



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105705165 B

(45)授权公告日 2020.04.24

(21)申请号 201480028493.8

(22)申请日 2014.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105705165 A

(43)申请公布日 2016.06.22

(30)优先权数据

61/801,287 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.11.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/029308 2014.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/144763 EN 2014.09.18

(73)专利权人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

(72)发明人 乃功·V·张

马希乌丁·艾哈迈德 赵琪

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

代理人 沈锦华

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件

WO 9218629 A1,1992.10.29,

CN 1726227 A,2006.01.25,

WO 2011160119 A2,2011.12.22,

Cheung N K V等.“Humanizing murine

IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo”.《Oncoimmunology》.2012,第1卷(第4期),第477-486页.

审查员 郭玉洁

权利要求书2页 说明书70页

序列表55页 附图3页

(54)发明名称

高亲和力抗GD2抗体

(57)摘要

在本申请案中,描述高亲和力抗GD2抗体药剂,及与其相关的各种方法和试剂,包括例如用于检测、预防和/或治疗性治疗GD2相关疾病,确切地说,成神经细胞瘤的方法和试剂。本发明提供结合到GD2的抗体药剂,其为参考3F8抗体的变体,因为其含有所述参考3F8抗体中未发现并且在本文中描述的一或多种特定结构特征。在一些实施例中,所提供的抗体药剂可用于医学中,例如用于诊断和/或治疗成神经细胞瘤。

肿瘤类型	人类化3F8单抗可 变片段阳性染色	染色强度			肿瘤类型	人类化3F8 单抗可变异 片段阳性染色	染色强度		
		V1	V1 D32H	V1 D32H E3K			V1	V1 D32H	V1 D32H E3K
Ewings	3/9~33%	3	4	4	NB	14/14~100%	0	2	3
		3	4	4			0	NA	3
		4	4	4			1	2	2
DSRCT	6/10~60%	0	1	1			1	4	NA
		0	1	1			2	4	4
		1	3	3			2	NA	3
		1	4	4			3	3	4
		3	4	4			3	4	4
		3	4	4			3	NA	4
		3	4	4			3	NA	3
OS	6/10~60%	0	1	1	肉瘤 (成人试验)	13/18~72%	0	1	1
		1	1	1			0	2	2
		1	1	2			0	2	2
		1	2	2			0	2	3
		1	2	3			1	3	3
		1	3	3			2	2	3
		0	1	1			2	3	3
		0	2	2			2	4	4
		0	0	1			3	3	4
		1	1	1			3	4	4
RMS	5/10~50%	0	1	1			3	4	4
		0	2	2			4	4	4
		0	0	1			4	4	4
		1	1	1			4	4	4
		3	3	3			4	4	4

单抗可变异片段浓度是3 µg/ml;
NB, 成神经细胞瘤; OS, 骨肉瘤; RMS, 横纹肌肉瘤;
Ewings, 尤文氏肉瘤; DSRCT, 促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤。
强度定义为0、1(弱, 不均匀染色)、2(弱, 均匀染色)、
3(强, 不均匀染色)及4(强, 均匀染色)。

1. 一种高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其特征在于,相较于适当参考抗GD2抗体,对GD2的亲合力增加,

其中所述抗体或其抗原结合片段包含作为相同序列的一部分的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列且所述相同序列是SEQ ID NO:11-16、19和21-25中的任何一个,并且

其中所述高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段具有选自以下的特征:轻链中D32H取代、轻链中E1K取代以及其组合。

2. 根据权利要求1所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其包含被标识为SEQ ID NO:1、2、7或8的轻链序列。

3. 根据权利要求1所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其包含被标识为SEQ ID NO:4、5或10的重链序列。

4. 根据权利要求1所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其包含被标识为SEQ ID NO:3或9的轻链序列。

5. 根据权利要求1所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其包含被标识为SEQ ID NO:1、2、7或8的轻链序列及被标识为SEQ ID NO:4、5或10的重链序列。

6. 根据权利要求4所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其包含被标识为SEQ ID NO:3或9的轻链可变区序列及被标识为SEQ ID NO:4或10的重链可变区序列。

7. 根据权利要求1所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是单链可变片段scFv。

8. 根据权利要求7所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其中所述scFv被标识为SEQ ID NO:11、13、19或22。

9. 根据权利要求7所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其中所述scFv被标识为SEQ ID NO:12、14、15、21、23或24。

10. 根据权利要求7所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其中所述scFv被标识为SEQ ID NO:16或25。

11. 一种双特异性抗体,其包括:包含根据权利要求7中所述的scFv的第一结合位点,及特异性结合到CD3或D0TA的第二结合位点。

12. 根据权利要求11所述的双特异性抗体,其中所述第二结合位点包含用于hu0KT3的scFv,其中所述scFv包含被标识为SEQ ID NO:26或27的序列。

13. 根据权利要求11所述的双特异性抗体,其包含被标识为SEQ ID NO:29或30的序列。

14. 根据权利要求11所述的双特异性抗体,其中所述第二结合位点包含scFv C825, scFv C825包含被标识为SEQ ID NO:28的序列。

15. 根据权利要求14所述的双特异性抗体,其包含被标识为SEQ ID NO:31的序列。

16. 一种编码根据权利要求1所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段的分离的核酸分子,所述核酸包含SEQ ID NO:32-34和36-45中的任一个的序列。

17. 一种重组载体,其包含根据权利要求16所述的核酸分子。

18. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求17所述的重组载体。

19. 一种用于产生高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段的方法,其包含以下步骤:在培养基中,在允许所述抗体或其片段表达的条件下培养根据权利要求18所述的宿主细胞,

及自所述培养基分离所述抗体或其片段。

20. 一种组合物,其包含根据权利要求1到10中任一权利要求所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述高亲和力抗GD2抗体与细胞毒性剂偶联。

22. 一种医药组合物,其包含根据权利要求20或21所述的组合物的所述高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,并且进一步包含医药学上可接受的载剂或稀释剂。

23. 一种根据权利要求1到10中任一权利要求所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段的用途,其是用于制造用以治疗或预防受试者的医学病况的药物,其中所述医学病况是以GD2表达为特征的癌症。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述医学病况是成神经细胞瘤、黑素瘤、肉瘤或脑肿瘤。

25. 根据权利要求23所述的用途,其中所述医学病况选自由以下组成的群组:骨肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、平滑肌肉瘤、梭形细胞肉瘤、脑肿瘤、小细胞肺癌、成视网膜细胞瘤及HTLV-1感染性T细胞白血病。

26. 根据权利要求23所述的用途,其中所述医学病况是癌瘤。

27. 一种根据权利要求11-15中任一权利要求所述的双特异性抗体的用途,其是用于制造用以治疗或预防受试者的医学病况的药物,其中所述医学病况是以GD2表达为特征的癌症。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述医学病况是成神经细胞瘤、黑素瘤、肉瘤或脑肿瘤。

29. 根据权利要求27所述的用途,其中所述医学病况选自由以下组成的群组:骨肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、平滑肌肉瘤、梭形细胞肉瘤、脑肿瘤、小细胞肺癌、成视网膜细胞瘤及HTLV-1感染的T细胞白血病。

30. 根据权利要求27所述的用途,其中所述医学病况是癌瘤。

31. 根据权利要求1到10中任一权利要求所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段,其为放射性标记的。

32. 一种包含根据权利要求31所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段的治疗性组合物。

33. 一种包含根据权利要求31所述的高亲和力抗GD2抗体或其抗原结合片段的诊断性组合物。

高亲和力抗GD2抗体

[0001] 相关申请案的交叉引用

[0002] 本申请案依据35 U.S.C.§119(e) 要求2013年3月15日提交的美国临时专利申请案第61/801,287号的权益,所述申请案以全文引用的方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本说明书提到2014年3月14日以电子形式提交的名为“2003080-0638_ST25”的ascii.txt文件的序列表。所述.txt文件是在2014年3月12日生成并且大小是94kb。

背景技术

[0005] 单克隆抗体 (MoAb) 疗法是一种公认的针对癌症的治疗模式,并且有五种MoAb已经被FDA批准用于成人的实体肿瘤,包括结肠直肠癌和乳癌、非小细胞肺癌、鳞状细胞癌及黑色素瘤(博伊达斯 (Boyiadzis) 等人,2008,生物疗法专家评论 (Expert Opin Biol Ther) 8, 1151-8;颜 (Yan) 等人,2008,癌症杂志 (Cancer J) 14,178-83)。

[0006] 此外,本发明了解到,MoAb疗法仍不适合用于治疗儿科癌症。与化学疗法或放射不同,MoAb疗法不具有骨髓抑制性和遗传毒性,一般具有极少的长期毒性。这些对于年幼儿童是着重考虑的。更重要的是,MoAb有效针对通常在高风险成神经细胞瘤 (NB) 中发现的血液、骨髓及骨骼中的转移性癌症。已经充分研究人类或人类化IgG1抗体作为一类药剂的药物动力学和毒性。此外,抗体可以携带细胞毒性有效负载,不管是基于免疫的、放射性同位素、毒素还是酶,由此增加靶向疗法的选择。

发明内容

[0007] 本发明提供结合到GD2的抗体药剂,其为参考3F8抗体的变体,因为其含有所述参考3F8抗体中未发现并且在本文中描述的一或多种特定结构特征。在一些实施例中,相对于不具有本文所描述的一或多个结构特征并且在其它方面相同的3F8抗体,所提供的抗体药剂显示出改善的稳定性和/或降低的免疫原性。在一些实施例中,所提供的抗体药剂可用于医学中,例如用于诊断和/或治疗NB。在一些实施例中,所提供的抗体药剂与一或多种有效负载(例如,可检测的有效负载和/或治疗性有效负载)相关联,包含一或多种有效负载,和/或递送一或多种有效负载。本发明还提供用于鉴别、表征、制备和/或使用此类抗体药剂的多种方法。

[0008] 在本申请案中,具体描述了高亲和力抗GD2抗体,其具有新的hu3F8构架hu3F8V5,经设计以具有降低的免疫原性以及增强的稳定性。hu3F8V5抗体是基于计算方法,通过优化hu3F8V1的构架结构(如W0 2011/160119及张 (Cheung) 等人,2012,肿瘤免疫学 (Oncoimmunology) 1:477-486中所描述)以降低免疫原性来进行设计。首先,将hu3F8V1重链和轻链序列分别与人类生殖系序列humIGHV199和humIGKV025 (EMBL数据库) 相比较。基于鼠类3F8 (蛋白质数据库登录号3VFG) 的晶体结构,使用CHARMM (哈佛分子力学化学 (CHemistry at Harvard Molecular mechanics)) 力场 (B.R.布鲁克斯 (B.R.Brooks) 等人,计算化学杂志 (J.Comp.Chem.) 30,1545-1615 (2009)) 对每一潜在的人类化突变执行分子模拟以确定所

述突变是否是结构上容许的。另外,根据免疫表位数据库 (Immune Epitope Database),使用NN比对法鉴别hu3F8V1中的II类MHC T细胞表位,并基于结构上容许的突变使其减到最少。基于对3F8晶体结构的GD2的计算模型(使用CDOCKER和Discovery Studio软件构建;加利福尼亚州圣地亚哥的艾克利公司 (Accelrys, San Diego, CA)),未建模成与GD2抗原直接相互作用的CDR残基被认为用于人类化突变。

[0009] 为了降低潜在免疫原性,在hu3F8V1中产生九点突变以制备hu3F8V5(参见表2)。发现全部九个突变在结构上都是结合到其抗原GD2的3F8计算模型容许的。所有突变都涉及将人类化时留在3F8上的鼠类残基变成人类生殖系序列。(LC:K24R、LC:S56T、LC:V58I、HC:I20L、HC:M92V) 涉及构架残基。如通过计算机模拟方法所鉴别,在去除较强T细胞表位的CDRH2中另外发现4个突变(HC:A62S、HC:F63V、HC:M64K、HC:S56G)。意外的是,结合到GD2的3F8的计算模型允许在CDR区中存在所提出的突变,因为其为通过移植方法改变CDR残基来进行抗体人类化的领域的技术人员不常见到的。

[0010] 为了基于酵母呈现法进行亲和力成熟,首先合成新颖的生物素化GD2衍生物以用于选择。先前使用标准生物素化GD2抗原(从功能糖组学协会 (Consortium for functional glycomics) 获得) 未取得成功。为了观察GD2,在流式细胞术中,通过融合PEG间隔子来产生新颖的合成GD2-叠氮基衍生物(图2)。使用这种新颖类似物,从酵母表面上呈现的hu3F8ScFv随机文库中选出2个突变,其具有增强的与合成GD2类似物的结合。第一个突变是位于CDR L1上的LC:D32H,并且第二个是作为构架残基的LC:E1K。在以重组方式表达的hu3F8V1ScFv和hu3F8V5ScFv构筑体中测试这两个突变(LC:E1K和LC:D32H) 并且使用Biacore分析测量对于天然GD2的结合亲和力。基于结构建模,以VL-VH形式产生所有hu3F8ScFv,因为其使得进入抗原结合袋不太受限制。这与以VH-VL形式构建的最常规的ScFv相对。另外,以完整IgG1形式测试若干变体。

[0011] 因此,本发明提供含有特定结构特征(相对于3F8和/或hu3F8V1的突变) 的新颖高亲和力抗GD2抗体药剂,包括完整抗体、单链可变片段(scFv) 及其它形式,所述结构特征降低免疫原性并增加所述抗体对GD2的亲和力。

[0012] 在一个实施例中,本发明提供一种用于抗GD23F8抗体的新构架,即hu3F8V5,其具有降低其免疫原性并去除T细胞表位的特定结构特征(相对于3F8和/或hu3F8V1的突变)。

[0013] 在另一实施例中,本发明提供对GD2具有增加的亲和力的抗GD2抗体药剂,所述抗体药剂在轻链(LC) 中具有特定结构特征,即位于CDR L1上的D32H,和作为构架残基的E1K。

[0014] 还提供了在重链(HV) 中具有特定结构特征(即G54I) 的抗GD2抗体药剂。

[0015] 本发明的抗体药剂可以具有以上描述的单一结构特征,或作为双重特征的呈任何组合形式的两个结构特征,或作为三重特征的呈任何组合形式的超过两个结构特征。在一些实施例中,这些结构特征,或与已经存在于3F8分子(例如hu3F8V5) 中用于类似或替代目的的其他结构特征的组合可以引入任何形式的3F8抗体中,例如引入hu3F8V1中。尽管本文中描述了在hu3F8V1和hu3F8V5中含有这些结构特征的抗体和单链可变片段(scFv),但应理解,可以将突变并入任何3F8抗体序列中以便实现亲和力的增强。

[0016] 在一个实施例中,本发明针对在轻链(LC) 中具有一个结构特征(E1K或D32H) 或两个结构特征(E1K和D32H) 和/或在重链(HC) 中具有G54I结构特征的3F8抗GD2抗体,以及抗体组合物、所述抗体的糖型、具有增强的稳定性的抗体、具有增强的与Fc受体的结合的抗体、

对GD2具有增强的亲和力的抗体、被工程设计成表达第二不同结合位点的双特异性抗体或双特异性T细胞接合剂,或任何本发明抗体的Fv片段在双特异性抗体、接合T细胞的串联scFv双特异性抗体(BiTE)、三特异性抗体或多特异性抗体的模块化IgG构建中的用途。如本文中所述并实现的,这些抗体以及与其相关的编码或互补核酸、载体、宿主细胞、组合物、调配物、装置、转基因动物、转基因植物,及其制备和使用方法与所属领域中已知的内容的组合是本发明的一部分。意外的是,相较于亲本hu3F8V1,含有结构特征E1K、D32H及G54I的任何组合的hu3F8显示对GD2明显较强的亲和力以及明显较强的PMN-ADCC和PBMC-ADCC活性,并具有低补体介导的细胞毒性(CMC)。由于相信低CMC介导与抗GD2免疫疗法有关的疼痛副作用,故其为所需的。不管是供体,还是在使用以人类CD16或CD32转染的NK92作为杀手细胞时,始终在ADCC分析中观察到此优越性。总的来说,这是很重要的,因为ADCC是经过证实的MoAb一般在患者中的抗肿瘤作用的机制。

[0017] 在一个实施例中,本发明针对一种3F8抗体药剂,其包含基于hu3F8V1或hu3F8V5但在本文所描述的一或多个结构特征存在方面不同的轻链和重链,所述抗体药剂以高亲和力结合到GD2并且介导所需作用,例如在体外抑制细胞生长,防止由抗GD2抗体疗法引起的疼痛副作用等等。

[0018] 在一个方面,本发明的抗体药剂包括具有本文所描述的单一结构特征的hu3F8V1IgG,例如hu3F8V1-E1K、hu3F8V1-D32H、hu3F8V1-G54I;具有如本文中所描述的双重结构特征的hu3F8V1IgG,例如hu3F8V1-E1KD32H、hu3F8V1-E1KG54I及hu3F8V1-D32HG54I;具有如本文中所描述三重结构特征的hu3F8V1IgG,例如hu3F8V1-E1KD32HG54I;hu3F8V5IgG;具有如本文中所描述的单一结构特征的hu3F8V5IgG,例如hu3F8V5-E1K、hu3F8V5-D32H、hu3F8V5-G54I;具有如本文中所描述的双重结构特征的hu3F8V5IgG,例如hu3F8V5-E1KD32H、hu3F8V5-E1KG54I及hu3F8V5-D32HG54I;及具有如本文中所描述的三重结构特征的hu3F8V5IgG,例如hu3F8V5-E1KD32HG54I。

[0019] 本发明还包括此类抗体的片段或衍生物,例如所述抗体链的一或多个部分,例如重链恒定区、连接区、多样性区或可变区,或轻链恒定区、连接区或可变区。所述抗体可以属于任何类别,例如IgG、IgM或IgA,或任何子类,例如IgG1、IgG2a、IgG4,及所属领域中已知的其它子类。可用于本发明中的抗体还包括本发明抗体的抗原结合抗体片段,包括(但不限于)Fab、Fab'及F(ab')₂、Fd、单链可变片段(scFv)、单链抗体、二硫键连接的或二硫键稳定化的Fvs(sdFv或dsFv)。

[0020] 本发明的单链可变片段包括hu3F8V1-E1K scFv、hu3F8V1-D32H scFv、hu3F8V1-G54I scFv;具有如本文中所描述的双重结构特征的hu3F8V1scFv,例如hu3F8V1-E1KD32H scFv、hu3F8V1-E1KG54I scFv及hu3F8V1-D32HG54I scFv;具有如本文中所描述的三重结构特征的hu3F8V1scFv,例如hu3F8V1-E1KD32HG54I scFv;hu3F8V5scFv;具有如本文中所描述的单一结构特征的hu3F8V5scFv,例如hu3F8V5-E1K scFv、hu3F8V5-D32H scFv、hu3F8V5-G54I scFv;具有如本文中所描述的双重结构特征的hu3F8V5scFv,例如hu3F8V5-E1KD32H scFv、hu3F8V5-E1KG54I scFv及hu3F8V5-D32HG54I scFv;具有如本文中所描述的三重结构特征的hu3F8V5scFv,例如hu3F8V5-E1KD32HG54I scFv,及其组合。

[0021] 本发明还包括单结构域抗体,其包含VL或VH结构域。另外,所述抗体可以通过任何方法,例如噬菌体呈现来产生,或在任何生物体、卵或细胞系,包括在细菌、昆虫、酵母(真

菌)、哺乳动物,或产生具有所需特性的抗体(例如人类化抗体)的其它类型的细胞或细胞系中产生。还可以通过组合来自不同物种的Fab部分和Fc区,或通过保持互补决定区并将构架区变为另一物种的构架区来形成所述抗体。

[0022] 优选的本发明的抗GD 2抗体包含以下肽序列中的任一者:

[0023] 被标识为SEQ ID NO:1的具有D32H结构特征的hu3F8V1轻链,

[0024] 被标识为SEQ ID NO:2的具有E1K结构特征的hu3F8V1轻链,

[0025] 被标识为SEQ ID NO:3的具有D32H和E1K双重结构特征的hu3F8V1轻链,

[0026] 被标识为SEQ ID NO:4的具有G54I结构特征的hu3F8V1重链,

[0027] 被标识为SEQ ID NO:5的hu3F8V5重链 γ 1,

[0028] 被标识为SEQ ID NO:6的hu3F8V5轻链 κ ,

[0029] 被标识为SEQ ID NO:7的具有D32H结构特征的hu3F8V5轻链,

[0030] 被标识为SEQ ID NO:8的具有E1K结构特征的hu3F8V5轻链,

[0031] 被标识为SEQ ID NO:9的具有E1K和D32H双重结构特征的hu3F8V5轻链,

[0032] 被标识为SEQ ID NO:10的具有G54I结构特征的hu3F8V5重链,

[0033] 以SEQ ID NO:11标识的具有含D32H结构特征的轻链可变区的hu3F8V1单链可变片段(scFv),

[0034] 被标识为SEQ ID NO:12的具有含D32H结构特征的轻链可变区及含G54I结构特征的重链可变区的hu3F8V1scFv,

[0035] 被标识为SEQ ID NO:13的具有含E1K结构特征的轻链可变区的hu3F8V1scFv,

[0036] 被标识为SEQ ID NO:14的具有含E1K结构特征的轻链可变区及含G54I结构特征的重链可变区的hu3F8V1scFv,

[0037] 被标识为SEQ ID NO:15的具有含E1K和D32H双重结构特征的轻链可变区的hu3F8V1scFv,

[0038] 被标识为SEQ ID NO:16的具有含E1K和D32H双重结构特征的轻链可变区及含G54I结构特征的重链可变区的hu3F8V1scFv,

[0039] 被标识为SEQ ID NO:17的具有含G54I结构特征的重链可变区的hu3F8V1scFv,

[0040] 被标识为SEQ ID NO:18的hu3F8V5scFv,

[0041] 被标识为SEQ ID NO:19的具有含D32H结构特征的轻链可变区的hu3F8V5scFv,

[0042] 被标识为SEQ ID NO:20的具有含G54I结构特征的重链可变区的hu3F8V5scFv,

[0043] 被标识为SEQ ID NO:21的具有含D32H结构特征的轻链可变区及含G54I结构特征的重链可变区的hu3F8V5scFv,

[0044] 被标识为SEQ ID NO:22的具有含E1K结构特征的轻链可变区的hu3F8V5scFv,

[0045] 被标识为SEQ ID NO:23的具有含E1K结构特征的轻链可变区及含G54I结构特征的重链可变区的hu3F8V5scFv,

[0046] 被标识为SEQ ID NO:24的具有含E1K和D32H双重结构特征的轻链可变区的hu3F8V5scFv,及

[0047] 被标识为SEQ ID NO:25的具有含E1K和D32H双重结构特征的轻链可变区及含G54I结构特征的重链可变区的hu3F8V5scFv。

[0048] 在另一个实施例中,以上描述的单链可变片段可以在存在或不存在连接子或间隔

子情况下连接到对另一抗原具有特异性的其它scFv,由此产生二价或双特异性抗GD2抗体。举例来说,被标识为SEQ ID NO:26的具有连接子和间隔子,或被标识为SEQ ID NO:27的不具有间隔子的hu0KT3scFv序列可以遵循SEQ ID NO:11-25中所描述的scFvs中的任一者。或者,被标识为SEQ ID NO:28的C825抗DOTA的scFv序列可以遵循以SEQ ID NO:11-25标识的scFv序列中的任一者。双特异性抗体的一些实例包括:

[0049] 被标识为SEQ ID NO:29的具有ADTKGP间隔子的hu3F8V1scFv-连接子-hu0KT3scFv,

[0050] 被标识为SEQ ID NO:30的不含间隔子的hu3F8V1scFv-连接子-hu0KT3scFv,及

[0051] 以SEQ ID NO:31标识的hu3F8V1scFv-C825scFv。

[0052] 在本发明的一些实施例中,所提供的抗体药剂可以另外经碳水化合物组合物修饰,例如以增加效应功能,其经修饰而在hu3F8V1的重链中具有特定三重残基特征DEL (S239D/A330L/I332E)、在重链中和/或在VH-VL Ala43Ser界面中具有用以增强稳定性的一或多个结构特征,和/或其组合。

[0053] 优选的本发明的抗体药剂是结合人类GD2并执行所需功能,即效应功能、防止疼痛或抑制细胞生长的那些抗体药剂。通过竞争性抑制测定单克隆抗体特异性和亲和力的某些代表性方法可以见于哈洛 (Harlow) 等人,抗体实验室手册 (Antibodies:A Laboratory Manual),冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港 (Cold Spring Harbor,N.Y.),1988)中,所述文献以引用的方式并入本文中。至少一种本发明的抗体结合至少一个对人类GD2、亚基、片段、部分或其任何组合具有特异性的指定表位。所述表位可以包含至少一个抗体结合区,所述表位优选包含GD2的至少一部分的至少1-5个糖残基或神经酰胺。

[0054] 在一个方面,本发明提供至少一种分离的本发明的hu3F8抗GD2抗体,其包含带有呈任何组合形式的本文中所定义的结构特征中的任一者的LC或HV中的任一者,及编码其的核酸序列,其中:

[0055] 具有单一结构特征D32H的hu3F8V1轻链是由以SEQ ID NO:32标识的多核苷酸编码,

[0056] hu3F8V1轻链双重结构特征E1K和D32H是由以SEQ ID NO:33标识的多核苷酸编码,

[0057] hu3F8V5重链是由以SEQ ID NO:34标识的多核苷酸编码,

[0058] hu3F8V5轻链是由以SEQ ID NO:35标识的多核苷酸编码,

[0059] 具有单一结构特征D32H的hu3F8V5轻链是由以SEQ ID NO:36标识的多核苷酸编码,

[0060] 具有双重结构特征E1K和D32H的hu3F8V5轻链是由以SEQ ID NO:37标识的多核苷酸编码,

[0061] 具有单一结构特征G54I的hu3F8V5重链是由以SEQ ID NO:38标识的多核苷酸编码,

[0062] 在轻链区域中具有单一结构特征D32H的hu3F8V1scFv是由以SEQ ID NO:39标识的多核苷酸编码,

[0063] 在轻链区域中具有双重结构特征E1K和D32H的hu3F8V1scFv是由以SEQ ID NO:40标识的多核苷酸编码,

[0064] 在轻链区域中具有E1K和D32H结构特征并且在重链区域中具有G54I结构特征的hu3F8V1scFv三重结构特征是由以SEQ ID NO:41标识的多核苷酸编码,

[0065] hu3F8V5scFv是由以SEQ ID NO:42标识的多核苷酸编码,

[0066] 在轻链区域中具有单一结构特征D32H的hu3F8V5scFv是由以SEQ ID NO:43标识的多核苷酸编码,

[0067] 在轻链区域中具有双重结构特征E1K和D32H的hu3F8V5scFv是由以SEQ ID NO:44标识的多核苷酸编码,及

[0068] 在轻链区域中具有E1K和D32H并且在重链区域中具有G54I的具有三重结构特征的hu3F8V5scFv是由以SEQ ID NO:45标识的多核苷酸编码。

[0069] 在一些方面,本发明提供一种诊断/检测或治疗性免疫偶联物,所述免疫偶联物包含抗体组分,所述抗体组分包含本发明的3F8MoAb中的任一者或其片段;或抗体融合蛋白或其片段,其包含本发明的3F8抗体中的任一者或其片段,其中所述抗体组分结合到至少一种诊断剂/检测剂或至少一种治疗剂。

[0070] 在一些方面,本发明提供一种治疗性免疫偶联物,其包含例如选自以下组成的群组的治疗剂:放射性核素、硼、钆或铀原子;免疫调节剂,例如细胞因子、干细胞生长因子;淋巴毒素,例如肿瘤坏死因子(TNF);造血因子,例如白细胞介素(IL);集落刺激因子(CSF),例如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF);干扰素(IFN),例如干扰素- α 、干扰素- β 或干扰素- γ ;及干细胞生长因子、造血因子、促红细胞生成素、血小板生成素、抗体、激素、激素拮抗剂、酶、酶抑制剂、光活性治疗剂、细胞毒性药物,例如抗有丝分裂剂、烷化剂、抗代谢物、血管生成抑制剂、细胞凋亡剂、生物碱、COX-2抑制剂及抗生素;细胞毒性毒素,例如植物毒素、微生物毒素及动物毒素,以及其合成变化形式,血管生成抑制剂、不同抗体,及其组合。

[0071] 在一些方面,本发明还提供一种多价、多特异性抗体或其片段,其包含对被3F8抗体识别的抗原具有亲和力的一或多个抗原结合位点及对除GD2以外的表位或半抗原具有亲和力的一或多个半抗原结合位点。在一个实施例中,所述多价、多特异性抗体或其片段包含诊断剂/检测剂或治疗剂。

[0072] 在一些方面,本发明提供一种向靶递送诊断剂/检测剂、治疗剂或其组合的方法,其包含:(i)向受试者投与本发明的多价、多特异性抗体或其片段;(ii)等待足以使一定量的非结合蛋白清除所述受试者的血流的时间;及(iii)向所述受试者投与包含诊断剂/检测剂、治疗剂或其组合的载剂分子,其结合到所述抗体的结合位点。在一些实施例中,所述诊断剂/检测剂或治疗剂选自包含以下的群组:同位素、染料、色素、造影剂、药物、毒素、细胞因子、酶、酶抑制剂、激素、激素拮抗剂、生长因子、放射性核素、金属、脂质体、纳米粒子、RNA、DNA及其组合。所述第二特异性还包括与来自所描述的试剂群组的任一者偶联的半抗原。这些半抗原包括(但不限于)生物素及其衍生物、DOTA及其衍生物、DTPA及其衍生物、荧光素及其衍生物、组胺及其衍生物、去铁胺及其衍生物。

[0073] 在本发明方法中的任一者中,所述受试者优选是哺乳动物,例如人类或家养宠物。

[0074] 在本发明的一些实施例中是一种治疗或鉴别受试者的患病组织的方法,其包含:(A)向所述受试者投与双特异性抗体或抗体片段,其具有至少一个特异性结合患病组织相关标记物的臂和至少一个特异性结合可靶向偶联物的其它臂,其中所述患病组织相关标记

物是被3F8MoAb识别的抗原；(B) 任选地，向所述受试者投与清除组合物，并使所述组合物清除循环中的非局部抗体或抗体片段；及(C) 向所述受试者投与第一可靶向偶联物，其包含载剂部分和一或多种偶联的治疗剂或诊断剂，所述载剂部分包含或带有至少一个可被所述双特异性抗体或抗体片段的所述至少一个其它臂识别的表位。优选地，特异性结合经靶向组织的至少一个臂是本发明的抗GD2抗体或抗GD2抗体的片段。

[0075] 在一些方面，本发明提供一种用于检测或治疗哺乳动物中表达被3F8MoAb识别的抗原的肿瘤的方法，其包含：(A) 投与有效量的双特异性抗体或抗体片段，其包含至少一个特异性结合经靶向组织的臂及至少一个特异性结合可靶向偶联物的其它臂，其中所述特异性结合经靶向组织的一个臂是本发明的3F8抗体或其片段；及(B) 投与可靶向偶联物。所述可靶向偶联物可以选自由以下组成的群组：(i) DOTA-Phe-Lys (HSG) -D-Tyr-Lys (HSG) -NH₂；(ii) Ac-Lys (HSG) D-Tyr-Lys (HSG) -Lys (Tscg-Cys) -NH₂；(iii) DOTA-D-Asp-D-Lys (HSG) -D-Asp-D-Lys (HSG) -NH₂；(iv) DOTA-D-Glu-D-Lys (HSG) -D-Glu-D-Lys (HSG) -NH₂；(v) DOTA-D-Tyr-D-Lys (HSG) -D-Glu-D-Lys (HSG) -NH₂；(vi) DOTA-D-Ala-D-Lys (HSG) -D-Glu-D-Lys (HSG) -NH₂；(vii) DOTA-D-Phe-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH₂；(viii) Ac-D-Phe-D-Lys (DOTA) -D-Tyr-D-Lys (DOTA) -NH₂；(ix) Ac-D-Phe-D-Lys (DTPA) -D-Tyr-D-Lys (DTPA) -NH₂；(x) Ac-D-Phe-D-Lys (Bz-DTPA) -D-Tyr-D-Lys (Bz-DTPA) -NH₂；(xi) Ac-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -D-Lys (Tscg-Cys) -NH₂；(xii) DOTA-D-Phe-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -D-Lys (Tscg-Cys) -NH₂；(xiii) (Tscg-Cys) -D-Phe-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -D-Lys (DOTA) -NH₂；(xiv) Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys (HSG) -D-Glu-D-Lys (HSG) -NH₂；(xv) (Tscg-Cys) -D-Glu-D-Lys (HSG) -D-Glu-D-Lys (HSG) -NH₂；(xvi) Ac-D-Cys-D-Lys (DOTA) -D-Tyr-D-Ala-D-Lys (DOTA) -D-Cys-NH₂；(xvii) Ac-D-Cys-D-Lys (DTPA) -D-Tyr-D-Lys (DTPA) -NH₂；(xviii) Ac-D-Lys (DTPA) -D-Tyr-D-Lys (DTPA) -D-Lys (Tscg-Cys) -NH₂；(xix) Ac-D-Lys (DOTA) -D-Tyr-D-Lys (DOTA) -D-Lys (Tscg-Cys) -NH₂；荧光素及其衍生物；去铁敏及其衍生物。

[0076] 在一些方面，本发明提供一种靶向方法，其中所述方法包含：(A) 向即将经历此类程序的受试者注射双特异性抗体F(ab)₂或F(ab')₂片段，或单链Fv片段，其中所述双特异性抗体或片段具有特异性结合到被本发明的3F8MoAb识别的抗原的第一抗体结合位点，并且具有特异性结合到半抗原的第二抗体结合位点，并使所述抗体片段在靶位点连接；(B) 如果所述双特异性片段在注射的约24小时内大部分未从循环清除，那么任选地使用清除剂清除非靶向抗体片段，并注射半抗原修饰的葡聚糖，或树枝状聚合物，或聚合物，其将非靶向抗体或片段迅速地移到肝中进行降解；(C) 在第一次注射的数小时内，通过核成像，或使用扫描仪或探针近距离检测靶位点处连接的标记的水平升高，来检测所述半抗原的存在，并进行所述程序，其中所述检测是在不使用造影剂或减影剂(subtraction agent)情况下执行。在一个优选实施例中，所述半抗原标记有诊断/检测用放射性同位素、MRI图像增强剂、荧光标记或化学发光标记。荧光标记可以包括若丹明、荧光素、肾造影剂、异硫氰酸荧光素、藻青蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛及荧光胺。化学发光标记可以包括鲁米诺(luminol)、异鲁米诺、芳香族吖啶酯、咪唑、吖啶盐及草酸酯。MRI图像增强剂包括钆和铁磁性物质。抗体-半抗原定位的成像检测携带GD2的整个肿瘤细胞，这对于肿瘤分期、测量肿瘤对治疗的反应、检测早期复发及肿瘤监测至关重要。作为癌症治愈性疗法的一部分，抗体-

半抗原定位的检测在手术期间给出肿瘤的精确位置并且揭露疾病的隐性部位,从而实现完整手术切除。

[0077] 在本发明中还考虑一种多价、多特异性抗体或其片段,其包含对被3F8抗体识别的抗原具有亲和力的一或多个抗原结合位点,及对细胞(淋巴细胞、自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞、骨髓细胞、干细胞、神经干细胞、间充质干细胞、白血病细胞、细胞毒性淋巴细胞及B淋巴细胞)上的表位或半抗原具有亲和力的一或多个半抗原结合位点。这些双特异性抗体或片段可以通过各种途径(包括静脉内、鞘内及瘤内)投与哺乳动物(包括人类)中以使内源性细胞或外源输注的细胞靶向携带抗原GD2的位点或组织或细胞。或者,可以在向哺乳动物(包括人类)投与之前,使用这些双特异性抗体或片段离体装备细胞。

[0078] 在本发明中还考虑使用遗传方法,使用3F8或其片段的序列产生对GD2具有特异性的嵌合表面受体,以使细胞(淋巴细胞、自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞、骨髓细胞、干细胞、神经干细胞、间充质干细胞、白血病细胞、细胞毒性淋巴细胞及B淋巴细胞)重定向到带有GD2的组织、器官或肿瘤的用途,其是用于诊断应用和治疗应用。

[0079] 在一个方面,本发明提供分离的核酸分子,其包含编码前述特异性抗GD2抗体的多核苷酸,与所述多核苷酸互补或与所述多核苷酸杂交,所述多核苷酸包含其至少一个指定序列、结构域、部分或变体。

[0080] 本发明另外提供包含所述抗GD2抗体核酸分子的重组载体、含有此类核酸和/或重组载体的宿主细胞,以及制备和/或使用此类抗体核酸、载体和/或宿主细胞的方法。因此,本发明包含编码至少一种分离的哺乳动物抗GD2抗体或其片段的分离的核酸;包含所述分离的核酸的分离的核酸载体;和/或包含所述分离的核酸的原核或真核宿主细胞。所述宿主细胞可以任选地是选自以下的至少一种: COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、CHO-S、DG44、BSC-1、Hep G2、653、Sp2/0、293、HeLa、骨髓瘤或淋巴瘤细胞,或其任何衍生物、永生化细胞或经转化细胞。还提供一种用于制造至少一种抗GD2抗体的方法,其包含在体外、体内或原位在一定条件下翻译编码所述抗体的核酸,以使得所述抗体以可检测或可回收的量表达,包括使用载体的方法,所述方法允许在代谢路径或酶的控制下使用生长和存活选择来扩增蛋白质表达,所述酶包括(但不限于) dhfr (二氢叶酸还原酶) 或GS (谷氨酰胺合成酶)。

[0081] 本发明还提供至少一种用于在宿主细胞中表达至少一种前述抗GD2抗体的方法,其包含在一定条件下培养如本文中所描述的宿主细胞,其中至少一种抗GD2抗体是以可检测和/或可回收的量表达。

[0082] 本发明还提供至少一种组合物,其包含 (a) 编码分离的抗GD2抗体的核酸和/或如本文中所描述抗体;及 (b) 适合的载剂或稀释剂。根据已知的载剂或稀释剂,所述载剂或稀释剂可以任选地是医药学上可接受的。所述组合物可以任选地进一步包含至少一种其它化合物、蛋白质或组合物。在这些组合物的一些中,嵌合或人类化抗体偶联到细胞毒性剂(即,削弱细胞的活力和/或功能的试剂),例如细胞毒性药物、毒素或放射性核素。

[0083] 本发明另外提供至少一种抗GD2抗体方法或组合物,如所属领域中已知和/或如本文中所描述,其以治疗有效量投与以调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者的至少一种GD2相关病况,和/或在相关病况之前、之后或期间投与。因此,本发明提供一种用于诊断或治疗细胞、组织、器官或动物的GD2相关病况的方法,其包含使包含有效量的至少一种本发明的分离的抗GD2抗体或其片段的组合物与所述细胞、组织、器官或动物接触,或向所述细

胞、组织、器官或动物投与所述组合物。所述方法可以任选地进一步包含将每公斤0.001-50mg的有效量的本发明的抗GD2抗体用于所述细胞、组织、器官或动物。所述方法可以任选地进一步包含通过至少一种选自以下的模式进行所述接触或所述投与：不经肠、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈管内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、鞘内、奥马耶内 (intra-Ommaya)、玻璃体内、眼内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、经阴道、经直肠、颊、舌下、鼻内或透皮。所述方法可以任选地进一步包含在所述抗体接触或投与之前、同时或之后，投与至少一种包含有效量的至少一种化合物或蛋白质或细胞的组合物，所述化合物或蛋白质或细胞选自以下至少一者：可检测标记或报告子、TNF拮抗剂、抗风湿剂、肌肉松弛剂、安眠药、非类固醇消炎药 (NSAID)、镇痛剂、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂、抗牛皮癣剂、皮质类固醇、同化类固醇、促红细胞生成素、免疫接种、免疫球蛋白、抗体或抗体源性偶联物、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病剂、刺激剂、哮喘药物、 β 促效剂、吸入性类固醇、肾上腺素或其类似物、细胞毒性剂或其它抗癌剂、抗代谢物 (例如甲氨蝶呤 (methotrexate))、抗增生剂、细胞因子、白细胞介素、生长因子、细胞因子拮抗剂及抗TNF α 、白细胞、T细胞、LAK细胞、TIL细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、NKT细胞、经工程改造的T细胞或NK细胞或单核细胞或粒细胞。

[0084] 本发明另外提供用于诊断细胞、组织、器官、动物或患者的至少一种GD2相关病况，和/或在相关病况 (如所属领域中已知和/或如本文中所描述) 之前、之后或期间进行诊断的至少一种抗GD2抗体方法。

[0085] 根据本发明，本发明还提供用于诊断至少一种抗GD2抗体病况的至少一种组合物、装置和/或递送方法。

[0086] 还提供一种组合物，其包含至少一种本发明的分离的人类化抗GD2抗体及至少一种医药学上可接受的载剂或稀释剂。所述组合物可以任选地进一步包含有效量的至少一种化合物或蛋白质，所述化合物或蛋白质选自以下至少一者：可检测标记或报告子、细胞毒性剂或其它抗癌剂、抗代谢物 (例如甲氨蝶呤)、抗增生剂、细胞因子或细胞因子拮抗剂、TNF拮抗剂、抗风湿剂、肌肉松弛剂、安眠药、非类固醇消炎药 (NTHE)、镇痛剂、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂、抗牛皮癣剂、皮质类固醇、同化类固醇、促红细胞生成素、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病剂、刺激剂、哮喘药物、 β 促效剂、吸入性类固醇、肾上腺素或类似物。

[0087] 还提供一种医疗装置，其包含至少一种本发明的分离的哺乳动物抗GD2抗体，其中所述装置适合于通过至少一种选自以下的模式接触或投与所述至少一种抗GD2抗体：不经肠、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、鞘内、奥马耶内、玻璃体内、眼内、结肠内、颈管内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、经阴道、经直肠、颊、舌下、鼻内或透皮。

[0088] 在另一方面，本发明提供一种试剂盒，其包含在第一容器中的呈冻干形式的至少一种本发明的嵌合或人类化抗GD2抗体或片段，及可任选的第二容器，所述第二容器包含无菌水、无菌缓冲水，或在水性稀释剂中的至少一种选自由以下组成的群组的防腐剂：苯酚、

间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、苯基亚硝酸汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁、对羟基苯甲酸烷酯、苯扎氯铵 (benzalkonium chloride)、苄索氯铵 (benzethonium chloride)、脱氢乙酸钠及硫柳汞 (thimerosal)、甘露醇、蔗糖、甘露糖、其它糖、吐温80 (tween 80), 或其混合物。在一个方面, 在所述试剂盒中, 在所述第一容器中的抗GD2抗体或指定部分或变体的浓度是用所述第二容器的内含物复原到约0.1mg/ml到约500mg/ml浓度。在另一方面, 所述第二容器进一步包含等渗剂。在另一方面, 所述第二容器进一步包含生理学上可接受的缓冲剂。在一个方面, 本发明提供一种治疗至少一种GD2特征性病况的方法, 其包含向有需要的患者投与提供于试剂盒中并且在投与之前复原的调配物。

[0089] 还提供一种用于人类医药或诊断应用的制品, 其包含包装材料及容器, 所述容器包含呈溶液或冻干形式的至少一种本发明的分离的嵌合或人类化抗GD2抗体。所述制品可以任选地包含具有所述容器作为以下的组成部分: 不经肠、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、鞘内、奥马耶内、玻璃体内、眼内、结肠内、颈管内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、经阴道、经直肠、颊、舌下、鼻内或透皮递送装置或系统。

附图说明

[0090] 本文中包括的附图包含以下诸图, 仅用于说明的目的而非限制。

[0091] 图1显示具有hu3F8V1scFv的不同肿瘤类型的染色强度的强度。

[0092] 图2显示使用点击化学 (Click Chemistry), 由叠氮基-GD2-寡糖与生物素-(PEG) 4-炔反应制成的生物素-PEG-GD2的化学结构。

[0093] 图3显示示例性hu3F8V1IgG的解离速率的Biacore传感图。

具体实施方式

[0094] 某些定义

[0095] 在以下说明中, 充分利用了重组DNA和免疫学中使用的多个术语。为了提供对说明书和权利要求书 (包括欲给出所述术语的范围) 更清晰并且更一致的理解, 提供以下定义。

[0096] 成人: 如本文中所用, 术语“成人”是指年龄为十八岁或更年长的人类。成人之间的体重可以变化极大, 并且典型范围是90磅到250磅。

[0097] 亲和力: 如所属领域中所知, “亲和力”是对特定配体 (例如, 抗体) 结合到其搭配物 (例如, 表位) 的紧密度的度量。亲和力可以通过不同方式测量。

[0098] 氨基酸: 如本文中所用, 术语“氨基酸”在其最广泛意义上是指可以并入多肽链中的任何化合物和/或物质。在一些实施例中, 氨基酸具有一般结构 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{COOH}$ 。在一些实施例中, 氨基酸是天然存在的氨基酸。在一些实施例中, 氨基酸是合成氨基酸; 在一些实施例中, 氨基酸是d-氨基酸; 在一些实施例中, 氨基酸是l-氨基酸。“标准氨基酸”是指天然存在的肽中常见的二十种标准l-氨基酸中的任一种。“非标准氨基酸”是指除标准氨基酸外的任何氨基酸, 不管其是以合成方式制备的还是从天然来源获得的。如本文中所用, “合成氨基酸”涵盖经化学修饰的氨基酸, 包括 (但不限于) 盐、氨基酸衍生物 (例如酰胺) 和/或取代。肽中包括羧基和/或氨基末端氨基酸在内的氨基酸可以通过甲基化、酰胺化、乙酰化、

保护基和/或以其它化学基团取代来进行修饰,这些修饰可以改变肽的循环半衰期,同时不会对其活性产生不利影响。氨基酸可以参与二硫键。氨基酸可以包含一个或翻译后修饰,例如与一或多个化学实体(例如甲基、乙酸酯基、乙酰基、磷酸酯基、甲酰基部分、类异戊二烯基、硫酸酯基、聚乙二醇部分、脂质部分、碳水化合物部分、生物素部分等)结合。术语“氨基酸”可与“氨基酸残基”互换使用并且可以指游离氨基酸和/或肽的氨基酸残基。从使用这一术语的上下文中显而易见,其是指游离氨基酸,抑或是指肽的残基。

[0099] 动物:如本文中所用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施例中,“动物”是指任一性别和处于任何发育阶段的人类。在一些实施例中,“动物”是指处于任何发育阶段的非人类动物。在某些实施例中,所述非人类动物是哺乳动物(例如啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施例中,动物包括(但不限于)哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类、昆虫和/或蠕虫。在某些实施例中,动物易受DV感染。在一些实施例中,动物可以是转基因动物、遗传工程改造的动物,和/或克隆。

[0100] 抗体:术语“抗体”是所属领域公认的术语并且意图包括结合到已知抗原的分子或分子的活性片段。结合到已知抗原的分子的活性片段的实例包括Fab和F(ab')₂片段。这些活性片段可以通过多种技术,由本发明的抗体得到。举例来说,可以用酶(例如胃蛋白酶)裂解纯化的单克隆抗体,并使其经历HPLC凝胶过滤。接着可以收集含有Fab段的适当部分并通过膜过滤等进行浓缩。有关分离抗体的活性片段的通用技术的进一步说明,参见例如,科奥B.A. (Khaw, B.A.) 等人,核医学杂志(J. Nucl. Med.) 23:1011-1019 (1982)。术语“抗体”还包括双特异性抗体和嵌合抗体,及其它可用形式。

[0101] 在一些实施例中,如本文中所描述的抗体为或包含全长免疫球蛋白分子(例如,IgG抗体)或免疫球蛋白分子的免疫活性(即,特异性结合)部分,如抗体片段。

[0102] 抗体片段是抗体的一部分,例如F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、sFv等。不管结构如何,抗体片段与完整抗体所识别的抗原结合。举例来说,3F8单克隆抗体片段与3F8所识别的表位结合。术语“抗体片段”还包括任何合成或经遗传工程改造的蛋白质,其包括抗体的抗原结合结构并且如同抗体一样,通过结合到特异性抗原以形成复合物来起作用。举例来说,抗体片段包括由可变区组成的分离的片段,例如由重链或轻链的可变区组成的“Fv”片段;轻链和重链可变区通过肽连接子连接的重组单链多肽分子(“scFv蛋白质”);及由作为或模拟高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位。

[0103] 举例来说,在一些实施例中,抗体片段包含一或多个,并且在一些实施例中包括所有在亲本抗体的重链或轻链中所见的互补决定区(CDR)。在一些实施例中,并且抗体片段进一步包括邻近CDR的序列。在一些实施例中,抗体片段包括与亲本完整抗体的一部分一致的序列;在一些实施例中,所述部分包括1、2或3个CDR;在一些实施例中,所述部分对应于全长链。在一些实施例中,所述部分的长度是至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50或更多个氨基酸。

[0104] 措辞“单克隆抗体”是所属领域公认的术语。单克隆抗体也是单特异性抗体,因为其是由一种类型的免疫细胞产生并且都是单一亲本细胞的克隆。

[0105] 所属领域中存在用于产生单克隆抗体的多种方法。举例来说,单克隆抗体可以通过重组DNA方法,例如美国专利第4,816,567号中描述的那些方法制备。在此上下文中,术语

“单克隆抗体”是指由单一真核、噬菌体或原核克隆得到的抗体。编码本发明的单克隆抗体的DNA可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合到编码鼠类抗体的重链和轻链,或来自人类、人类化或其它来源的此类链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离并测序。一旦分离,就可以将DNA放入表达载体中,接着将其转化到不以其它方式产生免疫球蛋白的宿主细胞中,以在重组宿主细胞中合成单克隆抗体,所述宿主细胞例如为NS0细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、酵母细胞、藻细胞、卵或骨髓瘤细胞。DNA还可以例如通过用所需物种的人类重链和轻链恒定结构域的编码序列代替同源人类序列(美国专利第4,816,567号;莫里森(Morrison)等人,同前文献)或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接到免疫球蛋白编码序列来进行修饰。此类非免疫球蛋白多肽可以取代本发明的抗体的恒定结构域,或可以取代本发明的抗体的一个抗原组合位点的可变结构域以产生嵌合二价抗体。

[0106] 在一些实施例中,“抗体药剂”为或包含抗体或其片段,或者包含此类抗体或其片段或由其组成的药剂。

[0107] 可比较的:术语“可比较的”在本文中用于描述两组(或两组以上)情形或情况彼此足够相似,从而允许比较所获得的结果或所观察到的现象。在一些实施例中,可比较的组的情形或情况的特征在于多个实质上相同的特征及一个或少量变化的特征。所属领域的普通技术人员应了解,数组情形在以足够数目和类型的实质上相同的特征为特征时是彼此可比较的,从而保证以下合理的结论:在不同组的情形或情况下获得的结果或观察到的现象的差异是由变化的那些特征的变化所引起或指示所述变化。

[0108] 对应于:如本文中所用,术语“对应于”通常用于指定所关注的多肽中氨基酸残基的位置/身份。所属领域技术人员应了解,出于简单的目的,多肽中的残基通常使用标准编号系统,基于参考相关多肽指定,因此,举例来说,“对应于”190位残基的氨基酸无需实际上是特定氨基酸链中的第190位氨基酸,而是对应于在参考多肽中190位处发现的残基;所属领域普通技术人员易于了解如何鉴别“对应的”氨基酸。

[0109] 剂型:如本文中所用,术语“剂型”和“单位剂型”是指用于待治疗患者的治疗性蛋白质(例如抗体)的物理上分散的单元。每一单元含有经计算以产生所需治疗作用的预定量的活性物质。然而,应理解,组合物的总剂量将由主治医师在合理医学判断范围内决定。

[0110] 给药方案:本文中使用的术语“给药方案”(或“治疗方案”)是通常间隔一定时间段向受试者单独投与的一组单位剂量(通常是一个以上)。在一些实施例中,给定治疗剂具有推荐的给药方案,其可能涉及一或多个剂量。在一些实施例中,给药方案包含多个剂量,其各自彼此间隔相同长度的时间段;在一些实施例中,给药方案包含多个剂量以及间隔开个别剂量的至少两个不同时间段。在一些实施例中,给药方案内的所有剂量都具有相同单位剂量的量。在一些实施例中,给药方案内的不同剂量具有不同的量。在一些实施例中,给药方案包含呈第一剂量的量的第一剂量,接着是呈不同于第一剂量的量的第二剂量的量的一或多个另外的剂量。在一些实施例中,给药方案包含呈第一剂量的量的第一剂量,接着是呈与第一剂量的量相同的第二剂量的量的一或多个另外的剂量。

[0111] 表位:术语“表位”是所属领域公认的。所属领域技术人员大体上应理解为指一或多种抗原中与抗体相互作用的区域。肽或蛋白质或糖抗原的表位可以是线性或呈一定构形,或者可以由抗原的相邻或不相邻氨基酸和/或糖序列形成。与许多碳水化合物相同,GD2

分子含有许多表位。所属领域的技术人员将理解,在一些实施例中,所提供的抗体药剂可以与其靶表位的变体结合(例如,交叉反应),所述靶表位的变体例如可以含有一或多个氨基酸或糖残基的取代、修饰、添加、缺失或化学模拟物。根据所提供的抗体药剂,此类变体表位及其用途在本发明的范围内。抗个体基因型抗体是本发明的一个实施例。在一些实施例中,氨基酸或糖表位,或模拟肽/化学物质,或抗个体基因型抗体提供一种例如用于在免疫亲和柱上从MoAb洗脱GD2或从GD2洗脱MoAb的便利方法。这些表位的进一步截短可为可能的。

[0112] 一致性:如本文中所用,术语“一致性”是指聚合物分子之间,例如核酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。举例来说,两个核酸序列的一致性百分比的计算可以通过出于最佳比较目的对准两个序列来进行(例如,可以将空位引入第一和第二核酸序列中的一个或两个中以便最佳对准并且出于比较目的可以忽略不一致序列)。在某些实施例中,出于比较目的而对准的序列长度是参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或实质上100%。接着比较在对应核苷酸位置处的核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中对应位置相同的核苷酸占据时,则所述分子在所述位置处是一致的。考虑到最佳对准两个序列需要引入的空位的数目和每一空位的长度,两个序列之间的一致性百分比与所述序列共有的一致位置的数目有关。序列的比较和两个序列之间一致性百分比的确定可以使用数学算法实现。举例来说,两个核苷酸序列之间的一致性百分比可使用迈尔(Meyers)和米勒(Miller)(CABIOS,1989,4:11-17)的算法来测定,所述算法已并入使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4的ALIGN程序(2.0版)中。或者,可以使用GCG软件包中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵确定两个核苷酸序列之间的一致性百分比。

[0113] 分离的:如本文中所用,术语“分离的”是指这样一种物质和/或实体:(1)已与在最初产生时与其相关联的至少一些组分分离(无论是在自然界中和/或在实验环境中);和/或(2)通过人工产生、制备和/或制造。分离的物质和/或实体可以与约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%的与其最初相关联的其它组分分离。在一些实施例中,分离的药剂是约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%纯。如本文中所用,如果一种物质实质上不含其它组分,那么其是“纯的”。如本文中所用,分离的物质和/或实体的纯度百分比的计算不应包括赋形剂(例如缓冲剂、溶剂、水等)。

[0114] 裸:在一些实施例中,如果一种抗体药剂未偶联到有效负载(例如,诊断剂或治疗剂),那么其可被称为“裸”的。此类裸抗体药剂可用于多种情形,包括由于所述抗体分子的Fc部分提供效应功能,例如补体固定和ADCC(抗体依赖性细胞的细胞毒性),这些效应功能使机制实行可能引起细胞溶解的作用。裸抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体,以及某些重组抗体,例如嵌合抗体、人类化抗体或人类抗体。然而,可能的情况是治疗功能不需要Fc部分,而是抗体通过其它机制,例如诱导细胞周期静止和细胞凋亡来发挥其治疗作用。在此情况下,裸抗体还包括如上文所定义的未偶联的抗体片段。

[0115] 嵌合:“嵌合”抗体是这样一种重组蛋白,其含有包括来源于一种物种的抗体(优选啮齿动物抗体)的互补决定区(CDR)的可变结构域,而所述抗体分子的恒定结构域是来源于人类抗体的恒定结构域。对于兽医学应用,嵌合抗体的恒定结构域可以来源于其它物种,例

如猫或狗的恒定结构域。

[0116] 人类化：“人类化”抗体是这样一种重组蛋白，其中来自一种物种的抗体（例如啮齿动物抗体）的CDR从所述啮齿动物抗体的重链和轻链可变链转移到人类重链和轻链可变结构域中。所述抗体分子的恒定结构域是来源于人类抗体的恒定结构域。

[0117] 人类：术语“人类”通常用于指由已经“工程改造”成响应于抗原攻击而产生特异性人类抗体的转基因小鼠获得的一种抗体。在此类技术中，将人类重链和轻链基因座的元件引入来源于含有内源性重链和轻链基因座靶向破坏的胚胎干细胞系的小鼠品系中。转基因小鼠可以合成对人类抗原具有特异性的人类抗体，并且所述小鼠可以用于产生人类抗体分泌性杂交瘤。用于从转基因小鼠获得人类抗体的方法描述于格林 (Green) 等人，自然·遗传学 (Nature Genet.) 7:13 (1994)；隆伯格 (Lonberg) 等人，自然 (Nature) 368:856 (1994)；及泰勒 (Taylor) 等人，国际免疫学 (Int. Immun.) 6:579 (1994) 中。还可以通过基因或染色体转染法，以及噬菌体呈现技术构建完全人类抗体，所述方法都是所属领域中已知的。有关来自未免疫供体的免疫球蛋白可变结构域基因谱系体外产生人类抗体及其片段，参见例如，麦卡弗蒂 (McCafferty) 等人，自然，348:552-553 (1990)。在此技术中，将抗体可变结构域基因同框克隆到丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中，并在噬菌体粒子的表面上呈现为功能性抗体片段。由于丝状粒子含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝，故基于所述抗体的功能特性进行的选择也引起编码展现那些特性的抗体的基因的选择。以此方式，噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体呈现可以通过多种形式进行，有关其评述，参见例如约翰逊 (Johnson) 和奇思维尔 (Chiswell)，结构生物学当前观点 (Current Opinion in Structural Biology) 3:5564-571 (1993)。

[0118] 还可以由体外活化的B细胞产生人类抗体。参见美国专利第5,567,610号和第5,229,275号，其以全文引用的方式并入。

[0119] 治疗剂：治疗剂是当根据特定方案投与时往往会实现所需治疗益处的一种实体。在一些实施例中，治疗剂可以与抗体部分分开、同时或依序投与，或偶联到抗体部分，即，抗体或抗体片段，或子片段，并且可用于治疗疾病。治疗剂的实例包括抗体、抗体片段、药物、毒素、核酸酶、激素、免疫调节剂、螯合剂、硼化合物、光活性药剂或染料及放射性同位素。

[0120] 诊断剂：诊断剂是当投与时可检测的一种实体。在一些实施例中，投与的诊断剂与抗体部分，即，抗体或抗体片段，或子片段偶联，并且可用于通过定位含有所述抗原的细胞来诊断或检测疾病。有用的诊断剂包括（但不限于）放射性同位素、染料（例如利用生物素-抗生物素蛋白链菌素复合物）、造影剂、荧光化合物或分子及用于磁共振成像 (MRI) 的增强剂（例如，顺磁性离子）。美国专利第6,331,175号描述MRI技术及偶联到MRI增强剂的抗体的制备并且所述专利是以全文引用的方式并入。优选地，所述诊断剂选自由以下组成的群组：放射性同位素、用于磁共振成像的增强剂、及荧光化合物。在一些实施例中，诊断剂可以包含放射性或非放射性标记、造影剂（例如用于磁共振成像、计算机断层扫描或超声波），并且所述放射性标记可以是发射 γ 、 β 、 α 、俄歇电子 (Auger electron) 或正电子的同位素。为了向抗体组分装载放射性金属或顺磁性离子，需要使其与具有长尾的试剂反应，所述长尾附接到多个用于结合离子的螯合基团。此类尾可以是聚合物，例如聚赖氨酸、多糖，或具有可以结合螯合基团的侧接基团的其它衍生化或可衍生化链，所述螯合基团例如为乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、卟啉、多胺、冠醚、双-缩氨基硫脲、聚脒及已知可用于

此目的的类似基团。螯合剂可以使用标准化学反应与抗体偶合。螯合剂通常通过能够与前述分子形成键,同时具有极小免疫反应性损失和极少聚集和/或内部交联的基团连接到所述抗体,用于将螯合剂偶联到抗体的其它更不寻常的方法和试剂揭示于1989年4月25日颁予霍苏恩 (Hawthorne) 的题为“抗体偶联物 (Antibody Conjugates)”的美国专利第4 824, 659号中,所述专利的揭示内容以全文引用的方式并入本文中。特别有用的金属-螯合剂组合包括2-苯甲基-DTPA及其单甲基和环己基类似物,其与诊断同位素一起使用以进行放射成像。当与本发明的抗体一起使用时,这些螯合剂在与非放射性金属(例如锰、铁及钆)络合时可用于MRI。大环螯合剂,例如NOTA、DOTA及TETA可与多种金属和放射金属,最确切地说,分别与放射性核素镓、钪及铜一起使用。此类金属-螯合剂络合物可以通过针对所关注的金属定制环大小而变得极稳定。本发明涵盖其它由于稳定结合核素(例如用于RAIT的²²³Ra)而引起关注的环类螯合剂(例如大环聚醚)。

[0121] 免疫偶联物:“免疫偶联物”是抗体组分与有效负载(例如,治疗剂或诊断剂)的偶联物(即,共价键联)。

[0122] 免疫调节剂:“免疫调节剂”是当存在时通常刺激免疫细胞(例如巨噬细胞、B细胞和/或T细胞)在免疫反应级联中增殖或变得活化的一种试剂。如本文中所描述的免疫调节剂的实例是细胞因子。所属领域技术人员应了解,某些白细胞介素和干扰素是刺激T细胞或其它免疫细胞增殖的细胞因子的实例。

[0123] 表达载体:“表达载体”是包含在宿主细胞中表达的基因的DNA分子。通常,基因表达是处于某些调控元件,包括组成型或诱导型启动子、组织特异性调控元件及强化子的控制下。此类基因被认为是“可操作地连接到”调控元件。

[0124] 宿主细胞:重组“宿主细胞”可以是含有克隆载体或表达载体的任何原核或真核细胞。这一术语还包括经遗传工程改造成在宿主细胞的染色体或基因组或宿主细胞的细胞中含有克隆的基因的那些原核或真核细胞,以及转基因动物。

[0125] 突变体:如本文中所用,术语“突变体”是指这样一种实体,其显示出与参考实体显著的结构一致性,但相较于参考实体,由于一或多个化学部分的存在或水平而在结构上不同于参考实体。在许多实施例中,突变体在功能上也与其参考实体不同。一般来说,一种特定实体是否被恰当地视为参考实体的“突变体”是基于其与参考实体的结构一致性的程度。所属领域的技术人员应了解,任何生物或化学参考实体都具有某些特征性结构元件。根据定义,突变体是共有一或多个所述特征性结构元件的不同化学实体。举几个例子,小分子可以具有特征性核心结构元件(例如大环核心)和/或一或多个特征性侧接部分,使得所述小分子的突变体是共有所述核心结构元件和所述特征性侧接部分,但在其它侧接部分方面和/或在所述核心内存在的键的类型(单键相对于双键,E相对于Z等)方面有所不同的突变体,多肽可以具有包含多个氨基酸的特征性序列元件,所述多个氨基酸在线性或三维空间中相对于彼此具有指定的位置和/或有助于特定生物功能,核酸可以具有包含多个核苷酸残基的特征性序列元件,所述多个核苷酸残基在线性或三维空间中相对于彼此具有指定的位置。举例来说,突变体多肽可能因氨基酸序列中的一或多个差异和/或共价附接到多肽主链的化学部分(例如碳水化合物、脂质等)的一或多个差异而不同于参考多肽。在一些实施例中,突变体多肽与参考多肽显示出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%的总体序列一致性。可替代地或另外,在一些实施例中,

突变体多肽并不与参考多肽共有至少一种特征性序列元件。在一些实施例中,参考多肽具有一或多种生物活性。在一些实施例中,突变体多肽共有参考多肽的生物活性中的一或多者。在一些实施例中,突变体多肽缺乏参考多肽的生物活性中的一或多者。在一些实施例中,突变体多肽显示出比参考多肽低的水平的一或多种生物活性。

[0126] 多特异性:“多特异性”抗体是可以同时结合到至少两个具有不同结构的靶(例如两种不同抗原、同一抗原上的两个不同表位,或半抗原及/或抗原或表位)的抗体。一种特异性将针对例如B细胞、T细胞、骨髓细胞、浆细胞或肥大细胞抗原或表位。另一种特异性可以针对同一细胞类型上的不同抗原,例如B细胞上的CD20、CD19、CD21、CD23、CD46、CD80、HLA-DR、CD74或CD22。多特异性多价抗体是具有一个以上结合位点的构筑体并且这些结合位点具有不同特异性。举例来说,双特异性双功能抗体,其中一个结合位点与一种抗原反应并且另一结合位点与另一抗原反应。

[0127] 双特异性:“双特异性”抗体是可以同时结合具有不同结构的两个靶的抗体。双特异性抗体(bsAb)和双特异性抗体片段(bsFab)具有至少一个特异性结合到例如GD2的臂及至少一个特异性结合到带有治疗剂或诊断剂的可靶向偶联物的其它臂。可以使用分子工程改造产生多种双特异性融合蛋白。在一种形式中,双特异性融合蛋白是二价的,由例如具有针对一种抗原的单一结合位点的scFv以及具有针对第二抗原的单一结合位点的Fab片段组成。在另一形式中,双特异性融合蛋白是四价的,由例如具有针对一种抗原的两个结合位点的IgG及针对第二抗原的两个相同scFv组成。

[0128] 近期用于制造双特异性MoAb的方法包括经工程改造的重组MoAb,其具有另外的半胱氨酸残基,由此使其比更常见的免疫球蛋白同型更强烈地交联。参见例如,菲茨杰拉德(FitzGerald)等人,蛋白质工程(Protein Eng.) 10(10):1221-1225,1997。另一方法是工程改造重组融合蛋白,其连接具有所需双重特异性的两种或两种以上不同单链抗体或抗体片段区段。参见例如,克罗马(Coloma)等人,自然—生物技术(Nature Biotech.) 15:159-163, 1997。可以使用分子工程改造产生多种双特异性融合蛋白。

[0129] 连接两种或两种以上不同单链抗体或抗体片段的双特异性融合蛋白是以类似方式制造的。可以使用重组方法制造多种融合蛋白。在一些实施例中,柔性连接子将scFv连接到3F8抗体的重链的恒定区。或者,scFv可以连接到另一人类化抗体的轻链的恒定区。通过PCR反应将重链Fd同框连接到scFv所需的适当连接子序列引入VL和Vk结构域中。接着将编码scFv的DNA片段连接于含有编码CH1结构域的DNA序列的分级载体中。切下所得scFv-CH1构筑体并将其连接于含有编码hu3F8抗体VH区域的DNA序列的载体中。可以使用所得载体转染适当宿主细胞,例如哺乳动物细胞,以表达双特异性融合蛋白。

[0130] 在一些实施例中,本发明的hu3F8抗体及其片段还可以用于制备功能性双特异性单链抗体(bscAb),又称为双功能抗体,并且可以使用重组方法在哺乳动物细胞中产生。参见例如,马克(Mack)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.), 92:7021-7025, 1995,以引用的方式并入本文中。举例来说,通过使用重组方法,经由甘氨酸-丝氨酸连接子连接两个单链Fv片段来制造bscAb。使用所属领域中已知的标准PCR方法分离所关注的两个抗体的V轻链和V重链结构域。双特异性单链抗体和双特异性融合蛋白包括在本发明的范围内。

[0131] 在一些实施例中,本文所描述的的双特异性双功能抗体的最终用途是用于预先靶

向GD2阳性细胞,随后特异性递送诊断剂/检测剂或治疗剂。这些双功能抗体选择性结合到经靶向抗原,实现增加的亲和力及在所需位置处的较长滞留时间。此外,未结合抗原的双功能抗体从体内迅速清除并且使正常组织的暴露减到最少。在某些特定实施例,本文中使用的双功能抗体可以包含或偶联到一或多种诊断剂/检测剂和/或治疗剂,例如同位素、药物、毒素、细胞因子、激素、生长因子、偶联物、放射性核素及金属。举例来说,钆金属被用于磁共振成像(MRI)。放射性核素也可用作诊断剂和治疗剂(不管是否存在双功能抗体或其它物质),尤其是能量范围为60到4,000keV的那些。

[0132] 可靶向构筑体可以具有不同结构,但经选择以避免引发免疫反应,而且还能在bsAb靶向方法内使用时迅速体内清除。疏水性试剂在引发较强免疫反应方面是最佳的,而亲水性试剂优选用于快速体内清除;因此,需要建立疏水性与亲水性之间的平衡。这部分通过依赖于使用亲水性螯合剂抵消许多有机部分的固有疏水性来实现。此外,可以选择具有相反溶解特性的可靶向构筑体的亚基,例如肽,其含有氨基酸,这些氨基酸中有一些是疏水性的并且有一些是亲水性的。除肽以外,可以使用碳水化合物。

[0133] 肽:可以使用具有少到两个氨基酸残基,优选两到十个残基的肽,在一些实施例中,其还与其它部分,例如螯合剂偶合。

[0134] 多肽:术语“多肽”在本文中被用作一种通称,意思指天然蛋白质、多肽序列的片段或类似物。因此,天然蛋白质片段及类似物是属于多肽种类的物质。根据本发明的多肽包含以SEQ ID NO:4、5、10表示的重链免疫球蛋白分子及以SEQ ID NO:1、2、3、6、7、8、9表示的轻链免疫球蛋白分子,以及由包含所述重链免疫球蛋白分子和所述轻链免疫球蛋白分子(例如 κ 轻链免疫球蛋白分子且反之亦然)的组合形成的抗体分子,以及其片段及类似物。

[0135] 连接子:在一些实施例中,在偶联物中利用的“连接子”应相较于所述偶联物具有低分子量,优选分子量低于50,000道尔顿(dalton),并且有利地低于约20,000道尔顿、10,000道尔顿或5,000道尔顿,包括可以在螯合剂中的金属离子。在一些实施例中,连接子部分上亲水性螯合剂部分的存在可以帮助确保快速体内清除。除亲水性外,可以针对金属结合特性选择螯合剂,并且可以随意地改变,因为至少对于bsAb表位是肽的一部分或是非螯合剂化学半抗原的那些连接子来说,金属-螯合剂络合物的识别不再是个问题。

[0136] 突变体:如本文中所用,术语“突变体”是指这样一种实体,其显示出与参考实体显著的结构一致性,但相较于参考实体,由于一或多种化学部分的存在或水平而在结构上不同于参考实体。在许多实施例中,突变体在功能上也与其参考实体不同。一般来说,一种特定实体是否被恰当地视为参考实体的“突变体”是基于其与参考实体的结构一致性的程度。所属领域的技术人员应了解,任何生物或化学参考实体都具有某些特征性结构元件。根据定义,突变体是共有一或多个所述特征性结构元件的不同化学实体。举几个例子,小分子可以具有特征性核心结构元件(例如大环核心)和/或一或多个特征性侧接部分,使得所述小分子的突变体是共有所述核心结构元件和所述特征性侧接部分,但在其它侧接部分方面和/或在所述核心内存在的键的类型(单键相对于双键,E相对于Z等)方面有所不同的突变体,多肽可以具有包含多个氨基酸的特征性序列元件,所述多个氨基酸在线性或三维空间中相对于彼此具有指定的位置和/或有助于特定生物功能,核酸可以具有包含多个核苷酸残基的特征性序列元件,所述多个核苷酸残基在线性或三维空间中相对于彼此具有指定的位置。举例来说,突变体多肽可能因氨基酸序列中的一或多个差异和/或共价连接到多肽主

链的化学部分(例如碳水化合物、脂质等)的一或多个差异而不同于参考多肽。在一些实施例中,突变体多肽与参考多肽显示出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%的总体序列一致性。可替代地或另外,在一些实施例中,突变体多肽并不与参考多肽共有至少一个特征性序列元件。在一些实施例中,参考多肽具有一或多种生物活性。在一些实施例中,突变体多肽共有参考多肽的生物活性中的一或多个者。在一些实施例中,突变体多肽缺乏参考多肽的生物活性中的一或多个者。在一些实施例中,突变体多肽显示出比参考多肽低的水平的一或多种生物活性。

[0137] 螯合剂:螯合剂,例如DTPA、DOTA、TETA或NOTA,可以用于多种情况中,包括用于偶联物中。当与本发明的bsAb一起使用时,这些螯合剂在与非放射性金属,例如Mn、Fe及GD络合时可以用于MRI。大环螯合剂,例如NOTA(1,4,7-三氮杂-环壬烷-N,N',N''-三乙酸)、DOTA及TETA(对溴乙酰胺基-苯甲基-四乙胺四乙酸)可与多种金属和放射性金属,最确切地说,分别与放射性核素Ga、Y及Cu一起使用。

[0138] 偶联物:在一些实施例中,所提供的抗体药剂被用于偶联物中。在一些特定实施例中,螯合剂,例如DTPA、DOTA、TETA或NOTA,或适合肽,可以偶联到可检测标记,例如荧光分子或细胞毒性剂,例如重金属或放射性核素。举例来说,通过将光活性剂或染料偶联到抗体融合蛋白可以获得治疗上有用的免疫偶联物。已经使用荧光组合物,例如荧光染料,及对可见光敏感的其它色素或染料(例如卟啉),通过将适合光导引到病变来检测和治疗病变。在疗法中,此已被称为光辐射、光疗或光动力疗法(乔瑞(Jori)等人(编),肿瘤及其它疾病的光动力疗法(PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES)(利博瑞普盖托(Libreria Progetto)1985);范登伯格(van den Bergh),英国化学(Chem.Britain)22:430(1986))。此外,已经将单克隆抗体与光活化的染料偶合用于实现光疗。米沃(Mew)等人,免疫学杂志(J.Immunol.)130:1473(1983);艾登(idem.),癌症研究(Cancer Res.)45:4380(1985);奥斯洛夫(Oseroff)等人,美国国家科学院院刊,83:8744(1986);艾登,光化学与光生物学(Photochem.Photobiol.)46:83(1987);哈萨(Hasan)等人,临床和生物学研究进展(Prog.Clin.Biol.Res.)288:471(1989);龙田(Tatsuta)等人,激光在外科和内科中的应用(Lasers Surg.Med.)9:422(1989);佩雷格林(Pelegrin)等人,癌症(Cancer)67:2529(1991)。然而,这些早期研究并不包括使用内窥镜疗法应用,尤其是使用抗体片段或子片段。因此,本发明涵盖包含光活性剂或染料的免疫偶联物的治疗应用。

[0139] 预防:如本文中所用,术语“预防(prevent/preventing/prevention)”是指通过投与预防性或治疗性药剂来预防受试者的病症的一或多种症状的复发或发作。

[0140] 组合:如本文所用,术语“组合”是指使用超过一种预防性和/或治疗性药剂。术语“组合”的使用并不限制向患有病症的受试者投与预防性和/或治疗性药剂的次序。第一预防性或治疗性药剂可以在向患有病症的受试者投与第二预防性或治疗性药剂之前(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之前)、同时或之后(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之后)投与。

[0141] 效应功能:如本文中所用,“效应功能”意思指由抗体Fc区与Fc受体或配体相互作用引起的生物化学事件。效应功能包括(但不限于)抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)及补体介导的细胞毒性(CMC)。效应功能包括在抗原结合之后操作的那些功能及独立于抗原结合操作的那些功能。

[0142] 效应细胞:如本文中所用,“效应细胞”意思指免疫系统中表达一或多种Fc受体并且介导一或多种效应功能的细胞。效应细胞包括(但不限于)单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞、血小板、大颗粒淋巴细胞、朗格罕氏细胞(Langerhans' cells)、自然杀伤(NK)细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞,并且可以来自任何生物体,包括(但不限于)人类、小鼠、大鼠、兔及猴。

[0143] Fc配体:如本文中所用,“Fc配体”意思指结合到抗体的Fc区以形成Fc-配体复合物的来自任何生物体的分子,优选多肽。Fc配体包括(但不限于)Fc γ RIIA(CD32A)、Fc γ RIIB(CD32B)、Fc γ RIIIA(CD16A)、Fc γ RIIIB(CD16B)、Fc γ RI(CD64)、Fc ϵ RII(CD23)、FcRn、C1q、C3、葡萄球菌蛋白A、链球菌蛋白G及病毒Fc γ R。Fc配体可以包括未发现的结合Fc的分子。

[0144] 衍生物:在多肽或蛋白质的上下文中,如本文中所用的术语“衍生物”是指包含已通过引入氨基酸残基取代、缺失或添加而改变的氨基酸序列的多肽或蛋白质。如本文中所用,术语“衍生物”还指已经修饰,即通过将任何类型的分子共价连接到多肽或蛋白质进行修饰的多肽或蛋白质。举例来说(但不限于),抗体可以例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、用已知保护基/阻断基团衍生化、蛋白水解裂解、与细胞配体或其它蛋白质的键联等进行修饰。可以通过使用所属领域技术人员已知的技术,包括(但不限于)特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素代谢合成等进行化学修饰来产生衍生物多肽或蛋白质。另外,衍生物多肽或蛋白质衍生物具有与得到其的多肽或蛋白质类似或相同的功能。

[0145] 片段:如本文中所用,术语“片段”是指包含具有另一多肽的氨基酸序列的至少5个相邻氨基酸残基、至少10个相邻氨基酸残基、至少15个相邻氨基酸残基、至少20个相邻氨基酸残基、至少25个相邻氨基酸残基、至少40个相邻氨基酸残基、至少50个相邻氨基酸残基、至少60个相邻氨基酸残基、至少70个相邻氨基酸残基、至少80个相邻氨基酸残基、至少90个相邻氨基酸残基、至少100个相邻氨基酸残基、至少125个相邻氨基酸残基、至少150个相邻氨基酸残基、至少175个相邻氨基酸残基、至少200个相邻氨基酸残基或至少250个相邻氨基酸残基的氨基酸序列的肽或多肽。在一个具体实施例中,多肽的片段保持所述多肽的至少一种功能。

[0146] 有效量:有效量:如本文中所用,术语“有效量”是指实现生物作用所需或足够的给定化合物、偶联物或组合物的量。根据本发明的方法,给定化合物、偶联物或组合物的有效量将是实现此选定结果的量,并且此类量可以由所属领域的技术人员按照常规,使用所属领域中已知的和/或本文中描述的分析测定,而无需过度实验。举例来说,用于治疗或预防癌症转移的有效量可以是在体内预防肿瘤细胞跨基底膜或跨内皮层迁移和侵袭所需的量。所述术语还与“足量”同义。用于任何特定应用的有效量可以取决于例如以下因素而变化:所治疗的疾病、病症或病况、投与的特定组合物、投药途径、受试者的体格和/或疾病或病况的严重程度。所属领域的普通技术人员可以根据本文提供的指导,凭经验确定本发明的特定化合物、偶联物或组合物的有效量,无需过度实验。

[0147] 约:如本文结合测量的量所用,术语“约”是指所属领域的技术人员所预期的使测量和操作与测量目的和所用测量设备的精确度在所关注的水平上相称的所测量的量的正态变化。除非另外指明,否则“约”是指所提供的值的+/-10%的变化。

[0148] 分离的:“分离的”多肽或片段、变体或衍生物意图指不处于天然环境中的多肽。不需要特定的纯化水平。举例来说,分离的多肽可以从其原生或天然环境移出。出于本发明的目的,在宿主细胞中表达的以重组方式产生的多肽和蛋白质被认为是分离的,并且已通过任何适合技术分离、分级分离,或部分或实质上纯化的原生或重组多肽也被认为是分离的。

[0149] 小分子:一般来说,“小分子”是大小低于约5千道尔顿(kilodalton,kD)的分子。在一些实施例中,小分子小于约4kD、3kD、约2kD或约1kD。在一些实施例中,小分子小于约800道尔顿(D)、约600D、约500D、约400D、约300D、约200D或约100D。在一些实施例中,小分子小于约2000g/mol、小于约1500g/mol、小于约1000g/mol、小于约800g/mol或小于约500g/mol。在一些实施例中,小分子不是聚合物。在一些实施例中,根据本发明,小分子不是蛋白质、多肽、寡肽、肽、多核苷酸、寡核苷酸、多糖、糖蛋白、蛋白多糖等。

[0150] 实质上:如本文中所用,术语“实质上”是指展现全部或接近全部范围或程度的所关注的特征或特性的定性条件。生物学领域的技术人员应理解,生物和化学现象很少(如果发生过)达到完全和/或进行到完全,或者实现或避免绝对结果。因此,术语“实质上”在本文中用于捕捉许多生物和化学现象中所固有的潜在完全性缺乏。

[0151] 治疗有效量:如本文中所用,术语“治疗有效量”是指以适用于任何药物治疗的合理效益/风险比赋予所治疗的受试者治疗作用的治疗性蛋白质的量。所述治疗作用可以是客观的(即,可通过一些测试或标记物测量)或主观的(即,个体声明有作用或感到有作用)。确切地说,“治疗有效量”是指例如通过改善与疾病有关的症状,预防或延缓疾病的发作,和/或减轻疾病的症状的严重程度或频率来有效治疗、改善或预防所需疾病或病况,或展现可检测的治疗或预防作用的治疗性蛋白质或组合物的量。治疗有效量通常是以可包含多个单位剂量的给药方案来投与。对于任何特定治疗性蛋白质来说,治疗有效量(和/或在有效给药方案内的适当单位剂量)可以例如取决于投药途径、与其它医药剂的组合而变化。用于任何特定患者的具体治疗有效量(和/或单位剂量)也可以取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所用具体医药剂的活性;所用具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别及饮食;所用具体融合蛋白的投药时间、投药途径和/或排泄或代谢速率;治疗持续时间;以及医学技术中众所周知的类似因素。

[0152] 治疗:如本文中所用,术语“治疗(treatment/treat/treating)”或“经治疗(treated)”是指防治和/或疗法,确切地说,其中目的是预防或减慢(减轻)非所需的生理变化或病症,例如多发性硬化的发展。有益的或所需的临床结果包括(但不限于)症状的缓解、疾病程度的减轻、疾病状态的稳定(即,未恶化)、疾病进展的延缓或减慢、疾病状态的改善或缓和及缓解(部分抑或全部缓解),无论是可检测的抑或不可检测的。“治疗”还可以指存活期相较于未接受治疗时的预期存活期延长。需要治疗的那些包括已患有病况或病症的那些,以及易患上病况或病症的那些,或打算预防病况或病症的那些。“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”意思指需要诊断、预后或治疗的任何受试者,尤其是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人类和其它灵长类动物、家畜、农畜,以及动物园、体育或玩赏动物,例如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、母牛等。

[0153] 单位剂量:如本文中所用,表述“单位剂量”是指以医药组合物的单一剂量形式和/或其物理上分散的单元形式投与的量。在许多实施例中,单位剂量含有预定量的活性剂。在一些实施例中,单位剂量含有整个单一剂量的药剂。在一些实施例中,投与一个以上单位剂

量以实现总体单一剂量。在一些实施例中,需要或预期将需要投与多个单位剂量以便实现预定作用。单位剂量可以是例如含有预定量的一或多种治疗剂的一定体积的液体(例如可接受的载剂)、预定量的一或多种呈固体形式的治疗剂、含有预定量的一或多种治疗剂的持续释放调配物或药物递送装置等。应了解,单位剂量还可以除治疗剂之外还包括多种组分中的任一者的调配物形式存在。举例来说,可接受的载剂(例如医药学上可接受的载剂)、稀释剂、稳定剂、缓冲剂、防腐剂等可以包括在内,如下文所述。所属领域的技术人员应了解,在许多实施例中,特定治疗剂的总适当每日剂量可以包含部分或多个单位剂量,并且可以例如由主治医师在合理的医学判断范围内决定。在一些实施例中,用于任何特定受试者或生物体的具体有效剂量水平可以取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所用具体活性化合物的活性;所用具体组合物;受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别及饮食;投药时间和所用具体活性化合物的排泄速率;治疗持续时间;与所用具体化合物组合或同时使用的药物和/或另外的疗法,以及医学领域中众所周知的类似因素。

[0154] 成神经细胞瘤

[0155] 成神经细胞瘤(NB)是最常见的儿童颅外实体肿瘤。在约50%的病例中,治愈性策略必须解决骨髓(BM)中的软组织肿块和转移。强化剂量的化学疗法改善肿瘤可切除性,并且术后照射将原发部位的复发风险降低到<10%(库什纳(Kushner)等人,2001,临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol) 19,2821-8)。然而,如通过组织学或间碘苯甲基胍(MIBG)扫描所证实,BM疾病通常持久存在并且预示着致死性结果(马特塞(Matthay)等人,2003,临床肿瘤学杂志,21,2486-91;施密特(Schmidt)等人,2008,欧洲癌症杂志(Eur J Cancer) 44,1552-8)。此外,骨髓复发很常见,尽管在诱导疗法之后实现了几乎完全的缓解。在治疗强化方面的尝试遭受急性和长期副作用,对于年轻患者来说,这两者是严重问题。有前景的新药剂很稀缺,并且到目前为止,有极少(如果存在的话)靶/路径特异性小分子在NB患者中显示出重要临床益处,不过许多有前景的指导仍在继续积累。在年龄>18个月的确诊的4期患者中,在毒性限制下治愈率<30%,有相当大的改善空间(皮尔逊(Pearson)等人,2008,柳叶刀一肿瘤学(Lancet Oncol) 9,247-56)。

[0156] 本发明涵盖认识到若干因素使NB特别适合MoAb靶向免疫疗法。首先,MoAb在人类白细胞存在下非常高效地介导NB的抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。其次,MoAb诱导NB细胞的补体介导的细胞毒性(CMC),所述NB细胞缺乏衰变加速因子CD55(张等人,1988,临床研究杂志(J Clin Invest) 81,1122-8)及同源限制因子CD59(陈(Chen)等人,2000,癌症研究(Cancer Res) 60,3013-8)。补体沉积在NB细胞上通过活化嗜中性粒细胞上的iC3b受体来增强ADCC(库什纳(Kushner)和张,1992,血液(Blood) 79,1484-90;米特利萨(Metelitsa)等人,2002,血液,99,4166-73),如果给与集落刺激因子,则甚至在剂量强化或骨髓性化学疗法加干细胞移植之后也可用(马克奥CL(Mackall,CL),2000,干细胞(Stem Cells) 18,10-8)。再次,使用强化的化学疗法(有关NB的护理标准)来实现临床缓解引起长期淋巴球减少和免疫抑制(马克奥等人,2000,血液,96,754-762),由此使患者不大可能排斥鼠类、嵌合或人类化MoAb(库什纳等人,2007,儿科血液与癌症(Pediatr Blood Cancer) 48,430-4)。

[0157] 参考抗GD2抗体

[0158] GD2是神经外胚层起源的肿瘤(包括成神经细胞瘤和骨髓瘤)上含量丰富并且在正常组织中表达受到高度限制的双唾液酸神经节苷脂。已经在临床上测试用于治疗NB的至少

两个抗GD2抗体家族,即3F8(张等人,1985,癌症研究,45,2642-9)和14.18(穆乔(Mujoo)等人,1989,癌症研究,49,2857-61)。

[0159] 嵌合ch14.18由鼠类MoAb 14.18的可变区和人类IgG1-K的恒定区组成(吉利斯(Gillies)等人,1989,免疫法杂志(J Immunol Methods) 125,191-202)。其在体内展现NB和黑素瘤细胞的ADCC和CMC(巴克(Barker)等人,1991,癌症研究,51,144-9;巴克和雷斯菲尔德(Reisfeld),1993,癌症研究,52,362-7;米勒(Mueller)等人,1990,美国国家科学院院刊(PNAS USA) 87,5702-05)。基于在I期研究中令人鼓舞的临床反应,在大型II期研究中将ch14.18作为4期NB的巩固疗法进行研究(吉曼(German)NB90和NB97研究)。对于诊断时>12个月的166位患者,当与基于维持化学疗法的患者相比较时,即使无事件存活率(EFS)在接受ch14.18的患者中类似,总体存活率(OS)也得到改善,并且BM复发率在用ch14.18治疗的患者中降低(西蒙(Simon)等人,2004,临床肿瘤学杂志,22,3549-57)。

[0160] 在2001年,儿童肿瘤协作组(Children's Oncology Group,COG)开始一项随机分组III期试验,用以研究ch14.18与GM-CSF和IL-2的组合在预防自体干细胞移植(ASCT)之后完全缓解(CR)的患者NB复发方面的功效(ClinicalTrials.gov NCT00026312)(吉尔曼等人,临床肿瘤学杂志,27:85-91,2009),其中发现2年的无进展存活率(PFS)和OS显著改善(余(Yu)等人,新英格兰医学杂志(N Engl J Med) 363:1324-1334,2010)。

[0161] 3F8是一种对GD2具有特异性的鼠类IgG3MoAb,其诱导细胞死亡并且在体外介导针对NB的高效ADCC和CMC(张等人,2007,同前文献)。在患有化疗耐药性骨髓疾病的患者中,尽管利用剂量强化诱导加侵袭性补救方案,有80%通常在1到2个周期的5天抗体加GM-CSF疗法之后实现BM缓解(库什纳等人,2007,美国临床肿瘤学协会会刊(Proc Amer Soc Clin Oncol) 25,526s)。鉴于m3F8针对化疗耐药性骨髓疾病的活性,将m3F8的使用扩展到处于第一次缓解的患者,得到令人鼓舞的结果。如果在复发风险最高的前3-5年间给与m3F8作为维持疗法,那么这些有利的临床结果在儿童中可以得到改善。然而,当化学疗法完成时,人类抗小鼠抗体反应(HAMA)在免疫系统恢复时成为一个限制因素。降低HAMA的一个策略是嵌合或人类化3F8。

[0162] 先前已描述人类化3F8(hu3F8-IgG1H1L1,下文称为hu3F8V1)的工程改造和分离(描述于W0 2011/160119,及张等人,2012,肿瘤免疫学(Oncoimmunology) 1:477-486中,都以全文引用的方式并入本文中)。这些抗体是使用标准重组方法制备,并且针对CHO-DG44细胞系在无血清培养基中的高表达进行选择。如Biacore系统使用表面等离子共振所测量,人类化3F8维持与m3F8类似的KD。与其它抗GD2抗体相比,hu3F8V1具有实质上较慢的koff,其解释为在体外较慢的洗出。与m3F8相同,人类化3F8在体外抑制细胞生长,这不是其它抗GD2抗体特有的。hu3F8V1的血液单核细胞(PBMC)-ADCC和嗜中性粒细胞(PMN)-ADCC比m3F8优良(10到>1000倍),而CMC较差。不管是供体,还是在使用以人类CD16或CD32转染的NK92作为杀手细胞时,始终在ADCC分析中观察到此优越性。当与m3F8相比较时,Hu3F8V1显示出针对NB异种移植物的优良抗肿瘤作用。

[0163] 所提供的抗体药剂

[0164] 本发明涵盖认识到,为了增加治疗效率,需要具有增强的亲和力的新人类化抗体形式。本发明涵盖认识到,希望开发作为3F8和/或hu3F8V1的变体的抗体(或其它抗体药剂)。本发明尤其提供此类抗体和抗体药剂。也就是说,本发明提供与3F8和/或hu3F8V1显示

出显著结构一致性并且还显示出相较于利用3F8和/或hu3F8V1所观察到的功能特性有所改善的功能特性(例如,稳定化和/或亲和力或特异性)的各种抗体药剂。在一个优选的具体实施例中,本发明涵盖一种分子,其包含变体Fc区,其中相对于野生型Fc区,所述变体Fc区包含至少一个氨基酸修饰,由此使所述分子对于Fc γ R具有改变的亲和力,其限制条件是,基于Fc-Fc γ R相互作用的结晶和结构分析,所述变体Fc区在与Fc γ R直接接触的位置处不具有取代,例如桑德曼(Sondermann)等人,2000(自然,406:267-273,以全文引用的方式并入本文中)中揭示的那些。Fc区内与Fc γ R直接接触的位置的实例是氨基酸234-239(铰链区)、氨基酸265-269(B/C环)、氨基酸297-299(C'/E环)及氨基酸327-332(F/G)环。在一些实施例中,包含变体Fc区的本发明分子包含基于结构和结晶分析,与Fc γ R直接接触的至少一个残基的修饰。

[0165] 本发明的一个方面包括对于活化和/或抑制性受体具有改变的亲和力的hu3F8抗体,其具有含一或多个氨基酸修饰的变体Fc区,其中所述一或多个氨基酸修饰是在239位处经天冬氨酸取代、在330位处经亮氨酸取代及在332位处经谷氨酸取代。

[0166] 本发明涵盖包含变体Fc区的分子,相对于参考抗体(例如,参考3F8抗体)Fc区,所述变体Fc区在本发明抗体的Fc区中具有一或多个氨基酸的添加、缺失和/或取代,例如以便改变效应功能,或者增强或减弱所提供的Fc对FcR的亲和力。根据本文提供的指导,制备和使用此类变体Fc区在所属领域技术人员的技能范围内。因此,本发明涵盖包含以较高亲和力结合到一或多个Fc γ R的变体Fc区的分子。如下文所论述,此类分子优选更有效地介导效应功能。

[0167] 在一些实施例中,本发明涵盖包含以比参考抗体(例如,参考3F8抗体)Fc区弱的亲和力结合到一或多个Fc γ R的变体Fc区的分子。在某些情况下,例如就作用机制涉及阻断或拮抗而不是杀灭带有靶抗原的细胞的抗体来说,减少或消除效应功能是合乎需要的。就阻断效应细胞中的Fc γ R活化受体(此类功能将存在于宿主细胞中)的自体免疫疾病来说,减少或消除效应功能将是合乎需要的。一般来说,效应功能增加将是针对肿瘤和外来细胞。

[0168] 在某些实施例中,本发明的Fc变体可以与其它Fc修饰组合,包括(但不限于)改变效应功能的修饰。本发明涵盖将本发明的Fc变体与其它Fc修饰组合,以在抗体或Fc融合物中提供加和、协同或新颖特性。优选本发明的Fc变体增进与其组合的修饰的表型。举例来说,如果将本发明的Fc变体与已知以比包含野生型Fc区的可比较分子高的亲和力结合Fc γ R111A的突变组合,那么具有本发明的突变的组合引起Fc γ R111A亲和力的较高倍数的增强。

[0169] 在一些实施例中,将本发明的Fc变体并入抗体药剂(例如,抗体或Fc融合物)中,所述抗体药剂包含一或多个经工程改造的糖型,即,共价连接到包含Fc区的分子的碳水化合物组合物,其中所述碳水化合物组合物在化学上不同于包含Fc区的亲本分子。

[0170] 本发明涵盖具有经修饰的糖基化位点,优选不改变抗体的功能(例如与GD2的结合活性)的抗体。如本文中所用,“糖基化位点”包括抗体中寡糖(即,含有连接在一起的两种或两种以上单糖的碳水化合物)将特异性并且共价衔接的任何特定氨基酸序列。寡糖侧链通常经由N键联或O键联连接到抗体的主链。N连接的糖基化是指寡糖部分附接到天冬酰胺残基的侧链。O连接的糖基化是指寡糖部分附接到羟基氨基酸,例如丝氨酸、苏氨酸。Fc-糖型,缺乏某些寡糖(包括岩藻糖和末端N-乙酰葡萄糖胺)的hu3F8-H1L1-IgG1n是在特定CHO细胞中

产生并且展现增强的ADCC效应功能。

[0171] 在一些实施例中,本发明涵盖通过添加或缺失糖基化位点来修饰本发明抗体的碳水化合物内含物的方法。用于修饰抗体的碳水化合物内含物的方法是所属领域众所周知的并且涵盖于本发明内,参见例如,美国专利第6,218,149号;EP 0 359 096 B1;美国公开案第US 2002/0028486号;WO 03/035835;美国公开案第2003/0115614号;美国专利第6,218,149号;美国专利第6,472,511号;全部以全文引用的方式并入本文中。在其它实施例中,本发明涵盖通过缺失本发明抗体的一或多个内源性碳水化合物部分来修饰所述抗体的碳水化合物内含物的方法。在一个具体实施例中,本发明涵盖通过将297位从天冬酰胺修饰为丙氨酸来缺失抗体Fc区的糖基化位点。

[0172] 经工程改造的糖型可用于多种目的,包括(但不限于)增强或降低效应功能。可以通过所属领域的技术人员已知的任何方法,例如通过使用经工程改造或变体表达菌株;通过与一或多种酶,例如DI N-乙酰胺基葡萄糖转移酶III (GnTIII) 共表达;通过在各种生物体或来自各种生物体的细胞系中表达包含Fc区的分子;或在表达包含Fc区的分子之后,通过修饰碳水化合物,来产生经工程改造的糖型。用于产生经工程改造的糖型的方法是所属领域中已知的,并且包括(但不限于)以下中描述的那些:尤曼纳(Umana)等人,1999,自然·生物技术(Nat.Biotechnol) 17:176-180;戴维斯(Davies)等人,20017生物技术与生物工程(Biotechnol Bioeng) 74:288-294;谢尔德(Shields)等人,2002,生物化学杂志(J Biol Chem) 277:26733-26740;新川(Shinkawa)等人,2003,生物化学杂志,278:3466-3473);美国专利第6,602,684号;美国系列号10/277,370;美国系列号10/113,929;PCT WO 00/61739A1;PCT WO 01/292246A1;PCT WO 02/311140A1;PCT WO 02/30954A1;POTILLEGENT™ 技术(拜瓦公司(Biowa, Inc.), 新泽西州普林斯顿(Princeton, N.J.)); GLYCOMAB™糖基化工程改造技术(格莱卡特生物技术公司(GLYCART biotechnology AG), 瑞士苏黎士(Zurich, Switzerland)); 其各自以全文引用的方式并入本文中。参见例如,WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; 冈崎(Okazaki)等人,2004, JMB, 336:1239-49, 其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0173] 还包括前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体,及其任何组合作为本发明的多肽。当提到抗GD2抗体或抗体多肽时,术语“片段”、“变体”、“衍生物”及“类似物”包括保持相应天然抗体或多肽的至少一些抗原结合特性的任何多肽,即,保持结合到GD2上一或多个表位的能力的那些多肽。

[0174] 本发明多肽的片段除包括本文中其它地方论述的特定抗体片段外,还包括蛋白水解片段,以及缺失片段。

[0175] 可根据本发明使用的抗GD2抗体和抗体多肽的变体包括如上文所描述的片段,以及由于氨基酸取代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。变体可以是天然存在的或是非天然存在的。非天然存在的变体可以使用所属领域已知的突变诱发技术或非天然氨基酸产生。变体多肽可以包含保守或非保守性氨基酸取代、缺失或添加。

[0176] 可根据本发明使用的抗GD2抗体和抗体多肽的衍生物是已经改变,从而展现在天然多肽上未发现的另外的特征的多肽。实例包括融合蛋白。变体多肽还可以在本文中称作“多肽类似物”。如本文中所用,抗GD2抗体或抗体多肽的“衍生物”是指具有一或多个通过侧接官能团反应而化学衍生化的残基的主题多肽。还包括含有二十个标准氨基酸的一或多个

天然存在的氨基酸衍生物的那些肽作为“衍生物”。举例来说,4-羟基脯氨酸可以取代脯氨酸;5-羟基赖氨酸可以取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可以取代组氨酸;高丝氨酸可以取代丝氨酸;并且鸟氨酸可以取代赖氨酸。

[0177] 在一些实施例中,所提供的抗体药剂显示出功能特性,如本文的实例中所阐述。举例来说,在一些实施例中,提供的药剂显示出相对于亲本3F8抗体和/或其人类化形式(例如,hu3F8V1)有所改善的结合。例示性人类化形式包括具有如本文中所描述的一或多个结构特征的那些。在一些特定实施例中,结构特征包括对应于呈现于免疫球蛋白可变区序列的人类构架区中的序列的一或多个氨基酸取代。在一些特定实施例中,结构特征包括对应于呈现于免疫球蛋白可变区序列的人类CDR区中的序列的一或多个氨基酸取代。在一些特定实施例中,结构特征包括相对于亲本抗体,降低所提供的药剂的免疫原性的一或多个氨基酸取代。在一些特定实施例中,结构特征包括相对于亲本抗体,降低、改善或消除所提供的药剂的T细胞表位的一或多个氨基酸取代。在一些实施例中,所提供的药剂具有结构特征,其包括表2中所示的那些。

[0178] 在一些实施例中,所提供的抗体药剂以比结合GD2的不同抗体的亲和力高至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或更高百分比的亲和力结合到GD2。在一些实施例中,所提供的抗体药剂以比不同抗体对GD2的亲和力高至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍或至少20的亲和力结合GD2。在一些实施例中,所提供的抗体药剂以比结合GD2的不同抗体的亲和力高超过20倍、超过30倍、超过40倍、超过50倍、超过60倍、超过70倍、超过80倍、超过90倍或超过100倍的亲和力结合GD2。在一些实施例中,所提供的抗体药剂对于不同神经节苷脂,例如GD1b显示结合亲和力,所述结合亲和力在彼此的亲和力的2倍内、3倍内、4倍内、5倍内、6倍内、7倍内、8倍内、9倍内或10倍内。

[0179] 在一些实施例中,所提供的抗体药剂在ADCC或CMC分析中显示在如本文所描述和/或例示的范围内的相对效力(例如,3F8EC₅₀/抗体EC₅₀或hu3F8V1EC₅₀/抗体EC₅₀比率)。在一些实施例中,相较于结合GD2的亲本抗体,所提供的抗体药剂显示至少1.0、至少1.5、至少2.0、至少2.5、至少3.0、至少3.5、至少4.0、至少4.5、至少5.0、至少5.5、至少6.0、至少6.5、至少7.0、至少7.5、至少8.0、至少8.5、至少9.0、至少9.5、至少10.0、至少10.5、至少11.0、至少11.5、至少12.0、至少12.5、至少13.0、至少13.5、至少14.0、至少14.5、至少15.0、至少15.5、至少16.0、至少16.5、至少17.0、至少17.5、至少18.0、至少18.5、至少19.0、至少19.5、至少20.0、至少20.5、至少21.0、至少21.5、至少22.0、至少22.5、至少23.0、至少23.5、至少24.0、至少24.5、至少25.0、至少25.5、至少26.0、至少26.5、至少27.0、至少27.5、至少28.0、至少28.5、至少29.0、至少29.5或至少30.0的相对效力。

[0180] 在一些实施例中,所提供的抗体药剂显示以低于100nM、低于90nM、低于80M、低于70nM、低于60nM、低于50nM、低于40nM、低于30nM、低于20nM或低于10nM的K_D(nM)结合到GD2。在一些特定实施例中,所提供的抗体药剂显示以低于9nM、低于8nM、低于7nM、低于6nM、低于5nM、低于4nM、低于3nM、低于2nM或低于1nM的K_D(nM)结合到GD2。在一些特定实施例中,所提供的抗体药剂显示以约0.2nM、约0.3nM、约0.4nM、约0.5nM、约0.6nM、约0.7nM、约0.8nM、约0.9nM、约1.0nM、约1.1nM、约1.2nM、约1.3nM、约1.4nM、约1.5nM、约1.6nM、约1.7nM、约

1.8nM、约1.9nM、约2.0nM、约2.1nM、约2.2nM、约2.3nM、约2.4nM、约2.5nM、约2.6nM、约2.7nM、约2.8nM、约2.9nM或约3.0nM的 K_D (nM) 结合到GD2。在一些特定实施例中,所提供的抗体药剂显示以约1nM、约2nM、约3nM、约4nM、约5nM、约6nM、约7nM、约8nM或约9nM的 K_D (nM) 结合到GD2。

[0181] 在一些实施例中,所提供的抗体药剂显示以下限为约 $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 并且上限为约 $20.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 的 K_{off} (s^{-1}) 结合到GD2。在一些实施例中,所提供的抗体药剂显示以一定 K_{off} (s^{-1}) 结合到GD2,所述 K_{off} 的下限选自由以下组成的群组: $2 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $4 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $7 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $8 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $9 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更高,并且其上限高于下限并且选自由以下组成的群组: $10 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $11 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $12 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $13 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $14 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $15 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $16 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $17 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $18 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $19 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $20 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更高。在某些实施例中,所提供的抗体药剂显示以约 $2.9 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $5.1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $6.9 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $8.8 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或 $18.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 的 K_{off} (s^{-1}) 结合到GD2。

[0182] 人类化抗体药剂

[0183] 在一个实施例中,由本发明提供的抗体是单克隆抗体,在一个优选实施例中,其为来源于其它物种的同源抗GD2抗体的人类化形式。人类化抗体是由重组DNA技术产生的一种抗体,其中使用人类免疫球蛋白轻链或重链中非抗原结合所需(例如,恒定区和可变结构域的构架区)的一些或全部氨基酸取代来自同源非人类抗体的轻链或重链的相应氨基酸。举例来说,针对给定抗原的鼠类抗体的人类化形式在其重链和轻链二者上具有(1) 人类抗体的恒定区;(2) 来自人类抗体可变结构域的构架区;及(3) 来自鼠类抗体的CDR。必要时,可以将人类构架区中的一或多个残基变为鼠类抗体中相应位置处的残基,由此保持人类化抗体对抗原的结合亲和力。这一改变有时称为“回复突变”。类似地,出于所需的原因,例如稳定性或对抗原的亲和力,可以使正向突变回复到鼠类序列。举例来说,对于hu3F8-H1L1 (或hu3F8V1),需要在重链序列中的19个位置以及轻链中的17个位置进行回复突变,以便维持体外结合亲和力。由于人类化抗体含有明显较少的非人类组分,故相较于嵌合人类抗体,人类化抗体一般不大可能在人体中引起免疫反应。

[0184] 用于制备本发明的人类化抗体的适合方法描述于以下中:例如维特(Winter) EP 0 239 400;琼斯(Jones)等人,自然,321:522-525(1986);莱克曼(Riechmann)等人,自然,332:323-327(1988);韦荷恩(Verhoeyen)等人,科学(Science) 239:1534-1536(1988);奎因(Queen)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Nat.Acad.ScL USA) 86:10029(1989);美国专利6,180,370;及奥兰迪(Orlandi)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sd.USA) 86:3833(1989);所有文献的揭示内容都以全文引用的方式并入本文中。一般来说,将鼠类(或其它非人类)CDR移植到人类抗体上是如下实现。从杂交瘤中分离编码重链和轻链可变结构域的cDNA。通过测序确定可变结构域(包括CDR)的DNA序列。将编码CDR的DNA插入人类抗体重链或轻链可变结构域编码序列的相应区域中,附接到所需同型的人类恒定区基因区段(例如,对于CH是 $\gamma 1$ 并且对于CL是 κ),由此合成基因。在哺乳动物宿主细胞(例如,CHO或NS0细胞)中共表达人类化重链和轻链基因以产生可溶性人类化抗体。为了促进大规模制造抗体,通常需要在制造细胞系中使用DHFR基因或GS基因针对高表达子进行选择。以生物反应器,或中空纤维培养系统或WAVE技术培养这些制造细胞系,以产生可溶性抗体的块状培养物,或产生在乳汁中表达抗体的转基因哺乳动物(例如,山羊、母牛或绵羊)(参见例如,美国

专利5,827,690)。

[0185] 使用上文所描述的方法,产生3F8抗体的人类化和嵌合形式。使用编码鼠类3F8轻链和重链可变区的cDNA构建用于表达鼠类-人类嵌合体的载体,其中鼠类3F8可变区连接到人类IgG1(对于重链)和人类κ(对于轻链)恒定区,如先前所描述。此外,产生具有变体糖基化的新颖hu3F8形式,以便增进与Fc受体的结合并增强抗原亲和力。

[0186] 为了制造人类化3F8抗体,通过与人类生殖系序列进行同源匹配来选出人类受体构架结构域。使用选出的这些人类受体构架,设计轻链和重链可变结构域并且产生各自的多种变体/形式并表达,如以下在实例中所描述。

[0187] 完全人类抗体是治疗性治疗人类患者特别需要的。人类抗体可以通过所属领域中已知的多种方法(包括以上描述的噬菌体呈现法),使用来源于人类免疫球蛋白序列的抗体文库制备。也参见,美国专利第4,444,887号和第4,716,111号;及PCT公开案W0 98/46645、W0 98/60433、W0 98/24893、W0 98/16664、W0 96/34096、W0 96/33735及W0 91/10741;其各自以全文引用的方式并入本文中。科尔(Cole)等人和博尔纳(Boerner)等人的技术也可用于制备人类单克隆抗体(科尔(Cole)等人,单克隆抗体和癌症疗法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy),阿兰R.丽丝(Alan R.Riss),(1985);及博尔纳等人,免疫学杂志,147(1):86-95(1991))。

[0188] 使用其它技术产生但保持本发明的抗GD2抗体的可变区的人类抗体是本发明的一部分。还可以使用不能表达功能性内源性小鼠免疫球蛋白但可以表达人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生人类抗体。举例来说,可以将人类重链和轻链免疫球蛋白基因复合物随机或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞中。或者,除人类重链和轻链基因外,还可以将人类可变区、恒定区及多样性区域引入小鼠胚胎干细胞中。可以通过同源重组引入人类免疫球蛋白基因座来分别或同时使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因不具功能性。确切地说,JH区域的纯合缺失将防止产生内源性抗体。使经修饰的胚胎干细胞扩增并显微注射到囊胚中以产生嵌合小鼠。接着饲养嵌合小鼠以产生表达人类抗体的纯合子代。用选定的抗原,例如本发明的多肽的全部或一部分,以标准方式对转基因小鼠进行免疫。可以使用常规杂交瘤技术,从经过免疫的转基因小鼠获得针对所述抗原的单克隆抗体。转基因小鼠所携带的人类免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,并且随后经历类别转换和体细胞突变。因此,使用此类技术,有可能制造出在治疗上有用的IgG、IgA、IgM及IgE抗体。有关这种用于制造人类抗体的技术的综述,参见隆伯格(Lonberg)和胡萨尔(Huszar)、国际免疫学评论(Int.Rev.Immunol.)13:65-93(1995)。有关这种用于制造人类抗体和人类单克隆抗体的技术以及用于制造此类抗体的方案的详细论述,参见例如,PCT公开案W0 98/24893;W0 92/01047;W0 96/34096;W0 96/33735;欧洲专利第0 598 877号;美国专利第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号、第5,886,793号、第5,916,771号及第5,939,598号,所述专利以全文引用的方式并入本文中。此外,多个公司,例如艾博吉斯公司(Abgenix, Inc.) (加利福尼亚州弗莱蒙特(Fremont, Calif.))、基因制药公司(Genpharm) (加利福尼亚州圣何塞(San Jose, Calif.))及米达雷斯公司(Medarex, Inc.) (新泽西州普林斯顿)可以使用与以上所描述类似的技术,参与提供针对所选抗原的人类抗体。

[0189] 还可以通过对移植有人类外周血液白细胞、脾细胞或骨髓的小鼠进行免疫来制备

人类MoAb(例如,XTL的三源杂交瘤技术)。识别选定表位的完全人类抗体可以使用称为“定向选择”的技术产生。在此方法中,使用了选定的非人类单克隆抗体,例如小鼠抗体来定向选择识别相同表位的完全人类抗体。(杰斯普(Jespersen)等人,生物技术(Bio/technology) 12:899-903(1988))。

[0190] 如本文中所用,“抗GD2抗体”、“抗GD2抗体部分”或“抗GD2抗体片段”和/或“抗GD2抗体变体”等包括含有包含免疫球蛋白分子的至少一部分的分子,含有来源于本文所描述的单克隆抗体中的任一者的重链或轻链或其配体结合部分的至少一个互补决定区(CDR),以及可以并入本发明的抗体中的非鼠类起源,优选人类起源的重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区或其任何部分的任何蛋白质或肽。或者,术语“抗GD2抗体”应共同地或单独地指具有单一突变的hu3F8V1IgG,例如hu3F8V1-E1K、hu3F8V1-D32H、hu3F8V1-G54I;具有双重突变的hu3F8V1IgG,例如hu3F8V1-E1KD32H、hu3F8V1-E1KG54I及hu3F8V1-D32HG54I;具有三重突变的hu3F8V1IgG,例如hu3F8V1-E1KD32HG54I;hu3F8V5IgG;具有单一突变的hu3F8V5IgG,例如hu3F8V5-E1K、hu3F8V5-D32H、hu3F8V5-G54I;具有双重突变的hu3F8V5IgG,例如hu3F8V5-E1KD32H、hu3F8V5-E1KG54I及hu3F8V5-D32HG54I;及具有三重突变的hu3F8V5IgG,例如hu3F8V5-E1KD32HG54I抗体,及其组合,以及其片段及区域,例如本发明的单链可变片段,包括hu3F8V1-E1K scFv、hu3F8V1-D32H scFv、hu3F8V1-G54I scFv;具有双重突变的hu3F8V1scFv,例如hu3F8V1-E1KD32H scFv、hu3F8V1-E1KG54I scFv及hu3F8V1-D32HG54I scFv;具有三重突变的hu3F8V1scFv,例如hu3F8V1-E1KD32HG54I scFv;hu3F8V5scFv;具有单一突变的hu3F8V5scFv,例如hu3F8V5-E1K scFv、hu3F8V5-D32H scFv、hu3F8V5-G54I scFv;具有双重突变的hu3F8V5scFv,例如hu3F8V5-E1KD32H scFv、hu3F8V5-E1KG54I scFv及hu3F8V5-D32HG54I scFv;具有三重突变的hu3F8V5scFv,例如hu3F8V5-E1KD32HG54I scFv,及其组合。此类抗体能够在体外、原位和/或体内调节、降低、拮抗、减低、缓解、阻断、抑制、终止和/或干扰至少一种细胞功能,其中所述细胞表达GD2。作为非限制性实例,适合的本发明抗GD2抗体、指定部分或变体可以高亲和力结合到人类GD2的表位。

[0191] 术语“抗体”进一步意图涵盖抗体、其消化片段、指定部分及变体,包括抗体模拟物或包含抗体中模拟抗体或其指定片段或部分的结构和/或功能的部分,包括单链抗体及其片段,其各自含有至少一个来源于抗GD2抗体的CDR。功能片段包括结合到哺乳动物GD2的抗原结合片段。举例来说,能够结合到GD2或其部分的抗体片段,包括(但不限于)Fab(例如,通过木瓜蛋白酶消化得到)、Fab' (例如,通过胃蛋白酶消化及部分还原得到)及F(ab')₂(例如,通过胃蛋白酶消化得到)、facb(例如,通过纤维蛋白溶酶消化得到)、pFc' (例如,通过胃蛋白酶或纤维蛋白溶酶消化得到)、Fd(例如,通过胃蛋白酶消化、部分还原及再聚集得到)、Fv或scFv(例如,通过分子生物学技术得到)片段,都涵盖在本发明中(参见例如,科里根(Colligan),免疫学(Immunology),同前文献)。

[0192] 如所属领域中所知和/或如本文中所描述,抗体片段可以通过酶裂解、合成或重组技术产生。抗体也可以使用一或多个终止密码子已引入天然终止位点上游的抗体基因,以多种截短形式产生。举例来说,编码F(ab')₂重链部分的组合基因可以经设计以包括编码重链的CH1结构域和/或铰链区的DNA序列。抗体的各种部分可以通过常规技术以化学方式连接在一起,或者可以使用基因工程技术以相邻蛋白质形式制备。

[0193] 如本文中所用,“嵌合”抗体或“人类化”抗体或“CDR移植”包括本文中描述的抗

GD2Ab的任何组合,或由其得到的任何CDR与来源于非鼠类抗体,优选地人类抗体的一或多种蛋白质或肽的组合。根据本发明,嵌合或人类化抗体包括CDR来源于本文所描述的抗GD2Ab中的一或多者的那些,并且所述抗体的至少一部分或其余部分来源于一或多种人类抗体。因此,抗体的人类部分可以包括在人体中实质上不具免疫原性的构架区、CL区、CH结构域(例如,CH1、CH2、CH3)、铰链区、(VL、VH)区。所述抗体的来源于人类抗体的区域不必与人类抗体具有100%一致性。在一个优选实施例中,保持尽可能多的人类氨基酸残基以使免疫原性可忽略,但必要时,这些人类残基可以经修饰以支持由CDR形成的抗原结合位点,同时使所述抗体的人类化最大。此类改变或变化任选地并且优选相对于未修饰抗体保留或降低在人体或其它物种中的免疫原性。已指出,人类化抗体可以由能够表达功能上重排的人类免疫球蛋白(例如重链和/或轻链)基因的非人类动物或原核或真核细胞产生。另外,当人类抗体是单链抗体时,其可以包含天然人类抗体中未发现的连接肽。举例来说,Fv可以包含连接重链可变区与轻链可变区的连接肽,例如两到约二十个甘氨酸或其它氨基酸残基,优选8-15个甘氨酸或其它氨基酸残基。认为此类连接肽属于人类起源。

[0194] 抗体人类化可以通过例如合成组合文库来进行,所述组合文库包含与一系列个别人类构架同框融合的非人类靶单克隆抗体的六个CDR。可以利用含有代表所有已知重链和轻链人类生殖系基因的基因的人类构架文库。接着,可以针对与所关注抗原的结合来筛选所得组合文库。就维持与亲本抗体的结合活性来说,这种方法可以允许选择最有利的完全人类构架组合。人类化抗体接着可以通过多种技术进一步优化。

[0195] 可以使用抗体人类化将小鼠或其它非人类抗体演变成“完全人类”抗体。所得抗体仅含有人类序列并且不含小鼠或非人类抗体序列,同时维持与起始抗体类似的结合亲和力和特异性。

[0196] 对于全长抗体分子,可以由杂交瘤细胞系的基因组DNA或mRNA获得免疫球蛋白基因。将抗体重链和轻链克隆到哺乳动物载体系统中。通过双链序列分析来证明组装。抗体构筑体可以在其它人类或哺乳动物宿主细胞系中表达。接着可以通过所表达的所关注抗体的瞬时转染分析和蛋白质印迹分析(Western blot analysis)验证所述构筑体。可以使用快速分析法分离并筛选具有最高生产率的稳定细胞系。

[0197] 如所属领域中众所周知,至少一种本发明的抗GD2抗体可以任选地由细胞系、混合细胞系、永生化细胞或永生化细胞的克隆群产生。参见例如,奥斯贝(Ausubel)等人编,最新分子生物学实验方法汇编(Current Protocols in Molecular Biology),约翰·威利父子公司(John Wiley&Sons, Inc.),纽约州纽约(NY, N.Y.) (1987-2001);萨布鲁克(Sambrook)等人,分子克隆实验指南(Molecular Cloning: A Laboratory Manual),第2增补版,纽约冷泉港(Cold Spring Harbor, N.Y.) (1989);哈洛(Harlow)和莱恩(Lane),抗体实验指南(antibodies, a Laboratory Manual),纽约冷泉港(1989)。科里根等人编,免疫学最新方案(Current Protocols in Immunology),约翰·威利父子公司,纽约(1994-2001);科里根等人,蛋白质科学实验指南(Current Protocols in Protein Science),约翰·威利父子公司,纽约州纽约(1997-2001),其各自全部以引用的方式并入本文中。

[0198] 在一种方法中,杂交瘤是通过融合适合的永生细胞系(例如骨髓瘤细胞系,例如(但不限于)Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L.5、>243、P3X63Ag8.653、Sp2SA3、Sp2MA1、Sp2SS1、Sp2SA5、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、

RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A等,或杂合骨髓瘤、其融合产物或自其得到的任何细胞或融合细胞,或所属领域中已知的任何其它适合的细胞系)制备。参见例如, www.atcc.org、www.lifetech.com.等,其中抗体产生细胞,例如(但不限于)分离或克隆的脾、外周血液、淋巴、扁桃体细胞或其它免疫或含B细胞的细胞,或任何其它表达重链或轻链恒定或可变或构架或CDR序列的细胞,所述序列为内源性或异源核酸形式、重组或内源性形式,病毒、细菌、藻类、原核、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼、哺乳动物、啮齿动物、马科、绵羊科动物、山羊、绵羊、灵长类动物、真核、基因组DNA、cDNA、rDNA、线粒体DNA或RNA、叶绿体DNA或RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链形式、杂交序列等,或其任何组合。参见例如,奥斯贝,同前文献,及科里根,免疫学,同前文献,第2章,全部以引用的方式并入本文中。

[0199] 还可以使用任何其它适合宿主细胞表达编码本发明的抗体、其指定片段或变体的异源或内源性核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可以使用选择性培养条件或其它适合的已知方法分离,并通过限制稀释法或细胞分选,或其它已知方法克隆。可以通过适合分析(例如,ELISA)选出产生具有所需特异性的抗体的细胞。

[0200] 本发明的抗体还可以使用至少一种抗GD2抗体编码核酸制备,由此提供在乳汁中产生此类抗体的转基因动物或哺乳动物,例如山羊、母牛、马、绵羊等。此类动物可以使用已知方法提供。参见例如(但不限于),美国专利第5,827,690号、第5,849,992号、第4,873,316号、第5,849,992号、第5,994,616号、第5,565,362号、第5,304,489号等,其各自全部以引用的方式并入本文中。

[0201] 本发明的抗体可以另外使用至少一种抗GD2抗体编码核酸制备,由此提供在植物部分中或在由其培养的细胞中产生此类抗体、指定部分或变体的转基因植物和经培养的植物细胞(例如(但不限于)烟草和玉米)。作为非限制性实例,已经成功地使用表达重组蛋白的转基因烟草叶片,例如使用诱导型启动子提供大量重组蛋白。参见例如,克拉默(Cramer)等人,微生物学与免疫学的当前课题(Curr.Top.Microbol.Immunol.) 240:95-118(1999)及其中引用的参考文献。此外,已经使用转基因玉米在商业制造水平上表达哺乳动物蛋白质,其生物活性与在其它重组系统中产生或从天然来源纯化的那些蛋白质相当。参见例如,胡德(Hood)等人,实验医学与生物学进展(Adv.Exp.Med.Biol.) 464:127-147(1999)及其中引用的参考文献。也已经由转基因植物种子(包括烟草种子和马铃薯块茎)产生大量抗体,包括抗体片段,例如单链抗体(scFv)。参见例如,康拉德(Conrad)等人,植物分子生物学(Plant Mol.Biol.) 38:101-109(1998)及其中引用的参考文献。因此,也可以根据已知方法,使用转基因植物产生本发明的抗体。另外参见例如,费舍尔(Fischer)等人,生物技术与应用生物化学(Biotechnol.Appl.Biochem.) 30:99-108(1999年10月);马(Ma)等人,生物技术趋势(Trends Biotechnol.) 13:522-7(1995);马等人,植物生理学(Plant Physiol.) 109:341-6(1995);怀特兰(Whitelam)等人,生物化学协会会报(Biochem Soc.Trans.) 22:940-944(1994);及其中引用的参考文献。以上参考文献各自全部以引用的方式并入本文中。

[0202] 抗GD2抗体可以通过众所周知的方法从重组细胞培养物回收和纯化,包括(但不限于)蛋白质A纯化、蛋白质G纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、羟磷灰石色谱法及凝集素色谱法。还可以采用高效液相色谱法("HPLC")进行纯化。参见例如,科里根,免疫学最新方案或蛋白

质科学实验指南, 约翰·威利父子公司, 纽约州纽约 (1997-2001), 例如第1、4、6、8、9及10章, 各自全部以引用的方式并入本文中。

[0203] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物, 及通过重组技术, 由真核宿主, 包括例如酵母、高等植物、昆虫及哺乳动物细胞产生的产物。取决于在重组产生程序中采用的宿主, 本发明的抗体可以经糖基化或可以未经糖基化, 其中优选经糖基化。此类方法描述于许多标准实验室手册中, 例如萨布鲁克, 同前文献, 第17.37-17.42部分; 奥斯贝, 同前文献, 第10、12、13、16、18及20章; 科里根, 蛋白质科学, 同前文献, 第12-14章, 全部都以引用的方式并入本文中。

[0204] 纯化的抗体可以通过例如ELISA、ELISPOT、流式细胞术、免疫细胞学、BIAcore™分析、SAPIDYNE KINEXA™动态排阻分析、SDS-PAGE及蛋白质印迹法, 或通过HPLC分析以及通过本文所揭示的多种其它功能分析表征。

[0205] 典型的哺乳动物表达载体含有至少一个介导mRNA转录起始的启动子元件、抗体编码序列, 及转录终止和转录物聚腺苷酸化所需的信号。另外的元件包括强化子、克拉克序列 (Kozak sequences) 及侧接供RNA剪接的供体和受体位点的中间序列。用来自SV40的早期和晚期启动子、来自逆转录病毒 (例如RSV、HTLVI、HIVI) 的长末端重复序列 (LTRS) 及巨细胞病毒 (CMV) 早期启动子, 可以实现非常高效的转录。然而, 还可以使用细胞元件 (例如, 人类肌动蛋白启动子)。用于实践本发明的适合表达载体包括例如以下载体, 例如pIRESneo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN或pLNCX (克隆技术实验室 (Clontech Labs), 加利福尼亚州帕洛阿尔托 (Palo Alto, Calif.)), pcDNA3.1 (+/-)、pcDNA/Zeo (+/-) 或pcDNA3.1/Hygro (+/-) (英杰公司 (Invitrogen)), PSVL及PMSG (法玛西亚 (Pharmacia), 瑞典乌普萨拉 (Uppsala, Sweden)), pRSVcat (ATCC 37152)、pSV2dhfr (ATCC 37146) 及pBC12MI (ATCC 67109)。可以使用的哺乳动物宿主细胞包括人类海拉293、H9及杰卡特细胞 (Jurkat cell)、小鼠NIH3T3及C127细胞、Cos 1、Cos 7及CV 1、鹌鹑QC1-3细胞、小鼠L细胞及中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0206] 或者, 可以在含有整合到染色体中的基因的稳定细胞系中表达所述基因。在例如DHFR、GPT、新霉素 (neomycin) 或潮霉素 (hygromycin) 等可选择标记物存在下进行共转染允许鉴别和分离经转染的细胞。

[0207] 转染的基因还可以经过扩增以表达大量编码的抗体。DHFR (二氢叶酸还原酶) 标记物可用于显现带有数百或甚至数千相关基因拷贝的细胞系。另一有用的选择标记物是酶谷氨酰胺合成酶 (GS) (墨菲 (Murphy) 等人, 生物化学杂志 (Biochem. J.) 227:277-279 (1991); 巴宾顿 (Bebbington) 等人, 生物技术, 10:169-175 (1992))。使用这些标记物, 使哺乳动物细胞在选择性培养基中生长并且选出具有最高抗性的细胞。这些细胞系含有整合到染色体中的扩增的基因。通常使用中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞及NS0细胞产生抗体。

[0208] 根据本发明, 抗GD2抗体包含以下任一者: hu3F8V1-E1K、hu3F8V1-D32H、hu3F8V1-G54I; 具有双重突变的hu3F8V1, 例如hu3F8V1-E1KD32H、hu3F8V1-E1KG54I及hu3F8V1-D32HG54I; 具有三重突变的hu3F8V1, 例如hu3F8V1-E1KD32HG54I; hu3F8V5IgG; 具有单一突变的hu3F8V5, 例如hu3F8V5-E1K、hu3F8V5-D32H、hu3F8V5-G54I; 具有双重突变的hu3F8V5, 例如hu3F8V5-E1KD32H、hu3F8V5-E1KG54I及hu3F8V5-D32HG54I; 及具有三重突变的hu3F8V5IgG, 例如hu3F8V5-E1KD32HG54I抗体, 或者可变区或CDR来源于以下任一者的抗体:

hu3F8V1-E1K、hu3F8V1-D32H、hu3F8V1-G54I；具有双重突变的hu3F8V1，例如hu3F8V1-E1KD32H、hu3F8V1-E1KG54I及hu3F8V1-D32HG54I；具有三重突变的hu3F8V1，例如hu3F8V1-E1KD32HG54I；hu3F8V5IgG；具有单一突变的hu3F8V5，例如hu3F8V5E1K、hu3F8V5-D32H、hu3F8V5-G54I；具有双重突变的hu3F8V5，例如hu3F8V5-E1KD32H、hu3F8V5-E1KG54I及hu3F8V5-D32HG54I；及具有三重突变的hu3F8V5，例如hu3F8V5-E1KD32HG54I抗体，并且所述抗体的构架区和恒定区来源于一或多种人类抗体。来源于所述抗体的可变区或CDR优选与以下任一者的可变区或CDR具有约90%到约100%一致性：hu3F8V1-E1K、hu3F8V1-D32H、hu3F8V1-G54I；具有双重突变的hu3F8V1，例如hu3F8V1-E1KD32H、hu3F8V1-E1KG54I及hu3F8V1-D32HG54I；具有三重突变的hu3F8V1，例如hu3F8V1-E1KD32HG54I；hu3F8V5；具有单一突变的hu3F8V5，例如hu3F8V5-E1K、hu3F8V5-D32H、hu3F8V5-G54I；具有双重突变的hu3F8V5，例如hu3F8V5-E1KD32H、hu3F8V5-E1KG54I及hu3F8V5-D32HG54I；及具有三重突变的hu3F8V5，例如hu3F8V5-E1KD32HG54I，不过涵盖由天然突变或由人工操作引起的任何和所有修饰，包括取代、插入及缺失，只要所述抗体保持结合到GD2的能力即可。嵌合抗体、人类化抗体或CDR移植抗体中来源于人类抗体的区域不必与人类抗体具有100%一致性。在一个优选实施例中，保持尽可能多的人类氨基酸残基以便使免疫原性可忽略，但视需要并且如根据本发明的下文所教导，这些人类残基，特别是构架区的残基经取代。本文所揭示的这些修饰是支持由CDR形成的抗原结合位点，同时使所述抗体的人类化最大所需的。

[0209] 与本文所描述的序列实质上相同的氨基酸序列包括含保守氨基酸取代以及氨基酸缺失和/或插入的序列。保守氨基酸取代是指第一氨基酸由化学和/或物理特性(例如电荷、结构、极性、疏水性/亲水性)类似于第一氨基酸的第二氨基酸置换。保守取代包括以下群组内的一个氨基酸被另一氨基酸置换：赖氨酸(K)、精氨酸(R)及组氨酸(H)；天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)；天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、酪氨酸(Y)、K、R、H、D及E；丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C)及甘氨酸(G)；F、W及Y；C、S及T。

[0210] 当然，所属领域的技术人员将取决于许多因素，包括以上描述的那些，确定氨基酸取代的数目。一般来说，任何给定抗GD2抗体、片段或变体的氨基酸取代、插入或缺失的数目将不超过40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1个，例如1-30个或其中的任何范围或值，如本文中所说明。

[0211] 本发明的抗GD2抗体中对于功能至关重要的氨基酸可以通过所属领域中已知的方法鉴别，例如定点突变诱发或丙氨酸扫描突变诱发(例如，奥斯贝，同前文献，第8、15章；坎宁安(Cunningham)和威尔斯(Wells)，科学，244:1081-1085(1989))。丙氨酸扫描突变诱发程序在分子中的每个残基处引入单一丙氨酸突变。接着测试所得突变分子的生物活性，例如(但不限于)至少结合到GD2。对于抗体结合很重要的位点也可以通过结构分析鉴别，例如结晶、核磁共振或光亲和标记(史密斯(Smith)等人，分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 224: 899-904(1992)；及德沃斯(de Vos)等人，科学，255:306-312(1992))。

[0212] 抗GD2抗体可以进一步任选地包含具有来源于至少一个本文所描述的序列的CDR的70-100%相邻氨基酸中的至少一者的多肽。

[0213] 在一个实施例中，免疫球蛋白链或其部分(例如，可变区、CDR)的氨基酸序列与表1-4中的至少一个序列的氨基酸序列具有约70-100%一致性(例如，70%、71%、72%、73%、

74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或其中任何范围或值)。

[0214] 本文提供例示性重链和轻链可变区序列。本发明的抗体或其指定变体可以包含来自本发明抗体的任何数量的相邻氨基酸残基,其中所述数量选自由抗GD2抗体中相邻残基数量的10-100%组成的整数的群组。任选地,这一由相邻氨基酸构成的子序列的长度是至少约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250个或更多个氨基酸或其中任何范围或值。另外,此类子序列的数量可以是选自由1到20组成的群组的任何整数,例如是至少2、3、4或5。

[0215] 根据本发明,核酸序列阐述于SEQ ID NO:32-45中,并且抗GD2抗体的推断氨基酸序列阐述于SEQ ID NO:1-31中。重链和轻链可变区中的每一者都含有三个CDR,所述CDR组合以形成抗原结合位点。三个CDR由主要起支撑所述CDR作用的四个构架区环绕。重链和轻链可变区序列内的CDR序列可以通过根据卡巴特(Kabat)等人(1987)在免疫学感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第4版,美国卫生与公共服务部(United States Department of Health and Human Services),美国政府印刷局(U.S.Government Printing Office),华盛顿(Washington,D.C.)中的计算机辅助比对或通过例如利用如由莱维特(Levitt)(1983)分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)168:595所描述的ENCAD程序的可变区分子建模来识别。

[0216] 本发明的编码人类化抗体、片段及区中恒定(C)区的人类基因可以通过已知方法来源于人类胎儿肝脏库。人类C区基因可以来源于任何人类细胞,包括表达并产生人类免疫球蛋白的那些人类细胞。人类CH区可以来源于人类H链的已知类别或同种型中的任一者,包括 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 及其亚型,例如G1、G2、G3及G4。因为H链同种型负责抗体的各种效应功能,所以CH区的选择将由所要效应功能(例如补体固定)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)中的活性引导。优选地,CH区来源于 γ 1(IgG1)或 γ 4(IgG4)。

[0217] 人类CL区可以来源于任一人类L链同种型 κ 或 λ ,优选地是 κ 。

[0218] 编码人类免疫球蛋白C区的基因通过标准克隆技术从人类细胞中获得(萨布鲁克(Sambrook)等人(分子克隆实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第2版,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press),纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.)(1989)和奥斯贝(Ausubel)等人编最新分子生物学实验方法汇编(Current Protocols in Molecular Biology)(1987-1993))。人类C区基因可容易地自含有表示两类L链、五类H链及其子类的基因的已知克隆体获得。

[0219] 抗体可变区的序列可以通过插入、取代及缺失达到嵌合抗体保持结合到人类GD2上的能力的程度来修饰。所属领域的一般技术人员可以通过进行下文所描述的功能性分析来确定这种活性的保持。可变区可以与以下识别的可变区具有例如约50%到约100%同源性。在一个优选实施例中,抗体的可变区与以下识别的可变区具有约80%到约100%同源性。在一个更优选实施例中,可变区与以下识别的可变区具有约90%到约100%同源性。

[0220] 在一个特定方面中,本发明的优选的抗GD2Mab包含与本文识别的序列具有95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同源性的可变轻链区并且进一步包含与本文识别的序列具有95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同源性的可变重链区。

[0221] 优选地,本发明的抗体或抗体的抗原结合片段或其指定部分或变异体结合人类GD2,并且由此部分地或实质上中和一个GD2蛋白质或片段,并且由此抑制经由GD2介导的活性。如本文所用,术语“中和抗体”是指取决于分析,可以抑制GD2依赖性活性达到约20%-120%,优选地达到至少约10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的抗体。抗GD2抗体抑制GD2依赖性活性的能力优选地通过至少一种如本文所描述和/或如所属领域中已知的合适分析来评估。

[0222] 如所陈述,本发明还涉及抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链及CDR,其包含序列与本文所描述的氨基酸序列实质上相同的氨基酸。如本文中所指明,这类抗GD2抗体可以包括一或多个来自天然突变或人类操控的氨基酸取代、缺失或添加。优选地,这类抗体或抗原结合片段及包含这类链或CDR的抗体可以高亲和力结合人类GD2。

[0223] 如所属领域的技术人员将了解的,本发明包括至少一种本发明的生物活性抗体。生物活性抗体的比活性是天然(非合成)的内源性或相关和已知抗体的至少20%、30%或40%,并且优选地至少50%、60%或70%,并且最优选地至少80%、90%或95%-100%。分析和量化酶活性和底物特异性的测量值的方法是所属领域的技术人员众所周知的。

[0224] 在另一方面,本发明涉及如本文所描述的人类抗体和抗原结合片段,其通过有机部分的共价连接来修饰。这类修饰可以产生具有改良的药物动力学特性(例如,增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是直链或分支链的亲水性聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在特定实施例中,亲水性聚合基团的分子量可以是约800到约120,000道尔顿,并且可以是聚烷二醇(例如,聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮,并且脂肪酸或脂肪酸酯基团可以包含约8到约40个碳原子。

[0225] 本发明的经修饰抗体和抗原结合片段可以包含一或多个直接或间接共价键结到抗体上的有机部分。键结到本发明的抗体或抗原结合片段上的每一个有机部分可以独立地是亲水性聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。如本文所用,术语“脂肪酸”涵盖单羧酸和二羧酸。“亲水性聚合基团”在本文使用所述术语时是指在水中的可溶性比在辛烷中更大的有机聚合物,例如聚赖氨酸。因此,本发明涵盖通过聚赖氨酸的共价连接来修饰的抗体。适合于修饰本发明抗体的亲水性聚合物可以是直链或分支链的,并且包括例如聚烷二醇(例如,PEG、单甲氧基-聚乙二醇(mPEG)、PPG等等)、碳水化合物(例如,葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等等)、亲水性氨基酸的聚合物(例如,聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等等)、聚烷氧化物、(例如,聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等等)及聚乙烯吡咯烷酮。优选地,修饰本发明抗体的亲水性聚合物作为单独分子实体的分子量是约800到约150,000。举例来说,可以使用PEG5000和PEG20,000,其中下标是所述聚合物以道尔顿为单位的平均分子量。亲水性聚合基团可以被一到约六个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。被脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水性聚合物可以通过采用合适的方法来制备。举例来说,包含氨基的聚合物可以与脂肪酸或脂肪酸酯的羧酸根偶合,并且脂肪酸或脂肪酸酯上活化的羧酸根(例如,用N,N-羰基二咪唑活化)可以与聚合物上的羟基偶合。

[0226] 适合于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可以含有一或多个不饱和单元。适合于修饰本发明抗体的脂肪酸包括例如正十二烷酸、正十四烷酸、正十八烷

酸、正二十烷酸、正二十二烷酸、正三十烷酸、正四十烷酸、顺- δ^9 -十八烷酸、全顺- $\delta^5,8,11,14$ -二十烷四烯酸、辛酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等等。合适的脂肪酸酯包括包含直链或分支链低碳数烷基的二羧酸单酯。低碳数烷基可以包含一到约十二个、优选地一到约六个碳原子。

[0227] 经修饰的人类抗体和抗原结合片段可以使用合适的方法来制备,例如通过与一或多种修饰剂反应。“修饰剂”在本文使用所述术语时是指包含活化基团的合适有机基团(例如,亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是可以在适当条件下与第二化学基团反应,由此在修饰剂与所述第二化学基团之间形成共价键的化学部分或官能团。举例来说,胺反应性活化基团包括亲电子基团,例如甲苯磺酸根、甲磺酸根、卤基(氯、溴、氟、碘)、N-羟基丁二酰亚胺酯(NHS)等等。可以与硫醇反应的活化基团包括例如顺丁烯二酰亚胺、碘乙酰基、丙烯酰基(acryloyl)、吡啶基二硫化物、5-硫醇-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB-硫醇)等等。醛官能团可以与含胺或含酰肼分子偶合,并且叠氮基可以与三价磷基反应以形成磷酰胺或磷酰亚胺键。将活化基团引入到分子中的合适方法是所属领域中已知的(参见例如G.T.赫南森(Hernanson, G.T.),生物偶联物技术(Bioconjugate Techniques),学术出版社(Academic Press):加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego, Calif.) (1996))。活化基团可以直接或经由连接子部分键结到有机基团(例如,亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)上,所述连接子部分例如二价C1-C12基团,其中一或多个碳原子可以被例如氧、氮或硫的杂原子置换。仅列举数例,合适的连接子部分包括例如四乙二醇、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-$ 。包含连接子部分的修饰剂可以例如通过使单-Boc-烷基二胺(例如,单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷)与脂肪酸在1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)的存在下反应以在自由胺与脂肪酸羧酸酯之间形成酰胺键来产生。Boc保护基可以通过用三氟乙酸(TFA)处理来从产物中去除以暴露可以如所描述与另一种羧酸酯偶合的伯胺,或可以与顺丁烯二酸酐反应并且所得产物环化以产生活化的脂肪酸顺丁烯二酰亚胺衍生物。(参见例如汤普森(Thompson)等人,WO 92/16221,其全部传授内容以引用的方式并入本文中。)

[0228] 本发明的经修饰抗体可以通过使人类抗体或抗原结合片段与修饰剂反应来产生。举例来说,有机部分可以通过采用胺反应性修饰剂(例如PEG的NHS酯)来以非位点特异性方式键结到抗体上。经修饰的人类抗体或抗原结合片段也可以通过使抗体或抗原结合片段的二硫键(例如,链内二硫键)还原来制备。经还原的抗体或抗原结合片段可以接着与硫醇反应性修饰剂反应以产生本发明的经修饰抗体。包含键结到本发明抗体特异性位点上的有机部分的经修饰人类抗体和抗原结合片段可以使用合适的方法来制备,例如逆转蛋白水解(菲什(Fisch)等人,生物偶联物化学(Bioconjugate Chem.), 3:147-153 (1992); 维伦(Werlen)等人,生物偶联物化学, 5:411-417 (1994); 库马兰(Kumaran)等人,蛋白质科学(Protein Sci.) 6(10):2233-2241 (1997); 伊藤(Itoh)等人,生物有机化学(Bioorg. Chem.), 24(1):59-68 (1996); 卡佩拉斯(Capellas)等人,生物技术与生物工程学(Biotechnol. Bioeng.), 56(4):456-463 (1997))和在G.T.赫南森,生物偶联物技术,学术出版社:加利福尼亚州圣地亚哥(1996)中所描述的方法。

[0229] 本发明的抗体可以如下文所示以广泛的亲和力(K_D)结合人类GD2。

[0230] 抗体对抗原的亲和力或亲合力可以使用任何合适的方法以实验方式测定。(参见例如贝佐夫斯基(Berzofsky)等人,“抗体-抗原相互作用”,在基本免疫学(Fundamental

Immunology), W.E. 保罗 (Paul, W.E.) 编, 雷文出版社 (Raven Press): 纽约州纽约 (1984) 中; 詹尼斯·库比 (Kuby, Janis) 免疫学 (Immunology), W.H. 弗里曼公司 (W.H. Freeman and Company): 纽约州纽约 (1992); 及本文所描述的方法)。如果在不同条件 (例如, 盐浓度、pH) 下测量, 那么所测量的特定抗体-抗原相互作用的亲和力可能变化。因此, 亲和力和其它抗原结合参数的测量优选地使用标准化的抗体和抗原溶液及标准化的缓冲剂 (例如本文所描述的缓冲剂) 来进行。

[0231] 适用于本发明方法和组合物中的抗GD2抗体的特征在于结合到GD2上并且优选地具有较低毒性。确切地说, 在本发明的抗体、指定片段或变异体中, 个别组分 (例如可变区、恒定区及构架) 单独地和/或共同地任选并优选地具有较低免疫原性, 所述抗体、指定片段或变异体适用于本发明。可以用于本发明中的抗体的特征任选地在于其在具有可测量的症状缓解和较低和/或可接受的毒性的情况下治疗患者持续延长的时间段的能力。较低或可接受的免疫原性和/或高亲和力以及其它合适的特性可以有助于达成疗法结果。“较低免疫原性”在本文中定义为在小于约75%或优选地小于约50%的经治疗患者中显著升高HAHA、HACA或HAMA响应和/或在所述经治疗患者中升高较低效价 (埃利奥特 (Elliott) 等人, 柳叶刀 (Lancet) 344:1125-1127 (1994), 其以引用的方式完全并入本文中)。

[0232] 也可以使用双特异性、异种特异性、异种偶联性或类似抗体, 所述抗体为对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆人类化抗体。在这种情况下, 结合特异性中的一者是针对至少一种GD2蛋白质, 另一种是针对任何其它抗原。用于制造双特异性抗体的方法是所属领域中已知的。传统上, 双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达, 其中所述两个重链具有不同特异性 (米尔斯坦 (Milstein) 和奎洛 (Cuello), 自然 (Nature) 305:537 (1983))。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机分类, 所以这些杂交瘤 (四源杂交瘤) 产生10种不同抗体分子的潜在混合物, 其中仅一个具有正确的双特异性结构。通常通过亲和色谱法步骤进行的正确分子的纯化是相当繁琐的, 并且产物产率较低。类似的程序公开于例如W0 93/08829; 美国专利第6,210,668号、第6,193,967号、第6,132,992号、第6,106,833号、第6,060,285号、第6,037,453号、第6,010,902号、第5,989,530号、第5,959,084号、第5,959,083号、第5,932,448号、第5,833,985号、第5,821,333号、第5,807,706号、第5,643,759号、第5,601,819号、第5,582,996号、第5,496,549号、第4,676,980号; W0 91/00360; W0 92/00373; EP 03089; 特劳内克 (Traunecker) 等人, 欧洲分子生物学杂志 (EMBO J) 10:3655 (1991); 苏雷什 (Suresh) 等人, 酶学方法 (Methods in Enzymology) 121:210 (1986); 尚 (Chan) 和卡特 (Carter), 2010, 自然·综述 (Nature Rev.) 10,301-316; 韦纳 (Weiner) 等人, 2010, 自然·综述 10,317-327; 其各自以引用的方式完全并入本文中。

[0233] 在某些实施例中, 结合到GD2上的抗体可以非偶联形式使用。在其它实施例中, 结合到GD2上的抗体可以偶联到例如可检测标记、药物、前药同位素上。

[0234] 在下文更详细描述的本发明某些方法中, 例如在检测细胞或组织中的GD2表达以作为肿瘤细胞转移可能性的度量或作为识别组织中原位癌瘤 (例如DCIS或LCIS) 的方式的方法中, 抗GD2抗体偶联到一或多种可检测标记上。对于这类用途, 抗体可以通过显色标记、酶促标记、放射性同位素标记、同位素标记、荧光标记、毒性标记、化学发光标记、核磁共振对比剂或其它标记的共价或非共价连接来可检测地标记。

[0235] 合适的显色标记的实例包括二氨基联苯胺和4-羟基偶氮-苯-2-甲酸。

[0236] 合适的酶标记的实例包括苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 Δ -5-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 α -甘油磷酸酯脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、过氧化酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、尿素酶、催化酶、葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶、葡糖淀粉酶及乙酰胆碱酯酶。

[0237] 合适的放射性同位素标记的实例包括 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{51}Cr 、 ^{57}To 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{152}Eu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{217}Ci 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd 等。在使用体内成像的情况下， ^{111}In 因为其避免 ^{125}I 或 ^{131}I 标记的GD2结合抗体由肝脏脱卤的问题而是优选的同位素。另外，这种放射性核苷酸具有更有利的用于成像的 γ 发射能量(珀金斯(Perkins)等人, 欧洲核医学杂志(Eur. J. Nucl. Med.) 70:296-301 (1985); 卡拉斯奎洛(Carasquillo)等人, 核医学杂志(J. Nucl. Med.) 25:281-287 (1987))。举例来说, 用1-(对异硫氰酸根合苯甲基)-DPTA与单克隆抗体偶合的 ^{111}In 已经在非肿瘤组织, 尤其肝脏中展示极少吸收, 并且因此增强肿瘤定位的特异性((埃斯特班)等人, 核医学杂志28:861-870 (1987))。

[0238] 合适的非放射性同位素标记的实例包括 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Tr 及 ^{56}Fe 。

[0239] 合适的荧光标记的实例包括 ^{152}Eu 标记、荧光素标记、异硫氰酸酯标记、罗丹明标记、藻红素标记、藻蓝蛋白标记、别藻蓝蛋白标记、绿色荧光蛋白(GFP)标记、邻苯二甲醛标记及荧光胺标记。

[0240] 合适的毒素标记的实例包括白喉(diphtheria)毒素、蓖麻毒素(ricin)及霍乱(cholera)毒素。

[0241] 化学发光标记的实例包括鲁米诺标记、异鲁米诺标记、芳族吖啶酯标记、咪唑标记、吖啶盐标记、乙二酸酯标记、荧光素标记、荧光素酶标记及发光蛋白质标记。

[0242] 核磁共振对比剂的实例包括重金属原子核, 例如 Gd 、 Mn 及铁。

[0243] 用于将上文所描述的标记结合到抗GD2抗体上的典型技术由肯尼迪(Kennedy)等人, 临床化学学报(Clin. Chim. Acta) 70:1-31 (1976) 和舒尔茨(Schurs)等人, 临床化学学报81:1-40 (1977) 提供。在后者中提及的偶合技术是戊二醛方法、高碘酸酯方法、二顺丁烯二酰亚胺方法、间顺丁烯二酰亚胺基苯甲基-N-羟基-丁二酰亚胺酯方法, 所有所述方法都以引用的方式并入本文中。

[0244] 为了用于本发明的某些治疗方法(例如在手术后切除残余肿瘤细胞或预防癌转移)中, 抗GD2抗体可以偶联到一或多种药物、前药或同位素上。优选的这类偶联物包含结合到GD2上的一或多种配体, 例如一或多种抗体或其片段、衍生物或变异体偶联到一或多种细胞毒性剂上; 这类偶联物适用于由本发明提供的治疗和预防肿瘤癌转移的方法中。根据本发明的某些这类实施例, 抗GD2抗体偶联到细胞毒性剂上。适用于生成抗GD2抗体-细胞毒性剂偶联物的细胞毒性剂(例如化学治疗剂)是所属领域中众所周知的, 并且包括(但不限于)顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、美法仑(melphalan)、多柔比星(doxorubicin)、甲胺喋呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶、依托泊苷(etoposide)、氮芥(mechlorethamine)、环磷酰胺、博来霉素(bleomycin)、微管毒物及番荔枝乙酰精宁(annonaceous acetogenin)。适合于根据本发明的这个方面来使用的其它化学治疗剂是众所周知的并且将是所属领域的一般技术人员熟悉的。

[0245] 本文也涵盖使用一或多种抗GD2抗体和一或多种小分子毒素,例如卡奇霉素(calicheamicin)、美登素(maytansine)(美国专利第5,208,020号)、单端孢霉烯(trichothene)及CC1065的偶联物。在本发明的一个实施例中,抗GD2抗体偶联到一或多个美登素分子上(例如每个抗GD2抗体约1到约10个美登素分子)。美登素可以例如转化为May-SS-Me,其可以还原成May-SH3并且与经修饰的抗GD2抗体反应(夏里(Chari)等人癌症研究(Cancer Research) 52:127-131(1992))以产生类美登素-抗GD2抗体偶联物。

[0246] 或者,抗GD2抗体可以偶联到一或多个卡奇霉素分子上。抗生素的卡奇霉素家族能够在亚皮摩尔浓度下产生双链DNA断裂。可以使用卡奇霉素的结构类似物(欣曼(Hinman)等人癌症研究53:3336-3342(1993)和洛德(Lode)等人癌症研究58:2925-2928(1998))。

[0247] 可以用于产生与一或多种抗GD2抗体的偶联物的酶活性毒素和其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合性活性片段、外毒素(exotoxin) A链(来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、相思子毒素(abrin) A链、莫迪素(modeccin) A链、 α -八叠球菌(α -sarcin)、油桐(*Aleuritesfordii*)蛋白、康乃馨(dianthin)蛋白、洋商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树素(gelonin)、米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)及单端孢霉烯。参见例如以英语出版于1993年10月28日的WO 93/21232,其公开内容以全文引用的方式并入本文中。类美登素也可以一或多种抗GD2抗体上。

[0248] 本发明进一步涵盖与具有核分解活性的化合物偶联的抗GD2抗体(例如,核糖核酸酶或DNA核酸内切酶,例如脱氧核糖核酸酶;DNA酶)。

[0249] 示例性替代形式

[0250] 在一些特定实施例中,所提供的抗GD2抗体药剂或其序列以多特异性(例如,双特异性)形式采用。在一些实施例中,双特异性MoAb可以包含双重可变结构域,其中一个结构域具有抗3F8可变结构域并且另一个结构域选自以下组成的群组:用于再靶向T细胞的抗OKT3(用于肿瘤细胞毒性)、或用于多步预靶向的DOTA-金属,C8.2.5、或用于ADCC的克隆体35,CD137(其中用抗41BB-scFv作为促效剂)、或用于ADC的CD137,41BBL(其中用41BBL作为促效剂)。CH2结构域中的N297A突变产生非糖基化,导致无FcR或C1q结合。(hu3F8V1-scFv)-(huOKT3-scFv)具有连接子和间隔基的氨基酸序列展示在SEQ ID NO:29中,并且其不具有间隔基的氨基酸序列展示在SEQ ID NO:30中。(hu3F8V1scFv)-(C8.2.5-scFv)的氨基酸序列(基于奥卡特(Orcutt)等人,2010,蛋白质工程设计和选择(Protein Eng Design and Selection) 23,221)展示在SEQ ID NO:31中。

[0251] 双特异性抗体(抗GD2和抗DOTA)可以用于多步预靶向的第一步,接着使用DOTA(金属)-葡聚糖作为清除剂进行血液清除,并且第三步骤引入DOTA(金属)-偶联的治疗剂,例如DOTA(金属)-放射性金属、DOTA(金属)-纳米粒子、DOTA(金属)-脂质体、DOTA(金属)-药物、DOTA(金属)-DNA、DOTA(金属)-RNA及DOTA(金属)-毒素。因为C8.2.5对每种类型的DOTA-金属复合物具有不同亲和力,所以所述预靶向的C8.2.5对清除剂和DOTA-配体的亲和力可以得到精确控制。

[0252] 如先前对其它抗GD2抗体所展示的,本文所呈现的hu3F8和其变异体的氨基酸序列

可以用于构建嵌合抗原受体 (CAR) (克劳斯 (Krause), 1998, 实验医学杂志 (J Exp Med) 188, 619-626)。再靶向免疫效应细胞的CAR策略不依赖于MHC-肽-TCR相互相用并且允许细胞针对各种各样的细胞表面抗原进行反应(戴维斯 (Davies) 和马赫 (Maher), 2010, 免疫治疗与试验会刊 (Archivum immunologiae et therapias experimentalis) 58, 165-178)。已经使用若干方法来设计CAR, 其中大多数采用单克隆抗体中呈单链可变片段 (scFv) 形式的抗原结合结构域来用于抗原识别。初始T细胞活化受体来源于允许研究人员阐明CD3 ζ 链作用的研究(欧文 (Irving) 和外斯 (Weiss), 1991, 细胞 (Cell) 64, 891-901; 罗密欧 (Romeo) 等人, 1992, 细胞 68, 889-897)。在后续研究中, 所关注的scFvs融合到CD3 ζ 链(埃沙 (Eshhar) 等人, 1993, 美国国家科学院院刊 (PNAS USA) 90, 720-724) 或Fc ϵ RI γ (维吉腾斯 (Weijtens) 等人, 1996, 免疫学杂志 (J Immunol) 157, 836-843) 上, 并且发现两者都足以用于T细胞活化。虽然这形成CAR构建的蓝图, 但在发现第一代CAR能够诱导T细胞增殖最多仅2-3次细胞分裂, 接着迅速细胞死亡之后, 出现共刺激分子的并入(贡 (Gong) 等人, 1999, 赘瘤1 (Neoplasia 1), 123-127)。通过对靶肿瘤细胞表达CD80, 研究人员能够展示CAR表达细胞可以受到再刺激, 导致T细胞数目进一步增加。沿着CD3 ζ 链并入有CD28共刺激分子的第一CAR展示相对于单独表达CD3 ζ 链的那些CAR的大量改良(克劳斯等人, 1998, 同前文献; 海恩斯 (Haynes) 等人, 2002, 血液 (Blood) 100, 3155-3163; 马赫等人, 2002, 自然·生物技术 (Nature Biotech) 20, 70-75); 这种包括T细胞数目的绝对增加以及IL-2产生的增加。从那之后, 若干其它小组开始使用其它共刺激分子, 与CD3 ζ 单独组合或与CD3 ζ 和CD28两者组合。这些额外信号传导分子包括4-1BB(王 (Wang) 等人, 2007, 人类基因治疗学 (Human Gene Ther) 18, 712-725; 布伦蒂安斯 (Brentjens) 等人, 2007, 临床癌症研究 (Clin Cncer Res) 13, 5426-5432; 今井 (Imai) 等人, 2004, 白血病 (Leukemia) 18, 676-684; 芬尼 (Finney) 等人, 2004, 免疫学杂志 172, 104-113)、DAP10(布伦蒂安斯等人, 2007, 同前文献)、OX40(布伦蒂安斯等人, 2007, 同前文献; 芬尼等人, 2004, 同前文献; 威尔基 (Wilkie) 等人, 2008, 免疫学杂志 180, 4901-4909; 源 (Nguyen) 和盖革 (Geiger), 2003, 基因疗法 (Gene Therapy) 10, 594-604; 普莱 (Pule) 等人, 2005, 分子治疗学 (Mol Ther) 12, 933-941) 及ICOS(芬尼等人, 2004, 同前文献), 并且已经应用于T细胞以及NK细胞的情形下(达尔德鲁普-林克 (Daldrup-Link) 等人, 2005, 欧洲放射学 (European radiology) 15, 4-13; 今井和坎帕纳 (Campana), 2004, 生物调节剂与内稳定药剂杂志 (J Biol Reg Homeostatic Ag) 18, 62-71; 罗伯茨 (Roberts) 等人, 1998, 免疫学杂志 375-384; 克鲁琴斯基 (Kruschinski) 等人, 2008, 美国国家科学院院刊 105, 17481-17486; 佩格勒姆 (Pegram) 等人, 2008, 免疫学杂志 181, 3449-3455)。虽然第一代CAR是仅有的目前为止已经在临床中测试过的CAR, 但体外和体内两者的比较已经表明使用第二和第三代CAR的明显优越性(海恩斯等人, 2002, 同前文献; 布伦蒂安斯等人, 2007, 同前文献; 腾 (Teng) 等人, 2004, 人类基因治疗学 15, 699-708; 海恩斯等人, 2002, 免疫学杂志 169, 5780-5786; 克沃里克 (Kowolik) 等人, 2006, 癌症研究 (Cancer Res) 66, 10995-11004; 罗斯克格 (Loskog) 等人, 2006, 白血病 20, 1819-1928; 穆勒 (Moeller) 等人, 2004, 癌症基因疗法 (Cancer Gene Therapy) 11, 371-379; 维拉 (Vera) 等人, 2006, 血液 108, 3890-3897)。

[0253] 目前, 大多数研究人员使用块状人类外周T细胞, 然而其它人最近开始使用EBV-特异性T细胞(罗西格 (Rossig) 等人, 2002, 血液 99, 2009-2016)、淋巴祖细胞(扎克热夫斯基 (Zakrzewski) 等人, 2006, 自然·医学 (Nature Med) 12, 1039-1047; 扎克热夫斯基等人,

2008, 自然·生物技术26, 453-461) 及未经分级的骨髓细胞(帕帕拜特罗(Papapetrou), 2009, 临床研究杂志(J clin Invest) 119, 157-168; 王等人, 1998, 自然·医学4, 168-172)。具有溶细胞性并且易于培养的杀手白血病细胞系(例如NK92、NK92MI、KHYG-1)也可以提供表达效应细胞的CAR的连续供应以用于临床前和临床测试。NK92MI是来源于非霍奇金淋巴瘤并且用人类IL-2cDNA转导的人类NK细胞系; 先前研究已经表明其在小鼠模型中的强细胞毒性能力(塔姆(Tam)等人, 1999, 血液学杂志(J Hematol) 8, 281-290; 科贝利克(Korbelik)和孙(Sun), 2001, 国际癌症杂志(Inter J Cancer) 93, 269-274)。另外, NK92细胞也已经用于临床环境中, 并且在多个I期研究之后证明在患有肾细胞癌和黑色素瘤的患者中安全(新井(Arai)等人, 2008, 细胞疗法(Cytotherapy) 10, 625-632)。因为其在体外易于保持和相对较短的倍增时间, 这些细胞是测试多种靶向方法的各种细胞毒性分析的理想效应子。虽然使用原始IL-2依赖性NK92细胞系的研究已经在小鼠和人类两者中展示最低限度的毒性, 但IL-2转导的NK92MI细胞可能具有更大的白血病生成的可能性。一种研究人员使用NK92细胞来尝试并且避免在SCID小鼠中的白血病生成的方法是通过在接种之前用3000cGy辐射效应子。在I期临床试验中, 这足以防止NK92MI细胞在免疫功能不全患者内不可控制地增殖。替代性安全机制是涉及采用自杀基因的安全机制。一个常见实例是使用疱疹病毒胸苷激酶基因, 其通过用投与阿昔洛韦(acyclovir)或更昔洛韦(ganciclovir)杀死表达所述基因的细胞来起作用(海林(Helene)等人, 1997, 免疫学杂志(J Immunol) 5079-5082)。

[0254] 核酸

[0255] 本发明MoAb的重链和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列描述于本申请中。本发明进一步提供包含编码本发明抗体和其片段的核苷酸序列的多核苷酸。本发明还涵盖在严格或较低严格度杂交条件下与编码本发明抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。

[0256] 多核苷酸现在可以通过所属领域中已知的任何方法来获得。举例来说, 因为抗体的核苷酸序列是已知的, 所以编码所述抗体的多核苷酸可以由化学合成的寡核苷酸来组装(例如, 如库特弥尔(Kutmeier)等人, 生物技术(BioTechniques) 17:242 (1994) 中所述), 其简单来说涉及合成含有部分编码所述抗体的序列的重叠寡核苷酸、粘接和接合那些寡核苷酸并且通过PCR来扩增所接合的寡核苷酸。

[0257] 或者, 编码抗体的多核苷酸可以由来自合适来源的核酸来产生。如果含有编码特定抗体的核酸的克隆体是不可获得的, 但所述抗体分子的序列是已知的, 那么编码免疫球蛋白的核酸可以化学方式合成, 或由合适的来源(例如抗体cDNA库、或从表达所述抗体的任何组织或细胞(例如经选择以表达本发明抗体的融合瘤细胞)产生的cDNA库、或自所述组织或细胞分离的核酸(优选地poly A+RNA))通过使用可与序列3'和5'端杂交的合成引子的PCR扩增或通过使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针识别来克隆例如来自编码所述抗体的cDNA库的cDNA克隆体而获得。由PCR产生的扩增核酸可以接着使用所属领域中众所周知的任何方法来克隆到可复制的克隆载体中。

[0258] 因为抗体的核苷酸序列和对应氨基酸序列确定, 所以所述抗体的核苷酸序列可以使用所属领域中众所周知用于操控核苷酸序列的方法来操控, 例如重组DNA技术、定点突变诱发、PCR等(参见例如萨布鲁克等人, 1990, 分子克隆实验指南, 第2版, 冷泉港实验室, 纽约州冷泉港和奥斯贝等人编, 1998, 最新分子生物学实验方法汇编, 约翰·威利父子公司(John Wiley&Sons), 纽约州, 两者都以全文引用的方式并入本文中), 以产生具有不同氨基

酸序列的抗体,例如产生氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0259] 本发明的核酸分子可以呈通过克隆或合成产生而获得的RNA形式(例如mRNA、hnRNA、tRNA或任何其它形式)或DNA(包括(但不限于)cDNA和基因组DNA)形式或其任何组合。DNA可以是三链、双链或单链或其任何组合。DNA或RNA的至少一条链的任何部分都可以是编码链,也称为有义链,或其可以是非编码链,也称为反义链。

[0260] 本发明的经分离核酸分子可以包括包含任选地具有一或多个内含子的开放阅读框架(ORF)的核酸分子,所述开放阅读框架例如(但不限于)至少一种CDR的至少一个指定部分,所述CDR如至少一个重链或轻链的CDR1、CDR2和/或CDR3;包含抗GD2抗体或可变区的编码序列的核酸分子;及包含实质上不同于上文所描述的那些的核苷酸序列但由于遗传密码的简并而仍编码至少一种如本文所描述和/或如所属领域中已知的抗GD2抗体的核酸分子。

[0261] 本发明提供在选择性杂交条件下与本文所公开的多核苷酸杂交的经分离核酸。因此,这个实施例的多核苷酸可以用于分离、检测和/或量化包含这类多核苷酸的核酸。举例来说,本发明的多核苷酸可以用于识别、分离或扩增寄存库中的部分或全长克隆体。在一些实施例中,多核苷酸是经分离的或以其它方式与来自人类或哺乳动物核酸库的cDNA互补的基因组或cDNA序列。

[0262] 核酸可以方便地包含除本发明多核苷酸之外的序列。举例来说,可以将包含一或多个核酸内切酶限制位点的多克隆位点插入到核酸中以帮助分离多核苷酸。另外,可以插入可翻译的序列以帮助分离本发明的经翻译多核苷酸。举例来说,六聚组氨酸标志物序列提供纯化本发明蛋白质的便利手段。本发明的核酸(排除编码序列)任选地是用于克隆和/或表达本发明多核苷酸的载体、衔接子或连接子。

[0263] 可以将额外序列添加到这类克隆和/或表达序列中以优化其在克隆和/或表达中的作用,以帮助分离多核苷酸或改良多核苷酸向细胞中的引入。克隆载体、表达载体、衔接子及连接子的用途是所属领域中众所周知的。(参见例如奥斯贝,同前文献;或萨布鲁克,同前文献)。

[0264] 由本发明进一步提供包含上文所描述的经分离或经纯化核酸分子中的任一者或其片段的载体。上文核酸分子中的任一者或其片段可以克隆到任何合适的载体中并且可以用于转化或转染任何合适的宿主。载体和构建其的方法的选择是所属领域的一般技术人员通常已知的,并且描述于一般技术参考(一般参见,“重组DNA部分D”,酶学方法,第153卷,吴(Wu)和格罗斯曼(格罗斯曼)编,学术出版社(1987))。合乎需要地,载体包含调控序列,例如转录与翻译起始和终止密码子,按需要并且考虑到所述载体是DNA还是RNA,所述调控序列对载体将引入到其中的宿主类型(例如,细菌、真菌、植物或动物)具有特异性。优选地,载体包含对宿主的属(genus)具有特异性的调控序列。最优选地,载体包含对宿主的种(species)具有特异性的调控序列。

[0265] 除复制的系统和插入的核酸之外,构建可以包括一或多个允许选择经转变或转染宿主的标志物基因。标志物基因包括杀生物剂抵抗性,例如对抗生素、重金属等的抵抗性;在营养缺陷型宿主中提供原营养的互补性等等。

[0266] 合适的载体包括被设计成用于繁殖和扩充或用于表达或两者的那些载体。举例来说,克隆载体选自由以下组成的群组:pUC系列、pBluescript系列(斯塔津公司(Stratagene),加利福尼亚州拉荷亚(LaJolla, Calif.))、pET系列(诺杰公司(Novagen),威

斯康星州麦迪逊 (Madison, Wis.))、pGEX 系列 (法玛西亚生物技术公司 (Pharmacia Biotech), 瑞典乌普萨拉 (Uppsala, Sweden)) 及 pEX 系列 (克隆科技公司 (Clontech), 加利福尼亚州帕洛阿尔托 (Palo Alto, Calif.))。也可以使用噬菌体载体, 例如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII (斯塔津公司)、 λ EMBL4 及 λ NM1149。植物表达载体的实例包括 pBI110、pBI101.2、pBI101.3、pBI121 及 pBIN19 (克隆科技公司)。动物表达载体的实例包括 pEUK-C1、pMAM 及 pMAMneo (克隆科技公司)。也可以根据制造商的建议使用 TOP0 克隆系统 (英杰公司 (Invitrogen), 加利福尼亚州卡尔斯巴德 (Carlsbad, Calif.))。

[0267] 表达载体可以包含可操作地连接于如上文所描述的经分离或经纯化核酸分子上的天然或非天然启动子。启动子的选择 (例如强、弱、可诱导、组织特异性和发育特异性) 处于所属领域中的技术内。类似地, 如上文所描述核酸分子或其片段与启动子的组合也处于所属领域中的技术内。

[0268] 合适的病毒载体包括例如反转录病毒载体; 基于细小病毒的载体, 例如基于腺相关病毒 (AAV) 的载体、AAV-腺病毒嵌合载体及基于腺病毒的载体; 及慢病毒载体, 例如基于单纯疱疹病毒 (HSV) 的载体。这些病毒载体可以使用在例如萨布鲁克等人, 分子克隆实验指南, 第2版, 冷泉港出版社, 纽约州冷泉港 (1989); 和奥斯贝等人, 最新分子生物学实验方法汇编, 格林出版协会 (Greene Publishing Associates) 和约翰·威利父子公司, 纽约州纽约 (1994) 中所描述的标准重组DNA技术来制备。

[0269] 反转录病毒载体来源于反转录病毒。反转录病毒是能够感染多种宿主细胞的RNA病毒。在感染后, 反转录病毒基因体整合到其宿主细胞的基因体中, 并且与宿主细胞DNA一起复制, 由此不变地产生病毒RNA和并入所述反转录病毒基因体中的任何核酸序列。因此, 在使用反转录病毒时可实现治疗因子的长期表达。尽管存在病原性逆转录病毒, 但预期用于基因疗法中的逆转录病毒是相对非病原性的。当采用病原性逆转录病毒, 例如人类免疫缺陷病毒 (HIV) 或人类T细胞淋巴病毒 (HTLV) 时, 必须在改变病毒基因体中小心谨慎以消除对宿主的毒性。另外, 可以操控反转录病毒载体以使得所述病毒具有复制缺陷。因此, 反转录病毒载体被视为尤其适用于体内稳定的基因转移。慢病毒载体 (例如基于HIV的载体) 是用于基因递送的反转录病毒载体示例。不同于其它逆转录病毒, 已知基于HIV的载体将其乘客基因并入非分裂细胞中, 并且因此可以用于治疗持续性疾病形式。

[0270] 任选地, 经分离或经纯化核酸分子或其片段在与另一个核酸分子连接后可以编码融合蛋白。融合蛋白的产生处于所属领域中的普通技术内, 并且可以涉及使用限制酶或重组克隆技术 (参见例如, Gateway™ (英杰公司))。也参见美国专利第5,314,995号。

[0271] 鉴于前述内容, 本发明还提供一种包含上文所描述的经分离或经纯化核酸分子的组合物, 所述核酸分子任选地呈载体形式。组合物可以包含如本文进一步描述的其它组分。

[0272] 同位素也可供用于产生用于本发明治疗方法中的放射性偶联抗GD2抗体。实例包括²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、³²P及Lu的放射性同位素。

[0273] 抗GD2抗体和细胞毒性剂的偶联物可以使用多种双官能蛋白质偶合剂来制得, 所述偶合剂例如N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇) 丙酸酯 (SPDP)、丁二酰亚胺基-4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基) 环己烷-1-甲酸酯、亚氨基硫杂环戊烷 (IT)、酰亚胺酯的双官能衍生物 (例如二亚胺代己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯 (例如辛二酸二丁二酰亚胺酯)、醛 (例如戊二醛)、组氨酸-叠氮化合物 (例如双(对叠氮基苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (例如

双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如亚甲代苯基2,6-二异氰酸酯)及双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。举例来说,蓖麻毒素免疫毒素可以如维特塔(Vitetta)等人,科学(Science) 238:1098 (1987)中所描述来制备。14碳标记的1-异硫氰酸根合苯甲基-3-甲基二乙三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸偶联到抗GD2抗体上的示例性螯合剂。参见WO 94/11026。连接子可以是便于细胞毒性药物在细胞中释放的“可裂解连接子”。举例来说,可以使用酸不稳定连接子、肽酶敏感性连接子、二甲基连接子或含二硫连接子(夏里等人癌症研究52:127-131 (1992))。

[0274] 或者,包含抗GD2抗体配体和细胞毒性剂的融合蛋白可以例如通过重组技术或肽合成来制得。

[0275] 组合物

[0276] 本发明的抗GD2抗体组合物包括任何合适的和有效量的包含至少一种抗GD2抗体药剂的组合物或药物组合物,其用于将所提供的抗体药剂递送到需要这类调节(modulation)、治疗或疗法细胞、组织、器官、动物或患者中。

[0277] 本发明还提供至少一种抗GD2抗体组合物,其包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种或六种以上的如本文所描述和/或如所属领域中已知的以非天然存在的组合物、混合物或形式提供的其抗GD2抗体。这类组合物包含非天然存在的组合物,所述组合物包含至少一种或两种抗GD2抗体氨基酸序列的全长C端和/或N端缺失的变异体、结构域、片段或指定变异体,所述氨基酸序列选自由本文所描述的抗体或其指定片段、结构域或变异体的CDR区中70%-100%连续氨基酸组成的群组。优选的抗GD2抗体组合物包括至少一种或两种全长、片段、结构域或变异体作为本文所描述的抗GD2抗体序列中含有至少一种CDR或LBR的部分。进一步优选的组合物包含本文所描述的抗GD2Ab中70%-100%CDR区中的至少一者的40%-99%。如所属领域中已知或如本文所描述的,这类组合物百分比是按液体或无水溶液、混合物、悬浮液、乳液或胶体的重量、体积、浓度、体积摩尔浓度(molarity)或重量摩尔浓度(molality)计。

[0278] 本发明的抗GD2抗体化合物、组合物或组合可以进一步包含任何合适助剂中的至少一者,所述助剂例如(但不限于)稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等等。药学上可接受的助剂是优选的。这类无菌溶液和制备这类无菌溶液的方法的非限制性实例是所属领域中众所周知的,例如(但限于)真纳罗(Gennaro)编,雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版,马克出版公司(Mack Publishing Co.) (宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton, Pa.)) 1990。如所属领域中众所周知或如本文所描述的,可以常规地选择适合于抗GD2抗片段或变异体组合物的投药模式、溶解度和/或稳定性的药学上可接受的载剂。

[0279] 适用于本发明组合物中的药物赋形剂和添加剂包括(但不限于)蛋白质、肽、氨基酸、脂质及碳水化合物(例如,糖,包括单糖、二糖、三糖、四糖和寡糖;衍生糖,例如糖醇、醛糖酸、酯化糖等等;及多糖或糖聚合物),其可以单独或以组合形式存在,并且单独或以组合形式占1-99.99重量%或体积%。示例性蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,例如人类血清白蛋白(HSA)、重组人类白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等等。也可以在缓冲能力中起作用的代表性氨基酸/抗体组分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜糖等等。一种优选的

氨基酸是甘氨酸。

[0280] 适用于本发明中的碳水化合物赋形剂包括例如单糖,例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等等;二糖,例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等等;多糖,例如棉籽糖(raffinose)、松三糖(melezitose)、麦芽糊精(maltodextrin)、葡聚糖、淀粉等等;及糖醇,例如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇(葡糖醇)、肌醇等等。用于本发明中的优选碳水化合物赋形剂是甘露糖醇、海藻糖及棉籽糖。

[0281] 抗GD2抗体组合物也可以包括缓冲剂或pH调节剂;通常,缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性缓冲剂包括有机酸盐,例如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、丁二酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐;Tris、缓血酸胺盐酸盐或磷酸盐缓冲剂。用于本发明组合物中的优选缓冲剂是有机酸盐,例如柠檬酸盐。

[0282] 另外,本发明的抗GD2抗体组合物可以包括聚合赋形剂/添加剂,例如聚乙烯吡咯酮、聚蔗糖(ficoll)(聚合糖)、葡萄糖结合剂(例如,环糊精,例如2-羟丙基- β -环糊精)、聚乙二醇、调味剂、抗菌剂、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(例如,聚山梨醇酯,例如“TWEEN 20”和“TWEEN 80”)、脂质(例如,磷脂、脂肪酸)、类固醇(例如,胆固醇)及螯合剂(例如,EDTA)。

[0283] 适用于根据本发明的抗GD2抗体、部分或变异体组合物中的这些和额外已知药物赋形剂和/或添加剂是所属领域中已知的,例如列于“雷明顿:制药科学与实践(Remington: The Science&Practice of Pharmacy)”,第19版,威廉姆斯与威廉姆斯公司(Williams&Williams), (1995) 和“医师案头参考手册(Physician's Desk Reference)”,第52版,医学经济公司(Medical Economics),新泽西州蒙特威尔(Montvale, N.J.) (1998) 中,其公开内容以引用的方式完全并入本文中。优选的载剂或赋形剂材料是碳水化合物(例如,糖和糖醇)和缓冲剂(例如,柠檬酸盐)或聚合剂。

[0284] 如上所述,本发明提供稳定的调配物,其优选地是具有生理盐水或所选择的盐的磷酸盐缓冲液、以及含有防腐剂的保存溶液和调配物及适合于药物或兽用的多用途保存调配物,其在药学上可接受的调配物中包含至少一种抗GD2抗体。保存调配物在水性稀释剂中含有至少一种已知防腐剂或任选地选自以下组成的群组:至少一种苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁(例如,六水合物)、对羟基苯甲酸烷酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠及硫柳汞或其混合物。如所属领域中已知的,可以使用任何合适的浓度或混合物,例如0.001%-5%或其中的任何范围或值,例如(但不限于)0.001%、0.003%、0.005%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.05%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4.0%、4.3%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%或其中的任何范围或值。非限制性实例包括:无防腐剂、0.1%-2%间甲酚(例如,0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.9%、1.0%)、0.1%-3%苯甲醇(例如,0.5%、0.9%、1.1%、1.5%、1.9%、2.0%、2.5%)、0.001%-0.5%硫柳汞(例如,0.005%、0.01%)、0.001%-2.0%苯酚(例如,0.05%、0.25%、0.28%、0.5%、0.9%、1.0%)、0.0005%-1.0%对羟基苯甲酸烷酯(例如,0.00075%、0.0009%、0.001%、

0.002%、0.005%、0.0075%、0.009%、0.01%、0.02%、0.05%、0.075%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、0.75%、0.9%、1.0%) 等等。

[0285] 如上所述,本发明提供一种制品,其包含包装材料和至少一个包含至少一种抗GD2抗体溶液与任选地处于水性稀释剂中的规定缓冲剂和/或防腐剂的小瓶,其中所述包装材料包含指示这类溶液可以保存1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72小时或72小时以上时段的标记。本发明进一步包含一种制品,其包含包装材料、包含冻干的至少一种抗GD2抗体的第一小瓶及包含规定缓冲剂或防腐剂的水性稀释剂的第二小瓶,其中所述包装材料包含指导患者使所述至少一种抗GD2抗体在所述水性稀释剂中复水以形成可以保持24小时或24小时以上时段的溶液。

[0286] 本发明产品中至少一种抗GD2抗体的范围包括在复水得到的量,如果在湿式/干式系统中,那么浓度是约1.0微克/毫升到约1000mg/ml,尽管较低和较高浓度是可操作的并且取决于预定递送媒介,例如溶液调配将不同于透皮贴片、经肺、经粘膜或渗透或微观泵方法。

[0287] 优选地,水性稀释剂任选地进一步包含药学上可接受的防腐剂。优选的防腐剂包括选自以下组成的群组的那些防腐剂:苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠及硫柳汞或其混合物。用于调配物中的防腐剂的浓度是足以得到抗微生物作用的浓度。这类浓度取决于所选择的防腐剂,并且容易地由所属领域的技术人员决定。

[0288] 可以任选并优选地向稀释剂中添加其它赋形剂,例如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐增强剂。等渗剂(例如甘油)常以已知浓度使用。优选地添加生理学上容许的缓冲剂以提供改良的pH控制。调配物可以覆盖广泛的pH,例如约pH 4到约pH 10,和约pH 5到约pH 9的优选范围,和约6.0到约8.0的最优选范围。优选地,本发明调配物的pH在约6.8与约7.8之间。优选的缓冲剂包括磷酸盐缓冲剂,最优选地磷酸钠,尤其磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0289] 可以任选地向调配物或组合物中添加其它添加剂,例如药学上可接受的增溶剂,如Tween 20(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯)、Tween 40(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单棕榈酸酯)、吐温80(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯)、普朗尼克(Pluronic) F68(聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)及PEG(聚乙二醇);或非离子型表面活性剂,例如聚山梨醇酯20或80或泊洛沙姆(poloxamer) 184或188; **PLURONIC®** 多元醇;其它嵌段共聚物及螯合剂,例如EDTA和EGTA,以减少聚集。这些添加剂在泵或塑料容器用于投与调配物的情况下尤其适用。药学上可接受的表面活性剂的存在缓和蛋白质聚集的倾向。

[0290] 本发明的调配物可以通过以下方法来制备,所述方法包含在水性稀释剂中将至少一种抗GD2抗体和选自由以下组成的群组的防腐剂混合:苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠及硫柳汞或其混合物。在水性稀释剂中混合至少一种抗GD2抗体和防腐剂使用常规的溶解和混合程序来进行。为了制备合适的调配物,举例来说,以足以以所要浓度提供蛋白质和防腐剂的量将缓冲溶液中所测量的量的至少一种抗GD2抗体与缓冲溶液中的所要防腐剂组合。所属领域的一般技术人员将认识到这种方法的变化形式。举例来说,添加组分的次序、是否使用额外添加剂、制备调配物的温度和pH都是可以针对所用浓度和投药手段进行优化的因子。

[0291] 可以透明溶液形式或以双重小瓶形式向患者提供所要求的调配物,所述双重小瓶包含一个小瓶的冻干的至少一种抗GD2抗体,所述抗体用在水性稀释剂中含有水、防腐剂和/或赋形剂、优选地磷酸盐缓冲液和/或生理盐水和所选择的盐的第二小瓶复水。需要复水的单个溶液小瓶或双重小瓶可以多次重复使用。并且可以满足患者治疗单个或多个周期的需要,并且因此可以提供比目前可获得的治疗方案更便利的治疗方案。

[0292] 本发明所要求的制品适用于在立即到24小时或24小时以上的时段内投与。因此,本发明所要求的制品向患者提供显著优点。本发明的调配物可以任选地安全储存在约2℃到约40℃的温度下,并且保持蛋白质得生物学活性持续延长的时间段,因此允许包装标记指示溶液可以保持6、12、18、24、36、48、72或96小时或96小时以上的时段和/或在所述时段内使用。如果使用保存的稀释剂,那么这类标记可以包括在高达1-12个月、半年、一年和一年半和/或两年内使用。

[0293] 本发明中至少一种抗GD2抗体的溶液可以通过包含将至少一种抗体混合在水性稀释剂中的方法来制备。混合使用常规的溶解和混合程序来进行。为了制备合适的稀释剂,举例来说,以足以以所要浓度提供蛋白质和任选地防腐剂或缓冲剂的量组合水或缓冲剂中所测量的量的至少一种抗体。所属领域的一般技术人员将认识到这种方法的变化形式。举例来说,添加组分的次序、是否使用额外添加剂、制备调配物的温度和pH都是可以针对所用浓度和投药手段进行优化的因子。

[0294] 可以透明溶液形式或以双重小瓶形式向患者提供所要求的产品,所述双重小瓶包含一个小瓶的冻干的至少一种抗GD2抗体,所述抗体用含有水性稀释剂的第二小瓶复水。需要复水的单个溶液小瓶或双重小瓶可以多次重复使用。并且可以满足患者治疗单个或多个周期的需要,并且因此提供比目前可获得的治疗方案更便利的治疗方案。

[0295] 可以通过向药店、诊所或其它这类机构和设施提供透明溶液或双重小瓶来向患者间接提供所要求的产品,所述双重小瓶包含一个小瓶的冻干的至少一种抗GD2抗体,所述抗体用含有水性稀释剂的第二小瓶复水,在这种情况下,透明溶液的大小可以是多达一升或甚至一升以上,从而提供较大储槽,可以从所述储槽中取出较小部分的至少一种抗体溶液一或多次以转移到较小小瓶中并且由药店或诊所向其顾客和/或患者提供。

[0296] 包含这些单个小瓶系统的公认装置包括用于递送溶液的那些笔型注射器装置,例如BD笔、BD AUTOJECTOR®、HUMAJECT®,例如由贝克顿-迪金森公司(Becton Dickensen)(新泽西州富兰克林湖(Franklin Lakes,N.J.))、迪斯特洛尼克公司(Disetronic)(瑞士布格多夫(Burgdorf,Switzerland));生物喷射公司(Bioject),俄勒冈州波特兰(Portland,Oreg);国家医疗产品公司(National Medical Products)韦斯顿医疗公司(Weston Medical)(英国彼得伯勒(Peterborough,UK)),医学注射公司(Medi-Ject Corp)(明尼苏达州明尼阿波利斯(Minneapolis,Minn.))所制得或开发。包含双重小瓶系统的公认装置包括用于使药筒中的冻干复水以用于递送所述复水溶液的那些笔型注射器系统,例如HUMATROPEN®。

[0297] 本发明所要求的产品包括包装材料。除调控机构所需的信息之外,包装材料还提供可以使用所述产品的条件。对于两个小瓶的湿式/干式产品,本发明的包装材料向患者提供用以使至少一种抗GD2抗体在水性稀释剂中复水以形成溶液并且在2-24小时或24小时以上的时段内使用所述溶液的说明书。对于单个小瓶溶液产物,标记指示这类溶液可以在2-

24小时或24小时以上的时段内使用。本发明所要求的产品适用于人类药物产品使用。

[0298] 本发明的调配物可以通过以下方法来制备,所述方法包含混合至少一种抗GD2抗体和所选择的缓冲剂,优选地含有生理盐水或所选择的盐的磷酸盐缓冲液。在水性稀释剂中混合至少一种抗体和缓冲剂使用常规的溶解和混合程序来进行。为了制备合适的调配物,举例来说,以足以以所要浓度提供蛋白质和缓冲剂的量将水或缓冲剂中所测量的量的至少一种抗体与水中的所要缓冲剂组合。所属领域的一般技术人员将认识到这种方法的变化形式。举例来说,添加组分的次序、是否使用额外添加剂、制备调配物的温度和pH都是可以针对所用浓度和投药手段进行优化的因子。

[0299] 可以透明溶液形式或以双重小瓶形式向患者提供所要求的稳定或保存调配物,所述双重小瓶包含一个小瓶的冻干的至少一种抗GD2抗体,所述抗体用在水性稀释剂中含有防腐剂或缓冲剂和赋形剂的第二小瓶复水。需要复水的单个溶液小瓶或双重小瓶可以多次重复使用。并且可以满足患者治疗单个或多个周期的需要,并且因此提供比目前可获得的治疗方案更便利的治疗方案。

[0300] 如所属领域中众所周知的,本文所描述的稳定或保存调配物或溶液中的至少一种抗GD2抗体可以根据本发明经由多种递送方法来向患者投与,所述递送方法包括SC或IM注射;透皮、经肺、经粘膜、植入、渗透泵、药筒、微观泵或所属领域的技术人员所了解的其它手段。

[0301] 在本发明的一个实施例中,包含本发明抗GD2抗体的药物组合物促进人类化抗体向生物体,优选地动物,优选地哺乳动物的投与。特定哺乳动物包括牛、犬、马、猫、羊及猪动物、非人类灵长类动物和人类。人类是尤其优选的。

[0302] 适合于内部投药的剂型(组合物)一般含有每单位或容器约0.1毫克到约500毫克的活性成分。在这些药物组合物中,活性成分将通常以按组合物的总重量计约0.5-99.999重量%的量存在。

[0303] 对于非经肠投药,可以用药学上可接受的非经肠媒剂将抗体调配为关联或单独提供的溶液、悬浮液、乳液或冻干粉末。这类媒剂的实例是水、生理盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、葡萄糖(dextrose)溶液及1%-10%人类血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性媒剂(例如不挥发性油)。媒剂或冻干粉末可以含有维持等渗性(例如,氯化钠、甘露糖醇)和化学稳定性(例如,缓冲剂和防腐剂)的添加剂。通过已知或合适的技术对调配物进行灭菌。

[0304] 适合的药物载剂描述于雷明顿氏药物科学,A.奥索尔(0sol)(所属领域中一本标准参考书)的最新版本中。

[0305] 用于非经肠投药的调配物可以含有无菌水或生理盐水、聚亚烷基二醇(例如聚乙二醇)、植物来源的油、氢化萘等等作为常见赋形剂。注射用水性或油性悬浮液可以通过根据已知方法使用适当的乳化剂或加湿剂和悬浮剂来制备。注射用药剂可以是无毒的不可口服的稀释剂,例如水溶液或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液。作为适用媒剂或溶剂,允许水、林格氏溶液、等渗生理盐水等;作为普通溶剂或悬浮溶剂,可以使用无菌非挥发性油。出于这些目的,可以使用任何类别的非挥发性油和脂肪酸,包括天然或合成或半合成的脂肪油或脂肪酸;天然或合成或半合成的单甘油酯或二甘油酯或三甘油酯。非经肠投药是所属领域中已知的,并且包括(但不限于)常规的注射手段、如美国专利第5,851,198号中所描述

的气体加压无针头注射装置及如美国专利第5,839,446号中所描述的激光穿孔装置,所述专利以引用的方式完全并入本文中。

[0306] 组合疗法

[0307] 在一些实施例中,投与所提供的抗GD2抗体,其任选地进一步包含至少一种选自以下的物质:至少一种TNF拮抗剂(例如(但不限于),TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或片段、其融合蛋白或小分子TNF拮抗剂)、抗风湿药(例如,甲胺喋呤、金诺芬(auranofin)、金硫葡萄糖(aurothioglucose)、硫唑嘌呤(azathioprine)、依那西普(etanercept)、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特(leflunomide)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine))、肌肉松弛剂、安眠药(narcotic)、非类固醇消炎药(NSAID)、镇痛剂、麻醉剂(anesthetic)、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(例如,氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯类(carbapenem)、头孢菌素(cephalosporin)、氟喹诺酮(fluoroquinolone)、大环内酯(macrolide)、青霉素(penicillin)、磺酰胺、四环素(tetracycline)、另一种抗微生物剂)、抗牛皮癣剂(antipsoriatic)、皮质类固醇(corticosteroid)、同化类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺药剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、止咳剂、止吐剂、抗溃疡药、缓泻药、抗凝血剂、红细胞生成素(例如,依泊汀 α (epoetin α))、非格司亭(filgrastim)(例如,G-CSF、优保津(Neupogen))、沙格司亭(sargramostim)(GM-CSF、鲁奇因(Leukine))、免疫作用剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如,巴利昔单抗(basiliximab)、环孢霉素(cyclosporine)、达利珠单抗(daclizumab))、生长激素、激素替代性药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂(mydriatic)、睫状肌麻痹剂(cycloplegic)、烷基化剂、抗代谢产物、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗忧郁剂、抗躁狂剂(antimanic agent)、抗精神病药(antipsychotic)、抗焦虑剂(anxiolytic)、催眠剂(hypnotic)、拟交感神经药(sympathomimetic)、刺激剂、多奈哌齐(donepezil)、他克林(tacrine)、哮喘药物、 β 促效剂、吸入式类固醇、白三烯素抑制剂(leukotriene inhibitor)、甲基黄嘌呤、色甘酸(cromolyn)、肾上腺素或类似物、脱氧核糖核酸酶 α (DNase α)(百慕时(Pulmozyme))、细胞因子或细胞因子拮抗剂、及细胞疗法。这类细胞因子的非限制性实例包括(但不限于)IL-1到IL-34中的任一者。合适的剂量是所属领域中众所周知的。参见例如,韦尔斯(Wells)等人编,《药物疗法手册》,第2版,阿普尔顿(Appleton)和兰格(Lange),康涅狄格州斯坦福德(Stamford,Conn.)(2000);PDR药典,塔拉斯孔便携式药典2000(PDR Pharmacopoeia,Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000),豪华版,塔拉斯孔出版社,加利福尼亚州罗玛琳达(Loma Linda,Calif.)(2000),所述参考文献中的每一者以引用的方式完全并入本文中。

[0308] 这类抗癌药或抗感染药也可以包括与至少一种本发明抗体缔合、结合、共同调配或共同投与的毒素分子。毒素可以任选地起选择性杀灭病理性细胞或组织的作用。病理性细胞可以是癌症或其它细胞。这类毒素可以是(但不限于)包含至少一个毒素功能性细胞毒性结构域的经纯化或重组的毒素或毒素片段,所述毒素例如选自蓖麻毒素、白喉毒素、毒液毒素或细菌毒素中的至少一者。术语毒素还包括由任何天然、突变或重组细菌或病毒产生的内毒素和外毒素两者,所述毒素可以在人类和其它哺乳动物中造成任何病理性病状(包括可能导致死亡的毒素休克)。这类毒素可以包括(但不限于)肠产毒性大肠杆菌(E.coli)热不稳定肠毒素(LT)、热稳定肠毒素(ST)、志贺杆菌(Shigella)细胞毒素、气单胞菌(Aeromonas)肠毒素、毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)、葡萄球菌肠毒素A(SEA)、葡萄球菌

肠毒素B (SEB) 或葡萄球菌肠毒素C (SEC)、链球菌肠毒素等。这类细菌包括(但不限于) 肠产毒性大肠杆菌 (ETEC) 种菌株、肠出血性大肠杆菌 (例如, 血清型0157:H7菌株)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 种 (例如, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*))、酿脓葡萄球菌 (*Staphylococcus pyogenes*))、志贺杆菌 (*Shigella*) 种 (例如, 痢疾志贺杆菌 (*Shigella dysenteriae*))、弗氏志贺杆菌 (*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺杆菌 (*Shigella boydii*) 及索氏志贺杆菌 (*Shigella sonnei*))、沙门氏菌 (*Salmonella*) 种 (例如, 伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*))、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella cholera-suis*)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*))、梭菌 (*Clostridium*) 种 (例如, 产气荚膜芽胞梭菌 (*Clostridium perfringens*))、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、肉毒芽孢梭菌 (*Clostridium botulinum*))、弯曲菌 (*Camphlobacter*) 种 (例如, 空肠弯曲菌 (*Camphlobacter jejuni*))、胎儿弯曲菌 (*Camphlobacter fetus*))、螺杆菌 (*Heliobacter*) 种 (例如, 幽门螺杆菌 (*Heliobacter pylori*))、气单胞菌种 (例如, 温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*))、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae*))、类志贺邻单胞菌 (*Pleisomonas shigelloides*)、小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersina enterocolitica*)、弧菌 (*Vibrios*) 种 (例如, 霍乱弧菌 (*Vibrios cholerae*))、副溶血性弧菌 (*Vibrios parahemolyticus*))、克雷白氏菌 (*Klebsiella*) 种、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及链球菌 (*Streptococci*)。参见例如, 施泰因 (Stein) 编, 内科医学 (INTERNAL MEDICINE), 第3版, 第1-13页, 小布朗公司 (Little, Brown and Co.), 波士顿 (Boston), (1990); 伊万斯 (Evans) 等人编, 人类细菌感染: 流行病学和控制 (Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control), 第2版, 第239-254页, 普雷纳姆医学图书公司 (Plenum Medical Book Co.), 纽约 (1991); 曼德尔 (Mandell) 等人, 传染病原理与实践 (Principles and Practice of Infectious Diseases), 第3版, 丘吉尔·利文斯顿出版社 (Churchill Livingstone), 纽约州 (1990); 伯科 (Berkow) 等人编, 默克手册 (The Merck Manual), 第16版, 默克公司 (Merck and Co.), 新泽西州拉维 (Rahway, N.J.), 1992; 伍德 (Wood) 等人, 欧洲微生物学会联合会微生物学免疫学 (FEMS Microbiology Immunology), 76:121-134 (1991); 马拉克 (Marrack) 等人, 科学, 248:705-711 (1990), 所述参考文献的内容以引用的方式完全并入本文中。

[0309] 产生

[0310] 如本文所描述或如所属领域中已知的, 根据本发明使用的至少一种抗GD2抗体可以通过重组手段 (包括来自哺乳动物细胞或转殖基因制备) 来产生, 可以是可由其它生物学来源纯化。

[0311] 也鉴于上文内容, 本发明提供一种宿主细胞, 其包含上文所描述的经分离或经纯化核酸分子, 所述宿主细胞任选地呈载体形式。最优选的是本发明的细胞表达所述载体, 以使得寡核苷酸或其片段由所述细胞有效地转录和翻译。细胞的实例包括(但不限于) 本文下文所阐述的人类细胞、人类细胞系、大肠杆菌 (例如, 大肠杆菌TB-1、TG-2、DH5 α 、XL-蓝MRF' (斯塔津公司)、SA2821及Y1090)、枯草杆菌 (*B. subtilis*)、绿脓假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)、粗糙链孢霉 (*N. crassa*)、昆虫细胞 (例如, Sf9、Ea4) 等。宿主细胞可以存在于宿主中, 所述宿主可以是动物, 哺乳动物, 尤其人类。

[0312] 在一个具体实施例中, 可以使用常规重组DNA技术将本文中识别的一或多种CDR插

入构架区内。构架区可以是天然存在的或共有的构架区,并且优选地是人类构架区(人类构架区列表参见例如,科西亚(Chothia)等人,分子生物学杂志278:457-479(1998))。优选地,通过组合构架区和CDR而产生的多核苷酸编码特异性结合GD2的抗体。可以在构架区内进行一或多个氨基酸取代,并且优选地,所述氨基酸取代改良抗体与其抗原的结合。另外,这类方法可以用于对参与链内二硫键的一或多个可变区半胱氨酸残基进行氨基酸取代或缺失以产生缺少一或多个链内二硫键的抗体分子。多核苷酸的其它改变由本发明涵盖并且处于所属领域的技术内。

[0313] 应用

[0314] 将需要针对GD2的高亲和力、中和嵌合或人类抗体来用于其中表达GD2的疾病中,举例来说,GD2在>50%的黑色素瘤(张(Zhang)等人,1997,国际癌症杂志(Int.J.Cancer) 73,42-49)、88%的骨肉瘤(海纳(Heiner)等人,1987,癌症研究(Cancer Res.) 47,5377-5388)及93%的软组织肉瘤(包括脂肪肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、平滑肌肉瘤和梭形细胞肉瘤)(常(Chang)等人,1992,癌症(Cancer) 70,633-638)以及大脑肿瘤(隆基(Longee)等人,1991,神经病理学学报(Acta Neuropathol.) 82,45-54)中表达。已经在患有黑色素瘤(萨利赫(萨利赫)等人,1992,人类抗体杂交瘤(Hum.Antibodies Hybridomas) 3,19-24;张(Cheung)等人,1987,临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncol.) 5,1430-1440;蔡(Choi)等人,2006,癌症免疫与免疫疗法(Cancer Immunol.Immunother.) 55,761-774)、肉瘤(蔡等人,2006,同前文献;叶(Yeh)等人,1992,第五届亚洲和大洋洲核医学与生物学大会会议记录(The fifth Asia and Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology Proceedings),第104页)、小细胞肺癌(格兰特(Grant)等人,1996,欧洲核医学杂志23,145-149)、大脑肿瘤(阿比特(Arbit)等人,1995,欧洲核医学杂志22,419-426)的患者中通过iv注射以及通过使用奥马耶(Ommaya)储槽的房室疗法(克拉默(Kramer)等人,2007,临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncol.) 25,5465-5470)来测试抗GD2抗体。GD2也是用于成视网膜细胞瘤(钱塔达(Chantada)等人,2006,儿科血液学/肿瘤学杂志(J.Pediatr.Hematol.Oncol.) 28,369-373)和HTLV-1感染的T细胞白血病细胞(古河(Furukawa)等人,1993,美国国家科学院院刊90,1972-1976)的肿瘤靶。在一个优选方面,本发明的抗GD2抗体可以用于治疗成神经细胞瘤。抗GD2抗体或其衍生物可以作为单一药剂或与其它治疗剂组合使用。另外,这些Mab可以用作化学致敏剂,因此其使用可以增加细胞毒性剂的疗效。这些抗体可以用作放射致敏剂,因此其使用可以改良辐射功效。其也可以与其它肿瘤免疫调节剂组合使用,所述肿瘤免疫调节剂例如IL-2、IL-12和/或IFN α 。另外,抗GD2抗体可以与其它单克隆抗体组合使用,所述单克隆抗体例如抗TNF- α 、IL-12/IL-23、IL-2、GpIIb/IIIa受体、CD52、CD20、RSV蛋白质、HER2/neu受体等等;以及与商业上批准的抗体组合使用,所述抗体包括美罗华(Rituxan)、赫赛汀(Herceptin)、麦罗塔(MyloTarg)、坎帕斯(Campath)、泽娃灵(Zevalin)、百克沙(Bexxar)、爱必妥(Erbix)、阿瓦斯汀(Avastin)及维克替比(Vectibix)。

[0315] 因此,如所属领域中已知或如本文所描述的,本发明还提供一种用于在细胞、组织、器官、动物或患者中调节或治疗至少一种GD2相关疾病的方法,所述方法使用至少一种本发明抗GD2抗体来进行。

[0316] 1986年使用淋巴激素活化的杀手细胞(LAK)和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的过继性免疫疗法试验报告患者中的偶然肿瘤响应。供体淋巴细胞输注已经展示在患有慢性骨髓

性白血病的患者中在同种异体干细胞移植后或在患有移植后EBV相关淋巴组织增生疾病(PTLD)的患者中甚至更成功。在实体肿瘤中,CTL在由高剂量化学疗法产生的淋巴细胞减少期间成功地治疗恶性黑色素瘤。通过使两种杂交瘤融合以产生具有两个结合位点的杂交免疫球蛋白分子来制得双特异性抗体。抗体不仅将肿瘤限定到T细胞上;其还将CD3交联在T细胞上并且引发活化级联。因此,基于TCR的细胞毒性绕过MHC限制而重定向到所要肿瘤靶上。用抗CD3×抗TAA(BsAb或BiTE抗体)装备多克隆活化的T细胞(ATC)组合MoAb(例如其中TAA为GD2的hu3F8)的靶向特异性与T细胞的不受MHC限制的穿孔素/颗粒酶介导的细胞毒性。BsAb或BiTE可以在输注到患者中之前装备离体扩充的活化T细胞。这种策略将每一个ATC转化成特异性CTL(塔库尔(Thakur)和卢姆(Lum),2010,分子治疗学新见(Curr Opin Mol Ther) 12,340-349;格拉波特(Grabert)等人,2006,临床癌症研究12,569-576)。

[0317] 肿瘤通过多种机制避开T细胞:较低或不表达MHC(例如在NB中)、使T细胞信号传导脱轨、减少肿瘤肽在MHC上的呈现、不存在共刺激分子及诱导抑制CTL和体液响应的调控T细胞。因为通过BsAb或BiTE装备的ATC进行的杀灭不受MHC限制,所以这种策略应克服一些这些肿瘤逃避机制。肿瘤分泌TGF- β ,从而使T细胞免疫反应向Th2类型偏移,下调白细胞介素2(IL-2)和IFN- γ 分泌,同时上调IL-10和IL-6,其全部导致免疫抑制。由BsAb或BiTE重定向的T细胞可以绕过调控细胞因子的这些负面作用,因为装备的ATC以IL-2非依赖性方式裂解肿瘤靶。用在肿瘤处定向的BsAb或BiTE装备T细胞治疗的患者具有增加的TNF- α 和IFN- γ 水平,其应使T细胞朝向Th1响应偏移。另外,细胞毒性T细胞经由其与肿瘤细胞上Fas受体(CD95)接合的Fas配体(FasL)进行杀灭。不利的是,肿瘤细胞上的FasL也可以诱导T细胞的细胞凋亡。经由CD3级联的TCR刺激保护CD8+不进行CD95介导的自杀。装备的ATC经由TCR与BsAb或BiTE的交联来抵抗CD95诱导的细胞死亡。T细胞连续杀灭(即一个T细胞杀灭连续肿瘤靶)、在过程期间增殖及移动到淋巴管和软组织中的能力增加在NB细胞转移出骨髓空间以形成肿瘤块时捕获NB的机率。最近使用BsAb或BiTE靶向人类癌症的研究已经展示前景。

[0318] 存在逐渐增加的证据(尤其来自已经接受同种造血细胞移植的患者的分析)支持T细胞抑制或根除淋巴瘤和某些形式的白血病的潜能(奥莱利(O'reilly)等人,2010,免疫学研讨文辑(Semin Immunol) 22,162-172)。然而,不存在有说服力的数据支持T细胞在控制儿童中实体肿瘤中的作用。这与以下事实相符:若干这些肿瘤不表达遗传I类或II类HLA等位基因(例如成神经细胞瘤)(拉法格罗(Raffaghello)等人,2005,癌基因(Oncogene) 24,4634-4644;伍尔夫(Wolf)等人,2005,癌症免疫与免疫疗法(Cancer Immunol Immunother) 54,400-406)或仅表达并且以较低水平表达I类等位基因(例如横纹肌肉瘤)((普拉多斯)等人,2006,赘生物(Neoplasma) 53,226-231)。此外,关键性共刺激分子(例如B7.1和ICAM-1)的表达常常是较低或不可检测的。因此,这些肿瘤引起T细胞响应的能力不良,并且效应T细胞通过结合由HLA等位基因呈现的肿瘤抗原而经由T细胞受体接合肿瘤得潜能受到限制。此外,目前可供用于成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)及促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤的最有效疗法以诱导极严重T-淋巴球减少症的剂量采用免疫抑制烷基化剂,尤其环磷酰胺。双功能抗体准许T细胞的靶向接合并且准许采用所述T细胞经由HLA非限制性CD3介导的活化而非其抗原特异性受HLA限制的TCR的效应功能。对CD3和例如CD-19、HER-2NEU或CEA的肿瘤抗原具有特异性的某些双功能单克隆抗体的研究已经表明这些抗体将细胞毒性T细胞与表达其它靶向抗原的肿瘤细胞相连的能力

(巴尔格 (Bargou) 等人, 2008, 科学 321, 974-977; 托普 (Topp) 等人, 2009, 血液 (ASH 年度会议摘要) 114, 840; 凯乌 (Kiewe) 等人, 2006, 临床癌症研究 12, 3085-3091; 拉特布斯 (Lutterbuese) 等人, 2009, 免疫疗法杂志 (J Immunother) 32, 341-352)。一旦抗体受体两者接合, 开始针对肿瘤细胞的细胞毒性T细胞响应。T细胞响应涉及在T细胞受体与肿瘤细胞之间形成细胞毒性突触以及穿孔素和颗粒酶介导的肿瘤细胞细胞凋亡诱导 (奥夫纳 (Offner) 等人, 2006, 分子免疫学 (Mol Immunol) 43, 763-771; 布里施魏茵 (Brischwein) 等人, 2006, 分子免疫学 43, 1129-1143)。CD3 的接合使T细胞活化, 从而诱导增强抗肿瘤作用的效应细胞因子的增殖和产生 (布里施魏茵等人, 2006, 同前文献; 布里施魏茵等人, 2007, 免疫疗法杂志 (J Immunother) 30, 798-807)。引人注目地, 活化T细胞上调抗凋亡蛋白 c-FLIP, 所述 c-FLIP 保护所述T细胞不受在T细胞活化期间产生的TNF和Fas配体的细胞毒性作用 (德雷尔 (Dreier) 等人, 2002, 国际癌症杂志 100, 690-697)。因此, T细胞响应放大。其结果是, 皮克水平的双功能抗体可以发挥显著的体外抗肿瘤作用 (拉特布斯等人, 2009, 同前文献; 布兰德尔 (Brandl) 等人, 2007, 癌症免疫与免疫疗法 56, 1551-1563) 和体内抗肿瘤作用, 如在临床前动物模型中并且在CD3/CD19在治疗B细胞淋巴瘤和ALL中具有双特异性的初始临床试验结果中所示 (托普等人, 2009, 同前文献; 凯乌等人, 2006, 同前文献)。已经假设所诱导的T细胞响应也可以补充天然 (naïve) T细胞并且在肿瘤位点下刺激肿瘤特异性T细胞的产生 (屈纳 (Koehne) 等人, 2002, 血液 99, 1730-1740)。双特异性抗体也可以用于再靶向除T-淋巴细胞之外的其它效应细胞。这些效应细胞包括NK细胞、B-淋巴细胞、树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性白细胞、间叶干细胞、神经干细胞及向细胞、组织或器官表达GD2的其它干细胞。当组织是肿瘤时, 可以采用这些效应细胞来杀灭或沉积用于诊断或用于疗法的蛋白质 (例如细胞因子、抗体、酶或毒素)、放射性同位素。当组织是正常器官时, 可以类似地采用效应细胞来递送用于诊断或用于疗法的蛋白质或同位素。

[0319] 本发明包括一种用于在细胞、组织、器官、动物或患者中调节或治疗至少一种恶性疾病; 抑制癌转移; 改善癌症恶病体质; 并且治疗炎性疾病, 例如肾小球膜增殖性丝球体肾炎等等的方法, 所述恶性疾病包括 (但不限于) 以下中的至少一者: 多发性骨髓瘤、白血病、急性白血病、急性淋巴母细胞白血病 (ALL)、B细胞、T细胞或FAB ALL、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性骨髓细胞性白血病 (CML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、毛状细胞白血病、骨髓发育不良综合征 (MDS)、淋巴瘤、霍奇金氏病 (Hodgkin's disease)、恶性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤 (non-hodgkin's lymphoma)、伯基特氏淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)、多发性骨髓瘤、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、结肠直肠癌、肾细胞癌、胰脏癌、前列腺癌、鼻咽癌、恶性组织细胞增多病、恶性疾病的肿瘤伴生综合征/高钙血症、实体肿瘤、腺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、血管瘤、转移性疾病、癌症相关骨骼再吸收、癌症相关骨骼疼痛。这一方法可以任选地通过在投与这类GD2抗体之前、同时或之后投与来与放射疗法、抗血管生成剂、化学治疗剂、法呢基转移酶 (farnesyl transferase) 抑制剂等等组合使用。

[0320] 本发明还提供一种用于在细胞、组织、器官、动物或患者中调节或治疗至少一种GD2介导的免疫相关疾病的方法, 所述疾病包括 (但不限于) 以下中的至少一者: 类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、全身性发作幼年型类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、胃溃疡、血清反应阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、全身性红斑狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维化、全身性血管

炎/韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、结节病、睾丸炎/输精管切除术反转程序、过敏性/特应性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、湿疹、过敏性接触性皮炎、过敏性结膜炎、过敏性肺炎、移植、器官移植排斥、移植物抗宿主疾病、全身炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性脓毒症、革兰氏阴性脓毒症、培养物阴性脓毒症、真菌脓毒症、嗜中性粒细胞减少性发热、尿路性脓毒症、脑膜炎球菌血症、外伤/出血、灼伤、电离辐射暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、类风湿性关节炎、酒精诱导的肝炎、慢性发炎性病变、结节病、克罗恩氏病变(Crohn's pathology)、镰状细胞贫血、糖尿病、肾变性病、特应性疾病、超敏反应、过敏性鼻炎、枯草热、常年性鼻炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、荨麻疹、全身性过敏反应、皮炎、恶性贫血、溶血性疾病、血小板减少症、任何器官或组织的移植物排斥、肾脏移植排斥、心脏移植排斥、肝脏移植排斥、胰脏移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、皮肤同种异体移植物排斥、软骨移植排斥、骨移植物排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺植入物排斥、副甲状腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植物排斥、同种异体移植物排斥、抗受体超敏反应、格雷夫斯病(Graves disease)、雷诺氏病(Raynaud's disease)、B型抗胰岛素性糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III型超敏反应、全身性红斑狼疮、POEMS综合征(多发性神经病、内脏增大、内分泌病、单克隆球蛋白症及皮肤变化综合征)、多发性神经病、内脏增大、内分泌病、单克隆球蛋白症、皮肤变化综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、硬皮病、混合结缔组织疾病、特发性阿狄森氏疾病(idiopathic Addison's disease)、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化症、白斑病、血管炎、MI心切开后综合征、IV型超敏、接触性皮炎、过敏性肺炎、同种异体移植物排斥、归因于胞内有机体的肉芽肿、药物敏感性、代谢性/特发性威尔逊氏病(Wilson's disease)、血色素沉着、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏症、糖尿病性视网膜病变、桥本氏甲状腺炎(hashimoto's thyroiditis)、骨质疏松、下丘脑-垂体-肾上腺轴线评估、原发性胆汁性肝硬化、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶病体质、囊肿性纤维化、新生慢性肺病、慢性阻塞性肺病(COPD)、家族性噬血淋巴组织细胞瘤病、皮肤病学病状、牛皮癣、秃发症、肾病综合征、肾炎、肾小球肾炎、急性肾衰竭、血液透析、尿毒症、毒性、惊厥前期、OKT3疗法、抗CD3疗法、细胞因子疗法、化学疗法、放射疗法(例如,包括(但不限于)乏力、贫血、恶病体质等等)、慢性水杨酸盐中毒、睡眠呼吸暂停、肥胖、心力衰竭、鼻窦炎、发炎性肠病等等。参见例如,默克手册,第12-17版,默克公司,新泽西州拉维(1972、1977、1982、1987、1992、1999),药物疗法手册,韦尔斯等人编,第二版,阿普尔顿和兰格,康涅狄格州斯坦福德(1998、2000),其各自以引用的方式完全并入。

[0321] 本发明还提供一种用于在细胞、组织、器官、动物或患者中调节或治疗至少一种传染病的方法,所述传染病包括(但不限于)以下中的至少一者:急性或慢性细菌感染、急性和慢性寄生虫或感染过程(包括细菌、病毒和真菌感染)、HIV感染/HIV神经病变、脑膜炎、肝炎(A、B或C等等)、脓毒性关节炎、腹膜炎、肺炎、会厌炎、大肠杆菌0157:h7、溶血性尿毒症综合征/血栓溶解剂血小板减少性紫癜症、疟疾、出血性登革热、利什曼体病(leishmaniasis)、麻风、毒性休克综合征、链球菌肌炎、气性坏疽、结核分枝杆菌(结核分枝杆菌)、鸟型细胞内分枝杆菌(myco bacterium avium intracellulare)、肺炎肺囊虫(pneumocystis carinii)肺炎、骨盆发炎疾病、睾丸炎/副睾炎、军团菌、莱姆病(lyme disease)、流感a、艾伯斯坦-巴尔病毒(epstein-barr virus)、重度相关嗜血性综合征、重度脑炎/无菌性脑膜炎等等。

[0322] 这类方法中的任一者可以任选地包含向需要这类调节、治疗或疗法的细胞、组织、

器官、动物或患者投与有效量的至少一种包含至少一种抗GD2抗体的组合物或药物组合物。

[0323] 本发明的任何方法可以包含向需要这类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者投与有效量的包含至少一种抗GD2抗体的组合物或药物组合物。这一方法可以任选地进一步包含用于治疗这类免疫疾病或恶性疾病的共同投药或组合疗法,其中投与所述至少一种抗GD2抗体、其指定部分或变异体进一步包含在至少一种选自以下的物质之前、同时和/或之后投与:至少一种TNF拮抗剂(例如(但不限于),TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或片段、其融合蛋白或小分子TNF拮抗剂)、IL-18抗体或片段、小分子IL-18拮抗剂或IL-18受体结合蛋白、IL-1抗体(包括IL-1 α 和IL-1 β 两者)或片段、可溶性IL-1受体拮抗剂、抗风湿药(例如,甲胺喋呤、金诺芬、金硫葡糖、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶)、放射疗法、抗血管生成剂、化学治疗剂、撒利多胺(Thalidomide)肌肉松弛剂、安眠药、非类固醇消炎药(NSAID)、镇痛剂、麻醉剂(anesthetic)、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(例如,氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯类、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺酰胺、四环素、另一种抗微生物剂)、抗牛皮癣剂、皮质类固醇、同化类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养、甲状腺药剂、维生素、钙相关激素、红细胞生成素(例如,依泊汀 α)、非格司亭(例如,G-CSF、优保津)、沙格司亭(GM-CSF、鲁奇因)、免疫作用剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如,巴利昔单抗、环孢霉素、达利珠单抗)、生长激素、激素替代性药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷基化剂、抗代谢产物、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗忧郁剂、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑剂、催眠剂、拟交感神经药、刺激剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药物、 β 促效剂、吸入式类固醇、白三烯素抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、脱氧核糖核酸酶 α (百慕时)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。合适的剂量是所属领域中众所周知的。参见例如,韦尔斯等人编,药物治疗手册,第2版,阿普尔顿和兰格,康涅狄格州斯坦福德(2000);PDR药典,塔拉斯孔便携式药典2000,豪华版,塔拉斯孔出版社,加利福尼亚州罗玛琳达(2000),其中的每一者以引用的方式完全并入本文中。

[0324] 适合于本发明的组合物、组合疗法、共同投药、装置和/或方法的TNF拮抗剂(其进一步包含至少一种本发明抗体、指定部分和其变体)包括(但不限于)抗TNF抗体、其抗原结合片段及特异性地结合到TNF上的受体分子;防止和/或抑制TNF合成、TNF释放或其对靶细胞作用的化合物,例如撒利多胺(thalidomide)、替尼达普(tenidap)、磷酸二酯酶抑制剂(例如,己酮可可碱(pentoxifylline)和咯利普兰(rolipram))、A2b腺苷受体促效剂和A2b腺苷受体增强剂;防止和/或抑制TNF受体信号传导的化合物,例如有丝分裂原活化的蛋白质(MAP)激酶抑制剂;阻断和/或抑制膜TNF裂解的化合物,例如金属蛋白酶抑制剂;阻断和/或抑制TNF活性的化合物,例如血管收缩素转化酶(ACE)抑制剂(例如,卡托普利(captopril));及阻断和/或抑制TNF产生和/或合成的化合物,例如MAP激酶抑制剂。

[0325] 本发明的任何方法可以包含一种用于治疗GD2介导的病症或其特征在于GD2表达的病症的方法,所述方法包含向需要这类调节、治疗或疗法地细胞、组织、器官、动物或患者投与有效量的包含至少一种抗GD2抗体的组合物或药物组合物。这一方法可以任选地进一步包含用于治疗这类免疫疾病的共同投药或组合疗法,其中投与所述至少一种抗GD2抗体、其指定部分或变异体进一步包含在如上文所描述的至少一种药剂之前、同时和/或之后投与。

[0326] 通常,病理性病状的治疗通过投与有效量或剂量的至少一种抗GD2抗体组合物来实现,取决于组合物比活性,所述组合物平均总计达到每剂量每千克患者至少约0.01到500毫克至少一种抗GD2抗体,并且优选地每单次或多次投药每千克患者至少约0.1到100毫克抗体的范围内。或者,有效血清浓度可以包含每单次或多次投药0.1-5000 μ g/ml血清浓度。合适的剂量是开业医生已知的,并且当然将取决于特定疾病病况、所投与组合物的比活性及进行治疗的特定患者,在一些情况下,为了实现所要治疗量,可能需要提供重复投药,即,特定监测或定量剂量的重复单独投药,其中所述单独投药重复直到实现所要日剂量或作用为止。

[0327] 优选的剂量可以任选地包括0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99和/或100-500毫克/千克/次投药或其任何范围、值或分率,或实现血清浓度为每单次或多次投药0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、1.6、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500和/或5000 μ g/ml血清浓度或其任何范围、值或分率。

[0328] 或者,投与剂量可以取决于已知因子而变化,所述因子例如特定药剂的药效学特征及其投药模式和途径;接受者的年龄、健康状况和重量;症状的性质和程度、同时治疗的类别、治疗频率及所要作用。通常,活性成分的剂量可以是每千克体重约0.1到100毫克。通常,每次投药或以持续释放形式每千克0.1到50毫克并且优选地0.1到10毫克有效获得所要结果。

[0329] 作为非限制性实例,可以如下形式提供人类或动物的治疗:每天,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天中的至少一天中,或或者或另外在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51或52周中的至少一周中,或或者或另外在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20年中的至少一年中使用单次输注或重复给药来一次性或定期给药0.1到100mg/kg,例如0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/kg的至少一种本发明抗体。

[0330] 本发明进一步涉及通过以下手段投与至少一种抗GD2抗体:非经肠、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、鞘内、奥马耶内、眼内、玻璃体内、结肠内、宫颈管内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、

胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、经阴道、经直肠、经颊、舌下、鼻内或透皮。可以制备至少一种抗GD2抗体组合物以特定地以液体溶液或悬浮液形式用于非经肠(皮下、肌肉内或静脉内)或任何其它投药;特定地以半固体形式(例如(但不限于)乳霜和栓剂)用于经阴道或经直肠投药中;例如(但不限于)以片剂或胶囊形式用于经颊或舌下投药;或以例如(但不限于)散剂、经鼻液或气溶胶或某些药剂的形式鼻内投药;或以例如(不限于)凝胶、软膏、乳液、悬浮液或贴片递送系统使用化学增强剂(例如改变皮肤结构或增加透皮贴片中药物浓度的二甲亚砜)(琼金杰(Junginger)等人在“药物渗透增强”;D.S.谢(Hsieh,D.S.)编,第59-90页,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker Inc.)纽约1994中,其以引用的方式完全并入本文中),或使用使得能够将含有蛋白质和肽的调配物施用到皮肤上的氧化剂(WO 98/53847),或施加瞬态传输途径(例如电穿孔)或增加带电荷药物经由皮肤的移动性的电场(例如离子电渗疗法),或应用超声波(例如超声波导入法)(美国专利第4,309,989号和第4,767,402号)透皮投药(上文公开和专利以引用的方式完全并入本文中)。

[0331] 对于经肺投药,优选地将至少一种抗GD2抗体组合物以有效到达肺下气道或鼻窦的粒度递送。根据本发明,至少一种抗GD2抗体可以通过所属领域中已知用于通过吸入投与治疗剂的多种吸入或经鼻装置中的任一者来递送。能够将气溶胶化调配物沉积在患者鼻腔或肺泡中的这些装置包括定量剂量吸入器、雾化器(nebulizer)、干粉产生器、喷雾器(sprayer)等等。适合于引导经肺或经鼻投与抗体的其它装置也是所属领域中已知的。所有这类装置可以使用适合于投药的调配物来将抗体分配在气溶胶中。这类气溶胶可以包含溶液(水性和非水性两者)或固体颗粒。如Ventolin®定量剂量吸入器的定量剂量吸入器通常使用推进气体并且需要在吸气期间致动(参见例如,WO 94/16970、WO 98/35888)。仅列举数例,如由吸入治疗剂公司(Inhale Therapeutics)出售的TURBUHALER™(阿斯特拉公司(Astra))、ROTAHALER®(葛兰素公司(Glaxo))、DISKUS®(葛兰素公司)装置的干粉吸入器使用混合粉末的呼吸致动(美国专利第4,668,218号,阿斯特拉公司;EP 237507,阿斯特拉公司;WO 97/25086,葛兰素公司;WO 94/08552,德切公司(Dura);美国专利第5,458,135号,吸入公司(Inhale);WO 94/06498,费森斯公司(Fisons),其以引用的方式完全并入本文中)。如ULTRAVENT®雾化器(马林克罗特公司(Mallinckrodt))和ACORN II®雾化器(马克思特医疗产品公司(Marquest Medical Products))的雾化器(美国专利第5,404,871号,阿拉迪姆公司(Aradigm);WO 97/22376)由溶液产生气溶胶,而定量剂量吸入器、干粉吸入器等产生小颗粒气溶胶,以上参考文献以引用的方式完全并入本文中。可商购的吸入装置的这些具体实例打算代表适合于本发明实践的具体装置,并且不打算限制本发明的范围。优选地,包含至少一种抗GD2抗体的组合物通过干粉吸入器或喷雾器来递送。用于投与至少一种本发明抗体的吸入装置具有若干所需特征。举例来说,通过吸入装置的递送有利地是可靠、可再现性并且精确的。为了得到良好可吸入性,吸入装置可以任选地递送较小无水颗粒,例如小于约10 μ m,优选地约1-5 μ m。

[0332] 包括GD2抗体组合物蛋白质的喷雾可以通过迫使至少一种抗GD2抗体的悬浮液或溶液在压力下通过喷嘴来产生。可以选择喷嘴大小和配置、所施加的压力及液体进料速率来实现所要输出量和粒度。电喷雾可以例如通过电场与毛细管或喷嘴进料结合来产生。有

利的是,由喷雾器递送的至少一种抗GD2抗体组合物蛋白质颗粒的粒度小于约10 μm ,优选地在约1 μm 到约5 μm ,并且最优选地约2 μm 到约3 μm 的范围内。

[0333] 适合与喷雾器一起使用的至少一种抗GD2抗体组合物蛋白质的调配物通常包括以每毫升溶液或每克约0.1mg到约100mg至少一种抗GD2抗体组合物蛋白质或其中任何范围或值的浓度处于水溶液中的抗体组合物蛋白质,例如(但不限于)0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/ml或mg/gm。调配物可以包括以下试剂,例如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂及优选地,锌。调配物也可以包括用于使抗体组合物蛋白质稳定化的赋形剂或试剂,例如缓冲剂、还原剂、块状蛋白质或碳水化合物。适用于调配抗体组合物蛋白质的块状蛋白质包括白蛋白、鱼精蛋白等等。适用于调配抗体组合物蛋白质的典型碳水化合物包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等等。抗体组合物蛋白质调配物也可以包括表面活性剂,其可以在形成气溶胶中减少或防止由溶液雾化所造成的抗体组合物蛋白质的表面诱导聚集。可以采用各种常规的表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。量将一般在调配物的0.001与14重量%之间范围内。出于本发明的目的而尤其优选的表面活性剂是聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等等。所属领域中已知用于调配例如GD2抗体或指定部分或变异体的蛋白质的额外试剂也可以包括于调配物中。

[0334] 抗体组合物蛋白质可以通过雾化器,例如喷射雾化器或超声波雾化器来投与。在喷射雾化器中,通常使用压缩空气源来产生通过孔口的高速空气喷射。随着气体在喷嘴外扩张,产生低压区,所述低压区通过连接到液体储槽毛细管抽取出抗体组合物蛋白质溶液。来自毛细管的液体流随着其离开管而被剪切成不稳定长丝和液滴,从而产生气溶胶。可以采用一系列配置、流动速率及挡板类型来实现给定喷射雾化器的所要性能特征。在超声波雾化器中,使用高频电能来产生振动机械能,通常采用压电换能器(piezoelectric transducer)。直接或经由耦联流体来将这种能量传输到抗体组合物蛋白质的调配物中,从而产生包括所述抗体组合物蛋白质的气溶胶。有利地,由雾化器递送的抗体组合物蛋白质颗粒的粒度小于约10 μm ,优选地在约1 μm 到约5 μm ,并且最优选地约2 μm 到约3 μm 的范围内。

[0335] 适合与喷射或超声波雾化器一起使用的至少一种抗GD2抗体的调配物通常包括每毫升溶液约0.1mg到约100mg至少一种抗GD2抗体蛋白质的浓度。调配物可以包括以下试剂,例如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂及优选地,锌。调配物也可以包括用于使至少一种抗GD2抗体组合物蛋白质稳定化的赋形剂或试剂,例如缓冲剂、还原剂、块状蛋白质或碳水化合物。适用于调配至少一种抗GD2抗体组合物蛋白质的块状蛋白质包括白蛋白、鱼精蛋白等等。适用于调配至少一种抗GD2抗体的典型碳水化合物包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等等。至少一种抗GD2抗体调配物也可以包括表面活性剂,其可以在形成气溶胶中减少或防止由溶液雾化所造成的至少一种抗GD2抗体的表面诱导聚集。可以采用各种常规的表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。量将一般在调配物的0.001与4重量%之间范围内。出于本发明的目的而尤其优选的表面活性剂是聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等等。所属领域中已知用于调配例如抗体蛋白质的蛋白质的额外试剂也可以包括于调配物中。

[0336] 在定量剂量吸入器(MDI)中,推进剂、至少一种抗GD2抗体及任何赋形剂或其它添

加剂以包括液化压缩气体的混合物形式含于罐中。计量阀的致动以气溶胶形式释放模具混合物,所述气溶胶优选地含有处于小于约10 μm ,优选地约1 μm 到约5 μm ,并且最优选地约2 μm 到约3 μm 的大小范围内的颗粒。所要气溶胶粒度可以通过采用通过所属领域的技术人员已知的各种方法产生的抗体组合物蛋白质调配物来获得,所述方法包括喷射研磨、喷雾干燥、临界点冷凝等等。优选的定量剂量吸入器包括由3M公司或葛兰素公司制造并且采用氢氟碳化物推进剂的那些吸入器。

[0337] 与定量剂量吸入器装置一起使用的至少一种抗GD2抗体的调配物将一般包括呈非水性介质中悬浮液形式的含有至少一种抗IL-6抗体的细粉状粉末,例如借助于表面活性剂而悬浮于推进剂中。推进剂可以是用于这个目的的任何常规材料,例如氯氟碳化物、氢氯氟碳化物、氢氟碳化物或烃,包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇和1,1,1,2-四氟乙烷、HFA-134a(氢氟烷烃-134a)、HFA-227(氢氟烷烃-227)等等。优选地,推进剂是氢氟碳化物。可以选择表面活性剂以使呈推进剂中悬浮液形式的至少一种抗GD2抗体稳定化,以保护活性剂不受化学降解等等影响。合适的表面活性剂包括脱水山梨糖醇三油酸酯、大豆卵磷脂、油酸等等。在一些情况下,溶液气溶胶优选使用例如乙醇的溶剂。所属领域中已知用于调配蛋白质的额外试剂也可以包括于调配物中。

[0338] 所属领域的一般技术人员将认识到,本发明的方法可以通过经由本文未描述的装置经肺投与至少一种抗GD2抗体组合物来实现。

[0339] 用于口服投药的调配物依赖于共同投与佐剂(例如,间苯二酚和非离子型表面活性剂,例如聚氧化乙烯油醇醚和正十六基聚乙醚)来人工增加肠壁的渗透性,以及依赖于共同投与酶促抑制剂(例如,胰腺胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟磷酸酯(DFF)及抑肽酶)来抑制酶促降解。用于口服投药的固体剂型的活性成分化合物可以与至少一种添加剂混合,所述添加剂包括蔗糖、乳糖、纤维素、甘露糖醇、海藻糖、棉籽糖、麦芽糖醇、葡聚糖、淀粉、琼脂、海藻酸盐、甲壳素、壳聚糖、果胶、黄蓍胶、阿拉伯胶、明胶、胶原蛋白、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物及甘油酯。这些剂型也可以含有其它类型的添加剂,例如非活性稀释剂、润滑剂(例如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯)、防腐剂(例如山梨酸、抗坏血酸、 α -生育酚)、抗氧化剂(例如半胱氨酸)、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、甜味剂、调味剂、芳香剂等。

[0340] 可以将片剂和丸剂进一步加工成肠溶衣包覆的制剂。用于口服投药的液体制剂包括可允许用于医疗用途的乳液、糖浆、酏剂、悬浮液及溶液制剂。这些制剂可以含有通常用于所述领域中的非活性稀释剂,例如水。也已经将脂质体描述为用于胰岛素的药物递送系统(美国专利第4,239,754号)。最近,混合氨基酸的人工聚合物的微球体(类蛋白质)已经用于递送药物(美国专利第4,925,673号)。此外,在美国专利第5,879,681号和美国专利第5,871,753号中所描述的载剂化合物用于经口递送生物活性剂,是所属领域中已知的。

[0341] 对于经由粘膜表面吸收,投与至少一种抗GD2抗体的组合物和方法包括包含多种微米级颗粒、粘膜粘附性大分子、生物活性肽及水性连续相的乳液,其通过实现乳液颗粒的粘膜粘附来促进经由粘膜表面的吸收(美国专利第5,514,670号)。适合于施用本发明乳液的粘液表面可以包括经角膜、经结膜、经颊、舌下、经鼻、经阴道、经肺、经胃、经肠及经直肠的投药途径。用于经阴道或经直肠投药的调配物(例如栓剂)可以含有例如聚亚烷基二醇、凡士林、可可脂等等作为赋形剂。用于鼻内投药的调配物可以是固体并且含有例如乳糖作为赋形剂,或可以是滴鼻液的水溶液或油溶液。对于经颊投药,赋形剂包括糖、硬脂酸钙、

硬脂酸镁、预胶凝化淀粉等等(美国专利第5,849,695号)。

[0342] 对于透皮投药,将至少一种抗GD2抗体囊封于递送装置中,所述递送装置例如脂质体或聚合纳米粒子、微粒、微囊或微球体(除非另外陈述,否则共同地称为微粒)。已知多种合适的装置,包括由合成聚合物(例如多羟基酸,例如聚乳酸、聚乙醇酸和其共聚物,聚原酸酯,聚酸酐及聚磷腈)和天然聚合物(例如胶原蛋白、聚氨基酸、白蛋白和其它蛋白质、海藻酸盐及其它多糖)及其组合制成的微粒(美国专利第5,814,599号)。

[0343] 有时可能需要在长时间段内向受试者递送本发明的化合物,例如单一投药持续一周到一年或一年以上的时段。可以采用各种缓慢释放、储库型或植入物剂型。举例来说,剂型可以含有在体液中溶解程度较低的化合物的药学上可接受无毒盐,例如(a)与多元酸的酸加成盐,所述多元酸例如磷酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、丹宁酸、双羟萘酸、褐藻酸、多聚谷氨酸、萘单磺酸或萘二磺酸、聚半乳糖醛酸等等;(b)与多价金属阳离子或与有机阳离子的盐,所述多价金属阳离子例如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等等,所述有机阳离子由例如N,N'-二苯甲基-乙二胺或乙二胺形成;或(c)(a)和(b)的组合,例如单宁酸锌盐。另外,本发明的化合物或优选地,例如刚刚所描述的那些盐的相对不溶性盐可以用例如芝麻油来调配成适合于注射的凝胶(例如单硬脂酸铝凝胶)。尤其优选的盐是锌盐、单宁酸锌盐、双羟萘酸盐等等。另一种类型的注射用缓慢释放储库型调配物将含有分散以囊封于缓慢降解的无毒非抗原性聚合物(例如聚乳酸/聚乙醇酸聚合物)中的化合物或盐,例如美国专利第3,773,919号中所描述。化合物或优选地,例如上文所描述的那些盐的相对不溶性盐也可以调配成胆固醇基质硅橡胶丸粒,尤其用于动物中。额外缓慢释放、储库型或植入物调配物(例如气体或液体脂质体)是文献(美国专利第5,770,222号和“持续和控制释放药物递送系统”,J.R.罗宾逊(Robinson)编,马塞尔·德克公司,纽约州,1978)中已知的。

[0344] 在整个本申请中引用的所有所引用的参考文献(包括文献参考、授予的专利、公开的专利申请及共同待决专利申请)的内容由此以引用的方式明确地并入。

[0345] 本发明的其它特征在示例性实施例的以下描述过程中将变得显而易见,所述示例性实施例为了说明本发明而给出并且并不打算对本发明进行限制。

[0346] 实例

[0347] 将通过以下非限制性实例进一步说明本发明。阐述这些实例以帮助理解本发明,但不打算并且不应解释为以任何方式限制其范围。实例不包括所属领域的一般技术人员将众所周知的常规方法(分子克隆技术等)的详细描述。除非另外指示,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是以摄氏度计并且压力是处于大气压或接近大气压。

[0348] 鼠类3F8和Fab片段制剂的抗体纯化

[0349] 如先前描述,由浓缩的融合瘤上清液纯化鼠类抗GD2MoAb 3F8(IgG3)(张等人,1985,癌症研究45,2642-2649)。使用标准Fab制备试剂盒(皮尔斯生物技术公司(Pierce Biotechnology),伊利诺伊州罗克福德(Rockford,IL))通过番木瓜酶消化来产生m3F8的Fab片段。

[0350] 结晶和数据收集

[0351] 在20mM HEPES pH 6.5中将经纯化的3F8Fab片段浓缩到12mg/ml,并且针对含有汉普顿指数试剂D7并含有0.1M BIS-TRIS,pH 6.5,25%PEG 3350的储槽(汉普顿研究公司(Hampton Research),加利福尼亚州亚里索维耶荷(Aliso Viejo,CA)在16℃下通过蒸气扩

散在悬滴中结晶。液滴通过混合1 μ l蛋白质溶液和1 μ l储槽溶液来形成。晶体受到含有25%甘油,0.1M BIS-TRIS,pH 6.5,25%PEG 3350的低温保护剂保护。在阿尔贡高级光子源(Argonne Advanced Photon Source)束线24IDC下收集数据。晶体属于空间群C2并且以1.65Å分辨率衍射。

[0352] 结构测定和优化

[0353] 通过使用Phaser (CCP4程序组) 用检索模型PDB项目2AJU进行分子置换来解出Fab结构(麦考伊(Mccoy)等人,2007,应用结晶学杂志(j.Appl.Crystallogr) 40,658-674)。使用Refmac5优化最优分子置换模型(穆什多夫(Murshudov)等人,1997,结晶学报(Acta Crystallogr) D 53,240-255),用O进行人工拟合(S.贝雷(Bailey,S.),1994,结晶学报D 50,760-763),用Arp-Warp添加溶剂(拉姆辛(Lamzin)和维尔东(Wildon),1993,结晶学报D49,129-147)。最终模型含有两个m3F8Fab多肽链和585个溶剂分子。最终模型寄存在蛋白质数据库中(访问码3VFG)。

[0354] 分子对接模拟和计算机模拟突变诱发

[0355] 使用薛定谔(Schrodinger)程序组2009平台(薛定谔公司(Schrödinger),纽约州纽约)进行GLIDE对接。OPLS力场用于使蛋白质和配体参数化。顶部配体姿态在2.0Å的均方根偏差内进行丛集,并且由GlideScore评分。使用发现工作室(Discovery Studio)3.0(阿克塞勒瑞斯公司(Accelrys),加利福尼亚州圣地亚哥)进行CDOCKER对接和相互相用能量测量。CHARMm力场用于使蛋白质和配体参数化。顶部配体姿态在2.0Å的均方根偏差内进行丛集,并且由CDOCKER相互相用能量(CDOCKER Interaction Energy)评分。对于所有涉及GD2的对接研究,神经酰胺尾部被甲基置换(数据未展示)。在刚性体条件下进行对接模拟,其中配体构象以刚性侧链对接到蛋白质/抗体上。在发现工作室3.0(阿克塞勒瑞斯公司,加利福尼亚州圣地亚哥)上使用智慧型最小化(Smart Minimizer)算法用CHARMm使最终对接复合物的能量减到最小。通过计算对接抗体结合的自由能来进行计算机模拟突变诱发:抗原模型使用CHARMm力场和发现工作室3.0(阿克塞勒瑞斯公司,加利福尼亚州圣地亚哥)上的计算突变能量(Calculate Mutation Energy)方案。

[0356] 图像呈现

[0357] 用Pymol(薛定谔公司,纽约州纽约)呈现分子结构图像的对接研究,或用发现工作室3.0(阿克塞勒瑞斯公司,加利福尼亚州圣地亚哥)呈现其静电位表面。

[0358] 暴露的疏水性表面区域的模型化

[0359] 在发现工作室3.0(阿克塞勒瑞斯公司,加利福尼亚州圣地亚哥)上对MoAb 3F8和MoAb 3F8H:Gly54Ile的抗原结合位点进行模型化。使用车纳姆塞缇(Chennamsetty)等人开发的聚集倾向(Spatial Aggregation Propensity)算法来呈现暴露的疏水性表面(车纳姆塞缇等人,2009,美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA) 106,11937-99842),其中对蛋白质表面上有效动态暴露疏水性的斑点进行定量并且染成红色。

[0360] 细胞培养

[0361] 由罗伯特·西格(Robert Seeger)博士(洛杉矶儿童医院)提供人类成神经细胞瘤细胞系LAN-1。黑色素瘤细胞系M14和OCM-1来自大卫·考布里尼克(David Cobrinik)博士(洛杉矶儿童医院)。所有细胞系都在补充有10%胎牛血清(海克隆公司(Hyclone),犹他州

南洛根 (South Logan, UT))、2mM谷氨酰胺、100U/ml青霉素及100μg/ml链霉素的F10RPMI 1640培养基中在37℃下在5%CO₂培育箱中生长。

[0362] hu3F8和变异体的构建

[0363] 如先前描述对CHO细胞 (蓝鹭生物技术公司 (Blue Heron Biotechnology) 或金斯瑞公司 (Genscript)) 合成人类化3F8基因 (张等人, 2012, 肿瘤免疫学 (Oncoimmunology) 1, 477-486)。使用bluescript载体 (加利福尼亚州尤里卡 (Eureka, CA)), 将hu3F8的这些重链和轻链基因转染到DG44细胞中并且用G418 (英杰公司, 加利福尼亚州) 选择。

[0364] 抗体纯化

[0365] 在Optichoc无血清培养基 (英杰公司) 和如先前描述采集的成熟上清液中培养Hu3F8和嵌合3F8生产系 (张等人, 2012, 同前文献)。用具有0.15M NaCl, pH 8.2的25mM柠檬酸钠缓冲剂对蛋白A亲和柱进行预平衡。用0.1M柠檬酸/柠檬酸钠缓冲剂, pH 3.9洗脱结合的hu3F8, 并且在25mM柠檬酸钠, pH 8.5中碱化 (1:10v/v比率)。使其穿过Sartobind-Q膜并且在25mM柠檬酸钠, 0.15M NaCl, pH 8.2中浓缩到5-10mg/ml。

[0366] 通过ELISA和流动式细胞测量术的GD2结合定量

[0367] 如先前描述进行ELISA (张等人, 2012, 同前文献)。用GD2以每孔20ng涂布微量滴定板。向每一个培养板中添加每孔150μl的BSA于PBS中的0.5%溶液 (稀释剂), 在环境温度下持续至少30分钟以阻断过量结合位点。向每一个孔中添加100μl标准品和样品 (稀释2倍), 并且在37℃下培育2.5小时。在用PBS洗涤培养板之后, 向每一个孔中添加100μL的以1:3500稀释于稀释剂中的山羊抗人类-IgG (H+L) (杰克逊研究实验室 (Jackson Research Laboratory)), 并且在4℃下培育1小时。在底物过氧化氢的情况下, 用色原体OPD (chromogen OPD) (西格马公司 (Sigma)) 使ELISA颜色反应在环境温度下在黑暗中显色30分钟。用5N H₂SO₄停止反应, 并且用ELISA板读取器MRX (丹尼克斯公司 (Dynerx)) 在490nm下读取光密度 (OD)。

[0368] 为了测量MoAbs与含抗原细胞结合的保持性, 将抗体与黑色素瘤M14细胞一起培育并且连续洗去。最初以每圆底管1×10⁶个细胞收集细胞, 离心并用PBS冲洗, 并且再悬浮于每分析管100μL PBS中。用MoAbs hu3F8或hu3F8-Ile (1微克MoAb/1×10⁶个细胞) 在4℃下培育细胞30分钟。接着使用具有3mM EDTA的5ml PBS对细胞进行连续洗涤回合, 接着粒化, 弃去上清液并且再悬浮。对于每一次连续洗涤, 用R-藻红素 (R-PE) 偶联的抗人IgG (Fc γ 片段特异性二级抗体) (杰克逊免疫研究) 在4℃下在黑暗中培育样品30分钟, 洗涤, 并且接着使用BD FACS Calibur仪器通过流动式细胞测量术来分析。一式三份地制备样品。

[0369] 通过51Cr释放的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)

[0370] 如先前描述, 使用经人类CD16Fc受体稳定转染的NK-92MI细胞进行ADCC分析 (张等人, 2012, 同前文献)。用EDTA于无Ca²⁺Mg²⁺的PBS中的2mM溶液分离LAN1-1、M14、OCM-1、U2OS、CRL1427、NCI-H345靶细胞并且在F10中洗涤, 随后用51Cr放射性标记以用于ADCC分析。

[0371] 统计学分析

[0372] 使用格拉夫帕德棱镜 (GraphPad Prism) 5.0进行曲线拟合和统计学分析。斯图登氏T检验用于计算显著性。

[0373] 实例1

[0374] 3F8:GD2模型的计算机模拟筛选突变诱发

[0375] 计算机模拟筛选突变诱发通过采用在对接3F8:GD2模型中直接与GD2相互作用的12个残基(L:Tyr37、L:Lys55、L:Val99、L:Leu102、H:Gly40、H:Tyr31、H:Asn32、H:Asn34、H:Ser56、H:Ser58、H:Gly97和H:Met98),并且分析单点突变在各个位点的效果的所有可能性来进行。使用CHARMm力场使模型能量降到最低,随后分析相互作用能的变化(静电、凡得瓦尔力(van der Waals)、熵)。最主要突变展示于表1中。发现只有4个突变使结合复合物的相互作用能增加了超过1kcal/mol(表1)。预测只有一个点突变具有实质上更高相互作用能(H:Gly54Ile),加权突变能量是-8kcal/mol。大部分此相互作用能增加是由于与抗原接触的凡得瓦尔力增加。还计算涉及12个相互作用残基的双点和三点突变的效果,但未发现额外突变组合增加相互作用能。表1阐述与对接GD2抗原直接相互作用的CDR残基的计算机模拟筛选突变诱发的结果。能量以kcal/mol单位展示。

[0376] 表1

	残基	突变	凡得瓦尔力项	静电项	熵项	加权突变能量	突变效果
[0377]	HC: GLY54	ILE	-18.84	0.21	0.19	-8.23	稳定
	HC: GLY103	LEU	-5.39	0.23	-0.07	-2.38	稳定
	HC: GLY103	TRP	-4.44	0.23	-0.01	-1.9	稳定
	HC: GLY55	THR	-2.96	0.07	-0.1	-1.38	稳定

[0378] 3F8与3F8-Ile(H:Gly54Ile)的抗原结合位点的分析

[0379] 将来源于计算机模拟筛选突变诱发仿真(H:Gly54Ile,称为3F8-Ile)的单点突变建模成3F8的抗原结合位点(数据未展示)。由于H:Gly54Ile突变的疏水性,使用空间聚集倾向算法(材料与方法),其提供疏水溶剂暴露的补丁的测量)进行抗原结合位点的疏水性分析。MoAb 3F8在以H:Ile56为中心的GD2结合位点具有疏水补丁(数据未展示)。H:Ile56伸出结合腔并且可以帮助抗体与包围GD2头组的膜表面相互作用。H:Gly54取代Ile增加抗原结合位点的暴露的疏水表面积并且还增加对接模型中与GD2接触的凡得瓦尔力(数据未展示)。

[0380] hu3F8和hu3F8-Ile H:Gly54Ile的结合和肿瘤细胞杀死特性

[0381] 为了测试H:Gly54Ile突变是否增加与肿瘤细胞的GD2和ADCC的亲合力,使突变工程改造成最近描述的人类化3F8(hu3F8)(张(Cheung)等人,2012,见上文)。Hu3F8的免疫原性低于鼠类3F8,保留此研究中发现的鼠类3F8的结构特征,并且当前处于I期临床试验。Hu3F8和hu3F8H:Gly54Ile(hu3F8-Ile)被构筑、表现、纯化并且测试GD2结合和ADCC。GD2的ELISA分析展示hu3F8-Ile相对于hu3F8具有可忽略的结合效率增加(GD2结合的EC50:hu3F8 48±13ng/mL,hu3F8-Ile 38±11ng/mL)(数据未展示)。为了测试这些抗体与GD2在其原生环境中在肿瘤细胞表面上结合的亲合力,进行洗涤实验,其中用PBS-EDTA使结合于GD2(+)黑素瘤细胞株M14的表面的抗体经受连续洗涤循环(参见材料与方法(Material and Methods))。Hu3F8-Ile展示抵抗洗掉肿瘤细胞的较大能力(hu3F8-Ile的t1/2=3次洗涤,hu3F8的t1/2=2次洗涤)(数据未展示)。未发现其它突变增强抗原结合。

[0382] 随后分析在经人类CD16Fc受体转染的自然杀手细胞株NK-92MI存在下Hu3F8和hu3F8-Ile在介导神经母细胞瘤LAN-1的ADCC中的效率(数据未展示)。Hu3F8-Ile一贯地展示与hu3F8相比细胞毒性效力增加约9倍(IC50细胞杀死:hu3F8 1.35±0.15ng/mL,hu3F8-Ile 0.15±0.01ng/mL)。还观测到针对黑素瘤M14和OCM-1细胞的ADCC效力增加6-7倍(M14

细胞的IC50细胞杀死:hu3F8 25 ± 2.2 ng/mL, hu3F8-I1e 3.7 ± 1.1 ng/mL; OCM-1细胞的IC50细胞杀死:hu3F8 8.5 ± 0.8 ng/mL, hu3F8-I1e 1.5 ± 0.1 ng/mL)。hu3F8-I1e相对于hu3F8的这些ADCC效力增加是高度显著的 ($p < 0.001$)。

[0383] 为了进一步使人类化3F8的潜在临床功效最佳,我们在3F8:GD2对接模型中对关键相互作用残基采用高通量计算机模拟筛选突变诱发。我们鉴别出单点突变(H:Gly54I1e),其展示结合亲和力在GD2-ELISA分析中适度增加并且hu3F8-I1e保持与GD2结合于细胞表面上的能力增加。更引人注目地,我们展示hu3F8在GD2阳性肿瘤细胞株的ADCC方面具有约6-9倍增加,肿瘤细胞株包括神经母细胞瘤、黑素瘤、骨肉瘤和小细胞肺癌。H:Gly54I1e突变的性质增加抗原结合位点处暴露的疏水表面积。由于GD2通过神经酰胺部分嵌入膜表面,在抗原结合位点添加I1e可以通过增强MoAb 3F8保持结合于膜表面的能力来强化ADCC,如在细胞洗涤实验中观测到。

[0384] 碳水化合物抗原在数种生物途径中起重要作用。抗体发展为目标碳水化合物对于研究细菌、肿瘤、血型、细胞间黏附相互作用;病毒、激素和毒素受体;和重组蛋白的糖基化是重要的(亨伯格-莫利纳罗(Heimburg-Molinaro)和里滕豪斯-奥尔森(Rittenhouse-Olson), 2009, 分子生物学方法(Methods Mol. Biol.) 534, 341-357)。因为对糖的免疫反应是T细胞独立的,针对碳水化合物抗原产生的抗体通常产生为低亲和力IgM抗体(亨伯格-莫利纳罗和里滕豪斯-奥尔森, 2009, 见上文)。为了产生较高亲和力抗体用于如在癌症免疫疗法情况下的治疗应用,通常需要亲和力成熟技术用于增强治疗效果。抗体亲和力成熟的传统方法,诸如酵母/噬菌体/核糖体显示依赖于易错PCR,其可能在抗体CDR中的各个氨基酸处不提供全范围多样性。在此研究中,我们展示可以采用计算机模拟筛选突变诱发,即使高分辨率共复合结构不可用。另外,我们展现亲和力适度增加可以增强MoAb 3F8治疗靶向肿瘤抗原GD2的功能特性。尽管预期ADCC增强转变为改进的功效,此将必须在患者的未来临床试验中经论证。使用这些计算机模拟技术可以对研发用于诊断或治疗癌症以及其它人类病症(其中碳水化合物抗原决定基是可药化标靶)的下一代MoAb的传统实验方法提供有价值的补充。

[0385] 设计新构架hu3F8ver5

[0386] 基于计算方法使hu3F8V1构架结构(WO 2011/160119, 张等人, 2012, 见上文)的降低免疫原性优化。首先, hu3F8V1重链和轻链序列分别与人类生殖系序列humIGHV199和humIGKV025进行比较(EMBL数据库, www.vbase2.org)。基于鼠类3F8的晶体结构(蛋白质数据库上升3VFG, <http://www.pdb.org>)对各个潜在人类化突变执行使用CHARMM(哈佛分子力学化学(Chemistry at Harvard Molecular mechanics))力场(布鲁克斯(Brooks)等人, 2009, 比较化学期刊(J. Comp. Chem.) 30, 1545-1615)的分子仿真以判定突变是否是结构上容许的。另外,使用NN比对方法基于免疫抗原决定基数据库(<http://www.iedb.org/>)鉴别hu3F8V1中的MHC II类T细胞抗原决定基,并且基于结构上容许的突变使其降到最低。基于对接到3F8晶体结构的GD2的计算模型(使用CDOCKER和Discovery Studio软件构建;加利福尼亚州圣地亚哥的艾克利公司(Accelrys, San Diego, CA)),未建模成与GD2抗原直接相互作用的CDR残基被认为用于人类化突变。

[0387] 从酵母库选择hu3F8突变体

[0388] 产生并且分离较高亲和力突变体的方法如描述于参考文献(赵(Zhao)等人, 分子

癌症疗法 (Mol. Cancer Ther.) 2011, 10, 1677-1685) 中。FACS选择之前, 酵母细胞 (1×10^9) 在室温下在PBSA缓冲剂 (0.1% BSA/PBS) 中用 $10 \mu\text{g}$ GD2共轭磁珠培育1h, 随后用磁力架分离。分离的珠粒用PBSA缓冲剂洗涤3次, 放入10ml 合成右旋糖酐蛋白氨基酸 (synthetic dextrose casmino acid; SDCAA) 培养基中并且在 30°C 振荡器中以250rpm生长过夜。从磁珠回收的酵母细胞在 20°C 下以250rpm振荡在合成半乳糖棉子糖酐蛋白氨基酸 (synthetic galactose raffinose casamino acid; SG/RCAA) 培养基中诱导18h。大约 1×10^8 个酵母细胞集结, 用PBSA缓冲剂洗涤两次, 并且再悬浮于含生物素标记的GD2和小鼠抗c-myc抗体 (英杰 (Invitrogen)) 的1:100稀释液的1ml PBSA缓冲剂中。培育后, 酵母细胞洗涤3次并且随后再悬浮于1ml PBSA缓冲剂中。将R-藻红素共轭抗生蛋白链菌素 (英杰) 和阿莱克萨荧光剂488共轭山羊抗小鼠IgG抗体 (英杰) 的1:100稀释液添加到酵母细胞, 在 4°C 下培育30min, 并且同样用PBSA缓冲剂洗涤3次, 并且随后再悬浮于PBSA缓冲剂中以供分选。确定分选闸控以便只选择具有较高抗原结合信号的群体。所收集的细胞在SDCAA培养基中在 30°C 下生长过夜, 并且在SG/RCAA中诱导以供下一轮分选。对于接下来的三个选择, 大约 $1-2 \times 10^7$ 个酵母细胞用于分别用生物素标记的IGF-1染色。酵母质体根据制造商的说明书使用天漠牌 (Zymoprep) 酵母质体小规模纯化II套组 (天漠研究 (Zymo Research)) 分离并且用于库构筑的模板。制备来自第4轮的质体, 测序并且特征化。

[0389] 表现hu3F8scFv和IgG1

[0390] 如先前所描述 (赵等人, 2011, 见上文) 来表现并且纯化ScFv。HB2151细胞经含有scFv序列的pComb3x质体转型。将单一新鲜群落接种到含有 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 安比西林 (ampicillin) 和0.2% 葡萄糖的2YT培养基中。通过异丙基-L-硫基-h-D-哌喃半乳糖苷诱导培养 (最终浓度0.5mM)。在 30°C 下过夜生长之后, 细菌在 $5,000 \times g$ 下离心15min。通过在 30°C 下培育30分钟从周质释放可溶性scFv。回收澄清上清液以供在Ni-NTA管柱上纯化。重组scFvs具有FLAG和His标签。IgG如先前所描述 (张等人, 2012, 见上文) 表现于CHO悬浮细胞中。使用HEK293细胞 (英杰自由式表现系统) 暂时表现Hu3F8V5IgG。在蛋白G管柱上纯化IgG。

[0391] ELISA

[0392] 对于与其它神经节苷脂的交叉反应性。GD2、GD1a、GD1b和GD3以每孔20ng/90% 乙醇涂布在聚乙烯基微量滴定盘上。空气干燥后, 在室温下用0.5% BSA/PBS以每孔150 μl 将孔堵塞1h。抗体以1mg/ml (每孔100 μl) 一式三份地添加到0.5% BSA中。在室温下培育1h并且用PBS洗涤之后, 对于IgG抗体添加以1:5000稀释的HRP-山羊抗人类IgG或对于scFv抗体添加以1:5000稀释的HRP-山羊抗Flag IgG。在 4°C 下培育1h并且进一步洗涤之后, 进行显色反应并且在490nm下使用ELISA盘式读取器读取OD。

[0393] 通过表面等离子共振进行亲和力测定

[0394] 使用Biacore T100测量亲和力。简单来说, 神经节苷脂经由疏水相互作用直接固定到CM5传感器芯片上。用GM1固定参考表面。用1:1比率的GD2和GM1或单独GD1b固定活性表面。GD2与GM1 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 或GD1b的稀释混合物以15 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流动速率注射 (300 μl) 历时20min。随后用10mM NaOH充分洗涤 (通常为以5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流动速率的20 μl 洗涤五次) 直到获得稳定基线。

[0395] 补体介导的细胞毒性 (CMC) 分析

[0396] 测试在人类血清或人类效应细胞不存在下抗体对肿瘤细胞生长和存活率的直接

影响。用2mM EDTA或胰蛋白酶-EDTA使肿瘤靶解离,洗涤并且与人类血清接种到96孔平底培养盘上。在5%CO₂培育箱中在37℃下培育24h之后,向各个孔添加F10中浓度增加的抗体。对照孔接收单独的F10。在37℃下在5%CO₂中培育4h之后,将WST-8试剂(开曼化工有限公司(Cayman Chemical Co.))添加到各个孔并且在黑暗中在CO₂培育箱中在37℃下培育2-6h。使用ELISA盘式读取器在450nm和690nm下读取OD。使用锥虫蓝(西格玛(Sigma))或贝克曼库尔特计数器(贝克曼库尔特(Beckman Coulter))使用直接细胞计数验证WST-8分析。

[0397] 通过51铬释放的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0398] 用2mM EDTA在不含Ca²⁺+Mg²⁺的PBS中使靶细胞分开,并且在F10中洗涤。使用量子简单细胞抗小鼠IgG珠粒根据制造商的说明书(邦斯实验室有限公司(Bangs Laboratories, Inc.))估计抗原密度。对于细胞毒性分析,用最终体积是250μl的10⁶个靶细胞培育100μCi的51Cr,并且在37℃下培育1h,其中以15min间隔使集结粒平缓再悬浮。细胞随后洗涤并且再悬浮于250μl F10中,并且在37℃下培育30min。洗涤后,计数细胞并且用锥虫蓝测定存活力,并且快速接种到96孔U型底培养盘上。将来自正常志愿者的外周血液收集到肝素化管中。使血液与3%聚葡萄糖/PBS混合并且在室温下保持20min以使红色细胞沉降。随后以菲科尔法分离白色细胞并且分成外周血液单核细胞(PBMC)以供PBMC-ADCC。细胞在F10中洗涤,计数并且进行存活力测定。在10U/ml IL-2存在下进行PBMC-ADCC。抗体在F10中从1μg/ml稀释到10倍稀释液。培养盘在37℃、5%CO₂培育箱中培育4h。收集ADCC上清液中释放的51Cr以供γ计数。使用10%十二烷基硫酸钠(SDS)测定总释放,并且只有在无效应子的情况下用F10测定背景自发释放。一般使用50:1的效应子:靶(E:T)比率。类似地,使用经人类CD16或人类CD32Fc受体稳定转染的NK-92MI细胞进行ADCC分析。不同于PBMC,在所述分析中不需要细胞因子。E:T比率保持在20:1。

[0399] 免疫组织化学(IHC)

[0400] 在机构审查委员会(institutional review board)批准下在纪念斯隆-凯特琳癌症中心(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)获得肿瘤和正常组织。快速冷冻组织的五微米到七微米部分在-20℃下在丙酮中固定30min。通过各者依次用抗生物素蛋白和生物素(载体抗生物素蛋白-生物素阻断套组;英杰)治疗20min来阻断内源性生物素结合活性。部分在室温下用3μg/ml scFv-Flag培育1h。洗涤后,部分在室温下用HRP抗Flag抗体培育30min并且随后与3,3'-二氨基联苯胺一起培育5min。还进行H&E染色。

[0401] 实例2

[0402] 构筑hu3F8V5

[0403] 为了降低潜在免疫原性,在hu3F8V1中产生九点突变以制成hu3F8V5(参见表2)。发现全部九个突变在结构上都是结合到其抗原GD2的3F8计算模型容许的。所有突变都涉及将人类化时留在3F8上的鼠类残基变成人类生殖系序列。五个突变(LC:K24R、LC:S56T、LC:V58I、HC:I20L、HC:M92V)涉及构架残基。如通过计算机模拟方法所鉴别,我们在去除较强T细胞抗原决定基的CDR H2中另外发现4个突变(HC:A62S、HC:F63V、HC:M64K、HC:S56G)。虽然通过移植方法使抗体人类化以便改变CDR残基对于熟习此项技术者来说是不常见的,我们的结合于GD2的3F8计算模型允许我们工程改造这些额外人类化突变。

[0404] hu3F8的亲合力成熟

[0405] 为了基于酵母显示法进行亲合力成熟,我们合成新颖生物素标记的GD2衍生物以

用于选择。我们先前已不成功使用标准生物素标记的GD2抗原。使用合成GD2-叠氮基衍生物(图2),我们将其与PEG间隔基耦合(参见以下实例7)。使用此新颖GD2类似物,从酵母表面上显示的hu3F8ScFv随机库中选出2个突变,其具有增强的与合成GD2类似物的结合。第一个突变是位于CDR L1上的LC:D32H,并且第二个突变是作为构架残基的LC:E1K。

[0406] 在以重组方式表现的hu3F8V1ScFv和hu3F8V5ScFv构筑体中测试两个突变(LC:E1K和LC:D32H),并且使用Biacore分析测量对于天然GD2的结合亲和力。基于结构建模,以VL-VH形式产生所有hu3F8scFv,因为其允许不太受限制的进入抗原结合袋。这与以VH-VL形式构筑的最常规的ScFv相对。此外,以完整IgG1形式测试若干变体。表2阐述hu3F8V5的设计。

[0407] 表2

[0408]	hu3F8V1 到 hu3F8V5 中作出的突变	位置	基本原理
	LC: K24R	构架	人类化突变
	LC: S56T	构架	人类化突变
	LC: V58I	构架	人类化突变、使结构稳定
	HC: I20L	构架	人类化突变
	HC: A62S	CDR H2	人类化突变、减少 T 细胞抗原决定基
	HC: F63V	CDR H2	人类化突变、减少 T 细胞抗原决定基
	HC: M64K	CDR H2	人类化突变、减少 T 细胞抗原决定基
	HC: S65G	CDR H2	人类化突变、减少 T 细胞抗原决定基
	HC: M92V	构架	人类化突变、使结构稳定

[0409] 实例3

[0410] 结合亲和力

[0411] 以ScFv形式测试的hu3F8变体的结合亲和力(参见表3)展示多个有趣的发现。首先,只设计为免疫原性低于hu3F8V1的hu3F8V5与hu3F8V1相比具有与GD2稍微较强的结合亲和力。两个亲和力成熟突变(LC:E1K及LC:D32H)在分别表现时展示与GD2结合增强。在以hu3F8V1或hu3F8V5scFv形式一起表现时,观测到结合亲和力更显著增强(低于 K_D 7-12倍)。在双突变(LC:E1K+LC:D32H)与HC:G54I组合时(基于计算机模拟建模,参考原始专利),结合亲和力不与单独双突变一样强,但亲和力仍高于hu3F8V1。已展示hu3F8G54I在GD2阳性肿瘤细胞株的ADCC方面具有7-10倍增加。

[0412] 完整IgG1形式的hu3F8变体的结合亲和力展示于表4中。类似于ScFv数据,在hu3F8V1和hu3F8V5形式下,双突变LC:E1K+LC:D32H展示比单突变LC:D32H更大的亲和力。在hu3F8V1和hu3F8V5形式下,LC:E1K+LC:D32H双突变对比亲本的总体增强是8-10倍。LC:E1K对结合增强的贡献是出人意料的,因为其不是典型CDR残基。无法进行hu3F8V1与hu3F8V5IgG构筑体的结合亲和力的直接比较,因为hu3F8V5构筑体暂时表现于HEK 293细胞中并且可能已改变可以影响结合的结构特性。表3阐述如通过Biacore测量的hu3F8scFv与GD2的结合亲和力。表4阐述如通过Biacore测量的hu3F8IgG与GD2的结合亲和力。

[0413] 表3

	抗体	K _D (M)	nM
[0414]	hu3F8V1 scFv	3.05E-08	31
	hu3F8V5 scFv	2.37E-08	24
	hu3F8V1 E1K scFv	1.15E-08	12
	hu3F8V1 D32H scFv	7.84E-09	8
	hu3F8V5 D32H scFv	5.52E-09	6
	hu3F8V1 E1K D32H scFv	3.71E-09	4
	hu3F8V5 E1K D32H scFv	1.96E-09	2
	hu3F8V1 E1K D32H G54I scFv	6.89E-09	7
	hu3F8V1 ScFv - huOKT3 ScFv 双特异性	8.86E-09	9
[0415]	表4		

	抗体	K _D (M)	nM
[0416]	hu3F8V1 IgG	2.983E-9	3
	hu3F8V1 D32H IgG	4.965E-10	0.5
	hu3F8V1 E1K D32H IgG	2.696E-10	0.3
	hu3F8V5 IgG*	1.32E-08	13
	hu3F8V5 D32H IgG*	2.36E-09	2.4
	hu3F8V5 E1K D32H IgG*	8.57E-10	1.6

[0417] *暂时表现于HEK293细胞中,与在稳定表现于CHO细胞中时相比可以显示不同糖基化

[0418] 实例4

[0419] 与其它神经节苷脂的交叉反应性

[0420] 在交叉反应性研究(表5,并且数据未展示)中,所有hu3F8变体具有与GD1b(神经节苷脂,还存在于神经母细胞瘤肿瘤细胞上)的类似交叉反应性,并且对所测试的其它神经节苷脂(GD1a、GD1b、GD3)无显著交叉反应性,展现hu3F8变体保持与亲本hu3F8V1相同的特异性。表5阐述如通过Biacore测量的hu3F8IgG与GD1b的结合亲和力。

[0421] 表5

	抗体	K _D (M)	nM
[0422]	hu3F8 V1 IgG	9.30E-08	93
	hu3F8 V1 D32H IgG	8.74E-08	87
	hu3F8 V1 E1K D32H IgG	8.36E-08	84

[0423] 实例5

[0424] 在ADCC和CMC中的抗体效力

[0425] 使用外周血液单核细胞(peripheral blood mononuclear cell;PBMC)或NK92-CD16(CD16阳性培养NK细胞)作为效应子并且使用神经母细胞瘤LAN-1细胞作为标靶在ADCC分析中比较抗GD2IgG1抗体(数据未展示)。这些抗体的ADCC效力被计算为(3F8的EC50)/(MoAb的EC50)比率。相对于亲本hu3F8V1IgG,hu3F8V1LC:D32H和hu 3F8V1LC:E1K+LC:D32H在PBMC-ADCC中是约20倍更强,并且在NK92-CD16-ADCC中是7倍更强(参见表6)。表6阐述使用hu3F8V1IgG的ADCC分析的概述。

[0426] 表6

	抗体	外周血液单核细胞 (PBMC)		抗体	NK92-CD16	
		EC ₅₀ (μg/ml)	相对效力*		EC ₅₀ (μg/ml)	相对效力*
[0427]	hu3F8 V1	0.00021	1.00	hu3F8 V1	0.002	1.00
	hu3F8 V1 D32H	0.00003	7.00	hu3F8 V1 D32H	0.0001	20.00
	hu3F8 V1 E1K	0.00003	7.00	hu3F8 V1 E1K	0.0001	20.00
	D32H			D32H		

[0428] *hu3F8V1用作参考物

[0429] 使用人类血清作为效应子并且使用LAN-1细胞作为标靶来测试相同抗体诱导CMC的能力。(表7,并且数据未展示)。hu3F8V1LC:D32H展示CMC较少增强,而hu3F8V1LC:E1K+LC:D32H展示与亲本hu3F8V1相对相同量的CMC。相对较低补体活化是合乎需要的,因为补体活化被认为介导与抗GD2免疫疗法相关的疼痛副作用。表7阐述用hu3F8V1IgG的CMC分析的概述。

[0430] 表7

	抗体	EC ₅₀ (μg/ml)	相对效力*
[0431]	hu3F8 V1	0.03	1.00
	hu3F8 V1 D32H	0.011	2.73
	hu3F8 V1 E1K D32H	0.029	1.03

[0432] *hu3F8V1用作参考物

[0433] 实例6

[0434] 正常组织和肿瘤上的免疫组织化学

[0435] 通过人类神经母细胞瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏肉瘤 (Ewing's sarcoma)、促结缔组织增生小圆细胞肿瘤和正常人类组织上的IHC来测试hu3F8V1、hu3F8V1LC:D32H和hu3F8LC:E1K+LC:D32H的ScFv型式的组织特异性(参见图1)。还测试十二个正常组织(参见表8)。额叶、脑桥、小脑和脊髓正如预期的都阳性染色有亲和力成熟纯系(hu3F8V1LC:D32H和hu3F8LC:E1K+LC:D32H)而不是亲本纯系(hu3F8V1),因为已知GD2存在于神经元组织上。在查看不同肿瘤样本的IHC中,亲和力成熟纯系(hu3F8V1LC:D32H和hu3F8LC:E1K+LC:D32H)展示相对于亲本抗体(hu3F8V1)对GD2阳性肿瘤的较高染色水准。表8阐述用hu3F8V1scFv染色的组织强度。

[0436] 表8

	组织	V1	V1 D32H	V1 E1K D32H
	阶段 4 NB	4	4	4
	回肠	0	0	0
	骨骼肌	0	0	0
	小脑	0	1	1
	额叶	0	1	1
[0437]	脑桥	0	1	1
	胃	0	0	0
	脊髓	0	1	1
	肺	0	0	0
	脾	0	0	0
	甲状腺	0	0	0
	肾	0	0	0
	睾丸	0	0	0

[0438] scFv浓度是3 μ g/ml;NB是神经母细胞瘤;强度定义为0、1(弱,非均质膜染色)、2(弱,均质膜染色)、3(强,非均质膜染色)和4(强,均质膜染色)。

[0439] 实例7

[0440] GD2生物素标记

[0441] 对于小规模反应,100 μ g GD2-叠氮基和50 μ g DBCO-PEG4生物素(点击化学工具(Click Chemistry Tool))在25 μ l水中在4 $^{\circ}$ C下在轻轻旋转下反应过夜。在第二天,通过添加30 μ g叠氮基-PEG-叠氮基(点击化学工具)并且在室温下培育1h使过量DBCO-PEG4生物素不活化。稀释产物以达到0.5mg/ml浓度并且储存在-80 $^{\circ}$ C下。

[0442] FACS分析

[0443] 至于FACS分析,使显示Hu3F8scFv的酵母细胞生长并且诱导。酵母细胞(1×10^6)用2 μ g/ml生物素标记的GD2-叠氮基-PEG4-生物素或GD2-生物素、小鼠抗c-myc抗体的1:100稀释液在PBS/0.1%BSA缓冲剂中在冰上培育30min。洗涤一次后,细胞用R-藻红素共轭抗生蛋白链菌素、阿莱克萨荧光剂488共轭山羊抗小鼠抗体的1:50稀释液在冰上培育30min,随后再次洗涤并且再悬浮于0.5ml PBSA缓冲剂中。使用碧迪生物科学(BD Bioscience)FACS进行分析。

[0444] 结果

[0445] 酵母细胞在细胞表面上用cmec标签显示Hu3F8scFv,其用于使GD2生物素共轭物与或不与PEG间隔基结合。在流式细胞分析中,Hu3F8scFv的表现和GD2结合分别检测为X轴和Y轴。我们发现PEG4间隔基的存在对于通过无间隔基的情况下与GD2比较在流式细胞分析中的GD2观测是必要的(数据未展示)。生物素-PEG-GD2化学结构参见图2。

[0446] 实例8

[0447] 通过表面等离子共振测量MoAb解离速率

[0448] 使用高密度GD2模型通过表面等离子共振(Biacore T100)测量具有亲和力增强性突变的hu3F8IgG的解离速率。

[0449] 简单来说,神经节苷脂经由疏水相互作用直接固定到CM5传感器芯片上。用GM1固定参考表面。用纯GD2固定活性表面。GD2(50 μ g/mL)以15 μ l/min流动速率注射(300 μ l)历时20分钟。随后用10mM NaOH充分洗涤(通常为以5 μ l/min流动速率的20 μ l洗涤五次)直到获得稳定基线。结果展示于表9和图3中。

[0450] 表9

	抗体	$K_{\text{离开}} (S^{-1})$	相对于 hu3F8V1 的倍数变化
[0451]	hu3F8V1 D32H G54I	2.9×10^{-4}	-6.4
	hu3F8V1 E1K D32H	5.1×10^{-4}	-3.6
	hu3F8V1 D32H	6.9×10^{-4}	-2.7
	hu3F8V1 E1K D32H G54I	8.8×10^{-4}	-2.1
	hu3F8V1	18.5×10^{-4}	1

[0452] 如表9和图3中所展示, hu3F8双突变体 (hu3F8V1LC:D32H HC:G54I和hu3F8V1LC:E1K LC:D32H) 展现最慢解离速率, 其比hu3F8V1慢3.6到6.4倍。单突变体 (hu3F8V1LC:D32H) 和三突变体 (hu3F8V1LC:E1K LC:D32H HC:G54I) 分别展现2.7倍和2.1倍更慢分解速率。

[0453] 在额外肿瘤细胞株的情况下ADCC中的抗体效力

[0454] 用NK92-CD16 (CD16阳性培养NK细胞) 作为效应子并且用神经母细胞瘤IMR-32或黑色素瘤M14作为标靶在ADCC分析中比较抗GD2IgG1抗体 (如上文所描述)。ADCC效力被计算为 hu3F8V1EC₅₀/抗体EC₅₀比率。结果展示于表10中。

[0455] 表10

	抗体	标靶: IMR-32		标靶: M14	
		EC ₅₀ (μg/ml)	相对效力	EC ₅₀ (μg/ml)	相对效力
[0456]	hu3F8V1 E1K D32H	0.0005	140.0	0.0001	25.0
	hu3F8V1 D32H G54I	0.0007	100.0	0.00011	22.7
	hu3F8V1D32H	0.0028	25.0	0.0005	5.0
	hu3F8V1 E1K D32H G54I	0.0045	15.6	0.0007	3.6
	hu3F8V1	0.07	1.0	0.0025	1.0

[0457] 结果展示相对于亲本hu3F8V1IgG, 双突变体 (hu3F8V1LC:D32H HC:G54I和hu3F8V1LC:E1K) 展现IMR-32细胞的ADCC增加100到140倍, 并且M14细胞的ADCC增加22到25倍。单突变体 (hu3F8V1LC:D32H) 展现IMR 32细胞的ADCC增加25倍, 并且M14细胞的ADCC增加5倍。三突变体 (hu3F8V1LC:E1K LC:D32H HC:G54I) 展现IMR 32细胞的ADCC增加15.6倍, 并且M14细胞的ADCC增加3.6倍。

序列表

<110> 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

<120> 高亲和力抗GD2抗体

<130> 2003080-0638

<150> 61/801287

<151> 2013-03-15

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

[0001]

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
100 105 110

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

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

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

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

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
195 200 205

Gly Glu Cys
210

<210> 2
<211> 211
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> 合成

<400> 2

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
100 105 110

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

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

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

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

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
195 200 205

[0003]

Gly Glu Cys
210

<210> 3
<211> 211
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 3

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
100 105 110

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

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

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

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

[0004]

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
195 200 205

Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr

	20	25	30
	Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu 35 40 45		
	Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met 50 55 60		
	Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu 65 70 75 80		
	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95		
	Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 115 120 125		
[0005]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 130 135 140		
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp 145 150 155 160		
	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 165 170 175		
	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser 180 185 190		
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro 195 200 205		
	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys 210 215 220		
	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 225 230 235 240		
	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 245 250 255		

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

[0006]

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 5
<211> 449
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

[0007] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

[0008]

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

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

<220>
<223> 合成

<400> 6

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

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

[0009] Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
100 105 110

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

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

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

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

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
195 200 205

Gly Glu Cys
210

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

<220>
<223> 合成

<400> 7

[0010] Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
100 105 110

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser

115	120	125
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln 130 135 140		
Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val 145 150 155 160		
Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu 165 170 175		
Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu 180 185 190		
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg 195 200 205		
Gly Glu Cys 210		

[0011] <210> 8
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 8

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

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
100 105 110

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

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

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

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

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

[0012]

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
195 200 205

Gly Glu Cys
210

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

<220>
<223> 合成

<400> 9

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
100 105 110

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

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

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

[0013]

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

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
195 200 205

Gly Glu Cys
210

<210> 10
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

[0014]

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

[0015]

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 11
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 11

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
 20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0016] Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
 65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
 130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
 145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
 165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
 180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 12
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 12

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

[0017] Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 13
<211> 239
<212> PRT
[0018] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 13

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly

	85	90	95
	Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 100 105 110		
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 115 120 125		
	Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val 130 135 140		
	Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro 145 150 155 160		
	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile 165 170 175		
	Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp 180 185 190		
[0019]	Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu 195 200 205		
	Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr 210 215 220		
	Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 225 230 235		
	<210> 14 <211> 239 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成		
	<400> 14		
	Lys Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Ala Gly 1 5 10 15		
	Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp 20 25 30		

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
130 135 140

[0020]

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 15

<211> 239

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 15

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

[0021]

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 16
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 16

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

[0022] Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 17
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

[0023]

<400> 17

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

[0024]

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 18
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 18

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

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

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
	Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	His	
				20					25					30			
	Val	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
	Tyr	Ser	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ser	
	65					70					75					80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Ser	Ser	Phe	Gly	
					85					90					95		
	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
				100					105					110			
[0026]	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	
			115					120					125				
	Pro	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	
		130					135					140					
	Ser	Gly	Phe	Ser	Val	Thr	Asn	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	
	145					150					155					160	
	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ile	
					165					170					175		
	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	
				180					185					190			
	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	
			195					200					205				
	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Arg	Gly	Gly	His	Tyr	Gly	Tyr	
		210					215					220					
	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		

225

230

235

<210> 20
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 20

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

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

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0027]

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
 65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val
 130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
 145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
 165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 21
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 21

[0028] Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

[0029]

<210> 22
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 22

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

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

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

[0030]

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 23
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 23

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

	20	25	30
	Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys 35	Pro Gly Gln Ala Pro 40	Arg Leu Leu Ile 45
	Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50	55	60
	Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser 65	70	75 80
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly 85	90	95
	Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 100	105	110
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 115	120	125
[0031]	Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val 130	135	140
	Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro 145	150	155 160
	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile 165	170	175
	Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp 180	185	190
	Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu 195	200	205
	Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr 210	215	220
	Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 225	230	235
	<210> 24		
	<211> 239		

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 24

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

[0032] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly
85 90 95

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

	195	200	205
	Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr 210 215 220		
	Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 225 230 235		
	<210> 25 <211> 239 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成		
	<400> 25		
	Lys Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Ala Gly 1 5 10 15		
	Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His 20 25 30		
[0033]	Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35 40 45		
	Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
	Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser 65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly 85 90 95		
	Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 100 105 110		
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 115 120 125		
	Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val 130 135 140		

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 26
<211> 262
<212> PRT
<213> 人工序列

[0034]

<220>
<223> 合成

<400> 26

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val
20 25 30

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn
65 70 75 80

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
100 105 110

Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
165 170 175

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
195 200 205

[0035]

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210 215 220

Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Lys Leu Gln Ile Thr Arg
260

<210> 27
<211> 256
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
1 5 10 15

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
 20 25 30
 Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr
 35 40 45
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 50 55 60
 Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu
 85 90 95
 Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110
 Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 [0036]
 Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser
 165 170 175
 Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro
 180 185 190
 Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
 195 200 205
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
 210 215 220
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
 225 230 235 240

Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
245 250 255

<210> 28
<211> 244
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 28

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

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

[0037] Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Thr Ala Leu Ile
50 55 60

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

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

Arg Arg Gly Ser Tyr Pro Tyr Asn Tyr Phe Asp Ala Trp Gly Cys Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Ile Gln Glu Ser Ala Leu
130 135 140

Thr Thr Pro Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr
145 150 155 160

Gly Ala Val Thr Ala Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro
165 170 175

Asp His Cys Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly His Asn Asn Arg Pro Pro
180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala
195 200 205

Leu Thr Ile Ala Gly Thr Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys
210 215 220

Ala Leu Trp Tyr Ser Asp His Trp Val Ile Gly Gly Gly Thr Arg Leu
225 230 235 240

Thr Val Leu Gly

<210> 29
<211> 501
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

[0038]

<400> 29

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

	100	105	110
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 115 120 125		
	Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val 130 135 140		
	Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro 145 150 155 160		
	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile 165 170 175		
	Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp 180 185 190		
	Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu 195 200 205		
[0039]	Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr 210 215 220		
	Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala 225 230 235 240		
	Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 245 250 255		
	Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val 260 265 270		
	Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr 275 280 285		
	Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly 290 295 300		
	Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr 305 310 315 320		
	Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys 325 330 335		

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

[0040]

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg
500

<210> 30
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 30

Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Ala Gly

1	5	10	15
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp	20	25	30
Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser	65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly	85	90	95
Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	100	105	110
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly	115	120	125
Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val	130	135	140
Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro	145	150	155
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile	165	170	175
Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp	180	185	190
Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu	195	200	205
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr	210	215	220
Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly	225	230	235
			240

[0041]

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
245 250 255

Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
260 265 270

Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met
275 280 285

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
290 295 300

Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
305 310 315 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln
325 330 335

Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg
340 345 350

[0042]

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro
355 360 365

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
385 390 395 400

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
405 410 415

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys
420 425 430

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
435 440 445

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser
450 455 460

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
465 470 475 480

Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
485 490 495

<210> 31
<211> 498
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 31

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

[0043] Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Val
245 250 255

Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu
260 265 270

[0044]

Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly Val
275 280 285

His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val
290 295 300

Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Thr Ala Leu Ile Ser Arg
305 310 315 320

Leu Asn Ile Tyr Arg Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Glu Met
325 330 335

Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg
340 345 350

Gly Ser Tyr Pro Tyr Asn Tyr Phe Asp Ala Trp Gly Cys Gly Thr Thr
355 360 365

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Ile Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala
405 410 415

Val Thr Ala Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His
420 425 430

Cys Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly His Asn Asn Arg Pro Pro Gly Val
435 440 445

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr
450 455 460

Ile Ala Gly Thr Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu
465 470 475 480

Trp Tyr Ser Asp His Trp Val Ile Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val
485 490 495

[0045]

Leu Gly

<210> 32
<211> 633
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 32
gaaatcgtca tgactcagac tcctgctact ctgtccgtct ccgctgggga aagggtcact 60
atcacttgta aggcatcaca gtccgtgagt aaccacgtga cttggtacca gcagaagcca 120
ggacaggcac ccaggtgtgt gatctactca gcctccaata gatatagcgg agtgccagca 180
cgcttcagcg ggtctgggta tggcaccgag ttcaccttta caatttccag cgtgcagtct 240
gaagacttcg ctgtctactt ttgccagcag gattattcta gttttggaca ggggacaaag 300
ctggagatca aacgaaccgt ggccgcccc tccgtgttca tcttcccccc ctccgacgag 360
cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtgggtg tgcctgctga acaacttcta cccccgggag 420
gccaaaggtgc agtggaaaggt ggacaacgcc ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtg 480

	accgagcagg actccaagga ctccacctac tccctgtcct ccacctgac cctgtccaag	540
	gccgactacg agaagcaciaa ggtgtacgcc tgcgaggtga cccaccaggg cctgtcctcc	600
	cccgtgacca agtccttcaa ccggggcgag tgc	633
	<210> 33	
	<211> 633	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 33	
	aaaatcgta tgactcagac tectgtact ctgtccgtct ccgtgggga aagggtcact	60
	atcacttgta aggcatcaca gtccgtgagt aaccacgtga ctgggtacca gcagaagcca	120
	ggacaggcac ccaggctgct gatctactca gcctccaata gatatagcgg agtgccagca	180
	cgcttcagcg ggtctgggta tggcaccgag ttacacctta caatttccag cgtgcagtct	240
	gaagacttcg ctgtctactt ttgccagcag gattattcta gttttggaca ggggacaaag	300
[0046]	ctggagatca aacgaaccgt ggccgcccc tccgtgttca tcttcccccc ctccgacgag	360
	cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtgggtg tgcctgtga acaacttcta cccccgggag	420
	gccaagggtgc agtgggaagg ggacaacgcc ctgcagtcgc gcaactccca ggagtcctgt	480
	accgagcagg actccaagga ctccacctac tccctgtcct ccacctgac cctgtccaag	540
	gccgactacg agaagcaciaa ggtgtacgcc tgcgaggtga cccaccaggg cctgtcctcc	600
	cccgtgacca agtccttcaa ccggggcgag tgc	633
	<210> 34	
	<211> 1347	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 34	
	cagggtccagc tggtcgaatc tggtcctggg gtcgtgcagc ctgggagggtc tctgcgtctg	60
	agttgtgccg tgtccgggtt ttccgtgact aactacggag tgcactgggt cagacagcca	120
	cctgggaagg gtctggagtg gctgggagtg atctgggcag gcggaattac caactacaat	180
	tccagcgtca aaggcaggct gaccatctct aaggacaaca gtaaaaatac agtgtatctg	240

	cagatgaatt ccctgagggc cgaagataca gctgtctact attgcgcctc tcggggcggt	300
	cattatggct acgcactgga ttactgggga cagggaactc tggtcaccgt ctcatcagcc	360
	tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
	acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg	480
	aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtcctaca gtccctagga	540
	ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
	atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaagggtg acaagagagt tgagccaaa	660
	tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcacagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
	tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag	780
	gtcacatgcg tgggtgggga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac	840
	gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
	gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg	1080
[0047]	accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1140
	gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgtg	1200
	gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag	1260
	caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
	aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa	1347
<210> 35		
<211> 633		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 35		
	gaaatcgtea tgactcagac tectgtacc ctgtccgtgt cagctgggga gcgtgtcact	60
	attacttgtc gggcttcaca gagcgtgtct aacgacgtga catggtacca gcagaagccc	120
	ggtcaggccc ctagactgct gatctactct gctagtaata ggtatactgg cattccagca	180
	cggttctcag gtcccgata tgggaccgag ttacacctta caatctccag cgtgcagagc	240
	gaagactttg ccgtctatct ttgccagcag gattattcat cattcggcca gggaactaaa	300

ctggaaatca agagaaccgt ggccgcccc tccgtgttca tcttcccccc ctccgacgag	360
cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg tgcctgctga acaacttcta cccccgggag	420
gccaaaggtgc agtgggaaggt ggacaacgcc ctgcagtccg gcaactccca ggagtcctgt	480
accgagcagg actccaagga ctccacctac tccctgtcct ccacctgac cctgtccaag	540
gccgactacg agaagcaciaa ggtgtacgcc tgcgaggtga cccaccaggg cctgtcctcc	600
cccgtgacca agtccttcaa ccggggcgag tgc	633

<210> 36
 <211> 633
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 36	
gaaatcgta tgactcagac tcctgtacc ctgtccgtgt cagctgggga gcgtgtcact	60
attacttgta gggcttcaca gaggctgtct aaccacgtga catggtacca gcagaagccc	120
ggtcaggccc ctagactgct gatctactct gctagtaata ggtatactgg cattccagca	180
cggttctcag gctccggata tgggaccgag ttacacctta caatctccag cgtgcagagc	240
gaagactttg ccgtctattt ttgccagcag gattattcat cattcggcca gggaactaaa	300
ctggaaatca agagaaccgt ggccgcccc tccgtgttca tcttcccccc ctccgacgag	360
cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg tgcctgctga acaacttcta cccccgggag	420
gccaaaggtgc agtgggaaggt ggacaacgcc ctgcagtccg gcaactccca ggagtcctgt	480
accgagcagg actccaagga ctccacctac tccctgtcct ccacctgac cctgtccaag	540
gccgactacg agaagcaciaa ggtgtacgcc tgcgaggtga cccaccaggg cctgtcctcc	600
cccgtgacca agtccttcaa ccggggcgag tgc	633

<210> 37
 <211> 633
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 37	
aaaatcgta tgactcagac tcctgtacc ctgtccgtgt cagctgggga gcgtgtcact	60

attacttgtc gggcttcaca gagegtgtct aaccacgtga catggtacca gcagaagccc	120
ggtcaggccc ctagactgct gatctactct gctagtaata ggtatactgg cattccagca	180
cggttctcag gctccggata tgggaccgag ttacacctta caatctccag cgtgcagagc	240
gaagactttg ccgtctattt ttgccagcag gattattcat cattcggcca gggaactaaa	300
ctggaaatca agagaaccgt ggccgcccc tccgtgttca tcttcccccc ctccgacgag	360
cagctgaagt ccggcacccg ctccgtggtg tgcctgctga acaacttcta cccccgggag	420
gccaaaggtgc agtgggaaggt ggacaacgcc ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtg	480
accgagcagg aciccaagga ctccacctac tccctgtcct ccacctgac cctgtccaag	540
gccgactacg agaagcaca ggtgtacgcc tgcgaggtga cccaccaggg cctgtcctcc	600
cccgtgacca agtccttcaa ccggggcgag tgc	633

<210> 38
 <211> 1404
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

[0049]

<400> 38	
cagggtccagc tggtcgaatc tggtcctggg gtcgtgcagc ctgggaggtc tctgcgtctg	60
agttgtgccg tgtccgggtt ttccgtgact aactacggag tgcactgggt cagacagcca	120
cctgggaagg gcttggagtg gctgggagtg atctgggcaa tcggaattac caactacaat	180
tccagcgtca aaggcaggct gaccatctct aaggacaaca gtaaaaatac agtgtatctg	240
cagatgaatt ccctgagggc cgaagataca gctgtctact attgcgcctc tcggggcggt	300
cattatggct acgcactgga ttactgggga cagggaactc tggtcaccgt ctcatcacat	360
tatggctacg cactggatta ctggggacag ggaactctgg tcaccgtctc atcagcctcc	420
accaagggcc catcggtctt cccctggca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccggcg tcctacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaaattct	720
tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc	840

acatgcgtgg	tggaggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagticaa	ctggtagctg	900
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	960
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	1020
aagtgcgaagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaacat	ctccaaagcc	1080
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	1140
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	1200
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagAAC	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	1260
tccgacggct	ctttcttctt	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	1320
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	1380
agcctctccc	tgtctccggg	taaa				1404

<210> 39
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0050] <220>
 <223> 合成

<400> 39	
gaaatcgta	tgactcagac
tectgtact	ctgtccgtct
ccgctgggga	aagggtcact
	60
atcacttgta	aggcatcaca
gtccgtgagt	aaccacgtga
cttggtacca	gcagaagcca
	120
ggacaggcac	ccaggctgct
gatctactca	gcctccaata
gatatagcgg	agtgccagca
	180
cgcttcagcg	ggctctggta
tggcaccgag	ttcaccttta
caatttccag	cgtgcagtct
	240
gaagacttcg	ctgtctactt
ttgccagcag	gattattcta
gttttggaca	ggggacaaag
	300
ctggagatca	aacgaggagg
aggaggtagc	ggaggaggag
gttctggcgg	aggggtagt
	360
cagggtgcagc	tggtcgaatc
cggctcctgga	gtggtccagc
caggcaggtc	cctgcggatt
	420
agctgtgcag	tgagtggttt
ctcagtcaca	aactacggag
tgcactgggt	caggcagcca
	480
cctggaaaag	ggctggagtg
gctgggagtg	atctgggctg
gcggaattac	taactacaat
	540
tccgccttca	tgagtagact
gactatctca	aaggacaact
ccaaaaatac	cgtgtatctg
	600
cagatgaatt	cactgcgagc
cgaagataca	gctatgtact
attgcgcttc	ccgtggcggt
	660
cattacgggt	acgctctgga
ttactggggt	cagggaactc
tggtcactgt	ctcctcc
	717

<210> 40

<211> 717
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 40
 aaaatcgta tgactcagac tcctgtact ctgtccgtct ccgctgggga aagggtcact 60
 atcacttgta aggcatcaca gtccgtgagt aaccacgtga ctgggtacca gcagaagcca 120
 ggacaggcac ccaggctgct gatctactca gcctccaata gatatagcgg agtgccagca 180
 cgcttcagcg ggctctggta tggcaccgag ttcaccttta caatttccag cgtgcagtct 240
 gaagacttcg ctgtctactt ttgccagcag gattattcta gttttggaca ggggacaaag 300
 ctggagatca aacgaggagg aggaggtagc ggaggaggag gttctggcgg agggggtagt 360
 cagggtgcagc tggtcgaatc cggtcctgga gtggtccagc caggcaggtc cctgcggatt 420
 agctgtgcag tgagtggttt ctcagtcaca aactacggag tgcactgggt caggcagtea 480
 cctggaaaag ggctggagtg gctgggagtg atctgggctg gcggaattac taactacaat 540
 tccgccttca tgagtagact gactatctca aaggacaact ccaaaaatac cgtgtatctg 600
 [0051] cagatgaatt cactgcgagc cgaagatata gctatgtact attgcgcttc ccgtggcggt 660
 cattacgggtt acgctctgga ttactggggt cagggaactc tggtcactgt ctctctcc 717

<210> 41
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 41
 aaaatcgta tgactcagac tcctgtact ctgtccgtct ccgctgggga aagggtcact 60
 atcacttgta aggcatcaca gtccgtgagt aaccacgtga ctgggtacca gcagaagcca 120
 ggacaggcac ccaggctgct gatctactca gcctccaata gatatagcgg agtgccagca 180
 cgcttcagcg ggctctggta tggcaccgag ttcaccttta caatttccag cgtgcagtct 240
 gaagacttcg ctgtctactt ttgccagcag gattattcta gttttggaca ggggacaaag 300
 ctggagatca aacgaggagg aggaggtagc ggaggaggag gttctggcgg agggggtagt 360
 cagggtgcagc tggtcgaatc cggtcctgga gtggtccagc caggcaggtc cctgcggatt 420
 agctgtgcag tgagtggttt ctcagtcaca aactacggag tgcactgggt caggcagtea 480

cctggaaaag ggctggagtg gctgggagtg atctgggcta tcggaattac taactacaat	540
tccgccttca tgagtagact gactatctca aaggacaact ccaaaaatac cgtgtatctg	600
cagatgaatt cactgcgagc cgaagataca gctatgtact attgcgcttc ccgtggcggt	660
cattacgggtt acgctctgga ttactgggggt cagggaactc tggtcactgt ctctcc	717

<210> 42
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 42	
gaaatcgtea tgactcagac tcttctacc ctgtccgtgt cagctgggga gcgtgtcact	60
attacttgtc gggcttcaca gacgctgtct aacgacgtga catggtacca gcagaagccc	120
ggtcaggccc ctagactgct gatctactct gctagtaata ggtatactgg cattccagca	180
cggttctcag gctccggata tgggaccgag ttcaccttta caatctccag cgtgcagagc	240
gaagactttg ccgtctatct ttgccagcag gattattcat cattcggcca gggaactaaa	300
ctggaaatca agagaggagg aggaggtagc ggaggaggag gtctctggcgg agggggtagt	360
caggtccagc tggtcgaatc tggctcctggg gtcgtgcagc ctgggaggtc tctgcgtctg	420
agttgtgccg tgtccgggtt ttccgtgact aactacggag tgcactgggt cagacagcca	480
cctgggaagg gctcggagtg gctgggagtg atctgggcag gcggaattac caactacaat	540
tccagcgtca aaggcaggct gaccatctct aaggacaaca gtaaaaatac agtgtatctg	600
cagatgaatt ccctgagggc cgaagataca gctgtctact attgcgcctc tcggggcggt	660
cattatggct acgcactgga ttactgggga cagggaactc tggtcaccgt ctcatca	717

<210> 43
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 43	
gaaatcgtea tgactcagac tcttctacc ctgtccgtgt cagctgggga gcgtgtcact	60
attacttgtc gggcttcaca gacgctgtct aaccacgtga catggtacca gcagaagccc	120

```

ggtcaggccc ctagactgct gatctactct gctagtaata ggtatactgg cattccagca      180
cggttctcag gctccggata tgggaccgag ttcaccttta caatctccag cgtgcagagc      240
gaagactttg ccgtctatTT ttgccagcag gattattcat cattcggcca gggaactaaa      300
ctggaaatca agagaggagg aggaggtagc ggaggaggag gttctggcgg agggggtagt      360
caggtccagc tggtcgaatc tggtcctggg gtcgtgcagc ctgggaggtc tctgcgtctg      420
agttgtgccg tgtccgggtt ttccgtgact aactacggag tgcactgggt cagacagcca      480
cctgggaagg gctcggagtg gctgggagtg atctgggcag gcggaattac caactacaat      540
tccagcgtca aaggcaggct gaccatctct aaggacaaca gtaaaaatac agtgtatctg      600
cagatgaatt ccctgagggc cgaagataca gctgtctact attgcgcctc tcggggcggt      660
cattatggct acgcactgga ttactgggga cagggaactc tggtcaccgt ctcatca      717

```

<210> 44
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

[0053]

```

<400> 44
aaaatcgta tgaactcagac tcttctacc ctgtccgtgt cagctgggga gcgtgtcact      60
attacttgta gggcttcaca gagcgtgtct aaccacgtga catggtacca gcagaagccc      120
ggtcaggccc ctagactgct gatctactct gctagtaata ggtatactgg cattccagca      180
cggttctcag gctccggata tgggaccgag ttcaccttta caatctccag cgtgcagagc      240
gaagactttg ccgtctatTT ttgccagcag gattattcat cattcggcca gggaactaaa      300
ctggaaatca agagaggagg aggaggtagc ggaggaggag gttctggcgg agggggtagt      360
caggtccagc tggtcgaatc tggtcctggg gtcgtgcagc ctgggaggtc tctgcgtctg      420
agttgtgccg tgtccgggtt ttccgtgact aactacggag tgcactgggt cagacagcca      480
cctgggaagg gctcggagtg gctgggagtg atctgggcag gcggaattac caactacaat      540
tccagcgtca aaggcaggct gaccatctct aaggacaaca gtaaaaatac agtgtatctg      600
cagatgaatt ccctgagggc cgaagataca gctgtctact attgcgcctc tcggggcggt      660
cattatggct acgcactgga ttactgggga cagggaactc tggtcaccgt ctcatca      717

```

<210> 45
 <211> 717

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 45
 aaaatcgta tgactcagac tcctgctacc ctgtccgtgt cagctgggga gcgtgtcact 60
 attacttgtc gggcttcaca gagcgtgtct aaccacgtga catggtacca gcagaagccc 120
 ggtcaggccc ctagactgct gatctactct gctagtaata ggtatactgg cattccagca 180
 cggttctcag gctccggata tgggaccgag ttcaccttta caatctccag cgtgcagagc 240
 gaagactttg ccgtctatct ttgccagcag gattattcat cattcggcca gggaactaaa 300
 ctggaaatca agagaggagg aggaggtagc ggaggaggag gtctctggcgg agggggtagt 360
 cagggtccagc tggtcgaatc tggtcctggg gtcgtgcagc ctgggagggtc tctgcgtctg 420
 agttgtgccg tgtccgggtt ttccgtgact aactacggag tgcactgggt cagacagcca 480
 cctgggaagg gtctggagtg gctgggagtg atctgggcaa tcggaattac caactacaat 540
 tccagcgtca aaggcaggct gaccatctct aaggacaaca gtaaaaatac agtgtatctg 600
 [0054] cagatgaatt ccctgagggc cgaagatata gctgtctact attgcgcctc tcggggcggt 660
 cattatggct acgcactgga ttactgggga cagggaactc tggtcaccgt ctcatca 717

<210> 46
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 46

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ser
	65					70					75					80
	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Ser	Ser	Phe	Gly
					85					90					95	
	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
				100					105					110		
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly
			115					120					125			
	Pro	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Ala	Val
		130					135					140				
[0055]	Ser	Gly	Phe	Ser	Val	Thr	Asn	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro
	145					150					155					160
	Pro	Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ile
					165					170					175	
	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Phe	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp
				180					185					190		
	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
			195					200					205			
	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Arg	Gly	Gly	His	Tyr	Gly	Tyr
		210					215					220				
	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
	225					230					235					

肿瘤类型	人类化3F8单链可 变片段阳性染色	染色强度			人类化3F8 单链可变的 阳性染色	肿瘤类型	染色强度		
		V1	V1 D32H	V1 D32H E1K			V1	V1 D32H	V1 D32H E1K
Ewings	3/9=33%	3	4	4	NB	0	2	3	
		3	4	4		0	NA	3	
		4	4	4		1	2	2	
		0	1	1		1	4	NA	
		0	1	1		2	4	4	
		1	3	3		2	NA	3	
		1	4	4		3	3	4	
		3	4	4		3	4	4	
		3	4	4		3	NA	4	
		0	1	1		3	NA	3	
		1	1	1		3	NA	4	
		1	2	2		4	4	4	
		1	2	2	4	4	4		
		3	3	3	4	4	4		
OS	6/10=60%	0	1	1	肉瘤 (成人试验)	0	1	1	
		1	1	1		0	2	2	
		1	1	2		0	2	2	
		1	2	2		0	2	3	
		1	2	2		1	3	3	
		3	3	3		2	2	2	
		0	1	1		2	3	3	
		0	2	2		2	4	4	
		0	0	1		3	3	4	
		1	1	1		3	4	4	
		3	3	3		4	4	4	
						4	4	4	
RMS	5/10=50%	0	1	1	13/18=72%	0	1	1	
		0	2	2		0	2	2	
		0	0	1		0	2	3	
		1	1	1		1	3	3	
		3	3	3		2	2	2	
						2	3	3	
						2	4	4	
						3	3	4	
						3	4	4	
						3	4	4	
						4	4	4	
						4	4	4	

单链可变的片段浓度是3 μg/ml;
NB, 成神经细胞瘤; OS, 骨肉瘤; RMS, 横纹肌肉瘤;
Ewings, 尤文氏肉瘤; DSRCT, 促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤,
强度定义为0、1(弱, 不均匀膜染色)、2(弱, 均匀膜染色)、
3(强, 不均匀膜染色)及4(强, 均匀膜染色)。

单链可变异片段浓度是3 µg/ml;
NB, 成神经细胞瘤; OS, 骨肉瘤; RMS, 横纹肌肉瘤;
Ewings, 尤文氏肉瘤; DSRCT, 促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤,
强度定义为0、1(弱, 不均匀膜染色)、2(弱, 均匀膜染色)、
3(强, 不均匀膜染色)及4(强, 均匀膜染色)。

图1

B184(生物素-双唾液酸神经节苷脂)

Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3[GalNAcb1-4]Galb1-4Glc-SPNH-LC-LC-生物素

来自

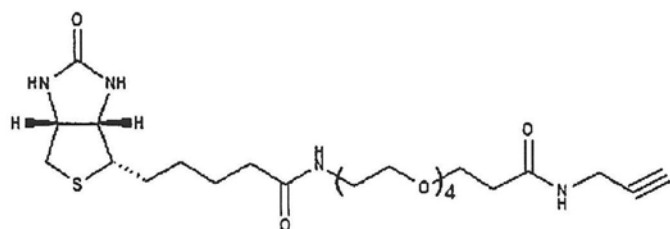
功能糖组学协会

蛋白质-聚糖相互作用中心

埃默里大学

生物素-聚乙二醇-双唾液酸神经节苷脂

由叠氮基-双唾液酸神经节苷脂-寡糖与生物素-(聚乙二醇)4-炔反应制成(使用点击化学)



+

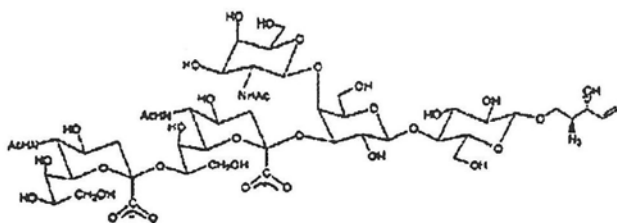


图2

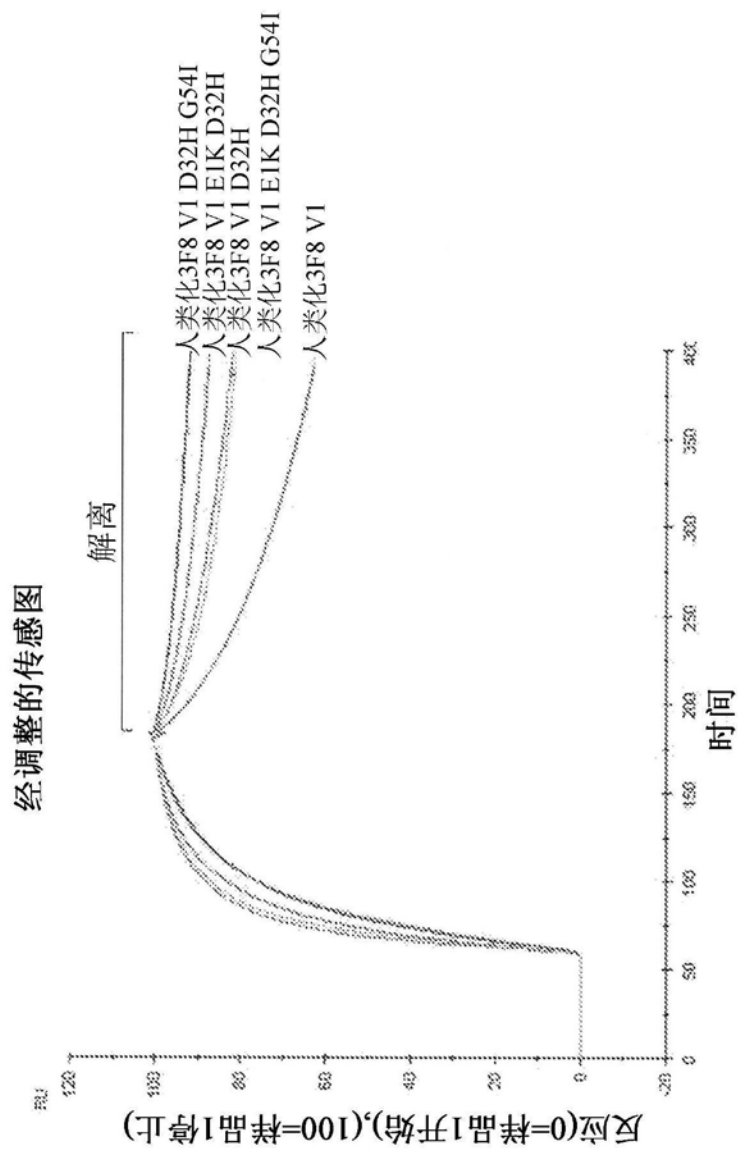


图3