



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103554261 B

(45)授权公告日 2017.03.01

(21)申请号 201310444419.1

C12N 15/13(2006.01)

(22)申请日 2004.07.21

C12N 15/85(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/68(2006.01)

申请公布号 CN 103554261 A

G01N 33/53(2006.01)

(43)申请公布日 2014.02.05

(56)对比文件

(30)优先权数据

EP 0425235 A2,1990.10.23,

60/488,447 2003.07.21 US

US 5416064 A,1995.05.16,

US 5776456 A,1998.07.07,

(62)分案原申请数据

WO 02/16401 A2,2002.02.28,

200480024331.3 2004.07.21

Kearse KP et al.Monoclonal antibody

(73)专利权人 伊缪诺金公司

DS6 detects a tumor-associated

地址 美国马萨诸塞州

sialoglycotope expressed on human serous

(72)发明人 G·佩恩 P·丘 D·J·塔瓦雷斯

ovarian carcinomas..《International

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

Journal of Cancer》.2000,第88卷866-872.

11256

审查员 王岩

代理人 陈文平

(51)Int.Cl.

权利要求书4页 说明书58页

C07K 16/30(2006.01)

序列表20页 附图32页

(54)发明名称

CA6抗原特异性细胞毒性偶联物及其应用方法

(57)摘要

公开了包含细胞结合剂和细胞毒性试剂的细胞毒性偶联物、包含所述偶联物的治疗组合物、使用所述偶联物抑制细胞生长和治疗疾病的方法,及包含所述细胞毒性偶联物的试剂盒。特别地,细胞结合剂为单克隆抗体和其表位结合片段,其识别并结合CA6糖表位。本发明也涉及DS6,抗CA6鼠单克隆抗体,及其表位结合片段的人源化或表面重构形式。

1. 人源化抗体或其表位结合片段, 包含SEQ ID NO:11中含有的CDR区和SEQ ID NO:8中含有的CDR区。

2. 权利要求1所述的抗体或其表位结合片段, 其中所述抗体或其表位结合片段包含至少一个重链可变区或其片段和至少一个轻链可变区或其片段,

其中所述至少一个重链可变区或其片段包含三个Kabat定义的互补决定区, 所述互补决定区依次具有SEQ ID NO:11的氨基酸31-35、50-66和99-106的氨基酸序列,

其中所述至少一个轻链可变区或其片段包含三个Kabat定义的互补决定区, 所述互补决定区依次具有SEQ ID NO:8的氨基酸24-33、49-55和88-96的氨基酸序列, 并且

所述抗体结合CA6糖表位。

3. 权利要求1所述的抗体或其表位结合片段, 其中所述轻链可变区或其片段的序列如SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示。

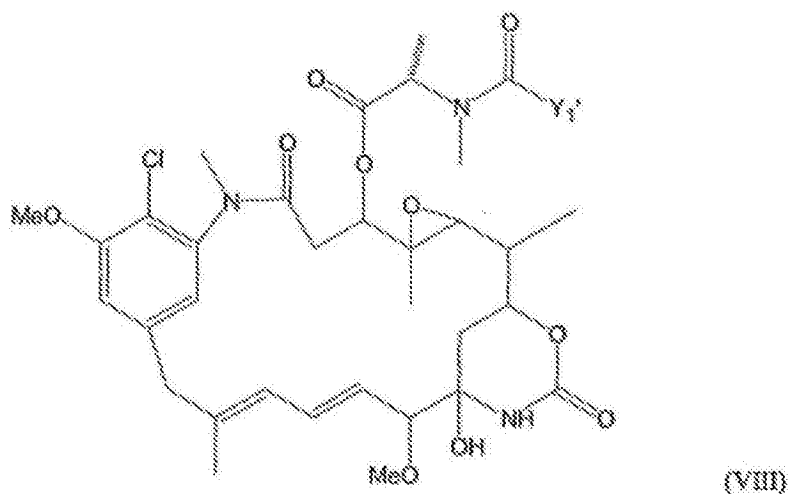
4. 权利要求1所述的抗体或其表位结合片段, 其中所述重链可变区或其片段的序列如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11所示。

5. 权利要求1所述的抗体或其表位结合片段, 其中所述轻链可变区或其片段的序列如SEQ ID NO:8所示, 且所述重链可变区或其片段的序列如SEQ ID NO:11所示。

6. 细胞毒性偶联物, 包含权利要求1-5任何一项所述的抗体或其表位结合片段以及细胞毒性试剂。

7. 权利要求6所述的细胞毒性偶联物, 其中所述细胞毒性试剂是美登素类。

8. 权利要求7所述的细胞毒性偶联物, 其中所述美登素类是式(VIII)的化合物:



其中:

Y_1' 代表

$(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

其中:

A、B和D每个独立为具有3到10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳香基或杂环烷基;

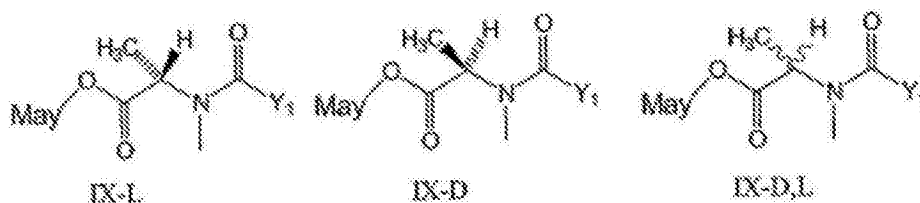
R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基; 和

l、m、n、o、p、q、r、s、t和u每个独立为0或1到5的整数,条件是l、m、n、o、p、q、r、s、t和u的至少两个不同时为零。

9. 根据权利要求8所述的细胞毒性偶联物,其中R₁是H和R₂是甲基。

10. 根据权利要求8所述的细胞毒性偶联物,其中R₁和R₂是甲基。

11. 根据权利要求7所述的细胞毒性偶联物,其中所述美登素类具有选自式(IX-L)、(IX-D)和(IX-D,L)的结构式:



其中:

Y₁代表(CR₇R₈)₁(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂S⁻,

其中:

R₁和R₂每个独立为CH₃、C₂H₅、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳香基或杂环烷基,此外,R₂可以是H;

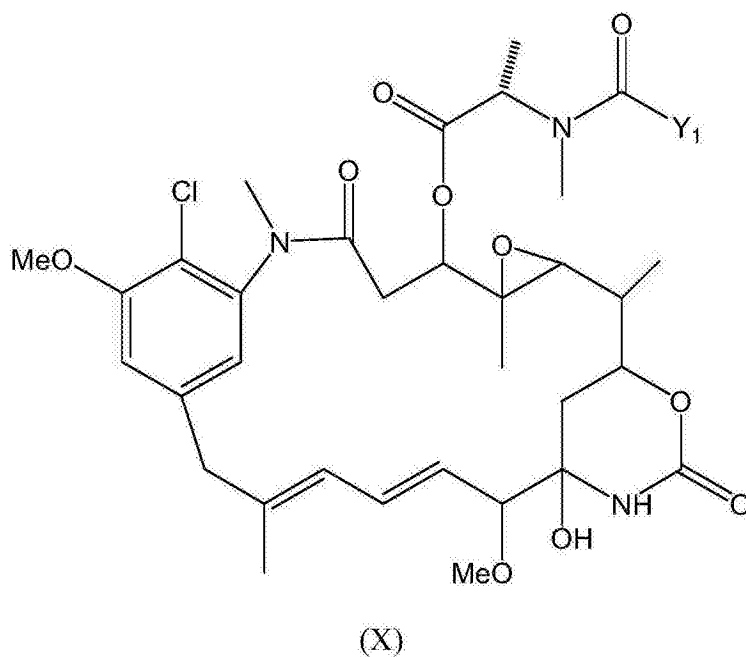
R₃、R₄、R₅、R₆、R₇和R₈每个独立为H、CH₃、C₂H₅、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;

l、m和n每个独立为1到5的整数,此外,n可以是0;和

May代表美登醇,其具有在C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20脱甲基处的侧链。

12. 根据权利要求11所述的细胞毒性偶联物,其中R₁是H和R₂是甲基,或者R₁和R₂是甲基。

13. 根据权利要求7所述的细胞毒性偶联物,其中所述美登素类是式(X)的化合物:



其中:

Y_1 代表 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

其中:

R_1 和 R_2 每个独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基,此外, R_2 可以是H;

R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;和

1、m和n每个独立为1到5的整数,此外,n可以是0。

14. 根据权利要求7所述的细胞毒性偶联物,其中所述美登素类是DM1或DM4。

15. 根据权利要求14所述的细胞毒性偶联物,其中所述美登素类是DM4。

16. 根据权利要求15所述的细胞毒性偶联物,其中所述抗体或其表位结合片段通过N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶二硫代)丁酸酯(SPDB)连接子与DM4共价连接。

17. 根据权利要求16所述的细胞毒性偶联物,其中1-10个DM4分子连接到所述抗体或其表位结合片段上。

18. 人源化抗体或其表位结合片段,包含至少一个重链可变区或其片段和至少一个轻链可变区或其片段,其中所述至少一个重链可变区或其片段包含三个互补决定区,所述互补决定区的序列依次分别如SEQ ID NO:1、21和3所示,并且其中所述至少一个轻链可变区或其片段包含三个互补决定区,所述互补决定区的序列依次分别如SEQ ID NO:4-6所示。

19. 编码权利要求1-5或18中任何一项的抗体或其表位结合片段的多核苷酸。

20. 编码权利要求1-5或18中任何一项的抗体或其表位结合片段的轻链或重链的多核苷酸。

21. 载体,包含权利要求19所述的多核苷酸。

22. 载体,包括权利要求20所述的多核苷酸。

23. 权利要求21所述的载体,其中所述载体为表达所述抗体或其表位结合片段的表达载体。

24. 权利要求22所述的载体,其中所述载体为表达所述抗体或其表位结合片段的表达载体。

25. 检测CA6糖表位的体外方法,包括:

- (a) 将样品与权利要求1-5或18中任何一项的抗体或其表位结合片段相接触;以及
- (b) 检测所述样品中抗体或其表位结合片段与CA6糖表位的结合。

26. 检测CA6糖表位的体外方法,包括:

(a) 将样品与结合CA6糖表位的、包含重链可变区和轻链可变区的抗体或其表位结合片段相接触,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:1、21和3所示的氨基酸序列的三个互补决定区,并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列的三个互补决定区;以及

(b) 检测所述样品中所述抗体或其表位结合片段与CA6糖表位的结合。

27. 权利要求26所述的方法,其中所述抗体或其表位结合片段是人源化的。

28. 权利要求26所述的方法,其中所述三个重链可变区互补决定区具有如SEQ ID NO:

11的氨基酸31-35、50-66和99-106的Kabat定义的氨基酸序列,且所述三个轻链可变区互补决定区具有如SEQ ID NO:8的氨基酸24-33、49-55和88-96的Kabat定义的氨基酸序列。

29.权利要求28所述的方法,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

30.权利要求26-29中任何一项所述的方法,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

31.用于检测CA6糖表位的组合物,包含权利要求1-5或18中任何一项的抗体或其表位结合片段。

32.用于检测CA6糖表位的组合物,包含结合CA6糖表位的、包含重链可变区和轻链可变区的人源化抗体或其表位结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:1、21和3所示的氨基酸序列的三个互补决定区,并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列的三个互补决定区。

33.权利要求32中所述的组合物,其中所述三个重链可变区互补决定区具有如SEQ ID NO:11的氨基酸31-35、50-66和99-106的Kabat定义的氨基酸序列,且所述三个轻链可变区互补决定区具有如SEQ ID NO:8的氨基酸24-33、49-55和88-96的Kabat定义的氨基酸序列。

34.权利要求32所述的组合物,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

35.权利要求32-34中任何一项所述的组合物,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

36.试剂盒,包含根据权利要求6-17任一项所述的细胞毒性偶联物和使用说明。

37.根据权利要求36所述的试剂盒,其中所述细胞毒性试剂是DM4。

38.根据权利要求37所述的试剂盒,其中所述轻链可变区的序列如SEQ ID NO:8所示,并且所述重链可变区的序列如SEQ ID NO:11所示。

CA6抗原特异性细胞毒性偶联物及其应用方法

[0001] 本申请是申请日为2004年07月21日和发明名称为“CA6抗原特异性细胞毒性偶联物及其应用方法”的200480024331.3号发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2003年7月21日提出的美国临时申请60/488,447的权益。

技术领域

[0004] 本发明涉及鼠抗-CA6糖表位(glycotope)单克隆抗体及其人源化或表面重构形式(humanized or resurfaced versions)。本发明也涉及抗-CA6糖表位单克隆抗体的表位结合片段(epitope-binding fragments),以及抗-CA6糖表位单克隆抗体的人源化或表面重构形式的表位结合片段。

[0005] 本发明进一步涉及包含细胞结合剂和细胞毒性试剂的细胞毒性偶联物,包含所述偶联物的治疗组合物,应用所述偶联物来抑制细胞生长和治疗疾病的方法,及包含所述细胞毒性偶联物的试剂盒。具体而言,细胞结合剂为单克隆抗体或其表位结合片段,其识别并结合CA6糖表位或其人源化或表面重构形式。

背景技术

[0006] 对开发抗癌治疗剂已经有很多的尝试,抗癌治疗剂需要特异性地靶向癌细胞,而不伤害周围的非癌细胞和组织。这样的治疗剂有潜力极大改善在人患者中的癌症的治疗。

[0007] 一个有前景的方法是连接细胞结合剂例如单克隆抗体与细胞毒性药物(Sela等,在Immunoconjugates189-216(C.Vogel,ed.1987);Ghose等,在Targeted Drugs1-22(E.Goldberg,ed.1983);Diener等,在Antibody mediated delivery systems1-23(J.Rodwell,ed.1988);Pietersz等,在Antibody mediated delivery systems25-53(J.Rodwell,ed.1988);Bumol等,在Antibody mediated delivery systems55-79(J.Rodwell,ed.1988)。取决于对细胞结合剂的选择,基于在这样的细胞的表面上所表达的分子的表达情况,这些细胞毒性偶联物可以被设计为仅仅识别和结合特定类型癌细胞。

[0008] 细胞毒性药物,例如甲氨蝶呤、柔红霉素、阿霉素、长春新碱、长春碱、美法仑、丝裂霉素C和苯丁酸氮芥已被用在这样的细胞毒性偶联物中,其被连接到各种鼠单克隆抗体上。在一些情形中,药物分子通过中间载体分子被连接到抗体分子上,中间载体分子例如血清白蛋白(Garnett等,46Cancer Res.2407-2412(1986);Ohkawa等,23Cancer Immunol.h-nmunother.81-86(1986);Endo等,47Cancer Res. 1076-1080(1980)),葡聚糖(Hurwitz等,2Appl.Biochem.25-35(1980);Manabi等,34Biochem.Pharmacol.289-291(1985);Dillman等,46Cancer Res.4886-4891(1986);Shoval等,85Proc.Natl.Acad.Sci.8276-8280(1988)),或聚谷氨酸(Tsukada等,73J.Natl.Cane.Inst.721-729(1984);Kato等,27J.Med.Chem.1602-1607(1984);Tsukada等,52Br.J.Cancer111-116(1985))。

[0009] 已经显现出一些前景的特异性偶联物的例子为C242抗体和美登素衍生的DM1的偶联物,C242抗体针对CanAg,CanAg为表达在结肠直肠和胰腺瘤上的抗原(Liu等,Proc Natl

Acad Sci USA, 93:8618-8623(1996))。在体外对该偶联物的评价显示,它对表达在细胞表面上的CanAg的结合亲和力很高,其表观 K_d 值为 $3 \times 10^{-11}M$,而且它对CanAg阳性细胞的细胞毒性效力(potency)很高,其 IC_{50} 为 $6 \times 10^{-11}M$ 。此细胞毒性是抗原依赖性的,因为细胞毒性作用被过量的非偶联抗体阻断,而且因为抗原阴性细胞对该偶联物的敏感性要低大于100倍。对各自的靶细胞具有高亲和力以及具有高抗原选择性细胞毒性的抗体-DM1偶联物的其它例子包括huN901的偶联物,其为抗人CD56抗体的人源化形式;huMy9-6的偶联物,其为抗CD33抗体的人源化形式;huC242的偶联物,其为抗CanAg Muc1表位的抗体的人源化形式;huJ591的偶联物,其为抗PSMA的脱免疫抗体(deimmunized antibody);曲妥珠单抗,其为抗Her2/neu的人源化抗体;和bivatuzumab,其为抗CD44v6的人源化抗体。

[0010] 在不断改进用于治疗癌症患者的方法中,开发特异性识别特定类型癌细胞的其它的细胞毒性偶联物将是重要的。

[0011] 为了此目标,本发明涉及抗体的开发,所述抗体识别并结合表达在癌细胞表面上的分子/受体,和涉及新型细胞毒性偶联物的开发,所述偶联物包含细胞结合剂例如抗体和细胞毒性试剂,所述细胞毒性试剂特异靶向表达在癌细胞表面上的分子/受体。

[0012] 更具体而言,本发明涉及位于由癌细胞表达的Muc1粘蛋白受体上的新CA6唾液糖表位(sialoglycotope)的表征,涉及抗体的预备,优选人源化抗体,其识别Muc1粘蛋白的新CA6唾液糖表位,而且在存在细胞毒性试剂的情况下,可以被用来抑制表达CA6糖表位的细胞的生长。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明包括抗体或其表位结合片段,所述抗体特异性识别并结合Muc1粘蛋白受体的新型CA6唾液酸糖表位(sialoglycotope)。在另一个实施方案中,本发明包括人源化抗体或其表位结合片段,其识别Muc1粘蛋白受体的新型CA6唾液酸糖表位(“CA6糖表位”)。

[0015] 在优选的实施方案中,本发明包括鼠抗-CA6单克隆抗体DS6(“DS6抗体”)和DS6抗体的表面重构或人源化形式,其中,在轻链和重链中,抗体或其表位结合片段的暴露于表面的残基被取代,以更接近已知的人抗体表面。本发明的人源化抗体及其表位结合片段具有改进的性质,因为与完全的鼠形式相比,它们在其被给予的人对象中具有更少的免疫原性(或完全是非免疫原性的)。因此,本发明的人源化DS6抗体及其表位结合片段特异性识别Muc1粘蛋白受体上的新型唾液酸糖表位,即CA6糖表位,而对人是没有免疫原性的。人源化抗体及其表位结合片段可以与药物例如美登素类(maytansinoid)结合,通过将该药物定向于Muc1CA6唾液酸糖表位,形成对抗原表达细胞具有特异细胞毒性的药物前体(prodrug)。因此可以使用包含这样的抗体和小的毒性药物(例如美登素类、紫杉类(taxanes)及CC-1065类似物)的细胞毒性偶联物作治疗剂,用于治疗肿瘤,例如乳房和卵巢肿瘤。

[0016] 本发明的DS6抗体的人源化形式就以下方面在本文中被完整表征:轻链和重链可变区的各自氨基酸序列,轻链和重链可变区基因的DNA序列,CDRs的鉴定,其表面氨基酸的鉴定和其以重组方式表达的方法的公开。

[0017] 在一个实施方案中,提供人源化DS6抗体或其表位结合片段,其具有包含CDRs的重链,所述CDRs具有SEQ ID NOS:1-3所示的氨基酸序列:

[0018] S Y N M H(SEQ ID NO:1),

[0019] Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G(SEQ ID NO:2),

- [0020] G D S V P F AY(SEQ ID NO:3),
- [0021] 并具有包含CDRs的轻链,所述CDRs具有SEQ ID NOS:4-6所示的氨基酸序列:
- [0022] S A H S S V S F M H(SEQ ID NO:4),
- [0023] S T S S L A S(SEQ ID NO:5),
- [0024] Q Q R S S F P L T(SEQ ID NO:6)
- [0025] 也提供了人源化DS6抗体及其表位结合片段,其具有轻链可变区,所述轻链可变区具有这样的氨基酸序列,即,此序列与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性:
- [0026] QIVLTQSPAIMASPGKEVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSL
- [0027] ASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG
- [0028] AGTKLELKR(SEQ ID NO:7)
- [0029] EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLA
- [0030] SGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG AGTKLELKR
- [0031] (SEQ ID NO:8)。
- [0032] 同样地,提供了人源化DS6抗体及其表位结合片段,其具有重链可变区,所述重链可变区具有这样的氨基酸序列,即,此序列与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性:
- [0033] QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY
- [0034] IYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
- [0035] FCARGDSVPFAYWGQGLVTVSA(SEQ ID NO:9)
- [0036] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG
- [0037] YIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
- [0038] FCARGDSVPFAYWGQGLVTVSA(SEQ ID NO:10)
- [0039] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG
- [0040] YIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
- [0041] FCARGDSVPFAYWGQGLVTVSA(SEQ ID NO:11)。
- [0042] 在另一个实施方案中,提供了人源化DS6抗体及其表位结合片段,其具有人源化或表面重构的轻链可变区,所述轻链可变区具有对应于SEQ ID NO:8的氨基酸序列:
- [0043] EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLA
- [0044] SGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG AGTKLELKR
- [0045] (SEQ ID NO:8)。
- [0046] 同样地,提供了人源化DS6抗体及其表位结合片段,其具有人源化或表面重构的重链可变区,所述重链可变区具有分别对应于SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列:
- [0047] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG
- [0048] YIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
- [0049] FCARGDSVPFAYWGQGLVTVSA(SEQ ID NO:10)
- [0050] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG
- [0051] YIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
- [0052] FCARGDSVPFAYWGQGLVTVSA(SEQ ID NO:11)。

[0053] 本发明的人源化DS6抗体及其表位结合片段也可以包括在轻链和/或重链氨基酸残基中的取代,所述取代发生在表1中带星标的残基所定义的一个或多个位置上,所述带星标的残基代表了被发现位于CDR的5埃之内的、需要变为人残基的鼠表面构架残基(murine surface framework residues)。例如,在鼠序列(SEQ ID NO:7)中的第一氨基酸残基Q被E代替(SEQ ID NO:8),以人源化抗体。然而,由于该残基与CDR接近,可能需要回复突变为鼠残基Q,以维持抗体亲和力。

[0054] 表1

接近 CDR 的 muDS6 构架残基 (Kabat 编号)	
轻链	重链
Q1*	Q1
V3	K64*
T5	P73*
P40	S74
G57	
A60	
S67	
E81	

[0056] 这在表2中被进一步显示,其中muDS6可变区表面残基被显示,与三个最同源的人可变区表面残基比对。表1中的氨基酸残基对应于表2中有下划线的氨基酸残基。

[0057] 表2

3 个最同源的人抗体表面		
抗体	轻链	SEQ ID NO:
muDS6	<u>Q</u> VTAIPK <u>P</u> GGAS <u>R</u> E <u>K</u>	SEQ ID NO: 12
28E4	EVTATPRPGGASSEK	SEQ ID NO: 13
HAZcP	EVTGTTPRPGGDSREK	SEQ ID NO: 14
SSaPB	EVTGTTPRPGGDSREK	SEQ ID NO: 15
抗体	重链	SEQ ID NO:
muDS6	QYQALRSKKPGQQK <u>K</u> G <u>P</u> SSSEQS	SEQ ID NO: 16
28E4	QQVAVKPKKPGQQKQGTSSSEQS	SEQ ID NO: 17
HAZcP	- QVAVKPKKPGQQKQGESSEQS	SEQ ID NO: 18
SsaPB	- QVAVKPKKPGQQKQGESSEQS	SEQ ID NO: 19

[0059] 本发明进一步提供了细胞毒性偶联物,其包含(1)细胞结合剂,其识别并结合CA6糖表位,和(2)细胞毒性试剂。在细胞毒性偶联物中,细胞结合剂对CA6糖表位具有高亲和力,细胞毒性试剂对表达CA6糖表位的细胞具有高度的细胞毒性,因此本发明的细胞毒性偶联物形成了有效的杀伤剂。

[0060] 在一个优选的实施方案中,所述细胞结合剂为抗-CA6抗体或其表位结合片段,更

优选为人源化抗-CA6抗体或其表位结合片段,其中细胞毒性试剂直接地或通过可切割的或不可切割的连接子被共价连接到抗体或其表位结合片段。在更优选的实施方案中,细胞结合剂为人源化DS6抗体或其表位结合片段,细胞毒性试剂为紫杉醇(taxol)、美登素类、CC-1065或CC-1065类似物。

[0061] 在本发明优选的实施方案中,细胞结合剂为人源化抗-CA6抗体,细胞毒性试剂为细胞毒性药物,例如美登素类或紫杉烷类(taxane)。

[0062] 更优选地,细胞结合剂为人源化抗-CA6抗体DS6,细胞毒性试剂为美登素化合物,例如DM1或DM4。

[0063] 本发明也包括抑制表达CA6糖表位的细胞生长的方法。在优选的实施方案中,用于抑制表达CA6糖表位的细胞生长的方法在体内进行,并导致细胞死亡,尽管也包括在体外和离体应用。

[0064] 本发明也提供了治疗组合物,其包含细胞毒性偶联物和药物学可接受载体或赋形剂。

[0065] 本发明进一步包括使用所述治疗组合物治疗患癌的对象的方法。在优选的实施方案中,细胞毒性偶联物包含抗-CA6抗体和细胞毒性试剂。在更优选的实施方案中,细胞毒性偶联物包括人源化DS6抗体-DM1偶联物、人源化DS6抗体-DM4或人源化DS6抗体-紫杉烷偶联物,所述偶联物与药物学可接受载体或赋形剂一起被施用。

[0066] 本发明也包括试剂盒,其包括抗-CA6抗体-细胞毒性试剂偶联物和使用说明。在优选的实施方案中,抗-CA6抗体为人源化DS6抗体,细胞毒性试剂为美登素化合物,例如DM1或DM4,或紫杉烷类药物,所述说明是关于使用该偶联物来治疗患癌对象。试剂盒也包括用于制备药物学上可接受的制剂所必需的组分,例如稀释剂——如果偶联物是处于冻干状态或浓缩形式的话,并且包括用于施用该制剂的组分。

[0067] 本发明也包括特异性结合和识别CA6糖表位的抗体的衍生物。在优选的实施方案中,通过表面重构或人源化结合CA6糖表位的抗体而制备抗体衍生物,其中衍生物具有降低的对宿主的免疫原性。

[0068] 本发明进一步提供了人源化抗体或其片段,其进一步被标记以便用于研究或诊断应用中。在优选的实施方案中,所述标记为放射性标记、荧光团、生色团、显像剂或金属离子。

[0069] 也提供用于诊断的方法,其中所述标记的人源化抗体或其表位结合片段被施给怀疑患癌的受体,并测量或监测标记在对象体内的分布。

[0070] 本发明也提供了用于治疗患癌对象的方法,通过施用本发明的人源化抗体偶联物——或者单独施用或者与其它细胞毒性试剂或治疗剂联合施用——来完成。所述癌可以是例如乳癌、结肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌、骨肉瘤、子宫颈癌、前列腺癌、肺癌、滑膜癌、胰腺癌、其中CA6被表达的肉瘤或肿瘤的一种或多种,或待确定的其它癌,其中CA6糖表位被显著表达。

[0071] 除非有其它说明,本文所引用的所有参考文献和专利被引入作为参考。

[0072] 本发明还涉及以下项目:

[0073] 项目1. 抗体或其表位结合片段,包含至少一个互补决定区,所述互补决定区具有选自SEQ ID NOS:1-6的氨基酸序列:

SYNMH (SEQ ID NO: 1)
 YIYPGNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 2)
 GDSVPFAY (SEQ ID NO: 3)
 [0074] SAHSSVSFMH (SEQ ID NO: 4)
 STSSLAS (SEQ ID NO: 5)
 QQRSSFPLT (SEQ ID NO: 6)。

[0075] 项目2.抗体或其表位结合片段,包含至少一个重链可变区或其片段和至少一个轻链可变区或其片段,其中所述至少一个重链可变区或其片段包含三个有次序的互补决定区,所述互补决定区分别具有由SEQ ID NOS:1-3所示的氨基酸序列:

[0076] SYNMH (SEQ ID NO:1)

[0077] YIYPGNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:2)

[0078] GDSVPFAY (SEQ ID NO:3)

[0079] 并且其中所述至少一个轻链可变区或其片段包含三个有次序的互补决定区,所述互补决定区分别具有由SEQ ID NOS:4-6所示的氨基酸序列:

[0080] SAHSSVSFMH (SEQ ID NO:4)

[0081] STSSLAS (SEQ ID NO:5)

[0082] QQRSSFPLT (SEQ ID NO:6)。

[0083] 项目3.项目2所述的抗体或其表位结合片段,其中所述轻链可变区或其片段与由SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示的氨基酸具有至少90%的序列同一性:

[0084] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSL

[0085] ASGVPARFGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0086] AGTKLELKR (SEQ ID NO:7)

[0087] EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLA

[0088] SGVPARFGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG AGTKLELKR

[0089] (SEQ ID NO:8)。

[0090] 项目4.项目3所述的抗体或其表位结合片段,其中所述轻链可变区或其片段与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性。

[0091] 项目5.项目3所述的抗体或其表位结合片段,其中所述轻链可变区或其片段具有SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0092] 项目6.项目2所述的抗体或其表位结合片段,其中所述重链可变区或其片段与选自SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11的氨基酸具有至少90%的序列同一性:

[0093] QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY

[0094] IYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0095] FCARGDSVPFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:9)

[0096] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0097] YIYPGNGATNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0098] FCARGDSVPFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:10)

[0099] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0100] YIYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

- [0101] FCARGDSVPFAYWGQGLTVSA(SEQ ID NO:11)。
- [0102] 项目7.项目6所述的抗体或其表位结合片段,其中所述重链可变区或其片段与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性。
- [0103] 项目8.项目6所述的抗体或其表位结合片段,其中所述重链可变区或其片段具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列。
- [0104] 项目9.编码项目1、2、3或6中任何一项的抗体或其表位结合片段的多核苷酸。
- [0105] 项目10.编码项目1、2、3或6中任何一项的抗体或其表位结合片段的轻链或重链的多核苷酸。
- [0106] 项目11.载体,包含项目9所述的多核苷酸。
- [0107] 项目12.载体,包括项目10所述的多核苷酸。
- [0108] 项目13.项目11所述的载体,其中所述载体为表达所述抗体或其表位结合片段的表达载体。
- [0109] 项目14.项目12所述的载体,其中所述载体为表达所述抗体或其表位结合片段的表达载体。
- [0110] 项目15.结合CA6糖表位的人源化的啮齿类动物抗体或其表位结合片段,其通过表面重构的方法产生,包括:
- [0111] (a)由一系列的啮齿类动物和人抗体重链和轻链可变区的x射线晶体结构获得的相对可及性分布,生成位置比对,从而产生一组重链和轻链可变区骨架表面暴露位置,其中所有的啮齿类动物和人可变区的比对位置有至少大约98%是相同的;
- [0112] (b)使用在所述步骤(a)中产生的所述那组重链和轻链可变区骨架表面暴露位置,为啮齿类动物抗体或其表位结合片段定义一组重链和轻链可变区骨架表面暴露氨基酸残基;
- [0113] (c)从人抗体氨基酸序列鉴定出一组重链和轻链可变区骨架表面暴露氨基酸残基,其与在所述步骤(b)中定义的所述那组啮齿类动物表面暴露氨基酸残基最接近为相同;
- [0114] (d)在所述啮齿类动物或其表位结合片段的可变区骨架氨基酸序列中,用在步骤(c)中鉴定出的所述重链和轻链可变区骨架表面暴露氨基酸残基组取代在所述步骤(b)中定义的所述重链和轻链可变区骨架表面暴露氨基酸残基组;
- [0115] (e)构建所述啮齿类动物抗体或其表位结合片段的所述可变区的三维模型,以及由在所述步骤(d)中指出的取代而产生的所述啮齿类动物抗体或其表位结合片段的所述可变区的三维模型;
- [0116] (f)比较在所述步骤(e)中构建的所述三维模型,鉴定来自在所述步骤(b)或(c)中鉴定出的所述组中的任何氨基酸残基,所述残基位于所述啮齿类动物抗体或其表位结合片段的互补决定区的任何残基的任何原子的5Å之内;
- [0117] (g)将在步骤(f)中鉴定出的任何残基从人变为原始的啮齿类动物氨基酸残基,由此定义出一组人源化的表面暴露氨基酸残基;
- [0118] (h)用在所述步骤(g)中定义的那组人源化可变区骨架表面暴露氨基酸残基代替在所述步骤(b)中定义的那组啮齿类动物抗体可变区骨架表面暴露氨基酸残基,和;
- [0119] (i)产生结合CA6糖表位的所述人源化的啮齿类动物抗体或其表位结合片段。
- [0120] 项目16.项目15所述的人源化的啮齿类动物抗体或其表位结合片段,其中所述人

源化的啮齿类动物抗体或其表位结合片段是表位结合片段。

[0121] 项目17.项目16所述的人源化的啮齿类动物抗体或其表位结合片段,其中所述表位结合片段选自Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd片段、单链Fvs片段、单链抗体、二硫连接的Fvs片段和包含V_L或V_H结构域的片段。

[0122] 项目18.项目15或16所述的人源化啮齿类动物抗体或其表位结合片段,其中所述表面暴露的氨基酸残基是那些其溶剂可及性大于30%的残基。

[0123] 项目19.项目15所述的人源化啮齿类动物抗体或其表位结合片段,包含至少一个互补决定区,所述互补决定区具有选自SEQ ID NOS:1-6的氨基酸序列:

	SYNMH	(SEQ ID NO: 1)
	YIYPGNGATNYNQKFKG	(SEQ ID NO: 2)
	GDSVPFAY	(SEQ ID NO: 3)
[0124]	SAHSSVSFMH	(SEQ ID NO: 4)
	STSSLAS	(SEQ ID NO: 5)
	QQRSSFPLT	(SEQ ID NO: 6) 。

[0125] 项目20.项目15所述的人源化啮齿类动物抗体或其表位结合片段,包含至少一个重链可变区或其片段和至少一个轻链可变区或其片段,其中所述至少一个重链可变区或其片段包含三个有次序的互补决定区,其分别具有由SEQ ID NOS:1-3所示的氨基酸序列:

[0126] S Y N M H(SEQ ID NO:1)

[0127] Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G(SEQ ID NO:2)

[0128] G D S V P F A Y(SEQ ID NO:3)

[0129] 并且其中所述至少一个轻链可变区或其片段包含三个有次序的互补决定区,其分别具有由SEQ ID NOS:4-6所示的氨基酸序列:

[0130] S A H S S V S F M H(SEQ ID NO:4)

[0131] S T S S L A S(SEQ ID NO:5)

[0132] Q Q R S S F P L T(SEQ ID NO:6)。

[0133] 项目21.项目15所述的人源化啮齿类动物抗体或其表位结合片段,包含具有SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区:

[0134] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSL

[0135] ASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0136] AGTKLELKR(SEQ ID NO:7)

[0137] EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLA

[0138] SGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELKR

[0139] (SEQ ID NO:8)。

[0140] 项目22.项目15所述的人源化啮齿类动物抗体或其表位结合片段,包含具有选自SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链可变区:

[0141] QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY

[0142] IYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0143] FCARGDSVPFAYWGQGLTVTVSA(SEQ ID NO:9)

[0144] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0145] YIYPGNGATNYNQKFQGGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0146] FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA(SEQ ID NO:10)

[0147] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0148] YIYPGNGATNYNQKFQGGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0149] FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA(SEQ ID NO:11)。

[0150] 项目23.改进的抗体或其表位结合片段,其结合表达CA6糖表位的细胞,所述改进的抗体或其表位结合片段通过下述而产生:

[0151] (a)提供编码抗体或其表位结合片段的DNA多核苷酸,所述抗体或其表位结合片段包含至少一个选自SEQ ID NOs:1到11的序列:

SYNMH (SEQ ID NO:1)

YIYPGNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:2)

GDSVPFAY (SEQ ID NO:3)

[0152] **SAHSSVSFMH** (SEQ ID NO:4)

STSSLAS (SEQ ID NO:5)

QQRSSFPLT (SEQ ID NO:6)

[0153] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQKPGTSPKLWIYSTSSL

[0154] ASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0155] AGTKLELKR(SEQ ID NO:7)

[0156] EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQKPGTSPKLWIYSTSSLA

[0157] SGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELKR

[0158] (SEQ ID NO:8)

[0159] QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY

[0160] IYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0161] FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA(SEQ ID NO:9)

[0162] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0163] YIYPGNGATNYNQKFQGGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0164] FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA(SEQ ID NO:10)

[0165] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0166] YIYPGNGATNYNQKFQGGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0167] FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA(SEQ ID NO:11);

[0168] (b)将至少一个核苷酸突变、缺失或插入引入到(a)的所述DNA多核苷酸,致使由所述DNA多核苷酸编码的氨基酸序列的至少一个残基被改变;

[0169] (c)表达由(b)的DNA多核苷酸编码的抗体或抗体片段,和;

[0170] (d)筛选所述被表达的抗体或抗体片段在与表达CA6糖表位的细胞的结合亲和力中的改善,由此产生改进的抗体或其表位结合片段。

[0171] 项目24.项目23所述的改进的抗体或其表位结合片段,其中所述至少一个核苷酸突变、缺失或插入是通过选自寡核苷酸介导的定点诱变、盒式诱变、易错聚合酶链反应、DNA重排和使用大肠杆菌增变株的方法而制备的。

[0172] 项目25.细胞毒性偶联物,其包含细胞结合剂和细胞毒性试剂,其中所述细胞结合

剂结合CA6糖表位。

[0173] 项目26.项目25所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞结合剂和所述细胞毒性试剂是共价连接的。

[0174] 项目27.根据项目25所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞结合剂和所述细胞毒性试剂是通过PEG连接基团共价连接的。

[0175] 项目28.根据项目25所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞结合剂和所述细胞毒性试剂是通过所述细胞毒性试剂的巯基或二硫官能基团共价连接的。

[0176] 项目29.根据项目25所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞结合剂选自多克隆抗体、单克隆抗体、抗体片段、人源化或表面重构抗体、抗体的功能等同物、改进的抗体、干扰素、淋巴因子、激素、生长因子、转铁蛋白和维生素。

[0177] 项目30.根据项目29所述的细胞毒性偶联物,其中所述抗体片段选自Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd片段、单链Fvs片段、单链抗体、二硫连接的Fvs片段和包含VL或VH结构域的片段。

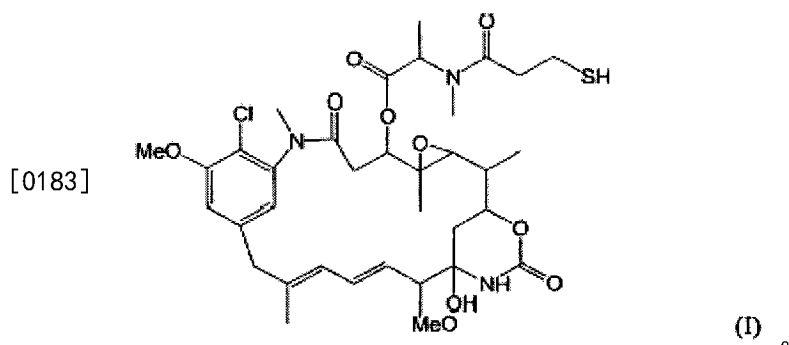
[0178] 项目31.根据项目25所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞结合剂是抗CA6单克隆抗体或其表位结合片段。

[0179] 项目32.根据项目25所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞结合剂是鼠抗CA6单克隆抗体DS6或其表位结合片段。

[0180] 项目33.根据项目25所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞结合剂是鼠抗CA6 单克隆抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式。

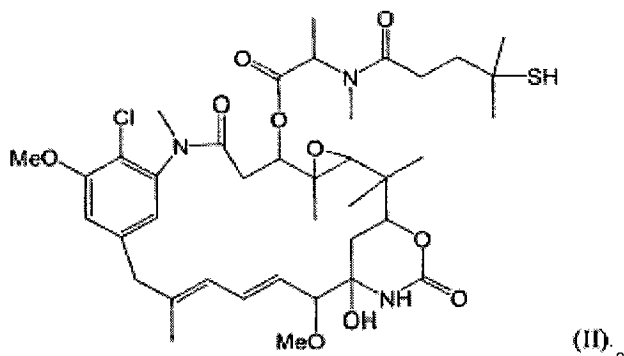
[0181] 项目34.根据项目25所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞毒性试剂选自美登素类化合物、紫杉烷类化合物、CC-1065化合物、海兔毒肽化合物、柔红霉素化合物和阿霉素化合物。

[0182] 项目35.根据项目34所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞毒性试剂是式(I)的美登素DM1:



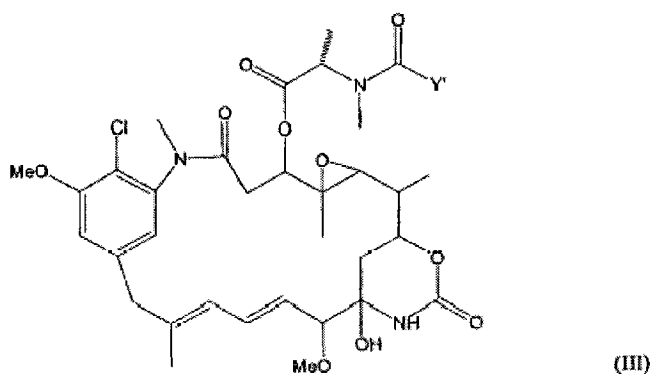
[0184] 项目36.根据项目34所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞毒性试剂是式(II)的美登素DM4:

[0185]



[0186] 项目37. 根据项目34所述的细胞毒性偶联物, 其中所述细胞毒性试剂是式(III)的美登素:

[0187]



[0188] 其中:

[0189] Y' 代表

[0190] $(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_pC=C_qA_r(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$, 其中:

[0191] R_1 和 R_2 每个独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基, 此外, R_2 可以是H;

[0192] A、B、D为具有3-10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或者取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0193] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0194] 1、m、n、o、p、q、r、s和t每个独立为0或从1到5的整数, 条件是1、m、n、o、p、q、r、s和t的至少两个不同时为0; 和

[0195] Z为H、SR或-COR, 其中R为具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基, 具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基, 或简单的或取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基。

[0196] 项目38. 根据项目37所述的细胞毒性偶联物, 其中 R_1 是H, R_2 是甲基, Z是H。

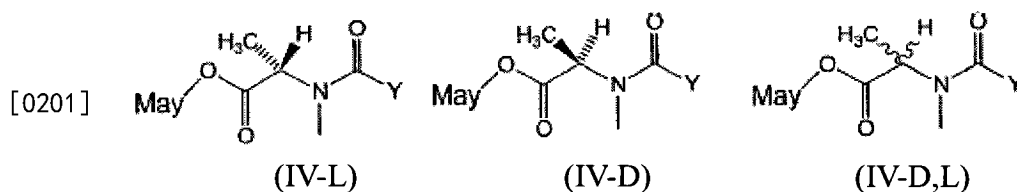
[0197] 项目39. 根据项目37所述的细胞毒性偶联物, 其中 R_1 和 R_2 是甲基, Z是H。

[0198] 项目40. 根据项目37所述的细胞毒性偶联物, 其中 R_1 是H, R_2 是甲基, Z是 $-SCH_3$ 。

[0199] 项目41. 根据项目37所述的细胞毒性偶联物, 其中 R_1 和 R_2 是甲基, Z是 $-SCH_3$ 。

[0200] 项目42. 根据项目34所述的细胞毒性偶联物, 其中所述细胞毒性试剂是选自式

(IV-L)、(IV-D)和(IV-D,L)的美登素:



[0202] 其中:

[0203] Y代表 $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

[0204] 其中:

[0205] R_1 和 R_2 每个独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳香基或杂环烷基,此外, R_2 可以是H;

[0206] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳香基或杂环烷基;

[0207] 1、m和n每个独立为1到5的整数,此外,n可以是0;

[0208] Z为H、SR或 $-\text{COR}$,其中R为具有1到10个碳原子的线性或支链烷基或烯基、具有3到10个碳原子的环烷基或烯基,或简单的或取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基;和

[0209] May代表美登素类,其具有在C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处的侧链。

[0210] 项目43.根据项目42所述的细胞毒性偶联物,其中 R_1 为H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m每个为1,n为0,Z为H。

[0211] 项目44.根据项目42所述的细胞毒性偶联物,其中 R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 每个为H,1和m为1,n为0和Z为H。

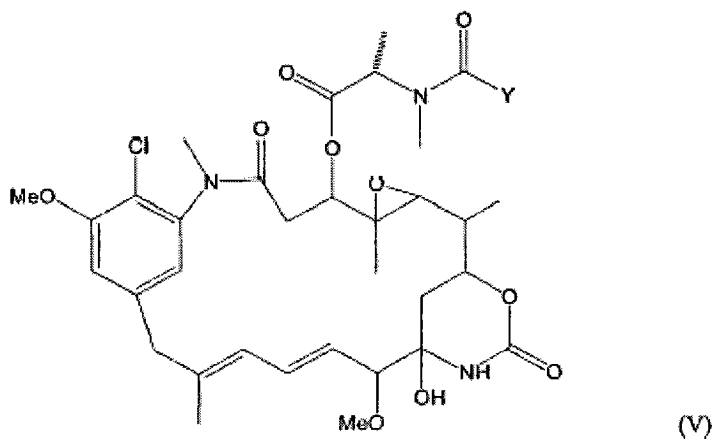
[0212] 项目45.根据项目42所述的细胞毒性偶联物,其中 R_1 为H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m每个为1,n为0和Z为 $-\text{SCH}_3$ 。

[0213] 项目46.根据项目42所述的细胞毒性偶联物,其中 R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 每个为H,1和m为1,n为0和z为 $-\text{SCH}_3$ 。

[0214] 项目47.根据项目42所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞毒性偶联物由式(IV-L)表示。

[0215] 项目48.根据项目34所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞毒性试剂是式(V)的美登素:

[0216]



[0217] 其中:

[0218] Y代表 $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

[0219] 其中:

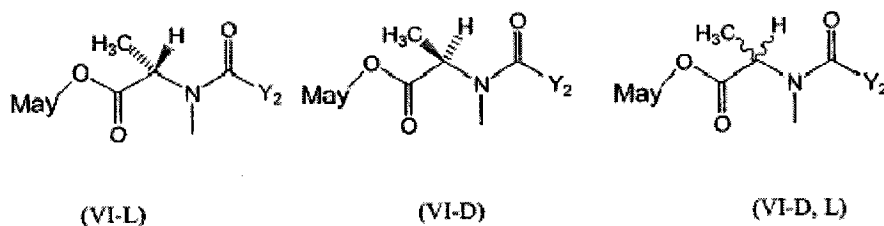
[0220] R_1 和 R_2 每个独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基,此外, R_2 可以是H;[0221] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0222] 1、m和n每个独立为1到5的整数,此外,n可以是0;和

[0223] Z为H、SR或 $-\text{COR}$,其中R为具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基,或简单的或取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基。[0224] 项目49.根据项目48所述的细胞毒性偶联物,其中 R_1 为H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m每个为1,n为0和Z为H。[0225] 项目50.根据项目48所述的细胞毒性偶联物,其中 R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 每个为H,1和m为1,n为0和Z为H。[0226] 项目51.根据项目48所述的细胞毒性偶联物,其中 R_1 为H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m每个为1,n为0和Z为 $-\text{SCH}_3$ 。[0227] 项目52.根据项目48所述的细胞毒性偶联物,其中 R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 每个为H,1和m为1,n为0和Z为 $-\text{SCH}_3$ 。

[0228] 项目53.根据项目34所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞毒性试剂是选自式(VI-L)、(VI-D)和(VI-D,L)的美登素:

[0229]



[0230] 其中:

[0231] Y_2 代表 $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$,

[0232] 其中:

[0233] R_1 和 R_2 每个独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基,此外, R_2 可以是H;

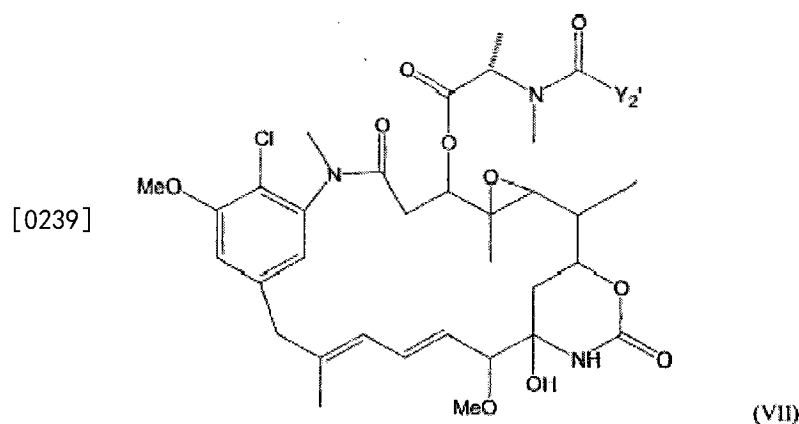
[0234] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0235] 1、m和n每个独立为1到5的整数,此外,n可以是0;

[0236] Z_2 为SR或-COR,其中R为具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基,或简单的或取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基;和

[0237] May为美登素类。

[0238] 项目54.根据项目34所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞毒性试剂是式(VII)的美登素:



[0240] 其中:

[0241] Y_2' 代表

[0242] $(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qAr(CR_5CR_6)_mDu(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2'$

[0243] 其中:

[0244] R_1 和 R_2 每个独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性或支链烷基或烯基、具有3到10个碳原子的环烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基,此外, R_2 可以是H;

[0245] A、B和D每个独立为具有3到10个碳原子的环烷基或环烯基,简单的或取代的芳基,或杂环芳香基或杂环烷基;

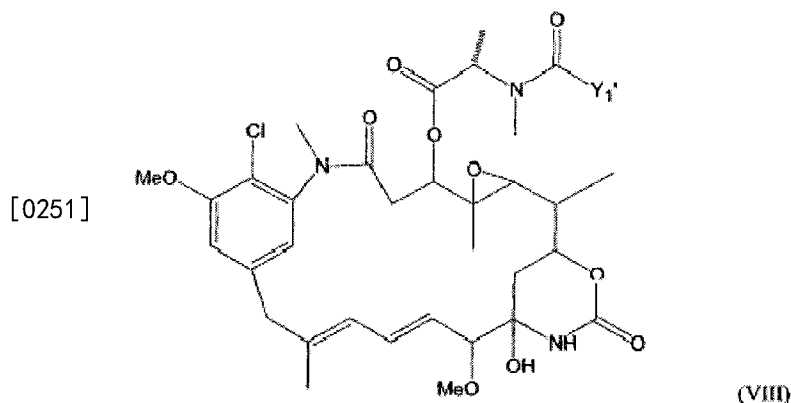
[0246] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0247] 1、m、n、o、p、q、r、s和t每个独立为0或1到5的整数,条件是1、m、n、o、p、q、r、s和t的至少两个不同时为零;和

[0248] Z_2 为SR或-COR,其中R为具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基,或简单的或取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基。

[0249] 项目55.根据项目54的细胞毒性偶联物,其中 R_1 是H, R_2 是甲基。

[0250] 项目56. 根据项目34所述的细胞毒性偶联物, 其中所述细胞毒性试剂是式(VIII)的美登素:



[0252] 其中:

[0253] Y_1' 代表

[0254] $(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qAr(CR_5CR_6)_mDu(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$,

[0255] 其中:

[0256] A、B和D每个独立为具有3到10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳香基或杂环烷基;

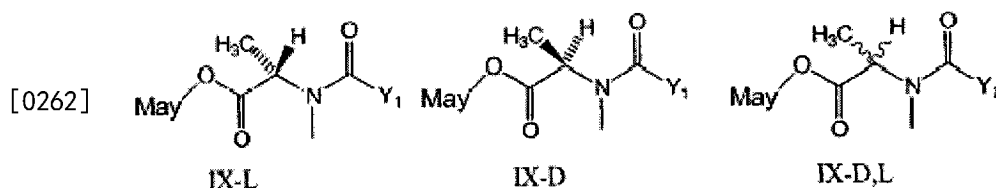
[0257] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;和

[0258] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 每个独立为0或1到5的整数, 条件是 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 的至少两个不同时为零。

[0259] 项目57. 根据项目56所述的细胞毒性偶联物, 其中 R_1 是H, R_2 是甲基。

[0260] 项目58. 根据项目56所述的细胞毒性偶联物, 其中 R_1 和 R_2 是甲基。

[0261] 项目59. 根据项目34所述的细胞毒性偶联物, 其中所述细胞毒性试剂是选自式(IX-L)、(IX-D)和(IX-D,L)的美登素:



[0263] 其中:

[0264] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$,

[0265] 其中:

[0266] R_1 和 R_2 每个独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳香基或杂环烷基, 此外, R_2 可以是H;

[0267] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环

烷基；

[0268] 1、m和n每个独立为1到5的整数，此外，n可以是0；和

[0269] May代表美登醇，其具有在C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20脱甲基处的侧链。

[0270] 项目60.根据项目59所述的细胞毒性偶联物，其中R₁为H和R₂为甲基，或R₁和R₂为甲基。

[0271] 项目61.根据项目59所述的细胞毒性偶联物，其中R₁为H，R₂为甲基，R₅、R₆、R₇和R₈每个为H；1和m每个为1；n为0。

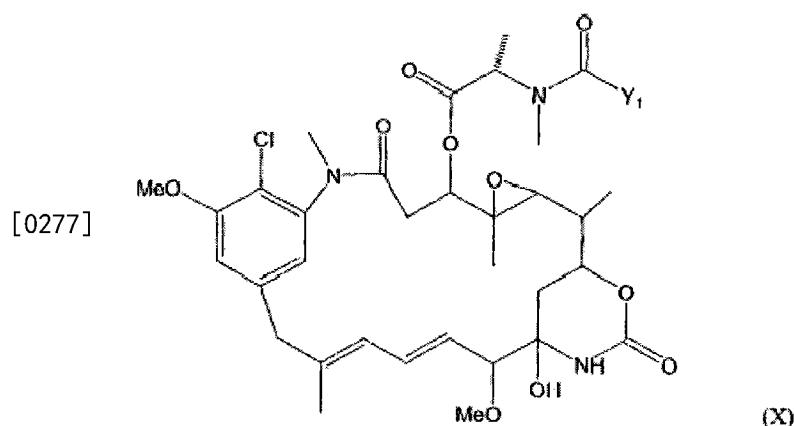
[0272] 项目62.根据项目59所述的细胞毒性偶联物，其中R₁和R₂为甲基；R₅、R₆、R₇和R₈每个为H；1和m为1；n为0。

[0273] 项目63.根据项目60所述的细胞毒性偶联物，其中美登素类由式(IX-L)表示。

[0274] 项目64.根据项目61所述的细胞毒性偶联物，其中美登素类由式(IX-L)表示。

[0275] 项目65.根据项目62所述的细胞毒性偶联物，其中美登素类由式(IX-L)表示。

[0276] 项目66.根据项目34所述的细胞毒性偶联物，其中所述细胞毒性试剂是式(X)的美登素：



[0278] 其中：

[0279] Y₁代表(CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂S⁻，

[0280] 其中：

[0281] R₁和R₂每个独立为CH₃、C₂H₅、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基，此外，R₂可以是H；

[0282] R₃、R₄、R₅、R₆、R₇和R₈每个独立为H、CH₃、C₂H₅、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基；

[0283] 1、m和n每个独立为1到5的整数，此外，n可以是0；和

[0284] May代表美登醇，其具有在C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20脱甲基处的侧链。

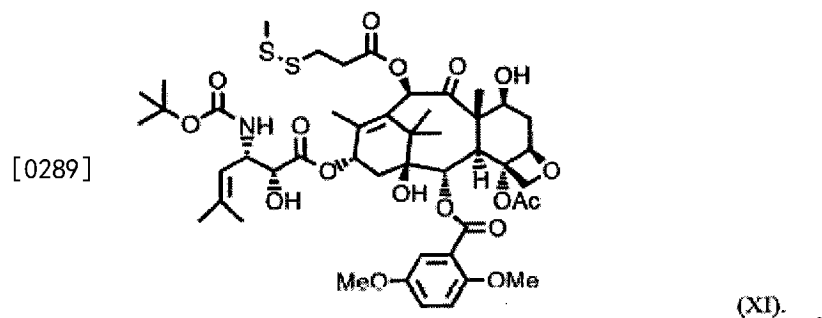
[0285] 项目67.根据项目66所述的细胞毒性偶联物，其中R₁为H，R₂为甲基，R₅、R₆、R₇和R₈每个为H；1和m每个为1；n为0。

[0286] 项目68.根据项目66所述的细胞毒性偶联物，其中其中R₁和R₂为甲基；R₅、R₆、R₇和R₈每个为H；1和m为1；n为0。

[0287] 项目69.根据项目25所述的细胞毒性偶联物，其中所述细胞结合剂为鼠抗CA6单克

隆抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式,其中所述细胞毒性试剂是DM1或DM4。

[0288] 项目70.根据项目34所述的细胞毒性偶联物,其中所述细胞毒性试剂是下式的紫杉烷类:



[0290] 项目71.用于抑制表达CA6糖表位的细胞的生长的方法,包括用项目25所述的细胞毒性偶联物接触表达CA6糖表位的细胞。

[0291] 项目72.根据项目71所述的用于抑制表达CA6糖表位的细胞的生长的方法,其中所述细胞毒性偶联物包含抗CA6单克隆抗体或其表位结合片段作为细胞结合剂,和DM1或DM4作为细胞毒性试剂。

[0292] 项目73.根据项目71所述的用于抑制表达CA6糖表位的细胞的生长的方法,其中所述细胞毒性偶联物包含抗CA6单克隆抗体或其表位结合片段作为细胞结合剂,和紫杉烷类作为细胞毒性试剂。

[0293] 项目74.根据项目71所述的用于抑制表达CA6糖表位的细胞的生长的方法,其中所述细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和DM1或DM4作为细胞毒性试剂。

[0294] 项目75.根据项目71所述的用于抑制表达CA6糖表位的细胞的生长的方法,其中所述细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和紫杉烷类作为细胞毒性试剂。

[0295] 项目76.根据项目71所述的用于抑制表达CA6糖表位的细胞的生长的方法,其中所述抑制生长导致细胞的死亡。

[0296] 项目77.根据项目71所述的用于抑制表达CA6糖表位的细胞的生长的方法,其中所述方法在体内、在体外或离体进行。

[0297] 项目78.治疗组合物,包含项目25的细胞毒性偶联物和药物学可接受的载体或赋形剂。

[0298] 项目79.根据项目78所述的治疗组合物,其中所述细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和DM1或DM4作为细胞毒性试剂。

[0299] 项目80.根据项目78所述的治疗组合物,其中所述细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和紫杉烷类作为细胞毒性试剂。

[0300] 项目81.治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括对患有癌症的对象施用治疗有效量的项目78所述的治疗组合物,从而治疗患有癌症的对象。

[0301] 项目82.根据项目81所述的治疗患有癌症的对象的方法,其中所述细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和DM1或DM4作为细胞毒性试剂。

[0302] 项目83.根据项目81所述的治疗患有癌症的对象的方法,其中所述细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和紫杉烷类 作为细胞毒性试剂。

[0303] 项目84.根据项目81所述的治疗患有癌症的对象的方法,其中所述癌症为其中CA6糖表位被表达或过量表达的癌症。

[0304] 项目85.根据项目81所述的治疗患有癌症的对象的方法,其中癌症选自浆液性卵巢癌、子宫内膜卵巢癌、子宫颈瘤、子宫内膜瘤、外阴瘤、乳腺癌、胰腺瘤和膀胱上皮瘤。

[0305] 项目86.试剂盒,包含项目25所述的细胞毒性偶联物,还包含:

[0306] a)隔离容器,其包含所述细胞毒性偶联物;和

[0307] b)用于使用所述试剂盒的说明书。

[0308] 项目87.根据项目86所述的试剂盒,其中所述细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和DM1或DM4作为细胞毒性试剂。

[0309] 项目88.根据项目86所述的试剂盒,其中所述细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和紫杉烷类作为细胞毒性试剂。

[0310] 项目89.根据项目86所述的试剂盒,其中所述说明书包括用于治疗患有癌症的对象的说明。

[0311] 项目90.根据项目89所述的试剂盒,其中所述癌症为其中CA6糖表位被表达或过量表达的癌症。

[0312] 项目91.根据项目90所述的试剂盒,其中所述癌症选自浆液性卵巢癌、子宫内膜卵巢癌、子宫颈瘤、子宫内膜瘤、外阴瘤、乳腺癌、胰腺瘤和膀胱上皮瘤。

[0313] 92.试剂盒,包含项目78所述的治疗组合物,还包含:

[0314] a)隔离容器,其中包含所述治疗组合物;和

[0315] b)用于使用所述试剂盒的说明书。

[0316] 项目93.根据项目92所述的试剂盒,其中所述治疗组合物的细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和DM1或DM4作为细胞毒性试剂。

[0317] 项目94.根据项目92所述的试剂盒,其中所述治疗组合物的细胞毒性偶联物包含鼠抗体DS6或其表位结合片段的人源化形式作为细胞结合剂,和紫杉烷类作为细胞毒性试剂。

[0318] 项目95.根据项目92所述的试剂盒,其中所述说明书包括用于治疗患有癌症的对象的说明。

[0319] 项目96.根据项目95所述的试剂盒,其中所述癌症为其中CA6糖表位被表达或过量表达的癌症。

[0320] 项目97.根据项目96所述的试剂盒,其中所述癌症选自浆液性卵巢癌、子宫内膜卵巢癌、子宫颈瘤、子宫内膜瘤、外阴瘤、乳腺癌、胰腺瘤和膀胱上皮瘤。

附图说明

[0321] 图1显示了用以测定DS6抗体结合所选择的癌细胞株表面的能力的研究的结果。通过流式细胞术测量用DS6一抗和FITC偶联的抗鼠IgG(H+L)二抗温育的细胞株的荧光。DS6抗

体结合Caov-3(图1A)和T-47D(图1B)细胞分别具有1.848nM和2.586nM的表观K_d。抗原阴性细胞株,SK-OV-3(图1C)和Colo205(图1D)显示无抗原特异性结合。

[0322] 图2显示了表位表达的点印迹分析的结果。Caov-3(图2A&图2B)、SKMEL28(图2C)和Colo205(图2D)细胞裂解物被分别点到硝化纤维膜上,然后用链霉菌蛋白酶(pronase)、蛋白酶K、神经氨酸酶或过碘酸温育。然后用DS6抗体(图2A)、CM1抗体(图2B)、R24抗体(图2C)或C242抗体(图2D)免疫印迹该膜。

[0323] 图3显示了DS6抗原表达的点印迹分析的结果。将Caov-3细胞裂解物各自点到PVDF膜上,然后在三氟甲磺酸(TFMSA)存在的条件下温育。然后用CM1抗体(1&2)或DS6抗体(3&4)免疫印迹该膜。

[0324] 图4显示了DS6抗原的糖表位分析的结果。将用N-聚糖酶("N-gly")、O-聚糖酶("O-gly")和/或唾液酸酶("S")预处理的Caov-3裂解物点样至硝化纤维上,然后用DS6抗体或CM1抗体(Muc-1VNTR)进行免疫印迹。

[0325] 图5显示了DS6抗原的蛋白质印迹分析的结果。细胞裂解物用DS6抗体进行免疫沉淀("IP")和免疫印迹。抗原对应于大于250kDa的蛋白条带,如在抗原阳性Caov-3(图5A和图5B)和T47D(图5C)细胞中观察到的。抗原阴性SK-OV-3(图5D)和Colo205(图5E)细胞系不显示此条带。免疫沉淀反应之后,用(图5A)神经氨酸酶("N")或(图5B)过碘酸("PA")温育Caov-3细胞裂解物的蛋白质G珠子。在同一凝胶上分析抗体("α")、IP前("Lys")和IP后穿流物("FT")裂解物对照。也用N-聚糖酶("N-gly")、O-聚糖酶("O-gly")和/或唾液酸酶("S")温育Caov-3免疫沉淀物(请见图5F),其中用生物素化-DS6和链霉亲和素-HRP探查印迹。

[0326] 图6显示了DS6抗体和CM1抗体在Caov-3(图6A)和HeLa(图6B)细胞裂解物上的免疫沉淀反应和/或免疫印迹的结果。叠加CM1和DS6蛋白印迹信号,表明DS6抗原在Muc1蛋白上。在HeLa裂解物中,Muc1双产物来自于Muc1的表达,该表达由串连重复数目不同的不同等位基因指导。

[0327] 图7显示了DS6抗体夹心ELISA设计(图7A)和标准曲线(图7B)。使用已知浓度的商业可得的CA15-3标准(其中1CA15-3单位=1DS6单位)产生标准曲线。

[0328] 图8显示了定量ELISA标准曲线。使用已知浓度的生物素-DS6,其或者由板上的羊抗鼠IgG(图8A)捕获,或直接结合到ELISA板上(图8B),测定检测抗体(链霉亲和素-HRP/生物素-DS6)信号的标准曲线(图8C)。

[0329] 图9显示了鼠DS6抗体的轻链(图9A)和重链(图9B)可变区的cDNA和氨基酸序列。每个序列中的三个CDR被加以下划线(Kabat定义)。

[0330] 图10显示了按照Kabat定义确定的鼠DS6抗体的轻链(图10A)和重链(图10B)CDRs。对于重链CDRs,AbM建模软件产生稍微不同的定义(图10C)。

[0331] 图11显示了鼠DS6抗体的轻链("muDS6LC")(SEQ ID NO:7的1-95残基)和重链("muDS6HC")(SEQ ID NO:9的1-98残基)氨基酸序列,它们与IgV?ap4(SEQ ID NO:23)和IgVh J558.41(SEQ ID NO:24)基因的胚系序列进行比对(align)。灰色表示序列差异。

[0332] 图12显示了在Brookhaven数据库中具有解析结构(solved structure)文件的10个轻链和重链抗体序列,它们与鼠DS6(muDS6)轻链("muDS6LC")和重链("muDS6HC")序列最同源。以最多同源到最少同源的顺序排列这些序列。

[0333] 图13显示了用于预测鼠DS6抗体轻链可变区的哪些骨架残基

(frameworkresidues)为表面可及的表面可及性(surface accessibility)数据和计算。具有25-35%的平均表面可及性的位置被标记('??*'),它们要经历第二轮分析。DS6抗体轻链可变区(图13A)和重链可变区(图13B)。

[0334] 图14显示了prDS6v1.0哺乳动物表达质粒图。该质粒被用来建立和表达重组嵌合的和人源化的DS6抗体。

[0335] 图15显示了鼠("muDS6")和人源化("huDS6")(v1.0&v1.2)DS6抗体轻链(图15A)和重链(图15B)可变结构域的氨基酸序列。

[0336] 图16显示了人源化DS6抗体("huDS6")(v1.0和v1.2)的轻链可变区的cDNA和氨基酸序列。

[0337] 图17显示了人源化DS6抗体v1.0(图17A)和v1.2(图17B)的重链可变区的cDNA和氨基酸序列。

[0338] 图18显示了来自在WISH细胞上进行的分析的muDS6和huDS克隆流式细胞术结合曲线。(图18A)嵌合,v1.0和v1.2人DS6克隆的结合亲和力($K_d=3.15, 3.71$ 和 4.20nM)与(图18B)裸DS6和生物素化鼠DS6($K_d=1.93$ 和 2.80nM)进行比较。

[0339] 图19显示了huDS6抗体与muDS6的竞争结合测定的结果。(图19A)用生物素-muDS6和链霉亲和素-DTAF温育WISH细胞,产生表观 K_d 为 6.76nM 的结合曲线。(图19B)变化浓度的裸muDS6、huDS6v1.0和v1.2与 2nM 生物素-muDS6和链霉亲和素-DTAF二级试剂混合。

[0340] 图20显示了未偶联的DS6抗体和DS6抗体-DM1偶联物的结合亲和力的测定结果。结果显示,DM1偶联没有不利地影响抗体的结合亲和力。DS6抗体-DM1偶联物的表观 K_d (3.902nM)("DS6-DM1")较裸抗体(2.020nM)("DS6")稍大。

[0341] 图21显示了在抗鼠IgG(H+L)DM1偶联物(2°Ab-DM1)存在或缺乏的情况下,使用DS6抗体进行的间接细胞存活率测定的结果。仅在存在二级偶联物(secondaryconjugate)("DS6+ 2°Ab-DM1 ")的情况下,以依赖于DS6抗体的方式杀死抗原阳性Caov-3细胞($\text{IC}_{50}=424.9\text{pM}$)。

[0342] 图22显示了DS6抗体和人源化DS6抗体的补体依赖性细胞毒性(CDC)测定的结果。结果表明,在HPAC(图22A)和ZR-75-1(图22B)细胞上,不存在DS6抗体或人源化DS6抗体的CDC介导效应(mediated effect)。

[0343] 图23显示了DS6抗体-DM1偶联物和游离的美登素在体外的细胞毒性测定的结果。在集落生成试验(clonogenic assay)中,将DS6抗原阳性卵巢(图23A)、乳房(图23B)、子宫颈(图23C)和胰腺(图23D)癌细胞系连续暴露于DS6抗体-DM1偶联物,测试了细胞毒性(左图)。通过72h暴露于游离的美登素,类似地测定了这些细胞系的美登素敏感性(右图)。被测试的卵巢癌细胞系是OVCAR5、TOV-21G、Caov-4和Caov-3。被测试的乳腺癌细胞系是T47D、BT-20和BT-483。被测试的子宫颈癌细胞系是KB、HeLa和WISH。被测试的胰腺癌细胞系为HPAC、Hs766T和HPAF-11。

[0344] 图24显示了DS6抗体-DM1偶联物在体外的细胞毒性测定结果。在MTT细胞存活率分析中,以依赖于DS6抗体-DM1偶联物的方式杀死人卵巢(图24A,图24B&图24C)、乳房(图24D&图24E)、子宫颈(图24F&图24G)和胰腺(图24H&图24I)癌细胞。裸DS6没有不利地影响这些细胞的生长,这表明DM1偶联对于细胞毒性是被要求的。

[0345] 图25A显示了在已建立的皮下KB肿瘤异种移植物上的DS6抗体-DM1偶联物的体内

抗肿瘤功效研究结果。在0天接种肿瘤细胞,在第6天给与第一次治疗。连续每天进行免疫偶联物治疗,总计5个剂量。一旦肿瘤体积超过 1500mm^3 ,则对PBS对照动物实施安乐死。以150或 $225\mu\text{g}/\text{kg}$ DM1的剂量施用偶联物,分别对应5.7和 $8.5\text{mg}/\text{kg}$ 的抗体浓度。在研究期间监测鼠的体重(图25B)。

[0346] 图26显示了在已建立的皮下肿瘤异种移植植物上的DS6抗体-DM1偶联物的体内抗肿瘤功效研究结果。在0天接种OVCAR5(图26A和图26B)、T0V-21G(图26C和图26D)、HPAC(图26E和图26F)和HeLa(图26G和图26H)细胞,在第6天和第13天给予免疫偶联物治疗。一旦肿瘤体积超过 1000mm^3 ,则对PBS对照动物实施安乐死。以 $600\mu\text{g}/\text{kg}$ DM1的剂量施用偶联物,对应 $27.7\text{mg}/\text{kg}$ 的抗体浓度。在研究期间监测鼠的肿瘤体积(图26A,图26C,图26E和26G)和体重(图26B,图26D,图26F和图26H)。

[0347] 图27显示了在腹膜内OVCAR5肿瘤上的DS6抗体-DM1偶联物的体内功效研究结果。在0天腹膜内注射肿瘤细胞,在第6天和第13天给予免疫偶联物治疗。一旦体重损失超过20%,则对动物实施安乐死。

[0348] 图28显示了在HeLa细胞上的裸DS6和紫杉烷类偶联的DS6抗体的结合亲和力研究的流式细胞术结合曲线。紫杉烷类化合物(MM1-202)偶联没有不利地影响抗体的结合亲和力。DS6-MM1-202偶联物的表现 $K_d(1.24\text{nM})$ 比裸DS6抗体的(620pM)稍大。

[0349] 发明详述

[0350] 本发明提供了抗-CA6单克隆抗体、抗-CA6人源化抗体和抗-CA6抗体的片段。本发明的每个抗体和抗体片段被设计为特异性识别并结合在细胞表面上的CA6糖表位。已知CA6可被许多人类肿瘤表达:95%的浆液性卵巢癌(serous ovarian carcinomas)、50%的子宫内膜卵巢癌(endometrioid ovarian carcinomas)、50%的子宫颈瘤(neoplasms of the uterine cervix)、69%的子宫内膜瘤(neoplasms of the endometrium)、80%的外阴瘤(neoplasms of the vulva)、60%的乳癌、67%胰腺瘤和48%的膀胱上皮瘤(tumors of the urothelium),但它很少被人正常组织表达。

[0351] 在Kearse等人在Int. J. Cancer 88(6):866-872(2000)上发表的报告中,当他们使用杂交瘤上清液鉴定在上面发现有CA6表位的蛋白时,他们错误鉴定其为具有包含CA6表位的N联糖的80kDa蛋白。使用纯化的DS6,我们已经证明,CA6表位被发现位于大于250kDa的非二硫键连接糖蛋白的O联糖上。此外,该糖蛋白经鉴定为粘蛋白,Muc1。因为不同的Muc1等位基因在不确定数目串连重复(VNTR)结构域中具有数目不同的串连重复,因此细胞经常表达两种具有不同尺寸的不同Muc1蛋白(Taylor-Papadimitriou, Biochim. Biophys. Acta 1455(2-3):301-13(1999)。由于在VNTR结构域中的重复数目不同以及糖基化作用中的差异,Muc1的分子量从细胞系到细胞系是变化的。

[0352] CA6免疫反应性对过碘酸的敏感性表明,CA6是糖类表位“糖表位(glycotope)”。CA6免疫反应性对用来自霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)的神经氨酸酶处理的另外的敏感性表明,CA6表位是唾液酸依赖性糖表位,因此为“唾液酸糖表位(sialoglycotope)”。

[0353] 可以在实施例2中找到CA6的表征细节(参阅下述)。可以在W002/16401; Wennerberg等, Am. J. Pathol. 143(4):1050-1054(1993); Smith等, Human Antibodies 9:61-65(1999); Kearse等, Int. J. Cancer 88(6):866-872(2000); Smith等, Int. J. Gynecol. Pathol. 20(3):260-6(2001)和Smith等, Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 10

(2):152-8(2002)中找到有关CA6的另外的细节。

[0354] 本发明也包括含两种主要组分的细胞毒性偶联物。第一组分为细胞结合剂,其识别并结合CA6糖表位。所述细胞结合剂应当以高度的特异性识别在Muc1上的CA6唾液酸糖表位,因此所述细胞毒性偶联物仅仅识别并结合所期望的细胞。高度的特异性允许该偶联物以靶向方式发挥作用,几乎不具有由非特异性结合而导致的副作用。

[0355] 在另一个实施方案中,本发明的细胞结合剂也以高度的亲和力识别CA6糖表位,因此该偶联物将与靶细胞接触足够的时间,从而使得该偶联物的细胞毒性药物部分可以在细胞上起作用,和/或使得有足够的时间可以被细胞内化。

[0356] 在一个优选的实施方案中,细胞毒性偶联物包含抗-CA6抗体作为细胞结合剂,更优选为鼠DS6抗-CA6单克隆抗体。在一个更优选的实施方案中,细胞毒性偶联物包含人源化DS6抗体或其表位结合片段。DS6抗体能以高度的特异性识别CA6,以靶向方式将细胞毒性试剂引导至异常细胞或组织,例如癌细胞。

[0357] 本发明的细胞偶联物的另一组分为细胞毒性试剂。在优选的实施方案中,该细胞毒性试剂为紫杉醇,美登素类例如DM1或DM4、CC-1065或CC-1065类似物。在优选的实施方案中,本发明的细胞结合剂直接地或通过可切割的或不可切割的连接子(linker)与细胞毒性试剂共价连接。

[0358] 细胞结合剂、细胞毒性试剂和连接子被更详细地在下面予以讨论。

[0359] 细胞结合剂

[0360] 本发明的化合物作为治疗剂的有效性取决于对合适的细胞结合剂的仔细选择。细胞结合剂可以是目前已知的任何种类,或将要已知的任何种类,而且包括肽和非肽。细胞结合剂可以是具有特异或非特异方式结合细胞的任何化合物。一般而言,这些试剂可以是抗体(特别是单克隆抗体)、淋巴因子、激素、生长因子、维生素、营养转运因子(例如转铁蛋白)或任何其它细胞结合分子或物质。

[0361] 可以被使用的细胞结合剂的更具体的例子包括:

[0362] (a)多克隆抗体;

[0363] (b)单克隆抗体;

[0364] (c)抗体片段,例如Fab、Fab' 和F(ab')₂、Fv(Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring 等, J Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff 等, Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244(1960));

[0365] (d)干扰素(例如 α 、 β 、 γ);

[0366] (e)淋巴因子,例如IL-2、IL-3、IL-4、IL-6;

[0367] (f)激素,例如胰岛素、TRH(促甲状腺素释放激素)、MSH(促黑激素)、类固醇激素,例如雄激素和雌激素;

[0368] (g)生长因子和集落刺激因子,例如EGF、TGF- α 、FGF、VEGF、G-CSF、M-CSF和GM-CSF(Burgess, Immunology Today 5:155-158(1984));

[0369] (h)转铁蛋白(O'Keefe等, J. Biol. Chem. 260:932-937(1985));和

[0370] (i)维生素,例如叶酸。

[0371] 抗体

[0372] 选择适合的细胞结合剂是选择的关键,这取决于欲靶向的具体细胞群体,但是一

一般而言,如果适合的抗体可以被利用或可以被制备,则优选抗体,更优选单克隆抗体。

[0373] 单克隆抗体技术允许以特异性单克隆抗体的形式产生非常特异性的细胞结合剂。通过用感兴趣的抗原——例如完整的靶细胞、从靶细胞中分离出的抗原、完整病毒、减毒完整病毒和病毒蛋白诸如病毒衣壳蛋白——免疫接种小鼠、大鼠、仓鼠或任何其它哺乳动物而制造出单克隆抗体的技术在本领域是极为熟知的。也可以使用敏化的人细胞。制造单克隆抗体的另一种方法是使用scFv(单链可变区)的噬菌体文库,尤其是人scFv(请参阅例如,Griffiths等,U.S.美国专利5,885,793和5,969,108;McCafferty等,W092/01047;Liming等,W099/06587)。

[0374] 典型的抗体由通过二硫键连接的两个相同的重链和两个相同的轻链组成。可变区为抗体重链和轻链的一部分,其在抗体中有着不同的序列,而且它整合了每个特定抗体对其抗原的结合性及特异性。可变性通常并不是在整个抗体可变区均匀分布的。它典型地集中在可变区的三个片段之内,其被称作互补性决定区(CDRs)或高度可变区,位于轻链和重链可变区内。可变区的具有更高保守性的部分被称作骨架区。重链和轻链的可变区包括四个骨架区,主要采用 β -折叠构型,其中各个骨架区通过三个CDRs连接起来,所述三个CDRs形成连接 β -折叠结构的环结构,在一些情况下,构成 β -折叠的一部分。在每个链中的CDRs通过骨架区被保持处于位置接近的状态,并且与来自另一链的CDRs一起帮助形成抗体的抗原结合部位(E.A.Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,1991,NIH)。

[0375] 恒定区为重链的一部分。虽然不直接参与抗体与抗原的结合,然而它的确显示各种效应子功能(effector functions),例如抗体参与抗体依赖性的细胞毒性。

[0376] 用在本发明中的适合的单克隆抗体包括鼠DS6单克隆抗体(美国专利6,596,503;ATCC保藏号PTA-4449)。

[0377] 人源化或表面重构DS6抗体

[0378] 优选地,人源化抗-CA6抗体被用作本发明的细胞结合剂。这样的人源化抗体的优选实施方案为人源化DS6抗体,或其表位结合片断。

[0379] 人源化的目标是减少引入到人体的异种抗体例如鼠抗体的免疫原性,同时保持该抗体完整的抗原结合亲和力及特异性。

[0380] 使用几种技术可以产生人源化抗体,例如表面重构(resurfacing)和CDR移植(grafting)。正如本文所用,表面重构技术使用了分子建模、统计分析和诱变的组合,来改变抗体可变区的非CDR表面,以模拟靶宿主的已知抗体的表面。

[0381] 在美国专利5,639,641(Pedersen等)中公开了用于抗体的表面重构的策略和方法,以及用于减少抗体在不同的宿主内的免疫原性的其它方法,在此引入其全部内容作为参考。简言之,在一个优选的方法中,(1)产生一系列抗体重链和轻链可变区的位置比对(allignments),以提供一组在重链和轻链可变区骨架表面暴露的位置,其中所有可变区的比对位置有至少大约98%是相同的;(2)为啮齿类动物抗体(或其片断)定义一组在重链和轻链可变区骨架表面暴露的氨基酸残基;(3)鉴定一组在重链和轻链可变区骨架表面暴露的氨基酸残基,其与所述啮齿类动物表面暴露氨基酸残基组最接近相同;(4)用在步骤(3)中鉴定的那组重链和轻链可变区骨架表面暴露氨基酸残基取代在步骤(2)中定义的那组重链和轻链可变区骨架表面暴露氨基酸残基,除了那些位于啮齿类动物抗体的互补性决定

区的任何残基的任何原子的5Å之内的氨基酸残基;和(5)产生具有结合特异性的人源化啮齿类动物抗体。

[0382] 可以使用多种其它技术来人源化抗体,包括CDR-移植(EP0239400;W091/09967;美国专利5,530,101;和5,585,089),镶面(veneering)或表面重构(EP0592106;EP0519596;Padlan E.A.,1991,Molecular Immunology28(4/5):489-498;Studnicka G.M.等,1994,Protein Engineering7(6):805-814;Roguska M.A.等,1994,PNAS91:969-973)和链重排(美国专利5,565,332)。可以通过多种在本领域已知的技术制备人抗体,包括噬菌体展示方法。参阅美国专利4,444,887、4,716,111、5,545,806和5,814,318;和国际专利申请公开号W098/46645,W098/50433,W098/24893,W098/16654,W096/34096,W096/33735和W091/10741(所述文献的全部内容被引入作为参考)。

[0383] 在优选的实施方案中,本发明提供了识别Muc1粘蛋白上的新的唾液酸糖表位(CA6糖表位)的人源化抗体或其片断。在另一实施方案中,人源化抗体或其表位结合片断具有抑制表达CA6糖表位的细胞生长的额外的能力。

[0384] 在更优选的实施方案中,提供了DS6抗体的表面重构或人源化形式,其中在轻链和重链中,抗体或其片断的表面暴露的残基被代替,以更类似于已知的人抗体表面。本发明的人源化DS6抗体或其表位结合片断具有改进的特性。例如,人源化DS6抗体或其表位结合片断特异性识别Muc1粘蛋白上的新的唾液酸糖表位(CA6糖表位)。更优选地,人源化DS6抗体或其表位结合片断具有抑制表达CA6糖表位的细胞生长的另外的能力。人源化抗体或其表位结合片断可以被连接到药物例如美登素类,通过将药物靶向于新的Muc1唾液酸糖表位——CA6,形成对抗原表达细胞具有特异性细胞毒性的前体药物。包含这样的抗体和小的毒性药物(例如美登素类、紫杉烷类和CC-1065类似物)的细胞毒性偶联物可以被用作治疗肿瘤例如和卵巢癌的治疗剂。

[0385] DS6抗体的人源化形式在本文也被充分表征,公开了其重链和轻链可变区各自的氨基酸序列、轻链和重链可变区基因的DNA序列、CDRs的鉴定、其表面氨基酸的鉴定和对其以重组形式进行表达的方法。

[0386] 在一个实施方案中,提供了人源化抗体或其表位结合片断,其具有包括CDRs的重链,所述CDRs具有由SEQ ID NOs:1-3所示的氨基酸序列:

[0387] S Y N M H(SEQ ID NO:1)

[0388] Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G(SEQ ID NO:2)

[0389] G D S V P F A Y(SEQ ID NO:3)

[0390] 当重链CDRs通过AbM建模软件来测定时,其由SEQ ID NOs:20-22表示:

[0391] G Y T F T S Y N M H(SEQ ID NO:20)

[0392] Y I Y P G N G A T N(SEQ ID NO:21)

[0393] G D S V P F A Y(SEQ ID NO:22)

[0394] 在相同的实施方案中,人源化抗体或其表位结合片断具有包括CDRs的轻链,所述CDRs具有SEQ ID NOS:4-6所示的氨基酸序列:

[0395] S A H S S V S F M H(SEQ ID NO:4)

[0396] S T S S L A S(SEQ ID NO:5)

[0397] Q Q R S S F P L T(SEQ ID NO:6)

[0398] 也提供了具有轻链可变区的人源化抗体及其表位结合片断,所述轻链可变区具有的氨基酸序列,与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8表示的氨基酸序列共享至少90%的序列同一性:

[0399] QIVLTQSPAIMASPGKEVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSL

[0400] ASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0401] AGTKLELKR(SEQ ID NO:7)

[0402] EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLA

[0403] SGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELKR

[0404] (SEQ ID NO:8)。

[0405] 同样地,提供了具有重链可变区的人源化抗体及其表位结合片断,所述重链可变区具有的氨基酸序列,与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列共享至少90%的序列同一性:

[0406] QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY

[0407] IYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISS■SEDSAVY

[0408] FCARGDSVPFAYWGQGLTVTVSA(SEQ ID NO:9)

[0409] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0410] YIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0411] FCARGDSVPFAYWGQGLTVTVSA(SEQ ID NO:10)

[0412] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0413] YIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0414] FCARGDSVPFAYWGQGLTVTVSA(SEQ ID NO:11)。

[0415] 在另一个实施方案中,提供了具有人源化或表面重构的轻链可变区的人源化抗体及其表位结合片断,所述可变区具有对应于SEQ ID NO:8的氨基酸序列:

[0416] EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLA

[0417] SGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELKR

[0418] (SEQ ID NO:8)。

[0419] 同样地,提供了具有人源化或表面重构的重链可变区的人源化抗体及其表位结合片断,所述可变区具有对应于SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列:

[0420] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0421] YIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0422] FCARGDSVPFAYWGQGLTVTVSA(SEQ ID NO:10)

[0423] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIG

[0424] YIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0425] FCARGDSVPFAYWGQGLTVTVSA(SEQ ID NO:11)。

[0426] 本发明的人源化抗体及其表位结合片断也可以包括下述的轻链和/或重链可变区的形式,即,其中与CDRs位置接近的人表面氨基酸残基被相应的muDS6表面残基取代,取代发生在表1(Kabat编号)中用星号标记的残基所定义的一个或多个位置处,目的是保持muDS6的结合亲和力及特异性。

[0427] 表1

[0428]	位置接近 CDR 的 muDS6 骨架残基(Kabat 编号)	
	轻链	重链
	Q1*	Q1
	V3	K64*
	T5	P73*
	P40	S74
	G57	
	A60	
	S67	
	E81	

[0429] 本文公开了DS6抗体轻链和重链的主要氨基酸和DNA序列,及其人源化形式的主要氨基酸和DNA序列。然而,本发明的范围并不限于包含这些序列的抗体和片断。而是,特异性地结合作为Muc1受体上独特的肿瘤特异性糖表位的CA6的所有抗体和片断都包括在本发明中。优选地,特异性结合CA6的抗体和片断也拮抗受体的生物活性。更优选地,这样的抗体进一步基本上没有激动剂活性。因此,本发明的抗体和抗体片断在其框架(scaffold)的氨基酸序列、CDRs和/或轻链和重链上可以不同于DS6抗体或其人源化衍生物,但仍然在本发明的范围之内。

[0430] DS6抗体的CDRs通过建模来鉴定,而且其分子结构已经被预测。此外,虽然CDRs对于表位识别是重要的,然而它们对本发明的抗体和片断并不是必需的。因此,提供了具有改进特性的抗体和片断,其通过例如本发明的抗体的亲和成熟(affinity maturation)而产生。

[0431] 很可能衍生出DS6的鼠轻链IgV γ ap4胚系基因和重链IgVh J558.41胚系基因被示于图11中,以DS6抗体的序列进行比对。该比较鉴定了在DS6抗体中可能的体细胞突变,包括在CDRs中的几个体细胞突变。

[0432] DS6抗体的重链和轻链可变区的序列以及DS6抗体的CDRs的序列并非是以以前已知的,其在图9A和9B中被阐明。这样的信息可以被用于产生DS6抗体的人源化形式。

[0433] 抗体片断

[0434] 本发明的抗体包括上述所讨论的全长抗体以及表位结合片断。如本文所用,“抗体片断”包括抗体的任何部分,该部分保留了结合由全长抗体所识别的表位的能力,一般被称作“表位结合片断”。抗体片断的例子包括但不限于Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、单链Fvs(scFv)、单链抗体、二硫连接的Fvs(dsFv)以及包含V_L或V_H区的片断。包括单链抗体在内的表位结合片段可以单独包含可变区或与下述区域的完整区域或部分区域相组合:铰链区、Ch1、Ch2和Ch3结构域。

[0435] 这样的片段可以包含一个或两个Fab片段或者F(ab')₂片段。优选地,抗体片段包含整个抗体的所有六个CDRs,尽管包含更少的这样的区域例如三个、四个或五个CDRs的片段也是有功能的。此外,片段可以是或可以组合下列免疫球蛋白类别的任何一种:IgG、IgM、IgA、IgD或IgE及其亚类。

[0436] 通过蛋白水解剪切,可以产生Fab和F(ab')₂片段,使用的酶例如有木瓜蛋白酶

(Fab片段)或胃蛋白酶(F(ab')₂片段)。

[0437] 单链FVs(scFVs)片段为表位结合片段,其包含抗体轻链可变区(V_L)的至少一个片段和与其连接的抗体重链可变区(V_H)至少一个片段。接头可以是短的柔性肽,其被选用以保证一旦(V_L)和(V_H)区被连接时,可发生恰当的三维折叠,以便保持衍生出该单链抗体片段的完整抗体的靶分子结合特异性。(V_L)或(V_H)序列的羧基末端可以通过连接子(接头)与互补(V_L)或(V_H)序列的氨基酸末端共价连接。

[0438] 本发明的单链抗体片段包含这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有在本说明书中所述的完整抗体的至少一个可变区或互补性决定区(CDRs),但是缺乏那些抗体的一些或所有的恒定结构域。这些恒定结构域对抗原结合不是必需的,但是构成了完整抗体结构的主要部分。因此单链抗体片段可以克服与使用包含部分或所有恒定结构域的抗体有关的一些问题。例如,单链抗体片段往往不存在在生物分子和重链恒定区之间的不期望的相互作用,或者其它不期望的生物活性。另外,单链抗体片段比完整抗体小的多,因此可以比完整抗体具有更大的毛细管通透性,这使得单链抗体片段可更加有效地定位(localize)和结合靶抗原结合部位。而且,可以在原核细胞中以相对大的规模产生抗体片段,因此便于其生产。此外,单链抗体片段的相对小的尺寸使其较完整抗体在受体内激发免疫反应的可能性更小。

[0439] 可以通过分子克隆、抗体噬菌体展示文库或普通技术人员熟知的相似技术产生单链抗体片段。例如,可以在真核细胞或原核细胞包括细菌中制备这些蛋白质。使用在本领域已知的各种噬菌体展示方法也可以产生本发明的表位结合片段。在噬菌体展示方法中,功能抗体结构域被展示在噬菌体颗粒的表面,所述噬菌体颗粒携带编码它们的多核苷酸序列。特别地,这样的噬菌体可以被用来展示由谱系或组合抗体文库(例如人或鼠)表达的表位结合结构域。可以用抗原选择或鉴定表达结合感兴趣的抗原的表位结合结构域的噬菌体,例如使用被结合或捕获至固体表面或珠子的标记抗原。在这些方法中使用的噬菌体一般为丝状噬菌体,包括fd和M13,结合结构域由噬菌体表达,Fab、Fv或二硫稳定的Fv抗体结构域通过重组方法融合到噬菌体的基因III或基因VIII蛋白。

[0440] 可以被用来制备本发明的表位结合片段的噬菌体展示方法的实例包括那些在Brinkman等,1995,J.Immunol.Methods182:41-50;Ames等,1995,J.Immunol.Methods184:177-186;Kettleborough等,1994,Eur.J.Immunol.24:952-958;Persic等1997,Gene187:9-18;Burton等,1994,Advances in Immunology57:191-280;PCT申请PCT/GB91/01134;PCT公开W090/02809;W091/10737;W092/01047;W092/18619;W093/11236;W095/15982;W095/20401;和美国专利5,698,426; 5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743和5,969,108中所公开的方法,在此引入每个文献的全部内容作为参考。

[0441] 在噬菌体选择之后,编码片段的噬菌体部分可以被分离和使用,通过在已选宿主中进行表达来产生表位结合片段,宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,其中使用重组DNA技术,例如,如下详述。例如,也可以利用重组产生Fab、Fab'和F(ab')₂片段的技术,使用在本领域已知的方法,例如那些公开在PCT公开号W092/22324;Mullinax等,1992,BioTechniques12(6):864-869;Sawai等,1995,AJRI34:26-34和Better等,1988,Science240:1041-1043中的方法;上述参考文献的全部内容被引入作为参考。可以被用于产生单链Fvs和抗体的技术的实例包括那些在美国专利4,946,778和5,258,498;Huston等,

1991, *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu等, 1993, *PNAS* 90:7995-7999; Skerra等, 1988, *Science* 240:1038-1040中所述的技术。

[0442] 功能等同物

[0443] 抗-CA6抗体和人源化抗-CA6抗体的功能等同物也包括在本发明的范围之内。例如, 术语“功能等同物(functional equivalents)”包括具有同源序列的抗体、嵌合抗体、人工抗体和修饰抗体, 其中各个功能等同物都被限定为其具有结合CA6的能力。普通技术人员将理解, 在被称作“抗体片段(antibody fragments)”的分子群体和被称作“功能等同物(functional equivalents)”的群体中存在重叠。产生功能等同物的方法例如在PCT申请W093/21319、欧洲专利申请239,400; PCT申请W089/09622; 欧洲专利申请338,745和欧洲专利申请EP332,424中被公开, 其全部内容被引入作为参考。

[0444] 具有同源序列的抗体是具有下述氨基酸序列的那些抗体, 所述氨基酸序列与本发明的抗-CA6抗体和人源化抗-CA6抗体的氨基酸序列具有序列同源性。优选地, 同源是与本发明的抗-CA6抗体和人源化抗-CA6抗体的可变区的氨基酸序列同源。本文应用于氨基酸序列的“序列同源性”被定义为一个序列对另一氨基酸序列具有至少大约90%、91%、92%、93%或94%序列同源性, 更优选具有至少大约95%、96%、97%、98%或99%序列同源性, 例如, 序列同源性是根据Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448 (1988)中的FASTA搜索方法测定的。

[0445] 如此处所用, 嵌合抗体为其中抗体的不同部分衍生自不同动物种类的抗体。例如, 具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区的抗体与人免疫球蛋白恒定区配对。产生嵌合抗体的方法在本领域是已知的。参阅例如Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi等, 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies等, 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; 美国专利5,807,715; 4,816,567和4,816,397, 在此引入其全部内容作为参考。

[0446] 通过将例如鼠抗体的互补性决定区替换到人骨架结构域中, 制备嵌合抗体的人源化形式, 例如参阅PCT公开号W092/22653。人源化嵌合抗体优选具有恒定区和可变区, 但不具有基本上或专有地来源于相应人抗体区域的互补性决定区(CDRs), 而是具有基本上或专有地来源于非人哺乳动物的CDRs。

[0447] 人工抗体包括scFv片段、二聚抗体、三聚抗体、四聚抗体和mru(请参阅综述Winter, G. and Milstein, C., 1991, *Nature* 349:293-299; Hudson, P. J., 1999, *Current Opinion in Immunology* 11:548-557), 其中每一个都具有抗原结合能力。在单链Fv片段(scFv)中, 抗体的V_H和V_L结构域由柔性肽连接。典型地, 该接头肽为大约15个氨基酸序列的长度。如果接头更小, 例如5个氨基酸, 则形成二聚抗体, 其为二价scFv二聚体。如果接头被减少到小于三个氨基酸残基, 则形成被称作三聚抗体和四聚抗体的三聚和四聚结构。抗体最小的结合单元为CDR, 典型地为重链的CDR2, 其具有特异性识别和结合能力, 因此, 它可以单独被使用。这样的片段被称作分子识别单元(molecular recognition unit)或mru。可以用短的接头肽将几种这样的mru连接起来, 从而形成与单一mru相比具有更高亲合力(avidity)的人工结合蛋白质。

[0448] 本申请的功能等同物也包括修饰的抗体, 例如通过任何类型的分子与抗体的共价连接所修饰的抗体。例如, 修饰的抗体包括例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、由已知的保护/阻隔基团进行的衍生化、蛋白水解切割、连接到细胞配体或其它蛋

白,而被修饰的抗体。共价连接并不阻止抗体产生抗独特型反应。可以通过已知的技术进行这些修饰,包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。另外,修饰的抗体可以包含一个或多个非经典氨基酸(non-classical amino acids)。

[0449] 通过交换不同链上不同框架内的不同CDRs,可以产生功能等同物。因此,例如,通过不同重链的替代,对于一组特定CDRs,不同类别的抗体是可能的,例如,由此可以产生IgG1-4、IgM、IgA1-2、IgD、IgE抗体类型和同工型。同样地,通过在完全为合成的框架内嵌入一组特定CDRs,可以产生包括在本发明范围之内的人工抗体。

[0450] 使用在本领域已知的很多方法,通过在位于一组特定CDRs的侧翼的可变和/或恒定区序列内进行突变、缺失和/或插入,可以容易地产生功能等同物。

[0451] 本发明的抗体片段和功能等同物包括那些分子,其与DS6抗体比较,以可检测的程度结合CA6。可检测的结合程度包括鼠DS6抗体与CA6的结合能力的至少10%至100%范围内的所有值,优选至少50%、60%或70%,更优选至少75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0452] 改进的抗体

[0453] CDRs对于表位识别与抗体结合是非常重要的。然而,可以对构成CDRs的残基进行改变,而不干扰抗体识别和结合其同源表位的能力。例如可以进行这样的改变,其不影响表位识别,然而增加抗体对表位的结合亲和力。

[0454] 因此,鼠和人源化抗体的改进的形式也包括在本发明的范围之内,所述形式也特异性识别并结合CA6,优选具有增加的亲和力。

[0455] 几项研究已经基于对原初抗体序列的了解,调查了在抗体序列的各种位置上引入一个或多个氨基酸变化对其特性例如结合及表达水平的影响(Yang, W. P. 等, 1995, J. Mol. Biol., 254, 392-403; Rader, C. 等, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. 等, 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539)。

[0456] 在这些研究中,使用例如寡核苷酸介导定点诱变、盒式诱变、易错聚合酶链反应、DNA重排或大肠杆菌的增变株这些方法,通过改变CDR1、CDR2、CDR3或骨架区中的重链和轻链基因序列,已经产生了原初抗体的等同物(Vaughan, T. J. 等, 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. 等, 1996, Chapter 16, pp. 277-291, 在"Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. 等, Academic Press)。这些改变原初抗体的序列的方法已经导致二级抗体的亲和力改善(Gram, H. 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. and Riechmann, L., 1996, Immunotechnology, 2, 169-179; Thompson, J. 等, 1996, J. Mol. Biol., 256, 77-88; Short, M. K. 等, 2002, J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Furukawa, K. 等, 2001, J. Biol. Chem., 276, 27622-27628)。

[0457] 通过改变抗体的一个或多个氨基酸残基这样的相似的定向策略,本发明中所述的抗体序列可以被用于开发具有改进功能的抗CA6抗体,包括对CA6改善的亲和力。

[0458] 改进的抗体也包括那些具有改进特征的抗体,其通过动物免疫、杂交瘤形成和选择具有特定特征的抗体的标准技术被制备。

[0459] 细胞毒性试剂

[0460] 在本发明的细胞毒性偶联物中使用的细胞毒性试剂可以是任何化合物,该化合物导致细胞死亡或诱导细胞死亡或以某种方式降低细胞生存能力。例如,优选的细胞毒性试

剂包括如下定义的美登素类和美登素类类似物、紫杉烷类药物(taxoids)、CC-1065和CC-1065类似物、海兔毒肽(dolastatin)和海兔毒肽类似物。这些细胞毒性试剂与本文公开的抗体、抗体片段、功能等同物、改进的抗体和其类似物偶联。

[0461] 可以通过在体外的方法制备细胞毒性偶联物。为了连接药物或前体药物和抗体,使用连接基团。适合的连接基团在本领域是熟知的,包括二巯基、硫醚基、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。优选的连接基团为二巯基和硫醚基。例如,可以使用二硫交换反应或通过抗体和药物或前体药物之间形成硫醚键而构建偶联物。

[0462] 美登素类

[0463] 美登素类和美登素类类似物属于可以被用在本发明中以形成细胞毒性偶联物的细胞毒性试剂。适合的美登素类的例子包括美登醇(maytansinol)和美登醇类似物。美登素类是抑制微管形成并且对哺乳动物细胞高毒性的药物。

[0464] 适合的美登醇类似物的例子包括那些具有修饰的芳香环和那些在其它位置 具有修饰的药物。这样的适合的美登素类被公开在美国专利4,424,219;4,256,746;4,294,757;4,307,016;4,313,946;4,315,929;4,331,598;4,361,650;4,362,663;4,364,866;4,450,254;4,322,348;4,371,533;6,333,410;5,475,092;5,585,499和5,846,545中。

[0465] 具有修饰的芳香环的适合的美登醇类似物的具体实例包括:

[0466] (1)C-19-脱氯(美国专利4,256,746)(通过ansamycin P2的LAH还原来制备);

[0467] (2)C-20-羟基(或C-20-脱甲基)+/-C-19-脱氯(美国专利4,361,650和4,307,016)(通过使用链霉菌(*Streptomyces*)或放线菌(*Actinomyces*)脱甲基化或者使用LAH的脱氯而制备);和

[0468] (3)C-20-脱甲氧基,C-20-酰氧基(-OCOR),+/-脱氯(美国专利4,294,757)(通过使用酰氯的酰基化来制备)。

[0469] 具有其它位置的修饰的适合的美登醇类似物的具体实例包括:

[0470] (1)C-9-SH(美国专利4,424,219)(通过美登醇与H₂S或P₂S₅的反应来制备);

[0471] (2)C-14-烷氧甲基(脱甲氧基/CH₂OR)(美国专利4,331,598);

[0472] (3)C-14-羟甲基或酰氧甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(美国专利4,450,254)(由诺卡菌(*Nocardia*)制备);

[0473] (4)C-15-羟基/酰氧基(美国专利4,364,866)(由美登醇通过链霉菌的转化来制备);

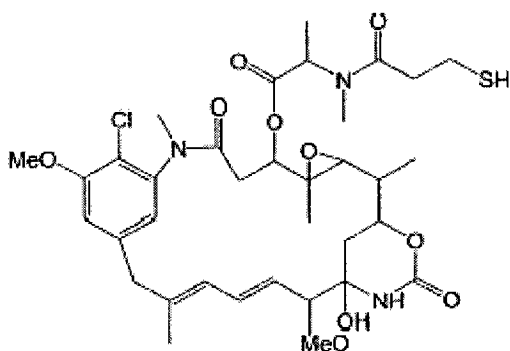
[0474] (5)C-15-甲氧基(美国专利4,313,946和4,315,929)(从滑桃树(*Trewia nudiflora*)分离);

[0475] (6)C-18-N-脱甲基(美国专利4,362,663和4,322,348)(由美登醇通过链霉菌的脱甲基作用来制备);和

[0476] (7)4,5-脱氧(美国专利4,371,533)(通过美登醇的三氯化钛/LAH还原来制备)。

[0477] 在一个优选的实施方案中,本发明的细胞毒性偶联物利用含硫醇美登素类(DM1)作细胞毒性试剂,其正式被称作N^{2'}-脱乙酰-N^{2'}-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素。DM1由下面的结构式(I)表示:

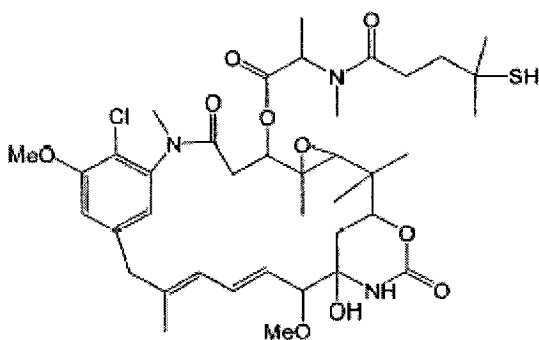
[0478]



(I)。

[0479] 在另一个优选的实施方案中,本发明的细胞毒性试剂利用含硫醇美登素类N^{2'}-脱乙酰-N^{2'}-(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素作细胞毒性试剂。DM4由下面的结构式(II)表示:

[0480]

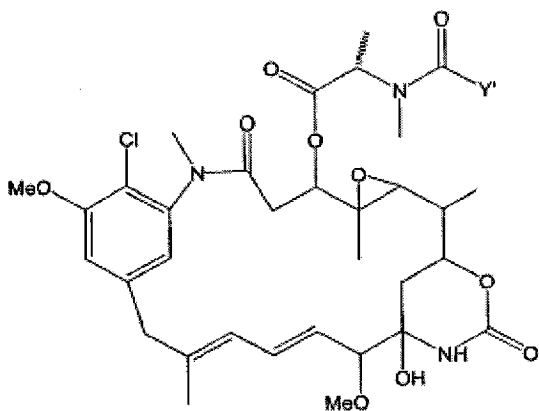


(II)。

[0481] 在本发明进一步的实施方案中,可以使用其它的美登素,包括含硫醇和二硫物的美登素类,其在带有硫原子的碳原子上具有单烷基或二烷基取代。这些包括在C-3、C-14羟甲基, C-15羟基或C-20脱甲基上具有酰化的氨基酸侧链的美登素类,所述侧链的酰基基团带有受阻的(hindered)硫氢基,其中带有硫醇官能性(thiol functionality)的酰基基团碳原子具有一个或两个取代基,所述取代基为CH₃、C₂H₅、具有1到10个碳原子的线性或支链烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的环烷基或链烯基、苯基、取代苯基或杂环芳香基团或杂环烷基,进一步,其中所述取代基之一可以是H,其中酰基基团在羰基官能团(carbonyl functionality)和硫原子之间具有至少三个碳原子的线性链长。

[0482] 这样的另外的美登素包括由式(III)表示的化合物:

[0483]



(III) ,

[0484] 其中:

[0485] Y' 代表

[0486] $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p\text{C}=\text{C}_q\text{A}_r(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m\text{Du}(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}=\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

[0487] 其中:

[0488] R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代苯基或杂环芳香基或杂环烷基,另外, R_2 可以是H;

[0489] A、B、D为具有3-10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或者取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0490] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代苯基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0491] 1、m、n、o、p、q、r、s和t各自独立为0或从1到5的整数,条件是1、m、n、o、p、q、r、s和t的至少两个不同时为0;和

[0492] Z为H、SR或 $-\text{COR}$,其中R为具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基,具有3到10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基,或简单的为取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基。

[0493] 式(III)优选的实施方案包括式(III)的化合物,

[0494] 其中:

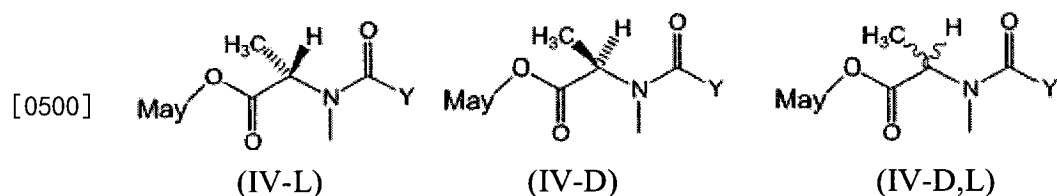
[0495] R_1 是H, R_2 是甲基,Z是H;

[0496] R_1 和 R_2 是甲基,Z是H;

[0497] R_1 是H, R_2 是甲基,Z是 $-\text{SCH}_3$;或

[0498] R_1 和 R_2 是甲基,Z是 $-\text{SCH}_3$ 。

[0499] 这样的另外的美登素也包括由式(IV-L)、(IV-D)或(IV-D,L)表示的化合物:



[0501] 其中:

[0502] Y代表 $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

[0503] 其中:

[0504] R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基,另外, R_2 可以是H;

[0505] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0506] 1、m和n各自独立为1到5的整数,另外,n可以是0;

[0507] Z为H、SR或 $-\text{COR}$,其中R为具有1到10个碳原子的线性的或分支的烷基或烯基、具有3到10个碳原子的环烷基或烯基,或者简单的或取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基;和

[0508] May代表美登素类,其在C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链。

[0509] 式(IV-L)、(IV-D)和(IV-D,L)的优选实施方案包括式(IV-L)、(IV-D)和(IV-D,L)的化合物,其中:

[0510] R_1 为H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每一个为H,1和m每一个为1,n为0,和Z为H。

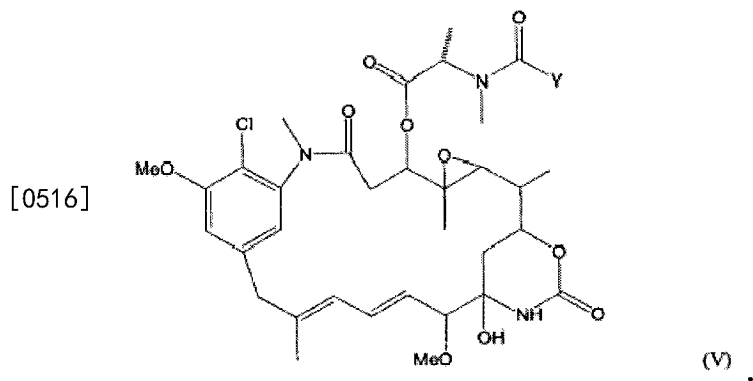
[0511] R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 每个为H,1和m为1,n为0,和Z为H。

[0512] R_1 为H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m每个为1,n为0,和Z为 $-SCH_3$ 。

[0513] R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 每个为H,1和m为1,n为0,和Z为 $-SCH_3$ 。

[0514] 优选的细胞毒性试剂由式(IV-L)表示。

[0515] 这样的另外的美登素也包括由式(V)所示的化合物:



[0517] 其中:

[0518] Y代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$,

[0519] 其中:

[0520] R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基,另外, R_2 可以是H;

[0521] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0522] 1、m和n各自独立为1到5的整数,另外,n可以是0;和

[0523] Z为H、SR或 $-COR$,其中R为具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基,或简单的或取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基。

[0524] 式(V)的优选的实施方案包括式(V)的化合物,其中:

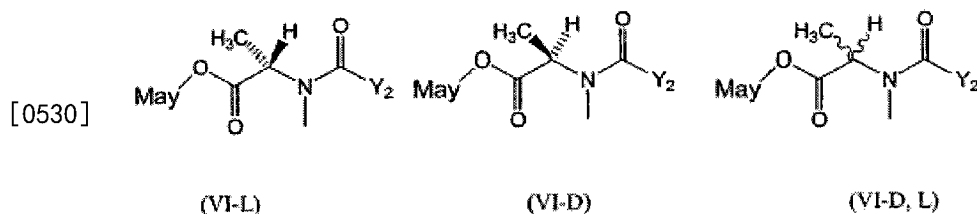
[0525] R_1 为H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m每个为1,n为0,和Z为H。

[0526] R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 每个为H,1和m为1,n为0,和Z为H。

[0527] R_1 为H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m每个为1,n为0,和Z为 $-SCH_3$ 。

[0528] R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 每个为H,1和m为1,n为0,和Z为 $-SCH_3$ 。

[0529] 这样的另外的美登素进一步包括由式(VI-L)、(VI-D)或(VI-D,L)所示的化合物:



[0531] 其中:

[0532] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

[0533] 其中:

[0534] R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基,另外, R_2 可以是H;

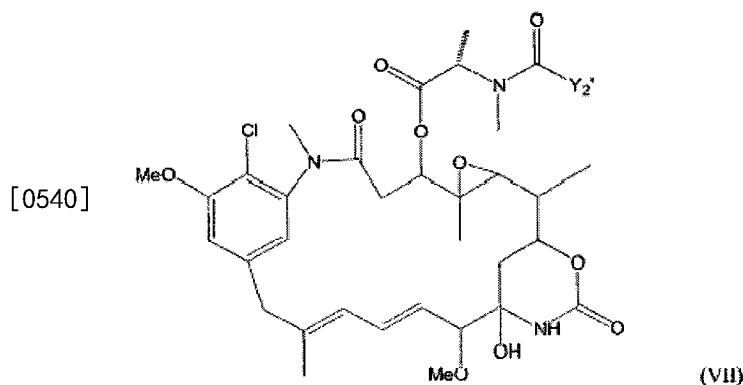
[0535] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性环烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基;

[0536] l 、 m 和 n 各自独立为1到5的整数,另外, n 可以是0;和

[0537] Z_2 为SR或COR,其中R为具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基,或简单的或取代的芳基或杂环芳香基团或杂环烷基基团;和

[0538] May为美登素类。

[0539] 这样的另外的美登素也包括由式(VII)表示的化合物:



[0541] 其中:

[0542] Y_2' 代表

[0543] $(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qAr(CR_5CR_6)_mDu(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sBt(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2'$

[0544] 其中:

[0545] R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性或分支烷基或烯基、具有3到10个碳原子的环烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基,另外, R_2 可以是H;

[0546] A、B和D各自独立为具有3到10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳香基或杂环烷基基团;

[0547] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香或杂环烷基基团;

[0548] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 每个独立为0或从1到5的整数,条件是 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 的至少两个不同时为零;和

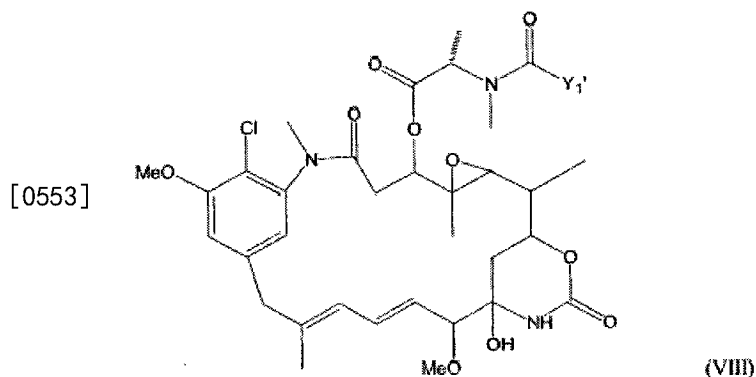
[0549] Z_2 为SR或-COR,其中R为具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原

子的分支或环状的烷基或烯基,或简单的或取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基基团。

[0550] 式(VII)的优选实施方案包括式(VII)的化合物,其中: R_1 为H和 R_2 为甲基。

[0551] 上述美登素类可以被偶联到抗CA6抗体DS6或其同源物或其片段,其中使用硫醇或二硫官能基团连接抗体和美登素类,所述硫醇或二硫官能团存在于美登素类的C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20脱羟基处的酰化氨基酸侧链的酰基基团上,其中酰化的氨基酸侧链的酰基基团所具有的硫醇或二硫官能基位于具有一个或两个取代基的碳原子上,所述取代基为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基基团,另外,取代基之一可以是H,其中所述酰基基团在羰基官能基和硫原子之间具有至少三个碳原子的线性链长度。

[0552] 本发明优选的偶联物为包含抗CA6抗体DS6或其同源物或其片段——其与式(VIII)的美登素类连接——的偶联物:



[0554] 其中:

[0555] Y_1' 代表

[0556] $(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qAr(CR_5CR_6)_mDu(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sBt(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$,

[0557] 其中:

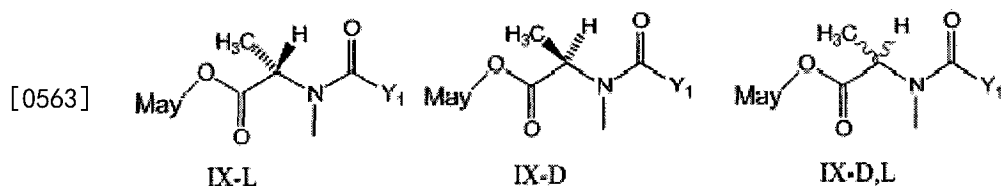
[0558] A、B和D各自独立为具有3到10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基或杂环芳香基或杂环烷基基团;

[0559] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基基团;和

[0560] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 每个独立为0或1到5的整数,条件是 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 的至少两个不同时为零。

[0561] 优选地, R_1 为H和 R_2 为甲基或 R_1 和 R_2 为甲基。

[0562] 本发明更优选的偶联物为包含抗CA6抗体DS6或其同源物或其片段,并与式(IX-L)、(IX-D)或(IX-D,L)的美登素类连接的偶联物:



[0564] 其中:

[0565] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$,

[0566] 其中:

[0567] R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳香基或杂环烷基,另外, R_2 可以是H;

[0568] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个独立为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1到10个碳原子的线性烷基或链烯基、具有3到10个碳原子的分支或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳香基或杂环烷基基团;

[0569] 1、m和n每个独立为1到5的整数,另外,n可以是0;和

[0570] May代表美登醇,其具有位于C-3,C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处处的侧链。

[0571] 式(IX-L)、(IX-D)和(IX-D,L)的优选实施方案包括式(IX-L)、(IX-D)和(IX-D,L)的化合物,其中:

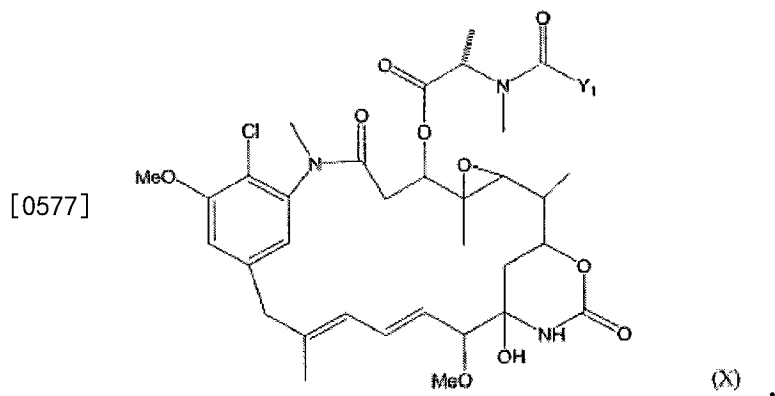
[0572] R_1 为H和 R_2 为甲基或 R_1 和 R_2 为甲基,

[0573] R_1 为H, R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m每个为1,n为0,

[0574] R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m为1,n为0。

[0575] 优选地,细胞毒性试剂由式(IX-L)表示。

[0576] 本发明进一步优选的偶联物为包含抗CA6抗体DS6或其同源物或其片段,并与式(X)的美登素类连接的偶联物:



[0578] 其中的取代基如上述式(IX)中的定义。

[0579] 特别优选的是任何上述化合物,其中 R_1 为H, R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 每个为H,1和m每个为1,及n为0。

[0580] 进一步特别优选的为任何上述化合物,其中 R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 每个为H,1和m为1,及n为0。

[0581] 更进一步,L-氨酰基立体异构体是优选的。

[0582] 于2004年5月20提交的正在审理中的美国专利申请10/849,136中所述的各种美登素类也可以被用在本发明的细胞毒性偶联物中。在此引入美国专利申请10/849,136的全部公开内容作为参考。

[0583] 含二硫化物(disulfide)的连接基团

[0584] 为了连接美登素类和细胞结合剂例如DS6抗体,美登素类包含连接部分(linking

moiety)。该连接部分包含化学键,该化学键允许完全活性的美登素类在特定部位释放。适合的化学键在本领域是熟知的,包括二硫键、酸不稳定键、光不稳定键、肽酶不稳定键和酯酶不稳定键。优选二硫键。

[0585] 连接部分也包括活性化学基团。在一个优选的实施方案中,所述活性化学基团可以通过二硫键连接部分与美登素类共价连接。

[0586] 特别优选的活性化学基团为N-琥珀酰亚胺酯(N-succinimidyl ester)和N-磺基琥珀酰亚胺酯(N-sulfosuccinimidyl esters)。

[0587] 特别优选的包含含有活性化学基团的连接部分的美登素类为美登醇的C-3酯及其类似物,其中所述连接部分包含二硫键,活性化学基团包括N-琥珀酰亚胺酯或N-磺基琥珀酰亚胺酯。

[0588] 美登素类上的很多位置可以作为化学连接连接部分的位置。例如,具有羟基的C-3位、用羟甲基修饰的C-14位、用羟基修饰的C-15位及具有羟基的C-20位都被认为是有用的。然而,优选C-3位,而且特别优选美登醇的C-3位。

[0589] 尽管根据含二硫键的连接部分,描述了具有连接部分的美登醇的酯的合成,但本领域普通技术人员将理解,具有其它化学键(如上所述)的连接部分也可以被用于本发明,正如其它美登素类可以被用于本发明。其它化学键的具体例子包括酸不稳定键、光不稳定键、肽酶不稳定键和酯酶不稳定键。在此所引入的美国专利 5,208,020的公开内容讲述了具有这样的键的美登素类的制备。

[0590] 在美国专利6,441,163和6,333,410和美国申请号10/161,651中描述了具有含活性基团的二硫部分的美登素类和美登素类衍生物的合成,其在此被引入作为参考。

[0591] 将含活性基团的美登素类例如DM1,与抗体例如DS6抗体反应,以产生细胞毒性偶联物。可以通过HPLC或凝胶过滤来纯化这些偶联物。

[0592] 美国专利6,333,410和美国申请号09/867,598、10/161,651和10/024,290中提供了用于生产这样的抗体-美登素类偶联物的几个不错的方案,在此引入其全部内容。

[0593] 一般而言,可以将具有含活性基团的二硫部分的摩尔过量的美登素类与在含水缓冲液中的抗体溶液温育。通过加入过量胺(例如乙醇胺、牛磺酸等)终止反应化合物。然后通过凝胶过滤来纯化美登素类-抗体偶联物。

[0594] 通过分光光度测量252nm和280nm处的吸光度比值,可以测定每个抗体分子所结合的美登素类分子的数量。优选平均1-10个美登素类分子/抗体分子。

[0595] 可以评价抗体与美登素类药物的偶联物在体外抑制各种不期望的细胞系增殖的能力。例如,细胞系如人表皮癌细胞系A-431、人小细胞肺癌细胞系(human smallcell lung cancer cell line)SW2、人乳瘤细胞系(human breast tumor line)SKBR3和伯基特淋巴瘤细胞系Namalwa可以容易地被用于评价这些化合物的细胞毒性。可以将待评价的细胞暴露于化合物24小时,通过已知的方法在直接测定中测量细胞的存活比例。然后由测定结果可以计算IC₅₀值。

[0596] 含PEG的连接基团

[0597] 也可以使用PEG连接基团连接美登素类与细胞结合剂,如在美国申请号10/024,290中所述。这些PEG连接基团在水和非水溶剂中都是可溶的,可以被用来将一个或多个细胞毒性试剂连接至细胞结合剂。示例性的PEG连接基团包括异双功能PEG连接子,其通过一

端的功能性巯基或二硫基团和另一端的活性酯而将细胞毒性试剂和细胞结合剂连接在该连接子的两端。

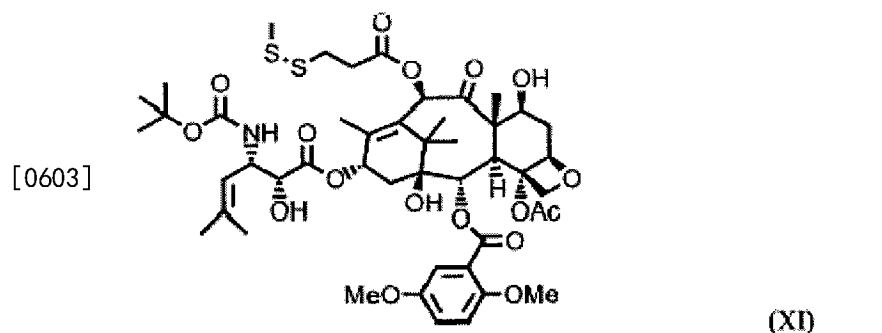
[0598] 作为使用PEG连接基团合成细胞毒性偶联物的一般实例,其具体细节也可参考美国申请号10/024,290。合成始于将具有活性PEG部分的一个或多个细胞毒性试剂与细胞结合剂反应,导致每个活性PEG部分的末端活性酯被细胞结合剂的氨基酸残基置换,从而产生包含一个或多个细胞毒性试剂的细胞毒性偶联物,所述细胞毒性试剂经由PEG连接基团与细胞结合剂共价连接。

[0599] 紫杉烷类(Taxanes)

[0600] 用在本发明的细胞毒性偶联物中的细胞毒性试剂也可以是紫杉烷类化合物或其衍生物。

[0601] 紫杉烷类化合物为一类化合物,其包括紫杉醇(paclitaxel)(泰素(Taxol)),其为细胞毒性天然产物,和多烯紫杉醇(docetaxel)(泰索帝(Taxotere)),其为半合成衍生物,这两种化合物被广泛用于癌症的治疗。紫杉烷类化合物为有丝分裂纺锤体毒剂,其抑制微管蛋白的解聚,导致细胞死亡。尽管在癌症的治疗中多烯紫杉醇和紫杉醇是有用的药剂,然而它们的抗肿瘤活性是有限制的,原因在于它们对正常细胞的非特异性毒性。此外,像紫杉醇和多烯紫杉醇这样的化合物本身并不能足够有效地应用于与细胞结合剂形成的偶联物中。

[0602] 可用于制备细胞毒性偶联物的优选的紫杉烷类化合物为式(XI)的紫杉烷类化合物:



[0604] 可以用在本发明的细胞毒性偶联物中的紫杉烷类化合物的合成方法,以及紫杉烷类化合物和细胞毒性试剂例如抗体的偶联方法,在美国专利5,416,064、5,475,092、6,340,701、6,372,738和6,436,931以及在美国申请号10/024,290、10/144,042、10/207,814、10/210,112和10/369,563中被予以详细描述。

[0605] CC-1065类似物

[0606] 应用在本发明的细胞毒性偶联物中的细胞毒性试剂也可以是CC-1065或其衍生物。

[0607] CC-1065是从泽耳链霉菌(*Streptomyces zelensis*)的培养物中分离出来的有效的抗肿瘤抗生素。CC-1065在体外比普通使用的抗癌药的药效高大约1000倍,普通使用的抗癌药例如阿霉素(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)和长春新碱(vincristine)(B.K.Bhuyan等,Cancer Res.,42,3532-3537(1982))。CC-1065及其类似物在美国专利6,372,738、6,340,701、5,846,545和5,585,499中被公开。

[0608] CC-1065的细胞毒性效价(cytotoxic potency)与其烷基化活性和其DNA结合或

DNA嵌入活性相关。这两种活性位于该分子的不同部分。这样,烷基化活性包含在环丙吡咯并吡啶(cyclopropapyrroloindole)(CPI)亚单位中,DNA结合活性位于两个吡咯并吡啶(pyrroloindole)亚单位中。

[0609] 尽管CC-1065作为细胞毒性试剂具有一定的诱人特征,然而它在治疗用途上具有局限性。对小鼠施用CC-1065会引起延迟性肝中毒,这导致在单次静脉剂量12.5 μ g/kg之后的第50天出现死亡{V.L.Reynolds等,J.Antibiotics,XXIX,319-334(1986)}。这已经激励起开发不引起延迟中毒的类似物的努力,以CC-1065为模型的更简单的类似物的合成已经被描述{M.A.Warpehoski等,J.Med.Chem.,31,590-603(1988)}。

[0610] 在另一系列的类似物中,CPI部分被环丙苯并吡啶(cyclopropabenzindole)(CBI)部分代替{D.L.Boger等,J.Org.Chem.,55,5823-5833,(1990),D.L.Boger等,BioOrg.Med.Chem.Lett.,1,115-120(1991)}。这些化合物保持了母本药物的高体外效价,而对小鼠不引发延迟毒性。类似CC-1065,这些化合物是烷基化剂,其以共价方式结合DNA的小沟以引起细胞死亡。然而,对最具前景的类似物阿多来新(Adozelesin)和卡折来新(Carzelesin)的临床评估已经产生令人失望的结果{B.F.Foster等,Investigational New Drugs,13,321-326(1996);I.Wolff等,Clin.Cancer Res.,2,1717-1723(1996)}。这些药物显示了不佳的治疗效果,原因在于其具有高全身毒性。

[0611] 通过定向传输到肿瘤部位而改变其在体内的分布,可以极大改善CC-1065类似物的治疗功效,这样,对非靶组织具有较低毒性,因此具有较低的全身毒性。为实现这个目标,CC-1065的类似物及衍生物与特异性靶向肿瘤细胞的细胞结合剂的偶联物已经被描述{美国专利:5,475,092;5,585,499;5,846,545}。这些偶联物在体外典型地显示出高靶特异性细胞毒性,并在小鼠中的人肿瘤异种移植模型中显示出非凡的抗肿瘤活性{R.V.J.Chari等,Cancer Res.,55,4079-4084(1995)}。

[0612] 可用在本发明的细胞毒性偶联物中的CC-1065类似物的合成方法,以及所述类似物与细胞结合剂例如抗体的偶联方法在美国专利5,475,092、5,846,545、5,585,499、6,534,660和6,586,618以及在美国申请10/116,053和10/265,452中被详细描述。

[0613] 其它药物

[0614] 药物例如甲氨蝶呤(methotrexate)、柔红霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、卡奇霉素(calicheamicin)、tubulysin及tubulysin类似物、duocarmycin及duocarmycin类似物、海兔毒肽及海兔毒肽类似物也适合制备本发明的偶联物。所述药物分子可以通过中间载体分子例如血清白蛋白与抗体分子连接。例如,Doxarubicin和Danorubicin化合物也可以是有用的细胞毒性试剂,如在美国序列号09/740991中所述。

[0615] 治疗用组合物

[0616] 本发明也提供了治疗组合物,其包括:

[0617] (a)有效量的一种或多种细胞毒性偶联物;和

[0618] (b)药理学可接受的载体。

[0619] 同样地,本发明提供用于抑制特定细胞群的生长的方法,该方法包括用有效量的细胞毒性偶联物或包含细胞毒性偶联物的治疗剂,接触靶细胞或包含靶细胞的组织,所述

细胞毒性偶联物或治疗剂单独施用或者与其它细胞毒性或治疗剂联合施用。

[0620] 本发明也包括使用本发明的治疗组合物治疗患癌对象的方法。

[0621] 通过先前所述的方法,可以评价细胞毒性偶联物在体外的效价和特异性(请参阅例如R.V.J.Chari等,Cancer Res.55:4079-4084(1995))。通过先前也已描述的方法,可以在小鼠的人肿瘤异种移植模型中评价抗肿瘤活性(请参阅例如Liu等,Proc.Natl.Acad.Sci.93:8618-8623(1996))。

[0622] 合适的药理学可接受的载体是熟知的,而且本领域普通技术人员能够确定其符合临床标准。正如本文所用,载体包括稀释剂和赋形剂。

[0623] 合适的载体、稀释剂和/或赋形剂的例子包括:(1)Dulbecco磷酸缓冲盐溶液,pH~7.4,包含或不包含大约1mg/ml到25mg/ml人血清白蛋白,(2)0.9%盐水(0.9%w/v氯化钠(NaCl)),和(3)5%(w/v)葡萄糖;也可以包含抗氧化剂例如色胺和稳定剂例如Tween20。

[0624] 抑制所选择的细胞群的生长的方法可以在体外(in vitro)、在体内(in vivo)或离体(ex vivo)进行实践。正如此处所用,抑制生长意味着减慢细胞的生长、减少细胞存活率、引起细胞的死亡、裂解细胞和诱导细胞死亡,无论是在短的时间期间或长的时间期间内。

[0625] 在体外使用的例子包括在自身骨髓移植到同一患者体内之前对自身骨髓的处理,目的是杀死患病的或恶性的细胞;骨髓移植之前的处理,目的是杀死活化T细胞(competent T cell)及预防移植物抗宿主疾病(GVHD);细胞培养物的处理,目的是杀死除了不表达靶抗原的期望变种之外的所有细胞;或杀死表达不期望的抗原的变种。

[0626] 本领域普通技术人员可容易地确定非临床的体外应用的情况。

[0627] 离体的临床应用的例子是在癌症治疗或自身免疫疾病治疗中,在自身移植之前,从骨髓中去除肿瘤细胞或淋巴细胞,或在移植之前,从自身或异源骨髓中去除T细胞和其它淋巴细胞,目的是预防移植物抗宿主疾病(GVHD)。治疗可以按如下进行。从患者或其它个体收获骨髓,然后在含有血清并加入本发明的细胞毒性试剂的培养基中温育。浓度在大约10 μ M到1pM之间,在大约37 $^{\circ}$ C温育大约30分钟到大约48小时。本领域普通技术人员可以容易地决定所述浓度和温育时间的具体条件,即剂量。温育之后,用含血清的培养基洗涤骨髓细胞,并按照已知的方法通过静脉输注将其返回至患者。在一些情况下,在收获骨髓和再输注已处理的细胞之间的时期,患者要接受其它治疗例如消融化疗或全身放射,此时,使用标准的医疗设备将已处理的骨髓细胞在液氮中冷冻保存。

[0628] 对于在体内的临床应用,本发明的细胞毒性偶联物将以溶液形式予以供应,对该溶液的无菌和内毒素水平进行检验。细胞毒性偶联物的合适的施用方案的实例如下。以静脉丸剂每周给药该偶联物,共4周。丸剂剂量被提供于50到100ml的生理盐水中,其中可以加入5到10ml的人血清白蛋白。剂量为每次给药10 μ g到100mg,静脉给药(每天100ng到1mg/kg的范围)。更优选地,剂量在50 μ g到30mg之间。最优选,剂量在1mg到20mg之间。治疗四周之后,患者可以继续以周为基础接受治疗。当临床情况准许时,本领域普通技术人员可以决定有关给药途径、赋形剂、稀释剂、剂量、次数等具体临床方案。

[0629] 根据杀死选择的细胞群体的体内或离体方法,可以被治疗的医学状况的实例包括任何类型的恶性状况,包括例如肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌和淋巴器官癌、骨肉瘤、滑膜癌、其中CA6被表达的肉瘤或癌以及其中CA6糖表位被明显

表达的其它待确定的癌;自身免疫疾病,例如系统性狼疮(systemic lupus)、风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)和多发性硬化;移植物排斥反应,例如肾移植排斥、肝移植排斥、肺移植排斥、心脏移植排斥和骨髓移植排斥;移植物抗宿主疾病;病毒感染,例如mV感染、HIV感染、AIDS等;和寄生虫感染,例如贾第虫病、阿米巴病、血吸虫病和本领域普通技术人员确定的其它感染。

[0630] 试剂盒

[0631] 本发明也包括试剂盒,其例如包含所述细胞毒性偶联物和使用该细胞毒性偶联物杀死特定细胞类型的使用说明。所述使用说明可以包括用于在体外、在体内或先体外后体内使用细胞毒性偶联物的指导。

[0632] 典型地,试剂盒有包含细胞毒性偶联物的分隔部分(compartment)。细胞毒性偶联物可以是冻干形式、液体形式或可适于被包含在试剂盒中的其它形式。试剂盒也可以包含对于实施在试剂盒中的使用说明上描述的方法所需的另外的组分,例如用于重构冻干粉的无菌溶液,在向患者给药之前用于与细胞毒性偶联物组合的额外试剂,和帮助向患者施用该偶联物的工具。

[0633] 其它的实施方案

[0634] 本发明进一步提供单克隆抗体、人源化抗体及其表位结合片段,它们被进一步标记以便用于研究或诊断应用中。在优选的实施方案中,所述标记为放射性标记、荧光团、生色团、显像剂或金属离子。

[0635] 也提供了诊断方法,其中所述标记的抗体或其表位结合片段被施予怀疑患癌的对象,并测量或监测标记在对象体内的分布。

[0636] 实施例

[0637] 参考下列实施例可最好地理解本发明的广泛的范围,这些实施例并非意在使本发明限于具体的实施方案。

[0638] 实施例1:通过流式细胞仪结合分析(flow cytometry binding assays),鉴定抗原阳性和阴性细胞

[0639] 流式细胞分析被用来将DS6表位CA6定位到细胞表面。人细胞系从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得,除了OVCAR5(Kearse等,/nt.JCancer88(6):866-872(2000))、OVCAR8和IGROV1细胞(M.Seiden,Massachusetts General Hospital)之外。所有的细胞在RPMI1640中培养,其中补充有4mM L-谷氨酰胺、50U/ml青霉素、50μg/ml链霉素(Cambrex Bio Science,Rockland,ME)和10%v/v胎牛血清(Atlas Biologicals,Fort Collins,CO),其在下文被称作培养基。细胞被保持在37℃,5%CO₂湿润温育箱中。

[0640] 在96孔板中,用FACS缓冲液(2%羊血清,RPMI)制备的连续稀释浓度的DS6抗体与细胞($1-2 \times 10^5$ 个细胞/孔)在冰上温育3-4h。在4℃,在台式离心机中以1500rpm旋转沉降细胞5分钟。去除培养基后,再用150μl的FACS缓冲液重新充填孔。然后重复洗涤步骤。FITC-标记羊抗鼠IgG(Jackson hnmunoresearch)用FACS缓冲液稀释1:100,并与细胞在冰上温育1h。用箔覆盖细胞培养板,以防止信号的光漂白。两次洗涤之后,用1%甲醛固定细胞,并在流式细胞仪上进行分析。

[0641] 显著地,CA6表位被发现于卵巢、乳房、子宫颈和胰腺来源的细胞系(表3)中,正如肿瘤免疫组织化学(immunohistochemistry)所预测。然而,其它肿瘤类型的一些细胞系显

示出有限的CA6表达。DS6抗体结合具有135.6pM的表观KD(在PC-3细胞中,表3)。在抗原阳性细胞系中,结合曲线(图1)的最大平均荧光(表3)表示了相对抗原密度。

[0642] 表3

[0643]

细胞系	组织	抗原	MMF [*]	表观 Kd (M)
HL-60	血液	-		
Jurkat	血液	-		
Namalwa	血液	-		
U-937	血液	-		
T98G	脑	+	35.94	1.775×10^{-10}
BT-20	乳房	+	232.20	9.142×10^{-10}
BT-474	乳房	-		
BT-483	乳房	+	1911.00	1.366×10^{-08}
BT-549	乳房	+	71.39	1.046×10^{-09}
CAMA-1	乳房	+	12.46	2.330×10^{-09}
MCF-7	乳房	+	81.41	2.890×10^{-09}
MDA-MB-157	乳房	+	8.635	1.972×10^{-10}
MDA-MB-231	乳房	+	31.85	1.460×10^{-09}
MDA-MB-468	乳房	+	71.58	8.127×10^{-10}
SK-BR-3	乳房	-		
T-47D	乳房	+	559.58	3.424×10^{-09}
ZR-75-1	乳房	+	811.67	4.299×10^{-09}
Hela	子宫颈	+	242.50	6.938×10^{-10}
KB	子宫颈	+	119.56	1.110×10^{-09}
WISH	子宫颈	+	1133.55	2.380×10^{-09}
Colo205	结肠	-		
DLD-1	结肠	-		
HCT-8	结肠	-		
HT-29	结肠	-		
Caki-1	肾	-		
A-549	肺	-		

[0644]

SW2	肺	-		
Caov-3	卵巢	+	465.20	5.478×10^{-09}
Caov-4	卵巢	+	149.00	4.043×10^{-09}
ES-2	卵巢	-		
IGROV1	卵巢	-		
OV-90	卵巢	-		
OVCAR-3	卵巢	-		
OVCAR5	卵巢	+	97.10	1.473×10^{-09}
OVCAR8	卵巢	-		
PA-1	卵巢	-		
SK-OV-3	卵巢	-		
SW626	卵巢	-		
TOV-112D	卵巢	-		
TOV-21G	卵巢	+	87.79	3.067×10^{-10}
AsPC-1	胰腺	-		
BxPC-3	胰腺	+	79.99	5.263×10^{-09}
HPAC	胰腺	+	2228.00	2.348×10^{-08}
HPAF-II	胰腺	+	266.50	2.811×10^{-09}
Hs766-T	胰腺	+	182.90	2.319×10^{-09}
MIAPaCa2	胰腺	-		
Mpanc96	胰腺	-		
SU.86.86	胰腺	+	36.86	1.043×10^{-09}
SW1990	胰腺	+	36.17	3.679×10^{-10}
PC-3	前列腺	+	24.81	1.356×10^{-10}
A375	皮肤	-		
SKMEL28	皮肤	-		
KLE	子宫	-		

[0645] *平均最大相对平均荧光

[0646] 实施例2:DS6表位的表征

[0647] 通过对CA6阳性细胞裂解产物(Caov-3)的点印迹进行免疫印迹,来分析DS6抗原——CA6的性质,所述细胞裂解产物用蛋白水解(链霉蛋白酶和蛋白酶K)和/或糖裂解(神经氨酸酶和过碘酸)处理进行消化。对阳性对照而言,在抗原阳性细胞系上测试识别各种表位类型的其它抗体(Caov-3和CM1;Colo205和C242;SKMEL28和R24)。CM1是识别Muc-1的不确定数目串连重复结构域(VNTR)的蛋白表位的抗体,因此为蛋白表位提供了对照。C242结合在Muc-1上的新的结肠直肠癌特异性唾液酸依赖性糖表位(CanAg),其为蛋白上的糖表位(glycotope)提供了对照。R24结合特异于黑素瘤的GD3神经节苷脂,因此为非蛋白质骨架上的糖表位提供了对照。

[0648] Caov-3、Colo205和SKMEL28细胞被铺于15cm组织培养板中。在裂解的前一天,更新培养基(30mL/板)。在冰上预冷改良RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl pH7.6,150mM NaCl,5mM EDTA,1%NP40,0.25%去氧胆酸钠)、蛋白酶抑制剂(PMSF,胃蛋白酶抑制剂A,亮抑蛋白酶肽和抑酶肽)和PBS。将培养基从板中吸出之后,用10mL冷PBS洗细胞两次。在冰上和/或4℃冷

室中进行所有随后的步骤。在PBS 的最后洗涤物被吸出之后,用1-2mL裂解缓冲液(RIPA缓冲液,带有新鲜加入的蛋白酶抑制剂,最终浓度为1mM PMSF,1μM胃蛋白酶抑制剂A,10μg/ml亮抑蛋白酶和2μg/ml抑酶肽)裂解细胞。使用细胞收集器(cell lifter)将裂解产物刮离平板,并通过上下吹吸悬液(5-10次)而将裂解产物粉碎,使用18G针。将裂解产物涡旋10分钟,然后在微离心机中以最大转速(13K rpm)离心10分钟。去掉沉淀,然后使用Bradford蛋白浓度分析试剂盒(Biorad)测定上清液。

[0649] 裂解产物(2μl)被直接移取到干燥的0.2μm的硝化纤维膜上。使斑点风干大约30分钟。该膜被切成片,每片包含一个点。在37℃,在存在链霉蛋白酶(1mg/ml酶,50mM Tris pH7.5,5mM CaCl₂)、蛋白酶K(1mg/ml酶,50mM Tris pH7.5,5mM CaCl₂)、神经氨酸酶(20mU/ml酶,50mM醋酸钠pH5,5mM CaCl₂,100μg/mlBSA)或过碘酸(20mM,0.5M醋酸钠pH5)的条件下将点温育1h。试剂购自Roche(酶)和VWR(过碘酸)。膜用在T-TBS洗涤缓冲液(0.1%Tween20,1X TBS)洗涤(5分钟),在室温下用封闭缓冲液(3%BSA、T-TBS)封闭2h,并在4℃在封闭缓冲液中用2μg/ml一抗(即DS6、CM1、C242、R24)过夜温育。用T-TBS将膜洗涤三次,5分钟,然后在室温下,用HRP偶联羊抗鼠(或人)IgG二抗(Jackson Immunoresearch;在封闭液中的1:2000稀释液)温育1h。将免疫印迹洗涤三次,使用ECL系统(Amersham)显影。

[0650] 被消化的对照裂解产物的免疫印迹(图2)显示,CM1信号被蛋白水解处理破坏,而糖裂解消化物的信号未受影响,这对于识别蛋白表位的抗体而言是被预料的。C242信号被蛋白水解或糖裂解处理破坏,这对于识别在蛋白上发现的糖表位的抗体而言是被预料的。R24信号未受蛋白水解处理的影响,其被神经氨酸酶或过碘酸处理完全破坏,这对于识别神经节苷脂的抗体而言是被预料的。被消化的Caov-3裂解产物点印迹的DS6免疫印迹显示,用蛋白水解和糖裂解化合物处理之后,信号发生损失。因此,如同C242,DS6结合在蛋白质核(proteinaceous core)上的糖表位。此外,在DS6免疫印迹中的信号对神经氨酸酶处理敏感。因此,CA6如同CanAg,是唾液酸依赖性糖表位。

[0651] 为了证实CA6的糖类本质,Caov-3裂解产物被点到PVDF膜上并用化学的去糖基化试剂,三氟甲烷磺酸(trifluoromethane sulfonic acid)(TFMSA),在氮气氛围中,室温下处理5分钟。用T-TBS洗涤点印迹,并用CM1或DS6作免疫印迹(图3)。在用酸处理后DS6信号被破坏,这进一步提供了证据表明CA6是糖表位。在TFMSA处理后CM1信号增强,表明该酸处理没有影响膜上的蛋白质,而且表明糖裂解处理暴露了被CM1识别的蛋白表位。

[0652] 为了进一步阐释容纳CA6的糖的结构,用N-聚糖酶、O-聚糖酶和/或唾液酸酶消化点印迹(图4)。在100℃,用2.5μl含SDS和β-巯基乙醇的变性缓冲液(Glyko)温育Caov-3细胞裂解产物(100μg,30μl)5分钟。然后在37℃,用1μlN-聚糖酶、O-聚糖酶和/或唾液酸酶A(Glyko)将该变性裂解产物消化1h。然后将消化的裂解产物点到(2μl)硝化纤维上,并如上述进行免疫印迹。

[0653] N-聚糖酶对DS6免疫印迹信号无明显影响。然而,用唾液酸酶消化的样品则没有产生信号。因为O-聚糖酶不能消化未经唾液酸酶预处理的唾液酸化O连接糖,所以单独用O-聚糖酶加工的样品的DS6信号将不受影响。相反,N-聚糖酶的活性不依赖任何糖苷酶的预处理。N-聚糖酶处理不影响DS6信号的事实表明,CA6表位极有可能位于唾液酸化的O连接糖链上。

[0654] 实施例3:对在其上发现有CA6表位的抗原的阐释

[0655] 为了鉴定在其上发现有CA6唾液酸糖表位的抗原,通过SDS-PAGE和蛋白质印迹法分析DS6免疫沉淀反应。在4℃,细胞裂解产物上清液(1mL/样品;3-5mg蛋白质)用由1mL RIPA缓冲液平衡的蛋白G珠子(Protein Gbead)(30μl)预清理1-2h,伴随旋转。在冰上和/或4℃冷室进行所有随后的步骤。在微量离心机中短时旋转沉降预清理珠子(2-3s)。将预处理的上清液转移到干净管子中,并用2μgDS6在旋转状态下温育过夜。将新制备的平衡的蛋白G珠子(30μl)加入裂解产物中,并在旋转状态下温育1h。在微量离心机中短时旋转沉降珠子-裂解物悬液,可任选地取出免疫沉淀反应后裂解物的样品。用1mL RIPA缓冲液将珠子洗涤5-10次。

[0656] 然后在37℃用30μl神经氨酸酶(20mU神经氨酸酶(Roche),50mM乙酸钠pH5,5mM CaCl₂,100μg/ml BSA)或30μl过碘酸(20mM过碘酸(VWR),0.5M乙酸钠pH5)消化免疫沉淀的DS6样品1h。然后将其悬浮在30μl的2X样品加样缓冲液(含β-巯基乙醇)中。将珠子煮沸5分钟,并将加样缓冲液上清液上样到4-12%或4-20%Tris-甘氨酸凝胶上(Invitrogen)。在125V将该凝胶在Laemmli电泳缓冲液(Laemmli electrophoresis running buffer)中分离1.5h。使用Mini Trans-blot转移装置(Biorad),整夜在20mA下,将凝胶样品转移到0.2μm的硝化纤维膜上(Invitrogen)。如在上述实施例2中所述,用DS6免疫印迹此膜。

[0657] 替代地,首先将免疫沉淀的珠子变性,然后用N-聚糖酶、O-聚糖酶和/或唾液酸酶A(Glyko)进行酶促消化。将珠子重悬浮于27μl温育缓冲液和2μl变性缓冲液(Glyko)中,并在100℃温育5分钟。冷却到室温之后,加入去污剂溶液(2μl)并用N-聚糖酶、O-聚糖酶和/或唾液酸酶A在37℃将样品温育4小时。加入5X样品加样缓冲液(7μl)之后,将样品煮沸5分钟。如上所述,使样品进行SDS-PAGE和免疫印迹。

[0658] DS6免疫沉淀出>250kDa的条带,在抗原阳性细胞裂解物中可以看到此蛋白质带(图5A、B和C)。在一些细胞系中(即T-47D),观察到两个条带(doublet)。在用神经氨酸酶或过碘酸(图5A和B)处理的Caov-3免疫沉淀反应中,>250kDa的条带被破坏,这表明CA6表位位于>250kDa的条带上。>250kDa的条带也被证明对免疫沉淀的N-聚糖酶处理反应不敏感,这与CA6位于O联糖上是一致的(图5F)。此外,支持250kDa条带为CA6抗原在于这样的事实,即在DS6抗原阴性细胞中DS6免疫沉淀反应没有显示这样的条带(图5D和E)。

[0659] 有几条证据表明CA6抗原为Muc1。由于其高分子量和对O联糖特异性糖水解酶的敏感性,CA6抗原很可能是粘蛋白。粘蛋白的过量表达在肿瘤中特别是在乳房和卵巢肿瘤中被很好地表征,这与DS6的主要肿瘤反应活性是一致的。此外,如同CanAg(其为在Muc1上的唾液酸糖表位),CA6对高氯酸沉淀不敏感,这表明CA6抗原极大可能是(heavily)O-糖基化的。观察到在一些DS6表达细胞系中,DS6免疫沉淀出>250kDa的两个条带,这暗示CA6为Muc1。人类Muc1的特点是存在两种不同的Muc1等位基因,其串连重复的数目不同,这导致两种不同分子量的两种Muc1蛋白质的表达。

[0660] 为了检验是否在Muc1上发现CA6,对来自Caov-3裂解物的DS6免疫沉淀物进行SDS-PAGE,并用DS6或Muc1VNTR抗体CM1进行免疫印迹。如在图6A所观察到的,CM1与由DS6免疫沉淀出来的>250kDa条带强烈反应。在图6B中,当用DS6或CM1进行免疫印迹时,来自HeLa细胞裂解物的DS6和CM1免疫沉淀显示出同样的>250kDa的两个条带。这些结果表明CA6表位的确位于Muc-1蛋白质上。在HeLa(和T-47D)细胞中所观察到的DS6双条带可以通过这样的事实予以解释,即Muc-1的表达是由具有不同数目的串连重复的不同等位基因来指导的。

[0661] 尽管CM1和DS6结合相同的Muc-1蛋白,然而它们是截然不同的表位。Caov-3裂解物的点印迹通过三氟甲烷磺酸(TFMSA)的化学去糖基化作用,完全破坏了DS6信号(图3)。然而,相同的处理增强了CM1信号。去糖基化作用可能是暴露了被隐藏的CM1抗体表位。此外,DS6和CM1的流式细胞术结合结果的比较(图4)表明,CA6表位并不是存在于表达Muc1的每个细胞上。有趣地发现,CA6表位在Co1o205上不被表达(表3),而已知Co1o205细胞系表达高水平的Muc1CanAg唾液酸糖表位。

[0662] 表4

[0663]

		DS6		CM1	
		MMF*	表观 Kd (M)	MMF*	表观 Kd (M)
DS6 阳性 & CM1 阳性	细胞系				
	BT549	71.39	1.046×10^{-09}	187.90	6.056×10^{-09}
	CaOV3	465.20	5.478×10^{-09}	1031.00	7.479×10^{-09}
	Hela	242.50	6.938×10^{-10}	334.80	2.907×10^{-09}
	KB	119.56	1.110×10^{-09}	338.00	5.345×10^{-09}
	MCF7	81.41	2.890×10^{-09}	1023.00	8.694×10^{-09}
DS6 阴性 &	KLE	27.48	-	561.70	8.156×10^{-09}
	OVCAR3	21.19	-	192.50	5.949×10^{-09}
CM1 阳性	SKOV3	17.53	-	49.41	6.246×10^{-09}

[0664] *最大平均相对荧光

[0665] 实施例4:流散的(shed)CA6表位的定量分析

[0666] 因为CA6表位位于Muc1上,已知在许多癌症患者中,Muc1分子会流散到血管中,所以采取定量方法,目的是确定这样的水平是否会抑制DS6抗体治疗。循环抗体与抗原的结合被认为可以导致免疫复合物从血液中快速清除。如果被施用的抗体剂量有很大部分被快速地从循环中去除,则到达肿瘤的量很可能减少,这导致抗体治疗剂的抗肿瘤活性降低。当抗体与高效的细胞毒性化合物偶联时,偶联物的快速清除可能潜在地增加非特异性毒性。因此,对于抗体-小的药物偶联物,例如DS6-DM1,可以预料到,高水平的流散抗原会降低抗肿瘤效应并增加剂量限制毒性(dose-limiting toxicity)。

[0667] 关于流散抗原浓度对药物动力学的影响,近来的抗体治疗剂的临床试验已经获得了相关的信息。例如,在曲妥珠单抗(Herceptin)——其为用于治疗表达her2/neu的转移性乳癌的抗体——的临床试验中,当流散的Her2/neu水平小于500ng/mL时,曲妥珠单抗清除的药物动力学显示未被改变(Pegram等,J.Clin.Oncol.16(8):2659-71(1998)。假定流散的Her2/neu的分子量为110,000道尔顿,流散的Her2/neu的摩尔浓度低于4.5nM似乎对药物动力学几乎没有影响。

[0668] 在另一个例子中,采用cantuzumab mertansine(huC242-DM1)的临床试验表明,治疗前流散CanAg(C242表位)的水平与抗体清除的药物动力学没有关联(Tolcher等,J.Clin.Oncol.21(2):211-22(2003)。CanAg表位,与由DS6识别的CA6表位相似,为在Muc1上的独特的肿瘤特异性O联唾液酸糖表位。然而,CanAg表位的异质性质使其难以用摩尔术语定量。在一般种群中,Muc1等位基因在长度上有变化,这取决于在不确定数目串连重复(VNTR)结构域中的串连重复的数目。在每个串连重复中都会出现几个O联糖基化作用的位点。考虑到CanAg表达的复杂性,便有了在固有糖基转移酶活性方面的细胞间变化。因此,甚至在一

个病人身上,每个Muc1分子具有广泛范围的CanAg表位也是可能的。而且,在一群患者中,每个Muc1分子的CanAg表位的比例将是不同的。由于这个原因,通过夹心ELISA测量血清样品中的流散CanAg,其中带有CanAg表位的流散的Muc1被C242捕获,并通过生物素化C242/链霉抗生物素蛋白HRP系统进行检测。流散出的CanAg被定量,其单位被标准化(U),与每ml血清的表位数目成比例,而非通过Muc1的摩尔浓度来表示。类似地,对于流散出的CA6表位的定量具有相似的情况。相反,对曲妥珠单抗而言,每个流散her2/neu分子仅有一个表位,这极大简化了对流散抗原的数量测定。

[0669] 为了将CA6流散表位水平与那些在曲妥珠单抗和cantuzumab mertansine的临床试验中所发现的结果联系起来,开发了用于获得在Muc1上的复杂流散表位例如唾液酸糖表位的摩尔浓度的方法。首先,建立对DS6的简单夹心式ELISA分析。对该分析的描绘被示于图7A中。DS6被用于捕获具有CA6表位的Muc1。因为每个Muc1分子具有多个CA6表位,所以生物素化的DS6也被用作示踪抗体。借助链霉抗生物素蛋白-HRP,使用ABTS作为底物,检测与被捕获的CA6结合的生物素化DS6。被捕获的CA6表位来自卵巢癌患者血清或来自商业供应的Muc1检验试剂盒(CA15-3)的标准品,该标准品被用于监测乳癌患者体内的流散Muc1。任意设置DS6单位/ml,其等同于CA15-3标准单位/ml。

[0670] 在图7B中显示了DS6夹心ELISA的结果,其中使用了CA15-3标准。所产生的曲线与在CA15-3分析中用CA15-3标准所获得的曲线非常相似。为将DS6单位/ml转化为CA6的摩尔浓度,需要将信号转化为皮克DS6的生物素化DS6标准曲线。假定在CA6表位和生物素化DS6抗体之间是一对一的化学计量,而且生物素化DS6的分子量为160,000道尔顿,则可以计算所加入的每体积样品所捕获的CA6的摩尔数。

[0671] 在图8A和B中描述了产生表示生物素化DS6的标准曲线的两种可供选择的方法。在图8A中,羊抗鼠IgG多克隆抗体被用于捕获生物素化DS6,其再以与在图7中所示的夹心ELISA分析中所用方式相同的方式被检测。在图8B所示的方法中,生物素化DS6被直接放置到ELISA板上,并如在图8A中所示被检测。如在图8C中看到的,通过每个方法所产生的生物素化DS6标准曲线非常一致。

[0672] 在表5中显示了对卵巢癌患者血清样品的各种流散抗原所作的分析。通过测量流散出的CA125单位/ml,CA125ELISA一般被用于监测卵巢癌患者的治疗。血清样品的CA125状况被提供。使用可识别不同于DS6所识别的表位的捕获抗体和检测抗体,通过测量流散的Muc1的单位/ml,CA15-3ELISA一般被用于监测乳癌患者的治疗。在表5中,测量了卵巢癌患者血清样品中的CA15-3。

[0673] 表5

[0674]

血清 编号	CA125 ¹ (U/ml)	CA15-3 ¹ (U/ml)	DS6 ² (U/ml)	DS6 ³ (pM)	DS6 ⁴ (pM)
4	72.80	117.72	29.79	52.13	188.94
5	3651.90	98.19	567.02	654.44	>2560.00
6	930.50	87.08	504.15	667.56	2505.00
7	76.00	72.70	135.65	246.94	778.25
8	32.50	18.44	39.96	65.19	239.88
9	551.70	292.39	>975.61	1512.31	>2560.00
10	90.00	42.40	49.48	85.19	305.88
11	200.50	60.58	92.32	152.38	526.75
12	283.00	35.67	83.65	135.81	485.06
13	197.50	20.61	35.92	61.06	216.25
14	100.60	6.13	12.39	23.19	88.06
15	34.60	59.18	199.85	286.63	1228.56
17	196.40	56.75	66.53	130.44	405.88
18	16.90	30.45	34.43	60.81	223.69
19	22.00	263.93	118.98	191.69	728.94
22	110.70	21.44	16.46	29.94	111.38

[0675] ¹由商业ELISA试剂盒测定[0676] ²由商业CA15-3标准测定(1CA15-3U=1DS6U)[0677] ³羊抗鼠IgG&生物素-DS6标准曲线[0678] ⁴生物素-DS6标准曲线

[0679] 对于表5中所报告的CA15-3的值,使用了来自CanAg Diagnostics的商业供应的CA15-3酶免疫分析试剂盒(Enzyme Immuno Assay kit)。对于DS6单位/ml,在DS6夹心ELISA中,使用CA15-3标准(来自CanAg Diagnostics的CA15-3酶免疫分析试剂盒)来产生标准曲线。任意设置DS6单位/ml等于CA15-3单位/ml。在最后两列中,使用在图8C中所示的生物素化DS6标准曲线来计算皮摩尔(pM)流散CA6。

[0680] 关于CanAg水平的定量分析,所报告的CanAg血清水平是针对在治疗前参与cantuzumab mertansine临床试验的患者(Tolcher等,J.Clin.Oncol.21(2):211-22(2003)。使用CanAg标准品,使用类似于对DS6所述的ELISA试验,制作CanAg标准曲线。C242被用于捕获CanAg标准品。使用生物素化C242示踪物,然后使用ABTS作为底物用链霉抗生物素蛋白-HRP进行显色,完成被捕获的CanAg的检测。建立生物素化C242标准曲线,如对生物素化DS6所作,以使单位/ml转化为循环CanAg表位的摩尔浓度。在表6中,报告了来自cantuzumab mertansine临床试验患者的CanAg水平,以及相应的循环CanAg的计算摩尔浓度。

[0681] 表6

[0682]

CanAg ¹ (U/ml)	CanAg ² (pM)	CanAg ³ (pM)
31240	19185.7	34592.8
8687	3535	9619.3
7456	4579	8256.2
3686	2263.7	4081.6
1447	888.7	1602.3
1262	775	1397.4
718	441	795.1
547	335.9	605.7
394	242	436.3
381	234	421.9
329	202.1	364.3
322	197.8	356.6
306	187	338.8
284	174.4	314.5
247	151.7	273.5
242	148.6	268
229	140.6	253.6
227	139.4	251.4
184	113	203.7
120	73.7	132.9
107	65.7	118.5
100	61.4	110.7
81	49.7	89.7
81	49.7	89.7
67	41.1	74.2
53	32.5	58.7
45	27.6	49.8
43	26.4	47.6
39	24	43.2
36	22.1	39.9
24	14.7	26.6
18	11.1	19.9
17	10.4	18.8
<10	6.1	11.3
<10	6.1	11.3
<10	6.1	11.3
<10	6.1	11.3

[0683] ¹由夹心ELISA测量的循环CanAg的处理前水平[0684] ²羊抗鼠IgG&生物素-C242标准曲线[0685] ³生物素-C242标准曲线

[0686] 卵巢癌患者的流散CA6的pM水平与CanAg阳性癌症患者的流散CanAg的计算pM水平的比较显示,一般地,流散出的CA6水平与流散出的CanAg水平类似。此外,16例卵巢癌患者的血清样品中仅有2例可能具有大于4.5nM的CA6水平,(血清样品5和9,它们的信号超出了标准曲线的范围),在Her2/neu阳性乳癌患者进行的临床试验中观察到超过该值可改变herceptin药物动力学。在37例临床试验患者中,仅有3例被发现CanAg水平高于4.5nM。在该

临床试验中,流散CanAg水平与cantuzumab mertansine的更快清除没有关联。然而,具有最高CanAg水平(31240U/ml)的患者仅仅在输血后8小时被取样。这些结果表明,Muc1的一些表位,例如CA6和CanAg,虽然在癌症患者中流散出来,但其流散出的水平未达到抑制抗体治疗剂治疗的水平。

[0687] 实施例6:克隆鼠DS6抗体可变区

[0688] 在临床的情况中,鼠单克隆抗体例如DS6具有有限的效用,因为它们被人免疫系统识别为外源物。患者会很快生成成人抗鼠抗体(HAMA),这导致鼠抗体的快速清除。因此,鼠DS6(muDS6)的可变区被表面重构,以产生人源化DS6(huDS6)抗体。

[0689] 通过RT-PCR克隆鼠DS6抗体可变区。使用Qiagen RNeasy小量制备试剂盒,从DS6杂交瘤细胞的汇合T175瓶纯化出总RNA。通过UV分光光度法测定RNA浓度,使用Gibco Superscript II试剂盒和随机六聚体引物(random hexamer primers),用4-5μg总RNA进行RT反应。

[0690] 用简并引物进行PCR反应,基于Wang Z等,J Immunol Methods. Jan13;233(1-2):167-77(2000)中所述。RT反应混合物被直接用于简并PCR反应。使用3'轻链引物HindKL,

[0691] (TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC)(SEQ ID NO:25)

[0692] 和3'重链引物BamIgG1,

[0693] (GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC)(SEQ ID NO:26),

[0694] 对于5'端的PCR引物,轻链的引物为SacIMK

[0695] (GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA)(SEQ ID NO:27),

[0696] 重链的引物为

[0697] EcoR1MH1(CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC)(SEQ ID NO:28)

[0698] 和

[0699] EcoR1MH2(CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG)(SEQ ID NO:29)的均等混合物(混合碱基:H=A+T+C,S=G+C,Y=C+T,K=G+T,M=A+C,R=A+G,W=A+T,V=A+C+G,N=A+T+G+C)。

[0700] PCR反应是标准的,例外的是用10%DMSO补充PCR反应(50μl反应混合物,含有终浓度如下的各物质:1X反应缓冲液(ROCHE),2mM的每一种dNTP,1mM的每一种引物,2μl RT反应产物,5μl DMSO和0.5μl Taq(ROCHE))。使用修改自Wang Z等,(J Immunol Methods. Jan13;233(1-2):167-77(2000))的步骤,在MJ research热循环控制仪(research thermocycler)上,进行PCR反应:1)94℃,3分钟;2)94℃,15秒;3)45℃,1分钟;4)72℃,2分钟;5)循环回到步骤#229次;6)在72℃用10分钟的最终延伸步骤结束。通过由PCR引物产生的限制性位点使用限制酶将PCR产物克隆到pBluescript II SK+(Stratagene)中。Seqwright测序服务对重链和轻链克隆进行测序。

[0701] 为了确认5'末端cDNA序列,进行另外的PCR和克隆。由简并PCR克隆测定的DS6轻链和重链cDNA序列被放入NCBI的Blast搜索网站,带有已提交的信号序列的鼠抗体序列被保存。利用在相关DNA序列中的保守肽段,由这些信号肽设计出PCR引物。EcoRI限制性位点被加入到前导序列引物中(表7),这些被用于RT-PCR反应中,如上所述。

[0702] 表7

DS6 信号序列简并引物

名称	序列
[0703] 重链-DS6HClead	tttgaattcaataactacaggtgtccact -SEQ ID NO : 30
轻链-KTILClead	ttttgagctccagattttcagcttcctgct -SEQ ID NO : 31

[0704] 几个单独的轻链和重链克隆被测序,以鉴定并避免可能的由聚合酶产生的序列错误。对于轻链和重链RT-PCR克隆,都仅仅获得单一的序列。这些序列对于设计可以扩增延伸到信号序列中的鼠DS6轻链和重链序列的引物来说是足够的。来自这些继续的PCR反应的随后的克隆确认了可变区的5'末端序列,其曾被最初的简并引物改变。来自各种cDNA克隆的累加结果提供了在图9中所呈现的最终鼠DS6轻链和重链序列。使用Kabat和AbM定义,鉴定了三个轻链和重链CDRs(图9和10)。对NCBI IgBlast数据库的搜索显示,muDS6抗体轻链可变区最可能衍生自鼠IgV γ ap4胚系基因,而重链可变区最可能衍生自鼠IgVh J558.41胚系基因(图11)。

[0705] 实施例7:DS6抗体的可变区表面残基的测定

[0706] 由Pedersen等(1994)和Roguska等(1996)描述的抗体表面重构技术始于预测鼠抗体可变序列的表面残基。表面残基被定义为这样的氨基酸,即,其总表面积的至少30%可接近水分子。在缺乏解析结构以发现muDS6的表面残基的情况下,我们在127个抗体结构资料中找出了10个具有最同源序列的抗体来进行比对(图12)。这些被比对的序列的每一个Kabat位置的溶剂可及性被平均(图13A和B)。

[0707] 平均可及性在25%到35%之间的表面位置要经历第二轮分析,在该轮分析中,参与比较的是一部分抗体,它们在任一侧都含有两个相同的侧翼残基(图13A和B)。第二轮分析之后,muDS6重链的21个预测表面残基被增加为23个,Tyr3和 Lys23被加入到具有大于30%的预测表面可及性的残基列表中。在我们的大部分表面重构抗体中,使用了重链CDR1的Kabat定义,但是对于DS6,在计算过程中不经意使用了AbM定义,因此重链残基T28没有被定义为骨架表面残基,否则它则可能是。轻链表面位置的数目从16减少到15,因为在第二轮分析中,Ala80的预测表面可及性从30.5%减少到27.8%。muDS6重链和轻链可变序列合起来具有38个预测的表面可及骨架残基。

[0708] 实施例8:人抗体选择

[0709] 将鼠DS6可变区的表面位置与Kabat数据库中人抗体序列中的相应位置进行比较(Johnson G,Wu TT.NucleicAcids Res.Jan1;29(1):205-6(2001))。使用抗体数据库管理软件SR(Searle,1998)提取并比对来自天然重链和轻链人抗体对的表面残基。选择具有最相同表面残基的人抗体可变区表面——对位于CDR5Å之内的位置给与特别考虑,以代替鼠DS6抗体可变区表面残基。

[0710] 实施例9:嵌合和人源化抗体的表达载体

[0711] 轻链和重链成对序列被克隆到单个哺乳动物表达载体中。人可变序列的PCR引物创造了限制性位点,这使得人信号序列可以被加入到pBluescriptII克隆载体中。然后可变序列可以被克隆到哺乳动物表达质粒中,该质粒具有分别针对轻链或重链的EcoRI和BsiWI或HindIII和ApaI位点(图14)。轻链可变序列按照框架被克隆到人IgKappa恒定区上,重链可变序列被克隆到人IgGamma1恒定区序列上。在最终的表达质粒中,人CMV启动子驱动轻链和重链cDNA序列的表达。

[0712] 实施例10:可能负面影响DS6活性的残基的鉴定

[0713] 到目前为止,对于大部分的人源化处理,目标抗体的分子模型已被建立,从而可以鉴定出位置最接近CDR的残基作为潜在的问题残基(problem residues)。由于被研究的表面重构抗体的数目在不断增加,因此历史经验在预测问题方面至少和建模是一样有效的,因此未建立DS6的分子模型。相反,将鼠DS6表面残基与那些先前表面重构的抗体的残基进行比较,具有可影响抗体结合活性的低至高风险的残基被鉴定。

[0714] 在可获得的解析抗体结构和来自先前的人源化工作的分子模型中,相似的残基组被重复鉴定为位于CDR的5Å之内。使用该数据,表1提供了可能最接近及可能位于CDR的5Å之内的鼠DS6残基。在先前的人源化中,这些位置中的许多也已经被改变,但是仅有重链位置74曾经导致结合活性损失。在huC242和huB4中,鼠残基被保留在该位置,目的是保存鼠抗体的结合活性。另一方面,在人源化6.2G5C6中,此相同的位置被变成对应的人残基,而没有损失活性(6.2G5C6为抗IGF1-R抗体,经常被简单称作抗C6)。尽管表1中的任何残基都可能在人源化抗体中是个问题,然而重链残基P73将特别受到关注,考虑到关于该位置的先前的经验。

[0715] 实施例11:最同源的人表面的选择

[0716] 使用SR软件,从Kabat抗体序列数据库中找出用于表面重构muDS6的候选人抗体表面。该软件提供了一个界面,仅仅搜索针对该抗体数据库的特定残基位置。为了保留天然的配对,轻链和重链的表面残基被一起进行比较。来自Kabat数据库的最同源人表面按序列同一性的等级被排列。由SR Kabat数据库软件排列的前3个表面被提供在表2中。然后将这些表面进行比较,以鉴定哪些人表面将需要对在表1中所鉴定的残基作最少的变化。抗Rh(D)抗体,28E4(Boucher等,1997),需要最少数目的表面残基变化(总共11),而且这些残基中仅有三个被包括在潜在问题残基的列表中。因为28E4抗体提供最同源的人表面,所有它是表面重构muDS6的最佳候选者。

[0717] 实施例12:人源化DS6抗体的DNA序列的构建

[0718] 使用PCR诱变来进行DS6的11个表面残基的改变。在鼠DS6可变区cDNA克隆上进行PCR诱变,构建表面重构人DS6基因。人源化引物组被设计为使氨基酸变化为表面重构DS6所需,如下表8中所示。

[0719] 表8

[0720]

引物名称	引物序列	
DS6HCapa	cgatgggcccttggtggaggtgcagagacagtgaccaga	SEQ ID NO: 32
DS6LCBsi	ttttcgtacgtttcagctccagcttggt	SEQ ID NO: 33
DS6HC5end	caggtgtacactcccaggcttatctccagcagtct	SEQ ID NO: 34
huC6HCapa	cgatgggcccttggtggagggcggcagagacagtgaccaga	SEQ ID NO: 35
ds6lc5et	caggtgtacactccgagattgttctcaccagctctccagcaaccatgtct gcatct	SEQ ID NO: 36
Ds6LCr18	ggcactgcaggttatggtgacctctcccctggaga	SEQ ID NO: 37
ds6lcs77f	caatcagcagcatggaggctgaaga	SEQ ID NO: 38
ds6lcs77r	gcctccatgctgctgattgtgaga	SEQ ID NO: 39
DS6HCvvpk	caggtgtacactcccaggctcagctcgtgcagtctggggctgaggtggtg aagccggggcctcagt	SEQ ID NO: 40
DS6HCt	ttgactgcagacacatcctccagcaca	SEQ ID NO: 41
ds6hcQT	gtgtctgcagtcaatgtggccttgccctggaaactctgat	SEQ ID NO: 42
HuDS6HCapa	cgatgggcccttggtggagggcggcagagacagtgacaaga	SEQ ID NO: 43

[0721] PCR反应是标准的,不同的是用10%DMSO补充所述反应(50 μ l反应混合物,终浓度为1X反应缓冲液(ROCHE),2mM每种dNTP,1mM每种引物,100ng模板,5 μ l DMSO和0.5 μ l Taq(ROCHE))。按下列步骤,在MJ Research热循环仪上,进行所述反应:1)94 $^{\circ}$ C,1分钟;2)94 $^{\circ}$ C,15秒;3)55 $^{\circ}$ C,1分钟;4)72 $^{\circ}$ C,1分钟;5)循环回到步骤#229次;6)在72 $^{\circ}$ C用4分钟的最终延伸步骤结束。PCR产物用其相应的限制性酶消化,并将其克隆到pBluescript克隆载体中。对克隆进行测序,以确认氨基酸变化。

[0722] 因为改变重链残基P73在过去已经引起过问题,所以建立了两种形式的重链,一种具有人28E4T73,一种保留鼠P73。在两种形式的人源化DS6中,其它10个表面残基从鼠变为鼠28E4残基(表2)。忠于通常的命名方法,最人源化的是1.0形式,因为它具有所有11个人表面残基。保留P73的重链形式被命名为1.2形式,万一需要其它的形式,因此1.1形式被保留给包含最多的鼠残基的形式。在图15A和B中显示了与鼠DS6氨基酸序列进行比对的这两种人源化形式的氨基酸序列。这两种人源化DS6抗体基因都被克隆到抗体表达质粒(图14),用于瞬时和稳定的转染。人源化形式v1.0和v1.2的轻链可变区的cDNA和氨基酸序列是相同的,并被示于图16中。人源化形式v1.0和v1.2的重链cDNA和氨基酸序列被示于图17A和B中。

[0723] 实施例13:huDS6在CHO细胞中的表达和纯化与亲和力测定

[0724] 为了测定人源化DS6形式是否保留了msDS6的结合亲和力,表达并纯化所述抗体是必需的。用各自的抗体表达质粒转染CHO细胞。因为huDS6的瞬时表达水平非常低,所以选择稳定的细胞系。

[0725] 将CHO DG44细胞(4.32×10^6 个细胞/板)用非选择性培养基(α -MEM+核苷酸(Gibco),补充以4mM L-谷氨酰胺,50U/ml青霉素,50 μ g/ml链霉素和10%v/v FBS)接种于15cm板中,并放置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂湿润温育箱中。第二天,使用Qiagen推荐的Polyfect Transfection方案的修改版本,用huDS6v1.0和v1.2表达质粒转染细胞。从细胞中吸走非选

择性培养基。用7ml预热(37℃)PBS洗板,并用20ml非选择性培养基再次充填所述板。将质粒DNA(11μg)稀释到800μl Hybridoma SFM(Gibco)中。然后,将70μl Polyfect(Qiagen)加入到DNA/SFM混合物中。然后将该Polyfect混合物轻轻涡旋几秒钟,并在室温下温育10分钟。将非选择性培养基(2.7ml)加入混合物中。将此最终混合物与板中细胞温育24小时。

[0726] 从板中除去转染混合物/培养基,然后对细胞进行胰蛋白酶处理并计数。然后,以不同的浓度(1800、600、200和67个细胞/孔),将选择性培养基(α -MEM-核苷酸,补充以4mM L-谷氨酰胺,50U/ml青霉素,50μg/ml链霉素,10%v/v FBS,1.25mg/mlG418)中的细胞置于96孔板。将细胞培养2-3周,如果必要,补充培养基。使用定量ELISA筛选各孔的抗体生产水平。将Immulon2HB96孔板用羊抗人IgG F(ab)₂抗体包被(Jackson ImmunoResearch;1μg/孔,在100μl50mM碳酸钠缓冲液中,pH9.6),并在室温下温育1.5h,同时转动。所有随后的步骤都在室温下进行。用T-TBS(0.1%Tween-20,TBS)洗孔两次,并用200μl的封闭缓冲液(1%BSA,T-TBS)封闭1h。用T-TBS将孔洗两次。在独立的平板中,用封闭缓冲液对抗体标准,EM164(100ng/ml)和培养上清液作系列稀释(1:2或1:3)。将这些稀释物(100μl)转移到ELISA板中温育1h。孔用T-TBS洗涤三次,与100μl羊抗人IgG Fc-AP(Jackson ImmunoResearch)温育45分钟,羊抗人IgG Fc-AP已用封闭缓冲液稀释成1:3000。用T-TBS洗5次之后,使用100μl PNPP显色剂(development reagent)(10mg/ml PNPP(对-硝基苯磷酸二钠盐;Pierce),0.1M二乙醇胺pH10.3缓冲液)将孔显色25分钟。用ELISA平板读数计测量405nm处的吸光度。在标准曲线的线性部分的吸光度读数(为培养物上清液的读数)被用于确定抗体水平。

[0727] 然后将由ELISA鉴定出的最高生产克隆进行扩增,并制备冷冻细胞储液。为了产生足够量的抗体用以纯化,用30ml选择性培养基将细胞扩展到15cm板上($\sim 1 \times 10^6$ 细胞/板)并培养1周。将培养上清液收集到250ml锥形管中,在台式离心机中旋转沉降(2000rpm,5分钟,4℃),然后通过0.2μm滤器进行无菌过滤。

[0728] 为了纯化DS6,将NaOH加入到过滤的培养上清液中,达到最终pH为8.0。用20-50倍柱体积的结合缓冲液平衡Hi Trap rProtein A柱(Amersham)。使用蠕动泵将上清液加样到柱上。然后,用50倍柱体积的结合缓冲液洗柱。使用洗脱缓冲液(100mM乙酸,50mM NaCl,pH3)将结合的抗体从柱中洗脱到放置在分级收集器上的试管中。然后使用中和缓冲液(2M K₂HPO₄,pH10.0)中和洗脱下来的抗体,并在PBS中透析整夜。将透析的抗体通过0.2μm针筒式滤器过滤。测量280nm处的吸光度,以测定最终的蛋白质浓度。

[0729] 通过流式细胞术来比较纯化的huIgG和muDS6的亲和力。在第一组试验中,测量与CA6-表达细胞系WISH的直接结合。如图18A所示,嵌合DS6、huDS6v1.0和huDS6v1.2显示出非常相似的亲和力,其表观K_D分别为3.15nM、3.71nM和4.2nM,这表明表面重构没有破坏CDRs。这些亲和力仅仅稍低于如图18B所示的muDS6的K_D(K_D=1.93nM)。为了确证huDS6形式保留了muDS6的亲和力,进行了竞争性结合试验。这一方式的优势在于同样的检测体系被用于鼠和人抗体;即生物素-muDS6/链霉抗生物素蛋白-DTAF。在一些情况下,实验测定的表观K_d会仅仅因为用于间接检测结合的二级试剂而发生变化。通过生物素-DS6在使用羊抗鼠-FITC时的表观K_d(K_d=2.80nM;图18B)和生物素-DS6在使用链霉抗生物素蛋白-DTAF时的表观K_d(K_d=6.76nM;图19A)的比较,便可对此进行例证。比较muDS6、huDS6v1.0和huDS6v1.2与生物素-DS6的竞争能力的竞争性结合试验的结果被示于图19B中。muDS6、huDS6v1.0和

huDS6v1.2的的表观EC₅₀分别为12.18nM、37.07nM和22.64nM。这些结果说明,用以产生人源化DS6的muDS6表面重构引起结合亲和力的稍微降低。

[0730] 实施例14:DS6-DM1细胞毒性偶联物的制备

[0731] 使用8倍摩尔过量的N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶二硫代)戊酸酯(SPP)修饰DS6抗体(8mg/ml),以引入二硫吡啶基。在室温下,在95%v/v缓冲液A(50mM KPi,50mM NaCl,2mM EDTA,pH6.5)和5%v/v DMA中将反应进行2h。通过NAP或Sephadex G25柱(在缓冲液A中平衡)将稍微膨胀的反应混合物进行凝胶过滤。通过测量抗体在280nm处的吸光度以及DTT释放2-巯基吡啶(Spy)在280和343nm处的吸光度,测定修饰的程度。然后在2.5mg Ab/mL,使用相对于Spy为1.7倍摩尔过量的N^{2'}-脱乙酰基-N^{2'}-(3-巯基-1-氧丙基)-美登素(L-DM1)将修饰的DS6进行偶联。在缓冲液A(97%v/v)和DMA(3%v/v)中进行此反应。将反应在室温下温育整夜,~20h。离心分离不透明反应混合物(1162×g,10分钟),然后将上清液通过用缓冲液B(1X PBS pH6.5)平衡的NAP-25或S300(Tandem3,3x26/10脱盐柱,G25介质)柱进行凝胶过滤。去除沉淀。使用0.22μm Millex-GV滤器将偶联物无菌过滤,然后在缓冲液B中用Slide-A-Lyzer进行透析。通过测量过滤后物质在252nm和280nm处的吸光度,测定每分子DS6连接的DM1分子的数目。DM1/Ab比为4.36,偶联DS6的阶段收率为55%。偶联抗体浓度为1.32mg/mL。通过大小排阻层析(SEC)对纯化的偶联物进行生化表征,该偶联物被发现具有92%的单体。纯化的偶联物中的DM1的分析显示,99%与抗体共价结合。在图20中,DS6-DM1偶联物和未修饰的DS6与Caov-3细胞的流式细胞结合分析表明,DS6的偶联导致亲和力仅有些许损失。

[0732] 实施例15:DS6-DM1在体外的细胞毒性

[0733] 作为裸抗体,DS6已经显示在细胞培养物中没有增殖或生长抑制活性(图21)。然而,当在存在DM1偶联至IgG重链和轻链的情况下,将细胞与DS6温育时,DS6非常有效地将该偶联物定向并传送到细胞上,导致间接的细胞毒性(图21)。为了进一步测定裸DS6的固有活性,使用鼠和人源化DS6进行了补体依赖性细胞毒性(CDC)测定。在存在5%人或兔血清和鼠或人源化DS6的各种稀释物的情况下,HPAC和ZR-75-1细胞(25000个细胞/孔)被置入96孔板,培养基为200μl RHP培养基中(RPMI-1640,0.1%BSA,20mM HEPES(pH7.2-7.4),100U/ml青霉素和100ug/ml链霉素)。在37℃温育细胞2h。然后将Alamar Blue(10%的终浓度)试剂(Biosource)加入上清液中。在测量荧光之前,将细胞温育5-24小时。在补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中,鼠和人源化DS6都没有影响(图22),这表明DS6的治疗应用需要结合毒性效应分子。

[0734] 用不同的DS6阳性细胞系,使用两种不同的测定形式来检验美登素类偶联的DS6抗体的细胞毒性。进行了集落生成分析,其中细胞(1000-2500个细胞/孔)被植入6孔板中,处于用被培养基稀释的2ml偶联物中。在几个浓度下,一般在 3×10^{-11} M到 3×10^{-9} M之间,将细胞持续暴露于偶联物,并在37℃,6%CO₂湿气箱中温育5-9天。用PBS洗涤培养板,并用1%w/v结晶紫/10%v/v甲醛/PBS溶液染色集落。然后用蒸馏水从孔中充分洗去未结合的染料,并使板干燥。使用Leica StereoZoom4 解剖显微镜计数集落。

[0735] 植板效率(plating efficiency)(PE)被计算为集落数目/被植细胞的数目。存活分数被计算为处理细胞的PE/未处理细胞的PE。通过绘制细胞存活分数对偶联物的摩尔浓度,测定IC₅₀浓度。在集落生成分析中(图23),DS6-DM1对杀死Caov-3细胞是有效的,其估算

IC₅₀为800pM。浓度为 3×10^{-9} M的偶联物对抗原阴性细胞A375仅有稍微的影响, 3×10^{-9} M为被测试的DS6-DM1的最高浓度,这表明偶联物的细胞杀死活性是特异性地针对抗原表达细胞。然而,尽管对美登素是明显敏感的,许多其它的DS6阳性细胞系对免疫偶联物不是特别敏感。所有的子宫颈细胞系(HeLa,KB和WISH)都对该偶联物敏感,然而,仅有选择数目的卵巢和乳房细胞系显示出一些细胞毒性效应。胰腺细胞系看起来无一受到影响。

[0736] 在MTT分析中,细胞以1000-5000个细胞/孔的密度被植入96孔板中。细胞被放入板中,裸DS6或DS6-DM1免疫偶联物用200μl培养基作系列稀释。样品一样三份。然后将细胞和抗体/偶联物混合物温育2-7d,此时通过MTT([3(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物])分析来评价细胞存活率。将MTT(50μg/孔)加入培养物上清液中,并使其在37℃温育3-4h。除去培养基,将MTT formazan溶于DMSO(175μl/孔)中。测量540-545nm处的吸光度。在MTT细胞存活率分析中(图24C),免疫偶联物能有效杀死Caov-3细胞,其估计IC₅₀为1.61nM。与没有效果的裸抗体相比较,具有最高浓度的偶联物的孔中未含存活的细胞(图21和图24)。

[0737] 在其它细胞系上的MTT分析的结果稍稍不同(图24A、B和D-I)。在许多情况下,尽管观察到一些细胞毒性,偶联物不能完全杀死全部细胞群(除了WISH细胞)。BT-20、OVCAR5和HPAC细胞是特别具有抗性的:在最高的偶联物浓度(32nM)孔中,超过50%的细胞仍是活的。

[0738] 实施例16:在体内的偶联物抗肿瘤活性

[0739] 为了证明DS6-DM1偶联物在体内的活性,在SCID鼠中建立了人肿瘤异种移植。人子宫颈癌细胞系KB的皮下模型被建立。KB细胞在体外生长,收集并将 5×10^6 个细胞于100μL无血清培养基中注入每只鼠的右肩,并使其生长6天,平均肿瘤体积达 $144 \pm 125\text{mm}^3$,此时开始药物处理。鼠每天被静脉给予PBS,150μg/kg DM1浓度的偶联物,或者225μg/kg DM1浓度的偶联物(每组两只鼠),共5天。在治疗期间每天监测毒性反应。在研究过程中,监测肿瘤体积(图25A)和相应的体重(图25B)。

[0740] 用PBS对照处理的KB肿瘤生长迅速,其倍增时间大约为4天。相反,对于225μg/kg和150μg/kg剂量组,分别在处理开始之后的14天和18天,用偶联物处理的两组鼠都显示出完全的肿瘤衰退。在150μg/kg剂量下,肿瘤延迟大约70天。在225μg/kg下的处理导致治愈,因为在第120天研究终止时,无肿瘤复发的迹象。如在图25B中所观察到的,在150μg/kg组中的鼠显示无重量损失,表明剂量得以很好的耐受。在更高的剂量,鼠的体重仅仅发生临时性的3%的降低。在5天的治疗期间,鼠未显示明显中毒迹象。总言之,该研究显示,DS6-DM1处理能够以非毒性剂量治愈有KB异种移植肿瘤的鼠。

[0741] 在一组皮下异种移植模型上进一步测试DS6-DM1活性(见图26)。被用于制备异种移植的肿瘤细胞系显示了一定范围的体外美登素敏感性和CA6表位密度(下面的表9)。OVCAR5细胞和TOV-21G为卵巢肿瘤细胞系;HPAC为胰腺肿瘤细胞系;HeLa为子宫颈肿瘤细胞系。OVCAR5和TOV-21G细胞具有低的表面CA6表达;HeLa细胞具有中等水平的表面CA6表达;HPAC细胞具有高的表面表达的CA6密度。TOV-21G和HPAC细胞对美登素敏感;OVCAR5和HeLa细胞对美登素的敏感性少2-7倍。

[0742] 表9

[0743]

细胞系	MMF*	表观 Kd (M)	集落生成试验 美登素 IC ₅₀ (M)	集落生成试验 偶联物 IC ₅₀ (M)	MTT 试验 偶联物 EC ₅₀ (M)
BT-20	232.20	9.14×10^{-10}	3.50×10^{-10}	$>3.00 \times 10^{-09}$	1.44×10^{-08}
BT-483	1911.00	1.37×10^{-08}	1.50×10^{-10}	1.00×10^{-10}	N/A
Caov-3	465.20	5.48×10^{-09}	3.20×10^{-11}	8.00×10^{-10}	1.61×10^{-09}
Caov-4	149.00	4.04×10^{-09}	6.00×10^{-10}	$>3.00 \times 10^{-09}$	N/A
Hela	242.50	6.94×10^{-10}	1.00×10^{-10}	1.80×10^{-09}	N/A
HPAC	2228.00	2.35×10^{-08}	5.50×10^{-11}	1.80×10^{-09}	1.84×10^{-09}
HPAF-II	266.50	2.81×10^{-09}	6.00×10^{-10}	$>3.00 \times 10^{-09}$	1.00×10^{-08}
Hs766T	182.90	2.32×10^{-09}	$>3.00 \times 10^{-09}$	$>3.00 \times 10^{-09}$	$>3.20 \times 10^{-08}$
KB	119.56	1.11×10^{-10}	3.00×10^{-11}	1.40×10^{-09}	3.01×10^{-09}
OVCAR5	97.10	1.47×10^{-09}	3.20×10^{-10}	$>3.00 \times 10^{-09}$	8.46×10^{-07}
T-47D	559.58	3.42×10^{-09}	1.20×10^{-10}	$>3.00 \times 10^{-09}$	N/A
TOV-21G	87.79	3.07×10^{-10}	4.80×10^{-11}	2.00×10^{-09}	6.88×10^{-09}
WISH	1133.55	2.38×10^{-09}	9.00×10^{-11}	4.60×10^{-10}	6.69×10^{-10}
ZR-75-1	811.67	4.30×10^{-09}	1.00×10^{-10}	N/A	9.45×10^{-10}

[0744] *平均最大相对平均荧光

[0745] 四种细胞系在体外培养,收集,将100μL无血清培养基中的 1×10^7 个细胞注入每只鼠的右肩(每个模型6只鼠),并使其生长6天,对于OVCAR5的测试组和对照组,平均肿瘤体积分别达 57.6 ± 6.7 和 $90.2 \pm 13.4 \text{ mm}^3$,对于HPAC的测试组和对照组,分别达 147.1 ± 29.6 和 $176.2 \pm 18.9 \text{ mm}^3$,对于HeLa的测试组和对照组,分别达 194.3 ± 37.2 和 $201.7 \pm 71.7 \text{ mm}^3$,对于TOV-21G的测试组和对照组,分别达 96.6 ± 22.8 和 $155.6 \pm 13.4 \text{ mm}^3$,此时开始药物治疗。对于每个模型,用两次周剂量的PBS静脉处理三只对照鼠,用两次周剂量的偶联物(600μg/kg DM1)静脉处理三只测试鼠。在治疗期间每天监测毒性反应,在研究过程中监测肿瘤体积和体重。针对各种模型的偶联物效果被示于图26A、C、E和G中,相应的体重被绘制在图26B、D、F和H中。OVCAR5、TOV-21G和HPAC细胞系形成侵入性肿瘤,正如在每个模型的PBS对照中所观察的。HeLa模型具有在开始指数生长之前的大约3周的滞后期。在所有模型中,DS6-DM1偶联物处理导致在所有的鼠中出现完全的肿瘤衰退。对于TOV-21G、HPAC和HeLa模型,鼠在61天保持无肿瘤。在OVCAR5模型中,在肿瘤接种之后大约45天,肿瘤复发。因此,在该模型中的DS6-DM1处理导致肿瘤生长延迟大约34天。生长延迟是有意义的,因为OVCAR5细胞对美登素较不敏感,而且具有低的CA6表位表达。在一些模型中,CA6表位密度更高或者模型具有更大的美登素敏感性,肿瘤衰退则更加强劲。要注意到仅仅施用了两次剂量,这是很重要的。很明显,应用在本研究中的剂量方案对鼠没有毒性,因为没有观察到重量损失。用额外的或更高的偶联物剂量则极可能实现治愈。

[0746] 人卵巢癌大多是腹膜的疾病。OVCAR5细胞在SCID鼠中侵袭性地生长为腹膜内模型(IP),形成肿瘤节,并以与人类疾病相似的方式产生腹水。为了证明在IP模型中的活性,DS6-DM1被用于治疗具有OVCAR5IP肿瘤的鼠(图27)。OVCAR5细胞在体外生长,收获,并对100μL无血清培养基中的 1×10^7 个细胞进行腹膜内注射。使肿瘤生长6天,此时开始治疗。或用PBS或用在600μg/kg DM1剂量的DS6-DM1偶联物每周处理鼠,共两周,并监测由腹膜疾病导致的体重损失。到28天时,PBS组的鼠已经损失了超过20%的体重,其被安乐死。在45天,在

治疗组的体重损失超过20%之后将其杀死。该研究表明,DS6-DM1能够延迟侵袭性OVCAR5IP模型中的肿瘤生长,尽管存在这样的事实,即,OVCAR5细胞对美登素较不敏感,而且每个细胞具有很少的CA6表位。因为所用的剂量方案未引起可见的毒性迹象,所以额外的或更高的剂量可以被用于实现进一步的肿瘤延迟或治愈,这是很有可能的。

[0747] 实施例17:DS6-SPP-MM1-202Taxoid细胞毒性偶联物的合成和表征

[0748] 用N-磺基琥珀酰亚胺基4-硝基-2-吡啶-戊酸酯(SSNPP)连接子修饰DS6。将10当量的在DMA中的SSNPP加入到90%缓冲液A、10%DMA中的50mg DS6Ab中。Ab的终浓度为8mg/ml。在室温下,将反应搅拌4小时,然后通过G25层析纯化。使用在280nm(抗体)和325nm(连接子)处的吸光度,分光光度法测量抗体修饰的程度,发现具有3.82个连接子/抗体。抗体回收为43.3mg,收率为87%。用Taxoid MM1-202(1812P.16)来偶联DS6-nitroSPP偶联物。在90%缓冲液A、10%DM1中以42mg的规模进行此偶联。在大约20小时的期间内,将taxoid以4等份的0.43eq/连接子(每等份)加入。此时,反应已经变得明显浑浊。在G25纯化之后,所得到的偶联物,其以大约64%的收率被回收,具有大约4.3个taxoid/Ab,大约1当量的未反应的连接子剩余。为了终止未反应的连接子,将1当量的半胱氨酸/未反应连接子加入偶联物中,同时整夜搅拌。在半胱氨酸加入时,一定的黄色色调是显著的,这表明了硫代吡啶(thiopyridine)的释放。然后在缓冲液B/0.01%Tween20中透析反应溶液,接着在单独的缓冲液B中进一步透析数天。最终的偶联物具有2.86个药物/抗体。抗体回收量为14.7mg,总共产生35%的收率。通过SEC进一步对偶联物进行生化表征,其被发现具有89%单体、10.5%二聚物和0.5%更高分子量的聚集体。

[0749] 流式细胞术分析比较了DS6-SPP-MM1-202taxoid和DS6抗体在HeLa细胞上的结合,结果被示于图28。此结果显示,当DS6偶联至紫杉烷类化合物(taxane)时,其保留了结合活性。

序列表

<110> 伊谔诺金公司
G·佩恩
P·丘
D·塔瓦雷斯

<120> CA6抗原特异性细胞毒性偶联物及其应用方法

<130> F179122

<140> PCT/US2004/023340

<141> 2004-07-21

<150> 60/488,447

<151> 2003-07-21

<160> 63

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 家鼠

<400> 1

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 家鼠

[0001] <400> 2

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 家鼠

<400> 3

Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 家鼠

<400> 4

Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 家鼠

<400> 5

	Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser	
	1 5	
	<210> 6	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 家鼠	
	<400> 6	
	Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr	
	1 5	
	<210> 7	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 家鼠	
	<220>	
	<221> 外显子	
	<222> (1)..(321)	
	<400> 7	
	caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cca ggg 48	
	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly	
	1 5 10 15	
	gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc cac tca agt gta agt ttc atg 96	
	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met	
	20 25 30	
	cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act tct ccc aaa ctc tgg att tat 144	
	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr	
	35 40 45	
[0002]	agc aca tcc agc ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc ggt ggc agt 192	
	Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser	
	50 55 60	
	gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag gct gaa 240	
	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu	
	65 70 75 80	
	gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg agt agt ttc ccg ctc acg 288	
	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr	
	85 90 95	
	ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt 321	
	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
	100 105	
	<210> 8	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人源化鼠抗体序列	
	<220>	
	<221> 外显子	
	<222> (1)..(321)	
	<400> 8	
	gag att gtt ctc acc cag tct cca gca acc atg tct gca tct cca ggg 48	
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly	
	1 5 10 15	
	gag agg gtc acc ata acc tgc agt gcc cac tca agt gta agt ttc atg 96	
	Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met	
	20 25 30	

	cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act tct ccc aaa ctc tgg att tat His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr 35 40 45	144
	agc aca tcc agc ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc ggt ggc agt Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser 50 55 60	192
	gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag gct gaa Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu 65 70 75 80	240
	gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg agt agt ttc ccg ctc acg Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr 85 90 95	288
	ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg 100 105	321
	<210> 9 <211> 351 <212> DNA <213> 家鼠	
	<220> <221> 外显子 <222> (1)..(351)	
	<400> 9 cag gct tat ctc cag cag tct ggg gct gag ctg gtg agg tct ggg gcc Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala 1 5 10 15	48
[0003]	tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr 20 25 30	96
	aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45	144
	gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe 50 55 60	192
	aag ggc aag gcc aca ttg act gca gac cca tcc tcc agc aca gcc tac Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
	atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys 85 90 95	288
	gca aga gga gat tcg gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100 105 110	336
	gtc act gtc tct gca Val Thr Val Ser Ala 115	351
	<210> 10 <211> 351 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人源化鼠抗体序列	
	<220>	

```

<221> 外显子
<222> (1)..(351)

<400> 10
cag gct cag ctc gtg cag tct ggg gct gag gtg gtg aag ccc ggg gcc      48
Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac      96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20      25      30

aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att      144
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45

gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc      192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50      55      60

cag ggc aag gcc aca ttg act gca gac aca tcc tcc agc aca gcc tac      240
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80

atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt      288
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
      85      90      95

gca aga gga gat tgc gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt      336
Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100      105      110

gtc act gtc tct gcc
Val Thr Val Ser Ala
115

```

[0004]

```

<210> 11
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化鼠抗体序列

```

```

<220>
<221> 外显子
<222> (1)..(351)

<400> 11
cag gct cag ctc gtg cag tct ggg gct gag gtg gtg aag ccc ggg gcc      48
Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac      96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20      25      30

aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att      144
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45

gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc      192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50      55      60

cag ggc aag gcc aca ttg act gca gac cca tcc tcc agc aca gcc tac      240
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80

atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt      288
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
      85      90      95

gca aga gga gat tgc gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt      336

```

Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu	
100	105	110
gtc act gtc tct gcc		351
Val Thr Val Ser Ala		
115		
<210>	12	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	家鼠	
<400>	12	
Gln Val Thr Ala Ile Pro Lys Pro Gly Gly Ala Ser Arg Glu Lys		
1	5	10 15
<210>	13	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	人类	
<400>	13	
Glu Val Thr Ala Thr Pro Arg Pro Gly Gly Ala Ser Ser Glu Lys		
1	5	10 15
<210>	14	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	人类	
<400>	14	
[0005] Glu Val Thr Gly Thr Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Arg Glu Lys		
1	5	10 15
<210>	15	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	人类	
<400>	15	
Glu Val Thr Gly Thr Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Arg Glu Lys		
1	5	10 15
<210>	16	
<211>	23	
<212>	PRT	
<213>	家鼠	
<400>	16	
Gln Tyr Gln Ala Leu Arg Ser Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Lys Gly		
1	5	10 15
Pro Ser Ser Ser Glu Gln Ser		
20		
<210>	17	
<211>	23	
<212>	PRT	
<213>	人类	
<400>	17	
Gln Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly		
1	5	10 15

[0006]

Thr Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 18
<211> 22
<212> PRT
<213> 人类

<400> 18

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

Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 19
<211> 22
<212> PRT
<213> 人类

<400> 19

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

Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 21

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn
1 5 10

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 22

Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 23
<211> 95
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 23

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

<210> 24
<211> 98
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 24

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

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

[0007]

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 25
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物

<400> 25
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc

46

<210> 26
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

	<220>		
	<223>	PCR引物	
	<400>	26	
		ggagatcca tagacagatg ggggtgtcgt ttiggc	36
	<210>	27	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	PCR引物	
	<400>	27	
		gggagctcga yattgtgnts acmcarwctm ca	32
	<210>	28	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	PCR引物	
	<220>		
	<221>	杂项特征	
	<222>	(18)..(18)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<400>	28	
		cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc	32
[0008]	<210>	29	
	<211>	35	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	PCR引物	
	<220>		
	<221>	杂项特征	
	<222>	(18)..(18)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<400>	29	
		cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg	35
	<210>	30	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	简并引物	
	<400>	30	
		ttttgaattc aataactaca ggtgtccact	30
	<210>	31	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	简并引物	
	<400>	31	

[0009]

tittgagctc cagattttca gcttcctgct 30

<210> 32
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物

<400> 32
cgatgggcc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga 40

<210> 33
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物

<400> 33
titttgtagc tttcagctcc agcttggt 28

<210> 34
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物

<400> 34
caggtgtaca ctcccaggct tatctccagc agtct 35

<210> 35
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物

<400> 35
cgatgggcc ttggtggagg cggcagagac agtgaccaga 40

<210> 36
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物

<400> 36
caggtgtaca ctccagagatt gttctcacc agtctccagc aacctgtct gcatct 56

<210> 37
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物

<400> 37
ggcactgcag gttatggtga cctctcccc tggaga 36

<210> 38

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR引物	
	<400> 38	
	caatcagcag catggaggct gaaga	25
	<210> 39	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR引物	
	<400> 39	
	gcctccatgc tgctgattgt gaga	24
	<210> 40	
	<211> 67	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR引物	
	<400> 40	
	cagggtgtaca ctcccaggct cagctcgtgc agtctggggc tgagggtggcg aagcccgggg	60
	cctcagt	67
[0010]	<210> 41	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR引物	
	<400> 41	
	ttgactgcag acacatcctc cagcaca	27
	<210> 42	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR引物	
	<400> 42	
	gtgtctgcag tcaatgtggc cttgccctgg aacttctgat	40
	<210> 43	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR引物	
	<400> 43	
	cgatggggccc ttgggtggagg cggcagagac agtgacaaga	40
	<210> 44	
	<211> 107	
	<212> PRT	

<213> 家鼠

<400> 44

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Ile Thr
85 90 95

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

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> 家鼠

[0011]

<220>

<221> 杂项特征

<222> (1)..(1)

<223> Xaa可以是任何自然发生的氨基酸

<400> 45

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Gly Ala Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> 家鼠

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Ser Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 47

<211> 108

<212> PRT

<213> 家鼠

[0012]

<400> 47

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 48

<211> 105

<212> PRT

<213> 家鼠

<400> 48

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

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

<210> 49
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<400> 49

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

[0013]

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

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<400> 50

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

Glu Lys Val Ile Met Thr Cys Ser Pro Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 51
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<400> 51

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

Glu Lys Val Thr Met Ala Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

[0014]

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu
 65 70 75 80

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

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 52
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<400> 52

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

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

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105 110

<210> 53
<211> 109
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 53

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Thr Ser Pro Lys Pro Trp
35 40 45

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

[0015]

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 54
<211> 117
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 54

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Lys Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 122
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 55

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

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

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Phe Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0016]

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

Ala Arg Ser Gly Gly Ser Tyr Arg Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
<211> 119
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 56

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

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

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

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Asn Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 120
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 57

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

[0017] Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58
<211> 121
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 58

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

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

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

Gly Tyr Asn Asn Pro Gly Asn Gly Tyr Ile Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 120
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 59

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

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

[0018]

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

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

Ala Arg Glu Lys Thr Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 60
<211> 120
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 60

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61
<211> 124
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 61

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

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

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

[0019] Gly Tyr Ile Asn Pro Gly Lys Gly Tyr Leu Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Phe Tyr Gly Gly Ser Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 62
<211> 116
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 62

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 116
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 63

[0020]

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

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

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

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Asp Asp Asn Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val
115

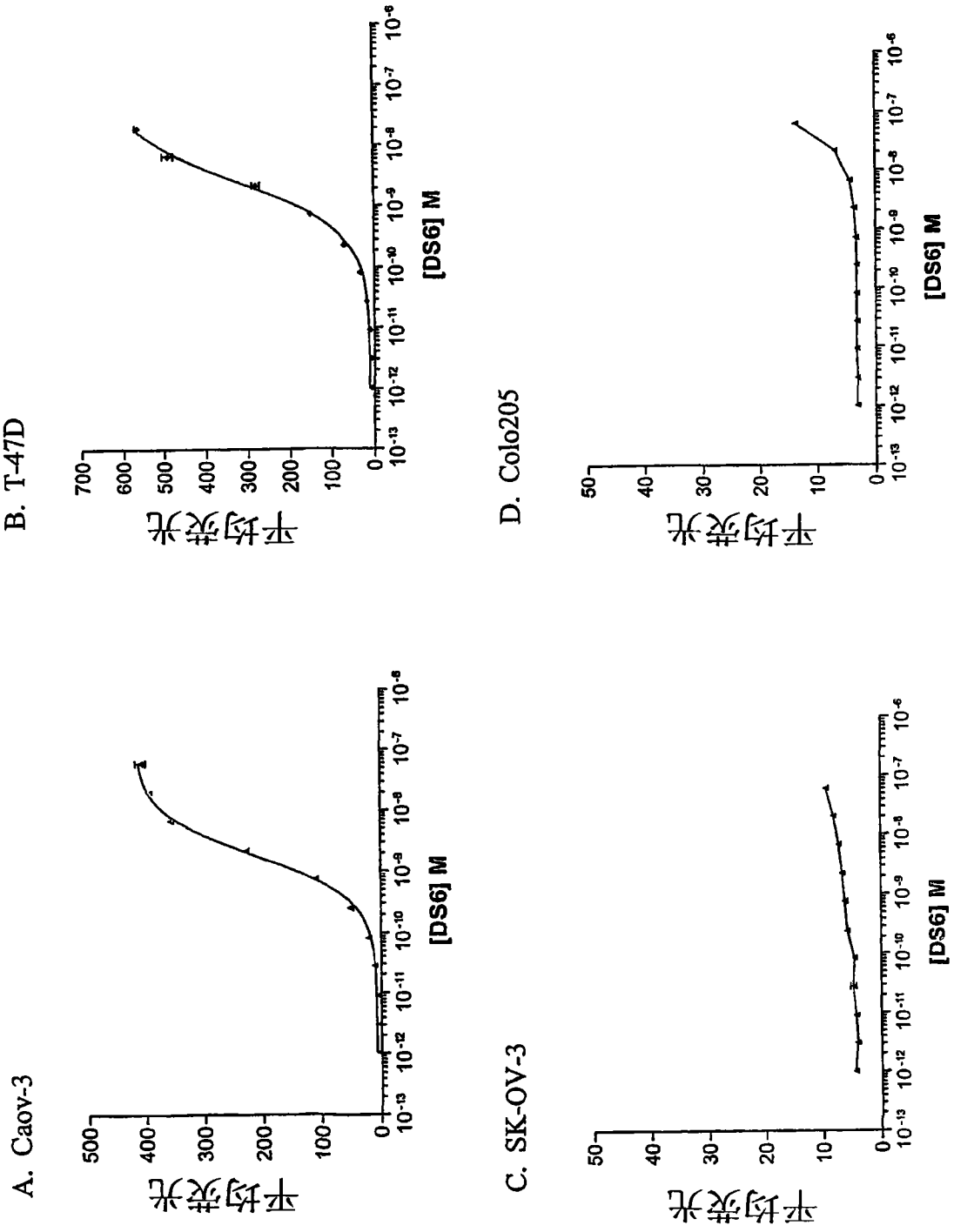


图1

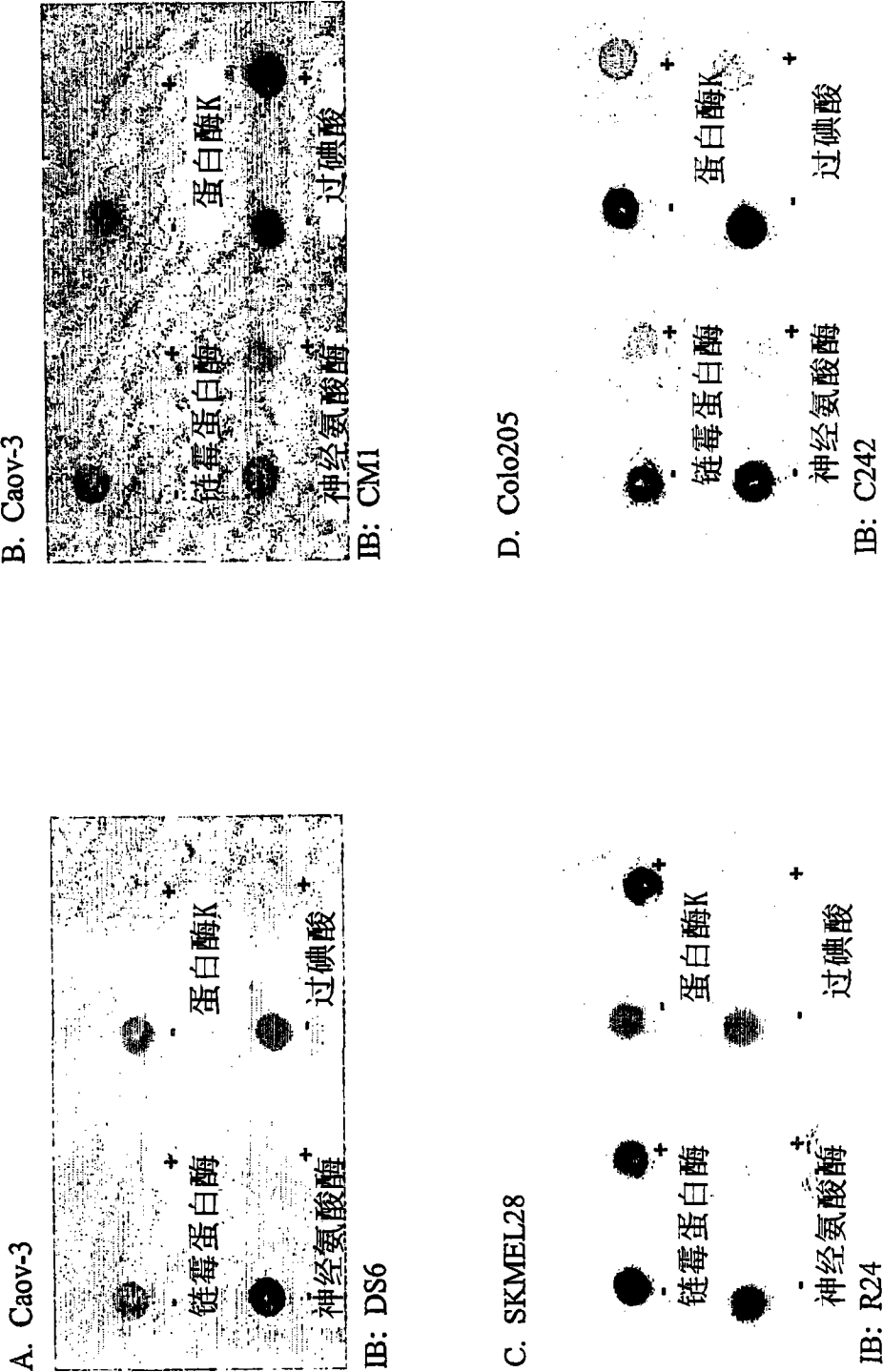


图2

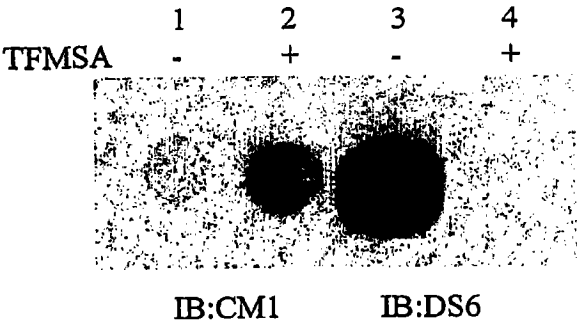


图3

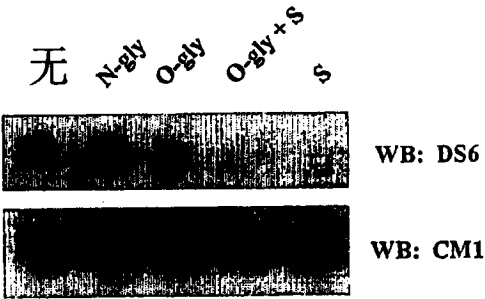


图4

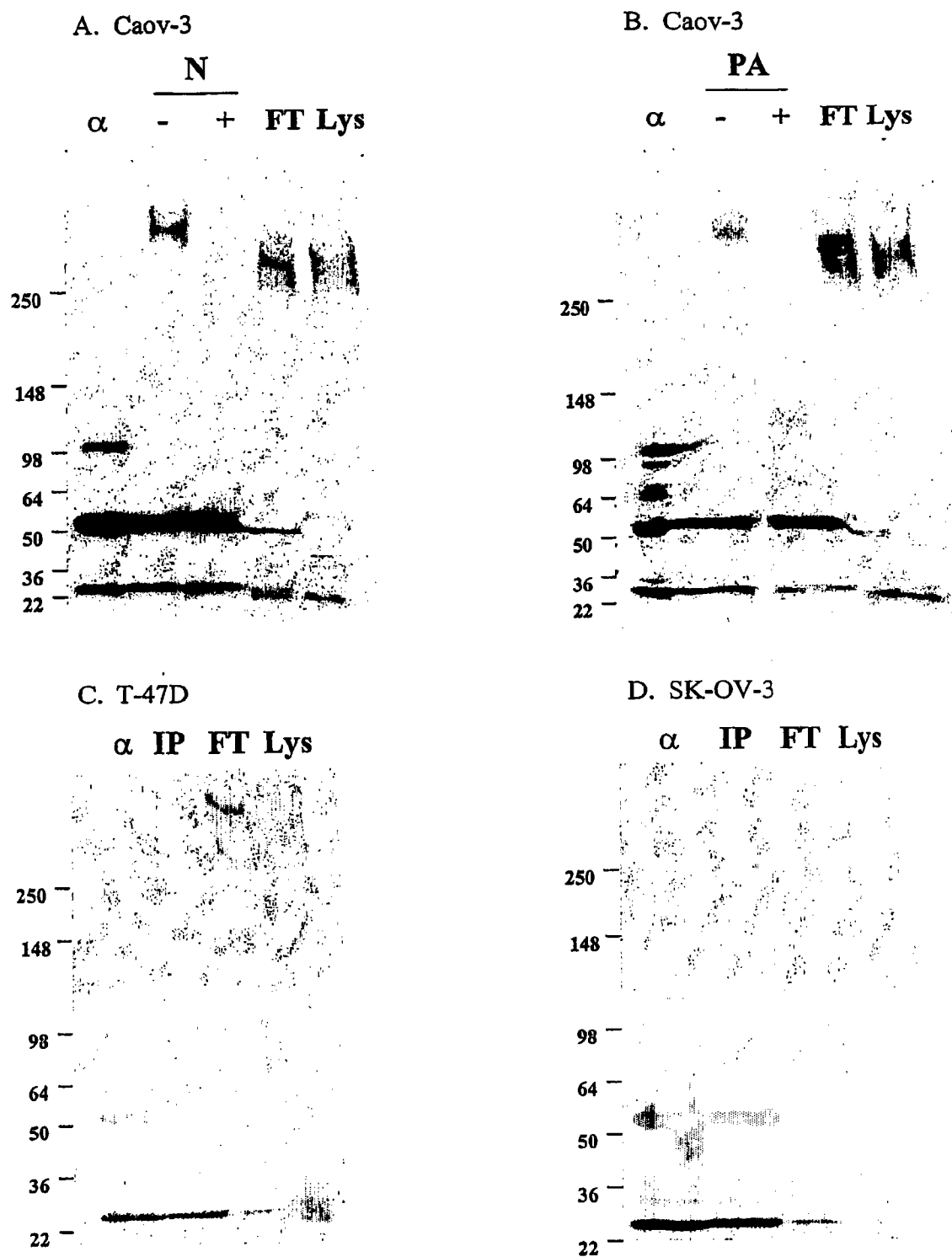


图5

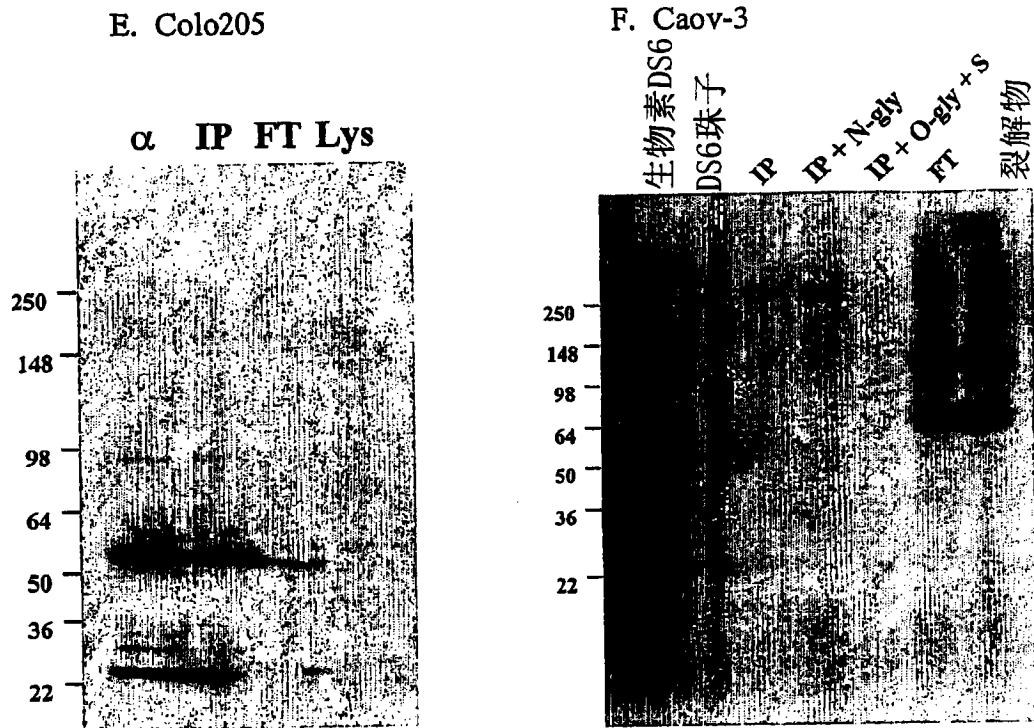


图5续

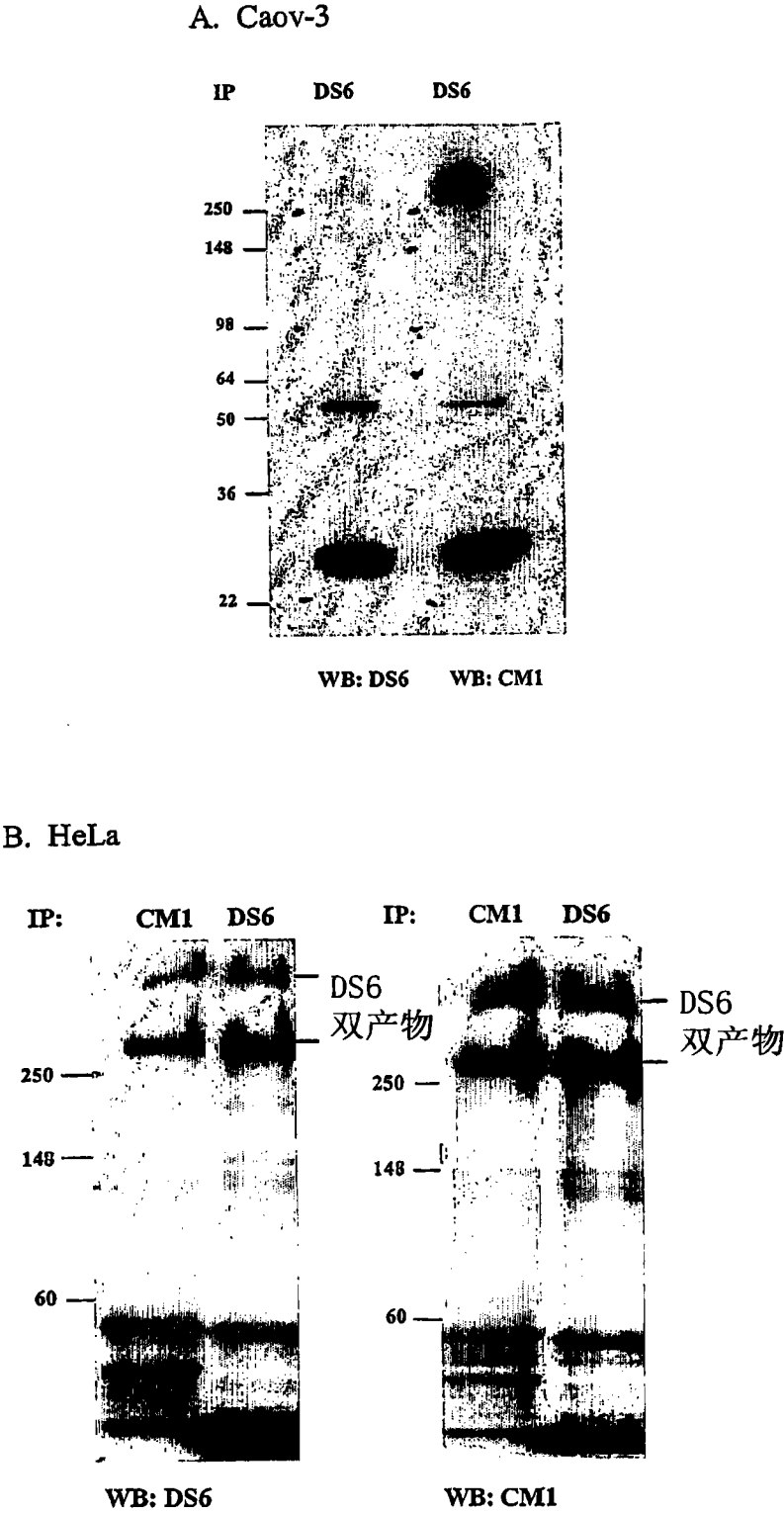


图6

流散出的抗原

A.



B.

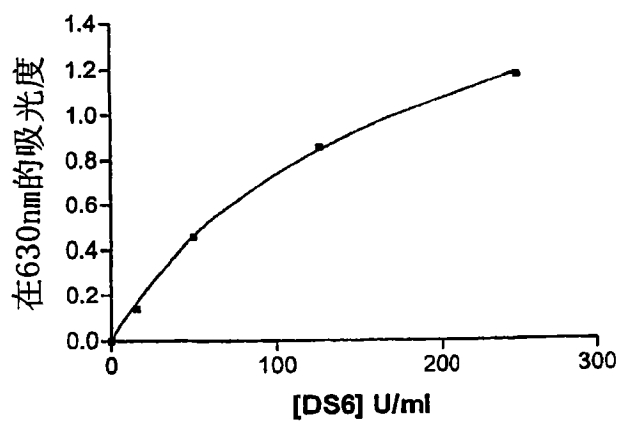
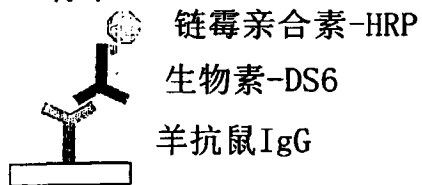
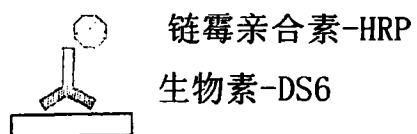


图7

A. 标准1



B. 标准2



C. 检测抗体标准曲线

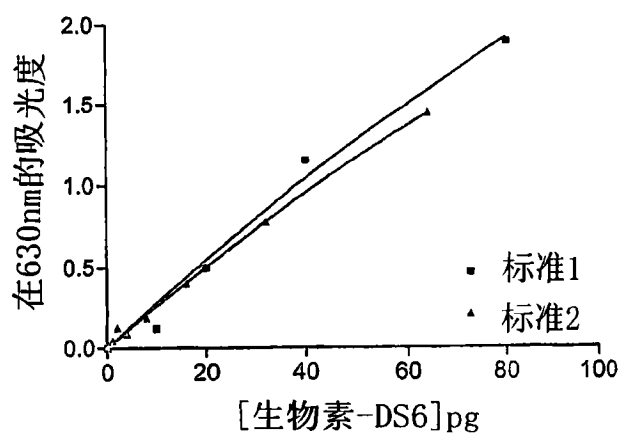


图8

A. 轻链 - SEQ ID NO:7

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E
 1 CAAATTGTTC TCACCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA

 CDR1
 K V T I T C S A H S S V S F M H
 51 GAAGGTCACC ATAACCTGCA GTGCCCACTC AAGTGTAAGT TTCATGCACT

 W F Q Q K P G T S P K L W I Y S T
 101 GGTTCAGCA GAAGCCAGGC ACTTCTCCCA AACTCTGGAT TTATAGCACA

 CDR2
 S S L A S G V P A R F G G S G S G
 151 TCCAGCCTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC TTCGGTGGA GTGGATCTGG

 T S Y S L T I S R M E A E D A A
 201 GACCTCTTAC TCTCTCACA TCAGCCGAAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA

 CDR3
 T Y Y C Q Q R S S F P L T F G A G
 251 CTTATTACTG CCAGCAAAGG AGTAGTTTCC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG

 T K L E L K R
 301 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG T

B. 重链 - SEQ ID NO:9

Q A Y L Q Q S G A E L V R S G A S
 1 CAGGCTTATC TCCAGCAGTC TGGGGCTGAG CTGGTGAGGT CTGGGGCCTC

 CDR1
 V K M S C K A S G Y T F T S Y N
 51 AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACATTTACC AGTTACAATA

 M H W V K Q T P G Q G L E W I G Y
 101 TGCACTGGGT AAAGCAGACA CCTGGACAGG GCCTGGAATG GATTGGATAT

 CDR2
 I Y P G N G A T N Y N Q K F K G K
 151 ATTTATCCTG GAAATGGTGC TACTAACTAC AATCAGAAGT TCAAGGGCAA

 A T L T A D P S S S T A Y M Q I
 201 GGCCACATTG ACTGCAGACC CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA

 S S L T S E D S A V Y F C A R G D
 251 GCAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGAGAT

 CDR3
 S V P F A Y W G Q G T L V T V S A
 301 TCGGTCCCGT TTGCTTACTG GGGCCAAGGG ACTCTTGTC A CTGTCTCTGC A

图9

A. 轻链

CDR1: S A H S S V S F M H - SEQ ID NO:4

CDR2: S T S S L A S - SEQ ID NO:5

CDR3: Q Q R S S F P L T - SEQ ID NO:6

B. 重链

CDR1: S Y N M H - SEQ ID NO:1

CDR2: Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G - SEQ ID NO:2

CDR3: G D S V P F A Y - SEQ ID NO:3

C. AbM重链

CDR1: G Y T F T S Y N M H - SEQ ID NO:20

CDR2: Y I Y P G N G A T N - SEQ ID NO:21

CDR3: G D S V P F A Y - SEQ ID NO:22

图10

轻链			
		1	50
IgVKap4	(1)	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQOKPGTSPKLWIYST	
muDS6LC	(1)	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQOKPGTSPKLWIYST	
		51	95
IgVKap4	(51)	SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYP	
muDS6LC	(51)	SSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPL	
重链			
		1	50
IgVh J558.41	(1)	QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY	
muDS6HC	(1)	QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY	
		51	98
IgVh J558.41	(51)	IYPGNQTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR	
muDS6HC	(51)	IYPGNQTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR	

图11

轻链 带有结构的10个最同源序列			
	1	60	
muDS6LC	(1) QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSAHS--SVSFMHWFQOKPGTSPKLWIYSTSSLASGVP		
lfor	(1) QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSATS--SVNYMHWFQOKPGTSPKLWIYSSSNLASGVP		
lpsk	(1) XIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASS--SVSNHWFQOKPGTSPKLWIYSTSTLASGVP		
layl	(1) DIQMTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASS--SVSYMYWYQOKPGSSPRLLIYDSTNLASGVP		
lbaf	(1) QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASS--SVYMYWYQOKPGSSPRLLIYDSTNLASGVP		
lmim	(1) QIVSTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSRS--YMQWYQOKPGTSPKRWIYDTSKLASGVP		
lclo	(1) QTVLSQSPAILASAPGEKVTMTCRASS--SVTYIHWYQOKPGSSPKSWIYATSNLASGVP		
la6t	(1) QSVLSQSPAILASAPGEKVTMTCPSS--SVSYMQWYQOKPGSSPKPWIYSTSNLASGVP		
lfig	(1) ENVLTQSPAIMASAPGEKVTMACRASSSVSSYTLHWYQOKSGASPKLLIYSTSNLASGVP		
l5c8	(1) DIVLTQSPAIMASALGERVTMTCTASSSVSSSNLHWYQOKPGSSPKLWIYSTSNLASGVP		
liai	(1) DIQLTQSPAFMAASAPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQOKSETSPKPWIYGTSNLASGVP		
	61	111	
muDS6LC	(59) ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFP-LTFGAGTKLELK--	(SEQ ID NO:7)	
lfor	(59) ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYP-ITFGSGTKLEIKR-	(SEQ ID NO:44)	
lpsk	(59) GRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSGYP-FTFGSGTKLEIKR-	(SEQ ID NO:45)	
layl	(59) VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSTYP-LTFGAGTKLELKR-	(SEQ ID NO:46)	
lbaf	(59) VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQWSSYPITFGVGTKELEKR-	(SEQ ID NO:47)	
lmim	(59) ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSS---YTFGGGTKEIKR-	(SEQ ID NO:48)	
lclo	(59) ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQHWSSKP-PTFGGGTKLEIKR-	(SEQ ID NO:49)	
la6t	(59) GRFSGSGSGTSFSLTISGVEAEDAATYYCQYSSHP-LTFGGGTKELEKR-	(SEQ ID NO:50)	
lfig	(61) ARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQYSSGYP-LTFGAGTKLELKR-	(SEQ ID NO:51)	
l5c8	(61) ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSP-YTFGGGTKEIKRA	(SEQ ID NO:52)	
liai	(61) VRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWNSYP-YTFGGGTKEIKR-	(SEQ ID NO:53)	
重链 带有结构的10个最同源序列			
	1	70	
muDS6HC	(1) QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNATNYNQKFKGKATL		
1PLG	(1) QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIHWVKQRPGEGLWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL		
1NMB	(1) QVQLQQPGAELVKPGASVMSCKASGYTFTNINMYWVKQSPGQGLEWIGIFYPGNGDTSYNQKFKDKATL		
1FOR	(1) QGQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSFWNVWVKQRPQGQGLEWIGQIYPGDGDNKYNGKFKGKATL		
1NOB	(1) QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYNMHWVKQRPGRGLEWIGRIDENSGGTKYNEKFKSKATL		
6FAB	(1) EVQLQQSGVELVRAGSSVKMSCKASGYTFTSNGINWVKQRPQGQGLEWIGYNNPNGNYIAYNEKFKGKATL		
1AE6	(1) QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIINWVKQRPQGQGLEWIGWIDPGSGNTKYNEKFKGKATL		
1D5B	(1) QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFTSSFWIEWVKQRPBGHGLEWIGEILPGSGGTHYNEKFKGKATF		
1FAI	(1) QVQLQQSGAELVRAGSSVKMSCKASGYTFTSYGVNVWVKQRPQGQGLEWIGYINPGKGYLSYNEKFKGKATL		
1MLB	(1) QVQLQESGAELVMPKPGASVKISCKATGYTFTSYWIEWVKQRPBGHGLEWIGEILPGSGSTYYNEKFKGKATF		
1JHL	(1) QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPQGQGLEWIGNIYPSDSTYNYNQKFKDKATL		
	71	124	
muDS6HC	(71) TADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDSVP-----FA-YWGQGTLLTVSA	(SEQ ID NO:9)	
1PLG	(71) TVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGK-----FAMDYWGQGTSTVTVSS	(SEQ ID NO:54)	
1NMB	(71) TADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGSGSYRY--DGGFDYWGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:55)	
1FOR	(71) TADKSSSTAYMQLYSLTSEDSAVYFCARSGN-Y----PYAMDYWGQGTSTVTVSS	(SEQ ID NO:56)	
1NOB	(71) TVDKPSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDYGS----SYFDYWGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:57)	
6FAB	(71) TVDKSSSTAYMQLRSLTSEDSAVYFCARSEYYG---GSYKFDYWGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:58)	
1AE6	(71) TVDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCAREKTTY----YYAMDYWGQGTSTVTVSA	(SEQ ID NO:59)	
1D5B	(71) TADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGHSYFY--DG--DYWGQGTSTVTVSS	(SEQ ID NO:60)	
1FAI	(71) TVDRSSSTAYMQLRSLTSEDAVYFCARSFYGGSDLAVYYFDSWGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:61)	
1MLB	(71) TADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNYG-----YWGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:62)	
1JHL	(71) TVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRDDNYG-----AMDYWGQGTTLTVTV--	(SEQ ID NO:63)	

图12

A. muDS6轻链表面计算

	ave % acc	>30	25-35	flank	surf	Kabat No	SR no	SR surf	seq	ave % acc	>30	25-35	flank	surf	Kabat No	SR no	SR surf
25-35																	
Q	53.59	1			1	1	2	2	P	19.01					59	68	
I	4.63					2	3		A	47.39	60			60	60	67	67
V	35.63	3			3	3	4	4	R	15.49				61	61	68	
L	4.02					4	5		F	2.19				62	62	69	
T	30.41	5	??	33.144	5	5	6	6	G	25.02		??	0	63	63	70	
Q	7.10					6	7		G	7.03				64	64	71	
S	29.08		??	29.604		7	8		S	26.00		??	28.46 2	65	65	72	
P	21.80					8	9		G	19.35				66	66	73	
A	31.98	9	??	31.567	9	9	10	10	S	38.04	67			67	67	74	74
I	37.67	10			10	10	11	11	G	17.85				68	68	75	
M	14.99					11	12		T	24.68				69	69	76	
S	27.16		??	26.2		12	13		S	28.93		??	28.05 9	70	70	77	
A	1.99					13	14		Y	1.55				71	71	78	
S	17.20					14	15		S	12.99				72	72	79	
P	34.43	15	??	33.573	15	15	16	16	L	0.03				73	73	80	
G	23.43					16	17		T	10.88				74	74	81	
E	25.59		??	25.601		17	18		I	0.08				75	75	82	
K	45.67	18			18	18	19	19	S	24.84				76	76	83	
V	2.97					19	20		R	32.14	77	??	46.08 7	77	77	84	84
T	28.62		??	26.845		20	21		M	0.87				78	78	85	
I	0.79					21	22		E	24.97				79	79	86	
T	20.78					22	23		A	30.52	80	??	27.85	80	80	87	
C	0.13					23	24		E	36.62	81			81	81	88	88
S	25.91		??			24	25		D	1.24				82	82	89	
A	3.25					25	26		A	17.79				83	83	90	
H	31.44	26	??			26	27		A	3.37				84	84	91	
S	28.15		??			27	28		T	11.19				85	85	92	
S	33.75	27A	??			27A	29		Y	0.05				86	86	93	
V	5.59					27B	30		Y	4.28				87	87	94	
S	32.25	27C	??			27C	31		C	0.04				88	88	95	
	8.34					27D	32		Q	1.16				89	89	96	
	3.70					27E	33		Q	0.23				90	90	97	
	0.00					27F	34		R	16.47				91	91	98	
	0.00					28	35		S	22.54				92	92	99	
	0.00					29	36		S	23.05				93	93	100	
	0.00					30	37			3.13				94	94	101	
	0.00					31	38			0.89				95	95	102	
F	22.65					32	39		F	22.65				95E	95E	107	
M	0.10					33	40		P	9.70				95F	95F	108	
H	2.53					34	41		L	6.52				96	96	109	
W	0.30					35	42		T	11.97				97	97	110	
F	1.13					36	43		F	6.15				98	98	111	
Q	3.34					37	44		G	1.68				99	99	112	
Q	8.68					38	45		A	28.73		??	20.74	100	100	113	
K	22.43					39	46		G	4.48				101	101	114	
P	50.62	40			40	40	47	47	T	0.10				102	102	115	
G	44.24	41			41	41	48	48	K	29.39		??	29.57 3	103	103	116	
T	25.08		??	29.575		42	49		L	1.15				104	104	117	
S	15.21					43	50		E	27.47		??	27.17	105	105	118	
P	2.56					44	51		L	21.86				106	106	119	
K	27.85		??	29.675		45	52		K	35.78	107			107	107	121	121
L	9.44					46	53										
W	5.39					47	54										
I	0.34					48	55										
Y	17.69					49	56										
S	13.01					50	57										
T	5.88					51	58										
S	29.44		??			52	59										
S	26.16		??			53	60										
L	22.15					54	61										
A	9.25					55	62										
S	51.26	56				56	63										
G	38.57	57			57	57	64	64									
V	8.78					58	65										

图13

B. muDS6重链表面计算

seq	Ave % acc	>30	25-35	flank	surf	Kabat No	SR no	SR surf	seq	Ave % acc	>30	25-35	flank	surf	Kabat No	SR no	SR surf
Q	64.68	1			1	1	2	2	K	39.08	64			64	64	70	70
A	15.65					2	3		G	39.4	65			65	65	71	71
Y	31.88	3	??*	31.88	3	3	4	4	K	16.66				66	66	72	
L	4.156					4	5		A	2.096				67	67	73	
Q	29.83		??*	30.16	5	5	6	6	T	25.55		??*	28.08	68	68	74	
Q	5.146					6	7		L	3.639				69	69	75	
S	21.64					7	8		T	25.85		??*	29.56	70	70	76	
G	20.31					8	9		A	13.24				71	71	77	
A	36.19	9			9	9	10	10	D	21.35				72	72	78	
E	21.29					10	11		P	36.15	73			73	73	79	79
L	49.11	11			11	11	12	12	S	48.82	74			74	74	80	80
V	10.25					12	13		S	24.62				75	75	81	
R	50.21	13			13	13	14	14	S	15.41				76	76	82	
S	34.2	14	??*	34.2	14	14	15	15	T	5.116				77	77	83	
G	29.89		??*	29.73		15	16		A	0.488				78	78	84	
A	18.34					16	17		Y	15.94				79	79	85	
S	25.54		??*	27.06		17	18		M	0.282				80	80	86	
V	4.2					18	19		Q	22.29				81	81	87	
K	36.48	19			19	19	20	20	I	1.738				82	82	88	
M	0.813					20	21		S	20.72				82A	82A	89	
S	13.11					21	22		S	31.21	82B	??*	31.18	82B	82B	90	90
C	0.529					22	23		L	0.63				82C	82C	91	
K	29.41		??*	31.16	23	23	24	24	T	26.26		??*	26.39	83	83	92	
A	3.823					24	25		S	35.72	84			84	84	93	93
S	21.79					25	26		E	38.86	85			85	85	94	94
G	26.57		??*			26	27		D	3.913				86	86	95	
Y	13.69					27	28		S	14.42				87	87	96	
T	34.52	28	??*			28	29		A	2.996				88	88	97	
F	3.192					29	30		V	16.13				89	89	98	
T	22.22					30	31		Y	1.019				90	90	99	
S	28.17		??*			31	32		F	2.811				91	91	100	
Y	0					32	33		C	0				92	92	101	
N	0					33	34		A	0.188				93	93	102	
M	14.35					34	35		R	5.789				94	94	103	
H	11.38					35	36		G	2.404				95	95	104	
	0.63					35A	37		D	15.82				96	96	105	
	1.018					35B	38		S	25.28		??*		97	97	106	
W	0.18					36	39		V	29.64		??*		98	98	107	
V	0.5					37	40		P	23.57				99	99	108	
K	5.459					38	41			18.79				100	100	109	
Q	10.08					39	42			12.87				100A	100A	110	
T	22.08					40	43			10.47				100B	100B	111	
P	48.17	41			41	41	44	44		2.039				100C	100C	112	
G	43.05	42			42	42	45	45		2.919				100D	100D	113	
Q	42.17	43			43	43	46	46		0.252				100E	100E	114	
G	11.9					44	47			0.522				100F	100F	115	
L	6.039					45	48			0				100G	100G	116	
E	19.21					46	49			0				100H	100H	117	
W	1.433					47	50		F	0.721				101	101	120	
I	0.123					48	51		A	12.13				102	102	121	
G	0					49	52		Y	24.24				103	103	122	
Y	4.983					50	53		W	7.003				104	104	123	
I	2.466					51	54		G	1.847				105	105	124	
Y	13.72					52	55		Q	36.46	106			106	106	125	125
P	2.199					52A	56		G	7.55				107	107	126	
	22.06					52B	57		T	1.036				108	108	127	
	39.1	52C				52C	58		L	25.8		??*	25.8	109	109	128	
G	25.76		??*			53	59		V	1.059				110	110	129	
N	0					54	60		T	25.56		??*	26.55	111	111	130	
G	0					55	61		V	7.217				112	112	131	
A	31.16	56	??*			56	62		S	41.66	113			113	113	132	132
T	22.29					57	63		A								
N	21.14					58	64										
Y	14.28					59	65										
N	6.902					60	66										
Q	47.15	61			61	61	67	67									
K	43.58	62			62	62	68	68									
F	4.24					63	69										

图13续

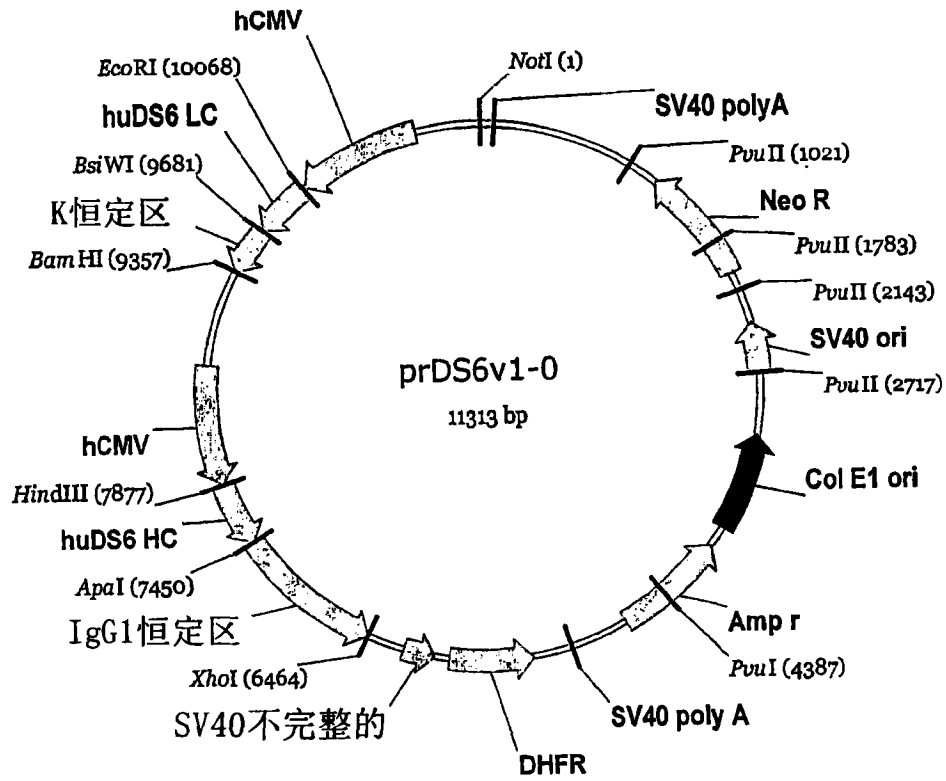


图14

A. 轻链氨基酸序列(鼠和人残基差异被示出)

Kabat #	1	51
muDS6LC	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQOKPGTSPKLWIYST	
huDS6LC v1.0	EIVLTQSPATMSASPERVTITCSAHSSVSFMHWFQOKPGTSPKLWIYST	
huDS6LC v1.2	EIVLTQSPATMSASPERVTITCSAHSSVSFMHWFQOKPGTSPKLWIYST	
Kabat #	52	101
muDS6LC	SSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSEMEADAATYYCQQRSSFPLTFGAG	
huDS6LC v1.0	SSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSEMEADAATYYCQQRSSFPLTFGAG	
huDS6LC v1.2	SSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSEMEADAATYYCQQRSSFPLTFGAG	
Kabat #	102	
muDS6LC	TKLELKR - SEQ ID NO:7	
huDS6LC v1.0	TKLELKR - SEQ ID NO:8	
huDS6LC v1.2	TKLELKR - SEQ ID NO:8	

B. 重链氨基酸序列(鼠和人残基差异被示出)

Kabat #	1	50
muDS6HC	QAYLQDSGAELVRS GASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY	
huDS6HC v1.0	QAQLQVSGAEIVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY	
huDS6HC v1.2	QAQLQVSGAEIVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY	
Kabat #	51	96
muDS6HC	IYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD	
huDS6HC v1.0	IYPGNGATNYNQKFGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD	
huDS6HC v1.2	IYPGNGATNYNQKFGKATLTADPSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD	
Kabat #	97	114
muDS6HC	SVPFAYWGQGLVTVSA - SEQ ID NO:9	
huDS6HC v1.0	SVPFAYWGQGLVTVSA - SEQ ID NO:10	
huDS6HC v1.2	SVPFAYWGQGLVTVSA - SEQ ID NO:11	

图15

huDS6轻链(v1.0和v1.2)—SEQ ID NO:8

```
      E I V L T Q S P A T M S A S P G E  
1  GAGATTGTTT TCACCCAGTC TCCAGCAACC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA  
  
      R V T I T C S A H S S V S F M H  
51 GAGGGTCACC ATAACCTGCA GTGCCCACTC AAGTGTAACT TTCATGCACT  
  
      W F Q Q K P G T S P K L W I Y S T  
101 GGTTCAGCA GAAGCCAGGC ACTTCTCCCA AACTCTGGAT TTATAGCACA  
  
      S S L A S G V P A R F G G S G S G  
151 TCCAGCCTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC TTCGGTGGCA GTGGATCTGG  
  
      T S Y S L T I S S M E A E D A A  
201 GACCTCTTAC TCTCTCACAA TCAGCAGCAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA  
  
      T Y Y C Q Q R S S F P L T F G A G  
251 CTTATTACTG CCAGCAAAGG AGTAGTTTCC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG  
  
      T K L E L K R  
301 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG T
```

图16

A. huDS6重链v1.0-SEQ ID NO:10

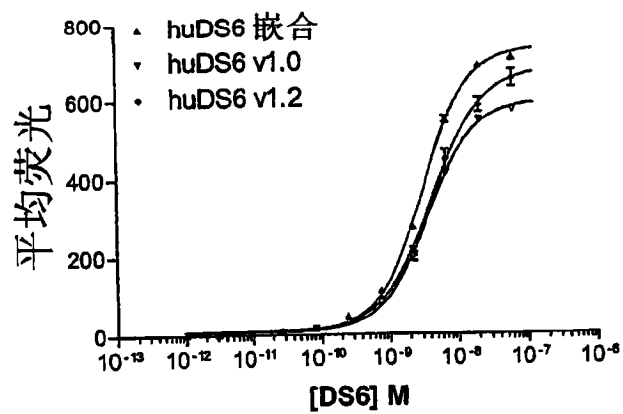
Q A Q L Q V S G A E V V K P G A S
1 CAGGCTCAGC TCCAGGTGTC TGGGGCTGAG GTGGTGAAGC CCGGGGCCTC
V K M S C K A S G Y T F T S Y N
51 AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACATTTACC AGTTACAATA
M H W V K Q T P G Q G L E W I G Y
101 TGCACTGGGT AAAGCAGACA CCTGGACAGG GCCTGGAATG GATTGGATAT
I Y P G N G A T N Y N Q K F Q G K
151 ATTTATCCTG GAAATGGTGC TACTAACTAC AATCAGAAGT TCCAGGGCAA
A T L T A D T S S S T A Y M Q I
201 GGCCACATTG ACTGCAGACA CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA
S S L T S E D S A V Y F C A R G D
251 GCAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGAGAT
S V P F A Y W G Q G T L V T V S A
301 TCGGTCCCGT TTGCTTACTG GGGCCAAGGG ACTCTTGTC A CTGTCTCTGC
351 C

B. huDS6重链v1.2-SEQ ID NO:11

Q A Q L Q V S G A E V V K P G A S
1 CAGGCTCAGC TCCAGGTGTC TGGGGCTGAG GTGGTGAAGC CCGGGGCCTC
V K M S C K A S G Y T F T S Y N
51 AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACATTTACC AGTTACAATA
M H W V K Q T P G Q G L E W I G Y
101 TGCACTGGGT AAAGCAGACA CCTGGACAGG GCCTGGAATG GATTGGATAT
I Y P G N G A T N Y N Q K F Q G K
151 ATTTATCCTG GAAATGGTGC TACTAACTAC AATCAGAAGT TCCAGGGCAA
A T L T A D P S S S T A Y M Q I
201 GGCCACATTG ACTGCAGACC CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA
S S L T S E D S A V Y F C A R G D
251 GCAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGAGAT
S V P F A Y W G Q G T L V T V S A
301 TCGGTCCCGT TTGCTTACTG GGGCCAAGGG ACTCTTGTC A CTGTCTCTGC

图17

A.



B.

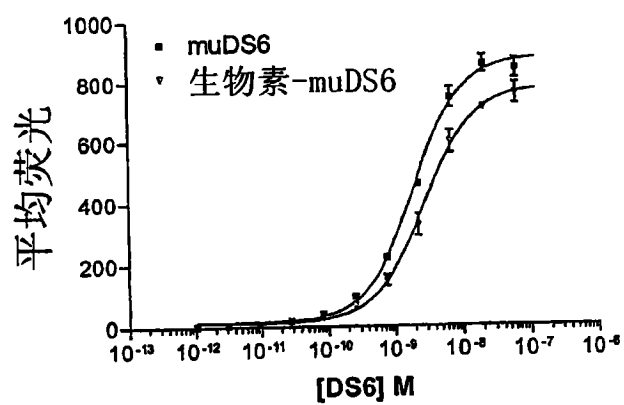


图18

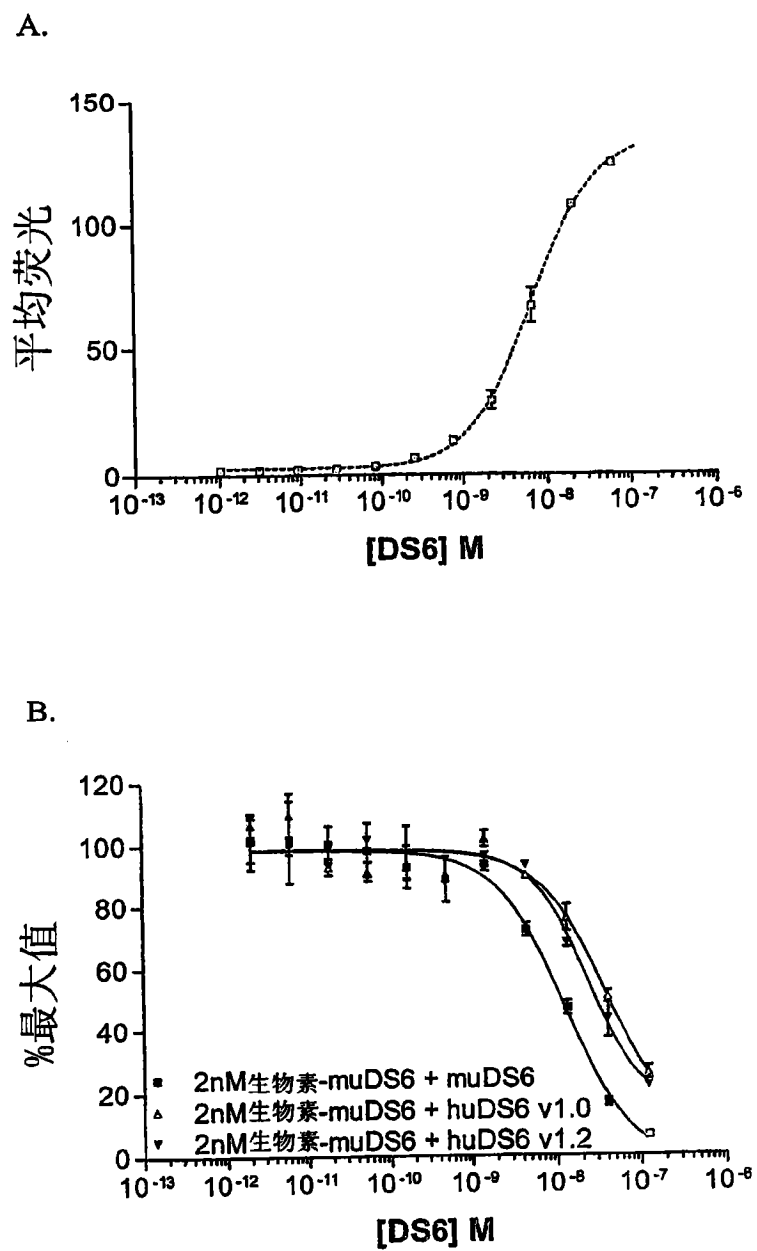


图19

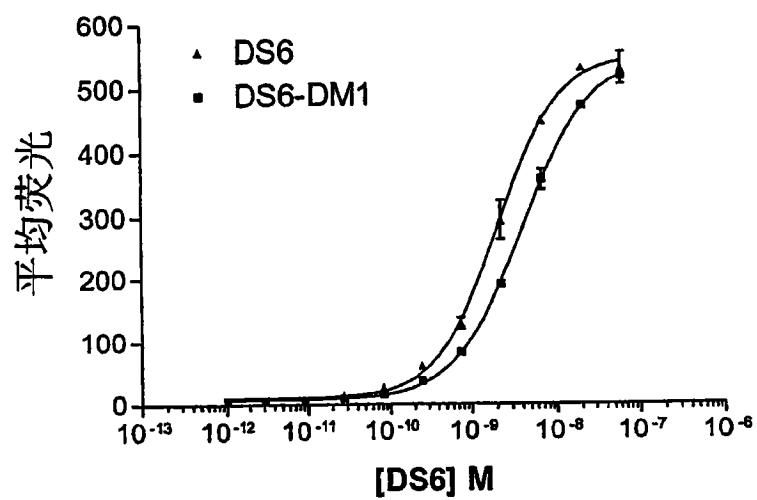


图20

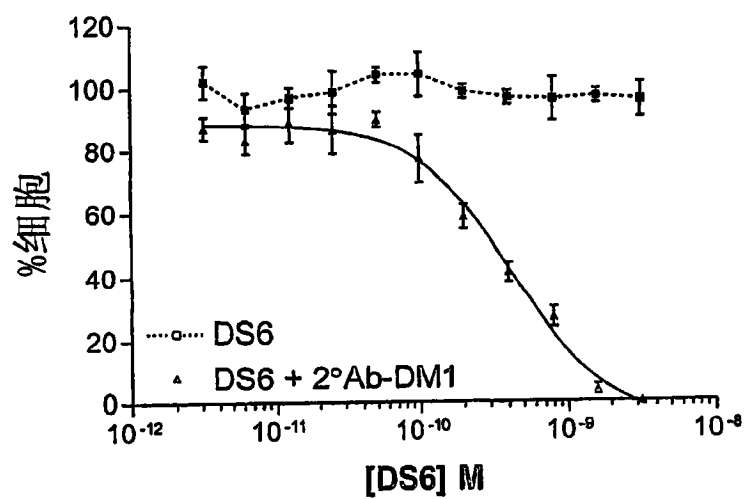
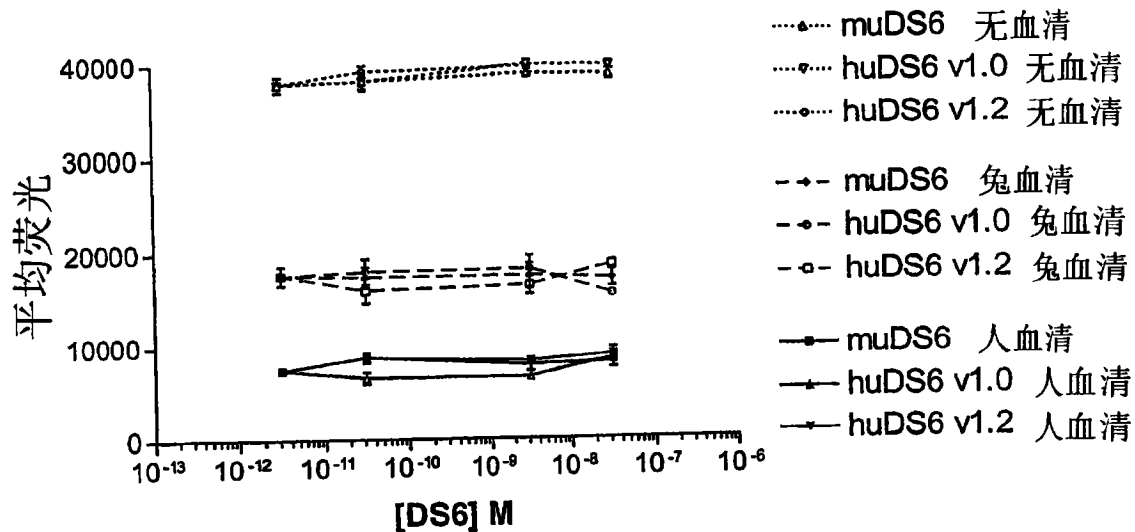


图21

A. HPAC



B. ZR-75-1

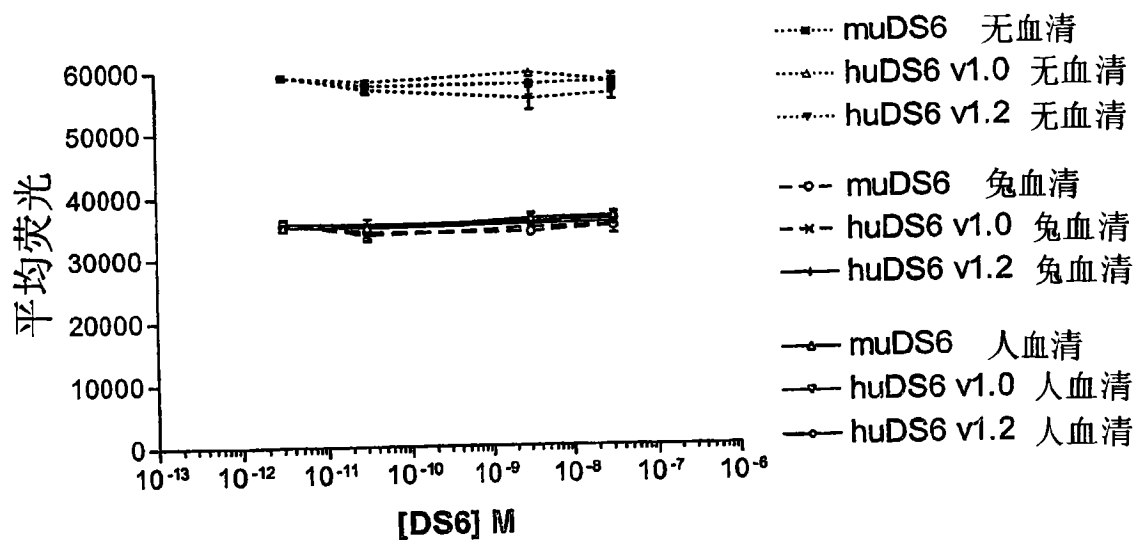


图22

A. 人卵巢癌细胞系

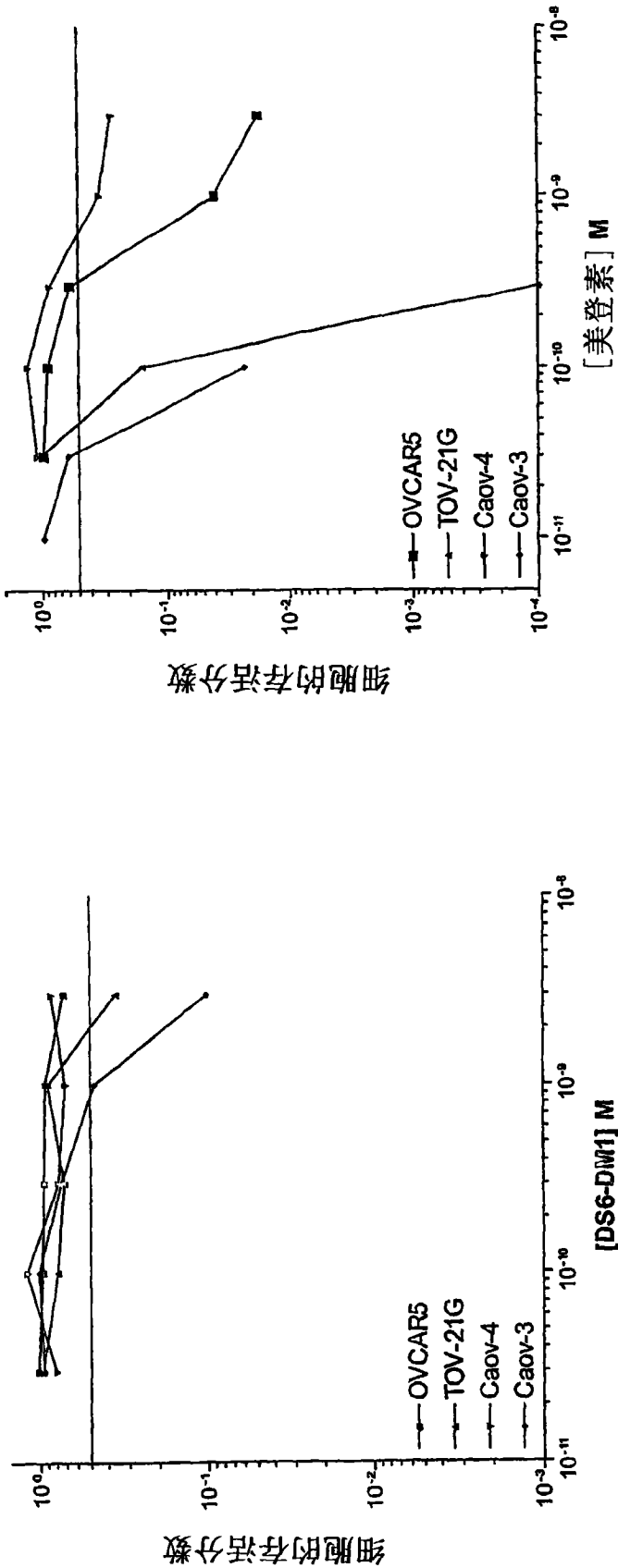


图23

B. 人乳腺癌细胞系

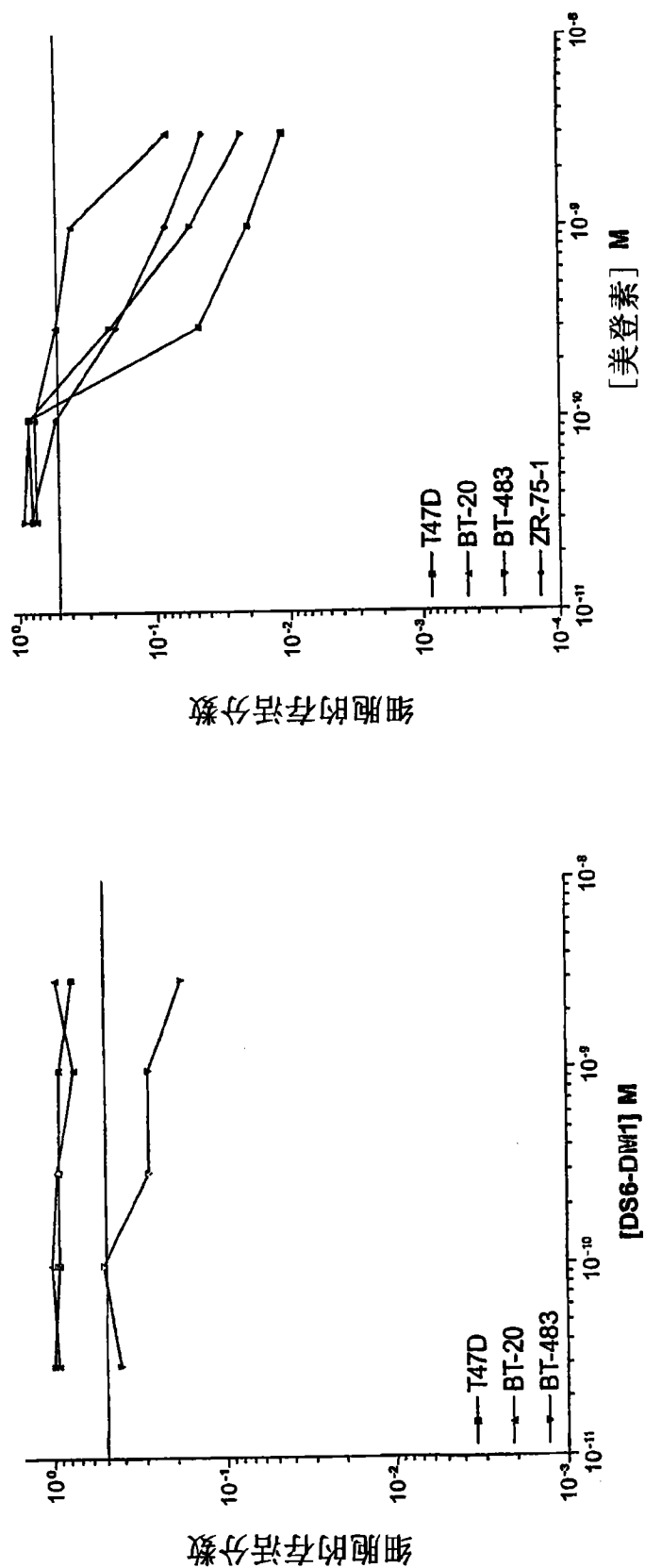


图23续

C. 人子宫颈癌细胞系

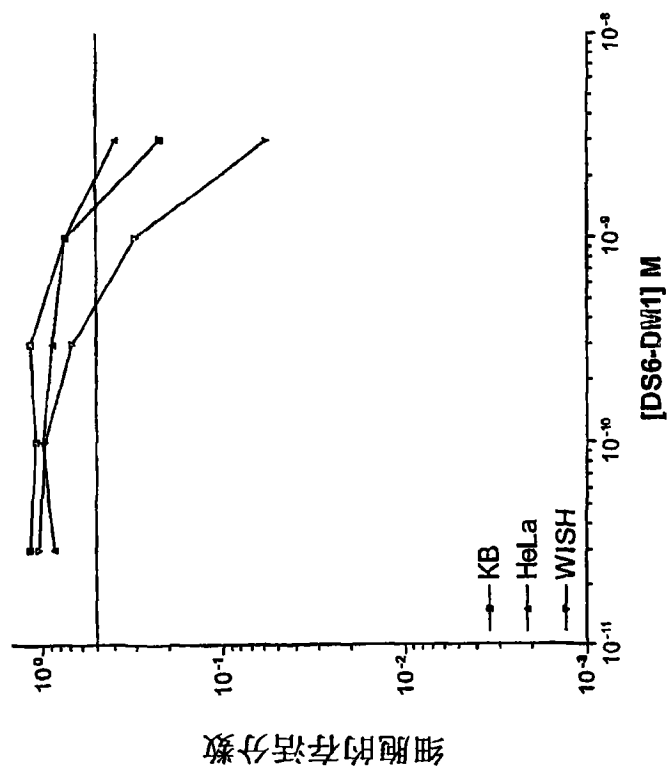
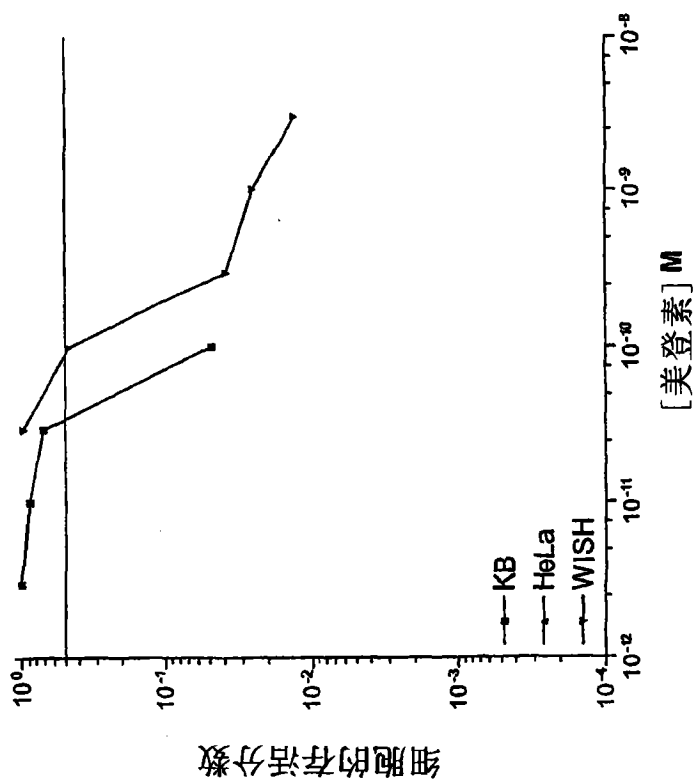


图23续

D. 人胰腺癌细胞系

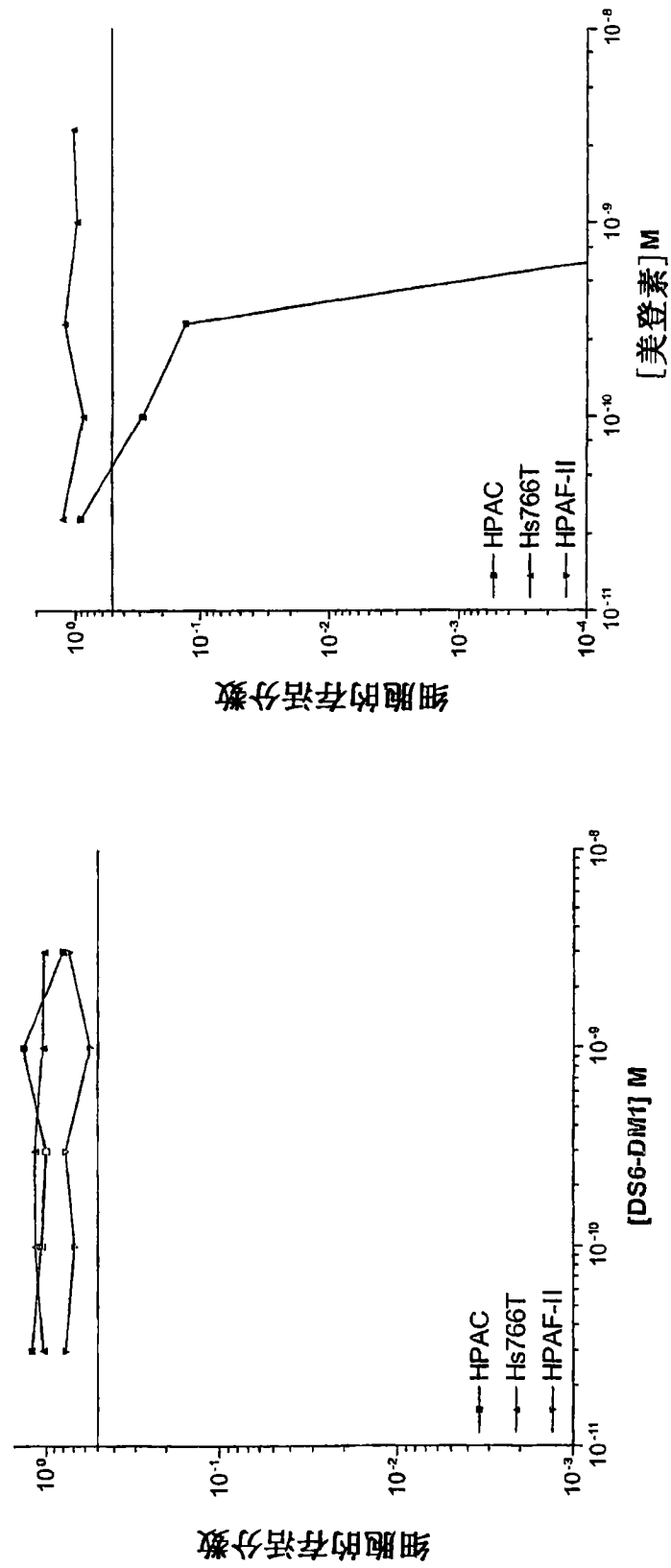


图23续

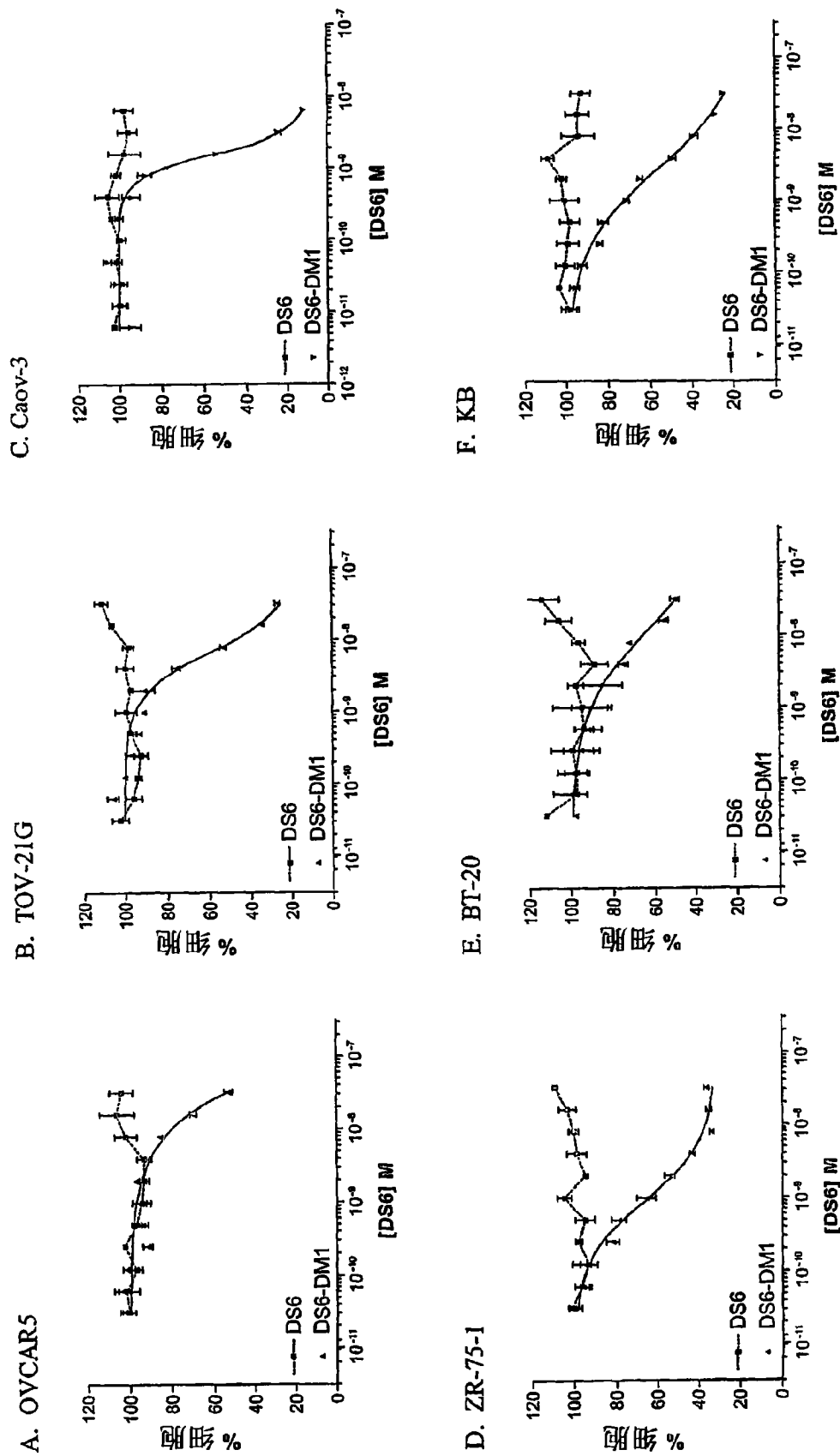


图24

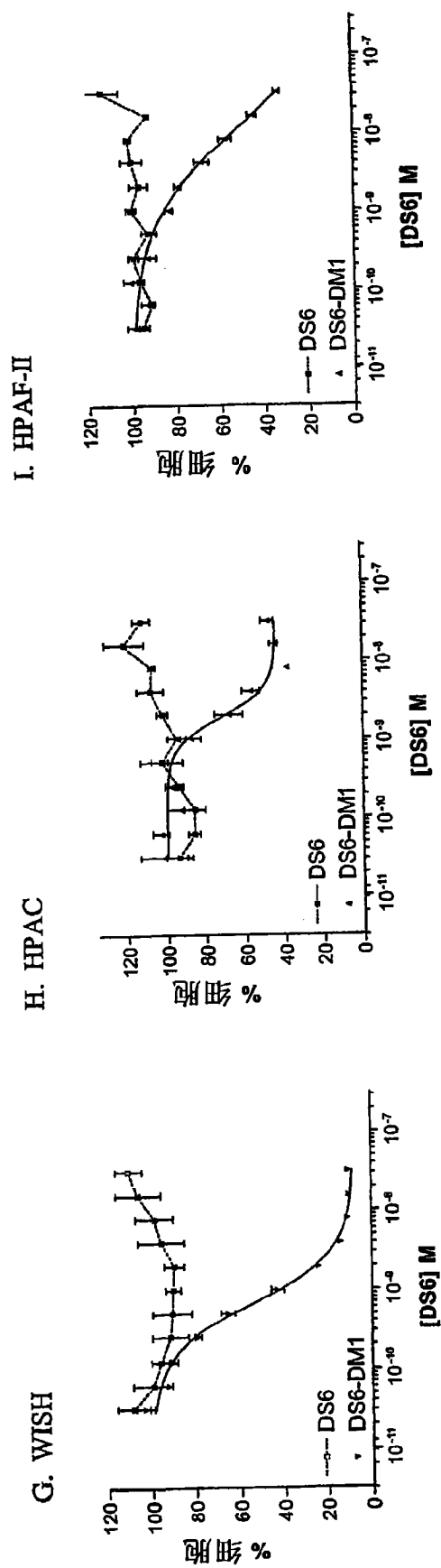
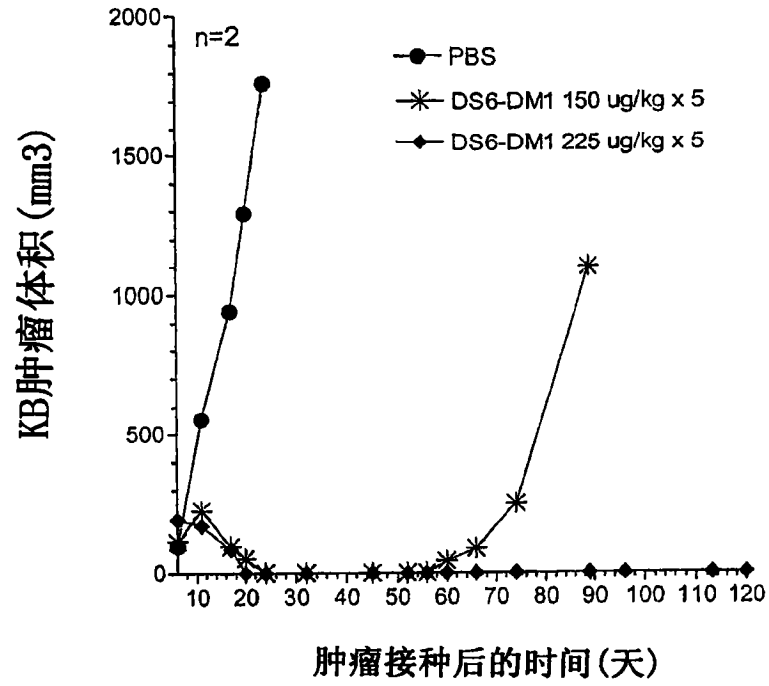


图24续

A.



B.

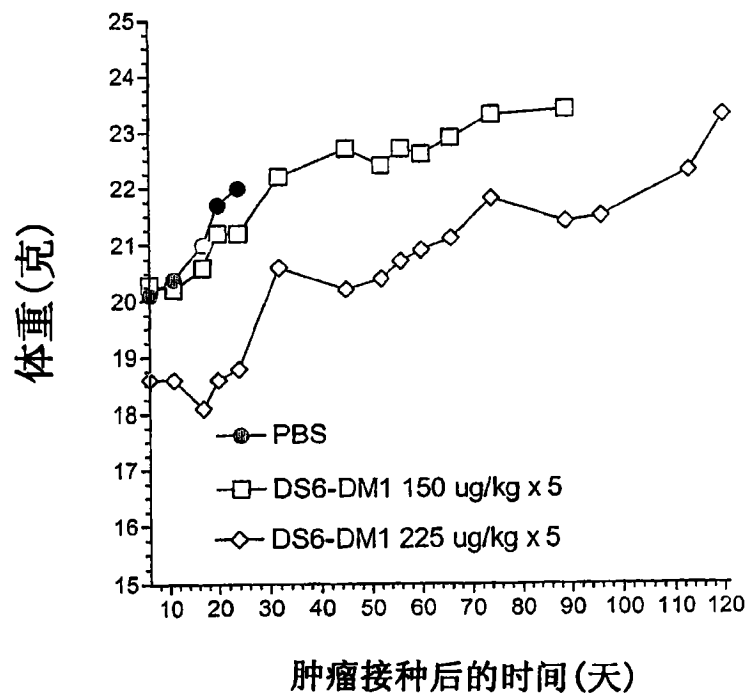


图25

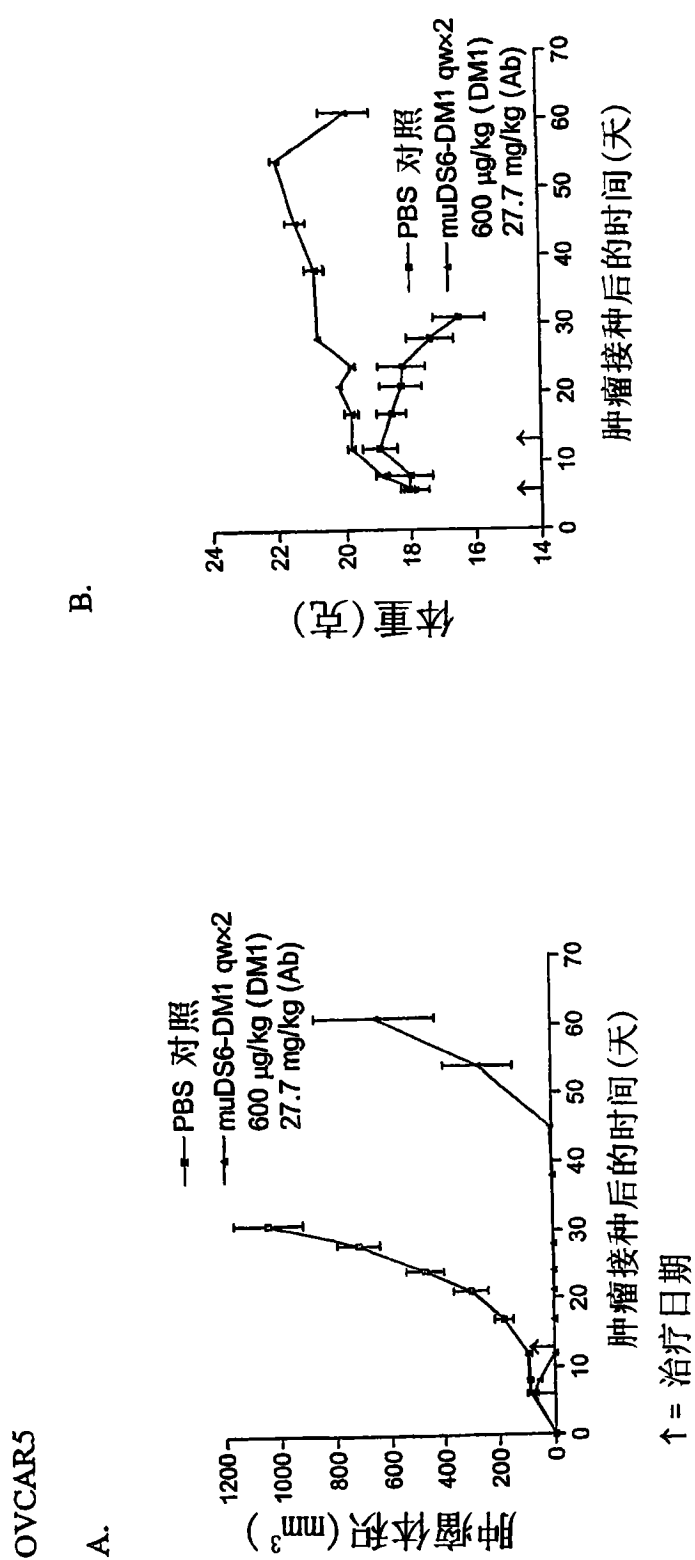


图26

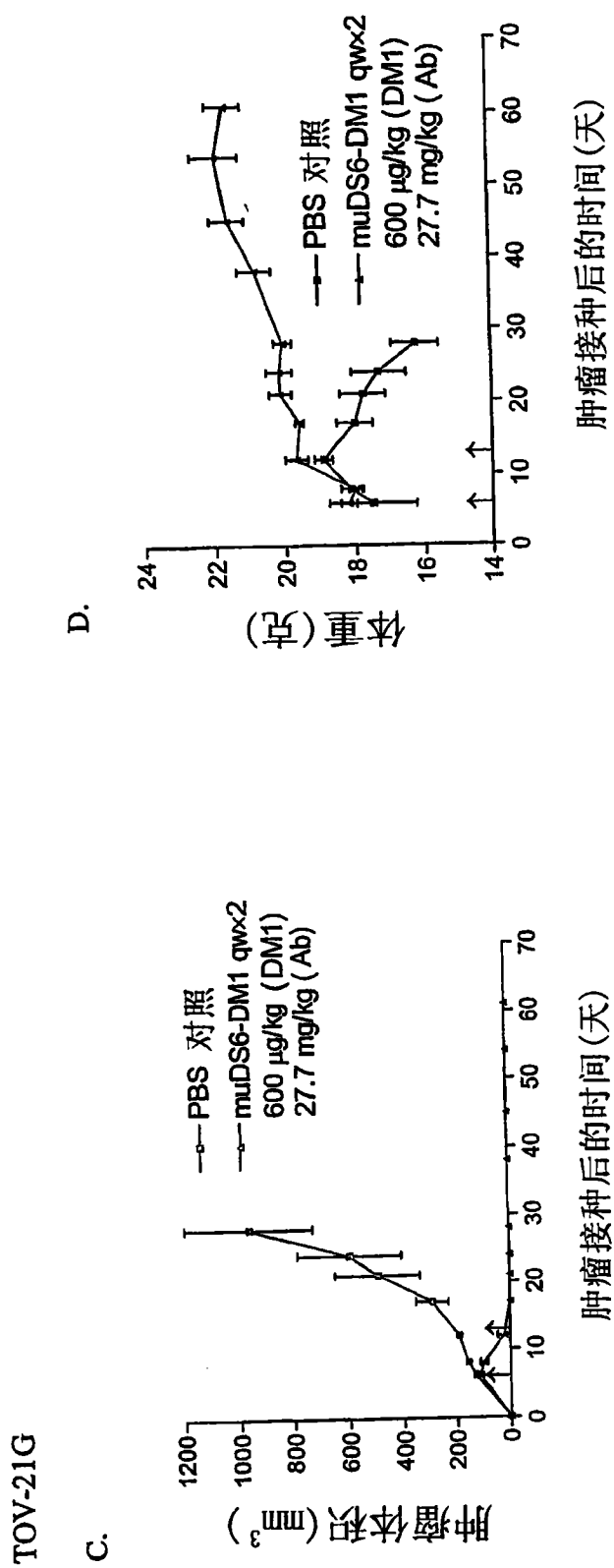


图26续

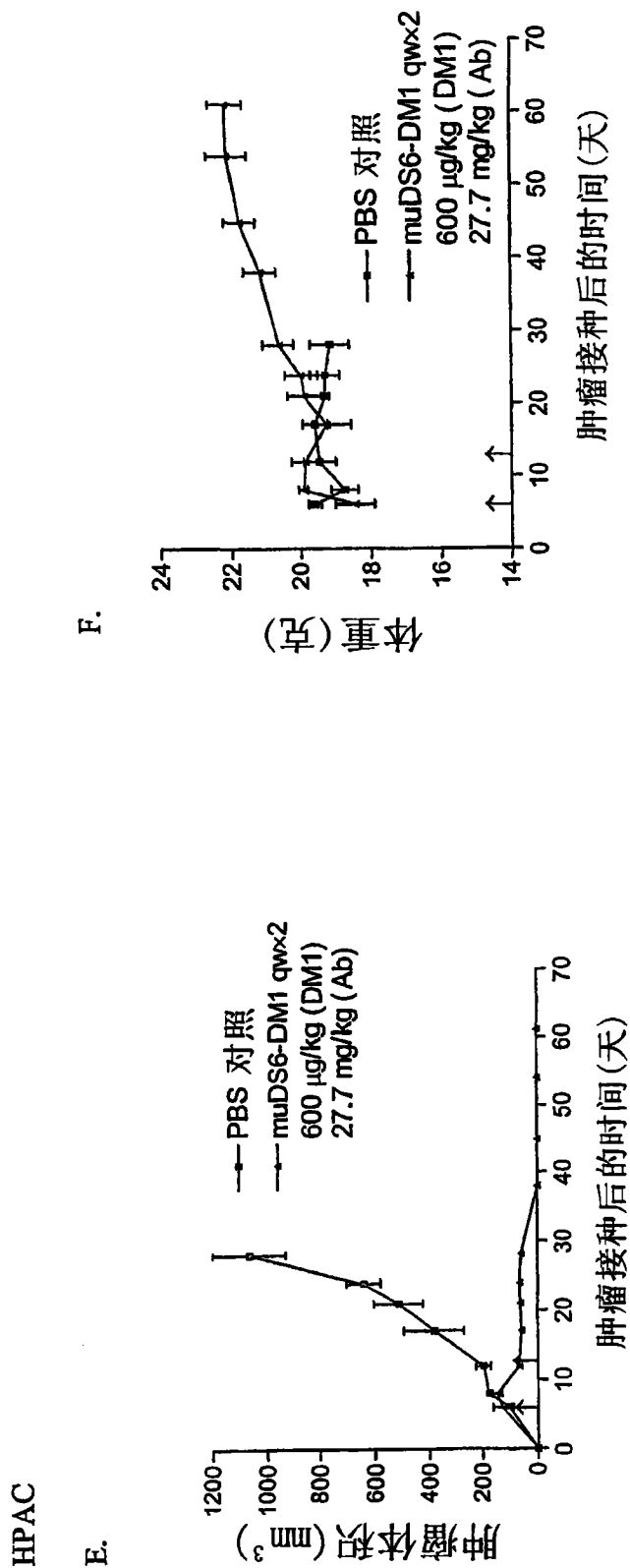


图26续

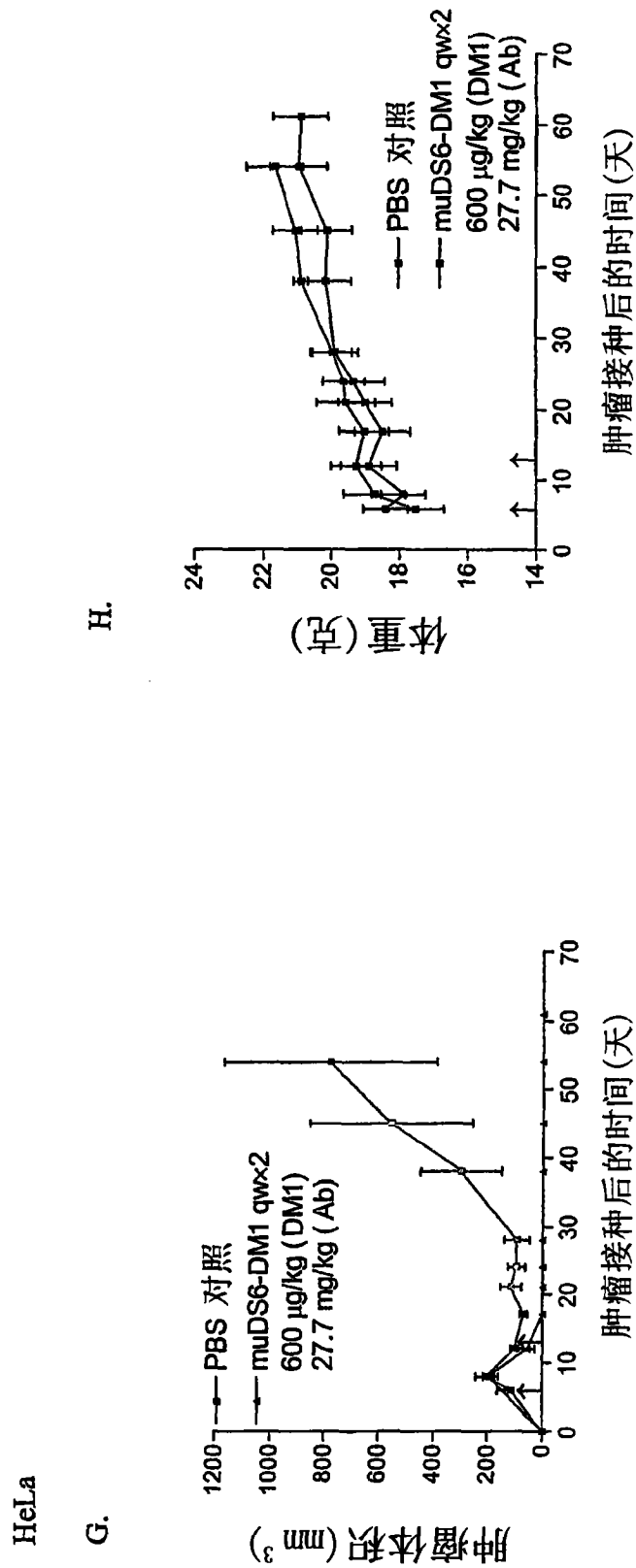


图26续

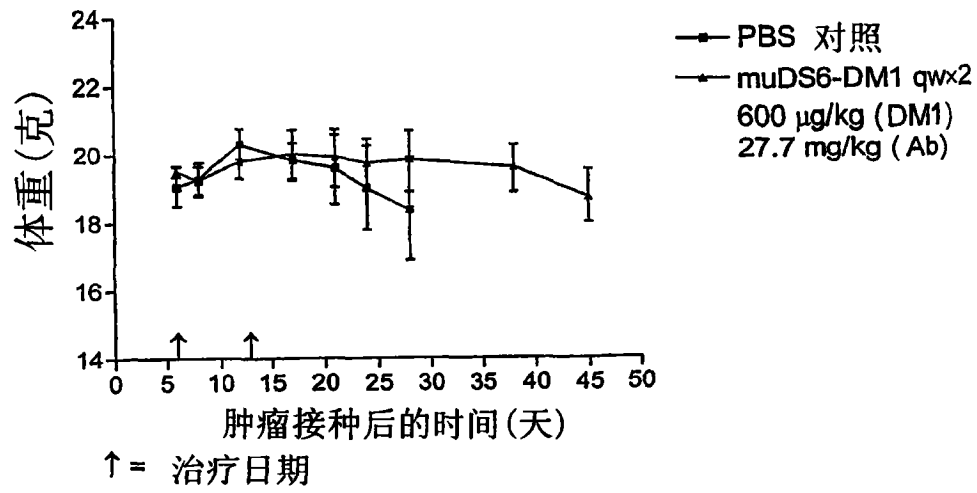


图27

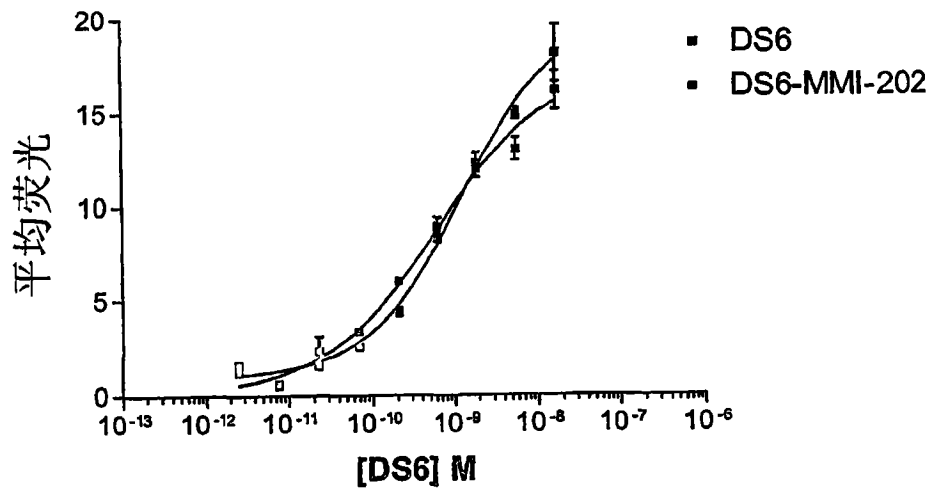


图28