



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101815726 B

(45) 授权公告日 2013.04.03

(21) 申请号 200880103166.9

(22) 申请日 2008.07.17

(30) 优先权数据

60/959,845 2007.07.17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.02.11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/070344 2008.07.17

(87) PCT申请的公布数据

W02009/012394 EN 2009.01.22

(73) 专利权人 米德列斯公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 乔纳森·A·特雷特 立升·卢

海春·黄 大鹏·姚 西恩·潘

海蒂·勒波兰卡 蒂莫西·斯普罗

马克·亚马纳卡

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 尚继栋

(51) Int. Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 1674111 A1, 2006.06.28, 实施例
6, 15-16, 18-22, 24-25.

EP 1780273 A1, 2007.05.02, 全文.

Naoko Yamauchi et al. The glypican 3
oncofetal protein is a promising diagnostic
marker for hepatocellular carcinoma. 《Modern
Pathology》. 2005, (第18期), 1591-1598.

Greten Tim F et al. Immunotherapy of
hepatocellular carcinoma. 《Journal of
Hepatology》. 2006, 第45卷(第6期), 868-878.

审查员 李谦

权利要求书 2 页 说明书 47 页

序列表 21 页 附图 12 页

(54) 发明名称

针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的单克隆抗体

(57) 摘要

本公开提供以高亲和力与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合的分离的单克隆抗体,特别是人单克隆抗体。还提供了编码磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的核酸分子、表达载体、宿主细胞和表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的方法。还提供了包含磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的免疫轭合物、双特异性分子和药物组合物。公开了检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的方法,以及治疗包括肝细胞癌在内的各种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 相关的病症的方法。

1. 分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体选自:

(i) 抗体,包含:

- a) 由 SEQ ID NO:1 组成的重链可变区 CDR1;
- b) 由 SEQ ID NO:4 组成的重链可变区 CDR2;
- c) 由 SEQ ID NO:7 组成的重链可变区 CDR3;
- d) 由 SEQ ID NO:10 组成的轻链可变区 CDR1;
- e) 由 SEQ ID NO:13 组成的轻链可变区 CDR2;和
- f) 由 SEQ ID NO:16 组成的轻链可变区 CDR3;

(ii) 抗体,包含:

- a) 由 SEQ ID NO:2 组成的重链可变区 CDR1;
- b) 由 SEQ ID NO:5 组成的重链可变区 CDR2;
- c) 由 SEQ ID NO:8 组成的重链可变区 CDR3;
- d) 由 SEQ ID NO:11 组成的轻链可变区 CDR1;
- e) 由 SEQ ID NO:14 组成的轻链可变区 CDR2;和
- f) 由 SEQ ID NO:17 组成的轻链可变区 CDR3;以及

(iii) 抗体,包含:

- a) 由 SEQ ID NO:3 组成的重链可变区 CDR1;
- b) 由 SEQ ID NO:6 组成的重链可变区 CDR2;
- c) 由 SEQ ID NO:9 组成的重链可变区 CDR3;
- d) 由 SEQ ID NO:12 组成的轻链可变区 CDR1;
- e) 由 SEQ ID NO:15 组成的轻链可变区 CDR2;和
- f) 由 SEQ ID NO:18 组成的轻链可变区 CDR3。

2. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,包含:

- a) 由 SEQ ID NO:1 组成的重链可变区 CDR1;
- b) 由 SEQ ID NO:4 组成的重链可变区 CDR2;
- c) 由 SEQ ID NO:7 组成的重链可变区 CDR3;
- d) 由 SEQ ID NO:10 组成的轻链可变区 CDR1;
- e) 由 SEQ ID NO:13 组成的轻链可变区 CDR2;和
- f) 由 SEQ ID NO:16 组成的轻链可变区 CDR3。

3. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,包含:

- a) 由 SEQ ID NO:2 组成的重链可变区 CDR1;
- b) 由 SEQ ID NO:5 组成的重链可变区 CDR2;
- c) 由 SEQ ID NO:8 组成的重链可变区 CDR3;
- d) 由 SEQ ID NO:11 组成的轻链可变区 CDR1;
- e) 由 SEQ ID NO:14 组成的轻链可变区 CDR2;和
- f) 由 SEQ ID NO:17 组成的轻链可变区 CDR3。

4. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,包含:

- a) 由 SEQ ID NO:3 组成的重链可变区 CDR1;
- b) 由 SEQ ID NO:6 组成的重链可变区 CDR2;

- c) 由 SEQ ID NO :9 组成的重链可变区 CDR3 ;
- d) 由 SEQ ID NO :12 组成的轻链可变区 CDR1 ;
- e) 由 SEQ ID NO :15 组成的轻链可变区 CDR2 ;和
- f) 由 SEQ ID NO :18 组成的轻链可变区 CDR3。
- 5. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体选自 :
 - i) 抗体,包含 : (a) 由 SEQ ID NO :19 的氨基酸序列组成的重链可变区和 (b) 由 SEQ ID NO :22 的氨基酸序列组成的轻链可变区 ;
 - ii) 抗体,包含 : (a) 由 SEQ ID NO :20 的氨基酸序列组成的重链可变区和 (b) 由 SEQ ID NO :23 的氨基酸序列组成的轻链可变区 ;以及
 - iii) 抗体,包含 : (a) 由 SEQ ID NO :21 的氨基酸序列组成的重链可变区和 (b) 由 SEQ ID NO :24 的氨基酸序列组成的轻链可变区。
- 6. 权利要求 5 的抗体或其抗原结合部分,包含 :
 - (a) 由 SEQ ID NO :19 的氨基酸序列组成的重链可变区和 (b) 由 SEQ ID NO :22 的氨基酸序列组成的轻链可变区。
- 7. 权利要求 5 的抗体或其抗原结合部分,包含 :
 - (a) 由 SEQ ID NO :20 的氨基酸序列组成的重链可变区和 (b) 由 SEQ ID NO :23 的氨基酸序列组成的轻链可变区。
- 8. 权利要求 5 的抗体或其抗原结合部分,包含 :
 - (a) 由 SEQ ID NO :21 的氨基酸序列组成的重链可变区和 (b) 由 SEQ ID NO :24 的氨基酸序列组成的轻链可变区。
- 9. 权利要求 1-8 中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体为低岩藻糖糖基化的抗体。
- 10. 权利要求 1-8 中任一项的抗体或其抗原结合部分,其是 IgG1 同种型的全长抗体。
- 11. 权利要求 1-8 中任一项的抗体或其抗原结合部分,其是 IgG4 同种型的全长抗体。
- 12. 如权利要求 1-8 中的任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分选自由人抗体、嵌合抗体和人源化抗体组成的组。
- 13. 一种免疫轭合物,其包含与治疗剂连接的前述权利要求的任一项所述的抗体或其抗原结合部分。
- 14. 权利要求 13 的免疫轭合物,其中所述治疗剂是细胞毒素或放射性同位素。
- 15. 一种组合物,其包含权利要求 1-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合部分或权利要求 13-14 中任一项所述的免疫轭合物和药学可接受的载体。
- 16. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 1-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合部分。
- 17. 一种表达载体,其包含权利要求 16 所述的核酸分子。
- 18. 一种宿主细胞,其包含权利要求 17 所述的表达载体。
- 19. 权利要求 1-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合部分在制备抑制表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的肿瘤细胞生长的药物中的用途。
- 20. 如权利要求 19 所述的用途,其中所述肿瘤细胞来源于肝组织。
- 21. 如权利要求 19 所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合部分是免疫轭合物。

针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的单克隆抗体

[0001] 发明背景

[0002] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 是属于糖基磷脂酰肌醇 - 锚定的硫酸肝素蛋白聚糖的磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族的癌胚抗原。磷脂酰肌醇蛋白聚糖的特征为复合称为硫酸肝素糖胺聚糖的多糖链的共价连接。磷脂酰肌醇蛋白聚糖参与细胞 - 胞外基质界面的细胞信号传导。(Sasisekharan 等人, Nature Reviews | Cancer, 第 2 卷 (2002))。截至目前, 已鉴别了人磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族的六个不同成员。细胞膜结合的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 包含通过一个或多个二硫键连接的两个亚基。

[0003] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 表达于发育过程中的胎肝和胎盘, 并且在正常的成人组织中被下调或沉默。磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 基因的突变和缺失是引起人类中 Simpson-Golabi-Behmel 或 Simpson 畸形综合征的原因。磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 表达于各种癌症并且特别是肝细胞癌 (“HCC”)、黑素瘤、Wilm’s 肿瘤和肝母细胞瘤。(Jakubovic 和 Jothy ;Ex. Mol. Path. 82 :184-189(2007) ;Nakatsura 和 Nishimura, Biodrugs 19(2) : 71-77(2005))。

[0004] HCC 是世界范围内癌症相关的死亡的第三大原因。每年 HCC 导致约 100 万例死亡。(Nakatsura 和 Nishimura, Biodrugs 19(2) : 71-77(2005))。乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和导致肝硬化的慢性严重饮酒仍是 HCC 的最常见的原因。由于丙型肝炎病毒感染的传播, 其发病率在美国急剧增加, 并预期其在接下来的 20 年增加。HCC 主要通过肝移植或肿瘤切除治疗。患者预后依赖于潜在肝功能和肿瘤诊断的阶段两方面。(Parikh 和 Hyman, Am J Med. 120(3) :194-202(2007))。需要有效的 HCC 治疗策略。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明提供与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合并表现出许多所需特性的分离的单克隆抗体, 特别是人单克隆抗体。这些特性包括与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的高亲和力结合。

[0007] 一方面, 本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中该抗体 :

[0008] (a) 以 1×10^{-7} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合 ;

[0009] (b) 与转染有磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的人 CHO 细胞结合。

[0010] 优选地, 该抗体为人抗体, 但是在替代实施方案中, 该抗体可以是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0011] 在一实施方案中, 该抗体以 5×10^{-8} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合、以 2×10^{-8} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合、以 1×10^{-8} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合、以 5×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合、以 4×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合、以 3×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合、或以 2×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合。

[0012] 在另一实施方案中, 本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中该抗体与参考抗体交叉竞争与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的结合, 所述参考抗体包含 :

[0013] (a) 包含选自由 SEQ ID NO :19、20 和 21 组成的组的氨基酸序列的重链可变区 ;和

- [0014] (b) 包含选自 SEQ ID NO:22、23 和 24 组成的组的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0015] 在各种实施方案中,所述参考抗体包含:
- [0016] (a) 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的重链可变区;和
- [0017] (b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0018] 或所述参考抗体包含:
- [0019] (a) 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的重链可变区;和
- [0020] (b) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0021] 或所述参考抗体包含:
- [0022] (a) 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列的重链可变区;和
- [0023] (b) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0024] 另一方面,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含为人 VH 5-51 基因的产物或来源于人 VH 5-51 基因的重链可变区,其中所述抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。本发明还提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含为人 VK A27 基因的产物或来源于 VK A27 基因的轻链可变区,其中所述抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。
- [0025] 在优选的实施方案中,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含:
- [0026] (a) 人 VH 5-51 基因的重链可变区;和
- [0027] (b) 人 VK A27 基因的轻链可变区;
- [0028] 其中所述抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。
- [0029] 另一方面,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含:
- [0030] 包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区;和包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区,其中:
- [0031] (a) 重链可变区 CDR3 序列包含选自 SEQ ID NO:7、8 和 9 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列;
- [0032] (b) 轻链可变区 CDR3 序列包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 18 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列;
- [0033] (c) 所述抗体以 1×10^{-7} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合;或
- [0034] (d) 与转染有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的人 CHO 细胞结合。
- [0035] 优选地,重链可变区 CDR2 序列包含选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列;且轻链可变区 CDR2 序列包含选自 SEQ ID NO:13、14 和 15 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列。优选地,重链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO:1、2 和 3 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列;且轻链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO:10、11 和 12 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列。
- [0036] 优选的组合包含:
- [0037] (a) 包含 SEQ ID NO:1 的重链可变区 CDR1;
- [0038] (b) 包含 SEQ ID NO:4 的重链可变区 CDR2;

- [0039] (c) 包含 SEQ ID NO:7 的重链可变区 CDR3 ;
- [0040] (d) 包含 SEQ ID NO:10 的轻链可变区 CDR1 ;
- [0041] (e) 包含 SEQ ID NO:13 的轻链可变区 CDR2 ;和
- [0042] (f) 包含 SEQ ID NO:16 的轻链可变区 CDR3。
- [0043] 另一优选的组合包含 :
- [0044] (a) 包含 SEQ ID NO:2 的重链可变区 CDR1 ;
- [0045] (b) 包含 SEQ ID NO:5 的重链可变区 CDR2 ;
- [0046] (c) 包含 SEQ ID NO:8 的重链可变区 CDR3 ;
- [0047] (d) 包含 SEQ ID NO:11 的轻链可变区 CDR1 ;
- [0048] (e) 包含 SEQ ID NO:14 的轻链可变区 CDR2 ;和
- [0049] (f) 包含 SEQ ID NO:17 的轻链可变区 CDR3。
- [0050] 另一优选的组合包含 :
- [0051] (a) 包含 SEQ ID NO:3 的重链可变区 CDR1 ;
- [0052] (b) 包含 SEQ ID NO:6 的重链可变区 CDR2 ;
- [0053] (c) 包含 SEQ ID NO:9 的重链可变区 CDR3 ;
- [0054] (d) 包含 SEQ ID NO:12 的轻链可变区 CDR1 ;
- [0055] (e) 包含 SEQ ID NO:15 的轻链可变区 CDR2 ;和
- [0056] (f) 包含 SEQ ID NO:18 的轻链可变区 CDR3。
- [0057] 本发明的其他优选抗体或其抗原结合部分包含 :
- [0058] (a) 包含选自由 SEQ ID NO:19、20 和 21 组成的组的氨基酸序列的重链可变区 ;和
- [0059] (b) 包含选自由 SEQ ID NO:22、23 和 24 组成的组的氨基酸序列的轻链可变区 ;
- [0060] 其中所述抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 特异性结合。
- [0061] 优选的组合包含 :
- [0062] (a) 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的重链可变区 ;和
- [0063] (b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0064] 另一优选的组合包含 :
- [0065] (a) 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的重链可变区 ;和
- [0066] (b) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0067] 另一优选的组合包含 :
- [0068] (a) 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列的重链可变区 ;和
- [0069] (b) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0070] 在本发明的另一方面,提供了与前述抗体中的任一种竞争结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的抗体或其抗原结合部分。
- [0071] 例如,本发明的抗体可以是例如 IgG1 或 IgG4 同种型的全长抗体。可选地,所述抗体可以是抗体片段,诸如 Fab、Fab' 或 Fab' 2 片段、或单链抗体。
- [0072] 本发明还提供包含与治疗剂连接的本发明的抗体或其抗原结合部分的免疫轭合物,所述治疗剂诸如细胞毒素或放射性同位素。本发明还提供包含与第二功能部分连接的本发明的抗体或其抗原结合部分的双特异性分子,所述第二功能部分具有与所述抗体或其抗原结合部分不同的结合特异性。

[0073] 还提供了组合物,其包含本发明的抗体或其抗原结合部分、或免疫轭合物或双特异性分子和药学可接受的载体。

[0074] 编码本发明的抗体或其抗原结合部分的核酸分子,以及包含此类核酸的表达载体和包含此类表达载体的宿主细胞,也包括在本发明内。

[0075] 本发明提供抑制表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的肿瘤细胞的生长的方法。所述方法包括使细胞与有效抑制肿瘤细胞生长的量的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体或其抗原结合部分接触。在优选的实施方案中,所述肿瘤细胞来源于肝组织。另外,所述抗体或其抗原结合部分可以是免疫轭合物。本发明的免疫轭合物可以是治疗剂,例如,细胞毒素或放射性同位素。

[0076] 通过下面的详述和实施例,本发明的其他特征和优点将是明显的,该详述和实施例不应理解为限制性的。所有参考文献、Genbank 条目、专利和公布的专利申请的内容通过引用明确并入本文。

[0077] 附图简述

[0078] 图 1A 显示 4A6 人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :25) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :19)。描绘出了 CDR1 (SEQ ID NO :1)、CDR2 (SEQ ID NO :4) 和 CDR3 (SEQ ID NO :7) 区,并指出了 V、D 和 J 的种系来源。

[0079] 图 1B 显示 4A6 人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :28) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :22)。描绘出了 CDR1 (SEQ ID NO :10)、CDR2 (SEQ ID NO :13) 和 CDR3 (SEQ ID NO :16) 区,并指出了 V 和 J 的种系来源。

[0080] 图 2A 显示 11E7 人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :26) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :20)。描绘出了 CDR1 (SEQ ID NO :2)、CDR2 (SEQ ID NO :5) 和 CDR3 (SEQ ID NO :8) 区,并指出了 V 和 J 的种系来源。

[0081] 图 2B 显示 11E7 人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :29) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :23)。描绘出了 CDR1 (SEQ ID NO :11)、CDR2 (SEQ ID NO :14) 和 CDR3 (SEQ ID NO :17) 区,并指出了 V 和 J 的种系来源。

[0082] 图 3A 显示 16D10 人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :27) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :21)。描绘出了 CDR1 (SEQ ID NO :3)、CDR2 (SEQ ID NO :6) 和 CDR3 (SEQ ID NO :9) 区,并指出了 V 和 J 的种系来源。

[0083] 图 3B 显示 16D10 人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :30) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :24)。描绘出了 CDR1 (SEQ ID NO :12)、CDR2 (SEQ ID NO :15) 和 CDR3 (SEQ ID NO :18) 区,并指出了 V 和 J 的种系来源。

[0084] 图 4 显示 4A6 的重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :19) 与人种系 V_H 5-51 氨基酸序列 (SEQ ID NO :31) 和人种系 J_H JH4b 氨基酸序列 (SEQ ID NO :32) 的比对。

[0085] 图 5 显示 11E7 的重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :20) 与人种系 V_H 5-51 氨基酸序列 (SEQ ID NO :31) 和人种系 J_H JH4b 氨基酸序列 (SEQ ID NO :32) 的比对。

[0086] 图 6 显示 16D10 的重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :21) 与人种系 V_H 5-51 氨基酸序列 (SEQ ID NO :31) 和人种系 J_H JH4b 氨基酸序列 (SEQ ID NO :32) 的比对。

[0087] 图 7 显示 4A6 的轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :22) 与人种系 V_K A27 氨基酸序列 (SEQ ID NO :33) 和人种系 J_K JK4 氨基酸序列 (SEQ ID NO :34) 的比对。

[0088] 图 8 显示 11E7 的轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :23) 与人种系 V_k A27 氨基酸序列 (SEQ ID NO :33) 和人种系 J_k JK4 氨基酸序列 (SEQ ID NO :34) 的比对。

[0089] 图 9 显示 16D10 的轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :24) 与人种系 V_k A27 氨基酸序列 (SEQ ID NO :33) 和人种系 J_k JK1 氨基酸序列 (SEQ ID NO :35) 的比对。

[0090] 图 10 显示 4A6、11E7 和 16D10 单克隆抗体对 HCC 细胞系 Hep-3B 的结合亲和力。使用荧光激活细胞分选仪 (“FACS”) 测定来测量结合。

[0091] 图 11 显示单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 与 HCC 细胞系 Hep-3B 和 Hep-G2 特异性结合。使用 FACS 测定来测量结合。

[0092] 图 12 显示单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 与稳定转染有磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 表达载体的 CHO 细胞特异性结合但不与亲本 CHO 细胞系结合。使用 FACS 测定来测量结合。

[0093] 图 13 显示单克隆抗体 4A6 与取自患者的肝癌细胞结合。使用免疫组织化学测定来揭示抗体结合。

[0094] 图 14 显示单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 可介导天然杀伤 (“NK”) T- 细胞介导的 Hep-3B 细胞的杀伤。用抗体依赖性细胞毒性 (“ADCC”) 测定来测量杀伤。

[0095] 图 15 显示单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 在与细胞表面磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 结合后被 Hep-3B 细胞内化。通过 Hum-ZAP 测定 (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) 来测量内化。

[0096] 图 16 显示单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 与细胞表面磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 结合后被 Hep-3B 细胞内化。在免疫荧光测定中揭示内化。

[0097] 发明详述

[0098] 本发明涉及以高亲和力与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 特异性结合的分离的单克隆抗体,特别是人单克隆抗体。在某些实施方案中,本发明的抗体来源于特定重链和轻链种系序列,和/或包含特定结构特征,诸如包含特定氨基酸序列的 CDR 区。本发明提供分离的抗体、制备该抗体的方法、包含该抗体的免疫轭合物和双特异性分子、和含有本发明的抗体、免疫轭合物或双特异性分子的药物组合物。本发明还涉及使用该抗体诸如检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3、以及治疗与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的表达相关的疾病诸如表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的肝细胞恶性肿瘤的方法。因此,本发明还提供使用本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体治疗肝细胞恶性肿瘤 (例如, HCC) 的方法。

[0099] 为了使本发明可以更容易被理解,首先定义了一些术语。其他的定义贯穿详细描述进行说明。

[0100] 术语“磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3”、“磷脂酰肌醇蛋白聚糖蛋白聚糖 3”、“GPC3”、“OTTHUMP00000062492”、“GTR2-2”、“SGB”、“DGSX”、“SDYS”、“SGBS”、“OCI-5”和“SGBS1”可以互换使用,并包括人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的变体、同种型和物种同系物。因此,在某些情况中,本公开的人抗体可与来自人以外的物种的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 交叉反应。在某些实施方案中,所述抗体可对一种或多种人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 蛋白具有完全特异性,并且可不表现物种或其他类型的非人交叉反应型。示例性人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的完整氨基酸序列具有 Genbank/NCBI 登录号 NM_004484 (SEQ ID NO :36)。

[0101] 术语“免疫应答”指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子 (包括抗体、细胞因子和补体) 的作用,该作用导致对侵入的病

原体、被病原体感染的细胞或组织、癌细胞、或在自身免疫或病理性炎症的情况中正常的人细胞或组织的选择性损伤、破坏或从人体的清除。

[0102] “信号转导途径”指在信号从细胞的一部分向细胞的另一部分传送中起作用的多种信号转导分子之间的生化关系。如本文所用,短语“细胞表面受体”包括,例如,能够接收信号和跨越细胞质膜传送此信号的分子和分子复合体。本发明的“细胞表面受体”的一个实例是磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3受体。

[0103] 本文提到的术语“抗体”包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即,“抗原结合部分”)或单链。“抗体”指包含通过二硫键互相连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每条重链包含重链可变区(本文缩写为 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域, C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,即 C_L 。 V_H 和 V_L 区可以进一步再分为高变区,称为互补决定区(CDR),散布有称为构架区(FR)的更保守的区域。每个 V_H 和 V_L 包含三个CDR和4个FR,它们从氨基端向羧基端以如下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和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的结合,该宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(如,效应细胞)和经典补系统的第一成分(C1q)。

[0104] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)指保留与抗原(如,磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3)特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。已显示抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来行使。术语抗体的“抗原结合部分”所包括的结合片段的实例包括:(i)Fab片段,即由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,即包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的双价片段;(iii)Fab'片段,其基本上是具有铰链区部分的Fab(参见,FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY(基础免疫学)(Paul编,第3版,1993);(iv)由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的Fd片段;(v)由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段,(vi)dAb片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546),其由 V_H 结构域组成;(vii)分离的互补决定区(CDR);和(viii)纳米抗体(nanobody),即含有单个可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外,尽管Fv片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由单独的基因编码,但是它们可以利用重组方法通过合成连接体连接在一起,该连接体使它们能够制成一条蛋白质链,其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见,例如Bird等人(1988)Science242:423-426;和Huston等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883)。这种单链抗体也预期包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段用本领域技术人员已知的常规技术获得,并用与完整抗体相同的方法对这些片段的实用性进行筛选。

[0105] 本文使用的“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3特异性结合的分离的抗体基本不含与除磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3以外的抗原特异性结合的抗体)。但是,与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3特异性结合的分离的抗体与诸如来自其他物种的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3分子等其他抗原可能具有交叉反应性。而且,分离的抗体可基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0106] 本文使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组成的抗体分子的制品。单克隆抗体组合物表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和性。

[0107] 本文使用的术语“人抗体”意欲包括具有如下可变区的抗体,在该可变区中,构架

区和 CDR 区都源自人种系免疫球蛋白序列。而且,如果该抗体含有恒定区,则该恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包含并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。但是,本文使用的术语“人抗体”不预期包括其中源自另一哺乳动物种诸如小鼠的种系的 CDR 序列已被移植到人构架序列上的抗体。

[0108] 术语“人单克隆抗体”是指表现单一结合特异性的抗体,其具有其中构架区和 CDR 区均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。在一实施方案中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,该杂交瘤包括与永生化细胞融合的 B 细胞,该 B 细胞从具有含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物(如,转基因小鼠)获得。

[0109] 本文使用的术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,诸如:(a) 从对于人免疫球蛋白基因而言为转基因或转染色体的动物(如,小鼠)或由该动物制备的杂交瘤(下文进一步描述)中分离的抗体,(b) 从经转化以表达人抗体的宿主细胞如转染瘤中分离的抗体,(c) 从重组组合人抗体文库中分离的抗体,和(d) 通过包括将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他 DNA 序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体具有其中构架区和 CDR 区均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。但是在某些实施方案中,这些重组人抗体可以经历体外诱变(或者,当使用人 Ig 序列的转基因动物时,经历体内体细胞诱变),因此重组抗体的 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列尽管是源自人种系 V_H 和 V_L 序列并与之相关的序列,但可能并非天然存在于体内人抗体种系的所有组成成分(repertoire)中。

[0110] 本文使用的“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(如,IgM 或 IgG1)。

[0111] 短语“识别抗原的抗体”和“抗原特异性抗体”在此与术语“与抗原特异性结合的抗体”可互换使用。

[0112] 术语“人抗体衍生物”是指人抗体的任何修饰形式,例如抗体和另一试剂或抗体的轭合物。

[0113] 术语“人源化抗体”是指其中来源于另一哺乳动物物种如小鼠的种系的 CDR 序列已经被移植到人构架序列上的抗体。可以在人构架序列内进行其他的构架区修饰。

[0114] 术语“嵌合抗体”是指其中可变区序列来源于一个物种而恒定区序列来源于另一个物种的抗体,诸如其中可变区序列来源于小鼠抗体而恒定区序列来源于人抗体的抗体。

[0115] 如本文使用的,“与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合”的抗体是指以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、更优选地 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、更优选地 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、更优选地 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、甚至更优选地 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合的抗体。

[0116] 本文使用的术语“基本不结合”蛋白质或细胞的意思是不与该蛋白质或细胞结合或者不以高亲和力与该蛋白质或细胞结合,即以 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 或更高、更优选地 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 或更高、更优选地 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 或更高、更优选地 $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 或更高、甚至更优选地 $1 \times 10^{-2} \text{M}$ 或更高的 K_D 与该蛋白质或细胞结合。

[0117] 本文使用的术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而本文使用的术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。本文使用的术语“ K_D ”是指解离常数,它是由 K_d 与 K_a 的比值(即 K_d/K_a)获得的,并表示为摩尔浓度(M)。抗体的 K_D 值可以用本领域确立的方法测定。测定抗体 K_D 的优选方法是使用表面等离子共振共

振法,优选使用生物传感器系统,诸如Biacore®系统。

[0118] 本文使用的术语 IgG 抗体的“高亲和力”指抗体对于靶抗原具有 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、更优选地 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、甚至更优选地 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、甚至更优选地 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低和甚至更优选地 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 。但是对于其他抗体同种型来说,“高亲和力”结合可能不同。例如,对于 IgM 同种型来说,“高亲和力”结合是指抗体具有 10^{-6}M 或更低、更优选地 10^{-7}M 或更低、甚至更优选地 10^{-8}M 或更低的 K_D 。

[0119] 本文使用的术语“受试者”包括任何人或非人类动物。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物,如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖类动物、爬行类动物等。

[0120] 本申请的各个方面在下面的章节中进一步详细描述。

[0121] 抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体

[0122] 本发明的抗体通过该抗体的特定功能特征或性质来表征。例如,所述抗体与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。优选地,本发明的抗体以高亲和力例如以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低的 K_D 与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合。本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体优选地表现下列特性中的一种或多种:

[0123] (a) 以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合;

[0124] (b) 与转染有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的人 CHO 细胞结合。

[0125] 优选地,所述抗体以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合、以 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合、以 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合、以 $4 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合、以 $3 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合、或以 $2.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合。

[0126] 所述抗体优选地与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 中存在的抗原性表位结合,该表位不存在与其他蛋白。所述抗体通常与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合但不与其他蛋白结合,或以低亲和力,诸如以 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 或更高、更优选地 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 或更高、更优选地 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 或更高、更优选地 $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 或更高、甚至更优选地 $1 \times 10^{-2} \text{M}$ 或更高的 K_D ,与其他蛋白结合。优选地,所述抗体基本不结合相关蛋白,例如,所述抗体基本不结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-4 或磷脂酰肌醇蛋白聚糖-6。

[0127] 在一实施方案中,所述抗体可被内化进入表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的细胞。评估抗体内化的标准测定是本领域已知的,包括,例如 HumZap 内化测定。

[0128] 评估抗体对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的结合能力的标准测定是本领域已知的,包括,例如 ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析。实施例中详细描述了合适的测定。抗体的结合动力学(如,结合亲和力)还可通过本领域已知的标准测定诸如通过Biacore®系统分析来评价。为了评价与肿瘤细胞如 Hep-3b 或 Hep-G2(ATCC 保藏号分别为 HB-8064 和 HB-8065)的结合,细胞可以从可公开获得的来源诸如美国典型培养物保藏中心获得并用于标准测定,诸如流式细胞术分析。

[0129] 单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10

[0130] 本发明的优选抗体是按实施例 1 和 2 中的描述分离和结构表征的人单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10。4A6、11E7 和 16D10 的 V_H 氨基酸序列分别以 SEQ ID NO:19、20 和 21 显

示。4A6、11E7 和 16D10 的 V_L 氨基酸序列分别以 SEQ ID NO:22、23 和 24 显示。

[0131] 鉴于这些抗体的每一种均可与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合,可“混合并匹配” V_H 和 V_L 序列以生成本发明的其他抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合分子。可使用上文和实施例中描述的结合测定(如,ELISA)测试这些“混合并匹配”的抗体的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合。优选地,当混合并匹配 V_H 和 V_L 链时,来自特定 V_H/V_L 配对的 V_H 序列被取代为结构上相似的 V_H 序列。同样,优选地,来自特定 V_H/V_L 配对的 V_L 序列被取代为结构上相似的 V_L 序列。

[0132] 因此,一方面,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含:

[0133] (a) 包含选自由 SEQ ID NO:19、20 和 21 组成的组的氨基酸序列的重链可变区;和

[0134] (b) 包含选自由 SEQ ID NO:22、23 和 24 组成的组的氨基酸序列的轻链可变区;

[0135] 其中所述抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、优选地人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。

[0136] 优选的重链和轻链组合包括:

[0137] (a) 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的重链可变区;和 (b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的轻链可变区;

[0138] 或

[0139] (b) 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的重链可变区;和 (b) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0140] (c) 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列的重链可变区;和 (b) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0141] 另一方面,本发明提供包含 4A6、11E7 和 16D10 的重链和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 或其组合的抗体。4A6、11E7 和 16D10 的 V_H CDR1 的氨基酸序列分别以 SEQ ID NO:1、2 和 3 显示。4A6、11E7 和 16D10 的 V_H CDR2 的氨基酸序列分别以 SEQ ID NO:4、5 和 6 显示。4A6、11E7 和 16D10 的 V_H CDR3 的氨基酸序列分别以 SEQ ID NO:7、8 和 9 显示。4A6、11E7 和 16D10 的 V_k CDR1 的氨基酸序列分别以 SEQ ID NO:10、11 和 12 显示。4A6、11E7 和 16D10 的 V_k CDR2 的氨基酸序列分别以 SEQ ID NO:13、14 和 15 显示。4A6、11E7 和 16D10 的 V_k CDR3 的氨基酸序列分别以 SEQ ID NO:16、17 和 18 显示。使用 Kabat 系统 (Kabat, E. A. 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫关注的蛋白的序列),第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242) 描绘出了 CDR 区。

[0142] 鉴于这些抗体中的每一种均可与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合并且抗原结合特异性主要由 CDR1、CDR2 和 CDR3 区提供,可“混合并匹配” V_H CDR1、CDR2 和 CDR3 序列和 V_k CDR1、CDR2 和 CDR3 序列(即,可“混合并匹配”来自不同抗体的 CDR,但是每个抗体必须含有 V_H CDR1、CDR2 和 CDR3 和 V_k CDR1、CDR2 和 CDR3)以生成本发明的其他抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合分子。可使用上文和实施例中描述的结合测定(如,ELISA、Biacore[®]分析)测试这些“混合并匹配”的抗体的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合。优选地,当混合并匹配 V_H CDR 序列时,来自特定 V_H 序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列被取代为结构上相似的 CDR 序列。同样,当混合并匹配 V_k CDR 序列时,来自特定 V_k 序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列优选地被取代为结构上相似的 CDR 序列。对于本领域技术人员来说非常明显的是,通过用来自本文公开的单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 的 CDR 序列的结构上相似的序列取代一个或多个

V_H 和 / 或 V_L CDR 区序列,可生成新的 V_H 和 V_L 序列。

[0143] 因此,另一方面,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含:

[0144] (a) 包含选自 SEQ ID NO:1、2 和 3 组成的组的氨基酸序列的重链可变区 CDR1;

[0145] (b) 包含选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 组成的组的氨基酸序列的重链可变区 CDR2;

[0146] (c) 包含选自 SEQ ID NO:7、8 和 9 组成的组的氨基酸序列的重链可变区 CDR3;

[0147] (d) 包含选自 SEQ ID NO:10、11 和 12 组成的组的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1;

[0148] (e) 包含选自 SEQ ID NO:13、14 和 15 组成的组的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2;和

[0149] (f) 包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 18 组成的组的氨基酸序列的轻链可变区 CDR3;

[0150] 其中所述抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3、优选地人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 特异性结合。

[0151] 在优选的实施方案中,所述抗体包含:

[0152] (a) 包含 SEQ ID NO:1 的重链可变区 CDR1;

[0153] (b) 包含 SEQ ID NO:4 的重链可变区 CDR2;

[0154] (c) 包含 SEQ ID NO:7 的重链可变区 CDR3;

[0155] (d) 包含 SEQ ID NO:10 的轻链可变区 CDR1;

[0156] (e) 包含 SEQ ID NO:13 的轻链可变区 CDR2;和

[0157] (f) 包含 SEQ ID NO:16 的轻链可变区 CDR3。

[0158] 在另一优选的实施方案中,所述抗体包含:

[0159] (a) 包含 SEQ ID NO:2 的重链可变区 CDR1;

[0160] (b) 包含 SEQ ID NO:5 的重链可变区 CDR2;

[0161] (c) 包含 SEQ ID NO:8 的重链可变区 CDR3;

[0162] (d) 包含 SEQ ID NO:11 的轻链可变区 CDR1;

[0163] (e) 包含 SEQ ID NO:14 的轻链可变区 CDR2;和

[0164] (f) 包含 SEQ ID NO:17 的轻链可变区 CDR3。

[0165] 在另一优选的实施方案中,所述抗体包含:

[0166] (a) 包含 SEQ ID NO:3 的重链可变区 CDR1;

[0167] (b) 包含 SEQ ID NO:6 的重链可变区 CDR2;

[0168] (c) 包含 SEQ ID NO:9 的重链可变区 CDR3;

[0169] (d) 包含 SEQ ID NO:12 的轻链可变区 CDR1;

[0170] (e) 包含 SEQ ID NO:15 的轻链可变区 CDR2;和

[0171] (f) 包含 SEQ ID NO:18 的轻链可变区 CDR3。

[0172] 本领域公知,依赖于 CDR1 和 / 或 CDR2 结构域,单独的 CDR3 结构域即可决定抗体对同源抗原的结合特异性,并且可基于共同的 CDR3 序列预测性地产生具有相同结合特异性的多种抗体。参见,例如,Klimka 等人,British J. of Cancer 83(2):252-260(2000)(描述了仅使用鼠抗 -CD30 抗体 Ki-4 的重链可变结构域 CDR3 的人源化抗 -CD30 抗体的产生);

Beiboer 等人, J. Mol. Biol. 296:833-849(2000) (描述了仅使用亲本鼠 MOC-31 抗-EGP-2 抗体的重链 CDR3 序列的重组上皮糖蛋白-2(EGP-2)抗体);Rader 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:8910-8915(1998) (描述了使用鼠抗-整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 抗体 LM609 的重链和轻链可变 CDR3 结构域的一组人源化抗-整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 抗体,其中每个成员抗体在 CDR3 结构域之外包含不同的序列,能够与亲本鼠抗体结合相同表位,其亲和力与亲本鼠抗体同样高或更高);Barbas 等人, J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162(1994) (公开了 CDR3 结构域对抗原结合提供了最重要的贡献);Barbas 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:2529-2533(1995) (描述了针对人胎盘 DNA 的三种 Fab(SI-1、SI-40 和 SI-32) 的重链 CDR3 序列向抗破伤风类毒素 Fab 的重链上的移植,由此取代了存在的重链 CDR3,并证明单独的 CDR3 结构域赋予结合特异性);和 Ditzel 等人, J. Immunol. 157:739-749(1996) (描述了移植研究,其中仅将亲本多特异性 Fab LNA3 的重链 CDR3 移植到单特异性 IgG 破伤风类毒素结合 Fab p313 抗体的重链就足以保留亲本 Fab 的结合特异性)。这些参考文献的每一个都特此通过引用整体并入。

[0173] 因此,本发明提供包含一个或多个来自人或非人动物来源的抗体的重链和/或轻链 CDR3 结构域的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体能够与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。在某些方面,本发明提供包含一个或多个来自非人抗体诸如小鼠或大鼠抗体的重链和/或轻链 CDR3 结构域的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体能够与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。在一些实施方案中,包含一个或多个来自非人抗体的重链和/或轻链 CDR3 结构域的这些发明的抗体与对应的亲本非人抗体 (a) 能够竞争结合;(b) 保留功能特性;(c) 结合相同的表位;和/或 (d) 具有相似的结合亲和力。

[0174] 在其他方面,本发明提供包含一个或多个来自人抗体(诸如,例如从非人动物获得的人抗体)的重链和/或轻链 CDR3 结构域的单克隆抗体,其中所述人抗体能够与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。在其他方面,本发明提供包含一个或多个来自第一人抗体(诸如,例如从非人动物获得的人抗体)的重链和/或轻链 CDR3 结构域的单克隆抗体,其中所述第一人抗体能够与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合,并且其中来自第一人抗体的 CDR3 结构域取代缺乏对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的结合特异性的人抗体中的 CDR3 结构域,以产生能够与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合的第二人抗体。在一些实施方案中,包含一个或多个来自第一人抗体的重链和/或轻链 CDR3 结构域这些发明的抗体与对应的亲本第一人抗体 (a) 能够竞争结合;(b) 保留功能特性;(c) 结合相同的表位;和/或 (d) 具有相似的结合亲和力。在优选的实施方案中,所述第一人抗体是 4A6、11E7 和 16D10。

[0175] 具有特定种系序列的抗体

[0176] 在某些实施方案中,本发明的抗体包含来自特定种系重链免疫球蛋白基因的重链可变区和/或来自特定种系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。

[0177] 例如,在优选的实施方案中,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含为人 VH 5-51 基因的产物或来源于人 VH 5-51 基因的重链可变区,其中所述抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。在另一优选的实施方案中,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含为人 VK A27 基因的产物或来源于 VK A27 基因的轻链可变区,其中所述抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。在又一优选的实施方案中,本发明提供分离的

单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体:

[0178] (a) 包含为人 V_H 5-51 基因(该基因编码如 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列)的产物或来源于该基因的重链可变区;

[0179] (b) 包含为 V_K A27 基因(该基因编码如 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列)的产物或来源于该基因的轻链可变区;并

[0180] (c) 与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、优选地人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 特异性结合。

[0181] 具有 V_H 5-51 和 V_K A27 的抗体的实例为 4A6、11E7 和 16D10

[0182] 如本文所用,如果人抗体的可变区是从使用人种系免疫球蛋白基因的系统获得的,则该人抗体包含“来源于”特定种系序列或“为其产物”的重链或轻链可变区。此类系统包括用感兴趣的抗原免疫接种携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或用感兴趣的抗原筛选在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库。“来源于”人种系免疫球蛋白序列或“为其产物”的人抗体可以这样鉴定:将该人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较,并选择在序列上最接近于(即,最高%同一性)该人抗体的序列的人种系免疫球蛋白序列。来源于”特定人种系免疫球蛋白序列或“为其产物”的人抗体与该种系序列相比可含有氨基酸差异,例如,由于天然发生的体细胞突变或定点突变的有意引入。但是,选择的人抗体在氨基酸序列上与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列通常至少 90% 相同,并含有当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(如,鼠种系序列)相比时将该人抗体鉴定为属于人类抗体的氨基酸残基。在某些情况中,人抗体在氨基酸序列与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列可至少 95% 或甚至至少 96%、97%、98% 或 99% 相同。通常而言,来源于特定人种系序列的人抗体将表现出与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的不超过 10 个氨基酸的差异。在某些情况中,人抗体可表现出与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的不超过 5、或甚至不超过 4、3、2、或 1 个氨基酸的差异。

[0183] 同源抗体

[0184] 在又一实施方案中,本发明的抗体包含的重链和轻链可变区包含与本文所述的优选抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列,并且其中所述抗体保留本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的所需功能性质。

[0185] 例如、本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0186] (a) 所述重链可变区包含与选自 SEQ ID NO:19、20 和 21 组成的组的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;

[0187] (b) 所述轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO:22、23 和 24 组成的组的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;且

[0188] (c) 所述抗体以 $1 \times 10^{-7} M$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合。

[0189] 所述抗体还可与转染有人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 CHO 细胞结合。

[0190] 在各种实施方案中,所述抗体可以是,例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0191] 在其他实施方案中, V_H 和 / 或 V_L 氨基酸序列可与上文所示的序列 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同源。具有与上文所示的序列的 V_H 和 V_L 区高度(即,80% 或更高)同源的 V_H 和 V_L 区的抗体可通过诱变(如,定点诱变或 PCR- 介导的诱变)编码 SEQ ID NO:25、26、27、28、29 和 30 的核酸分子,然后使用本文描述的功能测定测试所编码的改

变的抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合的能力来获得。

[0192] 如本文所用的,两个氨基酸序列之间的百分比同源性等同于两个序列之间的百分比同一性。考虑到为了两个序列的最佳比对所需要引入的缺口的数目和每个缺口的长度,两个序列之间的百分比同一性是这两个序列共有的相同位置的数目的函数(即,%同源性=相同位置的数目/位置的总数目 $\times 100$)。两个序列之间的序列比较和百分比同一性的确定可以使用如下文的非限制性实例中描述的数学算法实现。

[0193] 两个氨基酸序列之间的百分比同一性可以使用已整合入 ALIGN 程序(2.0 版本)的 E. Meyers 和 W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17(1988)) 的算法来确定,其使用 PAM120 权重残基表、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分。此外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性可以使用已整合入 GCG 软件包(可在 <http://www.gcg.com> 获得)的 GAP 程序的 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453(1970)) 算法确定,其使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵,以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重。

[0194] 另外地或可选地,本发明的蛋白序列可进一步作为“查询序列”用于进行公共数据库的检索,例如,鉴定相关序列。此类检索可以使用 Altschul 等人 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 的 XBLAST 程序(2.0 版本)进行。BLAST 蛋白质检索可以用 XBLAST 程序、得分=50、字长=3 进行,以获得与本发明的抗体分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的缺口比对,可以如 Altschul 等人, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 中描述的使用缺口 BLAST。当利用 BLAST 和缺口 BLAST 程序时,可以使用各自程序(如, XBLAST 和 NBLAST) 的缺省参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0195] 具有保守修饰的抗体

[0196] 在某些实施方案中,本发明的抗体包含:包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区和包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区,其中这些 CDR 序列中的一个或多个包含基于本文描述的优选抗体(如, 4A6、11E7 和 16D10) 的指定氨基酸序列或其保守修饰,并且其中所述抗体保留了本分明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的所需功能性质。因此,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含:包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区和包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区,其中:

[0197] (a) 所述重链可变区 CDR3 序列包含选自由 SEQ ID NO:7、8 和 9 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列;

[0198] (b) 所述轻链可变区 CDR3 序列包含选自由 SEQ ID NO:16、17 和 18 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列;且

[0199] (c) 所述抗体以 1×10^{-7} M 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合。

[0200] 所述抗体还可与转染有人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 CHO 细胞结合。

[0201] 在优选的实施方案中,所述重链可变区 CDR2 序列包含选自由 SEQ ID NO:4、5 和 6 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列;且所述轻链可变区 CDR2 序列包含选自由 SEQ ID NO:13、14 和 15 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列。在另一优选的实施方案中,所述重链可变区 CDR1 序列包含选自由 SEQ ID NO:1、2 和 3 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列;且所述轻链可变区 CDR1 序列包含选自由 SEQ ID NO:10、11 和 12 的氨基酸序列和其保守修饰组成的组的氨基酸序列。

[0202] 在各种实施方案中,所述抗体可以是,例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0203] 如本文所用的,术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变含有所述氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸取代、增加和缺失。可通过本领域已知的标准技术诸如定点诱变和 PCR- 介导的诱变向本发明的抗体引入修饰。保守氨基酸取代是其中将氨基酸残基取代为具有相似侧链的氨基酸残基的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域中已经定义。这些家族包括具有碱性侧链(如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸)、 β -分支侧链(如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本发明的抗体的 CDR 区内的一个或多个氨基酸残基可以取代为来自相同侧链家族的其他氨基酸残基,并且可以使用本文描述的功能测定测试改变的抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合的能力。

[0204] SEQ ID NO:1、2 或 3 的重链 CDR1 序列可包含一个或多个保守序列修饰,诸如一、二、三、四、五或更多个氨基酸取代、增加或缺失;SEQ ID NO:10、11 或 12 的轻链 CDR1 序列可包含一个或多个保守序列修饰,诸如一、二、三、四、五或更多个氨基酸取代、增加或缺失;用 SEQ ID NO:4、5 或 6 显示的重链 CDR2 序列可包含一个或多个保守序列修饰,诸如一、二、三、四、五或更多个氨基酸取代、增加或缺失;用 SEQ ID NO:13、14 或 15 显示的轻链 CDR2 序列可包含一个或多个保守序列修饰,诸如一、二、三、四、五或更多个氨基酸取代、增加或缺失;用 SEQ ID NO:7、8 或 9 显示的重链 CDR3 序列可包含一个或多个保守序列修饰,诸如一、二、三、四、五或更多个氨基酸取代、增加或缺失;和 / 或用 SEQ ID NO:16、17 或 18 显示的轻链 CDR3 序列可包含一个或多个保守序列修饰,诸如一、二、三、四、五或更多个氨基酸取代、增加或缺失。

[0205] 与本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体结合相同表位的抗体

[0206] 在另一实施方案中,本发明提供与本发明的任一磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 单克隆抗体结合人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 上的相同表位的抗体(即,能够与本发明的任一单克隆抗体交叉竞争与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的结合的抗体)。在优选的实施方案中,交叉竞争研究的参考抗体可以是单克隆抗体 4A6(具有分别如 SEQ ID NO:19 和 22 所示的 V_H 和 V_L 序列)、单克隆抗体 11E7(具有分别如 SEQ ID NO:20 和 23 所示的 V_H 和 V_L 序列)或单克隆抗体 16D10(具有分别如 SEQ ID NO:21 和 24 所示的 V_H 和 V_L 序列)。此类交叉竞争抗体可以基于它们在标准磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合测定中与 4A6、11E7 或 16D10 交叉竞争的能力来鉴定。例如,可以使用 Biacore 分析、ELISA 测定或流式细胞术来证明与本发明的抗体的交叉竞争。测试抗体抑制例如 4A6、11E7 或 16D10 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合的能力证明该测试抗体可与 4A6、11E7 或 16D10 竞争与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的结合,并因此与 4A6、11E7 或 16D10 结合人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 上的相同表位。在优选的实施方案中,与 4A6、11E7 或 16D10 结合人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 上的相同表位的抗体是人单克隆抗体。此类人单克隆抗体可以按照实施例中的描述进行制备和分离。

[0207] 工程化抗体和修饰的抗体

[0208] 本发明的抗体进一步可以使用具有本文所公开的一种或多种 V_H 和 / 或 V_L 序列的

抗体作为起始材料来制备,以构建修饰的抗体,该修饰的抗体与起始抗体相比可以具有改变的性质。可以通过修饰一个或两个可变区(即 V_H 和 / 或 V_L) 例如一个或多个 CDR 区内和 / 或一个或多个构架区内的一个或多个氨基酸来工程改造抗体。另外地或可选地,可以通过修饰恒定区内的残基来工程改造抗体,例如改变该抗体的效应功能。

[0209] 在某些实施方案中,可以使用 CDR 移植来对抗体的可变区进行工程改造。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因,CDR 内的氨基酸序列比 CDR 外的序列在各个抗体之间更加多样化。由于 CDR 序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此通过构建如下的表达载体能够表达模拟特定天然存在抗体的性质的重组抗体:该表达载体包含来自特定天然存在抗体的 CDR 序列,该 CDR 序列被移植到来自具有不同性质的不同抗体的构架序列上(参见,如, Riechmann, L. 等人 (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. 等人 (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. 等人 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; 授予 Winter 的美国专利第 5,225,539 号和授予 Queen 等人的美国专利第 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370 号)。

[0210] 因此,本发明的另一实施方案涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含:包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区,所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别包含选自由 SEQ ID NO:1、2 和 3, SEQ ID NO:4、5 和 6, 以及 SEQ ID NO:7、8 和 9 组成的组的氨基酸序列;和包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区,所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别包含选自由 SEQ ID NO:10、11 和 12, SEQ ID NO:13、14 和 15, 以及 SEQ ID NO:16、17 和 18 组成的组的氨基酸序列。因此,此类抗体含有单克隆抗体 4A6、11E7 或 16D10 的 V_H 和 V_L CDR 序列,但是还可能含有与这些抗体不同的构架序列。

[0211] 这些构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或发表的参考文献中获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在以下中发现:“VBase”人种系序列数据库(可从因特网上 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase 获得),以及 Kabat, E. A. 等人 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (免疫关注的蛋白的序列),第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242; Tomlinson, I. M. 等人 (1992) “The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops” (人种系 V_H 序列的所有组成成分揭示了具有不同的高变环的约五十组 V_H 区段) *J. Mol. Biol.* 227: 776-798; 和 Cox, J. P. L. 等人 (1994) “A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” (人种系 V_H 区段的目录揭示它们的使用具有强烈的偏好) *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; 其内容均通过引用明确并入本文。作为另一个实例,人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在 Genbank 数据库中发现。例如,在 HCo7 HuMAb 小鼠中发现的下列重链种系序列可以根据如下 Genbank 登录号获得:1-69 (NG_0010109、NT_024637 和 BC070333)、3-33 (NG_0010109 和 NT_024637) 和 3-7 (NG_0010109 和 NT_024637)。作为另一个实例,在 HCo12 HuMAb 小鼠中发现的以下重链种系序列可以根据如下 Genbank 登录号获得:1-69 (NG_0010109、NT_024637 和 BC070333)、5-51 (NG_0010109 和 NT_024637)、4-34 (NG_0010109 和 NT_024637)、3-30.3 (CAJ556644) 和 3-23 (AJ406678)。

[0212] 使用称为缺口 BLAST 的序列相似性检索方法之一 (Altschul 等人 (1997) *Nucleic*

Acids Research 25:3389-3402) 将抗体蛋白质序列与编译的蛋白质序列数据库进行比较, 该方法是本领域技术人员公知的。BLAST 是启发式算法, 其中抗体序列和数据库序列之间统计学显著的比对可能含有被比对字 (word) 的高得分区段对 (HSP)。无法通过延伸 (extension) 或修整 (trimming) 提高其分值的片段对被称为匹配字串 (hit)。简要地说, 翻译 VBASE 来源 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>) 的核苷酸序列, 保留介于 FR1 和 FR3 构架区之间并且包含 FR1 和 FR3 的区域。数据库序列的平均长度为 98 个残基。除去在蛋白质全长上完全匹配的重复序列。使用除了关闭的低复杂性过滤器以外采用缺省标准参数的 blastp 程序和 BLOSUM62 取代矩阵, 对蛋白质进行 BLAST 检索, 过滤前 5 个产生序列匹配的匹配字串。在全部 6 个构架中翻译核苷酸序列, 在数据库序列的匹配区段中不含终止密码子的构架被认为是潜在的匹配字串。随后用 BLAST 程序 tblastx 进行验证, 该程序在全部 6 个构架中翻译抗体序列, 并且将这些翻译与在全部 6 个构架中动态翻译的 VBASE 核苷酸序列进行比较。

[0213] 同一性是抗体序列与蛋白质数据库之间在序列全长上的精确氨基酸匹配。正结果 (同一性 + 取代匹配) 不是相同, 而是由 BLOSUM62 取代矩阵所指导的氨基酸取代。如果抗体序列以相同的同一性与两个数据库序列匹配, 则正结果最多的匹配字串被确定为匹配序列匹配字串。

[0214] 本发明的抗体中使用的优选构架序列在结构上类似于本发明所选抗体的构架序列, 例如, 类似于本发明的优选单克隆抗体使用的 V_H 5-51 构架序列 (SEQ ID NO:31) 和 / 或 V_K A27 构架序列 (SEQ ID NO:33)。 V_H CDR1、CDR2 和 CDR3 序列以及 V_K CDR1、CDR2 和 CDR3 序列可以移植到与该构架序列的来源种系免疫球蛋白基因中发现的构架区具有相同序列的构架区上, 或者 CDR 序列可以嫁接到与种系序列相比具有一个或多个突变的构架区上。例如, 已发现, 在某些情况下, 对构架区域内的残基进行突变有益于保持或增强抗体与抗原的结合能力 (参见例如授予 Queen 等人的美国专利第 5, 530, 101 ; 5, 585, 089 ; 5, 693, 762 和 6, 180, 370 号)。

[0215] 可变区修饰的另一类型是对 V_H 和 / 或 V_K CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 区域内的氨基酸残基进行突变, 进而改进感兴趣的抗体的一种或多种结合性质 (如亲和性)。可以进行定点诱变或 PCR 介导的诱变以引入突变, 其对抗体结合或感兴趣的其他功能性质的影响可以通过本文描述和实施例中提供的体外或体内测定来评估。优选引入保守修饰 (如上所述)。所述突变可以是氨基酸取代、增加或缺失, 但是优选为取代。此外, CDR 区内改变的残基通常不超过一、二、三、四或五个。

[0216] 因此, 在另一实施方案中, 本公开提供包含重链可变区的分离的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 单克隆抗体或其抗原结合部分, 所述重链可变区包含: (a) V_H CDR1 区, 其包含选自由 SEQ ID NO:1、2 和 3 组成的组的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO:1、2 和 3 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、缺失或增加的氨基酸序列; (b) V_H CDR2 区, 其包含选自由 SEQ ID NO:4、5 和 6 组成的组的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO:4、5 和 6 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、缺失或增加的氨基酸序列; (c) V_H CDR3 区, 其包含选自由 SEQ ID NO:7、8 和 9 组成的组的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO:7、8 和 9 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、缺失或增加的氨基酸序列; (d) V_K CDR1 区, 其包含选自由 SEQ ID NO:10、11 和 12 组成的组的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO:10、11 和 12 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、缺

失或增加的氨基酸序列；(e) V_k CDR2 区其包含选自 SEQ ID NO:13、14 和 15 组成的组的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:13、14 和 15 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、缺失或增加的氨基酸序列；和 (f) V_k CDR3 区，其包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 18 组成的组的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:16、17 和 18 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、缺失或增加的氨基酸序列。

[0217] 本发明的工程抗体包括如为了改善抗体的性质而对其 V_H 和 / 或 V_k 内的构架残基进行修饰的抗体。通常进行此类构架修饰是为了降低所述抗体的免疫原性。例如，一种方法是将一个或多个构架残基“回复突变”为相应的种系序列。更具体地说，经过体细胞突变的抗体可能包含与所述抗体的来源种系序列不同的构架残基。此类残基可以通过比较抗体构架序列和所述抗体的来源种系序列来鉴定。例如，对于 4A6，使用 Kabat 编号系统， V_H 的氨基酸残基 #73（在 FR3 内）是精氨酸（SEQ ID NO:19），而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是赖氨酸（SEQ ID NO:31）。为了使构架区序列恢复其种系构型，可以通过例如定点诱变或 PCR 介导的诱变将所述体细胞突变“回复突变”为种系序列（如，4A6 的 V_H 的残基 #73（FR3 的残基 #8）可以从精氨酸“回复突变”为赖氨酸）。

[0218] 作为另一实例，对于 4A6， V_H 的氨基酸残基 #76（在 FR3 内）是精氨酸（SEQ ID NO:19），而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是丝氨酸（SEQ ID NO:31）。为了使构架区序列恢复其种系构型，例如，4A6 的 V_H 的残基 #76（FR3 的残基 #11）可以从精氨酸“回复突变”为丝氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0219] 作为另一实例，对于 4A6， V_H 的氨基酸残基 #89（在 FR3 内）是亮氨酸（SEQ ID NO:19），而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是蛋氨酸（SEQ ID NO:31）。为了使构架区序列恢复其种系构型，例如，4A6 的 V_H 的残基 #89（FR3 的残基 #27）可以从亮氨酸“回复突变”为蛋氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0220] 作为另一实例，对于 11E7， V_H 的氨基酸残基 #76（在 FR3 内）是精氨酸（SEQ ID NO:20），而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是丝氨酸（SEQ ID NO:31）。为了使构架区序列恢复其种系构型，例如，11E7 的 V_H 的残基 #76（FR3 的残基 #11）可以从精氨酸“回复突变”为丝氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0221] 作为另一实例，对于 16D10， V_H 的氨基酸残基 #10（在 FR1 内）是天冬氨酸（SEQ ID NO:21），而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是谷氨酸（SEQ ID NO:31）。为了使构架区序列恢复其种系构型，例如，16D10 的 V_H 的残基 #10（FR1 的残基 #10）可以从天冬氨酸“回复突变”为谷氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0222] 作为另一实例，对于 16D10， V_H 的氨基酸残基 #12（在 FR1 内）是苏氨酸（SEQ ID NO:21），而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是赖氨酸（SEQ ID NO:31）。为了使构架区序列恢复其种系构型，例如，16D10 的 V_H 的残基 #12（FR1 的残基 #12）可以从苏氨酸“回复突变”为赖氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0223] 作为另一实例，对于 16D10， V_H 的氨基酸残基 #24（在 FR1 内）是缬氨酸（SEQ ID NO:21），而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是甘氨酸（SEQ ID NO:31）。为了使构架区序列恢复其种系构型，例如，16D10 的 V_H 的残基 #24（FR1 的残基 #24）可以从缬氨酸“回复突变”为甘氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0224] 作为另一实例，对于 16D10， V_H 的氨基酸残基 #28（在 FR1 内）是精氨酸（SEQ ID

NO :21), 而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是丝氨酸 (SEQ ID NO :31)。为了使构架区序列恢复其种系构型, 例如, 16D10 的 V_H 的残基 #28 (FR1 的残基 #28) 可以从精氨酸“回复突变”为丝氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0225] 作为另一实例, 对于 16D10, V_H 的氨基酸残基 #37 (在 FR2 内) 是蛋氨酸 (SEQ ID NO :21), 而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是缬氨酸 (SEQ ID NO :31)。为了使构架区序列恢复其种系构型, 例如, 16D10 的 V_H 的残基 #37 (FR2 的残基 #2) 可以从蛋氨酸“回复突变”为缬氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0226] 作为另一实例, 对于 16D10, V_H 的氨基酸残基 #41 (在 FR2 内) 是丝氨酸 (SEQ ID NO :21), 而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是脯氨酸 (SEQ ID NO :31)。为了使构架区序列恢复其种系构型, 例如, 16D10 的 V_H 的残基 #41 (FR2 的残基 #6) 可以从丝氨酸“回复突变”为脯氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0227] 作为另一实例, 对于 16D10, V_H 的氨基酸残基 #66 (在 FR3 内) 是组氨酸 (SEQ ID NO :21), 而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是谷氨酰胺 (SEQ ID NO :31)。为了使构架区序列恢复其种系构型, 例如, 16D10 的 V_H 的残基 #66 (FR3 的残基 #1) 可以从组氨酸“回复突变”为谷氨酰胺。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0228] 作为另一实例, 对于 16D10, V_H 的氨基酸残基 #76 (在 FR3 内) 是天冬酰胺 (SEQ ID NO :21), 而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是丝氨酸 (SEQ ID NO :31)。为了使构架区序列恢复其种系构型, 例如, 16D10 的 V_H 的残基 #76 (FR3 的残基 #11) 可以从天冬酰胺“回复突变”为丝氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0229] 作为另一实例, 对于 16D10, V_H 的氨基酸残基 #81 (在 FR3 内) 是精氨酸 (SEQ ID NO :21), 而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是谷氨酰胺 (SEQ ID NO :31)。为了使构架区序列恢复其种系构型, 例如, 16D10 的 V_H 的残基 #81 (FR3 的残基 #16) 可以从精氨酸“回复突变”为谷氨酰胺。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0230] 作为另一实例, 对于 16D10, V_H 的氨基酸残基 #89 (在 FR3 内) 是异亮氨酸 (SEQ ID NO :21), 而对应 V_H 5-51 种系序列中的此残基是蛋氨酸 (SEQ ID NO :31)。为了使构架区序列恢复其种系构型, 例如, 16D10 的 V_H 的残基 #89 (FR3 的残基 #27) 可以从异亮氨酸“回复突变”为蛋氨酸。此类“回复突变”抗体也意欲包括在本发明中。

[0231] 相似地, 本发明提供轻链中构架残基的回复突变。例如, 对于 16D10, V_K 的氨基酸残基 #3 (在 FR1 内) 是亮氨酸 (SEQ ID NO :24), 而对应 V_K A27 种系序列中的此残基是缬氨酸 (SEQ ID NO :33)。为了使构架区序列恢复其种系构型, 例如, 16D10 的 V_K 的残基 #3 (FR1 的残基 #3) 可以从亮氨酸“回复突变”为缬氨酸。

[0232] 另一种类型的构架修饰涉及对构架区内或甚至一个或多个 CDR 区内的一个或多个残基进行突变, 以除去 T 细胞表位, 进而降低抗体潜在的免疫原性。此方法也称作“去免疫”, 并且在美国专利公布第 20030153043 号 (Carr 等人) 中有进一步的详细说明。

[0233] 作为对构架区或 CDR 区内进行的修饰的附加或替代, 本发明的抗体可被工程改造以包括在 Fc 区域内的修饰, 通常用以改变所述抗体的一种或多种功能性质, 诸如血浆半衰期、补体结合、Fc 受体结合和 / 或抗原依赖性细胞毒性。此外, 本发明的抗体还可进行化学修饰 (如可以在抗体上连接一个或多个化学部分) 或进行修饰以改变其糖基化, 同样是为了改变所述抗体的一种或多种功能性质。每种实施方案都将在下面详细介绍。Fc 区的残基

编号是 Kabat 的 EU 指数编号。

[0234] 在一实施方案中,CH1 的铰链区进行修饰以改变(如,增加或减少)铰链区内的半胱氨酸残基数目。此方法在 Bodmer 等人的美国专利第 5,677,425 号中有进一步说明。例如,改变 CH1 铰链区半胱氨酸残基数以促进轻链和重链的组装或者以增加或降低抗体的稳定性。

[0235] 在另一实施方案中,抗体的 Fc 铰链区进行突变以降低抗体的生物半衰期。更具体地说,在 Fc 铰链片段的 CH₂-CH₃ 结构域的接合区域引入一个或多个氨基酸突变,以使得抗体相对于原始 Fc 铰链区 SpA 结合削弱了葡萄球菌蛋白 A(SpA) 结合。此方法在 Ward 等人的美国专利第 6,165,745 号中有进一步的详细描述。

[0236] 在另一实施方案中,抗体进行修饰以增加其生物半衰期。有多种方法可用。例如,可以引入下列突变中的一种或多种:T252L、T254S、T256F,如授予 Ward 的美国专利第 6,277,375 号所述。可选地,为了增加抗体的生物半衰期,可以改变抗体的 CH1 或 C_L 区以包含补救受体结合表位,该表位是来自 IgG 中 Fc 区的 CH2 结构域的两个环,如 Presta 等人的第 5,869,046 和 6,121,022 号美国专利所述。

[0237] 在其他实施方案中,用不同的氨基酸残基取代了至少一个氨基酸残基来改变 Fc 区,以改变抗体的效应功能。例如,可以用不同的氨基酸残基取代选自氨基酸残基 234、235、236、237、297、318、320 和 322 的一个或多个氨基酸残基,以使抗体具有改变的对效应配体的亲和性,但保留亲本抗体的抗原结合能力。例如,对其亲和力被改变的效应配体可以是 Fc 受体或补体的 C1 组分。此方法在 Winter 等人的美国专利第 5,624,821 和 5,648,260 号中有进一步的详细描述。

[0238] 在另一实例中,可以用不同的氨基酸残基取代选自氨基酸残基 329、331 和 322 的一个或多个氨基酸,以使抗体具有改变的 C1q 结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。此方法在 Idusogie 等人的美国专利第 6,194,551 号中有进一步的详细描述。

[0239] 在另一实例中,改变了氨基酸位置 231 和 239 中的一个或多个氨基酸残基,进而改变抗体结合补体的能力。此方法在 Bodmer 等人的 PCT 公布 WO 94/29351 中有进一步的详细描述。

[0240] 在另一实例中,Fc 区域进行了修饰,以增强抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或以增加抗体对 Fc γ 受体的亲和力,通过修饰下列位置的一个或多个氨基酸:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439。此方法在 Presta 的 PCT 公布 W000/42072 中有进一步的描述。此外,已绘制了人 IgG1 上 Fc γ R1、Fc γ RII、Fc γ RIII 和 FcRn 的结合位点,并已描述了具有改善的结合的变体(参见 Shields, R. L. 等人 (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604)。已表明位置 256、290、298、333、334 和 339 的特定突变能够改善与 Fc γ RIII 的结合。此外,已表明下列组合突变体能够提高与 Fc γ RIII 的结合:T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A 和 S298A/E333A/K334A。

[0241] 在另一实施方案中,抗体的糖基化进行了修饰。例如,可以制备去糖基化的抗体(即抗体没有糖基化)。例如,可以改变糖基化以增加抗体对抗原的亲和力。例如,此类糖修

饰可以通过改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,以造成一个或多个可变区构架糖基化位点的消除,进而消除该位点的糖基化。此类去糖基化可能增加抗体对抗原的亲合性。此方法在 Co 等人的美国专利第 5,714,350 和 6,350,861 号中有进一步的详细描述。

[0242] 此外或者可选地,抗体可以被制成具有改变的糖基化类型,例如岩藻糖基残基量减少的低岩藻糖糖基化的抗体,或具有增加的平头型 GlcNac 结构的抗体。已证实,此类改变的糖基化模式可以增加抗体的 ADCC 能力。例如,此类糖修饰可以通过在具有改变的糖基化机器的宿主细胞内表达所述抗体来实现。具有改变的糖基化机器的细胞在本领域已有报道,并可用作表达本发明重组抗体、进而产生具有改变的糖基化的抗体的宿主细胞。例如,细胞系 Ms704、Ms705 和 Ms709 缺乏岩藻糖基转移酶基因,即 FUT8(α (1,6) 岩藻糖基转移酶),所以在 Ms704、Ms705 和 Ms709 细胞系中表达的抗体的糖类缺少岩藻糖。Ms704、Ms705 和 Ms709FUT8^{-/-} 细胞系是通过使用两个替代载体(参见 Yamane 等人的美国专利公布第 20040110704 号和 Yamane-Ohnuki 等人(2004)Biotechnol Bioeng 87:614-22)靶向断裂 CHO/DG44 细胞中的 FUT8 基因而产生。作为另一实例,Hanai 等人的 EP1,176,195 描述了编码岩藻糖基转移酶的 FUT8 基因功能破坏的细胞系,以便在此细胞系中表达的抗体通过降低或消除 α 1,6 键相关酶而表现出低岩藻糖糖基化。Hanai 等人还描述了在将岩藻糖添加到 N-乙酰氨基葡萄糖(与抗体的 Fc 区域结合)上具有低酶活性或者不具有该酶活性的细胞系,例如大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/0(ATCC CRL 1662)。Presta 的 PCT 公布 W003/035835 描述了将岩藻糖添加到 Asn(297) 连接糖类的能力下降的变异的 CHO 细胞系,即 Lec13 细胞,同样造成所述宿主细胞内表达的抗体低岩藻糖糖基化(另参见 Shields,R. L. 等人(2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana 等人的 PCT 公布 W0 99/54342 描述了工程改造为表达糖蛋白修饰糖基化转移酶(如 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III(GnTIII))的细胞系,因此,工程改造的细胞系中表达的抗体表现出增加的平头型 GlcNac 结构,进而使抗体的 ADCC 活性增加(另参见 Umana 等人(1999)Nat. Biotech. 17:176-180)。可选地,可以使用岩藻糖苷酶切断抗体上的岩藻糖残基。例如,岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶从抗体上移除岩藻糖基残基(Tarentino,A. L. 等人(1975)Biochem. 14:5516-23)。

[0243] 本发明涵盖的另一抗体修饰为聚乙二醇化。例如,可以将抗体聚乙二醇化以增加抗体的生物(如血清)半衰期。要对抗体进行聚乙二醇化,通常使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)(诸如 PEG 的活性酯或醛衍生物)在使一个或多个 PEG 基团连接到抗体或抗体片段的条件下进行反应。优选地,聚乙二醇化通过与反应性 PEG 分子(或类似的反应性水溶性聚合物)发生酰化反应或烷基化反应实现。如本文所用,术语“聚乙二醇”意欲包括已经用来衍生其他蛋白质的 PEG 的任何形式,如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,进行聚乙二醇化的抗体为无糖基化的抗体。对蛋白进行聚乙二醇化的方法在本领域中是已知的,并可应用于本发明抗体。参见例如 Nishimura 等人的 EP 0 154316 和 Ishikawa 等人的 EP 0 401 384。

[0244] 抗体的物理性质

[0245] 本发明的抗体可进一步通过抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的各种物理性质进行表征。基于这些物理性质,多种分析可以用于检测和/或区分不同类别的抗体。

[0246] 在一些实施方案中,本发明的抗体可在轻链或重链可变区包含一个或多个糖基化

位点。可变区内一个或多个糖基化位点的存在可由于改变的抗原结合而导致该抗体免疫原性增加或抗体的 pK 值改变 (Marshall 等人 (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA 和 Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick 等人 (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh 等人 (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura 等人 (2000) *Mol Immunol* 37:697-706)。已知糖基化发生在含有 N-X-S/T 序列的模体。可以使用 Glycoblot 测定测试可变区的糖基化, Glycoblot 测定切割抗体产生 Fab, 然后使用测量高碘酸盐氧化和希夫碱形成的测定测试糖基化。可选地, 还可以使用 Dionex 光层析 (Dionex-LC) 法测试可变区糖基化, Dionex 光层析将 Fab 上的糖切割为单糖, 并分析各种糖的含量。在一些情况下, 优选的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体不包含可变区糖基化。这可以通过选择可变区不包含糖基化模体的抗体或者通过使用本领域公知的标准技术对糖基化模体中的残基进行突变来实现。

[0247] 在优选实施方案中, 本发明的抗体不包含天冬酰胺异构位点。脱酰胺或异天冬氨酸效应可分别在 N-G 或 D-G 序列上发生。脱酰胺或异天冬氨酸效应导致生成异天冬氨酸, 异天冬氨酸通过在侧链羧基末端而不是主链生成了一个扭结结构降低了抗体的稳定性。异天冬氨酸的生成可以使用等量 (iso-quant) 测定来测量, 该测定使用反相 HPLC 测试异天冬氨酸。

[0248] 每种抗体都有唯一的等电点 (pI), 但是通常情况下抗体落入 6 和 9.5 之间的 pH 范围内。IgG1 抗体的 pI 通常落入 7-9.5 的 pH 范围内, 而 IgG4 抗体的 pI 通常落入 6-8 的 pH 范围内。抗体可具有不在此范围内的 pI。虽然其影响基本上并不清楚, 但是推测 pI 不在正常范围内的抗体在体内条件下会有一些解折叠和不稳定。等电点可以使用毛细管等电聚焦测定进行测试, 该测定生成 pH 梯度, 并可使用激光聚焦以提高准确度 (Janini 等人 (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma 等人 (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt 等人 (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67)。在一些情况下, 优选 pI 值落入正常范围内的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体。这可以通过选择 pI 值在正常范围内的抗体或者通过使用本领域公知的标准技术对带电荷的表面残基进行突变来实现。

[0249] 每种抗体都有指示其热稳定性的熔化温度 (Krishnamurthy R 和 Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71)。较高的热稳定性指示在体内有较高的总体抗体稳定性。抗体的熔点可以使用诸如差示扫描量热法 (Chen 等人 (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando 等人 (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) 的技术来测量。 T_{M1} 指示抗体开始解折叠的温度。 T_{M2} 指示抗体完全解折叠的温度。通常情况下, 优选本发明的抗体的 T_{M1} 大于 60°C、优选地大于 65°C、甚至更优选地大于 70°C。可选地, 抗体的热稳定性可以使用圆二色性 (Murray 等人 (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9) 来测量。

[0250] 在优选实施方案中, 选择不快速降解的抗体。抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体的片段化可以使用本领域技术人员公知的毛细管电泳 (CE) 和 MALDI-MS (Alexander AJ 和 Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32) 进行测量。

[0251] 在另一优选实施方案中, 选择具有最小的聚集效应的抗体。聚集可导致触发不想要的免疫应答和/或改变的或不利的药物动力学性质。通常情况下, 抗体具有 25% 或更少、优选地 20% 或更少、甚至更优选地 15% 或更少、甚至更优选地 10% 或更少以及甚至更优选地 5% 或更少的聚集是可接受的。聚集可以使用本领域公知的多种技术进行测量, 包括体积

排阻柱 (SEC)、高效液相层析 (HPLC) 和光散射法以鉴定单体、二聚体、三聚体或多聚体。

[0252] 工程改造抗体的方法

[0253] 如上所述,通过修饰 V_H 和 / 或 V_K 序列或与其连接的恒定区,本文公开的具有 V_H 和 V_K 序列的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体可用于生成新的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体。因而,在本发明的另一方面,本发明抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体如 4A6、11E7 和 16D10 的结构特征用来生成保留本发明抗体的至少一种功能性质的结构相关的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体,所述功能性质诸如与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合。例如,4A6、11E7 和 16D10 或其突变的一个或多个 CDR 区可以通过重组与已知构架区和 / 或其他 CDR 组合在一起,以生成如上所述的其他、重组工程改造的本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体。其他类型的修饰包括上文所述的修饰。工程改造方法的起始材料是本文提供的 V_H 和 / 或 V_K 序列中的一种或多种或其一个或多个 CDR 区。要生成工程改造抗体,并不需要实际制备 (即表达为蛋白) 具有本文提供的 V_H 和 / 或 V_K 序列中的一种或多种或其一个或多个 CDR 区的抗体。而是将这些序列中包含的信息用作起始材料,以生成从原始序列衍生的“第二代”序列,然后制备“第二代”序列并将其表达为蛋白。

[0254] 因此,在另一实施方案中,本发明提供制备抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体的方法,该方法包括:

[0255] (a) 提供:(i) 重链可变区抗体序列,其包含选自由 SEQ ID NO:1、2 和 3 组成的组的 CDR1 序列、选自由 SEQ ID NO:4、5 和 6 组成的组的 CDR2 序列和 / 或选自由 SEQ ID NO:7、8 和 9 组成的组的 CDR3 序列;和 / 或 (ii) 轻链可变区抗体序列,其包含选自由 SEQ ID NO:10、11 和 12 组成的组的 CDR1 序列、选自由 SEQ ID NO:13、14 和 15 组成的组的 CDR2 序列和 / 或选自由 SEQ ID NO:16、17 和 18 组成的组的 CDR3 序列;

[0256] (b) 改变重链可变区抗体序列和 / 或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基,以生成至少一种改变的抗体序列;和

[0257] (c) 将改变的抗体序列表达为蛋白。

[0258] 可以使用标准的分子生物学技术制备和表达改变的抗体序列。

[0259] 优选地,改变的抗体序列编码的抗体是保留了本文所述的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体的一种、部分或全部功能性质的抗体,所述功能性质包括但不限于:

[0260] (i) 以 $1 \times 10^{-7} M$ 或更低的 K_D 与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合;

[0261] (ii) 与转染有磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的人 CHO 细胞结合。

[0262] 改变的抗体的功能性质可以使用本领域可用的和 / 或本文所述的标准测定进行评估,所述标准测定诸如实施例所述的那些测定 (如流式细胞术、结合测定)。

[0263] 在本发明工程改造抗体方法的某些实施方案中,可以随机地或选择性地在抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体编码序列的整体或局部引入突变,然后可以针对结合活性和 / 或本文所述的其他功能性质来筛选所得的修饰的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体。突变方法在本领域中已有描述。例如,Short 的 PCT 公布 W0 02/092780 描述了使用饱和诱变、合成连接组装或两种方法的组合产生和筛选抗体突变的方法。可选地,Lazar 等人的 PCT 公布 W0 03/074679 描述了使用计算筛选方法优化抗体的生理化学性质的方法。

[0264] 编码本发明的抗体的核酸分子

[0265] 本发明的另一方面涉及编码本发明的抗体的核酸分子。所述核酸分子可以存

在于完整细胞或细胞裂解物中,或者是部分纯化的或大致纯的形式。当使用标准技术将核酸同其他细胞组分或其他污染物(如细胞内的其他核酸或蛋白)分开时,该核酸即为“分离的”或“视为大致纯”,所述标准技术包括碱性/SDS裂解法、氯化铯密度梯度离心法(CsCl banding)、柱层析法、琼脂糖凝胶电泳和本领域公知的其他方法。参见 F. Ausubel 等人编(1987)Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学最新方案)GreenePublishing and Wiley Interscience,New York。本发明的核酸可以是例如 DNA 或 RNA,并可包含或不包含内含子序列。在优选实施方案中,所述核酸为 cDNA 分子。

[0266] 本发明的核酸可以使用标准分子生物学技术获得。对于由杂交瘤(如下文将进一步描述的从携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠中制备的杂交瘤)表达的抗体,编码由杂交瘤产生的抗体的轻链和重链的 cDNA 可通过标准 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术获得。对于从免疫球蛋白基因文库中获得的抗体(如使用噬菌体展示技术),可以从文库中回收编码该抗体的核酸。

[0267] 本发明的优选核酸分子为编码 4A6、11E7 或 16D10 单克隆抗体的 V_H 和 V_L 序列的核酸分子。编码 4A6、11E7 或 16D10 的 V_H 序列的 DNA 序列分别以 SEQ ID NO:25、26 和 27 显示。编码 4A6、11E7 或 16D10 的 V_L 序列的 DNA 序列分别以 SEQ ID NO:28、29 和 30 显示。

[0268] 本发明的其他优选核酸是与以 SEQ ID NO:25、26、27、28、29 和 30 显示的序列中的一种具有至少 80% 序列同一性、诸如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 序列同一性的核酸,这些核酸编码本发明的抗体或其抗原结合部分。

[0269] 两个核酸序列之间的百分比同一性是考虑缺口数目和每个缺口的长度时序列中核苷酸相同的位置数目,缺口的引入是两个序列的最佳比对所需要的。两个序列之间的序列比较和百分比同一性的确定可以使用数学算法诸如上文所述的 Meyers 和 Miller 的算法或 Altschul 的 XBLAST 程序来实现。

[0270] 又进一步地,本发明的优选核酸包含以 SEQ ID NO:25、26、27、28、29 和 30 显示的核酸序列的一个或多个 CDR- 编码部分。在此实施方案中,所述核酸可编码 4A6、11E7 或 16D10 的重链 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列或 4A6、11E7 或 16D10 的轻链 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列。

[0271] 与 SEQ ID NO:25、26、27、28、29 或 30 的此 CDR- 编码部分具有至少 80%、诸如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 序列同一性的核酸也是本发明的优选核酸。此类核酸可在非 CDR 编码区和 / 或在 CDR 编码区不同于 SEQ ID NO:25、26、27、28、29 或 30 的对应部分。当差异在 CDR 编码区时所述核酸编码的核酸 CDR 区通常包含与 4A6、11E7 和 16D10 的对应 CDR 序列相比的一种或多种如本文所定义的保守序列修饰。

[0272] 一旦获得编码 V_H 和 V_L 区段的 DNA 片段,这些 DNA 片段即可通过标准重组 DNA 技术进行进一步操作,例如,将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中,编码 V_L 或 V_H 的 DNA 片段操作连接至编码另一蛋白(如抗体恒定区或柔性连接体)的另一 DNA 片段。如该上下文所用,术语“操作连接”意指两个 DNA 片段的连接方式使这两个 DNA 片段编码的氨基酸序列保持符合阅读框(in-frame)。

[0273] 通过将编码 V_H 的 DNA 操作连接至编码重链恒定区(CH1、CH2 和 CH3)的另一 DNA 分子,编码 V_H 区的分离的 DNA 可以转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见 Kabatt, E. A. 等(1991)Sequences of Proteins of Immunological

Interest(免疫关注的蛋白的序列),第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH 出版号 91-3242),并且包含这些区域的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 的恒定区,但是最优选为 IgG1 或 IgG4 恒定区。对于 Fab 片段重链基因,编码 V_H 的 DNA 可操作连接至仅编码重链 CH1 恒定区的另一 DNA 分子。

[0274] 通过将编码 V_L 的 DNA 操作连接至编码轻链恒定区 CL 的另一 DNA 分子,编码 V_L 区的分离的 DNA 可以转化为全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因序列是本领域已知的(参见例如 Kabatt, E. A. 等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫关注的蛋白的序列),第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH 出版号 91-3242),并且包含这些区域的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。在优选实施方案中,轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区。

[0275] 为了生成 scFv 基因,将编码 V_H 和 V_L 的 DNA 片段操作连接至编码柔性连接体如编码氨基酸序列 (Gly4-Ser)3 的另一片段,以便可以将 V_H 和 V_L 序列表达为连续的单链蛋白,其中 V_L 和 V_H 区通过所述柔性连接体连接(例如,参见 Bird 等人(1988) Science 242: 423-426;Huston 等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883;McCafferty 等人,(1990) Nature 348:552-554)。

[0276] 单克隆抗体的产生

[0277] 本发明的单克隆抗体 (mAb) 可以通过多种技术制备,包括常规的单克隆抗体方法,如 Kohler 和 Milstein(1975) Nature 256:495 的标准的体细胞杂交技术。虽然优选体细胞杂交技术,但是原则上也可以使用制备单克隆抗体的其他技术,如 B 淋巴细胞的病毒转化或致癌转化。

[0278] 制备杂交瘤的优选动物系统为鼠系统。在小鼠中制备杂交瘤是非常完善建立的方法。免疫接种实验方案和分离免疫接种的脾细胞以进行融合的技术是本领域已知的。融合配偶体(如鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是已知的。

[0279] 可以基于按上述方法制备的非人单克隆抗体的序列制备本发明的嵌合或人源化抗体。编码重链和轻链免疫球蛋白的 DNA 可以从感兴趣的非人杂交瘤中获得,并可以使用标准的分子生物学技术进行工程改造以包含非鼠(如人)免疫球蛋白序列。例如,为了生成嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠可变区连接到人恒定区(例如,参见授予 Cabilly 等人的美国专利第 4,816,567 号)。为了生成人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠 CDR 区插入人构架(例如,参见授予 Winter 的美国专利第 5,225,539 号和授予 Queen 等人的美国专利第 5,530,101;5,585,089;5,693,762 和 6,180,370 号)。

[0280] 在优选实施方案中,本发明的抗体为人单克隆抗体。此类针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的人单克隆抗体可以使用携带有人免疫系统(而不是小鼠系统)的部分的转基因或转染色体小鼠产生。这些转基因和转染色体小鼠包括本文分别称为 HuMAb 小鼠[®]和 KM 小鼠[®]的小鼠,并在本文统称为“人 Ig 小鼠”。

[0281] HuMAb 小鼠[®] (Medarex[®], Inc.) 包含编码未重排的人重链(μ 和 γ)和 K 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座(miniloci),以及灭活内源 μ 和 K 链基因座的靶向突变(如,Lonberg 等人(1994) Nature 368(6474):856-859)。因此,该小鼠表现出下降的小鼠 IgM 或 K 表达,并且响应于免疫接种,所引入的人重链和轻链转基因发生类转换和体

细胞突变,以产生高亲和力的人 IgGK 单克隆抗体 (Lonberg, N. 等人 (1994), 同上; 综述于 Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 和 Harding, F. 和 Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546)。HuMAb 小鼠[®]的制备和使用,以及该小鼠携带的基因组修饰进一步描述于 Taylor, L. 等人 (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. 等人 (1993) International Immunology 5:647-656; Tuailon 等人 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi 等人 (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. 等人 (1993) EMBO J. 12:821-830; Tuailon 等人 (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. 等人 (1994) International Immunology 6:579-591; 和 Fishwild, D. 等人 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, 其内容均特此通过引用整体特别并入本文。进一步参见授予 Lonberg 和 Kay 的美国专利第 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 和 5,770,429 号; 授予 Surani 等人的美国专利第 5,545,807 号; Lonberg 和 Kay 的 PCT 公布第 WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884 和 WO99/45962 号; 和 Korman 等的 PCT 公布第 WO 01/14424 号。

[0282] 在另一实施方案中,本发明人抗体可以使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠(诸如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠)制备。该小鼠在本文称为“KM 小鼠[®]”,并详细描述于 Ishida 等人的 PCT 公布 WO 02/43478。

[0283] 又进一步地,表达人免疫球蛋白基因的替代转基因动物系统在本领域已有提供,并可以用来制备本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体。例如,可以使用称作 Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的替代转基因系统;例如,此类小鼠描述于授予 Kucherlapati 等人的美国专利第 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 和 6,162,963 号。

[0284] 此外,表达人免疫球蛋白基因的替代转染色体动物系统在本领域已有提供,并可以用来制备本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体。例如,可以使用携带人重链转染色体和人轻链转染色体二者的称作“TC 小鼠”的小鼠;此类小鼠描述于 Tomizuka 等人 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727。此外,携带人重链和轻链转折染色体的牛在本领域已有描述(例如, Kuroiwa 等人 (2002) Nature Biotechnology 20:889-894 和 PCT 申请第 WO 2002/092812 号),并可以用来制备本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体。

[0285] 本发明的人单克隆抗体还可以使用用于筛选人免疫球蛋白基因的文库的噬菌体展示方法制备。分离人抗体的此类噬菌体展示方法在本领域已建立。例如,参见:授予 Ladner 等人的美国专利第 5,223,409; 5,403,484; 和 5,571,698 号;授予 Dower 等人的美国专利第 5,427,908 和 5,580,717 号;授予 McCafferty 等人的美国专利第 5,969,108 和 6,172,197 号;和授予 Griffiths 等人的美国专利第 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 和 6,593,081 号。

[0286] 本发明的人单克隆抗体还可以使用 SCID 小鼠制备,所述 SCID 小鼠中已重构了人免疫细胞,所以在免疫接种时可以产生人抗体应答。例如,此类小鼠描述于授予 Wilson 等人的美国专利第 5,476,996 和 5,698,767 号。

[0287] 人 Ig 小鼠的免疫接种

[0288] 当人 Ig 小鼠用于制备本发明的人抗体时,可以使用磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗

原和 / 或重组磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 或表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的细胞或磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 融合蛋白的纯化或富集的制品对该小鼠进行免疫接种,如 Lonberg, N. 等人 (1994) Nature 368(6474) :856-859 ;Fishwild, D. 等人 (1996) Nature Biotechnology 14 :845-851 ;以及 PCT 公布 W098/24884 和 W0 01/14424 所述。优选地,所述小鼠在第一次输注时鼠龄为 6-16 周。例如,可以使用磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗原的纯化或重组的制品 (5-50 μ g) 对人 Ig 小鼠进行腹膜内免疫接种。

[0289] 制备针对人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的完全人单克隆抗体的详细方法如下面的实施例 1 所述。各种抗原的累积经验已表明,当使用于弗氏完全佐剂中的抗原对小鼠进行腹膜内 (IP) 初次免疫接种,然后每隔一周使用于弗氏不完全佐剂中的抗原对小鼠进行 IP 免疫接种 (最多总计 6 次) 时,转基因小鼠有响应。但是,发现弗氏佐剂之外的佐剂也是有效的。此外,发现没有佐剂时,全细胞具有高度的免疫原性。可以使用眶后放血获得的血浆样品来监测免疫接种方案过程中的免疫应答。可以用 ELISA (如下所述) 筛选血浆,并且具有足够的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 人免疫球蛋白滴度的小鼠可以用于融合。可在处死并摘除脾前 3 天用抗原对小鼠进行静脉内加强免疫。预期每次免疫接种可需要执行 2-3 次融合。通常每种抗原免疫接种 6 至 24 只小鼠。在一实施方案中,可使用带有 HCo7、HCo12 或 HCo17 人重链转基因的小鼠品系。可选地或另外地,可以使用 KM 小鼠[®]品系。此外,这些品系中的两种或更多种可一起杂交到具有多种不同的人重链转基因的单个小鼠中。

[0290] 生产人单克隆抗体的杂交瘤的制备

[0291] 为了制备生产本发明的人单克隆抗体的杂交瘤,可以分离来自免疫接种小鼠的脾细胞和 / 或淋巴结细胞,并将其与适当的永生细胞系诸如小鼠骨髓瘤细胞系融合。可以筛选所得杂交瘤的抗原特异抗体的生产。例如,可使用 50% PEG 将来自免疫接种小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬浮物与 1/6 数量的 P3X63-Ag8.653 非分泌小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL 1580) 融合。可选地,可以使用基于电场的电融合方法对来自免疫接种小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬浮物进行融合,该方法使用 CytoPulse 大室细胞融合电穿孔仪 (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland)。在平底微滴定板上涂布大约 2×10^5 个细胞,然后在选择性培养基上孵育两周,所述选择性培养基包含 20% 胎盘克隆血清、18% “653” 条件培养基、5% origin (IGEN)、4mM L- 谷氨酸、1mM 丙酮酸钠、5mM HEPES、0.055mM 2- 巯基乙醇、50 单位 /ml 青霉素、50mg/ml 链霉素、50mg/ml 庆大霉素和 1X HAT (Sigma; 所述 HAT 在融合后 24 小时加入)。大约两周后,可以在用 HT 取代 HAT 的培养基中培养细胞。然后就可以通过 ELISA 对各个孔进行人单克隆 IgM 和 IgG 抗体筛选。一旦发生广泛的杂交瘤生长,通常可在 10-14 天后观察培养基。分泌抗体的杂交瘤可以再涂布、再次筛选,并且如果仍为 IgG 阳性,即可通过有限稀释对所述单克隆抗体进行至少两次亚克隆。然后,可以对稳定的亚克隆进行体外培养,以在组织培养培养基中生成少量抗体用于表征。

[0292] 为了纯化人单克隆抗体,可以在 2 升转瓶中培养选择的杂交瘤用于单克隆抗体纯化。在用蛋白 A- 琼脂糖凝胶 (Pharmacia, Piscataway, N. J.) 进行亲和层析之前,可以过滤并浓缩上清液。洗脱的 IgG 可以通过凝胶电泳和高效液相层析进行检查以确保纯度。缓冲液可以交换为 PBS,并且可以使用 1.43 的消光系数通过 OD280 测定浓度。所述单克隆抗体可以分成小份并存储于 -80°C。

[0293] 生产单克隆抗体的转染瘤的制备

[0294] 本发明的抗体还可以通过宿主细胞转染瘤制备,例如,使用本领域公知的重组 DNA 技术和基因转染方法(如 Morrison, S. (1985) Science 229 :1202) 的组合。

[0295] 例如,为了表达抗体或其抗体片段,可以通过标准的分子生物学技术(如使用表达感兴趣的抗体的杂交瘤的 PCR 扩增或 cDNA 克隆)获得编码部分或全长轻链和重链的 DNA,并可将所述 DNA 插入表达载体,以便这些基因操作连接至转录和翻译控制序列。在此上下文中,术语“操作连接”意指抗体基因连接到载体中,以便载体内的转录和翻译控制序列行使其调控所述抗体基因的转录和翻译的预期功能。表达载体和表达控制序列选择为与所用表达宿主细胞相容的序列。抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入到单独的载体,或者更典型地,两个基因插入同一表达载体。抗体基因通过标准方法(如,连接抗体基因片段和载体上的互补限制位点,或者如果不存在限制位点则进行平末端连接)插入所述表达载体。通过插入到已编码期望的同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体,以使 V_H 区段操作连接至所述载体内的 C_H 区段且 V_K 区段操作连接至所述载体内的 C_L 区段,可以使用本文所述的抗体轻链和重链可变区生成任何抗体同种型的全长抗体基因。此外或者可选地,重组表达载体可以编码信号肽,其利于所述抗体链从宿主细胞的分泌。抗体链基因可以克隆到载体中,以使信号肽与所述抗体链基因的氨基末端符合阅读框地连接。所述信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异种信号肽(即来自非免疫球蛋白的蛋白质的信号肽)。

[0296] 除了抗体链基因外,本发明的重组表达载体还携带控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调控序列。术语“调控序列”意在包括控制抗体链基因转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(如多腺苷化信号)。例如,此类调控序列描述于 Goeddel (Gene Expression Technology(基因表达技术), Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))。本领域技术人员将理解,表达载体的设计,包括调控序列的选择,取决于诸如要转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括指导蛋白在哺乳动物细胞中高水平表达的病毒元件,诸如源自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒 40(SV40)、腺病毒(如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。可选地,也可以使用非病毒调控序列,诸如泛素蛋白启动子或 β -球蛋白启动子。又进一步地,调控元件包含不同来源的序列,诸如包含来自 SV40 早期启动子的序列和人 T 细胞白血病病毒 1 型的长末端重复序列的 SR α 启动子系统(Takebe, Y. 等人 (1988) Mol. Cell. Biol. 8 :466-472)。

[0297] 除了抗体链基因和调控序列之外,本发明的重组表达载体可携带其他序列,诸如调控载体在宿主细胞中复制的序列(如复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有助于选择已导入所述载体的宿主细胞(如,参见授予 Axel 等人的美国专利第 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017 号)。例如,选择标记基因通常赋予已导入所述载体的宿主细胞对药物诸如 G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于在 dhfr⁻ 宿主细胞中进行甲氨蝶呤选择/扩增)和 neo 基因(用于 G418 选择)。

[0298] 为了表达轻链和重链,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞。术语“转染”的各种形式意在包括常用于将外源 DNA 导入原核或真核宿主细胞的各种技术,如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染和类似技术。虽然理论上原核或真核宿主细胞均可用于表达本发明的抗体,但是最优选的是在真核细胞、最为优选地哺乳动物细胞

中表达抗体,原因是此类真核细胞,特别是哺乳动物细胞比原核细胞更有可能组装和分泌正确折叠并具有免疫活性的抗体。已报道,抗体基因的原核表达不能有效地高产量制备活性抗体 (Boss, M. A. 和 Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6 :12-13)。

[0299] 表达本发明重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) (包括 Urlaub 和 Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 :4216-4220 中描述的 dhfr-CHO 细胞,其与 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159 :601-621 中描述的 DHFR 选择标记一起使用)、NSO 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。特别是,为了和 NSO 骨髓瘤细胞一起使用,另一个优选的表达系统为 WO 87/04462 (授予 Wilson)、WO89/01036 (授予 Bebbington) 和 EP 338,841 (授予 Bebbington) 中公开的 GS 基因表达系统。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时,通过将宿主细胞培养足以使抗体在宿主细胞中表达或更优选地使抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中的一段时间,即可制备抗体。可以使用标准的蛋白纯化方法从培养基中回收抗体。

[0300] 抗体与抗原结合的特征

[0301] 可以通过例如标准 ELISA 测试本发明的抗体与人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的结合。简单而言,使用于 PBS 中的 0.25 μ g/ml 的纯化的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 包被微滴定板,然后用于 PBS 中的 5% 牛血清白蛋白封闭。将抗体稀释液 (如磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 免疫接种的小鼠的血浆稀释液) 加入每个孔中,并在 37°C 下孵育 1-2 小时。用 PBS/ 吐温洗涤平板,然后与用碱性磷酸酶耦联的第二种试剂 (如,对于人抗体,为山羊抗人 IgG Fc 特异性多克隆试剂) 在 37°C 孵育 1 小时。洗涤之后,用 pNPP 底物 (1mg/ml) 对平板进行显影,并在 405-650 的 OD 下进行分析。优选地,表现出最高滴度的小鼠将用于融合。

[0302] 上述 ELISA 测定还可用于筛选对磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 免疫原表现出阳性反应的杂交瘤。亚克隆与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 以高亲和力结合的杂交瘤并进一步表征。可以选择每个杂交瘤中一个保留亲本细胞反应性 (通过 ELISA) 的克隆,用于制成 5-10 小瓶细胞库,在 -140°C 保存并用于抗体纯化。

[0303] 为了纯化抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体,可以在 2 升转瓶中培养所选杂交瘤以进行单克隆抗体纯化。在用蛋白 A- 琼脂糖凝胶 (Pharmacia, Piscataway, N. J.) 进行亲和层析之前,可以过滤并浓缩上清液。洗脱的 IgG 可以通过凝胶电泳和高效液相层析进行检查以确保纯度。缓冲液可以交换为 PBS,并且可以使用 1.43 的消光系数通过 OD280 测定浓度。所述单克隆抗体可以分成小份并存储于 -80°C。

[0304] 为了确定所选抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体是否与特定表位结合,可以使用市售试剂 (Pierce, Rockford, IL) 对每个抗体进行生物素化。可以按照上述方法使用磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 包被的 ELISA 平板,进行使用未标记的单克隆抗体和生物素化的单克隆抗体的竞争研究。生物素化的 mAb 结合可以用链霉亲和素 - 碱性磷酸酶探针进行检测。

[0305] 为了确定纯化抗体的同种型,可以使用对特定同种型抗体特异的试剂进行同种型 ELISA。例如,为了确定人单克隆抗体的同种型,可以用 1 μ g/ml 抗人免疫球蛋白在 4°C 下过夜包被微滴定板的孔。用 1% BSA 封闭后,使平板与 1 μ g/ml 或更少的受试单克隆抗体或纯化的同种型对照在室温下反应 1 到 2 个小时。然后可以用人 IgG1 或人 IgM 特异性的耦联碱性磷酸酶的探针与孔反应。按照上述方法对平板进行显影和分析。

[0306] 可以通过蛋白质印迹进一步测试抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 人 IgG 与磷脂酰肌醇

蛋白聚糖-3 抗原的反应性。简单而言,可制备磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 并使其经受十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜上,用 10% 胎牛血清进行封闭,然后用受试单克隆抗体进行探测。可以使用抗人 IgG 碱性磷酸酶检测人 IgG 结合,并使用 BCIP/NBT 底物片 (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) 进行显影。

[0307] 本发明的抗体的结合特异性还可通过监测抗体与表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的细胞的结合来确定,例如,通过流式细胞术。通常可用编码磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的跨膜形式的表达载体转染细胞系诸如 CHO 细胞系。转染的蛋白可包含标签诸如 myc 标签,以便使用该标签的抗体进行检测;所述标签优选位于 N 末端。本发明的抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的结合可通过用抗体孵育转染的细胞并检测结合的抗体来确定。抗体与转染蛋白上的标签的结合可以用作阳性对照。

[0308] 本发明的抗体对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的特异性可通过使用确定所述抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合的相同方法确定抗体是否与其他蛋白(如磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-4 或磷脂酰肌醇蛋白聚糖-6)或与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 自身结合来进一步研究。

[0309] 免疫轭合物

[0310] 另一方面,本发明的特征为与诸如细胞毒素、药物(如免疫抑制剂)或放射性毒素等治疗性部分轭合的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体或其片段。此类轭合物在本文被称为“免疫轭合物”。包含一种或多种细胞毒素的免疫轭合物被称作“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害(如杀伤细胞)的任何药剂。实例包括:紫杉醇、松胞菌素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷、表鬼臼毒噻吩糖苷(tenoposide)、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、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。治疗剂还包括例如,抗代谢物(如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷化剂(如氮芥、硫代苯丁酸氮芥(Thioepa chlorambucil)、左旋苯丙氨酸氮芥、亚硝基脲氮芥(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素 C 和顺二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(如柔红霉素(以前的道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(如放线菌素 D(以前的更生霉素)、博来霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC))和抗有丝分裂试剂(如长春新碱和长春花碱)。

[0311] 可与本发明的抗体轭合的治疗性细胞毒素的其他优选实例包括倍癌霉素、刺孢霉素、美登素(maytansine)和 auristatins 以及它们的衍生物。刺孢霉素抗体轭合物的实例是可商业获得的(Mylotarg®; American Home Products)。

[0312] 可以利用本领域使用的连接体技术将细胞毒素与本发明的抗体轭合。已经用于将细胞毒素与抗体轭合的连接体类型的实例包括但不限于脲、硫醚、酯、二硫化物和含肽的连接体。可以选择,例如,在溶酶体区室内易被低 pH 切割或易被蛋白酶切割的连接体,该蛋白酶例如是在肿瘤组织中优先表达的蛋白酶,诸如组织蛋白酶(如组织蛋白酶 B、C、D)。

[0313] 细胞毒素的实例描述于例如美国专利第 6,989,452、7,087,600 和 7,129,261 号和 PCT 申请第 PCT/US02/17210、PCT/US2005/017804、PCT/US06/37793、PCT/US06/060050、PCT/US2006/060711、WO/2006/110476 号和美国专利申请第 60/891,028 号,其全部通过引

用以其整体并入本文。关于细胞毒素的类型、连接体和用于将治疗剂耦合至抗体的方法的进一步讨论,另参见 Saito, G. 等人 (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P. A. 等人 (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T. M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. 和 Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P. D. 和 Springer, C. J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。

[0314] 本发明的抗体也可以与放射性同位素耦合,以产生细胞毒性放射性药物,也被称作放射性免疫耦合物。可与抗体耦合以用于诊断或治疗的放射性同位素的实例包括但不限于碘¹³¹、钬¹¹¹、钇⁹⁰和镥¹⁷⁷。制备放射性免疫复合物的方法在本领域中已经建立。放射性免疫复合物的实例是商业可获得的,包括 **Zevalin®** (IDEC Pharmaceuticals) 和 **Bexxar®** (Corixa Pharmaceuticals), 并且可使用类似的方法使用本发明的抗体制备放射性免疫复合物。

[0315] 本发明的抗体耦合物可用于改变特定的生物应答,且药物部分不应理解为局限于经典的化疗剂。例如,药物部分可以是具有需要的生物活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可包括,例如,具有酶活性的毒素或其活性片段,诸如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,诸如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或生物应答调节物,诸如淋巴因子、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。

[0316] 用于将此类治疗性部分耦合至抗体的技术是公知的,参见,如 Arnon 等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy” (癌症治疗中用于免疫靶向药物的单克隆抗体),于 *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (单克隆抗体和癌症治疗), Reisfeld 等人 (编), 第 243-56 页 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等人,“Antibodies For Drug Delivery” (用于药物递送的抗体), 于 *Controlled Drug Delivery* (控制的药物递送) (第 2 版), Robinson 等人 (编), 第 623-53 页 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review” (癌症治疗中细胞毒剂的抗体载体: 综述), 于 *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (单克隆抗体 '84: 生物学和临床应用), Pinchera 等人 (编), 第 475-506 页 (1985); Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy” (放射性标记的抗体在癌症治疗中的治疗用途的分析、结果和前景), 于 *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (用于癌症检测和治疗的单克隆抗体), Baldwin 等人 (编), 第 303-16 页 (Academic Press 1985) 和 Thorpe 等人, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。

[0317] 双特异性分子

[0318] 另一方面,本发明的特征在于包含本发明抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体或其片段的双特异性分子。本发明的抗体或其抗原结合部分可以衍生或连接至另一个功能分子如另一肽或蛋白 (如另一抗体或受体的配基), 以生成与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。实际上,本发明的抗体可衍生或连接至多于一个的其他功能分子,以生成与两个以上不同位点和 / 或靶分子结合的多特异性分子; 此类多特异性分子亦包括在本

文所用的术语“双特异性分子”中。为了生成本发明的双特异性分子,本发明的抗体可以功能连接(如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方法)至一个或多个其他结合分子诸如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,以得到双特异性分子。

[0319] 因此,本发明包括的双特异性分子包含针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的至少一个第一结合特性和针对第二个靶表位的第二结合特性。在本发明的特定实施方案中,第二靶表位为Fc受体,如人Fc γ RI(CD64)或人Fc α 受体(CD89)。因此,本发明包括能与表达Fc γ R或Fc α R的效应细胞(如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞(PMN))和表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的靶细胞二者结合的双特异性分子。这些双特异性分子将表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的细胞靶向效应细胞,并触发Fc受体介导的效应细胞活性,诸如吞噬表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的细胞、细胞介导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、细胞因子释放或超氧化物阴离子的生成。

[0320] 在其中双特异性分子具有多特异性的本发明的实施方案中,除了抗Fc结合特异性和抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3结合特异性之外,所述分子还可包括第三结合特异性。在一实施方案中,所述第三结合特异性为抗增强因子(EF)部分,如与细胞毒活性中涉及的表面蛋白结合的分子,并因而增强针对靶细胞的免疫应答。“抗增强因子部分”可以是与给定分子(如抗原或受体)结合并进而增强Fc受体或靶细胞抗原的结合决定簇的效应的抗体、功能性抗体片段或配基。“抗增强因子部分”可以与Fc受体或靶细胞抗原结合。可选地,抗增强因子部分可以与不同于第一和第二结合特异性所结合的实体的实体结合。例如,抗增强因子部分可以与细胞毒性T细胞结合(如通过CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1或增强对靶细胞的免疫应答的其他免疫细胞)。

[0321] 在一实施方案中,本发明的双特异性分子包含至少一个抗体或其抗体片段作为结合特异性,包括如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb或单链Fv。抗体还可以是轻链或重链二聚体或其任何最小片段,诸如授予Ladner等人的美国专利第4,946,778号(其内容通过引用明确并入)中描述的Fv或单链构建体。

[0322] 在一实施方案中,Fc γ 受体结合特异性由单克隆抗体提供,所述单克隆抗体的结合不被人免疫球蛋白G(IgG)阻止。如本文所用,术语“IgG受体”指位于染色体1上的8个 γ 链基因中的任何一个。这些基因编码总共12个跨膜或可溶受体同种型,这些同种型分为三个Fc γ 受体类别:Fc γ RI(CD64)、Fc γ R II(CD32)和Fc γ R III(CD16)。在一优选实施方案中,Fc γ 受体为人高亲和力Fc γ RI。所述人Fc γ RI为对单体IgG表现出高亲和力(10^8 - 10^9 M⁻¹)的72kDa分子。

[0323] 某些优选抗Fc γ 单克隆抗体的制备和表征在PCT公布WO 88/00052和授予Fanger等人的美国专利第4,954,617号中描述,其教导通过引用完整并入本文。这些抗体在与受体的Fc γ 结合位点不同的位点处与Fc γ RI、Fc γ R II或Fc γ R III的表位结合,因而它们的结合基本上不被生理水平的IgG阻止。在本发明中有用的具体抗Fc γ RI抗体为mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62和mAb 197。制备mAb 32的杂交瘤可从美国典型培养物保藏中心获取(ATCC登录号为HB9469)。在其他实施方案中,抗Fc γ 受体抗体为单克隆抗体22的人源化形式(H22)。H22抗体的制备和表征如Graziano、R. F.等(1995)J. Immunol 155(10):4996-5002和PCT公布94/10332(Tempest等)所述。生成H22抗体的细胞系在美国典型培养物保藏中心的保存名称为HA022CL1,保藏号为CRL 11177。

[0324] 在其他优选实施方案中, Fc 受体的结合特异性由与人 IgA 受体 (如 Fc- α 受体 (Fc α RI (CD89)) 结合的抗体提供, 所述抗体的结合优选地不被人免疫球蛋白 A (IgA) 阻止。术语“IgA 受体”意在包括位于染色体 19 上的一个 α 基因 (Fc α RI) 的基因产物。已知该基因编码多个可选剪接的 55 到 110kDa 的跨膜同种型。Fc α RI (CD89) 在单核细胞 / 巨噬细胞、嗜酸性和嗜中性粒细胞上组成型表达但是在非效应细胞群中则不表达。Fc α RI 具有对 IgA1 和 IgA2 二者的中等亲和力 ($\approx 5 \times 10^7 \text{M}^{-1}$), 该亲和力在暴露于细胞因子诸如 G-CSF 或 GM-CSF 时增加 (Morton, H. C. 等 (1996) *Critical Reviews in Immunology* **16**:423-440)。已描述了四种 Fc α RI 特异性单克隆抗体, 它们被鉴别为 A3、A59、A62 和 A77, 它们在 IgA 配基结合结构域外与 Fc α RI 结合 (Monteiro, R. C. 等人 (1992) *J. Immunol.* **148**:1764)。

[0325] Fc α RI 和 Fc γ RI 是用于本发明双特异性分子的优选触发受体, 原因在于它们: (1) 主要表达于免疫效应细胞, 如单核细胞、PMN、巨噬细胞和树突细胞; (2) 表达水平高 (如每个细胞 5,000-100,000); (3) 是细胞毒活性 (如 ADCC、吞噬) 的介导者; 和 (4) 介导靶向它们的抗原 (包括自体抗原) 的增强的抗原呈递。

[0326] 虽然优选人单克隆抗体, 但是可用于本发明的双特异性分子的其他抗体是鼠单克隆抗体、嵌合单克隆抗体和人源化单克隆抗体。

[0327] 本发明的双特异性分子可以通过使用本领域已知方法辄合组成结合特异性如抗 FcR 和抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 结合特异性制备。例如, 可以单独生成双特异性分子的每种结合特异性, 然后将其彼此辄合。当结合特异性为蛋白质或肽时, 有多种偶联剂或交联剂可以用于共价辄合。交联剂的实例包括蛋白 A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺-S-乙酰-硫代乙酸酯 (SATA)、5,5'-二硫代双 (2-硝基苯甲酸) (DTNB)、邻苯撑双马来酰亚胺 (oPDM)、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫) 丙酸酯 (SPDP) 和磺酰琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚氨基甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (磺酰-SMCC) (如, 参见 Karpovsky 等人 (1984) *J. Exp. Med.* **160**:1686; Liu, MA 等人 (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8648)。其他方法包括 Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan 等人 (1985) *Science* **229**:81-83 和 Glennie 等人 (1987) *J. Immunol.* **139**:2367-2375) 中描述的方法。优选的辄合剂为 SATA 和磺酰-SMCC, 二者均可从 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) 获得。

[0328] 当结合特异性为抗体时, 它们可以通过两个重链的 C 末端铰链区的巯基键合来辄合。在特别优选的实施方案中, 对铰链区进行修饰以使其在辄合之前包含奇数个、优选地一个巯基残基。

[0329] 可选地, 两个结合特异性可以编码于同一个表达载体, 并在同一宿主细胞中表达和组装。当双特异性分子为 mAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')₂ 或配基 x Fab 融合蛋白时, 此方法尤为有用。本发明双特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合决定簇的单链分子, 或者是包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两个单链分子。例如, 制备双特异性分子的方法描述于美国专利第 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498 和 5,482,858 号, 其均通过引用明确并入本文。

[0330] 双特异性分子与其特异靶的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA)、FACS 分析、生物测定 (如生长抑制) 或蛋白质印迹测定确认。这些方法的每一种通常都是通过使用特异性针对感兴趣的复合体的标记试剂 (如抗体), 来检测特

别感兴趣的蛋白-抗体复合物的存在。例如, FcR-抗体复合物可以使用例如识别并特异结合抗体-FcR复合物的酶联抗体或抗体片段进行检测。可选地, 可以通过多种其他免疫测定的任一种来检测复合物。例如, 抗体可以进行放射性标记, 并用于放射免疫测定 (RIA) (例如, 参见 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques (放射免疫测定原理: 放射配基测定技术第七次培训课程), The Endocrine Society, 1986 年 3 月, 其通过引用并入本文)。放射性同位素可以通过诸如使用 γ 计数器、闪烁计数器的方法或通过放射自显影进行检测。

[0331] 药物组合物

[0332] 另一方面, 本发明提供含有与药学可接受的载体一起配制的一种或组合的本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分的组合物, 如药物组合物。此类组合物可包括一种或组合的 (如两种或更多不同的) 本发明的抗体或免疫轭合物或双特异性分子。例如, 本发明的药物组合物可包含与靶抗原上的不同表位结合或者具有互补活性的抗体 (或免疫轭合物或双特异性分子) 的组合。

[0333] 本发明的药物组合物还可通过组合治疗 (即与其他药剂组合) 施用。例如, 组合治疗可包括与至少一种其他抗炎剂或免疫抑制剂组合的本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体。可用于组合治疗的治疗剂的实例在下面有关本发明的抗体的用途部分进行更详细的说明。

[0334] 如本文所用, “药学可接受的载体” 包括生理相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂以及类似物。优选地, 所述载体适合进行静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用 (如通过注射或输注)。根据施用路径, 可将活性化合物 (即抗体、免疫轭合物或双特异性分子) 包被在材料内, 以保护该化合物免受酸和可使该化合物失活的其他自然条件的作用。

[0335] 本发明药物化合物可包括一种或多种药学可接受的盐。“药学可接受的盐” 指保持母化合物的所需生物活性而不带来任何不想要的毒理效应的盐 (例如, 参见 Berge, S. M. 等人 (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。此类盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些衍生自无毒无机酸诸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸以及类似无毒无机酸的酸加成盐, 以及那些衍生自无毒有机酸诸如脂肪族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香酸、脂肪族和芳香族磺酸以及类似无毒有机酸的酸加成盐。碱加成盐包括那些衍生自碱土金属诸如钠、钾、镁和钙以及类似碱土金属的碱加成盐, 以及那些衍生自无毒有机胺诸如 N, N' -二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因和类似无毒有机胺的碱加成盐。

[0336] 本发明的药物组合物还可包括药学可接受的抗氧化剂。药学可接受抗氧化剂的实例包括: (1) 水溶性抗氧化剂, 诸如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、亚硫酸氢钠、亚硫酸钠和类似水溶性抗氧化剂; (2) 脂溶性抗氧化剂, 诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚 (BHA)、丁羟甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚和类似脂溶性抗氧化剂; 和 (3) 金属螯合剂, 诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸和类似金属螯合剂。

[0337] 可用于本发明的药物组合物的合适的水和非水载体的实例包括: 水、乙醇、多元醇 (诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇和类似多元醇) 及其合适的混合物; 植物油, 诸如橄榄油; 和

可注射的有机酯,诸如油酸乙酯。例如,可通过使用包被材料(诸如卵磷脂)、通过维持所需的颗粒大小(在分散剂的情况下)以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0338] 这些组合物还可包含佐剂,诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过上述的灭菌程序和通过加入各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸以及类似抗菌剂和抗真菌剂)来确保防止微生物存在。组合物中还可加入等渗剂,诸如糖、氯化钠和类似等渗剂。此外,注射药物形式的延长吸收可通过加入延缓吸收剂诸如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0339] 药学可接受的载体包括无菌水溶液或分散剂以及用于即时制备无菌可注射溶液或分散剂的无菌粉末。用于药学活性物质的此类介质和试剂的使用是本领域已知的。除了与活性化合物不相容的介质或试剂外,包括任何常规介质或试剂在本发明的药物组合物中的使用。补充的活性化合物也可以掺入到组合物中。

[0340] 治疗组合物通常必须无菌,并在生产和储存条件下稳定。组合物可以配制成溶液、微乳状液、脂质体或适合高药物浓度的其他有序结构。载体可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇以及类似多元醇)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。例如,可通过使用包被材料(诸如卵磷脂)、通过维持所需的颗粒大小(在分散剂的情况下)以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇或氯化钠)。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包括延缓吸收剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来实现。

[0341] 无菌注射溶液可通过将活性化合物以所需的量掺入适当的溶剂中,并根据需要加入上面列举的成分中的一种或其组合,然后进行微过滤灭菌来制备。一般而言,分散剂是通过将活性组合物掺入包含基础分散介质和上面列举的其他所需成分的无菌载体中制备的。在无菌粉末用于制备无菌注射溶液的情况下,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥(冻干法),这些方法从预先无菌过滤的溶液中生成所述活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0342] 可与载体材料组合以生成单一剂量形式的活性成分的量根据治疗对象和特定的施用模式而有所不同。可与载体材料组合以生成单一剂量形式的活性成分的量一般为产生治疗效果的一组合物量。一般而言,以100%计,此量范围为约0.01%至约99%的活性成分,优选为约0.1%至约70%、最优选地约1%至约30%的活性成分与药学可接受的载体组合。

[0343] 对剂量方案进行调整以提供最佳的所需应答(如治疗应答)。例如,可施用单个丸药,可按时间施用几个分开的剂量,或根据治疗情况的紧急程度而按比例降低或增加剂量。特别有利的是配制成剂量单位形式的肠胃外组合物,以便于施用和保持剂量一致。如本文所用,剂量单位形式指适合用作所治疗的患者的单位剂量的物理离散单位;每个单位包含经计算产生所需治疗效果的预定量的活性化合物与必需的药物载体的联合。本发明剂量单位形式的规格由下列因素规定并直接取决于这些因素:(a) 活性化合物的独特特性和所需达到的特定治疗效果,和(b) 本领域中固有的对于配制用于治疗个体敏感性的此类活性化合物的限制。

[0344] 对于抗体的施用,剂量范围为从0.0001到100mg/kg患者体重,更常用的为0.01到5mg/kg患者体重。例如剂量可为0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg范围内。示例性治疗方案限定施用频率为每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每3个月一次或每3到6个月一次。本发明抗

磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的优选剂量方案包括经静脉施用的 1mg/kg 体重或 3mg/kg 体重,所述抗体按下列剂量方案之一施用:(i) 每 4 周一次,共 6 次,然后每 3 个月一次;(ii) 每三周一次;(iii) 3mg/kg 体重一次,然后按 1mg/kg 体重,每 3 周一次。

[0345] 在一些方法中,同时施用具有不同结合特异性的两种或多种单克隆抗体,这种情况下每种抗体的施用剂量均在指示的范围内。抗体通常多时机施用。例如,单次剂量之间的间隔可为每周、每月、每三个月或每年。间隔也可不固定,而是通过测量患者体内针对靶抗原的抗体的血液水平来确定。在一些方法中,调节剂量以使血浆抗体浓度达到约 1-1000 μ g/ml,而在一些方法中,达到约 25-300 μ g/ml。

[0346] 可选地,抗体可作为缓释制剂施用,这种情况只需较少频率的施用。剂量和频率根据所述抗体在患者体内的半衰期而有所不同。一般而言,人抗体的半衰期最长,接下来是人源化抗体、嵌合抗体和非人抗体。施用的剂量和频率可根据所述处理是预防性的还是治疗性的而有所不同。在预防性应用中,在长时间内以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者要余生持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对短的间隔施用相对高的剂量,直至疾病的进展降低或终止,且优选直至患者表现出疾病症状的部分或完全改善。此后,该患者可以按预防性方案用药。

[0347] 本发明的药物组合中活性成分的实际剂量水平可变化,以获得有效实现对特定患者、组合物和施用模式的所需治疗应答且对患者无毒的活性成分的量。所选剂量水平将取决于多种药物动力学因素,包括采用的特定的本发明组合物或其酯、盐或酰胺的活性,施用路径,施用时间,所用的特定化合物的排泄速率,治疗的持续时间,与所用的特定组合物一起使用的其他药物、化合物和 / 或材料,所治疗的患者的年龄、性别、体重、状态、身体状况和之前的治疗历史,以及医学领域熟知的类似因素。

[0348] “治疗有效剂量”的本发明的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体优选导致疾病症状的严重度的降低,无疾病症状期的频率和持续时间的增加或者防止由于疾苦而带来的损害或无能力。例如,对于磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3+ 肿瘤的治疗,与未治疗受试者相比,“治疗有效剂量”优选抑制细胞生长或肿瘤生长至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 60%和甚至更优选地至少约 80%。化合物抑制肿瘤生长的能力可在预测对人肿瘤效力的动物模型系统中进行评估。可选地,组合物的此性质可通过测试化合物抑制细胞生长的能力进行评估,此类抑制可通过本领域技术人员已知的方法在体外测量。治疗有效量的治疗化合物可减小肿瘤大小,或者以其他方式改善受试者的症状。本领域普通技术人员能够根据受试者体重、受试者症状的严重度和选择的特定组合物或施用路径等因素来确定这些量。

[0349] 本发明的组合物可使用本领域已知的一种或多种方法通过一种或多种施用路径施用。本领域技术人员了解,施用路径和 / 或施用模式将根据所需结果不同而有所不同。本发明的抗体的优选施用路径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其他肠胃外施用路径,例如通过注射或输注。如本文所用,习语“肠胃外施用”指经肠施用和局部施用之外的施用模式,一般为通过注射,其包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊髓内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0350] 可选地,本发明的抗体可通过非肠胃外路径施用,诸如局部、表皮或黏膜路径施

用,例如,鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部。

[0351] 活性化合物可与保护该化合物不被快速释放的载体一起制备,诸如控制释放制剂,包括植入体、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可使用生物可降解的、生物相容的聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酞类、聚乙醇酸、胶原、聚正酯类和聚乳酸。制备此类制剂的许多方法已获得专利或者为本领域的技术人员普遍所知。例如,参见, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems(缓释和控制释放药物递送系统), J. R. Robinson 编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0352] 治疗组合物可使用本领域已知的医疗设备施用。例如,在优选实施方案中,本发明的治疗组合物可使用无针皮下注射设备施用,诸如美国专利第 5,399,163 ;5,383,851 ;5,312,335 ;5,064,413 ;4,941,880 ;4,790,824 或 4,596,556 号中披露的设备。可用于本发明的公知的植入体和模块的实例包括:美国专利第 4,487,603 号(披露了用于按控制的速率分配药物的可植入的微输注泵);美国专利第 4,486,194 号(披露了通过皮肤施用药物的治疗设备);美国专利第 4,447,233 号(披露了以精确输注速率递送药物的药物输注泵);美国专利第 4,447,224 号(披露了用于持续递送药物的流量可变的植入式输注装置);美国专利第 4,439,196 号(披露了具有多室隔间的渗透药物递送系统);和美国专利第 4,475,196 号(披露了渗透药物递送系统)。这些专利均通过引用并入本文。许多其他此类植入体、递送系统和模块是本领域的技术人员已知的。

[0353] 在某些实施方案中,可配制本发明的人单克隆抗体以确保在体内的适当分配。例如,血脑屏障(BBB)可阻止许多高度亲水的化合物。为了确保本发明的治疗化合物穿过 BBB(如果需要),可以将它们制成例如脂质体。有关制备脂质体的方法,参见,例如美国专利第 4,522,811 ;5,374,548 和 5,399,331 号。脂质体可包含选择性运输到特定细胞或器官的一个或多个部分,进而增强靶向药物递送(例如,参见 V. V. Ranade(1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(例如,参见授予 Low 等人的美国专利 5,416,016);甘露糖苷(Umezawa 等人,(1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038);抗体(P. G. Bloeman 等人(1995) FEBS Lett. 357:140;M. Owais 等人(1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180);表面活性剂蛋白 A 受体(Briscoe 等人(1995) Am. J. Physiol. 1233:134);p120(Schreier 等人(1994) J. Biol. Chem. 269:9090);另参见 K. Keinänen ;M. L. Laukkanen(1994) FEBS Lett. 346:123 ;J. J. Killian ;I. J. Fidler(1994) Immunomethods 4:273。

[0354] 用途和方法

[0355] 本发明的抗体(特别是人抗体)、抗体组合物和方法有许多体外和体内诊断和治疗用途包括磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 介导的病症的诊断和治疗。例如,这些分子可体外或离体施用到培养的细胞或体内施用至人受试者,以治疗、预防和诊断各种病症。如本文所用,术语“受试者”意在包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物,如哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类、绵羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖动物和爬行动物。优选的受试者包括具有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 活性介导的病症的人患者。这些方法尤其适合治疗具有与异常的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 表达相关的病症的人患者。当针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的抗体与另一种药剂一起施用,它们二者可以顺序施用或同时施用。

[0356] 鉴于本发明的抗体对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的特异性结合,本发明的抗体可用

于特异地检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 在细胞表面的表达,并且此外还可用于通过免疫亲和纯化来纯化磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3。

[0357] 此外,鉴于磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 在多种肝肿瘤细胞的表达,本发明的人抗体、抗体组合物和方法可用于治疗具有肝肿瘤生成病症(如特征在于存在表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的肿瘤细胞,例如,HCC 细胞的病症)的受试者。

[0358] 在一实施方案中,本发明的抗体(如人单克隆抗体、多特异性和双特异性分子和组合物)可用于检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的水平或在其膜表面包含磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的细胞的水平,然后可将这些水平与某些疾病症状联系起来。可选地,所述抗体可用于抑制或阻止磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 功能,这又可与防止或改善某些疾病症状联系起来,进而暗示磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 是这些疾病的介导者。这可通过使样品和对照样品在允许所述抗体和磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 之间形成复合体的条件下与抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体接触来实现。检测并比较样品和对照中所述抗体和磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 之间形成的任何复合体。

[0359] 在另一实施方案中,可对本发明的抗体(如人抗体、多特异性和双特异性分子和组合物)进行与体外治疗或诊断用途相关的结合活性的初始测试。例如,可使用下面的实施例中描述的流式细胞术测定测试本发明的组合物。

[0360] 本发明的抗体(如人抗体、多特异性和双特异性分子、免疫轭合物和组合物)在磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 相关的疾病的治疗和诊断中还有其他用途。例如,人单克隆抗体、多特异性或双特异性分子和免疫轭合物可用于在体内或体外引起下列生物活动中的一种或多种:抑制表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的细胞的生长和/或杀死该细胞;在存在人效应细胞的情况下,介导表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的细胞的吞噬或 ADCC 作用;或阻止磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 配基与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合。

[0361] 在特定实施方案中,抗体(如人抗体、多特异性和双特异性分子和组合物)用于在体内治疗、预防或诊断多种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 相关的疾病。磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 相关的疾病实例包括但不限于 HCC 和其他肝癌。

[0362] 本发明的抗体组合物(如人单克隆抗体、多特异性和双特异性分子和免疫轭合物)在体内和体外的合适施用路径在本领域是公知的,并可由本领域技术人员进行选择。例如,抗体组合物可通过注射(如静脉内或皮下)施用。所用的分子的合适剂量将取决于受试者的年龄和体重,以及抗体组合物的浓度和/或制剂。

[0363] 如前所述,本发明的人抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体可与一种或更多其他治疗剂共同施用,所述治疗剂如细胞毒剂、放射性毒剂或免疫抑制剂。抗体可连接至所述剂(作为免疫复合体)或与所述剂分开施用。在后一种情况(分开施用)下,抗体可在所述剂之前、之后或与所述剂同时施用,或可与其他已知疗法(如抗癌疗法,如辐射)共同施用。此类治疗剂包括但不限于抗肿瘤剂,诸如多柔比星(阿霉素)、顺铂博来霉素硫酸盐、亚硝基脲氮芥、苯丁酸氮芥和环磷酰胺羟脲,这些治疗剂本身仅在对患者具有毒性或亚毒性的水平时才有效。顺铂以 100mg/剂量静脉内施用,每四周一次;而阿霉素以 60-75mg/ml 剂量静脉内施用,每 21 天一次。本发明的人抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体或其抗原结合片段与化疗剂的共同施用提供了两种抗癌剂,它们通过不同的对人肿瘤细胞产生细胞毒作用的机制起作用。此共同施用可以解决由于发展抗药性或者肿瘤细胞抗原性改变(这将使它们对

抗体没有反应性)所引起的问题。

[0364] 靶特异性的效应细胞,如连接至本发明的组合物(如人抗体、多特异性和双特异性分子)的效应细胞,也可用作治疗剂。靶向的效应细胞可以是人白细胞,诸如巨噬细胞、嗜中性粒细胞或单核细胞。其他细胞包括嗜酸性粒细胞、自然杀伤细胞和其他带有 IgG 或 IgA 受体的细胞。如果需要,可从要治疗的受试者获取效应细胞。靶特异性效应细胞可作为于生理可接受的溶液中的细胞的悬浮液来施用。施用的细胞数可在 10^8 - 10^9 数量级范围内,但是可根据治疗目的而有所不同。一般而言,该量足以实现在靶细胞(如表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的肿瘤细胞)的定位并通过如吞噬实现细胞杀伤。施用路径也可有所不同。

[0365] 使用靶特异性效应细胞的疗法可与清除靶细胞的其他技术联合进行。例如,使用本发明的组合物(如人抗体、多特异性和双特异性分子)和/或装备了这些组合物的效应细胞的抗肿瘤疗法可与化学疗法联合使用。此外,组合免疫疗法可用于指导两种不同的细胞毒效应细胞群排斥肿瘤细胞。例如,连接至抗 Fc- γ RI 或抗 CD3 的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体可与 IgG 受体或 IgA 受体特异结合剂联合使用。

[0366] 本发明的双特异性和多特异性分子也可用于调节 Fc γ R 或效应细胞上的 Fc γ R 水平,如通过遮盖并清除细胞表面的受体。抗 Fc 受体的混合物也可用于此目的。

[0367] 存在补体的情况下,也可使用具有补体结合位点的本发明的组合物(如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、多特异性和双特异性分子和免疫轭合物),所述补体结合位点诸如来自与补体结合的 IgG1、IgG2 或 IgG3 或 IgM 的部分。在一实施方案中,使用本发明的结合剂和适当的效应细胞对包含靶细胞的细胞群进行的离体治疗,可通过添加补体或包含补体的血清来补充。通过结合补体蛋白,可提高对包被有本发明结合剂的靶细胞的吞噬作用。在另一实施方案中,包被有本发明的组合物(如人抗体、多特异性和双特异性分子)的靶细胞也可被补体溶解。在又一实施方案中,本发明的组合物不激活补体。

[0368] 本发明的组合物(如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、多特异性和双特异性分子和免疫轭合物)还可与补体一起施用。在某些实施方案中,本公开提供包含人抗体、多特异性或双特异性分子以及血清或补体的组合物。当补体与人抗体、多特异性或双特异性分子紧密接近时,这些组合物可以是有利的。可选地,本发明的人抗体、多特异性或双特异性分子可与补体或血清分开施用。

[0369] 包含本发明的抗体组合物(如人抗体、双特异性或多特异性分子或免疫轭合物)和使用说明的试剂盒同样属于本发明范畴。试剂盒还可包含一种或多种其他试剂,诸如免疫抑制剂、细胞毒剂或放射性毒剂或一种或多种其他的本发明的人抗体(如具有互补活性的人抗体,该抗体与第一人抗体结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗原中的不同表位)。

[0370] 因此,使用本发明的抗体组合物治疗的患者可另外施用(在施用本发明的人抗体之前、与之同时或之后)其他治疗剂,诸如细胞毒剂或放射性毒剂,其可增强或放大大人抗体的治疗效果。

[0371] 在其他实施方案中,可另外使用调节(如增强或抑制)Fc γ 或 Fc γ 受体表达或活性的药剂来治疗受试者,例如,用细胞因子治疗受试者。在使用多特异性分子治疗过程中施用的优选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)。

[0372] 本发明的组合物(如人抗体、多特异性和双特异性分子)还可用于靶向表达 Fc γ R

或磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的细胞,例如用于标记此类细胞。对于此用途,可将结合剂连接至可检测的分子。因此,本发明提供在离体或体外定位表达Fc受体诸如Fc γ R或磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的细胞的方法。所述可检测标记可以是例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶的辅因子。

[0373] 在特定实施方案中,本发明提供检测样品中磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗原的存在或测量磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗原的量的方法,所述方法包括用与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3特异性结合的人单克隆抗体或其抗原结合部分,在允许所述抗体或其部分与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3之间形成复合体的条件下,接触所述样品和对照样品。然后检测复合体的形成,其中,样品与对照样品相比的复合体形成差异指示该样品中存在磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗原。

[0374] 在其他实施方案中,本发明提供了治疗受试者中由磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3介导的病症如HCC和其他肝癌的方法。

[0375] 在又一实施方案中,通过将化合物(如治疗剂、标记、细胞毒素、放射性毒素、免疫抑制剂等)连接至抗体,本发明的免疫轭合物可用于将此类化合物靶向至具有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3细胞表面受体的细胞。例如,抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体可轭合至下列文献中描述的毒素化合物中的任一种:美国专利第6,281,354和6,548,530号、美国专利公布第20030050331、20030064984、20030073852和20040087497号,或W003/022806。因此,本发明还提供了在离体或体内定位表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的细胞的方法(如使用可检测的标记,如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶的辅因子)。可选地,通过将细胞毒素或放射性毒素靶向到磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3,免疫轭合物可用于杀伤具有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3细胞表面受体的细胞。

[0376] 本发明进一步通过下面的实施例进行阐述,不应将这些实施例理解为进一步的限制。本申请引用的所有图和所有参考文献、专利和公开的专利申请明确地通过引用并入本文。

实施例

[0377] 实施例1:针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的人单克隆抗体的制备

[0378] 抗原

[0379] 构建了重组融合蛋白磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3-his,其包含连接于非磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3多肽,即组氨酸标签的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3蛋白的胞外域。磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3-his通过标准的重组方法产生,并用作免疫接种的抗原。此外,转染有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3-Myc表达构建体的CHO细胞和细胞系Hep-G2也用作免疫接种的抗原。

[0380] 转基因HuMAb小鼠[®]和KM小鼠[®]

[0381] 用表达人抗体基因的转基因HuMAb小鼠[®]的HCo17品系和转基因转染色体小鼠的KM品系制备针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的完全人单克隆抗体。按W0/2005/058815(其通过引用整体并入本文)中的描述构建HCo17品系。按W0 02/43478(其通过引用整体并入本文)中的描述构建KM品系。

[0382] HuMAb小鼠和KM小鼠免疫接种

[0383] 为了产生针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的完全人单克隆抗体,用CHO-S细胞中表

达的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3-his 蛋白、表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3-Myc 蛋白的 CHO 细胞和 Hep-G2 细胞免疫接种 HuMAb 小鼠[®]和 KM 小鼠[®]的小鼠。用于 HuMAb 小鼠[®]的一般性免疫接种方案描述于 Lonberg, N. 等人 (1994) Nature 368(6474):856-859; Fishwild, D. 等人 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 和 PCT 公布 WO 98/24884。第一次输注抗原时, 小鼠为 6-16 周龄。使用磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 融合蛋白的纯化的重组制品 (5-25 μ g) 或磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 表达细胞 (1×10^7 个细胞) 免疫接种每只 HuMAb 小鼠[®]和 KM 小鼠[®]。

[0384] 转基因小鼠用于完全弗氏佐剂或 Ribi 佐剂中的抗原腹膜内 (IP)、皮下 (Sc) 或通过足垫 (FP) 免疫接种, 然后用于不完全弗氏佐剂或 Ribi 佐剂中的抗原 IP、Sc 或 FP 免疫接种 3-21 天 (最多总计 12 次免疫接种)。通过眼眶后采血检测免疫应答。通过 ELISA (如下文所述) 和 FACS 对血浆进行筛选, 并将具有足够的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 人免疫球蛋白滴度的小鼠用于融合。在处死并摘除脾之前 3 和 2 天, 用抗原静脉内对小鼠加强免疫。每种抗原通常进行 10 至 35 次融合。每种抗原免疫接种数十只小鼠。

[0385] 产生抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的 HuMAb 小鼠[®]或 KM 小鼠[®]的选择

[0386] 为了选择产生与磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合的抗体的 HuMAb 小鼠[®]或 KM 小鼠[®], 通过 Fishwild, D. 等人 (1996) (同上) 描述的 ELISA 测试免疫接种的小鼠的血清。简单而言, 使用于 PBS 中的 1-2 μ g/ml 的纯化的重组磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 以 50 μ l/孔包被微滴定板, 4°C 孵育过夜, 然后用 200 μ l/孔的于 PBS/吐温 (0.05%) 中的 5% 鸡血清封闭。向每个孔中加入来自磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 免疫接种的小鼠的血浆稀释液, 并在室温下孵育 1-2 小时。用 PBS/吐温洗涤平板, 然后将其与耦联辣根过氧化物酶 (HRP) 的山羊抗人 IgG Fc 多克隆抗体在室温下孵育 1 小时。洗涤后, 用 ABTS 底物 (Sigma, A-1888, 0.22mg/ml) 对平板进行显影, 并通过分光光度计在 OD 415-495 分析。

[0387] 来自免疫接种的小鼠的血清然后进一步通过流式细胞术筛选与表达重组人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的细胞系但不与未表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的对照细胞系的结合。简而言之, 通过将表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 CHO 细胞与抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体以 1:20 稀释孵育评估抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的结合。洗涤细胞, 并用 FITC-标记的抗人 IgG Ab 检测结合。使用 FACScan 流式细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 进行流式细胞术分析。使用发展最高的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体滴度的小鼠进行融合。融合如下文所述进行, 并通过 ELISA 和 FACS 测试杂交瘤上清液的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 活性。

[0388] 产生针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的人单克隆抗体的杂交瘤的制备:

[0389] 从 HuMAb 小鼠[®]或 KM 小鼠[®]分离的小鼠脾细胞使用基于电场的电融合、使用 Cyto Pulse 大室细胞融合电穿孔仪 (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) 进行融合。然后筛选所得杂交瘤的抗原特异性抗体的产生。来自免疫接种的小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬浮物与 SP2/0 非分泌型小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL 1581) 使用基于电场的电融合、使用 Cyto Pulse 大室细胞融合电穿孔仪 (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) 进行融合。将细胞以大约 1×10^4 个细胞/孔铺板平底微滴定板上, 然后在选择性培养基中孵育大约两周, 该选择性培养基在加有 5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50mg/ml 庆大霉素和 1x HAT (Sigma, CRL P-7185) 的 DMEM (Mediatech, CRL 10013, 含高葡萄糖、L-谷氨酰胺

胺和丙酮酸钠) 中含有 10% 胎牛血清、10% P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) 条件培养基、3-5% origen (IGEN)。1-2 周后, 在用 HT 取代 HAT 的培养基上培养细胞。然后通过 ELISA 和 FACS (如上所述) 从各个孔中筛选人抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 单克隆 IgG 抗体。一旦发生广泛的杂交瘤生长, 通常在 10-14 天后监测培养基。分泌抗体的杂交瘤再次进行涂平板和筛选, 如果仍为人 IgG 阳性, 则通过有限稀释对抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 单克隆抗体进行至少两次亚克隆。然后对稳定的亚克隆进行体外培养, 以在组织培养培养基中生成少量抗体用于进一步表征。

[0390] 选择 HuMAb 小鼠[®]产生的杂交瘤克隆 4A6、11E7 和 16D10 用于进一步的分析。

[0391] 实施例 2: 人单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 的结构表征

[0392] 编码 4A6、11E7 和 16D10 单克隆抗体的重链和轻链可变区的 cDNA 序列通过使用标准 PCR 技术分别从 4A6、11E7 和 16D10 杂交瘤获得, 并使用标准 DNA 测序技术进行测序。

[0393] 4A6 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示在图 1A 中, 并分别用 SEQ ID NO: 25 和 19 表示。

[0394] 4A6 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示在图 1B 并分别用 SEQ ID NO: 28 和 22 表示。

[0395] 4A6 重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较表明, 4A6 重链利用来自人种系 V_H 5-51 的 V_H 区段和来自人种系 JH 4b 的 J_H 区段。4A6 V_H 序列与种系 V_H 5-51 序列的比对显示在图 4 中。使用 CDR 区确定的 Kabat 系统对 4A6 V_H 序列的进一步分析, 描绘了重链 CDR1、CDR2 和 CD3 区, 如图 1A 和 4 所示, 并分别用 SEQ ID NO: 1、4 和 7 表示。

[0396] 4A6 轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较表明, 4A6 轻链利用来自人种系 V_K A27 的 V_L 区段和来自人种系 JK4 的 J_K 区段。4A6 V_L 序列与种系 V_K A27 序列的比对显示在图 7 中。使用 CDR 区确定的 Kabat 系统对 4A6 V_L 序列的进一步分析, 描绘了轻链 CDR1、CDR2 和 CD3 区, 如图 1B 和 7 所示, 并分别用 SEQ ID NO: 10、13 和 16 表示。

[0397] 11E7 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示在图 2A 中, 并分别用 SEQ ID NO: 26 和 20 表示。

[0398] 11E7 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示在图 2B 中, 并分别用 SEQ ID NO: 29 和 23 表示。

[0399] 11E7 重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较表明, 11E7 重链利用来自人种系 V_H 5-51 的 V_H 区段和来自人种系 JH 4b 的 J_H 区段。11E7 V_H 序列与种系 V_H 5-51 序列的比对显示在图 5 中。使用 CDR 区确定的 Kabat 系统对 11E7 V_H 序列的进一步分析, 描绘了重链 CDR1、CDR2 和 CD3 区, 如图 2A 和 5 所示, 并分别用 SEQ ID NO: 2、5 和 8 表示。

[0400] 11E7 轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较表明, 11E7 轻链利用来自人种系 V_K A27 的 V_L 区段和来自人种系 JK 4 的 J_K 区段。11E7 V_L 序列与种系 V_K A27 序列的比对显示在图 8 中。使用 CDR 区确定的 Kabat 系统对 11E7 V_L 序列的进一步分析, 描绘了轻链 CDR1、CDR2 和 CD3 区, 如图 2B 和 8 所示, 并分别用 SEQ ID NO: 11、14 和 17 表示。

[0401] 16D10 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示在图 3A 中, 并分别用 SEQ ID NO:

27 和 21 表示。

[0402] 16D10 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示在图 3B 中,并分别用 SEQ ID NO : 30 和 24 表示。

[0403] 16D10 重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较表明,16D10 重链利用来自人种系 V_H 5-51 的 V_H 区段和来自人种系 JH 4b 的 J_H 区段。16D10 V_H 序列与种系 V_H 5-51 序列的比对显示在图 6 中。使用 CDR 区确定的 Kabat 系统对 16D10 V_H 序列的进一步分析,描绘了重链 CDR1、CDR2 和 CD3 区,如图 3A 和 6 所示,并分别用 SEQ ID NO :3、6 和 9 表示。

[0404] 16D10 轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较表明,16D10 轻链利用来自人种系 V_K A27 的 V_L 区段和来自人种系 JK1 的 J_K 区段。16D10 V_L 序列与种系 V_K A27 序列的比对显示在图 9 中。使用 CDR 区确定的 Kabat 系统对 16D10 V_L 序列的进一步分析,描绘了轻链 CDR1、CDR2 和 CD3 区,如图 3B 和 9 所示,并分别用 SEQ ID NO :12、15 和 18 表示。

[0405] 实施例 3 :抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 人单克隆抗体的结合特异性和结合动力学的表征

[0406] 在此实施例中,通过 Biacore 分析和流式细胞术检查了抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体的结合亲和力、动力学和特异性。

[0407] 结合亲和力和动力学

[0408] 通过 Biacore 分析 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 对抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体的亲和力和结合动力学进行了表征。使用标准的胺偶联化学和 Biacore 提供的试剂盒,将磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 经由伯胺共价连接于 CM5 芯片 (羧甲基葡聚糖包被的芯片)。通过以 40 μ L/min 的流速使 20、10、5、2.5 和 1.25 μ g/ml 的于 HBS-EP 缓冲液 (由 Biacore AB 提供) 中的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体的浓度系列流动测量结合。背景结合是使 IgG1 的浓度系列流经同一芯片而获得的。监视抗原 - 抗体缔合动力学 3 分钟,并监视解离动力学 10 分钟。使用 BIA 评估软件 (Biacore AB) 使缔合和解离曲线拟合为 1 : 1 Langmuir 结合模型。确定的 K_D 、 $k_{\text{缔合}}$ 和 $k_{\text{解离}}$ 值如表 1 所示。

[0409] 表 1 :抗脂酰肌醇聚糖 -3 单克隆抗体的 Biacore 结合数据

[0410]

抗磷脂酰肌醇蛋白 聚糖 -3 抗体	亲和力 K_D $\times 10^{-9}$ (M)	缔合速率 $k_{\text{缔合}}$ $\times 10^6$ (1/Ms)	解离速率 $k_{\text{解离}}$ $\times 10^{-4}$ 1/s
4A6	0.20	1.6	3.2
16D10	0.31	1.8	5.4
11E7	0.40	1.8	7.3

[0411] 通过 FACS 测量的结合亲和力

[0412] 使用荧光激活细胞分选仪 (“FACS”) 测定,显示抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体以高亲和力与细胞表面磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 蛋白结合。向 96 孔板的各个孔中加入 2×10^5 个细胞密度的 HCC 细胞系 Hep-3B。以 20 μ g/ml 的起始浓度加入 4A6、11E7 和 16D10 单克隆

抗体,并 1 : 3 稀释度对抗体进行系列稀释。洗涤细胞,并用 FITC- 标记的抗人 IgG Ab 检测结合。使用 FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 进行流式细胞术分析。按平均荧光强度 (“MFI”) 绘图的所得结合亲和力显示于图 10。抗体结合 HCC 细胞的结合亲和力呈浓度依赖性方式。每种抗体的有效浓度 (“EC50”) 确定为造成 50 % 平均荧光强度 (“MFI”) 的浓度。在此实施例中,最强的结合亲和力是用 4A6 抗体观察到的,其显示 0.83 的 MFI。观察到的下一最佳亲和力是对 16D10,其具有 1.39 的 EC50。三种抗体中的最低观察亲和力是对 11E7,其具有 1.98 的 EC50。

[0413] 通过 FACS 测量的结合特异性

[0414] 使用 FACS 测定显示抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体以特异性与细胞表面磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 蛋白结合。以 1×10^5 个细胞的密度在 DMEM+10 % FBS 中培养 HCC 细胞系 Hep-3B 和 Hep-G2。加入 $10 \mu\text{g/ml}$ 浓度的 4A6、11E7 和 16D10 单克隆抗体。另外,分析三种阴性对照以用于比较。这些阴性对照是 (1) 根本未染色, (2) 加入单独的二级抗体和 (3) hIgG₁ 同种型对照抗体。洗涤细胞,并用 FITC- 标记的抗人 IgG Ab 检测结合。使用 FACSCalibur 流式细胞仪进行流式细胞术分析。图 11 显示抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体以高亲和力与 HCC 细胞结合。相反,阴性对照样品未显示与 HCC 细胞的任何结合。

[0415] 开发了在细胞表面上稳定表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系,并使用其确定通过流式细胞术确定磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体的特异性。用含有编码磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的全长 cDNA 的表达质粒转染 CHO 细胞。通过将转染的细胞与 $10 \mu\text{g/ml}$ 浓度的每种磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体孵育,评估三种抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体的结合。洗涤细胞,并用藻红蛋白标记的抗人 IgG Ab (BD Biosciences) 检测结合。单独的二级抗体用作阴性对照。结果描绘于图 12。磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 与转染有磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的 CHO 细胞系结合但不与亲本 CHO 细胞系结合。这些数据证明了单克隆抗体对磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的特异性。

[0416] 通过 Biacore 的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体的表位框并

[0417] 通过 Biacore 分析进行表位框并 (epitope binning), 以确定抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体是否结合重叠的表位。具有重叠表位的抗体将竞争结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3, 而那些具有不同表位的抗体则不会竞争, 并同时与抗原结合。使用标准的胺偶联方案将纯化的 4A6 和 16D10 以 4000RU 固定在 CM5 芯片上。在注射之前, 使磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3-his (50nM) 与 4A6、11E7 或 16D10 单克隆抗体预孵育至少 1 小时。抗体浓度为 400nM 开始的两倍稀释系列。以 $5 \mu\text{l/min}$ 的流速注射抗体 - 抗原混合物 5 分钟。4A6、11E7 和 16D10 单克隆抗体中的每一种都能以浓度依赖的方式竞争结合固定的 4A6 和 16D10 抗体。这显示 4A6、16D10 和 11E7 具有重叠的表位。

[0418] 实施例 4 : 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体与肝癌组织结合

[0419] 抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体 4A6 显示出与人肝癌组织的结合。获得肝癌患者的活组织切片检查, 并使用抗体进行免疫组织化学染色 (Cytomix, MA)。使用 $5 \mu\text{m}$ 组织核。在载玻片上干燥 30 分钟后, 在室温下用丙酮固定组织切片 5 分钟。在 PBS 中洗涤载玻片, 然后用无血清蛋白和过氧化物酶封闭剂 (Dako S2001, CO) 将其封闭, 并随后将其与 $5 \mu\text{g/ml}$ 的初级抗体复合物在室温下孵育 45 分钟。接下来, 洗涤载玻片, 并使其与耦联 FITC 的二级抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab, 109-097-003) 孵育 30 分钟, 再次用 PBS 洗涤,

并与聚合物 HRP 耦合物 (Dako, CO, K4063) 孵育 20 分钟。使用色原 (Dako K3464) 作为底物, 得到棕色染色。将载玻片安装于 Faramount Aqueous Mounting Media (Dako, S3025)。显示 4A6 与肝肿瘤细胞特异性结合。如图 13 中所示, 4A6 单克隆抗体特异性染色癌性肝组织但不染色周围的正常组织。当用单克隆抗体染色时, 其他器官表现阴性或非特异性染色, 其包括子宫、肺、肝、肾结肠、子宫颈、乳腺、骨髓、肾上腺、小脑、大脑、食道、心、前列腺、胎盘、垂体、卵巢、胰腺、间皮、唾液腺、扁桃腺、皮肤、小肠、骨骼肌、胃、脾、睾丸、胸腺和甲状腺。数据证明, 抗 -Gpc3HuMab 4A6 识别肝肿瘤中表达的 Gcp3。

[0420] 实施例 5: 抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体活性

[0421] 使用抗体依赖性细胞毒性 (“ADCC”) 测定, 显示在天然杀伤细胞 T 细胞存在下, 单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 杀伤 Gcp3 阳性 Hep-G2 细胞。

[0422] 按下述方法从全血中制备人效应细胞。通过标准菲可帕克 (Ficoll-paque) 分离从肝素化全血中纯化人外周血单核细胞。将细胞重新悬浮于含有 10% FBS 200U/ml 人 IL-2 (PeproTech, NJ) 的 RPMI 1640 培养基中, 并在 37C 下孵育过夜。第二天, 收集细胞, 在 RPMI+1% BSA (测定介质) 中洗涤两次并以 1×10^6 /ml 重新悬浮。

[0423] $100 \mu\text{l}$ 于平底 96 孔板中 1×10^4 /孔的靶细胞在测定介质中于 37C 下孵育过夜。在测定介质中洗涤靶细胞两次之后, 向每个孔中加入 100ul 测定介质, 并与 50ul 效应细胞和 50ul 终浓度为 10ug/ml 的抗 -Gpc3 抗体或作为同种型对照的人 IgG1 孵育。使用 Takara LDH 细胞毒性检测试剂盒 (Roche, 04744 926001, Switzerland), 即一种如下所述的荧光发射分析, 测试 Gpc3+Hep-G2 细胞系对抗 -Gpc3 抗体的抗体特异性 ADCC。使靶细胞系 Hep-G2 与效应细胞以 1 : 50 的靶 : 效应物比孵育。在 37C 下孵育 18 小时后, 收集 100ul 上清液, 并转移至新的平底 96 孔板。向每个孔中加入 100ul 溶液 C, 并在室温下孵育 30 分钟。通过 SPECTRAMAX 340PC (MTX Lab System, VA) 在 490nm 下测量样品吸光度。通过计算三次重复的平均吸光度并减去背景来确定 % 裂解。

[0424] 如图 14 中可见的, 与 hIgG1 同种型对照抗体相比, 4A6、11E7 和 16D10 单克隆抗体的每一种均引起天然杀伤细胞 T- 细胞对 Hep-3b 细胞的特异性裂解。

[0425] 实施例 6: 抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体内化

[0426] 使用 Hum-Zap 测定显示单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 在与 Hep-3b 细胞结合后被该细胞内化。Hum-ZAP 测定显示了通过与耦合物毒素肥皂草蛋白的抗人 IgG 二级抗体的结合的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体的内化 (Advanced Targeting System, San Diego, CA, IT-22-100)。首先, 4A6、11E7 和 16D10 与 Hep-3B 细胞的表面结合。然后, Hum-ZAP 抗体与初级抗体结合。接下来, 初级抗体 /Hum-ZAP 复合体被细胞内化。肥皂草蛋白进入细胞造成蛋白质合成抑制和最终的细胞死亡。

[0427] Hum-ZAP 测定按如下进行。以 3×10^3 个细胞 / 孔的密度接种每种细胞。将抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体或同种型对照人 IgG 系列稀释, 然后加入细胞中。然后以 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度加入 Hum-ZAP, 并使平板孵育 96 小时。通过 CellTiter- Glo® 发光细胞存活能力测定试剂盒 (Promega, G7571) 检测平板中的细胞存活能力, 并通过 Luminomitor (Tuner BioSystems, Sunnyvale, CA) 在 490nm 下读板。通过 Prism (Graphpad) 分析数据。如图 15 中可见的, 细胞死亡与 4A6、11E7 和 16D10 单克隆抗体的浓度成正比。因此, 与 hIgG1 同种型对照抗体相比, 抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体被 Hep-3b 细胞有效内化。

[0428] 还使用免疫组织化学染色测定显示单克隆抗体 4A6、11E7 和 16D10 被 Hep-3b 细胞内化。将用细胞解离溶液收获的细胞以 104 个细胞 /100 μ l 培养基接种于 96 孔板的每个孔中,并与浓度为 5 μ g/ml 的于 FACS 缓冲液 (PBS+5% FBS) 中的单克隆抗体在冰上孵育 30 分钟。人 IgG1 同种型对照用作阴性对照。洗涤细胞两次,重新悬浮于培养基中 (100 μ l/孔),然后与用藻红蛋白 (Jackson ImmunoResearch Lab, PA) 轭合的山羊抗人二级抗体以 1 : 100 稀释度孵育 30 分钟。然后用培养基洗涤细胞,并立即在荧光显微镜下成像或在 37 $^{\circ}$ C 下孵育以在较晚时间点成像。用 Nikon TE200 相机在图 16 中所示的 0、30 或 60 分钟拍摄染色细胞的细胞形态学和免疫荧光强度的图像。仅在用 4A6、11E7 和 16D10 抗体染色的细胞中观察到荧光。用 IgG1 对照抗体未检测到荧光。

[0429] 如图 16 中可见的,加入抗体后 0 分钟,在细胞表面染色细胞。30 分钟后,细胞已开始内化抗体。60 分钟后,抗体已几乎完全被细胞内化。这显示人抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体在与表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的 HCC 细胞结合后被特异性内化。

[0430] 实施例 7:抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 抗体稳定性

[0431] 热稳定性

[0432] 通过量热分析 4A6、11E7 和 16D10 抗体的熔化温度确定了抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体的热稳定性。熔化温度 (T_m) 的量热测量在 VP 毛细管 DSC 差示扫描微热量仪平台上进行,该平台连有自动进样仪 (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA)。样品室体积为 0.144mL。按 1 $^{\circ}$ C /min 的速率在用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (pH 7.4) 中从 30 到 95 $^{\circ}$ C 加热浓度为 2.3 μ M 的样品,以获得抗体的变性数据。参考室中使用相同的缓冲液,以通过比较获得摩尔热容。基线校正观察的温谱图,并使用软件 Originv7.0 基于非 2- 态模型分析归一化的数据。如表 2 所示,观察到 16D10 在三种抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 单克隆抗体中具有最高程度的热稳定性。

[0433] 表 2. 差示扫描量热法:

[0434]

抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3	$T_m1(^{\circ}\text{C})$	$T_m2(^{\circ}\text{C})$	$T_m3(^{\circ}\text{C})$
16D10	72.1	74.3	83.5
4A6	70.7	80.9	83.1
11E7	70.6	82.6	84.9

[0435] 通过荧光光谱法测量的化学稳定性

[0436] 通过荧光光谱法测量化学变性的中点,比较了 4A6、11E7 和 16D10 的稳定性。化学变性的荧光测量在配备有 Micromax 读板仪的 SPEXFluorolog 3.22 (SPEX, Edison, NJ) 上执行。测量对已在 16 种不同浓度的于 PBS 缓冲液中的盐酸胍中平衡 24 小时的抗体样品进行。测量使用黑色、小体积、非结合表面 384 孔板 (Corning, Acton, MA) 进行,并且在 12 μ L 的孔体积中需要 1 μ M 抗体。在 280nm 处激发荧光,并在 320 和 400nm 之间测量发射光谱。扫描速度为 1 秒 /nm,狭缝设为 5nm 带通。缓冲液空白使用 PBS 进行,并自动从数据中扣除。使用 GraphPad Prism 软件使数据拟合为二态变性模型。如表 3 中所示,观察到 16D10 和 4A6 具有相似的稳定性,但是 11E7 显示两阶段的解折叠。

[0437] 表 3 :通过荧光光谱法确定的化学变性

[0438]

克隆	解折叠中点 (M)
4A6	2.84
16D10	2.74
11E7	两阶段

[0439] 本说明书中引用的所有参考文献,包括但不限于所有论文、出版物、专利、专利申请、报告、文本、报道、手稿、小册子、书籍、因特网记录、期刊文章、杂志、产品资料页和类似参考文献,特此通过引用整体并入本说明书。本文对于参考文献的讨论意在仅概述其作者作出的宣称,并不承认任何参考文献构成现有技术,并且申请人保留质疑所引用的参考文献的准确性和相关性的权力。

[0440] 虽然已通过例证和实施例的方式在一定程度上详细描述了上述发明以便于澄清和理解,但是本领域技术人员非常了解,根据本发明的教导,可对所述发明进行某些变化和修饰而不背离所附的权利要求的精神或范围。

[0441] 表 4 :序列表概述

[0442]

SEQ ID NO :	序列	SEQ ID NO :	序列
1	V _H CDR1a. a. 4A6	25	V _H n. t. 4A6
2	V _H CDR1a. a. 11E7	26	V _H n. t. 11E7
3	V _H CDR1a. a. 16D10	27	V _H n. t. 16D10
4	V _H CDR2a. a. 4A6	28	V _K n. t. 4A6
5	V _H CDR2a. a. 11E7	29	V _K n. t. 11E7
6	V _H CDR2a. a. 16D10	30	V _K n. t. 16D10
7	V _H CDR3a. a. 4A6	31	V _H 5-51 种系 a. a.
8	V _H CDR3a. a. 11E7	32	J _H JH4b 种系 a. a.
9	V _H CDR3a. a. 16D10	33	V _K A27 种系 a. a.
10	V _K CDR1a. a. 4A6	34	J _K JK4 种系 a. a.
11	V _K CDR1a. a. 11E7	35	J _K JK1 种系 a. a.

12	V _K CDR1a. a. 16D10	36	磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3a. a.
13	V _K CDR2a. a. 4A6		
14	V _K CDR2a. a. 11E7		
15	V _K CDR2a. a. 16D10		
16	V _K CDR3a. a. 4A6		
17	V _K CDR3a. a. 11E7		
18	V _K CDR3a. a. 16D10		
19	V _H a. a. 4A6		
20	V _H a. a. 11E7		
21	V _H a. a. 16D10		
22	V _K a. a. 4A6		
23	V _K a. a. 11E7		
24	V _K a. a. 16D10		

序列表

<110> 米德列斯公司

乔纳森·A·特雷特

立升·卢

海春·黄

大鹏·姚

西恩·潘

海蒂·勒波兰卡

蒂莫西·斯普罗

马克·亚马纳卡

<120> 针对磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的单克隆抗体

<130>MXI-374PC

<140>W0 PCT/US2008/070344

<141>2008-07-17

<150>US 60/959845

<151>2007-07-17

<160>48

<170>PatentIn 版本 3.5

<210>1

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>1

Ser Tyr Trp Ile Ala

1

5

<210>2

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>2

Asn Tyr Trp Ile Ala

1 5

<210>3

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>3

Asn Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210>4

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>4

Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210>5

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>5

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210>6

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>6

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210>7

<211>8

<212>PRT

<213> 人

<400>7

Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210>8

<211>8

<212>PRT

<213> 人

<400>8

Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210>9

<211>8

<212>PRT

<213> 人

<400>9

Thr Arg Glu Gly Phe Phe Asp Tyr

1 5

<210>10

<211>12

<212>PRT

<213> 人

<400>10

Arg Ala Val Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210>11

<211>12

<212>PRT

<213> 人

<400>11

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210>12

<211>12

<212>PRT

<213> 人

<400>12

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210>13

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>13

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210>14

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>14

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210>15

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>15

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210>16

<211>8

<212>PRT

<213> 人

<400>16

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr

1 5

<210>17

<211>8

<212>PRT

<213> 人

<400>17

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr

1 5

<210>18

<211>8

<212>PRT

<213> 人

<400>18

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr

1 5

<210>19

<211>117

<212>PRT

<213> 人

<400>19

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Arg Ser Ile Arg Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210>20

<211>117

<212>PRT

<213> 人

<400>20

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

<210>21

<211>117

<212>PRT

<213> 人

<400>21

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

	85	90	95
Ala Arg Thr Arg Glu Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro			
100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser			
115			

<210>22

<211>107

<212>PRT

<213>人

<400>22

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

<210>23

<211>107

<212>PRT

<213>人

<400>23

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser			
20	25	30	

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>24

<211>107

<212>PRT

<213> 人

<400>24

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

<210>25

<211>351

<212>DNA

<213> 人

<400>25

gaggtgcagc	tggtgcagtc	tgagcagag	gtgaaaaagc	ccggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	cagctttacc	agctactgga	tcgcctgggt	gcgccagatg	120
cccgggaaag	gcctggagtg	gatggggatc	atctttcctg	gtgactctga	taccagatac	180
agcccgtcct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	ggcccatcag	aaccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccttgt	attactgtgc	gagaacccgg	300
gaggggtact	ttgactactg	gggccaggga	accctgggtca	ccgtctcctc	a	351

<210>26

<211>351

<212>DNA

<213> 人

<400>26

gaggtgcagc	tggtgcagtc	tgagcagag	gtgaaaaagc	ccggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	cagctttacc	aactactgga	tcgcctgggt	gcgccagatg	120
cccgggaaag	gcctggagtg	gatggggatc	atctatcctg	gtgactctga	taccagatac	180
agcccgtcct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	agcccatcag	aaccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccatgt	attactgtgc	gagaacccgg	300
gaggggtact	ttgactactg	gggccaggga	accctgggtca	ccgtctcctc	a	351

<210>27

<211>351

<212>DNA

<213> 人

<400>27

gaggtgcaac	tggtgcagtc	tgagcagat	gtgacaaagc	ccggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	tttctggata	caggtttacc	aactactgga	tcggctggat	gcgccagatg	120
tccgggaaag	gcctggaatg	gatgggcac	atctatcctg	gtgactctga	taccagatac	180
agtcctcct	tccaaggcca	cgtcaccatc	tcagccgaca	aatccatcaa	caccgcctac	240
ctacgggtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccatgt	attactgtgc	gcgaacccgg	300
gaggggttct	ttgactactg	gggccaggga	accccggtca	ccgtctcctc	a	351

<210>28

<211>321

<212>DNA

<213> 人

<400>28

gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccgttca gagggttagc agcagctatt tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210>29

<211>321

<212>DNA

<213> 人

<400>29

gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210>30

<211>321

<212>DNA

<213> 人

<400>30

gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa a	321

<210>31

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>31

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

Ala Arg

<210>32

<211>15

<212>PRT

<213> 人

<400>32

Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10				15	

<210>33

<211>96

<212>PRT

<213> 人

<400>33

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

65		70		75		80									
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
				85					90					95	

<210>34

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>34

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5					10	

<210>35

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>35

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5					10	

<210>36

<211>580

<212>PRT

<213> 人

<400>36

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

Cys	Leu	Pro	Lys	Gly	Pro	Thr	Cys	Cys	Ser	Arg	Lys	Met	Glu	Glu	Lys
65					70					75					80
Tyr	Gln	Leu	Thr	Ala	Arg	Leu	Asn	Met	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Ser	Ala
				85					90					95	
Ser	Met	Glu	Leu	Lys	Phe	Leu	Ile	Ile	Gln	Asn	Ala	Ala	Val	Phe	Gln
			100					105					110		
Glu	Ala	Phe	Glu	Ile	Val	Val	Arg	His	Ala	Lys	Asn	Tyr	Thr	Asn	Ala
		115					120					125			
Met	Phe	Lys	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Leu	Thr	Pro	Gln	Ala	Phe	Glu	Phe
	130					135					140				
Val	Gly	Glu	Phe	Phe	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp
145					150					155					160
Ile	Asn	Val	Asp	Asp	Met	Val	Asn	Glu	Leu	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Pro
			165						170					175	
Val	Ile	Tyr	Thr	Gln	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Leu	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu
		180						185					190		
Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Leu	Arg	Gly	Ala	Arg	Arg	Asp	Leu	Lys	Val	Phe
	195						200					205			
Gly	Asn	Phe	Pro	Lys	Leu	Ile	Met	Thr	Gln	Val	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln
	210					215					220				
Val	Thr	Arg	Ile	Phe	Leu	Gln	Ala	Leu	Asn	Leu	Gly	Ile	Glu	Val	Ile
225					230					235					240
Asn	Thr	Thr	Asp	His	Leu	Lys	Phe	Ser	Lys	Asp	Cys	Gly	Arg	Met	Leu
			245						250					255	
Thr	Arg	Met	Trp	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Cys	Gln	Gly	Leu	Met	Met	Val	Lys
		260						265					270		
Pro	Cys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Asn	Val	Val	Met	Gln	Gly	Cys	Met	Ala	Gly
	275						280					285			
Val	Val	Glu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Trp	Arg	Glu	Tyr	Ile	Leu	Ser	Leu	Glu
	290					295					300				
Glu	Leu	Val	Asn	Gly	Met	Tyr	Arg	Ile	Tyr	Asp	Met	Glu	Asn	Val	Leu
305					310					315					320
Leu	Gly	Leu	Phe	Ser	Thr	Ile	His	Asp	Ser	Ile	Gln	Tyr	Val	Gln	Lys
			325						330					335	
Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	Thr	Thr	Thr	Ile	Gly	Lys	Leu	Cys	Ala	His	Ser
	340							345					350		
Gln	Gln	Arg	Gln	Tyr	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Asp	Leu	Phe	Ile
	355						360					365			
Asp	Lys	Lys	Val	Leu	Lys	Val	Ala	His	Val	Glu	His	Glu	Glu	Thr	Leu

370	375	380
Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser		
385	390	395
Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala		400
405	410	415
Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr		
420	425	430
Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His		
435	440	445
Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp		
450	455	460
Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys		
465	470	475
Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly		
485	490	495
Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly		
500	505	510
Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr		
515	520	525
Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro		
530	535	540
Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser		
545	550	555
Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe		
565	570	575
Phe Leu Val His		
580		

<210>37

<211>408

<212>DNA

<213> 人

<400>37

atgggggtcaa cgcgcatacct cgcctctctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag	60
gtgcagctgg tgcagtctgg agcagagggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc	120
tgtaagggtt ctggatacag ctttaccagc tactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc	180
gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc tttcctggtg actctgatac cagatacagc	240
ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaggt ccatcagaac cgcctacctg	300

cagtggagca gcctgaagge ctcggacacc gccttgtatt actgtgcgag aacccgggag 360
gggtactttg actactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 408

<210>38

<211>136

<212>PRT

<213> 人

<400>38

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1 5 10 15
Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
Thr Ser Tyr Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
Glu Trp Met Gly Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Arg Ser Ile Arg
 85 90 95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Leu
 100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210>39

<211>381

<212>DNA

<213> 人

<400>39

atggaaaccc cagegcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccgttca gagtgttagc agcagctatt tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacccac tttcggcgga 360
 gggaccaagg tggagatcaa a 381

<210>40

<211>127

<212>PRT

<213> 人

<400>40

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

<210>41

<211>408

<212>DNA

<213> 人

<400>41

atgggggtcaa cegccatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120
 tgtaagggtt ctggatacag ctttaccac tactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180
 gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc taccctgggtg actctgatac cagatacagc 240
 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaagt ccatcagaac cgcctacctg 300

cagtggagca gcctgaagge ctggacacc gccatgtatt actgtgcgag aacccgggag 360
gggtactttg actactgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctcctca 408

<210>42

<211>136

<212>PRT

<213> 人

<400>42

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1 5 10 15
Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
Thr Asn Tyr Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Arg
 85 90 95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210>43

<211>381

<212>DNA

<213> 人

<400>43

atggaaaccc cagcgcagct tctcttctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gattcactc tcaccatcag cagactggag 300

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccac tttcggcgga 360
gggaccaagg tggagatcaa a 381

<210>44

<211>127

<212>PRT

<213> 人

<400>44

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

<210>45

<211>408

<212>DNA

<213> 人

<400>45

atgggggtcaa cgcgcatect cgccctcctc ctggctattc tccgaggagt ctgtgccgag 60
gtgcaactgg tgcagtctgg agcagatgtg acaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120
tgtaaggttt ctggatacag gtttaccac tactggatcg gctggatgag ccagatgtcc 180
gggaaaggcc tggaatggat gggcatcatt tatcctgggtg actctgatac cagatacagt 240
ccgtccttcc aaggccacgt caccatctca gccgacaaat ccatcaaac cgctaccta 300
cgggtggagca gcctgaaggc ctccgacacc gccatttatt actgtgcgag aaccggggag 360

gggttcctttg actactgggg ccaggaacc ccggtcaccg tctcctca

408

<210>46

<211>136

<212>PRT

<213> 人

<400>46

Met	Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Leu	Arg	Gly
1				5				10					15		
Val	Cys	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Asp	Val	Thr	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Tyr	Arg	Phe
			35					40					45		
Thr	Asn	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Met	Arg	Gln	Met	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu
			50					55					60		
Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser
65				70				75					80		
Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Asn
			85					90					95		
Thr	Ala	Tyr	Leu	Arg	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Ile
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Thr	Arg	Glu	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			115					120					125		
Gly	Thr	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			130					135							

<210>47

<211>381

<212>DNA

<213> 人

<400>47

atggaaaccc	cagcgcagct	tctcttctc	ctgtactct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattctgt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	120
ctctcctgca	gggccagtc	gagtgttagc	agcagctact	tagcctggta	ccagcagaaa	180
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgcatcca	gcagggccac	tgcatccca	240
gacaggttca	gtggcagtg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	300

cctgaagatt ttgcagtgtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgac gttcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa a 381

<210>48

<211>127

<212>PRT

<213> 人

<400>48

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

V 区段: 5-51
J 区段: JH4b

```
      E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  E  S  L
1  GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                     CDR1
                                     ~~~~~~
      K  I  S  C  K  G  S  G  Y  S  F  T  S  Y  W  I  A  W
55 AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GCC TGG

                                     CDR2
                                     ~~~~~~
      V  R  Q  M  P  G  K  G  L  E  W  M  G  I  I  F  P  G
109 GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TTT CCT GGT

      CDR2
      ~~~~~~
      D  S  D  T  R  Y  S  P  S  F  Q  G  Q  V  T  I  S  A
163 GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

      D  R  S  I  R  T  A  Y  L  Q  W  S  S  L  K  A  S  D
217 GAC AGG TCC ATC AGA ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                     CDR3
                                     ~~~~~~
      T  A  L  Y  Y  C  A  R  T  R  E  G  Y  F  D  Y  W  G
271 ACC GCC TTG TAT TAC TGT GCG AGA ACC CGG GAG GGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC

      Q  G  T  L  V  T  V  S  S
325 CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

>磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 4A6, VH-NT 具有前导区

ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTG
TGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGA
GTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGA
TCGCCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCAT
CTTTCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCA
CCATCTCAGCCGACAGGTCCATCAGAACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCT
GAAGGCCTCGGACACCGCCTTGTATTACTGTGCGAGAACCCGGGAGGGGTAC
TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

>磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 4A6, VH-AA 具有前导区

MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIA
WVRQMPGKGLEWMGHIFPGDSDTRYSPSFQGGQVTISADRSIRTAYLQWSSLKAS
DTALYYCARTREGYFDYWGGQGLTVVSS

图 1A :抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 4A6 VH

V 区段: A27
J 区段: JK4

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      A   T   L   S   C   R   A   V   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC GTT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAT TTA GCC TGG

                                CDR2
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      Q   Y   G   S   S   P   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

>磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 4A6, VK-NT 具有前导区

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAC
CACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG
GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCGTTTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTA
TTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATG
GTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA
GTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCACTTTCGGCGGAGGGACCA
AGGTGGAGATCAAA

>磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 4A6, VK-AA 具有前导区

METPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRAVQSVSSSYLA
WYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ
YGSSPTFGGGTKVEIK

图 1B :抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 4A6 VK

V 区段: 5-51
J 区段: JH4b

```

      E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  E  S  L
1  GAG  GTG  CAG  CTG  GTG  CAG  TCT  GGA  GCA  GAG  GTG  AAA  AAG  CCC  GGG  GAG  TCT  CTG

                                CDR 1
                                ~~~~~~
      K  I  S  C  K  G  S  G  Y  S  F  T  N  Y  W  I  A  W
55 AAG  ATC  TCC  TGT  AAG  GGT  TCT  GGA  TAC  AGC  TTT  ACC  AAC  TAC  TGG  ATC  GCC  TGG

                                CDR 2
                                ~~~~~~
      V  R  Q  M  P  G  K  G  L  E  W  M  G  I  I  Y  P  G
109 GTG  CGC  CAG  ATG  CCC  GGG  AAA  GGC  CTG  GAG  TGG  ATG  GGG  ATC  ATC  TAT  CCT  GGT

                                CDR 2
                                ~~~~~~
      D  S  D  T  R  Y  S  P  S  F  Q  G  Q  V  T  I  S  A
163 GAC  TCT  GAT  ACC  AGA  TAC  AGC  CCG  TCC  TTC  CAA  GGC  CAG  GTC  ACC  ATC  TCA  GCC

      D  K  S  I  R  T  A  Y  L  Q  W  S  S  L  K  A  S  D
217 GAC  AAG  TCC  ATC  AGA  ACC  GCC  TAC  CTG  CAG  TGG  AGC  AGC  CTG  AAG  GCC  TCG  GAC

                                CDR 3
                                ~~~~~~
      T  A  M  Y  Y  C  A  R  T  R  E  G  Y  F  D  Y  W  G
271 ACC  GCC  ATG  TAT  TAC  TGT  GCG  AGA  ACC  CGG  GAG  GGG  TAC  TTT  GAC  TAC  TGG  GGC

      Q  G  T  I  V  T  V  S  S
325 CAG  GGA  ACC  CTG  GTC  ACC  GTC  TCC  TCA

```

> 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 11E7, VH-NT 具有前导区

```

ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGT
CTGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCG
GGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAAC
TACTGGATCGCCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGAT
GGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCC
AAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGAACC CGCCTACCTG
CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAG
AACCCGGGAGGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

```

> 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 11E7, VH-AA 具有前导区

```

MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIA
WVRQMPGKGLEWMGIHYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSIRTA YLQWSSLKAS
DTAMYYCARTREGYFDYWGQGLTVTVSS

```

图 2A :抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 11E7 VH

V 区段: A27
J 区段: JK4

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR 1
                                ~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR 2
                                ~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR 2
      ~~~~~
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR
                                ~~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR 3
      ~~~~~
      Q   Y   G   S   S   P   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

> 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 11E7, VK-NT 具有前导区

```

ATGGAAACCCCGAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGA
TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGT
CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGC
AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT
CCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCAC
TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAA

```

> 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 11E7, VK-AA 具有前导区

```

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY
GSSPTFGGGTKVEIK

```

图 2B :抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 11E7 VK

V 区段: 5-51

J 区段: JH4b

E V Q L V Q S G A D V T K P G E S L
1 GAG GTG CAA CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAT GTG ACA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

CDR1

K I S C K V S G Y R F T N Y W I G W
55 AAG ATC TCC TGT AAG GTT TCT GGA TAC AGG TTT ACC AAC TAC TGG ATC GGC TGG

CDR2

M R Q M S G K G L E W M G I I Y P G
109 ATG CCC CAG ATG TCC GGG AAA GGC CTG GAA TGG ATG GGC ATC ATC TAT CCT GGT

CDR2

D S D T R Y S P S F Q G H V T I S A
163 GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGT CCG TCC TTC CAA GGC CAC GTC ACC ATC TCA GCC

D K S I N T A Y L R W S S L K A S D
217 GAC AAA TCC ATC AAC ACC GCC TAC CTA CGG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

CDR3

T A I Y Y C A R T R E G F F D Y W G
271 ACC GCC ATT TAT TAC TGT GCG CGA ACC CGG GAG GGG TTC TTT GAC TAC TGG GGC

Q G T P V T V S S
325 CAG GGA ACC CCG GTC ACC GTC TCC TCA

> 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 16D10, VH-NT 具有前导区

ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTATTCTCCGAGGAGTCTG
TGCCGAGGTGCAACTGGTGCAGTCTGGAGCAGATGTGACAAAGCCCGGGGA
GTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGTTTCTGGATACAGGTTTACCAACTACTGGA
TCGGCTGGATGCGCCAGATGTCCGGGAAAGGCCTGGAATGGATGGGCATCAT
CTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGTCCGTCCTTCCAAGGCCACGTCA
CCATCTCAGCCGACAAATCCATCAACACCGCCTACCTACGGTGGAGCAGCCT
GAAGGCCTCGGACACCGCCATTTATTACTGTGCGCGAACCCGGGAGGGGTTT
TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGGTCACCGTCTCCTCA

> 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 16D10, VH-AA 具有前导区

MGSTAILALLLAILRGVCAEVQLVQSGADVTKPGESLKISCKVSGYRFTNYWIG
WMRQMSGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGHVTISADKSINTAYLRWSSLKAS
DTAIYYCARTREGFFDYWGQGTPVTVSS

图 3A : 抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 16D10 VH

V 区段: A27

J 区段: JK1

E I L L T Q S P G T L S L S P G E R
1 GAA ATT CTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

CDR2

Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

CDR2

R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

CDR3

T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

CDR3

Q Y G S S P T F G Q G T K V E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

>磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 16D10, VK-NT 具有前导区

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAC
CACCGGAGAAATTCTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG
GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTA
CTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC
AGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGACGTTCCGCCAAGGGACC
AAGGTGGAAATCAAA

>磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 16D10, VK-AA 具有前导区

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEILLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQY
GSSPTFGQGTKVEIK

图 3B:抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 16D10 VK

5-51 种系 4A6 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS ^{CDR1} YWIGW -----A-
5-51 种系 4A6 VH	VRQMPGKGLEWMGI ^{CDR2} IYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISA -----F-----
5-51 种系 JH4b 种系 4A6 VH	DKSISTAYLQWSSSLKASDTAMY YCAR ^{CDR3} YFDYWG -R--R-----L-----TREG-----
JH4b 种系 4A6 VH	QGT L V T V S S ----- (JH4b)

图 4:抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 4A6VH

5-51 种系 11E7 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS ^{CDR1} YWIGW -----N-----A-
5-51 种系 11E7 VH	VRQMPGKGLEWMGI ^{CDR2} IYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISA -----
5-51 种系 JH4b 种系 11E7 VH	DKSISTAYLQWSSSLKASDTAMY YCAR ^{CDR3} YFDYWG ----R-----TREG-----
JH4b 种系 11E7 VH	QGT L V T V S S -----

图 5:抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 11E7VH

5-51 种系 16D10 VH	E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K - - - - - D - T - - - - -
5-51 种系 16D10 VH	I S C K G S G Y S F T <u>CDR1</u> S Y W I G W V R - - - - V - - - R - - N - - - - M -
5-51 种系 16D10 VH	Q M P G K G L E W M G <u>CDR2</u> I I Y P G D S D - - S - - - - - - - - - - - - -
5-51 种系 16D10 VH	T R Y S P S F Q G Q V T I S A D K S I - - - - - H - - - - - - - - -
5-51 种系 16D10 VH	S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y N - - - - R - - - - - - - - - I - -
5-51 种系 JH4b 种系 16D10 VH	C A R <u>CDR3</u> F D Y W G Q G T L V T - - - T R E G F - - - - - P - -
JH4b 种系 16D10 VH	V S S - - -

图 6 :抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 16D10VH

A27 种系 4A6 VK	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 4A6 VK	A T L S C R A S <u>CDR1</u> Q S V S S S Y L A W - - - - - V - - - - - - - - -
A27 种系 4A6 VK	Y Q Q K P G Q A P R L L I Y <u>CDR2</u> G A S S - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 4A6 VK	<u>CDR2</u> R A T G I P D R F S G S G S G T D F - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 4A6 VK	T L T I S R L E P E D F A V Y Y C <u>Q</u> - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 JK4 种系 4A6 VK	<u>CDR3</u> Q Y G S S P T F G G G T K V E I K - - - - - - - - - - - - - (JK4)

图 7 :抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 4A6VK

A27 种系 11E7 VK	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R - - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 11E7 VK	A T L S C <u>CDR1</u> R A S Q S V S S S Y L A W - - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 11E7 VK	Y Q Q K P G Q A P R L L I Y <u>CDR2</u> G A S S - - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 11E7 VK	<u>CDR2</u> R A T G I P D R F S G S G S G T D F - - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 11E7 VK	T L T I S R L E P E D F A V Y Y C <u>Q</u> - - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 JK4 种系 11E7 VK	<u>CDR3</u> Q Y G S S P T F G G G T K V E I K - - - - - - - - - - - - - - - -

图 8:抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 11E7VK

A27 种系 16D10 VK	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R - - L - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 16D10 VK	A T L S C <u>CDR1</u> R A S Q S V S S S Y L A W - - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 16D10 VK	Y Q Q K P G Q A P R L L I Y <u>CDR2</u> G A S S - - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 16D10 VK	<u>CDR2</u> R A T G I P D R F S G S G S G T D F - - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 16D10 VK	T L T I S R L E P E D F A V Y Y C <u>Q</u> - - - - - - - - - - - - - - - -
A27 种系 JK1 种系 16D10 VK	<u>CDR3</u> Q Y G S S P T F G Q G T K V E I K - - - - - - - - - - - - - - - -

图 9:抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 16D10VK

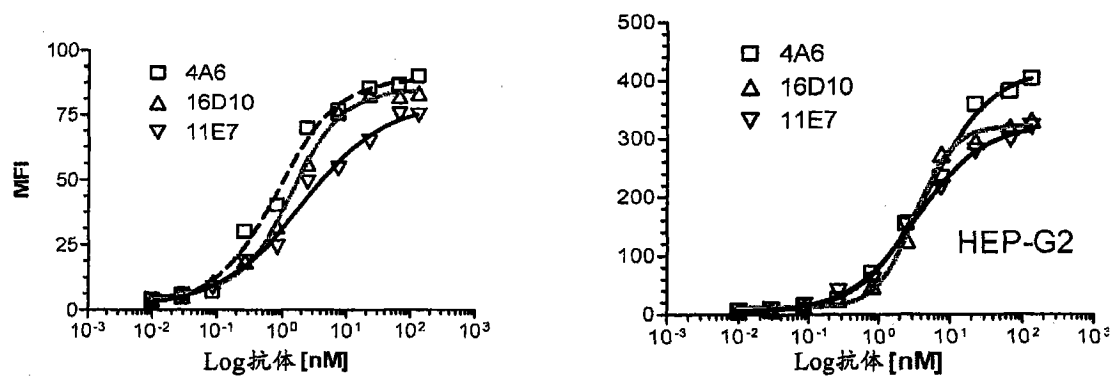


图 10 :FACS 滴定 (EC50)

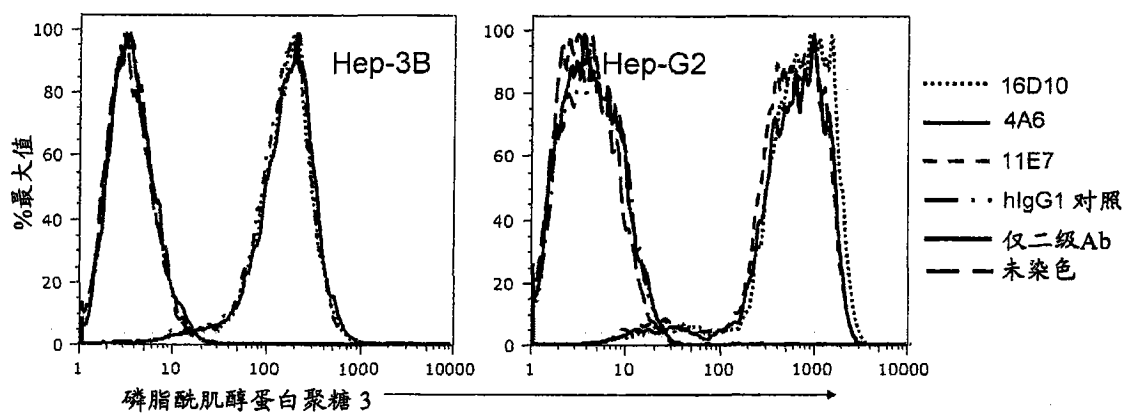


图 11 :FACS 分析显示与 HCC 细胞的特异性结合

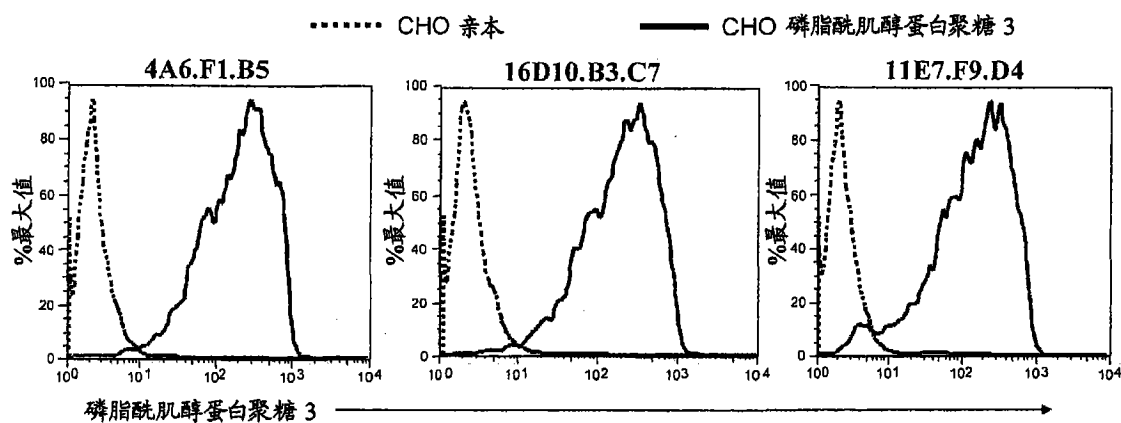


图 12 :FACS 分析显示与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的特异性抗体结合



图 13 :4A6 抗体与肝癌组织结合

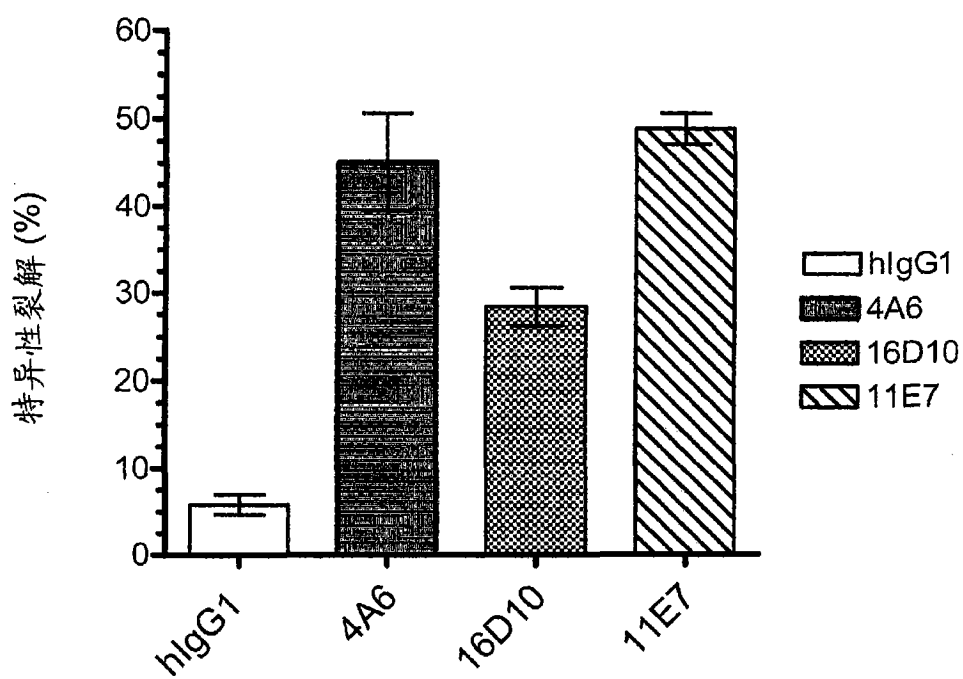


图 14 :抗体依赖性细胞毒性

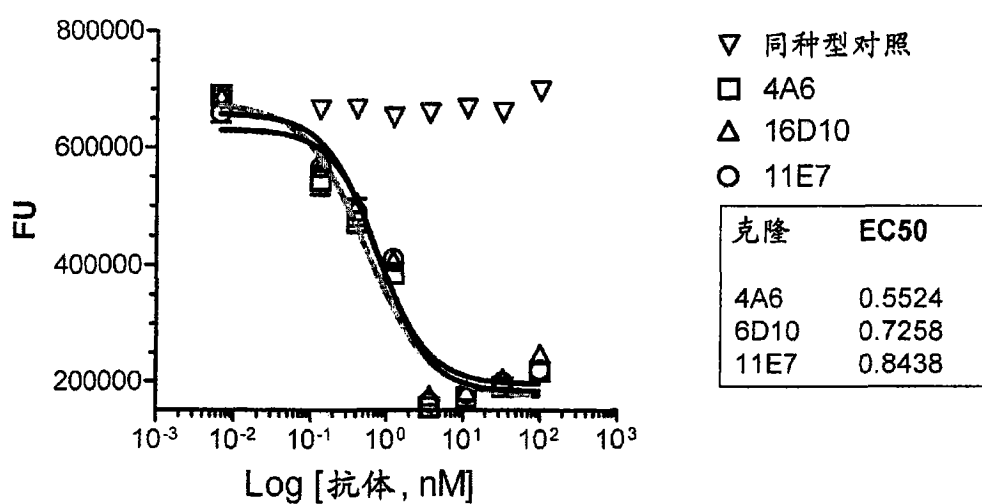


图 15 :HumZap 内化测定

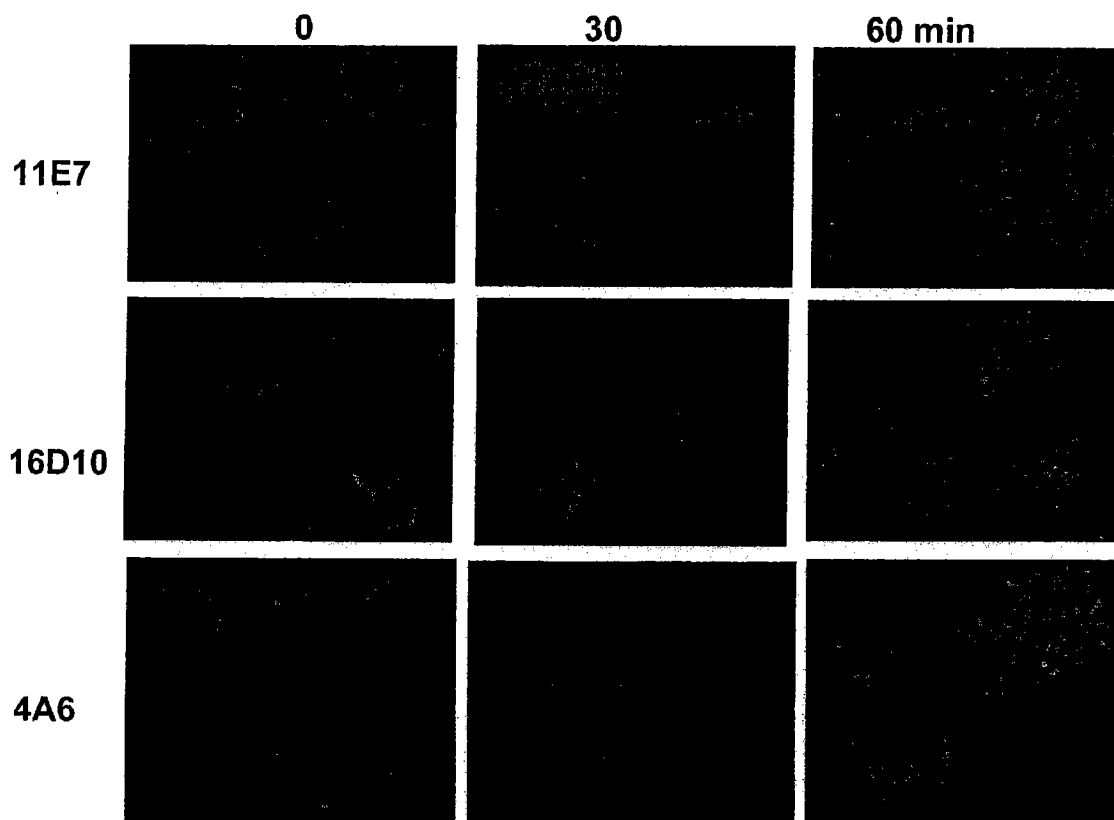


图 16 :免疫荧光显示抗体内化