



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104689314 B

(45)授权公告日 2018.02.02

(21)申请号 201510088717.0

(22)申请日 2011.06.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104689314 A

(43)申请公布日 2015.06.10

(30)优先权数据

61/355,516 2010.06.16 US

(62)分案原申请数据

201180039600.3 2011.06.15

(73)专利权人 高等教育联邦系统-匹兹堡大学

地址 美国宾夕法尼亚

(72)发明人 S·费龙 X·王 T·P·康拉茨

E·菲沃伊诺 B·胡德

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 左路

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2004087205 A1,2004.10.14,

WO 2006120230 A2,2006.11.16,

ARNOLD-SCHILD.D ET AL.One-step

single-chain Fv recombinant antibody-

based purification of gp96 for vaccine

development.《Cancer Research》.2000,第60卷

4175-4178.

审查员 李有朝

权利要求书2页 说明书52页

序列表10页 附图31页

(54)发明名称

内质蛋白的抗体及其用途

(57)摘要

本文公开了特异性结合内质蛋白的分离的单克隆抗体。在某些实施方案中,这些抗体是完全人源性的。本文还公开了编码这些抗体的重组核酸、包括这些核酸的表达载体和用这些表达载体转化过的宿主细胞。在几个实施方案中,所公开的抗体可用于检测和/或治疗表达内质蛋白的肿瘤,例如黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌。在一个实例中,所述肿瘤是黑素瘤。

1. 一种包括免疫缀合物的组合物在制备用于治疗被诊断为患有表达内质蛋白的癌症的受试者的药剂中的用途,其中所述治疗包括将治疗有效量的所述药剂给予所述受试者,从而治疗所述受试者中所述表达内质蛋白的癌症;

其中所述免疫缀合物包括人单克隆抗体或其抗原结合片段,以及效应分子;

其中所述人单克隆抗体或抗原结合片段包括重链可变域,其中所述重链可变域包括SEQ ID NO:1的氨基酸26-33所示的CDR1、SEQ ID NO:1的氨基酸51-58所示的CDR2、SEQ ID NO:1的氨基酸97-103所示的CDR3,并且

其中所述人单克隆抗体或抗原结合片段包括轻链可变域,其中所述轻链可变域包括SEQ ID NO:2的氨基酸27-32所示的CDR1、SEQ ID NO:2的氨基酸50-52所示的CDR2和SEQ ID NO:2的氨基酸89-97所示的CDR3;并且

其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合内质蛋白。

2. 权利要求1所述的用途,其中所述人单克隆抗体或抗原结合片段包括重链可变域,其中所述重链可变域包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

3. 权利要求1所述的用途,其中所述人单克隆抗体或抗原结合片段包括轻链可变域,其中所述轻链可变域包括SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

4. 权利要求1所述的用途,其中所述人单克隆抗体或抗原结合片段包括重链可变域,其中所述重链可变域包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;并且所述人单克隆抗体或抗原结合片段包括轻链可变域,其中所述轻链可变域包括SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

5. 权利要求1所述的用途,其中所述抗原结合片段是Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、单链Fv蛋白(scFv)或二硫化物稳定的Fv蛋白(dsFv)。

6. 权利要求5所述的用途,其中所述抗原结合片段是scFv。

7. 权利要求1所述的用途,其中所述人单克隆抗体是IgG。

8. 权利要求1-7中任一项所述的用途,其中所述效应分子是假单胞菌(Pseudomonas)外毒素(PE)或者其变体或片段。

9. 权利要求1-7中任一项所述的用途,其中所述效应分子是化学治疗剂或放射性核苷酸。

10. 权利要求1-7中任一项所述的用途,其中所述效应分子是细胞因子或趋化因子。

11. 权利要求10所述的用途,其中所述细胞因子是干扰素。

12. 权利要求1-7中任一项所述的用途,其中所述癌症是黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、卵巢癌、膀胱癌或胰脏腺癌。

13. 权利要求12所述的用途,其中治疗所述受试者包括减少转移灶的数量或尺寸。

14. 权利要求1-7中任一项所述的用途,其中所述受试者是使用治疗有效量的化学治疗剂、放射物或其组合进行治疗的受试者。

15. 权利要求14所述的用途,其中所述化学治疗剂为5-氟尿嘧啶、环巴胺或其组合。

16. 权利要求11所述的用途,其中所述干扰素为干扰素 α 。

17. 权利要求16所述的用途,其中所述干扰素 α 通过肽接头连接至所述人单克隆抗体或抗原结合片段。

18. 权利要求12所述的用途,其中所述效应分子是干扰素。

19. 权利要求18所述的用途,其中所述干扰素为干扰素 α 。

-
20. 权利要求14所述的用途,其中所述效应分子是干扰素。
21. 权利要求20所述的用途,其中所述干扰素为干扰素 α 。

内质蛋白的抗体及其用途

[0001] 本申请为分案申请,其原申请的申请日为2011年6月15日,申请号为201180039600.3,名称为“内质蛋白的抗体及其用途”。

[0002] 相关专利申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2010年6月16日提交的美国临时申请No.61/355,516的优先权,其全文在此以引用的方式纳入本文。

[0004] 政府支持的陈述

[0005] 本发明是依据美国国立卫生研究院授予的基金No.CA105500和No.CA138188在美国政府支持下完成的。美国政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0006] 本发明涉及抗体领域,具体涉及特异性结合内质蛋白的完全人源性抗体(fully human antibody)。

背景技术

[0007] 黑素瘤是攻击性的、频繁转移性肿瘤,其源自黑素细胞或黑素细胞相关的痣细胞(“Cellular and Molecular Immunology”(1991) (eds.) Abbas A.K., Lechtman, A.H., Pober, J.S.; W.B. Saunders Company, Philadelphia: 第340-341页)。黑素瘤占全部皮肤癌症的大约3%,在全世界妇女中黑素瘤的增加未被除肺癌外的任何其他的新生物所超过(“Cellular and Molecular Immunology”(1991) (eds.) Abbas, A.K., Lechtman, A.H., Pober, J.S.; W.B. Saunders Company Philadelphia: 第340-342页; Kirkwood and Agarwala (1993) Principles and Practice of Oncology 7:1-16)。甚至当黑素瘤表面上局限于皮肤时,也有最高达30%的患者将发生全身转移,大多数将死亡(Kirkwood and Agarwala (1993) Principles and Practice of Oncology 7:1-16)。治疗黑素瘤的经典方式包括手术、辐射和化学疗法。在过去的十年中,免疫疗法和其他分子方法已经作为新的且有前景的治疗黑素瘤方法浮现出来。

[0008] 黑素瘤沉积物存在淋巴细胞,提供了有力证据表明在人体中存在癌症免疫反应。当被分离后,这些淋巴细胞能够以主要组织相容性复合体(MHC)-限制方式识别特异性的自身肿瘤抗原和同种异体的黑素瘤(Itoh et al. (1986), Cancer Res. 46:3011-3017; Muul et al. (1987), J. Immunol. 138:989-995; Topalian et al. (1989) J. Immunol. 142:3714-3725; Darrow et al. (1989) J. Immunol. 142:3329-3335; Hom et al. (1991) J. Immunother. 10:153-164; Kawakami et al. (1992) J. Immunol. 148:638-643; Hom et al. (1993) J. Immunother. 13:18-30; O’Neil et al. (1993) J. Immunol. 151:1410-1418)。转移性黑素瘤患者的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)在体外可识别共有的抗原,包括黑素细胞-黑素瘤系特异性组织抗原(Kawakami et al. (1993) J. Immunother. 14:88-93; Anichini et al. (1993) J. Exp. Med. 177:989-998)。许多黑素瘤患者产生针对这些肿瘤的细胞和体液免疫反应以及黑素瘤表达MHC抗原和肿瘤相关抗原(TAA)的事实,暗示鉴定和表征额外的黑素瘤抗

原对于免疫治疗黑素瘤患者将是重要的。但是,还需要新的方式来治疗黑素瘤和其他癌症。

发明内容

[0009] 本文公开了特异性结合内质蛋白 (Grp94) 的分离的单克隆抗体以及这些抗体的抗原结合片段。在某些实施方案中这些抗体是完全人源性抗体。这些抗体对人内质蛋白有高亲和力并可以用于治疗和/或诊断癌症。在一个实例中,所述单克隆抗体是scFv。

[0010] 在某些实施方案中,所公开的抗体可用于检测表达内质蛋白的肿瘤,例如黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌。在其他实施方案中,所公开的抗体可用于治疗肿瘤,例如黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌。

[0011] 本文还公开了编码这些抗体的重组核酸、包括这些核酸的表达载体和用这些表达载体转化过的宿主细胞。

[0012] 上述的以及其他的特征和优势通过以下几个实施方案的详细描述会更清楚,详细描述参照附图进行。

附图说明

[0013] 图1a.用人黑素瘤细胞系WM1158淘选噬菌体展示scFv文库。所述噬菌体展示scFv文库含有大量的有不同特异性的噬菌体展示scFv片段。将所述文库加入到含有WM1158黑素瘤细胞悬液的管中。然后洗涤所述管以移除未结合的噬菌体,在高pH下洗脱结合的噬菌体并在细菌宿主大肠杆菌TG1中扩增。然后进行三轮淘选,用培养的人LG2淋巴样细胞吸收所分离的克隆以移除结合到人黑素瘤细胞和淋巴样细胞共有的抗原(Ag)的噬菌体。然后用WM1158细胞通过ELISA(酶联免疫吸附测定)对所分离的噬菌体进行反应性筛选。

[0014] 图1b.通过用WM1158细胞淘选噬菌体展示抗体文库而分离的scFv W9与所述黑素瘤细胞系WM1158和所述B淋巴样细胞系LG2的差异反应性。将WM1158细胞铺于96孔板并与scFv W9在室温孵育2小时。使用c-myc特异性mAb(单克隆抗体)9E10和HRP-链酶亲和素检测scFv的结合。识别无关抗原和LG2细胞的scFv 119被用作阴性对照。scFv W9特异性地与WM1158细胞系反应。

[0015] 图2.scFv W9与多种类型人细胞系的反应性。6种黑素瘤细胞系、4种乳癌细胞系、头颈部鳞状细胞癌细胞系、3种胰腺癌细胞系、膀胱癌细胞系、肺癌细胞系、上皮癌细胞系、结肠癌细胞系、肾癌细胞系、前列腺癌细胞系和卵巢癌细胞系被铺于96孔板并与scFv W9在室温孵育2小时。使用c-myc特异性mAb 9E10和HRP-链酶亲和素检测scFv的结合。scFv W9与所有黑素瘤细胞系、2种乳癌细胞系、头颈部鳞状细胞癌细胞系、胰腺癌细胞系、膀胱癌细胞系、肺癌细胞系、上皮癌细胞系、肾癌细胞系、卵巢癌细胞系和神经胶质瘤细胞系都有反应。

[0016] 图3a和3b.内质蛋白被鉴定为scFv W9识别的抗原。WM1158黑素瘤细胞裂解物与scFv W9进行免疫沉淀。使用I类HLA-特异性mAb TP25.99和HMW-MAA特异性scFv C21作为对照。在还原性的10%SDS-PAGE上分辨所述沉淀物中的蛋白质并用考马斯蓝染色。94-KDa是所述W9沉淀所特有的(A)。从T24(膀胱癌)、SUM149(乳癌)和SLR21(肾癌)细胞系的裂解物获得了相同的结果。从所述SDS凝胶切离所述特异性条带并通过质谱分析。在94-KDa条带中鉴别到的人蛋白为内质蛋白。

[0017] 图4.碳水化合物在scFv W9识别的决定簇的表达中的作用。将COL038细胞在存在0.5μg/ml衣霉素的情况下培养72小时。在只加入DMSO的培养基中孵育细胞并使用所述mAb TP25.99作为对照。通过ELISA检验细胞与scFv W9的结合。细胞与scFv W9在4℃孵育2小时。使用mAb 9E10和HRP-山羊抗小鼠IgG抗体检测scFv的结合。在450nm处读出吸光度,衣霉素处理诱导了scFv W9与COL038细胞的结合的强烈下降。因此,碳水化合物在scFv W9识别的决定簇的表达中起作用。

[0018] 图5a和5b.scFv W9对重组犬内质蛋白(Grp94)的反应性的特异性。将与内质蛋白(Grp94)在氨基酸序列上显示98.5%同源性的重组犬内质蛋白(Grp94)以20μg/孔固定在96孔板中,并与scFv W9在室温孵育2小时。使用mAb 9E10和HRP-山羊抗小鼠IgG抗体检测scFv的结合。在450nm处读出吸光度。scFv 119和BSA用作阴性对照。scFv W9识别在细胞膜上表达的内质蛋白决定簇。

[0019] 图6.重组犬内质蛋白(Grp94)对scFv W9与COL038细胞结合的剂量依赖的抑制。两倍稀释的重组犬内质蛋白(Grp94)与scFv W9预孵育。将所述混合物加入到接种有COL038细胞的96孔板。使用mAb9E10和HRP-山羊抗小鼠IgG抗体检测scFv的结合。在450nm处读出吸光度。B_{2m}用作对照。重组犬Grp94特异性抑制scFv W9与COL038细胞的结合。

[0020] 图7a和7b.用内质蛋白(Grp94) cDNA转染293细胞对scFv W9结合的影响。用3μg Grp94HSP90B1cDNA克隆通过电穿孔转染293细胞。将细胞与scFv W9和mAb 9E10孵育,然后与FITC-山羊抗小鼠IgG抗体孵育。通过流式细胞仪分析细胞。pCMV6-XL4载体被用作对照。未转染的细胞用作对照。电穿孔增加了scFv W9的结合。被scFv识别的抗原的表达通过热休克调节。

[0021] 图8a和8b.用内质蛋白(Grp94) shRNA转导FO-1细胞对scFv W9结合的影响。用内质蛋白(Grp94) shRNA和对照shRNA(ABCB5)转导FO-1细胞。将细胞与scFv W9和mAb 9E10孵育,然后与FITC-山羊抗小鼠IgG抗体孵育。然后通过流式细胞仪分析细胞。与对照shRNA相比,内质蛋白(Grp94) shRNA抑制scFv W9的结合。

[0022] 图9.碳水化合物在mAb W9识别的表位的表达中的作用。将人胰脏腺癌MIAPaCa-2 (5×10⁵)与或不与2μl的α-2(3,6,8,9)-神经氨酸酶在50μl RPMI 1640培养基中在5%CO₂恒温箱中于37℃下孵育24小时。然后将所述处理的细胞用mAb W9染色并通过流式细胞仪分析。用mAb TP25.99处理的细胞作对照。

[0023] 图10.在人胰脏腺癌MIAPaCa-2癌起始细胞上被mAb W9识别的细胞外内质蛋白(Grp94)表位的表达。将人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞与ALDEFLUOR孵育以检测ALDH活性(测试组)并用mAb W9染色。与ALDEFLUOR+DAEB抑制剂孵育并用mAb W9染色的细胞用作参考(对照)。人Ig(HiG)被用作对照。标明了癌起始细胞——被鉴定为ALDH^{bright}的细胞——的百分数。

[0024] 图11.通过mAb W9对手术移除的人胰脏腺癌癌灶进行免疫组织化学染色。用mAb W9(1μg/ml)染色手术移除的人胰脏腺癌癌灶和来自同一患者的正常胰腺组织的冷冻切片。(X200)。

[0025] 图12.使用mAb W9对人基底型(basal)乳癌MDA-MB-231和人黑素瘤异种移植物MV3上的内质蛋白(Grp94)表达的IHC染色分析。用mAb W9(5μg/ml)染色福尔马林固定且石蜡包埋的人基底型乳癌MDA-MB-231细胞、人管腔型(luminal)乳癌MCF-7细胞和人黑素瘤异种移

植物MV3 (X200)。用mAb W9进行的免疫组织化学染色显示MDA-MB-231细胞和MV3异种移植物被mAb W9 (5 μ g/ml) 强烈地染色。在MCF-7细胞中没有检测到染色。

[0026] 图13.mAb W9显著地抑制表达内质蛋白 (Grp94) 的肿瘤细胞的生长。将人癌细胞 (1×10^4 /孔) 接种于96孔板 (加入1%FCS的RPMI 1640) 并用mAb W9 (5 μ g/ml) 处理72小时。人Ig (HIg) 用作对照。然后通过MTT测定检验细胞。结果表示为生长抑制百分数%。*p值<0.05;**p值<0.01。

[0027] 图14. 癌细胞中mAb W9抗体诱导的细胞凋亡。分别使人MV3 (黑素瘤) 细胞和MIAPaCa-2 (胰腺腺癌) 细胞 (4×10^5 /ml) 饥饿24小时和3小时, 然后与mAb W9 (50 μ g/ml) 在含有1.5%FCS的RPMI 1640培养基中孵育。6小时后, 调查细胞中膜联蛋白V/PI染色的凋亡细胞的百分数。通过流式细胞仪分析细胞。人Ig (HIg) 用作阴性对照。

[0028] 图15. 在人黑素瘤M21细胞中mAb W9抗体对裂解的PARP的诱导。将人黑素瘤M21细胞 (4×10^5 /ml) 与mAb W9 (5 μ g/ml) 在含有1.5%FCS的RPMI 1640培养基中孵育72小时。通过蛋白质印迹 (Western blot) 分析检验细胞裂解物中的裂解的PARP。 β -肌动蛋白用作上样对照。mAb W9强烈地增加了裂解的PARP的表达。

[0029] 图16. 在人黑素瘤MV3细胞中mAb W9抗体对裂解的胱天蛋白酶-3 (caspase-3) 的诱导。使人黑素瘤MV3细胞 (4×10^5 /ml) 饥饿24小时, 然后与mAb W9 (50 μ g/ml) 在含有1.5%FCS的RPMI 1640培养基中孵育。通过Western blot检验细胞裂解物中的裂解的胱天蛋白酶-3。 β -肌动蛋白用作上样对照。用IMAGJ[®]软件测定结果条带的密度, 与 β -肌动蛋白条带的密度进行归一化, 显示在各自的条带下面。mAb W9强烈地增加了裂解的胱天蛋白酶-3的表达。在以HIg处理的细胞中没有检测到效果。

[0030] 图17. 由mAb W9介导的对人黑素瘤MV3细胞的细胞依赖性裂解。将人黑素瘤MV3细胞用50 μ Ci的⁵¹Cr标记并以 0.4×10^6 个细胞/ml的密度重悬, 与mAb W9 (50、10、2 μ g/ml) 在96孔组织培养-U型底-测定板中混合。人Ig (HIg) 用作对照。在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟后, 加入PBMC (40:1E:T) 并在CO₂恒温箱中于37 $^{\circ}$ C下孵育4小时。通过在Packard TOPCOUNTTM Microplate Scintillation Counter微板闪烁计数器中计数无细胞的上清测定⁵¹Cr的释放。

[0031] 图18. 由mAb W9介导的人黑素瘤MV3细胞的补体依赖的裂解。将人黑素瘤MV3细胞用50 μ Ci的⁵¹Cr标记并以 1×10^6 个细胞/ml的密度重悬。将所述靶细胞与mAb W9 (50、10、2 μ g/ml) 在存在人血清补体的情况下孵育。人Ig (HIg) 用作对照。在CO₂恒温箱37 $^{\circ}$ C孵育2小时后, 通过在Packard TopCountTM Microplate Scintillation Counter微板闪烁计数器中计数无细胞的上清测定⁵¹Cr的释放。

[0032] 图19.mAb W9对人胰腺腺癌MIAPaCa-2癌起始细胞体外增殖的抑制。将人胰腺腺癌MIAPaCa-2细胞与mAb W9 (25 μ g/ml) 在37 $^{\circ}$ C孵育48小时。然后收获细胞并用ALDEFLUOR[®]染色 (测试组)。用ALDEFLUOR[®]+DAEB染色的细胞用作参考 (对照组)。人Ig (HIg) 用作对照。标明了癌起始细胞——被鉴定为ALDH^{bright}的细胞——的百分数。

[0033] 图20.mAb W9对胰腺MIAPaCa-2和PANC 1细胞中信号途径RAS-MEK-ERK和FAK的抑制。将所述人胰腺MIAPaCa-2和PANC 1细胞以每孔 1.0×10^5 个的浓度接种在6孔板的含5% FCS的RPMI 1640培养基中, 与所述W9上清或者所述对照上清或者不作处理在37 $^{\circ}$ C孵育48小时。用抗RAS、C-Raf、磷酸化 (p) -ERK1/2、ERK1/2、(p) -FAK (Tyr397)、FAK、 β -连环蛋白、p-

AKT (Ser473) 和AKT的mAb通过蛋白质印迹检验细胞裂解物。钙联接蛋白和 β -肌动蛋白用作上样对照。

[0034] 图21.mAb W9对人黑素瘤M21细胞中信号途径的抑制。将所述人黑素瘤M21细胞以每孔 1.0×10^5 个细胞的浓度接种在6孔板的含5%FCS的RPMI 1640培养基中,与mAb W9 (5 μ g/ml) 孵育72小时。用抗磷酸化(p)-AKT、Bcl-2、C-Raf、(p)-ERK1/2、PKC α 、 β -连环蛋白mAb通过蛋白质印迹检验细胞裂解物。人Ig (HIg) 和PBS用作阴性对照。钙联接蛋白用作上样对照。

[0035] 图22.mAb W9对人黑素瘤MV3细胞中信号途径的抑制。将人黑素瘤MV3细胞与mAb W9在37 $^{\circ}$ C在RPMI 1640中孵育6小时。然后制备细胞裂解物并用抗RAS、Met、p-Met、 β -连环蛋白、Ras、C-RAF、p-AKT和p-ERK1/2、Thr202/Tyr204通过蛋白质印迹检验。 β -肌动蛋白用作上样对照。与HIg孵育的细胞用作对照。

[0036] 图23.在用mAb W9处理的小鼠中已建立的肺转移的减少。静脉注射MV3黑素瘤细胞(每只小鼠 1.4×10^8 个细胞)。15天后每48小时用mAb W9(每只小鼠100 μ g,静脉注射)处理小鼠。在第25天,处死小鼠,取肺,用福尔马林固定并用H&E染色以分析肿瘤区域。所示出的值为每组的平均肿瘤面积。**指示p值<0.01。

[0037] 图24. 化学治疗剂对UACC-257黑素瘤细胞的内质蛋白(Grp94)表达的增强。将人黑素瘤UACC-257细胞(2×10^5 /ml)在含有10%FCS、5-FU (300 μ M)、顺铂(10 μ M)和紫杉醇(20nM)的RPMI 1640培养基中孵育48小时。收获细胞,用mAb W9染色并通过流式细胞仪分析。未处理的细胞用作对照。示出了染色细胞的百分数和平均荧光强度(MFI)。

[0038] 图25a和25b.mAb W9与5-FU和环巴胺(cyclopamine)的组合对人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞增殖的抑制。将人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞(每孔 2.5×10^3 个细胞)接种在96孔板(加入5%FCS的RPMI 1640培养基),在37 $^{\circ}$ C下和5%CO₂气氛中,用mAb W9 (5 μ g/ml) 与5-FU (10 μ M) (A.),或mAb W9 (5 μ g/ml) 与环巴胺 (20 μ M) (B.) 的组合处理1、2、3天。然后通过MTT测定检验细胞。540nm处的O.D.值指示活细胞。

[0039] 图26.mAb W9与5-FU和环巴胺的组合对人胰脏腺癌MIAPaCa-2 癌起始细胞体外增殖的抑制。将人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞与mAb W9 (25 μ g/ml)、环巴胺 (20 μ M) 和5-FU (10 μ M) 在37 $^{\circ}$ C孵育48小时。然后用含或不含DEAB抑制剂的ALDEFLUOR染色细胞,以鉴定ALDH^{bright}细胞。抗I类HLA mAb TP25.99用作对照。标明了癌起始细胞——被鉴定为ALDH^{bright}的细胞——的百分数。

[0040] 图27.mAb W9与5-FU和环巴胺的组合对胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞凋亡的诱导。使人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞(4×10^5 /ml) 饥饿3小时,然后与mAb W9 (10 μ g/ml)、环巴胺 (20 μ M) 和5-FU (10 μ M) 在含有1.5%FCS的RPMI 1640培养基中孵育。24小时后,调查细胞中膜联蛋白V/PI染色的凋亡细胞的百分数。通过流式细胞仪分析细胞。HIg用作阴性对照。

[0041] 图28a和28b.mAb W9与辐射和环巴胺的组合对人胰脏腺癌MIAPaCa-2癌起始细胞体外增殖的抑制。以20Gy的剂量辐射人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞(4×10^5 /ml) (图A),并与mAb W9 (10 μ g/ml) 和环巴胺 (20 μ M) 在37 $^{\circ}$ C孵育72小时。然后用含或不含DEAB抑制剂的ALDEFLUOR染色细胞,以鉴定ALDH^{bright}细胞。未受辐射的细胞用作对照(图B)。标明了癌起始细胞——被鉴定为ALDH^{bright}的细胞——的百分数。

[0042] 图29.mAb W9与辐射和环巴胺的组合对胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞凋亡的诱导。以20Gy的剂量辐射人胰脏腺癌MiaPaCa-2细胞(4×10^5 /ml),并与mAb W9 (20 μ g/ml) 和环巴胺

(20 μ M) 孵育。8小时后,检验细胞中膜联蛋白V/PI染色的凋亡细胞的百分数。通过流式细胞仪分析细胞。未受辐射的细胞和人Ig (HIg) 用作对照。

[0043] 图30.mAb W9与5-FU和环巴胺的组合对人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞中信号途径的抑制。将人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞与mAb W9、环巴胺(20 μ M) 和5-FU(10 μ M) 在37 $^{\circ}$ C孵育2天(图D)。然后制备细胞裂解物并用抗RAS、C-Raf、磷酸化(p)-MEK(Ser217/221)、MEK、pERK(Thr202/Tyr204)、ERK、p-AKT(Ser473)、AKT的mAb通过蛋白质印迹测试。钙联接蛋白用作上样对照。用单独的mAb W9(图A),用mAb W9和环巴胺(图B) 以及用mAb W9和5-FU(图C) 孵育的细胞用作对照。

[0044] 图31.mAb W9与辐射和环巴胺的组合对人胰脏腺癌MIAPaCa-2 细胞中信号途径的抑制。以20Gy的剂量辐射人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞,并与mAb W9(10 μ g/ml) 和环巴胺(20 μ M) 在37 $^{\circ}$ C孵育48小时。然后制备细胞裂解物并用抗RAS、磷酸化(p)-ERK(Thr202/Tyr204)、ERK、p-AKT(Ser473)、AKT、SHh、GLI1的mAb通过蛋白质印迹测试。钙联接蛋白用作上样对照,钙联接蛋白和 β -肌动蛋白用作上样对照。

[0045] 序列表

[0046] 在随附的序列表中使用37C.F.R.1.822定义的核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码示出了核酸和氨基酸序列。每条核酸序列仅示出一条链,但是应认为通过任何对所引链的引用而将其互补链包括在内。所述序列表已作为ASCII文本文件[Sequence_Listing.txt,June15,2011,19.4KB]提交,其以引用的方式纳入本文。

[0047] SEQ ID NO:1是特异性结合内质蛋白的抗体重链的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO:2是特异性结合内质蛋白的抗体轻链的氨基酸序列。

[0049] SEQ ID NO:3是编码特异性结合内质蛋白的抗体重链的核酸序列。

[0050] SEQ ID NO:4是特异性结合内质蛋白的抗体轻链的核酸序列。

[0051] SEQ ID NO:5是人内质蛋白的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO:6是编码人内质蛋白的核酸序列。

[0053] SEQ ID NO:7和8是内质蛋白多肽的氨基酸序列。

具体实施方式

[0054] I. 缩写

[0055] 5-FU: 氟尿嘧啶

[0056] ADCC: 抗体依赖的细胞介导的细胞毒性

[0057] Ag: 抗原

[0058] ALDH^{bright}: 醛脱氢酶(bright)

[0059] 膜联蛋白V: 膜联蛋白A5

[0060] β -连环蛋白: 钙粘蛋白相关的蛋白

[0061] B-Raf: 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶B-Raf

[0062] CDC: 补体介导的细胞毒性

[0063] CDR: 互补决定区

[0064] C-Raf: RAF原癌基因丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶

[0065] DEAB: 4-(二乙氨基) 苯甲醛

- [0066] DMEM: 达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基
- [0067] ER: 内质网
- [0068] ERK1/2: 细胞外信号调节的激酶1/2
- [0069] FAK: 粘着斑激酶
- [0070] FBS: 胎牛血清
- [0071] FR: 框架区
- [0072] GLI1: 神经胶质瘤-相关的癌基因同系物1
- [0073] Grp: 葡萄糖调节的蛋白
- [0074] Gy: 戈瑞(焦耳/千克)
- [0075] HRP: 辣根过氧化物酶
- [0076] Ig: 免疫球蛋白
- [0077] mAb: 单克隆抗体
- [0078] MEK: 促分裂原活化蛋白激酶激酶
- [0079] Met: c-Met
- [0080] O.D.: 光密度
- [0081] PBS: 磷酸缓冲盐水
- [0082] p-ERK1/2: 磷酸化的细胞外信号调节的激酶1/2
- [0083] p-FAK: 磷酸化的粘着斑激酶
- [0084] PI: 碘化丙啶
- [0085] RAS: 大鼠肉瘤
- [0086] scFv: V_H和V_L两者的单链可变区
- [0087] SHH: 皮卡丘素(Sonic hedgehog homolog)
- [0088] V_H: 重链可变区
- [0089] V_L: 轻链可变区
- [0090] II. 术语

[0091] 除非另有说明,根据惯例用法使用技术术语。分子生物学常见术语的定义可以见于Benjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 和Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

[0092] 为帮助理解本公开内容的各个实施方案,提供了如下的具体术语解释:

[0093] 抗体: 至少包括可特异性识别并特异性结合抗原(例如内质蛋白或其片段)表位的轻链或重链免疫球蛋白可变区域的多肽配体。抗体由重链和轻链组成,所述重链和轻链每个均具有可变区域,称作重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)。一起地,所述V_H区和V_L区负责结合被抗体识别的抗原。

[0094] 抗体包括完整免疫球蛋白和变体。可特异性结合抗原例如内质蛋白的抗体的功能片段(抗原结合片段)在本领域是已知的,例如可特异性结合靶抗原的Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、单链Fv蛋白("scFv")和二硫化物稳定的Fv蛋白("dsFv")。scFv蛋白是融合蛋

白,其中免疫球蛋白的轻链可变区和免疫球蛋白的重链可变区通过接头结合,同时在dsFv中,所述链已被突变以引入二硫键来稳定所述链的缔合。所述术语还包括基因工程形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)和异缀合抗体(例如双特异性抗体)。还见于,Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL);Kuby,J., Immunology,3rd Ed.,W.H.Freeman&Co.,New York,1997。功能性片段还称为“抗原结合”片段,因为它们特异性结合所述靶抗原,例如人内质蛋白。

[0095] 一般地,天然产生的免疫球蛋白具有通过二硫键互相连接的重(H)链和轻(L)链。有两种类型的轻链,lambda(λ)和kappa(κ)。有5种决定抗体分子功能活性的主要的重链类别(或同种型):IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0096] 每个重链和轻链含有恒定区和可变区,(所述区也称为“域”)。组合地,所述重链和轻链的可变区特异性结合抗原。轻链和重链的可变区含有被3个高变区(也称为“互补决定区”或“CDR”)间隔的“框架”区。框架区和CDR的范围已经确定(参见,Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1991,在此以引用的方式纳入本文)。现在Kabat数据库是在线维护的,CDR序列可以确定,例如参见IMGT/V-QUEST程序版本:3.2.18.,March 29,2011,可从因特网和Brochet,X.et al.,Nucl.Acids Res.36,W503-508,2008获得。不同轻链或重链的框架区的序列在同一物种例如人内是相对保守的。抗体的框架区——所述组成的轻链和重链的结合框架区——用于在三维空间中安置并排列所述CDR。

[0097] CDR主要负责结合抗原表位。每条链的CDR一般称为CDR1、CDR2和CDR3,从N-末端开始顺序编号,并且一般还通过所述具体的CDR所在的链来鉴定。因此,V_H CDR3位于具有该结构的抗体的重链可变区,然而V_L CDR1是来自具有该结构的抗体的轻链可变区的CDR1。结合内质蛋白的抗体通常具有特异性的V_H区和V_L区序列,因此也具有特异性的CDR序列。有不同特异性的抗体(即对不同抗原有不同结合位点)具有不同的CDR。虽然抗体与抗体之间的CDR不同,但是在所述CDR内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。CDR内的这些位置被称为特异性决定残基(SDR)。

[0098] “V_H”或“VH”是指免疫球蛋白重链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的可变区。“V_L”或“VL”是指免疫球蛋白轻链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的可变区。

[0099] “单克隆抗体”是由B淋巴细胞的单个克隆或其中转染有单个抗体的轻链和重链基因的细胞产生的抗体。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法产生,例如通过骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合制造杂合的抗体形成细胞。单克隆抗体包括人源化的单克隆抗体。

[0100] “嵌合抗体”具有来自一个物种例如人的框架残基和来自另一物种的CDR(通常赋予抗原结合),例如特异性结合内质蛋白的鼠抗体。

[0101] “人”抗体(也称为“完全人源性”抗体)是包括人框架区和人免疫球蛋白的全部CDR的抗体。在一个实例中,所述框架和所述CDR是源自于相同的人重链和/或轻链氨基酸序列。但是,可以设计来自一个人抗体的框架以包括来自不同的人抗体的CDR。“人源化”的免疫球蛋白是包括人框架区和一个或多个来自非人(例如小鼠、大鼠或合成的)免疫球蛋白的CDR的免疫球蛋白。提供CDR的非人免疫球蛋白被称为“供体”,提供框架的人免疫球蛋白被称为“受体”。在一个实施方案中,在一个人源化免疫球蛋白中,全部CDR均是来自于供体免疫球

蛋白。恒定区不一定存在,但是如果它们存在,则它们必须与人免疫球蛋白恒定区基本相同,即具有至少约85-90% (例如约95%或更高) 的同一性。因此,可能除所述CDR之外,人源化免疫球蛋白的所有部分均与天然 人免疫球蛋白序列的对应部分基本相同的。“人源化”抗体是包括人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。人源化抗体结合的抗原与提供CDR的供体抗体结合的抗原相同。人源化免疫球蛋白或抗体的受体框架可能有有限数量的氨基酸被取自供体框架的氨基酸取代。人源化的或其他的单克隆抗体可以具有对抗原结合或其他免疫球蛋白功能基本没有影响的额外的保守性氨基酸取代。人源化免疫球蛋白可以通过基因工程的方式构建(例如参见,美国专利No.5,585,089)。

[0102] 抗原:在动物中可以刺激抗体产生或T细胞反应的化合物、组合物或物质,包括被注射或吸收到动物内的组合物。抗原与特异性体液或细胞免疫产物反应,包括由异源性免疫原诱导的那些。一种示例性的抗原是内质蛋白。术语“抗原”包括全部相关的抗原表位。“表位”或“抗原决定簇”是指与B细胞和/或T细胞反应的抗原上的位点。表位可以由连续的氨基酸或由通过蛋白质三级折叠紧靠的非连续的氨基酸而形成。由连续的氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时一般会保留,然而通过三级折叠形成的表位在以变性溶剂处理时一般会丢失。在单一空间构象中表位一般包括至少3个,更通常至少5个或8-10个氨基酸。测定表位空间构象的方法包括,例如x-射线结晶学和二维核磁共振。

[0103] 抗原可以是组织特异性抗原或疾病特异性抗原。这些术语不是排他的,因为组织特异性抗原也可以是疾病特异性抗原。组织特异性抗原在有限数量的组织例如单一组织中表达。组织特异性抗原的具体非限制性实例为黑素瘤特异性抗原或神经胶质瘤、乳、肺、前列腺、肾或膀胱特异性抗原。疾病特异性抗原在疾病过程例如黑素瘤或其他类型的癌症的同时表达。疾病特异性抗原的具体非限制性实例为其表达与肿瘤形成相关或者是肿瘤形成的预兆的抗原,所述肿瘤例如黑素瘤和/或神经胶质瘤和/或其他类型的癌症(例如内质蛋白)。疾病特异性抗原可以是被T细胞或B细胞识别的抗原。

[0104] 扩增:核酸分子(例如DNA或RNA分子)的扩增是指可增加样本内核酸分子拷贝数的技术的使用。扩增的一个实例是聚合酶链式反应,在其中从受试者收集的生物样品与一对寡核苷酸引物,在允许所述引物与所述样品中核酸模板杂交的条件下接触。所述引物在适合的条件下延伸,从所述模板分离,然后再退火、延伸、分离以增加所述核酸的拷贝数。所述扩增的产物可以使用标准技术通过电泳、限制性核酸内切 酶切割带型、寡核苷酸杂交或连接、和/或核酸测序来表征,扩增的其他实例包括美国专利No.5,744,311公开的链置换扩增;美国专利No.6,033,881公开的无转录等温扩增;WO 90/01069公开的修复链反应扩增;EP-A-320308公开的连接酶链反应扩增;美国专利No.5,427,930公开的填隙连接酶链反应扩增;和美国专利No.6,025,134公开的NASBATMRNA无转录扩增。

[0105] 动物:活的多细胞脊椎生物,一个包括例如哺乳动物和鸟类的种类。术语哺乳动物包括人和非人哺乳动物,包括非人的灵长类。类似地,术语“受试者”包括人以及兽医的受试者。

[0106] 结合亲和力:抗体对抗原的亲和力。在一个实施方案中,亲和力是通过由Frankel et al., Mol. Immunol., 16:101-106, 1979描述的Scatchard方法的修改方法来计算的。在另一个实施方案中,结合亲和力是通过抗原/抗体离解速率测量的。在另一个实施方案中,高的结合亲和力是通过竞争性放射免疫测定来测量的。在另一个实施方案中,结合亲和力是

通过ELISA测量的。抗体以高亲和力“特异性结合”抗原例如内质蛋白,并且不会明显地结合其他无关抗原。

[0107] 乳癌:乳房组织的良性或恶性瘤病症。乳癌最常见的类型是导管癌。原位导管癌是导管的非侵袭性的瘤病症。小叶癌不是侵袭性的疾病,但其是可能发展癌的指示。乳房的浸润癌(恶性)可分为几个阶段(I、IIA、IIB、IIIA、IIIB和IV)。

[0108] 化学治疗剂:在可由异常细胞生长表征的疾病治疗中有治疗用途的任何化学试剂。这样的疾病包括肿瘤、瘤(neoplasm)和癌症以及通过增生性生长而表征的疾病例如银屑病。在某些实施方案中,化学治疗剂是用于治疗乳癌、黑素瘤和/或神经胶质瘤的试剂。在一个实施方案中,化学治疗剂是放射性化合物。本领域技术人员可以容易地鉴定可用的化学治疗剂(例如参见Slapak and Kufe,Principles of Cancer Therapy,Chapter 86in Harrison's Principles of Internal Medicine,14th edition;Perry et al.,Chemotherapy,Ch.17in Abeloff,Clinical Oncology 2nd ed., ©2000Churchill Livingstone,Inc;Baltzer L,Berkery R(eds):Oncology Pocket Guide to Chemotherapy,2nd ed.St.Louis,Mosby-Year Book,1995;Fischer DS,Knobf MF,Durivage HJ(eds):The Cancer Chemotherapy Handbook,4th ed.St.Louis,Mosby-Year Book,1993)。联合化疗是给予受试者多于一种试剂以治疗癌症,例如将特异性结合内质蛋白的抗体与放射性或化学化合物联合给予受试者。

[0109] 嵌合抗体:包括源于两种不同抗体——一般属于不同物种——的序列的抗体。最典型地,嵌合抗体包括人和鼠抗体结构域,通常人恒定区和鼠可变区、鼠CDR和/或鼠SDR。

[0110] cDNA(互补DNA):缺少内部的非编码部分(内含子)以及决定转录的调节序列的一段DNA。实验室中通过从细胞中提取的信使RNA的反转录来合成cDNA。

[0111] 化学治疗剂:在可由异常细胞生长表征的疾病治疗中有治疗用途的试剂(例如抗癌试剂)。这样的疾病包括肿瘤、瘤和癌症以及通过增生性生长而表征的疾病例如银屑病。在一个实施方案中,化学治疗剂是用于治疗瘤例如实体瘤的试剂。化学治疗剂可以是蛋白质或非蛋白质试剂,例如小分子药物、抗体、肽、蛋白质和免疫调节剂。在一个实施方案中,化学治疗剂是放射性分子。本领域技术人员可以容易地鉴定化学治疗剂(例如参见Slapak and Kufe,Principles of Cancer Therapy,Chapter 86in Harrison's Principles of Internal Medicine,14th edition;Perry et al.,Chemotherapy,Ch.17in Abeloff,Clinical Oncology 2nd ed., ©2000Churchill Livingstone,Inc;Baltzer L,Berkery R(eds):Oncology Pocket Guide to Chemotherapy,2nd ed.St.Louis,Mosby-Year Book,1995;Fischer DS,Knobf MF,Durivage HJ(eds):The Cancer Chemotherapy Handbook,4th ed.St.Louis,Mosby-Year Book,1993)。

[0112] 保守性变体:“保守性”氨基酸取代是基本不影响或降低抗体特异性结合内质蛋白的亲力的那些取代。例如,特异性结合内质蛋白的人抗体可以包括最多约1个、最多约2个、最多约5个、最多约10个或最多约15个的保守性取代并且特异性结合原始的内质蛋白多肽。术语保守性变化还包括取代的氨基酸代替未被取代的原来的氨基酸的用途,条件是抗体特异性结合内质蛋白。非保守性取代是那些减少结合到内质蛋白的活性的取代。

[0113] 提供功能相似的氨基酸的保守性氨基酸取代表是本领域普通技术人员已知的。如下6组是被认为互相是保守性取代的氨基酸的实例:

[0114] 1) 丙氨酸(A), 丝氨酸(S), 苏氨酸(T);

[0115] 2) 天冬氨酸(D), 谷氨酸(E);

[0116] 3) 天冬酰胺(N), 谷氨酰胺(Q);

[0117] 4) 精氨酸(R), 赖氨酸(K);

[0118] 5) 异亮氨酸(I), 亮氨酸(L), 甲硫氨酸(M), 缬氨酸(V);

[0119] 6) 苯丙氨酸(F), 酪氨酸(Y), 色氨酸(W)。

[0120] 互补决定区(CDR): 共同限定天然Ig结合位点的天然Fv区的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。Ig的轻链和重链各有3个CDR, 分别命名为L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3和H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3。

[0121] 接触: 以直接物理联系放置; 包括固体和液体形式。

[0122] 细胞毒性: 分子例如免疫毒素对意在被靶向的细胞的毒性, 与生物体的其余细胞相反。相反地, 在一个实施方案中, 术语“毒性”是指免疫毒素对意图被所述免疫毒素的靶向部分打靶的那些细胞除外的细胞的毒性, 术语“动物毒性”是指免疫毒素对动物的毒性, 这是通过免疫毒素对意图被免疫毒素打靶的细胞除外的细胞的毒性而实现的。

[0123] 简并变体: 编码内质蛋白多肽的多核苷酸, 其包括由于遗传密码的简并性产生的序列。有20种天然氨基酸, 其大多数被多于一个密码子编码。因此, 所有简并核酸序列被包括在本公开内容内, 只要由所述核酸序列编码的内质蛋白多肽的氨基酸序列没有改变。

[0124] 诊断: 鉴定病理状况例如但不限于黑素瘤、卵巢癌、乳腺癌或神经胶质瘤的存在或性质。诊断方法在其灵敏度和特异性上不同。诊断测定的“灵敏度”是测试呈阳性的患病个体的百分数(真阳性的百分数)。诊断测定的“特异性”是1减去假阳性率, 其中假阳性率定义为测试呈阳性但没有疾病的那些个体的比例。虽然某一具体的诊断方法可能不能提供对病症的明确诊断, 如果所述方法提供有助于诊断的阳性指示就足够了。“预后性症状”是病理状况例如癌症或转移发展(例如严重度)的可能性。

[0125] 效应分子: 意在嵌合分子靶向的细胞产生合乎需要的效果的嵌合分子的部分。效应分子也称为效应部分(EM)、治疗性试剂或诊断试剂或类似的术语。

[0126] 治疗性试剂包括化合物例如核酸、蛋白质、肽、氨基酸或衍生物、糖蛋白、放射性同位素、脂质、碳水化合物或重组病毒。核酸治疗性和诊断的部分包括反义核酸、与单链或双链DNA共价交联的衍生寡核苷酸、和三链形成寡核苷酸。或者, 连接到靶向部分例如抗内质蛋白抗体的分子可以是包裹系统例如脂质体或微团, 所述脂质体或微团含有治疗性组合物例如药物、核酸(例如反义核酸)或可以被保护以免直接暴露于循环系统的另一个治疗性部分。制备附着于抗体的脂质体的方法是本领域技术人员已知的(例如参见美国专利No.4,957,735; 和Connor et al., Pharm. Ther. 28:341-365, 1985)。诊断试剂或部分包括放射性同位素和其他可检测标记。可用于此目的的可检测标记也是本领域已知的, 包括放射性同位素例如³⁵S、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、¹⁹F、^{99m}Tc、¹³¹I、³H、¹⁴C、¹⁵N、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In和¹²⁵I、荧光团、化学发光试剂和酶。

[0127] 表位: 抗原决定簇。这些是分子上具体的化学基团或肽序列, 其具有抗原性, 即其能诱发特异性免疫反应。抗体特异性结合多肽上具体的抗原表位。表位可以从连续的氨基酸或从通过蛋白质三级折叠紧靠的非连续的氨基酸而形成。由连续的氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时一般会保留, 然而通过三级折叠形成的表位在以变性溶剂处理时一般会

丢失。在单一空间构象中表位一般包括至少3个,更通常至少5个或8-10个氨基酸。测定表位空间构象的方法包括,例如x-射线结晶学和二维核磁共振。参见,例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol.66, Glenn E. Morris, Ed (1996)。表位可以是糖基化的。因此,抗体可以特异性结合糖基化形式(或非糖基化形式)的蛋白质。

[0128] 内质蛋白:一种还被称为葡萄糖调节的蛋白(Grp) 94(Grp94)的蛋白质,其是热休克蛋白90(Hsp90)家族的内质网(ER)驻留成员。在体内,hsp90和内质蛋白与客户蛋白质相互作用,并发挥作用以保护它们免遭泛素依赖性蛋白酶体降解。虽然所述内质蛋白在所有细胞类型中组成型表达,但是在包括低葡萄糖水平、低细胞外pH、突变蛋白表达和病毒感染在内的多种应激条件下,其表达被上调。热休克蛋白具有细胞保护功能,并直接或间接地调节细胞凋亡。

[0129] 已经证实在包括肝细胞癌、结肠直肠癌和肺癌细胞在内的肿瘤细胞中内质蛋白的细胞表面表达增加,并且内质蛋白对某些肿瘤细胞具有抗凋亡效果。此外,当慢性乙肝病毒(HBV)感染进展到肝硬化和肝细胞癌(HCC)时,观察到内质蛋白的水平增加。已经研究了Hsp90和内质蛋白的抑制剂(例如格尔德霉素(GA)和其低毒衍生物17-AAG)在癌症治疗中的效力。

[0130] 示例性的编码内质蛋白(Grp94)的核酸包括但不限于: **GENBANK®** 登录号 No.NM_003299、No.BC066656(智人);No.NM_011631(小鼠);No.NM_001045763:(热带非洲爪蟾(*Silurana*));No.NM_214103(野猪);No.NM_98210(斑马鱼);No.NM_001012197(褐鼠);No.NM_001134101:苏门答腊猩猩;No.NM_001003327(家犬)热休克蛋白90kDaβ(Grp94);No.NM_204289(原鸡)。

[0131] 表达调控序列:调节与其可操作地连接的异源核酸序列表达的核酸序列。当表达调控序列控制并调节核酸序列的转录(对其翻译的控制和调节视情况而定)时,表达调控序列与所述核酸序列是可操作地连接的。因此,表达调控序列可以包括适当的启动子、增强子、转录终止子、在蛋白编码基因前面的起始密码子(即ATG)、内含子剪接信号、使mRNA正确翻译的对所述基因正确读码框的维护、以及终止密码子。术语“调控序列”意图包括其存在可以影响表达的最少的组分,并且还可以包括其存在有利的额外组分,例如前导序列和融合伴侣序列。表达调控序列可以包括启动子。

[0132] 启动子是足以指导转录的最小序列。还包括那些足以使启动子依赖的基因表达具有可控的细胞类型特异性、组织特异性、或者可被外部信号或试剂诱导的启动子元件,所述元件可以位于所述基因的5'或3'区域。组成型的和可诱导的启动子都包括在内(参见例如 Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987)。例如,当在细菌系统中克隆时,可以使用可诱导的启动子例如细菌噬菌体λ的pL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac杂合启动子)等。在一个实施方案中,当在哺乳动物细胞系统中克隆时,可以使用源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如逆转录病毒长末端重复序列;腺病毒后期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。通过重组DNA或合成技术产生的启动子也可以用于使核酸序列转录。

[0133] 表达调控序列:调节与其可操作地连接的异源核酸序列表达的核酸序列。当表达调控序列控制并调节核酸序列的转录(对其翻译的控制和调节视情况而定)时,表达调控序列与所述核酸序列是可操作地连接的。因此,表达调控序列可以包括适当的启动子、增强

子、转录终止子、在蛋白编码基因前面的起始密码子(即ATG)、内含子剪接信号、使mRNA正确翻译的对所述基因正确读码框的维护以及终止密码子。术语“调控序列”意图包括其存在可以影响表达的最少的组分,并且还可以包括其存在有利的额外组分,例如前导序列和融合伴侣序列。表达调控序列可以包括启动子。

[0134] 启动子是足以指导转录的最小序列。还包括那些足以使启动子依赖的基因表达具有可控的细胞类型特异性、组织特异性、或者可被外部信号或试剂诱导的启动子元件,所述元件可以位于所述基因的5'或3'区域。组成型的和可诱导的启动子都包括在内(参见例如 Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987)。例如,当在细菌系统中克隆时,可以使用可诱导的启动子例如细菌噬菌体λ的pL、plac、ptrp、ptac (ptrp-lac杂合启动子)等。在一个实施方案中,当在哺乳动物细胞系统中克隆时,可以使用源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如逆转录病毒长末端重复序列;腺病毒后期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。通过重组DNA或合成技术产生的启动子也可以用于使核酸序列转录。

[0135] 表达:由核酸到蛋白质的翻译。蛋白质可以表达并留在细胞内,称为细胞表面膜的组分,或者被分泌到细胞外基质或介质中。

[0136] 框架区:插入CDR之间的氨基酸序列。框架区包括轻链可变框架区和重链可变框架区。框架区用来使CDR保持适当的方向以结合抗原。

[0137] 神经胶质瘤:在任何发育阶段都由神经胶质组成的肿瘤。神经胶质瘤包括脑和脊髓的所有内在的瘤,例如星形细胞瘤、室管膜瘤和少突神经胶质瘤。“低级别”神经胶质瘤是分化良好的(非退行发育);这些是良性的,意味着患者有更好的预后。“高级别”神经胶质瘤是未分化的或退行发育的;这些是恶性的,有更坏的预后。

[0138] 糖基化:碳水化合物共价附着到蛋白质例如抗原。糖基化包括N-连接的糖基化、O-连接的糖基化和C-连接的糖基化。

[0139] HAMA(人抗鼠抗体)反应:人受试者中对已经给予其的鼠抗体可变区和恒定区的免疫反应。重复的抗体给药可能导致所述抗体从患者血清中清除的速率增加,还可能引起患者的过敏反应。

[0140] 宿主细胞:载体可在其中增殖并表达其DNA的细胞。所述细胞可以是原核的或真核的。该术语还包括任何受试者宿主细胞的子代。应该理解不是所有子代都与亲代细胞相同,因为在复制期间可能有突变发生。但是,当使用术语“宿主细胞”时,这样的子代被包括在内。

[0141] 免疫反应:免疫系统的细胞例如B细胞、T细胞或单核细胞对刺激的反应。在一个实施方案中,所述反应对具体抗原是特异性的(“抗原特异性反应”)。在一个实施方案中,免疫反应是T细胞反应,例如CD4+反应或CD8+反应。在另一个实施方案中,所述反应是B细胞反应,导致特异性抗体的产生。

[0142] 免疫缀合物:效应分子与特异性结合目标抗原(例如人内质蛋白)的抗体或其功能片段的共价连接。所述效应分子可以是可检测标记、免疫毒素、细胞因子或趋化因子。毒素的具体非限制性实例包括但不限于相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白、假单胞菌(*Pseudomonas*)外毒素(PE,例如PE35、PE37、PE38和PE40)、白喉毒素(DT)、肉毒杆菌毒素或其修饰的毒素,或其他直接或间接抑制细胞生长或杀死细胞的有毒试剂。例如,PE和DT是高毒化合物,一般通

过肝脏毒性引起死亡。但是,通过移除所述PE和DT毒素的天然靶向组分(例如PE的域Ia和DT的B链)并将其用另外的靶向组分例如抗体代替,所述PE和DT可以被修饰为可用作免疫毒素的形式。“嵌合分子”是缀合(偶联)到效应分子的靶向部分例如配体或抗体。所述术语“缀合”或“连接”是指使两个多肽成为一个连续的多肽分子。在一个实施方案中,抗体被接合到效应分子。在另一个实施方案中,接合到效应分子的抗体进一步被接合到脂质或其他分子形成蛋白质或肽以增加其在体内的半衰期。所述连接可以通过化学或重组的方式。在一个实施方案中,所述连接是化学的,其中所述抗体部分和所述效应分子之间的反应产生在所述两个分子之间形成的共价键以形成一个分子。肽接头(短肽序列)可以可选地被包括在所述抗体和所述效应分子之间。因为免疫缀合物起初是由两个有独立功能的分子例如抗体和效应分子制备的,所以它们有时也称为“嵌合分子”。本文使用的所述术语“嵌合分子”因此是指缀合(偶联)到效应分子的靶向部分例如配体或抗体。

[0143] 免疫原性肽:一种肽,其包括等位基因特异性基序或其他序列例如N-末端重复以使得所述肽可结合MHC分子并诱导针对抗原(所述免疫原性肽从其中得到)的细胞毒性T淋巴细胞(“CTL”)反应或B细胞反应(例如抗体产生)。

[0144] 在一个实施方案中,使用本领域已知的序列基序或其他方法例如神经网络或多项式测定来鉴定免疫原性肽。一般地,使用算法来确定肽的“结合阈值”以选择那些具有某些分数的肽,所述分数给予其以特定亲和力结合的高概率并且在该分数时其是免疫原性的。所述算法基于具体位置的具体氨基酸对MHC结合的影响、具体位置的具体氨基酸对抗体结合的影响或在含有基序的肽中具体的取代对结合的影响。在免疫原性肽的序列中,“保守性残基”是在肽中的具体位置以显著高于随机分布预期的频率出现的残基。在一个实施方案中,保守性残基是所述MHC结构可以提供与所述免疫原性肽接触的点的地方。在一个具体非限制性实例中,免疫原性多肽包括内质蛋白的区域或其片段,其中所述多肽在表达所述全长内质蛋白多肽的宿主细胞的细胞表面表达。

[0145] 免疫原性组合物:一种包括多肽例如内质蛋白多肽的组合物,其可诱导针对表达内质蛋白多肽的细胞的可测量CTL反应,或诱导针对内质蛋白多肽的可测量的B细胞反应(例如抗体的产生)。免疫原性组合物还可以诱导细胞因子产生。其还指分离的编码内质蛋白多肽的核酸,其可用于表达所述内质蛋白多肽(因此可用于激发针对该多肽的免疫反应)。对体外使用,免疫原性组合物可由所分离的蛋白质或肽表位组成。对体内使用,所述免疫原性组合物一般包括在可药用载体和/或其他试剂中的所述蛋白质或免疫原性肽。通过本领域认可的测定,可以容易地测试任何具体的肽例如内质蛋白多肽或编码所述多肽的核酸诱导CTL或B细胞反应的能力。免疫原性组合物可以包括佐剂,其对本领域技术人员是已知的。

[0146] 免疫反应条件:包括参考的条件,该条件允许针对具体表位产生的抗体结合到那个表位的程度可检测地比结合到基本上全部其他表位的程度更大,和/或基本上排除结合全部其他表位。免疫反应条件依赖于所述抗体结合反应的形式,一般是在免疫测定方法中使用或体内遇到的那些条件。参见Harlow&Lane(见上文),对免疫测定形式和条件的描述。所述方法中采用的免疫反应条件是“生理条件”,其包括参考的条件(例如温度、渗透性和pH),该条件在活的哺乳动物或哺乳动物细胞内是典型的。虽然应该承认某些器官处在极端条件下,但生物体内和细胞内环境正常地为pH7左右(即从pH 6.0到pH 8.0,更典型地pH

6.5-7.5), 含有水作为主要溶剂, 并且以0℃以上50℃以下的温度存在。渗透性在可支持细胞生活和增殖的范围内。

[0147] 分离的: “分离的”生物组分, 例如核酸、蛋白质(包括抗体)或细胞器, 已经与所述组分天然存在的环境(例如细胞)中的其他生物组分(即其他染色体和额外染色体DNA以及RNA、蛋白质和细胞器)基本分开或被纯化。已经“分离的”核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语还包含通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸。

[0148] 标记: 直接或间接缀合到另一分子(例如抗体或蛋白质)以帮助检测该分子的可检测的化合物或组合物。标记的具体非限制性实例包括荧光标签、酶的连接和放射性同位素。在一个实例中, “标记的抗体”是指另一分子掺入到所述抗体。例如, 所述标记是可检测的标示物, 例如掺入放射性标记的氨基酸或附着到可通过标记的抗生物素蛋白检测的生物素基多肽(例如可以通过光学或比色方法检测的含有荧光标示物或酶活性的链霉亲和素)。标记多肽和糖蛋白的多种方法在本领域是已知的并可以被使用。可用于多肽的标记的实例包括但不限于: 放射性同位素或放射性核苷酸(例如³⁵S、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、¹⁹F、^{99m}Tc、¹³¹I、³H、¹⁴C、¹⁵N、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In和¹²⁵I)、荧光标记物(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明、稀土荧光体(lanthanide phosphor))、酶标记物(例如辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光标示物、生物素基团、被二级指示剂识别的预定的多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、二级抗体结合位点、金属结合域、表位标签)或磁性试剂例如钆螯合物。在某些实施方案中, 标记被多种长度的间隔臂附着以减少可能的空间位阻。

[0149] 接头: 在某些情况中, 接头是在抗体结合片段(例如Fv片段)内的肽, 其用于间接地使重链可变区与轻链可变区连结起来。“接头”还可以是指用于将靶向部分例如抗体连接到效应分子例如细胞毒素或可检测标记的肽。

[0150] 术语“缀合”、“接合”、“键合”或“连接”是指使两个多肽成为一个连续的多肽分子, 或将放射性核素或其他分子共价地附着到多肽例如scFv。在具体上下文中, 该术语包括参考将配体例如抗体部分接合到效应分子。所述连接可以通过化学或重组的方式。“化学方式”是指所述抗体部分和所述效应分子之间的反应使得在所述两个分子之间形成共价键以形成一个分子。

[0151] 哺乳动物: 该术语包括人和非人哺乳动物。类似地, 术语“受试者”包括人以及兽医的受试者。

[0152] 主要组织相容性复合体(MHC): 一般指定的意思包含在不同物种中描述的组织相容性抗原系统, 包括人白细胞抗原(“HLA”)。术语“基序”是指具有确定长度(通常约8到约11个氨基酸)的肽内的残基结构, 其被具体的MHC等位基因识别。对应于每个MHC等位基因的肽基序一般不同, 并且其在高度保守性残基和负结合残基的结构内有差别。

[0153] 黑素瘤: 起源于黑素细胞(产生黑素的细胞)的癌症形式。黑素细胞主要在皮肤被发现, 但还存在于肠和眼睛。皮肤中的黑素瘤包括浅表扩散性黑素瘤、结节性黑素瘤、肢端黑素瘤和恶性雀斑样痣(黑素瘤)。如上所述的任何类型可以产生黑素或可以是无黑色素的。类似地, 任何亚型可以显示粘连形成(向神经性的稠密纤维反应), 所述粘连形成是攻击行为且具有局部复发趋势的标示物。其他黑素瘤包括明细胞肉瘤、粘膜黑素瘤和葡萄膜黑素瘤。

[0154] 影响预后的特征是以毫米为单位的肿瘤厚度(Breslow深度)、皮肤结构相关的深度(Clark水平)、黑素瘤类型、溃疡存在度、淋巴/神经浸润存在度、肿瘤浸润的淋巴细胞存在度(如果存在,预后更好)、病灶位置、卫星病灶存在度以及局部或远端转移存在度。当黑素瘤已经扩散到淋巴结,最重要的因素之一是有恶性肿瘤的结的数量。一个结内的恶性肿瘤的程度也是重要的;微小转移中恶性肿瘤仅是微观的,其具有比大转移更有利的预后。当有远端转移时,5年存活率低于10%;生存中值是6-12个月。到皮肤和肺的转移有更好的预后。到脑、骨和肝的转移与更坏的预后相关。

[0155] 黑素瘤可分为如下阶段:

[0156] 阶段0:原位黑素瘤(Clark水平I),100%存活

[0157] 阶段I/II:侵袭性黑素瘤,85-95%存活

[0158] T1a:原发瘤小于1.00mm,无溃疡,Clark水平II-III

[0159] T1b:原发瘤小于1.00mm,有溃疡或Clark水平IV-V

[0160] T2a:原发瘤1.00-2.00mm,无溃疡

[0161] 阶段II:高风险黑素瘤,40-85%存活

[0162] T2b:原发瘤1.00-2.00mm,有溃疡

[0163] T3a:原发瘤2.00-4.00mm,无溃疡

[0164] T3b:原发瘤2.00-4.00mm,有溃疡

[0165] T4a:原发瘤4.00mm或更大,无溃疡

[0166] T4b:原发瘤4.00mm或更大,有溃疡

[0167] 阶段III:局部转移,25-60%存活

[0168] N1:单个阳性淋巴结

[0169] N2:2-3个阳性淋巴结或局部皮肤/中途转移

[0170] N3:4个阳性淋巴结或淋巴结和局部皮肤/中途转移

[0171] 阶段IV:远端转移,9-15%存活

[0172] M1a:远端皮肤转移,正常乳酸脱氢酶(LDH)

[0173] M1b:肺转移,正常LDH

[0174] M1c:其他远端转移或任何有升高的LDH的远端转移

[0175] 单克隆抗体:由B淋巴细胞的单克隆、其中转染有单个抗体轻链和重链基因的细胞或通过抗体文库中具体的噬菌体产生的抗体,使得所述单克隆抗体包括确定组的CDR并特异性结合目标靶抗原。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法产生,例如(但不限于)通过从骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合制造杂交的抗体形成细胞或从抗体序列的噬菌体展示文库选择。单克隆抗体包括人源化和完全人源性单克隆抗体。本文中,单克隆抗体的功能片段包括特异性结合所述单克隆抗体的靶蛋白(抗原结合)的抗体片段,例如但不限于scFv、Fv、dsRv或Fab。单克隆抗体特异性结合抗原表位,例如糖基化表位。单克隆抗体包括双功能抗体,其中一组或多组CDR特异性结合靶抗原例如内质蛋白和效应子功能增强的Fc和其他乙二醇修饰的抗体。

[0176] 瘤形成、恶性肿瘤、癌症或肿瘤:细胞异常及不受控制地生长的结果。瘤形成、恶性肿瘤、癌症或肿瘤经常可互换地使用。个体中肿瘤的量“肿瘤负荷”,其可以按照所述肿瘤的数量、体积或重量来测量。不会转移的肿瘤称为“良性”。侵袭周围组织和/或可以转移的

肿瘤称为“恶性”。血液肿瘤的实例包括白血病,其包括急性白血病(例如11q23阳性急性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性粒细胞性白血病和成髓细胞的、前髓细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞的白血病和红白血病)、慢性白血病(例如慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病(Hodgkin's disease)、非霍奇金淋巴瘤(无痛和高级别形式)、多发性骨髓瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0177] 实体瘤例如肉瘤和癌的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳癌(包括基底型乳癌、导管癌和小叶乳癌)、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯氏瘤、宫颈癌、睾丸瘤、精原细胞瘤、膀胱癌和中枢神经系统肿瘤(例如神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅神经胶质瘤(craniopharygioma)、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜神经胶质瘤(menangioma)、黑素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0178] 在几个实例中,肿瘤是黑素瘤、乳癌、肾癌、神经胶质瘤或鳞状细胞癌,例如头颈癌。

[0179] 核酸:由核苷酸单元(核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、相关天然存在的结构变体及其合成的非天然存在的类似物)通过磷酸二酯键组成的聚合物、相关的天然存在的结构变体及其合成的非天然存在的类似物。因此,该术语包括核苷酸聚合物,其中所述核苷酸及它们之间的键包括非天然存在的合成类似物,例如,举例但非限制地,磷硫酰、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性磷酸甲酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)等。这样的多核苷酸可以被合成,例如使用自动DNA合成仪。术语“寡核苷酸”一般是指短的多核苷酸,通常不大于约50个核苷酸。应该理解,当核苷酸序列由DNA序列(即A、T、G、C)表示时,这也包括其中“U”代替“T”的RNA序列(即A、U、G、C)。

[0180] 本文使用常规的符号描述核苷酸序列:单链核苷酸序列的左手末端为5'末端;双链核苷酸序列的左手方向称为5'方向。向初生RNA转录本添加核苷酸的5'到3'方向称为转录方向。与mRNA具有相同序列的DNA链称为“编码链”;所述DNA链上与从该DNA转录的mRNA具有相同序列的、位于所述RNA转录本5'末端的5'外侧的序列称为“上游序列”;所述DNA链上与所述RNA具有相同序列的、在所述编码RNA转录本3'末端的3'外侧的序列称为“下游序列”。

[0181] “cDNA”是指与mRNA互补或相同的单链或双链形式的DNA是。

[0182] “编码”是指多核苷酸例如基因、cDNA或mRNA中核苷酸具体序列在生物过程中用作合成其他聚合物和大分子的模板的固有性质,所述其他聚合物和大分子有确定的核苷酸序列(即rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列及由此产生的生物学性质。因此,如果由基因产生的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生了蛋白,那么所述基因编码所述蛋白。基因或cDNA的编码链——其核苷酸序列与mRNA序列相同并通常在序列表中提供——和用作转录模板的非编码链都可以被称为编码所述基因或cDNA的蛋白质或其他产物。除非

另有指定,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括互为简并版本且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质的核苷酸序列和RNA可以包括内含子。

[0183] “重组核酸”是指具有没有天然连接在一起的核苷酸序列的核酸。这包括核酸载体,其含有可用于转化适合的宿主细胞的扩增或装配的核酸。包括所述重组核酸的宿主细胞被称为“重组宿主细胞”。然后所述基因在所述重组宿主细胞中表达以产生例如“重组多肽”。重组核酸也可以用作非编码功能(例如启动子、复制起点、核糖体结合位点等)。

[0184] 如果序列为第一序列的多核苷酸特异性地与序列为第二序列的多核苷酸杂交,那么所述第一序列相对应第二序列为“反义的”。

[0185] 用于描述两个或更多核苷酸序列或氨基酸序列之间序列关系的术语包括“参考序列”、“选自”、“比较窗口”、“相同”、“序列同一性百分数”、“基本相同”、“互补”和“基本互补”。

[0186] 对于核酸序列的序列比较,一般一个序列作为参考序列,测试序列与之相比。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,如果必要可指定子序列坐标并指定序列算法程序参数。使用默认程序参数。用于比较的序列比对方法在本领域是已知的。可以进行最佳的用于比较的序列比对,例如通过Smith&Waterman,Adv.Appl.Math.2:482,1981的局部同源算法,通过Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443,1970的同源性比对算法,通过Pearson&Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444,1988的搜索相似性方法,通过这些算法(Wisconsin遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,WI)的计算机执行,或通过人工比对和目视检查(参见例如Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al.,eds 1995supplement))。

[0187] 可用算法的一个实例是PILEUP。PILEUP使用Feng&Doolittle,J.Mol.Evol.35:351-360,1987的渐进比对方法的简化方法。所使用的方法与Higgins&Sharp,CABIOS 5:151-153,1989描述的方法相似。使用PILEUP,将参考序列与其他测试序列比较以测定序列同一性关系的百分数,使用如下参数:默认空隙加权(3.00)、默认空隙长度加权(0.10)和加权的末端空隙。PILEUP可以从GCG序列分析软件包获得,例如7.0版本(Devereaux et al.,Nuc.Acids Res.12:387-395,1984)。

[0188] 另一个适合于测定序列同一性百分数和序列相似性的算法实例为BLAST和BLAST 2.0算法,其描述见于Altschul et al.,J.Mol.Biol.215:403-410,1990和Altschul et al.,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997。公众可以通过美国国立生物技术信息中心得到执行BLAST分析的软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用的默认字符长度(W)为11,比对(B)为50,期望(E)为10,M=5,N=-4,并且两条链都比较。BLASTP程序(用于氨基酸序列)使用的默认字符长度(W)为3,期望(E)为10,并使用BLOSUM62记分矩阵(参见see Henikoff&Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915,1989)。

[0189] 寡核苷酸:长度最高约100个核苷酸碱基的线性多核苷酸序列。

[0190] 开放读码框(ORF):不含任何终止密码子的编码氨基酸的一系列核苷酸三联体(密码子)。这些序列通常被翻译为肽。

[0191] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列以有功能关系的方式放置时,所述第一核酸序列与第二核酸序列是可操作地连接的。例如,如果启动子例如异源性启动子

影响编码序列的转录或表达,那么所述启动子与所述编码序列是可操作地连接的。当需要将两个蛋白编码区域连接时,所述可操作地连接的DNA序列通常是连续的并且位于相同的读码框中。

[0192] 药剂:当正确地给予受试者或细胞时能够诱导需要的治疗或预防效果的化学化合物或组合物。

[0193] 可药用载体:可用的可药用载体是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W.Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition, 1975中描述了适合药学递送本文公开的融合蛋白的的组合物和制剂。

[0194] 通常,所述载体的性质依赖于所采用的具体的给予模式。例如,肠胃外给予的制剂通常包括可注射液体,其包括药学和生理学可接受的液体例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为赋形剂。对于固体组合物(例如粉剂、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载体可以包括例如药用级甘露糖醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物中性载体外,要给予的药物组合物可以含有最小量的无毒辅助物质例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲试剂等,例如乙酸钠或去水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0195] 多核苷酸:术语多核苷酸或核酸序列是指至少10个碱基长度的聚合形式的核苷酸。重组多核苷酸包括没有与在其来源的生物体天然存在的基因组中与其直接连续的两个编码序列(一个在其5'末端,一个在其3'末端)直接连续的多核苷酸。因此该术语包括例如插入到载体、插入到自主复制质粒或病毒、或插入到原核生物或真核生物基因组DNA中的重组DNA,或作为独立于其他序列的单独分子(例如cDNA)存在的重组DNA。所述核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或两种核苷酸的修饰形式。该术语包括单链形式和双链形式的DNA。

[0196] 多肽:不管其长度或翻译后修饰(例如糖基化或磷酸化)的任何氨基酸链。在一个实施方案中,所述多肽是内质蛋白多肽。“残基”是指通过酰胺键或类酰胺键插入多肽中的氨基酸或氨基酸类似物。多肽具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端)。

[0197] 预防、治疗或改善疾病:“预防”疾病是指抑制疾病的全面发展。“治疗”是指在疾病或病理状况开始发展后改善其征象或症状的治疗性介入,例如肿瘤负荷减少或转移的数量尺寸的降低。“改善”是指疾病例如癌症的征象或症状的数量或严重度的减少。

[0198] 探针和引物:探针包括附着到可检测标记或报告分子上的分离的核酸。引物是短的核酸,优选DNA寡核苷酸,长度为15个核苷酸或更多。引物可以通过核酸杂交退火结合到互补的靶DNA链以形成所述引物与所述靶DNA链之间的杂合,然后通过DNA聚合酶沿所述靶DNA链延伸。引物对可用于核酸序列的扩增,例如通过本领域已知的聚合酶链式反应(PCR)或其他核酸扩增方法。本领域技术人员应该理解具体探针或引物的特异性随其长度而增加。因此,例如,包括20个连续核苷酸的引物将比只有15个核苷酸的对应引物以更高的特异性退火结合到靶上。因此,为了获得更高的特异性,可以选择包括20、25、30、35、40、50或更多个连续核苷酸的探针和引物。

[0199] 启动子:启动子是指指导核酸转录的核酸控制序列的阵列。启动子包括转录起始位点附近的必要核酸序列,例如聚合酶II型启动子中的TATA元件。启动子还可任选地包括远端增强子或抑制元件,其位置离所述转录起始位点可以多达几千碱基对。组成型和可诱导的启动子都包括在内(参见例如Bitter et al., Methods in Enzymology 153:516-544,

1987)。

[0200] 可以使用的启动子的具体非限制性实例包括源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如逆转录病毒长末端重复序列;腺病毒后期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。还可以使用由重组DNA或合成技术产生的启动子。可将多核苷酸插入到含有启动子序列的表达载体,其中所述启动子序列可帮助所述宿主中插入的遗传序列有效地表达。所述表达载体一般含有复制起点、启动子、以及允许对所转化细胞进行表型选择的具体核酸序列。

[0201] 纯化:术语纯化不需要绝对的纯;而是意图作为相对的术语。因此,例如,纯化的核酸是比其在细胞内天然环境中更浓缩的核酸。类似地,纯化的肽制剂是比其在细胞内天然环境中更浓缩的肽或蛋白质。基本纯化表示从其他蛋白质或细胞组分纯化。在一个实施方案中,纯化(或分离)制剂使得所述蛋白质或肽占所述制剂中总的肽或蛋白质含量的至少50%(例如但不限于70%、80%、90%、95%、98%或99%)。可以通过本领域任何已知方法纯化(和/或合成)本文所公开的内质蛋白多肽(参见例如Guide to Protein Purification, ed.Deutscher, Meth.Enzymol.185, Academic Press, San Diego, 1990; and Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer Verlag, New York, 1982)。

[0202] 重组:重组核酸是具有非天然存在的序列或者具有通过人工组合两种本来分离的序列片段而制造的序列的核酸。这种人工组合经常是通过化学合成,或更通常地通过核酸分离片段的人工操作例如通过基因工程技术来完成。

[0203] 重组毒素:其中细胞靶向部分融合到毒素上的嵌合蛋白质(Pastan et al., Science, 254:1173-1177, 1991)。如果所述细胞靶向部分是抗体的Fv部分,那么所述分子被称为重组免疫毒素(Chaudhary et al., Nature, 339:394-397, 1989)。所述毒素部分被遗传改造以使其不能结合存在于大多数正常细胞上的毒素受体。重组免疫毒素选择性杀死被所述抗原结合域识别的细胞。这些重组毒素和免疫毒素可以用于治疗癌症例如其中内质蛋白被表达的癌症。

[0204] 选择性杂交:在排除无关核苷酸序列的中度或高度严格条件下的杂交。

[0205] 在核酸杂交反应中,达到特定水平的严格性所使用的条件依赖于要杂交的核酸的性质而不同。例如,在选择杂交条件时可以考虑所述核酸杂交区域的长度、互补程度、核苷酸序列组成(例如GC含量比AT含量)和核苷酸类型(例如RNA对DNA)。另外要考虑所述核酸之一是否是固定化的,例如固定化到滤器上。

[0206] 渐进升高严格性的条件的具体非限制性实例如下:在约室温下 $2\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ (杂交条件);在约室温下 $0.2\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ (低严格性条件);在约 42°C $0.2\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ (中度严格性条件);在约 68°C $0.1\times\text{SSC}$ (高严格性条件)。本领域技术人员可以容易地确定这些条件的变化(例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol.1-3, ed.Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。洗涤可以使用这些条件中仅仅一个(例如高严格性条件)或可以使用所述条件的每个(例如以如上列出的顺序每个10-15分钟),可重复所列出的任何步骤或全部。但是,如上所提到的,最佳条件会依据具体涉及的杂交反应而不同,并可以凭经验确定。

[0207] 序列同一性:氨基酸序列之间的相似性可表述为序列之间的相似性,或者可表述为序列同一性。常常以同一性(或相似性或同源性)百分数的形式测量序列同一性;百分数

越高,两个序列越相似。当使用标准方法比对时,内质蛋白多肽的同系物或变体会拥有相对高程度的序列同一性。

[0208] 用于比较的序列比对方法在本领域是已知的。多种程序和比对算法描述于:Smith and Waterman,Adv.Appl.Math.2:482,1981;Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48:443,1970;Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444,1988;Higgins and Sharp,Gene 73:237,1988;Higgins and Sharp,CABIOS 5:151,1989;Corpet et al.,Nucleic Acids Research 16:10881,1988;以及Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444,1988.Altschul et al.,Nature Genet.6:119,1994中提供了序列比对方法和同源性计算的详细思路。

[0209] 所述NCBI基础局部比对搜索工具(BLAST)(Altschul et al.,J.Mol.Biol.215:403,1990)可以从几个来源得到,包括美国国立生物技术信息中心(NCBI,Bethesda,MD)和因特网,用于链接序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx。如何使用所述程序确定序列同一性的描述可以从因特网上的NCBI网站得到。

[0210] 通过全长比对计算(使用NCBI Blast 2.0、空隙blastp设定为默认参数),内质蛋白多肽的同系物和变体一般具有与内质蛋白氨基酸序列至少75%例如至少80%的序列同一性。对于大于约30个氨基酸的氨基酸序列比较,两个序列Blast功能的采用默认的BLOSUM62矩阵并使用默认参数(空隙存在值为11,每个残基空隙值为1)完成。当比对短肽时(少于约30个氨基酸),所述比对应使用两个序列Blast功能采用PAM30矩阵并使用默认参数(开放空隙9,延伸空隙1罚分)完成。当通过这种方法评估时,与所述参考序列有甚至更大相似性的蛋白质会显示增加的同一性百分数,例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。当不完整的序列用于序列同一性比较时,同系物和变体中10-20个氨基酸的短窗口一般具有与所述参考序列至少80%的序列同一性,并且可具有至少85%或至少90%或95%的序列同一性。测定这种短窗口中序列同一性的方法可以在因特网上NCBI网站获得。本领域技术人员应该理解,这些序列同一性范围仅为指导的目的而提供;获得具有落在所提供范围外的非常高的序列同一性的同系物是完全可能的。

[0211] 特异性结合试剂:基本仅结合到所确定的靶点的试剂。因此内质蛋白特异性结合试剂是基本仅结合到内质蛋白多肽的试剂。在一个实施方案中,所述特异性结合试剂是特异性结合内质蛋白的单克隆或多克隆抗体。

[0212] 鳞状细胞癌:起源于形成皮肤、眼睛、多种内脏器官和中空器官的内层以及某些腺体导管的表面的鳞状细胞、薄扁平细胞的一类癌症。鳞状细胞癌还指表皮样癌。一类鳞状细胞癌是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)。头颈部鳞状细胞癌包括鼻腔、鼻窦、唇、口、唾液腺、咽和喉的癌症。

[0213] HNSCC可分为如下阶段:

[0214] 阶段0:没有肿瘤存在的证据。

[0215] 阶段I:肿瘤最大尺寸小于2cm或更少;没有局部淋巴结牵连或远端转移的证据。

[0216] 阶段II:肿瘤大于2cm,但不大于4cm;没有局部淋巴结牵连或远端转移的证据。

[0217] 阶段III:肿瘤大于4cm;在某些情况中,肿瘤已经扩散到淋巴结;没有远端转移的证据。

[0218] 阶段IV:肿瘤已经扩散到淋巴结;在某些情况中,存在远端转移。

[0219] 受试者:活的多细胞有脊椎生物体,一个包括人和兽医的受试者的类别,其包括人和非人哺乳动物。

[0220] T细胞:对免疫反应关键的白细胞。T细胞包括但不限于CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞。CD4⁺T淋巴细胞是在其表面携带称为“分化簇4”(CD4)标示物的免疫细胞。这些细胞常称为“辅助”T细胞,其帮助协调免疫反应包括抗体反应以及杀伤性T细胞反应。CD8⁺T细胞携带“分化簇8”(CD8)标示物。在一个实施方案中,CD8T细胞是细胞毒性T淋巴细胞。在另一个实施方案中,CD8细胞是抑制性T细胞。

[0221] 治疗有效量:在治疗的受试者中足以达到需要效果的具体物质的量。例如,这可以是抑制或遏制肿瘤生长所必需的量。在一个实施方案中,治疗有效量是清除肿瘤或降低转移的数量或尺寸必需的量。当给予受试者时,通常使用会达到靶组织(例如在肿瘤中)浓度的剂量,其中所述靶组织浓度已被证实可达到需要的体外效果。

[0222] 毒素:对细胞呈细胞毒性的分子。毒素包括相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白、假单胞菌外毒素(*Pseudomonas* exotoxin, PE)、白喉毒素(DT)、肉毒杆菌毒素、皂草素、局限曲菌素或白树毒素,或其修饰的毒素。例如,PE和DT是高毒化合物,一般通过肝脏毒性引起死亡。但是,通过移除所述PE和DT毒素的天然靶向组分(例如PE的域Ia或DT的B链)并将其用不同的靶向部分例如抗体代替,所述PE和DT可以被修饰为可用作免疫毒素的形式。

[0223] 转导:转导细胞是已经通过分子生物学技术引入核酸分子的细胞。如本文所用的,术语转导包括可以将核酸分子引入所述细胞的所有技术,包括用病毒载体转染,用质粒载体转化,以及通过电穿孔、脂质转染和粒子枪加速进行的裸露DNA的引入。

[0224] 载体:被引入到宿主细胞从而产生转化的宿主细胞的核酸分子。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可以包括本领域已知的一种或多种选择标示物基因以及其他遗传元件。

[0225] 除非另有说明,本文使用的所有技术和科学术语与本公开内容所属领域普通技术人员的通常理解具有相同的含义。除非上下文另有明确的指示,单数形式的术语“一”、“一个”和“该”包括复数的指示对象。类似地,除非上下文另有明确指示,单词“或者”意图包括“和”。还应该理解,为核酸或多肽给出的所有碱基尺寸或氨基酸尺寸以及所有分子重量或分子质量值是近似值,被提供用以描述。虽然与本文描述的方法和材料相似或等价的方法和材料可以用于本公开内容的实施或测试,适合的方法和材料如下所述。术语“包括(comprise)”意为“包含(include)”。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他文献,其全文以引用的方式纳入本文。如果有冲突,那么以本说明书(包括术语解释)为准。另外,所述材料、方法和实例仅是说明性的,并非意图进行限制。

[0226] III. 特异性结合内质蛋白的人单克隆抗体

[0227] 已经生产了特异性结合内质蛋白(Grp94)的抗体,包括单克隆抗体例如完全人源性单克隆抗体。这些抗体和/或其抗原结合片段可以用于分离内质蛋白,并可用于检测和/或治疗表达内质蛋白的肿瘤,例如但不限于黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌或胰腺癌。这些抗体可以与可检测标记或效应分子缀合。

[0228] 在一个实施方案中,所述抗体特异性结合糖基化内质蛋白。因此,在该实施方案中,所述抗体没有特异性结合非糖基化内质蛋白或无关抗原。

[0229] 本文公开了特异性结合内质蛋白的人单克隆抗体及其抗原结合片段。在一个实例

中,人内质蛋白具有如下所述的氨基酸序列:

[0230] MRALWVLGLCCVLLTFGSVRADDEVDVDTVEEDLGKSREGSRTDDEVVQREEEAIQLDGLNASQIREL
REKSEKFAFQAEVNRMMKLIINSLYKNKEIFLRELISNASDALDKIRLISLTDENALSGNEELTVKIKCDKEKNLLH
VTDGTGVMTREELVKNLGTIAKSGTSEFLNKMTEAQEDGQSTSELIGQFGVGFYSAFLVADKVIIVTSKHNDTQHIW
ESDSNEFSVIADPRGNTLGRGTTITLVLKEEASDYLELDTIKNLVKKYSQFINFPIYVWSSKTETVEEPMEEEEAAK
EEKEESDDEAAVEEEEEEEKPKTKKVEKTQVWDWELMNDIKPIWQRPSKEVEEDEYKAFYKFSKESDDPMAYIHFTA
EGEVTFKSILFVPTSAPRGLFDEYGSKKSDYIKLYVRRVFI TDDFHDMPKYLNFVKGVVDSDDLPLNVSRETQQH
KLLKVIRKKLVRKTLDMIKKIADDKYNDTFWKEFGTNIKLGVIEDHSNRTRLAKLLRFQSSHPTDITSLDQYVERM
KEKQDKIYFMAGSSRKEAESSPFVERLLKKGYEVIYLTPEVDEYCIQALPEFDGKRFQNVAKGVKFESEKTKESR
EAVEKEFEPLLNWMKDKALKDKIEKAVVSQRLTESPCALVASQYGSNGMERIMKAQAYQTGKDISTNYYASQKKT
EINPRHPLIRDMLRRIKEDEDDKTVLDLAVVLFETATLRSGYLLPDTKAYGDRIERMLRLSLNIDPDAKVEEPEEE
PEETAEDTTEDTEQDEDEEMDVGTDDEEETAKESTA EKDEL

[0231] SEQ ID NO:5,还见于2010年6月16日可以获得的 **GENBANK®** 登录号No.NM_003299,其在此以引用的方式纳入本文。

[0232] 在另一个实例中,所述内质蛋白被如下核酸序列编码:

[0233] gtgggcggac cgcgcggctg gaggtgtgag gatccgaacc caggggtggg gggtggaggc
[0234] ggctcctgcg atcgaagggg acttgagact caccggccgc acgccatgag ggccctgtgg
[0235] gtgctgggcc tctgctgcgt cctgctgacc ttcgggtcgg tcagagctga cgatgaagtt
[0236] gatgtggatg gtacagtaga agaggatctg ggtaaaagta gagaaggatc aaggacggat
[0237] gatgaagtag tacagagaga ggaagaagct attcagttgg atggattaaa tgcatacaaa
[0238] ataagagaac ttagagagaa gtcggaaaag tttgccttcc aagccgaagt taacagaatg
[0239] atgaaactta tcatcaattc attgtataaa aataaagaga ttttcctgag agaactgatt
[0240] tcaaatgctt ctgatgcttt agataagata aggctaatat cactgactga tgaaaatgct
[0241] ctttctggaa atgaggaact aacagtcaaa attaagtgtg ataaggagaa gaacctgctg
[0242] catgtcacag acaccggtgt aggaatgacc agagaagagt tggttaaaaa ccttggtacc
[0243] atagccaaat ctgggacaag cgagttttta aacaaaatga ctgaagcaca ggaagatggc
[0244] cagtcaactt ctgaattgat tggccagttt ggtgtcgggt tctattccgc cttccttgta
[0245] gcagataagg ttattgtcac ttcaaacac aacaacgata cccagcacat ctgggagtct
[0246] gactccaatg aattttctgt aattgtctgac ccaagaggaa acactctagg acggggaacg
[0247] acaattaccc ttgtcttaaa agaagaagca tctgattacc ttgaattgga tacaattaaa
[0248] aatctcgtca aaaaatatc acagttcata aactttccta tttatgtatg gagcagcaag
[0249] actgaaactg ttgaggagcc catggaggaa gaagaagcag ccaaagaaga gaaagaagaa
[0250] tctgatgatg aagctgcagt agaggaagaa gaagaagaaa agaaaccaa gactaaaaaa
[0251] gttgaaaaaa ctgtctggga ctgggaactt atgaatgata tcaaaccaat atggcagaga
[0252] ccatcaaaag aagtagaaga agatgaatac aaagctttct acaaatcatt ttcaaaggaa
[0253] agtcatgacc ccatggctta tattcacttt actgctgaag gggaagtac cttcaaatca
[0254] attttatttg taccacatc tgctccacgt ggtctgttg acgaatatgg atctaaaaag
[0255] agcgattaca ttaagctcta tgtgcgcgt gtattcatca cagacgactt ccatgatatg
[0256] atgcctaaat acctcaattt tgtcaagggt gtggtggact cagatgatct ccccttgaat

[0257] gtttcccgcg agactcttca gcaacataaa ctgcttaagg tgattaggaa gaagcttggt
[0258] cgtaaaacgc tggacatgat caagaagatt gctgatgata aatacaatga tacttttttg
[0259] aaagaatttg gtaccaacat caagcttggt gtgattgaag accactcgaa tcgaacacgt
[0260] cttgctaaac ttcttaggtt ccagtcttct catcatccaa ctgacattac tagcctagac
[0261] cagtatgtgg aaagaatgaa ggaaaaacaa gacaaaatct acttcatggc tgggtccagc
[0262] agaaaagagg ctgaatcttc tccatttggt gagegacttc tgaaaagggt ctatgaagtt
[0263] atttacctca cagaacctgt ggatgaatac tgtattcagg cccttcccga atttgatggg
[0264] aagaggttcc agaatgttgc caaggaagga gtgaagttcg atgaaagtga gaaaactaag
[0265] gagagtcgtg aagcagttga gaaagaattt gagcctctgc tgaattggat gaaagataaa
[0266] gcccttaagg acaagattga aaaggctgtg gtgtctcagc gcctgacaga atctccgtgt
[0267] gctttgggtg ccagccagta cggatggtct ggcaacatgg agagaatcat gaaagcacia
[0268] gcgtaccaa cgggcaagga catctctaca aattactatg cgagtcagaa gaaaacattt
[0269] gaaattaatc ccagacaccc gctgatcaga gacatgcttc gacgaattaa ggaagatgaa
[0270] gatgataaaa cagttttgga tcttgctgtg gttttgtttg aaacagcaac gcttcgggtca
[0271] gggatctttt taccagacac taaagcatat ggagatagaa tagaaagaat gcttcgcctc
[0272] agtttgaaca ttgacctga tgcaaagggtg gaagaagagc ccgaagaaga acctgaagag
[0273] acagcagaag acacaacaga agacacagag caagacgaag atgaagaaat ggatgtggga
[0274] acagatgaag aagaagaaac agcaaaggaa tctacagctg aaaaagatga attgtaaatt
[0275] atactctcac catttggtac ctgtgtggag agggaatgtg aaatttacat catttctttt
[0276] tgggagagac ttgttttgga tgccccctaa tccccttctc ccctgcactg taaaatgtgg
[0277] gattatgggt cacaggaaaa agtgggtttt ttagttgaat tttttttaac attcctcatg
[0278] aatgtaaatt tgtactattt aactgactat tcttgatgta aaatcttgct atgtgtataa
[0279] aaataaaaaa gatcccaaat

[0280] SEQ ID NO:6, 还见于2010年6月16日的 **GENBANK®** 登录号No. NM_003299, 其在此以引用的方式纳入本文。

[0281] 本领域技术人员可以容易地使用分子生物学中的标准方法使用核酸序列产生多肽, 例如内质蛋白 (参见例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。用本文描述的治疗性试剂和抗体, 本领域技术人员可以容易地构建含有在功能上等价的核酸 (例如序列不同但编码相同EM或抗体序列的核酸) 的多个克隆。因此, 本发明提供编码抗体及其缀合物和融合蛋白的核酸。

[0282] 本文描述了特异性结合人内质蛋白例如糖基化内质蛋白的分离的人单克隆抗体及其片段。在某些实施方案中, 所述人单克隆抗体抗原结合片段是scFv。还描述了包括所提供的人单克隆抗体或其功能性片段 (其特异性结合人内质蛋白) 和可药用载体的组合物。还提供了编码这些抗体的核酸、包含这些核酸的表达载体和表达所述核酸的分离的宿主细胞。

[0283] 本文还描述了包含可特异性结合人内质蛋白的人单克隆抗体或其抗原结合片段的免疫缀合物。所述免疫缀合物可以包括任何治疗性试剂、毒素或其他部分。在一个实例中, 所述毒素是PE或其变体或片段。还描述了包括所述免疫缀合物的组合物。

[0284] 包括可特异性结合内质蛋白的人单克隆抗体或其抗原结合片段的组合物可以被用于筛选、研究、检测和治疗性目的。例如,所述人单克隆抗体或其抗原结合片段可以被用于鉴别其他特异性结合内质蛋白的抗体,例如用于竞争性免疫测定中。

[0285] 包括可特异性结合内质蛋白的人单克隆抗体或其抗原结合片段的组合物可以被用于治疗经诊断患有癌症的受试者,所述癌症例如相对于正常细胞显示出内质蛋白表达增加的癌症。例如所述抗体可以被用于治疗黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌。黑素瘤包括扩散性黑素瘤、结节性黑素瘤、肢端黑素瘤和恶性雀斑样痣(黑素瘤)。鳞状细胞癌包括但不限于头颈部鳞状细胞癌和肺鳞状细胞癌。

[0286] 包含所述内质蛋白抗体的组合物还可以被用于预防转移或降低微小转移(例如微小转移到局部淋巴结)的数量。包含所述内质蛋白抗体的免疫缀合物还可以被用于治疗经诊断患有癌症的患者。所述人单克隆抗体还可以被用于在受试者中诊断癌症,包括转移的检测。例如,所述人单克隆抗体可以与来自所述患者的样品例如血清样品接触,以检测内质蛋白水平的升高。本文所提供的抗体和组合物还可以被用于在受试者中检测癌症或确认患者中癌症的诊断。

[0287] 本文公开了可特异性结合人内质蛋白的完全人源性单克隆抗体及其可特异性结合内质蛋白的功能性片段(抗原结合片段)。小鼠单克隆抗体在临床使用中的主要限制是,在接受所述治疗的患者中会发生人抗鼠抗体(HAMA)反应。所述HAMA反应可以涉及变态反应和所给予的抗体从血清中清除的速率增加。已经发展多种类型的修饰的单克隆抗体,以在尽力维持亲本单克隆抗体的抗原结合亲和力的同时最小化HAMA反应。修饰的单克隆抗体的一种类型是人-小鼠嵌合体,其中鼠抗原结合可变区偶联到人恒定区(Morrison and Schlom, Important Advances in Oncology, Rosenberg, S.A. (Ed.), 1989)。修饰的单克隆抗体的第二种类型是互补决定区(CDR)移植的或人源化的单克隆抗体(Winter and Harris, Immunol. Today 14:243-246, 1993)。但是,本文公开的抗体是完全人源性的;其框架区和CDR都源于人序列。因此,当这些抗体被给予人受试者时没有诱导HAMA。

[0288] 在某些实施方案中,所述人单克隆抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:1所示重链可变链氨基酸序列的至少一部分并且特异性结合内质蛋白。例如,所述人单克隆抗体可以包括SDR(特异性决定残基)、CDR或可变区。在以下示出的氨基酸序列中,粗体为恒定区,下划线为CDR:

[0289]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVTITRDTAS
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R A H F D Y W G Q G T L V T V S
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF

**PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA (SEQ
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMetHEALHNHYT
QKSLSLSPGK**

ID NO:1)

[0290] 在某些实施方案中,所述人单克隆抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:1所示重链氨基酸序列的至少一部分并且特异性结合内质蛋白。在某些实例中,所述抗体轻链的至少一个CDR包含SEQ ID NO:1的氨基酸26-33 (CDR1)、SEQ ID NO:1的氨基酸51-58 (CDR2)和SEQ ID NO:1的氨基酸97-103 (CDR3) 中的一个或多个氨基酸序列。在另外的实例中,所述抗体的重链包含SEQ ID NO:1的氨基酸26-33 (CDR1)、SEQ ID NO:1的氨基酸51-58 (CDR2)和SEQ ID NO:1的氨基酸97-103 (CDR3) 的氨基酸序列。在某些实例中,所述抗体重链的可变区可以包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-113或由其组成。所述抗体重链可以包含SEQ ID NO:1或由其组成。

[0291] 在某些实施方案中,所述人单克隆抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:2所示轻链可变区氨基酸序列的至少一部分并且特异性结合内质蛋白。在以下示出的氨基酸序列中,粗体为恒定区,下划线为CDR:

[0292]

**EIELTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P T F G Q G T K V E I K **TVAAPS****VF**
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDS**STYSLSSTLTLSKADYEKH** (SEQ
KVYACEVTHQGLSSPVT**KSFNRGEC****

ID NO:2)

[0293] 在某些实例中,所述抗体轻链的至少一个CDR包含SEQ ID NO:2的氨基酸27-32 (CDR1)、SEQ ID NO:2的氨基酸50-52 (CDR2)和SEQ ID NO:2的氨基酸89-97 (CDR3) 中的一个或多个氨基酸序列。在另外的实例中,所述抗体的轻链包含SEQ ID NO:2的氨基酸27-32 (CDR1)、SEQ ID NO:2的氨基酸50-52 (CDR2)和SEQ ID NO:2的氨基酸89-97 (CDR3) 的氨基酸序列。所述抗体轻链的可变区可以包含SEQ ID NO:2的氨基酸1-107或由其组成。所述抗体轻链可以包含SEQ ID NO:2或由其组成。

[0294] 在某些实施方案中,所述人单克隆抗体是经标记的。在某些实例中,所述标记是荧光标记物、酶标记物或放射性标记物。

[0295] 所述单克隆抗体可以是任何同种型。所述单克隆抗体可以是例如IgA、IgM或IgG抗体,例如IgG₁或IgG₂。一类可特异性结合内质蛋白的抗体可被转换为另一类。在一方面,使用本领域已知的方法分离编码V_L或V_H的核酸分子,使得其分别不包含编码所述轻链恒定区或重链恒定区的任何核酸序列。然后将所述编码V_L或V_H的核酸分子与编码来自不同类免疫球

蛋白分子的 C_L 或 C_H 的核酸序列可操作地连接。如本领域技术人员所知,这可以通过使用包括 C_L 或 C_H 链的载体或核酸分子来达到。例如,起初是IgM的特异性结合内质蛋白的抗体可以被转换到IgG类抗体。类别转换可以被用于将一个IgG亚类转变为另一个IgG亚类,例如从IgG₁转换到IgG₂。

[0296] 完全人源性单克隆抗体包含人框架区。所述人框架区可以包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2 (这些序列包含CDR序列以及框架序列) 中一个或两者所公开的框架区。但是,所述框架区可以来自另外的来源。可以使用的框架序列的另外实例包含PCT公开号WO 2006/074071 (参见例如SEQ ID NO:1-16) 中公开的重链和轻链的氨基酸框架序列,其在此以引用的方式纳入本文。

[0297] 本发明包括抗体片段,例如Fab、F(ab')₂、scFv和Fv,其包含重链和轻链可变区并且结合内质蛋白上的表位决定簇。这些抗体片段保留了与抗原即人内质蛋白特异性结合的能力,因此是抗原结合片段。这些片段包括:

[0298] (1) Fab,含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段,可以通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体得到完整的轻链和一部分重链来产生;

[0299] (2) Fab',可以通过用胃蛋白酶处理整个抗体,然后还原得到完整的轻链和一部分重链来获得的抗体分子片段;每个抗体分子获得两个Fab'片段;

[0300] (3) (Fab')₂,可以通过用胃蛋白酶处理整个抗体,没有随后的还原而获得的抗体片段;F(ab')₂是通过两个二硫键结合在一起的两个Fab'片段的二聚体。

[0301] (4) Fv,含有表达为两条链的轻链可变区和重链可变区的基因工程片段;以及

[0302] (5) 单链抗体(例如scFv),其定义为含有轻链可变区和重链可变区并通过适合的多肽接头将其连接为一个遗传上融合的单链分子的基因工程分子。

[0303] (6) 单链抗体的二聚体(scFv₂),其定义为scFv的二聚体。这也被称为“微型抗体”。

[0304] 制造这些片段的方法是本领域已知的(参见例如Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988)。

[0305] 在另外的一组实施方案中,所述抗体是Fv抗体,其一般约25kDa并含有完全的抗原结合位点,每条重链和每条轻链各含有3个CDR。为产生这些抗体,可在一个宿主细胞中通过两个单独的核酸构建来表达所述V_H和V_L。如果所述V_H和V_L非连续地表达,那么所述Fv抗体的链一般通过非共价相互作用连接在一起。但是,稀释后这些链趋向于分离,因此已经发展了通过戊二醛、分子间二硫化物或多肽接头来交联所述链的方法。因此,在一个实例中,所述Fv可以是二硫化物稳定的Fv(dsFv),其中所述重链可变区和所述轻链可变区通过二硫键化学连接。

[0306] 在另外一个实施例中,所述Fv片段包括通过肽接头连接的V_H和V_L链。这些单链抗原结合蛋白(scFv)是通过构建含有由寡核苷酸连接的编码所述V_H和V_L域的DNA序列的结构基因而制备的。所述结构基因被插入表达载体,随后被引入宿主细胞例如大肠杆菌(*E. coli*)。所述重组宿主细胞合成由接头肽桥接两个V域形成的单一多肽链。产生scFv的方法是本领域已知的(参见Whitlow et al., *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 97, 1991; Bird et al., *Science* 242:423, 1988; 美国专利号No. 4,946,778; Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993; 和Sandhu, 见上文)。单链抗体的二聚体(scFv₂)也是可考虑的。

[0307] 抗体片段可以通过所述抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌中表达 编码所述片段的DNA来制备。抗体片段可以通过常规方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化整个抗体来获得。例如,可以通过胃蛋白酶对抗体的酶切割产生抗体片段以提供表示F(ab')₂的5S片段。可进一步使用硫醇还原试剂切割该片段,并且可任选地为二硫键切割产生的巯基基团提供保护基团,以产生3.5S Fab'单价片段。或者,使用胃蛋白酶的酶切割直接产生2个单价Fab'片段和Fc片段(参见美国专利No.4,036,945和美国专利No.4,331,647,以及其中含有的参考文献;Nisonhoff et al.,Arch.Biochem.Biophys.89:230,1960;Porter,Biochem.J.73:119,1959;Edelman et al.,Methods in Enzymology,Vol.1,第422页,Academic Press,1967;和Coligan et al.第2.8.1-2.8.10节和2.10.1-2.10.4节)。

[0308] 还可以使用切割抗体的其他方法例如使重链分离以形成单价轻链-重链片段、片段的进一步切割、或其他酶的、化学的或遗传学技术,只要所述片段能够结合被所述完整抗体识别的抗原。

[0309] 本领域技术人员应该认识到可以产生所述特异性结合人内质蛋白的抗体的保守性变体。这种在抗体片段例如dsFv片段或在scFv片段中采用的保守性变体,会保留为在所述V_H和V_L区域之间正确折叠和稳定所必需的关键氨基酸残基,并且会保留所述残基的电荷特性以保持所述分子的低pI和低毒性。可在所述V_H和V_L区域制造氨基酸取代(例如最多1个、最多2个、最多3个、最多4个或最多5个氨基酸取代)以增加产率。提供功能相似的氨基酸的保守性氨基酸取代表是本领域普通技术人员已知的。如下6组是被认为可互相保守性取代的氨基酸的实例:

[0310] 1) 丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T);

[0311] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0312] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0313] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0314] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0315] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W)。

[0316] IV. 治疗和诊断部分的用途

[0317] 所述特异性结合人内质蛋白的人单克隆抗体或其功能片段可以用于治疗和诊断方法中,例如治疗和检测黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌。对于治疗用途,所述方法可以包括给予受试者治疗有效量的特异性结合内质蛋白的抗体或其抗原结合片段,以用于治疗黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌,例如胰脏腺癌。

[0318] 在几个实施方案中,本文所述的人单克隆抗体或其抗原结合片段可以缀合到治疗性试剂上。免疫缀合物包括但不限于,其中治疗性试剂共价连接到抗体的分子。治疗性试剂是具有直接针对特别的靶分子或携带靶分子的细胞的特别生物活性的试剂。本领域技术人员应该理解治疗性试剂可以包括多种药物(例如长春花碱、道诺霉素等)、细胞毒素(例如天然或修饰的假单胞菌外毒素或白喉毒素)、形成胶囊的试剂(例如脂质体),其本身含有药学组合物、放射性试剂例如¹²⁵I, ³²P, ¹⁴C, ³H and ³⁵S和其他标记、靶部分和配体。

[0319] 毒素可以与本文描述的内质蛋白特异性人单克隆抗体及其抗原结合片段一起使用以产生免疫毒素。示例性毒素包括蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、白喉毒素及其亚单位,以

及肉毒杆菌毒素A到F。这些毒素可以容易地从商业来源获得(例如,Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)。可考虑的毒素还包括本文所述毒素的变体(参见例如美国专利No. 5,079,163和No. 4,689,401)。在一个实施方案中,所述毒素是假单胞菌外毒素(PE)(美国专利No. 5,602,095)。本文使用的“假单胞菌外毒素”是指全长天然(天然存在的)PE或修饰过的PE。这种修饰可以包括但不限于域Ia的消除,域Ib、II和III的多个氨基酸删除,一个或多个序列的羧基端的单个氨基酸取代和增加(例如见Siegall et al., J. Biol. Chem. 264:14256-14261, 1989)。在一个实施方案中,所述PE的细胞毒性片段保留天然PE细胞毒性的至少50%、至少75%、至少90%或至少95%。在某些实例中,所述细胞毒性片段具有比天然PE更高的细胞毒性。

[0320] 天然假单胞菌外毒素A(PE)是非常高活性的单体蛋白质(分子量66kD),其是由绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)分泌的,在真核细胞中可抑制蛋白合成。PE起作用的方法是使延伸因子2(EF-2)的ADP-核糖基化失活。所述外毒素含有3个通过协调作用导致细胞毒性的结构域。域Ia介导细胞结合。域II负责移位到细胞溶质中,域III介导延伸因子2的ADP-核糖基化。域Ib功能未知。本文所述单克隆抗体采用的PE可以包括天然PE的天然序列、天然序列的细胞毒性片段和保守性修饰的变体,及其细胞毒性片段。PE的细胞毒性片段包括在靶细胞中有或没有随后的蛋白水解或其他处理都具有细胞毒性的那些片段。PE的细胞毒性片段包括PE40、PE38和PE35。对于PE及其变体的其他描述,参见例如美国专利No. 4,892,827; No. 5,512,658; No. 5,602,095; No. 5,608,039; No. 5,821,238; and No. 5,854,044; PCT公开W0 99/51643; Pai et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 88:3358-3362, 1991; Kondo et al., J. Biol. Chem. 263:9470-9475, 1988; Pastan et al., Biochim. Biophys. Acta 1333:C1-C6, 1997, 其每个在此以引用的方式纳入本文。

[0321] 本文所述抗体及其抗原结合片段还可以用于将任何数量的不同诊断或治疗性化合物靶向其表面表达内质蛋白的细胞。因此,本公开内容的抗体可以直接或通过接头附着到将要直接递送到表达细胞表面内质蛋白的细胞的药物上。治疗性试剂包括化合物例如核酸、蛋白质、肽、氨基酸或衍生物、糖蛋白类、放射性同位素、脂质、碳水化合物或重组病毒。核酸治疗和诊断的部分包括反义核酸、与单链或双链DNA共价交联的衍生寡核苷酸和形成三联体的寡核苷酸。

[0322] 或者,连接到抗内质蛋白抗体的分子可以是包裹系统例如脂质体或微团,所述脂质体或微团含有治疗性组合物例如药物、核酸(例如反义核酸)或另外的治疗性部分,所述治疗性组合物优选地被隔离以免直接暴露于循环系统。制备附着于抗体的脂质体的方法是本领域技术人员已知的(例如参见美国专利No. 4,957,735; Connor et al., Pharm. Ther. 28:341-365, 1985)。

[0323] 本文公开的抗体可以缀合到另外的治疗性试剂和/或可以用于与另外的试剂联合(序贯给药或同时给药)。具体的治疗性试剂的选择依赖于具体的靶分子或细胞以及需要的生物效果。因此,例如所述治疗性试剂可以是用于使具体靶细胞死亡的细胞毒素。相反地,在需要引起非致死生物反应的地方,可将所述治疗性试剂缀合到非致死的药学试剂或含有非致死药学试剂的脂质体。

[0324] 所述治疗性试剂还可以是细胞因子或趋化因子。“细胞因子”是由一个细胞群释放的一类蛋白质或肽,作为细胞间中介物对另外的细胞起作用。细胞因子可以作为免疫调节

试剂起作用。细胞因子的实例可以包括淋巴因子、单核因子、生长因子和传统的多肽激素。因此,实施方案中利用了干扰素(例如IFN- α 、IFN- β 和IFN- γ);肿瘤坏死因子超家族(TNFSF)成员;人生长激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛肽;松弛肽原;促卵泡激素(FSH);促甲状腺激素(TSH);促黄体生成激素(LH);肝生长因子;前列腺素;成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素、OB蛋白质;TNF- α ;TNF- β ;整联蛋白;促血小板生成素(TPO);神经生长因子例如NGF- β ;血小板生长因子;TGF- α ;TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;促红细胞生成素(EPO);集落刺激因子(CSF)例如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白细胞介素(IL-1到IL-21)、kit-配体或FLT-3、血管他丁(angiotatin)、血小板反应蛋白或内皮他丁(endostatin)。这些细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质以及所述天然序列细胞因子的生物活性等价物。

[0325] 趋化因子还可以缀合到本文公开的抗体。趋化因子是小的(大约4-14kDa)、可诱导的和分泌的促炎症细胞因子的超家族,主要作为特定白细胞亚型的化学引诱物和激活剂起作用。趋化因子的产生是由炎性细胞因子、生长因子和病原刺激物诱导的。基于保守性氨基酸序列基序,可将所述趋化因子蛋白质分为亚家族(α 、 β 和 δ),基于与氨基端相邻的前2个半胱氨酸的位置可将其分类为4个高度保守的基团-CXC、CC、C和CX3C。目前为止,已经发现多于50种趋化因子,至少有18种人七跨膜域(seven-transmembrane-domain, 7TM)趋化因子受体。可用的趋化因子包括但不限于RANTES、MCAF、MCP-1和分形趋化因子(fractalkine)。

[0326] 所述治疗性试剂可以是化学治疗剂。在一个实施方案中,所述化学治疗剂是放射性分子。本领域技术人员可以容易地鉴定可用的化学治疗剂(例如参见Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition; Perry et al., Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L., Berkery R. (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer DS, Knobf MF, Durivage HJ (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993)。化学治疗剂包括本领域技术人员已知的那些,包括但不限于:5-氟尿嘧啶(5-FU)、硫唑嘌呤、环巴胺、环磷酰胺、抗代谢物(例如氟达拉滨)、抗肿瘤药(例如依托泊苷、多柔比星、氮甲蝶呤和长春新碱)、卡铂、顺铂、达卡巴嗪、替莫唑胺、PARP抑制剂和紫杉烷类例如红豆杉醇。雷帕霉素也被用作化学治疗剂。

[0327] 可以使用本领域技术人员已知的任何数量的方式,将效应分子(例如但不限于放射性核苷酸、细胞因子、趋化因子和化学治疗剂)连接到目标抗体上。共价和非共价的附着方式都可以使用。将效应分子附着到抗体的程序根据所述效应分子的化学结构而不同。多肽一般含有多种功能基团;例如羧酸(COOH)、游离胺(-NH₂)或巯基(-SH)基团,其能够与抗体上适合的功能基团反应以导致所述效应分子的结合。或者,衍生所述抗体以暴露或附着另外的反应性功能基团。所述衍生作用可以涉及若干接头分子的任何附着,例如可从Pierce Chemical Company, Rockford, IL获得的那些。所述接头可以是用于接合所述抗体到所述效应分子的任何分子。所述接头能够与所述抗体和所述效应分子都形成共价键。适合的接头是本领域技术人员已知的,包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头、或肽接头。当所述抗体和所述效应分子是多肽时,所述接头可以通过其侧基(例如通过到半胱氨酸的二硫键)接合到构成型(constituent)氨基酸或接合到末端氨基酸的 α 碳氨基和羧基基团。

[0328] 在某些情况中,当所述免疫缀合物已经到达其靶位点时需要将所述效应分子从所述抗体释放。因此,在这些情况中,免疫缀合物将包括在所述靶位点附近可被切割的键。切割接头以将所述效应分子从所述抗体释放可以由酶活性引起,或由所述免疫缀合物在所述靶细胞内或靶位点附近所处的条件引起。

[0329] 考虑到已经报告的大量用于将多种放射性诊断化合物、放射性治疗化合物、标记(例如酶或荧光分子)药物、毒素、多肽和其他试剂附着到抗体的方法,本领域技术人员将能够确定适合的方法用于附着给定试剂到抗体或其他多肽。

[0330] 本文公开的特异性结合内质蛋白的抗体或抗体片段可以衍生或连接到另外的分子(例如另外的肽或蛋白质)。通常,所述抗体或其部分是衍生的以使得对内质蛋白的结合不受所述衍生作用或标记的不利影响。例如,所述抗体可以被功能性地连接(通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他)到一种或多种其他分子实体例如另外的抗体(例如双特异性抗体(bispecific antibody或diabody))、检测试剂、药学试剂和/或可介导所述抗体或抗体部分与另外的分子(例如链霉亲和素核区域或多组氨酸标签)缔合的蛋白质或肽。

[0331] 一种类型的衍生抗体是通过两种或两种以上抗体(同一种类型或不同类型,例如形成双特异性抗体)交联而产生的。适合的交联剂包括具有被适当间隔(例如间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)分离的2个不同的反应基团的异型双功能交联剂或同型双功能的那些交联剂(例如双琥珀酰亚胺辛二酸酯)。这些交联剂(linker)可从Pierce Chemical Company, Rockford, Ill获得。

[0332] 本文提供了检测内质蛋白的方法,包括检测表达内质蛋白的细胞的方法,例如黑色素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌细胞。如本文所公开的,这些方法可以包括将来自受试者的样品与特异性结合内质蛋白的抗体或其抗原结合片段接触。所述方法可以用于检测原发瘤或可用于检测转移。

[0333] 在某些实施方案中,提供了检测受试者中癌症或确认受试者中癌症的诊断的方法。该方法包括将来自所述受试者的生物样品与特异性结合内质蛋白的分离的抗体或其抗原结合片段接触,以及检测所述分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段对所述样品的结合。与所述分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段对对照样品的结合相比,所述分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段对所述样品的结合增加可发现受试者中癌症或确认所述受试者中癌症的诊断。所述对照可以是来自已知没有癌症的受试者的样品或是标准值。

[0334] 所述样品可以是任何样品,包括但不限于来自活检、解剖和病理标本的组织。生物样品还包括组织切片,例如获取用于组织学目的的冷冻切片。生物样品还包括体液,例如血液、血清、血浆、痰和脊液。

[0335] 在某些实施方案中,所述特异性结合内质蛋白的人抗体(第一抗体)是未标记的,可以结合所述特异性结合内质蛋白的抗体的第二抗体或其他分子是标记的。如本领域技术人员所公知的,选择能够特异性结合具体种和类的所述第一抗体的第二抗体。例如,如果所述第一抗体是人IgG,那么所述第二抗体可以是人IgG抗体。可以结合抗体的其他分子包括但不限于蛋白质A和蛋白质G,此两者都可市购。

[0336] 所述特异性结合内质蛋白的人抗体或其抗原结合片段可以用可检测部分标记。有用的检测试剂包括荧光化合物,其包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲基氨基-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、稀土荧光体等。也可以使用生物荧光标示物,例如萤光素酶、绿色荧

光蛋白 (GFP)、黄色荧光蛋白 (YFP)。抗体还可以用可用于检测的酶来标记,例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶等。当抗体被用可检测的酶标记时,可以通过加入可被所述酶用于产生可识别的反应产物的另外的试剂来检测所述抗体。例如,当辣根过氧化物酶存在时,加入过氧化氢和二氨基联苯胺可产生有颜色的反应产物,其是可以目视检测的。抗体还可以用生物素标记,并通过间接测量其与抗生物素蛋白或链霉亲和素的结合来检测。应该注意到所述抗生物素蛋白本身可以用酶或荧光标记物来标记。

[0337] 抗体可以用磁性试剂例如钆来标记。抗体还可以用稀土元素 (例如铈和镱) 和锰标记。顺磁性颗粒例如超顺磁性氧化铁也可以用作标记。还可以用预先确定的可被第二报告分子 (例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体结合位点、金属结合域、表位标签) 识别的多肽表位来标记抗体。在某些实施方案中,标记被多种长度的间隔臂附着以减少可能的空间位阻。

[0338] 抗体还可以用放射性标记的氨基酸来标记。所述放射性标签可以用于诊断和治疗性目的。例如,所述放射性标签可以用于通过x-射线、发射光谱、磁共振成像 (MRI)、计算机断层扫描 (CT)、正电子发射断层扫描 (PET) 或其他诊断技术检测内质蛋白。可用作多肽的标记的实例包括但不限于如下的放射性同位素或放射性核苷酸: ^{35}S 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 和 ^{125}I 。

[0339] 抗体还可以用化学基团 (例如聚乙二醇 (PEG)、甲基或乙基基团、或碳水化合物基团) 衍生化。这些基团可以用于提高所述抗体的生物特性,例如增加血清半衰期或增加组织结合。

[0340] 本文描述的抗体还可以共价或非共价地连接到可检测标记。适合于这种用途的可检测标记包括任何通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学方法可检测的组合物。有用的标记包括磁珠、荧光染料 (例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白等)、放射性标记 (例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、酶 (例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其他ELISA中常用的酶) 和比色标记例如胶体 金或有色玻璃或塑料 (例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等) 珠。这些抗体可以用于多种免疫测定,包括荧光激活细胞分选 (FACS)、免疫组织化学、放射免疫测定 (RIA) 和酶联免疫测定 (ELISA)。

[0341] 检测这些标记的方法是本领域技术人员公知的。因此,例如,放射性标记可以使用照相胶片或闪烁计数器检测,荧光标示物可以使用光检测器检测以检测发光照度。酶标记一般通过提供底物给酶并检测所述酶对所述底物作用而产生的反应产物来检测,比色标记可通过简单地目测所述颜色标记来检测。

[0342] 在一个实施方案中,提供了用于检测生物样品例如血液样品中内质蛋白的试剂盒。用于检测多肽的试剂盒一般包括特异性结合内质蛋白的人抗体,例如任何本文公开的抗体。在某些实施方案中,抗体片段例如Fv片段包括在所述试剂盒中。对于体内使用,所述抗体可以是scFv片段。在另一个实施方案中,所述抗体是标记的 (例如用荧光、放射性或酶标记)。

[0343] 在一个实施方案中,试剂盒包括公开特异性结合内质蛋白的抗体的使用方法的说明材料。所述说明材料可以是书面形式,电子形式 (例如计算机软盘或高密度磁盘) 或可以是可视的形式 (例如视频文件)。所述试剂盒还可以包括另外的组分以帮助所述试剂盒被设计用于的具体应用。因此,例如,所述试剂盒还可以含有检测标记物的材料 (例如用于酶标

记物的酶底物、检测荧光标记物的滤光片组、适当的第二标记物例如第二抗体等)。所述试剂盒还可以包括通常用于实施具体方法的缓冲液和其他试剂。这种试剂盒和适当的内含物是本领域技术人员已知的。

[0344] 在一个实施方案中,所述诊断试剂盒包括免疫测定。虽然所述免疫测定的细节可以因具体采用的形式而不同,但是在生物样品中检测内质蛋白的方法通常包括将所述生物样品与在免疫活性条件下与内质蛋白特异性反应的抗体接触的步骤。使所述抗体在免疫活性条件下特异性结合以形成免疫复合物,并且可直接或间接地检测所述免疫复合物(结合的抗体)的存在。

[0345] V. 内质蛋白抗体多核苷酸和多肽

[0346] 编码本文提供的多肽(包括但不限于抗体、其抗原结合片段、免疫缀合物和融合蛋白)的核酸分子(也称为多核苷酸)可以容易地由本领域技术人员使用本文提供的氨基酸序列、本领域中可获得的序列和遗传密码产生。另外,技术人员可以容易地构建多个含有功能上等价的核酸的克隆,所述功能上等价的核酸例如序列不同但编码相同的效应分子或抗体序列的核酸。因此,本文提供了编码抗体、缀合物和融合蛋白的核酸。

[0347] 在某些实施方案中,所述内质蛋白人单克隆抗体具有由包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列编码的V_H域。在某些实施方案中,所述内质蛋白人单克隆抗体具有由包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列编码的V_L域。下文提供了示例性的核酸序列:

[0348] W9VH序列(hIgG1重链恒定区为黑体):

[0349]

```
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGG
ATACACCTTCACTAGCTATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCA
ACGCTGGCAATGGTAACACAAAAATATTCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGC
ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGGGCCCATTTTGACTA
C T G G G G C C A A G G T A C C C T G G T C A C C G T C T C G GCTAG
```

CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC
ACCTCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG
CGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT
CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGGACCCA
GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTC
TTCCCCCCTAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA (SEQ
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAGCCAAAGGGGACGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCG
TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAATGA

ID NO:3)

[0350] W9VL序列 (人κ轻链恒定区为黑体) :

[0351]

GAAATTGAGCTACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAG
TCAGAGCATTAGCAGCTACTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCAT
CCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
CTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCAACGTTCCGCCAAGGGACCAA
G G T G G A G A T C A A A **ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT**
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG
TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC (SEQ
CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
TCAACAGGGGAGAGTGTTAG

ID NO:4)

[0352] 可以通过任何适合的方法来制备编码所述特异性结合内质蛋白的人抗体或其特异性结合内质蛋白的抗原结合片段的核酸序列,所述方法包括例如克隆适当序列或通过直接的化学合成,所述化学合成方法例如Narang et al.,Meth.Enzymol.68:90-99,1979的磷酸三酯方法;Brown et al.,Meth.Enzymol.68:109-151,1979的磷酸二酯方法;Beaucage et al.,Tetra.Lett.22:1859-1862,1981的二乙基亚磷酰胺(diethylphosphoramidite)方

法;由Beaucage&Caruthers,Tetra.Letts.22(20):1859-1862,1981描述的固相亚磷酰胺三酯方法,例如使用例如Needham-VanDevanter et al.,Nucl.Acids Res.12:6159-6168,1984中描述的自动合成仪;以及美国专利No.4,458,066的固体载体方法。化学合成产生单链寡核苷酸。其可以通过与互补序列杂交或通过使用所述单链作为模板用DNA聚合酶的聚合作用而转变为双链DNA。本领域技术人员应该认识到虽然DNA的化学合成通常限制于约100个碱基的序列,但是通过较短序列的连接可以获得更长的序列。

[0353] 可以通过克隆技术制备编码特异性结合内质蛋白的人抗体或其特异性结合内质蛋白的抗原结合片段的示例性核酸。适当的克隆和测序技术的实例以及足以通过许多克隆练习指导技术人员的说明可见于Sambrook et al.,见上文;Berger and Kimmel (eds.),见上文;和 Ausubel,见上文。来自生物试剂和实验设备制造商的产品信息也可提供有用的信息。这些制造商包括SIGMA Chemical Company (Saint Louis,MO)、R&D Systems (Minneapolis,MN)、Pharmacia Amersham (Piscataway,NJ)、CLONTECH Laboratories,Inc. (Palo Alto,CA)、Chem Genes Corp.、Aldrich Chemical Company (Milwaukee,WI)、Glen Research,Inc.、GIBCO BRL Life Technologies,Inc. (Gaithersburg,MD)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG,Buchs,Switzerland)、Invitrogen (Carlsbad,CA) 和Applied Biosystems (Foster City,CA),以及本领域技术人员已知的许多其他商业来源。

[0354] 编码天然效应分子(EM)或抗内质蛋白抗体的核酸可以被修饰以形成本公开内容所述的EM、抗体或免疫缀合物。通过位点定向诱变的修饰是本领域已知的。核酸还可以通过扩增方法制备。扩增方法包括聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、基于转录的扩增系统(TAS)、自主序列复制系统(3SR)。多种克隆方法、宿主细胞和体外扩增方法是本领域技术人员已知的。

[0355] 在一个实施方案中,免疫缀合物是通过将编码人内质蛋白特异性的单克隆抗体或其抗原结合片段的cDNA插入到含有编码所述EM的cDNA的载体中来制备的。构建所述插入使得所述抗体和所述EM在同一读码框(即含有功能性抗体区域和功能性EM区域的一个连续的多肽)中。在一个实施方案中,编码EM、标记或酶的cDNA被连接到编码抗体的cDNA以使得所述EM、标记或酶位于所述抗体的羧基端。在另一个实施方案中,所述EM、标记或酶位于所述抗体的氨基端。在另一个实例中,编码所述EM、标记或酶的cDNA被连接到编码抗体的重链可变区的cDNA,使得所述EM、标记或酶位于所述重链可变区的羧基端。随后可通过二硫键将所述重链可变区连接到所述抗体的轻链可变区。还有另一个实例中,编码EM、标记或酶的cDNA被连接到编码抗体的轻链可变区的cDNA,使得所述EM、标记或酶位于所述轻链可变区的羧基端。随后可通过二硫键将所述轻链可变区连接到所述抗体的重链可变区。

[0356] 一旦所述编码EM、抗内质蛋白抗体、其抗原结合片段或免疫缀合物的核酸被分离并克隆,可以在重组工程细胞例如细菌、植物、酵母、昆虫和哺乳动物细胞中表达所需要的蛋白质。可以预期本领域技术人员能够知晓可用于表达蛋白质的多种表达系统,其包括大肠杆菌、其他细菌宿主、酵母、和多种高等真核细胞例如COS、CHO、HeLa和骨髓瘤细胞系。

[0357] 编码所述抗体或其片段的一种或多种DNA序列可以通过DNA传递到适合的宿主细胞而在体外表达。所述细胞可以是原核的或真核的。该术语还包括任何受试者宿主细胞的子代。应该理解可能不是全部子代都与亲代细胞相同的,因为在复制期间可能有突变发生。

稳定传递——意指外源DNA持续维持在宿主中——的方法是本领域已知的。表达目标抗体的杂交瘤也包括在本公开内容中。

[0358] 编码本文所述的分离抗体和抗体片段的核酸的表达,可以通过将所述DNA或cDNA可操作地连接到异源启动子(组成型的或可诱导的),然后将其掺入到表达框中来实现。所述框可以在原核细胞或真核细胞中适合于复制和整合。一般的表达框含有用于调节编码蛋白的DNA表达的特定序列。例如所述表达框可以包括适当的启动子、增强子、转录和翻译终止子、起始序列、在蛋白编码基因前面的起始密码子(即ATG)、内含子剪接信号、使mRNA正确翻译的对那段基因正确读码框的维护、以及终止密码子。

[0359] 为获得克隆基因的高水平表达,需要构建至少含有指导转录的强启动子、用于翻译起始的核糖体结合位点、和转录/翻译终止子的表达框。对于大肠杆菌,这包括启动子例如T7、trp、lac或 λ 启动子、核糖体结合位点、以及优选地转录终止信号。对于真核细胞,所述控制序列可以包括源自例如免疫球蛋白基因、SV40或巨细胞病毒的启动子和/或增强子,以及多聚腺苷酸序列,并还可包括剪接供体和受体序列。所述框可以通过已知的方法被转移到所选择的宿主细胞,例如对于大肠杆菌通过转化或电穿孔法,对于哺乳动物细胞通过磷酸钙处理、电穿孔或脂质转染法。被所述框转化的细胞可以通过由所述框中含有的基因(例如amp、gpt、neo、和hyg基因)赋予的对抗生素的抗性来选择。

[0360] 当所述宿主是真核细胞时,可以使用例如磷酸钙共沉淀转染DNA方法,常规机械方法例如显微注射、电穿孔、包装在脂质体中质粒的插入或病毒载体。还可以用编码所述抗体、标记的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列与编码选择性表型的第二外源DNA分子例如单纯疱疹胸苷激酶基因,共转化真核细胞。另外的方法是使用真核病毒载体,例如猿猴病毒40(SV40)或牛乳头瘤病毒瞬时感染或转化真核细胞并表达所述蛋白质(参见例如Eukaryotic Viral Vectors,Cold Spring Harbor Laboratory,Gluzman ed.,1982)。本领域技术人员可以容易地使用表达系统(例如质粒和载体)在细胞中产生蛋白质,所述细胞包括高等真核细胞例如COS、CHO、HeLa和骨髓瘤细胞系。

[0361] 可以对编码本文描述的多肽(即人内质蛋白特异性单克隆抗体或包含所述抗体的免疫缀合物)的核酸进行修饰而不减少其生物活性。可以进行某些修饰以帮助所述克隆、表达或将所述靶向分子掺入到融合蛋白。这些修饰是本领域技术人员已知的,其包括例如产生终止密码子、在氨基末端加入甲硫氨酸以提供起始位点、在任一末端加入另外氨基酸以形成便于定位的限制性位点或加入有助于纯化步骤的另外氨基酸(例如多His)。除重组方法之外,还可以使用本领域已知的标准肽合成整体或部分地构建本公开内容所述的免疫缀合物、效应部分和抗体。

[0362] 一旦表达,可以根据本领域标准方法包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱等纯化所述重组免疫缀合物、抗体和/或效应分子(通常参见R.Scopes,PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag,N.Y.,1982)。所述抗体、免疫缀合物和效应分子不需要是100%纯。如果用于治疗性目的,经过部分地纯化或纯化达到所需的均一性后所述多肽应该基本没有内毒素。

[0363] 从细菌例如大肠杆菌中表达单链抗体和/或再折叠为适当的活性形式(包括单链抗体)的方法已经被描述并且是已知的,并且可适用于本文公开的抗体。参见Buchner et al.,Anal.Biochem.205:263-270,1992;Pluckthun,Biotechnology 9:545,1991;Huse et

al., Science 246:1275, 1989 和 Ward et al., Nature 341:544, 1989, 以上所有文献以引用的方式纳入本文。

[0364] 经常地, 来自大肠杆菌或其他细菌的功能性异源蛋白质是从包涵体中分离, 并需要使用强变性剂增溶以及随后再折叠。如本领域已知的, 在所述增溶步骤中必须存在还原试剂以分开二硫键。含有还原试剂的示例性缓冲液为: 0.1M Tris pH 8、6M 胍、2mM EDTA、0.3M DTE (二硫赤藓醇)。所述二硫键的再氧化可以在还原和氧化形式的低分子量硫醇试剂存在的情况下发生, 如 Saxena et al., Biochemistry 9:5015-5021, 1970 中所述, 其以引用的方式纳入本文, 尤其如 Buchner et al. (见上文) 中所述。

[0365] 复性一般是通过将所述变性的和还原的蛋白质溶解 (例如 100 倍) 到再折叠缓冲液中来完成。示例性的缓冲液是 0.1M Tris, pH 8.0、0.5M L-精氨酸、8mM 氧化谷胱甘肽 (GSSG) 和 2mM EDTA。

[0366] 作为双链抗体纯化方法的修改, 所述重链区域和轻链区域被分别溶解和还原, 然后在所述再折叠溶液中结合。当混合的两种蛋白质中一种蛋白质的摩尔量不超过另一种蛋白质的摩尔量的 5 倍时, 可获得示例性的收率。在所述氧化还原-转变完成后, 可将过量氧化的谷胱甘肽或其他氧化低分子量化合物加入到所述再折叠溶液。

[0367] 除重组方法外, 还可以使用标准肽合成整体或部分地构建本文公开的抗体、标记抗体及其抗原结合片段。长度少于约 50 个氨基酸的多肽的固相合成可以通过将所述序列的 C 末端氨基酸附着到不溶的支持物, 然后将所述序列中剩余的氨基酸序贯添加而完成。固相合成技术见 Barany & Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A. pp. 3-284; Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156, 1963, 和 Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984 中所述。更大长度的蛋白质可以通过较短片段的氨基和羧基末端缩合来合成。通过羧基末端激活形成肽键的方法 (例如通过使用偶联剂 N,N'-二环己基碳二亚胺) 是本领域已知的。

[0368] VI. 组合物和治疗性方法

[0369] 本文提供的组合物包括载体和一种或多种特异性结合内质蛋白的抗体, 或其特异性结合内质蛋白的抗原结合片段。还提供了包含免疫缀合物或免疫毒素的组合物。所述组合物可以被制成单位剂量形式用于给予受试者。给予的量和时间由治疗医生判断以达到需要的目的。所述抗体可以制成可用于全身或局部 (例如肿瘤内) 给药的配方。在一个实例中, 所述特异性结合内质蛋白的抗体被制作为用于肠胃外给药例如静脉给药。

[0370] 用于给予的组合物可以包括溶解在可药用载体例如含水载体中的特异性结合内质蛋白的抗体 (或其特异性结合内质蛋白的功能片段) 溶液。可以使用多种含水载体, 例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的并通常没有不需要的物质。这些组合物可以通过常规的已知灭菌技术来灭菌。所述组合物可以含有接近生理条件所需要的可药用的辅料例如 pH 调节和缓冲试剂、毒性调节试剂等, 例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的抗体浓度可以有很大地不同, 并可以主要基于流体体积、粘性、体重等根据所选择给药的具体方式和受试者需要来选择。

[0371] 用于静脉给药的一般的药物组合物包括每个受试者每天约 0.1-10mg 抗体。可以使用每个受试者每天从 0.1mg 到最高约 100mg 的剂量, 尤其是如果所述试剂被给予到隔离的位

点而没有进入到循环或淋巴系统,例如进入到体腔或进入到器官的腔。用于制备可给予的组合物的实际方法是本领域技术人员已知或显而易见的,并且更详细地记载于出版物例如 Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995)。

[0372] 抗体可以以冻干形式提供并在给予前用无菌水再水化,虽然其还可以以已知浓度的无菌溶液提供。然后可将所述抗体溶液加入到含有0.9%氯化钠、USP的输液袋,一般以每千克体重0.5-15mg的剂量给予。给予抗体药物的大量经验是本领域可获得的,自从在1997年批准 **Rituxan®**后抗体药物在美国已经上市。抗体可以通过缓慢输注来给予,而不是静脉推注或快速注射(bolus)。在一个实例中,给予较高的负荷剂量,随后以较低水平给予维持剂量。例如,4mg/kg的起始负荷剂量可以在约90分钟的时间内输注,然后如果上述之前的剂量耐受良好,可以2mg/kg的每周维持剂量在30分钟时间内输注,持续4-8周。

[0373] 可以给予所述特异性结合内质蛋白的抗体(或其抗原结合片段或其免疫缀合物)以减慢或抑制细胞例如癌细胞的生长。在这些应用中,将治疗有效量的抗体给予受试者,该量足以抑制癌细胞的生长、复制或转移,或抑制癌症的征象或症状。在某些实施方案中,将所述抗体给予受试者以抑制或预防转移的发展,或减少转移例如微小转移例如到局部淋巴结的微小转移的大小或数量(Goto et al., Clin. Cancer Res. 14(11):3401-3407, 2008)。

[0374] 适合的受试者可以包括被诊断有表达内质蛋白的癌症的那些,例如但不限于黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌。人内质蛋白特异性抗体的治疗有效量依赖于所述疾病的严重度和患者健康的整体状态。所述抗体的治疗有效量可提供症状的主观减轻,或由临床医生或其他有资格的观察者注意到的客观可分辨的改善。这些组合物可以与另外的化学治疗剂同时或序贯地共同给予。

[0375] 许多化学治疗剂是本领域目前已知的。在一个实施方案中,所述化学治疗剂选自有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、插入性抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、抗生存试剂、生物反应调节剂、抗激素例如抗雄激素以及抗血管生成试剂。

[0376] 抗血管生成试剂例如MMP-2(基质金属蛋白酶2)抑制剂、MMP-9(基质金属蛋白酶9)抑制剂和COX-II(环氧合酶II)抑制剂可以与本发明的化合物共同使用。可用的COX-II抑制剂的实例包括西乐葆(CELEBREXTM, celecoxib)、伐地考昔和罗非考昔。可用的基质金属蛋白酶抑制剂的实例记载于PCT公开W0 96/33172(1996年10月24日公开)、PCT公开W0 96/27583(1996年3月7日公开)、欧洲专利申请No. 97304971.1(1997年7月8日提交)、欧洲专利申请No. 99308617.2(1999年10月29日提交)、PCT公开W0 98/07697(1998年2月26日公开)、PCT公开W0 98/03516(1998年1月29日公开)、PCT公开W0 98/34918(1998年8月13日公开)、PCT公开W0 98/34915(1998年8月13日公开)、PCT公开W0 98/33768(1998年8月6日公开)、PCT公开W0 98/30566(1998年7月16日公开)、欧洲专利公开606,046(1994年7月13日公开)欧洲专利公开931,788(1999年7月28日公开)、PCT公开W0 90/05719(1990年5月31日公开)、PCT公开W0 99/52910(1999年10月21日公开)、PCT公开W0 99/52889(1999年10月21日公开)、PCT公开W0 99/29667(1999年6月17日公开)、PCT国际申请No. PCT/IB98/01113(1998年7月21日提交)、欧洲专利申请No. 99302232.1(1999年3月25日提交)、美国专利No. 5,863,949(1999年1月26日授权)、美国专利No. 5,861,510(1999年1月19日授权)以及欧洲专利公开780,386

(1997年6月25日公开)。在一个实例中,所述MMP抑制剂在给予后不诱导关节痛。在另一个实例中,所述MMP抑制剂选择性地抑制MMP-2和/或MMP-9,相对于其他基质金属蛋白酶(例如MMP-1、MMP-3、MMP-4、MMP-5、MMP-6、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11、MMP-12和MMP-13)。可用的MMP抑制剂的一些具体实例为AG-3340、R0 32-3555、RS 13-0830、3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰基]-(1-羟基氨基甲酰基-环戊基)-氨基]-丙酸;3-外-3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-8-氧杂-双环[3.2.1]辛烷-3-羧酸羟基酰胺;(2R,3R) 1-[4-(2-氯-4-氟-苄氧基)-苯磺酰基]-3-羟基-3-甲基-哌啶-2-羧酸羟基酰胺;4-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-吡喃-4-羧酸羟基酰胺;3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰基]-(1-羟基氨基甲酰基-环丁基)-氨基]-丙酸;4-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-吡喃-4-羧酸羟基酰胺;(R) 3-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-吡喃-3-羧酸羟基酰胺;(2R,3R) 1-[4-(4-氟-2-甲基-苄氧基)-苯磺酰基]-3-羟基-3-甲基-哌啶-2-羧酸羟基酰胺;3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰基]-(1-羟基氨基甲酰基-1-甲基-乙基)-氨基]-丙酸;3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰基]-(4-羟基氨基甲酰基-四氢-吡喃-4-基)-氨基]-丙酸;3-外-3-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺酰氨基]-8-氧杂二环[3.2.1]辛烷-3-羧酸羟基酰胺;3-内-3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-8-氧杂-二环[3.2.1]辛烷-3-羧酸羟基酰胺;(R) 3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-呋喃-3-羧酸羟基酰胺;以及所述化合物的可药用盐和溶剂化物。

[0377] 特异性结合内质蛋白的抗体还可以与信号转导抑制剂一起使用,所述信号转导抑制剂例如可以抑制EGF-R(表皮生长因子受体)反应的试剂例如EGF-R抗体、EGF抗体和EGF-R抑制剂分子;VEGF(血管内皮生长因子)抑制剂例如VEGF受体和可以抑制VEGF的分子;以及erbB2受体抑制剂例如结合到erbB2受体的有机分子或抗体例如HERCEPTINTM(Genentech, Inc.)。EGF-R抑制剂记载于例如PCT公开W0 95/19970(1995年7月27日公开)、W0 98/14451(1998年4月9号公开)、W0 98/02434(1998年1月22日公开)、和美国专利No.5,747,498(1998年5月5日授权)。EGFR抑制试剂还包括但不限于单克隆抗体C225和抗EGFR 22Mab(ImClone Systems Incorporated)、ABX-EGF(Abgenix/Cell Genesys)、EMD-7200(Merck KgaA)、EMD-5590(Merck KgaA)、MDX-447/H-477(Medarex Inc.and Merck KgaA)以及化合物ZD-1834、ZD-1838和ZD-1839(AstraZeneca)、PKI-166(Novartis)、PKI-166/CGP-75166(Novartis)、PTK 787(Novartis)、CP 701(Cephalon)、来氟米特(Pharmacia/Sugen)、Cl-1033(Warner Lambert Parke Davis)、Cl-1033/PD 183,805(Warner Lambert Parke Davis)、CL-387,785(Wyeth-Ayerst)、BBR-1611(Boehringer Mannheim GmbH/Roche)、Naamidine A(Bristol Myers Squibb)、RC-3940-II(Pharmacia)、BIBX-1382(Boehringer Ingelheim)、OLX-103(Merck&Co.)、VRCTC-310(Ventech Research)、EGF融合毒素(Seragen Inc.)、DAB-389(Seragen/Lilgand)、ZM-252808(Imperial Cancer Research Fund)、RG-50864(INSERM)、LFM-A12(Parker Hughes Cancer Center)、WHI-P97(Parker Hughes Cancer Center)、GW-282974(Glaxo)、KT-8391(Kyowa Hakko)和EGF-R疫苗(York Medical/Centro de Immunologia Molecular(CIM))。

[0378] VEGF抑制剂,例如SU-5416和SU-6668(Sugen Inc.)、SH-268(Schering)和NX-1838(NeXstar)还可以与特异性结合内质蛋白的抗体共同使用。VEGF抑制剂记载于例如PCT公开W0 99/24440(1999年5月20日公开)、PCT国际申请PCT/IB99/00797(1999年5月3日提交)、PCT公开W0 95/21613(1995年8月17日公开)、PCT公开号W0 99/61422(1999年12月2日公

开)、美国专利号5,834,504(1998年11月10日授权)、PCT公开号W0 98/50356(1998年11月12日公开)、美国专利No.5,883,113(1999年3月16日授权)、美国专利No.5,886,020(1999年3月23日授权)、美国专利No.5,792,783(1998年8月11日授权)、PCT公开W0 99/10349(1999年3月4日公开)、PCT公开W0 97/32856(1997年9月12日公开)、PCT公开W0 97/22596(1997年6月26日公开)、PCT公开W0 98/54093(1998年12月3日公开)、PCT公开W0 98/02438(1998年1月22日公开)、W0 99/16755(1999年4月8日公开)和PCT公开W0 98/02437(1998年1月22日公开)。一些具体VEGF抑制剂的其他实例是IM862(Cytran Inc.);Genentech, Inc.的抗VEGF单克隆抗体;以及angiozyme,一种来自Ribozyme and Chiron的合成核酶。这些和其他的VEGF抑制剂可以与特异性结合内质蛋白的抗体共同使用。

[0379] ErbB2受体抑制剂,例如GW-282974(Glaxo Wellcome pic)以及单克隆抗体AR-209(Aronex Pharmaceuticals Inc.)和2B-1(Chiron),可以进一步与本发明的所述化合物联合,例如在PCT公开W0 98/02434(1998年1月22日公开)、PCT公开W0 99/35146(1999年7月15日公开)、PCT公开W0 99/35132(1999年7月15日公开)、PCT公开W0 98/02437(1998年1月22日公开)、PCT公开W0 97/13760(1997年4月17日公开)、PCT公开W0 95/19970(1995年7月27日公开)、美国专利No.5,587,458(1996年12月24日授权)和美国专利No.5,877,305(1999年3月2日授权)中指出的那些。可用的erbB2受体抑制剂还记载于1999年1月27日提交的美国临时申请No.60/117,341,以及1999年1月27日提交的美国临时申请No.60/117,346。

[0380] 特异性结合内质蛋白的抗体(或其抗原结合片段)可以与细胞因子或趋化因子一起使用和/或可以缀合到细胞因子或趋化因子,示例性的细胞因子包括但不限于:干扰素(IFN)例如IFN- α 、IFN- β 、和IFN- γ);肿瘤坏死因子超家族(TNFSF)成员;人生长激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛肽;松弛肽原;促卵泡激素(FSH);促甲状腺激素(TSH);促黄体生成激素(LH);肝生长因子;前列腺素;成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素、OB蛋白质;肿瘤坏死因子TNF- α ;TNF- β ;整联蛋白;促血小板生成素(TPO);神经生长因子(NGF)例如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF)- α ;TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;促红细胞生成素(EPO);集落刺激因子(CSF)例如巨噬细胞-CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF)、和粒细胞-CSF(G-CSF);白细胞介素(IL-1到IL-21)、kit-配体或FLT-3、血管他丁、血小板反应蛋白和内皮他丁。适合的趋化因子包括但不限于RANTES、MCAF、MCP-1和分形趋化因子。

[0381] 对于癌症例如黑素瘤的治疗,本文公开的抗体可以与外科治疗一起使用,或与另外的治疗包括达卡巴嗪(也称为DTIC)、替莫唑胺、PARP抑制剂或白细胞介素-2或干扰素例如干扰素(IFN),或这些试剂的组合一起使用。对于浅表黑素瘤的治疗,所述抗体可以与咪喹莫特共同使用。对于头颈部鳞状细胞癌的治疗,本文提供的抗体可以与外科手术、放射治疗、化疗、其他抗体(例如西妥昔单抗和贝伐单抗)或小分子疗法(例如厄洛替尼(erlotinib))共同使用。

[0382] 依赖于所述患者需要的和耐受的剂量和频率,可单次或多次给予所述组合物。在任何情况中,所述组合物应该提供足够量的至少一种本文公开的抗体以有效地治疗所述患者。所述剂量可被一次给予但是可以周期性地应用,直到达到治疗结果或者出现副作用应该停止治疗。在一个实例中,每隔一天输注30分钟输入1个剂量的抗体。在该实例中,可以给予约1个剂量到约10个剂量,例如每隔一天可以给予3个剂量或6个剂量。在另外一个实例

中,给予连续输注约5到10天。可以以有规律的间隔(例如按月)治疗所述受试者,直到达到需要的治疗结果。通常,所述剂量足以治疗或改善疾病的症状或征象,而不产生患者不可耐受的毒性。

[0383] 控制释放肠胃外制剂可以作为埋植剂、含油注射剂或作为颗粒系统。蛋白质递送系统的全面综述参见Banga,A.J.,*Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation, Processing,and Delivery Systems*,Technomic Publishing Company,Inc.,Lancaster,PA,(1995),其以引用的方式纳入本文。颗粒系统包括微球体、微粒、微囊剂、毫微囊剂、毫微球和毫微型颗粒。微囊剂含有所述治疗性蛋白质例如细胞毒素或药物作为中心核。在微球体中所述治疗剂分散在所述颗粒各处。小于约1 μ m的颗粒、微球体和微囊剂通常分别被称为毫微型颗粒、毫微球和毫微囊剂。毛细血管的直径为约5 μ m,因此只有毫微型颗粒可静脉给予。微粒直径一般约100 μ m,可皮下或肌肉内注射给予。参见例如,Kreuter,J.,*Colloidal Drug Delivery Systems*,J.Kreuter,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,NY,pp.219-342(1994);和Tice&Tabibi,*Treatise on Controlled Drug Delivery*,A.Kydonieus,ed.,Marcel Dekker,Inc.New York,NY,pp.315-339,(1992),其都以引用的方式纳入本文。

[0384] 聚合物可以用于本文公开的抗体组合物的离子控制释放。多种用于受控药物递送的可降解和不可降解的聚合基质是本领域已知的(Langer,*Accounts Chem.Res.*26:537-542,1993)。例如,嵌段共聚物polaxamer407在低温时以粘稠的流动液体存在,但是在体温时形成半固体凝胶。其已被证实是可用于制剂和重组白细胞介素-2和脲酶的持续递送的有效赋形剂(Johnston et al.,*Pharm.Res.*9:425-434,1992;and Pec et al.,*J.Parent.Sci.Tech.*44(2):58-65,1990)。或者,羟磷灰石已被作为微载体用于蛋白质的控制释放(Ijntema et al.,*Int.J.Pharm.*112:215-224,1994)。还有另一个方面,脂质体被用于脂质胶囊化药物的控制释放以及药物靶向作用(Betageri et al.,*Liposome Drug Delivery Systems*,Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,PA(1993))。许多可用于治疗性蛋白质的控制释放的另外系统是已知的(参见美国专利No.5,055,303;美国专利No.5,188,837;美国专利No.4,235,871;美国专利 No.4,501,728;美国专利No.4,837,028;美国专利No.4,957,735;美国专利No.5,019,369;美国专利No.5,055,303;美国专利No.5,514,670;美国专利No.5,413,797;美国专利No.5,268,164;美国专利No.5,004,697;美国专利No.4,902,505;美国专利No.5,506,206;美国专利No.5,271,961;美国专利No.5,254,342以及美国专利No.5,534,496)。

[0385] 共价连接到效应分子的、特异性结合内质蛋白的完全人源性单克隆抗体或其抗原结合片段可以用于多种目的,包括用于放射免疫疗法或放射免疫导向手术。例如,内质蛋白抗体可被连接到放射性同位素并用于免疫疗法以治疗表达内质蛋白的肿瘤。共价连接到放射性同位素的人内质蛋白抗体可用于在放射免疫导向手术中定位肿瘤,使得所述肿瘤可以被手术移除。在一个实施方案中,约10mCi放射性标记的人内质蛋白单克隆抗体被给予受试者。在其他实施方案中,约15mCi、约20mCi、约50mCi、约75mCi或约100mCi放射性标记的人内质蛋白单克隆抗体被给予受试者。在其他实施方案中,约100mCi到约100mCi放射性标记的人内质蛋白单克隆抗体被给予受试者。

[0386] 体内检测受试者中肿瘤的方法包括给予与效应分子例如放射性同位素复合的、特异性结合内质蛋白的人抗体或其抗原结合片段。在经过足够长的时间以使得所给予的放射

性标记抗体定位到肿瘤后,可检测到所述肿瘤。在一个具体的非限制性实例中,使用手持 γ 检测探针检测放射性标记的免疫复合物。在某些实施方案中,通过MRI、CT扫描或PET扫描检测所述肿瘤。表达内质蛋白的原发瘤、转移瘤或细胞可以被检测到。例如,在手术或治疗前将复合到效应分子例如放射性同位素的人内质蛋白单克隆抗体给予受试者。在一个具体实施方案中,在手术前执行所述检测步骤以定位所述肿瘤。在另一个实施方案中,在手术期间执行所述检测步骤,例如在放射免疫导向手术中,可在移除所述肿瘤前检测其位置。还可以在手术或治疗后将复合到效应分子例如放射性同位素的人内质蛋白单克隆抗体给予受试者,以测定所述治疗的效果,例如为了确保所述肿瘤的完全移除或为了检测所述肿瘤的复发。因此,所述抗体可用作治疗性试剂(例如用于针对肿瘤的免疫疗法)或用于进行放射免疫导向手术。

[0387] VI. 诊断方法和试剂盒

[0388] 本文提供了体外检测内质蛋白表达的方法。在一个实例中,在生物样品中检测内质蛋白的表达。所述样品可以是任何样品,包括但不限于来自活组织检查、解剖和病理标本的组织。生物样品还包括组织切片,例如获取用于组织学目的的冷冻切片。生物样品进一步包括体液,例如血液、血清、血浆、痰、脊液或尿。

[0389] 在几个实施方案中,提供了检测恶性肿瘤的方法,所述恶性肿瘤例如鳞状细胞癌(例如头颈部鳞状细胞癌)、黑素瘤、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌。特异性结合内质蛋白的抗体或其抗原结合片段可以被用于检测受试者血清样品中的内质蛋白,以检测所述受试者中的癌症或确认受试者中癌症的诊断。所述抗体还可以被用于鉴定转移病灶的起源。

[0390] 本公开内容提供了一种检测生物样品中内质蛋白的方法,其中所述方法包括将生物样品与结合内质蛋白的人抗体或其抗原结合片段在有助于形成免疫复合物的条件下接触,并检测所述免疫复合物,以检测所述生物样品中的内质蛋白。在一个实例中,检测到所述样品中的内质蛋白指示受试者有恶性肿瘤。在另一个实例中,检测到所述样品中的内质蛋白可确认受试者中癌症的诊断。在另一个实例中,检测到内质蛋白确认或检测到转移的存在。

[0391] 在某些实施方案中,所述特异性结合内质蛋白的完全人源性单克隆抗体或其抗原结合片段被用于检测或诊断受试者中的肿瘤,例如确认受试者中肿瘤的诊断。在其他实施方案中,所述特异性结合内质蛋白的完全人源性单克隆抗体或其抗原结合片段被用于检测治疗的效力。例如,已知有表达内质蛋白的恶性肿瘤的受试者被给予治疗性试剂。所述方法可以包括将生物样品与结合内质蛋白的人抗体或其抗原结合片段在有助于形成免疫复合物的条件下接触,并检测所述免疫复合物,以检测所述生物样品中的内质蛋白。与对照(例如来自治疗之前的受试者的样品或参考标准)相比,内质蛋白量的减少指示所述治疗性试剂对治疗所述恶性肿瘤是有效的。在某些实例中,与所述对照相比内质蛋白量的增加指示所述治疗性试剂对治疗所述恶性肿瘤不是有效的。

[0392] 在某些实施方案中,所述检测可以在体内。所述特异性结合内质蛋白的人单克隆抗体或其抗原结合片段可以被复合到放射性同位素。在经过足够长的时间以使得所给予的放射性标记抗体定位到肿瘤后,可通过例如MRI、CT扫描或PET扫描(如上述)检测到所述肿瘤。

[0393] 在一个实施方案中,使用可检测标记直接标记所述特异性结合内质蛋白的人抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中,所述特异性结合内质蛋白的人抗体或其抗原结合片段(第一抗体)是未标记的,可以结合所述特异性结合内质蛋白的人抗体的第二抗体或其他分子是标记的。如本领域技术人员已知的,选择能够特异性结合具体种和类的所述第一抗体的第二抗体。例如,如果所述第一抗体是人IgG,那么所述第二抗体可以是抗人IgG。可以结合抗体的其他分子包括但不限于蛋白质A和蛋白质G,此两者都可市购。

[0394] 适合于所述抗体或第二抗体的标记如上所述,其包括多种酶、辅基、荧光材料、发光材料、磁性试剂和放射性材料。适合的酶的非限制性实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶。适合的辅基复合物的非限制性实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素。适合的荧光材料的非限制性实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素(dichlorotriazinylamine fluorescein)、丹磺酰氯或藻红蛋白。一种非限制示例性的发光材料是鲁米诺(luminol);一种非限制示例性的磁性试剂是钆,非限制示例性的放射性标记包括 ^{35}S 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 和 ^{125}I 。

[0395] 在一个可选择的实施方案中,利用以可检测物质标记的内质蛋白标准和特异性结合内质蛋白的未标记人抗体通过竞争性免疫测定可以测定生物样品中的内质蛋白。在该测定中,将所述生物样品、标记的内质蛋白标准和特异性结合内质蛋白的人抗体或其抗原结合片段混合,测定结合到所述未标记抗体的标记的内质蛋白标准的量。所述生物样品中内质蛋白的量与结合到所述特异性结合内质蛋白的抗体或其抗原结合片段的所述标记的内质蛋白标准的量成反比。

[0396] 本文公开的所述免疫测定和方法可以用于许多目的。在一个实施方案中,所述特异性结合内质蛋白的人抗体或其抗原结合片段可用于检测细胞培养物的细胞中内质蛋白的产生。在另一个实施方案中,所述抗体可用于检测生物样品中内质蛋白的量。内质蛋白表达增加与几种类型的癌症相关,包括但不限于黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌。在一个实施方案中,提供了用于检测生物样品例如血清样品或组织样品中内质蛋白的试剂盒。例如,为确认受试者中的癌症诊断,可以进行活组织检查以获得用于组织学检查的组织样品。或者,可以获得血清样品以检测内质蛋白蛋白质的存在。用于检测多肽的试剂盒一般包括特异性结合内质蛋白的人抗体,例如任何本文公开的抗体。在某些实施方案中,抗体片段例如Fv片段或scFv或Fab包括在所述试剂盒中。在另外一个实施方案中,所述抗体是标记的(例如具有荧光标记物、放射性标记物或酶标记物)。

[0397] 在一个实施方案中,试剂盒包括公开特异性结合内质蛋白的抗体的使用方法的说明材料。所述说明材料可以是书面形式,电子形式(例如计算机软盘或高密度磁盘)或可以是可视的形式(例如视频文件)。所述试剂盒还可以包括另外的组分以帮助所述试剂盒被设计用于的具体应用。因此,例如,所述试剂盒还可以含有检测标记的材料(例如用于酶标记物的酶底物、检测荧光标记物的滤光片组、适当的第二标记物例如第二抗体等)。所述试剂盒还可以包括通常用于实施具体方法的缓冲液和其他试剂。这种试剂盒和适当的内含物是本领域技术人员已知的。

[0398] 在一个实施方案中,所述诊断试剂盒包括免疫测定。虽然所述免疫测定的细节可

以因具体采用的形式而不同,但是在生物样品中检测内质蛋白的方法通常包括将所述生物样品与在免疫活性条件下与内质蛋白多肽特异性反应的抗体或抗体片段接触的步骤。使所述抗体在免疫活性条件下特异性结合以形成免疫复合物,并且可直接或间接地检测所述免疫复合物(结合的抗体)的存在。

[0399] 当所述抗体被用于检测受试者中癌症或确认受试者中癌症的诊断时,诊断相关的信息可以显示在表达媒介上,例如电子或纸媒介。电子媒介可以包括例如计算机数据库、监视器或电子医疗记录。纸媒介包括例如由实验人员或临床医生记录的测试结果或纸质记录。

[0400] 在某些实施方案中,一旦诊断出所述肿瘤(例如黑素瘤),就开始治疗所述受试者的肿瘤(例如所述黑素瘤)。例如,所述治疗可以包括原发病灶或转移病灶的手术切除和/或给予化学治疗方案以治疗所述疾病。

[0401] 检测细胞表面标示物是否存在的方法是本领域已知的。例如,可将所述抗体缀合到其他化合物,所述化合物包括但不限于酶、磁珠、胶体磁珠、半抗原、荧光染料、金属化合物、放射性化合物或药物。所述抗体还可以被用于免疫测定例如但不限于放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)或免疫组织化学测定。所述抗体还可以用于荧光显微镜或荧光激活细胞分选(FACS)。FACS采用多个颜色通道,低角度和钝角光散射检测通道以及阻抗通道,以及其他更复杂的检测来分离或分选细胞(参见美国专利No. 5,061,620)。任何本文公开的特异性结合内质蛋白的所述人抗体可被用于这些测定。因此,所述抗体可以用于常规免疫测定,包括但不限于ELISA、RIA、FACS、组织免疫组织化学、蛋白质印迹或免疫沉淀。

[0402] 除非另有说明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员所通常理解的含义相同的含义。除非上下文另有明确的指示,单数形式的“一”、“一个”和“该”包括复数的指示对象。类似地,除非上下文另有明确指示,单词“或者”意在包括“和”。还应该理解,针对核酸或多肽给出的所有碱基尺寸或氨基酸尺寸以及所有分子量或分子质量值是近似值,并且被提供用以描述。虽然与本文描述的方法和材料相似或等价的方法和材料可以用于本公开内容的实施或测试,适合的方法和材料在下文中描述。术语“包括”意为“包含”。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献,全文以引用的方式纳入本文。如果有冲突,那么以本说明书(包括术语解释)为准。另外,所述材料、方法和实例仅是说明性的,并非意在进行限制。

[0403] 通过如下的非限制性实施例举例说明本公开内容。

[0404] 实施例

[0405] 令人信服的临床证据已经证实基于抗体的免疫疗法可以有效地治疗血液恶性肿瘤和实体瘤。为消除肿瘤抗原的免疫原性对所开发抗体的特异性的影响,使用合成的噬菌体单链可变区(scFv)文库分离人抗体,所述人抗体可识别在恶性细胞上调的细胞表面分子。分离了特异性结合内质蛋白的抗体。

[0406] 用人黑素瘤细胞系WM1158对所述合成的噬菌体scFv文库进行的淘选已经分离了被称为W9的scFv片段,其显示出与大量人细胞系的高反应性。对用scFv W9从细胞系中免疫沉淀出的抗原的SDS-PAGE鉴别出94-KDa的组分。由scFv W9识别的决定簇包括碳水化合物,因为在使用衣霉素孵育的细胞上其表达显著降低。对用scFv W9从多个细胞系中免疫沉淀出

的条带进行的基于质谱的分析将所述94-KDa组分鉴别为内质蛋白——90-KDa分子伴侣家族的一个成员。该结论通过scFv W9与内质蛋白(Grp94)重组犬蛋白的反应性得到确证,所述内质蛋白(Grp94)重组犬蛋白与人内质蛋白(Grp94)在氨基酸序列上具有98.5%的同源性。被scFv W9识别的所述决定簇在正常细胞没有表达。所述抗体可有效地诱导细胞凋亡和抑制癌细胞生长。因此,本文公开的结果证明,特异性结合内质蛋白的抗体(例如scFv W9)可用于恶性疾病的免疫疗法。这些抗体还可被用于检测恶性疾病。

[0407] 实施例1

[0408] 材料和方法

[0409] 如下的材料和方法被用于下面的实施例:

[0410] 细胞系:人黑素瘤细胞系WM1158、MV3、COL038、SK-MEL-28、M14和FO-1,人乳癌细胞系SUM149、MDA-MB-435s、MCF-7、T47D,人头颈癌细胞系PCI-13,人胰细胞系Panc 2.03、Panc 3.27、Panc 10.05,人结肠癌细胞系40-16,人肾癌细胞系SLR21,人前列腺癌细胞系Du145,人卵巢癌细胞系OVCAR3,人神经胶质瘤癌细胞系U-138,人宫颈癌细胞系HeLa和人B淋巴样细胞系LG2,被维持在补充有10%胎牛血清(FBS:BioWhittaker,Walkersville,MD,USA)和2mM L-谷氨酰胺(BioWhittaker)的RPMI-1640培养基(Cellgro,Mediatech,Washington,DC,USA)中。人膀胱癌细胞系T24、人肺癌细胞系A549、人表皮样癌细胞系A431、人神经胶质瘤癌细胞系A-172和人293细胞系培养在补充有10%FBS的DMEM培养基(Lonza,Verviers,Belgium)中。细胞培养在37℃下和5%CO₂气氛中。

[0411] 单克隆抗体、scFv抗体和试剂:C-myc癌蛋白特异性小鼠mAb9E10(Evan,et al.,Mol Cell Biol,1985Dec;5(12):3610-6)和HLA-I类抗原特异性小鼠mAb TP25.99(D'Urso et al.,J Clin Invest.1991January;87(1):284-292)在之前已有记载。抗-抗-id scFv#119(Wang et al.,1997.The anti-idiotypic approach to active specific immunotherapy of malignant melanoma.In *Idiotypes in Medicine:Autoimmunity, Infection and Cancer*.Y.Shoenfeld,R.Kennedy,and S.Ferrone,eds.Elsevier,Amsterdam,p.523)是通过用抗-id mAb MK2-23淘选而从所述合成的scFv文库(#1)(Nissim et al.,1994.Embo J 13:692-698)中分离的。小鼠mAb是通过序贯的硫酸铵沉淀和正辛酸沉淀从腹水中纯化的(Temponi et al.,1989,Hybridoma 8:85-95)。分别通过SDS-PAGE和通过用对应抗原在结合测定中测试,评估了mAb制品的纯度和活性。HRP-抗小鼠IgG Fc抗体购自Jackson ImmunoResearch(Laboratories,Inc.,West Grove,PA,USA)。R-藻红蛋白(RPE)标记的山羊抗小鼠Ig抗体的F(ab')₂片段购自BD Pharmingen(San Diego,CA,USA)。内质蛋白(Grp94)重组犬蛋白购自Stressgen Biotechnology Corporation(Victoria,British Columbia,Canada)。

[0412] 噬菌体展示文库:所述人单链Fv(scFv)抗体的半合成噬菌体文库是按照Nissim et al.1994,Embo J 13:692-698的记载构建的。

[0413] 噬菌体展示scFv抗体的选择:结合黑素瘤细胞的噬菌体展示scFv抗体分离自所述噬菌体展示scFv抗体文库,如前所述(Noronha et al.1998,J Immunol 161:2968-2976)。简言之,将噬菌体颗粒(1×10^3)加入到含有 1×10^7 WM1158黑素瘤细胞的聚丙烯培养管。在室温(R/T)下孵育90min后,通过用PBS洗涤所述细胞6次移除未结合的噬菌体。通过加入200μl的0.1M甘氨酸-HCl(pH=2.2)洗脱结合的噬菌体。四轮淘选后,通过人B淋巴样细胞——

LG2,吸收所分离的克隆以移除结合到人黑素瘤细胞和淋巴样细胞所共有的抗原(Ag)的噬菌体。

[0414] 结合测定:通过ELISA测试可溶性scFv W9抗体与肿瘤细胞系和内质蛋白(Grp94)重组犬蛋白的反应性,方法如Noronha et al.,1998,J Immunol 161:2968-2976中所述。结果表示为450nm处光密度的吸光度(O.D.)。

[0415] 免疫沉淀实验:将WM1158细胞(3×10^7)洗涤、沉淀、并在1.5ml含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液(50mmol/L Tris、4mmol/L EDTA、150mmol/L NaCl、含有1mmol/L苯甲基磺酰氟的0.5%NP40)中裂解。在冰上孵育30min后,在4℃下以 $13,000 \times g$ 离心所述细胞裂解物30min。收集上清,通过用PG-琼脂糖凝胶(Amersham Pharmacia Biotech AB,Uppsala, Sweden)孵育以预清除,并转移到含有15μl填充的G蛋白琼脂糖凝胶的管中,所述管预先配备有15μg的mAb 9E10和scFv W9和scFv 119(阴性对照)的胞质制品。在4℃下孵育2h后,用PBS洗涤小珠4次,用高盐缓冲液(350mmol/L NaCl、1mmol/L EDTA、10mmol/L Tris、0.1%牛血清白蛋白、1%NP40)洗涤2次,用裂解缓冲液洗涤2次。沉淀的蛋白质被洗脱到SDS上样缓冲液中,在还原性的12%Tris-HCl SDS聚丙烯酰胺凝胶上分辨,用考马斯蓝染色。

[0416] 衣霉素处理:在存在0.5μg/ml衣霉素(MP Biomedicals,Solon,OH,USA)的情况下,在37℃下和5%CO₂气氛中培养COL038细胞72小时。孵育在只加入DMSO的培养基中的细胞被用作对照。

[0417] 转染:使用Amaxa核转染(Amaxa nucleofection)技术并按照制造商的说明(Amaxa,Cologne,Germany)以3μg Grp 94HSP90B1cDNA克隆(Origene)转染293细胞。使用了nucleofector program Q-001。转染后,立即将细胞悬浮在500μl预暖的补充有10%FBS的DMEM培养基中,并在潮湿的恒温箱中于37℃下和5%CO₂中铺在6孔板中24小时。通过GFP的流式细胞分析测定转染效率。pCMV6-XL4载体用作对照。使用Lipofectamine 2000(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)根据制造商的说明进行转染。根据制造商的说明,用内质蛋白(Grp94)siRNA和对照siRNA(荧光素缀合物)-A(Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,CA,USA)转染细胞。

[0418] 还使用了如下的材料和方法(参见实施例5和9):

[0419] 细胞系、细胞裂解物和组织:人黑素瘤细胞系M21、MV3和SK-MEL-5,人胰脏腺癌细胞系MiaPaCa-2和PANC1,人神经胶质瘤细胞系U1338MG,人乳癌细胞系SUM149和MDA-MB-231,人间皮瘤细胞系Phi,人结肠癌细胞系RK0,人卵巢癌OVCAR3,人肉瘤细胞系HT1080,人多发性骨髓瘤细胞系MM.8,人B淋巴样细胞系RAJI,以及小鼠骨髓瘤细胞系NS0,被维持在补充有2mM L-谷氨酰胺(Cellgro)和10%胎牛血清(FBS)(PAA Laboratories Inc)的RPMI 1640培养基中。在37℃下和5%CO₂气氛中培养细胞。如Desai et al.Cancer Res 1998;58(11):2417-25中所述制备细胞裂解物。

[0420] 动物:C.B-17SCID小鼠(8-10周龄)从Taconic Farms,Inc获得。

[0421] 单克隆和多克隆抗体、scFv抗体和试剂:HLA-I类抗原特异性小鼠mAb TP25.99(Desai et al.,J Immunol 2000;165(6):3275-83)、钙联接蛋白特异性mAb TO-5(用作上样对照)是根据Ogino et al.,Tissue Antigens 62:385-393,2003中所述方法开发并表征的。纯化的人免疫球蛋白购自Sigma-Aldrich。FAK和磷酸化FAK(Tyr397)、ERK1/2和磷酸化44/42ERK1/2、AKT和磷酸化473AKT、MET磷酸化MET、PKC、β-连环蛋白、Ras、B-Raf、C-Raf、裂

解的胰天蛋白酶-3,裂解的胰天蛋白酶-7SHh、GLI1和 β -肌动蛋白特异性的抗体购自BD Bioscience和Cell signaling technology。大鼠抗内质蛋白(Grp94)抗体购自StressGen。小鼠mAb是通过序贯的硫酸铵沉淀和正辛酸沉淀从腹水中纯化的(Temponi et al., Hybridoma 1989;8(1):85-95)。分别通过SDS-PAGE和通过用对应抗原在结合测定中测试,评估了mAb制品的纯度和活性。

[0422] HRP抗小鼠、抗兔和抗大鼠抗体以及山羊抗人IgG Fc γ 抗体的RPE标记F(ab')₂片段购自Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc。山羊抗小鼠Ig抗体的RPE标记F(ab')₂片段购自BD Pharmingen。

[0423] 完全人源性mAb W9的构建:通过PCR扩增编码scFv W9轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区的基因,利用DNA Ligation Kit、MIGHTY MIX®(TAKARA Bio USA)并根据制造商的说明将其分别克隆到pFUSE2-CLIg-hk和pFUSE-CHlg-hG1(InvivoGen)。

[0424] 完全人源性mAb W9表达和纯化:使用电穿孔仪(Gene Pulser® II Electroporation System Bio-Rad)并根据制造商的说明将表达质粒pFUSE2-CLIg-hk和pFUSE-CHlg-hG1共转染到小鼠骨髓瘤细胞系NS0。所转染的细胞在补充有10%FCS、Zeocin(50 μ g/mL)和杀稻瘟素S(Blasticidin S)(10 μ g/mL)的RPMI 1640培养基中选择。然后通过限制稀释度将抗Zeocin和杀稻瘟素S的细胞进行单细胞亚克隆。通过ELISA从亚克隆细胞的耗尽培养上清液(spent supernatant)中筛选人Fc和(Fab')₂的表达以及对应抗原的反应性。使用HITrap®protein G HP柱(GE healthcare)并根据制造商的说明,从耗尽培养上清液或小鼠腹水中纯化完全人源性mAb W9。分别通过SDS-PAGE和抗原结合测定确定所纯化的mAb W9的纯度和活性。

[0425] 内质蛋白(Grp94)去糖基化:在存在或不存在2 μ l PNGase F、2 μ l O-糖苷酶和2 μ l α -2(3,6,8,9)-神经氨酸酶(Enzymatic Protein Deglycosylation Kit,Sigma)的情况下,将Grp94⁺MIAPaCa-2细胞(5×10^5)在50 μ l RPMI 1640培养基中在37℃下孵育24小时。然后将所述处理的细胞用mAb W9染色并通过流式细胞仪(Cyan,Beckman Coulter)分析。

[0426] 流式细胞仪分析:将细胞(2×10^5)与2 μ g/ml的mAb W9(稀释在总体积100 μ l的2%BSA-PBS中)在4℃下孵育30min。然后将细胞用0.5%的BSA-PBS洗涤2次,并与最佳量的山羊抗人IgG Fc γ 抗体的RPE标记F(ab')₂片段(Jackson ImmunoResearch, Inc)在4℃下孵育30min。洗涤3次后,在2%甲醛中固定细胞并用CYAN™ADP LX 9Color流式细胞仪(Dako)分析。mAb TP25.99和人免疫球蛋白用作对照。为进行癌起始细胞结合测定,使用ALDEFLUOR®(Stem Cell Technologies)并根据制造商的说明预先将细胞染色。

[0427] 免疫组织化学:将手术移除的人胰脏腺癌癌灶和正常胰组织的冷冻切片在室温下用4%甲醛/PBS固定20分钟。根据Wang et al.,Curr.Mol.Med 2010中所述,用scFv-FcC21对TMA载玻片进行IHC染色。使用OLYMPUS®BX51显微镜(OLYMPUS UK Ltd)以放大倍数 $\times 200$ 对染色的组织微阵列载玻片进行拍照用于分析。

[0428] 细胞增殖和MTT测定:以 1×10^4 每孔的密度将细胞接种在96孔板上,并将其在补充有1%FCS的培养基中与mAb W9(5 μ g/ml)孵育3天。通过每孔中加入10 μ l四唑盐组分噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide)(Sigma-Aldrich, Inc.St Louis, MO)并将所得混合物在37℃下孵育约3-4小时,测量了不同时间点的存活细胞数。有代谢活性、

存活的细胞将MTT转变为有颜色的甲臞(formazan)产物,其用分光光度法酶标仪(MTX Lab System, Inc, Vienna, VA)在540nm处测量。所得结果表示为活细胞的抑制百分比,使用仅用PBS孵育的活细胞的数量作为100%参考。

[0429] 细胞凋亡:在用mAb W9 (50 μ g/mL) 孵育6小时后,对凋亡和坏死的MV3和MIAPaca-2细胞的流式细胞分析是使用膜联蛋白V-FTIC和碘化丙啶(PI) 染色试剂盒(BD Pharmingen)并按照制造商的说明来完成的。

[0430] 蛋白质印迹:通过8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离细胞裂解物中的蛋白质并将其转移到0.45 μ m(孔隙大小)PVDF膜(Millipore)上。在4 $^{\circ}$ C下以5%脱脂奶粉加2%BSA封闭过夜后,序贯地将膜用适当浓度的第一抗体在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,然后用HRP标记的各自第二抗体在室温下孵育45min。用增强的化学发光系统(GE Life Science)使条带显影,用FOT0/**Analyst**[®] Investigator Eclipse system(Fotodyne Incorporate)读出条带密度。所述钙联接蛋白特异性mAb T0-5和 β -肌动蛋白特异性mAb被用作上样对照。

[0431] 免疫沉淀:将MV3细胞(3×10^7)洗涤、沉淀、并在1.5ml含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液(50mmol/L Tris、4mmol/L EDTA、150mmol/L NaCl、含有1mmol/L苯甲基磺酰氟的0.5% NP40)中裂解。在冰上孵育30min后,在4 $^{\circ}$ C下以13,000 $\times$ g离心所述细胞裂解物30min。收集上清,用PG-琼脂糖凝胶(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)孵育以预清除,并转移到含有10 μ l填充的G蛋白琼脂糖凝胶的管中,所述管预先配备有10 μ g的mAb mAb W9。在4 $^{\circ}$ C下孵育2h后,用PBS洗涤小珠4次,用高盐缓冲液(350mmol/L NaCl、1mmol/L EDTA、10mmol/L Tris、0.1%牛血清白蛋白、1%NP40)洗涤2次,用裂解缓冲液洗涤2次。沉淀的蛋白质被洗脱到SDS上样缓冲液中,在还原性的12%Tris-HCl SDS聚丙烯酰胺凝胶上分辨,然后转移到0.45- μ m(孔隙大小)PVDF膜(Millipore)上。所述印迹按前述进行。

[0432] ADCC:将MV3细胞用50 μ Ci的⁵¹Cr(Perkin Elmer)标记并以 0.4×10^6 个细胞/ml的密度重悬。将⁵¹Cr标记的细胞与mAb W9 (50 μ g/ml、10 μ g/ml, 50 μ l/孔)在96孔组织培养-U型底-测定板(BD.Falcon)中混合。人免疫球蛋白用作对照。在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟后,加入PBMC(40:1效应子:靶(E:T))并在37 $^{\circ}$ C下在CO₂恒温箱中孵育4小时。通过使用Packard TOPCOUNT[™]微板闪烁计数器(Conroe)计数无细胞上清来测定⁵¹Cr的释放。所述实验以三个重复进行两次。

[0433] CDC:将靶细胞MV3用50 μ Ci的⁵¹Cr标记并以 1×10^6 个细胞/ml的密度重悬。在存在人血清补体(Quidel)(用RPMI 1640、10mM HEPES、0.1%BSA稀释4倍)的情况下,将MV3细胞与mAb W9 (50 μ g/ml、10 μ g/ml, 50 μ l/孔)一起孵育。人免疫球蛋白用作对照。在CO₂恒温箱中于37 $^{\circ}$ C下孵育2小时后,通过使用Packard TOPCOUNT[™]微板闪烁计数器计数无细胞上清来测定⁵¹Cr的释放。所述实验以三个重复进行两次。

[0434] 对携带有已建立的人黑素瘤细胞来源肺转移的小鼠的治疗:给8周龄雌性SCID小鼠静脉(i.v.)注射人黑素瘤MV3细胞(每只小鼠注射 1.4×10^8 个细胞)。在静脉注射细胞15天后,小鼠被随机分为2组,每组13只。一组小鼠每48小时用mAb W9静脉注射(每只小鼠注射100 μ g),总共3次注射。利用同样的方案用人免疫球蛋白静脉注射另一组小鼠。在第25天处死小鼠,收集肺并进行FFPE。在显微镜下检查H&E染色的肺组织切片以检查转移。

[0435] 统计分析:使用Student's t-检验分析了从所述测试组获得的结果之间差异的统

计显著性。使用**MedCalc®** 软件 (Mariakerke,Belgium) 分析存活率统计。

[0436] 实施例2

[0437] 结合黑素瘤细胞的scFv片段的分离

[0438] 用WM1158细胞对合成的噬菌体scFv文库(#1)进行四轮淘选。用培养的人LG-2B淋巴样细胞吸收分离的噬菌体以移除这样的噬菌体,所述噬菌体结合到人细胞共有的抗原。从80个克隆中产生可溶性scFv并在细胞ELISA中测试其与黑素瘤细胞的反应性。在所测试的克隆中,命名为W9的scFv,强烈地与WM1158细胞系反应。所述反应性是特异性的,因为没有检测到与LG-2细胞的反应性。识别无关抗原的scFv#119用作阴性对照(图1)。

[0439] 实施例3

[0440] scFv W9的反应性

[0441] 当用一组人细胞系通过ELISA进行测试时,所述可溶性scFv W9与黑素瘤细胞系(MV3、COL038、SK-MEL-28、M14、FO-1)、基底型乳癌细胞系(SUM149、MDA-MB-435s)、头颈癌细胞系(PCI-13)、胰腺癌细胞系(PANC 2.03、PANC 3.27、PANC 10.05)、膀胱癌细胞系(T24)、肺癌细胞系(A549)、表皮样癌细胞系(A431)、宫颈癌细胞系(HeLa)、肾癌细胞系(SLR21)、卵巢癌细胞系(OVCAR3)和神经胶质瘤细胞系(U-138,A-172)。所述scFv片段不与管腔型乳癌细胞系(MCF-7、T47D)、结肠癌细胞系40-16、前列腺癌细胞系Du145和B淋巴样细胞系LG-2反应(图2)。

[0442] 如下呈现了对scFv W9与正常组织的免疫反应性的免疫组织化学分析结果。结果对所测试的至少2名患者的活检相关(+阳性)。

[0443]

组织*	W9
皮肤	仅汗腺:+
肾	阴性
肺	阴性
肝	阴性
结肠-直肠	阴性
胰	阴性
胃	阴性
甲状腺	阴性
脑皮质	阴性
睾丸	阴性
腮腺	仅腺泡上皮细胞:+
乳房	阴性
前列腺	阴性
脾	阴性

[0444] scFv W9的免疫组织化学染色显示内质蛋白(Grp94)仅由汗腺和腺泡上皮细胞表达,而多种正常组织不表达。

[0445] mAb W9的免疫组织化学染色显示内质蛋白(Grp94)表位在正常组织中有严格的分布,并且在胰脏腺癌癌灶中有表达(图11)。所述免疫组织化学分析已经显示,被mAb W9识别

的表位在正常组织中有严格分布。而且,mAb W9仅能染色手术移除的人胰脏腺癌癌灶,而不能染色来自同一患者的正常胰脏组织。此外,MDA-MB-231和MV3细胞系来源的异种移植物,分别被mAb W9强烈地染色,然而在MCF-7中没有检测到染色(图12)。

[0446] 实施例4

[0447] scFv W9特异性的免疫化学分析和Grp94的串联质谱鉴别

[0448] scFv W9与获自WM1158a的总细胞裂解物的免疫沉淀鉴别了在大约100KDa的单一一条带(图3)。scFv#119用作阴性对照。利用来自MV3(黑素瘤)、SUM149(基底型乳癌)、T24(膀胱癌)和SLR21(肾癌)细胞系的裂解物获得了相同的结果。将通过scFv W9从不同细胞裂解物中免疫沉淀的100KDa特异性条带切出,并用胰蛋白酶进行凝胶内消化。通过液相色谱-串联质谱分析所产生的胰蛋白酶肽,鉴定了2个胰蛋白酶肽(ELISNASDALDK (SEQ ID NO:7) 和GVVDSDDLPLNVS (SEQ ID NO:8)),其唯一地源自内质蛋白(Grp94)(图4)。

[0449] 被mAb W9识别的表位严格地依赖于唾液酸残基,因为与神经氨酸酶孵育后其与肿瘤细胞的反应性消失,但是没有被其他糖苷酶影响(图9)。在这些实验中,在存在或不存在2 μ l的 α -2(3,6,8,9)-神经氨酸酶的情况下,在5%CO₂恒温箱中,将人胰脏腺癌MIAPaCa-2(5×10^5)在50 μ l RPMI 1640培养基中在37°C下孵育24小时。然后将所处理的细胞用mAb W9染色并通过流式细胞仪分析。用mAb TP25.99处理的细胞用作对照。

[0450] 将人胰脏腺癌MIAPaCa-2细胞与ALDEFLUOR®孵育以检测ALDH活性(测试组),并用mAb W9染色。用ALDEFLUOR®+DAEB抑制剂孵育并用mAb W9染色的细胞用作参考(对照)。人Ig(Hlg)用作对照。标明了癌起始细胞——被鉴别为ALDH^{bright}的细胞——的百分数。流式分析显示癌起始细胞表达被mAb W9识别的表位,因为相同的抗体结合到所述被鉴别的ALDH^{bright}细胞群(图10)。

[0451] 实施例5

[0452] 衣霉素对scFv W9识别的决定簇表达的影响和对所述表位的进一步表征

[0453] 糖基化在内质蛋白(Grp94)上被scFv W9识别的表位的表达中起作用,因为该scFv片段与用衣霉素(糖蛋白N-糖基化的抑制剂)处理的COL038细胞不反应(图4)。单独用DMSO时没有观察到抑制。此外,在相同条件下没有观察到对于TP25.99mAb(对照)的抑制。这些数据表明碳水化合物对于scFv W9识别内质蛋白(Grp94)是必需的。

[0454] 被mAb W9识别的表位严格地依赖于唾液酸残基,因为用神经氨酸酶孵育后其与肿瘤细胞的反应性消失,但是不受其他糖苷酶影响(图9)。

[0455] 实施例6

[0456] scFv W9与内质蛋白(Grp94)犬重组蛋白的反应性

[0457] scFv W9以剂量依赖的方式特异性地与所述内质蛋白(Grp94)犬重组蛋白(RC-Grp94)反应(图5A),因为没有检测到与BSA的结合(阴性对照,图5B)。此外,RC-Grp94以剂量依赖的方式特异性地影响scFv W9与COL038细胞的结合。所述抑制是剂量依赖的和特异性的,因为 β 2-微球蛋白(阴性对照)没有显示抑制效果(图6)。

[0458] 实施例7

[0459] 电穿孔对scFv W9的结合的影响

[0460] 用内质蛋白(Grp94)全长cDNA或单独的载体(pCMV-XL4,阴性对照)瞬时转染电穿孔的293细胞。通过GFP表达评估所述转染效率(94%)。将转染24小时后收获的细胞与scFv

W9和mAb 9E10孵育,然后与FITC-山羊抗小鼠IgG抗体孵育。通过流式细胞仪分析细胞。未转染的细胞用作对照。在以内质蛋白(Grp94)(图7A)和单独的质粒(图7B)处理的细胞中观察到scFv W9结合的强烈增加。这些数据表明电穿孔增加了scFv的结合,并且热冲击可调节被scFv W9识别的抗原的表达。

[0461] 实施例8

[0462] 靶向内质蛋白(Grp94)的shRNA对scFv W9的结合的影响

[0463] 用shRNA转导F0-1细胞以达到对内质蛋白(Grp94)的敲低,或用ABCB5shRNA转导作为对照。转导后72小时收获细胞,用scFv W9和mAb 9E10孵育,然后用FITC-山羊抗小鼠IgG抗体孵育。通过流式细胞仪分析细胞。与对照shRNA(图8B)相比,Grp94shRNA(图8A)显著地抑制scFv W9的结合。

[0464] 实施例9

[0465] mAb W9对癌细胞的影响

[0466] 评估了mAb W9对癌细胞的影响。具体地,MTT分析已经证实mAb W9显著地抑制所测试的所有内质蛋白阳性(Grp94+)肿瘤细胞系的生长。但是,在Grp94⁻Raji细胞系中没有观察到影响。抗增殖效果是特异性的,因为用人免疫球蛋白作为对照时没有观察到生长抑制(图13)。因此,mAb W9抑制癌细胞增殖。

[0467] 流式分析已经证实mAb W9在人黑素瘤MV3和胰腺癌MIAPaCa-2细胞中诱导细胞凋亡(分别有48.90%和53.56%的细胞凋亡)。此外,蛋白质印迹分析显示在以mAb W9处理的细胞中裂解的胱天蛋白酶-3和裂解的PARP的表达显著增加(图14、15和16)。因此,mAb W9在癌细胞中诱导细胞凋亡。但是,mAb W9不介导细胞或补体依赖的靶细胞的裂解(图17和18)。

[0468] 另外,mAb W9抑制人胰脏腺癌MIAPaCa-2癌起始细胞的增殖。流式分析已经证实,当与人免疫球蛋白(阴性对照)相比时,在用mAb W9处理的细胞中,被定义为ALDH^{bright}细胞的癌起始细胞的百分比下降50%(图19)。mAb W9处理的细胞中Ras、C-Raf、PCK α 、 β -连环蛋白和Bcl-2的水平下降。而且,mAb W9处理抑制了Akt、Erk、Mek、Fak和Met的激活(图20-22)。在一个使用mAb W9的pull-down(下拉)测定中,内质蛋白(Grp94)与Met、Ras和C-Raf免疫共沉淀(图23)。

[0469] 使用**OLYMPUS®**BX51显微镜(**OLYMPUS®**UK Ltd.)分析了H&E染色的组织切片中存在于每个切片中5个随机选择的200 $\times$ 视野/部分内的转移结节的累积面积。使用SPOT IMAGING **SOFTWARE®**Advanced(Diagnostic Instruments,Inc.)测量和计算每组的平均肿瘤面积,这些MV3肿瘤的值以柱状图 $\pm$ SD形式提供。与使用同种型对照抗体处理的小鼠相比,mAb W9处理的小鼠的转移面积有统计学上的显著(约50%)减少(图24)。

[0470] 内质蛋白(Grp94)表达被化学治疗剂增强。流式分析已经证实用5-氟尿嘧啶(FU)、顺铂和紫杉醇处理增加了内质蛋白(Grp94)的表面表达。所述效果是特异性的(图25)。MTT结果证实mAb W9与5-FU和环巴胺分别组合,比单独每种试剂更有效地抑制胰脏腺癌细胞生长(图26)。流式分析还证实mAb W9对癌起始细胞生长的抑制被环巴胺和5-FU增强。在与mAb W9、环巴胺和5-FU孵育后检测到ALDH^{bright}细胞的大约90%生长抑制。相比之下,在单独地用mAb W9或环巴胺孵育的培养物中所述抑制仅为50%,在用5-FU孵育的培养物中为20%,在用mAb W9与环巴胺或5-FU的组合孵育的培养物中为70%(图27)。流式分析还证实mAb对细胞凋亡的诱导被环巴胺和5-FU增强。mAb W9与环巴胺和5-FU的组合诱导了70%的细胞的凋

亡。但是,在用5-FU、环巴胺或5-FU和环巴胺组合处理的细胞中诱导了少于35%的细胞凋亡(图28)。

[0471] 流式分析还证实mAb W9对癌起始细胞生长的抑制被辐射和环巴胺增强。在用mAb W9、辐射和环巴胺的组合处理后检测到ALDH^{bright}细胞的大约90%生长抑制。相比之下,在单独地用mAb W9或环巴胺处理的培养物中所述抑制仅为大约50%,在仅用辐射处理的培养物中为少于30%(图29)。流式分析证实mAb对细胞凋亡的诱导被辐射和环巴胺增强。用mAb W9与辐射和环巴胺的组合在73.87%的细胞中诱导了细胞凋亡,但是单独用mAb W9则少于25%(图30)。

[0472] 还检查了mAb W9处理对Ras和C-Raf蛋白质水平的影响。Ras和C-Raf水平被环巴胺和5-FU增强。在对Mek、Erk和Akt激活的抑制中发现了协同效果(图31)。mAb W9处理在抑制Ras和GLI1蛋白质水平以及Erk和Akt激活方面的效果被辐射和环巴胺增强(图31)。

[0473] 实施例10

[0474] 用于治疗癌症的内质蛋白-特异性单克隆抗体

[0475] 本实施例描述了内质蛋白特异性人单克隆抗体用于治疗显示内质蛋白过表达的癌症(本文称为“内质蛋白阳性”的癌症)的用途,所述癌症包括但不限于黑素瘤、乳癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、卵巢癌或胰腺癌。被诊断患有内质蛋白阳性癌症的患者可以根据本领域的标准程序治疗。通常的治疗选择包括手术、放射治疗、化疗、免疫疗法或干扰素治疗。

[0476] 在本实施例中,被诊断患有内质蛋白阳性黑素瘤的患者被给予包含连接到假单胞菌外毒素(PE)的内质蛋白特异性的人单克隆抗体的免疫缀合物。PE免疫缀合物的制备已有记载(参见例如美国专利No.7,081,518和美国授权前公开No.2005/0214304,其以引用的方式纳入本文)。在某些患者中,总计3-6个剂量的所述免疫缀合物被每隔一天通过静脉输注给予。在其他患者中,所述免疫缀合物在十天的过程中通过连续静脉输注给予。给予患者的免疫缀合物的剂量依据所述患者的体重和性别以及给药的方式和时程而变化。在治疗后,评价患者的癌症进展(包括肿瘤生长和转移)和疾病的其他临床征象。可单独地用所述免疫缀合物治疗患者,或用所述免疫缀合物与一种或多种标准癌症治疗的组合治疗患者。例如,经历手术移除所述黑素瘤的患者随后可以用所述免疫缀合物治疗。

[0477] 应该明白,在不背离本发明精神主旨的情况下,所述方法或组合物的精确细节可以变化或修改。我们本发明人要求保护落在如下权利要求范围和精神主旨内的所有这种修改和变化的权利。

序列表

<110> 高等教育联邦系统-匹兹堡大学
 Ferrone, Soldano
 Wang, Xinhui
 Conrads, Thomas P.
 Favoino, Elvira
 Hood, Brian L

<120> 内质蛋白的抗体及其用途

<130> 8123-85229-02

<150> 61/355,516

<151> 2010-06-16

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 443

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

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

[0001]

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

[0002]

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 2
<211> 213
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

[0003]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

	195	200	205
	Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 3		
	<211> 1332		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 3		
	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt		60
	tcttgcagg cttctggata caccttcaact agctatgcta tgcatgggt gcgccaggcc		120
	ccgggacaaa ggcttgagtg gatgggatgg atcaacgctg gcaatggtaa cacaaaatat		180
	tcacagaagt tccagggcag agtcaccatt accagggaca catccgcgag cacagectac		240
	atggagctga gcagcctgag atctgaagac acggccgtgt attactgtgc aagggcccat		300
	tttgactact ggggccaaagg taccctggtc accgtctcgg ctagcaccaa gggcccatcg		360
	gttttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc		420
	ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc		480
	agcgggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc		540
[0004]	gtgggtgaccg tgccttccag cagcttgggc acctcagcct acatctgcaa cgtgaatcac		600
	aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgta caaaactcac		660
	acatgcccac cgtgcccagc aectgaacte ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc		720
	ccaaaaceca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtgggtgtg		780
	gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg		840
	cataatgcc aagacaaagcc ggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc		900
	gtcttcaccg tcttgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctccc		960
	aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga		1020
	gaaccacagg tgtacacct gcccacatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc		1080
	ctgacctgcc tggteaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat		1140
	gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggtccttc		1200
	ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca		1260
	tgtccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct		1320
	ccgggtaaat ga		1332
	<210> 4		
	<211> 642		
	<212> DNA		
	<213> 智人		

<400> 4
 gaaattgagc tcacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtc gagcattagc agctacttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattcagtt tgc aaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccaac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggagatcaa aacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgc tgaataa ctctatccc 420
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgtg 540
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 600
 agctcgcccg tcacaaagag ctccaacagg ggagagtgtt ag 642

<210> 5
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

[0005]

Met Arg Ala Leu Trp Val Leu Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Thr Phe
 1 5 10 15
 Gly Ser Val Arg Ala Asp Asp Glu Val Asp Val Asp Gly Thr Val Glu
 20 25 30
 Glu Asp Leu Gly Lys Ser Arg Glu Gly Ser Arg Thr Asp Asp Glu Val
 35 40 45
 Val Gln Arg Glu Glu Glu Ala Ile Gln Leu Asp Gly Leu Asn Ala Ser
 50 55 60
 Gln Ile Arg Glu Leu Arg Glu Lys Ser Glu Lys Phe Ala Phe Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Val Asn Arg Met Met Lys Leu Ile Ile Asn Ser Leu Tyr Lys Asn
 85 90 95
 Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Leu
 100 105 110
 Asp Lys Ile Arg Leu Ile Ser Leu Thr Asp Glu Asn Ala Leu Ser Gly
 115 120 125
 Asn Glu Glu Leu Thr Val Lys Ile Lys Cys Asp Lys Glu Lys Asn Leu
 130 135 140

Leu His Val Thr Asp Thr Gly Val Gly Met Thr Arg Glu Glu Leu Val
145 150 155 160

Lys Asn Leu Gly Thr Ile Ala Lys Ser Gly Thr Ser Glu Phe Leu Asn
165 170 175

Lys Met Thr Glu Ala Gln Glu Asp Gly Gln Ser Thr Ser Glu Leu Ile
180 185 190

Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Phe Leu Val Ala Asp Lys
195 200 205

Val Ile Val Thr Ser Lys His Asn Asn Asp Thr Gln His Ile Trp Glu
210 215 220

Ser Asp Ser Asn Glu Phe Ser Val Ile Ala Asp Pro Arg Gly Asn Thr
225 230 235 240

Leu Gly Arg Gly Thr Thr Ile Thr Leu Val Leu Lys Glu Glu Ala Ser
245 250 255

Asp Tyr Leu Glu Leu Asp Thr Ile Lys Asn Leu Val Lys Lys Tyr Ser
260 265 270

[0006]

Gln Phe Ile Asn Phe Pro Ile Tyr Val Trp Ser Ser Lys Thr Glu Thr
275 280 285

Val Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Glu Ala Ala Lys Glu Glu Lys Glu
290 295 300

Glu Ser Asp Asp Glu Ala Ala Val Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys
305 310 315 320

Pro Lys Thr Lys Lys Val Glu Lys Thr Val Trp Asp Trp Glu Leu Met
325 330 335

Asn Asp Ile Lys Pro Ile Trp Gln Arg Pro Ser Lys Glu Val Glu Glu
340 345 350

Asp Glu Tyr Lys Ala Phe Tyr Lys Ser Phe Ser Lys Glu Ser Asp Asp
355 360 365

Pro Met Ala Tyr Ile His Phe Thr Ala Glu Gly Glu Val Thr Phe Lys
370 375 380

Ser Ile Leu Phe Val Pro Thr Ser Ala Pro Arg Gly Leu Phe Asp Glu
385 390 395 400

Tyr Gly Ser Lys Lys Ser Asp Tyr Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val
 405 410 415
 Phe Ile Thr Asp Asp Phe His Asp Met Met Pro Lys Tyr Leu Asn Phe
 420 425 430
 Val Lys Gly Val Val Asp Ser Asp Asp Leu Pro Leu Asn Val Ser Arg
 435 440 445
 Glu Thr Leu Gln Gln His Lys Leu Leu Lys Val Ile Arg Lys Lys Leu
 450 455 460
 Val Arg Lys Thr Leu Asp Met Ile Lys Lys Ile Ala Asp Asp Lys Tyr
 465 470 475 480
 Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe Gly Thr Asn Ile Lys Leu Gly Val
 485 490 495
 Ile Glu Asp His Ser Asn Arg Thr Arg Leu Ala Lys Leu Leu Arg Phe
 500 505 510
 Gln Ser Ser His His Pro Thr Asp Ile Thr Ser Leu Asp Gln Tyr Val
 515 520 525
 Glu Arg Met Lys Glu Lys Gln Asp Lys Ile Tyr Phe Met Ala Gly Ser
 530 535 540
 Ser Arg Lys Glu Ala Glu Ser Ser Pro Phe Val Glu Arg Leu Leu Lys
 545 550 555 560
 Lys Gly Tyr Glu Val Ile Tyr Leu Thr Glu Pro Val Asp Glu Tyr Cys
 565 570 575
 Ile Gln Ala Leu Pro Glu Phe Asp Gly Lys Arg Phe Gln Asn Val Ala
 580 585 590
 Lys Glu Gly Val Lys Phe Asp Glu Ser Glu Lys Thr Lys Glu Ser Arg
 595 600 605
 Glu Ala Val Glu Lys Glu Phe Glu Pro Leu Leu Asn Trp Met Lys Asp
 610 615 620
 Lys Ala Leu Lys Asp Lys Ile Glu Lys Ala Val Val Ser Gln Arg Leu
 625 630 635 640
 Thr Glu Ser Pro Cys Ala Leu Val Ala Ser Gln Tyr Gly Trp Ser Gly
 645 650 655

[0007]

Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Tyr Gln Thr Gly Lys Asp
660 665 670

Ile Ser Thr Asn Tyr Tyr Ala Ser Gln Lys Lys Thr Phe Glu Ile Asn
675 680 685

Pro Arg His Pro Leu Ile Arg Asp Met Leu Arg Arg Ile Lys Glu Asp
690 695 700

Glu Asp Asp Lys Thr Val Leu Asp Leu Ala Val Val Leu Phe Glu Thr
705 710 715 720

Ala Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Lys Ala Tyr Gly
725 730 735

Asp Arg Ile Glu Arg Met Leu Arg Leu Ser Leu Asn Ile Asp Pro Asp
740 745 750

Ala Lys Val Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Pro Glu Glu Thr Ala Glu
755 760 765

Asp Thr Thr Glu Asp Thr Glu Gln Asp Glu Asp Glu Glu Met Asp Val
770 775 780

[0008] Gly Thr Asp Glu Glu Glu Glu Thr Ala Lys Glu Ser Thr Ala Glu Lys
785 790 795 800

Asp Glu Leu

<210> 6

<211> 2780

<212> DNA

<213> 智人

<400> 6

gtgggaggac cgcgcggctg gaggtgtgag gatecgaacc caggggtggg ggggtggagc 60

ggctcctgcg atcgaagggg acttgagact caccggccgc acgccatgag ggccctgtgg 120

gtgctgggccc tctgctgcgt cctgcigacc ttggggtcgg tcagagctga cgatgaagtt 180

gatgtggatg gtacagtaga agaggatctg ggtaaaagta gagaaggatc aaggacggat 240

gatgaagtag tacagagaga ggaagaagct attcagttgg atggattaaa tgcattcaca 300

ataagagaac ttagagagaa gtcggaagag ttgccttcc aagccgaagt taacagaatg 360

atgaaactta tcatcaattc attgtataaa aataaagaga ttttcctgag agaactgatt 420

tcaaatgctt ctgatgcttt agataagata aggctaatat cactgactga tgaaaatgct 480

ctttctggaa atgaggaact aacagtcaca attaagtgtg ataaggagaa gaacctgctg 540

catgtcacag acaccggtgt aggaatgacc agagaagagt tggttaaaaa ctttgttacc 600

[0009]	atagccaaat ctgggacaag cgagttttta aacaaaatga ctgaagcaca ggaagatggc	660
	cagteaactt ctgaattgat tggccagttt ggtgtcgggt tctattccgc ctctcttgta	720
	gcagataagg ttattgtcac ttcaaaacac aacaacgata cccagcacat ctgggagttc	780
	gactccaatg aattttctgt aattgtgac ccaagaggaa acactctagg acggggaacg	840
	acaattaccc ttgtcttaaa agaagaagca tctgattacc ttgaattgga tacaattaaa	900
	aatctcgtca aaaaatatte acagttcata aactttccta tttatgtatg gagcagcaag	960
	actgaaactg ttgaggagcc catggaggaa gaagaagcag ccaaagaaga gaaagaagaa	1020
	tctgatgatg aagctgcagt agaggaagaa gaagaagaaa agaaaccaa gactaaaaaa	1080
	gttgaaaaaa ctgtctggga ctgggaactt atgaatgata tcaaaccaat atggcagaga	1140
	ccatcaaaag aagtagaaga agatgaatac aaagctttct acaaatcatt ttcaaaggaa	1200
	agtgatgacc ccatggetta tattcacttt actgctgaag ggaagttac ctccaatca	1260
	attttatttg taccacate tgctccacgt ggtctgtttg acgaatatgg atctaaaaag	1320
	agcgattaca ttaagcteta tgtgcgccgt gtattcata cagaagactt ccatgatatg	1380
	atgcctaaat acctcaattt tgtaagggt gtggaggact cagatgatct ccccttgaat	1440
	gtttcccgcg agactettca gcaacataaa ctgettaagg tgattaggaa gaagcttggt	1500
	cgtaaaacgc tggacatgat caagaagatt gctgatgata aatacaatga tactttttgg	1560
	aaagaatttg gtaccaacat caagcttggt gtgattgaag accactcgaa tcgaacacgt	1620
	cttgctaaac ttcttaggtt ccagtcttct catcatecaa ctgacattac tagcctagac	1680
	cagtatgttg aaagaatgaa ggaaaaacaa gacaaaatct acttcatggc tgggtccagc	1740
	agaaaagagg ctgaatcttc tccatttggt gagcgacttc tgaaaaaggg ctatgaagtt	1800
	atttacctca cagaacctgt ggatgaatac tgtattcagg cccctccga atttgatggg	1860
	aagaggttcc agaattgtgc caaggaagga gtgaagtgc atgaaagtga gaaaactaag	1920
	gagagtcgtg aagcagttga gaaagaattt gagcctctgc tgaattggat gaaagataaa	1980
	gcccttaagg acaagattga aaaggtgtg gtgtctcagc gcctgacaga atctccgtgt	2040
	gctttggigg ccagccagta cggatggtct ggcaacatgg agagaatcat gaaagcacia	2100
	gcgtacaaa cgggcaagga catctctaca aattactatg cgagtcagaa gaaaacattt	2160
	gaaattaate ccagacaccc gctgatcaga gacatgcttc gacgaattaa ggaagatgaa	2220
	gatgataaaa cagttttgga tcttgctgtg gttttgtttg aaacagcaac gcttcggtca	2280
	gggtatcttt taccagacac taaagcatat ggagatagaa tagaaagaat gcttcgcctc	2340
	agtttgaaca ttgacctga tgcaaagggt gaagaagagc ccgaagaaga acctgaagag	2400
	acagcagaag acacaacaga agacacagag caagacgaag atgaagaaat ggatgtggga	2460
	acagatgaag aagaagaaac agcaaaggaa tctacagctg aaaaagatga attgtaaatt	2520

atactctcac catttggatc ctgtgtggag aggggaatgtg aaatttacat catttctttt	2580
tgggagagac ttgttttggg tgccttctaa tcccttctc cctgcacig taaaatgigg	2640
gattatgggt cacaggaaaa agtgggtttt ttagttgaat ttttttaac attcctcatg	2700
aatgtaaatt tgtactatit aactgactat tcttgatgta aaatcttgc atgtgtataa	2760
aaataaaaaa gatcccaaat	2780

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

[0010]

<400> 7

Glu	Leu	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys
1				5					10		

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8

Gly	Val	Val	Asp	Ser	Asp	Asp	Leu	Pro	Leu	Asn	Val	Ser	Arg
1				5					10				

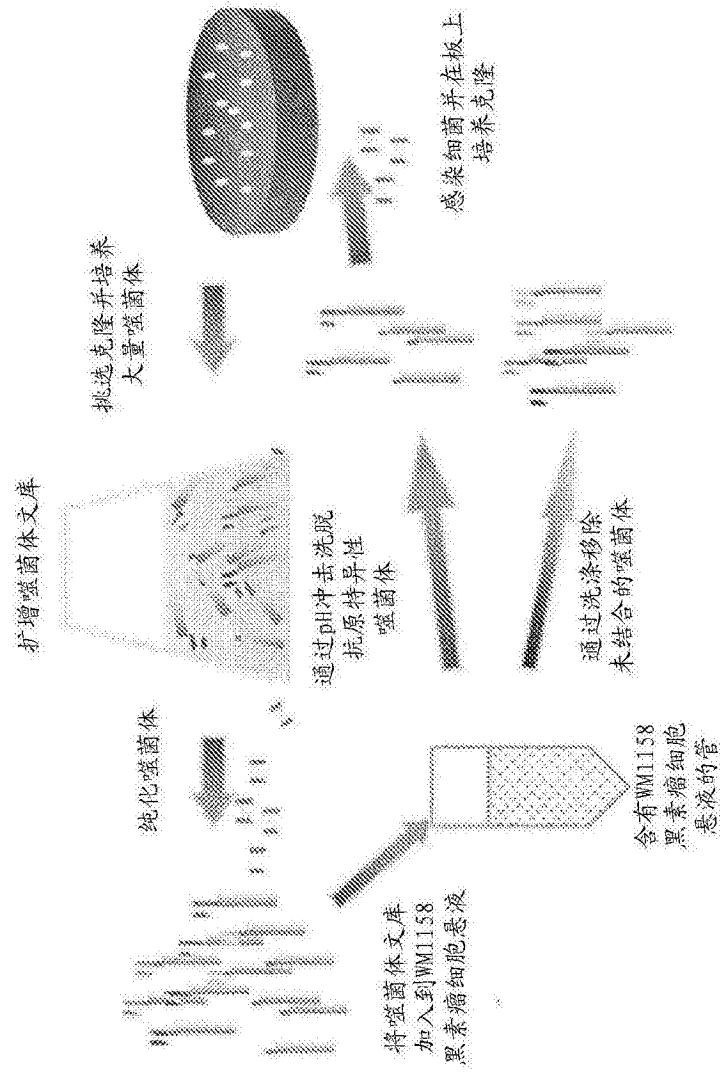


图1A

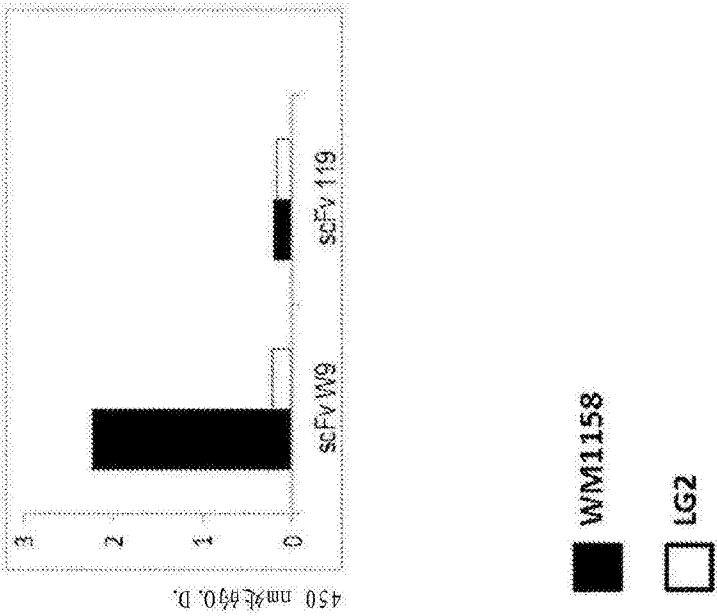


图1B

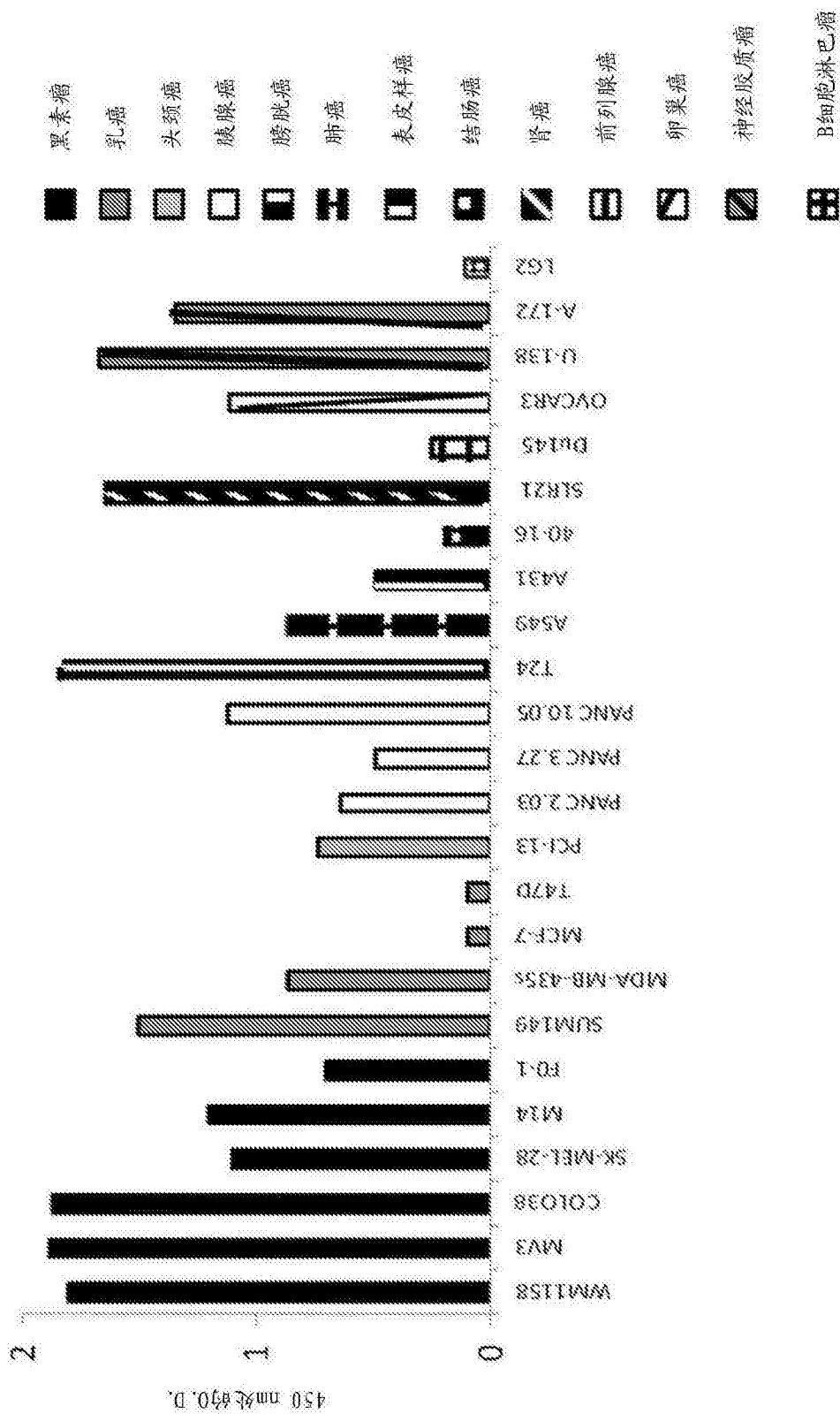


图2

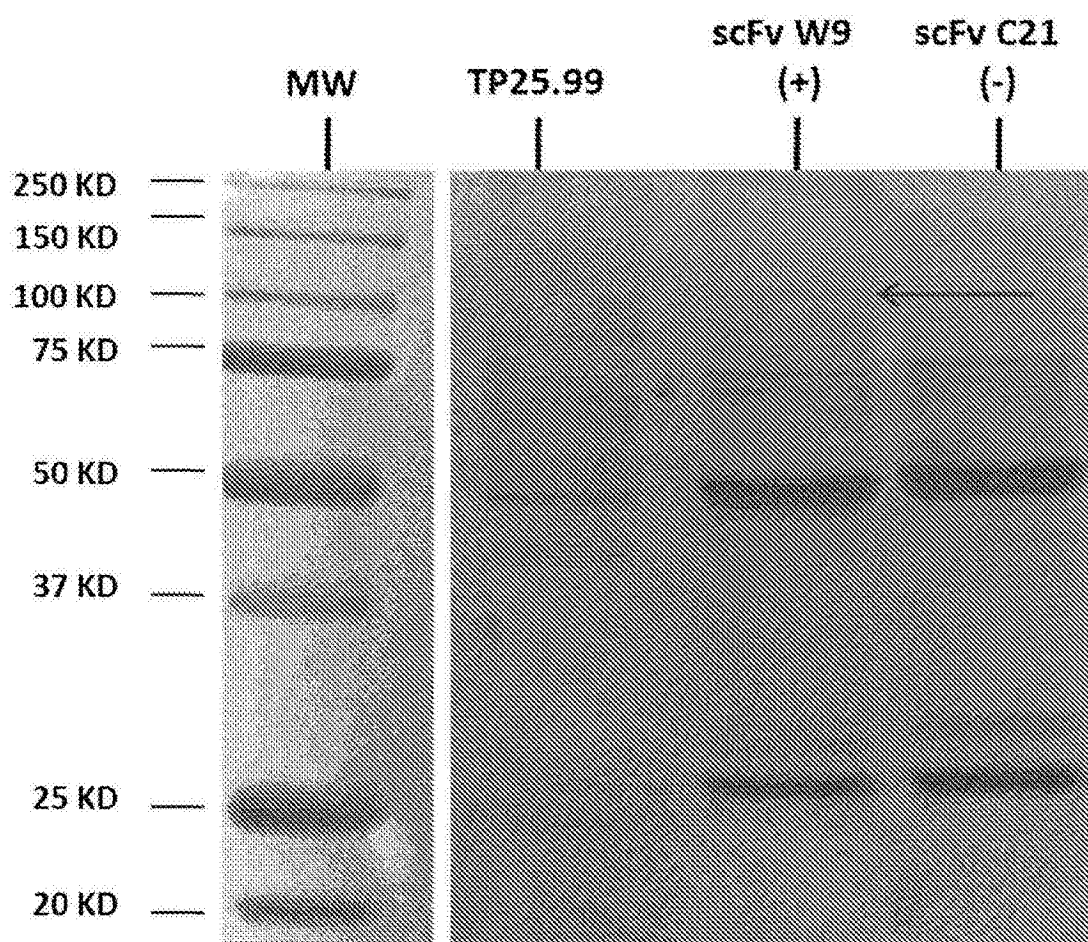


图3A

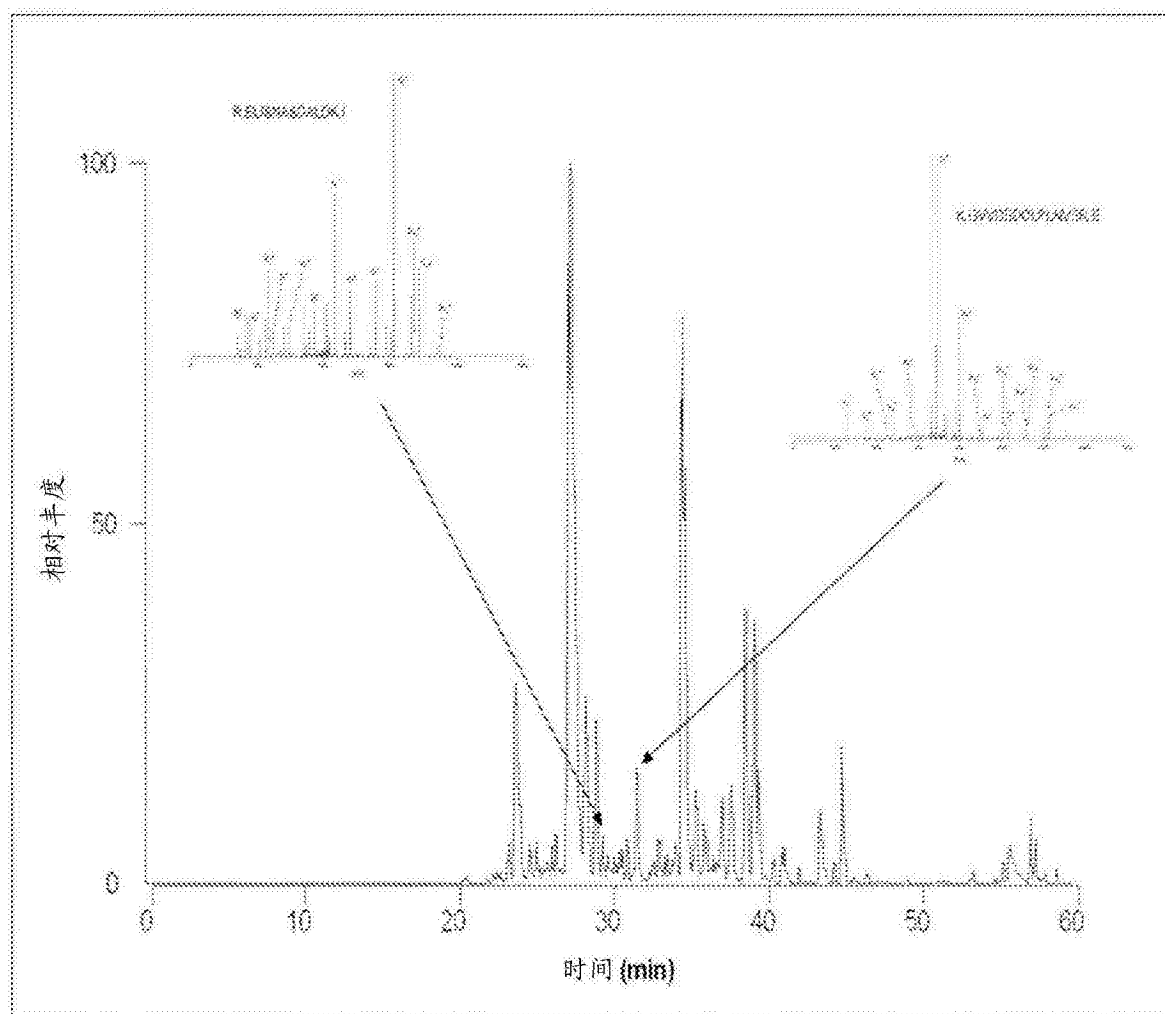


图3B

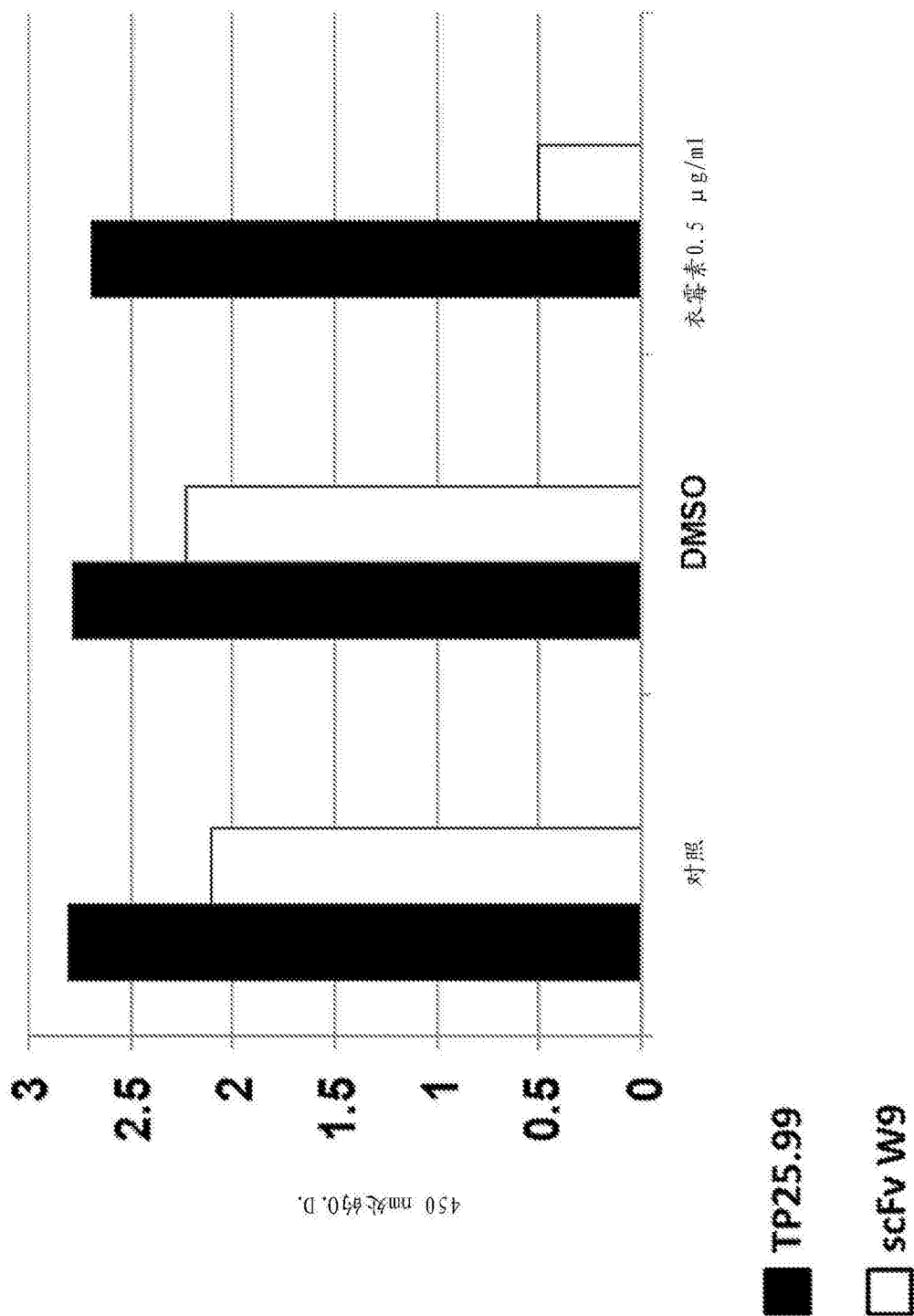


图4

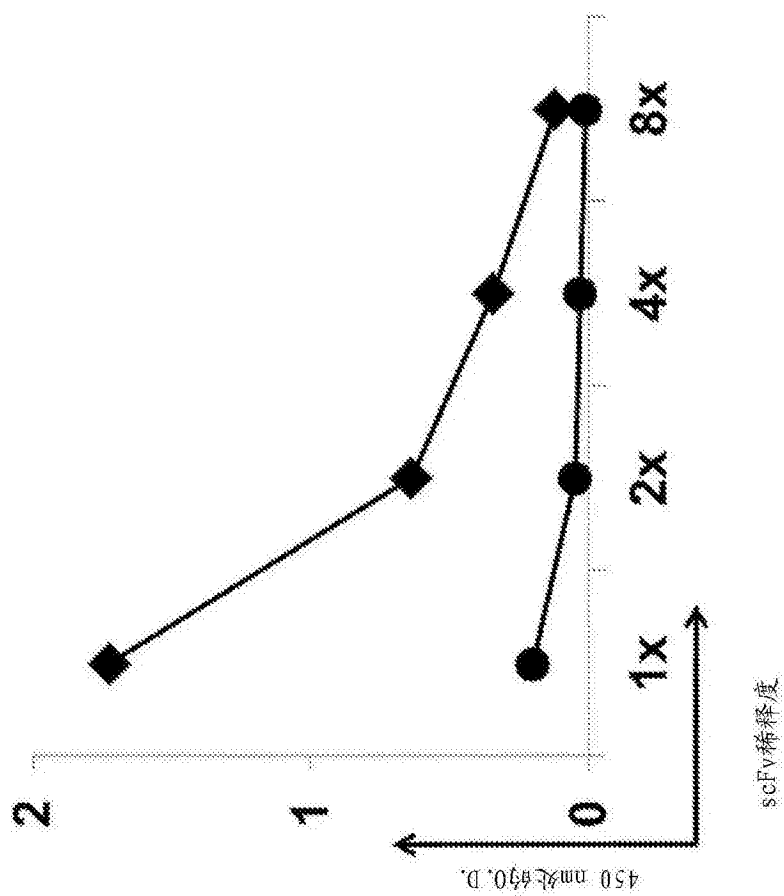


图5A

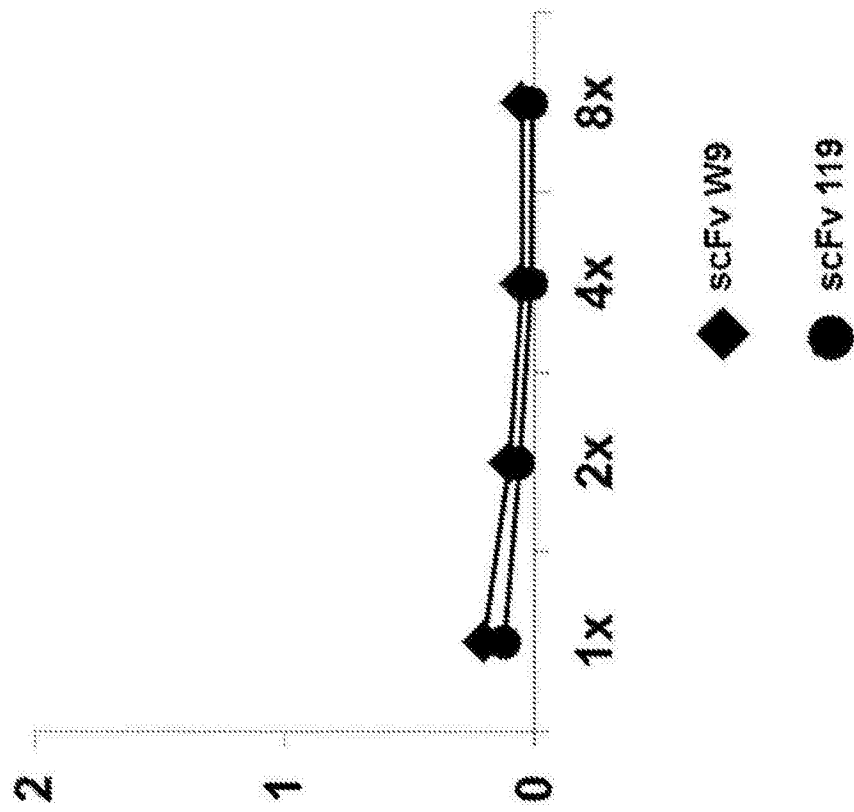


图5B

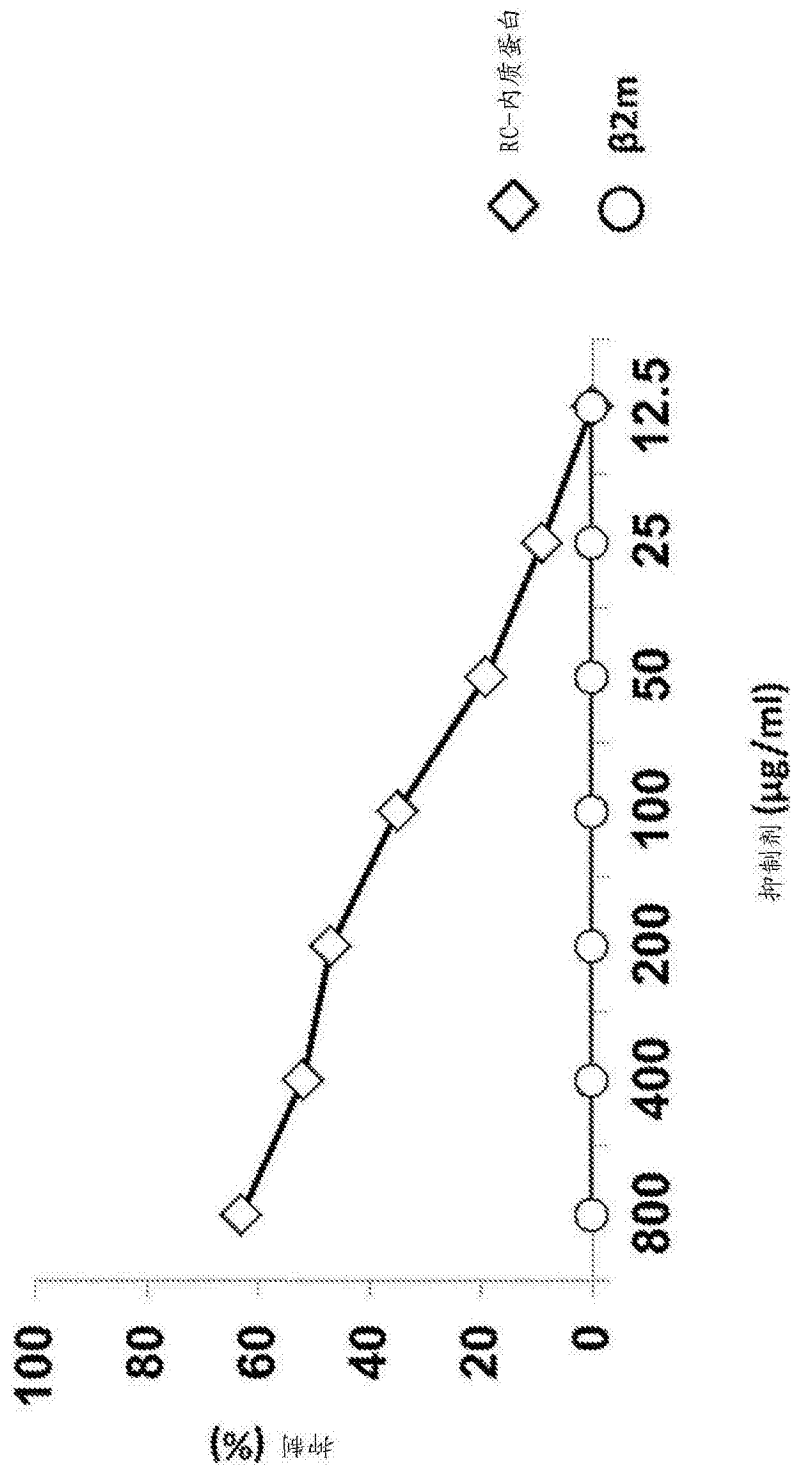


图6

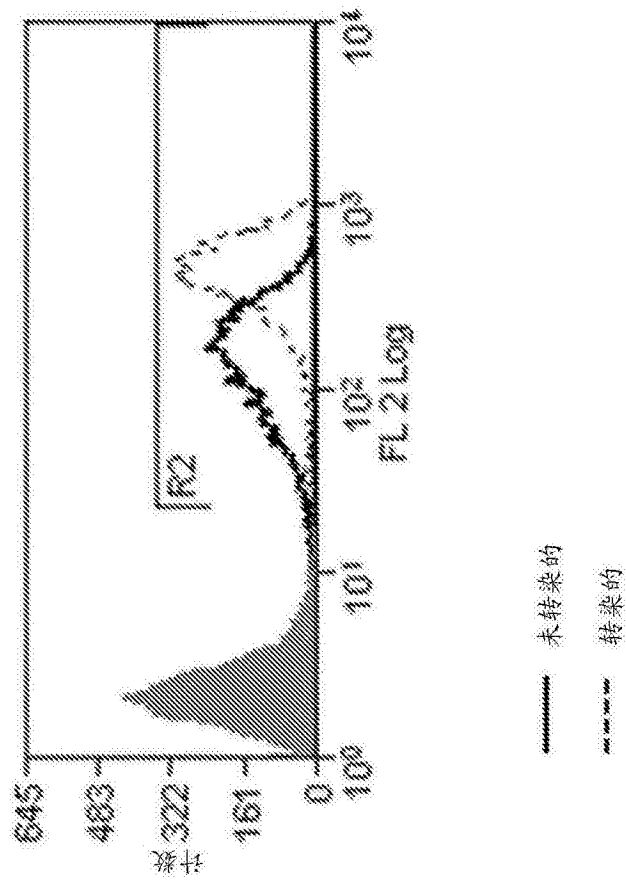


图7A

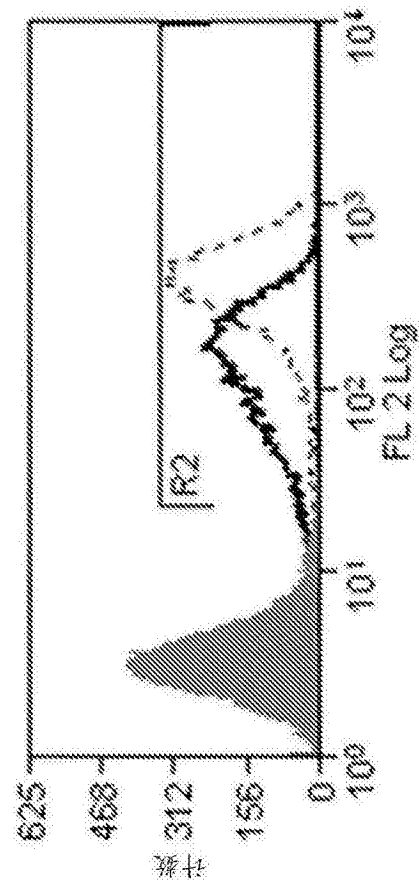


图7B

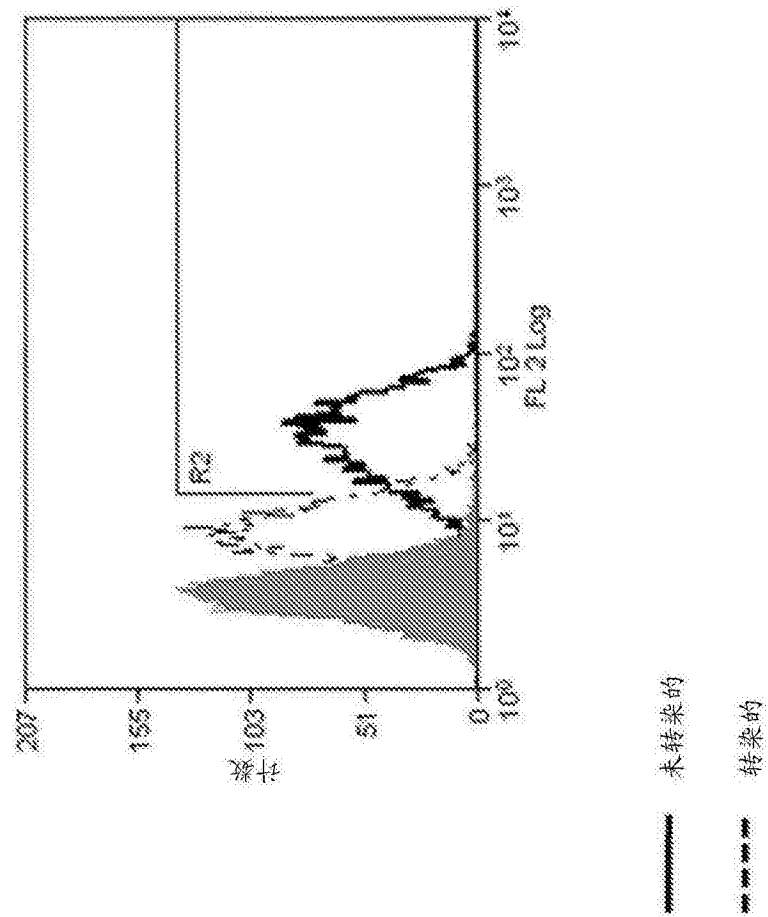


图8A

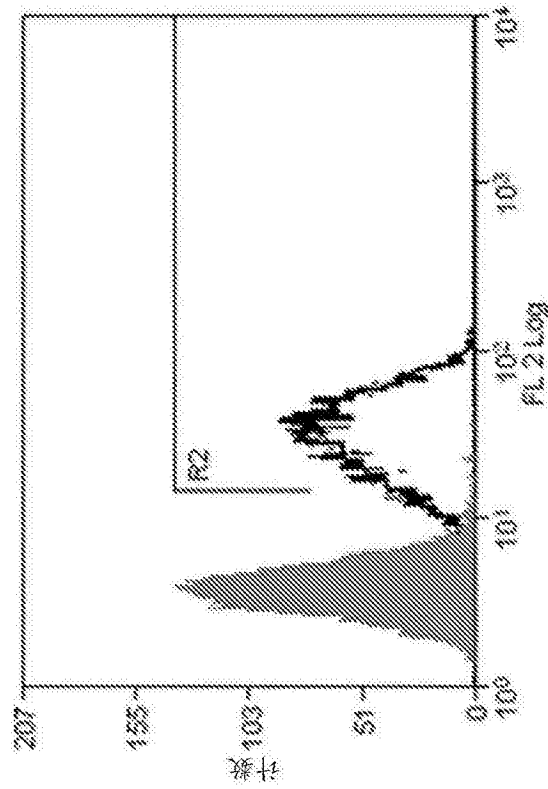


图8B

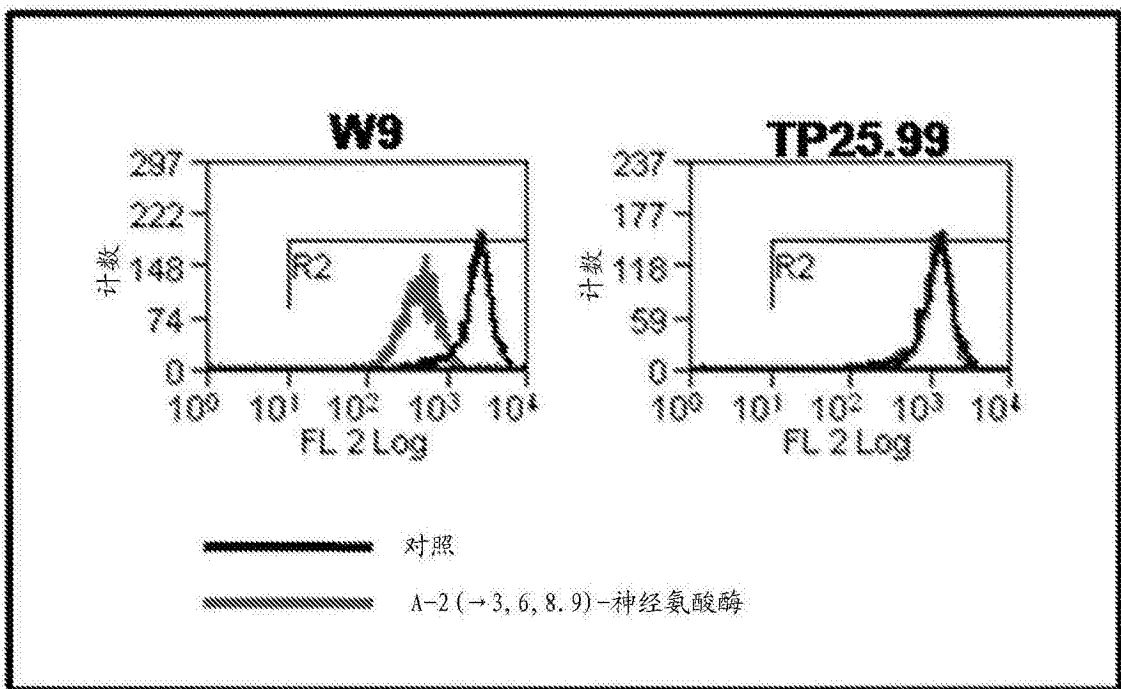


图9

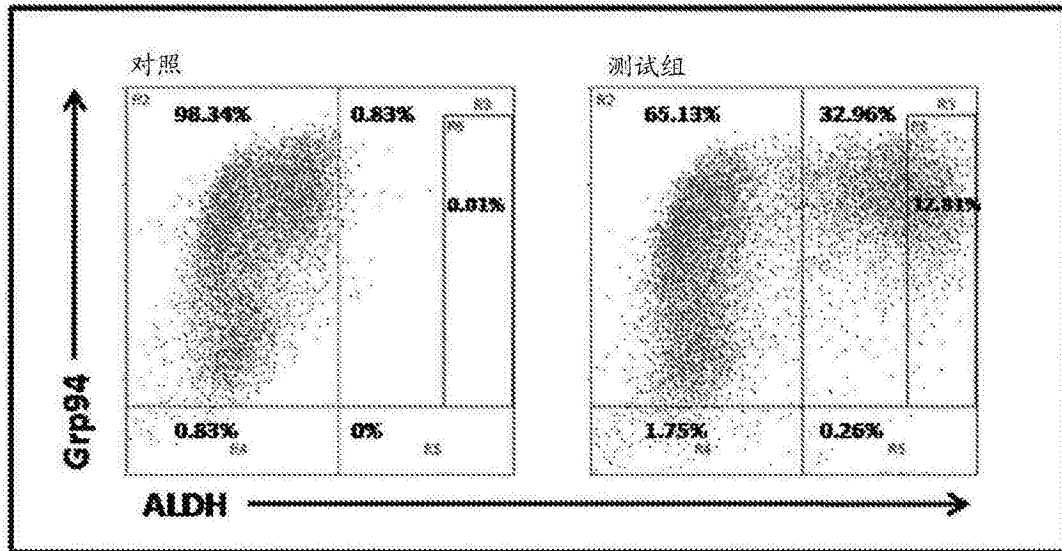


图10

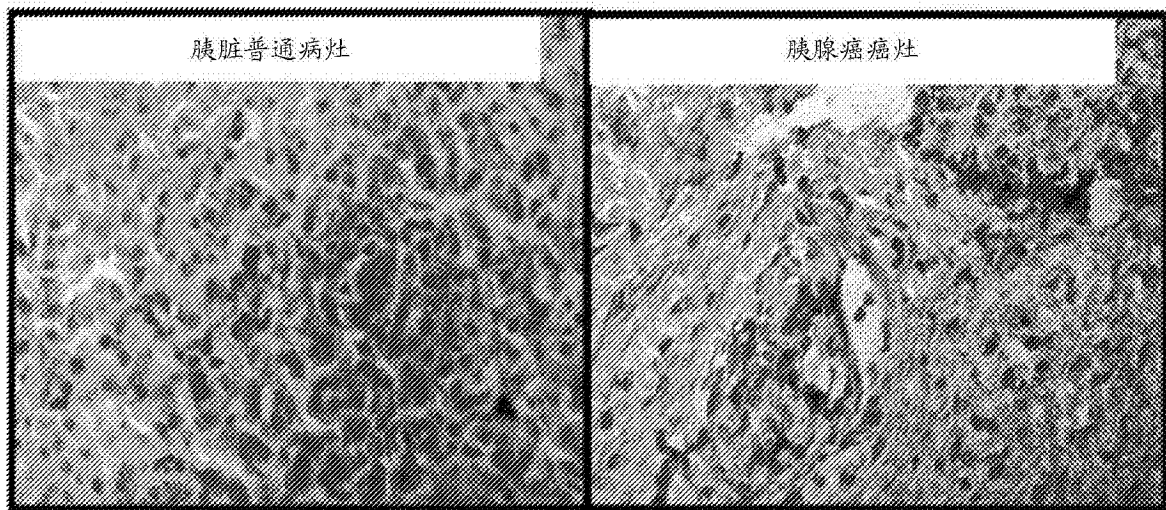


图11

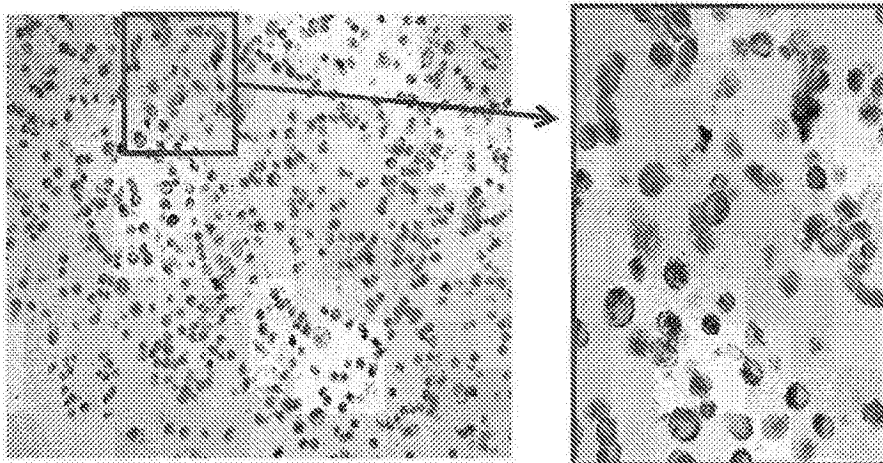
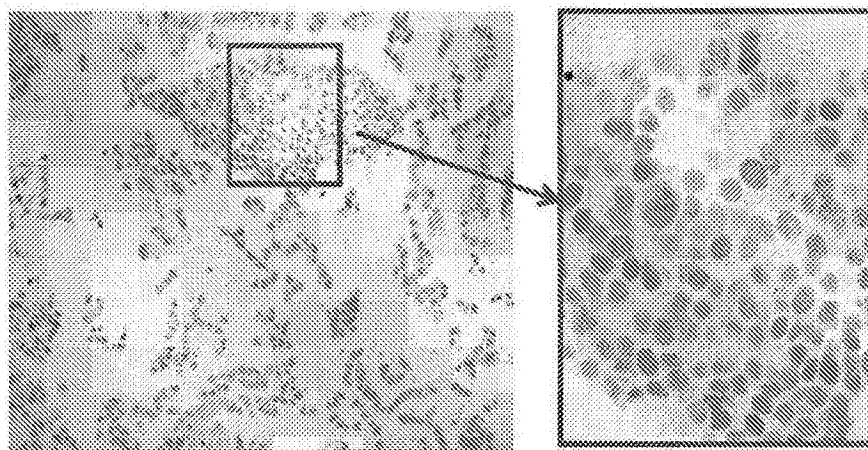
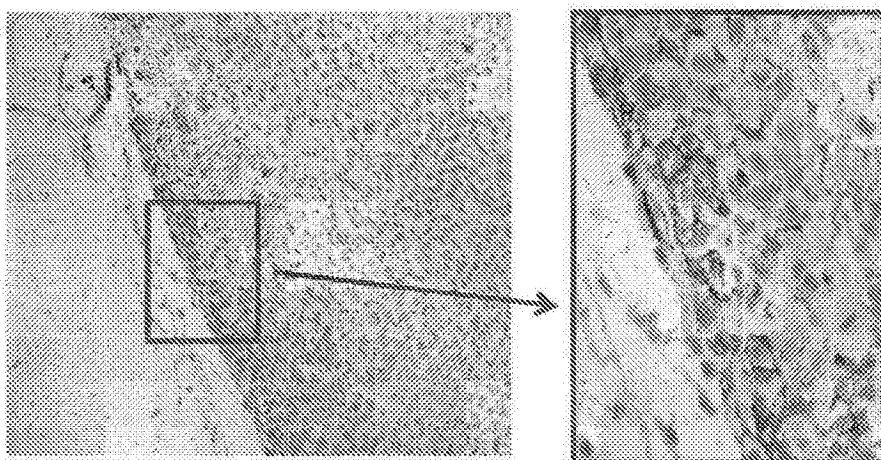
MDA-MB-231**MCF-7 (阴性对照)****MV3 异种移植物**

图12

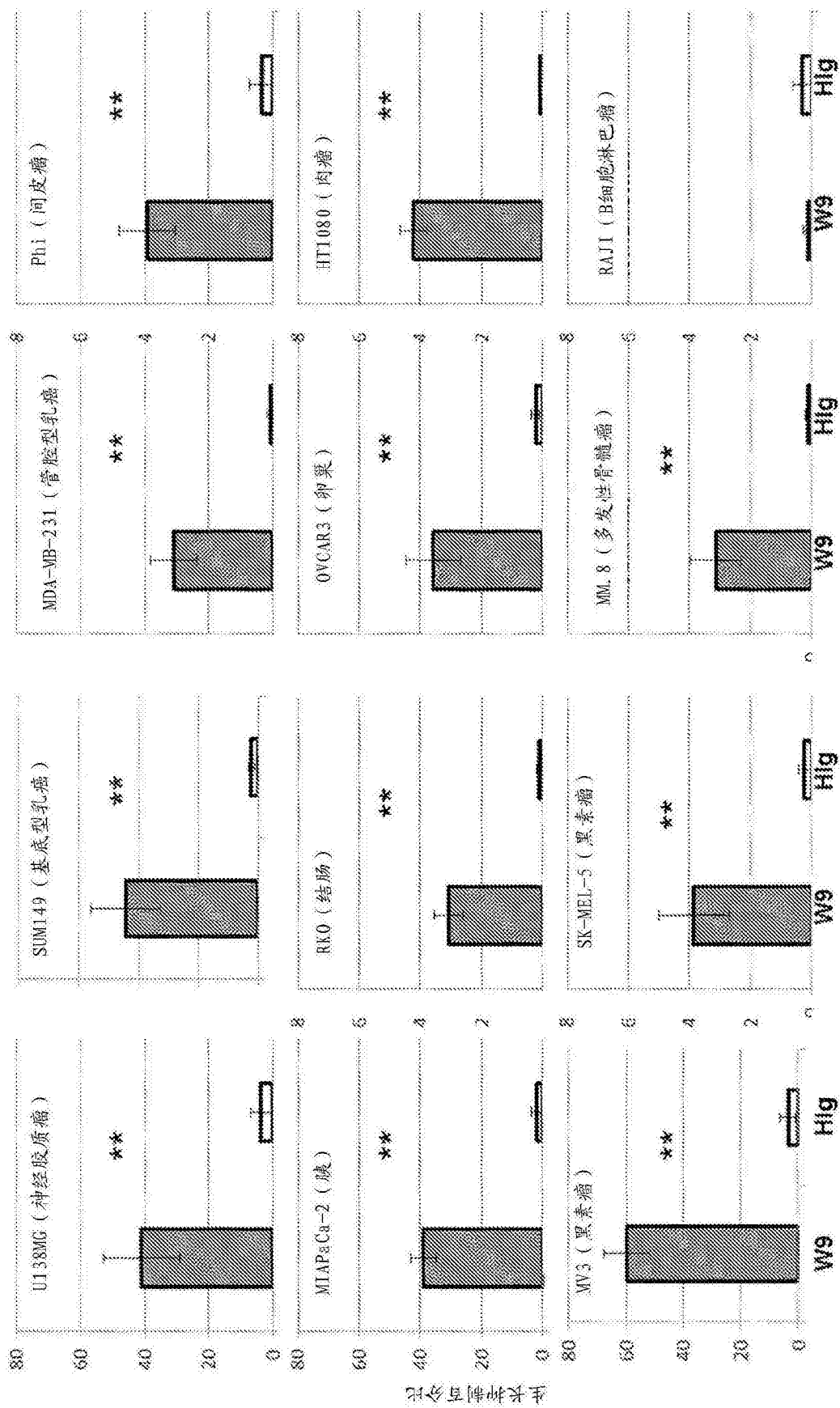
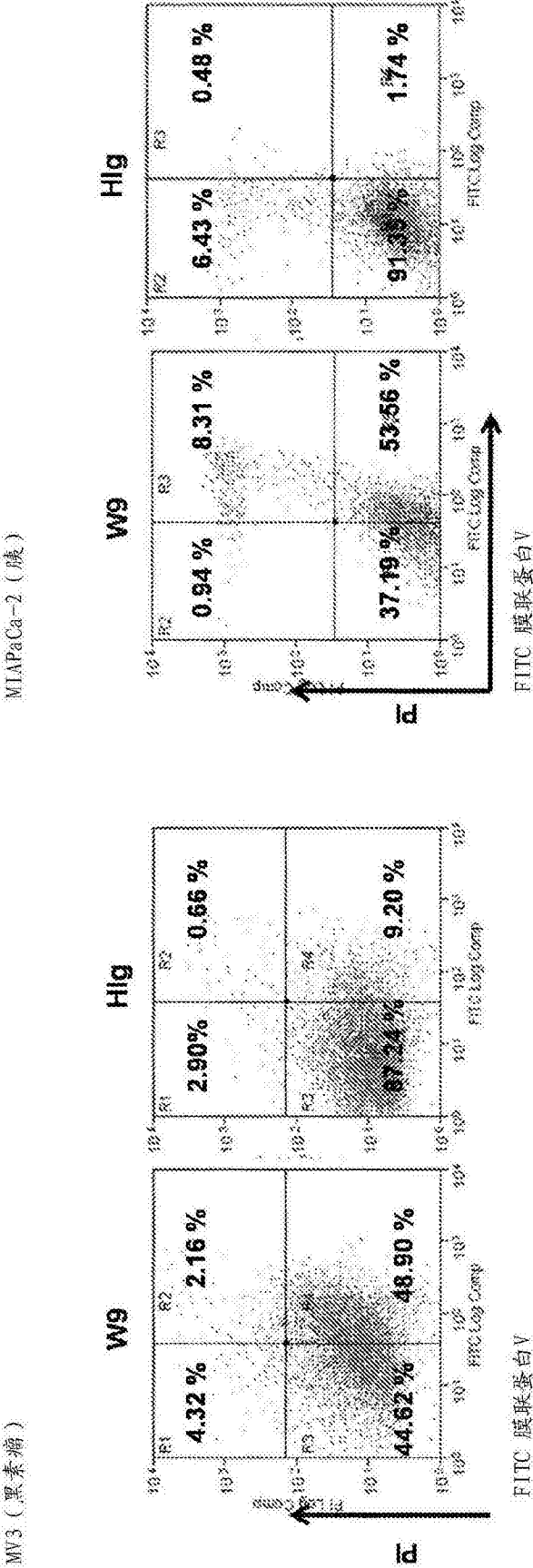
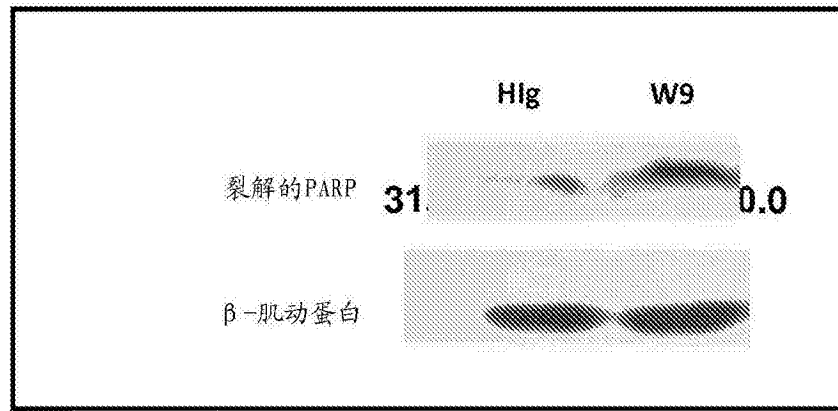


图13





a. 使用对照细胞作为参照的%密度增加

图15

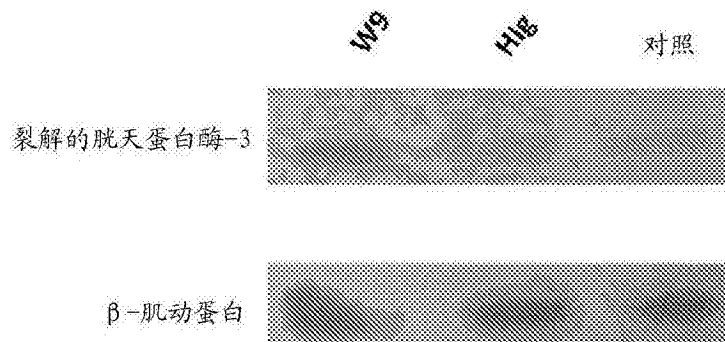


图16

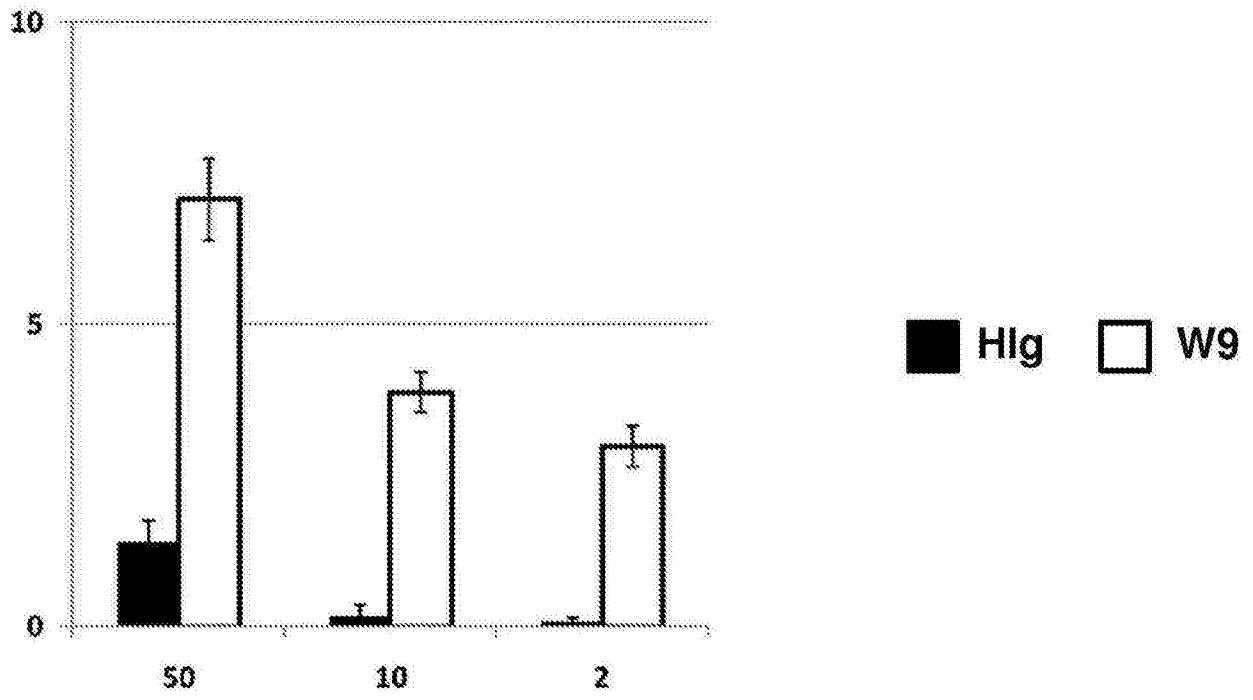


图17

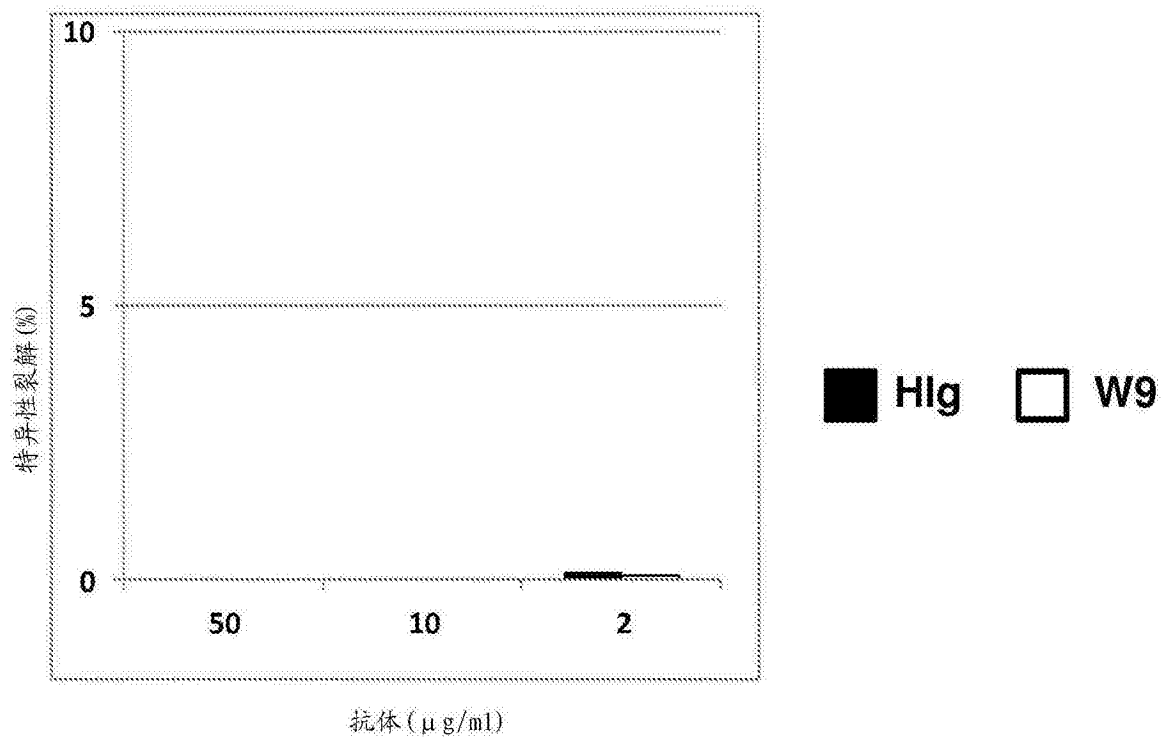


图18

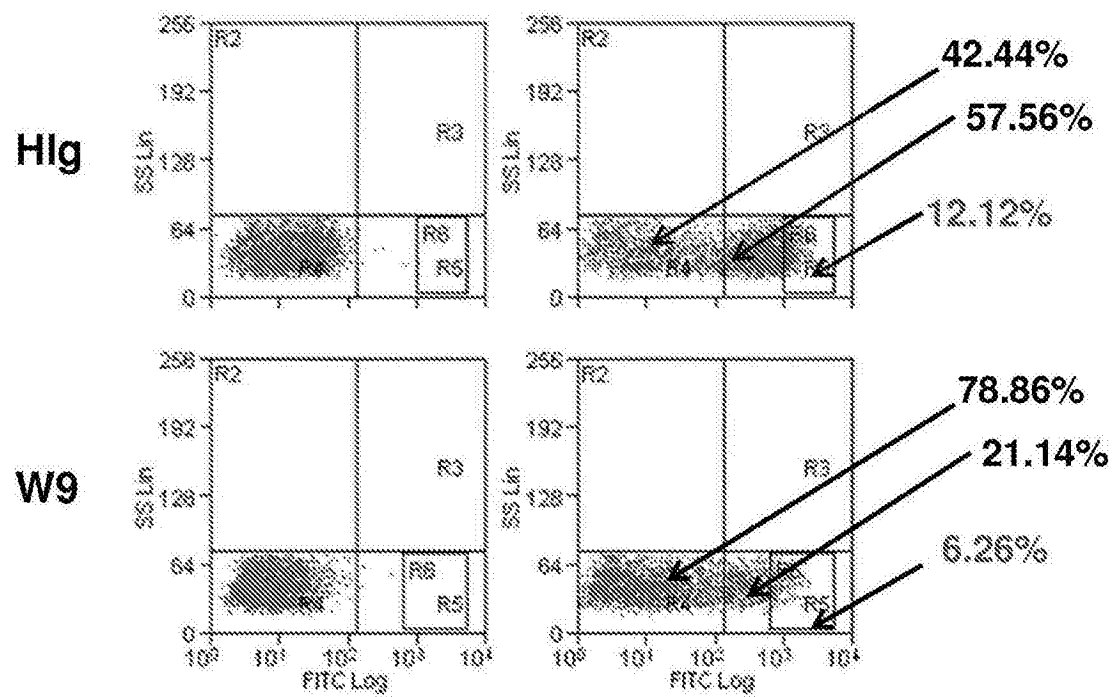


图19

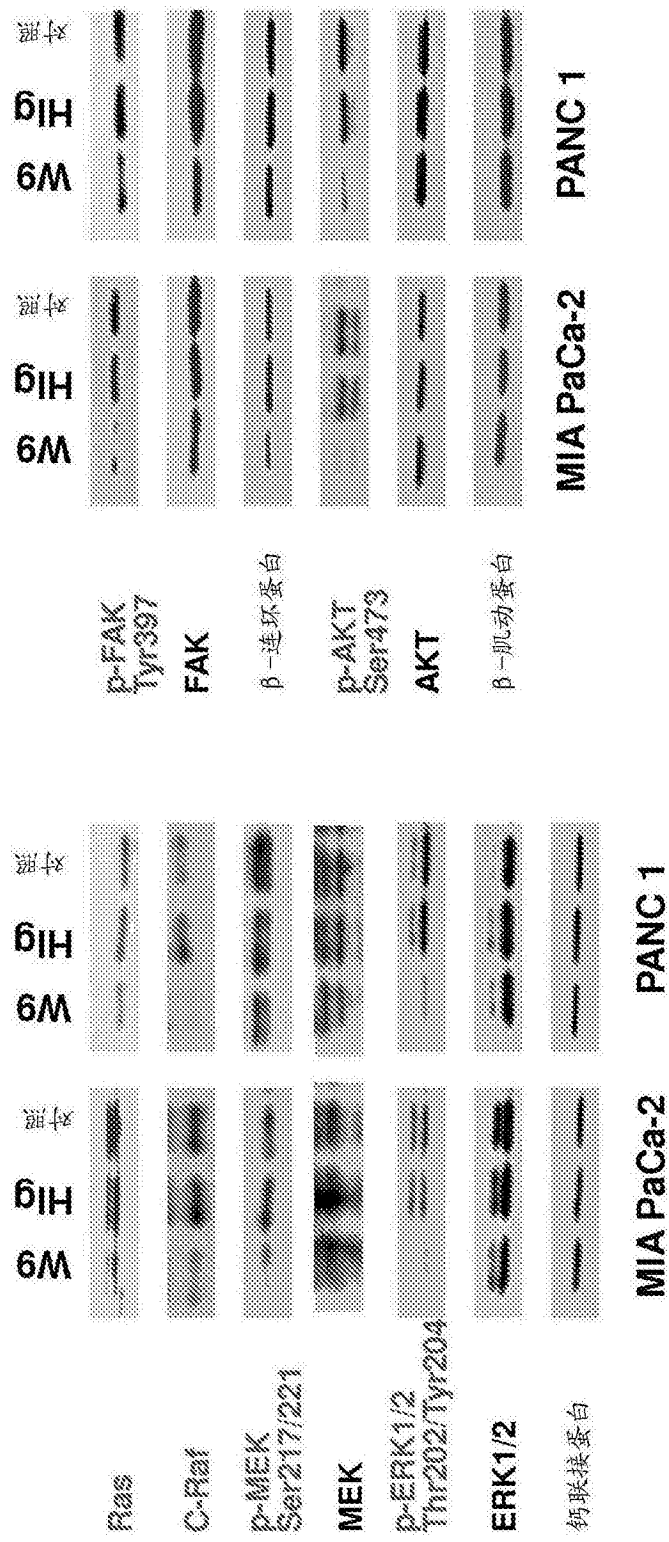


图 20

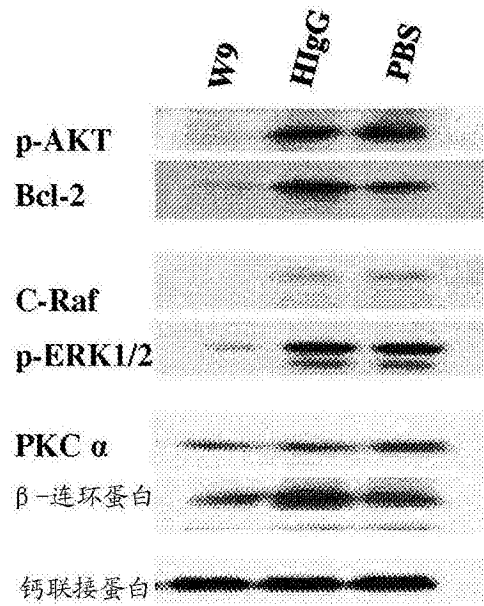


图21

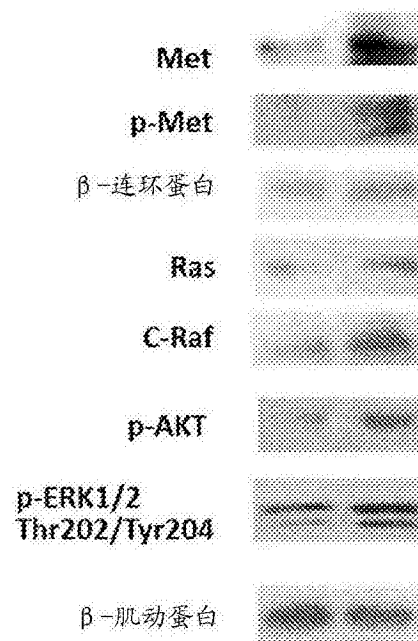


图22

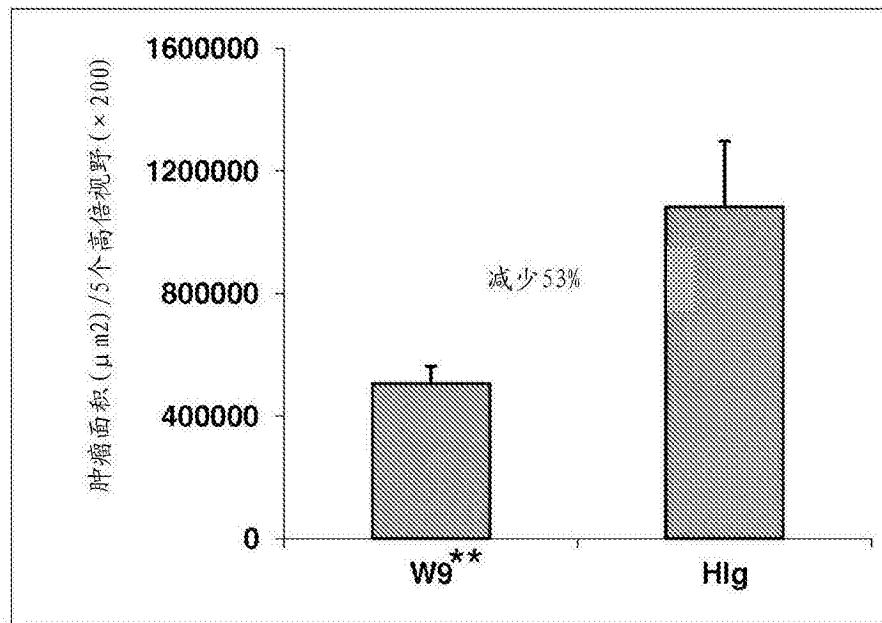
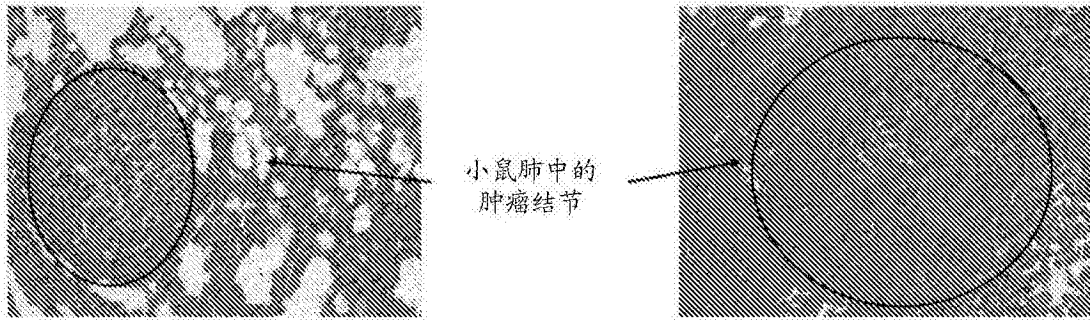


图23

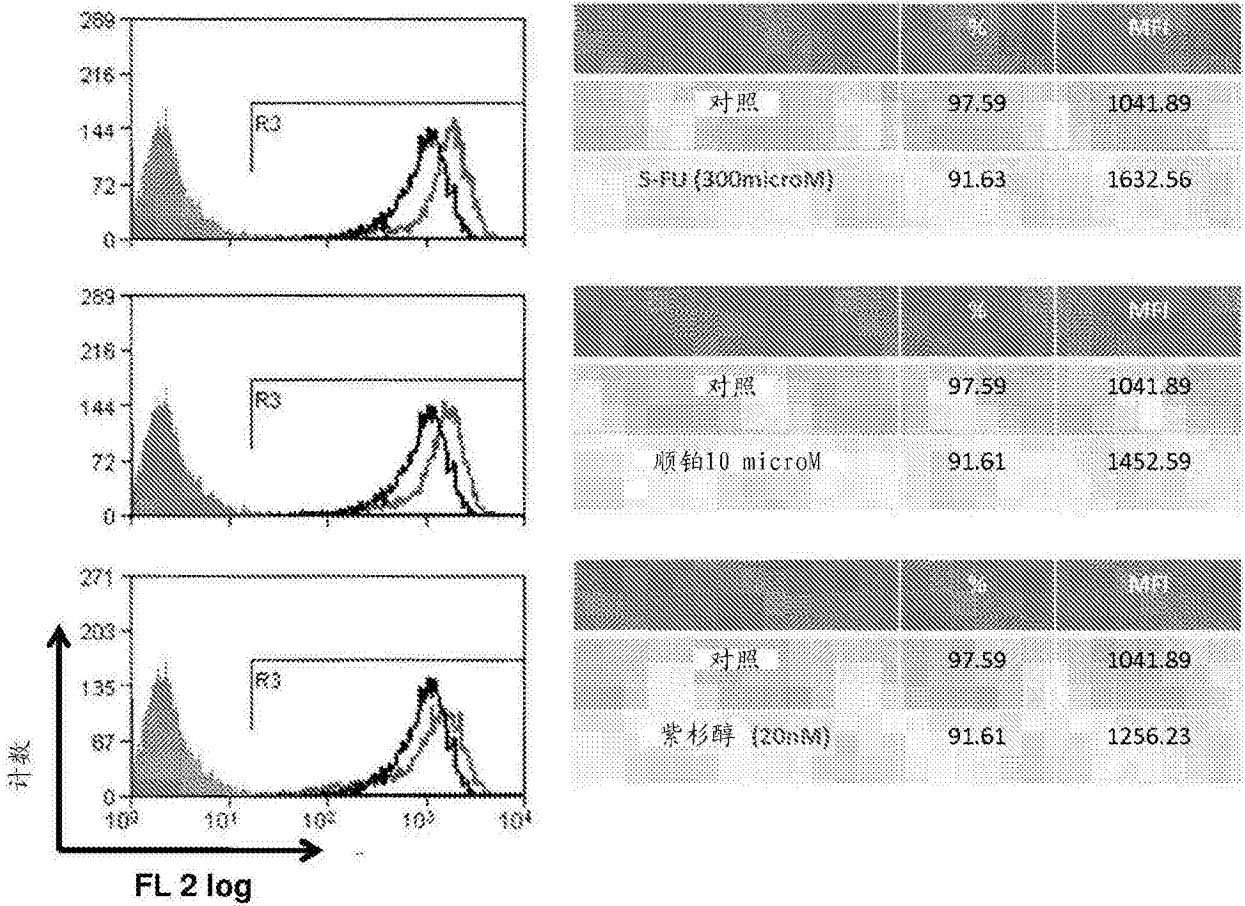


图24

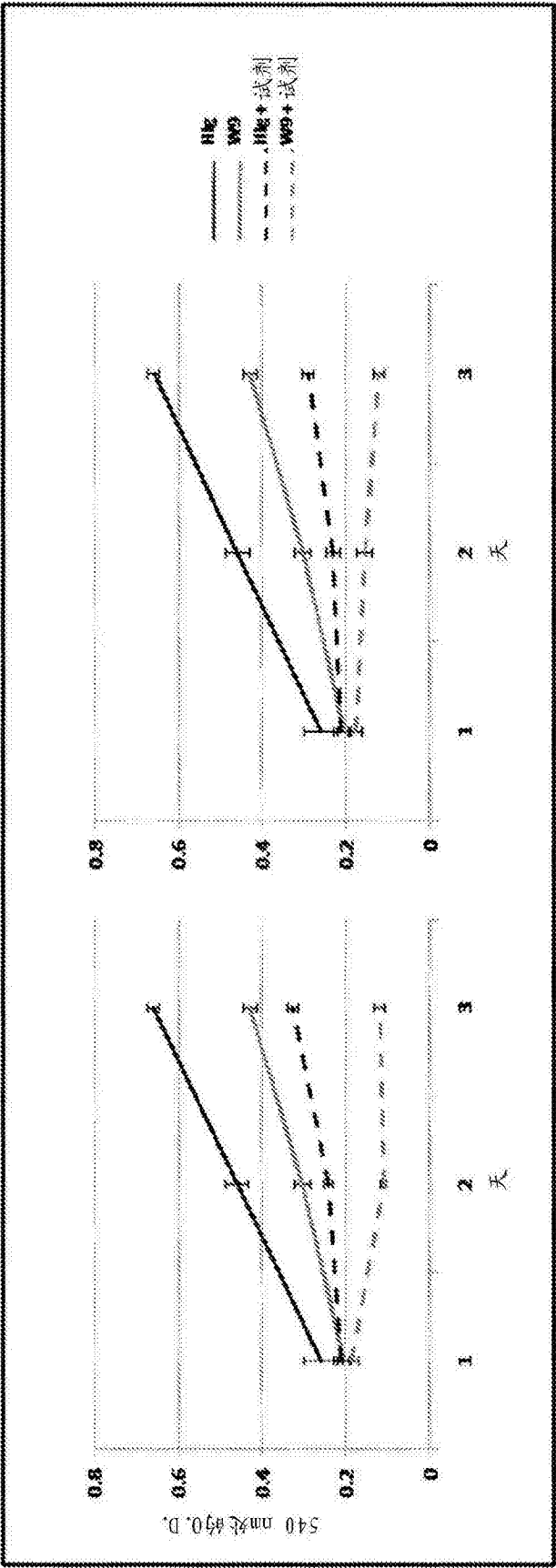


图 25B

图 25A

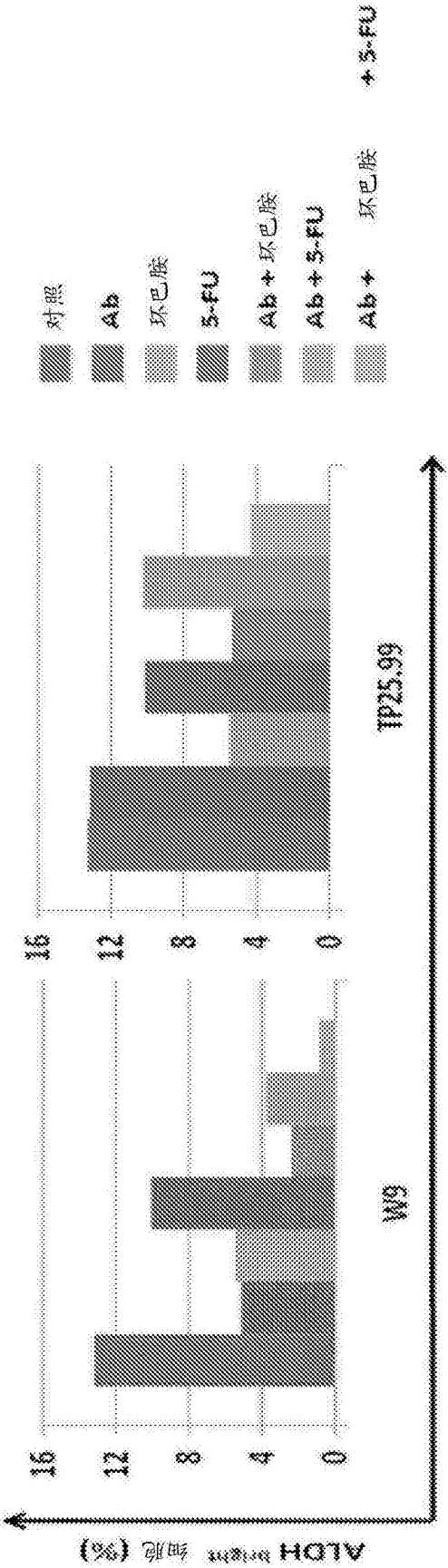


图26

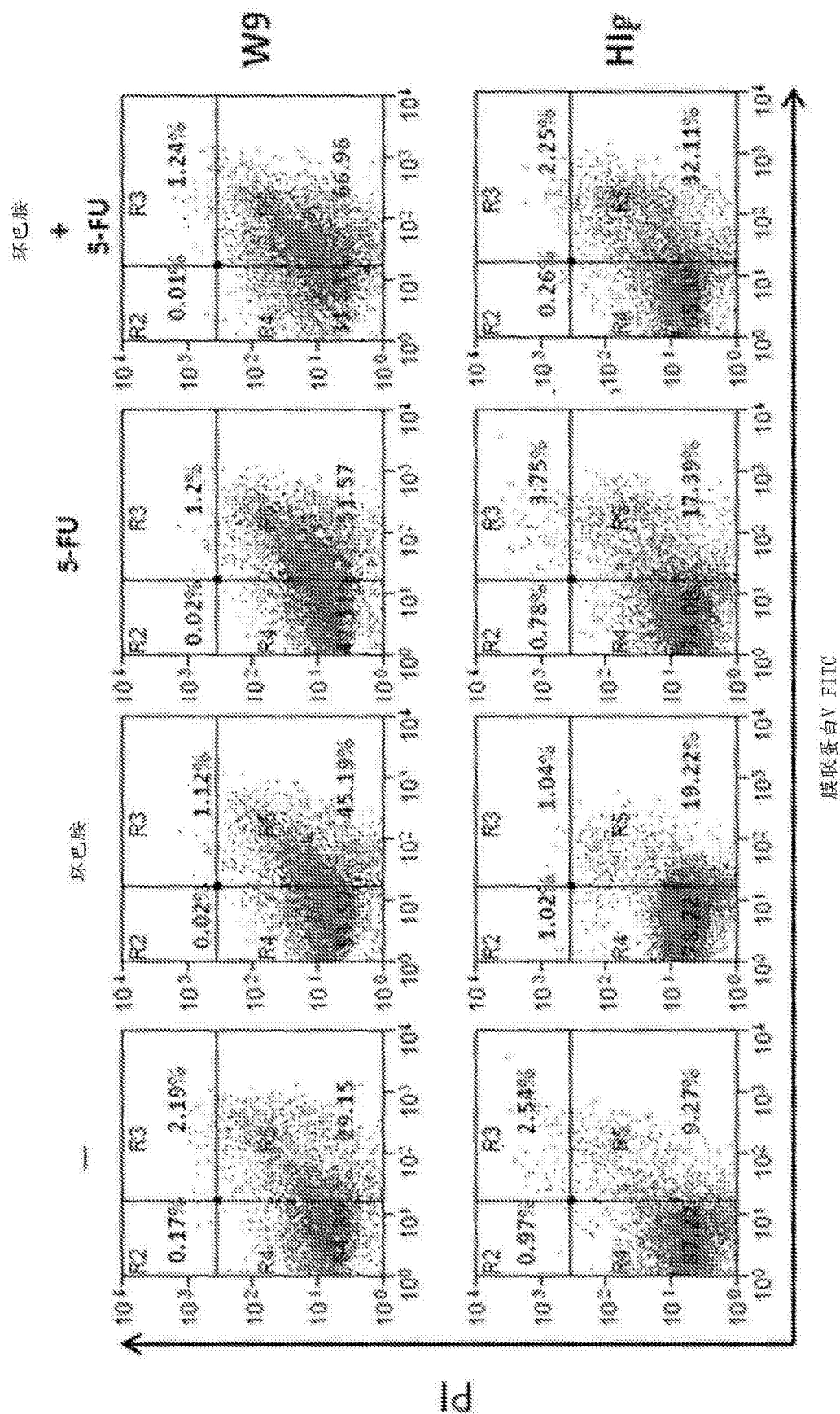


图27

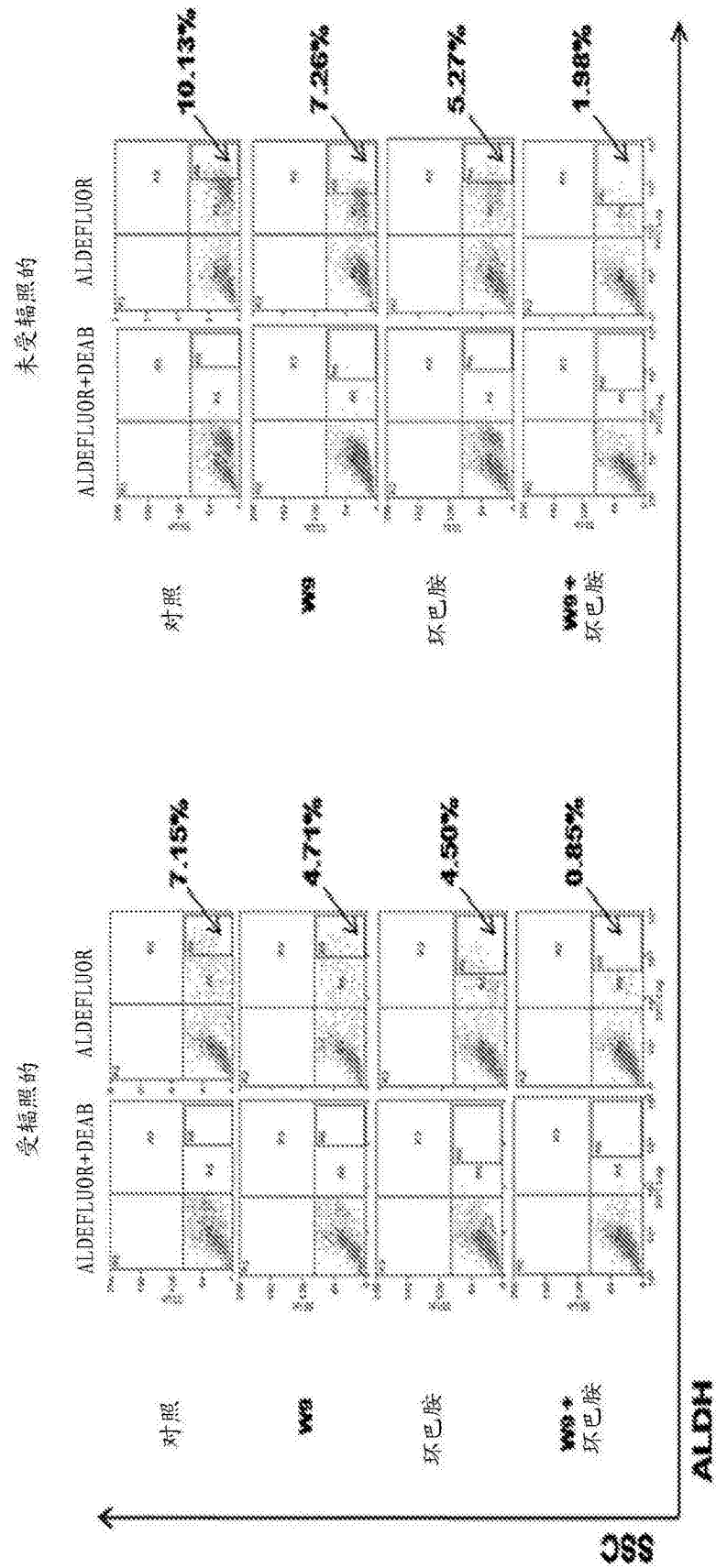


图 28B

图 28A

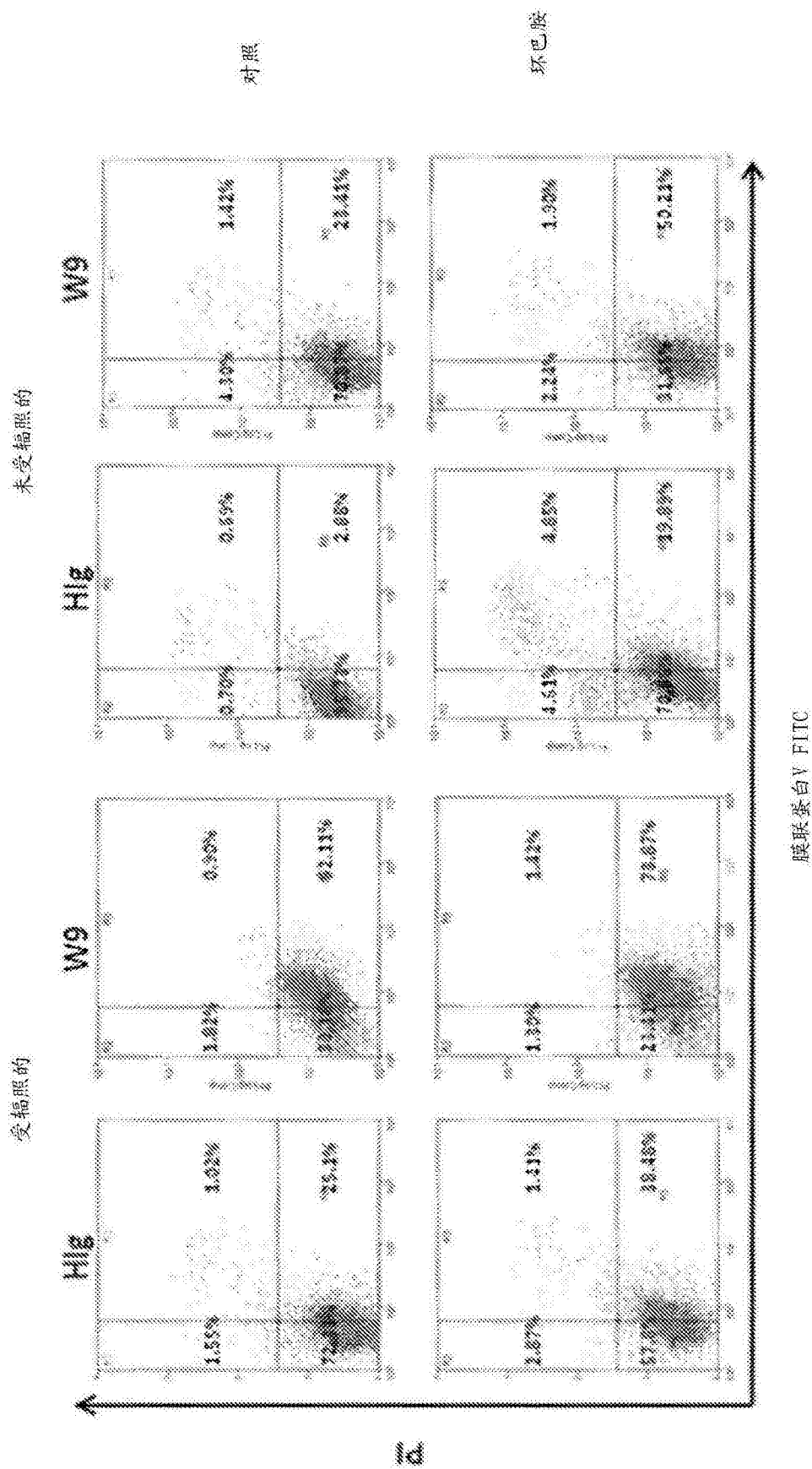


图29

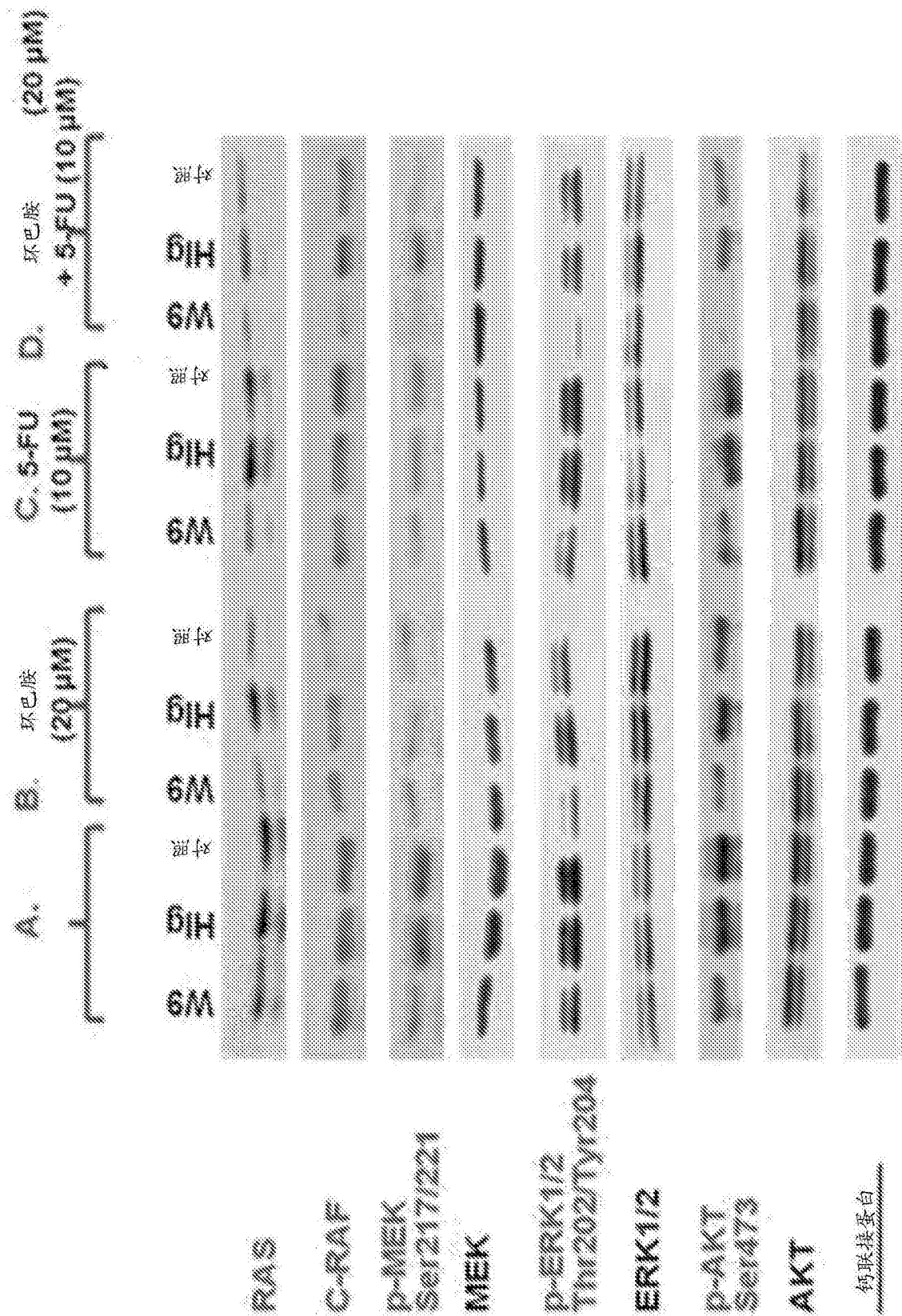


图30

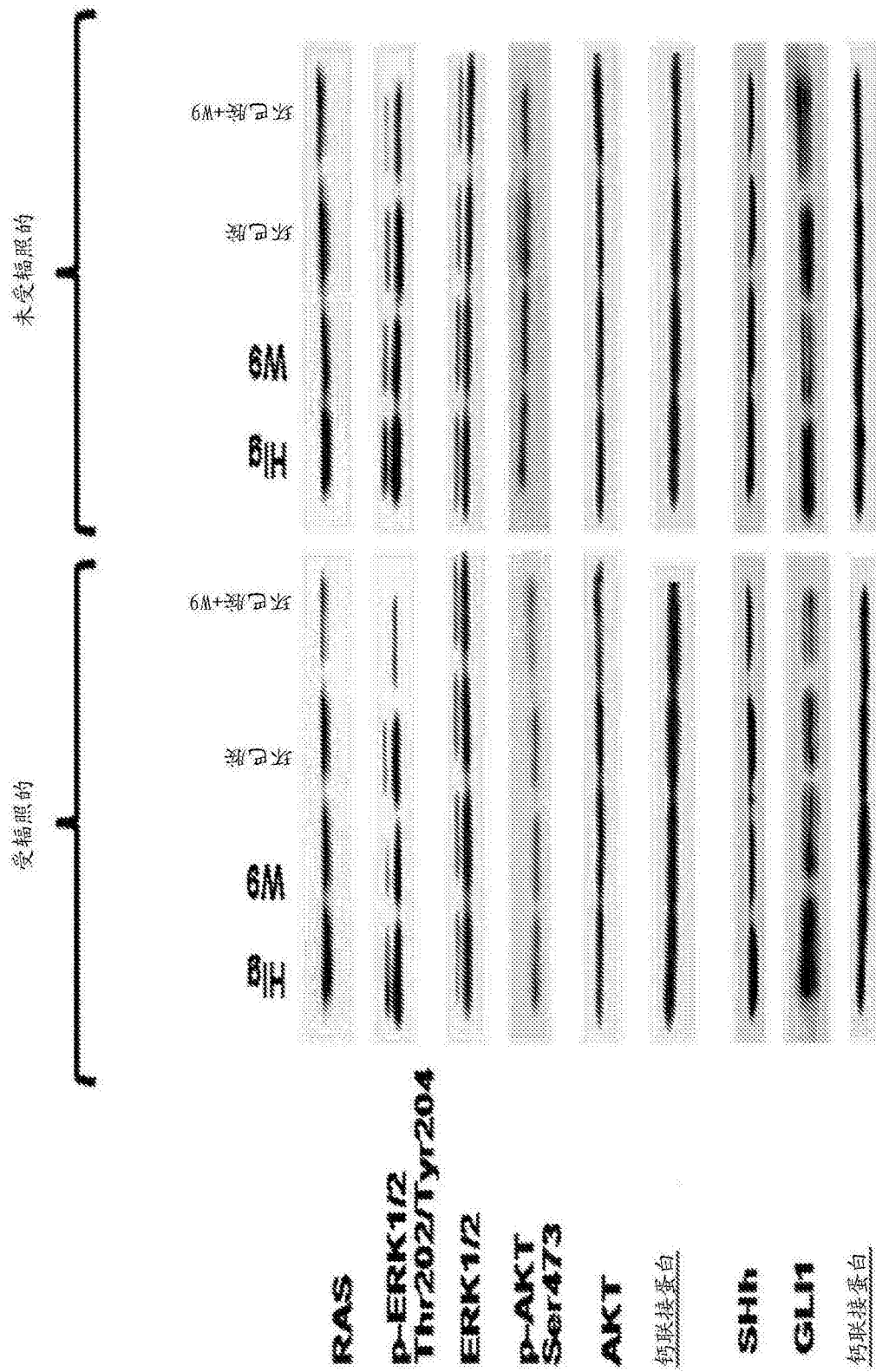


图31