

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/574
G01N 33/53



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97197912. X

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1165764C

[22] 申请日 1997. 7. 17 [21] 申请号 97197912. X
[30] 优先权
[32] 1996. 7. 18 [33] US [31] 60/022,125
[32] 1997. 4. 9 [33] US [31] 08/838,682
[86] 国际申请 PCT/US1997/012035 1997. 7. 17
[87] 国际公布 WO1998/003873 英 1998. 1. 29
[85] 进入国家阶段日期 1999. 3. 15
[71] 专利权人 康乃尔研究基金会有限公司
地址 美国纽约州
[72] 发明人 N · H · 邦德
审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 齐曾度

权利要求书 8 页 说明书 48 页 附图 14 页

[54] 发明名称 抗 PSMA 抗体或其抗原结合部分，
以及它们的用途

[57] 摘要

本发明涉及或者识别前列腺特异性膜抗原胞外域，或者与前列腺特异性膜抗原结合并用其内在化的抗体或其结合部分、探针、配体或其它生物学药物的用途。可以将这些生物学药物标记并用于检测癌组织，特别是邻近或包含表达前列腺特异性膜抗原胞外域的血管内皮细胞的癌组织。也可以将所述标记的生物学药物用于检测正常的、良性增生的或癌变的前列腺上皮细胞或其部分。它们也可以单独使用或与有效消除或杀伤这类细胞的物质结合，作为前列腺癌或其它癌症的治疗。还公开了四个杂交瘤细胞系，它们每个均产生识别正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞或其部分的前列腺特异性膜抗原胞外域的单克隆抗体。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种抗体或其抗原结合部分，其与前列腺特异性膜抗原的细胞外结构域结合，并允许细胞内活性细胞毒药剂的治疗性应用。
- 5 2. 一种抗体或其抗原结合部分，其与前列腺特异性膜抗原的细胞外结构域结合，其中抗体是 IgG 或其抗原结合部分来源于 IgG。
3. 一种抗体或其抗原结合部分，其与前列腺特异性膜抗原的细胞外结构域结合，其中抗体或其抗原结合部分是通过用 PSMA 表达细胞免疫小鼠产生的。
- 10 4. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分是用 PSMA 表达细胞免疫小鼠产生的。
5. 权利要求 2 的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分是用 PSMA 表达细胞免疫小鼠产生的。
6. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，其中抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。
- 15 7. 权利要求 6 的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分是选自 E99、J415、J533 或 J591 的单克隆抗体。
8. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分是由保藏号选自 ATCC HB-12101、HB-12109、HB-12127 和 HB-12126 的杂交瘤产生的。
- 20 9. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分与前列腺特异性膜抗原的表位结合，所述表位被由保藏号选自 ATCC HB-12101、HB-12109、HB-12127 和 HB-12126 的杂交瘤产生的单克隆抗体识别。
- 25 10. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分包括一个抗原结合部分，所述抗原结合部分选自 J591 的可变重链的抗原结合部分和 J591 的可变轻链的抗原结合部分。

11. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分包括 J591 的可变重链的抗原结合部分和 J591 的可变轻链的抗原结合部分。

5 12. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分包括一个抗原结合部分，所述抗原结合部分选自 J415 的可变重链的抗原结合部分和 J415 的可变轻链的抗原结合部分。

13. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分包括 J415 的可变重链的抗原结合部分和
10 J415 的可变轻链的抗原结合部分。

14. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分包括一个抗原结合部分，所述抗原结合部分的氨基酸序列选自可变重链 SEQ ID NO:8、可变轻链 SEQ ID NO:19、由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变重链的氨基酸序列和由
15 杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变轻链的氨基酸序列。

15. 权利要求 14 的抗体或抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分包括：

氨基酸序列选自可变重链 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列和由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变重链的氨基酸序列的抗原结合部分；和

20 氨基酸序列选自可变轻链 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列和由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变轻链的氨基酸序列的抗原结合部分。

16. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分包括氨基酸序列选自可变重链 SEQ ID NO:8 和可变轻链 SEQ ID NO:19 的抗原结合部分。

25 17. 分离的权利要求 16 的抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分包括氨基酸序列为可变重链 SEQ ID NO:8 和氨基酸序列为可变轻链 SEQ ID NO:19 的抗原结合部分。

18. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分，

其中抗体或其抗原结合部分包括氨基酸序列选自由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变重链的氨基酸序列和由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变轻链的氨基酸序列的抗原结合部分。

5 19. 分离的权利要求 18 的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括氨基酸序列包括由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变重链的氨基酸序列和由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变轻链的氨基酸序列的抗原结合部分。

10 20. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括一个抗原结合部分, 其氨基酸序列由选自下列的核酸序列编码: 可变重链 SEQ ID NO:6、可变轻链 SEQ ID NO:17、编码由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变重链的核酸序列和由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变轻链的核酸序列。

21. 分离的权利要求 20 的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括:

15 由选自可变重链 SEQ ID NO:6 的序列和编码杂交瘤 ATCC HB-12126 的可变重链的核酸序列的核酸序列编码的抗原结合部分; 和

由选自可变轻链 SEQ ID NO:17 的序列和编码杂交瘤 ATCC HB-12126 的可变轻链的核酸序列的核酸序列编码的抗原结合部分。

20 22. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括一个抗原结合部分, 其氨基酸序列由选自下列的核酸序列编码: 可变重链 SEQ ID NO:6 和可变轻链 SEQ ID NO:17。

25 23. 分离的权利要求 22 的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括其氨基酸序列由可变重链 SEQ ID NO:6 的核酸序列编码的抗原结合部分和由可变轻链 SEQ ID NO:17 的核酸序列编码的抗原结合部分。

24. 权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括一个抗原结合部分, 其氨基酸序列由

选自下列的核酸序列编码: 编码由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变重链的核酸序列, 和编码由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变轻链的核酸序列。

25. 分离的权利要求 24 的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括氨基酸序列由编码由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变重链的核酸序列编码的抗原结合部分, 和氨基酸序列由编码由杂交瘤 ATCC HB-12126 产生的可变轻链的核酸序列编码的抗原结合部分。

26. 分离的权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括一个抗原结合部分, 其氨基酸序列选自: 由杂交瘤 ATCC HB-12109 产生的可变重链的氨基酸序列, 和由杂交瘤 ATCC HB-12109 产生的可变轻链的氨基酸序列。

27. 分离的权利要求 26 的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括由杂交瘤 ATCC HB-12109 产生的可变重链的氨基酸序列的抗原结合部分, 和由杂交瘤 ATCC HB-12109 产生的可变轻链的氨基酸序列的抗原结合部分。

28. 分离的权利要求 1-5 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括一个抗原结合部分, 其氨基酸序列由选自下列的核酸序列编码: 编码由杂交瘤 ATCC HB-12109 产生的可变重链的抗原结合部分的核酸序列, 和编码由杂交瘤 ATCC HB-12109 产生的可变轻链的抗原结合部分的核酸序列。

29. 分离的权利要求 28 的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包括氨基酸序列由编码由杂交瘤 ATCC HB-12109 产生的可变重链的核酸序列编码的抗原结合部分, 和氨基酸序列由编码由杂交瘤 ATCC HB-12109 产生的可变轻链的核酸序列编码的抗原结合部分。

30. 权利要求 1-5 或 7 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗原结合部分选自 Fab 片段、F(ab')₂ 片段和 Fv 片段。

31. 权利要求 1-5 或 7 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分用前列腺特异性膜抗原内在化。

32. 权利要求 1-5 或 7 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分与细胞毒药物偶联。

5 33. 权利要求 32 的抗体或其抗原结合部分, 其中细胞毒药物选自治疗药物、放射性化合物、来源于植物、真菌或细菌的分子、生物蛋白和它们的混合物。

34. 权利要求 33 的抗体或其抗原结合部分, 其中细胞毒药物是放射性化合物。

10 35. 权利要求 34 的抗体或其抗原结合部分, 其中放射性化合物是 α 发射体、 β 发射体或 γ 发射体。

36. 权利要求 35 的抗体或其抗原结合部分, 其中 α 发射体选自 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 和 ^{211}At 。

15 37. 权利要求 35 的抗体或其抗原结合部分, 其中 β 发射体是 ^{186}Re 或 ^{90}Y 。

38. 权利要求 35 的抗体或其抗原结合部分, 其中 γ 发射体是 ^{131}I 。

39. 权利要求 33 的抗体或其抗原结合部分, 其中细胞毒药物是来源于细菌或植物的分子。

20 40. 权利要求 33 的抗体或其抗原结合部分, 其中细胞毒药物是生物蛋白。

41. 权利要求 1-5 或 7 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分与标记物偶联。

25 42. 权利要求 41 的抗体或其抗原结合部分, 其中标记物选自荧光标记、生物活性酶标记、核磁共振活性标记、发光标记和生色团标记。

43. 权利要求 42 的抗体或其抗原结合部分, 其中放射性标记是短程放射发射体。

44. 权利要求 42 的抗体或其抗原结合部分, 其中放射性标记选自 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{111}In 。

45. 权利要求 1-5 或 7 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分存在于还包含药用载体、赋形剂或稳定剂的混合物中。

46. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-5 或 7 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分。

47. 权利要求 1-5 或 7 中任一权利要求的抗体或其抗原结合部分在制备用于在受试者中治疗、预防癌症或延缓癌症发展的药物中的用途。

48. 权利要求 47 的用途, 其中抗体或其抗原结合部分与细胞毒药物偶联。

49. 权利要求 48 的用途, 其中细胞毒药物选自治疗药物、放射性化合物、来源于植物、真菌或细菌的分子、生物蛋白和它们的混合物。

50. 权利要求 49 的用途, 其中细胞毒药物是放射性化合物。

51. 权利要求 50 的用途, 其中放射性化合物是 α 发射体、 β 发射体或 γ 发射体。

52. 权利要求 51 的用途, 其中 α 发射体选自 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 和 ^{211}At 。

53. 权利要求 51 的用途, 其中 β 发射体是 ^{186}Re 或 ^{90}Y 。

54. 权利要求 51 的用途, 其中 γ 发射体是 ^{131}I 。

55. 权利要求 49 的用途, 其中细胞毒药物是来源于细菌或植物的分子。

56. 权利要求 49 的用途, 其中细胞毒药物是生物蛋白。

57. 权利要求 47 的用途, 其中抗体或其抗原结合部分与标记物偶联。

58. 权利要求 57 的用途, 其中标记物选自荧光标记、生物活性酶标记、核磁共振活性标记、发光标记和生色团标记。

59. 权利要求 58 的用途, 其中放射性标记是短程放射发射体。
60. 权利要求 58 的用途, 其中放射性标记选自 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{111}In 。
61. 权利要求 47 的用途, 其中药物还包含一种药用载体、赋形剂或稳定剂。
62. 权利要求 47 的用途, 其中受试者是哺乳动物。
63. 权利要求 62 的用途, 其中哺乳动物是人。
64. 权利要求 47 的用途, 其中癌症是前列腺癌。
65. 权利要求 47 的用途, 其中癌症选自肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌或转移到肝脏的腺癌。
66. 权利要求 47 的用途, 其中抗体或其抗原结合部分与邻近非前列腺癌细胞或在非前列腺癌细胞间的血管内皮细胞结合。
67. 权利要求 47 的用途, 其中药物可经胃肠、静脉、动脉或肌肉内施用。
68. 权利要求 47 的用途, 其中抗体或抗原结合部分与肝细胞结合。
69. 权利要求 47 的用途, 其中抗体或其抗原结合部分有效地引发内源性宿主免疫功能。
70. 权利要求 69 的用途, 其中内源性宿主免疫功能是补体介导的细胞毒性或抗体依赖型细胞毒性。
71. 权利要求 47 的用途, 其中抗体或其抗原结合部分可与外科治疗、放射性治疗、化疗、免疫治疗或激素替换结合施用。
72. 权利要求 71 的用途, 其中激素替换包括用雌激素和抗雄激素药剂治疗。
73. 权利要求 72 的用途, 其中抗雄激素药剂是阻断或抑制睾酮作用的药剂。
74. 权利要求 64 的用途, 其中前列腺癌是转移性的。
75. 权利要求 74 的用途, 其中转移性的前列腺癌包括骨髓或淋

巴结转移。

76. 权利要求 47 的用途，其中药物可在前列腺切除后施用。

77. 权利要求 47 的用途，其中药物可与第二抗体施用，所述第二抗体或其抗原结合部分可与前列腺特异性膜抗原结合。

5 78. 保藏号为 ATCC HB-12101、HB-121-9、HB-12127 或 HB-12126 的杂交瘤细胞系。

79. 一种分离的细胞，其产生分离的权利要求 1-5 或 7 抗体或其抗原结合部分。

80. 权利要求 79 的细胞，其来源于淋巴细胞系。

10

抗 PSMA 抗体或其抗原结合部分，以及它们的用途

5 本申请要求保护 1996 年 7 月 18 日提交的 60/022,125 号美国临时专利申请的利益，本申请是 1997 年 4 月 9 日提交的美国专利申请第 08/838,682 号的部分继续申请，第 08/838,682 号美国专利申请要求保护 1996 年 5 月 6 日提交的美国临时专利申请序号第 60/016,976 号的利益。

10

发明领域

本发明涉及用生物学药物的癌症的治疗和诊断。

发明背景

15 尽管对某些类型的癌症治疗有所提高，但是在美国它仍然是死亡的主要原因。由于在大多数情况下，早期诊断可大大增加癌症完全缓解的机会，所以非常希望医生在实质的肿瘤发生前能够检测到癌症。然而，能快速并准确地检测许多类型癌症的方法的发展继续向医学界 (the medial community) 提出挑战。前列腺癌就是一个这类用作例证的癌症。

20

前列腺癌是男性中最常见的癌症，在美国 1996 年估计有 317,000 个病例。它是每年估计死于肿瘤的 40,000 名死亡的男性中第二个主要的死亡原因。需要及时检测和治疗以限制由前列腺癌导致的死亡率。

25 前列腺癌的检测

当转移时，前列腺癌对骨头和淋巴结有独特的偏爱。Saitoh 等，“前列腺癌的转移形式。涉及器官的位点和数量间的联系，” Cancer, 54: 3078-3084(1984)。在临床诊断的时候，通过放射性核素扫描多达

25%的病人有可证实的骨转移。Murphy, G. P. 等, “由美国外科医师学院在美国进行的前列腺癌的国家调查” J. Urol., 127:928-939 (1982)。已证实要准确估计关键的牵涉情况是困难的。诸如计算机 X 线断层照相术(“CT”)或磁共振(“MR”)成像的成像技术通过标准而不是大小(即>1 cm)不能区别转移的前列腺癌累及的淋巴结。因此, 通过定义, 这些成像形式在小体积(<1 cm)病变的检测中是固有地不敏感, 并且在较大体积腺病的检测中是非特异性的。最近的研究评价了在临床定位的前列腺癌的病人中 MR 的准确度。Rifkin 等, “在早期前列腺癌中磁共振成像与超声波检查的比较” N. Engl. J. Med., 323:621-626(1990)。在这项研究中, 194 例病人进行 MR, 而这些病人的 185 例有淋巴结解剖。23 例(13%)病人有病理学累及的淋巴结。MR 只对这 23 个病例的 1 例表示怀疑, 导致敏感率为 4%。用 CT 扫描也获得类似的结果。Gasser 等, “在早期前列腺癌中 MRI 与超声波检查” N. Engl. J. Med. (通讯), 324(7): 49-495(1991)。

Gutman 等, J. Clin. Invest 17:473(1938)首次报道了在有转移的前列腺癌病人中血清酸性磷酸酶活性的升高。在前列腺的癌症中, 前列腺酸性磷酸酶从癌组织释放到血流中, 结果是总血清酸性磷酸酶水平大大增加至正常值以上。从那时起进行了这个酶以及它与前列腺癌的关系的大量研究, 如 Yam, Amer. J. Med. 56:604(1974)。然而, 在大约 65-90%的有骨转移的前列腺癌病人中、在大约 30%X 线诊断证实的无骨转移的病人中、以及在大约只有 5-10%的缺少临床可证实的转移的病人中测定的血清酸性磷酸酶活性升高。

尝试发展对前列腺酸性磷酸酶的特异性检测的先有技术仅仅获得有限的成功, 因为依赖于对所谓的“特异性”底物的酶活性技术不能考虑到在这许多的酸性磷酸酶中与前列腺来源的酶活性不相关的其它生物化学和免疫化学的差异。在同工酶的情况下, 即遗传学上限定的具有相同的酶活性特征和相似的分子结构、但是氨基酸序列和/或含量不同并且因此在免疫化学上可区别的酶, 似乎仅仅通过特定底物的

选择内在地不可能区别不同的同工酶形式。因此，并不惊奇这些先有技术方法没有一个对前列腺酸性磷酸酶活性的直接检测有高度特异性，参见如 Cancer 5:236(1952); J. Lab. Clin. Med. 82:486 (1973); Clin. Chem. Acta. 44: 21 (1973);和 J. Physiol. Chem. 356:1775 (1975)。

除了似乎在许多用于检测前列腺酸性磷酸酶的在先技术试剂中固有的非特异性的前述问题，还有已报道的血清酸性磷酸酶的升高与其它疾病相关，这使获得前列腺癌的准确临床诊断的问题更复杂。例如，Tuchman 等，Am. J. Med. 27:959(1959)注意到在患高歇病的病人中血清酸性磷酸酶的水平似乎升高。

由于在开发对前列腺酸性磷酸酶的“特异性”底物的固有的困难，所以一些研究者开发了检测前列腺酸性磷酸酶的免疫化学方法。然而，以前报道的免疫化学方法有其自身的缺点，这阻碍了它们的广泛接受。例如，Shulman 等，Immunology 93:474 (1964)描述了检测人前列腺酸性磷酸酶的免疫扩散试验。用由通过从患前列腺病的病人的直肠按摩获得的前列腺液抗原制备的抗血清，在对正常肾、睾丸、肝和肺的抽提物的双向扩散技术中没有观察到交叉反应沉淀线。然而，即使使用大量抗原时，以及使用大量可以与存在于前列腺液中与其它抗原性不相关的血清蛋白成分交叉反应的抗血清时，这种方法有敏感性有限的缺点。

Chu 等的 WO 79/00475 描述了检测与前列腺癌相关的前列腺酸性磷酸酶同工酶形式的方法，该方法消除了许多上述缺点。然而，为制备其抗体，需要从中提取与前列腺癌相关的诊断学上相关的前列腺酸性磷酸酶同工酶形式的前列腺癌组织的来源，这提出了实际问题。

在最近几年，为了开发特异性诊断试剂，已耗费了相当大的努力以鉴别对各种类型恶性肿瘤的酶或抗原标志物。理想的肿瘤标志物将连同其它的特征，表现出组织或细胞类型特异性。以前的研究人员已证实人类前列腺组织特异性抗原的出现。

前列腺癌的治疗

如 W. J. Catalona 在“前列腺癌的控制” New Engl. J. Med., 331(15): 996-1004 (1994) 中描述, 前列腺癌通过警惕的等待、有效的治疗和缓解可以获得控制。

- 5 对于预期寿命不到 10 年的人, 当对良性增生的部分进行前列腺切除术时发现的轻度、早期的前列腺癌, 警惕的等待是合适的。这种癌症在检测后的最初 5 年很少发展。在另一方面, 对于更年轻的人, 有效的治疗通常更合适。

- 10 当前列腺癌被定位并且病人的预期寿命为 10 年或更长时, 前列腺根除切除术提供根除该疾病的最好机会。历史上, 这个方法的缺点是大多数癌症在它们被检测的时候已扩散超过手术的范围。然而, 使用前列腺特异性抗原测试允许早期检测前列腺癌。结果, 外科手术扩展得越小, 则并发症越少。患大的、进行性肿瘤的病人通过前列腺根除切除术治疗不太成功。

- 15 外科手术后, 如果有可检测的血清前列腺特异性抗原浓度, 则表明癌症顽固。在许多情况下, 通过放射治疗可以降低前列腺特异性抗原的浓度。然而, 在 2 年内, 该浓度经常再次增加。

- 20 放疗也已作为对前列腺根除切除术的替代方法使用。通常用放疗的病人是那些年纪较大和健康状况较差的病人, 以及那些患较严重的、临床上更晚期的肿瘤的病人。特别推荐的方法是涉及三维的外束疗法(external-beam therapy)、将该放射的区域设计为符合治疗组织体积的保形放疗(conformal radiation therapy)、用超声制导(ultrasonund guidance)植入放射性化合物种子的组织内放射治疗、以及外束疗法和组织内放射治疗的联合。

- 25 对于患局部晚期疾病的病人的治疗, 在前列腺根除切除术或放疗前或后已使用激素疗法。激素疗法是患播散性前列腺癌的男性的主要治疗形式。睾丸切除术降低血清睾酮的浓度, 而雌激素疗法同样是有利的。来自雌激素的己烯雌酚是另一个有用的激素疗法, 它有引起心

血管毒性的缺点。当给予促性腺激素释放激素激动剂时，睾酮浓度最终降低。氟利坦和其它非类固醇化合物的抗雄激素药物阻断睾酮与其胞内受体的结合。结果，它阻断睾酮的作用，增加血清睾酮的浓度并且使病人能保持有性交能力，这是前列腺根除切除术和放疗后的一个重要问题。

细胞毒性化疗在治疗前列腺癌中大多无效。它的细胞毒性使这种治疗不适于上了年纪的病人。另外，前列腺癌对细胞毒药物有相对抗性。

10 在前列腺癌的检测和治疗中单克隆抗体的应用

理论上，放射性标记的单克隆抗体(“mAb”)提供增强在淋巴结和在别处检测前列腺癌的敏感性和特异性的潜力。尽管先前已针对前列腺相关抗原制备了许多 mAb，但考虑到成像的目的，这些 mAb 没有一种特异性地产生。尽管如此，临床的需要已导致某些这类 mAb 作为可能的成像药物的评估。Vihko 等，“用前列腺酸性磷酸酶特异性抗体的前列腺癌的放射成像” Biotechnology in Diagnostics, 131-134 (1985)、Babaian 等，“用 111-碘标记的单克隆抗体 PAY 276 的转移性前列腺癌的放射免疫学成像” J.Urol., 137:439-443 (1987); Leroy 等，“在前列腺癌中淋巴结侵害的放射免疫检测。在体内碘 123 (123-I) 标记的单克隆抗前列腺酸性磷酸酶(PAP)227 A F (ab')₂ 抗体片段的应用，” Cancer, 64:1-5(1989)、Meyers 等，“转移性前列腺癌的单克隆抗体成像的发展” The Prostate, 14:209-220 (1989)。

在某些情况下，开发用于前列腺癌的检测和/或治疗的单克隆抗体识别恶性前列腺组织的特异性抗原。因此将这类抗体用于从良性的前列腺组织中区别恶性前列腺组织(用于治疗 and 检测)。参见 Bazinet 等的美国专利第 4,970,299 号和 Freeman 等的美国专利第 4,902,615 号。

其它的单克隆抗体与在所有的癌变或良性的前列腺上皮细胞上

的表面抗原均反应。参见 Chu 等的美国专利第 4,446,122 号和 Re 33,405 号、McEwan 等的美国专利第 4,863,851 号和 Ueda 等的美国专利第 5,055,404 号。然而,通过这些单克隆抗体检测的抗原在血液中存在并且因此与在肿瘤位点的抗原竞争所述克隆抗体。这产生背景干
5 扰,使这类抗体的使用不适于体内成像。在治疗中,如果这类抗体与细胞毒性药物结合,则可能对其它器官有害。

Horoszewicz 等“在前列腺上皮细胞和前列腺癌病人的血清中针对一种新的抗原标志物的单克隆抗体” Anticancer Research, 7: 927-936 (1987) (“Horoszewicz”) 以及 Horoszewicz 的美国专利第
10 5,162,504 号描述了一种抗体,称为 7E11,它识别前列腺特异性膜抗原(“PSMA”)。Israeli 等的“编码前列腺特异性膜抗原的互补 DNA 的分子克隆” Cancer Research, 53:227-230 (1993) (“Israeli”) 描述了 PSMA 的克隆和测序,并报道了 PSMA 是前列腺特异性的,并且显示在转移部位和激素不应状态中表达水平增加。其它研究已表明相对于
15 正常前列腺或良性增生的前列腺的细胞,PSMA 在前列腺癌细胞中表达更强。而且,在血清中未发现 PSMA (Troyer 等“在组织提取物和体液中的前列腺特异性膜抗原(PSMA)的检测和特征鉴定” Int. J. Cancer, 62:552-558 (1995))。

这些特征使 PSMA 成为一个有吸引力的靶,用于前列腺癌的成像和
20 治疗的抗体介导的靶向。用铟标记的 7E11 的成像研究已显示,该抗体正好定位于前列腺和转移的部位。另外,与其它常用的如 CT 和 MR 成像或骨扫描的成像技术比较,7E11 似乎明显提高检测疾患的敏感性。Bander, “用于成像和前列腺癌治疗的单克隆抗体的当前状况” Sem. In Oncology, 21:607-612 (1994)。

25 然而,7E11 和其它已知介导成像和治疗的 PSMA 的抗体有几个缺点。首先,PSMA 是一个已知有短的胞内尾和长的胞外域的完整膜蛋白。生物化学特性和图谱(Troyer 等“前列腺特异性膜抗原的 7E11-C5.3 抗原决定簇的生物化学特征和图谱” Urol. Oncol., 1:29-37

(1995)) 已显示 7E11 抗体结合的抗原决定簇或抗原性位点存在于该分子的胞内部分。因为抗体分子在正常环境中不能穿过细胞膜, 除非它们与分子的胞外部分结合并在胞内移位, 所以 7E11 抗体在另外的健康、存活的细胞中不能利用其抗原靶位点。

5 因此, 采用 7E11 的成像限于肿瘤保藏物内的死细胞中的检测。另外, 7E11 抗体的治疗用途是有限的, 因为仅仅可以有效地导向已经死亡或含有大比例死细胞的组织的细胞。

 虽然在一种特殊类型的癌症的诊断和治疗中不适应之处和问题是先前讨论的焦点, 但前列腺癌仅仅是一个代表模型。大量其它癌症
10 的诊断和治疗有同样的问题。

 本发明的目标在于克服先有技术抗体在诊断和治疗前列腺癌和其它类型癌症中的缺陷。

发明概述

15 本发明的一个方面涉及消除或杀伤癌细胞的方法。该方法涉及提供一种生物学药物, 该生物学药物当与前列腺特异性膜抗原胞外域接触时, 识别前列腺特异性膜抗原胞外域。在对允许该生物学药物与邻近所述癌细胞的血管内皮细胞结合和杀伤或消除所述癌细胞均有效的条件下, 将这些生物学药物与邻近所述癌细胞的血管内皮细胞接触。
20 该生物学药物可以单独使用, 或可在该生物学药物与邻近所述癌细胞的血管内皮细胞结合时, 将该生物学药物与有效杀伤或消除所述癌细胞的物质结合。

 在按照本发明的消除或杀伤癌细胞的方法的一个特别推荐的实施方案中, 当与前列腺特异性膜抗原胞外域接触时, 该生物学药物与
25 这类细胞的前列腺特异性膜抗原结合并且内在化。推荐用于按照本发明的消除或杀伤癌细胞的方法的生物学药物是抗体或其结合部分、探针或配体。本发明的方法对杀伤或消除肾癌、泌尿道上皮(Urothelial)癌、结肠癌、直肠癌、肺癌和乳腺癌的癌细胞和转移至肝脏的腺癌的

癌细胞特别有用。

本发明的另一方面涉及在生物学样品中检测癌组织的方法。这个方法涉及提供一种生物学药物，当该生物学药物与前列腺特异性膜抗原胞外域接触时，它与前列腺特异性膜抗原胞外域结合。当该生物学药物与邻近该癌组织或在该癌组织内的血管内皮细胞结合时，将该生物学药物与有效允许检测邻近该癌组织或在该癌组织内的血管内皮细胞的标记结合。在有效允许该生物学药物与该生物学样品中邻近该癌组织或在该癌组织内的血管内皮细胞结合的条件下，将该生物学样品与具有标记的该生物学药物接触。通过检测该标记检测在该生物学样品中癌组织的存在。

在按照本发明的检测癌组织的方法的一个特别推荐的实施方案中，该生物学药物是这样一种药物，当它与前列腺特异性膜抗原胞外域接触时，它与该前列腺特异性膜抗原结合并且内在化。推荐用于按照本发明的检测癌组织的方法的生物学药物是抗体或其结合部分、探针或配体。该方法可特别用于检测肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、直肠癌、肺癌和乳腺癌的癌组织和转移至肝脏的腺癌的癌组织。

本发明的再一个方面涉及消除或杀伤正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的方法。该方法涉及提供识别前列腺特异性膜抗原胞外域的生物学药物。该生物学药物可以单独使用，或可以当该生物学药物与所述细胞结合时，将其与有效杀伤所述细胞的物质结合。然后在允许该生物学药物与前列腺特异性膜抗原胞外域结合和杀伤或消除所述癌细胞均有效的条件下，将这些生物学药物与所述细胞接触。

在按照本发明的消除或杀伤正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的方法的一个特别推荐的实施方案中，该生物学药物与这类细胞的前列腺特异性膜抗原结合并且内在化。推荐的用于按照本发明的消除或杀伤正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的方法的生物学药物是抗体或其结合部分、探针或配体。

本发明的另外一个方面涉及在生物学样品中检测正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞或其部分的方法。该方法涉及提供与前列腺特异性膜抗原胞外域结合的生物学药物。当该生物学药物与所述细胞或其部分结合时，将该生物学药物与对允许检测所述细胞或其部分有效的标记结合。在对允许该生物学药物与该生物学样品中任何所述细胞或其部分的前列腺特异性膜抗原胞外域结合有效的条件下，将该生物学样品与具有标记的该生物学药物接触。通过检测该标记检测在该生物学样品中任何细胞或其部分的存在。

在按照本发明的检测正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的方法的一个特别推荐的实施方案中，该生物学药物与这类细胞的前列腺特异性膜抗原结合并且内在化。推荐的用于按照本发明的检测正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的方法的生物学药物是抗体或其结合部分、探针或配体。

本发明的另外一个方面关于识别前列腺特异性膜抗原胞外域的生物学药物。在一个推荐的实施方案中，分离的该生物学药物与前列腺特异性膜抗原结合并且内在化。推荐的按照本发明的识别前列腺特异性膜抗原胞外域的分离的生物学药物是分离的抗体或其结合部分、探针或配体。也公开了产生这些类型的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

本发明的生物学药物识别正常的、良性增生的、和癌变的前列腺上皮细胞的抗原的胞外域。不象 7E11 抗体，该抗体识别仅仅在细胞裂解后暴露于细胞外的前列腺相关抗原的抗原决定簇，本发明的生物学药物与暴露在细胞外的活的前列腺细胞中的抗原决定簇结合。使用本发明的生物学药物，可将活的、正常的不固定的、良性增生的、和癌变的前列腺上皮细胞作为靶，它使治疗和诊断更有效。在治疗前列腺癌的一个推荐的实施方案中，本发明的生物学药物也与前列腺特异性膜抗原结合并用其内在化，这允许细胞内活性细胞毒药剂的治疗性应用。

附图简述

图 1 是在 4 °C 温育后在 LNCaP 细胞表面上的金标记的单克隆抗体 J591 的免疫电子显微照片。

5 图 2 是用金标记的单克隆抗体 J591 处理的 LNCaP 细胞在 37 °C 温育 5 分钟后的免疫电子显微照片。

图 3 是用金标记的单克隆抗体 J591 处理的 LNCaP 细胞在 37 °C 温育 10 分钟后的免疫电子显微照片。

图 4 是用金标记的单克隆抗体 J591 处理的 LNCaP 细胞在 37 °C 温育 15 分钟后的免疫电子显微照片。

10 图 5 是用金标记的单克隆抗体 J591 处理的 LNCaP 细胞在 37 °C 温育 10 分钟后的免疫电子显微照片，显示 J591 在核内体内。

图 6 总结了单克隆抗体 J591 重链的测序策略。

图 7 显示单克隆抗体 J591 重链的核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 1)、对应的反向非编码链的核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 2)和对应的推断的氨基酸序列(称为 SEQ. ID. No. 3、4 和 5)。

图 8 是单克隆抗体 J591 的重链与小鼠重链亚组 IIA 的共有序列的比较。

图 9 总结了单克隆抗体 J591 的 κ 轻链的测序策略。

20 图 10 显示单克隆抗体 J591 κ 轻链的核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 9)、对应的反向编码链核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 10)和对应的推断的氨基酸序列(称为 SEQ. ID. No. 11、12 和 13)。

图 11 是单克隆抗体 J591 的 κ 轻链与小鼠 κ 链亚组 V 的共有序列的比较。

25 图 12A-12F 是显示 mAb J591 对各种癌症的新脉管系统的免疫化学反应的显微照片(250 × 放大倍数)。

本发明的详细描述

本发明的一个方面涉及消除或杀伤正常的、良性增生的和癌变的

前列腺上皮细胞的方法。该方法涉及提供诸如抗体或其结合部分、探针、或配体的生物学药物，该生物学药物与这类细胞的前列腺特异性膜抗原胞外域(即前列腺特异性膜抗原在这类细胞外面的一部分)结合。该生物学药物可单独使用，或当该生物学药物与所述细胞结合时，
5 可以将该生物学药物与有效杀伤所述细胞的物质结合。然后在对允许该生物学药物与前列腺特异性膜抗原胞外域结合和杀伤或消除所述细胞均有效的条件下，将这些生物学药物与所述细胞接触。通过在对允许该生物学药物与前列腺特异性膜抗原胞外域结合和杀伤或消除所述癌细胞均有效的条件下，将该生物学药物以其优选形式给予哺乳动物，在活的哺乳动物中实施这类接触。这种给药可口服或肠胃外进行。

在按照本发明的消除或杀伤正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的方法的一个特别推荐的实施方案中，该生物学药物与这类细胞的前列腺特异性膜抗原结合并且内在化。再者，该生物学药物可以单独使用。或者，当该生物学药物与前列腺特异性膜抗原结合时，
15 以及当该生物学药物用该前列腺特异性膜抗原内在化时，将该生物学药物与有效杀伤所述细胞的物质结合。

该生物学药物用该前列腺特异性膜抗原内在化的机制对本发明的实施不是关键性的。例如，该生物学药物可以诱导前列腺特异性膜抗原的内在化。或者，该生物学药物的内在化可以是前列腺特异性膜抗原的常规内在化的结果。

上述生物学药物(即诸如抗体或其结合部分、探针或配体的生物学药物，当与前列腺特异性膜抗原胞外域接触时，该生物学药物识别前列腺特异性膜抗原胞外域，并且最好是用其内在化)可以用于消除或杀伤癌细胞。在本发明的这个方面，该生物学药物可以单独使用，或
25 当该生物学药物与邻近癌细胞的血管内皮细胞结合时，可以将该生物学药物与有效杀伤所述癌细胞的物质结合。将这些生物学药物与邻近所述癌细胞的血管内皮细胞接触。在对允许该生物学药物与邻近所述癌细胞的血管内皮细胞结合有效的条件下，并且另外，在对杀伤或消

除所述癌细胞有效的条件下实施该接触。杀伤或消除所述癌细胞的机制对本发明的实施不是关键性的。例如，通过作为该生物学药物与邻近它们的血管内皮细胞结合的结果，可以直接杀伤或消除所述癌细胞。或者，该生物学药物可以杀伤、消除其结合的血管内皮细胞或者改变所述细胞性质，以使流向邻近它的癌细胞的血液停止或者减少，因此导致所述癌细胞被杀伤或消除。因此，本发明的方法对杀伤或消除在癌组织中的血管内皮细胞以及包含在癌组织内的癌细胞特别有用。

在按照本发明的消除或杀伤癌细胞的方法的一个特别推荐的实施方案中，使用的该生物学药物是这样一种生物学药物，当它与前列腺特异性膜抗原胞外域接触时，它与前列腺特异性膜抗原胞外域结合并用其内在化。本发明的方法对杀伤或消除癌变的前列腺上皮细胞以及非癌变前列腺上皮细胞的癌细胞特别有用。非癌变前列腺上皮细胞的癌细胞的例子是肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、直肠癌、肺癌和乳腺癌的癌细胞和转移至肝脏的腺癌的癌细胞。虽然本发明的方法可以用于杀伤或消除任何表达前列腺特异性膜抗原胞外域或其一部分的细胞或其生存依赖于表达前列腺特异性抗原胞外域或其部分的细胞的细胞，但是本发明的方法对杀伤或消除癌细胞特别有用，因为不论癌症涉及何种类型，供应血液到癌组织(例如肿瘤、癌细胞的集合或其它癌块)的血管内皮细胞均表达前列腺特异性膜抗原胞外域。相反，供应血液到正常组织的血管内皮细胞不表达前列腺特异性膜抗原胞外域。

本发明的另外一个方面涉及在生物样品中检测正常的、良性增生的和癌变的上皮细胞或其部分的方法。该方法涉及提供诸如抗体或其结合部分、探针或配体的生物学药物，它与这类细胞的前列腺特异性膜抗原胞外域结合。当该生物学药物与所述细胞或其部分结合时，将该生物学药物与对允许检测所述细胞或其部分(如从这类正常的、良性增生的和癌变的细胞释放的前列腺特异性膜抗原或其片段)有效的标记结合。在对允许该生物学药物与该生物样品中任何所述细胞或

其部分的前列腺特异性膜抗原胞外域结合有效的条件下，将该生物学样品与具有标记的该生物学药物接触。通过检测该标记，检测在该生物学样品中任何细胞或其部分的存在。以其推荐的形式实施这类接触，包括在对允许该生物学药物与该生物学样品中的任何细胞或其部分的前列腺特异性膜抗原胞外域结合有效的条件下，在活的哺乳动物中给予该哺乳动物该生物学药物。而且，这种给药可口服或肠胃外进行。

可用本发明的方法筛选有与正常的、良性增生的、和癌变的上皮细胞或其部分相关的疾病的病人。或者，可用它鉴别这类疾病的复发，特别是当将该病定位在该病人的特定生物学材料中时。例如，在前列腺根除切除术后，在前列腺窝中可能遇到前列腺疾病的复发。用本发明的方法，通过给予该哺乳动物短程放射标记的抗体，然后例如用经直肠检测器探头在直肠检测该标记，可以检测复发。

或者，在血清或尿或其它体液样品中可以进行该接触步骤，例如以在体液中检测 PSMA 的存在。当在血清或尿样品中进行该接触时，最好是除了 PSMA，该生物学药物基本上不识别在血液中循环的抗原。因为完整的前列腺细胞不排泄或分泌 PSMA 到胞外环境中，所以在血清、尿、或其它体液中检测到 PSMA 通常表明前列腺细胞被裂解。因此，可以用本发明的生物学药物和方法通过监测血清、尿或其它体液中的 PSMA 的水平，测定前列腺癌治疗方案的有效性。

在按照本发明的检测正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的方法的一个特别推荐的实施方案中，诸如抗体或其结合部分、探针或配体的该生物学药物与这类细胞的前列腺特异性膜抗原结合并且内在化。此外，当该生物学药物与前列腺特异性膜抗原结合时以及该生物学药物用前列腺特异性膜抗原内在化时，将该生物学药物与有效允许检测所述细胞或其部分的标记结合。

本发明的另一方面涉及在生物学样品中检测癌组织的方法。这个方法涉及提供上述生物学药物(即诸如抗体或其结合部分、探针或配体

的生物学药物，当与前列腺特异性膜抗原胞外域接触时，该生物学药物识别前列腺特异性膜抗原胞外域)。当该生物学药物与邻近该癌组织或在癌组织内的血管内皮细胞结合时，将该生物学药物与有效检测允许邻近该癌组织或在癌组织内的血管内皮细胞的标记结合。然后将该生物学样品与具有标记的该生物学药物接触。在有效允许该生物学药物与该生物学样品中邻近该癌组织或在癌组织内的血管内皮细胞结合的条件下进行接触。通过检测该标记，检测在该生物学样品中癌细胞或其部分的存在。

与其使整个生物学样品与该生物学药物接触，不如设想可以用该生物学样品的一部分。例如，可将组织活检样品与该生物学药物接触，以确定在该组织活检样品中以及在从中获取它的更大的生物学样品中癌组织的存在。或者，可将该生物学药物与血清或尿样品接触，以确定在其中是否存在任何表达前列腺特异性膜抗原胞外域的血管内皮细胞。因为在癌组织的脉管系统而不是在正常组织的脉管系统中发现表达前列腺特异性膜抗原胞外域的血管内皮细胞，所以在血清或尿样品中检测到该标记表明，在活检样品取样的更大的生物学样品(如病人)中存在癌组织。

在按照本发明的检测癌组织的方法的一个特别推荐的实施方案中，使用的该生物学药物是这样一种生物学药物，当它与前列腺特异性膜抗原胞外域接触时，它与前列腺特异性膜抗原结合并用其内在化。可以用本发明的方法检测癌变的前列腺上皮细胞和含非癌变前列腺上皮细胞的癌细胞的癌组织。可用本发明的方法检测的含非癌变前列腺上皮细胞的癌细胞的癌组织，包括肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、直肠癌、肺癌和乳腺癌的癌组织以及转移至肝脏的腺癌的癌组织。

如以上表明，或者适于杀伤、消除或者适于检测癌细胞以及正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的生物学药物包括诸如单克隆抗体或多克隆抗体的抗体。另外，可以使用抗体片段、半抗体、杂种衍生物、探针和其它分子构成物。这些诸如抗体、其结合部分、探

针或配体的生物学药物与正常的、良性增生的、和癌变的前列腺上皮细胞中的前列腺特异性膜抗原胞外域结合。结果，当实施本发明的方法来杀伤、消除或检测正常的、良性增生的、和癌变的前列腺上皮细胞时，该生物学药物与所有的这类细胞结合，而不仅仅是与固定的细胞或与另外的其胞内抗原域暴露于细胞外环境的细胞接触。因此，该生物学药物的结合被浓缩在有前列腺上皮细胞的区域，不论这些细胞是固定还是非固定的、存活的还是坏死的。另外或者，诸如抗体、其结合部分、探针或配体的这些生物学药物与正常的、良性增生的、和癌变的前列腺上皮细胞中的前列腺特异性膜抗原或其部分结合并用其内在化。

可以通过本领域熟知的技术实现单克隆抗体的生产。大体上，该方法包括首先从哺乳动物(如小鼠)的脾中获得免疫细胞(淋巴细胞)，该哺乳动物已事先在体内或在体外用目的抗原免疫。然后将该抗体分泌淋巴细胞与(小鼠)骨髓瘤细胞或转化的细胞融合，这些细胞能在细胞培养中无限复制，因此产生无限增殖的、免疫球蛋白分泌细胞系。将获得的融合细胞或杂交瘤细胞培养，并且就所需要的单克隆抗体的产生筛选获得的集落。将产生这类抗体的集落克隆，并且在体内或体外生长以产生大量的抗体。融合这类细胞的理论基础和实践方法的描述参见 Kohler 和 Milstein, Nature 256:495 (1975)，它通过引用结合在本文中。

通过用本发明的蛋白或多肽在体内免疫动物(如小鼠)免疫哺乳动物的淋巴细胞。根据需要以最多至几周的间隔重复这种免疫，以获得足够效价的抗体。最后一次抗原加强后，处死该动物并取出脾细胞。

通过标准的和公知的技术，例如通过用聚乙二醇(“PEG”)或其它融合剂(参见 Milstein 和 Kohler, Eur. J. Immunol. 6:511 (1976)，它通过引用结合到本文中)实现与哺乳动物骨髓瘤细胞或其它能在细胞培养中无限复制的融合伙伴(partner)的融合。该无限增殖细胞系最好是鼠的，但是也可以得自包括但不限于大鼠和人类的其它哺乳动物种

的细胞，选择利用某些营养所需酶缺陷、能够快速生长、和有良好的融合能力的所述无限增殖细胞系。许多这类细胞系是本领域技术人员公知的，并且其它是经常被描述的。

5 产生多克隆抗体的方法也是公知的。通常可以通过将本发明的蛋白或多肽皮下给予新西兰白兔产生这类抗体，该新西兰兔已先抽血以获得免疫前血清。可以将所述抗原以每个部位 100 μ l 的总体积在 6 个不同的部位注射。每种注射的材料将包含合成的表面活性剂佐剂 pluronic 多元醇、或在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后含该蛋白或多肽的磨碎的丙烯酰胺凝胶。然后在第一次注射 2 周后将所述兔抽血，并且
10 每 6 周用同样的抗原定期加强 3 次。然后在每次加强 10 天后收集血清样品。然后通过亲和层析用相应的抗原捕获该抗体，从所述血清中回收多克隆抗体。最后，用 150 mg/Kg IV 戊巴比妥将所述兔安乐死。产生多克隆抗体的这种和其它的方法在 E. Harlow 等编辑的 Antibodies: A Laboratory Manual (1989) 中公开，该文献通过引用结合到本文中。

15 除了利用全抗体，本发明的方法还包括这类抗体的结合部分的使用。这类结合部分包括 Fab 片段、F(ab')₂ 片段和 Fv 片段。通过常规方法可以制备这些抗体片段，例如蛋白水解片段化方法，如 J. Goding, 在 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 98-118 页 (N.Y. Academic Press 1983) 中描述，它通过引用结合到本文中。

20 或者，本发明的方法可以利用在自然界发现的或通过重组 DNA 方法或其它生物学方法或分子方法合成制备的探针或配体。合适的探针或配体是与用本发明的单克隆抗体鉴别的前列腺特异性膜抗原胞外域结合的分子。其它合适的探针或配体是与前列腺特异性膜抗原结合并用其内在化的分子。这类探针或配体可以是例如蛋白、肽、植物凝集
25 素或核酸探针。

特别推荐使用以下表 1 中鉴定的单克隆抗体。

表 1

<u>单克隆抗体名称</u>	<u>杂交瘤细胞系的 ATCC 名称</u>
E99	HB-12101
J415	HB-12109
J533	HB-12127
J591	HB-12126

可以单独使用这些抗体，或作为与其它抗体或其它生物学药物的混合物的成分，来治疗癌症或使癌组织(特别是其中的血管内皮细胞)或有不同的表面抗原特征的前列腺上皮细胞成像。

无论该生物学药物是用于治疗还是用于诊断，它们均可通过口服、胃肠外、皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内、鼻内滴注、腔内或膀胱内滴注、在眼内、动脉内、损害部位内给予，或通过施用于粘膜给予该生物学药物，所述粘膜例如鼻、喉和支气管的粘膜。它们可以单独给予或与药学上或生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂一同给予，它们可以是固体或液体形式，例如片剂、胶囊剂、粉剂、溶液、悬液或乳液。

该固体单位剂量形式可以是常规类型的形式。该固体形式可以是诸如通常的明胶类型的胶囊剂，含所述生物学药物(例如本发明的抗体或其结合部分)和载体(例如润滑剂和诸如乳糖、蔗糖或玉米淀粉的惰性填充剂)。在另一个实施方案中，将这些成分用常规片剂基料(base)(诸如乳糖、蔗糖或玉米淀粉)与粘合剂(如阿拉伯胶、玉米淀粉、土豆淀粉或明胶)和崩解剂(如玉米淀粉、土豆淀粉或海藻酸)以及润滑剂(像硬脂酸或硬脂酸镁)结合制成片剂。

本发明的生物学药物也可以通过生理学上可接受的稀释剂和药用载体中的这些材料的溶液或悬液以注射剂型给予。这类载体包括诸如水和油的无菌液体，加入或没有加入表面活性剂和其它药学上和生理学上可接受的载体，包括辅助剂、赋形剂或稳定剂。例证性的油是

那些石油、动物、植物或合成来源的油，例如花生油、豆油或矿物油。通常，水、盐水、含水葡萄糖和相关的糖溶液以及诸如丙二醇或聚乙二醇的二醇是优选的液体载体，特别是对注射溶液而言。

5 对于用作气雾剂，可以将含本发明生物学药物的溶液或悬液随同适当的抛射剂(例如与常规辅助剂一起的丙烷、丁烷或异丁烷的烃类抛射剂)包装在加压的气雾剂容器中。也可以以诸如在喷雾器或雾化器中的非加压形式给予本发明的材料。

10 可以用所述生物学药物在体内检测癌组织(特别是其中的血管内皮细胞)和正常的、良性增生的、和癌变的前列腺上皮细胞。这种检测通过标记该生物学药物、给予哺乳动物该生物学药物、然后使该哺乳动物成像获得。

按照本发明可用于诊断成像的标记的例子是诸如 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 和 ^{188}Rh 的放射标记、诸如荧光素和若丹明的荧光标记、核磁共振活性标记、通过正电子发射 X 射线断层照相术(“PET”)扫描仪可检测的发射正电子的同位素、诸如虫荧光素的化学发光物以及诸如过氧化物酶或磷酸酶的酶标记。也可以使用短程放射发射体，例如通过短程检测器探头(例如经直肠探头)可检测的同位素。当这些同位素和经直肠探头联合使用时，它们在检测前列腺窝复发和 pelvic nodal 病特别有用。通过本领域已知的技术可以用这类试剂标记该生物学药物。例如，对于涉及抗体的放射标记，参见 Wensel 和 Meares, Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York (1983)，它通过引用结合到本文中。也可参见 D. Colcher 等，“在无胸腺小鼠中作为用于人类癌症异种移植物定位的放射药物的单克隆抗体的用途”，Meth. Enzymol. 121:802-816 (1986)，它
25 通过引用结合到本文中。

本发明的放射标记的生物学药物可以用于体外诊断试验。标记的生物学药物(例如标记抗体、其结合部分、探针或配体)的比活取决于放射性标记的半衰期、同位素的纯度和该标记怎样加入该生物学药物

中。表 2 列出了几种常用的同位素、它们的比活和半衰期。在免疫分析试验中，一般该比活越高，敏感性越好。

表 2

同位素	纯同位素的比活 (居里/摩尔)	半衰期
¹⁴ C	6.25 × 10 ¹	5720 年
³ H	2.01 × 10 ⁴	12.5 年
³⁵ S	1.50 × 10 ⁶	87 天
¹²⁵ I	2.18 × 10 ⁶	60 天
³² P	3.16 × 10 ⁶	14.3 天
¹³¹ I	1.62 × 10 ⁷	8.1 天

5

10

15

20

用表 2 中列出的放射性同位素标记生物学药物的方法一般是本领域公知的。在美国专利第 4,302,438 号描述了氘标记方法，该专利通过引用结合到本文中。Goding, J.W.(见上文，第 124-126 页)和其中引用的参考文献描述了特别适于鼠单克隆抗体的碘标记、氘标记和 ³⁵S 标记的方法，这些文献通过引用结合到本文中。Hunter 和 Greenwood 在 Nature 144:945 (1962)、David 等在 Biochemistry 13:1014-1021 (1974)和美国专利第 3,867,517 和 4,376,110 号中描述了碘标记诸如抗体、其结合部分、探针或配体的生物学药物的其它方法，这些文献通过引用结合到本文中。用于成像的放射标记元素包括例如 ¹²³I、¹³¹I、¹¹¹In 和 ^{99m}Tc。Greenwood, F.等 Biochem. J. 89: 114-123 (1963); Marchalonis J., Biochem. J. 113:299-305 (1969)和 Morrison, M.等在 Immunochemistry, 289-297 (1971)中描述了碘标记生物学药物的方法,这些文献通过引用结合到本文中。Rhodes, B.等在 Burchiel, S. 等 (编辑), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, 纽约: Masson 111-123

(1982)和其中引用的参考文献中描述了^{99m}Tc-标记的方法,这些文献通过引用结合到本文中。Hnatowich, D. J. 等在 J. Immul. Methods, 65:147-157 (1983)、Hnatowich, D. 等在 J. Applied Radiation, 35:554-557 (1984)和 Buckley, R. G. 等在 F.E.B.S. 166:202-204
5 (1984)中描述了适于¹¹¹In-标记生物学药物的方法,这些文献通过引用结合到本文中。

在放射标记的生物学药物的情况中,将该生物学药物给予病人,它定位于具有该生物学药物与之反应的抗原的肿瘤上,并且在体内用诸如放射核扫描(用如 γ 照相机或发射 X 射线断层照相术)的已知技术
10 检测或“成像”。参见例如 A. R. Bradwell 等,“抗体成像的发展”,Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy、R. W. Baldwin 等, (编辑), 第 65-85 页(Academic Press 1985), 它通过引用结合到本文中。或者,可以用诸如位于 Brookhaven National Laboratory 的称为 Pet VI 的正电子发射经轴 X 射线断层照相扫描仪,
15 其中该放射标记发射正电子(如¹¹C、¹⁸F、¹⁵O 和¹³N)。

可以从本领域已知的标准部分制备荧光团和生色团标记的生物学药物。因为抗体和其它蛋白吸收波长在大约 310 nm 以下的光,所以应当选择在波长 310 nm 以上、最好是在 400 nm 以上具有实际吸收的
20 荧光部分。Stryer, 在 Science, 162:526 (1968)和 Brand, L. 等在 Annual Review of Biochemistry, 41 :843-868 (1972)中描述了种种合适的荧光物质(flurescer)和生色团,这些文献通过引用结合到本文中。通过诸如那些在美国专利第 3, 940, 475、4, 289, 747 和 4, 376, 110 号中公开的方法,可以用荧光发色团基团标记所述生物学药物,这些文献通过引用结合到本文中。

25 具有以上描述的多种所需性质的一组荧光物质是咕吨染料,它包括得自 3,6-二羟基-9-henylxanthhydrol 和 resamines 的荧光素以及得自 3,6-二氨基-苯基 xanthhydrol 和丽丝胺若丹明 B 的若丹明。9-邻-羧苯基 xanthhydrol 的若丹明和荧光素衍生物具有一个 9-邻-羧

苯基基团。具有诸如氨基和异硫氰酸酯基团的荧光素化合物(例如异硫氰酸盐荧光素和荧光胺)是很容易得到的。另一组荧光化合物是萘胺,它在 α 或 β 位置有一个氨基基团。

5 通过 Goding, J. (见上文, 第 208-249 页)描述的方法, 可以用荧光色素或生色团标记生物学药物。可以用含 NMR-活性的 ^{19}F 原子或多种这类原子的指示基团标记所述生物学药物, 因为 (i) 基本上所有的天然丰富的氟原子是 ^{19}F 同位素, 由此基本上所有的含氟化合物均是 NMR-活性的; (ii) 诸如三氟乙酸酐的许多有化学活性的多氟代化合物以相对低的价钱市售, 以及 (iii) 已发现许多氟代化合物在医学上可接受用于人类, 例如用来作为血红蛋白替代物运载氧的全氟化聚醚。在允许
10 温育这样的时间后, 用诸如那些 Pykett 在 Scientific American, 246:78-88 (1982) (通过引用结合到本文中) 中描述的一种仪器进行整体 NMR 测定, 以将癌组织(特别是其中的血管内皮细胞)和前列腺上皮细胞定位和成像。

15 在重要的是区别含活的前列腺上皮细胞区和含死的前列腺上皮细胞区或者区别活的和死的前列腺上皮细胞的情况下, 可将如上述标记的本发明的抗体(或其它本发明的生物学药物)随同用仅识别活的或仅识别死的前列腺上皮细胞的抗体和其它生物学药物一起给予, 所述细胞用可以区别于用来标记该题述抗体的标记物的标记物标记。通过
20 监测这两种标记物在不同位置或时间的浓度, 可以确定活的和死的正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的空间和瞬时浓度变化。特别是, 用既识别活的前列腺上皮细胞又识别死的前列腺上皮细胞的本发明标记抗体和只识别死的前列腺上皮细胞的标记 7E11 抗体可以实施这个方法。

25 也可以利用所述生物学药物在体内杀伤或消除癌细胞和正常的、良性增生的以及癌变的前列腺上皮细胞。这涉及用所述生物学药物本身或用与本发明的生物学药物(即识别正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的生物学药物)结合的细胞毒药物。这涉及给予需要

这类治疗的哺乳动物与细胞毒药物结合的所述生物学药物。在正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞的情况下，因为所述生物学药物识别前列腺上皮细胞，所以所述生物学药物结合的任何这类细胞均被破坏。虽然这种给药可能破坏正常的前列腺细胞，但是这不成问题，因为前列腺不是生命或存活所需要的。虽然前列腺可以间接影响生育力，但是这在接受本发明治疗的病人中似乎不是一个实际的考虑。在癌组织的情况下，因为所述生物学药物识别邻近癌细胞的血管内皮细胞，所以该生物学药物/细胞毒药物复合物与这些血管内皮细胞的结合破坏这些血管内皮细胞，因此切断流向邻近癌细胞的血液，并且因此杀伤或消除这些癌细胞。或者，凭借所述生物学药物与邻近癌细胞的血管内皮细胞的结合，将其定位于癌细胞附近。因此，利用适当的生物学药物(包括那些有效非区别性杀伤但仅在短程内杀伤细胞的生物学药物)，可以选择性地杀伤或消除在癌组织中的细胞(包括癌细胞)。

可以用本发明的生物学药物来运送各种细胞毒药物，包括治疗药物、发射射线的化合物、植物、真菌或细菌来源的分子、生物学蛋白和其混合物。所述细胞毒性药物可以是胞内作用的细胞毒性药物，例短程放射发射体，包括例如短程高能 α -发射体。

酶活性毒素和其片段的例子是白喉毒素A片段、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A(来自绿脓假单孢菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、modeccin A链、 α -sacrin、某些油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、某些Dianthin蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAP、PAPII和PAP-S)、*Morodica charantia*抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaria officinalis*)抑制剂、gelonin、丝林霉素、局限曲菌素、酚霉素和伊诺霉素。在W084/03508和W085/03508中描述了制备所述免疫毒素的酶活性多肽的方法，这些专利通过引用结合到本文中。某些细胞毒性部分得自例如阿霉素、苯丁酸氮芥、道诺霉素、氮

甲喋呤、新制癌菌素(neocarzinostatin)和铂。

所述生物学药物与所述细胞毒药物缀合的方法已先前描述。

Flechner, I. European Journal of Cancer, 9:741-745 (1973); Ghose, T. 等, British Medical Journal, 3:495-499 (1972)和 Szekerke, M. 等, Neoplasma, 19:211-215 (1972)中描述了苯丁酸氮芥与抗体缀合的方法, 它们通过引用结合到本文中。 Hurwitz, E. 等在 Cancer Research, 35:1175-1181 (1975)和 Arnon, R 等在 Cancer Surveys, 1:429-449 (1982)中描述了道诺霉素和阿霉素与抗体缀合的方法, 它们通过引用结合到本文中。在美国专利第 4, 414, 148 和 Osawa, T. 等在 Cancer Surveys, 1:373-388 (1982)以及其中引用的参考文献中描述了制备抗体-蓖麻毒蛋白缀合物的方法, 它们通过引用结合到本文中。在 EP 86309516.2 中也描述了偶联方法, 它通过引用结合到本文中。

本发明的一个特别推荐的实施方案特别适于杀伤或消除正常的、良性增生的和癌变的前列腺上皮细胞, 在该实施方案中, 将第一生物学药物与仅在非常接近于前体药物激活剂时被激活的前体药物缀合。将该前体药物激活剂与按照本发明的第二生物学药物缀合, 最好是与结合至前列腺特异性膜抗原分子上的非竞争性位点的第二生物学药物缀合。可以通过常规的竞争结合测定, 确定两种生物学药物是与竞争性结合位点还是与非竞争性结合位点结合。例如, 单克隆抗体 J591、J533 和 E99 与前列腺特异性膜抗原分子上的竞争性结合位点结合。另一方面, 单克隆抗体 J415 结合的结合位点不与 J591、J533 和 E99 结合的位点竞争。因此, 例如, 第一生物学药物可以是 J591、J533 和 E99 的一个, 而第二生物学药物可以是 J415。或者, 第一生物学药物可以是 J415, 而第二生物学药物可以是 J591、J533 和 E99 之一。在 Blakely 等“ZD2767, 在结肠肿瘤异种移植物中导致肿瘤消退的抗体指导的酶前体药物治疗的改进系统,” Cancer Research, 56:3287-3292 (1996)中描述了适用于本发明实践的药物-前体药物

对, 该文献通过引用结合到本文中。

或者, 可以将该生物学药物与高能射线发射体偶联, 所述发射体例如为放射性同位素如 γ -发射体 ^{131}I , 当它位于该肿瘤位点时, 导致几个细胞直径范围的杀伤。如参见 S. E. Order, “在癌症治疗中放射标记抗体的治疗用途的分析、结果和未来展望, ” Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin 等(编辑), 第 303-316 页 (Academic Press 1985), 它通过引用结合到本文中。其它适合的放射性同位素包括 α -发射体, 如 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 和 ^{211}At , 以及 β -发射体, 如 ^{186}Re 和 ^{90}Y 。因为前列腺上皮细胞和癌内的血管内皮细胞对放射相对敏感, 所以预期放射治疗应当特别有效。

当将所述生物学药物单独使用来杀伤或消除癌细胞或前列腺上皮细胞时, 通过引发例如补体介导的或抗体依赖性细胞的细胞毒性的内源宿主免疫功能, 可以影响这种杀伤或消除作用。

本发明的生物学药物可以作为试剂盒与设备一起使用和出售, 来检测特定的标记。

本发明的生物学药物可以与其它治疗性治疗方式联用。这类其它治疗包括外科手术、放疗、低温外科、热疗、激素治疗、化疗、疫苗和其它免疫治疗。

本发明还包括涉及用所述生物学药物杀伤或消除以用于预防的方法。例如, 可以用这些材料来防止或延缓前列腺癌或其它癌症的发展或进程。

用本发明的治疗方法来治疗前列腺癌和其它癌症有许多益处。因为按照本发明的生物学药物只导向癌细胞(例如含血管内皮细胞的癌组织的细胞)和前列腺上皮细胞, 所以不损害其它组织。结果, 用这类生物学药物的治疗更安全, 特别是对于年龄较大的病人。预期按照本发明的治疗特别有效, 因为它将高水平的生物学药物(例如抗体或其结合部分、探针或配体)导向前列腺癌转移的和许多其它主要癌症转移癌占优势的骨髓和淋巴结。并且, 本发明的方法特别适于治疗前列腺癌,

因为前列腺癌的肿瘤位点在大小上倾向于更小，因此容易用细胞毒药物破坏。可以用临床参数有效地监测按照本发明的治疗，例如，在前列腺癌的情况下，血清前列腺特异性抗原和/或病人的癌症的病理学特征，包括阶段、Gleason 评分、囊外的侵害、精液的侵害、小泡的侵害或神经周的侵害、阳性界限、累及的淋巴结等。或者，可以用这些参数来表明何时应当使用这类治疗。

因为本发明的生物学药物与活的前列腺细胞结合，用这些生物学药物治疗前列腺癌的治疗方法比那些导向裂解的前列腺细胞的治疗方法有效得多。由于同样的原因，通过使用本发明的生物学药物大大提高了确定活的正常的、良性增生的或癌变的前列腺上皮细胞(以及在癌内的血管内皮细胞)的位置的诊断方法和成像方法。另外，区别活的和死的前列腺细胞的能力特别有助于监测特定治疗制度的有效性。

按照国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约的要求，并作为其补偿，已经将杂交瘤 E99、J415、J533 和 J591 保藏在 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 的美国典型培养物保藏中心(“A.T.C.C.”)。杂交瘤 E99 于 1996 年 5 月 2 日保藏，并且被 A.T.C.C. 接受的保藏号为 HB-12101。杂交瘤 J415 于 1996 年 5 月 30 日保藏，并且被 A.T.C.C. 接受的保藏号为 HB-12109。杂交瘤 J533 和 J591 于 1996 年 6 月 6 日保藏，并且被 A.T.C.C. 接受的保藏号分别为 HB-12127 和 HB-12126。

通过以下实施例进一步说明本发明。

实施例

实施例 1--人组织

从 New York Hospital Cornell University Medical Center (“NYH-CUMC”)的病理学系获得良性和恶性组织的新鲜样本。

实施例 2--组织培养

从 NYH-CUMC 的泌尿肿瘤学实验室获得人类癌症的培养细胞系。从美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD)获得前列腺癌细胞系 PC-3 (Mickey, D. D. 等, “在无胸腺小鼠中作为单层培养物和作为实体瘤的人类前列腺腺癌细胞系(DU145)的特征,” Prog. Clin. Biol. Res., 37: 67-84 (1980), 它通过引用结合到本文中)、DU145 (Mickey, D. D. 等, “在无胸腺小鼠中作为单层培养物和作为实体瘤的人类前列腺腺癌细胞系(DU145)的特征,” Prog. Clin. Biol. Res., 37:67-84 (1980), 它通过引用结合到本文中)和 LNCaP (Horoszewicz, J.S. 等, “人类前列腺癌的 LNCaP 模型,” Cancer Res., 43 :1809-1818 (1983), 它通过引用结合到本文中)。最初在补加 10%FCS、0.1 mM 非必需氨基酸、2 mM L-谷氨酰胺、100 单位/ml 的青霉素、100 μ g/ml 的链霉素和 HAT 培养基(GIBCO, Grand Island, NY)的 RPMI-1640 培养基中克隆杂交瘤。在没有氨基喋呤的同样的培养基中培养亚克隆。

15

实施例 3--小鼠单克隆抗体的制备

用 LNCaP(6×10^6 细胞)以 2 周间隔腹膜内免疫雌性 BALB/c 小鼠 3 次。用已在体外生长的新鲜前列腺上皮细胞给予最终的腹膜内加强免疫。3 天后,采用标准技术将脾细胞与 SP-2 小鼠骨髓瘤细胞融合(Ueda, R., 等, “用小鼠单克隆抗体定义的人类肾癌的细胞表面抗原:组织特异性肾糖蛋白的鉴定,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:5122-5126 (1981), 它通过引用结合到本文中)。通过对存活的 LNCaP 的玫瑰花结和补体细胞毒性分析筛选获得的克隆的上清液。通过免疫化学对正常的肾、结肠和前列腺筛选被这些分析确定为阳性的克隆。通过有限稀释将 LNCaP⁺/Nm1⁻肾⁻/结肠⁻/前列腺⁺的克隆选择并亚克隆 3 次。通过用特化(specified)的兔抗血清(Calbiochem, San Diego, CA)的免疫扩散,确定来自每个克隆的培养上清液的免疫球蛋白类别。用 MAPS-II 试剂盒(Bio-Rad, Richmond, CA)纯化 mAb。

25

实施例 4--mAb 的生物素标记

将纯化的 mAb 在 0.1 M NaHCO₃ 中透析 2 小时。将 1 ml 1 mg/ml 的 mAb 与 0.1 ml 二甲亚砜中的生物素酰胺己酸 N-羟基丁二酰胺酯 (Sigma) (1 mg/ml) 混合, 并在室温搅拌 4 小时。通过对磷酸缓冲盐水 (“PBS”) 透析, 除去未结合的生物素。

实施例 5--前列腺组织的免疫组化染色

将前列腺组织的冷冻切片置于预先用 0.45% 明胶溶液包被的 Falcon 3034 板套 (plate cover) (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) 环内, 如 Marusich, M.F., 在 “加工大量的组织切片以进行免疫组化杂交瘤筛选的快速方法, ” J. Immunol. Methods, 111:143-145 (1988) 中描述, 它通过引用结合到本文中。将所述板贮存在 -80 °C。在室温下用 PBS 中的 2% 多聚甲醛固定冷冻切片 10 分钟, 并且在用 PBS 冲洗后, 通过用 PBS 中的 0.3% 过氧化氢处理 10 分钟, 封闭内源性过氧化物酶活性。将切片与 PBS 中的 2% BSA 温育 20 分钟后, 在室温下加入 mAb 60 分钟。用 PBS 充分冲洗玻片, 并且在室温下与在 PBS 中的 10% 正常人血清 1 : 100 稀释的过氧化物酶结合的兔抗小鼠 Ig (DAKO Corp., Santa Barbara, CA) 温育。在二氨基联苯胺反应后, 将切片用苏木精复染色。

实施例 6--血清学分析

如 Ueda, R., 等, 在 “用小鼠单克隆抗体定义的人类肾癌的细胞表面抗原: 组织特异性肾糖蛋白的鉴定, ” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:5122-5126 (1981) (它通过引用结合到本文中) 中描述, 进行抗鼠免疫球蛋白混合红细胞吸附分析。用 0.01% 氯化铬将抗小鼠 Ig (DAKO Corp.) 与 O 型人类红细胞缀合以制备指示细胞。在先前在 Terasaki 平板 (Nunc, Denmark) 中预先倒板的细胞上进行血清学分析。抗体与靶细胞在室温下温育 1 小时。然后洗靶细胞, 并且加入指示细胞 1 小时。

实施例 7--免疫沉淀

将 LNCaP 细胞在冰上用生物素-NHSS(以 5 mM 的终浓度)生物素标记 30 分钟。洗涤后,在冰上将生物素标记的细胞重新悬浮在 1 ml 裂解缓冲液(20 mM Tris/HCl pH 8.0、1 mM EDTA、1 mM PMSF、1% triton X-100)中 30 分钟。将悬浮液在 4 °C 以 1500g × 100 分钟离心,并且将上清液在 4 °C 以 12,000 rpm × 15 分钟离心。在 4 °C 用兔或山羊抗小鼠 IgG-包被的 pansorbin 预吸收获得的溶胞产物 1 小时。在 4 °C 将该预吸收的溶胞产物与该 mAb 一起温育过夜。在 4 °C 加入兔或山羊抗小鼠 Ig-包被的琼脂糖珠 2 小时,然后洗涤。将这些珠重新悬浮在 Tris 碱/NaCl 中,加入到具有 2-巯基乙醇的样品缓冲液并煮沸 5 分钟。离心后,将上清液在 SDS-PAGE 12%凝胶上电泳。将该凝胶转移至硝酸纤维素膜上,用链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶封闭并染色。将该膜用二氨基联苯胺(“DAB”)显色。

继续的免疫沉淀是相似的,除了最初用一种 mAb 在 4 °C 过夜预清除该溶胞产物。然后用第二 mAb 来免疫沉淀该预清除的溶胞产物。

筛选了接近 2000 个克隆,其中如在以上实施例 3 中描述的方法选择 4 个克隆。亚克隆后,通过对存活的(即未固定的)LNCaP 的免疫荧光、免疫沉淀和继续的免疫沉淀分析来自 4 个杂交瘤(E99、J415、J533 和 J591)的上清液,以证实对 PSMA 的反应性。

用 LNCaP 靶细胞(最初由 Horoszewicz 描述,在这里通过引用结合到本文中,以制备 7E11 抗体和表达 PSMA 的原型细胞系)的免疫荧光研究表明, E99 抗体结合活的 LNCaP 细胞并赋予活的 LNCaP 细胞免疫荧光。这与 7E11 抗体相反(最初由 Horoszewicz 注意到,在这里通过引用结合), 7E11 抗体仅仅很少或不与活的 LNCaP 细胞结合,但是一旦所述细胞被固定(杀伤),则显示出极强的结合。

用免疫组化检查这 4 种 mAb 与正常的人组织的反应性;这些结果表示在表 3 中。

表 3

通过间接免疫过氧化物酶(immunoperoxidase)染色的

mAb 与人类正常组织的反应性

组织	E99 (γ ₃)	J415 (γ ₁)	J533 (γ ₁)	J591 (γ ₁)
前列腺*	●	●	●	●
肾	○	○	○	○
肾小球	■	■	■	■
近端小管	○	○	○	○
输尿管	○	○	○	○
膀胱	○	○	○	○
睾丸	○	○	○	○
子宫	○	○	○	○
食管	○	○	○	○
小肠	○	○	○	○
胃	○	○	○	○
结肠	○	○	○	○
脾	○	○	○	○
甲状腺	○	○	○	○
肺	○	○	○	○
胰腺	○	○	○	○
肝	○	○	○	○
* BPH	0-3 ⁺	0-3 ⁺	0-4 ⁺	0-4 ⁺
* 前列腺癌	0-3 ⁺	0-3 ⁺	0-4 ⁺	0-4 ⁺
* LNCaP (Scid)	3 ⁺	4 ⁺	4 ⁺	4 ⁺
* LuCaP (Scid)	0-2 ⁺	0-2 ⁺	0-3 ⁺	0-3 ⁺

5 ● - 阳性；■ - 弱，异种；○ - 阴性

以上继续的免疫沉淀研究表明 7E11、E99、J415、J533 和 J591 与同一分子(即 PSMA) 结合。

10 实施例 8--蛋白质印迹分析

为了证实抗体 E99、J415、J533 和 J591 沉淀与 7E11 抗体相同的带(即 PSMA)，进行蛋白质印迹分析。将精浆(400 μg/泳道)或 LNCaP 溶胞液点样到 12% SDS-PAGE 凝胶的泳道中。电泳后，将该凝胶转移至硝酸纤维膜。将该膜用 5%奶粉/Tris 缓冲盐水-吐温 20(“TBST”) 在室温

15 封闭 60 分钟。洗涤后，将该膜与第一 mAb 温育 60 分钟。重复洗涤后，

将该膜与 5%奶粉/TBST 中的绵羊抗小鼠 Ig-过氧化物酶的 1/5000 稀释液于室温下温育 60 分钟。重复洗涤后, 将该膜按照厂商指南用称为“ECL”的化学发光标记(Amersham Life Science, International, Arlington Heights, Illinois)显色。蛋白质印迹实验的结果显示在表 4。

表 4

蛋白印迹数据

样品	7E11	E99	J415	J533	J591
前列腺液 (精浆)	100 KD 带	100 KD 带	100 KD 带	100 KD 带	100 KD 带
LNCaP 细胞	100 Kd 和	100 Kd 和	100 Kd 和	100 Kd 和	100 Kd 和
溶胞产物	200 KD 带	200 KD 带	200 KD 带	200 KD 带	200 KD 带

10 实施例 9--mAb 与 PSMA 外域的反应性

在体外, 通过免疫荧光测试(不用固定)新鲜的、活的 LNCaP 细胞, 以证实细胞表面(外面)该检测的 PSMA 的表达。将 LNCaP 细胞洗涤并且在室温下与 mAb 温育 1 小时, 然后与兔抗-鼠 Ig-荧光素(DAKO Corp., Santa Barbara, CA)温育。这些孔用荧光显微镜读数。阴性对照由同型匹配的不相干的 mAb 组成, 而抗 I 类 MHC mAb 作为阳性对照。

免疫荧光和玫瑰花结分析结果显示在表 5。

表 5

7E11 与新 mAb 的比较

LNCaP 活细胞	7E11	E99	J415	J533	J591
免疫荧光	阴性	3+	3+	4+	4+
玫瑰花结测定	阴性	+	+	+	+
LNCaP 固定的	+++	++++	+++	++	+++

实施例 10--竞争研究

用以下方法进行竞争研究，以确定 J591、J533、E99 和 J415 是检测相同的前列腺特异性膜抗原分子的抗原位点(抗原决定簇)还是检测不同的前列腺特异性膜抗原分子的抗原位点。

- 5 将板用作为前列腺特异性膜抗原来源的 LNCaP 细胞系溶胞产物包被并洗涤，以除去未结合的材料。在室温下将“冷的”(未标记的)单克隆抗体在板上温育 1 小时，以允许与其抗原位点结合。接着，加入或用生物素或用 ^{125}I 标记的第二单克隆抗体 1 小时。洗涤这些板以除去未结合的材料。通过在酶联免疫测定中用抗生物素蛋白-碱性磷酸酶
- 10 (在生物素标记的第二单克隆抗体的情况下)、或者通过在 γ 计数器中对所述孔物理计数(在 ^{125}I 标记的第二单克隆抗体的情况下)，测定与前列腺特异性膜抗原-包被板结合的第二单克隆抗体的量。对照由用冷的和标记的同一单克隆抗体组成以限定“100%竞争”，或用总体上不同的分子的单克隆抗体(如单克隆抗体 I-56，它检测抑制素，一种与
- 15 前列腺特异性膜抗原不同的前列腺相关蛋白)组成以限定“0%竞争”。

结果表明 J591、J533 和 E99 各自干扰、竞争或阻碍另一个的结合，但是不阻碍 J415 的结合，反之亦然。已知在不同(细胞内)位点结合 PSMA 的 7E11/CYT356 不阻碍 J591、J533、E99 和 J415 中的任何一个。

- 20 具有与非竞争性位点结合的单克隆抗体对允许检测例如体液中的可溶性抗原的抗体夹层分析的发展，所述抗原例如为溶解的前列腺特异性膜抗原或其片段。例如，可以用 J591 从体液中“捕捉”该抗原(如前列腺特异性膜抗原或其片段)，并且在另一个步骤，通过标记的 J415 检测该抗原。

- 25 在另一种设置中，例如治疗，通过用非竞争性单克隆抗体的联合可以增强抗体结合。例如，假设在前列腺特异性膜抗原分子上所述非竞争位点每个出现一个(represented once)，加入 J591 加 J415 的混合物结合的单克隆抗体分子将比结合单独的每一种单克隆抗体多一

倍。结合两个非竞争性抗原结合位点也可以导致更大的抗原交联，并且也许增加内在化。而且，因为所述两个检测位点在物理学上位于相同的前列腺特异性膜抗原分子上，所以两个单克隆抗体分子与该单个前列腺特异性膜抗原分子的结合将所述两个单克隆抗体分子互相邻近放置，这是一种提供最佳药物-前体药物互相作用的设置。例如，可以将单克隆抗体 J591 与无活性的前体药物缀合，并且可以将 J415 与前体药物激活剂缀合。因为前体药物和激活剂将仅结合在邻近前列腺特异性膜抗原表达细胞(如前列腺癌细胞)的部位，所以只在那些部位发生前体药物活化为该活性形式。

实施例 11--显微镜检查

聚焦显微镜检查和免疫电镜检查证实 E99、J591、J533 和 J415 在网格蛋白覆盖的凹处结合于细胞膜，并且然后快速内在化进入核内体(细胞质囊)。图 1-4 是金标记的单克隆抗体 J591 与细胞表面互相作用后，随时间变化的免疫电子显微照片。在这些图中，用黑点表示单克隆抗体的位置。

将活的 LNCaP 细胞与 J591 在 4 °C 温育 1 小时。将这些细胞洗涤并置于 37 °C 0、5、10 或 15 分钟，这些时间后，将细胞固定并加工以进行免疫电镜观察。图 1 显示 37 °C 温育前的细胞。可以见到 J591 沿该细胞膜的外面结合于该细胞。在该图中，“M”表示细胞的线粒体，而“N”表示细胞核。图 2 显示在 37 °C 温育 5 分钟后的细胞。箭头指示网格蛋白覆盖的凹陷的形成。图 3 显示 37 °C 温育 10 分钟后的细胞，可见网格蛋白覆盖的凹陷的箍断(pinching off)或胞吞作用，如箭头所示。图 4 显示在 37 °C 温育 15 分钟后的细胞，单克隆抗体 J591 也被包含进该细胞的细胞质囊(endocytic vesicle)内，如箭头指示。在图 5 中可以看出，在 37 °C 温育 15 分钟后，单克隆抗体 J519 也包含于核内体中，如箭头指示。

实施例 12--单克隆抗体 J591 可变区的测序

从 10^7 鼠杂交瘤 J591 细胞中制备总 RNA。测试来自这些细胞的条件培养基样品与在前列腺细胞上的 J591 与该特异性抗原的结合。通过 ELISA 和蛋白印迹，该条件培养基对于结合该抗原为阳性。

5 用逆转录酶以及小鼠 κ 恒定区和小鼠 IgG 恒定区的引物制备 VH cDNA 和 VK cDNA。通过 PCR 用各种小鼠信号序列引物(对 VH 为 6 个，对 VK 为 7 个)扩增第一链 cDNA。将扩增的 DNA 凝胶纯化并且克隆到 pT7Blue 载体中。

10 通过 PCR 筛选正确插入的获得的 VH 和 VK 克隆，并且通过双脱氧链终止法测定选定克隆的 DNA 序列。

除引物区外(因为这个序列依赖于使用的引物序列)，所有获得的 VH 克隆均给出同样的序列。从用 3 个不同的 5' 引物产生的克隆中获得这个序列。一个克隆在该信号序列内有一个碱基对变化，而一个克隆包含一个异常的 PCR 产物。用图 6 所示的测序策略，获得了重链的核苷酸序列。它称为 SEQ. ID. No. 1，它于对应的反向非编码链(称为 SEQ. ID. No. 2)显示在图 7 中。这些序列包括该抗体的部分信号序列和部分恒定区。对应的推断的 J591 VH 的氨基酸序列称为 SEQ. ID. No. 3、SEQ. ID. No. 4 和 SEQ. ID. No. 5，也显示在图 7 中。J591 重链可变区(除了信号序列和恒定区组成部分)的编码链具有以下核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 6)：

20
25
GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAGG
ATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCAGTGAATATACCATACACTGGGTGAAG
CAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAAACATCAATCCTAACAATGGTGGT
ACCACCTACAATCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCC
AGTACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTAACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTAT
TGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCC
TCA

J591 重链可变区(除信号序列和恒定区组成部分)的反向编码链具有以下核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 7)：

5 TGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCTTGGCCCCAGTAGTCAAAGTTCCAACCAGCTGC
ACAATAATAGACTGCAGAATCCTCAGATGTTAGGCTGCGGAGCTCCATGTAGGCTGT
ACTGGAGGACTTGTCTACAGTCAATGTGGCCTTGTCTCGAACTTCTGATTGTAGGT
GGTACCACCATTGTTAGGATTGATGTTTCCAATCCACTCAAGGCTCTTTCCATGGCT
CTGCTTCACCCAGTGTATGGTATATTCAGTGAATGTGTATCCAGAAGTCTTGCAGGA
TATCCTCACTGAAGTCCCAGGCTTCACCAGTTCAGGTCCAGACTGTTGCAGCTGGAC
CTC

J591 重链可变区(除信号序列和恒定区组成部分)相应的蛋白序列具有
以下核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 8):

10 EVQLQQSGPELVKPGTQSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGG
TTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLTVS
S

15 J591 VH 属于小鼠重链 IIA 亚组(Kabat 等, Sequences of Proteins
of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human
Services (1991) (“Kabat”), 它通过引用结合到本文中)。在图 8 中
比较了 J591 VH 的序列与该亚组的共有序列。

20 与该 VH 相反, 获得了一个以上的 VK 序列。在检查的 15 个 VK 克
隆中, 4 个给出了来自融合伙伴的异常小鼠 Igk 的序列(Carol 等,
Molecular Immunology, 25:991-995 (1988), 它通过引用结合到本文
中)。这些克隆源于两个特异性 5' 引物。对这些克隆没有做更进一步
的工作。在剩余的克隆中, 10 个给出了相同的核苷酸序列, 并且一个
克隆 VK17 给出了另一个 VK 序列。这 10 个相同的克隆源于 3 个 5' 引物
(与给出异常序列的 2 个引物不同), 其中一个也产生 VK17。图 9 显示
使用的测序策略。

25 对应于这 10 个相同克隆的 J591 VK 的核酸序列(称为 SEQ. ID. No.
9)以及对应的反向非编码链的核酸序列(称为 SEQ. ID. No. 10)和推
断的称为 SEQ. ID. No. 11、SEQ. ID. No. 12 和 SEQ. ID. No. 13
的氨基酸序列表示在图 10 中。这些序列包括该抗体的部分信号序列和

部分恒定区。对应于这 10 个相同克隆的 J591 轻(κ)链可变区(除了信号序列和恒定区组成部分)的编码链具有以下核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 14) :

5 AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTC
ACCTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTTACTTATGTTTCCTGGTATCAACAG
AAACCAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGG
GTCCCCGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTCTGACCATCAGC
AGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGACAGATTATCACTGTGGACAGGGTTACAGCTATCCG
TACACGTTCTCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

10 对应于这 10 个相同克隆的 J591 轻(κ)链可变区(除了信号序列和恒定区组成部分)的反向非编码链具有以下核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 15) :

15 TTTTATTTCCAGCTTGGTCCCCCTCCGAACGTGTACGGATAGCTGTAACCCCTGTCC
ACAGTGATAATCTGCAAGGTCTTCAGCCTGCACACTGCTGATGGTCAGAGTGAAATC
TGTTGCAGATCCACTGCCTGTGAAGCGATCGGGGACCCCAGTGTACCGGTTGGATGC
CCCGTATATCAGCAGTTTAGGAGACTGCTCTGGTTTCTGTTGATACCAGGAAACATA
AGTAACCACATTCTCACTGGCCTTGACAGGTCAAGGTGACCCTCTCTCCTACTGACAT
GGACATGGATTTGGGAGATTGGGTCATTACAATGTT

20 对应于这 10 个相同克隆的相应的 J591 轻(κ)链可变区(除了信号序列和恒定区组成部分)的蛋白序列具有以下核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 16) :

NIVMTQSPKSMSSVGERVTLTCKASENVVTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTG
VPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIK

25 对应于克隆 VK17 的 J591 轻(κ)链可变区(除了信号序列和恒定区组成部分)的编码链具有以下核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 17) :

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTC
AGCATCATCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAG
AAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGA
GTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACT
AATGTTTCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCT
CTCACGTTTCGGTGCTGGGACCATGCTGGACCTGAAA

5 对应于克隆 VK17 的 J591 轻(κ)链可变区(除了信号序列和恒定区组成部分)的反向非编码链具有以下核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No. 18):

TTTCAGGTCCAGCATGGTCCCAGCACCGAACGTGAGAGGATAGCTGTTATATTGCTG
ACAGAAATAATCTGCCAAGTCTTCAGACTGAACATTAGTAATGGTGAGAGTGAAGTC
TGTCCCAGATCCACTGCCTGTGAAGCGATCAGGGACTCCAGTGTGCCGAGTGGATGC
CCAATAAATCAGTAGTTTAGGAGATTGTCCTGGTTTCTGTTGATACCAGTCTACAGC
10 AGTACCCACATCTTGACTGGCCTTACAGATGATGCTGACCCTGTCTCCTACTGATGT
GGACATGAATTTGTGAGACTGGGTCATCACAATGTC

对应于克隆 VK17 的相应的 J591 轻(κ)链可变区(除了信号序列和恒定区组成部分)的蛋白序列具有以下核苷酸序列(称为 SEQ. ID. No.
15 19):

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIWASTRHTG
VPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLK

20 J591 VK 属于小鼠 κ 链 V 亚组(Kabat, 它通过引用结合到本文中)。在图 11 中比较了对应于 10 个相同克隆的 J591 VK 的序列与该亚组的共有序列。

推荐的 J591 是那些其重链可变区 DNA 编码链序列对应于 SEQ. ID. No. 6 和其重链可变区 DNA 的非编码(反义)链对应于 SEQ. ID. No. 7 的 J591。J591 的重链可变区的氨基酸序列最好对应于 SEQ. ID. No.
25 8。J591 的轻链可变区的 DNA 编码链序列最好对应于 SEQ. ID. No. 17、DNA 非编码链(反义)序列对应于 SEQ. ID. No. 18 和氨基酸序列对应于 SEQ. ID. No. 19。

实施例 13--正常组织和癌组织的免疫组化染色

将来自 23 例癌症的癌组织在液氮中预冷冻,在干冰上的 OCT 化合物(Miles, Elkhart, Indiana)中快速冷冻,并且贮存在-80 °C。在冷丙酮(4 °C)中固定冷冻切片(5 μm)10 分钟。在室温下将 mAb (5 μg/ml 或杂交瘤上清液)温育 1 小时。用作为第二抗体的兔抗鼠 Ig-过氧化物酶(Dako, Carpinteria, California)和作为色原的 DAB (Sigma, St. Louis, Missouri)检测抗体结合。将同型匹配的不相干的抗体用作阴性对照。

在所有研究的 23 例癌症中,包括 9/9 肾癌、5/5 泌尿道上皮癌、6/6 结肠癌、1/1 肺癌和 1/1 乳腺癌以及 1/1 转移到肝脏的腺癌, mAb J591、J533、J415 和 E99 与血管内皮强烈反应。图 2A-2F 分别显示 mAb J591 与肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、肺癌和乳腺癌以及转移到肝脏的腺癌的新脉管系统的免疫组化反应性。

虽然为了说明的目的已经详细描述了本发明,但是不用说,这些细节仅仅是为了说明,那些本领域技术人员可以做变化而不脱离由以下权利要求书限定的本发明的精神和范围。

序列表

(1) 一般资料

- 5 (i) 申请人: Cornell Research Foundation, Inc.
- (ii) 发明名称: 癌症的治疗和诊断
- 10 (iii) 序列数: 19
- (iv) 通信地址:
- 15 (A) 收信人: Nixon, Hargrave, Devans & Doyle LLP
- (B) 街道: Clinton Square, P.O. Box 1051
- (C) 城市: Rochester
- (D) 州: 纽约
- (E) 国家: 美国
- (F) 邮政编码: 14603-1051
- (v) 计算机可读形式
- (A) 媒体类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC 兼容机
- (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 软件: PatentIn Release $\approx$ 1.0, 版本 1.30
- (vi) 当前申请数据
- (A) 申请号:
- (B) 提交日期:
- (C) 分类:
- (vii) 在先申请数据
- (A) 申请号: US 06/022,125
- (B) 提交日期: 1996 年 7 月 18 日
- (vii) 在先申请数据
- (A) 申请号: US 08/838,623
- (B) 提交日期: 1997 年 4 月 9 日
- (viii) 代理律师/代理人资料
- (A) 姓名: Goldman, Michael L.
- (B) 注册号: 30,727
- (C) 参考/档案号: 19603/1174
- (ix) 电讯资料
- (A) 电话: (716) 263-1304
- (B) 传真: (716) 263-1600

20

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 391 个碱基对

- (B) 类型：核酸
- (C) 链型：单链
- (D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：cDNA

(xi) 顺序描述：SEQ ID NO: 1:

```

5      TCTCCTGTCA GGAAGTGCAG GTGTCCTCTC TGAGGTCCAG CTGCAACAGT CTGGACCTGA      60
      ACTGGTGAAG CCTGGGACTT CAGTGAGGAT ATCCTGCAAG ACTTCTGGAT ACACATTCAC      120
      TGAATATACC ATACACTGGG TGAAGCAGAG CCATGGAAAG AGCCTTGAGT GGATTGGAAA      180
      CATCAATCCT AACAAATGGTG GTACCACCTA CAATCAGAAG TTCGAGGACA AGGCCACATT      240
10     GACTGTAGAC AAGTCCTCCA GTACAGCCTA CATGGAGCTC CGCAGCCTAA CATCTGAGGA      300
      TTCTGCAGTC TATTATTGTG CAGCTGGTTG GAACTTTGAC TACTGGGGCC AAGGCACCAC      360
      TCTCACAGTC TCCTCAGCCA AAACGACACC C      391
15

```

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度：391 个碱基对
 - (B) 类型：核酸
 - (C) 链型：单链
 - (D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：cDNA

(xi) 顺序描述：SEQ ID NO: 2:

```

20     GGGTGTGCTT TTGGCTGAGG AGACTGTGAG AGTGGTGCCT TGGCCCCAGT AGTCAAAGTT      60
      CCAACCAGCT GCACAATAAT AGACTGCAGA ATCCTCAGAT GTTAGGCTGC GGAGCTCCAT      120
      GTAGGCTGTA CTGGAGGACT TGTCTACAGT CAATGTGGCC TTGTCCTCGA ACTTCTGATT      180
25     GTAGGTGGTA CCACCATTGT TAGGATTGAT GTTTCCAATC CACTCAAGGC TCTTTCCATG      240
      GCTCTGCTTC ACCCAGTGTA TGGTATATTC AGTGAATGTG TATCCAGAAG TCTTGACAGGA      300
      TATCCTCACT GAAGTCCCAG GCTTCACCAG TTCAGGTCCA GACTGTTGCA GCTGGACCTC      360
30     AGAGAGGACA CCTGCAGTTC CTAGCAGGAG A      391

```

(2) SEQ ID NO: 3 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度：123 个氨基酸
 - (B) 类型：氨基酸
 - (C) 链型：
 - (D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 3:

```

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

```

25

(2) SEQ ID NO: 4 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 130 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 键型:

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 4:

```

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

```

```

      Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
           115                120                125
5      Thr Pro
      130

```

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

- (i) 顺序特征:
 (A) 长度: 125 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型:
 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 5:

```

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

```

(2) SEQ ID NO: 6 的信息:

- (i) 顺序特征:
 (A) 长度: 345 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 6:

```

35      GAGGTCCAGC TGCAACAGTC TGGACCTGAA CTGGTGAAGC CTGGGACTTC AGTGAGGATA      60
      TCCTGCAAGA CTTCTGGATA CACATTCAC TGAATATACCA TACACTGGGT GAAGCAGAGC      120

```

5. CATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGAAAC ATCAATCCTA ACAATGGTGG TACCACCTAC 180
 AATCAGAAGT TCGAGGACAA GGCCACATTG ACTGTAGACA AGTCCTCCAG TACAGCCTAC 240
 ATGGAGCTCC GCAGCCTAAC ATCTGAGGAT TCTGCAGTCT ATTATTGTGC AGCTGGTTGG 300
 AACTTTGACT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 345

10 (2) SEQ ID NO: 7 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 345 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 7:

15 TGAGGAGACT GTGAGAGTGG TGCCTTGGCC CCAGTAGTCA AAGTTCCAAC CAGCTGCACA 60
 ATAATAGACT GCAGAATCCT CAGATGTTAG GCTGCGGAGC TCCATGTAGG CTGTACTGGA 120
 GGACTTGTCT ACAGTCAATG TGGCCTTGTC CTCGAACTTC TGATTGTAGG TGGTACCACC 180
 ATTGTTAGGA TTGATGTTTC CAATCCACTC AAGGCTCTTT CCATGGCTCT GCTTCACCCA 240
 20 GTGTATGGTA TATTCAGTGA ATGTGTATCC AGAAGTCTTG CAGGATATCC TCACTGAAGT 300
 CCCAGGCTTC ACCAGTTCAG GTCCAGACTG TTGCAGCTGG ACCTC 345

(2) SEQ ID NO: 8 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 115 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 8:

25 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 30 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

5 Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 10 Val Ser Ser
 115

(2) SEQ ID NO: 9 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 363 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 9:

15 TTATATGGAG CTGATGGGAA CATTGTAATG ACCCAATCTC CCAAATCCAT GTCCATGTCA 60
 GTAGGAGAGA GGGTCACCTT GACCTGCAAG GCCAGTGAGA ATGTGGTTAC TTATGTTTCC 120
 20 TGGTATCAAC AGAAACCAGA GCAGTCTCCT AAAGTGTCTGA TATACGGGGC ATCCAACCGG 180
 TACACTGGGG TCCCCGATCG CTTCACAGGC AGTGGATCTG CAACAGATTT CACTCTGACC 240
 ATCAGCAGTG TGCAGGCTGA AGACCTTGCA GATTATCACT GTGGACAGGG TTACAGCTAT 300
 25 CCGTACACGT TCGGAGGGGG GACCAAGCTG GAAATAAAAC GGGCTGATGC TGCACCAACT 360
 GTA 363

30 (2) SEQ ID NO: 10 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 363 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 10:

35 TACAGTTGGT GCAGCATCAG CCCGTTTTAT TTCCAGCTTG GTCCCCCTC CGAACGTGTA 60
 CGGATAGCTG TAACCCTGTC CACAGTGATA ATCTGCAAGG TCTTCAGCCT GCACACTGCT 120
 GATGGTCAGA GTGAAATCTG TTGCAGATCC ACTGCCTGTG AAGCGATCGG GGACCCCACT 180

5 GTACCGGTTG GATGCCCCGT ATATCAGCAG TTTAGGAGAC TGCTCTGGTT TCTGTTGATA 240
 CCAGGAAACA TAAGTAACCA CATTCTCACT GGCCTTGCAG GTCAAGGTGA CCCTCTCTCC 300
 TACTGACATG GACATGGATT TGGGAGATTG GGTTCATTACA ATGTTCCCAT CAGCTCCATA 360
 TAA 363

(2) SEQ ID NO: 11 的信息:

- (i) 顺序特征:
 (A) 长度: 121 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型:
 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 11:

10

Leu Tyr Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser
 1 5 10 15

15

Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser
 20 25 30

Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln
 35 40 45

20

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

25

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln
 85 90 95

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

30

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
 115 120

(2) SEQ ID NO: 12 的信息:

- (i) 顺序特征:
 (A) 长度: 114 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型:
 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 8:

35

Tyr Met Glu Leu Met Gly Thr Leu Pro Asn Leu Pro Asn Pro Cys Pro
 1 5 10 15

```

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

```

20

(2) SEQ ID NO: 13 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 116 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 13:

```

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

```

(2) SEQ ID NO: 14 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 321 个碱基对

- (B) 类型：核酸
(C) 链型：单链
(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：cDNA

(xi) 顺序描述：SEQ ID NO: 14:

```

AACATTGTAA TGACCCAATC TCCCAAATCC ATGTCCATGT CAGTAGGAGA GAGGGTCACC      60
TTGACCTGCA AGGCCAGTGA GAATGTGGTT ACTTATGTTT CCTGGTATCA ACAGAAACCA      120
5  GAGCAGTCTC CTAAACTGCT GATATACGGG GCATCCAACC GGTACACTGG GGTCCCCGAT      180
CGCTTCACAG GCAGTGGATC TGCAACAGAT TTCACTCTGA CCATCAGCAG TGTGCAGGCT      240
GAAGACCTTG CAGATTATCA CTGTGGACAG GGTTACAGCT ATCCGTACAC GTTCGGAGGG      300
10 GGGACCAAGC TGGAAATAAA A      321

```

(2) SEQ ID NO: 15 的信息:

- (i) 顺序特征:
(A) 长度：321 个碱基对
(B) 类型：核酸
(C) 链型：单链
(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：cDNA

(xi) 顺序描述：SEQ ID NO: 15:

```

TTTTATTTCC AGCTTGGTCC CCCCTCCGAA CGTGTACGGA TAGCTGTAAC CCTGTCCACA      60
GTGATAATCT GCAAGGTCTT CAGCCTGCAC ACTGCTGATG GTCAGAGTGA AATCTGTTGC      120
20 AGATCCACTG CCTGTGAAGC GATCGGGGAC CCCAGTGTAC CGGTTGGATG CCCC GTATAT      180
CAGCAGTTTA GGAGACTGCT CTGGTTTCTG TTGATAACCAG GAAACATAAG TAACCACATT      240
CTCACTGGCC TTGCAGGTCA AGGTGACCCT CTCTCCTACT GACATGGACA TGGATTTGGG      300
25 AGATTGGGTC ATTACAATGT T      321

```

(2) SEQ ID NO: 16 的信息:

- (i) 顺序特征:
(A) 长度：107 个氨基酸
(B) 类型：氨基酸
(C) 链型：
(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：蛋白质

(xi) 顺序描述：SEQ ID NO: 16 :

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

20

(2) SEQ ID NO: 17 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 321 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: cDNA
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 17:

	GACATTGTGA	TGACCCAGTC	TCACAAATTC	ATGTCCACAT	CAGTAGGAGA	CAGGGTCAGC	60
25	ATCATCTGTA	AGGCCAGTCA	AGATGTGGGT	ACTGCTGTAG	ACTGGTATCA	ACAGAAACCA	120
	GGACAATCTC	CTAAACTACT	GATTTATTGG	GCATCCACTC	GGCACACTGG	AGTCCCTGAT	180
	CGCTTCACAG	GCAGTGGATC	TGGGACAGAC	TTCACTCTCA	CCATTACTAA	TGTTTCAGTCT	240
30	GAAGACTTGG	CAGATTATTT	CTGTCAGCAA	TATAACAGCT	ATCCTCTCAC	GTTCGGTGCT	300
	GGGACCATGC	TGGACCTGAA	A				321

35

(2) SEQ ID NO: 18 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 321 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: cDNA
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 18:

```

      TTCAGGTCC AGCATGGTCC CAGCACCGAA CGTGAGAGGA TAGCTGTTAT ATTGCTGACA      60
5    GAAATAATCT GCCAAGTCTT CAGACTGAAC ATTAGTAATG GTGAGAGTGA AGTCTGTCCC      120
      AGATCCACTG CCTGTGAAGC GATCAGGGAC TCCAGTGTGC CGAGTGGATG CCCAATAAAT      180
      CAGTAGTTTA GGAGATTGTC CTGGTTTCTG TTGATACCAG TCTACAGCAG TACCCACATC      240
10   TTGACTGGCC TTACAGATGA TGCTGACCCCT GTCTCCTACT GATGTGGACA TGAATTTGTG      300
      AGACTGGGTC ATCACAATGT C                                321

```

(2) SEQ ID NO: 19 的信息:

- (i) 顺序特征:
- (A) 长度: 107 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 19:

```

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

```

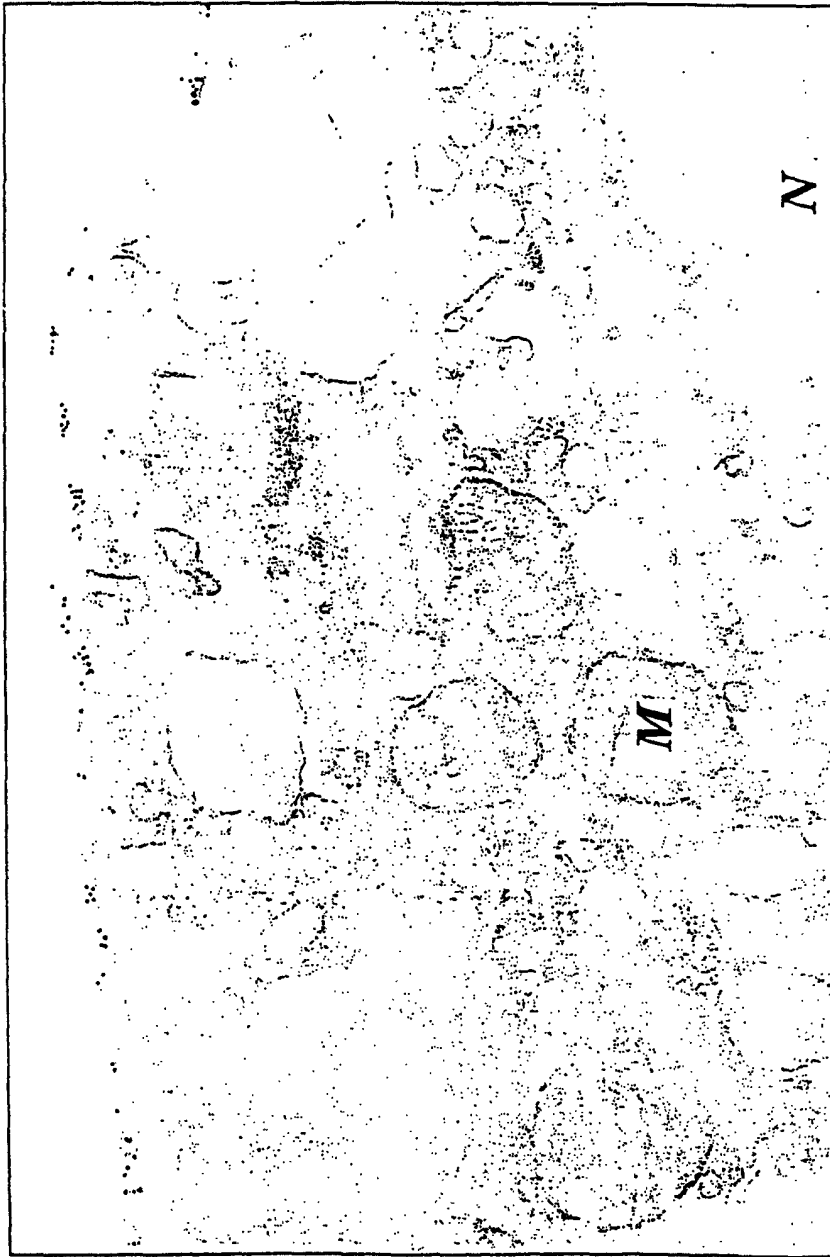


图 1

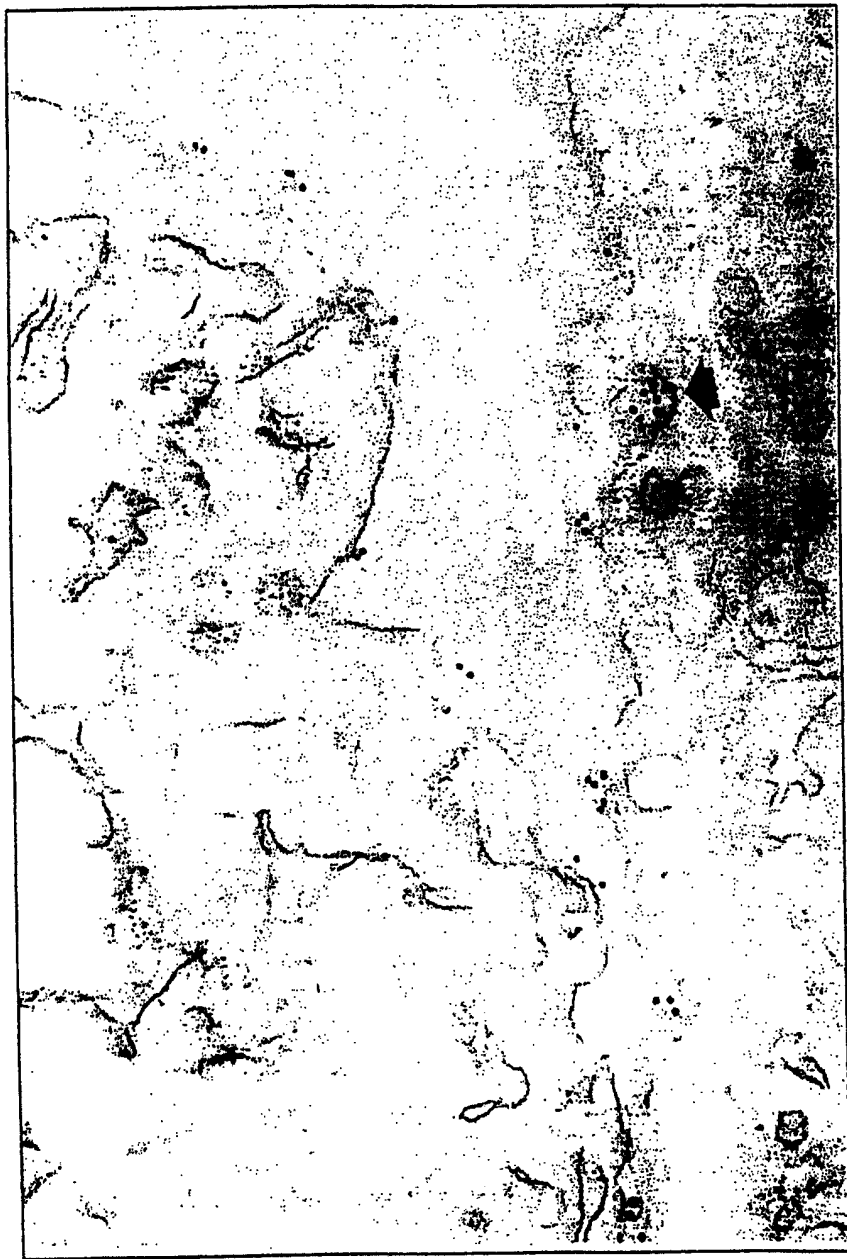


图 2

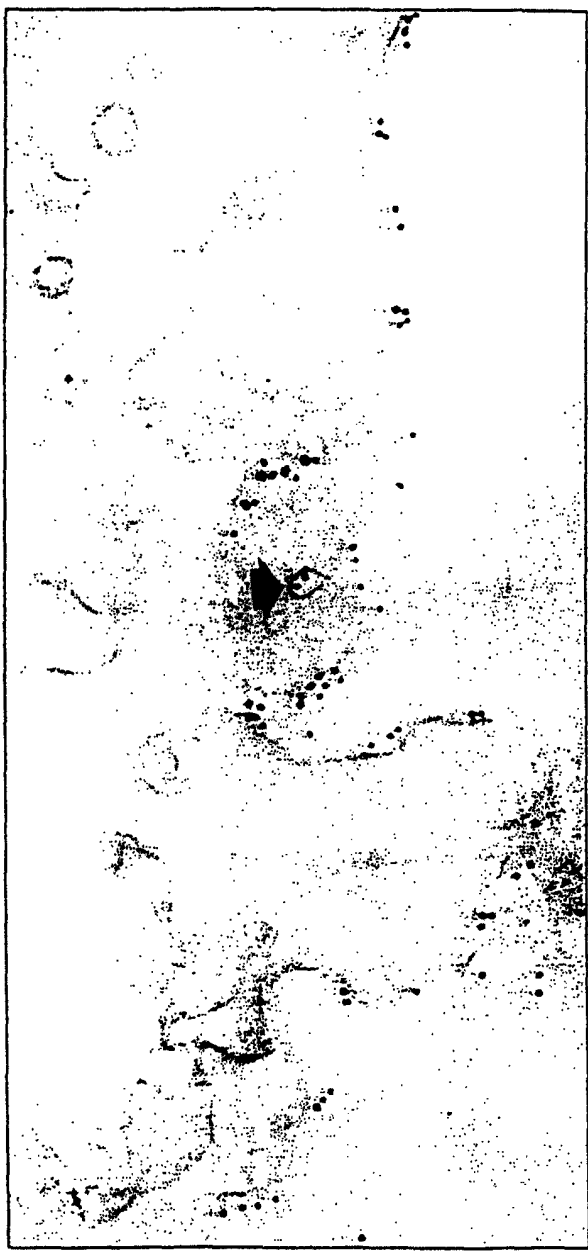


图 3

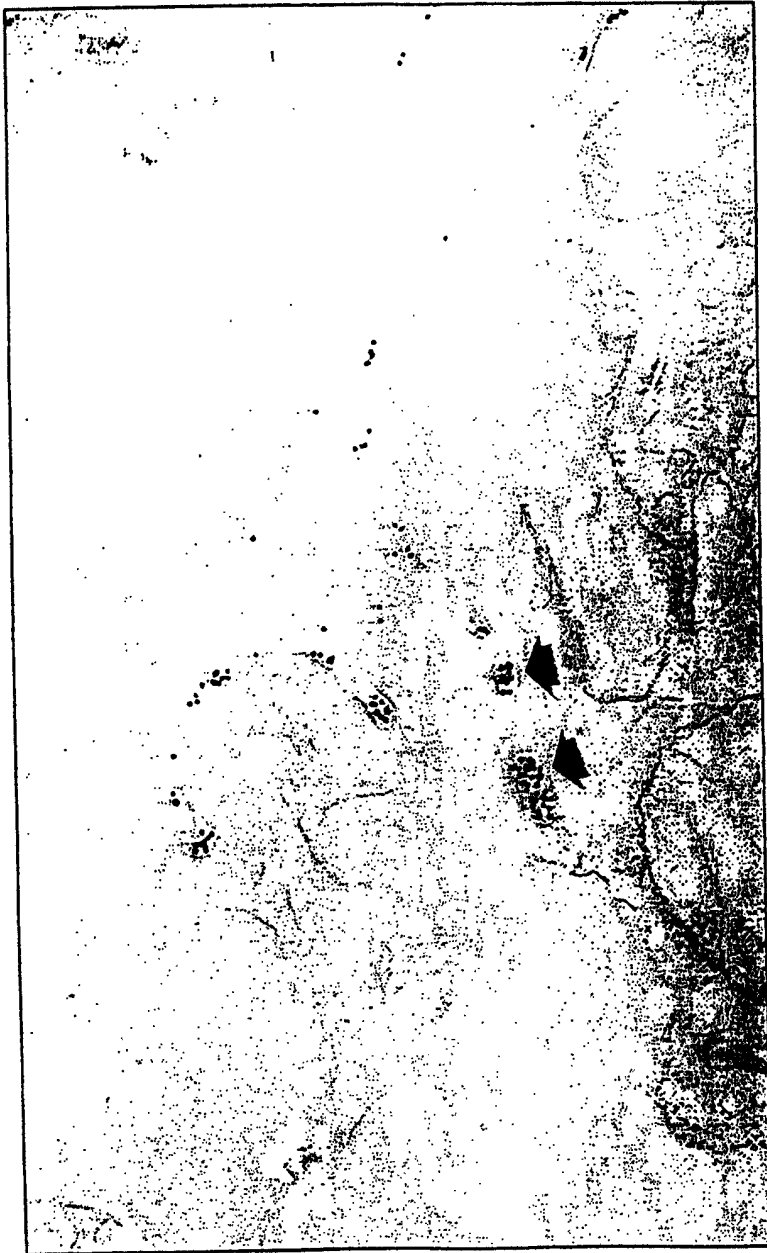


图4



图5

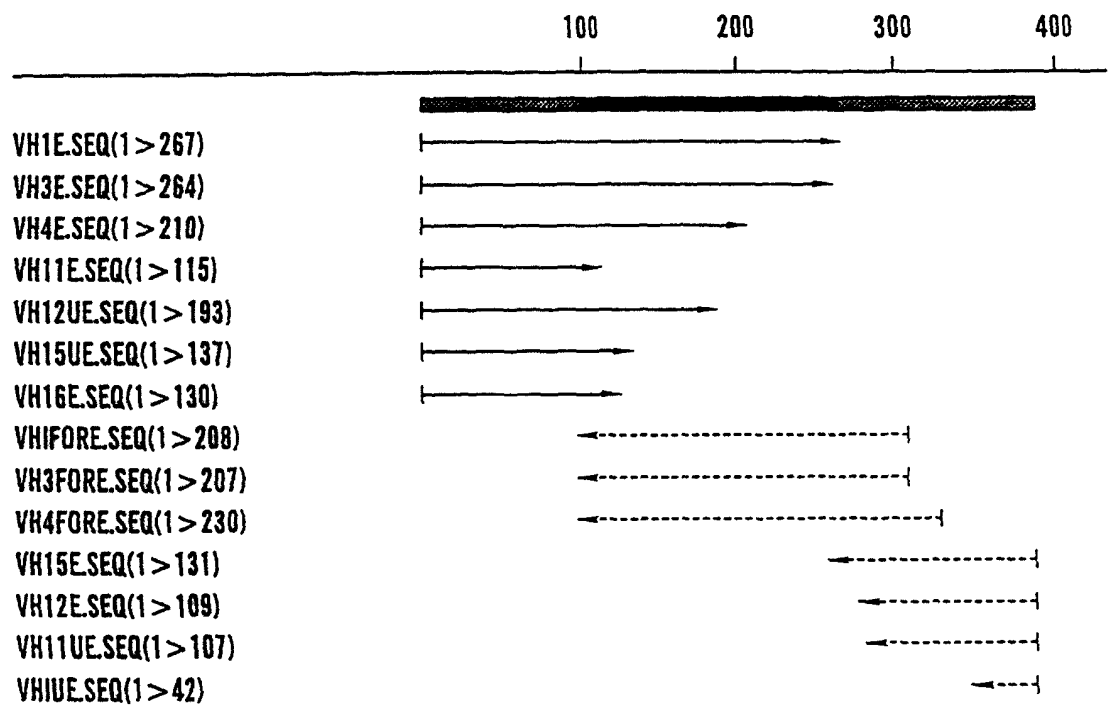


图 6

酶： 设置：		所有 74 种酶(没有过滤) 线性、只在某些位点、标准的遗传密码	
SEQ. ID. NO. 1	TCTCCTGTCAGGA	Alu I	Eco57 I
SEQ. ID. NO. 2	AGAGGACAGTCCT	Sau96 I	Bsr I
SEQ. ID. NO. 3	S P V R N C R C P L	Ava II	
SEQ. ID. NO. 4	L L S G T A G V L S E V Q L Q Q S G P E L V K		
SEQ. ID. NO. 5	L S C Q E L Q V S S L R S S C N S L D L N W S		
Hph I		Dra III	
Bsp6 II		Bsr I	
SEQ. ID. NO. 1	CCTGGGACTTCAGTGAGGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACCTGAATATACCATACACTGGG		
SEQ. ID. NO. 2	GGACCTGAAGTCACCTCCTATAGGACGTTCTGAAGACCTATGTGTAAGTACCTATATGGTATGTGACCC		
SEQ. ID. NO. 3	A W D F S E D I L Q D F W I H I H I Y H T L G		
SEQ. ID. NO. 4	P G T S V R I S C K T S G Y T F T E Y T I H W		
SEQ. ID. NO. 5	L G L Q G Y P A R L L D T H S L N T P Y T G		
Hph I		Rsa I	
Nco I		Kpn I	
SEQ. ID. NO. 1	TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCCTTGAGTGGATTGGAAACATCAATCCTAACATGGTGGTACCACCTA		
SEQ. ID. NO. 2	ACTTCGTCTCGGTACCTTCTCGGAACCTCACCTAACCTTTGTAGTTAGGATTGTACCACCATGGTGGAT		
SEQ. ID. NO. 3	E A E P W K E P V D W K H Q S Q W W Y H L		
SEQ. ID. NO. 4	V K Q S H G K S L E W I G N I N P N N G G T T Y		
SEQ. ID. NO. 5	S R A M E R A L S G L E T S I L T M V V P P		

图 7A

酶:		所有 74 种酶(没有过滤)	
设置:		线性、只在某些位点、标准的遗传密码	
SEQ. ID. NO. 1	CAATCAGAAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCCTCAGTACAGCCTACATGGAGCTC		
SEQ. ID. NO. 2	GTTAGTCTTCAAGCTCCTGTTCCGGTGTAACCTGACATCTGTTTCAGGAGGTCATGTCGGATGTACCTCGAG		
SEQ. ID. NO. 3	Q S E V R G Q G H I D C R Q V L Q Y S L H G A		
SEQ. ID. NO. 4	N Q K F E D K A T L T V D K S S S T A Y M E L		
SEQ. ID. NO. 5	T I R S S R T R P H . L . T S P P V Q P T W S S		
SEQ. ID. NO. 1	CGCAGCCTAACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTATTGTGCAGCTGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCC		
SEQ. ID. NO. 2	GCGTCGGATTGTAGACTCCTAAGACGTCAGATAATAACACGTCGACCAACCTTGAAACTGATGACCCCGG		
SEQ. ID. NO. 3	P Q P N I . G F C S L L L C S W L E L . L L G P		
SEQ. ID. NO. 4	R S L T S E D S A V Y Y C A A G W N F D Y W G		
SEQ. ID. NO. 5	A A . H L R I L Q S I I V Q L V G T L T T G A		
SEQ. ID. NO. 1	AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC		
SEQ. ID. NO. 2	TTCCGTTGGTGAGAGTGTACAGAGGAGTCGGTTTGTCTGTGGG		
SEQ. ID. NO. 3	R H H S H S L L S Q N D T		
SEQ. ID. NO. 4	Q G T T L T V S S A K T T P		
SEQ. ID. NO. 5	K A P L S Q S P Q P K R H P		

图 7B

LIPMAN-PEARSON 蛋白序列对比
KTUPLE: 2; 间隙补偿: 4; 间隙长度补偿: 12

SEQ1(L>115) J591VH.PRO (1>115)	相似性 指数 75.6	间隙 数 2	间隙 长度 10	一致 长度 125
EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTI-HWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTT EVQLQQSGPELVKPG:SV:ISCK:SGYTFTEY:Y:WVKQS.GKSLEWIG:INP.NGGT: EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFDYYMNNWVKQSPGKSLEWIGDINPGNGGTS └─10┐└─20┐└─30┐└─40┐└─50┐└─60┐└─70┐└─80┐└─90┐└─100┐└─110┐└─120┐ YNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAG-----WNFDYWGGQGT YNQKF.:KATLTVDKSSSTAYM:L.SLTSEDSAVYYCA G...FDYWGGQGT YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYYSSSYMAYYAFDYWGQGT └─10┐└─20┐└─30┐└─40┐└─50┐└─60┐└─70┐└─80┐└─90┐└─100┐└─110┐└─120┐				

LTVSS
:TVSS
VTVSS

图 8

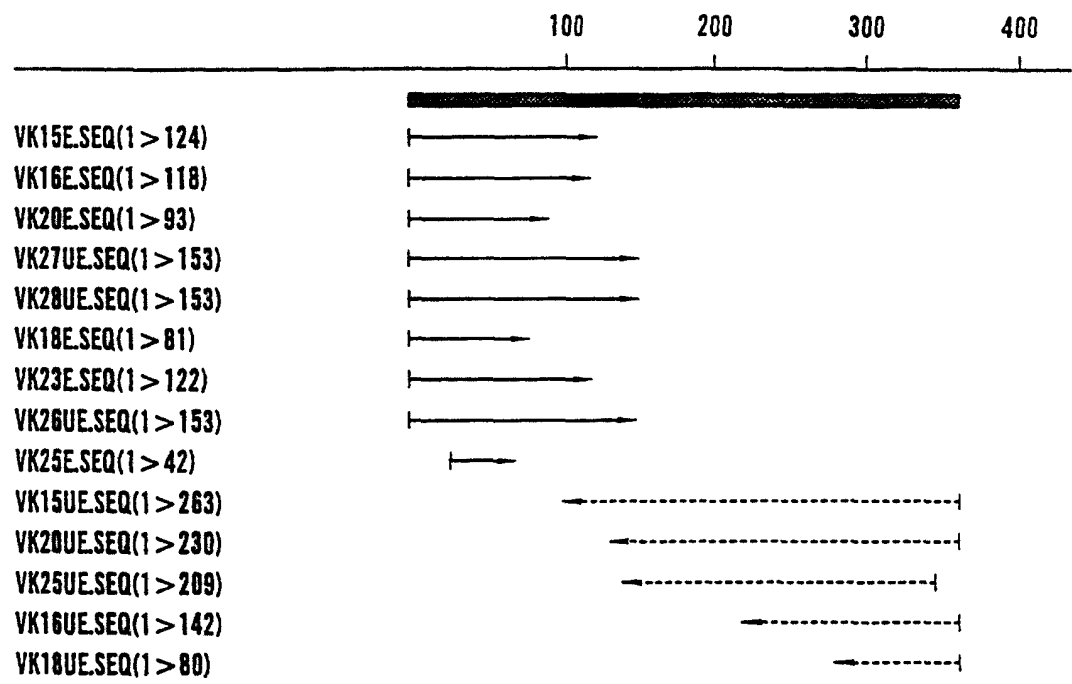


图 9

酶： 设置：		所有 74 种酶 (没有过滤) 线性、只在某些位点、标准的遗传密码	
SEQ. ID. NO. 9	TTATATGGAGCTGATGGGAACATTGTAATGACCCAAATCTCCAAATCCATGTCCATGTCCAGTAGGAGAGA	Alu I	Hph I
SEQ. ID. NO. 10	AAATACCTCGACTACCCCTTGTAACATTACTGGGTAGAGGGTTAGGTACAGGTACAGTCATCCTCTCT		
SEQ. ID. NO. 11	L Y G A D G N I V M T Q S P K S M S M S V G E		
SEQ. ID. NO. 12	Y M E L M G T L . P N L P N P C P C Q . E R		
SEQ. ID. NO. 13	I I W S . W E H C N D P I S Q I H V H V S R R E		
		Hae III	
		Bsr I	
SEQ. ID. NO. 9	GGGTCACCTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAAATGTGGTTACTTATGTTCCTGGTATCAACAGAAACCAGA		
SEQ. ID. NO. 10	CCCAGTGGAACTGGACGTTCCGGTCACTCTACACCAATGAATACAAAGGACCATAGTTGTCTTTGGTCT		
SEQ. ID. NO. 11	R V T L T C K A S E N V V T Y V S W Y Q Q K P E		
SEQ. ID. NO. 12	G S P . P A R P V R M W L L M F P G I N R N Q		
SEQ. ID. NO. 13	G H L D L Q G Q . E C G Y L C F L V S T E T R		
		Mbo I	
		Ava II	Dpn I
		Bsr I	Bsa0 I
		Hpa II	Pvu I
		Rsa I	
SEQ. ID. NO. 9	GCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGGCATCCAAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATCGCTTCACAGGC	Alw26 I	Fok I
SEQ. ID. NO. 10	CGTCAGAGGATTTGACGACTATATGCCCGTAGGTTGGCCATGTGACCCAGGGCTAGCGAAGTGTCCG		
SEQ. ID. NO. 11	Q S P K L L I Y G A S N R Y T G V P D R F T G		
SEQ. ID. NO. 12	S S L L N C . Y T G H P T G T L G S P I A S Q A		
SEQ. ID. NO. 13	A V S . T A D I R G I Q P V H W G P R S L H R		

图 10A

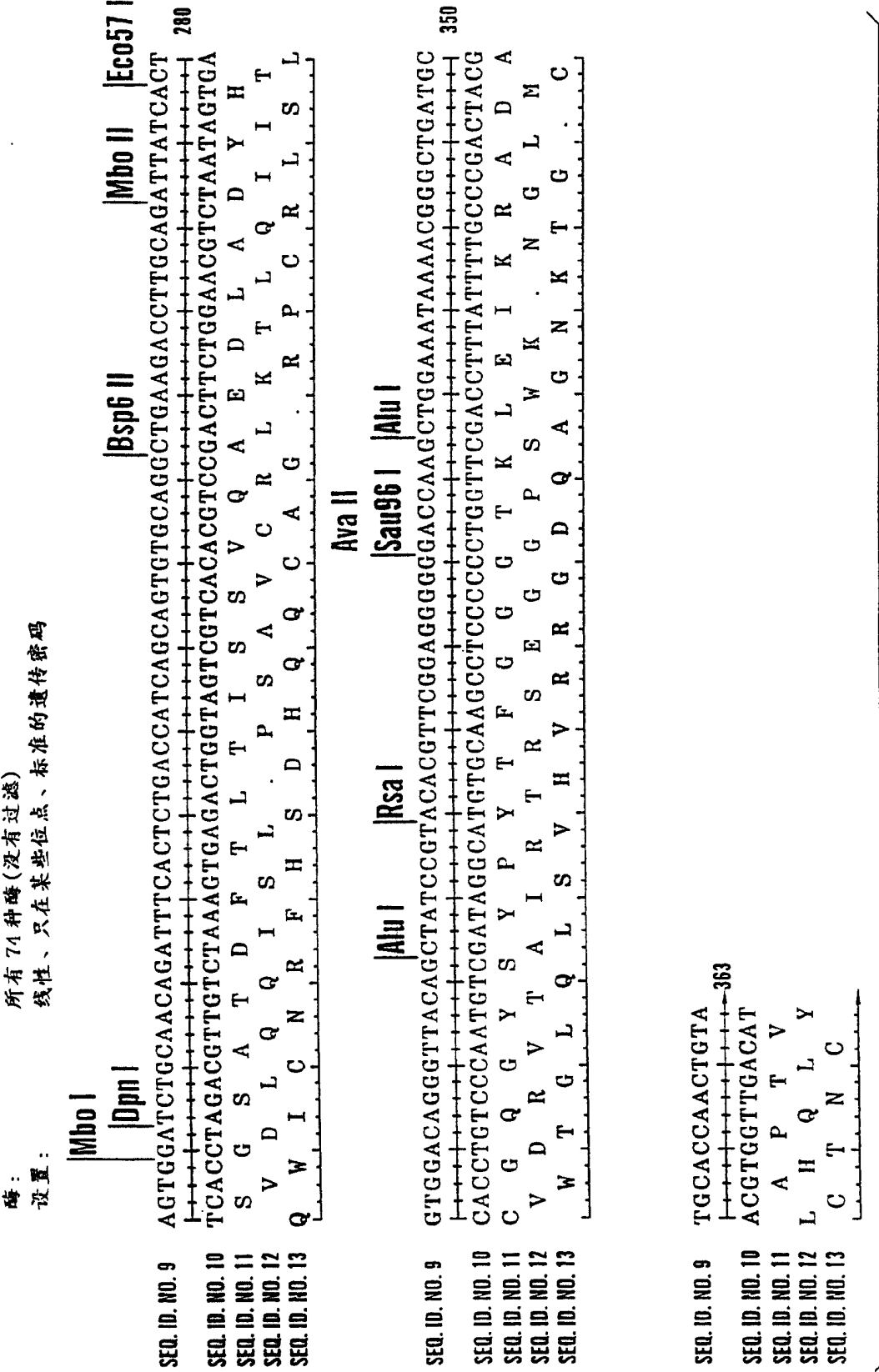


图 10B

LIPMAN-PEARSON 蛋白序列对比
KTUPLE: 2; 间隙补偿: 4; 间隙长度补偿: 12

SEQ1 (1 > 107) J591VK.PRO	SEQ2 (L > 111) MUVKV.PRO	相似性 指数	间隙 数	间隙 长度	一致 长度
(1 > 107)	(1 > 109)	60.4	2	2	109
┌10┐ NIVMTQSPKSMSSVGERVTLTCKAS-ENVVTVVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVP └10┘ ┌20┐ :1 MTQSP.S:S S:G:RVT:TC:AS:::Y::WYQQKP.SPKLLIY AS.:GVP └20┘ ┌10┐ DIGMTQSPSSLASGLDRVTITCRASQDDDISNYLNWYQQKPGGSPKLLIYYASRLHSGVP └10┘ ┌60┐ DRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQGSY-PYTFGGGTTKLEIK └60┘ ┌70┐ .RF:GSGS:TD::LTIS:::ED:A.Y C QG: P TFGGGTTKLEIK └70┘ ┌80┐ SRFSGSGGTDYSLTISNLEGEDIAFYFCQQGNTLPPRTFGGGTTKLEIK └80┘ ┌30┐ └30┘ ┌40┐ └40┘ ┌50┐ └50┘ ┌60┐ └60┘					

图 11

