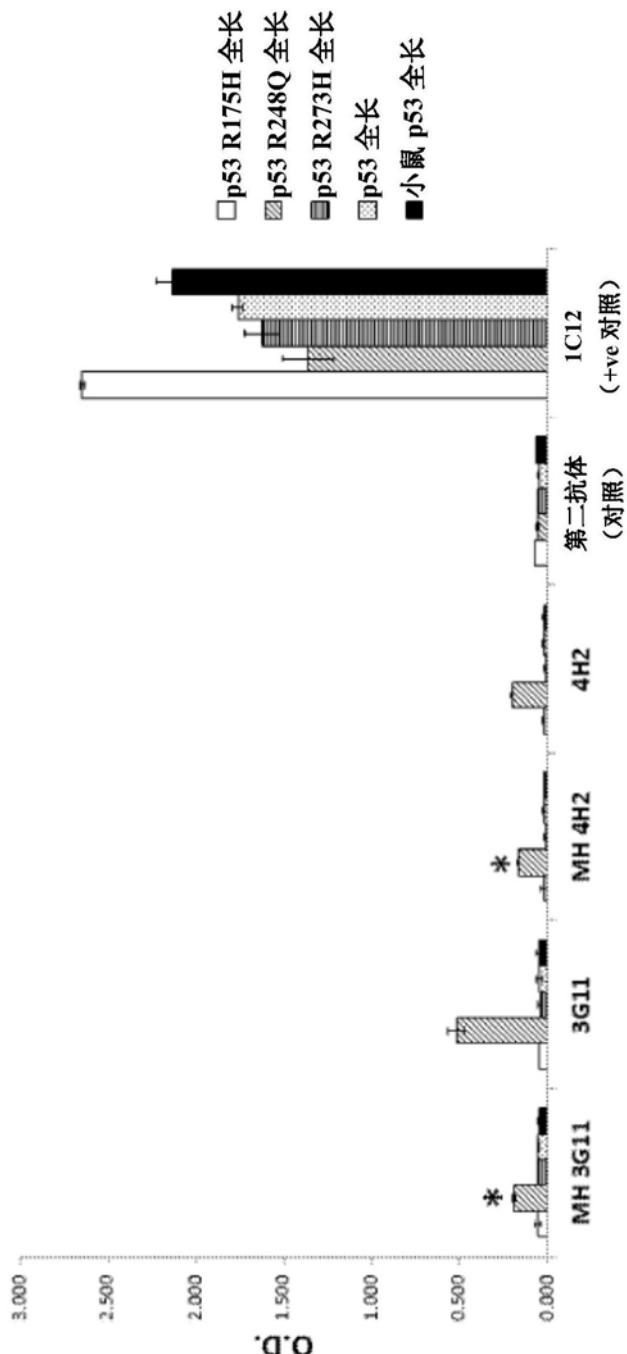


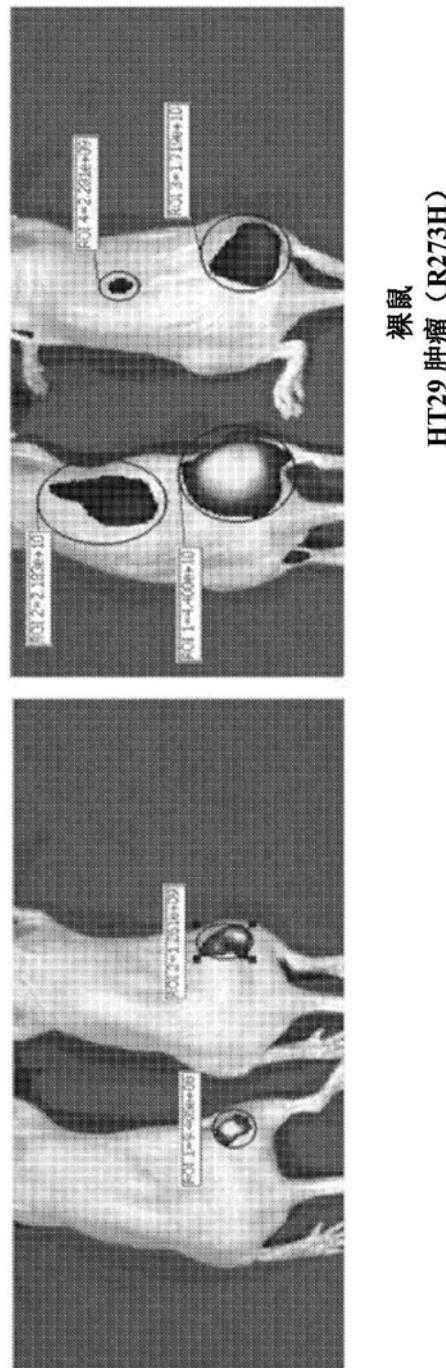
图66



注意：“MH 3G11”是指嵌合 3G11 抗体，“MH 4H2”代表嵌合 4H2 抗体 (+ve 对照)

图67

对照 mIgG mAb
13E4, p53-R273H mAb



裸鼠
HT29 肿瘤 (R273H)

图68

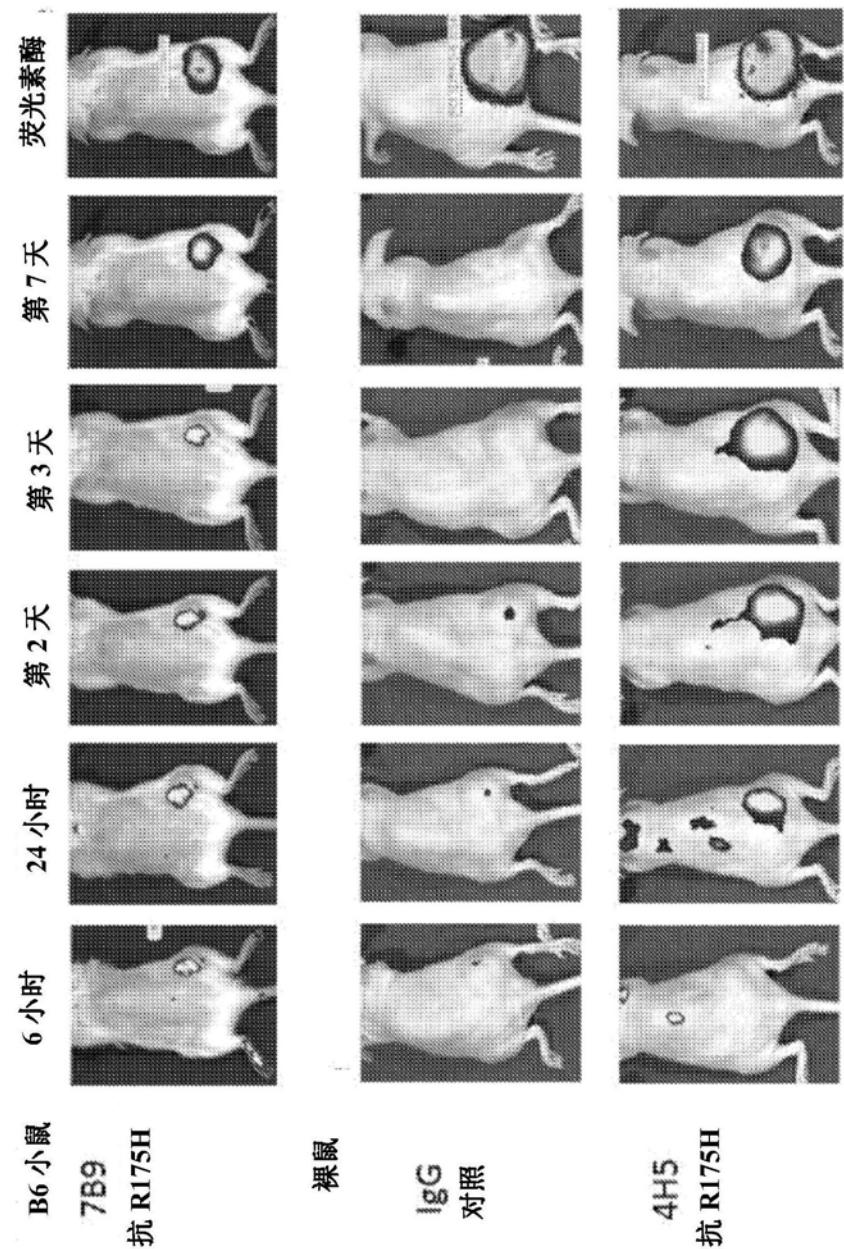


图69

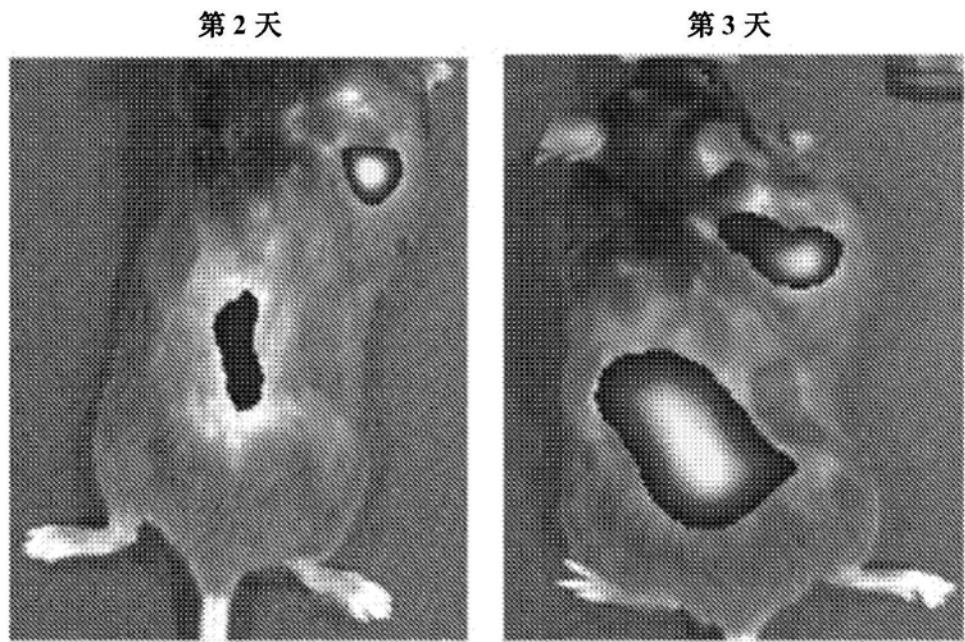


图70

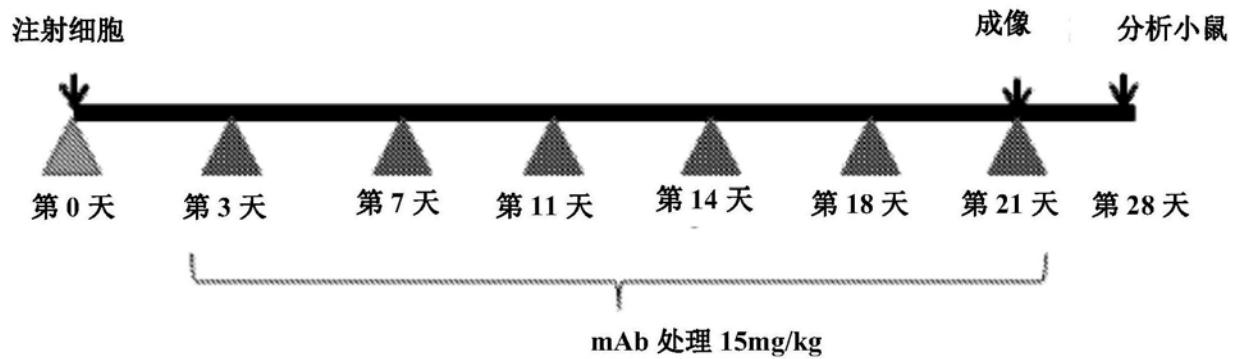


图71A

第 21 天

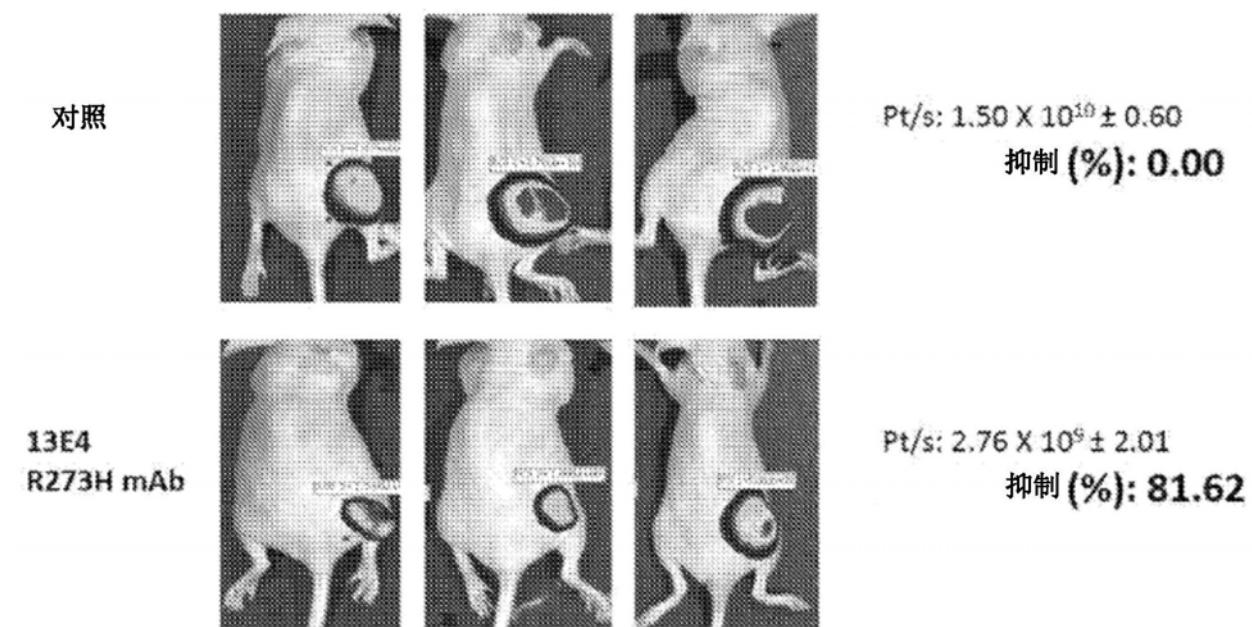


图71B

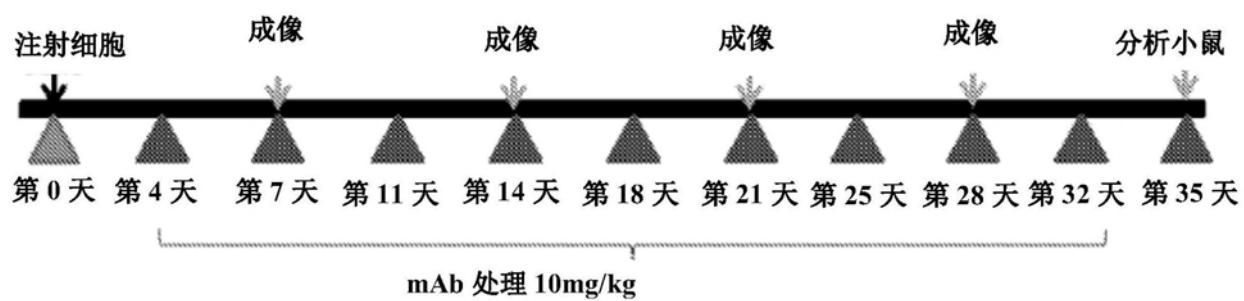


图72A

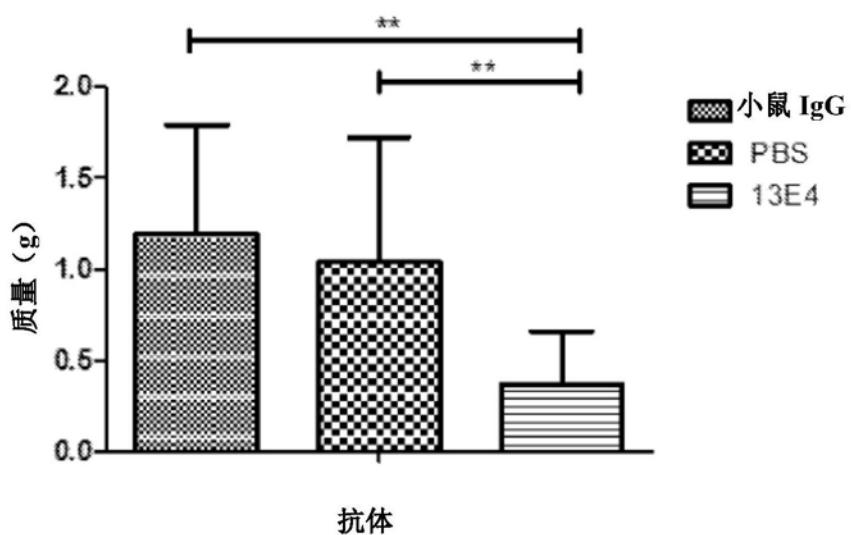


图72B

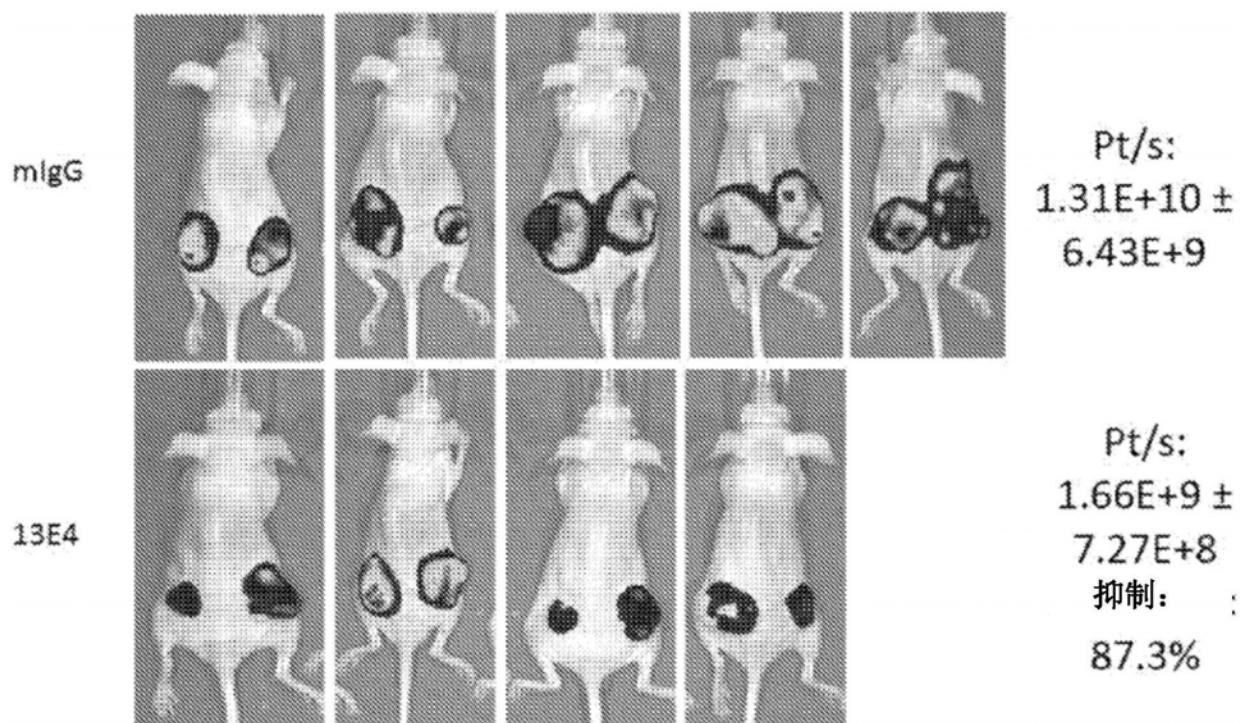


图72C

肿瘤生长曲线

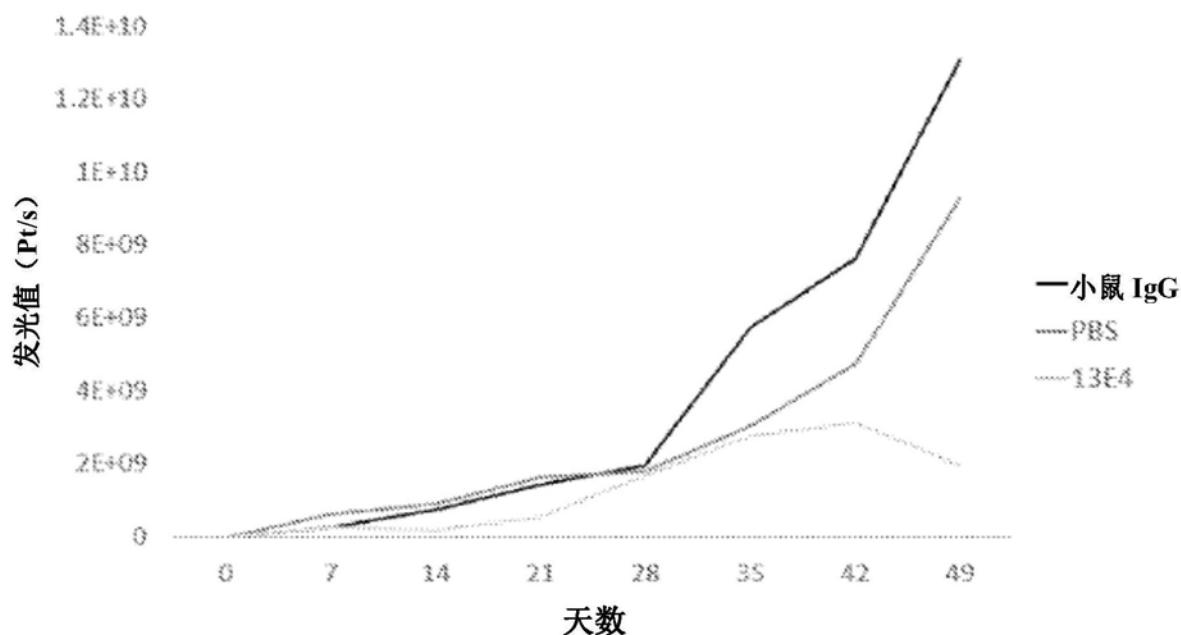
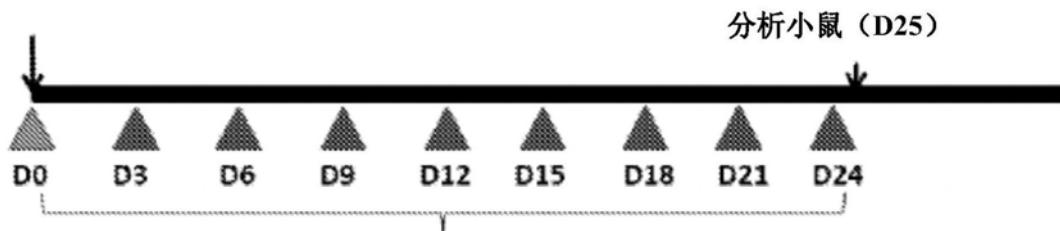


图72D

向 B6 小鼠注射 p53R175H 小鼠肿瘤细胞，
克隆 32 (3×10^6 每只小鼠)



mAb 处理；在第 3、6、9、12、15、
18、21 和 24 天向小鼠静脉注射 100
 μ g 腹水。在第 25 天处死小鼠并测
量肿瘤重量。

图73A

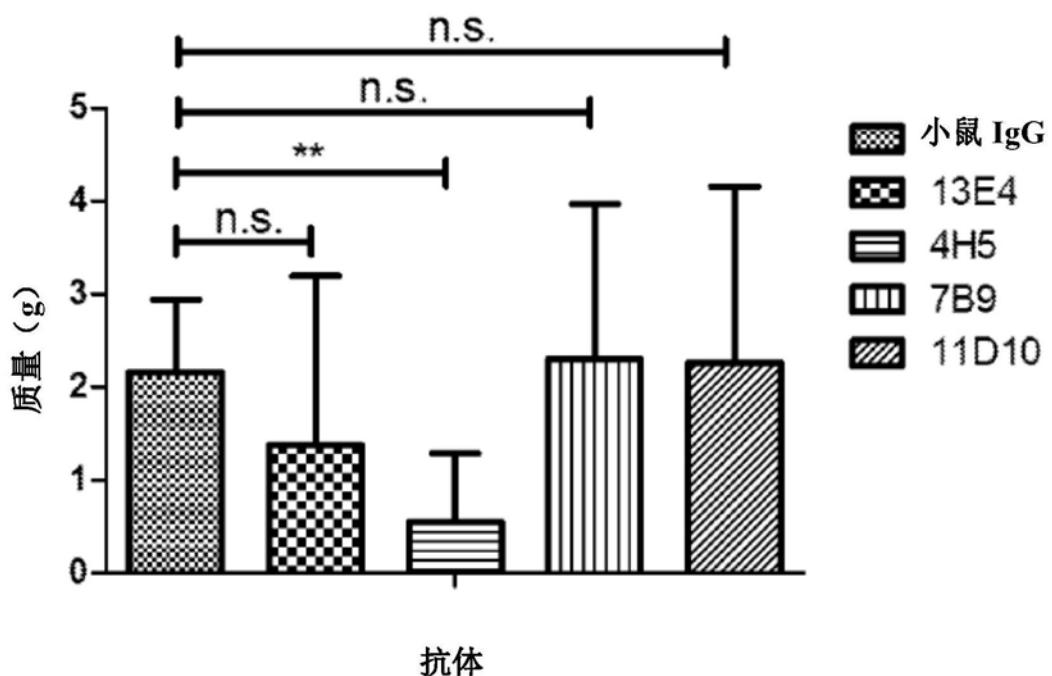


图73B

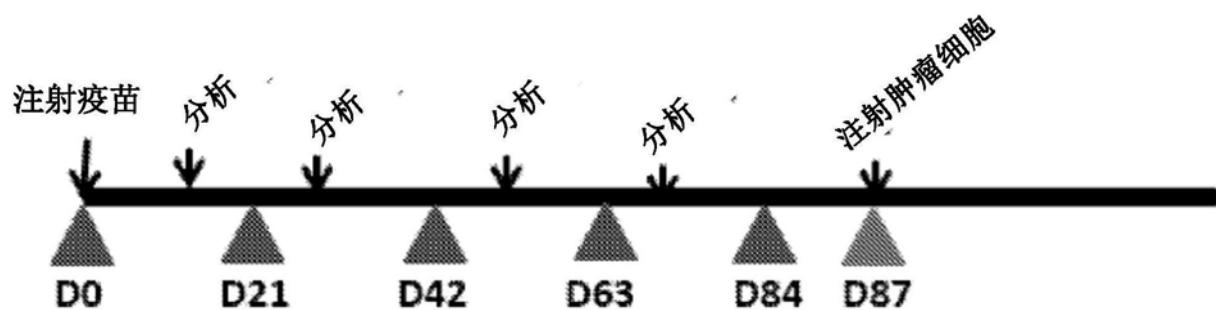


图74A

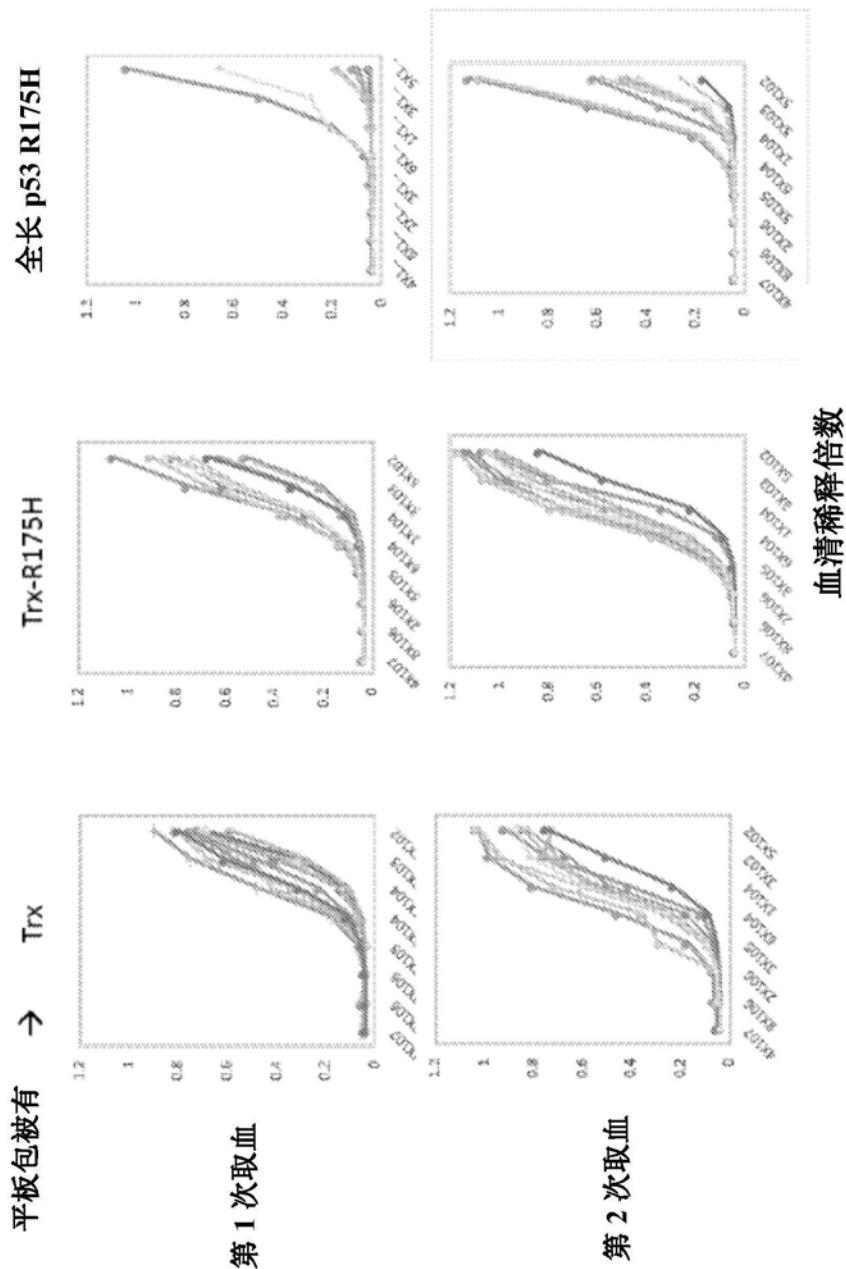


图74B

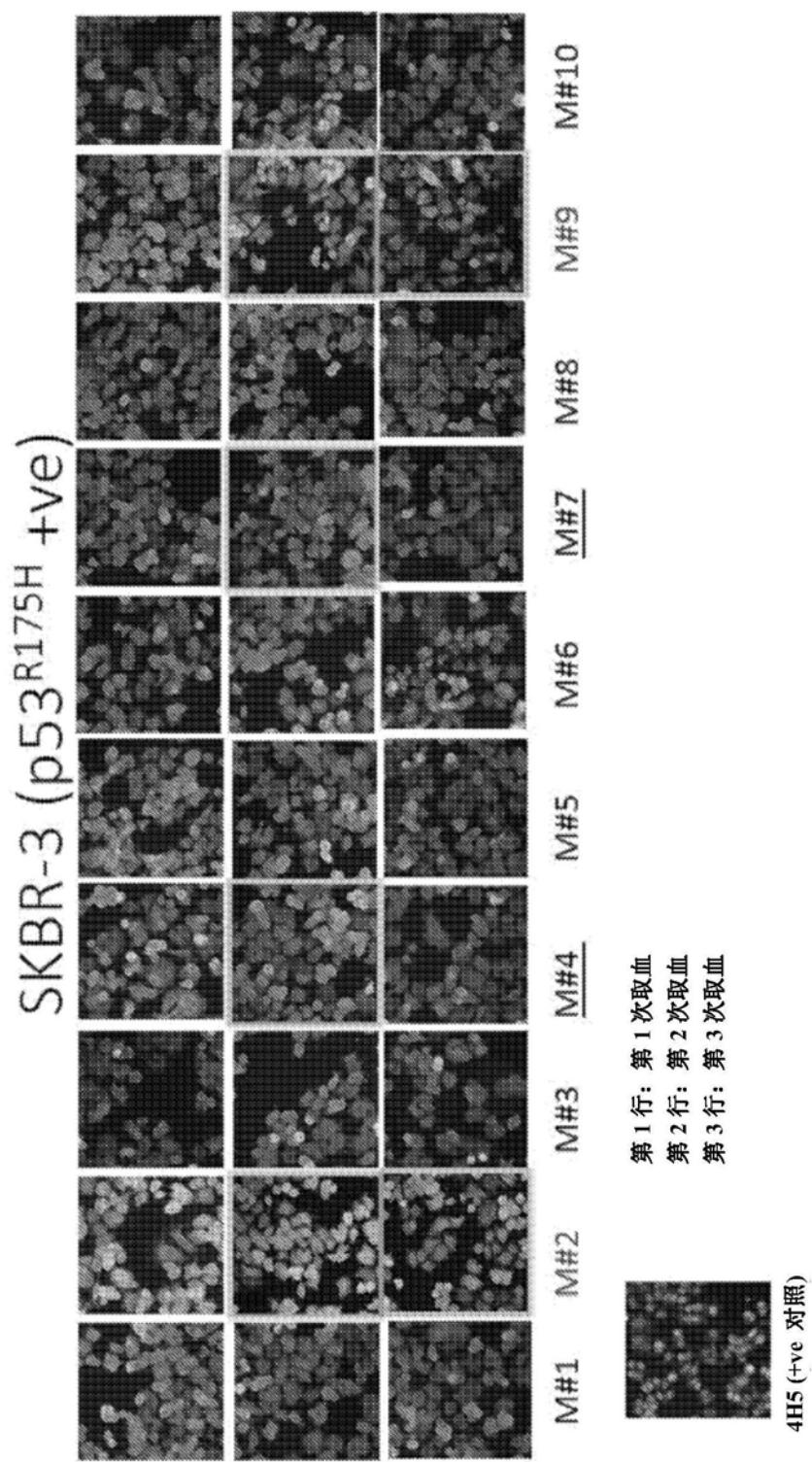


图74C

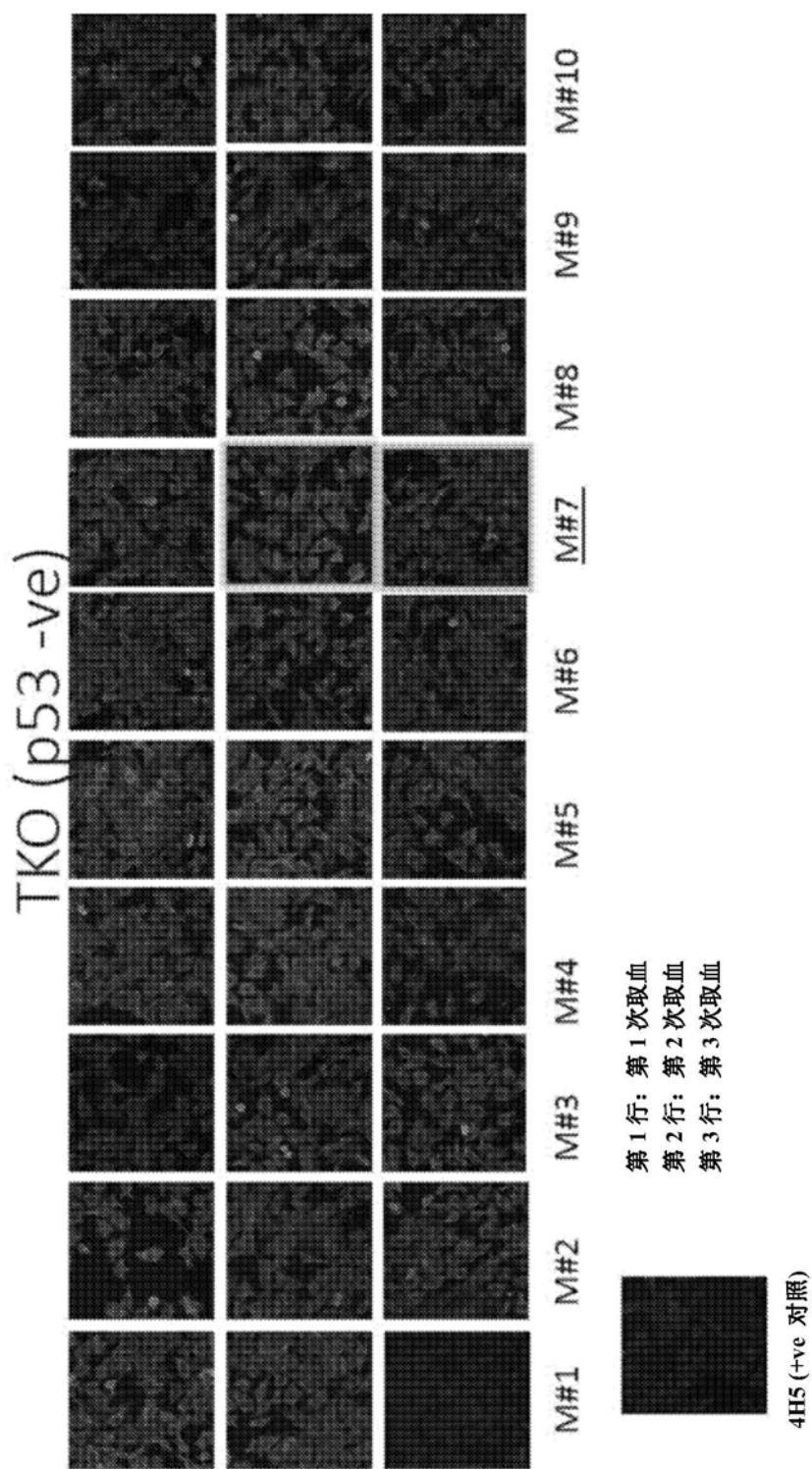


图74D

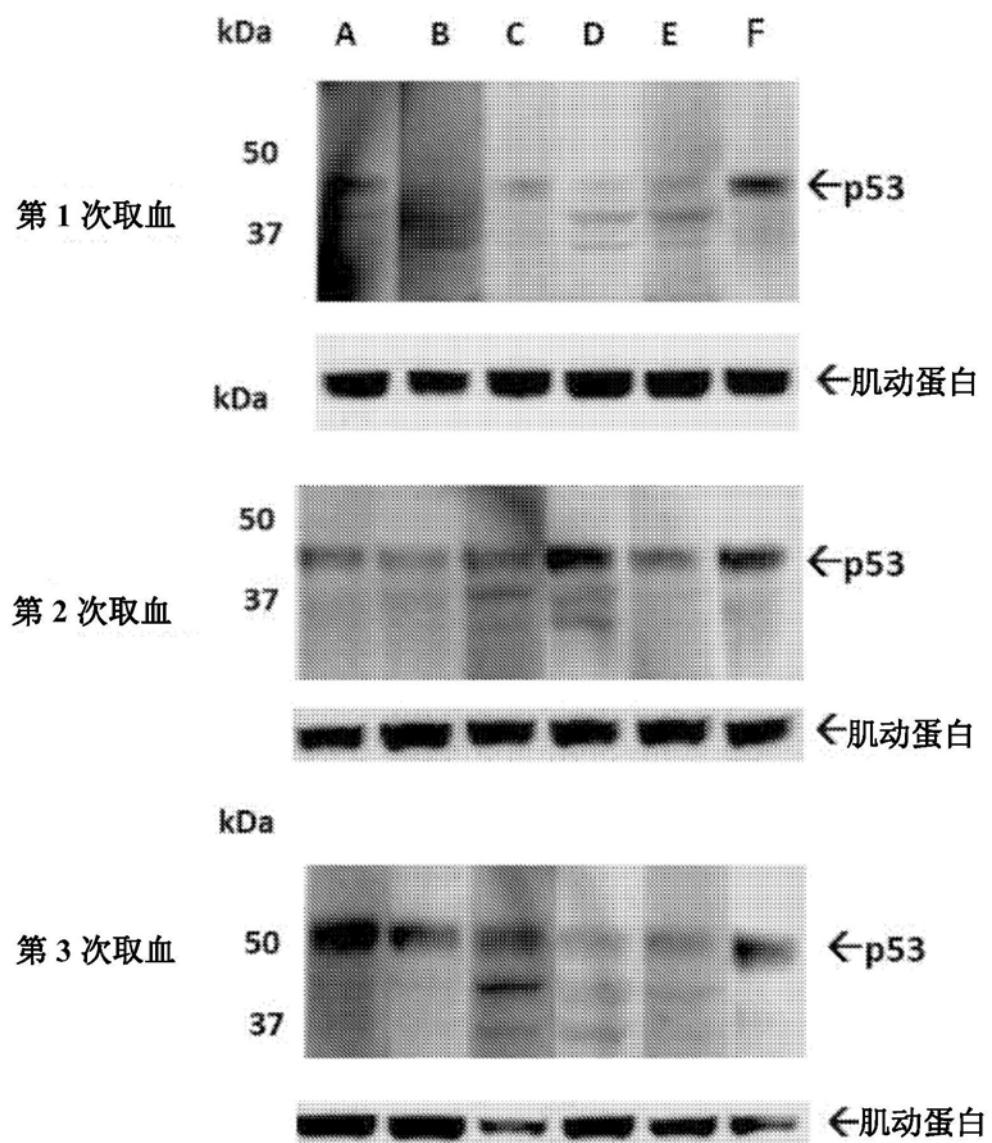


图74E

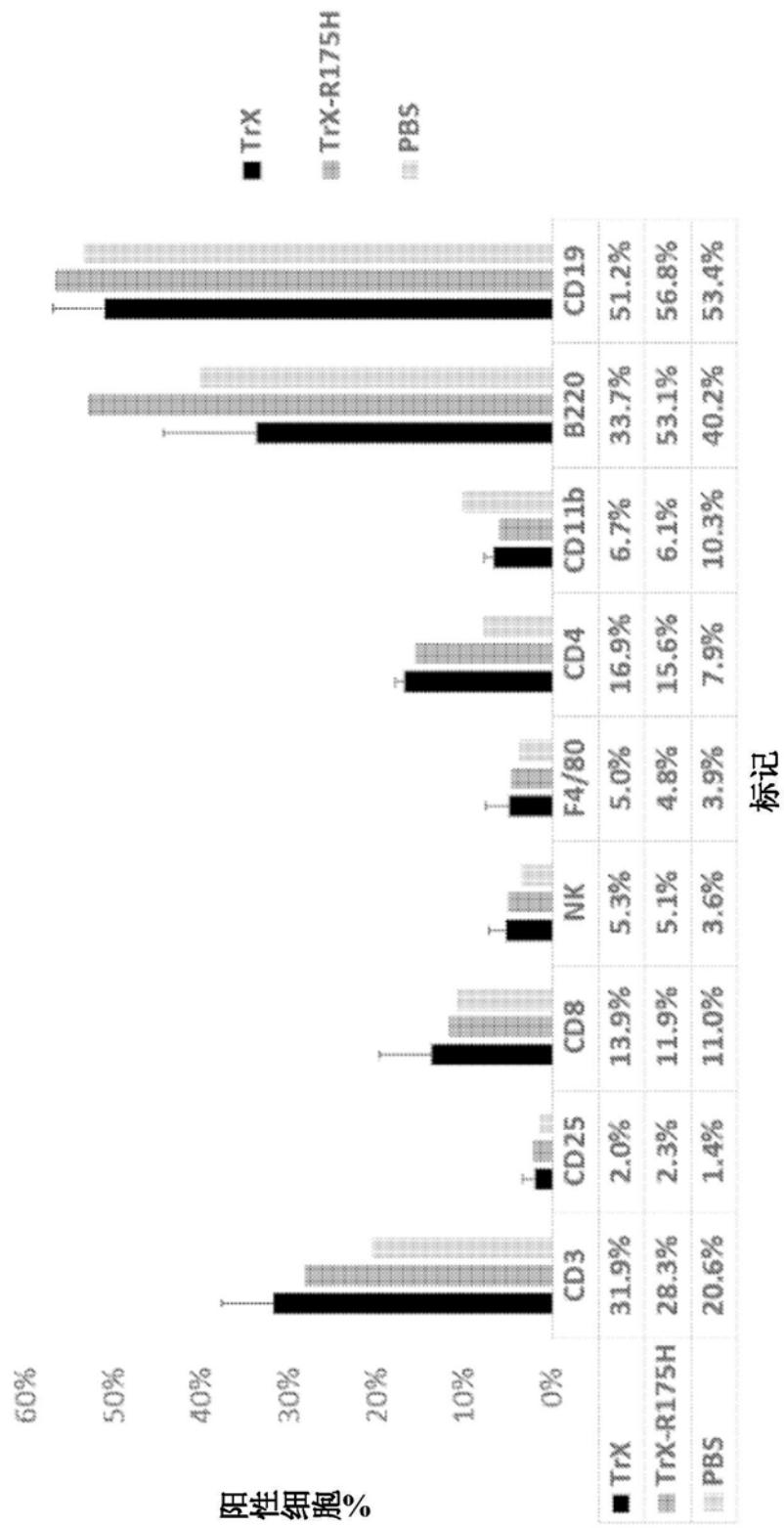


图74F