



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111875703 B

(45) 授权公告日 2024. 06. 04

(21) 申请号 202010370074.X

(22) 申请日 2010.11.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111875703 A

(43) 申请公布日 2020.11.03

(30) 优先权数据
09014136.7 2009.11.11 EP
10006956.6 2010.07.06 EP
61/260,202 2009.11.11 US
61/361,618 2010.07.06 US

(62) 分案原申请数据
201080051324.8 2010.11.11

(83) 生物保藏信息
DSM ACC3067 2010.06.21
DSM ACC3068 2010.06.21
DSM ACC3069 2010.06.21
DSM ACC3070 2010.06.21
DSM ACC3071 2010.06.21
DSM ACC3072 2010.06.21
DSM ACC3073 2010.06.21
DSM ACC3089 2010.08.31
DSM ACC3090 2010.08.31

(73) 专利权人 安斯泰来制药股份有限公司
地址 日本东京
专利权人 约翰·古腾堡大学美因兹医学大
学转化肿瘤学公司

(72) 发明人 乌尔·沙欣 厄兹莱姆·图雷奇
米夏埃尔·科斯洛夫斯基
科登·沃尔特 斯特凡·韦尔
玛丽亚·克罗伊茨贝格
贝恩德·胡布纳
米夏埃尔·埃尔代连

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227
专利代理师 顾晋伟 刘振佳

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2006131953 A2, 2006.12.14
审查员 王烟岚

权利要求书3页 说明书60页
序列表23页 附图30页

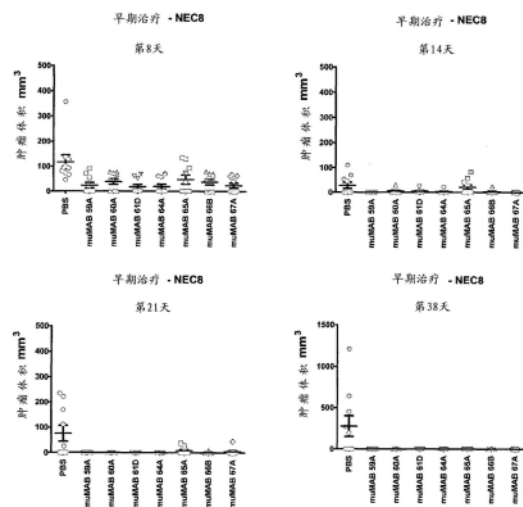
(54) 发明名称

密蛋白6 (CLDN6) 特异性的抗体

(57) 摘要

本发明涉及密蛋白6 (CLDN6) 特异性的抗体。本发明提供可用作治疗剂的抗体, 所述治疗剂用于治疗 and/或预防与表达密蛋白-6 (CLDN6) 之细胞相关的疾病, 包括肿瘤相关的疾病, 例如卵巢癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、恶性黑色素瘤、头颈癌、肉瘤、胆管癌、膀胱癌、肾癌、结肠癌、胎盘绒毛膜癌、子宫颈癌、睾丸癌和子宫癌。

CN 111875703 B



1. 生产与CLDN6相结合之抗CLND6抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 在宿主细胞表达所述抗体或其抗原结合片段的条件下培养宿主细胞,所述宿主细胞经包含编码抗体重链可变区之核酸序列的表达构建体和包含编码抗体轻链可变区之核酸序列的表达构建体转化,其中所述表达构建体存在于一种或更多种表达载体中;以及

b. 收获由所述细胞所表达的抗体或其抗原结合片段的制备物;

其中:

(i) 所述编码抗体重链可变区的核酸序列包含编码SEQ ID NO:34的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3区的核酸序列,并且所述编码抗体轻链可变区的核酸序列包含编码SEQ ID NO:35的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3区的核酸序列,

其中HCDR1由在SEQ ID NO:34内确定的氨基酸序列GYSFTGYT (SEQ ID NO:47) 组成, HCDR2由在SEQ ID NO:34内确定的氨基酸序列INPYNGGT (SEQ ID NO:54) 组成,并且HCDR3由在SEQ ID NO:34内确定的氨基酸序列ARDYGYVLDY (SEQ ID NO:55) 组成;并且其中LCDR1由在SEQ ID NO:35内确定的氨基酸序列SSVSY (SEQ ID NO:56) 组成, LCDR2由在SEQ ID NO:35内确定的氨基酸序列STS (SEQ ID NO:53) 组成,并且LCDR3由在SEQ ID NO:35内确定的氨基酸序列QQRSIYPPWT (SEQ ID NO:57) 组成;

(ii) 所述编码抗体重链可变区的核酸序列包含编码SEQ ID NO:36的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3区的核酸序列,并且所述编码抗体轻链可变区的核酸序列包含编码SEQ ID NO:37的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3区的核酸序列,

其中HCDR1由在SEQ ID NO:36内确定的氨基酸序列GYSFTGYT (SEQ ID NO:47) 组成, HCDR2由在SEQ ID NO:36内确定的氨基酸序列INPYNGGT (SEQ ID NO:54) 组成,并且HCDR3由在SEQ ID NO:36内确定的氨基酸序列ARDYGFVLDY (SEQ ID NO:58) 组成;并且其中LCDR1由在SEQ ID NO:37内确定的氨基酸序列SSVSY (SEQ ID NO:56) 组成, LCDR2由在SEQ ID NO:37内确定的氨基酸序列STS (SEQ ID NO:53) 组成,并且LCDR3由在SEQ ID NO:37内确定的氨基酸序列QQRSNYPPWT (SEQ ID NO:59) 组成;

(iii) 所述编码抗体重链可变区的核酸序列包含编码SEQ ID NO:38的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3区的核酸序列,并且所述编码抗体轻链可变区的核酸序列包含编码SEQ ID NO:39的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3区的核酸序列,

其中HCDR1由在SEQ ID NO:38内确定的氨基酸序列GYSFTGYT (SEQ ID NO:47) 组成, HCDR2由在SEQ ID NO:38内确定的氨基酸序列INPYNGGI (SEQ ID NO:60) 组成,并且HCDR3由在SEQ ID NO:38内确定的氨基酸序列ARDFGYVLDY (SEQ ID NO:61) 组成;并且其中LCDR1由在SEQ ID NO:39内确定的氨基酸序列SSVSY (SEQ ID NO:56) 组成, LCDR2由在SEQ ID NO:39内确定的氨基酸序列STS (SEQ ID NO:53) 组成,并且LCDR3由在SEQ ID NO:39内确定的氨基酸序列ARDFGYVLDY (SEQ ID NO:61) 组成;或者

(iv) 所述编码抗体重链可变区的核酸序列包含编码SEQ ID NO:40的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3区的核酸序列,并且所述编码抗体轻链可变区的核酸序列包含编码SEQ ID NO:41的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3区的核酸序列,

其中HCDR1由在SEQ ID NO:40内确定的氨基酸序列GYSFTGYT (SEQ ID NO:47) 组成, HCDR2由在SEQ ID NO:40内确定的氨基酸序列INPYNGGS (SEQ ID NO:63) 组成, HCDR3由在

SEQ ID NO:40内确定的氨基酸序列ARDYGYVFDY (SEQ ID NO:64) 组成;LCDR1由在SEQ ID NO:41内确定的氨基酸序列SSVNY (SEQ ID NO:65) 组成,LCDR2由在SEQ ID NO:41内确定的氨基酸序列STS (SEQ ID NO:53) 组成,并且LCDR3由在SEQ ID NO:41内确定的氨基酸序列QQRNNYPPWT (SEQ ID NO:66) 组成,

其中所述重链可变区的氨基酸残基与所述轻链可变区的氨基酸残基共价连接。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述宿主细胞是真核宿主细胞。

3. 权利要求2所述的方法,其中所述真核宿主细胞是:淋巴细胞、CHO细胞、NS/O细胞、HEK293细胞、HEK293T细胞、植物细胞、真菌细胞、COS细胞、K562细胞、HELA细胞或昆虫细胞。

4. 权利要求3所述的方法,其中所述淋巴细胞是树突细胞或B细胞。

5. 权利要求3所述的方法,其中所述真菌细胞是酵母细胞。

6. 权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述表达载体包含启动子序列、前导序列、翻译起始序列、轻链恒定区、重链恒定区、3' 非翻译序列、多聚腺苷酸化序列或转录终止序列。

7. 包含重组核酸的组合物,所述组合物包含:

(i) 编码包含重链CDR1、CDR2和CDR3区之多肽的核酸序列,所述重链CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:34的第26-33位、51-58位和97-106位;以及

编码包含轻链CDR1、CDR2和CDR3区之多肽的核酸序列,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:35的第27-31位、49-51位和88-97位;

(ii) 编码包含重链CDR1、CDR2和CDR3区之多肽的核酸序列,所述重链CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:36的第26-33位、51-58位和97-106位;以及

编码包含轻链CDR1、CDR2和CDR3区之多肽的核酸序列,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:37的第27-31位、49-51位和88-97位;

(iii) 编码包含重链CDR1、CDR2和CDR3区之多肽的核酸序列,所述重链CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:38的第26-33位、51-58位和97-106位;以及

编码包含轻链CDR1、CDR2和CDR3区之多肽的核酸序列,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:39的第27-31位、49-51位和88-97位;或者

(iv) 编码包含重链CDR1、CDR2和CDR3区之多肽的核酸序列,所述重链CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:40的第26-33位、51-58位和97-106位;以及

编码包含轻链CDR1、CDR2和CDR3区之多肽的核酸序列,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:41的第27-31位、49-51位和88-97位。

8. 权利要求7所述的组合物,其包含以下的核酸序列:

(i) 编码包含氨基酸序列为SEQ ID NO:34的重链可变区和氨基酸序列为SEQ ID NO:35的轻链可变区之多肽的核酸序列;

(ii) 编码包含氨基酸序列为SEQ ID NO:36的重链可变区和氨基酸序列为SEQ ID NO:37的轻链可变区之多肽的核酸序列;

(iii) 编码包含氨基酸序列为SEQ ID NO:38的重链可变区和氨基酸序列为SEQ ID NO:39的轻链可变区之多肽的核酸序列;或者

(iv) 编码包含氨基酸序列为SEQ ID NO:40的重链可变区和氨基酸序列为SEQ ID NO:41的轻链可变区之多肽的核酸序列。

9. 权利要求7或8所述的组合物,其中所述核酸序列有效连接至表达控制序列。
10. 包含权利要求7至9中任一项所限定的重组核酸的重组人细胞,其中所述重组人细胞不存在于人中。
11. 权利要求10所述的重组人细胞,其中所述细胞是HEK293细胞、HEK293T细胞、K562细胞、HELA细胞或淋巴细胞。
12. 权利要求11所述的重组人细胞,其中所述淋巴细胞是树突细胞或B细胞。
13. 由权利要求7至9中任一项所限定的重组核酸编码的多肽,其中所述重链可变区的氨基酸残基与所述轻链可变区的氨基酸残基共价连接。
14. 权利要求13所述的多肽,其还包含免疫球蛋白铰链区。
15. 权利要求13或14所述的多肽,其是单链Fv或包含单链Fv。
16. 产生重组真核宿主细胞的方法,其包括以下步骤:
 - a. 用包含权利要求7至9中任一项所述的重组核酸的表达载体转化真核细胞;以及
 - b. 获得经转化细胞,其中所述经转化细胞包含所述重组核酸。
17. 权利要求16所述的方法,其中所述重组真核宿主细胞是人细胞。
18. 权利要求17所述的方法,其中所述人细胞是HEK293细胞、HEK293T细胞、K562细胞、HELA细胞或淋巴细胞。
19. 权利要求18所述的方法,其中所述淋巴细胞是树突细胞或B细胞。
20. 抗体,其包含对CD64具有特异性的结合结构域,其中所述抗体是包含对CLDN6具有特异性的另一结合结构域的双特异性抗体,其中所述抗体包含由权利要求7至9中任一项所限定的重组核酸编码的多肽序列。

密蛋白6 (CLDN6) 特异性的抗体

[0001] 本申请是2016年6月16日提交的申请号为201610429065.7的中国专利申请的分案申请,该母案申请是申请号为201080051324.8的中国专利申请的分案申请,原申请是2010年11月11日提交的PCT国际申请PCT/EP2010/006888于2012年05月11日进入中国国家阶段的申请。

技术领域

[0002] 本申请涉及密蛋白6 (CLDN6) 特异性的抗体。

背景技术

[0003] 在过去的十年间,抗体已被成功地引入临床用于癌症治疗,并且已成为肿瘤学中最有希望的疗法。与常规药物相比,基于抗体的癌症治疗具有较高特异性和较低副作用的潜力。原因是抗体在正常和肿瘤细胞之间的精确区分,及其作用方式依赖毒性较小的免疫抗肿瘤机制(例如,补体激活和募集细胞毒性免疫细胞)的事实。

[0004] 密蛋白 (claudin) 是位于上皮与内皮的紧密连接内的整合膜蛋白。预测密蛋白具有四个跨膜区段,有两个细胞外环,并且N和C末端位于胞质中。跨膜蛋白质的密蛋白 (CLDN) 家族在上皮与内皮紧密连接的维持中发挥关键作用,并且还可能在细胞骨架的维持中以及在细胞信号传导中发挥作用。除了它们的膜定位之外,这些蛋白质在肿瘤和正常细胞之间的差异表达使它们成为有吸引力的癌症免疫治疗靶标,并且在癌症治疗中使用靶向CLDN的基于抗体的疗法使高水平的治疗特异性成为可能。

[0005] 然而,靶向CLDN之疗法的临床应用面临多种障碍。身体中普遍存在的CLDN表达以及CLDN在维持紧密连接中的关键作用要求靶向CLDN之疗法的靶标特异性,以使治疗特异性最大化以及全身毒性最小化。

[0006] WO 2009/087978涉及抗CLDN6抗体,并且涉及其作为抗癌剂的应用。尤其是描述了所设计的单克隆抗体AB3-1、AE1-16、AE49-11和AE3-20。然而,通过实施例5中的FACS分析表明,这些抗体都不是CLDN6特异性的。抗体AE3-20与CLDN9反应,而抗体AE1-16和AE49-11表现出与CLDN9相当大的反应性,并且还和CLDN4反应。抗体AB3-1与CLDN6的结合与其与CLDN9的结合一样强。实施例7中描述了当向小鼠肿瘤模型施用,抗体AE49-11倾向于抑制肿瘤生长,并且具有延长生命的作用。然而,鉴于所使用抗体的非特异性,还不清楚所描述的作用是否是由抗体与CLDN6结合所引起的。

[0007] 因此,到目前为止,尚未描述与表达CLDN6之细胞的表面选择性结合的CLDN6特异性的抗体。然而,需要这样的特异性抗体用于使用CLDN6作为靶标的基于抗体的治疗方法。

[0008] 图1中所示的CLDN3、CLDN4、CLDN6和CLDN9的序列比对说明CLDN6与其他密蛋白有高度的保守性。CLDN6与其他密蛋白(尤其是CLDN9和CLDN4)的这种高同源性以及WO 2009/087978无法提供CLDN6特异性抗体的事实表明也许不能产生与CLDN6特异性结合的抗体。

发明内容

[0009] 本文中公开的实验结果确证CLDN6在不同的人癌细胞中表达,而在正常组织中的表达限于胎盘。

[0010] 此外,本发明第一次描述成功地产生能够与表达CLDN6之完整细胞的表面结合的CLDN6特异性抗体。表达CLDN6之完整细胞的FACS分析显示抗CLDN6抗体的特异性结合,而对于表达其他密蛋白(尤其是CLDN3、CLDN4和CLDN9)的细胞或者不表达任何这些CLDN蛋白的细胞未观察到结合。因此,本发明出人意料地证明,可产生这样的抗体,其与表达CLDN6之细胞表面上的CLDN6特异性地进行抗原-抗体反应,但基本不与其他高度同源性的密蛋白进行抗原-抗体反应。

[0011] 本发明一般地提供可用作治疗剂(therapeutics)的抗体,所述治疗剂用于治疗/或预防与表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞相关的疾病,包括肿瘤相关的疾病,尤其是癌症,例如卵巢癌(尤其是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤)、肺癌(包括小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),尤其是鳞状细胞肺癌和腺癌)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(尤其是基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑色素瘤、头颈癌(尤其是恶性多形性腺瘤)、肉瘤(尤其是滑膜肉瘤和癌肉瘤)、胆管癌、膀胱癌(尤其是移行细胞癌和乳头状癌)、肾癌(尤其是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌)、结肠癌、小肠癌(包括回肠癌,尤其是小肠腺癌和回肠腺癌)、睾丸胚胎瘤、胎盘绒毛膜癌、子宫颈癌、睾丸癌(尤其是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎睾丸癌)、子宫癌、生殖细胞肿瘤(例如畸胎瘤或胚胎瘤,尤其是睾丸的生殖细胞肿瘤),及其转移形式。

[0012] 在一个方面中,本发明涉及能够与表达CLDN6之细胞表面所缔合的CLDN6相结合的抗体。优选地,所述抗体基本不能与表达CLDN9之细胞表面所缔合的CLDN9相结合。优选地,所述抗体基本不能与表达CLDN4之细胞表面所缔合的CLDN4相结合和/或基本不能与表达CLDN3之细胞表面所缔合的CLDN3相结合。最优选地,所述抗体基本不能与CLDN6以外的其他CLDN蛋白(所述其他CLDN蛋白与表达所述CLDN蛋白之细胞表面相缔合)相结合,并且是CLDN6特异性的。优选地,表达所述CLDN蛋白的所述细胞是完整细胞,尤其是非透化的细胞,并且与细胞表面相缔合的所述CLDN蛋白具有天然的(即非变性的)构象。优选地,所述抗体能够与一个或更多个天然构象的CLDN6表位相结合。

[0013] 在一个实施方案中,所述抗体能够与位于CLDN6的细胞外部分之内的表位相结合,其中CLDN6的所述细胞外部分优选地包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的任一氨基酸序列,优选SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列,更优选SEQ ID NO:6的氨基酸序列。优选地,所述抗体能够与位于SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的任一氨基酸序列(优选SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列)之内的表位相结合。

[0014] 在一个实施方案中,所述抗体能够通过如下与CLDN6结合:通过至少与选自Thr33、Phe35、Gly37、Ser39、Ile40和Leu151的一个、优选超过一个(例如,2、3、4或5个)、优选全部氨基酸相互作用,优选通过至少与选自Thr33、Phe35、Gly37、Ser39和Ile40的一个、优选超过一个、优选全部氨基酸相互作用,更优选通过至少与选自Phe35、Gly37、Ser39和Ile40或者Thr33、Phe35、Gly37和Ser39的一个、优选超过一个、优选全部氨基酸相互作用,并且尤其

是通过至少与选自Phe35、Gly37和Ser39的一个、优选超过一个、优选全部氨基酸相互作用。优选地,所述抗体不与选自Glu154、Ala155、Arg158和Gly161的一个或更多个、优选全部氨基酸相互作用,并且优选不与选自Arg158和Gly161的一个或更多个、优选全部氨基酸相互作用。

[0015] 可通过丙氨酸扫描氨基酸的突变来分析抗体与CLDN6 (尤其是天然构象CLDN6) 之间的相互作用。可评价CLDN6突变体被特异性单克隆抗体所结合的能力。特异性单克隆抗体与CLDN6突变体之结合受损表明被突变的氨基酸是重要的接触残基。可例如通过流式细胞术分析结合。

[0016] 在一个实施方案中,通过包括以下步骤的方法可获得所述抗体:用具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的任一氨基酸序列(优选SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列)的肽或免疫等效肽或者表达所述肽的核酸或宿主细胞免疫接种动物。

[0017] 在不同的一些实施方案中,所述抗体能够结合的CLDN6具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。尤其优选地是,所述抗体能够与具有SEQ ID NO:2之氨基酸序列的CLDN6相结合,并且能够与具有SEQ ID NO:8之氨基酸序列的CLDN6相结合。

[0018] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体重链,所述重链包含选自SEQ ID NO:34、36、38和40之抗体重链序列或其变体的CDR序列的至少一个、优选两个、更优选所有三个。在图25中所给出的上文中所提及的抗体重链序列中,以方框标记所述CDR序列。

[0019] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体重链,所述重链包含CDR3序列Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3,其中Xaa1是任何氨基酸,优选芳族氨基酸,更优选Phe或Tyr,最优选Tyr,Xaa2是任何氨基酸,优选芳族氨基酸,更优选Phe或Tyr,最优选Tyr,并且Xaa3是任何氨基酸,优选Leu或Phe,更优选Leu。在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体重链,所述重链包含CDR3序列Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3或Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp,其中Xaa1、Xaa2和Xaa3的定义见上文。在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体重链,所述重链包含CDR3序列Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp,其中Xaa1、Xaa2和Xaa3的定义见上文。在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体重链,所述重链包含CDR3序列Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr,其中Xaa1、Xaa2和Xaa3的定义见上文。在一个实施方案中,根据前述实施方案的抗体包含抗体重链,所述重链包含根据SEQ ID NO:47的CDR1序列或其变体和/或根据SEQ ID NO:48的CDR2序列或其变体。

[0020] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体重链,所述重链包含选自SEQ ID NO:34、36、38和40的抗体重链序列或其变体。

[0021] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体轻链,所述轻链包含选自SEQ ID NO:35、37、39和41之抗体轻链序列或其变体的CDR序列的至少一个、优选两个、更优选所有三个。在图26中所给出的上文中提及的抗体轻链序列中,以方框标记CDR序列。

[0022] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体轻链,所述轻链包含CDR3序列Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro,其中Xaa是任何氨基酸,优选Ser或Asn,最优选Ser,Xaa2是任何氨基酸,优选Tyr、Ser、Ile、Asn或Thr,更优选Tyr、Ser或Asn,最优选Asn,并且Xaa3是任何氨基酸,优选Ser或Tyr,更优选Tyr。在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体轻链,所述轻链包含CDR3序列Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro,其中Xaa1、Xaa2和Xaa3的定义见上文。在

一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体轻链,所述轻链包含CDR3序列Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr,其中Xaa1、Xaa2和Xaa3的定义见上文。在一个实施方案中,根据前述实施方案的抗体包含抗体轻链,所述轻链包含根据SEQ ID NO:52的CDR1序列或其变体和/或根据SEQ ID NO:53的CDR2序列或其变体。

[0023] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含抗体轻链,所述轻链包含选自SEQ ID NO:35、37、39和41的抗体轻链序列或其变体。

[0024] 在多种实施方案中,本发明的抗体包含上文中所讨论的抗体重链和上文中所讨论的抗体轻链。

[0025] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含:

[0026] (i) 抗体重链,其包含SEQ ID NO:x的抗体重链序列或其变体的CDR序列的至少一个、优选两个、更优选所有三个,以及

[0027] (ii) 抗体轻链,其包含SEQ ID NO:x+1的抗体轻链序列或其变体的CDR序列的至少一个、优选两个、更优选所有三个;

[0028] 其中x选自34、36、38和40。

[0029] 在上文中所提及的抗体重链序列和抗体轻链序列中分别用方框标出CDR序列,分别在图25和图26中给出。

[0030] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含:

[0031] (i) 抗体重链,其包含选自Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3、Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3、Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp、Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp和Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr的CDR3序列,其中Xaa1是任何氨基酸,优选芳族氨基酸,更优选Phe或Tyr,最优选Tyr,Xaa2是任何氨基酸,优选芳族氨基酸,更优选Phe或Tyr,最优选Tyr,并且Xaa3是任何氨基酸,优选Leu或Phe,最优选Leu,以及

[0032] (ii) 抗体轻链,其包含选自Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro、Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro、Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr的CDR3序列,其中Xaa1是任何氨基酸,优选Ser或Asn,最优选Ser,Xaa2是任何氨基酸,优选Tyr、Ser、Ile、Asn或Thr,更优选Tyr、Ser或Asn,最优选Asn,并且Xaa3是任何氨基酸,优选Ser或Tyr,更优选Tyr。

[0033] 在一个实施方案中,根据前述实施方案的抗体包含(i) 抗体重链,其包含根据SEQ ID NO:47的CDR1序列或其变体和/或根据SEQ ID NO:48的CDR2序列或其变体,和/或(ii) 抗体轻链,其包含根据SEQ ID NO:52的CDR1序列或其变体和/或根据SEQ ID NO:53的CDR2序列或其变体。

[0034] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含:

[0035] (i) 抗体重链,其包含SEQ ID NO:x的抗体重链序列或其变体,以及

[0036] (ii) 抗体轻链,其包含SEQ ID NO:x+1的抗体轻链或其变体;

[0037] 其中x选自34、36、38和40。

[0038] 在优选的一些实施方案中,所述抗体具有一种或更多种以下活性:(i) 杀伤表达CLDN6的细胞,(ii) 抑制表达CLDN6之细胞的增殖,(iii) 抑制表达CLDN6之细胞的集落形成,(iv) 介导已建立之肿瘤的缓解(即,大小减小),优选完全缓解(即,完全消失),(v) 预防肿瘤的形成或再形成,以及(vi) 抑制表达CLDN6之细胞的转移。因此,所述抗体可以用于前述一种或更多种(尤其是当向患者施用时)。如本文中所描述的那样,可治疗性应用所述杀伤细

胞和/或抑制细胞的一种或更多种活性。尤其是可将杀伤细胞、抑制细胞的增殖和/或抑制细胞的集落形成用于治疗或预防癌症(包括癌症转移)。可应用抑制细胞的增殖、集落形成和/或转移,尤其是用于治疗或预防癌症转移和癌细胞的转移性扩散。优选地,本发明的抗体通过诱导补体依赖性细胞毒作用(complement dependent cytotoxicity,CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞的细胞毒作用(antibody dependent cellular cytotoxicity,ADCC)介导的裂解、凋亡、同质性黏附(homotypic adhesion)和/或吞噬作用(优选通过诱导CDC介导的裂解和/或ADCC介导的裂解)介导对细胞的杀伤。然而,本发明还包括这样的一些实施方案,其中所述抗体发挥本文中所描述的活性(例如,杀伤细胞和/或抑制一种或更多种细胞活性(例如,细胞增殖和/或集落形成))而不诱导补体依赖性细胞毒作用(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)介导的裂解、凋亡、同质性黏附和/或吞噬作用。例如,本发明的抗体还可简单地通过与细胞表面上的CLDN6结合而发挥作用,因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。

[0039] 优选地,在效应细胞存在下,发生ADCC介导的细胞裂解,在一些具体的实施方案中,所述效应细胞选自单核细胞、单个核细胞(mononuclear cell)、NK细胞和PMN,并且吞噬作用是通过巨噬细胞进行的。

[0040] 可通过在使用溴脱氧尿苷(5-溴-2-脱氧尿苷,BrdU)的测定中测定表达CLDN6之癌细胞的增殖来体外测量抑制或降低表达CLDN6之细胞(优选癌细胞)的增殖的活性。BrdU是合成的核苷,其是胸苷的类似物,并且可被并入复制中的细胞(在细胞周期的S期的过程中)的新合成的DNA,在DNA复制的过程中替代胸苷。使用例如BrdU特异性的抗体检出所并入的化学品表明细胞正在活跃地复制其DNA。

[0041] 在克隆生成测定(clonogenic assay)中,可体外测量抑制或降低表达CLDN6之细胞(优选癌细胞)集落形成的活性。克隆生成测定是用于研究特定药剂对细胞存活和增殖之有效性的微生物技术。其在癌症研究的实验室中经常使用,用于测定药物或辐射对增殖的肿瘤细胞的作用。该实验涉及三个主要的步骤:(i)向细胞(尤其是癌细胞)的样品应用处理,(ii)将细胞接种进入组织培养容器中,以及(iii)使细胞生长。固定所产生的集落,染色,计数。如果单个肿瘤细胞定植(colonize)器官,对于转移灶的形成,集落形成是重要的。抗体的抑制作用表明其在抑制转移灶之形成中的潜力。在克隆生成测定中,具有抑制或降低集落形成之活性的抗体尤其可用于治疗或预防癌细胞(尤其是本文中提及的癌类型)的转移和转移性扩散。

[0042] 在一些优选的实施方案中,所述抗体表现出对抗带有天然构象CLDN6之细胞的一种或更多种免疫效应功能,其中所述一种或更多种免疫效应功能优选地选自补体依赖性细胞毒作用(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,ADCC)、诱导凋亡以及抑制增殖,优选的效应功能是ADCC和/或CDC。

[0043] 优选地,所述抗体表现出一种或更多种活性或者一种或更多种免疫效应功能是通过所述抗体与CLDN6相结合(优选与位于CLDN6的细胞外部分之内的表位相结合)而诱导的,其中CLDN6的所述细胞外部分优选地包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的任何一种氨基酸序列,优选SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列,更优选SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0044] 根据本发明,表达CLDN6的细胞优选地以CLDN6与其细胞表面缔合为特征。表达

CLDN6之细胞或者带有天然构象CLDN6之细胞优选地是肿瘤细胞(例如,癌细胞),优选来自选自以下癌的癌细胞:卵巢癌(尤其是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤)、肺癌(包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),尤其是鳞状细胞肺癌和腺癌)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(尤其是基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑色素瘤、头颈癌(尤其是恶性多形性腺瘤)、肉瘤(尤其是滑膜肉瘤和癌肉瘤)、胆管癌、膀胱癌(尤其是移行细胞癌和乳头状癌)、肾癌(尤其是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌)、结肠癌、小肠癌(包括回肠癌,尤其是小肠腺癌和回肠腺癌)、睾丸胚胎癌、胎盘绒毛膜癌、子宫颈癌、睾丸癌(尤其是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎睾丸癌)、子宫癌、生殖细胞肿瘤(例如畸胎瘤或胚胎癌,尤其是睾丸的生殖细胞肿瘤),及其转移形式。

[0045] 本发明的抗体可以连接一个或多个治疗效应部分(例如,放射性标记、细胞毒素、治疗酶(therapeutic enzyme)、诱导凋亡的药剂等)以提供靶向的细胞毒性(即,杀伤肿瘤细胞)。

[0046] 在一个实施方案中,本发明的抗体(i)与表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞相结合,并且(ii)不与不表达CLDN6以及不以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞相结合。本发明的抗体优选(i)介导杀伤表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞和/或抑制其增殖,并且(ii)不介导杀伤不表达CLDN6以及不以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞和/或不抑制其增殖。

[0047] 在一些具体的优选实施方案中,本发明的抗体与存在于活细胞表面上的CLDN6天然表位(例如,SEQ ID NOs:6或7的表位)相结合。在另一些优选的实施方案中,本发明的抗体对于表达CLDN6之癌细胞是特异性的,并且不与不表达CLDN6的癌细胞相结合。

[0048] 本发明的抗体可源自不同的物种,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,其中源自一个物种(优选人)的抗体恒定区与源自另一个物种的抗原结合位点组合。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来源的恒定和框架区相组合。

[0049] 本发明的抗体包括多克隆和单克隆抗体,并且包括IgG2a(例如,IgG2a、 κ 、 λ)、IgG2b(例如,IgG2b、 κ 、 λ)、IgG3(例如,IgG3、 κ 、 λ)和IgM抗体。然而,本发明还包括其他抗体同种型,包括IgG1、IgA1、IgA2、分泌型IgA、IgD和IgE抗体。所述抗体可以是完整的抗体或者其抗原结合片段,包括例如Fab、F(ab')₂、Fv片段、单链Fv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质,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)与铰链区融合的免疫球蛋白重链CH2恒定区,以及(iii)与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质还在US2003/0118592和US2003/0133939中公开。

[0050] 本发明的抗体优选地是单克隆、嵌合、人或人源化抗体,或者抗体的片段。本发明的抗体包括完全人抗体。可在非人转基因动物(例如,转基因小鼠)中产生这样的抗体,所述转基因动物能够通过进行V-D-J重组和同种型转换产生抗CLDN6人单克隆抗体的多个同种型。这样的转基因动物还可以是用于产生多克隆抗体的转基因兔(例如,公开于US2003/0017534中)。

[0051] 本发明的抗体优选地以约1~100nM或更低的解离平衡常数(KD)与CLDN6解离。优选地,本发明的抗体不与相关的细胞表面抗原交叉反应,并因而不抑制其功能。

[0052] 在一些优选的实施方案中,本发明的抗体可以具有一个或更多个以下特性:

[0053] a) 对CLDN6的特异性;

[0054] b) 与CLDN6的结合亲和力,约100nM或更低,优选约5~10nM或更低,以及更优选约1~3nM或更低,

[0055] c) 诱导细胞CDC的能力,所述细胞表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征;

[0056] d) 抑制细胞生长的能力,所述细胞表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征;

[0057] e) 诱导细胞凋亡的能力,所述细胞表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征;

[0058] f) 诱导细胞同质性粘附的能力,所述细胞表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征;

[0059] g) 诱导细胞ADCC的能力,所述细胞表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征;

[0060] h) 延迟具有肿瘤细胞之对象存活的能力,所述肿瘤细胞表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征;

[0061] i) 耗竭细胞的能力,所述细胞表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征;

[0062] j) 使CLDN6在活细胞表面聚集的能力。

[0063] 本文中所描述的优选的抗体是由杂交瘤细胞产生的或可从其获得的抗体,所述杂交瘤细胞保藏在DSMZ (德国布伦瑞克市因霍芬大街7bd号,邮编38124),并且具有以下命名和登记号之一:

[0064] 1. GT512muMAB 59A,登记号DSM ACC3067,保藏于2010年6月21日;

[0065] 2. GT512muMAB 60A,登记号DSM ACC3068,保藏于2010年6月21日;

[0066] 3. GT512muMAB 61D,登记号DSM ACC3069,保藏于2010年6月21日;

[0067] 4. GT512muMAB 64A,登记号DSM ACC3070,保藏于2010年6月21日;

[0068] 5. GT512muMAB 65A,登记号DSM ACC3071,保藏于2010年6月21日;

[0069] 6. GT512muMAB 66B,登记号DSM ACC3072,保藏于2010年6月21日;

[0070] 7. GT512muMAB 67A,登记号DSM ACC3073.保藏于2010年6月21日;

[0071] 8. GT512muMAB 55A,登记号DSM ACC3089,保藏于2010年8月31日;或者

[0072] 9. GT512muMAB 89A,登记号DSM ACC3090,保藏于2010年8月31日。

[0073] 本文中通过参照抗体的命名和/或通过参照产生抗体的克隆来命名本发明的抗体,例如muMAB59A。

[0074] 另一些优选的抗体具有由上述杂交瘤产生或可从其获得之抗体特异性的抗体,并且尤其是包含与由上述杂交瘤产生的或可从其获得的抗体的抗原结合部分或抗原结合位点(尤其是可变区)相同或高度同源的抗体。优选的抗体包括具有与由上述杂交瘤产生的或可从其获得的抗体的CDR区相同或高度同源的抗体。对于“高度同源”,包括在每个CDR区中进行1至5(优选1至4,例如1至3或者1或2)个替换。尤其优选的抗体是由上述杂交瘤产生的或可从其获得的抗体的嵌合化和人源化形式。

[0075] 因此,本发明的抗体可选自:(i)由以如下登记号保藏的克隆产生的或可从其获得的抗体:DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A)、DSM ACC3068 (GT512muMAB 60A)、DSM ACC3069 (GT512muMAB 61D)、DSM ACC3070 (GT512muMAB 64A)、DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A)、DSM ACC3072 (GT512muMAB 66B)、DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A)、DSM ACC3089 (GT512muMAB 55A)或DSM ACC3090 (GT512muMAB 89A), (ii)抗体,其为(i)抗体的嵌合化或人源化形式, (iii)抗体,其具有(i)抗体的特异性,以及(iv)抗体,其包含(i)抗体的抗原结合部分或抗原结合位点。所述(i)抗体的抗原结合部分或抗原结合位点可包含(i)抗体的可变区。

[0076] 本发明还涉及例如产生本文中所描述抗体的杂交瘤细胞。

[0077] 优选的杂交瘤细胞是保藏于DSMZ(德国布伦瑞克市因霍芬大街7bd号,邮编38124)的杂交瘤细胞,并且其具有以下命名和登记号之一:

[0078] 1. GT512muMAB 59A, 登记号DSM ACC3067, 保藏于2011年6月21日;

[0079] 2. GT512muMAB 60A, 登记号DSM ACC3068, 保藏于2011年6月21日;

[0080] 3. GT512muMAB 61D, 登记号DSM ACC3069, 保藏于2011年6月21日;

[0081] 4. GT512muMAB 64A, 登记号DSM ACC3070, 保藏于2011年6月21日;

[0082] 5. GT512muMAB 65A, 登记号DSM ACC3071, 保藏于2011年6月21日;

[0083] 6. GT512muMAB 66B, 登记号DSM ACC3072, 保藏于2011年6月21日;

[0084] 7. GT512muMAB 67A, 登记号DSM ACC3073. 保藏于2011年6月21日;

[0085] 8. GTS12muMAB 55A, 登记号DSM ACC3089, 保藏于2011年8月31日;或者

[0086] 9. GTS12muMAB 89A, 登记号DSM ACC3090, 保藏于2011年8月31日。

[0087] 本发明的抗CLDN6抗体可以被衍生化,与其他结合特异性相连接或共表达。在一个具体的实施方案中,本发明提供至少包含一个对CLDN6的第一结合特异性(例如,抗CLDN6抗体或其拟似物)和对效应细胞的第二结合特异性(例如,对Fc受体(例如,Fc- γ 受体(例如,Fc- γ RI)或任何其他Fc受体)或者对T细胞受体(例如CD3)的结合特异性)的双特异性或多特异性分子。

[0088] 因此,本发明包括与CLDN6以及与Fc受体或T细胞受体(例如CD3)结合的双特异性和多特异性分子。Fc受体的实例是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))。还可靶向其他Fc受体(例如,IgA受体(例如,Fc α RI))。Fc受体优选位于效应细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞或激活的单个核细胞)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不同于免疫球蛋白Fc(例如,IgG或IgA)之受体结合位点的位点与Fc受体结合。因此,所述双特异性和多特异性分子的结合不被生理水平的免疫球蛋白所阻断。

[0089] 在另一个方面中,本发明的抗CLDN6抗体被衍生化,与其他功能性分子(例如,其他肽或蛋白质(例如,Fab'片段))相连接或共表达。例如,本发明的抗体可以与一个或多个其他分子实体(例如,其他抗体(例如,以产生双功能或多功能的抗体)、细胞毒素、细胞配体或抗原(例如,以产生免疫缀合物(例如,免疫毒素)))功能性地连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合等)。本发明的抗体可以与其他治疗部分(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)相连接。因此,本发明包括很多种抗体缀合物、双特异性和多特异性分子以及融合蛋白质,它们都与表达CLDN6的细胞和/或与以CLDN6与其细胞表面缔合为特征的细胞相结合,并且它们可用于将其他分子靶向这样的细胞。

[0090] 一般来说,对于本发明的目的而言,术语“抗体”包括本文中所描述的所有抗体衍生物,例如抗体缀合物、双特异性和多特异性分子以及融合蛋白质。

[0091] 在另一个方面中,本发明还考虑源自非免疫球蛋白结构域的结合CLDN6的蛋白质,尤其是单链蛋白质。例如Binz et al. (2005) Nature Biotechnology 23 (10):1257-1268 (通过引用并入本文) 中描述了这样的结合蛋白以及用于对其进行生产的方法。要理解的是,本文中给出的关于免疫球蛋白或源自免疫球蛋白之结合分子的教导还相应地适用于源自非免疫球蛋白结构域的结合分子。尤其是使用这样的源自非免疫球蛋白结构域的结合分子可以阻断表达所述靶标以及以所述靶标与其细胞表面相缔合为特征之细胞的CLDN6,并因而引起本文中公开的本发明抗体的治疗作用,尤其是本文中公开的抑制肿瘤细胞的一种或更多种活性,例如增殖。尽管不是强制性的,可以通过例如与抗体的Fc区融合而将抗体的效应功能赋予这样的非免疫球蛋白结合分子。

[0092] 通过靶向细胞所表达的以及与细胞表面缔合的CLDN6,本发明一般地包括疾病(尤其是肿瘤疾病)的治疗和/或诊断。这些方法提供对这样的细胞的选择性检测和/或根除,因而使对不表达CLDN6以及不以CLDN6与其细胞表面缔合为特征之正常细胞的不良作用最小化。用于治疗或诊断的优选疾病是其中涉及表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞的疾病(例如,肿瘤疾病),尤其是癌症疾病,例如本文中描述的那些癌症疾病。

[0093] 在一个方面中,本发明提供包含本发明抗体或抗体组合的组合物(例如,药物和诊断组合物/试剂盒)。本发明的药物组合物可包含可药用载剂(carrier),并且可任选地包含一种或更多种辅料、稳定剂等。在一个具体的实施方案中,所述组合物包含抗体的组合,所述抗体与独特的表位结合或者具有独特的功能特征(例如,诱导CDC和/或ADCC以及诱导凋亡)。在本发明的这一实施方案中,可组合使用抗体,例如作为包含两种或更多种抗CLDN6单克隆抗体的药物组合物而使用。例如,具有不同但互补活性的抗CLDN6抗体可以在单个治疗中组合以达到所需的治疗效果。在一个优选的实施方案中,所述组合物包含与诱导凋亡的另一抗CLDN6抗体组合的介导CDC的抗CLDN6抗体。在另一个实施方案中,所述组合物包含在效应细胞存在下介导高度有效杀伤靶细胞的抗CLDN6抗体,其与抑制表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞生长的另一抗CLDN6抗体相组合。

[0094] 本发明还包括同时或顺序施用两种或更多种本发明的抗CLDN6抗体,其中优选至少一种所述抗体是嵌合的抗CLDN6抗体,并且至少一种其他抗体是人抗CLDN6抗体,所述抗体与相同或不同的CLDN6表位相结合。优选地,首先施用本发明的嵌合CLDN6抗体,随后施用本发明的人抗CLDN6抗体,其中优选长时间(即,作为维持治疗)施用所述人抗CLDN6抗体。

[0095] 本发明的抗体、缀合物、双特异性/多特异性分子和组合物可用于通过使细胞与有效量的抗体、缀合物、双特异性/多特异性分子或组合物接触而抑制表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的生长和/或选择性杀伤表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞的多种方法,以抑制细胞的生长和/或杀伤细胞。在一个实施方案中,所述方法包括杀伤表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞,任选地在效应细胞存在下,例如通过CDC、凋亡、ADCC、吞噬作用或通过这些机制中的两种或更多种的组合来进行杀伤。可使用本发明的抗体抑制或杀伤的表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞包括癌细胞。

[0096] 本发明的抗体、缀合物、双特异性/多特异性分子和组合物可用于治疗和/或预防

多种与表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞相关的疾病,通过向遭受这样的疾病的患者施用所述抗体。可被治疗(例如,改善)或预防的示例疾病包括但不限于肿瘤发生性疾病(tumorigenic disease)。可被治疗和/或预防的肿瘤发生性疾病的实例包括癌疾病,例如卵巢癌(尤其是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤)、肺癌(包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),尤其是鳞状细胞肺癌和腺癌)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(尤其是基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑色素瘤、头颈癌(尤其是恶性多形性腺瘤)、肉瘤(尤其是滑膜肉瘤和癌肉瘤)、胆管癌、膀胱癌(尤其是移行细胞癌和乳头状癌)、肾癌(尤其是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌)、结肠癌、小肠癌(包括回肠癌,尤其是小肠腺癌和回肠腺癌)、睾丸胚胎瘤、胎盘绒毛膜癌、子宫颈癌、睾丸癌(尤其是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎睾丸癌)、子宫癌、生殖细胞肿瘤(例如畸胎瘤或胚胎瘤,尤其是睾丸的生殖细胞肿瘤),及其转移形式。

[0097] 在另一个方面中,本发明涉及治疗或预防与表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞相关的疾病或病症的方法,其包括向对象施用本发明的抗体、缀合物、双功能/多功能分子或组合物。优选地,所述疾病或病症是肿瘤相关的疾病,并且在一些具体的实施方案中,所述疾病或病症选自:卵巢癌(尤其是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤)、肺癌(包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),尤其是鳞状细胞肺癌和腺癌)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(尤其是基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑色素瘤、头颈癌(尤其是恶性多形性腺瘤)、肉瘤(尤其是滑膜肉瘤和癌肉瘤)、胆管癌、膀胱癌(尤其是移行细胞癌和乳头状癌)、肾癌(尤其是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌)、结肠癌、小肠癌(包括回肠癌,尤其是小肠腺癌和回肠腺癌)、睾丸胚胎瘤、胎盘绒毛膜癌、子宫颈癌、睾丸癌(尤其是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎睾丸癌)、子宫癌、生殖细胞肿瘤(例如畸胎瘤或胚胎瘤,尤其是睾丸的生殖细胞肿瘤),及其转移形式。CLDN6优选地表达于所述细胞的表面上。

[0098] 本发明可涉及使用本文中描述的药剂和组合物用于肿瘤疾病的预防性和/或治疗性治疗,即用于治疗患有肿瘤疾病或有肿瘤疾病发病风险的患者。在一个方面中,本发明提供用于抑制肿瘤生长的方法,其包括施用一种或更多种本文中描述的药剂和组合物。

[0099] 优选地,以这样的方式施用本文中描述的药剂和组合物,以使当组织或器官(例如,胎盘组织或胎盘)没有肿瘤时,即使其中的细胞表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征,治疗活性物质也不被递送或基本不被递送至所述组织或器官。为此,可局部施用本文中描述的药剂和组合物。

[0100] 在一个方面中,本发明提供本文中描述的抗体用于本文中描述的治疗方法。在一个实施方案中,本发明提供本文中描述的药物组合物用于本文中描述的治疗方法。

[0101] 在本发明的一个具体的实施方案中,另外用化疗剂、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)治疗施用了所述抗体的对象。在治疗过程中用于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)。除此之外,典型的治疗剂还包括抗肿瘤剂,例如多柔比星、顺铂、泰素帝(taxotere)、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤(methotrexat)、吉西他滨和环磷酰胺。

[0102] 在另一个方面中,本发明涉及用人CLDN6或其肽片段免疫接种非人动物(例如,小

鼠)以获得抗体的免疫策略。用于免疫接种的优选的肽是选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的肽,以及免疫等效肽。

[0103] 可用CLDN6抗原或其肽片段和/或表达CLDN6或其肽片段的核酸和/或细胞的纯化或富集的制备物免疫接种野生型以及转基因的非人动物。优选地,所述转基因非人动物能够通过进行V-D-J重组和同种型转换产生多同种型的抗CLDN6的人单克隆抗体(例如,IgG、IgA和/或IgM)。可通过例如经典的或非经典的同种型转换而发生同种型转换。

[0104] 因此,在另一个方面中,本发明提供来自上文中所描述的非人动物中的分离的B细胞。可随后通过与永生化细胞融合而使所述分离的B细胞永生化以提供本发明的抗体来源(例如,杂交瘤)。这样的杂交瘤(即,其产生本发明的抗体)也包括在本发明的范围之内。

[0105] 在另一个方面中,本发明涉及用于诊断、检测或监控肿瘤疾病的方法,其包括使用本发明抗体检测和/或测定从患者中分离的生物样品中CLDN6的量或表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的量。所述生物样品可以从患有肿瘤疾病、怀疑患有或发生肿瘤疾病或者具有肿瘤疾病之潜力的患者中分离。

[0106] 在根据本发明的用于诊断、检测或监控肿瘤疾病的方法的一个实施方案中,生物样品和/或对照/参比样品来自与受肿瘤疾病所影响的要诊断、检测或监控的组织或器官相对应的组织或器官,例如要诊断、检测或监控的肿瘤疾病是卵巢癌,则生物样品和/或对照/参比样品是卵巢组织。本文中描述了这样的组织和器官,例如与不同的肿瘤疾病和癌症一起描述。

[0107] 在根据本发明的用于诊断、检测或监控肿瘤疾病的方法的一个实施方案中,所述生物样品来自这样的组织或器官,当所述组织或器官没有肿瘤时,其中的细胞基本不表达CLDN6以及基本不以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征。优选地,所述组织不是胎盘组织。

[0108] 一般来说,相对于参比水平来比较生物样品中靶分子的水平,其中与所述参比水平的偏差指示肿瘤疾病在对象中的存在和/或阶段。所述参比水平可以是在对照样品(例如,来自健康的组织或对象)中测定的水平或者来自健康对象的中位水平。与所述参比水平的“偏差”表示任何显著改变,例如升高或降低至少10%、20%或30%,优选至少40%或50%或者甚至更高。优选地,在所述生物样品中存在CLDN6或表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞或者所述生物样品中CLDN6或表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的量相对于参比水平升高指示肿瘤疾病的存在。

[0109] 一般来说,本发明的方法中的检测和/或定量涉及使用与靶分子特异性结合的标记抗体。

[0110] 在一个具体的方面中,本发明涉及用于检测肿瘤疾病(即,测定位置或位点(例如,具体的组织或器官))的方法,其包括向患者施用偶联了可检测标记物的本发明抗体。在所述患者中标记组织或器官可指示在所述组织或器官中存在肿瘤疾病或有发生肿瘤疾病的风险。

[0111] 如本文中示例的那样,本发明的抗体可直接从表达抗体的杂交瘤获得,或者可在宿主细胞(例如,CHO细胞或淋巴细胞)中克隆和重组表达。宿主细胞的其他实例是微生物(例如,大肠杆菌(E.coli))和真菌(例如,酵母)。或者,可在转基因的非人动物或植物中重组地产生它们。然而,本发明还考虑这样的一些实施方案,其中通过使用本文中公开的免疫策略在患者中原位免疫或接种来产生抗体。

[0112] 本发明还涉及核酸,所述核酸包含编码本文中描述的抗体或其部分(例如,抗体链)的基因或核酸序列。所述核酸可包含于载体(vector)(例如,质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者例如常规地用于基因工程中的其他载体)中。所述载体可包含其他基因,例如标志物基因,其允许在合适的宿主细胞和在合适的条件下选择所述载体。此外,所述载体可包含表达控制元件,其允许在合适的宿主中适当地表达编码区。这样的控制元件是技术人员已知的,并且可包括启动子、剪接盒(splice cassette)和翻译起始密码子。

[0113] 优选地,本发明的核酸与上文中允许在真核或原核细胞中表达的表达控制序列可操作地连接。确保在真核或原核细胞中表达的控制元件是本领域技术人员公知的。

[0114] 用于构建根据本发明的核酸分子的方法,用于构建包含上述核酸分子之载体的方法,用于将载体引入到合适地选择的宿主细胞中的方法,用于引起或实现表达的方法是现有技术中公知的。

[0115] 本发明的另一个方面涉及包含本文中所公开的核酸或载体的宿主细胞。

[0116] 通过以下的详细描述和权利要求,本发明的其他特征和优势将是显而易见的。

附图说明

[0117] 图1. CLDN3、CLDN4、CLDN6和CLDN9的序列比对。

[0118] 图2. 从经免疫接种以产生CLDN6特异性抗体的小鼠中获得的血清的免疫荧光分析。

[0119] (A) 用抗CLDN6单克隆小鼠抗体(R&D Systems, MAB3656)探查分别以编码人CLDN6和GFP的核酸共转染的未固定的CHO-K1细胞。CLDN6位于经转染细胞的质膜,并且可在活细胞上被特异性抗体所靶向。

[0120] (B) 来自以其为基础产生杂交瘤F3-6C3-H8的小鼠的血清含有与未固定的CHO-K1细胞表面上的CLDN6相结合的抗体,所述CHO-K1细胞是以编码人CLDN6和GFP的核酸共转染的。

[0121] 图3. 用于测定HEK293T细胞中密蛋白之内源性表达的Western印迹分析。

[0122] 使用市售的抗-CLDN3(A)(Invitrogen, Cat No. 34-1700)、抗-CLDN4(A)(Zymed, 32-9400)、抗-CLDN6(A)(ARP, 01-8865)和抗-CLDN9(A)(Santa Cruz, sc-17672)抗体,通过Western印迹测试分别以编码CLDN3、CLDN4、CLDN6和CLDN9的核酸转染的或者模拟转染的HEK293T细胞的蛋白质裂解液。所述抗体仅在各自的HEK293T转化体中检出与抗体对应的靶标的表达。在未转染的HEK293T细胞中,未观察到这些密蛋白的任何内源性表达。

[0123] 图4. 用于测定市售抗CLDN抗体之特异性的流式细胞术分析。

[0124] 通过流式细胞术测定市售的抗CLDN抗体与分别转染了编码CLDN3、CLDN4、CLDN6和CLDN9之核酸的或者未转染的HEK293T细胞的结合。仅市售的抗CLDN3抗体对其靶标是特异性的。

[0125] 图5. 用于测定根据本发明制备的抗CLDN抗体之特异性的流式细胞术分析。

[0126] 通过流式细胞术测定来自单克隆的杂交瘤细胞亚克隆之上清液中的抗体与编码CLDN6、CLDN3、CLDN4或CLDN9的载体和编码荧光标志物的载体共转染的HEK293T细胞的结合。

[0127] (A) 来自单克隆的杂交瘤亚克隆F3-6C3-H8之上清液中的抗体与转染了CLDN6的细

胞(但不与分别转染了CLDN3、CLDN4和CLDN9的细胞)特异性地结合。相反,来自单克隆的杂交瘤亚克隆F4-4F7-F2之上清液中的抗体与转染了CLDN6或CLDN9的细胞结合。来自单克隆杂交瘤亚克隆F3-6C3-H8之上清液中的抗体还与转染了CLDN6的(I143V)-SNP变体的细胞结合。

[0128] (B) 来自单克隆杂交瘤亚克隆F3-7B3-B4之上清液中的抗体与转染了CLDN6、CLDN3或CLDN9的细胞结合。来自单克隆杂交瘤亚克隆F3-3F7-A5之上清液中的抗体与转染了CLDN6、CLDN4或CLDN9的细胞结合。

[0129] 图6. 抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A的结合特异性。

[0130] 使用瞬时表达相应的人密蛋白的HEK293T细胞,通过流式细胞术分析抗CLDN6抗体与人CLDN6、3、4、9和CLDN6 SNP(单核苷酸多态性)变体I143V的结合。与荧光标志物共转染HEK293T以区分未转染的(Q1和Q3群)和转染的(Q2和Q4群)细胞。所使用的抗体浓度是饱和结合CLDN6的浓度(25 μ g/ml)。用抗人密蛋白-6(R&D Systems, MAB3656)、人密蛋白-3(R&D Systems, MAB4620)和人密蛋白-4(R&D Systems, MAB 4219)的市售单克隆抗体确证人CLDN6、3、4、9和CLDN6-SNP(I143V)的表达。

[0131] 图7. 抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A的相对亲和力。

[0132] 通过流式细胞术分析抗CLDN6抗体与稳定表达于HEK293细胞表面上的人CLDN6之结合以测定相对亲和力。在饱和结合实验中,以抗体的浓度对FACS信号(荧光强度的中位值)作图。通过非线性回归计算EC50(在平衡时与一半的结合位点结合的抗体浓度)。CLDN6特异性的抗体muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A表现出非常低的EC50值(EC50200 ~ 500ng/ml),并且在低浓度达到饱和结合。

[0133] 图8. 抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A的补体依赖性细胞毒作用(CDC)活性。

[0134] 使用检测未裂解细胞中内源性ATP的萤光素酶依赖的测定分析抗CLDN6抗体的CDC活性。因此,用不同浓度的muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A处理稳定表达人CLDN6的CHO-K1细胞。MuMAB59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A表现出剂量依赖的CDC活性,并在低浓度下诱导CDC。

[0135] 图9. 抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 65A和66B对内源性表达CLDN6之NEC8和NEC8 LVTS254 (CLDN6敲低)细胞的补体依赖性细胞毒作用(CDC)。

[0136] 抗CLDN6抗体muMAB 65A和66B以剂量依赖的方式诱导对NEC8细胞的CDC。通过使用NEC 8LVTS254细胞(CLDN6敲低)证明muMAB65A和66B的靶标特异性。

[0137] 图10. 在使用植入肿瘤细胞系NEC8之小鼠的早期治疗异种移植模型中,muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A的治疗作用。该模型使用无胸腺的Nude-Foxn1tm小鼠中的内源性表达CLDN6的NEC8异种移植物。与盐水对照组相比,在植入NEC8细胞的小鼠中,muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A显示出肿瘤生长抑制。

[0138] 图11. 抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 61D、64A、67A和89A的结合特异性。

[0139] 使用稳定表达相应人密蛋白的HEK293细胞,通过流式细胞术分别分析抗CLDN6抗体与人CLDN6、3、4和9的结合。所使用的抗体浓度是饱和结合的浓度(25 μ g/ml)。分别用市售

的抗人密蛋白-3(R&D Systems, MAB4620)和人密蛋白-4(R&D Systems, MAB 4219)的单克隆抗体以及CLDN6/9反应性鼠单克隆抗体muMAB 5F2D2确证人CLDN3、4、6和9的表达。在没有一抗(primary antibody)的相同条件下进行阴性对照。

[0140] 图12.抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 61D、64A、67A和89A与HEK293-CLDN6细胞的相对亲和力。

[0141] 通过流式细胞术分析抗CLDN6抗体与HEK293细胞表面上稳定表达的人CLDN6的结合以测定相对亲和力。在饱和结合实验中,将抗体的浓度相对于FACS信号(荧光强度的中位值)作图。通过非线性回归计算EC50(在平衡时与一半的结合位点结合的抗体浓度)。CLDN6特异性的抗体chimAB 64A和89A表现出非常低的EC50值(EC50 450~600ng/ml),并且在低浓度达到饱和结合。ChimAB 67A和61D分别显示低的(EC50 1000ng/ml)和中等的(EC50 2300ng/ml)EC50值。

[0142] 图13.抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 61D、64A、67A和89A对NEC8细胞的相对亲和力。

[0143] 为测定抗CLDN6抗体与内源性表达人CLDN6之肿瘤细胞的结合亲和力,通过流式细胞术分析所述抗体与睾丸癌细胞系NEC8的结合。CLDN6特异性抗体chimAB 64A和89A表现出非常低的EC50值(EC50 600~650ng/ml),并且在低浓度下达到饱和结合,而chimAB 61D和67A分别表现出中等的(EC50 1700ng/ml)和高的(EC50 6100ng/ml)EC50值。

[0144] 图14.抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 61D、64A、67A和89A对OV90细胞的相对亲和力。

[0145] 为测定抗CLDN6抗体与内源性表达人CLDN6之肿瘤细胞的结合亲和力,通过流式细胞术分析所述抗体与卵巢癌细胞系OV90的结合。CLDN6特异性抗体chimAB 64A和89A表现出非常低的EC50值(EC50 550~600ng/ml),并且在低浓度下达到饱和结合。ChimAB 61D和67A显示中等的EC50值(分别为EC50 1500ng/ml和EC50 2300ng/ml)。

[0146] 图15.抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 61D、64A、67A和89A对NEC8野生型和NEC8敲低细胞的补体依赖性细胞毒作用(CDC)活性。

[0147] 使用检测未裂解细胞中内源性ATP的萤光素酶依赖的测定分析抗CLDN6抗体的CDC活性。因此,用不同浓度的chimAB 61D、64A、67A和89A处理异位表达萤光素酶的NEC8野生型细胞(NEC8 LVTS277)。在NEC-8细胞中, chimAB 61D、64A、67A和89A以剂量依赖的方式表现出CDC活性,而在NEC-8 CLDN6敲低细胞(NEC8 LVTS2 54)中,这些抗体都没有诱导非特异性的细胞裂解。该结果证明了chimAB 61D、64A、67A和89A的靶标特异性效应功能。

[0148] 图16.抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 61D、64A、67A和89A对NEC8野生型和NEC8敲低细胞的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)活性。

[0149] 使用检测未裂解细胞中内源性ATP的萤光素酶依赖的测定分析抗CLDN6抗体的ADCC活性。因此,用不同浓度的chimAB 61D、64A、67A和89A处理NEC-8野生型细胞(NEC 8 LVTS2 77)。ChimAB 61D、64A、67A和89A表现出剂量依赖的ADCC活性,并且甚至在低抗体浓度下诱导ADCC。为了证明靶标特异性,使用了具有稳定CLDN6敲低(NEC8 LVTS2 54)的NEC8细胞。

[0150] 图17.在使用植入肿瘤细胞系NEC8之小鼠的早期治疗异种移植模型中抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 61D、64A和67A的治疗性长期作用。

[0151] 该模型使用无胸腺的Nude-Foxn1tm小鼠中的内源性表达CLDN6的NEC8异种移植植物。

用CLDN6特异性的抗体治疗小鼠46天。治疗之后,监控肿瘤生长60天。即便是在终止免疫治疗之后,用鼠单抗muMAB 61D、64A和67A治疗的小鼠没有显示出任何肿瘤生长。

[0152] 图18. 在使用植入肿瘤细胞系NEC8之小鼠的早期治疗异种移植模型中抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 89A的治疗性作用。

[0153] 该模型使用无胸腺的Nude-Foxn1^{nu}小鼠中的内源性表达CLDN6的NEC8异种移植植物。散点表示无胸腺的Nude-Foxn1^{nu}小鼠中NEC8异种移植植物的早期治疗过程中不同时间点时所植入肿瘤的体积。与盐水对照组相比,muMAB 89A在植入NEC8细胞的小鼠中显示出肿瘤生长抑制(A)。分别用PBS(作为对照)和CLDN6特异性抗体治疗小鼠47天。再监控肿瘤生长51天。在研究结束时,与PBS对照相比,在以muMAB89A治疗的小鼠中没有可检出的肿瘤(B)。

[0154] 图19. 在使用植入肿瘤细胞系NEC8之小鼠的晚期治疗异种移植模型中抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 64A的治疗性作用。

[0155] 散点表示无胸腺的Nude-Foxn1^{nu}小鼠中NEC8异种移植植物的晚期治疗过程中不同时间点时所植入肿瘤的体积。与抗体和盐水对照组相比,用鼠单克隆抗CLDN6抗体muMAB 64A的免疫治疗显示对实体NEC8异种移植植物之肿瘤生长的抑制。

[0156] 图20. 在使用植入肿瘤细胞系NEC8之小鼠的晚期治疗异种移植模型中抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 64A的治疗性长期作用。

[0157] 植入15天之后,用CLDN6特异性抗体muMAB 64A治疗小鼠45天。再监控肿瘤生长49天(A)。存活图显示用CLDN6特异性抗体muMAB 64A治疗之小鼠的存活延长(B)。

[0158] 图21. 在使用植入肿瘤细胞系NEC8之小鼠的晚期治疗异种移植模型中,抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 61D、67A和89A的治疗性作用。散点表示晚期NEC8异种移植植物的治疗过程中不同时间点时所植入NEC8肿瘤的体积。与盐水和抗体对照组相比,用鼠单克隆抗CLDN6抗体muMAB 61D、67A和89A实现了对肿瘤生长的抑制。

[0159] 图22. 在使用植入肿瘤细胞系NEC8之小鼠的晚期治疗异种移植模型中,抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 61D、67A和89A的治疗性长期作用。

[0160] 植入之后17天,用CLDN6特异性抗体muMAB 61D、67A和89A治疗小鼠42天。再监控肿瘤生长49天(A)。存活图显示用CLDN6特异性抗体muMAB 61D和67A治疗之小鼠的存活延长(B)。

[0161] 图23. 在使用植入肿瘤细胞系NEC8野生型和具有稳定CLDN6敲低的NEC8细胞之小鼠的晚期治疗异种移植模型中抗CLDN6鼠单克隆抗体muMAB 64A和89A的治疗性作用。

[0162] MuMAB 64A和89A仅在植入NEC8野生型而非植入NEC8 CLDN6敲低细胞之小鼠中显示治疗性作用,这证明了抗体的体内靶标特异性。

[0163] 图24. chimMAB 61D、64A、67A和89A的高分辨率表位作图。

[0164] 丙氨酸突变体被命名为“野生型残基号丙氨酸”或在野生型丙氨酸的情况下命名为“野生型残基号甘氨酸”,其中以单个字母的代码给出氨基酸。CLDN6的第一细胞外结构域的氨基酸F35、G37、S39以及可能的T33对于与CLDN6特异性嵌合抗体chimAB 61D、64A、67A和89A的相互作用是重要的。残基I40对于chimAB 89A的结合是至关重要的,并且它有助于chimAB 61D和67A的结合。此外,CLDN6的第二细胞外结构域的L151有助于与chimAB 67A的相互作用。尽管免疫荧光实验确证了CLDN6突变体P28A、W30A、G49A、L50A、W51A、C54A和C64A的表达,但它们没有显示膜染色。因此,我们不能排除我们的抗体与这些氨基酸的相互作用

用。总之,在此定义的表位与我们使用CLDN6的EC1结构域之DNA和肽的免疫策略相一致。

[0165] 图25.本发明的CLDN6特异性抗体重链可变区氨基酸序列的比对。以方框描画出CDR序列(HCDR1、HCDR2和HCDR3)的轮廓。

[0166] 图26.本发明的CLDN6特异性抗体轻链可变区氨基酸序列的比对。以方框描画出CDR序列(LCDR1、LCDR2和LCDR3)的轮廓。

[0167] 术语的定义

[0168] 为了使本发明可被更容易地理解,首先定义了某些术语。在整个详细描述中阐述另一些定义。

[0169] 在整个本说明书和随后的权利要求书中,除非上下文中另外要求,词语“包含(comprise)”以及变化形式(例如,“comprises”和“comprising”)将被理解为意指包括所陈述的数目、整数或步骤或者数目、整数或步骤的组,但不排除任何其他数目、整数或步骤或者数目、整数或步骤的组。除非本文中另外指明或者与上下文明确地相矛盾,描述本发明的上下文中(尤其是在权利要求书的上下文中)使用的没有数量词修饰的名词要解释为一个/种或更多个/种。本文中数值的引用范围仅是意在充当单独参照落入该范围的每个分别的数值的快捷方法。除非本文中另外指明,每个单独的值均如同其在本文中被单独引用而被并入本说明书。除非本文中另外指明或者与上下文明确地相矛盾,可以以任何合适的顺序进行本文中所描述的所有方法。除非另外要求,本文中提供的任何和全部实施例或示例性语言(例如,“例如”)的使用仅意在更好地举例说明本发明,并不对本发明的范围进行限制。本说明书中没有应当被解释为表明对实施本发明至关重要的任何不要求保护之元素的语言。

[0170] 密蛋白是蛋白质家族,是紧密连接的最重要成分,所述紧密连接建立控制上皮细胞之间的胞间空间中的分子流的细胞旁屏障(paracellular barrier)。密蛋白是4次跨膜的跨膜蛋白质,其N-末端和C-末端均位于胞质中。第一细胞外环由平均53个氨基酸组成,而第二细胞外环由约24个氨基酸组成。CLDN6和CLDN9是CLDN家族中最相似的成员。

[0171] 本文中使用的术语“CLDN”意为密蛋白,并且包括CLDN6、CLDN9、CLDN4和CLDN3。优选地,CLDN是人CLDN。

[0172] 术语“CLDN6”优选地表示人CLDN6,并且尤其是表示(i)核酸,其包含编码SEQ ID NO:2之氨基酸序列或编码SEQ ID NO:8之氨基酸序列的核酸序列,例如,包含SEQ ID NO:1之核酸序列的核酸,或者(ii)蛋白质,其包含SEQ ID NO:2之氨基酸序列或包含SEQ ID NO:8之氨基酸序列。CLDN6的第一细胞外环优选地包含SEQ ID NO:2中所示或SEQ ID NO:8中所示氨基酸序列的氨基酸28至80,更优选氨基酸28至76,例如,SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。CLDN6的第二细胞外环优选地包含SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列或SEQ ID NO:8中所示氨基酸序列的氨基酸138至160,优选氨基酸141至159,更优选氨基酸145至157,例如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。所述第一和第二细胞外环优选地形成CLDN6的细胞外部分。

[0173] 术语“CLDN9”优选地表示人CLDN9,并且尤其是表示(i)核酸,其包含编码SEQ ID NO:9之氨基酸序列的核酸序列,或者(ii)蛋白质,其包含SEQ ID NO:9之氨基酸序列。CLDN9的第一细胞外环优选地包含SEQ ID NO:9中所示氨基酸序列的氨基酸28至76。CLDN9的第二细胞外环优选地包含SEQ ID NO:9中所示氨基酸序列的氨基酸141至159。所述第一和第二

细胞外环优选地形成CLDN9的细胞外部分。

[0174] 术语“CLDN4”优选地表示人CLDN4,并且尤其是表示(i)核酸,其包含编码SEQ ID NO:10之氨基酸序列的核酸序列,或者(ii)蛋白质,其包含SEQ ID NO:10之氨基酸序列。CLDN4的第一细胞外环优选地包含SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列的氨基酸28至76。CLDN4的第二细胞外环优选地包含SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列的氨基酸141至159。所述第一和第二细胞外环优选地形成CLDN4的细胞外部分。

[0175] 术语“CLDN3”优选地表示人CLDN3,并且尤其是表示(i)核酸,其包含编码SEQ ID NO:11之氨基酸序列的核酸序列,或者(ii)蛋白质,其包含SEQ ID NO:11之氨基酸序列。CLDN3的第一细胞外环优选地包含SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列的氨基酸27至75。CLDN3的第二细胞外环优选地包含SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列的氨基酸140至158。所述第一和第二细胞外环优选地形成CLDN3的细胞外部分。

[0176] 上文中描述的CLDN序列包括所述序列的任何变体,尤其是突变体,剪接变体,构象、同种型、等位基因变体,物种变体和物种同源物,尤其是天然存在的变体。等位基因变体表示基因正常序列的改变,其重要性通常是不清楚的。完整的基因序列通常鉴定出给定基因的很多等位基因变体。物种同源物是给定核酸或氨基酸序列的具有不同物种来源的核酸或氨基酸序列。术语“CLDN”应包括(i)CLDN剪接变体,(ii)CLDN转录后修饰变体,尤其是包括具有不同糖基化(例如,N-糖基化状态)的变体,(iii)CLDN构象变体,(iv)CLDN癌相关的和CLDN非癌相关的变体。优选地,CLDN以其天然构象存在。

[0177] 已发现CLDN6表达于例如卵巢癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、黑色素瘤、头颈癌、肉瘤、胆管癌、肾细胞癌和膀胱癌。CLDN6是尤其优选的靶标,用于预防和/或治疗卵巢癌(尤其是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤)、肺癌(包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),尤其是鳞状细胞肺癌和腺癌)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(尤其是基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑色素瘤、头颈癌(尤其是恶性多形性腺瘤)、肉瘤(尤其是滑膜肉瘤和癌肉瘤)、胆管癌、膀胱癌(尤其是移行细胞癌和乳头状癌)、肾癌(尤其是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌)、结肠癌、小肠癌(包括回肠癌,尤其是小肠腺癌和回肠腺癌)、睾丸胚胎瘤、胎盘绒毛膜癌、子宫颈癌、睾丸癌(尤其是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎睾丸癌)、子宫癌、生殖细胞肿瘤(例如畸胎瘤或胚胎癌,尤其是睾丸的生殖细胞肿瘤),及其转移形式。在一个实施方案中,与CLDN6表达相关的癌疾病选自卵巢癌、肺癌、转移性卵巢癌和转移性肺癌。优选地,所述卵巢癌是癌或腺癌。优选地,所述肺癌是癌或腺癌,并且优选地是细支气管癌,例如细支气管癌或细支气管腺癌。在一个实施方案中,所述与CLDN6表达相关的肿瘤细胞是这样的癌细胞。

[0178] 术语“部分(portion)”是指级分(fraction)。对于具体结构(例如氨基酸序列或蛋白质),术语其“部分”可表示所述结构的连续或不连续级分。优选地,氨基酸序列的部分包含所述氨基酸序列之氨基酸的至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、优选至少40%、优选至少50%、更优选至少60%、更优选至少70%、甚至更优选至少80%以及最优选至少90%。优选地,如果所述部分是不连续的级分,所述不连续级分是由结构的2、3、4、5、6、7、8或更多个部分组成,每个部分是连续的结构元件。例如,氨基酸序列的不连续级分可由所述氨基酸序列的2、3、4、5、6、7、8或更多个(优选不超过4个)部分组成,其中每个部分优选地包含所述氨基酸序列的至少5个连续的氨基酸、至少10个连续的氨基酸、优选至少20个连

续的氨基酸、优选至少30个连续的氨基酸。

[0179] 术语“部分(part)”和“片段(fragment)”在本文中可互换使用,并且是指连续的元件。例如,结构(例如氨基酸序列或蛋白质)的部分是指所述结构的连续元件。结构的部分(portion)、部分(part)或片段(fragment)优选地包含所述结构的一个或更多个功能特征。例如,表位或肽的部分(portion)、部分(part)或片段(fragment)优选地与从其来源的表位或肽免疫等效。

[0180] 在本发明的情况下,术语“CLDN的细胞外部分”是指CLDN朝向细胞外空间的部分,并优选地可从所述细胞的外侧接近,例如通过位于细胞外的抗体而接近。优选地,该术语是指CLDN的一个或更多个细胞外环或其部分或者任何其他细胞外部分(所述其他细胞外部分优选地是所述CLDN特异性的)。优选地,所述部分包含至少5、至少8、至少10、至少15、至少20、至少30或至少50个或者更多个氨基酸。

[0181] 术语“与细胞表面相缔合的CLDN”被理解为表示天然的CLDN,即非变性的、优选天然折叠状态的CLDN。优选地,术语“与细胞表面相缔合的CLDN”意为CLDN与所述细胞的质膜相缔合并位于所述质膜,其中CLDN的至少一部分(优选细胞外部分)朝向所述细胞的细胞外空间,并且可从所述细胞的外侧接近,例如通过位于细胞外的抗体接近。所述缔合可以是直接或间接的。例如,所述缔合可以是通过一个或多个跨膜结构域、一个或多个脂质锚,和/或通过见于细胞质膜外层(outer leaflet)的任何其他蛋白质、脂质、糖或其他结构的相互作用。例如,与细胞表面缔合的CLDN可以是具有细胞外部分的跨膜蛋白质(即,整合膜蛋白)或者可以是通过与其他蛋白质(其为跨膜蛋白质)相互作用而与细胞表面相缔合的蛋白质。

[0182] 如果CLDN6位于所述细胞的表面并且可被添加至细胞的CLDN6特异性的抗体接近并结合,则CLDN6与细胞表面相缔合。在一些优选的实施方式中,以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞是表达CLDN6的细胞。要理解的是,在细胞表达CLDN6的情况下,与所述细胞表面相缔合的CLDN6可仅是所表达的CLDN6的一部分。

[0183] 术语“带有CLDN的细胞”优选地意为所述细胞在其表面上带有CLDN,即CLDN与所述细胞的表面相缔合。

[0184] 按照现有技术中通常的意义使用“细胞表面”或“细胞的表面”,并且因此包括可被蛋白质和其他分子接近并结合的细胞的外侧。

[0185] 词语“表达于细胞表面上的CLDN”意为细胞所表达的CLDN与所述细胞的表面相缔合。

[0186] 根据本发明,如果表达和缔合水平低于胎盘细胞或胎盘组织中的表达和缔合,则CLDN6基本不表达于细胞中并且基本不与细胞表面相缔合。优选地,表达和缔合的水平低于胎盘细胞或胎盘组织中表达和缔合的10%,优选低于5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%,或者甚至更低。优选地,如果表达和缔合的水平超过非肿瘤发生性、非癌性的组织(除了胎盘组织之外)中的表达和缔合水平的2倍(优选1.5倍)并且优选地不超过所述非肿瘤发生性、非癌性的组织中的表达和缔合水平,则CLDN6基本不表达于细胞中并且基本不与细胞表面相缔合。优选地,如果表达或缔合水平低于检出限和/或如果表达或缔合水平太低而使添加至细胞的CLDN6特异性抗体无法结合,则CLDN6基本不表达于细胞中并且基本不与细胞表面相缔合。

[0187] 根据本发明,如果表达和缔合水平超过非肿瘤发生性、非癌性的组织(除了胎盘组

织之外)中的表达和缔合水平,优选超过2倍,优选10倍、100倍、1000倍或10000倍,则CLDN6表达于细胞中并且与细胞表面相缔合。优选地,如果表达和缔合水平高于检出限和/或如果表达和缔合水平足够高以使添加至细胞的CLDN6特异性抗体结合,则CLDN6表达于细胞中并且与细胞表面相缔合。优选地,表达于细胞中的CLDN6表达或暴露于所述细胞的表面上。

[0188] 术语“筏(raft)”是指位于细胞质膜的外层区域中的富含鞘脂和胆固醇的膜微域(microdomain)。某些蛋白质与这样的结构域缔合的能力及其形成“聚集体”或“焦点聚集体(focal aggregate)”的能力可影响蛋白质的功能。例如,被本发明的抗体结合之后,CLDN6分子转位到这样的结构中,在质膜中产生高密度的CLDN6抗原-抗体复合物。这样的高密度的CLDN6抗原-抗体复合物可使CDC过程中的补体系统有效激活。

[0189] 根据本发明,术语“疾病”是指任何病理状态,包括癌症,尤其是本文中所描述形式的癌症。

[0190] 根据本发明,“与表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞相关的疾病”意为与健康组织或器官中的状态相比,病态的组织或器官的细胞中的表达和缔合优选地升高。升高是指升高至少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%或者甚至更高。在一个实施方案中,表达以及与细胞表面的缔合仅见于病态的组织,而健康组织中的表达被抑制。根据本发明,与表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞相关的疾病包括肿瘤疾病,例如癌疾病。此外,根据本发明,肿瘤疾病(例如癌疾病)优选是这样的疾病,其中肿瘤细胞或癌细胞表达CLDN6并且以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征。

[0191] 本文中使用的“肿瘤疾病”、“肿瘤相关疾病”或“肿瘤发生性疾病”包括以异常调节的细胞生长、增殖、分化、黏附和/或迁移为特征的疾病,其可导致肿瘤和/或肿瘤转移的产生或产生所述肿瘤和/或肿瘤转移的趋势。“肿瘤细胞”意为通过迅速的、不可控的细胞增殖而生长并且在引起该新生长的刺激消除之后继续生长的异常细胞。

[0192] “肿瘤”意为通过快速的、不可控的细胞增殖而生长的并且在引起该新生长的刺激消除之后继续生长的异常的细胞群或组织。肿瘤表现为部分或完全缺乏结构性组织(structural organization)和与正常组织的功能性协调,并且通常形成独特的组织块,所述肿瘤可以是良性的、恶化前的或恶性的。

[0193] 优选地,根据本发明的“肿瘤疾病”、“肿瘤相关疾病”或“肿瘤发生性疾病”是癌疾病(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“肿瘤发生性疾病”以表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞为特征,并且肿瘤细胞表达CLDN6并且以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征。

[0194] 表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞优选地是肿瘤细胞或癌细胞,优选本文中描述的肿瘤和癌的肿瘤细胞或癌细胞。优选地,这样的细胞不是胎盘细胞。

[0195] 根据本发明的优选的癌疾病或癌症选自:卵巢癌(尤其是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤)、肺癌(包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),尤其是鳞状细胞肺癌和腺癌)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(尤其是基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑色素瘤、头颈癌(尤其是恶性多形性腺瘤)、肉瘤(尤其是滑膜肉瘤和癌肉瘤)、胆管癌、膀胱癌(尤其是移行细胞癌和乳头状癌)、肾癌(尤其是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞

癌)、结肠癌、小肠癌(包括回肠癌,尤其是小肠腺癌和回肠腺癌)、睾丸胚胎癌、胎盘绒毛膜癌、子宫颈癌、睾丸癌(尤其是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎睾丸癌)、子宫癌、生殖细胞肿瘤(例如畸胎瘤或胚胎癌,尤其是睾丸的生殖细胞肿瘤),及其转移形式。

[0196] 肺癌的主要类型是小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)。有三种主要亚型的非小细胞肺癌:鳞状细胞肺癌、腺癌和大细胞肺癌。腺癌占肺癌的约10%。与小细胞肺癌和鳞状细胞肺癌(二者均倾向于位于更中心的位置)相反,这种癌通常见于肺的外周。

[0197] 皮肤癌是皮肤上的恶性生长。最常见的皮肤癌是基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤。恶性黑色素瘤是严重类型的皮肤癌。它是由色素细胞(称为黑素细胞)的不可控生长所引起的。

[0198] 根据本发明,“癌(carcinoma)”是始于器官衬里层(上皮细胞)的癌症(cancer)。

[0199] “细支气管癌”是肺的癌,被认为源自终末细支气管的上皮,其中肿瘤组织沿着肺泡壁延伸,并在肺泡中以小团块生长。在一些细胞中以及在肺泡中的物质(其还包含裸露的细胞)中可展示出黏蛋白。

[0200] “腺癌”是源自腺组织的癌症。该组织也是称为上皮组织的较大组织分类的一部分。上皮组织包括皮肤、腺体以及内衬于身体的腔和器官的多种其他组织。上皮在胚胎学上源自外胚层、内胚层和中胚层。被分类为腺癌的细胞不一定必需是腺体的一部分,只要他们具有分泌特征即可。这种形式的癌可发生于一些高等哺乳动物(包括人)中。分化良好的腺癌倾向于与其所来源的腺组织类似,而低分化的腺癌可以不是这样。通过染色来自活检的细胞,病理学家将确定肿瘤是否是腺癌或其他一些类型的癌。因为身体内腺体普遍存在的属性,腺癌可源自身体的很多组织。虽然每种腺体可不分泌相同的物质,只要细胞有外分泌功能,它就可被认为是腺性的,并且它的恶性形式因而被命名为腺癌。只要有充足的时间,恶性腺癌侵袭其他组织并经常转移。卵巢腺癌是最常见类型的卵巢癌。它包括浆液和黏液性腺癌、透明细胞腺癌和子宫内膜样腺癌。

[0201] “囊腺癌”是表面上皮-间质肿瘤(surface epithelial-stromal tumor)(一种类型的卵巢癌)的恶性形式。

[0202] 表面上皮-间质肿瘤是被认为源自卵巢表面上皮(改性的腹膜)或源自异位子宫内膜或输卵管(管)组织的一类卵巢肿瘤。该组肿瘤占有所有卵巢肿瘤的绝大多数。

[0203] 畸胎瘤是指生殖细胞肿瘤,它是畸胎瘤与胚胎癌或与绒毛膜癌或与这二者的混合物。绒毛膜癌是恶性的、滋养层的和侵袭性的癌,通常是胎盘的癌。它以早期血行扩散至肺为特征。

[0204] 肉瘤是导致中胚层增殖的结缔组织(骨、软骨、脂肪)的癌。这与上皮来源的癌相反。滑膜肉瘤是罕见形式的癌症,其通常发生在臂或腿的关节附近。它是一种软组织肉瘤。

[0205] 肾细胞癌(renal cell carcinoma)(还称为肾细胞癌(renal cell cancer)或肾细胞腺癌)是源自近曲小管(肾中过滤血液并除去废物的非常小的管)之衬里的肾癌。目前,肾细胞癌是成人中最常见的肾癌类型,并且是所有生殖泌尿肿瘤中最致命的。肾细胞癌的独特亚型是透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌。透明细胞肾细胞癌是最常见形式的肾细胞癌。当在显微镜下观察时,组成透明细胞肾细胞癌的细胞表现的非常苍白或透明。乳头状肾细胞癌是第二常见的亚型。这些癌在一些(如果不是大多数的话)肿瘤中形成小的手指样突出(称为乳头状突起)。

[0206] 生殖细胞肿瘤是源自生殖细胞的肿瘤。生殖细胞肿瘤可以是癌性或非癌性的肿瘤。生殖细胞通常发生于性腺(卵巢和睾丸)内。源自性腺外(例如,头中,口内,颈,骨盆;在胎儿、婴儿和幼儿中最常见于身体中线,尤其是在尾骨的尖部)的生殖细胞肿瘤可以是源自胚胎发育过程中之错误的出生缺陷。

[0207] 两种主要类型的生殖细胞肿瘤是精原细胞瘤和非精原细胞瘤,其中非精原细胞瘤包括:畸胎瘤、胚胎瘤、卵黄囊瘤、绒毛膜癌和分化的畸胎瘤。来自非精原细胞的多数细胞系等同于胚胎瘤,即它们几乎完全由在基础条件下不分化的干细胞组成,尽管其中一些可以响应于分化诱导剂(例如,视黄酸)。

[0208] “转移”意为癌细胞从其初始位置扩散至身体的其他部分。转移的形成是非常复杂的过程,有赖于恶性细胞从原发肿瘤脱离,侵袭细胞外基质,穿透内皮基底膜以进入体腔和血管,并随后通过血液运输,然后浸润靶器官。最终,新肿瘤在目标位置的生长有赖于血管发生。甚至在除去原发肿瘤之后仍经常发生肿瘤转移,因为肿瘤细胞或组分可残留并发展出转移潜力。在一个实施方案中,根据本发明的术语“转移”表示“远端转移”,其表示远离原发肿瘤和局部淋巴结系统的转移。

[0209] 继发性或转移性肿瘤的细胞与原发性肿瘤中的细胞类似。这意味着例如如果卵巢癌转移至肝,则所述继发性肿瘤由异常的卵巢细胞(而不是异常的肝细胞)组成。随后,肝中的肿瘤被称为转移性卵巢癌(而不是肝癌)。

[0210] “治疗”意为向对象施用本文中描述的化合物或组合物以预防或清除疾病,包括使对象中的肿瘤的大小或肿瘤的数目降低;阻滞或减缓对象中的疾病;抑制或减缓对象中新疾病的发生;降低目前患有或以前曾患有疾病之对象中的症状和/或复发的频率或严重程度;和/或延长(即,提高)所述对象的寿命。

[0211] 术语“疾病的治疗”包括疾病或其症状的治愈、缩短时程、改善、预防、减缓或抑制进展或恶化,或者预防或延缓发生。

[0212] “有风险”意为鉴定为与一般人群相比具有高于正常发病(尤其是癌症)机会的对象(即,患者)。此外,已患有或目前患有疾病(尤其是癌症)的对象是具有升高的发病风险的对象,因为这样的对象可继续发病。目前已患有或曾患有癌症的对象还具有升高的癌转移风险。

[0213] 术语“免疫治疗”表示与特异性免疫反应相关的治疗。在本发明的情况下,术语例如“保护”、“预防”、“预防性的(prophylactic)”、“预防的(preventive)”或“保护性的(protective)”表示在个体中预防或治疗(或二者兼有)肿瘤的发生和/或传播。在本发明的情况中,术语“免疫治疗”优选地是指主动肿瘤免疫或肿瘤接种。预防性施用免疫治疗(例如,预防性施用本发明的组合物)优选地对接受者进行保护以避免发生肿瘤生长。治疗性施用免疫治疗(例如,治疗性施用本发明的组合物)可导致抑制肿瘤的进展/生长。这包括使肿瘤的进展/生长减速(尤其是破坏肿瘤的进展),这优选地导致肿瘤的清除。治疗性施用免疫治疗可对个体进行保护以避免例如现存肿瘤的播散或转移。

[0214] 术语“免疫”或“接种”描述以诱导用于治疗性或预防性原因的免疫应答为目的向对象施用抗原的过程。

[0215] 可互换地使用术语“对象”、“个体”、“生物”或“患者”,其表示脊椎动物,优选哺乳动物。例如,在本发明的情况中,哺乳动物是人、非人灵长类、家养的动物(例如,犬、猫、绵

羊、牛、山羊、猪、马等)、实验动物(例如,小鼠、大鼠、兔、豚鼠等)以及圈养的动物(例如,动物园中的动物)。本文中使用的术语“动物”还包括人。术语“对象”还可包括患者,即,患有疾病(优选与CLDN6之表达相关的疾病(优选肿瘤发生性疾病(例如癌症)))的动物(优选人)。

[0216] 术语“佐剂”表示延长或增强或加速免疫应答的化合物。本发明的化合物优选地无需添加佐剂而发挥其作用。尽管如此,本申请的组合物可包含任何已知的佐剂。佐剂包含一组异质的化合物,例如油乳剂(例如,弗氏佐剂)、无机化合物(例如,明矾)、细菌产物(例如,百日咳毒素杆菌(*Bordetella pertussis*)毒素)、脂质体和免疫刺激复合物。佐剂的实例是单磷酸基-脂质-A(MPL SmithKline Beecham)。皂苷,例如QS21(SmithKline Beecham)、DQS21(SmithKline Beecham;WO 96/33739)、QS7、QS17、QS18和QS-L1(So et al.,1997, Mol.Cells 7:178-186),不完全弗氏佐剂,完全弗氏佐剂,维生素E, montanid,明矾,CpG寡核苷酸(Krieg et al.,1995,Nature 374:546-549)和多种以生物可降解的油(例如,角鲨烯和/或生育酚)制备的油包水型乳剂。

[0217] 根据本发明,样品可以是任何根据本发明可使用的样品,尤其是生物样品,例如组织样品(包括体液)和/或细胞样品,并且可以以常规方式获得,例如通过组织活检(包括钻取活检)以及通过取血、支气管吸出物、痰、尿、粪便或其他体液。根据本发明,术语“生物样品”还包括生物样品的级分。

[0218] 术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白,并且包括包含其抗原结合部分的任何分子。术语“抗体”包括单克隆抗体及其片段或衍生物,包括但不限于人单克隆抗体、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体、单链抗体(例如,scFv's)和抗原结合的抗体片段(例如,Fab和Fab'片段),并且还包括抗体的所有重组形式,例如原核细胞中表达的抗体、非糖基化的抗体以及本文中描述的任何抗原结合的抗体片段和衍生物。每个重链包含重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区。每个轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区。VH和VL区还可再分为高变区(称为互补决定区(complementarity determining region,CDR)),其间散布着更保守的区域(称为框架区(framework region,FR))。VH和VL各自由三个CDR和四个FR构成,按照以下顺序从氨基末端向羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有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)和经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。

[0219] 根据本发明,术语“CDR序列的至少一个”优选地意为至少CDR3序列。术语“抗体链的CDR序列”优选地表示抗体重链或轻链的CDR1、CDR2和CDR3。

[0220] 根据本发明,提及包含具体CDR序列(例如,具体的CDR3序列)的抗体链意为所述具体CDR序列形成所述抗体链的CDR区(例如CDR3区),即所述CDR区由所述具体CDR序列组成,或形成CDR区(例如,所述抗体链的CDR3区)的一部分,即所述CDR区包含所述具体CDR序列。

[0221] 如果根据本发明提到包含具体抗体重链和/或具体抗体轻链(例如,包含具体CDR序列的链),抗体的两个重链和/或两个轻链优选地分别由具体抗体重链和/或具体抗体轻链构成。

[0222] 术语“人源化抗体”是指具有基本源自非人物种免疫球蛋白之抗原结合位点的分子,其中分子的其余免疫球蛋白结构是基于人免疫球蛋白之结构和/或序列的。抗原结合位点可包含与恒定结构域融合的完整可变结构域或仅包含移植到可变结构域中合适框架区

上的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型或者可通过一个或更多个氨基酸替换而被修饰,例如被修饰而更接近于人免疫球蛋白。人源化抗体的一些形式保持所有CDR序列(例如,含有小鼠抗体全部6个CDR的人源化小鼠抗体)。其他形式具有相对于初始抗体改变的一个或更多个CDR。

[0223] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其中每个重链和轻链氨基酸序列的一部分与源自特定物种的抗体中的相应序列同源,而所述链的其余区段与另一物种中相应的序列同源。一般来说,轻链和重链的可变区都模拟源自一个哺乳动物物种之抗体的可变区,而恒定部分与源自另一物种的抗体序列同源。这种嵌合形式的一个明显的优势是与源自例如人细胞制备物的恒定区组合的可变区可便利地源自目前已知的使用容易获得的来自非人宿主生物的B细胞或杂交瘤的来源。虽然可变区具有方便制备以及特异性不受来源影响的优势,但当注射所述抗体时,人的恒定区比来自非人来源的恒定区引起更低可能性的人对象免疫应答。然而,该定义不限于这个具体的实例。

[0224] 本文中使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或者简单地“结合部分”)是指抗体的一个或更多个片段,其保持与抗原特异性的结合能力。已证明可通过全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。包括在术语抗体的“抗原结合部分”之内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH结构域组成的一价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含通过铰链区中二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546),其是由VH结构域组成的;(vi) 分离的互补决定区(CDR),以及(vii) 可任选地通过合成接头(synthetic linker)连接的两种或更多种分离的CDR的组合。此外,尽管Fv片段的两个结构域(VL和VH)是不同基因编码的,可使用重组方法通过合成接头将它们连接,所述合成接头使它们作为单个蛋白质链而制造,其中VL和VH区配对以形成一价分子(被称为单链Fv(singel chain Fv, scFv);参见例如Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也意在包括于术语抗体的“抗原结合部分”之中。另一个实例是结合结构域免疫球蛋白融合蛋白质,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,(ii) 与铰链区融合的免疫球蛋白重链CH2恒定区,以及(iii) 与CH2恒定区融合的免疫球蛋白重链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。US 2003/0118592和US 2003/0133939中也公开了结合结构域免疫球蛋白融合蛋白质。通过使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,筛选所述片段,以与完整抗体相同的方式使用所述片段。

[0225] 术语“表位”是指分子中的抗原决定簇,即是指分子中被免疫系统识别(例如被抗体识别)的部分。例如,表位是被免疫系统识别的抗原上不连续的三维位点。在本发明的情况下,所述表位优选地源自CLDN蛋白。表位通常由分子的化学活性表面基团(例如,氨基酸或糖侧链)组成,并且经常具有特异性的三维结构特征,以及特异性的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在变性溶剂存在下,丧失与前者而非与后者的结合。蛋白质(例如,CLDN)的表位优选地包含所述蛋白质的连续或不连续部分,并且长度优选地是5至100、优选5至50、更优选8至30、最优选10至25个氨基酸,例如,所述表位的长度可优选地是8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。

[0226] 本文中使用的术语“不连续表位”意为蛋白质抗原上的构象表位,其是由蛋白质的

一级序列中的至少两个不同区域形成的。

[0227] 术语“双特异性分子”意在包括具有两个不同的结合特异性的任何试剂,例如蛋白质、肽或者蛋白质或肽的复合物。例如,所述分子可以与以下结合或相互作用:(a) 细胞表面抗原,和(b) 效应细胞表面上的Fc受体。术语“多特异性”或“异种特异性分子”意在包括具有超过两个不同的结合特异性的任何试剂,例如,蛋白质、肽或者蛋白质或肽的复合物。例如,所述分子可以与以下结合或相互作用:(a) 细胞表面抗原,(b) 效应细胞表面上的Fc受体,和(c) 至少一种其他成分。因此,本发明包括但不限于导向CLDN6以及导向其他靶标(例如,效应细胞上的Fc受体)的双特异性、三特异性、四特异性和其他多特异性分子。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结构域表达于单个多肽链上,但使用的接头太短从而无法使相同链上的两个结构域之间配对,因而迫使所述结构域与其他链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger,P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1 121-1 123)。

[0228] 本文中使用的术语“异种抗体”是指两个或更多个抗体、其衍生物或连接在一起的抗原结合区,其中至少两个具有不同的特异性。这些不同的特异性包括对效应细胞上的Fc受体的结合特异性,以及对靶细胞(例如,肿瘤细胞)上的抗原或表位的结合特异性。

[0229] 本文中描述的抗体可以是人抗体。本文中使用的术语“人抗体”意在包括具有源自人种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不被人种系免疫球蛋白序列(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或者通过体内体细胞突变而引入的突变)所编码的氨基酸残基。

[0230] 本文中使用的术语“单克隆抗体”是指单个分子组成之抗体分子的制备物。单克隆抗体显示对特定表位的单一结合特异性和亲和力。在一个实施方案中,单克隆抗体是由杂交瘤产生的,所述杂交瘤包含与永生化细胞融合的获自非人动物(例如,小鼠)的B细胞。

[0231] 本文中使用的术语“重组抗体”包括由重组方式制备、表达、产生或分离的所有抗体,例如(a) 从以免疫球蛋白基因转基因的或转染色体动物(例如,小鼠)或从其制备的杂交瘤中分离的抗体,(b) 从转化以表达抗体的宿主细胞中(例如,从转染瘤中)分离的抗体,(c) 从重组的、组合的抗体文库中分离的抗体,和(d) 由涉及将免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。

[0232] 本文中使用的术语“转染瘤”包括表达抗体的重组真核宿主细胞,例如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。

[0233] 本文中使用的“异源抗体”是相对于产生所述抗体的转基因生物而定义的。该术语是指这样的抗体,其具有对应于生物中所发现的但不组成转基因生物的氨基酸序列或编码性核酸序列,并且通常源自不同于所述转基因生物的物种。

[0234] 本文中使用的“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,具有与鼠轻链相缔合之人重链的抗体是异源杂合抗体。

[0235] 本发明包括本文中描述的所有抗体和衍生物,其对于本发明的目的而言均包括于术语“抗体”中。术语“抗体衍生物”是指抗体的任何修饰形式,例如,抗体与其他试剂或抗体的缀合物或者抗体片段。

[0236] 本文中描述的抗体优选地是分离的。本文中使用的“分离的抗体”意指这样的抗

体,其基本没有具有不同抗原特异性的其他抗体(例如,与CLDN6特异性结合的分离抗体是这样的抗体,其基本没有与CLDN6以外的抗原特异性结合的抗体)。然而,与人CLDN6的表位、同种型或变体特异性结合的分离的抗体可以具有与其他相关抗原(例如,来自其他物种)(例如,CLDN6的物种同源物)的交叉反应性。此外,分离的抗体可基本没有其他细胞物质和/或化学品。在本发明的一个实施方案中,“分离的”单克隆抗体的组合表示具有不同特异性并且组合于明确界定的组合物中的抗体。

[0237] 根据本发明,在标准测定(例如,本文中描述的测定)中,如果抗体与预先确定靶标有显著的亲和力并且与所述预先确定的靶标结合,则所述抗体能够与所述预先确定的靶标结合。优选地,在流式细胞术分析(FACS分析)中(其中测定所述抗体与表达于完整细胞表面上的所述靶标的结合),如果抗体可检测地与所述靶标结合,则所述抗体能够与所述靶标结合。优选地,如果以10 μ g/ml或更低、5 μ g/ml或更低或者2 μ g/ml或更低的浓度存在,所述抗体可检测地与所述靶标结合。优选地,如果以50nM或更低、30nM或更低或者15nM或更低的浓度存在,所述抗体可检测地与所述靶标结合。经常通过平衡解离常数(K_D)测量“亲和力”或“结合亲和力”。优选地,术语“显著的亲和力”是指以10⁻⁵M或更低、10⁻⁶M或更低、10⁻⁷M或更低、10⁻⁸M或更低、10⁻⁹M或更低、10⁻¹⁰M或更低、10⁻¹¹M或更低或者10⁻¹²M或更低的解离常数(K_D)与预先确定的靶标结合。本发明的抗体优选地具有6500ng/ml或更低、3000ng/ml或更低、2500ng/ml或更低、2000ng/ml或更低、1500ng/ml或更低、1000ng/ml或更低、500ng/ml或更低、400ng/ml或更低、300ng/ml或更低、200ng/ml或更低或者100ng/ml或更低的与CLDN6结合的EC50值。

[0238] 在标准的测定中,如果抗体不具有对靶标的显著亲和力并且不与所述靶标显著地结合,则所述抗体(基本)不能与所述靶标结合。优选地,在流式细胞术分析(FACS分析)中(其中测定所述抗体与表达于完整细胞表面上的所述靶标的结合),如果抗体不与靶标可检测地结合,则所述抗体(基本)不能与所述靶标结合。优选地,如果以高达2 μ g/ml、优选高达5 μ g/ml、优选高达10 μ g/ml、优选高达20 μ g/ml、更优选高达50 μ g/ml、尤其是高达100 μ g/ml或高达150 μ g/ml、高达200 μ g/ml或者更高的浓度存在,则所述抗体不与所述靶标可检测地结合。优选地,如果以高达15nM、优选高达30nM、优选高达50nM、优选高达100nM、优选高达150nM或高达170nM、高达300nM、高达600nM、高达1000nM、高达1300nM或者更高的浓度存在,则所述抗体不与所述靶标可检测地结合。优选地,如果以与抗体所结合靶标饱和结合的浓度存在,则所述抗体不与所述靶标(即,CLDN6)可检测地结合。优选地,如果抗体与所述靶标以高于与预先确定之靶标(所述抗体所能够与其结合)结合之 K_D 的至少10倍、100倍、10³倍、10⁴倍、10⁵倍或10⁶倍高的 K_D 结合,则抗体不具有对靶标的显著亲和力。例如,如果抗体与所述抗体所能够结合的所述靶标相结合的 K_D 是10⁻⁷M,则抗体不具有显著亲和力的与靶标结合的 K_D 可以是至少10⁻⁶M、10⁻⁵M、10⁻⁴M、10⁻³M、10⁻²M或10⁻¹M。

[0239] 如果抗体能够与预先确定的靶标结合而不能与其他靶标结合(即,在标准测定中对其他靶标没有显著的亲和力并且不与其他靶标显著地结合),则所述抗体对所述预先确定的靶标是特异性的。根据本发明,如果抗体能够与CLDN6结合但不能与其他靶标(尤其是除CLDN6之外的密蛋白,例如CLDN9、CLDN4、CLDN3和CLDN1)结合,则所述抗体是CLDN6特异性的。优选地,如果与CLDN6之外的密蛋白(例如,CLDN9、CLDN4、CLDN3和CLDN1)的亲和力和结合没有显著超过与密蛋白不相关的蛋白质(例如,牛血清白蛋白(bovine serum albumin,

BSA)、酪蛋白、人血清白蛋白(human serum albumin,HSA)或非密蛋白的膜蛋白质(例如,MHC分子或转铁蛋白受体)或任何其他指定的多肽)的亲力和结合,则所述抗体是CLDN6特异性的。优选地,如果抗体与所述靶标以低于与预先确定之靶标(所述抗体对其不是特异性的)结合之 K_D 的至少10倍、100倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍或 10^6 倍的 K_D 结合,则所述抗体对预先确定的靶标是特异性的。例如,如果抗体与对其特异性靶标之结合的 K_D 是 10^{-7} M,则与对其非特异性靶标之结合的 K_D 可以是至少 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M、 10^{-3} M、 10^{-2} M或 10^{-1} M。

[0240] 可使用任何合适的方法实验性测定抗体与靶标的结合;参见例如Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company New York, N Y (1992) 和本文中描述的方法。可使用常规技术很容易地测定亲和力,例如,通过平衡透析;通过使用BIAcore 2000仪器,使用制造商所描述的一般方法;通过使用放射标记的靶抗原的放射免疫测定;或通过技术人员已知的其他方法。例如,可通过Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949) 的方法分析亲和力数据。如果在不同条件(例如,盐浓度、pH)下测量,所测量的具体抗体-抗原相互作用的亲和力可以不同。因此,亲和力的测量和其他抗原-结合参数(例如,KD、IC50)优选地用抗体与抗原的标准化的溶液以及标准化的缓冲液制成。

[0241] 本发明抗体的独特特征是与细胞表面密蛋白6结合的能力。这已通过流式细胞术分析表达密蛋白6的细胞而被证明。

[0242] 为了测试单克隆抗体与表达密蛋白之活细胞的结合,可使用流式细胞术。简单地说,将表达与膜结合之密蛋白(在标准的生长条件下生长)的细胞系与多个浓度的PBS(含有2%热灭活的FCS和0.1%NaN₃)中的抗体在4°C下混合30分钟。清洗之后,在与一抗染色相同的条件下,使细胞与荧光标记的二抗反应。利用光和侧向散射特性,可通过FACS分析样品以对单种细胞圈门(gate),并测定被标记抗体的结合。

[0243] 根据本发明的术语“结合”优选地表示本文中定义的特异性结合。

[0244] 本文中使用的“同种型”是指由重链恒定区基因所编码的抗体类型(例如,IgM或IgG1)。

[0245] 本文中使用的“同种型转换”是指抗体的类型或同种型从一种Ig类型变为另一种Ig类型的现象。

[0246] 本文中使用的应用于对象的术语“天然的(naturally occurring)”是指对象可在自然中找到的事实。例如,可已从天然来源中分离的存在于生物(包括病毒)中的并且已在实验室中被人刻意修饰的多肽或多核苷酸序列是天然的。

[0247] 本文中使用的术语“重排的”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型,其中在实质上编码完整的VH或VL结构域的构象中,V区段的位置分别紧邻D-J或J区段。可通过比较种系DNA来鉴定重排的免疫球蛋白(抗体)基因座;重排的基因座将具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源性元件。

[0248] 本文中关于V区段而使用的术语“未重排的”或“种系构型”是指这样的构型,其中V区段未重组,以使其紧邻D或J区段。

[0249] 本文中使用的术语“核酸分子”意在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链的或双链的,但优选地是双链的DNA。可以以例如RNA的形式将核酸分子用于引入(即,转染)

细胞,所述RNA可通过体外转录从DNA模板制备。此外,在应用之前,可通过稳定序列、加帽和多聚腺苷酸化来修饰所述RNA。

[0250] 根据本发明描述的核酸已优选地被分离。根据本发明,术语“分离的核酸”意为所述核酸是(i)体外扩增的,例如通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR), (ii)通过克隆重组产生的, (iii)纯化的,例如通过切割和凝胶电泳分离,或者(iv)合成的,例如通过化学合成。分离的核酸是可用于重组DNA技术之操作的核酸。

[0251] 根据本发明,核酸可单独存在或与其他核酸联合存在,所述其他核酸可以是同源的或异源的。在一些优选的实施方案中,核酸与表达控制序列功能性连接,所述表达控制序列与所述核酸可以是同源或异源的,其中术语“同源的”意为所述核酸天然地与表达控制序列功能性连接,而术语“异源的”意为所述核酸天然地不与表达控制序列功能性连接。

[0252] 如果它们是彼此以这样的方式共价连接以使所述核酸的表达或转录在所述表达控制序列的控制或影响之下,则核酸(例如,表达RNA和/或蛋白质或肽的核酸)与表达控制序列彼此功能性连接。如果要将所述核酸翻译成为功能性蛋白质,那么用表达控制序列与编码序列功能性连接,诱导所述表达控制序列导致所述核酸的转录,而不引起编码序列中的移码或者所述编码序列不能被翻译成为所需的蛋白质或肽。

[0253] 根据本发明,术语“表达控制序列”包含启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或mRNA翻译的其他控制元件。在本发明的一些具体的实施方案中,可调节所述表达控制序列。表达控制序列的精确结构可作为物种或细胞类型的函数而不同,但通常包含5'-非转录的以及5'-和3'-非翻译序列,其分别参与转录和翻译的起始,例如TATA框、加帽序列、CAAT序列等。更具体地说,5'-非转录的表达控制序列包含启动子区,其包含用于功能性连接的核酸之转录控制的启动子序列。表达控制序列还可包括增强子序列或上游激活子序列。

[0254] 根据本发明,术语“启动子”或“启动子区”表示这样的核酸序列,其位于被表达核酸序列的上游(5'),并且通过提供对RNA聚合酶的识别和结合位点而控制序列的表达。“启动子区”还可包含识别和结合参与基因转录调节之其他因子的位点。启动子可控制原核或真核基因的转录。此外,启动子可以是“可诱导型的”并且可以响应于诱导剂而起始转录,或者如果转录不受诱导剂控制,所述启动子可以是“组成型的”。如果不存在诱导剂,在可诱导型启动子控制之下的基因不表达或仅少量表达。在诱导剂存在下,所述基因被打开或转录水平升高。这一般是通过特定转录因子的结合所介导的。

[0255] 根据本发明,优选的启动子包括SP6、T3和T7聚合酶的启动子、人U6 RNA启动子、CMV启动子及其人工的杂合启动子(例如,CMV),其中一部分或一些部分与其他细胞蛋白质(例如,人GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶))的基因启动子的一部分或一些部分融合,并且包含或不包含额外的内含子。

[0256] 根据本发明,以最通常的意义使用术语“表达”,其包括产生RNA或产生RNA和蛋白质/肽。它还包括核酸的部分表达。此外,可以瞬时地或稳定地进行表达。根据本发明,术语表达还包括“异常表达”或“不正常表达”。

[0257] 根据本发明,“异常表达”或“不正常表达”意为与参比相比(优选与非肿瘤发生性的正常细胞或健康的个体中的状态相比)表达改变(优选升高)。表达的升高是指升高至少10%,尤其是至少20%,至少50%或至少100%。在一个实施方案中,表达仅见于患病的组

织,而健康组织中的表达被抑制。

[0258] 在一个优选的实施方案中,根据本发明,核酸分子(在适当情况下)与启动子(其控制核酸的表达)存在于载体中。在此以其最常用的意义使用的术语“载体”,其包括用于核酸的任何中间媒介物(vehicle),其使所述核酸例如被引入原核和/或真核细胞,并且在适当情况下被整合进入基因组。这类载体优选地在所述细胞中复制和/或表达。载体包括质粒、噬菌粒、噬菌体或病毒基因组。本文中使用的术语“质粒”通常表示可独立于染色体DNA而复制的染色体外遗传物质的构建体,通常为环状DNA双链体。

[0259] 对于表达抗体的载体,可使用其中抗体重链和轻链存在于不同的载体中的载体类型或者其中重链和轻链存在于同一载体中的载体类型。

[0260] 要这样解释本文中给出的关于特定核酸和氨基酸序列(例如,序列表中的序列)的教导,以使其还表示所述特定序列的修饰形式(即,变体),其导致功能性等同于所述特定序列的序列,例如,氨基酸序列表现出与所述特定氨基酸序列相同或相似的特性,并且编码氨基酸序列的核酸序列表现出与所述特定核酸序列所编码的氨基酸序列相同或相似的特性。一个重要的特性是保持抗体与其靶标的结合,或者维持抗体的效应功能,例如CDC和/或ADCC。优选地,当在抗体中替换所述特异性序列时,相对于特定序列而修饰的序列保持所述抗体与靶标的结合,并且优选保持本文中描述的所述抗体的功能。

[0261] 类似地,要这样解释本文中给出的关于特定抗体或产生特异性抗体之杂交瘤的教导,以使其还表示以氨基酸序列和/或核酸序列为特征的抗体,所述氨基酸序列和/或核酸序列是与所述特定抗体的所述氨基酸序列和/或核酸序列相比较而修饰的,但在功能上是等同的。一个重要的特性是保持抗体与其靶标的结合或维持抗体的效应功能。优选地,当用相对于特定序列修饰的序列替换抗体中的特定序列时,保持所述抗体与靶标的结合,并且优选保持本文中描述的所述抗体的功能,例如CDC介导的裂解或ADCC介导的裂解。

[0262] 本领域技术人员会理解,可修饰高变区和可变区(尤其是CDR的序列)而不失去与靶标结合的能力。例如,CDR区会与本文中指定的抗体相同或高度同源。对于“高度同源”,考虑可在CDR中进行1至5(优选1至4,例如1至3或者1或2)个替换。此外,可修饰高变区和可变区,以使其显示出与本文中具体公开的抗体区域基本同源。

[0263] 要理解的是,本文中描述的特定核酸还包括为在具体宿主细胞或生物中优化密码子使用而修饰的核酸。生物之间密码子使用的差异可导致涉及异源基因表达的很多问题。通过改变原序列的一个或更多个核苷酸的密码子优化可导致要在其中表达所述核酸的同源或异源宿主中核酸表达的优化(尤其是翻译效率的优化)。

[0264] 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从其来源的核酸序列、氨基酸序列或肽的功能特性。这样的功能特性包括与其他分子的相互作用或结合。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、修饰形式或片段分别与从其来源的核酸序列、氨基酸序列或肽免疫等效。

[0265] 优选地,特定核酸序列与相对于所述特定核酸序列而修饰的核酸序列或所述特定核酸序列之变体的核酸序列的同一性程度会为至少70%,优选至少75%,更优选至少80%,甚至更优选至少90%或者最优选至少95%、96%、97%、98%或99%。对于CLDN6核酸变体,同一性的程度优选以至少约300、至少约400、至少约450、至少约500、至少约550、至少约600或至少约630个核苷酸的区域给出。在一些优选的实施方案中,为全长的参比核酸序列(例

如,序列表中给出的核酸序列)给出同一性程度。优选地,这两个序列能够彼此杂交并形成稳定的双链体,杂交优选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 et al., Editors,2nd Edition,Cold Spring Harbor Laboratory press,Cold Spring Harbor, New York,1989或者Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel et al., Editors,John Wiley&Sons,Inc.,New York,并且是指例如在65°C下在杂交缓冲液(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(pH7)、0.5%SDS、2mM EDTA)中的杂交。SSC是0.15M氯化钠/0.15M柠檬酸钠,pH 7。杂交之后,清洗已被转移了DNA的膜,例如室温下在2×SSC中清洗,并随后在高达68°C的温度下在0.1~0.5×SSC/0.1×SDS中清洗。

[0266] 根据本发明,术语“变体”还包括突变体,剪接变体,构象、同种型、等位基因变体,物种变体和物种同源物,尤其是天然存在的变体。等位基因变体涉及基因正常序列中的改变,其重要性通常不清楚。全基因测序通常鉴定给定基因的大量等位基因变体。物种同源物是给定核酸或氨基酸序列的具有不同物种来源的核酸或氨基酸序列。

[0267] 对于本发明的目的而言,氨基酸序列的“变体”包含氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、氨基酸缺失变体和/或氨基酸替换变体。在蛋白质的N-末端和/或C-末端包含缺失的氨基酸缺失变体还称为N-末端和/或C-末端截断变体(truncation variant)。

[0268] 氨基酸插入变体包括在特定氨基酸序列中插入单个或两个或更多个氨基酸。在具有插入的氨基酸序列变体的情况中,向氨基酸序列的特定位置点中插入一个或更多个氨基酸残基,尽管随机插入并对所产生的产物进行合适的筛选也是可能的。

[0269] 氨基酸添加变体包含氨基和/或羧基末端融合一个或更多个氨基酸,例如1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。

[0270] 氨基酸缺失变体以从序列中除去一个或更多个氨基酸(例如,通过除去1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸)为特征。所述缺失可以在蛋白质的任何位置。

[0271] 氨基酸替换变体以序列中至少一个残基被除去并在其位置中插入其他残基为特征。优选在氨基酸序列中同源蛋白质或肽之间非保守的位置处修饰和/或优选将氨基酸置换为其他具有相似特性的氨基酸。优选地,蛋白质变体中的氨基酸改变是保守性氨基酸改变,即替换带有类似电荷的或不带电荷的氨基酸。保守性氨基酸改变涉及替换以其侧链相关联的氨基酸家族的一个。天然氨基酸通常分为四个家族:酸性的(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性的(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性的(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和不带电的极性的(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)氨基酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时共同分类为芳族氨基酸。

[0272] 特定氨基酸序列与相对于所述特定氨基酸而修饰的氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体之间(例如,显示基本同源的氨基酸序列之间)优选的相似性程度、优选的同一性会为至少70%,优选至少80%,甚至更优选至少90%或者最优选至少95%、96%、97%、98%或99%。优选地为氨基酸区域给出相似性或同一性程度,所述区域为参比氨基酸序列之全长的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。例如,如果参比氨基酸序列由200个氨基酸组成,优选地为至少约20、至少约40、至少约60、至少约80、至少约100、至少约120、至少约140、至

少约160、至少约180或约200个氨基酸给出的相似性或同一性程度,优选连续的氨基酸。对于CLDN6多肽变体,优选地为至少约100、至少约120、至少约140、至少约160、至少约180、至少约200、至少约210个氨基酸的区域给出相似性或同一性程度。在一些优选的实施方案中,为全长的参比氨基酸序列(例如,序列中所给出的氨基酸序列)给出相似性或同一性程度。可用现有技术中已知的工具进行用于确定序列相似性(优选序列同一性)的比对,优选使用最好的序列比对,例如使用Align,使用标准设置,优选EMBOSS::meedle、Matrix:Blosum62、Gap Open 10.0、Gap Extend 0.5。

[0273] “序列相似性”表示相同或存在保守性氨基酸替换的氨基酸百分比。两个多肽或核酸序列之间的“序列同一性”表示序列之间相同的氨基酸或核苷酸百分比。

[0274] 在最佳比对之后,获得“百分同一性”,该百分比是纯统计学的,并且这两个序列之间的差异在其整个长度上随机地分布。通过任选地比对它们之后,比较这些序列,常规地进行两个核苷酸或氨基酸序列之间的序列比较,所述比较是通过区段或“比较窗”进行的,以鉴定和比较具有序列相似性的局部区域。除了手工进行之外,可通过Smith and Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482的局部同源性算法,通过Neddleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443的局部同源性算法,通过Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444的相似性搜索法,或者通过使用这些算法的计算机程序(GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N and TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)来产生对用于比较之序列的最佳比对。

[0275] 通过测定被比较的两个序列之间相同位置的数目来计算百分同一性,将该数目除以所比较的位置数并使结果乘以100以获得这两个序列之间的百分同一性。

[0276] 例如,可根据所涉残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质而进行“保守性替换”。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)带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸;以及(d)带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。替换通常可在组(a)~(d)之内进行。此外,根据甘氨酸和脯氨酸破坏 α -螺旋的能力,它们可以彼此替换。可在以下组之间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。鉴于已知的遗传代码以及重组和合成DNA技术,技术人员可很容易地构建编码保守性氨基酸变体的DNA。

[0277] 本发明包括这样的抗体,其中在Fc区已进行修改以改变所述抗体的功能或药理学特性。这样的改变可导致C1q结合以及CDC或者Fc γ R结合以及ADCC的降低或升高。可例如在重链恒定区的一个或多个氨基酸残基中进行替换,因而,与修饰的抗体相比,导致效应功能的改变,同时保持与抗原结合的能力,参见US 5,624,821和US 5,648,260。

[0278] 可通过修饰Ig恒定结构域或Ig样恒定结构域的补救受体(salvage recptor)表位来提高抗体的体内半衰期,以使分子不包含完整的CH2结构域或完整的Ig Fc区,参见US 6,121,022和US 6,194,551。还可通过在Fc区中进行突变来升高体内半衰期,所述突变例如通过在位置252处以苏氨酸替换亮氨酸,通过在位置254处以苏氨酸替换丝氨酸,或者通过在位置256处以苏氨酸替换苯丙氨酸,参见US 6,277,375。

[0279] 此外,可修饰抗体的糖基化模式以改变抗体的效应功能。例如,可在转染瘤中表达

所述抗体,所述转染瘤在Fc区的位置297处不添加通常与Asn连接的岩藻糖单位以增强Fc区对Fc受体的亲和力,这反过来会导致NK细胞存在下升高的抗体ADCC,参见Shield et al. (2002) JBC, 277:26733。此外,可进行半乳糖基化修饰以修饰CDC。

[0280] 或者,在另一个实施方案中,可沿着抗CLDN6抗体的全部或部分编码序列随机引入突变(例如通过饱和诱变),并且可筛选所产生的经修饰的抗CLDN6抗体的结合活性。

[0281] 根据本发明,术语“细胞”或“宿主细胞”优选地表示完整细胞,即具有完整膜的未释放其正常的细胞内成分(例如,酶、细胞器或遗传物质)的细胞。完整细胞优选地是活细胞(viable cell),即能够进行正常代谢功能的活细胞(living cell)。优选地,根据本发明,所述术语表示可用外源性核酸转化或转染的任何细胞。根据本发明,术语“细胞”包括原核细胞(例如,大肠杆菌(E.coli))或真核细胞(例如,树突细胞、B细胞、CHO细胞、COS细胞、K562细胞、HEK293细胞、HELA细胞、酵母细胞和昆虫细胞)。所述外源性核酸可见于细胞内部(i)这样的自由分散,(ii)并入重组载体,或者(iii)整合进入宿主基因组或线粒体DNA。尤其优选哺乳动物的细胞,例如来自人、小鼠、仓鼠、猪、山羊和灵长类的细胞。所述细胞可以源自很多组织类型,并且包括原代细胞和细胞系。具体的实例包括角质形成细胞、外周血白细胞、骨髓干细胞和胚胎干细胞。在另一些实施方案中,所述细胞是抗原呈递细胞,尤其是树突细胞、单核细胞或巨噬细胞。本文中使用的术语“宿主细胞”优选意指其中已引入重组表达载体的细胞。

[0282] 包含核酸分子的细胞优选地表达所述核酸所编码的肽或蛋白质。

[0283] 术语“转基因动物”是指具有包含一个或多个转基因(优选重链和/或轻链转基因)或转染色体(transchromosome)(整合或不整合到动物的天然基因组DNA中)的基因组的动物,并且其优选能够表达所述转基因。例如,转基因小鼠可具有人轻链转基因以及人重链转基因或人重链转染色体,以使当用CLDN6抗原和/或表达CLDN6的细胞免疫时,所述小鼠产生人抗-CLDN6抗体。人重链转基因可被整合到小鼠的染色体DNA中(如转基因小鼠(例如,HuMAb小鼠(例如,HCo7或HCo12小鼠))中的情况那样),或者可以染色体外维持人重链转基因(如WO 02/43478中描述的转染色体(例如,KM)小鼠中的情况那样)。通过进行V-D-J重组和同种型转换,这样的转基因和转染色体小鼠可以以能够产生多同种型的抗CLDN6的人单克隆抗体(例如,IgG、IgA和/或IgE)。

[0284] 本文中使用的“降低”或“抑制”意为引起总体降低的能力,优选5%或更高、10%或更高、20%或更高、更优选50%或更高并且最优选75%或更高水平的降低,例如细胞增殖水平的降低。术语“抑制”或类似的词语包括完全或基本完全的抑制,即降低至0或基本降低至0。

[0285] 术语例如“升高”或“增强”优选地表示升高或增强约至少10%、优选至少20%、优选至少30%、更优选至少40%、更优选至少50%、甚至更优选至少80%并且最优选至少100%。这些术语还可表示这样的情况,其中在0时间没有可检出的某些化合物或病症的信号,而在0时间之后的特定时间点有可检出的某些化合物或病症的信号。

[0286] 术语“免疫等效”意为例如对于免疫作用的类型(例如诱导体液和/或细胞免疫应答)、所诱导的免疫反应的强度和/或持续时间或者所诱导的免疫反应的特异性而言,免疫等效分子(例如免疫等效氨基酸序列)表现出相同或基本相同的免疫特性和/或发挥相同或基本相同的免疫作用。在本发明的情况中,术语“免疫等效”优选地是相对于免疫的肽或肽

变体的免疫作用或特性而使用的。特定的免疫特性是与抗体结合和(在适当情况下)产生免疫应答(优选地通过刺激抗体的产生)的能力。例如,如果所述氨基酸序列在暴露于对象的免疫系统时诱导免疫反应(优选抗体,其具有与参比氨基酸序列(例如,所述参比氨基酸序列形成CLDN6的一部分)反应的特异性),则所述氨基酸序列与参比氨基酸序列免疫等效。

[0287] 在本文的情况中,术语“免疫效应功能”包括免疫系统的组分所介导的任何功能,其导致抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤发生,包括抑制肿瘤的播散和转移。优选地,免疫效应功能导致杀伤肿瘤细胞。优选地,本发明的情况中的免疫效应功能是抗体介导的效应功能。这样的功能包括补体依赖性细胞毒作用(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)、在带有肿瘤相关抗原的细胞中诱导凋亡(例如,通过抗体与表面抗原的结合)和/或抑制带有肿瘤相关抗原之细胞的增殖,优选ADCC和/或CDC。因此,能够介导一种或更多种免疫效应功能的抗体优选地能够通过诱导CDC介导的裂解、ADCC介导的裂解、凋亡、同质性黏附和/或吞噬作用(优选通过诱导CDC介导的裂解和/或ADCC介导的裂解)介导对细胞的杀伤。抗体还可简单地通过与肿瘤细胞表面上的肿瘤相关抗原结合而发挥作用。例如,抗体可仅通过与肿瘤细胞表面上的肿瘤相关抗原结合而阻断肿瘤相关抗原的功能或诱导凋亡。

具体实施方式

[0288] mAb作用的机制

[0289] 尽管以下提供对作为本发明抗体治疗效果之基础的机制的考虑,但不认为这是以任何方式限制本发明。

[0290] 本文中描述的抗体可与免疫系统的组分相互作用,优选通过ADCC或CDC相互作用。本发明的抗体还可用于使有效负载(例如,放射性同位素、药物或毒素)靶向以直接杀伤肿瘤细胞或可与常规化疗剂协同使用,通过补充作用机制(可包括抗肿瘤免疫应答,其可因化疗剂对T淋巴细胞的毒性副作用而被破坏)攻击肿瘤。然而,本发明的抗体还可通过简单地与细胞表面的CLDN6结合(因而例如阻断细胞的增殖)而发挥作用。

[0291] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用

[0292] ADCC描述本文中描述的效应细胞(尤其是淋巴细胞)的细胞杀伤能力,其优选地要求靶细胞被抗体所标记。

[0293] 当抗体与肿瘤细胞上的抗原结合并且抗体Fc结构域占用免疫效应细胞表面上的Fc受体(FcR)时,ADCC优选地发生。已鉴定多个家族的Fc受体,并且特定细胞群特征性地表达确定的Fc受体。ADCC可被视为直接诱导不同程度的即时肿瘤破坏的机制,其导致抗原呈递以及肿瘤指导的T细胞应答的诱导。优选地,体内诱导ADCC将导致肿瘤指导的T细胞应答和宿主源性抗体应答。

[0294] 补体依赖性细胞毒作用

[0295] CDC是另一种抗体指导的细胞杀伤方法。IgM是补体激活的最有效同种型。通过经典的补体激活途径,IgG1和IgG3也均非常有效地指导CDC。优选地,在该级联中,抗原-抗体复合物的形成导致所参与的抗体分子(例如,IgG分子)的C_H2结构域上暴露多个紧邻的C1q结合位点(C1q是补体C1的三个亚组分之一)。优选地,这些暴露的C1q结合位点将之前低亲和力的C1q-IgG相互作用转变为高亲和力的相互作用,这触发与一系列其他补体蛋白相关的事件级联,并导致蛋白水解释放效应细胞趋化/激活剂C3a和C5a。优选地,补体级联在膜

攻击复合物形成后结束,所述膜攻击复合物在细胞膜中产生孔,其促进水和溶质自由进出通过所述细胞。

[0296] 抗体的产生

[0297] 可通过多种技术产生本发明的抗体,所述技术包括常规的单克隆抗体法,例如 Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975) 的标准体细胞杂交技术。尽管优选体细胞杂交法,原则上可采用用于产生单克隆抗体的其他技术,例如病毒或癌基因转化B淋巴细胞或使用抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0298] 用于制备分泌单克隆抗体之杂交瘤的优选动物系统是鼠系统。小鼠中的杂交瘤生产是非常完善的方法。分离用于融合的经免疫脾细胞的免疫方案和技术是现有技术中已知的。融合伴侣(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是已知的。

[0299] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的其他优选动物系统是大鼠和兔系统(例如描述于 Spieker-Polet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:9348 (1995), 还参见 Rossi et al., *Am. J. Clin. Pathol.* 124:295 (2005))。

[0300] 在另一个优选的实施方案中,可使用带有部分人免疫系统(而非小鼠系统)的转基因或转染色体小鼠来生成抗CLDN6的人单克隆抗体。这些转基因的和转染色体的小鼠包括分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且其在本文中统称为“转基因小鼠”。可按照W02004 035607中对CD20的详细描述来在这样的转基因小鼠中产生人抗体。

[0301] 用于生成单克隆抗体的另一个策略是从所定义策略的产生抗体之淋巴细胞中直接分离编码抗体的基因,例如参见 Babcock et al., 1996; *A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy*. 对于重组抗体工程的细节还参见 Welschof and Kraus, *Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8 and Benny K.C. Lo *Antibody Engineering* ISBN 1-58829-092-1。

[0302] 免疫

[0303] 如所描述的那样可用载剂缀合的源自CLDN6序列的肽(其是重组表达的CLDN6抗原或其片段和/或表达CLDN6或其片段之细胞的富集的制备物)免疫接种小鼠以生成抗CLDN6抗体。或者,可用DNA编码的全长人CLDN6或其片段免疫接种小鼠。在使用纯化的或富集的CLDN6抗原制备物免疫接种不产生抗体的情况中,还可用表达CLDN6的细胞(例如,细胞系)免疫接种小鼠以促进免疫应答。

[0304] 可在免疫方案的过程中监控免疫应答,其中通过尾静脉或后眼眶取血来获得血浆和血清样品。具有足够效价的抗CLDN6免疫球蛋白的小鼠可用于融合。在处死和取出脾之前3~5天,可用表达CLDN6的细胞腹膜内或静脉内加强小鼠以升高分泌特定抗体之杂交瘤的比例。

[0305] 生成产生单克隆抗体的杂交瘤

[0306] 为生成产生抗CLDN6单克隆抗体的杂交瘤,可分离获自经免疫小鼠的淋巴结或脾的细胞,并使其与合适的永生化细胞系(例如,小鼠骨髓瘤细胞系)融合。随后可从所产生的杂交瘤中筛选抗原特异性抗体的产生。随后可通过ELISA从各个孔筛选分泌抗体的杂交瘤。使用表达CLDN6的细胞,通过免疫荧光和FACS分析来鉴定对CLDN6具有特异性的抗体。可再次接种分泌抗体的杂交瘤,再次筛选,并且如果其仍然是抗CLDN6单克隆抗体阳性,则可通

过有限稀释进行亚克隆。可随后体外培养稳定的亚克隆以在组织培养基中生成用于表征的抗体。

[0307] 生成产生单克隆抗体的转染瘤

[0308] 还可使用例如现有技术 (Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202) 中公知的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合以在宿主细胞转染瘤中产生本发明的抗体。

[0309] 例如, 在一个实施方案中, 可将目的基因 (例如, 抗体基因) 连接到表达载体 (例如, 真核表达质粒 (例如, WO 87/04462、WO 89/01036 和 EP 338841 中公开的 GS 基因表达系统或现有技术中公知的其他表达系统所使用的真核表达质粒)) 中。可将具有所克隆的抗体基因的纯化质粒引入真核宿主细胞, 例如 CHO 细胞、NS/O 细胞、HEK293T 细胞或 HEK293 细胞或者其他真核细胞, 例如植物来源的细胞、真菌或酵母细胞。用于引入这些基因的方法可以是现有技术中所描述的方法, 例如电穿孔、lipofectine、lipofectamine 等。将这些抗体基因引入宿主细胞之后, 可鉴定和选择表达所述抗体的细胞。这些细胞代表转染瘤, 随后可放大其表达水平并提高规模以产生抗体。可从这些培养上清液和/或细胞中分离和纯化重组抗体。

[0310] 或者, 可在其他表达系统 (包括原核细胞 (例如微生物 (例如大肠杆菌 (*E. coli*))) 中表达所克隆的抗体基因。此外, 可在转基因的非人动物中产生抗体, 例如在来自绵羊和兔的奶中, 或在来自母鸡的卵中, 或在转基因植物中产生; 参见例如 Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216:165-181; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231:147-157; 和 Fischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380:825-839。

[0311] 使用部分抗体序列来表达完整抗体 (即, 人源化和嵌合化)。

[0312] a) 嵌合化

[0313] 当用毒素或放射性同位素标记后, 鼠单克隆抗体可在人中被用作治疗性抗体。非标记的鼠抗体在人中是高度免疫原性的, 当重复应用后导致治疗作用的降低。主要的免疫原性是通过重链恒定区介导的。如果使各个抗体嵌合化或人源化, 可降低或完全避免鼠抗体在人中的免疫原性。嵌合抗体是其中的不同部分来自不同动物物种的抗体, 例如具有来自鼠抗体可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。抗体的嵌合化是通过将鼠抗体重链和轻链的可变区与人重链和轻链恒定区相连接而实现的 (例如, Kraus et al. 在 *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8 中所描述的那样)。在一个优选的实施方案中, 嵌合抗体是通过将人 κ -轻链恒定区与鼠轻链可变区相连接而生成的。在另一个优选的实施方案中, 可通过将人 λ -轻链恒定区与鼠轻链可变区相连接而生成嵌合抗体。优选的用于生成嵌合抗体的重链恒定区是 IgG1、IgG3 和 IgG4。其他优选的用于生成嵌合抗体的重链恒定区是 IgG2、IgA、IgD 和 IgM。

[0314] b) 人源化

[0315] 抗体主要通过位于 6 个重链和轻链互补决定区 (CDR) 中的氨基酸残基与目标抗原相互作用。为此, 在各个抗体之间, CDR 中的氨基酸序列比 CDR 外的序列更多样化。因为 CDR 序列负责多数抗体-抗原相互作用, 通过构建包含从具有不同特性的不同抗体移植到框架序列上的来自特定天然抗体 CDR 序列的表达载体, 可表达模拟特定天然抗体之特性的重组抗体 (参见例如 Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; 和 Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033)。这样的框架序列可获自包含种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库。这些种系序列会

不同于成熟的抗体基因序列,因为它们不会包含完整组装的可变区基因,其是通过B细胞成熟过程中的V(D)J连接而形成的。在每个均匀地分布的可变区,种系基因序列还会不同于高亲和力的二级全套抗体的序列。例如,体细胞突变在框架区1的氨基末端部分和在框架区4的羧基末端部分中相对罕见。此外,很多体细胞突变不明显地改变抗体的结合特性。为此,并不必需获得具体抗体的整个DNA序列以重新产生具有与原抗体相似结合特性的完整重组抗体(见WO 99/45962)。跨越CDR区的部分重链和轻链序列通常足以用于该目的。所述部分序列被用于测定哪个种系可变区段和连接基因区段贡献于重组的抗体可变基因。随后将种系序列用于填充可变区的缺失部分。在蛋白质成熟的过程中切除重链和轻链前导序列,其并不贡献于最终抗体的特性。为了添加丢失的序列,可通过连接或PCR扩增来将被克隆的cDNA序列与合成的寡核苷酸组合。或者,可作为一组短的、重叠的、寡核苷酸来合成整个可变区,并通过PCR扩增来组合以产生整个合成的可变区克隆。该过程具有某些优势,例如清除或包含特定的限制位点,或者优化特定的密码子。

[0316] 使用来自杂交瘤的重链和轻链核苷酸序列的转录物来设计重叠组的合成寡核苷酸以产生具有与天然序列相同氨基酸编码能力的合成V序列。

[0317] 合成的重链和 κ 链序列可以如下三种方式不同于天然序列:重复的核苷酸碱基串被中断以促进寡核苷酸合成和PCR扩增;根据Kozak规则(Kozak,1991,J.Biol.Chem.266:19867-19870)并入最佳的翻译起始位点;以及在翻译起始位点的上游设计HindIII位点。

[0318] 对于重链和轻链可变区,优化的编码和对应的非编码链序列大约在对应的非编码寡核苷酸的中点处被分解成30~50个核苷酸。因此,对于每条链,所述寡核苷酸可被组装成为跨越150~400个核苷酸区段的重叠双链组。随后将汇集池(pool)用作模板以产生150~400个核苷酸的PCR扩增产物。一般来说,单个可变区核苷酸组将被分解成两个汇集池,其被分别扩增以生成两个重叠的PCR产物。随后通过PCR扩增将这些重叠的产物组合以形成完整的可变区。还可在PCR扩增中理想地包括重链或轻链恒定区的重叠片段以生成很容易被克隆到表达载体构建体中的片段。

[0319] 随后将所重建的嵌合化的或人源化的重链和轻链可变区与克隆的启动子、前导、翻译起始、恒定区、3'非翻译、聚腺嘌呤和转录终止序列组合以形成表达载体构建体。重链和轻链表达构建体可组合到单个载体中,共转染、先后转染或分别转染到宿主细胞中,随后使所述宿主细胞融合形成表达这两个链的宿主细胞。描述了用于构建人IgG κ 表达载体的质粒。可这样构建所述质粒,以使PCR扩增的V重链和V κ 轻链cDNA序列可被用于重新构建完整的重链和轻链小基因(minigene)。这些质粒可被用于完整地表达人或嵌合IgG1, κ 或IgG4, κ 抗体。可构建类似的质粒用于表达其他重链同种型,或用于表达包含 λ 轻链的抗体。

[0320] 因此,在本发明的另一方面中,使用本发明抗CLDN6抗体的结构特征以产生结构相关的人源化抗CLDN6抗体,其保持至少一种本发明抗体的功能特性(例如,与CLDN6结合)。更具体地说,小鼠单克隆抗体的一个或多个CDR区可与已知的人框架区和CDR重组地组合以产生本发明的其他重组设计的人源化抗CLDN6抗体。

[0321] 与表达抗原之细胞的结合

[0322] 使用标准的结合测定(例如,实施例下列出的测定(例如,ELISA、Western印迹、免疫荧光和流式细胞术分析)),可测定抗体与CLDN6结合的能力。

[0323] 分离和表征抗体

[0324] 为纯化抗CLDN6抗体,可使所选择的杂交瘤生长于两升的旋转瓶(spinner-flask)中用于单克隆抗体的纯化。或者,可在基于透析的生物反应器中产生抗CLDN6抗体。可过滤上清液,(如果必要的话)浓缩,随后用蛋白质G-琼脂糖凝胶(sepharose)或蛋白质A-琼脂糖凝胶进行亲和层析。可通过凝胶电泳和高效液相色谱验证被洗脱的IgG以确保纯度。缓冲溶液可更换为PBS,并且可使用1.43的消光系数通过OD280测定浓度。可将单克隆抗体分装并储存于-80℃。

[0325] 为了测定所选择的抗CLDN6单克隆抗体是否与独特的表位结合,可使用位点定向诱变或多位点定向诱变。

[0326] 同种型测定

[0327] 为测定纯化抗体的同种型,可用多种商业化试剂盒(例如,Zymed,Roche Diagnostics)进行同种型ELISA。可用抗小鼠Ig包被微滴定板的孔。封闭之后,使所述板与单克隆抗体或纯化的同种型对照在环境温度下反应两小时。随后,可使所述孔与小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG3、IgA或小鼠IgM特异性的过氧化物酶缀合的探针反应。清洗之后,可用ABTS底物(1mg/ml)显色,并分析405~650的OD。或者,可按照制造商的描述使用IsoStrip小鼠单克隆抗体同种型试剂盒(Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit)(Roche, Cat.No.1493027)。

[0328] 流式细胞术分析

[0329] 为了证明经免疫小鼠的血清中存在抗CLDN6抗体或者单克隆抗体与表达CLDN6的活细胞相结合,可使用流式细胞术。可将天然或转染后表达CLDN6的细胞系和缺乏CLDN6表达的阴性对照(在标准生长条件下生长)与多种浓度的杂交瘤上清液或含有1%FBS的PBS中的单克隆抗体混合,并可在4℃下孵育30分钟。清洗之后,可在与一抗染色相同的条件下使APC或Alexa647标记的IgG抗体与结合了CLDN6的单克隆抗体结合。利用光和侧向散射特性对单种活细胞进行圈门,可用FACS仪通过流式细胞术分析样品。为了在单次测量中从非特异性的结合物中区分CLDN6特异性的单克隆抗体,可应用共转染的方法。瞬时转染编码CLDN6的质粒,并可按照上文中的描述对荧光标志物进行染色。与抗体染色的细胞相比,可在不同的荧光通道中检测经转染的细胞。因为大多数经转染的细胞表达两种转基因,CLDN6特异性的单克隆抗体优先与表达荧光标志物的细胞结合,而非特异性抗体以与非转染细胞相当的比率结合。除了流式细胞术测定之外或替代该测定,可使用应用荧光显微镜的替代测定。可按照上文的描述准确地对细胞进行染色,并通过荧光显微镜检测。

[0330] 免疫荧光显微镜检查

[0331] 为了证明经免疫小鼠的血清中存在抗CLDN6抗体或单克隆抗体与表达CLDN6的活细胞结合,可使用免疫荧光显微镜分析。例如,在标准生长条件下,在补充有10%胎牛血清(fetal calf serum,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,使自然地或转染之后表达CLDN6的细胞系和缺乏CLDN6表达的阴性对照生长于腔式载玻片(chamber slide)中。可随后将细胞与甲醇或多聚甲醛固定,或者不处理。随后,可使细胞与抗CLDN6的单克隆抗体在25℃下反应30分钟。清洗之后,可使细胞与Alexa555标记的抗小鼠IgG二抗(分子探针)在相同的条件下反应。可随后通过荧光显微镜检查细胞。

[0332] 当用甲醇固定或用多聚甲醛固定并用曲通X-100透化细胞之后,可观察细胞中的

总CLDN6水平。可在活细胞和未透化的多聚甲醛固定的细胞中检测CLDN6的表面定位。通过用紧密连接标志物(例如ZO-1)共染色,可分析CLDN6与紧密连接的其他靶向。此外,可检测抗体结合的作用和CLDN6在细胞膜中的定位。

[0333] Western印迹

[0334] 还可通过Western印迹测试抗CLDN6 IgG与CLDN6抗原的反应性。简单地说,可制备来自表达CLDN6之细胞的细胞提取物和合适的阴性对照,并进行十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳之后,所分离的抗原将被转移至硝酸纤维素膜,封闭,用要测试的单克隆抗体探查。可使用抗小鼠IgG过氧化物酶检测IgG结合,并用ECL底物显色。

[0335] 免疫组织化学

[0336] 可通过以技术人员公知的方式(例如,使用来自非癌组织或癌组织样品的多聚甲醛或丙酮固定的冰冻切片或用多聚甲醛固定的石蜡包埋的组织切片,所述样品获自常规外科手术过程中的患者或者获自用自然地或转染之后表达CLDN6之细胞系接种的携带异种植肿瘤的小鼠)进行免疫组织化学来进一步测试抗CLDN6小鼠IgG与CLDN6抗原的反应性。对于免疫染色,可孵育与CLDN6反应的抗体,随后根据供应商的使用说明用辣根过氧化物酶级合的山羊抗小鼠或山羊抗兔抗体(DAKO)孵育。

[0337] 抗体的体外吞噬和细胞杀伤活性

[0338] 除了与CLDN6特异性地结合,可测试抗CLDN6抗体介导吞噬和杀伤表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的能力。在体内模型中筛选之前,单克隆抗体体外活性的测试将提供初始筛选。

[0339] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC):

[0340] 简单地说,可通过Ficoll Hypaque密度离心纯化来自健康供体的多形核细胞(polymorphonuclear cell, PMN)、NK细胞、单核细胞、单个核细胞或其他效应细胞,随后裂解所污染的红细胞。可将经清洗的效应细胞悬于补充有10%热灭活的胎牛血清或者作为替代地补充有5%热灭活的人血清的PRMI中,以多种效应细胞对靶细胞的比例与用⁵¹Cr标记的表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的靶细胞混合。或者,可以用荧光增强的配体(BATDA)标记靶细胞。可通过荧光计测量从死细胞释放的锕与增强的配体的高度荧光的螯合物。另一种作为替代的技术可利用萤光素酶转染靶细胞。所添加的荧光黄(lucifer yellow)随后可仅被活细胞氧化。可随后以多种浓度添加纯化的抗CLDN6 IgG。可使用无关的人IgG作为阴性对照。测定可在37°C下进行4至20小时,这取决于所使用的效应细胞。可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溶解。或者,荧光黄氧化所产生的发光可以是活细胞的量度。

[0341] 还可在多种组合中测试抗CLDN6单克隆抗体以确定细胞溶解是否被多种单克隆抗体所加强。

[0342] 补体依赖性细胞毒作用(CDC):

[0343] 使用多种已知的技术可测试单克隆的抗CLDN6抗体介导CDC的能力。例如,可以以技术人员已知的方式从血液中获得用于补体的血清。为了测定mAb的CDC活性,可使用不同的方法。例如可测量⁵¹Cr释放或可使用碘化丙啶(propidium iodide, PI)排除测定来评价升高的膜通透性。简单地说,可清洗靶细胞,并且可用多种浓度的mAb在室温下或在37°C下孵

育 5×10^5 /ml靶细胞10~30分钟。可随后添加血清或血浆至终浓度为20% (v/v),并在37°C下孵育细胞20~30分钟。可将来自每个样品的所有细胞添加至FACS管中的PI溶液中。随后可通过使用FACSArray的流式细胞术分析立即分析该混合物。

[0344] 在作为替代的测定中,可在黏附的细胞上测定CDC的诱导。在该测定的一个实施方案中,在测定前24小时,在组织培养平底微滴定板中以 3×10^4 /孔的密度接种细胞。次日,除去生长培养基,并以三个重复用抗体孵育所述细胞。用生长培养基或含有0.2%皂苷的生长培养基孵育对照细胞用于分别测定背景裂解和最大裂解。在室温下孵育20分钟之后,除去上清液,并向细胞中添加DMEM(预热至37°C)中的20% (v/v)人血浆或血清,并在37°C下再孵育20分钟。将来自每个样品的所有细胞添加至碘化丙啶溶液(10 μ g/ml)中。随后,用含有2.5 μ g/ml溴化乙锭的PBS替换上清液,并使用Tecan Satire在600nm测量以520nm激发后的荧光发射。按以下计算比裂解(specific lysis)的百分比:%比裂解=(荧光样品-荧光背景)/(荧光最大裂解-荧光背景) $\times 100$ 。

[0345] 单克隆抗体抑制细胞增殖

[0346] 为测试启动凋亡的能力,可例如在37°C下将单克隆的抗CLDN6抗体与CLDN6阳性肿瘤细胞或转染了CLDN6的肿瘤细胞一起孵育约20小时。可收获细胞,在膜联蛋白-V(Annexin-V)结合缓冲液(BD biosciences)中清洗,与FITC或APC缀合的膜联蛋白V(BD biosciences)一起在黑暗中孵育15分钟。将来自每个样品的所有细胞添加至FACS管中的PI(10 μ g/ml于PBS中)溶液中,立即通过流式细胞术(见上文)进行评价。或者,可用市售的试剂盒检测单克隆抗体对细胞增殖的总体抑制。DELTA细胞增殖试剂盒(Perkin-Elmer, Cat.No.AD0200)是基于对微板中增殖细胞的DNA合成过程中5-溴-2'-脱氧尿苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)参入之测量的非同位素免疫测定。使用铈标记的单克隆抗体检测所参入的BrdU。为允许抗体检测,使用固定液(fix solution)固定细胞并使DNA变性。洗掉未结合的抗体,并向从标记的抗体解离到溶液中的铈离子中添加DELTA诱导剂,其中它们与DELTA诱导剂的组分形成高度荧光的螯合物。所测得的荧光(在检测中应用时间分辨荧光测定)与每个孔的细胞中DNA的合成成比例。

[0347] 临床前研究

[0348] 可在体内模型中(例如,在以(可能在转染之后)表达CLDN6的细胞系接种的携带异种移植肿瘤的免疫缺陷的小鼠中)测试与CLDN6结合的单克隆抗体以测定其在控制表达CLDN6之肿瘤细胞的生长中的效力。

[0349] 在将表达CLDN6之肿瘤细胞异种移植到免疫受损的小鼠或其他动物中之后可使用本发明的抗体进行体内研究。可向无肿瘤小鼠施用抗体,随后注射肿瘤细胞以测量抗体预防肿瘤形成或肿瘤相关症状的作用。可向荷瘤小鼠施用抗体以测定每种抗体降低肿瘤生长、转移或肿瘤相关症状的治疗效果。抗体应用可与其他物质(例如,抑制细胞的药物、生长因子抑制剂、细胞周期阻断剂、血管发生抑制剂或其他抗体)的应用相组合以测定组合的协同效力和潜在毒性。为分析本发明抗体所介导的毒性副作用,可用抗体或对照试剂接种动物,并彻底地研究可能与CLDN6抗体治疗相关的症状。体内应用CLDN6抗体的可能的副作用尤其地包括表达CLDN6之组织(包括胎盘)中的毒性。在人和其他物种(例如,小鼠)中识别CLDN6的抗体尤其地可用于预防在人中应用单克隆CLDN6抗体所介导的潜在副作用。

[0350] 表位作图

[0351] 可按照“Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9和“Epitope Mapping: A Practical Approach” Practical Approach Series, 248 by Olwyn M.R. Westwood, Frank C. Hay中的详细描述来进行本发明抗体所识别表位的作图。

[0352] I. 与CLDN6结合的双特异性/多特异性分子

[0353] 在本发明的另一个实施方案中, 抗CLDN6抗体可被衍生化或与其他功能分子(例如, 其他肽或蛋白质(例如, Fab' 片段))相连接以生成与多个结合位点或目标表位结合的双特异性或多特异性分子。例如, 本发明的抗体可与一个或多个其他结合分子(例如, 其他抗体、肽或结合模拟物)功能性连接(例如, 通过化学偶连、基因融合、非共价缔合等)。

[0354] 因此, 本发明包括双特异性和多特异性分子, 其包含至少一个对CLDN6的第一结合特异性和对第二目标表位的第二结合特异性。在本发明的一个具体实施方案中, 所述第二目标表位是Fc受体(例如, 人Fc- γ RI (CD64) 或人Fc- α 受体 (CD89), 或者T细胞受体(例如, CD3)。因此, 本发明包括能够与表达Fc- γ R、Fc- α R或Fc- ϵ R之效应细胞(例如, 单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞(PMN))以及与表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之靶细胞相结合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CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞靶向效应细胞, 并且可触发Fc受体介导的效应细胞活性, 例如吞噬表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞、抗体依赖性细胞的细胞毒作用(ADCC)、细胞因子释放或生成超氧阴离子。

[0355] 本发明的双特异性和多特异性分子还可包括除了抗Fc结合特异性和抗CLDN6结合特异性之外的第三结合特异性。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, 例如与参与细胞毒活性并因而升高对靶细胞的免疫应答之表面蛋白质相结合的分子。“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)相结合的配体, 并因而导致增强对Fc受体或靶细胞抗原的结合决定簇作用。“抗增强因子部分”可与Fc受体或靶细胞抗原结合。或者, 所述抗增强因子部分可与这样的实体结合, 所述实体不同于以第一和第二结合特异性结合的实体。例如, 所述抗增强因子部分可与细胞毒T细胞(例如, 通过CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1或导致升高对靶细胞之免疫应答的其他免疫细胞)相结合。

[0356] 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作为结合特异性的至少一个抗体(包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或单链Fv)。所述抗体还可以是轻链或重链链二聚体或其任何最小片段(例如, Fv或Ladner et al., US 4,946,778中描述的单链构建体)。所述抗体还可以是US2003/0118592和US 2003/0133939中公开的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白质。

[0357] 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对存在于效应细胞表面上的Fc- γ R或Fc- α R的结合特异性, 以及对靶细胞抗原(例如, CLDN6)的第二结合特异性。

[0358] 在一个实施方案中, 通过单克隆抗体提供对Fc受体的结合特异性, 所述结合不被人免疫球蛋白G(IgG)所阻断。本文中使用的术语“IgG受体”是指位于1号染色体上的八个 γ -链基因中的任一个。这些基因编码总共12个跨膜或可溶的受体同种型, 其分为三个Fc- γ 受体类别: Fc- γ RI (CD64)、Fc- γ RII (CD32)和Fc- γ RIII (CD 16)。在一个优选的实施方案中, 所述Fc- γ 受体是人高亲和力Fc- γ RI。

[0359] 在另一些优选的实施方案中,通过与IgA受体(例如,Fc- α 受体(Fc- α RI(CD89)))结合的抗体提供对Fc受体的结合特异性,所述结合优选地不被人免疫球蛋白A(IgA)所阻断。术语“IgA受体”意在包括位于19号染色体上的一个 α -基因(Fc- α RI)的基因产物。已知该基因编码多种55至110kDa的选择性剪接的膜同种型。Fc- α RI(CD89)组成性地表达在单核细胞/巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞上,但不表达在非效应细胞群上。Fc- α RI对IgA1和IgA2都具有中度亲和力,其在暴露于细胞因子(例如,G-CSF或GM-CSF)后升高(Morton,H.C.et al.(1996)Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。已描述了四种Fc- α RI特异性的单克隆抗体(确认为A3、A59、A62和A77),其在IgA配体结合结构域以外结合Fc- α RI(Monteiro,R.C.et al.(1992)J.Immunol.148:1764)。

[0360] 在另一个实施方案中,所述双特异性分子是包含两个根据本发明的具有互补功能活性的单克隆抗体,例如,一个抗体主要通过诱导CDC发挥作用,而另一个抗体主要通过诱导凋亡发挥作用。

[0361] 本文中使用的“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。用于本发明的优选的抗体在不被内源性免疫球蛋白所结合的位点与效应细胞的Fc受体结合。

[0362] 本文中使用的术语“效应细胞”是指参与免疫应答之效应期(而不是免疫应答的识别和激活期)的免疫细胞。示例性的免疫细胞包括骨髓或淋巴来源的细胞,例如淋巴细胞(例如,B细胞和T细胞(包括细胞毒T细胞(cytolytic T cell,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、嗜中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。一些效应细胞表达特定的Fc受体并且执行特定的免疫功能。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的细胞毒作用(ADCC),例如嗜中性粒细胞能够诱导ADCC。例如,表达FcR的单核细胞、巨噬细胞参与对靶细胞的特异性杀伤并且将抗原呈递至免疫系统的其他组分,或者与呈递抗原的细胞结合。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。可通过体液因子(例如细胞因子)调节效应细胞上特定FcR的表达。例如,已发现干扰素 γ (IFN- γ)上调Fc- γ RI的表达。这种增强的表达升高荷有Fc- γ RI之细胞对靶标的细胞毒活性。效应细胞可吞噬靶抗原或靶细胞或使其溶解。

[0363] “靶细胞”应当意为对象(例如,人或动物)中可被本发明抗体所靶向的任何不合需要的细胞。在一些优选的实施方案中,所述靶细胞是表达或过表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞。表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞通常包括肿瘤细胞。

[0364] II. 免疫缀合物

[0365] 在另一个方面中,本发明以抗CLDN6抗体与治疗部分或治疗剂(例如,细胞毒素、药物(例如,免疫抑制剂)或放射性同位素)缀合为特征。这样的缀合物在本文中称为“免疫缀合物”。包含一个或多个毒素的免疫缀合物被称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害并且尤其是杀伤细胞的任何药剂。实例包括泰素、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽醌二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢鞣酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素,及其类似物或同系物。

[0366] 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(例如,甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂(例如,氮芥、塞替派、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链佐星、丝裂霉素C和顺式-二氯二氨铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(例如,柔红霉素(以前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素类(例如,更生霉素(以前称为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和安曲霉素(anthracycline, AMC))和抗微管剂(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剂或放射毒剂。在另一个实施方案中,所述治疗剂是免疫抑制剂。在另一个实施方案中,所述治疗剂是GM-CSF。在一个优选的实施方案中,所述治疗剂是多柔比星、顺铂、硫酸博来霉素、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺或蓖麻毒蛋白A(ricin A)。

[0367] 本发明的抗体还可与放射性同位素(例如,碘-131、钷-90或铟-111)缀合以生成用于治疗CLDN6相关疾病(例如,癌症)的细胞毒性的放射性药品。本发明的抗体缀合物可用于修饰给定的生物应答,并且药物部分不被解释为限于经典的化疗剂。例如,所述药物部分可以是具有所需生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可包括例如酶活性的毒素或其活性片段,例如相思豆毒蛋白(abrin)、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,例如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或者生物应答调节剂,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")或其他生长因子。

[0368] 用于将这样的治疗部分与抗体缀合的技术是公知的,参见例如Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp.243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp.475-506 (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 et al. (eds.), pp.303-16 (Academic Press 1985), 和 Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。

[0369] 在另一个实施方案中,将根据本发明的抗体与接头-螯合剂(linker-chelator)(例如,替伊莫单抗(tiuxetan))连接,这使得抗体与放射性同位素缀合。

[0370] III. 药物组合物

[0371] 在另一个方面中,本发明提供含有本发明抗体之一或之组合的组合物(例如,药物组合物)。可用可药用载剂或稀释剂以及根据常规技术(例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995中所公开的技术)的任何其他已知辅料或赋形剂配制所述药物组合物。在一个实施方案中,所述组合物包含以不同机制发挥作用的本发明的多种(例如,两种或更多种)分离的

抗体的组合,例如,主要通过诱导CDC而发挥作用的一种抗体与主要通过诱导凋亡而发挥作用的另一种抗体的组合。

[0372] 还可在组合治疗中(即与其他药剂组合)施用本发明的药物组合物。例如,所述组合治疗可包括具有至少一个抗炎剂或至少一个免疫抑制剂的本发明组合物。在一个实施方案中,这样的治疗剂包括一种或更多种抗炎剂,例如甾体药物或NSAID(非甾体抗炎药)。优选的药剂包括例如阿司匹林和其他水杨酸盐/酯、Cox-2抑制剂(例如,罗非昔布(万络(Vioxx))和塞来昔布(西乐葆(Celebrex)))、NSAID,例如布洛芬(美林(Motrin)、艾德维尔(Advil))、非诺洛芬(礼来痛保(Nalfon))、萘普生(消痛灵(Naprosyn))、舒林酸(奇诺力(Clinoril))、双氯芬酸(扶他林(Voltaren))、吡罗昔康(费定(Feldene))、酮洛芬(奥鲁地(Orudis))、二氟尼柳(二氟尼柳(Dolobid))、萘丁美酮(瑞力芬(Relafen))、依托度酸(罗丁(Lodine))、奥沙普秦(噁丙嗪(Daypro))和吲哚美辛(消炎痛(Indocin))。

[0373] 在另一个实施方案中,这样的治疗剂包括引起调节T细胞的耗尽或功能失活的药剂,例如低剂量的环磷酰胺(cyclophosphamid)、抗CTLA4抗体、抗IL2或抗IL2受体抗体。

[0374] 在另一个实施方案中,这样的治疗剂包括一种或更多种化疗剂,例如泰素衍生物、泰素帝、吉西他滨、5-氟尿嘧啶、多柔比星(阿霉素)、顺铂(普雷蒂诺(Platinol))、环磷酰胺(Cytoxan、Procytox、Neosar)。在另一个实施方案中,可以与化疗剂组合施用本发明的抗体,所述化疗剂在患有癌症(例如,本文中描述的癌症类型)的患者中优选地表现出治疗效果。

[0375] 在另一个实施方案中,可与放射治疗和/或自体外周干细胞或骨髓移植联合施用本发明的抗体。

[0376] 本文中使用的“可药用载剂”包括生理学上相容的任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂等。优选地,所述载剂适合静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如,通过注射或输注)。根据施用途径,活性化合物(例如,抗体、双特异性和多特异性分子)可被包被于这样的材料中,所述材料保护所述化合物免受酸和可失活所述化合物之其他天然条件的作用。

[0377] “可药用盐”是指保持母体化合物的所需生物活性且不赋予任何不需要的毒理学作用(参见例如Berge, S.M, et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)的盐。

[0378] 所述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性无机酸的盐,所述无机酸例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等,以及源自无毒有机酸的盐,所述有机酸例如脂肪族一和二羧酸、苯基取代的烷酸、羟基烷酸、芳香酸、脂肪族和芳香族磺酸等。碱加成盐包括源自碱土金属(例如,钠、钾、镁、钙等),以及来自无毒性的有机胺(例如,N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等)的盐。

[0379] 可通过现有技术中已知的多种方法施用本发明的组合物。技术人员会理解,施用途径和/或方式会根据所需的结果而不同。可与载剂制备活性化合物,所述载剂会保护所述化合物免于迅速释放,例如控释制剂(包括植入剂、经皮贴剂和微胶囊递送系统)。可使用可生物降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这种制剂的方法是本领域技术人员广泛知晓的。参见例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker,

Inc., New York, 1978。

[0380] 为了以某些施用途施用本发明的化合物,有必要用防止其失活的材料包被所述化合物或与所述化合物共施用。例如,可在合适的载剂(例如,脂质体或稀释剂)中向对象施用所述化合物。可药用稀释剂包括盐水和缓冲溶液。脂质体包括水包油包水型CGF乳剂,以及常规脂质体(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

[0381] 可药用载剂包括无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。使用这样的介质和药剂用于药物活性物质是现有技术中已知的。除非常规介质或药剂与活性化合物不相容,均考虑将其用于本发明的药物组合物中。还可将补充活性化合物并入所述组合物中。

[0382] 治疗组合物通常必须是无菌的,并且在制造和储存条件下是稳定的。可作为溶液、微乳剂、脂质体或适于高药物浓度的其他有序结构来配制所述组合物。所述载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。可例如通过使用包衣(例如,卵磷脂),通过维持所需的颗粒大小(在分散体的情况中)以及通过使用表面活性剂来维持合适的流动性。在很多情况下,所述组合物中会优选地包含等渗剂(例如,糖、多元醇(例如,甘露醇、山梨糖醇或氯化钠)。可通过在所述组合物中包含延缓吸收的试剂(例如,单硬脂酸盐和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0383] 可通过以所需的量将活性化合物并入合适的溶剂(其具有上文中所列举成分之一或之组合)来按需要制备无菌可注射溶液,随后无菌微孔过滤。

[0384] 一般来说,通过将活性化合物并入无菌载剂来制备分散体,所述载剂含有基本分散介质和所需的上文中所列举的其他成分。在无菌粉末用于制备无菌可注射溶液的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),这产生来自其之前经无菌过滤之溶液的活性成分加任何附加的所需成分的粉末。

[0385] 调节剂量方案以提供最佳的所需的应答(例如,治疗性应答)。例如,可施用单次推注,可随时间施用多个分开的剂量,或可按照治疗情况之紧急程度所指示的那样成比例地降低或升高剂量。以剂量单位形式配制胃肠外组合物对于方便施用和剂量均匀度来说是尤其有利的。本文中使用的剂量单位形式是指适合作为单一剂量用于要治疗之对象的物理上离散的单位;每个单位含有与所需药物载剂联合的经计算产生所需治疗效果的预先确定量的活性化合物。

[0386] 可药用抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚(butylated hydroxyanisole, BHA)、丁羟甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;以及(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0387] 对于治疗性组合物,本发明的制剂包括合适的用于经口、经鼻、表面(包括口腔和舌下)、经直肠、经阴道和/或肠胃外施用的组合物。所述制剂可方便地以单位剂型存在并且可通过药学领域中已知的任何方法来制备。可与载剂材料组合以产生单个剂型的活性成分的量会根据要治疗的对象和具体的施用方式而不同。可与载剂材料组合以产生单个剂型的活性成分的量通常会是在产生治疗作用的组合物的量。

[0388] 适于经阴道施用的本发明的制剂还包括以下含有现有技术中已知的合适载剂的

制剂:子宫托(pessary)、塞子(tampon)、乳膏剂、凝胶剂、贴剂、糊剂、泡沫剂、喷雾剂。本发明组合物的用于表面或经皮施用的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。可在无菌条件下将活性化合物与可药用载剂以及与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合。

[0389] 本文中使用的词语“肠胃外施用”和“肠胃外地使用”意为不同于肠胃和表面施用的施用方式,通常通过注射施用,所述注射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、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0390] 可用于本发明药物组合物的合适的水或非水载剂的实例包括水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(例如,橄榄油)和可注射的有机酯(例如,油酸乙酯)。可例如通过使用包衣材料(例如,卵磷脂),通过维持所需的颗粒大小(在分散体的情况中)以及通过使用表面活性剂来维持合适的流动性。

[0391] 这些组合物还可含有辅料,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过灭菌过程以及通过包含多种抗菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚山梨酸等)来确保防止微生物的存在。还可在所述组合物中理想地包含等渗剂,例如糖、氯化钠等。此外,可通过包含延缓吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来产生可注射药物形式的延长吸收。

[0392] 不管选择何种施用途径,通过本领域技术人员已知的常规方法,可将可以以合适的水化形式使用的本发明化合物和/或本发明组合物配制成可药用剂型。

[0393] 本发明组合物中活性成分的实际剂量水平可以不同,以获得对于具体患者、组合物和施用方式来说有效达到所需治疗应答而对所述患者没有毒性之量的活性成分。所选择的剂量水平将取决于多种药动学因素,包括所使用的本发明具体组合物的活性,施用途径,施用时间,所使用的具体化合物的排泄速率,治疗的持续时间,与所使用的具体组合物组合使用其他药物、化合物和/或物质,年龄,性别,体重,状况,一般健康和被治疗患者之前的病史,以及医学领域中公知的类似因素。

[0394] 具有本领域普通技能的医生或兽医可很容易地确定所需的药物组合物的有效量并开处方。例如,医生或兽医可使所述药物组合物中使用的本发明化合物的剂量始于低于达到所需治疗作用所需要的水平,并逐渐升高剂量,直至达到所需的作用。一般来说,本发明组合物的合适日剂量会是这样的化合物量,其是有效产生治疗作用的最低剂量。这样的有效剂量通常会取决于上文中所描述的因素。所述施用优选地是静脉内、肌内、腹膜内或皮下施用,优选地向临近靶标的位置施用。如果需要的话,可在整日中,以合适的间隔,作为2、3、4、5、6或更多个亚剂量,任选地以单位剂型,分别施用治疗性组合物的有效日剂量。虽然可单独施用本发明的化合物,优选地作为药物制剂(组合物)施用所述化合物。

[0395] 在一个实施方案中,可通过输注(优选长时间(例如,超过24小时)缓慢连续输注)施用本发明的抗体,以降低毒性的副作用。还可以通过在2至24小时(例如,2至12小时)的时间段内连续输注来进行所述施用。可按需要重复这样的方案一次或更多次,例如6个月或12个月之后。施用后可通过使用靶向抗CLDN6抗体的抗特应抗体(anti-idiotypic antibody)在生物样品中测量循环单克隆抗CLDN6抗体的量来确定或调节剂量。

[0396] 在另一个实施方案中,通过维持治疗(例如,每周1次,为期6个月或更长)施用所述抗体。

[0397] 在另一个实施方案中,可通过这样的方案施用根据本发明的抗体,所述方案包括一次输注抗CLDN6抗体,随后输注与放射性同位素缀合的抗CLDN6抗体。例如7至9天之后可重复所述方案。

[0398] 在本发明的一个实施方案中,以脂质体制成本发明的治疗性化合物。在一个更优选的实施方案中,所述脂质体包括靶向部分。在一个最优的实施方案中,通过向临近所需区域(例如,肿瘤的位置)的位置推注注射来递送脂质体中的治疗性化合物。所述组合物必须是易于注射器注射的某种程度上的流体。它在制造和储存的条件下必须是稳定的,并且必须防止微生物(例如,细菌和真菌)的污染作用而保存。

[0399] 在另一个实施方案中,可以这样配制本发明的抗体以防止或降低其转运通过胎盘。这可通过现有技术中已知的方法(例如,通过抗体的聚乙二醇化或通过使用F(ab)₂'片段)来进行。还可参照"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; 和参照"Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74:279-283。

[0400] 可通过客观的肿瘤响应(其可以是完全的或部分的)来测量肿瘤治疗的“治疗有效剂量”。完全响应(complete response, CR)被定义为没有疾病的临床的、放射学的或其他证据。部分响应(partial response, PR)来自降低总肿瘤大小超过50%。进展的中位时间是表征客观肿瘤响应之持久性的量度。

[0401] 还可通过稳定肿瘤之进展的能力来测量肿瘤治疗的“治疗有效剂量”。可在预测在人肿瘤中之效力的动物模型系统中评价化合物抑制肿瘤的能力。或者,可通过技术人员已知的体外测定,通过检测化合物抑制细胞生长的能力或检测凋亡来评价化合物的这种特征。治疗有效量的治疗性化合物可降低肿瘤大小,或者以其他方式在对象中改善症状。本领域技术人员能够根据这样的因素测定所述量:对象的身材大小、对象症状的严重程度以及所选择的具体组合物或施用途径。

[0402] 所述组合物必须是无菌的并且所述组合物是可通过注射器递送之程度的流体。除了水,载剂可以是等渗缓冲盐水溶液、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚丙二醇等)及其合适的混合物。可例如通过使用包衣(例如,卵磷脂),通过维持所需的颗粒大小(在分散体的情况中)以及通过使用表面活性剂来维持合适的流动性。在很多情况下,在所述组合物中优选地包含等渗剂,例如糖、多元醇(例如,甘露醇或山梨糖醇)和氯化钠。可通过在所述组合物中包含延缓吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来产生可注射组合物的长期吸收。

[0403] 如上文中所描述的那样,当由惰性稀释剂或可吸收的可食用载剂合适地保护所述活性化合物时,可经口施用所述化合物。

[0404] IV. 本发明的应用和方法

[0405] 本发明的抗体(包括本文中描述的免疫缀合物、双特异性/多特异性分子、组合物和其他衍生物)具有多种治疗效用,涉及与表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞相关疾病的治疗。例如,可向培养物中的细胞(例如,体外或离体)或向人对象(例如,体内)施用所述抗体以治疗或预防多种疾病,例如本文中描述的那些疾病。优选的对

象包括患有这样疾病的人患者:所述疾病可通过杀伤患病的细胞(尤其是以与正常细胞相比改变的CLDN6表达模式和/或改变的CLDN6与细胞表面缔合模式为特征的细胞)而纠正或改善。

[0406] 例如,在一个实施方案中,本发明的抗体可用于治疗患有肿瘤发生性疾病(例如,以存在肿瘤细胞为特征的疾病,所述肿瘤细胞表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征)的对象。可被治疗和/或预防的肿瘤发生性疾病的实例包括所有表达CLDN6的癌和肿瘤实体,包括本文中描述的那些。

[0407] 根据本发明描述的药物组合物 and 治疗方法还可用于免疫或接种以预防本文中描述的疾病。

[0408] 在另一个实施方案中,本发明的抗体可用于检测CLDN6的水平或CLDN6的具体形式,或者在其膜表面上含有CLDN6之细胞的水平,所述水平可随后与某些疾病或疾病症状(如上文所述)相联系。或者,所述抗体可用于耗尽表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的功能或与其相互作用,因而表明这些细胞是重要的疾病中介物。这可通过将样品和对照样品与抗CLDN6抗体在允许所述抗体与CLDN6之间形成复合物的条件下相接触而实现。在所述样品和对照样品(即,参比样品)中检测和比较抗体与CLDN6之间所形成的任何复合物。

[0409] 可首先测试本发明的抗体与体外治疗或诊断应用相关的结合活性。例如,可按照本文中的描述使用流式细胞术测定法来测试所述抗体。

[0410] 本发明的抗体可用于体内或体外诱导一种或更多种以下生物活性:抑制表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的生长和/或分化;杀伤表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征的细胞;在效应细胞存在下介导表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的吞噬或ADCC;在补体存在下介导表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的吞噬或ADCC;介导表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的凋亡;诱导同质性黏附;和/或结合CLDN6之后诱导转位到脂膜筏(lipid raft)中。

[0411] 在一个具体的实施方案中,体内或体外使用所述抗体以治疗、预防或诊断多种CLDN6相关疾病。除此之外,CLDN6相关疾病的实例还包括癌症,例如本文中描述的癌症。

[0412] 如上文所述,可与一种或其他更多种的治疗剂(例如,细胞毒剂、放射毒剂、抗血管发生剂或和免疫抑制剂)共施用本发明的抗CLDN6抗体以降低对抗本发明抗体之免疫应答的诱导。所述抗体可与所述剂(作为免疫复合物)相连接或者可与所述剂分别施用。在后一种情况(分别施用)下,可在所述剂之前、之后施用或与所述剂同时施用所述抗体,或者可与其他已知的治疗(例如,抗癌治疗(例如,放疗))共施用所述抗体。除此之外,这样的治疗剂还包括抗肿瘤剂(如上文所列)。与化疗剂共施用本发明的抗CLDN6抗体提供通过不同机制运作而产生对肿瘤细胞之细胞毒作用的两种抗癌剂。这样的共施用可解决由于发生对药物的抗性 or 肿瘤细胞抗原性的改变而引起的问题,其可导致它们不与所述抗体反应。

[0413] 在补体存在下,还可使用具有补体结合位点(例如,IgG1、2或3或者IgM中与补体结合的部分)的本发明组合物(例如,抗体、多特异性和双特异性分子和免疫缀合物)。在一个实施方案中,用本发明的结合剂和合适的效应细胞离体处理包含靶细胞的细胞群可辅之以添加补体或含有补体的血清。通过与补体蛋白结合,可提高对以本发明的结合剂包被的靶

细胞的吞噬。在另一个实施方案中,用本发明的组合物包被的靶细胞还可被补体所溶解。在另一个实施方案中,本发明的组合物不激活补体。

[0414] 还可与补体一起施用本发明的组合物。因此,包含抗体、多特异性或双特异性分子和血清或补体的组合物在本发明的范围之内。这些组合物是有利的,在于所述补体与所述抗体、多特异性或双特异性分子紧邻。

[0415] 或者,可分别施用本发明的抗体、多特异性或双特异性分子以及补体或血清。本发明的组合物与靶细胞的结合可导致CLDN6抗原-抗体复合物转位到细胞膜的质膜筏中。所述转位产生可有效激活和/或增强CDC的高密度的抗原-抗体复合物。

[0416] 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在本发明的范围之内。所述试剂盒还可含有一种或更多种附加的试剂,例如免疫抑制试剂、细胞毒剂或放射毒剂,或者一种或更多种附加的本发明抗体(例如,具有补充活性的抗体)。

[0417] 因此,可向用本发明抗体组合物治疗的患者额外地施用(施用本发明的抗体之前、与其同时或之后)增强或扩大本发明抗体之治疗作用的其他治疗剂(例如,细胞毒或放射毒剂)。

[0418] 在另一些实施方案中,可用(通过例如用细胞因子治疗对象)调节(例如,增强或抑制)Fc- γ 或Fc- α 受体之表达或活性的药剂额外地治疗对象。优选地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)。用于升高本文中描述的抗体和药物组合物之治疗效果的其他重要试剂是 β -葡聚糖(β -glucan),其是支链葡萄糖残基的同多糖,并且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。还可使用生物所产生的 β -葡聚糖片段。优选地,所述 β -葡聚糖是 β (1,3)葡萄糖的聚合物,其中主链葡萄糖单位的至少一些(例如,主链葡萄糖单位的3~6%)具有分支,例如 β (1,6)分支。

[0419] 在一个具体的实施方案中,本发明提供用于在样品中检测CLDN6抗原之存在或者测量CLDN6抗原之量的方法,其包括在允许所述抗体或其部分与CLDN6之间形成复合物的条件下使所述样品和对照药品与特异性结合CLDN6的抗体相接触。随后检测复合物的形成,其中所述样品与对照样品相比,复合形成之间的差异指示所述样品中存在CLDN6抗原。

[0420] 在另一个实施方案中,本发明提供用于体内或体外检测表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的存在或对其量进行定量的方法。所述方法包括(i)向对象施用与可检测标志物缀合的本发明组合物;和(ii)使所述对象暴露于用于检测所述可检测标志物的方法以鉴定含有表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞的区域。

[0421] 上文中描述的方法可尤其地用于诊断CLDN6相关疾病和/或CLDN6转位相关疾病,例如癌疾病。优选地,样品中CLDN6的量高于对照样品中CLDN6的量指示所述样品所来源的对象(尤其是人)中存在CLDN6相关疾病。

[0422] 当用于上文中所描述的方法时,可为本文中描述的抗体提供发挥以下功能的标记物:(i)提供可检测信号;(ii)与第二标记物相互作用以修饰所述第一或第二标记物所提供的可检测信号,例如FRET(荧光共振能量转移,Fluorescence Resonance Energy Transfer);(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),或者(iv)提供捕获部分,例如亲和力、抗体/抗原或离子络合。适合作为标记物的的结构例

如荧光标记物、发光标记物、发色团标记物、放射性同位素标记物、同位素标记物,优选稳定的同位素标记物、同量异位素标记物(isobaric label)、酶标记物、颗粒标记物(尤其是金属颗粒标记物、磁性颗粒标记物、聚合物颗粒标记物)、小有机分子(例如,生物素、受体的配体或结合分子(例如,细胞黏附蛋白或卵磷脂))、可通过使用结合剂检测包含核酸和/或氨基酸残基的标记物序列等。标记物非限制性地包括硫酸钡、碘西他酸、碘番酸、胺碘苯丙酸钙、泛影酸钠、泛影葡胺、甲泛葡胺、酪洋酸钠和放射诊断剂(包括正电子发射体,(例如氟-18和碳-11)、 γ 发射体(例如,碘-123、镓-99m、碘-131和铟-111)、核磁共振核素(例如,氟和钆))。

[0423] 在另一个实施方案中,通过将化合物与抗体相连接,本发明的免疫缀合物可用于将化合物(例如,治疗剂、标记物、细胞毒素、放射毒素、免疫抑制剂等)靶向具有与其表面缔合之CLDN6的细胞。因此,本发明还提供用于离体或体外定位表达CLDN6以及以CLDN6与其细胞表面相缔合为特征之细胞(例如,循环肿瘤细胞)的方法。

[0424] 通过以下实施例进一步举例说明本发明,所述实施例不被解释为限制本发明的范围。

[0425] 实施例

[0426] 本文中描述或以本身已知的和例如在Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Edition(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.中所描述的方式实施本文中使用的技术和方法。除非具体指明,根据制造商的信息实施所有方法(包括试剂盒和试剂的使用)。

[0427] 实施例1:使用实时RT-PCR在正常组织、癌性组织和细胞系中对CLDN6表达进行定量

[0428] 使用RNeasy Mini Kit(Qiagen)从冷冻的组织标本和癌细胞系中提取总细胞RNA,根据制造商的说明,以dT₁₈寡核苷酸为引物用Superscript II(GIBCO/Lifetech)逆转录。通过在30个循环的PCR中扩增p53转录物而测试所获得的cDNA的完整性。以HPRT归一化之后,使用 $\Delta\Delta$ CT计算对CLDN6的表达进行定量。

[0429] 对于每种正常组织类型,测试来自三个个体的组织。在40个循环的RT-PCR之后,仅可在正常组织中检测到痕量的CLDN6转录物。轻度超过表达截断值的唯一正常组织是胎盘。

[0430] 与正常组织相反,我们发现来自卵巢癌(腺癌)、肺癌(NSCLC,在腺癌中具有最高频率和表达水平)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑色素瘤、头颈癌(恶性多形性腺瘤)、肉瘤(滑膜肉瘤和癌肉瘤)、胆管癌、肾细胞癌(透明细胞癌和乳头状癌)、子宫癌以及癌细胞系A2780(卵巢癌)、NIH-OVCAR3(卵巢癌)、HCT-116(结肠癌)、EFO-27(卵巢癌)、CPC-N(SCLC)、NCI-H552(NSCLC)、SNU-1(胃癌)、KATOIII(胃癌)、YAPC(胰腺癌)、AGS(胃癌)、FU97(胃癌)、MKN7(胃癌)。

[0431] 实施例2:使用Western印迹分析对正常组织、癌性组织和细胞系中的CLDN6表达进行定量

[0432] 对于Western印迹分析,使用从以Laemmli裂解缓冲液裂解的细胞中提取的20 μ g总蛋白质。在还原性样品缓冲液(Roth)中稀释提取物,进行SDS-PAGE,随后电转移到PVDF膜(Pa11)上。用与CLDN6(ARP)和 β -肌动蛋白(Abeam)反应的多克隆抗体进行免疫染色,随后通过用辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗(Dako)检测一抗。

[0433] 对于每个正常的组织类型,测试来自多达5个个体的组织裂解液。在所分析的任何正常组织中未检出CLDN6蛋白表达。与正常组织相反,在来自卵巢癌和肺癌的样品中检出了高表达的CLDN6蛋白。在NIH-OVCAR3(卵巢癌)、MKN7(胃癌)、AGS(胃癌)、CPC-N(SCLC)、HCT-116(结肠癌)、FU97(胃癌)、NEC8(睾丸胚胎癌)、JAR(胎盘绒毛膜癌)、JEG3(胎盘绒毛膜癌)、BEWO(胎盘绒毛膜癌)和PA-1(卵巢畸胎瘤)中检出CLDN6表达。

[0434] 实施例3:在正常组织和癌性组织中免疫组织化学(IHC)分析CLDN6表达

[0435] 在加热板(HI 1220,Leica)上以58℃孵育石蜡包埋的组织切片(4μm)1小时。通过RT下在Roticlear(Roth)中孵育载玻片2×10分钟而从切片中除去石蜡。随后,使切片在梯度的醇(99%、2×96%、80%和70%,每次5分钟)中脱水。通过在120℃(15psi(磅每平方英寸))下在10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)+0.05%吐温-20中煮沸载玻片15分钟而进行抗原修复。煮沸载玻片之后直接在PBS中孵育5分钟。在RT下,用MeOH中的0.3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性15分钟。为了避免非特异性结合,用PBS中的10%山羊血清在RT下封闭载玻片30分钟。随后,在4℃下用CLDN6特异性的多克隆抗体(1μg/ml)(ARP)过夜孵育载玻片。次日,在RT下用PBS清洗载玻片(3×5分钟),并在RT下用100μl二抗(PowerVision聚HRP-抗兔IgG即用型(ImmunoLogic))孵育1小时。随后,在RT下用PBS清洗载玻片(3×5分钟)。通过使用来自Vector Laboratories(Burlingame)的VECTOR NovaRED Substrate Kit SK-4800进行最后的染色。在RT下用苏木精复染切片90秒。用梯度的醇(70%、80%、2×96%和99%,每次5分钟)脱水以及在二甲苯中孵育10分钟之后,用X-tra Kit(Mediate Histotechnic)封片。

[0436] 在来自肺、卵巢、胃、结肠、胰腺、肝、十二指肠或肾的正常组织中未检出CLDN6蛋白表达。与正常组织相反,在来自卵巢癌、肺癌、皮肤癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、膀胱癌(移行细胞癌)、子宫颈癌、睾丸癌、(精原细胞瘤)和子宫癌的组织切片上观察到了强的或至少显著的染色。在恶性表皮细胞群的质膜,染色显著增强,而临近的间质和非恶性上皮细胞是阴性的。这些结果表明CLDN6蛋白质位于恶性细胞的质膜。

[0437] 实施例4:生成抗CLDN6的鼠抗体

[0438] a.生成编码全长CLDN6和CLDN6片段的表达载体

[0439] 通过化学合成(GENEART AG,Germany)制备编码全长CLDN6(NCBI登记号NP_067018.2,SEQ ID NO:2)的非天然的、密码子优化的DNA序列(SEQ ID NO:3)并将其克隆到pcDNA3.1/myc-His载体(Invitrogen,USA)中以产生载体p3953。插入终止密码子使得CLDN6蛋白的表达不与载体所编码的myc-His标签融合。使用市售的抗CLDN6抗体(ARP,01-8865;R&D Systems,MAB3656),通过Western印迹、流式细胞术和免疫荧光分析测试CLDN6的表达。

[0440] 此外,制备密码子优化的DNA序列(SEQ ID NO:4)并将其克隆到pcDNA3.1/myc-His载体中以产生载体p3974,所述DNA序列编码与源自N-末端Ig κ前导序列的信号肽融合的CLDN6(SEQ ID NO:6)的推定的细胞外结构域2(extracellular domain 2,EC2)片段,其后面有4个额外的氨基酸以确保正确的信号肽切割位点(SEQ ID NO:5)。免疫之前,使用市售的抗myc抗体(Cell Signaling,MAB 2276),通过免疫荧光显微术在瞬时转染的且多聚甲醛(PFA)固定的CHO-K1细胞中确证EC2片段的表达。

[0441] b.生成稳定表达CLDN6的细胞系

[0442] 使用载体p3953,通过标准技术生成稳定表达CLDN6的HEK293和P3X63Ag8U.1细胞

系。

[0443] c. 免疫

[0444] 通过在第0、16和36天腹膜内注射,用25 μ g p3974质粒DNA以及4 μ l PEI-甘露糖(PEI-Man; in vivo-jetPEITM-Man,来自PolyPlus Transfection)(含有5%葡萄糖的H₂O中的150mM PEI-Man)一起免疫接种Balb/c小鼠。在第48和62天时,通过腹膜内注射转染了p3953载体以稳定表达CLDN6的P3X63Ag8U.1骨髓瘤细胞免疫接种小鼠。在注射之前,以3000拉德(rad)辐照第62天所施用的细胞。在第20和70天之间,使用以编码CLDN6和GFP的核酸共转染的CHO-K1细胞,通过免疫荧光显微术监控小鼠血清中抗CLDN6抗体的存在。为此,转染后24小时,在室温(RT)下用1:100稀释的来自经免疫之小鼠的血清孵育PFA固定的或未固定的细胞45分钟。清洗细胞,用Alexa555标记的抗小鼠Ig抗体(Molecular Probes)孵育并进行荧光显微术。

[0445] 在获自小鼠的血清样品中检测抗CLDN6的特异性抗体,以其为基础产生杂交瘤F3-6C3-H8;见图2。

[0446] 为生成单抗,在进行脾切除术之前4天,通过腹膜内注射 2×10^7 个以p3953载体稳定转染的HEK293细胞加强具有可检出的抗CLDN6免疫应答的小鼠。

[0447] d. 生成产生抗CLDN6鼠单克隆抗体的杂交瘤

[0448] 使用PEG 1500 (Roche, CRL 10783641001),将从经免疫小鼠中分离的 6×10^7 个脾细胞与 3×10^7 个小鼠骨髓瘤细胞系P3X63Ag8.653(ATCC, CRL 1580)融合。在平底微量滴定板中以约 5×10^4 个细胞/孔接种细胞,在含有10%经热灭活的胎牛血清、1%杂交瘤融合和克隆添加剂(hybridoma fusion and cloning supplement, HFCS, Roche, CRL 11363735)、10mM HEPES、1mM丙酮酸钠、4.5%葡萄糖、0.1mM 2-巯基乙醇、1 \times 青霉素/链霉素以及1 \times HAT添加剂(Invitrogen, CRL 21060)的PRMI选择培养基中培养约2周。10至14天之后,通过流式细胞术筛选每个孔的抗CLDN6单克隆抗体。通过有限稀释对分泌抗体的杂交瘤进行亚克隆,并再次测试抗CLDN6的单克隆抗体。培养稳定的亚克隆以在组织培养基中生成少量用于表征的抗体。从来自保持母体细胞之反应性(通过流式细胞术测试)的每个杂交瘤中选择至少一个克隆。为每个克隆生成9小瓶细胞的库并将其储存于液氮中。

[0449] 实施例5:杂交瘤上清液和单克隆抗体的结合特征

[0450] a. 通过(i)Western印迹和(ii)流式细胞术分析对瞬时转染的HEK293T细胞进行质量控制

[0451] (i) 分别用编码CLDN3、CLDN4、CLDN6和CLDN9的核酸转染HEK293T细胞或者进行模拟转染。通过Western印迹测定HEK293T细胞中CLDN3、CLDN4、CLDN6和CLDN9的表达。为此,转染后24小时收获细胞,进行裂解。对裂解液进行SDS-PAGE,印迹到硝酸纤维素膜上,在变性条件下,用与相应的密蛋白C-末端特异性结合的抗-CLDN3(A)(Invitrogen, 34-1700)、抗-CLDN4(A)(Zymed, 32-9400)、抗-CLDN6(A)(ARP, 01-8865)或抗-CLDN9(A)(Santa Cruz, sc-17672)抗体染色。用过氧化物酶标记的二抗孵育并用ECL试剂显色之后,使用LAS-3000显像仪(Fuji)进行可视化。仅在转染的细胞中(但未在对照细胞中)分别观察到了CLDN3、CLDN4、CLDN6和CLDN9之预期分子量的带(图3),表明HEK293T细胞不内源地表达所研究的任何密蛋白,因而是用于测定CLDN6抗体的交叉反应性的合适工具。

[0452] (ii) 使用识别天然表位的抗CLDN抗体(小鼠抗CLDN3 IgG2a (R&D, MAB4620)、小鼠

抗CLDN4 IgG2a (R&D, MAB4219)、小鼠抗CLDN6 IgG2b (R&D, MAB3656), 通过流式细胞术进一步分析 (i) 的HEK293T细胞。以获自Sigma的产品编号为M9144和M8894的抗体充当同种型对照。分别使用以编码CLDN3、CLDN4、CLDN6和CLDN9的核酸瞬时转染的HEK293T细胞分析这些抗CLDN抗体的特异性。抗CLDN4抗体表现出与CLDN3、CLDN6和CLDN9的交叉反应性。抗CLDN3抗体与CLDN3特异性地结合 (图4)。

[0453] b. 使用流式细胞术测定根据本发明产生的单克隆抗体的特异性

[0454] 用编码不同CLDN蛋白的载体和编码荧光标志物的载体共转染HEK293T细胞。转染后24小时, 使用0.05%胰蛋白酶/EDTA溶液收获细胞, 用FACS缓冲液 (含有2%FCS和0.1%叠氮化钠的PBS) 清洗。以 2×10^5 个细胞/孔将细胞转移到U-底微滴定板中, 在4°C下用杂交瘤上清液孵育60分钟。用FACS缓冲液清洗三次之后, 用别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 缀合的抗小鼠IgG 1+2a+2b+3特异性的二抗 (Dianova, 115-135-164) 孵育细胞。随后, 将细胞清洗两次, 使用BD FACSArray通过流式细胞术对结合进行评价 (图5)。以荧光标志物的表达为横轴, 相对于纵轴上的抗体结合进行作图。以市售的小鼠抗CLDN6 IgG2b抗体 (R&D, MAB3656) 充当阳性对照, 并且以可获自Sigma的产品编号为M8894的抗体充当同种型对照。

[0455] 来自单克隆的杂交瘤亚克隆F3-6C3-H2、F3-6C3-H8、F3-6C3-H9、F3-6C3-D8和F3-6C3-G4 (都源自杂交瘤F3-6C3) 的上清液中的抗体是CLDN6特异性的, 并且不与CLDN9、CLDN3和CLDN4结合。图5A示例性地显示单克隆杂交瘤亚克隆F3-6C3-H8的结果。来自单克隆杂交瘤亚克隆F3-6C3-H8上清液中的抗体还与用CLDN6的 (I143V) -SNP变体转染的细胞结合。来自单克隆杂交瘤亚克隆F4-4F7-F2之上清液中的抗体与CLDN6和CLDN9都结合 (图5A)。来自单克隆杂交瘤亚克隆F3-7B3-B4之上清液中的抗体与CLDN6、CLDN3和CLDN9结合 (图5B)。来自单克隆杂交瘤亚克隆F3-3F7-A5之上清液中的抗体与CLDN6、CLDN4和CLDN9结合 (图5B)。

[0456] 实施例6: 生成和测试抗CLDN6的单克隆抗体

[0457] a. 生成编码CLDN6的细胞外结构域1的表达载体

[0458] 制备密码子优化的DNA序列 (SEQ ID NO:12) 并将其克隆到pcDNA3.1/myc-His载体中以产生载体p3973, 所述DNA序列编码与源自N-末端Ig κ 前导序列的信号肽融合的CLDN6 (SEQ ID NO:7) 的推定的细胞外结构域1 (extracellular domain 1, EC1) 片段, 其后面有4个额外的氨基酸以确保正确的信号肽切割位点 (SEQ ID NO:13)。免疫之前, 使用市售的抗myc抗体 (Cell Signaling, MAB 2276), 通过免疫荧光显微术在瞬时转染的且多聚甲醛 (PFA) 固定的CHO-K1细胞中确证EC1片段的表达。

[0459] b. 免疫

[0460] 通过在第0和14天腹膜内注射, 用25 μ g p3973质粒DNA以及4 μ l PEI-甘露糖 (PEI-Man; in vivo-jetPEITM-Man, 来自PolyPlus Transfection) (含有5%葡萄糖的水中的150mM PEI-Man) 一起免疫接种Balb/c小鼠。第28和44天, 用KLH缀合的肽SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15 (在PBS中各自100 μ g, JPT Peptide Technologies GmbH, Germany) 和HPLC纯化的PTO-CpG-ODN (25 μ g于PBS中; 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT; Eurofins MWG Operon, Germany) 一起皮下免疫接种小鼠。第64、77和97天, 用 2×10^7 个以p3953载体转染的P3X63Ag8U.1骨髓瘤细胞腹膜内注射免疫接种小鼠。施用之前, 用丝裂霉素C (2.5 μ g/ml, Sigma-Aldrich, M4287) 处理细胞。第64和97天, 与HPLC纯化的PTO-CpG-ODN (50 μ g于PBS中) 一起施用细胞, 第77天, 将与不完全弗氏佐剂 (incomplete Freund's adjuvant) 一起施用。

[0461] 为生成单克隆抗体,在进行脾切除术之前4天,通过腹膜内注射 2×10^7 个以p3953载体稳定转染的HEK293细胞加强具有可检出的抗CLDN6免疫应答的小鼠。

[0462] c. 测试抗CLDN6的单克隆抗体

[0463] 流式细胞术

[0464] 为测试单克隆抗体与CLDN6及其同源物的结合,用相应的编码密蛋白的质粒瞬时转染HEK293T细胞,并通过流式细胞术分析表达。为了区分转染的和非转染的细胞,用荧光标记物作为报道基因共转染HEK293T细胞。转染24小时之后,用0.05%胰蛋白酶/EDTA收获细胞,用FACS缓冲液(含有2%FCS和0.1%叠氮化钠的PBS)清洗,以 2×10^6 个细胞/ml的浓度悬于FACS缓冲液中。在4℃下,将100 μ l细胞悬液与指定浓度的合适抗体一起孵育30分钟。使用交叉反应的抗体检测CLDN6和CLDN9表达。市售的小鼠抗密蛋白抗体抗CLDN3 (R&D, MAB4620) 和抗CLDN4 (R&D, MAB4219) 充当阳性对照,而小鼠IgG2a (Sigma, M9144) 和IgG2b (Sigma, M8894) 分别充当同种型对照。用FACS缓冲液清洗细胞三次,并将其与APC缀合的抗小鼠IgG1+2a+2b+3a特异性的二抗 (Dianova, 115-135-164) 一起孵育30分钟。清洗细胞两次,重悬于FACS缓冲液中。使用BD FACSArray通过流式细胞术分析结合。以荧光标志物的表达为横轴,相对于纵轴上的抗体结合进行作图。

[0465] CDC

[0466] 向与抗CLDN6抗体一起孵育的靶细胞中添加人补体之后,通过测量未裂解细胞中细胞内ATP的含量测定补体依赖性的细胞毒作用(CDC)。作为非常灵敏的分析方法,使用萤光素酶的发光反应测量ATP。

[0467] 用0.05%胰蛋白酶/EDTA收获稳定转染CLDN6的CHO-K1细胞(CHO-K1-CLDN6),用X-Vivo 15培养基(Lonza, BE04-418Q)清洗两次,以 1×10^7 个细胞/ml的浓度悬于X-Vivo 15培养基中。将250 μ l的细胞悬液转移到0.4cm电穿孔小槽(electroporation cuvette)中并将其与7 μ g体外转录的编码萤光素酶的RNA(萤光素酶IVT RNA)混合。使用Gene Pulser Xcell (Bio Rad)以200V和300 μ F电穿孔细胞。电穿孔之后,将细胞悬于2.4ml预热的含有10% (v/v) FCS、1% (v/v) 青霉素/链霉素和1.5mg/ml G418的具有GlutaMax-I的D-MEM/F12(1:1)培养基(Invitrogen, 31331-093)中。将50 μ l/孔细胞悬液接种进入白色96孔PP板中,在37℃和7.5%CO₂下孵育。电穿孔之后24小时,以指定浓度向细胞中添加50 μ l 60% RPMI (含有20mM HEPES) 和40% 人血清(获自6位健康供体的混合血清)中的单克隆鼠抗CLDN6抗体。向总裂解对照中添加每孔10 μ l PBS中的8% (v/v) 曲通X-100,而向最大活细胞对照和向实际样品中添加每孔10 μ l的PBS。在37℃和7.5%CO₂下孵育80分钟之后,每孔添加50 μ l 萤光素混合物(ddH₂O中的3.84mg/ml D-萤光素、0.64U/ml ATP酶和160mM HEPES)。在RT下,将板在黑暗中孵育45分钟。使用发光计(Infinite M200, TECAN)测量发光。以积分数字相对光单位(relative light unit, RLU)给出结果。

[0468] 以200V和400 μ F电穿孔NEC8细胞,在含有10% (v/v) FCS的具有GlutaMAX-I的RPMI 1640培养基(Invitrogen, 61870)中培养。

[0469] 按以下计算比裂解:

$$[0470] \quad \text{比裂解} [\%] = 100 - \left[\frac{(\text{样品}-\text{总裂解})}{(\text{最大活细胞}-\text{总裂解})} \times 100 \right]$$

[0471] 最大活细胞:10 μ l PBS,没有抗体

[0472] 总裂解:10 μ l PBS中的8% (v/v) 曲通X-100,没有抗体

[0473] 早期治疗

[0474] 对于早期抗体治疗,将200 μ l PBS中的 2×10^7 个NEC8细胞皮下接种进入无胸腺的Nude-Foxn1^{nu}小鼠的肋部。每个实验组由10只6~8周龄的雌性小鼠组成。接种之后3天,每周两次交替静脉内和腹膜内注射应用200 μ g纯化的鼠单克隆抗体muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A 46天。以PBS治疗的实验组充当阴性对照。每两周监测一次肿瘤体积(TV=(长度 \times 宽度²)/2)。以mm³表示TV,允许构建随时间的肿瘤生长曲线。当肿瘤达到大于1500mm³的体积时,杀死小鼠。

[0475] d. 结果

[0476] 鼠单克隆抗体muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A显示与人CLDN6和CLDN6 SNP(单核苷酸多态性)变体I143V的强结合,但未观察到与CLDN3、4和9的结合(图6)。

[0477] MuMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A表现出非常低的EC50值(EC50 200~500ng/ml),并且在低浓度下达到饱和结合(图7)。

[0478] MuMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A在低浓度下表现出剂量依赖性CDC活性和诱导的CDC(图8)。抗CLDN6抗体muMAB 65A和66B以剂量依赖的方式诱导对NEC8细胞的CDC(图9)。通过使用NEC8 LVTS2 54细胞(CLDN6敲低)证明muMAB 65A和66B的靶标特异性。

[0479] 此外,在移植了NEC8细胞的小鼠中,muMAB 59A、60A、61D、64A、65A、66B和67A显示出肿瘤生长抑制(图10)。

[0480] 实施例7:生成和测试抗CLDN6的嵌合单克隆抗体

[0481] a. 生成小鼠/人嵌合单克隆抗体

[0482] 对于嵌合化,使用列在下表中的引物,通过PCR扩增包含前导序列的鼠重链和轻链可变区。通过ApaI限制位点(5'-GGGCCC-3')将鼠重链与表达载体所编码的人Fc γ 1链的N-末端部分融合。使用BsiWI限制位点将包含前导序列的鼠 κ 链的可变结构域克隆到恒定区之前。通过测序核实载体中恒定区的正确方向(即,适合载体的启动子向前进行)。由于ApaI限制位点的位置,为此,除了ApaI位点的序列,包含前导序列之可变区的任何扩增需要包括人 γ -1恒定区序列的前11个核苷酸。人 γ -1重链恒定区的核苷酸序列示于SEQ ID NO:24,如此表达的人 γ -1恒定区示于SEQ ID NO:25。编码 κ 轻链恒定部分的核苷酸序列示于SEQ ID NO:26,相应的氨基酸序列示于SEQ ID NO:27。

[0483] 表1:用于抗体克隆的小鼠杂交瘤细胞系

	muMAB	同种型	引物 SEQ ID NO:
[0484] 重链	64A	IgG2a	17, 18
	89A	IgG2a	17, 19
	61D	IgG2a	17, 20
	67A	IgG2a	17, 20
轻链	64A	IgK	21, 22
	89A	IgK	21, 23
	61D	IgK	21, 22
	67A	IgK	21, 22

[0485] 通过在相应的鼠抗体名称前添加前缀“chim”来命名嵌合单克隆抗体,例如chimAB 64A。

[0486] 根据Matz et al. (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6)中描述的“越轨PCR (step-out PCR)”方法进行对包含前导序列的鼠轻链和重链可变区的扩增。为此,通过本领域技术人员已知的标准方法从单克隆杂交瘤细胞系(见表1)中制备总RNA,例如使用RNeasy Mini Kit (Qiagen)来制备。根据也在Matz et al. (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6, 1558)中描述的“模板开关”法制备单链cDNA。在cDNA链聚合的过程中,除了(dT)30寡聚物(SEQ ID NO:28)之外,DNA/RNA杂合寡聚物(SEQ ID NO:29)充当用于模板开关的5'接合体。在该接合体寡聚物中,最后3个核苷酸是核糖核苷酸而不是脱氧核糖核苷酸。随后的“越轨PCR”使用靶向小鼠 κ 链恒定区或 γ 链2a亚类恒定区(分别为SEQ ID NO:30和31)的反义寡聚物。之前用IsoStrip (Roche)对杂交瘤细胞系所产生的鼠单克隆抗体的IgG亚类进行免疫分析,并据此选择合适的反义寡聚物(见表1)。包含两种寡聚物(列在SEQ ID NO:32和33中)的引物混合物在所述“越轨PCR”中充当有义寡聚物。

[0487] 随后通过PCR扩增所鉴定的包含前导序列的鼠可变区,略去5'UTR和3'小鼠恒定区,向末端添加限制位点,这允许亚克隆到所制备的带有人恒定区的载体中。此外,所述有义寡聚物提供共有的Kozak序列(5'-GCCGCCACC-3'),并且除了ApaI限制位点之外,用于重链可变区的反义寡聚物还包括人 γ -1恒定区的前11个核苷酸(见表1,SEQ ID NO:17至23)。使用HindIII和BsiWI限制酶克隆包含前导序列的 κ 轻链可变区, γ 重链可变区要求HindIII和ApaI限制酶。

[0488] 扩增其他包含前导序列的鼠轻链和重链可变区,并根据上述公开的方案生成其他抗CLDN6嵌合单克隆抗体。

[0489] b. 产生嵌合单克隆抗CLDN6抗体

[0490] 在以编码相应抗体的轻链和重链的质粒DNA转染的HEK293T细胞(ATCC CRL-11268)中瞬时表达嵌合单克隆抗体。转染之前24小时,将 8×10^7 个细胞接种到145mm细胞培养板上,并在25ml HEK293T培养基(DMEM/F12+GlutaMAX-I、10%FCS、1%青霉素/链霉素)中培养。将20 μ g质粒DNA溶于每个细胞培养板的5ml没有添加物的HEK293T培养基中。添加75 μ l

线性聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) (1mg/ml) (Polyscience, 23966) 之后, 在RT下孵育 (DNA:PEI) - 混合物15分钟。随后, 向细胞中逐滴添加转染-混合物。转染后24小时, 用含有1%青霉素/链霉素的Pro293a培养基 (Lonza, BE12-764Q) 替换HEK293T培养基。为了最佳的表达, 在37°C和7.5%CO₂下再培养转染的细胞96至120小时。收获上清液, 使用蛋白A柱通过FPLC纯化嵌合的抗体。测定抗体的浓度, 通过SDS-PAGE测试品质。

[0491] c. 测试抗CLDN6的嵌合单克隆抗体

[0492] 流式细胞术

[0493] 通过流式细胞术分析以测试CLDN6特异性的嵌合单克隆抗体与分别用CLDN3、4、6或9稳定转染的HEK293细胞以及内源性表达CLDN6的肿瘤细胞系结合的特异性和亲和力。因此, 用0.05%胰蛋白酶/EDTA收获细胞, 用FACS缓冲液 (含有2%FCS和0.1%叠氮化钠的PBS) 清洗, 以 2×10^6 个细胞/ml的浓度悬于FACS缓冲液中。在4°C下, 将100 μ l细胞悬液与指定浓度的合适抗体一起孵育60分钟。使用嵌合的交叉反应的抗体 (chimAB 5F2D2) 检测CLDN6和CLDN9表达。市售的小鼠抗密蛋白抗体抗CLDN3 (R&D, MAB4620) 和抗CLDN4 (R&D, MAB4219) 抗体充当阳性对照, 而人IgG1- κ (Sigma, I5154) 充当阴性对照。用FACS缓冲液清洗细胞三次, 并将其分别与APC缀合的山羊抗人IgG Fc- γ (Dianova, 109-136-170) 或APC缀合的抗小鼠IgG1+2a+2b+3a (Dianova, 115-135-164) 特异性的二抗在4°C下一起孵育30分钟。清洗细胞两次, 重悬于FACS缓冲液中。使用BD FACSArray通过流式细胞术分析结合。

[0494] CDC

[0495] 向与抗CLDN6抗体一起孵育的靶细胞中添加人补体之后, 通过测量未裂解细胞中细胞内ATP的含量测定补体依赖性细胞毒作用 (CDC)。作为非常灵敏的分析方法, 使用萤光素酶的生物发光反应测量ATP。

[0496] 在该测定中, 使用均以萤光素酶表达构建体稳定转导的NEC8野生型细胞 (CLDN6阳性) 和NEC8 CLDN6敲低的细胞 (CLDN6阴性)。用0.05%胰蛋白酶/EDTA收获细胞, 并将其在含有10% (v/v) FCS的具有GlutaMax-I的RPMI培养基 (Invitrogen, 61870-010) 中调节至 2×10^5 个细胞/ml的浓度。将 1×10^4 个细胞接种到白色96孔PP板中, 在37°C和5%CO₂下孵育24小时。孵育之后, 以指定浓度向细胞中添加50 μ l 160% RPMI (含有20mM HEPES) 中的单克隆嵌合抗CLDN6抗体和40%人血清 (获自6位健康供体的混合血清)。向总裂解对照中添加每孔10 μ l PBS中的8% (v/v) 曲通X-100, 而向最大活细胞对照和向实际样品中添加每孔10 μ l的PBS。在37°C和5%CO₂下孵育80分钟之后, 每孔添加50 μ l 荧光素混合物 (ddH₂O中的3.84mg/ml D-荧光素、0.64U/ml ATP酶和160mM HEPES)。在RT下, 将板在黑暗中孵育45分钟。使用发光计 (Infinite M200, TECAN) 测量生物发光。以积分数字相对光单位 (RLU) 给出结果。

[0497] 按以下计算比裂解:

$$[0498] \quad \text{比裂解} [\%] = 100 - \left[\frac{(\text{样品} - \text{总裂解})}{(\text{最大活细胞} - \text{总裂解})} \times 100 \right]$$

[0499] 最大活细胞: 10 μ l PBS, 没有抗体

[0500] 总裂解: 10 μ l PBS中的8% (v/v) 曲通X-100, 没有抗体

[0501] ADCC

[0502] 向与抗CLDN6抗体一起孵育的靶细胞中添加人PBMC之后, 通过测量未裂解细胞中细胞内ATP的含量测定抗体依赖性细胞的细胞毒作用 (ADCC)。作为非常灵敏的分析方法, 使

用萤光素酶的生物发光反应测量ATP。

[0503] 在该测定中,使用均以萤光素酶表达构建体稳定转导的NEC-8野生型细胞 (CLDN6阳性) 和NEC-8 CLDN6敲低的细胞 (CLDN6阴性)。用0.05%胰蛋白酶/EDTA收获细胞,并将其在含有10% (v/v) FCS和20mM HEPES的具有GlutaMax-I的RPMI培养基 (Invitrogen, 61870-010) 中调节至 2×10^5 个细胞/ml的浓度。将 1×10^4 个细胞接种到白色96孔PP板中,在37°C和5%CO₂下孵育4小时。

[0504] 使用Ficoll Hypaque (GE Healthcare, 17144003), 通过密度梯度离心, 从人供体血液样品中分离PBMC。分离含有分裂间期之PBMC, 用PBS/EDTA (2mM) 清洗细胞两次。将 1×10^8 个PBMC接种到50ml含有5%热灭活人血清 (Lonza, US14-402E) 的X-Vivo 15培养基 (Lonza, BE04-418Q) 中, 在37°C和5%CO₂下孵育2小时。

[0505] 接种靶细胞 (NEC-8) 之后4小时, 以指定的浓度向细胞中添加25 μ l PBS中的单克隆嵌合抗CLDN6抗体。收获2小时内从黏附的单核细胞中分离出的非黏附的PBMC, 在X-vivo 15培养基中调节至 8×10^6 个细胞/ml。向靶细胞和单克隆嵌合抗CLDN6抗体中添加25 μ l该细胞悬液。在37°C和5%CO₂下孵育板24小时。

[0506] 孵育24小时之后, 向总裂解对照中添加每孔10 μ l PBS中的8% (v/v) 曲通X-100, 而向最大活细胞对照和向实际样品中添加每孔10 μ l的PBS。每孔添加50 μ l 萤光素混合物 (ddH₂O中的3.84mg/ml D-萤光素、0.64U/ml ATP酶和160mM HEPES)。在RT下, 将板在黑暗中孵育30分钟。使用发光计 (Infinite M200, TECAN) 测量生物发光。以积分数字相对光单位 (RLU) 给出结果。

[0507] 按以下计算比裂解:

$$[0508] \quad \text{比裂解 [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{样品} - \text{总裂解})}{(\text{最大活细胞} - \text{总裂解})} \times 100 \right]$$

[0509] 最大活细胞: 10 μ l PBS, 没有抗体

[0510] 总裂解: 10 μ l PBS中的8% (v/v) 曲通X-100, 没有抗体

[0511] d. 结果

[0512] 抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 61D、64A、67A和89A显示出与人CLDN6的强结合, 但未观察到与CLDN3、4和9的结合 (图11)。

[0513] 对于与稳定表达于HEK293细胞表面上的人CLDN6的结合, 抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 64A和89A表现出非常低的EC50值 (EC50 450 ~ 600ng/ml), 并且在低浓度达到饱和结合。ChimAB 67A和61D分别显示出低的 (EC50 1000ng/ml) 和中等的 (EC50 2300ng/ml) 的EC50值 (图12)。

[0514] 对于与内源性地表达于NEC8细胞中的CLDN6的结合, 抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 64A和89A表现出非常低的EC50值 (EC50 600 ~ 650ng/ml), 并且在低浓度达到饱和结合, 而chimAB 61D和67A分别显示出中等的 (EC50 1700ng/ml) 和高的 (EC50 6100ng/ml) EC50值 (图13)。

[0515] 对于与内源性地表达于OV90细胞中的CLDN6的结合, 抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 64A和89A表现出非常低的EC50值 (EC50 550 ~ 600ng/ml), 并且在低浓度达到饱和结合。chimAB 61D和67A分别显示出中等的EC50值 (分别为EC50 1500ng/ml和EC50 2300ng/ml) (图14)。

[0516] 抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 61D、64A、67A和89A以剂量依赖性方式表现出对NEC-8细胞的CDC活性(图15)。

[0517] 抗CLDN6嵌合单克隆抗体chimAB 61D、64A、67A和89A表现出对NEC-8细胞的剂量依赖性的ADCC活性,并且甚至在低抗体浓度下诱导ADCC(图16)。

[0518] 这些结果清楚地显示这些抗CLDN6的嵌合单克隆抗体的特异性。

[0519] 实施例8:使用抗CLDN6单克隆抗体的治疗

[0520] 早期治疗

[0521] 对于早期抗体治疗,将200 μ l RPMI培养基(Gibco)中的 2×10^7 个NEC8细胞皮下接种进入无胸腺的Nude-Foxn1tm小鼠的肋部。每个实验组由10只6~8周龄的雌性小鼠组成。接种肿瘤细胞之后3天,每周两次交替静脉内和腹膜内注射应用200 μ g纯化的鼠单克隆抗体muMAB 89A 7周。以PBS治疗的实验组充当阴性对照。每两周监测一次肿瘤体积(TV=(长度 \times 宽度²)/2)。以mm³表示TV,允许构建随时间的肿瘤生长曲线。当肿瘤达到大于1500mm³的体积时,处死小鼠。

[0522] 晚期治疗

[0523] 对于晚期异种移植肿瘤的抗体治疗,将200 μ l RPMI培养基(Gibco)中的 2×10^7 个NEC8细胞皮下接种进入6~8周龄雌性无胸腺的Nude-Foxn1tm小鼠的肋部。每两周监测一次肿瘤体积(TV=(长度 \times 宽度²)/2)。以mm³表示TV,允许构建随时间的肿瘤生长曲线。接种肿瘤15至17天之后,将小鼠分成具有高于80mm³的均匀肿瘤大小的每组8只动物的治疗组。每周两次交替静脉内和腹膜内注射应用200 μ g纯化的鼠单克隆抗体muMAB 61D、64A、67A和89A 5周。用PBS和非特异性抗体治疗的实验组充当阴性对照。当肿瘤达到大于1500mm³的体积时,处死小鼠。

[0524] 在使用植入了肿瘤细胞系NEC8之小鼠的早期治疗异种移植模型中,用鼠单克隆抗体muMAB 61D、64A和67A治疗小鼠,甚至在停止免疫治疗之后都没有显示出任何肿瘤生长(图17)。

[0525] 在使用植入了肿瘤细胞系NEC8之小鼠的早期治疗异种移植模型中,muMAB 89A显示肿瘤生长抑制,并且在研究结束时,用muMAB89A治疗的小鼠中没有可检出的肿瘤(图18)。

[0526] 在使用植入了肿瘤细胞系NEC8之小鼠的晚期治疗异种移植模型中,muMAB 64A显示抑制肿瘤生长(图19)。

[0527] 在使用植入了肿瘤细胞系NEC8之小鼠的晚期治疗异种移植模型中,以muMAB 64A治疗的小鼠显示存活延长(图20)。

[0528] 在使用植入了肿瘤细胞系NEC8之小鼠的晚期治疗异种移植模型中,用鼠单克隆抗CLDN6抗体muMAB 61D、67A和89A实现对肿瘤生长的抑制(图21)。

[0529] 在使用植入了肿瘤细胞系NEC8之小鼠的晚期治疗异种移植模型中,用CLDN6特异性抗体muMAB 61D或67A治疗的小鼠显示存活延长(图22)。

[0530] 在使用植入了肿瘤细胞系NEC8野生型和具有稳定CLDN6敲低的NEC8细胞之小鼠的晚期治疗异种移植模型中,muMAB 64A和89A仅在植入了NEC8野生型的小鼠中(而非植入了具有稳定CLDN6敲低的NEC8细胞中)显示治疗作用,表明抗体的体内CLDN6特异性(图23)。

[0531] 实施例9:抗CLDN6单克隆抗体的高分辨率表位作图

[0532] 在ELISA表位作图研究中,CLDN6特异性的单克隆抗体仅显示与线性肽非常弱的

(如果有的话)结合,表明其表位是构象表位。为分析本文中描述的抗体与天然构象的CLDN6的相互作用,将哺乳动物细胞培养物中的位点定向诱变用作表位作图技术。分别在第一和第二细胞外结构域中进行氨基酸27~81和137~161的丙氨酸扫描诱变。在HEK293T细胞中瞬时表达之后,评价CLDN6突变体被特异性单克隆抗体所结合的能力。特异性单克隆抗体与CLDN6突变体的结合受损表明突变的氨基酸是重要的接触和/或构象残基。通过流式细胞术分析所述结合。用荧光标志物共转染细胞以区分转染的和未转染的细胞群。

[0533] 已通过丙氨酸扫描系统地鉴定了对于与CLDN6特异性嵌合抗体相互作用来说重要的CLDN6氨基酸残基。通过位点定向诱变(GENE ART AG, Germany)生成丙氨酸和甘氨酸突变。为测试单克隆嵌合抗体与野生型CLDN6及其突变体的结合,用编码相应密蛋白的质粒瞬时转染HEK293T细胞,通过流式细胞术分析表达。为了区分转染和未转染的细胞,用荧光标志物作为报道基因共转染HEK293T细胞。转染之后24小时,用0.05%胰蛋白酶/EDTA收获细胞,用FACS缓冲液(含有2%FCS和0.1%叠氮化钠的PBS)清洗,以 2×10^6 个细胞/ml的浓度重悬于FACS缓冲液中。在4°C下用10 μ g/ml抗体孵育100 μ l细胞悬液45分钟。使用市售的小鼠抗CLDN6抗体(R&D, MAB3656)作为对照检测细胞表面CLDN6突变体的表达。用FACS缓冲液清洗细胞三次,用APC缀合的山羊抗人IgG Fc- γ (Dianova, 109-136-170)或APC缀合的抗小鼠IgG1+2a+2b+3a特异性二抗(Dianova, 115-135-164)在4°C下孵育30分钟。清洗细胞两次,重悬于FACS缓冲液中。通过使用BD FACSArray的流式细胞术分析被转染细胞群中的结合。因此,以荧光标志物的表达为横轴,相对于纵轴上的抗体结合进行作图。与突变的CLDN6结合的单克隆嵌合CLDN6特异性抗体的平均信号强度表示为野生型结合的百分比。在被突变之后,对于结合至关重要的氨基酸不显示结合,而支持结合的氨基酸仅显示与野生型相比降低的结合。

[0534] 高分辨率表位作图证明CLDN6第一细胞外结构域的氨基酸F35、G37、S39以及可能地T33对于与CLDN6特异性嵌合抗体chimAB 61D、64A、67A和89A的相互作用是重要的。残基I40对于chimAB 89A的结合是至关重要的,并且它有助于chimAB 61D和67A的结合。此外,CLDN6第二细胞外结构域的L151对于与chimAB 67A的相互作用是重要的(图24)。

[0535]	申请人或代理机构的 档案参考 342-52 PCT	国际申请号
--------	------------------------------	-------

[0536] 保藏微生物或其他生物材料的证明

[0537] (PCT细则13bis)

A. 以下证明涉及说明书中第 10 页, 第 9-10 行提及的保藏微生物或其它生物材料。	
B. 保藏物身份 其它保藏物的识别请见附页 <input checked="" type="checkbox"/>	
保藏机构名称 DSMZ-德国微生物菌种和细胞培养物保藏中心	
保藏机构地址 (包括邮编及国家) 德国 布伦瑞克市因霍芬大街 7bd 号 邮编 38124	
保藏日期 2010 年 6 月 21 日	登记号 DSM ACC3067
C. 额外指示(如不适用可空) 该信息在附页上 <input type="checkbox"/>	
-小鼠 (<i>Mus musculus</i>) 骨髓瘤 P3X63Ag8.653 与小鼠 (<i>Mus musculus</i>) 脾细胞融合 -分泌抗人 CLDN6 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”)	

[0539] (仅限受理局使用)	(仅限国际局使用)
<input type="checkbox"/> 该页与国际申请一起受理	<input type="checkbox"/> 该页由国际局受理:
被授权官员	被授权官员

[0540] 表PCT/RO/134(1998年7月;2004年1月重印)

[0541] 生物材料的附加页

[0542] 另外保藏物的识别

[0543] 1) 保藏机构的名称和地址:

[0544] 德国微生物菌种和细胞培养物保藏中心

[0545] 德国

[0546] 布伦瑞克市因霍芬大街7bd号

[0547] 邮编 38124

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
2010年6月21日	DSM ACC3068	第10页, 第13-14行
2010年6月21日	DSM ACC3069	第10页, 第15-16行
[0548] 2010年6月21日	DSM ACC3070	第10页, 第17-18行
2010年6月21日	DSM ACC3071	第10页, 第19-20行
2010年6月21日	DSM ACC3072	第10页, 第21-22行
2010年6月21日	DSM ACC3073	第10页, 第23-24行
2010年8月31日	DSM ACC3089	第10页, 第25-26行
2010年8月31日	DSM ACC3090	第10页, 第27-28行

[0549] 针对上述保藏物的额外指示:

[0550] -小鼠 (*Mus musculus*) 骨髓瘤P3X63Ag8.653与小鼠 (*Mus musculus*) 的脾细胞融合

[0551] -分泌抗人CLDN6抗体的杂交瘤

[0552] 2) 保藏人:

[0553] 所有上述保藏物均由以下单位制备:

[0554] 加尼梅德药物公司

[0555] Freiligrathstraße 12

[0556] 55131 Mainz

[0557] DE

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	Ganymed Pharmaceuticals AG 等
[0003]	<120>	用于治疗癌的抗体
[0004]	<130>	342-52 PCT
[0005]	<150>	EP 09 014 136.7
[0006]	<151>	2009-11-11
[0007]	<150>	EP 10 006 956.6
[0008]	<151>	2010-07-06
[0009]	<150>	US 61/361,618
[0010]	<151>	2010-07-06
[0011]	<150>	US 61/260,202
[0012]	<151>	2009-11-11
[0013]	<160>	53
[0014]	<170>	PatentIn version 3.5
[0015]	<210>	1
[0016]	<211>	1369
[0017]	<212>	DNA
[0018]	<213>	人
[0019]	<400>	1
[0020]	cgacactcgg	cctaggaatt tcccttatct ccttcgcagt gcagctcctt caacctcgcc 60
[0021]	atggcctctg	ccggaatgca gatcctggga gtcgtcctga cactgctggg ctgggtgaat 120
[0022]	ggcctggctc	cctgtgccct gcccatgtgg aaggtgaccg ctttcatcgg caacagcadc 180
[0023]	gtggtggccc	aggtggtgtg ggagggcctg tggatgtcct gcgtggtgca gagcaccggc 240
[0024]	cagatgcagt	gcaaggtgta cgactcactg ctggcgctgc cacaggacct gcaggctgca 300
[0025]	cgtgccctct	gtgtcatcgc cctccttctg gccctgttcg gcttgctggt ctaccttget 360
[0026]	ggggccaagt	gtaccacctg tgtggaggag aaggattcca aggcccgcct ggtgctcacc 420
[0027]	tctgggattg	tctttgtcat ctacaggggc ctgacgctaa tccccgtgtg ctggacggcg 480
[0028]	catgccatca	tccgggactt ctataacccc ctggtggctg aggcccaaaa gcgggagctg 540
[0029]	ggggcctccc	tctacttggg ctgggcggcc tcaggccttt tgttgctggg tggggggttg 600
[0030]	ctgtgctgca	cttgcccctc gggggggtcc cagggccccca gccattacat ggcccgcctac 660
[0031]	tcaacatctg	ccctgccaat ctctcggggg ccctctgagt accctaccaa gaattacgtc 720
[0032]	tgacgtggag	gggaatgggg gctccgctgg cgctagagcc atccagaagt ggcagtgcc 780
[0033]	aacagctttg	ggatgggttc gtacctttg tttctgcctc ctgctatfff tcttttgact 840
[0034]	gaggatattt	aaaattcatt tgaaaactga gccaaagtgt tgactcagac tctcacttag 900
[0035]	gctctgctgt	ttctcacctt tggatgatgg agccaaagag gggatgcttt gagattcttg 960
[0036]	atcttgacat	gcccatctta gaagccagtc aagctatgga actaatgcgg aggctgcttg 1020
[0037]	ctgtgctggc	tttgcaacaa gacagactgt cccaagagt tcttgctgct gctgggggct 1080
[0038]	gggttccct	agatgtcact ggacagctgc cccccatcct actcaggtct ctggagctcc 1140
[0039]	tctcttcacc	cctggaaaaa caaatgatct gttacaaaag gactgcccac ctccggaact 1200
[0040]	tctgacctct	gtttcctccg tcttgataag acgtccacc cccaggcca ggtcccagct 1260
[0041]	atgtagacc	ccgccccac ctccaacact gcaccttct gccctgccc cctcgtctca 1320

[0126]	Val Ala Glu Ala Gln Lys
[0127]	35
[0128]	<210> 6
[0129]	<211> 13
[0130]	<212> PRT
[0131]	<213> 人
[0132]	<400> 6
[0133]	Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys
[0134]	1 5 10
[0135]	<210> 7
[0136]	<211> 53
[0137]	<212> PRT
[0138]	<213> 人
[0139]	<400> 7
[0140]	Pro Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala
[0141]	1 5 10 15
[0142]	Gln Val Val Trp Glu Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr
[0143]	20 25 30
[0144]	Gly Gln Met Gln Cys Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln
[0145]	35 40 45
[0146]	Asp Leu Gln Ala Ala
[0147]	50
[0148]	<210> 8
[0149]	<211> 220
[0150]	<212> PRT
[0151]	<213> 人
[0152]	<220>
[0153]	<221> 变体
[0154]	<222> (143)..(143)
[0155]	<223> 人密蛋白6 的I143V多态性
[0156]	<400> 8
[0157]	Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
[0158]	1 5 10 15
[0159]	Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
[0160]	20 25 30
[0161]	Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
[0162]	35 40 45
[0163]	Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
[0164]	50 55 60
[0165]	Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
[0166]	65 70 75 80
[0167]	Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu

[0168]		85		90		95
[0169]	Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp					
[0170]		100		105		110
[0171]	Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser					
[0172]		115		120		125
[0173]	Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Val Ile					
[0174]		130		135		140
[0175]	Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu					
[0176]		145		150		160
[0177]	Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu					
[0178]		165		170		175
[0179]	Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly					
[0180]		180		185		190
[0181]	Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser					
[0182]		195		200		205
[0183]	Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val					
[0184]		210		215		220
[0185]	<210>	9				
[0186]	<211>	217				
[0187]	<212>	PRT				
[0188]	<213>	人				
[0189]	<400>	9				
[0190]	Met Ala Ser Thr Gly Leu Glu Leu Leu Gly Met Thr Leu Ala Val Leu					
[0191]		1		5		10
[0192]	Gly Trp Leu Gly Thr Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Leu Trp Lys Val					
[0193]		20		25		30
[0194]	Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu					
[0195]		35		40		45
[0196]	Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys					
[0197]		50		55		60
[0198]	Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala					
[0199]		65		70		75
[0200]	Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Leu Leu					
[0201]		85		90		95
[0202]	Val Ala Ile Thr Gly Ala Gln Cys Thr Thr Cys Val Glu Asp Glu Gly					
[0203]		100		105		110
[0204]	Ala Lys Ala Arg Ile Val Leu Thr Ala Gly Val Ile Leu Leu Leu Ala					
[0205]		115		120		125
[0206]	Gly Ile Leu Val Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile					
[0207]		130		135		140
[0208]	Gln Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Leu Lys Arg Glu Leu					
[0209]		145		150		160

[0210]	Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Met Leu
[0211]	165 170 175
[0212]	Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Pro Pro Gln Val Glu Arg
[0213]	180 185 190
[0214]	Pro Arg Gly Pro Arg Leu Gly Tyr Ser Ile Pro Ser Arg Ser Gly Ala
[0215]	195 200 205
[0216]	Ser Gly Leu Asp Lys Arg Asp Tyr Val
[0217]	210 215
[0218]	<210> 10
[0219]	<211> 209
[0220]	<212> PRT
[0221]	<213> 人
[0222]	<400> 10
[0223]	Met Ala Ser Met Gly Leu Gln Val Met Gly Ile Ala Leu Ala Val Leu
[0224]	1 5 10 15
[0225]	Gly Trp Leu Ala Val Met Leu Cys Cys Ala Leu Pro Met Trp Arg Val
[0226]	20 25 30
[0227]	Thr Ala Phe Ile Gly Ser Asn Ile Val Thr Ser Gln Thr Ile Trp Glu
[0228]	35 40 45
[0229]	Gly Leu Trp Met Asn Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
[0230]	50 55 60
[0231]	Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
[0232]	65 70 75 80
[0233]	Arg Ala Leu Val Ile Ile Ser Ile Ile Val Ala Ala Leu Gly Val Leu
[0234]	85 90 95
[0235]	Leu Ser Val Val Gly Gly Lys Cys Thr Asn Cys Leu Glu Asp Glu Ser
[0236]	100 105 110
[0237]	Ala Lys Ala Lys Thr Met Ile Val Ala Gly Val Val Phe Leu Leu Ala
[0238]	115 120 125
[0239]	Gly Leu Met Val Ile Val Pro Val Ser Trp Thr Ala His Asn Ile Ile
[0240]	130 135 140
[0241]	Gln Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Ser Gly Gln Lys Arg Glu Met
[0242]	145 150 155 160
[0243]	Gly Ala Ser Leu Tyr Val Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
[0244]	165 170 175
[0245]	Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Asn Cys Pro Pro Arg Thr Asp Lys Pro
[0246]	180 185 190
[0247]	Tyr Ser Ala Lys Tyr Ser Ala Ala Arg Ser Ala Ala Ala Ser Asn Tyr
[0248]	195 200 205
[0249]	Val
[0250]	<210> 11
[0251]	<211> 220

[0252]	<212>	PRT		
[0253]	<213>	人		
[0254]	<400>	11		
[0255]	Met Ser Met Gly Leu Glu Ile Thr Gly Thr Ala Leu Ala Val Leu Gly			
[0256]	1	5	10	15
[0257]	Trp Leu Gly Thr Ile Val Cys Cys Ala Leu Pro Met Trp Arg Val Ser			
[0258]		20	25	30
[0259]	Ala Phe Ile Gly Ser Asn Ile Ile Thr Ser Gln Asn Ile Trp Glu Gly			
[0260]		35	40	45
[0261]	Leu Trp Met Asn Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys Lys			
[0262]		50	55	60
[0263]	Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala Arg			
[0264]		65	70	75
[0265]	Ala Leu Ile Val Val Ala Ile Leu Leu Ala Ala Phe Gly Leu Leu Val			
[0266]		85	90	95
[0267]	Ala Leu Val Gly Ala Gln Cys Thr Asn Cys Val Gln Asp Asp Thr Ala			
[0268]		100	105	110
[0269]	Lys Ala Lys Ile Thr Ile Val Ala Gly Val Leu Phe Leu Leu Ala Ala			
[0270]		115	120	125
[0271]	Leu Leu Thr Leu Val Pro Val Ser Trp Ser Ala Asn Thr Ile Ile Arg			
[0272]		130	135	140
[0273]	Asp Phe Tyr Asn Pro Val Val Pro Glu Ala Gln Lys Arg Glu Met Gly			
[0274]		145	150	155
[0275]	Ala Gly Leu Tyr Val Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Gln Leu Leu Gly			
[0276]		165	170	175
[0277]	Gly Ala Leu Leu Cys Cys Ser Cys Pro Pro Arg Glu Lys Lys Tyr Thr			
[0278]		180	185	190
[0279]	Ala Thr Lys Val Val Tyr Ser Ala Pro Arg Ser Thr Gly Pro Gly Ala			
[0280]		195	200	205
[0281]	Ser Leu Gly Thr Gly Tyr Asp Arg Lys Asp Tyr Val			
[0282]		210	215	220
[0283]	<210>	12		
[0284]	<211>	159		
[0285]	<212>	DNA		
[0286]	<213>	人工的		
[0287]	<220>			
[0288]	<223>	编码预测的人密蛋白6的细胞外环1 (EC1) 的密码子优化的核酸序列		
[0289]	<400>	12		
[0290]	cccatgtgga aagtgaccgc cttcatcggc aacagcatcg tgggtgcccga ggtggtctgg			60
[0291]	gagggcctgt ggatgagctg cgtggtgcag agcaccggcc agatgcagtg caaggtgtac			120
[0292]	gacagcctgc tggccctgcc tcaggatctg caggctgct			159
[0293]	<210>	13		

[0336]	<210> 16	
[0337]	<211> 20	
[0338]	<212> DNA	
[0339]	<213> 人工的	
[0340]	<220>	
[0341]	<223> 寡核苷酸	
[0342]	<400> 16	
[0343]	tccatgacgt tcctgacgtt	20
[0344]	<210> 17	
[0345]	<211> 43	
[0346]	<212> DNA	
[0347]	<213> 人工序列	
[0348]	<220>	
[0349]	<223> 寡核苷酸	
[0350]	<400> 17	
[0351]	gagaaagctt gccgccacca tgggatggag ctggatcttt ctc	43
[0352]	<210> 18	
[0353]	<211> 43	
[0354]	<212> DNA	
[0355]	<213> 人工序列	
[0356]	<220>	
[0357]	<223> 寡核苷酸	
[0358]	<400> 18	
[0359]	gagagggccc ttggtggagg ctgaagagac tgtgagagtg gtg	43
[0360]	<210> 19	
[0361]	<211> 43	
[0362]	<212> DNA	
[0363]	<213> 人工序列	
[0364]	<220>	
[0365]	<223> 寡核苷酸	
[0366]	<400> 19	
[0367]	gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg	43
[0368]	<210> 20	
[0369]	<211> 43	
[0370]	<212> DNA	
[0371]	<213> 人工序列	
[0372]	<220>	
[0373]	<223> 寡核苷酸	
[0374]	<400> 20	
[0375]	gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg	43
[0376]	<210> 21	
[0377]	<211> 46	

[0378]	<212> DNA	
[0379]	<213> 人工序列	
[0380]	<220>	
[0381]	<223> 寡核苷酸	
[0382]	<400> 21	
[0383]	gagaaagctt gccgccacca tgcattttca agtgcagatt ttcagc	46
[0384]	<210> 22	
[0385]	<211> 33	
[0386]	<212> DNA	
[0387]	<213> 人工序列	
[0388]	<220>	
[0389]	<223> 寡核苷酸	
[0390]	<400> 22	
[0391]	cacacgtacg tttgatttcc agcttgggtgc ctc	33
[0392]	<210> 23	
[0393]	<211> 33	
[0394]	<212> DNA	
[0395]	<213> 人工序列	
[0396]	<220>	
[0397]	<223> 寡核苷酸	
[0398]	<400> 23	
[0399]	cacacgtacg tttgatttcc agcttgggtgc ctc	33
[0400]	<210> 24	
[0401]	<211> 993	
[0402]	<212> DNA	
[0403]	<213> 人	
[0404]	<400> 24	
[0405]	gcctccacca agggcccaag cgtgttcccc ctggcccca gcagcaagag caccagcggc	60
[0406]	ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccg gaccgtgagc	120
[0407]	tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc	180
[0408]	ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc	240
[0409]	tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc	300
[0410]	aagagctgcg acaagacca cacctgcccc ccctgcccag ccccagagct gctgggcgga	360
[0411]	cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag caggacccc	420
[0412]	gagtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaggacc cagagtgaa gttcaactgg	480
[0413]	tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac	540
[0414]	agcacctaca ggggtggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag	600
[0415]	gaatacaagt gcaaggtctc caacaagcc ctgccagccc ccatcgaaaa gaccatcagc	660
[0416]	aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacacc tgccccccag ccgggaggag	720
[0417]	atgaccaaga accaggtgct cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc cagcgacatc	780
[0418]	gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg	840
[0419]	ctggacagcg acggcagctt cttctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg	900

[0420] cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 960
 [0421] cagaagtccc tgagcctgag ccccggaag tag 993
 [0422] <210> 25
 [0423] <211> 330
 [0424] <212> PRT
 [0425] <213> 人
 [0426] <400> 25
 [0427] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 [0428] 1 5 10 15
 [0429] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 [0430] 20 25 30
 [0431] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 [0432] 35 40 45
 [0433] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 [0434] 50 55 60
 [0435] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 [0436] 65 70 75 80
 [0437] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 [0438] 85 90 95
 [0439] Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 [0440] 100 105 110
 [0441] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 [0442] 115 120 125
 [0443] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 [0444] 130 135 140
 [0445] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 [0446] 145 150 155 160
 [0447] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 [0448] 165 170 175
 [0449] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 [0450] 180 185 190
 [0451] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 [0452] 195 200 205
 [0453] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 [0454] 210 215 220
 [0455] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 [0456] 225 230 235 240
 [0457] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 [0458] 245 250 255
 [0459] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 [0460] 260 265 270
 [0461] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

[0462]	275	280	285
[0463]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[0464]	290	295	300
[0465]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0466]	305	310	315 320
[0467]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0468]		325	330
[0469]	<210>	26	
[0470]	<211>	324	
[0471]	<212>	DNA	
[0472]	<213>	人	
[0473]	<400>	26	
[0474]	cgtagcgtgg ccgctcccag cgtgttcac ttcccccca gcgacgagca gctgaagtcc	60	
[0475]	ggcaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggc caaggtgcag	120	
[0476]	tggaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac	180	
[0477]	agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgacct tgagcaagc cgactacgag	240	
[0478]	aagcacaagg tgtacgctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag	300	
[0479]	agcttaaca ggggcgagtg ctag	324	
[0480]	<210>	27	
[0481]	<211>	107	
[0482]	<212>	PRT	
[0483]	<213>	人	
[0484]	<400>	27	
[0485]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0486]	1	5	10 15
[0487]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[0488]		20	25 30
[0489]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0490]		35	40 45
[0491]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[0492]		50	55 60
[0493]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[0494]	65	70	75 80
[0495]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[0496]		85	90 95
[0497]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0498]		100	105
[0499]	<210>	28	
[0500]	<211>	32	
[0501]	<212>	DNA	
[0502]	<213>	人工序列	
[0503]	<220>		

[0504]	<223>	寡核苷酸	
[0505]	<220>		
[0506]	<221>	misc_feature	
[0507]	<222>	(31)..(32)	
[0508]	<223>	任何核苷酸	
[0509]	<400>	28	
[0510]		tttttttttt tttttttttt tttttttttt nn	32
[0511]	<210>	29	
[0512]	<211>	30	
[0513]	<212>	DNA	
[0514]	<213>	人工序列	
[0515]	<220>		
[0516]	<223>	寡核苷酸	
[0517]	<400>	29	
[0518]		aagcagtggg atcaacgcag agtacgcggg	30
[0519]	<210>	30	
[0520]	<211>	26	
[0521]	<212>	DNA	
[0522]	<213>	人工序列	
[0523]	<220>		
[0524]	<223>	寡核苷酸	
[0525]	<400>	30	
[0526]		ctgctcactg gatgggtggga agatgg	26
[0527]	<210>	31	
[0528]	<211>	25	
[0529]	<212>	DNA	
[0530]	<213>	人工序列	
[0531]	<220>		
[0532]	<223>	寡核苷酸	
[0533]	<400>	31	
[0534]		acagggcca gtgatagac cgatg	25
[0535]	<210>	32	
[0536]	<211>	45	
[0537]	<212>	DNA	
[0538]	<213>	人工序列	
[0539]	<220>		
[0540]	<223>	寡核苷酸	
[0541]	<400>	32	
[0542]		gtaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gatatcaacgc agagt	45
[0543]	<210>	33	
[0544]	<211>	22	
[0545]	<212>	DNA	

[0546]	<213>	人工序列	
[0547]	<220>		
[0548]	<223>	寡核苷酸	
[0549]	<400>	33	
[0550]		gtaatacgac tcactatagg gc	22
[0551]	<210>	34	
[0552]	<211>	117	
[0553]	<212>	PRT	
[0554]	<213>	人工序列	
[0555]	<220>		
[0556]	<223>	抗体VH序列	
[0557]	<400>	34	
[0558]		Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[0559]		1 5 10 15	
[0560]		Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr	
[0561]		20 25 30	
[0562]		Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile	
[0563]		35 40 45	
[0564]		Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	
[0565]		50 55 60	
[0566]		Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[0567]		65 70 75 80	
[0568]		Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0569]		85 90 95	
[0570]		Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
[0571]		100 105 110	
[0572]		Leu Thr Val Ser Ser	
[0573]		115	
[0574]	<210>	35	
[0575]	<211>	107	
[0576]	<212>	PRT	
[0577]	<213>	人工序列	
[0578]	<220>		
[0579]	<223>	抗体VL序列	
[0580]	<400>	35	
[0581]		Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly	
[0582]		1 5 10 15	
[0583]		Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu	
[0584]		20 25 30	
[0585]		His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Val Tyr	
[0586]		35 40 45	
[0587]		Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser	

[0588]	50	55	60
[0589]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu		
[0590]	65	70	75 80
[0591]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ile Tyr Pro Pro Trp		
[0592]		85	90 95
[0593]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0594]		100	105
[0595]	<210>	36	
[0596]	<211>	117	
[0597]	<212>	PRT	
[0598]	<213>	人工序列	
[0599]	<220>		
[0600]	<223>	抗体VH序列	
[0601]	<400>	36	
[0602]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0603]	1	5	10 15
[0604]	Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr		
[0605]		20	25 30
[0606]	Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile		
[0607]		35	40 45
[0608]	Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0609]		50	55 60
[0610]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0611]		65	70 75 80
[0612]	Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0613]		85	90 95
[0614]	Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
[0615]		100	105 110
[0616]	Leu Thr Val Ser Ser		
[0617]		115	
[0618]	<210>	37	
[0619]	<211>	107	
[0620]	<212>	PRT	
[0621]	<213>	人工序列	
[0622]	<220>		
[0623]	<223>	抗体VL序列	
[0624]	<400>	37	
[0625]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly		
[0626]	1	5	10 15
[0627]	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met		
[0628]		20	25 30
[0629]	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr		

[0630]	35	40	45
[0631]	Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg		
[0632]	50	55	60
[0633]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu		
[0634]	65	70	75 80
[0635]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp		
[0636]		85	90 95
[0637]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0638]		100	105
[0639]	<210> 38		
[0640]	<211> 117		
[0641]	<212> PRT		
[0642]	<213> 人工序列		
[0643]	<220>		
[0644]	<223> 抗体VH序列		
[0645]	<400> 38		
[0646]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0647]	1	5	10 15
[0648]	Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr		
[0649]		20	25 30
[0650]	Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile		
[0651]		35	40 45
[0652]	Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0653]		50	55 60
[0654]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0655]		65	70 75 80
[0656]	Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys		
[0657]		85	90 95
[0658]	Ala Arg Asp Phe Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
[0659]		100	105 110
[0660]	Leu Thr Val Ser Ser		
[0661]		115	
[0662]	<210> 39		
[0663]	<211> 107		
[0664]	<212> PRT		
[0665]	<213> 人工序列		
[0666]	<220>		
[0667]	<223> 抗体VL序列		
[0668]	<400> 39		
[0669]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly		
[0670]	1	5	10 15
[0671]	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met		

[0672]	20	25	30
[0673]	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr		
[0674]	35	40	45
[0675]	Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
[0676]	50	55	60
[0677]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu		
[0678]	65	70	75
[0679]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Pro Trp		
[0680]	85	90	95
[0681]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0682]	100	105	
[0683]	<210> 40		
[0684]	<211> 117		
[0685]	<212> PRT		
[0686]	<213> 人工序列		
[0687]	<220>		
[0688]	<223> 抗体VH序列		
[0689]	<400> 40		
[0690]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0691]	1	5	10
[0692]	Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr		
[0693]	20	25	30
[0694]	Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile		
[0695]	35	40	45
[0696]	Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0697]	50	55	60
[0698]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0699]	65	70	75
[0700]	Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0701]	85	90	95
[0702]	Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
[0703]	100	105	110
[0704]	Leu Thr Val Ser Ser		
[0705]	115		
[0706]	<210> 41		
[0707]	<211> 107		
[0708]	<212> PRT		
[0709]	<213> 人工序列		
[0710]	<220>		
[0711]	<223> 抗体VL序列		
[0712]	<400> 41		
[0713]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly		

[0714]	1	5	10	15
[0715]	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met			
[0716]		20	25	30
[0717]	His Trp Phe Gln Leu Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
[0718]		35	40	45
[0719]	Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg			
[0720]		50	55	60
[0721]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu			
[0722]		65	70	75
[0723]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Asn Tyr Pro Pro Trp			
[0724]		85	90	95
[0725]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0726]		100	105	
[0727]	<210>	42		
[0728]	<211>	5		
[0729]	<212>	PRT		
[0730]	<213>	人工序列		
[0731]	<220>			
[0732]	<223>	抗体VH CDR3序列		
[0733]	<220>			
[0734]	<221>	MISC_FEATURE		
[0735]	<222>	(1) .. (1)		
[0736]	<223>	任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr		
[0737]	<220>			
[0738]	<221>	MISC_FEATURE		
[0739]	<222>	(3) .. (3)		
[0740]	<223>	任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr		
[0741]	<220>			
[0742]	<221>	MISC_FEATURE		
[0743]	<222>	(5) .. (5)		
[0744]	<223>	任何氨基酸, 优选Leu或Phe, 更优选Leu		
[0745]	<400>	42		
[0746]	Xaa Gly Xaa Val Xaa			
[0747]	1	5		
[0748]	<210>	43		
[0749]	<211>	6		
[0750]	<212>	PRT		
[0751]	<213>	人工序列		
[0752]	<220>			
[0753]	<223>	抗体VH CDR3序列		
[0754]	<220>			
[0755]	<221>	MISC_FEATURE		

- [0756] <222> (2) .. (2)
- [0757] <223> 任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr
- [0758] <220>
- [0759] <221> MISC_FEATURE
- [0760] <222> (4) .. (4)
- [0761] <223> 任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr
- [0762] <220>
- [0763] <221> MISC_FEATURE
- [0764] <222> (6) .. (6)
- [0765] <223> 任何氨基酸, 优选Leu或Phe, 更优选Leu
- [0766] <400> 43
- [0767] Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa
- [0768] 1 5
- [0769] <210> 44
- [0770] <211> 6
- [0771] <212> PRT
- [0772] <213> 人工序列
- [0773] <220>
- [0774] <223> 抗体VH CDR3序列
- [0775] <220>
- [0776] <221> MISC_FEATURE
- [0777] <222> (1) .. (1)
- [0778] <223> 任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr
- [0779] <220>
- [0780] <221> MISC_FEATURE
- [0781] <222> (3) .. (3)
- [0782] <223> 任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr
- [0783] <220>
- [0784] <221> MISC_FEATURE
- [0785] <222> (5) .. (5)
- [0786] <223> 任何氨基酸, 优选Leu或Phe, 更优选Leu
- [0787] <400> 44
- [0788] Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp
- [0789] 1 5
- [0790] <210> 45
- [0791] <211> 7
- [0792] <212> PRT
- [0793] <213> 人工序列
- [0794] <220>
- [0795] <223> 抗体VH CDR3序列
- [0796] <220>
- [0797] <221> MISC_FEATURE

[0798]	<222>	(2) .. (2)
[0799]	<223>	任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr
[0800]	<220>	
[0801]	<221>	MISC_FEATURE
[0802]	<222>	(4) .. (4)
[0803]	<223>	任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr
[0804]	<220>	
[0805]	<221>	MISC_FEATURE
[0806]	<222>	(6) .. (6)
[0807]	<223>	任何氨基酸, 优选Leu或Phe, 更优选Leu
[0808]	<400>	45
[0809]		Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp
[0810]	1	5
[0811]	<210>	46
[0812]	<211>	10
[0813]	<212>	PRT
[0814]	<213>	人工序列
[0815]	<220>	
[0816]	<223>	抗体VH CDR3序列
[0817]	<220>	
[0818]	<221>	MISC_FEATURE
[0819]	<222>	(4) .. (4)
[0820]	<223>	任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr
[0821]	<220>	
[0822]	<221>	MISC_FEATURE
[0823]	<222>	(6) .. (6)
[0824]	<223>	任何氨基酸, 优选芳族氨基酸, 更优选Phe或Tyr, 最优选Tyr
[0825]	<220>	
[0826]	<221>	MISC_FEATURE
[0827]	<222>	(8) .. (8)
[0828]	<223>	任何氨基酸, 优选Leu或Phe, 更优选Leu
[0829]	<400>	46
[0830]		Ala Arg Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp Tyr
[0831]	1	5 10
[0832]	<210>	47
[0833]	<211>	8
[0834]	<212>	PRT
[0835]	<213>	人工序列
[0836]	<220>	
[0837]	<223>	抗体VH CDR1序列
[0838]	<400>	47
[0839]		Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr

[0840]	1	5
[0841]	<210>	48
[0842]	<211>	8
[0843]	<212>	PRT
[0844]	<213>	人工序列
[0845]	<220>	
[0846]	<223>	抗体VH CDR2序列
[0847]	<220>	
[0848]	<221>	MISC_FEATURE
[0849]	<222>	(8) .. (8)
[0850]	<223>	任何氨基酸, 优选Leu或Phe, 更优选Leu
[0851]	<400>	48
[0852]	Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Xaa	
[0853]	1	5
[0854]	<210>	49
[0855]	<211>	5
[0856]	<212>	PRT
[0857]	<213>	人工序列
[0858]	<220>	
[0859]	<223>	抗体VL CDR3序列
[0860]	<220>	
[0861]	<221>	MISC_FEATURE
[0862]	<222>	(2) .. (2)
[0863]	<223>	任何氨基酸, 优选Ser或Asn, 最优选Ser
[0864]	<220>	
[0865]	<221>	MISC_FEATURE
[0866]	<222>	(3) .. (3)
[0867]	<223>	任何氨基酸, 优选Tyr、Ser、Ile、Asn或Thr, 更优选Tyr、Ser或Asn, 最优选Asn
[0868]	<220>	
[0869]	<221>	MISC_FEATURE
[0870]	<222>	(4) .. (4)
[0871]	<223>	任何氨基酸, 优选Ser或Tyr, 更优选Tyr
[0872]	<400>	49
[0873]	Arg Xaa Xaa Xaa Pro	
[0874]	1	5
[0875]	<210>	50
[0876]	<211>	7
[0877]	<212>	PRT
[0878]	<213>	人工序列
[0879]	<220>	
[0880]	<223>	抗体VL CDR3序列
[0881]	<220>	

[0882]	<221>	MISC_FEATURE
[0883]	<222>	(3) .. (3)
[0884]	<223>	任何氨基酸, 优选Ser或Asn, 最优选Ser
[0885]	<220>	
[0886]	<221>	MISC_FEATURE
[0887]	<222>	(4) .. (4)
[0888]	<223>	任何氨基酸, 优选Tyr、Ser、Ile、Asn或Thr, 更优选Tyr、Ser或Asn, 最优选Asn
[0889]	<220>	
[0890]	<221>	MISC_FEATURE
[0891]	<222>	(5) .. (5)
[0892]	<223>	任何氨基酸, 优选Ser或Tyr, 更优选Tyr
[0893]	<400>	50
[0894]		Gln Arg Xaa Xaa Xaa Pro Pro
[0895]	1	5
[0896]	<210>	51
[0897]	<211>	10
[0898]	<212>	PRT
[0899]	<213>	人工序列
[0900]	<220>	
[0901]	<223>	抗体VL CDR3序列
[0902]	<220>	
[0903]	<221>	MISC_FEATURE
[0904]	<222>	(4) .. (4)
[0905]	<223>	任何氨基酸, 优选Ser或Asn, 最优选Ser
[0906]	<220>	
[0907]	<221>	MISC_FEATURE
[0908]	<222>	(5) .. (5)
[0909]	<223>	任何氨基酸, 优选Tyr、Ser、Ile、Asn或Thr, 更优选Tyr、Ser或Asn, 最优选Asn
[0910]	<220>	
[0911]	<221>	MISC_FEATURE
[0912]	<222>	(6) .. (6)
[0913]	<223>	任何氨基酸, 优选Ser或Tyr, 更优选Tyr
[0914]	<400>	51
[0915]		Gln Gln Arg Xaa Xaa Xaa Pro Pro Trp Thr
[0916]	1	5 10
[0917]	<210>	52
[0918]	<211>	5
[0919]	<212>	PRT
[0920]	<213>	人工序列
[0921]	<220>	
[0922]	<223>	抗体VL CDR1序列
[0923]	<220>	

- [0924] <221> MISC_FEATURE
[0925] <222> (4) .. (4)
[0926] <223> 任何氨基酸, 优选Ser或Asn, 最优选Ser
[0927] <400> 52
[0928] Ser Ser Val Xaa Tyr
[0929] 1 5
[0930] <210> 53
[0931] <211> 3
[0932] <212> PRT
[0933] <213> 人工序列
[0934] <220>
[0935] <223> 抗体VL CDR2序列
[0936] <400> 53
[0937] Ser Thr Ser
[0938] 1



图2A

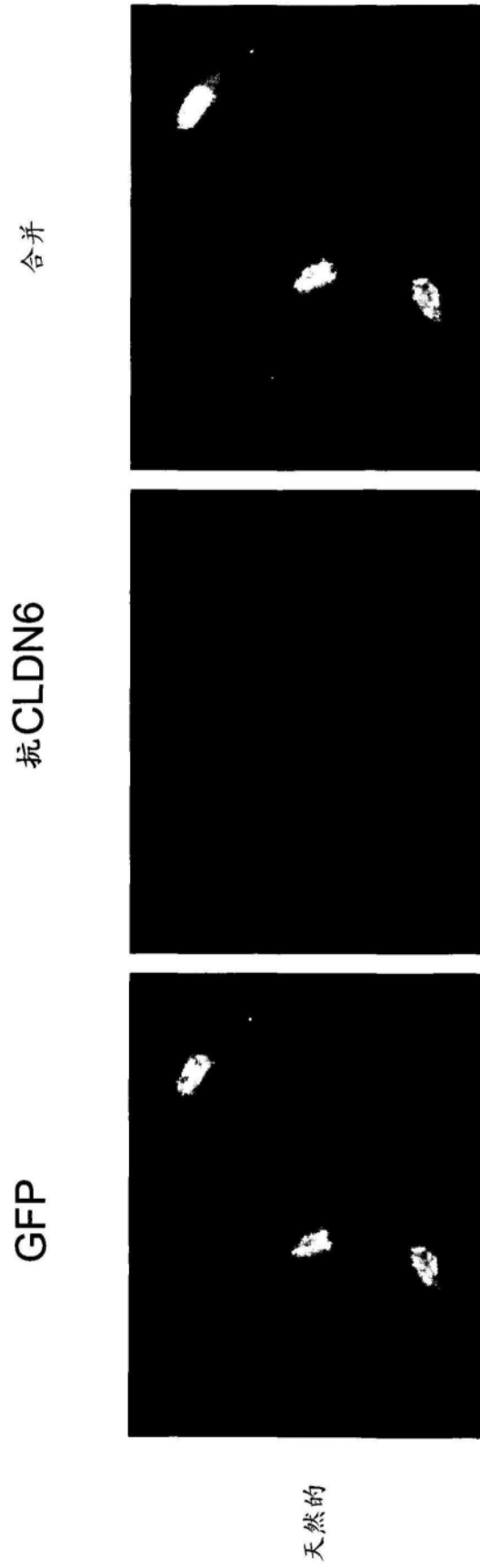


图2B

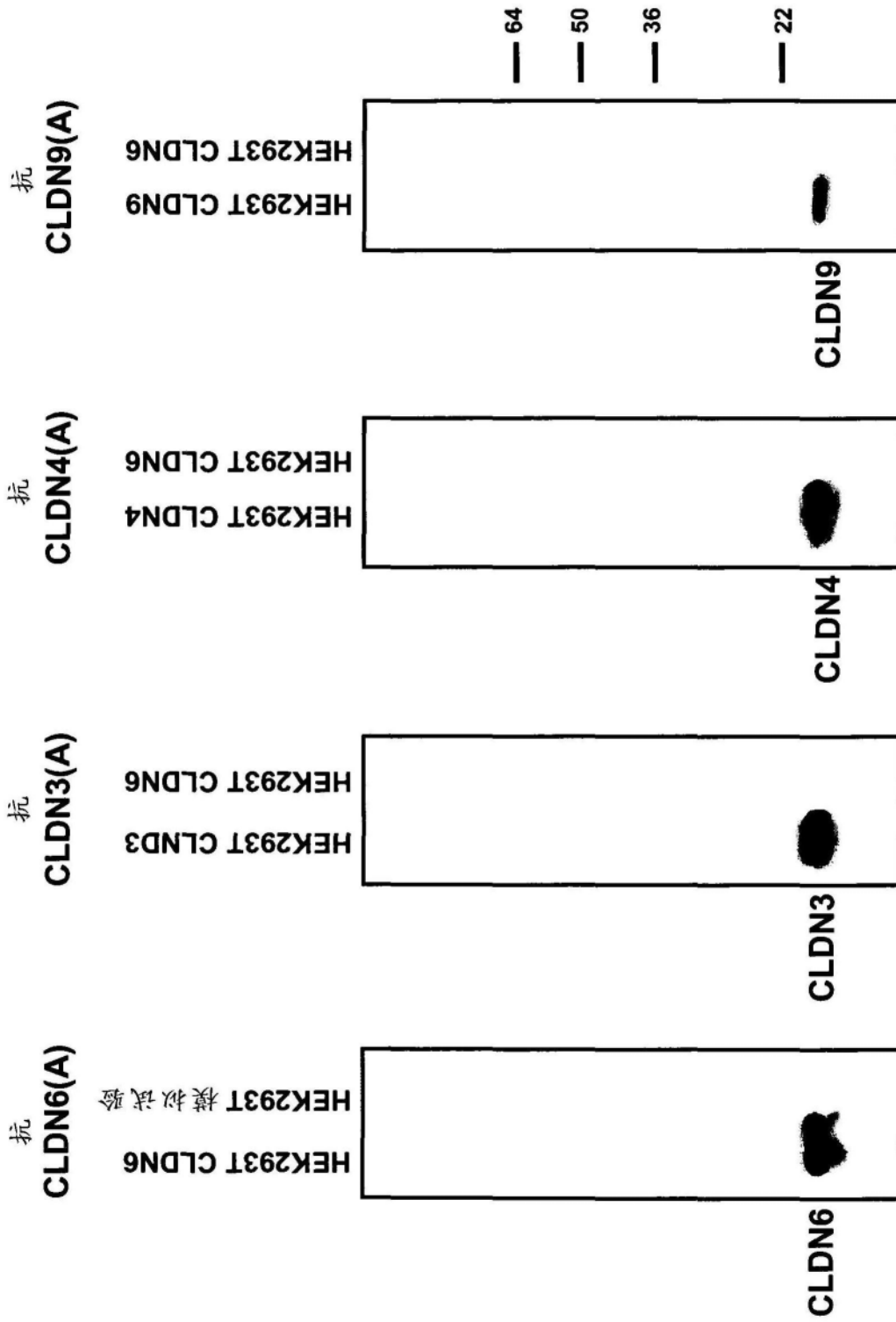
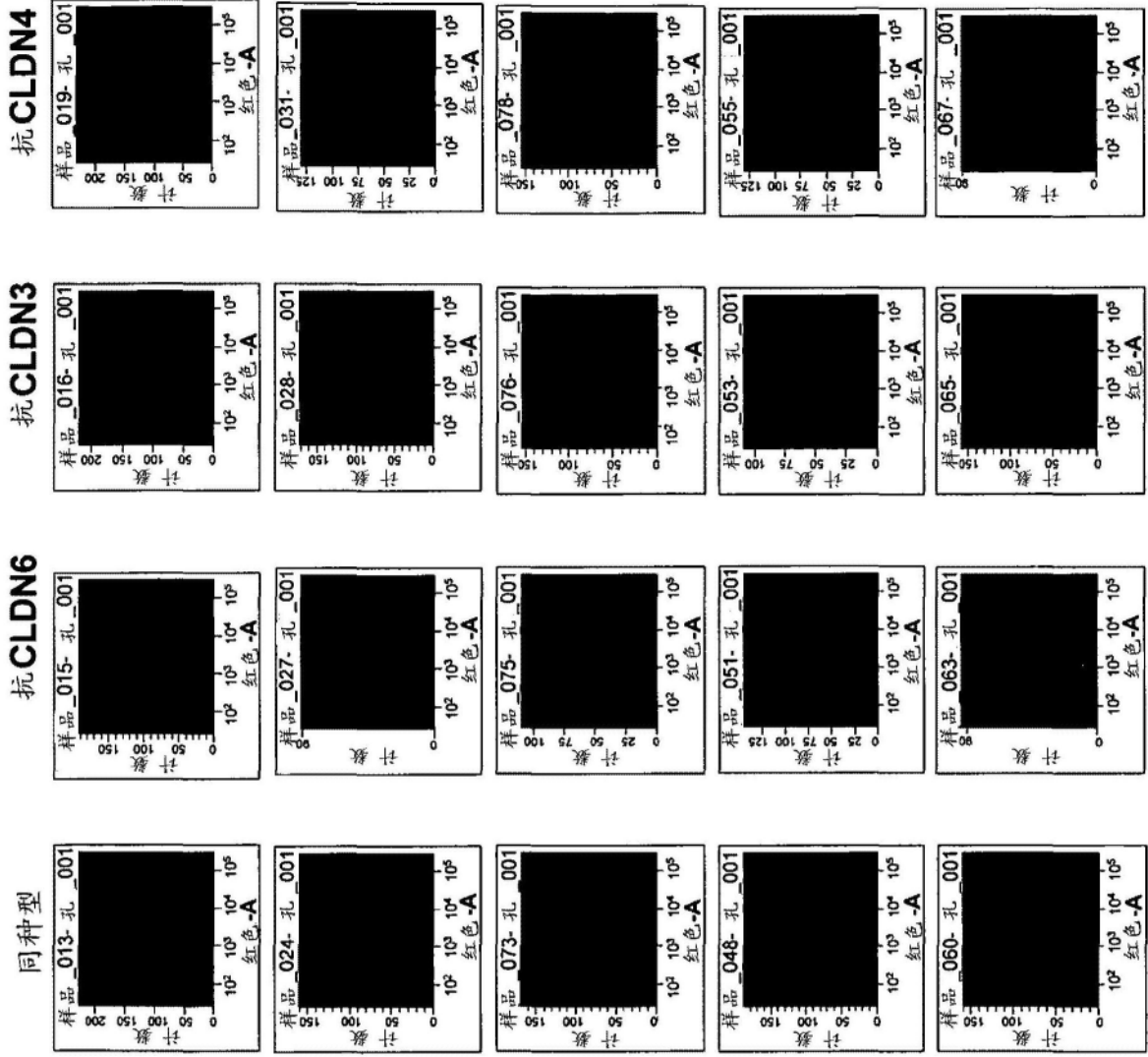


图3



未转染的

CLDN6
转染的

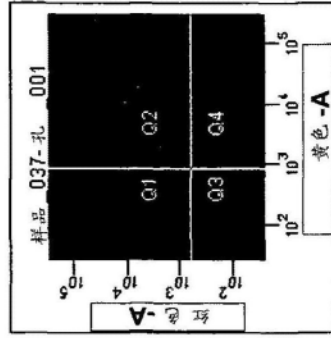
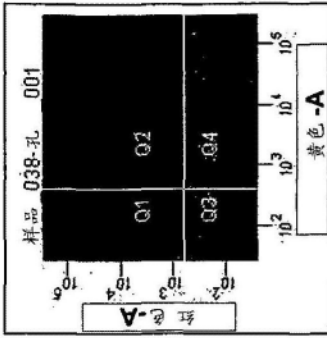
CLDN9
转染的

CLDN3
转染的

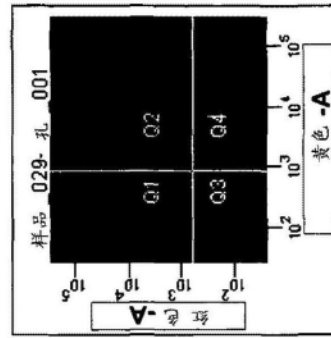
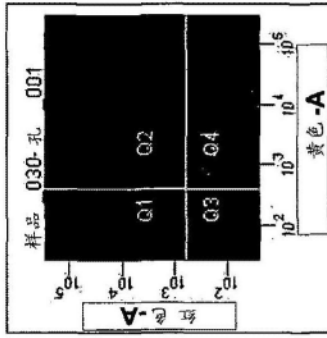
CLDN4
转染的

图4

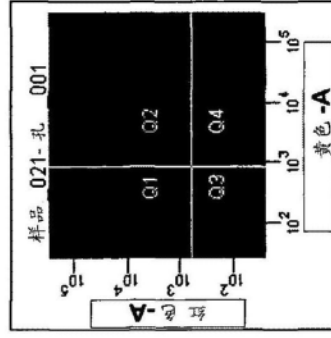
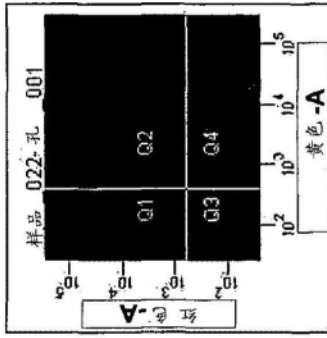
CLDN9



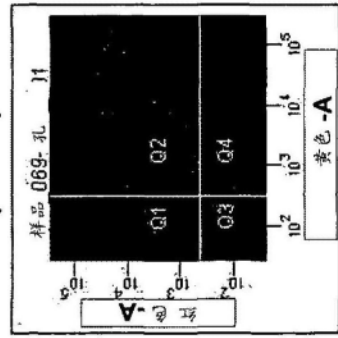
CLDN4



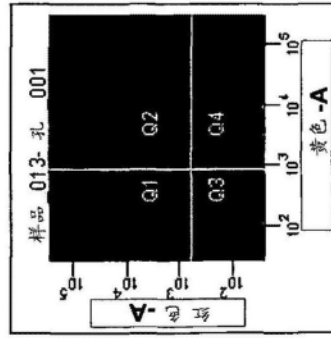
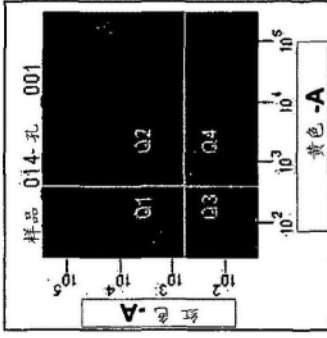
CLDN3



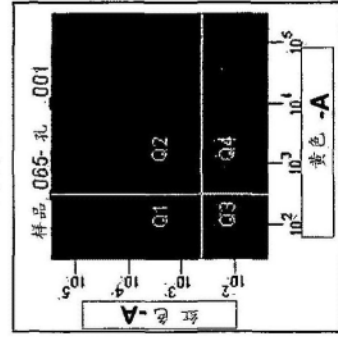
CLDN6(I143V)-SNP



CLDN6



同种型



F3-6C3-H8

F4-4F7-F2

F3-6C3-H8

图5A

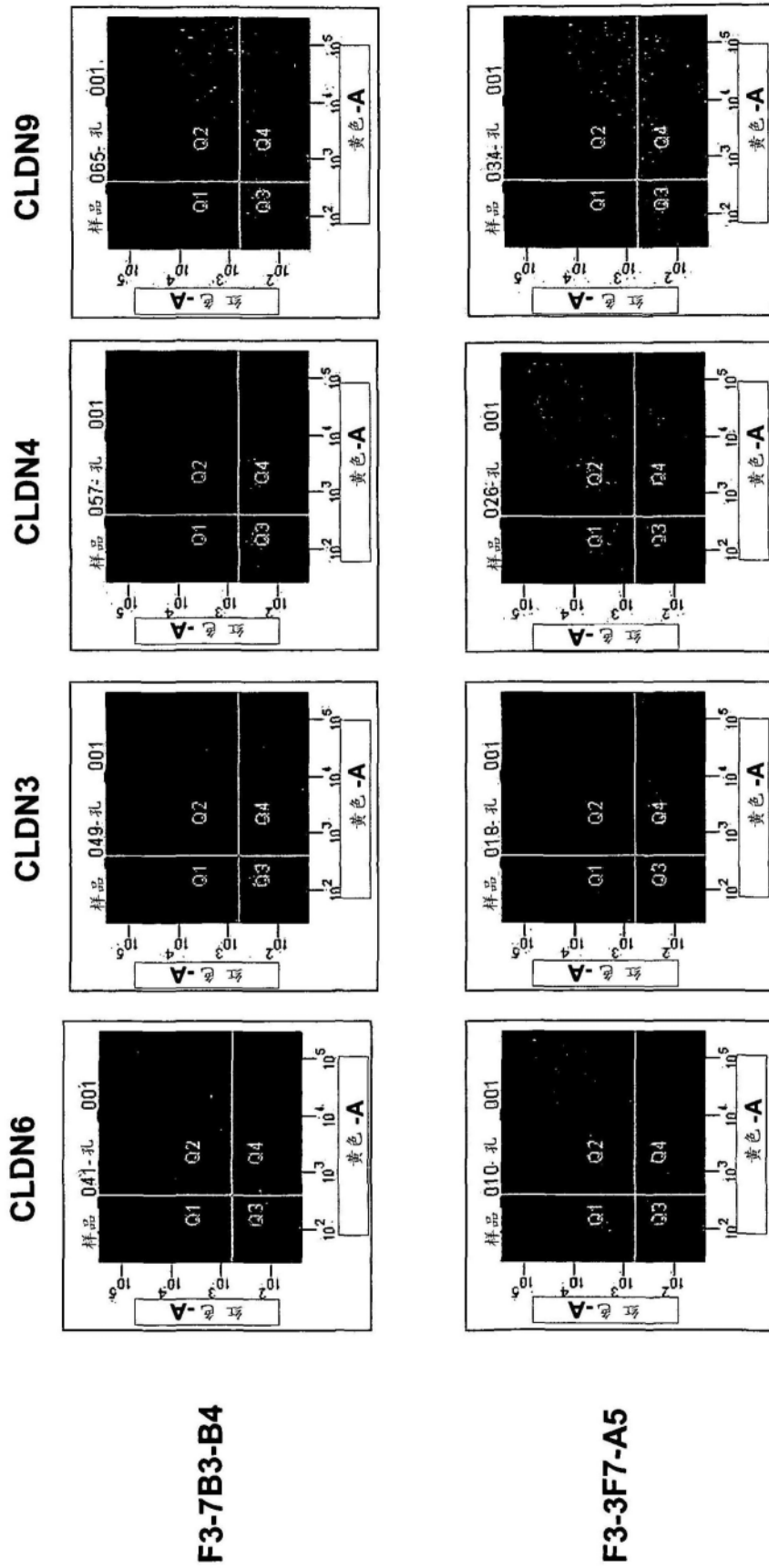


图5B

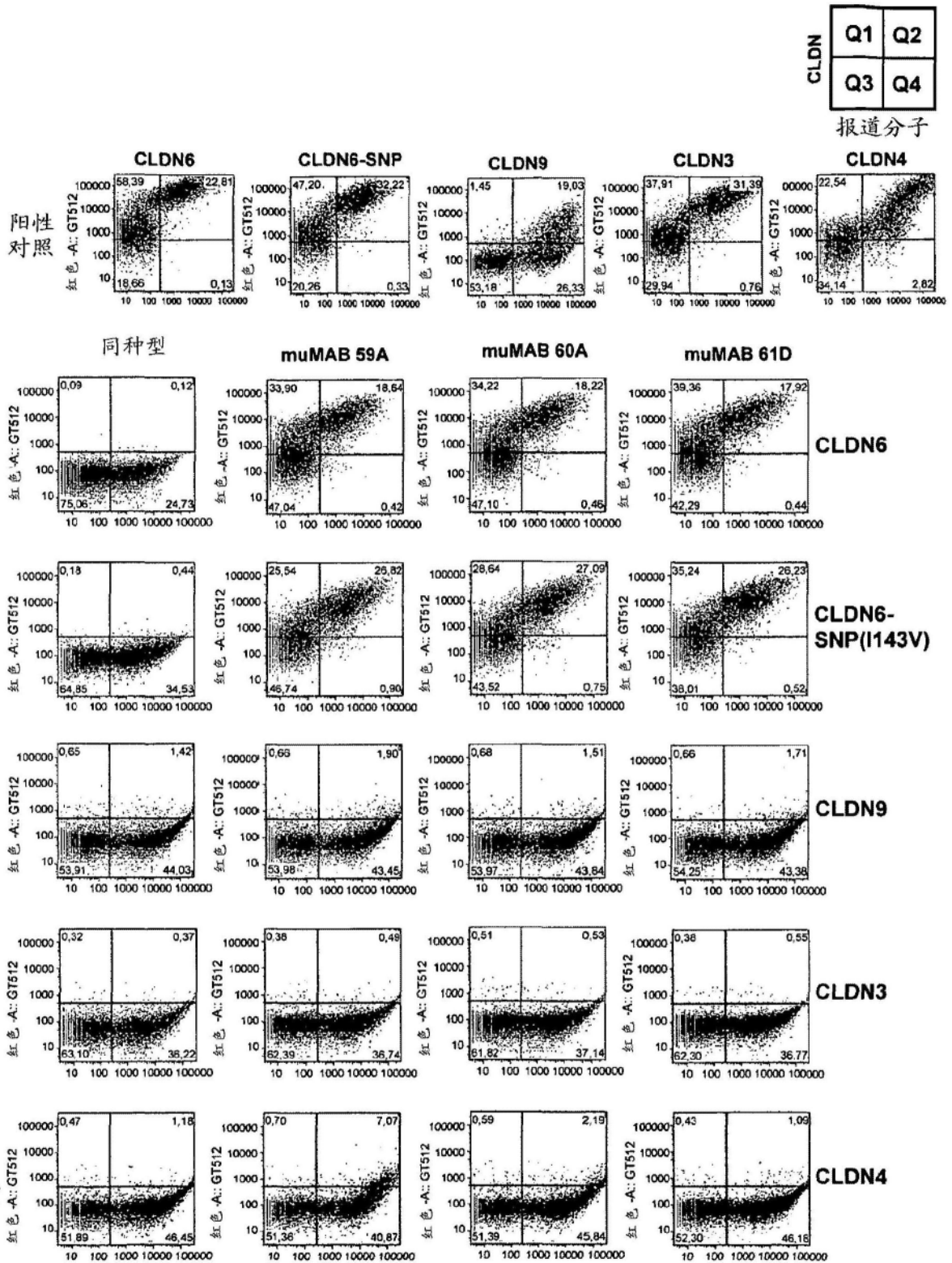


图6

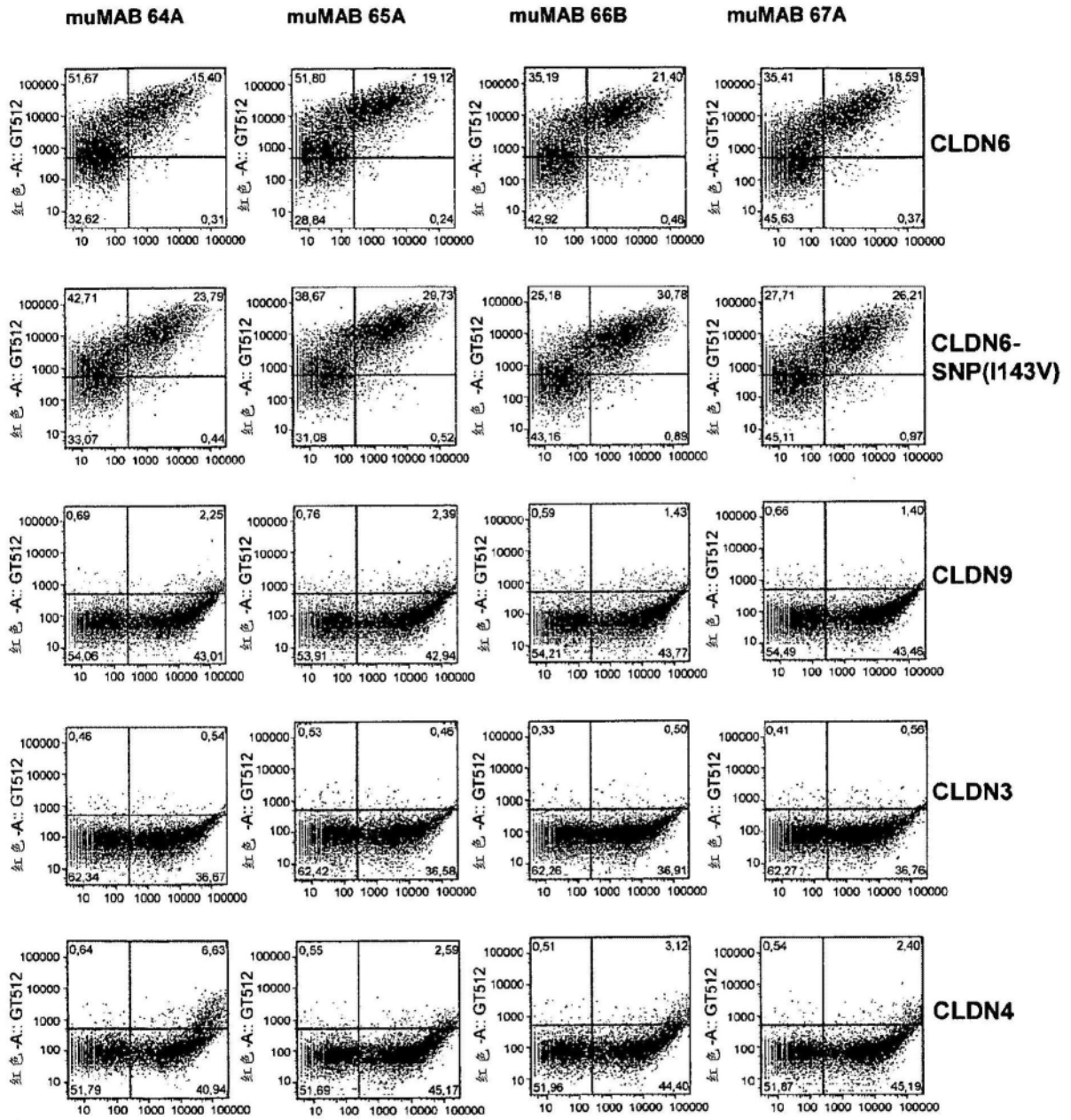


图6(续)

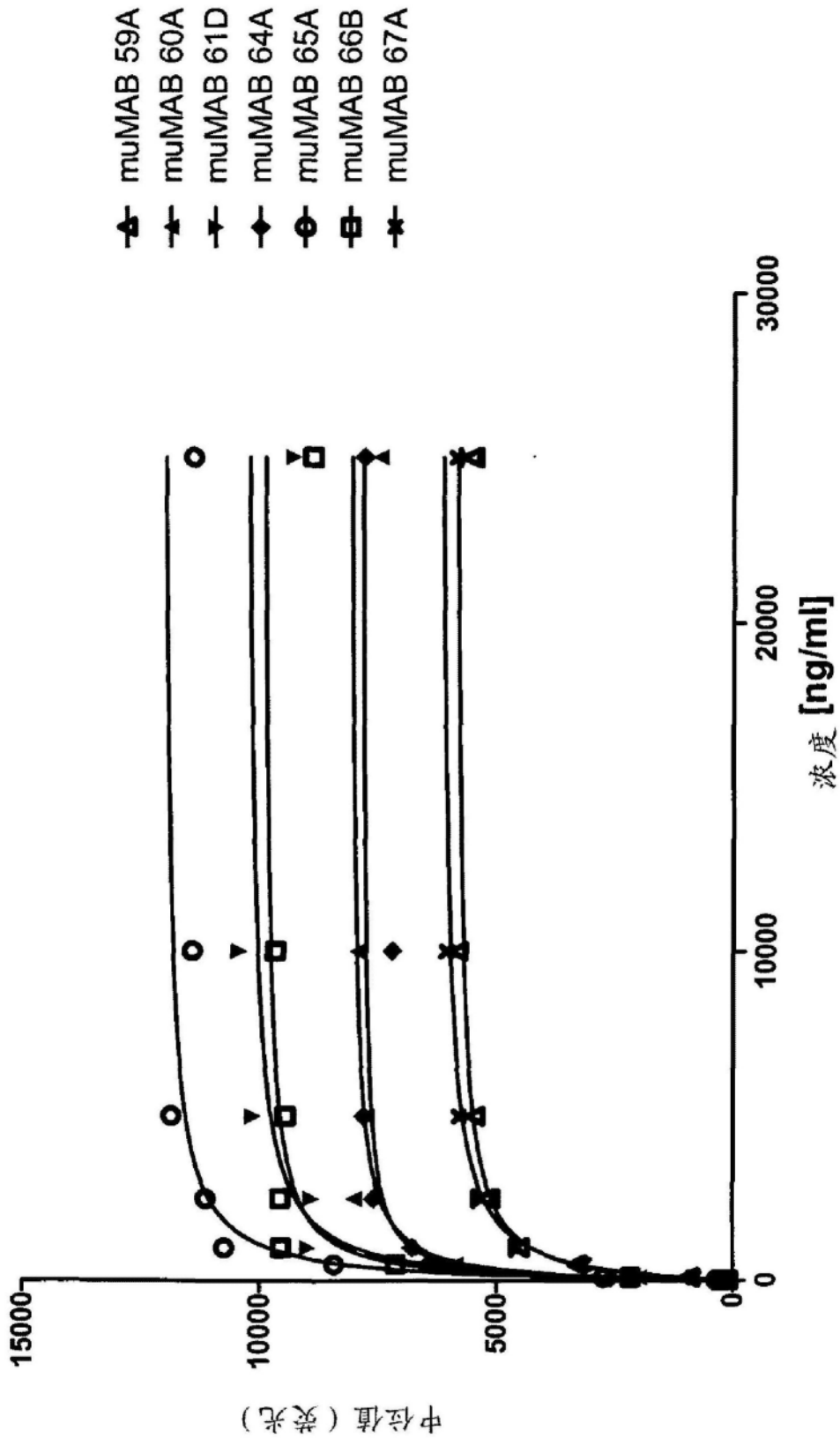


图7

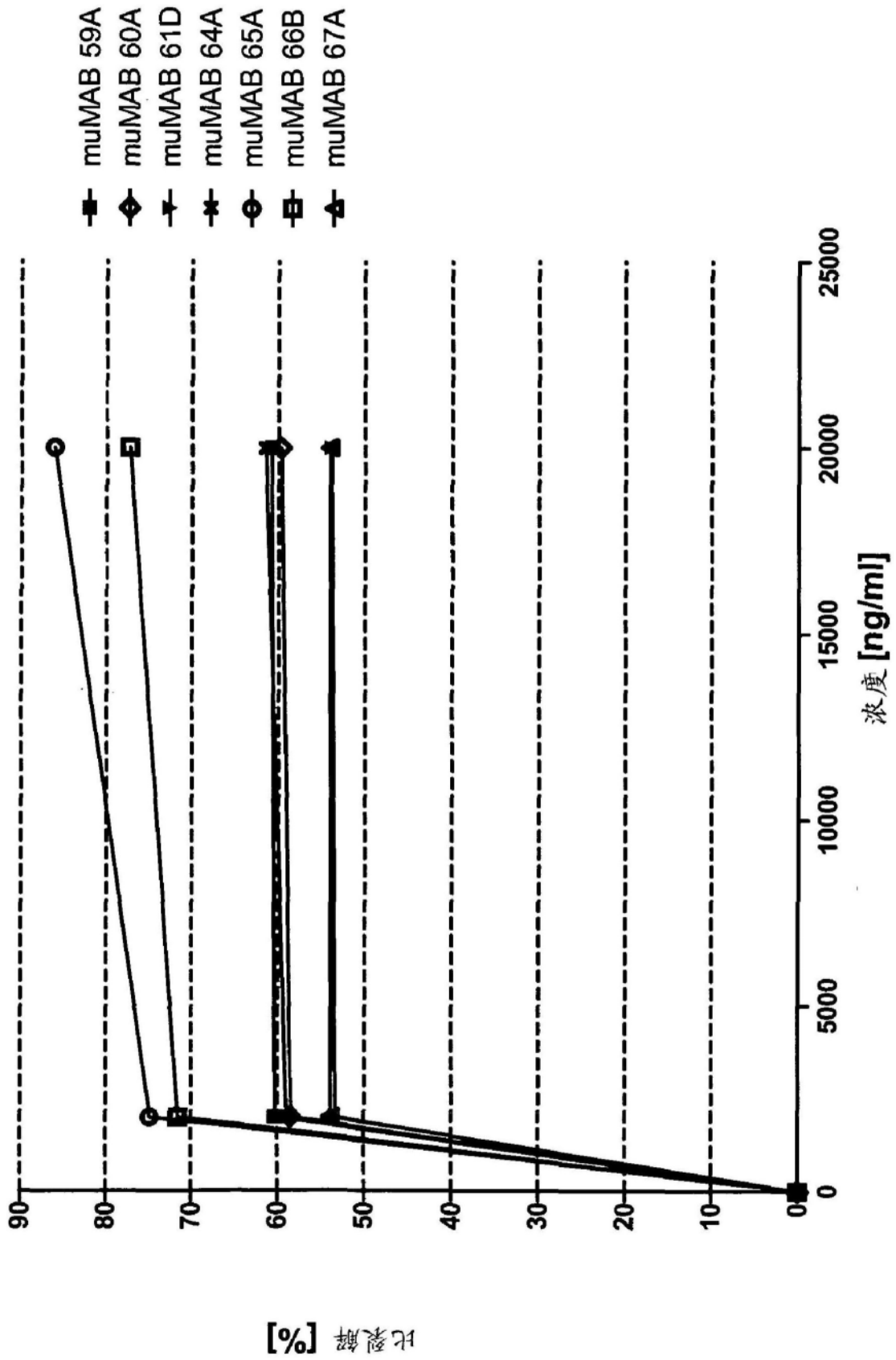


图8

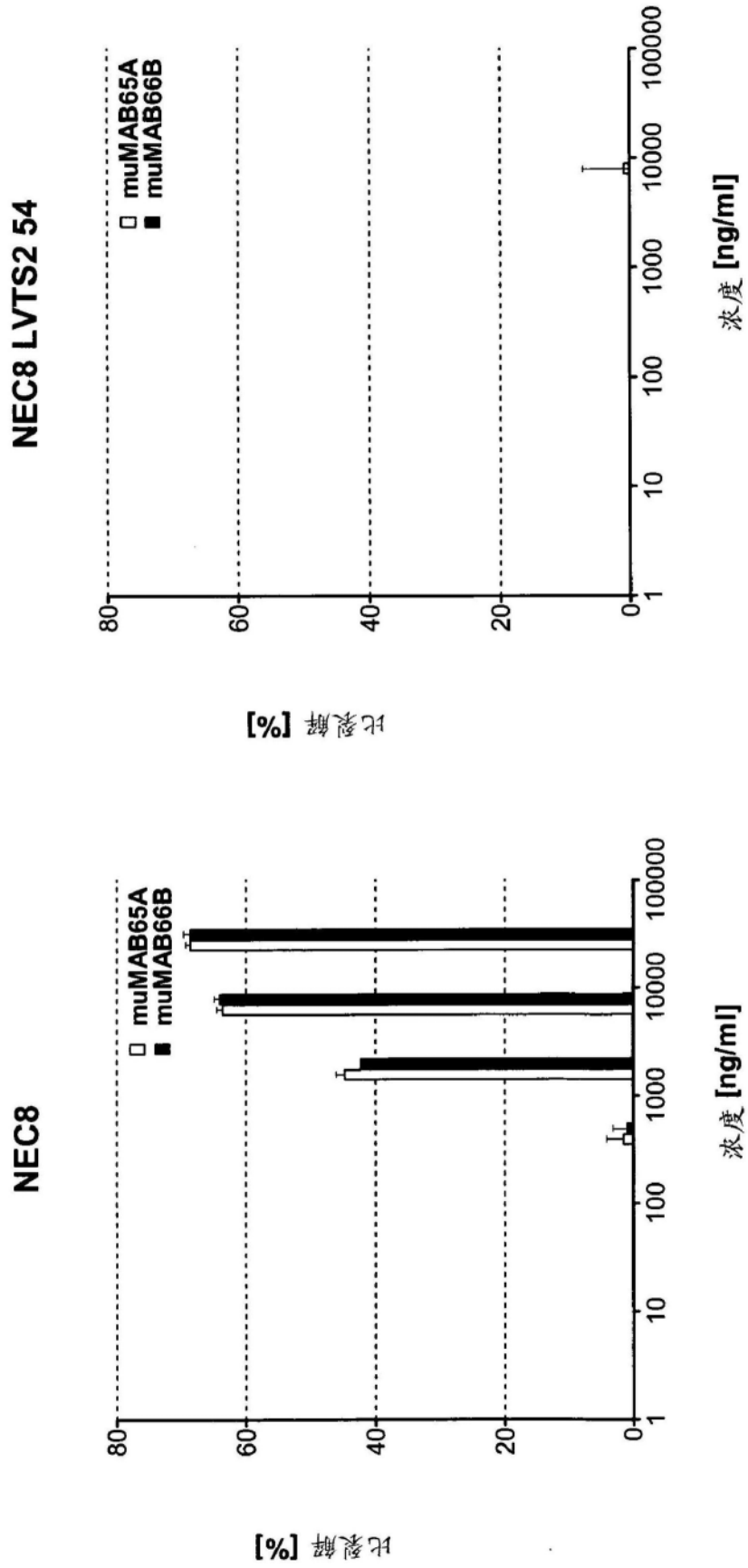


图9

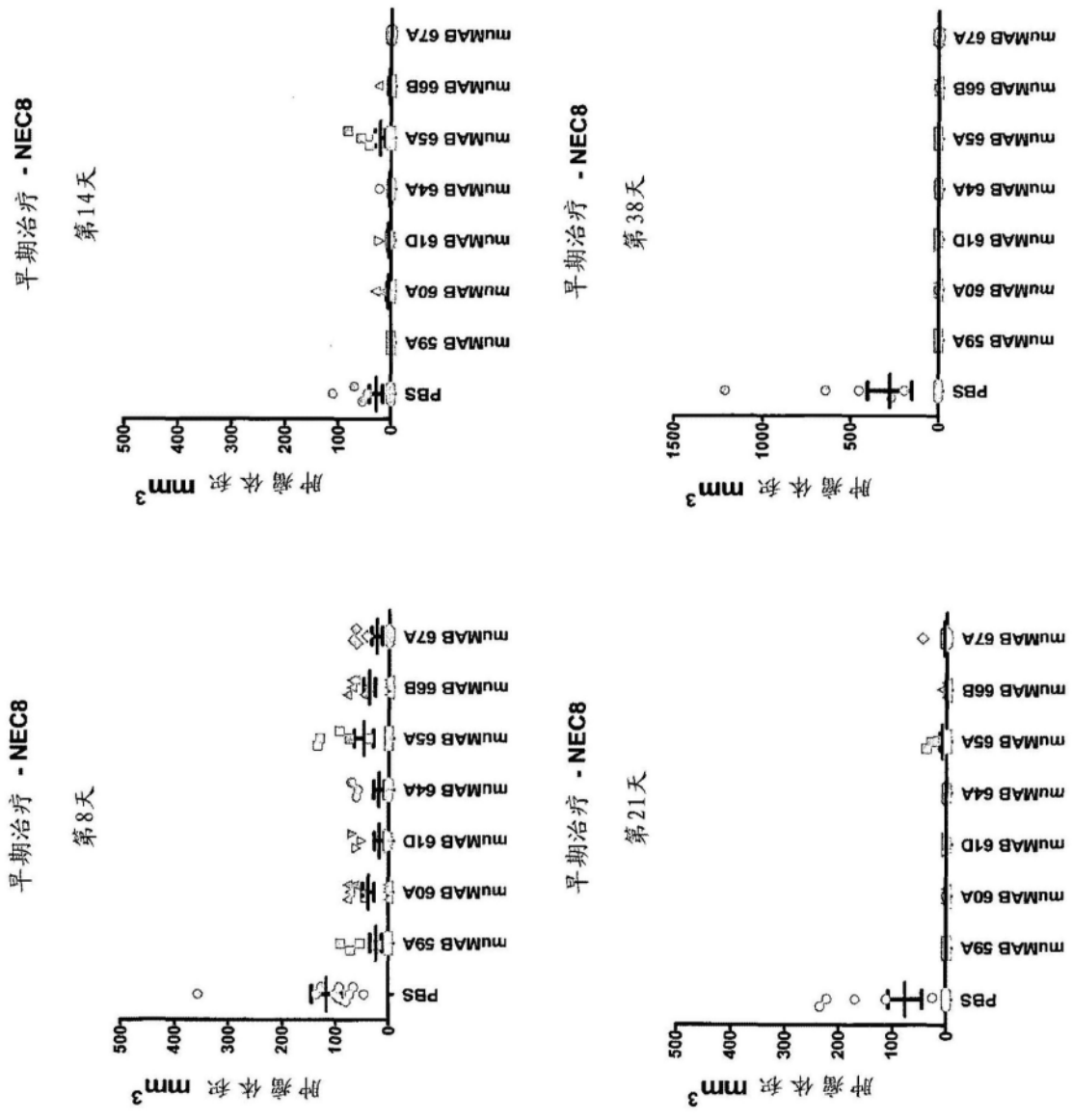


图10

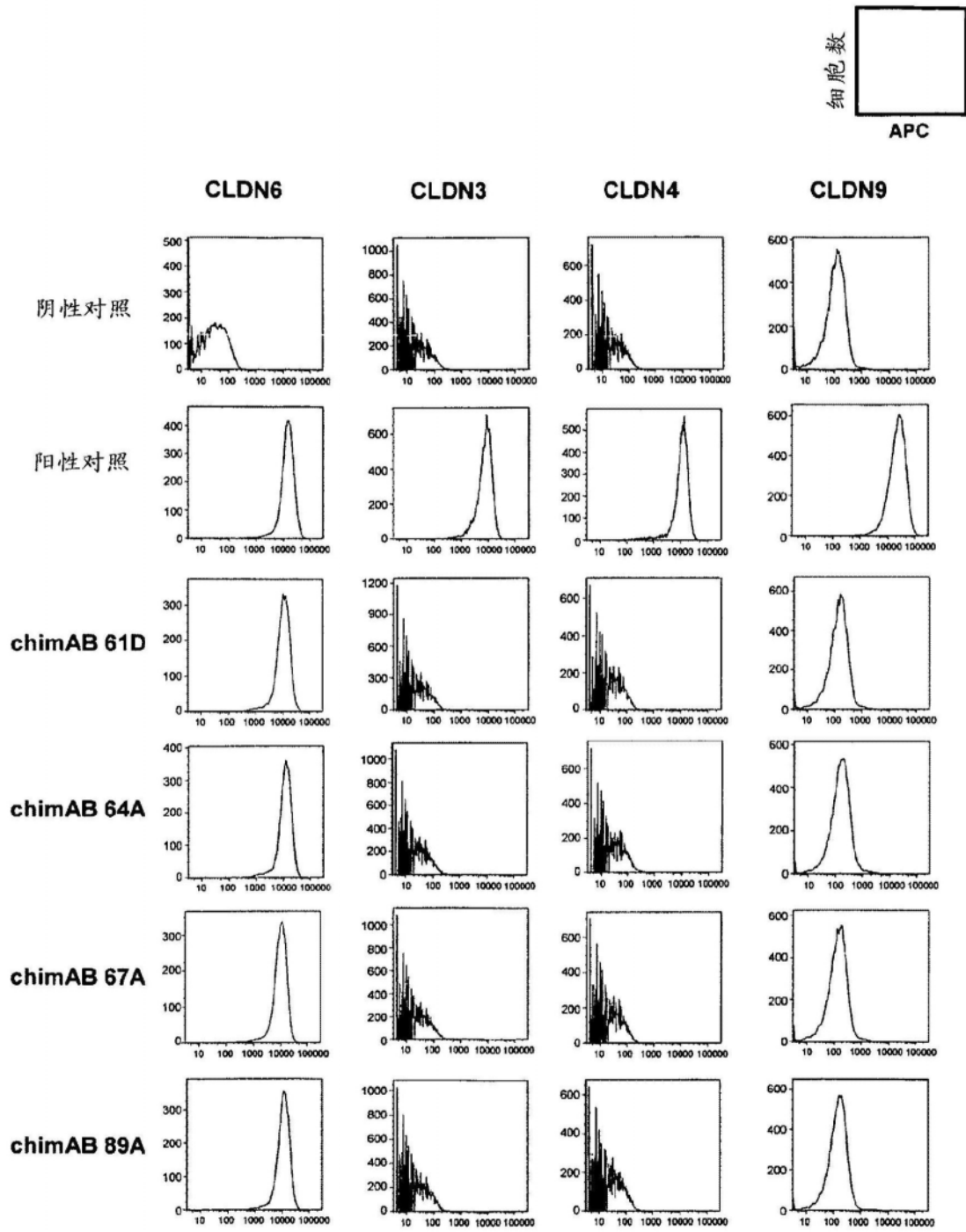


图11

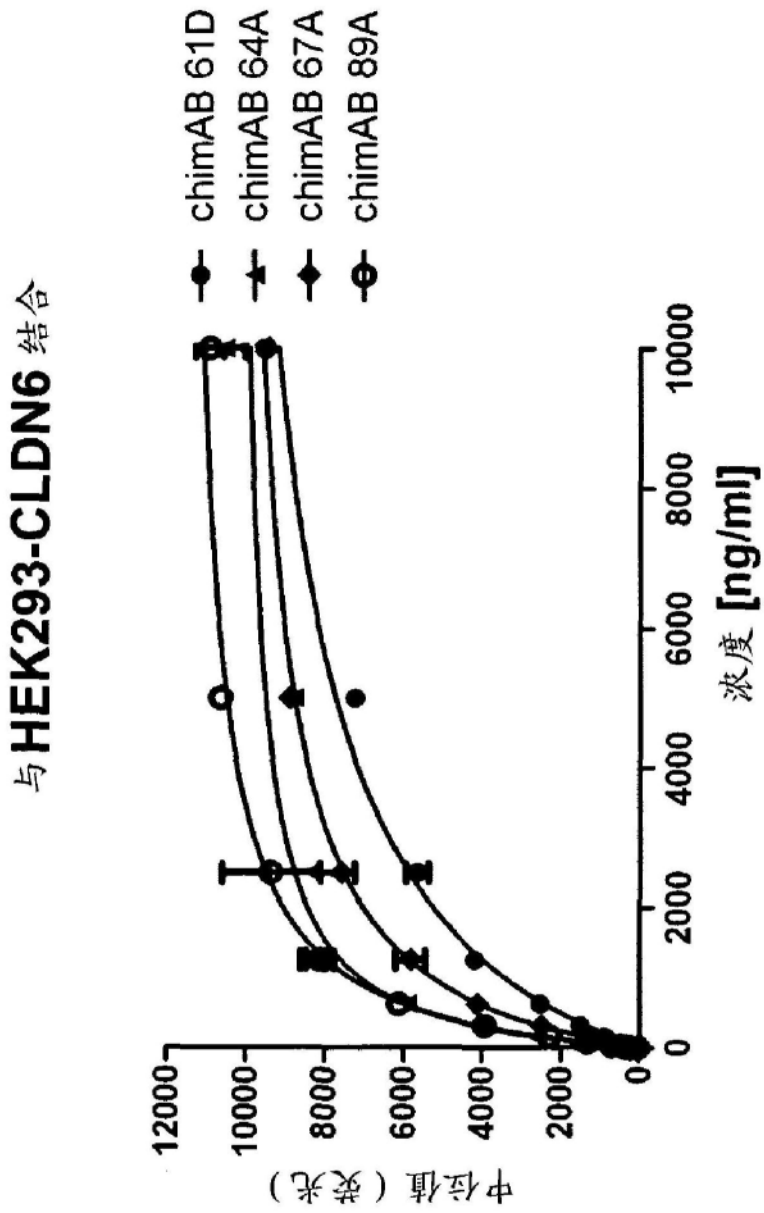


图12

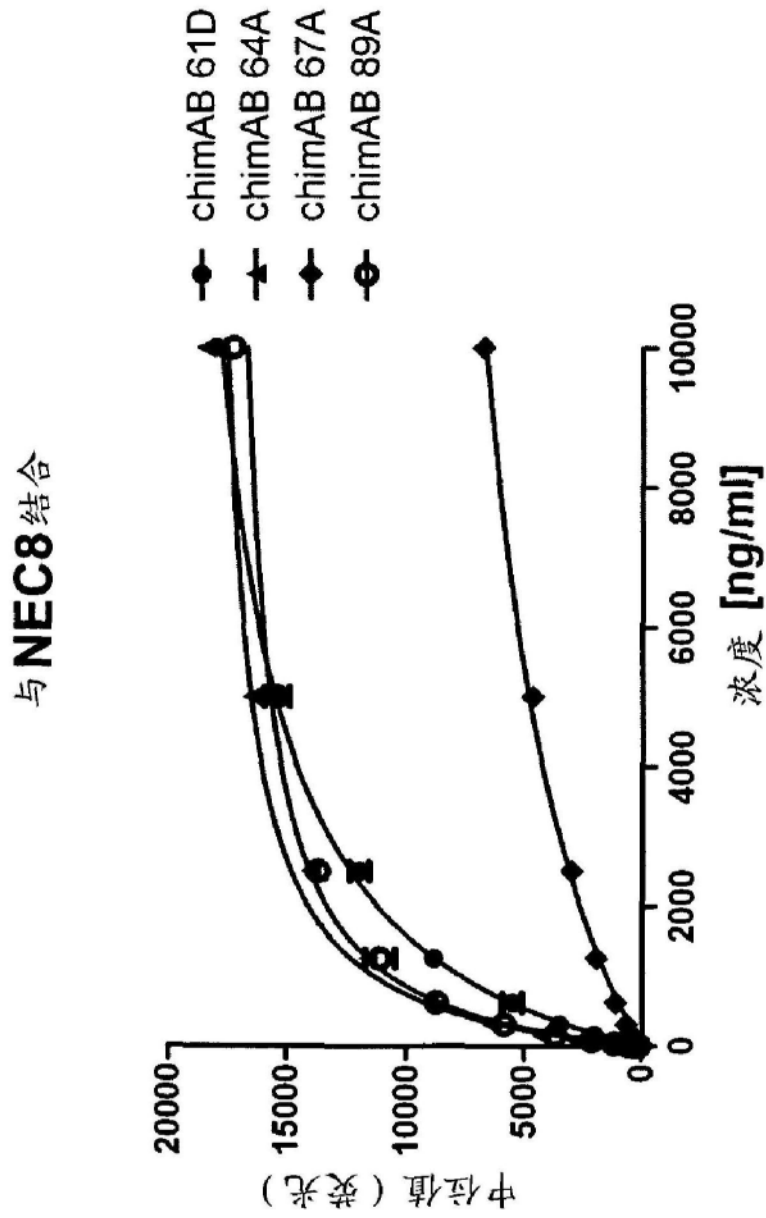


图13

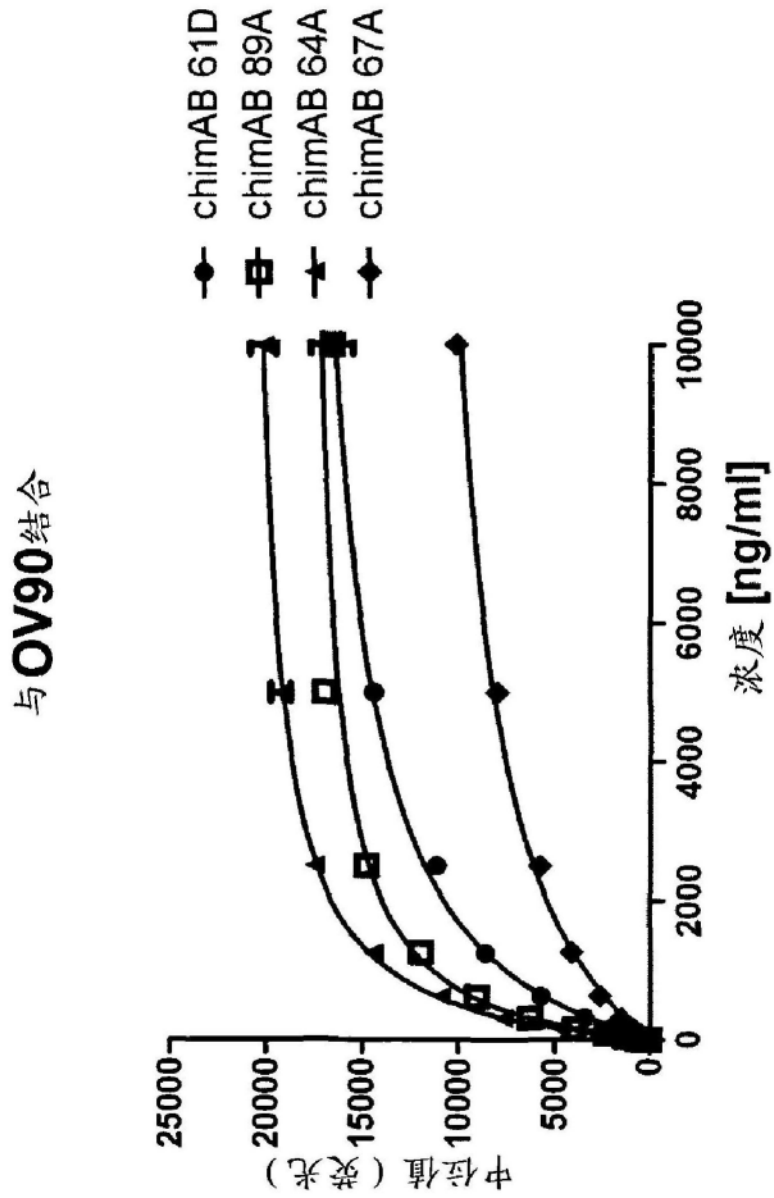


图14

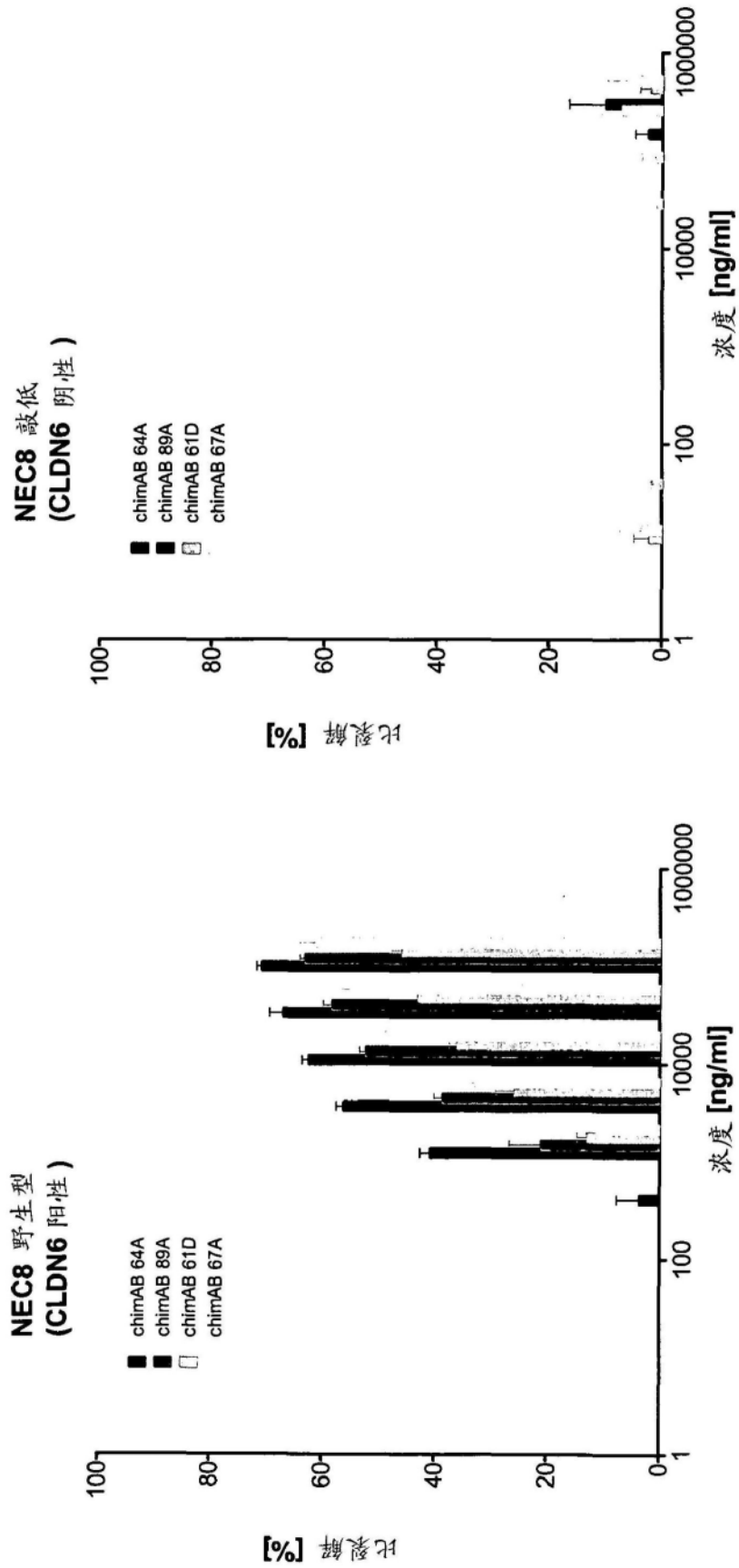


图15

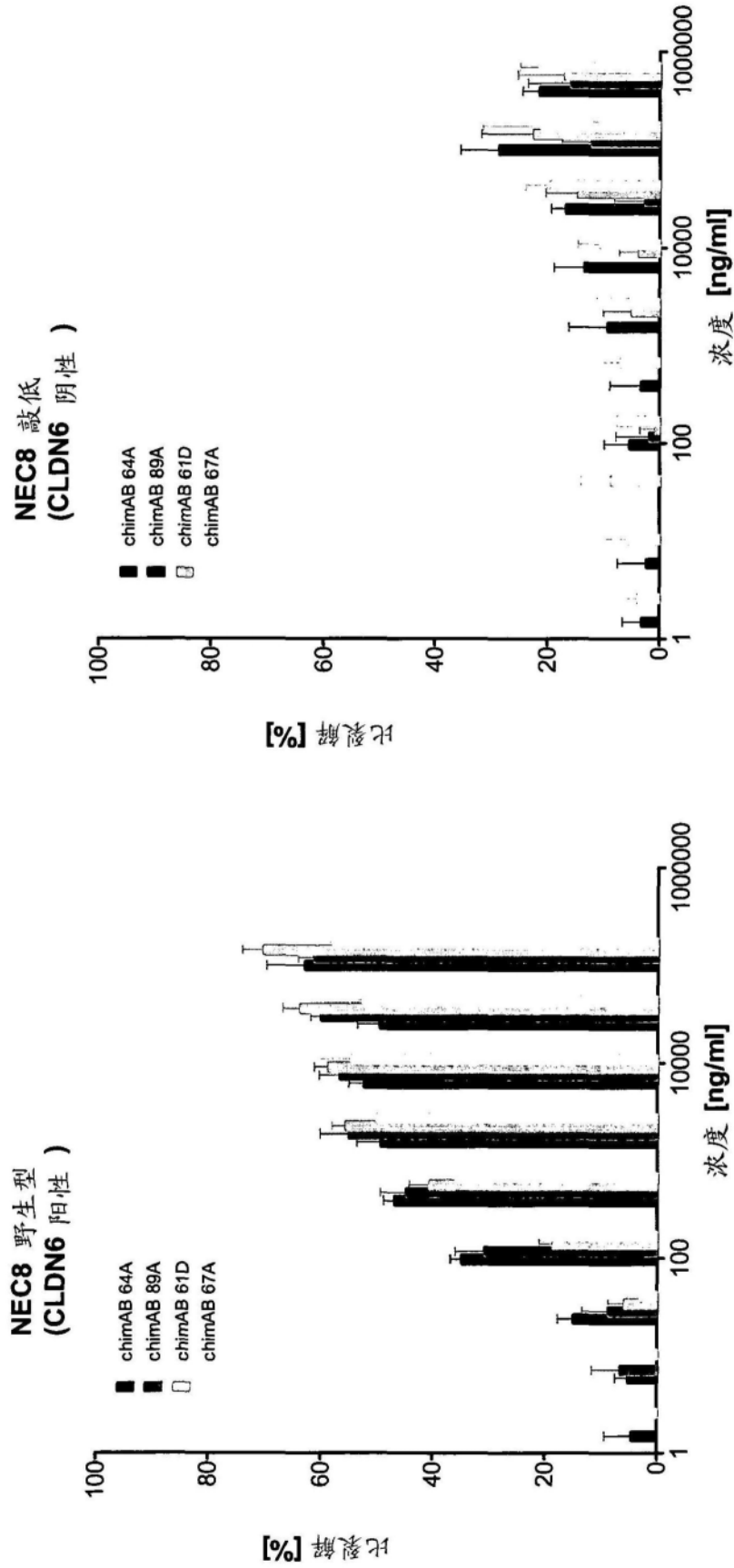


图16

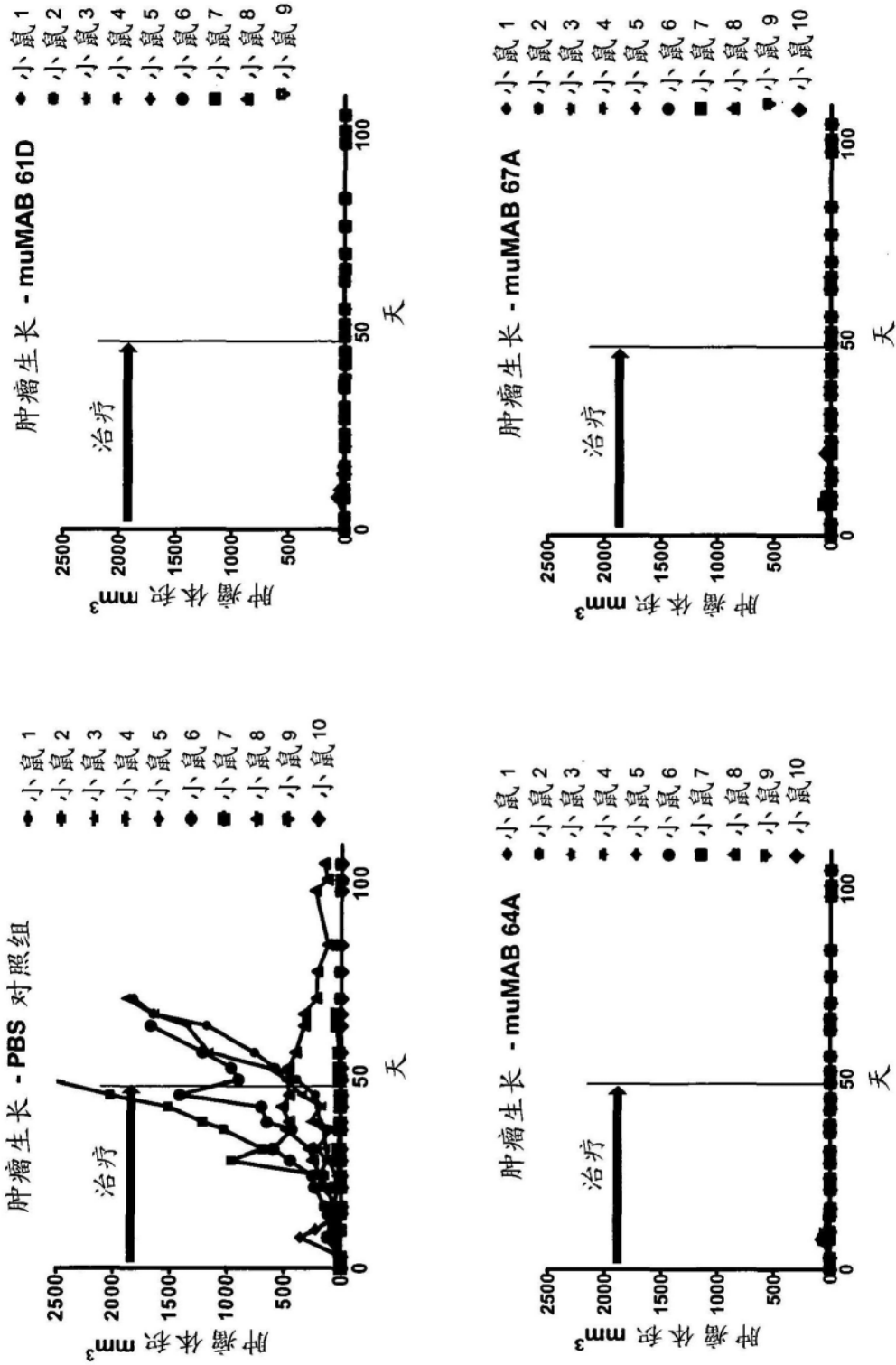
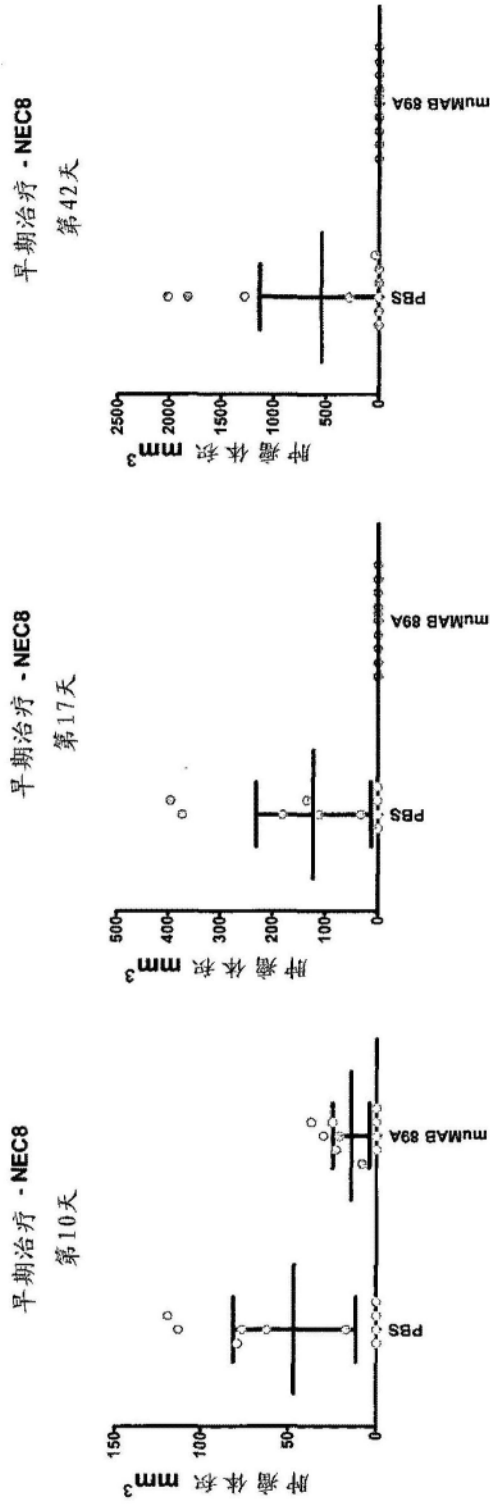


图17

(A)



(B)

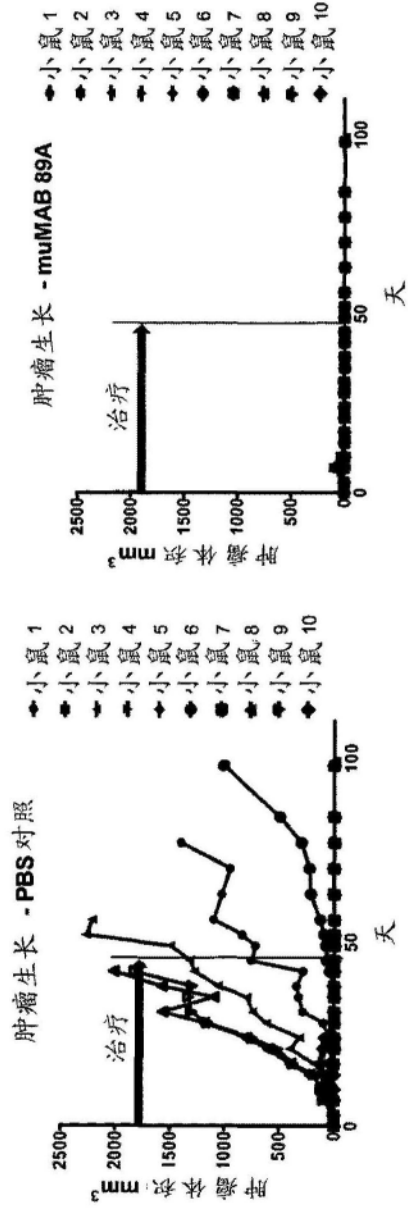


图18

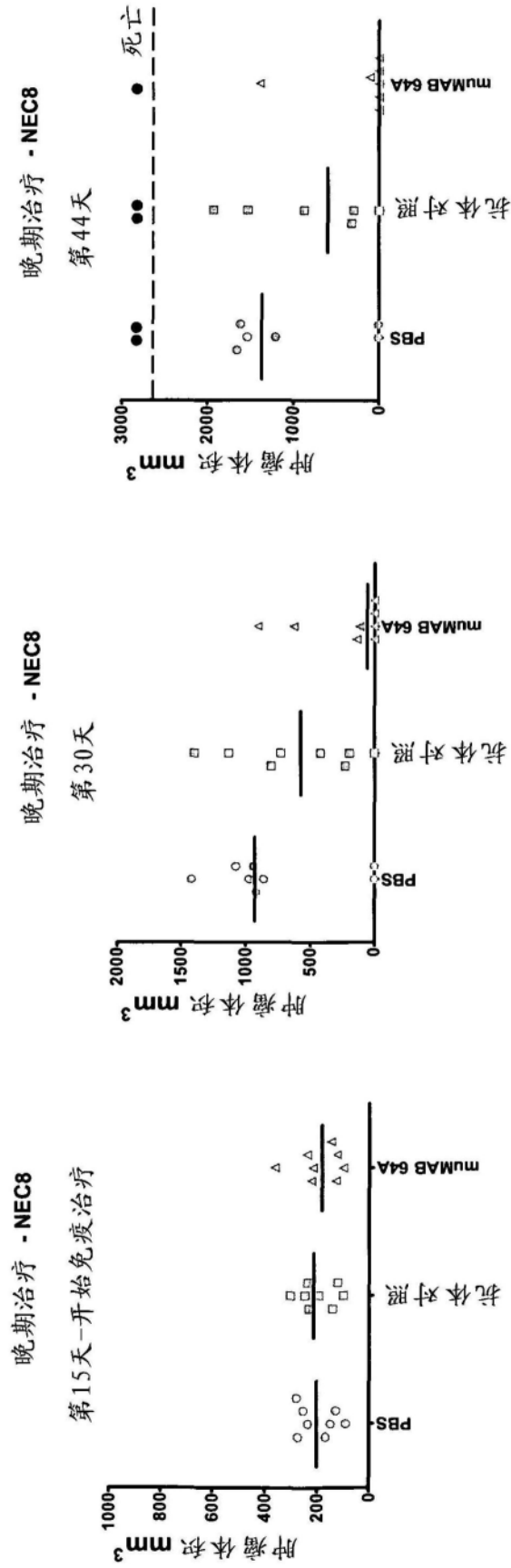


图19

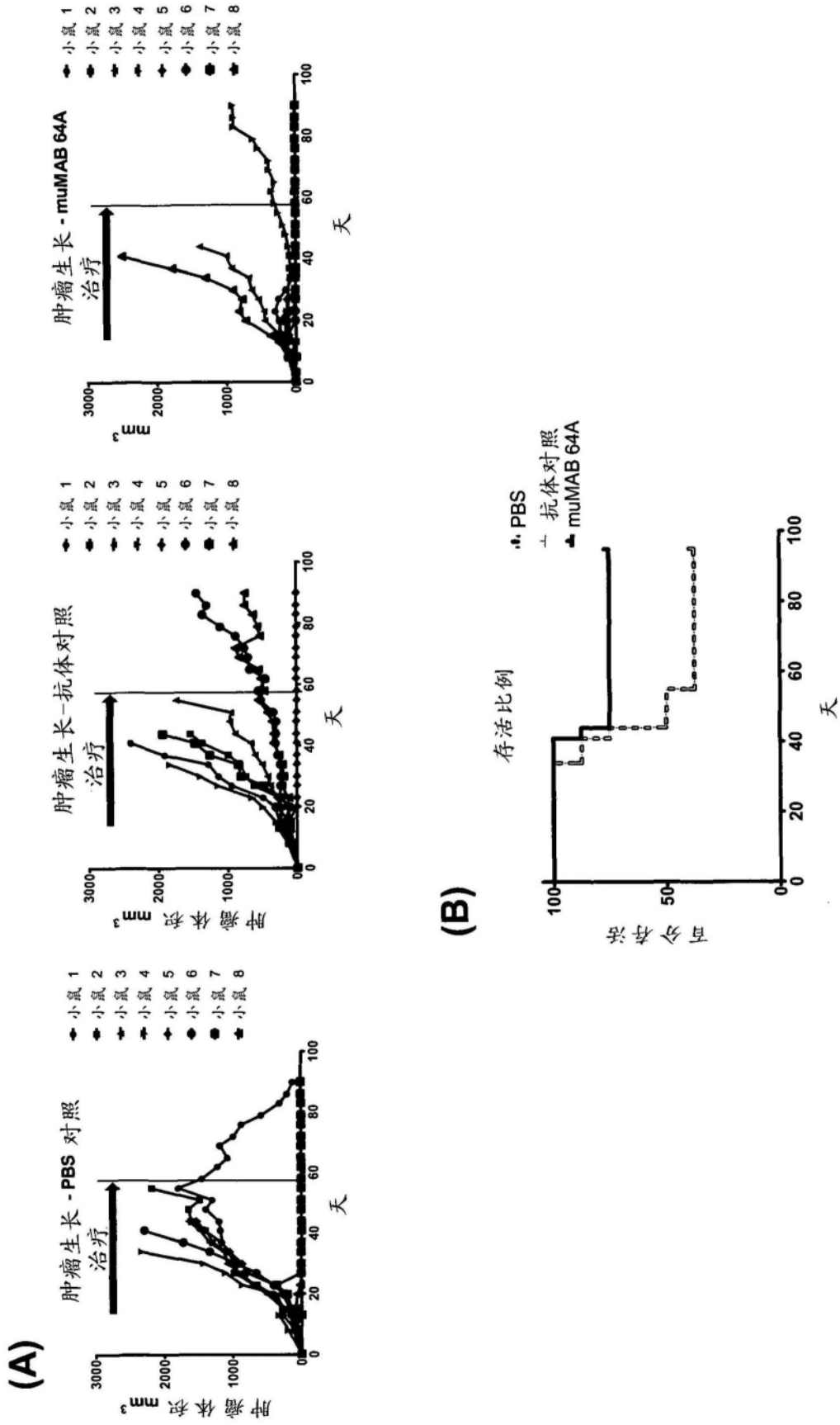


图20

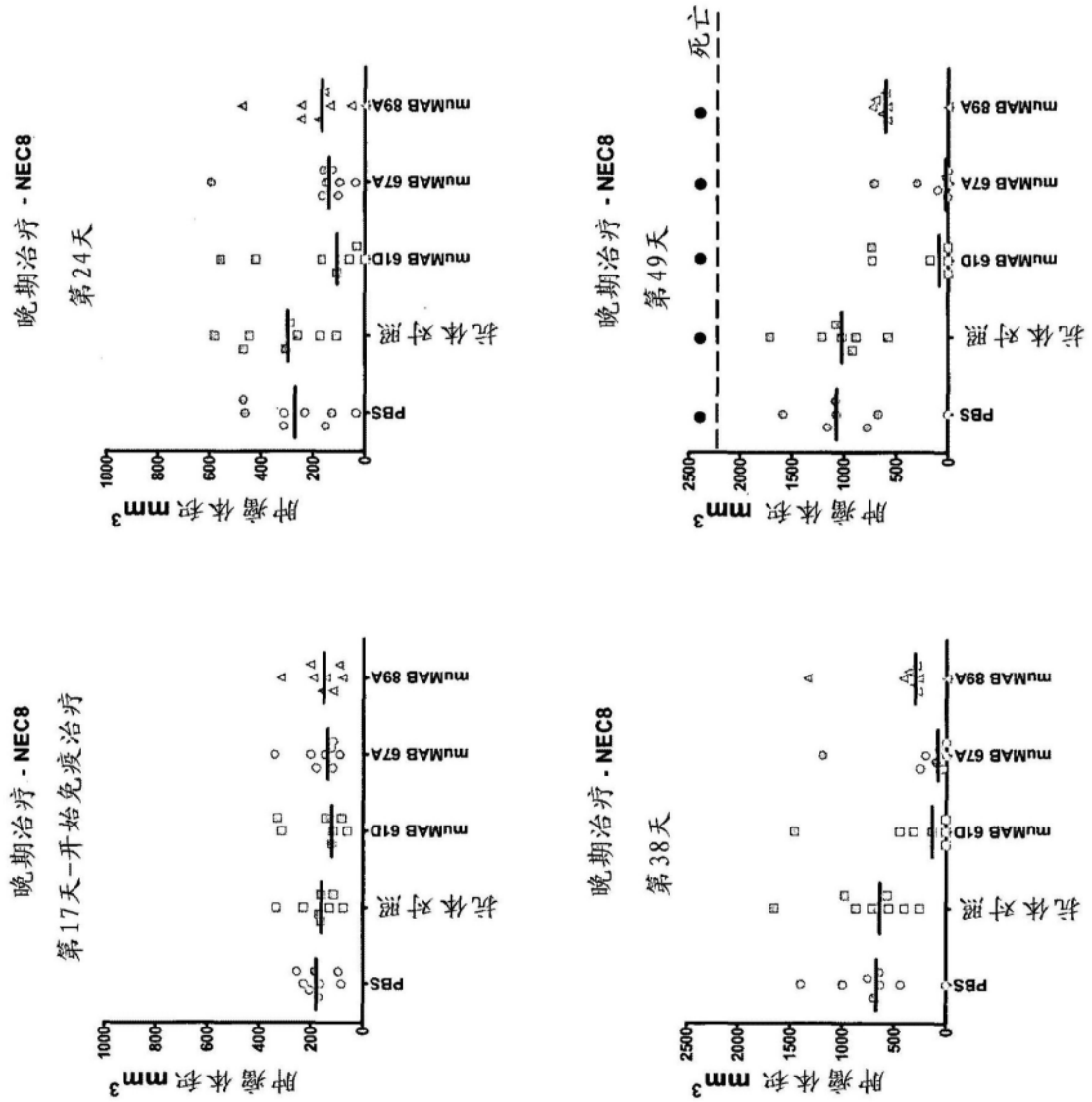


图21

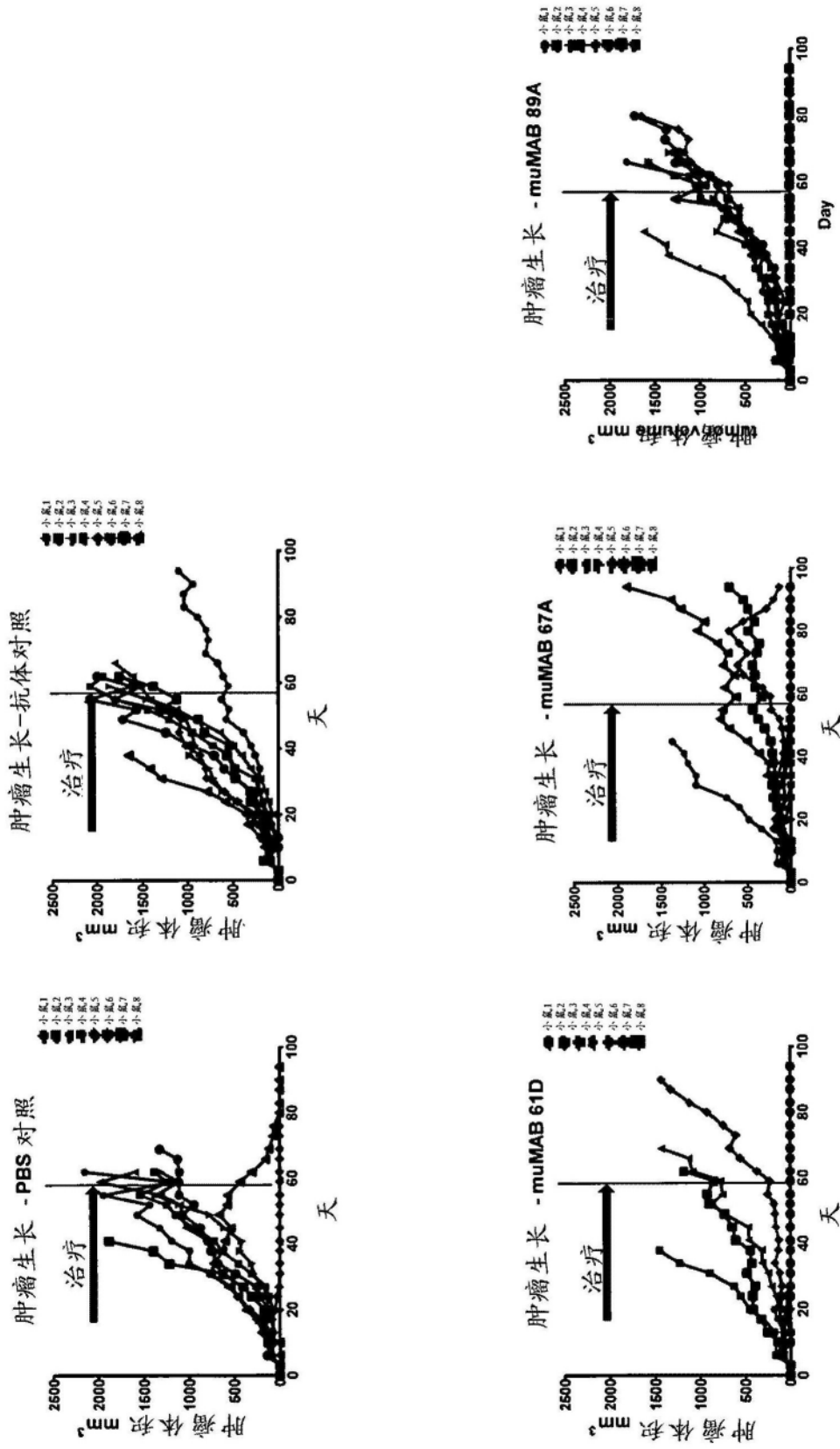


图22A

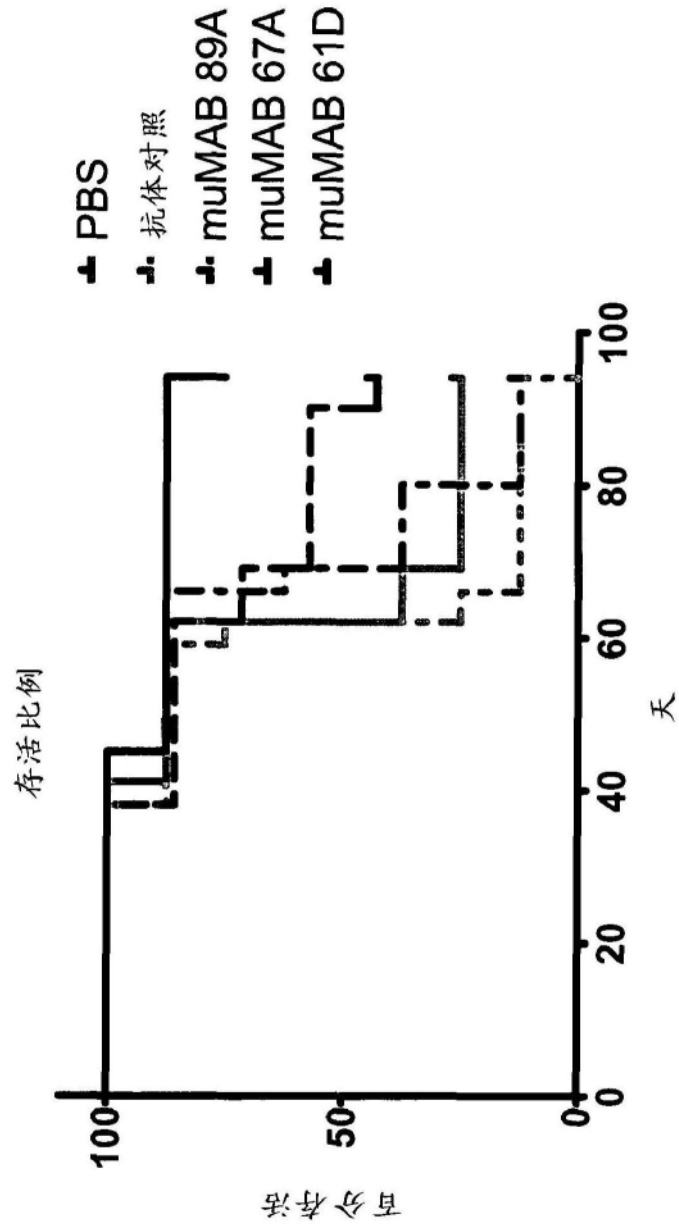


图22B

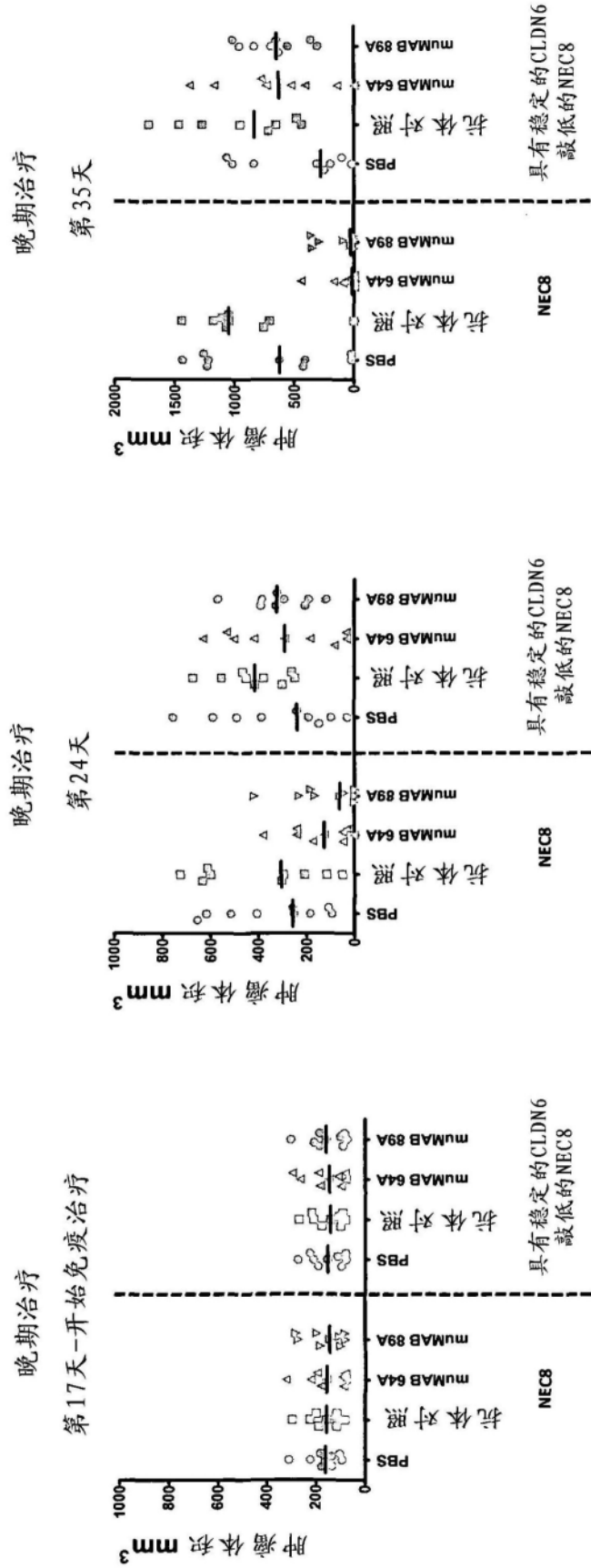


图23

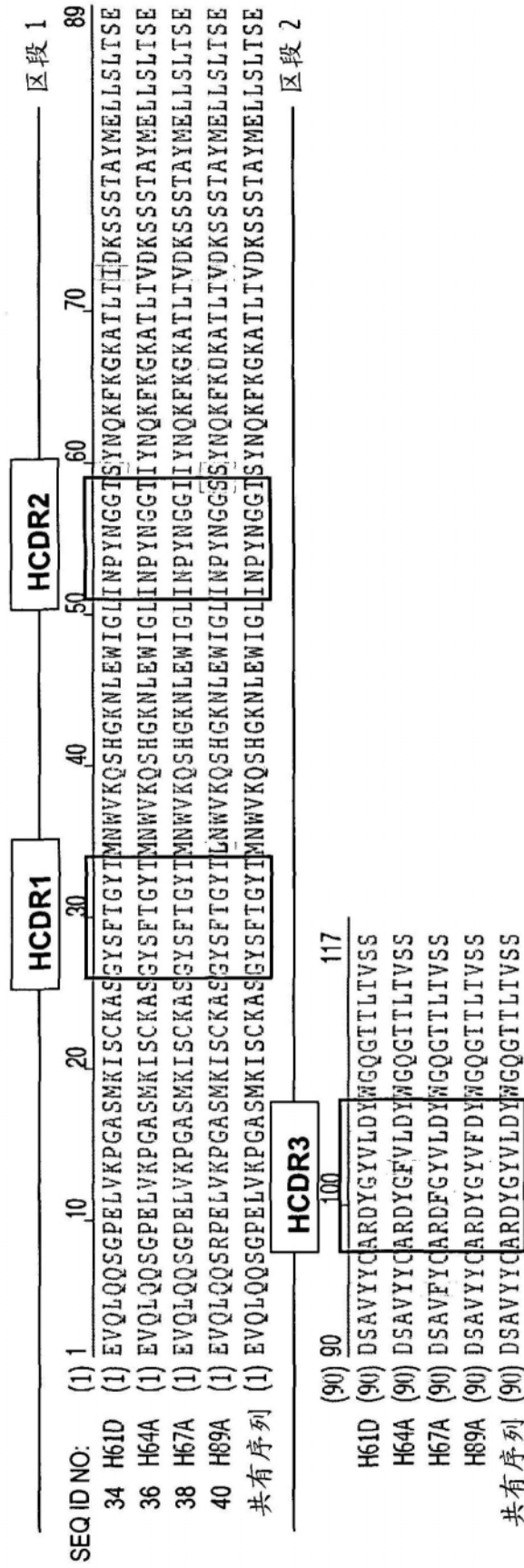


图25

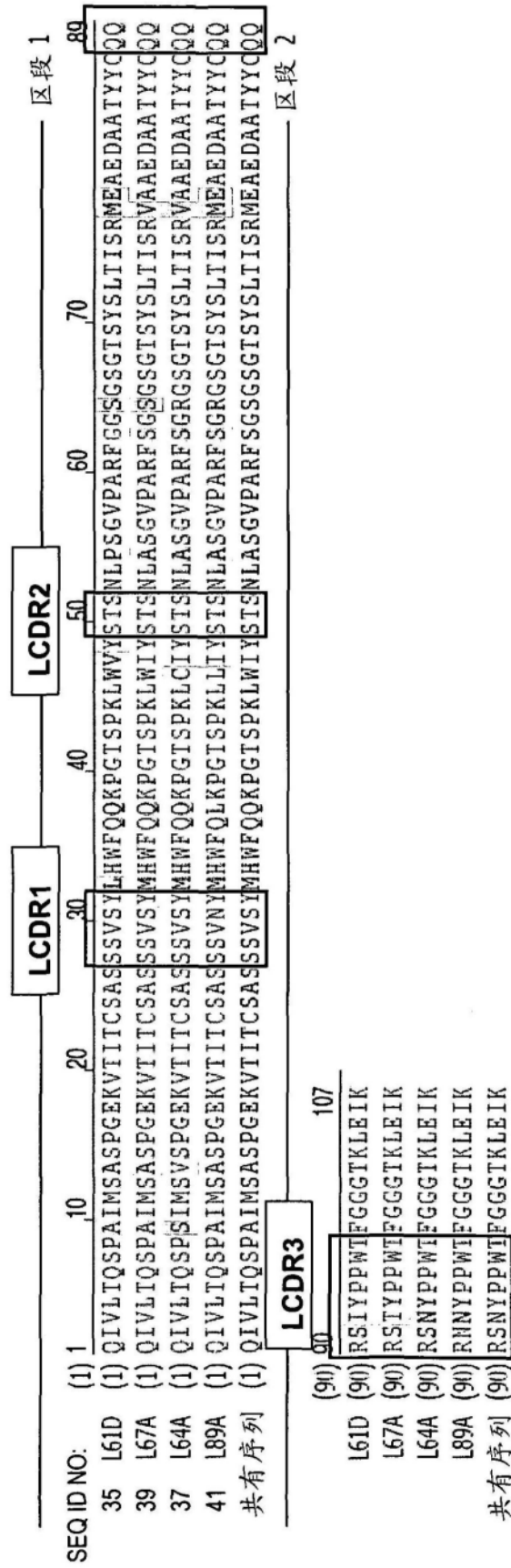


图26