



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106488774 B

(45)授权公告日 2019.11.01

(21)申请号 201580027114.8

(22)申请日 2015.04.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106488774 A

(43)申请公布日 2017.03.08

(30)优先权数据

61/981,240 2014.04.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/026595 2015.04.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/161311 EN 2015.10.22

(73)专利权人 纽约州立大学研究基金会

地址 美国纽约

(72)发明人 凯特·里顿豪斯-奥尔森

朱莉娅·阿布杜拉 静·英·恩格

斯蒂芬·T·康瑞

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

代理人 宋融冰

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件

US 2006018913 A1, 2006.01.26, 说明书第  
10-25段.

审查员 蔡放

权利要求书1页 说明书27页

序列表7页 附图7页

## (54)发明名称

人源化抗-TF-抗原抗体

## (57)摘要

提供了人源化单克隆抗体(mAb)或其片段,其特异性地结合至Thomsen-Friedenreich(TF)人肿瘤抗原。提供了三个不同的可变重链和三个可变轻链,其可以组合以制备总计二十五个不同的重链和轻链组合。提供了使用所述mAb及其片段用于癌症治疗和诊断成像的方法,以及用于制备所述mAb及其片段的方法。还提供了表达所述mAb及其片段的体外细胞培养物以及试剂盒。

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
Kabat #	1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 a 55 60 65			
mJAAF11	EVQLLESGAELAKPGASVKMSCKA	SGYFTTTYWMH	WVKQRPQGQLEWIG	FISPNTDYTEYNQKFRD
H1	EVQLVESGAELAKPGASVKMSCKA	SGYFTTTYWMH	WVKQAPQGQLEWIG	FISPNTDYTEYNQKFRD
H2	EVQLLESGAELAKPGASVKMSCKA	SGYFTTTYWMH	WVKQAPQGQLEWIG	FISPNTDYTEYNQKFRD
H3	EVQLVESGAELAKPGASVKMSCKA	SGYFTTTYWMH	WVKQAPQGQLEWIG	FISPNTDYTEYNQKFRD

	FR3	CDR3	FR4
Kabat #	70 75 80 a b c83 85 90 95 100a 105 110 113		
mJAAF11	KATLTADKSSTAYMQLSLTSEDSAVYYCA	RSFIGYNFDWGGGT	TLTVSS
H1	RVITMTADTSSTAYMELSRRLRSDTAVYYCA	RSFIGYNFDWGGGT	TLTVSS
H2	RVITMTADKSSTAYMELSLTSEDSAVYYCA	RSFIGYNFDWGGGT	TLTVSS
H3	KATMTADTSSTAYMELSRRLRSDTAVYYCA	RSFIGYNFDWGGGT	TLTVSS

1. 一种特异性地结合至TF-Ag的部分人源化单克隆抗体 (mAb) 或其片段, 所述单克隆抗体或其片段包括重链H2a和轻链L2a配对的抗体H2aL2a或重链H3和轻链L3配对的抗体H3L3,

EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWMHWKQAPGQGLEWIGFISPNTDYTEYNQKFRDKATMTA  
DTSISTAYMELSRSDDTAVYYCARSTFIGYNFDFWGGTTTLTVSS (SEQ ID NO:9) (H3),

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGFISPNTDYTEYNQKFRDRVITITA  
DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTFIGYNFDFWGGTTVTVS (SEQ ID NO:13) (H2a);

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQRPQGSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS  
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:12) (L3);

DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS  
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKVDIK (SEQ ID NO:15) (L2a)。

2. 如权利要求1所述的特异性地结合至TF-Ag的部分人源化单克隆抗体 (mAb) 或其片段, 其中所述mAb或其片段包含人IgG恒定区。

3. 如权利要求1所述的特异性地结合至TF-Ag的部分人源化单克隆抗体 (mAb) 或其片段, 其中所述mAb或其片段缀合至选自由化学治疗药物、毒素和放射性同位素组成的组中的试剂。

4. 根据权利要求1所述的特异性地结合至TF-Ag的部分人源化单克隆抗体 (mAb) 或其片段在制备用于治疗个体中癌症的药物中用途, 其中所述癌症是胰腺癌、结肠癌或乳腺癌, 其中向所述个体施用一种或多种权利要求1所述的mAb或其片段, 其中所述个体中的所述癌细胞的生长、或存活、或转移、或它们的组合在所述施用之后被抑制。

5. 如权利要求4所述的用途, 其中所述mAb或其片段包含人IgG恒定区。

6. 如权利要求4所述的用途, 其中所述mAb或其片段缀合至选自由化学治疗药物、毒素和放射性同位素组成的组中的试剂。

7. 一种药物组合物, 包含根据权利要求1所述的特异性地结合至TF-Ag的部分人源化单克隆抗体 (mAb) 或其片段。

8. 一种体外细胞培养物, 其中所述细胞培养物中的细胞表达根据权利要求1所述的特异性地结合至TF-Ag的部分人源化单克隆抗体 (mAb) 或其片段。

## 人源化抗-TF-抗原抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2014年4月18日提交的申请号为61/981,240的美国临时申请的优先权,将其公开内容通过引用并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开内容总体上涉及识别Thomsen-Friedenreich (TF) 人肿瘤抗原的人源化抗体,以及利用该单克隆抗体的方法。

### 背景技术

[0004] 在癌病变期间,在细胞表面上的糖类结构的生物合成中发生变化,并且连接至蛋白质或连接至脂质的若干不同糖类已被识别是肿瘤相关的抗原。Thomsen-Friedenreich (TF) 二糖 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ) 被典型地发现O-连接至丝氨酸或苏氨酸残基。TF-Ag (也称为T抗原) 已与若干人类肿瘤相关,包括在胰腺、结肠和乳腺中发现的那些,并且基于此已被称为泛癌标记 (pan-carcinoma marker)。TF-Ag通过用较大的聚糖链延伸而从正常成人组织中的免疫系统被隐蔽起来。在癌中,细胞糖基化系统可以被破坏,这导致这些链的截短和TF抗原的暴露。可以靶向TF-Ag的新单克隆抗体及其抗体片段是期望的,并且由本公开内容提供。

### 发明内容

[0005] 本公开内容在多个实施方案中包括用于治疗TF+癌症的组合物和方法。在实施方案中,公开内容包括特异性地结合至TF-Ag的部分人源化单克隆抗体 (mAbs) 或其片段。该mAb或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含选自以下各项组成的组中的序列:

[0006] EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGFISPNT DYTEYNQKFRDR VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSFIGYNFDFWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:7) (H1);

[0007] EVQLLESAGIELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGFISPNT DYTEYNQKFRDR VTLTADKSSSTAYMELSSLTSEDYAVYYCARSFIGYNFDFWGQGTITVTV SS (SEQ ID NO:8) (H2);和

[0008] EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWIGFISPNTD YTEYNQKFRDK ATMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSFIGYNFDFWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO:9) (H3),和它们的组合。

[0009] 所述轻链包含选自以下各项组成的组中的序列:

[0010] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWFQQRPQGSPRLLIYKVS NRFSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:10) (L1);

[0011] L2DIVMTQTPLSLPVTLGQPASISCRSSQTIVYSNGNTYLEW FQQRPQGSPRLLIYKVS NRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQGSHVPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:11) (L2);和

[0012] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQRPQGSPRLLIYKVS NRFSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:12) (L3);和它们的组

合。

[0013] 制备和测试了另外的形式H2、H3、L2和L3。这些包括以下：

[0014] 重链可变区H2a：

[0015] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGFISPNT DYTEYNQKFRDR  
VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSFIGYNFDWVGQGTITVTV S (SEQ ID NO:13)

[0016] 重链可变区H3a：

[0017] EGQLLESGLAKPGASVKMSCKASGYTFTTYWMHWVKRPGQGLEWIGFISPNTD YTEYNQKFRDK  
ATLTADKSSTTAYMQLSSLTSDDSAVYYCARSFIGYNFDWVGQGTTLTVS S (SEQ ID NO:14)

[0018] 轻链可变区L2a：

[0019] DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR FSGVPDRF  
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKVDIK (SEQ ID NO:15)

[0020] 轻链可变区L3a：

[0021] ELVMTQTPLSLPVNLGDQASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS N RFSGVPDRF  
SGSGSGTDFTLKISRVEADDLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:16) .

[0022] 在本公开内容中包括的重和轻可变链的组合为：H1-L1；H1-L2；H1-L2a；H1-L3；H1-L3a；H2-L1；H2-L2；H2-L2a；H2-L3；H2-L3a；H3-L1；H3-L2；H3-L2a；H3-L3；H3-L3a；H2a-L1；H2a-L2；H2a-L2a；H2a-L3；H2a-L3a；H3a-L1；H3a-L2；H3a-L2a；H3a-L3；和H3a-L3a。

[0023] 在实施方案中，所述mAb包含人IgG恒定区。在实施方案中，所述mAb或其TF-Ag 结合片段缀合至选自化学治疗药物、毒素和放射性同位素组成的组中的试剂。

[0024] 在另一方面，本公开内容包括用于预防和/或治疗个体中的癌症的方法，其中所述癌症包含表达TF-Ag的癌细胞。所述方法包括向个体施用(给药，administer)一种或多种如上所述的mAb或片段，其中所述个体中的癌细胞的生长、或存活、或转移、或它们的组合在所述施用之后被抑制。

[0025] 在另一方面，提供了包含部分人源化mAb或其片段的药物组合物。

[0026] 在另一方面，本公开内容提供体外细胞培养物，其中该细胞培养物中的细胞表达所述部分人源化mAb或其片段。

[0027] 在另一方面，本公开内容提供编码所述mAb及其TF-Ag结合片段的多核苷酸序列，包含这样的多核苷酸的表达载体和包含这样的表达载体的体外细胞培养物。在实施方案中，所述mAb或其TF-Ag结合片段由多于一种的表达载体编码。

[0028] 在实施方案中，提供了制备所述mAb及其TF-Ag结合片段的方法，并且通常包括在体外细胞培养物中表达所述mAb或TF-Ag结合片段、或它们的组合，和从所述细胞培养物分离所述mAb或TF-Ag结合片段、或它们的组合。

[0029] 还提供了包含所述mAb及其TF-Ag结合片段的试剂盒。

## 附图说明

[0030] 图1提供了包含在本公开内容中的JAA-F11重链可变区和三个VH变体区(H1、H2和H3)的氨基酸序列比对。黑体指示在JAA-F11和所设计的人源化H链之间的相同氨基酸；黑体和加阴影的氨基酸指示所设计的人源化链和小鼠JAA-F11之间的区别。以黑体和斜体显示的在位置72的丙氨酸是被保留以避免空间位阻的小鼠残基。互补决定区(CDR)以斜体排列。

编号根据Kabat系统。mJAAF11序列是SEQ ID NO:17。H1序列是SEQ ID NO:7;H2序列是SEQ ID NO:8;H3序列是SEQ ID NO:9。

[0031] 图2描绘了mJAA-F11轻链可变区(JAA-F11VH)和三个VL变体区(L1、L2和L3)的氨基酸序列比对。黑体指示小鼠氨基酸或与小鼠序列相同的氨基酸,黑体和加阴影的氨基酸是所设计的人源化JAA-F11变体和小鼠JAA-F11之间的区别。以黑体和斜体显示的在位置51的亮氨酸是被保留以避免空间位阻的小鼠残基。mJAAF11序列是SEQ ID NO:17。L1序列是SEQ ID NO:10;L2序列是SEQ ID NO:11;L3序列是SEQ ID NO:12。

[0032] 图3.通过ELISA利用mJAA-F11抑制来确定相对亲和力以评估各个hJAA-F11和嵌合抗体与TF-Ag-BSA的结合。误差棒代表 $\pm 1$ 标准误差。

[0033] 图4.hJAA-F11、嵌合和小鼠JAA-F11(50 $\mu$ g/mL)与10个乳腺癌细胞系的结合。细胞系包括三阴性(HCC 70、BT 549、MDA-MB-231、MDA-MB-468、DU 4475)、ER/PR-阳性(HCC 1419、AU 565、MDA-kb2)和HER2-阳性(CAMA-1、HCC 1428)。对于以上测试的所有细胞系,与hJAA-F11、嵌合或小鼠JAA-F11(在50 $\mu$ g/mL)的结合显著高于( $p \leq 0.05$ ) (学生T-检验) TF-Ag阴性对照骨髓瘤的那些。各个误差棒代表 $\pm 1$ 标准偏差。

[0034] 图5.嵌合抗体和人源化JAA-F11抗体(除了H3L3)引起肿瘤细胞生长的小( $\sim 6-11\%$ )但统计学显著性的抑制。没有看到细胞增殖的增强。对于在2或1 $\mu$ g/ml的任何抗体都没有看到显著性结果。

[0035] 图6A.小鼠、嵌合和4个hJAA-F11构建体针对TF-Ag阳性人乳腺癌细胞系(BT 549)的ADCC活性。结果呈现为相比于细胞的100%溶解在抗体处理的细胞中的百分比细胞溶解。在人细胞系中的所有情况下,H2L2和H3L3显示比嵌合或小鼠抗体统计学更大的ADCC活性( $p < 0.05$ )。这是来自供体#1和供体#2的PBMC上的所有实验的代表性平均值(多于3个的独立实验)。误差棒表示 $\pm 1$ 标准误差。

[0036] 图6B.在来自供体#1的PBMC上,小鼠、嵌合和4个hJAA-F11构建体针对TF-Ag阳性人乳腺癌细胞系(BT 549)的ADCC活性。结果呈现为相比于细胞的100%溶解在抗体处理的细胞中的百分比细胞溶解。在人细胞系中的所有情况下,H2L2和H3L3显示比嵌合或小鼠抗体统计学更大的ADCC活性( $p < 0.05$ )。这是至少3个独立实验的平均值。误差棒表示 $\pm 1$ 标准误差。

[0037] 图6C.在来自供体#2的PBMC上,小鼠、嵌合和4个hJAA-F11构建体针对TF-Ag阳性人乳腺癌细胞系(BT 549)的ADCC活性。结果呈现为相比于细胞的100%溶解在抗体处理的细胞中的百分比细胞溶解。在人细胞系中的所有情况下,H2L2和H3L3显示比嵌合或小鼠抗体统计学更大的ADCC活性( $p < 0.05$ )。这是至少3个独立实验的平均值。误差棒表示 $\pm 1$ 标准误差。

[0038] 图6D.小鼠、嵌合和3个hJAA-F11构建体针对4T1TF-Ag阳性小鼠乳腺癌细胞系的ADCC活性。结果呈现为相比于细胞的100%溶解在抗体处理的细胞中的百分比细胞溶解。H3L3和嵌合显示比小鼠抗体统计学更大的ADCC活性( $p < 0.05$ )。误差棒表示 $\pm 1$ 标准误差。ADCC仅利用来自供体#3的PBMC进行一次。

[0039] 图7.人源化、嵌合和小鼠JAA-F11不诱导补体依赖细胞毒性(CDC)。测试了小鼠、嵌合和2个hJAA-F11构建体针对人HCC 1428乳腺癌细胞系的CDC活性。结果呈现为相比于细胞的100%溶解在抗体处理的细胞中的百分比细胞溶解。阳性对照:试剂盒中包括的LDH 阳性

细胞显示溶解。误差棒表示 $\pm 1$ 标准误差。

[0040] 图8. 小鼠、嵌合和4个hJAA-F11抗体利用酶免疫测定的内化以测量表面结合。内化通过在37°C或4°C用抗体孵育小鼠4T1乳腺癌细胞进行分析。如预期的,分布图(pattern)与图20中对于H3L3所示的ADCC分布图相反,但对于H2L2是出乎意料的,其诱导ADCC 并且内化。小鼠、H2L2、嵌合Ab、H2L3和H1L1显著性地内化( $p < 0.05$ )。误差棒表示 $\pm 1$ 标准误差。

[0041] 图9. 显示hJAA-F11抗体在携带4T1肿瘤的小鼠中的免疫定位的MicroPET图像。

[0042] 图10. 显示游离124碘向在携带4T1肿瘤的小鼠中的甲状腺的定位的MicroPET图像。

## 具体实施方式

[0043] 本公开内容包括特异性地识别TF-Ag的不同的人源化单克隆抗体(mAb)及其片段、制备该mAb的方法和使用该mAb用于预防和/或治疗目的的方法,以及用于诊断成像的方法。由本公开内容提供的mAb的氨基酸序列利用新颖方式开发以改变以ATCCC目录号 CRL-2381保藏的杂交瘤所产生的mAb中的氨基酸序列,使得mAb的框架区以保持特异性和降低免疫原性的引导方式结合鼠类和人类免疫球蛋白(Ig)序列二者。所述杂交瘤产生称为 JAA-F11的mAb。在鼠类框架区的情形中引入到JAA-F11序列中的变化导致三个不同重和三个不同轻可变链的系综物(ensemble),这些链可以组合以产生二十五个不同的mAb,其适于抗击各种各样的癌症(包含表达TF-Ag的癌细胞)中的任一种。此外,所述mAb具有所需的特性,使得它们特别适合于在个体中优先诱导不同的抗癌机制。例如,取决于重链和轻链的选择,本公开内容包括提供用于刺激增强的抗体-依赖性细胞毒性或补体依赖性细胞毒性,或所述mAb的内化。

[0044] 本公开内容的实施方案包括来自JAA-F11mAb的CDR序列。这些是:VH链:CDR1:SGYTFTTYWMH;(SEQ ID NO:1);CDR2:FISPNTDYTEYNQKFRD;(SEQ ID NO:2);CDR3:RSFIGYNFDFWGQGT;(SEQ ID NO:3);和VL链:CDR1:CRSSQTIVYSNGNTYLEW;(SEQ ID NO:4);CDR2:KVSNRFSGVDP;(SEQ ID NO:5);和CDR3:CFQGSHPFTFGSG;(SEQ ID NO:6)。

[0045] CDR序列放置于修饰的框架序列的情形中。因而,所述mAb及其TF-Ag结合片段包含选自以下的重链:

[0046] H1- EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGFISPNTDYT EYNQKFRDRVMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSFIGYNFDFWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:7);

[0047] H2- EVQLLESGLAELKKPGASVKVSKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGFISPNTDYT EYNQKFRDRVTLTADKSSSTAYMELSSLTSEDVAVYYCARSFIGYNFDFWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:8);

[0048] H3- EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWMHWVKQAPGQGLEWIGFISPNTDYTE YNQKFRDKATMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSFIGYNFDFWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:9)和它们的组合;

[0049] 和选自由以下各项组成的组中的轻链:

[0050] L1-DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQTIVYSNGNTYLEW FQQRPGQSPRLLIY KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQGSHPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:10);

[0051] L2-DIVMTQTPLSLPVTLGQPASIS CRSSQTIVYSNGNTYLEW FQQRPGQSPRLLIY KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQGSHPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:11);

[0052] L3-DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQTIVYSNGNTYLEW YLQRPQGSPRLLIY KVSNRFSG VPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYY CFQGSHPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:12) 和它们的组合。

[0053] 除了前述序列之外,以某些组合制备和测试以下重链和轻链:

[0054] 重链可变区H2a:

[0055] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGFISPNT DYTEYNQKFRDR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSFIGYNFDFWGQGTITVTV S (SEQ ID NO:13)

[0056] 重链可变区H3a:

[0057] EGQLLESGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTTYWMHWVKRPGQGLEWIGFISPNTD YTEYNQKFRDK ATLTDKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCARSFIGYNFDFWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO:14)

[0058] 轻链可变区L2a:

[0059] DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS NR FSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQGSHPFTFGSGTKVDIK (SEQ ID NO:15)

[0060] 轻链可变区L3a:

[0061] ELVMTQTPLSLPVNLGDQASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NR FSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEADDLGYYCFQGSHPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:16) .

[0062] 本公开内容涵盖包含包括前述序列或由前述序列组成的氨基酸序列的mAb及其TF-Ag 结合片段。在实施方案中,本公开内容包括mAb及其TF-Ag结合片段,其中框架和CDR序列由以下各项组成:SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

[0063] 因此,以下25个重链和轻链组合被此公开内容涵盖:H1-L1;H1-L2;H1-L2a;H1-L3;H1-L3a;H2-L1;H2-L2;H2-L2a;H2-L3;H2-L3a;H3-L1;H3-L2;H3-L2a;H3-L3;H3-L3a; H2a-L1;H2a-L2;H2a-L2a;H2a-L3;H2a-L3a;H3a-L1;H3a-L2;H3a-L2a;H3a-L3;和 H3a-L3a。在实施方案中,本公开内容包括包含H1L1、H2L2、H3L3、H2L3、H2a和L2a,以及H3a和L3a的組合的mAb及其TF-Ag结合片段。在此公开内容中,除了对于以下描述的H和L链的組合的结果之外,还制备和测试了H2a-L2a和H3aL3a,并且对于这两个組合的结果分别类似于对于H2-L2和H3-L3报告的那些结果。H2a-L2a和H3a-L3a组合作为亚克隆程序的结果制备,允许选择对于TF-Ag具有进一步增强的结合特性的额外亚克隆体(如通过在酶免疫测定(EIA)中的最高反应性确定的)。这些之中,对于内化最佳的是H2L2和 H2aL2a,而对于ADCC最佳的是H2L2、H2aL2a、H3L3和H3aL3a。

[0064] 代表性的VH和VL序列经由附图1和2进一步描述。具体地,图1提供包括在此公开内容中的JAA-F11重链可变区和三个VH变体区(H1、H2和H3)的氨基酸序列比对。黑体指示在JAA-F11和所设计的人源化H链之间的相同氨基酸;黑体和加阴影的氨基酸指示所设计的人源化链和小鼠JAA-F11之间的区别。以黑体和斜体显示的在位置72的丙氨酸是被保留以避免空间位阻的小鼠残基。CDR以斜体排列。编号根据Kabat系统。因此将理解,虽然本文中描述的mAb称为“人源化”,但它们确实包含某些鼠类残基,并且因此可以被认为是部分人源化的。

[0065] 图2描绘了mJAA-F11轻链可变区(JAA-F11VH)和三个VL变体区(L1、L2和L3)的氨基酸序列比对。黑体指示小鼠氨基酸或与小鼠序列相同的氨基酸,黑体和加阴影的氨基酸是

所设计的人源化JAA-F11变体和小鼠JAA-F11之间的区别。以黑体和斜体显示的在位置51的亮氨酸是被保留以避免空间位阻的小鼠残基。根据图1和2明显的是,尽管本发明提供的人源化H和L链包括与JAA-F11小鼠抗体的区别和它们本身之间的区别,但是某些鼠类氨基酸已被保留以维持该人源化mAb的特异性。

[0066] 本文描述的人源化mAb的片段也包括在本发明中。合适的抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、ScFv和Fv片段。多种技术已被开发用于生产抗体片段并且包括此公开内容的范围内。在实施方案中,所述mAb或其片段经由重组表达载体生产宿主细胞。本公开内容包括编码本文描述的氨基酸序列的所有多核苷酸序列、包含这样的多核苷酸序列的表达载体和包含这样的表达载体的体外细胞培养物。在实施方案中,细胞培养物是真核细胞。在实施方案中,细胞培养物是哺乳动物细胞。在实施方案中,细胞是CHO细胞。包含所述mAb和/或其TF-Ag结合片段的试剂盒、和/或表达所述mAb和/或其TF-Ag结合片段的细胞培养物由此公开内容提供。通常,试剂盒包括一个以上容纳所述mAb和/或其TF-Ag结合片段、或表达它们的细胞的密封容器。使用所述mAb和/或TF-Ag结合片段用于治疗 and/或成像目的说明书可以包括在试剂盒中。

[0067] 在实施方案中,本公开内容包括制备所述mAb或其TF-Ag结合片段的方法,包括培养包含表达载体或编码所述mAb或其TF-Ag结合片段的其它多核苷酸序列的细胞,允许所述mAb或其TF-Ag结合片段表达,和从细胞培养物分离所述mAb或其TF-Ag结合片段。编码所述mAb或其TF-Ag结合片段的核苷酸序列可以利用任何合适的表达载体表达,许多表达载体在本领域是已知的和/或可商购获得。在一个实施方案中,重链和轻链在单个表达载体如质粒上表达。在另一个实施方案中,重链和轻链在同一细胞中的不同质粒上表达,之后该表达的重链和轻链形成常规mAb结构。得益于本公开内容,所述mAb或其TF-Ag结合片段可以利用常规技术分离和/或纯化。

[0068] 在另一方面,本公开内容提供了抑制个体中的癌细胞的生长和/或抑制个体中的癌细胞的转移的方法,该癌细胞表达TF-Ag分子。所述方法包括向个体施用治疗量的人源化mAb 和/或其片段,其中所述施用抑制表达TF-Ag的癌细胞的生长和/或抑制其转移。在实施方案中,实施本发明的方法减小了肿瘤的体积,和/或减少了转移灶或继发肿瘤的形成。在实施方案中,所述方法对需要其的个体提供。在实施方案中,有需要的个体已被诊断患有或被怀疑具有发展或癌症复发或者处于发展或具有癌症复发的风险。在实施方案中,使用治疗有效量的mAb或其TF-Ag结合片段。如本文使用的,术语“治疗有效”意指施用的mAb或其TF-Ag 结合片段的量为足以抑制TF+癌细胞的生长、存活和/或转移的量。

[0069] 在多个实施方案中,人源化mAb和/或其片段可以缀合至化学治疗剂以能够经由结合至表达TF-Ag的细胞将该化学治疗剂定位至癌细胞。在这样的抗体缀合物的产生中可用的化学治疗剂包括酶活性毒素及其片段。合适的酶活性毒素包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 $\alpha$ 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲霉素、酚霉素、新霉素和单端孢霉烯。化学治疗剂可以通过任何合适的化学缀合方式共价地连接至所述mAb或其TF-Ag结合片段。在实施方案中,化学治疗剂可以包含具有所述mAb或TF-Ag 结合片段的融合蛋白的节段。

[0070] 在另一方面,本公开内容提供了用于在个体中鉴别转移灶、肿瘤或其组合的方法,其中所述转移灶或肿瘤包含表达TF-Ag的细胞。所述方法包括以下步骤:向个体施用人源化mAb和/或其片段,其中人源化mAb和/或其片段已被缀合至可检测标记,和检测所述可检测标记以鉴别转移灶、肿瘤或其组合。因此,可将人源化mAb和/或其片段开缀合至可检测标记如放射活性剂。各种各样的放射活性同位素可用于缀合至JAA-F11mAb,使得JAA-F11mAb结合的细胞可以被成像或选择性地破坏。对于表达TF-Ag的细胞的选择性破坏,JAA-F11 mAb可以缀合至高度放射活性原子如In111、At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212以及Lu的放射活性同位素。

[0071] 当人源化mAb和/或其片段用于鉴别转移灶中或肿瘤中表达TF-Ag的细胞时,它们可以包含用于核素研究的放射活性原子例如Tc99m(亚稳锝-99)、I123,或者用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像或“MRI”)的自旋标记,如I123、I131、I124、F19、C13、N15、O17或钆(III)或锰(II)。

[0072] 标记的人源化mAb和/或其片段可以注射入被诊断患有或怀疑具有转移性疾病的患者中以鉴别转移灶和/或肿瘤。来自这样的成像的信息可以用于患者的疾病状态的诊断或分期。使用的标记可以根据要使用的成像系统进行选择。例如,铟111、锝99或碘131可以用于平面扫描或单光子发射计算断层摄像(SPECT)。发射正电子的标记如氟19、碘123和碘124可以用于正电子发射断层造影术。顺磁离子如钆(III)或锰(II)可以用于磁共振成像(MRI)。标记在个体的特定组织内的定位允许包含表达TF-Ag的细胞的转移灶或肿瘤的定位。在特定位置大于背景的标记的浓度允许鉴别转移细胞的存在。在一个优选实施方案中,在施用标记的人源化mAb和/或其片段之后,允许合适时间期过去使得未结合的人源化mAb和/或其片段从个体被清除,使得背景标记大大地减少。

[0073] 包含缀合或未缀合的人源化mAb和/或其片段的治疗制剂可以通过与药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(雷明顿制药科学第16版0sol, A.Ed. (1980))混合,以冻干制剂或水溶液的形式制备。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对受体无毒,并且包括缓冲液如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;氯化苄甲烃铵;苄索氯铵;苯酚,丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲苯酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、白明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。人源化mAb和/或其片段可以与药物组合物中的其它化学治疗剂组合。

[0074] 所述人源化mAb和/或其TF-结合片段可以通过任何合适方式施用,包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、淋巴管内或皮下施用。另外,人源化mAb和/或其片段可以合适地通过脉冲输注,例如在减少抗体剂量的情况下施用。优选地,用药通过注射,最优选静脉内或皮下注射给予,这部分地取决于施用是否短暂或漫长。在某些实施方案中,人源化mAb和/或其片段施用至被诊断患有或怀疑具有乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、卵巢癌、膀胱癌或其它TF Ag+癌的个体以抑制癌细胞的转移或抑

制其生长。

[0075] 也可以施用其它化合物如化学治疗剂、免疫抑制剂和/或细胞因子。联合施用可以包括同时施用,使用单独的制剂或单个药物制剂,并且还可以包括以任意顺序的连续施用,其中优选地在两种(或所有)活性剂同时地发挥它们的生物活性期间存在一个时期。

[0076] 人源化mAb和/或其片段可以根据前述治疗方法以足以抑制表达TF-Ag的细胞的转移和/或生长的量施用至人或其它动物。本领域技术人员将理解,药学上可接受的载体或稀释剂的形式和特性由与其要组合的活性成分的量、施用途径和其它熟知变量如个体大小和疾病阶段支配。

[0077] 实施例1

[0078] 以下实施例描述了制备和使用此公开内容的人源化mAb,以及所述mAb的物理和功能性质。

[0079] 人源化JAA-F11的设计和构建

[0080] 在验证小鼠JAA-F11可变区的序列之后,定义CDR以保持对于TF-Ag的特异性和亲和力。包含的CDR分别基于序列和结构变化性根据Kabat等[139]和Chothia等[141]二者定义。如果两个氨基酸含有一对分隔开6Å以下的原子,则认为它们二者在蛋白结构中彼此接触[138]。关于小鼠JAA-F11的X射线晶体学和计算碳水化合物线程研究[142]鉴别出在距离结合位点5-6Å内的氨基酸残基。这些氨基酸以及对于构象结构重要的在轻链的位置L23和L88处的两个半胱氨酸残基包括在JAA-F11人源化中使用的CDR的最后包容性定义中。

[0081] 人类框架的选择

[0082] 应用三种不同方式来选择用于重链和轻链JAAF11可变区链的人类受体抗体框架。设计了重链的三个变体(H1、H2、H3)和轻链的3个变体(L1、L2、L3)。所述3个重链(VH)中的任一个可以与所述3个轻链(VL)中的任一个配对以生成总计9个可能的hJAA-F11VH/VL组合变体。

[0083] 为了生成这些变体,单独地进行BLAST检索,以针对人类免疫球蛋白序列比较mJAA-F11(小鼠抗体)的VH和VL序列。使用Seaview序列比对程序,将前10个最同源的人类VH和VL序列与mJAA-F11的对应可变区进行比对。

[0084] 对于第一个变体H1和L1,框架区的氨基酸序列基于在前10个最同源的人类IgG可变序列中的各个位置处最经常看到的氨基酸进行选择。对于变体H2和L2,框架区的氨基酸序列按如下进行选择:如果在前10个人类序列的任一个中的氨基酸与小鼠免疫球蛋白中的对应氨基酸匹配,则选择该氨基酸,在剩余位置中,选择在人类序列中最经常看到的氨基酸。对于第三个变体H3和L3,框架区的氨基酸序列在各个CDR的任一侧上含有3个小鼠氨基酸,而该序列的剩余部分由在前10个人类序列中最经常看到的氨基酸组成。

[0085] 还构建了嵌合JAA-F11,其由连接至人类恒定区的整个小鼠JAA-F11可变区构成。制备该嵌合体以验证正确的小鼠可变区已被克隆和测序并且还在评价人源化JAA-F11抗体时用作阳性对照。预期该嵌合体保持与小鼠JAA-F11相同的结合特性,同时具有人类恒定区。

[0086] hJAA-F11的模型的评估

[0087] 对最初提出的hJAA-F11构建体评估对结合位点的构象影响。三个重链变体(H1、H2、H3)在位置72处具有对于丙氨酸的精氨酸的替代,其可以潜在地引起与周围氨基酸的

严重空间相互作用。对于轻链变体 (L1、L2、L3)，在位置51的亮氨酸被精氨酸替代，这可以导致与周围氨基酸侧链的空间位阻。该精氨酸残基被移除并被原始小鼠JAA-F11框架残基丙氨酸 72 (VH) 和亮氨酸51 (VL) 替代，如图1和2所示。小鼠JAA-F11重链和轻链可变氨基酸序列与hJAA-F11构建体之间的比对比较如图1和2所示。当相比于其它H和L序列时，本领域技术人员还将识别在H2a、H3a、L2a和L3a中提供的氨基酸序列中的不同。

[0088] hJAA-F11变体的免疫原性预测

[0089] 利用我们的人源化变体 (CDR移植的) 的T20评分预测的免疫原性被预测为极低 (表1)。使用T20评分来测量单克隆抗体可变区序列的“人性”。这种评分系统由Gao等人开发 [Monoclonal antibody humanness score and its applications. 2013. BMC Biotechnology, 13:55], 利用超过38,000个人类抗体序列的数据库。在这种方法中, 进行此数据库的蛋白质BLAST 并且试验人源化Ab针对这些人类序列进行比较。将人源化抗体与前20个人类Ab BLAST 匹配进行比较并且对与这些序列的相似性进行评分。最高的可能评分为100 (与人类最相似的)。

[0090] 当Gao等人在已在临床上用于人类的超过90个抗体上测试此免疫原性评分方法, 并且发现具有高于80的FR&CDR的T20评分的抗体不是免疫原性的, 同时仅对于FR序列的T20评分 (其高于85) 不是免疫原性的时, 证实了此方法有效。利用当前hJAA-F11变体的T20值, 在患者中预期了极低的免疫原性。这证实该CDR-移植的抗体更加人性并且预期比嵌合体是更低免疫原性的, H1L1变体是CDR-移植的变体中最具人性的, 并且所有hJAA-F11变体被预期具有低的免于原性。

[0091] 表1. hJAA-F11构建体的免疫原性的评估。\*对于FR和CDR序列, 评分>80在人类不是免疫原性的。\*\*仅对于FR序列, 评分>85在人类不是免疫原性的。

[0092]

JAA-F11 变体	T20-评分 (FR & CDR)		T20-评分(FR)	
	重链	轻链	重链	轻链
嵌合体	67	78	77	86
H1L1	83	88	97	96
H2L2	76	87	90	95
H3L3	78	86	90	93

[0093] 人源化和嵌合JAA-F11变体的表达和生产

[0094] 将hJAA-F11与嵌合的VH和VL基因克隆入两个不同的哺乳动物表达载体, 其分别含有人IgG1重链恒定区 (6307pAH) 和人κ轻链恒定区 (6714pAN) 以生产含有完整IgG1和κ基因的质粒。正确的序列以及在6307pAH和6714pAN表达载体中的克隆VH和VL区各自的取向通过测序确认。

[0095] 在将两个载体稳定共转染入CHO-K1细胞之后, 利用抗生素G418和嵌合或hJAA-F11的表达, 基于新霉素抗性, 选择表达hJAA-F11或嵌合体的稳定克隆体。hJAA-F11候选物的筛选如利用已形成技术, 使用用于抗-TF-Ag抗体的ELISA进行。来自对TF-Ag显示最高反应性的各个人源化JAA-F11H/L组合变体和嵌合JAA-F11的共转染的克隆体被选择用于如本文所

述的表征。人源化JAA-F11构建体和嵌合JAA-F11个体地通过蛋白A柱色谱从培养上清而被纯化。已经生产了嵌合抗体以及H1L1、H2L2、H3L3和H2L3、H2aL3a和H3aL3a。在获益于本公开内容下,技术人员可以容易地生产涵盖在本发明中的剩余抗体H和L链组合。

[0096] 通过聚糖阵列的化学特异性分析

[0097] 在初始筛选之后,利用功能糖组学协会的聚糖阵列确定hJAA-F11和嵌合JAA-F11变体的化学特异性。将这些数据与对于小鼠JAA-F11获得的数据进行比较。聚糖阵列分析是一种间接免疫荧光法以确定凝集素和抗体的聚糖结合反应性。利用早期聚糖阵列来证实小鼠 JAA-F11的化学特异性。利用这种方法在610个不同聚糖下来分析抗体候选物的反应性。hJAA-F11、H1L1、H2L2、H3L3和嵌合抗体显示与小鼠抗体相同的良好结合特异性,包括与Gal $\beta$ 1-3GalNAc- $\alpha$  (TF-Ag) 连接结构的结合的限制,以及与 $\alpha$ 2-3唾液酸化结构的结合的缺乏。聚糖阵列显示在610个聚糖之中,人源化抗体、嵌合和小鼠JAA-F11仅结合TF-Ag 和四个其它含有TF-Ag的糖结构。所测试的440或610糖之中,小鼠JAA-F11、嵌合和 hJAA-F11构建体结合的四个另外的糖对于用JAA-F11的肿瘤靶向应该不是生物学有问题的。Neu5Ac $\alpha$ 2-6 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 、GlcNAc $\beta$ 1-6 (Gal $\beta$ 1-3) GalNAc $\beta$ 和 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6 (Gal $\beta$ 1-3) GalNAc $\beta$ 未取代的仅在分泌流体、癌症或其它疾病状态中发现。Neu5Ac $\beta$ 2-6Gal $\beta$ 1-3GalNAc不是天然结构并且不在人类中。

[0098] 当相比于嵌合和小鼠抗体时,人源化JAA-F11构建体的特异性看起来相同或甚至提高。例如,H2L3显示在任何添加至TF-Ag下的统计学 ( $p < 0.05$ ,通过ANOVA) 更少结合,并且H1L1和H2L2不允许二糖被添加至GalNAc的C-6羟基,且这与其它抗体是统计学不同的 ( $p < 0.05$ )。

[0099] 与阵列上超过600个负糖的结合的缺乏表明对于所有这些抗体的可能的靶向能力。不结合的密切相关糖类的重要实例是Gal $\beta$ 1-3GalNAc- $\beta$ 连接结构,表明所述抗体将结合至肿瘤组织并且不结合至中枢神经系统GM1神经节苷脂、NK细胞的无唾液酸-GM1、糖脂的GD1 或至外周神经组织的无唾液酸GM1 (这些是 $\beta$ -连接的)。熟知的TF-Ag在正常组织上的伸长通过 $\beta$ 1-3N-乙酰基葡萄糖胺基-转移酶在Gal上添加GlcNAc $\beta$ 1-3形成 GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Sp8,或通过2-3唾液酸转移酶形成Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc (唾液酸-TF) 或利用第二唾液酸转移酶形成Neu5Ac2-3Gal $\beta$ 1-3 (Neu5Ac $\alpha$ 2-6) GalNAc (二唾液酸-TF) 进行,所有这些不结合小鼠、嵌合或人源化JAA-F11。因此对于JAA-F11或hJAA-F11 构建体,不预期正常组织结合。

[0100] 相对亲和力分析

[0101] 四种hJAA-F11和嵌合抗体与TF-Ag的相对结合亲和力通过比较小鼠抗体在酶免疫测定中与入源化抗体竞争的能力来确定。在此测定中,将3 $\mu$ g的每个人源化Ab与小鼠抗TF-Ag 抗体 (mJAA-F11) 的系列稀释液混合。人抗-TF-Ag与TF-Ag涂覆板的结合利用特异性抗-人 IgG物种测量。将用来抑制1 $\mu$ g的hJAA-F11至50%所需的小鼠mJAA-F11的量外推并用作相对亲和力的量度。用于抑制所需的小鼠抗体的量越高,抗体的相对亲和力越高。

[0102] 结果概括在图3以及表2和3中。表2显示由不同抗体与1 $\mu$ g的此人源化抗体竞争所需的小鼠JAA-F11的半数最大抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。H2L2显示在抗体中对TF-Ag具有最高相对亲和力,小鼠抗体的IC<sub>50</sub>为2.31 $\mu$ g。表7显示针对彼此ANOVA-Tukey事后检验对于各个抗体计算的p-值。可以看出,当相比于hJAA-F11和嵌合抗体的每一个 (除了H2L3,其中其达到显著

性 ( $p=0.057$ )), H2L2抗体的这种提高的亲合力差异是统计学显著性的 ( $p<0.05$ ) (表 3)。H2L3与H1L1、H2L2、H3L3和嵌合抗体不是显著性地不同的。H1L1、H3L3和嵌合抗体的相对亲合力彼此不是显著性不同的。

[0103] 表2.hJAA-F11和嵌合JAA-F11抗体对于TF-Ag的相对亲合力

[0104]

IC <sub>50</sub> , 对于 TF-Ag 的相对亲合力: 1 $\mu$ g 的各个 hJAA-F11 或嵌合体的 50%抑制所需的 $\mu$ g mJAA-F11				
H1L1	H2L2	H2L3	H3L3	Chimeric
<b>1.11 <math>\pm</math> 0.18<sup>a</sup></b>	<b>2.31 <math>\pm</math> 0.20</b>	<b>1.64 <math>\pm</math> 0.39<sup>a</sup></b>	<b>1.28 <math>\pm</math> 0.41<sup>a</sup></b>	<b>1.14 <math>\pm</math> 0.30<sup>a</sup></b>

[0105] <sup>a</sup>显示三个独立实验的平均值 $\pm$ 1SD。

[0106] 表3.对重复的IC<sub>50</sub>测定进行ANOVA分析以比较不同抗体的IC<sub>50</sub>之间的差异。 $P<0.05$  显著性的(加阴影的)。

[0107]

P-值 (Tukey)	H2L2	H2L3	H3L3	H1L1
H2L2		0.057	0.002	0.00
H2L3	0.057		0.330	0.071
H3L3	0.002	0.33		0.908
H1L1	0.00	0.071	0.908	
嵌合体	0.00	0.093	0.948	1.00

[0108] hJAA-F11的生物反应性、特异性和活性的分析

[0109] 3hJAA-F11和嵌合JAA-F11抗体结合至人肿瘤细胞系。

[0110] hJAA-F11和嵌合JAA-F11抗体与多种人乳腺肿瘤细胞系的结合利用全细胞ELISA评估。TF-Ag阳性小鼠哺乳动物肿瘤4T1细胞系用作阳性对照而P3-X63-Ag8骨髓瘤细胞系用作TF-Ag阴性对照。在不同的三天进行测定并利用对照细胞系一次一式四份地测定3至4 中细胞系。如果由于hJAA-F11或嵌合JAA-F11(在50 $\mu$ g/mL)所致的相对结合显著高于 ( $p\leq 0.05$ ) TF-Ag阴性对照骨髓瘤的相对结合,则认为该细胞系是阳性的。结果显示在图4中。

[0111] 测试的癌细胞系由乳腺癌的不同亚组(激素受体阳性或阴性、Her2-阳性或阴性和三阴性) 组成。测试的雌激素受体(ER)和孕酮受体(PR)阳性细胞系是CAMA-1和HCC-1428。测试了两个Her2/neu受体阳性细胞系HCC-1419和AU-565。测试的三阴性乳腺癌(TNBC)细胞系是 HCC-70、MDA-MB-231、MDA-MB-468、DU-4475和BT-549。一个细胞系MDA-kb2表达雄激素受体但是雌激素受体阴性的。这些乳腺癌细胞系之前已使用小鼠JAA-F11考察并且全部对于TF-Ag表达是阳性的。在此公开内容中,结果显示hJAA-F11和嵌合JAA-F11抗体结合至考察的全部10个乳腺癌细胞系,确认TF-Ag在这些细胞系上的表达。在不同乳腺癌亚组之中,目前还没有用于治疗TNBC患者的靶向疗法。获得的数据表明TF-Ag在靶向侵袭性TNBC的治疗作用以及hJAA-F11抗体治疗和增加乳腺癌患者的存活(而不管受体状态)的用途。表4概述了乳腺癌的类型以及所测试的各个细胞系的TF-Ag的表达。

[0112] 表4.在全细胞ELISA中测试的乳腺癌细胞系的表格。表格显示了激素受体、Her2/neu受体和TF-Ag的表达。三阴性(黑体)、ER/PR阳性(斜体)和HER2-阳性(黑体且斜体)。

MDA-kb2\*对于雌激素受体是阴性的但表达雄激素受体。

[0113]

细胞系	雌激素受体	孕酮受体	Her2/neu受体	TF-Ag表达
HCC-70	-	-	-	+
BT-549	-	-	-	+
MDA-MB-231	-	-	-	+
MDA-MB-468	-	-	-	+
DU-4475	-	-	-	+
CAMA-1	+	+	-	+
HCC-1428	+	+	-	+
HCC-1419	-	-	+	+
AU 565	-	-	+	+
MDA-kb2*	-	-	-	+

[0114] 人源化JAA-F11在体外抑制癌细胞的增殖

[0115] 由于一些抗-TF-Ag抗体已显示引起肿瘤细胞增殖,所以确定不同构建体对细胞增殖的影响很重要。选取测量代谢活性的MTT测定作为用于氘标记的胸腺嘧啶脱氧核苷直接增殖测定的代用品。相比于没有抗体的对照,人源化、嵌合和小鼠JAA-F11抗体对癌细胞生长的影响通过已知的方法在4ug/ml的抗体得到确定。数据显示在图5中。嵌合抗体和人源化JAA-F11抗体(除了H3L3)引起了肿瘤细胞生长的小(~6-11%)但统计学显著性抑制。没有看到细胞增殖的增强。

[0116] 人源化JAA-F11诱导ADCC

[0117] 在以下改变下根据标准技术,基于乳酸脱氢酶(LDH)释放测定,利用CytoTox 96(非放射活性细胞毒性测定;Promega, Madison, WI),在人乳腺肿瘤细胞系上进行抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。从EDTA抗-凝固全血分离新鲜人外周血单核细胞用于以效应器与靶标比率为100:1与人源化抗体和4T1小鼠乳腺癌细胞一起使用。利用LDH的释放来定量细胞毒性。

[0118] 图6A显示在人乳腺癌细胞系BT 549上比较的由小鼠、嵌合、H1L1和H3L3抗体促进的ADCC的量。实验重复多于三次。在所有实验中,H2L2和H3L3显示比人细胞系中的嵌合或小鼠抗体显著更大的( $p < 0.5$ )ADCC。超过20%的带有TF-Ag的BT549和HCC70靶细胞由在200 $\mu$ g/mL的H2L2和H3L3抗体以100:1效应器对靶标(E:T)比率溶解。同样,在小鼠4T1细胞系上的所有实验中,尽管测试的所有抗体诱导小于10%的ADCC,但H3L3抗体显示比嵌合或小鼠抗体显著更大的( $p < 0.05$ )ADCC。这表明当前H2L2和H3L3抗体对于免疫治疗是最佳选择。相反,小鼠JAA-F11在任何试验中都不显示统计学显著性的ADCC能力。来自三个单个PBMC供体的ADCC结果显示在图6B、6C和6D中。

[0119] 人源化JAA-F11不诱导CDC

[0120] 使用人乳腺癌细胞HCC-1428细胞作为靶细胞,通过乳酸脱氢酶(LDH)释放测定来确定hJAA-F11和嵌合抗体介导补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。提供有试剂盒的LDH阳性对照用作阳性对照并显示溶解。小鼠JAA-F11、嵌合体、H1L1、H3L3、H2L3抗体不诱导补体依赖性细胞毒性,因为没有发现溶解,如图7中所示。

[0121] 人源化JAA-F11内化入癌细胞

[0122] 人源化和嵌合JAA-F11到4T1乳腺肿瘤细胞中的内化通过两种方法确定,即利用在将细胞在4℃或37℃孵育之后测量和比较表面结合的酶免疫测定,和利用LAMP-1(溶酶体相关膜蛋白,一种溶酶体标记物)和用于核染色的DAPI染色的免疫荧光显微镜法。在酶免疫测定中,如图8所示,小鼠、H2L2、嵌合体、H2L3和H1L1抗体显著地内化,具有的p-值分别为0.001、0.002、0.001、0.002和0.014。然而,H3L3抗体没有显示显著内化( $p=0.16$ )并且这是预期的,因为H3L3显示比嵌合或小鼠JAA-F11显著更大的( $p<0.5$ )ADCC。

[0123] 在免疫荧光实验中,与酶免疫测定一致,小鼠、嵌合、H2L2、H2L3抗体显示内化并且与LAMP-1和H3L3的共定位显示没有内化的膜染色。此数据证实了利用表面酶免疫测定获得的结果。将预期,显示较高ADCC活性的抗体将显示较低的内化,因为细胞表面上的抗体存在对于ADCC功能是需要。内化测定已在hJAA-F11、嵌合体和mJAA-F11上进行。H3L3显示与此预期的一致,具有低量的内化但相对高的ADCC。H1L1、H2L3、嵌合体和 mJAA-F11都显示统计学显著性内化并且没有良好进行ADCC。对于HEL2抗体观察到未预期的结果,其类似于H3L3诱导高ADCC,但相比于嵌合体和其它人源化抗体显示最高的内化百分比活性。

[0124] 免疫荧光内化实验开始使用5μg/mL的抗体进行并使用在0.1μg/ml的抗体浓度重复,内化的抗体甚至在此低浓度如此做。以上数据表明,由于高百分比的内化,以及此内化的快速速率,所以嵌合体、H2L2和H2L3构建体具有被用作抗体-药物缀合物的潜能。聚糖特异性、相对亲和力/内化、ADCC和CDC数据概括在下表5中。

[0125] 表5. 小鼠、人源化和嵌合JAA-F11的内化、ADCC和聚糖特异性的概括。

[0126]

JAA-F11 变体	ADCC	CDC	内化	对于 TF-Ag 增加的 特异性	亲和力等 级
小鼠	否	否	是	否	
嵌合	否	否	是	否	3

[0127]

H1L1	是	否	否	是	3
H2L2	是	否	是	是	1
H2L3	否	否	是	是	2
H3L3	是	否	否	否	3

[0128] MicroPET成像

[0129] MicroPET成像在一只小鼠上系列地进行,各个小鼠注射有124碘-hJAA-F11H2L2抗体以及游离124碘。在24、48、72、96、168和192小时进行成像。图9显示在不同时间点注射有124碘-hJAA-F11H2L2抗体的小鼠的冠状图,而图10是注射游离124碘的对照小鼠。放射标记的抗体由肿瘤的摄取在注射后24/48/72和96小时进行观察。抗体的摄取还在48小时在脾脏中看到(图9)。带有4T1TF-Ag阳性肿瘤的阴性对照小鼠(其仅接受游离124碘)显示,在整个研究中,除了定位至甲状腺,没有定位至任何器官或肿瘤(图10)。

[0130] 完全鼠类JAA-F11对于乳腺癌患者中的被动体液免疫疗法和药物缀合物疗法具有潜力。然而,由于在人中小鼠抗体的使用已显示受人抗-鼠类抗体(HAMA)响应的形成和患者体内短暂半衰期的限制,所以人源化是期望的以降低小鼠JAA-F11抗体的免疫原性而且还允许其在循环中保持较长时间。

[0131] 从前述结果的描述将认识到,此公开内容尤其提供了一种用于小鼠JAA-F11mAb的人源化以及在小鼠、嵌合和人源化JAA-F11抗体之间的比较和对比的新方式。mJAA-F11部分地通过CDR移植人源化。如将有本领域技术人员认识到的,传统上,通过CDR移植的人源化利用单个人抗体受体框架[Jones等人.Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse.1986.Nature 321:522-525]。因此,人框架序列选自现有人胚系基因。相反,在本公开内容中,使用三种新的且不同的方式来选择人受体抗体框架,用于重链和轻链JAAF11可变区链,产生重链的三个变体(H1、H2、H3)和轻链的三个变体(L1、L2、L3)。如以上讨论的,三个重链中的任一个(VH)可以与3个轻链中的任一个(VL)配对而生成总计9个可能的hJAA-F11VH/VL组合变体。还产生了具有完全小鼠可变区以及人IgG1和 $\kappa$ 恒定区的嵌合JAA-F11,并用作对照。

[0132] 一个问题是在定义CDR和FR区中使用的方式是否将降低人源化抗体的免疫原性。使用由Gao等人开发[Monoclonal antibody humanness score and its applications.2013.BMC Biotechnology,13:55]且用已经在患者中应用的90个抗体的分析验证的T20评分方法来预测人源化JAA-F11变体的免疫原性。人源化JAA-F11变体的T20评分全都高于(被提高)( $>85$ ) 嵌合JAA-F11( $<85$ ),表明重和轻可变链通过所有三种本发明方法的人源化生成将比嵌合变体更低免疫原性的hJAA-F11变体。

[0133] 我们人源化小鼠JAA-F11并且五个抗体已使用CHO-K1细胞生产,嵌合体 and 4个hJAA-F11构建体H1L1、H2L2、H3L3和H2L3。因此,在获益于本公开内容下,技术人员可以制备任何可用的其它四种可能的VH和VL组合。

[0134] 通过CDR移植的抗体人源化可以引起亲和力下降或者抗原结合的丧失,这可能是由于CDR构象和抗原结合位点受人源化抗体中的一些框架氨基酸残基的变化负面影响所致。CDR由与框架区和其它CDR相互作用的残基组成。除了CDR氨基酸与顺序地附近的氨基酸的相互作用之外,可以直接或间接影响抗原结合的一些框架残基包括Vernier区域残基和在VL/VH界面处的残基。Vernier区残基是在CDR下方的 $\beta$ -片框架中的残基,其提供用于环结构的构象的基础。在轻链上的Vernier残基在位置2、4、35、36、46、48、49、64、67、69和71处,而在重链上,它们被鉴别在位置2、27、28、29、30、47、48、49、67、69、71、73、78、93、94和103处。在VL/VH界面处的残基已由Chothia和同事鉴别出来[Chothia C等人,可变结构域的包装.1989.J.Mol.Biol.186:651-63],并且在轻链的位置34、36、38、44、46、87、89、91、96和98处,以及在重链的位置35、37、39、45、47、91、93、95、100-100K和103处。

[0135] 我们显示了在本公开内容中使用的用于选择人FR和CDR的方式相对于嵌合和小鼠JAA-F11,不会负面地改变人源化JAA-F11对于TF-Ag的亲和力。当定义CDR时,已包括了结合位点的5 Å至6 Å内的残基以确保对于TF-Ag的亲和力和特异性被保持。这些残基在重链上的位置H31、H32、H33、H35、H50、H52、H53、H54、H95、H96、H97、H98和H100处,以及在轻链上的位置L27d、L28、L30、L32、L34、L50、L89、L91、L92和L96处。然而,根据相对亲和力研究,虽然所有的人源化抗体保持对于TF-Ag的亲和力,但我们观察到在抗体之间的亲和力方面的差

异。相对亲和力研究揭示H2L2抗体是具有最高亲和力的抗体,接着是H2L3抗体。在抗体之中,H2L2抗体对于TF-Ag具有最高相对亲和力,需要超过2mg的小鼠抗体用于抑制1mg的H2L2抗体。H2L3抗体还具有比H1L1和嵌合抗体更高的亲和力,尽管不是显著性的,而H1L1、H3L3和嵌合抗体对于TF-Ag的相对亲和力彼此之间不是显著性不同的。

[0136] 这些在亲和力方面的提高可以归属于不同人源化变体之间的一些残基的变化。变体之间的差异在以下列于表6和6B中。

[0137] 表6A. 重链可变H1、H2、H3和小鼠序列之间的差异。

[0138]

位置	H1	H2	H3	小鼠
5	缬氨酸	亮氨酸	缬氨酸	亮氨酸
11	缬氨酸	亮氨酸	缬氨酸	亮氨酸
38*	精氨酸	精氨酸	赖氨酸	赖氨酸
48***	蛋氨酸	蛋氨酸	异亮氨酸	异亮氨酸
66*	精氨酸	精氨酸	赖氨酸	赖氨酸
67***	缬氨酸	缬氨酸	丙氨酸	丙氨酸
69***	蛋氨酸	亮氨酸	蛋氨酸	亮氨酸

[0139]

73**	苏氨酸	赖氨酸	苏氨酸	赖氨酸
75	异亮氨酸	丝氨酸	异亮氨酸	丝氨酸
82b	精氨酸	丝氨酸	精氨酸	丝氨酸
83	精氨酸	苏氨酸	精氨酸	苏氨酸
85	天冬氨酸	谷氨酸	天冬氨酸	谷氨酸
108*	亮氨酸	苏氨酸	苏氨酸	苏氨酸
109*	缬氨酸	缬氨酸	亮氨酸	亮氨酸
12	赖氨酸	赖氨酸	赖氨酸	丙氨酸
20	缬氨酸	缬氨酸	缬氨酸	蛋氨酸
40	丙氨酸	丙氨酸	丙氨酸	精氨酸
76	丝氨酸	丝氨酸	丝氨酸	苏氨酸
81	谷氨酸	谷氨酸	谷氨酸	谷氨酰胺

[0140] \*\*指示Vernier区域位置。

[0141] \*指示此位置在我们修饰的CDR的4个氨基酸内。

[0142] 表6B. 轻链可变L1、L2、L3和小鼠序列之间的差异

[0143]

位置	L1	L2	L3	小鼠
----	----	----	----	----

1	天冬氨酸	天冬氨酸	天冬氨酸	谷氨酸
2**	缬氨酸	缬氨酸	缬氨酸	亮氨酸
7	丝氨酸	苏氨酸	丝氨酸	苏氨酸
14	苏氨酸	苏氨酸	苏氨酸	天冬酰胺
17	谷氨酰胺	谷氨酰胺	谷氨酰胺	天冬氨酸
18	脯氨酸	脯氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺
36***	苯丙氨酸	苯丙氨酸	酪氨酸	酪氨酸
37*	谷氨酰胺	谷氨酰胺	亮氨酸	亮氨酸
39*	精氨酸	精氨酸	精氨酸	赖氨酸
45	精氨酸	精氨酸	精氨酸	赖氨酸
81	谷氨酸	谷氨酸	谷氨酸	天冬氨酸
83	缬氨酸	缬氨酸	缬氨酸	亮氨酸

[0144] \*\*指示Vernier区域位置。

[0145] \*指示此位置在我们修饰的CDR的4个氨基酸内。

[0146] 如以上提及的,影响抗原结合的框架残基包括Vernier区域和VL/VH界面残基。当比较人源化构建体时,本公开内容的mAb保留大多数的Vernier区域和VL/VH界面残基,其对于结合位点构象可能很重要,然而形成了一些变化以生成较低免疫原性的人源化变体而发生。改变的氨基酸在Vernier区域中或在VH/VL界面中,并且已对CDR的4个氨基酸(顺序地)内的氨基酸形成变化,如通过星号指示的。在三个构建体之间不同的重链序列上有四个Vernier区域位置,即位置48、67、69和73。H2保留小鼠残基但在八个位置5、11、69、73、75、82b、83和85处在H1和H3构建体之间不同。在这八个残基中,两个是Vernier区域残基,在位置69和73处。同时,H2和H1在两个Vernier区域位置处(即在残基48和67处)具有替代,其在H3上保持为小鼠残基。由于在H1L1和H3L3之间的亲和力方面没有差异,所以这表明在48和67处的Vernier区域位置会不可能对于亲和力差异有贡献,因为它们保持在H3中保持,但在H1中改变。然而,与H1和H3不同,H2保留在位置69和73处的小鼠Vernier区域残基,表明在这两个Vernier区域位置处的变化对亲和力方面的差异有贡献。相比于H1和H3,在CDR2下方的这两个Vernier区域残基可能具有增强的H2结合。在人源化构建体之间不同的氨基酸之中,位置69和108与结合位点最接近。在H2中的位置69的氨基酸(如同在小鼠抗体中)是亮氨酸,而其它人源化构建体二者都具有蛋氨酸。在H2和小鼠抗体之间的差异之中,在氨基酸38、48、66、67和109处的变化与CDR最接近并还可能影响亲和力。

[0147] 由于H2L2具有比H2L3更高的亲和力,所以L2和L3的比较可以进一步有助于描述对于此差异的原因。对于VL/VH残基没有变化并且在轻链上的大多数Vernier区域残基在3个人源化构建体之间保持,除了Vernier位置2和36。与L3不同,但与小鼠抗体一样,较高亲和力L2在Vernier位置36具有苯丙氨酸而不是酪氨酸。在位置36和37处的氨基酸可以有方式影响构象,因为它们结合在结合位点的5 Å内,并且是位置24-35中的部分氨基酸,其被发现GalNAc的还原端处的α连接需要的保持中很重要。

[0148] 许多正常组织具有与TF-Ag不相同但非常相似的结构如Galβ1-3GalNAc-β连接结构,其通常存在于中枢神经系统(在NK细胞上)和外周神经组织中,因此良好特异性的保持是在此人源化中的关键特征。相比于小鼠抗体,hJAA-F11H1L1、H2L2、H3L3和嵌合抗体保留

相同或提高的抗原结合的良好特异性,包括与Gal $\beta$ 1-3GalNAc- $\alpha$  (TF-Ag) 连接结构的结合的限制,以及基于聚糖阵列与 $\alpha$ 2-3唾液酸化结构的结合的缺乏。当针对超过600个不同糖进行测试时,人源化JAA-F11构建体的特异性看起来相同甚至提高。小鼠JAA-F11和所有人源化构建体仅与5个糖反应,即TF-Ag和3个具有连接至GlcNAc的一个额外的糖1-6(在2个中NeuAc,和在第三个中的GlcNAc)的三糖或与具有连接1-6至GlcNAc的2个额外的糖GalGlcNAc的糖反应。例如,当相比于嵌合和小鼠抗体时,H2L3显示在所有4个结合至JAA-F11的其它糖上较少的结合,而H1L1和H2L2与结合至JAA-F11的四糖没有结合。尽管这4个结合至JAA-F11的其它糖还不知晓在正常组织上被表达,但是对于靶标结构增加的特异性总是期望的。这证实在人治疗中对于所有这些抗体的可能的靶向能力。由于相比于其它构建体,H2L3具有增加的结合特异性,如通过与所述4个糖中的3个的较少结合显示的,所以H2和H3之间差异可能引起此差异。已经在亲和力部分讨论的变体之间的差异可能是对于此提高的特异性的原因。H2L3与H2L2的不同在于其与NeuAc $\alpha$ 2-6 (TF-Ag) 和 GlcNAc $\beta$ 2-6 (TF-Ag)降低的结合。

[0149] 在没有意图受理论限制的情况下,据信当相比于H3L3和小鼠抗体时,H1L1和H2L2根本不结合至四糖的原因可能不得不处理这些抗体之间的共有差异。H1和H2都具有在位置48处的蛋氨酸,其是Vernier区域位置并且顺序地在CDR的4个氨基酸内。此蛋氨酸不是小鼠和H3抗体的异亮氨酸。

[0150] 在本公开内容中,全细胞EIA结果突显了hJAA-F11和嵌合JAA-F11抗体结合三阴性乳腺癌细胞系的能力。获得的数据表明TF-Ag在靶向所有乳腺癌而尤其是侵袭性三阴性乳腺癌(TNBC)中的潜在治疗作用,因为在目前对于这些类型的癌症还没有靶向疗法。

[0151] 结合TF-Ag的一些凝集素和抗体引起表达TF-Ag的肿瘤细胞的增加的增殖。这被认为通常与凝集素或抗体是否结合在还原端的 $\alpha$ 和 $\beta$ 异头物二者(增殖引起的)或仅 $\alpha$ 异头物(抑制性的)。而小鼠JAA-F11仅结合 $\alpha$ 异头物并且不会引起肿瘤细胞的增殖,确定人源化构建体是否对肿瘤细胞具有此作用很重要。人源化JAA-F11和嵌合抗体在体外不会引起癌细胞的增殖,相反,类似于小鼠JAA-F11的作用,观察到小鼠4T1和人癌细胞生长的小(~6-11%)但显著的抑制。

[0152] 由于ADCC是抗体消除肿瘤细胞的主要机制之一,并且对于抗体被用于癌症治疗是很重要的,所以考察了人源化JAA-F11变体诱导ADCC的能力。利用一些但不是全部的人源化构建体,观察到了ADCC活性,并且在三个个体的PBMC下观察到。H2L2和H3L3抗体二者诱导比小鼠4T1和人乳腺癌细胞系二者的嵌合或小鼠抗体显著更大的ADCC,表明当前H2L2和H3L3抗体可以是用于直接被动免疫疗法的优选选择。小鼠JAA-F11在任一试验中不显示任何统计学显著性ADCC能力。抗体用于杀死肿瘤细胞的另一种效应器功能是CDC。人源化、嵌合和小鼠JAA-F11抗体都不诱导CDC,但这种CDC活性的缺乏不排除其作为免疫治疗剂的用途,事实上已发现Herceptin仅诱导微不足道的量的CDC,并且这不是其作用模式中的一种。利用Rituxan的数据实际上显示补体结合抑制NK细胞结合并降低功效。

[0153] 抗体可以潜在地用来以抗体-药物缀合物的形式将药物或毒素携带入细胞。因此,我们评估了人源化JAA-F11变体在结合至癌细胞上的TF-Ag后内化的能力。小鼠JAA-F11之前已显示在1小时内内化。利用酶免疫测定,我们证实了小鼠、H2L2、嵌合、H2L3和H1L1抗体显著地内化到小鼠4T1乳腺癌细胞中而H3L3抗体不显示显著内化。活细胞荧光显微镜法确

认了从酶免疫测定获得的结果。我们预期显示较高ADCC活性的抗体将显示较低的内化并且来自两个内化测定的结果显示与此预期一致,因为H3L3抗体表现出比小鼠或嵌合抗体更大的ADCC但不显著内化。然而,H2L2,即使它在ADCC测定中良好进行,但内化好。这两者如何可以在相同抗体下发生的机制还未被理解,但一种可能性在于在CHO细胞中不同生产速率可以导致不同的岩藻糖基化率,所以如果H2L2较低岩藻糖基化,则它可能在该时间期间在ADCC更好进行,其在细胞表面,即使它被内化。这些结果显示嵌合、H2L2和 H2L3构建体具有被用作抗体-药物缀合物的潜力。

[0154] 小鼠124I-JAA-F11抗体已显示在小鼠中定位至TF-Ag乳腺肿瘤。标记的JAA-F11抗体保持结合至4T1肿瘤持续至少20天和对于人三阴性乳腺肿瘤持续24天,暗示JAA-F11可以用来发现转移和治疗带有TF-Ag的肿瘤。为了测试碘-124标记的人源化抗体是否将在小鼠中定位至人乳腺肿瘤,利用具有最高亲和力的人源化抗体,H2L2变体(其内化和进行ADCC)。成像显示优先肿瘤摄取,其中在甲状腺和在脾脏中的摄取在后一个实验中利用冷兔免疫球蛋白阻断。MicroPET成像显示放射标记的人源化抗体在24小时内被肿瘤吸收并且直至96小时可以看到。这样的在患者中的放射定位可以用来发现转移并且还用来在直接被动免疫疗法或抗体-药物缀合物疗法之前确定在具体患者中是否存在任何脱靶结合。

[0155] Thomsen-Friedenreich抗原(TF-Ag)存在于多于80%的若干人癌瘤(包括乳腺癌)。其在肿瘤粘附和转移中具有功能作用,所以抗体靶向TF-Ag的能力表明作为免疫治疗剂、作为用于杀死癌细胞和用于抑制转移的抗体-药物缀合物的可能用途。对于TF-Ag具有其独特高特异性的JAA-F11抗体保持作为用于治疗乳腺癌和其它癌症的被动抗TF-Ag反应的巨大潜力。在我们的人源化方式中,我们保持了此独特特异性并且已利用人源化JAA-F11变体可能使其增强。

[0156] 实施例2

[0157] 此实施例提供用来获得本文中描述的结果的材料和方法的描述。

[0158] JAA-F11CDR之前已被预测。我们进行了小鼠JAA-F11抗体的克隆和测序以确认重链和轻链可变区二者的氨基酸序列。

[0159] 为了在人中具有治疗益处,抗体应保持其对于其靶抗原的特异性同时不产生抗-小鼠免疫反应。我们选择了CDR移植方式以保留小鼠JAA-F11的CDR以便保持对于TF-Ag $\alpha$ 的特异性和亲和力。使用Chothia和Kabat方法以及X射线晶体结构和计算碳水化合物线程来选择CDR。

[0160] 为了选择用于重链和轻链JAAF-11可变区链中的每一个的人受体抗体框架,针对整个非冗余人(智人)Genbank数据库,在blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins进行了蛋白BLAST® (BLASTP)检索,以鉴别与小鼠JAA-F11最同源的人抗体。将所有非智人蛋白序列、人源化抗体和噬菌体展示序列从BLASTP结果消除。所得的前十个与JAA-F11的重和轻可变链序列中的每一个最同源的序列被选择作为用于人源化JAA-F11(hJAA-F11)的潜在人受体抗体框架。使用SeaView序列比对程序来比对所述十个潜在人受体可变重链或轻链框架序列与小鼠JAA-F11可变重链或轻链区序列。

[0161] 从所述10个最相似人免疫球蛋白序列的蛋白BLAST选择构建三个重链(H1、H2和H3)和三个轻链(L1、L2和L3)可变区。然后将来自小鼠JAA-F11的最后CDR通过三种不同方法中的一种移植到人框架区上,生成3个不同重链和3个不同轻链。在第一种方法中,(a)重

链H1和轻链L1FR序列设计成含有在前十个所选人FR序列之中的各个位点中的最经常出现的人氨基酸。在第二种方法中, (b) 重链H2和轻链L2设计成含有在各个位点中在所述前十个所选人FR序列之中最经常出现的人氨基酸, 除非氨基酸存在于在小鼠JAA-F11中看到的所匹配的前十个人FR的任一个中, 然后将该氨基酸保持为与在小鼠JAA-F11中一样。在第三方法中, (c) 在重链H3或轻链L3中, 保持在小鼠JAA-F11的CDR1、CDR2和CD3 之前和之后的三个FR残基并且剩余的残基是如在变体H1或L1中的在人序列中最经常出现看到的氨基酸。这些设计的重可变链中的任一个可以与类似地设计的轻可变链配对, 例如 H1/L1、H1/L2、H1L3、H2L1、H2L3等。

[0162] 还构建了嵌合JAA-F11, 其中整个小鼠JAA-F11可变区连接至人IgG1恒定区。这是提供应具有小鼠抗体的原始特异性和亲和力同时具有人恒定区的基线, 以用作用于评价人源化变体的阳性对照。

[0163] hJAA-F11的模型的评估

[0164] 评估多种hJAA-F11构建体的构象效应。简言之, 将提出的多种hJAA-F11构建体的重和轻可变链序列与JAA-F11序列进行比对。将对于可以潜在地引起与周围氨基酸的严重空间相互作用的各个人源化变体的框架中的任何氨基酸残基移除并用原始小鼠JAA-F11框架残基替代。

[0165] 使用T20评分预测hJAA-F11变体的免疫原性

[0166] 尽管人源化和完全人抗体被认为是非免疫原性的并且对于人使用是安全的, 但是完全人和人源化抗体的免疫原性已在患者中报道。为了确定所选择的序列是否具有低免疫原性, 通过T20评分方法进行免疫原性分析。利用超过38,000人抗体序列的数据库, 由Gao等人开发的T20评分分析仪计算单克隆抗体可变区序列的“人性”。

[0167] 在此方法中, 进行蛋白BLAST检索并且将试验人源化Ab首先针对所有这些人序列进行比较。然后将人源化抗体与前20个人Ab BLAST匹配进行比较并对与这些序列的相似性进行评分。对于人源化抗体的T20评分从前20个匹配人序列的百分比同一性的平均值获得。最高的可能评分为100 (与人最相同的)。作为用于此方法与患者中的免疫原性的关系的构思的证据, Gao等人利用T20评分比较了要么被批准用于临床使用要么处于临床开发 (小鼠、嵌合 (来自小鼠)、人源化 (n=22) 和全人抗体序列) 的多个阶段的超过90个抗体的在患者体内的免疫原性结果, 并且发现具有高于80的FR&CDR序列的T20评分的Ab不是免疫原性的, 并且利用仅对于FR序列的T20评分, 高于85的那些不是免疫原性的。对于人源化JAA-F11 变体的T20评分使用在abanalyzer.lakepharma.com/的T20Cutoff人数据库计算。

[0168] 密码子优化和基因合成。在设计人源化JAA-F11VH和VL变体氨基酸序列之后, 手动地选择对应核苷酸序列用于灰仓鼠 (*Cricetulus griseus*) (CHO) 细胞蛋白生产最佳的密码子使用并且合成和插入pUC57质粒 (一种常用克隆载体)。

[0169] 哺乳动物表达载体中的hJAA-F11和嵌合JAA-F11可变重链 (VH) 和轻链 (VL) 基因的亚克隆和测序。在人巨细胞病毒 (CMV) 启动子和氨苄西林 (Amp) 和组氨醇脱氢酶 (hisD) 盒的控制下, 将hJAA-F11VH基因亚克隆和插入含有人IgG1重链引导子/恒定区的表达载体 (pAH6307)。在人CMV启动子和新霉素磷酸转移酶 (neoR) 盒的控制下, 将VL基因插入到含有人κ轻链引导子/恒定区的表达载体 (pAN 6714)。类似地, 使嵌合JAA-F11VH和VL表达并且在随后分析中用作阳性对照。

[0170] 人源化和嵌合JAA-F11变体的表达和生产。

[0171] 共转染入CHO-K1细胞。

[0172] 将粘附性中华仓鼠卵巢(CHO-K1;ATCC#CCL-61,Manassas,VA)细胞培养18小时,然后在加湿空气中在37℃和5%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)在补充有10%胎牛血清(FCS;Hyclone)的Ham's F12培养基(Corning Cellgro,Manassas,VA)中转染,并在50-80%融合率时收获。将哺乳动物6307pAH(VH)和6714pAN(VL)表达载体通过电穿孔(Gene Pulser System (Bio-Rad,Hercules,CA)共转染入CHO-K1细胞。简言之,使用PvuI限制酶(Promega,Madison, WI)将各个质粒线性化并将5μg的各个质粒加入至在0.4cm电穿孔池(Bio-Rad,Hercules, CA)中500μL总体积的冷Ham's F12培养基(Corning Cellgro,Manassas,VA)中的5x10<sup>6</sup> CHO-K1细胞。容纳混合物的池在960μF和250mV电穿孔。然后转染混合物用预温热非选择性培养基(Ham's F12,补充有10%FCS)稀释至1x10<sup>5</sup>个细胞/mL的浓度。然后将两百微升以1x10<sup>4</sup>个细胞/孔的密度铺板到96-孔组织培养板(BD Bioscience,San Jose,California)中。转染的细胞在组织培养孵育器中在37℃和5%CO<sub>2</sub>孵育。在72小时,从96-孔组织培养板移除非选择性培养基并用200μl的含有700μg/ml G418(Gibco,Life Technologies,Grand Island,NY)、5mM的组氨醇(Sigma-Aldrich,St Louis,MO)和10mM of HEPES缓冲液(Corning Cellgro,Manassas,VA)的Ham's F12(加10%FCS)选择性培养基替代,并且允许克隆体生长多至3周。用质粒6307pAH和6714pAN转染的CHO-K1细胞将继续生长,而未转染的 CHO-K1细胞将不生长。对于接下来的14至21天,每2-4天,替换所述选择性培养基以除去死亡细胞的碎片并且允许抗性细胞的克隆体在选择性培养基中生长。

[0173] 培养上清通过酶联免疫测定(ELISA)的分析

[0174] 在选择之后的14-21天之间,收集来自96-孔板的CHO-K1培养上清并通过酶联免疫测定(ELISA)对抗体进行分析。简言之,将100μL的培养上清加入至Immulon 1B-介质结合96-孔微滴定板(Thermo Scientific,Milford,MA),该板已用在包被缓冲液(0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,在 pH 9.6)中的1.25μg/mL的TF-Ag-BSA缀合物包被并用TBS-brij(pH 7.2)洗涤五次。还将在无菌PBS中的净化的小鼠JAA-F11(1mg/mL)的1:500稀释液加入到在各个板上的2-3个孔以用作阳性对照。在37℃的2小时孵育之后,将板洗涤五次并将在1%BSA-PBST缓冲液(1:10,000)中的100μL的抗-人IgG-碱性磷酸酶缀合物二抗(Sigma-Aldrich,St Louis,MO)加入到用于转染的细胞的各个孔中,而将在1%BSA-PBST缓冲液中的抗-小鼠IgG-碱性磷酸酶缀合物二抗(Sigma-Aldrich,St Louis,MO)的1:1000稀释液用于小鼠JAA-F11对照孔。在室温孵育1小时之后,将板洗涤五次,然后将100μL的磷酸酶底物(磷酸对硝基苯酯(pNPP))(Sigma-Aldrich,St Louis,MO)加入至各个孔。在室温的一小时孵育之后,使用板阅读器在405nm对板进行读数,以筛选对于TF-Ag的IgG抗体的存在。作为空白,在一抗孵育接着二抗孵育和底物孵育期间使用HAM's F12(加10%FCS)培养基。

[0175] 稳定克隆体的传代和生产

[0176] 在开始选择后14-21天,对于抗-TF-Ag抗体的初始筛选之后,选择具有最高吸光度读数的10-12个克隆体并转移到24-孔组织培养板中用于扩展。来自这些克隆体的培养上清然后通过ELISA分析。将给出最高吸光度读数的4个克隆体转移至T25组织培养瓶,扩展并通过ELISA再次对于抗-TF-Ag抗体进行筛选以确保这些克隆体仍然生产对于TF-Ag反应性的抗体。然后将这4个克隆体转移至T75组织培养瓶、扩展、对于抗-TF-Ag抗体再筛选并将细胞

储存冷冻在液氮中。然后将具有最高抗-TF-Ag结果的克隆体进一步扩展并传代2-3次以确保该细胞系是稳定的。

[0177] 来自以上获得的最佳克隆体的用于各个hJAA-F11重链和轻链组合的稳定个体细胞克隆体通过有限稀释的亚克隆而产生。简言之,细胞在T75组织培养瓶中生长至汇合,收获并计数并且以0.3个细胞/孔接种到在选择性培养基中的96-孔板的各个孔中。7-10天后在显微镜下仔细检查这些板并且标记显示细胞的单个焦点的孔并进行监控直至看到足够的生长密度。来自这些标记孔的上清通过ELISA测试抗-TF-Ag抗体。给出最高吸光度读数的4个克隆体如上所述进行扩展以获得亲本克隆体。对给出最高吸光度的亚克隆体进行扩展并用于在 T200Nunc™细胞培养Tripleflask (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 中生产上清。

[0178] 对于各个人源化变体JAA-F11在Tripleflask培养瓶中的生产,将细胞培养3周,之后收获1升的培养上清。生产嵌合JAA-F11的克隆体如所述人源化JAA-F11变体的相同方式进行处理。

[0179] 人源化和嵌合JAA-F11变体的纯化

[0180] 人源化和嵌合JAA-F11变体上清使用蛋白 A-琼脂糖® 4B、快速流动亲和柱 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 纯化。为了制备蛋白A柱,将在缓冲液A (0.02M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15M NaCl, pH至8.0) 中的树脂的1:1悬浮液倒入柱中。装好柱之后,将其用20柱体积 (CV) 的缓冲液A洗涤。将一升的CHO-K1细胞培养上清以3500rpm离心30分钟从而清除死细胞或碎片,然后过滤。将过滤的上清上样到Protein A柱上并允许以1mL/min的流速通过重力滴落。然后该柱用10CV的缓冲液A洗涤。抗体使用3CV的缓冲液B (0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1M柠檬酸, pH 3.9) 从蛋白A柱洗脱。将洗出液用0.1M NaOH小心地中和以最小化低pH 对抗体的影响。蛋白A柱用20-30CV的缓冲液A再平衡并在2-8℃储存。各个柱对于同一抗体使用多达五次。如后续测定所需的,在有或没有苯酚红的情况下,针对1X磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或RPMI培养基,将纯化的抗体在4℃透析过夜 (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette; Thermo Scientific)。在透析之后,将抗体用0.22μm滤器 (Corning) 过滤并且蛋白浓度通过如以下详述的Bio-Rad蛋白测定来确定。将抗体储存在4℃并使用ELISA检查与TF-Ag的结合。

[0181] Bio-Rad蛋白测定

[0182] 抗体浓度使用Bio-Rad蛋白测定来确定,该Bio-Rad蛋白测定基于Bradford染料结合方法。简言之,将染料试剂用蒸馏水以1:4比率稀释并使用Whatman滤纸#1过滤。使用1X PBS 缓冲液制备已知蛋白标准物 (1.44mg/mL γ 球蛋白, Bio-Rad, Hercules, CA) 和人源化抗体样品的系列稀释液。将10μL的各个标准物和样品溶液一式三份地置于微滴定板的孔中。然后将两百微升的稀释染料试剂使用多通道移液管加入至所有孔,并在没有形成气泡的情况下通过上下吸移充分混合。将该板在室温孵育指示5分钟至1小时。然后在板读数器 (Bio-Tek Instruments) 上在595nm读出吸光度。

[0183] 人源化和嵌合JAA-F11抗体的化学特异性和亲和力的分析

[0184] 化学特异性的确定

[0185] 多种hJAA-F11构建体和嵌合JAA-F11的化学特异性使用印刷聚糖阵列确定。将此与之前对于小鼠JAA-F11获得的数据进行比较。所述聚糖阵列是一种间接免疫荧光方法,描述于功能糖组学协会 (Consortium for Functional Glycomics) 网站。分析各个构建体与

610个不同聚糖的反应性。简言之,将印刷阵列用抗体连续孵育,洗涤,并用FITC标记的二抗孵育。在洗涤之后,在Perkin Elmer Microscanarray XL4000中读出图像并储存tiff文件图像并且使用 Imagen V.6图像分析软件进行图像分析。各个结合聚糖的相对结合被表示并归一化至原始聚糖TF-Ag的结合。使用ANOVA进行相对结合能力的比较和统计学分析。

[0186] 相对亲和力的确定

[0187] hJAA-F11与TF-Ag的相对亲和力结合使用与小鼠JAA-F11抗体和嵌合JAA-F11抗体的竞争性抑制ELISA进行分析。简言之,在1.25ug/mL TF-Ag包埋的96-孔板(Thermo Scientific, Milford, MA)上,将3ug/mL hJAA-F11或嵌合JAA-F11在不同浓度的小鼠JAA-F11(10、8、6、4、2ug/mL)存在下孵育。结合的抗体通过用抗-人IgG二抗和底物的孵育进行检测并且吸光度读数如在这些材料和方法中所述获得。确定并比较抑制3ug/mL人源化或嵌合抗体的结合达50%所需的小鼠抗体的量。抑制所需的小鼠抗体的量越高,抗体的相对亲和力越高。使用ANOVA来比较各个人源化抗体和嵌合抗体的相对亲和力。

[0188] hJAA-F11的生物效能的分析

[0189] 与人类乳腺肿瘤细胞系的结合的评估

[0190] hJAA-F11与多种人类乳腺肿瘤细胞系的结合使用全细胞ELISA分析。带有TF-Ag的小鼠乳房肿瘤4T1细胞系用作阳性对照,而作为用于生产JAA F11杂交瘤的融合伴侣的 P3-X63-Ag8骨髓瘤(ATCC号:CRL-1580)细胞系用作TF-抗原阴性对照。通过使用学生T检验将各个抗体与各个细胞系的反应性与该抗体与骨髓瘤细胞的反应性进行比较来确定阳性结合。为了标准化数据,通过用骨髓瘤细胞的吸光度读数除试验细胞系的吸光度读数来表示与各个细胞系的结合。

[0191] 细胞制备

[0192] 使用非酶细胞倾卸装置(Mediatech, Inc. VA, USA)收获4T1乳腺肿瘤和骨髓瘤细胞系。为了防止细胞成团,将培养基、缓冲液和试剂在使用之前预先温热。对于粘附性细胞,将培养基从培养皿移除并将细胞用没有钙和镁的1X Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)(Mediatech Inc., Cellgro)漂洗。将五毫升的细胞裂解液加入至各个瓶,然后在37℃孵育10分钟。从这些瓶汲取液体以去除细胞。对于非粘附性骨髓瘤细胞,也从这些瓶汲取液体并将培养上清以1000x G离心10min。将细胞团粒再悬浮在细胞裂解液中并在37℃孵育10min。在孵育之后,将20mL的1X DPBS加入至细胞中并反覆地吸移以除去团块。然后将细胞悬浮液以1000 x G离心10分钟。将上清倒出并将团粒再悬浮在5mL DPBS中。细胞使用台盼蓝染色和血球计进行计数。将细胞稀释以获得 $1 \times 10^6$ 个存活细胞/ml。将两百微升的细胞悬浮液( $2 \times 10^5$ 个细胞)置于5ml聚苯乙烯四管中。将两百微升的4%甲醛溶液加入至各个管并在室温孵育20min,之后以1500x G离心10min。将上清一次性小心地倒出,细胞在DPBS中洗涤,接着离心和倒出。将两百微升的PBS-吐温1%BSA(w/v)加入至各个管并在4℃储存过夜或直至两周。

[0193] 在细胞上的酶免疫测定

[0194] 将两百微升的50ug/mL的小鼠JAA-F11、hJAA-F11或嵌合JAA-F11抗体加入至容纳一式四份测试的不同细胞系的管并在37℃孵育两小时。用200μL的1X PBS-0.1%吐温20-1%BSA处理的一组管作用于所测试的各个细胞系的阴性对照。将这些管用3mL的洗涤缓冲液(1X PBS吐温,无叠氮化物)洗涤三次,然后以1500x G离心10分钟。在各个清洗之间

将上清小心地倒出。将两百微升的在PBS-吐温-1%BSA中的抗-小鼠IgG( $\gamma$ -链-特异的)辣根过氧化物酶二抗(1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 或抗-人IgG( $\gamma$ -链-特异的)辣根过氧化物酶二抗(1:2000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 加入至相应管, 然后在室温(RT) 孵育1小时。在孵育之后, 倾倒管并洗涤三次, 并在洗涤之间以1500x G离心。然后将两百微升的邻苯二胺二盐酸盐底物(OPD; Sigma, St. Louis, MO) 溶液加入至各个管并在室温孵育1小时。在孵育之后, 通过加入100 $\mu$ L的终止液(1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 使反应终止并以1500x G离心10分钟。接下来, 从各个管移出200 $\mu$ L的上清并转移至微滴定板中相应孔。使用微板读数器(Microplate Autoreader, 型号EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.) 在490nm读出吸光度并且未反应的OPD底物用作空白。对于不同的细胞系, 各个相应平均空白(仅具有PBS-吐温-1%BSA的管) 从它们的相应平均OD扣除从而得到最终的光学读数。各个实验重复3次。

[0195] hJAA-F11对于体外癌细胞增殖的影响

[0196] 为了考察人源化和嵌合JAA-F11抗体对癌细胞生长的影响, 进行体外3-[4, 5-二甲基噻唑-2-基]-2, 5-二苯基溴化四唑(噻唑蓝, MTT) 增殖分析。将4T1小鼠乳腺肿瘤细胞和人乳腺肿瘤细胞在变化量的JAA-F11、人源化和嵌合JAA-F11(4、2和1 $\mu$ g/mL) 存在下以10次重复地以1x10<sup>4</sup>个细胞/孔接种到96-孔板中。当以此细胞密度铺板时, 细胞在它们在72小时的生长曲线的线性部分。在没有抗体的培养基中生长的细胞用作正常生长对照。单独的培养基用作空白。在37℃的细胞生长68小时之后, 将10 $\mu$ L的四唑盐MTT(5mg/ml) 加入至各个孔, 并将这些板返回至孵育器持续另外的4小时。在孵育结束时, 在各个孔中所得的甲瓞产物通过添加120 $\mu$ L的二甲亚砷(DMSO, Fisher Scientific) 溶解, 然后在570nm测量各个孔的吸光度(Microplate Autoreader, 型号EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.)。

[0197] 抗体依赖性细胞毒性测定

[0198] 为了考察hJAA-F11抗体的效应器功能, 进行抗体依赖性细胞毒性(ADCC) 和补体依赖性细胞毒性(CDC) 分析。

[0199] 使用人外周血单核细胞(PBMC) 作为效应器细胞和人乳腺肿瘤细胞系作为靶细胞, 以效应器与靶(E:T) 比率为100:1, 通过乳酸脱氢酶(LDH) 释放测定(CytoTox 96非放射活性细胞毒性测定; Promega, Madison, WI) 来确定ADCC。

[0200] 使用Ficoll-Paque, 通过密度梯度离心, 从全血制备PBMC。将在紫顶病EDTA真空抽血管(purple-top EDTA vacutainer) 中收集的全血与等体积的预温热无菌DPBS混合。然后将二十毫升稀释的血液轻轻地成层到在50mL圆锥管中的15mL的Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare)。将样品在室温下不间断地以1300rpm离心30-40min。接下来, 收集PBMC层并将无菌的PBS加入至该PBMC至总体积为40mL。然后将该混合物在18°至22℃以1000 rpm离心10min以除去任何污染Ficoll和血小板/血浆蛋白。抛弃上清, 将细胞重新悬浮在新鲜的无菌PBS中, 并且重复离心步骤。将细胞重新悬浮在RPMI 1640培养基(10%FCS) 中并使用血球计和台盼蓝计数。

[0201] 将靶细胞(1x10<sup>4</sup>; 30 $\mu$ L) 和PBMC(1x10<sup>6</sup>; 30 $\mu$ L) 加入到96-孔U形底板中并在组织培养孵育器中在37℃用hJAA-F11或嵌合抗体(200 $\mu$ g/mL; 30 $\mu$ L) 孵育17小时。在完成所述17小时孵育之前的四十五分钟, 将10 $\mu$ L的裂解液(x10) 加入至容纳靶细胞最大LDH释放对照(靶细胞和培养基) 和体积校正对照(仅培养基) 的孔。在孵育结束时, 将板以1000rpm离心4分钟。然后将五十微升等分试样从所有孔转移至新的平底96-孔板。接下来, 将50 $\mu$ L的重构底

物混合物加入至这些孔的每一个。将板用金属箔覆盖并在室温孵育30分钟。反应利用向各个孔添加50μL的终止液而终止,并使用微板读数器 (MicroplateAutoreader, 型号EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.) 记录在490nm的吸光度。细胞毒性利用以下公式计算:

[0202] 细胞毒性 (%) =  $100 \times [(E-SE)] / [(M-SE)]$ ,

[0203] 其中对于各个条件,测量底物的吸光度。条件为如下;E是实验孔,SE是在没有抗体对照(用效应器细胞和PBS孵育的靶细胞)的情况下的自发释放,M是通过用10X裂解液溶解的靶细胞确定的最大释放。

[0204] 补体依赖性细胞毒性(CDC)测定

[0205] 使用HCC 1428乳腺肿瘤细胞(ATCC®CRL-2327, Manassas, VA)作为靶细胞种群,通过乳酸脱氢酶(LDH)释放测定(CytoTox 96非放射性细胞毒性测定; Promega, Madison, WI)来确定CDC。以试剂盒提供的含有牛心脏LDH的LDH阳性样品用作阳性对照。在比较兔、幼兔和豚鼠补体的细胞毒性的背景水平之后,将冻干的豚鼠血清(CL3112, Cedarlane Laboratories, Burlington, NC)用作补体的来源并根据制造商说明书重构。在测定中使用的最佳细胞浓度为 $1 \times 10^4$ 个细胞/50μL/孔。使用的抗体针对无苯酚红的RPMI培养基透析。对于实验孔,在圆底96-孔培养板中,在四个组中将50μl的HCC 1428细胞悬浮液、20μl的补体稀释液(以1:20的最终稀释液)和30μL的抗体(最终浓度在100μg/ml)在各个孔中混合。包括了容纳靶细胞和没有抗体的补体的对照孔以控制由用作补体来源的血清介导的任何细胞毒性以及LDH的自发释放。将板以1000rpm离心4分钟,然后在37℃用5%二氧化碳孵育2小时。在完成所述2小时孵育之前的四十五分钟,将10μL的裂解液(x10)加入至容纳靶细胞最大LDH释放对照和体积校正对照的孔。

[0206] 在孵育结束时,将板以1000rpm离心4分钟。然后将五十微升等分试样从所有孔转移至新的平底96-孔板。接下来,将50μL的重构底物混合物加入至各个孔。将板用金属箔覆盖并在室温孵育30分钟。利用向每个孔添加50μl的终止液使反应终止,然后使用微板读数器 (MicroplateAutoreader, 型号EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.) 记录在490nm的吸光度。细胞毒性利用以下公式计算:

[0207] 细胞毒性 (%) =  $100 \times [(E-SE)] / [(M-SE)]$ ,

[0208] 其中对于各个条件,测量底物的吸光度。条件为如下;E是实验孔的吸光度,SE是在有补体但没有抗体(用补体和培养基孵育靶细胞)的情况下的自发释放,并且M是用10X裂解液裂解的靶细胞的释放。

[0209] 细胞内化测定

[0210] 人源化和嵌合JAA-F11到4T1乳腺肿瘤细胞中的内化通过两种方法分析,即利用在2个孵育温度4℃和37℃测量的表面结合的酶免疫测定和免疫荧光显微镜法。

[0211] 内化的酶免疫测定法

[0212] 测试小鼠4T1乳腺癌细胞系对于JAA-F11、hJAA-F11或嵌合JAA-F11的内化。将五十万( $5 \times 10^5$ )个细胞接种到6-孔板的全部六个孔中并生长至汇合。对于所测试的各个抗体,准备两个板。从各个板移除培养基并将1mL的抗体(200μg/mL)加入至各个板的3个孔,并将1mL的PBS稀释液加入至剩余的3个孔。将一组板在37℃孵育以允许内化并且另一个板在4℃孵育。在1小时孵育之后,移除培养基并将这些孔用1mL的无苯酚红的RPMI培养基洗涤4次。接下来,将1mL的2%低聚甲醛加入至各个孔并将这些板在室温孵育20分钟以固定细胞。然

后这些板用无苯酚红的RPMI培养基洗涤4次。接下来,加入1mL在1% BSA/PBS中的抗-小鼠或抗-人类IgG( $\gamma$ -链-特异的)碱性磷酸酶二抗(1:5000, Sigma, St. Louis, MO)并将板在37℃孵育1小时。然后将板无苯酚红的RPMI培养基洗涤4次并加入1mL的磷酸对硝基苯酯底物(pNPP)并在黑暗中孵育1小时。在1小时孵育之后,将来自各个孔的200 $\mu$ L转移至96-孔板的相应孔并使用微板读数器(Microplate Autoreader, 型号EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.)在405nm记录吸光度。未反应的底物用作空白。对一式三份的孔求平均值,并将单独培养基空白的平均光密度从含有抗体的孔减去。百分比内化使用以下公式计算:

[0213]  $\% \text{内化} = 100 * [1 - (37^{\circ}\text{C} \text{ 样品} - 37^{\circ}\text{C} \text{ 空白}) / (4^{\circ}\text{C} \text{ 样品} - 4^{\circ}\text{C} \text{ 空白})]$

[0214] 免疫荧光显微镜法

[0215] 在此方法中,在10%FCS RPMI 1640培养基中,以 $3 \times 10^5$ 个细胞的密度,在两个6-孔组织培养板的孔中,将4T1乳腺癌细胞接种到盖玻片上,并在37℃和5%CO<sub>2</sub>培养24小时。从板移除培养基并将1.5mL的在无血清的RPMI 1640培养基中稀释的试验抗体(5  $\mu$ g/mL)加入至相应孔。将两个板在4℃放置20分钟以允许用于抗体的表面结合。在20分钟孵育之后,将盖玻片从所述板中的一个转移到一个新的6-孔板中。从第二个板移出抗体稀释液并加入预温热的无血清RPMI 1640培养基并将该板在组织培养孵育器中在37℃孵育1小时。将来自第一板的盖玻片用冰冷5%BSA/PBS洗涤两次,用1X PBS漂洗一次,然后用4%低聚甲醛溶液(Affymetrix)在室温固定15min。在37℃孵育1小时之后,将来自第二板的盖玻片转移至一个新的6-孔板,洗涤,漂洗和固定。

[0216] 在1X PBS中三次洗涤之后,将两个板中的细胞用在PBS中的0.1%Triton X-100、0.1%脱氧胆酸钠在室温渗透10min。接下来,细胞用1X PBS漂洗三次,然后在室温在5%BSA/PBS孵育30分钟。然后在室温,盖玻片用以在5%BSA/PBS中的1 $\mu$ g/mL的稀释液的兔抗-溶酶体膜蛋白1(LAMP1; Abcam, 24170)抗体孵育1小时。然后盖玻片用1X PBS漂洗三次并用在5%BSA/PBS中以1:500的稀释的抗-小鼠IgG-Alexa 647和抗-兔IgG Alexa 488(小鼠JAA-F11盖玻片)以及抗-人IgG-Alexa 647和抗-兔IgG Alexa 488(嵌合和hJAA-F11)二抗(Molecular Probes, Invitrogen)孵育。使用抗-兔IgG Alexa 488二抗以检测抗-LAMP 1抗体。将盖玻片在黑暗中在室温孵育1小时。在孵育后,将细胞在黑暗中用1X PBS漂洗三次。将盖玻片在细胞面朝下地放置在显微镜载玻片上的具有DAPI培养基的Slowfade Gold试剂(Molecular Probes, Life Technologies)上,并用指甲油密封。细胞用AxioImager荧光显微镜(Zeiss)分析。捕获图像并利用AxioVision Release 4.8.2软件分析。

[0217] 用来测试人源化JAA-F11检测带有TF-Ag的乳腺肿瘤的功效的体内研究

[0218] 利用从上述体外生物学研究获得的H2L2人源化JAA-F11抗体,在小鼠中进行免疫定位研究以测试碘-124标记的人源化抗体是否将定位至小鼠中的TF-Ag乳腺肿瘤。

[0219] hJAA-F11(H2L2)抗体的[124]碘标记

[0220] 人源化JAA-F11抗体的[124]碘标记使用Bolton Hunter方法进行。在碘化之前,将人源化抗体首先使用水溶性Bolton Hunter试剂(Sulfo-SHPP)(Thermo Scientific, Rockford IL, USA)修饰。简言之,将1.9mg的hJAA-F11抗体溶解于修饰缓冲液(200mM硼酸盐缓冲液, pH 9.0)。将5mg的水溶性Bolton Hunter试剂在使用前立即溶解于1mL修饰缓冲液。然后将100 $\mu$ L的水溶性Bolton Hunter试剂溶液加入至抗体样品并在定期混合下在冰上孵育3小时。未反应的水溶性Bolton Hunter试剂通过针对磷酸盐缓冲盐水(PBS: 0.1M磷

酸钠,150mM氯化钠)透析而除去。在此中间步骤,人源化抗体含有连接至该抗体的一些赖氨酸的连接基团,并且其稳定达2周。

[0221] 然后将修饰的hJAA-F11抗体使用Chizzonite间接标记法[158]进行标记。简言之,将 Pierce预包埋的碘化管(Thermo Fisher, Rockford, IL, USA)用1mL的高Tris碘化缓冲液(0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.15M NaCl)预润湿。将缓冲液倒出然后将100 $\mu$ L的高Tris碘化缓冲液直接加入至该管的底部,随后加入280 $\mu$ L的(4.59miliCurie)在0.02M NaOH溶液中的<sup>124</sup>I 碘化钠(IBA Molecular, Richmond, VA)。使用放射性同位素校准器CRC 12 (Capintec)得到初始计数。测量混合物的pH以确保其处于pH 7中性。在室温的6分钟活化之后,将活化的碘化物加入至之前修饰的huJAA-F11溶液。在9分钟孵育期之后,加入50 $\mu$ L的清除缓冲液(在Tris碘化缓冲液中的10mg酪氨酸/mL; 25mM Tris, pH 7.5, 0.4M NaCl)并将混合物孵育5分钟。清除缓冲液的目的是除去与缓冲液中的酪氨酸反应的游离碘。

[0222] 然后,将1mL的Tris/NaCl/EDTA缓冲液(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.4M NaCl, 5mM EDTA, 0.05%叠氮化钠)加入至反应混合物。然后将样品加入至已用Tris/NaCl/EDTA缓冲液预先平衡的10mL脱盐柱。样品管用0.5mL Tris/NaCl/EDTA缓冲液洗涤并将洗液加入至柱。样品以500 $\mu$ L的十五个馏分洗脱,各自使用Tris/NaCl/EDTA缓冲液,并对放射活性进行测试。放射标记有效性在具有最高活性的馏分上通过高效液相色谱(HPLC)确定。将放射标记的抗体在标记的2小时内注入动物。为了确保标记的人源化JAA-F11保持其TF-Ag反应性,还进行放射免疫测定。

[0223] 动物和肿瘤模型

[0224] 这个研究中的动物依照实验动物护理和使用委员会(IACUC)条例安置和利用。所有方案由布法罗大学的IACUC批准。通过在右乳头之一下方皮下地注入在0.1mL D-PBS中的 $5 \times 10^4$ 个细胞,将4T1小鼠乳腺癌细胞移植到7-8周龄雌性Balb/C小鼠中。将小鼠分成2个组并在肿瘤移植后10-14天通过尾静脉注射[<sup>124</sup>I]-hJAA-F11 (n=13) 和游离<sup>124</sup>I<sub>2</sub> (n=7), 然后经过生物分布研究和显微-PET成像。对来自2个组的每一个的一只小鼠成像并在整个研究中跟踪。在注射标记的抗体后所有小鼠接受0.2g/L碘化钾水溶液并在整个研究中作为甲状腺阻断方案。

[0225] 生物分布研究

[0226] 通过在注射放射标记的抗体后72、96、168和192小时腹膜内地注射0.1mL戊巴比妥钠(Fatal Plus)处死小鼠。在各个时间点,处死接受标记的抗体的三只小鼠和具有游离碘的两只小鼠。收获血液、肌肉、脾脏、肺、肾、心脏、肝、小肠和大肠、胃、脑、皮肤、肿瘤组织、骨、尾、食管、甲状腺和卵巢,并放入到预称重的5ml聚丙烯管中。将这些管再称重以获得各个组织/器官的实际重量。将所有管加盖并使用 $\gamma$ 计数器测量放射活性。对于各个组织的放射性摄取根据如在附件2中的以下公式计算为注射剂量/克组织(%ID/g):

[0227] Micro-PET成像

[0228] 在使用已知的技术注射之后24、48、72、96、168和192小时,标记的抗体在一只小鼠(各自来自两个组)中的定位使用microPET照相机Focus120® (Siemens Concorde Microsystems)通过microPET成像确定。简言之,在扫描之前,将小鼠用02/异氟醚(1%-3%异氟醚)麻醉,然后在microPET扫描仪的台架中以卧姿成像。将发射扫描窗口设置在350至750keV之间。对于每只小鼠进行30分钟的扫描。

[0229] 放射免疫测定

[0230] 为了确定放射标记抗体的免疫反应性,进行放射免疫测定(RIA)。将微滴定板用在包埋缓冲液中的100 $\mu$ L的1.25 $\mu$ g/mL TF-Ag-BSA缀合物包埋。将缓冲液从孔移除并用1%BSA/PBS-吐温洗涤。将一百微升的放射标记的hJAA-F11在1%BSA/PBS-吐温中的系列稀释液加入至孔并允许在室温结合1小时。在孵育之后,使用多通道移液管,通过手动地用1%BSA/PBS-吐温将孔洗涤三次而移除未结合的抗体。通过在室温用200 $\mu$ L的1M乙酸 /0.15M NaCl缓冲液(pH 2.4)孵育30分钟而从板除去结合的hJAA-F11。在孵育之后,将来自各个孔的100 $\mu$ L溶液加入到单独的聚丙烯试管中并使用 $\gamma$ 计数器测量放射活性。

[0231] 尽管本发明已通过具体实施方案进行了描述,但是对于本领域技术人员来说常规改变将是明显的并且这样的改变也预计在本发明的范围内。

## 序列表

<110> 纽约州立大学研究基金会  
凯特·里顿豪斯-奥尔森

<120> 人源化的抗-TF-抗原抗体

<130> 011520.01155

<150> 61/981,240

<151> 2014-04-18

<160> 17

<170> PatentIn 版本3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His  
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Phe Ile Ser Pro Asn Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Arg  
1 5 10 15

[0001]

Asp

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Arg Ser Phe Ile Gly Tyr Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
1 5 10 15

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu  
1 5 10 15

Glu Trp

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp

1	5	10
<210> 6		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 小鼠		
<400> 6		
Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Gly Ser Gly		
1	5	10
<210> 7		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人源化抗体链		
<400> 7		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr		
	20	25
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40
Gly Phe Ile Ser Pro Asn Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe		
	50	55
Arg Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Ala Arg Ser Phe Ile Gly Tyr Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105
Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	
<210> 8		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人源化抗体链		
<400> 8		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr		
	20	25
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40

[0002]

Gly Phe Ile Ser Pro Asn Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Phe Ile Gly Tyr Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 9  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人源化抗体链

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

[0003]

Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Phe Ile Ser Pro Asn Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Arg Asp Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Phe Ile Gly Tyr Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 10  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人源化抗体链

<400> 10

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

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

<210> 11  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化抗体链

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15

[0004]

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

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

<210> 12  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化抗体链

<400> 12

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

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

<210> 13  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人源化抗体链

<400> 13

[0005]

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Phe Ile Ser Pro Asn Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Phe Ile Gly Tyr Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser  
 115

<210> 14  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人源化抗体链

&lt;400&gt; 14

Glu Gly Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Lys Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Ser Pro Asn Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Ile Gly Tyr Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人源化抗体链

&lt;400&gt; 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser  
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

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

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0006]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人源化抗体链

&lt;400&gt; 16

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser  
20 25 30

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

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

[0007]

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;400&gt; 17

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser  
20 25 30

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

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

	<u>FR1</u>					<u>CDR1</u>					<u>FR2</u>					<u>CDR2</u>						
Kabat #	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	a	55	60	65							
mJAAF11	E	V	Q	L	E	S	G	A	E	L	A	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K
H1	E	V	Q	L	E	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K
H2	E	V	Q	L	E	S	G	A	E	L	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K
H3	E	V	Q	L	E	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K

	<u>FR3</u>					<u>CDR3</u>					<u>FR4</u>																																									
Kabat #	70	75	80	a	b	c	83	85	90	95	100a	105	110	113																																						
mJAAF11	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	T	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	S	F	I	G	Y	N	F	D	F	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
H1	R	V	T	M	A	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	F	I	G	Y	N	F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
H2	R	V	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	F	I	G	Y	N	F	D	F	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
H3	K	A	T	M	A	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	F	I	G	Y	N	F	D	F	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	

图1

	<u>FR1</u>					<u>CDR1</u>					<u>FR2</u>					<u>CDR2</u>																																																
Kabat#	1	5	10	15	20	25	a	b	c	30	35	40	45	50	55	60																																																
JAAF11	E	L	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	N	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	T	I	V	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D
L1	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	T	I	V	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	F	Q	R	P	G	Q	S	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	
L2	D	I	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	T	I	V	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	F	Q	R	P	G	Q	S	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	
L3	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	T	I	V	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	R	P	G	Q	S	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D

	<u>FR3</u>					<u>CDR3</u>					<u>FR4</u>																																			
Kabat#	61	65	70	75	80	85	90	95	100	a																																				
JAAF11	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	D	D	L	G	V	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K
L1	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K
L2	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K
L3	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K

图2

相对亲和力：hJAA-F11和与mJAA-F11的嵌合体的抑制

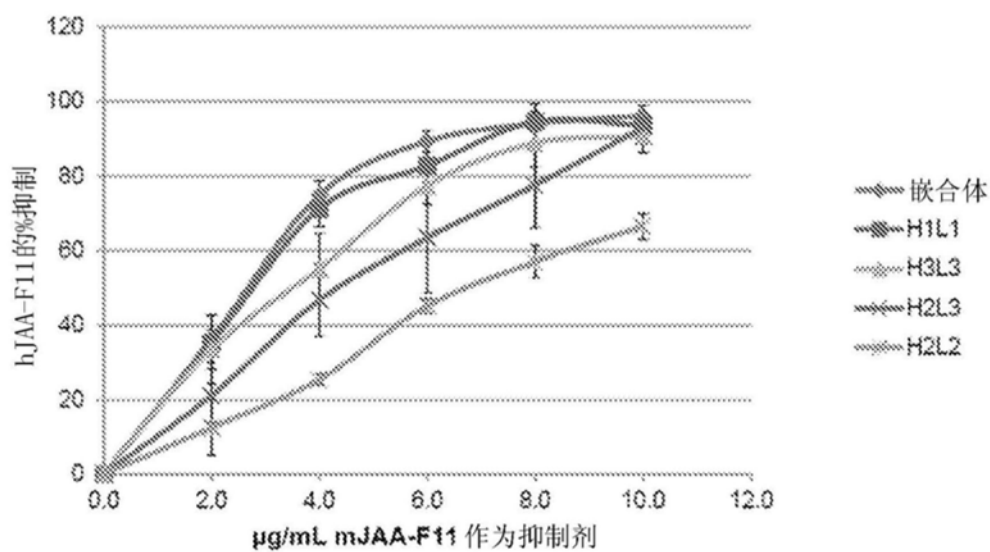


图3

在10个乳腺癌细胞系上的TF-抗原表达

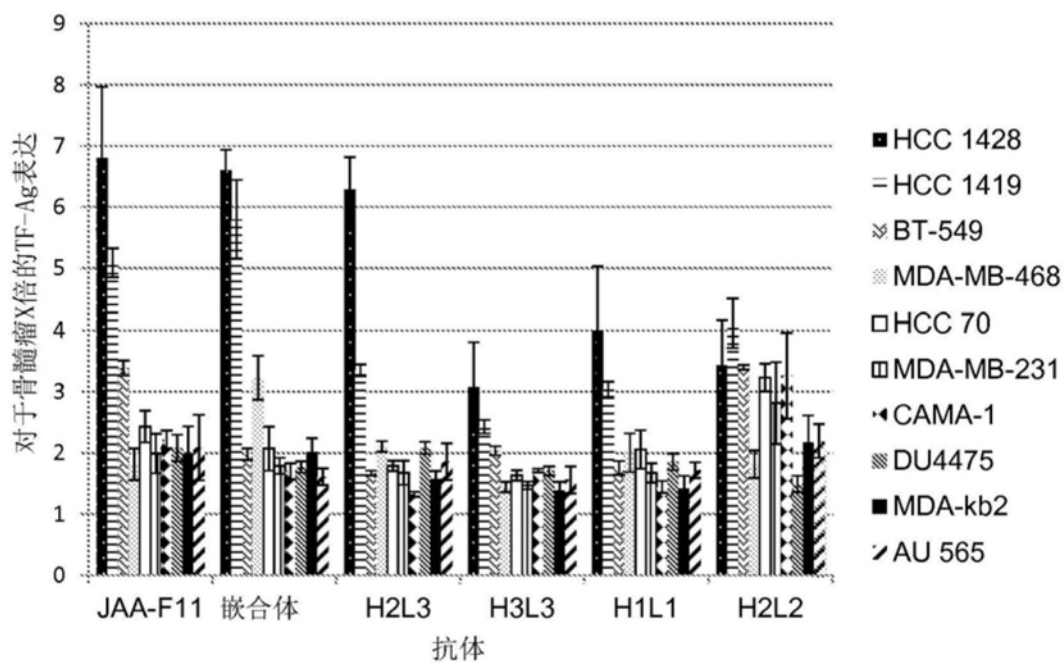


图4

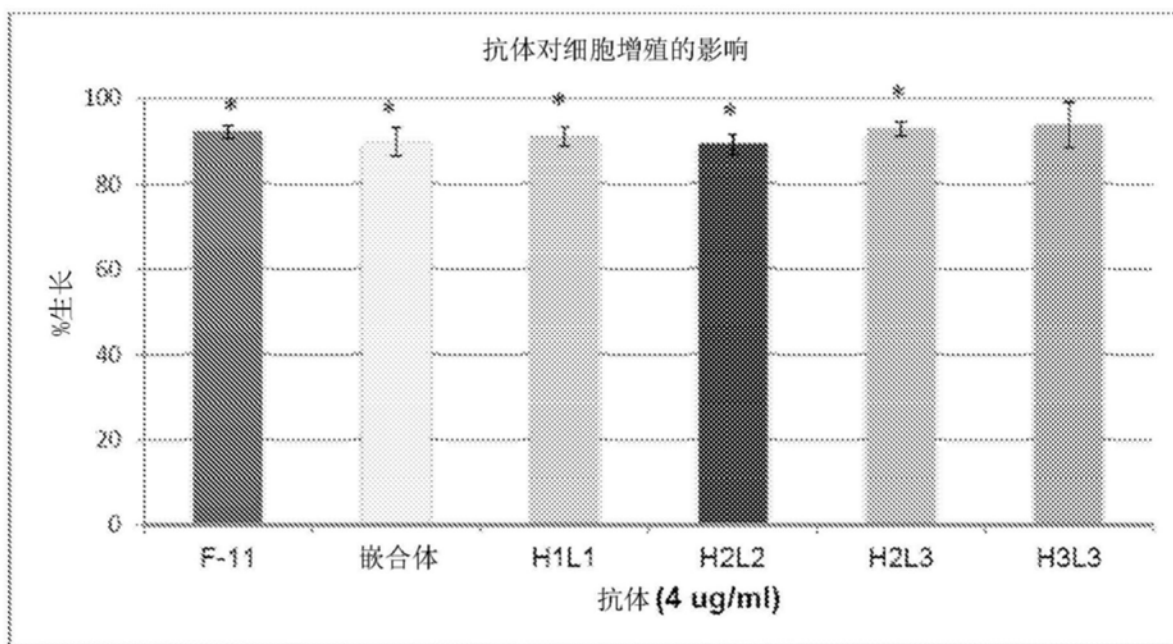


图5

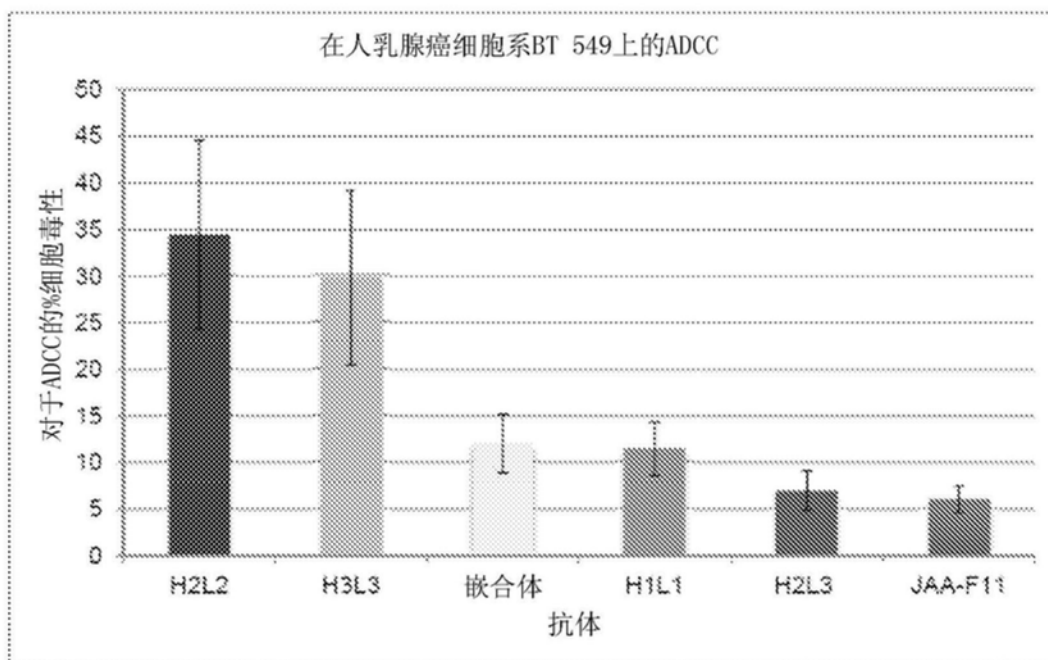


图6A

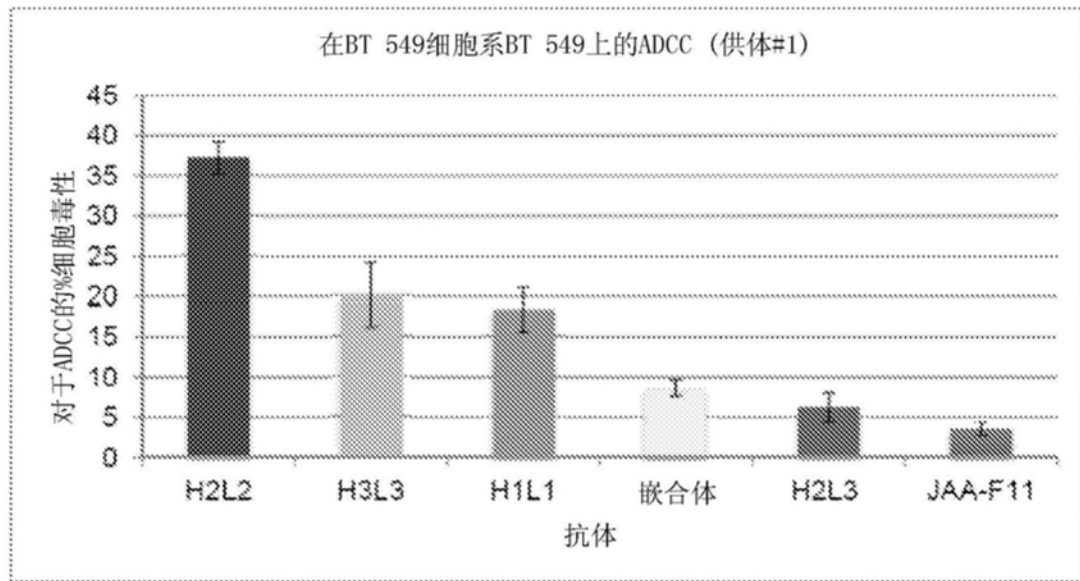


图6B

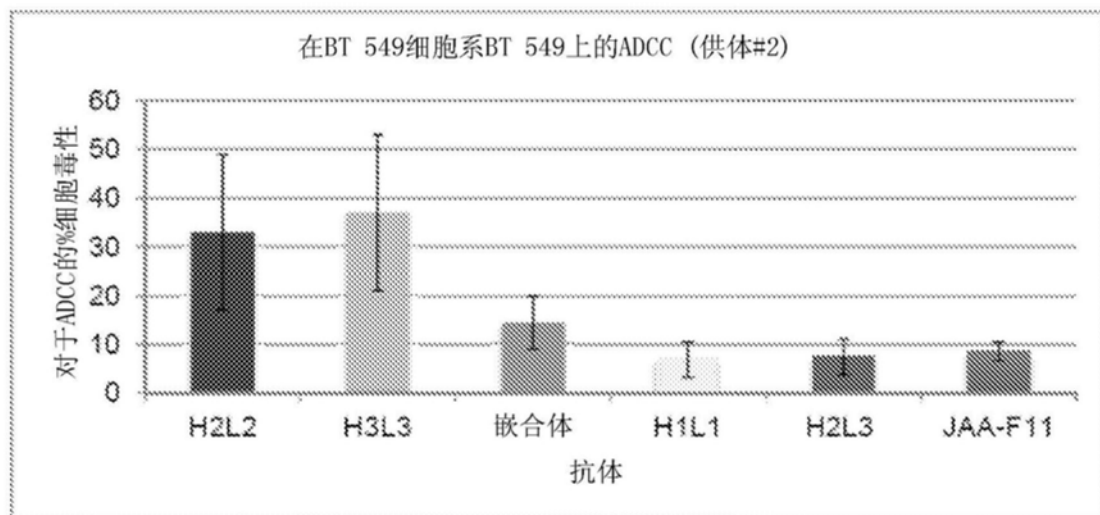


图6C

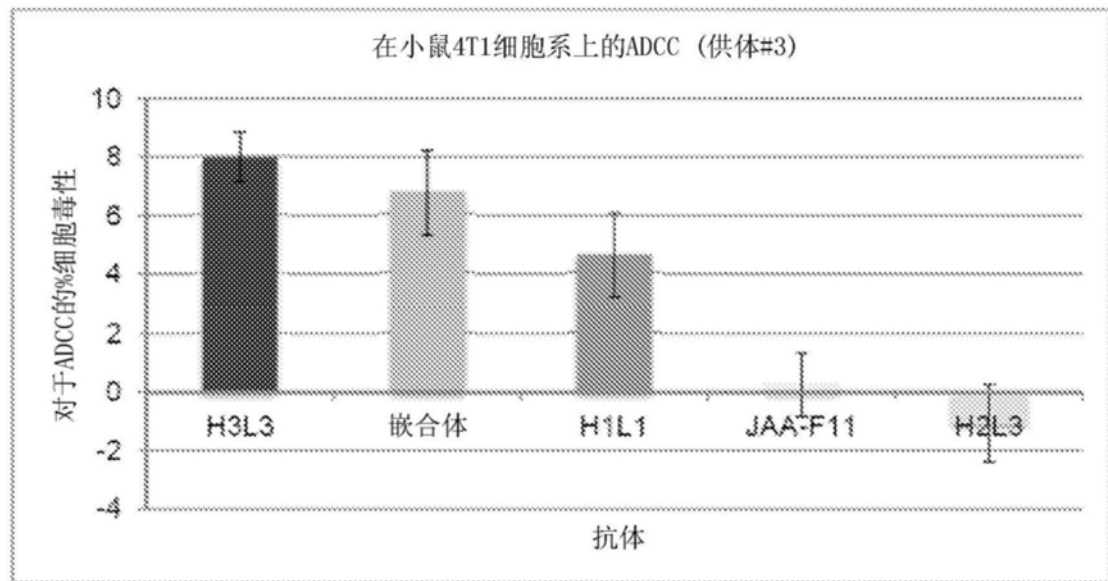


图6D

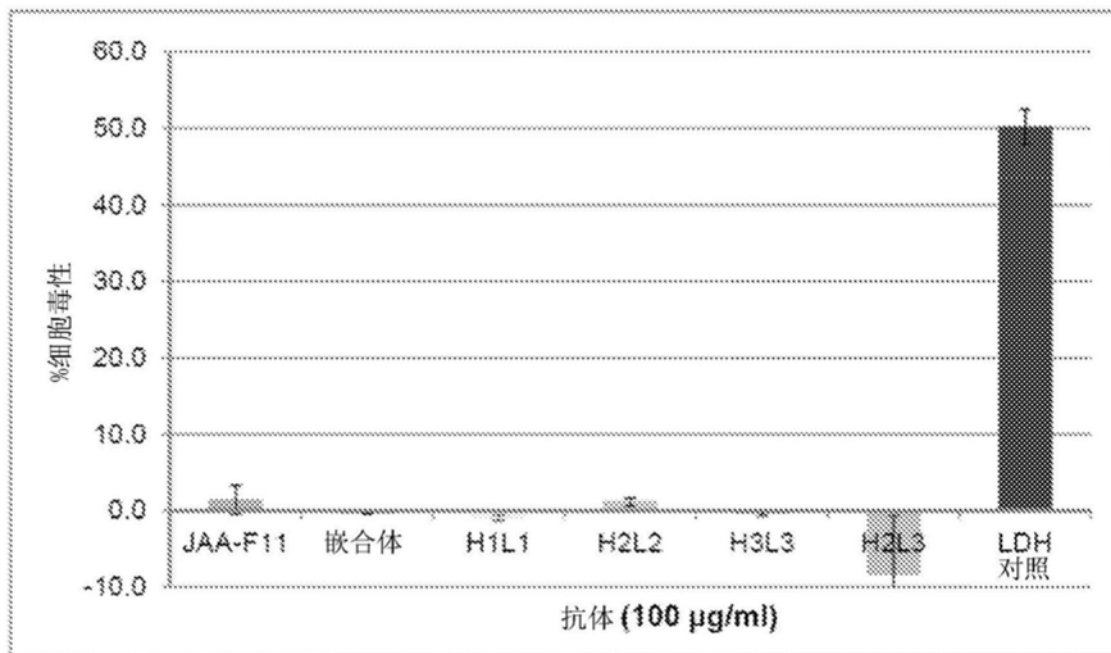


图7

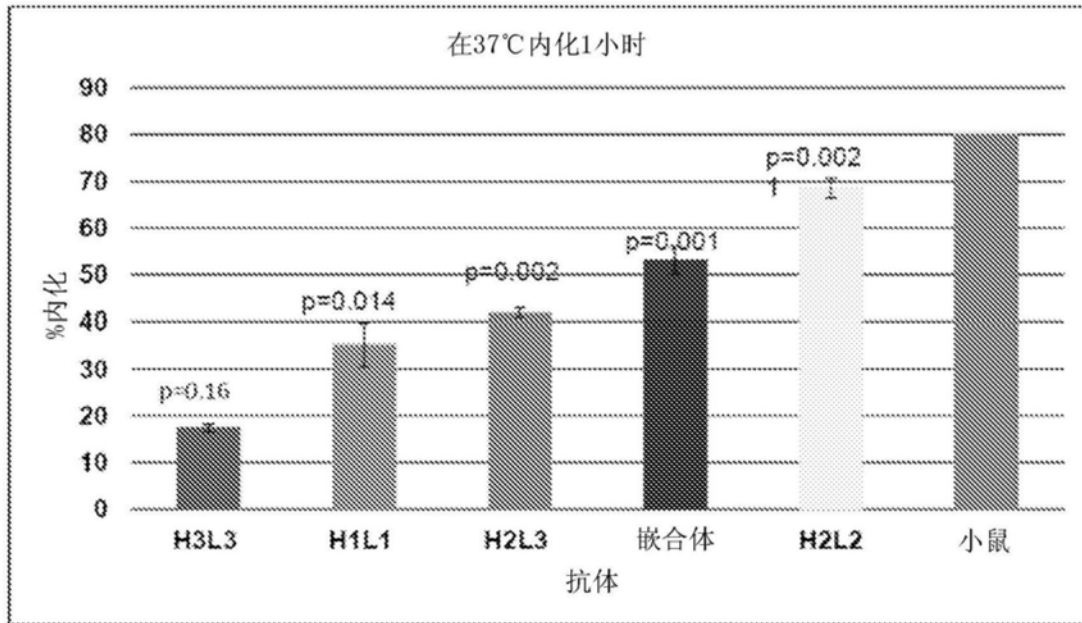


图8

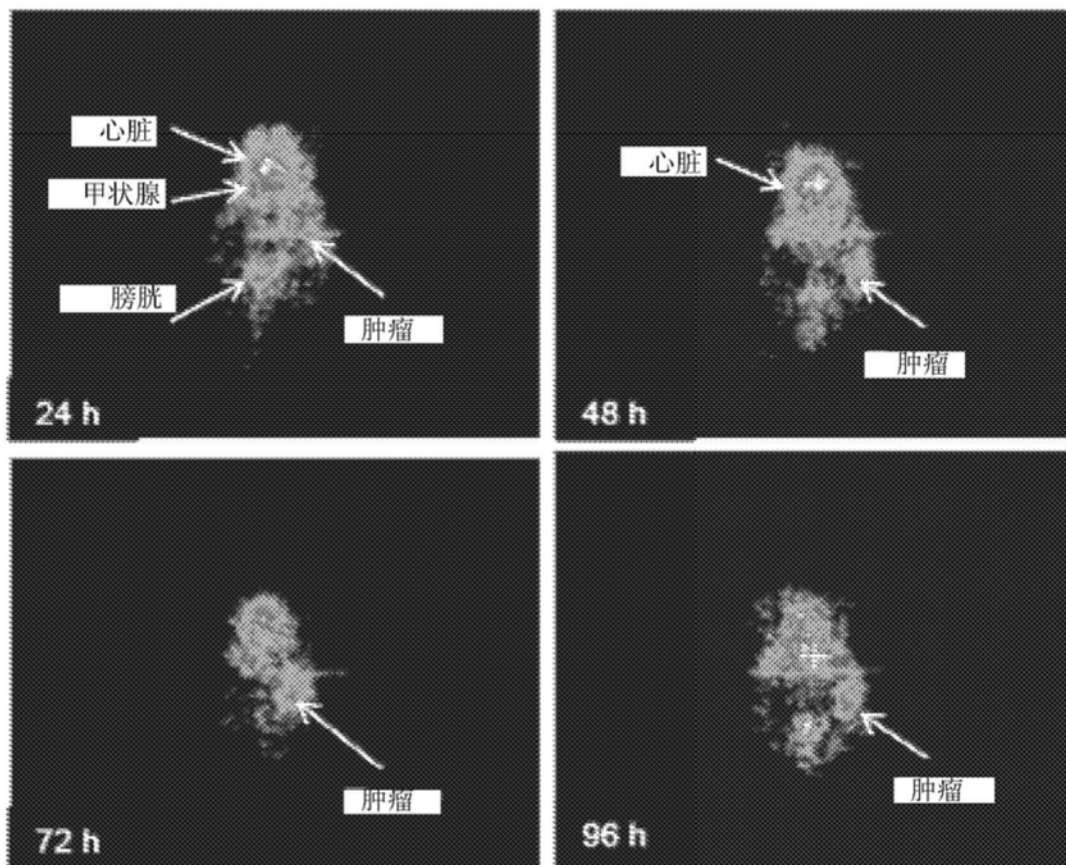


图9

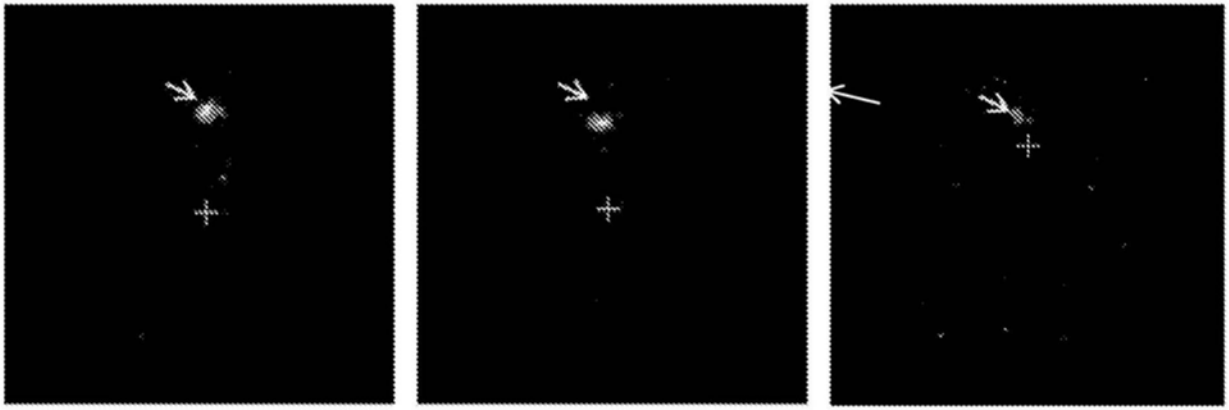


图10