



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104628858 B

(45)授权公告日 2018.11.16

(21)申请号 201410649373.1

DSM ACC2948 2008.09.01

(22)申请日 2009.09.16

DSM ACC2949 2008.09.01

DSM ACC2950 2008.09.01

(65)同一申请的已公布的文献号

DSM ACC2951 2008.09.01

申请公布号 CN 104628858 A

DSM ACC2952 2008.09.01

(43)申请公布日 2015.05.20

DSM ACC2953 2008.09.01

(续)

(62)分案原申请数据

(73)专利权人 加尼梅德药物公司

200980136101.9 2009.09.16

地址 德国美因兹

专利权人 约翰内斯·古滕伯格美因兹大学

(83)生物保藏信息

(72)发明人 乌尔·沙欣 厄兹莱姆·图雷奇

DSM ACC2822 2007.03.13

米夏埃尔·科斯洛夫斯基

DSM ACC2823 2007.03.13

里塔·米特纳赫特-克劳斯

DSM ACC2824 2007.03.13

DSM ACC2825 2007.03.13

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

DSM ACC2826 2007.03.13

代理人 郑斌 卢蓓

DSM ACC2891 2008.03.11

DSM ACC2892 2008.03.11

DSM ACC2893 2008.03.11

(51)Int.Cl.

C07K 16/30(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

DSM ACC2897 2008.03.11

DSM ACC2898 2008.03.11

DSM ACC2943 2008.09.01

DSM ACC2944 2008.09.01

DSM ACC2945 2008.09.01

DSM ACC2946 2008.09.01

DSM ACC2947 2008.09.01

审查员 薛旻

权利要求书2页 说明书67页

序列表28页 附图27页

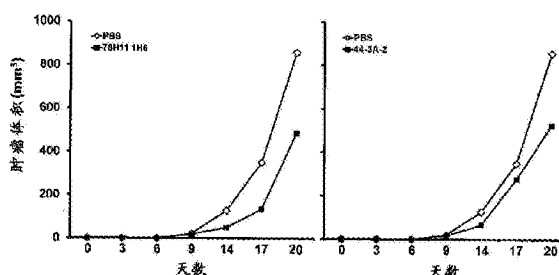
(54)发明名称

肿瘤疾病是肺中的转移癌。

用于治疗癌症的单克隆抗体

(57)摘要

本发明涉及用于治疗癌症的单克隆抗体,提供了可用作治疗和/或预防与表达GT468细胞相关之疾病的治疗剂的抗体,所述疾病包括肿瘤相关疾病例如乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌(尤其是肾细胞癌)、前列腺癌、肝癌、黑色素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式。在一个实施方案中,所述



[转续页]

[接上页]

(83)生物保藏信息

DSM ACC2954 2008.09.01	DSM ACC2960 2008.09.01
DSM ACC2955 2008.09.01	DSM ACC2961 2008.09.01
DSM ACC2956 2008.09.01	DSM ACC2962 2008.09.01
DSM ACC2957 2008.09.01	DSM ACC2963 2008.09.01
DSM ACC2958 2008.09.01	DSM ACC2964 2008.09.02
DSM ACC2959 2008.09.01	DSM ACC3001 2009.07.16

1. 与GT468结合的抗体,其中GT468具有根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且其中所述抗体选自:

(a) 由以登记号DSM ACC3001 (62-9B-1) 保藏的克隆所产生的或可由所述克隆获得的抗体,和

(b) 作为 (a) 所述抗体的嵌合或人源化形式的抗体。

2. 权利要求1所述的抗体,其是单克隆抗体、嵌合抗体、或人源化抗体。

3. 权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体与GT468特异性结合。

4. 权利要求1或2所述的抗体,其与GT468的天然表位结合。

5. 权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体具有一种或更多种以下活性:

(i) 杀死表达GT468的肿瘤细胞,

(ii) 抑制表达GT468的肿瘤细胞的增殖,

(iii) 抑制表达GT468的肿瘤细胞的集落形成,和

(iv) 抑制表达GT468的肿瘤细胞的转移。

6. 权利要求5所述的抗体,其中所述一种或更多种活性通过所述抗体与所述细胞所表达GT468之胞外结构域的结合来诱导。

7. 权利要求5或6所述的抗体,其中所述表达GT468的肿瘤细胞是癌细胞。

8. 权利要求7所述的抗体,其中所述癌细胞来自于选自以下的癌症:乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式,和肺中的转移癌。

9. 权利要求8所述的抗体,其中所述肾癌是肾细胞癌。

10. 以登记号DSM ACC3001 (62-9B-1) 保藏的杂交瘤。

11. 缀合物,其包含与治疗剂偶联的权利要求1至9中任一项所述抗体。

12. 权利要求11的缀合物,其中所述治疗剂是放射性同位素或药物。

13. 权利要求11的缀合物,其中所述治疗剂是毒素。

14. 权利要求13的缀合物,其中所述毒素是细胞毒剂。

15. 药物组合物,其包含权利要求1至9中任一项所述抗体和/或权利要求11至14中任一项的缀合物,以及可药用载体。

16. 权利要求1至9中任一项所述抗体和/或权利要求11至14中任一项的缀合物在制备用于抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的生长之药物中的用途,其中GT468的氨基酸序列是SEQ ID NO:2。

17. 权利要求1至9中任一项所述抗体和/或权利要求11至14中任一项的缀合物在制备用于杀死表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞之药物中的用途,其包括使所述细胞接触有效量的权利要求1至9中任一项所述之抗体和/或权利要求11至14中任一项的缀合物,其中GT468的氨基酸序列是SEQ ID NO:2。

18. 权利要求1至9中任一项所述抗体和/或权利要求11至14中任一项的缀合物在制备用于抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的转移性传播之药物中的用途,其包括使所述细胞接触有效量的权利要求1至9中任一项所述之抗体和/或权利要求11至14中任一项的缀合物,其中GT468的氨基酸序列是SEQ ID NO:2。

19. 权利要求1至9中任一项所述抗体和/或权利要求11至14中任一项的缀合物在制备用于治疗或预防对象中与表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞有关的疾病或病症之药物中的用途,其包括向所述对象施用权利要求1至9中任一项所述的抗体、权利要求11至14中任一项的缀合物或权利要求15的药物组合物,其中GT468的氨基酸序列是SEQ ID NO:2。

20. 权利要求19的用途,其中所述疾病或病症是肿瘤相关疾病。

21. 权利要求20的用途,其中所述肿瘤相关疾病是癌症。

22. 权利要求21所述的用途,其中所述癌症选自乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式,和肺中的转移癌。

23. 权利要求22所述的用途,其中所述肾癌是肾细胞癌。

用于治疗癌症的单克隆抗体

[0001] 本申请是申请号为200980136101.9的中国专利申请的分案申请,原申请是2009年9月16日提交的PCT国际申请PCT/EP2009/006704于2011年3月15日进入中国国家阶段的申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于治疗癌症的单克隆抗体。

背景技术

[0003] 基于抗体的癌症疗法已被成功地引入临床中,并已在过去十年中成为肿瘤学中最具有前景的疗法。

[0004] 与传统药物相比,基于抗体的癌症疗法具有较高特异性和较低副作用等潜力。究其原因抗体能够精确地区分正常和肿瘤细胞,并且它们的作用模式依赖于毒性较低的免疫抗肿瘤机制,例如补体活化和细胞毒性免疫细胞的招募。

[0005] 基于抗体之疗法的靶标需要具有特别的性质,所述性质形成了正确区分正常细胞和肿瘤细胞的基础。显然,仅存在于肿瘤细胞中并在正常组织中完全检测不到的靶标对于开发有效且安全的抗体疗法来说是理想的。另一方面,高水平过表达可作为治疗窗的基础并且副作用低,例如人类2型表皮生长因子受体(HER-2)作为基因扩增的结果,其是抗体曲妥珠单抗(trastuzumab)(赫赛汀(Herceptin))的良好靶标。

[0006] 用于肿瘤治疗的已经批准或在临床开发中的抗体的其它靶标具有不同的性质,它们并非基于肿瘤细胞上靶分子的大量过表达。在针对蛋白聚糖MUC-1的抗体的情形中,该靶标之骨架的肽重复表位在肿瘤细胞中糖基化不足,并因此与其正常对应物不同。在针对CD20(利妥昔单抗(rituximab))、CD52(坎帕斯-1H(Campath-1H))和CD22(依帕珠单抗(epratuzumab))的抗体的情形中,抗体靶标在肿瘤细胞和正常淋巴细胞上具有类似的表达水平。此时,由于靶标阴性的干细胞恢复了正常淋巴细胞群,因此利用抗体剔除正常细胞是可耐受的。抗体靶标可接近性具有差异的另一些实例包括癌胚抗原(CEA)和碳酸酐酶IX(CA9)。这两种抗原均分别表达于结肠和肾的正常上皮细胞上。然而,放射性标记的成像抗体能够很好地区分肿瘤组织与正常组织,并且细胞毒性抗体耐受良好。这极有可能是由于CA9和CEA限制性表达在正常上皮组织的腔室一侧(IgG抗体没有机会接近此处)所致。同样地,抗原上皮细胞粘附分子(Ep-CAM)属于这一类。作为上皮细胞的同型细胞粘附分子,其定位于细胞间隙。令人感兴趣的是,由于高亲合力的抗Ep-CAM抗体毒性很强,因此中等亲合力的抗体耐受良好。这提示可接近正常细胞上的Ep-CAM靶标,同时还表明抗体结合动力学可拓展治疗的领域。

[0007] 已有八种抗体被批准用于治疗肿瘤疾病,其中大多数为淋巴瘤和白血病(Adams, G.P.&Weiner, L.M. (2005) Nat. Biotechnol. 23, 1147-1157)。只有3种单克隆抗体(mAb)(即赫赛汀,阿瓦斯汀(Avastin)和爱必妥(Erbitux))解决了占癌症诱发死亡率90%以上的实体癌问题。医疗中的大批需要、已提供的经批准mAb的明显临床有益效果及其巨大的商业成

功均激发了开发针对更广患者群的基于抗体之治疗以及提高其疗效的创新方法的一轮浪潮 (Brekke, O.H. & Sandlie, I. (2003) *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 52-62; Carter, P. (2001) *Nat. Rev. Cancer* 1, 118-129)。

[0008] 开发下一代升级的基于抗体之癌症疗法所面临的一个挑战是选择合适的靶标分子, 这是有利的毒性/功效模式的关键所在。

[0009] 对于目前可用于治疗实体癌的抗体 (由于其靶标表达在正常组织上所致) 来说, 尚未充分发掘出抗体分子作用模式的全部潜能。例如, 赫赛汀的靶标 Her2/neu 表达于许多正常的人体组织中, 包括心肌 (Crone, S.A., Zhao, Y.Y., Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, K.L., Chen, J., Kahn, R., Condorelli, G. 等 (2002) *Nat. Med.* 8, 459-465)。因此, 所设计的赫赛汀具有减低的免疫效价, 并且不能以最高有效剂量给药, 否则将出现不能承受的毒性。这种“使具有锋利潜力的刀变钝”限制了赫赛汀的疗效。

[0010] 除了不在毒性相关的正常组织中表达以外, 在肿瘤细胞表面上稳健且大量表达以及表现出促进肿瘤的功能是理想的抗体靶标的期望特征 (Houshmand, P. & Zlotnik, A. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 640-644)。

[0011] 为了发现用于抗体治疗癌症的新靶标, 我们使用综合数据挖掘和实验验证方法鉴定出 GT468。GT468 是胎盘特异性基因, 其在多种肿瘤特别是乳腺癌中往往异常活化并高度表达。在 MCF-7 和 BT-549 乳腺癌细胞中, RNAi 介导的 GT468 沉默显著破坏了运动、迁移和侵入, 并诱导 G1/S 细胞周期阻滞使增殖几乎完全受阻。GT468 的敲低与细胞周期蛋白 D1 的表达减少相关, 并降低了 AKT 激酶的磷酸化。此外, GT468 位于癌细胞的表面上, 其对于拮抗该分子之生物功能的抗体来说是可接近的。

[0012] GT468 具有使其成为极具吸引力的治疗性抗体之靶标的若干特性。作为仅在如怀孕这样的特别时期才在人体中出现的细胞谱系分化抗原, 它在健康的毒性相关组织中不存在, 如同自身抗原可能的情形一样。它在多种肿瘤实体中的高普遍性使众多患者可以采用 GT468 靶向疗法来治疗。例如在乳腺癌的情形中, 82% 的患者携带该靶标。相反地, 赫赛汀的靶标 Her2/neu (唯一可用于治疗这种癌症类型的 mAb) 仅在 20-25% 的乳腺癌患者中过表达 (Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. 等 (1989) *Science* 244, 707-712)。对于 GT468 分别在 42% 和 58% 的病例中表达的肺癌和胃癌来说, 由于这些癌症类型缺少合适的靶标, 到目前为止尚无经批准的 mAb 疗法。

[0013] 可将针对活细胞上 GT468 之抗体用于开发成药物, 这种抗体可表现出抗肿瘤效果例如增殖抑制。GT468 不仅参与增殖, 而且还参与细胞的运动、迁移和侵入。最令人感兴趣的是, 所有这些属性不仅充分造就了肿瘤表型, 而且还是人滋养层细胞的固有特性, 所述滋养层细胞的生理特征是生长快速并且有效侵入子宫组织。预期可对 GT468 的 mAb 进行改造, 使其以最大潜力地迅速介入所有这些作用来介导免疫效应功能 (例如 ADCC 和 CDC)。

发明内容

[0014] 本发明一般地提供可用作治疗和/或预防与表达 GT468 和/或特征在于其细胞表面与 GT468 缔合之疾病的抗体, 所述疾病包括肿瘤相关疾病例如癌症, 尤其是乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食道癌、头颈癌、肾癌 (尤其是肾细胞癌)、前列腺癌、

肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式。在一个实施方案中,所述癌症疾病是肺中的转移癌。

[0015] 一方面,本发明涉及能够与GT468结合的抗体。本文所述的抗体优选地是分离的单克隆抗体,所述抗体特异性地与GT468上存在的表位结合,优选地与GT468的细胞外结构域中的表位结合,更优选地与SEQ ID NO:3-10和35-82结合。优选地,所述抗体能够与位于细胞表面的GT468结合,优选地与位于GT468细胞外结构域的一个或多个表位(优选地在GT468的23-212位氨基酸残基中)结合,最优选地与位于SEQ ID NO:3-10和35-82氨基酸序列之一中的表位结合。在一个优选的实施方案中,所述抗体对SEQ ID NO:3-10和35-82氨基酸序列之一或多个具有特异性。在多个实施方案中,所述抗体能够结合包含SEQ ID NO:2的29至119位氨基酸的肽,优选29至212位氨基酸,更优选23至212位氨基酸。

[0016] 本发明所包括的单克隆抗体包括IgA、IgG1-4、IgE、IgM和IgD抗体。在一个实施方案中,抗体是IgG1抗体,更尤其是IgG1、 κ 同种型或IgG1、 λ 同种型。在另一个实施方案中,抗体是IgG3抗体,更尤其是IgG3、 κ 同种型或IgG3、 λ 同种型。在又一个实施方案中,抗体是IgG4抗体,更尤其是IgG4、 κ 同种型或IgG4、 λ 同种型。还在另一个实施方案中,抗体是IgA1或IgA2抗体。还在另一个实施方案中,抗体是IgM抗体。

[0017] 在一个实施方案中,本发明的抗体结合一种或多种根据SEQ ID NO:75-79的肽。在一个实施方案中,抗体结合根据SEQ ID NO:75的肽和/或根据SEQ ID NO:76的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:75的肽和根据SEQ ID NO:76的肽。在另一个实施方案中,抗体结合根据SEQ ID NO:77的肽和/或根据SEQ ID NO:78的肽和/或根据SEQ ID NO:79的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:78的肽和根据SEQ ID NO:79的肽,或结合根据SEQ ID NO:77的肽、根据SEQ ID NO:78的肽和根据SEQ ID NO:79的肽。

[0018] 在一个实施方案中,使用根据SEQ ID NO:4的肽或根据SEQ ID NO:80的肽进行免疫,获得本发明的抗体。在另一个实施方案中,使用根据SEQ ID NO:6的肽或根据SEQ ID NO:81的肽进行免疫,获得本发明的抗体。优选地,本发明的抗体结合一种或多种所述肽。

[0019] 在又一个实施方案中,使用根据SEQ ID NO:4的肽或根据SEQ ID NO:80的肽进行免疫,获得下述抗体,所述抗体结合根据SEQ ID NO:75的肽和/或根据SEQ ID NO:76的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:75的肽和根据SEQ ID NO:76的肽。在另一个实施方案中,使用根据SEQ ID NO:6的肽或根据SEQ ID NO:81的肽进行免疫,获得下述抗体,所述抗体结合根据SEQ ID NO:77的肽和/或根据SEQ ID NO:78的肽和/或根据SEQ ID NO:79的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:78的肽和根据SEQ ID NO:79的肽或结合根据SEQ ID NO:77的肽、根据SEQ ID NO:78的肽和根据SEQ ID NO:79的肽。

[0020] 在一个实施方案中,本发明的抗体结合一种或多种根据SEQ ID NO:61-66的肽。在一个实施方案中,抗体结合根据SEQ ID NO:61的肽和/或根据SEQ ID NO:62的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:61的肽和根据SEQ ID NO:62的肽。在另一个实施方案中,抗体结合根据SEQ ID NO:64的肽和/或根据SEQ ID NO:65的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:64的肽和根据SEQ ID NO:65的肽。在另一实施方案中,抗体结合根据SEQ ID NO:65的肽和/或根据SEQ ID NO:66的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:65的肽和根据SEQ ID NO:66的肽。

[0021] 在一个实施方案中,使用根据SEQ ID NO:82的肽进行免疫,获得本发明的抗体。优选地,本发明的抗体结合所述肽。根据SEQ ID NO:82的肽具有C-端GS-连接子,所述连接子

被添加以帮助肽的1和16位氨基酸之间二硫键的形成。推测所述肽与GT468的天然构象相似。由使用SEQ ID NO:82的肽进行免疫获得的杂交瘤51-1A-1所生产的抗体对表达GT468的癌细胞的增殖和集落形成显示强抑制活性。

[0022] 在又一个实施方案中,使用根据SEQ ID NO:82的肽进行免疫,获得下述抗体,所述抗体结合根据SEQ ID NO:64的肽和/或根据SEQ ID NO:65的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:64的肽和根据SEQ ID NO:65的肽,或者所述抗体结合根据SEQ ID NO:65的肽和/或根据SEQ ID NO:66的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:65的肽和根据SEQ ID NO:66的肽。

[0023] 在一个实施方案中,本发明的抗体结合一种或多种根据SEQ ID NO:57-60的肽。在一个实施方案中,抗体结合根据SEQ ID NO:57的肽和/或根据SEQ ID NO:58的肽和/或根据SEQ ID NO:59的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:57的肽和根据SEQ ID NO:58的肽和根据SEQ ID NO:59的肽。在另一个实施方案中,抗体结合根据SEQ ID NO:59的肽和/或根据SEQ ID NO:60的肽,更优选地结合根据SEQ ID NO:59的肽和根据SEQ ID NO:60的肽。

[0024] 优选地,本发明的抗体与癌细胞结合,尤其是本文所述之癌症类型的细胞,优选不与非癌细胞显著结合,更优选地不与除胎盘细胞和睾丸细胞之外的非癌细胞显著结合。优选地,所述抗体与表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞(例如癌细胞)的结合介导杀死所述细胞和/或抑制该细胞的一种或多种活性(例如运动、迁移、侵入、增殖和集落形成)。优选地,抗体抑制所述细胞的增殖和/或集落形成。

[0025] 本发明的抗体杀死细胞和/或抑制细胞的一种或多种活性(尤其是细胞增殖和/或集落形成)优选地通过该抗体与所述细胞表达的GT468结合和/或与所述细胞的细胞表面相互作用来诱导。这样杀死细胞和/或抑制细胞的一种或多种活性可用于本文所述的治疗中。具体而言,杀死细胞和/或抑制细胞增殖和/或抑制细胞集落形成可用于治疗或预防癌症,包括癌症转移。抑制细胞的运动、迁移、侵入、增殖和/或集落形成可尤其用于治疗或预防癌症转移和癌细胞转移性传播。

[0026] 优选地,所述表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞是癌细胞,尤其选自以下癌症疾病的致瘤性癌细胞:乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌(尤其是肾细胞癌)、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式。在一个实施方案中,所述癌症疾病是肺中的转移癌。

[0027] 本发明的抗体可附着至一种或多种治疗效应物部分(therapeutic effector moieties),例如放射性标签、细胞毒素、治疗性酶、诱导凋亡的试剂等等,从而提供定向的细胞毒性,即杀死肿瘤细胞。

[0028] 优选地,本发明的抗体通过诱导补体依赖性细胞毒作用(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)介导的裂解、细胞凋亡、同质性粘附(homotypic adhesion)和/或吞噬作用(优选地通过诱导CDC介导的裂解和/或ADCC介导的裂解)来杀死细胞。然而,本发明还包括下述实施方案,其中抗体发挥其如本文所述的活性,如杀死细胞和/或抑制细胞的一种或多种活性,例如细胞增殖和/或集落形成,而不诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)介导的裂解、凋亡、同型粘附和/或吞噬作用。例如,本发明的抗体也可简单地通过与细胞表面上的GT468结合而发挥作用,从而例如阻断细胞的增殖。在一个实施方案中,本发明的抗体不诱导CDC介导的细胞裂解。

[0029] 优选地,ADCC介导的细胞裂解在效应细胞(在一些具体实施方案中选自单核细胞(monocyte)、单个核细胞(mononuclear cell)、NK细胞和PMN)存在时发生,而吞噬作用由巨噬细胞实现。

[0030] 在一个尤其优选的实施方案中,本发明的抗体具有抑制或降低表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞(优选癌细胞如乳腺癌细胞)增殖的活性。可以在使用溴脱氧尿苷(5-溴-2-脱氧尿苷,BrdU)的实验中,通过测定表达GT468的癌细胞的增殖来体外测量这一活性。BrdU是合成的核苷,其为胸苷的类似物并且可以在DNA复制期间代替胸苷,掺入正在复制的细胞(细胞周期的S期)新合成的DNA中。使用例如对BrdU具有特异性的抗体检测所掺入的化学品,这指示了活跃地复制其DNA的细胞。可以使用细胞系BT-549、Caov-3、EFO-21、SK-BR-3、MCF-7、MDA-MB-468和MDA-MB-231作为表达GT468的癌细胞。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体抑制或降低细胞系SK-BR-3、MCF-7和MDA-MB-468中一种或多种的增殖,优选地抑制或降低细胞系SK-BR-3和MCF-7二者的增殖,最优选地抑制或降低SK-BR-3、MCF-7和MDA-MB-468全部细胞系的增殖。在这一方面中优选的本发明抗体选自:(i)由杂交瘤35-48B-1、35-50A-2a、38-10B-1、38-1A-1、45-2A-1、45-8A-2、48-3B-1、48-4A-1、49-3A-1、51-1A-1、53-13A-2、53-29A1、56-4A-2、62-9B-1、78H11H6和44-3A-2生产的抗体和/或可得自它们的抗体,(ii)属于(i)所述抗体的嵌合或人源化形式的抗体,和(iii)具有(i)所述抗体之特异性的抗体,尤其是包含(i)所述抗体的抗原结合部分或抗原结合位点(尤其是可变区)的抗体。在这一方面中,尤其优选的本发明抗体选自:(i)由杂交瘤35-48B-1、48-3B-1、51-1A-1和56-4A-2生产的抗体和/或可得自它们的抗体,(ii)属于(i)所述抗体的嵌合或人源化形式的抗体,和(iii)具有(i)所述抗体的特异性的抗体,尤其是包含(i)所述抗体的抗原结合部分或抗原结合位点(尤其是可变区)的抗体。

[0031] 在一个尤其优选的实施方案中,本发明的抗体具有抑制或减少表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞(优选癌细胞如乳腺癌细胞)的集落形成的活性。可以在克隆形成实验(clonogenic assay)中体外测量该活性。可以使用细胞系BT-549、Caov-3、EFO-21、SK-BR-3、MCF-7、MDA-MB-468和MDA-MB-231作为表达GT-468的癌细胞。克隆形成实验是一种研究特定试剂对细胞存活和增殖的效力的微生物学技术。其常常在癌症研究实验室中用于测定药物或辐射对正在增殖的肿瘤细胞的影响。该实验包括三个主要的步骤:(i)对细胞(尤其是癌细胞)样品进行处理,(ii)将细胞置于组织培养容器中,和(iii)允许细胞生长。将产生的集落固定、染色并计数。如果个体肿瘤细胞在器官中定殖,则集落形成对转移的形成而言是重要的。抗体的抑制活性表明它们阻抑转移形成的潜力。在克隆形成实验中具有抑制或减少集落形成之活性的抗体尤其适用于治疗或预防癌细胞(尤其是本文提到的癌症类型)的转移和转移性传播。在这一方面中优选的本发明抗体选自下组:(i)由杂交瘤51G6 2H3 2B4、78H11 1H6、16-5B-1、22-1A-1、29-8B-1和51-1A-1产生的抗体和/或可得自它们的抗体,(ii)属于(i)所述抗体的嵌合或人源化形式的抗体,和(iii)具有(i)所述抗体之特异性的抗体,尤其是包含(i)中抗体的抗原结合部分或抗原结合位点(尤其是可变区)的抗体。在这一方面中,尤其优选的本发明的抗体选自下组:(i)由杂交瘤51G6 2H3 2B4、29-8B-1和51-1A-1生产的抗体和/或可得自它们的抗体,(ii)属于(i)所述抗体的嵌合或人源化形式的抗体,和(iii)具有(i)所述抗体之特异性的抗体,尤其是包含(i)中抗体的抗原结合部分或抗原结合位点(尤其是可变区)的抗体。

[0032] 在一个尤其优选的实施方案中,本发明的抗体具有抑制或减少表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的增殖的活性,并且具有抑制或减少表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的集落形成的活性。在这一方面中优选的本发明抗体选自下组:(i)由杂交瘤51-1A-1产生的抗体和/或可得自它们的抗体,(ii)属于(i)所述抗体的嵌合或人源化形式的抗体,和(iii)具有(i)所述抗体之特异性的抗体,尤其是包含(i)所述抗体的抗原结合部分或抗原结合位点(尤其是可变区)的抗体。

[0033] 在一个实施方案中,本发明涉及下述抗体,所述抗体(i)结合表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞,和(ii)不结合不表达GT468和/或特征不在于其细胞表面与GT468缔合之细胞。本发明的抗体优选地(i)介导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的杀死和/或抑制其增殖,和(ii)不介导不表达GT468和/或特征不在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的杀死和/或不抑制其增殖。

[0034] 本发明的抗体可以是单克隆、嵌合的、人的或人源化的抗体或抗体片段,其可选自IgG1、IgG2(优选IgG2a和IgG2b)、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、分泌型IgA、IgD和IgE抗体。

[0035] 本发明的抗体包括全人抗体。此类抗体可以在下述非人转基因动物(例如转基因小鼠)中生产,所述非人转基因动物能够通过发生V-D-J重组和同种型转换而生产GT468的人单克隆抗体的多种同种型。此类转基因动物也可以是生产多克隆抗体的转基因兔,如US 2003/0017534所公开。

[0036] 本发明的抗体与GT468抗原的结合可以例如通过活化补系统来介导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞(例如肿瘤细胞)的杀死,和/或可抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞(例如肿瘤细胞)的增殖。或者或除介导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的杀死和/或抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的增殖之外,本发明的抗体与GT468抗原的结合可抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞(例如肿瘤细胞)的运动、迁移、集落形成和/或侵袭,并且因此可抑制肿瘤细胞的转移性传播。表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的杀死可以通过一种或多种以下机制发生:表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC);表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的凋亡;表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的效应细胞吞噬作用;或表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的效应细胞抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0037] 根据本发明的所有方面,GT468优选为人GT468,优选地具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,更优选地具有SEQ ID NO:2氨基酸序列之细胞外结构/或的氨基酸序列,特别是具有涵盖SEQ ID NO:2之23至212位氨基酸的氨基酸序列。

[0038] 在一些特别优选的实施方案中,本发明的抗体与活细胞表面上存在的GT468的天然表位(例如SEQ ID NO:3-10和35-82所示的)结合。在一些更优选的实施方案中,本发明的抗体对癌细胞(优选乳腺癌细胞)具有特异性。优选地,本发明的抗体对表达GT-468的癌细胞如细胞系BT-549、Caov-3、EFO-21、SK-BR-3、MCF-7、MDA-MB-468和MDA-MB-231是特异性的,并且不结合不表达GT468的癌细胞如NUG-C4胃癌细胞。

[0039] 在本发明的一些实施方案中,GT468表达在细胞表面上和/或与细胞表面相关。

[0040] 可通过包括以下步骤的方法来获得本发明的抗体:用含有选自SEQ ID NO:2-10和

35-82之氨基酸序列的蛋白质或肽或者其免疫原性片段或衍生物、或表达所述蛋白质或肽或者其免疫原性片段或衍生物的核酸或宿主细胞来免疫动物。优选地,本发明的抗体对以上提及的蛋白质、肽或其免疫原性片段或衍生物具有特异性。对于用于免疫的蛋白质或肽来说,衍生物涉及这些蛋白质或肽的变体,所述变体具有与衍生出其的蛋白质或肽同样的免疫原性。特别地,当用于免疫产生抗体(特别是单克隆抗体)时,蛋白质或肽的衍生物提供了与使用蛋白质或肽进行免疫时所获得抗体具有同样特异性的抗体。例如,这样的衍生物可包括一个或多个氨基酸的缺失、替换或添加。特别地,它可包括一个或多个氨基酸的添加,例如在N-端或C-端或两者处添加半胱氨酸。

[0041] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗体由具有如下登记号的克隆产生:DSM ACC2822 (4E9-1H9)、DSM ACC2826 (9B6-2A9)、DSM ACC2824 (59D6-2F2)、DSM ACC2825 (61C11-2B5)、DSM ACC2823 (78H11-1H6)、DSM ACC2895 (22-1A-1)、DSM ACC2893 (22-2A-1)、DSM ACC2896 (22-9B-1)、DSM ACC2897 (23-33A-1)、DSM ACC2891 (23-19A-1)、DSM ACC2894 (F11#33F7D12)、DSM ACC2892 (4A12 2D4 1A10)、DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4)、DSM ACC2961 (42H11 1C11 2B2)、DSM ACC2962 (51G6 2H3 2B4)、DSM ACC2943 (16-5B-1)、DSM ACC2956 (20-11A-I)、DSM ACC2947 (29-1A-2)、DSM ACC2964 (29-8B-1)、DSM ACC2959 (35-48B-1)、DSM ACC2963 (35-50A-2a)、DSM ACC2957 (38-10B-1)、DSM ACC2958 (38-1A-1)、DSM ACC2948 (44-3A-2)、DSM ACC2949 (45-2A-1)、DSM ACC2950 (45-8A-2)、DSM ACC2951 (48-3B-1)、DSM ACC2952 (48-4A-1)、DSM ACC2946 (49-3A-1)、DSM ACC2945 (49-8A-1)、DSM ACC2944 (51-1A-I)、DSM ACC2953 (53-13A-2)、DSM ACC2955 (53-29A-1)、DSM ACC2960 (54-4B-2)、DSM ACC2954 (56-4A-2)或DSM ACC3001 (62-9B-1)。

[0042] 在一个实施方案中,本发明的抗体与治疗剂(如毒素、放射性同位素、药物或细胞毒剂)偶联。

[0043] 另一方面,本发明涉及能产生本发明抗体的杂交瘤。优选的杂交瘤具有如下登记号:DSM ACC2822 (4E9-1H9)、DSM ACC2826 (9B6-2A9)、DSM ACC2824 (59D6-2F2)、DSM ACC2825 (61C11-2B5)、DSM ACC2823 (78H11-1H6)、DSM ACC2895 (22-1A-1)、DSM ACC2893 (22-2A-1)、DSM ACC2896 (22-9B-1)、DSM ACC2897 (23-33A-1)、DSM ACC2891 (23-19A-1)、DSM ACC2894 (F11#33F7D12)、DSM ACC2892 (4A12 2D4 1A10)、DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4)、DSM ACC2961 (42H11 1C11 2B2)、DSM ACC2962 (51G6 2H3 2B4)、DSM ACC2943 (16-5B-1)、DSM ACC2956 (20-11A-I)、DSM ACC2947 (29-1A-2)、DSM ACC2964 (29-8B-1)、DSM ACC2959 (35-48B-1)、DSM ACC2963 (35-50A-2a)、DSM ACC2957 (38-10B-1)、DSM ACC2958 (38-1A-1)、DSM ACC2948 (44-3A-2)、DSM ACC2949 (45-2A-1)、DSM ACC2950 (45-8A-2)、DSM ACC2951 (48-3B-1)、DSM ACC2952 (48-4A-1)、DSM ACC2946 (49-3A-1)、DSM ACC2945 (49-8A-1)、DSM ACC2944 (51-1A-I)、DSM ACC2953 (53-13A-2)、DSM ACC2955 (53-29A-1)、DSM ACC2960 (54-4B-2)、DSM ACC2954 (56-4A-2)或DSM ACC3001 (62-9B-1)。

[0044] 本文通过引用抗体名称和/或引用产生该抗体的克隆(如4E9-1H9)来指明本发明的抗体。

[0045] 优选地,本发明的抗体能够区分由不同细胞类型(包括癌细胞和非恶性细胞)表达的GT468变体。

[0046] 本发明的抗体优选地介导杀死表达GT468和/或特征在于其细胞表面通过与GT468

结合而与GT468缔合的细胞。优选地,GT468在所述细胞表面上表达。在一个实施方案中,本发明的抗体诱导补体依赖性细胞毒作用(CDC),例如表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞至少约20~40%的CDC介导之裂解,优选地约40~50%的CDC介导之裂解,更优选地大于50%的CDC介导之裂解。作为诱导CDC的替代或补充,本发明的抗体可在效应细胞(例如单核细胞、单个核细胞、NK细胞和PMN)存在下诱导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。本发明的抗体可具有诱导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞发生凋亡的能力,诱导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞同质性粘附的能力,和/或在巨噬细胞存在下诱导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的吞噬。本发明的抗体可具有一种或多种上述功能特性。优选地,本发明的抗体诱导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的CDC介导之裂解和ADCC介导之裂解,更优选地诱导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的ADCC介导之裂解而不诱导所述细胞的CDC介导之裂解。针对本发明抗体之靶细胞的实例包括但不限于表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的癌细胞。在一个特别优选的实施方案中,由本发明抗体所介导的杀死细胞是GT468特异性的,即本发明的抗体优选以CDC和/或ADCC介导之裂解的方式介导杀死表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞,但不介导杀死不表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468不发生缔合的细胞。上述抗体可用于在治疗或预防癌症中介导杀死肿瘤细胞,所述癌症例如乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食道癌、头颈癌、肾癌(尤其是肾细胞癌)、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式。在一个实施方案中,所述癌症疾病是肺中的转移癌。

[0047] 本发明的抗体可源自不同的物种,其包括但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠和人。本发明的抗体还包括嵌合分子,其中源自某一物种(优选人)的抗体恒定区与源自另一物种的抗原结合位点相组合。此外,本发明的抗体包括人源化分子,其中源自非人物种之抗体的抗原结合位点与人源的恒定区和框架区相组合。

[0048] 本发明的抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体,其中包括IgG2a(如IgG2a, κ , λ)、IgG2b(如IgG2b, κ , λ)、IgG3(如IgG3, κ , λ)和IgM抗体。然而,本发明还涵盖了另一些抗体同种型(isotype),包括IgG1、IgA1、IgA2、分泌型IgA、IgD和IgE抗体。所述抗体可以是完整抗体或其抗原结合片段,包括例如Fab、F(ab')₂、Fv、单链Fv片段或双特异性抗体。此外,所述抗原结合片段包括结合结构域免疫球蛋白融合蛋白,其包含(i)与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合结构域多肽(例如重链可变区或轻链可变区),(ii)与所述铰链区融合的免疫球蛋白重链CH2恒定区,以及(iii)与所述CH2恒定区融合的免疫球蛋白重链CH3恒定区。这样的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白还进一步公开于US2003/0118592和US 2003/0133939中。

[0049] 优选地,本发明的抗体与GT468解离的解离平衡常数(k_D)约为1~100nM或更低。优选地,本发明的抗体不与相关细胞表面抗原发生交叉反应,并因此不抑制其功能。

[0050] 在一些优选的实施方案中,本发明的抗体可通过如下一个或多个属性来表征:

[0051] a) 对GT468具有特异性;

[0052] b) 与GT468的结合亲和力约为100nM或更低,优选地约5~10nM或更低,更优选地约

1~3nM或更低;

[0053] c) 能够对CD55/59阴性细胞或CD55/59阳性细胞介导高水平的CDC;

[0054] d) 能够抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的生长;

[0055] e) 能够诱导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞发生细胞凋亡;

[0056] f) 能够诱导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞发生同质性粘附;

[0057] g) 能够在效应细胞存在下诱导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞发生ADCC;

[0058] h) 能够延长具有表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的肿瘤细胞的患者存活;

[0059] i) 能够清除表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞; j) 能够清除低水平表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞; 和/或

[0060] k) 能够使GT468聚集在活细胞表面上。

[0061] 本发明的抗GT468抗体可以衍生成、连接至或共表达有另一些结合特异性。在一个具体的实施方案中, 本发明提供了双特异性或多特异性分子, 其包含至少一种针对GT468的第一结合特异性(例如, 抗GT468抗体或其模拟物) 以及针对效应细胞的第二结合特异性(例如针对Fc受体(如Fc- γ 受体, 例如Fc- γ RI, 或任何其它Fc受体) 或T细胞受体(如CD3) 的结合特异性)。

[0062] 因此, 本发明包含与GT468以及Fc受体或T细胞受体(如CD3) 结合的双特异性或多特异性分子。Fc受体的实例包括IgG受体、Fc- γ 受体(Fc γ R)(例如Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RIII(CD16))。也可以靶向另一些Fc受体, 例如IgA受体(如Fc α RI)。所述Fc受体优选地位于效应细胞(例如, 单核细胞、巨噬细胞或活化的单个核细胞)的表面上。在一个优选的实施方案中, 所述双特异性和多特异性分子在有别于受体之免疫球蛋白Fc(例如, IgG或IgA)结合位点的位点处与Fc受体结合。因此, 生理水平的免疫球蛋白不会阻断所述双特异性和多特异性分子的结合。

[0063] 另一方面, 本发明的抗GT468抗体衍生化、连接或共表达有另一功能性分子(例如, 另一肽或蛋白质(如Fab' 片段))。例如, 本发明的抗体可与一个或多个其它分子实体(例如另一抗体(例如用以产生双特异性或多特异性抗体)、细胞毒素、细胞配体或抗原(例如用以产生免疫缀合物, 如免疫毒素))进行功能性连接(例如, 借助化学偶联、基因融合、非共价相互作用等来实现)。本发明的抗体可与另一些治疗性部分(例如, 放射性同位素、小分子抗癌药物、重组细胞因子或趋化因子)结合。因此, 本发明涵盖了多种抗体缀合物、双特异性和多特异性分子以及融合蛋白, 所有这些均与表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞集合并且均可用于将另一些分子靶向这些细胞。

[0064] 通常, 就本发明的目的而言, 本文所述的所有抗体衍生物如抗体缀合物、双特异性和多特异性分子和融合蛋白都被术语“抗体”包括在内。

[0065] 另一方面, 本发明还囊括了源自非免疫球蛋白结构域的GT468结合蛋白质, 尤其是单链蛋白质。这种结合蛋白质及其产生方法描述于例如Binz等, (2005) Nature Biotechnology 23(10):1257-1268, 其通过引用并入本文。应当理解, 本文有关免疫球蛋白

或源自免疫球蛋白之结合分子的教导也相应地适用于源自非免疫球蛋白结构域的结合分子。特别地,使用这种源自非免疫球蛋白结构域的结合分子有可能阻断表达GT468靶标和/或特征在于其细胞表面与GT468靶标缔合之细胞中的GT468,并因此产生本文所述的本发明抗体之治疗效果,特别是抑制本文所公开的一种或多种肿瘤细胞活性(例如增殖)。通过例如与抗体的Fc区融合,有可能向这些非免疫球蛋白结合分子赋予抗体的效应分子功能,尽管这并非强制性的。

[0066] 本发明通常包括通过靶向由细胞表达的GT468和/或与细胞表面缔合的GT468来治疗和/或诊断疾病,尤其是肿瘤疾病。这些方法提供了此类细胞的选择性检测和/或消除,从而使对不表达GT468和/或特征不在于其细胞表面与GT468缔合之正常细胞的不利影响尽可能小。治疗或诊断的优选疾病是其中涉及表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的疾病,如肿瘤疾病,尤其是癌症疾病,如本文所述的癌症疾病。

[0067] 一方面,本发明提供了组合物(例如,药物和诊断组合物/试剂盒),其包含本发明的抗体或抗体组合。本发明的药物组合物可包含可药用载体,并可任选地包含一种或多种佐剂、稳定剂等。在一个具体实施方案中,所述组合物包含与不同表位结合或具有独特功能特征(例如诱导CDC和/或ADCC以及诱导细胞凋亡)之抗体的组合。在本发明的该实施方案中,抗体可组合使用,例如作为包含两种或更多种抗GT468单克隆抗体的药物组合物。例如,可在单一治疗中将具有不同但互补之活性的抗GT468抗体进行组合以实现期望的治疗效果。在一个优选的实施方案中,所述组合物包含与另一诱导细胞凋亡之抗GT468抗体联用的介导CDC之抗GT468抗体。在另一实施方案中,所述组合物包含与另一抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞生长的抗GT468抗体联用的在效应细胞存在下介导高效杀死靶细胞的抗GT468抗体。

[0068] 本发明还包括同时或依序施用两种或更多种本发明抗GT468抗体,其中优选地至少一种所述抗体是抗GT468嵌合抗体,以及至少一种另外的抗体是人抗GT468抗体,所述抗体与GT468的相同或不同表位结合。优选地,首先施用本发明的嵌合GT468抗体,然后施用本发明的人抗GT468抗体,其中所述人抗GT468抗体优选长期施用(即维持治疗)。

[0069] 本发明的抗体、缀合物、双特异性/多特异性分子以及组合物可用于多种抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的生长和/或选择性杀死表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞(其通过使有效量的所述抗体、缀合物、双特异性/多特异性分子或组合物与所述细胞接触来实现)的方法中,从而抑制该细胞的生长和/或杀死该细胞。在一个实施方案中,所述方法包括杀死表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞,任选地在效应细胞存在的情况下,例如通过CDC、细胞凋亡、ADCC、吞噬或通过两个或更多个上述机制的组合来实现。可使用本发明抗体抑制或杀死的表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞包括癌细胞。

[0070] 本发明的抗体、缀合物和双特异性/多特异性分子和组合物可用于治疗和/或预防多种疾病,所述疾病涉及表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞,其通过向患有这些疾病的患者施用所述抗体来实现。可治疗(例如,缓解)或预防的疾病实例包括但不限于致瘤性疾病。可治疗和/或预防的致瘤性疾病实例包括癌症疾病如乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌(尤其是肾细胞癌)、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转

移形式。在一个实施方案中,癌症疾病是肺中的转移癌。

[0071] 本发明一方面涉及抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的选自运动、迁移、侵袭、生长(增殖)和集落形成的一种或多种活性(优选生长和/或集落形成)的方法,该方法包括使所述细胞与有效量的本发明抗体、缀合物、双特异性/多特异性分子或组合物接触。优选地,GT468表达在所述细胞的表面上。

[0072] 另一方面,本发明涉及治疗或预防表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞所参与的疾病或病症的方法,该方法包括向对象施用本发明的抗体、缀合物、双特异性/多特异性分子或组合物。优选地,所述疾病或病症是肿瘤相关的疾病,在一些具体的实施方案中选自乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食道癌、头颈癌、肾癌(尤其是肾细胞癌)、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式。在一个实施方案中,肿瘤是肺中的转移癌。优选地,GT468在所述细胞的表面上表达。

[0073] 本发明可涉及本文所述试剂和组合物用于对肿瘤疾病进行预防性和/或治疗性处理的用途,即用于治疗患有肿瘤疾病或有发生肿瘤疾病之风险的患者用途。在一个方面中,本发明提供了抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括施用本文所述的一种或多种试剂和组合物。

[0074] 优选地,本文所述的试剂和组合物以下述方式被施用,所述方式使得当组织或器官中没有显著表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的肿瘤时(如胎盘组织和/或睾丸组织),则治疗活性物质不被递送或不被显著递送至该组织或器官。为此,可以局部施用本文所述的试剂和组合物。

[0075] 在一个方面中,本发明提供了用于本文所述治疗方法中的本文所述抗体。在一个实施方案中,本发明提供了用于本文所述治疗方法中的本文所述药物组合物。

[0076] 在本发明的一个具体实施方案中,还使用化疗药剂、辐射或者调节(例如增强或抑制)Fc受体(例如Fc- γ 受体)之表达或活性的药剂(例如细胞因子)对施用所述抗体的对象进行治疗。在治疗期间施用的典型细胞因子包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)。典型治疗剂包括抗肿瘤药剂,例如阿霉素、顺铂、多西他赛(taxotere)、5-氟尿嘧啶(5-fluoruracil)、氨甲蝶呤(methotrexat)、吉西他滨(gemcitabin)和环磷酰胺等。

[0077] 另一方面,本发明涉及使用人GT468或其肽段免疫非人动物(如小鼠)以获得抗体的免疫策略。用于免疫的优选肽选自SEQ ID NO:2-10和35-82的肽或其衍生物。因此,在一些优选的实施方案中,本发明的抗体是由使用选自SEQ ID NO:2-10和35-82的肽或其衍生物进行免疫而获得的抗体。类似地,可以在转基因非人动物(例如转基因小鼠)中产生针对GT468的抗体。所述转基因非人动物可以是具有包含重链转基因和轻链转基因之基因组的转基因小鼠,所述重链转基因和轻链转基因编码抗体的全部或一部分。

[0078] 可以用经纯化或经富集的GT468抗原和/或表达GT468或其肽段的核酸和/或细胞制备物来免疫野生型以及转基因非人动物。优选地,所述非人动物能够通过进行V-D-J重排和同种型转换(isotype switching)来产生针对GT468之人单克隆抗体的多种同种型(例如,IgG、IgA和/或IgM)。同种型转换可通过例如经典或非经典的同种型转换而发生。

[0079] 因此,在另一方面,本发明提供了从上述非人动物分离的B细胞。然后,可通过与永

生化细胞融合使所述经分离的B细胞永生化,从而提供本发明抗体的来源(例如,杂交瘤)。这种杂交瘤(其产生本发明的抗体)也涵盖在本发明的范围内。

[0080] 在又一个方面中,本发明涉及用于诊断、检测或监测肿瘤疾病的方法,所述方法包括通过使用本发明抗体在分离自患者的生物样品中检测和/或测定GR468或表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的量。生物样品可分离自患有肿瘤疾病、疑似患有肿瘤疾病或有可能发生肿瘤疾病的患者。

[0081] 在本发明诊断、检测或监测肿瘤疾病的方法的一个实施方案中,生物样品和/或对照/参照样品种自对应于要诊断、检测或监测肿瘤疾病病变的组织或器官的组织或器官,例如要诊断、检测或监测的肿瘤疾病是乳腺癌,则生物样品和/或对照/参照样品种自乳腺组织。此类组织和器官如本文所述,例如与不同的肿瘤疾病和癌症相关联。

[0082] 在诊断、检测或监测肿瘤疾病的方法的一个实施方案中,生物样品来自于下述组织或器官,其中当组织或器官没有肿瘤时细胞不显著表达GT468和/或特征不在于其细胞表面与GT468实质性缔合。优选地,所述组织是除胎盘组织或睾丸组织之外的组织。

[0083] 通常,将生物样品中靶分子的水平与参照水平比较,其中与所述参照水平的偏差指示了对象中肿瘤疾病的存在和/或阶段。参照水平可以是在(例如来自健康组织或对象的)对照样品种自测定的水平,或是来自健康对象的中值水平。与所述参照水平的“偏差”是指任何显著的改变,如提高或降低至少10%、20%或30%,优选地至少40%或50%,或甚至更多。优选地,所述生物样品中GT468或表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的存在,或与参照水平相比生物样品中GT468或表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的量的提高指示肿瘤疾病的存在。

[0084] 通常,本发明方法中定量的检测和/或测定涉及使用特异性结合靶分子的标记抗体。

[0085] 在一个具体的方面中,本发明涉及用于对肿瘤疾病进行检测(例如确定位置或部位,例如特定组织或器官)的方法,包括对患者施用与检测标记偶联的本发明抗体。所述患者中组织或器官的标记可指出所述组织或器官中肿瘤疾病的存在或风险。

[0086] 如本文所列举地,本发明的抗体可直接从表达所述抗体的杂交瘤获得,或者可以在宿主细胞(如CHO细胞或淋巴细胞)中克隆以及重组表达。宿主细胞的另一些实例包括微生物(例如大肠杆菌)和真菌(例如酵母)。或者,它们可以在转基因非人动物或植物中重组产生。然而,本发明还包括下述实施方案,其中使用本文公开的免疫策略,通过免疫或疫苗接种在患者中原位生产抗体。

[0087] 产生本发明抗体的优选杂交瘤细胞是保藏在DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany)、具有下列名称和登记号的杂交瘤细胞:

[0088] 1. 4E9-1H9, 登记号DSM ACC2822, 于2007年3月13日保藏

[0089] 2. 9B6-2A9, 登记号DSM ACC2826, 于2007年3月13日保藏

[0090] 3. 59D6-2F2, 登记号DSM ACC2824, 于2007年3月13日保藏

[0091] 4. 61C11-2B5, 登记号DSM ACC2825, 于2007年3月13日保藏

[0092] 5. 78H11-1H6, 登记号DSM ACC2823, 于2007年3月13日保藏

[0093] 6. 22-1A-1, 登记号DSM ACC2895, 于2008年3月11日保藏

[0094] 7. 22-2A-1, 登记号DSM ACC2893, 于2008年3月11日保藏

- [0095] 8.22-9B-1, 登记号DSM ACC2896, 于2008年3月11日保藏
- [0096] 9.23-33A-1, 登记号DSM ACC2897, 于2008年3月11日保藏
- [0097] 10.23-19A-1, 登记号DSM ACC2891, 于2008年3月11日保藏
- [0098] 11.F11#33F7D12, 登记号DSM ACC2894, 于2008年3月11日保藏
- [0099] 12.4A12 2D4 1A10, 登记号DSM ACC2892, 于2008年3月11日保藏
- [0100] 13.4E9 1D12 2D4, 登记号DSM ACC2898, 于2008年3月11日保藏
- [0101] 14.42H11 1C11 2B2, 登记号DSM ACC2961, 于2008年9月1日保藏
- [0102] 15.51G6 2H3 2B4, 登记号DSM ACC2962, 于2008年9月1日保藏
- [0103] 16.16-5B-1, 登记号DSM ACC2943, 于2008年9月1日保藏
- [0104] 17.20-11A-1, 登记号DSM ACC2956, 于2008年9月1日保藏
- [0105] 18.29-1A-2, 登记号DSM ACC2947, 于2008年9月1日保藏
- [0106] 19.29-8B-1, 登记号DSM ACC2964, 于2008年9月2日保藏
- [0107] 20.35-48B-1, 登记号DSM ACC2959, 于2008年9月1日保藏
- [0108] 21.35-50A-2a, 登记号DSM ACC2963, 于2008年9月1日保藏
- [0109] 22.38-10B-1, 登记号DSM ACC2957, 于2008年9月1日保藏
- [0110] 23.38-1A-1, 登记号DSM ACC2958, 于2008年9月1日保藏
- [0111] 24.44-3A-2, 登记号DSM ACC2948, 于2008年9月1日保藏
- [0112] 25.45-2A-1, 登记号DSM ACC2949, 于2008年9月1日保藏
- [0113] 26.45-8A-2, 登记号DSM ACC2950, 于2008年9月1日保藏
- [0114] 27.48-3B-1, 登记号DSM ACC2951, 于2008年9月1日保藏
- [0115] 28.48-4A-1, 登记号DSM ACC2952, 于2008年9月1日保藏
- [0116] 29.49-3A-1, 登记号DSM ACC2946, 于2008年9月1日保藏
- [0117] 30.49-8A-1, 登记号DSM ACC2945, 于2008年9月1日保藏
- [0118] 31.51-1A-1, 登记号DSM ACC2944, 于2008年9月1日保藏
- [0119] 32.53-13A-2, 登记号DSM ACC2953, 于2008年9月1日保藏
- [0120] 33.53-29A-1, 登记号DSM ACC2955, 于2008年9月1日保藏
- [0121] 34.54-4B-2, 登记号DSM ACC2960, 于2008年9月1日保藏
- [0122] 35.56-4A-2, 登记号DSM ACC2954, 于2008年9月1日保藏
- [0123] 36.62-9B-1, 登记号DSM ACC3001, 于2009年7月16日保藏

[0124] 本发明的优选抗体是由上述杂交瘤产生或可从中获得的抗体及其嵌合的和人源化的形式。本发明的另一些优选抗体是具有由上述杂交瘤产生或可从中获得之抗体的特异性的抗体, 尤其是包含由上述杂交瘤产生或可从中获得之抗体的抗原结合部分或抗原结合位点(特别是可变区)的抗体。

[0125] 在一些优选的实施方案中, 抗体(特别是嵌合形式的本发明抗体)包括含有重链恒定区(CH)的抗体, 所述重链恒定区包含源自人重链恒定区(例如SEQ ID NO:17或24所示氨基酸序列或其片段)的氨基酸序列。在另一些优选的实施方案中, 抗体(特别是嵌合形式的本发明抗体)包括含有轻链恒定区(CL)的抗体, 所述轻链恒定区包含源自人轻链恒定区(例如SEQ ID NO:18或22所示氨基酸序列或其片段)的氨基酸序列。在一个特别优选的实施方案中, 抗体(特别是嵌合形式的本发明抗体)包括含有CH并且含有CL的抗体, 所述CH包含源

自人CH(例如SEQ ID NO:17或24所示氨基酸序列或其片段)的氨基酸序列,所述CL包含源自人CL(例如SEQ ID NO:18或22所示氨基酸序列或其片段)的氨基酸序列。

[0126] 包含SEQ ID NO:17所示氨基酸序列的CH可由包含SEQ ID NO:20所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的CH可由包含SEQ ID NO:23所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:18所示氨基酸序列的CL可由包含SEQ ID NO:19所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的CL可由包含SEQ ID NO:21所示核酸序列的核酸编码。

[0127] 上文中使用的“片段”或“氨基酸序列片段”涉及抗体序列的一部分,即表示所述抗体序列在N端和/或C端缩短的序列,当它取代所述抗体时,抗体中的序列保留了所述抗体与GT468结合以及优选地本文所述抗体的功能(例如CDC介导的裂解或ADCC介导的裂解)。优选地,片段的氨基酸序列包含来自所述氨基酸序列之至少80%,优选地至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸残基。本文所述片段的氨基酸序列可由编码所述氨基酸序列的各核酸序列片段所编码。

[0128] 本发明还涉及包含编码本文所述抗体或其部分(例如,抗体链)之基因或核酸序列的核酸。所述核酸可包含在载体中,所述载体例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或例如在基因工程中常规使用的其它载体。所述载体还可包含基因,例如允许在合适条件下、在合适的宿主细胞中选择该载体的标记基因。此外,所述载体可包含表达调控元件,其允许所述编码区在适当的宿主中正确表达。这样的调控元件是本领域技术人员已知的,并可包括启动子、剪接盒和翻译起始密码子。

[0129] 优选地,本发明的核酸与上述表达调控序列有效连接,以允许在真核或原核细胞中表达。确保在真核或原核细胞中表达的调控元件是本领域技术人员所熟知的。

[0130] 用于构建本发明核酸分子的方法、用于构建包含上述核酸分子之载体的方法、用于将所述载体引入适当选择的宿主细胞中的方法、用于导致或实现所述表达的方法是本领域中众所周知的。

[0131] 本发明的另一方面涉及包含本文所述核酸或载体的宿主细胞。

[0132] 根据以下的详细说明和权利要求,本发明的其它特征和优点将是显然的。

附图说明

[0133] 图1.GT468是在癌细胞中异常活化的滋养层细胞谱系标志物。(A)在正常组织、原发性乳腺癌样品和癌细胞系(1,MCF-7;2,MDA-MB-435S;3,BT-549;4,MDA-MB-231;5,SNU-16;6,LCLC-103H;7,KYSE-510;8,KYSE-30;9,EFO-27;10,TOV-21G;11,TOV-112D;12,CAOV-3;13,EFO-21;14,FU-OV-1;15,LNCAP;16,CAPAN-2)中进行35个循环的终点RT-PCR。(B)在正常组织(1,睾丸;2,胎盘;3,脑;4,肺;5,乳房;6,结肠;7,肝;8,胃;9,肾;10,前列腺;11,胰腺;12,卵巢;13,脾;14,皮肤;15,心肌;16,子宫内膜;17,静息状态的PBMC;18,增殖状态的PBMC;19,肾上腺)、原发性乳腺癌样品和(C)癌细胞系中进行40个循环的定量实时RT-PCR。(D)在MCF-7和BT-549乳腺癌细胞中,sirNA所介导的GT468沉默的定量实时RT-PCR。(E)sirNA所介导GT468蛋白表达减少的Western印迹分析。对照细胞或者未处理或者用乱序的非沉默双链体(ns-sirNA)进行转染。(F)人的正常和肿瘤组织中GT468蛋白水平的Western印迹分析。(G)使用GT468特异性抗体,对来自人的正常乳房组织(左)和乳腺癌(右)的切片

进行免疫组化分析。

[0134] 图2.GT468是细胞表面相关蛋白质。在转染GT468特异性siRNA (siRNA#1) 或非沉默siRNA (ns-siRNA) 后使用抗GT468 C端抗体对(A) 经甲醇固定的和(B) 非固定的MCF-7和BT-549乳腺癌细胞进行染色。

[0135] 图3.GT468的表达促进乳腺癌细胞的运动、迁移和侵入。(A) 利用Transwell迁移测定,在向上层腔室和下层腔室中添加5%FCS 12小时后进行化动性(chemokinesis) (运动性) 分析。(B) 利用Transwell迁移测定,在仅向下层腔室添加5%FCS (从而获得梯度) 12小时后对MCF-7和BT-549进行细胞趋化分析。(C) 在向下层腔室添加5%FCS作为化学引诱剂24小时后对趋化侵入Matrigel进行分析。

[0136] 图4.GT468的表达促进乳腺癌细胞的增殖。(A) 利用GT468特异性siRNA双链体启动敲低72小时后,对MCF-7和BT-549细胞的增殖进行分析。(B) GT468沉默启动72小时后,对细胞的细胞周期进行分析,显示为不同细胞周期状态之细胞百分比的柱状图。(C) 在用siRNA转染72小时后,通过膜联蛋白V染色来测定细胞凋亡。作为膜联蛋白V染色的阳性对照,用6 μ M喜树碱处理细胞12小时。

[0137] 图5.可利用GT468的功能拮抗性抗体来开发药物。在与不同量的抗GT468抗体和对照抗体(同种型对照)一起孵育48小时后,对MCF-7和BT-549细胞进行增殖分析。

[0138] 图6.细胞周期蛋白D1和AKT激酶参与GT468的功能。在用GT468特异性siRNA双链体处理72小时后对细胞周期蛋白D1进行(A) 实时定量RT-PCR分析和(B) Western印迹分析。在(C) GT468敲低72小时后或(D) 用抗GT468 C端抗体处理1小时后对AKT Ser473磷酸化进行Western印迹分析。

[0139] 图7.确定杂交瘤上清液中针对GT468所产生抗体之特异性的肽ELISA。杂交瘤上清液仅与用于免疫的肽反应。

[0140] 图8.利用含有针对GT468所产生抗体的杂交瘤上清液对转染有GT468-eGFP构建体的CHO细胞进行染色。该杂交瘤上清液特异性地染色表达GT468-eGFP的细胞。

[0141] 图9.可利用GT468的功能拮抗性单克隆抗体来开发药物。对与杂交瘤上清液一起孵育72小时后的不同癌细胞系进行增殖分析。

[0142] 图10.确定杂交瘤上清液中针对GT468所产生抗体之特异性的(A) 粗裂解物ELISA (CrELISA) 或(B) 肽特异性ELISA。杂交瘤上清液仅与(A) GT468裂解物或(B) 用于免疫的各种肽反应。

[0143] 图11.确定杂交瘤上清液中针对GT468所产生抗体之特异性的流式细胞分析。所有杂交瘤上清液均显示对转染有GT468之细胞的特异性染色,而在模拟转染的细胞中则未观察到染色。

[0144] 图12.确定杂交瘤上清液中针对GT468所产生抗体之特异性的Western印迹。所有杂交瘤上清液均显示对转染有GT468 pcDNA3.1表达质粒之HEK293细胞的裂解物的特异性反应,而模拟转染细胞的裂解物则未显示出信号。在模拟转染裂解物中杂交瘤上清液23-33A-1的微弱信号是由于HEK GT468裂解物的溢出所致。

[0145] 图13.鉴定GT468蛋白中抗体结合表位的肽ELISA。杂交瘤上清液22-1A-1、23-33A-1和23-19A-1均显示与两种重叠肽结合,这暗示与GT468线性表位的反应。22-2A-1和22-9B-1的结合模式暗示与GT468蛋白的构象表位(非连续表位)的反应。

[0146] 图14.可利用GT468的功能拮抗性单克隆抗体来开发药物。对与经纯化杂交瘤上清液一起孵育72小时或120小时后的不同癌细胞系进行增殖分析。

[0147] 图15.用于测定杂交瘤上清液中针对GT468所产生抗体之特异性的流式细胞术分析。杂交瘤上清液显示对用GT468 116-212位氨基酸转染的细胞的特异性染色,而对模拟转染的细胞未观察到染色。

[0148] 图16A、B.用于测定单克隆抗体与未固定的内源性表达GT468的肿瘤细胞(MCF-7、MDA-MB-468和SK-BR-3乳腺癌细胞)特异性结合的流式细胞术分析。使用不表达GT468的NUG-C4胃癌细胞作为阴性对照。抗体能够与表达GT468的肿瘤细胞结合。

[0149] 图17.用于测定杂交瘤上清液中针对GT468所产生抗体之特异性的Western印迹。所有杂交瘤上清液均显示对用GT468表达质粒转染的HEK293细胞裂解物的特异反应性,而模拟转染的细胞的裂解物显示无信号。

[0150] 图18.GT468可通过功能拮抗性单克隆抗体而用于制药。与纯化的杂交瘤上清液孵育72小时后不同癌细胞系的增殖分析。

[0151] 图19.克隆形成实验,用于分析针对GT468的单克隆抗体对内源表达GT468的SK-BR-3细胞集落形成的抑制活性。将细胞与抗体一起孵育减少或抑制了集落形成。

[0152] 图20A-B.使用实时RT-PCR定量正常组织中的GT468表达。针对每种正常组织类型测试来自三个个体的组织。40个RT-PCR循环后在正常组织中仅可检测到痕量的GT468转录本。超过表达截止值(虚线,所有正常组织的平均表达值+3倍标准差(99%百分位数))的唯一正常组织是胎盘和睾丸。误差线,STD。除了乳腺癌(见图1)之外,还在来自肺癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌、肾细胞癌、肝癌、肉瘤、甲状腺癌和头与颈癌的样品中发现GT468的高表达。

[0153] 图21.癌细胞系中GT468表达的Western印迹分析。在用GT468表达质粒转染的HEK293细胞(阳性对照)、SK-BR-3(乳腺癌)、BEWO(胎盘绒毛膜癌)、JAR(胎盘绒毛膜癌)、HCT-15(结肠癌)、LnCaP(前列腺癌)、HeLa(宫颈癌)、MDA-MB-468(乳腺癌)、JEG-3(胎盘绒毛膜癌)、JIMT-1(乳腺癌)、LA1-55n(神经母细胞瘤)、PC-3(前列腺癌)、BT-20(乳腺癌)和NCI-H929(骨髓瘤)中检测了GT468表达。Me1H0(恶性黑素瘤)和NUGC4(胃癌)被测试为阴性。

[0154] 图22.GT468可通过功能拮抗性单克隆抗体而用于制药。与纯化的杂交瘤上清液孵育72小时后,GT468阳性MDA-MB-468乳腺癌细胞和GT468阴性NUGC4胃癌细胞的增殖分析。

[0155] 图23.用于测定杂交瘤上清液中针对GT468所产生抗体之特异性的Western印迹。杂交瘤上清液显示对用GT468表达质粒转染的HEK293细胞裂解物的特异反应性,而对模拟转染的细胞的裂解物未显示信号。

[0156] 图24.抗GT468单克隆抗体处理减弱了裸鼠中BEWO胎盘绒毛膜癌异种移植物的肿瘤生长。皮下注射BEWO细胞后,用纯化的单克隆抗体(200 μ g)处理动物,一周两次,持续两周。

[0157] 图25.鉴定GT468蛋白中的抗体结合表位的肽ELISA。杂交瘤上清液29-8B-1、35-48B-1、44-3A-2、49-3A-1、49-8A-1、51-1A-1、53-13A-2和62-9B1各自显示与一种或多种重叠的肽结合,指示了对GT468线性表位的反应性。29-1A-2和54-4B-2的结合模式指示了对GT468蛋白的构象表位(不连续表位)的反应性。

[0158] 图26.在实验性转移实验中,抗GT468单克隆抗体处理显著削弱了MCF-7乳腺癌细

胞的转移性传播。静脉内注射 1×10^6 个MCF-7细胞后,用纯化的单克隆抗体(200 μ g)处理动物,一周两次。接种后5周,使用对人微卫星DNA具有特异性的寡核苷酸,通过定量PCR测定动物肺中的转移肿瘤负荷。

具体实施方式

[0159] 定义

[0160] 为了使本发明更易于理解,首先对某些术语进行定义。其它定义在通篇详细说明中阐明。

[0161] 术语“GT468”优选地涉及人的GT468,特别地涉及(i)包含编码SEQ ID NO:2氨基酸序列之核酸序列的核酸,例如包含SEQ ID NO:1核酸序列的核酸,或(ii)包含SEQ ID NO:2氨基酸序列的蛋白质,并包括所述序列的任何变体,尤其是突变体、剪接变体、构象、同工型(isoform)、等位基因变体、物种变体和物种同源物,尤其是天然存在的那些。等位基因变体涉及基因正常序列中的改变,其意义经常是不清楚的。全基因测序经常鉴定出给定基因的大量等位基因变体。物种同源物是与给定的核酸或氨基酸序列具有不同的物种来源的核酸或氨基酸序列。术语“GT468”应当包括(i)GT468剪接变体,(ii)GT468翻译后修饰的变体,尤其包括具有不同糖基化如N-糖基化状态的变体,(iii)GT468构象变体,(iv)GT468癌症相关变体和GT468癌症无关变体。

[0162] 在一个实施方案中,术语“GT468”涉及对应于细胞外结构域或胞外域(ectodomain)的GT468部分,优选地涉及不包含N端疏水结构域的GT468氨基酸序列。术语“GT468”包括含有SEQ ID NO:2之29~119位氨基酸(优选29~212位氨基酸,更优选23~212位氨基酸)或SEQ ID NO:2变体的相应氨基酸的蛋白质。

[0163] 根据本发明,与GT468有关的术语“细胞外结构域”或“细胞外域”涉及与表达GT468之细胞的表面相缔合的GT468部分。优选地,所述“细胞外结构域”或“细胞外域”存在于细胞外区室中。GT468的“细胞外结构域”或“细胞外域”优选地指全长GT468中缺少N端疏水结构域的部分。根据本发明,与GT468有关的术语“疏水结构域”涉及并非所述细胞外结构域之一部分的GT468部分,并优选包含位于靠近GT468N端的疏水序列。GT468的“疏水结构域”可包含位于所述疏水序列之前的位于GT468N端的序列。针对SEQ ID NO:2来说,所述N端疏水结构域优选包含1~22位氨基酸。应当理解,对本发明GT468多肽的任何疏水结构域或序列的鉴定均是根据本领域用于鉴定疏水结构域或序列所应用的常规标准来实现的。疏水结构域的精确边界可存在差异,但最有可能的是,所述差异不超过本文最初鉴定之结构域两端的约5个氨基酸。因此,GT468多肽的细胞外结构域可任选地在本文所鉴定之疏水结构域/细胞外结构域边界处包含约5个或更少的氨基酸。

[0164] “细胞表面”按照其在本领域中的惯常含义来使用,并因此包含蛋白质和其它分子有机会与之结合的细胞外部。

[0165] “在细胞表面上表达的GT468”这一表述是指由细胞表达的GT468与所述细胞的表面有关。

[0166] 如果GT468位于所述细胞的表面并有机会与添加至细胞的GT468特异性抗体结合,则该GT468与细胞表面相关。在一些优选的实施方案中,特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞是表达GT468的细胞。应当理解,在GT468由细胞表达的情形中,与所述细胞表面相关

的GT468可以仅为所表达GT468的一部分,尤其是如上所述的其细胞外结构域。

[0167] 根据本发明,如果表达和/或缔合的水平与胎盘细胞或胎盘组织中的表达和/或缔合相比更低,则GT468不在细胞中显著表达和/或不与细胞表面显著缔合。优选地,表达和/或缔合的水平低于胎盘细胞或胎盘组织中表达和/或缔合的10%,优选地少于5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%,或甚至更低。优选地,如果表达和/或缔合的水平超过脑、肺、乳腺、结肠、肝、胃、肾、前列腺、胰腺、卵巢、脾、皮肤、心肌和子宫内膜中一种或多种非致瘤性、非癌组织中表达和/或缔合水平不多于2倍、优选地1.5倍,优选地不超过所述非致瘤性、非癌组织中的表达和/或缔合水平,则GT468不在细胞中显著表达和/或不与细胞表面显著缔合。优选地,如果表达和/或缔合水平低于检出限和/或如果表达和/或缔合水平太低而无法允许添加至细胞的GT468特异性抗体的结合,则GT468不在细胞中显著表达和/或不与细胞表面显著缔合。

[0168] 根据本发明,如果表达和/或缔合水平超过脑、肺、乳腺、结肠、肝、胃、肾、前列腺、胰腺、卵巢、脾、皮肤、心肌和子宫内膜中一种或多种非致瘤性、非癌组织中表达和/或缔合水平优选地多于2倍、优选地10倍、100倍、1000倍或10000倍,则GT468在细胞中表达和/或与细胞表面缔合。优选地,如果表达或缔合水平高于检出限和/或如果表达和/或缔合水平足够高从而允许与添加至细胞的GT468特异性抗体结合,则GT468在细胞中表达和/或与细胞表面缔合。优选地,在细胞中表达的GT468是在所述细胞表面上表达或暴露的细胞。

[0169] 术语“筏(raft)”是指位于细胞质膜外侧区域的富含鞘脂和胆固醇的膜微区。某些蛋白质与上述区域相互作用的能力及其形成“聚集”或“焦点聚集(focal aggregate)”的能力可影响蛋白质的功能。例如,GT468分子与本发明抗体结合后易位至这些结构中形成了质膜中高密度的GT468抗原-抗体复合物。这种高密度的GT468抗原-抗体复合物可以在CDC期间有效地激活补体系统。

[0170] 根据本发明,术语“疾病”是指任何病理状态,包括癌症,特别是本文所述的癌症形式。

[0171] 本发明“与表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞相关的疾病”表示与健康组织或器官中的状态相比,患病组织或器官的细胞中表达和/或缔合优选地被提高。提高是指提高至少10%,尤其是至少20%,至少50%,至少100%,至少200%,至少500%,至少1000%,至少10000%或甚至更多。在一个实施方案中,表达和/或与细胞表面的缔合仅存在于患病组织中,而健康组织中的表达被阻抑。根据本发明,与表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞相关的疾病包括肿瘤疾病例如癌症疾病。另外,根据本发明,肿瘤疾病如癌症疾病优选地是其中肿瘤细胞或癌细胞表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的疾病。

[0172] 在本文中使用时,“肿瘤疾病”、“肿瘤相关疾病”或“致瘤性疾病”包括特征是异常调节的细胞生长、增殖、分化、粘附和/或迁移的疾病,其可导致肿瘤和/或肿瘤转移的产生或产生趋势。“肿瘤细胞”表示异常的细胞,其通过迅速、失控的细胞增殖而生长,并且在起始新生长的刺激终止后仍继续生长。

[0173] “肿瘤”是指异常的细胞群或组织,其通过迅速、失控的细胞增殖而生长,并且在起始新生长的刺激终止后仍继续生长。肿瘤显示出结构组织以及与正常组织功能相协调的部分或全部缺乏,并且通常形成可以是良性、恶变前或恶性的独特的组织块。

[0174] 优选地,本发明的“肿瘤疾病”、“肿瘤相关疾病”或“致瘤性疾病”是癌症疾病,即恶性疾病,并且肿瘤细胞是癌细胞。优选地,“肿瘤疾病”、“肿瘤相关疾病”或“致瘤性疾病”的特征是表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞,并且肿瘤细胞表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合。

[0175] 表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞优选地是肿瘤细胞或癌细胞,优选地是本文所述的肿瘤和癌症的肿瘤细胞或癌细胞。优选地,此类细胞是除胎盘细胞和/或睾丸细胞之外的细胞。

[0176] 本发明优选的癌症疾病或癌症选自下组:乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌(尤其是肾细胞癌)、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式。在一个实施方案中,癌症疾病选自肺中的转移癌。

[0177] 根据本发明,“上皮癌(carcinoma)”是在器官衬里层(上皮细胞)中开始的癌症。

[0178] 绒毛膜癌是恶性、滋养层和侵略性的癌症,通常在胎盘中。其特征是早期造血性传播至肺。

[0179] 肉瘤是导致中胚层增殖的结缔组织(骨、软骨、脂肪)的癌症。这与上皮起源的上皮癌不同。

[0180] 肾细胞癌(Renal cell carcinoma)也称作肾细胞癌症(renal cell cancer)或肾细胞腺癌,其为起源于近曲小管(proximal convoluted tubule)衬里的肾癌,所述近曲小管是肾中过滤血并去除废弃物的非常细小的管道。肾细胞癌是迄今为止成年人中最常见的肾癌类型,并且在所有泌尿生殖系统肿瘤中致死性最高。肾细胞癌的不同亚型是透明肾细胞癌和乳头状肾细胞癌。透明肾细胞癌是肾细胞癌的最常见形式。在显微镜下观察时,组成透明肾细胞癌的细胞看起来非常苍白或透明。乳头状肾细胞癌是第二常见的亚型。这些癌症在一些(如果不是大部分)肿瘤中形成小指样投影(称作乳头)。

[0181] “转移”是指癌细胞从其原来的部位传播到机体另一部分。转移的形成是非常复杂的过程,其依赖于恶性细胞从原发肿瘤脱离、侵入细胞外基质、穿透内皮基底膜进入体腔和血管以及通过血液运输而浸润靶器官。最后,靶部位的新肿瘤生长依赖于血管发生。肿瘤转移常会发生,甚至在除去原发肿瘤后亦会发生,这是因为肿瘤细胞或组分可保留和发展转移潜能。在一个实施方案中,本发明的术语“转移”涉及“远处转移”,后者涉及远离原发肿瘤和局部淋巴结系统的转移。

[0182] 继发或转移肿瘤的细胞与原发肿瘤中的细胞相似。例如,这表示如果卵巢癌转移至肝,则继发肿瘤由异常的卵巢细胞而不是异常的肝细胞组成。肝中的肿瘤随后被称作转移卵巢癌而不是肝癌。

[0183] 术语“疾病治疗”包括对疾病或其症状的治愈、缩短持续时间、缓解、预防、减缓,或者抑制疾病或其症状的进展或恶化,或者防止或延缓疾病或其症状的发病。

[0184] 本发明的术语“患者”表示人类、非人灵长动物或其他动物,尤其是哺乳动物如牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物如小鼠和大鼠。在一个尤其优选的实施方案中,患者是人类。

[0185] 根据本发明,样品可以是可用于本发明的任何样品(特别是生物样品,例如组织样品(包括体液和/或细胞样品)),并可通过常规的方式(例如,组织活检(包括钻取活组织检

查(punch biopsy))以及采集血液、支气管抽取物、痰、尿、粪便或其它体液)而获得。根据本发明,术语“生物样品”还包括生物样品的组分。

[0186] 术语“抗体”是指包含由链间二硫键连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白,或其抗原结合部分。术语“抗体”还包括所有重组形式的抗体,尤其是本文所述的抗体,例如在原核生物中表达的抗体、非糖基化的抗体以及本文所述的任何抗原结合抗体片段和衍生物。每条重链由重链可变区(本文中简写为VH)和重链恒定区组成。每条轻链由轻链可变区(本文中简写为VL)和轻链恒定区组成。VH和VL区可进一步细分为高变区(称为互补决定区(CDR))、穿插在较保守区域间的区域(称为框架区(FR))。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端依次为:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)以及经典补体系统的第一组分(C1q))结合。

[0187] 术语“人源化抗体”是指具有基本上源自非人物种之免疫球蛋白的抗原结合位点的分子,其中该分子的其余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。所述抗原结合位点可包含融合至恒定区上的全部可变区或者仅有“嫁接”至合适的可变区框架区上的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型的或者经一个或多个氨基酸替换所修饰,例如经修饰使其与人免疫球蛋白更相像。人源化抗体的某些形式保留了所有CDR序列(例如,包含小鼠抗体中全部六个CDR的人源化小鼠抗体)。另一些形式具有相比于原始抗体进行改变的一个或多个CDR。

[0188] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其中每条重链和轻链氨基酸序列的一部分与源自特定物种或属于特定类别之抗体中的相应序列同源,而所述链的其余部分则与另一物种或类别之抗体中的相应序列同源。通常,轻链和重链的可变区模拟源自某一哺乳动物物种之抗体的可变区,而恒定部分则与源自另一物种之抗体的序列同源。一个明显的优势是,在这种嵌合形式中,使用易于获得的来自非人宿主生物的B细胞或杂交瘤使得可变区可方便地来源于目前已知的多种来源,并且恒定区来源于例如人细胞制备物。尽管所述可变区具有易于制备的优点并且特异性不受来源的影响,但是当注射入该抗体时,与非人来源的恒定区相比,人的恒定区引起人受试者发生免疫反应的可能性较小。然而,该定义不仅限于这一具体实例。

[0189] 本文使用的术语抗体之“抗原结合部分”(或简称为“结合部分”)是指保留了特异性结合抗原之能力的一种或多种抗体片段。已显示,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来实现。术语抗体之“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括:(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含由铰链区二硫桥连接之两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂之VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等,(1989) Nature 341:544-546);(vi) 经分离的互补决定区(CDR),以及(vii) 两个或更多个经分离CDR的组合,其可任选地由合成的连接子结合。此外,尽管Fv片段的两个结构域(VL和VH)由单独的基因编码,但是可使用重组方法对它们进行连接,所述重组方法利用能够将它们制备成单一蛋白链(其中VL和VH两个区域形成单价分子,称为单链Fv(scFv))的合成连接子来实现;参见,例如Bird等(1988) Science 242:423-426;以及Huston等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-

5883)。这样的单链抗体也旨在囊括在术语抗体之“抗原结合部分”的范围内。另一实例是结合结构域免疫球蛋白融合蛋白,其包含(i)融合至免疫球蛋白铰链区多肽的结合结构域多肽,(ii)融合至所述铰链区的免疫球蛋白重链CH2恒定区,以及(iii)融合至所述CH2恒定区的免疫球蛋白重链CH3恒定区。所述结合结构域多肽可以是重链可变区或轻链可变区。所述结合结构域免疫球蛋白融合蛋白还公开于US 2003/0118592和US 2003/0133939中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并采用与完整抗体同样的方式来筛选可用的片段。

[0190] 术语“表位”是指能够与抗体结合的蛋白质决定簇,其中本文的术语“结合”优选地涉及特异性结合。表位通常由具有化学活性的表面分子集合(例如氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特异性的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在变性溶剂存在时,前者(而非后者)的结合丧失。

[0191] 本文使用的术语“不连续表位”是指蛋白质抗原上的构象表位,其由该蛋白质一级序列中至少两个单独的区域形成。

[0192] 术语“双特异性分子”旨在包括具有两种不同结合特异性的任何试剂,例如蛋白质、肽或者蛋白质复合物或肽复合物。例如,所述分子可与(a)细胞表面抗原和(b)效应细胞表面上的Fc受体结合或相互作用。术语“多特异性分子”或“异种特异性分子(heterospecific molecule)”旨在包括具有两种以上不同结合特异性的任何试剂,例如蛋白质、肽或者蛋白质复合物或肽复合物。例如,所述分子可以与(a)细胞表面抗原、(b)效应细胞表面上的Fc受体以及(c)至少一种另外组分结合或相互作用。因此,本发明包括但不限于针对GT468以及针对另一些靶标(如效应细胞上的Fc受体)的双特异性、三特异性、四特异性和另外的多特异性分子。术语“双特异性抗体”还包括双抗体(diabody)。双抗体是二价、双特异性抗体,其中VH和VL结构域表达在单一多肽链上,然而使用过短的、以致于所述同一链上的两个结构域不能配对的连接子,从而使所述结构域与另一链的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点(参见,例如Holliger,P.等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.等(1994)Structure 2:1121-1123)。

[0193] 本发明还包括本文所述抗体的衍生物,它们就本发明的目的而言包括在术语“抗体”之内。术语“抗体衍生物”是指抗体的任何修饰形式,例如抗体与另一试剂或抗体的缀合物。如本文所使用地,如果抗体是通过免疫动物或通过筛选免疫球蛋白基因文库而从系统中获得的,其中所选抗体的氨基酸序列与由生殖系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列具有至少90%、更优选至少95%、甚至更优选至少96%、97%、98%或99%的同一性,则该抗体“源自”特定的生殖系序列。通常,与由生殖系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列相比,源自特定生殖系序列的抗体将显示不超过10个(更优选地不超过5个,甚至更优选地不超过4、3、2或1个)氨基酸差异。

[0194] 本文使用的术语“异种抗体(heteroantibody)”是指两种或更多种抗体、其衍生物或连接在一起的抗原结合区域,其中至少两种具有不同的特异性。这些不同的特异性包括针对效应细胞上Fc受体的结合特异性以及针对靶细胞(例如肿瘤细胞)上抗原或表位的结合特异性。

[0195] 本文所述的抗体可以是人抗体。本文使用的术语“人抗体”旨在包括具有源自人生殖系免疫球蛋白序列之可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括并非由人生殖系免

疫球蛋白序列所编码的氨基酸残基(例如,通过在体外进行随机诱变或位点特异性诱变或者通过在体内进行体细胞突变所引入的突变)。

[0196] 本文使用的术语“单克隆抗体”是指单一分子组成的抗体分子制备物。单克隆抗体显示针对特定表位的单一结合特异性及亲合力。在一个实施方案中,单克隆抗体由杂交瘤产生,所述杂交瘤包含与永生化细胞融合的来自非人动物(如小鼠)的B细胞。

[0197] 本文使用的术语“重组抗体”包括利用重组手段制备、表达、产生或分离的所有抗体,例如(a)从与所述免疫球蛋白基因或由其制备之杂交瘤有关的转基因或转染色体动物(例如小鼠)中分离的抗体,(b)从经转化表达所述抗体的宿主细胞(例如从转染瘤(transfectoma))中分离的抗体,(c)从重组的组合抗体文库中分离的抗体,和(d)利用任何其它手段(包括将免疫球蛋白基因序列与其它DNA序列剪接)制备、表达、产生或分离的抗体。

[0198] 本文使用的术语“转染瘤”包括表达抗体的重组真核宿主细胞,如CHO细胞、NS/0细胞、HEK293细胞、HEK293T细胞、植物细胞或真菌(包括酵母)细胞。

[0199] 本文使用的“异源抗体”的定义与产生这种抗体的转基因生物有关。该术语是指如下抗体:其具有的氨基酸序列或编码核酸序列对应于不包括所述转基因生物在内的生物中的序列,并且一般源自非所述转基因生物的物种。

[0200] 本文使用的“异杂合抗体(heterohybrid antibody)”是指具有不同生物来源之轻链和重链的抗体。例如,具有人的重链以及小鼠的轻链的抗体是异杂合抗体。

[0201] 优选地,本文所述的抗体是经分离的。本文使用的“经分离抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性之其它抗体的抗体(例如,特异性结合GT468的经分离抗体基本上不含特异性结合非GT468之抗原的抗体)。然而,特异性结合人GT468的表位、同工型或变体的经分离抗体可与其它相关抗原(例如来自其它物种的抗原(如GT468物种同源物))具有交叉反应。此外,经分离抗体可基本上不含其它细胞材料和/或化学制剂。在本发明的一个实施方案中,“经分离”单克隆抗体的组合涉及具有不同特异性且在成熟组合物中被组合的抗体。

[0202] 根据本发明,术语“结合”优选地涉及特异性结合。“特异性结合”是指与结合其他靶标相比,试剂(如抗体)与(预定的)靶标(如抗原或表位)的结合更强。如果试剂结合第一靶标的解离常数(k_d)低于结合第二靶标的解离常数,则该试剂与第一靶标的结合较之与第二靶标的结合更强。优选地,与试剂非特异性结合之靶标的解离常数(k_d)相比,试剂特异性结合靶标的解离常数(k_d)低超过10倍,优选超过20倍,更优选超过50倍,甚至更优选超过100倍、200倍、500倍或1000倍。通常,抗体以相当于约 1×10^{-7} M或更低之 K_d 的亲合力结合,其与预先确定之抗原的结合亲合力比与非特异性抗原(并非预先确定的抗原或极其相关的抗原,例如BSA、酪蛋白)的结合亲合力对应的 K_d 至少低两个数量级。

[0203] 本文使用的术语“KD”(M)意指特定的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0204] 本文使用的“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体种类(例如,IgM或IgG1)。

[0205] 本文使用的“类型转换”是指抗体的种类或同种型从一种Ig类别变为另一种Ig类别的现象。

[0206] 本文使用的适用于某对象的术语“天然存在”是指可以在自然界中发现该对象。例如,可以从自然来源分离并且尚未在实验室中被人为有意修饰的生物(包括病毒)中存在的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0207] 本文使用的术语“重排”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型,其中在编码基本完整的VII或VL结构域的构象中,V部分分别位于紧邻D-J或J部分处。可通过与生殖系DNA比较来鉴定重排免疫球蛋白(抗体)的基因座;重排基因座将具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源性元件。

[0208] 本文使用的与V部分有关的术语“未重排的”或“生殖系构型”是指V部分未发生重组从而紧邻D或J部分的构型。

[0209] 本文使用的术语“核酸分子”旨在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链的或双链的,但优选双链DNA。

[0210] 优选地,本发明所述的核酸已被分离。根据本发明,术语“经分离核酸”是指该核酸:(i)被体外扩增,例如通过聚合酶链式反应(PCR)来实现,(ii)通过克隆被重组产生,(iii)被纯化,例如通过切割和凝胶电泳分离来实现,或者(iv)被合成,例如通过化学合成来实现。经分离核酸是可用于进行重组DNA技术操作的核酸。

[0211] 根据本发明,核酸可以单独存在或与另一些核酸(其可以是同源的或异源的)组合存在。在一些优选的实施方案中,核酸与表达调控序列功能性连接,所述表达调控序列可以与所述核酸是同源的或异源的,其中术语“同源的”是指核酸在自然条件下也与该表达调控序列功能性连接,而“异源的”是指核酸在自然条件下不与该表达调控序列功能性连接。

[0212] 核酸(如表达RNA和/或蛋白质或肽的核酸)与表达调控序列彼此是“功能性”连接的,如果它们以如下方式彼此共价连接的话:所述核酸的表达或转录受所述表达调控序列的调控或影响。如果核酸(其含有与编码序列功能性连接的表达调控序列)将被翻译成有功能的蛋白质,诱导所述表达调控序列会导致所述核酸的转录,而不会造成编码序列的移码或者所述编码序列不能被翻译成预期的蛋白质或肽。

[0213] 根据本发明,术语“表达调控序列”包括启动子、核糖体结合位点、增强子以及调节基因转录或mRNA翻译的其它调控元件。在本发明一些特别的实施方案中,所述表达调控序列可以被调节。表达调控序列的确切结构可因物种或细胞类型的功能而不同,但一般包含分别参与起始转录和翻译的5'-非转录序列以及5'-和3'-非翻译序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。更特别地,5'-非转录表达调控序列包含启动子区域,其包含用于转录调控功能性连接之核酸的启动子序列。表达调控序列还可包括增强子序列或上游激活序列。

[0214] 根据本发明,术语“启动子”或“启动子区域”涉及如下核酸序列,其位于所表达核酸序列的上游(5')并通过为RNA聚合酶提供识别和结合位点来调控该序列的表达。所述“启动子区域”还可包含针对另一些因子的识别和结合位点,所述因子参与基因转录的调节。启动子可以调控原核基因或真核基因的转录。另外,启动子可以是“诱导型的”(其可以响应于诱导剂而起始转录)或“组成型的”(如果转录不受诱导剂调控的话)。如果不存在诱导剂,则受诱导型启动子调控的基因不表达或者仅很低程度表达。在诱导剂存在时,所述基因被开启或者说其转录水平提高。这一般由特异性转录因子的结合来介导。

[0215] 本发明优选的启动子包括SP6、T3和T7聚合酶的启动子,人U6RNA启动子、CMV启动子及其(例如CMV)人工杂合启动子(其一部分或多个部分与另外细胞蛋白质(例如人GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶))之基因启动子的一部分或多个部分融合,并且包含或不包含(一个或多个)额外内含子)。

[0216] 根据本发明,术语“表达”以其最一般的含义使用,并包括产生RNA或者产生RNA和

蛋白质/肽。其还包括核酸的部分表达。此外,可进行瞬时或稳定表达。

[0217] 在一个优选的实施方案中,根据本发明,核酸分子存在于载体中,并视情况带有调控该核酸表达的启动子。本文使用的术语“载体”以其最一般的含义使用,并包括其核酸能够使所述核酸例如被引入原核和/或真核细胞并视情况被整合进基因组中的任何中介运载体(vehicle)。这种载体优选地在细胞中复制和/或表达。载体包括质粒、噬菌粒、噬菌体或病毒基因组。本文使用的术语“质粒”一般地涉及可独立于染色体DNA进行复制的染色体外遗传物质构建体,通常是环状DNA双链体。

[0218] 作为用于表达抗体的载体,可使用抗体重链和轻链存在于不同载体中的载体类型,或者重链和轻链存在于同一载体中的载体类型。

[0219] 应当理解,本文给出的有关特异性核酸和氨基酸序列(例如所述序列表中所示的序列)的教导还涉及对所述特异性序列进行修饰,所得序列在功能上等同于所述特异性序列,例如表现出与所述特异性氨基酸序列一致或类似特性的氨基酸序列以及所编码的氨基酸序列表现出与由所述特异性核酸序列编码之氨基酸序列一致或类似特性的核酸序列。类似地应当理解,本文给出的有关特异性抗体或生产特异性抗体的杂交瘤的教导还涉及下述抗体,所述抗体的特征是氨基酸序列和/或核酸序列与特异性抗体的氨基酸序列和/或核酸序列相比被修饰,但是功能上等同的。一个重要的特性是保留了抗体与其靶标的结合或者说维持了抗体的效应物功能。优选地,当针对特异性序列进行修饰的序列取代了所述特异性序列时,所述经修饰序列保留了所述抗体与GT468的结合以及优选地如本文所述之抗体的功能(例如CDC介导的裂解或ADCC介导的裂解)。

[0220] 本领域技术人员应理解,可特别地对CDR、高变区和可变区的序列进行修饰而不丧失与GT468结合的能力。例如,CDR区域与本文指明的抗体区域一致或高度同源。“高度同源”是指,在CDR中可进行1~5处、优选1~4处(例如1~3处或1~2处)替换。此外,可对高变区和可变区进行修饰使它们显示与本文指明的抗体区域基本同源。

[0221] 应当理解,本文所述的特异性核酸还包括为了在特定宿主细胞或生物体中优化密码子使用而进行修饰的核酸。生物体之间密码子使用的差异可引起与异源基因表达有关的多种问题。通过改变原始序列的一个或多个核苷酸进行密码子优化可导致待表达所述核酸的同源或异源宿主中核酸表达的优化(特别是对翻译效率的优化)。例如,如果根据本发明使用来源于人并编码抗体恒定区和/或框架区的核酸(例如用于制备嵌合或人源化的抗体),可优选地为了优化密码子使用而修饰所述核酸,特别是如果所述核酸(其任选地与异源核酸(例如源自本文所述之其它生物的核酸)融合)将在非人生物(例如小鼠或仓鼠)的细胞中表达的话。例如,所述编码人的轻链和重链恒定区的核酸序列(如SEQ ID No:19和20分别所示的序列)可被修饰为包含一个或多个(优选地至少1、2、3、4、5、10、15、20个,以及优选地多达10、15、20、25、30、50、70或100或更多个)核苷酸替换,其导致密码子使用的优化但不引起氨基酸序列的改变。这样的核苷酸替换优选地涉及SEQ ID No:19和20中分别的核苷酸替换,其分别选自SEQ ID No:19和20的以下比对中所示的替换(其经修饰的对应物不引起所编码氨基酸序列的改变),或者涉及分别编码人的轻链和重链恒定区的另一些核酸序列中相应位置的对应替换。优选地,SEQ ID No:19和20的以下比对中分别所示的所有替换(其经修饰的对应物不引起所编码氨基酸序列的改变)分别由编码人的轻链和重链恒定区的核酸序列产生。

[0222] SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:21的比对:

```
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT 60
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCC 60

GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG 120
|||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG 120

TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC 180
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC 180

[0223] AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG 240
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG 240

AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAG 300
|||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
AAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG 300

AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG 324
|||||  |||  |||  |||  |||  |||
AGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTAG 324
```

[0224] SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:23的比对:

[0226] 此外,根据本发明,修饰本文所述的氨基酸序列(特别是人的重链恒定区的序列)用以将该序列改造成期望的同种异型(例如在高加索人群中发现的同种异型)可以是理想

的。这样的修饰优选地选自SEQ ID NO:17中的如下氨基酸替换或者位于人重链另一些恒定区中的相应位置:K93R、D235E和L237M。优选地,所有这些修饰均包含在人重链恒定区的氨基酸序列中。

[0227] 根据本发明,术语“相应位置”涉及在两种核酸或蛋白质序列的序列比对中彼此对齐的核苷酸或氨基酸残基。

[0228] 根据本发明,核酸序列、氨基酸序列或肽的变体、衍生物、修饰形式或片段优选地分别具有其来源核酸序列、氨基酸序列或肽的功能特性。此类功能特性包括与其他分子相互作用或者结合。在一个实施方案中,核酸序列、氨基酸序列或肽的变体、衍生物、修饰形式或片段在免疫学上分别等同于其来源的核酸序列、氨基酸序列或肽。

[0229] 优选地,特异性核酸序列与针对该特异性核酸序列进行修饰的核酸序列或者该特异性核酸序列的变体核酸序列之间的同一性程度为至少70%,优选地至少75%,更优选地至少80%,甚至更优选地至少90%或最优选地至少95%、96%、97%、98%或99%。对于GT468核酸变体来说,同一性程度优选地在具有至少约300个、至少约400个、至少约450个、至少约500个、至少约550个、至少约600个或至少约630个核苷酸的区域中给出。在一些优选的实施方案中,所述同一性程度针对参考核酸序列(例如序列表中所示的核酸序列)的整个长度给出。优选地,所述两个序列能够彼此杂交并形成稳定的双链体,所述杂交优选地在允许多核苷酸之间特异性杂交的条件(严格条件)下进行。严格条件描述于例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook等编著,第二版, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989或者Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel等编著, John Wiley & Sons, Inc., New York中,其是指例如在65℃、在杂交缓冲液(3.5×SSC、0.02% Ficoll、0.02% 聚乙烯吡咯烷酮、0.02% 牛血清白蛋白、2.5mM NaH₂PO₄ (pH 7)、0.5% SDS、2mM EDTA) 中杂交。SSC是0.15M氯化钠/0.15M柠檬酸钠(pH 7)。杂交后,清洗所述DNA已转移其中的膜,例如,在2×SSC中室温下,然后在0.1~0.5×SSC/0.1×SDS中68℃下。

[0230] 就本发明的目的而言,氨基酸序列的“变体”包括氨基酸插入变体、氨基酸缺失变体和/或氨基酸替换变体。

[0231] 优选地,相似性程度(优选地,特异性氨基酸序列与针对该特异性氨基酸序列进行修饰的氨基酸序列或者该特异性氨基酸序列的变体氨基酸序列之间(例如显示基本同源的氨基酸序列之间)的同一性为至少70%、优选地至少80%、甚至更优选地至少90%或最优选地至少95%、96%、97%、98%或99%。对于GT468多肽变体来说,相似性程度或同一性优选地在具有至少约100个、至少约120个、至少约140个、至少约160个、至少约180个、至少约200个、至少约210个或212个氨基酸的区域中给出。在一些优选的实施方案中,在一定程度的相似性或同一性证是整个长度范围的氨基酸序列,如序列表中的氨基酸序列。

[0232] 所有上述经修饰的序列或序列变体均在本发明的范围内。

[0233] “序列相似性”表示一致的或经保守性氨基酸替换的氨基酸的百分比。两个多肽或核酸序列之间的“序列同一性”表示两序列之间一致的氨基酸或核苷酸的百分比。

[0234] “同一性百分比”在最优比对后获得,该百分比纯粹是统计学意义上的,两序列之间的差异随机分布并覆盖其全长。常规地,两个核苷酸序列或氨基酸序列之间的序列比较在对这些序列进行最优比对后进行,所述比较通过分段或通过“比较窗(window of

comparison)”来进行,从而确定和比较局部区域的序列相似性。除了手动方式以外,可采用如下方式获得为了进行比较而对序列进行的最优比对:Smith和Waterman的局部同源性算法(Smith和Waterman,1981,Ads App.Math.2,482)、Neddleman和Wunsch的局部同源性算法(Neddleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48,443)、Pearson和Lipman的相似性搜索方法(Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl Acad.Sci.USA 85,2444)或使用这些算法(Wisconsin Genetics软件包(Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.)中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA)的计算机程序。

[0235] 同一性百分比的计算方式如下:确定所比较两序列之间一致位置的数目,将该数目除以所比较的位置数,所得结果乘以100,从而获得这两个序列之间的同一性百分比。

[0236] “保守性替换”可例如基于所涉及残基之极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两性性质的相似度来进行。例如:(a)非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸;(b)极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;(c)荷正电的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸;以及(d)荷负电的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。替换通常可在(a)-(d)组内进行。此外,甘氨酸和脯氨酸可相互替换,这基于它们破坏 α 螺旋的能力。可在以下组中进行一些优选的替换:(i)S和T;(ii)P和G;以及(iii)A、V、L和I。由于遗传密码以及重组和合成DNA的技术是已知的,本领域技术人员可容易地构建出编码所述保守氨基酸变体的DNA。

[0237] 本发明包括已在Fc区进行改变以改变抗体功能或药代动力学特性的抗体。这些改变可导致C1q结合和CDC的降低或提高或者Fc γ R结合和ADCC的降低或提高。替换可例如在重链恒定区的一个或多个氨基酸残基中进行,因而造成效应物功能的变化而保留了与经修饰抗体相当的抗原结合能力,参见US 5,624,821和US 5,648,260。

[0238] 可通过对Ig恒定结构域或Ig样恒定结构域的补救受体(salvage receptor)表位进行修饰(使该分子不包含完整的CH2结构域或完整的Ig Fc区域)来改善抗体的体内半衰期,参见US 6,121,022和US 6,194,551。还可通过在Fc区域中制造突变来提高体内半衰期,例如通过在252位用苏氨酸替换亮氨酸、通过在254位用苏氨酸替换丝氨酸或通过在256位用苏氨酸替换苯丙氨酸来实现,参见US 6,277,375。

[0239] 此外,可对抗体的糖基化模式进行修饰从而改变抗体的效应物功能。例如,可以在转染瘤中表达抗体,该转染瘤不添加通常与所述Fc区域297位之Asn结合的岩藻糖单位,从而提高了Fc区域针对Fc-受体的亲合力,继而导致在NK细胞存在下的抗体ADCC提高,参见Shield等(2002)JBC,277:26733。此外,可进行半乳糖基化修饰来改造CDC。

[0240] 作为替代地,在另一实施方案中,可以沿抗GT468抗体编码序列的全长或部分引入随机突变(例如通过饱和诱变来实现),可对所得的经修饰抗GT468抗体进行结合活性筛选。

[0241] 本文使用的术语“重组的宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意指引入重组表达载体的细胞。应当理解,该术语不仅是指特定对象的细胞,还指这些细胞的子代。由于突变或环境影响所致后代中可出现某些修饰,因此这些子代可事实上有别于亲代细胞,但仍包括在本文使用的术语“宿主细胞”的范围内。重组的宿主细胞包括例如转染瘤(如CHO细胞、NS/O细胞和淋巴细胞)。

[0242] 本文使用的“对象”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,

例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人类的灵长类、绵羊、狗、牛、鸡、两栖类、爬行类等。

[0243] 术语“转基因动物”是指具有包含一种或多种转基因(优选重链和/或轻链转基因)或转染色体(整合或不整合进动物的天然基因组DNA中)之基因组并且优选能够表达该转基因的动物。例如,转基因小鼠可具有人的轻链转基因以及人的重链转基因或人的重链转染色体,从而当用GT468抗原和/或表达GT468的细胞免疫时,小鼠产生人抗GT468抗体。可将人的重链转基因整合进小鼠的染色体DNA中,正如转基因小鼠例如HuMAb小鼠(如HCo7或HCo12小鼠)中的情形,或者可将人的重链转基因维持在染色体外,正如WO 02/43478中所述的转染色体(例如,KM)小鼠中的情形。这样的转基因小鼠和转染色体小鼠可通过进行V-D-J重组和类型转换而能够产生多种针对GT468的人单克隆抗体同种型(例如,IgG、IgA和/或IgE)。

[0244] 本文使用的“减少”或“抑制”意指导致总体降低的能力,其降低水平(例如细胞增殖水平)为优选5%以上、10%以上、20%以上,更优选50%以上,最优选75%以上。

[0245] 短语“抑制细胞活性”或类似的短语包括细胞活性的完全或基本完全的抑制和细胞活性的降低。优选地,所述细胞活性的抑制降低肿瘤细胞生长和/或诱导肿瘤细胞死亡,并且因此具有肿瘤抑制效应或肿瘤破坏效应。mAb的作用机制

[0246] 尽管下文提供了有关本发明抗体治疗效果之机制的考虑,但不应视为以任何方式限制本发明。

[0247] 本文所述的抗体可与免疫系统的组分相互作用,优选地通过ADCC或CDC来实现。本发明的抗体还可用于指向有效负载(例如,放射性同位素、药物或毒素)以直接杀死肿瘤细胞,或者可与常规化疗药剂协同使用,通过互补的作用机制来攻击肿瘤,所述作用机制可包括抗肿瘤免疫反应,该反应可能因对T淋巴细胞具有化疗毒副作用而受到影响。然而,本发明的抗体还可以仅通过与细胞表面上的GT468结合并因此例如阻断细胞增殖而起效。

[0248] 抗体依赖性细胞毒作用

[0249] ADCC描述了本文所述效应细胞(特别是淋巴细胞)的细胞杀伤能力,其优选地需要靶细胞被抗体所标记。

[0250] ADCC优选地发生在抗体与肿瘤细胞上的抗原结合以及抗体Fc结构域与免疫效应细胞表面上的Fc受体(FcR)结合时。已鉴定了Fc受体的几个家族,特定细胞群特征性表达所述Fc受体。可将ADCC看作是直接诱导迅速产生的不同程度肿瘤破坏(其导致抗原呈递以及诱导针对肿瘤的T细胞应答)的机制。优选地,体内诱导ADCC将导致针对肿瘤的T细胞应答和源自宿主的抗体应答。

[0251] 补体依赖性细胞毒作用

[0252] CDC是可由抗体介导的另一种细胞杀死方法。IgM是针对补体活化最有效的同种型。IgG1和IgG3对于经由经典补体活化途径来介导CDC也都非常有效。优选地,在该级联反应中,抗原-抗体复合物的形成导致与参与反应之抗体分子(如IgG分子)的C_H2结构域非常接近的多个C1q(C1q是补体C1的三个亚组分之一)结合位点暴露出来。优选地,这些暴露出来的C1q结合位点将先前低亲合力的C1q-IgG相互作用转换为高亲合力的相互作用,继而引发涉及一系列其它补体蛋白并导致蛋白质水解释放效应细胞的趋化/活化剂C3a和C5a的级联事件。优选地,补体级联反应终止于膜攻击复合物的形成(其在细胞膜中形成小孔,从而促使水和溶质自由进出细胞)。

[0253] 抗体产生

[0254] 本发明的抗体可利用多种技术来产生,包括常规的单克隆抗体方法,例如Kohler和Milstein,Nature 256:495 (1975)的标准体细胞杂交技术。尽管体细胞杂交方法是优选的,但是原则上也可应用产生单克隆抗体的其它技术,例如病毒转化或致癌转化B淋巴细胞或者使用抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0255] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的优选动物系统是小鼠系统。利用小鼠生产杂交瘤是非常成熟的方法。免疫操作方法以及分离用于融合的经免疫脾细胞的技术是本领域已知的。融合伴侣(例如,小鼠骨髓瘤细胞)和融合操作方法也是已知的。

[0256] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的其它优选动物系统包括大鼠和兔系统(例如Spieker-Polet等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92:9348 (1995)中有所描述,还参见Rossi等,Am.J.Clin.Pathol.124:295 (2005))。

[0257] 在另一优选的实施方案中,可使用携带部分人体免疫系统(而非小鼠系统)的转基因或转染色体小鼠来产生针对GT468的人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,下文中统称为“转基因小鼠”。在此类转基因小鼠中产生人的抗体可根据W02004035607中有关CD20的详细描述来进行。

[0258] 另一种产生单克隆抗体的策略是直接从根据已有策略产生抗体的淋巴细胞分离基因编码的抗体,例如参见Babcock等,1996,A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single,isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy.有关重组抗体工程的详细信息请参见Welschhof和Kraus,Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8以及Benny K.C.Lo Antibody Engineering ISBN1-58829-092-1。

[0259] 免疫

[0260] 为了产生针对GT468的抗体,可使用源自GT468序列的与载体缀合的肽、重组表达GT468抗原或其片段的富集制备物和/或表达GT468的细胞来免疫小鼠,如上所述。或者,可用编码人全长GT468的DNA(如SEQ ID NO:1)或其片段(特别是编码SEQ ID NO:3-10和35-82的那些)来免疫小鼠。如果在使用GT468抗原的纯化或富集制备物进行免疫时不产生抗体,则还可使用表达GT468的细胞(例如细胞系)来免疫小鼠以促进免疫应答。

[0261] 可使用通过尾静脉或眼球后取血得到的血浆和血清样品来监测免疫全过程中的免疫应答。可使用拥有足量效价之抗GT468免疫球蛋白的小鼠进行融合。可以在处死小鼠以及取出脾的3天前使用表达GT468的细胞对小鼠进行腹膜内或静脉内加强免疫,以提高分泌特异性抗体之杂交瘤的产率。

[0262] 产生单克隆抗体之杂交瘤的获得

[0263] 为了获得产生针对GT468之单克隆抗体的杂交瘤,可以从经免疫小鼠分离出脾细胞和淋巴结细胞并使其与适当的永生化细胞系(如小鼠骨髓瘤细胞系)进行融合。随后,可对所得杂交瘤进行产生抗原特异性抗体的筛选。然后,可利用ELISA对各孔中分泌抗体之杂交瘤进行筛选。使用表达GT468的细胞,利用免疫荧光和FACS(流式细胞术)可鉴定出特异性针对GT468的抗体。可以将分泌抗体的杂交瘤再次铺板及筛选,仍然呈抗GT468阳性的单克隆抗体可以通过有限稀释进行亚克隆。然后,可在体外培养稳定的亚克隆,以在组织培养基中获得抗体用于表征。

[0264] 产生单克隆抗体之转染瘤的获得

[0265] 使用例如本领域熟知的一系列重组DNA技术和基因转染的方法 (Morrison, S. (1985) Science 229:1202), 本发明的抗体也可以在宿主细胞转染瘤中产生。

[0266] 例如, 在一个实施方案中, 可以将目的基因 (例如抗体基因) 连接到表达载体 (例如GS基因表达系统 (WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338 841中有所公开) 或本领域熟知的其它表达系统中使用的真核表达质粒) 中。可以将带有经克隆抗体基因的纯化质粒引入真核宿主细胞 (如CHO细胞、NS/O细胞、HEK293T细胞或HEK293细胞, 或者作为替代地其它真核细胞如植物来源之细胞、真菌或酵母细胞)。用于引入这些基因的方法可以是本领域中已知的方法例如电穿孔、lipofectine (脂质体)、lipofectamine (脂质体) 等。在将这些抗体基因引入宿主细胞后, 可鉴定并选择表达抗体的细胞。这些细胞代表了随后可因其表达水平和扩大产生抗体而进行扩增的转染瘤。可以从这些培养物上清液和/或细胞分离和纯化重组抗体。

[0267] 或者, 经克隆抗体基因可表达在其它表达系统中, 包括原核细胞例如微生物 (如大肠杆菌)。此外, 所述抗体可以在转基因非人动物中产生 (例如在羊和兔的乳汁中或母鸡的卵中) 或者在转基因植物中产生; 参见例如Verma, R. 等 (1998) J. Immunol. Meth. 216:165-181; Pollock等 (1999) J. Immunol. Meth. 231:147-157; 以及Fischer, R. 等 (1999) Biol. Chem. 380:825-839。

[0268] 使用部分抗体序列来表达完整抗体 (即人源化和嵌合化)

[0269] a) 嵌合化

[0270] 小鼠单克隆抗体被毒素或放射性同位素标记时可用作人的治疗性抗体。未经标记的小鼠抗体重复使用时对人体具有高度免疫原性, 导致治疗效果降低。主要的免疫原性是由重链恒定区所介导的。如果对各抗体进行嵌合化或人源化, 则可以减少或完全避免小鼠抗体的免疫原性。嵌合抗体是其不同部分来自不同动物物种的抗体, 例如具有小鼠抗体可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。抗体嵌合化通过将小鼠抗体重链及轻链的可变区与人的重链及轻链的恒定区结合来实现 (例如, 如Kraus等, Methods in Molecular Biology系列中的Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8中所述)。在一个优选的实施方案中, 通过将人的 κ 轻链恒定区与小鼠轻链可变区结合而得到嵌合抗体。在另一个优选的实施方案中, 通过将人的 λ 轻链恒定区与小鼠轻链可变区结合而得到嵌合抗体。用于产生嵌合抗体的优选重链恒定区为IgG1、IgG3和IgG4。用于产生嵌合抗体的其它优选重链恒定区抗体为IgG2、IgA、IgD和IgM。

[0271] b) 人源化

[0272] 抗体与靶抗原相互作用主要是通过位于重链和轻链六个互补决定区 (CDR) 的氨基酸残基来实现的。因此, 与CDR外部的序列相比, CDR中的氨基酸序列在各种抗体之间差异更大。由于CDR序列负责形成大多数抗体-抗原相互作用, 因此表达模拟天然特异性抗体性质的重组抗体是可能的, 其通过构建包含来自天然特异性抗体之CDR序列以及与其“嫁接”的来自具有不同性质之不同抗体的框架序列的表达载体来实现 (例如, 参见Riechmann, L. 等 (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. 等 (1986) Nature 321:522-525; 以及Queen, C. 等 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033)。这样的框架序列可从包含生殖系抗体基因序列的公共DNA数据库获得。这些生殖系序列不同于成熟抗体基因序列, 这是因为它们不包含完整组装的可变基因 (其是由B细胞成熟期间的V(D)J连接形成的)。生殖系基因序

列还在整个可变区与高亲合力第二抗体库(secondary repertoire antibody)的序列不同。例如,在框架区1的氨基端部分和框架区4的羧基末端部分中,体细胞突变的频率相对较低。此外,许多体细胞突变并不显著改变抗体的结合能力。因此,为了重建与原始抗体具有类似结合性质的完整重组抗体,并不需要获得特定抗体的整个DNA序列(参见WO 99/45962)。覆盖CDR区域的部分重链和轻链序列通常足以实现这一目的。使用所述部分序列来确定哪些生殖系可变基因和连接基因片段负责形成重组抗体可变基因。然后,用生殖系序列来填补可变区的缺失部分。重链和轻链的前导序列在蛋白质成熟过程中被切割,因而与最终抗体的性质无关。为了添加缺失序列,可通过连接或PCR扩增将克隆的cDNA序列与合成的寡核苷酸结合。或者,可以将整个可变区合成为一组短的、重叠的寡核苷酸,并通过PCR扩增进行结合以产生完全合成的可变区克隆。这个方法具有某些优势,例如去除或加入特定的限制性酶切位点或者优化特定的密码子。

[0273] 使用来自杂交瘤的重链和轻链转录物之核苷酸序列来设计一组重叠的合成寡核苷酸,以产生氨基酸编码能力与天然序列相同的合成V序列。合成的重链和 κ 链序列与天然序列可在三个方面有所不同:插入重复核酸碱基串以有利于寡核苷酸合成以及PCR扩增;根据Kozak规则并入最优翻译起始位点(Kozak,1991,J.Biol.Chem.266:19867-19870);以及对翻译起始站点上游的HindIII位点进行改造。

[0274] 对于重链和轻链可变区来说,经优化的编码及相应的非编码链序列大致在所述相应非编码寡核苷酸中点处被分成30~50个核苷酸。因此,对每条链来说,寡核苷酸可组装成150~400个核苷酸片段的重叠、双链集合。然后,将该集合用作产生150~400个核苷酸PCR扩增产物的模板。通常,单个可变区寡核苷酸集合会被分为两组,这两组分别进行扩增以产生两种重叠的PCR产物。然后,利用PCR扩增将这些重叠的产物结合以形成完整的可变区。在PCR扩增中包含重链或轻链恒定区的重叠片段以产生可容易地克隆进表达载体构建体中的片段也是可取的。

[0275] 随后,将重建的嵌合或人源化重链和轻链可变区与克隆的启动子序列、前导序列、翻译起始序列、恒定区序列、3'非翻译序列、多腺苷酸化序列和转录终止序列结合以形成表达载体构建体。可以将所述重链和轻链表达构建体结合进单一载体,利用共同转染、依序转染或单独转染的方式转染进宿主细胞,然后对该宿主细胞进行融合以形成表达这两种链的宿主细胞。本文描述了用于构建针对人IgG κ 之表达载体的质粒。可以构建所述质粒以使PCR扩增的V重链和V κ 轻链cDNA序列可用于重建完整的重链和轻链微基因(minigene)。这些质粒可用于表达完整的人的或嵌合的IgG1, κ 或IgG4, κ 抗体。可构建类似的质粒用于表达其它重链同种型或者表达包含 λ 轻链的抗体。

[0276] 因此,在本发明的另一方面,使用本发明抗GT468抗体的结构特征来产生结构相关的保留了至少本发明抗体之功能特性(如与GT468结合)的人源化抗GT468抗体。更具体地,可将小鼠单克隆抗体的一个或多个CDR区域与已知的人框架区和CDR重组结合,以产生本发明另外的重组改造的、人源化的抗GT468抗体。

[0277] 与抗原表达细胞结合

[0278] 可使用标准结合测定来确定抗体结合GT468的能力,例如实施例中所列出的测定(例如,ELISA、Western印迹、免疫荧光和流式细胞分析)。抗体的分离和表征

[0279] 为了纯化抗GT468抗体,可将选定的杂交瘤培养在用于纯化单克隆抗体的两升转

瓶中。或者,抗GT468抗体可以在基于透析的生物反应器中产生。在用蛋白G琼脂糖凝胶或蛋白A琼脂糖凝胶进行亲和层析前,可对上清液进行过滤,必要时进行浓缩。经洗脱的IgG可以通过凝胶电泳和高效液相色谱法进行检测以确保纯度。可将缓冲溶液更换成PBS,其浓度可通过使用消光系数1.43在OD280下测定。可将所述单克隆抗体进行分装并储存于-80℃。

[0280] 为了确定所选抗GT468单克隆抗体是否结合唯一的表位,可使用定点或多点突变。

[0281] 同种型测定

[0282] 为了测定纯化抗体的同种型,可使用多种市售试剂盒(例如Zymed, Roche Diagnostics)进行同种型ELISA。可使用抗小鼠Ig来包被微量滴定板的孔。封闭后,在室温下将该板与单克隆抗体或纯化的同种型对照一起反应2小时。然后,可将孔与小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG3、IgA或小鼠IgM特异性的、缀合有过氧化物酶的探针一起反应。清洗后,可用ABTS底物(1mg/ml)使该板显影,并在OD 405~650下进行分析。或者,可根据生产商的说明使用IsoStrip小鼠单克隆抗体分型试剂盒(Roche,货号1493027)。

[0283] 流式细胞术分析

[0284] 为了测定经免疫小鼠的血清中存在抗GT468抗体或者单克隆抗体与表达GT468之活细胞的结合,可以使用流式细胞术。可以将天然表达GT468或转染后表达GT468的细胞系以及缺乏GT468表达的阴性对照(在标准培养条件下培养)与杂交瘤上清液或含有1%FBS的PBS中的不同浓度单克隆抗体混合,可在4℃孵育30分钟。清洗后,可以在与第一抗体染色同样的条件下将经APC或Alexa647标记的抗IgG抗体与结合GT468的单克隆抗体结合。可使用流式细胞仪对这些样品进行流式细胞分析,其使用光和侧向散射性质来对单个活细胞设门。为了在单次测量中将GT468特异性单克隆抗体与非特异性结合物区分,可使用共转染方法。可以如上所述对瞬时转染编码GT468和荧光标记之质粒的细胞进行染色。可以在不同于抗体染色细胞的荧光通道中检测经转染细胞。由于大多数转染细胞都表达所述两种基因,因此GT468特异性单克隆抗体优先结合表达荧光标记的细胞,而非特异性抗体则以相当的比例与未转染细胞结合。另一种使用荧光显微镜的测定可用作流式细胞术测定的补充或替代。可如上所述对细胞进行染色并利用荧光显微镜进行分析。

[0285] 免疫荧光显微镜

[0286] 为了测定经免疫小鼠的血清中存在抗GT468抗体或者单克隆抗体与表达GT468之活细胞的结合,可以使用免疫荧光显微镜分析。例如,在添加了10%胎牛血清(FCS)、2mM L-谷氨酰胺、100IU/ml青霉素和100μg/ml链霉素的DMEM/F12培养基中的标准培养条件下,将自发表达GT468或转染后表达GT468的细胞系以及缺乏GT468表达的阴性对照培养在腔室玻片上。然后,细胞用甲醇或甲醛固定或不做处理。随后,可将细胞与针对GT468的单克隆抗体在25℃反应30分钟。清洗后,可在同样的条件下将细胞与经Alexa555标记的抗小鼠IgG第二抗体(Molecular Probes)反应。然后通过荧光显微镜对细胞进行分析。

[0287] 可对经甲醇固定或甲醛固定并经Triton X-100透化的细胞中GT468总水平进行观察。可研究活细胞以及未经透化、甲醛固定的细胞中GT468的细胞表面定位。此外,可通过与紧密连接标记(如ZO-1)共同染色来分析靶向GT468的紧密连接程度。此外,可以对抗体结合效果以及GT468在细胞膜中的定位进行研究。

[0288] Western印迹

[0289] 还可通过Western印迹来测试抗GT468 IgG与GT468抗原的反应。简言之,可制备来

自表达GT468之细胞的细胞提取物和适当的阴性对照,并进行十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜、封闭并用待测试的单克隆抗体进行检测。可使用抗小鼠IgG过氧化物酶来检测IgG结合并用ECL底物来显影。

[0290] 免疫组化

[0291] 还可利用免疫组化来测试抗GT468的小鼠IgG与GT468抗原的反应,其采用本领域技术人员熟知的方式,例如使用经甲醛或丙酮固定的冰冻切片或经甲醛固定的石蜡包埋组织切片,所述切片均来自从例行外科手术期间的患者或者携带异种移植肿瘤的小鼠(其接种了自发表达GT468的细胞系或者在转染GT468后)而得到的非癌组织或癌组织样品。对于免疫染色而言,可将与GT468反应的抗体一起孵育,随后可根据供应商的说明与缀合有辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠或山羊抗兔抗体(DAKO)一起孵育。

[0292] 抗体的体外吞噬和细胞杀伤活性

[0293] 除了与GT468特异性结合,可测试抗GT468抗体介导吞噬和杀死表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的能力。在测试体内模型前,单克隆抗体活性的体外测试将提供初步的筛选。

[0294] 抗体依赖性细胞毒作用(ADCC):

[0295] 简言之,可通过Ficoll Hypaque密度离心来纯化来自健康捐赠者的多形核细胞(PMN)、NK细胞、单核细胞、单个核细胞或其它效应细胞,随后裂解红细胞污染物。清洗过的效应细胞可以在添加了10%热灭活胎牛血清的RPMI或作为替代地添加了5%热灭活人血清的RPMI中悬浮,并与经⁵¹Cr标记的表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的靶细胞混合(以不同的效应细胞对靶细胞的比例)。或者,可以用荧光增强配体(BATDA)对靶细胞进行标记。可利用荧光计来测量从死细胞释放出的带有增强配体的高强度荧光钨螯合物。另一种替代技术可使用萤光素酶转染进靶细胞。所加入的萤光黄可随后被活细胞氧化。然后可加入不同浓度的经纯化抗GT468IgG。使用不相关的人IgG作为阴性对照。根据所使用的效应细胞类型,测定可在37℃进行4~20小时。可以通过测量培养物上清液中的⁵¹Cr释放或EuTDA螯合物的存在来测定样品的细胞裂解。或者,可通过萤光黄氧化所导致的发光来测量活细胞。

[0296] 还可测试不同组合的抗GT468单克隆抗体,从而确定多种单克隆抗体是否增强细胞裂解。

[0297] 补体依赖性细胞毒作用(CDC):

[0298] 使用多种已知的技术,可测试抗GT468单克隆抗体介导CDC的能力。例如,可采用本领域技术人员已知的方式从血液中获得含补体的血清。可使用不同的方法来测定mAb的CDC活性。使用碘化丙锭(PI)排除测定(propidium iodide exclusion assay)可例如测量⁵¹Cr释放或者可评估膜通透性。简言之,可清洗靶细胞,并且可将 5×10^5 /ml靶细胞与不同浓度的mAb在室温下或在37℃孵育10~30分钟。然后,可加入血清或血浆至终浓度为20%(体积/体积),并37℃下孵育细胞20~30分钟。可将每种样品的所有细胞加至FACS管中的PI溶液中。然后可使用FACSArray对该混合物立即进行流式细胞分析。

[0299] 在另一可替代的测定中,可利用贴壁细胞来测定CDC的诱导。在该测定的一个实施方案中,在测定24小时前接种细胞,其密度为组织培养平底微量滴定板每孔 3×10^4 个细胞。次日,移除培养基,将细胞一式三份与抗体一起孵育。将对照细胞分别与生长培养基或含

0.2%皂甙的生长培养基一起孵育用以分别测定裂解背景和最大裂解。在室温下孵育20分钟后,移除上清液并向细胞中加入含20% (体积/体积) 人血浆或血清的DMEM (37℃预热),再于37℃孵育20分钟。将每种样品的所有细胞加入碘化丙锭溶液 (10μg/ml)。然后,用含2.5μg/ml溴化乙锭的PBS替换上清液,并使用Tecan Safire在600nm测量520nm处激发的荧光。特异性裂解的百分比如下计算: %特异性裂解 = (荧光样品-荧光背景) / (荧光最大裂解-荧光背景) × 100。

[0300] 利用单克隆抗体抑制细胞增殖:

[0301] 为了测试启动凋亡的能力,可以将抗GT468单克隆抗体例如与GT468阳性肿瘤细胞或经GT468转染之肿瘤细胞在37℃一起孵育约20小时。可收获这些细胞,用Annexin-V (膜联蛋白) 结合缓冲液 (BD biosciences) 清洗,并与缀合有FITC或APC (BD biosciences) 的Annexin V一起避光孵育15分钟。可将每种样品的所有细胞加入FACS管中的PI溶液 (PBS中10μg/ml) 中,并立即通过流式细胞术进行评估 (如上所述)。或者,可以用市售试剂盒检测单克隆抗体对细胞增殖的一般性抑制。DELTA细胞增殖试剂盒 (Perkin-Elmer, 货号AD0200) 是一种非同位素型免疫测定,其基于对微量滴定板中增殖细胞DNA合成时掺入的5-溴-2'-脱氧尿嘧啶 (BrdU) 的测量来实现。使用铈标记的单克隆抗体来检测掺入的BrdU。为了能够检测抗体,使用Fix溶液将细胞固定并使DNA变性。未结合的抗体被冲掉,加入DELTA诱导剂使铈离子从经标记抗体解离到溶液中,铈离子在溶液中与DELTA诱导剂的组分形成高强度荧光螯合物。所测量的荧光 (在检测中应用时间分辨荧光分析 (time-resolved fluorometry)) 与每孔细胞的DNA合成比例。

[0302] 临床前研究

[0303] 还可以使用与GT468结合的单克隆抗体在体内模型中测试 (例如,在接种了表达GT468之细胞系的携带异种移植肿瘤的免疫缺陷小鼠中,可能在转染后),以测定它们在控制表达GT468之肿瘤细胞生长中的功效。

[0304] 可在将表达GT468的肿瘤细胞异种移植进免疫功能低下的小鼠或其它动物中后使用本发明的抗体进行体内研究。可以将抗体施用给无肿瘤小鼠然后再注射肿瘤细胞,以测量该抗体对防止形成肿瘤或肿瘤相关症状的效果。可以将抗体施用给荷瘤小鼠以测定各抗体对减少肿瘤生长、转移或肿瘤相关症状的疗效。可以将抗体与其它物质 (如细胞增殖抑制药 (cystostatic drug)、生长因子抑制剂、细胞周期阻断剂、血管发生抑制剂或其它抗体) 联用,以确定组合的协同效果和潜在毒性。为了分析本发明抗体所介导的毒副作用,可用抗体或对照试剂接种动物并对可能与GT468抗体治疗有关的症状进行全程研究。体内应用GT468抗体的可能副作用尤其包括表达GT468的组织 (包括胎盘) 中的毒性。在人和其它物种 (如小鼠) 中识别GT468的抗体对于预测向人施用抗GT468单克隆抗体所介导的潜在副作用尤其有用。

[0305] 表位作图

[0306] 对本发明抗体所识别的表位作图可按照“Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology)” by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9以及“Epitope Mapping: A Practical Approach” Practical Approach Series, 248 by Olwyn M.R. Westwood, Frank C. Hay中的详细说明来进行。

[0307] I. 与GT468结合的双特异/多特异性分子

[0308] 在本发明的另一个实施方案中,抗GT468抗体可以衍生成或连接至另一功能性分子(例如另一肽或蛋白质(例如,Fab' 片段))以产生与多个结合位点或靶表位结合的双特异性或多特异性分子。例如,本发明的抗体可以与一个或多个其它结合分子(如另一抗体、肽或结合类似物)功能性连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价相互作用等来实现)。

[0309] 因此,本发明包括双特异性和多特异性分子,其包含至少一种针对GT468的第一结合特异性和针对第二靶表位的第二结合特异性。在本发明的一个具体实施方案中,所述第二靶位表位是Fc受体(例如人的Fc- γ RI (CD64) 或人的Fc- α 受体 (CD89)) 或T细胞受体(例如CD3)。因此,本发明包括能够结合表达Fc- γ R、Fc- α R或Fc- ϵ R的效应细胞(例如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞(PMN)) 以及表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的双特异性和多特异性分子。这些双特异性和多特异性分子可将表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞靶向至效应细胞,并可引发Fc受体介导的效应细胞活性(如吞噬表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞、抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)、细胞因子释放或产生超氧阴离子)。

[0310] 除了抗Fc结合特异性和抗GT468结合特异性以外,本发明的双特异性和多特异性分子还包含第三结合特异性。在一个实施方案中,所述第三结合特异性是抗增强因子(enhancement factor,EF) 部分,例如与参与细胞毒性的表面蛋白结合从而增强了针对靶细胞的免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以是抗体、功能性抗体片段或与给定分子(例如抗原或受体)结合的配体,从而提高结合Fc受体或靶细胞抗原的效果。“抗增强因子部分”可结合Fc受体或靶细胞抗原。或者,所述抗增强因子部分可以结合与第一和第二结合特异性所结合之实体不同的实体。例如,抗增强因子部分可以结合细胞毒性T细胞(例如,经由CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1或其它免疫细胞,从而增强针对靶细胞的免疫应答)。

[0311] 在一个实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子包含至少一种抗体的结合特异性部分,包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或单链Fv。所述抗体也可以是轻链或重链二聚体或其任意最小的片段(如Ladner等在US4,946,778中所述的Fv或单链构建体。所述抗体也可以是如US 2003/0118592和US 2003/0133939中所述的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白)。

[0312] 在一个实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子包含针对效应细胞表面上存在的Fc- γ R或Fc- α R的结合特异性,以及针对靶细胞抗原(例如GT468)的第二结合特异性。

[0313] 在一个实施方案中,针对Fc受体的结合特异性由单克隆抗体提供,其结合不被人免疫球蛋白G(IgG)阻断。本文使用的术语“IgG受体”是指位于1号染色体上的8个 γ 链基因。这些基因编码总共12种跨膜或可溶性受体同工型,并被分成三类Fc- γ 受体:Fc- γ RI (CD64)、Fc- γ RII (CD32) 和Fc- γ RIII (CD16)。在一个优选的实施方案中,Fc- γ 受体是人的高亲合力Fc- γ RI。

[0314] 产生和表征这些优选的单克隆抗体由Fanger等在WO 88/00052以及US 4,954,617中描述。这些抗体与Fc- γ RI、Fc- γ RII或Fc- γ RIII之表位的结合位点与Fc γ 的受体结合位点不同,因此它们的结合基本上不被生理水平的IgG所阻断。本发明中可用的特异性的抗Fc- γ RI抗体包括mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62和mAb 197。在另一些实施方案中,抗Fc γ 受体抗体是人源化形式的单克隆抗体22(H22)。H22抗体的产生与表征描述于Graziano, R.F.等(1995) J. Immunol. 155 (10):4996-5002以及WO 94/10332中。产生H22抗体的细胞系

在1992年11月4日保藏于美国典型培养物保藏中心,其名称为HA022CL1,登记号为CRL 11177。

[0315] 在另一些优选的实施方案中,针对Fc受体的结合特异性由与人IgA受体例如Fc- α 受体(Fc- α RI (CD89))结合的抗体提供,其结合优选地不被人免疫球蛋白A(IgA抗体)所阻断。术语“IgA受体”旨在包括位于19号染色体上的 α -基因的基因产物(Fc- α RI)。已知该基因编码几种替代性剪接跨膜同工型(55~110kDa)。Fc- α RI (CD89)在单核细胞/巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞上组成型表达,但不在非效应细胞群上表达。Fc- α RI对IgA1和IgA2均具有中等亲合力,在暴露于细胞因子(如G-CSF或GM-CSF)后该亲合力增强(Morton, H.C等(1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440)。已描述了鉴定为A3、A59、A62和A77的四种Fc- α RI特异性单克隆抗体(其在IgA配体结合结构域外部与Fc- α RI结合)(Monteiro, R.C等(1992) *J. Immunol.* 148:1764)。

[0316] Fc- α RI和Fc- γ RI是用于本发明中的优选诱发受体,这是因为它们(1)主要表达在免疫效应细胞(例如,单核细胞、PMN、巨噬细胞和树突细胞)上;(2)表达水平高(例如,每个细胞上有5,000~100,000个);(3)介导细胞毒性(例如ADCC、吞噬作用);(4)介导增强的抗原(包括自身抗原)靶向于其的抗原呈递。

[0317] 在另一个实施方案中,所述双特异性分子由根据本发明具有互补功能活性的两个单克隆抗体组成,例如一个抗体主要行使诱导CDC,而另一抗体则主要行使诱导细胞凋亡。

[0318] 本文使用的“效应细胞特异性抗体”是指与效应细胞的Fc受体结合的抗体或功能性抗体片段。本发明中使用的优选抗体与效应细胞之Fc受体结合的位点不与内源性免疫球蛋白结合。

[0319] 本文中使用的术语“效应细胞”是指参与免疫应答效应阶段(而非免疫应答的识别和活化阶段)的免疫细胞。免疫细胞的实例包括髓系或淋巴来源的细胞,例如淋巴细胞(例如,包括细胞毒性T细胞(CTL)、杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、多形核细胞、粒性白细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞的B细胞和T细胞)。一些效应细胞表达特异性的Fc受体并具有特异性免疫功能。在一些优选的实施方案中,效应细胞能够诱导抗体依赖性细胞毒作用(ADCC),例如中性粒细胞能诱导ADCC。例如,表达FcR的单核细胞、巨噬细胞参与特异性杀死靶细胞以及将抗原呈递给免疫系统的其它组分,或者与展示抗原的细胞结合。在另一些实施方案中,效应细胞可吞噬靶抗原、靶细胞或微生物。效应细胞上特定FcR的表达受到体液因素(如细胞因子)的调节。例如,已发现Fc- γ RI的表达被干扰素 γ (IFN- γ)上调。这种增强的表达提高了具有Fc- γ RI之细胞针对靶标的细胞毒性。效应细胞可以吞噬或裂解靶抗原或靶细胞。

[0320] “靶细胞”应当指对象(例如,人或动物)中被本发明抗体所靶向的任何不良细胞。在一些优选的实施方案中,靶细胞是表达或过表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞。表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞通常包括肿瘤细胞。

[0321] 可使用化学技术(参见,例如D.M.Kranz等(1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5807)、“polydome”技术(参见US 4,474,893)或重组DNA技术来制备本发明的双特异性和多特异性分子。

[0322] 特别地,使用本领域已知的方法,可通过结合组成型特异性(例如,抗FcR和抗

GT468的结合特异性)来制备本发明的双特异性和多特异性分子。例如,可分别产生所述双特异性和多特异性分子的每种结合特异性,然后彼此结合。当结合特异性是蛋白质或肽时,可使用多种偶联剂或交联剂用于共价结合。交联剂的实例包括A蛋白、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺-S-乙酰-硫代乙酯(SATA)、5,5'-二硫代二(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻苯撑双马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺酸琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷基-1-羧酸酯(sulfo-SMCC)(参见例如Karpovsky等(1984) J.Exp.Med.160:1686;Liu,MA等(1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648)。其它方法包括描述于Paulus(Behring Ins.Mitt.(1985) No.78,118-132);Brennan等(Science (1985) 229:81-83)以及Glennie等(J.Immunol.(1987) 139:2367-2375)中的方法。优选的结合试剂包括SATA和sulfo-SMCC,这两种均可从Pierce Chemical Co.(Rockford,IL)获得。

[0323] 当结合特异性是抗体时,它们可通过两条重链C端铰链区的巯基键合而结合。在一个特别优选的实施方案中,在结合前,对铰链区进行修饰使其包含奇数个巯基残基,优选一个。

[0324] 或者,两种结合特异性可以在同一载体中编码并在同一宿主细胞中表达和组装。当双特异性和多特异性分子是mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')₂或配体×Fab融合蛋白时,该方法尤其有用。本发明的双特异性和多特异性分子(例如,双特异性分子)可以是单链分子,如单链双特异性抗体(包含一种单链抗体和结合决定区(binding determinant)的单链双特异分子,或者包含两种结合决定域的单链双特异性分子)。双特异性和多特异性分子也可以是单链分子或者可包含至少两个单链分子。制备双特异性和多特异性分子的方法描述在例如US 5,260,203、US 5,455,030、US 4,881,175、US 5,132,405、US 5,091,513、US 5,476,786、US 5,013,653、US 5,258,498以及US 5,482,858中。

[0325] 双特异性和多特异性分子与其特异靶标的结合可通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS分析、生物测定(例如生长抑制)或Western印迹测定来验证。通常,这些测定中的每一种均通过使用特异性针对目标蛋白质-抗体复合物的经标记试剂(例如,抗体)来检测目标蛋白质-抗体复合物。例如,所述FcR-抗体复合物可使用例如识别并特异结合该抗体-FcR复合物的酶联抗体或抗体片段来检测。或者,可使用多种其它免疫测定来检测复合物。例如,可对抗体进行放射性标记并用于放射免疫测定(RIA)(例如参见Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,1986年3月)中。可通过例如使用γ-计数器或闪烁计数器等手段或通过放射自显影来检测放射性同位素。

[0326] II.免疫缀合物

[0327] 另一方面,本发明涉及缀合有治疗部分或药剂(例如细胞毒素、药物(例如,免疫抑制剂)或放射性同位素)的抗GT468抗体。这种缀合物在本文中称为“免疫缀合物”。包含一种或多种细胞毒素的免疫缀合物被称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害特别是杀死细胞的任何药剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱(emetine)、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱(colchicin)、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、放线菌素D、1-脱氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔

(propranolol) 和嘌呤霉素及其类似物或同源物。

[0328] 用于形成本发明免疫缀合物的合适治疗剂包括但不限于抗代谢物类(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨(fludarabin)、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(decarbazine))、烷基化剂类(例如氮芥、塞替派丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、马法兰(melphalan)、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、链佐霉素(streptozotocin)、丝裂霉素C和顺式二氯二胺铂(II)(DDP 顺铂)、蒽环霉素类(例如柔红霉素(其前身为道诺霉素)和阿霉素)、抗生素类(例如,更生霉素(其前身为放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和氨苄霉素(anthracycline, AMC)以及抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。在一个优选的实施方案中,所述治疗剂是细胞毒性剂或放射毒性剂。在另一实施方案中,所述治疗剂是免疫抑制剂。在又一实施方案中,所述治疗剂是GM-CSF。在一个优选的实施方案中,所述治疗剂是阿霉素、顺铂、硫酸博来霉素、卡莫司汀、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、环磷酰胺或蓖麻毒素A。

[0329] 本发明的抗体还可与放射性同位素缀合,例如碘-131、钇-90或铟-111,以产生细胞毒性放射性药物用于治疗GT468相关疾病(例如癌症)。本发明的抗体缀合物可用于修饰给定的生物应答,所述药物部分不应理解为仅限于常规的化学治疗剂。例如,所述药物部分可以是具有理想生物活性的蛋白质或肽。这样的蛋白质可包括例如具有酶促活性的毒素或其活性片段,例如相思豆毒素(abrin)、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素(pseudomonas exotoxin)或白喉毒素;蛋白质,例如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或生物应答调节剂,例如淋巴因子、白介素-1("IL-1")、白介素-2("IL-2")、白介素-6("IL-6")、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子("GM-CSF")、粒细胞集落刺激因子("G-CSF")或另一些生长因子。

[0330] 用于将这些治疗部分与抗体缀合的技术是众所周知的,参见,例如Arnon等, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld等(编), 243-56页 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom等, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (第二版), Robinson等(编), 623-53页 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera等(编), 475-506页 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin等(编), 303-16页 (Academic Press 1985) 以及 Thorpe等, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

[0331] 在另一实施方案中,本发明的抗体与连接子-螯合剂(例如tiuxetan)结合,其允许所述抗体与放射性同位素缀合。

[0332] III. 药物组合物

[0333] 另一方面,本发明提供了组合物,例如药物组合物,其包含一种本发明抗体或本发明抗体的组合。根据常规技术(例如Reminton: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, Gennaro编, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995),所述药物组合物可与可药用载体或稀释剂以及任何其它已知的辅药和赋形剂一起配制。在一个实施方案中,所述组合

物包含由多种(例如,两种或更多种)经分离的本发明抗体组成的组合,其通过不同的机制起作用,例如,主要通过诱导CDC起作用的一种抗体与主要通过诱导细胞凋亡起作用的另一抗体联用。

[0334] 本发明的药物组合物还可与治疗联用,即与其它药剂联用。例如,所述联合治疗可包含本发明的组合物与至少一种抗炎剂或至少一种免疫抑制剂。在一个实施方案中,这样的治疗剂包括一种或多种抗炎剂,例如类固醇药物或NSAID(非甾体抗炎药)。优选的药剂包括例如阿司匹林及其它水杨酸类、Cox-2抑制剂(例如罗非昔布(rofecoxib)(万络(Vioxx)) and 塞来昔布(celecoxib)(西乐葆(Celebrex)))、NSAID类(例如布洛芬(摩特林(Motrin)、阿德维尔(Advil))、非诺洛芬(fenoprofen)(苯氧布洛芬(Nalfon))、萘普生(naproxen)(甲氧萘丙酸(Naprosyn))、舒林酸(sulindac)(奇诺力(Clinoril))、双氯芬酸(diclofenac)(扶他林(Voltaren))、吡罗昔康(piroxicam)(费定(Feldene))、酮洛芬(ketoprofen)(奥鲁地(Orudis))、二氟尼柳(diflunisal)(双氟尼酸(Dolobid))、萘丁美酮(nabumetone)(瑞力芬(Relafen))、依托度酸(etodolac)(罗丁(Lodine))、奥沙普秦(oxaprozin)(Daypro)和吲哚美辛(吲哚新(Indocin)))。

[0335] 在另一实施方案中,这样的治疗剂包括导致调节性T细胞耗竭或功能失活的药剂,如低剂量的环磷酰胺(cyclophosphamid)、抗CTLA4抗体、抗IL-2或抗IL-2受体的抗体。

[0336] 在又一实施方案中,这样的治疗剂包括一种或多种化疗剂,例如紫杉醇衍生物、泰索帝(taxotere)、吉西他滨、5-氟尿嘧啶、多柔比星(阿霉素)、顺铂(铂)、环磷酰胺(Cytosan、Procytox、Neosar)。在另一实施方案中,本发明的抗体可与化疗药剂联用,其优选地在患有乳腺癌、肺癌、胃癌和/或卵巢癌或其它癌症类型(例如本文所述的癌症类型)的患者中表现出治疗功效。

[0337] 在又一实施方案中,本发明的抗体可与放疗和/或自体外周干细胞或骨髓移植联用。

[0338] 在另一实施方案中,本发明的抗体可与选自抗CD25抗体、抗EPCAM抗体、抗EGFR、抗Her2/neu和抗CD40抗体的一种或多种抗体联用。

[0339] 在又一实施方案中,本发明的抗体可与抗C3b(i)抗体联用以增强补体活化。

[0340] 本文使用的“可药用载体”包括任何及所有生理相容性的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,所述载体适于静脉内、肌肉内、皮下、胃肠外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。根据施用途径,所述活性化合物(即抗体、双特异性和多特异性分子)可用某种物质包被,以保护该化合物免受酸类及其它可能使该化合物失活的天然条件的作用。

[0341] “可药用的盐”是指保留了所需的亲本化合物生物活性且不表现任何不期望的毒性效应的盐(参见,例如Berge,S.M.等(1977)J.Pharm.Sci.66:1-19)。

[0342] 这些盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括源自无毒无机酸的盐,例如盐酸盐、硝酸盐、磷酸盐、硫酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、亚磷酸盐等,以及来自无毒有机酸的盐,例如脂肪单羧酸盐和脂肪二羧酸盐、苯基取代的烷酸盐、羟基烷酸盐、芳香酸盐、脂肪族和芳香族磺酸盐等。碱加成盐包括源自碱土金属的盐,例如钠盐、钾盐、镁盐、钙盐等,以及来自无毒有机胺的盐,例如N,N'-二苯基乙二胺盐、N-甲基还原葡萄糖胺盐、氯普鲁卡因盐、胆碱盐、二乙醇胺盐、乙二胺盐、普鲁卡因盐等。

[0343] 本发明的组合物可通过多种本领域已知的方法来施用。本领域技术人员应理解，施用途和/或模式可根据所期望的结果而变化。所述活性化合物可与保护该化合物免于迅速释放的载体（例如控释制剂）一起制备，所述控释制剂包括植入物、透皮贴剂和微囊递送系统。可使用生物可降解的、生物相容性的聚合物，例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这样制剂的方法一般是本领域技术人员已知的。参见，例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson编，Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0344] 为了通过某些施用方式来施用本发明的化合物，可能有必要使用防止该化合物失活的物质来包被该化合物或与该化合物一起施用。例如，所述化合物可以在合适的载体（例如，脂质体或稀释剂）中施用给受试者。可药用的稀释剂包括盐水和含水缓冲溶液。脂质体包括水包油包水型CGF乳剂以及常规脂质体（Strejan等（1984）J. Neuroimmunol. 7:27）。

[0345] 可药用的载体包括用于临时制备无菌注射用溶液或分散剂的无菌水溶液或分散剂以及无菌粉末。使用这样的针对药物活性物质的介质和试剂是本领域已知的。除了与所述活性化合物不相容的常规介质或试剂以外，任何常规介质或试剂在本发明药物组合物中的用途是在考虑范围内的。还可将补充性活性化合物掺入所述组合物中。

[0346] 治疗组合物通常在制备和储存条件下须是无菌的且稳定的。所述组合物可配制成溶液、微乳（microemulsion）、脂质体或其它适合高浓度药物的有序结构。所述载体可以是溶剂或分散介质，其包含例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等）及其合适的混合物。可例如通过使用包衣（如卵磷脂）、通过维持分散剂中所需的颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情形中，优选地，所述组合物中包含等渗剂，例如糖、多元醇（例如甘露醇、山梨醇）或氯化钠。延长吸收注射用组合物可以通过在该组合物中包含延迟吸收的试剂（例如单硬脂酸盐和明胶）来实现。

[0347] 无菌注射用溶液可通过在合适溶剂中掺入所需量的活性化合物以及一种以上列举之成分或其组合来制备，需要时，随后进行灭菌微滤。

[0348] 一般地，分散剂通过无菌运载体（vehicle）中掺入活性化合物来制备，所述运载体含有基础分散介质以及所需的以上列举之另一些成分。在用于制备无菌注射用溶液的无菌粉末的情形中，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥（冻干），从其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何其它所需成分的粉末。

[0349] 调整给药方案以提供最佳的理想应答（例如，治疗应答）。例如，根据治疗情形的迫切程度，可施用单次团注（single bolus），可施用随时间的若干分次剂量，或者可成比例地减少或增加剂量。尤其有利的是，配制剂量单位形式便于施用以及使剂量均一的胃肠外组合物。本文使用的“剂量单位形式”是指对于待治疗对象来说适合作为单次剂量的物理分散单位；每单位含有预定量的活性化合物，经计算其与所需的药物载体一起产生预期的治疗效果。本发明剂量单位形式的规格由以下因素决定或直接取决于以下因素：(a) 活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果，和 (b) 用于治疗敏感型个体的活性化合物在化合方面的固有局限性。

[0350] 可药用抗氧化剂的实例包括：(1) 水溶性抗氧化剂，如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等；(2) 油溶性抗氧化剂，如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醌（BHA），丁羟甲苯（BHT）、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等；和 (3) 金属螯合剂，如柠檬酸、

乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0351] 对于治疗组合物来说,本发明的制剂包括适于经口、经鼻、外用(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或胃肠外施用的制剂。所述制剂可以方便地以单位剂量形式呈现并可以通过药物领域已知的任何方法来制备。可与载体物质联用以产生单一剂型的活性成分的量将取决于待治疗对象以及具体施用方式而变化。可与载体物质联用以产生单一剂型的活性成分的量一般是产生治疗效果的组合物的量。

[0352] 一般地,以100%计,所述活性成分的量从约0.01%至约99%,优选地从约0.1%至约70%,最优选地从约1%至约30%。

[0353] 本发明的适于阴道施用的制剂还包括阴道栓剂、卫生棉条、霜剂、凝胶剂、膏剂、泡沫剂或喷雾剂,其含有本领域已知的合适载体。用于外用或透皮施用本发明组合物的剂型包括粉末、喷雾剂、油膏剂、膏剂、霜剂、洗液剂、凝胶剂、溶液、贴剂和吸入剂。所述活性化合物可在无菌条件下与可药用载体以及所需的任意防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0354] 本文使用的短语“胃肠外施用”意指除肠内和外用施用以外的施用方式,通常通过注射来实现,其包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、角质下、关节腔内、包膜下、蛛网膜下、椎管内、硬膜外和胸骨下(intrasternal)注射和输注。

[0355] 可用于本发明药物组合物中的合适的含水和非含水载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其适当的混合物、植物油(如橄榄油)和注射用有机酯类(如油酸乙酯)。可例如通过使用包衣物质(如卵磷脂)、通过维持分散剂中所需的颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0356] 这些组合物还可包含辅药,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过灭菌步骤以及通过包含多种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯(paraben)、氯丁醇(chlorobutanol)、苯酚山梨酸等)来防止微生物的存在。所述组合物中包含等渗剂(如糖、氯化钠等)也是可取的。此外,注射用药物形式的延长吸收可通过包含延长吸收的试剂(如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0357] 在一个实施方案中,本发明的单克隆抗体采用结晶形式通过皮下注射来施用,参见Yang等(2003)PNAS,100(12):6934-6939。当本发明化合物作为药物施用给人和动物时,它们可以单独施用或作为药物组合物(含有例如与可药用载体联用的0.01~99.5%(更优选地,0.1~90%)的活性成分)施用。

[0358] 不管选用何种施用途径,通过本领域技术人员已知的常规方法,将本发明的化合物(其可采用合适的水合形式)和/或本发明的药物组合物配制成可药用剂型。

[0359] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以不同,从而获得针对特定患者、组合物和施用模式的有效实现期望治疗应答而对患者无毒性的活性成分的量。所选剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括本发明所应用具体组合物的活性、施用途径、施用时间、所应用具体化合物的排泄速率、治疗持续时间、与所应用具体组合物联用的其它药物、化合物和/或物质、年龄、性别、体重、病症、总体健康状况和所治疗患者的既往医治史等医学领域众所周知的因素。

[0360] 具有本领域普通技术的医生或兽医可以容易地确定所述药物组合物的所需有效量并开具处方。例如,医生或兽医一开始可以采用低于所需水平的药物组合物中所应用本

发明化合物的剂量,以实现期望的治疗效果,并逐渐增加剂量直至达到预期效果。一般来说,本发明组合物的合适日剂量为有效产生治疗效果之最低剂量的化合物量。这样的有效剂量一般取决于上述因素。优选采用静脉内、肌内、腹膜内或皮下方式施用,优选在邻近靶部位处施用。需要时,治疗组合物的有效日剂量可作为2次、3次、4次、5次、6次或更多次亚剂量分别施用(以一天中的合适间隔),任选地,采用单位剂型。尽管本发明的化合物有可能单独施用,但优选作为药物制剂(组合物)来施用所述化合物。

[0361] 在一个实施方案中,本发明的抗体可通过输注来施用,优选在较长时间内(例如超过24小时)缓慢持续输注,以减少毒副作用。还可通过持续输注2~24小时(如2~12小时)来进行施用。必要时,可重复该方案一次或多次,例如,在6个月或12个月后。可通过在生物样品中施用后测量循环抗GT468单克隆抗体的量来确定或调整剂量,其通过使用靶向抗GT468抗体的抗独特型抗体来实现。

[0362] 在另一实施方案中,所述抗体通过维持治疗来施用,例如,在6个月或更长时间内每周一次。

[0363] 在另一实施方案中,本发明的抗体可以通过包括以下步骤的方案来施用:一次性输注针对GT468的抗体,然后输注缀合有放射性同位素的针对GT468的抗体。该方案可以在例如7至9天后重复。

[0364] 治疗组合物可与本领域已知的医疗设备一起施用。例如,在一个优选的实施方案中,本发明的治疗组合物可以与无针头皮下注射设备一起施用,例如US 5,399,163、US 5,383,851、US 5,312,335、US 5,064,413、US 4,941,880、US 4,790,824或US 4,596,556中所述的设备。可用于本发明的众所周知的植入物和组件(module)的实例包括描述于以下文献中的那些:US 4,487,603,其公开了用于以受控速率配药的可植入式微型输注泵;US 4,486,194,其公开了用于通过皮肤施用药物的治疗设备;US 4,447,233,其公开了用于以精确的输注速率递送药物的药物输注泵;US 4,447,224,其公开了用于连续药物递送的可变流量(variable flow)可植入式输注装置;US 4,439,196,其公开了具有多个腔室分区的渗透性药物递送系统;以及US 4,475,196,其公开了渗透性药物递送系统。

[0365] 许多其它这样的植入物、递送系统和组件是本领域技术人员所熟知的。在一些实施方案中,可以配制本发明的抗体以确保在体内正确分配。例如,血脑屏障(BBB)排除了许多高度亲水性的化合物。为了确保本发明的治疗化合物能穿越血脑屏障(需要时),可将它们配制在例如脂质体中。有关制备脂质体的方法,参见例如US 4,522,811、US 5,374,548和US 5,399,331。脂质体可包含一个或多个选择性运送到特定细胞或器官中并因此提高药物靶向递送的部分(参见例如V.V.Ranade(1989) J.Clin.Pharmacol.29:685)。靶向部分的实例包括叶酸或生物素(参见例如Low等的US 5,416,016)、甘露糖苷(Umezawa等,(1988) Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038)、抗体(P.G.Bloeman等(1995) FEBS Lett.357:140;M.Owais等(1995) Antimicrob.Agents Chemother.39:180)和表面活性蛋白A受体(Briscoe等(1995) Am.J.Physiol.1233:134)。

[0366] 在本发明的一个实施方案中,本发明的治疗化合物被配制在脂质体中。在一个更优选的实施方案中,所述脂质体包含靶向部分。在一个最优选的实施方案中,所述脂质体中的治疗化合物通过团注注射至邻近期望区域的部位(例如肿瘤部位)来递送。所述组合物必须是达到易于注射之程度的流体。它必须在生产和储存条件下是稳定的,并且必须针对微

生物(如细菌和真菌)的污染作用而进行防腐。

[0367] 在另一实施方案中,本发明的抗体可配制以防止或减少其穿越胎盘运送。这可以通过本领域已知的方法来实现,例如通过抗体的聚乙二醇化或通过使用F(ab)₂' 片段来实现。还可参考“Cunningham-Rundles C,Zhuo Z,Griffith B,Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation.” J. Immunol. Methods, 152:177-190; 以及参考Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74:279-283。

[0368] 有关肿瘤治疗的“治疗有效剂量”可通过目标肿瘤应答(可以是完全的或部分的)来测量。完全应答(complete response, CR)被定义为无疾病的临床、放射学或其它证据。部分应答(partial response, PR)源于总的肿瘤体积减少了超过50%。进展的中间时间是表征目标肿瘤应答持续时间的量度。

[0369] 有关肿瘤治疗的“治疗有效剂量”还可通过其稳定疾病进程的能力来测量。化合物抑制癌症的能力可以在动物模型系统中评价,其预示对人体肿瘤的功效。或者,组合物的这一特性可以通过利用本领域技术人员已知的体外测定来研究该化合物抑制细胞生长或细胞凋亡的能力而评估。治疗有效量的治疗化合物可以减少肿瘤的体积,或以其它方式缓解对象中的症状。本领域普通技术人员能够基于如下因素确定这样的量:对象的体积、对象症状的严重程度以及所选的具体组合物或施用途径。

[0370] 所述组合物必须是无菌的以及达到该组合物可利用注射器进行递送之程度的流体。除了水以外,所述载体可以是等渗缓冲盐溶液、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其适当的混合物。适当的流动性可例如通过使用包衣(如卵磷脂)、通过维持分散剂所需的颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持。在许多情形中,组合物中优选地包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇或山梨醇)以及氯化钠。注射用组合物的长时间吸收可通过在该组合物中包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0371] 当所述活性化合物被如上所述适当保护时,该化合物可以经口施用,例如,与惰性稀释剂或可吸收食用载体一起施用。

[0372] IV. 本发明的用途和方法

[0373] 本发明的抗体(包括免疫缀合物、双特异性/多特异性物质以及本文所述的组合物及其它衍生物)具有多种治疗用途,包括治疗表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞参与的疾病。例如,所述抗体可施用给培养中的细胞(例如,体外或离体),或施用给人类对象(例如,在体内),以治疗或预防如本文所述的多种疾病。本文使用的术语“对象”旨在包括人和非人动物,其响应于针对GT468的抗体。优选的对象包括患有可通过杀死患病细胞(尤其是特征在于与正常细胞相比,GT468的表达模式改变和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之模式改变的细胞)而得以纠正或缓解之疾病的人类患者。

[0374] 例如,在一个实施方案中,本发明的抗体可用于治疗患有致瘤性疾病(例如,特征在于存在表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之肿瘤细胞的疾病,包括例如乳腺癌)的对象。可进行治疗和/或预防的致瘤性疾病的实例包括所有表达GT468的癌症以及肿瘤实体,包括乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌(尤其是肾细胞癌)、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜

癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式。这些癌症可以处于早期、中期或晚期(例如,转移)。在一个实施方案中,所述癌症疾病是肺中的转移癌。

[0375] 本发明所述的药物组合物 and 治疗方法还可用于免疫或接种疫苗,以预防本文所述的疾病。

[0376] 在另一个实施方案中,本发明的抗体可用于检测GT468或特定形式之GT468的水平,或者其膜表面上含有GT468之细胞的水平,然后可将上述水平与如上面所述的某些疾病或疾病症状建立关联。或者,所述抗体可以用于清除表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞或与其相互作用,从而暗示这些细胞成为疾病的重要介导体。这可以通过使样品和对照样品与抗GT468抗体在允许抗体和GT468之间形成复合物的条件下接触来实现。检测抗体和GT468之间形成的任何复合物并在样品和对照样品(即参照样品)中进行比较。

[0377] 可最初测试本发明抗体与治疗或诊断用途有关的体外结合活性。例如,可使用本文所述的流式细胞测定来测试所述抗体。

[0378] 此外,可以测定抗体诱导至少一种效应物介导之效应细胞活性(包括抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的生长和/或将其杀死)的活性。例如,可测定所述抗体诱导CDC和/或细胞凋亡的活性。本文中描述了测定CDC、同质性粘附、分子聚簇(molecular clustering)或细胞凋亡的操作步骤。

[0379] 本发明的抗体可用于在体内或体外引起一种或多种以下的生物活性:抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的生长和/或分化;杀死表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞;在效应细胞存在下,介导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的吞噬作用或ADCC;在补体存在下,介导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的CDC;介导表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的细胞凋亡;诱导同质性粘附;和/或诱导结合GT468后的易位进脂筏。

[0380] 在一个具体的实施方案中,所述抗体用于在体内或体外治疗、预防或诊断多种GT468相关疾病。GT468相关疾病的实例包括癌症,如乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌(尤其是肾细胞癌)、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式。在一个实施方案中,癌症疾病是肺中的转移癌。

[0381] 在体内和体外施用本发明抗体组合物的合适途径是本领域众所周知的,并可以由本领域普通技术人员来选择。

[0382] 如上所述,本发明的抗GT468抗体可以与一种或其它多种治疗剂(例如,细胞毒性剂、放射毒性剂、抗血管发生剂或/和免疫抑制剂)一起施用,以降低针对本发明抗体的免疫应答。所述抗体可与所述试剂连接(作为免疫复合物)或可与所述试剂单独施用。在后一种情形中(单独施用),所述抗体可以在所述试剂施用前、后或同时施用,或者可以与另一些已知治疗(例如抗癌疗法,如放疗)共同施用。这样的治疗剂包括抗肿瘤剂(如以上列出的)等。将本发明的抗GT468抗体与化疗药剂共同施用提供了两种抗癌药剂,其通过不同的机制产生针对肿瘤细胞的细胞毒作用。这种共同施用可以解决由于肿瘤细胞发生耐药性或抗原性改变使其对抗体不发生反应所导致的问题。

[0383] 在本发明的另一具体实施方案中,另外使用抗血管发生剂(包括靶向VEGF或VEGFR的抗体)以及一种或多种抑制血管发生的化合物对施用所述抗体的对象进行治疗。用这些药物进行预先治疗或平行应用可改善抗体对实体肿瘤(bulk tumor)的穿透。

[0384] 在本发明的另一具体实施方案中,另外使用抑制生长因子受体信号传导的化合物(包括与EGFR受体结合的单克隆抗体以及抑制由EGFR、Her1或Her2/neu受体启动之信号传导的化合物)对施用所述抗体的对象进行治疗。

[0385] 靶标特异性效应细胞(例如与本发明组合物(例如抗体、多特异性和双特异性分子)结合的效应细胞)也可用作治疗剂。用于靶向的效应细胞可以是人的白细胞例如巨噬细胞、中性粒细胞或单核细胞。另一些细胞包括嗜酸性粒细胞、自然杀伤细胞和其它具有IgG受体或IgA受体的细胞。需要时,可以从待治疗的对象获得效应细胞。所述靶标特异性效应细胞可作为生理可接受溶液中的细胞悬浮物来施用。所施用的细胞量可以在 $10^8 \sim 10^9$ 数量级,但根据治疗目的而变化。一般地,该数量将足以实现在靶细胞(例如表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞)上定位并通过例如吞噬作用杀死细胞。施用途径也可以改变。

[0386] 用靶标特异性效应细胞治疗可与其它除去靶细胞的技术一起进行。例如,使用本发明组合物的抗肿瘤治疗和/或带有这些组合物的效应细胞可以与化疗联用。此外,针对肿瘤细胞排斥,可使用联合免疫疗法指导两种独特的细胞毒性效应物群体。例如,抗GT468抗体与抗Fc-RI或抗CD3连接可用于与IgG受体或IgA受体特异性结合剂联用。

[0387] 本发明的双特异性和多特异性分子还可用于调节效应细胞上的Fc- γ R或Fc- α R水平,例如通过对所述细胞表面上的受体加帽(capping)或清除来实现。抗Fc受体的混合物也可用于这一目的。

[0388] 具有补体结合位点(例如来自IgG1、-2或-3或IgM的结合补体的部分)的本发明组合物(例如,抗体、多特异性和双特异性分子以及免疫缀合物)也可以在补体存在下使用。在一个实施方案中,使用本发明的结合剂和适当的效应细胞来离体治疗包含靶细胞的细胞群可以补充添加补体或含补体的血清。包被有本发明结合剂的靶细胞的吞噬作用可以通过与补体蛋白结合来改善。在另一实施方案中,包被有本发明组合物的靶细胞也可以被补体裂解。在另一实施方案中,本发明的组合物不激活补体。

[0389] 本发明的组合物也可以与补体一起施用。因此,包含抗体、多特异性或双特异性分子以及血清或补体的组合物也涵盖在本发明的范围内。这些组合物的优势在于补体位于紧邻抗体、多特异性或双特异性分子的位置。

[0390] 另外,本发明的抗体、多特异性或双特异性分子以及补体或血清可单独施用。本发明组合物与靶细胞的结合可导致GT468抗原-抗体复合物易位至细胞膜的脂筏中。这种易位形成了高密度的抗原-抗体复合物,其可有效地激活和/或增强CDC。

[0391] 包含本发明抗体组合物(例如,抗体和免疫缀合物)以及使用说明书的试剂盒也涵盖在本发明的范围内。所述试剂盒还可包含一种或多种额外的试剂,如免疫抑制剂、细胞毒性剂或放射毒性剂,或者一种或多种额外的本发明抗体(例如,具有互补活性的抗体)。

[0392] 因此,用本发明抗体组合物进行治疗的患者还可施用(在施用本发明抗体之前、同时或之后)另一治疗剂,如增强或提高本发明抗体疗效的细胞毒性剂或放射毒性剂。

[0393] 在另一些实施方案中,所述对象还可以额外地用调节(例如增强或抑制)Fc- γ 受

体或Fc- α 受体表达或活性的药剂来治疗,其通过例如用细胞因子治疗对象来实现。优选的细胞因子包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)。其它用于提高本文所述抗体和药物组合物之治疗效果的重要试剂有 β -葡聚糖,其是由多种植物和微生物(例如,细菌、藻类、真菌、酵母和谷物)产生的支链葡萄糖残基的均一多糖(homopolysaccharide)。也可使用生物体产生的 β -葡聚糖片段。优选地, β -葡聚糖是 β (1,3)葡萄糖的多聚物,其中至少某些骨架葡萄糖单位(例如3~6%的骨架葡萄糖单位)具有分支(如 β (1,6)分支)。

[0394] 在一个具体的实施方案中,本发明提供了用于检测样品中GT468抗原的存在或测量GT468抗原的量的方法,其包括在允许抗体或其部分与GT468之间复合物形成的条件下,使样品和对照样品与特异性结合GT468的抗体接触。然后,检测复合物的形成,其中与对照样品相比,样品间不同复合物形成指示样品中GT468抗原的存在。

[0395] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于在体内或体外检测表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的存在或对其定量的方法。该方法包括(i)向对象施用缀合有可检测标记的本发明组合物;以及(ii)检测对象中的所述可检测标记,以鉴定含有表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的区域。

[0396] 上述方法可用于尤其是诊断GT468相关疾病和/或GT468相关疾病(如癌症疾病)的定位。优选地,样品中GT468的量高于对照样品中GT468的量指示样品所来源的对象(尤其是人)中存在GT468相关疾病。

[0397] 在如上文所述的方法中使用时,可以为本文所述的抗体提供发挥以下功能的标记:(i)提供可检测的信号;(ii)与第二标记相互作用,以修饰第一或第二标记提供的可检测信号,例如FRET(荧光共振能量转移);(iii)通过电荷、疏水性、形状或其他物理参数影响迁移率,例如电泳迁移率,或(iv)提供捕获部分,例如亲合力、抗体/抗原或离子络合作用。适合作为标记的是例如以下的结构:荧光标记,发光标记,生色团标记,放射性同位素标记,同位素标记(优选地是稳定的同位素标记),同重素标记(isobaric label),酶标记,颗粒标记(尤其是金属颗粒标记、磁颗粒标记、聚合物颗粒标记),小有机分子如生物素,受体的配体或结合分子如细胞粘附蛋白或凝集素,包含可以通过使用结合试剂等来检测的核酸和/或氨基酸残基的标记序列。标记以非限制性的方式包括硫酸钡,碘西他酸,碘番酸,胺碘苯丙酸钙(calcium ipodate),泛影酸钠,泛影葡胺,甲泛葡胺,丁酰碘泛酸钠和放射性诊断剂,包括正电子发射体如氟-18和碳-11, γ 发射体如碘-123、钨-99m、碘-131和铟-111,用于核磁共振的核素,如氟和钆。

[0398] 在另一实施方案中,本发明的免疫缀合物可用于将化合物(例如,治疗剂、标签、细胞毒性剂、放射毒性剂、免疫抑制剂等)靶向至其表面与GT468相关的细胞,其通过将所述化合物与抗体连接来实现。因此,本发明还提供了用于离体或体内定位表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合的细胞(如循环肿瘤细胞)的方法。

[0399] 以下实施例对本发明进一步举例说明,其不应被解释为限制本发明的范围。

[0400] 实施例

[0401] 实施例1:材料和方法

[0402] 本文提及的技术和方法以众所周知的方式以及如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版(1989)Cold Spring harbor Laboratory Press,

Cold Spring harbor, N.Y.中所述或如下所述来进行。所有的方法包括试剂盒和试剂的使用均按照制造商的信息来进行。

[0403] 组织和细胞系

[0404] 重组DNA工作得到官方许可并依照Rheinland-Pfalz州政府的规定进行。组织来自于在例行诊断或治疗过程中得到的人的剩余材料并储存于-80℃备用。乳腺癌细胞系MCF-7和BT549在DMEM/10%FCS中培养。RNA的分离、RT-PCR和实时RT-PCR

[0405] 如前所述 (Koslowski, M., Sahin, U., Huber, C. & Tureci, O. (2006) Hum. Mol. Genet. 15, 2392-2399) 进行RNA提取、第一链cDNA合成、RT-PCR和实时RT-PCR。对于终点分析来说, 在35个循环的RT-PCR中使用GT468-特异性寡核苷酸 (有义5' -AAATTT GGC AGC TGC CTT CAC-3'; 反义5' -TGA TGC CAC ATT CAG TAA CAC-3', 60℃退火)。在40个循环的RT-PCR中一式三份进行实时定量表达分析。与HPRT (有义5' -TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA-3'; 反义5' -GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3', 62℃退火) 进行归一化后, 使用 $\Delta\Delta CT$ 计算对肿瘤样品中的GT468转录物相对于正常组织进行定量。PCR反应的特异性通过从任意选择的样品中克隆和测序扩增产物而得到验证。

[0406] 生物信息学

[0407] 针对滋养层细胞特异性分子电子克隆 (in silico cloning), 对在别处详述的数据采集策略进行修改和调整 (Koslowski, M., Bell, C., Seitz, G., Lehr, H. A., Roemer, K., Muntefering, H., Huber, C., Sahin, U. & Tureci, O. (2004) Cancer Res. 64, 5988-5993; Koslowski, M., Tureci, O., Bell, C., Krause, P., Lehr, H. A., Brunner, J., Seitz, G., Nestle, F. O., Huber, C. & Sahin, U. (2002) Cancer Res. 62, 6750-6755; Koslowski, M., Sahin, U., Huber, C. & Tureci, O. (2006) Hum. Mol. Genet. 15, 2392-2399)。简言之, 将GenBank的分级关键词检索与数字化的cDNA文库消减结合。

[0408] 对于关键词检索来说, 使用ENTREZ检索和检索系统 (Retrieval System) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) 访问GenBank的核苷酸序列文件, 以寻找注释为特异性表达在胎盘或滋养层组织中的基因。随后, 使用序列同源性检索程序BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 将每个核苷酸序列与所有的人核苷酸序列进行比对以防冗余。作为第二道筛选, 针对所有克隆进行了电子Northern (eNorthern), 其通过关键词检索由对每个目的基因进行针对NCBI之EST数据库的BLAST检索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 而获得。需要考虑到的是, 在公共区域中的某些cDNA文库未得到恰当的注释 (Scheurle, D., De Young, M. P., Binniger, D. M., Page, H., Jahanzeb, M. & Narayanan, R. (2000) Cancer Res. 60, 4037-4043)。

[0409] 对于数字化消减来说, 使用了NCBI中的癌症基因组解剖计划的cDNA xProfiler工具 (<http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler>), 其用于比较cDNA文库的两个集合 (A和B) 的基因表达, 其中每个集合可以是单一文库或若干文库。集合A和集合B的检索选项设置为“人 (Homo Sapiens)” (针对“生物体”) 和“所有EST文库” (针对文库组合) 以检索dbEST中的所有cDNA文库。从胎盘和滋养层组织制备的与检索选项匹配的所有cDNA文库与排除了混合组织文库的集合A进行比对。对于集合B来说, 选择从除了胎盘、滋养层细胞、睾丸、卵巢及完整胎儿以外的正常组织制备的所有cDNA文库。

[0410] 使用EMBOSS CpGPlot软件 (Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. (2000) Trends

Genet. 16, 276-277) 对GT468启动子区域进行分析。另外,使用MEMSAT3 (Jones, D.T., Taylor, W.R. & Thornton, J.M. (1994) *Biochemistry* 33, 3038-3049)、TMpred (Hofmann, K. & Stoffel, W. (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 166) 和GOR IV (Garnier, J., Osguthorpe, D.J. & Robson, B. (1978) *J. Mol. Biol.* 120, 97-120) 分析GT468的蛋白序列。抗血清、免疫荧光和免疫化学

[0411] 通过定制抗体服务 (Squarix, Marl, Germany) 得到针对GT468的氨基酸117-127产生的多克隆抗血清。按照制造商的说明,使用VECTOR NovaRED Substrate试剂盒 (Vector, Burlingame, CA) 对组织冰冻切片进行免疫组化分析。对于Western印迹分析来说,使用从Triton-X裂解之细胞提取的30 μ g总蛋白。提取物在还原型样品缓冲液 (Roth, Karlsruhe, Germany) 中稀释,进行SDS-PAGE,随后电转移到PVDF膜 (Pall, Easthills, NY) 上。使用与pAKT (Cell Signaling, Danvers, MA)、AKT (Cell Signaling, Danvers, MA)、细胞周期蛋白D1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 和 β -肌动蛋白 (Abeam, Cambridge, UK) 反应的抗体进行免疫染色,随后用缀合有辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠和山羊抗兔的第二抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) 检测第一抗体。

[0412] siRNA双链体

[0413] GT468的siRNA双链体 (Qiagen, Hilden, Germany) (有义5' -r (CCA UGA GAG UAG CCA GCA) dTdT-3', 反义5' -r (UUG CUG GCU ACU CUC AUG G) dAdG-3') 靶向GT468 mRNA序列 (NM_021796.3) 的670~690位核苷酸。使用乱序siRNA双链体 (有义5' -r (UAA CUG UAU AAU CGA CUA G) dTdT-3', 反义5' -r (CUA GUC GAU UAU ACA GUU A) dGdA-3') 作为对照。对于GT468沉默研究来说,按照制造商的说明使用HiPerFect转染试剂 (Qiagen) 用10nM siRNA双链体转染细胞。使用另一组靶向342~362位核苷酸的GT468 siRNA双链体 (有义5' -r (GGU UCA GGA CAA AGU CCA A) dTdT-5', 反义5' -r (UUG GAC UUU GUC CUG AAC C) dGdG-3') 再现了所有结果。

[0414] 转染siRNA后的细胞增殖分析

[0415] 转染siRNA双链体24小时后,将 1×10^4 细胞在添加了10%FCS的培养基中培养48小时。根据制造商的说明使用DELTA细胞增殖试剂盒 (Perkin Elmer, Boston, MA), 利用Wallac Victor²多标计数仪 (Perkin Elmer, Boston, MA), 通过测量掺入新合成的DNA链的BrdU来分析增殖。

[0416] 细胞周期分析

[0417] 细胞以不同浓度培养在添加了10%FCS的培养基中。转染siRNA双链体72小时后,收获细胞并进行乙醇固定,在进行流式细胞DNA含量分析之前用碘化丙锭染色。使用CellQuestTM Pro (BD, Franklin Lakes, NJ) 和FlowJoTM (Tree Star, Ashland, OR) 流式细胞分析软件对处于细胞周期不同阶段的细胞进行定量。通过在siRNA转染后48小时和72小时进行AnnexinV染色来对凋亡细胞进行定量。

[0418] 细胞迁移和体外侵入测定

[0419] 细胞迁移测定在带有8.0 μ m孔膜的transwell小室 (BD Biosciences, San Jose, CA) 中进行,在试验前将细胞培养在无血清培养基中12小时。对于siRNA实验来说,细胞在如上所述的siRNA双链体转染24小时后被转移到无血清条件下。将含有 4×10^4 细胞的400 μ l无血清培养基加入上层小室。下层小室含有800 μ l添加了5%FCS的培养基作为趋化剂。24小时

后,用冰冷的甲醇固定迁移到膜下侧的细胞;切下膜,置于显微镜玻片上并用Hoechst (Dako,Glostrup,Denmark)封片用于荧光显微镜分析。对每个膜的5个随机视野(100倍放大)中的细胞计数。所有实验均一式三份进行。使用同样的实验装置,将趋化剂加至小室的上层和下层,对细胞的化动性(chemokinesis)进行分析。对于体外侵入测定来说,上层小室中备有100 μ l的用无血清培养基稀释至1mg/ml的Matrigel (BD Biosciences, San Jose, NJ)。小室在37 $^{\circ}$ C孵育5小时后用于凝胶化(gelling)。

[0420] 与抗体孵育后的细胞增殖分析

[0421] 内源性表达GT468的癌细胞系BT-549、Caov-3、EFO-21、MCF-7和MDA-MB-231与杂交瘤上清液(用DMEM细胞培养基以1:2稀释)孵育72小时。根据制造商的说明使用DELFIACell增殖试剂盒(Perkin Elmer, Boston, MA),利用WallacVictor²多标计数仪(Perkin Elmer),通过测量掺入新合成的DNA链中的BrdU来分析增殖。

[0422] 或者,分别将内源性表达GT468的癌细胞系SK-BR-3和MCF-7与经HPLC纯化的杂交瘤上清液(用DMEM细胞培养基稀释至所示浓度)孵育72小时或120小时。如上所述分析增殖。

[0423] 或者,分别将内源性表达GT468的癌细胞系SK-BR-3、MCF-7、MDA-MB-468和作为对照的GT468阴性黑色素瘤细胞系MelHo与稀释在DMEM (SK-BR-3、MCF-7、MDA-MB-468)或RPMI (MelHo)细胞培养基中的经FPLC纯化的杂交瘤上清液(10 μ g/ml和50 μ g/ml)孵育72小时。根据制造商的说明使用DELFIACell增殖试剂盒(Perkin Elmer),利用WallacVictor²多标计数仪(Perkin Elmer),通过测量掺入新合成的DNA链中的BrdU来分析增殖。

[0424] 免疫荧光显微术

[0425] 使用免疫荧光显微术分析来证实经免疫小鼠的血清中抗GT468抗体的存在或者单克隆抗体与表达GT468之活细胞的结合。将用GT468-eGFP转染的CHO细胞在标准培养条件下(在添加了10%胎牛血清(FCS)、2mM L-谷氨酰胺、100IU/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM/F12培养基中)培养在腔室玻片上。然后,用甲醇或甲醛/0.1%皂苷固定细胞。在25 $^{\circ}$ C,将细胞与抗GT468抗体一起孵育60分钟。清洗后,在同样的条件下,将细胞与标记有Alexa555的抗小鼠IgG第二抗体(Molecular Probes)一起孵育。

[0426] GT468肽特异性ELISA

[0427] 在37 $^{\circ}$ C,用相应的GT468肽(5或10 μ g/ml)包被MaxiSorp或Microwell板(Nunc)1小时。在4 $^{\circ}$ C,用PBS 3%BSA封闭过夜。用PBS清洗后,向板中添加杂交瘤上清液(用PBS/3%BSA以1:5或1:10稀释,或用在2 $\times$ PBS/6%BSA, pH 7.3以1:2稀释)或纯化的抗体(在PBS/3%BSA, pH 7.3中稀释为1 μ g/ml)并在室温下孵育1小时(以90rpm进行轨道振摇)。用PBS清洗后,加入在PBS 3%BSA, pH7.3中的第二抗体(缀合有HRP0的山羊抗小鼠IgG,亚类1+2a+2b+3, Jackson ImmunoResearch),并在室温下以90rpm轨道振摇培养1小时。使用PBS的最后一次清洗步骤后,加入由100mM醋酸钠(pH 5.2)中1mM或1.5mM ABTS组成的底物溶液。在使用前,临时在底物溶液中补充0.3 μ l/ml的30% H_2O_2 。30~60分钟后,使用Tecan Safire Plate 读数仪(Tecan)来测量405nm处的吸光值。

[0428] 产生人的抗GT468单克隆抗体之杂交瘤的产生

[0429] 基于标准操作,从先前使用下文所述不同免疫方案进行免疫的动物中分离小鼠的脾并在PEG存在下与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后,使用肽特异性ELISA、GT468 CrELISA以及通过IF转染GT468-eGFP的CHO细胞来筛选所得到的产生GT468特异性免疫球蛋白的杂交

瘤。

[0430] 将来自于免疫小鼠的脾淋巴细胞单细胞悬液与P3X63Ag8U.1非分泌型小鼠骨髓瘤细胞(ATCC,CRL 1597)(或在56-4A-2和62-9B-1的情况下为P3X63Ag8.653小鼠骨髓瘤细胞(ATCC,CRL 1580))以2:1的比例用50%PEG(Roche Diagnostics,CRL 738641)进行融合。细胞以约 3×10^4 /孔在平底微量滴定板上铺板,随后是在含10%胎牛血清、2%杂交瘤融合和克隆添加物(HFCS,Roche Diagnostics,CRL 1363735)外加10mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50 μ g/ml庆大霉素和1 $\times$ HAT(Sigma,CRL H0262)的选择性培养基中孵育两周。10天至14天后,利用肽特异性ELISA筛选各孔中的抗GT468单克隆抗体。对分泌抗体的杂交瘤重新铺板,如果仍是抗GT468单克隆抗体阳性的,则通过有限稀释进行亚克隆。然后,将稳定的亚克隆进行体外培养以得到组织培养基中少量的抗体用于表征。从每个杂交瘤中至少选择一个保留了亲本细胞反应性(通过ELISA和IF)的克隆。

[0431] 从杂交瘤上清液中纯化单克隆抗体

[0432] 使用HiTrapTM MabSelect SuReTM,通过进行单步骤亲和层析,从杂交瘤上清液中制备抗体。用100mM柠檬酸盐(pH 3.0—pH 4.0,取决于抗体同种型)洗脱后,立即用1M Tris,pH 8.0中和收集到的级分。为了进一步进行实验,将抗体制备物以5L PBS透析两次,无菌过滤(0.2 μ m)并储存于4℃下。

[0433] 分型

[0434] 为了对杂交瘤上清液分型,按照制造商所述,使用IsoStrip小鼠单克隆抗体分型试剂盒(Roche)。

[0435] 使用表达GT468之细菌裂解物的粗裂解物进行CrELISA

[0436] • 抗原的制备

[0437] 用GT468 pQE质粒或非插入型pQE(后文中称为“参考”)转化大肠杆菌XL0LR细菌,并在LB培养基中培养至A600纳米 $\sim$ 0.35E。用2mM IPTG诱导蛋白表达,使细胞在37℃再培养4小时。利用考马斯凝胶分析监测蛋白表达的适当诱导及其动力学。将细菌旋转沉降,并用含有0.2mM蛋白酶抑制剂AEBSF盐酸盐(AppliChem)的少量体积PBS(pH 7.2)中再次悬浮。细胞置于冰上并用超声(Branson Sonic Power A Smithkline)破碎。将GT468和参考裂解物稀释至含0.2mM AEBSF和20%(体积/体积)甘油的PBS中的总蛋白浓度为2mg/ml。将等分样品用液氮速冻并存放在-70℃备用。

[0438] • 酶联免疫吸附测定

[0439] 使用前,将GT468以及参考裂解物稀释于包被缓冲液(100mM HEPES,pH 7.2)中,然后转移至平底F96Maxisorp微孔板(50 μ l/孔,Nunc),并在37℃吸附2小时。

[0440] 抗原固定后,用含0.1%吐温20的清洗缓冲液(50mM Tris,150mM氯化钠,pH 7.2)清洗板两次,然后用不含去污剂的清洗缓冲液清洗两次。每孔中加入50 μ l 1:100稀释的人血清,并在轨道摇床上室温孵育1小时。在一些实验中,人血清在进行测定之前要进行预处理。

[0441] 每种人血清样品都在包被有GT468或参考裂解物的孔中一式两份平行测试。如上所述再次清洗板,并与用含50mM HEPES(pH 7.4)的3%(重量/体积)奶粉以1:5000稀释的50 μ l/孔的第二抗体(山羊抗人IgG-AP Dianova)室温孵育1小时。在室温下,用100 μ l/孔的底物溶液[2mg每毫升ALP缓冲液(Roche Diagnostics,Mannheim,Germany)含4-硝基苯基磷酸二钠盐六水合物(Merck)]使板显影30分钟,立即用微板读数仪(Victor2 Wallac,Perkin-

Elmer, Turku, Finland) 读取405nm处的吸光值。

[0442] 流式细胞术分析

[0443] 收获转染有GT468 pcDNA3.1或非插入型质粒(模拟)的HEK293细胞,用冰冷甲醇固定,并用PBS/10%FCS封闭30分钟。细胞与杂交瘤上清液孵育1小时,用PBS/1 FCS清洗两次,每次10分钟,与山羊抗小鼠Cy3第二抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)一起孵育。

[0444] 另外,收获用GT468质粒DNA或无插入的质粒(模拟)转染的HEK293细胞或者SK-BR-3、MCF-7、MDA-MB-468、NUG-C4细胞,并用PBS/5%FCS/0.1%叠氮化钠封闭。将细胞与稀释于PBS/5%FCS/0.1%叠氮化钠中5ug/ml纯化的抗体或杂交瘤上清液一起孵育1小时,用PBS/5%FCS/0.1%叠氮化钠进行3次5分钟的清洗,并与山羊抗小鼠APC第二抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)一起孵育。使用来自Becton Dickinson的FACSarray分析细胞。

[0445] 克隆形成实验

[0446] 克隆形成实验或集落形成实验是分析单个细胞生长成为集落之能力的体外细胞存活实验。进行该实验来测定GT468抗体对集落产生能力的效力。将表达GT468的SK-BR-3细胞接种于48孔板(2000个细胞/孔)中。允许细胞在FPLC纯化的来自杂交瘤上清液的抗体(45 µg/ml)存在下生长2周,所有实验一式三份进行。将集落固定并用6%戊二醛(体积/体积)和0.5%结晶紫(重量/体积)染色。使用Olympus小型数码相机(C-750 Ultra Zoom)从经染色和干燥的平板获得图像,并目测分析。

[0447] Western印迹

[0448] 使用基于Triton-X的裂解缓冲液(50mM HEPES (pH 7.4), 10% (体积/体积) 甘油, 1% (体积/体积) Triton X-100, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 5mM EDTA, 100mM NaF) 来制备转染有GT468 pcDNA3.1或非插入型质粒(模拟)的HEK293细胞的全细胞裂解物。提取物在还原型样品缓冲液中(Roth)稀释,进行SDS-PAGE并电转到PVDF膜(Pa11)上。使用与GT468反应的多克隆抗体(Koslowski等2007)或来自杂交瘤上清液的FPLC纯化的抗体(5µg/ml)进行免疫印迹,然后用缀合有辣根过氧化物酶的山羊抗兔第二抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)检测第一抗体。

[0449] 早期处理异种移植瘤(xenograft)模型

[0450] 将 5×10^6 个GT468阳性BEW0胎盘绒毛膜癌细胞皮下注射进裸鼠中。接种肿瘤细胞后3天,用纯化的单克隆抗体(200µg静脉注射,每组8只动物)处理动物。每周两次给予抗体,持续2周。使用卡尺监测肿瘤生长。

[0451] 实验性转移实验

[0452] 注射雌激素依赖性MCF-7细胞之前一周,通过皮下植入17β-雌二醇长期释放丸(1mg, 60天释放; Innovative Research of America)来制备无胸腺的裸鼠。静脉注射 1×10^6 个MCF-7细胞后,用纯化的单克隆抗体(200µg)一周两次处理动物。注射细胞五周后,使用实时PCR对无胸腺小鼠(每组5-8只动物)肺中的肿瘤负荷进行定量。使用QIAamp DNA Mini试剂盒(Qiagen)提取来自肺组织的DNA,并从200ng DNA中扩增人17号染色体α-卫星区的226bp片段(有义5'-CAG CTG ACT AAA CAG AAG CAG-3'; 反义5'-GAG TTG AAT GCA GTC ATC ACA G-3')。参照来自正常对照小鼠的正常肺,定量肿瘤负荷(DNA拷贝数)。

[0453] 实施例2:GT468在多种肿瘤中异常活化并且高度表达

[0454] 为了鉴定胎盘特异性滋养层细胞基因,对全基因组数据采集策略进行了改动,该策略是我们曾为电子鉴定生殖细胞特异性分子而开发的(Koslowski,M.,Bell,C,Seitz,G.,Lehr,H.A.,Roemer,K.,Muntefering H.,Huber,C,Sahin,U.&Tureci,O. (2004) Cancer Res.64,5988-5993;Koslowski,M.,Tureci,O.,Bell,C,Krause,P.,Lehr,H.A.,Brunner,J.,Seitz,G.,Nestle,F.O.,Huber,C.&Sahin,U. (2002) Cancer Res.62,6750-6755;Koslowski,M.,Sahin,U.,Huber,C.&Tureci,O. (2006) Hum.Mol.Genet.15,2392-2399)。原则上,将GenBank的分级关键词检索与数字化的cDNA文库消减结合用于预测真正的胎盘特异性基因。GT468是通过该方法鉴定的。

[0455] 通过终点RT-PCR和定量实时RT-PCR在一整套正常和肿瘤组织标本中研究GT468mRNA。经证实,GT468的表达仅限于胎盘。在所有其它正常组织标本中,样品转录量低于或仅处于高灵敏度RT-PCR的检出限(图1A、B、C,表1)。唯一例外的是睾丸,然而其转录物水平低于胎盘中观察到水平的3~4个对数。

[0456] 表1.利用终点RT-PCR分类的GT468在组织和细胞系中的表达

[0457]

	GT468表达
正常组织	
睾丸	2/3
胎盘	3/3
脑	0/3
肺	0/3
乳房	0/3
结肠	0/3
肝	0/3
胃	0/3
肾	0/3
前列腺	0/3
胰腺	0/3
卵巢	0/3
脾	0/3
皮肤	0/2
心肌	0/2
子宫内膜	0/3
静息PBMC	0/3
增殖PBMC	1/6
小肠	0/3
胸腺	0/2
肾上腺	0/2

癌组织	
乳腺癌	44/62
肺癌	21/50
胃癌	18/31
卵巢癌	2/9
肝细胞癌	1/5
癌细胞系	22/40

[0458] 在覆盖了不同癌症类型的原发肿瘤样本的38% (86/225) 中以及肿瘤细胞系的55% (22/40) 中,发现了该基因的异常活化以及严格控制的转录。GT468的普遍程度和转录物水平在乳腺癌和乳腺癌细胞系中最高(图1A、B、C)。62个原发性乳腺癌样品中的44个(82%)呈GT468表达阳性(定义为超过非滋养层正常组织的背景至少100倍),其中24% (15/62)显示低表达(100~1000倍),40% (25/62)显示中度表达(1000~10000倍)以及17% (11/62)显示高表达(>10,000倍)(图1B)。此外,我们在50个肺癌样品中的21个(42%)以及在胃癌和卵巢癌中均发现了GT468转录物(表1)。GT468的产生与组织学亚型、肿瘤分期或肿瘤分级无关。

[0459] 使用实时RT-PCR,在40个循环的RT-PCR后,仅可在正常组织中检测出痕量的GT468转录本。超出表达截止值(虚线,所有正常组织的平均表达+3倍标准差(99%百分位数))的唯一正常组织是胎盘和睾丸(图20A)。除乳腺癌以外,我们发现GT468在来自肺癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌、肾细胞癌、肝癌、肉瘤、甲状腺癌和头颈癌的样品中高表达(图20B)。

[0460] 用GT468表达质粒转染的HEK293细胞(阳性对照)、SK-BR-3(乳腺癌)、BEWO(胎盘绒毛膜癌)、JAR(胎盘绒毛膜癌)、HCT-15(结肠癌)、LnCaP(前列腺癌)、HeLa(宫颈癌)、MDA-MB-468(乳腺癌)、JEG-3(胎盘绒毛膜癌)、JIMT-1(乳腺癌)、LA1-55n(神经母细胞瘤)、PC-3(前列腺癌)、BT-20(乳腺癌)和NCI-H929(骨髓瘤)中GT468表达的Western印迹分析证明了这些癌细胞系中GT468的表达(图21)。Me1H0(恶性黑色素瘤)和NUGC4(胃癌)被测试为阴性。

[0461] 实施例3:GT468位于癌细胞表面上,并且可接近抗体

[0462] 得到针对GT468特异性肽表位(SEQ ID NO:2的117-127位氨基酸)的多克隆兔抗体(兔抗GT468 C端)。通过使用小干扰RNA(siRNA)使GT468发生基因沉默来验证该抗体的特异性。为了排除siRNA的脱靶活性,使用两组GT468特异性siRNA双链体、乱序非沉默寡核苷酸和非转染的细胞进行实验。通过用这些siRNA双链体转染乳腺癌细胞系MCF-7和BT-549,得到了与对照相比组成型GT468mRNA表达稳定且可重复性减少80~90%的细胞系(图1D)。与该观察结果一致的是,在Western印迹分析中检测到的26kDa条带(与预测的GT468大小相符)在这两种细胞系中几乎完全消失(图1E),这印证了GT468蛋白表达的显著敲低以及抗体的特异性。

[0463] 使用兔抗GT468 C端抗体对原发性人体组织样品中的GT468蛋白进行的Western印迹染色证实了,该基因在乳腺癌标本中探测到的水平与其唯一表达之正常组织胎盘中的表达水平相当(图1F)。使用兔抗GT468 C端抗体对人乳腺肿瘤切片进行的免疫组化显示,在用RT-PCR检测呈GT468 mRNA表达阳性的标本中具有特异性免疫反应。染色仅限于肿瘤细胞群,而邻接的基质细胞和非肿瘤上皮细胞以及患者匹配的正常组织则没有反应(图1G)。对

肿瘤细胞的免疫染色在质膜处着色重,表明GT468是细胞表面蛋白。

[0464] 用计算机分析GT468蛋白质序列的拓扑结构,预测出疏水结构域覆盖5~22位氨基酸,其后是由23~212位氨基酸构成的大的细胞外结构域。GT468细胞外部分的29~119位氨基酸代表一个截短的透明带(ZP)结构域。该ZP域在多种细胞外暴露的受体样蛋白质中被发现,包括III型TGF- β 受体、尿调素(uromodulin)、糖蛋白GP2以及精子受体ZP2和ZP3(Bork, P.&Sander, C. (1992) FEBS Lett. 300, 237-240),并参与聚合反应(Jovine, L., Janssen, W.G., Litscher, E.S. & Wassarman, P.M. (2006) BMC Biochem. 7, 11)。通过用兔抗GT468 C端抗体进行染色的MCF-7和BT-549乳腺癌细胞进行免疫荧光显微镜观察,对组成型表达的GT468的亚细胞定位进行评估,其表位(117~127位氨基酸)位于该蛋白质预测的细胞外部分中。这两种细胞系显示细胞膜处不同的染色(图2A)。siRNA诱导GT468表达敲低后的信号丧失证实了染色的特异性。最重要地,特异性膜染色不仅在用甲醇固定的细胞中观察到,并且在未固定的天然细胞中也观察到(图2B),这表明抗体的表位无需穿透细胞膜便可接近,从而支持了羧基端在细胞外定位的所预测拓扑结构。

[0465] 实施例4: siRNA诱导的GT468基因沉默抑制了癌细胞的运动、迁移和侵入并阻止癌细胞增殖

[0466] 为了确定GT468在肿瘤细胞中的生物学意义,研究了其siRNA诱导的基因沉默对必要细胞功能的影响。

[0467] 首先,在transwell迁移测定中对乳腺癌细胞系MCF-7和BT-549进行了研究。通过向系统的上层和下层小室添加作为趋化剂的5%FCS所评估的两种细胞系的基线运动性(化动性)基本上被GT468特异性siRNA双链体所抑制(图3A)。同样,我们还观察到细胞定向趋化迁移能力的显著降低(图3B)。此外,细胞的化学侵入活性受到GT468 siRNA处理的显著影响,这是因为细胞无法穿过Matrigel屏障沿趋化剂梯度而迁移(图3C)。

[0468] 而后观察到,通过测量BrdU掺入DNA得到的肿瘤细胞增殖在含GT468特异性siRNA双链体的两种细胞中均减少了80~90%(图4A)。细胞周期分析揭示出转染GT468siRNA的细胞中特有的G1/S阻滞是导致增殖阻断的根本原因(图4B)。细胞的生存力并未受到影响,并且Annexin V染色并未指示细胞凋亡(图4C)。

[0469] 实施例5: 用抗GT468抗体处理癌细胞抑制细胞生长

[0470] 我们测量了与兔抗GT468 C端抗体和非反应性对照抗体孵育的MCF-7和BT-549细胞的增殖。靶向GT468导致对两个细胞系增殖的浓度依赖性的有效抑制(图5)。

[0471] 实例6: GT468之siRNA诱导的沉默和抗体诱导的功能拮抗的下游效应

[0472] 真核细胞的增殖和细胞周期是由细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)控制的。各周期蛋白在细胞周期的不同阶段通过激活一系列CDK的活性而发挥作用。限制点控制是由细胞周期蛋白D-和E-依赖性激酶家族介导的(Morgan, D.O. (1997) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13, 261-291; Sherr, C.J. (2000) Cancer Res. 60, 3689-3695)。为了研究GT468沉默是否通过改变细胞周期蛋白的表达来诱导所观察到的细胞周期失调,测定了用GT468siRNA处理过的乳腺癌细胞系MCF-7和BT-549中细胞周期蛋白D1、D2、D3和细胞周期蛋白E的表达。

[0473] 令人感兴趣的是,GT468敲低后,通过实时PCR检测到细胞周期蛋白D1转录物的显著降低(图6A)以及通过Western印迹检测细胞周期蛋白D1的蛋白水平显著降低(图6B)。而

其它所分析的细胞周期蛋白则未观察到转录水平的变化。

[0474] 已知细胞周期蛋白D1是细胞周期由G1向S发展的主要调节物。令人感兴趣的是,在突发性乳腺癌的肿瘤发生中,细胞周期蛋白D1的过表达被视为早期事件(Caldon,C.E.,Daly,R.J.,Sutherland,R.L.&Musgrove,E.A. (2006) *J.Cell Biochem.* 97,261-274;Sutherland,R.L.&Musgrove,E.A. (2004) *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 9,95-104)。D型细胞周期蛋白是不稳定的,其诱导、合成以及与其催化伴侣组装都依赖于持续的有丝分裂信号。因此,D型细胞周期蛋白可作为响应于细胞外因素的活性激酶形成的生长因子感应器(Sutherland,R.L.&Musgrove,E.A. (2004) *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 9,95-104;Sherr,C.J. (1993) *Cell* 73,1059-1065)。在乳腺癌中,已显示细胞周期蛋白D1的表达通过磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/AKT依赖性途径来控制(Sutherland,R.L.&Musgrove,E.A. (2004) *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 9,95-104;D'Amico,M.,Hulit,J.,Amanatullah,D.F.,Zafonte,B.T.,Albanese,C,Bouzahzah,B.,Fu,M.,Augenlicht,L.H.,Donehower,L.A.,Takemaru,K.等(2000) *J.Biol.Chem.* 275,32649-32657;Muis-Helmericks,R.C,Grimes,H.L.,Bellacosa,A.,Malstrom,S.E.,Tsichlis,P.N.&Rosen,N. (1998) *J.Biol.Chem.* 273,29864-29872)。AKT使糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)失活,从而提高了细胞周期蛋白D1的转录以及其蛋白水解周转及其在细胞核内的蛋白质水平(Sutherland,R.L.&Musgrove,E.A. (2004) *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 9,95-104,Diehl,J.A.,Cheng,M.,Roussel,M.F.&Sherr,C.J. (1998) *Genes Dev.* 12,3499-3511;Radu,A.,Neubauer,V.,Akagi,T.,Hanafusa,h.&Georgescu,M.M. (2003) *Mol.Cell Biol.* 23,6139-6149)。此外,AKT途径是癌细胞运动和迁移的重要调节物(Sutherland,R.L.&Musgrove,E.A. (2004) *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 9,95-104,Cantley,L.C. (2002) *Science* 296,1655-1657;Luo,J.,Manning,B.D.&Cantley,L.C. (2003) *Cancer Cell* 4,257-262),这是GT468明显参与的两种另外的细胞功能。这促使我们分析GT468是否在MCF-7和BT-549细胞中影响了AKT激酶的调控。

[0475] 在肿瘤细胞中常观察到AKT持续对PI3K过度活化的组成型磷酸化和高度活化。通过siRNA技术沉默GT468之后AKT Ser473磷酸化(pAKT)的水平以及使用抗GT468 C端抗体的功能拮抗均导致pAKT水平的显著减少,尤其是在MCF-7细胞中(图6C、D),这表明AKT激酶活化参与GT468下游效应的执行。令人感兴趣的是,在BT-549细胞中pAKT的下调并不明显,BT-549细胞缺乏PTEN并因此具有更高水平的PI3K过度活化。

[0476] 实施例7:GT468特异性单克隆抗体

[0477] 用与KLH偶联的肽免疫Ba1b/c或C57/BL6小鼠。在第1、15、45和86天腹膜内(i.p.)注射50 μ g肽和作为佐剂的50 μ l Montanide ISA50V。在第24、57和92天,通过肽特异性ELISA监测小鼠血清中针对GT468的抗体的存在情况。在脾切除之三天前对有可检测免疫应答的小鼠进行加强,从而产生单克隆抗体。

[0478] 使用具有SEQ ID NO:3-10序列的肽来得到产生单克隆抗体的杂交瘤生产。例如,使用SEQ ID NO:3的肽免疫得到杂交瘤4E9-1H9和9B6-2A9,使用SEQ ID NO:4的肽免疫得到杂交瘤59D6-2F2,使用SEQ ID NO:6的肽免疫得到杂交瘤61C11-2B5和78H11-1H6。

[0479] 进行肽特异性ELISA以确保单克隆抗体的特异性结合。杂交瘤上清液以1:5或1:10稀释测试针对用于免疫小鼠的各肽。作为对照,所有杂交瘤上清液均针对两种不相关的肽

进行测试。所有单克隆抗体仅与用于免疫小鼠的肽发生特异性反应(图7)。

[0480] 通过免疫荧光(IF)显微术分析单克隆抗体与全长GT468蛋白的结合特异性。转染GT468-eGFP融合构建体24小时后,CHO细胞用杂交瘤上清液(1:5稀释)染色。合并eGFP信号和第二抗小鼠抗体(Alexa555)的信号显示,染色只在GT468-eGFP转染细胞中显示,而未转染细胞为阴性(图8)。

[0481] 为了分析单克隆抗体结合GT468对癌细胞增殖的影响,将表达内源性GT468的癌细胞系BT-549、Caov-3、EF0-21、MCF-7以及MDA-MB-231与杂交瘤上清液(1:2稀释)孵育72小时。通过测量BrdU掺入DNA来测量细胞增殖。尽管单克隆抗体4E91H9在所使用浓度下没有改变细胞的增殖,但抗体9B62A9和59D62F2明显减少所分析的所有癌细胞系的增殖(图9)。

[0482] 因此,显示可产生选择性靶向细胞表达之GT468的单克隆抗体。此外,显示可产生抑制表达GT468之癌细胞增殖的针对GT468的单克隆抗体。

[0483] 实施例8:使用GT468 pcDNA3.1质粒免疫以及随后的肽/蛋白质注射来获得GT468特异性单克隆抗体

[0484] 在第1天和第15天,用GT468 pcDNA3.1质粒和作为佐剂的PEI甘露糖肌内(i.m.)免疫Balb/c或C57/BL6小鼠。之后在第30天和第45天注射50 μ g肽和作为佐剂的50 μ l Montanide ISA 50V(腹膜内)或者150 μ g蛋白质和弗氏不完全佐剂(IFA)(皮下)。通过肽特异性ELISA或CrELISA监测小鼠血清中针对GT468的抗体的存在情况。在脾切除之三天前对具有可检测免疫应答的小鼠进行加强,从而产生单克隆抗体。

[0485] 使用GT468DNA进行两倍肌内免疫,随后使用重组GT468蛋白进行两倍皮下施用,得到了杂交瘤22-1A-1、22-2A-1、22-9B-1、23-33A-1和23-19A-1。使用GT468DNA两倍肌内免疫,随后使用SEQ ID NO:10的肽进行两倍腹膜内施用,得到了杂交瘤F11#33F7D12。使用GT468DNA两倍肌内免疫,随后使用SEQ ID NO:3的肽两倍腹膜内施用,得到了杂交瘤4A12 2D4 1A10和4E9 1D12 2D4。

[0486] 下表列出了所获得的抗体及其同种型。

[0487] 表2.通过用GT468 DNA免疫随后注射肽/蛋白质所得到的单克隆抗体

[0488]

杂交瘤	同种型
22-1A-1	IgG2b
22-2A-1	IgG2b
22-9B-1	IgG2a
23-33A-1	IgG1
23-19A-1	IgG1
F11#33F7D12	IgG1
4A12 2D4 1A10	IgG1
4E9 1D12 2D4	IgG3

[0489] 进行粗裂解物ELISA(CrELISA)以确保来自杂交瘤22-1A-1、22-2A-1、22-9B-1、23-33A-1和23-19A-1的单克隆抗体的特异性结合。杂交瘤上清液针对转化有GT468 pQE表达载体的大肠杆菌的裂解物进行测试。作为对照,杂交瘤上清液针对转化有无插入物(模拟)pQE质粒的大肠杆菌的裂解物进行测试。所有的单克隆抗体仅特异性地与特定的GT468裂解物

反应(图10A)。

[0490] 进行肽特异性ELISA以确保来自杂交瘤F11#33F7D12、4A12 2D4 1A10和4E9 1D12 2D4的单克隆抗体的特异性结合。杂交瘤上清液针对用于免疫小鼠的肽进行测试。作为对照,杂交瘤上清液针对一种不相关的肽进行测试。单克隆抗体仅特异性地与用于免疫小鼠的肽反应(图10B)。

[0491] 单克隆抗体与全长GT468蛋白的特异性结合通过本文所述的流式细胞分析来进行分析。对于流式细胞分析单克隆抗体4E9 1D12 2D4来说,使用了转染效率约40%的瞬时转染HEK细胞。所有杂交瘤上清液均显示GT468转染细胞的特异性染色,而模拟转染的细胞则未被染色(图11)。

[0492] 通过Western印迹来分析单克隆抗体与全长GT468蛋白的特异性结合。所有杂交瘤上清液均显示与转染有GT468 pcDNA3.1的HEK293细胞裂解物的特异性反应,而模拟转染细胞的裂解物则无信号(图12;在模拟裂解物中杂交瘤上清液23-33A-1的微弱信号被认为是由HEK GT468裂解物溢出造成的)。

[0493] 进行肽ELISA以鉴定GT468蛋白中与单克隆抗体结合的表位。完整的GT468蛋白质序列由一组重叠11个氨基酸的51个重叠多肽合成(15聚体)。在ELISA中测试所有杂交瘤上清液与这些肽的特异性结合。作为对照,使用一种不相关的肽。所有上清液均显示特异性结合GT468肽。杂交瘤上清液22-1A-1、23-33A-1和23-19A-1均结合两个重叠的肽,暗示与GT468的线性表位反应。22-2A-1和22-9B-1的结合模式则较为复杂,这意味着与GT468蛋白的构象表位反应。

[0494] 为了分析单克隆抗体结合GT468对癌细胞增殖的影响,表达内源性GT468的癌细胞系SK-BR-3 (4A12 2D4 1A10)或MCF-7 (4E9 1D12 2D4)与纯化的杂交瘤上清液以图14中所示的浓度一起孵育72小时或120小时。通过BrdU掺入到DNA来测量细胞增殖。尽管不相关的对照单克隆抗体并未改变细胞的增殖,然而单克隆抗体4A12 2D4 1A10和4E9 1D12 2D4呈浓度依赖性地明显减少细胞增殖(图14)。

[0495] 实施例9:使用不同免疫策略获得的GT468特异性单克隆抗体

[0496] 如表3中所示免疫Balb/c或C57/BL6小鼠。肽:腹膜内(i.p.)注射50μg肽和作为佐剂的50μl Montanide ISA 50V。DNA:肌肉内(i.m.)注射25μg GT468质粒DNA与作为佐剂的PEI-甘露糖。重组蛋白:皮下(s.c.)注射150μg GT468蛋白和弗氏不完全佐剂(IFA)。细胞:腹膜内(i.p.)注射用GT468质粒DNA转染的 $1-2 \times 10^7$ 个HEK293细胞。通常,每隔一周给予免疫原。在脾切除之三天前对具有可检测免疫应答的小鼠进行加强,以产生单克隆抗体。

[0497] 表3. 免疫方案

[0498]

克隆	1. 免疫	2. 免疫	3. 免疫	4. 免疫	5. 免疫	6. 免疫	加强
42B11 1C11 2B2	KLH 偶联肽 (Seq_ID80)	KLH 偶联肽 (Seq_ID80)	KLH 偶联肽 (Seq_ID80)	KLH 偶联肽 (Seq_ID80)			肽 (Seq_ID80)
51G6 2H3 2B4 1E3	KLH 偶联肽 (Seq_ID80)	KLH 偶联肽 (Seq_ID80)	KLH 偶联肽 (Seq_ID80)	KLH 偶联肽 (Seq_ID80)			肽 (Seq_ID80)
78H11 1H6	KLH 偶联肽 (Seq_ID81)	KLH 偶联肽 (Seq_ID81)	KLH 偶联肽 (Seq_ID81)	KLH 偶联肽 (Seq_ID81)			肽 (Seq_ID81)
16-5B-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +CpG (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID84) +CpG (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID84) +CpG (Seq_ID83)	重组 GT468 蛋白 (Seq_ID87)			重组 GT468 蛋白 (Seq_ID87)
20-11A-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	重组 GT468 蛋白 (Seq_ID87)	重组 GT468 蛋白 (Seq_ID87)		重组 GT468 蛋白 (Seq_ID87)
22-1A-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖				重组 GT468 蛋白 (Seq_ID87)
29-1A-2	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	重组 GT468 蛋白 (Seq_ID87)	重组 GT468 蛋白 (Seq_ID87)		用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID84)
29-8B-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖				
35-48B-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID84)	重组 GT468 蛋白 (Seq_ID87)		混合物 (Seq_ID57-71)
35-50A-2a	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖				
38-1A-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID86)			用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)
38-10B-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖				
44-3A-2	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)			用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)
45-2A-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)			用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)
45-8A-2	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖				
48-3B-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)			用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)
48-4A-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖				
49-3A-1	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID85) +PEI-甘露糖	用 GT468 DNA 转染 的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)		用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)
49-8A-1	KLH 偶联肽 (Seq_ID82)	KLH 偶联肽 (Seq_ID82)					用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)
51-1A-1							
53-13A-2	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID84) +PEI-甘露糖	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83) (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83) (Seq_ID83)	用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)
53-29A-1	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)			用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)
54-4B-2	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)			用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)
56-4A-2	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	GT468 DNA (Seq_ID85) +CpG (Seq_ID83)	用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)			用 GT468 DNA 转染的 HEK293 细胞 (Seq_ID85)

[0499] 下表列出获得的抗体及其同种型。

[0500] 表4. 使用不同免疫策略获得的单克隆抗体

[0501]

杂交瘤	同种型
42H11 1C11 2B2	IgG2b
51G6 2H3 2B4	IgG1
16-5B-1	IgG2a
20-11A-1	IgG2a
29-1A-2	IgG1
29-8B-1	IgG1
35-48B-1	IgG3
35-50A-2a	IgG2a
38-10B-1	IgG2b
38-1A-1	IgG2b
44-3A-2	IgG2a
45-2A-1	IgG2b
45-8A-2	IgG1
48-3B-1	IgG3
48-4A-1	IgG3
49-3A-1	IgG2a
49-8A-1	IgG1
51-1A-1	IgG2a
53-13A-2	IgG2a
53-29A1	IgG2b
54-4B-2	IgG2b
56-4A-2	IgG2a

[0502] 使用这些抗体和分别在实施例7和8中获得的另外两种抗体78H11 1H6 (同种型: IgG1) 和22-1A-1 (同种型: IgG2b) 进行进一步的测试。

[0503] 使用图13和25中所示具有11个氨基酸重叠的51个重叠肽 (15聚体) 的集合进行肽特异性ELISA, 来鉴定单克隆抗体所结合的GT468蛋白表位。在ELISA中将每种纯化的杂交瘤上清液测试与所有肽的特异性结合。使用无关的肽作为对照。

[0504] 如表5中所示, 15种上清液显示对GT468肽的特异性结合。在这15种上清液中, 13种上清液与1种肽结合, 或与2或3种邻近的肽结合, 提示识别了GT468的线性表位, 2种上清液与至少部分不邻近的肽结合, 提示表位的线性/构象限定。在肽特异性ELISA中, 9种上清液未显示与GT468肽的特异性结合, 但在FACS或IF中显示结合, 提示与GT468的非线性构象表位的反应性。

[0505] 表5. 在肽特异性ELISA中测试单克隆抗体

[0506]

杂交瘤	反应性 (肽)
42H11 1C11 2B2	47, 48
51G6 2H3 2B4	47, 48

78H11 1H6	50,51
16-5B-1	47,48
20-11A-1	47,48
22-1A-1	50,51
29-1A-2	27,29,30
29-8B-1	49-51
35-48B-1	13
35-50A-2a	阴性
38-10B-1	阴性
38-1A-1	阴性
44-3A-2	31,32
45-2A-1	阴性
45-8A-2	阴性
48-3B-1	阴性
48-4A-1	阴性

[0507]

49-3A-1	29-31
49-8A-1	37,38
51-1A-1	36,37
53-13A-2	33,34
53-29A-1	阴性
54-4B-2	34,37
56-4A-2	阴性

[0508] 通过流式细胞术分析来分析来自杂交瘤的单克隆抗体对GT468的特异性结合。用经FPLC纯化的杂交瘤上清液 (5 μ g/ml) 对稳定转染有pDisplay-GT468aa116-212的天然的、未固定的HEK293细胞或模拟转染的细胞进行染色。在质粒pDisplay-GT468aa116-212中, GT468的116-212位氨基酸在C端与PDGF受体跨膜结构域融合。该构建体确保在细胞膜上稳定表达GT468的116-212位氨基酸。在未固定的状态下用上清液染色细胞, 检测其与天然构象GT468的结合。杂交瘤上清液显示对用GT468转染之细胞的特异性染色, 而对模拟转染的细胞未观察到染色 (图15)。

[0509] 通过流式细胞术分析来分析来自杂交瘤的单克隆抗体对内源表达GT468的未固定肿瘤细胞的特异性结合。使用MCF-7、MDA-MB-468和SK-BR-3乳腺癌细胞作为内源性表达GT468的肿瘤细胞, 使用不表达GT468的NUG-C4胃癌细胞作为阴性对照。用经FPLC纯化的杂交瘤上清液 (5 μ g/ml) 染色天然的未固定细胞。杂交瘤上清液显示对表达GT468之癌细胞程度不同的特异性染色。但是对一些上清液而言, 细胞群被显著染色 (42H11 1C11 2B2、22-1A-1、35-50A-2a、54-4B-2), 对其他上清液而言仅一个亚群 (约5%的细胞) 是阳性的 (图16)。这指出与强表达的亚群的结合。结果证明抗体能够与表达GT468的肿瘤细胞结合。

[0510] 通过Western印迹分析杂交瘤上清液中单克隆抗体与全长GT468蛋白的特异性结合。经FPLC纯化的杂交瘤上清液 (5 μ g/ml) 显示与用GT468表达质粒转染的HEK293细胞裂解

物的特异性反应性,而模拟转染细胞的裂解物显示无信号,证实与GT468的结合是特异性的(图17、23)。

[0511] 在增殖实验中分析来自杂交瘤上清液的单克隆抗体的增殖抑制活性(图18、22)。将内源表达GT468的乳腺癌细胞(SK-BR-3、MDA-MB-468、MCF-7)和GT468阴性的Me1Ho黑素瘤细胞或NUGC4胃癌细胞接种于96孔板中(5000个细胞/孔),并与指定浓度的经FPLC纯化的杂交瘤上清液一起孵育。72小时后,通过掺入DNA的BrdU来测量细胞增殖。将所有数值针对未与杂交瘤上清液孵育的对照细胞进行归一化。在Me1Ho或NUGC4对照细胞中未观察到增殖抑制。杂交瘤上清液显示以浓度依赖性方式对表达GT468的乳腺癌细胞具有程度不同的特异性增殖抑制活性。一些抗体(35-48B-1、48-3B-1、51-1A-1、56-4A-2)显示对测试的所有GT468阳性细胞系都有显著影响。

[0512] 进行克隆形成实验来分析来自杂交瘤的单克隆抗体对内源性表达GT468的SK-BR-3细胞集落形成的抑制活性。将细胞接种于48孔板中(3000个细胞/孔)并与经FPLC纯化的杂交瘤上清液(45 μ g/ml)一起孵育。用戊二醛固定在14天时间段中生长的集落,并用结晶紫染色进行视觉评价。将细胞与抗体一起孵育减少或抑制了集落形成(图19)。如果个体肿瘤细胞在器官中定殖,则集落形成对转移的形成是重要的。抗体的抑制活性指出它们阻抑转移形成的潜力。

[0513] 实施例10:抗GT468单克隆抗体处理减弱了裸鼠中的异种移植肿瘤生长

[0514] 将GT468阳性BEWO胎盘绒毛膜癌细胞皮下注射进裸鼠中,并用纯化的GT468单克隆抗体处理动物。图24证实,抗GT468单克隆抗体处理减弱了裸鼠中BEWO胎盘绒毛膜癌异种移植肿瘤的生长。

[0515] 实施例11:抗GT468单克隆抗体处理减少了裸鼠肺中的转移肿瘤负荷

[0516] 将MCF-7细胞静脉内注射进通过17 β -雌二醇长期释放丸皮下植入进行了预处理的裸鼠中,并用纯化的GT468单克隆抗体处理动物。注射后五周,用于对无胸腺小鼠肺中的肿瘤负荷进行定量的实时PCR显示,用抗GT468单克隆抗体处理的小鼠肺中的转移肿瘤负荷显著减少(图26)。

[0517] 以下内容对应于母案申请中的原始权利要求书,现作为说明书的一部分并入此处:

[0518] 1.能够与GT468结合并具有一种或多种以下活性的抗体:

[0519] (i) 杀死表达GT468的肿瘤细胞,

[0520] (ii) 抑制表达GT468的肿瘤细胞的增殖,

[0521] (iii) 抑制表达GT468的肿瘤细胞的集落形成,和

[0522] (iv) 抑制表达GT468的肿瘤细胞的转移。

[0523] 2.项1所述的抗体,其中所述一种或多种活性通过所述抗体与所述细胞所表达GT468之胞外结构域的结合来诱导。

[0524] 3.项1或2所述的抗体,其中所述表达GT468的肿瘤细胞是癌细胞。

[0525] 4.项3所述的抗体,其中所述癌细胞来自于选自以下的癌症:乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌尤其是肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式,和肺中的转移癌。

[0526] 5. 项1至4中任一项所述的抗体,其是单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体或人源化抗体,或者抗体片段。

[0527] 6. 项1至5中任一项所述的抗体,其中GT468具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0528] 7. 项1至6中任一项所述的抗体,其中所述抗体与GT468特异性结合。

[0529] 8. 项1至7中任一项所述的抗体,其与GT468的天然表位结合。

[0530] 9. 项1至8中任一项所述的抗体,其可通过包括以下步骤的方法来获得:用含有选自SEQ ID NO:2-10和35-82之氨基酸序列的蛋白质或肽或者其免疫原性片段或衍生物、或者表达所述蛋白质或肽或者其免疫原性片段或衍生物的核酸或宿主细胞来免疫动物。

[0531] 10. 选自以下的抗体:

[0532] (i) 由以如下登记号保藏的克隆所产生的或可由所述克隆获得的抗体:

[0533] DSM ACC2822 (4E9-1H9), DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2), DSM ACC2825 (61C11-2B5), DSM ACC2823 (78H11-1H6), DSM ACC2895 (22-1A-1), DSM ACC2893 (22-2A-1), DSM ACC2896 (22-9B-1), DSM ACC2897 (23-33A-1), DSM ACC2891 (23-19A-1), DSM ACC2894 (F11#33F7D12), DSM ACC2892 (4A12 2D4 1A10), DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4), DSM ACC2961 (42H11 1C11 2B2), DSM ACC2962 (51G6 2H3 2B4), DSM ACC2943 (16-5B-1), DSM ACC2956 (20-11A-1), DSM ACC2947 (29-1A-2), DSM ACC2964 (29-8B-1), DSM ACC2959 (35-48B-1), DSM ACC2963 (35-50A-2a), DSM ACC2957 (38-10B-1), DSM ACC2958 (38-1A-1), DSM ACC2948 (44-3A-2), DSM ACC2949 (45-2A-1), DSM ACC2950 (45-8A-2), DSM ACC2951 (48-3B-1), DSM ACC2952 (48-4A-1), DSM ACC2946 (49-3A-1), DSM ACC2945 (49-8A-1), DSM ACC2944 (51-1A-1), DSM ACC2953 (53-13A-2), DSM ACC2955 (53-29A-1), DSM ACC2960 (54-4B-2), DSM ACC2954 (56-4A-2), or DSM ACC3001 (62-9B-1),

[0534] (ii) 作为(i)所述抗体的嵌合或人源化形式的抗体,

[0535] (iii) 具有(i)所述抗体的特异性的抗体,和

[0536] (iv) 包含(i)所述抗体的抗原结合部分或抗原结合位点的抗体。

[0537] 11. 项10所述的抗体,其中(i)所述抗体的抗原结合部分或抗原结合位点包含(i)所述抗体的可变区。

[0538] 12. 能够产生项1至11中任一项所述抗体的杂交瘤。

[0539] 13. 以如下登记号保藏的杂交瘤: DSM ACC2822 (4E9-1H9), DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2), DSM ACC2825 (61C11-2B5), DSM ACC2823 (78H11-1H6), DSM ACC2895 (22-1A-1), DSM ACC2893 (22-2A-1), DSM ACC2896 (22-9B-1), DSM ACC2897 (23-33A-1), DSM ACC2891 (23-19A-1), DSM ACC2894 (F11#33F7D12), DSM ACC2892 (4A12 2D4 1A10), DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4), DSM ACC2961 (42H11 1C11 2B2), DSM ACC2962 (51G6 2H3 2B4), DSM ACC2943 (16-5B-1), DSM ACC2956 (20-11A-1), DSM ACC2947 (29-1A-2), DSM ACC2964 (29-8B-1), DSM ACC2959 (35-48B-1), DSM ACC2963 (35-50A-2a), DSM ACC2957 (38-10B-1), DSM ACC2958 (38-1A-1), DSM ACC2948 (44-3A-2), DSM ACC2949 (45-2A-1), DSM ACC2950 (45-8A-2), DSM ACC2951 (48-3B-1), DSM ACC2952 (48-4A-1), DSM ACC2946 (49-3A-1), DSM ACC2945 (49-8A-1), DSM ACC2944 (51-1A-1), DSM ACC2953 (53-13A-2), DSM ACC2955 (53-29A-1), DSM ACC2960 (54-4B-2), DSM ACC2954 (56-4A-2) 或 DSM ACC3001 (62-9B-1)。

- [0540] 14. 缀合物,其包含与治疗剂偶联的项1至11中任一项所述抗体。
- [0541] 15. 项14的缀合物,其中所述治疗剂是毒素、放射性同位素、药物或细胞毒剂。
- [0542] 16. 药物组合物,其包含项1至11中任一项所述抗体和/或项14或15的缀合物,以及可药用载体。
- [0543] 17. 抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的生长的方法,其包括使所述细胞接触项1至11中任一项所述抗体和/或项14或15的缀合物。
- [0544] 18. 杀死表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的方法,其包括使所述细胞接触有效量的项1至11中任一项所述之抗体和/或项14或15的缀合物。
- [0545] 19. 抑制表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞的转移性传播的方法,其包括使所述细胞接触有效量的项1至11中任一项所述之抗体和/或项14或15的缀合物。
- [0546] 20. 治疗或预防对象中与表达GT468和/或特征在于其细胞表面与GT468缔合之细胞有关的疾病或病症的方法,其包括向所述对象施用项1至11中任一项所述的抗体、项14或15的缀合物或项16的药物组合物。
- [0547] 21. 项20的方法,其中所述疾病或病症是肿瘤相关疾病。
- [0548] 22. 项21的方法,其中所述肿瘤相关疾病是癌症。
- [0549] 23. 项22所述的方法,其中所述癌症选自乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌尤其是肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌,及其转移形式,和肺中的转移癌。
- [0550] 保藏微生物或其他生物材料的证明
- [0551] (PCT细则13bis)

[0552]

A. 以下证明涉及说明书中第 19 页, 第 2 行提及的保藏微生物或其它生物材料。	
B. 保藏物识别 其它保藏物的识别请见附页 ☒	
保藏机构名称 德国微生物菌种保藏中心	
保藏机构地址 (包括邮编及国家) Inhoffenstr. 7 B 38124 Braunschweig DE	
保藏日期 2007 年 3 月 13 日	登记号 DSM ACC2822
C. 额外指示(如不适用可空) 该信息在附页上 ☐	
-小鼠 (<i>Mus musculus</i>) 骨髓瘤 P3X63Ag8U.1 与小鼠脾细胞融合 -分泌抗人 GT468 抗体的杂交瘤	
D. 指示所针对的指定国 (如果该指示不针对所有指定国)	
E. 备注(如不适用则可不填) 下面列出的指示将被随后提交给国际局 (指明该指示的一般性质, 例如“保藏物登记号”)	
(仅限受理局使用)	(仅限国际局使用)
☒ 该页与国际申请一起受理	☐ 该页由国际局受理:
被授权官员 Wallentin, Marko	被授权官员

[0553] 表PCT/RO/134 (1998年7月;2004年1月重印)

[0554] 生物材料的附加页

[0555] 其他保藏物的标识

[0556] 1) 保藏机构的名称和地址:

[0557] 德国微生物菌种保藏中心

[0558] Inhoffenstr.7B

[0559] 38124 Braunschweig

[0560] DE

[0561]

保藏日期	登记号	以下指示涉及所保藏微生物在如下页中有所描述
2007 年 3 月 13 日	DSM ACC2826	第 19 页
2007 年 3 月 13 日	DSM ACC2824	第 19 页
2007 年 3 月 13 日	DSM ACC2825	第 19 页
2007 年 3 月 13 日	DSM ACC2823	第 19 页
2008 年 3 月 11 日	DSM ACC2895	第 19 页
2008 年 3 月 11 日	DSM ACC2893	第 19 页
2008 年 3 月 11 日	DSM ACC2896	第 19 页
2008 年 3 月 11 日	DSM ACC2897	第 19 页
2008 年 3 月 11 日	DSM ACC2891	第 19 页
2008 年 3 月 11 日	DSM ACC2894	第 19 页
2008 年 3 月 11 日	DSM ACC2892	第 19 页
2008 年 3 月 11 日	DSM ACC2898	第 19 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2961	第 19 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2962	第 19 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2943	第 19 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2956	第 19 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2947	第 19 页
2008 年 9 月 2 日	DSM ACC2964	第 19 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2959	第 19 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2963	第 19 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2957	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2958	第 20 页

[0562]

2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2948	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2949	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2950	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2951	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2952	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2946	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2945	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2944	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2953	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2955	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2960	第 20 页
2008 年 9 月 1 日	DSM ACC2954	第 20 页
2009 年 7 月 16 日	DSM ACC3001	第 20 页

[0563] 针对上述保藏物的额外指示

[0564] -小鼠 (*Mus musculus*) 骨髓瘤P3X63Ag8U.1或P3X63Ag8.653 (对于DSM ACC2954和DSM ACC3001) 与小鼠的脾细胞融合

[0565] -分泌抗人GT468抗体的杂交瘤

[0566] 2) 保藏人

[0567] 所有上述保藏物均由以下单位制备:

[0568] 加尼梅德药物公司

[0569] Freiligrathstraße 12

[0570] 55131 Mainz

[0571] DE

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

<120> 用于治疗癌症的单克隆抗体

<130> 342-46PCT

<150> EP 08016277.9

<151> 2008-09-16

<150> US 61/097,453

<151> 2008-09-16

<160> 89

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1126

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

[0001]

```

atatatcaga ccatacagaag gatttgtata aagagtgaact ctccatatgaa ggtaaaggcc      60
acccctcttcc agttccagtg actgagatac atttttccaa tcttgggggc aaatacagac      120
acagcaagtt ccttcttccc ttggaaatt tggeagctgc cttcaccagt gagcacaag      180
ccacatttca aaggaaactg acaaattatc ccagctgccc agaagaagaa atcctcactg      240
gacggcttcc tgtttcctgt ggttcattat ctgattggct gcagggatga aagtttttaa      300
gttcatagga ctgatgatcc tectcaoctc tgcgttttca gccggttcag gacaaagtc      360
aatgactgtg ctgtgtctca tagactgggt catggtcaca gtgcacccct tcatgtctaa      420
caacgatgtg tgtgtacact ttcatgaact acacttgggc ctgggttgcc ccccaaacca      480
tgttcagcca cagcctacc agttcaccta cctgtttact gaatgtggca tcagggccaa      540
agctgtctct caggacatgg ttatctacag cactgagata cactactctt ctaagggcac      600
gccatctaag tttgtgatcc cagtgtcatg tgctgcccc caaaagtccc catggctcac      660
caagccctgc tccatgagag tagccagcaa gagcagggcc acagcccaga aggatgagaa      720
atgctacgag gtgttcagct tgtcacagtc cagtcaaagg cccaactgcg attgtccacc      780
ttgtgtcttc agtgaagaag agcataccca ggtcccttgt caccaagcag gggctcagga      840
ggctcaacct ctgcagccat ctcactttct tgatatttct gaggatttgt ctcttcacac      900
agatgatatg attgggtcca tgtgatcctc aggtttgggg tctcctgaag atgctatttc      960
tagaattagt atatagtgt caaatgtctg acaaataagt gctcttgtga cctcatgtg      1020
agcacttttg agaaagagaa acctatagca acttcatgaa ttaagccttt ttctatatct      1080
ttatattoat gtgtaaacaa aaaataaaaat aaaattctga tcgcat      1126

```

<210> 2

<211> 212
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Lys Val Phe Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala
 1 5 10 15

Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile
 20 25 30

Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val
 35 40 45

Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn
 50 55 60

His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys
 65 70 75 80

Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr
 85 90 95

[0002]

Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro
 100 105 110

Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys
 115 120 125

Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu
 130 135 140

Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn
 145 150 155 160

Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val
 165 170 175

Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser
 180 185 190

His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met
 195 200 205

Ile Gly Ser Met
 210

<210> 3
 <211> 12

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> Description of 人工的 sequence: Peptide for Immunization

<400> 3

Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

<400> 4

Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp
1 5 10

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

[0003] <220>
<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

<400> 5

Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

<400> 6

Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met
1 5 10

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

<400> 7

Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu
1 5 10 15

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

<400> 8

Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly
1 5 10

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

<400> 9

Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val Ser Cys
1 5 10 15

[0004]

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

<400> 10

Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys
1 5 10

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: siRNA

<400> 11
ccaugagagu agccagcaat t

21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> 人工序列描述: siRNA	
	<400> 12	
	uugcuggcua cucucaugga g	21
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: siRNA	
	<400> 13	
	gguucaggac aaaguccaat t	21
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: siRNA	
	<400> 14	
	uuggacuuug uccugaaccg g	21
[0005]	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 15	
	aaatttgga gctgccttca c	21
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 16	
	tgatgccaca ttcagtaaca c	21
	<210> 17	
	<211> 326	
	<212> PRT	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译	
	<400> 17	

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

[0006]

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 18

[0007]

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 19
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>

<223> 人工序列描述: PCR产物	
<400> 19	
cgtaacggagg ctgcaccatc tgtcttcac ttcocgccat ctgatgagca gttgaaatct	60
ggaaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag	120
tggaaggttg ataacgcct ccaatcgggt aactccagg agagtgtcac agagcaggac	180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acocctgacgc tgagcaaagc agactacgag	240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag	300
agcttcaaca ggggagagtg ttag	324
<210> 20	
<211> 981	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工序列描述: PCR产物	
<400> 20	
ggcccatcgg tcttccccct ggcacccctc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	60
ctgggctgac tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc	120
gcocctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	180
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac	240
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac	300
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	360
ctcttcccc caaaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	420
gtggtggtg acgtgagcca cgaagacoc tgggtcaagl tcaactggta cgtggacggc	480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	540
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	600
aaggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	660
cagcccccag aaaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatgc cgtggagtgg	780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccggtgt ggactccgac	840
ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	900
gttttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	960
tccctgtctc cgggtaaatg a	981
<210> 21	
<211> 324	
<212> DNA	
<213> 人工的	

<220>
 <223> 人工序列描述: 经密码子优化的核酸
 <400> 21
 cgtacggtgg ccgctcccag cgtgttcac ttcccccca gcgacgagca gctgaagtcc 60
 ggcaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggc caaggtgcag 120
 tggaaggtgg acaacgocct gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac 180
 agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgaccc tgagcaaggc cgactacgag 240
 aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag 300
 agcttcaaca ggggcgagtg ctag 324

<210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 经密码子优化的蛋白质

<400> 22
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

[0009]

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 23
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 经密码子优化的核酸

<400> 23
 ggcccaagcg tgttccccct ggccccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc 60
 ctgggctgcc tggatgaagga ctacttcccc gagcccgatga ccgtgagctg gaacagcgga 120
 gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc 180
 ctgagcagcg tggatgacct gccagcagc agcctgggca ccagaccta catctgcaac 240
 gtgaaccaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac 300
 aagaccaca cctgcccccc ctgcccagcc ccagagctgc tgggcggacc cagcgtgttc 360
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggaggtgc acaacgcca gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 540
 gtggtgtccc tgctgacctg gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 660
 cagccacggg agccccaggt gtacacctg cccccagcc gggaggagat gaccaagac 720
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg 780
 gagagcaacg gccagccga gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac 840
 ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac 900
 [0010] gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccttg 960
 agcctgagcc ccggcaagta g 981

<210> 24
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 经密码子优化的蛋白质

<400> 24

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 35 40 45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 50 55 60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 65 70 75 80

```

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
      85                      90                      95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
      100                    105                    110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
      115                    120                    125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
      130                    135                    140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
      145                    150                    155                    160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
      165                    170                    175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
      180                    185                    190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
      195                    200                    205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
      210                    215                    220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
      225                    230                    235                    240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
      245                    250                    255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
      260                    265                    270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
      275                    280                    285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
      290                    295                    300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
      305                    310                    315                    320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325

```

[0011]

	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 25	
	tgacactggc aaaacaatgc a	21
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 26	
	ggtccttttc accagcaagc t	21
	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
[0012]	<220>	
	<223> 人工序列描述: sirna	
	<400> 27	
	uaacuguaaa aucgacuagt t	21
	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: sirna	
	<400> 28	
	cuagucgauu auacaguuag a	21
	<210> 29	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽	
	<400> 29	
	Met Lys Val Phe Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser	
	1 5 10 15	

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 30

Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 31

Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln
 1 5 10 15

[0013]

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 32

Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 33

Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 34
 Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe
 1 5 10 15

 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

 <400> 35
 Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val
 1 5 10 15

 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

 <400> 36
 Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met
 1 5 10 15
 [0014]

 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

 <400> 37
 Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp
 1 5 10 15

 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

 <400> 38
 Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val Cys Val His
 1 5 10 15

 <210> 39
 <211> 15

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 39

Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val Cys Val His Phe His Glu Leu
1 5 10 15

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 40

Asn Asn Asp Val Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu
1 5 10 15

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

[0015] <220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 41

Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro
1 5 10 15

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 42

His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn His Val Gln
1 5 10 15

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 43

Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn His Val Gln Pro His Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 44

Cys Pro Pro Asn His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr
1 5 10 15

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 45

His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu
1 5 10 15

[0016]

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 46

His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg
1 5 10 15

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 47

Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val
1 5 10 15

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 48

Val	Thr	Glu	Cys	Gly	Ile	Arg	Ala	Lys	Ala	Val	Ser	Gln	Asp	Met
1				5					10				15	

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 49

Gly	Ile	Arg	Ala	Lys	Ala	Val	Ser	Gln	Asp	Met	Val	Ile	Tyr	Ser
1				5					10				15	

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

[0017] <400> 50

Lys	Ala	Val	Ser	Gln	Asp	Met	Val	Ile	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ile	His
1				5					10				15	

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 51

Gln	Asp	Met	Val	Ile	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ile	His	Tyr	Ser	Ser	Lys
1				5					10				15	

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 52

Ile	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ile	His	Tyr	Ser	Ser	Lys	Gly	Thr	Pro	Ser
1				5					10				15	

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 53

Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile
1 5 10 15

<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 54

Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val Ser Cys
1 5 10 15

[0018]

<210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 55

Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln
1 5 10 15

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 56

Phe Val Ile Pro Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp
1 5 10 15

<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 57

Val	Ser	Cys	Ala	Ala	Pro	Gln	Lys	Ser	Pro	Trp	Leu	Thr	Lys	Pro
1				5					10					15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 58

Ala	Pro	Gln	Lys	Ser	Pro	Trp	Leu	Thr	Lys	Pro	Cys	Ser	Met	Arg
1				5					10					15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

[0019] <400> 59

Ser	Pro	Trp	Leu	Thr	Lys	Pro	Cys	Ser	Met	Arg	Val	Ala	Ser	Lys
1				5					10					15

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 60

Thr	Lys	Pro	Cys	Ser	Met	Arg	Val	Ala	Ser	Lys	Ser	Arg	Ala	Thr
1				5					10					15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 61

Ser	Met	Arg	Val	Ala	Ser	Lys	Ser	Arg	Ala	Thr	Ala	Gln	Lys	Asp
1				5					10					15

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 62

Ala	Ser	Lys	Ser	Arg	Ala	Thr	Ala	Gln	Lys	Asp	Glu	Lys	Cys	Tyr
1				5					10					15

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 63

Arg	Ala	Thr	Ala	Gln	Lys	Asp	Glu	Lys	Cys	Tyr	Glu	Val	Phe	Ser
1				5					10					15

[0020]

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 64

Gln	Lys	Asp	Glu	Lys	Cys	Tyr	Glu	Val	Phe	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser
1				5					10					15

<210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 65

Lys	Cys	Tyr	Glu	Val	Phe	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro
1				5					10					15

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 66

Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys
1 5 10 15

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 67

Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val
1 5 10 15

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 68

[0021]

Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu
1 5 10 15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 69

Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln
1 5 10 15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 70

Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro Cys His
1 5 10 15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 71

Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro Cys His Gln Ala Gly Ala
1 5 10 15

<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 72

His Thr Gln Val Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln
1 5 10 15

<210> 73
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

[0022]

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 73

Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro
1 5 10 15

<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 74

Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu
1 5 10 15

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 75

Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu
1 5 10 15

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 76

Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu
1 5 10 15

<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 77

His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp
1 5 10 15

[0023]

<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 78

Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser
1 5 10 15

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 用于筛选的肽

<400> 79

Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met
1 5 10 15

<210> 80
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

<400> 80

Cys Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp
 1 5 10

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

<400> 81

Cys Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met
 1 5 10

<210> 82

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于免疫的肽

[0024] <400> 82

Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys
 1 5 10 15

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Cys
 20 25

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于免疫的寡核苷酸

<400> 83

tccatgacgt tccatgacgt

20

<210> 84

<211> 639

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 经优化的质粒插入片段

<400> 84

```

atgaagggtgt tcaagttcat cggcctgatg atcctgctga ccagcgcctt cagcgccggc 60
agcgggccaga gcccctatgac cgtgctgtgc agcatcgact ggttcatggt gaccgtgcac 120
cccttcatgc tgaacaacga cgtgtgcgtg cacttccacg agctgcacct gggcctgggc 180
tgccctccca accacgtgca gcccacgac taccagttca cctaccgggt gaccgagtgc 240
ggcatccggg ccaaggccgt gagccaggac atggtgatct acagcaccga gatecactac 300
agcagcaagg gcacccccag caagttcgtg atccccgtga gctgtgccgc cctcagaag 360
agccctgggc tgaccaagcc ctgcagcatg cgggtggcca gcaagagccg ggccaccgcc 420
cagaaagacg agaagtgcta cgagggttgc agcctgagcc agagcagcca gcggcccaac 480
tgcgactgcc cccctgctgt gttcagcgag gaagagcaca cccaggtgcc ctgccaccag 540
gccggagccc aggaagccca gccctgcag ccagccact tcttgacat cagcgaggac 600
tggtccctgc acaccgacga catgatcggc agcatgtga 639

```

<210> 85
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 经优化的质粒插入片段

[0025]

```

<400> 85
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gactatccat atgatgttcc agattatgct gggggcccagc cggccagatc tgccgcccct 120
cagaagagcc cctggctgac caagccctgc agcatgcggg tggccagcaa gagccgggcc 180
accgcccaga aagacgagaa gtgctacgag gtgttcagcc tgagccagag cagccagcgg 240
cccaactgcg actgcccccc ctgcgtgttc agcgaggaag agcacaccca ggtgccttgc 300
caccaggtag acgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatgctgt gggccaggac 360
acgcaggagg tcctcgtggt gccacaactcc ttgcccttta aggtggtggt gatctcagcc 420
atcctggccc tggtggtgct caccatcacc tcccttacc tccatcatc gctttggcag 480
aagaagccac gtttag 495

```

<210> 86
 <211> 588
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工序列描述: 经优化的质粒插入片段

```

<400> 86
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gactatccat atgatgttcc agattatgct gggggcccagc cggccagatc tgccgcccct 120

```

```

cagaagagcc cctggctgac caagccctgc agcatgcggg tggccagcaa gagccgggcc 180
accgcccaga aagacgagaa gtgctacgag gtgttcagcc tgagccagag cagccagcgg 240
cccaactgcg actgcccccc ctgcgtgttc agcgaggaag agcacacca ggtgccctgc 300
caccaggccg gagcccagga agcccagccc ctgcagccca gccacttcct ggacatcagc 360
gaggactggt cctgcacac cgacgacatg atcggcagca tggtcgacga acaaaaactc 420
atctcagaag aggatctgaa tgctgtgggc caggacacgc aggaggtcat cgtggtgcc 480
cactccttgc cctttaaggt ggtggtgatc tcagccatcc tggccctggt ggtgctcacc 540
atcatctccc ttatcatcct catcatgctt tggcagaaga agccacgtta g 591

```

<210> 87

<211> 579

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列描述: 用于免疫的重组蛋白

<400> 87

```

Met Ser Gly Ser His His His His His His Ser Ser Gly Met His Lys
1          5          10          15

```

[0026]

```

Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr
20          25          30

```

```

Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile
35          40          45

```

```

Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln
50          55          60

```

```

Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Gly
65          70          75          80

```

```

Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro
85          90          95

```

```

Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val
100         105         110

```

```

Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu
115         120         125

```

```

Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp
130         135         140

```

Glu 145	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu 150	Asp	Lys	Glu	Leu	Lys 155	Ala	Lys	Gly	Lys	Ser 160
Ala	Leu	Met	Phe	Asn 165	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr 170	Phe	Thr	Trp	Pro	Leu 175	Ile
Ala	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ala	Phe	Lys 185	Tyr	Glu	Asn	Gly	Lys 190	Tyr	Asp
Ile	Lys	Asp 195	Val	Gly	Val	Asp	Asn 200	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala 205	Gly	Leu	Thr
Phe 210	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Lys 215	Asn	Lys	His	Met	Asn 220	Ala	Asp	Thr	Asp
Tyr 225	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala 230	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly 235	Glu	Thr	Ala	Met	Thr 240
Ile	Asn	Gly	Pro	Trp 245	Ala	Trp	Ser	Asn	Ile 250	Asp	Thr	Ser	Lys	Val 255	Asn
Tyr	Gly	Val	Thr 260	Val	Leu	Pro	Thr	Phe 265	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser 270	Lys	Pro
[0027]															
Phe 275	Val	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Gly 280	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser 285	Pro	Asn	Lys
Glu 290	Leu	Ala	Lys	Glu	Phe 295	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu 300	Leu	Thr	Asp	Glu	Gly
Leu 305	Glu	Ala	Val	Asn	Lys 310	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly 315	Ala	Val	Ala	Leu	Lys 320
Ser	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp 330	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala	Thr 335	Met
Glu	Asn	Ala	Gln	Lys	Gly	Glu	Ile	Met 345	Pro	Asn	Ile	Pro	Gln 350	Met	Ser
Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	Val	Arg	Thr 360	Ala	Val	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Gly 365
Arg	Gln	Thr	Val	Asp	Glu	Ala 375	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln 380	Thr	Asn	Ala	Ala
Ala 385	Met	His	Ser	Ser	Ser 390	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn 395	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn 400

Leu Gly Ile Glu Gly Arg Pro Gly Arg Gly Arg Asn Asn Asp Val Cys
405 410 415

Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn His
420 425 430

Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly
435 440 445

Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr Glu
450 455 460

Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val
465 470 475 480

Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys Ser
485 490 495

Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu Lys
500 505 510

Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys
515 520 525

[0028] Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro
530 535 540

Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser His
545 550 555 560

Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile
565 570 575

Gly Ser Met

<210> 88
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 88
cagctgacta aacagaagca g

21

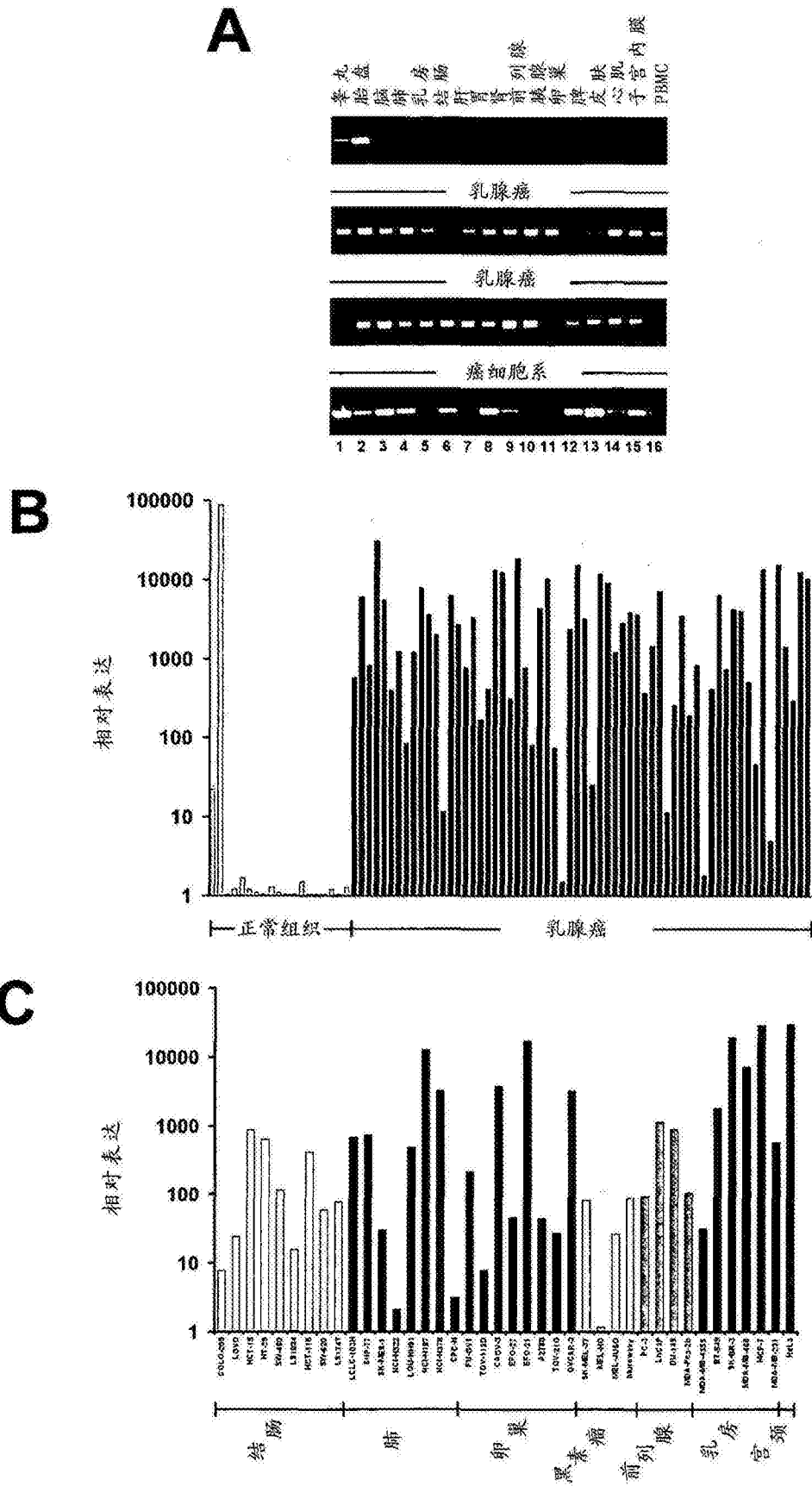
<210> 89
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 89
gagttgaatg cagtcacac ag

22

[0029]



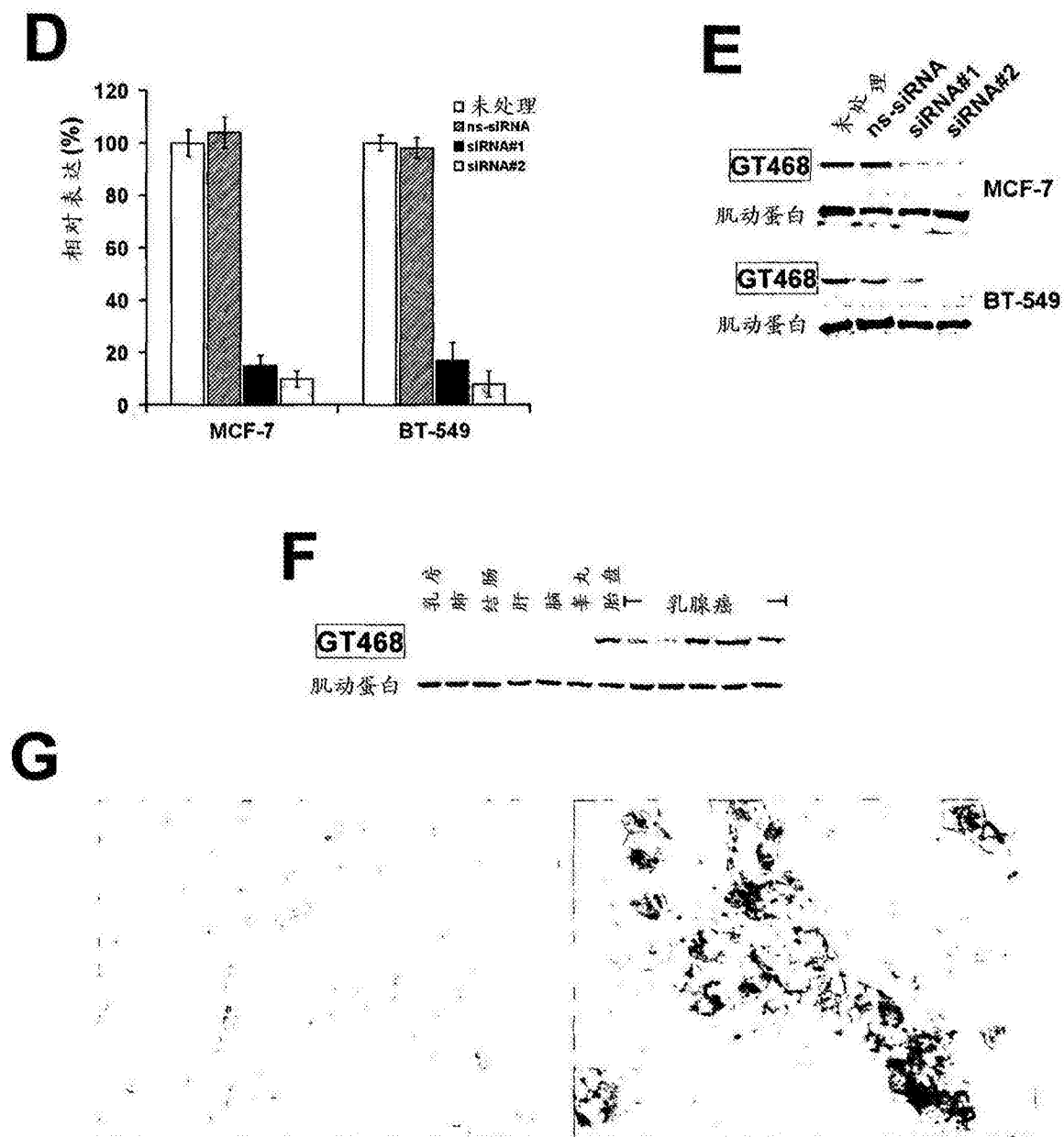


图1

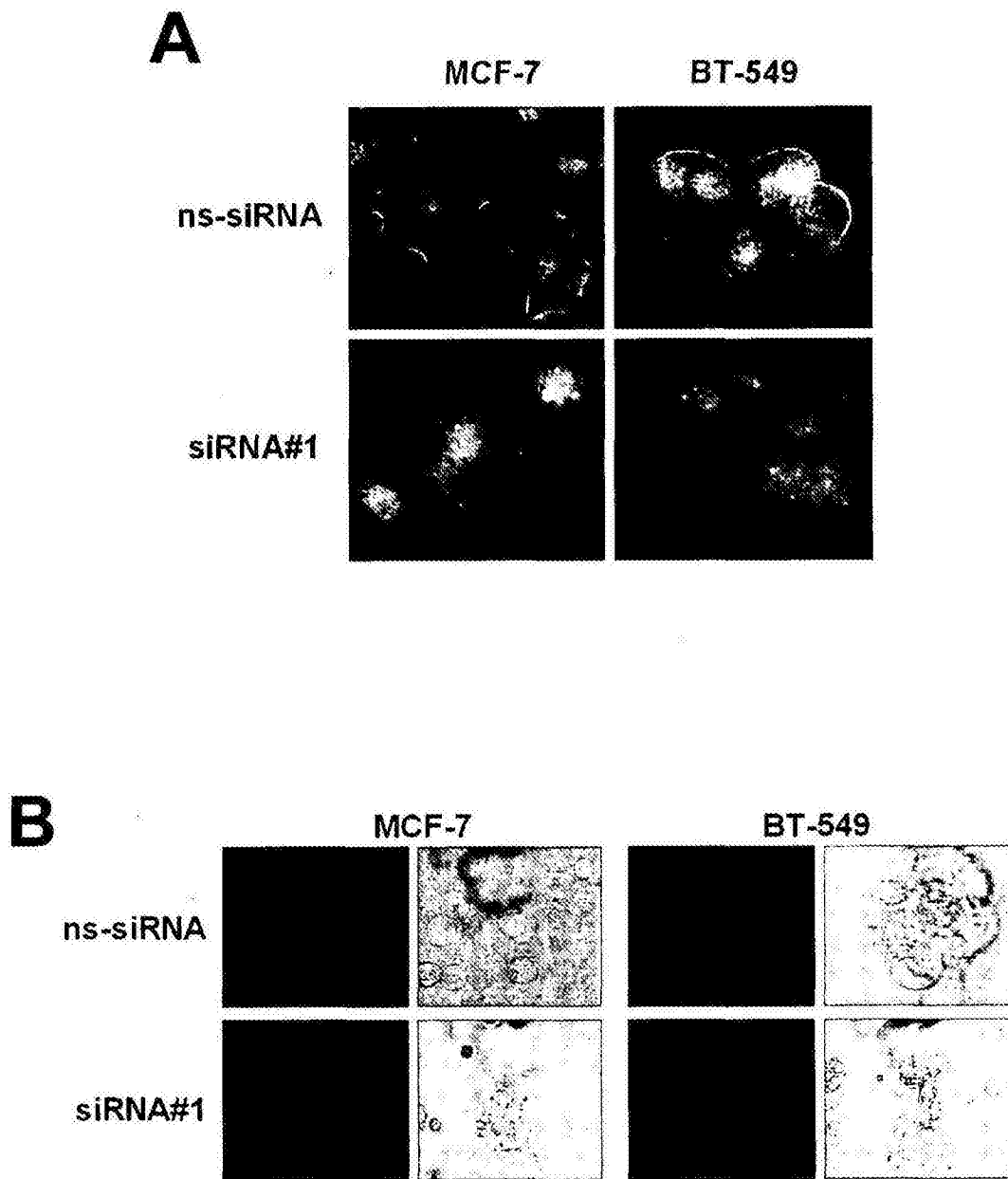


图2

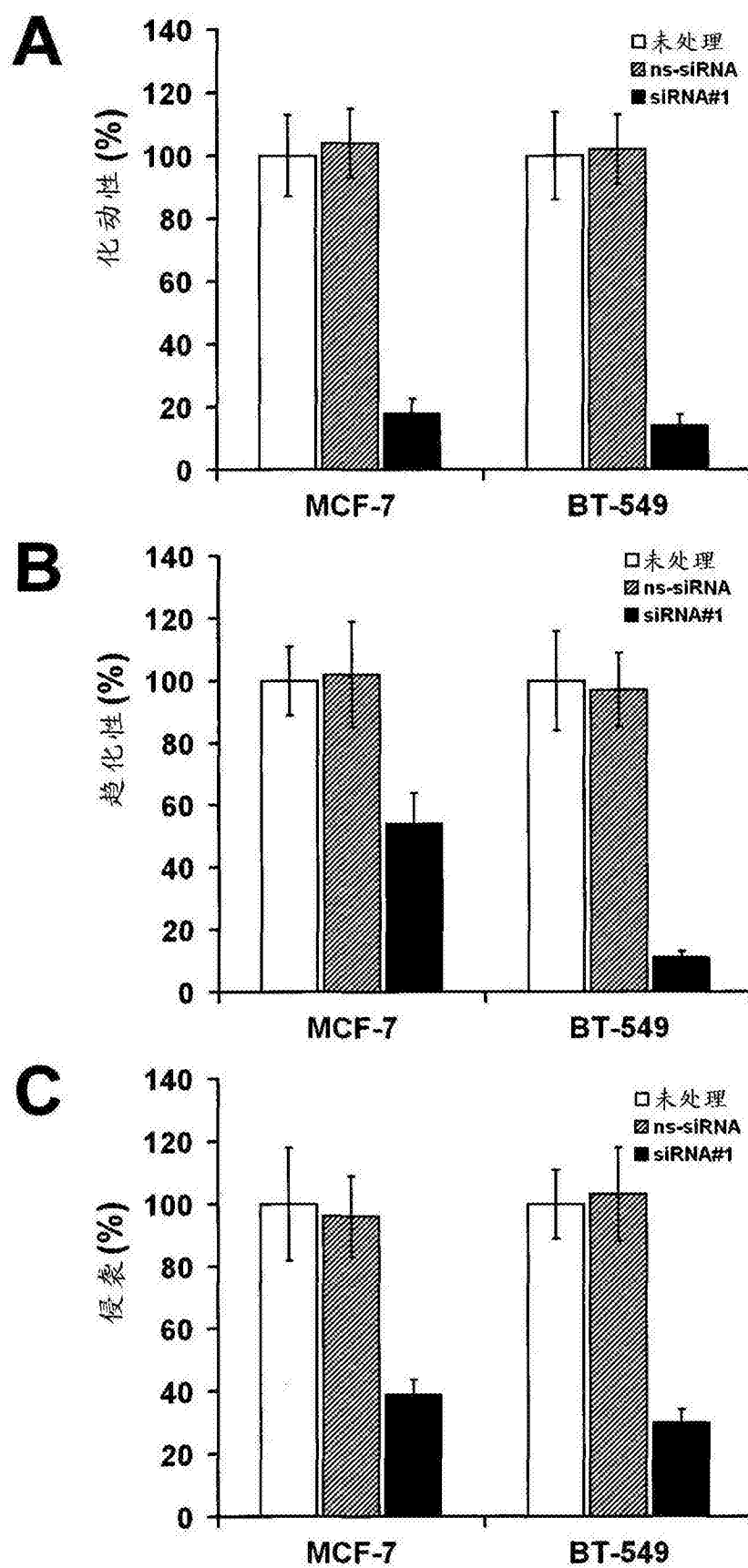


图3

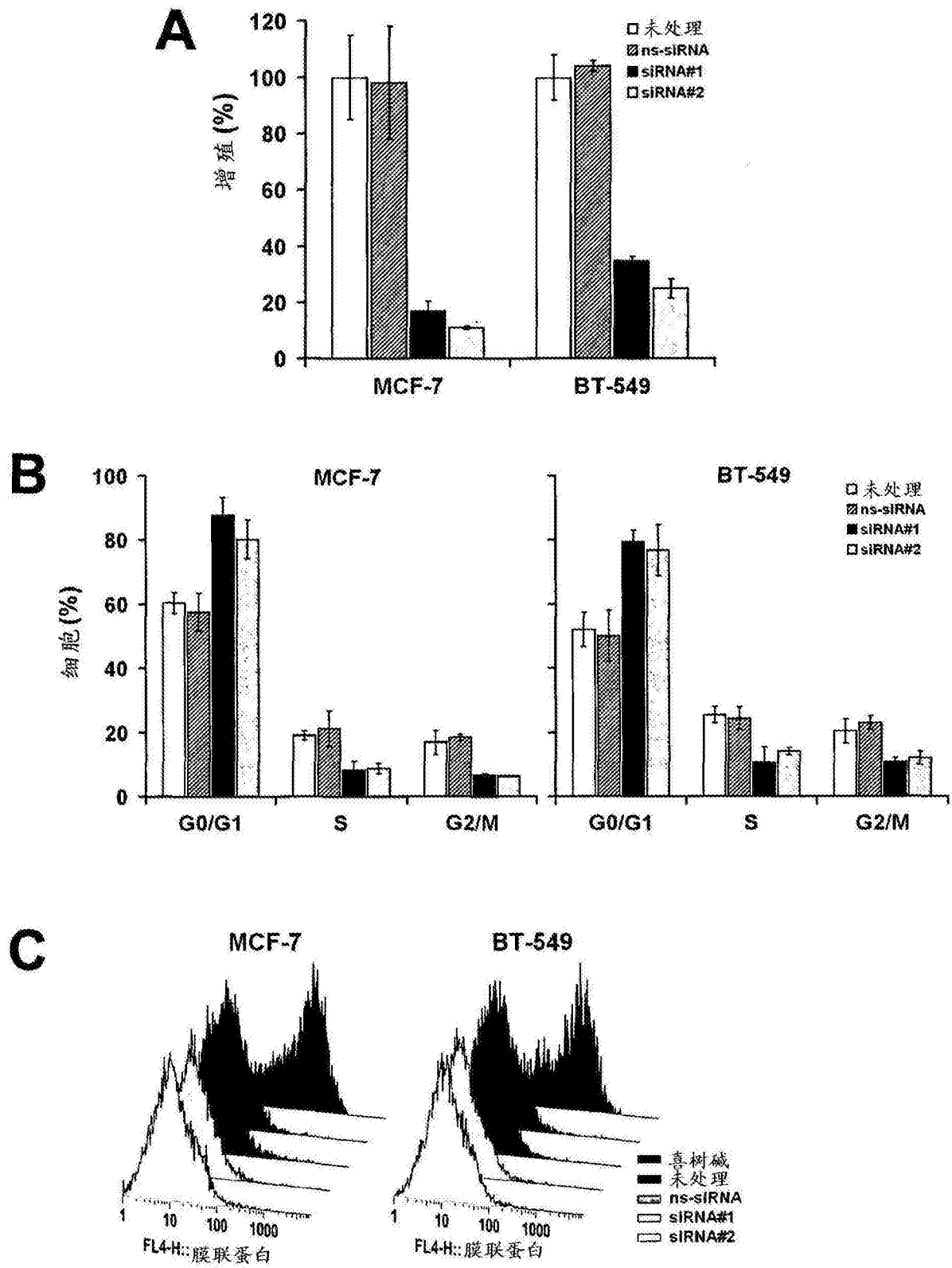


图4

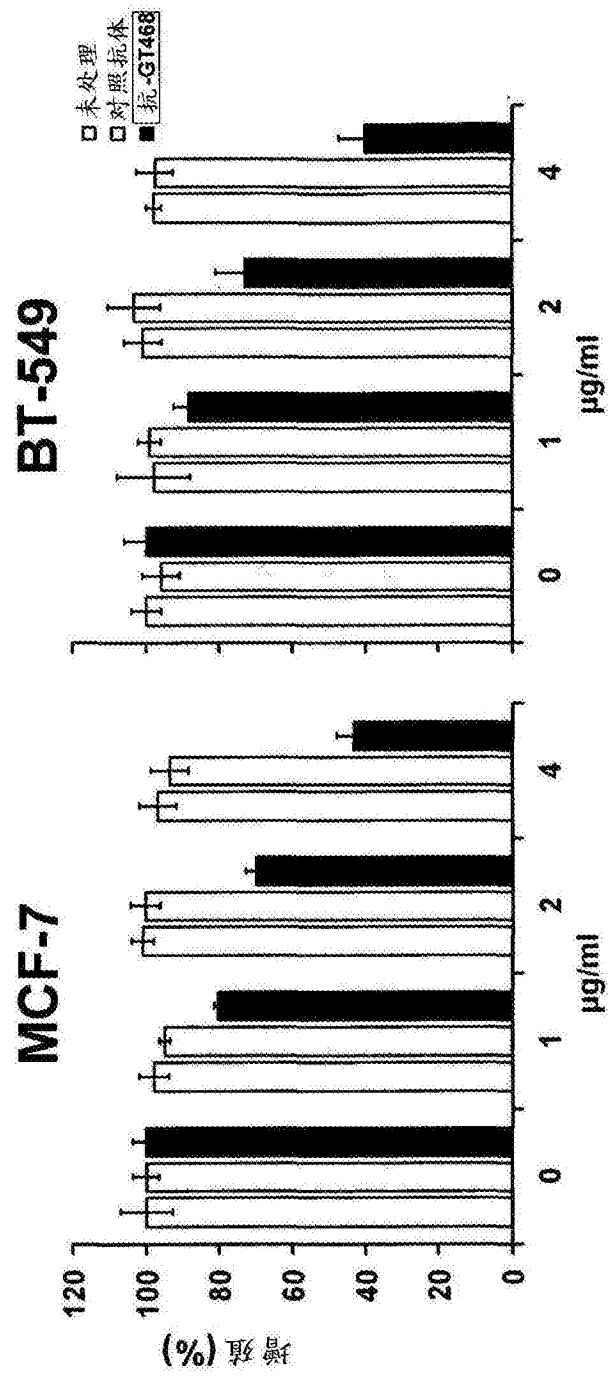


图5

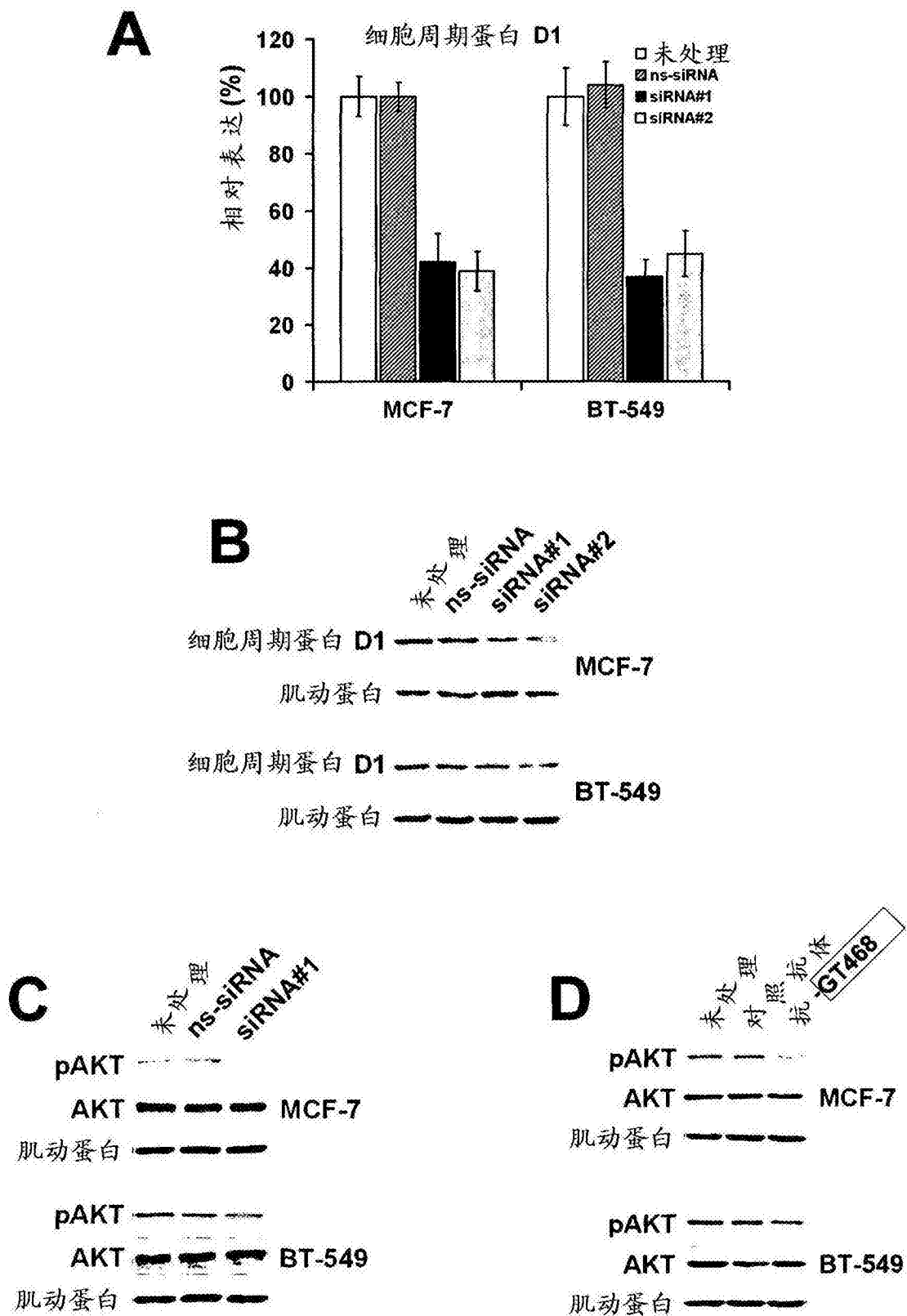


图6

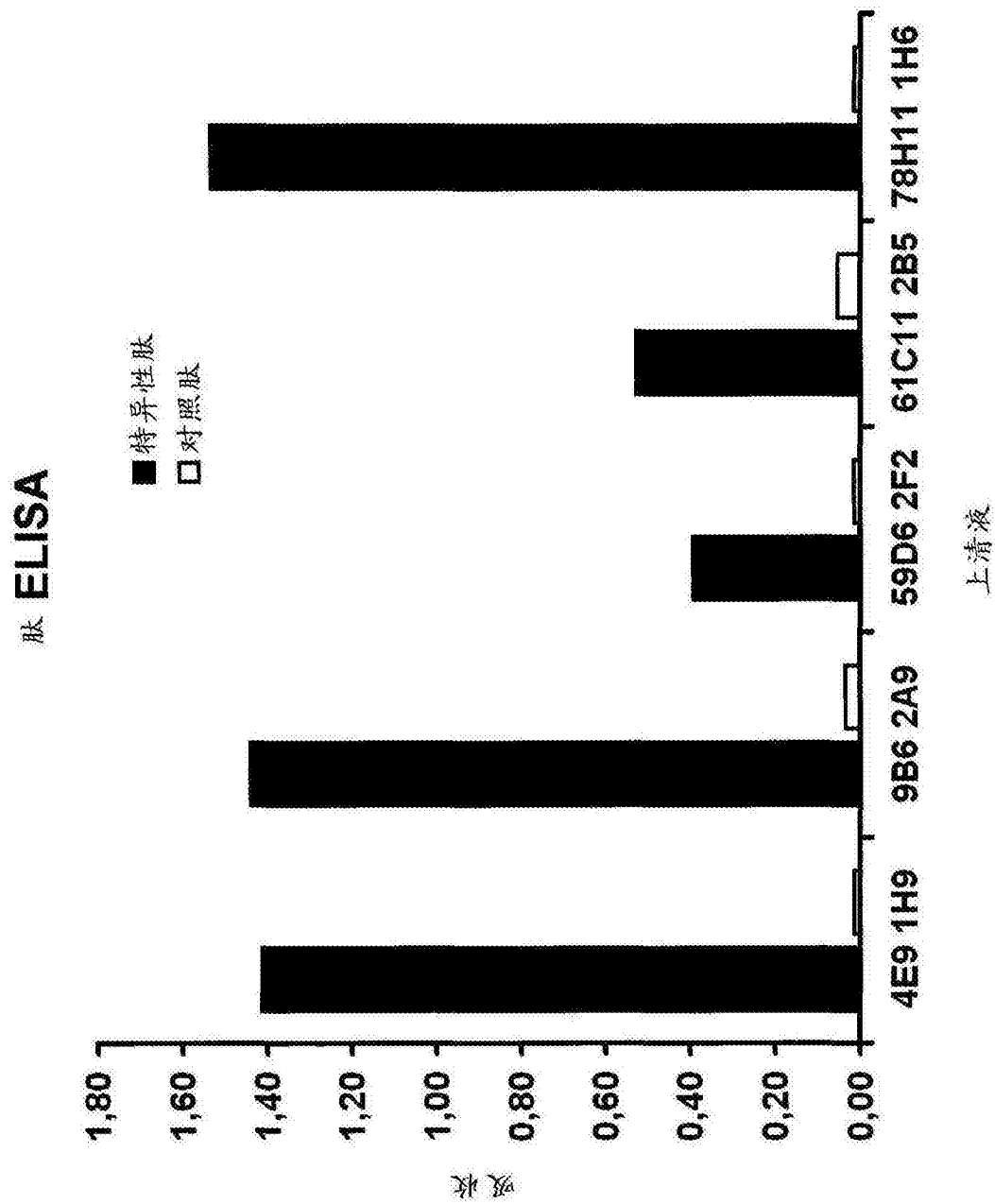


图7

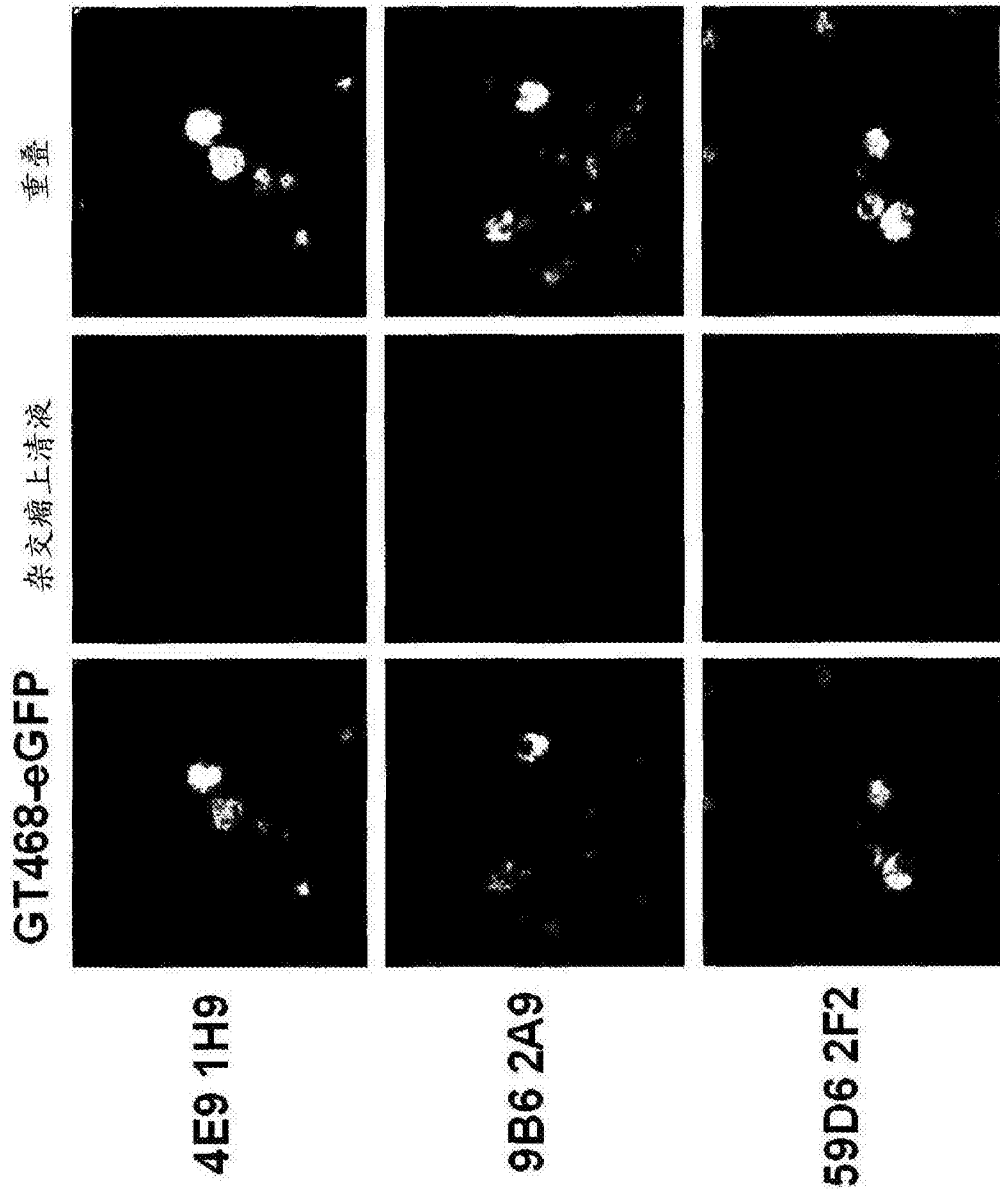


图8

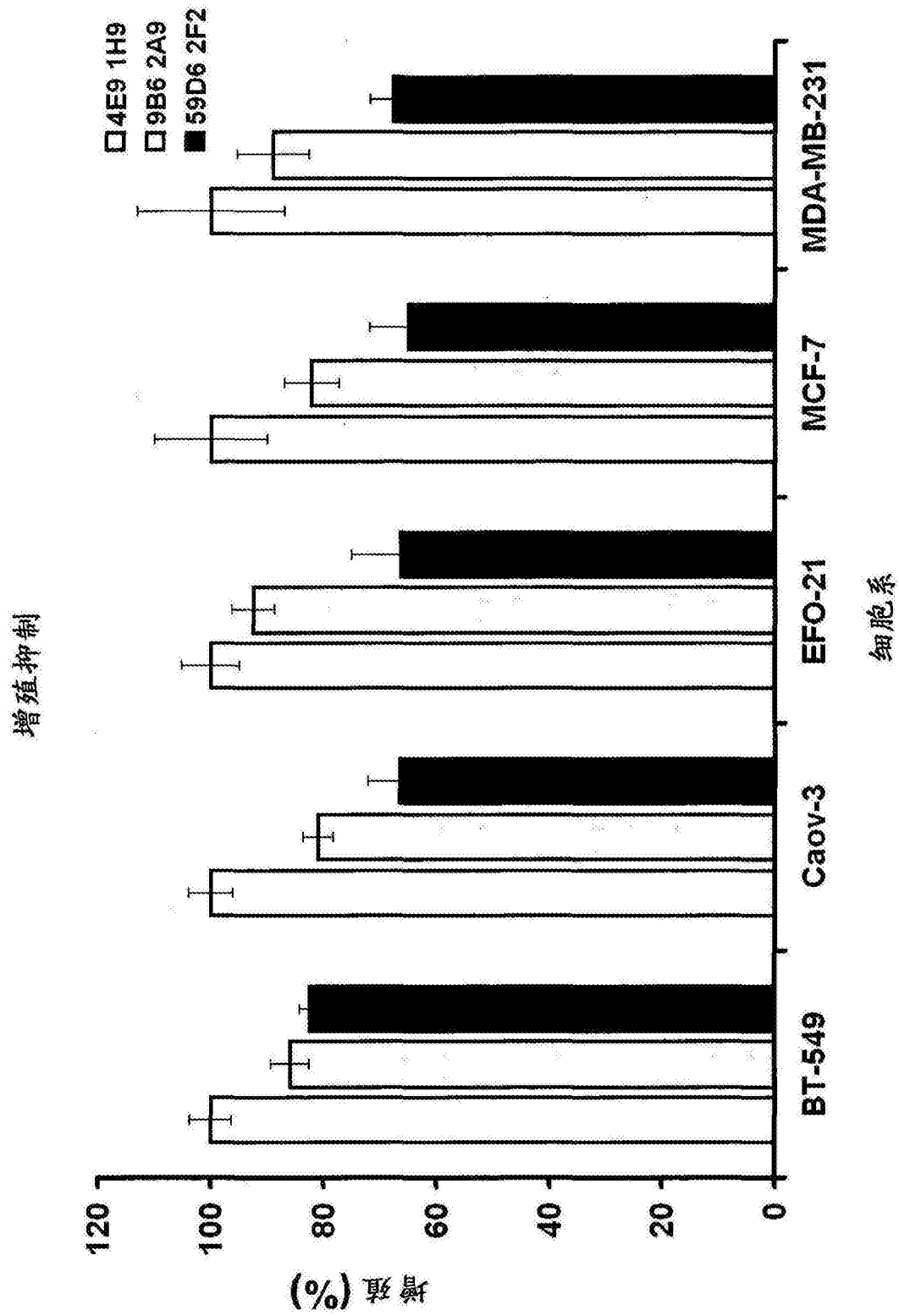


图9

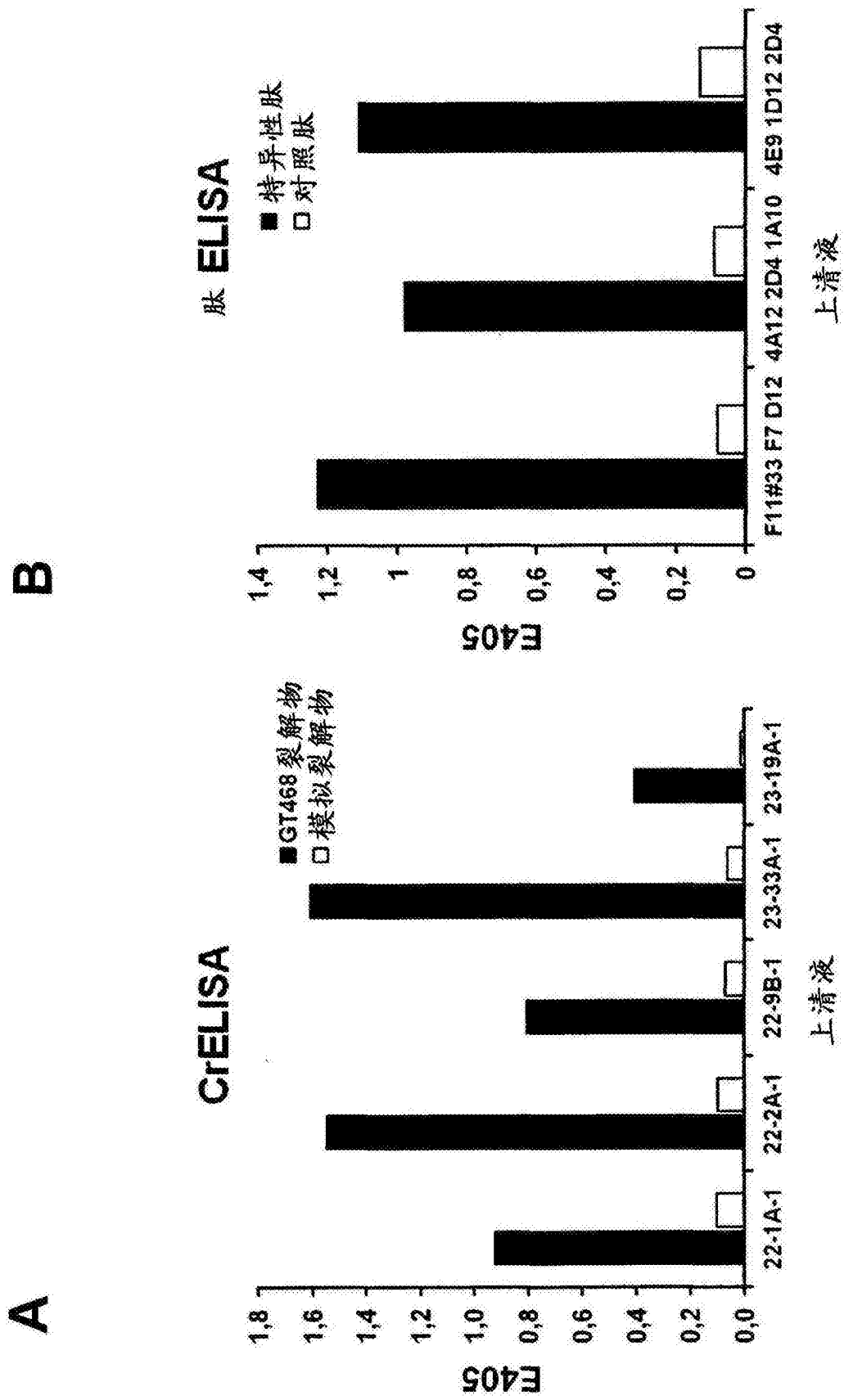


图10

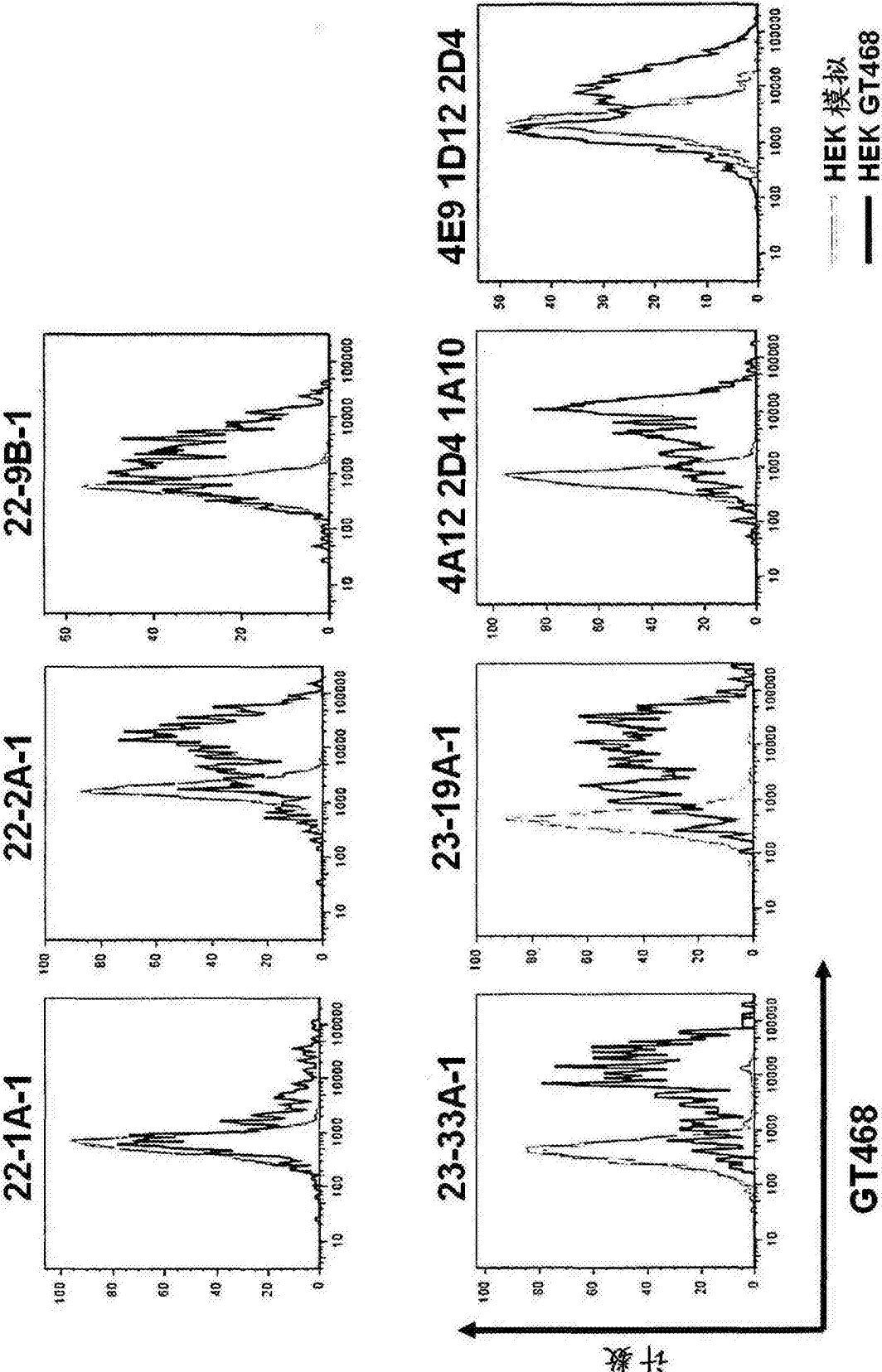


图11

肽	序列	肽	序列
1	MKVFKFIGLMILLTS	26	SSKGTPSKFVIPVSC
2	KFIGLMILLTSAFSA	27	TPSKFVIPVSCAAPQ
3	LMILLTSAFSAGSGQ	28	FVIPVSCAAPQKSPW
4	LTSAFSAGSGQSPMT	29	VSCAAPQKSPWLTKP
5	FSAGSGQSPMTVLC	30	APQKSPWLTKPCSMR
6	SGQSPMTVLC SIDWF	31	SPWLTKPCSMRVASK
7	PMTVLC SIDWFMVTV	32	TKPCSMRVASKSRAT
8	LCSIDWFMVTVHPPM	33	SMRVASKSRATAQKD
9	DWFMVTVHPPMLNND	34	ASKSRATAQKDEKCY
10	VTVHPPMLNNDVCVH	35	RATAQKDEKCYEVFS
11	PFMLNNDVCVHFHEL	36	QKDEKCYEVFSLSQS
12	NNDVCVHFHELHLGL	37	KCYEVFSLSQSSQRP
13	CVHFHELHLGLGCPP	38	VFSLSQSSQRPNCDC
14	HELHLGLGCPPNHVQ	39	SQSSQRPNCDCPPCV
15	LGLGCPPNHVQPHAY	40	QRPNCDCPPCVFSEE
16	CPPNHVQPHAYQFTY	41	CDCPPCV FSEEHTQ
17	HVQPHAYQFTYRVTE	42	PCV FSEEHTQVPCH
18	HAYQFTYRVTECGIR	43	SEEHTQVPCHQAGA
19	FTYRVTECGIRAKAV	44	HTQVPCHQAGAEAQ
20	VTECGIRAKAVSQDM	45	PCHQAGAEAQPLQP
21	GIRAKAVSQDMVIYS	46	AGAEAQPLQPSHFL
22	KAVSQDMVIYSTEIH	47	EAQPLQPSHFLDISE
23	QDMVIYSTEIHYSSK	48	LQPSHFLDISEDWSL
24	IYSTEIHYSSKGTIPS	49	HFLDISEDWSLHTDD
25	EIHYSSKGTIPSKFVI	50	ISEDWSLHTDDMIGS
		51	SEDWSLHTDDMIGSM

杂交瘤	反应性(肽)
22-1A-1	50+51
22-2A-1	18, 26-31, 42
22-9B-1	27, 29-31
23-33A-1	47+48
23-19A-1	48+49

杂交瘤	反应性(序列)
F11#33 F7 D12	VFSLSQSSQRPNC
4A12 2D4 1A10	APQKSPWLTKPC
4A9 1D12 2D4	APQKSPWLTKPC

图13

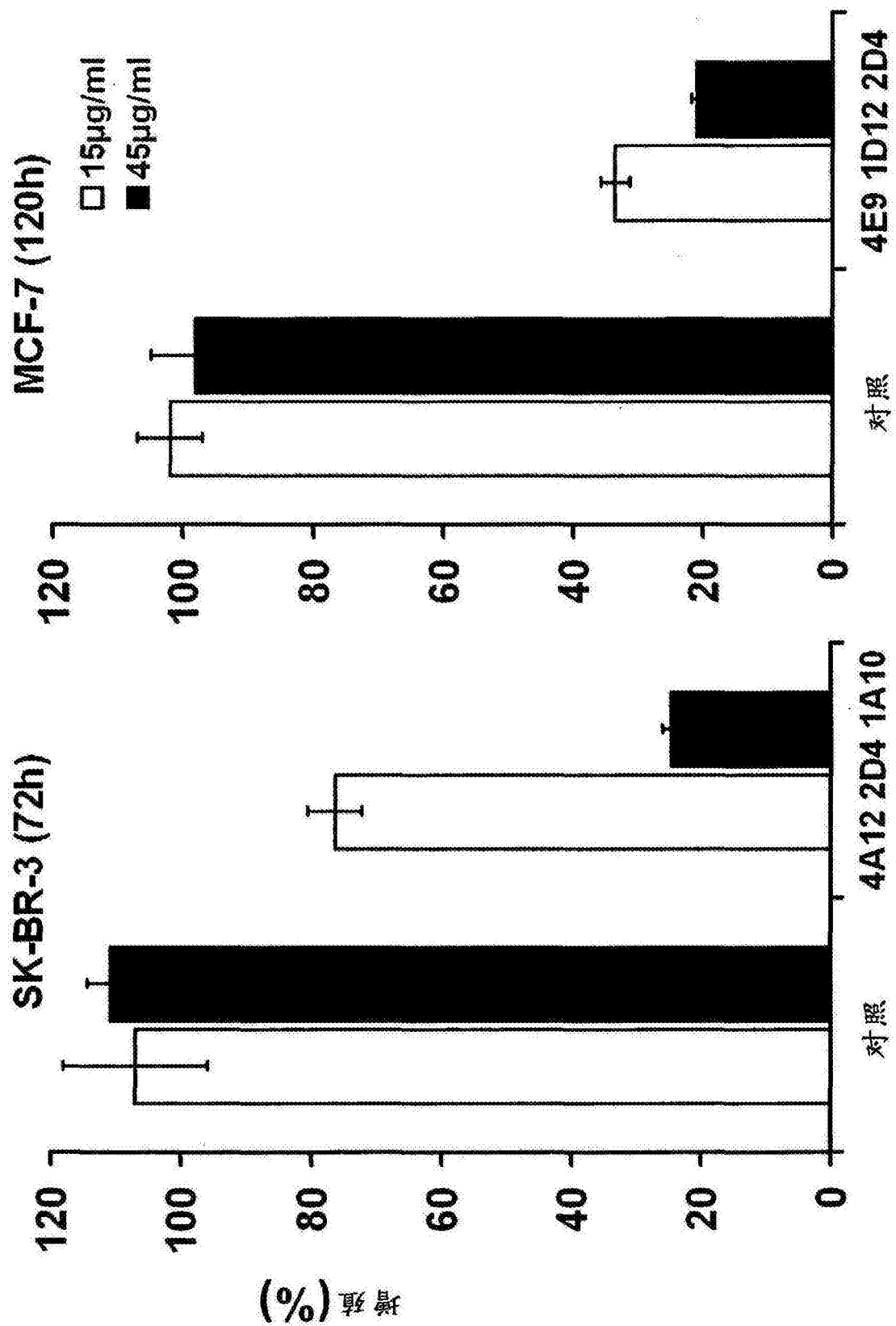


图14

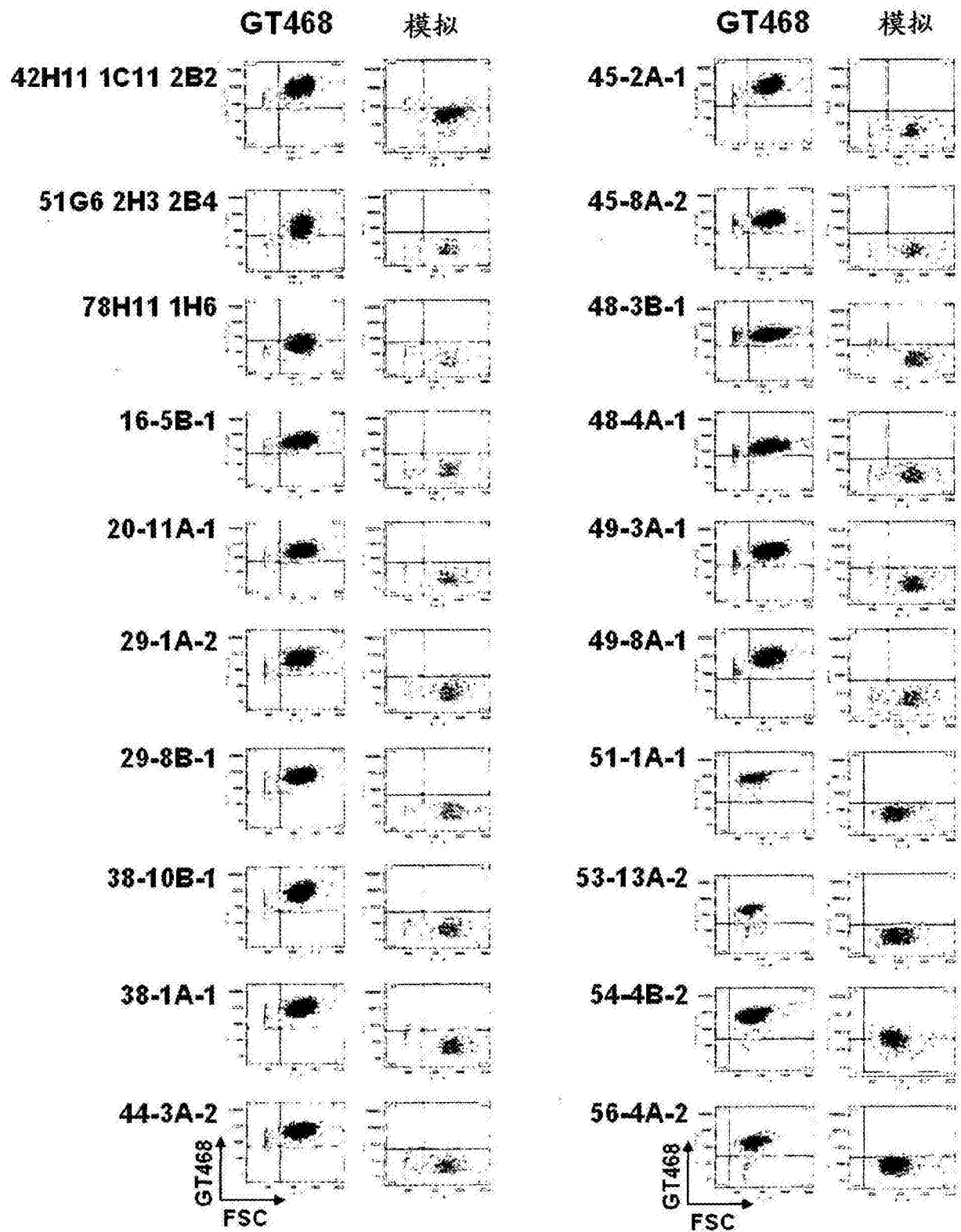


图15

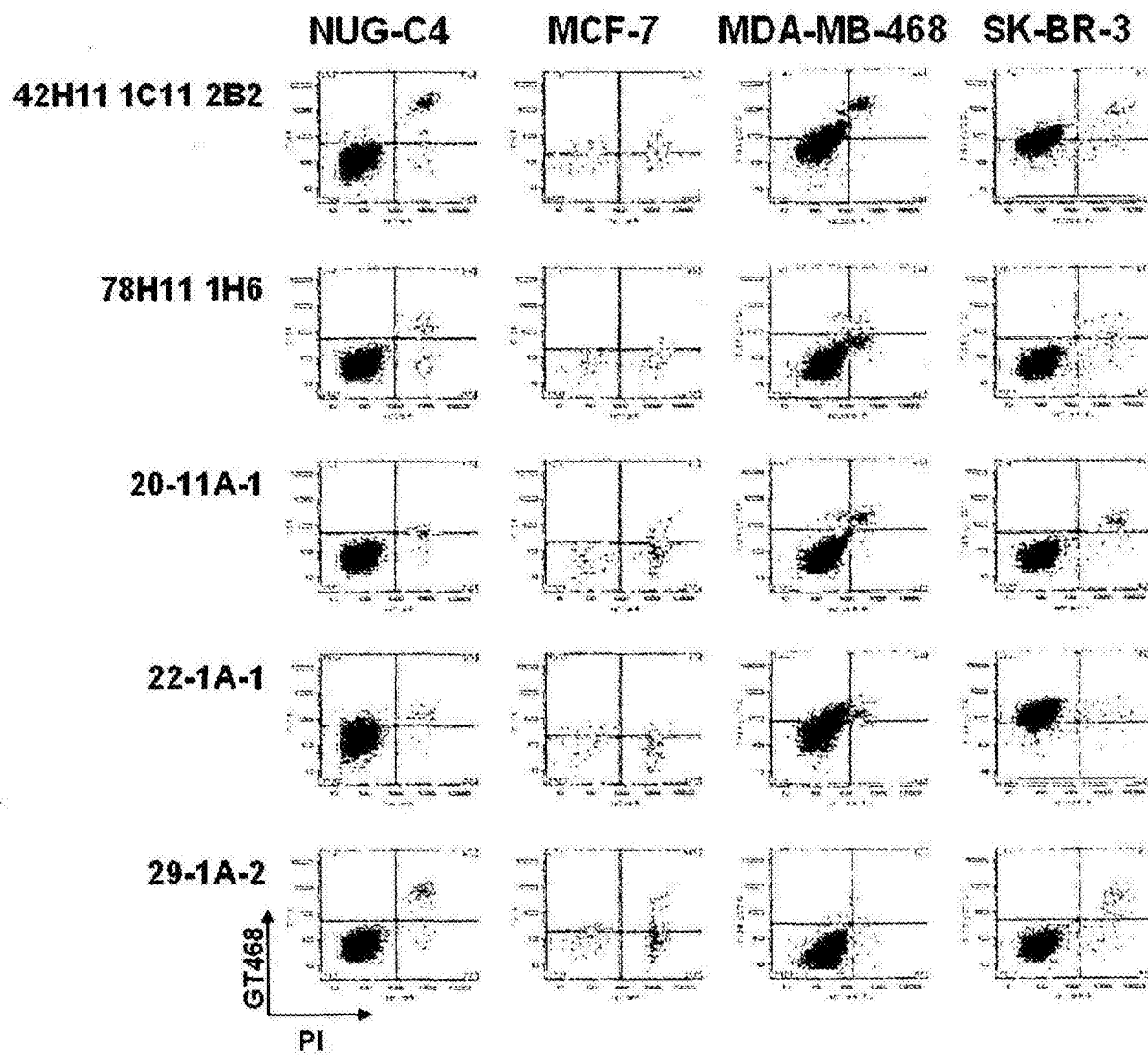


图16A

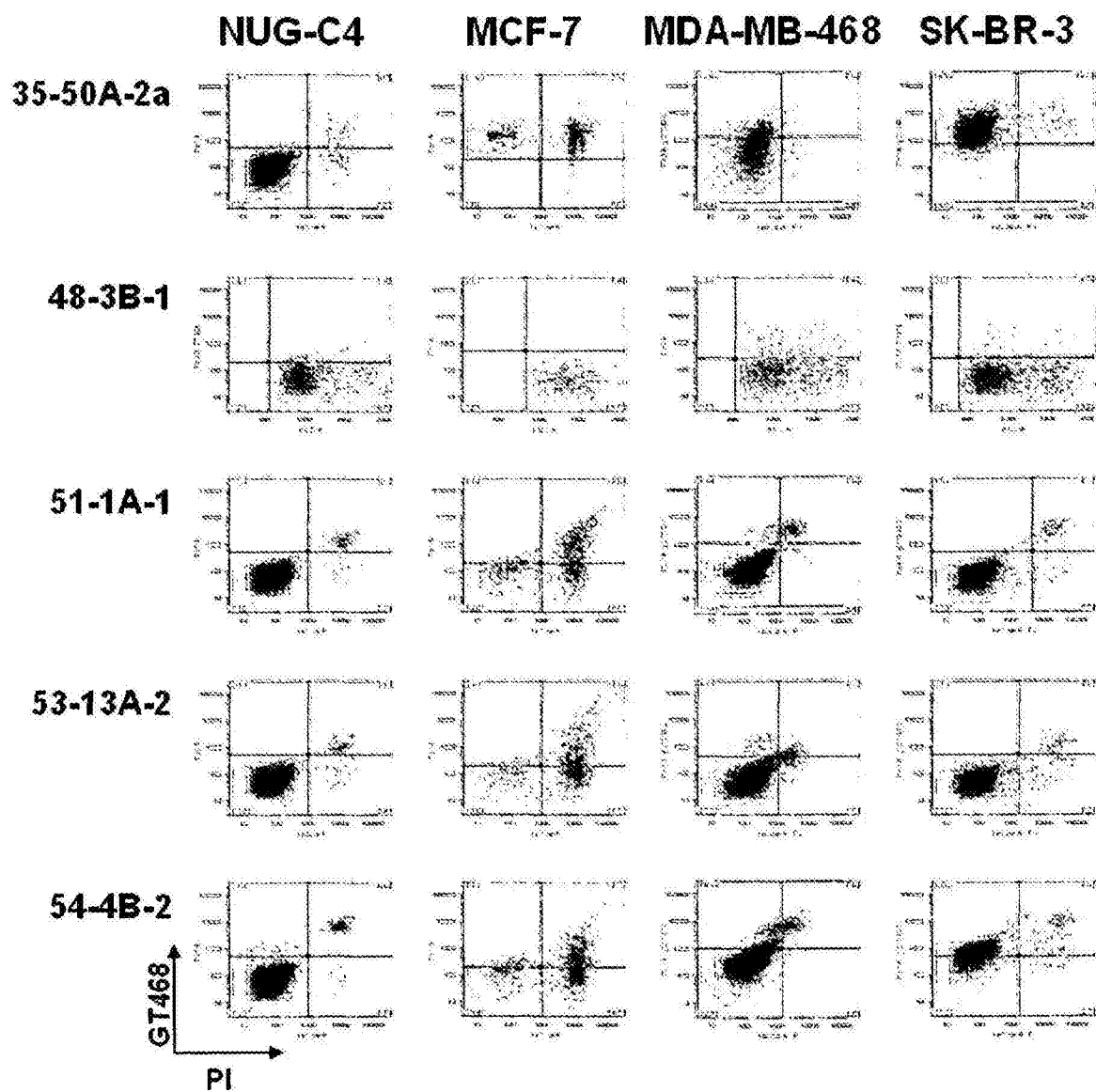


图16B

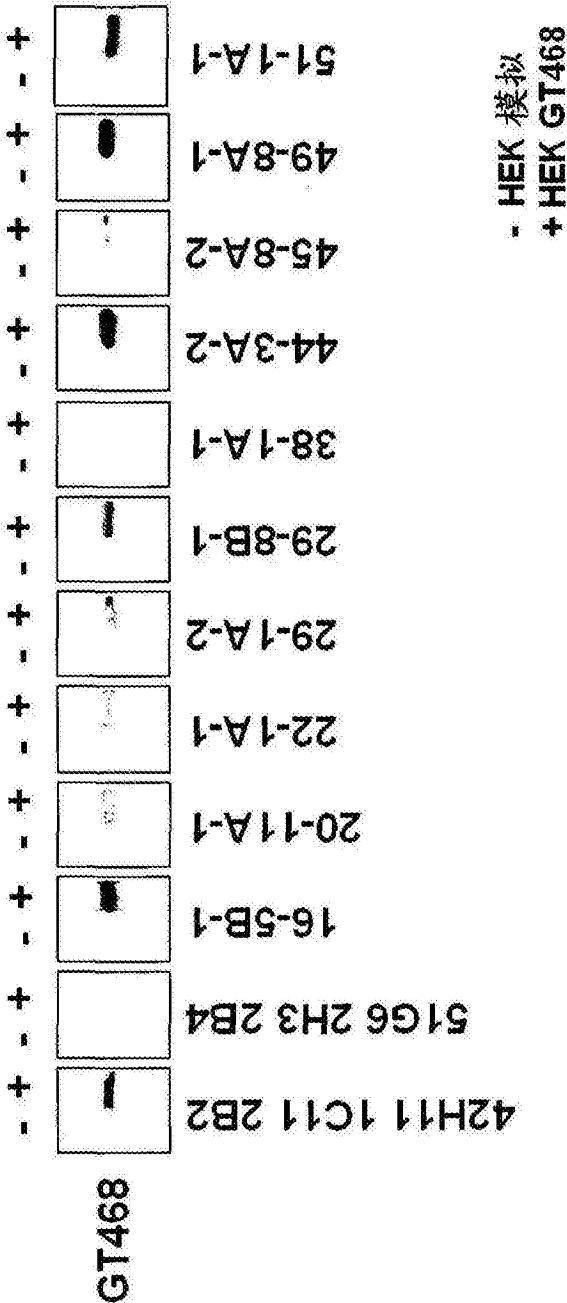


图17

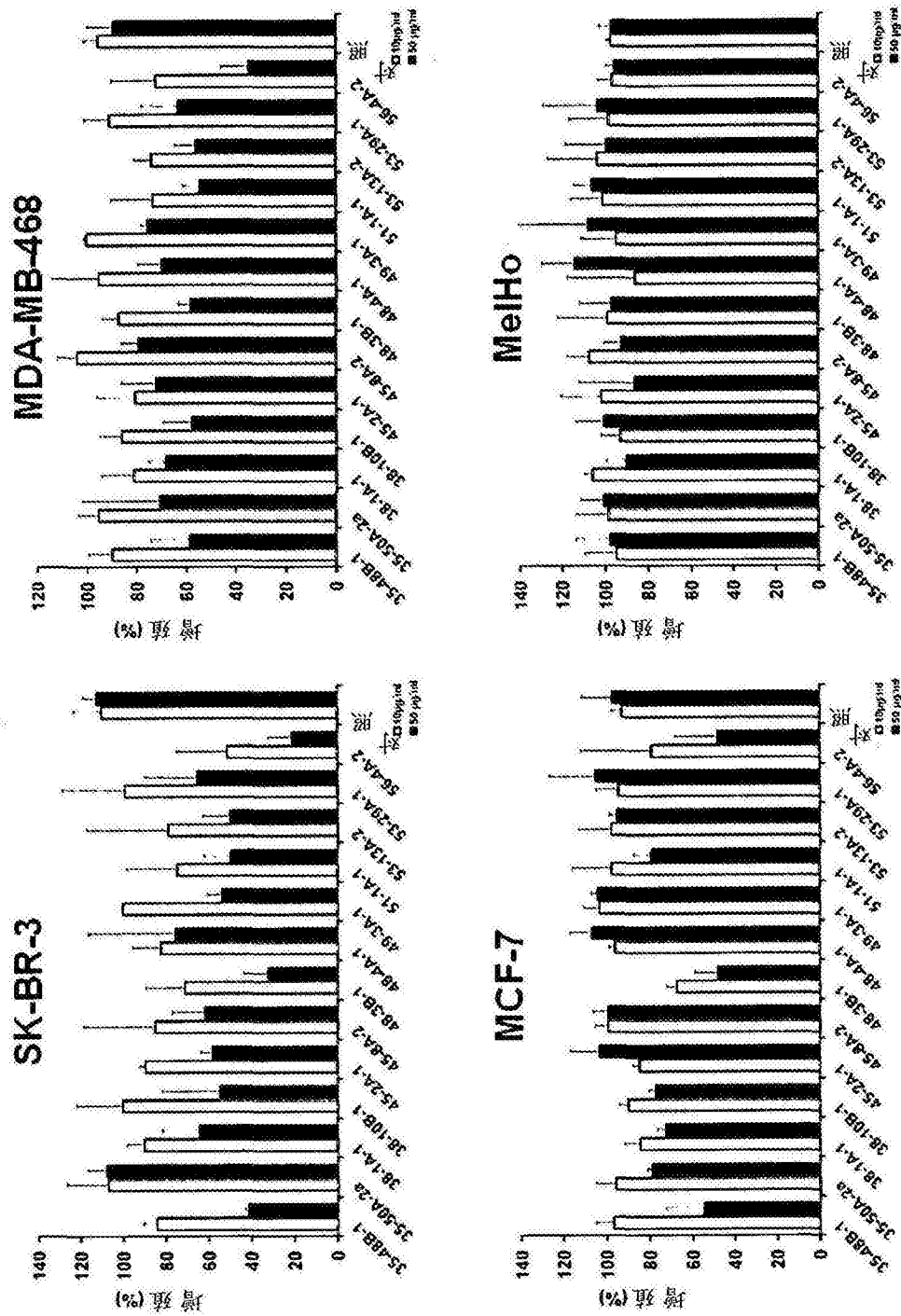


图18

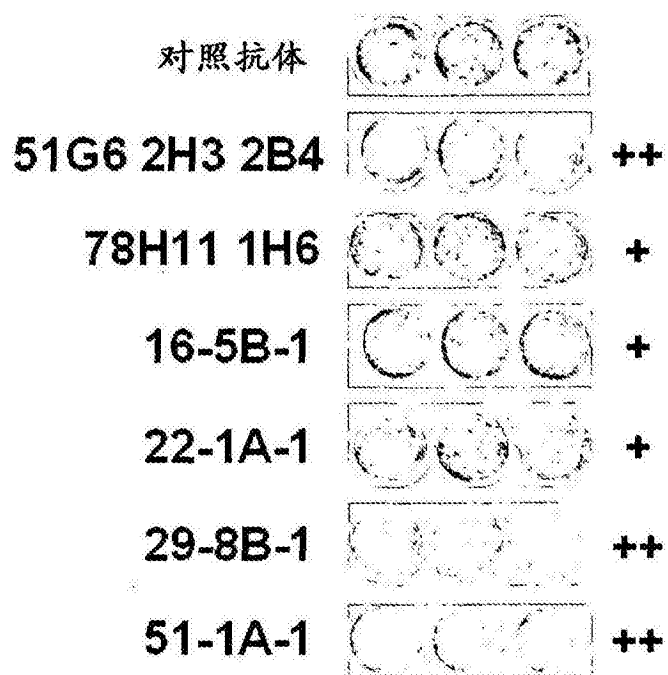


图19

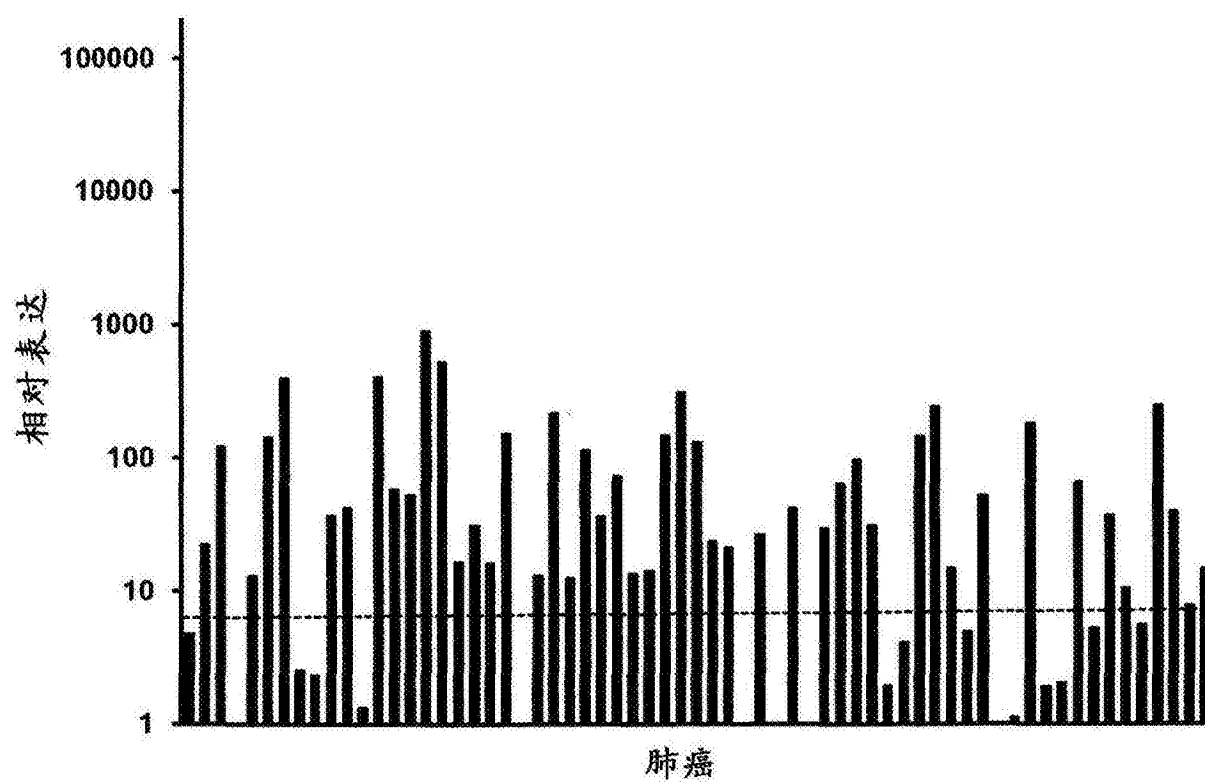
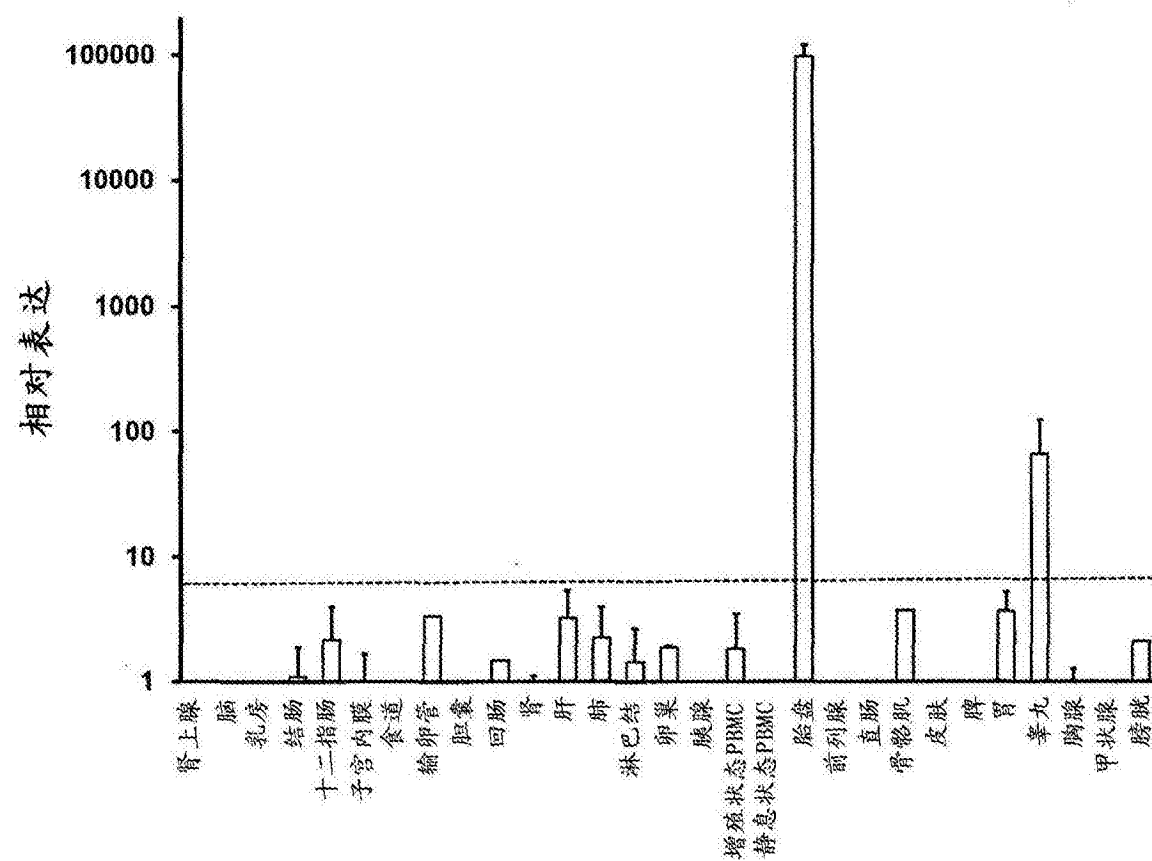


图 20A

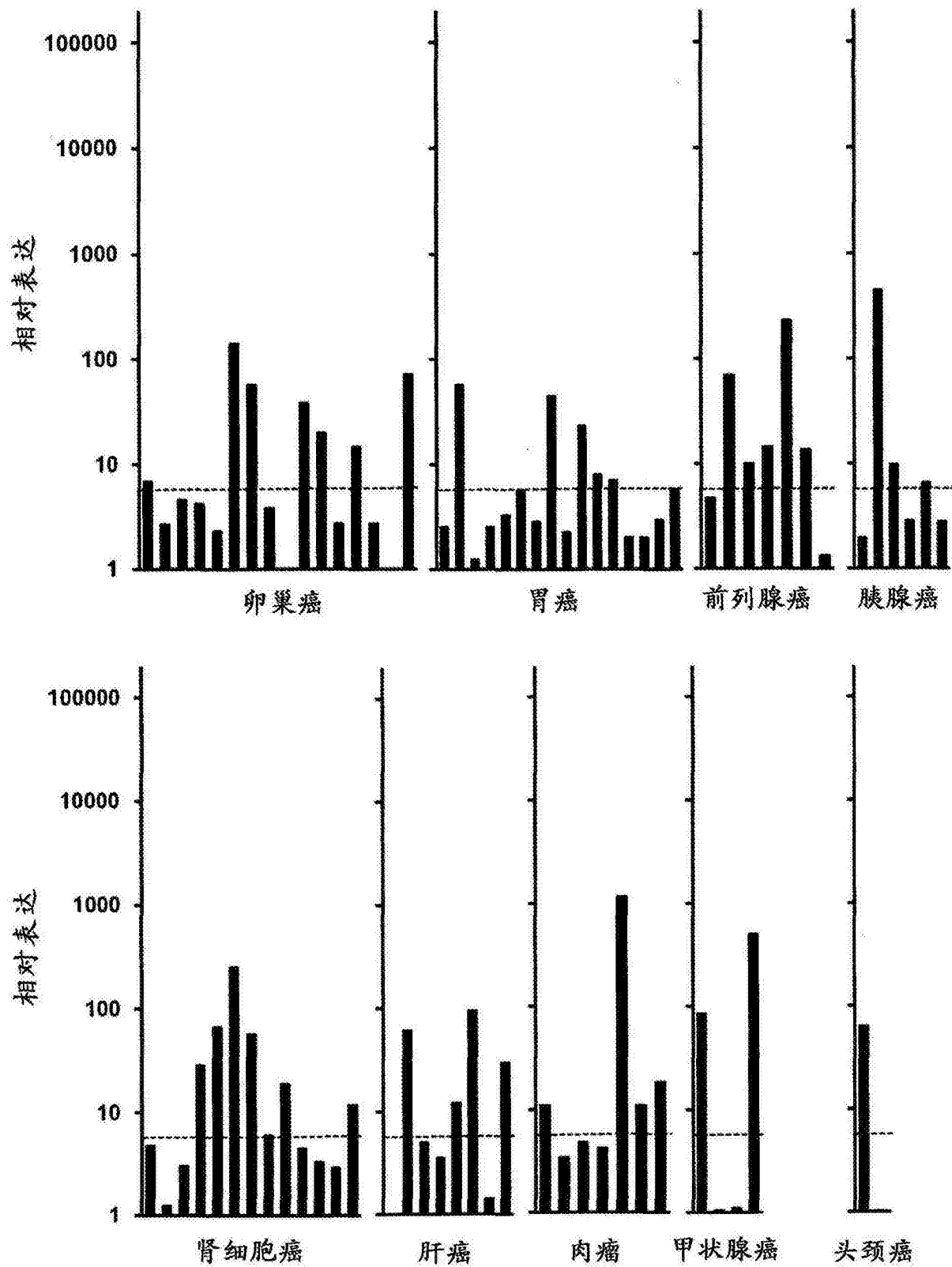


图20B

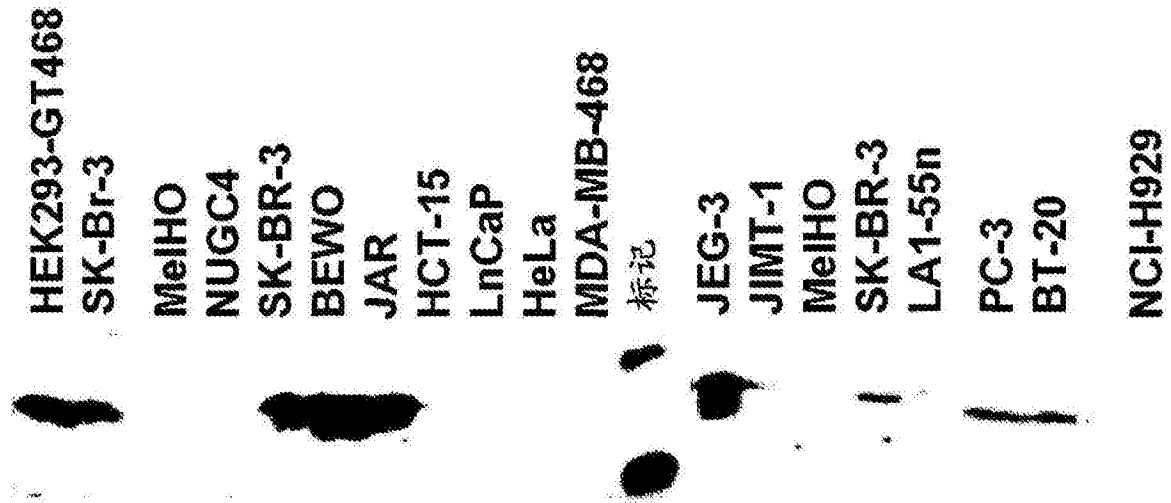


图21

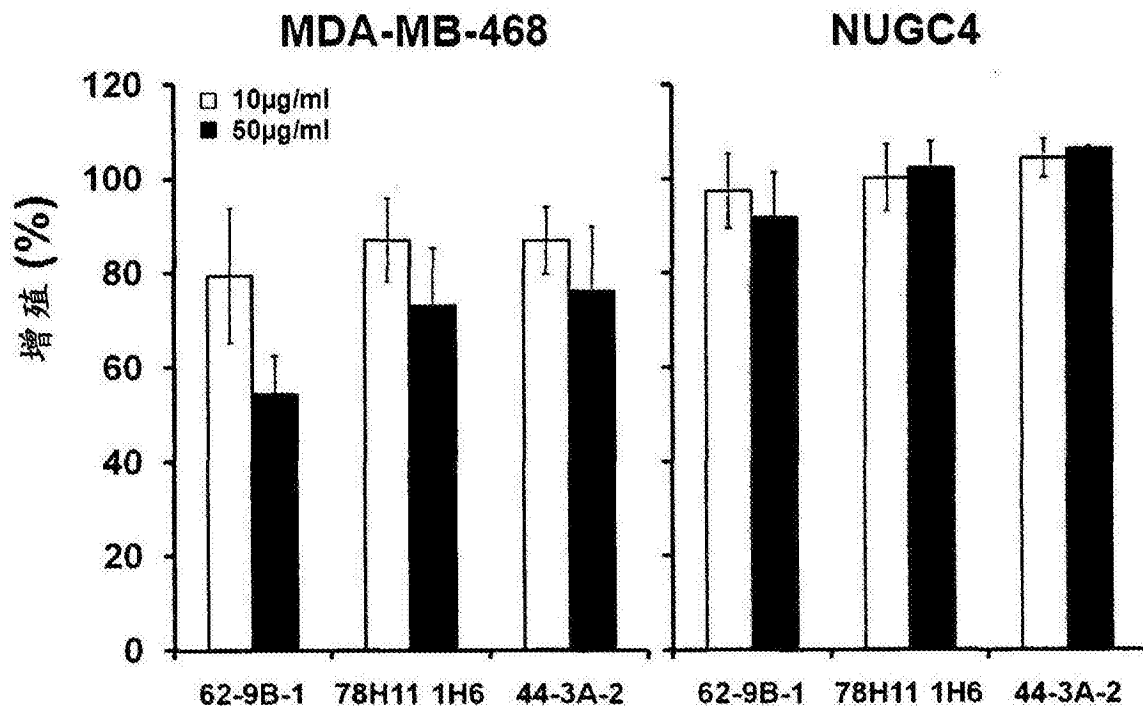


图22

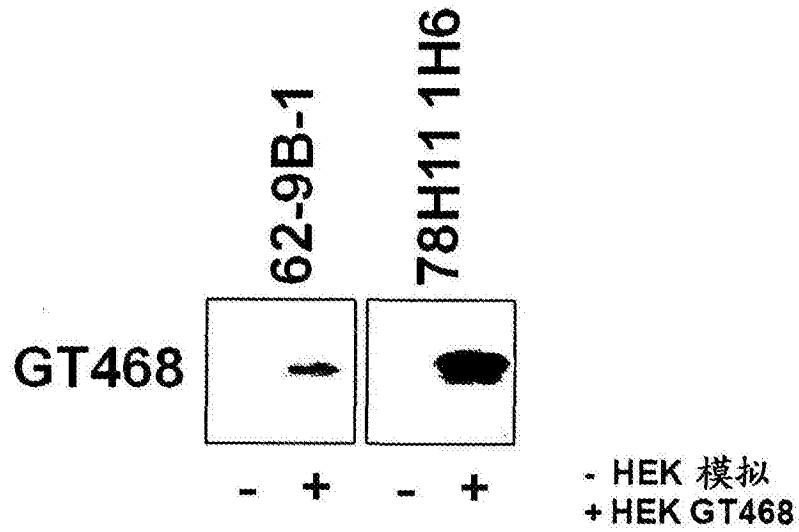


图23

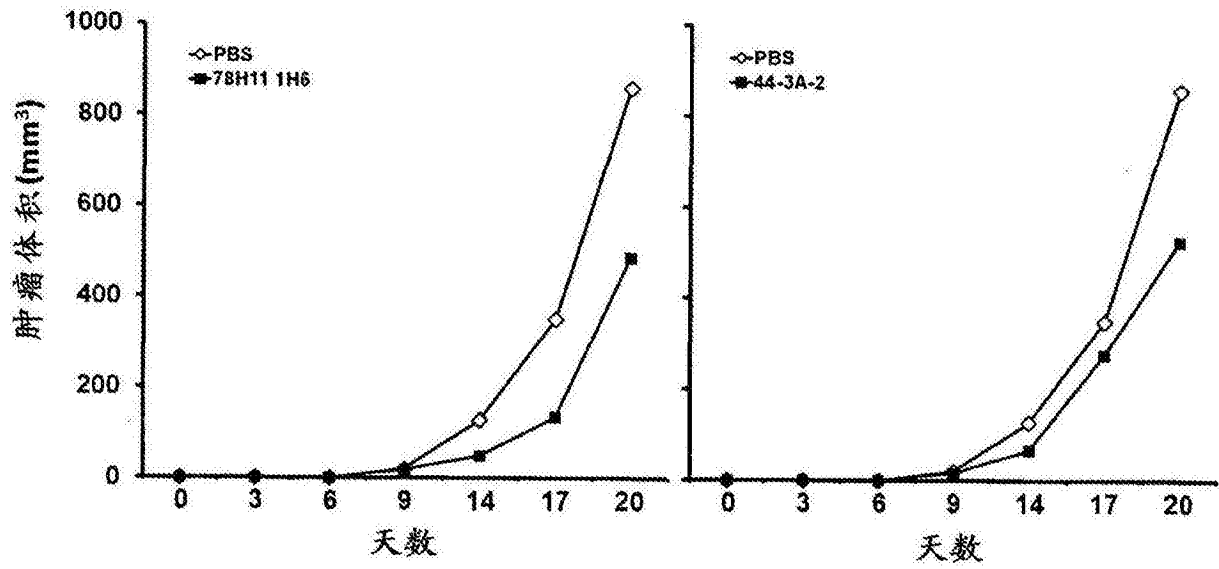


图24

肽	序列	肽	序列
1	MKVFKFIGLMILLTS	26	SSKGTPSKFVIPVSC
2	KFIGLMILLTSAFSA	27	TPSKFVIPVSCAAPQ
3	LMILLTSAFSAGSGQ	28	FVIPVSCAAPQKSPW
4	LTSAFSAGSGQSPMT	29	VSCAAPQKSPWLTKP
5	FSAGSGQSPMTVLC	30	APQKSPWLTKPCSMR
6	SGQSPMTVLC SIDWF	31	SPWLTKPCSMRVASK
7	PMTVLC SIDWFMVTV	32	TKPCSMRVASKSRAT
8	LCSIDWFMVTVHFFM	33	SMRVASKSRATAQKD
9	DWFMVTVHFFMLNND	34	ASKSRATAQKDEKCY
10	VTVHFFMLNNDVCVH	35	RATAQKDEKCYEVFS
11	PFMLNNDVCVHFHEL	36	QKDEKCYEVFSLSQS
12	NNDVCVHFHELHLGL	37	KCYEVFSLSQSSQRP
13	CVHFHELHLGLGCPP	38	VFSLSQSSQRPNCDC
14	HELHLGLGCPPNHVQ	39	SQSSQRPNCDCPPCV
15	LGLGCPPNHVQPHAY	40	QRPNCDCPPCVFSEE
16	CPPNHVQPHAYQFTY	41	CDCPPCVFSEEHTQ
17	HVQPHAYQFTYRVTE	42	PCVFSEEHTQVPCH
18	HAYQFTYRVTECGIR	43	SEEHTQVPCHQAGA
19	FTYRVTECGIRAKAV	44	HTQVPCHQAGAEAQ
20	VTECGIRAKAVSQDM	45	PCHQAGAEAQPLQP
21	GIRAKAVSQDMVIYS	46	AGAEAQPLQPSHFL
22	KAVSQDMVIYSTEIH	47	EAQPLQPSHFLDISE
23	QDMVIYSTEIHYSSK	48	LQPSHFLDISEDWSL
24	IYSTEIHYSSKGTSP	49	HFLDISEDWSLHTDD
25	EIHYSSKGTSPSKFVI	50	ISEDWSLHTDDMIGS
		51	SEDWSLHTDDMIGSM

杂交瘤	反应性(肽)
29-1A-2	27, 29, 30
29-8B-1	49-51
35-48B-1	13
44-3A-2	31, 32
49-3A-1	29-31
49-8A-1	37, 38
51-1A-1	36-37
53-13A-2	33, 34
54-4B-2	34, 37
62-9B-1	36, 37

杂交瘤	反应性(序列)
78H11 1H6	WSLHTDDMIGSM

图25

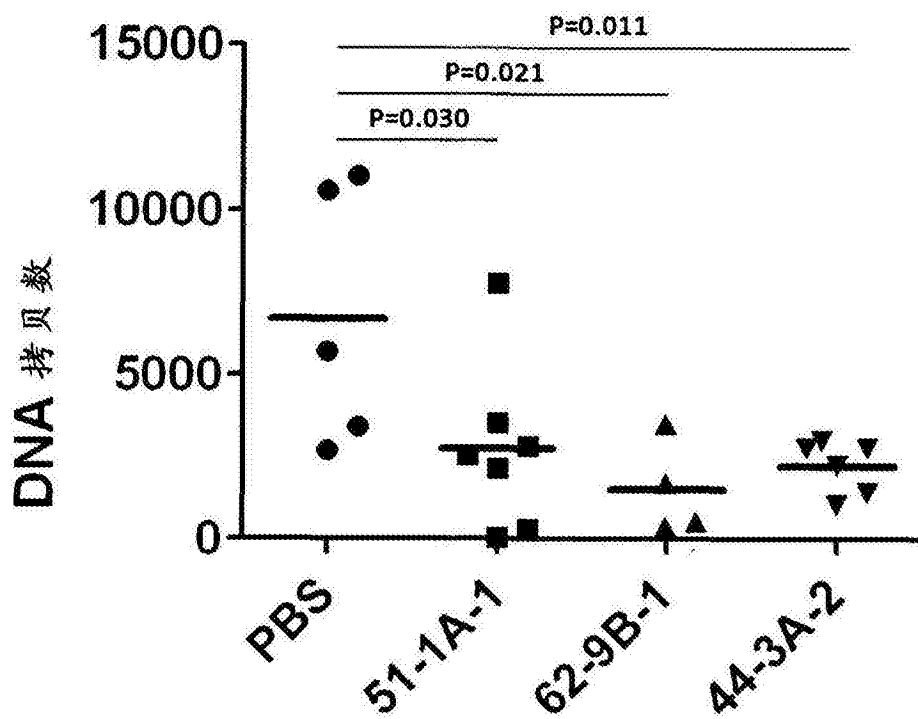


图26