



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108883163 B

(45) 授权公告日 2022.04.15

(21) 申请号 201680060066.7

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2016.09.06

A61K 39/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00 (2006.01)

申请公布号 CN 108883163 A

C12P 21/08 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.11.23

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

WO 0146455 A2, 2001.06.28

62/214,242 2015.09.04 US

WO 0146455 A2, 2001.06.28

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2014127276 A1, 2014.08.21

2018.04.13

CN 104098696 A, 2014.10.15

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2009012460 A1, 2009.01.22

PCT/US2016/050391 2016.09.06

US 2011136743 A1, 2011.06.09

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2009286312 A1, 2009.11.19

W02017/041092 EN 2017.03.09

US 2014234350 A1, 2014.08.21

(73) 专利权人 健康研究公司

Paola Fortugno等. Survivin exists in

地址 美国纽约

immunochemically distinct subcellular

(72) 发明人 罗伯特·A·芬斯特梅克

pools and is involved in spindle

迈克尔·J·切谢尔斯

microtubule function.《Journal of Cell

Science》.2002,第115卷575-585.

审查员 陈中伟

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

权利要求书2页 说明书16页

务所(普通合伙) 11201

序列表10页 附图13页

代理人 宋融冰

(54) 发明名称

用于癌症治疗的抗存活蛋白抗体

(57) 摘要

提供了存活蛋白特异性抗体、编码该抗体的核酸以及通过施用该抗体来治疗包含表达存活蛋白细胞的肿瘤的方法。发现抗体组合物对抑制肿瘤生长是有效的。

1. 对存活蛋白具有特异性的抗体在制备用于治疗个体中表达存活蛋白的肿瘤的药物中的用途,包括向患有所述表达存活蛋白的肿瘤的所述个体施用包含所述对存活蛋白具有特异性的抗体的组合物,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中

a) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:7序列所示的VH CDR1、SEQ ID NO:8序列所示的VH CDR2和SEQ ID NO:9序列所示的VH CDR3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:10序列所示的VL CDR1、SEQ ID NO:11序列所示的VL CDR2和SEQ ID NO:12序列所示的VL CDR3;或者

b) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:13序列所示的VH CDR1、SEQ ID NO:14序列所示的VH CDR2和SEQ ID NO:15序列所示的VH CDR3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:16序列所示的VL CDR1、SEQ ID NO:17序列所示的VL CDR2和SEQ ID NO:18序列所示的VL CDR3。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体响应于长度为9至23个氨基酸且包含序列QMFFCF (SEQ ID NO:3) 的肽而产生。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述抗体响应于具有序列DLAQMFCCFKELEGW (SEQ ID NO:4) 的肽而产生。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、单链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体具有同种型IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述抗体具有同种型IgG2b或IgG1。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:19具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:20具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:21具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:22具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

10. 一种分离的单克隆抗体,其特异性结合存活蛋白,包含重链可变区和轻链可变区,其中,

a) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:7序列所示的VH CDR1、SEQ ID NO:8序列所示的VH CDR2和SEQ ID NO:9序列所示的VH CDR3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:10序列所示的VL CDR1、SEQ ID NO:11序列所示的VL CDR2和SEQ ID NO:12序列所示的VL CDR3;或者

b) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:13序列所示的VH CDR1、SEQ ID NO:14序列所示的VH CDR2和SEQ ID NO:15序列所示的VH CDR3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:16序列所示的VL CDR1、SEQ ID NO:17序列所示的VL CDR2和SEQ ID NO:18序列所示的VL CDR3。

11. 根据权利要求10所述的抗体,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:19具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:20具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

12. 根据权利要求10所述的抗体,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:21具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:22具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

13. 根据权利要求10所述的抗体,其中所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、单链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。
14. 根据权利要求10所述的抗体,其中所述抗体具有同种型IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE。
15. 根据权利要求14所述的抗体,其中所述抗体具有同种型IgG2b或IgG1。
16. 一种药物组合物,包含权利要求10所述的抗体和药学上可接受的载体。
17. 一种转化细胞,其中所述转化细胞已经导入了编码权利要求10所述的抗体的多核苷酸序列。

## 用于癌症治疗的抗存活蛋白抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年9月4日提交的申请号为62/214,242的美国临时专利申请的优先权,其公开内容通过引用并入本文。

### 背景技术

[0003] 存活蛋白是属于细胞凋亡抑制剂家族的细胞内蛋白质。存活蛋白与有丝分裂纺锤体配合作用以调节细胞分裂。存活蛋白在某些细胞中的细胞周期G2/M阶段表达,并在细胞周期进程的这个阶段与纺锤体微管组织中心结合(associate)。存活蛋白在许多不同的细胞基因座中发挥重要作用,以调节细胞周期并抑制凋亡性细胞死亡。它经常由许多不同类型的癌细胞表达,但不常表达于正常的成人组织。存活蛋白肽序列已被用于开发疫苗接种策略。虽然患有某些癌症的患者的生存率有所提高,但挑战依然存在,特别是对于诊断时患有晚期疾病的患者。因此,仍然需要开发更多战略来对抗癌症。

### 发明内容

[0004] 本公开提供了用于治疗包含表达存活蛋白细胞的肿瘤的组合物和方法。本公开提供了分离的抗体(包括单克隆抗体和多克隆抗体及其片段和变体)、包含抗体的组合物、编码抗体或其部分或其变体的核酸分子、包含核酸分子的载体、包含抗体和/核酸分子的细胞、包含一种或多种抗体或核酸分子的试剂盒、以及利用抗体或核酸分子或包含抗体或核酸分子的细胞来抑制肿瘤生长的方法。

[0005] 一方面,本公开提供了分离的抗体,其可以是多克隆抗体或单克隆抗体(mAb),其对存活蛋白的一个或多个表位具有特异性反应活性。响应于施用存活蛋白肽或其修饰物可产生抗体。例如,响应于长度可以是9至23个氨基酸并包含核心序列QMFFCF(SEQ ID NO:3)的肽而产生抗体。

[0006] 本公开的抗体可以是包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的单克隆抗体,其中重链可变区(VH)包含具有SEQ ID NO:7所示序列的互补决定区(CDR)1、具有SEQ ID NO:8所示序列的CDR2和具有SEQ ID NO:9所示序列的CDR3,轻链可变区(VL)包含具有SEQ ID NO:10所示序列的CDR1、具有SEQ ID NO:11所示序列的CDR2和具有SEQ ID NO:12所示序列的CDR3;或是包含VH和VL的单克隆抗体,其中VH包含具有SEQ ID NO:13所示序列的CDR1、具有SEQ ID NO:14所示序列的CDR2和具有SEQ ID NO:15所示序列的CDR3,VL包含具有SEQ ID NO:16所示序列的CDR1、具有SEQ ID NO:17所示序列的CDR2和具有SEQ ID NO:18所示序列的CDR3。

[0007] 本公开的抗体可以是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。在嵌合抗体或人源化抗体中,重链和/或轻链的一些部分可以与来自一个物种的序列相同或同源,而其它部分可以与来自不同物种的序列相同或同源。例如,可以分离或产生鼠单克隆抗体,然后将这些抗体的部分(或源自其的序列信息)用于产生嵌合抗体或人源化抗体。例如,可以用一种或多种存活蛋白肽为小鼠免疫接种,然后可以收集腹水液样品。可对样品进行筛选并选择以开发一

组单克隆抗体和相应的杂交瘤细胞株。然后可以利用这些单克隆抗体的部分或序列来产生嵌合抗体或人源化抗体。本公开的抗体还可以是抗体片段、单链、双特异性或多特异性抗体。

[0008] 本公开提供了包含编码抗体(包括mAb)序列的部分或全部的序列的核酸分子。本公开还提供了包含核酸分子的细胞。

[0009] 本公开提供了对需要治疗的个体中的肿瘤进行治疗的方法,其包括向个体施用包含一种或多种对存活蛋白(例如,诸如人存活蛋白)具有特异性的抗体的组合物。

## 附图说明

[0010] 图1、显示了抗存活蛋白单克隆抗体对具有GL261神经胶质瘤的C57BL/6小鼠的颅内神经胶质瘤模型的作用。肿瘤植入后每7天给小鼠施用一次抗存活蛋白抗体。存活百分比显示为相对于时间的函数。IgG是正常小鼠的非特异性IgG。对照是植入有肿瘤但未接受治疗的小鼠。

[0011] 图2、显示了抗存活蛋白多克隆抗体和单克隆抗体对具有GL261神经胶质瘤的C57BL/6小鼠的皮下肿瘤模型的作用。肿瘤植入后每7天给小鼠施用一次所示的治疗。SurVaxM是存活蛋白疫苗;抗存活蛋白血清(抗体)来源于接受活性存活蛋白疫苗或存活蛋白肽的非荷瘤小鼠集合(non-tumor bearing pooled mice)。对照是植入有肿瘤但未接受治疗的小鼠。

[0012] 图3、显示了抗存活蛋白多克隆抗体对具有GL261神经胶质瘤的C57BL/6小鼠的皮下肿瘤模型的作用。肿瘤植入后每7天给小鼠施用一次所示的治疗。SurVaxM是存活蛋白疫苗;抗存活蛋白血清(抗体)来源于接受活性SurVaxM疫苗的非荷瘤小鼠集合。继续密切观察(follow-up)小鼠至50天。

[0013] 图4、显示了两种单克隆抗体对裸(免疫功能低下)小鼠中B16鼠黑素瘤的作用。示出了接受非特异性IgG、mAb 2C2和mAb H30各组的肿瘤体积。每个点代表一只动物。

[0014] 图5、显示了两种单克隆抗体对C57B1/6(免疫功能正常)小鼠中B16鼠黑素瘤的作用。示出了接受非特异性IgG、mAb 2C2和mAb H30各组的肿瘤体积。每个点代表一只动物。

[0015] 图6、以相对于时间的函数显示了两种单克隆抗体对裸(免疫功能低下)小鼠中B16鼠黑素瘤的作用。示出了接受非特异性IgG、mAb 2C2和mAb H30各组的肿瘤体积。

[0016] 图7、以相对于时间的函数显示了两种单克隆抗体对C57B1/6(免疫功能正常)小鼠中B16鼠黑素瘤的作用。示出了接受非特异性IgG、mAb 2C2和mAb H30各组的肿瘤体积。

[0017] 图8、显示了两种单克隆抗体对裸(免疫功能低下)小鼠中GL261鼠神经胶质瘤的作用。示出了对照(未经治疗)、接受非特异性IgG、mAb 2C2和mAb H30各组的肿瘤体积。每个点代表一只动物。

[0018] 图9、显示了两种单克隆抗体对C57B1/6(免疫功能正常)小鼠中GL261鼠神经胶质瘤的作用。示出了接受对照、非特异性IgG、mAb 2C2和mAb H30各组的肿瘤体积。每个点代表一只动物。

[0019] 图10、以相对于时间的函数显示了两种单克隆抗体对C57B1/6(免疫功能正常)小鼠中GL261鼠神经胶质瘤的作用。示出了接受对照、非特异性IgG、mAb 2C2和mAb H30各组的肿瘤体积。

[0020] 图11、以相对于时间的函数显示了两种单克隆抗体对裸(免疫功能低下)小鼠中GL261鼠神经胶质瘤的作用。示出了接受对照、非特异性IgG、mAb 2C2和mAb H30各组的肿瘤体积。

[0021] 图12、显示了被施用以存活蛋白疫苗(SEQ ID NO:4)的患者产生的总IgG。示出了8名患者的数据。血清ELISA研究显示血清IgG对野生型存活蛋白肽(氨基酸53-67(SEQ ID NO:27))的反应活性逐渐增加。

[0022] 图13、显示了被施用以存活蛋白疫苗(SEQ ID NO:4)的患者产生的存活蛋白特异性IgG。示出了8名患者的数据。血清ELISA研究显示血清IgG对经过修饰的存活蛋白肽(氨基酸53-67/M57-SEQ ID NO:4)的反应活性逐渐增加。

### 具体实施方式

[0023] 本公开基于我们的观察结果,即接种了存活蛋白肽的小鼠的抗血清和纯化出的针对存活蛋白的鼠单克隆抗体显著抑制动物模型中的肿瘤生长。这是令人惊讶的,因为存活蛋白是一种被认为不会由细胞分泌或展示在细胞表面的细胞内蛋白质,除非在MHC I类呈递的背景下。因此,抗体介导的(被动)存活蛋白免疫疗法被预期为不会具有疗效。但是,我们却发现其是有疗效的。

[0024] 本公开提供了分离的抗体及其片段、分离的编码抗体或其片段的核酸分子、产生抗体或其片段的细胞、包含编码抗体或其片段的核酸的载体或细胞、包含任何前述的组合物,制备任何前述的方法、以及利用抗体及其片段或核酸分子治疗癌症(例如涉及表达存活蛋白的肿瘤的那些癌症)的方法。

[0025] 本申请对序列表的描述如下:

[0026] SEQ ID NO:1是表示人存活蛋白中片段长度为23个氨基酸的氨基酸序列。

[0027] SEQ ID NO:2是SEQ ID NO:1的变体,其中单个氨基酸发生变化。

[0028] SEQ ID NO:3是SEQ ID NO:2中六个氨基酸长度的片段。

[0029] SEQ ID NO:4是SEQ ID NO:2中十五个氨基酸长度的片段并且包含SEQ ID NO:3序列。

[0030] SEQ ID NO:5是SEQ ID NO:2中十个氨基酸长度的片段并且包含SEQ ID NO:3序列。

[0031] SEQ ID NO:6是SEQ ID NO:2中九个氨基酸长度的片段并且包含SEQ ID NO:3序列。

[0032] SEQ ID NO:7是mAb 2C2E7的VH CDR1的氨基酸序列。

[0033] SEQ ID NO:8是mAb 2C2E7的VH CDR2的氨基酸序列。

[0034] SEQ ID NO:9是mAb 2C2E7的VH CDR3的氨基酸序列。

[0035] SEQ ID NO:10是mAb 2C2E7的VL CDR1的氨基酸序列。

[0036] SEQ ID NO:11是mAb 2C2E7的VL CDR2的氨基酸序列。

[0037] SEQ ID NO:12是mAb 2C2E7的VL CDR3的氨基酸序列。

[0038] SEQ ID NO:13是mAb 30H3D2的VH CDR1的氨基酸序列。

[0039] SEQ ID NO:14是mAb 30H3D2的VH CDR2的氨基酸序列。

[0040] SEQ ID NO:15是mAb 30H3D2的VH CDR3的氨基酸序列。

- [0041] SEQ ID NO:16是mAb 30H3D2的VL CDR1的氨基酸序列。
- [0042] SEQ ID NO:17是mAb 30H3D2的VL CDR2的氨基酸序列。
- [0043] SEQ ID NO:18是mAb 30H3D2的VL CDR3的氨基酸序列。
- [0044] SEQ ID NO:19是mAb 2C2E7的重链可变区的氨基酸序列。
- [0045] SEQ ID NO:20是mAb 2C2E7的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0046] SEQ ID NO:21是mAb 30H3D2的重链可变区的氨基酸序列。
- [0047] SEQ ID NO:22是mAb 30H3D2的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0048] SEQ ID NO:23是编码2C2E7重链可变区的核苷酸序列(其编码SEQ ID NO:19的氨基酸序列)。
- [0049] SEQ ID NO:24是编码2C2E7轻链可变区的核苷酸序列(其编码SEQ ID NO:20的氨基酸序列)。
- [0050] SEQ ID NO:25是编码30H3D2重链可变区的核苷酸序列(其编码SEQ ID NO:21的氨基酸序列)。
- [0051] SEQ ID NO:26是编码30H3D2轻链可变区的核苷酸序列(其编码SEQ ID NO:22的氨基酸序列)。
- [0052] SEQ ID NO:27是人存活蛋白中十五个氨基酸长度的片段。
- [0053] 虽然疫苗在抗存活蛋白癌症免疫疗法中提供了一种前进方向,但采用抗体被动免疫疗法有几个优势。例如,人源化单克隆抗体:1) 不会受到HLA限制(与肽疫苗不同),2) 可能对由其肿瘤造成的严重免疫功能低下的患者的癌细胞立即发挥作用,3) 可以是可剂量化的,4) 可以与疫苗或其它药物或疗法(例如,诸如放射疗法)联合使用,以开发替代或补充的作用机制。上述一个或多个优点通常也适用于包括嵌合抗体、人抗体和人源化抗体的mAb。
- [0054] 本文所用的术语“存活蛋白肽”或“多个存活蛋白肽”是指全长存活蛋白的片段,并包括可产生与野生型存活蛋白(例如人存活蛋白)反应的抗体的肽的变体。如本文所用的术语“抗存活蛋白抗体”是指响应于存活蛋白或一种或多种存活蛋白肽(包括其变体)而产生的抗体。
- [0055] 一方面,本公开提供了包含抗体或其片段的组合物,抗体或其片段包括对存活蛋白的一个或多个表位具有反应活性的人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。7,943,138号和8,580,269号美国专利提供了合适的存活蛋白表位或其变体的示例,其公开内容通过引用并入本文。本公开的组合物包含响应于施用与人存活蛋白内序列相同的肽或其变体(例如至少95%相同)而产生的抗体。例如,在施用存活蛋白序列的以下部分ENE PDLAQ CFFCF K ELEG WEP DD (SEQ ID NO:1)的变体的肽后,个体中可以产生抗体并可以将其分离出来。该变体可以是ENE PDLAQ MFFCF K ELEG WEP DD (SEQ ID NO:2,即SEQ ID NO:1的第9位发生C到M的变化)。所施用肽可以是SEQ ID NO:2中第9至23(包括其间的所有整数)位连续氨基酸,其中该肽包含QMFFCF (SEQ ID NO:3)核心序列。示例性存活蛋白肽包括DLAQMFFCF K ELEG W (SEQ ID NO:4),AQMF FCF KEL (SEQ ID NO:5)和QMFFCF KEL (SEQ ID NO:6)。分离的抗体或其片段可以不经修饰而使用,或者可以对它们进行工程改造,例如,诸如以产生如本文所述的嵌合抗体或人源化抗体或各种片段。在一个实施方案中,产生对肽DLAQMFFCF K ELEG W (SEQ ID NO:4)具有反应活性的人源化抗体或其片段。
- [0056] 如本文所用的术语“抗体”可涵盖全部抗体分子、全长免疫球蛋白分子(例如天然

存在的全长免疫球蛋白分子或通过免疫球蛋白基因片段重组方法形成的全长免疫球蛋白分子)、以及抗体片段。抗体片段可以是包含至少一个抗体-抗原结合位点的片段。诸如,抗体片段可以表现出对包含基序DLAQCFDCFKELEGW (SEQ ID NO:27) 的存活蛋白或其片段的特异性结合。术语“抗体”可以包括如单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性(例如双特异性)抗体、重组抗体、人抗体、嵌合抗体和人源化抗体。术语“抗体”还可以涵盖重组表达的抗原结合蛋白和抗原结合合成肽。此外,术语“抗体”可以涵盖微型抗体和双抗体,所有这些抗体优选表现出与存活蛋白或其片段(特别是人存活蛋白)的特异性结合。如本文所用,术语“抗体”还可以涵盖体内产生的免疫球蛋白,以及体外产生的免疫球蛋白,例如,诸如通过杂交瘤产生的免疫球蛋白。通过诸如乙酰化、甲酰化、酰胺化、磷酸化或聚乙二醇化(polyethylene glycolation) (聚乙二醇化(PEGylation)) 以及糖基化可以对本公开的抗体进行修饰。如本文所用的术语“抗体”旨在覆盖本文公开的所有抗体。例如,术语“抗体”可以指单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人抗体或人源化抗体或其抗原(即存活蛋白)结合片段。

[0057] 可以利用存活蛋白肽的施用来产生多克隆抗体。例如,可以给合适的动物施用一种或多种存活蛋白肽,并收集血清。此外,可以从经过免疫接种的动物或接种有存活蛋白或存活蛋白肽的患者(诸如从可能参与临床试验的个体)分离表达人抗存活蛋白抗体的细胞。可以对患者样品的IgG+记忆B细胞进行扩增并诱导其分化成IgG分泌细胞,进而对其高亲和力靶标(存活蛋白肽)结合筛选。还可以将细胞用于产生杂交瘤。采用PIPE方法通过RT-PCR可以从分离的细胞中克隆出抗体基因的可变区(Dodev TS等人, (2014) *Scientific Reports* 4,5885. doi:10.1038/srep058853)。可以从这些分子构建出重组人mAb、人源化mAb或嵌合mAb并将其表达出来,可以在功能和结合亲和力测定中并且针抗肿瘤活性进行筛选。在这方面,我们已经能够在临床研究中通过ELISA检测一些患者的特异性抗体。可以将样品冷冻以备以后用于分离记忆B细胞。

[0058] 本公开的抗体可以是全部免疫球蛋白分子,例如多克隆抗体或单克隆抗体,或者可以是其抗原结合片段,包括但不限于Fab、F(ab')、F(ab')2、Fv、dAb、Fd、CDR片段、单链抗体(scFv)、二价单链抗体、单链噬菌体抗体、双抗体、纳米抗体等。抗体的片段可以以合成方式产生或通过酶促或化学裂解完整免疫球蛋白来产生,或者可以通过重组DNA技术对其进行基因工程改造。这些技术在本领域中是众所周知的。

[0059] 在一个实施方案中,本公开提供了分离的抗体。术语“分离的”是指抗体或其片段是从其天然环境中分离和/或回收的。从其天然环境中分离出抗体可以使得抗体在使用时免受通常存在于其天然环境中的其它活性剂(诸如其它蛋白质)的干扰。

[0060] 在一个实施方案中,本公开提供了产生和分离响应于将存活蛋白或存活蛋白肽引入到骆驼体内而由该骆驼产生的单域抗体或纳米抗体。纳米抗体通常是重链抗体,因此含有重链同源二聚体而不含抗体轻链。这些抗体通常包含单个可变结构域和两个恒定结构域(CH2和CH3)。

[0061] 本公开的抗体可以从人或非人动物获得。在许多哺乳动物中,完整的免疫球蛋白具有两条重链和两条轻链。每条轻链通过二硫键与重链共价连接。两条重链通过另外的二硫键相互连接。轻链通常具有一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)。重链也可以具有一个可变结构域(VH)。可变结构域含有互补决定区(CDR)。重链可以进一步具有三个或四

个恒定结构域 (CH1、CH2、CH3 和 CH4)。恒定结构域的可变性产生了多种同种型, 例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。

[0062] CDR主要负责与抗原的表位结合。从N末端开始顺序编号, 每条链的CDR通常被称为CDR1、CDR2和CDR3, 并且通常由特定CDR所处链标识。因此,  $V_H$  CDR3 (或VH-CDR3) 位于其所存在的抗体的重链的可变结构域中, 而 $V_L$  CDR1 (或VL-CDR1) 是其所存在的抗体的轻链的可变结构域中的CDR1。诸如, 结合存活蛋白或存活蛋白肽的抗体会具有特定的 $V_H$ 区和 $V_L$ 区序列, 并因此具有特定的CDR序列。具有不同特异性 (即对不同抗原具有不同结合位点) 的抗体具有不同的CDR。

[0063] 如本文所用的术语 $V_H$ 或VH是指免疫球蛋白重链的可变区, 包括Fv、scFv、dsFv或Fab的重链, 术语 $V_L$ 或VL是指免疫球蛋白轻链的可变区, 包括Fv、scFv、dsFv或Fab的轻链。

[0064] 术语“单克隆抗体”是指由B淋巴细胞的单个克隆所产生的抗体或者由已经将单个抗体的轻链和/或重链基因转染到其中的细胞所产生的抗体。通过本领域技术人员已知的方法来产生单克隆抗体, 例如通过融合骨髓瘤细胞与免疫脾脏细胞制备杂交抗体形成细胞。诸如, 可以用一种或多种存活蛋白肽为小鼠 (或其它合适的动物) 进行免疫接种, 然后可以收集腹水液样品。可对样品进行筛选并选择以开发一组单克隆抗体和相应的杂交瘤细胞株。可以分离或产生鼠 (或其它) 单克隆抗体, 然后如果需要对其进行人源化。

[0065] 本公开的抗体可以是任何类别的抗体。诸如, 本发明的抗体可以是抗体同种型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE。诸如, 抗体可以是IgG2b。如本文所用的术语“同种型”具体可以指由重链恒定区基因编码的抗体类别 (例如, 如IgG)。人免疫球蛋白恒定区的序列在本领域中是已知的, 并且可以从公共数据库获得, 例如美国国立医学图书馆的国家生物技术信息中心 (NCBI)。

[0066] 术语“嵌合抗体”是指具有来自一个物种 (例如人) 的框架残基和来自另一物种 (例如特异性结合存活蛋白的鼠抗体) 的CDR (通常赋予抗原结合) 的抗体。在嵌合抗体中, 重链和/或轻链的一些部分可以与来自特定物种的序列相同或同源, 而其它部分可以与来自不同物种的序列相同或同源。嵌合抗体通常表现降低的免疫原性和提高的稳定性。本领域已知的用于克隆鼠免疫球蛋白可变结构域的技术- 例如, 诸如参见Orlandi等人, Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:3833 (1989) 和Leung等人, Hybridoma 13:469 (1994)。作为嵌合抗体的示例, 可以将编码来源于除人以外的动物 (如小鼠、大鼠或鸡) 的抗体的轻链或重链可变结构域的多核苷酸与编码来源于人抗体的轻链或重链恒定结构域的多核苷酸连接, 以产生编码嵌合抗体的多核苷酸 (例如DNA)。嵌合抗体的示例包括包含SEQ ID NO:19和20的抗体, 和包含SEQ ID NO:20和21的抗体。

[0067] “人”抗体 (也称为“完全人”抗体) 是包括人框架区和来自单个或不同人免疫球蛋白的所有CDR的抗体。因此, 可以将来自一种人抗体的框架工程改造成包括来自不同人抗体的CDR。产生人抗体的方法是本领域已知的- 例如, 诸如参见Mancini等人, 2004, New Microbiol. 27:315-28; Conrad和Scheller, 2005, Comb. Chem. High Throughput Screen. 8: 117-26。

[0068] “人源化抗体”通常是具有一个或多个从非人来源导入其中 (即, 引入其中) 的氨基酸残基的人抗体。诸如, 人源化抗体是重组蛋白质, 在这种重组蛋白中将来自例如啮齿动物、兔子、狗、山羊或马的物种的抗体的CDR导入人重链可变结构域和轻链可变结构域。抗体

分子的恒定结构域(也称为框架区)通常与人抗体的恒定结构域相同。可以将提供CDR的非人免疫球蛋白称为“供体”，可以将提供框架的人免疫球蛋白称为“受体”。诸如，人源化免疫球蛋白中所有的CDR都可以来自供体免疫球蛋白。恒定区不需要总是存在，但如果它们存在，它们可以与人免疫球蛋白恒定区基本相同，即至少约85至90%、例如约95%或更高的同一性。人源化抗体与提供CDR的供体抗体结合相同的抗原。人源化免疫球蛋白或抗体的受体框架可以具有有限数量的取自供体框架的氨基酸取代。人源化单克隆抗体或其它单克隆抗体可以具有其它保守氨基酸的取代，其对抗原结合或其它免疫球蛋白功能基本上没有影响。可以通过基因工程改造的手段构建人源化免疫球蛋白(参见，诸如5,585,089号美国专利和2010/0196266号美国公开)。诸如，可以分离或产生鼠单克隆抗体，然后对其进行人源化。人源化抗体的示例包括包含具有SEQ ID N0:7至12序列的CDR的抗体和包含具有SEQ ID N0:13至18序列的CDR的抗体。

[0069] 通过酶消化可以产生抗体片段。诸如，用木瓜蛋白酶消化抗体产生了被称为“Fab”片段和“Fc”片段的两个相同抗原结合片段。Fab片段含有完整的L链、和H链的可变区结构域(VH)、以及一条重链的第一恒定结构域。每个Fab片段关于抗原结合都是单价的，即Fab片段具有单个抗原结合位点。用胃蛋白酶处理抗体产生单一大小的F(ab')2片段，F(ab')2片段大致对应于两个二硫键连接的具有二价抗原结合活性的Fab片段，并且F(ab')2片段能够交联抗原。“Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段，也被缩写为“sFv”或“scFv”的单链Fv是包含连接成单一多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。术语“双抗体”是指小抗体片段，小抗体片段是这样制备的：通过在VH和VL结构域之间用短接头构建sFv片段，从而实现V结构域的链间配对而不是链内配对，从而产生二价片段，即具有两个抗原结合位点的片段。单域抗体(sdAb)是具有单个单体可变抗体结构域的抗体片段。ScAb可以由骆驼中存在的重链抗体制成。抗体片段可以是单个可变区或者可以是由单个CDR组成或包含单个CDR的肽。单链抗体具有通过接头彼此线性连接的重链可变结构域和轻链可变结构域。通过将编码重链可变结构域的多核苷酸、编码接头的多核苷酸(通常10至20个核苷酸)和编码轻链可变结构域的多核苷酸结合可以产生编码单链抗体的多核苷酸(例如DNA)，其中重链可变结构域和轻链可变结构域二者都来源于人抗体。

[0070] 本发明的抗体可以是双特异性的或多特异性的。双特异性抗体(双抗体)是对抗原的至少两个不同表位(例如存活蛋白的两个不同表位)具有结合特异性的抗体。诸如，通过诸如依次连接编码重链可变区A的多核苷酸、编码轻链可变区B的多核苷酸、编码重链可变区B的多核苷酸和编码轻链可变区A的多核苷酸可以产生编码双特异性抗体的多核苷酸(例如DNA)。优选地，重链可变结构域和轻链可变结构域二者都来源于人抗体。

[0071] 本公开提供了SEQ ID N0:1至29所示序列的变体。诸如，变体可以与SEQ ID N0:1-27所公开序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0072] 本公开提供了经过转导而表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。本公开的CAR分子将基于抗体的存活蛋白特异性与T细胞受体活化的细胞内结构域组合以产生嵌合蛋白，该嵌合蛋白表现出特异性的抗存活蛋白并因此具有抗肿瘤细胞免疫活性。CAR分子可以包含重链可变区或轻链可变区的一个或多个CDR。本公开进一步提供了经过基因修饰而稳定表达CAR的T细胞。表达CAR的T细胞在本文中称为CAR T细胞或经CAR修饰的T细胞。诸如，可以对T细胞进行基因修饰以稳定表达CAR，该CAR将某种抗体(例如本文所述的单克隆抗体)的存活

蛋白识别结构域与CD3- $\zeta$ 链的胞内结构域组合成单一嵌合蛋白。

[0073] 作为示例,本公开提供了单克隆抗体,单克隆抗体可以是分离的单克隆抗体,分离的单克隆抗体特异性结合存活蛋白,存活蛋白可以是人存活蛋白。作为示例,提供了被命名为2C2的mAb和命名为H30(或30H3)的mAb。用于最终抗体测序和IgG纯化的mAb 2C2亚克隆被命名为2C2E7,而用于最终抗体测序和IgG纯化的mAb H30亚克隆命名为30H3D2。抗体包含重链可变区和轻链可变区。重链可变区包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,并且轻链可变区包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。作为示例,VH CDR1具有氨基酸序列TYGMS(SEQ ID NO:7),VH CDR2具有氨基酸序列WINPYSGVPTYAVDFKG(SEQ ID NO:8),VH CDR3具有氨基酸序列GGRRGDFGY(SEQ ID NO:9);并且VL CDR1具有氨基酸序列SASSSISYMH(SEQ ID NO:10),VL CDR2具有氨基酸序列DTSKLAS(SEQ ID NO:11),VL CDR3具有氨基酸序列HQRSSHHT(SEQ ID NO:12)。作为另一示例,VH CDR1具有氨基酸序列SYGMS(SEQ ID NO:13),VH CDR2具有氨基酸序列TISSGGSHTYPDSVRG(SEQ ID NO:14),VH CDR3具有氨基酸序列HPIYYYISSYAMDY(SEQ ID NO:15);VL CDR1具有氨基酸序列RSSQSLVHSTGNTYLH(SEQ ID NO:16),VL CDR2具有氨基酸序列KVSNRFS(SEQ ID NO:17),VL CDR3具有氨基酸序列SQSTHVPPT(SEQ ID NO:18)。

[0074] 本公开的抗体可以是具有VH CDR和/或VL CDR的抗体,VH CDR与SEQ ID NO:7、8、9所示序列具有1或2个不同氨基酸,VL CDR与SEQ ID NO:10、11、12所示序列具有1或2个不同氨基酸。本公开的抗体可以是具有VH CDR和/或VL CDR的抗体,VH CDR与SEQ ID NO:13、14、15所示序列具有1或2个不同氨基酸,VL CDR与SEQ ID NO:16、17、18所示序列具有1或2个不同氨基酸。

[0075] 本公开的抗体可以是重链可变区包含SEQ ID NO:19序列并且轻链可变区包含SEQ ID NO:20序列的抗体。在SEQ ID NO:19序列中,第1至19位氨基酸代表前导序列,第20至49位氨基酸代表框架区(FR)1,第50至54位氨基酸代表CDR1,第55至68位氨基酸代表FR2,第69至85位氨基酸代表CDR2,第86至117位氨基酸代表FR3,第118至126位氨基酸代表CDR3,第127至137位氨基酸代表FR4。在SEQ ID NO:20序列中,第1至22位氨基酸代表前导序列,第23至45位氨基酸代表FR1,第46至55位氨基酸代表CDR1,第56至70位氨基酸代表FR2,第71至77位氨基酸代表CDR2,第78至109位氨基酸代表FR3,第110至117位氨基酸代表CDR3,第118至127位氨基酸代表FR4。

[0076] 本公开的抗体可以是包含含有SEQ ID NO:21序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22序列的轻链可变区的抗体。在SEQ ID NO:21序列中,第1至19位氨基酸代表前导序列,第20至49位氨基酸代表FR1,第50至54位氨基酸代表CDR1,第55至68位氨基酸代表FR2,第69至85位氨基酸代表CDR2,第86至117位氨基酸代表FR3,第118至131位氨基酸代表CDR3,第132至142位氨基酸代表FR4。在SEQ ID NO:22序列中,第1至19位氨基酸代表前导序列,第20至42位氨基酸代表FR1,第43至58位氨基酸代表CDR1,第59至73位氨基酸代表FR2,第74至80位氨基酸代表CDR2,第81至112位氨基酸代表FR3,第113至121位氨基酸代表CDR3,第122至131位氨基酸代表FR4。

[0077] 本公开的抗体可以是包含含有SEQ ID NO:19序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20序列的轻链可变区的抗体或与其具有90%至99%序列同一性的变体。本公开的抗体可以是包含含有SEQ ID NO:21序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22序列的轻链可变区的抗体或与其具有90%至99%序列同一性的变体。抗体可以是包含重链可变区和/或轻链

可变区的抗体或与其具有90%至99%序列同一性的变体,重链可变区包含SEQ ID NO:19中排除前导序列(即,排除第1至19位氨基酸)的剩余序列,轻链可变区包含SEQ ID NO:20中排除前导序列(即,排除第1至22位氨基酸)的剩余序列。本公开的抗体可以是包含重链可变区和/或轻链可变区的抗体或与其具有90%至99%序列同一性的变体,重链可变区包含SEQ ID NO:21中排除前导序列(即,排除第1至19位氨基酸)的剩余序列,轻链可变区包含SEQ ID NO:22中排除前导序列(即,排除第1至19位氨基酸)的剩余序列。

[0078] 本公开的抗体可以是包含重链可变区和/或轻链可变区的抗体,重链可变区含有与SEQ ID NO:19具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且重链可变区包含具有SEQ ID NO:7序列的CDR1、具有SEQ ID NO:8序列的CDR2和具有SEQ ID NO:9序列的CDR3,而轻链可变区含有与SEQ ID NO:20具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且轻链可变区包含具有SEQ ID NO:10序列的CDR1、具有SEQ ID NO:11序列的CDR2和具有SEQ ID NO:12序列的CDR3。

[0079] 本公开的抗体可以是包含重链可变区和/或轻链可变区的抗体,重链可变区含有与SEQ ID NO:21具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且重链可变区包含具有SEQ ID NO:13序列的CDR1、具有SEQ ID NO:14序列的CDR2和具有SEQ ID NO:15序列的CDR3,而轻链可变区含有与SEQ ID NO:20具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且轻链可变区包含具有SEQ ID NO:16序列的CDR1、具有SEQ ID NO:17序列的CDR2和具有SEQ ID NO:18序列的CDR3。

[0080] 本公开的抗体可以是包含重链可变区和轻链可变区的嵌合抗体、人抗体或人源化抗体,该重链可变区包含分别具有SEQ ID NO:7、8和9序列的CDR1、CDR2和CDR3,而该轻链可变区包含分别具有SEQ ID NO:10、11和12序列的CDR1、CDR2和CDR3;或包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含分别具有SEQ ID NO:13、14和15序列的CDR1、CDR2和CDR3,而该轻链可变区包含分别具有SEQ ID NO:16、17和18序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0081] 本公开还提供了分离的核苷酸序列,其编码存活蛋白特异性抗体的全部或部分重链可变区的。诸如,本公开提供了分离的核酸分子,其包含SEQ ID NO:23或25的序列。本公开分离的核苷酸分子可以编码存活蛋白特异性抗体的全部或部分轻链可变区。诸如,分离的核酸分子可以包含SEQ ID NO:24或26的序列。核酸分子的变体可与重链可变区的SEQ ID NO:23或25序列或与轻链可变区的SEQ ID NO:24或26序列具有至少90%至至少99%同一性。

[0082] 本公开还提供了分离的核酸分子,其包含编码识别存活蛋白表位的一个或多个CDR的序列或由编码识别存活蛋白表位的一个或多个CDR的序列组成-例如,诸如编码SEQ ID NO:7至18的序列。核酸分子可以由SEQ ID NO:7至18中任一序列组成,或者核酸分子可以包含SEQ ID NO:7至18的一个或多个序列,并且还包含另外的1至50个核苷酸-通常位于序列的侧面。

[0083] 本公开提供了包含编码本文提供的抗体(包括mAb)或其存活蛋白结合片段的表达载体或其它多核苷酸序列的细胞。利用任何合适的表达载体可以表达编码mAb或其存活蛋白结合片段的核苷酸序列,其中许多表达载体是本领域已知的和/或可商购获得的。载体通

常包括核酸序列,例如能够使其在宿主细胞中复制的复制起点。载体也可以包含选择性标志物基因。重链和轻链可以表达于单个表达载体,例如质粒,或者重链和轻链可以在相同细胞中表达于不同质粒,之后表达出的重链和轻链可以形成常规的mAb结构。考虑到本公开的益处,采用常规技术可以分离和/或纯化mAb或其存活蛋白结合片段。

[0084] 分离的单克隆抗体或其片段可以用例如酶促、荧光或放射性标签进行标记,或者可以将其与效应分子例如诸如毒素缀合。

[0085] 本公开提供了包含抗体或其片段和药学上合适的载体的药物组合物。合适的载体包括在所用剂量和浓度下对接受者无毒的辅料或稳定剂,并包括缓冲剂如乙酸盐、Tris、磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲铵;苯扎氯铵、苯索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂例如EDTA;张力调节剂例如海藻糖和氯化钠;糖类例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;表面活性剂例如聚山梨酸酯;成盐抗衡离子例如钠;和/或非离子表面活性剂例如吐温或聚乙二醇(PEG)。药物组合物可以包含其它治疗剂。

[0086] 本公开的组合物可以包含一种类型的单克隆抗体或多于一种类型的单克隆抗体。本公开的组合物可以含有一种或多种抗体或者其片段或变体。组合物可以含有单克隆抗体和多克隆抗体。组合物可以包含一种或多种抗体亚型。诸如,组合物可以包含IgG或IgM的混合物或IgG1、IgG2和IgG2b中的一种或多种的混合物。本公开的组合物可以包含作为唯一活性成分的抗体,其中抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人抗体、人源化抗体或其组合。“活性成分”是指该成分通过抑制肿瘤生长而具有抗肿瘤作用。

[0087] 本公开的药物组合物可以包含每种抗体或所有抗体的浓度在0.1mg/ml至100mg/ml、1mg/ml至10mg/ml、1mg/ml至50mg/ml、1mg/ml至100mg/ml、10mg/ml至100mg/ml或50mg/ml至100mg/ml范围的一种或多种抗体。诸如,本公开的药物组合物可以包含至少或约0.1mg/ml、至少或约1mg/ml、至少或约5mg/ml、至少或约10mg/ml、至少或约50mg/ml、至少或约100mg/ml的抗体。

[0088] 可以通过本领域已知的常规方法施用本公开的组合物。例如,可以通过静脉内、肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、经口、局部或吸入途径而施用包含抗体或其片段的组合物,或通过大脑内或脊髓内对流增强的递送或直接瘤内注射而施用包含抗体或其片段的组合物。可以在靶标部位(例如肿瘤处或肿瘤内)直接肠道外施用抗体。可以按单次施用或按多次施用来引入组合物,并且可以在一段时间内以连续方式引入组合物。在一个实施方案中,可以每日施用组合物,持续至少2天的时间,例如,诸如2至30天(以及其间的所有时间)的时间。在一个实施方案中,每天施用组合物,持续7至10天。可选地,可以以所需的间隔(例如每2、3、4、5天等)施用组合物。

[0089] 本领域技术人员将认识到,本发明方法中采用的特定给药方案的形式和特征将由施用途径和其它众所周知的变量(例如个体的大小和疾病的阶段)决定。此外,可以以单位剂量的形式提供组合物,用于向需要治疗的个体施用。可以将抗体提供为施用前被重构的冻干形式。重构培养基可以是无菌0.9%盐溶液或合适的生理缓冲液或水,或本领域已知的

用于施用前使蛋白质重构的任何其它溶液。

[0090] 本公开还提供了可用于向需要治疗的个体施用的试剂盒。诸如，试剂盒可以包括一种或多种可以是冻干形式的抗体，任选地包括重构培养基和施用说明书。试剂盒可以包含单剂量或多剂量。

[0091] 本公开提供了用于治疗肿瘤的方法，例如包含表达存活蛋白细胞的肿瘤。这样的肿瘤在本文中可以被称为“表达存活蛋白的肿瘤”。术语“治疗”是指使与正在治疗的特定病症的存在相关的一种或多种症状或特征减轻。治疗并不一定意味着完全缓解，也不排除重现(recurrence)或复发(relapses)。诸如，本公开提供了使肿瘤尺寸减小或使肿瘤生长停滞或使肿瘤(例如包含表达存活蛋白细胞的肿瘤)生长速率降低或使与患有肿瘤的个体相关的任何其它症状减轻的方法-所有这些方法都被认为是“治疗”-包括向需要治疗的个体施用治疗有效量的包含如本文所述的抗体或其片段的组合物。在一个实施方案中，该方法是被动免疫的方法。

[0092] 可由本公开组合物治疗的肿瘤的示例包括但不限于神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、多发性骨髓瘤、黑素瘤、脑膜瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤、结肠癌、胰腺癌、肝癌、肾癌、恶性间叶肿瘤等。

[0093] 可以结合将存活蛋白肽用作疫苗来实施本发明的方法。可以在施用其它疗法之前、同时或之后施用本发明的组合物。

[0094] 一方面，本公开提供了包含分离的抗体的组合物，分离的抗体对存活蛋白的一个或多个表位具有反应活性，其中分离的抗体或其抗原结合片段与存活蛋白的一个或多个表位结合。响应于施用具有序列ENEPDLAQMFDCFKELEGWEPDD (SEQ ID NO:2) 的肽或其片段(例如SEQ ID NO:4)可以产生抗体，其中片段具有SEQ ID NO:2中9至23个(包括其间的所有整数)连续氨基酸，其中肽包含QMFFCF (SEQ ID NO:3)的核心序列。组合物可以是这样的，即只有存在的一种或多种抗体是响应于施用存活蛋白肽而产生的分离的一种/多种抗体抗体。该组合物可以含有其它蛋白质，例如载体蛋白质。抗体可以是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体、或单链抗体、或多特异性抗体。

[0095] 可以通过常规方法例如诸如ELISA来测量抗体对特定抗原的反应活性。反应活性是结合亲和力的指标。也可以通过抗原/抗体解离速率或竞争性放射免疫测定法等来测量结合亲和力。抗体与抗原的特异性结合意味着抗体以高亲和力结合抗原并且不与不相关的抗原特异性结合。

[0096] 一方面，本公开提供了被动免疫的方法，其包括向需要治疗的个体施用治疗有效量的组合物，该组合物包含一种或多种响应于施用具有序列ENEPDLAQMFDCFKELEGWEPDD (SEQ ID NO:2) 的肽或其片段(例如SEQ ID NO:4)而产生的抗体，其中片段具有SEQ ID NO:2中9至23个(包括其间的所有整数)连续氨基酸，其中肽包含QMFFCF (SEQ ID NO:3)的核心序列，从对象(人或非人)中分离出响应于施用上述肽或其片段而产生的抗体，将这些抗体培育在杂交瘤上清液中，或者这些抗体可以是利用分离的抗体序列进行过工程改造的抗体。

[0097] 以下示例旨在说明而非意图限制。

[0098] 示例1

[0099] 本示例描述了证明抗存活蛋白抗体对肿瘤生长影响的动物研究。

[0100] 给小鼠施用DLAQMFVCFKELEGW-钥孔血蓝蛋白 (KLH) (SurVaxM) (SVN53-67/M57-KLH) (SEQ ID NO:4) 作为免疫接种。给小鼠皮下注射100 $\mu$ g肽。每7天为小鼠重复免疫接种一次,持续28天的时间。最终免疫接种后两周,通过CO<sub>2</sub>窒息使小鼠安乐死,并通过心脏穿刺收集血液。使血液凝固并以10,000 $\times$ g离心以产生澄清的血清。将存活蛋白抗血清用于对肿瘤植入模型小鼠进行被动免疫。

[0101] 利用颅内肿瘤模型、皮下肿瘤模型来显示抗存活蛋白抗体对抗肿瘤生长的功效。颅内研究采用植入有1 $\times$ 10<sup>5</sup>个GL261神经胶质瘤细胞的麻醉C57BL/6小鼠,其中利用穿过相对于作为解剖参考点的前囟颅骨缝前方1mm且侧方2mm位置处的颅内钻孔的26号针头推进到3mm深度来植入1 $\times$ 10<sup>5</sup>个GL261神经胶质瘤细胞。3天后,将小鼠随机分组并注射10 $\mu$ g抗存活蛋白抗体或10 $\mu$ g正常IgG作为对照。在20天的时间内每5天施用一次抗体,总共给药4次。密切观察小鼠神经功能缺陷症状作为肿瘤生长的指标,并按照既定标准处死小鼠。数据以存活率表示,并以Kaplan-Meier曲线示出,p<0.0001。

[0102] 利用23号皮内用针头在右侧胁腹皮下植入1 $\times$ 10<sup>6</sup>个GL261神经胶质瘤细胞来建立皮下肿瘤模型。允许肿瘤生长7天直到它们达到约2mm直径。然后在第7天给小鼠施用100 $\mu$ g SurVaxM (SVN53-67/M57-KLH) 存活蛋白疫苗;或50 $\mu$ l从先前已经施用了SurVaxM的小鼠获得的小鼠血清形式的抗存活蛋白抗体,或者10 $\mu$ g来源于接受SurVaxM存活蛋白疫苗或对存活蛋白具有反应活性的单克隆抗体的非荷瘤小鼠集合的mAb(抗体)。在28天的时间内每7天进行重复施用治疗,共给药4次。每天测量肿瘤并利用公式“V=XY2/2”计算体积。密切观察小鼠60天。数据显示为群体(combined)肿瘤体积(图1)和个体肿瘤进展(图2),p<0.0001。SurVaxM疫苗是指其中肽含有序列DLAQMFVCFKELEGW (SEQ ID NO:4) 的疫苗。

[0103] 这些研究的结果如下。如图1所示,在具有GL261神经胶质瘤的颅内胶质瘤模型C57BL/6小鼠中,在肿瘤植入后每7天施用抗存活蛋白抗体一次,接受抗存活蛋白抗体的小鼠比对照显著存活更长时间。所用的IgG是正常小鼠非特异性IgG。图2显示了具有GL261神经胶质瘤的C57BL/6小鼠的皮下肿瘤模型。在肿瘤植入后每7天给小鼠施用一次所示的治疗。与颅内研究类似,接受纯化的mAb或抗血清的小鼠具有显著小于对照的肿瘤,并且显示出所观察到的抗肿瘤作用是由活性疫苗本身所引起的。图3显示了具有GL261神经胶质瘤的C57BL/6小鼠的皮下肿瘤模型。在肿瘤植入后每7天给小鼠施用一次所示的治疗。SurVaxM是存活蛋白疫苗;抗存活蛋白血清(抗体)来源于接受活性SurVaxM疫苗的非荷瘤小鼠集合。数据显示了50天内个体肿瘤生长。(每组n=4)

[0104] 这些数据表明施用存活蛋白抗体对于减小肿瘤体积和延长存活时间是有效的。

[0105] 示例2

[0106] 本示例描述了单克隆抗体的产生和抗体抑制肿瘤生长的影响。

[0107] 方法:

[0108] 细胞株和培养条件:GL261鼠神经胶质瘤细胞和B16f1鼠黑素瘤细胞株生长于37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下、含有10%胎牛血清、5,000单位青霉素/链霉素、50 $\mu$ M 2-巯基乙醇、25mM HEPES和1 $\times$ 非必需氨基酸的完全Dulbecco's改良伊格尔培养基(DMEM)的100-mm组织培养板上,每周更换2至3次培养基。

[0109] 肽:利用Fmoc化学和固相载体树脂(Genscript, Piscataway, NJ)合成肽。在使用前将每种肽储存在-20°C并稀释在DMSO中。抗原序列1:DLAQMFVCFKELEGW (SEQ ID NO:4);抗原

序列2: DLAQCFFCFKELEGW (SEQ ID NO:27) ; 免疫原: 肽(批号:614429-1) -KLH缀合物。

[0110] 为小鼠免疫接种以产生抗体: 每轮抗体生产使用10只小鼠。采用5只Balb/c小鼠和5只C57B1/6小鼠产生针对抗原1 (SVN53-67/M57) 具有反应活性的抗血清。用免疫原: 肽-KLH缀合物 (SVN53-67/M57-KLH) 对小鼠进行免疫接种。4轮免疫接种后获得血清样品。通过间接ELISA分析确认对存活蛋白具有反应活性的抗血清后, 选择测试为阳性的鼠用于杂交瘤生产。使每只反应活性小鼠的细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合来产生一些杂交瘤细胞株。进一步分离出在这些细胞株中的2个亚克隆并对其进行表征。

[0111] 间接ELISA检测抗体反应活性: 用1 $\mu$ g/ml包被抗原: A: (SVN53-67/M57) DLAQMFFCFKELEGW (SEQ ID NO:4) 或B: (野生型SVN53-67) DLAQCFFCFKELEGW (SEQ ID NO:27) 的磷酸盐缓冲盐溶液 (pH 7.4) 以100 $\mu$ l/孔包被96孔ELISA板。将鼠抗血清或杂交瘤细胞培养上清液以100 $\mu$ l/孔施加到经过包被的ELISA板中并进行孵育。然后加入第二抗体: 过氧化物酶-亲和纯 (AffiniPure) 山羊抗-小鼠IgG、Fc $\gamma$ , 然后进行标准检测。

[0112] 杂交瘤测序: 按照TRIzol®试剂 (Ambion, 目录号:15596-026) 的技术手册从杂交瘤细胞中分离总RNA。通过琼脂糖凝胶电泳分析总RNA。按照PrimeScript™第一链cDNA合成试剂盒 (Takara, 目录号:6110A) 的技术手册, 采用同种型特异性反义引物或通用引物将总RNA逆转录为cDNA。根据GenScript的RACE标准操作程序扩增VH和VL的抗体片段。利用标准分子克隆程序将经过扩增的抗体片段分别克隆到标准克隆载体中。进行菌落PCR筛选以鉴定具有正确大小的插入片段的克隆。对每个抗体片段的不少于5个具有正确大小的插入片段的单菌落进行测序。具有正确大小的VH和VL插入片段的五个单菌落被送去测序。发现五种不同克隆的VH和VL基因几乎相同。共有序列被认为是所产生抗体的序列。

[0113] 测量患者血清抗体: 收集患者血清并储存在-80℃。在预包被的ELISA板 (平底, Nunc) 上, 一式三份地将系列稀释的澄清血清施加于未缀合的存活蛋白肽、游离KLH和随机肽 (20 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/孔)。将样品在4℃下过夜孵育并洗涤 (PBS, 1% BSA)。加入HRP缀合的抗人IgG检测抗体 (Bio-Rad), 在25℃下保持1小时。将ELISA板洗涤4次, 在室温下加入TMB比色溶液 (Biolegend) 并显色15分钟, 并在Bio-Rad自动读板器中450nm下读数。

[0114] 为小鼠免疫接种用于肿瘤生长研究: 用100 $\mu$ l抗SVN53-67/M57杂交瘤上清液或10 $\mu$ g纯化的单克隆抗体进行小鼠主要研究的论证。首先以颅内或皮下方式对小鼠植入鼠GL261胶质瘤细胞或B16f1鼠黑素瘤细胞。在肿瘤植入后4天, 小鼠接受腹腔注射抗体, 每周一次重复进行, 最多5周, 并密切观测肿瘤生长。

[0115] 脑内注射GL261肿瘤细胞并进行存活分析: 将雄性C57BL/6小鼠 (Charles River, Horsham, PA) 用气体异氟烷麻醉并固定在头部立体定位架 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) 中。做一个中线头皮切口, 并确定前囟。测量立体定向坐标 (相对于前囟的侧向2.0mm前侧1.2mm), 以将细胞植入到深额叶白质。在此处钻一个钻孔, 将悬浮于2.5 $\mu$ l DMEM中的 $1\times 10^5$ 个GL261细胞通过具有固定式25号针头的汉密尔顿注射器注射到相对于硬脑膜的3.0mm深度。以1 $\mu$ l/min进行注射。拔出针头并缝合切口。绘制Kaplan-Meier存活图, 并确定所有组的中位存活时间。每组n=8只小鼠。

[0116] 皮下肿瘤生长研究: 将 $2\times 10^7$ 个G1261细胞或 $1\times 10^6$ 个B16f1细胞的100 $\mu$ l PBS的悬液注射到雄性C57B1/6 (免疫功能正常) 小鼠 (Charles River, Horsham, PA) 经过剃刮的右侧胁腹皮下以及裸 (免疫功能低下) 小鼠NCr-*nu/nu* (Charles River, Horsham, PA)。每天用卡

尺测量肿瘤生长，并根据公式 $V = (a \cdot (b^2)) / 2$ 计算体积，其中V是体积，而a和b是肿瘤的垂直直径。数据呈现为随时间推移的肿瘤生长以及比较平均肿瘤体积。在所示呈现的各种研究中，每组n=4、5或10只小鼠。

[0117] 结果：

[0118] 利用经过修饰的存活蛋白肽，即SEQ ID NO:4，来产生杂交瘤。给10只小鼠施用15 $\mu$ g/ml的包含SEQ ID NO:4的肽的肽疫苗。其中在9只小鼠中产生了抗存活蛋白滴度。生成了几种杂交瘤细胞株，其产生了对SEQ ID NO:4的肽和存活蛋白肽DLAQCFCCFKELEGW (SEQ ID NO:27) 具有反应活性的抗体，该存活蛋白肽序列与人存活蛋白的一部分相同。在杂交瘤中，特别选择了两个用于进一步表征。这些被称为2C2和30H3。从这些杂交瘤中，对每个克隆分别进行了进一步表征。这些分别被称为2C2E7和30H3D2。发现2C2E7具有同种型IgG2b，发现30H3D2具有同种型IgG1。因此，对具有正确大小的重链可变区和轻链可变区插入片段的几个单菌落进行了测序。发现这些序列几乎相同并产生共有序列。在SEQ ID NO:19和20中分别提供了mAb 2C2E7的重链可变区和轻链可变区的共有氨基酸序列。在SEQ ID NO:21和22中分别提供了mAb 30H3D2的重链可变区和轻链可变区的共有氨基酸序列。在SEQ ID NO:23、24、25和26中分别提供了SEQ ID NO:19、20、21和22的氨基酸序列的相应核苷酸序列。

[0119] 来自抗体2C2E7的重链可变区的共有氨基酸序列如下所示：

[0120] MGWLWNLLFLMAAAQSAQAIQLVQSGPELKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSWVKQAPGRGLKWMG WINPYSGVPTYAVDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARGGRRGDFGYWGQGTTLVSS (SEQ ID NO:19)。

[0121] 来自抗体2C2E7的轻链可变区的共有氨基酸序列如下所示：

[0122] MDFQVQIFSFLLISASVILSSGQIGLTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSSISYMHWYQQKPGTSPKTW IYDTSKLASGVPARFSGSGSGTYSLSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSHHTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:20)。

[0123] 来自抗体30H3D2的重链可变区的共有氨基酸序列如下所示：

[0124] MNFGLSLIFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRLTPDKRLEWVA TISSGGSHTYYPDPSVRGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHPIYYYISSYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:21)。

[0125] 来自抗体30H3D2的轻链可变区的共有氨基酸序列如下所示：

[0126] MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQTPLSPVSLGDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSP KLLIYKVSNRFSGPDRFGGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:22)。

[0127] 编码mAb 2C2E7的SEQ ID NO:19所示的重链可变区的氨基酸的核苷酸序列如下所示：

[0128] ATGGGTTGGCTGTGAACTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCAAAGTGCCAAGCACAGATCCAGTT GGTACAATCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTCTGGGTATACCTTC ACAACCTATGGAATGAGCTGGGTGAAACAGCCTCCAGGAAGGGTTAAAGTGGATGGCTGGATAAACCCCTACT CTGGAGTGCCAACATATGCTGTTGACTTCAAGGGACGGTTGCCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCATA TTTGCAGATCAACAACCTAAAAATGAGGACACGGCTACATATTCTGTGCAAGAGGAGGGCGGAGGGGGACTTT GGCTACTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:23)。

[0129] 编码mAb 2C2E7的SEQ ID NO:20所示的轻链可变区的氨基酸的核苷酸序列如下所

示：

[0130] ATGGATTTCAGGTGCAGATTCAGCTTCAGCTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATACTGTCCAGCGGACA  
AATTGGTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACCATGACCTGCAGTGCCAGC  
TCAAGTATAAGTTACATGCATTGGTACCCAGCAGAAGGCCAGGCACCTCCCCAAAACATGGATTATGACACATCCA  
AACTGGCTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACCTCTTATTCTCTACAATCAGCAGCAT  
GGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCATCAGCGGAGTAGTCACCACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTG  
GAAATAAAA (SEQ ID NO:24)。

[0131] 编码mAb 30H3D2的SEQ ID NO:21所示的重链可变区的氨基酸的核苷酸序列如下所示：

[0132] ATGAACCTCGGGCTCAGCTGATTTCTGCCCTTATTTAAAAGGTGTCAGTGTGAGGTGCAGCT  
GGTGGAGTCTGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTC  
AGTAGCTATGGCATGTCTGGGTCGCCTGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGTCGCAACCATTAGCAGTGGTG  
GTAGTCACACCTACTATCCAGACAGTGTGAGGGGGCGATTCAACCCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTA  
CCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACACCCAATTATTACTACATT  
AGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:25)。

[0133] 编码mAb 30H3D2的SEQ ID NO:22所示的轻链可变区的氨基酸的核苷酸序列如下所示：

[0134] ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCCCTGCTCCAGCAGTGATGTTGTGAT  
GACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTGCAGATCTAGTCAGAGCCTT  
GTACACAGTACTGGAAACACCTATTACATTGGTACCTGCGAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACA  
AAGTTCCAACCGATTCTGGGTCCCAGACAGGTCGGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGAT  
CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCCTCGACGTTGGTGG  
GGCACCAAGCTGGAAATCAA (SEQ ID NO:26)。

[0135] 测试抗体对用于为动物免疫接种的肽 (SEQ ID NO:4) 和对来自人存活蛋白的序列 (SEQ ID NO:27) 的结合。15ng/ml抗体浓度的2C2E7足以结合经过修饰的存活蛋白肽 (SEQ ID NO:4) , 测试出OD值为1.019; 并且足以结合野生型存活蛋白肽 (SEQ ID NO:27) , 测试出OD值为0.891。2C2E7在其信号与空白比率>2:1的最高稀释度下的滴度为1:512,000, 与高亲和力抗体的预期滴度一致。此外, 30ng/ml抗体浓度的30H3D2足以结合经过修饰的存活蛋白肽 (SEQ ID NO:4) , 测试出OD值为1.021; 并且足以结合野生型存活蛋白肽 (SEQ ID NO:27) , 测试出OD值为0.874。30H3在其信号与空白比率>2:1的最高稀释度下的滴度为1:512,000, 与高亲和力抗体的预期滴度一致。

[0136] 然后将抗体用于动物模型以确定对肿瘤生长的影响。动物模型与示例1中所用的动物模型相同。结果显示在图4至11中。2C2和H30抗存活蛋白抗体的研究在皮下鼠肿瘤模型中进行。使可植入肿瘤建立 (establish) 在小鼠中, 然后开始用2C2、H30或非特异性IgG对它们进行治疗, 每5至7天一次持续30天的时间。采用两种宿主小鼠品系, 图4、6、8、10中的NCr-nu/nu (裸鼠) 和图5、7、9、11中的C57B1/6小鼠。裸鼠代表抗体活性预计会特别依赖于无免疫系统支持下抗体与靶标直接结合的免疫功能低下模型。C57B1/6小鼠代表抗体可受益于还有免疫支持机制 (例如巨噬细胞、树突细胞和T细胞) 参与的免疫功能正常模型。当用2C2或H30抗体治疗时, 图4至7中的B16黑素瘤和图8至11中的GL261神经胶质瘤细胞都显示出对

C57B1/6(免疫功能正常)模型的生长抑制作用(图5、7),而对裸鼠(免疫功能低下)模型的生长抑制作用程度较小(图4、6)。该观察结果表明在C57B1/6小鼠中的抗体依赖性应答明显是免疫功能介导的(图5、7、9、11),而这种抗体依赖性应答在裸鼠中并没有因为缺乏免疫支持而被完全消除(图4、6、8、10)。在免疫功能低下模型(图4、6、8、10)中,仍然存在的抗体依赖性生长抑制作用充分暗示了与抗体本身无关的额外免疫系统或抗体本身具有直接生长抑制性组分。观察到罗斯韦尔帕克癌症学会(Roswell Park Cancer Institute)主持的SurVaxM(SVN53-67/M57-KLH)(SEQ ID NO:4(FDA批准的/I171010))临床I期试验中招募的神经胶质瘤患者在其接受临床试验方案期间表现出对SurVaxM肽意想不到的抗体应答。本文中示出了产生具有反应活性的抗血清的8名患者,该反应活性抗血清对由SEQ ID NO:27的氨基酸组成的野生型存活蛋白肽和由SEQ ID NO:4的氨基酸组成的经过修饰的存活蛋白肽都有反应活性,SEQ ID NO:4也包含在用于免疫接种的15个氨基酸的肽序列中。这些抗体可用于治疗目的。

[0137] 尽管已经利用具体实施方案和示例描述了本公开,但是常规修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的,并且这样的修改意图在本公开和权利要求的范围内。

## 序列表

<110> 健康研究公司  
<120> 用于癌症治疗的抗存活蛋白抗体  
<130> 003551.00664  
<150> 62/214, 242  
<151> 2015-09-04  
<160> 27  
<170> PatentIn 版本 3.5  
<210> 1  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 1

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
1 5 10 15

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp  
20

[0001]

<210> 2  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 突变蛋白  
<400> 2

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
1 5 10 15

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp  
20

<210> 3  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 蛋白质片段  
<400> 3

Gln Met Phe Phe Cys Phe  
1 5

<210> 4  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 蛋白质片段

<400> 4

Asp Leu Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp  
1 5 10 15

<210> 5  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 蛋白质片段

<400> 5

[0002]

Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
1 5 10

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 蛋白质片段

<400> 6

Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
1 5

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗体序列

<400> 7

Thr Tyr Gly Met Ser  
1 5

<210> 8  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗体序列

<400> 8

Trp Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Val Asp Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

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

[0003] <220>  
<223> 抗体序列

<400> 9

Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Gly Tyr  
1 5

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

<220>  
<223> 抗体序列

<400> 10

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met His  
1 5 10

<210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗体序列

<400> 11

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 12

His Gln Arg Ser Ser His His Thr  
1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

[0004]

<400> 13

Ser Tyr Gly Met Ser  
1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 14

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Arg  
1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗体序列

&lt;400&gt; 15

His Pro Ile Tyr Tyr Tyr Ile Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗体序列

&lt;400&gt; 16

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

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0005]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗体序列

&lt;400&gt; 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗体序列

&lt;400&gt; 18

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr  
1 5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 137

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗体序列

&lt;400&gt; 19

Met	Gly	Trp	Leu	Trp	Asn	Leu	Leu	Phe	Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Gln	Ser
1				5					10					15	

Ala	Gln	Ala	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys
				20				25				30			

Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
				35			40					45			

Thr	Thr	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu
				50			55			60					

Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Thr	Tyr	Ala
65				70					75				80		

Val	Asp	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser
				85				90				95			

[0006]

Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr
				100				105				110			

Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Arg	Arg	Gly	Asp	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly
				115			120					125			

Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser						
130					135									

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 127

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗体序列

&lt;400&gt; 20

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser
1				5					10				15		

Val	Ile	Leu	Ser	Ser	Gly	Gln	Ile	Gly	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile
				20			25				30				

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser  
50 55 60

Pro Lys Thr Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg  
100 105 110

Ser Ser His His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

<210> 21

<211> 142

<212> PRT

[0007] <213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 21

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly  
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys  
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Leu Thr Pro Asp Lys Arg Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Pro  
65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85

90

95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ile Tyr Tyr Tyr Ile Ser Ser Tyr Ala  
 115 120 125

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

<210> 22

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 22

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
 1 5 10 15

[0008]

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu  
 35 40 45

Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys  
 100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu  
 115 120 125

Glu Ile Lys  
130

<210> 23  
<211> 411  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗体基因序列

<400> 23  
atgggttggc tgtggaactt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60  
atccagttgg tacaatctgg acctgagctg aagaaggctg gagagacagt caagatctcc 120  
tgcaaggctt ctgggtatac cttcacaacc tatggaatga gctgggtgaa acaggctcca 180  
ggaaggggtt taaagtggat gggctggata aaccctact ctggagtgcc aacatatgt 240  
gttgacttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300  
cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag aggagggcgg 360  
agggggact ttggctactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 411

[0009]

<210> 24  
<211> 381  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗体基因序列

<400> 24  
atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaatac gtgcctcagt catactgtcc 60  
agcggacaaa ttggcttcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatactcc agggagaag 120  
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt ataagttaca tgcattggta ccagcagaag 180  
ccaggcacct cccccaaaac atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtccct 240  
gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttatttctc tcacaatcag cagcatggag 300  
gctgaagatg ctgccactta ttactgccat cagcggagta gtcaccacac gttcggaggg 360  
gggaccaagc tggaaataaa a 381

<210> 25  
<211> 426  
<212> DNA  
<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗体基因序列

&lt;400&gt; 25

atgaacttcg ggctcagctt gatttcctt gcctttattt taaaagggtgt ccagtgttag	60
gtgcagctgg tggagctctgg gggagactta gtgaaggctg gagggccctt gaaactctcc	120
tgtcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg cctgactcca	180
gacaagaggc tggagtggtt cgcaaccatt agcagtggtg gtagtcacac ctactatcca	240
gacagtgtga gggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg	300
caaattgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acacccaatt	360
tattactaca tttagtagcta tgctatggac tactgggtc aaggaacctc agtcaccgtc	420
tcctca	426

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

[0010]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗体基因序列

&lt;400&gt; 26

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttccctgttc cagcagtgtat	60
gttgtatgtatcc cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc	120
tcttcagat ctagtcagag cttgtacac agtactggaa acacctattt acattggtag	180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagttccaa ccgattttct	240
ggggtcccag acaggttcgg tggcagtggta tcagggacag atttcacact caagatcagc	300
agagtgaggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tggcctccg	360
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa	393

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 27

Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp			
1	5	10	15

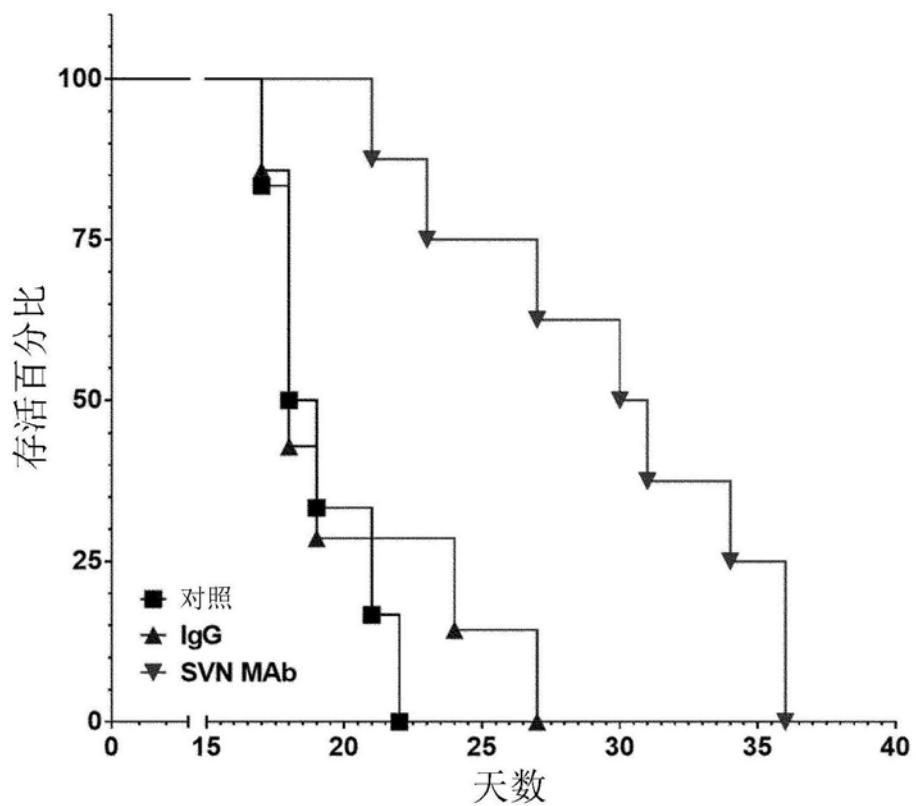


图1

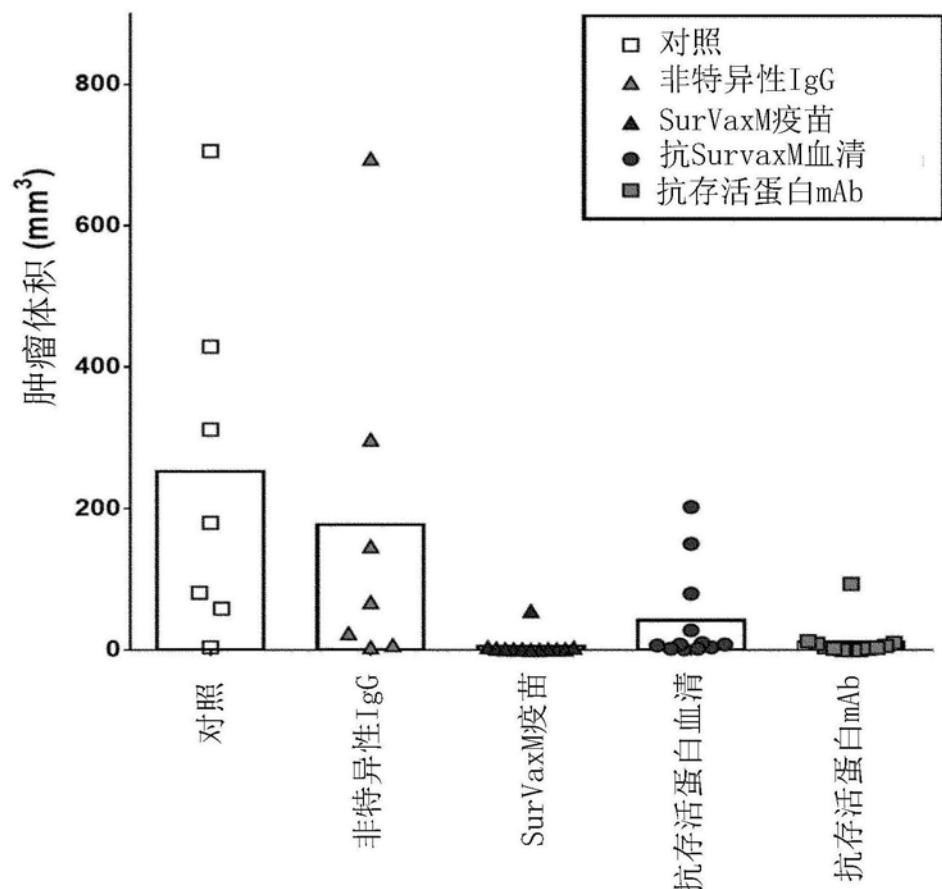


图2

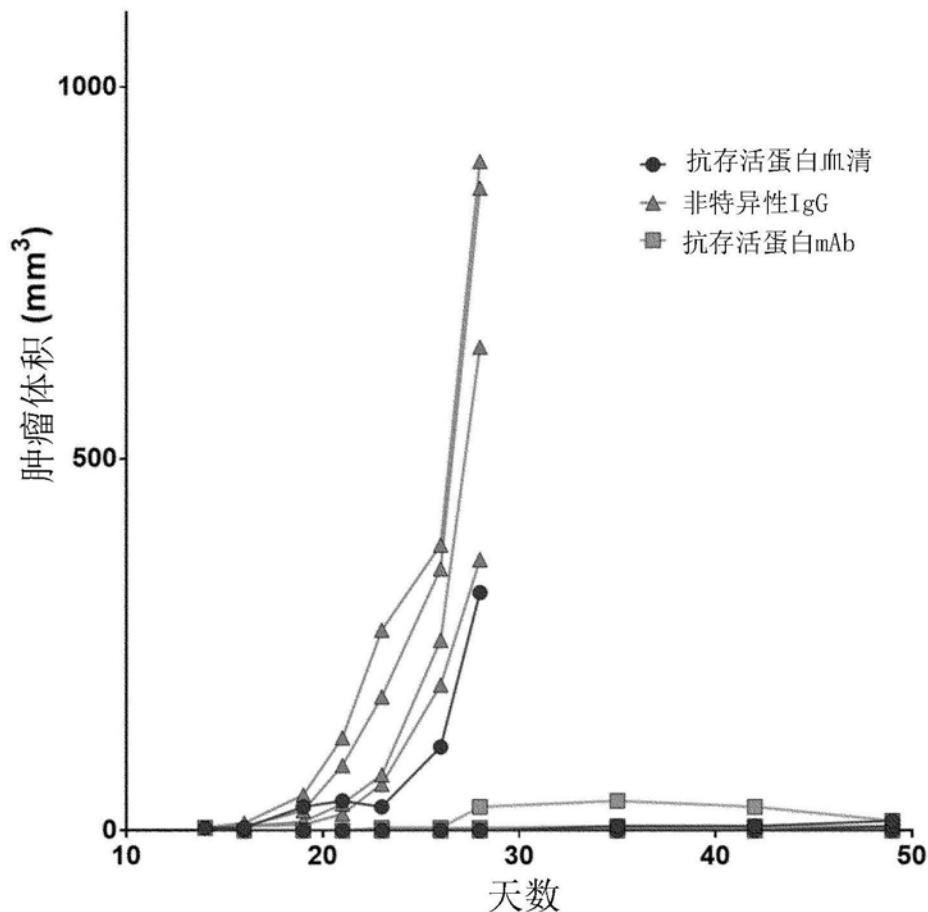


图3

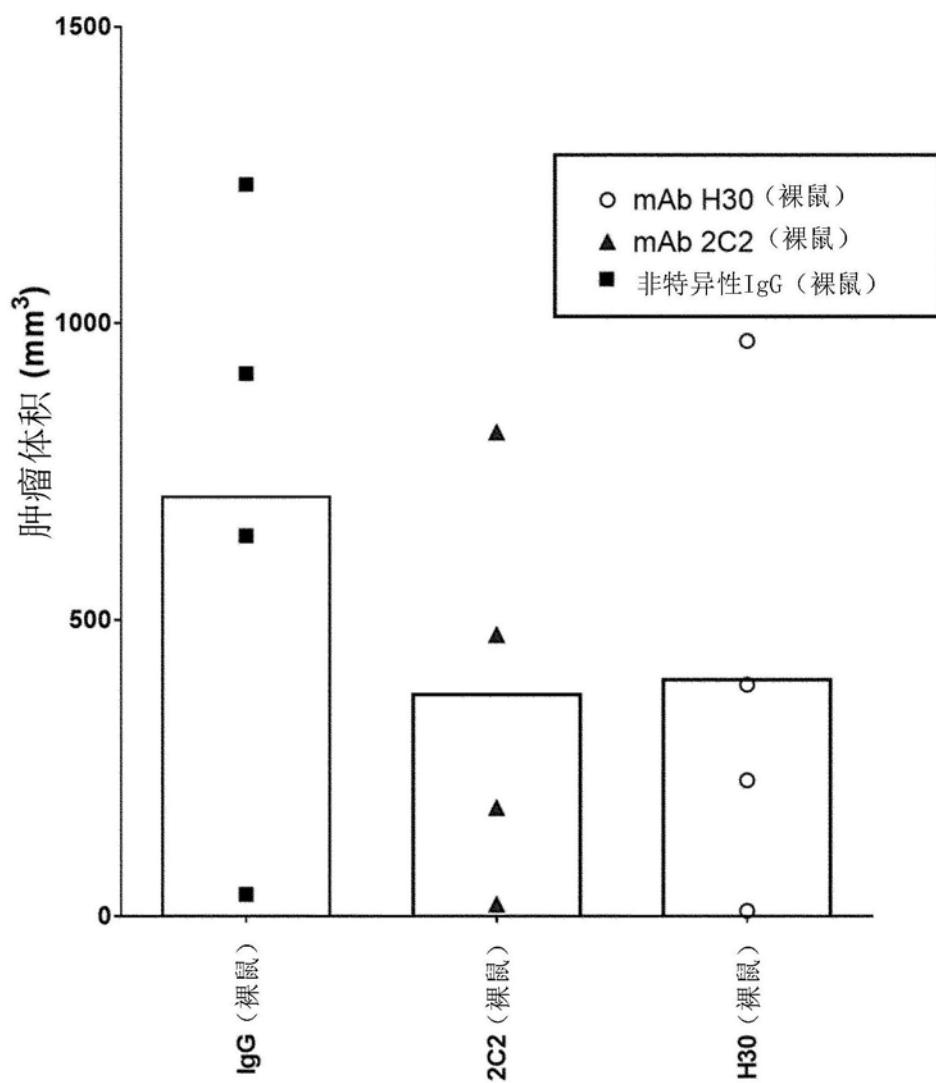


图4

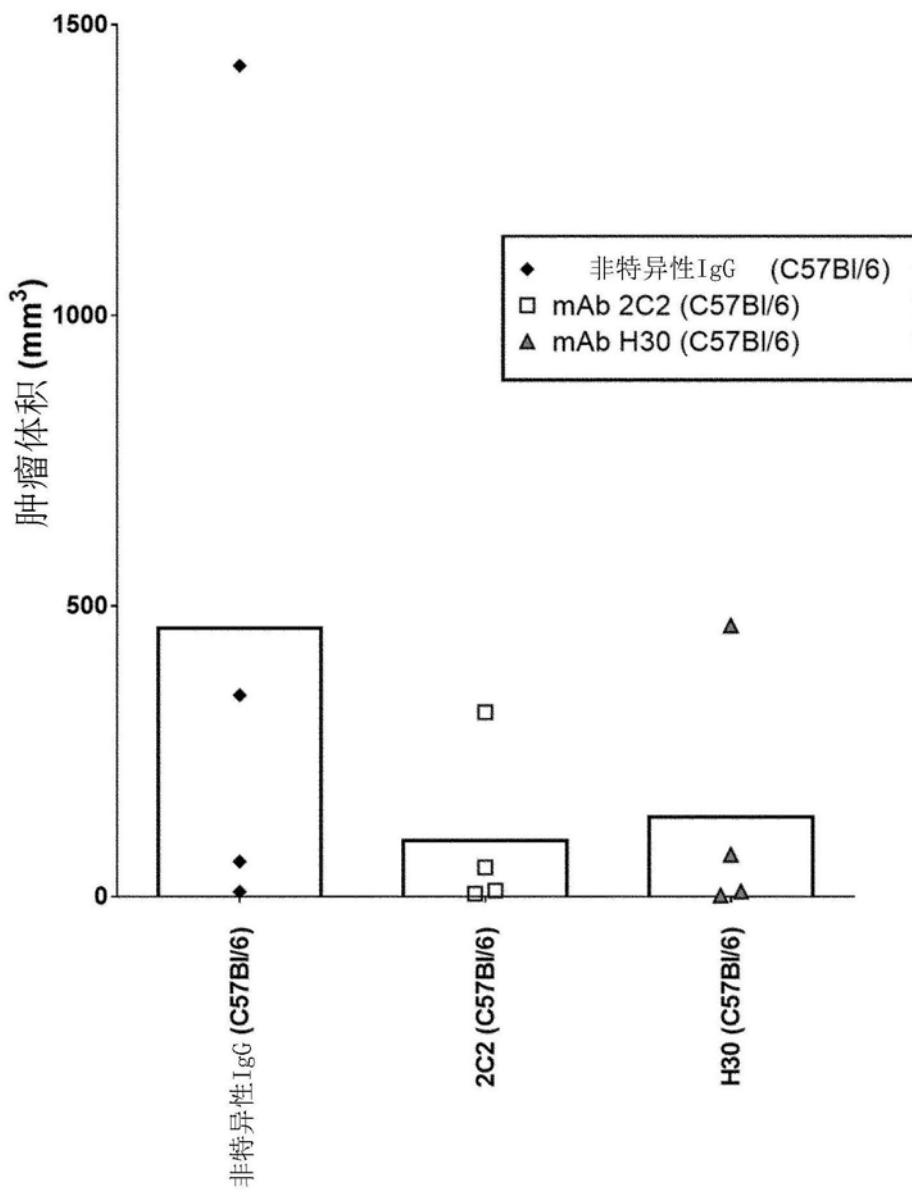


图5

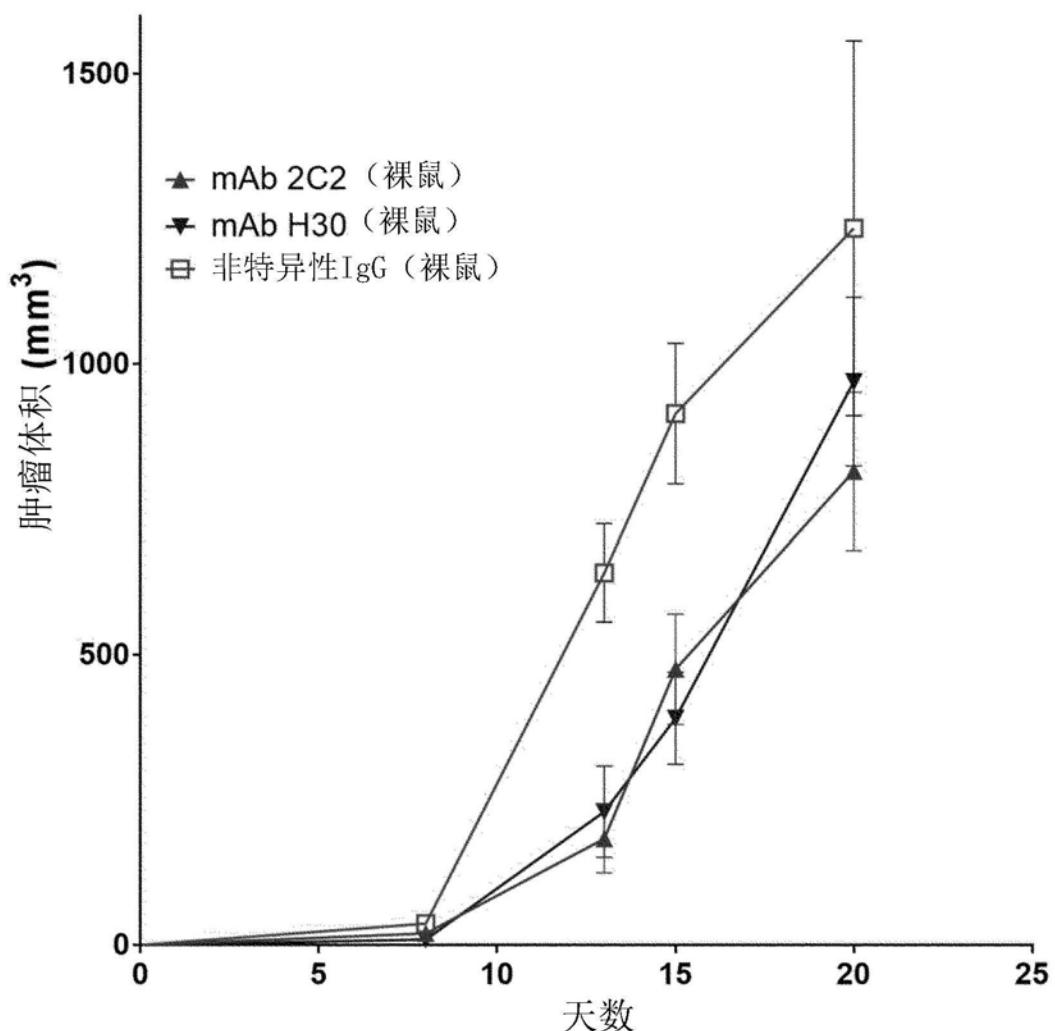
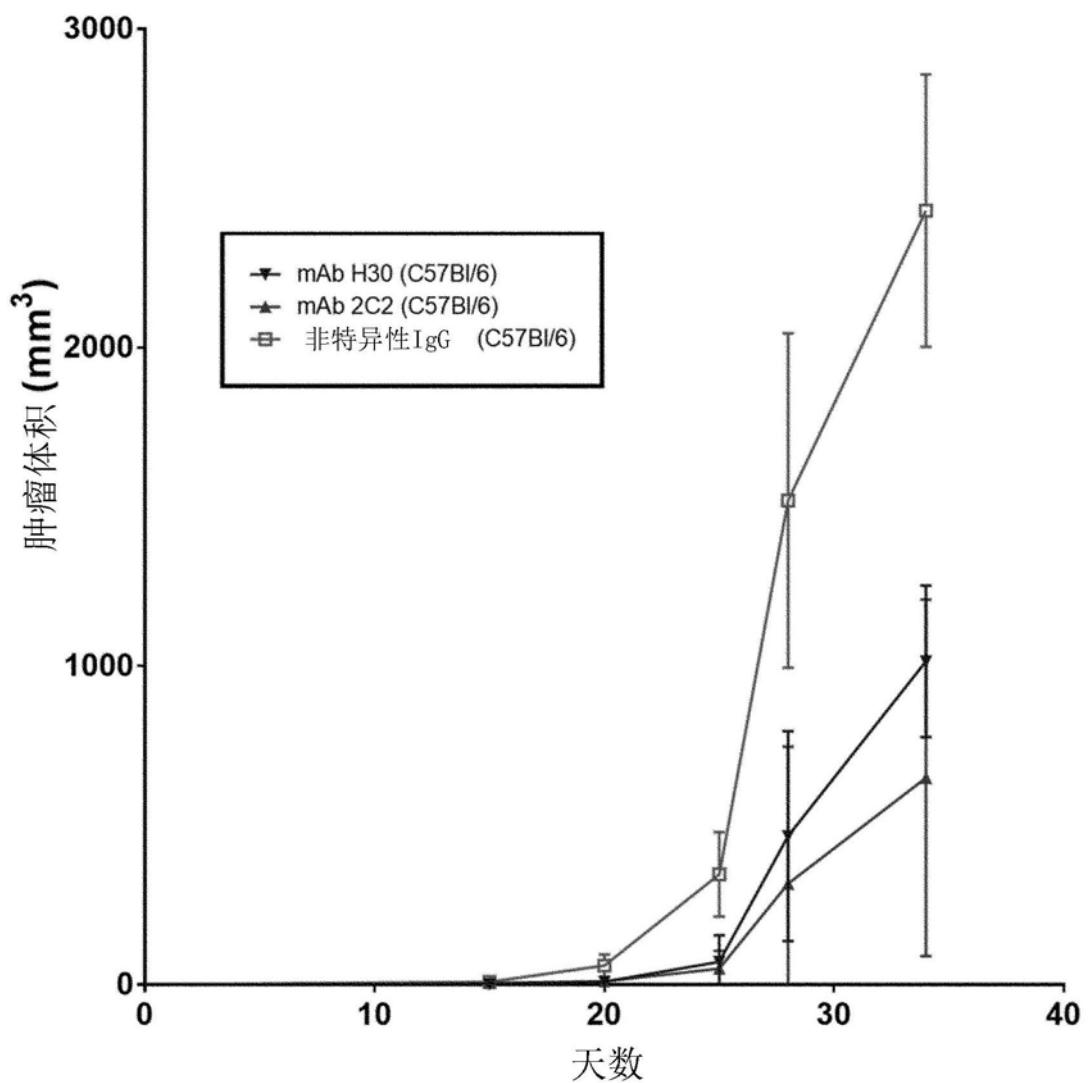


图6



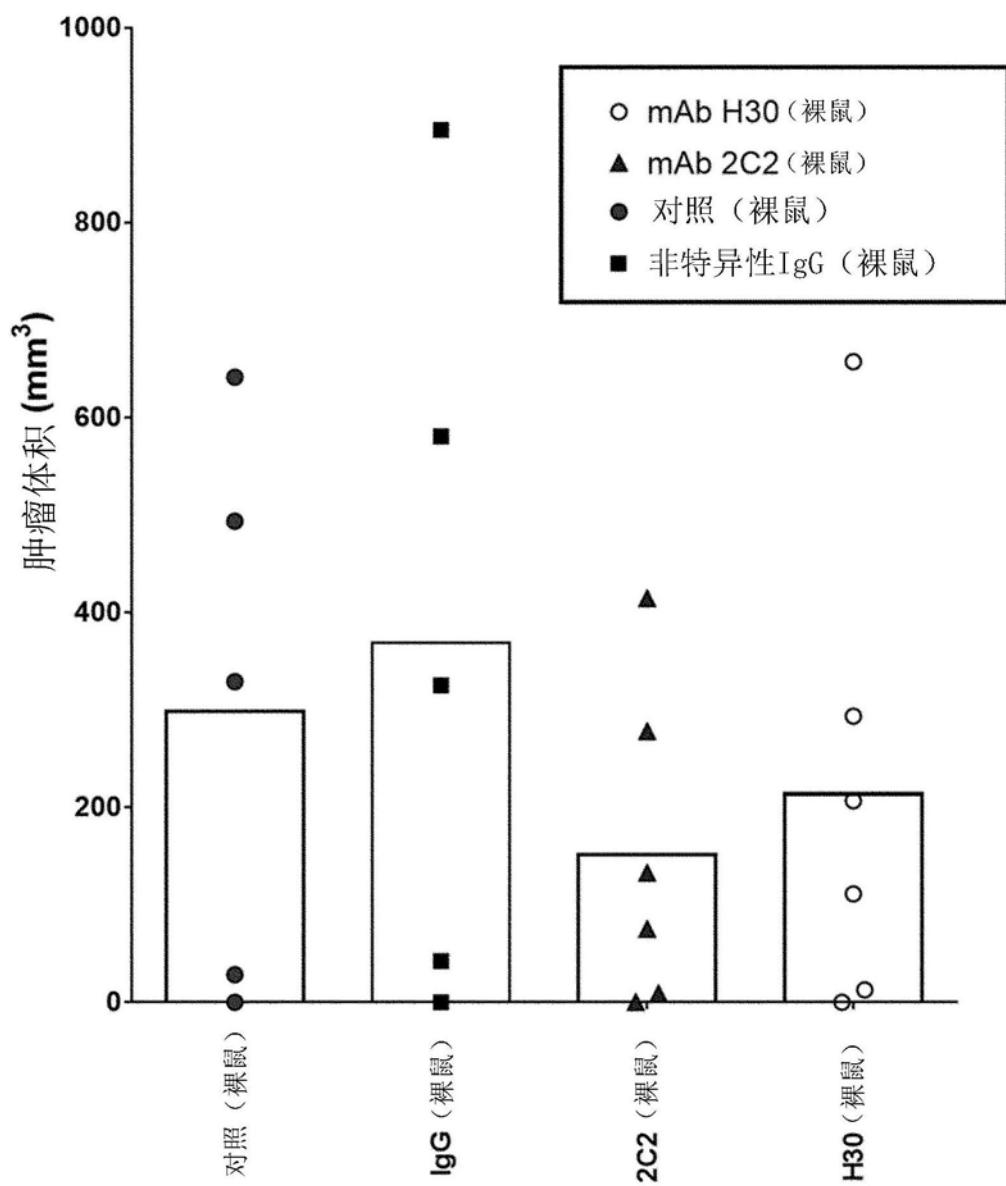


图8

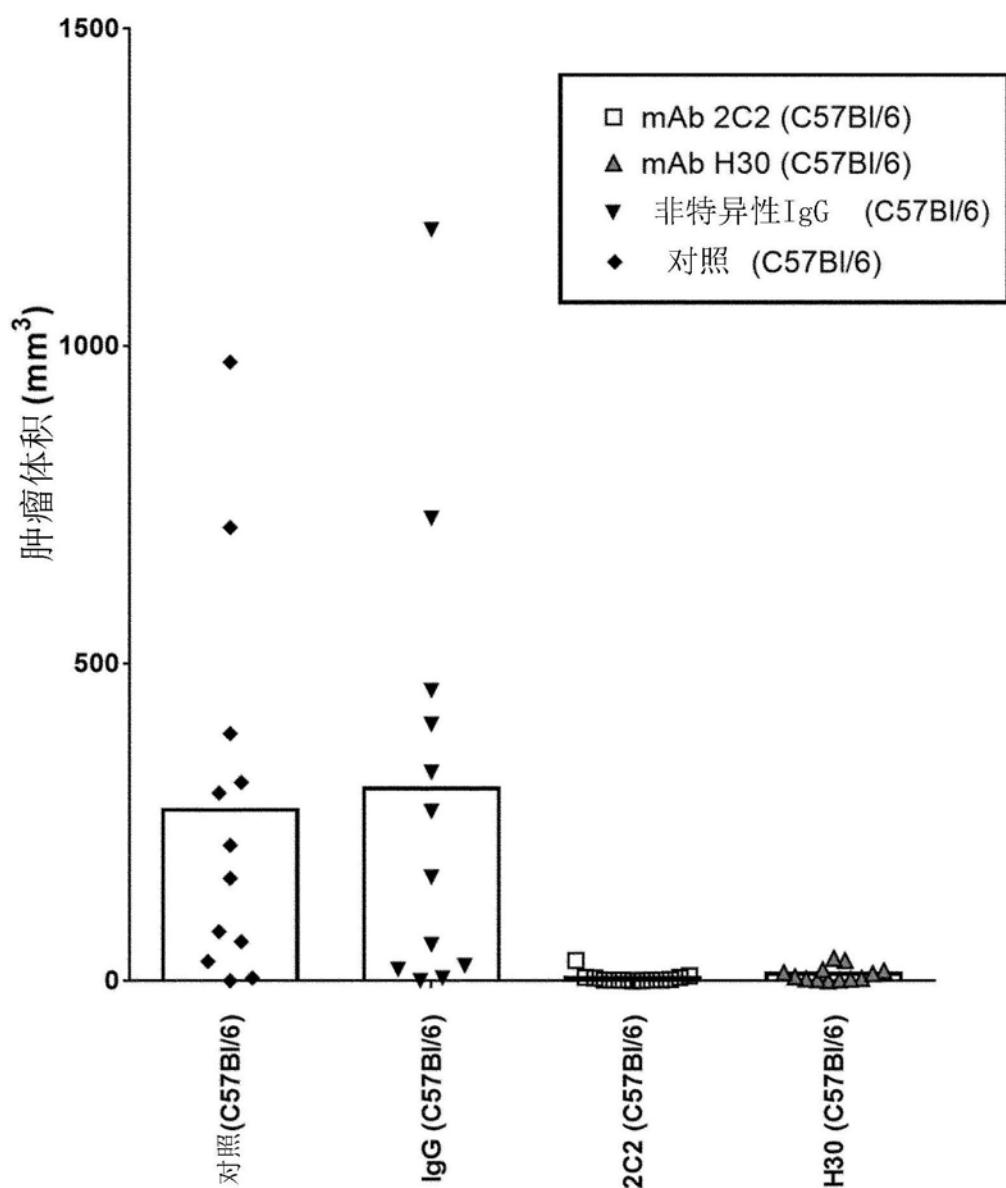


图9

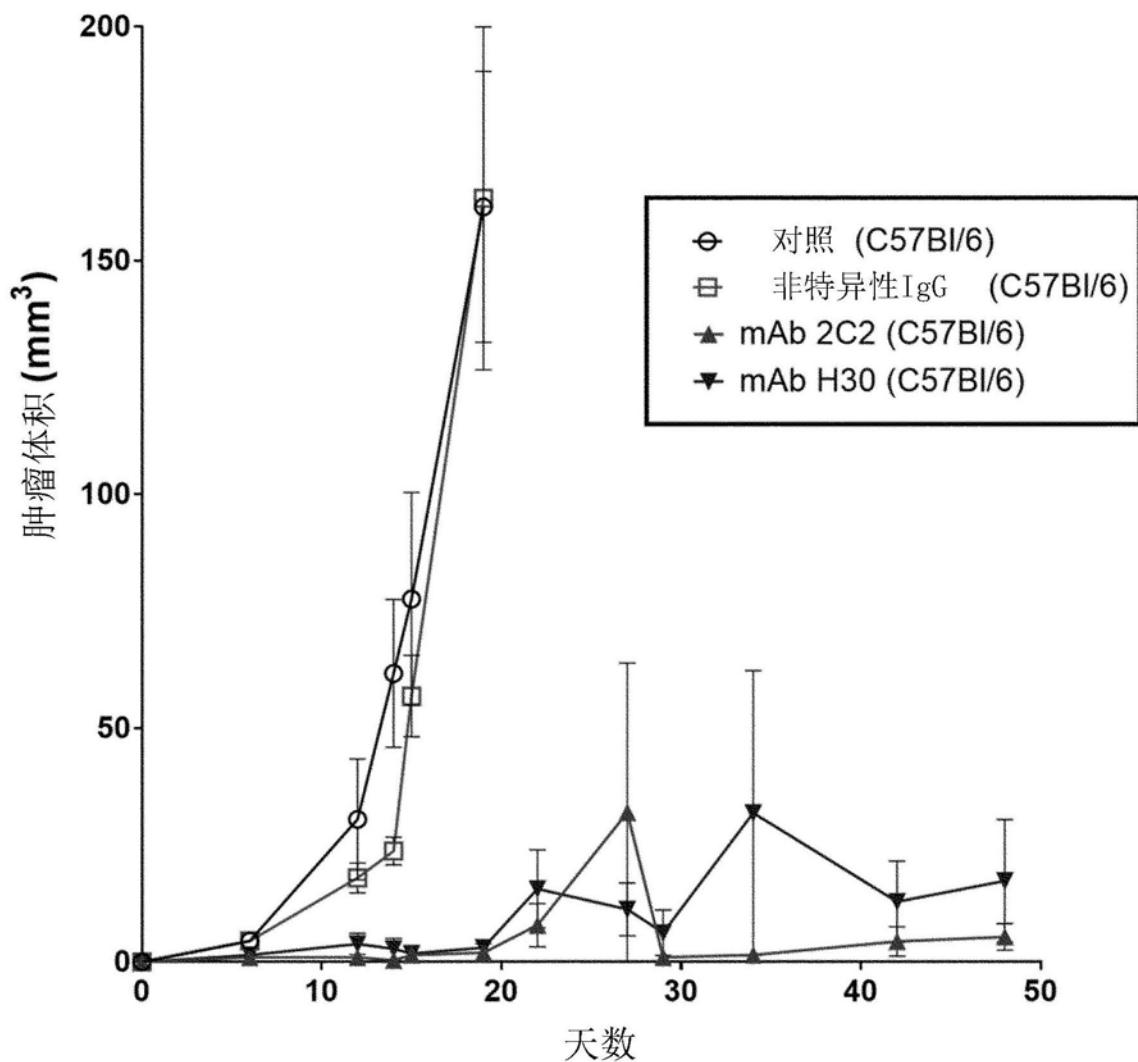


图10

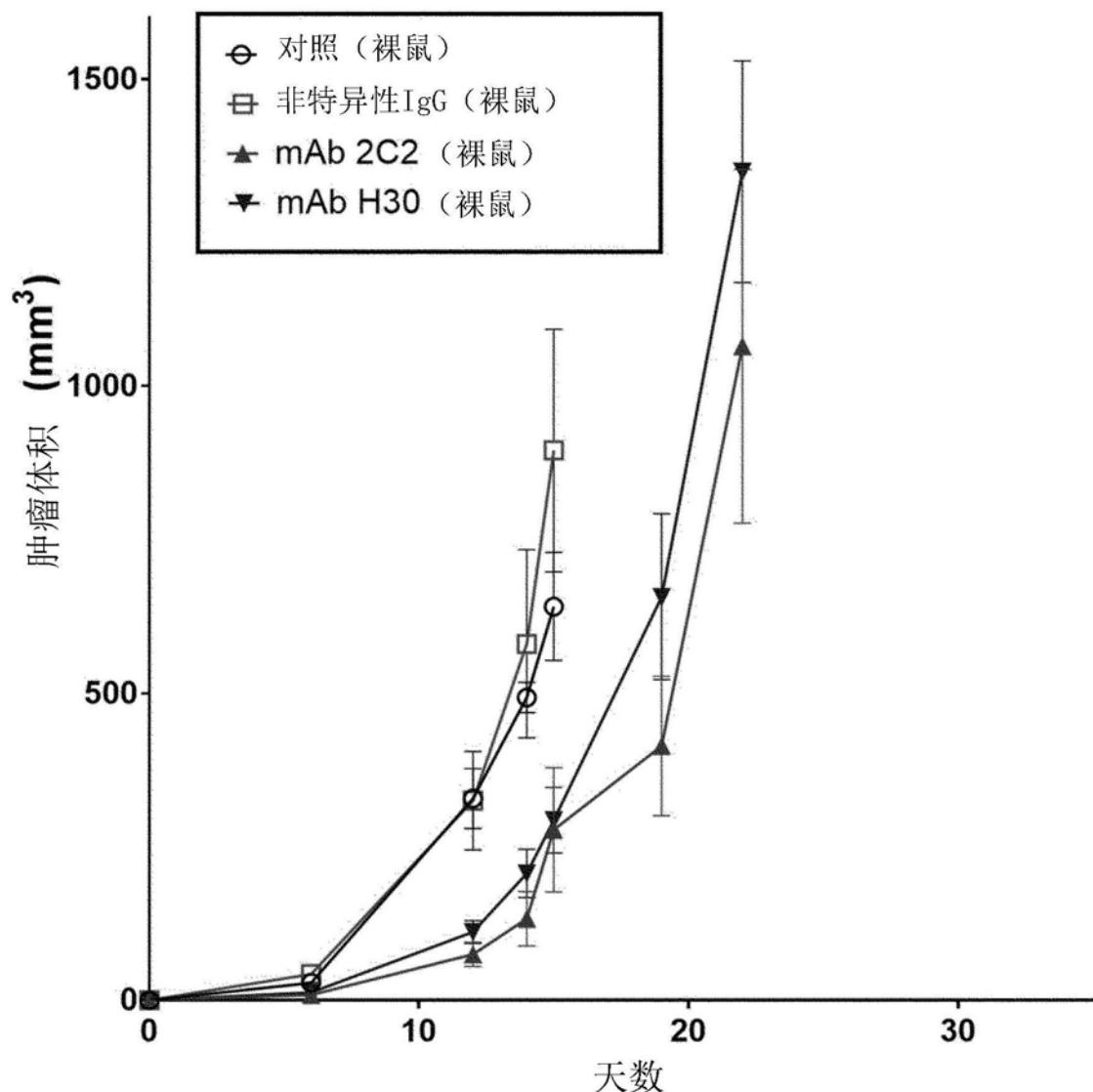


图11

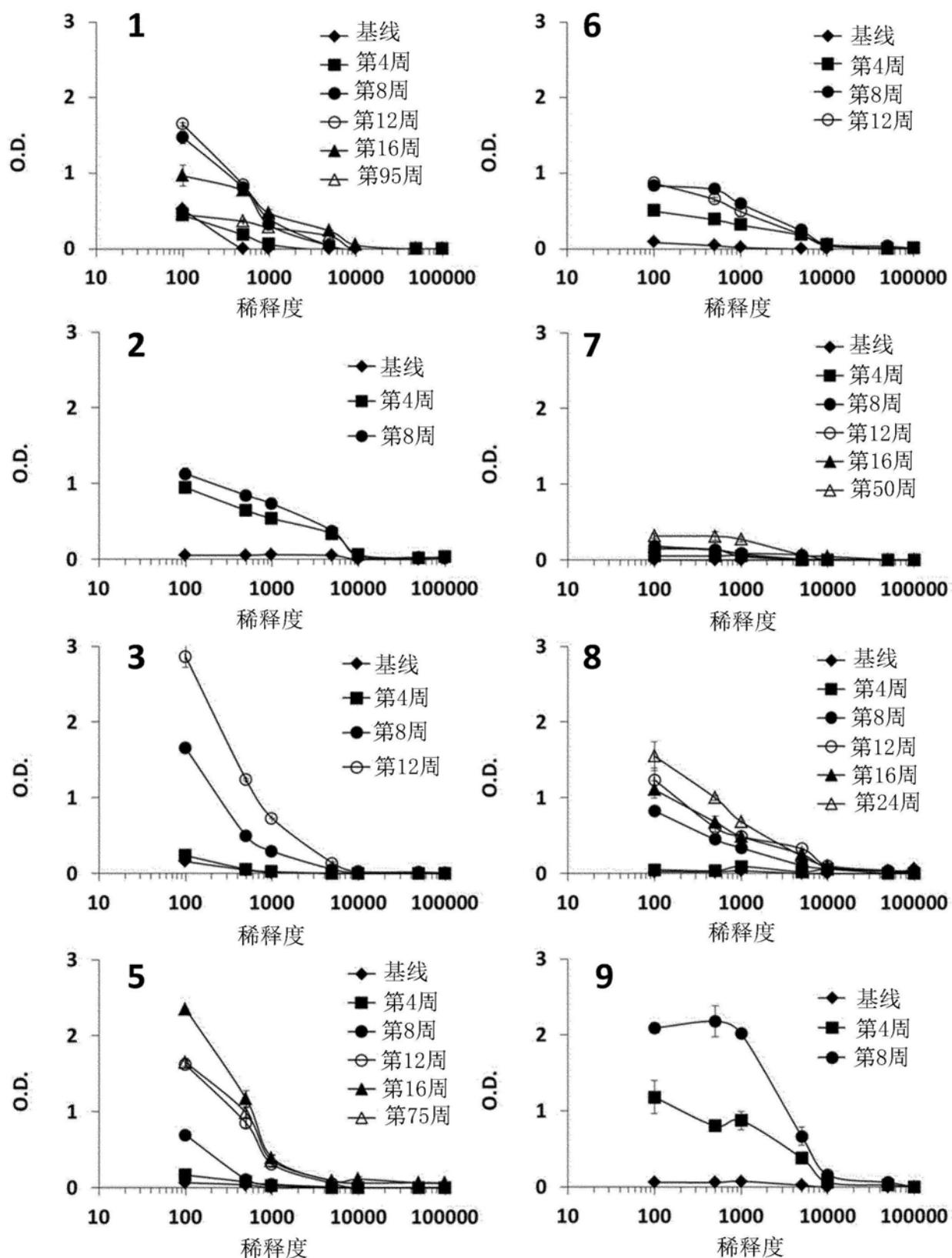


图12

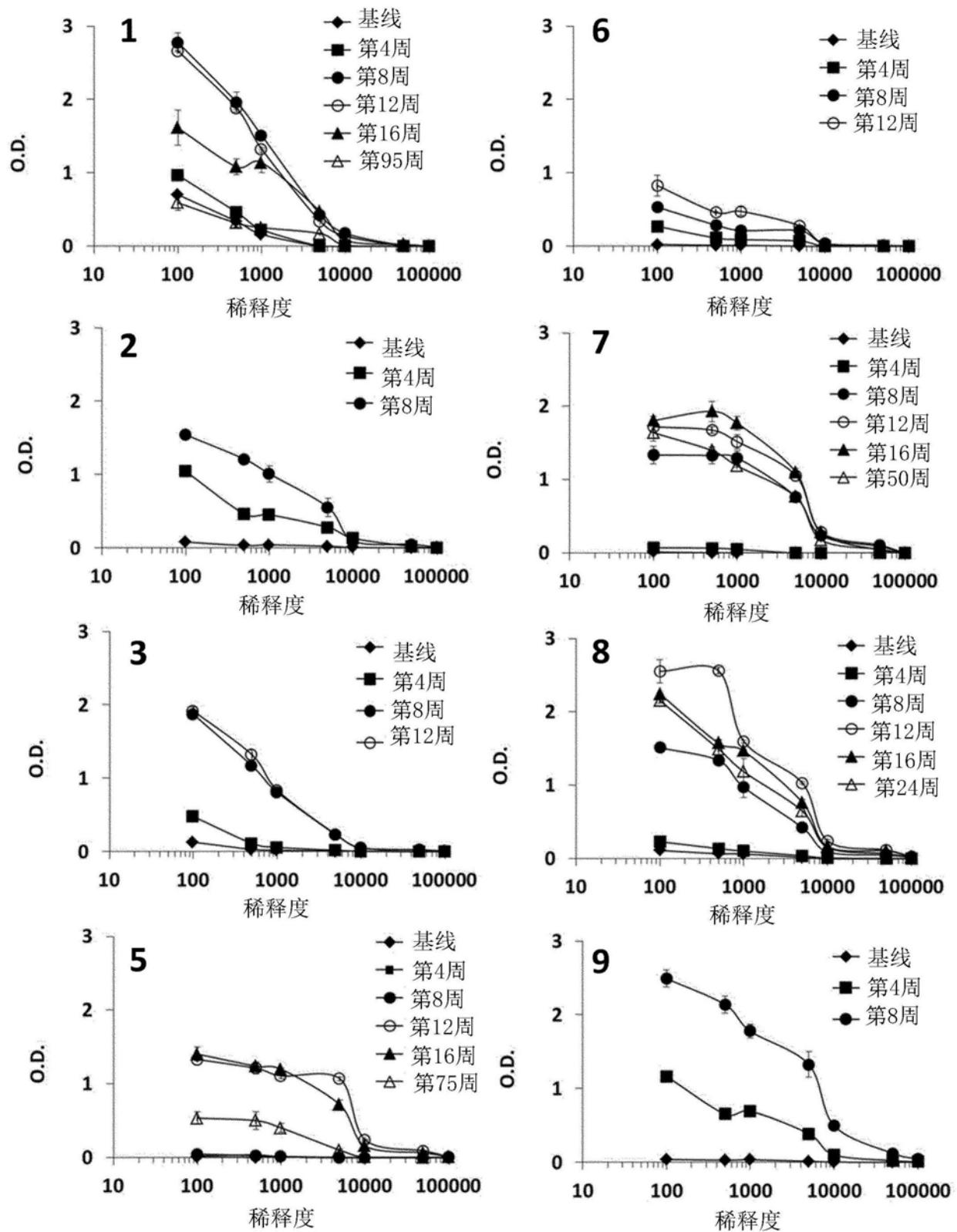


图13