(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114702581 A
(43)申请公布日 2022.07.05

(21)申请号 202210185767.0

(22)申请日 2016.01.30

(30)优先权数据
62/110,338 2015.01.30 US
14/723,297 2015.05.27 US
14/798,312 2015.07.13 US

(62)分案原申请数据
201680008450.2 2016.01.30

(71)申请人 台湾地区“中央研究院”
地址 中国台湾台北市南港区研究院路2段128号

(72)发明人 翁启惠 吴宗益 马彻 吴汉忠

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
专利代理师 林斯凯

(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/44(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书102页
序列表59页 附图58页

(54)发明名称

增进抗体功效的通用糖型组合物及方法

(57)摘要

本申请涉及增进抗体功效的通用糖型组合物及方法。本发明涉及包含抗体或其结合片段、进一步包含通用Fc糖型的组合物及使用方法。

CN 114702581 A

1.一种结合至Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1的经分离单株抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含用于提高单株抗体的结合/效应活性的Fc糖型,其中所述抗体包含具有下式的糖型:

$Sia_2(\alpha 2\text{-}6)Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$

其中所述抗体包含:

(i)H-CDR1,其氨基酸序列为SEQ ID NO:207、SEQ ID NO:217或SEQ ID NO:227的序列;

(ii)H-CDR2,其氨基酸序列为SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:218或SEQ ID NO:228的序列;

(iii)H-CDR3,其氨基酸序列为SEQ ID NO:209、SEQ ID NO:219或SEQ ID NO:229的序列;

(iv)L-CDR1,其氨基酸序列为SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:214或SEQ ID NO:224的序列;

(v)L-CDR2,其氨基酸序列为SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:215或SEQ ID NO:225的序列;

(vi)L-CDR3,其氨基酸序列为SEQ ID NO:206、SEQ ID NO:216或SEQ ID NO:226的序列。

2.如权利要求1的经分离单株抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为IgG1且与Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1的结合为特异性结合。

3.如权利要求2的经分离单株抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:

具有SEQ ID NO:202、SEQ ID No.212或SEQ ID No:222的序列的VH;及

具有SEQ ID No:203、SEQ ID No.213或SEQ ID No:223的序列的VL。

4.如权利要求3的经分离单株抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为人类抗体。

5.如权利要求3的经分离单株抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为人类化抗体。

6.如权利要求1的经分离单株抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段为Fab片段、F(ab')2片段,或单链Fv片段。

7.一种医药组合物,其包含如权利要求4或5的经分离单株抗体或其抗原结合片段及医药学上可接受的载剂。

8.一种如权利要求7的医药组合物于制备治疗有需要的个体的癌症的药剂的用途,所述药剂提高所述个体的ADCC活性。

9.如权利要求8的用途,其中所述癌症选自由以下组成的群:脑癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏癌、骨癌、皮肤癌、子宫颈癌、卵巢癌及前列腺癌。

10.一种制备同质抗体的群体的方法,所述同质抗体为权利要求1的单株抗体的同质抗体,所述方法包含:

(a)使单株抗体与α-海藻糖苷酶及至少一种内切糖苷酶接触;

(b)产生具有单一N-乙酰基葡糖胺(GlcNAc)的去海藻糖基化抗体;及

(c)添加$Sia_2(\alpha 2\text{-}6)Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc$至抗体Fc区的GlcNAc,以形成具有如权利要求1所定义的所述糖型的经分离单株抗体的所述同质抗体。

11.一种如权利要求1的经分离单株抗体或其抗原结合片段于制备治疗有需要的个体的癌症的药剂的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段用于结合至选自由Globo H、SSEA-3

及SSEA-4组成的群的一或多种抗原。

增进抗体功效的通用糖型组合物及方法

[0001] 本申请是申请日为2016年1月30日、申请号为“201680008450.2”、名称为“增进抗体 功效的通用糖型组合物及方法”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及根据所要结合/效应活性调节的所选通用Fc糖型,其用于增进 针对许多疾病(包括癌症、发炎病症及感染性疾病)的抗体的治疗功效。特定言 的,为了增进治疗功效,可产生及/或并入所选及/或定向优化通用Fc糖型至单 株抗体的设计及/或产生。

背景技术

[0003] 基于抗体的疗法针对许多疾病(包括发炎病症、癌症、感染性疾病及实体 器官移植排斥)的功效已有经证实的记录。当前,在美国(USA)、欧盟(EU)及若 干个其他国家已有超过40种治疗性单株抗体(mAb)获准用于临床用途。大部分 彼等物用于治疗癌症及免疫疾病。具有抗肿瘤活性的治疗性抗体的实例包括抗 CD20、抗Her2、抗EGFR、抗CD40、抗CTLA-4及抗PD-1抗体。

[0004] 所核准的大部分生物医药是在哺乳动物细胞培养系统中产生,以递送具 有所要糖基化型态的蛋白质且从而确保降低的免疫原性以及较高的活体内功效 及稳定性。非人类哺乳动物表达系统(诸如CHO或NS0细胞)具有添加复杂的人 类型聚醣所必需的机构。然而,这些系统中所产生的聚醣可能不同于人体中所 产生的聚醣。其糖基化机构往往添加非所要的碳水化合物决定子,而碳水化合 物决定子可能会改变蛋白质折迭、诱导免疫原性且缩短药物的循环寿命。

[0005] 此外,哺乳动物细胞培养物递送不全具有相同特性的糖基化型态的异质 性混合物。这些糖基化型态可影响治疗蛋白的特性,如安全性、功效及血清半 衰期。哺乳动物细胞培养系统递送不全具有相同特性的糖基化型态的异质性混 合物。

发明内容

[0006] Fc糖基化在治疗性单株抗体的领域中已成为一个重要的主题。Fc糖基化 可显著地改变Fc效应功能,诸如Fc受体结合及补体活化,且因此影响治疗性抗 体的活体内安全性及功效概况。抗体内的Fc糖基化的多样性将对应于Fc效应功 能的多样性。因此,Fc聚醣中的此异质性会因为影响IgG分子与Fc受体的结合 且从而影响抗体效应功能而产生功能性后果,且可能在患者中引发不乐见作 用,因此认为其有安全隐忧。

[0007] 需要改良单株抗体疗法来针对许多疾病,包括发炎病症、癌症及感染性 疾病。Fc中的一些特定糖型可为所要生物学功能赋予改良的效应功能,诸如抗 体依赖性细胞的细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity;ADCC)。因 此,其适用于产生具有优化Fc糖型的治疗性抗体。

[0008] 因此,本发明提供根据所要结合/效应活性调节的所选通用Fc糖型,其用 于增进针对许多疾病(包括癌症、发炎病症及感染性疾病)的治疗性抗体的功 效。为了增进治疗功

效,可将所选及/或定向优化通用Fc糖型应用及/或并入至 单株抗体(优选为治疗性单株抗体)的设计及/或产生。

[0009] 在一个态样中,本发明提供用于增进单株抗体的结合/效应活性的Fc糖 型,其中所述抗体包含具有下式的糖型:

[0010] $Sia_2(\alpha 2\text{-}6)Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$

[0011]

[0012] 在一些实施例中,本发明提供包含图1的糖型及医药学上可接受的载剂的 医药组合物。在一个态样中,本发明提供一种治疗感染性、过度增生性疾病及/ 或病状的方法,其中所述方法包含向有需要的个体投与包含具有$Sia_2(\alpha 2\text{-}\ 6)Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$的糖型的医药组合物。

[0013] 在一些实施例中,抗体为小鼠、嵌合、人类化及/或人类MC41抗体,其包 含以下序列:

[0014] 表1-1.抗SSEA-4鼠类MC41的氨基酸及核苷酸序列。

[0015]

SEQ ID NO	描述	序列
200	MC41 VH核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGAAGGAAAGCGGACCCGGACTGGTCGCC CCCTCTAAGTCTCTGTCTATTACTTGTACTGTGAGCGGATTC TCTCTGAGCTCCCAGGGCGTGTACTGGGTGAGGCAGCCAC CTGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGAGCCATCTGGGCAGG AGGCAGCACCAACTATAATTCCGCCCTGATGTCTCGCCTGT CTATCAGCAAGGACAACTCCAAGTCTCAGGTGTTCCTGAA GATGAACAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCATGTACTATT GCGCCCGGGTGGACGGCTACAGAGGCTATAACATGGATTAC TGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGC
201	MC41 VL核苷酸序列	GAGAATGTGCTGACACAGTCCCCAGCAATCATGAGCGCCT CCCCAGGAGAGAAGGTGACCATGACATGTTCCGCCTCCTCT AGCGTGTCTTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGTCCTCTAC CAGCCCTAAGCTGTGGATCTACGACACAAGCAAGCTGGCC TCCGGCGTGCCCGGCCGGTTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCA ACTCTTATAGCCTGACCATCAGCAGCATGGAGGCCGAGGAT GTGGCCACATACTATTGCTTTCAGGGCTCTGGCTACCCACT GACATTCGGGGCTGGAACTAAACTGGAACTGAAG CGA
202	MC41 VH氨基酸序列	QVQLKESGPGLVAPSKSLSITCTVSGFSLSSQGVYWVRQPPGK GLEWLGAIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNS LQTDDTAMYYCARVDGYRGYNMDYWGQGTSVTVSS
203	MC41 VL氨基酸序列	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTS PKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATY YCFQGSGYPLTFGAGTKLELKR
204	MC41 VL	SSVSY

[0016]

	CDR1	
205	MC41 VL CDR2	DTS
206	MC41 VL CDR3	FQGSGYPLT
207	MC41 VH CDR1	GFSLSSQG
208	MC41 VH CDR2	IWAGGST
209	MC41 VH CDR3	ARVDGYRGYNMDY

[0017] 表1-2.第2种人类化单株抗体hMC41的氨基酸及核苷酸序列。

[0018] 第2种

[0019]

SEQ ID NO	描述	序列
210	MC41 VH核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCCGGACCAGGACTGGTGGCA CCATCTAAGACCCTGAGCCTGACCTGCACAGTGAGCGGCTT CTCCCTGAGCTCCCAGGGCGTGTACTGGATCAGGCAGCCA CCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGCCATCTGGGCCG GCGGCTCTACAAACTATAATTCCGCCCTGATGTCTCGCCTGT CTATCAGCAAGGACAACTCCAAGTCTCAGGTGTTTCTGAAG ATGAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCATGTACTATTG CGCCCGGGTGGACGGCTACAGAGGCTATAACATGGATTATT GGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCTAGC
211	MC41 VL核苷酸序列	GAGAATGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCATCATGAGCGCCAC ACCAGGCGAGAAGGTGACCATGACATGTTCCGCCTCCTCTA GCGTGTCTTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGTCCTCTACC AGCCCCAAGCTGTGGATCTACGACACAAGCAAGCTGGCAT CCGGAGTGCCTGGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAAA CAGCTATACCCTGACAATCAGCTCCATGGAGGCCGAGGATG TGGCCACCTACTATTGTTTCCAGGGATCCGGATACCCACTG ACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGT
212	MC41 VH氨基酸序列	QVQLKESGPGLVAPSK**T**LS**L**TCTVSGFSLSSQGVYW**I**RQPPGK GLEW**I**GAIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAMYYCARVDGYRGYNMDYWGQGT**L**VTVSS
213	MC41 VL氨基酸序列	ENVLTQSPAIMSA**T**PGEKVTMTCSASSSVSY**L**HWYQQKSSTS PKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSY**T**LTISSMEAEDVATY YCFQGSGYPLTFGAGTKLE**I**KR
214	MC41 VL CDR1	SSVSY
215	MC41 VL CDR2	DTS
216	MC41 VL CDR3	FQGSGYPLT
217	MC41 VH CDR1	GFSLSSQG
218	MC41 VH CDR2	IWAGGST
219	MC41 VH CDR3	ARVDGYRGYNMDY

[0020] 表1-3.第3种人类化单株抗体hMC41的氨基酸及核苷酸序列。

[0021] 第3种

[0022]

SEQ ID NO	描述	序列
220	MC41 VH核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCCGGACCAGGACTGGTGGCAC CATCTAAGACCCTGAGCCTGACCTGCACAGTGAGCGGCTTC TCCCTGAGCTCCCAGGGCGTGTACTGGATCAGGCAGCCACC TGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGCCATCTGGGCCGGC GGCTCTACAAACTATAATTCCGCCCTGATGTCTCGCCTGTCT ATCAGCAAGGACAACTCCAAGTCTCAGGTGTTTCTGAAGAT GAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCATGTACTATTGCG CCCGGGTGGACGGCTACAGAGGCTATAACATGGATTATTGG GGCCAGGGCACCtcGGTGACAGTGTCTAGC
221	MC41 VL核苷酸序列	GAGAATGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCATCATGAGCGCCAC ACCAGGCGAGAAGGTGACCATGACATGTTCCGCCTCCTCTA GCGTGTCTTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGTCCTCTACC AGCCCCAAGCTGTGGATCTACGACACAAGCAAGCTGGCATC CGGAGTGCCTGGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAAAC AGCTATACCCTGACAATCAGCTCCATGGAGGCCGAGGATGT GGCCACCTACTATTGTTTCCAGGGATCCGGATACCCACTGAC CTTTGGCGCCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGT
222	MC41 VH氨基酸序列	QVQLKESGPGLVAPSK**T**LS**L**TCTVSGFSLSSQGVYW**I**RQPPGK GLEW**I**GAIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAMYYCARVDGYRGYNMDYWGQGTSVTVSS
223	MC41 VL氨基酸序列	ENVLTQSPAIMSA**T**PGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTS PKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSY**T**LTISSMEAEDVATY YCFQGSGYPLTFGAGTKLE**I**KR
224	MC41 VL CDR1	SSVSY
225	MC41 VL CDR2	DTS
226	MC41 VL CDR3	FQGSGYPLT
227	MC41 VH CDR1	GFSLSSQG
228	MC41 VH CDR2	IWAGGST
229	MC41 VH CDR3	ARVDGYRGYNMDY

[0023] 在一个态样中,本发明提供一种结合至 Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1的经分离单株抗体 或其结合片段,其中所述抗体或其片段包含用于提高单株抗体的结合/效应活性 的Fc糖型,其中所述抗体包含具有下式的糖型:

[0024] $Sia_2(\alpha 2\text{-}6)Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$

[0025]

[0026] 在一个实施例中,抗体为IgG1且与 Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→的结合为特异性结合。

[0027] 在一个实施例中,抗体包含具有SEQ ID NO:147或SEQ ID NO:137的VH 及具有SEQ ID NO:148或SEQ ID NO:138的VL。

[0028] 在一个实施例中,经分离抗体或其抗原结合片段包含分别选自(i)-(iii)的 H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3:

[0029] (i)选自SEQ ID NO:152(GFSLTSYG)的H-CDR1;

[0030] (ii)选自SEQ ID NO:153(IWGEGST)的H-CDR2;

[0031] (iii)选自SEQ ID NO:154(AMTGTAY)的H-CDR3;

[0032] 且包含分别选自(iv)至(vi)的L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3：

[0033] (iv)选自SEQ ID NO:149(SSVSY)的L-CDR1；

[0034] (v)选自SEQ ID NO:150(DTS)的L-CDR2；及

[0035] (vi)选自SEQ ID NO:151(HQWSSSPHT)的L-CDR3。

[0036] 在一个实施例中，经分离抗体或抗原结合片段进一步包含分别选自(i)-(iv) 的H-FR1、H-FR2、H-FR3及HFR4：

[0037] (i)选自SEQ ID NO:159(QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS)的H-FR1；

[0038] (ii)选自SEQ ID NO:160(VSWIRQPPGKGLEWIGV)的H-FR2；

[0039] (iii)选自SEQ ID NO:161(NYHSVLISRLTISKDNSKSQVFLKL NSLQTDDTATYYC)的H-FR3；

[0040] (iv)选自SEQ ID NO:162(WGQGTLVTVSS)的H-FR4；

[0041] 且包含分别选自(v)至(viii)的L-FR1、L-FR2、L-FR3及L-FR4：

[0042] (v)选自SEQ ID NO:155(QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAS)的L-FR1；

[0043] (vi)选自SEQ ID NO:156(MHWYQQKSGTSPKRWIY)的L-FR2；

[0044] (vii)选自SEQ ID NO:157(KLSSGVPGRFSGSGSGTSYSLTI SRLEAEDAATYYC)的L-FR3；

[0045] (viii)选自SEQ ID NO:158(FGGGTKVEIKR)的L-FR4。

[0046] 在一个实施例中，抗体为人类抗体。

[0047] 在一个实施例中，抗体为人类化抗体。

[0048] 在一个实施例中，抗体包含具有SEQ ID NO:200、SEQ ID No.210或SEQ ID No:137的VH及具有SEQ ID No:201、SEQ ID No.211或SEQ ID No:221的 VL。

[0049] 在一个实施例中，经分离抗体或其抗原结合片段包含分别选自(i)-(iii)的 H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3：

[0050] (i)选自SEQ ID NO:207、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:227的H-CDR1；

[0051] (ii)选自SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:218、SEQ ID NO:228的H-CDR2；

[0052] (iii)选自SEQ ID NO:209、SEQ ID NO:219、SEQ ID NO:229的H-CDR3；

[0053] 且包含分别选自(iv)至(vi)的L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3：

[0054] (iv)选自SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:214及SEQ ID NO:224的L-CDR1；

[0055] (v)选自SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:215及SEQ ID NO:225的L-CDR2；

[0056] (vi)选自SEQ ID NO:206、SEQ ID NO:216及SEQ ID NO:226的L-CDR3。

[0057] 在一个实施例中，权利要求9的抗体，其中所述抗体为人类抗体。

[0058] 在一个实施例中，权利要求9的抗体，其中所述抗体为人类化抗体。

[0059] 在一个实施例中，抗原结合片段为Fab片段、F(ab')2片段或单链Fv片段。

[0060] 在一个态样中，本发明提供包含如权利要求6、7、10或11中任一项的单株 抗体或其结合片段及医药学上可接受的载剂的医药组合物。

[0061] 在一个实施例中，医药组合物适用于治疗过度增生性疾病。

[0062] 在一个态样中，本发明提供一种治疗有需要的个体的癌症的方法，其中 所述方法包含向所述个体投与治疗有效量的如权利要求13的医药组合物，其中 所投与抗体提高所述个体的ADCC活性。

[0063] 在一个实施例中，治疗方法所针对的癌症选自由以下组成的群：脑癌、肺癌、乳

癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏 癌、骨癌、皮肤癌、子宫颈癌、卵巢癌及前列腺癌。

[0064] 在一个实施例中，所述方法包含视情况将医药调配物与至少一种其他化 学治疗剂组合投与。

[0065] 在另一态样中，本发明亦提供一种制备同质抗体群的方法，所述方法包 含：

[0066] (a)使单株抗体与α-海藻糖苷酶及至少一种内切糖苷酶接触；

[0067] (b)产生具有单一N-乙酰基葡糖胺(GlcNAc)的去海藻糖基化抗体；及

[0068] (c)添加通用聚醣至抗体Fc区的GlcNAc中以形成具有所述糖型的同质抗 体。

[0069] 在一个实施例中，抗体或其结合片段包括特异性结合至选自由Globo H、SSEA-3及SSEA-4组成的群的一或多种抗原的抗体或其结合片段。

[0070] 本发明的另一个态样提供基于MC48的修饰的人类化糖抗体。范例及其氨 基酸与核酸结构/序列提供于下文：

[0071] 表17-0.小鼠单株抗体MC48的氨基酸及核苷酸序列。

[0072]

SEQ ID NO	描述	序列
41	MC48 VH核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGC GCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGTCTCAGG GTTCTCATTAACCAGCTATGGTGTAAGCTGGGTTCGCCA GCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATAT GGGGTGAGGGGAGCACAAATTATCATTCAGTTCTCATAT CCAGACTGACCATTAGTAAGGATAACTCCAAGAGCCAAG TTTTCTTAAAACTGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAG CCACGTACTACTGTGCCATGACTGGGACAGCTTACTGGG GCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
42	MC48 VL核苷酸序列	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAT CTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGC TCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCA

[0073]

		GGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAA CTGTCTTCTGGAGTCCCTGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGG TCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGGTTGGAG GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCATCAGTGGAGT AGTAGTCCACACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGTTGGA GATAAAA
43	MC48 VH氨基酸序列	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWLGVIWGEGSTNYHSVLISRLTISKDNSKSQVFLKL NSLQTDDTATYYCAMTGTAYWGQGTLVTVSA
44	MC48 VL氨基酸序列	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSG TSPKRWIYDTSKLSSGVPGRFSGSGSGTSYSLTISRLEAEDA ATYYCHQWSSSPHTFGGGTKLEIK
45	MC48 VL CDR1	SSVSY
46	MC48 VL CDR2	DTS
47	MC48 VL CDR3	HQWSSSPHT
48	MC48 VH CDR1	GFSLTSYG
49	MC48 VH CDR2	IWGEGST
50	MC48 VH CDR3	AMTGTAY

[0074] 表17-1.人类化单株抗体MC48(第1种)的氨基酸及核苷酸序列

[0075]

SEQ ID NO	描述	序列
115	hMC48 VH核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGCAAGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAA ACCCTCAGAAACTCTGTCCCTTACATGCACTGTCTCAGG GTTCTCATTAACCAGCTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAG CCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGATTGGAGTAATATGG GGTGAGGGGAGCACAAATTATCATTCAGTTCTCATATCCA GACTGACCATTAGTGTGGATACCTCCAAGAATCAATTTA GCTTAAAACTGAGCAGTGTTACCGCTGCTGACACAGCCG TTTACTACTGTGCCATGACTGGGACAGCTTACTGGGGCC AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC
116	hMC48 VL核苷酸序列	GAGATTGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCACACTGTCACTG AGCCCAGGCGAGCGAGCCACACTGTCCTGTTCTGCTAG CTCCTCTGTCTCCTACATGCATTGGTATCAGCAGAAGCCA GGACTGGCACCACGACTGCTGATCTATGACACTTCTAAA CTGAGTTCAGGCATTCCCGCCAGATTCAGTGGCTCAGGG AGCGGAACCGACTTTACTCTGACCATTAGCTCCCTGGAG CCTGAAGATTTCGCCGTGTACTATTGCCATCAGTGGTCAT CAAGCCCTCATACCTTCGGGGGGGGGACTAAGGTGGAA ATCAAACGC
117	hMC48 VH氨基酸序列	QVQL**Q**ESGPGLV**K**PS**E**TLS**L**TCTVSGFSLTSYGVSW**I**RQPP GKGLEW**I**GVIWGEGSTNYHSVLISRLTI**S**V**D**T**S**K**N**Q**FS**LKL **SSVTAA**DTA**V**YYCAMTGTAYWGQGTLVTVS**S**
118	hMC48 VL氨基酸序列	**E**IVLTQSPA**TLSL**SPGE**RATLS**CSASSSVSYMHWYQQK**P**G **LAPRLL**IYDTSKLSSG**IPA**RFSGSGSGT**DFT**LTI**SS**LE**P**EDF**A** VYYCHQWSSSPHTFGGGTK**V**EIKR

[0076]

119	hMC48 VL CDR1	SSVSY
120	hMC48 VL CDR2	DTS
121	hMC48 VL CDR3	HQWSSSPHT
122	hMC48 VH CDR1	GFSLTSYG
123	hMC48 VH CDR2	IWGEGST
124	hMC48 VH CDR3	AMTGTAY

[0077] 表17-2.人类化单株抗体MC48(第2种)的氨基酸及核苷酸序列

[0078]

SEQ ID NO	描述	序列
125	hMC48 VH核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGAAGCAGAGCGGACCTGGCCTGGTGCA GCCCTCACAGAGCCTGAGCATCACTTGTACCGTCAGTGG ATTCTCCCTGACATCTTACGGCGTGTCTTGGGTCAGGCA GAGCCCTGGCAAGGGGCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCT GGGGAGAAGGCTCAACTAACTATCACAGCGTCCTGATCA GTCGCCTGTCAATTAACAAGGACAATTCTAAAAGTCAGG TGTTCTTTAAAATGAACAGCCTGCAGTCCAATGATACCG CCATCTACTATTGCGCTATGACCGGCACAGCATACTGGGG GCAGGGAACACTGGTGACTGTCTCCGCT
126	hMC48 VL核苷酸序列	GAGATTGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCACACTGTCACTG AGCCCAGGCGAGCGAGCCACACTGTCCTGTTCTGCTAG CTCCTCTGTCTCCTACATGCATTGGTATCAGCAGAAGCCA GGACTGGCACCACGACTGCTGATCTATGACACTTCTAAA CTGAGTTCAGGCATTCCCGCCAGATTCAGTGGCTCAGGG AGCGGAACCGACTTTACTCTGACCATTAGCTCCCTGGAG CCTGAAGATTTCGCCGTGTACTATTGCCATCAGTGGTCAT CAAGCCCTCATACCTTCGGGGGGGGGACTAAGCTGGAA ATCAAACGC
127	hMC48 VH氨基酸序列	QVQLK**Q**SGPGLV**Q**PSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVRQ**S**P GKGLEWLGVIWGEGSTNYHSVLISRL**S**INKDNSKSQVF**F**K **M**NSLQ**SN**DTA**I**YYCAMTGTAYWGQGTLVTVSA
128	hMC48 VL氨基酸序列	**E**IVLTQSPA**TLSL**SPGE**RATLS**CSASSSVSYMHWYQQK**P**G **LAPRLL**IYDTSKLSSG**I**P**A**RFSGSGSGT**DFT**LTI**SS**LE**P**ED**F**A VYYCHQWSSSPHTFGGGTK**V**LEIKR
129	hMC48 VL CDR1	SSVSY
130	hMC48 VL CDR2	DTS
131	hMC48 VL CDR3	HQWSSSPHT
132	hMC48 VH CDR1	GFSLTSYG
133	hMC48 VH CDR2	IWGEGST
134	hMC48 VH CDR3	AMTGTAY

[0079] 表17-3.人类化单株抗体MC48(第3种)的氨基酸及核苷酸序列

[0080]

SEQ ID NO	描述	序列
135	hMC48 VH核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCCGGACTGGTGAA ACCTAGCGAAACACTGAGCCTGACTTGTACCGTGAGCG GATTTTCCCTGACCTCTTATGGAGTGAGCTGGATCAGAC AGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGTGATT TGGGGAGAAGGCTCCACAAACTATCACAGTGTCCTGATC TCACGACTGACTATTTCTAAGGACAACTCTAAAAGTCAG GTCTTCCTGAAACTGAATAGTCTGCAGACTGACGATACC GCTACATACTATTGCGCAATGACAGGGACAGCATACTGG GGACAGGGAACCCTGGTGACAGTCAGCTCC
136	hMC48 VL核苷酸序列	CAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGCAATTATGTCAGCC AGCCCAGGGGAAAAGGTGACAATGACTTGTAGTGCTTCT AGTTCAGTCTCATACATGCATTGGTATCAGCAGAAGCCA GGCCTGGCCCCCAGACTGCTGATCTACGACACCTCCAAA CTGAGCTCCGGCGTGCCCGGGAGATTTTCCGGCTCTGGG AGTGGAACTTCATATAGCCTGACCATTTCTAGGCTGGAG GCCGAAGATGCCGCTACATACTATTGCCACCAGTGGAGC AGTAGCCCCCATACATTCGGAGGCGGGACCAAAGTGGA AATCAAACGC
137	hMC48 VH氨基酸序列	QVQL**Q**ESGPGLV**K**PS**E**TLS**L**TCTVSGFSLTSYGVSW**I**RQPP GKGLEW**I**GVIWGEGSTNYHSVLISRLTISKDNSKSQVFLKL NSLQTDDTATYYCAMTGTAYWGQGTLVTVS**S**
138	hMC48 VL氨基酸序列	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQK**P**G **L**AP**RLL**IYDTSKLSSGVPGRFSGSGSGTSYSLTISRLEAEDA ATYYCHQWSSSPHTFGGGTK**V**EIKR
139	hMC48 VL CDR1	SSVSY
140	hMC48 VL CDR2	DTS
141	hMC48 VL CDR3	HQWSSSPHT
142	hMC48 VH CDR1	GFSLTSYG
143	hMC48 VH CDR2	IWGEGST
144	hMC48 VH CDR3	AMTGTAY

[0081] 表17-4.人类化单株抗体MC48(第4种)的氨基酸及核苷酸序列

[0082]

SEQ ID NO	描述	序列
145	hMC48 VH核苷酸序列	CAGGTCCAGCTGAAAGAGAGCGGCCCCGGACTGGTCGC CCCTTCACAGAGCCTGAGCATTACTTGCACCGTGAGCGG ATTTTCACTGACCAGCTACGGAGTGAGCTGGATTAGACA GCCTCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGTGATTTG GGGAGAAGGCAGCACCAACTATCACAGTGTCCTGATCTC ACGCCTGACAATTTCCAAGGACAACAGCAAATCCCAGG TCTTCCTGAAACTGAATTCTCTGCAGACTGACGATACCG CTACATACTATTGCGCAATGACAGGGACAGCATACTGGG

[0083]

		GACAGGGAACCCTGGTGACAGTCAGTAGT
146	hMC48 VL核苷酸序列	CAGATCGTGCTGACACAGTCCCCAGCAATTATGTCTGCC AGTCCCGGGGAGAAGGTGACAATGACTTGTAGTGCCAG CTCCTCTGTCTCATACATGCATTGGTATCAGCAGAAGTCC GGCACATCTCCTAAACGGTGGATCTACGACACTTCTAAA CTGAGTTCAGGCGTGCCCGGGAGATTTTCAGGCAGCGG GTCCGGAACTTCTTATAGTCTGACCATTTCCCGACTGGA GGCCGAAGATGCCGCTACCTACTATTGCCATCAGTGGTC TTCAAGCCCTCATACTTTTGGGGGGGGAACTAAGGTGGA AATCAAGCGA
147	hMC48 VH氨基酸序列	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWIRQPPG KGLEWIGVIWGEGSTNYHSVLISRLTISKDNSKSQVFLKLN SLQTDDTATYYCAMTGTAYWGQGTLVTVSS
148	hMC48 VL氨基酸序列	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSG TSPKRWIYDTSKLSSGVPGRFSGSGSGTSYSLTISRLEAEDA ATYYCHQWSSSPHTFGGGTKVEIKR
149	hMC48 VL CDR1	SSVSY
150	hMC48 VL CDR2	DTS
151	hMC48 VL CDR3	HQWSSSPHT
152	hMC48 VH CDR1	GFSLTSYG
153	hMC48 VH CDR2	IWGEGST
154	hMC48 VH CDR3	AMTGTAY
155	hMC48 VL FR1	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAS
156	hMC48 VL FR2	MHWYQQKSGTSPKRWIY
157	hMC48 VL FR3	KLSSGVPGRFSGSGSGTSYSLTISRLEAEDAATYYC
158	hMC48 VL FR4	FGGGTKVEIKR
159	hMC48 VH FR1	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS
160	hMC48 VH FR2	VSWIRQPPGKGLEWIGV
161	hMC48 VH FR3	NYHSVLISRLTISKDNSKSQVFLKLNSLQTDDTATYYC
162	hMC48 VH FR4	WGQGTLVTVSS

[0084] 对SSEA4及其片段具有特异性的抗体

[0085] 本发明的一个态样提供结合至SSEA-4及其片段的新颖抗体。抗SSEA-4抗 体结合至Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1 (SSEA-4六醣)及Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1(SSEA-4六醣的 片段)。在一些实例中,抗体能够结合至Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→ 3Galβ1。在一些实例中,抗体能够结合至Neu5Gcα2→3Galβ1→3GalNAcβ1 →3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1(SSEA-4六醣的类似物)。

[0086] 在一些实施例中,所述方法提高ADCC。

[0087] 在一个实施例中,医药组合物包含具有通用双触角N-聚醣的抗体或其结 合片段,所述通用双触角N-聚醣的末端为呈α-2,6键联方式的唾液酸。

[0088] 在另一态样中,本发明提供治疗及/或降低个体的癌症风险的方法,包含 向有需要的个体投与治疗有效量的如本文所述的组合物。

[0089] 治疗可减小肿瘤尺寸、消除恶性细胞、预防癌转移、预防复发、减少或 杀死播散性癌症、延长存活期及/或延长肿瘤癌症进展的时间。

[0090] 在一些实施例中,本文所述的组合物调配为可注射剂。在一些实施例 中,组合物是皮下投与。

[0091] 本发明的某些实施例的细节阐述于本文中。本发明的其他特征、目标及 优点根据实施方式、图式、实例及权利要求将显而易见。

附图说明

[0092] 图1.治疗性抗体中的优化通用Fc聚醣的结构。

[0093] 图2.制备同质抗体的通用策略,其中优化通用聚醣位于Fc区以便增进其 治疗活性。

[0094] 图3.展现抗流感病毒抗体的提高的抗病毒抗体依赖性细胞介导性细胞毒 性(ADCC)结果。

[0095] 图4.列举抗CD20 GAb相较于利妥昔单抗而言提高的例示性ADCC活性的 表。

[0096] 图5.六种抗CD20 GAb。

[0097] 图6A及6B.图6A位于表的顶部,图6B位于表的底部。表列举抗CD20 GAb及利妥昔单抗的例示性FcγRIIIA结合。可使用此项技术中已知的分析量测 FcγRIIIA结合。例示性分析描述于实例中。Fc受体结合可以抗CD20 GAb相对于 利妥昔单抗的相对比率来测定。在例示性实施例中,Fc受体结合增加至少1.2 倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍或20倍、30倍、 40倍、50倍、100倍或更高。

[0098] 图7.不同的同质抗体对具有CD20的不同细胞的结合活性。图7显示 Rituxan-SCT(Gab101)及Rituxan单GlcNAc对Ramos细胞的CDC作用。

[0099] 图8.不同的同质抗体对具有CD20的不同细胞的结合活性。图8显示 Rituxan-SCT(Gab101)及Rituxan单GlcNAc对Raji细胞的CDC作用。

[0100] 图9.不同的同质抗体对具有CD20的不同细胞的结合活性。图9显示 Rituxan-SCT(Gab101)及Rituxan单GlcNAc对SU-DHL-4细胞的CDC作用。

[0101] 图10.人类SU-DHL-4B细胞的耗乏,如FACS所分析。细胞在15%自体血 浆不存在或存在下与不同浓度的抗CD20 Gab Rituxan-SCT、Rituxan-GlcNAc及 利妥昔单抗一起培养。洗涤之后,细胞用抗CD2-PE及抗CD19-FITC染色。在 FACS上,基于CD19+CD2-B细胞来分析B细胞耗乏(图13)。

[0102] 图11.人类Ramos B细胞的耗乏,如FACS所分析。细胞在15%自体血浆不 存在或存在下与不同浓度的抗CD20 Gab Rituxan-SCT、Rituxan-GlcNAc及利妥 昔单抗一起培养。洗涤之后,细胞用抗CD2-PE及抗CD19-FITC染色。在FACS 上,基于CD19+CD2-B细胞来分析B细胞耗乏(图13)。

[0103] 图12.人类Raji B细胞的耗乏,如FACS所分析。细胞在15%自体血浆不存 在或存

在下与不同浓度的抗CD20 Gab Rituxan-SCT、Rituxan-GlcNAc及利妥昔 单抗一起培养。洗涤之后，细胞用抗CD2-PE及抗CD19-FITC染色。在FACS 上，基于CD19+CD2-B细胞来分析B细胞耗乏(图13)。

[0104] 图13.不同的同质抗体使人类B细胞发生的耗乏。

[0105] 图14.列举抗HER2 GAb相较于曲妥珠单抗(Trastuzumab)而言提高的例示 性ADCC活性的表。

[0106] 图15.列举抗HER2 GAb及利妥昔单抗的例示性Fcγ RIIIA结合的表。

[0107] 图16A.包覆SSEA-4的基于固体的ELISA，以测定人类化MC41噬菌体纯 系的结合活性。

[0108] 图16B.包覆BSA的基于固体的ELISA，以测定人类化MC41噬菌体纯系的 结合活性。

[0109] 图17A.为了评估完整人类化MC41 IgG的结合活性，构筑第1、第2、第3 人类化MC41及嵌合MC41(chMC41)的完整IgG。ELISA结果显示，第2及第3人 类化MC41可以剂量依赖性模式与SSEA-4发生反应(图17A)，但与BSA不发生反 应(图17B)，chMC41观测到相同结果。

[0110] 图17B.为了评估完整人类化MC41 IgG的结合活性，构筑第1、第2、第3 人类化MC41及嵌合MC41(chMC41)的完整IgG。ELISA结果显示，第2及第3人 类化MC41可以剂量依赖性模式与SSEA-4发生反应(图17A)，但与BSA不发生反 应(图17B)，chMC41观测到相同结果。

[0111] 图18A及图18B.图18A显示图18B的条形图的图例。为了测定chMC41及 hMC41的结合特异性，构建聚醣数组。结果显示于图18B中。嵌合及人类化 MC41显示的特异性结合大于市售SSEA4抗体(MC813)。其仅识别SSEA4或经羟 乙酰基修饰的SSEA4。

[0112] 图19A及19B.图19A显示图19B的条形图的图例。为了测定chMC41及 hMC41的结合特异性，构建聚醣数组。结果显示于图19B中。嵌合及人类化 MC41显示的特异性结合大于市售SSEA4抗体(MC813)。其仅识别SSEA4或经羟 乙酰基修饰的SSEA4。

[0113] 图20A.为了研究chMC41的效应功能，进行ADCC分析。利用HPAC胰脏 癌细胞株来评估chMC41、阳性对照MC813或阴性对照NHIgG的ADCC及CDC活 性。

[0114] 图20B.为了研究chMC41的效应功能，进行CDC分析。利用HPAC胰脏癌 细胞株来评估chMC41、阳性对照MC813或阴性对照NHIgG的ADCC及CDC活 性。

[0115] 图21A及图21B.为了研究chMC41及hMC41的效应功能，进行ADCC及 CDC分析。利用HPAC胰脏癌细胞株来评估chMC41、hMC41、阳性对照MC813 或阴性对照NHIgG及NMIgG的ADCC及CDC活性。图21A显示经由ADCC发生的 癌细胞杀灭活性。图21B显示经由CDC发生的癌细胞杀灭活性。

[0116] 图22A.为了鉴别结合至SSEA-4的抗体，发明人使用含有2×10^{10}个成员的 噬菌体呈现人类原生scFv库，其如发明人的先前报导所述建立(Lu等人，2011)。首先通过结合戴诺珠粒(Dynabead)的噬菌体移除此库，接着通过SSEA-4-PEG结 合的戴诺珠粒选择结合SSEA-4的噬菌体。在生物淘选期间，发明人使用两种缓 冲系统:PBS及含有0.01％Tween20的PBS(PBST0.01)。五轮的亲和力选择之 后，第五轮噬菌体回收率增加，在PBS及PBST0.01系统中分别为第一轮的约55 倍及80倍。

[0117] 图22B.为了鉴别结合至SSEA-4的抗体，发明人使用含有2×10^{10}个成员的 噬菌体呈现人类原生scFv库，其如发明人的先前报导所述建立(Lu等人，2011)。首先通过结合戴诺珠粒的噬菌体移除此库，接着通过SSEA-4-PEG结合的戴诺 珠粒选择结合SSEA-4的噬菌

体。在生物淘选期间，发明人使用两种缓冲系统：PBS及含有0.01％Tween20的PBS(PBST0.01)。五轮的亲和力选择之后，第五轮 噬菌体回收率增加，在PBS及PBST0.01系统中分别为第一轮的约55倍及80倍。

[0118] 图23A.随机选择噬菌体纯系且通过ELISA测试SSEA-4结合。

[0119] 图23B.随机选择噬菌体纯系且通过ELISA测试SSEA-4结合。

[0120] 图23C.随机选择噬菌体纯系且通过ELISA测试SSEA-4结合。

[0121] 图23D.随机选择噬菌体纯系且通过ELISA测试SSEA-4结合。

[0122] 图24.为了检查两种噬菌体纯系的特异性及结合亲和力，发明人使用与球 系列聚醣(包括SSEA-4-BSA、Globo H-BSA及SSEA-3-BSA)相同的噬菌体效价进 行比较性ELISA。

[0123] 图25A.为了建立针对SSEA-4的完全人类抗体(hAb)，发明人分别对p2-78 scFv的VH及VL编码序列进行分子工程改造而并入至人类IgG1主链。使用 FreeStyle 293表达系统产生抗SSEA-4p2-78 hAb，接着经由蛋白质G琼脂糖管柱 纯化。发明人利用库马斯蓝(coomassie blue)染色，通过SDS-PAGE分析来检查 抗体纯度。

[0124] 图25B.ELISA，以研究p2-78 hAb对球系列聚醣的结合活性。

[0125] 图26A.市售IgM抗体的阳性对照MC631。含有203种不同聚醣的聚醣数 组，以进一步证实p2-78 hAb的特异性。

[0126] 图26B.p2-78 hAb所识别的聚醣。

[0127] 图26C.含有203种不同聚醣的聚醣数组，以进一步证实p2-78 hAb的特异 性。

[0128] 图27A.将MC48及MC41的VH及VL可变区与NCBI IgBLAST或IMGT数据 库比对之后，发明人产生第1、第2、第3及第4人类化MC48序列以及第1、第2 及第3人类化MC41序列。发明人接着根据这些人类化MC48及MC41序列构筑且 产生噬菌体呈现scFv形式。为测定人类化MC48及MC41噬菌体纯系的结合活 性，发明人进行包覆SSEA-4-BSA的基于固体的ELISA。发明人发现，第3及第4 人类化MC48以及第2及第3人类化MC41 scFv噬菌体可以剂量依赖性方式识别 SSEA-4，而第1及第2人类化MC48以及第1MC41 scFv对SSEA-4失去结合活性。数据显示，相较于鼠类mAb MC48或MC41的结合亲和力，第4人类化MC48及第 3人类化MC41 scFv噬菌体纯系的结合亲和力得以维持。

[0129] 图27B.将MC48及MC41的VH及VL可变区与NCBI IgBLAST或IMGT数据 库比对之后，发明人产生第1、第2、第3及第4人类化MC48序列以及第1、第2 及第3人类化MC41序列。发明人接着根据这些人类化MC48及MC41序列构筑且 产生噬菌体呈现scFv形式。为测定人类化MC48及MC41噬菌体纯系的结合活 性，发明人进行包覆SSEA-4-BSA的基于固体的ELISA。发明人发现，第3及第4 人类化MC48以及第2及第3人类化MC41 scFv噬菌体可以剂量依赖性方式识别 SSEA-4，而第1及第2人类化MC48以及第1MC41 scFv对SSEA-4失去结合活性。数据显示，相较于鼠类mAb MC48或MC41的结合亲和力，第4人类化MC48及第 3人类化MC41 scFv噬菌体纯系的结合亲和力得以维持。

[0130] 图28A.将MC48及MC41的VH及VL可变区与NCBI IgBLAST或IMGT数据 库比对之后，本发明人产生第1、第2、第3及第4人类化MC48序列以及第1、第 2及第3人类化MC41序列。发明人接着根据这些人类化MC48及MC41序列构筑 且产生噬菌体呈现scFv形式。为测定人类化MC48及MC41噬菌体纯系的结合活 性，发明人进行包覆SSEA-4-BSA的基于固体的ELISA。发明人发现，第3及第4 人类化MC48以及第2及第3人类化MC41 scFv噬菌体可以剂量依赖性

方式识别 SSEA-4,而第1及第2人类化MC48以及第1MC41 scFv对SSEA-4失去结合活性。数据显示,相较于鼠类mAb MC48或MC41的结合亲和力,第4人类化MC48及第 3人类化MC41 scFv噬菌体纯系的结合亲和力得以维持。

[0131] 图28B.将MC48及MC41的VH及VL可变区与NCBI IgBLAST或IMGT数据 库比对之后,发明人产生第1、第2、第3及第4人类化MC48序列以及第1、第2 及第3人类化MC41序列。发明人接着根据这些人类化MC48及MC41序列构筑且 产生噬菌体呈现scFv形式。为测定人类化MC48及MC41噬菌体纯系的结合活 性,发明人进行包覆SSEA-4-BSA的基于固体的ELISA。发明人发现,第3及第4 人类化MC48以及第2及第3人类化MC41 scFv噬菌体可以剂量依赖性方式识别 SSEA-4,而第1及第2人类化MC48以及第1MC41 scFv对SSEA-4失去结合活性。数据显示,相较于鼠类mAb MC48或MC41的结合亲和力,第4人类化MC48及第 3人类化MC41 scFv噬菌体纯系的结合亲和力得以维持。

[0132] 图29A及图29B.将MC48及MC41的VH及VL可变区与NCBI IgBLAST或 IMGT数据库比对之后,发明人产生第1、第2、第3及第4人类化MC48序列以及 第1、第2及第3人类化MC41序列。发明人接着根据这些人类化MC48及MC41序 列构筑且产生噬菌体呈现scFv形式。为测定人类化MC48及MC41噬菌体纯系的 结合活性,发明人进行包覆SSEA-4-BSA的基于固体的ELISA。发明人发现,第 3及第4人类化MC48以及第2及第3人类化MC41 scFv噬菌体可以剂量依赖性方式 识别SSEA-4,而第1及第2人类化MC48以及第1MC41 scFv对SSEA-4失去结合活性。数据显示,相较于鼠类mAb MC48或MC41的结合亲和力,第4人类化MC48 及第3人类化MC41 scFv噬菌体纯系的结合亲和力得以维持。

[0133] 图29B.将MC48及MC41的VH及VL可变区与NCBI IgBLAST或IMGT数据 库比对之后,发明人产生第1、第2、第3及第4人类化MC48序列以及第1、第2 及第3人类化MC41序列。发明人接着根据这些人类化MC48及MC41序列构筑且 产生噬菌体呈现scFv形式。为测定人类化MC48及MC41噬菌体纯系的结合活 性,发明人进行包覆SSEA-4-BSA的基于固体的ELISA。发明人发现,第3及第4 人类化MC48以及第2及第3人类化MC41 scFv噬菌体可以剂量依赖性方式识别 SSEA-4,而第1及第2人类化MC48以及第1MC41 scFv对SSEA-4失去结合活性。数据显示,相较于鼠类mAb MC48或MC41的结合亲和力,第4人类化MC48及第 3人类化MC41 scFv噬菌体纯系的结合亲和力得以维持。

[0134] 图30A及30B.为了评估完整人类化MC41 IgG的结合活性,发明人构筑第 1、第2、第3人类化MC41及嵌合MC41(chMC41)的完整IgG。ELISA结果显示, 第2及第3人类化MC41可以剂量依赖性模式与SSEA-4发生反应(图30A),但不与 BSA反应(图30B),chMC41观测到相同结果。

[0135] 图31A及图31B.为了测定chMC41及hMC41的结合特异性,构建聚醣数 组。嵌合及人类化MC41显示的特异性结合大于市售SSEA4抗体(MC813)。其仅 识别SSEA4或经羟乙酰基修饰的SSEA4。图31A显示被识别的聚醣且图31B显示 数组结果。

[0136] 图32A及图32B.为了测定chMC41及hMC41的结合特异性,构建聚醣数 组。嵌合及人类化MC41显示的特异性结合大于市售SSEA4抗体(MC813)。其仅 识别SSEA4或经羟乙酰基修饰的SSEA4。图32A显示被识别的聚醣且图32B显示 数组结果。

[0137] 图33A及图33B.为了研究hMC48、chMC41及hMC41的效应功能,进行 ADCC及CDC分析。使用HPAC、BxPC3及PL45胰脏癌细胞株,评估hMC48或NHIgG在10μg/ml浓度下的ADCC及

CDC活性。

[0138] 图34A.用chMC41、hMC41、阳性对照MC813或阴性对照NHIgG处理 HPAC细胞。

[0139] 图34B.用chMC41、hMC41、阳性对照MC813或阴性对照NHIgG处理 HPAC细胞。

[0140] 图35A及35B.数据显示hMC41及chMC41的效应功能优于hMC48的效应功 能。有趣的是，人类化MC41不仅维持其原始活性，而且其经由ADCC及CDC显 示的癌细胞杀灭活性比MC813更强。

[0141] 图36.通过ELISA检查hMC41及hMC48对SSEA-4的结合能力。结果显示 hMC41对SSEA-4的结合比hMC48好得多。相较于hMC48，人类化MC41的最大 结合值更高且Kd值更小(就hMC41及hMC48而言，分别为0.2μg/ml及4.6 μg/ml)。

具体实施方式

[0142] 化学定义

[0143] 下文更详细地描述特定官能基及化学术语的定义。化学元素是根据 Handbook of Chemistry and Physics第75版内封面的元素周期表(CAS版)来鉴 别，且特定官能基大体上如其中所述来定义。另外，于Thomas Sorrell,Organic Chemistry,University Science Books,Sausalito,1999;Smith及March,March's Advanced Organic Chemistry,第5版,John Wiley&Sons,Inc.,New York,2001; Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers,Inc.,New York,1989;及Carruthers,Some Modern Methods of Organic Synthesis,第3版, Cambridge University Press,Cambridge,1987中描述有机化学的一般原理以及特 定官能性部分及反应性。此外，于Wong等人的US20100136042、US20090317837及US20140051127中描述例示性聚醣及抗体方法描述，其每一 者的揭示内容以引用的方式并入本文中。

[0144] 本文所述的化合物可包含一或多个不对称中心，且因此可呈各种异构体 形式(例如对映异构体及/或非对映异构体)存在。举例而言，本文所述的化合物 可呈个别对映异构体、非对映异构体或几何异构体形式，或可呈立体异构体的 混合物形式，包括外消旋混合物及其中一或多种立体异构体增浓的混合物。异 构体可通过熟习此项技术者已知的方法(包括对掌性高压液相层析(HPLC)以及 对掌性盐的形成及结晶)自混合物中分离;或可通过不对称合成来制备偏好的异 构体。参见例如Jacques等人,Enantiomers,Racemates and Resolutions(Wiley Interscience,New York,1981);Wilen等人,Tetrahedron 33:2725(1977);Eliel, Stereochemistry of Carbon Compounds(McGraw-Hill,NY,1962);及Wilen, Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions第268页(E.L.Eliel编,Univ.of Notre Dame Press,Notre Dame,IN 1972)。本发明另外涵盖本文所述化合物，呈实质上不含其他异构体的个别异构体形式及替代地呈各种异构体的混合物形 式。

[0145] 当列举数值范围时，意欲涵盖此范围内的每个数值及子范围。举例而言，「C_{1-6}」意欲涵盖C_1、C_2、C_3、C_4、C_5、C_6、C_{1-6}、C_{1-5}、C_{1-4}、C_{1-3}、C_{1-2}、C_{2-6}、C_{2-5}、C_{2-4}、C_{2-3}、C_{3-6}、C_{3-5}、C_{3-4}、C_{4-6}、C_{4-5}及C_{5-6}。

[0146] 除非另有指明，否则将采用属于此项技术的技能范围内的分子生物学、微生物学、重组DNA及免疫学的公知技术来实施本发明。于文献中充分说明此 类技术。参见例如Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版,Sambrook, Fritsch及Maniatis编

(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989);DNA Cloning, 第I及II卷(D.N.Glover编,1985);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);B. Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);the treatise,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller及M.P.Calos编,1987,Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology,第154及155卷(Wu等人编),Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer及Walker编,Academic Press,London,1987); Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow及Lane s编(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988);及Handbook Of Experimental Immunology,第I-IV卷 (D.M.Weir及C.C.Blackwell编,1986)。

[0147] 如本文所用,术语「聚醣」是指多醣或寡醣。聚醣在本文中亦用于指以 下糖结合物的碳水化合物部分,糖结合物为诸如糖蛋白、糖脂、糖肽、糖蛋白 质组、肽聚醣、脂多醣或蛋白聚醣。聚醣通常仅由单糖之间的O-糖苷键联组 成。举例而言,纤维素为由β-1,4-连接型D-葡萄糖组成的聚醣(或更特定而言, 葡聚糖),而甲壳素为由β-1,4-连接型N-乙酰基-D-葡糖胺组成的聚醣。聚醣可以 是单糖残基的均聚物或杂聚物,且可以是线性或分支的。可发现聚醣连接至蛋 白质,如糖蛋白及蛋白聚醣。通常于细胞外表面上发现到它们。O连接型及N连 接型聚醣在真核生物中很常见,也可在原核生物中发现(虽然不常见)。发现N连 接型聚醣连接至序列子中的天冬酰胺酸的R族氮(N)。序列子为Asn-X-Ser或Asn- X-Thr序列,其中X为坚果糖外的任何氨基酸。

[0148] 如本文所使用,术语「抗原决定基」定义为抗原分子的一部分,此部分 接触抗体或T细胞受体的抗原结合位点。

[0149] 如本文所用,术语「流动式细胞测量术」或「FACS」意谓一种技术,它 是经由光学及电子侦测装置检查悬浮于液流中的颗粒或细胞的物理及化学特 性。

[0150] 非天然存在的抗体或「经分离」的抗体为已鉴别且自其原生环境的组分 分离且/或回收的抗体。其原生环境的污染物组分为会干扰抗体的研究、诊断或 治疗用途的物质,且可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质溶质。在一个实 施例中,将抗体纯化(1)至大于抗体的95wt%,如通过例如洛瑞方法(Lowry method)所测定,且在一些实施例中超过99wt%;(2)至足以通过使用例如旋杯 式定序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)至同质,此 通过使用例如库马斯蓝(Coomassie blue)或银染剂、在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE所达成。经分离抗体包括原位位于重组细胞内的抗体,因为将不存 在抗体天然环境中的至少一种组分。然而,经分离抗体通常将通过至少一个纯 化步骤来制备。

[0151] Fab片段亦含有轻链的恒定域及重链的第一恒定域(CH1)。Fab'片段与Fab 片段不同处在于,包括一或多个来自抗体铰链区的半胱胺酸的重链CH1域的羧 基末端处添加几个残基。Fab'-SH在本文中为其中恒定域的半胱胺酸残基携有游 离硫醇基的Fab'名称。F(ab')2抗体片段最初是以其间具有铰链半胱胺酸的Fab'片 段对形式产生。抗体片段的其他化学偶联亦已知。

[0152] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的「轻链」可基于其恒定域的 氨基酸序列而归类为两种明显不同类型(称为κ及λ)之一。

[0153] 取决于重链恒定域的氨基酸序列,抗体(免疫球蛋白)可归为不同类别。免 疫球蛋白有五种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG及IgM,且其中若干者可进一 步分成子类(同型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。对应于不同 类别的免疫球蛋白的重链恒定域分别称为α、δ、ε、γ及μ。已熟知不同类别的免 疫球蛋白的次单元结构及三维组态且大体描述于例如Abbas等人,Cellular and Mol.Immunology,第4版(2000)中。抗体可较大融合分子的一部分,而所述较大 融合分子是由抗体与一或多种其他蛋白质或肽共价或非共价结合所形成。

[0154] 「抗体片段」仅包含完整抗体的一部分,其中所述部分保留与存在于完 整抗体中时通常与那个部份相关的功能中的至少一种功能,及多达大多数或全 部功能。在一个实施例中,抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点且因此保留 结合抗原的能力。在另一个实施例中,抗体片段(例如包含Fc区的抗体片段)保 留存在于完整抗体中时通常与所述Fc区相关的至少一个生物学功能,诸如FcRn 结合、抗体半衰期调节、ADCC功能及补体结合。在一个实施例中,抗体片段 是一种单价抗体,具有实质上类似于完整抗体的活体内半衰期。举例而言,此 种抗体片段可包含连接至Fc序列的抗原结合臂,Fc序列能够为所述片段赋予活体内稳定性。

[0155] 关于本发明的特定氨基酸序列的一致性或同源性在本文中定义为,为了 达成最大同源性百分比且不考虑任何保守性取代作为序列一致性的一部分,在 对准序列及必要时引入空位之后,候选序列中的与特定残基一致的氨基酸残基 百分比。特定序列的N端、C端或内部延伸部分、缺失或插入均不应理解为影响 同源性。本发明中称的所有序列比对为此类最大同源性比对。一般而言,本发 明的聚核苷酸、寡核苷酸及片段与所关注的核酸序列之间的核酸序列同源性为 至少80%>,且更典型地,同源性优选增大为至少85%、90%、91%、92%、 92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%及/或100%。两个氨基酸序列之间若部分或完全一致,则其序列为同源。

[0156] 术语「球系列相关病症」是指或描述典型特征为路径功能或呈递发生异 常或导致路径功能或呈递发生异常的病症。此类病症的实例包括(但不限于)过 度增生性疾病,包括癌症。

[0157] 如本文所用,「治疗」是指试图改变待治疗的个体或细胞的自然过程的临 床干预,且可为了预防而进行或在临床病理学过程中进行。所要治疗作用包括 (但不限于)预防疾病发生或复发、缓解症状、减轻疾病的任何直接或间接病理 性后果、预防或减少发炎及/或组织/器官损伤、降低疾病进展速率、改善或缓 和疾病病况及缓解或改善预后。在一些实施例中,本发明的抗体是用于延迟疾 病或病症的发展。

[0158] 除非另有说明,否则将采用此项技术范围内的分子生物学、微生物学、 重组DNA及免疫学的公知技术来实施本发明。于文献中充分说明此类技术。参 见例如Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版,Sambrook,Fritsch及 Maniatis编(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989);DNA Cloning,第I及II 卷(D.N.Glover编,1985);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss, Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);the treatise,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller及M.P.Calos编,1987,Cold

Spring Harbor Laboratory)；Methods In Enzymology,第154及155卷(Wu等人编)，Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer及Walker编,Academic Press,London,1987)；Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow及Lane s(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988)；及Handbook Of Experimental Immunology,第I-IV卷(D.M.Weir及C.C.Blackwell编,1986)。

[0159] 如本文所使用，术语「聚醣」是指多醣或寡醣。聚醣在本文中亦用于指 糖结合物的碳水化合物部分，糖结合物为诸如糖蛋白、糖脂、糖肽、糖蛋白质 组、肽聚醣、脂多醣或蛋白聚醣。聚醣通常仅由单糖之间的O-糖苷键联组成。举例而言，纤维素为由β-1,4-连接型D-葡萄糖组成的聚醣(或更特定而言，葡聚 糖)，而甲壳素为由β-1,4-连接型N-乙酰基-D-葡糖胺组成的聚醣。聚醣可以是单 糖残基的同型聚合物或异型聚合物，且可以是线性或分支的。可发现聚醣连接 至蛋白质，如糖蛋白及蛋白聚醣。通常于细胞外表面上发现到它们。O连接型 及N连接型聚醣在真核生物中很常见，也可在原核生物中发现(然而不常见)。发 现N连接型聚醣连接至序列子中的天冬酰胺酸的R族氮(N)。序列子为Asn-X-Ser 或Asn-X-Thr序列，其中X为坚果糖之外的任何氨基酸。

[0160] 如本文所使用，术语「抗原」定义为能够引发免疫反应的任何物质。

[0161] 如本文所使用，术语「免疫原性」是指免疫原、抗原或疫苗刺激免疫反 应的能力。

[0162] 如本文所使用，术语「CD1d」是指糖蛋白的CD1(分化丛集1)家族的一 员，表达在各种人类抗原呈递细胞表面上。CD1d呈递的脂质抗原会活化天然杀 手T细胞。CD1d具有供糖脂抗原结合其中的较深抗原结合凹槽。树突状细胞上 所表达的CD1d分子可结合及呈递糖脂，包括α-GalCer类似物，诸如C34。

[0163] 如本文所使用，术语「抗原决定基」定义为抗原分子的一部分，此部分 接触抗体或T细胞受体的抗原结合位点。

[0164] 如本文所使用，术语「疫苗」是指含有抗原的制剂，其由完整致病生物 体(杀死或减毒)或这些生物体的组分(诸如蛋白质、肽或多醣)组成，用于赋予 针对这些生物体所致的疾病的免疫力。疫苗制剂可为天然的、合成的或通过重 组DNA技术获得。

[0165] 如本文所使用，术语「抗原特异性」是指细胞群的一种特性，其使得提 供特定抗原或抗原片段会引起特定细胞增生。

[0166] 如本文所使用，术语「特异性结合」是指结合对(例如抗体与抗原)之间的 相互作用。在各种情形下，特异性结合的具体表达可以是约10^{-6}莫耳/公升、约 10^{-7}莫耳/公升或约10^{-8}莫耳/公升或更小的亲和力常数。

[0167] 「经分离」抗体为已鉴别且与其天然环境的组分分离及/或自其天然环境 的组分中回收的抗体。其天然环境的污染物组分为干扰抗体研究、诊断性或治 疗性使用的物质，且可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白溶质。在一个实施 例中，将抗体纯化(1)至大于抗体的95wt％，如通过例如洛瑞方法(Lowry method)所测定，且在有些实施例中超过99wt％；(2)至足以通过使用例如旋杯 式定序仪获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度；或(3)至同质，此是通过使用例如库马斯蓝或银染剂、在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE 所达成。经分离抗体包括原位位于重组细胞内的抗体，因为将不存在抗体天然 环境中的至少一种组分。然而，分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制 备。

[0168] 如本文所用，词组「实质上相似」、「实质上相同」、「等效」或「实质上 等效」表示两

个数值(例如一者与一分子相关而另一者与参考分子/比较分子相 关)之间的相似程度够大,使得在依据这些值(例如Kd值、抗病毒作用等)所量测 的生物学特征的背景下,熟习此项技术者会认为这两个值之间的差异极小或没 有生物学及/或统计学显著性。以参考/比较分子的值为函数,所述两个值之间 的差异例如为小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%及/或小于约 10%。

[0169] 如本文所用,词组「实质上减少」或「实质上不同」表示两个数值(通 常,一者与一种分子相关而另一者与参考/比较分子相关)之间的差异程度够 大,使得在依据这些值(例如Kd值)所量测的生物学特征的背景下,熟习此项技 术者会认为这两个值之间的差异有统计学显著性。以参考/比较分子的值为函 数,所述两个值之间的差异例如为大于约10%、大于约20%、大于约30%、大于 约40%及/或大于约50%。

[0170] 「结合亲和力」一般是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合搭配物 (例如抗原)间的非共价相互作用的总强度。除非另有说明,否则如本文所使用 的「结合亲和力」是指反映结合对(例如抗体与抗原)成员之间1:1相互作用的固 有结合亲和力。分子X对其搭配物Y的亲和力一般可由解离常数(Kd)表示。可通 过此项技术中已知的常用方法(包括本文所述的方法)量测亲和力。低亲和力抗 体一般与抗原结合缓慢且倾向于容易解离,而高亲和力抗体一般与抗原结合较 快且倾向于维持结合状态更久。此项技术中已知多种量测结合亲和力的方法, 这些方法中的任一者均可用于达成本发明的目的。以下描述特定说明性实施 例。

[0171] 在一个实施例中,根据本发明的「Kd」或「Kd值」是通过放射性标记抗 原结合分析(RIA)量测,所述分析利用所关注的抗体的Fab形式及其抗原执行, 如以下分析所述。Fab对抗原的溶液结合亲和力是通过在滴定系列的非标记抗 原的存在下用最小浓度的(^{125}I)标记抗原平衡Fab,接着用涂有抗Fab抗体的盘捕 捉结合抗原来量测(Chen等人,(1999)J.Mol Biol 293:865-881)。为了建立分析 条件,用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5μg/ml捕捉抗-Fab抗体(Cappel Lab)将微量 滴定盘(Dynex)涂布隔夜,且随后在室温下(约23℃)用PBS中的2%(w/v)牛血清 白蛋白阻断历时两至五小时。在非吸附性盘(Nunc#269620)中,将100pM或26 pM[^{125}I]-抗原与所关注的Fab的连续稀释液混合(例如,符合Presta等人,(1997)Cancer Res.57:4593-4599中对抗VEGF抗体、Fab-12的评估)。随后培育所关注 的Fab隔夜;然而,培育可持续一段较长的时间(例如65小时)以确保达到平衡。 此后,在室温下将混合物转移至捕捉盘中用于培育(例如历时1小时)。随后移除 溶液且用于PBS中的0.1%Tween-20洗涤盘8次。当盘干燥时,添加150μl/孔的 闪烁体(MicroScint-20;Packard),且盘用Topcount伽玛计数器(Packard)计数历时 十分钟。选择提供小于或等于20%最大结合的各Fab的浓度用于竞争性结合分 析。根据另一个实施例,Kd或Kd值是通过使用表面电浆子共振分析,在25℃使 用具有约10个反应单位(RU)的固定有抗原CM5芯片的BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,N.J.)来量测。简而言之,根据供货 商的说明书用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)及N-羟基 丁二酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5,BIAcore Inc.)。用 10mM乙酸钠(pH 4.8)将抗原稀释成5μg/ml(约0.2μM),随后以5μl/分钟的流速 注射以使偶合蛋白质达到约10个反应单位(RU)。继注射抗原之后,注射1M乙 醇胺以阻断未反应基团。在每个实验中,活化斑点且乙醇胺阻断而不固定要用 在参考性扣除的蛋白质。关于动力学量测,在25℃,以约25μl/

min的流速注射 Fab于含0.05％Tween 20的PBS(PBST)中的两倍连续稀释液(0.78nM至500 nM)。使用简单的一比一朗格缪尔结合模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIAcore®评估软件3.2版),通过同时拟合缔合及解离感测图谱来计算缔 合速率(kon)及解离速率(koff)。以koff/kon比率来计算平衡解离常数(Kd)。参见 例如Chen,Y.等人,(1999)J.Mol Biol 293:865-881。若通过上述表面电浆子共振 分析法得到的结合速率超过$10^6M^{-1}s^{-1}$,则结合速率可使用荧光淬灭技术测定，所述技术是在PBS(pH 7.2)中量测20nM抗抗原抗体(Fab形式)在25℃、抗原浓度 递增的情况下,荧光发射强度(激发＝295nm;发射＝340nm,16nm带通)的增 加或减少,如用光谱仪(诸如具有搅拌式比色管的止流装备型光谱亮度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco光谱亮度计(ThermoSpectronic))所量测。

[0172] 根据本发明的「结合速率」或「缔合的速率」或「缔合速率」或「kon」 亦可使用上述相同的表面电浆子共振技术,在25℃使用具有约10个反应单位 (RU)的固定有抗原的CM5芯片的BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc.,Piscataway,NJ)来测定。简而言之,根据供货商的说明书,用N-乙基-N'- (3-二甲基胺基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)及N-羟基丁二酰亚胺(NHS)活化羧 甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5,BIAcore Inc.)。用10mM乙酸钠(pH 4.8)将 抗原稀释成5μg/ml(约0.2μM),随后以5μl/分钟的流速注射以使偶合蛋白质达 到约10个反应单位(RU)。继注射抗原之后,注射1M乙醇胺以阻断未反应基 团。关于动力学量测,在25℃,以约25μl/min的流速注射Fab于含0.05％Tween 20的PBS(PBST)中的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。使用简单的一比一朗 格缪尔结合模型(BIAcore®评估软件3.2版),通过同时拟合缔合及解离感测图谱 来计算结合速率(kon)及解离速率(koff)。以比率koff/kon来计算平衡解离常数 (Kd)。参见例如Chen,Y.等人,(1999)J.Mol Biol 293:865-881。然而,若通过上 述表面电浆子共振分析得到的结合速率超过$10^6M^{-1}s^{-1}$,则结合速率可使用荧光 淬灭技术测定,所述技术是在PBS(pH 7.2)中量测20nM抗抗原抗体(Fab形式)在 25℃、抗原浓度递增的情况下,荧光发射强度(激发＝295nm;发射＝340nm,16nm带通)的增加或减少,如用光谱仪(诸如具有搅拌式比色管的止流装备型光 谱亮度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco光谱亮度计 (ThermoSpectronic))所量测。

[0173] 如本文所使用的术语「载体」意指一种核酸分子,能够转运所连接的另 一核酸分子。一类载体为「质粒」,其是指一个环状双股DNA环,其他DNA区 段可接合于其中。另一类载体为噬菌体载体。另一种类型的载体为病毒载体， 其中可将其他DNA区段接合至病毒基因组。某些载体能够在引入这些载体的宿 主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体及游离型哺乳动物载 体)。其他载体(例如,非游离型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞之后并入至宿 主细胞基因组中,且从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导其 操作性连接的基因表达。在本文中将这些载体称为「重组表达载体」(或简称为「重组载体」)。一般而言,适用于重组DNA技术中的表达载体通常呈质粒形 式。在本说明书中,由于质粒为最常用的载体形式,故「质粒」与「载体」可 互换使用。

[0174] 如本文中可互换使用的「聚核苷酸」或「核酸」是指任何长度的核苷酸 的聚合物,且包括DNA及RNA。核苷酸可为脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经 修饰的核苷酸或碱基及/或其类似物,或可通过DNA或RNA聚合酶或合成反应并 入聚合物中的任何物质。聚核苷酸可包含经修饰的核苷酸,诸如甲基化核苷酸 及其类似物。若有修饰的话,可在装配聚合物之前

或之后对核苷酸结构进行修 饰。核苷酸序列可间杂有非核苷酸组分。聚核苷酸可在合成之后进一步修饰，诸如与标记结合。其他类型的修饰包括例如一或多种天然核苷酸经类似物取 代,也就是「帽」;核苷酸间修饰,诸如那些使用不带电荷键联的修饰(例如膦 酸甲酯、磷酸三酯、磷酰胺酸、胺基甲酸酯等)及使用带电荷键联的修饰(例如 硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、那些含有侧接部分的修饰(诸如蛋白(例如核酸 酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-离胺酸等)、那些使用嵌入剂的修饰(例如吖啶 (acridine)、补骨脂素(psoralen)等)、那些含有螯合剂的修饰(例如金属、放射性 金属、硼、氧化性金属等)、那些含有烷化剂的修饰、那些使用经修饰的键联的 修饰(例如α变旋异构体核酸等),以及聚核苷酸的未修饰形式。另外,通常存在 于糖中的任何羟基均可例如经膦酸酯基、磷酸酯基置换,经标准保护基团保护 或经活化以制备与其他核苷酸的其他键联;或可与固体或半固体支撑物结合。5'及3'端OH可经磷酸化或经胺或具有1至20个碳原子的有机封端基部分取代。其 他羟基亦可相对于标准保护基加以衍生。聚核苷酸亦可含有此项技术中通常已 知的核糖或脱氧核糖类似形式,包括例如2'-O-甲基-核糖、2'-O-烯丙基核糖、 2'-氟-核糖或2'-迭氮基-核糖、碳环形糖类似物、α-变旋异构体糖、差向异构体 糖(诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖(lyxoses))、哌喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖 (sedoheptuloses)、非环形类似物及基本核苷类似物,诸如甲基核糖核苷。一或 多个磷酸二酯键联可经替代性键联基置换。这些替代性连接基团包括(但不限 于)其中磷酸酯基经P(O)S(「硫代酸酯基」)、P(S)S(「二硫代酸酯基」)、(O)NR_2 (「酰胺化物」)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH2(「甲缩醛」)置换的实施例,其 中每个R或R'独立地为H或视情况含有醚(-O-)键联的经取代或未经取代的烷基(1-20个C)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳醛基。聚核苷酸中所有的键联 不需要完全相同。上述描述适用于本文中所提及的所有聚核苷酸,包括RNA及 DNA。

[0175] 如本文中所使用,「寡核苷酸」泛指通常为单股、通常为合成的短聚核苷 酸,长度通常(但不一定)小于约200个核苷酸。术语「寡核苷酸」及「聚核苷 酸」不相抵触。上文有关聚核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。

[0176] 「抗体」(Ab)及「免疫球蛋白」(Ig)为具有相同结构特征的糖蛋白。虽然 抗体对于特定抗原展现结合特异性,但免疫球蛋白包括抗体与通常缺乏抗原特 异性的其他抗体样分子。举例来说,淋巴系统少量生产后一类的多肽,而骨髓 瘤大量生产所述种多肽。

[0177] 术语「抗体」与「免疫球蛋白」在广义上可互换使用,且包括单株抗体 (例如全长或完整单株抗体)、多株抗体、单价、多价抗体、多特异性抗体(例如 双特异性抗体,只要其展现出所需的生物活性即可),且亦可包括某些抗体片段 (如本文更详细地描述)。抗体可为嵌合抗体、人类抗体、人类化抗体及/或亲和 力成熟抗体。

[0178] 抗体的「可变区」或「可变域」是指抗体的重链或轻链的胺基端域。这 些域通常为抗体最多变的部分且含有抗原结合位点。

[0179] 术语「可变」是指,抗体间可变域的某些部分的序列广泛不同且这些部 分用于各特定抗体对其特定抗原的结合及特异性。然而,可变性在整个抗体可 变域中并非平均分布。其集中于轻链与重链可变域中称为互补决定区(CDR)或 高变区的三个区段。可变域中非常保守的部分称为构架(FR)。天然重链及轻链 的可变域各包含四个FR区,通过三个CDR所连接(形成环连接),主要采用β-褶 板构型(在有些状况中形成β-褶板结构的一部分)。各链中的CDR由FR区紧密连 在一起且与来自其它链的CDR一起参与抗体的抗原结合位点的形

成(参见Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))。恒定域不直接涉入抗体与抗原的结合,但展 现各种效应功能,诸如使抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0180] 以番木瓜蛋白酶消化抗体会产生两个称为「Fab」片段的相同抗原结合片 段,各具有单一抗原结合位点;及一个残余「Fc」片段,其名称反映其易于结 晶的能力。胃蛋白酶处理会产生F(ab')2片段,其具有两个抗原结合位点且仍能 够与抗原交联。

[0181] 「Fv」为含有完整抗原识别位点及抗原结合位点的最小抗体片段。在双 链Fv种类中,此区域是由一个重链可变域与一个轻链可变域非共价紧密缔合的 二聚体组成。在单链Fv种类中,可通过可挠性肽连接符共价连接一个重链可变 域与一个轻链可变域,从而使轻链与重链可以与双链Fv种类中的结构类似的「二聚」结构缔合。在此构型中,各可变域的3个CDR相互作用以界定VH-VL 二聚体表面上的抗原结合位点。总体而言,六个CDR赋予抗体抗原结合特异 性。然而,即使单个可变域(或Fv的一半,包含仅三个对抗原具有特异性的CDR)亦具有识别及结合抗原的能力,但亲和力比整个结合位点低。

[0182] Fab片段亦含有轻链恒定域及重链第一恒定域(CH1)。Fab'片段与Fab片段 不同处在于,在包括一或多个来自抗体铰链区的半胱胺酸的重链CH1域的羧基 端处添加数个残基。Fab'-SH在本文中指代恒定域的半胱胺酸残基带有游离硫醇 基的Fab'。F(ab')2抗体片段最初是以彼此间具有铰链半胱胺酸的Fab'片段对形式 产生。亦已知抗体片段的其他化学偶合。

[0183] 基于恒定域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的「轻链」可归类为两种明显不同类型(称作κ及λ)之一。

[0184] 抗体(免疫球蛋白)视其重链的恒定域的氨基酸序列可归为不同类。免疫球 蛋白有五种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG及IgM,且这些类别中数个类别可 进一步分成亚类(同型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。对应于 不同类别免疫球蛋白的重链恒定域分别称作α、δ、ε、γ及μ。已熟知不同类别的 免疫球蛋白的次单元结构及三维构型且一般性描述于例如Abbas等人,Cellular and Mol.Immunology,第4版(2000)中。一个抗体可以是较大融合分子的一部 分,而所述较大融合分子是由所述抗体与一或多种其他蛋白质或肽共价或非共 价缔合所形成。

[0185] 术语「全长抗体」、「完整抗体」及「整个抗体」在本文中可互换地使 用,其是指实质上呈完整形式的抗体,而非如下定义的抗体片段。这些术语尤 其是指具有含有Fc区的重链的抗体。

[0186] 「抗体片段」仅包含完整抗体的一部分,其中所述部分保留与存在于完 整抗体中时通常与那个部分相关的功能中的至少一种功能,及大部分或全部功 能。在一个实施例中,抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点且因此保留结合 抗原的能力。在另一个实施例中,抗体片段(例如包含Fc区者)保留存在于完整 抗体中时通常与Fc区相关的至少一个生物学功能,诸如FcRn结合、抗体半衰期 调节、ADCC功能及补体结合。在一个实施例中,抗体片段是一种单价抗体, 具有实质上类似于完整抗体的活体内半衰期。举例而言,所述抗体片段可包含 连接至Fc序列的抗原结合臂,Fc序列能够为所述片段赋予活体内稳定性。

[0187] 如本文所用,术语「单株抗体」是指自一群实质上同质的抗体获得的抗 体,例如构成所述群体的个别抗体为相同的,除了可能少量存在的可能天然存 在的突变外或仅包含

同质糖型概况(群体中的糖抗体仅具有单一聚醣或单一聚醣 概况)。通过在Fc-297位置使用2,3-及2,6-唾液酸基及去海藻糖基化复合物双触 角聚醣来增强效应功能的同质抗体组合物的实例描述于US12/959,351中。因 此,修饰语「单株」表示抗体不为离散抗体混合物的特征。所述单株抗体通常 包括包含结合标靶的多肽序列的抗体,其中标靶结合多肽序列是通过包括自多 个多肽序列中选出单一标靶结合多肽序列的方法获得。举例而言,选择方法可 为自多个纯系(诸如融合瘤纯系库、噬菌体纯系库或重组DNA纯系库)中选出独 特纯系。应了解,可进一步修改所选靶向结合序列,例如以增进对标靶的亲和 力、使靶向结合序列人类化、增进其在细胞培养中的产量、减少其活体内免疫 原性、形成多特异性抗体等,且包含所修改的靶向结合序列的抗体亦为本发明 的单株抗体。与通常包括针对不同决定子(抗原决定基)的不同抗体的多株抗体 制剂相比,单株抗体制剂中的各单株抗体是针对抗原上的单个决定子。除特异 性外,单株抗体制剂有利的处亦在于其通常未受其他免疫球蛋白污染。修饰语 「单株」指示抗体是自一群实质上同质的抗体获得的特征,且并不应解释为需要通过任何特定方法来产生抗体。举例而言,根据本发明使用的单株抗体可通 过多种技术产生,包括例如融合瘤方法(例如Kohler等人,Nature,256:495 (1975);Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版,1988);Hammerling等人,于:Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563-681 (Elsevier,N.Y.,1981));重组DNA方法(参见例如 美国专利第4,816,567号);噬菌体呈现技术(参见例如Clackson等人,Nature, 352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Sidhu等人, J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093 (2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);及 Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004),及用于在具有一部分 或全部人类免疫球蛋白基因座或编码人类免疫球蛋白序列的基因的动物中产生 人类或人类样抗体的技术(参见例如WO98/24893;WO96/34096; WO96/33735;WO91/10741;Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 2551(1993);Jakobovits等人,Nature 362:255-258(1993);Bruggemann等人, Year in Immunol.7:33(1993);美国专利第5,545,807号、第5,545,806号、第 5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,661,016号;Marks等人,Bio. Technology 10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994); Morrison,Nature 368:812-813(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnol.14: 845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnol.14:826(1996)及Lonberg及 Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995)。

[0188] 本文的单株抗体特定包括「嵌合」抗体,其中重链及/或轻链的一部分与 得自特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而 所述(这些)链的其余部分与得自另一物种或属于另一抗体种类或亚类的抗体中 的相应序列相同或同源;以及这些抗体的片段,只要其展现出所需生物学活性 即可(美国专利第4,816,567号;及Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

[0189] 「人类化」形式的非人类(例如鼠科)抗体为含有自非人类免疫球蛋白获得 的最小序列的嵌合抗体。在一个实施例中,人类化抗体为人类免疫球蛋白(受体 抗体),其中来自受体高变区的残基置换成获自具有所要特异性、亲和力及/或 能力的非人类物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物)的高 变区的残基。在一些情况下,人类免疫

球蛋白的构架区(FR)残基经相应非人类 残基置换。此外,人类化抗体可包含受体抗体或供者抗体中未见的残基。进行 这些修饰以进一步提升抗体效能。一般而言,人类化抗体将包含实质上所有至 少一个且通常两个可变域,其中所有或实质上所有高变环对应于非人类免疫球 蛋白的高变环,且所有或实质上所有FR为人类免疫球蛋白序列的FR。人类化抗 体视情况亦将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常为人类免疫球蛋白恒定区)的至 少一部分。更多详情,参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann 等人,Nature 332:323-329(1988);及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596 (1992)。亦参见以下评论文章及其中引用的参考文献:Vaswani及Hamilton, Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc. Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle及Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433 (1994)。

[0190] 术语「高变区」、「HVR」或「HV」在用于本文中时是指抗体可变域中序 列高变且/或形成结构上界定的环的区域。一般而言,抗体包含六个高变区;三 个在VH中(H1、H2、H3),且三个在VL中(L1、L2、L3)。本文中使用且包含许 多有关高变区的描绘。Kabat互补决定区(CDR)是基于序列可变性且最常用 (Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。Chothia则 是指出结构环的位置(Chothia及Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM高 变区代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,且为Oxford Molecular的AbM 抗体建模软件所用。基于可用复杂晶体结构来分析「接触」高变区。下面标示 来自这些高变区中的每一者的残基。

[0191] 环Kabat AbM Chothia接触

[0192] L1 L24-L34 L24-L34 L26-L32 L30-L36

[0193] L2 L50-L56 L50-L56 L50-L52 L46-L55

[0194] L3 L89-L97 L89-L97 L91-L96 L89-L96

[0195] H1 H31-H35B H26-H35B H26-H32 H30-H35B

[0196] (Kabat编号)

[0197] H1 H31-H35 H26-H35 H26-H32 H30-H35

[0198] (Chothia编号)

[0199] H2 H50-H65 H50-H58 H53-H55 H47-H58

[0200] H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

[0201] 高变区可包含如下「延伸的高变区」:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或 50-56或49-56(L2)及89-97或89-96(L3)以及VH中的26-35(H1)、50-65或49-65 (H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。关于这些定义中的每一者,根据Kabat等 人上文将可变域残基予以编号。

[0202] 「构架」或「FR」残基为除如本文所定义的高变区残基外的彼等可变域 残基。

[0203] 术语「如Kabat中的可变域残基编号」或「如Kabat中的氨基酸位置编号」 及其变化形式是指在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991) 中,用于汇编抗体的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用这个编号系 统,实际的线性氨基酸序列可含有更少或其他氨基酸,相当于缩短或插入可变 域的FR或HVR。举例而言,重链可

变域可包括H2的残基52之后插入单一氨基酸 (根据Kabat的残基52a)及重链FR残基82之后的插入残基(例如根据Kabat的残基82a、82b及82c等)。可通过将抗体序列与「标准」Kabat编号序列的同源区比 对,来决定指定抗体中残基的Kabat编号。

[0204] 「单链Fv」或「scFv」抗体片段包含抗体的VH及VL域,其中这些域存在 于单一多肽链中。一般而言,scFv多肽另外包含VH与VL结构域之间的多肽连 接符,使scFv能够形成抗原结合所需结构。关于回顾scFv,参见Pluckthun,于 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷中,Rosenburg及Moore编, Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。

[0205] 术语「双功能抗体」是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,这些片 段包含与相同多肽链(VH-VL)中的轻链可变域(VL)连接的重链可变域(VH)。通 过使用短到无法使同一链上两个域之间配对的连接符,这些域被迫与另一链的 互补域配对且产生两个抗原结合位点。于例如EP 404,097;WO 93/11161;及 Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)中更完整地描述 双功能抗体。

[0206] 「人类抗体」为具有与人类所产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸 序列及/或使用本文所揭示的制造人类抗体的任何技术制得的抗体。人类抗体的 此定义尤其排除包含非人类抗原结合残基的人类化抗体。

[0207] 「亲和力成熟」抗体为一种抗体,其一或多个HVR中的一或多处改变使 得抗体对抗原的亲和力增进(与不具有彼等改变的亲本抗体相比)。在一个实施 例中,亲和力成熟抗体对靶抗原具有奈莫耳浓度(nanomolar)或甚至皮莫耳浓度 (picomolar)亲和力。可由此项技术中已知的程序制备亲和力成熟抗体。Marks等 人,Bio/Technology 10:779-783(1992)描述通过VH及VL域改组进行亲和力成 熟。以下描述CDR及/或构架残基的随机突变诱发:Barbas等人,Proc Nat.Acad. Sci.USA 91:3809-3813(1994);Schier等人,Gene 169:147-155(1995);Yelton等 人,J.Immunol.155:1994-2004(1995);Jackson等人,J.Immunol.154(7):3310-9 (1995);及Hawkins等人,J.Mol.Biol.226:889-896(1992)。

[0208] 「阻断」抗体或「拮抗剂」抗体为抑制或降低所结合的抗原的生物活性 的抗体。某些阻断抗体或拮抗剂抗体实质上或完全地抑制抗原的生物活性。

[0209] 如本文中所使用的「促效剂抗体」为一种模拟所关注多肽的至少一种功 能活性的抗体。

[0210] 「病症」为受益于本发明抗体治疗的任何病状。此包括慢性及急性病症 或疾病,包括使哺乳动物易患所述病症的彼等病理性病状。本文中欲治疗的病 症的非限制性实例包括癌症。

[0211] 术语「细胞增生性病症」及「增生性病症」是指与某种程度的异常细胞 增生相关的病症。在一个实施例中,细胞增生性病症为癌症。

[0212] 如本文所使用的「肿瘤」是指所有赘生性细胞生长及增生(不论恶性或良 性),及所有癌前及癌性细胞及组织。如本文中所引述,术语「癌症」、「癌性」、「细胞增生性病症」、「增生性病症」及「肿瘤」不相抵触。

[0213] 术语「癌症」及「癌性」是指或描述哺乳动物体内的生理病况,特征通 常是不受调控的细胞生长/增生。癌症的实例包括(但不限于)癌瘤、淋巴瘤(例如 霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非霍奇金氏淋巴瘤)、胚细胞瘤、肉瘤 及白血病。这些癌症的更特

定实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺 癌、肺腺癌、肺鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰脏癌、神经胶质母细 胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝瘤、乳癌、结肠癌、结肠直肠 癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲 状腺癌、肝癌、白血病及其他淋巴组织增生性病症，以及各种类型的头颈癌。

[0214] 如本文所使用，「治疗」是指试图改变所治疗的个体或细胞的自然过程的 临床干预，且可出于预防的目的或临床病理学过程中进行。理想的治疗效果包 括防止疾病发作或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理性后果、 防止或减缓炎症及/或组织/器官伤害、降低疾病进展速度、改善或减缓疾病状 态，及症状缓解或预后改善。在一些实施例中，使用本发明的抗体来推迟疾病 或病症的发展。

[0215] 「个体(individual)」或「个体(subject)」为脊椎动物。在某些实施例中， 脊椎动物为哺乳动物。哺乳动物包括(但不限于)农场动物(诸如牛)、运动型动 物、宠物(诸如猫、狗及马)、灵长类动物、小鼠及大鼠。在某些实施例中，脊 椎动物为人类。

[0216] 用于治疗目的的「哺乳动物」是指归类为哺乳动物的任何动物，包括人 类、家畜及农场动物，及动物园动物、运动型动物或宠物动物，诸如狗、马、 猫、牛等。在某些实施例中，哺乳动物为人类。

[0217] 「有效量」是指有效达成期望治疗或预防结果所必需的剂量及时间量。

[0218] 本发明的物质/分子的「治疗有效量」可根据诸如以下因素而变：个体的 疾病状态、年龄、性别及体重，以及所述物质/分子在个体中诱发所要反应的能 力。治疗有效量亦为一种治疗有益效应超过所述物质/分子的任何毒性或有害效 应的量。「预防有效量」是指有效达成期望预防结果所必需的剂量及时间量。 由于预防剂量是在患病之前或在患病早期的个体中使用，因此预防有效量通常 (但不一定)小于治疗有效量。

[0219] 如本文所用的术语「细胞毒性剂」是指一种抑制或阻止细胞功能及/或引 起细胞破坏的物质。所述术语意欲包括放射性同位素(例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、 Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}及Lu的放射性同位素)；化学治疗 剂，例如甲胺蝶呤、阿霉素(adriamicin)、长春花生物碱(vinca alkaloids)(长春新 碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、阿霉素 (doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、道诺霉素(daunorubicin)或其他嵌入剂、酶及其片段(诸如核酸 分解酶、抗生素及毒素，诸如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶 促活性毒素，包括其片段及/或变异体)，以及下文所揭示的各种抗肿瘤剂或抗 癌剂。在下文中描述其他细胞毒性剂。杀肿瘤剂可摧毁肿瘤细胞。

[0220] 「化学治疗剂」为可用于治疗癌症的化合物。化学治疗剂的实例包括：烷化剂，诸如噻替派(thiotepa)及CYTOXAN®环磷酰胺；烷基磺酸盐类，诸如 白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶类， 诸如苯唑多巴(benzodopa)、卡巴醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利 多巴(uredopa)；伸乙基亚胺类及甲基密胺类，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸 乙基密胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷酰胺(trietylenephosphoramide)、三 伸乙基硫代磷酰胺(triethiylenethiophosphoramide)及三羟甲密胺 (trimethylolomelamine)；多聚乙酰类(acetogenins)(尤其布拉他辛(bullatacin)及 布拉他辛酮(bullatacinone))；Δ-9-四氢大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol)(屈 大麻酚(dronabinol，MARINOL®))；

β-拉帕酮(beta-lapachone);拉帕醇 (lapachol);秋水仙碱(colchicine);桦木酸(betulinic acid);喜树碱 (camptothecin)(包括合成类似物拓朴替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊 诺替康(irinotecan;CAMPTOSAR®)、乙酰基喜树碱(acetylcamptothecin)、斯考 普莱叮(scopolectin)及9-胺基喜树碱);苔藓虫素(bryostatin);卡利斯塔叮 (callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)及比 折来新合成类似物);足叶草毒素(podophyllotoxin);足叶草酸(podophyllinic acid);替尼泊苷(teniposide);念珠藻环肽(cryptophycin)(尤其念珠藻环肽1及念 珠藻环肽8);海兔毒素(dolastatin);多卡米辛(duocarmycin)(包括合成类似物, KW-2189及CB1-TM1);艾榴素(eleutherobin);盘克斯塔叮(pancratistatin);沙 考的汀(sarcodictyin);海绵素(spongistatin);氮芥类,诸如苯丁酸氮芥、萘氮 芥(chlomaphazine)、氯磷酰胺、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺、二氯甲二 乙胺、盐酸二氯甲二乙胺氧化物(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法 仑、新氮芥(novembichin)、胆固醇苯乙酸氮芥(phenesterine)、松龙苯芥 (prednimustine)、氯乙环磷酰胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);硝 基脲,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及拉宁司汀 (ranimnustine);抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如,卡奇霉素(calicheamicin), 尤其卡奇霉素γ1及卡奇霉素ω1(参见,例如,Agnew,Chem.Intl.Ed.Engl., 33:183-186(1994));达米辛(dynemicin),包括达米辛A;艾斯帕米辛(esperamicin);以及新制癌菌素(neocarzinostatin)发色团及相关色蛋白烯二炔抗 生素发色团)、克拉斯米辛(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、奥斯拉米 辛(authramycin)、重氮丝胺酸(azaserine)、博莱霉素(bleomycin)、放线菌素 C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、克罗米辛(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、道诺霉 素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-侧氧-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®阿 霉素(包括吗啉并-阿霉素(morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉并-阿霉素 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯并-阿霉素及脱氧阿霉素 (deoxydoxorubicin))、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、埃达霉素 (idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycins)(诸如丝裂霉 素C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、泼非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、奎那霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,诸如甲胺 蝶呤及5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)(5-FU);叶酸类似物,诸如傣诺特呤 (denopterin)、甲胺蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类 似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,诸如环胞苷(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他 滨(enocitabine)、氟尿核苷(floxuridine);雄性激素,诸如二甲睾酮 (calusterone)、屈他雄酮丙酸酯

(dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺剂,诸如 胺基苯乙哌啶酮(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂,诸如夫罗林酸(frolinic acid);醋葡内酯(aceglatone);醛磷酰胺葡 糖苷(aldophosphamide glycoside);胺基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);伊利卢 拉(eniluracil);胺苯吖啶(amsacrine);倍思塔布(bestrabucil);比生群 (bisantrene);埃达曲克(edatraxate);得弗伐胺(defofamine);秋水仙胺 (demecolcine);地吖醌(diaziquone);艾弗利散(elfornithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃坡霉素(epothilone);乙环氧啶(etoglucid);硝酸镓(gallium nitrate);羟基脲(hydroxyurea);香菇糖(lentinan);罗尼达宁(lonidainine);美登素类(maytansinoids),诸如美登素(maytansine)及胺沙托辛(ansamitocins);丙脒腙(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫比达摩(mopidanmol);硝拉维林(nitraerine);喷司他丁(pentostatin);凡那明 (phenamet);比柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙基酰肼(2- ethylhydrazide);普鲁苄肼(procarbazine);PSK®多醣复合物(JHS Natural Products,Eugene,Oreg.);丙亚胺(razoxane);根霉菌素(rhizoxin);西佐糖 (sizofuran);螺锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺 醌(triaziquone);2,2',2″-三氯三乙基胺;单端孢霉烯族毒素(trichothecenes)(尤 其T-2毒素、弗纳库林A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)及胺癸叮 (anguidine));乌拉坦(urethan);去乙酰长春酰胺(vindesine)(ELDISINE®, FILDESIN®);氮烯唑胺(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露 醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);双溴丙基哌嗪(pipobroman);甲托辛 (gacytosine);阿糖胞苷(arabinoside)(「Ara-C」);噻替派;紫杉醇(taxoids), 例如TAXOL®太平洋紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.); 不含Cremophor、白蛋白经工程改造的太平洋紫杉醇纳米微粒调配物 ABRAXANE™(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,Ill.)及TAXOTERE®多西他赛(doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer,Antony,France);克罗 南布(chloranbucil);吉西他滨(gemcitabine)(GEMZAR®);6-硫鸟嘌呤(6- thioguanine);巯基嘌呤(mercaptopurine);甲胺蝶呤;铂类似物,诸如顺铂 (cisplatin)及卡铂(carboplatin);长春花碱(vinblastine)(VELBAN®);铂;依托泊 苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱 (vincristine)(ONCOVIN®);奥沙利铂(oxaliplatin);卢考弗文(leucovovin);长春 瑞滨(vinorelbine)(NAVELBINE®) ;诺凡特龙(novantrone);依达曲沙 (edatrexate);道诺霉素;胺基蝶呤;伊班膦酸盐(ibandronate);拓扑异构酶抑 制剂RFS 2000;二氟甲基鸟胺酸(difluoromethylornithine)(DMFO);类视色素 类,诸如视黄酸(retinoic acid);卡培他滨(capecitabine)(XELODA®);以上任一 种治疗剂的医药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及以上两种或更多治疗剂的 组合,诸如CHOP(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱与泼尼松龙(prednisolone)的组 合治疗的缩写)及FOLFOX(奥沙利铂(oxaliplatin)(ELOXATIN™)与5-FU及卢考弗 文组合治疗方案的缩写)。

[0221] 医药调配物

[0222] 医药组合物是以与剂量调配物兼容的方式且在治疗上具有有效性、保护 性及治

疗性的量投与。投药所需的活性成分的准确量视从业者判断而定。然 而,熟习此项技术者容易确定适合的剂量范围。初始投药及追加剂量的适合方 案亦为可变的,但可包括初始投药,随后再投药。疫苗剂量亦可视投药途径而 定且根据宿主体型而变。

[0223] 在此项技术中已熟知于动物(例如小鼠、兔、山羊、绵羊或马)体内产生单 株及多株抗体及其片段的方法。参见例如Harlow及Lane,(1988)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York。术语「抗体」包 括完整免疫球蛋白分子以及其片段,诸如Fab、F(ab')$_2$、Fv、scFv(单链抗体)及 dAb(域抗体;Ward等人,(1989)Nature,341,544)。

[0224] 本文所揭示的组合物可与熟习此项技术者经阅读本发明而可鉴别的其他 活性剂、载剂、媒剂、赋形剂或助剂一起包括于医药组合物中。

[0225] 医药组合物优选包含至少一种医药学上可接受的载剂。在这些医药组合 物中,本文所揭示的组合物形成「活性化合物」,亦称为「活性剂」。如本文所 用,措辞「医药学上可接受的载剂」包括与医药投药相容的溶剂、分散介质、 包衣剂、抗细菌剂及抗真菌剂、等张剂及吸收延迟剂及类似物。组合物中亦可 并入补充性活性化合物。医药组合物调配成可与其预期的投药途径兼容。投药 途径的实例包括非经肠,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(局 部)、经黏膜及经直肠投药。用于非经肠、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包 括以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二 醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲 酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓 冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;及张力调节剂,例如氯化钠或右旋 糖。可用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)调节pH。非经肠制剂可封装于由玻璃或 塑料制成的安瓿、抛弃式注射器或多剂量小瓶中。

[0226] 临床应用

[0227] 本发明提供经选择且定向的优化糖抗体,其适用于治疗个体的增生性疾 病,诸如癌症(例如肺癌、大肠癌、胰脏癌、胆道癌或子宫内膜癌)、良性赘瘤 或血管生成。

[0228] 本文所述的组合物亦可用于癌症治疗与诊断。在此项技术中已熟知于人 类及/或动物(例如小鼠、兔、山羊、绵羊或马)体内产生单株及多株抗体及其片 段的方法。参见例如Harlow及Lane,(1988)Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,New York。术语「抗体」包括完整免疫球蛋白 分子以及其片段,诸如Fab、F(ab)$_2$、Fv、scFv(单链抗体)及dAb(域抗体; Ward等人,(1989)Nature,341,544)。

[0229] 这些组合物可进一步包含此项技术中熟知的适合载剂,诸如医药学上可 接受的赋形剂,包括缓冲剂。

[0230] 亦提供非天然存在及/或分离的抗体及聚核苷酸。在某些实施例中,分离 的抗体及聚核苷酸为实质上纯的。

[0231] 抗体的抗原结合域是由两个具有约110个氨基酸的可变(V)区形成,一个来 自轻链(VL)及重链(VH),两者均存在三个高变环或互补决定区(CDR)。可变域 可在噬菌体上,以单链Fv(scFv)片段形式(其中VH与VL经由短的可挠性肽共价 连接);或以Fab片段形式(其中其各自与恒定域融合且发生非共价相互作用)进 行功能呈现,如Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中所述。如 本文所用,scFv编码噬菌体纯系及Fab编码噬菌体纯系统称为「Fv噬菌体纯 系」或「Fv纯系」。

[0232] 可通过聚合酶链反应(PCR)分别选殖出VH及VL基因的谱系且在噬菌体库 中随机重组,接着可针对抗原结合纯系进行搜寻,如Winter等人,Ann.Rev. Immunol.,12:433-455(1994)中所述。在无需构筑融合瘤的情况下,经免疫来 源的库提供对免疫原具有高亲和力的抗体。或者,可在无需任何免疫接种的情 况下选殖出原生谱系,对广泛范围的非自体抗原以及自体抗原提供单一人类抗 体来源,如Griffiths等人,EMBO J,12:725-734(1993)所述。最后,亦可以合成 方式如下制备原生库:自干细胞选殖出未重排V基因区段,且使用含有随机序 列的PCR引物编码CDR3高度可变区及实现活体外重排,如Hoogenboom及 Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所述。

[0233] 使用丝状噬菌体,通过与微小外壳蛋白pIII融合来呈现抗体片段。抗体片 段可以单链Fv片段形式呈现,其中VH与VL域通过可挠性多肽间隔子连接于同 一多肽链上,例如如Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)所述;或以 Fab片段形式呈现,其中一条链与pIII融合且另一条链分泌至细菌宿主细胞周质 中,其中在噬菌体表面上通过置换一些野生型外壳蛋白而变成是呈现Fab-外壳 蛋白结构的组装,例如如Hoogenboom等人,Nucl.Acids Res.,19:4133-4137 (1991)中所述。

[0234] 自所关注细胞回收编码抗体可变基因区段(包括VH及VL区段)的核酸且予 以扩增。在重排的VH及VL基因库的情况下,所要DNA可如下获得:自淋巴细 胞分离出基因组DNA或mRNA,随后用与重排VH及VL基因的5'及3'端匹配的引 物进行聚合酶链反应(PCR),如Orlandi等人,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA),86: 3833-3837(1989)中所述,藉此制备多样化V基因谱系用于表达。V基因可自cDNA及基因组DNA扩增,其中反向引物位于编码成熟V域的外显子5'端且正向 引物主要位于J区段内,如Orlandi等人,(1989)及Ward等人,Nature,341:544-546 (1989)中所述。然而,自cDNA扩增时,反向引物亦可位于前导外显子中,如Jones等人,Biotechnol.,9:88-89(1991)中所述,且正向引物位于恒定区内,如 Sastry等人,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA),86:5728-5732(1989)中所述。为使互 补性达到最大,可在引物中并入简并性,如Orlandi等人(1989)或Sastry等人 (1989)所述。在某些实施例中,库多样性如下予以最大化:使用靶向各V基因家 族的PCR引物以便扩增免疫细胞核酸样品中存在的所有可用VH及VL排列,例 如如Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)的方法中所述或如Orum等人, Nucleic Acids Res.,21:4491-4498(1993)的方法中所述。为了将经扩增DNA选 殖入表达载体中,可在一端将罕见限制位点以标记形式引入PCR引物内,如Orlandi等人(1989)中所述;或用加标记的引物进一步进行PCR扩增,如 Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)中所述。

[0235] 以合成方式重排的V基因的谱系可活体外源于V基因区段。已选殖及定序 大部分人类VH基因区段(报导于Tomlinson等人,J.Mol.Biol.,227:776-798 (1992)中),且定位(报导于Matsuda等人,Nature Genet.,3:88-94(1993)中);可 使用这些经选殖区段(包括H1及H2环的所有主要构形),利用编码具有多样性序 列及长度的H3环的PCR引物产生多样性VH基因谱系,如Hoogenboom及Winter, J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)中所述。亦可制备其中所有序列多样性集中于 单一长度的长H3环中的VH谱系,如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89: 4457-4461(1992)中所述。已选殖及定序人类Vκ及Vλ区段(报导于Williams及 Winter,Eur.J.Immunol.,23:1456-1461(1993)中)且可用于制备合成轻链谱系。基于一系列VH及VL折迭及L3及H3长度,合成V基因谱系将编码具有结构多样 性

相当多的抗体。编码V基因的DNA扩增之后，可根据Hoogenboom及Winter,J. Mol.Biol.,227:381-388(1992)的方法使生殖系V基因区段进行活体外重排。

[0236] 可通过以若干方式将VH与VL基因谱系组合在一起而构筑抗体片段的谱 系。各谱系可在不同载体中产生，且在活体外重组载体(例如如Hogrefe等人, Gene,128:119-126(1993)中所述)或在活体内通过组合感染来重组，例如 Waterhouse等人,Nucl.Acids Res.,21:2265-2266(1993)中所述的loxP系统。活 体内重组方法是利用Fab片段的双链性质来克服大肠杆菌转形效率对库尺寸加 诸的限制。分别选殖原生VH及VL谱系，一者选殖入噬菌质粒中，且另一者选 殖入噬菌体载体中。两种库接着通过噬菌体感染含有噬菌质粒的细菌而组合， 使得各细胞含有不同组合且库尺寸仅受存在的细胞数目限制(约1012个纯系)。两种载体均含有活体内重组信号，使得VH及VL基因在单一复制子上重组且共 封装于噬菌体病毒粒子中。这些巨大库提供大量具有良好亲和性(约10^{-8}M的 Kd^{-1})的多样性抗体。

[0237] 或者，可依序将谱系选殖入同一载体中，例如如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:7978-7982(1991)中所述，或通过PCR组装在一起，接着选 殖，例如如Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)中所述。亦可利用PCR组 装，使用编码可挠性肽间隔子的DNA将VH与VL DNA相连接，以形成单链Fv (scFv)谱系。在又一技术中，利用「细胞内PCR组装」，通过PCR将淋巴细胞内 的VH与VL基因组合，接着选殖所连接基因的纯系谱系，如Embleton等人,Nucl. Acids Res.,20:3831-3837(1992)中所述。

[0238] 可通过此项技术中已知的任何技术来筛选库。标靶可用于涂布吸收盘的 孔，在附着于吸收盘或用于细胞分选的宿主细胞上表达，或与生物素结合以便 被经链亲和素涂布的珠粒捕捉，或在此项技术中已知的任何其他方法中用于淘 选噬菌体呈现库。

[0239] 洗涤结合至固相的噬菌体，接着通过酸溶离，例如如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:7978-7982(1991)中所述，或通过碱溶离，例如如 Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)中所述，或通过SSEA-3/SSEA- 4/GLOBO H抗原竞争而溶离，例如以类似于Clackson等人,Nature,352:624-628 (1991)的抗原竞争方法的程序进行。可在单一回合选择中将噬菌体增浓20-1,000 倍。此外，增浓的噬菌体可于细菌培养物中生长且进一步进行多回合选择。

[0240] 选择效率取决多种因素，包括洗涤期间的解离动力学，及单一噬菌体上 的多个抗体片段是否可同时与抗原接合。可通过使用短暂洗涤、多价噬菌体呈 现及抗原于固相中的高包覆密度而保留具有快速解离动力学(及弱结合亲和力) 的抗体。高密度不仅经由多价相互作用使噬菌体稳定，还有利于已解离的噬菌 体再结合。可通过使用长时间洗涤及单价噬菌体呈现(如Bass等人,Proteins,8: 309-314(1990)及WO 92/09690中所述)以及抗原的低包覆密度(如Marks等人, Biotechnol.,10:779-783(1992)中所述)来促进具有缓慢解离动力学(及良好结合 亲和力)的抗体的选择。

[0241] 然而，所选抗体的随机突变(例如如上述一些亲和力成熟技术中所进行)可 能产生许多突变体，其大部分结合至抗原且少数具有较高亲和性。在有限 SSEA-3/SSEA-4/GLOBO H的情况下，稀少的高亲和力噬菌体可胜出。为保留所 有的较高亲和力突变体，可将噬菌体与过量的生物素化SSEA-3/SSEA-4/GLOBO H一起培育，但其中生物素化SSEA-3/SSEA-4/GLOBO H的莫耳浓度低于SSEA- 3/SSEA-4/GLOBO H的标靶莫耳浓度亲和力常数。接着可通过经链亲和素涂布 的顺磁珠粒捕捉高亲和力结合噬菌体。此类「平衡捕捉」允许根

据结合亲和力 来选择抗体,其中敏感性允许自大量过量的具有较低亲和力的噬菌体中分离出 亲和力至少两倍高的突变体纯系。亦可基于解离动力学操控用于洗涤结合至固 相的噬菌体的条件以进行区分。

[0242] 编码本发明的Fv纯系的DNA容易使用公知程序分离及定序(例如使用为了 自融合瘤或噬菌体DNA模板特定扩增所关注的重链及轻链编码区所设计的寡核 苷酸引物)。DNA在分离之后,则可置放于表达载体中,接着转染至原本不产 生免疫球蛋白的宿主细胞(诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中,以在重组宿主细胞中合成所要单株抗体。关于编 码抗体的DNA在细菌中的重组表达的评述论文包括Skerra等人,Curr.Opinion in Immunol.,5:256(1993)及Pluckthun,Immunol.Revs,130:151(1992)。

[0243] 编码本发明的Fv纯系的DNA可与编码重链及/或轻链恒定区的已知DNA序 列(例如可自Kabat等人,同上获得适当DNA序列)组合,以形成编码全长或部分 长度重链及/或轻链的纯系。应了解,任何同型恒定区可用于此目的,包括 IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恒定区,且此类恒定区可获自任何人类或动物物 种。Fv纯系源于一个动物(诸如人类)物种的可变域DNA,接着与另一动物物种 的恒定区DNA融合以形成编码序列用于「杂交」的编码序列,如本文所用的 「嵌合」及「杂交」抗体的定义包括全长重链及/或轻链。在一个实施例中,源 于人类可变DNA的Fv纯系与人类恒定区DNA融合以形成所有人类全长或部分长 度重链及/或轻链的编码序列。

[0244] 根据原生库(天然或合成)制造的抗体可具有中等亲和力(约10^6至10^7M^{-1}的 Kd^{-1}),但亲和力成熟亦可通过构筑第二库及自第二库再选择来进行活体外模 拟,如Winter等人(1994)(同上)中所述。举例而言,可在Hawkins等人,J.Mol. Biol.,226:889-896(1992)的方法或Gram等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA,89: 3576-3580(1992)的方法中,通过使用易错聚合酶(Leung等人,Technique 1:11- 15(1989)中报导)而在活体外随机引入突变。另外,亲和力成熟可如下进行:使 所选个别Fv纯系中的一或多个CDR发生随机突变(例如使用PCR,使用携有跨越 所关注的CDR的随机序列的引物)且筛选高亲和力纯系。WO 9607754(1996年3 月14日公开)描述一种诱导免疫球蛋白轻链的互补决定区发生突变以产生轻链基 因库的方法。另一种有效方法为将通过噬菌体呈现所选的VH或VL域与获自未 经免疫供者的天然存在的V域变异体的谱系重组且在数回合链改组中根据较高 亲和力来筛选,如Marks等人,Biotechnol.,10:779-783(1992)中所述。此技术可 产生亲和力在$10^{-9}M$范围内的抗体及抗体片段。

[0245] 在此项技术中已熟知产生及评估抗体亲和力的其他方法且描述于例如 Kohler等人,Nature 256:495(1975);美国专利第4,816,567号;Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice,第59-103页(Academic Press, 1986;Kozbor,J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987;Munson等人,Anal.Biochem.,107:220(1980);Engels等人,Agnew. Chem.Int.Ed.Engl.,28:716-734(1989);Abrahmsen等人,EMBO J.,4:3901 (1985);Methods in Enzymology,第44卷(1976);Morrison等人,Proc.Natl. Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)。

[0246] 通用方法

[0247] 可使用此项技术中的常规技能产生抗体,包括本文所述的彼等技术,诸 如融合瘤技术及筛选结合分子的噬菌体呈现库。在此项技术中已确立这些方 法。

[0248] 简言之,本发明抗体可通过使用组合库来产生,以筛选具有所要活性的 合成抗体纯系。原则上,合成抗体纯系是通过筛选噬菌体库来选择,这些噬菌 体库含有呈现与噬菌体外壳蛋白融合的抗体可变区(Fv)的各种片段的噬菌体。这些噬菌体库通过针对所要抗原的亲和力层析来进行淘选。表达能够结合至所 要抗原的Fv片段的纯系吸附至抗原且因此与库中的非结合纯系分离。结合纯系 接着自抗原溶离,且可通过额外的抗原吸附/溶离循环进一步增浓。任一种本发 明抗体可如下获得:设计适合的抗原筛选程序来选出所关注的噬菌体纯系,随 后使用得自所关注噬菌体纯系的Fv序列及适合恒定区(Fc)序列来构筑全长抗体 纯系,适合恒定区(Fc)序列描述于Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH公告91-3242,Bethesda Md.(1991),第1-3 卷。

[0249] 单株抗体可获自实质上同质抗体群,亦即构成所述群体的个别抗体均为 相同的,但其中可能存在少量的可能天然发生的突变。因此,修饰语「单株」表示抗体不为离散抗体混合物的特征。

[0250] 本发明的单株抗体可使用此项技术中已知的多种方法制备,包括首次描 述于Kohler等人,Nature,256:495(1975)中的融合瘤方法,或者其可通过重组 DNA方法制备(例如美国专利第4,816,567号)。

[0251] 载体、宿主细胞及重组方法

[0252] 为了以重组方式产生本发明抗体,分离编码其的核酸且插入可复制载体 中用于进一步选殖(DNA扩增)或表达。编码抗体的DNA容易使用公知程序分离 及定序(例如通过使用能够特异性地结合至编码抗体重链及轻链的基因的寡核苷 酸探针)。有多种载体可供使用。载体的选择有一部分要视所用宿主细胞而定。 宿主细胞包括(但不限于)原核或真核(通常为哺乳动物)源细胞。应了解到,为 达成此目的可使用任何同型恒定区,包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恒定区, 且此类恒定区可自任何人类或动物物种获得。

[0253] 使用原核宿主细胞产生抗体

[0254] 载体构筑

[0255] 编码本发明抗体的多肽组分的聚核苷酸序列可使用标准重组技术获得。所要聚核苷酸序列可自抗体产生细胞(诸如融合瘤细胞)中分离及定序。或者, 可使用核苷酸合成仪或PCR技术合成聚核苷酸。在获得编码多肽的序列之后, 即插入能够在原核宿主中复制及表达异源聚核苷酸的重组载体中。此项技术中 可获得且已知的许多载体可用于本发明的目的。适当载体的选择主要会取决于 插入载体中的核酸尺寸及要被载体转形的特定宿主细胞。各载体含有不同组 分,此视其功能(异源聚核苷酸的扩增或表达,或两者)及与其存在于其中的特 定宿主细胞的兼容性而定。载体组分通常包括(但不限于):复制起点、选择标 记基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入序列及转 录终止序列。

[0256] 一般而言,将含有源于与宿主细胞兼容的物种的复制子及控制序列的质 粒载体联合这些宿主使用。载体通常携有复制位点以及能够在经转形细胞中提 供表型选择的标记序列。举例而言,大肠杆菌典型地使用pBR322(源于大肠杆 菌物种的质粒)转形。pBR322含有编码安比西林(ampicillin;Amp)及四环素 (tetracycline;Tet)抗性的基因,且因此

提供容易鉴别经转形细胞的方式。pBR322、其衍生物或其他微生物质粒或噬菌体亦可含有或经修饰成含有可被微 生物体用于表达内源性蛋白质的启动子。于Carter等人的美国专利第5,648,237 号中详细地描述用于表达特定抗体的pBR322衍生物的实例。

[0257] 另外，含有与宿主微生物兼容的复制子及控制序列的噬菌体载体可作为 转形载体与这些宿主联合使用。举例而言，诸如λGEM™-11的噬菌体可用于制 备重组载体，其可用于使诸如大肠杆菌LE392的敏感宿主细胞转形。

[0258] 本发明的表达载体可包含两个或更多个编码多肽组分中的每一者的启动 子-顺反子对。启动子为位于顺反子上游(5')，调节顺反子表达的未转译调节序 列。原核启动子典型地分为两类：诱导性启动子及组成性启动子。诱导性启动 子为在其控制下，对培养条件的变化(例如存在或不存在营养物或温度变化)做 出反应而使顺反子转录量开始提高的启动子。

[0259] 已熟知可被多种潜在宿主细胞所识别的许多启动子。所选启动子可操作 地连接至编码轻链或重链的顺反子DNA，这是经由限制酶消化来移除源DNA中 的启动子及将经分离启动子序列插入本发明的载体中来达成。原生启动子序列 与许多异源启动子均可用于导引靶基因的扩增及/或表达。在一些实施例中，相 较于原生标靶多肽启动子，由于异源启动子通常允许所表达的标靶基因的转录 增加及产量提高，因此使用异源启动子。

[0260] 适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子、β-半乳糖酶及乳糖启动子系 统、色胺酸(trp)启动子系统及杂交启动子，诸如tac或trc启动子。然而，在细菌 中发挥功能的其他启动子(诸如其他已知细菌或噬菌体启动子)亦适合。其核苷 酸序列已公开，从而使得熟悉此项技术者能够可操作地使用提供任何必需的限 制位点的连接符或接附子，将这些核苷酸序列与编码标靶轻链及重链的顺反子 接合(Siebenlist等人(1980)Cell 20:269)。

[0261] 在本发明的一个态样中，重组载体内的各顺反子包含分泌信号序列组 分，其导引所表达的多肽易位跨越膜。一般而言，信号序列可为载体的一个组 分，或其可为插入载体中的标靶多肽DNA的一部分。为了本发明的目的所选的 信号序列应能被宿主细胞识别及处理(亦即被信号肽酶裂解)的信号序列。对于 不会识别及处理异源多肽的原生信号序列的原核宿主细胞而言，信号序列取代 成选自由例如以下组成的群的原核信号序列：碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热 稳定性肠毒素II(STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA及MBP。在本发 明的一个实施例中，在表达系统的两个顺反子中所用的信号序列为STII信号序 列或其变异体。

[0262] 在另一态样中，根据本发明的免疫球蛋白的产生可在宿主细胞的细胞质 中进行，且因此各顺反子内不需要有分泌信号序列。就此而言，免疫球蛋白轻 链与重链在细胞质内进行表达、折迭及组装而形成功能性免疫球蛋白。某些宿 主菌株(例如大肠杆菌trxB-菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件，从而允 许所表达的蛋白质次单元进行正确的折迭及组装。Proba及Pluckthun Gene, 159:203(1995)。

[0263] 本发明抗体亦可通过使用表达系统产生，在表达系统中可调节所表达多 肽组分的定量比率，以使得本发明的所分泌及正确组装的抗体的产量达到最 大。此类调节至少一部分通过同时调节多肽组分的转译强度来完成。

[0264] 于Simmons等人的美国专利第5,840,523号中揭示一种用于调节转译强度的 技术。其利用顺反子内的转译起始区(TIR)的变异体。对于指定的TIR而言，可 产生具有一系

列转译强度的一系列氨基酸或核酸序列变异体，藉此提供一种适 宜的方式，从而能根据特定链的所要表达量来调节此因子。可通过公知突变诱 发技术产生TIR变异体，其产生可改变氨基酸序列的密码子变化。在某些实施 例中，核苷酸序列的变化为静默的。TIR变化可包括例如Shine-Dalgarno序列的 数目或间距的变化，以及信号序列的变化。一种用于产生突变体信号序列的方 法为在不会改变信号序列的氨基酸序列的编码序列起始处产生「密码子库」(亦 即变化为静默的)。此可通过改变各密码子的第三核苷酸位置来完成；另外，一些氨基酸(诸如白胺酸、丝胺酸及精胺酸)具有多个第一及第二位置，可在制备 所述库时增添复杂度。于Yansura等人(1992)METHODS:A Companion to Methods in Enzymol.4:151-158中详细描述此突变诱发方法。

[0265] 在一个实施例中，产生对其中各顺反子具有一系列TIR强度的一组载体。此有限组比较各链的表达量以及所要抗体产物在不同TIR强度组合下的产量。TIR强度可通过量化报导基因的表达量来确定，如Simmons等人的美国专利第 5,840,523号中详细所述。基于转译强度比较，选出要在本发明的表达载体构筑 体中组合的所要个别TIR。

[0266] 适用于表达本发明抗体的原核宿主细胞包括古细菌(Archaebacteria)及真细 菌(Eubacteria)，诸如革兰氏阴性(Gram-negative)或革兰氏阳性生物体。适用细 菌的实例包括埃希氏菌属(Escherichia)(例如大肠杆菌)、杆菌属(例如枯草杆菌 (B.subtilis))、肠内细菌、假单胞菌种(例如绿脓假单胞菌(P.aeruginosa))、鼠伤 寒沙门杆菌(Salmonella typhimurium)、黏质沙雷氏菌(Serratia marcescans)、克 雷伯氏菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、志贺杆菌属(Shigella)、根瘤菌 属(Rhizobia)、透明颤菌属(Vitreoscilla)或副球菌属(Paracoccus)。在一个实施例 中，使用革兰氏阴性细胞。在一个实施例中，大肠杆菌细胞用作本发明的宿 主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株W3110(Bachmann,Cellular and Molecular Biology,第2卷(Washington,D.C.:美国微生物学学会(American Society for Microbiology,1987)，第1190-1219页)；ATCC寄存号27,325)及其衍生物，包括 具有基因型W3110ΔfhuA(ΔtonA)ptr3 lac Iq lacL8ΔompTΔ(nmpc-fepE)degP41 kanR的菌株33D3(美国专利第5,639,635号)。其他菌株及其衍生物，诸如大肠杆 菌294(ATCC 31,446)、大肠杆菌B、大肠杆菌λ1776(ATCC 31,537)及大肠杆菌RV308(ATCC 31,608)亦为适合的。这些实例具说明性，而非限制性。在此项技 术中已知用于构筑具有所定义的基因型的任一种上述细菌的衍生物的方法且描 述于例如Bass等人，Proteins,8:309-314(1990)中。一般需要考虑到复制子在细 菌细胞中的可复制性来选择适当细菌。举例而言，当使用熟知质粒(诸如 pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410)供应复制子时，宜使用大肠杆菌、沙 雷氏菌或沙门氏菌种作为宿主。典型地，宿主细胞应分泌最少量的蛋白水解 酶，且细胞培养物中宜并入其他蛋白酶抑制剂。

[0267] 抗体产生

[0268] 宿主细胞用上述表达载体转形且在适当时经调节的公知营养物培养基中 培养以便诱导启动子、选择转形体或扩增编码所要序列的基因。

[0269] 转形意谓将DNA引入原核宿主中，使得DNA可以染色体外组件或染色体 整合体形式复制。视所用宿主细胞而定，转形是使用适于此类细胞的标准技术 进行。使用氯化钙的钙处理法通常用于含有实质性细胞壁障壁的细菌细胞。另 一种转形方法是使用聚乙二醇/DMSO。又一种所用技术为电穿孔。

[0270] 用于产生本发明多肽的原核细胞生长在此项技术中已知且适用于培养所 选宿主细胞的培养基中。适合培养基的实例包括鲁利亚肉汤(luria broth;LB)与 必需的营养增补剂。在一些实施例中,培养基亦含有基于构筑表达载体所选的 选择剂,以选择性地允许含有表达载体的原核细胞生长。举例而言,将安比西 林添加至培养基中供表达安比西林抗性基因的细胞生长。

[0271] 除碳、氮及无机磷酸盐源之外,亦可包括适当浓度的任何必需增补剂, 其单独引入或与诸如复合氮源的其他增补剂或培养基混合引入。视情况,培养 基可含有一或多种选自由麸胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、巯基乙醇酸盐、二硫赤 藓糖醇及二硫苏糖醇组成的群的还原剂。

[0272] 在适合温度下培养原核宿主细胞。对于大肠杆菌生长而言,例如,生长 在包括(但不限于)约20℃至约39℃、约25℃至约37℃及约30℃的温度范围下发 生。培养基的pH可为约5至约9范围内的任何pH,这主要视宿主生物体而定。对 于大肠杆菌而言,pH可为约6.8至约7.4,或约7.0。

[0273] 若本发明的表达载体中使用诱导性启动子,则在适于活化启动子的条件 下诱导蛋白质表达。在本发明的一个态样中,使用PhoA启动子控制多肽转录。 因此,将经转形的宿主细胞培养在用于诱导的磷酸盐限制性培养基中。在一个 实施例中,磷酸盐限制性培养基为C.R.A.P培养基(参见例如Simmons等人,J. Immunol.Methods(2002),263:133-147)。根据所用载体构筑体,可使用多种其 他诱导剂,如此项技术中所知。

[0274] 在一个实施例中,所表达的本发明多肽分泌至宿主细胞的周质中且自宿 主细胞的周质中回收。蛋白质回收典型地包括碎裂微生物,通常通过诸如渗透 冲击、音波处理或溶解来碎裂微生物。细胞碎裂后,可通过离心或过滤来移除 细胞碎片或全细胞。可进一步纯化蛋白质,例如通过亲和力树脂层析来进一步 纯化。或者,可将蛋白质转运至培养基中且在其中进行分离。可自培养物中移 除细胞,且过滤并浓缩培养物上清液以便进一步纯化所产生的蛋白质。所表达 的多肽可使用通常已知的方法(诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)及西方墨点分 析)进一步分离及鉴别。

[0275] 在本发明的一个态样中,通过酸酵方法大量产生抗体。可利用各种大规 模分批馈料酸酵程序来产生重组蛋白质。大规模酸酵具有至少1000公升容量, 例如约1,000至100,000公升容量。这些酸酵器是使用搅拌器叶轮分散氧及营养 物,尤其葡萄糖(常见的碳/能量来源)。小规模酸酵通常是指在体积容量不超过 约100公升且范围可在约1公升至约100公升范围内的酸酵器中进行的酸酵。

[0276] 在酸酵方法中,典型地在细胞已在适合条件下生长至所要密度(例如 OD550为约180-220之)之后开始诱导蛋白质表达,在此阶段,细胞处于早期稳 定期。根据所用载体构筑体,可使用多种其他诱导剂,如此项技术中所知及上 文所述。细胞在诱导之前可生长更短的时段。细胞通常诱导历时约12-50小时, 然可使用更长或更短的诱导时间。

[0277] 为了增进本发明多肽的产量及质量,可修改各种酸酵条件。举例而言, 为了增进所分泌抗体多肽的正确组装及折迭,可使用过度表达伴护蛋白的其他 载体,诸如Dsb蛋白质(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及或DsbG)或FkpA(具有伴 护蛋白活性的肽基脯胺酰基顺,反异构酶),使宿主原核细胞共转形。伴护蛋白 已证明可促进细菌宿主细胞中所产生的异源蛋白质的正确折迭及溶解性。Chen 等人,(1999)J Bio Chem 274:19601-19605;Georgiou等

人,美国专利第 6,083,715号;Georgiou等人,美国专利第6,027,888号;Bothmann及Pluckthun (2000)J.Biol.Chem.275:17100-17105;Ramm及Pluckthun(2000)J.Biol.Chem.275:17106-17113;Arie等人,(2001)Mol.Microbiol.39:199-210。

[0278] 为了使所表达的异源蛋白质(尤其对蛋白水解敏感的蛋白质)的蛋白水解降 至最低,本发明可使用某些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株。举例而言,宿主细胞 菌株可经修饰以在编码已知细菌蛋白酶(诸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、 蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其组合)的基因中造成基因突变。可利用一些大肠杆菌蛋白酶缺乏性菌株且描述于例如Joly等人(1998),同上; Georgiou等人,美国专利第5,264,365号;Georgiou等人,美国专利第5,508,192 号;Hara等人,Microbial Drug Resistance,2:63-72(1996)。

[0279] 在一个实施例中,缺乏蛋白水解酶且经过度表达一或多种伴护蛋白的质 粒转形的大肠杆菌菌株在本发明的表达系统中用作宿主细胞。

[0280] 抗体纯化

[0281] 在一个实施例中,进一步纯化本文中产生的抗体蛋白质,以获得实质上 同质的制剂供进一步分析及使用。可使用此项技术中已知的标准蛋白质纯化方 法。以下程序举例说明适合纯化程序:免疫亲和力或离子交换管柱上的分离、乙醇沈淀、逆相HPLC、二氧化硅层析或阳离子交换树脂层析(诸如DEAE)、层 析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沈淀,及使用例如Sephadex G-75进行的凝胶过 滤。

[0282] 在一个态样中,使用固定于固相上的蛋白质A对本发明的抗体产物进行免 疫亲和力纯化。蛋白质A为来自金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureas)的41kD 细胞壁蛋白质,其以高亲和力结合至抗体的Fc区。Lindmark等人(1983)J. Immunol.Meth.62:1-13。固定蛋白质A的固相可为包含玻璃或二氧化硅表面的 管柱,或可控微孔玻璃管柱或硅酸管柱。在一些应用中,管柱经诸如甘油的试 剂涂布,以尽可能防止污染物的非特异性附着。

[0283] 作为纯化的第一步骤,可将如上文所述源于细胞培养物的制剂施加至蛋 白质A所固定的固相上,以允许所关注的抗体特异性结合至蛋白质A。接着洗涤 固相,以移除非特异性结合至固相的污染物。最后,通过溶离自固相回收所关 注的抗体。

[0284] 使用真核宿主细胞产生抗体

[0285] 载体组分通常包括(但不限于)以下一或多者:信号序列、复制起点、一或 多种标记基因、增强子组件、启动子及转录终止序列。

[0286] (i)信号序列组分

[0287] 用于真核宿主细胞中的载体亦可含有信号序列,或在所关注的成熟蛋白 质或多肽的N端处具有特定裂解位点的其他多肽。所选异源信号序列是会被宿 主细胞识别且处理(亦即通过信号肽酶裂解)的信号序列。在哺乳动物细胞表达 时,可利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌性前导序列,例如单纯疱疹病毒gD 信号。

[0288] 此前驱物区域的DNA在阅读框架中连接至编码抗体的DNA。

[0289] (ii)复制起点

[0290] 一般而言,哺乳动物表达载体不需要复制起点组分。举例而言,通常可 使用SV40起点,仅由于SV40起点含有早期启动子。

[0291] (iii)选择基因组分

[0292] 表达载体及选殖载体可含有选择基因,亦称为可选标记。典型的选择基 因编码如

下蛋白质:(a)赋予对抗生素或其他毒素(例如安比西林、新霉素、甲 胺喋呤或四环素)的抗性;(b)补充营养缺陷(必要时);或(c)供应无法自复合培 养基获得的关键营养物。

[0293] 选择方案的一个实例是利用药物来阻滞宿主细胞生长。经异源基因成功 转形的彼等细胞产生赋予药物抗性的蛋白质且因此在选择方案中存活下来。此 类显性选择的实例是使用药物新霉素、霉酚酸(mycophenolic acid)及湿霉素 (hygromycin)。

[0294] 适用于哺乳动物细胞的可选标记的另一实例为能够鉴别有能力吸收抗体 核酸的细胞的彼等标记,诸如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I及金属硫蛋白-II (例如灵长类动物金属硫蛋白基因)、腺苷去胺酶、鸟胺酸去羧酶等。

[0295] 举例而言,首先可通过将所有转形体培养在含有甲胺喋呤(Mtx)(DHFR的 竞争性拮抗剂)的培养基中来鉴别经DHFR选择基因转形的细胞。使用野生型 DHFR时,适当的宿主细胞包括例如缺乏DHFR活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞 株(例如ATCC CRL-9096)。

[0296] 或者,可通过在含有针对可选标记的选择剂(诸如胺基糖苷抗生素,例如 康霉素(kanamycin)、新霉素或G418)的培养基中进行细胞生长,选出经编码抗 体、野生型DHFR蛋白质及另一种可选标记(诸如胺基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)) 的DNA序列转形或共转形的宿主细胞(尤其是含有内源性DHFR的野生型宿主)。参见美国专利第4,965,199号。

[0297] (iv)启动子组分

[0298] 表达载体及选殖载体通常含有启动子,而启动子会被宿主生物体识别且 可操作地连接至编码所关注多肽(例如抗体)的核酸。已知用于真核生物的启动 子序列。实际上所有的真核基因在转录起始位点上游约25至30个碱基处均具有 富AT区。在许多基因转录起始处上游70至80个碱基处发现的另一个序列是 CNCAAT区域,其中N可为任何核苷酸。在大多数真核基因的3'端处为AATAAA 序列,其可为聚A尾添加至编码序列的3'端的信号。所有这些序列宜插入真核表 达载体中。

[0299] 在哺乳动物宿主细胞中可通过例如下列启动子来控制自载体进行的抗体 多肽转录:获自诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头状瘤 病毒、禽鸟肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、B型肝炎病毒与猿猴病毒40 (SV40)的基因组的启动子;异源哺乳动物启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫 球蛋白启动子;或热休克启动子,限制条件为此类启动子与宿主细胞系统兼 容。

[0300] SV40病毒的早期及晚期启动子宜以亦含有SV40病毒复制起点的SV40限制 性片段形式获得。人类巨细胞病毒的立即早期启动子宜以HindIII E限制性片段 形式获得。在哺乳动物宿主中使用牛乳头状瘤病毒作为载体来表达DNA的系统 揭示于美国专利第4,419,446号中。此系统的变化形式描述于美国专利第 4,601,978号中。亦参见Reyes等人,Nature 297:598-601(1982),其关于在得自单 纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下、在小鼠细胞中表达人类β-干扰素 cDNA。或者,可使用劳斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)长末端重复序列作为 启动子。

[0301] (v)增强子组件组分

[0302] 通常通过将增强子序列插入载体中来增强高等真核生物转录编码本发明 抗体多肽的DNA。现已知得自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、α- 胎蛋白及胰岛素)的许多增强子序列。然而,典型地,将使用得自真核细胞病毒 的增强子。实例包括复制起点后侧的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早 期启动子增强子、复制起点后侧的多瘤病毒

增强子,及腺病毒增强子。亦参见 Yaniv,Nature 297:17-18(1982),其关于用于活化真核启动子的增强组件。可在 抗体多肽编码序列的5'或3'位置处将增强子剪接至表达载体中,但通常位于相 对于启动子的5'位点。

[0303] (vi)转录终止组分

[0304] 真核宿主细胞中所用的表达载体典型地亦将含有终止转录及稳定mRNA所 需的序列。此类序列通常可获自真核或病毒DNA或cDNA的5'及偶尔3'未转译 区。这些区域在编码抗体的mRNA的未转译部分中含有以多腺苷酸化片段形式 转录的核苷酸区段。一种有用的转录终止组分为牛生长激素多腺苷酸化区域。参见WO94/11026及其中所揭示的表达载体。

[0305] (vii)宿主细胞的选择及转形

[0306] 本文中适用于选殖或表达载体中的DNA的宿主细胞包括本文所述的高等 真核生物细胞,包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养物(组织培养物) 中的繁殖已变成常规程序。适用哺乳动物宿主细胞株的实例为经SV40转形的猴 肾脏CV1株(COS-7,ATCC CRL 1651);人类胚肾细胞株(293细胞或经次选殖以 便在悬浮培养物中生长的293细胞,Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)); 幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO,Urlaub 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠塞特利氏细胞(mouse sertoli cell)(TM4,Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CVI ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL1587);人类子宫颈癌 细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛鼠肝细胞 (buffalo rat liver cell)(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人类肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人类肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)); MRC 5细胞;FS4细胞;及人类肝肿瘤株(Hep G2)。

[0307] 宿主细胞经用于产生抗体的上述表达载体或选殖载体转形且在适当时经 调节的公知营养物培养基中培养以便诱导启动子、选择转形体或扩增编码所要 序列的基因。

[0308] (viii)培养宿主细胞

[0309] 可在多种培养基中培养用于产生本发明抗体的宿主细胞。市售培养基, 诸如Ham's F10(Sigma)、最低必需培养基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及 杜贝可氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM)(Sigma),适用于培养宿主细胞。另外,以下文献中所述的任一种培养 基可用作宿主细胞培养基:Ham等人,Meth.Enz.58:44(1979);Barnes等人, Anal.Biochem.102:255(1980);美国专利第4,767,704号;第4,657,866号;第 4,927,762号;第4,560,655号;或第5,122,469号;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利Re.30,985。这些培养基中的任一者可以视需要补充激素 及/或其他生长因子(例如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(例如氯化钠、钙盐、镁盐及磷酸盐)、缓冲剂(例如HEPES)、核苷酸(例如腺苷及胸苷)、抗生 素(例如GENTAMYCIN™药物)、痕量元素(定义为通常以微莫耳浓度范围内的最 终浓度存在的无机化合物)及葡萄糖或等效能量来源。亦可以熟习此项技术者已 知的适当浓度包括任何其他必要的增补剂。培养条件(诸如温度、pH及类似条 件)为先前经选择用于表达的宿主细胞所用的培养条件,且对于一般技术者而言为显而易见的。

[0310] (ix)抗体的纯化

[0311] 使用重组技术时,抗体可在细胞内产生,或直接分泌至培养基中。若抗 体在细胞

内产生,则第一步骤,通常会例如通过离心或超滤来移除微粒碎片(宿 主细胞或溶解片段)。在抗体分泌至培养基中的情况下,通常先使用市售蛋白质 浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)浓缩此类表达系统的上 清液。任一个前述步骤中可包括诸如PMSF的蛋白酶抑制剂以抑制蛋白水解,且可包括抗生素以防止外来污染物生长。

[0312] 自细胞制备的抗体组合物可使用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析 及亲和力层析加以纯化,其中亲和力层析为通常可接受的纯化技术。亲和力试 剂(诸如蛋白质A)作为亲和力配位体的适合性取决于存在于抗体中的任何免疫球 蛋白Fc域的类型及同型。蛋白质A可用于纯化基于人类γ1、γ2或γ4重链的抗体 (Lindmark等人,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。所有小鼠同型及人类γ3均推 荐用蛋白质G(Guss等人,EMBO J.5:15671575(1986))。亲和力配位体所附着的 基质最常为琼脂糖,但也可利用其他基质。与用琼脂糖可达成的流速与处理时 间相比,机械稳定性基质(诸如可控微孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)可使得 流速更快及处理时间更短。在抗体包含CH3域的情况下,Bakerbond ABX™树脂 (J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)适用于纯化。亦可利用其他蛋白质纯化技术,诸 如离子交换管柱上的分离、乙醇沉淀、逆相HPLC、二氧化硅层析、肝素SEPHAROSE™层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬胺酸管柱)层析、层 析聚焦、SDS-PAGE及硫酸铵沉淀,此视欲回收的抗体而定。

[0313] 在任何初步纯化步骤之后,可视需要对包含所关注抗体及污染物的混合 物进行进一步纯化步骤,例如使用pH约2.5-4.5的溶离缓冲液进行低pH疏水性相 互作用层析,此通常在低盐浓度(例如约0-0.25M盐)下进行。

[0314] 应注意,一般而言,在此项技术中已充分确立用于制备供研究、测试及 临床用途中使用的抗体的技术及方法,其与上文一致且/或熟习此项技术者认为 适用于所关注的特定抗体。

[0315] 活性分析

[0316] 可通过此项技术中已知的多种分析表征本发明抗体的物理/化学特性及生 物学功能。

[0317] 可通过一系列分析进一步表征经纯化的抗体,分析包括(但不限于)N端定 序、氨基酸分析、非变性尺寸排除高压液相层析(HPLC)、质谱、离子交换层析 及番木瓜蛋白酶消化。

[0318] 需要时,分析抗体的生物活性。在一些实施例中,测试本发明抗体的抗 原结合活性。此项技术中已知且本文中可使用的抗原结合分析包括(不限于)使 用诸如下列技术的任何直接或竞争性结合分析:西方墨点、放射免疫分析、酶 联免疫吸附分析(enzyme linked immunosorbent assay;ELISA)、「夹层」免疫分 析、免疫沈淀分析、荧光免疫分析及蛋白质A免疫分析。

[0319] 在一个实施例中,本发明涵盖具有一些但非所有效应功能的变化的抗 体,对于活体内抗体半衰期至关重要,但某些效应功能(诸如补体及ADCC)为不 必要或有害的许多应用来说,这使得所述抗体成为合乎需要的候选物。在某些 实施例中,量测抗体的Fc活性以确保仅维持所要特性。可进行活体外及/或活体 内细胞毒性分析以证实CDC及/或ADCC活性的降低/消除。举例而言,可进行Fc 受体(FcR)结合分析以确保抗体不具有FcγR结合能力(因此可能不具有ADCC活 性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的初级细胞(也就是NK

细胞)仅会表 达FcγRIII,而单核细胞表达FcγRI、FcγRII及FcγRIII。于Ravetch及Kinet,Annu. Rev.Immunol.9:457-92(1991)第464页的表3中概述FcR在造血细胞上的表达。于美国专利第5,500,362号或美国专利第5,821,337号中描述评估所关注分子的 ADCC活性的活体外分析的一个实例。适用于此类分析的效应细胞包括周边血 液单核细胞(PBMC)及天然杀手(NK)细胞。或者或另外,可评估所关注分子在 活体内(例如动物模型,诸如Clynes等人,PNAS(USA)95:652-656(1998)中所揭 示的动物模型)的ADCC活性。亦可进行C1q结合分析以证实抗体不能结合C1 q且 因此缺乏CDC活性。为评估补体活化,可进行CDC分析,例如如Gazzano- Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996)中所述。亦可使用此项技术中 已知的方法进行FcRn结合及活体内清除率/半衰期测定。

[0320] 抗体片段

[0321] 本发明涵盖抗体片段。在某些情形中,使用抗体片段比完整抗体还有优 势。尺寸较小的片段允许快速清除,且可增进对实体肿瘤的近接。

[0322] 已开发出用于产生抗体片段的多种技术。传统上,这些片段经由完整抗 体的蛋白水解消化而衍生而来(参见例如Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992));及Brennan等人,Science,229:81 (1985))。然而,这些片段现可由重组宿主细胞直接产生。Fab、Fv及ScFv抗体 片段皆可在大肠杆菌中表达且自大肠杆菌分泌,从而容易产生大量这些片段。 抗体片段可自上文所论述的抗体噬菌体库中分离。或者,Fab'-SH片段可自大肠 杆菌中直接回收且化学偶合而形成F(ab')2片段(Carter等人,Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一方法,可自重组宿主细胞培养物中直接分离出 F(ab')2片段。于美国专利第5,869,046号中描述活体内半衰期延长且包含救助受 体结合抗原决定基残基的Fab及F(ab')2片段。抗体片段的其他产生技术对于熟 习此项技术者而言将为显而易见的。在其他实施例中,所选抗体为单链Fv片段 (scFv)。参见WO 93/16185;美国专利第5,571,894号;及第5,587,458号。Fv及 sFv为唯一一种具有完整结合位点,但缺乏恒定区的抗体片段;因此,其在活 体内使用期间适用于减少非特异性结合。可构筑sFv融合蛋白以在sFv的胺基端 或羧基端产生效应蛋白的融合物。参见Antibody Engineering,Borrebaeck编,同 上。抗体片段亦可为「线性抗体」,例如如美国专利第5,641,870号中所述。这 些线性抗体片段可具有单特异性或双特异性。

[0323] 人类化抗体

[0324] 本文所述的任一种抗体可为全长抗体或其抗原结合片段。在一些实例 中,抗原结合片段为Fab片段、F(ab')2片段或单链Fv片段。在一些实例中,抗 原结合片段为Fab片段、F(ab')2片段或单链Fv片段。在一些实例中,经分离抗 体为人类抗体、人类化抗体、嵌合抗体或单链抗体。

[0325] 本文所述的任一种抗体具有以下一或多种特征:

[0326] a)为重组抗体、单株抗体、嵌合抗体、人类化抗体、人类抗体、抗体片 段、双特异性抗体、单特异性抗体、单价抗体、IgG1抗体、IgG2抗体,或抗体 衍生物;b)为人类、鼠类、人类化或嵌合抗体、抗原结合片段,或抗体衍生 物;c)为单链抗体片段、多抗体、Fab片段,及/或免疫球蛋白IgG、IgM、IgA、 IgE、IgD同型及/或其亚类;d)具有一或多个以下特征:(i)介导癌细胞的ADCC 及/或CDC;(ii)诱导及/或促进癌细胞发生细胞凋亡;(iii)抑制癌细胞的靶细胞 增生;(iv)诱导及/或促进癌细胞的吞噬;及/或(v)诱导及/或促进细胞毒性剂的 释

放;e)特异性结合肿瘤相关性碳水化合物抗原,所述抗原为肿瘤特异性碳水 化合物抗原;f)不结合非癌细胞、非肿瘤细胞、良性癌细胞及/或良性肿瘤细胞 上所表达的抗原;及/或g)特异性结合癌症干细胞及正常癌细胞上所表达的肿瘤 相关性碳水化合物抗原。

[0327] 优选地,抗体对其相应抗原的结合具有特异性。术语「特异性」一般用 于指结合对中的一员对其特异性结合搭配物外的分子不显示任何显著性结合的 情形,例如与除本文中所指定者外的任何其他分子具有小于约30%、优选 20%、10%或1%交叉反应性。

[0328] 抗体适合以高亲和力(低KD值)结合至其标靶抗原决定基,且KD优选在奈 莫耳浓度或更低的范围内。亲和力可通过此项技术中已知的方法(诸如表面电浆 子共振)量测。

[0329] 例示性抗体制备

[0330] 能够结合至本文所述的Globo H抗原决定基及SSEA-4抗原决定基的例示性 抗体可通过此项技术中已知的任何方法产生。参见例如Harlow及Lane,(1988) Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York。宿主动物免疫接种及融合瘤技术

[0331] 可通过自针对血清中所需抗体的增加所检查的经免疫哺乳动物收集血液 及通过任何公知方法将血清与血液分离来制备针对抗Globo H及抗SSEA-4抗体 的例示性多株抗体。多株抗体包括含有多株抗体的血清,还有可自血清分离含 有多株抗体的溶离份。

[0332] 通常在宿主动物(例如兔、小鼠、马或山羊)中,通过皮下(sc)或腹膜内(ip) 多次注射相关抗原及佐剂来产生多株抗体。其可适用于使用双官能剂或衍生剂 (例如顺丁烯二酰亚胺基苯甲酰基磺基丁二酰亚胺酯(经由半胱胺酸残基结合)、N-羟基丁二酰亚胺(经由离胺酸残基)、戊二醛、丁二酸酐、$SOCl_2$等)使相关抗 原与在待免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质(例如匙孔螺血氰蛋白、血清白蛋 白、牛甲状腺球蛋白,或大豆胰蛋白酶抑制剂)结合。

[0333] 任何哺乳动物可用抗原免疫以便产生所需抗体。一般而言,可使用啮齿 目、兔形目或灵长类动物。啮齿目动物包括例如小鼠、大鼠及仓鼠。兔形目动 物包括例如兔。灵长类动物包括例如狭鼻猴(旧世界猴),诸如食蟹猕猴、恒河 猴、狒狒及黑猩猩。

[0334] 用抗原将动物免疫的方法在此项技术中已知。腹膜内注射或皮下注射抗 原为哺乳动物的标准免疫方法。更特定言之,可将抗原稀释且悬浮于适量磷酸 盐缓冲盐水(PBS)、生理盐水等物中。需要时,可将抗原悬浮液与适量的标准 佐剂(诸如弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant))混合,制成乳液,接着投 与给哺乳动物。通过将1mg或1μg肽或结合物(分别用于兔或小鼠)与3个体积的 弗氏不完全佐剂合并而使动物针对抗原、免疫原性结合物或衍生物进行免疫。

[0335] 动物可通过每4至21天投与数次与适量弗氏不完全佐剂混合的抗原来进行 追加免疫直至效价平稳。动物通过在多处皮下注射含有1/5至1/10原始量的肽或 结合物的弗氏完全佐剂来进行追加免疫。7至14天后将动物放血且分析血清的 抗体效价。免疫接种亦可使用适当载剂。如上免疫接种之后,通过标准方法检 查血清中所需抗体含量的增加。优选地,动物是用相同抗原、但与不同蛋白质 结合及/或经由不同交联试剂结合的结合物进行追加免疫。结合物亦可以蛋白质 融合物形式在重组细胞培养物中产生。同样,诸如明矾的聚集剂适用于增强免 疫反应。

[0336] 在过去二十至三十年间,已开发出可制备供人类活体内治疗应用的嵌 合、人类化

或人类抗体的多种方法。使用最多且经证实的方法为使用融合瘤方 法制备小鼠mAb,接着通过将mAb的V_H及V_L域构架区及恒定域转化成人类V_H及 V_L域的最高同源人类构架区以及所需人类γ免疫球蛋白同型及子类的恒定区而 使mAb发生人类化。临床上使用的许多mAb(诸如Xolair)为人类γ1、κ同型及子 类的人类化mAb且使用此方法制备。

[0337] 在一些实施例中,抗体可通过公知融合瘤技术产生。Kohler等人,Nature, 256:495(1975)。在融合瘤方法中,小鼠或其他适当宿主动物(诸如仓鼠或兔)如 上文所述进行免疫以诱发淋巴细胞产生或能够产生特异结合至用于免疫的蛋白 质的抗体。或者,淋巴细胞可于活体外进行免疫。

[0338] 为制备单株抗体,自经抗原免疫的哺乳动物收集免疫细胞且如上文所述 检查血清中所需抗体的含量增加,并进行细胞融合。用于细胞融合的免疫细胞 优选获自脾脏。待与上述免疫细胞融合的其他优选亲本细胞包括例如哺乳动物 的骨髓瘤细胞,及更佳具有通过药物选择融合细胞的获得性特性的骨髓瘤细 胞。

[0339] 优选的骨髓瘤细胞为有效融合,使所选抗体产生细胞稳定高量产生抗体 且对诸如HAT培养基的培养基敏感的骨髓瘤细胞。其中,优选的骨髓瘤细胞株 为鼠类骨髓瘤细胞株,诸如源于MOPC-21及MPC-11小鼠肿瘤的骨髓瘤细胞 株,购自沙克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center,San Diego,Calif.USA);及获自美国典型培养物保存中心(American Type Culture Collection,Rockville,Md.USA)的SP-2细胞。亦已描述用于产生人类单株抗体 的人类骨髓瘤及小鼠-人类杂骨髓瘤细胞株(Kozbor,J.Immunol.,133:3001 (1984);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987))。

[0340] 上述免疫细胞及骨髓瘤细胞可根据已知方法融合,例如Milstein等人的方 法(Galfre等人,Methods Enzymol.73:3-46,1981)。接着使用适当融合剂(诸如聚 乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合而形成融合瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,第59-103页(Academic Press,1986))。通过 细胞融合获得的所得融合瘤可通过将其培养在标准选择培养基(诸如HAT培养基 (含有次黄嘌呤、胺基喋呤及胸苷的培养基)中来进行选择。细胞培养物典型地 在HAT培养基中持续数日至数周(足以允许所需融合瘤(非融合细胞)之外的所有 其他细胞死亡的时间)。接着,进行标准限制稀释,以筛选及选殖产生所需抗体 的融合瘤细胞。

[0341] 由此制备的融合瘤接种且生长于适合培养基中,所述培养基优选含有一 或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的物质。举例而言,若亲本骨 髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),则用于 融合瘤的培养基典型地包括次黄嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(HAT培养基),这些物 质会阻止缺乏HGPRT的细胞生长。

[0342] 针对抗原的单株抗体的产生情况来分析融合瘤细胞生长于其中的培养 基。优选地,融合瘤细胞所产生的单株抗体的结合特异性是通过免疫沈淀或通 过活体外结合分析来测定。利用酶联免疫吸附分析(ELISA)、酶免疫分析 (EIA)、放射免疫分析(RIA)及/或免疫荧光量测吸亮度可用于量测本发明抗体的 抗原结合活性。在ELISA中,使本发明的抗体固定于盘中,将本发明的蛋白质 施加至盘中,接着施加含有所需抗体的样品,诸如抗体产生细胞的培养物上清 液或经纯化抗体。接着,施加可识别一级抗体且经酶(诸如碱性磷酸酶)标记的 二级抗体,且对盘进行培育。接着,洗涤之后,向盘添加酶受质,诸如对硝基 苯

基磷酸盐,且量测吸亮度以评估样品的抗原结合活性。此方法中可使用蛋白 质片段,诸如C端或N端片段。可利用BIAcore(Pharmacia)评估本发明抗体的活 性。单株抗体的结合亲和力可例如通过Munson等人,Anal.Biochem.,107:220 (1980)的史卡查分析(Scatchard analysis)测定。

[0343] 利用任一种公知方法(包括上述方法),可鉴别及选择产生结合至本文所述 的抗原决定基的抗体的融合瘤细胞用于进一步表征。

[0344] 鉴别产生具有所需特异性、亲和力及/或活性的抗体的融合瘤细胞后,可 通过有限稀释程序次选殖纯系并通过标准方法生长(Goding,Monoclonal Antibodies: Principles and Practice,第59-103页(Academic Press,1986))。适用于 此目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。由次纯系分泌的单株抗 体宜通过公知免疫球蛋白纯化程序与培养基、腹水或血清分离,这些纯化程序 为诸如蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和力层析。

[0345] 此外,融合瘤细胞可以腹水性肿瘤形式活体内生长于动物体内。举例而 言,所得融合瘤可随后移植至小鼠的腹腔中且收取腹水。

[0346] 所得单株抗体可通过例如硫酸铵沈淀、蛋白质A或蛋白质G管柱、DEAE离 子交换层析或与本发明的蛋白质偶合的亲和力管柱进行纯化。本发明的抗体不 仅可用于纯化及检测本发明的蛋白质,而且可用作本发明蛋白质的促效剂及拮 抗剂的候选物。此外,此抗体可应用于针对与本发明蛋白质相关的疾病的抗体 治疗法。

[0347] 重组技术

[0348] 由此获得的单株抗体亦可使用基因工程改造技术,以重组方式制备(参见 例如Borrebaeck C.A.K.及Larrick J.W.Therapeutic Monoclonal Antibodies,英 国MacMillan Publishers LTD出版,1990)。可自免疫细胞(诸如产生抗体的融合瘤 或免疫淋巴细胞)选殖编码抗体的DNA,插入适当载体中,且引入宿主细胞 中,以制备重组抗体。本发明亦提供如上文所述制备的重组抗体。

[0349] 当所得抗体要被投与给人体时(抗体疗法),偏好使用人类抗体或人类化抗 体以便减少免疫原性。举例而言,具有人类抗体基因谱系的转殖基因动物可用 选自蛋白质、表达蛋白质的细胞或其溶胞物的抗原进行免疫。接着自动物收集 产生抗体的细胞,且与骨髓瘤细胞融合,获得融合瘤,可由其制备针对所述蛋 白质的人类抗体。或者,产生抗体的免疫细胞(诸如免疫淋巴细胞)可通过致癌 基因获得永生,且用于制备单株抗体。

[0350] 编码单株抗体的DNA很容易使用公知程序(例如通过使用能够特异性结合 至编码鼠类抗体重链及轻链的基因的寡核苷酸探针)来进行分离及定序。融合瘤 细胞用作所述DNA的优选来源。DNA在分离后,即可置入表达载体中,接着转 染至宿主细胞(诸如原本不会产生免疫球蛋白的大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中,以在重组宿主细胞中合成单株抗 体。关于在细菌中重组表达所述编码抗体的DNA的讨论文章包括Skerra等人, Curr.Opinion in Immunol.,5:256-262(1993)及Pluckthun, Immunol.Rev., 130:151-188(1992)。

[0351] 编码由上述融合瘤细胞产生的抗体的DNA可经由常规技术进行遗传修 饰,以产生经基因工程改造的抗体。经基因工程改造的抗体(诸如人类化抗体、嵌合抗体、单链抗体及双特异性抗体)可经由例如公知重组技术产生。接着可修 饰DNA,例如通过用人类重链及轻

链恒定域编码序列取代同源鼠类序列 (Morrison等人,(1984)Proc.Nat.Acad.Sci.81:6851)或通过将非免疫球蛋白多肽 编码序列的全部或一部分与免疫球蛋白编码序列共价连接。以此方式可制备具 有靶抗原的结合特异性的基因工程改造抗体,诸如「嵌合」或「杂交」抗体。

[0352] 在此项技术中已熟知为制备「嵌合抗体」所开发的技术。参见例如 Morrison等人,(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,6851;Neuberger等人, (1984)Nature 312,604;及Takeda等人,(1984)Nature 314:452。

[0353] 典型地,用这些非免疫球蛋白多肽取代抗体恒定域,或用其取代抗体的 具有一个抗原结合位点的可变域以形成嵌合二价抗体,所述嵌合二价抗体包含 一个对抗原具有特异性的抗原结合位点及另一个对不同抗原具有特异性的抗原 结合位点。

[0354] 亦可使用合成蛋白质化学中的已知方法(包括涉及交联剂的彼等方法)在活 体外制备嵌合或杂交抗体。举例而言,可使用双硫键交换反应或通过形成硫醚 键来构筑免疫毒素。适用于此目的的试剂的实例包括亚胺基硫醇酯 (iminothiolate)及甲基-4-巯基丁酰亚胺酯(methyl-4-mercaptobutyrimidate)。

[0355] 在此项技术中已熟知用于使非人类抗体发生人类化的方法。一般而言, 人类化抗体中已引入一或多个来自非人类来源的氨基酸残基。这些非人类氨基 酸残基通常称为「输入」残基,其通常取自「输入」可变域。人类化基本上可 遵循Winter及同事的方法(Jones等人,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等 人,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536 (1988)),通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人类抗体的相应序列来执行。因 此,这些「人类化」抗体为嵌合抗体(美国专利第4,816,567号),其中实质上少 于完整的人类可变域经非人类物种的相应序列取代。实务上,人类化抗体通常 为人类抗体,其中一些CDR残基及可能一些FR残基经来自啮齿动物抗体的类似 位点的残基取代。

[0356] 选择可用于制备人类化抗体的人类可变域(轻链与重链)对于减少抗原性而 言非常重要。根据所谓的「最佳拟合」方法,对照已知人类可变域序列的整个 库来筛选啮齿动物抗体的可变域序列。接着将与啮齿动物序列最接近的人类序 列视作人类化抗体的人类构架(FR)(Sims等人,J.Immunol.,151:2296(1993); Chothia等人,J.Mol.Biol.,196:901(1987))。另一方法使用一个特定构架,它是 衍生自具有特定轻链或重链子群的所有人类抗体的一致序列。若干种不同人类 化抗体可使用相同构架(Carter等人,Proc.Natl.Acad Sci.USA,89:4285(1992); Presta等人,J.Immnol.,151:2623(1993))。

[0357] 更重要的是,抗体经人类化而保留对抗原的高亲和力及其它有利生物特 性。为实现这个目标,根据一个优选方法,人类化抗体是通过使用亲本及人类 化序列的三维模型分析亲本序列及各种设想的人类化产物的方法来制备。三维 免疫球蛋白模型普遍可得且为熟习此项技术者熟知。可获得说明及呈现所选择 的候选免疫球蛋白序列的可能三维构形结构的计算机程序。对这些呈现的检查 允许分析残基在候选免疫球蛋白序列发生作用时的可能角色,亦即分析影响候 选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以此方式,可自接受者及输入序列选 择FR残基且予以组合以便获得所需抗体特征,诸如对标靶抗原的亲和力增加。一般而言,CDR残基直接且最实质上涉及影响抗原结合。

[0358] 或者,在不产生内源免疫球蛋白的情况下,现在可产生于免疫后能够产 生全人类

抗体谱系的转殖基因动物(例如小鼠)。举例而言,已描述在嵌合及生 殖系突变小鼠中,抗体重链连接区(J_H)基因的同型合子缺失会导致内源抗体产 生被完全抑制。将人类生殖系免疫球蛋白基因数组转移至这些生殖系突变体小 鼠体内将会在抗原激发后引起人类抗体的产生。参见例如Jakobovits等人,Proc. Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature,362:255-258 (1993);Bruggermann等人,Year in Immunol.,7:33(1993)。人类抗体亦可源于噬 菌体呈现库(Hoogenboom等人,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J. Mol.Biol.,222:581-597(1991))。

[0359] 编码本文所述的抗Globo H及抗SSEA-4抗体(包括重链、轻链或两者)的任 一种核酸、包含一或多种核酸的载体(诸如表达载体)及包含一或多个载体的宿 主细胞亦属于本发明的范畴内。在一些实例中,载体包含核酸,而所述核酸包 含编码如本文所述的抗Globo H抗体的重链可变区或轻链可变区的核苷酸序 列。在一些实例中,载体包含核酸,而所述核酸包含编码如本文所述的抗 SSEA-4抗体的重链可变区或轻链可变区的核苷酸序列。在其他实例中,载体包 含编码重链可变区与轻链可变区的核苷酸序列,其表达可受到单一启动子或两 个各别启动子所控制。此处亦提供用于制备如本文所述的抗Globo H及抗SSEA- 4抗体中的任一者的方法,例如经由此章节中所述的重组技术制备。

[0360] 用于制备抗体的其他技术

[0361] 在其他实施例中,完全人类抗体可通过使用已经工程改造以表达特定人 类免疫球蛋白的市售小鼠获得。被设计成产生更合需要(例如完全人类抗体)或 更稳固的免疫反应的转殖基因动物亦可用于产生人类化或人类抗体。这些技术 的实例为Amgen,Inc.(Fremont,Calif.)的Xenomouse^{RTM}及Medarex,Inc. (Princeton,N.J.)的HuMAb-Mouse^{RTM}及TC Mouse^{TM}。在另一替代例中,抗体可 通过噬菌体呈现技术以重组方式制得。参见例如美国专利第5,565,332号;第 5,580,717号;第5,733,743号;及第6,265,150号;及Winter等人,(1994)Annu. Rev.Immunol.12:433-455。或者,可使用噬菌体呈现技术(McCafferty等人,(1990)Nature 348:552-553),从未经免疫供者的免疫球蛋白可变(V)域基因谱系 在活体外产生人类抗体及抗体片段。

[0362] 完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段可经由常规方法制备。举例而言, F(ab')$_2$片段可通过胃蛋白酶消化抗体分子来产生,且Fab片段可通过将F(ab')$_2$片 段的二硫桥键还原来产生。

[0363] 或者,可自使用McCafferty等人,Nature,348:552-554(1990);Clackson等 人,Nature,352:624-628(1991)及Marks等人,J.Mol Biol.,222:581-597(1991)中 所述的技术所产生的抗体噬菌体库(例如单链抗体噬菌体库)分离出本文所述的 抗Globo H及抗SSEA-4抗体。后续公开案描述通过链改组(Marks等人, Bio/Technology,10:779-783(1992))以及组合感染及活体内重组作为构筑极大噬 菌体库的策略(Waterhouse等人,Nuc.Acids.Res.,21:2265-2266(1993)),产生高 亲和力(nM范围)人类抗体。因此,这些技术是用于分离单株抗体的传统单株抗 体融合瘤技术的可行替代方案。

[0364] 如本文所述获得的抗体可纯化至同质。举例而言,可根据一般蛋白质所 用的分离及纯化方法进行抗体的分离及纯化。举例而言,可通过对管柱层析(诸 如亲和力层析)、过滤器、超过滤、盐析、透析、SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳、等 电聚焦及其他方式(Antibodies:A Laboratory Manual.Harlow及David Lane编, Cold Spring Harbor Laboratory,1988)

(但不限于此)进行适当选择及组合使用来 分离及单离抗体。可通过吸光度量测、酶联免疫吸附分析(ELISA)等来测定如 上获得的抗体的浓度。亲和力层析之外的例示性层析包括例如离子交换层析、 疏水性层析、凝胶过滤、逆相层析、吸附层析及类似方法(Strategies for Protein Purification and Characterization:A Laboratory Course Manual.Daniel R. Marshak等人编,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1996)。可通过液相层析 (诸如HPLC、FPLC)执行层析程序。

[0365] 抗体可使用此项技术中熟知的方法表征。举例而言,一种方法为鉴别抗 原所结合的抗原决定基,或「抗原决定基定位」。此项技术中已知许多对蛋白 质上的抗原决定基位置进行定位及表征的方法,包括解出抗体-抗原复合物的晶 体结构、竞争分析、基因片段表达分析及基于合成肽的分析,如例如Harlow及 Lane,Using Antibodies(a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1999)的第11章中所述。在另一实例中,抗原决 定基定位可用于测定抗体所结合的序列。抗原决定基可以是线性抗原决定基(亦 即包含于单区段氨基酸中),或可以是通过可不一定包含于单区段(初级结构线 性序列)中的氨基酸的三维相互作用形成的构形抗原决定基。不同长度(例如至 少4-6个氨基酸长)的肽可经分离或合成(例如以重组方式)且用于抗体的结合分析。在另一实例中,可在系统性筛选中通过使用源于靶抗原序列的重迭肽且测 定抗体的结合来确定抗体所结合的抗原决定基。根据基因片段表达分析,编码 靶抗原的开放阅读框架可随机地或依据特定遗传构造加以片段化,且测定抗原 的所表达片段与待测试的抗体的反应性。基因片段可例如通过PCR产生,接着 在放射性氨基酸存在下活体外转录且转译成蛋白质。接着是通过免疫沈淀及凝 胶电泳来测定抗体与经放射性标记的抗原片段的结合。亦可通过使用在噬菌体 粒子(噬菌体库)表面上所呈现的随机肽序列的大型库来鉴别某些抗原决定基。或者,可在简单结合分析中测试重迭肽片段的所定义库与测试抗体的结合。

[0366] 在另一实例中,可进行抗原结合域的突变诱发、域交换实验及丙胺酸扫 描突变诱发以鉴别抗原决定基结合所需、足够及/或需要的残基。举例而言,域 交换实验可使用靶抗原突变体进行,其中候选抗体的结合抗原决定基中的多个 残基被密切相关、但抗原性不同的蛋白质(诸如神经营养蛋白家族的另一成员) 的序列置换(交换)。通过评估抗体与突变体靶蛋白的结合,可评估特定抗原片 段对抗体结合的重要性。

[0367] 或者,可使用已知会结合至相同抗原的其他抗体来进行竞争分析,以判 定一个抗体(例如本文所述的MC45抗体)是否与其他抗体结合至相同抗原决定 基。竞争分析为熟习此项技术者所熟知。

[0368] 适合的例示性通用抗体制备方法的其他态样

[0369] 在此项技术中已熟知在动物(例如小鼠、兔、山羊、绵羊或马)体内产生单 株及多株抗体及其片段的方法。参见例如Harlow及Lane,(1988)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York。术语「抗体」包 括完整免疫球蛋白分子以及其片段,诸如Fab、F(ab')2、Fv、scFv(单链抗体)及 dAb(域抗体;Ward等人,(1989)Nature,341,544)。

[0370] 本文所揭示的组合物可与熟习此项技术者经阅读本发明后而可鉴别的其 他活性剂、载剂、媒剂、赋形剂或助剂一起包括于医药组合物中。

[0371] 医药组合物优选包含至少一种医药学上可接受的载剂。在这些医药组合 物中,本

文所揭示的组合物形成「活性化合物」,亦称为「活性剂」。如本文所 用,措辞「医药学上可接受的载剂」包括与医药投药相容的溶剂、分散介质、 包衣剂、抗细菌剂及抗真菌剂、等张剂及吸收延迟剂及类似物。组合物中亦可 并入补充性活性化合物。医药组合物调配成与其预定投药途径可兼容。投药途 径的实例包括非经肠,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(局 部)、经黏膜及直肠投药。用于非经肠、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括 以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、 甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯; 抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲 剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;及张力调节剂,例如氯化钠或右旋糖。 可用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)调节pH。非经肠制剂可密封在由玻璃或塑料 制成的安瓿、抛弃式注射器或多剂量小瓶中。

[0372] 提供包含至少一种抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体或至少一种包含编码抗 SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体的序列的聚核苷酸的组合物。在某些实施例中, 组合物可为医药组合物。如本文所使用,组合物包含一或多种结合至一或多种 SSEA-3/SSEA-4/Globo H的抗体及/或一或多种包含编码一或多种结合至一或多 种SSEA-3/SSEA-4/Globo H的抗体的序列的聚核苷酸。这些组合物可进一步包 含此项技术中熟知的适合载剂,诸如医药学上可接受的赋形剂,包括缓冲剂。

[0373] 亦提供经分离的抗体及聚核苷酸。在某些实施例中,经分离的抗体及聚 核苷酸为实质上纯的。

[0374] 在一个实施例中,抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体为单株抗体。在另一个 实施例中,提供抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体的片段(例如Fab、Fab'-SH及 F(ab')2片段)。这些抗体片段可通过诸如酶促消化的传统方式产生,或可通过重 组技术产生。这些抗体片段可为嵌合抗体片段、人类化抗体片段或人类抗体片 段。这些片段可用于达成下文所述的诊断及治疗目的。

[0375] 此项技术中已知用于产生噬菌体呈现库的多种方法,由所述库可获得所 关注的抗体。一种产生所关注的抗体的方法是经由使用噬菌体抗体库,如Lee 等人,J.Mol.Biol.(2004),340(5):1073-93中所述。

[0376] 本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体可通过使用组合库筛选具有所需 活性的合成抗体纯系来产生。原则上,通过筛选含有呈现融合至噬菌体外壳蛋 白的抗体可变区(Fv)的各种片段的噬菌体的噬菌体库来选择合成抗体纯系。通 过对所需抗原进行亲和力层析来淘选这些噬菌体库。使表达能够与所需抗原结 合的Fv片段的纯系吸附至抗原且从而与库中非结合纯系分离。接着将结合纯系 自抗原溶离,且可通过额外的抗原吸附/溶离循环进一步增浓。本发明的任一种 抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体可如下获得:设计适合的抗原筛选程序以选择 所关注的噬菌体纯系,随后使用来自所关注的噬菌体纯系的Fv序列及Kabat等 人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication 91- 3242,Bethesda Md.(1991),第1-3卷中所述的适合恒定区(Fc)序列建构全长抗 SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体纯系。

[0377] 抗体的抗原结合域是由两个具有约110个氨基酸的可变(V)区形成,两个可 变区各来自轻链(VL)及重链(VH),两者均存在三个高变环或互补决定区 (CDR)。可变域可以单链Fv(scFv)片段(其中VH与VL经由可挠性短肽共价键联) 或Fab片段(其中VH与VL各与恒定

域融合且发生非共价相互作用)形式于噬菌体 上进行功能呈现,如Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中所 述。如本文所使用,scFv编码噬菌体纯系及Fab编码噬菌体纯系统称为「Fv噬 菌体纯系」或「Fv纯系」。

[0378] 可通过聚合酶链反应(PCR)分别选殖VH与VL基因谱系,且在噬菌体库中 随机重组,接着可搜寻抗原结合纯系,如Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12: 433-455(1994)中所述。来自经免疫来源的库提供对免疫原具高亲和力的抗体而 无需构筑融合瘤。或者,天然谱系可经选殖,为广范围的非自体抗原以及自体 抗原提供单一来源的人类抗体而无需任何免疫作用,如Griffiths等人,EMBO J, 12:725-734(1993)所述。最后,亦可通过自干细胞选殖未经重排的V-基因片段 并使用含有随机序列的PCR引物编码高变CDR3区及完成活体外重排以合成方式 获得天然库,如Hoogenboom及Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所述。

[0379] 使用丝状噬菌体通过与少量外壳蛋白pIII融合来呈现抗体片段。这些抗体 片段可作为单链Fv片段呈现,其中VH域与VL域通过可挠性多肽间隔子连接于 同一多肽链上,例如如Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)中所述;或 作为Fab片段呈现,其中一链与pIII融合而另一链分泌进入细菌性宿主细胞周质 内,在周质内通过置换野生型外壳蛋白中的一部分来组装呈现于噬菌体表面上 的Fab-外壳蛋白结构,例如如Hoogenboom等人,Nucl.Acids Res.,19:4133- 4137(1991)中所述。

[0380] 大体而言,编码抗体基因片段的核酸可从由人类或动物采集的免疫细胞 获得。若需要偏好抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H纯系的库,则用SSEA-3/SSEA- 4/Globo H免疫个体以产生抗体反应,且回收脾脏细胞及/或循环B细胞或其他外 周血液淋巴细胞(PBL)用于库建构。在一个实施例中,如下获得偏好抗人类 SSEA-3/SSEA-4/Globo H纯系的人类抗体基因片段文:在携有功能性人类免疫 球蛋白基因数组(且缺乏功能性内源性抗体产生系统)的转殖基因小鼠体内产生 抗人类SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体反应,从而使SSEA-3/SSEA-4/Globo H免疫 接种产生B细胞,这些B细胞产生针对SSEA-3/SSEA-4/Globo H的人类抗体。于下文中描述产生人类抗体的转殖基因小鼠的产生。

[0381] 通过使用适于分离表达SSEA-3/SSEA-4/Globo H特异性抗体的B细胞的筛 选程序,可针对抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H反应性细胞群进行额外增浓,筛选 程序为例如通过使用SSEA-3/SSEA-4/Globo H亲和力层析分离细胞,或细胞吸 附至经荧光染料标记的SSEA-3/SSEA-4/Globo H,随后进行流动活化式细胞分 选(FACS)。

[0382] 或者,使用来自未经免疫供者的脾脏细胞及/或B细胞或其他PBL可更适当 地呈现可能抗体谱系,且亦允许使用其中SSEA-3/SSEA-4/Globo H不具抗原性 的任何动物(人类或非人类)物种来建构抗体库。对于合并活体外抗体基因构造 的库而言,自个体收取干细胞以提供编码未经重排的抗体基因区段的核酸。所 关注的免疫细胞可获自多种动物物种,诸如人类、小鼠、大鼠、兔形目、狼、 犬、猫、猪、牛、马及鸟类物种等。

[0383] 自所关注的细胞中回收编码抗体可变基因区段(包括VH及VL区段)的核酸 并予以扩增。在重排VH及VL基因库的情况下,可通过以下方式获得所要 DNA:自淋巴细胞中分离基因组DNA或mRNA,随后利用与重排VH及VL基因 的5'端及3'端匹配的引物进行聚合酶链反应(PCR),如Orlandi等人,Proc.Natl. Acad.Sci.(USA),86:3833-3837(1989)中所述,从而制备用于表达的各种V基因 谱系。可利用编码成熟V-域的外显子的5'端处的反向引物以及位

于J-区段内的 正向引物,自cDNA及基因组DNA扩增V基因,如Orlandi等人,(1989)及Ward等人,Nature,341:544-546(1989)中所述。然而,自cDNA扩增时,亦可使反向引 物定位于前导外显子中,如Jones等人,Biotechnol.,9:88-89(1991)中所述,且正 向引物亦可定位于恒定区内,如Sastry等人,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA), 86:5728-5732(1989)中所述。为使互补性达到最大,可在引物中并入简并性, 如Orlandi等人(1989)或Sastry等人(1989)中所述。在某些实施例中,库多样性是 通过使用靶向各V-基因家族的PCR引物而达到最大,以便扩增存在于免疫细胞 核酸样品中的所有可利用的VH与VL排列,例如如Marks等人,J.Mol.Biol., 222:581-597(1991)的方法中所述,或如Orum等人,Nucleic Acids Res., 21:4491- 4498(1993)中所述。将经扩增的DNA选殖入表达载体中时,可在一端处将稀少 的限制性位点引入PCR引物内引入作为标记,如Orlandi等人(1989)中所述;或 利用标记引物进行进一步PCR扩增,如Clackson等人,Nature,352:624-628 (1991)中所述。

[0384] 以合成方式重排的V基因谱系在活体外可以是衍生自V基因区段。已选殖 且定序人类VH-基因区段中的大部分(报导于Tomlinson等人,J.Mol.Biol., 227:776-798(1992)中),且已绘出图谱(报导于Matsuda等人,Nature Genet.,3:88- 94(1993)中);可使用这些经选殖区段(包括H1与H2环的所有主要构形)以及编 码各种序列及长度的H3环的PCR引物产生各种VH基因谱系,如Hoogenboom及 Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)中所述。亦可制备具有所有序列多样性 集中于单倍长的长H3环的VH谱系,如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:4457-4461(1992)中所述。已选殖且定序人类Vκ及Vλ区段(报导于Williams及 Winter,Eur.J.Immunol.,23:1456-1461(1993)中)且可用于制备合成性轻链谱 系。基于一定范围的VH与VL折迭及L3与H3长度,合成V基因谱系将编码具有 大量结构多样性的抗体。扩增编码V-基因的DNA之后,生殖系V-基因区段可根 据Hoogenboom及Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)的方法在活体外进行 重排。

[0385] 可以数种方式通过将VH与VL基因谱系组合在一起来建构抗体片段谱系。各种谱系可于不同载体中建立,且在活体外重组载体(例如如Hogrefe等人, Gene,128:119-126(1993)中所述),或在活体内通过组合感染来重组载体(例如 Waterhouse等人,Nucl.Acids Res.,21:2265-2266(1993)中所述的loxP系统)。活体 内重组方法利用Fab片段的双链性质来克服大肠杆菌转形效率对库大小加诸的 限制。分别选殖原生VH及VL谱系,一者选殖至噬粒中而另一者选殖至噬菌体 载体中。接着通过噬菌体感染含有噬粒的细菌来组合两个库,从而使各细胞含 有不同组合且库大小仅受所存在的细胞数量(约1012个纯系)限制。两载体均含 有活体内重组信号,从而使VH与VL基因重组于单一复制子上并共包装于噬菌 体病毒粒子中。这些巨大库提供大量具有良好亲和性(约10^{-8}M的Kd^{-1})的多种抗 体。

[0386] 或者,可将这些谱系依序选殖入同一载体中,例如如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:7978-7982(1991)中所述;或通过PCR组装在一起且接 着选殖,例如如Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)中所述。亦可使用 PCR组装将VH及VL DNA与编码可挠性肽间隔子的DNA相连接以形成单链Fv (scFv)谱系。在又一种技术中,「细胞内PCR组装」用于在淋巴细胞内通过PCR 组合VH及VL基因,接着选殖所连接基因的纯系谱系,如Embleton等人,Nucl. Acids Res.,20:3831-3837(1992)中所述。

[0387] 可通过技术已知的任何技艺来筛选库。举例而言,SSEA-3/SSEA-4/Globo H标靶可用于涂布吸附盘的孔,在附着于吸附盘或用于细胞分选的宿主细胞上 表达,或与生物素结

合以便用涂有链亲和素的珠粒捕捉,或在此项技术中已知 用于淘选噬菌体呈现库的任何其他方法中使用。

[0388] 噬菌体库样品与固定的SSEA-3/SSEA-4/Globo H在适于至少一部分噬菌体 粒子与吸附剂结合的条件下接触。一般而言,会模拟生理条件来选择条件,包 括pH、离子强度、温度及类似条件。洗涤结合固相的噬菌体且接着通过酸予以 溶离,例如如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:7978-7982(1991)中所 述;或通过碱予以溶离,例如如Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)中 所述,或通过SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗原竞争,例如用类似于Clackson等人, Nature,352:624-628(1991)的抗原竞争方法的程序。可在单轮选择中将噬菌体增 浓约20倍至约1,000倍。此外,可使所增浓的噬菌体在细菌培养物中生长并经历 另一轮选择。

[0389] 选择效率视许多因素而定,包括洗涤期间的解离动力学及单一噬菌体上 的多个抗体片段能否同时与抗原接合。可通过使用短时间洗涤、多价噬菌体呈 现及抗原于固相中的高涂布密度来保留具有快速解离动力学(及弱结合亲和力) 的抗体。高密度不仅经由多价相互作用来稳定噬菌体,还有利于使已解离的噬 菌体再结合。可通过使用长时间洗涤及单价噬菌体呈现(如Bass等人,Proteins, 8:309-314(1990)及WO 92/09690中所述)及低抗原涂布密度(如Marks等人, Biotechnol.,10:779-783(1992)中所述)促进具有缓慢解离动力学(及良好结合亲 和力)的抗体的选择。

[0390] 可在对于SSEA-3/SSEA-4/Globo H具有不同亲和力(甚至是亲和力稍有不同 而已)的噬菌体抗体之间作出选择。然而,所选抗体的随机突变(例如如上述一 些亲和力成熟技术中所进行)可能产生许多突变体,大部分突变体结合至抗原, 而少数具有较高亲和力。在SSEA-3/SSEA-4/Globo H有限的情况下,只有少数 高亲和力噬菌体可胜出。为留下所有亲和力较高的突变体,可将噬菌体与过量 的经生物素化的SSEA-3/SSEA-4/Globo H一起培育,但经生物素化的SSEA- 3/SSEA-4/Globo H的莫耳浓度低于SSEA-3/SSEA-4/Globo H的目标莫耳浓度亲和 力常数。接着可通过涂布链亲和素的顺磁珠粒捕捉高亲和力结合噬菌体。此「平衡捕捉」允许根据抗体的结合亲和力选择抗体,其敏感性允许使具有仅两 倍高亲和力的突变体纯系与具有较低亲和力的大量过量噬菌体分离。亦可基于 解离动力学操控用于洗涤与固相结合的噬菌体的条件来进行区分。

[0391] 可根据活性选择抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H纯系。在一个实施例中,本发 明提供阻断SSEA-3/SSEA-4/Globo H配位体与SSEA-3/SSEA-4/Globo H之间结 合、但不阻断SSEA-3/SSEA-4/Globo H配位体与第二蛋白质之间结合的抗SSEA- 3/SSEA-4/Globo H抗体。可如下选择对应于这些抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体 的Fv纯系:(1)自如上文章节B(I)(2)中所述的噬菌体库分离出抗SSEA-3/SSEA- 4/Globo H纯系,且视情况扩增所分离的噬菌体纯系群(通过使所述群体在适合 的细菌宿主中生长);(2)根据分别需要阻断及非阻断活性来选择SSEA-3/SSEA- 4/Globo H及第二蛋白质;(3)使抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H噬菌体纯系吸附至所 固定的SSEA-3/SSEA-4/Globo H;(4)使用过量的第二蛋白质溶离可识别SSEA-3/SSEA-4/Globo H结合决定子的任何非所需纯系,这些SSEA-3/SSEA-4/Globo H 结合决定子与第二蛋白质的结合决定子重迭或共享;及(5)溶离在步骤(4)之后 维持吸附的纯系。视情况,具有所要阻断/非阻断特性的纯系可进一步通过将本 文中所述的选择程序重复一或多次来增浓。

[0392] 编码本发明的Fv纯系的DNA易使用公知程序分离且定序(例如通过使用设 计成能自融合瘤或噬菌体DNA模板特定扩增所关注的重链及轻链编码区的寡核 苷酸引物)。DNA在分离后,置于表达载体内,接着转染至宿主细胞(诸如大肠 杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中(除此之外 不产生免疫球蛋白),以于重组宿主细胞中合成所需单株抗体。关于在细菌中以 重组方式表达编码抗体的DNA的评论文章包括Skerra等人,Curr.Opinion in Immunol.,5:256(1993)及Pluckthun,Immunol.Revs,130:151(1992)。

[0393] 可将编码本发明Fv纯系的DNA与编码重链及/或轻链恒定区的已知DNA序 列(例如可由Kabat等人(同上文)获得适当的DNA序列)组合,形成编码全长或部 分长度重链及/或轻链的纯系。应了解到,为达成此目的,可使用任何同型的恒 定区,包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恒定区,且可由任何人类或动物物种获 得这些恒定区。如本文所使用,定义「嵌合」及「杂交」抗体包括一种Fv纯 系,其源自一种动物(诸如人类)物种的可变域DNA且接着与另一动物物种的恒 定区DNA融合,形成「杂交体」(全长重链及/或轻链)编码序列。在一个实施例 中,源自人类可变DNA的Fv纯系是与人类恒定区DNA融合以形成所有人类全长 或部分长度重链及/或轻链的编码序列。

[0394] 由原生库所产生的抗体(天然的或合成的)可具有中度亲和力(约10^6至10^7 M^{-1}的Kd^{-1}),但亲和力成熟亦可通过建构第二库及自第二库中再选择来进行活 体外模拟,如Winter等人(1994)(同上)中所述。举例而言,可通过使用易错聚合 酶(Leung等人,Technique,1:11-15(1989)中报导),使用Hawkins等人,J.Mol. Biol.,226:889-896(1992)的方法或Gram等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89: 3576-3580(1992)的方法在活体外随机引入突变。另外,亲和力成熟可如下进 行:使所选个别Fv纯系中的一或多个CDR发生随机突变(例如使用PCR,使用携 有跨越所关注的CDR的随机序列的引物),且筛选较高亲和力纯系。WO 9607754(1996年3月14日公开)描述一种诱导免疫球蛋白轻链的互补决定区发生 突变以建立轻链基因库的方法。另一个有效方法为将通过噬菌体呈现所选择的 VH域或VL域与获自未经免疫供者的天然存在的V域变异体谱系重组且以数轮链 改组针对高亲和力来进行筛选,如Marks等人,Biotechnol.,10:779-783(1992)中 所述。此技术可产生亲和力在10^{-9}M范围内的抗体及抗体片段。

[0395] 产生抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体的其他方法

[0396] 在此项技术中已熟知产生及评估抗体亲和力的其他方法且描述于例如 Kohler等人,Nature 256:495(1975);美国专利第4,816,567号;Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice,第59-103页(Academic Press, 1986;Kozbor,J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987;Munson等人,Anal.Biochem.,107:220(1980);Engels等人,Agnew. Chem.Int.Ed.Engl.,28:716-734(1989);Abrahmsen等人,EMBO J.,4:3901 (1985);Methods in Enzymology,第44卷(1976);Morrison等人,Proc.Natl. Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)。

[0397] 通用方法

[0398] 因此,本发明的一个态样特征为三重靶向Globo H、SSEA3及SSEA-4的经 分离抗体。三重靶向抗体特异性结合至Fucα1→2Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→ 4Galβ1→4Glcβ1

(Globo H六醣)及Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→ 4Glcβ1(SSEA-3五醣)及Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→ 4Glcβ1(SSEA-4六醣)。在一个实例中,三重靶向抗体为mAb 651。

[0399] 本发明的另一态样特征为双重靶向Globo H及SSEA3的经分离抗体。双重 靶向抗体特异性结合至Fucα1→2Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→ 4Glcβ1(Globo H六醣)及Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1 (SSEA-3五醣)。在一个实例中,双重靶向抗体为mAb 273。

[0400] 在又一态样中,本发明特征为对SSEA-4具特异性的经分离抗体。抗SSEA- 4抗体结合至Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1 (SSEA-4六醣)。在一些实例中,抗体能够结合Neu5Gcα2→3Galβ1→3GalNAcβ1 →3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1(SSEA-4六醣的类似物)。优选地,抗体不为小鼠 IgG3(例如mAb MC-831-70)且抗体不为小鼠IgM(例如抗RM1)。抗体的实例包 括(但不限于)mAb 45及48。

[0401] 本发明的另一态样特征为对SSEA-4及其片段具有特异性的经分离抗体。 抗SSEA-4抗体结合至Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→ 4Glcβ1(SSEA-4六醣)及Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1(SSEA-4六 醣的片段)。在一些实例中,抗体能够结合至Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ 1→3Galβ1。在一些实例中,抗体能够结合至Neu5Gcα2→3Galβ1→3GalNAcβ1 →3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1(SSEA-4六醣的类似物)。在一个实例中,抗体为 mAb 46。

[0402] 已开发出三重靶向Globo H、SSEA-3及SSEA-4的抗体、双重靶向Globo H 及SSEA-3的抗体,及抗SSEA-4抗体且揭示于本文中。本发明的抗体可用于治 疗、诊断或用作研究工具。

[0403] 因此,本发明的一个态样涉及在Fc上包含单一均匀N-聚醣的同质单株抗 体群的组合物,其中结构为优化N-聚醣结构以便提高效应细胞功能的功效。

[0404] 在优选实施例中,N-聚醣连接至Fc区的Asn-297。

[0405] 在优选实施例中,其中N-聚醣是由Sia_2(α2-6)$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$的 结构组成。

[0406] 可在活体外产生本文所述的糖抗体。可通过Fc糖基工程改造来产生糖抗 体。在某些实施例中,糖抗体是由通过哺乳动物细胞培养所获得的单株抗体, 经酶促方式或化学酶促方式予以工程改造而成。

[0407] 在一些实施例中,相对于相应单株抗体中的野生型Fc区,本文所述的糖 抗体中的Fc区对FcγRIIA或FcγRIIIA展现结合亲和力增强。

[0408] 在一些实施例中,相对于野生型免疫球蛋白,本文所述的糖抗体展现抗 体依赖性细胞介导性细胞毒性(ADCC)活性增强。

[0409] 在一些实施例中,糖抗体是选自由人类IgG1、IgG2、IgG3及IgG4组成的 群。单株抗体可为人类化抗体、人类抗体或嵌合抗体。

[0410] 本文所述的糖抗体可结合至与癌症、自体免疫病症、发炎病症或感染性 疾病相关的抗原。例示性癌症相关抗原可包括例如Globo-H、SSEA-3、SSEA- 4。

[0411] 在其他态样中,本文所揭示的抗体可侦测聚醣变异体及衍生物。举例而 言,聚醣的还原端为游离的或连接至天然尾部(例如SSEA4糖脂)或非天然尾部 (例如用于制备聚醣

数组或用于结合供诊断目的用的连接符)。所有这些衍生物 均可被抗体识别。

[0412] 在某些诊断及数组实施例中,本发明的抗体因此不仅可侦测本文所述的 聚醣,还可侦测其氧化变异体。本发明的抗体亦可侦测这些氧化变异体的结合 产物。

[0413] 在某些态样中,本发明提供特异性结合至 Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1,及其氧化变异 体,及这些氧化变异体的结合产物,及其氧化变异体,及这些氧化变异体的结 合产物的经分离的人类化单株糖抗体;其中这些氧化变异体为聚醣一级醇变成 羰基的转化产物,且其中结合产物为羰基变成具有一级或二级胺部分的亚胺的 转化产物。

[0414] 举例而言,可通过熟习此项技术者已知的方法将包含一级醇的聚醣转化 成氧化变异体。作为一个非限制性实例,半乳糖上的一级醇可通过使聚醣与氧 化剂(例如过碘酸钠(偏过碘酸钠)或另一种过碘酸盐(例如钾盐、铵盐、锰盐、 锂盐))接触而转化成醛。聚醣中的一或多数个糖部分可发生氧化。氧化剂于水 或适合缓冲剂中的浓度可为1微莫耳浓度、5微莫耳浓度、10微莫耳浓度、25微 莫耳浓度、50微莫耳浓度、100微莫耳浓度、200微莫耳浓度、500微莫耳浓 度、750微莫耳浓度、1毫莫耳浓度、5毫莫耳浓度、10毫莫耳浓度、25毫莫耳 浓度、50毫莫耳浓度、100毫莫耳浓度或500毫莫耳浓度。温度可为5至45℃, 优选为15至40℃,更佳为35至40℃。反应时间可为10秒至20分钟,优选为30秒 至10分钟。适合缓冲剂可包括或不包括盐水、磷酸盐、CHES、MES、硼酸 盐、乙酸盐、碳酸盐、甲酸盐、柠檬酸盐、乙二酸盐。优选使用弱酸性缓冲 剂。优选使用不含TRIS或甘胺酸或游离糖类的缓冲液,因为这些物质在反应中 具竞争性。转化物可通过熟习此项技术者已知的方法,通过透析或离心透析加 以纯化。

[0415] 通过熟习此项技艺者已知的方法且如以下文献中所述,可由氧化产物与 适当胺、肼、酰肼或侧氧基胺的反应形成结合产物:G.Hermanson, Bioconjugate Techniques,3版,ISBN:978-0-12-382239-0,Academic Press, 2013,所述文献以引用的方式并入本文中。作为一个非限制性实例,一级胺可 与具有单一醛官能基的聚醣反应,所述醛官能基由聚醣内的半乳糖的一级醇经 过碘酸盐氧化而形成。净产物为亚胺。亚胺视情况可通过熟习此项技术者已知 的方法(例如氰基硼氢化物还原)进一步还原成醇,以形成对于水解而言更稳定的结合产物。在一些态样中,胺、肼、酰肼或侧氧基胺可进一步共价连接至数 组、报导分子或生物素以便进一步修饰结合产物。在一些态样中,报导子分子 可为荧光分子。在一些态样中,报导分子可为放射性标记的分子。在一些态样 中,报导分子可为具有独特光谱特征(例如IR谱、拉曼谱(Raman spectra)或NMR 谱)的分子。在一些态样中,数组可为固体表面、经化学改质的表面、经聚合物 涂布的表面、珠粒、凝胶、颗粒或纳米颗粒。在一些态样中,纳米颗粒可为荧 光纳米颗粒或展现光致发光。在一些态样中,结合产物可为羰基变成具有一级 或二级胺部分的亚胺的转化产物。

[0416] 一般而言,本发明提供亲和力成熟的SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体。这些 抗体对SSEA-3/SSEA-4/Globo H具有增强的亲和力及特异性。亲和力及敏感性 增强允许本发明的分子用于受益于以下的应用及方法中:(a)本发明的分子敏感 性增强及/或(b)本发明的分子对SSEA-3/SSEA-4/Globo H紧密结合。

[0417] 在一个态样中,SSEA4/SSEA3/Globo H为癌细胞及癌症干细胞特异性表达 的三种聚醣。β-3-GalT5(用于合成此三种糖脂的主要酶)基因表达减量 (knockdown)会使癌细胞

发生细胞凋亡,但不会使正常细胞发生细胞凋亡。抗 体,特别言之,优先或特异性针对SSEA4及/或同时针对SSEA3/SSEA4/Globo H 的糖抗体为有效的癌症治疗剂。在另一态样中,三种聚醣(SSEA4/SSEA3/Globo H,尤其SSEA3)适用作癌症干细胞标记。

[0418] 在一个态样中,SSEA4及/或SSEA4/SSEA3/Globo H的组合适用作为治疗 不同癌症的治疗标靶,癌症包括例如脑癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、胃 癌、肝癌、胆管癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏癌、骨癌(骨肉瘤)、皮肤癌、子宫 颈癌、卵巢癌及前列腺癌。

[0419] 在一个实施例中,提供针对在这些例示性癌症类型的细胞表面上表达的 SSEA4的人类或人类化治疗性抗体。

[0420] 在另一个实施例中,提供针对在这些例示性癌症类型的细胞表面上同时 表达的SSEA3/SSEA4/Globo-H的人类或人类化治疗性抗体。

[0421] 另外,本发明亦关于靶向SSEA-3/SSEA-4/Globo H相关抗原决定基(天然及 经修饰)的免疫原性结合物组合物,其可诱发适用于调节球系列鞘醣脂合成的抗 体及/或结合片段产生。此外,本发明亦关于使用本文所述的组合物治疗或检测 过度增生性疾病及/或病状的方法。

[0422] 在一个实施例中,SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体适用于治疗需要部分或完 全阻断一或多种SSEA-3/SSEA-4/Globo H活性的SSEA-3/SSEA-4/Globo H介导性 病症。在一个实施例中,本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体是用于治疗 癌症。

[0423] 在无需质谱或基因操作的情况下,本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗 体允许在免疫分析(诸如夹心分析、免疫沈淀、ELISA或免疫显微术)中对抗原 决定基进行灵敏且特异性的检测。此又在观测及阐明这些路径正常作用与检测 这些路径何时作用异常方面提供显著优势。

[0424] 本发明的SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体亦可用于确定在疾病的发展及发病 机制中的角色。举例而言,如上文所述,本发明的SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗 体可用于确定TACA在正常情况下的短暂表达是否可能与一或多种疾病状态有 关。

[0425] 本发明的SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体可进一步用于治疗一或多种SSEA- 3/SSEA-4/Globo H调节异常或发生异常作用的疾病,而不会干扰本发明的抗 SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体对其不具特异性的SSEA-3/SSEA-4/Globo H的正常 活性。

[0426] 在另一态样中,本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体可用作检测各种 细胞类型及组织中的癌症状态的试剂。

[0427] 在又一态样中,本发明抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体适用于开发阻断活 性模式类似于本发明的目标抗体的SSEA-3/SSEA-4/Globo H拮抗剂。举例而 言,本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体可用于确定及鉴别具有相同SSEA- 3/SSEA-4/Globo H结合特征及/或SSEA-3/SSEA-4/Globo H路径阻断能力的其他 抗体。

[0428] 作为另一实例,本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体可用于鉴别与本 文中所例示的抗体结合实质上相同的SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗原决定子(包括 线性及构形抗原决定基)的其他抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体。

[0429] 本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体可用于基于涉及SSEA-3/SSEA- 4/Globo H的生理学路径的分析中,以便筛选SSEA-3/SSEA-4/Globo H的小分子 拮抗剂,这些拮抗剂在阻断一或多种结合搭配物结合至SSEA-3/SSEA-4/Globo H方面展现与抗体类似的药理学

作用。

[0430] 可使用此项技术中的常规技能来产生抗体,包括本文所述的彼等技术,诸如融合瘤技术及筛选结合分子的噬菌体呈现库。于此项技术中已充分确立这 些方法。

[0431] 简言之,可通过使用组合库筛选具有所需活性的合成抗体纯系来产生本 发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体。原则上,通过筛选含有呈现融合至噬 菌体外壳蛋白的抗体可变区(Fv)的各种片段的噬菌体的噬菌体库来选择合成抗 体纯系。通过对所需抗原进行亲和力层析来淘选这些噬菌体库。使表达能够与 所需抗原结合的Fv片段的纯系吸附至抗原且因此使其与库中非结合纯系分离。接着将结合纯系自抗原溶离,且可通过额外的抗原吸附/溶离循环进一步增浓。本发明的任一种抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体可如下获得:设计适合的抗原 筛选程序以选出所关注的噬菌体纯系,随后使用来自所关注的噬菌体纯系的Fv 序列及Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication 91-3242,Bethesda Md.(1991),第1-3卷中所述的适合恒定区(Fc)序列建构全长抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体纯系。

[0432] 在一个实施例中,本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体为单株抗体。亦涵盖于本发明的范畴内的为本文所提供的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体的 抗体片段,诸如Fab、Fab'、Fab'-SH及F(ab')2片段,及其变异体。这些抗体片 段可通过诸如酶促消化的传统方式产生,或可通过重组技术产生。这些抗体片 段可为嵌合抗体片段、人类抗体片段或人类化抗体片段。这些片段适用于本文 中所述的实验性目的、诊断性目的及治疗性目的。

[0433] 单株抗体可获自实质上同质的抗体群,亦即组成所述群体的个别抗体相 同,除少量存在的可能天然发生的突变之外。因此,修饰语「单株」表示抗体 并非离散抗体混合物的特征。

[0434] 本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H单株抗体可使用此项技术中已知的多 种方法产生,包括首次由Kohler等人,Nature,256:495(1975)描述的融合瘤方 法,或替代地可通过重组DNA方法产生(例如美国专利第4,816,567号)。

[0435] 载体、宿主细胞及重组方法

[0436] 为了以重组方式产生本发明的抗体,分离编码所述抗体的核酸且将其插 入可复制载体中用于进一步选殖(DNA的扩增)或表达。容易地分离编码抗体的 DNA且使用公知程序(例如通过使用能够与编码抗体重链及轻链的基因特异性 结合的寡核苷酸探针)进行定序。可利用多种载体。载体的选择有一部分视待使 用的宿主细胞而定。宿主细胞包括(但不限于)原核生物来源或真核生物来源(通 常哺乳动物)的细胞。应了解到,为达成此目的可使用任何同型的恒定区,包括 IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恒定区,且这些恒定区可由任何人类或动物物种获 得。

[0437] 使用原核宿主细胞产生抗体

[0438] 载体建构

[0439] 可使用标准重组技术获得编码本发明抗体的多肽组分的聚核苷酸序列。可自产生抗体的细胞(诸如融合瘤细胞)中分离所需聚核苷酸序列并进行定序。或者,可使用核苷酸合成仪或PCR技术合成聚核苷酸。在获得编码多肽的序列 后,将其插入能够在原核宿主中复制并表达异源聚核苷酸的重组载体中。对于 本发明而言可使用可获得且为此项技术中所知的多种载体。适当载体的选择主 要取决于插入载体中的核酸大小及要被载体转形

的特定宿主细胞。各载体含有 不同组分,这视其功能(异源聚核苷酸扩增或表达或两者)及与其存在其中的特 定宿主细胞的兼容性而定。载体组分通常包括(但不限于):复制起点、选择标 记基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入序列及转 录终止序列。

[0440] 一般而言,将含有源自与宿主细胞兼容的物种的复制子及控制序列的质 粒载体与这些宿主联合使用。载体通常携有复制位点以及能够于经转形细胞中 提供表型选择的标记序列。举例而言,大肠杆菌典型地使用pBR322(一种源自 大肠杆菌种的质粒)转形。pBR322含有编码安比西林(ampicillin,Amp)及四环 素(tetracycline,Tet)抗性的基因,且因此提供简易鉴别经转形细胞的方式。pBR322、其衍生物或其他微生物质粒或噬菌体亦可含有或经修饰成含有可被微 生物体使用以供表达内源蛋白质的启动子。于Carter等人的美国专利第 5,648,237号中详细描述用于表达特定抗体的pBR322衍生物的实例。

[0441] 此外,含有与宿主微生物兼容的复制子及控制序列的噬菌体载体可作为 转形载体与这些宿主联合使用。举例而言,诸如λGEM™-11的噬菌体可用于制 造重组载体,其可用以转形易感宿主细胞(诸如大肠杆菌LE392)。

[0442] 本发明的表达载体可包含两个或更多个编码各多肽组分的启动子-顺反子 对。启动子为未经转译的调控序列,位于调节其表达的顺反子上游(5')。原核 启动子通常分为两类:诱导型启动子及组成型启动子。诱导型启动子为在其控 制下,对培养条件的变化(例如存在或不存在营养物或温度变化)做出反应而使 顺反子转录量开始提高的启动子。

[0443] 已熟知可被多种潜在宿主细胞所识别的许多启动子。所选启动子可操作 地连接至编码轻链或重链的顺反子DNA,这是经由限制酶消化来移除源DNA中 的启动子及将经分离启动子序列插入本发明的载体中来达成。原生启动子序列 与多种异源启动子均可用于导引目标基因的扩增及/或表达。在一些实施例中, 相较于原生目标多肽启动子,由于异源启动子通常允许经表达的目标基因的转 录更多及产率更高,故而使用异源启动子。

[0444] 适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子、β-半乳糖酶及乳糖启动子系 统、色胺酸(trp)启动子系统及杂交启动子(诸如tac或trc启动子)。然而,在细菌 中具有功能性的其他启动子(诸如其他已知的细菌或噬菌体启动子)亦适用。其 核苷酸序列已公开,从而使得熟悉此项技术者能够可操作地使用提供任何必需 的限制位点的连接符或接附子,将这些核苷酸序列与编码标靶轻链及重链的顺 反子接合(Siebenlist等人(1980)Cell 20:269)。

[0445] 在本发明的一态样中,重组载体内的各顺反子包含分泌信号序列组分, 其导引经表达的多肽易位跨越膜。一般而言,信号序列可为载体的一个组分, 或其可为插入载体中的标靶多肽DNA的一部分。出于本发明的目的所选择的信 号序列应能被宿主细胞识别及处理(亦即被信号肽酶裂解)的信号序列。对于不 会识别及处理异源多肽的原生信号序列的原核宿主细胞而言,信号序列经选自 例如由以下组成的群的原核信号序列取代:碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳 定性肠毒素II(STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA及MBP。在本发明 的一个实施例中,用于表达系统的两种顺反子中的信号序列为STII信号序列或 其变异体。

[0446] 在另一态样中,本发明的免疫球蛋白的产生可于宿主细胞的细胞质中进 行,且因此各顺反子内不需要有分泌信号序列。就此而言,免疫球蛋白轻链及 重链是在细胞质内表

达、折迭并组装形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株(例 如大肠杆菌trxB-菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,藉此允许经表达 的蛋白质次单元正确折迭及组装。Proba及Pluckthun Gene,159:203(1995)。

[0447] 本发明的抗体亦可通过使用表达系统产生,在表达系统中可调节所表达 的多肽组分的定量比率,以使本发明的经分泌及正确组装的抗体的产量达到最 大。所述调节可至少一部分通过同时调节多肽组分的转译强度来完成。

[0448] 于Simmons等人的美国专利第5,840,523号中揭示一种调节转译强度的技 术。其利用顺反子内的转译起始区(TIR)的变异体。对于指定TIR而言,可产生 具有一系列转译强度的一系列氨基酸或核酸序列变异体,从而提供一种针对特 定链的所要表达量来调节此因子的便利方式。可通过公知突变诱发技艺产生 TIR变异体,产生可改变氨基酸序列的密码子变化。在某些实施例中,核苷酸 序列变化为静默的。TIR变化可包括例如Shine-Dalgarno序列的编号或间距改 变,以及信号序列改变。一种产生突变信号序列的方法为在不会改变信号序列 的氨基酸序列(亦即变化为静默)的编码序列起始处产生「密码子库」。此可通过 改变各密码子的第三核苷酸位置来完成;此外有些氨基酸(诸如白胺酸、丝胺酸及精胺酸)具有多个第一及第二位置,可在制备所述库时增添复杂度。于 Yansura等人(1992)METHODS:A Companion to Methods in Enzymol.4:151-158 中详细描述此突变诱发方法。

[0449] 在一个实施例中,产生对其中各顺反子具有一系列TIR强度的一组载体。此有限组比较各链的表达量以及所要抗体产品在各种TIR强度组合下的产量。TIR强度可通过量化报导基因的表达量来确定,如Simmons等人的美国专利第 5,840,523号中所详述。基于转译强度比较,选出要在本发明的表达载体构筑体 中组合的所需个别TIR。

[0450] 适于表达本发明抗体的原核宿主细胞包括古细菌(Archaebacteria)及真细菌(Eubacteria),诸如革兰氏阴性(Gram-negative)或革兰氏阳性生物体。适用细菌 的实例包括埃希氏菌属(Escherichia)(例如大肠杆菌)、杆菌属(例如枯草芽孢杆 菌(B.subtilis))、肠内细菌、假单胞菌种(例如绿脓假单胞菌(P.aeruginosa)、鼠 伤寒沙门杆菌(Salmonella typhimurium)、黏质沙雷氏菌(Serratia marcescans)、 克雷伯氏菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、志贺杆菌属(Shigella)、根瘤 菌属(Rhizobia)、透明颤菌属(Vitreoscilla)或副球菌属(Paracoccus)。在一个实施 例中,使用革兰氏阴性细胞。在一个实施例中,使用大肠杆菌细胞作为本发明 的宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株W3110(Bachmann,Cellular and Molecular Biology,第2卷(Washington,D.C.:American Society for Microbiology,1987),第1190-1219页;ATCC寄存号27,325)及其衍生物,包括具 有基因型W3110ΔfhuA(ΔtonA)ptr3 lac Iq lacL8ΔompTΔ(nmpc-fepE)degP41 kanR的菌株33D3(美国专利第5,639,635号)。其他菌株及其衍生物(诸如大肠杆 菌294(ATCC 31,446)、大肠杆菌B、大肠杆菌λ1776(ATCC 31,537)及大肠杆菌 RV308(ATCC 31,608))亦为适用的。这些实例具例示性,而非限制性。于此项 技术中已知用于构筑具有所定义基因型的任一种上述细菌的衍生物的方法且描 述于例如Bass等人,Proteins,8:309-314(1990)中。一般需要考虑到复制子在细 菌细胞中的可复制性来选择适当细菌。举例而言,当使用熟知的质粒(诸如 pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410)提供复制子时,大肠杆菌、沙雷氏菌 或沙门杆菌菌种可适用作宿主。宿主细胞通常应分泌最少量的蛋白水解

酶,且 细胞培养物中宜并入其他蛋白酶抑制剂。

[0451] 抗体产生

[0452] 宿主细胞经上述表达载体转形且于适当时经调节的公知营养物培养基中 培养以便诱导启动子、选择转形体或扩增编码所需序列的基因。

[0453] 转形意谓将DNA引入原核宿主中,使得DNA可以染色体外组件或染色体 整合体形式复制。视所使用的宿主细胞而定,使用适于这些细胞的标准技术进 行转形。使用氯化钙进行钙处理一般用于含有实质性细胞壁障壁的细菌细胞。 另一种转形方法是采用聚乙二醇/DMSO。所使用的另一种技术为电穿孔。

[0454] 用以产生本发明的多肽的原核细胞生长于此项技术中已知且适于培养所 选宿主细胞的培养基中。合适培养基的实例包括鲁利亚肉汤(luria broth,LB)外 加必需的营养增补剂。在一些实施例中,培养基亦含有基于构筑表达载体而选 择的选择剂,以选择性地允许含有所述表达载体的原核细胞生长。举例而言, 将安比西林添加至培养基中以使表达安比西林抗性基因的细胞生长。

[0455] 除碳、氮及无机磷酸盐源外,亦可包括适当浓度的任何必需增补剂,其 单独引入或与诸如复合氮源的其他增补剂或培养基混合引入。视情况,培养基 可含有一或多种选自由麸胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、巯基乙醇酸酯、二硫赤藓 糖醇及二硫苏糖醇组成的群的还原剂。

[0456] 在合适的温度下培养原核宿主细胞。对于大肠杆菌生长而言,例如生长 在包括(但不限于)约20℃至约39℃、约25℃至约37℃范围内的温度下及约30℃ 的温度下发生。培养基的pH可为约5至约9范围内的任何pH,这主要视宿主生物 体而定。对于大肠杆菌而言,pH可为约6.8至约7.4,或约7.0。

[0457] 若本发明的表达载体中使用诱导型启动子,则在适于活化所述启动子的 条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一态样中,使用PhoA启动子控制多肽转 录。因此,将经转形的宿主细胞培养于磷酸盐限制性培养基中以进行诱导。在 一个实施例中,所述磷酸盐限制性培养基为C.R.A.P培养基(参见例如Simmons 等人,J.Immunol.Methods(2002),263:133-147)。如此项技术中所知,可根据所 用载体构筑体使用多种其他诱导剂。

[0458] 在一个实施例中,本发明的经表达多肽分泌至宿主细胞的周质中且自宿 主细胞的周质中回收。蛋白质回收通常包含碎裂微生物,一般通过诸如渗透冲 击、音波处理或溶解来碎裂微生物。细胞碎裂后,可通过离心或过滤来移除细 胞碎片或全细胞。蛋白质可例如通过亲和力树脂层析进一步纯化。或者,可将 蛋白质转运至培养基中且在其中进行分离。可自培养物中移除细胞,且过滤且 浓缩培养物上清液以进一步纯化所产生的蛋白质。经表达的多肽可使用通常已 知的方法(诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)及西方墨点分析)进一步分离且加以 鉴别。

[0459] 在本发明的一态样中,通过酸酵方法大量生产抗体。可利用多种大规模 分批馈料酸酵程序来产生重组蛋白。大规模酸酵具有至少1000公升的容量,例 如约1,000至100,000公升容量。这些酸酵器使用搅拌器叶轮分散氧及营养物, 尤其葡萄糖(常见碳/能量来源)。小规模酸酵一般是指在体积容量不超过约100 公升且可在约1公升至约100公升范围内的酸酵器中进行的酸酵。

[0460] 在酸酵过程中,通常在细胞已于合适条件下生长至所需密度(例如, OD550为约

180-220,在此阶段细胞处于稳定期早期)后开始诱导蛋白质表达。如此项技术中已知且如上文所述,可根据所用载体构筑体使用多种诱导剂。可 在诱导前使细胞生长较短的时段。通常诱导细胞约12-50小时,不过可使用更长 或更短的诱导时间。

[0461] 为增进本发明的多肽的产率及质量,可改变多种酰酵条件。举例而言, 为增进分泌的抗体多肽的适当组装及折迭,可使用过度表达伴护蛋白 (chaperone protein)的额外载体共转形宿主原核细胞,这些伴护蛋白为诸如Dsb 蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及/或DsbG)或FkpA(具有伴护蛋白活性的肽基 脯胺酰基顺,反-异构酶)。已证实伴护蛋白会促进细菌宿主细胞中所产生的异源 蛋白质正确折迭及溶解性。Chen等人,(1999)J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou等人,美国专利第6,083,715号;Georgiou等人,美国专利第6,027,888 号;Bothmann及Pluckthun(2000)J.Biol.Chem.275:17100-17105;Ramm及Pluckthun(2000)J.Biol.Chem.275:17106-17113;Arie等人,(2001)Mol. Microbiol.39:199-210。

[0462] 为使所表达的异源蛋白质(尤其对蛋白水解敏感的蛋白质)的蛋白水解降至 最低,本发明可使用某些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株。举例而言,宿主细胞菌 株可经修饰以在编码已知细菌蛋白酶(诸如,蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、 蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其组合)的基因中造成基因突变。可利用一些大肠杆菌蛋白酶缺乏性菌株且描述于例如Joly等人,(1998),同上; Georgiou等人,美国专利第5,264,365号;Georgiou等人,美国专利第5,508,192 号;Hara等人,Microbial Drug Resistance,2:63-72(1996)。

[0463] 在一个实施例中,缺乏蛋白水解酶且经过度表达一或多种伴护蛋白的质 粒转形的大肠杆菌菌株在本发明的表达系统中用作宿主细胞。

[0464] 抗体纯化

[0465] 在一个实施例中,进一步纯化本文中所产生的抗体蛋白质,以获得实质 上同质的制剂供进一步分析及使用。可使用此项技术中已知的标准蛋白纯化方 法。以下程序例示合适的纯化程序:免疫亲和力或离子交换管柱上分离、乙醇 沈淀、逆相HPLC、在二氧化硅上或在阳离子交换树脂(诸如DEAE)上层析、层 析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沈淀,及使用例如Sephadex G-75进行的凝胶过 滤。

[0466] 在一态样中,使用固定于固相上的蛋白质A对本发明的抗体产物进行免疫 亲和力纯化。蛋白质A为来自金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureas)的41kD细 胞壁蛋白质,其以高亲和力结合至抗体的Fc区。Lindmark等人,(1983)J. Immunol.Meth.62:1-13。固定蛋白质A的固相可为包含玻璃或二氧化硅表面的 管柱,或可控微孔玻璃管柱或硅酸管柱。在一些应用中,管柱经诸如甘油的试 剂涂布,以尽可能防止污染物的非特异性附着。

[0467] 作为纯化的第一步骤,可将如上文所述源于细胞培养物的制剂施加至蛋 白质A固定的固相上,以允许所关注的抗体特异性结合至蛋白质A。接着洗涤固 相,以移除非特异性结合至固相的污染物。最后,通过溶离自固相回收所关注 的抗体。

[0468] 使用真核宿主细胞产生抗体

[0469] 载体组分一般包括(但不限于)以下一或多者:信号序列、复制起点、一或 多个标记基因、增强子组件、启动子及转录终止序列。

[0470] (i)信号序列组分

[0471] 用于真核宿主细胞中的载体亦可含有信号序列,或在所关注的成熟蛋白 或多肽

的N端处具有特定裂解位点的其他多肽。所选异源信号序列通常是会被 宿主细胞识别及处理(亦即通过信号肽酶裂解)的信号序列。在哺乳动物细胞表 达时,可利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹病毒gD 信号。

[0472] 此前驱区的DNA在阅读框架中连接至编码抗体的DNA。

[0473] (ii)复制起点

[0474] 一般而言,哺乳动物表达载体不需要复制起点组分。举例而言,通常可 使用SV40起点,仅因为其含有早期启动子。

[0475] (iii)选择基因组分

[0476] 表达载体及选殖载体可含有选择基因,亦称为可选标记。典型的选择基 因编码具有以下蛋白质:(a)赋予对抗生素或其他毒素(例如安比西林、新霉素 (neomycin)、甲胺喋呤或四环素)的抗性;(b)补充营养缺陷(必要时);或(c)提供 不能自复合培养基获得的关键营养物。

[0477] 选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。经异源基因成功 转形的彼等细胞产生赋予药物抗性的蛋白质,且因此在选择方案中存活下来。此显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸及湿霉素(hygromycin)。

[0478] 适用于哺乳动物细胞的可选标记的另一实例为能够鉴别有能力吸收抗体 核酸的细胞的可选标记,诸如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I及金属硫蛋白-II (例如灵长类动物金属硫蛋白基因)、腺苷去胺酶、鸟胺酸去羧酶等。

[0479] 举例而言,可首先通过将所有转形体培养在含有甲胺蝶呤(Mtx)(DHFR的 竞争性拮抗剂)的培养基中来鉴别经DHFR选择基因转形的细胞。适当的宿主细 胞(当使用野生型DHFR时)包括例如缺乏DHFR活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞 株(例如ATCC CRL-9096)。

[0480] 或者,可通过在含有针对可选标记的选择剂(诸如胺基糖苷抗生素,例如 康霉素(kanamycin)、新霉素或G418)的培养基中进行细胞生长,选出经编码抗 体、野生型DHFR蛋白及另一可选标记(诸如胺基糖苷3'-磷酸转移酶(APH))的 DNA序列转形或共转形的宿主细胞(尤其是含有内源DHFR的野生型宿主)。参见 美国专利第4,965,199号。

[0481] (iv)启动子组分

[0482] 表达载体及选殖载体一般含有启动子,而启动子会被宿主生物体识别且 可操作地连接至编码所关注的多肽(例如抗体)的核酸。已知用于真核生物的启 动子序列。实际上所有真核基因于转录起始位点上游约25至30个碱基处均具有 富AT区。于多种基因转录起始处上游70至80个碱基处发现的另一序列为 CNCAAT区,其中N可为任何核苷酸。大部分真核基因的3'端处为AATAAA序 列,所述序列可为聚A尾添加至编码序列的3'端的信号。所有这些序列均适于插 入真核表达载体中。

[0483] 在哺乳动物宿主细胞中可通过例如如下启动子来控制自载体进行的抗体 多肽转录:获自病毒(诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳 头状瘤病毒、禽鸟肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、B型肝炎病毒及猿猴 病毒40(SV40))的基因组的启动子、异源哺乳动物启动子(例如肌动蛋白启动子 或免疫球蛋白启动子)或热休克启动子,限制条件为这些启动子与宿主细胞系统 兼容。

[0484] SV40病毒的早期及晚期启动子宜以亦含有SV40病毒复制起点的SV40限制 片段形式获得。人类巨细胞病毒的立即早期启动子宜以HindIII E限制片段形式 获得。在哺乳动

物宿主中使用牛乳头状瘤病毒作为载体来表达DNA的系统揭示 于美国专利第4,419,446号中。此系统的变化形式描述于美国专利第4,601,978号 中。亦参见Reyes等人,Nature 297:598-601(1982),其关于在来自单纯疱疹病毒 的胸苷激酶启动子控制下,于小鼠细胞中表达人类β-干扰素cDNA。或者,可使 用劳斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)长末端重复序列作为启动子。

[0485] (v)增强子组件组分

[0486] 通常通过将增强子序列插入载体内来增加高等真核生物转录编码本发明 的抗体多肽的DNA。现已知源自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋 白、α-胎蛋白及胰岛素)的许多增强子序列。然而,通常使用来自真核细胞病毒 的增强子。实例包括复制起点后侧的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早 期启动子增强子、复制起点后侧的多瘤病毒增强子及腺病毒增强子。关于用于 活化真核启动子的增强组件,亦参见Yaniv,Nature 297:17-18(1982)。可在抗体 多肽编码序列的5'或3'位置处将增强子剪接至表达载体中,但通常位于相对于 启动子的5'位点。

[0487] (vi)转录终止组分

[0488] 用于真核宿主细胞中的表达载体通常亦含有终止转录及稳定mRNA所必需 的序列。这些序列通常可自真核或病毒DNA或cDNA的5'且有时3'非转译区获 得。这些区域在编码抗体的mRNA的非转译部分中含有以多腺苷酸化片段形式 转录的核苷酸区段。一种适用的转录终止组分为牛生长激素多腺苷酸化区。参 见WO94/11026及其中所揭示的表达载体。

[0489] (vii)宿主细胞的选择及转形

[0490] 适用于选殖或表达本文载体中的DNA的宿主细胞包括本文所述的高等真 核生物细胞,包括脊椎动物宿主细胞。使脊椎动物细胞在培养物(组织培养物) 中繁殖已成为一种常规程序。适用哺乳动物宿主细胞株的实例为经SV40转形的 猴肾CV1细胞株(COS-7,ATCC CRL 1651);人类胚肾细胞株(293细胞或经次选 殖以供在悬浮培养物中生长的293细胞,Graham等人,J.Gen Virol.36:59 (1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO,Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠塞特利氏细 胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人类子宫颈癌瘤细胞 (HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛鼠(buffalo rat) 肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人类肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人类 肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI 细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4 细胞;及人类肝肿瘤细胞株(Hep G2)。

[0491] 宿主细胞经用于产生抗体的上述表达载体或选殖载体转形且于适当时经 调节的公知营养物培养基中培养以便诱导启动子、选择转形体或扩增编码所要 序列的基因。

[0492] (viii)培养宿主细胞

[0493] 可于多种培养基中培养用于产生本发明抗体的宿主细胞。市售培养基, 诸如汉氏F10(Ham's F10,Sigma)、最低必需培养基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)及杜贝可氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)(Sigma),适用于培养宿主细胞。此外,以下文献中所述的任一种培养 基可用作这些宿主细胞的培养基:Ham等人,Meth.Enz.58:44(1979);Barnes等 人,Anal.Biochem.102:255(1980);美国专利第4,

767,704号;第4,657,866号; 第4,927,762号;第4,560,655号;或第5,122,469号;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利Re.30,985。任何这些培养基均可视需要补充激素及/或其他生长因子(诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙 盐、镁盐及磷酸盐)、缓冲剂(诸如HEPES)、核苷酸(诸如腺苷及胸苷)、抗生素 (诸如GENTAMYCIN™药物)、痕量元素(定义为通常以在微莫耳浓度范围内的最 终浓度存在的无机化合物)及葡萄糖或等效能量来源。亦可包括熟习此项技术者 已知的合适浓度的任何其他必需增补剂。培养条件(诸如温度、pH及类似条件) 为先前选用于表达的宿主细胞所用的条件,且为一般熟习此项技术者显而易 知。

[0494] (ix)抗体纯化

[0495] 当使用重组技术时,抗体可于细胞内产生或直接分泌至培养基中。若抗 体是在细胞内产生,则第一步骤,一般会例如通过离心或超滤来移除微粒碎片 (宿主细胞或溶解片段)。在抗体分泌至培养基中的情形下,通常先使用市售蛋 白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)浓缩这些表达系统 的上清液。在任何前述步骤中可包括诸如PMSF的蛋白酶抑制剂以抑制蛋白水 解,且可包括抗生素以防止外来污染物生长。

[0496] 由细胞所制备的抗体组合物可使用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透 析及亲和力层析加以纯化,亲和力层析为通常可接受的纯化技艺。亲和力试剂 (诸如蛋白质A)作为亲和力配位体的适用性取决于存在于抗体中的任何免疫球蛋 白Fc域的种类及同型。蛋白质A可用于纯化基于人类γ1、γ2或γ4重链的抗体 (Lindmark等人,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。所有小鼠同型及人类γ3均推 荐用蛋白质G(Guss等人,EMBO J.5:15671575(1986))。虽然亲和力配位体所连 接的基质最常为琼脂糖,但也可利用其他基质。与用琼脂糖可达成的流速及处 理时间相比,机械稳定性基质(诸如可控微孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)可 使流速更快且处理时间更短。在抗体包含CH3域的情况下,则Bakerbond ABX™树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)适用于纯化。亦可利用其他蛋白质纯化技 术,诸如离子交换管柱上的分离、乙醇沈淀、逆相HPLC、二氧化硅层析、肝 素SEPHAROSE™层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬胺酸管柱)层析、 层析聚焦、SDS-PAGE及硫酸铵沈淀,此视欲回收的抗体而定。

[0497] 在任何初步纯化步骤后,可视需要对包含所关注抗体及污染物的混合物 进行进一步纯化步骤,例如使用pH在约2.5-4.5之间的溶离缓冲液进行低pH疏水 性相互作用层析,一般在低盐浓度(例如约0-0.25M盐)下进行。

[0498] 应了解,一般而言,于此项技术中已充分确立用于制备供研究、测试及 临床用途中使用的抗体的技艺及方法,其符合上述及/或熟习此项技术者认为适 用于所关注的特定抗体。

[0499] 活性分析

[0500] 可通过此项技术中已知的各种分析来表征本发明抗体的物理/化学特性及 生物功能。

[0501] 可通过一系列分析进一步表征经纯化抗体,分析包括(但不限于)N端定 序、氨基酸分析、非变性尺寸排除高压液相层析(HPLC)、质谱、离子交换层析 及番木瓜蛋白酶消化。

[0502] 需要时,分析抗体的生物活性。在一些实施例中,测试本发明抗体的抗 原结合活性。此项技术中已知且本文中可使用的抗原结合分析包括(不限于)使 用诸如下列技术的

任何直接或竞争性结合分析:西方墨点、放射免疫分析、ELISA(酶联免疫吸附分析)、「夹层」免疫分析、免疫沈淀分析、荧光免疫分 析、化学发光免疫分析、纳米粒子免疫分析、适体免疫分析及蛋白质A免疫分 析。

[0503] 抗体片段

[0504] 本发明涵盖抗体片段。在某些情形下,使用抗体片段比完整抗体还有优 势。尺寸较小的片段允许快速清除且可增进对实体肿瘤的近接。

[0505] 已开发出各种技术用于产生抗体片段。传统上,这些片段可经由完整抗 体的蛋白水解消化衍生而来(参见例如Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992);及Brennan等人,Science,229:81 (1985))。然而,这些片段现在可由重组宿主细胞直接产生。Fab、Fv及ScFv抗 体片段皆可表达于大肠杆菌中并自大肠杆菌分泌,从而容易产生大量这些片 段。可自上文所讨论的抗体噬菌体库中分离抗体片段。或者,Fab'-SH片段可自 大肠杆菌直接回收且化学偶合而形成F(ab')2片段(Carter等人,Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一方法,F(ab')2片段可直接自重组宿主细胞培养物 中分离。于美国专利第5,869,046号中描述包含救助受体结合抗原决定基残基且 活体内半衰期延长的Fab及F(ab')2片段。用于产生抗体片段的其他技术对于熟 练从业者而言显而易见。在其他实施例中,所选抗体为单链Fv片段(scFv)。参 见WO 93/16185;美国专利第5,571,894号及第5,587,458号。Fv及sFv为唯一一种 具有完整结合位点,但缺乏恒定区的抗体片段;因此,其在活体内使用期间适 用于减少非特异性结合。可建构sFv融合蛋白以在sFv的胺基端或羧基端处产生 效应蛋白的融合物。参见Antibody Engineering,Borrebaeck编,同上。抗体片段 亦可为「线性抗体」,例如如美国专利第5,641,870号中所述。这些线性抗体片 段可为单特异性或双特异性的。

[0506] 人类化抗体

[0507] 本发明包括人类化抗体。此项技术中已知将非人类抗体人类化的各种方 法。举例而言,人类化抗体中可引入一或多个来自非人类来源的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基通常称为「输入」残基,其通常是自「输入」可变域取 得。人类化基本上可遵循Winter及同事的方法(Jones等人,(1986)Nature 321:522-525;Riechmann等人,(1988)Nature 332:323-327;Verhoeyen等人, (1988)Science 239:1534-1536),通过用高变区序列取代人类抗体的相应序列来 进行。因此,这些「人类化」抗体为嵌合抗体(美国专利第4,816,567号),其中 实质上少于完整的人类可变域经来自非人类物种的相应序列取代。实务上,人 类化抗体通常为人类抗体,其中某些高变区残基及可能一些FR残基经来自啮齿 动物抗体的类似位点的残基取代。

[0508] 选择用于产生人类化抗体的人类可变域(轻链与重链)对于减少抗原性而言 非常重要。根据所谓的「最佳拟合」方法,对照已知人类可变域序列的完整库 来筛选啮齿动物抗体的可变域序列。接着将与啮齿动物的序列最接近的人类序 列当作人类化抗体的人类构架(Sims等人,(1993)J.Immunol.151:2296;Chothia 等人,(1987)J.Mol.Biol.196:901。另一方法是使用一个特定构架,它是源自具 有轻链或重链的特定亚群的所有人类抗体的一致序列。若干种不同人类化抗体 可使用相同构架(Carter等人,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285;Presta 等人,(1993)J.Immunol.,151:2623)。

[0509] 通常更需要使抗体在保留对抗原的高亲和力及其他良好生物特性的情况 下人类

化。为达成此目标，根据一种方法，人类化抗体是通过使用亲本序列及 人类化序列的三维模型，分析亲本序列及各种设想的人类化产物的方法来制 备。三维免疫球蛋白模型普遍可得且为熟习此项技术者熟知。可获得说明及呈 现所选择的候选免疫球蛋白序列的可能三维构形结构的计算机程序。对这些呈 现的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列发生作用时的可能角色，亦即分 析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以此方式，可自接受者及输 入序列选择FR残基并予以组合以便获得所需抗体特征，诸如对标靶抗原的亲和 力增加。一般而言，高变区残基直接且极实质上涉及影响抗原结合。

[0510] 人类抗体

[0511] 可通过如上文所述将选自人类源噬菌体呈现库的Fv纯系可变域序列与已 知人类恒定域序列组合来建构本发明的人类抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体。或者，可通过融合瘤方法产生本发明的人类单株抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗 体。例如Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984)；Brodeur等人，Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications，第51-63页(Marcel Dekker, Inc.,New York,1987)；及Boerner等人，J.Immunol.,147:86(1991)已描述用于产 生人类单株抗体的人类骨髓瘤及小鼠-人类杂骨髓瘤细胞株。

[0512] 在不产生内源免疫球蛋白的情况下，现在可产生于免疫后能够产生全人 类抗体谱系的转殖基因动物(例如小鼠)。举例而言，已描述在嵌合及生殖系突 变小鼠中，抗体重链连接区(JH)基因的同型合子缺失会导致内源抗体产生被完 全抑制。将人类生殖系免疫球蛋白基因数组转移至这些生殖系突变体小鼠体内 将会在抗原激发后引起人类抗体的产生。参见例如Jakobovits等人，Proc.Natl. Acad.Sci.USA,90:2551(1993)；Jakobovits等人，Nature,362:255(1993)； Bruggermann等人，Year in Immunol.,7:33(1993)。

[0513] 亦可使用基因改组自非人类(例如啮齿动物)抗体获得人类抗体，其中人类 抗体具有与初始非人类抗体类似的亲和力及特异性。根据此方法(其亦称「抗原 决定基印记法」)，通过如上所述的噬菌体呈现技术所获得的非人类抗体片段的 重链或轻链可变区经人类V域基因谱系置换，形成非人类链/人类链scFv或Fab嵌 合体的群体。以抗原进行选择可分离非人类链/人类链嵌合scFv或Fab，其中人 类链恢复移除初级噬菌体呈现纯系中的相应非人类链后被损坏的抗原结合位 点，亦即抗原决定基决定(印模)了人类链搭配物的选择。当重复所述方法以置 换剩余非人类链时，获得人类抗体(参见1993年4月1日公开的PCT WO 93/06213 号)。与传统通过CDR移植对非人类抗体进行人类化不同的是，此技术提供不具 有非人类来源的FR或CDR残基的完整人类抗体。

[0514] 双特异性抗体

[0515] 双特异性抗体为对至少两种不同抗原具有结合特异性的单株抗体。在某 些实施例中，双特异性抗体为人类抗体或人类化抗体。在某些实施例中，结合 特异性之一是针对包括特定离胺酸键联的SSEA-3/SSEA-4/Globo H，而另一者 是针对任何其他抗原。在某些实施例中，双特异性抗体可结合至具有两个不同 离胺酸键联的两种不同SSEA-3/SSEA-4/Globo H。可制备全长抗体或抗体片段 形式的双特异性抗体(例如F(ab')2双特异性抗体)。

[0516] 此项技术中已知制造双特异性抗体的方法。传统上，双特异性抗体的重 组产生是以共表达两个免疫球蛋白重链-轻链对为基础，其中两个重链具有不同 特异性(Milstein及Cuello,Nature,305:537(1983))。由于免疫球蛋白重链及轻链 的随机分配，这些融合瘤

(四源融合瘤)产生具有10种不同抗体分子的可能混合 物,其中仅一种具有正确双特异性结构。通常通过亲和力层析步骤来纯化正确 分子相当繁琐,且产物产率低。于1993年5月13日公开的WO 93/08829中及 Traunecker等人,EMBO J.,10:3655(1991)中揭示类似程序。

[0517] 根据不同实施例,具有所要结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变 域是与免疫球蛋白恒定域序列融合。此融合例如是使用免疫球蛋白重链恒定 域,包含铰链、CH2及CH3区的至少一部分。在某些实施例中,含有轻链结合 所需位点的第一重链恒定区(CH1)存在于这些融合体中的至少一者中。将编码 免疫球蛋白重链融合体及(若需要)免疫球蛋白轻链的DNA插入单独表达载体 中,且将其共转染至适当的宿主生物体中。当在构建时使用比率不等的三个多 肽链能够提供最佳产率时,在实施例中提供很大的弹性调整三个多肽片段的相 互比例。然而,若等比率的至少两个多肽链的表达造成高产率或当比率并非特别重要时,可能将两个或全部三个多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0518] 在所述方法的一实施例中,双特异性抗体由在一臂中具有第一结合特异 性的杂交免疫球蛋白重链与在另一臂中的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第 二结合特异性)组成。已发现由于免疫球蛋白轻链仅存在于一半双特异性分子中 提供一种简便的分离方式,故此不对称结构会促进所需双特异性化合物与非所 需的免疫球蛋白链组合分离。于WO 94/04690中揭示此方法。关于产生双特异 性抗体的其他细节,参见例如Suresh等人,Methods in Enzymology,121:210 (1986)。

[0519] 根据另一方法,一对抗体分子间的界面可经工程改造,使得自重组细胞 培养物回收的杂二聚体百分比达到最大。所述界面包含抗体恒定域的CH3域的 至少一部分。在此方法中,使第一抗体分子界面的一或多条小氨基酸侧链经较 大侧链(例如酪胺酸或色胺酸)置换。通过用较小氨基酸侧链(例如丙胺酸或苏胺 酸)置换较大氨基酸侧链,于第二抗体分子的界面上产生具有与较大侧链相同或 类似尺寸的补偿「空穴」。此提供一种机制,使杂二聚体的产率增加超过其他 不合需要的最终产物(诸如同二聚体)。

[0520] 双特异性抗体包括交联或「杂结合」抗体。举例而言,呈杂结合物形式 的抗体中的一者可与抗生物素蛋白偶合,另一者与生物素偶合。举例而言,已 提出这些抗体使免疫系统细胞靶向非所需的细胞(美国专利第4,676,980号),且 用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373及EP 03089)。可使用任何便利 的交联方法制备杂结合抗体。在此项技术中熟知适合交联剂以及许多交联技术 且揭示于美国专利第4,676,980号中。

[0521] 文献中亦已描述自抗体片段产生双特异性抗体的技术。举例而言,可使 用化学键联制备双特异性抗体。Brennan等人,Science,229:81(1985)描述一种 程序,其中完整抗体经蛋白水解裂解而产生F(ab')2片段。在二硫醇错合剂亚砷 酸钠存在下还原这些片段,以便稳定邻近二硫醇且防止分子间二硫键形成。接 着将所产生的Fab'片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。接着通过用巯基 乙胺还原将Fab'-TNB衍生物之一再转化为Fab'-硫醇,且与等莫耳量的另一Fab'- TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。所产生的双特异性抗体可用作用于选择 性固定酶的试剂。

[0522] 近期进展已使得自大肠杆菌中直接回收Fab'-SH片段变得容易,这些片段 可经化学偶合形成双特异性抗体。Shalaby等人,J.Exp.Med.,175:217-225 (1992)描述了完全人类化双特异性抗体F(ab')2分子的制备。各Fab'片段分别自大 肠杆菌被分泌且在活体外经历定向化学偶合以形成双特异性抗体。由此形成的 双特异性抗体能够与过度表达HER2受

体的细胞及正常人类T细胞结合，且亦能 触发人类细胞毒性淋巴细胞的溶解活性来对抗人类乳房肿瘤目标。

[0523] 亦已描述多种直接由重组细胞培养物制备及分离双特异性抗体片段的技 术。举例而言，已使用白胺酸拉链产生双特异性抗体。Kostelny等人，J. Immunol.，148(5)：1547-1553(1992)。通过基因融合将来自Fos及Jun蛋白质的白 胺酸拉链肽连接至两种不同抗体的Fab'部分。抗体同二聚体在铰链区还原而形 成单体，且接着再氧化而形成抗体杂二聚体。此方法亦可用于产生抗体同二聚 体。Hollinger等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)所述的「双 功能抗体」技术已提供一种用于制造双特异性抗体片段的替代机制。这些片段 包含经连接符连接至轻链可变域(VL)的重链可变域(VH)，所述连接符短到让相 同链上的两个结构域无法配对。因此，迫使一个片段的VH及VL域与另一片段 的互补VL及VH域配对，藉此形成两个抗原结合位点。亦已报导另一种通过使 用单链Fv(sFv)二聚体来制备双特异性抗体片段的策略。参见Gruber等人，J. Immunol.，152:5368(1994)。

[0524] 具有两价以上的抗体亦考虑在内。举例而言，可制备三特异性抗体。Tutt 等人，J.Immunol.147:60(1991)。

[0525] 多价抗体

[0526] 比起二价抗体，多价抗体可更快地被表达抗体所结合的抗原的细胞内化 (及/或异化)。本发明的抗体可为具有三个或更多个抗原结合位点的多价抗体 (IgM类别的抗体除外)(例如四价抗体)，而多价抗体可通过重组表达编码抗体多 肽链的核酸容易地产生。多价抗体可包含二聚化域及三个或更多个抗原结合位 点。二聚化域例如包含(或包括)Fc区或铰链区。在此情形下，抗体将包含一Fc 区及Fc区胺基端的三个或更多个抗原结合位点。在一实施例中，多价抗体例如 包含(或包括)三个至约八个，或四个抗原结合位点。多价抗体包含至少一个多 肽链(例如，两个多肽链)，其中多肽链包含两个或更多个可变域。举例而言， 多肽链可包含VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc，其中VD1为第一可变域，VD2为第二 可变域，Fc为Fc区的一条多肽链，X1及X2表示氨基酸或多肽，且n为0或1。举 例而言，多肽链可包含VH-CH1-可挠性连接符-VH-CH1-Fc区链；或VH-CH1- VH-CH1-Fc区链。本文中的多价抗体可进一步包含至少两个(例如四个)轻链可 变域多肽。本文的多价抗体可例如包含约两个至约八个轻链可变域多肽。本文 所涵盖的轻链可变域多肽包含轻链可变域且视情形进一步包含CL域。

[0527] 抗体变异体

[0528] 在一些实施例中，本发明涵盖本文所述的抗体的氨基酸序列修饰。举例 而言，可能需要改良抗体的结合亲和力及/或其他生物学特性。可通过将适当的 核苷酸改变引入抗体核酸中或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变异体。这 些修饰包括(例如)抗体氨基酸序列内的残基缺失及/或插入及/或取代。可进行缺 失、插入及取代的任何组合以获得最终构筑体，其限制条件为最终构筑体具有 所需的特征。可在制造序列时将氨基酸变化引入目标抗体氨基酸序列中。

[0529] 有一种方法称为「丙胺酸扫描突变诱发」，如Cunningham及Wells(1989) Science，244:1081-1085所描述，适用于鉴别抗体的作为优选突变诱发位置的某 些残基或区域。在本文中，鉴别出一个残基或一组标靶残基(例如带电荷残基， 诸如Arg、Asp、His、Lys及Glu)且用中性或带负电荷的氨基酸(例如丙胺酸或聚 丙胺酸)置换以影响氨基酸与抗原的相互

作用。随后，通过在取代位点处或为取 代位点引入更多或其他变异体，以改进证明对取代具有功能敏感性的彼等氨基 酸位置。因此，虽然预先确定引入氨基酸序列变异的位点，但突变的性质自身 无需预先确定。举例而言，为分析特定位点的突变的效能，在靶密码子或区执 行ala扫描或随机突变且针对所需的活性筛选所表达的免疫球蛋白。

[0530] 氨基酸序列插入物包括长度为一个残基至含有一百个或更多残基的多肽 的胺基及/或羧基端融合体，以及具有单个或多个氨基酸残基的序列内插入物。末端插入物的实例包括具有N端甲硫胺酰基残基的抗体或与细胞毒素多肽融合 的抗体。抗体分子的其他插入变异体包括抗体的N端或C端与酶(例如对于 ADEPT而言)或与延长抗体的血清半衰期的多肽的融合体。

[0531] 另一类变异体为氨基酸取代变异体。在抗体分子中，这些变异体有至少 一个氨基酸残基替换成不同残基。最引人关注的取代突变位点包括高变区，但 亦涵盖FR变化。于表A中「优选取代」标题下显示保守性取代。若这些取代导 致生物活性改变，则可引入更多实质性变化(如表A命名为「例示性取代」，或 下文参考氨基酸类别进一步所述)，且筛选产物。

[0532] 表A

[0533] 原始残基例示性取代优选取代

[0534] Ala(A)Val;Leu;Ile Val

[0535] Arg(R)Lys;Gln;Asn Lys

[0536] Asn(N)Gln;His;Asp,Lys;Arg Gln

[0537] Asp(D)Glu;Asn Glu

[0538] Cys(C)Ser;Ala Ser

[0539] Gln(Q)Asn;Glu Asn

[0540] Glu(E)Asp;Gln Asp

[0541] Gly(G)Ala Ala

[0542] His(H)Asn;Gln;Lys;Arg Arg

[0543] Ile(I)Leu;Val;Met;Ala;Leu

[0544] Phe;正白胺酸

[0545] Leu(L)正白胺酸;Ile;Val;Ile

[0546] Met;Ala;Phe

[0547] Lys(K)Arg;Gln;Asn Arg

[0548] Met(M)Leu;Phe;Ile Leu

[0549] Phe(F)Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr Tyr

[0550] Pro(P)Ala Ala

[0551] Ser(S)Thr Thr

[0552] Thr(T)Val;Ser Ser

[0553] Trp(W)Tyr;Phe Tyr

[0554] Tyr(Y)Trp;Phe;Thr;Ser Phe

[0555] Val(V)Ile;Leu;Met;Phe;Leu

[0556] Ala;正白胺酸

[0557] 可通过选择取代来完成抗体生物学特性的实质修饰，这些取代在维持以 下各者

的作用方面显著不同：(a)取代区域中多肽骨架的结构，例如褶板或螺旋 构形；(b)靶点处的分子电荷或疏水性；或(c)侧链体积。氨基酸可根据其侧链特 性的相似性来分类(于A.L.Lehninger,Biochemistry,第2版,第73-75页,Worth Publishers,New York(1975))：

[0558] • (1)非极性:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp (W)、Met(M)

[0559] • (2)不带电荷极性:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn (N)、Gln(O)

[0560] • (3)酸性:Asp(D)、Glu(E)

[0561] • (4)碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

[0562] 或者，天然存在的残基可基于共同的侧链特性来分类：

[0563] (1)疏水性:正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0564] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0565] (3)酸性:Asp、Glu；

[0566] (4)碱性:His、Lys、Arg；

[0567] (5)影响链定向的残基:Gly、Pro；

[0568] (6)芳族性:Trp、Tyr、Phe。

[0569] 非保守性取代将需要将这些类别中的一者的成员换成另一类别。亦可将 这些经取代的残基引入保守性取代位点中或引入其余(非保守性)位点中。

[0570] 一种类型的取代变异体涉及取代亲本抗体(例如人类化抗体或人类抗体)的 一或多个高变区残基。通常，相对于产生变异体的亲本抗体，所得选用于进一 步开发的变异体的生物特性会经过修饰(例如经增进)。产生这些取代变异体的 适宜方法涉及使用噬菌体呈现的亲和力成熟。简而言之，使数个高变区位点(例 如6-7个位点)突变，于各位点处产生所有可能的氨基酸取代。使由此所产生的 抗体由丝状噬菌体粒子呈现，呈现与封装于各粒子内的噬菌体外壳蛋白(例如，M13的基因III产物)的至少一部分融合的形式。接着针对如本文所揭示的抗体的 生物学活性(例如结合亲和力)筛选噬菌体呈现的变异体。为鉴别用于修饰的候 选高变区位点，可执行扫描诱变(例如丙胺酸扫描)以鉴别出对抗原结合作用显 著的高变区残基。或者或另外，其可有益于分析抗原-抗体复合物的晶体结构，以便鉴别抗体与抗原之间的接触点。根据此项技术已知的技术，包括本文详述 的彼等技术，这些接触残基及相邻残基为取代候选物。在产生这些变异体后，则所述组变异体使用此项技术中已知的技艺(包括本文中所述的彼等技艺)进行 筛选，且在一或多个相关分析中可选择具有优良特性的抗体用于进一步开发。

[0571] 由多种此项技术中已知的方法制备编码抗体的氨基酸序列变异体的核酸 分子。这些方法包括(但不限于)自天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变异 体的情况下)，或由早期制备的抗体变异体或非变异体形式进行寡核苷酸介导 (或定点)的突变诱发、PCR突变诱发及卡匣突变诱发来制备。

[0572] 可能需要将一或多个氨基酸修饰引入本发明抗体的Fc区，从而产生Fc区 变异体。Fc区变异体可包含在一或多个氨基酸位置(包括铰链半胱胺酸位置)处 具有氨基酸修饰(例如取代)的人类Fc区序列(例如人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0573] 免疫结合物

[0574] 在另一态样中，本发明提供免疫结合物或抗体-药物结合物(ADC)，其包 含与细胞毒性剂(诸如化学治疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如细菌、真 菌、植物或动物来源的酶

促活性毒素,或其片段))结合的抗体或与放射性同位 素结合的抗体(亦即,放射性结合物)。

[0575] 抗体-药物结合物供局部递送细胞毒性剂或细胞生长抑制剂(亦即杀灭或抑 制肿瘤细胞的药物)以便治疗癌症的用途(Syrigos及Epenetos(1999)Anticancer Research 19:605-614;Niculescu-Duvaz及Springer(1997)Adv.Drg Del.Rev. 26:151-172;美国专利第4,975,278号)允许将药物部分靶向递送至肿瘤且积聚于 细胞内,其中全身性投与这些未结合的药剂可能对正常细胞以及企图要消除的 肿瘤细胞产生无法接受的毒性程度(Baldwin等人,(1986)Lancet pp.(1986年3月 15日):603-05;Thorpe,(1985)「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review,」于Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,A.Pinchera等人(编),第475-506页)。藉此试图使功效最大 但毒性最小。已报导多株抗体与单株抗体均适用于这些策略中(Rowland等人, (1986)Cancer Immunol.Immunother.,21:183-87)。这些方法中使用的药物包括 道诺霉素、阿霉素、甲胺蝶呤及长春地辛(Rowland等人,(1986),同上)。抗体- 毒素结合物中所用的毒素包括细菌性毒素(诸如白喉毒素(diphtheria toxin))、植 物毒素(诸如蓖麻毒素(ricin))、小分子毒素(诸如格尔德霉素(geldanamycin)) (Mandler等人,(2000)Jour.of the Nat.Cancer Inst.92(19):1573-1581;Mandler等 人,(2000)Bioorganic&Med.Chem.Letters 10:1025-1028;Mandler等人,(2002) Bioconjugate Chem.13:786-791)、类美登素(maytansinoids)(EP 1391213;Liu等 人,(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623)及卡奇霉素 (calicheamicin)(Lode等人,(1998)Cancer Res.58:2928;Hinman等人,(1993) Cancer Res.53:3336-3342)。这些毒素可通过包括结合微管蛋白、结合DNA或抑 制拓扑异构酶的机制来发挥其细胞毒性及细胞抑制作用。有些细胞毒性药物当 与大抗体或蛋白质受体配位体结合时易变成不具活性的或活性较低的。

[0576] 抗体衍生物

[0577] 本发明的抗体可进一步修饰成含有此项技术中已知且易获得的其他非蛋 白质部分。在一个实施例中,适于抗体衍生化的部分为水溶性聚合物。水溶性 聚合物的非限制性实例包括(但不限于)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚 物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啶酮、聚-1,3-二氧戊环、 聚-1,3,6-三恶烷、乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚 物),及葡聚糖或聚(N-乙烯吡咯啶酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/ 氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二 醇丙醛可因其于水中的稳定性而有利于制造。聚合物可具有任何分子量,且可 以是分支或不分支。可改变与抗体连接的聚合物的数目,且若连接超过一种聚 合物,则这些聚合物可为相同或不同分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的 数目及/或类型可基于包括(但不限于)以下的考虑因素来确定:待改良的抗体的 具体特性或功能、抗体衍生物是否可在限定条件下用于治疗等等。

[0578] 在另一个实施例中,提供抗体与可通过曝露于辐射来选择性加热的非蛋 白质部分的结合物。在一实施例中,所述非蛋白质部分为纳米碳管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.102:11600-11605(2005))。此辐射可以是任何波长,且包 括(但不限于)虽不至于损伤一般细胞,但能将非蛋白质部分加热至会杀死邻近 所述抗体-非蛋白质

部分的细胞的温度的波长。

[0579] 医药调配物

[0580] 包含本发明抗体的治疗性调配物是通过将具有所要纯度的抗体与视需要 选用的生理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂混合(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编辑(1980)),制成水溶液、冻干或其 他干燥调配物的形式储存备用。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所使用的剂 量及浓度下对接受者无毒性,且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐、组胺酸 及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸及甲硫胺酸;防腐剂(诸如十八烷基二 甲基苯甲基氯化铵;氯化六羟季铵(hexamethonium chloride);氯化苯甲烃铵 (benzalkonium chloride)、苄索氯铵(benzethonium chloride);苯酚、丁醇或苯甲 醇;对羟基苯甲酸烷酯(诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯);儿茶 酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽; 蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡 咯啶酮;氨基酸,诸如甘胺酸、麸酰胺酸、天冬酰胺酸、组胺酸、精胺酸或离 胺酸;单糖、双糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂, 诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐相对离 子,诸如钠;金属错合物(例如Zn-蛋白质错合物);及/或非离子界面活性剂, 诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0581] 本文中的调配物亦可含有一种以上为治疗特定适应症所需的活性化合 物,包括(但不限于)具有彼此无不利影响的补充活性的彼等物。这些分子适合 以可有效地达成预期目的的量组合存在。

[0582] 亦可将活性成分截留于例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微胶 囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊))中、截留于胶状药物递送系统(例如脂质粒、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子及纳米 胶囊)中或截留于巨乳液中。于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol,A.编(1980)中揭示这些技术。

[0583] 欲用于活体内投药的调配物必须是无菌的。其可容易经由通过无菌过滤 膜过滤来达成。

[0584] 可制备持续释放型制剂。持续释放型制剂的适当实例包括含有本发明免 疫球蛋白的固体疏水性聚合物的半渗透性基质,这些基质呈成形物品的形式, 例如薄膜或微胶囊。持续释放型基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(甲基丙 烯酸2-羟乙酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(美国专利第3,773,919号)、L-麸胺酸 与γ乙基-L-麸胺酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸- 乙醇酸共聚物(诸如LUPRON DEPOT™)(由乳酸-乙醇酸共聚物与亮丙瑞林乙酸 盐(leuprolide acetate)组成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物 (诸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸)使分子能够释放历时超过100天,但某些 水凝胶释放蛋白质的时间更短。当经囊封免疫球蛋白于体内存留太久时,它们 可能因暴露于37℃下的湿度而变性或聚集,导致生物活性丧失且可能使免疫原 性发生变化。视所涉及的机制而定,可针对稳定化来设计合理策略。举例而 言,若发现聚集机制为经硫基-二硫化物互换形成分子间S-S键,则可通过修饰 硫氢基残基、自酸性溶液冻干、控制水分含量、使用适当添加剂及开发特定聚 合物基质组合物来达成稳定的效果。

[0585] 用途

[0586] 本发明的抗体可用于例如活体外、离体及活体内治疗方法中。本发明的 抗体可用作部分地或完全地阻抑活体外、离体及/或活体内特定抗原活性的拮抗 剂。此外，本发明的抗体中的至少一些可中和其他物种的抗原活性。因此，本 发明的抗体可用于例如在含有抗原的细胞培养物中、在具有可与本发明的抗体 交叉反应的抗原的人类个体或其他哺乳动物个体(例如黑猩猩、狒狒、狨猴、食 蟹猕猴及恒河猴、猪或小鼠)中抑制特定抗原活性。在一个实施例中，本发明的 抗体可通过使所述抗体与抗原接触，使得抗原活性受到抑制而用来抑制抗原活 性。在一个实施例中，抗原为人类蛋白质分子。

[0587] 在一个实施例中，本发明的抗体可用于在罹患抗原活性有害的病症的个 体体内抑制抗原的方法，所述方法包含将本发明的抗体投与给个体以便抑制个 体体内的抗原活性。在一个实施例中，抗原为人类蛋白质分子且个体为人类个 体。或者，个体可为表达与本发明抗体结合的抗原的哺乳动物。此外，个体可 为已引入(例如通过投与抗原或通过表达抗原转殖基因)抗原的哺乳动物。出于 治疗目的，可将本发明的抗体投与给人类个体。此外，出于兽医学目的或用作 人类疾病的动物模型，本发明的抗体可投与给表达与抗体交叉反应的抗原的非 人类哺乳动物(例如灵长类动物、猪或小鼠)。关于后者，这些动物模型可适用 于评估本发明抗体的治疗功效(例如测试投药的剂量及时程)。本发明的抗体可 用于治疗、抑制、延迟与SSEA-3/SSEA-4/Globo H及SSEA-3/SSEA-4/Globo H化 蛋白质的异常表达及/或活性有关的疾病、病症或病状的进展、预防/延迟其复 发、改善或预防这些疾病、病症或病状，而与SSEA-3/SSEA-4/Globo H及SSEA- 3/SSEA-4/Globo H化蛋白质的异常表达及/或活性有关的疾病、病症或病状包括 (但不限于)癌症、肌肉病症、泛素路径相关性遗传病症、免疫/发炎病症、神经 病症，及其他泛素路径相关性病症。

[0588] 在一个态样中，本发明的阻断性抗体对SSEA-3/SSEA-4/Globo H具有特异 性。

[0589] 在某些实施例中，向患者投与包含本发明抗体与细胞毒性剂结合的免疫 结合物。在一些实施例中，免疫结合物及/或其所结合的抗原被细胞表面上表达 一或多种与SSEA-3/SSEA-4/Globo H有关的蛋白质的细胞内化，从而增强免疫 结合物杀死与其结合的靶细胞的治疗功效。在一个实施例中，细胞毒性剂靶向 或干扰靶细胞中的核酸。这些细胞毒性剂的实例包括本文中所注明的任一种化 学治疗剂(诸如类美登素或卡奇霉素)、放射性同位素或核糖核酸酶或DNA核酸 内切酶。

[0590] 本发明的抗体在治疗中可单独使用或与其他组合物组合使用。举例而 言，本发明的抗体可与另一抗体及/或佐剂/治疗剂(例如类固醇)共投药。举例而 言，本发明抗体可与消炎剂及/或防腐剂组合于治疗方案中，例如用于治疗本文 所述的任何疾病，包括癌症、肌肉病症、泛素路径相关性遗传病症、免疫/发炎 病症、神经病症及其他泛素路径相关性病症。上文注明的这些组合疗法包括组 合投药(其中两种或更多种药剂纳入同一或各别调配物中)，及分开投药，在此 情况下，本发明抗体可在辅助疗法投与之前及/或之后投与。

[0591] 本发明的抗体(及辅助治疗剂)可通过任何适当方式(包括非经肠、皮下、 腹膜内、肺内及鼻内)投药，且若需要局部治疗，则为病灶内投药。非经肠输注 包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下投药。另外，适当地通过脉冲输 注来投与抗体，尤其剂量降低的抗体。可通过任何适当途径(例如通过注射，诸 如静脉内或皮下注射)给药，有一部分取决于投药为短暂或长期。

[0592] 在抗体制备及投药中可考虑本发明的抗体的结合靶的位置。当结合靶为 细胞内分子时，本发明的某些实施例提供要被引入结合靶所在的细胞中的抗体 或其抗原结合片段。在一实施例中，本发明的抗体可作为胞内抗体(intrabody) 表达于细胞内。如本文中所使用的术语「胞内抗体」是指如以下文献中所述的 可在细胞内表达且能够选择性结合靶分子的抗体或其抗原结合部分：Marasco, Gene Therapy 4:11-15(1997)；Kontermann, Methods 34:163-170(2004)；美国 专利第6,004,940号及第6,329,173号；美国专利申请公开案第2003/0104402号，及PCT公开案第WO2003/077945号。胞内抗体的细胞内表达是通过将编码所需 抗体或其抗原结合部分的核酸(缺乏野生型前导序列及通常与编码抗体或抗原结 合片段的基因有关的分泌信号)引入靶细胞中来达成。可使用将核酸引入细胞内 的任一种标准方法，包括(但不限于)：微量注射、弹道注射、电穿孔、磷酸钙 沈淀、脂质粒及用逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒及携有所关注的核酸的牛 痘载体转染。可将编码本发明的抗SSEA-3/SSEA-4/Globo H抗体的全部或一部 分的一或多种核酸递送至靶细胞，从而表达能够在细胞内结合至SSEA-3/SSEA- 4/Globo H且调节一或多种SSEA-3/SSEA-4/Globo H介导性细胞路径的一或多种 胞内抗体。

[0593] 在另一实施例中，提供内化抗体。抗体可具有增强抗体递送入细胞内的 某些特性，或可修饰成具有这些特性。在此项技术中已知达成此目的的技术。举例而言，已知抗体的阳离子化有助于其吸收至细胞中(参见例如美国专利第 6,703,019号)。脂质转染或脂质粒亦可用于将抗体递送入细胞内。当使用抗体 片段时，特异性结合靶蛋白的结合域的最小抑制片段通常为有利的。举例而 言，基于抗体的可变区序列，可设计保留结合标靶蛋白质序列的能力的肽分 子。这些肽可化学合成及/或通过重组DNA技术产生。参见例如Marasco等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893(1993)。

[0594] 可通过此项技术中已知的方法增强调节性多肽进入靶细胞内。举例而 言，某些序列(诸如源于HIV Tat或触角足突变同源域蛋白质的彼等序列)能够导 引异源蛋白质跨越细胞膜高效吸收。参见例如Chen等人,Proc.Natl.Acad.Sci. USA(1999),96:4325-4329。

[0595] 当结合靶位于脑内时，本发明的某些实施例提供可穿越血脑障壁的抗体 或其抗原结合片段。某些神经变性疾病与血脑障壁的通透性增加相关，以至于 抗体或抗原结合片段容易引入脑内。当血脑障壁保持完整时，此项技术已知有 若干种方法用于将分子输送穿越血脑障壁，包括(但不限于)物理方法、基于脂 质的方法以及基于受体及通道的方法。

[0596] 输送抗体或抗原结合片段穿越血脑障壁的物理方法包括(但不限于)完全规 避血脑障壁或在血脑障壁内形成开孔。规避方法包括(但不限于)直接注入脑内 (参见例如Papanastassiou等人,Gene Therapy 9:398-406(2002))、间质性输注/对 流增强性递送(参见例如Bobo等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:2076-2080 (1994))及将递送装置植入脑内(参见例如Gill等人,Nature Med.9:589-595 (2003)；及Gliadel Wafers™,Guildford Pharmaceutical)。在障壁内形成开孔的方 法包括(但不限于)超音波(参见例如美国专利公开案第2002/0038086号)、渗透压 (例如投与高张性甘露糖醇(Neuwelt,E.A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation,第1及2卷,Plenum Press,N.Y.(1989)))、通过例如舒缓激 肽或渗透剂A-7的渗透(参见例如美国专利第5,112,596号、第5,268,164号、第 5,506,206号及第5,686,416号)，以及用含有编码抗体或抗原结合片段的基因的 载体转染跨立血脑障壁的神经元(参见例如美国专利公开案第2003/

0083299 号)。

[0597] 输送抗体或抗原结合片段穿越血脑障壁的基于脂质的方法包括(但不限 于):将抗体或抗原结合片段囊封于脂质粒内,这些脂质粒与结合血脑障壁的血 管内皮上的受体的抗体结合片段偶合(参见例如美国专利申请公开案第 20020025313),及以低密度脂蛋白粒子(参见例如美国专利申请公开案第 20040204354号)或脱脂脂蛋白E(参见例如美国专利申请公开案第20040131692 号)涂布抗体或抗原结合片段。

[0598] 输送抗体或抗原结合片段穿越血脑障壁的基于受体及通道的方法包括(但 不限于)使用糖皮质激素阻断剂增加血脑障壁的通透性(参见例如美国专利申请 公开案第2002/0065259号、第2003/0162695号及第2005/0124533号);活化钾通 道(参见例如美国专利申请公开案第2005/0089473号)、抑制ABC药物转运子(参 见例如美国专利申请公开案第2003/0073713号);用运铁蛋白涂布抗体且调节一 或多种运铁蛋白受体的活性(参见例如美国专利申请公开案第2003/0129186 号),及使抗体发生阳离子化(参见例如美国专利第5,004,697号)。

[0599] 本发明的抗体组合物以符合良好医疗规范的方式调配、给药及投药。在 此背景下考虑的因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个别患 者的临床病状、病症的起因、药剂的递送位点、投药方法、投药时程及从业医 生已知的其他因素。抗体无需但视情况可与一或多种当前用于预防或治疗所述 病症的药剂一起调配。这些其他药剂的有效量视存在于调配物中的本发明的抗 体的量、病症或治疗的类型及上文所讨论的其他因素而定。这些药剂通常以相 同剂量且利用本文中所述的投药途径使用,或以本文中所述剂量的约1%至99% 使用,或以任意剂量且凭经验/临床上确定为适当的任何途径使用。

[0600] 用于预防或治疗疾病时,本发明的抗体(当单独使用或与诸如化学治疗剂 的其他药剂组合使用时)的适当剂量视待治疗的疾病类型、抗体类型、疾病严重 程度及病程、抗体投药是出于预防性或治疗性目的、先前疗法、患者临床病史 及对抗体的反应及主治医师的判断而定。抗体适于一次性或经一系列治疗投与 至患者。视疾病类型及严重程度而定,约1μg/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10 mg/kg)抗体可为投与给患者的初始候选剂量,不论是例如通过一或多次分开投 药,或通过连续输注。一种典型日剂量可在约1μg/kg至100mg/kg或更多的范 围内,此视上文所提及的因素而定。用于历经数天或更长时间的重复投药时,视病状而定,治疗通常可持续至疾病症状受到所要抑制为止。抗体的一种例示 性剂量在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此,可将约0.5mg/kg、2.0 mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg的一或多个剂量(或其任何组合)投与给患者。这些 剂量可间歇地投与,例如每周或每三周(例如使得患者接受约二至约二十或例如 约六个剂量的抗体)。最初可投与较高负荷剂量,接着可投与一或多个较低剂 量。例示性给药方案包含投与约4mg/kg的初始负荷剂量的抗体,随后投与约2 mg/kg的每周维持剂量的抗体。然而,其他剂量方案可为适用的。此疗法的进 程易于通过公知技术及分析监测。

[0601] 制品

[0602] 在本发明的另一态样中,提供一种含有可用于治疗、预防及/或诊断上述 病症的物质的制品。所述制品包含容器及附于所述容器上或与所述容器关联的 标签或药品说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由诸 如玻璃或塑料的各种材料形成。所述容器容纳单独组合物或与另一种有效治 疗、预防及/或诊断病状的组合物的组合,

且所述容器可具有无菌接取口(例如 所述容器可为静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物 中的至少一种活性剂为本发明的抗体。卷标或药品说明书指示所述组合物用于 治疗所选病状。此外,所述制品可包含(a)内含组合物的第一容器,其中所述组 合物包含本发明的抗体;及(b)内含组合物的第二容器,其中所述组合物包含另 一种细胞毒性剂或治疗剂。本发明的实施例中的制品可进一步包含药品说明 书,所述药品说明书指示组合物可用于治疗特定病状。或者或另外,所述制品 可进一步包含第二(或第三)容器,其含有医药学上可接受的缓冲剂(诸如注射用 抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)及葡萄糖溶 液)。其可进一步包括就商业及使用者观点而言所需的其他物质,包括其他缓冲 剂、稀释剂、过滤器、针及注射器。

[0603] 医药组合物及调配物

[0604] 制备如本文所述的抗体之后,可制备「冻干前调配物」。用于制备调配物 的抗体优选为基本上纯的且宜为基本上同质的(亦即不含污染蛋白质等)。「基本 上纯的」蛋白质意谓以组合物总重量计,组合物包含至少约90wt%、优选至少 约95wt%蛋白质。「基本上同质」蛋白质意谓以组合物总重量计,组合物包含 至少约99wt%蛋白质。在某些实施例中,蛋白质为抗体。

[0605] 考虑所需剂量体积、投药模式等来确定冻干前调配物中的抗体量。在所 选蛋白质为完整抗体(全长抗体)的情况下,约2mg/mL至约50mg/mL、优选约5 mg/mL至约40mg/mL且最佳约20至30mg/mL为例示性起始蛋白质浓度。蛋白质 一般存在于溶液中。举例而言,蛋白质可存在于约pH 4-8且优选约pH 5-7的pH 缓冲溶液中。例示性缓冲剂包括组胺酸、磷酸盐、Tris、柠檬酸盐、丁二酸盐 及其他有机酸。缓冲剂浓度可为约1mM至约20mM,或约3mM至约15mM, 此视例如缓冲剂及调配物(例如复原调配物)的所需等张性而定。优选缓冲剂为 组胺酸,原因在于如下文所表明,此缓冲剂可具有冻干保护特性。丁二酸盐显 示为另一种适用缓冲剂。

[0606] 向冻干前调配物添加冻干保护剂。在优选实施例中,冻干保护剂为非还 原糖,诸如蔗糖或海藻糖。冻干前调配物中的冻干保护剂量一般应使得当复原 时,所得调配物具有等张性。然而,高张性复原调配物亦可为适合的。此外, 冻干保护剂的量不得太低,太低会致使冻干后的蛋白质发生不可接受量的降解/ 聚集。在冻干保护剂为糖(诸如蔗糖或海藻糖)且蛋白质为抗体的情况下,冻干 前调配物中的例示性冻干保护剂浓度为约10mM至约400mM,且优选为约30 mM至约300mM,且最佳为约50mM至约100mM。

[0607] 针对每种蛋白质与冻干保护剂组合来选择蛋白质与冻干保护剂的比率。 在抗体为所选蛋白质且糖(例如蔗糖或海藻糖)为用于产生具有高蛋白质浓度的 等张性复原调配物的冻干保护剂的情况下,冻干保护剂与抗体的莫耳比可为约 100至约1500莫耳冻干保护剂比1莫耳抗体,且优选为约200至约1000莫耳冻干 保护剂比1莫耳抗体,例如约200至约600莫耳冻干保护剂比1莫耳抗体。

[0608] 在本发明的优选实施例中,已发现需要向冻干前调配物添加界面活性 剂。或者或另外,可向冻干调配物及/或复原调配物添加界面活性剂。例示性界 面活性剂包括非离子界面活性剂,诸如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或聚山梨 醇酯80);泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆188);曲拉通(Triton);十二烷基 硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油醇基- 或硬脂酰基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆

蔻基-、亚油醇基-或硬脂酰基-肌胺 酸;亚油醇基-、肉豆蔻基-或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺基丙基-、椰油酰胺基 丙基-、亚油酰胺基丙基-、肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-或异硬脂酰 胺基丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺基丙基);肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-或异硬脂酰胺基丙基-二甲胺;甲基椰油酰基牛磺酸钠或甲基油醇牛磺酸二 钠;及MONAQUAT™系列(Mona Industries,Inc.,Paterson,N.J.);聚乙二醇、聚 丙二醇,及乙二醇与丙二醇的共聚物(例如Pluronics、PF68等)。界面活性剂添 加量应使得在复原之后,会减少复原蛋白质的聚集且将微粒形成减至最少。举 例而言,界面活性剂可以约0.001-0.5%的量且优选以约0.005-0.05%的量存在于 冻干前调配物中。

[0609] 在本发明的某些实施例中,使用冻干保护剂(诸如蔗糖或海藻糖)与增积剂 (例如甘露糖醇或甘胺酸)的混合物制备冻干前调配物。增积剂可允许产生均一 冻干饼而其中无过多囊袋等。

[0610] 其他医药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂,诸如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中所述的彼等物,可包括于冻 干前调配物(及/或冻干调配物及/或复原调配物)中,限制条件为其对调配物的所 需特征无不利影响。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量及浓度下 对接受者无毒且包括:其他缓冲剂;防腐剂;共溶剂;抗氧化剂,包括抗坏血 酸及甲硫胺酸;螯合剂,诸如EDTA;金属错合物(例如Zn-蛋白质错合物);生 物可降解聚合物,诸如聚酯;及/或成盐相对离子,诸如钠。

[0611] 本文所述的医药组合物及调配物优选为稳定的。「稳定」的调配物/组合物 为在储存后,其中的抗体基本上保持其物理及化学稳定性及完整性的调配物/组 合物。用于量测蛋白质稳定性的各种分析技术可在此项技术中获得且回顾于 Peptide and Protein Drug Delivery,247-301,Vincent Lee编,Marcel Dekker,Inc., New York,N.Y.,Pubs.(1991)及Jones,A.Adv.Drug Delivery Rev.10:29-90 (1993)。稳定性可在所选温度下、针对所选时段加以量测。

[0612] 欲用于活体内投药的调配物必须无菌。此容易在冻干及复原之前或之后 通过通过无菌过滤膜过滤来达成。或者,可通过例如将蛋白质以外的成分在约 120℃下进行高压灭菌历时约30分钟来使整个混合物达成无菌性。

[0613] 蛋白质、冻干保护剂及其他可选组分混合在一起之后,将调配物冻干。许 多不同冷冻干燥机可用于此目的,诸如Hull50®(Hull,USA)或GT20®(Leybold- Heraeus,Germany)冷冻干燥机。通过冷冻调配物且随后使冷冻内容物中的冰在适 于初步干燥的温度下升华来实现冻干。在此条件下,产物温度低于调配物的共 晶点或塌陷温度。典型地,在适合压力(范围典型地为约50至250毫托)下,初步 干燥的搁板温度在约-30至25℃范围内(限制条件为在初步干燥期间产物保持冷冻 状态)。干燥所需时间主要由调配物、容纳样品的容器(例如玻璃瓶)的尺寸及类 型及液体体积决定,且可在几小时至数日范围内(例如40-60小时)。二次干燥阶 段可在约0-40℃下执行,这主要视容器的类型及尺寸以及所用蛋白质类型而定。 然而,本文中发现到二次干燥步骤可能并非必需的。举例而言,在冻干的整个 水移除阶段期间,搁板温度可为约15-30℃(例如约20℃)。二次干燥所需的时间 及压力为产生适合冻干饼的时间及压力,此视例如温度及其他参数而定。二次 干燥时间是由产物中的所需残余水分含量决定且典型地花至少约5小时(例如10- 15小时)。压力可与初步干

燥步骤期间所用的压力相同。冻干条件可根据调配物 及小瓶尺寸而变化。

[0614] 在一些情况下,可能需要将蛋白质调配物在要进行蛋白质复原的容器中 予以冻干,以避免转移步骤。在此情况下,容器可为例如3、5、10、20、50或100cc小瓶。作为一般性提议,冻干将产生水分含量少于约5%且优选少于约3% 的冻干调配物。

[0615] 在所需阶段,典型地为向患者投与蛋白质时,冻干调配物可用稀释剂复 原,使得复原调配物中的蛋白质浓度为至少50mg/mL,例如约50mg/mL至约 400mg/mL,更佳为约80mg/mL至约300mg/mL,且最佳为约90mg/mL至约150 mg/mL。在意欲皮下递送复原调配物的情况下,复原调配物中的这些高蛋白质 浓度被认为特别适用的。然而,对于其他投药途径(诸如静脉内投药)而言,可 能需要降低复原调配物中的蛋白质浓度(在复原调配物中例如约5-50mg/mL,或 约10-40mg/mL蛋白质)。在某些实施例中,复原调配物中的蛋白质浓度显著高 于冻干前调配物的蛋白质浓度。举例而言,复原调配物中的蛋白质浓度可为冻 干前调配物蛋白质浓度的约2-40倍,优选3-10倍且最佳3-6倍(例如至少3倍或至 少4倍)。

[0616] 复原一般在约25℃的温度下进行以确保水合作用完全,然而需要时可采 用其他温度。复原所需的时间将视例如稀释剂类型、赋形剂及蛋白质的量而 定。例示性稀释剂包括无菌水、注射用抑菌水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸 盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。稀释剂视情况含有防 腐剂。例示性防腐剂已描述如上,其中芳族醇(诸如苯甲醇或酚醇)为优选防腐 剂。通过评估蛋白质兼容性及防腐剂功效测试的不同防腐剂浓度来确定防腐剂 用量。举例而言,若防腐剂为芳族醇(诸如苯甲醇),则其可以约0.1-2.0%且优 选约0.5-1.5%、但最佳约1.0-1.2%的量存在。优选地,复原调配物在每个小瓶 中有少于6000个尺寸>10μm的粒子。

[0617] 治疗应用

[0618] 本文描述治疗方法,其包括向需要此治疗的个体投与治疗有效量的包括 一或多种本文所述抗体的组合物。

[0619] 在某些实施例中,待治疗的个体为哺乳动物。在某些实施例中,个体为 人类。在某些实施例中,个体为驯养动物,诸如狗、猫、牛、猪、马、绵羊或 山羊。在某些实施例中,个体为伴侣动物,例如狗或猫。在某些实施例中,个 体为家畜动物,诸如牛、猪、马、绵羊或山羊。在某些实施例中,个体为动物 园动物。在另一个实施例中,个体为研究动物,诸如啮齿动物、犬或非人类灵 长类动物。在某些实施例中,个体为非人类转殖基因动物,诸如转殖基因小鼠 或转殖基因猪。

[0620] 在一些实施例中,需要治疗的个体(例如人类患者)经诊断患有癌症、怀疑 患有癌症或处于癌症的风险下。癌症的实例包括(但不限于)脑癌、肺癌、乳 癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏癌、子宫 颈癌、卵巢癌及前列腺癌。在一些实施例中,癌症为脑癌、肺癌、乳癌、卵巢 癌、前列腺癌、结肠癌或胰脏癌。在一些优选实施例中,癌症为脑癌或多形性 神经胶质母细胞瘤(GBM)癌症。

[0621] 在优选实施例中,抗体能够靶向表达Globo H、SSEA-3及SSEA-4的癌细 胞。在一些实施例中,抗体能够靶向癌细胞上的Globo H及SSEA。在一些实施 例中,抗体能够靶向癌症中的SSEA。

[0622] 因此,抗体为针对Globo H、SSEA-3及SSEA-4的三重靶向抗体。在一些实 施例中,抗体为针对Globo H及SSEA-3的双重靶向抗体与抗SSEA-4抗体的混合 物。在一些实施例

中，抗体为针对Globo H、SSEA-3及SSEA-4的三重靶向抗体 与抗SSEA-4抗体的混合物。在一些实施例中，抗体为抗Globo H、抗SSEA-3及 抗SSEA-4抗体的混合物。在一些实施例中，抗体为抗Globo H与抗SSEA-4抗体 的混合物。在一些实施例中，抗体为抗SSEA-4抗体。

[0623] 治疗可减小肿瘤尺寸、消除恶性细胞、预防癌转移、预防复发、减少或 杀死散播性癌症、延长存活期及/或延长进展至肿瘤癌症的时间。

[0624] 在一些实施例中，治疗进一步包含在所述投与抗体之前、期间或之后投 与另一种疗法。在一些实施例中，另一种疗法是用化学治疗剂治疗。在一些实 施例中，额外疗法为放射疗法。

[0625] 本发明的方法尤其有利于治疗及预防早期肿瘤，藉此防止进展至较晚 期，从而降低与晚期癌症有关的发病率及死亡率。本发明的方法亦有利于预防 肿瘤复发或肿瘤再生长(例如原发性肿瘤移除之后持续存在的潜伏肿瘤)，或有 利于减少或预防肿瘤发生。

[0626] 在一些实施例中，如本文所揭示的方法适用于治疗或预防癌症，例如特 征为Globo H、SSEA-3及/或SSEA-4表达增强的癌症。在一些实施例中，癌症包 含癌症干细胞。在一些实施例中，癌症为癌前期，及/或恶性癌症及/或抗治疗 性癌症。在一些实施例中，癌症为脑癌。

[0627] 对于本发明的方法而言，癌症可为实体肿瘤，例如乳癌、结肠直肠癌、 直肠癌、肺癌、肾细胞癌、神经胶质瘤(例如退行性星形细胞瘤、退行性寡树突 状星形细胞瘤、退行性寡树突状神经胶质瘤、多形性神经胶质母细胞瘤 (GBM))、肾脏癌、前列腺癌、肝癌、胰脏癌、软组织肉瘤、类癌瘤、头颈癌、 黑色素瘤及卵巢癌。在一个实施例中，癌症为脑癌或GBM。为实施本文所揭示 的方法，可经由适合途径(诸如静脉内投药(例如快速注射或连续输注一段时 间)、肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、经口、吸入 或局部途径)将有效量的含有至少一种本文所述抗体的上述医药组合物/调配物 投与给需要治疗的个体(例如人类)。包括喷嘴式喷雾器及超音波喷雾器的用于 液体调配物的市售喷雾器适用于投药。液体调配物可直接雾化且冻干粉末可在 复原之后雾化。或者，抗体可使用氟碳调配物及计量吸入器予以气溶胶化，或 以冻干且经研磨的粉末形式吸入。

[0628] 通过本文所述的方法治疗的个体可为哺乳动物，更佳为人类。哺乳动物 包括(但不限于)农场动物、运动型动物、宠物、灵长类动物、马、狗、猫、小 鼠及大鼠。需要治疗的人类个体可为患有癌症、处于罹患癌症的风险下或怀疑 患有癌症的人类患者，包括(但不限于)脑癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、 胃癌、肝癌、胆管癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏癌、子宫颈癌、卵巢癌及前列腺 癌。患有癌症的个体可通过常规医学检查来鉴别。

[0629] 如本文所使用，「有效量」是指对个体产生治疗作用所必需的各活性剂(单 独或与一或多种其他活性剂组合)的量。如熟习此项技术者所认知，有效量会改 变，视以下而定：所治疗的特定病状、病状严重程度、个别患者参数(包括年 龄、身体状况、体型、性别及体重)、治疗持续时间、并行疗法(若存在)的性 质、特定投药途径，及健康从业者的知识及专长范围内的类似因素。这些因素 已为一般技术者熟知且仅用常规实验便可解决。通常使用个别组分或其组合的 最大剂量优选，亦即根据合理医学判断的最高安全剂量。然而一般技术者应了 解，患者因医疗原因、心理原因或实际上任何其他原因可坚持较低剂量或可耐受剂量。

[0630] 诸如半衰期的经验性考虑因素一般将有助于确定剂量。举例而言，与人 类免疫系

统兼容的抗体(诸如人类化抗体或完全人类抗体)可用于延长抗体半衰 期,且防止抗体受到宿主的免疫系统攻击。可加以确定投药频率且在治疗过程 中加以调整,且通常(但不一定)基于癌症的治疗及/或抑制及/或改善及/或延 迟。或者,本文所述抗体的持续连续释放型调配物可为适当的。在此项技术中 已知达成持续释放的各种调配物及装置。

[0631] 在一个实例中,可凭经验确定用于已给过一或多次抗体投药的个体的如 本文所述抗体的剂量。给与个体剂量递增的抗体。为评估抗体功效,可遵循常 规实务追踪疾病(例如癌症)的指标。

[0632] 一般而言,投与本文所述的任一种抗体的初始候选剂量可为约2mg/kg。出于本发明的目的,典型日剂量的范围可为约0.1μg/kg至3μg/kg至30μg/kg至 300μg/kg至3mg/kg至30mg/kg至100mg/kg或更高,视上述因素而定。对于数 日或更长时间的重复投药而言,视病状而定,持续治疗直至症状受到抑制或直 至达成足以减缓癌症或其症状的治疗程度。例示性给药方案包含投与约2mg/kg 抗体的初始剂量,随后为每周约1mg/kg抗体的维持剂量,或随后为每隔一周约 1mg/kg的维持剂量。然而,视从业者所希望达到的药物动力学衰减模式而定, 其他给药方案亦可能适用。举例而言,预期一周给药一至四次。在一些实施例 中,可使用约3μg/mg至约2mg/kg(诸如约3μg/mg、约10μg/mg、约30 μg/mg、约100μg/mg、约300μg/mg、约1mg/kg,及约2mg/kg)范围内的剂量。 在一些实施例中,给药频率为每周、每2周、每4周、每5周、每6周、每7周、 每8周、每9周或每10周一次;或每月、每2个月或每3个月或更长时间一次。此 疗法的进程容易通过公知技术及分析监控。给药方案(包括所用抗体)可随时间改变。

[0633] 出于本发明的目的,本文所述抗体的适当剂量将会视以下而定:所用特 定抗体(或其组合物)、癌症的类型及严重程度、投与抗体是出于预防或治疗目 的、先前疗法、患者临床病史及对抗体的反应,及主治医师的判断。本文所述 的抗体基本上可在预选时间段内连续投与或可以一系列间隔剂量投与,例如在 长成癌症之前、期间或之后。

[0634] 如本文所使用,术语「治疗」是指将包括一或多种活性剂的组合物施用 于或投与给患有癌症、癌症症状、癌症素因的个体,目的在于治疗、治愈、减 轻、缓和、改变、补救、改善、改良或影响癌症、癌症症状或癌症素因。

[0635] 减轻癌症包括延迟癌症发展或进展,或降低癌症严重程度。减轻癌症不 一定需要治愈性结果。如其中所用,「延迟」癌症发展意谓推迟、阻碍、减 缓、阻滞、稳定及/或推迟癌症进展。延迟的时间长度可能不同,取决于癌症病 史及/或所治疗的个体。「延迟」或缓解癌症发展或延迟癌症发作的方法为,与 不使用所述方法相比,一种在指定时间范围内使出现癌症的一或多种症状的机 率(风险)降低及/或在指定时间范围内降低症状程度的方法。这些比较通常是基 于临床研究,使用了足以得到统计学显著结果的许多个体来进行。

[0636] 癌症的「发展」或「进展」意谓癌症的初始显现及/或随后发生的进展。癌症发展可为可检测的且使用此项技术中熟知的标准临床技术予以评估。然 而,发展亦指可能检测不到的进展。出于本发明的目的,发展或进展是指症状 的生物学过程。「发展」包括发生、复发及发作。如本文所使用,癌症的「发 作」或「发生」包括初始发作及/或复发。

[0637] 视待治疗的疾病类型或疾病部位而定,可利用医药技术中的一般技术者 已知的公知方法将医药组合物投与给个体。此组合物亦可经由其他公知途径投 与,例如经口、非经肠、通过吸入喷雾、局部、直肠、鼻、颊内、阴道或经由 植入式储集器投与。如本文所用的

术语「非经肠」包括皮下、皮内、静脉内、 肌肉内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内及颅内注射或输注 技术。另外，可经由可注射储槽式投药途径投与给个体，诸如使用1个月、3个 月或6个月储槽可注射或可生物降解材料及方法。

[0638] 可注射组合物可含有各种载剂，诸如植物油、二甲基乙酰胺、二甲基甲 酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、乙醇及多元醇(甘油、丙二醇、 液体聚乙二醇及类似物)。对于静脉内注射而言，可通过滴注方法投与水溶性抗 体，藉此输注含有抗体及生理学上可接受的赋形剂的医药调配物。生理学上可 接受的赋形剂可包括例如5％右旋糖、0.9％盐水、林格氏溶液或其他适合赋形 剂。肌肉内制剂(例如抗体的适合可溶性盐形式的无菌调配物)可于医药赋形剂 (诸如注射用水、0.9％盐水或5％葡萄糖溶液)中溶解且投与。

[0639] 诊断应用

[0640] 本文描述一种诊断个体的癌症的方法，包含(a)将包括一或多种单株抗体 的组合物施用于获自个体的细胞或组织样品，这些单株抗体检测由GM3、 GM2、GM1、GD1、GD1a、GD3、GD2、GT1b、A2B5、LeX、sLeX、LeY、 SSEA-3、SSEA-4、Globo H、TF、Tn、sTn、CD44、CD24、CD45、CD90、 CD133组成的一组标记的表达；(b)分析单株抗体与细胞或组织样品的结合；及 (c)将此结合与正常对照值比较，以确定个体中癌症的存在。

[0641] 用于检测及诊断的癌症实例包括(但不限于)脑癌、肺癌、乳癌、口腔癌、 食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏癌、子宫颈癌、卵巢癌 及前列腺癌。在一些实施例中，癌症为脑癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺 癌、结肠癌或胰脏癌。

[0642] 在一些实施例中，标记是由GM2、GM1、GD1a、GT1b、A2B5、Tf、 Tn、Globo H、SSEA3、SSEA4、CD24、CD44及CD90组成。在一些实施例中， 组合物包括能够检测GM2、GM1、GD1a、GT1b、A2B5、Tf、Tn、Globo H、 SSEA3、SSEA4、CD24、CD44及CD90的多种单株抗体。

[0643] 在一些实施例中，抗体能够检测表达Globo H、SSEA-3及SSEA-4的癌细 胞。在一些实施例中，抗体能够检测癌细胞上的Globo H及SSEA。在一些实施 例中，抗体能够检测癌症中的SSEA。在一些实施例中，癌症为脑癌或多形性神 经胶质母细胞瘤(GBM)癌症，且抗体为抗SSEA-4单株抗体。

[0644] Globo H、SSEA-3及/或SSEA-4特异性单株抗体可于活体外及活体内诊断 性分析中单独或组合使用以检测表达Globo H、SSEA-3及SSEA-4的癌细胞(例如 GBM、某些实体肿瘤细胞，及如本文中所指明的造血系癌细胞)。举例而言， 可自患者获得样品(例如血液样品或组织活体检查)且与针对Globo H、SSEA-3 及SSEA-4的三重靶向抗体或Globo H/SSEA-3双重靶向抗体与抗SSEA-4的组合 接触，且可通过检测抗体结合来确定患者样品中表达Globo H、SSEA-3及 SSEA-4的癌细胞的存在。可直接检测抗体结合(例如其中抗体本身经标记)或通 过使用第二检测剂(诸如二级抗体)检测。可检测标记可与本发明抗体直接或间接(例如经由螯合剂或连接符)结合。

[0645] 在一些实施例中，使Globo H、SSEA-3及/或SSEA-4特异性单株抗体与得 自患有或怀疑患有癌症的个体的生物样品接触，并测定抗体与样品中细胞的结 合，此时高于或低于正常抗体结合均表明所述个体患有癌症。在一些实施例 中，生物样品为血液样品或血液部分(例如血清、血浆、血小板、红血球、白血 球)。在一些实施例中，生物样品为得自例如疑似肿瘤部位或已知患病的组织的 组织样品(活组织检查)，例如以确定已知肿瘤的边界。在一些实施例中，生物 样品获自发炎部位。

[0646] 典型地进行活组织检查以获得组织样品，亦即非流体细胞类型。所应用 的活组织检查技术将视待评估的组织类型(例如乳房、皮肤、结肠、前列腺、肾 脏、肺、膀胱、淋巴结、肝脏、骨髓、呼吸道或肺)而定。在癌症的情况下，技 术亦将视肿瘤的尺寸及类型(例如实体、悬浮或血液)及其他因素而定。于例如Harrison's Principles of Internal Medicine,Kasper等人编,第16版,2005,第70章 及整个第V部分中详述活组织检查技术。

[0647] 本发明诊断性分析中可使用检测抗体与样品中的细胞结合的任何方法。 在此项技术中已熟知检测抗体结合的方法，例如流动式细胞测量术、荧光显微 法、ELISA等。在一些实施例中，方法包含在测定步骤前制备用于检测的生物 样品。举例而言，可将细胞的亚群(例如白血球)与个体样品的其余部分(例如其 他血液组分)分离或可使组织中的细胞悬浮以便更容易检测。

[0648] 在一些实施例中，测定样品中表达Globo H/SSEA-3/SSEA-4的细胞的百分 率且与对照样品相比，例如得自已知患有癌症的个体或个体群的样品(阳性对 照)或得自已知未患有癌症的个体或个体群的样品(正常、非疾病，或阴性对 照)。在一些实施例中，对照为针对指定组织所确立的Globo H/SSEA-3/SSEA-4 标准表达范围。高于或低于表达Globo H/SSEA-3/SSEA-4的细胞的正常百分 率，或表达量较高或较低，均表明个体患有癌症。

[0649] 在一个实施例中，提供一种套组，用于检测生物样品(诸如血液样品或组 织样品)中的Globo H、SSEA-3及SSEA-4。举例而言，为确诊个体的癌症，可进 行活组织检查以获得组织样品用于组织学检查。或者，可获得血液样品以检测 Globo H、SSEA-3及SSEA-4的存在。用于检测多肽的套组典型地包含一或多种 特异性结合Globo H、SSEA-3及SSEA-4的抗体，诸如本文所揭示的任一种抗 体。在另一实施例中，抗体是经标记(例如经荧光、放射性或酶促标记标记)。

[0650] 在一个实施例中，套组包括说明性材料，其揭示一或多种特异性结合 Globo H、SSEA-3及SSEA-4的抗体的使用方式。说明性材料可呈书面形式、电 子形式(诸如计算机磁盘或光盘)或可为可见的(诸如录像档案)。套组亦可包括 促进套组据以设计的特定应用的其他组分。因此，举例而言，套组可另外含有 检测标记的方式(诸如用于酶促标记的酶受质、检测荧光标记的滤波器组、适当 的第二标记(诸如二级抗体)，或类似物)。套组可另外包括缓冲剂及惯常用于实 施特定方法的其他试剂。这些套组及适当内容物为熟习此项技术者所熟知。

[0651] 在此项技术中已熟知测定细胞表面标记存在或不存在的方法。举例而 言，抗体可与其他化合物结合，其他化合物包括(但不限于)酶、磁性珠粒、胶 态磁性珠粒、半抗原、荧光染料、金属化合物、放射性化合物或药物。抗体亦 可用于免疫分析中，诸如(但不限于)放射免疫分析(RIA)、酶联免疫吸附分析 (ELISA)或免疫组织化学分析。抗体亦可用于荧光活化细胞分选(FACS)。FACS 是采用多个彩色通道、低角度及钝角光散射检测信道及阻抗信道以及其他程度 更复杂的检测来分离或分选细胞(参见美国专利第5,061,620号)。这些分析中可 使用结合至Globo H、SSEA-3及SSEA-4的任一种单株抗体，如本文所揭示。因 此，抗体可用于公知免疫分析中，包括(但不限于)ELISA、RIA、FACS、组织 免疫化学、西方墨点或免疫沈淀。

[0652] 对肿瘤进行分期及/或确定预后的方法

[0653] 本发明的另一态样特征为一种对人类患者中的肿瘤进行分期及/或确定预 后的

方法,所述方法包含:(a)将包括一或多种抗体的组合物施用于获自患者的 细胞或组织样品,这些抗体检测由SSEA-3、SSEA-4及Globo H组成的标记的表 达;(b)分析单株抗体与细胞或组织样品的结合;(c)将测试样品中的标记表达量 与参考样品中的标记表达量进行比较;及(d)根据步骤(c)中鉴别的结果来确定患 者肿瘤的分期及/或预后。

[0654] 在一些实施例中,癌症为脑癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠 癌或胰脏癌。在一些优选实施例中,癌症为脑癌或GBM。

[0655] 在一些实施例中,抗体能够检测表达Globo H、SSEA-3及SSEA-4的癌细 胞。在一些实施例中,抗体能够检测癌细胞上的Globo H及SSEA。在一些实施 例中,抗体能够检测癌症中的SSEA。在一些实施例中,癌症为脑癌或多形性神 经胶质母细胞瘤(GBM)癌症,且抗体为抗SSEA-4单株抗体。在一些实施例中, 当癌症为脑癌或GBM时,抗体为抗SSEA-4。

[0656] 在一些实施例中,所提供的聚醣结合物、免疫原性组合物适用于治疗或 诊断癌症,包括(但不限于)听神经瘤、腺癌、肾上腺癌、肛门癌、血管肉瘤(例 如淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、血管肉瘤)、阑尾癌、良性单株球蛋白症、胆 道癌(例如胆管癌)、膀胱癌、乳癌(例如乳房腺癌、乳房乳头状癌瘤、乳腺癌、 乳房髓质癌)、脑癌(例如脑膜瘤;神经胶质瘤,例如星形细胞瘤、寡树突神经 胶质瘤;神经管胚细胞瘤)、支气管癌、类癌瘤、子宫颈癌(例如子宫颈腺癌)、 绒膜癌、脊索瘤、颅咽管瘤、结肠直肠癌(例如结肠癌、直肠癌、结肠直肠腺癌)、上皮癌瘤、室管膜瘤、内皮肉瘤(例如卡波西氏肉瘤、多发性特发性出血 性肉瘤)、子宫内膜癌(例如子宫癌、子宫肉瘤)、食道癌(例如食道腺癌、巴雷 特氏腺癌(Barrett's adenocarinoma))、尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma)、眼癌(例如眼 内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤)、家族性嗜伊红血球增多症、胆囊癌、胃癌(例 如胃腺癌)、胃肠基质肿瘤(GIST)、头颈癌(例如头颈部鳞状细胞癌)、口腔癌(例 如口腔鳞状细胞癌(OSCC)、咽喉癌(例如喉癌、咽癌、鼻咽癌、口咽癌))、造血 癌症(例如白血病,诸如急性淋巴细胞性白血病(ALL)(例如B细胞ALL、T细胞 ALL)、急性骨髓细胞性白血病(AML)(例如B细胞AML、T细胞AML)、慢性骨髓 细胞性白血病(CML)(例如B细胞CML、T细胞CML)及慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)(例如B细胞CLL、T细胞CLL);淋巴瘤,诸如霍奇金氏淋巴瘤(HL)(例如B 细胞HL、T细胞HL)及非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)(例如B细胞NHL,诸如弥漫性大 细胞淋巴瘤(DLCL)(例如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL))、滤泡性淋巴瘤、慢 性淋巴细胞性白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤(CLL/SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、 边缘区B细胞淋巴瘤(例如黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、结边缘区B细胞淋 巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤 (Burkitt lymphoma)、淋巴浆细胞淋巴瘤(亦即「瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症 (Waldenström's macroglobulinemia)」)、毛细胞白血病(HCL)、免疫母细胞性大 细胞淋巴瘤、前驱B-淋巴母细胞性淋巴瘤及原发性中枢神经系统(CNS)淋巴 瘤;及T细胞NHL,诸如前驱T-淋巴母细胞性淋巴瘤/白血病、周边T细胞淋巴瘤 (PTCL)(例如皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)(例如蕈样肉芽肿、塞扎莱症候群(Sezary syndrome))、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、结外天然杀手T细胞淋巴瘤、肠 病型T细胞淋巴瘤、皮下脂层炎样T细胞淋巴瘤、退形性大细胞淋巴瘤);一或多种如上文所述的白血病/淋巴瘤的混合;及多发性骨髓瘤(MM))、重链疾病(例 如α链疾病、γ链疾病、μ链疾病)、血管母细胞瘤、发炎性肌纤维母细胞肿瘤、 免疫细胞性淀粉样变性、肾脏癌(例如肾母细胞瘤,亦称为威尔姆斯氏肿瘤 (Wilms'tumor)、肾细胞癌)、肝癌(例如肝细胞癌(HCC)、恶性肝肿瘤)、肺癌(例 如支气管癌、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌

(NSCLC)、肺腺癌)、平滑肌肉 瘤(LMS)、肥大细胞增多症(例如全身性肥大细胞增多症)、骨髓发育不良症候群 (MDS)、间皮瘤、骨髓增生性病症(MPD)(例如真性红血球增多症(PV))、原发性 血小板增多症(ET)、原因不明性骨髓细胞化生(AMM)(亦称为骨髓纤维化 (MF))、慢性特发性骨髓纤维化、慢性骨髓细胞性白血病(CML)、慢性嗜中性球 白血病(CNL)、嗜伊红白血球增多症候群(HES))、神经母细胞瘤、神经纤维瘤 (例如1型或2型神经纤维瘤(NF)、许旺细胞瘤病(schwannomatosis))、神经内分 泌癌(例如胃肠胰脏神经内分泌肿瘤(GEP-NET)、类癌瘤)、骨肉瘤、卵巢癌(例 如囊腺癌、卵巢胚胎癌瘤、卵巢腺癌)、乳头状腺癌、胰脏癌(例如胰腺癌、管 内乳头状黏液性赘瘤(IPMN)、胰岛细胞瘤)、阴茎癌(例如阴茎及阴囊的佩吉特 氏病(Paget's disease))、松果体瘤、原始神经外胚层瘤(PNT)、前列腺癌(例如前列腺腺癌)、直肠癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌(例如鳞状细胞癌(SCC)、 角化棘皮瘤(KA)、黑色素瘤、基底细胞癌(BCC))、小肠癌(例如阑尾癌)、软组 织肉瘤(例如恶性纤维组织细胞瘤(MFH)、脂肪肉瘤、恶性周边神经鞘肿瘤 (MPNST)、软骨肉瘤、纤维肉瘤、黏液肉瘤)、皮脂腺癌瘤、汗腺癌瘤、滑膜 瘤、睾丸癌(例如精原细胞瘤、睾丸胚胎癌瘤)、甲状腺癌(例如甲状腺的乳头状 癌瘤、乳头状甲状腺癌瘤(PTC)、髓质甲状腺癌)、尿道癌、阴道癌及外阴癌(例 如外阴的佩吉特氏病)。在某些实施例中,所提供的聚醣结合物、免疫原性组合物或疫苗适用于治疗脑癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管 癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏癌、骨癌、皮肤癌、子宫颈癌、卵巢癌及前列腺 癌。

[0657] 为了执行本文所述的治疗方法,有效量的任一种本文所述聚醣组合物可 经由适合路径投与给需要治疗的个体,如上文所述。个体,诸如人类个体,可 以是患有癌症、怀疑患有癌症或易患癌症的患者。在一些实施例中,聚醣结合 物或免疫原性组合物的量足以诱发反应,以抑制癌症生长及/或减小肿瘤块。在 其他实施例中,聚醣组合物的量可有效延迟标靶癌症的发作或降低癌症发展的 风险。达成有效量所必需的所提供聚醣组合物的确切量将因个体而异,此视以 下而定:个体的物种、年龄及一般状况、副作用或病症的严重程度、特定化合 物的身分、投药方式及类似者。所要剂量的递送可为一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每隔两天、每周、每两周、每三周或每四周。在某些实施 例中,所要剂量可使用多次投药递送(例如两次、三次、四次、五次、六次、七 次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次投药)。

[0658] 在某些实施例中,就对70kg成年人一天投与一或多次来说,所提供的聚 醣结合物的有效量可包含每个单位剂型约0.0001mg至约3000mg、约0.0001mg 至约2000mg、约0.0001mg至约1000mg、约0.001mg至约1000mg、约0.01mg 至约1000mg、约0.1mg至约1000mg、约1mg至约1000mg、约1mg至约100 mg、约10mg至约1000mg,或约100mg至约1000mg化合物。

[0659] 在某些实施例中,所提供的聚醣组合物可经口或非经肠,以足以递送约 每天每公斤个体体重0.001mg至约100mg、约0.01mg至约50mg、优选约0.1 mg至约40mg、优选约0.5mg至约30mg、约0.01mg至约10mg、约0.1mg至约 10mg及更佳约1mg至约25mg的剂量水平,一天投与一或多次,以获得所要治 疗作用。

[0660] 应了解如本文所述的剂量范围提供关于向成人投与所提供的聚醣结合 物、免疫原性组合物或疫苗的指导。投与给例如儿童或青少年的量可由从医者 或熟习此项技术者确定且可低于成人投与量或与成人投与量相同。

[0661] 亦将了解,所提供的聚醣组合物可与一或多种其他治疗活性剂组合投 与。所提供

的聚醣结合物、免疫原性组合物或疫苗可与改良其生物可用性、减 少及/或调节其代谢、抑制其排泄及/或调节其在体内的分布的其他治疗活性剂 组合投与。亦应了解，所用疗法可针对相同病症达到所要作用，且/或其可达到 不同作用。

[0662] 所提供的聚醣组合物可与一或多种其他治疗活性剂同时、在其之前或之 后投与。一般而言，各药剂将以根据彼药剂所确定的剂量及/或时程来投与。另 外应了解，此组合中所用的其他治疗活性剂可在单一组合物中一起投与或在不 同组合物中分开投与。疗法中使用的特定组合会考虑到本发明化合物与其他治 疗活性剂的兼容性及/或希望达成的所要治疗作用。一般而言，预期组合中所用 的其他治疗活性剂用量不超过个别使用时的用量。在一些实施例中，组合用量 将低于个别用量。

[0663] 在某些实施例中，所提供的聚醣组合物与本文所述的一或多种其他医药 剂组合投与。在某些实施例中，其他医药剂为抗癌剂。抗癌剂涵盖生物治疗抗 癌剂以及化学治疗剂。

[0664] 例示性生物治疗抗癌剂包括(但不限于)干扰素、细胞激素(例如肿瘤坏死 因子、干扰素α、干扰素γ)、疫苗、造血生长因子、单株血清疗法、免疫刺激剂 及/或免疫调节剂(例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-6或IL-12)、免疫细胞生长因子(例 如GM-CSF)及抗体(例如赫赛汀(HERCEPTIN)(曲妥珠单抗(trastuzumab))、T- DM1、阿瓦斯汀(AVASTIN)(贝伐单抗(bevacizumab))、艾必妥(ERBITUX)(西妥 昔单抗(cetuximab))、维克替比(VECTIBIX)(帕尼单抗(panitumumab))、美罗华 (RITUXAN)(利妥昔单抗(rituximab))、百克沙(BEXXAR)(托西莫单抗 (tositumomab)))。

[0665] 例示性化学治疗剂包括(但不限于)抗雌激素(例如他莫昔芬(tamoxifen)、雷 诺昔酚(raloxifene)及甲地孕酮(megestrol))、LHRH促效剂(例如膏斯克林 (goscrclin)及亮丙瑞林(leuprolide))、抗雄激素(例如氟他胺(flutamide)及比卡鲁 胺(bicalutamide))、光动力疗法(例如弗妥珀芬(vertoporfin)(BPD-MA)、酞花青(phthalocyanine)、光敏剂Pc4及去甲氧基-竹红菌素A(demethoxy-hypocrellin A)(2BA-2-DMHA))、氮芥(例如环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、曲洛磷胺(trofosfamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、雌氮芥 (estramustine)及美法仑(melphalan))、亚硝基脲(例如卡莫司汀 (carmustine)(BCNU)及洛莫司汀(lomustine)(CCNU))、烷基磺酸酯(例如白消安 (busulfan)及曲奥舒凡(treosulfan))、三氮烯(例如达喀尔巴嗪(dacarbazine)、替莫 唑胺(temozolomide))、含铂化合物(例如顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥 沙利铂(oxaliplatin))、长春花生物碱(例如长春新碱(vincristine)、长春碱 (vinblastine)、长春地辛(vindesine)及长春瑞滨(vinorelbine))、类紫杉醇(例如太 平洋紫杉醇或太平洋紫杉醇等效物，诸如纳米颗粒白蛋白结合的太平洋紫杉醇 (Abraxane)、二十二碳六烯酸结合的太平洋紫杉醇(DHA-太平洋紫杉醇，他克普 辛(Taxoprexin))、聚麸胺酸盐结合的太平洋紫杉醇(PG-太平洋紫杉醇，太平洋 紫杉醇聚麸胺酸，CT-2103，XYOTAX)、肿瘤活化前药(TAP)ANG1005 (Angiopep-2结合至三个太平洋紫杉醇分子)、太平洋紫杉醇-EC-1(太平洋紫杉 醇结合至erbB2识别肽EC-1)，及葡萄糖结合的太平洋紫杉醇，例如2'-太平洋紫 杉醇2-葡萄哌喃糖基丁二酸甲酯；多西他赛(docetaxel)，紫杉醇)、表鬼臼脂 (epipodophyllins)(例如依托泊苷(etoposide)、磷酸依托泊苷(etoposide phosphate)、替尼泊苷(teniposide)、拓朴替康(topotecan)、9-

胺基喜树碱(9- aminocamptothecin)、开普替康(camptoirinotecan)、伊立替康(irinotecan)、克立 那托(crisnatol)、丝裂霉素C(mytomycin C))、抗代谢物、DHFR抑制剂(例如甲 胺喋呤(methotrexate)、二氯甲胺喋呤(dichloromethotrexate)、曲美沙特(trimetrexate)、依达曲沙(edatrexate))、IMP去氢酶抑制剂(例如霉酚酸 (mycophenolic acid)、噻唑呋林(tiazofurin)、病毒唑(ribavirin)及EICAR)、核糖 核苷酸还原酶抑制剂(例如羟基脲(hydroxyurea)及去铁胺(deferoxamine))、尿嘧 啶类似物(例如5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷(floxuridine)、脱氧氟尿苷 (doxifluridine)、雷替曲赛(ratitrexed)、喃氟啶-尿嘧啶(tegafur-uracil)、卡培他 滨(capecitabine))、胞嘧啶类似物(例如阿糖胞苷(ara C)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside)及氟达拉滨(fludarabine))、嘌呤类似物(例如巯基嘌呤 (mercaptopurine)及硫鸟嘌呤(Thioguanine))、维生素D3类似物(例如EB 1089、CB 1093及KH 1060)、异戊烯化抑制剂(例如洛伐他汀(lovastatin))、多巴胺激导 性神经毒素(例如1-甲基-4-苯基吡锭离子)、细胞周期抑制剂(例如星形孢菌素(staurosporine))、放线菌素(actinomycin)(例如放线菌素D、放线菌素D)、博莱 霉素(bleomycin)(例如博莱霉素A2、博莱霉素B2、培洛霉素(peplomycin))、蒽 环霉素(anthracycline)(例如道诺霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、聚乙 二醇化脂质粒阿霉素、埃达霉素(idarubicin)、表柔比星(epirubicin)、吡柔比星 (pirarubicin)、佐柔比星(zorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone))、MDR抑制剂(例 如维拉帕米(verapamil))、Ca^{2+}ATP酶抑制剂(例如毒胡萝卜素(thapsigargin))、 伊马替尼(imatinib)、沙立度胺(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)、酪胺酸 激酶抑制剂(例如阿西替尼(axitinib)(AG013736))、伯舒替尼(bosutinib)(SKI- 606)、西地尼布(cediranib)(RECENTIN™,AZD2171)、达沙替尼 (dasatinib)(SPRYCEL®,BMS-354825)、埃罗替尼(erlotinib)(TARCEVA®)、吉 非替尼(gefitinib)(IRESSA®)、伊马替尼(imatinib)(Gleevec®,CGP57148B, STI-571)、拉帕替尼(lapatinib)(TYKERB® , TYVERB®) 、来他替尼 (lestaurtinib)(CEP-701)、来那替尼(neratinib)(HKI-272)、尼罗替尼 (nilotinib)(TASIGNA®) 、司马沙尼(semaxanib)(司马西尼(semaxinib), SU5416)、舒尼替尼(sunitinib)(SUTENT® ,SU11248)、妥赛兰尼 (toceranib)(PALLADIA®)、凡德他尼(vandetanib)(ZACTIMA®,ZD6474)、凡塔 蓝尼(vatalanib)(PTK787,PTK/ZK)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)(HERCEPTIN®)、贝伐单抗(bevacizumab)(AVASTIN®)、利妥昔单 抗(rituximab)(RITUXAN®)、西妥昔单抗(cetuximab)(ERBITUX®)、帕尼单抗 (panitumumab)(VECTIBIX®)、兰尼单抗(ranibizumab)(Lucentis®)、尼罗替尼 (nilotinib)(TASIGNA®) 、索拉非尼(sorafenib)(NEXAVAR®) 、依维莫司 (everolimus)(AFINITOR®)、阿仑单抗(alemtuzumab)(CAMPATH®)、吉妥单抗奥 唑米星(gemtuzumab ozogamicin)(MYLOTARG®) 、坦罗莫司 (temsirolimus)(TORISEL®)、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、多韦替尼乳酸 盐(dovitinib lactate)(TKI258,CHIR-258)、BIBW 2992(TOVOK™)、SGX523、 PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、 BIBF 1120(VARGATEF®)、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、 BMS-690154、CEP-11981、

替沃扎尼(tivozanib)(AV-951)、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647及/或XL228)、蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米 (bortezomib)(VELCADE))、mTOR抑制剂(例如雷帕霉素(rapamycin)、坦罗莫司 (temsirolimus)(CCI-779)、依维莫司(everolimus)(RAD-001)、地磷莫司 (ridaforolimus)、AP23573(Ariad)、AZD8055(AstraZeneca)、BEZ235 (Novartis)、BGT226(Norvartis)、XL765(Sanofi Aventis)、PF-4691502 (Pfizer)、GDC0980(Genetech)、SF1126(Semafoe)及OSI-027(OSI))、奥利默森 (oblimersen)、吉西他滨(gemcitabine)、洋红霉素(carminomycin)、甲酰四氢叶 酸(leucovorin)、培美曲塞(pemetrexed)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、达喀尔 巴嗪(dacarbazine)、丙卡巴肼(procarbizine)、泼尼龙(prednisolone)、地塞米松 (dexamethasone)、卡普热新(campathecin)、普卡霉素(plicamycin)、天冬酰胺酶 (asparaginase)、胺基喋呤(aminopterin)、甲胺喋呤(methopterin)、泊非罗霉素 (porfiromycin)、美法仑、异长春碱、环氧长春碱(leurosine)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、曲贝替定(trabectedin)、丙卡巴肼(procarbazine)、迪斯德莫来 (discodermolide)、洋红霉素(carminomycin)、胺基喋呤(aminopterin)及六甲基三 聚氰胺(hexamethyl melamine)。

[0666] 除非另有定义,否则本文中所用的所有技术及科学术语具有与本发明所 属领域的一般技术者通常所理解相同的含义。虽然类似或等效于本文所述者的 任何方法及材料可用于本发明的实施或测试中,但现将描述优选的方法及材 料。本文特别提及的所有公开案及专利以引用的方式并入本文中用于所有目 的,包括描述及揭示公开案中所报导、可联合本发明使用的化学品、细胞株、 载体、动物、仪器、统计学分析及方法。本说明书中所引用的所有参考文献视 为此项技术的技能水平的指标。本文不应解释为承认本发明无权先于先前发明 的此类揭示内容。

[0667] 实例

[0668] 纳入以下实例以展示本发明的优选实施例。熟习此项技术者应了解到,以下实例中所揭示的技术代表发明人发现在本发明实施中起良好作用的技术,且因此可视为构成其优选实施方式。然而,根据本发明,熟习此项技术者应了 解,在不背离本发明的精神及范畴的情况下可对所揭示的特定实施例作出许多 改变且仍获得相同或类似结果。

[0669] 实例1:优化通用Fc聚醣的例示性结构

[0670] 用于治疗性抗体的优化通用Fc聚醣的聚醣结构为Sia_2(α2- 6)$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$(图1)。

[0671]

[0672] 图1.治疗性抗体的优化通用Fc聚醣的结构。

[0673] 实例2:用于制备于Fc区具有优化通用聚醣的同质抗体的例示性通用程序。

[0674] 本发明提供用于制备于Fc区具有优化通用聚醣的同质抗体群的例示性改 良方法,所述方法包含以下步骤:(a)使单株抗体与α-海藻糖苷酶及至少一种内 切糖苷酶接触,藉此产生具有单一N-乙酰基葡糖胺(GlcNAc)的去海藻糖基化抗 体,及(b)添加通用聚醣至抗体Fc区的GlcNAc中以形成具有图1所示优化聚醣形 式的同质抗体(图2)。

[0675] 参见图2。制备同质抗体的通用策略,其中优化通用聚醣位于Fc区以便改 良其治疗活性。

[0676] 内切糖苷酶用于剪去N-聚醣中的寡醣的可变部分。本文所用这些切糖苷 酶的实

例包括(但不限于)EndoA、EndoF、EndoF1、EndoF2、EndoH、 EndoM、EndoS及其变异体。

[0677] 实例3:制备于Fc区具有通用聚醣的同质抗体,从而增进单株抗体介导的抗病 毒治疗性。

[0678] 用于制备于Fc区具有通用聚醣的同质抗流感病毒抗体以增强其ADCC作用 的例示性方法。

[0679] 通过抗体Fc与Fc受体之间的相互作用以触发功能,帮助广泛中和单株抗 体靶向血球凝集素(HA)的保守性茎区。基于经证明的ADCC作用来选择抗流感 病毒抗体FI6,及靶向(HA)的茎区的另一种抗流感病毒抗体F10,以便通过使用 本文所揭示的通用策略及方法来制备具有优化通用聚醣的同质抗体。简言之, 按照文献报导方法(参考文献)制备FI6及F10抗体。内部制得的异质单株抗体FI6 或F10用作起始物质且用内切糖苷酶(endo S)予以修饰,产生GlcNAc-Fuc的二糖 mAb与GlcNAc的单糖mAb的混合物。随后经由施加海藻糖苷酶而获得同质单糖 mAb;或在一个步骤中经由Endo S与海藻糖苷酶的组合而获得单糖物质。

[0680] 磷酸钠缓冲液(50mM,pH 7.0,0.125mL)中的FI6/F10(0.25mg)与Endo S (12.5μg)及BfFucH(0.25mg)一起在37℃下培育22小时。LC-MS及SDS-PAGE分 析指示重链上的N-聚醣完全裂解。反应混合物在经磷酸钠缓冲液(20mM,pH 7.0)预平衡的蛋白质A-琼脂糖树脂(0.1mL)管柱上进行亲和力层析。用磷酸钠缓 冲液(20mM,pH 7.0,1.0mL)洗涤管柱。所结合的IgG利用甘胺酸-HCl(50 mM,pH 3.0,1.0mL)释放,且溶离份立即用Tris-Cl缓冲液(1.0M,pH 8.3)中 和。将含有Fc片段的溶离份合并且通过离心过滤(Amicon超离心过滤器,Millipore,Billerica,MA)浓缩,得到单GlcNAc同质抗体(0.193mg)。对产物进行 胰蛋白酶处理,且使用纳米喷雾LC/MS分析糖肽TKPREEQYNSTYR及 EEQYNSTYR,以证实聚醣工程化FI6/F10的糖基化型态。

[0681] 根据有一些修改的公开方法,自母鸡蛋卵黄分离出唾液酸基聚醣(SCT)。 简言之,将母鸡蛋卵黄的乙醇萃取物离心,过滤且用endo M处理,反应完全之 后,通过凝胶过滤及离子交换层析纯化SCT,将纯化的SCT冻干,得到呈白色 粉末状的纯SCT产物(82%)。

[0682] 在4℃下搅拌SCT($Sia_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc$)(3.0mg)、氯化2-氯-1,3- 二甲基咪唑鎓(DMC)(6.3mg)及Et_3N(9.0μL)于水(60.0μL)中的溶液1小时。反 应混合物在Sephadex G-25管柱上通过0.05%Et_3N水溶液溶离来进行凝胶过滤层 析。将含有产物(SCT恶唑啉)的溶离份合并且冻干,得到白色粉末(2.6mg、产 率87.4%)。

[0683] 将SCT恶唑啉添加至糖苷合成酶(glycosynthase)与单GlcNAc Fi6或F10于50 mM Tris缓冲液(pH 7.8)中的混合物且在室温下培育一小时。反应混合物利用蛋 白质A亲和力管柱纯化,随后用aman离子(amanion)交换管柱capto Q纯化,以收 集所要产物:优化抗流感病毒同质抗体FI6-M或F10-M。对产物进行胰蛋白酶处 理,且使用纳米喷雾LC/MS分析糖肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR,以证 实FI6-M/F10-M的糖基化型态。

[0684] 实例4:

[0685] FI6/F10及糖基工程化FI6-M/F10-M的ADCC分析。参见图3,其证实抗流 感病毒抗体的ADCC结果增强。

[0686] 使用具有聚醣修饰的抗流感单株抗体FI6及F10证明,抗病毒抗体依赖性细 胞介导性细胞毒性(ADCC)增强。人类HEK293T细胞用质粒短暂转染,以便在 细胞表面上表达全长Cal/09HA,从而仿真受流感病毒感染的细胞。将这些细胞 与自健康供者分离的新鲜制备

人类周边血液单核细胞(PBMC)以经感染细胞与 PBMC比率为1:20或1:50进行混合。接着向混合物中添加具有及不具有聚醣修饰 的不同浓度的抗体FI6及F10。5小时之后,根据HEK293T细胞溶解(LDH释放)来 监测FI6及F10诱导性ADCC的结果。结果显示,具有聚醣修饰的抗体FI6及F10 诱导的ADCC增强1.5-3倍。

[0687] 实例5:用于ADCC分析的例示性方法及材料

[0688] 实例:抗干细胞单株抗体FI6及F10

[0689] 通过使用聚伸乙基亚胺将F10及FI6抗体表达质粒转染至HEK293F细胞中且 在Freestyle 293表达培养基(Invitrogen)中培养。培育7天之后,通过离心来收集 上清液且通过蛋白质A珠粒(Roche Diagnostics)纯化抗体。于PBS缓冲液中通过 Superdex 200(GE Healthcare)凝胶过滤层析进一步纯化抗体。

[0690] 实例6:

[0691] 活体外抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)分析

[0692] 用pVax-Cal/09血球凝集素(HA)表达质粒转染HEK293T细胞48小时。表达 HA的HEK293T细胞用胰蛋白酶处理且于50ul DMEM培养基(Gibco)中,以每孔 5,000个细胞接种于U形底96孔盘中。

[0693] 通过对获自健康自愿者的全血进行Ficoll-Paque分离来制备周边血液单核 细胞(PBMC)且作为效应细胞用于ADCC分析中。简言之,全血用等体积的 HBSS稀释,在Ficoll-Paque plus(GE Healthcare)上分层且以400g离心40分钟。收集PBMC细胞,用HBSS洗涤两次且使用50/1的效应子对标靶比率与表达HA的 HEK293T细胞混合。

[0694] PBMC与表达HA的HEK293T细胞的混合物用不同浓度的抗体FI6及F10处 理且在37℃下培育5小时。

[0695] 培育5小时之后,使用cytoTox96非放射性细胞毒性分析套组(Promega), 通过量测被释出的乳酸去氢酶(LDH)来监测ADCC。

[0696] 实例7:制备于Fc区具有通用聚醣的同质抗体,从而增进单株抗体介导的抗癌 治疗

[0697] 代表性实例:

[0698] 按照制备于Fc区具有通用聚醣的同质抗流感病毒抗体的先前所述相同方 法,使用市售Rituxan®及Herceptin®作为起始物质。可获得于Fc区具有优化通用 聚醣Sia_2(α2-6)$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$的同质Rituxan®及Herceptin®。使用相 同方法,发明人亦已制备在其Fc区具有不同糖型的不同的同质Rituxan®及 Herceptin®抗体,以便比较具有不同聚醣的抗体活性。

[0699] 抗CD20同质抗体的生物学特征

[0700] Fc糖基化可影响多种免疫球蛋白效应介导功能,包括ADCC、CDC及循环 半衰期。ADCC增强为增进治疗性抗体药物功效的关键策略。其可降低有效药 物剂量以获得较低药物成本的效益。本文所述的抗CD20同质抗体可通过功能特 性表征。抗CD20 GAb对表达人类CD20的细胞具有细胞生长抑制活性,包括细 胞凋亡。在一些实施例中,抗CD20 GAb展现比其专利抗体更强的细胞生长抑 制活性。

[0701] 实例8:

[0702] 抗CD20糖抗体的ADCC活性

[0703] 相较于亲本抗体的ADCC活性，本发明的同质抗体的ADCC活性增加至少8 倍，优选至少15倍，更佳至少35倍，优选至少50倍，优选至少60倍，最佳至少 80倍。

[0704] 可使用标靶癌细胞株(诸如SKBR5、SKBR3、LoVo、MCF7、OVCAR3及/ 或Kato III)，与亲本抗体比较来量测本发明同质抗体的ADCC溶解活性。

[0705] 相较于亲本抗体利妥昔单抗，本文所述的多种抗CD20 GAb(特定言之， GAb101及GAb104)展现增强的ADCC活性。本发明的同质抗体可作为B细胞介 导性恶性肿瘤及免疫疾病(其中涉及B细胞或B细胞所产生的抗体)的治疗剂展现 优良作用，且本发明的一个目标为使用抗CD20 Gab来开发治疗剂。

[0706] 实例9:抗CD20糖抗体的CDC活性

[0707] 本文所述的同质抗体出乎意料能够增进ADCC而不影响CDC。例示性CDC 分析描述于实例中。在例示性实施例中，糖抗体的ADCC增强，但其他免疫球 蛋白型效应功能(诸如补体依赖性细胞毒性(CDC))仍然相似或未受到显著影响。FcγRIII与抗CD20糖抗体之间的结合

[0708] 将FcγRIIIA转染至HEK-293细胞株中以表达重组蛋白质。对所分泌的 FcγRIIIA重组蛋白质进行纯化，接着在HBS-EP缓冲液中稀释成连续浓度(200 nM、100nM、50nM、25nM及12.5nM)。抗CD20 GAb 101、102、104、105、 106、107、108、109、110及111中的每一者在HBS-EP缓冲液中稀释至10mg/ml 的浓度，接着捕捉于预固定抗人类Fab域抗体的CM5芯片上。注入FcγRIIIA的连 续滴定液且以30ml/min的流速结合。使用Biacore T200评估软件将单循环动力 学数据拟合至1:1结合模型以量测平衡常数(Ka/Kd)。结果示于图6A及6B中。

[0709] 图6A及6B列举抗CD20 GAb及利妥昔单抗的例示性FcγRIIIA结合。FcγRIIIA结合可使用此项技术中已知的分析量测。例示性分析描述于实例中。可以随着抗CD20 GAb相对于利妥昔单抗的相对比率来测定Fc受体结合。在例 示性实施例中，Fc受体结合增加至少1.2倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、 8倍、9倍、10倍、15倍或20倍、30倍、40倍、50倍、100倍或更高。

[0710] 相较于利妥昔单抗，结合数据显示抗CD20 GAb(特定言之，GAb101及 GAb104)对标靶分子CD20展现更强的结合亲和力。

[0711] 综合而言，相较于利妥昔单抗，抗CD20 GAb(特定言之，GAb101及 GAb104)展现ADCC活性增强且FcγRIIIA结合亲和力更强。本发明的同质抗体可 单独或优选以包含两种或更多种此类抗体的组合物形式且视情况与其他治疗(诸 如化学疗法)组合提供优良的临床反应。ADCC增强的抗CD20糖抗体可提供B细 胞淋巴瘤及其他疾病的替代性疗法。使用本发明的糖抗体可改变当前投药途径 及当前治疗方案，原因为其效应功能增强意谓其可以较低浓度及较低频率给 药，从而降低抗体毒性及/或抗体耐受性发展的可能性。此外，其效应功能的改 善为治疗临床适应症提供新方法，这些适应症先前对重组宿主系统中所产生的 相应抗CD20单株抗体治疗具抗性或难治性。

[0712] 实例10:结合至B淋巴瘤细胞

[0713] 检查Rituxan-SCT(GAb101)及Rituxan单-GlcNAc对Ramos细胞、Raji及SU- DHL-4细胞的结合活性，且结果显示两者均具有与利妥昔单抗相似的结合活性 (图7-9)。

[0714] 实例11:针对B淋巴瘤细胞的CDC

[0715] 测试Rituxan-SCT(GAb101)及Rituxan单-GlcNAc对Ramos细胞、Raji及SU- DHL-4细胞的CDC作用。在另一种B淋巴瘤细胞株SU-DHL-4中证实使用Ramos 细胞所见的比较性CDC概况(GAb101的CDC概况增强且Riruxan-GlcNAc的CDC 概况减小)(图10-12)。在第二种情形下使用不同细胞继代进行时获得可再现性 结果。

[0716] 实例11:

[0717] 参见图13。人类B细胞的耗乏

[0718] 使用自人类血液新鲜制备的人类PBMC细胞执行人类B细胞的耗乏。于 RPMI 1640-5%FBS中的$2x10^6$个细胞培养在微量培养盘上,在37℃、在15%自 体血浆不存在或存在下,与不同浓度的抗CD20 GAb Rituxan-SCT、Rituxan- GlcNAc及利妥昔单抗一起培育4小时。洗涤之后的细胞在冰上用抗CD2-PE及抗 CD19-FITC染色5分钟。在FACS上,基于$CD19^+CD2^-$B细胞来分析B细胞耗乏。 (图13)。参见图13。由不同的同质抗体造成的人类B细胞发生耗乏。

[0719] 实例12:结合至B淋巴瘤细胞。

[0720] 研究抗体对$CD20^+$B淋巴瘤细胞株(Ramos及Raji)的结合且用流动式细胞测 量术分析。细胞于含有1%胎牛血清的PBS中、在微量培养盘上以每孔$2x10^5$个细 胞、在冰上与不同浓度的所关注抗体一起培育1小时。洗涤细胞,再悬浮于PBS 缓冲液中,且与侦测性山羊抗hIgG-Fcγ-PE一起在冰上培育30分钟。洗涤细胞且 进行FACS分析。

[0721] 实例13:结合至表达FcRIIIa的CHO细胞。

[0722] 在用经高亲和力CD16a(158Val)转染的CHO细胞中,研究抗体对FcRIIIa受 体(CD16a)的结合(此为已知与诱导抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)相关的前 驱事件)且用流动式细胞测量术分析。在微量培养盘上以每孔$1x10^5$个细胞,将 含有1%胎牛血清的PBS中的细胞与不同浓度的所关注抗体一起在冰上培育1小 时。洗涤细胞,再悬浮于PBS缓冲液中,且与侦测性山羊抗hIgG-Fcγ-PE一起在 冰上培育30分钟。洗涤细胞且进行FACS分析。

[0723] 针对B淋巴瘤细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)。在CD20+B淋巴瘤细胞 株(Ramos及SKW6.4)中研究抗体诱导的CDC作用且用流动式细胞测量术分析。 在微量培养盘上以每孔$2.0x10^5$个细胞,将RPMI 1640培养基中的细胞与不同浓 度的所关注抗体一起在冰上培育30分钟。洗涤细胞且在37℃下与含有10%人类 血清的RPMI 1640一起培育30分钟。洗涤细胞且在黑暗中与PI试剂一起培育5分 钟。在FACS上分析CDC所致的细胞死亡。

[0724] 针对B淋巴瘤细胞的抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。使用新鲜制备 的人类PBMC作为效应细胞,在含有CD20的B淋巴瘤细胞株(Ramos及SKW6.4) 中研究糖抗体所诱导的ADCC作用,且用流动式细胞测量术分析结果。首先在 37℃下用CFSE标记PBS-0.1%BSA中的标靶B细胞5分钟。洗涤之后,于37℃下 在微量培养盘上将RPMI 1640培养基中的经CFSE标记的细胞与不同浓度的所关 注糖抗体及PBMC效应细胞一起培育4小时。靶细胞对效应细胞的比率设定为 25:1。在黑暗中将所得混合物用PI试剂染色5分钟。在FACS上分析ADDC所致的 细胞死亡。

[0725] 人类B细胞的耗乏。使用自人类血液新鲜制备的人类PBMC细胞执行人类B 细胞的耗乏。在15%自体血浆不存在或存在的情况下,于37℃下在微量培养盘 上将RPMI 1640-5%FBS中所培养的$2x10^6$个细胞与不同浓度的所关注抗体一起 培育4小时。洗涤之后的细胞在冰上用抗CD2-PE及抗CD19-FITC染色5分钟。在 FACS上,基于$CD19^+CD2^-$B细胞来分析B细

胞耗乏。

[0726] 通过聚醣工程策略制备同质Herceptin®。

[0727] 制备经不同聚醣修饰的同质Herceptin®的方法。

[0728] 抗HER2同质抗体的生物学特征

[0729] Fc糖基化可影响多种免疫球蛋白效应介导功能,包括ADCC、CDC及循环 半衰期。ADCC增强为增进治疗性抗体药物功效的关键策略。其具有降低有效 药物剂量以获得较低药物成本效益的可能性。本文所述的抗HER2糖抗体可通 过功能特性表征。抗HER2 GAb对表达人类HER2的细胞具有细胞生长抑制活 性,包括细胞凋亡。在一些实施例中,抗HER2 GAb展现比其专利抗体更强的 细胞生长抑制活性。

[0730] 抗HER2糖抗体的ADCC活性

[0731] 相较于亲本抗体的ADCC活性,根据本发明的糖抗体的ADCC活性增加至 少3倍,优选至少9倍,更佳至少10倍,优选至少12倍,优选至少20倍,最佳至 少30倍。

[0732] 可使用标靶癌细胞株(诸如SKBR5、SKBR3、LoVo、MCF7、OVCAR3及/ 或Kato III),与亲本抗体相比较来量测本发明糖抗体的ADCC溶解活性。

[0733] 表3列举相较于曲妥珠单抗,抗HER2 GAb的例示性ADCC活性增强。例示 性分析描述于实例中。

[0734] 表3.

[0735]

抗HER2	曲妥珠单抗	GAb101	GAb104	GAb105	GAb107	GAb108	GAb111
ADCC (倍数)	1	30	14.3	9.5	10	6.5	3

[0736] 相较于亲本抗体利妥昔单抗,本文所述的多种抗HER2 GAb(特定言之, GAb101及GAb104)展现增强的ADCC活性。预期本发明的糖抗体可作为HER2阳 性疾病的治疗剂展现优良作用,且本发明的一个目标为使用抗HER2 Gab来开发 治疗剂。

[0737] 抗HER2糖抗体的CDC活性

[0738] 本文所述的糖抗体出乎意料能够增进ADCC而不影响CDC。例示性CDC分 析描述于实例中。在例示性实施例中,糖抗体的ADCC增强,但其他免疫球蛋 白型效应功能(诸如补体依赖性细胞毒性(CDC))仍然相似或未受到显著影响。FcγRIII与抗HER2糖抗体之间的结合

[0739] 图15列举抗HER2 GAb及利妥昔单抗的例示性FcγRIIIA结合。

[0740] FcγRIIIA结合可使用此项技术中已知的分析量测。例示性分析描述于实例 中。可以随着抗HER2 GAb相对于曲妥珠单抗的相对比率来测定Fc受体结合。 在例示性实施例中,Fc受体结合增加至少2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8 倍、9倍、10倍、15倍或20倍、30倍、40倍、50倍或更高。

[0741] 相较于曲妥珠单抗,结合数据显示抗HER2 GAb(特定言之,GAb101及 GAb104)对标靶分HER2展现更强的结合亲和力。

[0742] 综合而言,相较于曲妥珠单抗,抗HER2 GAb(特定言之,GAb101及 GAb104)展现ADCC活性增强且FcγRIIIA结合亲和力更强。预期本发明的糖抗体 可单独或优选以包含两种或更多种此类抗体的组合物形式且视情况与其他治疗 (诸如化学疗法)组合来提供优良的临床反应。预期ADCC增强的抗HER2糖抗体 可提供HER2阳性疾病的替代疗法。使用本发明

的糖抗体可有利改变当前投药 途径及当前治疗方案,原因为其效应功能增强意谓其可以较低浓度及较低频率 给药,从而降低抗体毒性及/或抗体耐受性发展的可能性。此外,其效应功能的 改善为治疗临床适应症提供新方法,这些适应症先前对重组宿主系统中所产生的相应抗HER2单株抗体治疗具抗性或难治性。

[0743] 制备于Fc区具有通用聚醣(SCT)的同质抗体,从而增进单株抗体介导的消 炎治疗

[0744] 具有siaa2,6Gal结构的Fc区可增强消炎活性。在此,发明人制备于Fc区具 有SCT聚醣的同质修美乐(Humira)以增进其消炎活性。

[0745] 抗TNFα的N糖基化的通用分析程序

[0746] 发明人已开发出一种质谱方法来监测在碰撞诱导性解离(collision induced dissociation;CID)能量施加至糖肽前驱物时寡醣源片段离子(氧阳离子)的产 生。氧阳离子方法的多反应监测(Multiple Reaction Monitoring;MRM)可满足对 即将出现的生物仿制药(biosimilar)的例行质量控制分析的管制性要求。

[0747] 将5ug阿达木单抗(Adalimumab;Humira®)(购自Abbvie)溶于25ul 2M胍- HCl中,且添加二硫苏糖醇(DTT)直至最终浓度为5mM。在110℃培育10分钟之 后,于37℃下使经还原的半胱胺酸残基在10mM碘乙酰胺(IAA)中发生烷基化1 小时。在室温下添加5mM DTT以淬灭过量IAA历时10分钟。产物用离心管柱 (10kDa蛋白质MW截止)微离心之前,于50mM碳酸氢铵中稀释15倍。使用酶:蛋 白质比率1:25(w/w)在37℃下进行胰蛋白酶消化4小时。样品冷冻在-20℃下用于 LC-MS/MS分析。

[0748] 仪器使用

[0749] 使用4000QTrap三重四极质谱仪(AB Sciex)联合Aglient 1200HPLC系统, 根据m/z 204氧阳离子(HexNAc)监测进行糖肽量化。对糖肽微异质性进行相对 量化时,用计算器获得前驱离子m/z,涵盖所有可能的聚醣组合物,且监测各 前驱离子的单一定量性跃迁(Q3 m/z=204)。

[0750] MS资料分析

[0751] 所得原始数据使用Analyst 1.5(AB Sciex)处理。对各跃迁的质量层析图进 行积分且根据峰面积来量化。相对于所组合的所有组分的总和来计算各组分的 组成百分比。

[0752] 制备抗TNFα抗体Humira-SCT

[0753] 根据公开的方法自母鸡蛋卵黄分离出唾液酸基糖肽(SGP)。简言之,将母 鸡蛋卵黄的苯酚萃取物离心,过滤且通过层析管柱(包括Sephadex G-50、Sephadex G-25、DEAE-Toyoperarl 650M、CM-Sephadex C-25及Sephadex G-25) 纯化。唾液酸基糖肽(SGP)(52mg)于磷酸钠缓冲液(50mM,pH 6.0,5mM)的 溶液与Endo M(53μg)一起在37℃下培育。7小时之后,反应混合物在Sephadex G-25管柱上通过水溶离来进行凝胶过滤层析。将含有产物的溶离份合并且冻 干,得到呈白色粉末状的产物(聚醣-101)(30mg,产率82%)。

[0754] 在4℃下搅拌聚醣-101(Sia_2(α2-6)$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc$)(30mg)、氯化 2-氯-1,3-二甲基咪唑鎓(DMC)(62.7mg)及Et_3N(89μL)于水中的溶液1小时。反 应混合物在Sephadex G-25管柱上进行凝胶过滤层析且通过0.05%Et_3N水溶液溶 离。将含有产物(SCT恶唑啉)的溶离份合并且冻干,得到白色粉末。

[0755] 将SCT恶唑啉添加至内切糖苷酶与GAb Humira-GlcNAc于50mM Tris缓冲 液(pH 7.8)中的混合物且在室温下培育一小时。反应混合物用蛋白质A亲和力管 柱纯化,随后用

aman离子交换管柱capto Q纯化,收集所要产物抗TNFα GAb101。对产物进行胰蛋白酶处理,且使用纳米喷雾LC/MS分析糖肽 TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR,以证实Humira-SCT的糖基化型态。

[0756] 抗TNFα的结合亲和力

[0757] 在大肠杆菌(PROSPEC)中产生含有158个氨基酸的人类重组TNF-α (MW＝17.5kDa)且纯化。对重组人类TNF-α蛋白质进行滴定且在HBS-EP缓冲液 中制备50nM、25nM、12.5nM、6.25nM及3.125nM的连续稀释液。阿达木单 抗及抗TNFαGAb 200及401在HBS-EP缓冲液中稀释至10μg/ml的浓度,接着捕 捉于预固定有抗人类Fc域抗体的CM5芯片上。重组人类TNF-α作为分析物连续 浓缩,接着以30μl/min的流速注射且结合至芯片上的所捕捉抗体。结合之后, 通过再生缓冲液10mM甘胺酸-HCl pH 1.5,以50μl/min的流速洗涤抗体-分析物 复合物。在4℃下CM5芯片维持于PBS pH7.4中供进一步使用。使用Biacore T200评估软件将单循环动力学数据拟合至1:1结合模型以量测平衡常数 (Ka/Kd)。

[0758] 实例13:产生抗SSEA-4单株抗体

[0759] 利用融合瘤方法开发对SSEA-4具有特异性的mAb。6至8周龄的雌性 BALB/c小鼠用SSEA-4疫苗皮下免疫3次。以2周间隔时间给与三次免疫。每种 疫苗含有2μg SSEA-4。通过以4,000×g离心10分钟来获得所有血清。通过聚醣 微数组来分析血清反应。最后腹膜内追加2μg SSEA-4,且3天后,使用经免疫 小鼠的脾脏细胞产生融合瘤。

[0760] 如下筛选分泌具有所需抗原结合活性的抗体的融合瘤细胞。通过将4 μg/mL中性链亲和素于碳酸盐缓冲液(0.1M,pH 9.6)中在4℃下培育隔夜来涂布 微量滴定盘。各孔用含有1％BSA的PBS(pH＝7.3)阻断1小时且与4μg/mL SSEA- 4-生物素一起培育1小时。抗血清在37℃下以不同稀释度维持1小时。洗涤之 后,配位体结合的抗体通过结合HRP的山羊抗小鼠IgG或IgM抗体(Jackson ImmunoResearch)以1:10,000进行检测且在37℃培育1小时,随后与TMB受质一 起培育。在450nm测定OD。选择阳性纯系用于进一步表征。在此研究中鉴别出 特异性结合至SSEA-4的三种例示性纯系45、46及48。小鼠单株同型分型是使用IsoQuick试纸条及套组(sigma,I9535)。添加融合瘤培养基至反应瓶中。将试纸 条插入样品中,确保试纸条直立。样品沿着试纸条而上。进行最终解释之前, 允许试纸条显色5分钟。

[0761] 利用分泌抗体的融合瘤纯系,通过PCR扩增mAb 45、46及48的V_H及V_L基 因区段。对由此获得的基因区段进行定序以确定mAb 45、46及48的V_H及V_L序 列。

[0762] 实例14:产生嵌合抗体

[0763] 利用分泌抗体的融合瘤纯系,通过PCR扩增mAb 273及651的V_H及V_L基因 区段。对由此获得的基因区段进行定序以确定mAb 273及651的V_H及V_L序列。 将重链及轻链可变区选殖入人类IgG1抗体表达载体中。VH是使用酶切位点 BsiWI及ApaI,而VL是使用酶切位点BsPEI及NheI。将载体短暂转染至293F或 CHO-S细胞中。纯化重组嵌合Ab且在结合分析与补体依赖性肿瘤细胞溶解分析 中进一步研究。

[0764] 利用分泌抗体的融合瘤纯系,通过PCR扩增mAb 46及48的V_H及V_L基因区 段。对由此获得的基因区段进行定序以确定mAb 46及48的V_H及V_L序列。将重 链及轻链可变区选殖至人类IgG1抗体表达载体中。VH是使用酶切位点BsiWI及 ApaI,而VL是使用酶切位点BsPEI及NheI。将载体短暂转染至293F或CHO-S细 胞中。纯化重组嵌合Ab且在结合分析及补体依赖性肿瘤细胞溶解分析中进一步 研究。

[0765] 实例15:通过流动式细胞测量术对针对癌细胞的抗体进行的结合分析

[0766] 检查mAb 273及抗SSEA-4(mAb 45、46及48)与癌细胞株的结合。将细胞 (1×10^5)再悬浮于100μL含有不同浓度抗体的FACS缓冲液(1%BSA/PBS溶液)中 且在冰上培育30分钟。用FACS缓冲液洗涤两次之后,细胞与649标记的山羊抗 小鼠抗体(1:100;Jackson ImmunoResearch)一起在冰上培育30分钟,随后在 FACSCalibur系统(BD Biosciences)上分析。乳癌细胞MCF-7用mAb 273染色。胰 脏癌细胞(HPAC及BxPC3)及乳癌细胞MCF-7用mAb 45染色。胰脏癌细胞(HPAC 及BxPC3)及乳癌细胞MCF-7用mAb 46染色。胰脏癌细胞(HPAC及BxPC3)及乳癌 细胞MCF-7用mAb 48染色。

[0767] 发明人亦使用聚醣数组测定表面上MC45、MC48及MC813-70与SSEA-4六 醣的解离常数,且MC45、48及813的Kd值显示如下。这些结果显示这些mAb对 于SSEA4具有高度特异性。

[0768]

	Kd (nM) ± SD(nM)
MC45	0.37 ± 0.08
MC48	0.46 ± 0.1
MC813-70	4.21 ± 0.26

[0769] 实例16:检查例示性mAb 46及48介导表达SSEA-4的细胞的CDC的能力。 智人胰腺癌细胞(BxPC3)在作为补体来源的兔血清存在下。通过添加存活率探 针7-AAD来评估细胞死亡。基于7-AAD量测结果,使用FACScan流式细胞仪计 算比溶解百分率。抗体在40μg/mL下显示约20%杀灭活性。mAb 46及48成功地 介导表达SSEA-4的细胞的CDC。

[0770] 实例15.例示性噬菌体呈现生物淘选程序

[0771] 用结合PEG与羧基戴诺珠粒结合物(Invitrogen)在室温下非特异性结合1小 时来扣减含有2.5×10^{10}个纯系的噬菌体呈现人类原生scFv库(Lu等人,2011),且 随后与SSEA-4-PEG固定的戴诺珠粒一起在4℃培育1小时。用PBS或含有0.01% Tween 20的PBS(PBST0.01)洗涤之后,通过在37℃用大肠杆菌TG1细胞感染0.5 小时来回收结合至SSEA-4-PEG-戴诺珠粒的噬菌体。连续稀释一些感染细胞以 测定效价,而其他细胞是通过M13KO7噬菌体救援且扩增。测定所救援噬菌体 效价之后,进行下一轮生物淘选。在第四轮及第五轮生物淘选中,随机选择噬 菌体纯系进行培养以供ELISA筛选。

[0772] 所选噬菌体纯系的ELISA筛选

[0773] 为了检测抗原识别,微孔盘(Nunc)分别用0.2μg/ml SSEA-4-BSA、Globo H-BSA、SSEA-3-BSA及BSA涂布。所选噬菌体纯系在含有3%BSA的PBS中1:2 稀释且添加至各孔中。盘在室温下培育1小时,用PBST0.1洗涤,且与结合辣根 过氧化酶(HRP)的小鼠抗M13噬菌体抗体(GE Healthcare)一起培育。再次洗涤 盘,且添加OPD及H2O2。用3N HCl终止反应之后,使用微量培养盘式读取器 (型号680,BioRad),使用490nm量测吸亮度。萃取来自ELISA阳性噬菌体纯系 的噬粒,以通过自动定序来鉴别scFv编码区。

[0774] 抗SSEA-4人类IgG的建构及表达

[0775] 利用AgeI及NheI位点将所选scFv的VH区域选殖入含有信号肽及人类免疫 球蛋白γ1重链恒定区的经修饰表达载体pcDNA5-FRT-γ1中。利用AgeI及EcoRV 位点将所选scFv的VL区域选殖入含有信号肽及人类免疫球蛋白κ轻链恒定区的 经修饰表达载体p-κ-HuGs中。两种质粒均转染至FreeStyle293细胞(Invitrogen) 中且在37℃的无血清培养基中连

续培育1周以产生人类抗体。

[0776] 抗SSEA-4人类IgG的纯化

[0777] 收集培养基,离心且使用0.45μm孔径膜过滤。接着对上清液进行蛋白质 G管柱层析(GE Healthcare)以便纯化抗SSEA-4人类IgG。溶离物相对于PBS透析 之后,依旧使用库马斯蓝染色,通过SDS-PAGE分析来检查抗体。通过布拉福 试剂(Bradford reagent)(Thermo Scientific)及分光亮度计来评估抗体浓度。

[0778] MC48的人类化

[0779] 两种人类基因(GenBank寄存号Q9UL73及AY577298)分别最类似于MC48 VH及VL。发明人使MC48的三个序列发生人类化,包括由Q9UL73基因的经修 饰构架(FR)1至FR4组成的第1个人类化MC48(hMC48)VH,及由来自寄存号 AY577298的四个FR组成的第1个hMC48 VL;第2个hMC48 VH FR,其后为来自 PDB的1YY8,而第2个hMC48 VL与第1个序列相同;以及第3个hMC48 VH序列 (Q9UL73基因的经修饰的FR1、FR2及FR4)及第3个hMC48 VL(相对于人类AY577298基因而言FR2及FR4有变化)。所有这些人类化序列均为MC48的VH及 VL的保守性CDR1至CDR3。

[0780] 建构人类化MC48变异体的单链片段可变区(scFv)

[0781] 对人类化MC48序列(VH-GGGGSGGGGSGGGGS-VL(SEQ ID NO:115))的 scFv形式进行基因合成(基因组学)且通过Sfi I及Not I(Fermentas)切割。凝胶萃 取之后,将消化产物选殖至pCANTAB-5E噬粒(GE Healthcare)中。

[0782] 产生人类化MC48(hMC48)scFv噬菌体纯系。

[0783] 使hMC48变异体噬粒转形至TG1大肠杆菌中且在含有100μg/ml安比西林及 2%葡萄糖的2×YT培养基(BD Pharmingen)中回收,并在37℃下通过M13KO7辅 助噬菌体(NEB)救援1小时。以1,500×g离心10分钟之后,将这些集结粒再悬浮 于含有100μg/ml安比西林及50μg/ml康霉素的2×YT培养基中隔夜以产生scFv- 噬菌体。

[0784] 通过ELISA对hMC48 scFv噬菌体纯系进行的结合分析

[0785] 将SSEA-4-BSA以0.2μg/ml的浓度涂布于ELISA盘上。洗涤及阻断之后, 连续稀释的噬菌体在室温下培育1.5小时。洗涤之后,在室温下添加1:1000稀释 的HRP与抗M13抗体结合物(GE Healthcare)历时1小时。接着,液体受质 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色且用3N HCl终止显色。在450nm量测光学密 度。

[0786] 结果

[0787] 鉴别结合至SSEA-4的经噬菌体呈现的scFv

[0788] 为了鉴别结合至SSEA-4的抗体,使用含有2.5×10^{10}个成员的噬菌体呈现人 类原生scFv库,其如发明人的先前报导所述建立(Lu等人,2011)。此库中首先移 除结合戴诺珠粒的噬菌体,接着通过SSEA-4-PEG与戴诺珠粒结合物选择结合 SSEA-4的噬菌体。在生物淘选期间使用两种缓冲系统:PBS及含有0.01% Tween20的PBS(PBST0.01)。五轮亲和力选择之后,第五轮的噬菌体回收率增 加,在PBS及PBST0.01系统中,分别为第一轮的约55倍及80倍(图22A及22B)。随机选择噬菌体纯系且通过ELISA测试SSEA-4结合(图23A至23D)。发现七个纯 系特异性结合至SSEA-4-BSA,但不结合至BSA对照蛋白质。通过对所有8个个 别纯系进行定序,鉴别出两种含有不同人类VH及VL编码区的独特抗SSEA-4噬 菌体纯系(p1-52及p2-78)。

[0789] 为了检查所述两种噬菌体纯系的特异性及结合亲和力,使用与球系列聚 醣(包括SSEA-4-BSA、Globo H-BSA及SSEA-3-BSA)相同的噬菌体效价进行比较 性ELISA(图24)。p2-78噬菌体纯系显示对SSEA-4-BSA及SSEA-3-BSA的结合强 烈,且对Globo H-BSA的结合稍微较弱。然而,发明人发现到,p1-52噬菌体纯 系对于SSEA-4-BSA的结合活性极弱。因此,聚焦于p2-78纯系用于进一步研 究。

[0790] 为了建立针对SSEA-4的完全人类抗体(hAb),发明人分别对p2-78 scFv的 VH及VL编码序列进行分子工程改造而形成人类IgG1主链。使用FreeStyle 293 表达系统产生抗SSEA-4p2-78 hAb,接着经由蛋白质G琼脂糖管柱纯化。使用 库马斯蓝染色,通过SDS-PAGE分析来检查抗体纯度(图25A)。结果显示抗体纯 度超过95%。随后进行ELISA以研究p2-78 hAb对于球系列聚醣的结合活性(图 25B)。发现p2-78 hAb结合至SSEA-4及SSEA-3,但不结合至Globo H,表明p2- 78的人类IgG形式保有其亲本scFv形式识别SSEA-4的结合抗原决定基的活性。

[0791] 使用含有203种不同聚醣的聚醣数组来进一步证实p2-78 hAb的特异性。结 果显示p2-78 hAb识别SSEA4、唾液酸基-SSEA4、SSEA4Gc及Gb5(SSEA3)(图 26A)。有趣的是,p2-78 hAb亦识别GloboH,类似于ELISA分析结果(图26B)。 使用市售IgM抗体MC631作为阳性对照(图26C)。

[0792] 开发人类化MC48 mAb

[0793] 非人类化鼠类mAb对于临床配置上可能有某些局限性,包括其血清半衰期 短、不能引发人类效应功能及产生人类抗鼠类抗体(HAMA)反应(LoBuglio等人, 1989)。因此,mAb可通过将其CDR移植至人类Ig分子的VH及VL FR上予以人类 化(Roguska等人,1994)。

[0794] 为了开发人类化MC48,对来自融合瘤细胞的MC48的V_H及V_L可变区进行 定序(表17-0)。将MC48的V_H及V_L可变区与NCBI IgBLAST数据库比对之后,发 明人修改MC48的FR且产生第1、第2、第3及第4人类化MC48序列(表17-1至表17-4)。接着根据这些人类化MC48序列建构且产生噬菌体呈现scFv形式。为测 定人类化MC48噬菌体纯系的结合活性,进行包覆SSEA-4-BSA的基于固体的 ELISA(图27A至29B)。发现到人类化MC48 scFv噬菌体可以剂量依赖性方式识 别SSEA-4。数据表明,相较于鼠类mAb MC48,第4人类化MC48 scFv噬菌体维 持其结合亲和力。

[0795] 实例16

[0796] 补体依赖性细胞毒性(CDC)分析。

[0797] 检查例示性人类化MC 48介导表达SSEA-4的细胞的CDC的能力。将智人乳 癌或胰脏癌细胞涂铺于96孔盘的各孔中生长隔夜,随后分析。在作为补体来源 的兔血清(1:5稀释度;Life Technologies)存在下,接着将细胞与连续稀释浓度 的人类化MC 48或人类IgG1同型对照一起在RPMI中培育。通过添加存活率探针 7-AAD来评估细胞死亡。基于7-AAD量测结果,使用FACScan流式细胞仪计算 比溶解百分率。相较于同型对照,这些抗体在10μg/ml下显示显著的杀灭活 性。如所示,人类化MC48-4成功地介导表达SSEA-4的细胞的CDC。

[0798] 实例17

[0799] 材料及方法

[0800] 构筑MC41、第1hMC41、第2hMC41及第3hMC41噬菌体纯系的例示性单链片 段可变区(scFv)

[0801] 对scFv形式的MC41、第1hMC41、第2hMC41及第3hMC41序列(V_H- GGGGSGGGGSGGGGS-V_L)进行基因合成(Genomics)且通过Sfi I及Not I (Fermentas)切割。凝胶萃取之后,将消化产物选殖入pCANTAB-5E噬粒(GE Healthcare)中。使hMC41变异体噬粒转形至TG1大肠杆菌中且在含有100μg/ml 安比西林及2%葡萄糖的2×YT培养基(BD Pharmingen)中回收,并在37℃下通过 M13KO7辅助噬菌体(NEB)救援1小时。以1,500×g离心10分钟之后,将这些集结 粒再悬浮于含有100μg/ml安比西林及50μg/ml康霉素的2×YT培养基中隔夜以产 生scFv-噬菌体。

[0802] 证明功效:通过ELISA对MC41及hMC41 scFv噬菌体纯系进行结合分析

[0803] 将SSEA-4-BSA以0.2μg/ml的浓度涂布于ELISA盘上。洗涤且阻断之后, 将连续稀释的噬菌体或IgG在室温下培育1.5小时。洗涤之后,在室温下添加 1:1000稀释的HRP结合抗M13抗体(GE Healthcare)、1:2000稀释的HRP结合抗人 类或抗小鼠IgG抗体1小时。接着,液体受质3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色 且用3N HCl终止显色。在450nm量测光学密度。

[0804] 证明功效:MC41的人类化

[0805] 两种人类基因IGHJ4*08及IGKV6-21*02与MC41 V_H及V_L最相似。因而,发 明人选择来自这两种基因的FR用于MC41的人类化。所有人类化MC41的V_H及 V_L中的CDR1至CDR3均具保守性。

[0806] 证明功效:抗SSEA-4人类化IgG的构筑及表达

[0807] 利用AgeI及NheI位点将人类化MC41的V_H区域选殖入含有信号肽及人类免 疫球蛋白γ1重链恒定区的经修饰表达载体pcDNA5-FRT-γ1中。利用AgeI及 EcoRV位点将人类化MC41的V_L区域选殖入含有信号肽及人类免疫球蛋白κ轻链 恒定区的经修饰表达载体p-κ-HuGs中。两种质粒均转染至FreeStyle293细胞 (Invitrogen)中且在37℃下,于无血清培养基中连续培育1周以产生人类化抗 体。

[0808] 证明功效:抗SSEA-4人类化IgG的纯化

[0809] 收集培养基,离心且使用0.45μm孔径膜过滤。接着对上清液进行蛋白质 G管柱层析(GE Healthcare)以便纯化抗SSEA-4人类化IgG。溶离物相对于PBS透 析之后,依旧使用库马斯蓝染色,通过SDS-PAGE分析来检查抗体。通过布拉 福试剂(Bradford reagent)(Thermo Scientific)及分光亮度计来评估抗体浓度。

[0810] 证明功效:通过聚醣数组获得的chMC41及hMC41结合特异性

[0811] 聚醣数组玻片通过1%BSA阻断45分钟,接着与连续稀释的chMC41或 hMC41 IgG一起在室温下培育再45分钟。洗涤之后,在室温下使用驴抗人类IgG Fcγ-F674作为二级抗体历时40分钟。最后,洗涤玻片,干燥且随后用波长674 nm扫描。

[0812] 证明功效:抗体依赖性细胞介导性细胞毒性(ADCC)分析

[0813] 将HPAC(5×10^3个细胞)胰脏癌细胞接种于96孔盘中且培养直至约80%汇 合。这些细胞接着与抗体chMC41、hMC41、MC813、NHIgG或NMIgG以及 PBMC(效应子,E)一起在37℃下培育16小时。处理之后,利用CytoTox-ONE™同质膜完整性分析套组(Promega)侦测LDH表达量。使用560nm激发波长及590 nm发射波长,通过荧光(Molecular Device,SpectraMax M5)读取反应(图21A)。

[0814] 证明功效:补体依赖性细胞毒性(CDC)分析

[0815] 将HPAC(5×10^3个细胞)胰脏癌细胞株培养隔夜直至约80％汇合,且与含有 抗体chMC41、hMC41、MC813、NHIgG或NMIgG及兔补体(20％)(Low-Tox-M兔 补体,Cedarlane)的混合物在37℃下反应16小时。接着,利用CytoTox-ONE™同 质膜完整性分析套组(Promega)量测细胞存活率(图21B),随后进行与ADCC分析 程序相同的程序。

[0816] 证明功效:开发人类化MC41 mAb

[0817] 鼠类mAb的临床用途有限,包括其血清半衰期短、不能触发人类效应功能 及产生人类抗鼠类抗体(HAMA)反应(LoBuglio等人,1989)。因此,mAb须通过 将其CDR移植至人类Ig分子的V_H及V_L FR上予以人类化(Roguska等人,1994)。

[0818] 将MC41的V_H及V_L可变区与NCBI IgBLAST或IMGT数据库比对之后,发明 人产生第1、第2及第3人类化MC41序列。发明人接着根据这些人类化MC41序 列构筑且产生噬菌体呈现scFv形式。为测定人类化MC41噬菌体纯系的结合活 性,进行包覆SSEA-4-BSA的基于固体的ELISA(图27A至29B)。发现到第2及第 3人类化MC41 scFv噬菌体可以剂量依赖性方式识别SSEA-4,而第1MC41 scFv 对SSEA-4失去结合活性(图27A至29B)。为了评估完整人类化MC41 IgG的结合 活性,发明人构筑第1、第2、第3人类化MC41及嵌合MC41(chMC41)的完整 IgG。ELISA结果显示,第2及第3人类化MC41可以剂量依赖性模式与SSEA-4反 应(图30A),但不与BSA反应(图30B),对于chMC41而言观测到相同结果。相较 于鼠类MC41的结合亲和力,第2及第3人类化MC41的结合亲和力得以维持。发 明人将第2人类化IgG命名为hMC41。为了测定chMC41及hMC41的结合特异 性,构建聚醣数组。嵌合及人类化MC41显示的特异性结合大于市售SSEA4抗体 (MC813)。其仅识别SSEA4或经羟乙酰基修饰的SSEA4(图19A、19B、31A至32B)。

[0819] 证明功效:chMC41及hMC41的ADCC及CDC。

[0820] 为了证明chMC41及hMC41的效应功能,进行ADCC及CDC分析。使用 HPAC胰脏癌细胞株评估chMC41、hMC41、阳性对照MC813或阴性对照NHIgG 及NMIgG的ADCC及CDC活性(图34A至35B)。数据显示hMC41的效应功能类似 于chMC41。有趣的是,人类化MC41不但维持其原始活性,其经由ADCC及 CDC显示的癌细胞杀灭活性比MC813还要更强(图35A及35B)。

[0821] 参考文献

[0822] LoBuglio,A.F.,Wheeler,R.H.,Trang,J.,Haynes,A.,Rogers,K.,Harvey, E.B.,Sun,L.,Ghrayeb,J.,and Khazaeli,M.B.(1989).Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man:kinetics and immune response.Proc Natl Acad Sci U S A 86,4220-4224.

[0823] Roguska,M.A.,Pedersen,J.T.,Keddy,C.A.,Henry,A.H.,Searle,S.J.,Lambert,J.M.,Goldmacher,V.S.,Blattler,W.A.,Rees,A.R.,and Guild,B.C. (1994).Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing.Proc Natl Acad Sci USA 91,969-973.

[0824] 实例18

[0825] 证明功效:材料及方法

[0826] 噬菌体呈现生物淘选程序

[0827] 用PEG结合的羧基戴诺珠粒(Invitrogen)在室温下非特异性结合1小时来扣 减含有2.5×10^{10}个纯系的噬菌体呈现人类原生scFv库(Lu等人,2011),且随后与 SSEA-4-PEG固

定的戴诺珠粒一起在4℃下培育1小时。用PBS或含有0.01％Tween 20的PBS(PBST$_{0.01}$)洗涤之后,通过在37℃下用大肠杆菌TG1细胞感染0.5 小时来回收结合至SSEA-4-PEG-戴诺珠粒的噬菌体。连续稀释一些感染细胞以 测定效价,而其他细胞是通过M13KO7噬菌体救援且扩增。测定所救援噬菌体 效价之后,进行下一轮生物淘选。在第四轮及第五轮生物淘选中,随机选择噬 菌体纯系进行培养以供ELISA筛选。

[0828] 所选噬菌体纯系的ELISA筛选

[0829] 为了侦测抗原识别,微孔盘(Nunc)分别用0.2μg/ml SSEA-4-BSA、Globo H-BSA、SSEA-3-BSA及BSA涂布。所选噬菌体纯系在含有3％BSA的PBS中1:2 稀释且添加至各孔中。盘在室温下培育1小时,用PBST0.1洗涤,且与辣根过氧 化酶(HRP)结合的小鼠抗M13噬菌体抗体(GE Healthcare)一起培育。再次洗涤 盘,且添加OPD及H_2O_2。用3N HCl终止反应之后,使用微量培养盘式读取器 (型号680,BioRad),使用490nm量测吸亮度。萃取来自ELISA阳性噬菌体纯系 的噬粒,以通过自动定序来鉴别scFv编码区。

[0830] 证明功效:抗SSEA-4人类IgG的构筑及表达

[0831] 利用AgeI及NheI位点将所选scFv的V_H区域选殖入含有信号肽及人类免疫 球蛋白γ1重链恒定区的经修饰表达载体pcDNA5-FRT-γ1中。利用AgeI及EcoRV 位点将所选scFv的V_L区域选殖入含有信号肽及人类免疫球蛋白κ轻链恒定区的 经修饰表达载体p-κ-HuGs中。两种质粒均转染至FreeStyle293细胞(Invitrogen) 中且在37℃的无血清培养基中连续培育1周以产生人类抗体。

[0832] 证明功效:抗SSEA-4人类IgG的纯化

[0833] 收集培养基,离心且使用0.45μm孔径膜过滤。接着对上清液进行蛋白质 G管柱层析(GE Healthcare)以便纯化抗SSEA-4人类IgG。溶离物相对于PBS透析 之后,依旧使用库马斯蓝染色,通过SDS-PAGE分析来检查抗体。通过布拉福 试剂(Thermo Scientific)及分光亮度计来评估抗体浓度。

[0834] 证明功效:MC48及MC41的人类化

[0835] 两种人类基因(GenBank寄存号Q9UL73及AY577298)分别最类似于MC48 V_H及V_L。发明人使MC48的三个序列发生人类化,包括由Q9UL73基因的经修饰 构架(FR)1至FR4组成的第1个人类化MC48(hMC48)V_H;由来自寄存号 AY577298的四个FR组成的第1个hMC48 V_L;第2个hMC48 VH FR,其后为来自 PDB的1YY8,而第2个hMC48 V_L与第1个序列相同;以及第3个hMC48 V_H序列 (Q9UL73基因的经修饰的FR1、FR2及FR4)及第3个hMC48 V_L(相对于人类AY577298基因而言,仅FR2及FR4变化)。其他两种人类基因IGHJ4*08及 IGKV6-21*02与MC41 V_H及V_L最相似。因而,发明人选择来自这两种基因的FR 用于MC41的人类化。所有人类化MC48及MC41的V_H及V_L中的CDR1至CDR3均 具保守性。

[0836] 证明功效:人类化MC48及MC41噬菌体纯系的单链片段可变区(scFv)的构筑

[0837] 对scFv形式的人类化MC48(hMC48)及MC41(hMC41)序列(V_H- GGGGSGGGGSGGGGS-V_L)进行基因合成(Genomics)且通过Sfi I及Not I (Fermentas)切割。凝胶萃取之后,将消化产物选殖至pCANTAB-5E噬粒(GE Healthcare)中。使hMC48及hMC41变异体噬粒转形至TG1大肠杆菌中且在含有 100μg/ml安比西林及2％葡萄糖的2×YT培养基(BD Pharmingen)中回收,并在 37℃下通过M13KO7辅助噬菌体(NEB)救援1小时。以1,500×g离心10分钟之后, 将这些集结粒再悬浮于含有100μg/ml安比西林及50μg/ml康霉素的2×YT培养基 中隔夜以产

生scFv-噬菌体。

[0838] 证明功效:通过ELISA对hMC48及hMC41 scFv噬菌体纯系或IgG进行结合分析

[0839] 将SSEA-4-BSA以0.2μg/ml的浓度涂布于ELISA盘上。洗涤且阻断之后，将连续稀释的噬菌体或IgG在室温下培育1.5小时。洗涤之后,在室温下添加 1:1000稀释的结合HRP的抗M13抗体(GE Healthcare)、1:2000稀释的结合HRP的 抗人类或抗小鼠IgG抗体历时1小时。接着,液体受质3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)显色且用3N HCl终止显色。在450nm量测光学密度。

[0840] 证明功效:通过聚醣数组获得的p2-78 hAb、chMC41及hMC41结合特异性

[0841] 聚醣数组玻片通过1％BSA阻断45分钟,接着与连续稀释的p2-78 hAb、chMC41或hMC41 IgG一起在室温下培育再45分钟。洗涤之后,在室温下使用驴 抗人类IgG Fcγ-F674作为二级抗体历时40分钟。最后,洗涤玻片,干燥且随后 用波长674nm扫描。

[0842] 证明功效:抗体依赖性细胞介导性细胞毒性(ADCC)分析

[0843] 将HPAC、BxPC3或PL45(5×10^3个细胞)胰脏癌细胞接种于96孔盘中且培养 直至约80％汇合。接着将这些细胞与抗体hMC48、hMC41或NHIgG,及PBMC (效应子,E)一起在37℃下培育16小时。处理之后,利用CytoTox-ONE™同质膜 完整性分析套组(Promega)侦测LDH表达量。使用560nm激发波长及590nm发射 波长,通过荧光(Molecular Device,SpectraMax M5)读取反应。

[0844] 证明功效:补体依赖性细胞毒性(CDC)分析

[0845] 将HPAC、BxPC3或PL45(5×10^3个细胞)胰脏癌细胞株培养隔夜直至约80％ 汇合,且与含有抗体hMC48、hMC41或NMIgG及兔补体(10％及20％)(Low-Tox- M兔补体,Cedarlane)的混合物在37℃下反应16小时。接着,利用CytoTox- ONE™同质膜完整性分析套组(Promega)量测细胞存活率,随后进行与ADCC分 析程序相同的程序。

[0846] 证明功效:

[0847] 鉴别结合至SSEA-4的经噬菌体呈现的scFv

[0848] 为了鉴别结合至SSEA-4的抗体,使用含有2×10^{10}个成员的噬菌体呈现人 类原生scFv库,其如发明人的先前报导所述建立(Lu等人,2011)。首先通过结合 戴诺珠粒的噬菌体移除此库,接着通过SSEA-4-PEG结合的戴诺珠粒选择结合 SSEA-4的噬菌体。在生物淘选期间使用两种缓冲系统:PBS及含有0.01％ Tween20的PBS(PBST$_{0.01}$)。五轮亲和力选择之后,第五轮的噬菌体回收率增 加,在PBS及PBST$_{0.01}$系统中,分别为第一轮的约55倍及80倍(图22A及22B)。随 机选择噬菌体纯系且通过ELISA测试SSEA-4结合(图23A至23D)。发现七个纯系 特异性结合至SSEA-4-BSA,但不结合至BSA对照蛋白质。通过对所有8种个别 纯系进行定序,鉴别出两种含有不同人类V_H及V_L编码区的独特抗SSEA-4噬菌 体纯系(p1-52及p2-78)。

[0849] 为了检查所述两种噬菌体纯系的特异性及结合亲和力,使用与球系列聚 醣(包括SSEA-4-BSA、Globo H-BSA及SSEA-3-BSA)相同的噬菌体效价进行比较 性ELISA(图24)。p2-78噬菌体纯系显示对SSEA-4-BSA及SSEA-3-BSA的结合强 烈,及对Globo H-BSA的结合稍微较弱。然而,发明人发现到,p1-52噬菌体纯 系对SSEA-4-BSA的结合活性极弱。因此,聚焦于p2-78纯系用于进一步研究。

[0850] 为了建立针对SSEA-4的完全人类抗体(hAb),发明人分别对p2-78 scFv的 V_H及V_L

编码序列进行分子工程改造而形成人类IgG_1主链。使用FreeStyle 293表 达系统产生抗SSEA-4p2-78 hAb,接着经由蛋白质G琼脂糖管柱纯化。使用库 马斯蓝染色,通过SDS-PAGE分析来检查抗体纯度(图25A)。结果显示抗体纯度 超过95%。随后进行ELISA以研究p2-78 hAb对于球系列聚醣的结合活性(图 25B)。发现p2-78 hAb结合至SSEA-4及SSEA-3,但不结合至Globo H,表明p2- 78的人类IgG形式保有其亲本scFv形式识别SSEA-4的结合抗原决定基的活性。

[0851] 使用含有203种不同聚醣的聚醣数组来进一步证实p2-78 hAb的特异性。结 果显示p2-78 hAb识别SSEA4、唾液酸基-SSEA4、SSEA4Gc及Gb5(SSEA3)(图 26A)。有趣的是,p2-78 hAb亦稍微识别Globo H,类似于ELISA分析结果(图 26B)。使用市售IgM抗体MC631作为阳性对照(图26C)。

[0852] 证明功效:开发人类化MC48及MC41 mAb

[0853] 鼠类mAb的临床用途有限,包括其血清半衰期短、不能触发人类效应功能 及产生人类抗鼠类抗体(HAMA)反应(LoBuglio等人,1989)。因此,mAb须通过 将其CDR移植至人类Ig分子的V_H及V_L FR上予以人类化(Roguska等人,1994)。

[0854] 将MC48及MC41的V_H及V_L可变区与NCBI IgBLAST或IMGT数据库比对之 后,本发明人产生第1、第2、第3及第4人类化MC48序列以及第1、第2及第3人 类化MC41序列。接着根据这些人类化MC48及MC41序列构筑且产生噬菌体呈 现scFv形式。为了测定人类化MC48及MC41噬菌体纯系的结合活性,进行包覆 SSEA-4-BSA的基于固体的ELISA(图27A至29B)。发现到第3及第4人类化MC48 以及第2及第3人类化MC41 scFv噬菌体可以剂量依赖性方式识别SSEA-4,而第1 及第2人类化MC48以及第1MC41 scFv对SSEA-4失去结合活性(图27A至29B)。数据显示,相较于鼠类mAb MC48或MC41的结合亲和力,第4人类化MC48及第 3人类化MC41 scFv噬菌体纯系的结合亲和力得以维持。为了评估完整人类化 MC41 IgG的结合活性,发明人构筑第1、第2、第3人类化MC41及嵌合MC41 (chMC41)的完整IgG。ELISA结果显示,第2及第3人类化MC41可以剂量依赖性 模式与SSEA-4反应(图30A),但不与BSA反应(图30B),对于chMC41而言观测到 相同结果。发明人将第2人类化IgG命名为hMC41。为了测定chMC41及hMC41 的结合特异性,构建聚醣数组。嵌合及人类化MC41显示的特异性结合大于市 售SSEA4抗体(MC813)。其仅识别SSEA4或经羟乙酰基修饰的SSEA4(图31A及 31B)。

[0855] 证明功效:hMC48、chMC41及hMC41的ADCC及CDC测试

[0856] 为了研究hMC48、chMC41及hMC41的效应功能,进行ADCC及CDC分 析。使用HPAC、BxPC3及PL45胰脏癌细胞株,评估hMC48或NHIgG在10μg/ml 浓度下的ADCC及CDC活性(图33A及33B)。此外,用chMC41、hMC41、阳性对 照MC813或阴性对照NHIgG处理HPAC细胞(图34A及34B)。数据显示hMC41及 chMC41的效应功能优于hMC48的效应功能。有趣的是,人类化MC41不但维持 其原始活性,其经由ADCC及CDC显示的癌细胞杀灭活性比MC813还要更强(图 35A及35B)。

[0857] 实例19

[0858] MC41相对于MC 48的结合

[0859] 通过ELISA检查hMC41及hMC48对SSEA-4的结合能力。结果显示hMC41对 SSEA-4的结合比hMC48好得多。相较于hMC48,人类化MC41的最大结合值更 高且Kd值更小(对于hMC41及hMC48而言,分别为0.2μg/ml及4.6μg/ml)(图 36)。

[0860] 参考文献

[0861] LoBuglio,A.F.,Wheeler,R.H.,Trang,J.,Haynes,A.,Rogers,K.,Harvey, E.B., Sun,L.,Ghrayeb,J.,and Khazaeli,M.B.(1989).Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man:kinetics and immune response.Proc Natl Acad Sci U SA 86,4220-4224.

[0862] Lu,R.-M.,Chang,Y.-L.,Chen,M.-S.,and Wu,H.-C.(2011).Single chain anti-c-Met antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor-targeted imaging and drug delivery.Biomaterials 32,3265-3274.

[0863] Roguska,M.A.,Pedersen,J.T.,Keddy,C.A.,Henry,A.H.,Searle,S.J., Lambert,J.M.,Goldmacher,V.S.,Blattler,W.A.,Rees,A.R.,and Guild,B.C. (1994) .Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing.Proc Natl Acad Sci USA 91,969-973。

序列表

<110> 台湾地区“中央研究院”

<120> 增进抗体功效的通用糖型组合物及方法

<130> G2112-02205

<140> PCT/US2016/15858

<141> 2016-01-30

<150> 14/798,312

<151> 2015-07-13

<150> 14/723,297

<151> 2015-05-27

<150> 62/110,338

<151> 2015-01-30

<160> 229

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 1

caggtgcagc tgaagcagtc tggacctgag ctagtgaaga ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggttactaca tgcactgggt caagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggatat attagttgtt acaatggtgg tactaggtac 180

aacctgaagt tcaagggcaa ggccacattt actgtagaca catcctccac cacagcctac 240

atgcagttca acaacctgac atctgaagac tctgcggtct attactgtgc aagagggggg 300

tacgacgagg gtgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210> 2

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 2

gatattgtaa tgacacagtc tcccaaatcc atattcatgt cagttggaga gagggtcacc 60

ttgagctgca aggccagtga gaatgtgggt acttatgtat cctggtatca acagaaacca 120

gagcagtctc ctaaactgat gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagaccttg cagattatca ctgtggacag agttacacct atccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 3
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 3

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

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 4

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

50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Thr Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 5
Glu Asn Val Gly Thr Tyr
1 5
<210> 6
<400> 6
000
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 7
Gly Gln Ser Tyr Thr Tyr Pro Tyr Thr
1 5
<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 8
Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr
1 5
<210> 9
<211> 8

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 9
Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Gly Thr
1 5
<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 10
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Glu Gly Asp Tyr
1 5 10
<210> 11
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 11
gaggtccagc tgcaacaatc tgggtctgtg ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc aactcctgga tgcactgggc gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgtgtg gattggagag attgatccta atactggtaa tactaactac 180
aatgagaact tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca catcctccac cacagcctac 240
gtggatctca gcagcctgac atctgaagac tctgcggtct attactgtgc aagaggactc 300
gggctacttg tttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348
<210> 12
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 12
caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120
tcctccccca aaccctggat ttatgtcaca tccaacctga cttctggagt ccctgttcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcagagt ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtaataacc cgtggacgtt cggtggaggc 300
accaagctgg aaatcaaa 318

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 13

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

<210> 14
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 14

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 15
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 16
<400> 16
000

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 17
Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 18
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp
1 5

<210> 19

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 19
Ile Asp Pro Asn Thr Gly Asn Thr
1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 20
Ala Arg Gly Leu Gly Leu Leu Val Tyr
1 5
<210> 21
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 21
caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
acatgcactg tctcagggtt ctcattaagc agatatggtg taagctgggt tcgccagcct 120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggtg acgggagcac aaattatcat 180
tcagctctca tatccagact gagcatcagc aaggataact ccaagagcca agttttctta 240
aaactgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccacgtact actgtgccat gactgggaca 300
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtctctgca 339
<210> 22
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 22
caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaaat tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccaccagtgg aatagtagcc cacacacgtt cggaggggg 300
accaagctgg aaataaaa 318

<210> 23
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 23

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

<210> 24
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 24

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 25
Ser Ser Val Asn Tyr
1 5
<210> 26
<400> 26
000
<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 27
His Gln Trp Asn Ser Ser Pro His Thr
1 5
<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 28
Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Gly
1 5
<210> 29

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 29
Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
1 5
<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 30
Ala Met Thr Gly Thr Ala Tyr
1 5
<210> 31
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 31
caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
acatgcactg tctcaggatt ctcattaacc agctatggta taagctgggt tcgccagcct 120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggtg acgggagcac aaattatcat 180
tcagctctcg tatccagact gagcatcagc aaggataact ccaagagcca agttttctta 240
aaactgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccacgtact actgtgccaa aactgggaca 300
tcttactggg gccaagggac tctggtcact gtctctgca 339
<210> 32
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 32
caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtgccc cacacacgtt cggaggggg 300
accaagctgg aaataaaa 318

<210> 33
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 33

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

<210> 34
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 34

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 35
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5
<210> 36
<400> 36
000
<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 37
Gln Gln Trp Ser Ser Ala Pro His Thr
1 5
<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 38
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
1 5
<210> 39

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 39
Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
1 5
<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 40
Ala Lys Thr Gly Thr Ser Tyr
1 5
<210> 41
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 41
caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
acatgcactg tctcagggtt ctcattaacc agctatggtg taagctgggt tcgccagcct 120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggtg aggggagcac aaattatcat 180
tcagttctca tatccagact gaccattagt aaggataact ccaagagcca agttttctta 240
aaactgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccacgtact actgtgccat gactgggaca 300
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtctctgca 339
<210> 42
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 42
caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgt cttctggagt ccctggtcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcaggtt ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccatcagtgg agtagtagtc cacacacgtt cggaggggg 300
accaagttgg agataaaa 318

<210> 43
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 43

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

<210> 44
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 44

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 45
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5
<210> 46
<400> 46
000
<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 47
His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr
1 5
<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 48
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
1 5
<210> 49

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 49
Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr
1 5
<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 50
Ala Met Thr Gly Thr Ala Tyr
1 5
<210> 51
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 51
Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser
20 25
<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 52
Gly Asp Ser Val Ser Ser Ser Ser Ala Ala
1 5 10
<210> 53
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 53
Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10 15
Arg
<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 54
Thr Tyr Tyr Lys Ser Thr Trp His Asn
1 5
<210> 55
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 55
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gly Ala Ser
20 25
<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 56
Gly Phe Thr Phe Arg Lys Ser Trp
1 5
<210> 57
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 57
Met Gly Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10 15
Asn
<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 58
Thr Asn Asp Asp Ala Lys Glu Lys
1 5
<210> 59
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 59
Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr
1 5 10 15
Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35
<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 60
Ala Arg Glu Lys Gly Arg Val Arg Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 61
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 62
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 62
Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Phe Arg Asp Asn
1 5 10 15
Asp Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Phe Cys
35
<210> 63
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 63
Ala Ser Leu Ser Ser Val Ser Ala Gly Asp Pro Pro Arg Gly Pro Glu
1 5 10 15
Asn Ile Glu Tyr Phe Glu His
20
<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 64
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 65
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 65
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ala Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
20 25
<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 66
Gln Ser Val Gly Asn Lys Tyr
1 5
<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 67
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15
Tyr
<210> 68
<400> 68
000
<210> 69
<211> 26
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 69
Asp Ile Gln Met 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
20 25
<210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 70
Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
1 5
<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 71
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15
Tyr
<210> 72
<400> 72
000
<210> 73
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 73
Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30
Val Tyr Tyr Cys
35
<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 74
Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Arg Arg Leu Thr
1 5 10
<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 75
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10
<210> 76
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 76
Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30
Thr Tyr Tyr Cys
35
<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 77
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5
<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 78
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
1 5 10
<210> 79
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 79
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
20 25
<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 80
Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val Ser
1 5
<210> 81
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 81
Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
1 5 10
<210> 82
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 82
Gly Val Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Val Leu Ile
1 5 10 15
Ser Arg Leu
<210> 83
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 83
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
20 25
<210> 84
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 84
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10
<210> 85
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 85
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
20 25
<210> 86
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 86
Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
1 5 10
<210> 87
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 87
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
20 25
<210> 88
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 88
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10
<210> 89
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 89
Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Leu Asn
1 5 10 15
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25
<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 90
Ala Met Thr Gly Thr Ala Tyr
1 5
<210> 91
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 91
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10
<210> 92
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 92
Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser
1 5 10 15
Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25
<210> 93
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 93
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 94
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 94
Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn
1 5 10 15
Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
20 25
<210> 95
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 95
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10
<210> 96
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 96
Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Leu Asn
1 5 10 15
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25
<210> 97
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 97
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 98
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 98
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20
<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 99
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10
<210> 100
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 100
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 101
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 101
Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser
1 5
<210> 102
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 102
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20
<210> 103
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 103
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 104
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 104
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20
<210> 105
<211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 105
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 106
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 106
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20
<210> 107
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 107
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 108
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 108
Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 109

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 109
His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr
1 5
<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 110
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10
<210> 111
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 111
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 112
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10
<210> 113
<211> 32

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 113

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

<210> 114
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 114

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

<210> 115
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 115

caggtgcagc tgcaagagtc aggacctggc ctggtgaaac cctcagaaac tctgtccctt 60
acatgcactg tctcagggtt ctcattaacc agctatggtg taagctggat tcgccagcct 120
ccaggaaagg gtctggagtg gattggagta atatggggtg aggggagcac aaattatcat 180
tcagttctca tatccagact gaccattagt gtggatacct ccaagaatca atttagctta 240
aaactgagca gtgttaccgc tgctgacaca gccgtttact actgtgccat gactgggaca 300
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtctctagc 339

<210> 116
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 116
gagattgtgc tgacccagag ccctgccaca ctgtcactga gcccaggcga gcgagccaca 60
ctgtcctgtt ctgctagctc ctctgtctcc tacatgcatt ggtatcagca gaagccagga 120
ctggcaccac gactgctgat ctatgacact tctaaactga gttcaggcat tcccgccaga 180
ttcagtggct cagggagcgg aaccgacttt actctgacca ttagctccct ggagcctgaa 240
gatttcgccg tgtactattg ccatcagtgg tcatcaagcc ctcatacctt cgggggggggg 300
actaaggtgg aaatcaaacg c 321
<210> 117
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 117
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Val Leu Ile
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Met Thr Gly Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser
<210> 118
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 118
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 119
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5
<210> 120
<400> 120
000
<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 121
His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr
1 5
<210> 122
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 122

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
1 5
<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 123
Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr
1 5
<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 124
Ala Met Thr Gly Thr Ala Tyr
1 5
<210> 125
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 125
caggtgcagc tgaagcagag cggacctggc ctggtgcagc cctcacagag cctgagcatc 60
acttgtaccg tcagtggatt ctccctgaca tcttacggcg tgtcttgggt caggcagagc 120
cctggcaagg ggctggagtg gctgggcgtg atctggggag aaggctcaac taactatcac 180
agcgtcctga tcagtcgcct gtcaattaac aaggacaatt ctaaaagtca ggtgttcttt 240
aaaatgaaca gcctgcagtc caatgatacc gccatctact attgcgctat gaccggcaca 300
gcatactggg ggcagggaac actggtgact gtctccgct 339
<210> 126
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 126
gagattgtgc tgacccagag ccctgccaca ctgtcactga gcccaggcga gcgagccaca 60
ctgtcctgtt ctgctagctc ctctgtctcc tacatgcatt ggtatcagca gaagccagga 120
ctggcaccac gactgctgat ctatgacact tctaaactga gttcaggcat tcccgccaga 180
ttcagtggct cagggagcgg aaccgacttt actctgacca ttagctccct ggagcctgaa 240
gatttcgccg tgtactattg ccatcagtgg tcatcaagcc ctcatacctt cgggggggggg 300
actaagctgg aaatcaaacg c 321
<210> 127
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 127
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Val Leu Ile
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Met Thr Gly Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ala
<210> 128
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 128
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 129
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5
<210> 130
<400> 130
000
<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 131
His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr
1 5
<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 132

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
1 5
<210> 133
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 133
Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr
1 5
<210> 134
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 134
Ala Met Thr Gly Thr Ala Tyr
1 5
<210> 135
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 135
caggtgcagc tgcaggaaag cggacccgga ctggtgaaac ctagcgaaac actgagcctg 60
acttgtaccg tgagcggatt ttccctgacc tcttatggag tgagctggat cagacagccc 120
cctggcaagg gactggagtg gatcggcgtg atttggggag aaggctccac aaactatcac 180
agtgtcctga tctcacgact gactatttct aaggacaact ctaaaagtca ggtcttcctg 240
aaactgaata gtctgcagac tgacgatacc gctacatact attgcgcaat gacagggaca 300
gcatactggg gacagggaac cctggtgaca gtcagctcc 339
<210> 136
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 136
cagatcgtgc tgacacagtc ccctgcaatt atgtcagcca gcccagggga aaaggtgaca 60
atgacttgta gtgcttctag ttcagtctca tacatgcatt ggtatcagca gaagccaggc 120
ctggccccca gactgctgat ctacgacacc tccaaactga gctccggcgt gcccgggaga 180
ttttccggct ctgggagtgg aacttcatat agcctgacca tttctaggct ggaggccgaa 240
gatgccgcta catactattg ccaccagtgg agcagtagcc cccatacatt cggaggcggg 300
accaaagtgg aaatcaaacg c 321
<210> 137
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 137
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Val Leu Ile
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Met Thr Gly Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser
<210> 138
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 138
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 139

Ser Ser Val Ser Tyr

1 5

<210> 140

<400> 140

000

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 141

His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr

1 5

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 142

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
1 5
<210> 143
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 143
Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr
1 5
<210> 144
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 144
Ala Met Thr Gly Thr Ala Tyr
1 5
<210> 145
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 145
caggtccagc tgaaagagag cggccccgga ctggtcgccc cttcacagag cctgagcatt 60
acttgcaccg tgagcggatt ttcactgacc agctacggag tgagctggat tagacagcct 120
cctggcaagg gactggagtg gatcggcgtg atttggggag aaggcagcac caactatcac 180
agtgtcctga tctcacgcct gacaatttcc aaggacaaca gcaaatccca ggtcttcctg 240
aaactgaatt ctctgcagac tgacgatacc gctacatact attgcgcaat gacagggaca 300
gcatactggg gacagggaac cctggtgaca gtcagtagt 339
<210> 146
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 146
cagatcgtgc tgacacagtc cccagcaatt atgtctgcca gtcccgggga gaaggtgaca 60
atgacttgta gtgccagctc ctctgtctca tacatgcatt ggtatcagca gaagtccggc 120
acatctccta aacggtggat ctacgacact tctaaactga gttcaggcgt gcccgggaga 180
ttttcaggca gcgggtccgg aacttcttat agtctgacca tttcccgact ggaggccgaa 240
gatgccgcta cctactattg ccatcagtgg tcttcaagcc ctcatacttt tgggggggga 300
actaaggtgg aaatcaagcg a 321
<210> 147
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 147
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Val Leu Ile
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Met Thr Gly Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser
<210> 148
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 148
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 149

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 149

Ser Ser Val Ser Tyr

1 5

<210> 150

<400> 150

000

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 151

His Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Thr

1 5

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 152

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
1 5
<210> 153
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 153
Ile Trp Gly Glu Gly Ser Thr
1 5
<210> 154
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 154
Ala Met Thr Gly Thr Ala Tyr
1 5
<210> 155
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 155
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
20 25
<210> 156
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 156
Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile

1 5 10 15
Tyr
<210> 157
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 157
Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala
20 25 30
Thr Tyr Tyr Cys
35
<210> 158
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 158
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10
<210> 159
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 159
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
20 25
<210> 160
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 160
Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15
Val
<210> 161
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 161
Asn Tyr His Ser Val Leu Ile Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15
Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
20 25 30
Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
35
<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 162
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 163
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 163
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 164
<400> 164

000

<210> 165

<400> 165

000

<210> 166

<400> 166

000

<210> 167

<400> 167

000

<210> 168

<400> 168

000

<210> 169

<400> 169

000

<210> 170

<400> 170

000

<210> 171

<400> 171

000

<210> 172

<400> 172

000

<210> 173

<400> 173

000

<210> 174

<400> 174

000

<210> 175

<400> 175

000

<210> 176

<400> 176

000

<210> 177

<400> 177

000

<210> 178

<400> 178

000

<210> 179

<400> 179

000

<210> 180

<400> 180

000

<210> 181

<400> 181

000

<210> 182

<400> 182

000

<210> 183

<400> 183

000

<210> 184

<400> 184

000

<210> 185

<400> 185

000

<210> 186

<400> 186

000

<210> 187

<400> 187

000

<210> 188

<400> 188

000

<210> 189

<400> 189

000

<210> 190

<400> 190

000
<210> 191
<400> 191
000
<210> 192
<400> 192
000
<210> 193
<400> 193
000
<210> 194
<400> 194
000
<210> 195
<400> 195
000
<210> 196
<400> 196
000
<210> 197
<400> 197
000
<210> 198
<400> 198
000
<210> 199
<400> 199
000
<210> 200
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 200
caggtgcagc tgaaggaaag cggacccgga ctggtcgccc cctctaagtc tctgtctatt 60
acttgtactg tgagcggatt ctctctgagc tcccagggcg tgtactgggt gaggcagcca 120
cctggcaagg gcctggagtg gctgggagcc atctgggcag gaggcagcac caactataat 180
tccgccctga tgtctcgcct gtctatcagc aaggacaact ccaagtctca ggtgttcctg 240

aagatgaaca gcctgcagac cgacgataca gccatgtact attgcgcccg ggtggacggc 300
tacagaggct ataacatgga ttactggggc cagggcacca gcgtgacagt gtctagc 357
<210> 201
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 201
gagaatgtgc tgacacagtc cccagcaatc atgagcgcct ccccaggaga gaaggtgacc 60
atgacatgtt ccgcctcctc tagcgtgtct tacatgcact ggtatcagca gaagtcctct 120
accagcccta agctgtggat ctacgacaca agcaagctgg cctccggcgt gcccggccgg 180
ttttctggca gcggctccgg caactcttat agcctgacca tcagcagcat ggaggccgag 240
gatgtggcca catactattg ctttcagggc tctggctacc cactgacatt cggggctgga 300
actaaactgg aactgaagcg a 321
<210> 202
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 202
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Lys
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gln
20 25 30
Gly Val Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Ala Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Val Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 203

<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 203

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

<210> 204
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 204

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 205
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 205

Asp Thr Ser
1

<210> 206

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 206
Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 207
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 207
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gln Gly
1 5
<210> 208
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 208
Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr
1 5
<210> 209
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 209
Ala Arg Val Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Asn Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 210
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 210
caggtgcagc tgaaggagtc cggaccagga ctggtggcac catctaagac cctgagcctg 60
acctgcacag tgagcggctt ctccctgagc tcccagggcg tgtactggat caggcagcca 120
cctggcaagg gactggagtg gatcggcgcc atctgggccg gcggctctac aaactataat 180
tccgccctga tgtctcgcct gtctatcagc aaggacaact ccaagtctca ggtgtttctg 240
aagatgaata gcctgcagac cgacgataca gccatgtact attgcgcccg ggtggacggc 300
tacagaggct ataacatgga ttattggggc cagggcaccc tggtgacagt gtctagc 357
<210> 211
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 211
gagaatgtgc tgacccagtc tcctgccatc atgagcgcca caccaggcga gaaggtgacc 60
atgacatgtt ccgcctcctc tagcgtgtct tacctgcact ggtatcagca gaagtcctct 120
accagcccca agctgtggat ctacgacaca agcaagctgg catccggagt gcctggccgg 180
ttcagcggat ccggatctgg aaacagctat accctgacaa tcagctccat ggaggccgag 240
gatgtggcca cctactattg tttccaggga tccggatacc cactgacctt tggcgccggc 300
acaaagctgg agatcaagcg t 321
<210> 212
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 212
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Lys
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gln
20 25 30
Gly Val Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Val Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 213
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 213

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

<210> 214
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 214

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 215
<211> 3
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 215
Asp Thr Ser
1
<210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 216
Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 217
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 217
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gln Gly
1 5
<210> 218
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 218
Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr
1 5
<210> 219
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 219
Ala Arg Val Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Asn Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 220
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 220
caggtgcagc tgaaggagtc cggaccagga ctggtggcac catctaagac cctgagcctg 60
acctgcacag tgagcggctt ctccctgagc tcccagggcg tgtactggat caggcagcca 120
cctggcaagg gactggagtg gatcggcgcc atctgggccg gcggctctac aaactataat 180
tccgccctga tgtctcgcct gtctatcagc aaggacaact ccaagtctca ggtgtttctg 240
aagatgaata gcctgcagac cgacgataca gccatgtact attgcgcccg ggtggacggc 300
tacagaggct ataacatgga ttattggggc cagggcacct cggtgacagt gtctagc 357
<210> 221
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
<400> 221
gagaatgtgc tgacccagtc tcctgccatc atgagcgcca caccaggcga gaaggtgacc 60
atgacatgtt ccgcctcctc tagcgtgtct tacatgcact ggtatcagca gaagtcctct 120
accagcccca agctgtggat ctacgacaca agcaagctgg catccggagt gcctggccgg 180
ttcagcggat ccggatctgg aaacagctat accctgacaa tcagctccat ggaggccgag 240
gatgtggcca cctactattg tttccaggga tccggatacc cactgacctt tggcgccggc 300
acaaagctgg agatcaagcg t 321
<210> 222
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 222
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Lys
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gln

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

<210> 223
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽
<400> 223
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 224
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 224
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5
<210> 225
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 225
Asp Thr Ser
1
<210> 226
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 226
Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 227
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 227
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gln Gly
1 5
<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽
<400> 228
Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 229

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 229

Ala Arg Val Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Asn Met Asp Tyr

1 5 10

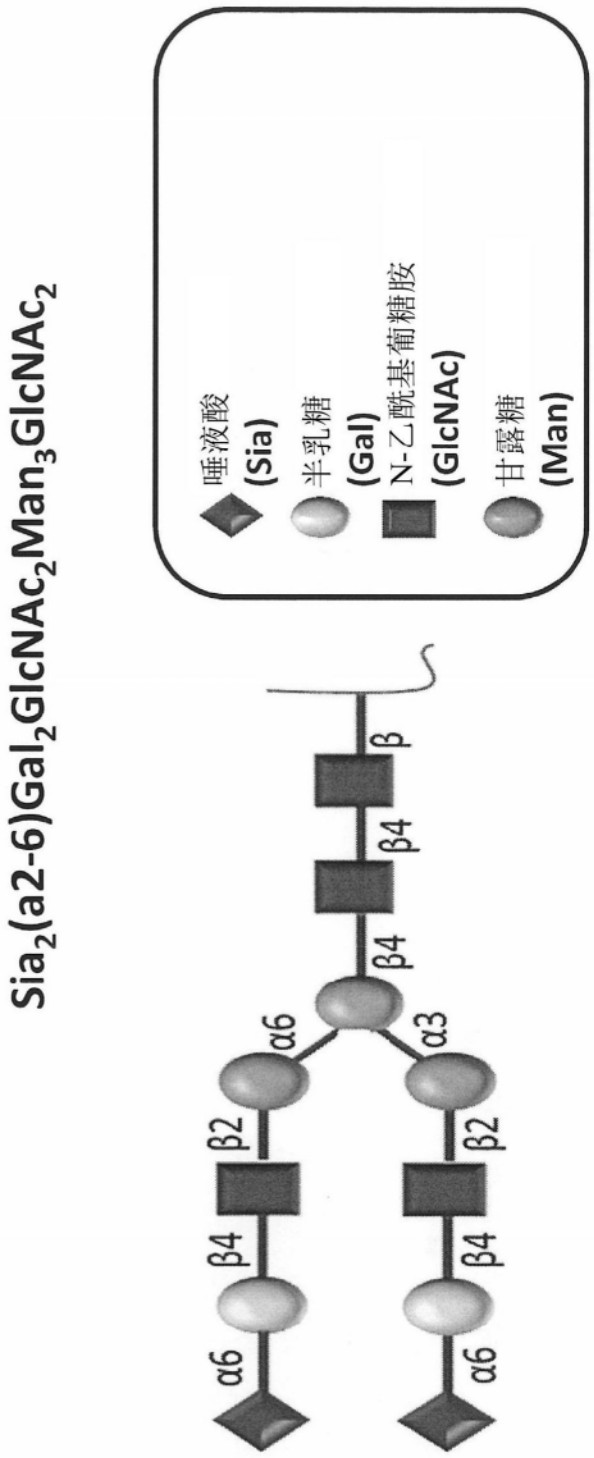

$Sia_2(a2\text{-}6)Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$
唾液酸
(Sia)
半乳糖
(Gal)
N-乙酰基葡糖胺
(GlcNAc)
甘露糖
(Man)
α6
β4
β2
α6
α3
β2
β4
β4
β

图1

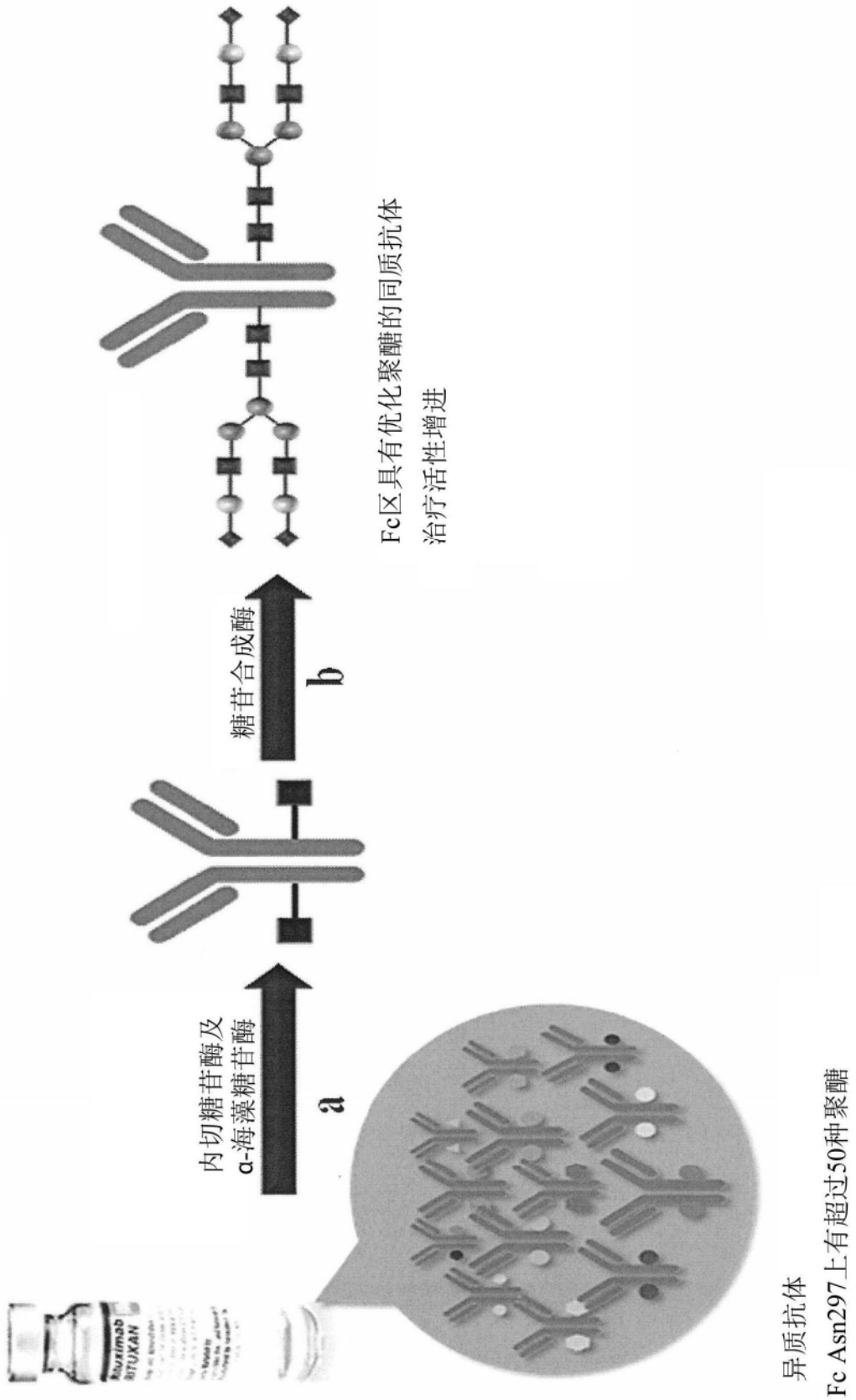

内切糖苷酶及
α-海藻糖苷酶
a
糖苷合成酶
b
Fc区具有优化聚醣的同质抗体
治疗活性增进
异质抗体
Fc Asn297上有超过50种聚醣

图2

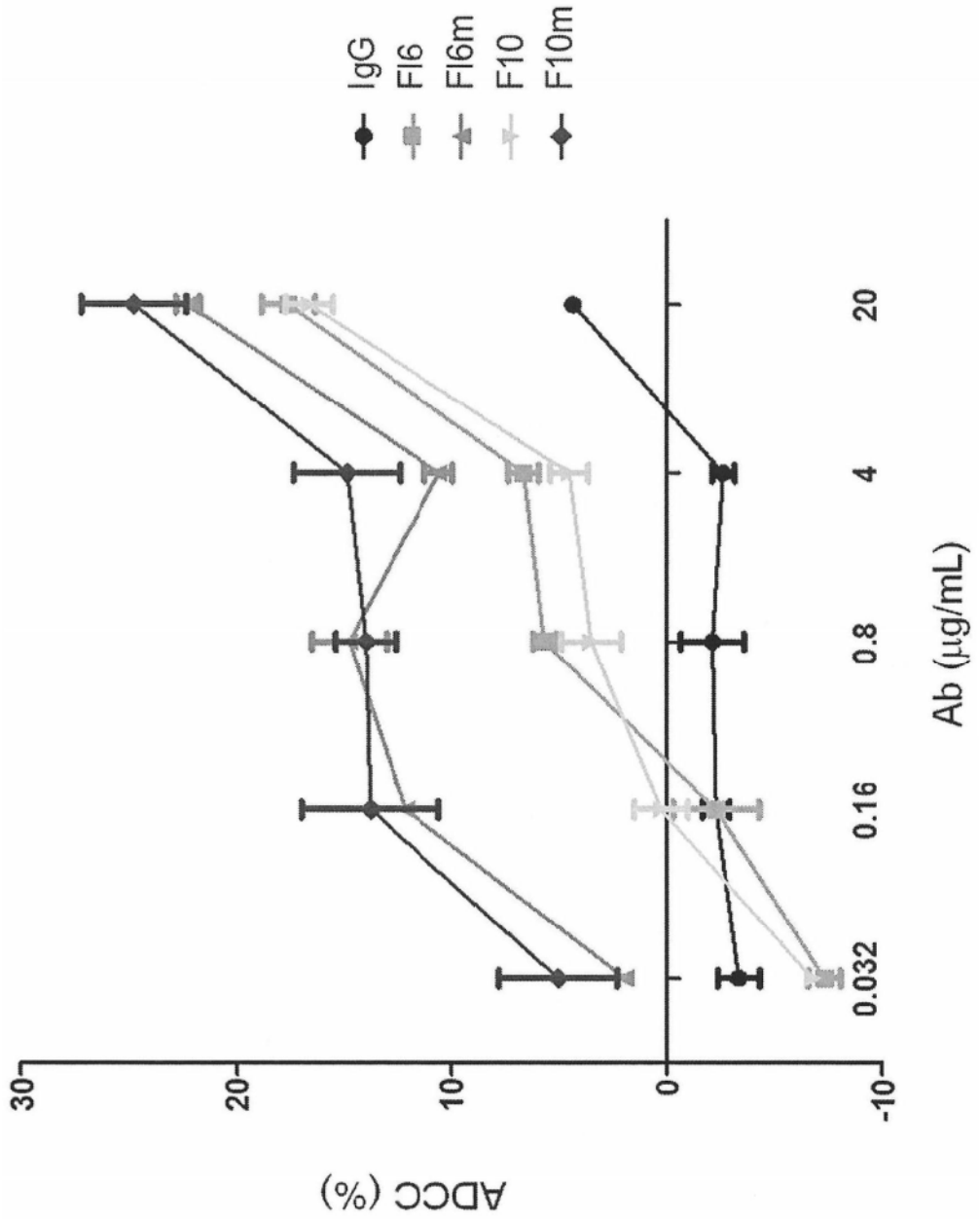


图3

抗CD20	利妥昔单抗	GAb10 1	GAb10 4	GAb10 5	GAb10 7	GAb10 8	GAb11 1
ADCC (倍数)	1	85	54	37	58	17	8

图4

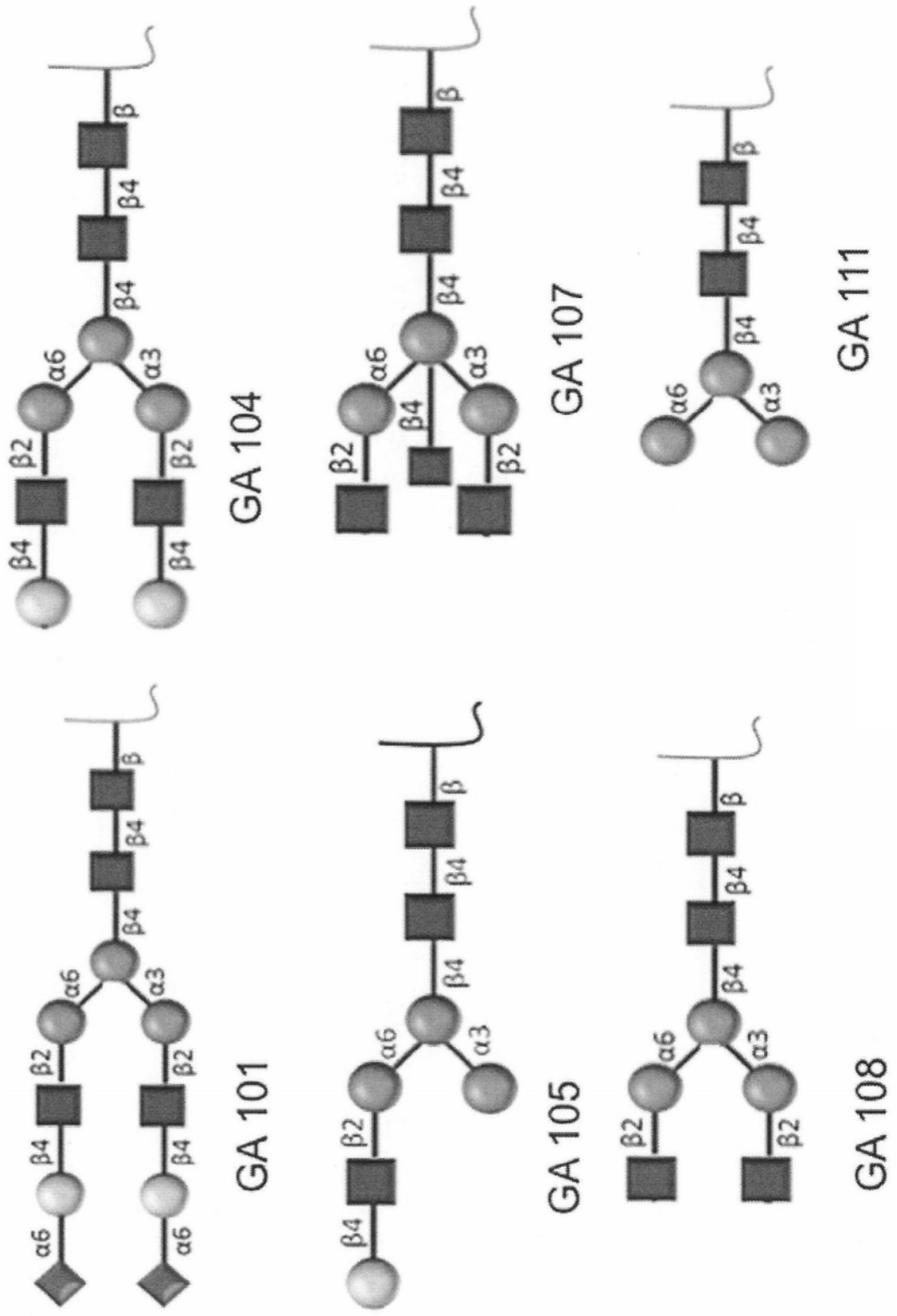
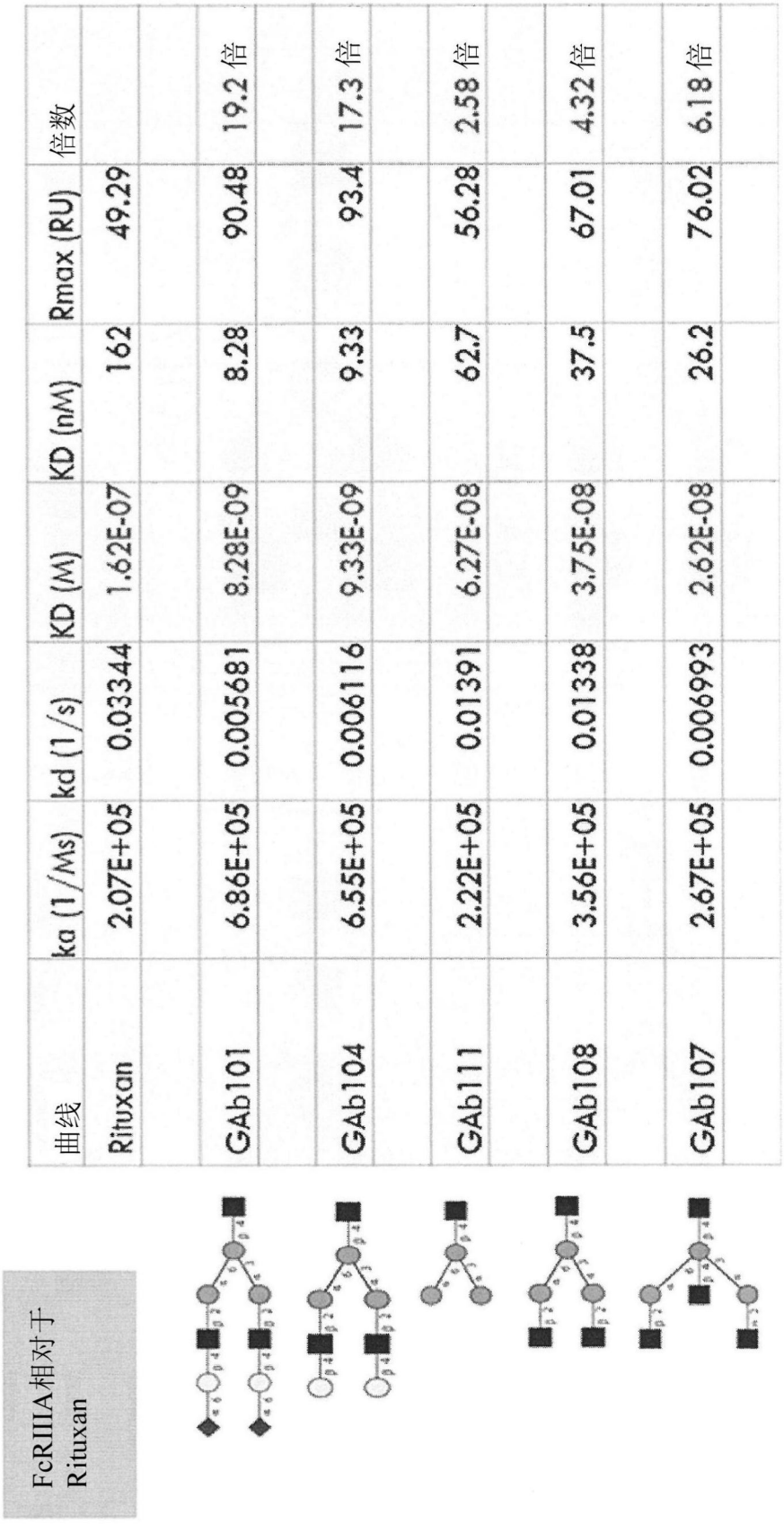


图5



曲线	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (nM)	Rmax (RU)	倍数
Rituxan	2.07E+05	0.03344	1.62E-07	162	49.29	
GAb101	6.86E+05	0.005681	8.28E-09	8.28	90.48	19.2 倍
GAb104	6.55E+05	0.006116	9.33E-09	9.33	93.4	17.3 倍
GAb111	2.22E+05	0.01391	6.27E-08	62.7	56.28	2.58 倍
GAb108	3.56E+05	0.01338	3.75E-08	37.5	67.01	4.32 倍
GAb107	2.67E+05	0.006993	2.62E-08	26.2	76.02	6.18 倍

图6A

GAb109	2.39E+05	0.01996	8.36E-08	83.6	51.03	1.94 倍
GAb110	4.44E+05	0.05322	1.20E-07	120	38.43	1.35 倍
GAb105	3.25E+05	0.004263	1.31E-08	13.1	72.12	12.3 倍
GAb106	3.67E+05	0.01	2.72E-08	27.2	70.8	5.95 倍
GAb102	3.33E+05	0.006284	1.89E-08	18.9	67.52	8.57 倍

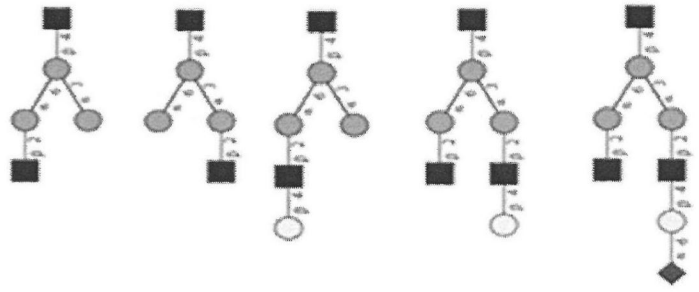


图6B

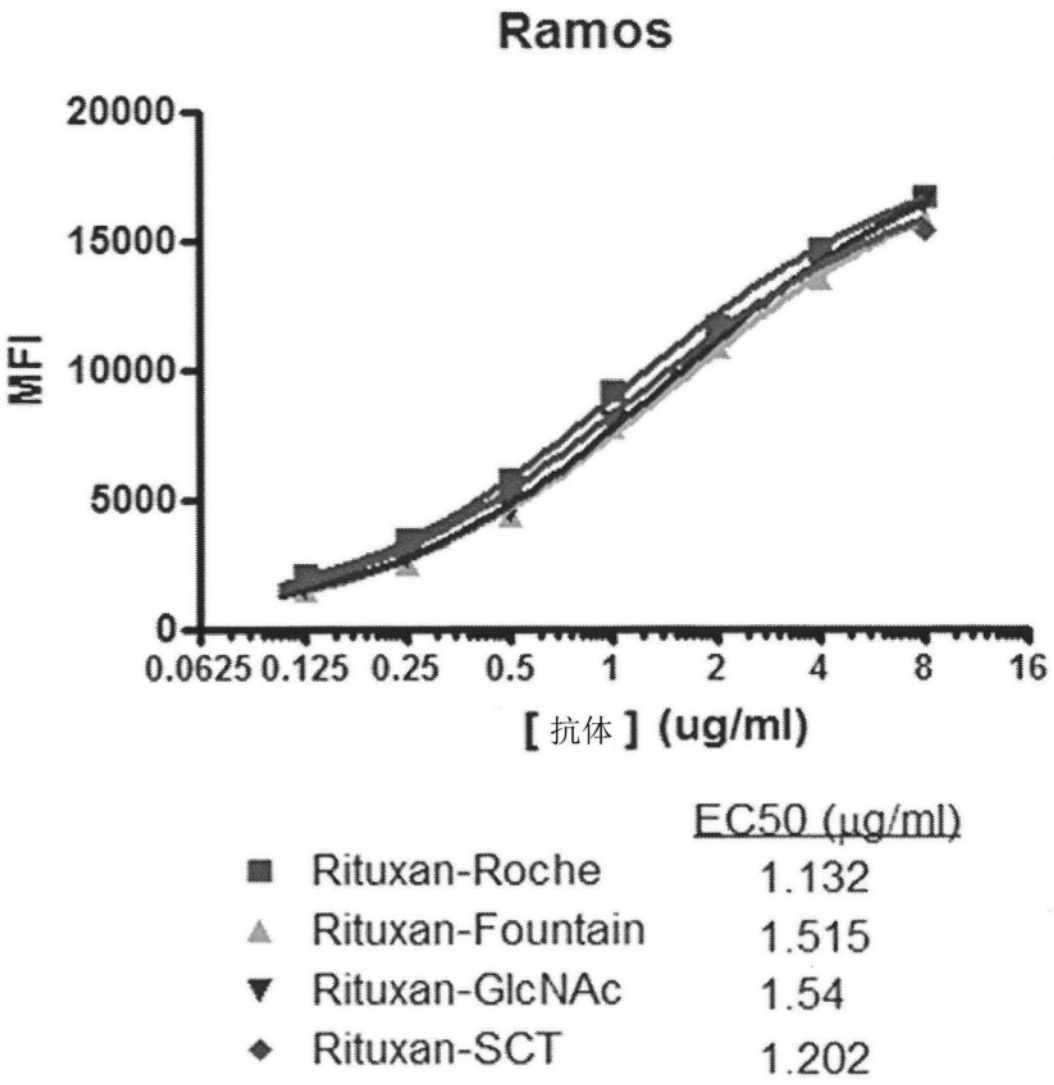

Ramos
20000
15000
10000
5000
0
MFI
0.0625 0.125 0.25 0.5 1 2 4 8 16
[抗体] (ug/ml)
EC50 (μg/ml)
Rituxan-Roche 1.132
Rituxan-Fountain 1.515
Rituxan-GlcNAc 1.54
Rituxan-SCT 1.202

图7

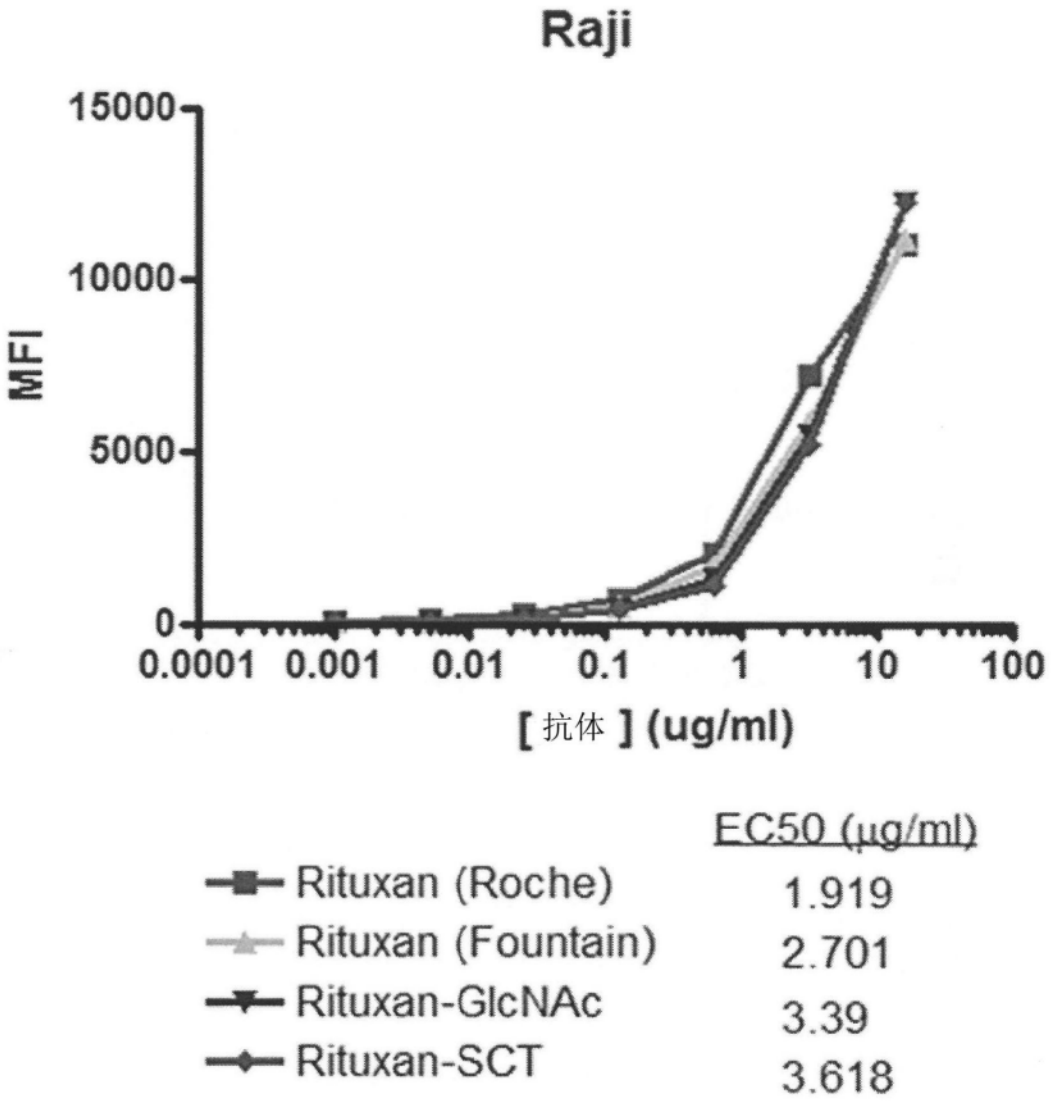

Raji
15000
10000
5000
0
MFI
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[抗体] (ug/ml)
EC50 (μg/ml)
Rituxan (Roche)
1.919
Rituxan (Fountain)
2.701
Rituxan-GlcNAc
3.39
Rituxan-SCT
3.618

图8

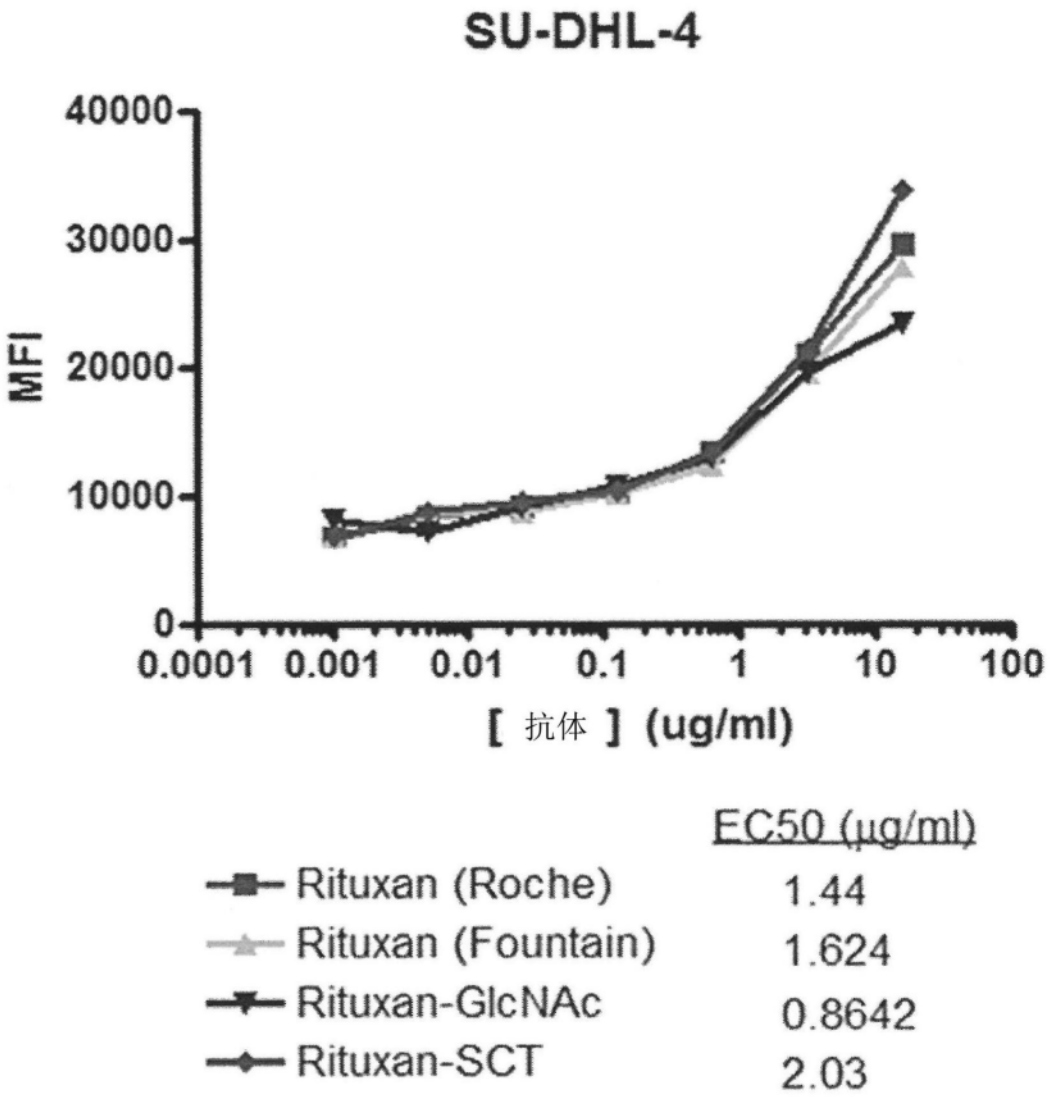

SU-DHL-4
40000
30000
20000
10000
0
MFI
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[抗体] (ug/ml)
EC50 (μg/ml)
Rituxan (Roche)
1.44
Rituxan (Fountain)
1.624
Rituxan-GlcNAc
0.8642
Rituxan-SCT
2.03

图9

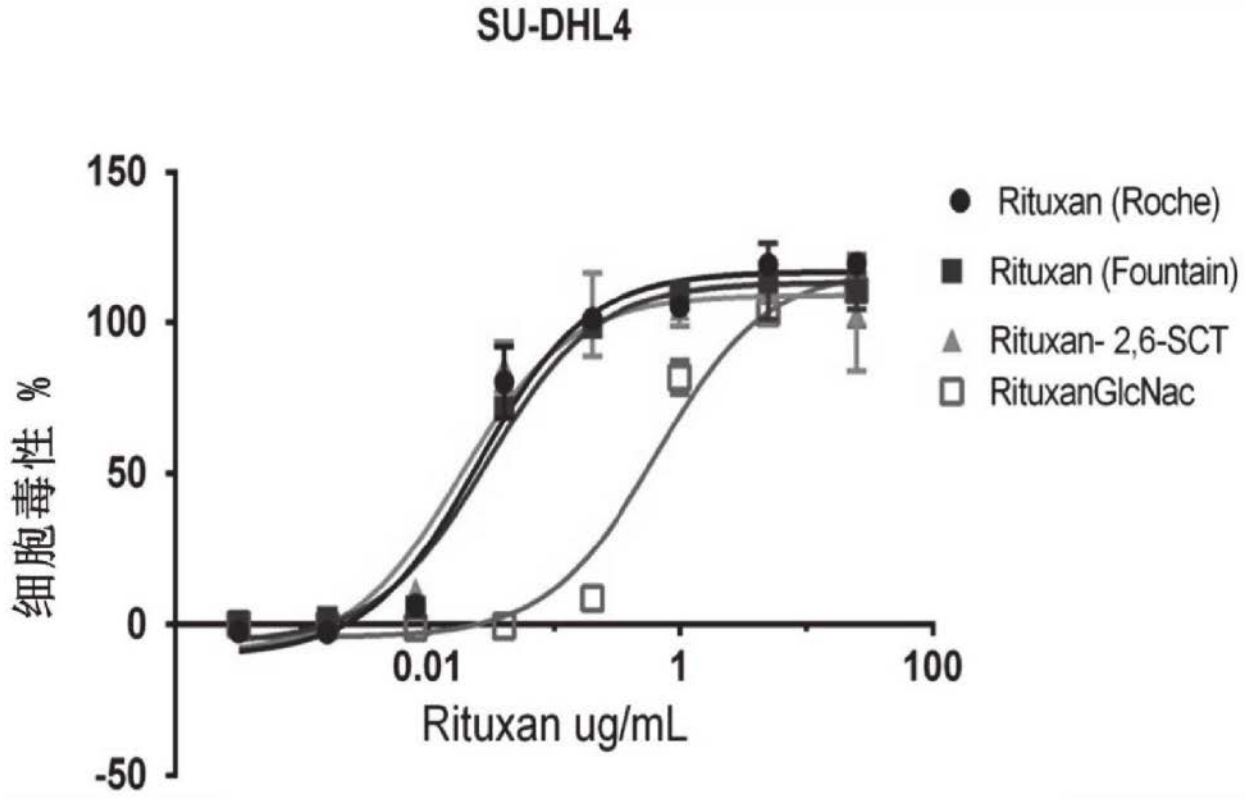

SU-DHL4
150
100
50
0
-50
细胞毒性 %
0.01
1
100
Rituxan ug/mL
Rituxan (Roche)
Rituxan (Fountain)
Rituxan- 2,6-SCT
RituxanGlcNac

图10

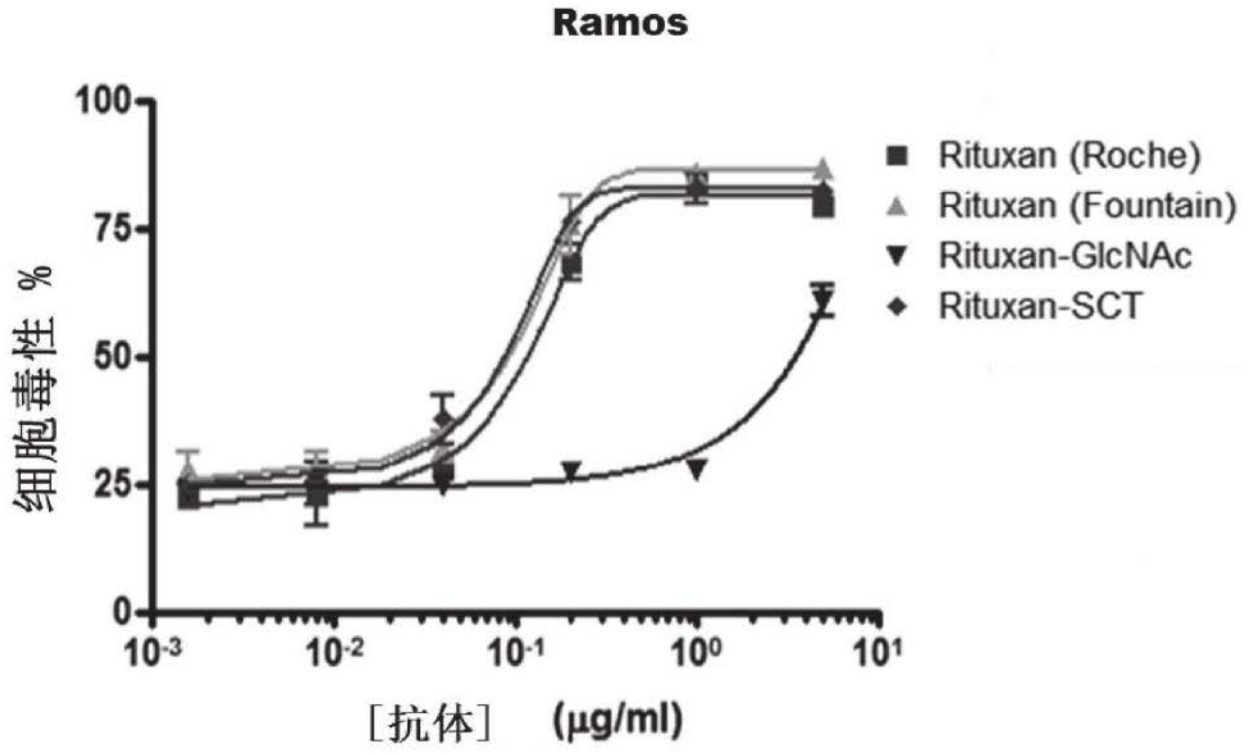

Ramos
100
75
50
25
0
细胞毒性 %
10-3
10-2
10-1
100
101
[抗体] (μg/ml)
Rituxan (Roche)
Rituxan (Fountain)
Rituxan-GlcNAc
Rituxan-SCT

图11

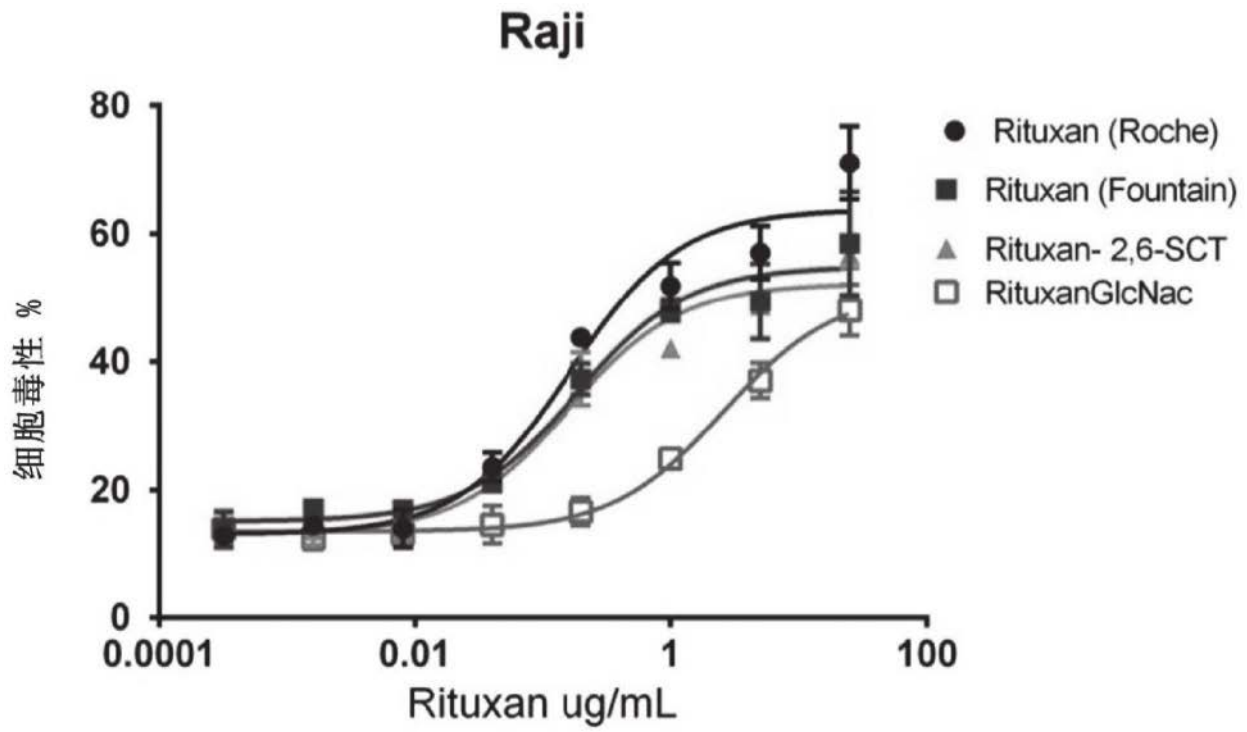

Raji
80
60
40
20
0
细胞毒性 %
0.0001
0.01
1
100
Rituxan ug/mL
Rituxan (Roche)
Rituxan (Fountain)
Rituxan- 2,6-SCT
RituxanGlcNac

图12

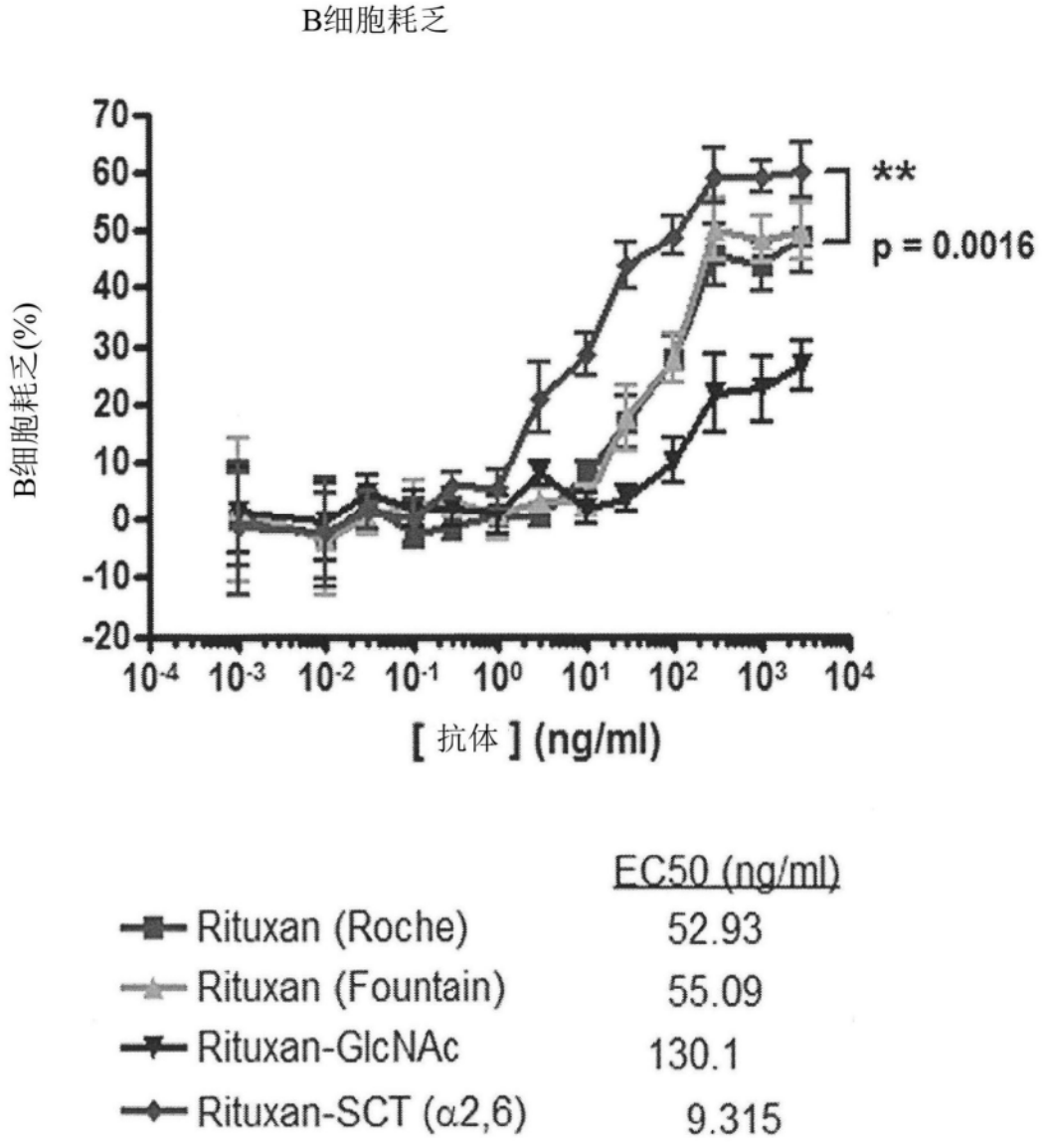

B细胞耗乏
B细胞耗乏(%)
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104
[抗体] (ng/ml)
**
p = 0.0016
EC50 (ng/ml)
Rituxan (Roche) 52.93
Rituxan (Fountain) 55.09
Rituxan-GlcNAc 130.1
Rituxan-SCT (α2,6) 9.315

图13

抗HER2	曲妥珠单抗	GAb10 1	GAb10 4	GAb10 5	GAb10 7	GAb10 8	GAb11 1
ADCC (倍数)	1	30	14.3	9.5	10	6.5	3

图14

FcRIIIA相对于Herceptin

曲线	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (nM)	Rmax (RU)	倍数
Herceptin	1.87E+05	0.0189	1.01E-07	101	34.63	
GAb101	8.86E+05	0.007662	8.65E-09	8.65	66.02	11.7倍
GAb104	3.07E+05	0.003439	1.12E-08	11.2	58.44	9倍
GAb108	2.32E+05	0.009301	4.01E-08	40.1	59.12	2.5倍
GAb106	3.06E+05	0.008412	2.75E-08	27.5	60.03	3.7倍
GAb102	3.42E+05	0.006187	1.81E-08	18.1	54.43	5.6倍
GAb107	2.77E+05	0.007191	2.59E-08	25.9	59.64	3.9倍

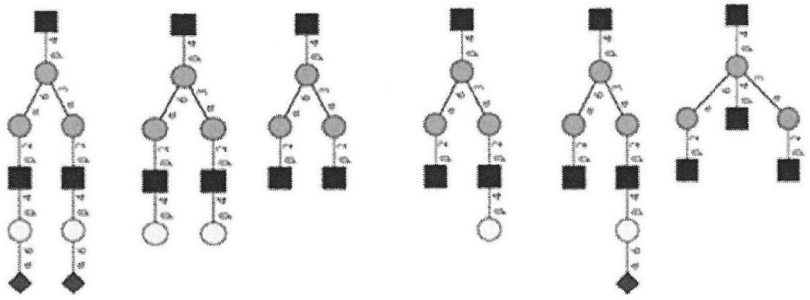


图15

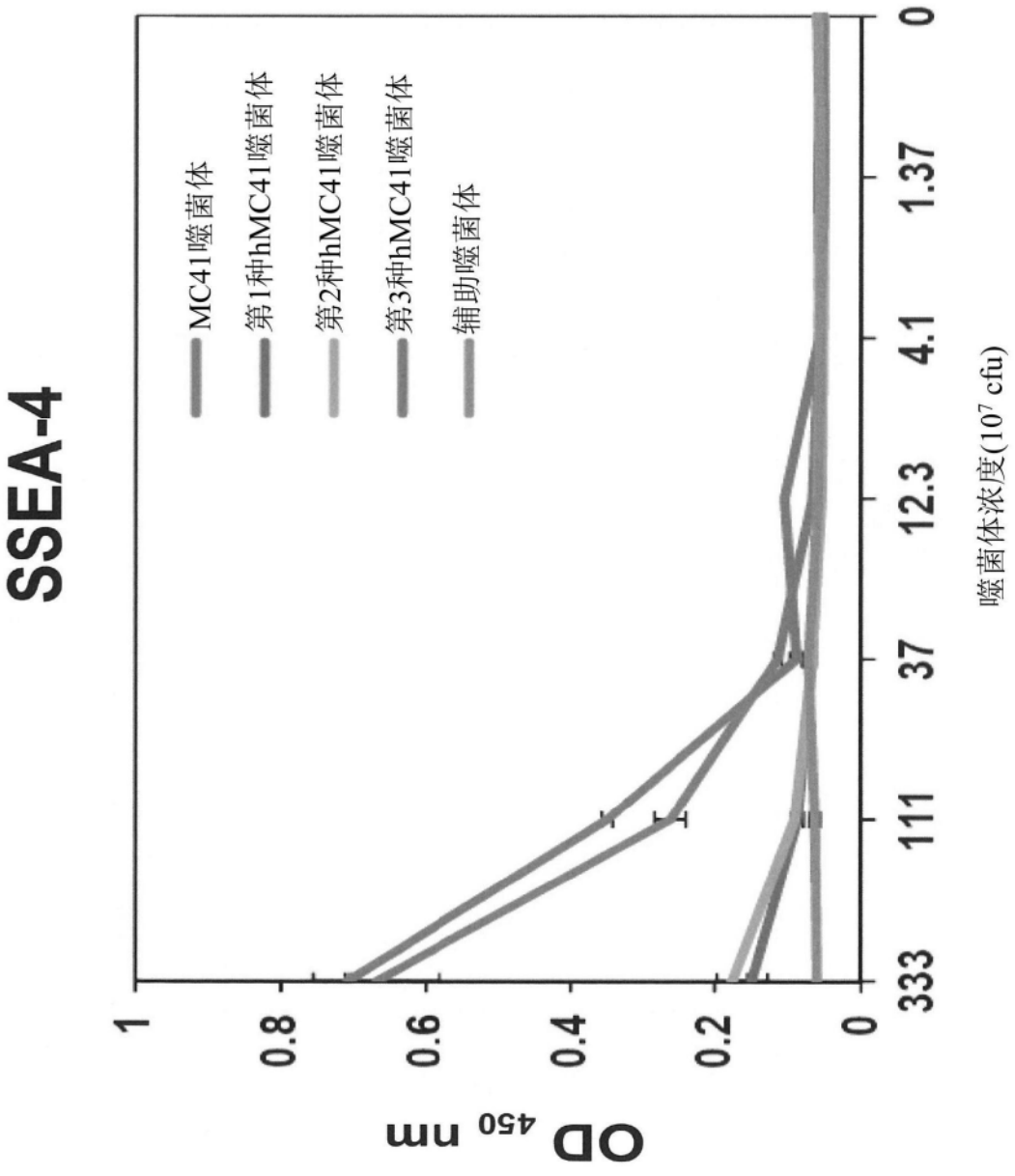

SSEA-4
MC41噬菌体
第1种hMC41噬菌体
第2种hMC41噬菌体
第3种hMC41噬菌体
辅助噬菌体
OD 450 nm
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
333
111
37
12.3
4.1
1.37
0
噬菌体浓度(10^7 cfu)

图16A

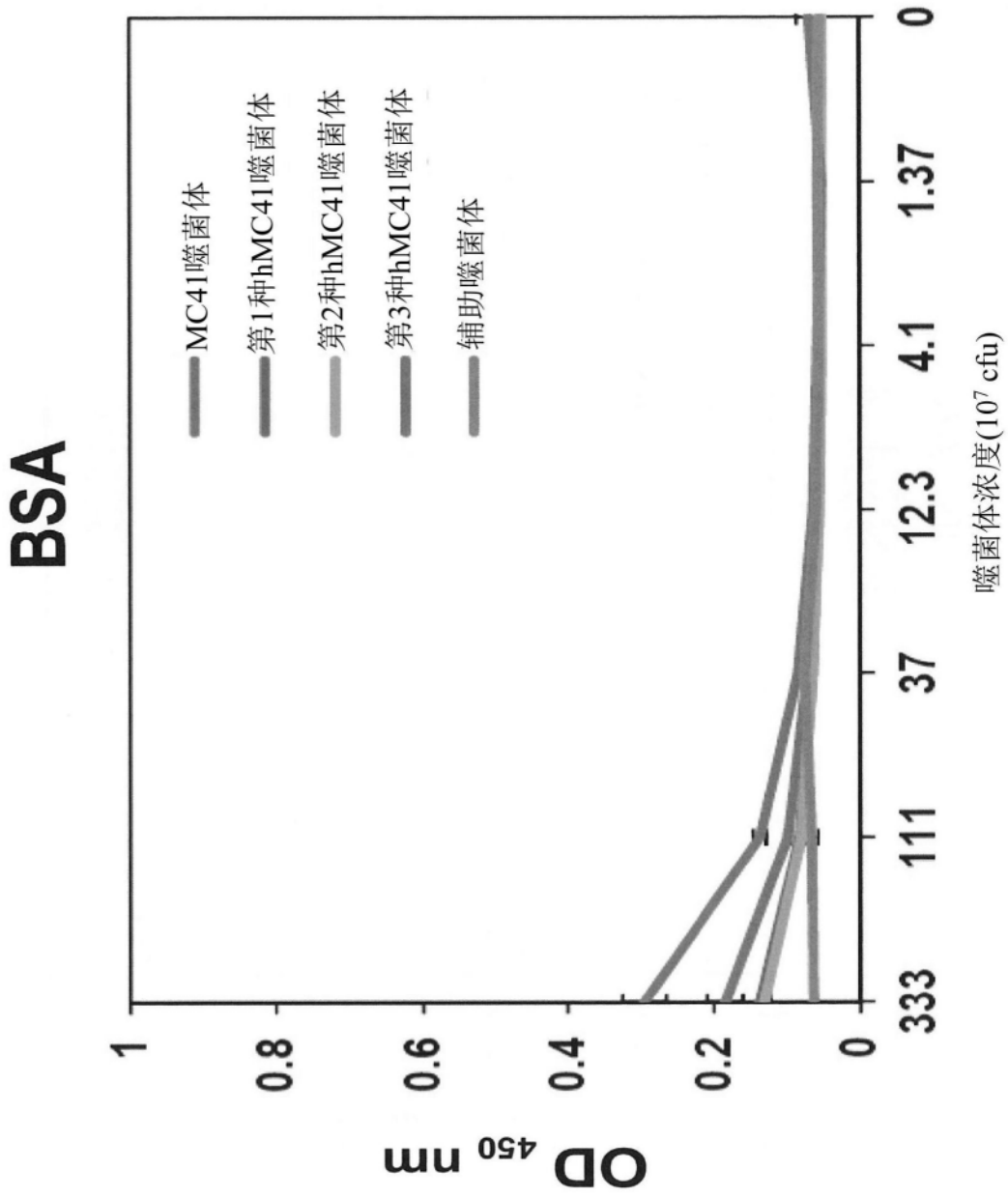

BSA
MC41噬菌体
第1种hMC41噬菌体
第2种hMC41噬菌体
第3种hMC41噬菌体
辅助噬菌体
OD 450 nm
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
333
111
37
12.3
4.1
1.37
0
噬菌体浓度(10^7 cfu)

图16B

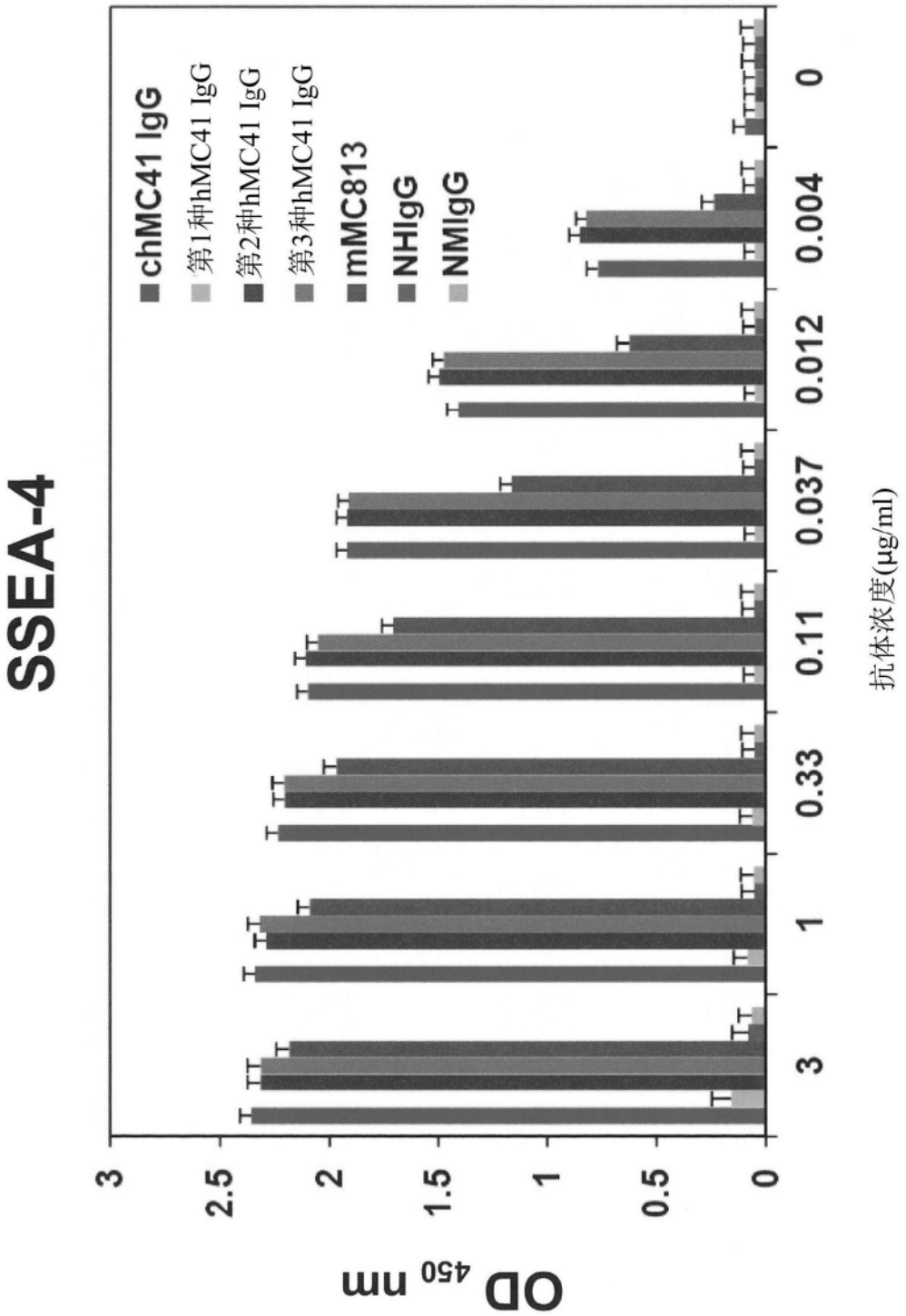

SSEA-4
chMC41 IgG
第1种hMC41 IgG
第2种hMC41 IgG
第3种hMC41 IgG
mMC813
NHIgG
NMIgG
OD 450 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
3
1
0.33
0.11
0.037
0.012
0.004
0
抗体浓度(μg/ml)

图17A

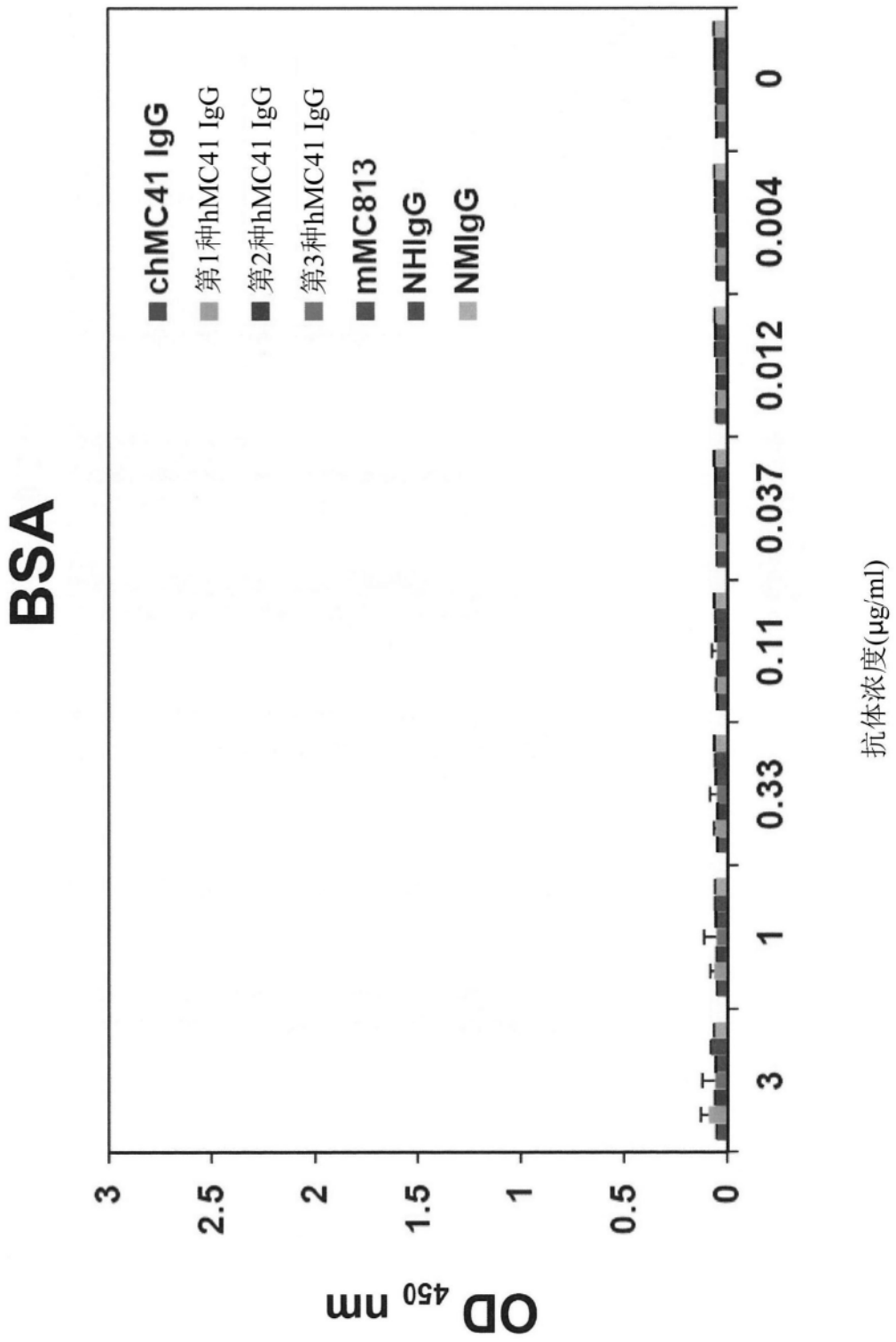

BSA
chMC41 IgG
第1种hMC41 IgG
第2种hMC41 IgG
第3种hMC41 IgG
mMC813
NHIgG
NMIgG
OD 450 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
3
1
0.33
0.11
0.037
0.012
0.004
0
抗体浓度(μg/ml)

图17B

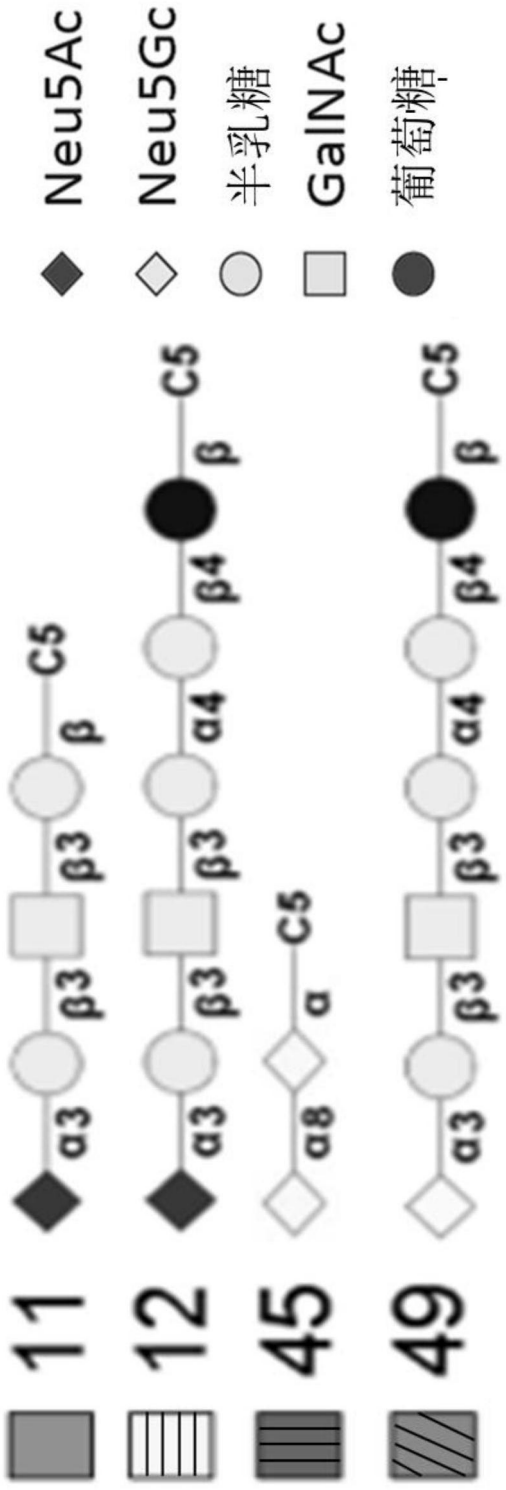


图18A

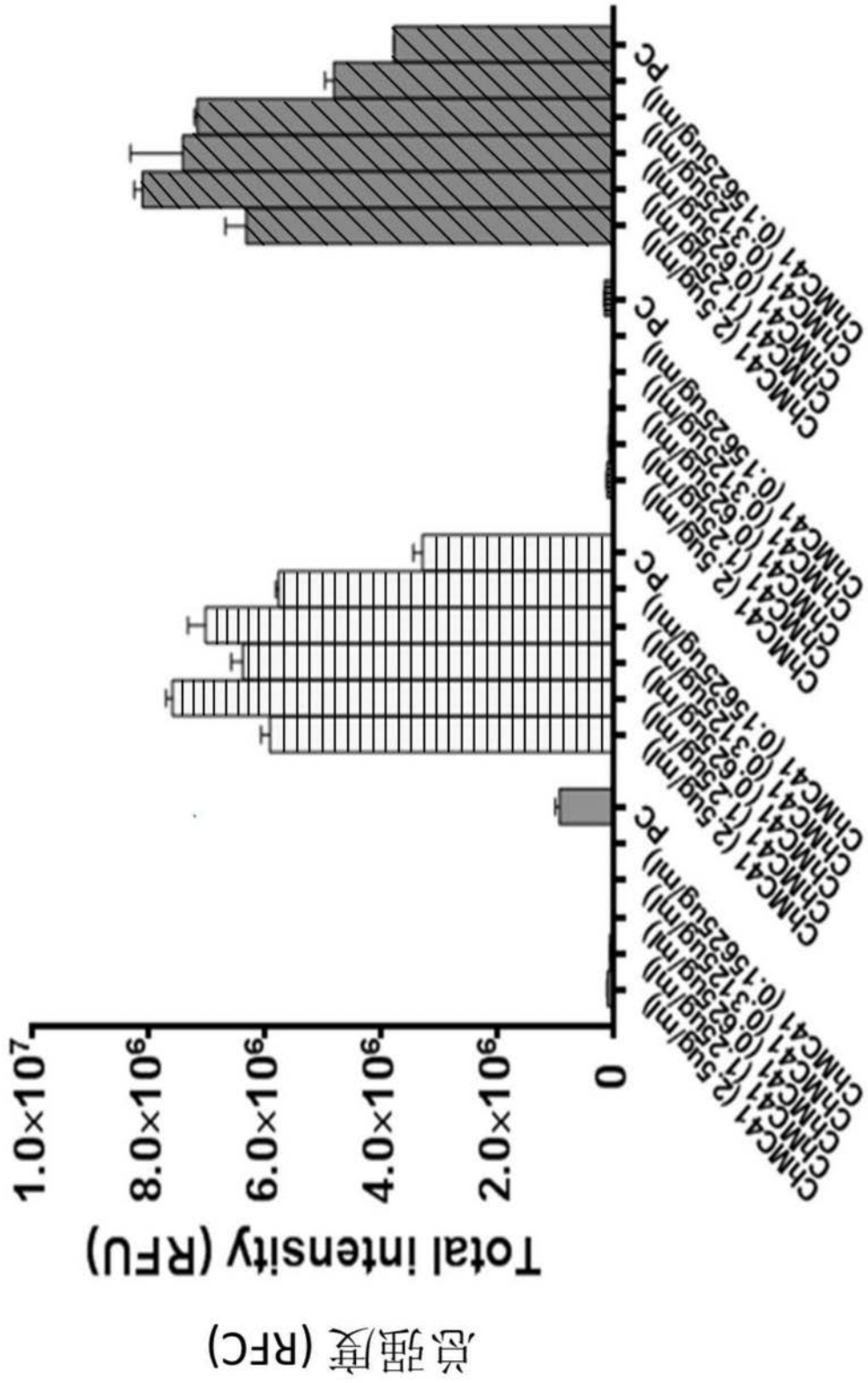

总强度 (RFC)
Total intensity (RFU)
1.0×10⁷
8.0×10⁶
6.0×10⁶
4.0×10⁶
2.0×10⁶
0
PC
ChMC47 (2.5ug/ml)
ChMC47 (1.25ug/ml)
ChMC47 (0.625ug/ml)
ChMC47 (0.3125ug/ml)
ChMC47 (0.15625ug/ml)

图18B



图19A

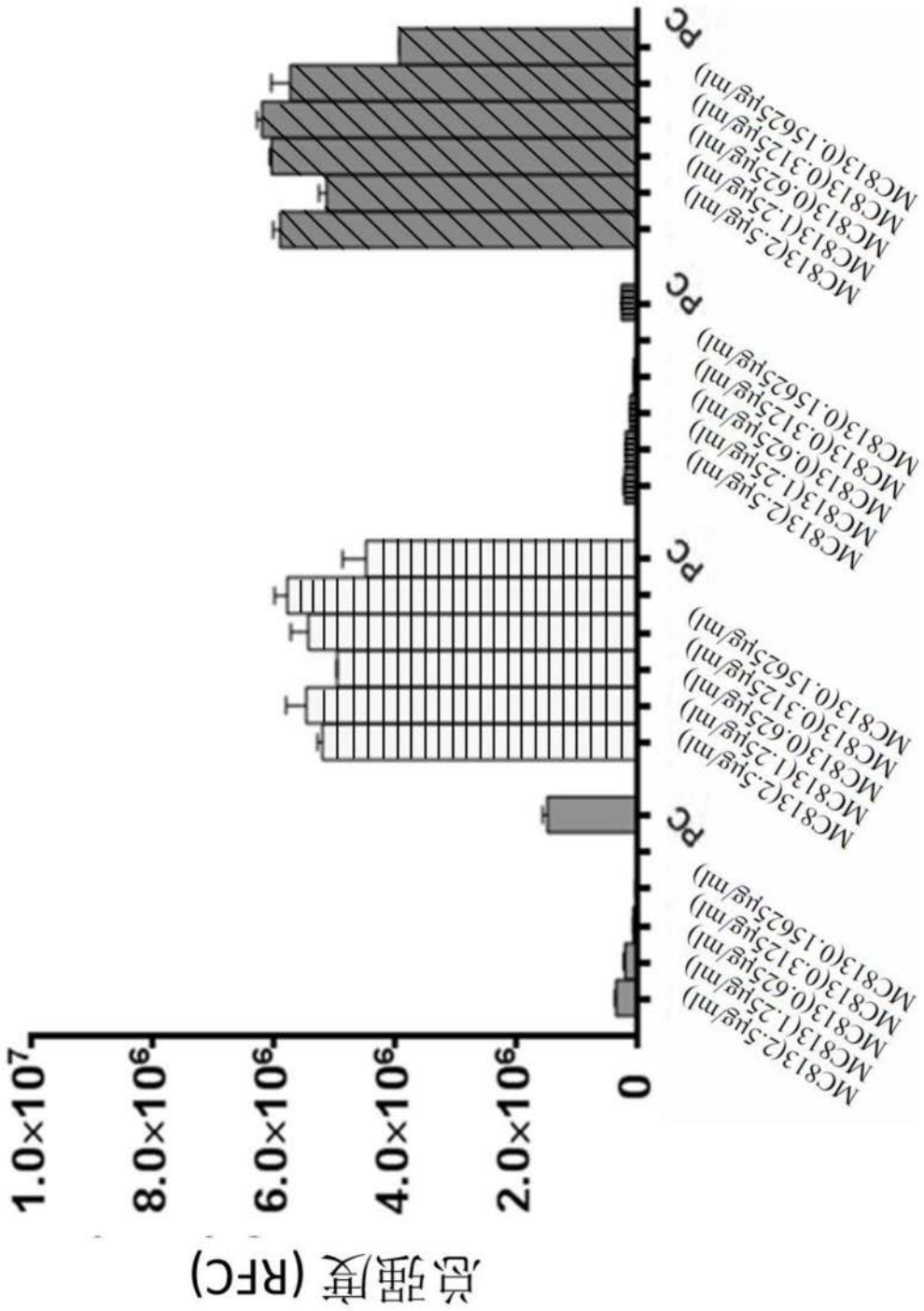

总强度 (RFC)
1.0×10⁷
8.0×10⁶
6.0×10⁶
4.0×10⁶
2.0×10⁶
0
PC
MC813(2.5μg/ml)
MC813(1.25μg/ml)
MC813(0.625μg/ml)
MC813(0.3125μg/ml)
MC813(0.15625μg/ml)

图19B

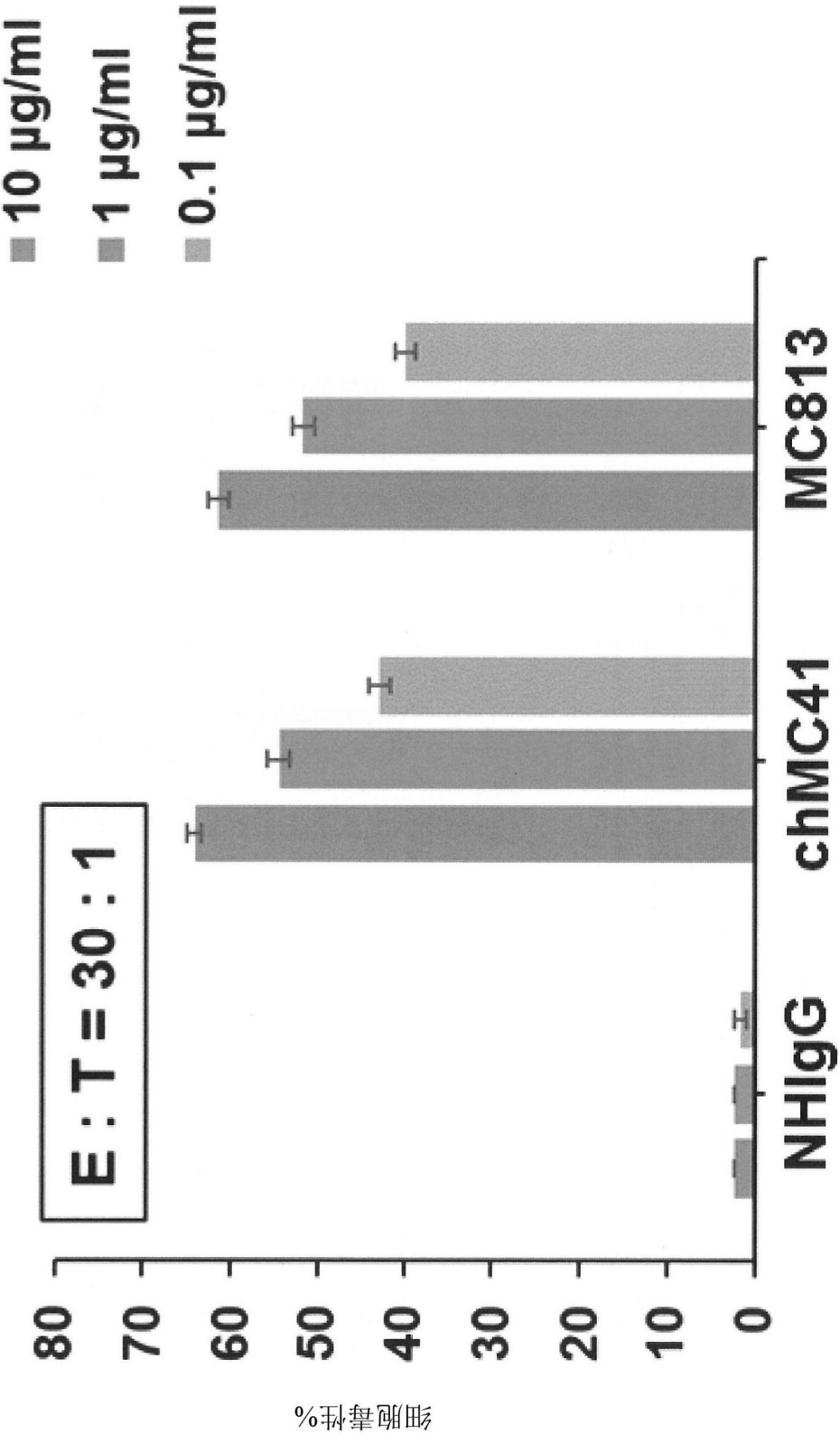

10 μg/ml
1 μg/ml
0.1 μg/ml
E : T = 30 : 1
80
70
60
50
40
30
20
10
0
NHIgG
chMC41
MC813
细胞毒性%

图20A

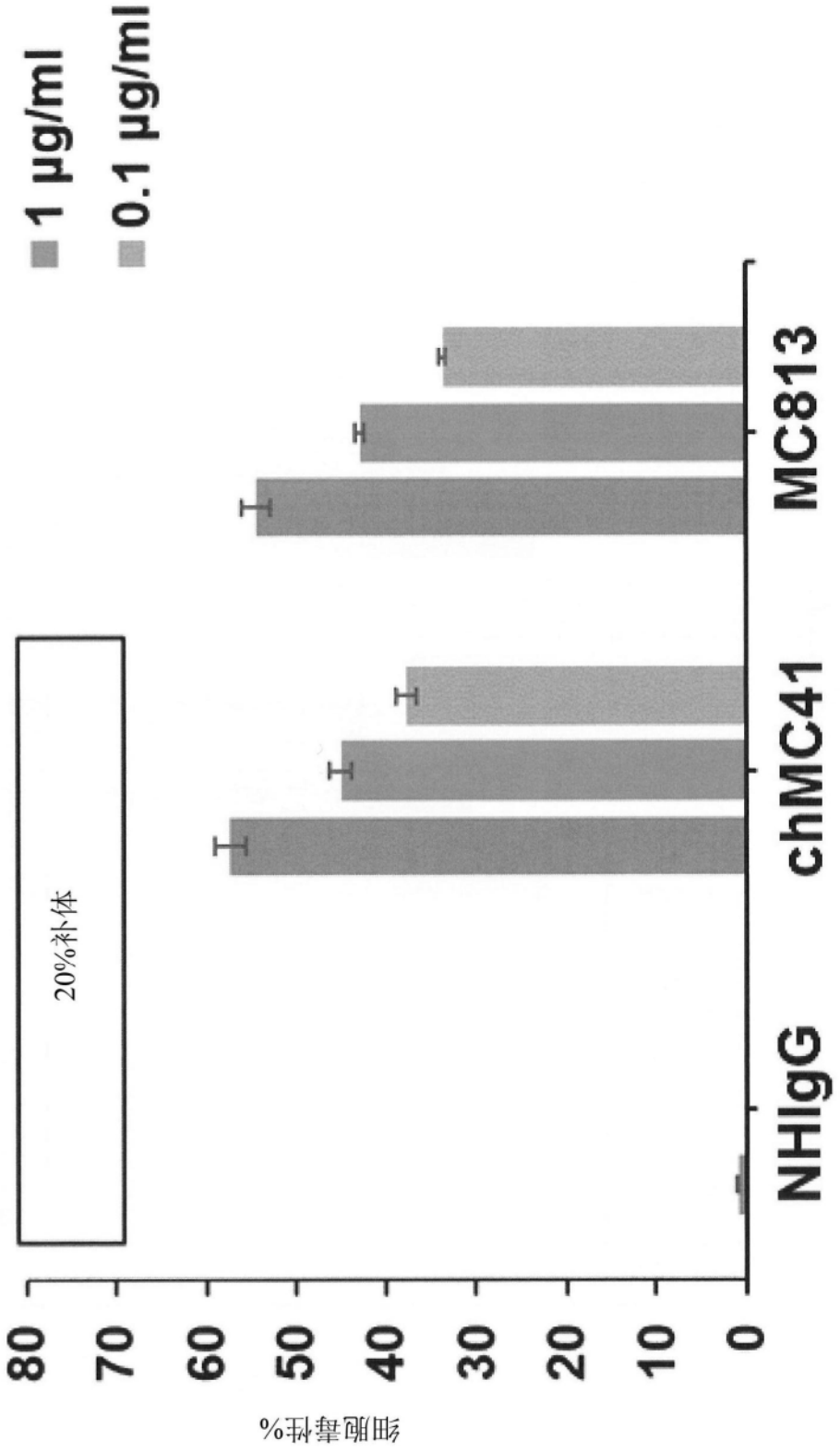

10 µg/ml
1 µg/ml
0.1 µg/ml
20%补体
NHIgG
chMC41
MC813
细胞毒性%
0
10
20
30
40
50
60
70
80

图20B

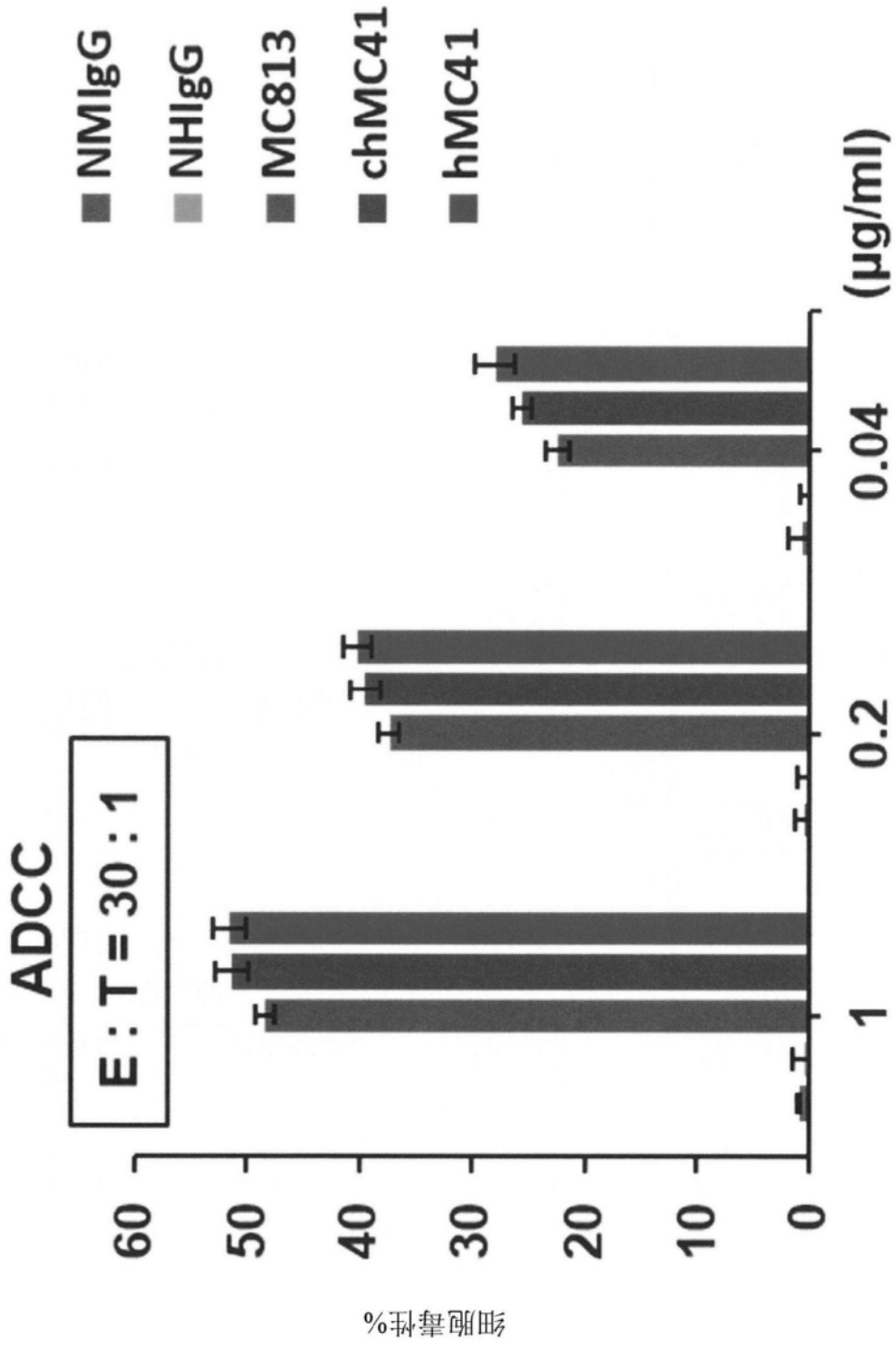

NMIgG
NHIgG
MC813
chMC41
hMC41
ADCC
E : T = 30 : 1
细胞毒性%
60
50
40
30
20
10
0
1
0.2
0.04
(μg/ml)

图21A

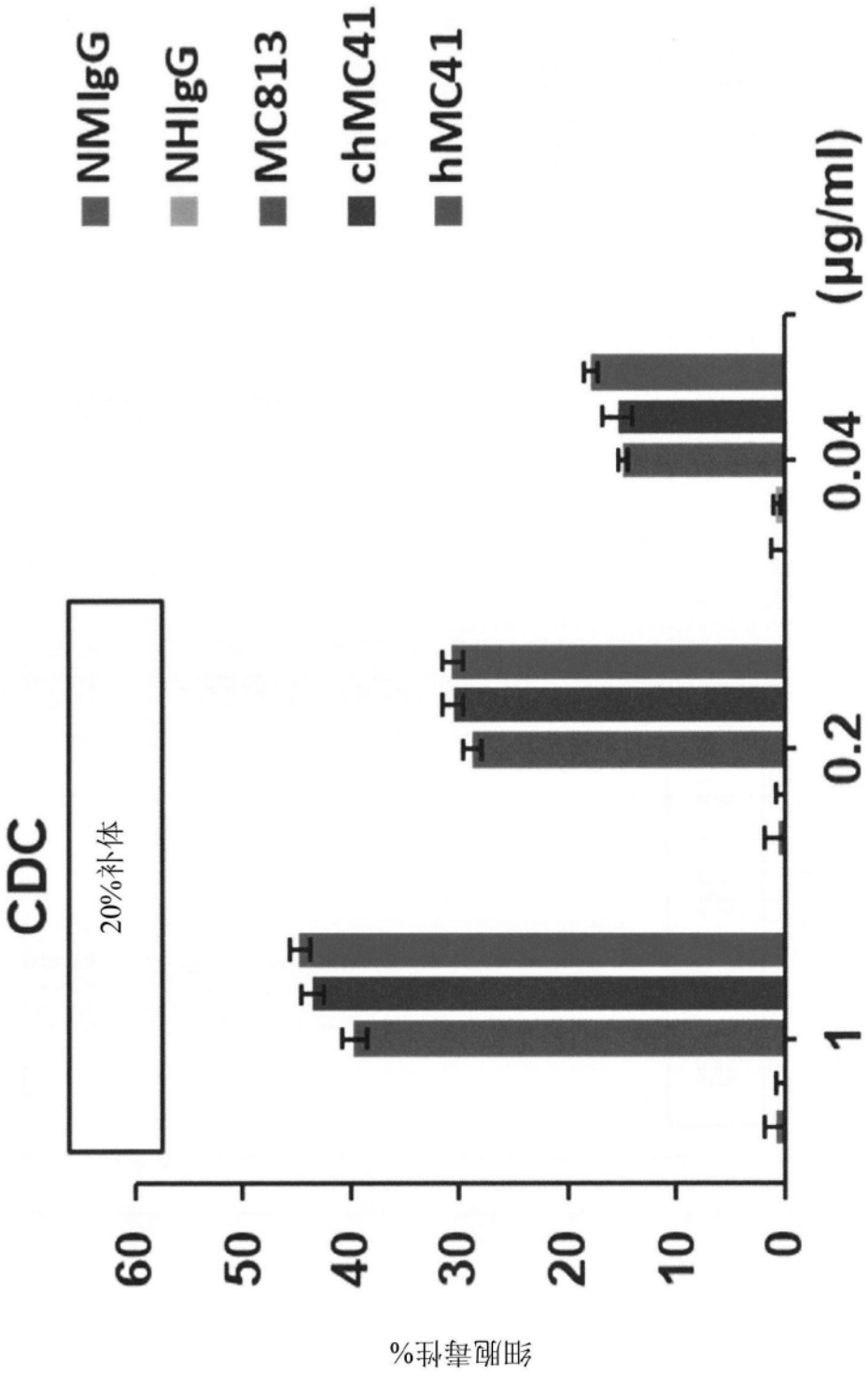

NMIgG
NHIgG
MC813
chMC41
hMC41
(μg/ml)
0.04
0.2
1
CDC
20%补体
0
10
20
30
40
50
60
细胞毒性%

图21B

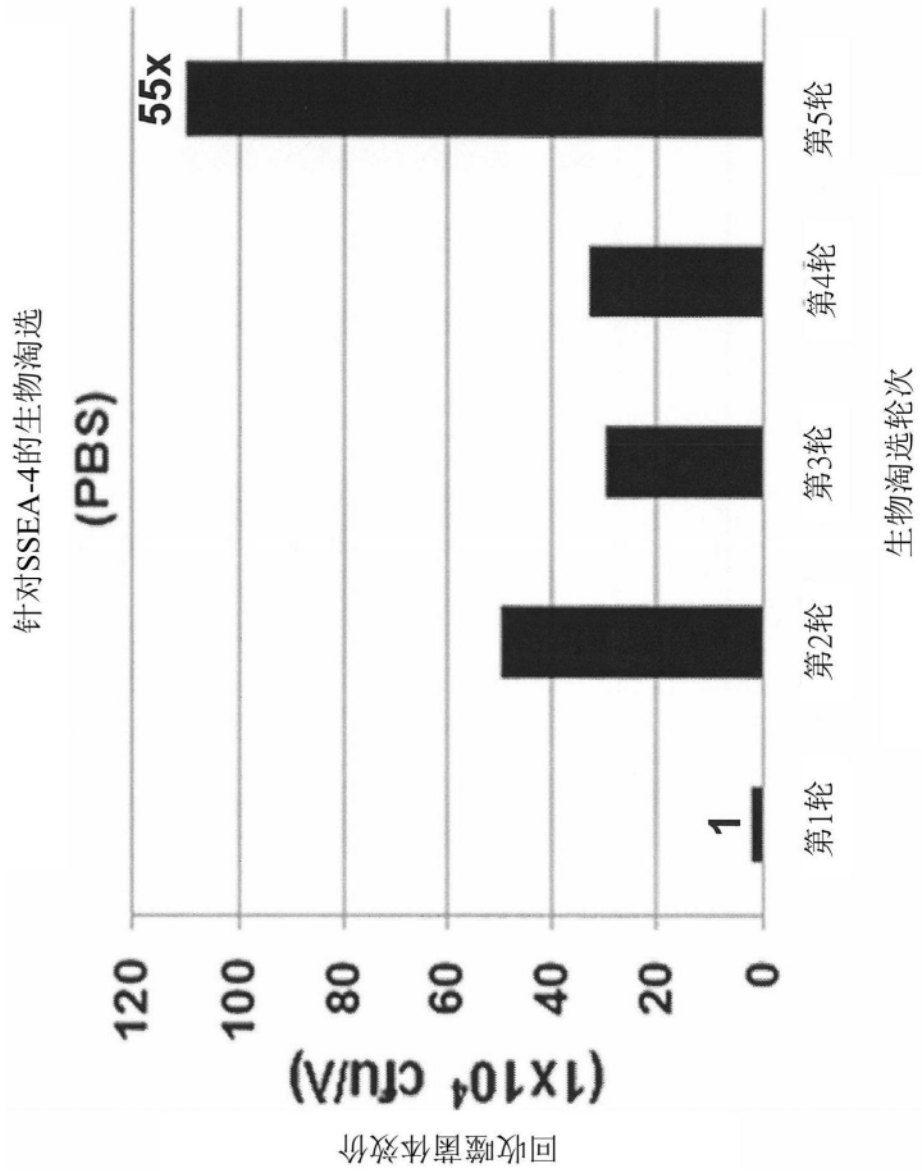

针对SSEA-4的生物淘选
(PBS)
55x
1
回收噬菌体效价
(1X10⁴ cfu/λ)
120
100
80
60
40
20
0
第1轮
第2轮
第3轮
第4轮
第5轮
生物淘选轮次

图22A

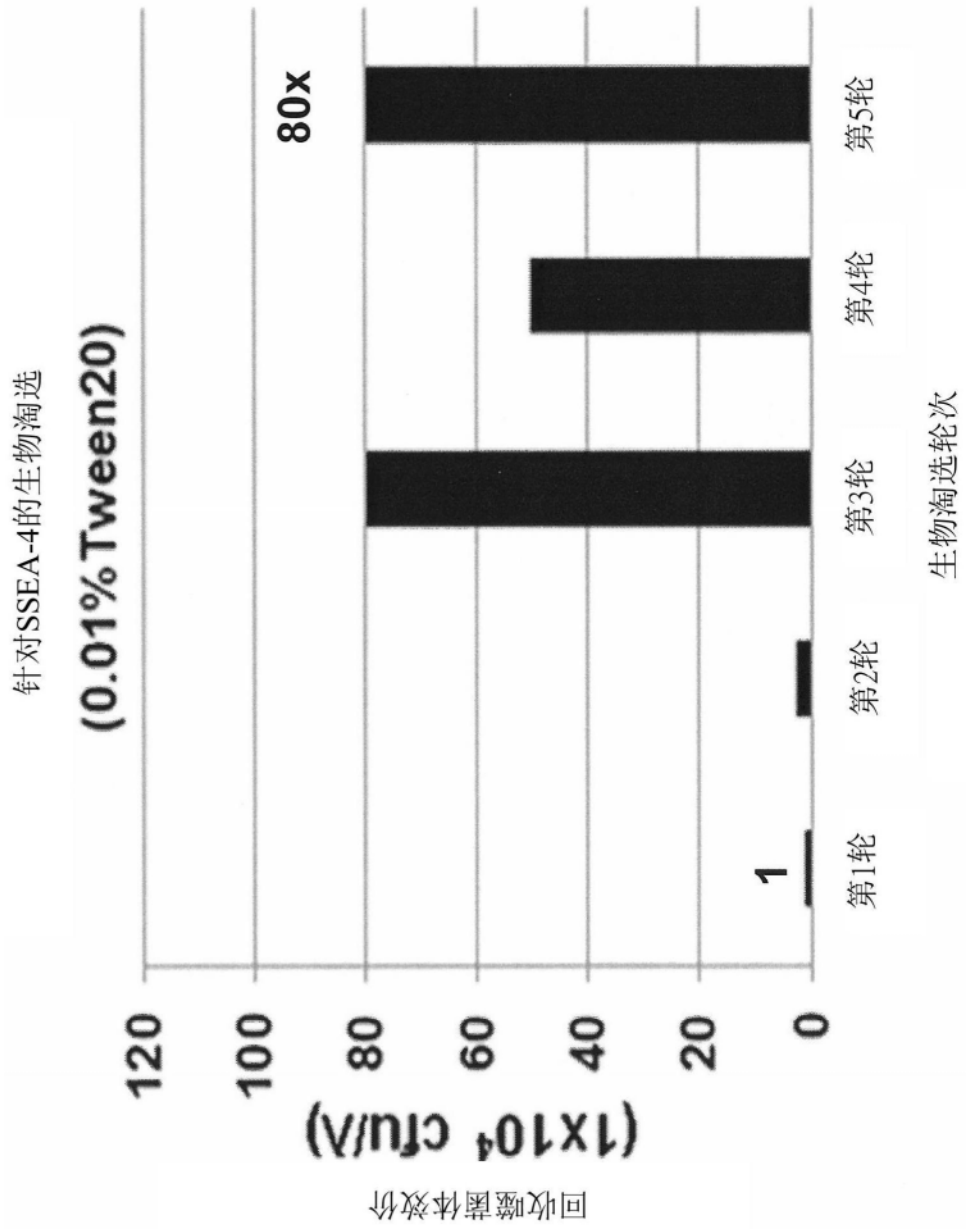

针对SSEA-4的生物淘选
(0.01% Tween20)
回收噬菌体效价
(1X10⁴ cfu/λ)
120
100
80
60
40
20
0
80x
1
第1轮
第2轮
第3轮
第4轮
第5轮
生物淘选轮次

图22B

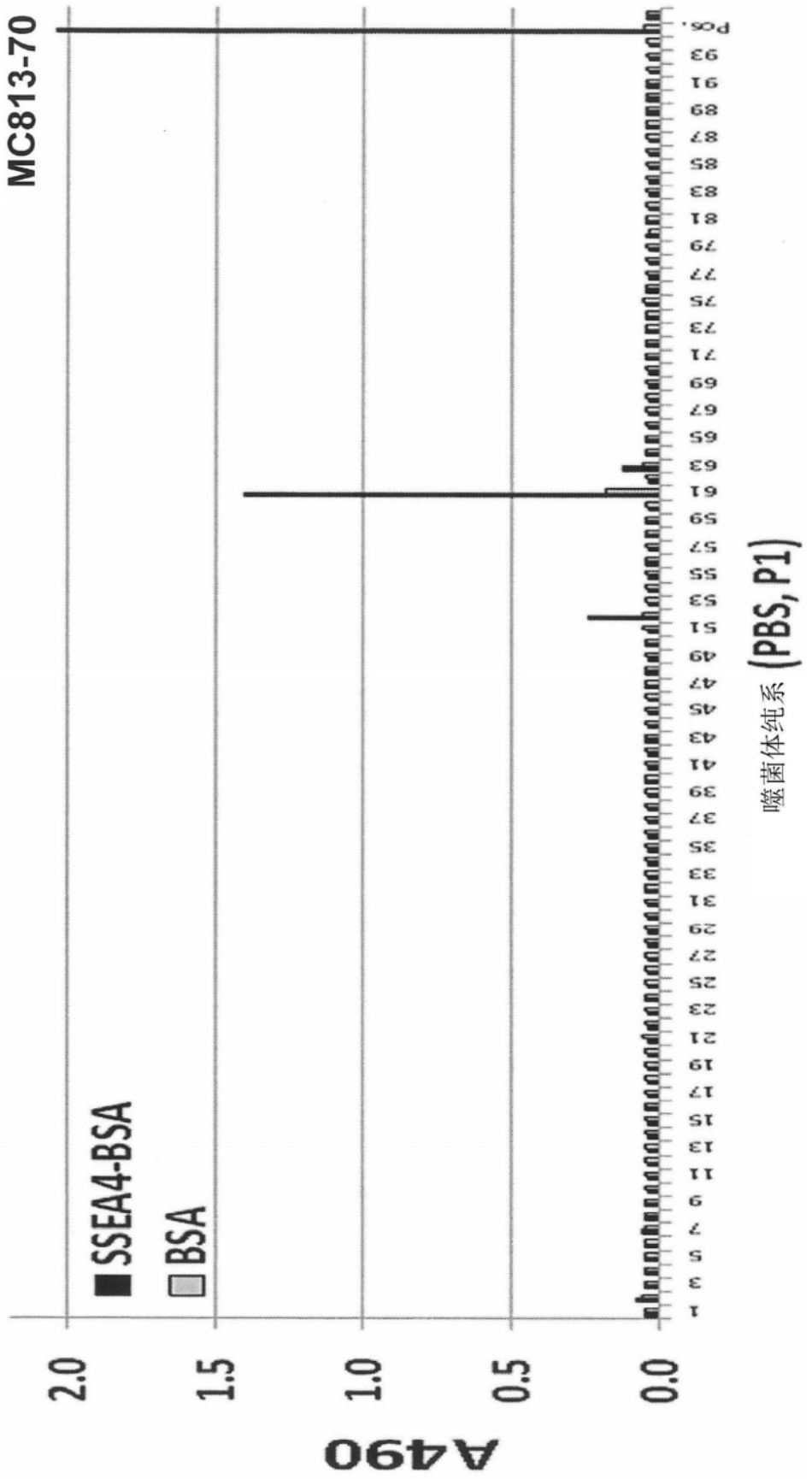


图23A

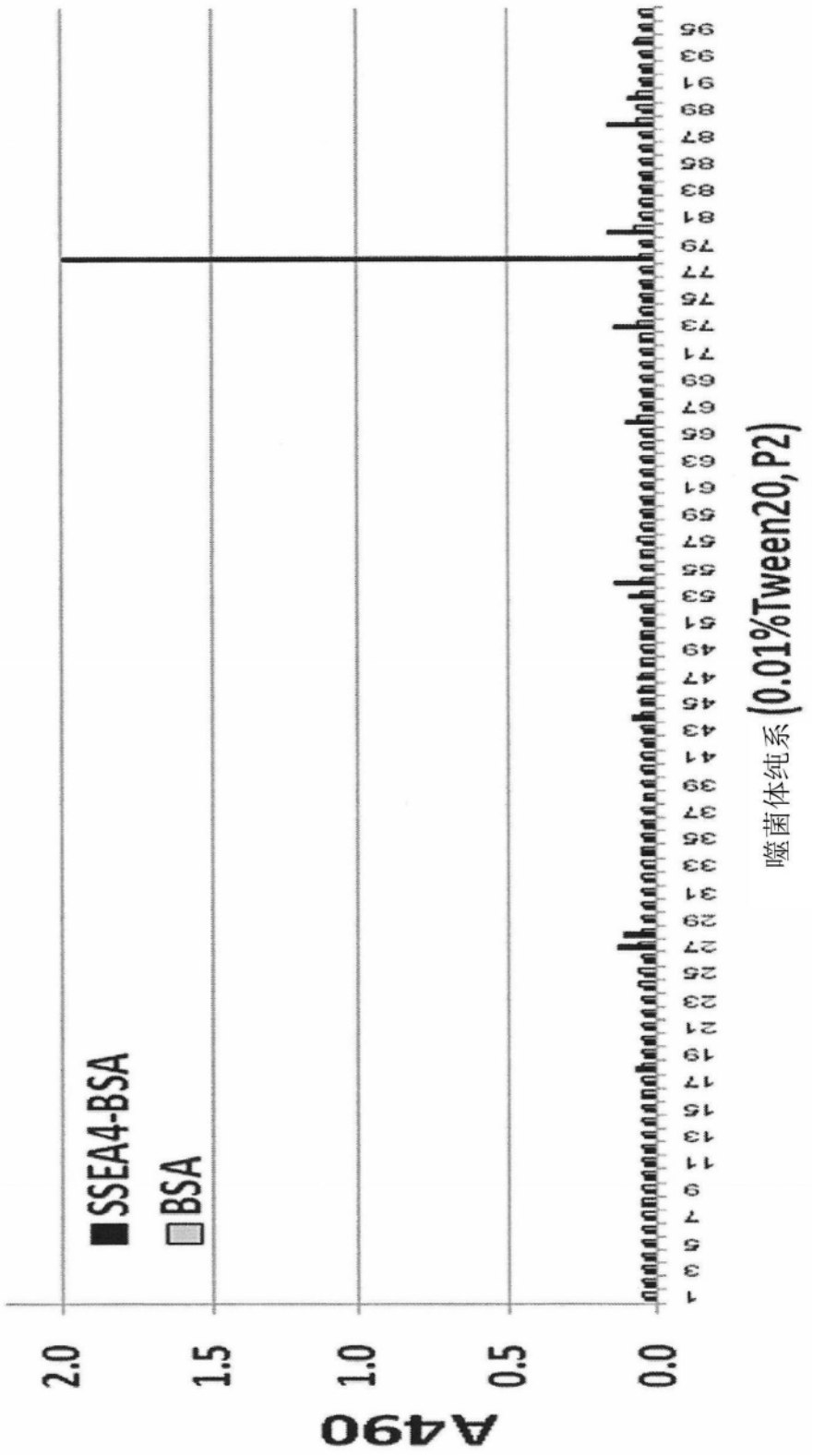


图23B

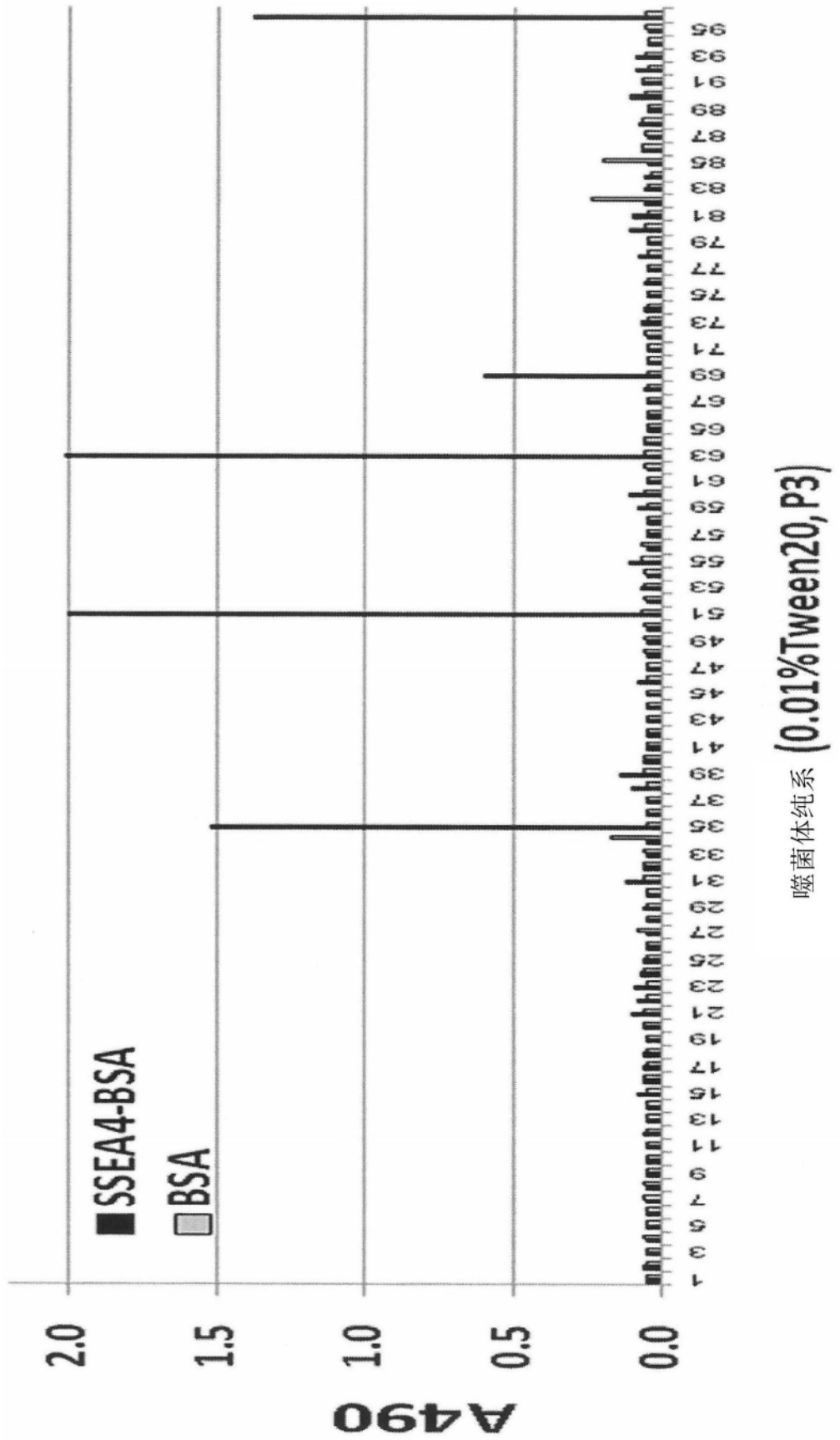


图23C

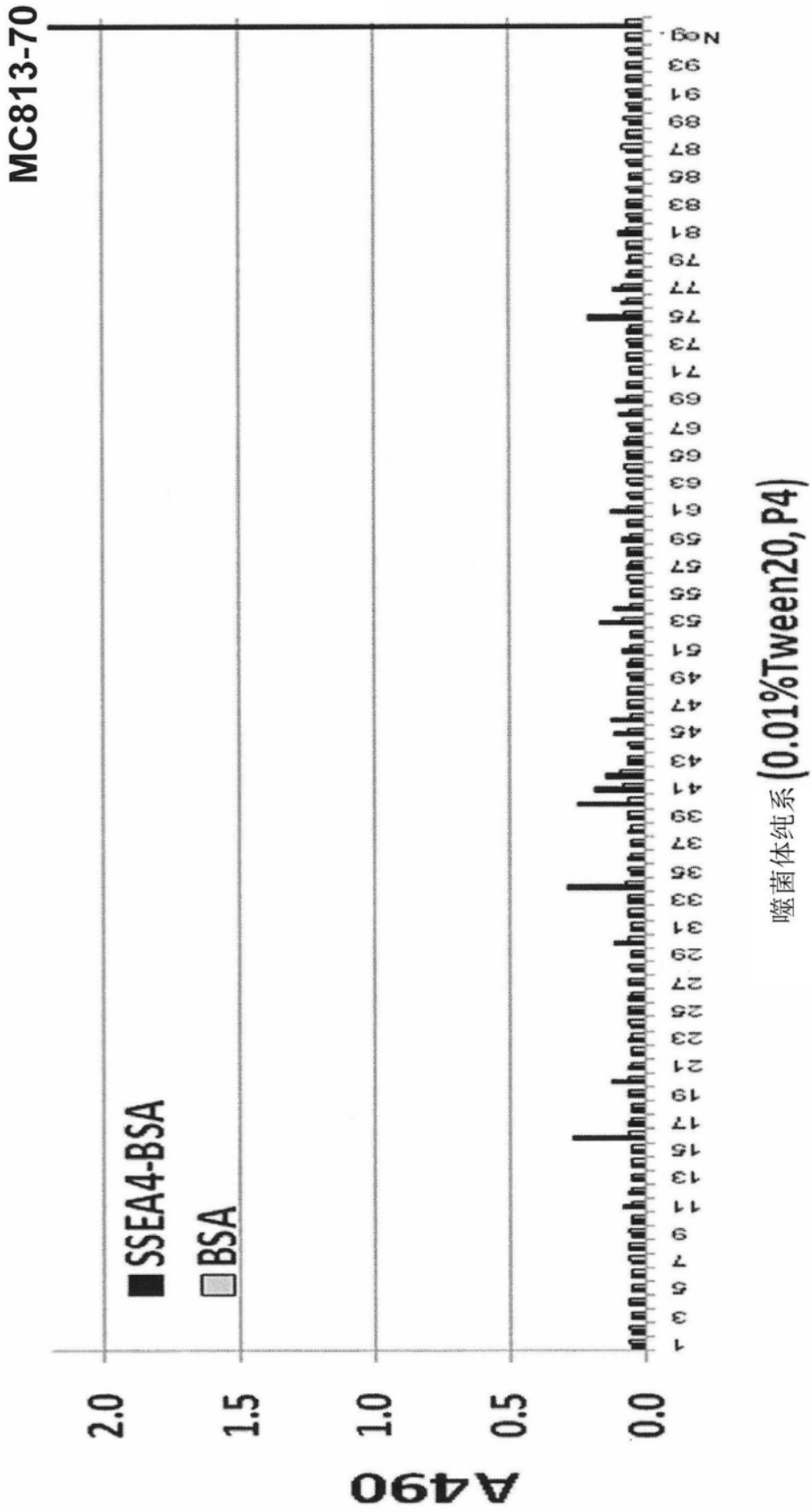


图23D

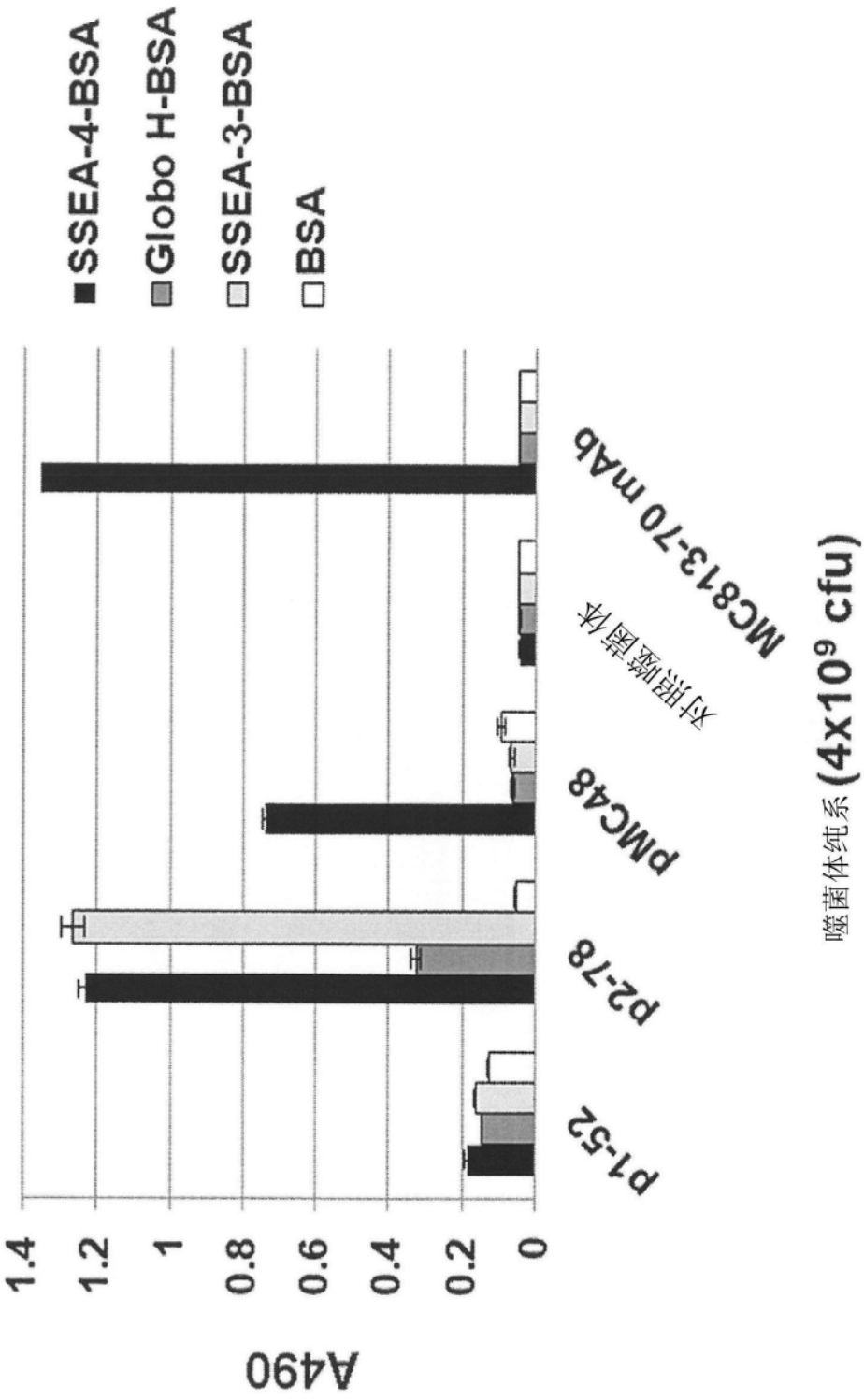

SSEA-4-BSA
Globo H-BSA
SSEA-3-BSA
BSA
A490
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
P1-52
P2-78
PMC48
对照噬菌体
MC813-70 mAb
噬菌体纯系 (4x10^9 cfu)

图24

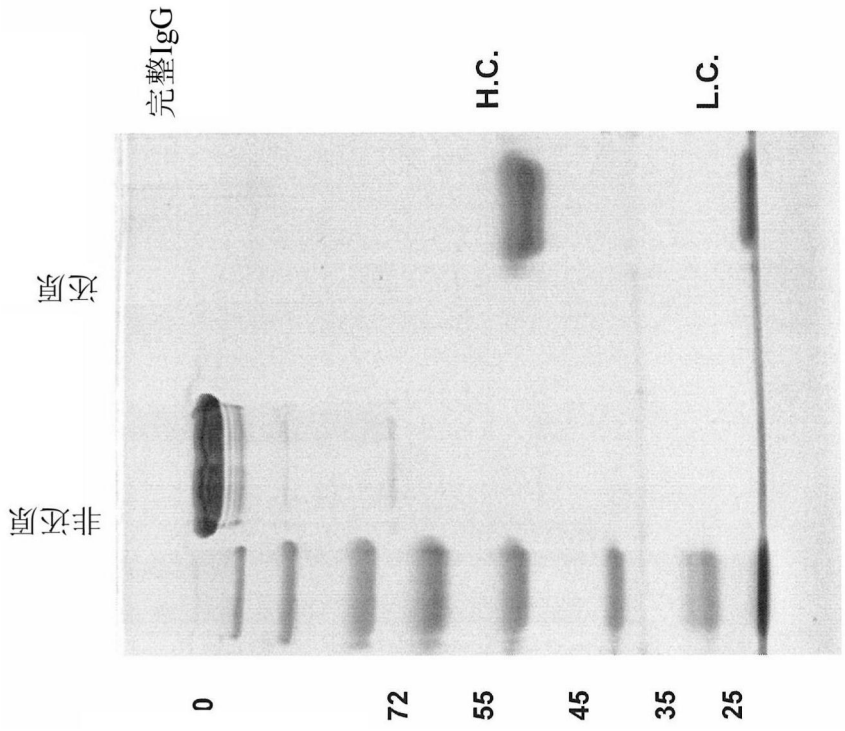


图25A

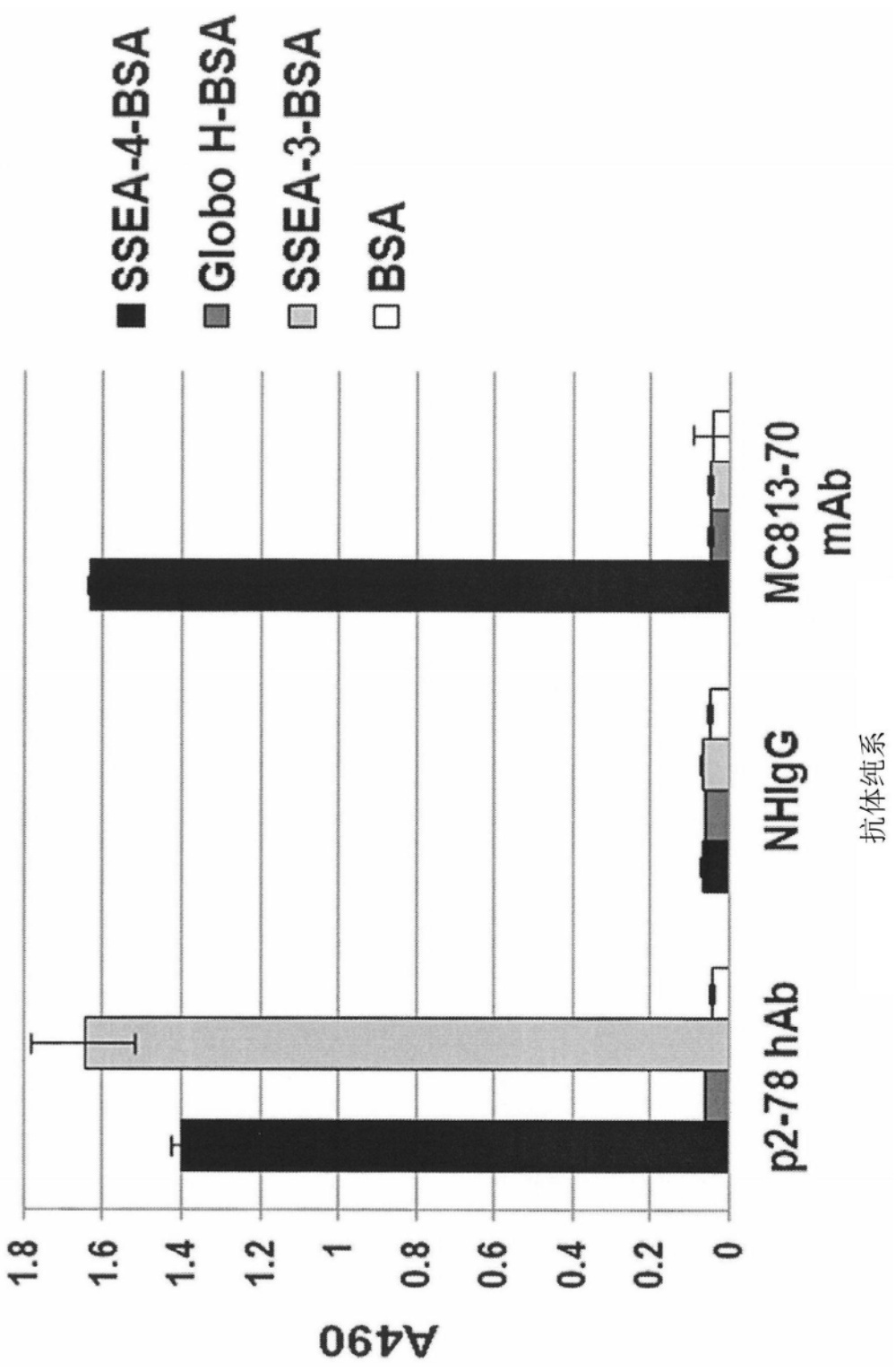

SSEA-4-BSA
Globo H-BSA
SSEA-3-BSA
BSA
A490
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
p2-78 hAb
NHIgG
MC813-70 mAb
抗体纯系

图25B

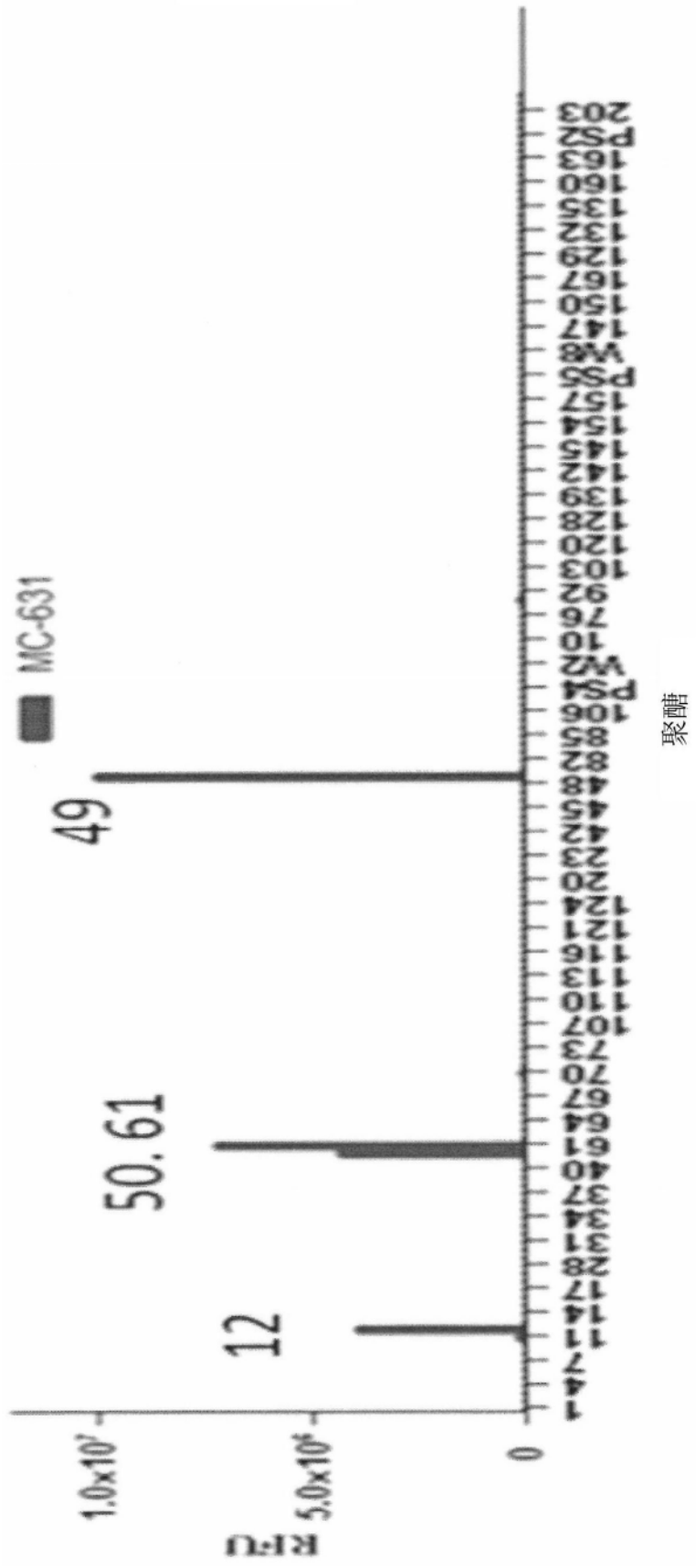

MC-631
49
50.61
12
1.0x10⁷
5.0x10⁶
0
RFU
聚醣
147
114
117
128
133
134
137
140
146
167
170
173
107
110
113
116
119
122
124
120
123
125
144
148
182
185
106
PS4
PV2
10
76
92
103
120
128
139
142
145
154
157
PS5
PV8
147
150
167
129
132
135
160
163
PS2
203

图26A

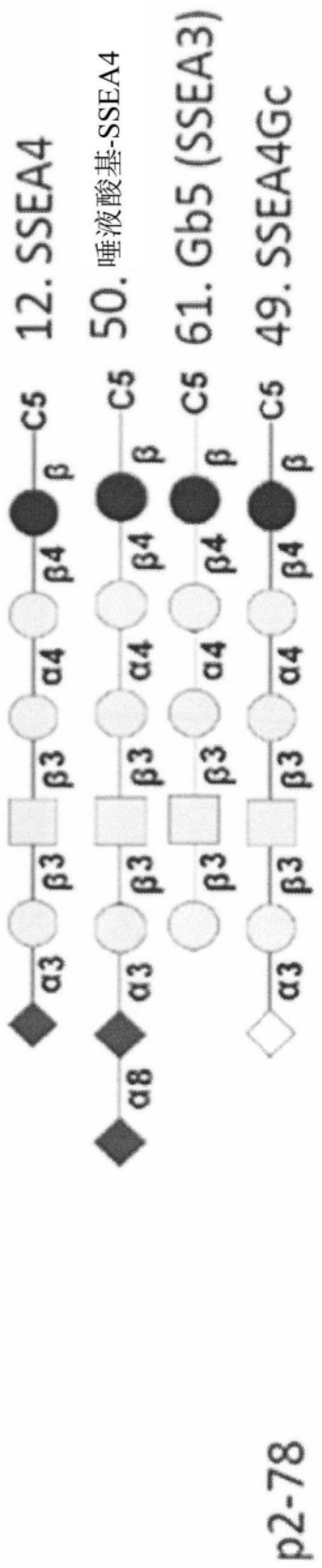

12. SSEA4
50. 唾液酸基-SSEA4
61. Gb5 (SSEA3)
49. SSEA4Gc
α3
α8
β3
α4
β4
β
C5
p2-78

图26B

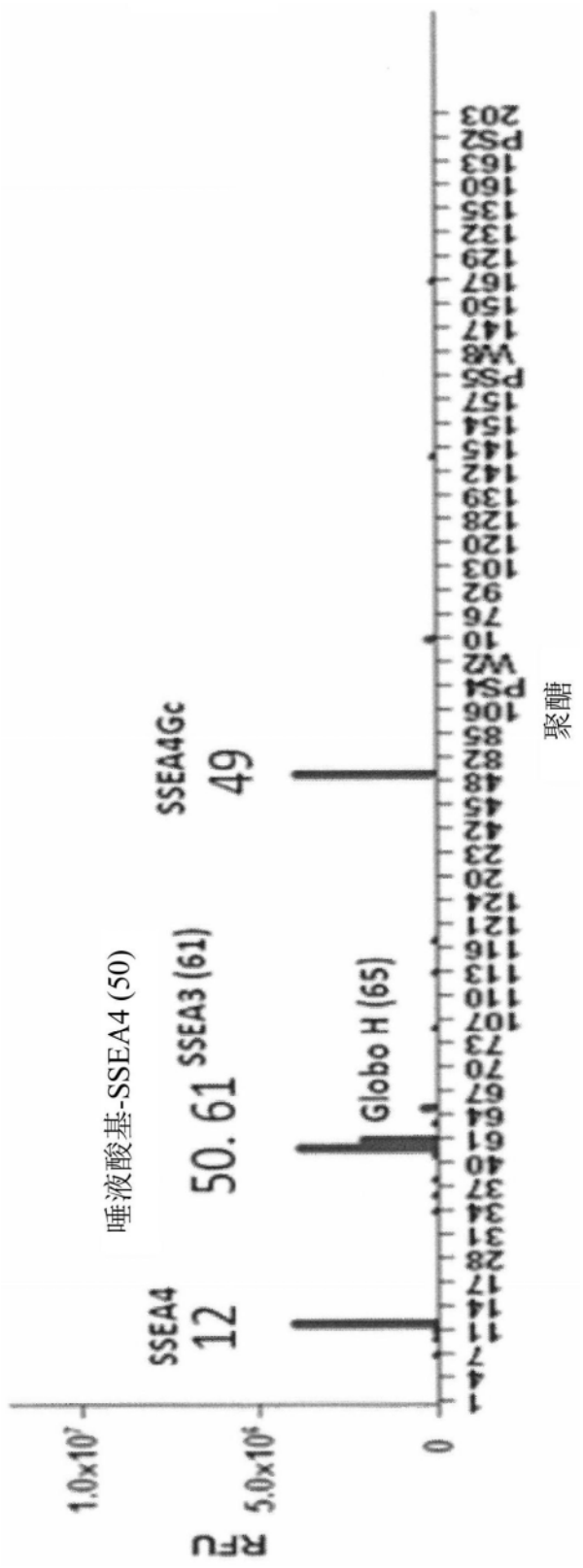

RFU
1.0x10⁷
5.0x10⁶
0
SSEA4
12
唾液酸基-SSEA4 (50)
50.61
SSEA3 (61)
Globo H (65)
SSEA4Gc
49
聚醣

图26C

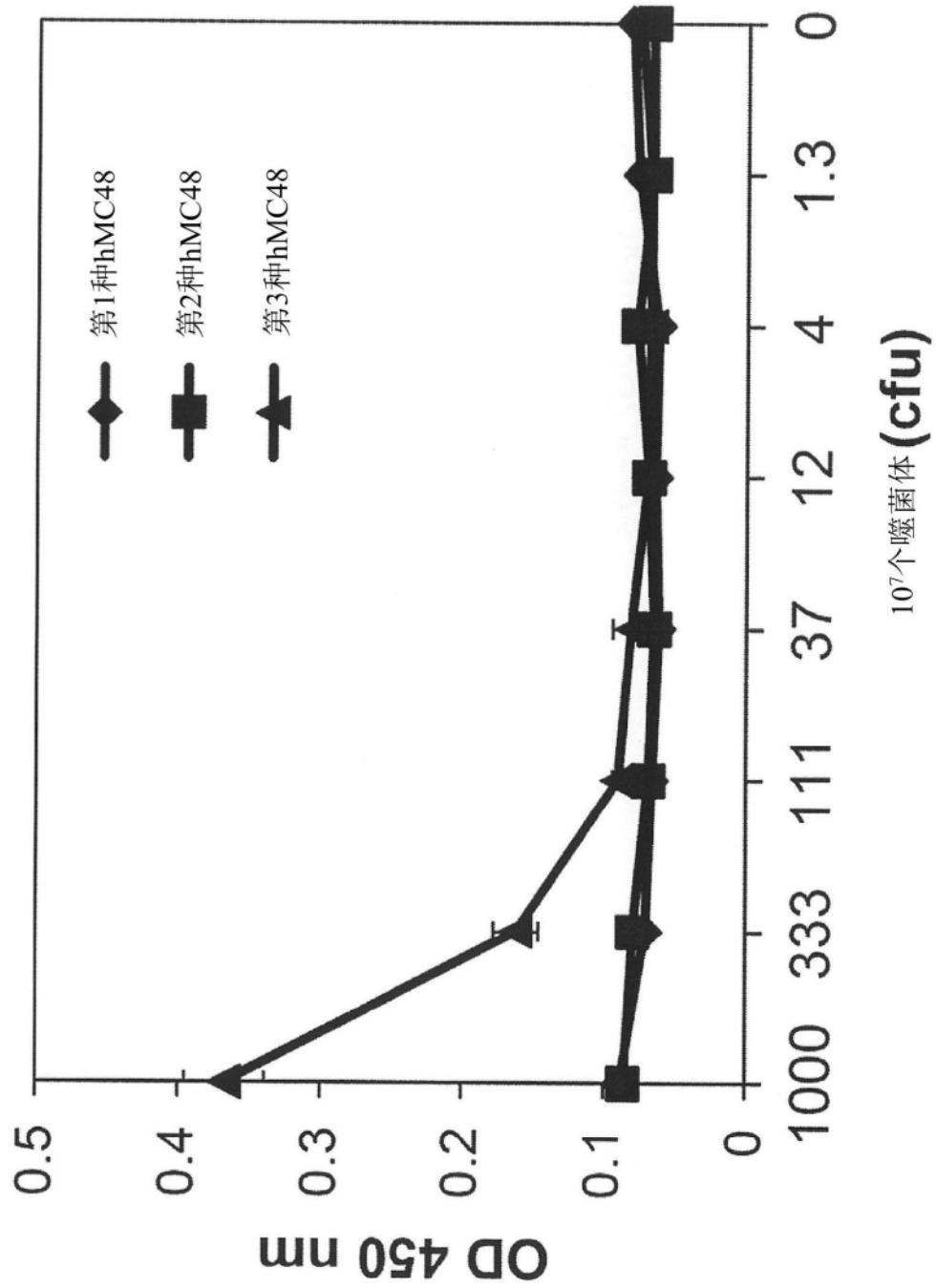

第1种hMC48
第2种hMC48
第3种hMC48
OD 450 nm
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1000
333
111
37
12
4
1.3
0
10^7个噬菌体(cfu)

图27A

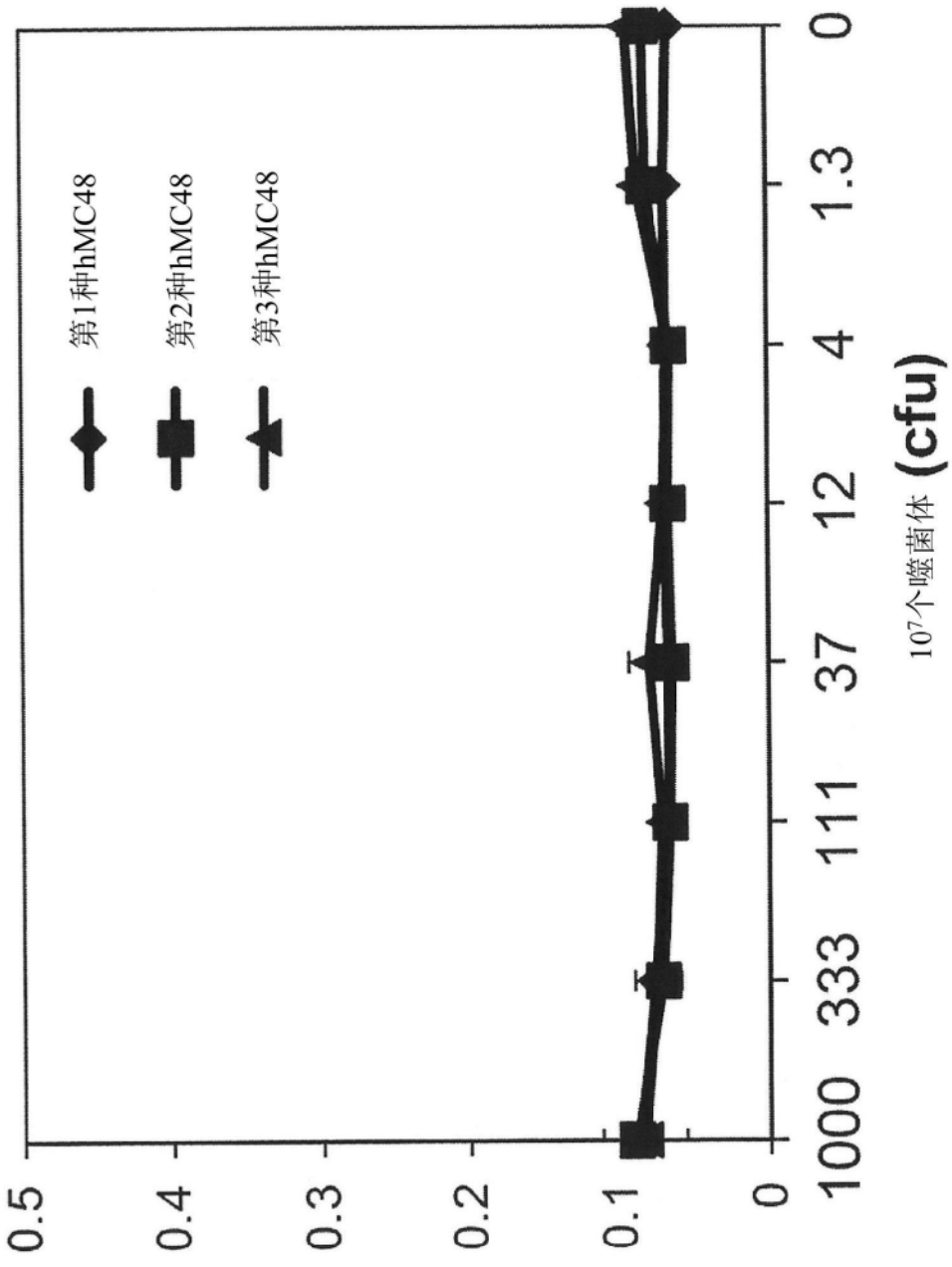

第1种hMC48
第2种hMC48
第3种hMC48
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1000
333
111
37
12
4
1.3
0
10^7个噬菌体 (cfu)

图27B

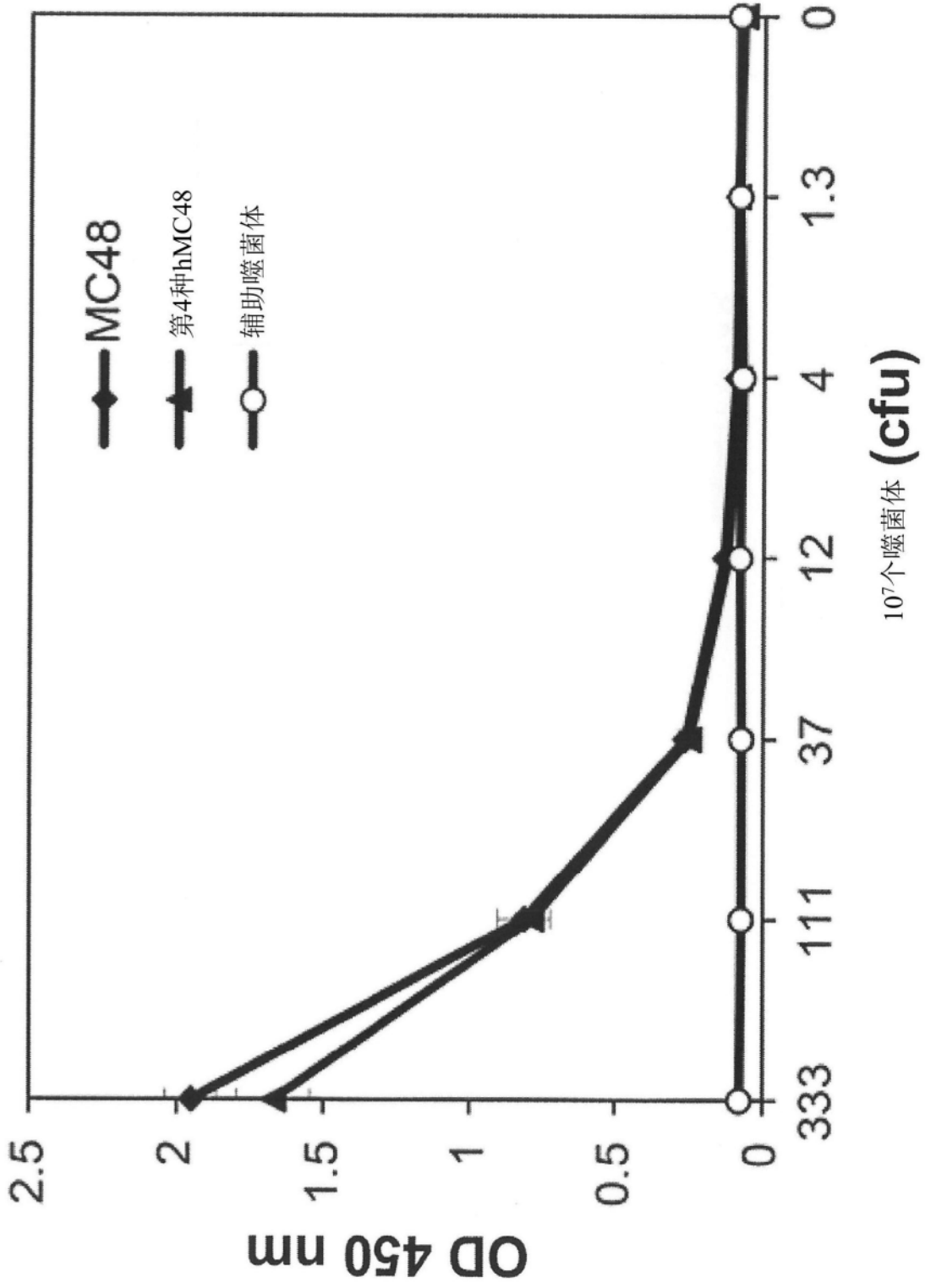

MC48
第4种hMC48
辅助噬菌体
OD 450 nm
2.5
2
1.5
1
0.5
0
333
111
37
12
4
1.3
0
10^7个噬菌体 (cfu)

图28A

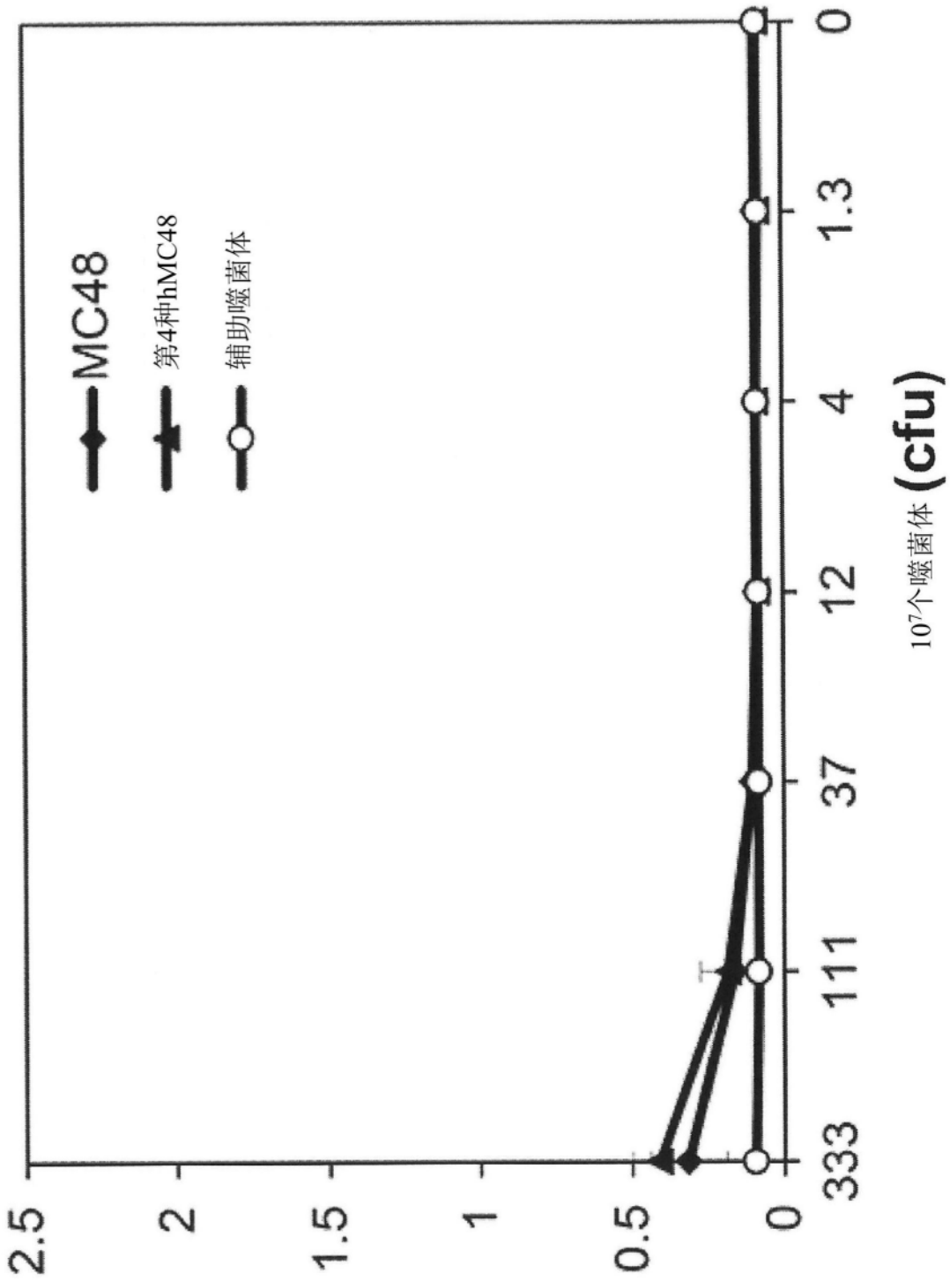

MC48
第4种hMC48
辅助噬菌体
2.5
2
1.5
1
0.5
0
333
111
37
12
4
1.3
0
10^7个噬菌体 (cfu)

图28B

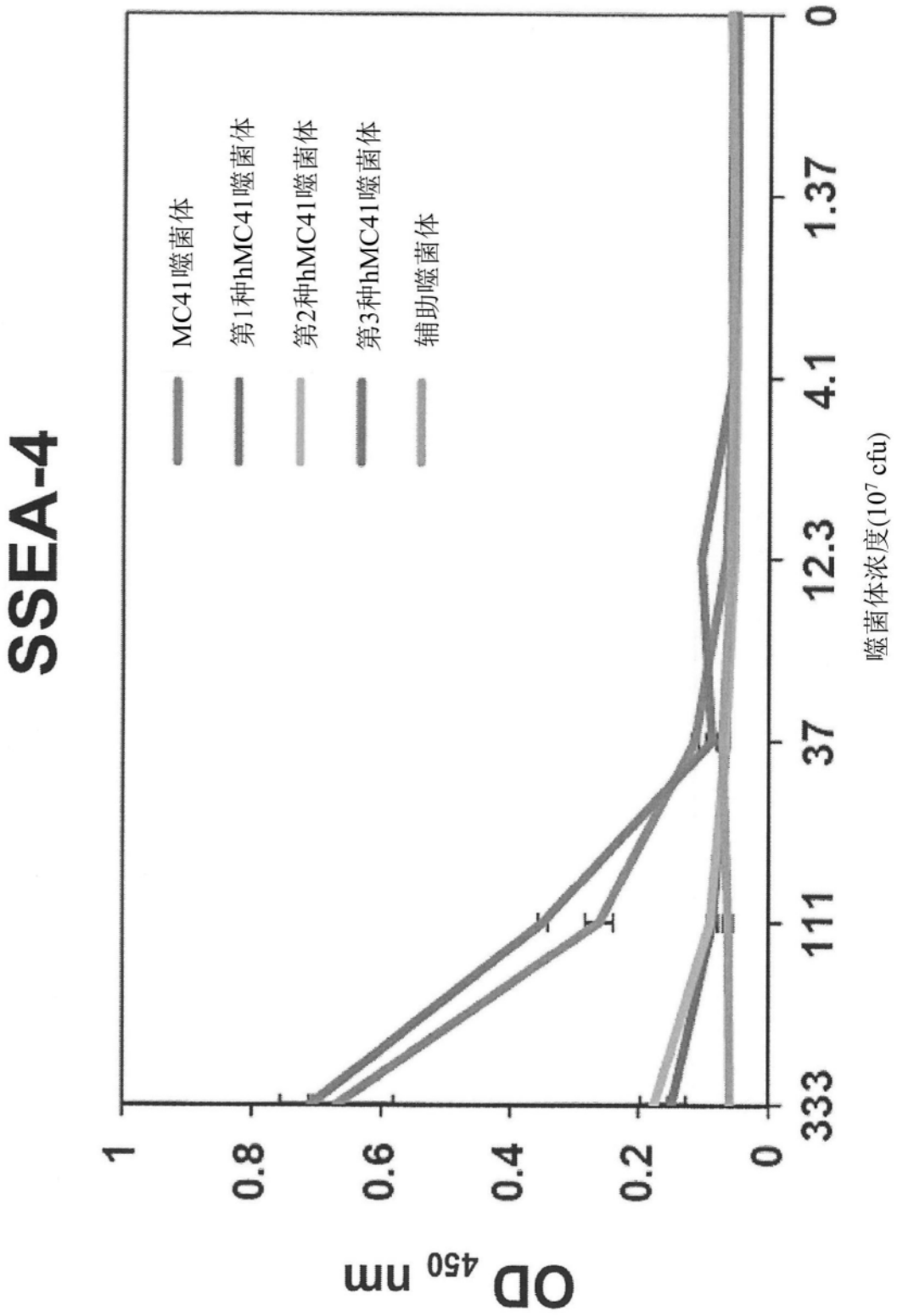

SSEA-4
MC41噬菌体
第1种hMC41噬菌体
第2种hMC41噬菌体
第3种hMC41噬菌体
辅助噬菌体
OD 450 nm
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
333
111
37
12.3
4.1
1.37
0
噬菌体浓度(10^7 cfu)

图29A

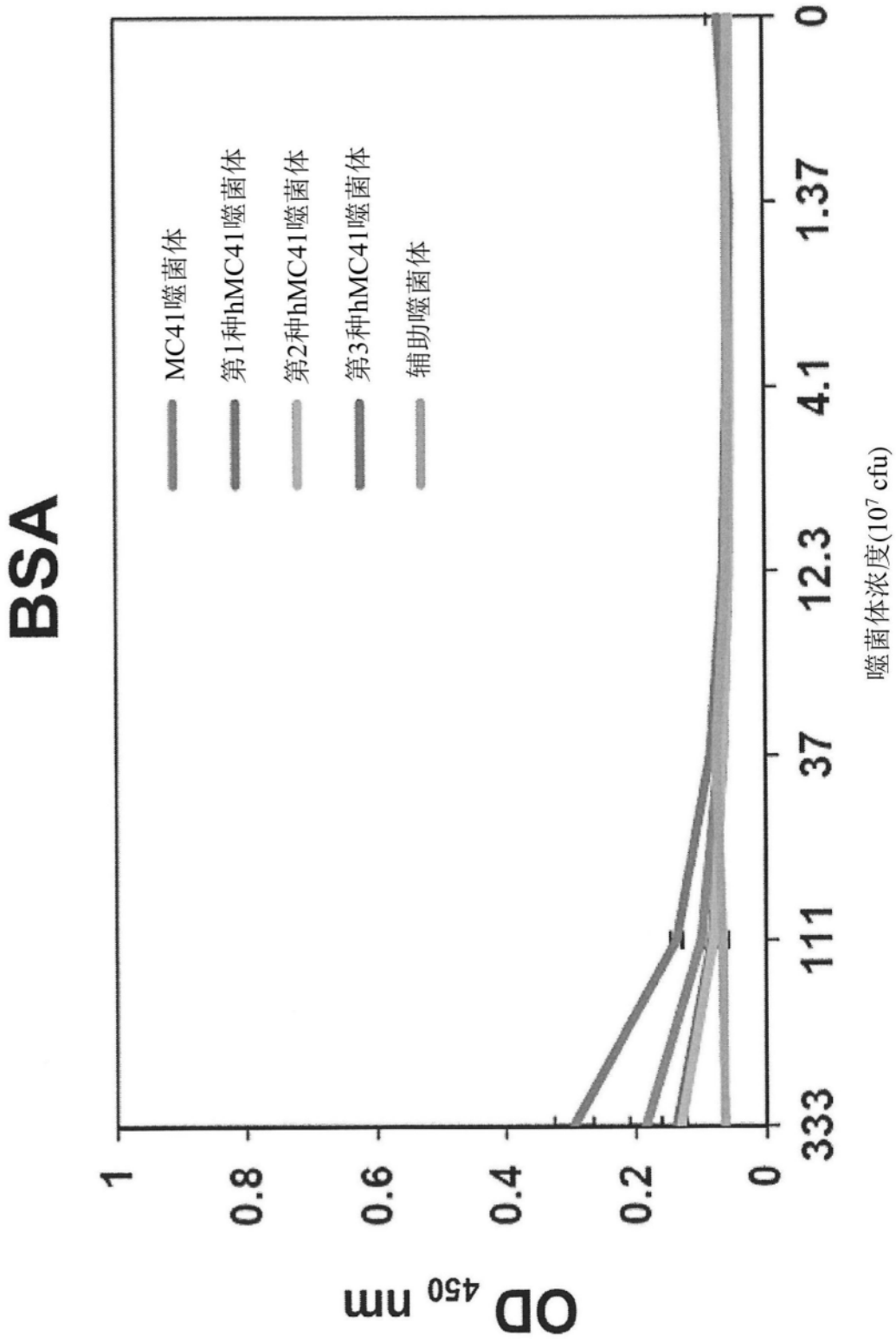

BSA
MC41噬菌体
第1种hMC41噬菌体
第2种hMC41噬菌体
第3种hMC41噬菌体
辅助噬菌体
OD 450 nm
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
333
111
37
12.3
4.1
1.37
0
噬菌体浓度(10^7 cfu)

图29B

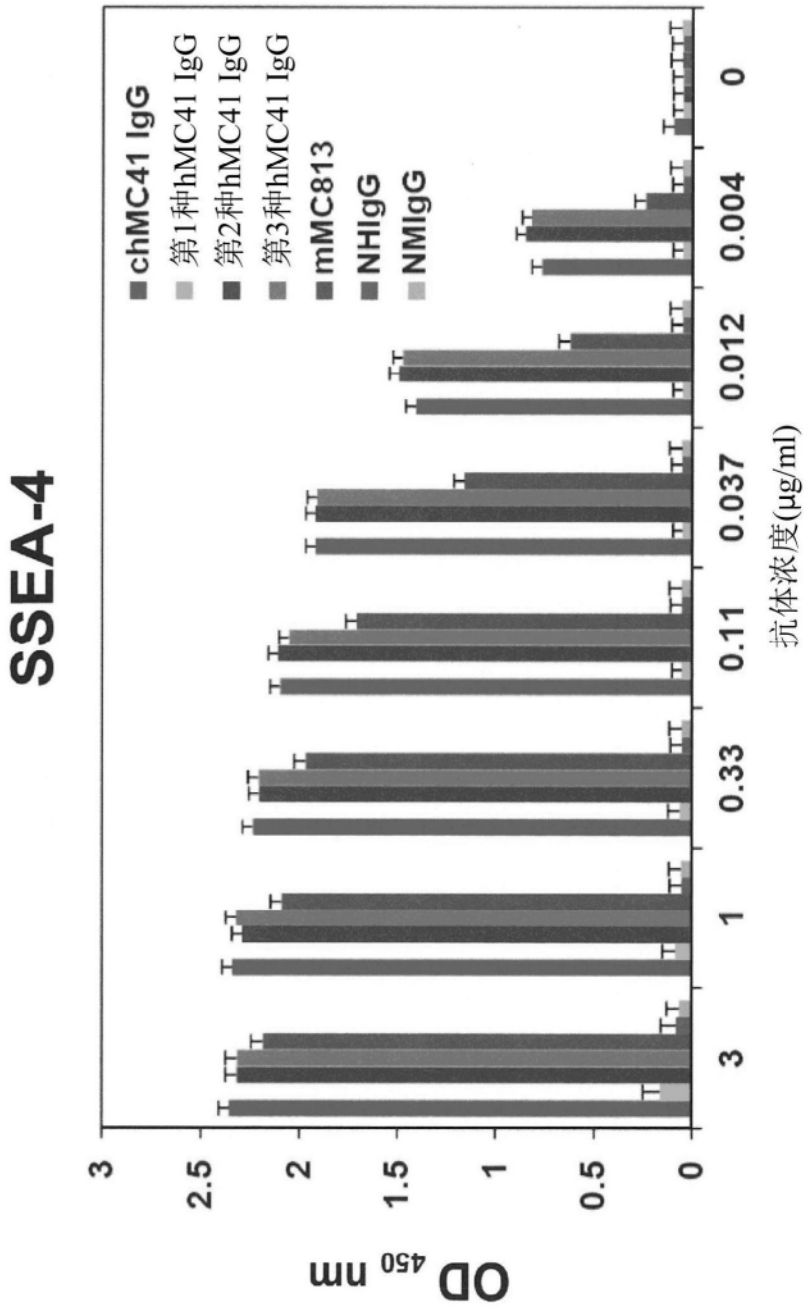

SSEA-4
chMC41 IgG
第1种hMC41 IgG
第2种hMC41 IgG
第3种hMC41 IgG
mMC813
NHIgG
NMIgG
OD 450 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
3
1
0.33
0.11
0.037
0.012
0.004
0
抗体浓度(μg/ml)

图30A

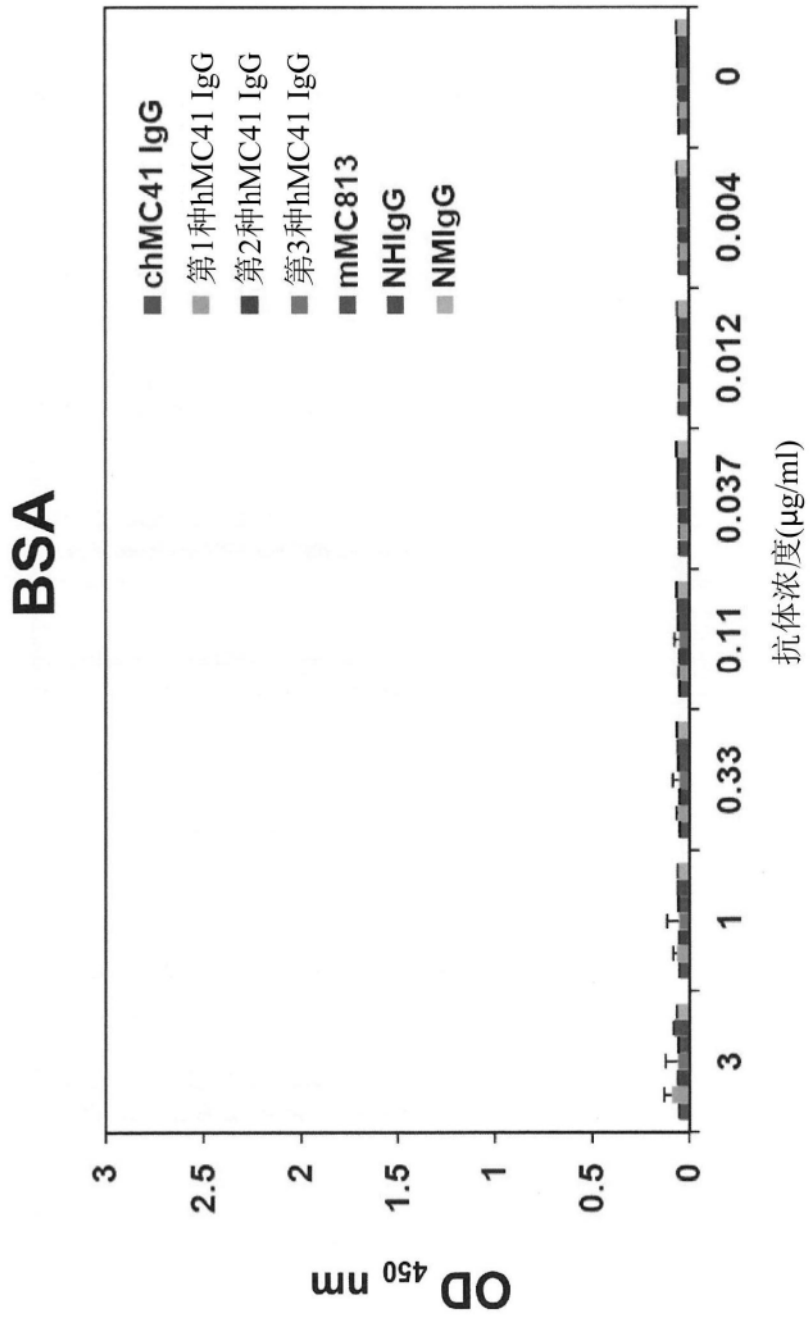

BSA
chMC41 IgG
第1种hMC41 IgG
第2种hMC41 IgG
第3种hMC41 IgG
mMC813
NHIgG
NMIgG
OD 450 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
3
1
0.33
0.11
0.037
0.012
0.004
0
抗体浓度(μg/ml)

图30B

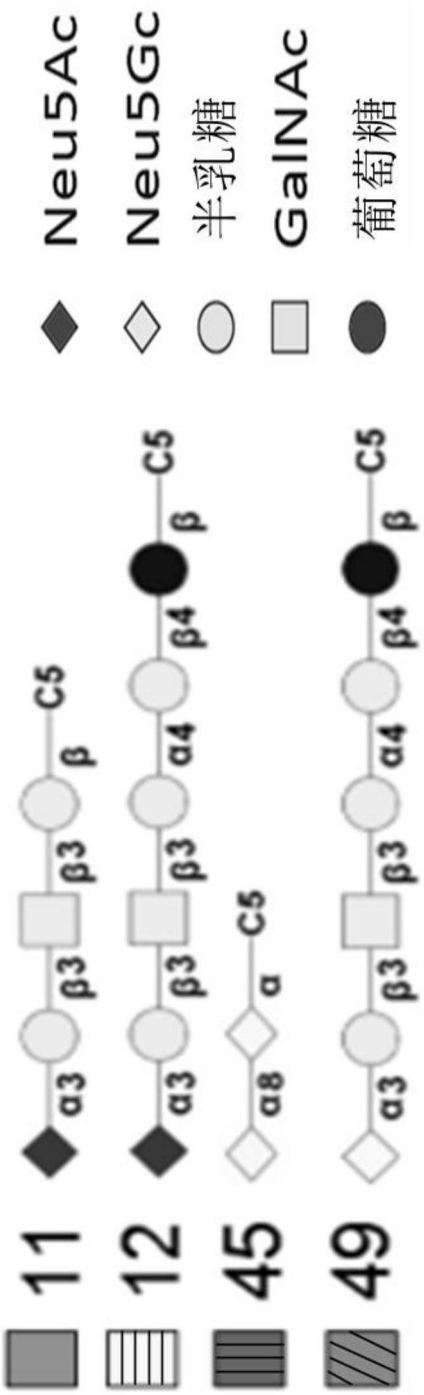


图31A

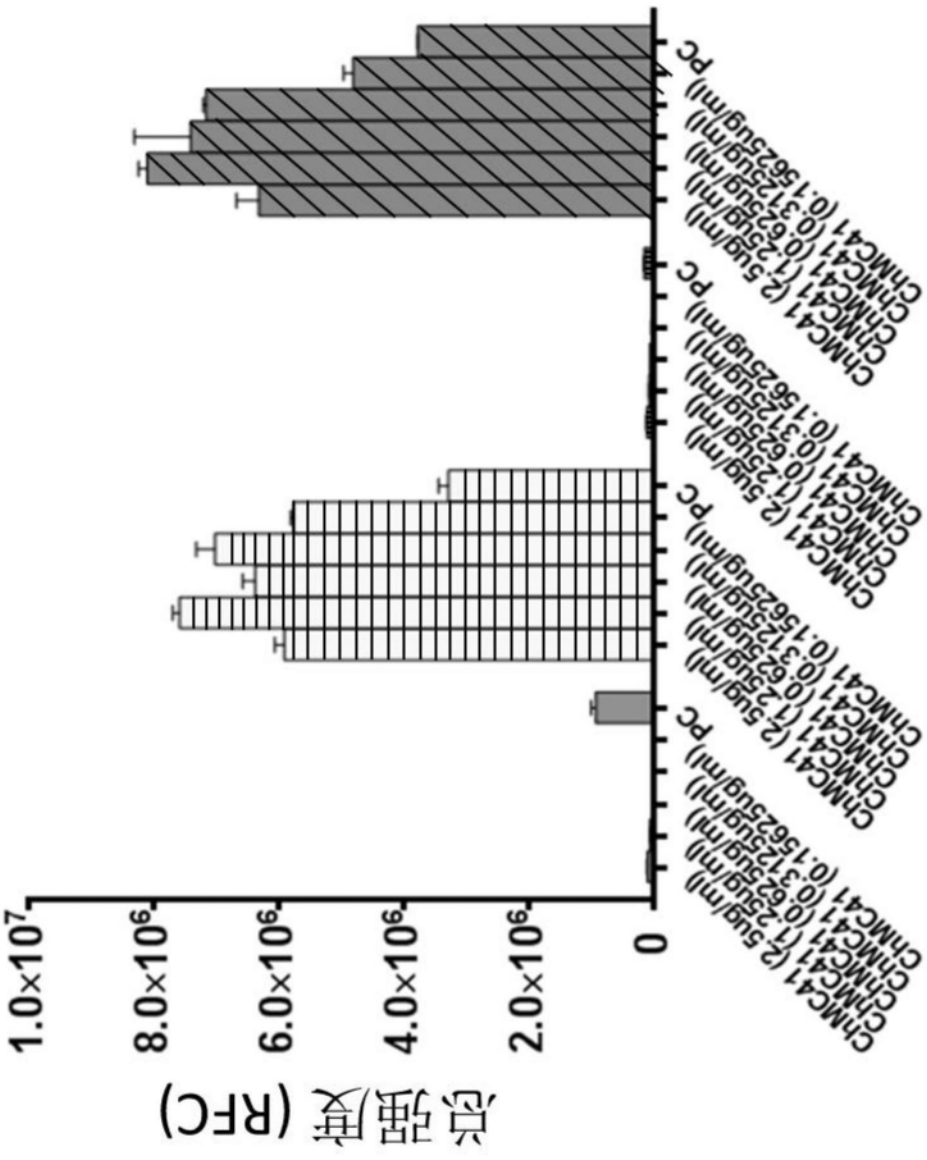

总强度 (RFC)
1.0×10^7
8.0×10^6
6.0×10^6
4.0×10^6
2.0×10^6
0
PC
ChMC41 (2.5ug/ml)
ChMC41 (1.25ug/ml)
ChMC41 (0.625ug/ml)
ChMC41 (0.3125ug/ml)
ChMC41 (0.15625ug/ml)

图31B

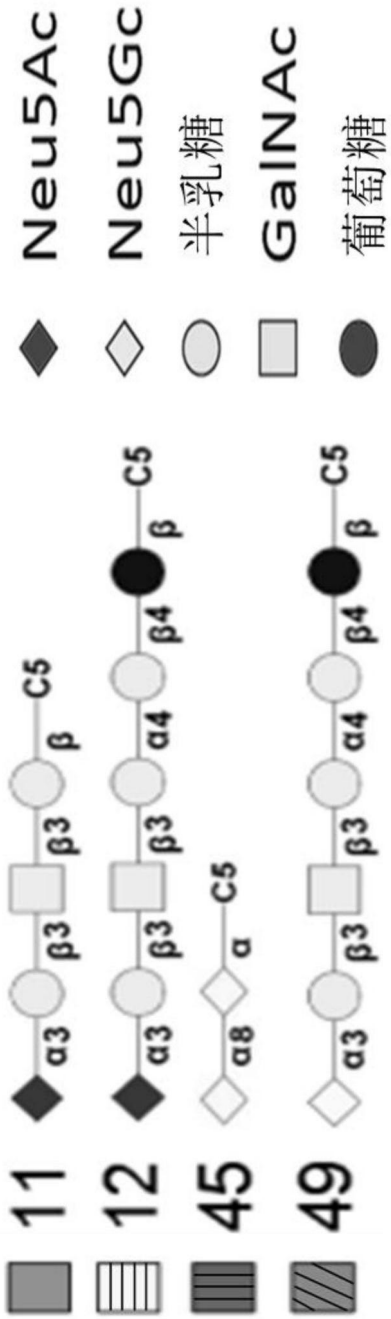

Neu5Ac
Neu5Gc
半乳糖
GalNAc
葡萄糖
11
12
45
49
α3
β3
β3
β
C5
α3
β3
α4
β4
β
C5
α8
α
C5
α3
β3
α4
β4
β
C5

图32A

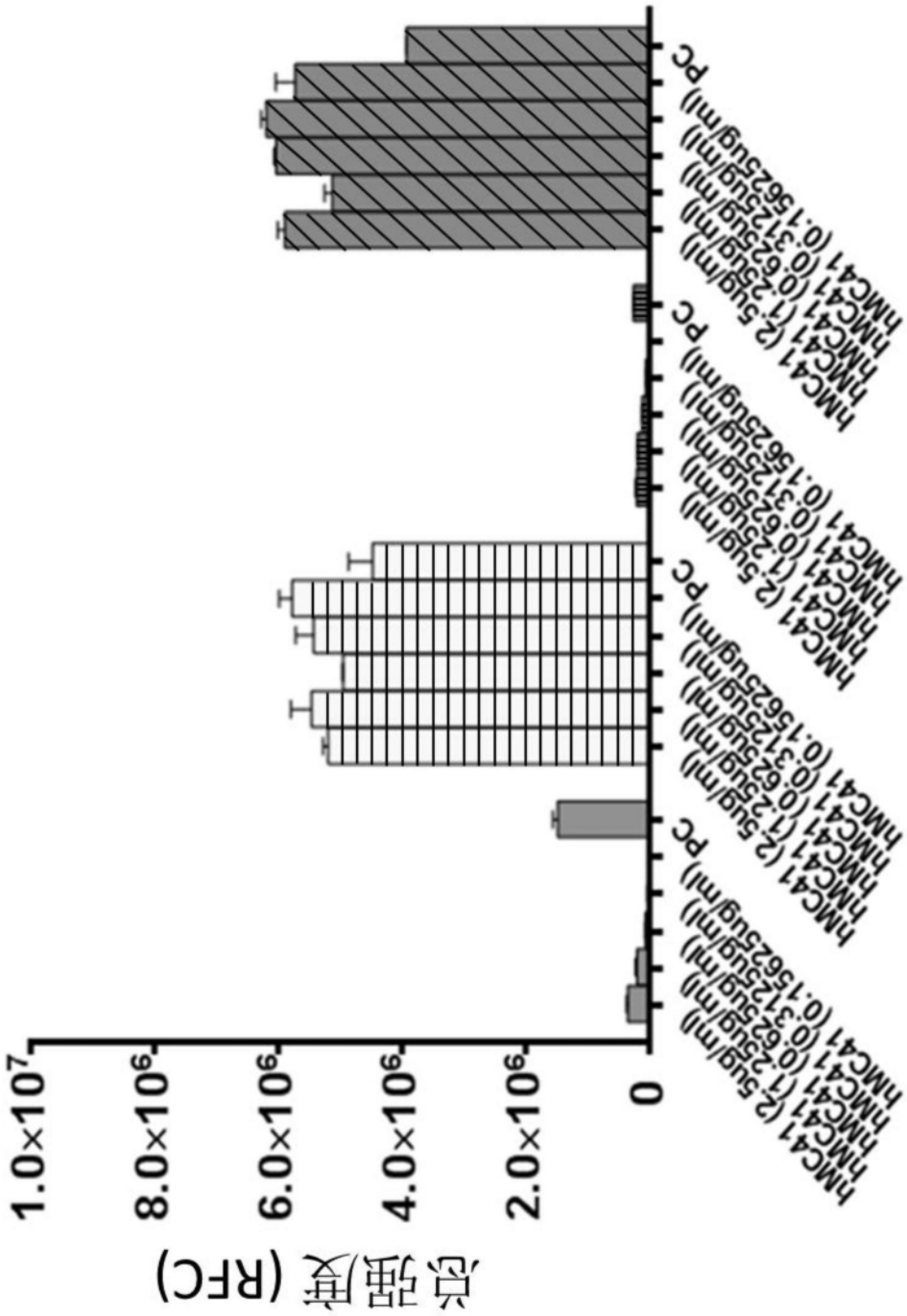

总强度 (RFC)
1.0×10⁷
8.0×10⁶
6.0×10⁶
4.0×10⁶
2.0×10⁶
0
PC
hMC41 (2.5ug/ml)
hMC41 (1.25ug/ml)
hMC41 (0.625ug/ml)
hMC41 (0.3125ug/ml)
hMC41 (0.15625ug/ml)

图32B

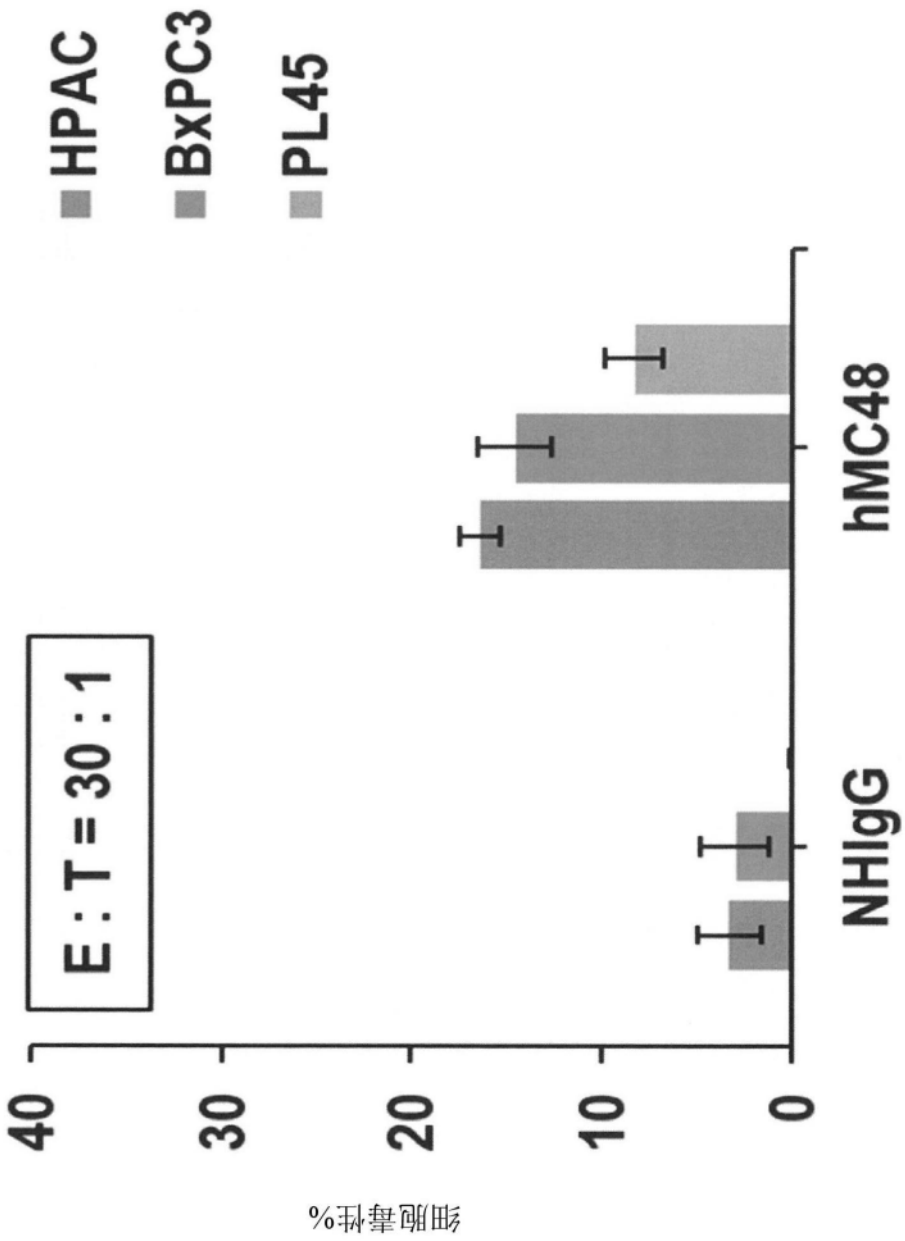


图33A

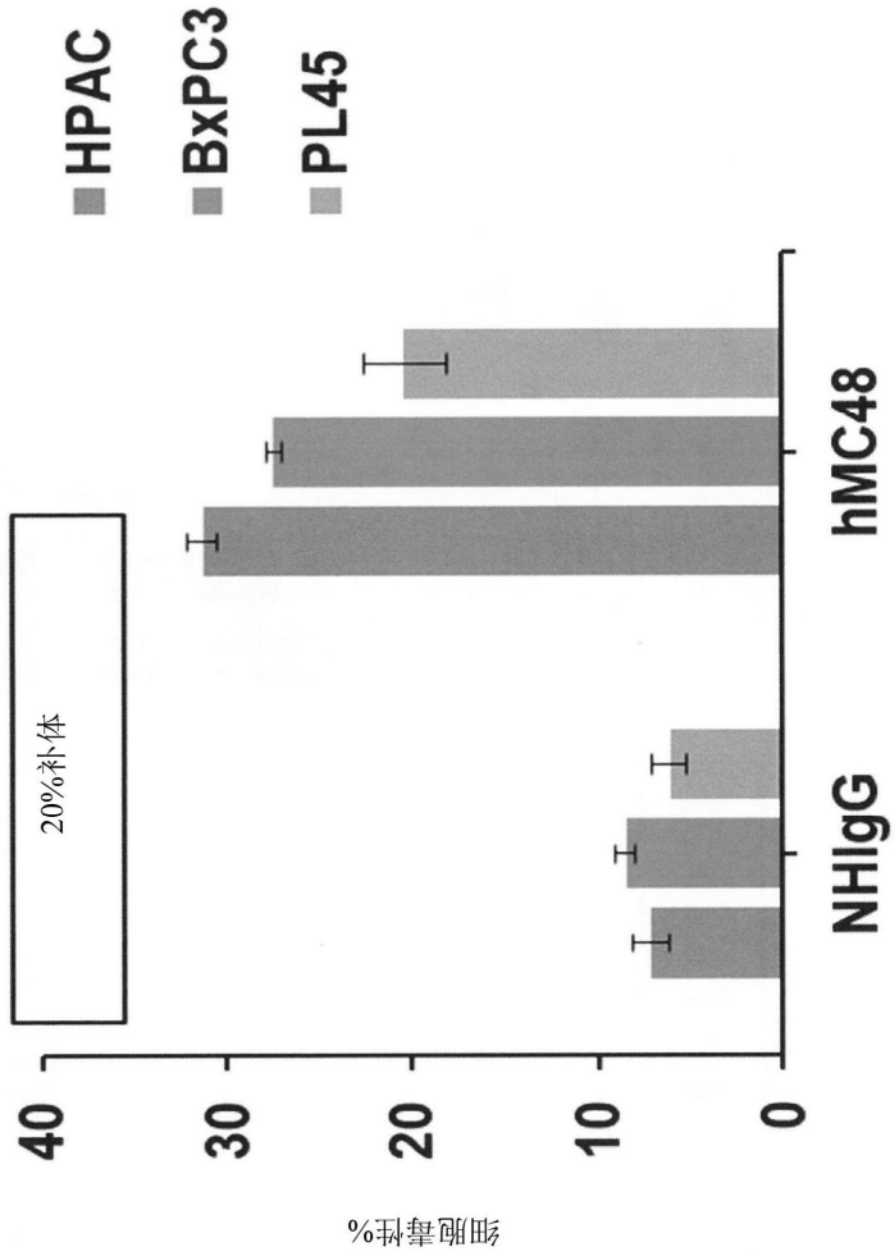


图33B

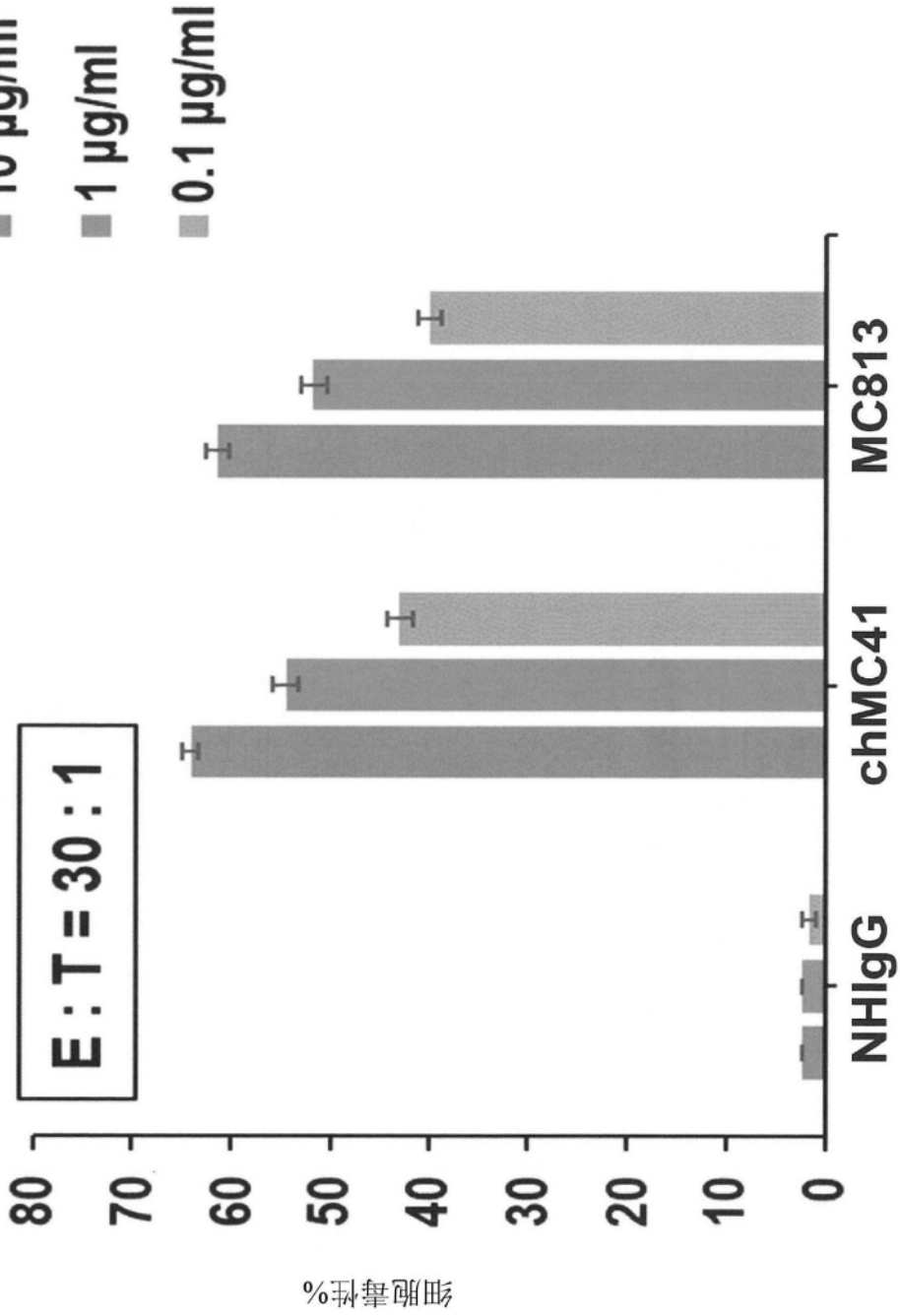

10 μg/ml
1 μg/ml
0.1 μg/ml
E:T=30:1
NHIgG
chMC41
MC813
0
10
20
30
40
50
60
70
80
细胞毒性%

图34A

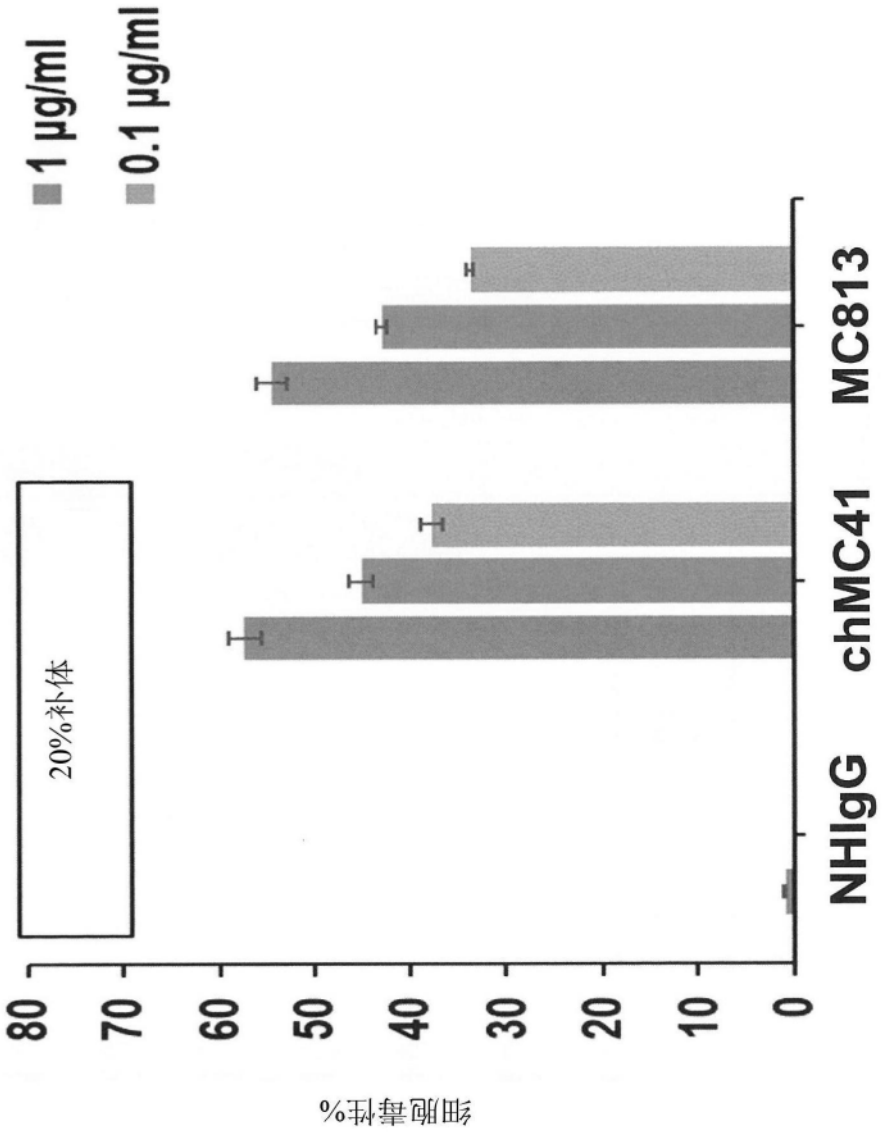

10 μg/ml
1 μg/ml
0.1 μg/ml
20%补体
NHIgG
chMC41
MC813
0
10
20
30
40
50
60
70
80
细胞毒性%

图34B

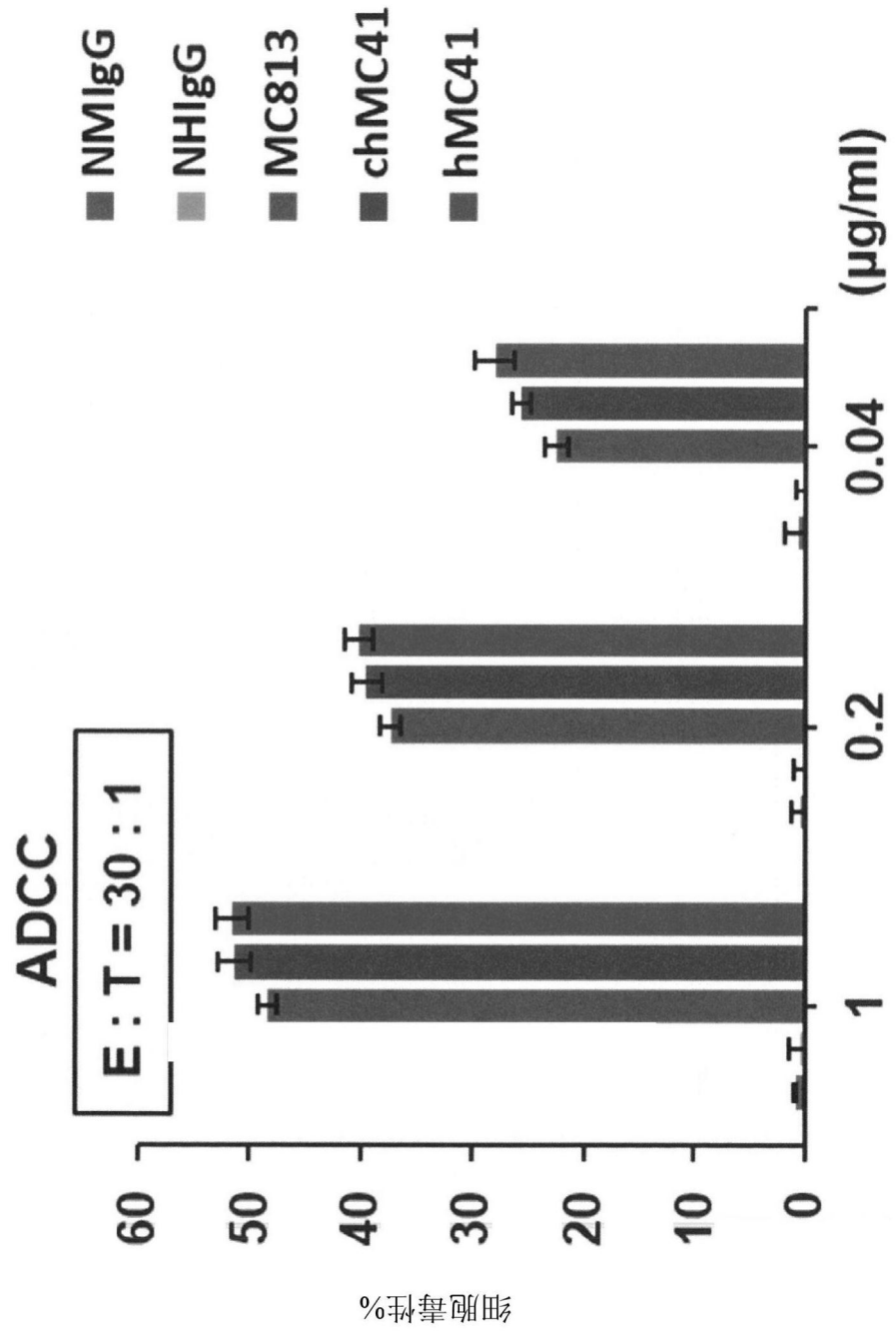

NMIgG
NHIgG
MC813
chMC41
hMC41
ADCC
E : T = 30 : 1
60
50
40
30
20
10
0
1
0.2
0.04
(μg/ml)
细胞毒性%

图35A

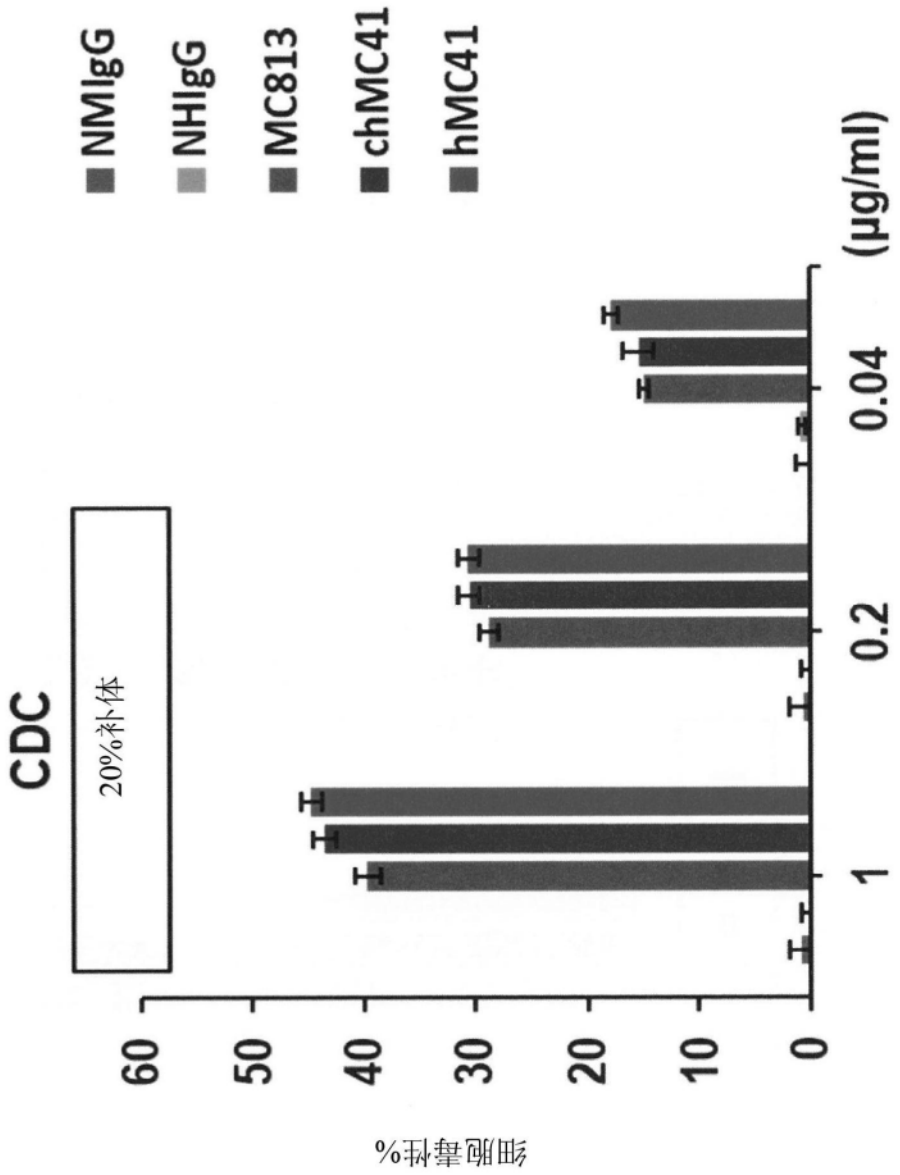

NMIgG
NHIgG
MC813
chMC41
hMC41
(μg/ml)
0.04
0.2
1
CDC
20%补体
0
10
20
30
40
50
60
细胞毒性%

图35B

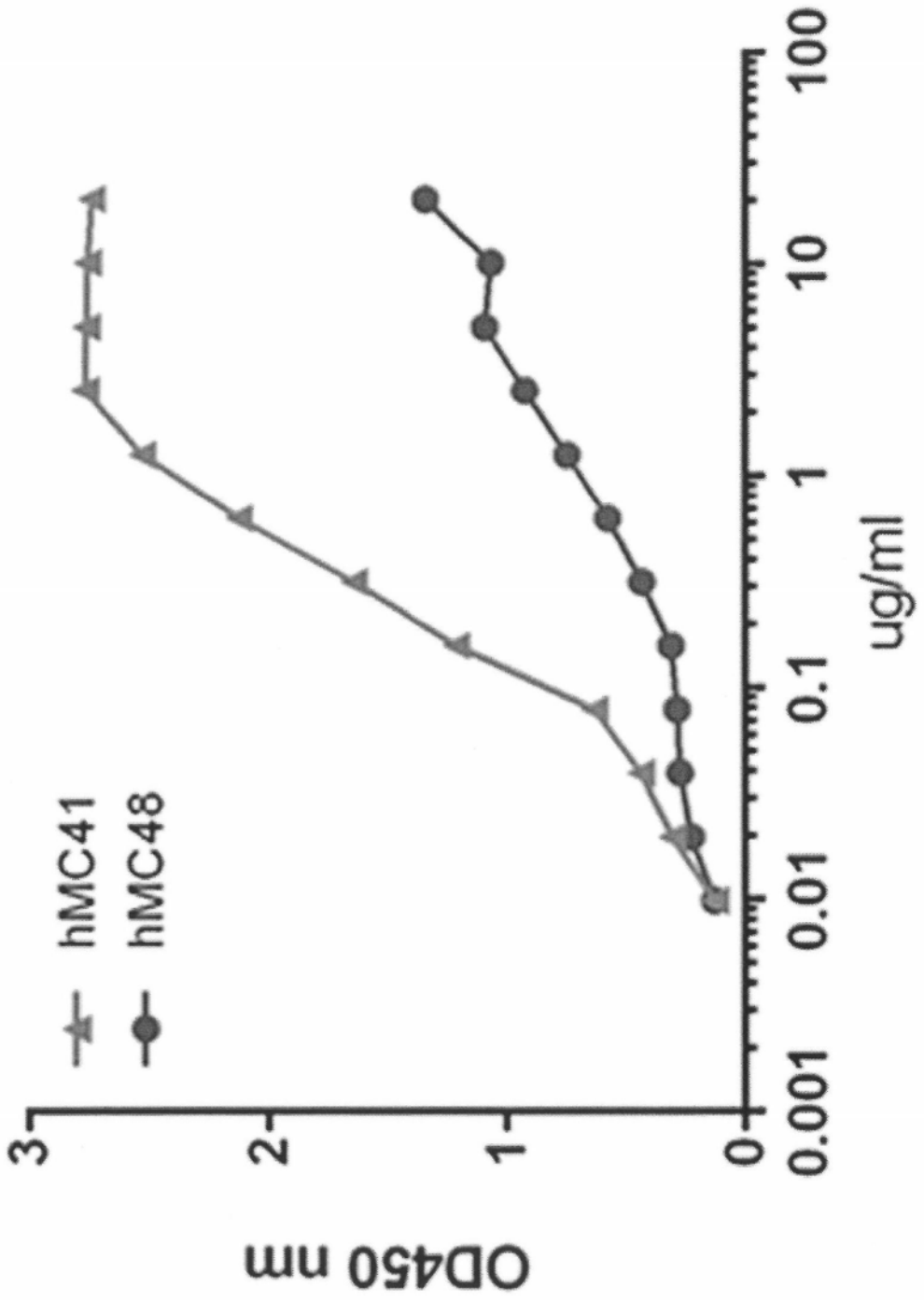


图36