



1. 一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或其变异体的分离的轻链互补决定区 1。
2. 一个编码权利要求 1 的轻链互补决定区 1 的分离的核酸序列，或其变异体。
3. 一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或其变异体的分离的轻链互补决定区 2。
4. 一个编码权利要求 3 的轻链互补决定区 2 的分离的核酸序列，或其变异体。
5. 一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO:3 或其变异体的分离的轻链互补决定区 3。
6. 一个编码权利要求 5 的轻链互补决定区 3 的分离的核酸序列，或其变异体。
7. 一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO:4 或其变异体的分离的重链互补决定区 1。
8. 一个编码权利要求 7 的重链互补决定区 1 的分离的核酸序列，或其变异体。
9. 一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或其变异体的分离的重链互补决定区 2。
10. 一个编码权利要求 9 的重链互补决定区 2 的分离的核酸序列，或其变异体。
11. 一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6 或其变异体的分离的重链互补决定区 3。
12. 一个编码权利要求 11 的重链互补决定区 3 的分离的核酸序列，或其变异体。

13. 一个包含权利要求 1, 3 和/或 5 的轻链互补决定区的分离的轻链可变区, 或其变异体。

14. 一个编码权利要求 13 的轻链可变区的分离的核酸序列, 或其变异体。

15. 一个包含权利要求 7, 9 和/或 11 的重链互补决定区的分离的重链可变区, 或其变异体。

16. 一个编码权利要求 15 的重链可变区的分离的核酸序列, 或其变异体。

17. 一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7 (图 1)的分离的轻链可变区, 或其变异体。

18. 一个包含 SEQ ID NO:8 (图 1)的轻链可变区的分离的核酸序列, 或其变异体。

19. 一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9 (图 2)的分离的重链可变区, 或其变异体。

20. 一个包含 SEQ ID NO:10 的重链可变区(图 2)的分离的核酸序列, 或其变异体。

21. 一个包含权利要求 1, 3 和/或 5 的轻链互补决定区的结合蛋白, 或其变异体。

22. 一个包含权利要求 7, 9 和/或 11 的重链互补决定区的结合蛋白, 或其变异体。

23. 一个包含权利要求 1, 3 和/或 5 的轻链互补决定区和权利要求 7, 9 和/或 11 的重链互补决定区的结合蛋白, 或其变异体。

24. 一个包含权利要求 13 或 17 的轻链可变区的结合蛋白, 或其变异体。

25. 一个包含权利要求 15 或 19 的重链可变区的结合蛋白, 或其变异体。

26. 一个包含权利要求 13 或 17 的轻链可变区和权利要求 15 或 19

的重链可变区的结合蛋白，或其变异体。

27. 权利要求 21-26 中任何一项的结合蛋白，其中，该结合蛋白结合到葡萄糖转运体 8 或其变异体上。

28. 权利要求 21-26 中任何一项的结合蛋白，其中，该结合蛋白结合到包含了由 SEQ ID NOS:11-20 定义的任何一个氨基酸序列或其变异体的蛋白质上。

29. 权利要求 21-26 中任何一项的结合蛋白，其中，该结合蛋白结合到包含了由 SEQ ID NOS:11 定义的氨基酸序列或其变异体的蛋白质上。

30. 权利要求 21-26 中任何一项的结合蛋白，其中，该结合蛋白结合到包含了由 SEQ ID NOS:12 定义的氨基酸序列或其变异体的蛋白质上。

31. 权利要求 21-26 中任何一项的结合蛋白，其中，该结合蛋白结合到包含了由 SEQ ID NOS:13 定义的氨基酸序列或其变异体的蛋白质上。

32. 权利要求 21-26 中任何一项的结合蛋白，其中，该结合蛋白结合到与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体上，该变异体在 N-端的二-亮氨酸部分发生改性。

33. 权利要求 32 的结合蛋白，其中，在 N-端的二-亮氨酸部分的改性是由二-亮氨酸改性为二-丙氨酸。

34. 权利要求 21-33 中任何一项的结合蛋白，其中，亲和力成熟被用于提高结合蛋白对葡萄糖转运体 8 或其变异体的亲和力、或对包含任何一个 SEQ ID NOS:11-20 的氨基酸序列中的蛋白质的亲和力。

35. 一种结合蛋白，其中，该结合蛋白对与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体是特异性。

36. 根据权利要求 35 的结合蛋白，其中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体包含由 SEQ ID NOS:11 定义的氨基酸序列或其变异体。

37. 根据权利要求 35 的结合蛋白，其中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体包含由 SEQ ID NOS:12 定义的氨基酸序列或其变异体。

38. 根据权利要求 35 的结合蛋白，其中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体包含由 SEQ ID NOS:13 定义的氨基酸序列或其变异体。

39. 根据权利要求 35 的结合蛋白，其中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体包含的葡萄糖转运体 8 在 N-端的二-亮氨酸部分发生改性。

40. 根据权利要求 39 的结合蛋白，其中，在 N-端的二-亮氨酸部分的改性是由二-亮氨酸改性为二-丙氨酸。

41. 根据权利要求 35-40 中任何一项的结合蛋白，其中，亲和力成熟被用于提高结合蛋白对与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体的亲和力。

42. 一种可结合到癌细胞上的抗原上的结合蛋白，其中，可通过竞争性结合分析识别结合蛋白。

43. 根据权利要求 42 的结合蛋白，其中，竞争性结合分析包括：

(1) 用最小浓度的根据权利要求 21-42 中任何一项中的结合蛋白 (Ab1) 与固定数量的癌细胞一起温培，这些结合蛋白对固定数量的癌细胞产生最大结合，并测量 Ab1 的中荧光强度( $MF_{Ab1}$ )；

(2) 通过向 Ab1 和癌细胞中加入 Ab2，测试试验的结合蛋白 (Ab2) 两个或更多浓度，并测量中荧光强度( $MF_{(Ab1+Ab2)}$ )；

(3) 测量背景荧光强度 ( $MF_{bgd}$ )；

(4) 计算 PI，其中，

$$PI = [(MF_{(Ab1+Ab2)} - MF_{背景}) / (MF_{Ab1} - MF_{背景})] \times 100; \text{ 以及}$$

(5) 将 PI 与对照物的 PI 值进行比较；

其中，与对照物的 PI 在统计学上有显著不同的 PI 表明试验的结合蛋白能够结合到癌细胞上的抗原上。

44. 权利要求 21-43 中任何一项的结合蛋白，其中，结合蛋白是抗

体。

45. 权利要求 44 的结合蛋白，其中，抗体是抗体片段。

46. 权利要求 45 的结合蛋白，其中，抗体片段是 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv、ds-scFv、其二聚体、微型抗体、双链抗体或多聚抗体，或双特异性抗体片段。

47. 一种组合物，包含权利要求 21-46 中任何一项的结合蛋白，其具有药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂或稳定剂。

48. 一种免疫偶联物，包含(1)权利要求 21-46 中任何一项的结合到癌细胞上的抗原上的结合蛋白，其附于(2)一种癌症治疗剂上，该癌症治疗试剂是毒害细胞的、抑制细胞生长的，或者是阻止或降低癌症细胞分裂的和/或转移的能力。

49. 权利要求 48 的免疫偶联物，其中，癌症治疗剂是细胞毒素。

50. 权利要求 49 的免疫偶联物，其中，细胞毒素是核糖体-失活的多肽。

51. 根据权利要求 50 的免疫偶联物，其中，细胞毒素选自由多花白树素 (gelonin)、bouganin、皂草毒素 (saporin)、蓖麻毒素 (ricin)、蓖麻毒素 A 链、异株泻根毒素(bryodin)、白喉毒素 (diphtheria toxin)、局限曲菌素(restrictocin)、假单细胞菌外毒素 A(Pseudomonas exotoxin A)、或它们的变异体组成的组。

52. 权利要求 50 的免疫偶联物，其中，毒素是改性的 bouganin 或其变异体。

53. 权利要求 50 的免疫偶联物，其中，毒素是包含氨基酸 252-608 的假单细胞菌外毒素 A 的截去形式或其变异体。

54. 权利要求 48-53 中任何一项的免疫偶联物，其中，免疫毒素被癌细胞内化。

55. 一种组合物，包含根据权利要求 48-54 中任何一项的免疫偶联物，其具有药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂或稳定剂。

56. 根据权利要求 48-54 中任何一项的有效量的免疫偶联物在制造治疗或预防癌症的药物中的应用。

57. 根据权利要求 56 的应用, 还包含一种或多种其它癌症治疗剂在制造同时的、分开的或连续的治疗或预防癌症的药物中的应用。

58. 根据权利要求 48-54 中任何一项的有效量的免疫偶联物在治疗或预防癌症中的应用。

59. 根据权利要求 58 的应用, 还包含一种或多种其它癌症治疗剂在同时的、分开的或连续的治疗或预防癌症中的应用。

60. 一种治疗或预防癌症的方法, 包含向疑似患癌症的受治疗者施用权利要求 48-54 中任何一项的有效量的免疫偶联物。

61. 根据权利要求 60 的方法, 进一步包含至少一个其它的抗癌症疗法。

62. 一种治疗或预防癌症的试剂盒, 包含权利要求 48-54 中任何一项的有效量的免疫偶联物, 以及使用其治疗或预防癌症的指导说明。

63. 一种检测或监控受测试者中的癌症的方法, 该方法包含以下步骤:

(1) 将从所述受测试者中取出的测试样品与权利要求 21-46 中任何一项的结合蛋白接触, 所述结合蛋白特异性地结合到癌细胞上的抗原, 形成结合蛋白-抗原复合物;

(2) 测量测试样品中结合蛋白-抗原复合物的量; 以及

(3) 将测试样品中的结合蛋白-抗原复合物的量与对照物比较。

64. 一种诊断癌症的试剂盒, 包含权利要求 21-46 中任何一项的结合到癌细胞上的抗原的结合蛋白, 以及其使用指导说明。

65. 一种诊断试剂, 包含(1) 根据权利要求 21-46 中任何一项的结合到癌细胞上的抗原的结合蛋白, 其附于(2) 可直接或间接地生成可检测的信号标记物上。

66. 权利要求 65 的诊断试剂, 其中, 标记物是放射性同位素、荧

光化合物、化学发光化合物、酶、成像试剂或金属离子。

67. 一种试剂盒，包含权利要求 65 或 66 的诊断试剂以及其使用指导说明。

68. 一种重组表达载体，包含权利要求 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 的任何一项的核酸分子。

69. 一种宿主细胞，包含权利要求 68 的重组表达载体。

70. 一种分离的蛋白质，包含可特异性地结合到权利要求 21-46 中任何一项的结合蛋白的氨基酸序列。

71. 权利要求 70 的分离的蛋白质，包含葡萄糖转运体 8 或其变异体。

72. 权利要求 70 的分离的蛋白质，包含 SEQ ID NOS:11-20 中任何一个的氨基酸序列或其变异体。

73. 权利要求 70 的分离的蛋白质，包含与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体。

74. 权利要求 73 的分离的蛋白质，其中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体包含的葡萄糖转运体 8 在 N-端的二-亮氨酸部分发生改性。

75. 权利要求 74 的分离的蛋白质，其中，在 N-端的二-亮氨酸部分的改性是由二-亮氨酸改性为二-丙氨酸。

76. 一种分离的蛋白质，包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或其变异体。

77. 一种分离的蛋白质，包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或其变异体。

78. 一种分离的蛋白质，包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列或其变异体。

79. 一种分离的核酸序列，其编码权利要求 70-78 中任何一项的分离的蛋白质。

80. 一种重组表达载体，包含权利要求 79 的核酸序列。
81. 一种检测或监控患有或怀疑患有癌症的受测试者的癌症的方法，该方法包含检测权利要求 70-78 中任何一项的在样品中细胞上的分离的蛋白质，其中，如果在细胞上检测到分离的蛋白质，则表明有癌症存在。
82. 一种药物组合物，包含根据权利要求 70-78 中任何一项的有效量的分离的蛋白质或其片段与适合的稀释剂或载体的混合物。
83. 权利要求 82 的药物组合物，进一步包含佐药。
84. 一种药物组合物，包含权利要求 79 的有效量的分离的核酸序列与适合的稀释剂或载体的混合物。
85. 权利要求 84 的药物组合物，进一步包含佐药。
86. 一种药物组合物，包含权利要求 80 的有效量的重组表达载体与适合的稀释剂或载体的混合物。
87. 权利要求 86 的药物组合物，进一步包含佐药。
88. 根据权利要求 70-78 的任何一项的分离的蛋白质或其片段在制造治疗或预防癌症的药物中的应用。
89. 根据权利要求 70-78 的任何一项的分离的蛋白质或其片段在制造诱发受测试者的免疫应答的药物中的应用。
90. 根据权利要求 79 的分离的核酸序列在制造治疗或预防癌症的药物中的应用。
91. 根据权利要求 79 的分离的核酸序列在制造诱发受测试者的免疫应答的药物中的应用。
92. 权利要求 80 的重组表达载体在制造治疗或预防癌症的药物中的应用。
93. 权利要求 80 的重组表达载体在制造诱发受测试者的免疫应答的药物中的应用。
94. 一种治疗或预防癌症的方法，包含向患有或疑似患癌症的受治

疗者施用根据权利要求 70-78 中任何一项的有效量的分离的蛋白质或其片段。

95. 一种治疗或预防癌症的方法，包含向患有或疑似患癌症的受治疗者施用根据权利要求 79 的有效量的分离的核酸序列。

96. 一种治疗或预防癌症的方法，包含向患有或疑似患癌症的受治疗者施用权利要求 80 的有效量的重组表达载体。

97. 一种在受测试者中诱发对权利要求 70-78 中任何一项的分离的蛋白质的免疫应答的方法，包含向所述受测试者施用根据权利要求 70-78 中任何一项的有效量的分离的蛋白质或其变异体。

98. 一种在受测试者中诱发对权利要求 70-78 中任何一项的分离的蛋白质的免疫应答的方法，包含向所述受测试者施用根据权利要求 79 的有效量的分离的核酸序列。

99. 一种在受测试者中诱发对权利要求 70-78 中任何一项的分离的蛋白质的免疫应答的方法，包含向所述受测试者施用权利要求 80 的有效量的重组表达载体。

100. 一种试剂盒，包含权利要求 82-87 中任何一项的药物组合物及其使用指导说明。

101. 一种在受测试者中治疗或预防癌症的方法，包含阻止或降低与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体作为糖的转运体的功能。

102. 根据权利要求 101 的方法，其中，权利要求 21-46 中任何一项的结合蛋白被用于阻止或降低与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体作为糖的转运体的功能。

103. 根据权利要求 101 的方法，其中，葡萄糖转运体抑制剂被用于阻止或降低与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体作为糖的转运体的功能。

104. 根据权利要求 101 的方法，其中，通过阻止或降低在细胞中与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体的表达，而阻止或降低与癌症相关

的葡萄糖转运体 8 的变异体的功能。

105. 一种确认具有预防或治疗癌症的化合物的方法，包含以下步骤：

(a) 将表达了权利要求 70-78 中任何一项的分离的蛋白质的细胞与测试化合物接触；以及

(b) 确定分离的蛋白质作为葡萄糖转运体的表达或功能；

(c) 与对照物比较的分离的蛋白质的表达或功能，其中，如果与对照物相比，分离的蛋白质的表达或功能有所降低，则表明该化合物可用作预防或治疗癌症。

## 肿瘤特异性抗体和细胞表面蛋白质

### 技术领域

本发明涉及人肿瘤特异性结合蛋白及其所有应用。特别的，本发明涉及对癌细胞上的抗原或分子为特异的抗体或抗体片段、及含有本发明的结合蛋白的免疫偶联物，以及它们的使用方法。本发明还涉及新的与癌症相关的抗原和其应用。

### 背景技术

在 2000 年，全世界有约 2200 万人患癌症，620 万人死于这类疾病。每年有超过 1000 万新增病例，且预计在未来 15 年内增加 50%（WHO，世界癌症报道（World Cancer Report））。Bernard W. Stewart 和 Paul Kleihues 编，IARC Press, Lyon, 2003)。目前的癌症治疗局限于侵入性手术、放射疗法和化学疗法，所有的这些方法或是导致潜在的严重副作用，非特异性毒效和/或由创伤带来的体形和/或生活质量的改变。癌症可发展成为对化学疗法产生不反应性，从而降低了其他治疗手段的选择余地和成功机会。对于一些癌症的预后比其他的更坏，且某些癌症其结果几乎都是致命的。此外，那些有着相对较高治疗成功率的癌症，同样也有着非常高的发生率，因此还是主要的杀手。

导致现有癌症疗法的不足的原因之一是它们缺少对受影响的组织和细胞的选择性。手术切除总是包含移除看似正常的被认为是“安全界限”的组织，而这样会增加发病率和并发症的危险。另外，手术切除还包含移除一些散置于癌细胞中、有可能维持或恢复受影响的器官或组织的健康组织。放射线和化疗由于其非特异性的作用模式，会损害到许多正常的细胞。这将会导致严重的副作用，例如严重的恶心、体重减轻和体力

降低、脱发等，并且还会增加其在以后患其他癌症的危险。对于癌细胞有更高选择性的治疗将不会伤及正常细胞，从而将提高作用/副作用比例和生活质量。

对癌症治疗的选择性可通过使用对仅存在于或主要上存在于癌细胞中的分子有特异性的抗体来提高。这样的抗体可被用于调节免疫系统以及增强患者自身免疫系统对癌症的识别和毁灭。它们还可以妨碍或改变靶分子的功能，从而妨碍或改变癌细胞的功能。它们还能用于靶向药物、基因、毒素或其他与癌细胞医学相关的分子。这种抗体-药物复合物通常被称作为免疫毒素或免疫偶联物，且近年来许多这样的化合物都被进行了测试。 [Kreitman RJ (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11:570-578; Kreitman RJ (2000) Immunotoxins. *Expert Opin Pharmacother* 1:1117-1129; Wahl RL (1994) Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer* 73:989-992; Grossbard ML, Fidas P (1995) Prospects for immunotoxin therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Immunol Immunopathol* 76:107-114; Jurcic JG, Caron PC, Scheinberg DA (1995) Monoclonal antibody therapy of leukemia and lymphoma. *Adv Pharmacol* 33:287-314; Lewis JP, DeNardo GL, DeNardo SJ (1995) Radioimmunotherapy of lymphoma: a UC Davis experience. *Hybridoma* 14:115-120; Uckun FM, Reaman GH (1995) Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 18:195-201; Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 345:241-247]. 迄今已测试过的对抗已知肿瘤标记物的抗体大多为小鼠的单克隆抗体，有时通过分子工程进行“人类化”。不幸的是，它们的靶也通常存在于正常细胞的亚群中，因此引起一些非特异性的影响。此外，这些抗体基本上是小鼠蛋白，它们被人类患者的免疫体识别为外

来蛋白。接下来的免疫反应和抗体响应可导致效率的丧失或副作用的产生。

本发明的发明人在开发治疗癌症的抗体过程中使用了各种不同的方法。与对带有癌细胞或分离的癌细胞标记物的试验动物进行免疫处理不同的是，本发明的发明人仅仅寻求那些可被患者自身免疫系统识别的标记物，换句话说，那些被免疫系统识别为外来分子的标记物。这就意味着标记物或抗体通常是基本上不存在于正常细胞中的，因此进一步降低了非特异性毒性的危险。杂交瘤文库产生自癌症患者衍生的淋巴细胞，及由它们分泌的抗体进行了结合到正常和癌细胞的测试。只有那些显示出对癌细胞有高选择性的抗体为了以后的评价和发展才被作为癌症治疗或诊断试剂的研究。本专利申请的主题即是这样的一种高选择性的抗体。除了具有选择性外，该抗体由于是完全的人蛋白，因此能与病人的免疫系统完全相容。本发明的抗体可以用作诊断或治疗用，或者作为改造其他靶抗原的结合分子的基础。本发明的抗体还可以用作识别靶抗原。然后，该抗原能被用在设计新的癌症治疗和诊断之中。

抗体分子的基本结构包括 4 条蛋白链，其中 2 条重链，2 条轻链。这些链通过二硫键相互连接。每条轻链均是由轻链可变区和轻链恒定区组成。每条重链均是由重链可变区和重链恒定区组成。轻链和重链的可变区可进一步细分为构架区和超变区，被称作互补决定区 (CDR)。每条轻链和重链的可变区均是由 3 个 CDRs 和 4 个构架区组成。

葡萄糖转运体 8 (GLUT8)是蛋白质 GLUT 家族中的一员，及已知其具有转运糖的活性。GLUT8 由在人染色体 9 上发现的基因 *slc2a8* 编码。GLUT8 的长度为 477 个氨基酸，是~50 kDa 的 II 型跨膜蛋白质。其具有 12 个跨膜区域。其在 TM1 和 TM2 之间具有一个短的细胞外环，以及在 TM9 和 TM10 之间具有一个长的细胞外环。尽管具有几个跨膜区域，由于 N-端的二-亮氨酸部分的原因，GLUT8 很可能位于细胞内(Ibberson et al. JBC 275: 4607-4612, 2000; Moadel et al., Cancer Res 65 :698-702, 2005)。在

经胰岛素处理的小鼠细胞中已观察到了向膜的迁移(Carayannopoulos et al., PNAS 97:7313-18, 2000) 或在经低氧休克或胰岛素处理的大鼠细胞中(US 09/886,954 [2002/0038464])。在人类中, 还没有膜定位的报道, 且没有确认任何诱导迁移的刺激物(Widmer et al., Endocrinology 146:4727-36, 2005)。

GLUT/SLC2A 家族的命名法已公开在 Amer.J.Physiol.Endocrinol.Metab. 282:E974-76, 2002 中。如在该文中指出的, GLUT8 在过去被用作描述现在所知的 GLUT12。N-端的二-亮氨酸部分已被发现存在于所有的哺乳动物的 GLUT8 序列中(见 Zhao et al., Biochimica et Biophysica Acta 1680:103-113, 2004 -显示在牛、人、大鼠和小鼠)。

## 发明内容

本发明者们制备了人癌症特异性抗体, 其结合到包括乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、黑素瘤、肝癌、结肠癌、子宫颈癌、头和颈癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和子宫内膜癌在内的几种癌症细胞。重要的是, 该抗体不会显著地结合到正常的组织上, 因此使得其适用于癌症的治疗和诊断中。

本发明者们已克隆出抗体并对其进行了测序, 还确定了抗体轻链和重链可变区和互补决定区 1, 2 和 3 的序列。因此, 本发明提供了分离的轻链互补决定区 1, 2 和/或 3, 其分别包含氨基酸序列 RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1), AASSLHS (SEQ ID NO:2) 和 LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3); 以及分离的重链互补决定区 1, 2 和 3, 其分别包含氨基酸序列 NYAMS (SEQ ID NO:4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5)和 VPYRSTWYPLY (SEQ ID NO:6)。

本发明还提供了分离的核酸序列, 该核酸序列编码轻链互补决定区 1, 2 和/或 3, 其分别包含氨基酸序列 RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1),

AASSLHS (SEQ ID NO:2) 和 LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3); 以及分离的核酸序列, 该核酸序列编码重链互补决定区 1, 2 和/或 3, 其分别包含氨基酸序列 NYAMS (SEQ ID NO:4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5) 和 VPYRSTWYPLY (SEQ ID NO:6)。

本发明的其它方面是关于分离的轻链可变区, 其包含本发明的轻链互补决定区 1, 2 和/或 3 (SEQ ID NOS:1-3), 以及分离的重链可变区, 其包含本发明的重链互补决定区 1, 2 和/或 3 (SEQ ID NOS:4-6)。在一实施方式中, 轻链可变区包含示于图 1 中的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)。在另一实施方式中, 重链可变区包含示于图 2 中的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9)。

本发明还提供了编码本发明的轻链可变区的一个分离的核酸序列, 以及编码本发明的重链可变区的一个分离的核酸序列。在一实施方式中, 轻链可变区包含示于图 1 中的核酸序列 (SEQ ID NO:8)。在另一实施方式中, 重链可变区包含示于图 2 中的核酸序列 (SEQ ID NO:10)。

本发明的另一方面是关于一种结合蛋白, 优选为抗体或抗体片段, 其包含至少一个本发明的轻链互补决定区 (即一个或多个 SEQ ID NOS:1-3) 和/或至少一个本发明的重链互补决定区 (即一个或多个 SEQ ID NOS:4-6)。本发明还提供一种结合蛋白, 优选为抗体或抗体片段, 其包含本发明的轻链可变区和/或本发明的重链可变区。

本发明者们还确认了与本发明的结合蛋白结合的抗原。因此, 本发明提供的结合蛋白结合到: 葡萄糖转运体 8 (GLUT8) 或其变异体; 包含氨基酸序列 SEQ ID NOS:11-20, 优选为 SEQ ID NOS:11-13 中任何一个的蛋白质; 或在癌细胞表面表达的与癌症相关的 GLUT8 的变异体。在本发明的一个实施方式中, 与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含由 SEQ ID NOS:11, 12 或 13 中任何一个或其变异体定义的氨基酸序列。在本发明的另一实施方式中, 与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含在 N-端的二-亮氨酸部分产生改性的 GLUT8。在本发明的又一实施方式中, N-端的二-亮氨酸部

分被改性为二-丙胺酸。

此外，本发明还提供含有本发明的结合蛋白，例如抗体或抗体片段，并具有药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂或稳定剂的组合物。

本发明的又一方面是关于一种免疫偶联物，其包含：(1)本发明的结合蛋白，优选为结合到癌细胞上的抗原或分子上的抗体或抗体片段，其附于(2)效应物分子上。本发明的再一方面是一种免疫偶联物包含：(1)本发明的结合蛋白，优选为结合到被癌细胞内化的抗原或分子上的抗体或抗体片段，其附于(2)效应物分子上。在一优选的实施方式中，效应物分子是(i)一种标记物，其可直接或间接地生成可检测的信号，或者是(ii)一种癌症治疗试剂，其或者是毒害细胞的、抑制细胞生长的，或者是阻止或降低癌症细胞分裂和/或转移的能力。优选地，该癌症治疗试剂是毒素或细胞毒素。

本发明还提供含有本发明的免疫偶联物的组合物，以及该免疫偶联物在生产治疗或预防及诊断癌症的药物中的应用。此外，本发明提供了使用本发明的免疫偶联物及相关的试剂盒于治疗或预防癌症的方法。

本发明的另一方面是检测或监控受测试者中癌症的方法，该方法包含以下步骤：

(1) 将从所述受测试者中取出的测试样品与本发明的结合蛋白接触，所述结合蛋白特异性地结合到癌细胞上的抗原，形成结合蛋白-抗原复合物；

(2) 测量测试样品中结合蛋白-抗原复合物的含量；以及

(3) 将测试样品中的结合蛋白-抗原复合物的含量与对照物比较。

本发明的另一方面是关于包含本发明的免疫偶联物的诊断试剂，其中的效应分子是一标记物，其可以直接或间接地生成可探测的信号。

本发明还包括可特异性地结合到本发明的结合蛋白之一的分离的蛋白、其核酸序列及应用。

本发明者们还确认了与本发明的结合蛋白结合的抗原。本发明包括新的与癌症相关的抗原，其是在癌细胞表面表达的 GLUT8 的变异体。本发明还包括了新的与癌症相关的抗原在癌症的治疗和诊断的应用。

在本发明的一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含由 SEQ ID NOS: 11, 12 或 13 中任何一个或其变异体定义的氨基酸序列。在本发明的另一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含在 N-端的二-亮氨酸部分产生改性的 GLUT8。在本发明的又一实施方式中，N-端的二-亮氨酸部分被改性为二-丙氨酸。

本发明还包括检测或监控患有或怀疑患有癌症的受测试者的癌症的方法，该方法包括检测样品中细胞上的与癌症相关的 GLUT8 的变异体，其中，如果在细胞上检测到与癌症相关的 GLUT8 的变异体，则表明有癌症存在。

此外，本发明还包括检测或监控患有或怀疑患有癌症的受测试者的癌症的方法，该方法包含检测在样品的细胞中与癌症相关的 GLUT8 的变异体的表达，其中，如果在细胞中检测到与癌症相关的 GLUT8 的变异体的表达，则表明有癌症存在。

本发明的另一方面是治疗或预防受测试者中的癌症的方法，该方法通过调整 GLUT8 在癌细胞中的功能或表达而达成。

本发明还包括治疗或预防受测试者中的癌症的方法，该方法使用与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段。此外，本发明还包括含有有效量的与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段、编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段的核酸序列、和/或包含了编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段的核酸序列的重组体表达的载体的药物组合物。

本发明的其他特征及益处将从以下的详细说明中更清楚地看出。然而，应当明白的是这些详细的说明和具体的例子虽然给出了本发明的优选的实施方式，但它们仅是为了示例的目的。本领域的技术人员能够在不脱离本发明精神下，从本发明详细的描述中得出各种基于本发明的变

化和改进。

## 附图说明

本发明将由附图加以说明，其中：

图 1 是轻链可变区 VB1-050 的核酸(SEQ ID NO:8)和氨基酸(SEQ ID NO:7)序列。

图 2 是重链可变区 VB1-050 的核酸(SEQ ID NO:10)和氨基酸(SEQ ID NO:9)序列。

图 3 显示了于不同温度下温培 A-375 细胞之后、由流式细胞仪确定的抗体结合到细胞的表面。在 4°C 下温培细胞悬浮液后的 A-375 细胞的荧光标记：4B5 (1) 和 VB1-050 (2)。将抗体结合的细胞加温到 37°C 后的 A-375 细胞的荧光标记：VB1-050 (3) 保持 60 分钟，(4) 保持 120 分钟。

图 4 显示了共聚焦显微镜对 VB1-050 内化的评估。A-375 细胞与抗体一同在 4°C 下温培，洗净并加温到 37°C 保持 60 分钟。细胞被固定、透化和用已荧光标记的第二抗体标记。在 VB1-050 于 4°C 下温培 60 分钟后，对 A-375 细胞的荧光标记显示出标记物的圆周表面分布，(60X x 4) 的放大 (A)。当抗体结合的细胞在 37°C 下温培 60 分钟后，细胞通过内化的抗体，显示出强的细胞内染色，(60X x 4) 的放大(B)。

图 5 显示了 PCR 反应的琼脂糖胶。在 UV 灯下用溴化乙锭检测到 DNA。A) 通过 *EcoRI* 和 *PvuII* 消化 PelB-V<sub>H845</sub>-C<sub>H</sub>-F-de-bouganin/psV73 质粒和 PelB(-S)-V<sub>H050</sub>-C<sub>H</sub>-F-de-bouganin/pSV73，并分别加载到泳道 1 和泳道 3 上。\*号表示 *EcoRI*-PelB-*PvuII* 插入了连接到预消化的 PelB(-S)-V<sub>H050</sub>-C<sub>H</sub>-F-de-bouganin/pSV73 (用箭头表示的) 的肽前导序列，从而产生了 PelB-V<sub>H050</sub>-C<sub>H</sub>-F-de-bouganin/pSV73。B) 通过 *EcoRV* 和 *XhoI* 消化 PelB(-S)-V<sub>L050</sub>-C<sub>L</sub>/pSV73 和 *SpeI*-de-bouganin-PelB-V<sub>L845</sub>-C<sub>L</sub>/pSV73 质粒，并分别加载到泳道 2-3 和泳道 4-5 上。用\*号和箭头分别标识插入片段和载体，用于产生 *SpeI*-de-bouganin-PelB-V<sub>L845</sub>-C<sub>L</sub>/pSV73 质粒，随后，

该质粒被插入到 3302 质粒中。C) SpeI-de-bouganin-PelB-V<sub>L845</sub>-C<sub>L</sub>/3302 质粒, 和 D) PelB-V<sub>H050</sub>-C<sub>H</sub>-F-de-bouganin 插入片段, 通过 *EcoRI* 和 *SpeI* 消化 (分别用箭头和\*号标识), 并加载到泳道 2 上, 该插入片段经连接产生 VB6-050/3302。

图 6 示出了 VB6-050 的西方墨点。在非还原的条件下, 将典型的 VB6-845 (泳道 1) 和 VB6-050 (泳道 2) 的上清液加载到 SDS-PAGE 凝胶上, 并用抗-人 K 轻链-HRP 抗体(1/1000)进行免疫印迹。泳道 3 和 4 分别对应于未经诱导培养物的上清液和梯状条带 (ladder)。泳道 5 是 VB6-845 上清液, 之前在西方墨点法测试中为阳性。

图 7 示出了由 E104 上清液得到的典型的经纯化的 VB6-050 的西方墨点。A) 用抗人 K 轻链-HRP 抗体对 16  $\mu$ L 取自纯化过程中不同阶段的样品进行免疫印迹。箭头表示完整的产物。泳道 1: 培养物上清液; 泳道 2: 浓缩上清液的渗透物; 泳道 3: 以 1/10 稀释的浓缩上清液; 泳道 4: 经渗透过滤浓缩的上清液的渗透物; 泳道 5: 经渗透过滤的上清液稀释 1/10; 泳道 6: CM-琼脂糖柱的流经物; 泳道 7: CM-琼脂糖柱的洗涤物; 泳道 8: CM-琼脂糖柱或 Ni-琼脂糖起始材料的洗脱物; 泳道 9: Ni-螯合柱的流经物; 泳道 10, 11 和 12: Ni-螯合柱中不同步骤的洗涤物; 泳道 13: Ni-螯合-琼脂糖或 SEC-200 起始材料的洗脱物; 泳道 14: SEC-200 流分物 26-28 的汇总; 泳道 15: 梯和 VB6-845 作为对照物。B) VB6-050 的考马斯 (Coomassie) 染色。泳道 1: SEC-200 起始材料; 泳道 2: 流分物 27; 泳道 3: 纯化的 VB6-845; 泳道 4: 梯。

图 8 示出了 VB6-050 的滴定曲线。用不同浓度的 VB6-050 培育 SKBR-3, A-375 和 SK-OV-3 细胞, 并由流式细胞仪获得荧光强度的中位数。中荧光强度 (median fluorescence, MF) 增加倍数使用下面公式计算, MF 增加倍数 = 在各浓度测得的 MF / 用 PBS 测得的 MF。

图 9 示出了 VB6-050 的体外细胞毒性。用抗原阳性细胞 MB-435S (空心圆圈) 和抗原阴性细胞 Daudi (实心圆圈) 进行 VB6-050 的 MTS 测定。

每个孔植有 1000 细胞，与 Fab-de-bouganin 纯化的蛋白质温培。经培育 5 天后，进行细胞生存力的测定和  $IC_{50}$  的确定。

图 10 示出了 HepG2, MCF-7, Panc-1 和 C-33A 在 PF-2D 系统上的分级谱图。在两个阳性和两个阴性细胞系之间的抗原表达的不同的比较谱图。该图代表了从 10 到 25 分钟的层析谱图。分离的抗原的区别可清楚地两个阳性细胞系中看到。MCF-7 和 HepG2 在洗脱时间为 15 和 18 分钟处显示出两个峰，表明了中等水平的疏水性。Panc-1 和 C-33A 未显示出相应的峰。在 12 分钟处的峰在各细胞系中均有观察到。

图 11 示出了由 HepG2 细胞系获得的肽的 TOF-MS 扫描结果，以探测样品中所有的肽离子的存在。在 1200-1400V 下对静态纳米喷雾进行 53 次 100-1200 amu 范围的扫描发现了大量回收的肽，对它们的分析获得了蛋白质 ID 为葡萄糖转运体 8。

图 12 示出了由 Panc-1 细胞系获得的肽的 TOF-MS 扫描结果，以探测样品中所有的肽离子的存在。在 1200-1400V 下对静态纳米喷雾进行 30 次 100-1200 amu 范围的扫描发现了大量回收的肽，对它们的分析获得了蛋白质 ID 为 IgG。

图 13 示出了由 MCF-7 细胞系获得的肽的 TOF-MS 扫描结果，以探测样品中所有的肽离子的存在。在 1200-1400V 下对静态纳米喷雾进行 27 次 100-1200 amu 范围的扫描发现了大量回收的肽，对它们的分析获得了蛋白质 ID 为葡萄糖转运体 8。

图 14 示出了由 C-33A 细胞系获得的肽的 TOF-MS 扫描结果，以探测样品中所有的肽离子的存在。在 1200-1400V 下对静态纳米喷雾进行 30 次 100-1200 amu 范围的扫描发现了大量回收的肽，对它们的分析获得了蛋白质 ID 为 IgG。

图 15 示出了由质谱分析回收的肽的序列覆盖 (sequence coverage)，其列于表 8 中。从溶液内经胰蛋白酶消化的溶液中总共回收了 8 个肽，获得了 34% 的蛋白质覆盖。划下底线的序列表示回收的肽序列，用粗体

表示的序列表示变异的氨基酸序列。

图 16 示出了从 VB1-050Ag 回收的肽的肽质量指纹分析结果。蛋白质分数大于 64 的被认为是显著的。唯一观察到的显著的蛋白质 IDs 指向一个抗原，即葡萄糖转运体 8。

图 17 示出了鉴定的抗原，即葡萄糖转运体 8，具有显著分数 83。由于数据库本身服务器的特点，以及相似性/同源性相关连的蛋白质，该蛋白质的所有的异构体就象被击中而萎靡。由 MS/MS 裂解和肽的同一性确认了该抗原是葡萄糖转运体 8。

图 18 示出了中性肽 Mr. 1401.54 的 MS/MS 离子裂解谱，显示为三价的分子(466.60000, 3+)。肽序列与葡萄糖转运体 8 的肽序列完全符合。

图 19 示出了中性肽 Mr. 1070.785 的 MS/MS 离子裂解谱，显示为二价的分子(536.40000, 2+)。肽序列与葡萄糖转运体 8 的肽序列完全符合。

图 20 示出了中性肽 Mr. 1997.9992 的 MS/MS 离子裂解谱，显示为三价的分子(667.098230, 3+)。与葡萄糖转运体 8 的同源肽序列相比，显示的肽序列改变了位于 7, 10, 12, 13, 14, 15 和 18 处的氨基酸。

图 21 示出了中性肽 Mr. 1176.3547 的 MS/MS 离子裂解谱，显示为二价的分子(589.100000, 2+)。与葡萄糖转运体 8 的同源肽序列相比，显示的肽序列改变了位于 7, 10, 12, 13, 14 和 15 处的氨基酸。

## 具体实施方式

### (A) 定义

在此使用的术语“全身性施用”意味着例如通过注射（皮下、静脉、肌肉等）、口服、吸入、经皮肤给予或局部施用（例如局部药膏或油膏等）、栓剂施用或植入手段等方便的方法进行全身性施用免疫偶联物和其他癌症治疗剂。植入物可以是多孔的、非多孔的或凝胶状物质，包括膜，例如硅橡胶膜或纤维。栓剂通常含重量比例为 0.5%到 10%的活性成分。

术语“氨基酸”包括所有的天然氨基酸和改性的氨基酸。

在此使用的术语“抗体”意在包括单克隆抗体、多克隆抗体和嵌合抗体。抗体可由重组源得到和/或由转基因动物产生。在此使用的术语“抗体片段”意在包括 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, 其二聚体、微型抗体、双抗体和多聚抗体, 以及双特异性抗体片段。可使用常规技术将抗体变为片段。例如, F(ab')<sub>2</sub> 片段可经由胃蛋白酶处理抗体而产生。产生的 F(ab')<sub>2</sub> 片段可经处理而还原二硫键, 从而产生 Fab' 片段。木瓜蛋白酶的消化可导致 Fab 片段的形成。Fab、Fab' 和 F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、微型抗体、双抗体、双特异性抗体片段, 以及其他片段也可通过重组技术合成。

在此使用的术语“本发明的抗体或抗体片段”包括至少一本发明的轻链互补决定区(即一个或多个 SEQ ID NOS:1-3)和/或至少一本发明的重链互补决定区(即一个或多个 SEQ ID NOS:4-6)。优选地, 抗体或抗体片段包含轻链 CDR 序列(SEQ ID NOS:1-3) 和/或重链 CDR 序列(SEQ ID NOS:4-6)或这些序列的功能性变异体 ( functional variants of the sequences), 这样, 这些抗体或抗体片段就能够结合到癌细胞上而不会具体地结合到正常细胞上。本发明的抗体或抗体片段还包括结合到葡萄糖转运体 8(GLUT8)或其变异体, 或包含氨基酸序列 SEQ ID NOS:11-20, 优选为 SEQ ID NOS:11-13 中任何一个的蛋白质上的抗体或抗体片段。

“至少为适度的严格杂交条件”是指为促进在溶液中两个互补核酸分子间进行选择性交配所选择的条件。杂交可发生在全部或部分核酸序列分子上。杂交的部分的长度通常至少为 15 个(例如, 20, 25, 30, 40 或 50)核苷酸。本领域技术人员应当知道核酸双链 (duplex) 或杂种的稳定性取决于 T<sub>m</sub>, 而在含钠的缓冲液中, T<sub>m</sub> 是钠离子浓度和温度的函数 (T<sub>m</sub> = 81.5°C - 16.6 (Log<sub>10</sub> [Na<sup>+</sup>]) + 0.41(%(G+C) 600/l), 或类似的方程)。因此, 决定杂种稳定性的洗涤条件的参数为钠离子浓度和温度。为了鉴定某一分子与一已知的核酸分子是相似的, 而不是相同的, 可假设 1% 的错配将会导致 T<sub>m</sub> 降低约 1°C。例如, 如果认为核酸分子有大于 95% 的同

一性，则最终的洗涤温度将降低约 5°C。基于这些考虑，本领域的技术人员将能够轻松地选择合适的杂交条件。在优选的实施方式中，选择的是严格的杂交条件。例如，以下条件可应用于获得严格杂交：基于上述方程，在 5x 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)/5x Denhardt's 溶液/1.0% SDS 中于  $T_m - 5^\circ\text{C}$  的条件下进行杂交，然后在 60°C 下用 0.2x SSC/0.1% SDS 洗涤。适度的严格杂交条件包括在 42°C 下于 3x SSC 中洗涤的步骤。然而，应当理解的是，相当的严格度可通过使用替代缓冲液、盐和温度来达成。另外，还可在如下著作中找到关于杂交条件的其他指导：Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002，以及 Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001。

在此使用的术语“结合蛋白”指特异性地结合到其他物质上的蛋白。在一实施方式中，结合蛋白为抗体或抗体片段。

在此使用的术语“本发明的结合蛋白”包括本发明的抗体或抗体片段。

“适合体内施用的生物相容性形式”是指一种被施用的物质的形式，其疗效超过任何毒效。

在此使用的术语“癌症”包括可被本发明的结合蛋白，优选为本发明的抗体或抗体片段结合的任何癌症。

在此使用的术语“与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体”是指表达于癌细胞表面的葡萄糖转运体 8 的新的变异体。在本发明的一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体具有与 GLUT8 相同的作为糖的转运体的功能，但位于细胞中的不同位置。例如，与癌症相关的 GLUT8 的变异体具有与 GLUT8 相同的作为糖的转运体的功能，但定位于细胞的表面。在另一实施方式中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体是含有由 SEQ ID NO: 11 定义的氨基酸序列的蛋白质。在又一实施方式中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体是含有由 SEQ ID NO: 12 定义的氨基

酸序列的蛋白质。在再一实施方式中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体是含有由 SEQ ID NO: 13 定义的氨基酸序列的蛋白质。在本发明的另一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含了在 N-端的二-亮氨酸部分发生改性的 GLUT8。在本发明的又一实施方式中，N-端的二-亮氨酸部分被改性为二-丙氨酸。

在此使用的“保守氨基酸取代”是指在该氨基酸中，一氨基酸残基被另一氨基酸残基所取代，而不丧失该蛋白质所期望的功能。

在该方法中可使用对照。在此使用的术语“对照”是指受测试者或一组受测试者中的样品，已知他们或者患有癌症，或者不患有癌症。

所用的术语“可控制的释放系统”指本发明的免疫偶联物和/或其他癌症治疗剂可以可控制的方式施用。例如，用微型泵可直接将可控制的剂量送至肿瘤区域，从而能够精确地调节药物组合物递送的时机和浓度(例如参见 Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, pp. 115-138)。

术语“肽的衍生物”是指具有一个或多个通过功能性侧基反应而发生化学衍生的残基的肽。这样的衍生的分子包括那些自由氨基被衍生形成胺盐酸盐、对甲苯磺酸基、苄氧羰基、叔丁基氧基羰基、氯乙酰基或甲酰基形式的分子。自由的羧基可衍生形成盐、甲酯、乙酯或其它形式的酯或酰肼。自由的羟基可衍生形成 O-酰基或 O-烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可衍生形成 N-im-苄基组氨酸。其它的衍生物包括那些含有 20 个标准氨基酸中一个或多个天然氨基酸衍生物的肽。例如，4-羟基脯氨酸可代替脯氨酸；5-羟基赖氨酸可代替赖氨酸；3-甲基组氨酸可代替组氨酸；高丝氨酸可代替丝氨酸；以及鸟氨酸可代替赖氨酸。

术语“检测或监控癌症”是指确定受测试者是否患有癌症以及癌症程度的方法或过程。并且，本发明的结合蛋白可被用于检测或监控疾病的出现和发展。

在此使用的术语“直接施用”是指免疫偶联物和/或其他癌症治疗剂可

在肿瘤内、血管内和肿瘤周围施用，而无限制。例如，免疫偶联物可通过一次或多次直接注射到肿瘤中、通过连续或间断地灌注入肿瘤中、通过引入免疫偶联物蓄库、通过在肿瘤中引入一缓慢释放装置、通过在肿瘤中引入一缓慢释放的配方，和/或通过直接应用在肿瘤上来进行施用。“在肿瘤中”施用的方式包括将免疫偶联物和/或其他癌症治疗剂引入肿瘤区域，或引入基本上直接流入肿瘤区域的血管或淋巴管中。

在此用的术语“有效量”是指在一定剂量下和一段时间内有效达到预期结果的量。免疫偶联物的有效量可根据一些因素如动物的疾病状态、年龄、性别、体重而变化。可对治疗剂量进行调整，以提供最佳治疗反应。例如，可将剂量分为若干次每日施用，或可以根据治疗情况的紧迫度而适当地降低剂量。

“葡萄糖转运体 8”(GLUT8)是由在人染色体 9 上发现的基因 *slc2a8* 编码的蛋白质。其是 GLUT 蛋白质家族中 III 级中的一员，已知具有转运糖的能力。GLUT8 的长度为 477 个氨基酸，是约 50 kDa 的 II 型跨膜蛋白质。其具有 12 个跨膜区域。在 TM1 和 TM2 之间具有一个短的假定的细胞外环，以及在 TM9 和 TM10 之间具有一个长的细胞外环。该术语包括了 GLUT8 的变异体。(GLUT/SLC2A 家族命名法: Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282:E974-76, 2002.)

在此用的术语“重链互补决定区”指在抗体分子的重链可变区域内的超变区。重链可变区有 3 个互补决定区，从氨基端到羧基端，分别是重链互补决定区 1、重链互补决定区 2 和重链互补决定区 3。

在此用的术语“重链可变区”指重链的可变区。

在此用的术语“本发明的免疫偶联物”包含(1) 结合蛋白，优选为本发明的抗体或抗体片段，其附于(2) 效应物分子上。效应物分子可以是某人希望递送到癌症细胞的任何分子，其包括但不限于 (i) 一种标记物，其可直接或间接地生成可检测的信号，或者是(ii) 一种癌症治疗试剂，例如是毒害细胞的、抑制细胞生长的，或是阻止或降低癌症细胞分裂和/或转

移的能力的毒素。

在此使用的术语“分离的核酸序列”是指在用重组 DNA 技术产生时基本上没有细胞物质或培养介质的核酸，或在用化学合成时基本上没有化学前体或其他化学物质的核酸。另外，分离的核酸基本上也没有那些天然侧接于核酸（即位于核酸 5' 和 3'端的序列）的序列，而由此衍生出该核酸。术语“核酸”意在包括 DNA 和 RNA，可以是双链的或单链的。

在此使用的术语“分离的蛋白质”是指在用重组 DNA 技术产生时基本上没有细胞物质或培养介质的蛋白质，或在用化学合成时基本上没有化学前体或其他化学物质的蛋白质。其包括本发明的轻链互补区 1, 2 和 3、本发明的重链互补区 1, 2 和 3、本发明的轻链可变区、本发明的重链可变区和本发明的结合蛋白和结合到本发明的结合蛋白上的抗体。

在此用的术语“轻链互补决定区”指在抗体分子的轻链可变区域内的超变区。轻链可变区有 3 个互补决定区，从氨基端到羧基端，分别是轻链互补决定区 1、轻链互补决定区 2 和轻链互补决定区 3。

在此用的术语“轻链可变区”指轻链的可变区。

GLUT8 中的术语“在 N-端的二-亮氨酸部分的改性”是指在 N-端的二-亮氨酸部分发生的改变，其影响了 GLUT8 的定位，使得 GLUT8 在细胞表面，优选为癌细胞表面表达。在本发明的一实施方式中，N-端基二-亮氨酸部分变为了二-丙氨酸。

在此用的术语“改性的 bouganin”指具有在 PCT/CA2005/000410 和美国专利申请号 11.084,080 中描述的具有减少的倾向性以激活免疫反应的改性的 bouganin。在一个例子中，改性的 bouganin 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 29):

YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDK  
RFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPT  
VATSKLFPGV TNRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKL EFSIE  
AIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETE VVDRGLYGSFKPNF

KVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVNKVSQIS  
PDMGILKFKSSK.

在此用的术语“核酸序列”是指含天然碱基、糖和糖间（骨架）键连的核苷或核苷酸单体的序列。该术语也包括含有非天然的单体或其部分的改性的或取代过的序列。本发明的核酸序列可以是脱氧核糖核酸(DNA)的序列或核糖核酸(RNA)的序列，并可包括天然的碱基，其包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。序列也可含改性的碱基。这些改性的碱基的例子包括氮和脱氮腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶；以及黄嘌呤和次黄嘌呤。

在此用的术语“样品”是指任何由受测试者中获得的任何液体、细胞或组织样品，其可用于进行癌症测定。

在此用的术语“序列同一性”指两个多肽序列中的序列相同的百分比。为确定两个多肽序列中的序列相同的百分比，需将该两个序列的氨基酸序列进行排序，优选用 Clustal W 运算法则(Thompson, JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22 (22): 4673-4680)，及 BLOSUM 62 记分矩阵(Henikoff S. and Henikoff J.G., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919)，以及空位开放罚分为 10，空位延伸罚分 (gap extension penalty) 为 0.1，这样就获得了两序列中最高等级的匹配，而在该两序列中之一的至少 50% 的总长度包括在序列对比之中。另一可用于序列对比的方法是 Needleman 和 Wunsch 序列对比法 (*J. Mol. Biol.*, 1970, 48: 443)，其由 Smith 和 Waterman 加以修改 (*Adv. Appl. Math.*, 1981, 2: 482)，从而就获得了两序列中最高等级的匹配，并确定了两序列中相同的氨基酸的数目。其他计算两氨基酸序列之间的同一性百分比的方法通常有如在 Carillo 和 Lipton (*SIAM J. Applied Math.*, 1988, 48:1073)中描述的方法，以及在 *Computational Molecular Biology*, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, *Biocomputing: Informatics and Genomics Projects* 中描述的方法。通常，计算机程序会被用于这些计算。可用于此的计算机

程序包括但不限于 GCG (Devereux et al., Nucleic Acids Res., 1984, 12: 387) BLASTP, BLASTN 和 FASTA (Altschul et al., J. Molec. Biol., 1990: 215: 403)。

术语“N-端的二-亮氨酸部分”是指在 GLUT8 中的 N-端的二-亮氨酸部分，其涉及蛋白质定位到细胞的细胞内区域。在本发明的一实施方式中，二-亮氨酸部分位于 GLUT8 的 12-13 处。

在此用的术语“受测试者”是指动物界中的任何成员，优选为哺乳动物，更优选为人。在一优选的实施方式中，受测试者疑似或确实患有癌症。

在此用的术语“治疗癌症”指抑制癌细胞的复制，抑制癌细胞的扩散（转移），抑制肿瘤的生长，减少癌细胞的数量或肿瘤生长，降低癌症的恶性程度（例如，增加的癌细胞分化），或改善与癌症相关的症状。

在此用的术语“变异体”包括本发明的氨基酸和核苷酸序列的改性或化学等同物，其与本发明的氨基酸和核酸序列以基本上相同的方式实现基本上相同的功能。例如，本发明的蛋白的变异体包括但不限于：保守氨基酸取代。本发明的蛋白的变异体还包括本发明的蛋白的添加和缺失。此外，变异的肽和变异的核苷酸序列包括它们的类似物和衍生物。

## **(B) 本发明的蛋白和核酸**

### ***(i) 轻链和重链互补决定区以及轻链和重链可变区***

本发明提供分离的轻链互补决定区 1，其包含氨基酸序列 RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1)。本发明还提供分离的轻链互补决定区 2，其包含氨基酸序列 AASSLHS (SEQ ID NO:2)。此外，本发明还提供分离的轻链互补决定区 3，其包含氨基酸序列 LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3)。

本发明提供分离的重链互补决定区 1，其包含氨基酸序列 NYAMS (SEQ ID NO:4)。本发明还提供分离的重链互补决定区 2，其包含氨基酸序列 AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5)。此外，本发明还提供分离

的重链互补决定区 3，其包含氨基酸序列 VPYRSTWYPLY (SEQ ID NO:6)。

本发明提供分离的轻链互补决定区 1, 2 和 3，其分别包含氨基酸序列 RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1)，AASSLHS (SEQ ID NO:2) 和 LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3)；以及分离的重链互补决定区 1, 2 和 3，其分别包含氨基酸序列 NYAMS (SEQ ID NO:4)，AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5)和 VPYRSTWYPLY (SEQ ID NO:6)。

本发明还包括 CDR 序列的变异体，其能结合到由上述 CDR 序列识别的相同的抗原决定位或抗原上。

本发明的其他方面还涉及分离的轻链可变区，其包含本发明的轻链互补决定区 1, 2 和/或 3 (SEQ ID NOS:1-3)；以及重链可变区，其包含本发明的重链互补决定区 1, 2 和/或 3 (SEQ ID NOS:4-6)。在一实施方式中，轻链可变区包含示于图 1 中的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)，而重链可变区包含示于图 2 中的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9)。

本发明还包括分离的轻链可变区和重链可变区的变异体，它们可结合到由上述分离的轻链可变区和分离的重链可变区序列识别的相同的抗原决定位或抗原上。

本领域的技术人员应当理解，本发明包括氨基酸序列 SEQ ID NOS:1-6, 7 和 9 的变异体，包括本发明公开的序列的化学等同物。这样的等同物包括与在此揭露的特异性蛋白以基本相同的方式实现基本相同的功能的蛋白。CDR 序列的功能变异体将能够结合到由天然 CDR 序列识别的抗体或抗原决定位。例如，等同物包括但不限于保守氨基酸取代。

在一个实施方式中，轻链互补决定区 1, 2 和 3 及重链互补决定区 1, 2 和 3 的变异的氨基酸序列分别至少有 50%，优选为至少 60%，更优选为至少 70%，最优选为至少 80%，及进一步更优选为至少 90%的序列与 SEQ ID NOS:1-6 相同。

在另一实施方式中，轻链可变区及重链可变区的变异的氨基酸序列

至少有 50%，优选为至少 60%，更优选为至少 70%，最优选为至少 80%，及进一步更优选为至少 90%的序列分别与 SEQ ID NOS:7 和 9 相同。

本发明还提供编码本发明的轻链可变区的分离的核酸序列，以及编码本发明的重链可变区的分离的核酸序列。在一实施方式中，轻链可变区包含示于图 1 中的核酸序列(SEQ ID NO: 8)。在另一实施方式中，重链可变区包含示于图 2 中的核酸序列(SEQ ID NO:10)。本发明还包括编码本发明的轻链可变区和重链可变区的核酸序列的变异体。例如，变异体包括至少在适度的严格杂交条件下，杂交到编码本发明的轻链可变区和重链可变区的核酸序列上的核苷酸序列。

本发明还提供编码轻链互补决定区 1, 2 和/或 3 的分离的核酸序列，其分别包含氨基酸序列 RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1), AASSLHS (SEQ ID NO:2) 和 LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3); 以及编码重链互补决定区 1, 2 和/或 3 的分离的核酸序列，其分别包括氨基酸序列 NYAMS (SEQ ID NO:4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5) 和 VPYRSTWYPLY (SEQ ID NO:6)。本发明还提供编码示于图 1 中的轻链可变区(SEQ ID NO:7)的分离的核酸序列，以及编码示于图 2 中的重链可变区(SEQ ID NO:9)的分离的核酸序列。

本发明还包括编码以上讨论的 CDR 序列的变异体和变异区域的分离的核酸序列。

变异的核酸序列包括至少在适度的严格杂交条件下，杂交到编码示于 SEQ ID NOS:1-6, 7 和 9 中的氨基酸序列以及其变异体上的核酸序列。

### **(ii) 结合蛋白**

本发明的另一方面是结合蛋白，优选为抗体或抗体片段，其包含至少一个本发明的轻链互补决定区（即一个或多个 SEQ ID NOS:1-3）和/或至少一个本发明的重链互补决定区（即一个或多个 SEQ ID NOS:4-6）。这样的结合蛋白可通常被称作“本发明的结合蛋白”，或优选地被称之为“本发明的抗体或抗体片段”。

在一实施方式中，该结合蛋白，优选地为抗体或抗体片段，包含轻链互补决定区 1, 2 和 3，其分别包含氨基酸序列 RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1), AASSLHS (SEQ ID NO:2)和 LQYSTYPIT (SQ ID NO:3)；以及分离的重链互补决定区 1, 2 和 3，其分别包含氨基酸序列 NYAMS (SEQ ID NO:4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5)和 VPYRSTWYPLY (SEQ ID NO:6)。本发明还提供结合蛋白，优选地为抗体或抗体片段，其包含本发明的示于图 1 中的轻链可变区(SEQ ID NO:7)和/或示于图 2 中的重链可变区(SEQ ID NO:9)。

本领域的技术人员应当理解，本发明包括上述公开的特异性结合蛋白的变异体，其包括上述公开的序列的化学等同物。这样的等同物与上述公开的结合蛋白以基本上相同的方式实现基本上相同的功能。如上述公开的结合蛋白，结合蛋白的功能性变异体将能结合到相同的抗原上。在一实施方式中，结合蛋白结合到葡萄糖转运体 8 或其变异体、一个包含氨基酸序列 SEQ ID NOS:11-20，优选为 SEQ ID NOS:11-13 中任何一个的蛋白质、或在癌细胞表面表达的与癌症相关的 GLUT8 的变异体上。

本发明者们发现了在癌细胞表面表达的 GLUT8 的新的变异体。因此，本发明包括了对与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体产生特异性的结合蛋白。在一实施方式中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体包含由 SEQ ID NOS: 11-13 定义的氨基酸序列中的任何一个，或其变异体。在本发明的另一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含在 N-端的二-亮氨酸部分发生改性的 GLUT8。在又一实施方式中，N-端的二-亮氨酸部分已被改性为二-丙氨酸。

在一些实施方式中，抗体或抗体片段包含所有或部分重链恒定区，例如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM 或 IgD 恒定区。优选地，重链恒定区是 IgG1 重链恒定区。再有，抗体或抗体片段可包含所有或部分  $\kappa$  (kappa) 轻链恒定区或  $\lambda$  (lambda) 轻链恒定区。优选的是，轻链恒定区是  $\lambda$  轻链恒定区。

为产生人的单克隆抗体，产生抗体的细胞（淋巴细胞）可从癌症患者中获得，且通过标准的体细胞融合程序与骨髓瘤细胞融合，从而无限增殖化这些细胞以产生杂交瘤细胞（hybridoma cells）。这些技术已为本领域所熟知（例如，首先由 Kohler 和 Milstein 提出的杂交瘤技术 (*Nature* 256:495-497 (1975))，以及其他的技術，例如人 B-细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., *Immunol.Today* 4:72 (1983))，EBV-杂交瘤技术以产生人单克隆抗体 (Cole et al., *Methods Enzymol*, 121:140-67 (1986))，和筛选组合抗体文库 (Huse et al., *Science* 246:1275 (1989))。杂交瘤细胞可经免疫化学筛选以产生与癌细胞的特异性反应的抗体，而且该单克隆抗体可以被分离。

对特殊的抗原或分子，如癌细胞上的抗原或分子有反应性的特异性抗体，或抗体片段也可通过筛选编码免疫球蛋白基因或其部分的表达文库，并表达于具有细胞表面成分的细菌来产生。例如，完整的 Fab 片段，VH 区域和 FV 区域可使用抗菌素表达文库来表达在细菌中(例如，参见 Ward 等, *Nature* 341:544-546 (1989); Huse 等, *Science* 246:1275-1281 (1989); 和 McCafferty 等, *Nature* 348:552-554 (1990))。

本发明包括所有的与本发明的抗体或抗体片段结合到相同抗原的抗体和抗体片段。本领域的技术人员应当理解结合测试可用于发现具有与本发明的抗体或抗体片段相同的结合特异性的其他抗体和抗体片段。如以下所示例的，竞争结合测定可用于发现这样的其他抗体。

在使用流式细胞仪进行竞争测定前，先确定本发明的抗体的最低浓度 (Ab1)，在该浓度下，抗体对固定数量的癌细胞（例如，用于 VB1-050 的 A-375 细胞）产生最大的结合。从呈指数增长的培养物中收集总计为  $10^6$  个细胞，并与各种浓度的抗体于 4°C 下温培 1 小时。细胞经洗涤并与适当的探测抗体于 4°C 下再温培 1 小时。洗涤后，细胞用流式细胞仪进行分析。对每一测试抗体，以中荧光强度对抗体浓度作图，由数据得到饱和曲线。

对于竞争测定，癌细胞按上述进行制备，并用固定浓度的抗体 (Ab1)

以双份进行处理。该固定浓度是抗体对按上述确定的固定数量的癌细胞产生最大的结合的最低浓度。在加入 Ab1 后立即向每个试管中加入不同浓度的潜在抑制抗体(Ab2)，并将混合物在 4°C 下温培 1 小时。抑制百分比以及随最大的中荧光强度的变化均通过从各测试样品(Ab1 + Ab2)的中荧光强度读数中扣除背景荧光强度(PBS-5% FCS)而计算得到。然后，得到的结果除以 Ab1 的中荧光强度（最大结合）与背景强度（如下）的差。再乘以 100 后得到抑制百分比的结果。用重复点的平均值及它们相对的标准误差对抗体浓度作图。以下公式用于计算抑制百分比：

$$PI = [(MF_{(Ab1+Ab2)} - MF_{背景}) / (MF_{Ab1} - MF_{背景})] \times 100$$

其中，PI = 抑制百分比； $MF_{(Ab1+Ab2)}$  = 由 Ab1+Ab2 混合物测得的中荧光强度； $MF_{背景}$  = 以 PBS-5% FCS 得到的背景中荧光强度。

从而，本发明提供能结合到癌细胞上抗原的结合蛋白，其中，该结合蛋白可通过如下方法鉴定，该方法包括：

(1) 用最小浓度的本发明的结合蛋白与固定数量的癌细胞一起温培，优选是以产生对固定数量的癌细胞的最大结合的抗体或抗体片段 (Ab1)，并测量(Ab1) 的中荧光强度( $MF_{Ab1}$ )；

(2) 通过向 Ab1 和癌细胞中加入 Ab2，对测试的结合蛋白 (Ab2)的两个或更多浓度进行测试，并测量中荧光强度( $MF_{(Ab1+Ab2)}$ )；

(3) 测量背景荧光强度 ( $MF_{背景}$ )；

(4) 计算 PI，其中，

$$PI = [(MF_{(Ab1+Ab2)} - MF_{背景}) / (MF_{Ab1} - MF_{背景})] \times 100； 以及$$

(5) 将 PI 与对照物的 PI 值进行比较；

其中，与对照物的 PI 有在统计上显著不同的 PI 表明该测试的结合蛋白能够结合到癌细胞的抗原上。

本领域的技术人员应当知道，通过增加其对抗原、葡萄糖转运体 8

或其变异体的亲和力，亲和力成熟技术（affinity maturation techniques）可用于改性本发明的结合蛋白或免疫偶联物。

通常使用两种策略来增加抗体的结合亲和力。一种方法应用到 Ab-Ag 复合物的晶体结构的分辨率来鉴定抗原结合中涉及的关键残基 (Davies D.R., Cohen G.H. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. Proc Natl. Acad. Sci. U.S A. 93, 7-12)。接着，这些残基可发生突变而增加交互作用。另一方法是模仿体内的抗原刺激，其驱动由 B 细胞产生的免疫球蛋白的亲和力成熟。在免疫反应的成熟过程中，免疫球蛋白的可变区发生体细胞突变 (Mc Heyzer-Williams M. 2003. B-cell signaling mechanism and activation. Fundamental Immunology, Fifth edition, 195-225)。该对免疫系统有高度特异性的过程，其特征在于在非常高的速率下引入点突变。它仅仅发生在编码可变区的 DNA 片段中，且不包括保守区域。然后，表达发生了体细胞突变的变异的抗体的 B 细胞被进行抗原介导的选择，从而选择有更高亲和力的免疫球蛋白。为在体外重复该现象，采用了多种方法以通过任意的或靶向的过程来引入突变。任意的突变可使用倾向差错 PCR、链改组或突变大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株来引入 (Clackson T. Hoogenboom N.R., Griffiths A.D. and Winter G. 1991 Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 352, 624-628, Hawkins R.E., Russell S.J. and Winter G. 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. J. Mol. Biol. 226, 889-896, Low N., Holliger P. and Winter G. 1996. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. J Mol. Biol. 260, 359-368)。由该策略产生了巨大的文库，并通过如核糖体、噬菌体或酵母等的展示技术来选择反应性的克隆。(Min L. (2000). Applications of display technology in protein analysis. Nat. Biotechnol. 18, 1251-1256)。

CDRs 的靶向突变，特别是轻链和重链的 CDR3，已展示出其为增加

抗体亲和力的有效技术。CDR3 的 3-4 个氨基酸段或被称为“热点”的特异性区域被靶向以形成突变。据 Yang 等报道, 通过 4 个 CDR 残基的突变, 抗-HIV gp120 Fab 片段增加了 420 倍的亲和力 (Yang W.P., Green K., Pinz-Sweeney S., Briones A.T., Burton D.R. and Barbas C.F. III. 1995. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into picomolar range. *J.Mol.Biol.*, 254, 392-403)。在 C6.5 scFv 中的 VL CDR3 的一个突变与 VH CDR3 的三个突变组合得出 1230 倍的亲和力的增加。(Schier R., McCall A., Adams G.P., Marshall K.W., Merrit H., Yin M., Crawford R.S. Weiner L.M., Marks C. and Marks J.D. 1996. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementary determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.*, 263, 551-567)。

“热点”是体内发生体细胞超突变的序列。(Neuberger M.S and Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 248-254)。热点序列可被定义为在某些密码子中的共有核苷酸序列。共有序列是四核苷酸, RGYW, 其中, R 可以是 A 或 G, Y 可以是 C 或 T, W 可以是 A 或 T (Neuberger M.S and Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 248-254)。此外, 由核苷酸 AGY 编码的丝氨酸残基主要存在于可变区域的 CDR 区, 优于位于那些由 TCN 编码的对应于潜在热点序列之上的丝氨酸。(Wagner S.D., Milstein C. and Neuberger M.S. 1995. Codon bias targets mutation. *Nature*, 376, 732)。结构分析表明, CDR 环, 特别是 CDR3 环, 对抗原结合贡献最大 (Giudicelli V., Chaume D. and Lefranc M.P. 2004. IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res.* 32, 435-440)。因此, 本发明每一抗体的重链和轻链的 CDRs 的核苷酸序列均被扫描以检查热点序列和 AGY 密码子的存在。使用国际免疫原 Tics 数据库 (International ImMunoGen Tics database), 将轻

链和重链的 CDR 区中经鉴定的热点与重链和轻链的生殖序列进行比较 (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) (Davies D.R., Padlan E.A. and Sheriff S. 1990. Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 439-473)。若一序列与生殖系相同, 则说明体细胞突变未发生; 因此, 任意突变被引入来模仿发生在体内的体细胞事件。与此相反的是, 不同的序列则说明一些体细胞突变已经发生。然而该体内的体细胞突变是否为最佳, 还有待于确定。编码 CDR 中埋藏的或保守的氨基酸的热点未被诱变。这些残基通常对整个结构都是至关重要的, 且由于它们被埋藏而不太可能与抗原发生作用。此外, 该序列可以与生殖系序列中预测的主要是发生体细胞突变之处相比较 (Tomlinson I.M., Cox J.P.L., Gherardi E., Lesk A.M. and Chotia C. 1995. The structural repertoire of the human V<sub>l</sub> domain. *EMBO J.* 14, 4628-4638, Tomlinson I.M., Walter G., Jones P.T., Dear P.H., Sonnhammer E.L.L. and Winter G. 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J.Mol.Biol.* 256, 813-817)。类似的策略应用于 BL22 scFv 的亲和力成熟。对重链的 CDR3 引入的点突变导致 5—10 倍在多种 CD22 阳性细胞系的结合活性的增加 (Salvatore G., Beers R., Margulies I., Kreitman R.J. and Pastan I. 2002. Improved cytotoxic activity toward cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display. *Clinical Cancer research*, 8, 995-1002)。此外, 在 CDR1 和 CDR2 环中的多种氨基酸的突变也产生了具有在 3—7 倍的范围内增加的亲和力的突变体 (Ho M., Kreitman J., Onda M. and Pastan I. 2005. In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. *J.Biol. Chem.*, 280, 607-617)。

在通过任意的或靶向的过程引入突变后, 抗体得以表达并被评价其功能。例如, 可基于结合进行功能性筛选。一旦功能得以评价, 即可用已知的方法进行所选抗体的 DNA 排序。

在另一个实施方式中，锚固周质的表达（anchored periplasmic expression）（APEX）方法被用于本发明的结合蛋白或免疫偶联物的亲和力成熟，该方法被描述于 Harvey, B 等中（PNAS 2004 June 22; 101(25): 9193-8）。

从而，本发明包括本发明的结合蛋白，该结合蛋白经亲和力成熟化而增加结合蛋白对葡萄糖转运体 8 或其变异体的亲和力、一种包含 SEQ ID NOS:11-20，优选 SEQ ID NOS:11-13 的氨基酸序列的蛋白质，或一种与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体。

本发明还提供了包含本发明的结合蛋白的组合物，优选的是抗体和抗体片段，并附有药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂或稳定剂。

### ***(iii) 新的与癌症相关的抗原***

如上所述，本发明者们已鉴定了与本发明的结合蛋白结合的抗原。该新的与癌症相关的抗原表达在癌细胞的表面，在正常细胞表面无显著表达。因此，本发明包括能够特异性地与本发明的结合蛋白之一结合的分离的蛋白质，及其氨基酸序列和其应用。

在一实施方式中，本发明提供一种包含葡萄糖转运体 8 或其变异体的分离的蛋白质。在另一实施方式中，本发明提供一种包含氨基酸序列 SEQ ID NOS: 11-20 中任何一个或其变异体的分离的蛋白质。在又一实施方式中，本发明提供一种包含氨基酸序列 SEQ ID NOS: 11 或其变异体的分离的蛋白质。本发明还提供一种包含氨基酸序列 SEQ ID NOS: 12 或其变异体的分离的蛋白质。进而，本发明还提供一种包含氨基酸序列 SEQ ID NOS: 13 或其变异体的分离的蛋白质。此外，本发明提供一种表达在癌细胞的表面的与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体。在本发明的一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含由 SEQ ID NOS: 11, 12 或 13 中的任何一个或其变异体定义的氨基酸序列。在本发明的另一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含在 N-端的二-亮氨酸部分发生改性的 GLUT8。在本发明的进一步的实施方式中，N-端的二-亮氨酸部分

被改性为二-丙胺酸。

本领域的技术人员应当理解，本发明包括氨基酸序列 SEQ ID NOS:11-13 的变异体，包括本发明公开的序列的化学等同物的变异体。这样的等同物包括一种与在此公开的特异性蛋白以基本上相同的方式实现基本上相同的功能的蛋白。例如，等同物包括但不限于保守氨基酸取代。

在一个实施方式中，本发明的分离的蛋白质的变异的氨基酸序列至少有 50%，优选为至少 60%，更优选为至少 70%，最优选为至少 80%，进一步更优选为至少 90%的序列分别与 SEQ ID NOS: 11-13 相同。

本发明包括分离的蛋白质的使用。例如，使用本发明的分离的蛋白质来生成结合蛋白和免疫偶联物，其可用于治疗或预防癌症，或可用于探测或监控受测试者中的癌症。因此，本发明包括本发明的分离的蛋白质在生产治疗或预防癌症的药物中的应用。

### **(C) 免疫偶联物**

本发明也包括一种免疫偶联物，其包括：(1) 本发明的的结合蛋白，优选为抗体或抗体片段，其附于(2) 效应物分子上。在一实施方式中，本发明的结合蛋白结合到癌细胞上的抗原或分子上。

抗原可以是葡萄糖转运体 8 或其变异体；一种包含氨基酸序列 SEQ ID NOS:11-20，优选为 SEQ ID NOS:11, 12 或 13 中任何一个的蛋白质；或与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体。在本发明的一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含由 SEQ ID NOS: 11, 12 或 13 中的任何一个或其变异体定义的氨基酸序列。在本发明的另一实施方式中，GLUT8 的与癌症相关的变异体包含在 N-端的二-亮氨酸部分产生改性的 GLUT8。在本发明的又一实施方式中，N-端的二-亮氨酸部分被改性为二-丙胺酸。

在一个优选的实施方式中，效应物分子是(i)一种标记物，其可直接或间接地生成可检测的信号，或者是(ii) 一种癌症治疗试剂，其或者是毒

害细胞的、抑制细胞生长的，或者是阻止或降低癌症细胞分裂的和/或转移的能力。该免疫偶联物在此通常被称为“本发明的免疫偶联物”。

在本发明的一个实施方式中，效应物分子是一种癌症治疗试剂，该癌症治疗试剂优选为一种毒素，其或者是毒害细胞的、抑制细胞生长的，或者是阻止或降低癌症细胞分裂的和/或转移的能力。因此，本发明的一方面是一种免疫偶联物，包含(1)本发明的结合蛋白，优选为抗体或抗体片段，其附于(2)一种癌症治疗试剂，例如细胞毒素上。

在另一实施方式中，免疫偶联物被内化，且癌症治疗试剂是一种细胞毒素，其阻碍了细胞的蛋白质合成，从而导致细胞的死亡。重要的是，由于大多数正常细胞不会广泛表达位于癌细胞上的抗原，它们不能结合并内化免疫偶联物，从而保护其不会被毒素或其它癌症治疗试剂的杀伤效应。

可在本发明的免疫偶联物中使用多种效应物分子，而若干这样的效应物分子是细胞内活化的分子。因此，在本发明的一个实施方式中，免疫偶联物被癌症细胞内化。

在优选的实施方式中，效应物分子是一种癌症治疗试剂，更优选的是包含具有核糖体失活活性的多肽的细胞毒素，其包括但不限于：多花白树毒素 (gelonin)、bouganin、皂草毒素 (saporin)、蓖麻毒素 (ricin)、蓖麻毒素 A 链、异株泻根毒素(bryodin)、白喉毒素 (diphtheria toxin)、局限曲菌素(restrictocin)、假单细胞菌外毒素 A (Pseudomonas exotoxin A) 和它们的变异体。当蛋白是核糖体失活蛋白时，免疫偶联物必须在结合到癌细胞时被内化，从而使该蛋白对细胞产生细胞毒害性。因此，在本发明的一实施方式中，效应物分子是一种毒素，且免疫偶联物被癌症细胞内化。

在本发明的一个实施方式中，毒素是 bouganin 或假单细胞菌外毒素 A，以及它们的变异体。在另一个实施方式中，毒素是经改性的 bouganin，或是失去细胞结合区域的假单细胞菌外毒素 A 的截去形式。

在又一的实施方式中，毒素是基本上失去 T 细胞的抗原决定位的 bouganin，或是由氨基酸 252-608 组成的假单细胞菌外毒素 A 的截去形式。

在其他的非限制性实施方式中，癌症治疗试剂包含一种破坏 DNA 的试剂。因此，癌症治疗试剂可以选自但不局限于烯二炔类（例如刺孢霉素和埃斯波霉素(esperamicin)）以及非烯二炔类的小分子试剂（例如博来霉素（bleomycin）、甲锭丙基乙二胺四乙酸铁(methidiumpropyl-EDTA-Fe(II))）。可用于本发明中的其他癌症治疗试剂包括但不限于：道诺霉素（daunorubicin）、阿霉素（doxorubicin）、远端霉素 A（distamycin A）、顺铂（cisplatin）、丝裂霉素 C（mitomycin C）、海鞘素（ecteinascidins）、倍癌霉素(duocarmycin)/CC-1065 以及博来霉素/培洛霉素（pepleomycin）。

在其他非限制性实施方式中，癌症治疗试剂包含一种破坏微管蛋白的试剂。这样的试剂可包括但不限于：力索新（rhizoxin）/美登素（maytansine）、紫杉醇（paclitaxel）、长春新碱（vincristine）和长春碱（vinblastine）、秋水仙碱（colchicine）、auristatin 海兔毒素(dolastatin) 10 MMAE 和 peloruside A。

在其他的非限制性实施例中，本发明的免疫偶联物的癌症治疗试剂的部分可包含烷基化试剂，其包括但不限于：Asaley NSC 167780、AZQ NSC 182986、BCNU NSC 409962、白消安（Busulfan）NSC 750、羧基邻苯二甲酸铂（carboxyphthalatoplatinum）NSC 271674、CBDCA NSC 241240、CCNU NSC 79037、CHIP NSC 256927、苯丁酸氮芥(chlorambucil) NSC 3088、氯脲霉素（chlorozotocin）NSC 178248、顺式-铂（cis-platinum）NSC 119875、克罗米松（clomesone）NSC 338947、氰基吗啉代阿霉素（cyanomorpholinodoxorubicin）NSC 357704、cyclodisone NSC 348948、二去水卫矛醇(dianhydrogalactitol)NSC 132313、fluorodopan NSC 73754、hepsulfam NSC 329680、羟胺硫蒽酮（hycanthone）NSC 142982、

美法仑(melphalan) NSC 8806、甲基 CCNU NSC 95441、丝裂霉素 C NSC 26980、米托唑酰胺(mitozolamide) NSC 353451、氮芥(nitrogen mustard) NSC 762、PCNU NSC 95466、哌嗪 NSC 344007、二酮哌嗪(piperazinedione) NSC 135758、哌泊溴烷(pipobroman) NSC 25154、甲基丝裂霉素(porfiromycin) NSC 56410、螺旋乙内酰脲芥(spirohydantoin mustard) NSC 172112、特洛西酮(teroxirone) NSC 296934、四氧环己铂(tetraplatin) NSC 363812、硫替派(thio-tepa) NSC 6396、三乙烯三聚氰胺(triethylenemelamine) NSC 9706、尿嘧啶氮芥(uracil nitrogen mustard) NSC 34462 和 Yoshi-864 NSC 102627。

在其他非限制性实施方式中，本发明的免疫偶联物的癌症治疗试剂的部分可包含抗有丝分裂试剂，其包括但不限于：别秋水仙碱(allocolchicine) NSC 406042、软海绵素(Halichondrin) B NSC 609395、秋水仙碱(colchicine) NSC 757、秋水仙碱衍生物 NSC 33410、海兔毒素 10 NSC 376128 (NG - auristatin 衍生的)、美登素(maytansine) NSC 153858、力索新(rhizoxin) NSC 332598、紫杉醇(taxol) NSC 125973、紫杉醇衍生物 NSC 608832、硫代秋水仙碱(thiocolchicine) NSC 361792、三苯甲游基半胱氨酸(trityl cysteine) NSC 83265、硫酸长春碱(vinblastine sulfate) NSC 49842 和硫酸长春新碱(vincristine sulfate) NSC 67574。

在其他非限制性实施方式中，本发明的免疫偶联物的癌症治疗试剂的部分可包含拓扑异构酶 I 抑制剂，其包括但不限于：喜树碱(camptothecin) NSC 94600, 喜树碱钠盐 NSC 100880、氨基喜树碱(aminocamptothecin) NSC 603071、喜树碱衍生物 NSC 95382、喜树碱衍生物 NSC 107124、喜树碱衍生物 NSC 643833、喜树碱衍生物 NSC 629971、喜树碱衍生物 NSC 295500、喜树碱衍生物 NSC 249910、喜树碱衍生物 NSC 606985、喜树碱衍生物 NSC 374028、喜树碱衍生物 NSC 176323、喜树碱衍生物 NSC 295501、喜树碱衍生物 NSC 606172、喜树碱衍生物 NSC 606173、喜树碱衍生物 NSC 610458、喜树碱衍生物 NSC

618939、喜树碱衍生物 NSC 610457、喜树碱衍生物 NSC 610459、喜树碱衍生物 NSC 606499、喜树碱衍生物 NSC 610456、喜树碱衍生物 NSC 364830、喜树碱衍生物 NSC 606497 和吗啉代阿霉素 (morpholinodoxorubicin) NSC 354646。

在其他非限制性实施方式中，本发明的免疫偶联物的癌症治疗试剂的部分可包含拓扑异构酶 II 抑制剂，其包括但不限于：阿霉素 (doxorubicin) NSC 123127、氨萘非特 (amonafile) NSC 308847、m-AMSA NSC 249992、蒽吡唑类 (anthrapyrazole) 衍生物 NSC 355644、吡唑啉吡啶 (pyrazoloacridine) NSC 366140、盐酸比生群 (bisantrene HCL) NSC 337766、正定霉素 (daunorubicin) NSC 82151、脱氧阿霉素 (deoxydoxorubicin) NSC 267469、米托蒽醌 (mitoxantrone) NSC 301739、美诺立尔 (menogaril) NSC 269148、N,N-联卞基正定霉素 NSC 268242、oxanthrazole NSC 349174、柔红酮 (rubidazole) NSC 164011、VM-26 NSC 122819 和 VP-16 NSC 141540。

在其他非限制性实施方式中，本发明的免疫偶联物的癌症治疗试剂的部分可包含 RNA 或 DNA 抗代谢物，其包括但不限于：L-阿拉诺新 (alanosine) NSC 153353、5-氮杂胞苷 (azacytidine) NSC 102816、5-氟尿嘧啶 (fluorouracil) NSC 19893、阿西维辛 (acicicil) NSC 163501、氨基喋呤 (aminopterin) 衍生物 NSC 132483、氨基喋呤衍生物 NSC 184692、氨基喋呤衍生物 NSC 134033、an antifol NSC 633713、an antifol NSC 623017、Baker's soluble antifol NSC 139105、二氯烯丙基甲花醌 (dichlorallyl lawsone) NSC 126771、布利喹啉 (brequinar) NSC 368390、呋喃氟尿嘧啶 (florafur) (前体药物 (pro-drug)) NSC 148958、5,6-二氢-5-氮杂胞嘧啶核苷 NSC 264880、甲氨蝶呤 (methotrexate) NSC 740、甲氨蝶呤衍生物 NSC 174121、N-(磷乙酰基)-L-天冬氨酸酯 (PALA) NSC 224131、吡唑呋喃菌素 (pyrazofurin) NSC 143095、三甲曲沙 (trimetrexate) NSC 352122、3-HP NSC 95678、2'-脱氧-5-氟尿嘧啶 NSC 27640、5-HP NSC

107392、 $\alpha$ -TGDR NSC 71851、甘氨阿非迪霉素 (aphidicolin glycinate) NSC 303812、ara-C NSC 63878、5-氮-2'-脱氧胞苷 NSC 127716、 $\beta$ -TGDR NSC 71261、环胞苷 NSC 145668、胍唑 (guanazole) NSC 1895、羟基脲 NSC 32065、次黄嘌呤核苷甘油二醛 (inosine (肌苷) glycodialdehyde) NSC 118994、麦克菌素 (macbecin) II NSC 330500、吡唑咪唑唑 (pyrazoloimidazole) NSC 51143、硫鸟嘌呤 NSC 752 和硫嘌呤 (thiopurine) NSC 755。

在另一非限制性实施方式中，本发明的免疫偶联物的治疗部分可以是核酸。可用的核酸包括但不限于反义 RNA、基因或其它多核苷酸、核酸类似物例如硫鸟嘌呤和硫嘌呤。

本发明进一步提供了免疫偶联物，其包含：(i) 本发明的结合蛋白，优选为抗体或抗体片段，其附于(2) 效应物分子上，该效应物分子为一标记，可直接或间接地生成可检测的信号。这些免疫偶联物可用于研究或诊断，例如用于癌症的体内探测。标记物优选为能够直接或间接地产生可检测的信号。例如，标记物可是不透射线的或是放射线同位素，例如， $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ；荧光的 (荧光团)或化学发光的 (发色团) 化合物，例如荧光素异硫氰酸盐 (fluorescein isothiocyanate)、若丹明 (rhodamine) 或荧光素 (luciferin)；酶，例如碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase)、 $\beta$ -半乳糖苷酶 (beta-galactosidase) 或辣根过氧化酶 (horseradish peroxidase)；成像试剂；或金属离子。

在另一实施方式中，免疫偶联物可被间接地检测到。例如，对免疫偶联物有特异性的第二抗体，且含有可用于检测免疫偶联物的可探测的标记物。

本发明的结合蛋白，优选为抗体或抗体片段，可通过任何能将该结合蛋白与效应物分子关联或连接的方式而“附于”效应物分子之上。例如，结合蛋白可通过化学或重组的方式而附于效应物分子上。用于制备融合物或偶联物的化学方法已为本领域所知，其可用于制备免疫偶联物。用

于偶联结合蛋白和效应物分子的方法必须能够将结合蛋白连接到效应物分子上，而不会影响结合蛋白结合到癌细胞上抗原的能力。

本发明的结合蛋白可间接地连接到效应物分子上。例如，结合蛋白可直接连接到含有若干种类型中的一种效应物分子的脂质体上。效应物分子和/或结合蛋白也可结合到固体表面上。

在一实施方式中，结合蛋白，优选为抗体或抗体片段，以及效应物分子均是蛋白质且可使用习知方法进行偶联。有几百种用于偶联两蛋白的偶联剂。(例如，见“Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking”. 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor)。通常，偶联剂的选择是基于在结合蛋白上或可被插入到结合蛋白的反应性官能团，该结合蛋白优选为抗体或抗体片段、和/或效应物分子。此外，如果有没有反应性基团，则可使用光活化的偶联剂。在某些情况下，需要在结合蛋白，优选为抗体或抗体片段和效应物分子之间加入一间隔区 (spacer)。本领域已知的偶联剂包括同源双官能性试剂 (homobifunctional agents)：戊二醛 (glutaraldehyde)、乙二酸二甲酯 (dimethyladipimidate) 和双重氮对二胺基联苯(Bis(diazobenzidine) )，以及异源官能性试剂 (heterobifunctional agents)：间双马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺 (m Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimide) 和硫代间双马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-m Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimide)。

也可使用重组 DNA 技术来制备结合蛋白—效应物分子蛋白的融合物。在此，编码结合蛋白的 DNA 序列融合到编码效应物分子的 DNA 序列中，产生嵌合 (chimeric) DNA 分子。嵌合 DNA 序列被转染到宿主细胞中以表达融合蛋白。该融合蛋白可从细胞培养基中回复，并用已知技术进行纯化。

将作为标记物的效应物分子附在结合蛋白上的例子包括描述于以下文献中的方法：Hunter 等, Nature 144:945 (1962); David 等, Biochemistry 13:1014 (1974); Pain, et al., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); Nygren, J.

Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982); Wensel and Meares, Radioimmunoimaging And Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y. (1983); 和 Colcher 等., "Use Of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice", Meth. Enzymol., 121:802-16 (1986)。

#### **(D) 本发明的蛋白质的制备**

本领域的技术人员应当能理解, 本发明的蛋白, 例如轻链和重链的互补决定区、轻链和重链的可变区、抗体和抗体片段、免疫偶联物以及与癌症相关的抗原, 可通过许多方法中的任何一种来制备, 但最为优选的是采用重组方法进行制备。

因此, 本发明的核酸分子可通过已知的方式引入到能确保良好地表达本发明的蛋白的合适的表达载体中。可用的表达载体包括但不限于: 黏端质粒、质粒或改性的病毒(例如, 复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒), 只有在载体与所使用的宿主细胞相容时。表达载体为“适合于宿主细胞的转化”, 意为表达载体含有本发明的核酸分子以及基于被用于进行表达的宿主细胞而选择的调整序列, 其有效地连接到核酸分子上。有效地连接意为核酸通过允许核酸进行表达的方式而连接到调整序列上。

因此, 本发明构思出了本发明的重组表达载体, 其含有本发明的核酸分子、或其片段, 以及用于转录和翻译插入的蛋白序列的必要的调节序列。

适合的调节序列可衍生自多种来源, 包括细菌的、真菌的、病毒的、哺乳动物的或昆虫的基因 (例如, 见描述于以下文献中的调节序列: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))。适合的调节序列的选择取决于如

下讨论的所选的宿主细胞，且这可以由本领域的技术人员容易地实现。这些调节序列的例子包括：转录启动区和增强子或 RNA 聚合酶结合序列、核糖体结合序列，包括一翻译起始信号。此外，基于所选的宿主细胞以及使用的载体，还可向表达载体中引入其他序列，例如复制起点、附加的 DNA 限制性位点、增强子以及可施加诱导转录的序列。

本发明的重组表达载体还可含有选择性标记基因，从而便于选择经本发明的重组分子转化或转染的宿主细胞。选择性标记基因的例子是编码蛋白如 G418 和潮霉素 (hygromycin) 这类对某些药物产生抵制性的蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶、萤火虫荧光素酶、或免疫球蛋白或其一部分，例如免疫球蛋白的 Fc 部分，优选为 IgG 的基因。通过选择性标记蛋白例如  $\beta$ -半乳糖苷酶，氯霉素乙酰转移酶或萤火虫荧光素酶浓度的改变来监控选择性标记基因的转录。如果选择性标记基因编码的蛋白产生对抗生素的抵抗性，例如对新霉素的抵抗性，则被转化的细胞可用 G418 进行选择。插入了选择性标记基因的细胞将存活，而其他的细胞则会死亡。这就使得对本发明的重组表达载体的表达的显现和测定，特别是使得确定表达和表现型的突变的效果成为可能。可以理解的是，选择性标记物可从感兴趣的核酸引入到另一个的载体上。

重组的表达载体也可以含有编码融合部分的基因，该融合部分提供重组蛋白的增强的表达；重组蛋白的增强的溶解性；以及通过在亲和力纯化中作为配体而辅助靶的重组蛋白的纯化。例如，蛋白水解的切割位点可被加入到靶的重组蛋白中，以允许在纯化融合蛋白后，重组蛋白从融合部分分离。典型的融合表达载体包括 pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) 和 pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ)，其分别融合谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、麦芽糖 E 结合蛋白或蛋白 A 到重组蛋白上。

重组表达载体可被引入到宿主细胞中而产生转化的宿主细胞。术语“用转化”、“用,,转染”、“转化”和“转染”意在包含用习知的许多可能的方

法之一，将核酸（例如载体）引入到细胞中。在此使用的术语“转化的宿主细胞”也意在包括能够进行糖基化的细胞，其已被本发明的重组表达载体进行了转化。原核细胞可用核酸通过如电穿孔或氯化钙介导的转化而被转化。例如，可用常规技术，如磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-右旋糖苷介导的转化、脂质转染剂、电穿孔或微型注射等将核酸引入到哺乳动物细胞中。合适的转化和转染宿主细胞的方法均可在 Sambrook 等 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)的著作以及其他实验教科书中找到。

合适的宿主细胞包括大量不同的真核宿主细胞和原核细胞。例如，本发明的蛋白可在酵母细胞或哺乳动物细胞中得以表达。其他适用的宿主细胞可在 Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991)中找到。此外，本发明的蛋白还可以在原核细胞，如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (Zhang et al., Science 303(5656): 371-3 (2004))中表达。再有，还可使用基于假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的表达系统，例如荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) (US Patent Application Publication No. US 2005/0186666, Schneider, Jane C et al.)。

适合于实现本发明的酵母和真菌宿主细胞包括但不限于：酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母属 (*Pichia*) 或克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*) 属，以及各种曲霉菌属的菌种。用于在酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达的载体包括 pYepSec1 (Baldari等, Embo J. 6:229-234 (1987)), pMFa (Kurjan and Herskowitz, Cell 30:933-943 (1982)), pJRY88 (Schultz 等, Gene 54:113-123 (1987)), 和 pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)。酵母和真菌转化的协议已为本领域的技术人员所熟知。(见 Hinnen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929 (1978); Itoh 等, J. Bacteriology 153:163 (1983), 和 Cullen et al. (BiolTechnology 5:369 (1987))。

适合于进行本发明的哺乳动物细胞包括：COS (例如 ATCC No. CRL 1650 或 1651)、BHK (例如 ATCC No. CRL 6281)、CHO (ATCC No. CCL 61)、HeLa (例如 ATCC No. CCL 2)、293 (ATCC No. 1573) 和 NS-1 细胞。适合于直接在哺乳动物细胞中表达的表达载体通常包括启动子 (例如, 来自病毒性物质, 如多瘤病毒、腺病毒 2、细胞巨化病毒和猿病毒 40), 以及其他的转录和翻译控制序列。哺乳动物的表达载体的例子包括 pCDM8 (Seed, B., Nature 329:840 (1987)) 和 pMT2PC (Kaufman 等, EMBO J. 6:187-195 (1987))。

由在此所述的教导, 也可以容易地实现启动子、终止区以及向植物、鸟、昆虫细胞中引入适当类型的表达载体的方法。例如, 在一实施方式中, 本发明的蛋白可以从植物细胞得以表达(见 Sinkar 等., J. Biosci (Bangalore) 11:47-58 (1987), 该文综述了发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 载体的使用; 另见 Zambryski 等, Genetic Engineering, Principles and Methods, Hollaender 和 Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York (1984), 该文描述了使用表达载体用于植物细胞, 包括 PAPS2022、PAPS2023 和 PAPS2034)。

适合于进行本发明的昆虫细胞包括源自蚕 (*Bombyx*)、夜蛾 (*Trichoplusia*) 或夜蛾 (*Spodoptera*) 种的细胞和细胞系。可用于温培的昆虫细胞(SF 9 细胞)中蛋白表达的杆状病毒 (Baculovirus) 载体包括 pAc 系列(Smith 等, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165 (1983)) 和 pVL 系列 (Lucklow, V.A., 和 Summers, M.D., Virology 170:31-39 (1989))。适合表达本发明的重组蛋白的一些杆状病毒-昆虫细胞表达系统描述在 PCT/US/02442 中。

可选择的, 本发明的蛋白也可表达在非人的转基因动物中, 如在大鼠、兔、羊和猪中(Hammer 等 Nature 315:680-683 (1985); Palmiter 等 Science 222:809-814 (1983); Brinster 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442 (1985); Palmiter 和 Brinster Cell 41:343-345 (1985) 以及 U.S. Patent No. 4,736,866)。

本发明的蛋白可通过化学合成法使用蛋白化学中习知的方法，例如固体相合成法制备(Merrifield, J. Am. Chem. Assoc. 85:2149-2154 (1964); Frische 等, J. Pept. Sci. 2(4): 212-22 (1996)) 或在均相溶液里合成(Houbenweyl, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, Vol. 15 I and II, Thieme, Stuttgart (1987))。

N-端的或 C-端的融合蛋白包含与其他分子偶联的本发明的蛋白，例如，蛋白可通过重组技术经融合制备。所得的融合蛋白含有融合到在此描述的挑选的蛋白或标记物蛋白的本发明的蛋白。本发明的重组蛋白也可由已知技术偶联到其他蛋白上。例如，可使用 WO 90/10457 中描述的异源双官能性含硫的偶联剂、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫-丙酸)或 N-琥珀酰亚胺-5-硫代乙酸偶联蛋白。可用于制备融合蛋白或偶联物的蛋白的例子包括细胞结合蛋白，例如免疫球蛋白、荷尔蒙、生长因子、外源凝集素、胰岛素、低密脂蛋白、胰高血糖素、内啡肽、铁传递蛋白、铃蟾肽 (bombesin)、脱唾液酸糖原蛋白谷胱甘肽-S-转移酶 (asialoglycoprotein glutathione-S-transferase (GST))、红血球凝聚素 (HA) 和截断的 myc。

因此，本发明提供了重组表达载体，其包含编码本发明的蛋白的核酸序列，例如本发明的轻链和重链互补决定区，轻链和重链可变区，结合蛋白，例如抗体和抗体片段，以及本发明免疫偶联物和本发明的新的分离的蛋白质。再有，本发明提供含有本发明的重组表达载体的宿主细胞。

### **(E) 本发明的结合蛋白和免疫毒素的治疗方法和药物组合物**

本发明者们已示出了本发明的结合蛋白结合到葡萄糖转运体 8 或其变异体；包含氨基酸序列 SEQ ID NOS: 11-20 中任何一个定义的氨基酸序列，优选为 11、12 或 13，或与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体；或

与癌症相关的 GLUT8 的变异体上。在本发明的一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含由 SEQ ID NOS: 11, 12 或 13 中的任何一个或其变异体定义的氨基酸序列。在本发明的另一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含在 N-端的二-亮氨酸部分发生改性的 GLUT8。在本发明的进一步的实施方式中，N-端的二-亮氨酸部分被改性为二-丙氨酸。

发明者们还示出了本发明的结合蛋白显示出对癌细胞的特异性，且它们被细胞所内化。因此本发明的结合蛋白可被用于靶向递送生物活性的或与医药相关的试剂，例如成像试剂、放射性试剂或细胞毒素。

在一实施方式中，本发明提供一种治疗或预防癌症的方法，该方法包含向患有或疑似患癌症的病人施用有效量的本发明的免疫偶联物。在另一实施方式中，本发明提供有效量的本发明的免疫偶联物在制造治疗和预防癌症的药物中的应用。此外，本发明提供有效量的本发明的免疫偶联物的应用，进一步包含另外的癌症的治疗试剂在制造同时的、分开的或连续的治疗或预防癌症的药物中的应用。本发明还提供有效量的本发明的免疫偶联物在治疗或预防癌症中的应用。另外，本发明还提供有效量的本发明的免疫偶联物，进一步包含使用其它的癌症治疗制剂在制备同时、分开或连续治疗或预防癌症的药物中的应用。

在本发明的一实施方式中，癌症包括但不限于：胃癌、结肠癌、前列腺癌、和子宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、头和颈癌、鳞状细胞癌、胃肠癌、乳癌（例如恶性肿瘤、输送管的、小叶的和乳头的）、肺癌、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病（例如急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病和慢性骨髓性白血病）、脑癌、神经母细胞瘤、肉瘤、直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、质浆细胞瘤、淋巴瘤和黑素瘤。在一优选的实施方式中，癌症包括但不限于：乳癌、前列腺癌、结肠癌、前列腺癌、子宫颈癌、肾癌、黑素瘤、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、和头和颈癌。

本发明的免疫偶联物的选择性抑制或破坏癌细胞的能力可通过使用癌细胞系在体外容易地进行测试。本发明的免疫偶联物的选择性抑制效果可通过如展示对癌细胞的细胞增殖的选择性抑制来确定。

毒性也可基于细胞生存能力来测量，例如，癌症和正常细胞培养基在暴露于免疫偶联物时的生存能力可进行比较。细胞生存能力可借助已知的技术，如台盼蓝排除法（trypan blue exclusion assays）进行评价。

在另一例子中，可使用许多模型来测试本发明的免疫偶联物的效力。Thompson, E.W. 等 (Breast Cancer Res. Treatment 31:357-370 (1994)) 描述了一种模型，其通过测量肿瘤细胞介导的细胞外基质的蛋白水解和肿瘤细胞对重构基底膜（胶原质、层粘蛋白、纤维连接蛋白、Matrigel 或明胶）的入侵，来确定人的乳癌细胞在体外的入侵性。其他的适用的癌细胞模型包括培养的卵巢腺癌细胞 (Young, T.N. 等 Gynecol. Oncol. 62:89-99 (1996); Moore, D.H. 等 Gynecol. Oncol. 65:78-82 (1997)), 人滤泡性甲状腺癌细胞 (Demeure, M.J. et al., World J. Surg. 16:770-776 (1992)), 人黑素瘤 (A-2058) 和纤维肉瘤 (HT-1080) 细胞系 (Mackay, A.R. 等 Lab. Invest. 70:781-783 (1994)), 以及肺鳞状 (HS-24) 和腺癌 (SB-3) 细胞系 (Spiess, E. 等 J. Histochem. Cytochem. 42:917-929 (1994))。体内测试系统包括植入肿瘤，且描述了肿瘤在无胸腺的裸鼠中的生长和转移的测量(Thompson, E.W.等, Breast Cancer Res. Treatment 31:357-370 (1994); Shi, Y.E.等, Cancer Res. 53:1409-1415 (1993))。

本发明的免疫偶联物可配入药物组合物中，以适合体内施用的生物相容形式给予受试者。可向包括人和动物在内的有机生物施用药物。施用治疗活性量的本发明的药物组合物被定义为以一定剂量，在一定时间内有效地获得期望的结果的必要的剂量。例如，一种物质的治疗活性量可根据个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及本发明的重组蛋白在个体中产生期望反应的能力等因素而定。可对剂量的选取进行调整，以期获得最佳治疗反应。例如，可每日施用若干次分开的剂量，或者可

以根据治疗情况的紧迫度而成比例地降低剂量。

因此，本发明提供了用于治疗或预防癌症的药物组合物，其包含本发明的免疫偶联物，和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一优选的实施方式中，在药物组合物中的效应物分子是癌症治疗试剂，更优选是毒素。

包含本发明的免疫偶联物的药物制剂可全身地进行施用。药物制剂可直接施用到癌症部位。取决于施用的方式，可用一种材料将免疫偶联物进行涂层，以保护化合物不受到酶、酸和其他使化合物失活的天然环境的作用。

根据本发明的一方面，免疫偶联物通过直接施用而给予患者。本发明构思出了施用至少为足以获得端点的一定量的药物组合物，如果需要，还包含药学上可接受的载体。

本发明也提供了降低手术后并发症危险的方法，包含在手术治疗癌症之前、之中和之后施用有效量的本发明的免疫偶联物。

在此所述的组合物可通过已知的制备药学上可接受的组合物的方法制备，该药学上可接受的组合物在施用时，有效量的活性物质与药学上可接受的载体结合形成混合物。适合的载体例如在以下文献中有描述：*Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, 20<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA, 2000)*。基于此，组合物包括但不限于与一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂相关的物质的溶液，且在具有适当的 pH 值的缓冲液中和具有生理液的等渗透压。

药物组合物包括但不限于：冻干粉或水性的或非水的灭菌的可注射溶液或悬浮液，其可进一步含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使组合物基本上与受药者的组织和血液相容的溶质。其他可存在于该组合物中的成分如包括水、表面活性剂（例如 Tween）、醇、多元醇、甘油和植物油。即时注射溶液和悬浮液可用灭菌粉末、颗粒、药片或浓缩的溶液或悬浮液来配制。免疫偶联物的非限制性的供给形式可以是如冻干粉，其可以

在向病人施用前，用蒸馏水或盐水复原。

本发明的药物组合物可包含药学上可接受的载体。合适的药学上可接受的载体包括基本上是化学惰性的和非毒性的组合物，它们不会影响到药物组合物的生物活性的效力。合适的药学上可接受的载体的例子包括但不限于：水、盐水溶液、甘油溶液、乙醇、N-(1(2,3-二油基氧)丙基)N,N,N-氯化三甲铵 (DOTMA)、二油酰磷脂酰-乙醇胺 (DOPE)和脂质体。这样的组合物应当含有治疗有效量的化合物，以及适当量的载体，以提供直接形式供病人施用。

组合物可以是药学上可接受的盐的形式，其包括但不限于那些用自由氨基形成的盐，而那些自由氨基源自如盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等；以及那些用自由羧基形成的盐，而那些自由羧基源自如钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因 (procaine) 等。

在本发明的各种实施方式中，药物组合物被直接全身地施用或直接递送至肿瘤区域。

药物组合物可被用于治疗患有癌症的动物的方法中，包括哺乳动物，优选为人。施用的免疫偶联物的剂量和类型将取决于许多能够容易地在人类受治者中得以监控的因素。这样的因素包括癌症的病因学和严重程度（级别和阶段）。

本领域的技术人员，例如内科医师，应当能够容易地察觉到使用本发明的免疫偶联物治疗癌症的结果。例如，标准的医学测试以测量癌症的临床标记物的方法可作为治疗效力的有力指示物。这样的测试可包括但不限于：身体检查、表现量表、疾病标记物、12-导联 ECG、肿瘤测量、活体组织检查、细胞检查、细胞学研究、最长肿瘤直径计算、肿瘤的放射线照相术、肿瘤的数码成像、维生征象、体重、不良事件的记录、感染性事件的评价、伴随药物的评价、疼痛评价、血液或血清化学、尿样分析、CT 扫描以及药物代谢动力学分析。此外，包含免疫偶联物和另一

癌症治疗剂的组合疗法的协同效应可通过与经历单一疗法的病人进行对比研究来确定。

本发明的另一实施方式是关于治疗或预防癌症的试剂盒，其包含有效量的本发明的免疫偶联物，以及使用其治疗癌症的指导说明。

在大多数核准的抗癌疗法中，抗癌疗法与其他抗癌疗法联合使用。因此，本发明提供了用于预防或治疗癌症的方法，该方法使用本发明的免疫偶联物以及至少一种另外的抗癌疗法。其他的癌症疗法可以在施用免疫偶联物之前、交叠、同时和/或之后施用。当同时施用时，免疫偶联物和其他的癌症治疗剂可在同一配方中或在不同的配方中，如果在不同的配方中，则可选用不同施用方式。一种或多种免疫偶联物和一种或多种其他癌症疗法的组合可以协同对抗癌症。其他的癌症疗法包括但不限于：放射性和其他的抗癌治疗剂。这些其他的癌症治疗剂可包括但不限于：2,2',2"三氯三乙胺、6-氮尿苷（6-azauridine）、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸（6-diazo-5-oxo-L-norleucine）、6-巯基嘌呤（mercaptopurine）、aceglarone、aclacinomycins、放射菌素、六甲蜜胺（altretamine）、氨鲁米特（aminoglutethimide）、氨鲁米特（aminoglutethimide）、胺苯吡啶（amsacrine）、阿纳托唑（anastrozole）、安西他滨（ancitabine）、血管生成素反义寡核苷酸（angiogenin antisense oligonucleotide）、安曲霉素（anthramycin）、阿扎胞苷（azacitidine）、重氮乙酰丝氨酸（azaserine）、氮丙环（aziridine）、batimastar、bcl-2 反义寡核苷酸、苯佐替派（benzodepa）、必卡他胺（bicalutamide）、比生群（bisantrene）、博来霉素（bleomycin）、布舍瑞林（buserelin）、白消安（busulfan）、放线菌素 C（cactinomycin）、卡普睾酮（calusterone）、卡铂（carboplatin）、卡巴醌（carboquone）、洋红霉素（carminomycin）、卡莫氟（carmofur）、卡莫司汀（carmustine）、卡柔比星（carubicin）、嗜癌菌素（carzinophilin）、苯丁酸氮芥（chlorambucil）、萘氮芥（chlornaphazine）、氯地孕酮（chlormadinone acetate）、氯脲霉素（chlorozotocin）、色霉素（chromomycins）、顺铂

(cisplatin)、克拉屈滨 (cladribine)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、阿糖胞苷 (cytarabine)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、更生霉素 (dactinomycin)、正定霉素 (daunorubicin)、地磷酰胺 (defosfamide)、秋水仙胺 (demecolcine)、denopterin、地托比星 (detorubicin)、地吡醌 (diaziquone)、烯紫衫醇 (docetaxel)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、多柔比星 (doxorubicin)、屈洛昔芬 (droloxifene)、屈他雄酮 (dromostanolone)、依达曲沙 (edatrexate)、eflomithine、依利醋铵 (elliptinium acetate)、乙嘧替氟 (emitefur)、enocitabune、表柔吡星 (epirubicin)、环硫雄醇 (epitiostanol)、依索比星 (esorubicin)、雌莫司汀 (estramustine)、依托格鲁 (etoglucid)、依托泊苷 (etoposide)、法屈唑 (fadrozole)、芬维 A 胺 (fenretinide)、2-去氧氟尿苷 (floxuridine)、氟达拉滨 (fludarabine)、氟尿嘧啶 (fluorouracil)、氟他胺 (flutamide)、亚叶酸 (folinic acid)、福美斯坦 (formestane)、磷雌酚 (fosfestrol)、福莫司汀 (fotemustine)、硝酸镓 (gallium nitrate)、吉西他汀 (gemcitabine)、戈舍瑞林 (goserelin)、己雌酚 (hexestrol)、羟基脲 (hydroxyurea)、伊达比星 (idarubicin)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、英丙舒凡 (improsulfan)、干扰素 -  $\alpha$  (interferon-alpha)、干扰素 -  $\beta$  (interferon-beta)、干扰素 -  $\gamma$  (interferon-gamma)、白细胞介素 -2 (interleukin-2)、左旋门冬酰胺酶 (L-asparaginase)、香菇多糖 (lentinan)、来曲唑 (letrozole)、柳菩林 (leuprolide)、洛莫司汀 (lomustine)、氯尼达明 (lonidamine)、甘露醇氮芥 (mannomustine)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧化双氯乙基甲胺 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、安宫黄体素 (medroxyprogesterone)、醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、氯地孕酮 (melengestrol)、美法仑 (melphalan)、美诺立尔 (menogaril)、美雄烷 (mepitiostane)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、美妥替派 (meturedopa)、米帕 (miboplatin)、米替福新 (miltefosine)、二溴甘露醇 (mitobronitol)、米托胍脲 (mitoguazone)、二溴卫矛醇 (mitolactol)、丝裂霉素

(mitomycins)、米托坦 (mitotane)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、莫哌达醇 (mopidamol)、霉酚酸 (mycophenolic acid)、尼鲁米特 (nilutamide)、尼莫司汀 (nimustine)、nitracine、诺拉霉素 (nogalamycin)、novembichin、olivomycins、草酸铂 (oxaliplatin)、紫杉醇 (paclitaxel)、喷司他丁 (pentostatin)、培洛霉素 (peplomycin)、哌磷酰胺 (perfosfamide)、蛋氨酸芥 (phenamet)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、哌泊溴烷 (pipobroman)、哌泊舒凡 (pipo sulfan)、吡柔比星 (pirarubicin)、吡曲克辛 (piritrexim)、普卡霉素 (plicamycin)、足叶草酸 2-乙基-酰肼 (podophyllinic acid 2-ethyl-hydrazide)、聚磷酸雌二醇 (polyestradiol phosphate)、吡吩姆钠 (porfimer sodium)、甲基丝裂霉素 (porfiromycin)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、丙卡巴肼 (procabazine)、丙帕锗 (propagermanium)、PSK、蝶罗呤 (pteropterin)、嘌呤霉素 (puromycin)、quelamycin、雷莫司汀 (ranimustine)、丙亚胺 (razoxane)、鲁道柔比星 (rodorubicin)、罗喹美克 (roquinimex)、sizofican、索布佐生 (sobuzoxane)、螺锗 (spirogermanium)、链黑菌素 (streptonigrin)、链脲佐菌素 (streptozocin)、它莫西芬 (tamoxifen)、泰素帝 (taxotere)、替加氟 (tegafur)、替莫唑胺 (temozolomide)、替尼泊甙 (teniposide)、细交链孢菌酮酸 (tenuzonic acid)、testolacone、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、巯基鸟嘌呤 (thioguanine)、塞替派 (thiotepa)、托穆戴克斯 (Tomudex)、拓扑替康 (topotecan)、托瑞米芬 (toremifene)、三亚胺醌 (triaziquone)、三亚乙基密胺 (triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酸胺 (triethylenethiophosphoramidate)、曲洛司坦 (trilostane)、三甲曲沙 (trimetrexate)、曲普瑞林 (triptorelin)、曲洛磷胺 (trofosfamide)、trontecan、6-mercaptopurin 结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、尿嘧啶芥子气 (uracil mustard)、乌瑞替派 (uredepa)、乌拉坦 (urethan)、长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine)、净司他丁 (zinostatin) 和佐柔比星 (zorubicin)、胞嘧啶阿糖胞苷 (cytosine arabinoside)、吉妥单抗

(gemtuzumab)、thioepa、cyclophosphamide、抗代谢物 (antimetabolites) (例如甲氨蝶呤 (methotrexate)、6-硫鸟嘌呤 (6-thioguanine (鸟嘌呤))、阿糖胞苷 (cytarabine)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)、氟达拉滨 (fludarabine)、吉西他汀 (gemcitabine)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、temozamide)、六甲密胺 (hexamethylmelamine)、LYSODREN、核苷相似物 (nucleoside analogues)、植物生物碱 (plant alkaloids) (例如, 泰素 (Taxol)、紫杉醇 (paclitaxel)、喜树碱 (camptothecin)、拓扑替康 (topotecan)、伊立替康 (irinotecan) (CAMPTOSAR,CPT-11)、长春新碱 (vincristine)、长春花生物碱 (vinca alkaloids) 例如长春碱 (vinblastine)、鬼臼毒素 (podophyllotoxin)、表鬼臼毒素 (epipodophyllotoxin)、VP-16 (依托泊苷 (etoposide))、松胞菌素 B (cytochalasin B)、短杆菌肽 D (gramicidin D)、溴化乙锭 (ethidium bromide)、依米丁 (emetine)、蒽环类 (anthracyclines) (例如, 正定霉素)、阿霉素脂质体 (doxorubicin liposomal)、二羟基蒽醌 (dihydroxyanthracindione)、米拉霉素 (mithramycin)、放线菌素 D (actinomycin D)、阿地白介素 (aldesleukin)、allutamine、biaomycin、卡培他滨 (capecitabine)、carboplatin、chlorambucil、cyclophosphamide、daclizumab、floxuridine、lauprolide acetate、左旋咪唑 (levamisole)、lomustine、mercaptopurine、美司钠 (mesna)、mitolane、pegasparicase、pentostatin、picamycin、riuximab、坎帕斯-1 (campath-1)、strabizocin、维 A 酸 (tretinoin)、VEGF 反义寡核苷酸、长春地辛 (vindesine) 和长春瑞宾 (vinorelbine)。含有一种或多种癌症制剂的组合物 (例如, FLAG, CHOP) 也可用于本发明。FLAG 包含氟达拉滨 (fludarabine)、阿糖胞苷 (cytosine (胞嘧啶) arabinoside) (Ara-C) 和 G-CSF。CHOP 包含环磷酰胺 (cyclophosphamide)、长春新碱 (vincristine)、阿霉素 (doxorubicin) 和强的松 (prednisone)。已知的所有癌症制剂可参见最新版的 The Merck Index 和 Physician's Desk Reference 两书。

用于联合疗法的药物组合物也可包括, 但不限于: 抗生素 (例如, 更

生霉素(dactinomycin)、平阳霉素(bleomycin)、米拉霉素(mithramycin)、蒽蒽霉素(anthracycline)、门冬酰胺酶(asparaginase)、杆菌(Bacillus)和介兰(Guerin)、白喉毒素(diphtheria toxin)、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、抗有丝分裂剂、相思豆毒素(abrin)、蓖麻毒蛋白A(ricin A)、假单胞菌外毒素(Pseudomonas exotoxin)、神经生长因子、血小板衍生的生长因子、组织血浆酶原活化剂、抗组胺剂、抗作呕剂等。

实际上,向需要这种治疗的病人施用有效量的免疫偶联物,可减少其他具有显著临床功效的癌症治疗剂的剂量。这种其他癌症治疗剂减少的剂量的功效在没有施用免疫偶联物时可能未观察到。因此,本发明提供了治疗肿瘤或癌症的方法,该方法包含施用减少剂量的一种或多种其他癌症治疗剂。

再有,与标准治疗方法的周期长短或多少相比,向需要这种治疗的病人施用包含免疫偶联物的联合疗法可导致更短的治疗时间。因此,本发明提供了治疗肿瘤或癌症的方法,该方法包含施用减少剂量的一种或多种其他癌症治疗剂,以获得相对较短的持续时间和/或更少的治疗周期。

因此,根据本发明,包含免疫偶联物和其他癌症治疗剂的联合疗法可降低整个癌症治疗的毒性(即副作用)。例如,与单一疗法或其他联合疗法相比,当施用减少剂量的免疫偶联物和/或其他癌症治疗剂时,和/或当减少周期的持续时间(即单一施药的时段或一系列的施药的时段)时,和/或当减少周期数目时,可观察到毒性的降低。

因此,本发明提供药物组合物,其包含免疫偶联物和一种或多种其他癌症治疗剂,可选择地含在药学上可接受的载体中。

本发明还提供包含有效量的免疫偶联物的试剂盒,可选择地与一种或多种其他癌症治疗剂联合,以及使用其治疗癌症的指导说明。

如上所述,含免疫偶联物的联合疗法可能敏化癌症或肿瘤对其他癌症治疗剂的施用。因此,本发明构思出用于预防、治疗、和/或预防癌症

复发的联合疗法，该疗法包含在施用减少剂量的癌症治疗剂之前、之后或同时，施用有效量的免疫偶联物。例如，用免疫偶联物的最初的治疗可能增加癌症或肿瘤对随后的癌症治疗剂的剂量的敏感程度。该剂量接近或低于单独采用癌症治疗剂或无免疫偶联物时的标准剂量的下限。当同时施予时，免疫偶联物可与癌症治疗剂分开施用，可选择地通过不同的施用模式给予。

在另外的实施方式中，其他的癌症治疗剂的施用可使癌症或肿瘤对免疫偶联剂或结合蛋白产生敏化。在该实施方式中，其他的癌症治疗剂可在施用免疫偶联剂或结合蛋白前给予。

在一实施方式中，其他的癌症治疗剂包括顺铂（cisplatin），例如 PLATINOL 或 PLATINOL-AQ (Bristol Myers)，其剂量大约在 5 到 10、11 到 20、21 到 40 或 41 到 75 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在另一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含卡铂（carboplatin），例如 PARAPLATIN (Bristol Myers)，其剂量大约在 2 到 3、4 到 8、9 到 16、17 到 35 或 36 到 75 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在又一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含环磷酰胺（cyclophosphamide），例如 CYTOXAN (Bristol Myers Squibb)，其剂量大约在 0.25 到 0.5、0.6 到 0.9、1 到 2、3 到 5、6 到 10、11 到 20 或 21 到 40 mg/kg/周期的范围。

在另一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含阿糖胞苷（cytarabine），例如 CYTOSAR-U (Pharmacia & Upjohn)，其剂量大约在 0.5 to 1、2 to 4、5 to 10、11 到 25、26 到 50 或 51 到 100 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。在另一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含阿糖胞苷脂质体例如 DEPOCYT (Chiron Corp.)，其剂量大约在 5 到 50 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在又一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含达卡巴嗪（dacarbazine），例如 DTIC 或 DTICDOME (Bayer Corp.)，其剂量大约在 15 到 250 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围，或大约在 0.2 到 2 mg/kg/周期的范围。

在另一实施方式中，其他的癌症制剂包含拓扑替康 (topotecan)，例如 HYCAMTIN (SmithKline Beecham)，其剂量大约在 0.1 到 0.2、0.3 到 0.4、0.5 到 0.8 或 0.9 到 1.5 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在又一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含依立替康(irinotecan)，例如 CAMPTOSAR (Pharmacia & Upjohn)，其剂量大约在 5 到 9、10 到 25 或 26 到 50 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在另一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含氟达拉滨 (fludarabine)，例如 FLUDARA (Berlex Laboratories)，其剂量大约在 2.5 到 5、6 到 10、11 到 15 或 16 到 25 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在又一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含胞嘧啶阿糖胞苷(cytosine arabinoside) (Ara-C)，其剂量大约在 200 到 2000 mg/m<sup>2</sup>/周期、300 到 1000 mg/m<sup>2</sup>/周期、400 到 800 mg/m<sup>2</sup>/周期或 500 到 700 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在另一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含多烯紫杉醇(docetaxel)，例如 TAXOTERE (Rhone Poulenc Rorer)，其剂量大约在 6 到 10、11 到 30 或 31 到 60 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在又一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含紫杉醇(paclitaxel)，例如 泰素 (TAXOL) (Bristol Myers Squibb)，其剂量大约在 10 到 20、21 到 40、41 到 70 或 71 到 135 mg/kg/周期的范围。

在另一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)，其剂量大约在 0.5 到 5 mg/kg/周期、1 到 4 mg/kg/周期或 2-3 mg/kg/周期的范围。

在又一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含多柔比星(doxorubicin)，例如 ADRIAMYCIN (Pharmacia & Upjohn)、DOXIL (Alza)、RUBEX (Bristol Myers Squibb)，其剂量大约在 2 到 4、5 到 8、9 到 15、16 到 30 或 31 到 60 mg/kg/周期的范围。

在另一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含依托泊苷(etoposide)，例如 VEPESID (Pharmacia & Upjohn)，其剂量大约在 3.5 到 7、8 到 15、16

到 25 或 26 到 50 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在又一实施方式中，其他的癌症治疗剂包含长春碱 (vinblastine)，例如 VELBAN (Eli Lilly)，其剂量大约在 0.3 到 0.5、0.6 到 0.9、1 到 2 或 3 到 3.6 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在另一实施方式中，其他的癌症治疗剂包括长春新碱 (vincristine)，例如 ONCOVIN (Eli Lilly)，其剂量大约在 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 或 0.7 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在又一实施方式中，其他的癌症治疗剂包括甲氨蝶呤 (methotrexate)，其剂量大约在 0.2 到 0.9、1 到 5、6 到 10 或 11 到 20 mg/m<sup>2</sup>/周期的范围。

在另一实施方式中，免疫偶联物与至少一种其他的免疫治疗剂联合施用，该其他的免疫治疗剂包括但不限于：利妥昔 (rituxan)、利妥昔单抗 (rituximab)、campath-1、吉妥单抗 (gemtuzumab) 和 trastuzumab。

在又一实施方式中，免疫偶联物与至少一种或多种抗血管新生的试剂联合施用，该抗血管新生的试剂包括但不限于：抑制管张素 (Angiostatin)、沙利度胺 (thalidomide)、三环 (kringle) 5、内皮抑制素 (endostatin)、丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serpin)、抗凝血酶 (anti-thrombin)、纤维连接蛋白的 29 kDa N-端的和 40 kDa C-端的水解蛋白片段、催乳素的 16 kDa 水解蛋白片段、血小板因子 4 的 7.8 kDa 水解蛋白片段、对应于血小板因子 4 的含 13 个氨基酸的肽 (Maione et al., 1990, Cancer Res. 51:2077-2083)、对应于胶原质 I 片段的含 14 个氨基酸的肽 (Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511)，对应于凝血酶敏感蛋白 1 片段的含 19 个氨基酸的肽 (Tolsma 等, 1993, J. Cell Biol. 122:497-511)，对应于 SPARC 片段的含 20 个氨基酸的肽 (Sage 等, 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334)，和它们变异体，包括其药学上可接受的盐。

在另一实施方式中，免疫偶联物与一种放射疗法联合施用。该疗法也可包含手术和/或化学疗法。例如，免疫偶联物可与放射疗法以及顺铂 (cisplatin) (Platinol)、5-氟尿嘧啶 (fluorouracil) (5-FU, Adrucil)、卡

铂 (carboplatin) (Paraplatin) 和/或紫杉醇(paclitaxel)(泰素 (Taxol)) 联合施用。使用免疫偶联物进行治疗可容许较低的放射剂量和/或较低放射治疗的频率, 例如可减少影响吞咽功能从而导致减重或脱水的严重喉咙疼痛的发生。

在又一实施方式中, 免疫偶联物与至少一种或多种细胞激素 (cytokines) 联合施用, 该细胞激素包括但不限于: 淋巴因子 (lymphokine)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factors)、类肿瘤坏死因子的细胞激素、干扰素、巨噬细胞炎症蛋白 (macrophage inflammatory protein)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte monocyte colony stimulating factor)、白细胞介素 (包括但不限于: 白细胞介素-1、白细胞介素-2、白细胞介素-6、白细胞介素-12、白细胞介素-15、白细胞介素-18) 和它们的变异体, 包括它们的药学上可接受的盐。

在另一实施方式中, 免疫偶联物与一种癌症疫苗或生物试剂联合施用, 该癌症疫苗或生物制剂包括但不限于: 自体同源的细胞或组织、非自体同源的细胞或组织、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen),  $\alpha$ -胎球蛋白、人类绒毛膜性腺激素 (human chorionic gonadotropin)、卡介苗活疫苗 (BCG live vaccine)、分枝杆菌细胞壁-DNA 复合物 (Mycobacterial cell wall-DNA complexes)、黑色素细胞衍生蛋白 (melanocyte lineage proteins) 和突变的及肿瘤特异性抗原。

在又一实施方式中, 免疫偶联物与荷尔蒙疗法联合施用。荷尔蒙治疗剂包括但不限于: 荷尔蒙兴奋剂 (hormonal agonist)、荷尔蒙拮抗剂 (hormonal antagonist) (例如, 氟他胺 (flutamide)、它莫西芬 (tamoxifen)、醋酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate) (LUPRON)) 和类固醇 (例如, 地塞米松 (dexamethasone)、维甲类化学物、倍他米松 (betamethasone)、氢化可的松 (cortisol)、可的松 (cortisone)、强的松 (prednisone)、去氢睾酮 (dehydrotestosterone)、糖肾上腺皮质激素 (glucocorticoid)、盐皮质激素 (mineralocorticoid)、雌激素 (estrogen)、睾丸激素 (testosterone)、孕酮

(progestin) )。

在另一实施方式中，免疫偶联物与基因治疗计划联合施用，以治疗或预防癌症。

因此，联合疗法可增加癌症或肿瘤对所施用的免疫偶联物和/或其他癌症治疗剂的敏感度。这样，可有望获得更短的治疗周期，从而减少毒性事件。治疗周期的长短可随所施用的特异性的癌症治疗剂而改变。本发明也考虑了连续或不连续地进行给药，或者将每日的剂量分为若干次进行部分给药。本领域的技术人员应当能够认识到对特异性的癌症治疗剂的适当的治疗周期，而本发明考虑了对每一种癌症疗法的最佳治疗计划的评估。具体的专业指导已为人知。参见例如 Therasse 等, 2000, “New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada,” J Natl Cancer Inst. Feb 2;92(3):205-16。

免疫偶联物可通过任何适合的方法例如注射、口服、吸入、经皮肤、在肿瘤内施用。而其他的癌症治疗剂可通过相同的或不同的模式施用。此外，当需要向病人施用多种癌症治疗剂时，免疫偶联物和一种或多种其他的癌症治疗剂可用一种方法施用，而其他的癌症治疗剂可用另一种模式施用。

#### **(F) 本发明的结合蛋白和免疫毒素的诊断方法和试剂**

本发明的结合蛋白选择地结合到癌细胞或被癌细胞内化的分子，而无明显地结合到正常细胞。因此，结合蛋白可用于诊断癌症。如上所述，发明者们已示出了本发明的结合蛋白结合到葡萄糖转运体 8 或其变异体；包含氨基酸序列 SEQ ID NOS:11-20 中任何一个定义的蛋白质；或与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体。在本发明的一个实施方式中，与癌症

相关的 GLUT8 的变异体包含由 SEQ ID NOS: 11、12 或 13 或其变异体中任何一个定义的氨基酸序列。在本发明的另一个实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体包含在 N-端的二-亮氨酸部分产生改性的 GLUT8。在本发明的又一实施方式中，N-端的二-亮氨酸部分被改性为二-丙胺酸。

在一优选的实施方式中，结合蛋白是本发明的抗体或抗体片段。并且，癌细胞可被评价以确定它们对本发明的治疗方法的易感性。评价方法例如取癌细胞样品，确定样品的能力结合到本发明的结合蛋白，优选为抗体或抗体片段。

因此，本发明包括诊断方法、试剂和试剂盒，它们本身可用在本发明的治疗方法之前、之中或之后，以确定是否有癌细胞的存在，所述癌细胞是否表达抗原，并结合到本发明的蛋白，优选抗体或抗体片段上。

在一实施方式中，本发明提供一种检测或监控受测试者中的癌症的方法，该方法包括以下步骤：

(1) 将从所述受测试者中取出的测试样品与本发明的结合蛋白接触，所述结合蛋白特异性地结合到癌细胞上的抗原，形成结合蛋白-抗原复合物；

(2) 测量测试样品中结合蛋白-抗原复合物的量；以及

(3) 将测试样品中的结合蛋白-抗原复合物的量与对照物比较。

在一实施方式中，抗原是葡萄糖转运体 8 或其变异体；一种包含氨基酸序列 SEQ ID NOS:11-20，优选为 SEQ ID NOS:11、12 或 13 中任何一个定义的蛋白质；或与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体。在另一实施方式中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体在 N-端的二-亮氨酸部分包含一个突变，这样，该突变的葡萄糖转运体 8 就定位在细胞膜中。

本发明进一步包括用于诊断癌症的试剂盒，其包含任何一种本发明的结合到癌细胞表面的抗体的结合蛋白，以及使用其诊断癌症的指导说明。

为应用于诊断，本发明的结合蛋白，优选为抗体或抗体片段，可用

可探测的标记物，如不透射线的或放射线同位素例如  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ；荧光的（荧光团）或化学发光的（发色团）化合物，例如荧光素异硫氰酸盐、若丹明或荧光素；酶，例如碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或山葵过氧化酶；成像试剂；或金属离子进行标记。如上所述，将标记物附着于结合蛋白，如抗体或抗体片段之上的方法已为本领域所习知。

本发明的另一方面是检测或监控受测试者中癌症的方法，该方法包含以下步骤：

- (1) 测量在取自所述受测试者的样品中本发明的抗体的量；以及
- (2) 将测试样品中本发明的抗体的量与对照物作比较。

在一实施方式中，本发明的抗体的量是通过用如 ELISA 来测量测试样品中的本发明的抗体的量而测定。在另一实施方式中，本发明的抗体的量是通过用如 RT-PCR 来测量编码测试样品中的本发明的抗体的核酸的表达水平而测定。

### **(G) 新的与癌症相关的抗原的药物组合物，方法和应用**

本发明提供了新的与癌症相关的抗原，其表达在癌细胞的表面，且在正常细胞表面无显著表达。因此，该新的与癌症相关的抗原可用于治疗和预防癌症的疗法中，包括使用该新的与癌症相关的抗原或其片段来引起体内的免疫应答。并且，本发明包括了新的与癌症相关的 GLUT8 的变异体来探测或监控癌症。

#### ***(i) 药物组合物***

本发明的一实施方式是药物组合物，其包含有效量的新的与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段在具有适当的稀释剂或载体的混合物中。本发明的另一实施方式是药物组合物，其包含有效量的分离的核酸在具有适当的稀释剂或载体的混合物中，该核酸编码新的与癌症相关的 GLUT8 的变异体。本发明的进一方面是药物组合物，其包含有效量的重组表达在具有适当的稀释剂或载体的混合物中，该重组表达包括编码新

的与癌症相关的 GLUT8 的变异体的核酸序列。

例如，本发明的药物组合物可被用于治疗或预防癌症。并且，药物组合物可被用于引起受测试者对新的与癌症相关的 GLUT8 的变异体的免疫应答。

药物组合物可按如上所述进行制备和施用。药物组合物可与如上讨论的其它的抗癌症的治疗试剂联合使用。

当免疫试剂（即新的与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段，和/或对其编码的核酸序列，和/或其的重组表达载体）和/或其组合物在不受施用形式约束下，能够与佐药用于共免疫，则免疫原性可得到显著地提高。通常，佐药的用量为磷酸盐缓冲盐水溶液中的 0.05-1.0%。佐药能够提高免疫原的免疫原性，但它们自身却不一定是免疫性的。佐药可通过将免疫原保留在靠近施用的部位来产生贮库效应，从而达成向免疫系统的细胞缓慢的、持续地释放免疫原。佐药也能够将免疫系统的细胞吸引到免疫原贮库，并激发这些细胞产生免疫应答。这样，本发明的实施方式包含了进一步含有佐药的药物组合物。

佐药已被使用多年来提高宿主对如疫苗的免疫应答。内部佐药（例如脂多糖）通常为疫苗中使用的被杀死的或毒性减弱的细菌的成分。外部佐药为免疫调节剂，其通常是以非共价键的方式连接到抗原上，并配制用于增强宿主的免疫应答。因此，佐药已被确认为经肠胃外的递送而增强对抗原的免疫应答。但是，这些佐药中的一些是有毒的，能导致不期望的副作用，从而不适合用于人和许多动物。事实上，只有氢氧化铝和磷酸铝（通常统称为 alum）是通常被用作人和兽医用的疫苗中的佐药。已建立了完整的 Alum 在增加抗体对白喉和白喉类毒素的应答方面的效果。尽管如此，这是有限制的。例如，alum 对于用作流感疫苗是没有效果，且不一致地引起细胞介导的与其它免疫原的免疫应答。在小鼠中被 alum-辅助的抗原而诱出的抗体主要是 IgG1 同种型，其可不被一些疫苗试剂作出最佳的保护。

大量的外部佐药可激起潜在的对免疫原的免疫应答。这些佐药包括复合到细胞膜蛋白质抗原的皂角苷（免疫刺激复合物）、具有矿物油的普流尼克（pluronic）聚合物、杀死的分枝细菌和矿物油、弗氏完全佐药（Freund's complete adjuvant）、细菌产品，例如胞壁酰二肽（muramyl dipeptide, MDP）和脂多糖（LPS）以及脂质 A 和脂质体。

在本发明的一方面，在本发明的任何一个实施方式中均可使用的佐药如下所述。用于肠胃外免疫的佐药，包括铝化合物（如氢氧化铝、磷酸铝和氢氧化磷酸铝）。抗原可根据标准协议沉淀到或吸附到铝化合物中。其它的佐药如 RIBI(ImmunoChem, Hamilton, MT)也可用于肠胃外施用。

用于粘膜免疫的佐药包括细菌毒素（例如，霍乱毒素（CT）、大肠杆菌不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)、艰难梭状芽孢杆菌毒素 A（Clostridium difficile toxin A）和日咳毒素（pertussis toxin, PT），或它们的组合、亚单位、类毒素，或它们的突变体）。例如，可使用天然的霍乱毒素亚单位 B（CTB）的纯化制剂。只要它们保留佐药活性，则这些毒素的片段、类似物、衍生物和它们任意的毒素的融合体也可适用。优选的，使用减毒的突变体。合适的突变体在以下文献中有描述：（例如，WO 95/17211 (Arg-7-Lys CT 突变体), WO 96/6627 (Arg-192-Gly LT 突变体), 和 WO 95/34323 (Arg-9-Lys 和 Glu-129-Gly PT 突变体))。可用于本发明的方法和组合物中的其它的 LT 突变体包括如，Ser-63-Lys、Ala-69-Gly、Glu-110-Asp 和 Glu-112-Asp 突变体。其它不同来源（例如，大肠杆菌、明尼苏达沙门氏菌（Salmonella minnesota）、鼠伤寒沙门氏菌（Salmonella typhimurium），或弗氏志贺菌（Shigella flexneri）、皂角苷，或聚交酯乙交酯（PLGA）微球）的佐药也可用于粘膜施用。

同时适用于肠胃外免疫和粘膜免疫的佐药包括聚磷腈（polyphosphazene）（例如，WO 95/2415）、DC-chol（3 b-(N-(N',N'-二甲基氨基甲烷)-氨基甲酰)胆固醇）（例如，美国专利 No. 5,283,185 和 WO

96/14831) 以及 QS-21 (例如, WO 88/9336)。

采用任何一种本领域的技术人员熟知的传统方法, 可向受测试者进行免疫的药物组合物, 该药物组合物包含与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段、和/或对其编码的分离的核酸序列、和/或重组表达载体。这药物组合物可通过包括, 如粘膜 (例如眼睛、鼻内、口、胃、肺、肠、直肠、阴道、或尿道) 表面、肠胃外 (如皮下、皮内、肌肉、静脉内或腹膜内) 途径或经结节内进行免疫。优选的途径是取决于对本领域的技术人员能够容易地选出的免疫原。可以是单一剂量的或间隔重复的形式进行给药。本领域技术人员应该理解, 合适的剂量取决于各种参数, 如免疫原本身 (即肽对核酸) (和其更特异性的类型)、施用途径和被免疫的动物的状况 (体重、年纪等)。

本发明还提供含有有效量的本发明的药物组合物的试剂盒, 可选择的, 可含有一种或多种其它的癌症治疗剂, 以及其使用说明。

### *(ii) 治疗方法*

如上所述, 新的与癌症相关的 GLUT8 的变异体位于癌细胞表面, 而在正常细胞上不显著。因此, 该新的与癌症相关的抗原可用于预防或治疗癌症的疗法中。并且, 该新的与癌症相关的抗原可用于在受测试者中引起免疫应答, 例如, 在疫苗中。

本发明的一实施方式是与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段在制造治疗或预防癌症的药物中的应用。本发明的另一实施方式是与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段在制造在受测试者中引起免疫应答的药物中的应用。

本发明还包括编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段的分离的核酸序列在制造治疗或预防癌症的药物中的应用。并且, 本发明还包括编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段的分离的核酸序列在制造在受测试者中引起免疫应答的药物中的应用。

本发明的进一步的实施方式是包含了编码与癌症相关的 GLUT8 的

变异体或其片段的分离的核酸序列的重组表达载体在制造治疗或预防癌症的药物中的应用。并且,本发明还包括包含了编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段的分离的核酸序列的重组表达载体在制造在受测试者中引起免疫应答的药物中的应用。

本发明的其它的实施方式是对患有或疑似患有癌症的受测试者进行癌症的治疗或预防的方法,包括向该受测试者施用有效量的与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段。此外,本发明还包括对患有或疑似患有癌症的受测试者进行癌症的治疗或预防的方法,包括向该受测试者施用有效量的编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段的分离的核酸序列。进而,本发明还包括对患有或疑似患有癌症的受测试者进行癌症的治疗或预防的方法,包括向该受测试者施用有效量的包含了编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段的分离的核酸序列的重组表达载体。

本发明的另一实施方式是在受测试者中诱发对与癌症相关的 GLUT8 的变异体的免疫应答的方法,包括向该受测试者施用有效量的与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段。此外,本发明还包括在受测试者中诱发对与癌症相关的 GLUT8 的变异体的免疫应答的方法,包括向该受测试者施用有效量的编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段的分离的核酸序列。进而,本发明还包括在受测试者中诱发对与癌症相关的 GLUT8 的变异体的免疫应答的方法,包括向该受测试者施用有效量的包含了编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体或其片段的分离的核酸序列的重组表达载体。

### ***(iii) 诊断方法***

新的与癌症相关的 GLUT8 的变异体位于癌细胞表面,而在正常细胞上不显著。因此,对新的与癌症相关的 GLUT8 的变异体的检测可用于癌症的诊断方法。在优选的实施方式中,与癌症相关的 GLUT8 的变异体含有由 SEQ ID NOS: 11、12 或 13 或其变异体的任何一个定义的氨基酸序

列。在本发明的另一实施方式中，与癌症相关的 GLUT8 的变异体含有在 N-端的二-亮氨酸部分发生改性的 GLUT8。在本发明的进一步的实施方式中，N-端的二-亮氨酸部分被改性为二-丙氨酸。

本发明的一个实施方式是对患有或疑似患有癌症的受测试者进行癌症的检测或监控的方法，包括检测样品中细胞上的与癌症相关的 GLUT8 的变异体，其中，如果在细胞上检测到了与癌症相关的 GLUT8 的变异体，则表明有癌症。

若干的技术可用于检测细胞上与癌症相关的 GLUT8 的变异体。例如，本发明的结合蛋白可用于免疫分析，以探测与癌症相关的 GLUT8 的变异体在细胞表面的表达。本领域的技术人员应当理解有若干的技术可用于检测和/或定量与癌症相关的 GLUT8 的变异体在细胞表面的表达。这些技术包括西方墨点法、SDS-PAGE 后进行的免疫沉淀、免疫细胞化学、FACS、蛋白质阵列等。

本发明的其它方面是对患有或疑似患有癌症的受测试者进行癌症的检测或监控的方法，包括检测样品中细胞内的与癌症相关的 GLUT8 的变异体，其中，如果在细胞内检测到与癌症相关的 GLUT8 的变异体，则表明有癌症。在一优选的实施例中，编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体的 RNA 表达产物被用于检测细胞上的与癌症相关的 GLUT8 的变异体。本领域技术人员应当理解，通过检测编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体的 mRNA，或那些特异性地和/或选择性与编码与癌症相关的 GLUT8 的变异体的 mRNA 杂交的寡核苷酸、cDNA、DNA、RNA、PCR 产物、合成的 DNA、合成的 RNA 或其它天然或改性的核苷酸，则可对 RNA 表达产物进行检测或定量。

若干的方法可用于检测和/或定量细胞内与癌症相关的 GLUT8 的变异体的 RNA 表达，包括 RT-PCR，核酸酶保护分析 (nuclease protection assay)，例如核糖核酸酶保护分析 (ribonuclease protection assays) 和 S1 核酸酶分析 (S1 nuclease assays)，以及北方墨点法 (Northern blots) 等。

## (H) 其它方法

葡萄糖转运体 8 已显示出具有转运糖的活性。因此，本发明包括通过调控癌细胞上或内的与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体，来治疗或预防受测试者中的癌症的方法。

在本发明的一实施方式中，治疗或预防受测试者中的癌症的方法包括，阻止或减少与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体作为糖的转运体的功能。

在本发明的另一实施方式中，葡萄糖转运体的非抗体抑制剂被用于治疗或预防受测试者中的癌症。

已知有几种葡萄糖转运体家族的分子的抑制剂，包括类黄酮家族中的几个成员。例如，腺苷酸环化酶激动剂 (forskolin)、根皮素 (phloretin) (一种类似类黄酮的化合物) 和细胞松弛素 B (cytochalasin B) 已知为抑制 GLUT1，且它们的假定结合部位已在 GLUT-1 的三维分子模型上得到确认 (Salas-Burgos 等, *Biophys.J.* 87 :2990-2999, 2004)。槲黄素 (Quercetin)，一种黄酮醇，显示出抑制 GLUT2-介导的葡萄糖转运 (Song 等, *J.Biol.Chem.* 277 :15252-15260, 2002)。雌二醇 (Oestradiol) 和异黄酮植物雌激素染料木素 (isoflavone phytoestrogen Genistein) 也是 GLUT1-介导的葡萄糖转运的抑制剂，且也有人提出了这些分子的假定的结合部位 (Afzal 等, *Biochem J.* 365: 707-719, 2002)。葡萄糖转运体抑制剂中的腺苷酸环化酶激动剂 (forskolin)、吡啶啉醇 (dipyridamole, 潘生丁) 和异丁基甲基黄嘌呤 (isobutylmethylxanthine (黄嘌呤) (IBMX)) 均结合到 GLUT1 和 GLUT4 上 (Hellwig & Joost, *Mol. Pharmacol.* 40:383-389, 1991)。细胞松弛素 B 也结合到 GLUT4 上 (Wandel 等, *Biochim. Biophys. Acta* 1284:56-62, 1996)。

除了这些已知的抑制剂外，本领域的技术人员应当理解，存在若干已知的用于确认葡萄糖转运体抑制剂的分析。例如，抑制剂对葡萄糖转

运体的作用可通过表达感兴趣的 GLUT，优选为葡萄糖转运体 8，在细胞如非洲爪蟾卵母细胞（*Xenopus laevis* oocytes）或 CHO 中，测量在有或没有抑制剂的存在下的葡萄糖的摄取，并确定抑制剂是否具有竞争性来进行评价。一旦知道给定的 GLUT 异构体的序列后，就可容易地测试出它对大量分子的敏感性，从而确认候选药物。

因此，本发明包括了向受测试者根据其需要施用有效量的葡萄糖转运体的抑制剂，来治疗或预防受测试者中的癌症的方法。该抑制剂包括类黄酮家族中的成员，例如槲黄素（Quercetin）或染料木素（genistein）、似类黄酮的化合物，例如根皮素（phloretin）、雌性激素类（Oestrogenic）化合物，包括雌二醇（oestradiol）或染料木素（genistein）、腺苷酸环化酶激动剂（forskolin）、细胞松弛素 B（cytochalasin B）和/或异丁基甲基黄嘌呤（isobutylmethylxanthine（黄嘌呤）（IBMX））。

在本发明的另一实施方式中，与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体的功能通过降低或阻止与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体在细胞中的表达而得到阻止或降低。

用于阻止或降低与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体在细胞中的表达的标准技术包括，使用对与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体基因的转录物活泼的反义、三螺旋核酸或核酶分子。

例如，可采用标准技术生产反义核酸分子，即与编码感兴趣的多肽的正义核酸的互补的分子，例如，与双链 cDNA 分子的编码链互补，或与 mRNA 序列互补。因此，反义核酸可由氢键结合到正义核酸上。反义核酸可与整条编码链或仅与其部分互补，例如蛋白质编码区域（或开发阅读框）的全部或部分。反义核酸分子可与编码感兴趣的多肽的核酸序列的编码链中的非编码区形成反义。该非编码区（5'和 3'的非翻译区）是 5'和 3'的序列，其与编码区的侧翼相接，并不会翻译为氨基酸。

反义寡核苷酸例如可以在长度上有约 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 或 50 个核苷酸或更多。本发明的反义核酸可使用本领域习知方法，采用

化学合成和酶连接反应构建。例如，反义核酸（例如反义寡核苷酸）可使用天然核苷酸，或多项地经改性以提高分子生物稳定性的或增加反义和正义核酸间形成的双链的物理稳定性的核苷酸而进行化学合成。例如，可使用硫代磷酸酯（phosphorothioate）衍生物和吡啶取代的核苷。可用于产生反义核酸的改性的核苷酸包括：5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-（羧基羟基甲基）尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 $\beta$ -D-半乳糖基 Q 核苷（beta-D-galactosylqueosine）、肌苷、N6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 $\beta$ -D-甘露糖基 Q 核苷（beta-D-mannosylqueosine）、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基- N6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸（v）、wybutoxosine、假尿嘧啶、Q 核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2 硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸（v）、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-（3-氨基-3-N-2-羧基丙基）尿嘧啶、(acp3)w 和 2, 6-而氨基嘌呤。此外，反义核酸可使用表达载体以生物形式产生，将一核酸按反义取向亚克隆到该载体（即从插入的核酸转录的 RNA 将与感兴趣的靶核酸呈反义取向）。

被施用到受测试者的或与编码感兴趣的多肽的细胞的 mRNA 杂交或结合的原位生成的反义核酸分子，从而抑制表达，例如通过抑制转录和/或翻译。杂交可通过传统的核苷酸的互补性形成稳定的双链，或如在反义核酸分子通过在双链的主要凹区内的形成特异性相互反应的情况下，结合到 DNA 双链。本发明的施用反义核酸分子的例子包括在组织部位直接注射。另外，反义核酸分子也可经改性而靶向选择的细胞，然后进行全身性施用。例如，对于全身性施用，反义分子可经改性，从而对表达在所选细胞上，如 T 细胞或脑细胞上的受体或抗原，通过连接反义核酸

分子到结合于细胞表面的受体或抗原的肽或抗体上，而进行特异性结合。反义核酸分子也可使用载体，如下面描述的基因疗法的载体向细胞传递。为了获得足够的反义核酸分子的细胞内浓度，优选的载体构建是反义核酸分子在强 pol II 或 pol III 启动子控制下放置于其中的。

感兴趣的反义核酸分子可为 $\alpha$ -异头核酸分子。 $\alpha$ -异头核酸分子与互补 RNA 形成特异性双链杂交链，其中，与通常的 $\alpha$ -单元不同的是，杂交链是相互平行(Gaultier 等., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641)。该反义核酸分子也可含有 2'-o-甲基核糖核苷酸(Inoue 等, 1987, *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148)或一嵌合 RNA-DNA 的类似物(Inoue 等, 1987, *FEBS Lett.* 215:327-330)。

核酶是催化性的 RNA 分子，具有核糖核酸酶活性，能够切割单链核酸，例如 mRNA，核酶具有与单链核酸互补的区域，且可通过标准技术生成。因此，核酶（例如锤头型核酶）（描述于 Haselhoff and Gerlach, 1988, *Nature* 334:585-591）可被用于催化性切割 mRNA 转录物，从而抑制由 mRNA 编码的蛋白质的翻译。对编码感兴趣的多肽的核酸分子具有特异性的核酶可基于编码与癌症相关的 GLUT 8 的变异体的 cDNA 的核苷酸序列而设计。例如，根据 Cech 等的美国专利 No. 4,987,071;和 Cech 等的美国专利 No. 5,116,742，可构建出四膜虫（*Tetrahymena*）L-19 IVS RNA 的衍生物，其中，活性部位的核苷酸序列是互补于被切割的核苷酸序列。此外，编码感兴趣的多肽的 mRNA 可被用于选择催化的 RNA，其选自 RNA 分子的汇总，且具有特异性核糖核酸酶的活性。参见如 Bartel and Szostak, 1993, *Science* 261:1411-1418。

三螺旋结构也可用已知的技术生成。例如，可通过靶向与编码多肽的基因的调节区（例如启动子和/或增强子）互补的核苷酸序列，形成三螺旋结构，以抑制基因在靶细胞中的转录，从而抑制感兴趣的多肽的表达。参见 Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene, 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36;和 Maher, 1992, *Bioassays* 14(12):807-15。

在多个实施方式中，可在碱基部分、糖部分或磷酸骨架处对核酸组合物进行改性，以提高如分子的稳定性、杂交性或溶解性。例如，核酸的脱氧核糖磷酸骨架可经改性而生成肽核酸（见 Hyrup 等, 1996, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4(1): 5-23）。在此使用的术语“肽核酸”或“PNAs”是指核酸模仿物，例如 DNA 模仿物，其中的脱氧核糖磷酸骨架被假肽骨架取代，而仅保留了 4 个天然的核碱基。PNAs 的中性骨架显示出在低离子浓度条件下对 DNA 和 RNA 的特异性杂交。PNA 低聚物的合成可使用标准的固相肽合成协议进行，该协议描述于 Hyrup 等, 1996, *supra*; Perry-O'Keefe 等, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675 中。

PNAs 可经改性而如提高它们的稳定性或细胞性摄入。这通过附着亲脂性的或其它辅助基团到 PNA 上，形成 PNA-DNA 嵌合体，或通过使用脂质体或其它本领域习知的药物递送技术达成。例如，可生成 PNA-DNA 嵌合体，其可集 PNA 和 DNA 的有利特点于一身。这样的嵌合体允许 DNA 识别酶，例如 RNase H 和 DNA 聚合酶，与 DNA 部分作用，而 PNA 部分可提供高的结合亲和力和特异性。PNA-DNA 嵌合体可使用适当长度的连接体（linker）连接，连接体的选择考虑碱基堆积、核碱基之间的键的数目和取向(Hyrup, 1996, *supra*)。PNA-DNA 嵌合体的合成可按 Hyrup, 1996, *supra*, 和 Finn 等, 1996, *Nucleic Acids Res.* 24(17):3357-63 中的描述进行。例如，DNA 链的合成可在一支撑物上使用标准亚磷酰胺偶联化学和改性的核苷类似物进行。化合物如 5'-(4-甲氧基三苯甲基)氨基-5'-脱氧-胸苷亚磷酰胺可用于连接 PNA 和 DNA 的 5'端(Mag 等, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17:5973-88)。然后，PNA 单体逐步偶联，与 5'PNA 片段和 3'DNA 片段产生嵌合分子(Finn 等, 1996, *Nucleic Acids Res.* 24(17):3357-63)。嵌合分子也可用 5'DNA 片段和 3'PNA 片段合成(Peterser 等, 1975, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5:1119-11124)。

在其它实施方式中，寡核苷酸可包括其它的侧基，例如肽（例如，用于体内靶向宿主细胞的受体），或有助于跨细胞膜传输的试剂（例如，

参见 Letsinger 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre 等, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652; International Publication No. W0 88/09810) 或血-脑屏障 (参见如 International Publication No. W0 89/10134)。此外, 寡核苷酸可用杂交触发的切割试剂 (参见如 Krol 等, 1988, Bio/Techniques 6:958-976) 或插入试剂 (参见如 Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549) 进行改性。为此, 寡核苷酸可与其它分子, 如肽, 杂交触发的交联试剂、转运试剂、杂交触发的切割试剂等偶联。

本发明的其它方面涉及识别能够调节与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体的表达或活性的化合物的方法, 该方法可用于预防或治疗癌症。在本发明的一实施方式中, 用于识别具有预防或治疗癌症的能力的化合物的方法包括以下步骤:

- (a) 将表达与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体的细胞与测试化合物接触; 以及
- (b) 确认与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体的表达或功能;
- (c) 将与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体的表达或功能与对照物比较, 其中, 与对照物相比, 当与癌症相关的葡萄糖转运体 8 的变异体的表达或功能有所降低, 则表明一化合物可用于预防或治疗癌症。

以下用非限制性的实施例来说明本发明:

### 实施例

#### 实施例 1: VB1-050 单克隆抗体的生成

VB1-050 单克隆抗体是由癌症病人的汇总的(pooled)淋巴细胞产生。SHFP-1 被用作融合伙伴(fusion partner)来产生单克隆抗体。VB1-050 是 IgG1,  $\lambda$ -单克隆抗体。

#### 实施例 2: 序列测定

信使 RNA (mRNA) 从杂交瘤细胞中分离, 且合成第一股互补 DNA(cDNA)。然后, 通过 PCR, cDNA 被用于分离抗体 H 和 L 链基因。根据 H ( $\gamma$ ) 和 L ( $\kappa$ ) 链同型的一致骨架区来设计 PCR 引物 (见注释)。

PCR 的产物被分别克隆到 TOPO-pCR 2.1 载体, 且被转化到大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞中。在 TOPO-pCR 2.1 中含有插入片段的独立的克隆经分离并培养。质粒 DNA 经纯化并测定序列。

$\gamma$  引物:

1) 5' TCT AAA GAA GCC CCT GGG AGC ACA GCT CAT CAC CAT  
G 3' (SEQ ID NO:21)

2) 5' GCC CGG GGA GCG GGG GCT TGC CGG CCG TCG CAC  
TCA 3' (SEQ ID NO:22)

3) 5' ACC ATG AGT GAG AAA AAC TGG ATT TGT GTG GCA 3'  
(SEQ ID NO:23)

4) 5' GGA GCC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA 3' (SEQ  
ID NO:24)

5) 5' CTC ACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT 3' (SEQ ID  
NO:25)

6) 5' GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG  
GCC 3' (SEQ ID NO:26)

$\kappa$  引物:

7) 5' GGC TCG AGA TGG ACA TGR RRD YCC HVG YKC ASC TT  
3' (SEQ ID NO:27)

8) 5' CCC GTC GAC CAT CAG ATG GCG GGA AGA T 3' (SEQ ID  
NO:28)

备注: 为了用单一引物分离尽可能多的种类, 对某些共有引物使用混合的碱基: R=A+G, D=A+T+G, Y=C+T, H=A+C+T, V=A+C

+G, K = T + G, S = C + G, W = A + T。

各 PCR 反应在 50  $\mu$ L 的反应体积内包含以下成分：

10x PCR 缓冲剂 5 $\mu$ L  
2 mM dNTPs 5 $\mu$ L  
50 mM MgCl<sub>2</sub> 2 $\mu$ L  
5' 引物 20 pmol  
3' 引物 20 pmol  
Taq DNA 聚合酶 2.5 U  
DNA 模板 50 ng

PCR 循环条件为：94 $^{\circ}$ C 下 1 分钟，62 $^{\circ}$ C 下 1 分钟，72 $^{\circ}$ C 下 1.5 分钟，进行 30 个循环，且最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 分钟。扩增的 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上经电泳分离，切离，用 Qiaquick 凝胶提取试剂盒纯化，并克隆到 TOPO pCR 2.1 克隆载体中，然后用 373 DNA 延伸测序仪进行 DNA 测序 (Griffin G.H. and Griffin M.A.: PCR technology, Current innovations. CRC Press, Boca. Raton. Florida3431.USA; Cloning vector pCR 2.1, Catalogue #205184. Invitrogen, Carlsbad, CA; Qiagen, Qiaquick gel extraction kit, Catalogue # 28706. Qiagen Inc., Mississauga, ON; and 373 DNA Stretch. PE Applied Biosystems, Mississauga ON.)。

VB1-050 的 CDR 序列示于表 1。

轻链可变区和重链可变区分别示于图 1 和图 2。

### 实施例 3: 由癌细胞活性测定的抗体谱 (Antibody Profiling)

用流式细胞仪测试 VB1-050 对肿瘤和正常细胞的反应性。对代表了 15 种不同类型的上皮癌细胞的单板癌细胞系进行了筛选。VB1-050 的结果总结于表 2 中。尽管 VB1-050 对于所有症状的 MF 值均大于 2.0，但

在乳房、黑素瘤和卵巢细胞系等中，却不限于此，而观察到最强的活性。相比之下，正常细胞的反应性通常低于那些在癌细胞上见到的。在乳房和前列腺细胞系中的 VB1-050 的平均表达是在癌细胞系上的 9 倍以上。肾脏和肺细胞系是两个例外，但它们的 MF 值仍低于相应的癌细胞类型。MF 值是在各症状中，由所有细胞系中相对于对照抗体的中荧光强度的平均增加的倍数的总和计算得到的平均。MF 值为 0 表明相对于对照抗体而言，没有可测量的反应性。

#### **实施例 4: 正常组织微阵列**

测试 VB1-050 对流动阳性癌细胞系 SKBR-3 的作用，以评估适当的组织形式以表明膜的染色以及定义最佳的染色条件。在所有的实验组中，VB1-050 表现出强的核和/或核膜的染色。值得注意的是，细胞离心的载片中显示出在细胞膜上有斑点状的染色，这出现在约 30% 的完整细胞中。在冷冻切片上，除了核和/或核膜的染色（60% 的细胞）和细胞质的染色（10% 的细胞）外，也检测到了类似的细胞膜的染色（10% 的细胞）。在固定的细胞颗粒上，该抗体对核和核膜（70% 的细胞）和细胞质（10% 的细胞）的染色，几乎没有对细胞膜（3-5% 的细胞）染色。由于固定并不对抗原产生影响（可由细胞离心图片机的照片上对固定的细胞的染色证明），在固定的细胞颗粒中明显的细胞膜的染色的丢失可能是由于这些细胞具有比冷冻细胞更小的表面积。在冷冻细胞中可见的更大的膜面积是由于细胞质收缩所致，以及因本质问题，使用冷冻细胞需要更厚的切片。另外，固定后的加工（如嵌入等）可改变表面抗原。

一旦优化的染色条件确定后，即对抗体进行测试，且与在用于正常组织反应性的福尔马林固定的重要正常的低密度（LD）阵列之上的同型对照物(4B5)进行比较。VB1-050 的结果总结于表 3 中。在任何正常的重要组织中均没有发现明显的膜染色。在许多组织中看到强烈的核和/或核膜的染色。类似的，在非重要正常组织中均未看到一致性的细胞膜染色。

但除了测试以外，在接受测试的 1/5 中显示出 30%的膜染色。

### **实施例 5: 肿瘤组织微阵列**

与重要和非重要正常组织筛选不同的是，在一些但不是所有的肿瘤组织中观察到了细胞膜反应性。VB1-050 更多地在结肠、前列腺、胃、卵巢和肝脏中被检测到。最强的染色(2+) 一致地在胃癌中检测到。通常，膜被染色的细胞的百分比随症状和各症状中的组织样品而改变；然而，结肠癌显示出了最高百分比的被染色的细胞。见表 5。从肺癌、直肠癌、皮肤癌和子宫癌的组织样品中没有发现染色。

### **实施例 6:由流式细胞仪和共焦显微镜对 VB1-050 结合及内化的评价:**

使用 VB1-050 和两个对肿瘤细胞系 A-375 显示强反应性的对照抗体 (5E9 和 MA-103)来评价 VB1-050 的内化。代表性的实验示于表 6。在不同的温度下的 VB1-050 结合结果与内化抗体 5E9 的没有区别。在 37°C 下 60 分钟后，结合于膜上的 VB1-050 从细胞表面消失，且中荧光强度减少了 61.8%。在 37°C 下的温培时间的增加与继续减少的中荧光强度有关，但是在较慢的速率下而增加的。到 120 分钟时，中荧光强度已减少了 69.6%。显示细胞表面结合的流式柱状图见于图 3。

为了确认结合于细胞表面的 VB1-050 是否被内化到 A-375 细胞或从质膜脱落，通过借用激光扫描共焦显微镜观察直接观察荧光分布以及细胞内染色，对经抗体处理的细胞作进一步评价。与 MA-103 和 5E9 相似，用 VB1-050 在 4°C 下温培 60 分钟的 A-375 细胞显示出荧光标记的圆周表面分布 (图 4A)。将 VB1-050 抗体结合的细胞加温到 37°C 揭示了用内化的抗体在 60 分钟内的强的细胞内染色。见图 4B。

### **实施例 7: 结合亲和力状态**

影响抗体-抗原复合物的最为重要的因素是抗体对其抗原的亲和力。

该结合亲和力是这些反应物的恒定性能，表达为平衡常数(K)，定义为结合/解离的比率或  $K_A/K_D$ 。对于给定的抗体，观察到的亲和力的不同与解离( $K_D$ )的相关程度是高于与结合( $K_A$ )的相关程度，因此，选择  $K_D$  来测量 VB1-050 的亲和力。

使用流式细胞方法来确定抗体亲和力 [Benedict, C.A. 等(1997) "Determination of the binding affinity of an anti-CD34 single-chain antibody using a novel, flow cytometry based assay" J. Immunol. Methods 2001, 223-31]。简言之，用不同浓度范围的 VB1-050 温育 A-375 细胞在足够时间内以获得平衡。然后，细胞经洗过并用生物素偶联的抗人 IgG 二抗体处理。然后用流式细胞仪检测结合了抗体的细胞以分析肿瘤细胞。确定的中荧光强度的倒数作为抗体浓度的倒数的函数，以通过 Lineweaver-Burk 方法作图 [Lineweaver, H. 等(1934) "The determination of enzyme dissociation constants" J. Am. Chem. Soc. 56, 658] 确定  $K_D$ 。

VB1-050 和 A-375 之间相互作用的  $K_D$  值确定为  $4.90 \times 10^{-8} M$ 。

### **实施例 8：改造和测试 De-Bouganin 免疫毒素**

#### **1) 改造 VB6-050**

将由 *EcoRI* 和 *PvuII* 对 PelB-V<sub>H845</sub>-C<sub>H</sub>-F-de-bouganin/pSV73 质粒的消化获得的 PelB-V<sub>H</sub>-PvuII 插入片段连接到由相同酶预消化过（之前经改造的含有 PelB 前导体而无信号肽序列 PelB(-S)的内含物表达）的 PelB(-S)-V<sub>H050</sub>-C<sub>H</sub>-F-de-bouganin/psV73 载体中。通过连接反应转化的 10F 受态细胞，并在氨比西林盘上被选择。通过绘制限制性位点来筛选菌落以确定含有 PelB-V<sub>H050</sub>-C<sub>H</sub>-F-de-bouganin 插入片段的克隆。

PelB(-S)-V<sub>L050</sub>-C<sub>L</sub> 片段用 *EcoRV* 和 *XhoI* 消化，并连接到由相同酶预消化过的 SpeI-de-bouganin-PelB-V<sub>L845</sub>-C<sub>L</sub>/psV73 载体中。然后，通过连接反应转化 10F 受态细胞，并置于含有氨比西林的 LB-琼脂盘上。通过绘制限制性位点来筛选菌落以确定含有 SpeI-de-bouganin-PelB-V<sub>L050</sub>-C<sub>L</sub> 插

入片段的克隆。然后使用 *EcoRV* 和 *XhoI* 限制性位点将 *SpeI*-de-bouganin-PelB- $V_{L050}$ - $C_L$  插入片段克隆到 pING3302 质粒。*PelB*- $V_{H050}$ - $C_H$ -F-de-bouganin 片段用 *EcoRI* 和 *SpeI* 消化,并连接到由产生 VB6-050 插入片段的相同酶预消化过的 *SpeI*-de-bouganin-PelB- $V_{L050}$ - $C_L$ /3302 载体上。然后,含有 VB6-050 插入片段的质粒经分离并用于转化 E104 细胞。

## 2) 小试表达研究

经转化的含有 VB6-050 的 E104 细胞在含 30mL 的 TB 培养液 (1% 接种体) 在 250 mL 振动烧瓶中于 37°C, 225rpm 下振动繁殖约 5 小时,直到光学密度 (O.D. 600 nm) 达到 2。此时,用最终浓度为 0.1% 的 L- (+) 树胶醛糖诱导培养物,并在 25°C 培养 16 小时。接着,在 14000rpm 下,离心 5 分钟以收集上清液,并以西方墨点法,在非还原的条件下使用抗  $\lambda$  或抗人 K 轻链的抗体确认免疫毒素的存在和大小来进行分析。

## 3) 种细胞库生产

为了生成 MCB,使用采自含有 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的四环素的 LB-琼脂盘上的单一菌落,在 37°C 恒定振动下,培育 5 mL 的 2xYT 和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的四环素。当  $\text{OD}_{600}$  达到~2 时,在 250mL 的振动烧瓶中于 37°C 下,用 1.25 mL 的种子培养物接种到 50 mL 的含 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的四环素的 2xYT 介质。将 1.5 mL 的部分置于冷冻管(cryotube)中,并储存于-80°C。测试三个独立的小瓶如上所述的表达。

## 4) 发酵和纯化

VB6-050 的补料发酵在 15L CHEMAP 发酵器中以 TB 培养液进行。在  $\text{OD}_{600}$  为 20 (中间-log) 时,用混合料 (50%甘油) 和诱导剂 (200 g L-树胶醛糖) 进行诱导。在诱导后 30 个小时,获得培养物,并在 8000rpm 下离心 30 分钟,然后用 CM-琼脂糖柱和螯合-琼脂糖柱及再经体积排斥色谱柱进行纯化。简单说来,上清液经浓缩和用 20mM 磷酸钠 pH6.9  $\pm$  0.1 进行渗透过滤。然后,将经渗透过滤的浓缩的上清液载入 CM-琼脂糖柱,

并用 20 mM 磷酸钠、25 mM NaCl pH  $6.9 \pm 0.1$  平衡。该柱子用 20 mM 磷酸钠, 25 mM NaCl pH  $6.9 \pm 0.1$  洗。然后用 20 mM 磷酸钠和 150 mM NaCl pH  $7.5 \pm 0.1$  洗脱结合的 VB6 Fab-de-bouganin 融合蛋白。再将 CM-琼脂糖洗脱液调节到最终浓度为 0.25% 曲拉通-X100, 并载入带电荷的螯合-琼脂糖柱。然后, 螯合-琼脂糖柱由 3 种不同的清洗缓冲剂清洗, 首先是 20mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, 0.25% 曲拉通-X100 pH  $7.5 \pm 0.1$ , 然后是 20 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl pH  $7.5 \pm 0.1$  和再是 20 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, 10 mM 咪唑 pH  $7.5 \pm 0.1$ 。结合的 VB6 Fab-de-bouganin 融合蛋白经 20 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, 250 mM 咪唑 pH  $7.5 \pm 0.1$  洗脱, 并收集 2mL 的流分物。确定各流分物在  $A_{280}$  nm 的吸收率, 并收集含有原料的流分物并载入体积排斥色谱柱 S200, 以获得约 80% 的纯度。该过程中各步骤的样品均用西方墨点法分析, 分析用到抗 K 的抗体。最后用胶体蓝染色确定经体积排斥色谱柱后的纯度。

#### 5) VB6-050 的生物活性

人黑素瘤 A-375、人 T 细胞 Daudi、人卵巢 SK-OV-3、人胰腺 Panc-1、人乳腺 SKBR-3 和 MB-435S 以及人结肠 Colo-320 细胞系分别在它们各自的基质中按照 ATCC 协议生长。在 30-40% 的饱和度下获得的细胞具有生存能力大于 90%。

##### a) 结合活性

使用流式细胞仪展示分别使用抗原阳性细胞系 SKBR-3、A-375 和 SK-OV-3, 以及抗原阴性细胞系 Panc-1、Colo-320 和 Daudi 来使纯化的 VB6-050 保留结合的特异性。使用抗 de-bouganin 的抗体检测结合。简言之, 待测试的构建体用  $0.45 \times 10^6$  个癌细胞在冰上培育 1.5 小时。经清洗后, 用兔抗 de-bouganin (1/100) 在冰上 1 小时检测细胞表面的结合反应性。细胞经清洗并用 FITC-偶联的抗-兔 IgG 在冰上培育 30 分钟。然后, 清洗细胞, 并再悬浮于含 5% FCS 的碘化丙啶的 PBS 中, 供流式细胞仪测定 Fab 结合之用。

### **b) 竞争分析**

饱和曲线通过用浓度在 10-750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内增加的 VB6-050 与抗原阳性细胞培育而生成的。如前所述那样使用流式细胞仪测定结合的 Fab-de-bouganin。然后，对应于饱和点的 Fab-de-bouganin 的浓度用抗原阳性细胞在增加浓度的亲本 IgG 抗体存在下培育。结合的 Fab-de-bouganin 的减少由流式细胞仪测量。4B5 IgG 被用作阴性对照。

### **c) 细胞毒性分析**

VB6-050 的细胞毒性通过 MTS 分析测量。简言之，抗原阳性和抗原阴性细胞以每孔 1000 个细胞进行下种，并在 37°C 下培育 3 小时。接着，改变 VB6-050 的浓度，向细胞中加入 de-bouganin，5 天后，确定细胞生存能力。

## **结果**

### **1) 在 pING3302 表达载体中 VB6-050 的改造和小试表达**

为第一个尝试生产 Fab-de-bouganin 蛋白质，载体被改造为两个分离的构建体，其中，Fd 部分融合到 de-bouganin 和轻链。每个链的表达通过 PelB 前导序列 PelB(-S) 中的信号肽的缺失而导入内含体中。然而，在内含体中 Fd-de-bouganin 蛋白质的表达的缺少以及成功的 VB6-845 可溶性表达阐释了对 VB6-050 可溶的 Fab-de-bouganin 构建体的重新改造。为了减少重新改造的时间，并基于可行性，限制酶被用于将 Fd-F-de-bouganin 和  $V_L-C_L$  片段连接到含有信号肽的 PelB 前导序列。

对 050 的 Fd 和轻链的分析分别揭示了重链和轻链中 *EcoRI*, *PvuII*, *EcoRV* 和 *XhoI* 所处的限制性位点，从而允许在没有 PCR 反应下使用 VB6-845 中间的构建体来重新改造 VB6-050。为此，通过使用 *EcoRI* 和 *PvuII* 限制性位点，并连接到事先用相同酶预消化的 PelB(-S)- $V_{H050}$ - $C_H$ -F-de-bouganin 上 (图 5A)，可获得具有 PelB- $V_{H845}$ - $C_H$ -F-de-bouganin 的前导肽的 PelB 插入片段。类似的，PelB(-S)- $V_{L050}$ - $C_L$ /pSV73 质粒由 *EcoRV* 和 *XhoI* 消化，且插入片段克隆到

事先用 *EcoRV* 和 *XhoI* 预消化的 *SpeI*-de-bouganin-PelB- $V_{L845}$ - $C_{Lk}$  载体。接着，使用 *EcoRI* 和 *XhoI* 限制性位点将该插入片段 PelB- $V_{L050}$ - $C_L$  插入到 3302 质粒中（图 5B）。然后，PelB- $V_{H050}$ - $C_H$ -F-de-bouganin 片段通过 *EcoRI*-*SpeI* 限制性位点而连接，从而在 3302 DNA 质粒中产生 VB6-050 插入片段。最后 3302 DNA 质粒再转化到 E104 细胞（图 5C 和 5D）。

在非还原的条件下对 VB6-050 进行的西方墨点分析表明，用抗 K 轻链的抗体探测出了全长的蛋白质（图 6）。此外，VB6-050 的表达水平与用作参考的 VB6-845 相似。未经诱导的 E104 培养物上清液的西方墨点揭示了没有对应的条带，这说明这些蛋白质被特异性地以相应的抗体探测到（图 6，泳道 4）。另外，在各克隆中，也获得了在 VB6-845 中观察到类似的降解产物的谱。

## 2) VB6-050 的纯化

对产自 15 升发酵器中的 VB6-050 进行了纯化。用西方墨点对纯化过程中取自各步骤的等量样品进行了分析，以评估各柱的回收率（图 7A）。免疫印迹用抗人 K 轻链培育。在浓缩和渗过滤的步骤中的渗透物，没有观察到可检测的产物（图 7A，泳道 2 和 4）。经渗过滤的材料，以 1/10 稀释，载入 CM-琼脂糖柱（图 7A，泳道 5）。西方墨点分析显示，CM 洗脱物（图 7A，泳道 8）包含了全长的 VB6-050 和可能的降解的 VB6-050 片段。泳道 9 的镍柱的流经物显示大多数 VB6-050 和其它产物结合到柱上。然后，将泳道 13 的  $Ni^{2+}$  洗脱物载入 SEC 200 体积排斥色谱，以从降解的片段分离出完整的 VB6-050（图 7A，泳道 14 和图 7B，泳道 2）。

## 3) 由流式细胞仪检测 VB6-050 的蛋白质结合

对于 VB6-050，根据各抗体谱的数据选择抗原阳性和抗原阴性细胞系。通过流式细胞仪用抗 bouganin 的抗体检测出了结合的

Fab-de-bouganin。如所期望的，在用抗原阴性细胞系培育后，用流式细胞仪未检测出有结合。相反，在用抗原阳性细胞系培育后，检测到了结合的 Fab-de-bouganin。此外，抗原阳性细胞用在 0 to 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内的多种浓度的 Fab-de-bouganin 蛋白质进行了培育，并通过流式细胞仪确定结合活性。由此生成滴定曲线（图 8）。以确定的中荧光强度的倒数作为抗体浓度的倒数的函数作图，并通过 Lineweaver-Burk 方法[Lineweaver, H. 等(1934) "The determination of enzyme dissociation constants" J. Am. Chem. Soc. 56, 658]确定  $K_D$ 。作图产生了一条直线，且  $K_D$  可由曲线的斜率计算出。离解常数  $K_D$  由以下方程确定： $1/F = 1/F_{\text{max}} + (K_D/F_{\text{max}})(1/VB6)$ ，其中， $F =$  扣除背景的中荧光强度， $F_{\text{max}}$  由图中计算得到（图 8）。Fab-de-bouganin 的饱和点由饱和曲线确定，并用于使用了亲本抗体的竞争分析。VB6-050 的饱和点，250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，用抗原阳性细胞在其相应亲本 IgG 范围由 0-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  增加的条件下进行培育。使用抗 bouganin 的抗体，通过流式细胞仪检测出了结合的 VB6-050。如所期望的，亲本 IgG 争夺了对 Fab-de-bouganin 蛋白质的结合。抑制 50% 的结合的 Fab-de-bouganin 所需要的 IgG 的浓度被确定为 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。（表 7）

#### 4) VB6-050 蛋白质的细胞毒性

用浓度范围在 1 nM 到 1  $\mu\text{M}$  的不同浓度的 VB6-050 与阴性和阳性抗原细胞系培育。培育后 5 天，计算出 VB6-050 的  $IC_{50}$  值为 400 nM（图 9）（表 7）。与之相比的，用抗原阴性细胞系未能确定出  $IC_{50}$ 。

## 结论

选自 Hybridomics 和 Immunomine™ 平台的 VB1-050 IgG 被改造成可溶的 Fab-de-bouganin 融合蛋白质，其含有经弗林蛋白酶（furin）可裂解的连接体而基因连接到  $V_H-C_H$  区的 de-bouganin。数据证实了由 IgG 衍生的 Fab-de-bouganin 形式适合于可溶的表达，并使得下游过程易于进行。一旦经纯化，流式细胞仪数据显示出 VB6 形式的谱数据符合亲本 IgG，

这说明特异性和选择性得以保留。此外，IgG 与 VB6 融合蛋白质的竞争说明两个片段都结合到相同抗原。计算出的 VB6 形式的亲和力在微摩尔级范围内，导致  $IC_{50} \geq 280$  nM。

### **实施例 9: 抗原识别**

#### **VB1-050 Ag 的初步表征**

在去糖基化后，VB1-050 在结合上显示出 58.62% (P-值 0.008) 的增加。该在去糖基化后观察到的抗原结合的增加表明，多糖部分可能部分地掩盖了细胞表面的抗原位点，而去糖基化可能是识别抗原的关键步骤。

#### **免疫沉淀**

用 N-聚糖酶对等量的分别取自四种阳性细胞系:MCF-7、MDA-MB-435S、A-375、HepG2，和三种阴性细胞系:Panc-1、Daudi、C-33A 的细胞膜制剂进行去糖基化，并用 40  $\mu$ g 的 VB1-050 和 4B5-IgG 回转。上述过程均是在模拟体内环境的条件下，以及有蛋白酶抑制剂存在下进行。免疫复合物经离心，并用 RIP-A 溶解缓冲剂清洗，及用 0.2M 甘氨酸 pH 2.5 洗脱。

#### **基于凝胶的分析和西方墨点**

由上述所有细胞系获得的免疫沉淀物暴露于样品制备物的还原的和非还原的条件下，然后进行 SDS-PAGE 和西方墨点分析。所得墨点用 4B5-IgG 和 VB1-050 同时探测，以及相应的第二抗体偶联到 HRP 上，从而通过化学发光显示出了经免疫沉淀的蛋白质。在所有细胞系的 1D-PAGE 上，检测出了位于 VB1-050 的免疫沉淀物的约 50 kDa 的条带，2D-PAGE 未产生任何结果。4B5-IgG 未检测出任何条带。由于用传统的方法未显示出任何不同表达的抗原，于是探索出另一种用于抗原识别的方法。

**先后使用 ProteomeLab™ PF-2D 和 nano-ESI-MS/MS 得到的 HTP-抗原 ID**

## HepG2, MCF-7, Panc-1 和 C-33A 的 PF2D 分级

由细胞膜制备物获得的预分级的 VB1-050 免疫沉淀物通过高速离心清除所有的颗粒物质。清澈的上清液用初始 (Start) 缓冲剂平衡, 并在第一维的色层聚焦柱上分级。在 pH = 7.4-7.6 洗脱的峰值流分用溶剂 A (0.1%TFA)以 1:4 的比率平衡, 并在 HPRP 柱上分级, 并用到含有微量 TFA 的浓度梯度在 0-100%范围的乙腈。

通过在色层聚焦柱上的分级 (CF), HepG2 和 MCF-7 显示出单一的在 pH 7.4-7.6 洗脱出的宽峰含有两个流分 (构成# B6 和 B7), 分别出现在 68 分钟和 65 分钟。另外, 还在图 10A 和 B 中观察到, 从 HPRP 柱洗脱出的 HepG2 和 MCF-7 的膜显示出不同的分离谱, 且完全依赖于 VB1-050 反应性抗原的存在。这两个峰在阳性细胞系中显示出有差异的调节, 而这在阴性细胞系 Panc-1 和 C-33A 的膜 (图 10A 和 B) 中可忽略或完全不存在。对在阳性细胞系 (MCF-7 和 HepG2) 中的蛋白质峰的分析表明, 从 RP-HPLC 柱洗脱的峰的保留时间分别为 15 和 18 分钟。这些峰在抗原-阴性细胞系 (Panc-1 和 C-33A) 中未观察到。相反, 在阴性细胞系中观察到了在稍早于 12 分钟时洗脱出的单峰。

### 使用 ProteoVue™/DeltaVue™软件进行的分级分析

将由 HPRP 柱获得的色谱谱图输入到 ProteoVue™文件中, 转化成可接受的形式, 再用于在 DeltaVue™上进行最后分析。这些分析结果经合并用于来自阳性 (HepG2 和 MCF-7) 和阴性 (Panc-1 和 C-33A) 细胞系的抗原分级, 并用 ProteoVue®软件编排处理, 以产生各细胞系的完整的膜蛋白图。然后在 DeltaVue™软件上生成有差异地调节的蛋白质的比较谱。两种细胞系的分级的色谱谱图由峰转化为带状图, 使得有差异地表达的区域更易于识别。阳性细胞系中的特别是差异表达的峰/带可聚焦以获得更好的分辨率和分析。在各实验中获得的阳性和阴性图的重叠显示出仅在阳性细胞系 (HepG2 和 MCF-7) 中可见到蛋白质的过度表达, 这些流分被用作肽提取之用。

### 由峰值流分提取肽

用测序级胰蛋白酶进行胰蛋白酶消化，通过 20 小时的肽提取过程，最终获得肽用配备了纳米源且工作流速为 20-50 nL/min 的 QSTAR Pulsar-I (ESI-qTOF-MS/MS) 进行分析。将肽离子化，并检测二价、三价或四价的分子，然后对应到它们相应的质量。在条件允许的情况下，也进行被识别的蛋白质的重新测序。从阳性和阴性细胞系中同时提取肽，以确保抗原是正确的。由质谱获取的肽的质量被直接用于识别抗原，所依据的是由蛋白质数据库获得的 MOWSE 分数。这可通过 MASCOT 搜索引擎获得。

在胰蛋白酶消化后由在 15-18 分钟洗脱出的所有四个样品 (MCF-7, HepG2, Panc-1 和 C-33A) 的峰值提取肽，并进行 MS 分析。除了在 15 和 18 分钟洗脱出的流分外，在 12 分钟从阳性和阴性细胞系洗脱的流分也同时进行处理。图 11-14 示出了由细胞系获得的肽的 TOF-MS 扫描结果。如图 15 所示，从两个阳性细胞系中确认出了一种单一对应于葡萄糖转运体 8 的蛋白质，而在阴性细胞系中未检测出。两峰 (15 对 18 分钟) 之间在洗脱上的差别可归咎于糖基化或其它翻译后改性上的变化。

### 质谱分析

以两种方法进行肽的分析：

- 所有回收的和重新构建到它们的正确质量的肽均直接用于肽质量指纹技术分析步骤，以获得蛋白质的 ID。
- 高丰度的和很好离子化的肽被进一步进行 MS/MS 离子碎片化，其中，y'和'b'离子被用作推导它们的主要结构。然后在蛋白质数据库中检索这些序列的同源物，以获得蛋白质的 ID。

将肽离子化，并在 LC-MS/MS 系统上检测二价、三价或四价的分子，这不同于在由矩阵辅助的离子化的如 MALDI 系统上检测单价离子。具有电荷差异的肽随后在质量重建步骤，被归属于它们各自对应的质量。这些肽的质量随后用基于矩阵科学的 mascot 搜索引擎进行直接分析以获得

抗原 ID。由质谱获取的肽的质量被直接用于识别抗原，所依据的是由蛋白质数据库获得的 MOWSE 分数。这可通过搜索引擎如 MASCOT, SEQUEST, 和 Prospector 获得。由于 QSTAR-pulsar-I 的购买包括了从 Pepsea 服务器得到大多数近期蛋白质数据库新增内容的许可，且又与 MASCOT 兼容，因此选用该搜索引擎于所有的蛋白质检索。

图 15, 16 和表 8 给出了回收的肽和它们在葡萄糖转运体 8 中绘制成的序列位置。所有的具代表性的肽均通过重新测序获得。图 17 确认了葡萄糖转运体 8 为抗原。

四个肽的 MS/MS 片段化(1401.54 - 466.600000, 3+; 1070.785448 - 536.400000, 2+; 1998.272862 - 667.098230, 3+; 1176.185448 - 589.100000, 2+)产生了示于图 18-21 的碎片离子，绘制成葡萄糖转运体 8 的肽。由于这些 2 种肽均在 TOF-MS 中检测出，除源自质谱指纹法的肽外，这些肽也被用作 MS/MS 离子片段化。安装在纳米源上的离散纳喷雾头被用于此用途。碰撞能量为 48V，气帘气体和 CAD 气体分别维持在 25 和 6，样品循环 1.667 分钟（100 个循环）以获得稳定的质谱离子片段化。源自谱图的肽与葡萄糖转运体 8 的序列明显吻合，因此被视作主要的命中。离子片段化的数据进一步确认了葡萄糖转运体 8 为 VB1-050 的同源抗原。

肽的质量指纹和抗原-阳性流分的 MS/MS 片段化解释了葡萄糖转运体-8/GLUTX1/SLC 2A8 基因产物是 VB1-050 的同源结合抗原。葡萄糖转运体-8 是约 50 kDa 的二型跨膜蛋白质，在细胞内具有 N-末端。在回收的的肽中，获得了 34%的序列覆盖率。由流动选择为阳性的细胞系表现出在免疫沉淀后抗原的存在。对两个肽的 MS/MS 分析为 1070.785，表现为二价分子(536.40000, 2+); 1401.54，表现为三价分子(466.60000, 3+)，分别确认了两个肽序列，SLASVVVGVIQ (292-303)和 KTLEQITAHFEGR (466-477)。与对应于葡萄糖转运体-8 的蛋白质序列明显吻合。

由 MCF-7 回收的另外两个肽的 MS/MS 测序, 1176.3547 和 1997.9992, 与 GLUT8 的相应的肽具有 68.2%的序列同源性，在 7 个位置，即 7, 10,

12-15, 18 发生了氨基酸的改变。该并入的改变对于由 Shin 等报道的在 12, 13 的位置从 LL 到 AA 的改变 (2004, J. Neuro. Res. 75: 835), 这导致 GLUT8 从细胞溶质到细胞质膜的定向。

尽管本发明已通过目前被认为是优选的实施例加以了说明, 但应当理解本发明并不限于上述揭示的例子。相反, 本发明还包括在权利要求所表现的本发明的精神和范围中的各种变化和等同的情况。

正如各单独的出版公开物、专利和专利申请被具体和单独地完全引用, 在此, 所有的出版公开物、专利和专利申请均被全文引入作为参考。

表 1: CDR 序列

## CDR 序列

		VB1-050		
		L-链	H-链	
CDR1	RASQDISNYLA	SEQ ID NO:1	NYAMS	SEQ ID NO:4
CDR2	AASSLHS	SEQ ID NO:2	AITPSGGSTNYADSVKG	SEQ ID NO:5
CDR3	LQYSTYPIT	SEQ ID NO:3	VPYRSTWYPLY	SEQ ID NO:6

表 2: 肿瘤和正常细胞与 VB1-050 的表面活性的比较

临床症状	代表性的癌细胞系	N <sup>1</sup>	MF <sup>2</sup>	相对排名
乳腺	MCF-7 <sup>c</sup> , MDA-MB-231 <sup>d</sup> , MDA-MB-435S <sup>e</sup>	3	29.9	1
黑素瘤	A-375, SK-MEL-5 <sup>a,b</sup> , SK-MEL-28 <sup>a</sup>	3	22.7	2
卵巢	SK-OV-3 <sup>a</sup> , OVCAR-3	2	21.7	3
前列腺	DU-145 <sup>a,b,f</sup> , PC-3 <sup>a,b,g</sup> , LNCaP <sup>a,b,g</sup>	3	19.6	4
肾	Caki-1 <sup>a</sup> , A498 <sup>a</sup> , ACHN <sup>a</sup>	3	18.4	5
直肠	Sw837, NCI-H630	2	15.2	6
肺	A-549, NCI-H460, NCI-H69	3	14.8	7

肝	SK-HEP-1, Hep-G2	2	14.6	8
结肠	HT-29 <sup>a</sup> , SW480, WiDr	3	13.3	9
子宫颈	HeLa, C-41, C-33A	3	11.8	10
头和颈	SCC-15, SCC-25	2	11.4	11
膀胱	UM-UC-3, T24	2	9.8	12
胃	AGS, NCI-N-87, KATO III	3	9.6	13
胰腺	PANC-1, BxPC-3, MIA PaCa-2	3	7.6	14
子宫内膜	RL-95-2, HEC-1-A	2	7.0	15
正常细胞类型	细胞系			肿瘤:正常
肾	HRE	1	12.5	1.5
肺	NHLF	1	8.7	1.7
内皮	HUVEC	1	5.0	不适用
乳腺	HMEC	1	3.1	9.6
前列腺	PrEC	1	2.1	9.3

<sup>1</sup>N 表示每种症状测试的细胞系的数目。<sup>2</sup>MF: 数值表示各症状中, 从所有细胞系获得的由相对于对照抗体的中荧光强度的增加的平均倍数的总值计算出的平均值。0 值表示相对于对照抗体, 没有可测量的相对反应性。<sup>a</sup>表示由 AntiCancer Inc.提供的常位模型。<sup>b</sup>可进行 GFP (绿色荧光蛋白)-转染的细胞系。<sup>c</sup>Her2/neu<sup>-</sup>, ER<sup>+</sup>. <sup>d</sup>Her2/neu<sup>-</sup>, ER<sup>-</sup>, p53<sup>wt</sup>, ras<sup>wt</sup>. <sup>e</sup>Her2/neu<sup>-</sup>, ER<sup>-</sup>, p53<sup>mt</sup>, ras<sup>wt</sup>. <sup>f</sup>雄激素-响应的. <sup>g</sup>雄激素-不响应的。

表 3: VB1-050 的福尔马林固定的重要正常组织的 LD 阵列

组织	膜染色	评分范围 <sup>1</sup>
脑	无 (0/6)	0
结肠 <sup>2</sup>	无 (0/4)	0
心脏	无 (0/5)	0
肾	无 (0/3)	0
肝	无 (0/5)	0
肺	无 (0/4)	0
胰腺	无 (0/4)	0
胃 <sup>3</sup>	无 (0/4)	0

<sup>1</sup>评分标准基于 0-3+级，0 表示没有染色，且微量少于 1+，但大于 0。分数 1+到 3+表示染色强度的增加，3+为强的深褐色的染色。通常，6 个不同患者的单一样品被筛选。其中，少于 6 个患者被筛选出的表明分数或者是丢失，或者不是有代表性的被染色的组织。括号中的值表明在评分范围内被染色的细胞的百分比。<sup>2</sup>仅使用了相邻的正常组织。<sup>3</sup>5 个中的 4 个为相邻的正常组织样品。

表 4: VB1-050 的 HD 福尔马林固定的正常 TMA

组织	膜染色	评分范围*
肾上腺	无 (0/5)	0
大动脉	无 (0/5)	0
动脉	无 (0/5)	0
前列腺	无 (0/5)	0
脑	无 (0/5)	0
乳腺	无 (0/5)	0
输卵管	无 (0/5)	0
淋巴结(LN)	无 (0/4)	0
肌肉	无 (0/5)	0
卵巢	无 (0/5)	0
垂体	无 (0/5)	0
胎盘	无 (0/5)	0
前列腺	0/5	0
皮肤	0/1	
脊髓	无 (0/3)	0
脾	无 (0/5)	0
睾丸	1/5	1+ (30%)
胸腺	无 (0/1)	0
甲状腺	无 (0/5)	0
输尿管	0/2	0
子宫	无 (0/3)	0

\*评分标准基于0-3+级，0表示没有染色，且微量少于1+，但大于0。分数1+到3+表示染色强度的增加，3+为强的深褐色的染色。通常，8个不同患者中的两个样品被筛选。其中，少于8个患者被筛选出的表明分数或者是丢失，或者不是有代表性的被染色的组织。括号中的值表明在评分范围内被染色的细胞的百分比。

表 5: VB1-050 的 HD 福尔马林固定的肿瘤 TMA

组织	膜染色	评分范围*
膀胱	2/8	2+ (50%)
乳腺	1/8	1+ (90%)
子宫颈	1/8	1+ (30%)
结肠	4/7	1+ (70-90%)
肾	1/8	2+ (40%)
肝	3/6	1+ (80%)
肺	0/6	不适用
卵巢	3/7	1+ (20%)
胰腺	2/8	2+ (30-80%)
前列腺	4/7	1+ (20-60%)
直肠	0/7	不适用
皮肤	0/4	不适用
胃	4/8	2+ (30%)
子宫	0/8	不适用
头和颈	2/8	2+ (30-50%)

\*评分标准基于 0-3+级，0 表示没有染色，且微量少于 1+，但大于 0。分数 1+到 3+表示染色强度的增加，3+为强的深褐色的染色。通常，8 个不同患者中的两个样品被筛选。其中，少于 8 个患者被筛选出的表明分数或者是丢失，或者不是有代表性的被染色的组织。头和颈癌包括咽喉、唇、喉、口、扁桃腺和齿龈表面的癌症。括号中的值表明在评分范围内被染色的细胞的百分比。用粗体表示的癌症症状指示出 VB1-050 的反应性。

表 6:以时间和温度的函数作为抗体结合的流式细胞仪的评核

MAb ID	抗体 <sup>1</sup>	培育 (分钟) 37 <sup>0</sup> C	平均荧光 (MF)	MF <sup>2</sup> 的增加 倍数	% MF <sup>3</sup> 的 减少
VB1-050	VB1-050	- <sup>4</sup>	1041.0±23.0	129.1	-
		60	397.5±5.1	49.2	61.8
		120	317.5±4.1	39.3	69.6
未经内化的 对照	MA-103	-	536.1±31.3	112.8	-
		120	535.5±16.8	113.0	-
经内化的对 照	5E9	- <sup>4</sup>	246±11	60.0	-
		60	53.5±1.5	13.0	78.3
		120	48±4	11.7	80.5

<sup>1</sup> 示出了代表性的实验。<sup>2</sup> MF 增加高于阴性对照, 小鼠骨髓瘤 IgG 或人 IgG (4B5)。<sup>3</sup> 从肿瘤细胞的细胞表面的 MF 降低的百分比。<sup>4</sup>(-) 是在冰上培育 120 分钟的细胞。

表 7: VB6-050的生物学表征

	亲和力 (M)	VB6 饱和浓 度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	IgG 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*	IC <sub>50</sub> (nM)
VB6-008	$1.4 \cdot 10^{-6}$	ND	ND	280

ND: 未确定。 \* 抑制50%的VB6结合的IgG的浓度。

表 8: 回收的肽

观察值	起点	终点	肽	SEQ ID NO:
1998.27	3	22	PEDPSETEPAAPRPGASAPR	12
1151.241	6	15	PSETEPAAPR	13
3140.68	26	56	RVFLAAFAAALGPLSFGFALGYSSPA IPSLQRA	14
2916.29	64	93	RLDDAAASWFGAVVTLGAAAGGVL GGWLVDRA	15
889.04	216	223	RQEAMAALRF	16
2984.32	224	249	RFLWGSEQGWEDPPIGAEQSFHLAL LRQ	17
4263.10	427	463	KEFSSLMEVLRPYGAFWLASAFCIF SVLFTLFCVPEIKG	18
1401.54	466	477	KTLEQITAHFEGR	19
	292	302	SLASVVVGVIQ	20

<110> 维文蒂阿生物技术股份有限公司

<120> 癌症特异性抗体和细胞表面蛋白质

<130> 10241-64

<140>

<141>

<150> US 60/637,448

<151> 2004-12-21

<160> 29

<170> 专利文本 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Ala Ala Ser Ser Leu His Ser  
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Leu Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Ile Thr  
1 5

<210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 4

Asn Tyr Ala Met Ser  
 1 5

<210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 5

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

Gly

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 6

Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 7

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

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

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

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

<210> 8  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 8

gacatcaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgtc gggcgagtc ggacattagt aattatttag cctggtttca gcggaacca 120  
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcacagtaa ggtccaaca 180  
 caattcagcg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgcctacag tatagtactt accctatcac cttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

<210> 9  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 9

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

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

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

Gly Arg Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 10  
<211> 360  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 10

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagac ttggtacagc ctggggggtc gctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagc aactatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120  
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagcg attactccta gtggtggtag taaaaattat 180  
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attcccagaa tacactgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgg gagagtccca 300  
tatagaagca cttggtaccc tttatattgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 11  
<211> 477  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 11

Met Thr Pro Glu Asp Pro Ser Glu Thr Glu Pro Ala Ala Pro Arg Pro  
1 5 10 15

Gly Ala Ser Ala Pro Arg Gly Arg Arg Val Phe Leu Ala Ala Phe Ala  
20 25 30

Ala Ala Leu Gly Pro Leu Ser Phe Gly Phe Ala Leu Gly Tyr Ser Ser  
35 40 45

---

Pro Ala Ile Pro Ser Leu Gln Arg Ala Ala Pro Pro Ala Pro Arg Leu  
 50 55 60

Asp Asp Ala Ala Ala Ser Trp Phe Gly Ala Val Val Thr Leu Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Gly Gly Val Leu Gly Gly Trp Leu Val Asp Arg Ala Gly Arg  
 85 90 95

Lys Leu Ser Leu Leu Leu Cys Ser Val Pro Phe Val Ala Gly Phe Ala  
 100 105 110

Val Ile Thr Ala Ala Gln Asp Val Trp Met Leu Leu Gly Gly Arg Leu  
 115 120 125

Leu Thr Gly Leu Ala Cys Gly Val Ala Ser Leu Val Ala Pro Val Tyr  
 130 135 140

Ile Ser Glu Ile Ala Tyr Pro Ala Val Arg Gly Leu Leu Gly Ser Cys  
 145 150 155 160

Val Gln Leu Met Val Val Val Gly Ile Leu Leu Ala Tyr Leu Ala Gly  
 165 170 175

Trp Val Leu Glu Trp Arg Trp Leu Ala Val Leu Gly Cys Val Pro Pro  
 180 185 190

Ser Leu Met Leu Leu Leu Met Cys Phe Met Pro Glu Thr Pro Arg Phe  
 195 200 205

Leu Leu Thr Gln His Arg Arg Gln Glu Ala Met Ala Ala Leu Arg Phe  
 210 215 220

Leu Trp Gly Ser Glu Gln Gly Trp Glu Asp Pro Pro Ile Gly Ala Glu  
 225 230 235 240

Gln Ser Phe His Leu Ala Leu Leu Arg Gln Pro Gly Ile Tyr Lys Pro  
 245 250 255

Phe Ile Ile Gly Val Ser Leu Met Ala Phe Gln Gln Leu Ser Gly Val  
 260 265 270

Asn Ala Val Met Phe Tyr Ala Glu Thr Ile Phe Glu Glu Ala Lys Phe  
 275 280 285

Lys Asp Ser Ser Leu Ala Ser Val Val Val Gly Val Ile Gln Val Leu  
290 295 300

Phe Thr Ala Val Ala Ala Leu Ile Met Asp Arg Ala Gly Arg Arg Leu  
305 310 315 320

Leu Leu Val Leu Ser Gly Val Val Met Val Phe Ser Thr Ser Ala Phe  
325 330 335

Gly Ala Tyr Phe Lys Leu Thr Gln Gly Gly Pro Gly Asn Ser Ser His  
340 345 350

Val Ala Ile Ser Ala Pro Val Ser Ala Gln Pro Val Asp Ala Ser Val  
355 360 365

Gly Leu Ala Trp Leu Ala Val Gly Asn Met Cys Leu Phe Ile Ala Gly  
370 375 380

Phe Ala Val Gly Trp Gly Pro Ile Pro Trp Leu Leu Met Ser Glu Ile  
385 390 395 400

Phe Pro Leu His Val Lys Gly Val Ala Thr Gly Ile Cys Val Leu Thr  
405 410 415

Asn Trp Leu Met Ala Phe Leu Val Thr Lys Glu Phe Ser Ser Leu Met  
420 425 430

Glu Val Leu Arg Pro Tyr Gly Ala Phe Trp Leu Ala Ser Ala Phe Cys  
435 440 445

Ile Phe Ser Val Leu Phe Thr Leu Phe Cys Val Pro Glu Ile Lys Gly  
450 455 460

Lys Thr Leu Glu Gln Ile Thr Ala His Phe Glu Gly Arg  
465 470 475

<210> 12  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 12

Pro Glu Asp Pro Ser Glu Thr Glu Pro Ala Ala Pro Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Ala Pro Arg  
20

<210> 13  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 13

Pro Ser Glu Thr Glu Pro Ala Ala Pro Arg  
1 5 10

<210> 14  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 14

Arg Val Phe Leu Ala Ala Phe Ala Ala Ala Leu Gly Pro Leu Ser Phe  
1 5 10 15

Gly Phe Ala Leu Gly Tyr Ser Ser Pro Ala Ile Pro Ser Leu Gln Arg  
20 25 30

Ala

<210> 15  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 15

Arg Leu Asp Asp Ala Ala Ala Ser Trp Phe Gly Ala Val Val Thr Leu  
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Gly Gly Val Leu Gly Gly Trp Leu Val Asp Arg Ala  
20 25 30

<210> 16

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 16

Arg Gln Glu Ala Met Ala Ala Leu Arg Phe  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 17

Arg Phe Leu Trp Gly Ser Glu Gln Gly Trp Glu Asp Pro Pro Ile Gly  
 1 5 10 15

Ala Glu Gln Ser Phe His Leu Ala Leu Leu Arg Gln  
 20 25

<210> 18  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 18

Lys Glu Phe Ser Ser Leu Met Glu Val Leu Arg Pro Tyr Gly Ala Phe  
 1 5 10 15

Trp Leu Ala Ser Ala Phe Cys Ile Phe Ser Val Leu Phe Thr Leu Phe  
 20 25 30

Cys Val Pro Glu Ile Lys Gly  
 35

<210> 19  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 19

Lys Thr Leu Glu Gln Ile Thr Ala His Phe Glu Gly Arg



<210> 24  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223>  $\gamma$  引物  
  
 <400> 24  
 ggagccggtg accagggttc cctggcccca 30

<210> 25  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223>  $\gamma$  引物  
  
 <400> 25  
 ctcaccatgg agtttgggct gagctggggt 30

<210> 26  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223>  $\gamma$  引物  
  
 <400> 26  
 ggaggctgag gagacggtga ccagggttcc ctggcc 36

<210> 27  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> K 引物  
 <400> 27

ggctcgagat ggacatgrrr dycchvgykc asctt

35

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

<220>  
 <223> K引物

<400> 28

cccgtcgacc atcagatggc gggaagat

28

<210> 29  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 29

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr  
 1 5 10 15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys  
 20 25 30

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val  
 35 40 45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile  
 50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly  
 65 70 75 80

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

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly  
 100 105 110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu  
 115 120 125

---

Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly  
 130 135 140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile  
 145 150 155 160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val  
 165 170 175

Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu  
 180 185 190

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser  
 195 200 205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro  
 210 215 220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp  
 225 230 235 240

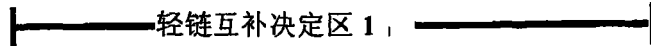
Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys  
 245 250

**VB1-050**

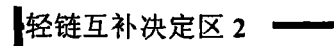
**V<sub>L</sub>** (SEQ ID NOS: 8 和 7)

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC  
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V

ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGT AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG  
T I T C R A S Q D I S N Y L A W F Q



CGG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAC  
R K P G K A P K S L I Y A A S S L H



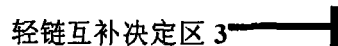
AGT AAG GTC CCA ACA CAA TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC  
S K V P T Q F S G S G S G T D F T L



ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CTA CAG TAT  
T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q Y



AGT ACT TAC CCT ATC ACC TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA  
S T Y P I T F G G G T K V E I K R



**图 1**

**VB1-050****V<sub>II</sub>** (SEQ ID NOS: 10 和 9)

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GAC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCG CTG  
 E V Q L L E S G G D L V Q P G G S L

AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGC AAC TAT GCC ATG AGC TGG  
 R L S C A A S G F T F S N Y A M S W

┌重链互补决定区 1 ─┘

GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCG ATT ACT CCT AGT  
 V R Q A P G K G L E W V S A I T P S

GGT GGT AGT ACA AAT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA  
 G G S T N Y A D S V K G R F T I S R

┌重链互补决定区 2 ─┘

GAC AAT TCC CAG AAT ACA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GTC GAG GAC  
 D N S Q N T L Y L Q M N S L R V E D

ACG GCC GTA TAT TAC TGT GGG AGA GTC CCA TAT AGA AGC ACT TGG TAC CCT TTA  
 T A V Y Y C G R V P Y R S T W Y P L

┌重链互补决定区 3 ─┘

TAT TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA  
 Y W G Q G T L V T V S S

┌

图 2

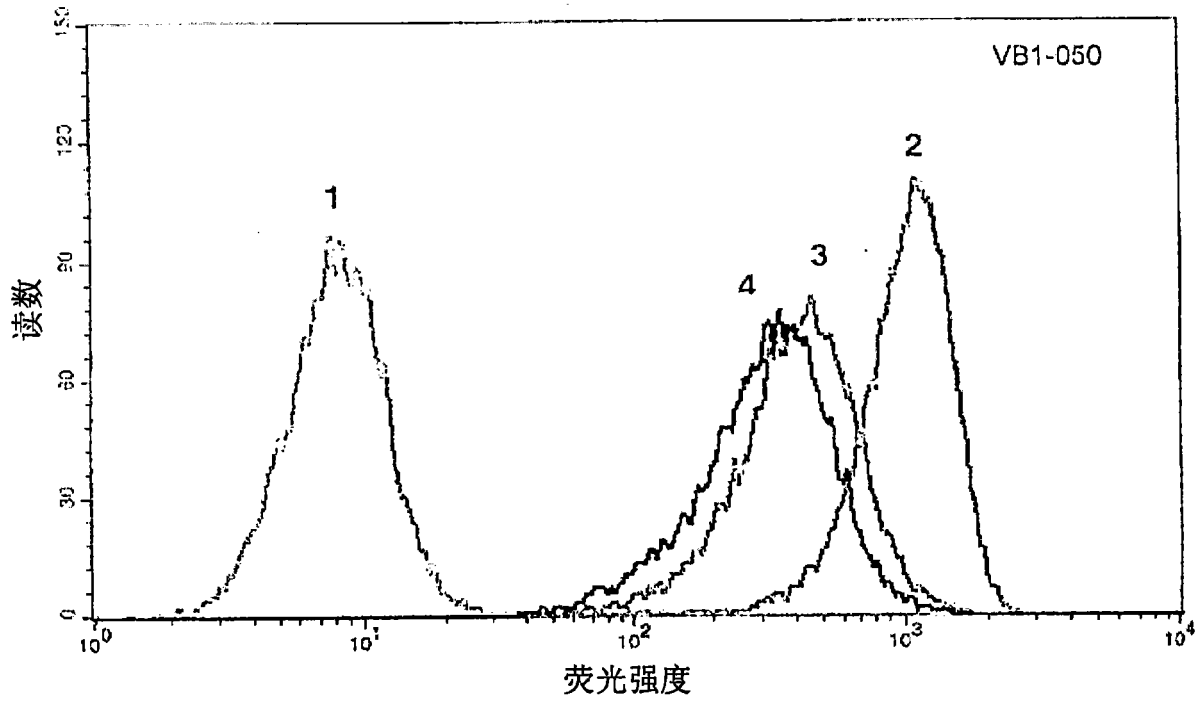


图 3

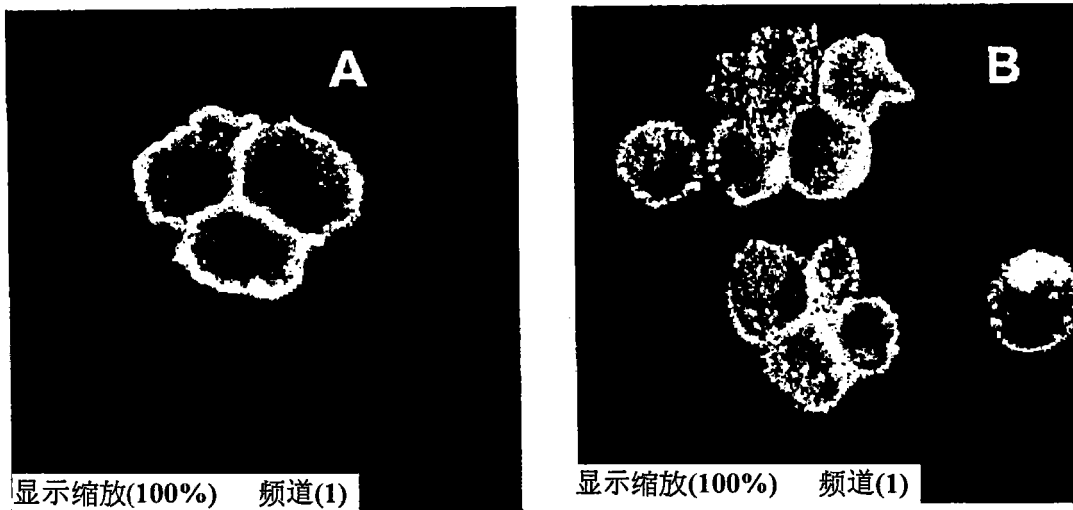


图 4

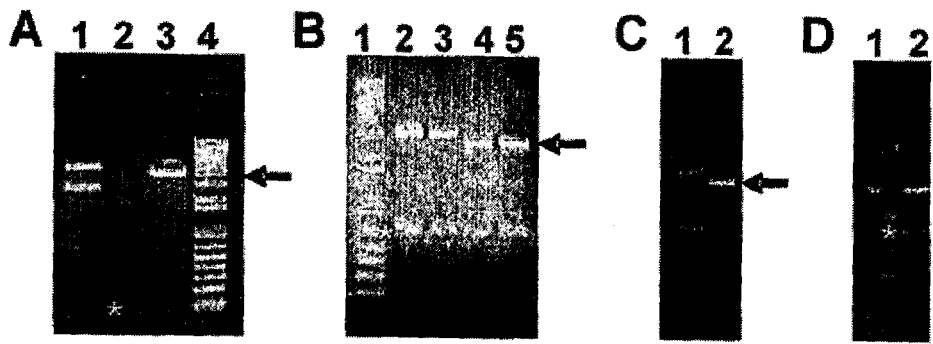


图 5

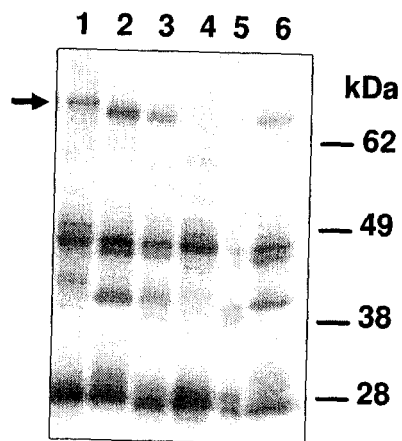


图 6

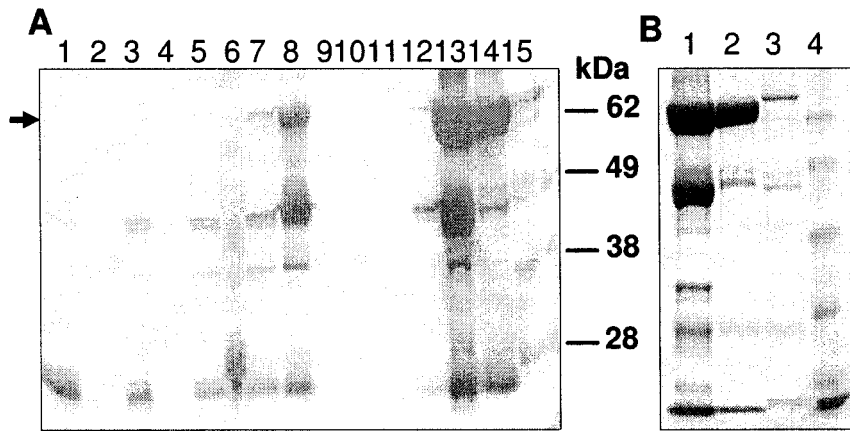


图 7

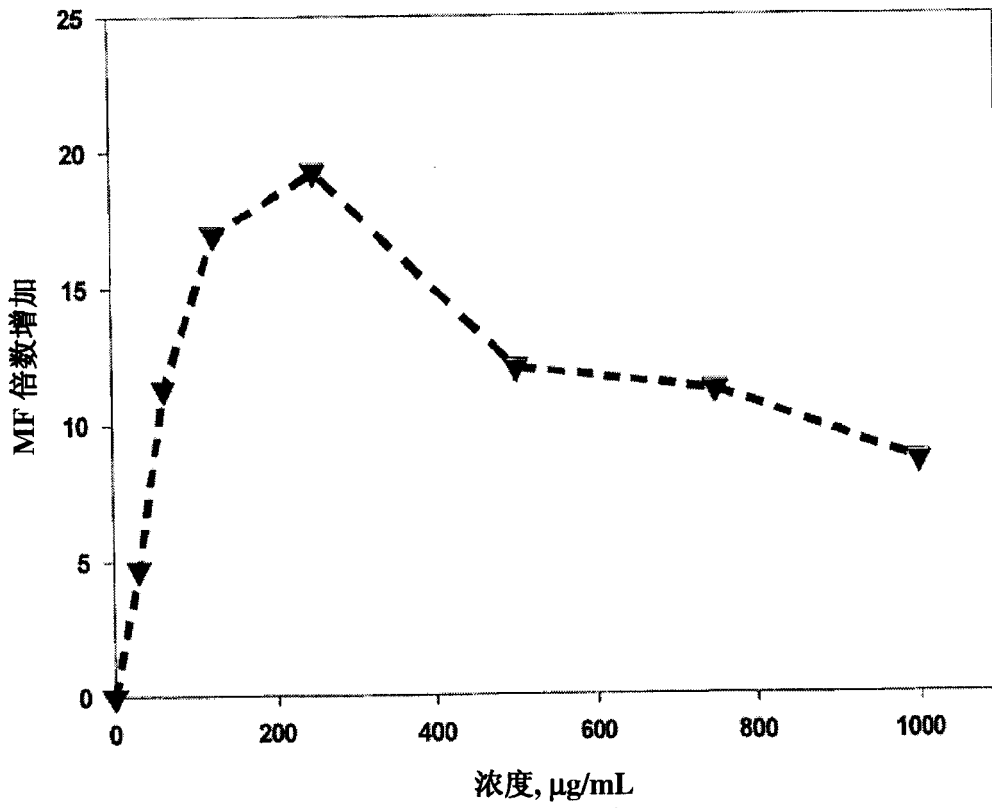


图 8

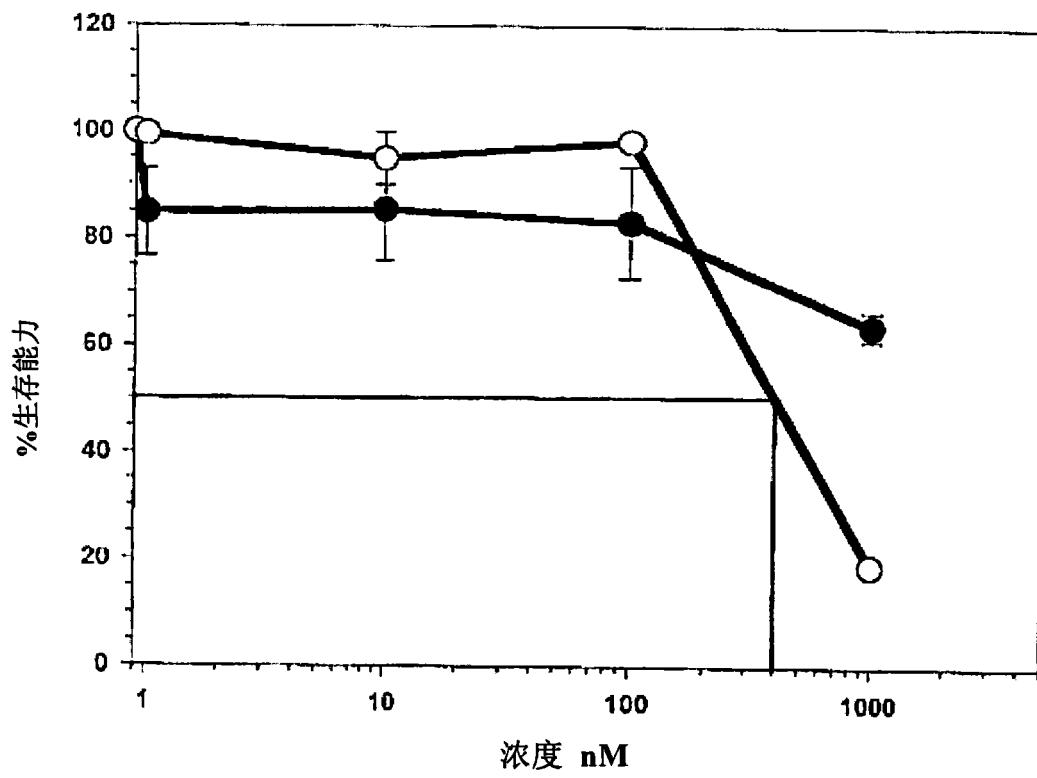


图 9

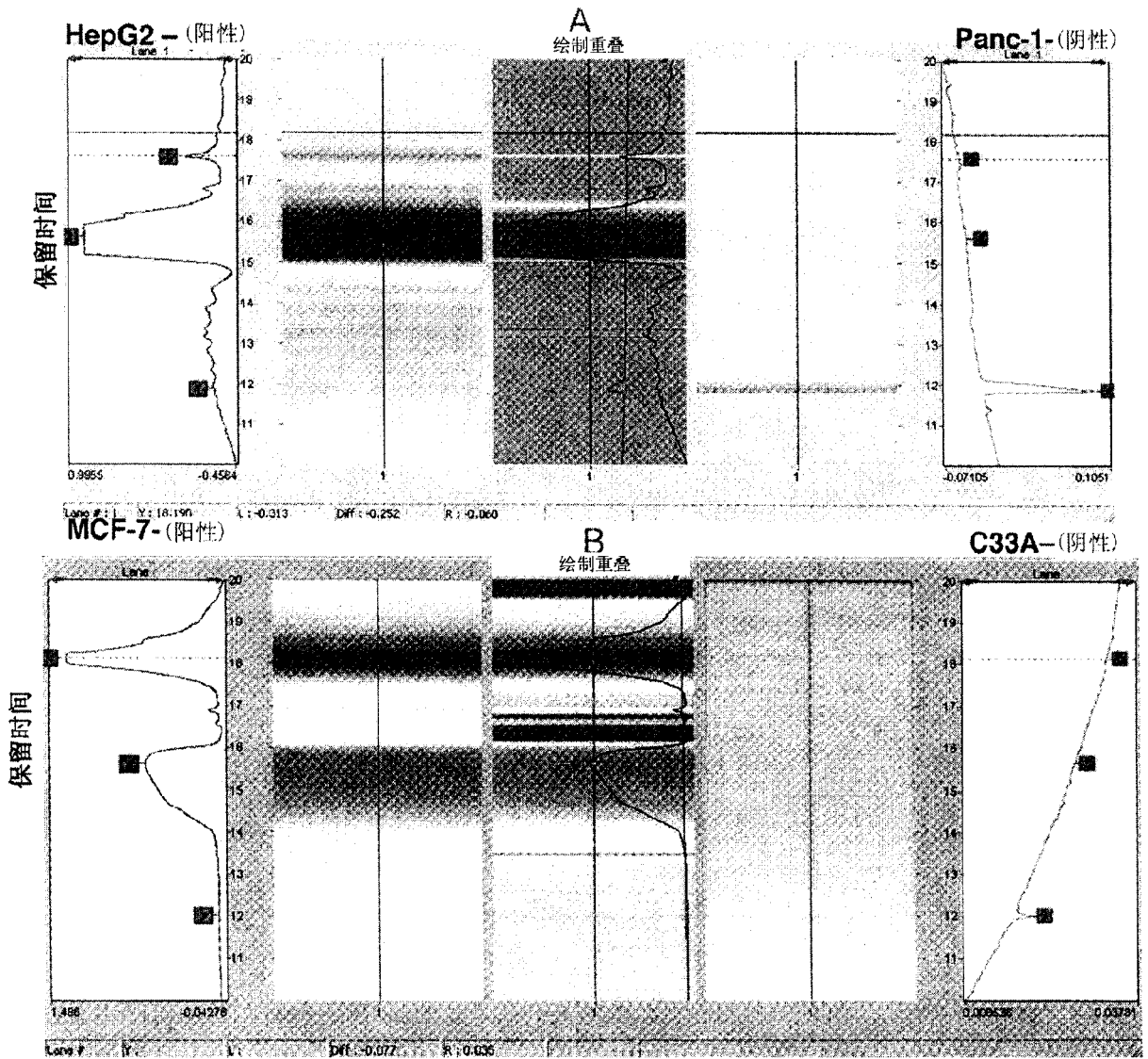
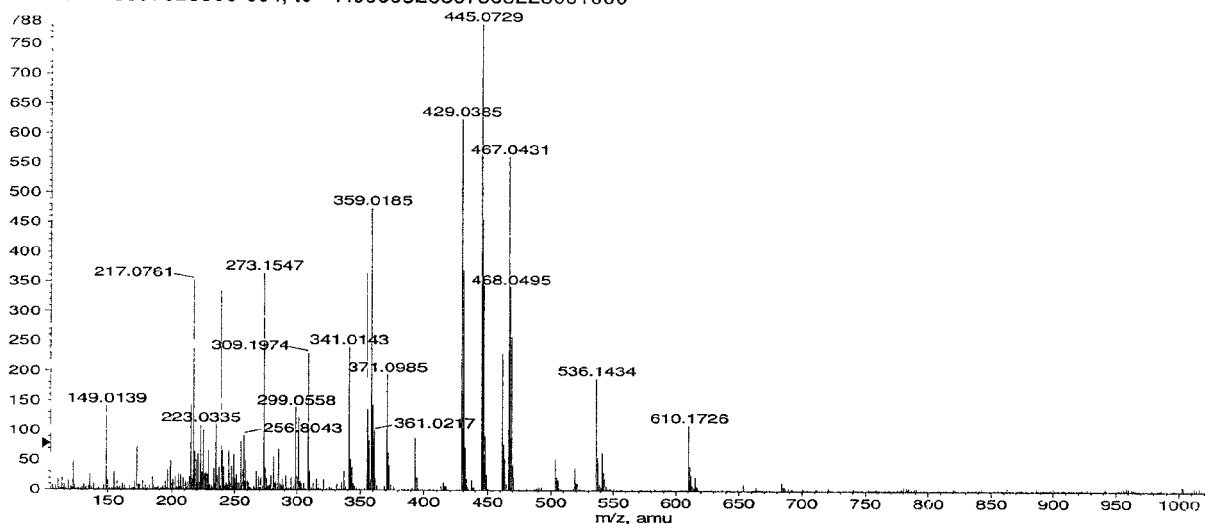


图 10

### TOF MS – VB1-050\_HepG2

+TOF MS: 来自 insol\_HepG2.wiff 的 53 MCA 扫描  
a=3.56443277559762350e-004, t0=-7.08663268973032250e+000

最大 788.0 读数



### VB1-050\_HepG2 的质量重建

+TOF MS 的质量重建: 来自 insol\_HepG2.wiff 的 53 MCA 扫描

最大 2787.0 cps

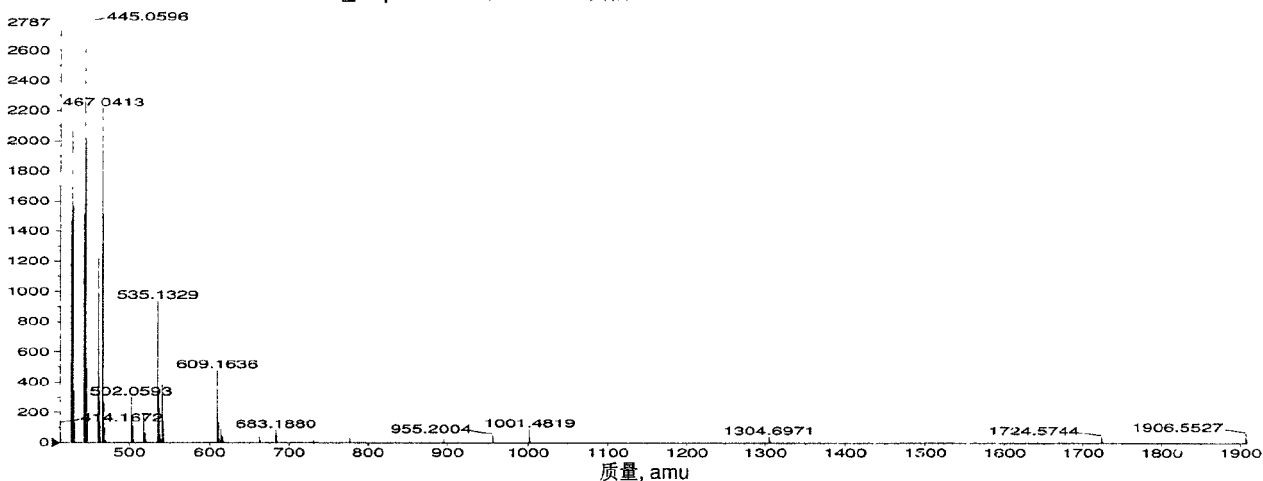
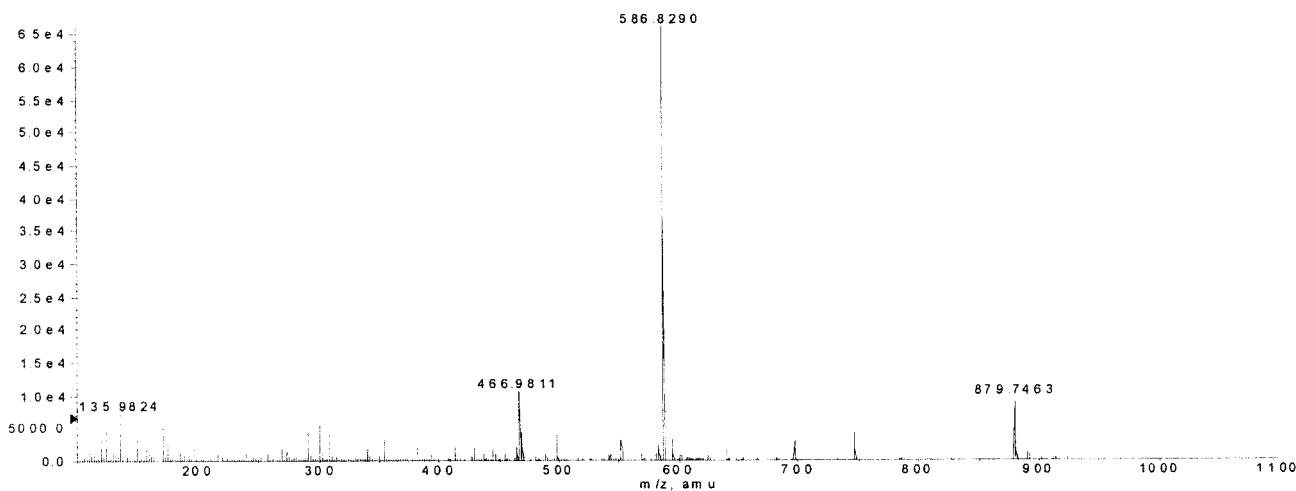


图 11

### VB1-050\_Panc-1的TOP MS

\*TOF MS: 来自VB1-050\_Panc-1.wiff的30MCA扫描  
a=3.56429448729902530e-004, t0=-6.47233171954212590e+000

最大6.6e4读数



### VB1-050\_Panc-1的质量重建

+TOF MS的质量重建: 来自VB1-050\_Panc-1.wiff的30MCA扫描

最大4.2e5cps.

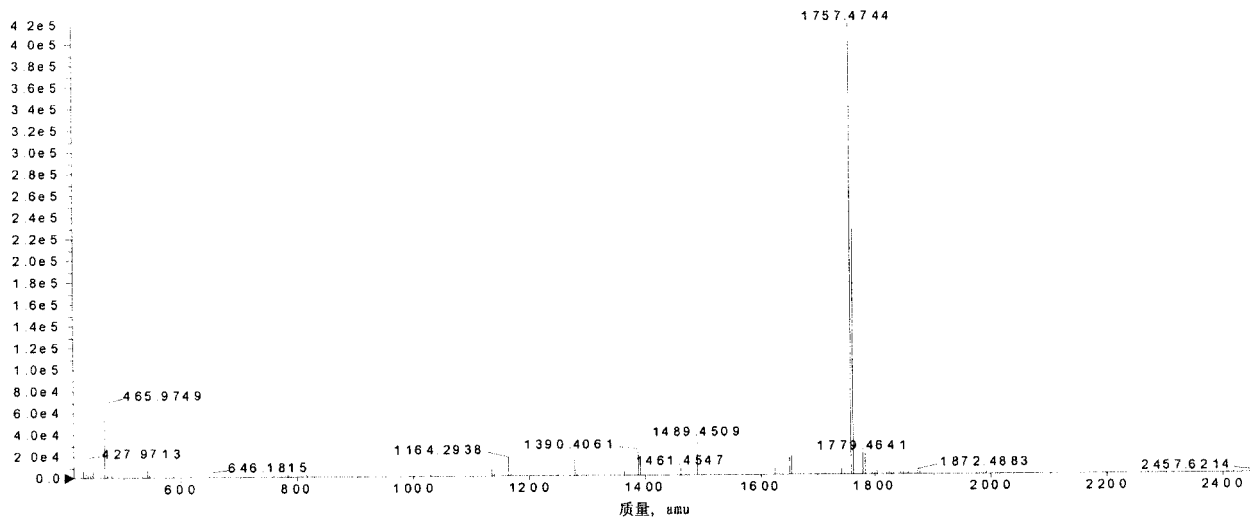
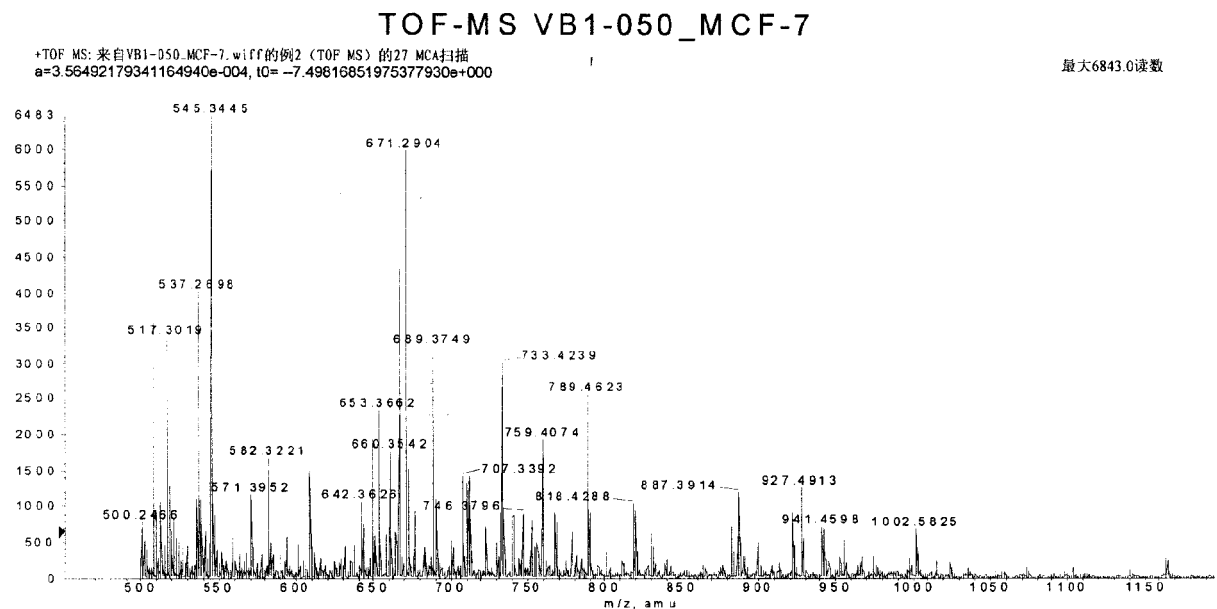


图12



### VB1-050\_MCF-7 的质量重建

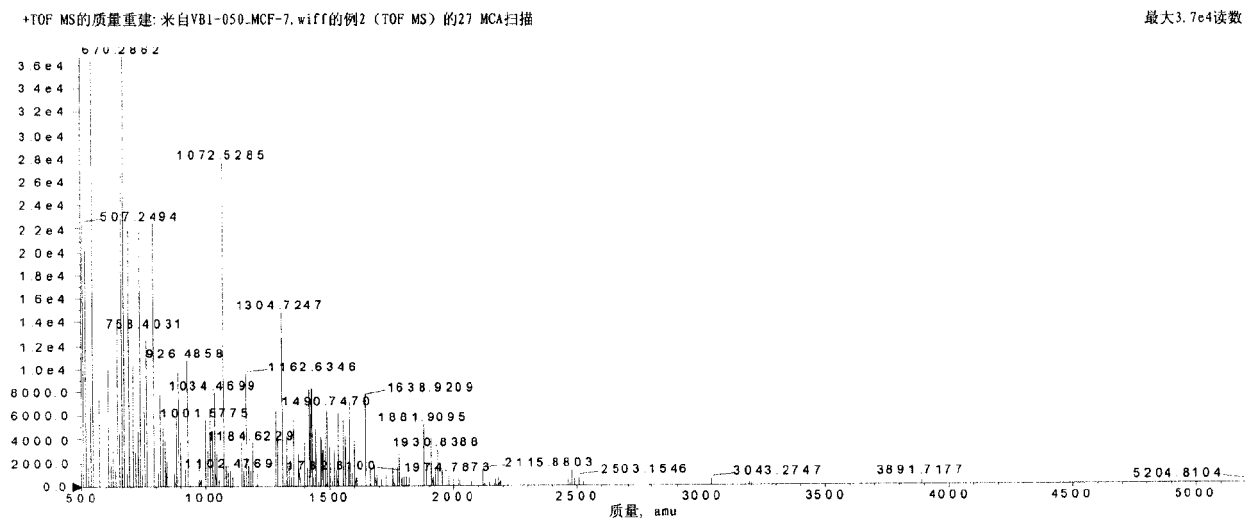
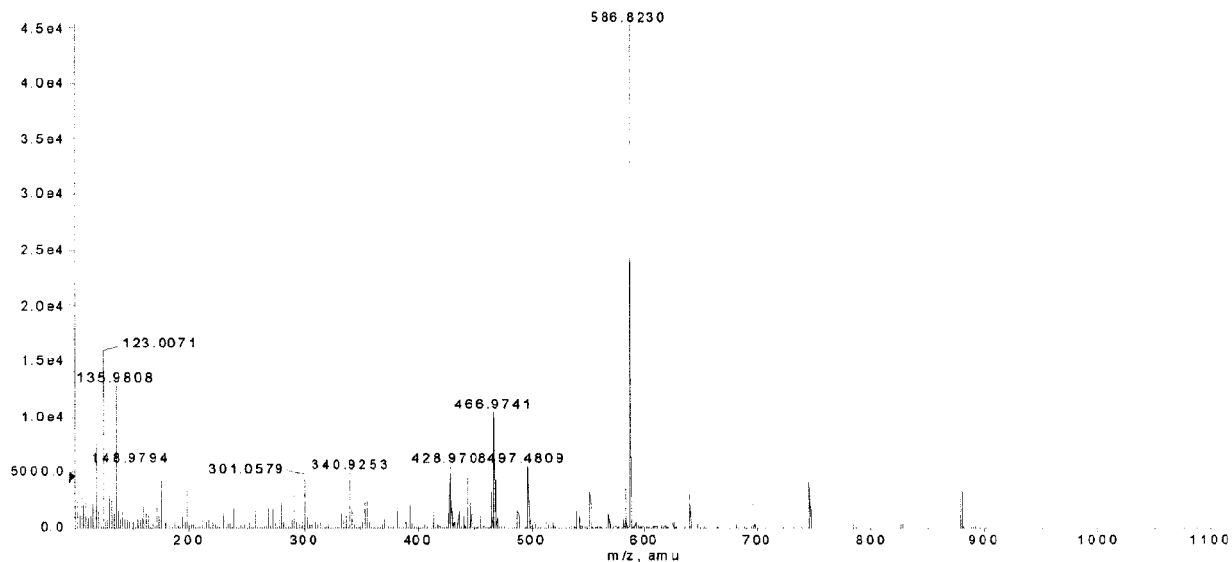


图13

### TOF MS-VB1-050\_C-33A

+TOF MS: 来自微离子喷雾规格3 051105.wiff的30 MCA扫描  
a=3.56429448729902530e-004, t0=-6.47233171954212590e+000

最大4.6e4读数



### VB1-050\_C33-A 的质量重建

+TOF MS的质量重建: 来自微离子喷雾规格3 051105.wiff的30 MCA扫描

最大2.8e5 cps.

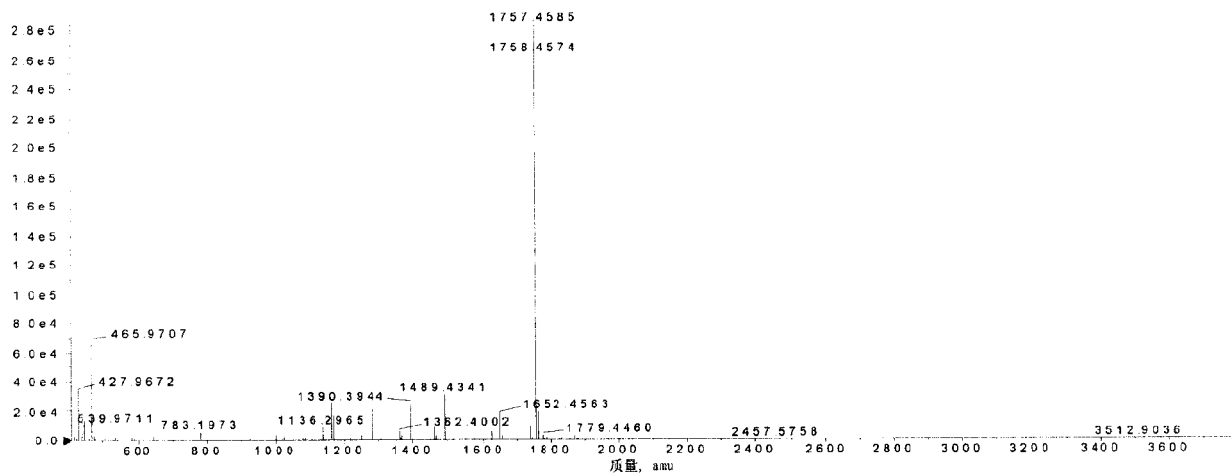


图14

SEQ ID NO: 11

	<u>MTPEDPSETE</u>	<u>PAAPRPGASA</u>	<u>PRGRRVFLAA</u>	<u>FAAALGPLSF</u>	<u>GFALGYSSPA</u>
51	<u>IPSLQRAAPP</u>	<u>APRLDDAAAS</u>	<u>WFGAVVTLGA</u>	<u>AAGGVLGGWL</u>	<u>VDRAGRKLSL</u>
101	<u>LLCSVPFVAG</u>	<u>FAVITAAQDV</u>	<u>WMLLGRRLLT</u>	<u>GLACGVASLV</u>	<u>APVYISEIAY</u>
151	<u>PAVRGLLGSC</u>	<u>VQLMVVVGIL</u>	<u>LAYLAGWVLE</u>	<u>WRWLAVLGCV</u>	<u>PPSLMLLLMC</u>
201	<u>FMPETPRFL</u>	<u>TQHRRQEAMA</u>	<u>ALRFLWGSEQ</u>	<u>GWEDPPIGAE</u>	<u>QSFHLALLRQ</u>
251	<u>PGIYKPFII</u>	<u>VSLMAFQQLS</u>	<u>GVNAVMFYAE</u>	<u>TIFEEAKFKD</u>	<u>SSLASVVVGV</u>
301	<u>IQVLFTAVAA</u>	<u>LIMDRAGRRL</u>	<u>LLVLSGVVMV</u>	<u>FSTSAFGAYF</u>	<u>KLTQGGPGNS</u>
351	<u>SHVAISAPVS</u>	<u>AQPVDASVGL</u>	<u>AWLAVGNMCL</u>	<u>FIAGFAVGWG</u>	<u>PIPWLLMSEI</u>
401	<u>FPLHVKG VAT</u>	<u>GICVLTNWLM</u>	<u>AFLVTKEFSS</u>	<u>LMEVLRPYGA</u>	<u>FWLASAFCIF</u>
451	<u>SVLFTLFCVP</u>	<u>EIKGKTLEQI</u>	<u>TAHFEGR</u>		

图 15

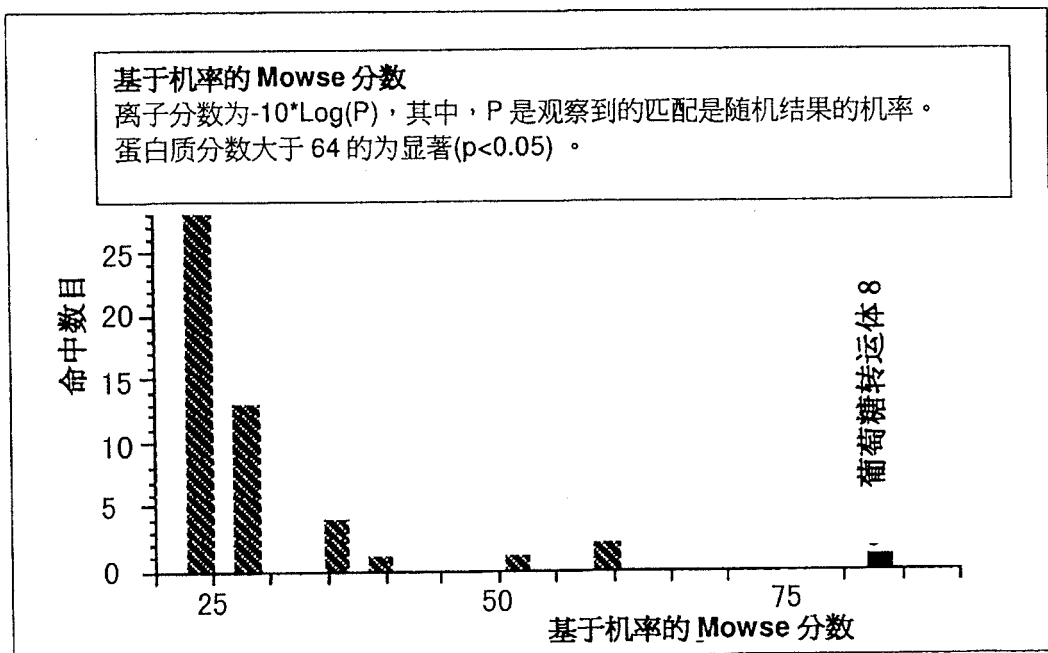
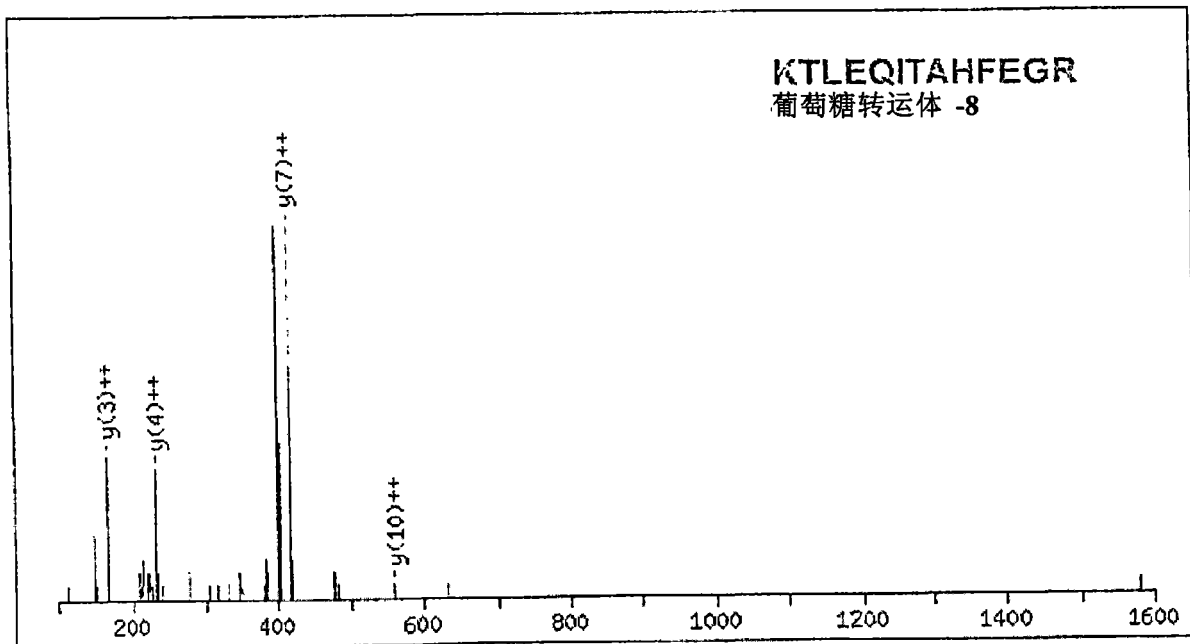


图 16

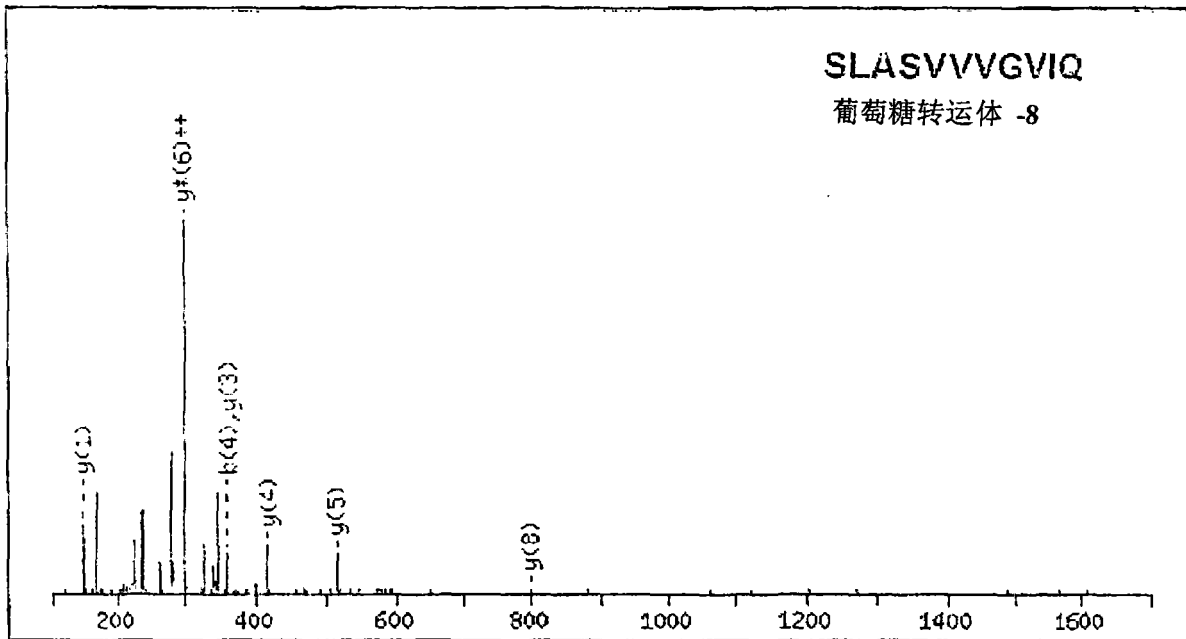
	进入号	质量	分数	描述
1	gi 7018306	50858	83	葡萄糖转运体 8[智人]
2	gi 7688146	50792	61	葡萄糖转运体 8[智人]
3	gi 21361449	50818	61	溶质载体家族 2, (易化葡萄糖转运体) 成员 8[智人]
4	gi 55665089	43470	52	溶质载体家族 2, (易化葡萄糖转运体) 成员 8[智人]
5	gi 55665088	27790	40	溶质载体家族 2, (易化葡萄糖转运体) 成员 8[智人]
6	gi 22749173	31126	35	假定的蛋白质 LOC157983[智人]
7	gi 62860046	123247	34	锌指, 包含 RNA-结合区的 3 [智人]
8	gi 42657033	13184	34	预测的: 假定的蛋白质 XP_379299[智人]
9	gi 21754605	42167	34	未命名的蛋白质产物[智人]
10	gi 913281	9360	29	多巴胺 D4 受体; DRD4[智人]
11	gi 4100621	35815	29	WASP 相互作用物蛋白质[智人]
12	gi 10863977	10834	28	LSM2 同源物, 与 U6 小核 RNA 相关[智人]
13	gi 54695676	22023	28	密蛋白 11 (少突胶质细胞跨膜蛋白质) [智人]
14	gi 10938016	21993	28	密蛋白 11[智人]
15	gi 20372496	12576	28	抗-乙酰胆碱受体免疫球蛋白重链可变区[智人]
16	gi 3283415	23363	28	少突胶质细胞特异性蛋白[智人]
17	gi 609455	14106	28	该 CDS 特征被包括以显示相应的 V_ 区域的翻译
18	gi 55957504	26342	27	类似脑信号蛋白的新的蛋白质[智人]
19	gi 47077813	59197	27	未命名的蛋白质产物[智人]
20	gi 57208269	35223	27	染色体 20 的可读框 160[智人]

图 17



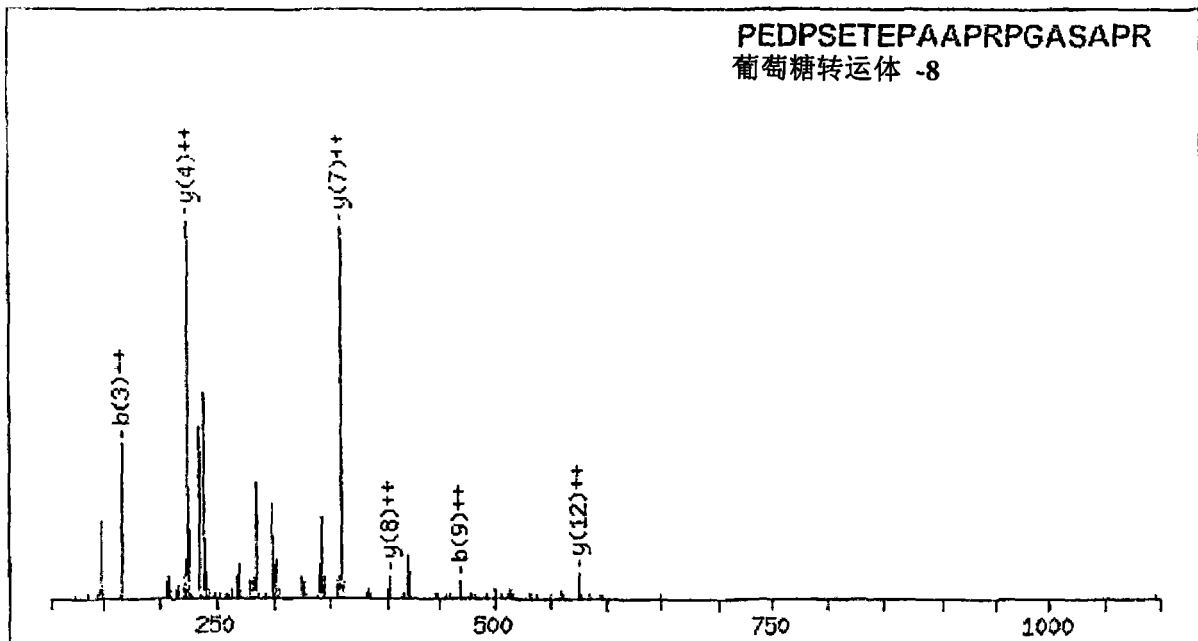
中性肽 Mr 的单同位素质量(计算): 1401.54 离子分数: 73 期望值: 1.3e+02  
符合 (粗红线): 取 12 个最强峰, 4/140 片段离子。

图 18



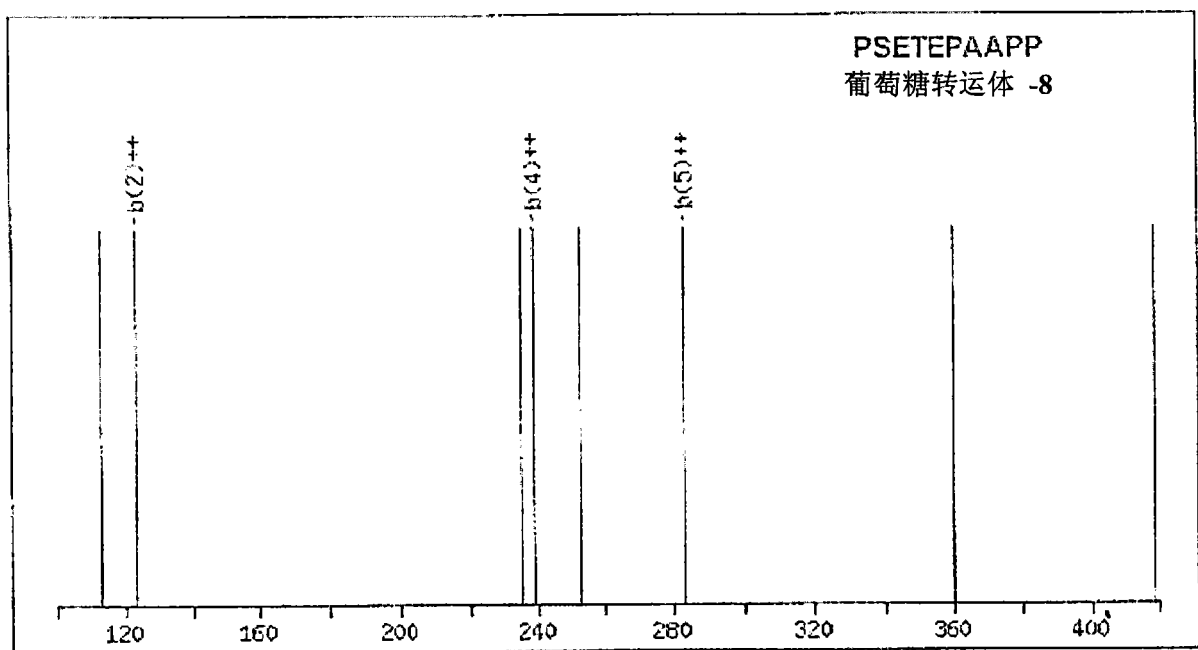
中性肽 Mr 的单同位素质量(计算): 1070.63 离子分数: 68 期望值: 5.6e+02  
符合(粗红线): 取 36 个最强峰, 7/86 片段离子

图 19



中性肽 Mr 的单同位素质量(计算): 1997.9992 离子分数: 18 期望值: 2.6e+02  
符合(粗红线): 取 18 个最强峰, 6/172 片段离子

图 20



中性肽 Mr 的单同位素质量(计算): 1176.3547 可变的改性: M3: 氧化 (M) 离子分数: 11  
期望值: 0.64 符合(粗红线): 取 8 个最强峰, 3/100 片段离子

图 21

专利名称(译)	肿瘤特异性抗体和细胞表面蛋白质		
公开(公告)号	<a href="#">CN101160402A</a>	公开(公告)日	2008-04-09
申请号	CN200580048522.8	申请日	2005-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	维文蒂阿生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	维文蒂阿生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	维文蒂阿生物技术股份有限公司		
[标]发明人	尼古拉斯R格罗沃 格伦麦克唐纳 乔伊斯林恩特韦斯特尔 吉恩尼克西兹尔尤 弗兰西娜C查海尔		
发明人	尼古拉斯·R·格罗沃 格伦·麦克唐纳 乔伊斯林·恩特韦斯特尔 吉恩尼克·西兹尔尤 弗兰西娜·C·查海尔		
IPC分类号	C12N15/13 G01N33/574 G01N33/53 A61K31/7088 A61K39/395 A61K39/00		
CPC分类号	G01N33/57488 C07K2317/565 C07K2317/21 C07K2317/92 C07K16/3053 C07K2317/55 G01N2500/10 A61K39/0011 C07K16/3046 C07K16/303 C07K2317/41 C07K16/30 C07K2317/51 C07K16/3069 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/04 A61K39/001102		
代理人(译)	林晓红		
优先权	60/637448 2004-12-21 US		
其他公开文献	CN101160402B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了癌症特异性抗体的重链和轻链互补决定区的氨基酸和核酸序列。并且，本发明还提供了癌症特异性的抗体和免疫偶联物，其含有癌症特异性抗体，附于毒素或标记物之上，以及它们的方法及应用。本发明还涉及使用本发明的癌症特异性抗体的诊断方法和试剂盒。另外，本发明还提供了新的与癌症相关的抗原和其应用。

**VB1-050**

**V<sub>L</sub> (SEQ ID NOS: 8 和 7)**

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC  
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V

ACC ATC ACT TGT CCG GCG AGT CAG GAC ATT AGT AAT TAT TTA GCG TGG TTT CAG  
T I T C R A S Q D I S N Y L A W F Q  
┌──────────轻链互补决定区 1──────────┐

CGG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAC  
R K P G K A P K S L I Y A A S S L H  
┌──────────轻链互补决定区 2──────────┐

AGT AAG GTC CCA ACA CAA TTC ACG GCG AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC  
S K V F T Q F S G S G S G T D F T L  
└──────────┘

ACC ATC AGC AGC CTG CAG CTT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CTA CAG TAT  
T I S S L Q P E D F A T V Y C L Q Y  
┌──────────┐

AGT ACT TAC CCT ATC ACC TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA  
S T Y P I T F G G C T K V E I K R  
轻链互补决定区 3 ───────────┘