



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101048425 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 26

(21) 申请号 200480033872. 2

A61K 39/395 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 09. 17

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/504, 441 2003. 09. 18 US

W0 0171352 A2, 2001. 09. 27, 全文.

US 6143540 A, 2000. 11. 07, 全文.

CN 1370082 A, 2002. 09. 18, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006. 05. 17

审查员 殷晶

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/030676 2004. 09. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02005/028498 EN 2005. 03. 31

(73) 专利权人 雷文生物技术公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 T·W·梁 D·T·洛 许晓琳

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 申基成 郑霞

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)

C07H 21/04 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 43 页 附图 9 页

(54) 发明名称

KID3 及与其结合的 KID3 抗体

(57) 摘要

本发明提供疾病和癌症相关表位 KID3 的鉴定和表征。本发明还提供与 KID3 结合的单克隆抗体家族, 诊断和治疗多种表达 KID3 的人癌症和疾病的方法。

1. 纯化的具有保藏号 ATCC No. PTA-4860 的杂交瘤所表达的免疫球蛋白或其抗原结合片段。

2. 权利要求 1 的纯化的免疫球蛋白或其抗原结合片段, 其中免疫球蛋白是非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体, 或人抗体。

3. 编码权利要求 1 的免疫球蛋白或其抗原结合片段的分离核酸序列。

4. 权利要求 3 的分离核酸序列, 其中核酸与启动子有效连接。

5. 权利要求 4 的分离核酸序列, 其中启动子和核酸包含于表达载体中。

6. 权利要求 3 的分离核酸序列, 其中免疫球蛋白为单克隆抗体。

7. 转染、转化或感染了载体的细胞系, 所述载体含有权利要求 3 的分离核酸序列。

8. 产生权利要求 1 的纯化的免疫球蛋白或其抗原结合片段的方法, 其包括以下步骤:

a. 在表达免疫球蛋白或其抗原结合片段的条件下培养用权利要求 3 的分离核酸序列转化的细胞系; 并

b. 收获表达的免疫球蛋白或其抗原结合片段。

9. 权利要求 8 的方法, 其中免疫球蛋白为单克隆抗体。

10. 药物组合物, 其含有治疗有效剂量的权利要求 1 的纯化免疫球蛋白或其抗原结合片段以及可药用载体。

11. 药物组合物, 其含有可药用载体以及治疗有效剂量的具有保藏号 ATCC No. PTA-4860 的杂交瘤所表达的单克隆抗体或其抗原结合片段。

12. 权利要求 11 的药物组合物, 其中组合物含有额外的治疗部分。

13. 分离的具有保藏号 ATCC No. PTA-4860 的细胞系或其后代。

14. 权利要求 1 的纯化的免疫球蛋白或其抗原结合片段以及化学治疗剂在制备将化学治疗剂递送到癌细胞的药物中的用途, 其中

癌细胞选自肾上腺瘤、AIDS 相关癌症、泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌 (鳞状细胞癌和移行细胞癌)、骨癌 (釉质瘤、动脉瘤骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞型肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜瘤、尤因氏瘤、外骨粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维发育不全、骨纤维性结构不良、胆囊和胆管癌症、妊娠性滋养层细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌症、小岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌 (肾胚细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、非白血性白血病、脂肪瘤 / 良性脂肪瘤、脂肪肉瘤 / 恶性脂肪瘤、肝癌 (肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌、髓母细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、posterior uveal melanoma、罕见的血液学紊乱、肾脏转移癌、杆状瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状上皮细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌和子宫癌症 (宫颈癌、子宫内膜癌、平滑肌瘤)。

15. 权利要求 14 的方法, 其中化学治疗剂施用于个体。

16. 权利要求 1 的纯化的免疫球蛋白或其抗原结合片段以及化学治疗剂在制备抑制癌细胞生长的药物中的用途, 其中:

癌细胞选自肾上腺瘤、AIDS 相关癌症、泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌 (鳞状细

胞癌和移行细胞癌)、骨癌(釉质瘤、动脉瘤骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞型肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜瘤、尤因氏瘤、外骨粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维发育不全、骨纤维性结构不良、胆囊和胆管癌症、妊娠性滋养层细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌症、小岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌(肾胚细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、非白血性白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、肝癌(肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌、髓母细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、posterior uveal melanoma、罕见的血液学紊乱、肾脏转移癌、杆状瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状上皮细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌和子宫癌症(宫颈癌、子宫内膜癌、平滑肌瘤)。

17. 权利要求 16 的用途,其中化学治疗剂递送进癌细胞。

18. 权利要求 1 的纯化的免疫球蛋白或其抗原结合片段制备用于在个体中检测癌细胞存在与否的试剂中的用途,其中癌细胞选自肾上腺瘤、AIDS 相关癌症、泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌(鳞状细胞癌和移行细胞癌)、骨癌(釉质瘤、动脉瘤骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞型肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜瘤、尤因氏瘤、外骨粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维发育不全、骨纤维性结构不良、胆囊和胆管癌症、妊娠性滋养层细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌症、小岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌(肾胚细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、非白血性白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、肝癌(肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌、髓母细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、posterior uveal melanoma、罕见的血液学紊乱、肾脏转移癌、杆状瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状上皮细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌和子宫癌症(宫颈癌、子宫内膜癌、平滑肌瘤)。

19. 权利要求 18 的用途,其中所述检测使用取自所述个体的肿瘤活检标本的细胞。

KID3 及其结合的 KID3 抗体

[0001] 相关申请交差参考

[0002] 本申请要求在本文中整体引入为参考的提交于 2003 年 9 月 18 日的 U. S. 临时申请序列号 60/504, 441 的权益。

发明领域

[0003] 本发明属于生物学和免疫治疗领域。更具体的, 它涉及新疾病和癌症相关的表位 KID3 以及与 KID3 结合的多克隆和单克隆抗体和其他多肽。本发明另外提供使用拮抗剂、调节剂和与 KID3 结合的肽 (包括 KID3 抗体) 诊断和 / 或治疗多种与 KID3 相关的人类疾病和癌症。

背景技术

[0004] 除了已知的诊断用途以外, 抗体已经显示出作为治疗剂的用途。例如近年来已经使用免疫疗法 (或抗体用于治疗目的的用途) 来治疗癌症。被动免疫疗法涉及单克隆抗体在癌症治疗中的用途。参阅如《Cancer: Principles and Practice of Oncology》, 第六版 (2001) 20 章 495-508 页。这些抗体能具有内在的治疗生物学活性, 所述活性可以通过直接抑制肿瘤细胞生长或存活和通过其招募身体免疫系统天然细胞杀伤活性的能力。这些试剂可以单独施用或与放射性或化学治疗剂结合施用。这类疗法的两个实例为被批准分别用于治疗非何杰金氏淋巴瘤和乳腺癌的利妥希玛和 Trastuzumab。另外, 抗体可以用于产生抗体缀合物, 其中抗体与毒性剂连接并通过与肿瘤的特异性结合将该毒性剂导向肿瘤。被批准用于治疗非白血性白血病的抗体缀合物实例为 Gemtuzumab ozogamicin。出版物中已经公开了与癌细胞结合并可能用于诊断和治疗的单克隆抗体。参阅例如以下尤其公开了一些靶蛋白的分子量的专利申请: U. S. 专利 No. 6, 054, 561 (200kD c-erbB-2 (Her2) 及其他 40-200kD 大小的未知抗原) 和 U. S. 专利 No. 5, 656, 444 (50kD 和 55kD 癌胚蛋白)。临床试验和 / 或已批准用于实体瘤治疗的抗体实例包括: 司徒曼布 (抗原: 180kD, HER2/neu)、Edrecolomab (抗原: 40-50kD, Ep-CAM)、抗人乳脂肪球 (HMF1) (抗原 > 200kD, HMW 粘蛋白)、Cetuximab (抗原: 150kD 和 170kD, EGF 受体)、Alemtuzumab (抗原: 21-28kD, CD52) 和利妥希玛 (抗原: 35kD, CD20)。

[0005] 用于治疗乳腺癌的 trastuzumab 的抗原靶点 (Her-2 受体) 和临床试验用于治疗若干癌症的 cetuximab 的抗原靶点 (EGF 受体) 以可检测水平存在于大量正常成人组织中, 包括皮肤、结肠、肺、卵巢、肝和胰。使用这些治疗剂的安全界限可能由表达水平的差异或抗体在这些位点的可接近性或活性的差异提供。

[0006] 另一种类型的免疫疗法为使用特定肿瘤中存在的抗原或指导该抗原表达的 DNA 构建体的主动免疫疗法或疫苗接种, 所述抗原接着激起个体中的免疫应答, 即诱导个体主动产生针对其自身癌症的抗体。主动免疫接种尚不如被动免疫疗法或免疫毒素一样经常使用。

[0007] 已经提出了若干疾病 (包括癌症) 发展模型。理论的范围从单感染 / 转化事件的

因果关系到从日益“疾病样”或“癌症样”的组织类型到最终导致具有完全致病性或恶性能力的组织的发展。一些人认为例如就癌症而言,单个突变事件足以导致恶性化,而其他人认为继发的改变也是必要的。其他一些人提出,通过细胞水平的连续突变选择事件,升高的突变负荷和肿瘤分级对瘤形成的起始和发展都是必要的。一些癌症靶标只可见于肿瘤组织中,而其他的存在于正常组织中并在肿瘤组织中上调和/或过表达。在这种情况下,一些研究者提出过表达与恶性化的获得相联系,而其他人提出过表达只是通往提高的疾病状态的途径所伴随趋势的标记。

[0008] 理想的诊断和/或治疗抗体应该对在多种癌症中存在而在任何正常组织中不存在或仅以低水平存在的抗原具有特异性。发现、表征和分离与癌症特异相关的新抗原可应用于许多方面。首先,抗原可用于产生针对该抗原的单克隆抗体。理想的抗体应具有针对癌细胞的生物活性并能够招募免疫系统对外来抗原的应答。抗体可以作为治疗剂单独施用或与现有治疗组合施用,或用于制备与毒性剂连接的免疫缀合物。具有相同特异性,但在单独施用时有低生物活性或无生物活性的抗体也是有用的,因为抗体可以用于制备带有放射性同位素、毒素或化学治疗剂或含有化学治疗剂的脂质体的免疫缀合物,所述缀合形式由于将毒素导向含有抗原的细胞的抗体而具有生物活性。

[0009] 理想的诊断性和/或治疗性抗体所需的一个方面是发现和表征与多种肿瘤相关的抗原。几乎没有在非癌细胞低表达而在多种类型的癌症中表达的抗原(例如“全癌”抗原)。分离和纯化这些抗原将可用于产生靶向该抗原的(例如诊断性或治疗性)抗体。与针对仅与一种特定类型癌症相关的抗原的抗体相反,与“全癌”抗原结合的抗体可能靶向可见于不同组织的多种癌症。抗原还可以用于发现药物(例如小分子)和进一步表征细胞调节、生长和分化。

[0010] 糖基化和差别糖基化的调节与癌症发展和预后相关。细胞表面碳水化合物决定簇在恶性转化中可能发生巨大的改变。与多种癌症相关的碳水化合物决定簇的实例为 Lewis 抗原。使用对碳水化合物决定簇(如 Lewis 抗原)特异的单克隆抗体已经显示出可在体外有效调节细胞的转移潜力(Liu 等,2001)。

[0011] 所需的是疾病和/或癌细胞表面的新靶标,所述靶标可用于特异性识别该细胞表面抗原的抗体和其他试剂诊断和治疗这些疾病和/或癌症。基于本文公开的发现,另外还需要特异性识别细胞表面的靶标并能调控降低或增强 KID3 的促进疾病活性的新抗体和其他试剂。鉴定能够抑制其疾病相关活性的人 KID3 拮抗剂是本发明的目的之一。提供用于测试 KID3 和作为免疫原或用于选择抗人 KID3 抗体的新化合物是另一个目的。

[0012] 如下文更详细描述,本发明人已经发现了鉴定为本文提供的新拮抗剂、调节剂和抗体的表位靶标的新表位(本文中我们称为 KID3)。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供 KID3 拮抗剂、调节剂和与 KID3 结合的单克隆抗体,其中 KID3 表达于多种人类癌症中。在一个方面,本发明是与 KID3 结合的单克隆抗体家族。

[0015] 在另一个方面,本发明是由宿主细胞系(KIDNEY. 3.1 1E8. 2AI 1)产生的单克隆抗体抗 KID3,所述宿主细胞系在 2002 年 12 月 18 日以专利保藏编号 PTA-4860 保藏于美国典型培养物保藏中心。

[0016] 在另一方面,本发明是产生对患病和/或癌症细胞具反应性的单克隆抗体抗 KID3

的方法,所述方法包括以下步骤:

[0017] (a) 用免疫原免疫宿主哺乳动物;

[0018] (b) 从该哺乳动物获得淋巴细胞;

[0019] (c) 将淋巴细胞(b)与骨髓瘤细胞系融合以产生杂交瘤;

[0020] (d) 培养(c)的杂交瘤以产生单克隆抗体;和

[0021] (e) 筛选抗体,仅选择与患病和/或癌细胞或细胞系结合而不与非癌或正常细胞或细胞系结合或与正常细胞低水平结合或以不同方式结合的抗体。

[0022] 在另一方面,本发明是产生抗 KID3 抗体的方法,包括在允许产生该抗体的条件下培养编码这些抗体的宿主细胞或其后代并纯化抗 KID3 抗体。

[0023] 在另一方面,本发明提供通过在合适的细胞中表达(可以以单个轻链或重链分别表达,或在一个载体中同时表达轻链和重链)一个或多个编码该抗体的多核苷酸来产生任何本文所述抗体(或多肽)的方法,通常接着回收和/或分离目的抗体或多肽。

[0024] 在另一方面,本发明是抗 KID3 抗体或竞争性抑制 KID3 抗体与 KID3 优先结合的多肽(是否为抗体均可)。在一些实施方案中,本发明是优先结合与其他抗 KID3 抗体相同或不同的 KID3 表位的抗体或多肽(是否为抗体均可)。

[0025] 在另一方面,本发明是含有被特异于 KID3 表位的抗体特异性结合的 KID3 的组合物。在一个实施方案中,抗体为抗 KID3。在另一实施方案中,施用了对应于 KID3 的两个或多个不同表位的两个或多个抗 KID3 抗体,或者抗体可以是多效价的,与 KID3 表位和不同细胞靶标结合。在一些实施方案中,抗 KID3 抗体与治疗剂或可检测标记连接。

[0026] 在另一方面,本发明是含有抗 KID3 抗体片段或区域的抗体。在一个实施方案中,片段为抗体轻链。在另一个实施方案中,片段为抗体重链。在另一个实施方案中,片段含有来自抗体轻链和/或重链的一个或多个可变区。在另一个实施方案中,片段含有来自抗体轻链和/或重链的一个或多个互补决定区(CDR)。

[0027] 在另一方面,本发明提供含有抗 KID3 抗体的以下任一部分的多肽(是否为抗体均可):

[0028] (a) 来自轻链或重链的一个或多个 CDR(或其片段);

[0029] (b) 来自轻链的三个 CDR;

[0030] (c) 来自重链的三个 CDR;

[0031] (d) 来自轻链的三个 CDR 和来自重链的三个 CDR;

[0032] (e) 轻链可变区;

[0033] (f) 重链可变区。

[0034] 在另一方面,本发明是人源化抗体。在一些实施方案中,人源化抗体含有非人抗 KID3 抗体的一个或多个 CDR。在一些实施方案中,人源化抗体与其他抗 KID3 抗体结合相同或不同表位。一般地,本发明的人源化抗体含有一个或多个(一个、两个、三个、四个、五个、六个)与原始非人抗 KID3 抗体的 CDR 相同或来自于此的 CDR 或其片段。在一些实施方案中,人抗体与其他抗 KID3 抗体结合相同或不同的表位。在另一方面,本发明是含有来自非人抗 KID3 抗体重链和轻链可变区的可变区与来自人抗体重链和轻链恒定区的恒定区的嵌合抗体。

[0035] 在另一方面,本发明是分离的多核苷酸,其编码由保藏号 ATCC No. PTA-4860 的宿

主细胞或其后代产生的抗体小鼠抗 KID3。本发明包括具有上文所指出抗体的内在结合或生物活性的抗体多肽。在另一方面,本发明提供编码本文所述的任何抗体(包括抗体片段)以及任何其他多肽的多核苷酸。

[0036] 另一方面,本发明是含有本文所述的任何多肽(包括本文所述的任何抗体)或多核苷酸的药物组合物,例如含有与化学治疗剂连接的抗 KID3 抗体的药物组合物、含有抗 KID3 抗体片段的抗体、非人抗 KID3 抗体的人源化抗体、含有来自非人抗 KID3 抗体可变区的可变区与来自人抗体恒定区的恒定区的嵌合抗体或具有非人抗体 KID3 抗体的一种或多种特性的人抗体或与化学治疗剂(如放射性部分)连接的任何本文所述的抗 KID3 抗体,以及可药用赋形剂。

[0037] 在一个方面中,本发明是含有与存在于疾病或癌细胞上的 KID3 结合的抗 KID3 抗体的组合物。在优选的实施方案中,癌细胞选自卵巢、肺、前列腺、胰、结肠和乳腺癌细胞。在一些实施方案中,癌细胞是分离的。在一些实施方案中,癌细胞为生物样品。生物样品一般来自个体,例如人。在另一方面,本发明是通过检测来自个体的细胞上的 KID3 来诊断个体中疾病(特别是个体中与炎性或自身免疫应答相关的疾病或紊乱)的方法。在本发明的另一方面,方法用于调控个体中的炎性或自身免疫应答。可以使用本发明的组合物和方法治疗由炎性和自身免疫紊乱引起的疾病和状况,包括(用以说明而非限制)多发性硬化症、脑膜炎、脑炎、中风、其他脑外伤、炎性肠病(包括溃疡性结肠炎和克罗恩病)、重症肌无力、狼疮、类风湿性关节炎、哮喘、急性青少年型糖尿病、艾滋病、痴呆、动脉粥样硬化、肾炎、视网膜炎、特应性皮炎、银屑病、心肌缺血和急性白血球介导的肺损伤。

[0038] 本发明的抗体和其他治疗剂的治疗用途的其他适应症包括施用于有器官或移植物排斥风险的个体。近年来移植如皮肤、肾、肝、心、肺、胰和骨髓等组织和器官的手术技术的效率已经有了可观的提高。缺乏在同种异体移植物或器官受者中诱导免疫耐受的优良试剂可能成为最突出的问题。在将同种异体细胞或器官移植到宿主中(即供者和受者为同一物种的不同个体)时,宿主免疫系统可能产生对移植物中外源抗原的免疫应答(宿主抗移植物病),引起移植组织的破坏。

[0039] 在另一方面,本发明为诊断个体是否患有癌症的方法,包括检测在从该个体中选择的细胞中是否表达 KID3,其中所述细胞上表达 KID3 为所述癌症的指标。在一些实施方案中,使用抗 KID3 抗体检测 KID3 的表达。在一些实施方案中,本方法涉及检测细胞中 KID3 的表达水平。本文所使用的术语“检测”包括参考或不参考对照的定性和/或定量检测(测量水平)。

[0040] 在另一方面,本发明为通过检测个体细胞上或释放的 KID3 来诊断个体中癌症的方法,其中癌症选自(包括但不限于)肾上腺瘤、AIDS 相关癌症、泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌(鳞状细胞癌和移行细胞癌)、骨癌(釉质瘤、动脉瘤骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、chordoma、嫌色细胞型肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜瘤、尤因氏瘤、外骨粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维发育不全、骨纤维性结构不良、胆囊和胆管癌症、妊娠性滋养层细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌症、小岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌(肾胚细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、非白血性白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、肝癌(肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌、髓母细胞瘤、

黑素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、posterior uveal melanoma、罕见的血液学紊乱 (rare hematologic disorders)、肾脏转移癌、杆状瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状上皮细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌和子宫癌症 (宫颈癌、子宫内膜癌、平滑肌瘤)。

[0041] 在另一方面,本方法为辅助诊断个体中癌症(例如但不限于卵巢、肺、前列腺、胰腺、结肠或乳腺癌)的方法,包括检测来自个体的生物样品中KID3的表达。在一些实施方案中,使用抗KID3抗体检测KID3的表达。在一些实施方案中,方法是检测细胞中KID3的表达水平。从癌中释放的KID3可能促使体液(例如血液、唾液或肠粘蛋白分泌物)中可检测的KID3或其部分的水平提高。

[0042] 在另一方面,本发明为通过施用足以降低癌细胞生长的有效剂量的与KID3结合的抗体来治疗癌症的方法。在一些实施方案中,抗体为抗KID3抗体。在某些实施方案中,癌细胞选自(包括但不限于)肾上腺瘤、AIDS相关癌症、泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌(鳞状细胞癌和移行细胞癌)、骨癌(髓质瘤、动脉瘤骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、chordoma、嫌色细胞型肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜瘤、尤因氏瘤、外骨粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维发育不全、骨纤维性结构不良、胆囊和胆管癌症、妊娠性滋养层细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌症、小岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌(肾胚细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、非白血性白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、肝癌(肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌、髓母细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、儿科癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、posterior uveal melanoma、罕见的血液学紊乱、肾脏转移癌、杆状瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状上皮细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌和子宫癌症(宫颈癌、子宫内膜癌、平滑肌瘤)。

[0043] 在另一方面,本发明为延缓患癌症个体中发生转移的方法,包括施用有效剂量的与KID3特异性结合的抗体家族中的至少一个。在一个实施方案中,抗体为抗KID3抗体。在另一方面,本发明为在体外或个体中抑制癌细胞生长和/或增殖的方法,包括对细胞培养物或样品或个体施用有效剂量的含有抗KID3抗体的组合物,其中抗体与化学治疗剂结合(包括连接)。

[0044] 在另一方面,本发明为通过施用有效剂量的与KID3特异性结合的抗体家族中至少一个成员而在个体中将治疗剂递送到癌细胞的方法。在另一实施方案中,抗KID3抗体与另一治疗剂组合(包括连接)递送到个体。

[0045] 在一些实施方案中,抗KID3抗体为来自本文所命名抗体(一般(但不必须)包括该抗体的一个或多个部分或完整的CDR)的人源化抗体。在一些实施方案中,抗KID3抗体为具有所命名抗体一项或多项特性的人抗体。在一些实施方案中,将化学治疗剂(如毒素或放射性分子)递送到癌细胞中(被内化)。在一些实施方案中,试剂为肥皂草毒蛋白。

[0046] 在另一方面,本发明为在个体中治疗癌症的方法,包括向个体施用有效剂量的组

合物,所述组合物含有与化学治疗剂结合(包括连接)的抗 KID3 抗体。

[0047] 本发明另外还提供通过增强或降低来调控 KID3 与胞质信号配偶体结合的方法。可以通过使存在于细胞表面的 KID3 分子接触调控信号配偶体与 KID3 结合的试剂来影响 KID3 与胞质信号配偶体的结合。可以施用阻断或减弱 KID3 与其结合和/或信号配偶体结合的试剂来调控与 KID3 介导的炎症或免疫应答相关的生物或病理过程。这一功能所涉及的病理过程包括肿瘤相关的细胞生长和通过凋亡、坏死、肿瘤或其他细胞死亡途径诱导细胞死亡。

[0048] 可以测试剂阻断、降低、增强或其他调控 KID3 与结合配偶体如抗 KID3 抗体结合的能力。具体而言,可以通过将含有 KID3 相互作用位点的肽(一般以其在完整活细胞中的天然构型)与结合配偶体(如测试剂)一起孵育,并检测测试剂是否降低或增强结合配偶体与 KID3 肽的结合来测试剂调控这种相互作用的能力。

[0049] KID3 功能的激动剂、拮抗剂和其他调节剂明确地包含于本发明的范围之内。这些激动剂、拮抗剂和调节剂是多肽,其含有 KID3 中一个或多个抗原决定位点或含有这些位点的一个或多个片段、这些位点的变体或这些位点的肽模拟物。这些激动剂、拮抗剂和 KID3 调控化合物以线性或环状形式提供,并任选地含有至少一个在自然界不普遍存在的氨基酸残基或至少一个酰胺等构物。这些化合物可以是糖基化的。本发明的 KID3 功能激动剂、拮抗剂和其他调节剂参考抗体而用于上文所述的所有实施方案和方法。

[0050] 本发明其他方面涉及所鉴定的并在本文中称为 KID3 的新表位。该表位适于作为免疫原并用于多种研究、诊断和治疗目的。

[0051] 在某些方面中,本发明为在个体中辅助诊断疾病的方法,其包括以下步骤:

[0052] (i) 测定取自个体的血液或组织样品中 KID3 的存在;

[0053] (ii) 相对于正常(非疾病)血液或组织样品,检测所述样品是否具有提高数量的 KID3 标记物;和

[0054] (iii) 将所述标记物提高的数量与阳性诊断相联系或将不存在所述标记物提高的数量与该疾病的阴性诊断相联系。

[0055] 在某些实施方案中,使用抗 KID3 抗体检测标记物。在某些实施方案中,通过选自放射性同位素成像、流式细胞术和免疫组织化学的技术实施该方法。

[0056] 附图简述

[0057] 图 1 显示在肾囊模型中植入了 Colo205 人结肠瘤细胞的一些动物的肾,图 1 的上图来自对照(未处理)动物,而下图来自经处理的动物。

[0058] 图 2 为显示肾囊异种移植物模型中 Colo205 和 HT-29 结肠瘤细胞对全身施用抗 KID3 抗体的应答率的图表。

[0059] 图 3 显示皮下模型中抗 KID3 抗体对人结肠瘤细胞系 Colo205 的效力。

[0060] 图 4 显示用以说明抗 KID3 抗体对单层生长的人结肠瘤细胞系的体外抑制的若干实验的图示结果。

[0061] 图 5 显示与化学治疗剂伊立替康和 5FU 组合的抗 KID3 抗体的体外活性。

[0062] 图 6 为显示小鼠抗 KID3 和 Mab-ZAP(缀合肥皂草毒蛋白的抗 IgG)对人结肠瘤细胞系 Colo205 生长的影响的图表。

[0063] 图 7 显示抗 KID3 单克隆抗体小鼠抗 KID3 κ 轻链的核酸序列,包括天然信号序列。

在 DNA 序列上包括了相应的蛋白质翻译。

[0064] 图 8 显示抗 KID3 单克隆抗体小鼠抗 KID3G1 重链的核酸序列,包括天然信号序列。在 DNA 序列上包括了相应的蛋白质翻译。

[0065] 发明详述

[0066] 本发明提供可以作为免疫原或可直接作为诊断或治疗剂使用的新碳水化合物表位——KID3。另外,本发明提供诊断和治疗多种疾病的单克隆抗体、多肽和其他组合物,所述疾病包括与表达和 / 或过表达 KID3 相关的人类癌症。

[0067] I. 一般技术

[0068] 除非特别指出,应用本发明将使用本领域技术范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术。这些技术在以下文献中充分说明:例如《Molecular Cloning:A Laboratory Manual》,第二版(Sambrook 等,1989) Cold Spring Harbor Press、《Oligonucleotide Synthesis》(M. J. Gait 编辑,1984)、《Methods in Molecular Biology》,Humana Press、《Cell Biology:A Laboratory Notebook》(J. E. Cellis 编辑,1998) Academic Press、《Animal Cell Culture》(R. I. Freshney 编辑,1987)、《Introduction to Cell and Tissue Culture》(J. P. Mather 和 P. E. Roberts, 1998) Plenum Press、《Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures》(A. Doyle, J. B. Griffiths 和 D. G. Newell 编辑,1993-8) J. Wiley and Sons、《Methods in Enzymology》(Academic Press, Inc.)、《Handbook of Experimental Immunology》(D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编辑)、《Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells》(J. M. Miller 和 M. P. Calos 编辑,1987)、《Current Protocols in Molecular Biology》(F. M. Ausubel 等编辑,1987)、《PCR:The Polymerase Chain Reaction》(Mullis 等编辑,1994)、《Current Protocols in Immunology》(J. E. Coligan 等编辑,1991)、《Short Protocols in Molecular Biology》(Wiley and Sons,1999)、《Immunobiology》(C. A. Janeway 和 P. Travers,1997)、《Antibodies》(P. Finch,1997)、《Antibodies:a practical approach》(D. Catty 编辑,IRL Press,1988-1989)、《Monoclonal antibodies:a practical approach》(P. Shepherd 和 C. Dean 编辑,Oxford University Press,2000)、《Using antibodies:a laboratory manual》E. Harlow 和 D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999)、《The Antibodies》(N. Zanetti 和 J. D. Capra 编辑,Harwood Academic Publishers,1995) 和《Cancer:Principles and Practice of Oncology》(V. T. DeVita 等编辑,J. B. Lippincott Company,1993)。

[0069] II. 定义

[0070] “KID3”指新碳水化合物表位,本发明的抗体针对该表位。KID3 表位为抗 KID3 抗体结合的碳水化合物结构,不限制或涉及其附着的蛋白质或多肽或其他结构。KID3 存在于结肠和若干类型的癌症中。现在相信与其正常组织类似物相比,KID3 可能在某些癌细胞中过表达。

[0071] 通过用 N- 葡聚糖酶处理表达 KID3 的蛋白质后抗 KID3 抗体结合的丧失确定 KID3 为 N 连接碳水化合物。迄今为止的研究表明,如通过直接结合和交叉竞争试验所确定,KID3 不是一种先前报道过的粘蛋白或 Lewis 血型的癌症相关碳水化合物。用抗 KID3 对人肿瘤细胞系膜提取物进行 Western 印迹分析显示,KID3 存在于分子量范围从 25kDa 到大于 250kDa

的多种膜相关蛋白质中。用 KID3 抗体敏感（体内和体外）株系 Colo201、Colo205、SU86.86 和 SNU-16 测定的 KID3 反应性的带型跨越从 25kDa 到 > 250kDa 的全部范围，并显示出定性区别于与在大多数抗 KID3 抗体非敏感性肿瘤细胞系中观察到的带型，所述非敏感细胞系表现为只表达这些 KID3 相关蛋白质的亚群。未展示的数据表明表达 KID3 的蛋白质通过新的相互作用位点支持 E-钙粘蛋白的结合，先前并未将所述位点归于 E-钙粘蛋白的结合和功能。

[0072] 术语“RAAG 12”指该新 KID3 表位。术语“RAAG12”、“KID3 表位”和“KID3”在本申请中可交换使用。

[0073] 术语“表位”指抗原表面能够引发免疫应答和能够结合该应答产生的特异性抗体的分子区域。术语“表位”和“抗原决定簇”在本申请中可交换使用。

[0074] KID3 功能的激动剂、拮抗剂和其他调节剂明确包含于本发明范围内。这些激动剂、拮抗剂和调节剂是与 KID3 中的一个或多个抗原决定簇或 KID3 的表位片段或变体相互作用的多肽、肽模拟物、小分子或其他化合物或组合物。这些激动剂、拮抗剂和 KID3 调控化合物以线性或环状形式提供，并任选地含有至少一个在自然界中不普遍存在的氨基酸残基或至少一个酰胺等构物。这些化合物可以是糖基化的或具有其他翻译后修饰。

[0075] 更具体的，本文使用的术语“KID3 激动剂”、“拮抗剂”或“调节剂”定义为任何以下化合物：

[0076] (1) 能够破坏或阻断人 KID3 与其天然配体或抗 KID3 抗体之间相互作用；

[0077] (2) 能够结合人 KID3 和其天然配体或抗 KID3 抗体；

[0078] (3) 含有可用于产生抗体的抗原决定簇，所述抗体能够结合人 KID3 及其天然配体或抗 KID3 抗体；

[0079] (4) 含有可用于筛选抗体的抗原决定簇，所述抗体能够结合人 KID3 及其天然配体或抗 KID3 抗体；

[0080] (5) 含有可用于产生抗体的抗原决定簇，所述抗体能够破坏或阻断人 KID3 与其天然配体或抗 KID3 抗体之间的相互作用；

[0081] (6) 含有可用于筛选抗体的抗原决定簇，所述抗体能够破坏或阻断人 KID3 与其天然配体或抗 KID3 抗体之间的相互作用。

[0082] KID3 激动剂、拮抗剂和调节剂包括 KID3 变体、KID3 激动剂、拮抗剂、肽模拟物和小分子。KID3 激动剂、拮抗剂和调节剂还包括抗 KID3 抗体和对包括碳水化合物替代、缺失和添加变体或它们的任意组合在内的人 KID3 具有反应性的免疫球蛋白变体、嵌合免疫球蛋白、人源化免疫球蛋白和抗 KID3 抗体。本发明的 KID3 激动剂、拮抗剂和调节剂是基于发明人对人 KID3 与其天然配体或抗 KID3 抗体的结合相关的抗原决定簇的鉴定。因此，本发明提供具有与抗 KID3 抗体的一个或多个 KID3 结合结构域相同或相似的分子结构的 KID3 激动剂、拮抗剂和调节剂。

[0083] 本文所使用的术语“KID3 变体”指人 KID3 的所有与任意 KID3 激动剂、拮抗剂和调节剂相互作用的碳水化合物变体，所述变体包括糖替代、缺失和添加变体或其任意组合。定义中还包括分子中含有该分子变动区的任何 KID3 变体片段。

[0084] “抗体”是能够通过至少一个位于免疫球蛋白分子可变区的表位识别位点与靶标（如碳水化合物、多核苷酸、脂类、多肽等）特异性结合的免疫球蛋白分子。本文所使用的该

术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其突变体、天然存在的变体、含有带所需特异性表位识别位点的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体以及含有所需特异性表位识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰构型。

[0085] “单克隆抗体”指同源抗体群,其中单克隆抗体含有与表位选择性结合相关的(天然存在的和非天然存在的)氨基酸。当针对单个表位时,单克隆抗体为高度特异性。术语“单克隆抗体”不仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,还包括其片段(如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其突变体、含有抗体部分的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体以及含有所需特异性的表位识别位点并与表位结合的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的构型。对于抗体的来源或产生抗体的方式(如通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)不作限制。该术语包括整个免疫球蛋白以及上文“抗体”的定义中所述的片段等。

[0086] “人源化抗体”指通常使用重组技术制备的嵌合分子,其具有来自非人物种来源的免疫球蛋白的表位结合位点,该分子其余的免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可以含有与恒定区融合的完整可变区,或者只含有移植到可变区中适当的构架区的互补性决定区(CDR)。表位结合位点可以是野生型或通过一个或多个氨基酸替代进行修饰。这使恒定区在人类个体中不成为免疫原,而保留了对外源可变区免疫应答的可能性(LoBuglio, A. F. 等, (1989)Proc Natl Acad Sci USA 86: 4220-4224)。另一方法着眼于不仅提供人源的恒定区,而且修饰可变区以将其改造为尽可能接近人类形式。已知重链和轻链可变区含有三个根据目的表位改变并决定结合能力的互补性决定区(CDR)及其侧翼的四个构架区(FR),构架区在给定物种中相对稳定,推断其提供 CDR 的支架。制备针对特定表位的非人抗体时,可以通过将来自非人抗体的 CDR 移植到待修饰的人抗体中存在的 FR 上来对可变区进行“改造”或“人源化”。该方法在多种抗体中的应用已经报道于 Sato, K. 等, (1993)Cancer Res 53:851-856、Riechmann, L. 等, (1988)Nature 332:323-327、Verhoeyen, M. 等, (1988)Science 239:1534-1536、Kettleborough, C. A. 等, (1991)ProteinEngineering 4:773-3783、Maeda, H. 等, (1991)Human AntibodiesHybridoma 2:124-134、Gorman, S. D. 等, (1991)Proc Natl Acad Sci USA88:4181-4185、Tempest, P. R. 等, (1991)Bio/Technology 9:266-271、Co, M. S. 等, (1991)Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873、Carter, P. 等, (1992)Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-4289 和 Co, M. S. 等, (1992)J Immunol148:1149-1154。在一些实施方案中,人源化抗体保留了所有 CDR 序列(例如含有来自小鼠抗体的全部六个 CDR 的人源化小鼠抗体)。在其他实施方案中,人源化抗体具有对来源抗体而言有所改变的一个或多个 CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),它们也称为“来自”来源抗体的一个或多个 CDR 的一个或多个 CDR。

[0087] 与抗体或多肽“特异性结合”或“优先结合”(本文中互换使用)的表位是本领域所熟知的术语,测定这种特异性或优先结合的方法也为本领域所熟知。如果与其他细胞或物质相比,分子与特定的细胞或物质更频繁、更快速、更持久和/或更具亲和力地反应或结合,则称该分子表现出“特异性结合”或“优先结合”。如果抗体的结合比与其他物质的结合更具亲和力、亲合力、更快速和/或更持久,则抗体与靶标“特异性结合”或“优先结合”。例

如,与 KID3 表位特异性或优先结合的抗体为与结合其他 KID3 表位或非 KID3 表位相比,与该 KID3 表位的结合更具亲和力、亲合力、更迅速和 / 更持久的抗体。通过该定义还应理解,特异性或优先结合一种靶标的抗体 (或部分或表位) 还可能特异性或优先结合第二种靶标。因此,“特异性结合”或“优先结合”并不一定需要 (虽然可以包括) 排他性结合。一般 (但不必然是) 结合的优先性即意为优先结合。

[0088] 就具有或“保留免疫活性”的表位而言,术语“免疫活性”指抗体 (如抗 KID3 抗体) 在不同条件下 (例如将表位置于减弱和变性条件后) 与表位结合的能力。

[0089] 抗 KID3 抗体与不同的生物功能相关,包括 (但不限于) 结合 KID3 (包括存在于癌症细胞上的 KID3,包括但不仅限于卵巢、前列腺、胰腺、肺、结肠或乳腺癌细胞) 的能力 ; 体外或体内结合暴露于活细胞表面的 KID3 部分的能力 ; 将化学治疗剂递送到表达 KID3 的癌细胞 (如卵巢、前列腺、胰腺、肺、结肠或乳腺癌细胞) 的能力 ; 将治疗剂或可检测标记物递送到表达 KID3 的癌细胞的能力 ; 通过凋亡、坏死、肿瘤或其他细胞死亡途径影响细胞死亡的能力。

[0090] “肿瘤病 (oncosis)”或“肿胀”事件是区别于凋亡的细胞死亡形式。肿瘤病首先在 1910 年用于描述骨细胞的局部缺血性死亡 (Trump 等,1997)。肿胀细胞的特征在于细胞和细胞器膨胀、空泡化和提高的膜通透性。肿瘤病通常在受到伤害后迅速发生,早期变化导致细胞形状和体积的改变。肿胀的内在分子和生化机制尚未充分阐明。在一些系统中,肿瘤病可能起因于细胞膜中离子通道失调和胞内 ATP 水平降低,其引起钠流入并导致细胞膨胀和破裂 (Barros 等 2001)。在本文的讨论中,所述 KID3 或 KID3 抗体以及其他试剂、拮抗剂、调节剂和多肽 (包括抗体) 可能具有一项或多项这些特征或生物效应。

[0091] “抗 KID3 等价抗体”或“抗 KID3 等价多肽”指具有与抗 KID3 抗体相关的一项或多项生物功能 (如结合特异性) 的抗体或多肽。

[0092] 本文所使用的“试剂”指生物、药物或化学化合物。非限制性实例包括简单或复杂有机或无机分子、肽、蛋白质、寡核苷酸、抗体、抗体衍生物、抗体片段、维生素衍生物、碳水化合物、毒素或化学治疗化合物。可以合成多种化合物,例如小分子和寡聚物 (如寡肽和寡核苷酸), 合成的有机化合物基于多种核心结构。另外,多种天然来源可以提供用于筛选的化合物,如植物或动物提取物等等。本领域技术人员容易认识到,本发明试剂的结构没有限制。

[0093] 本发明方法中所使用的试剂可以随机选择或合理地选择或设计。如本文所使用的,在不考虑与 KID3 涉及其天然结合偶联体或已知抗体的结合的特异序列而随机选择试剂时,称为随机选择试剂。随机选择试剂的实例是使用化学文库或肽组合文库。

[0094] 在考虑靶位点和 / 或其构象与试剂作用关系的非随机基础上选择试剂时,本文中称为合理选择或设计试剂。抗 KID3 试剂阻断 KID3/ 抗 KID3 相互作用。本发明还包括当前已知或以后鉴定的在 KID3 及其天然结合配偶体的相互作用位点发生作用的试剂 (尽管其他配体及其活性 KID3 相互作用位点也在本发明的范围内)。可以利用组成受体 / 配体和 / 或 KID3/ 抗 KID3 抗体复合物接触位点的肽序列或碳水化合物结构来合理选择或合理设计试剂。例如,合理选择的试剂可以是四级结构与 KID3 相同并暴露于天然环境中活细胞表面的肽或碳水化合物。这些试剂能如所需的通过与抗 KID3 抗体或天然配体结合来降低或阻断抗 KID3 抗体和 KID3 的结合或 KID3 与其天然配体的结合。

[0095] 就抗体而言,本文所使用的术语“标记”旨在包括通过将可检测物质如放射性试剂或荧光基团(例如异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红蛋白(PE))与抗体偶联(即物理连接)直接标记抗体以及通过可检测物质的反应性间接标记探针或抗体。

[0096] 就抗体而言,本文所使用的术语“结合”包括与试剂(例如化学治疗剂)共价或非共价附着或接合。抗体可以通过直接接合或附着于通用平台的间接接合与试剂(例如化学治疗剂)结合,从而抗体指导试剂定位到抗体结合的癌细胞,其中抗体和试剂在生理条件下不显著分离,从而试剂不靶向抗体结合的同一癌细胞或从而不降低试剂的潜力。

[0097] “生物样品”包括从个体获得并可用于诊断或筛选试验的多种样品类型。该定义包括唾液、血和生物来源的其他液体样品、固体组织样品(如活检标本)或来自于此的组织培养物或细胞及其后代,例如取自怀疑患有癌症的个体的组织样品(在优选的实施方案中取自卵巢、肺、前列腺、胰腺、结肠和乳腺组织)获得的细胞。该定义还包括在采集后以任何方式处理的细胞,例如用试剂处理、增溶或富集某些组分(如蛋白质或多核苷酸)或包埋于半固体或固体基质中用于切片。术语“生物样品”包括临床样品,还包括培养细胞、细胞上清液、细胞溶解产物、血清、血浆、生物流体和组织样品。

[0098] “宿主细胞”包括可作为或已作为载体的受体用于整合多核苷酸插入物的个体细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,由于天然的、偶然的或故意的突变,后代不一定与来源亲本细胞(在形态学或基因组DNA互补上)完全相同。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸体内转染的细胞。

[0099] 本文所使用的“延缓发生转移”指延迟、阻碍、减慢、迟缓、稳定和/或推迟发生转移。取决于癌症病史和/或受治个体,这一延缓可以为不同的时间长度。对于本领域技术人员而言,有效或显著的延缓显然实际上可能包括阻止,即个体不发生转移。

[0100] 在一个实施方案中,药物组合物的“有效量”为足以引起有益或所需结果的量,所述结果包括(但不限于)临床结果如肿瘤尺寸缩小(在癌症如乳腺癌或前列腺癌中)、减慢癌细胞生长、延缓发生转移、减弱疾病引起的症状、提高疾病患者的生存质量、降低治疗疾病所需其他药物的剂量、如通过靶向和内化作用增强另一药物的效力、延缓疾病发展和/或延长个体存活时间。可以在一次或多次给药中施用有效剂量。就本发明而言,药物、化合物或药物组合物的有效量为足以直接或间接减弱癌细胞增殖(或破坏癌细胞)和减弱和/或延缓癌细胞发生、生长或转移的量。在一些实施方案中,可以与(或不与)另一药物、化合物或药物组合物联合而实现药物、化合物或药物组合物的有效量。因此,可以在施用一种或多种化学治疗剂的背景下考虑“有效量”,如果与一种或多种其他试剂联合,可以考虑以有效量进行单一试剂给药,可以得到需要的结果。尽管个体的需求多变,测定每一组分的有效量的最佳范围在本领域技术范围内。一般剂量包括0.1-100mg/kg/体重。优选的剂量包括1-100mg/kg/体重。最优选的剂量包括10-100mg/kg/体重。

[0101] 当核酸分子或试剂、抗体、组合物或细胞等与其原始来源的污染核酸分子、抗体、试剂、组合物或细胞等基本上分开时,在本文中称为“分离的”核酸分子或试剂、抗体、组合物或细胞等。

[0102] “个体”为脊椎动物,优选为哺乳动物,更优选为人。哺乳动物包括(但不限于)农业动物、运动动物、宠物、灵长动物、小鼠和大鼠。

[0103] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指任意长度的氨基酸

多聚体。多聚体可以是线性的或分支的,可以含有修饰的氨基酸并可以间有非氨基酸。该术语还包括天然修饰或被干涉的氨基酸多聚体,例如形成二硫键、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,如与标记组分连接。该定义还包括例如含有一个或多个氨基酸(包括如非天然氨基酸等)类似物以及本领域其他已知修饰的多肽。应该理解,由于本发明的多肽是基于抗体的,所以多肽可以以单链或结合链存在。

[0104] 本发明的范围内还包括本文所述 KID3 激动剂、拮抗剂和调节剂(包括抗 KID3 抗体)的肽模拟物。这些肽模拟物包括用自然界中不普遍存在的氨基酸残基(如氨基酸的 D 异构体或 N-烷基化氨基酸类)替代了其中至少一个氨基酸残基的肽。在其他实施方案中,通过用酰胺等构物取代 KID3 激动剂、拮抗剂或调节剂中至少一个酰胺键($-\text{C}(\text{. dbd. O})-\text{NH}-$)构建肽模拟物。合适的酰胺等构物包括 $-\text{CH. sub. 2}-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH. sub. 2}-\text{S}-$ 、 $-\text{CH. sub. 2}-\text{S}(\text{O}). \text{sub. n}-$ (其中 n 为 1 或 2)、 $-\text{CH. sub. 2}-\text{CH. sub. 2}-$ 、 $-\text{CH. dbd. CH}-$ (E 或 Z)、 $-\text{C}(\text{. dbd. O})-\text{CH. sub. 2}-$ 、 $-\text{CH}(\text{CN})-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(\text{OH})-\text{CH. sub. 2}-$ 和 $-\text{O}-\text{C}(\text{. dbd. O})-\text{NH}-$ 。KID3 激动剂、拮抗剂或调节剂中适合用酰胺等构物取代的酰胺键包括可被 KID3 激动剂、拮抗剂或调节剂治疗的预期受试者的内源性酯酶或蛋白酶水解的键。肽模拟物可以具有碳水化合物样结构特征,以更有效地提高它们与天然 KID3 的相似性。

[0105] 本文所使用的“基本纯净”指至少 85% 纯净(即不含污染物),更优选至少 90% 纯净、更优选至少 95% 纯净、更优选至少 98% 纯净、更优选至少 99% 纯净或更高的纯度。

[0106] “毒素”指在细胞内产生不利应答的任何物质。例如,针对癌细胞的毒素将对癌细胞具有不利的、有时是有害的作用。毒素的实例包括(但不限于)放射性同位素、加利车霉素和美登木素生物碱。

[0107] 本文所使用的“治疗”为得到有益或需要的结果(包括且优选临床结果)的方法。就本发明而言,有益或需要的临床结果包括(但不限于)以下一种或多种:降低癌细胞或其他患病细胞的增殖(或破坏癌细胞或患病细胞)、减弱癌症中可见的癌细胞转移、缩小肿瘤尺寸、减弱疾病导致的症状、提高疾病患者的生存质量、降低治疗疾病所需其他药物的剂量、延缓疾病发展和/或延长个体的存活期。

[0108] III. 产生抗体和多肽的方法

[0109] 产生单克隆抗体的方法为本领域所公知。可以使用的一个方法为 Kohler 和 Milstein, Nature 256:495-497(1975)的方法或其修饰。一般在非人物种(如小鼠)中产生单克隆抗体。通常使用小鼠或大鼠进行免疫,但也可以使用其他动物。通过用致免疫量的含有人 KID3 的细胞、细胞提取物或蛋白质制品免疫小鼠来产生抗体。免疫原可以是(但不限于)原代细胞、培养的细胞系、癌细胞、核酸或组织。在一个实施方案中使用了人胚肾上皮细胞。在另一个实施方案中使用了人膀胱或胰腺祖细胞。在实施例 1 中详细描述了分离和培养人胚肾细胞的方法。在作为免疫原使用之前,可以将用于免疫的细胞(如人胚肾细胞、膀胱细胞或人胰腺祖细胞)培养一段时间(至少 24 小时)。细胞(例如人胚肾、膀胱细胞或人胰腺祖细胞)可以单独作为免疫原使用,或者与非变性佐剂(如 Ribi)组合。作为免疫原使用时一般应保持细胞完整并优选有活力的。完整细胞比破裂细胞使表位更好的被免疫动物检测到。变性佐剂或破碎佐剂(如弗氏佐剂)可能破坏人胚肾或其他细胞,因此不鼓励使用。可以按周期间隔(如隔周一次或每周一次)多次施用免疫原,或者可以

以在动物中维持活力的方式（如组织重组体）施用。实施例 2 描述了用于产生抗 KID3 抗体并且可以用于产生与 KID3 结合的其他单克隆抗体的方法。

[0110] 在一个实施方案中,通过使用过表达 KID3 的宿主细胞作为免疫原来得到与 KID3 结合的单克隆抗体。这些细胞包括（但不限于）人胚肾细胞和人结肠癌细胞。

[0111] 为鉴别抗体应答,可以从动物中获得小量生物样品（如血）并测试针对免疫原的抗体效价。可以取出脾和 / 或若干大淋巴结并分离成为单细胞。需要时,在去除非特异粘附细胞后,可以通过将细胞悬液涂在包被该表位的平板或孔板上筛选脾细胞。表达对该表位具有特异性的膜结合免疫球蛋白的 B 细胞将与平板结合,并且不会随剩余的悬液一起被冲洗掉。然后将得到的 B 细胞或者全部分离的脾细胞与骨髓瘤细胞（例如 X63-Ag8.653 和来自 Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, CA 的）融合。可以使用聚乙二醇 (PEG) 将脾或淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤。接着在选择培养基（例如次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶核苷培养基）中培养杂交瘤细胞。然后通过有限稀释将得到的杂交瘤铺板并使用 FACS 或免疫组化 (IHC 筛选) 测试与免疫原（如人胚肾细胞表面、癌细胞系表面、Ag-KID3、胚胎切片等）特异结合的抗体的产量。然后体外（如在组织培养瓶或毛细管反应器中）或体内（如小鼠腹水）培养选择的分泌单克隆抗体的杂交瘤。实施例 3 提供了关于获得和筛选抗 KID3 抗体的方法的其他细节。

[0112] 可以使用另一种细胞融合技术——EBV 永生化 B 细胞产生本发明的单克隆抗体。需要时,扩大并亚克隆杂交瘤,并通过常规试验流程（例如 FACS、IHC、放射性免疫测定、酶免疫测定、荧光免疫测定等）测定上清液的抗免疫原活性。

[0113] 另外,可以通过本领域已知的任何方法（例如人源化、使用转基因小鼠产生全人抗体、噬菌体展示技术等）重组产生单克隆抗体抗 KID3 和任何其他等价抗体并对其测序。在一个实施方案中,测序抗 KID3 单克隆抗体,然后将多核苷酸序列克隆到载体中以表达或增殖。可以在宿主细胞中的载体中保存编码目的抗体的序列,然后可以扩大宿主细胞并冻存待用。

[0114] 图 7 显示抗 KID3 单克隆抗体——小鼠抗 KID3 的 κ 轻链的核酸和相应翻译的蛋白质序列（包括天然信号序列）。天然信号序列为氨基酸 1-20、核苷酸残基 1-60。轻链可变区为氨基酸 21-131、核苷酸残基 61-393。人 κ 恒定区为氨基酸 132-238、核苷酸残基 394-714。中止密码子为核苷酸残基 715-717。

[0115] 图 8 显示抗 KID3 单克隆抗体——小鼠抗 KID3 的 G1 重链的核酸和相应翻译的蛋白质序列（包括天然信号序列）。天然信号序列为氨基酸 1-18、核苷酸残基 1-54。重链可变区为氨基酸 19-138、核苷酸残基 55-414。人 $\gamma 1$ 恒定区为氨基酸 139-468、核苷酸残基 415-1404。中止密码子为核苷酸残基 1405-1407。

[0116] 单克隆抗体抗 KID3 和任何其他等价抗体的核苷酸序列可用于基因操作而产生“人源化”抗体,以改进抗体的亲和力或其他特征。人源化抗体的一般原则涉及保留抗体表位结合部分的基本序列,而用人抗体序列替换抗体的非人剩余部分。人源化单克隆抗体有四个一般步骤。它们是:(1) 确定起始抗体轻链和重链可变区的核苷酸和预测的氨基酸序列;(2) 设计人源化抗体,即确定在人源化过程中使用哪个抗体构架区;(3) 实际人源化方法 / 技术和 (4) 转染和表达人源化抗体。参阅如 U. S. 专利 No. 4,816,567、5,807,715、5,866,692 和 6,331,415。

[0117] 已经描述了含有来自非人免疫球蛋白的表位结合位点的大量“人源化”抗体分子,包括具有与人恒定区融合的啮齿类或修饰的啮齿类 V 区及其相关互补性决定区 (CDR) 的嵌合抗体。参阅如 Winter 等 Nature 349 :293-299 (1991)、Lobuglio 等 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 :4220-4224(1989)、Shaw 等 Immunol. 138 :4534-4538(1987) 和 Brown 等 Cancer Res. 47 :3577-3583(1987)。其他文献描述了在与适当的人抗体恒定区融合之前移植到人支持构架区 (FR) 的啮齿类 CDR。参阅如 Riechmann 等 Nature 332 :323-327(1988)、Verhoeyen 等 Science 239 :1534-1536(1988) 和 Jones 等 Nature 321 :522-525(1986)。另一参考文献描述了重组修饰的啮齿类构架区所支持的啮齿类 CDR。参阅如 European Patent Publication No. 519, 596。这些“人源化”分子设计用于使针对啮齿类抗人抗体分子的不需要的免疫应答最小化,所述应答限制了这些部分在人受试者中治疗应用的持久性和效力。也可以利用 Daugherty 等 Nucl. Acids Res. , 19 :2471-2476(1991) 和 U. S. 专利 No. 6, 180, 377、6, 054, 297、5, 997, 867 和 5, 866, 692 中所述的其他人源化抗体的方法。

[0118] 本发明还包括本发明抗体 (如小鼠抗人 KID3) 的单链可变区片段 (“scFv”)。通过使用短连接肽连接轻链和 / 或重链可变区产生单链可变区片段。Bird 等 (1988) Science 242 :423-426 描述了连接跨度约 3.5nm 的一个可变区的羧基端和另一可变区氨基端的连接肽实例。设计并使用了其他序列的接头,Bird 等 (1988)。可以进而修饰接头以具有额外的功能,如附着药物或附着到固体支持物上。可以重组或合成产生单链可变区。可以使用自动合成仪合成产生 scFv。为重组产生 scFv,可以将含有编码该 scFv 的多核苷酸的适当质粒引入合适的真核 (如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞) 或原核 (如大肠杆菌) 宿主细胞中。可以通过常规操作 (如连接多核苷酸) 产生编码目的 scFv 的多核苷酸。可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化技术分离产生的 scFv。

[0119] 本发明包括 KID3 激动剂、拮抗剂、调节剂和抗体 (包括功能性等价抗体) 及多肽的不显著影响特性修饰物和增强或减弱了活性的变体。

[0120] 修饰多肽是本领域的常规技术,无需在本文详细描述。修饰多肽的实例包括保氨基酸残基的保守性替换、缺失或添加一个或多个不显著损害功能活性的氨基酸或使用化学类似物。可以互相保守性替代的氨基酸残基包括 (但不限于):甘氨酸 / 丙氨酸、缬氨酸 / 异亮氨酸 / 亮氨酸、天冬酰胺 / 谷氨酰胺、天冬氨酸 / 谷氨酸、丝氨酸 / 苏氨酸、赖氨酸 / 精氨酸和苯丙氨酸 / 酪氨酸。这些多肽还包括糖基化和非糖基化多肽以及具有其他翻译后修饰 (如不同糖的糖基化、乙酰化和磷酸化) 的多肽。氨基酸替换优选为保守性的,即替代的氨基酸具有与原来氨基酸类似的化学特性。这些保守性替换为本领域公知,且上文已提供了实例。氨基酸修饰的范围可以从改变或修饰一个或多个氨基酸到将区域 (如可变区) 完全重新设计。

[0121] 可变区的变化可以改变亲和力和 / 或特异性。修饰的其他方法包括使用本领域已知的偶联技术,包括 (但不限于) 酶方法、氧化替换和螯合作用。修饰可用于例如附着免疫测定的标记,如附着放射性免疫测定的放射性同位素。使用本领域已建立的方法产生修饰多肽,并可使用本领域已知的标准测定法进行筛选。

[0122] 本发明还包括含有来自本发明多肽或抗体的一个或多个片段或区域的融合蛋白。在一个实施方案中提供了含有轻链可变区的至少 10 个连续氨基酸和重链可变区的至少 10 个氨基酸的融合多肽。在另一实施方案中,融合多肽含有异源免疫球蛋白恒定区。在另一

实施方案中,融合多肽含有抗体的轻链可变区和重链可变区,所述抗体产生自如本文所述的 ATCC 保藏的杂交瘤。就本发明而言,抗体融合蛋白含有一个或多个抗 KID3 多肽和天然分子中未附着的另一氨基酸序列,例如异源序列或另一区域的同源序列。

[0123] 可以通过本领域已知的方法(如合成或重组)产生抗 KID3 多肽和其他 KID3 激动剂、拮抗剂和调节剂。产生 KID3 肽激动剂、拮抗剂和调节剂的一种方法涉及化学合成多肽,接着在适于得到天然构象(即正确的二硫键)的氧化条件下处理。这可使用本领域技术人员所熟知的方法达到(参阅《Genetic Engineering Principles and Methods》,Setlow, J. K. 编辑,Plenum Press, N. Y., 第 12 卷,1-19 页(1990)中 Kelley, R. F. & Winkler, M. E.、Stewart, J. M. & Young, J. D. 《Solid Phase Peptide Synthesis》Pierce Chemical Co. Rockford, 111. (1984), 另外参阅 U. S. 专利 No. 4, 105, 603、3, 972, 859、3, 842, 067 和 3, 862, 925)。

[0124] 可以使用固相肽合成方便地制备本发明的多肽(Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85 :2149 (1964); Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :5132 (1985))。

[0125] 在另一实施方案中,可以通过使用市售的经设计表达特定人免疫球蛋白的小鼠获得全人抗体。还可以使用经设计产生更需要的(例如全人抗体)或更强的免疫应答的转基因动物来产生人源化或人抗体。这些技术的实例为 Abgenix, Inc. (Fremont, CA) 的 Xenomouse™ 和 Medarex, Inc. (Princeton, NJ) 的 HuMAb-Mouse 和 TC Mouse。

[0126] 另外,可以使用本领域已知的任何方法重组产生并表达抗体。抗体的重组产生通过首先分离宿主动物产生的抗体、获得基因序列和使用该基因序列在宿主细胞(如 CHO 细胞)中重组表达抗体。可以使用的另一方法为在植物(如烟草)或转基因乳中表达抗体。已经公开了在植物或乳中重组表达抗体的方法。参阅如 Peeters 等(2001) Vaccine 19 :2756、Lonberg, N. 和 D. Huszar (1995) Int. Rev. Immunol 13 :65 和 Pollock 等(1999) J Immunol Methods 231 :147。产生抗体衍生物如人源化的、单链抗体等技术为本领域所公知。另外,可以通过噬菌体展示技术重组产生抗体。参阅如 U. S. 专利 No. 5, 565, 332、5, 580, 717、5, 733, 743、6, 265, 150 和 Winter 等 Annu. Rev. Immunol. 12 :433-455 (1994)。

[0127] 可以通过本领域技术人员所熟知的 Edman 降解法对目的抗体或蛋白质测序。从质谱或 Edman 降解法得到的肽信息可以用于设计克隆目的蛋白质所使用的探针或引物。

[0128] 克隆目的蛋白质的另一方法为使用纯化的 KID3 或其部分“淘选”表达抗体的细胞。通过从表达目的抗体或蛋白质的组织或细胞得到 cDNA 文库、在另一种细胞类型中过表达 cDNA 和筛选第二种细胞类型的转染细胞与 KID3 的特异性结合实施“淘选”流程。可在本领域可见通过“淘选”克隆编码细胞表面蛋白质的哺乳动物基因的方法的详细描述。参阅如 Aruffo, A. 和 Seed, B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8573-8577 (1987) 和 Stephan, J. 等, Endocrinology 140 :5841-5854 (1999)。

[0129] 可以根据本领域的标准方法通过逆转录来自特定细胞类型的 mRNA 来得到编码抗 KID3 抗体和其他 KID3 肽激动剂、拮抗剂和调节剂的 cDNA。具体地, mRNA 可以根据先前 Sambrook 等设置的步骤使用多种水解酶或化学溶液分离,或按照生产商(如 Qiagen、Invitrogen、Promega)提供的附带说明书用市售的核酸结合树脂提取。然后将合成的 cDNA 引入表达载体以在另一类型的细胞中产生目的抗体或蛋白质。这意味着表达载体必须可在宿主细胞中作为游离基因或染色体 DNA 的整合部分复制。合适的载体包括(但不限于)

质粒、病毒载体（包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒）和粘粒。

[0130] 可以通过大量合适方法中的任一种将含有目的多核苷酸的载体引入宿主细胞，包括电穿孔、使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质转染、微粒轰击、脂质转染和感染（例如载体为感染剂如痘苗病毒时）。引入载体或多核苷酸的选择经常取决于宿主细胞的特征。

[0131] 任何能够过表达异源 DNA 的宿主细胞都可以用于分离编码目的抗体、多肽或蛋白质的基因的目的。哺乳动物宿主细胞的非限制性的实例包括（但不限于）COS、HeLa 和 CHO 细胞。优选地，宿主细胞表达 cDNA 的水平比相应内源相关抗体或蛋白质在宿主细胞中的表达水平（如果存在的话）高 5 倍，更优选高 10 倍，甚至更优选高 20 倍。通过免疫测定或 FACS 筛选宿主细胞与 KID3 的特异性结合。可以鉴定出过表达目的抗体或蛋白质的细胞。

[0132] 还有多种技术可用于产生突变体 KID3 肽激动剂、拮抗剂和调节剂，相对于亲本 KID3 肽激动剂、拮抗剂或调节剂分子，所述 KID3 肽激动剂、拮抗剂和调节剂编码氨基酸序列中存在添加、缺失或改变的所得蛋白质。

[0133] 本发明包括含有本发明抗体氨基酸序列的多肽。可以通过本领域已知的方法产生本发明的多肽。可以通过抗体的蛋白水解或其他降解、通过如上文所述的重组方法（即单个或融合多肽）或化学合成产生多肽。通过化学合成可以便利地产生抗体的多肽，特别是长度上至约 50 个氨基酸的短肽。化学合成的方法为本领域所公知并可商业获得。例如，可以利用固相方法用自动多肽合成仪产生抗 KID3 多肽。

[0134] IV. 筛选多肽和单克隆抗体的方法。

[0135] 可以使用若干方法筛选与 KID3 结合的多肽和单克隆抗体。应该理解“结合”是指与生物学或免疫学相关的结合，即对免疫球蛋白所编码或多肽所针对的独有抗原决定簇具有特异性的结合。不涉及以极高浓度使用抗体时可能出现的针对非特异靶标的非特异性结合。在一个实施方案中，使用标准筛选技术筛选单克隆抗体与 KID3 的结合。以这种方式获得抗 KID3 单克隆抗体。根据布达佩斯条约，已于 2002 年 12 月 18 日将产生抗 KID3 单克隆抗体的杂交瘤以专利保藏编号 PTA-4860 保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC）10801 University Blvd., Manassas VA 20110-2209。

[0136] 筛选了与 KID3 结合的单克隆抗体与癌组织和非癌细胞的结合。在一个实施方案中，选择了与 KID3 结合且同时与人癌细胞或组织交叉反应而不以同等程度与正常细胞或组织交叉反应的单克隆抗体。筛选可用的一个方法为免疫组织化学（IHC）。标准免疫组织化学技术为本领域一般技术人员所公知。参阅如《Animal Cell Culture Methods》（J. P. Mather 和 D. Barnes 编辑，Academic Press，第 57 卷，第 18 章和 19 章，314-350 页，1998）。可以从活检、尸检或尸体剖检中得到生物样品（如组织）。为确定 KID3 是否只在癌细胞中表达，可以使用抗 KID3 抗体检测 KID3 在取自癌症个体的组织中的存在，其中使用患癌症个体的其他非癌组织或来自无癌症个体的组织作为对照。可将组织包埋于防止冰冻过程中损伤的半固体或半固体物质（如琼脂糖凝胶或 OCT）中，并切片用于染色。可以使用不同器官的不同分级的癌来筛选单克隆抗体。可用于筛选目的的组织实例包括（但不限于）卵巢、乳腺、肺、前列腺、结肠、肾、皮肤、甲状腺、脑、心、肝、胃、神经、血管、骨、上消化道和胰腺。可用于筛选目的的不同癌症类型包括（但不限于）上皮癌、腺癌、肉瘤、腺肉瘤、

淋巴瘤和非白血性白血病。

[0137] 另外,可以使用以下癌细胞系及其各自组织的正常细胞筛选对癌组织具有特异性的单克隆抗体:SK-Ov-3(ATCC#HTB 77)、LnCap(ATCC#CRL-1740)、A549(ATCC#CCL 185)、PANC-1(ATCC#CRL 1469)、SK-BR-3(ATCC#HTB 30)、SK-MES-1(ATCC#HTB 58)、HT-29(HTB-38)、SW 480(ATCC#CCL 228)、AsPC-1(ATCC#CRL 1682)、Capan-1(ATCC#HTB 79)、CFPAC-1(ATCC#CRL 1918)、HPAF-II(ATCC#CRL-1997)、Hs-700T(ATCC#HTB 147)、ES-2(ATCC#CRL-1978)、PC-3(ATCC#CRL 1435)、Du-145(ATCC#HTB-81)、Calu3(ATCC#HTB-55)、A498(ATCC#CRL-7908)、Caki-2(ATCC#HTB-47)、786-0(ATCC#CRL-1932)、Hs 766T(ATCC#HTB-134)、MCF7(ATCC#HTB-22)、BT-474(ATCC#HTB-20)、Rav CA130(Raven Biotechnologies, inc. 开发的专利肺癌株系)、Rav9926(Raven 开发的专利胰腺癌细胞系)和 22Rv1(ATCC#CRL-2505)。可使用来自不同器官正常组织的原代或低传代数细胞培养物作为阴性对照,这些器官包括(但不限于)卵巢、乳腺、肺、前列腺、结肠、肾、皮肤、甲状腺、动脉平滑肌和内皮细胞。可以在载玻片或盖玻片,或塑料表面上培养癌和非癌细胞,或如 W001/43869 中所述在 cellarray™ 中制备,并如上文所述使用组织 IHC 筛选抗体的结合。另外,可以使用非蛋白水解方法从培养表面移去细胞并离心为沉淀,然后包埋沉淀并作为组织处理用于如上文所述的 IHC 分析。可以将细胞接种到允许肿瘤生长的免疫缺陷型动物中,然后收获肿瘤、包埋,并作为 IHC 分析的组织来源。另外,可以通过与第一抗体和连接荧光分子的第二“报告”抗体孵育并接着使用荧光激活细胞分选(FACS)机进行分析来筛选单个细胞。

[0138] 可以使用若干不同的检测系统检测抗体与组织切片的结合。免疫组化一般涉及将第一抗体与组织结合和接着结合第二抗体,所述第二抗体对第一抗体的来源物种具有反应性,并缀合了可检测标记物(例如辣根过氧化物酶(HRP)或二氨基联苯胺(DAB))。可以使用的另一方法为多克隆对映体互补抗体或 polyMICA。D. C. Mangham 和 P. G. Isaacson(Histopathology (1999) 35(2):129-33)所述的 PolyMICA(多克隆对映体互补抗体)技术可用于测试第一抗体(如抗 KID3 抗体)与正常和癌组织的结合。可从 BindingSite Limited(P. O. Box 4073 Birmingham B296AT England)购得若干种类的 polyMICA™ 检测试剂盒。产品号 HK004. D 为使用 DAB 发色团的 polyMICA 检测试剂盒。产品号 HK004. A 为使用 AEC 发色团的 polyMICA 检测试剂盒。另外,可以使用可检测标记物直接标记第一抗体。

[0139] 选择合适抗体的 IHC 筛选的第一步是将小鼠中产生的第一抗体(如抗 KID3 抗体)与一种或多种免疫原(如细胞或组织样品)结合。在一个实施方案中,组织样品为不同器官的冰冻组织切片。细胞或组织样品可以是癌细胞或组织或非癌细胞或组织。

[0140] 可以制备、切片(固定或不固定)冰冻组织,并通过熟悉本领域的人员所知的大量方法中的任一种进行 IHC。参阅如 Stephan 等 Dev. Biol. 212:264-277(1999)和 Stephan 等 Endocrinology 140:5841-54(1999)。

[0141] V. 表征抗 KID3 抗体的方法

[0142] 可以使用若干方法表征抗 KID3 抗体。一种方法为鉴定其结合的表位。可以通过合成构成 KID3 的核心碳水化合物完成表位作图。还可以将这些合成的碳水化合物人工附加到载体分子(如牛血清白蛋白(BSA)或人血清白蛋白(HAS))上构成“新蛋白质”。

合成新蛋白质可从多种来源购得,例如 Lundonia Biotech AB(Lund, Sweden) 和 Dextra Laboratories(Reading, United Kingdom)。这些新蛋白质可以作为筛选靶标用于发现其他抗 KID3 抗体。

[0143] 可用于表征抗 KID3 抗体的另一方法为使用已知结合同一表位(即 KID3)的其他抗体的竞争试验,以确定抗 KID3 抗体是否与其他抗体结合同一表位。可以获得并使用本文教导的结合试验鉴定市售的 KID3 抗体实例。竞争试验为本领域技术人员所熟知,且在实施例中详细说明了该流程和说明性数据。还可以通过其结合的癌组织类型或肿瘤类型进一步表征抗 KID3 抗体。

[0144] VI. 使用抗 KID3 抗体和 KID 调节剂诊断癌症的方法

[0145] 为了诊断的目的,可以使用本文所公开方法产生的 KID3 的单克隆抗体在多种组织中鉴定癌细胞存在与否,这些组织包括(但不限于)卵巢、乳腺、肺、前列腺、结肠、肾、胰腺、皮肤、甲状腺、脑、心、肝、胃、神经、血管、骨和上消化道。还可以使用本文所公开方法产生的 KID3 的多克隆抗体在多种组织中鉴定癌细胞存在与否,或从实体瘤释放后在血液中循环的其抗原决定簇水平。这些循环的抗原决定簇可以是完整的 IKD3 表位或其仍然能够被本文教导的方法检测到的片段。可以使用本领域通常使用的标准方法通过 FACS 分析进行这些检测。

[0146] 这些用途包括形成 KID3 和与 KID3 特异性结合的抗体的复合物。这些抗体的实例包括(但不限于)以编号 PTA-4860 保藏于 ATCC 的杂交瘤所产生的抗 KID3 单克隆抗体。可以体外或体内形成这些复合物。不限于任何理论的,单克隆抗体抗 KID3 可以与 KID3 结合并被内化。

[0147] 在本发明诊断方法的优选实施方案中,抗体携带了可检测标记。可使用的标记包括放射性试剂或荧光基团,如异硫氰酸荧光素(fluoroisothiocyanate)或藻红蛋白。

[0148] 与用于诊断和治疗目的的其他已知商业使用抗体一样,本发明的靶表位在正常组织中广泛表达。它也在一些肿瘤中上调。因此,用作诊断或治疗剂的本发明抗体的具体剂量和递送途径需要适应于具体的肿瘤或疾病状态以及具体的受治个体。

[0149] 使用抗体进行诊断的一个方法是体内肿瘤造影:将抗体与放射性或不透射线剂连接,将抗体施用于个体并使用 x-射线或其他造影仪显示标记抗体在表达表位的癌细胞表面的定位。抗体以促进生理条件下的结合的浓度施用。

[0150] 检测 KID3 的体外技术为本领域的常规方法,包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀、免疫荧光、酶免疫测定(EIA)、放射免疫测定(RIA)和 Western 印迹分析。

[0151] 在本发明的一个方面中,肿瘤或赘生物放射造影或使用放射性标记抗体评估治疗方法效力的方法包括按本发明的实践对个体施用放射性标记的肿瘤特异性抗体的步骤。放射性标记的抗体可以是含有优选选自以下放射性标记的单克隆或多克隆抗体:锝 99-m、铟-111、碘-131、铯-137、铯-138、铯-139、铯-140、铯-141、铯-142、铯-143、铯-144、铯-145、铯-146、铯-147、铯-148、铯-149、铯-150、铯-151、铯-152、铯-153、铯-154、铯-155、铯-156、铯-157、铯-158、铯-159、铯-160、铯-161、铯-162、铯-163、铯-164、铯-165、铯-166、铯-167、铯-168、铯-169、铯-170、铯-171、铯-172、铯-173、铯-174、铯-175、铯-176、铯-177、铯-178、铯-179、铯-180、铯-181、铯-182、铯-183、铯-184、铯-185、铯-186、铯-187、铯-188、铯-189、铯-190、铯-191、铯-192、铯-193、铯-194、铯-195、铯-196、铯-197、铯-198、铯-199、铯-200、铯-201、铯-202、铯-203、铯-204、铯-205、铯-206、铯-207、铯-208、铯-209、铯-210、铯-211、铯-212、铯-213、铯-214、铯-215、铯-216、铯-217、铯-218、铯-219、铯-220、铯-221、铯-222、铯-223、铯-224、铯-225、铯-226、铯-227、铯-228、铯-229、铯-230、铯-231、铯-232、铯-233、铯-234、铯-235、铯-236、铯-237、铯-238、铯-239、铯-240、铯-241、铯-242、铯-243、铯-244、铯-245、铯-246、铯-247、铯-248、铯-249、铯-250、铯-251、铯-252、铯-253、铯-254、铯-255、铯-256、铯-257、铯-258、铯-259、铯-260、铯-261、铯-262、铯-263、铯-264、铯-265、铯-266、铯-267、铯-268、铯-269、铯-270、铯-271、铯-272、铯-273、铯-274、铯-275、铯-276、铯-277、铯-278、铯-279、铯-280、铯-281、铯-282、铯-283、铯-284、铯-285、铯-286、铯-287、铯-288、铯-289、铯-290、铯-291、铯-292、铯-293、铯-294、铯-295、铯-296、铯-297、铯-298、铯-299、铯-300、铯-301、铯-302、铯-303、铯-304、铯-305、铯-306、铯-307、铯-308、铯-309、铯-310、铯-311、铯-312、铯-313、铯-314、铯-315、铯-316、铯-317、铯-318、铯-319、铯-320、铯-321、铯-322、铯-323、铯-324、铯-325、铯-326、铯-327、铯-328、铯-329、铯-330、铯-331、铯-332、铯-333、铯-334、铯-335、铯-336、铯-337、铯-338、铯-339、铯-340、铯-341、铯-342、铯-343、铯-344、铯-345、铯-346、铯-347、铯-348、铯-349、铯-350、铯-351、铯-352、铯-353、铯-354、铯-355、铯-356、铯-357、铯-358、铯-359、铯-360、铯-361、铯-362、铯-363、铯-364、铯-365、铯-366、铯-367、铯-368、铯-369、铯-370、铯-371、铯-372、铯-373、铯-374、铯-375、铯-376、铯-377、铯-378、铯-379、铯-380、铯-381、铯-382、铯-383、铯-384、铯-385、铯-386、铯-387、铯-388、铯-389、铯-390、铯-391、铯-392、铯-393、铯-394、铯-395、铯-396、铯-397、铯-398、铯-399、铯-400、铯-401、铯-402、铯-403、铯-404、铯-405、铯-406、铯-407、铯-408、铯-409、铯-410、铯-411、铯-412、铯-413、铯-414、铯-415、铯-416、铯-417、铯-418、铯-419、铯-420、铯-421、铯-422、铯-423、铯-424、铯-425、铯-426、铯-427、铯-428、铯-429、铯-430、铯-431、铯-432、铯-433、铯-434、铯-435、铯-436、铯-437、铯-438、铯-439、铯-440、铯-441、铯-442、铯-443、铯-444、铯-445、铯-446、铯-447、铯-448、铯-449、铯-450、铯-451、铯-452、铯-453、铯-454、铯-455、铯-456、铯-457、铯-458、铯-459、铯-460、铯-461、铯-462、铯-463、铯-464、铯-465、铯-466、铯-467、铯-468、铯-469、铯-470、铯-471、铯-472、铯-473、铯-474、铯-475、铯-476、铯-477、铯-478、铯-479、铯-480、铯-481、铯-482、铯-483、铯-484、铯-485、铯-486、铯-487、铯-488、铯-489、铯-490、铯-491、铯-492、铯-493、铯-494、铯-495、铯-496、铯-497、铯-498、铯-499、铯-500、铯-501、铯-502、铯-503、铯-504、铯-505、铯-506、铯-507、铯-508、铯-509、铯-510、铯-511、铯-512、铯-513、铯-514、铯-515、铯-516、铯-517、铯-518、铯-519、铯-520、铯-521、铯-522、铯-523、铯-524、铯-525、铯-526、铯-527、铯-528、铯-529、铯-530、铯-531、铯-532、铯-533、铯-534、铯-535、铯-536、铯-537、铯-538、铯-539、铯-540、铯-541、铯-542、铯-543、铯-544、铯-545、铯-546、铯-547、铯-548、铯-549、铯-550、铯-551、铯-552、铯-553、铯-554、铯-555、铯-556、铯-557、铯-558、铯-559、铯-560、铯-561、铯-562、铯-563、铯-564、铯-565、铯-566、铯-567、铯-568、铯-569、铯-570、铯-571、铯-572、铯-573、铯-574、铯-575、铯-576、铯-577、铯-578、铯-579、铯-580、铯-581、铯-582、铯-583、铯-584、铯-585、铯-586、铯-587、铯-588、铯-589、铯-590、铯-591、铯-592、铯-593、铯-594、铯-595、铯-596、铯-597、铯-598、铯-599、铯-600、铯-601、铯-602、铯-603、铯-604、铯-605、铯-606、铯-607、铯-608、铯-609、铯-610、铯-611、铯-612、铯-613、铯-614、铯-615、铯-616、铯-617、铯-618、铯-619、铯-620、铯-621、铯-622、铯-623、铯-624、铯-625、铯-626、铯-627、铯-628、铯-629、铯-630、铯-631、铯-632、铯-633、铯-634、铯-635、铯-636、铯-637、铯-638、铯-639、铯-640、铯-641、铯-642、铯-643、铯-644、铯-645、铯-646、铯-647、铯-648、铯-649、铯-650、铯-651、铯-652、铯-653、铯-654、铯-655、铯-656、铯-657、铯-658、铯-659、铯-660、铯-661、铯-662、铯-663、铯-664、铯-665、铯-666、铯-667、铯-668、铯-669、铯-670、铯-671、铯-672、铯-673、铯-674、铯-675、铯-676、铯-677、铯-678、铯-679、铯-680、铯-681、铯-682、铯-683、铯-684、铯-685、铯-686、铯-687、铯-688、铯-689、铯-690、铯-691、铯-692、铯-693、铯-694、铯-695、铯-696、铯-697、铯-698、铯-699、铯-700、铯-701、铯-702、铯-703、铯-704、铯-705、铯-706、铯-707、铯-708、铯-709、铯-710、铯-711、铯-712、铯-713、铯-714、铯-715、铯-716、铯-717、铯-718、铯-719、铯-720、铯-721、铯-722、铯-723、铯-724、铯-725、铯-726、铯-727、铯-728、铯-729、铯-730、铯-731、铯-732、铯-733、铯-734、铯-735、铯-736、铯-737、铯-738、铯-739、铯-740、铯-741、铯-742、铯-743、铯-744、铯-745、铯-746、铯-747、铯-748、铯-749、铯-750、铯-751、铯-752、铯-753、铯-754、铯-755、铯-756、铯-757、铯-758、铯-759、铯-760、铯-761、铯-762、铯-763、铯-764、铯-765、铯-766、铯-767、铯-768、铯-769、铯-770、铯-771、铯-772、铯-773、铯-774、铯-775、铯-776、铯-777、铯-778、铯-779、铯-780、铯-781、铯-782、铯-783、铯-784、铯-785、铯-786、铯-787、铯-788、铯-789、铯-790、铯-791、铯-792、铯-793、铯-794、铯-795、铯-796、铯-797、铯-798、铯-799、铯-800、铯-801、铯-802、铯-803、铯-804、铯-805、铯-806、铯-807、铯-808、铯-809、铯-810、铯-811、铯-812、铯-813、铯-814、铯-815、铯-816、铯-817、铯-818、铯-819、铯-820、铯-821、铯-822、铯-823、铯-824、铯-825、铯-826、铯-827、铯-828、铯-829、铯-830、铯-831、铯-832、铯-833、铯-834、铯-835、铯-836、铯-837、铯-838、铯-839、铯-840、铯-841、铯-842、铯-843、铯-844、铯-845、铯-846、铯-847、铯-848、铯-849、铯-850、铯-851、铯-852、铯-853、铯-854、铯-855、铯-856、铯-857、铯-858、铯-859、铯-860、铯-861、铯-862、铯-863、铯-864、铯-865、铯-866、铯-867、铯-868、铯-869、铯-870、铯-871、铯-872、铯-873、铯-874、铯-875、铯-876、铯-877、铯-878、铯-879、铯-880、铯-881、铯-882、铯-883、铯-884、铯-885、铯-886、铯-887、铯-888、铯-889、铯-890、铯-891、铯-892、铯-893、铯-894、铯-895、铯-896、铯-897、铯-898、铯-899、铯-900、铯-901、铯-902、铯-903、铯-904、铯-905、铯-906、铯-907、铯-908、铯-909、铯-910、铯-911、铯-912、铯-913、铯-914、铯-915、铯-916、铯-917、铯-918、铯-919、铯-920、铯-921、铯-922、铯-923、铯-924、铯-925、铯-926、铯-927、铯-928、铯-929、铯-930、铯-931、铯-932、铯-933、铯-934、铯-935、铯-936、铯-937、铯-938、铯-939、铯-940、铯-941、铯-942、铯-943、铯-944、铯-945、铯-946、铯-947、铯-948、铯-949、铯-950、铯-951、铯-952、铯-953、铯-954、铯-955、铯-956、铯-957、铯-958、铯-959、铯-960、铯-961、铯-962、铯-963、铯-964、铯-965、铯-966、铯-967、铯-968、铯-969、铯-970、铯-971、铯-972、铯-973、铯-974、铯-975、铯-976、铯-977、铯-978、铯-979、铯-980、铯-981、铯-982、铯-983、铯-984、铯-985、铯-986、铯-987、铯-988、铯-989、铯-990、铯-991、铯-992、铯-993、铯-994、铯-995、铯-996、铯-997、铯-998、铯-999、铯-1000、铯-1001、铯-1002、铯-1003、铯-1004、铯-1005、铯-1006、铯-1007、铯-1008、铯-1009、铯-1010、铯-1011、铯-1012、铯-1013、铯-1014、铯-1015、铯-1016、铯-1017、铯-1018、铯-1019、铯-1020、铯-1021、铯-1022、铯-1023、铯-1024、铯-1025、铯-1026、铯-1027、铯-1028、铯-1029、铯-1030、铯-1031、铯-1032、铯-1033、铯-1034、铯-1035、铯-1036、铯-1037、铯-1038、铯-1039、铯-1040、铯-1041、铯-1042、铯-1043、铯-1044、铯-1045、铯-1046、铯-1047、铯-1048、铯-1049、铯-1050、铯-1051、铯-1052、铯-1053、铯-1054、铯-1055、铯-1056、铯-1057、铯-1058、铯-1059、铯-1060、铯-1061、铯-1062、铯-1063、铯-1064、铯-1065、铯-1066、铯-1067、铯-1068、铯-1069、铯-1070、铯-1071、铯-1072、铯-1073、铯-1074、铯-1075、铯-1076、铯-1077、铯-1078、铯-1079、铯-1080、铯-1081、铯-1082、铯-1083、铯-1084、铯-1085、铯-1086、铯-1087、铯-1088、铯-1089、铯-1090、铯-1091、铯-1092、铯-1093、铯-1094、铯-1095、铯-1096、铯-1097、铯-1098、铯-1099、铯-1100、铯-1101、铯-1102、铯-1103、铯-1104、铯-1105、铯-1106、铯-1107、铯-1108、铯-1109、铯-1110、铯-1111、铯-1112、铯-1113、铯-1114、铯-1115、铯-1116、铯-1117、铯-1118、铯-1119、铯-1120、铯-1121、铯-1122、铯-1123、铯-1124、铯-1125、铯-1126、铯-1127、铯-1128、铯-1129、铯-1130、铯-1131、铯-1132、铯-1133、铯-1134、铯-1135、铯-1136、铯-1137、铯-1138、铯-1139、铯-1140、铯-1141、铯-1142、铯-1143、铯-1144、铯-1145、铯-1146、铯-1147、铯-1148、铯-1149、铯-1150、铯-1151、铯-1152、铯-1153、铯-1154、铯-1155、铯-1156、铯-1157、铯-1158、铯-1159、铯-1160、铯-1161、铯-1162、铯-1163、铯-1164、铯-1165、铯-1166、铯-1167、铯-1168、铯-1169、铯-1170、铯-1171、铯-1172、铯-1173、铯-1174、铯-1175、铯-1176、铯-1177、铯-1178、铯-1179、铯-1180、铯-1181、铯-1182、铯-1183、铯-1184、铯-1185、铯-1186、铯-1187、铯-1188、铯-1189、铯-1190、铯-1191、铯-1192、铯-1193、铯-1194、铯-1195、铯-1196、铯-1197、铯-1198、铯-1199、铯-1200、铯-1201、铯-1202、铯-1203、铯-1204、铯-1205、铯-1206、铯-1207、铯-1208、铯-1209、铯-1210、铯-1211、铯-1212、铯-1213、铯-1214、铯-1215、铯-1216、铯-1217、铯-1218、铯-1219、铯-1220、铯-1221、铯-1222、铯-1223、铯-1224、铯-1225、铯-1226、铯-1227、铯-1228、铯-1229、铯-1230、铯-1231、铯-1232、铯-1233、铯-1234、铯-1235、铯-1236、铯-1237、铯-1238、铯-1239、铯-1240、铯-1241、铯-1242、铯-1243、铯-1244、铯-1245、铯-1246、铯-1247、铯-1248、铯-1249、铯-1250、铯-1251、铯-1252、铯-1253、铯-1254、铯-1255、铯-1256、铯-1257、铯-1258、铯-1259、铯-1260、铯-1261、铯-1262、铯-1263、铯-1264、铯-1265、铯-1266、铯-1267、铯-1268、铯-1269、铯-1270、铯-1271、铯-1272、铯-1273、铯-1274、铯-1275、铯-1276、铯-1277、铯-1278、铯-1279、铯-1280、铯-1281、铯-1282、铯-1283、铯-1284、铯-1285、铯-1286、铯-1287、铯-1288、铯-1289、铯-1290、铯-1291、铯-1292、铯-1293、铯-1294、铯-1295、铯-1296、铯-1297、铯-1298、铯-1299、铯-1300、铯-1301、铯-1302、铯-1303、铯-1304、铯-1305、铯-1306、铯-1307、铯-1308、铯-1309、铯-1310、铯-1311、铯-1312、铯-1313、铯-1314、铯-1315、铯-1316、铯-1317、铯-1318、铯-1319、铯-1320、铯-1321、铯-1322、铯-1323、铯-1324、铯-1325、铯-1326、铯-1327、铯-1328、铯-1329、铯-1330、铯-1331、铯-1332、铯-1333、铯-1334、铯-1335、铯-1336、铯-1337、铯-1338、铯-1339、铯-1340、铯-1341、铯-1342、铯-1343、铯-1344、铯-1345、铯-1346、铯-1347、铯-1348、铯-1349、铯-1350、铯-1351、铯-1352、铯-1353、铯-1354、铯-1355、铯-1356、铯-1357、铯-1358、铯-1359、铯-1360、铯-1361、铯-1362、铯-1363、铯-1364、铯-1365、铯-1366、铯-1367、铯-1368、铯-1369、铯-1370、铯-1371、铯-1372、铯-1373、铯-1374、铯-1375、铯-1376、铯-1377、铯-1378、铯-1379、铯-1380、铯-1381、铯-1382、铯-1383、铯-1384、铯-1385、铯-1386、铯-1387、铯-1388、铯-1389、铯-1390、铯-1391、铯-1392、铯-1393、铯-1394、铯-1395、铯-1396、铯-1397、铯-1398、铯-1399、铯-1400、铯-1401、铯-1402、铯-1403、铯-1404、铯-1405、铯-1406、铯-1407、铯-1408、铯-1409、铯-1410、铯-1411、铯-1412、铯-1413、铯-1414、铯-1415、铯-1416、铯-1417、铯-1418、铯-1419、铯-1420、铯-1421、铯-1422、铯-1423、铯-1424、铯-1425、铯-1426、铯-1427、铯-1428、铯-1429、铯-1430、铯-1431、铯-1432、铯-1433、铯-1434、铯-1435、铯-1436、铯-1437、铯-1438、铯-1439、铯-1440、铯-1441、铯-1442、铯-1443、铯-1444、铯-1445、铯-1446、铯-1447、铯-1448、铯-1449、铯-1450、铯-1451、铯-1452、铯-1453、铯-1454、铯-1455、铯-1456、铯-1457、铯-1458、铯-1459、铯-1460、铯-1461、铯-1462、铯-1463、铯-1464、铯-1465、铯-1466、铯-1467、铯-1468、铯-1469、铯-1470、铯-1471、铯-1472、铯-1473、铯-1474、铯-1475、铯-1476、铯-1477、铯-1478、铯-1479、铯-1480、铯-1481、铯-1482、铯-1483、铯-1484、铯-1485、铯-1486、铯-1487、铯-1488、铯-1489、铯-1490、铯-1491、铯-1492、铯-1493、铯-1494、铯-1495、铯-1496、铯-1497、铯-1498、铯-1499、铯-1500、铯-1501、铯-1502、铯-1503、铯-1504、铯-1505、铯-1506、铯-1507、铯-1508、铯-1509、铯-1510、铯-1511、铯-1512、铯-1513、铯-1514、铯-1515、铯-1516、铯-1517、铯-1518、铯-1519、铯-1520、铯-1521、铯-1522、铯-1523、铯-1524、铯-1525、铯-1526、铯-1527、铯-1528、铯-1529、铯-1530、铯-1531、铯-1532、铯-1533、铯-1534、铯-1535、铯-1536、铯-1537、铯-1538、铯-1539、铯-1540、铯-1541、铯-1542、铯-1543、铯-1544、铯-1545、铯-1546、铯-1547、铯-1548、铯-1549、铯-1550、铯-1551、铯-1552、铯-1553、铯-1554、铯-1555、铯-1556、铯-1557、铯-1558、铯-1559、铯-1560、铯-1561、铯-1562、铯-1563、铯-1564、铯-1565、铯-1566、铯-1567、铯-1568、铯-1569、铯-1570、铯-1571、铯-1572、铯-1573、铯-1574、铯-1575、铯-1576、铯-1577、铯-1578、铯-1579、铯-1580、铯-1581、铯-1582、铯-1583、铯-1584、铯-1585、铯-1586、铯-1587、铯-1588、铯-1589、铯-1590、铯-1591、铯-1592、铯-1593、铯-1594、铯-1595、铯-1596、铯-1597、铯-1598、铯-1599、铯-1600、铯-1601、铯-1602、铯-1603、铯-1604、铯-1605、铯-1606、铯-1607、铯-1608、铯-1609、铯-1610、铯-1611、铯-1612、铯-1613、铯-1614、铯-1615、铯-1616、铯-1617、铯-1618、铯-1619、铯-1620、铯-1621、铯-1622、铯-1623、铯-1624、铯-1625、铯-1626、铯-1627、铯-1628、铯-1629、铯-1630、铯-1631、铯-1632、铯-1633、铯-1634、铯-1635、铯-1636、铯-1637、铯-1638、铯-1639、铯-1640、铯-1641、铯-1642、铯-1643、铯-1644、铯-1645、铯-1646、铯-1647、铯-1

学意义的转移灶位置的相关造影也在设想中。

[0152] 另一方法中,取出癌细胞并通过本领域所熟知的方法制备用于免疫组织化学的组织(例如包埋于冰冻化合物中、冰冻并切片(固定或不固定),固定并石蜡包埋(使用或不使用多种表位回复或复染的方法))。单克隆抗体还可以用于鉴定不同发育阶段的癌细胞。抗体还可以用于在预先水平检测哪些个体的肿瘤在其表面表达表位,并候选使用针对所述表位的抗体进行免疫治疗。抗体可以识别表达 KID3 的卵巢、前列腺或胰腺的原位或转移癌以及肺的原位癌。本文所使用的检测可以包括定性和/或定量检测,并可以包括将正常细胞测定的水平与癌细胞中 KID3 表达提高的水平相比较。

[0153] 本发明还提供在个体中辅助诊断癌症(如卵巢、肺、胰腺、前列腺或乳腺癌)的方法,所述方法使用任何与 KID3 结合的抗体或可用于检测 KID3 表达水平的任何其他方法。本文所使用的“辅助诊断”的方法指这些方法帮助作出关于癌症分级或性质的临床结论,对于最终诊断而言是否为决定性的均有可能。因此,辅助诊断癌症的方法可能包括检测来自个体的生物样品中 KID3 的水平或/或测定样品中 KID3 表达水平的步骤。识别表位或其部分的抗体还可以用于产生诊断性免疫测定法以检测体液(包括但不仅限于血液、唾液、尿液、肺液或腹水)中活细胞或濒死癌细胞释放或分泌的抗原决定簇。

[0154] 不是所有具体的目的肿瘤中的细胞都表达 KID3,而且其他组织中的癌细胞也可能表达 KID3,因此需要筛选个体的癌细胞中 KID3 存在与否,以确定个体中免疫治疗的有效性。本发明的方法产生的抗 KID3 抗体可以用于测定诊断为患有癌症的个体是否可以认为是使用针对 KID3 的抗体的免疫治疗候选者。在一个实施方案中,可以使用针对 KID3 的抗体测试癌性肿瘤或活检样品的 KID3 表达。癌细胞表达 KID3 的个体为使用针对 KID3 抗体的免疫治疗合适候选者。也可以用抗 KID3 抗体染色区别癌组织与正常组织。

[0155] 将抗 KID3 抗体用于诊断目的的方法可用于任何形式的抗癌疗法(例如化学疗法或放射疗法)之前或之后,以确定哪些肿瘤最有可能应答于给定的疗法、诊断癌症个体、肿瘤亚型或转移疾病的来源和疾病发展或对治疗的应答。

[0156] 本发明的组合物还适用于诊断除癌症外的其他疾病状态,所述诊断用其他疾病(非癌)细胞使用以上应用中一般描述的方法进行。适用于本发明方法的疾病状态包括(但不限于)个体中与炎症或自身免疫应答相关的疾病或紊乱。上文所述方法可用于调控个体中的炎症或自身免疫应答。可使用本发明的组合物和方法进行诊断和/或治疗的炎症或自身免疫紊乱引起的疾病和状况包括(用于说明而非限制)多发性硬化、脑膜炎、脑炎、中风、其他脑外伤、炎性肠病(包括溃疡性结肠炎和克罗恩病、重症肌无力、狼疮、类风湿性关节炎、哮喘、急性青少年型糖尿病、AIDS 痴呆、动脉粥样硬化、肾炎、视网膜炎、特应性皮炎、银屑病、心肌缺血和急性白细胞介导的肺损伤。

[0157] 本发明抗体和其他治疗剂的诊断和/或治疗用途的其他适应症包括施用于有器官或移植物排斥风险的个体。近年来移植组织和器官如皮肤、肾、肝、心、肺、胰腺和骨髓的外科技术已经有可观的提高。最突出的问题可能是缺乏在所移植同种异体移植物或器官的受者中诱导免疫耐受的良好试剂。将同种异体细胞或器官移植到宿主(即供者和受者为来自同一物种的不同个体)时,宿主免疫系统可能开启针对移植物中外源抗原决定簇的免疫应答(宿主针对移植物的疾病),引起移植的组织的破坏。

[0158] 本申请中列述抗 KID3 抗体用途的任何用途也包括本文所述的其他 KID3 激动剂、

拮抗剂和调节剂的用途。在这些实施方案中，KID3 激动剂、拮抗剂或其他非抗体调节剂代替了所述步骤中的 KID3 抗体，并进行了本领域普通技术人员范围内的改变，以使方法适用于替代的 KID3 调节性组合物。

[0159] VII. 本发明的组合物

[0160] 本发明还包括含有抗 KID3 抗体、来自抗 KID3 抗体的多肽、含有编码抗 KID3 抗体的序列的多核苷酸和其他本文所述试剂的组合物（包括药物组合物）。本文使用的组合物另外含有一种或多种与 KID 结合的抗体、多肽和 / 或蛋白质、KID 激动剂、拮抗剂、调节剂和 / 或一种或多种多核苷酸，所述多核苷酸含有编码一种或多种与 KID3 结合的抗体、多肽和蛋白质的序列。

[0161] 本发明另外提供任何 KID3 激动剂、拮抗剂或调节剂和附加化学结构的缀合物，所述结构支持特定 KID3 激动剂、拮抗剂或调节剂的意欲功能或功能。这些缀合物包括与大分子（如本文讨论的诊断、筛选或纯化流程中所使用的任何不可溶固体支持基质）共价结合的 KID3 激动剂、拮抗剂或调节剂。合适的基质材料包括具有化学惰性、高孔隙率并具有大量能够与肽配体形成共价连接的功能性基团的任何物质。基质材料的实例和制备基质 - 配体缀合物的方法描述于 Dean 等编辑《Affinity Chromatography : A Practical Approach》，IRL Press (1985)、Work 等编辑《Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology》，第 7 卷，第 II 部，North-Holland (1979) 中的 Lowe, " An Introduction to Affinity Chromatography " , in Neurath 等编辑《The Proteins》，第三版，第 1 卷，95-178 页 (1975) 中的 Porath 等, " Biospecific Affinity Chromatography " 和 Schott, 《Affinity Chromatography》，Dekker (1984)。

[0162] 本文还提供 KID3 激动剂、拮抗剂或调节剂的缀合物以及在本文讨论的诊断方法中的任何报告分子部分的用途。

[0163] 本发明的 KID3 激动剂、拮抗剂或调节剂、多肽和蛋白质（包括抗 KID3 抗体）通过任何（一个或多个）以下判据进行鉴定和表征：

[0164] (a) 能够与 KID3（包括癌细胞上的 KID3，包括但不限于卵巢、前列腺、胰腺、肺、结肠或乳腺癌细胞）结合；

[0165] (b) 能够竞争性抑制已知抗 KID3 抗体与 KID3 的优先结合，包括能够与原始抗体优先结合的同 KID3 表位优先结合；

[0166] (c) 能够在体外或体内与暴露于活细胞表面的 KID3 部分结合；

[0167] (d) 能够与暴露于活癌细胞（例如但不限于卵巢、前列腺、胰腺、肺、结肠或乳腺癌细胞）表面的 KID3 部分结合；

[0168] (e) 能够将化学治疗剂或可检测标记物递送到表达 KID3 的癌细胞（例如但不限于卵巢、前列腺、胰腺、肺、结肠或乳腺癌细胞）；

[0169] (f) 能够将治疗剂递送到表达 KID3 的癌细胞（例如但不限于卵巢、前列腺、胰腺、肺、结肠或乳腺癌细胞）中。

[0170] 在一些实施方案中，本发明的抗体为保藏号 ATCC 号 PTA-4860 的宿主细胞或其后代所产生的抗体。本发明还包括这些保藏的杂交瘤所产生的抗体和等价抗体或多肽片段（如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc 等）、嵌合抗体、单链 (ScFv)、其突变体、含有抗体部分的融合蛋白、人源化抗体和它们的任何修饰构型或含有所需特异性的表位 (KID3)、识别位点

的等价抗体的多种制剂。本发明还提供显示出抗 KID3 家族成员的一项或多项生物学特征的人抗体。抗 KID3 家族的等价抗体（包括人源化抗体和人抗体）、多肽片段和含有任何这些片段的多肽通过上述五个判据进行鉴定和表征。

[0171] 在一些实施方案中，与 KID3 结合的本发明抗体、多肽和蛋白质为竞争性抑制本文说明的抗 KID3 抗体与 KID3 优先结合的抗体、多肽和蛋白质。在一些实施方案中，抗体、多肽和蛋白质与抗体小鼠抗 KID3 优先结合的同 KID3 表位优先结合。

[0172] 因此，本发明提供以下任何项（或含有以下任何项的组合物，包括药物组合物）：

[0173] (a) 由上文鉴定保藏号的宿主细胞或其后代产生的抗体；

[0174] (b) 这些抗体的人源化形式；

[0175] (c) 含有这些抗体的一个或多个轻链和 / 或重链可变区的抗体；

[0176] (d) 嵌合抗体，其含有同源于或来自于这些抗体的重链和轻链可变区的可变区以及同源于或来自于人抗体的重链和轻链恒定区的恒定区；

[0177] (e) 含有这些抗体的一个或多个轻链和 / 或重链 CDR（至少一个、两个、三个、四个、五个或六个）的抗体；

[0178] (f) 含有这些抗体的重链和 / 或轻链的抗体；

[0179] (g) 等价于这些抗体的人抗体。

[0180] 抗体的人源化形式可以具有或不具有与原始抗体或上文确定的保藏号的宿主细胞所产生抗体相同的 CDR。确定 CDR 区是本领域范围内的技术。在一些实施方案中，本发明提供至少含有一个 CDR 的抗体，所述 CDR 与上述保藏的杂交瘤之一所产生的抗体或上述保藏号的宿主细胞所产生的抗体的至少一个 CDR、至少两个、至少三个、至少四个、至少六个 CDR 基本同源（或者，在一些实施方案中与这些抗体之一的全部六个 CDR 基本同源，或来自这些抗体之一）。其他实施方案包括具有至少两个、三个、四个、五个或六个 CDR 的抗体，所述 CDR 与本文保藏杂交瘤所产生抗体的至少两个、三个、四个、五个或六个 CDR 基本同源，或者来自这些抗体。应该理解，就本发明而言，一般保留了结合特异性和 / 或总体活性（即将化学治疗剂递送到或递送进癌细胞来降低癌细胞生长和 / 或增殖，以在癌细胞中诱导细胞凋亡，从而延缓转移发展，和 / 或姑息治疗），尽管活性的程度与保藏的杂交瘤所产生的抗体相比可能发生变化（可能变大或变小）。本发明还提供产生任何这些抗体的方法。产生抗体的方法为本领域所公知，并在本文中有所描述。

[0181] 本发明还提供含有本发明抗体氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中，多肽含有抗体的一个或多个轻链和 / 或重链可变区。在一些实施方案中，多肽含有抗体的一个或多个轻链和 / 或重链 CDR。在一些实施方案中，多肽含有抗体的三个轻链和 / 或重链 CDR。在一些实施方案中，多肽含有具有以下任何一项的抗体的氨基酸序列：原始抗体序列的至少 5 个连续氨基酸、至少 8 个连续氨基酸、至少约 10 个连续氨基酸、至少约 15 个连续氨基酸、至少约 20 个连续氨基酸、至少约 25 个连续氨基酸、至少约 30 个连续氨基酸，其中至少 3 个氨基酸来自抗体可变区。在一个实施方案中，可变区来自原始抗体的轻链。在另一实施方案中，可变区来自抗体的重链。在另一实施方案中，连续的 5 个（或更多）连续氨基酸来自抗体的互补决定区（CDR）。

[0182] 在本发明的一些实施方案中，直接将表达本发明的 KID3、KID3 部分、抗 KID3 抗体或其他与 KID3 结合的多肽的本发明细胞施用于个体，以调控其体内 KID3 生物活性。

[0183] 将 KID3 调节剂和抗 KID3 抗体用于治疗目的的方法

[0184] KID3 的单克隆抗体可以在患癌症或其他疾病的个体中用于治疗目的。使用抗 KID3 抗体的疗法可能涉及如上文所述在体外或体内形成复合物。在一个实施方案中,抗 KID3 单克隆抗体可以与癌细胞结合并降低癌细胞的增殖。应该理解以促进生理条件下(如体内)结合的浓度施用抗体。在另一实施方案中,KID3 的单克隆抗体可以用于针对不同组织(如结肠、肺、乳腺、前列腺、卵巢、胰腺、肾和其他癌症类型,如肉瘤)癌细胞的免疫疗法。在另一实施方案中,抗 KID3 单克隆抗体可以单独与癌细胞结合并降低癌细胞的细胞分裂。在另一实施方案中,抗 KID3 单克隆抗体可以与癌细胞结合并延缓转移的发展。在另一实施方案中,使用抗 KID3 抗体对患癌症的个体给予姑息疗法。癌症个体的姑息疗法涉及治疗或减轻疾病的有害症状或由针对疾病给予的其他不直接影响癌症发展的治疗所引起的医源性症状。它包括减轻疼痛、营养支持、性问题、心理痛苦、抑郁、疲劳、精神紊乱、恶心、呕吐等的治疗。

[0185] 在这种条件下,可以与增强或指导个体自身免疫应答的试剂(如强化 ADCC 的试剂)一起施用抗 KID3 抗体。也可以修饰抗 KID3 抗体的糖基化模式以强化或减弱 ADCC。已经显示了抗体的不同糖基化可提高 ADCC 应答(US 专利 6,602,684)。降低抗体的岩藻糖基化也与提高 ADCC 应答相关(Yamane-Ohnuki 等,2004)。降低 ADCC 的修饰也是本领域普遍已知的并可用于本文的一些实施方案中。

[0186] 在另一实施方案中,抗 KID3 抗体可与放射性分子、毒素(如加利车霉素)、化学治疗分子、脂质体或含有化学治疗化合物的其他载体缀合或结合,并施用于需要这些治疗的个体,以将这些化合物靶向含有抗体识别的表位的癌细胞,从而消灭癌或患病细胞。不限于任何特殊理论的,抗 KID3 抗体被表面带有 KID3 的细胞内化,从而将缀合部分递送到细胞以诱导治疗效果。在另一实施方案中,在手术去除表达该表位的癌时,可以使用抗体作为辅助疗法以延缓转移的发展。还可以在手术前对带有表达该表位的肿瘤的个体施用抗体(肿瘤辅助疗法),以减小肿瘤的大小并因此使手术简化、减少手术中的组织损耗和/或降低引起的损伤。

[0187] 本发明应用中考虑细胞周期给药。在这些实施方案中,在预决定阶段使用化学治疗剂使肿瘤或其他靶疾病细胞的细胞周期同步化。接着(单独或与额外的治疗部分一起)施用本发明的抗 KID3 抗体。在另外的实施方案中,在施加第二轮治疗之前使用抗 KID3 抗体使细胞周期同步化并减少细胞分裂,第二轮治疗可以是施用抗 KID3 抗体和/或额外的治疗部分。

[0188] 化学治疗剂包括放射性分子、毒素(也称为细胞毒素或细胞毒剂,包括任何对癌细胞生存力有害的试剂)、试剂和脂质体或含有化学治疗化合物的其他载体。合适的化学治疗剂的实例包括(但不仅限于)1-去氢睾酮、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、放线菌素 D、阿霉素、阿地白介素、烷化剂、别嘌呤钠、六甲密胺、阿密磷定、阿纳托唑、氮苄霉素(AMC)、抗有丝分裂剂、顺二氯二氨基铂(II)(DDP,顺铂)、二氨基二氯铂、蒽环类抗生素、抗生素、抗代谢物、天冬酰胺酶、BCG live(膀胱内)、倍他米松磷酸酯钠和醋酸倍他米松、比卡鲁胺、硫酸博来霉素、白消安、亚叶酸钙、加利车霉素、卡培他滨、碳铂、环己亚硝脒(CCNU)、亚硝脒氮芥(BSNU)、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、秋水仙碱、缀合雌激素、环磷酰胺、Cyclophosphamide、阿糖胞苷、阿糖胞苷、松胞菌素 B、环磷酰胺、达卡巴嗪、更生霉素、

更生霉素（从前的放线菌素）、daunirubicin HCL、daunorubicin 柠檬酸、地尼白介素 2、右雷佐生、二溴甘露醇、二羟炭疽杆菌素 dione、多西紫杉醇、多拉司琼、盐酸多柔比星、屈大麻酚、大肠杆菌 L-天冬酰胺酶、依米丁、阿法依伯汀、欧文氏菌 L-天冬酰胺酶、酯化雌激素、雌二醇、雌氮芥磷酸钠、溴化乙啶、乙炔雌二醇、1-羟基-亚乙基-1,1-二膦酸、etoposide citrororum factor、磷酸依托泊苷、非格司亭、氟尿嘧啶脱氧核苷、氟康唑、磷酸氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟他胺、亚叶酸、盐酸吉西他滨、糖皮质激素、醋酸高锡林、短杆菌肽 D、盐酸格拉司琼、羟基脲、盐酸伊达比星、异磷酰胺、干扰素 α -2b、盐酸伊立替康、来曲唑、亚叶酸钙、醋酸亮丙瑞林、盐酸左旋咪唑、利多卡因、洛莫司汀、maytansinoid、盐酸双氯乙基甲胺、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、盐酸美法仑、mercaptipurine、美司钠、甲氨蝶呤、甲睾酮、光神霉素、丝裂霉素 C、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、醋酸奥曲肽、盐酸昂丹司琼、紫杉醇、帕米膦酸二钠、喷司他丁、盐酸匹鲁卡品、plimycin、植入亚硝脲氮芥的聚苯丙生 20、吡吩姆钠、普鲁卡因、盐酸丙卡巴肼、普萘洛尔、利妥希玛、沙格司亭、链唑霉素、他莫昔芬、紫杉醇、替尼泊苷、鬼臼噻吩甙 (tenoposide)、睾内酯、丁卡因、thioepa 苯丁酸氮芥、硫鸟嘌呤、塞替派、盐酸拓扑特肯、柠檬酸托瑞米芬、曲妥单抗、维甲酸、戊柔比星、长春碱、硫酸长春新碱和长春瑞滨。

[0189] 在优选的实施方案中，细胞毒素对分裂或快速分裂的细胞特别有效，因此非分裂细胞相对不受毒效应的影响。

[0190] 本发明的抗体可被其结合的患病或癌细胞内化，从而对治疗应用特别有用，例如将需要被内化以发挥其有害活性的毒剂递送进细胞。这些毒剂的实例包括（但不仅限于）肥皂草毒蛋白、加利车霉素、auristatin 和美登木素生物碱。

[0191] 本发明的抗体、多肽或其他治疗或诊断剂可以直接或间接与放射性分子、毒素或其他治疗剂或脂质体或含有治疗剂的其他载体共价或非共价结合（包括缀合或连接）。只要抗体能与其靶 KID3 结合，抗体可以在任何位置与放射性分子、毒素或化学治疗分子连接。

[0192] 毒素或化学治疗剂可以直接或间接（即通过接头基团或通过带有适当附着位点的连接分子，如 U. S. 专利 5,552,391 所述的平台分子）与适当的单克隆抗体偶联（如共价连接）。可以使用本领域已知的方法将本发明的毒素和化学治疗剂与特定的靶向蛋白直接偶联。例如，当各自具有能与对方发生反应的取代基时，试剂和抗体之间可直接发生反应。例如其一的亲核基团如氨基或巯基能够与另一个的含羰基的基团如酸酐或酰基卤或带有强离去基团（如卤化物）的烷基发生反应。

[0193] 还可以通过微载体将本发明的抗体或多肽或其他治疗或诊断剂与化学治疗剂连接。微载体指不溶于水的可生物降解或不能生物降解的颗粒，其大小小于约 150、120 或 100 μm ，更一般地小于 50–60 μm ，优选小于约 10、5、2.5、2 或 1.5 μm 。微载体包括“纳米载体”，它是大小小于约 1 μm 、优选小于 500nm 的微载体。这些微粒为本领域所公知。固相微载体可以是由生物相容的天然存在的多聚体、合成多聚体或合成共聚物形成的颗粒，包括或不包括由琼脂糖或交联琼脂糖以及本领域已知的其他可生物降解材料所形成的微载体。可生物降解固相微载体可由在哺乳动物生理条件下可降解（例如聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物）或可侵蚀（例如聚原酸酯如 3,9-二亚乙基-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]十一烷 (DETOSU) 或聚酸酐，如聚癸二酸酸酐）的多聚体形成。如果液相微载体可生物降解，微载

体也可以是液相的（如基于油或脂），如脂质体、无抗原决定簇的 iscom（免疫刺激复合物，即胆固醇、磷脂、佐剂活性皂苷的稳定复合物）或水包油或油包水乳剂中的微滴或微胞。可生物降解液相微载体一般掺入本领域大量已知的可生物降解油，包括角鲨烯和植物油。微载体一般为球形，但也可使用非球形的微载体（如杆状、椭圆球化等）。由于其不可溶（于水）的性质，可从水或基于水的（水性）溶液中过滤微载体。

[0194] 含有本发明的抗体、多肽或其他治疗或诊断剂的本发明缀合物可以包含同时含有能与毒剂或化学治疗剂偶联的基团和能够与抗体偶联的基团的双功能接头。接头可以发挥间隔区的功能使抗体远离试剂，以防止结合容量的干扰。接头可以是可切割的或不可切割的。接头还可用于提高试剂或抗体上取代基的化学反应性，并因此提高偶联效率。提高化学反应性还可以使试剂或试剂上若非如此则不可用的官能团易于使用。双功能接头可以以本领域已知的方式与抗体偶联。例如，可以使用含有活性酯部分（如 N-羟基琥珀酰亚胺酯）的接头通过酰胺键与抗体中的赖氨酸残基偶联。在另一实施例中，可以将含有亲核胺或肼残基的接头与抗体碳水化合物残基氧化醇解所产生的醛基偶联。除了这些直接偶联的方法以外，可以通过中间载体（如氨基乙醇）与抗体间接偶联。在这些实施方案中，修饰的连接是通过赖氨酸、碳水化合物或中间载体。在一个实施方案中，接头位点选择性地与蛋白质中游离的硫氢基偶联。适合与蛋白质中的硫氢基选择性偶联的部分为本领域所熟知。实例包括二硫化物、 α -巯基卤素和 α -羧基卤素以及马来酰亚胺。当亲核胺功能与 α -巯基或羧基卤素存在于同一分子中时，存在通过胺的分子内烷化作用环化的可能。防止该问题的方法为本领域普通技术人员所熟知，例如制备胺和 α -卤素功能被刚性基团（如芳基或反式烯烃）分隔开的分子，刚性基团使不需要的空间环化作用不易发生。通过二硫化物部分制备美登木素生物碱和抗体的缀合物可参阅如 U. S. 专利 6,441,163。

[0195] 可用于制备抗体-药物缀合物的可切割接头之一是基于顺乌头酸的酸敏感接头，该接头在不同细胞区室（受体介导的胞吞作用中遇到的内体和溶酶体）的酸性环境中具有优势。制备柔红霉素与大分子载体的缀合物参阅如 Shen 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 102:1048-1054(1981)，制备柔红霉素与抗黑素瘤抗体的缀合物参阅如 Yang 等, J. Natl. Canc. Inst. 80:1154-1159(1988)，以类似的方式使用酸敏感接头制备柔红霉素和抗 T 细胞抗体的缀合物参阅如 Dillman 等, Cancer Res. 48:6097-6102(1988)，通过肽间隔臂将柔红霉素与抗体连接参阅如 Trouet 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 79:626-629(1982)。

[0196] 可以使用本领域已知的任何技术将本发明的抗体（或多肽）或其他治疗或诊断试剂与放射性分子缀合（连接）。放射性标记方法的讨论参阅《Cancer Therapy with Monoclonal AntibodiesT》，D. M. Goldenberg 编辑（CRC Press, Boca Raton, 1995）。

[0197] 另外，抗体可以与第二抗体缀合而形成 Segal 在 U. S. 专利号 4,676,980 所述的异源缀合物。形成交联抗体可以使免疫系统靶向特定的细胞类型，如表达 KID3 的癌细胞或患病细胞。

[0198] 本发明还提供使用抗 KID3 抗体或与 KID3 结合的其他实施方案与化学治疗剂连接而在癌症（包括但不限于前列腺、肺、乳腺、卵巢、胰腺或结肠癌）个体中延缓转移发展的方法。在一些实施方案中，抗体为人源化的或嵌合形式的非人抗 KID3 抗体。

[0199] 在另一实施方案中，抗体可以在手术去除表达该表位的癌时用作辅助疗法，以延缓转移发展。还可以在手术之前对患表达该表位肿瘤的个体施用抗体或与化学治疗剂结合

的抗体（肿瘤辅助疗法），以缩小肿瘤的大小，从而简化手术、减少手术中的组织损失和 / 或降低所引起的损伤。

[0200] 在另一实施方案中，本文所述的任何与 KID3 结合的实施方案可以与表达 KID3 的癌细胞结合并在表达 KID3 的癌细胞中诱导细胞死亡事件。在一些情况下细胞死亡事件是通过凋亡途径或通过坏死途径或通过肿胀途径。

[0201] 在另一实施方案中，本文所述的任何与 KID3 结合的实施方案可以与表达 KID3 的癌细胞结合并诱导针对表达 KID3 的癌细胞的有效免疫应答。在一些情况下，有效免疫应答可以引起癌细胞死亡（如抗体与癌细胞的结合诱导细胞死亡）或抑制癌细胞生长（如阻断细胞循环进程）。在其他情况下，任何本文所述的新抗体可以与癌细胞结合，并且抗体依赖性细胞毒性（ADCC）能够清除抗 KID3 抗体结合的癌细胞。因此，本发明提供包括施用任何本文所述组合物的刺激免疫应答的方法。

[0202] 在一些情况下，抗体结合还可以活化细胞和体液免疫应答，并募集更多的天然杀伤细胞或提高产生进一步活化个体免疫系统以破坏癌细胞的细胞因子（如 IL-2、IFN- γ 、IL-12、TNF- α 、TNF- β 等）。在另一实施方案中，抗 KID3 抗体可以与癌细胞结合，且巨噬细胞或其他吞噬细胞可以调理癌细胞。

[0203] 可以施用多种抗 KID3 抗体或其片段的制剂。在一些实施方案中，可以简单地施用抗 KID3 抗体或其片段。除了药理学活性剂以外，本发明的组合物可以含有携带本领域熟知的赋形剂和辅药以及相对惰性物质的适当可药用载体，所述惰性物质帮助施用药理学效应物质或帮助将活性化合物加工成可药用递送到作用位点的制剂。例如，赋形剂可以赋予形态或稠度，或发挥稀释剂的作用。合适的赋形剂包括（但不限于）稳定剂、湿润剂和乳化剂、不同渗量的盐、包胶剂、缓冲液和皮肤穿透增强剂。

[0204] 非消化道给药的合适制剂包括水溶性形式活性化合物（如水溶性盐）的水性溶液。另外，可以施用活性化合物的悬液，如油剂注射悬液。合适的亲脂溶剂或载体包括脂肪油（如芝麻油）或合成脂肪酸酯（如油酸乙酯或甘油三酯）。水注射悬液可以含有提高悬液粘度的物质，包括如羧甲基纤维素钠、山梨醇和 / 或葡聚糖。任选地，悬液还可以含有稳定剂。也可以使用脂质体将待递送进细胞的试剂包胶。

[0205] 根据本发明用于全身给药的药物制剂可以为肠内、肠胃外或局部给药配制。实际上，可以同时使用全部三种类型的制剂以将活性成分全身给药。肠胃外和非肠胃外药物递送的赋形剂和制剂见于 Remington, 《The Science and Practice Of Pharmacy》第二十版 Mack Publishing(2000)。

[0206] 口服的合适制剂包括硬或软胶囊、丸剂、片剂（包括包衣片）、酏剂、悬液剂、糖浆剂或吸入剂及其控释剂型。

[0207] 这些试剂一般配制用于注射给药（如腹膜内、静脉、皮下、肌内等），尽管也可以使用其他给药形式（如口、粘膜等）。因此，抗 KID3 抗体优选与可药用载体如盐水、林格溶液、葡聚糖溶液等等组合。

[0208] 具体的给药方案（即剂量、时间和重复）取决于具体的个体及该个体的病史。一般施周至少约 100 μ g / 千克体重、更优选至少约 250 μ g / 千克体重、甚至更优选至少约 750 μ g / 千克体重、甚至更优选至少约 3mg / 千克体重、甚至更优选至少约 5mg / 千克体重、甚至更优选至少约 10mg / 千克体重的剂量。

[0209] 经验因素（如半衰期）一般参与剂量的确定。可以使用与人免疫系统相容的抗体如人源化抗体或全人抗体来延长抗体的半衰期并使抗体免受宿主免疫系统的攻击。可以在治疗过程中确定和调整给药频率，并基于减少癌细胞数目、维持或还原癌细胞、减少癌细胞增殖或延缓转移发展。另外，抗 KID3 抗体的持久连续释放制剂可能是合适的。实现持久连续释放的多种制剂和设备为本领域已知。

[0210] 在一个实施方案中，在已经给药一次或多次的个体中可以根据经验确定抗 KID3 抗体的剂量。对个体给予增加的抗 KID3 抗体剂量。为评估抗 KID3 抗体的效力，可以跟随特定癌症疾病态的标记物。它们包括通过触诊或视觉观察直接测量肿瘤大小、通过 x 射线或其他成像技术间接测量肿瘤的大小、通过直接肿瘤活检和显微镜检查肿瘤样品进行评估的改进方法、测量间接肿瘤标记物（如前列腺癌的 PSA）、疼痛或瘫痪的减弱、语言、视觉、呼吸或其他与癌症相关的失能的改善、提高的食欲或以接收测试或延长存活衡量的提高的生命质量。对本领域技术人员来说显而易见的是，剂量取决于以下因素发生变化：个体、癌症类型、癌症阶段、癌症是否已开始转移到个体的其他部位以及过去和现在使用的疗法。

[0211] 其他配方包括本领域已知的合适递送方式，包括但不限于载体，如脂质体。参阅如 Mahato 等 (1997) Pharm. Res. 14 :853-859。脂质体制剂包括但不限于细胞转染剂、多层囊泡和单层囊泡。

[0212] 在一些实施方案中可以存在多于一个抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。这些组合物可以包括对上皮癌、腺癌、肉瘤或腺肉瘤具有反应性的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个不同抗体。抗 KID3 抗体可以与对器官（包括但不限于卵巢、乳腺、肺、前列腺、结肠、肾、皮肤、甲状腺、骨、上消化道和胰腺）中的上皮癌、腺癌、肉瘤或腺肉瘤具有反应性的一种或多种抗体混合。在一个实施方案中使用了不同抗 KID3 抗体的混合物。本领域经常提到的抗体混合物可能对于治疗更大范围的个体种群特别有用。

[0213] 提供以下实施例用于说明（而非限制）本发明。

实施例

[0214] 实施例 1 制备作为免疫原的人肾细胞。

[0215] 从 Advanced Biosciences Research at Alameda County, California 得到孕龄 10 到 18 周的人胚肾。购买了肾并在冰水混合物上的组织培养基中运至实验室。运达后立即将肾转移到洗涤培养基（含有青霉素 / 链霉素和庆大霉素的冷 PBS）中。用镊子去除外膜并在 70% 乙醇中短时洗涤，接着用洗涤培养基冲洗两次。在 100mm 的干燥培养皿中用剪刀将肾剪碎成 1mm 的小块。将组织块移至 10ml 本文称为 I/3F 的明确的无血清培养基中。

[0216] 用于本实施例的培养基包括以下组分：氯化钙 (CaCl_2) 0.18g/L、氯化钾 (KCl) 0.298g/L、硝酸钾 (KNO_3) 0.000012629g/L、(脱水)硫酸镁 (MgSO_4) 0.068g/L、六水氯化镁 0.037g/L、氯化钠 (NaCl) 6.2g/L、碳酸氢钠 (NaHCO_3) 1.2g/L、磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.043g/L、磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 0.088g/L、亚硒酸钠 ($\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.000012629g/L、偏钒酸铵 0.000000351g/L、钼酸 $-4\text{H}_2\text{O}$ (铵) 0.00000372g/L、硫酸铜 $-5\text{H}_2\text{O}$ 0.00000075g/L、硫酸亚铁 $-7\text{H}_2\text{O}$ 0.0002502g/L、硫酸锰 $4.53\text{E}^{-08}\text{g/L}$ 、硫酸锌 $-7\text{H}_2\text{O}$ 0.0002589g/L、果糖 2g/L、羟乙基哌嗪乙磺酸 3.57g/L、腐胺 -2HCl 0.0000483g/L、硫辛酸 0.0000618g/L、丙酮酸钠 0.11003g/L、亚油酸 0.00002523g/L、L-丙氨酸

0.020173g/L、L-天冬酰胺(游离碱)0.0175g/L、L-天冬酰胺-H₂O 0.0045g/L、L-精氨酸-HCl 0.12201g/L、L-天冬氨酸 0.024993g/L、L-胱氨酸-2HCl 0.06398g/L、L-半胱氨酸-HCl-H₂O 0.005268g/L、L-谷氨酸 0.056913g/L、L-谷氨酰胺 0.6g/L、甘氨酸 0.023253g/L、L-组氨酸 HCl-H₂O 0.035691g/L、L-异亮氨酸 0.074682g/L、L-亮氨酸 0.077436g/L、L-赖氨酸-HCl 0.113162g/L、L-甲硫氨酸 0.022344g/L、L-苯丙氨酸 0.047688g/L、L-脯氨酸 0.038359g/L、L-丝氨酸 0.032553g/L、L-苏氨酸 0.070073g/L、L-色氨酸 0.011812g/L、L-酪氨酸(二钠盐)0.0751688g/L、L-缬氨酸 0.069316g/L、生物素 0.000011299g/L、D-Ca 泛酸 0.0028714g/L、氯化胆碱 0.006988g/L、叶酸 0.0031972g/L、I-肌醇 0.010446g/L、烟酰胺 0.00281098g/L、盐酸吡哆醛 0.0028g/L、盐酸吡哆醇 0.00001851g/L、核黄素 0.00029128g/L、盐酸硫胺 0.0029011g/L、维生素 B₁₂ 0.0000499g/L, pH 7.2, 摩尔渗透压浓度 295mM。虽然在本发明的应用中可以使用多种普遍使用的细胞培养基, 本发明优选的实施方案使用无血清的基于果糖的细胞培养基。这些培养基可见于其公开内容在本文中整体引入的 U. S. 申请 NO. 60/504, 674。

[0217] 将组织块转移到 15ml 离心管中并在 1000×g 离心组织块 5 分钟。将组织块重悬于含有胰岛素 (10 μg/ml)、运铁蛋白 (10 μg/ml)、表皮生长因子 (20ng/ml)、生长素 (0.005IU/ml)、猪垂体提取物 (0.2%)、鸡血清 (0.1%)、庆大霉素 (100 μg/ml)、青霉素/链霉素 (1×) 和胶原酶/中性蛋白酶 (0.1%) 的 I/3F 培养基中并在 4°C 孵育过夜。第二天将消化的组织块以 1000×g 离心 5 分钟并用 I/3F 培养基洗涤两次。以 10ml 含有胰岛素 (10 μg/ml)、运铁蛋白 (10 μg/ml)、表皮生长因子 (20ng/ml)、生长素 (0.005IU/ml)、猪垂体提取物 (0.2%)、鸡血清 (0.1%) 的 I/F3 培养基重悬沉淀并在预涂了纤维结合蛋白的 10cm 平板中培养。

[0218] 在这些培养条件下, 人胚肾细胞附着于涂底物的平板并单层生长。每周更换两次培养基。

[0219] 为收获细胞, 用不含钙和镁的 Hanks 盐溶液冲洗一次, 将细胞单层在 Hanks 盐溶液中的 10mM EDTA 中于 37°C 孵育 15 分钟。轻轻吹吸使细胞从培养表面脱离。通过在 1000×g 离心 5 分钟沉淀细胞悬液。弃去上清液并以 (适当时含有非变性佐剂的) 无血清培养基 (I/3F 培养基) 重悬细胞。

[0220] 实施例 2. 生单克隆抗体的生成

[0221] 将非变性佐剂 (Ribi, R730, Corixa, Hamilton MT) 在磷酸缓冲溶液中再水化为 4ml。然后用 400 μl Hank's 平衡盐溶液稀释 100 μl 该再水化的佐剂, 接着将其与一些实施例 1 的用于免疫的细胞沉淀轻轻混合。细胞沉淀剩余的部分如上文 (但无佐剂) 制备于 Hank's 平衡盐溶液中待免疫。

[0222] 每周约一次或两次经足垫向 Balb/c 小鼠中注射人胚肾细胞 (每只小鼠约 106 个细胞)。精确的免疫安排如下: 第 0 天, 免疫正 Ribi。第 3 天, 免疫正 Ribi。第 7 天, 免疫正 Ribi。第 38 天, 免疫负 Ribi。第 42 天, 免疫负 Ribi。第 45 天, 免疫负 Ribi。第 49 天, 免疫负 Ribi。第 56 天, 免疫负 Ribi。第 63 天, 免疫负 Ribi。第 82 天, 取血用于效价测试。第 84 天, 免疫正 Ribi。第 87 天, 免疫正 Ribi。第 94 天, 免疫正 Ribi。第 101 天, 融合前加强 (无 Ribi)。第 104 天, 收获用于融合的结节。

[0223] 第 82 天, 从每只免疫动物的尾部抽一滴血并用 FACS 分析测试抗体针对人胚肾细

胞的效价。当效价达到至少 1 : 2000 时,在 CO₂ 箱中以颈脱位法处死小鼠。收获用于制备杂交瘤的淋巴结。

[0224] 使用 35%聚乙二醇 4000 将具有最高效价的取自小鼠的淋巴结与小鼠骨髓瘤株系 X63-Ag8.653 融合。融合后的第 10 天,通过荧光激活细胞分选术 (FACS) 筛选杂交瘤上清液中人胚肾细胞特异性单克隆抗体的存在。将每一杂交瘤的条件培养基与人胚肾细胞的等分式样孵育 30 分钟。孵育后,洗涤细胞样品,以 0.1ml 稀释剂重悬,并与 1g/ml 缀合了 FITC 的山羊抗小鼠 IgG 的 F(ab')₂ 片段在 4℃孵育 30 分钟。洗涤细胞,以 0.5ml FACS 稀释剂重悬并使用 FACScan 细胞分析仪 (Becton Dickinson;San Jose,CA) 分析。选择杂交瘤克隆以进一步扩增、克隆和基于它们与一种或多种癌细胞系表面结合而表征,所述结合通过 FACS 评估。选择了产生命名为小鼠抗 KID3 的单克隆抗体的杂交瘤,所述抗体与命名为 KID3 的表位结合。

[0225] 实施例 3. 抗 KID3 抗体 (包括小鼠抗 KID3) 的纯化

[0226] 在 10.0mM EDTA 存在下使人胚肾细胞从组织培养瓶脱离,1400rpm 离心 5 分钟并以含有 1% BSA 和 2mM EDTA 的磷酸缓冲溶液 (FACS 稀释剂) 重悬。计数细胞并调整至 10⁷ 个细胞 /ml。将约 0.1ml 细胞与 100 μl FACS 稀释剂中的 100 μl 杂交瘤上清液在 37℃孵育 30 分钟。使用 G 蛋白亲和层析从组织培养物中纯化与人胚肾细胞结合的单克隆抗体。抗体纯化方法中使用了以下材料:杂交瘤组织培养上清液、Immunopure (G) IgG 结合缓冲液 (Pierce#21011Rockford, IL)、Immunopure IgG 洗脱缓冲液 (Pierce#21009)、浓盐酸 (调整 pH)、Corning 1 升 PES (聚醚砜)、0.22 μm 滤器 (Corning#431098, Coming, NY)、Amersham Pharmacia GradiFracSystem (Amersham Pharmacia,Piscataway,NJ)、Protein-G Sepharose 4Fast Flow (AmershamPharmacia-0618-02)、3M KSCN/50mMTris pH 7.8 的 Stripping buffer 和 PBS (磷酸缓冲溶液) 3M Tris pH 9.0。

[0227] 为纯化本文中称为小鼠抗 KID3 的小鼠抗人 KID3 抗体,测量上清液的体积并在上清液中加入等体积的结合缓冲液。使混合物平衡至室温。通过 0.22 μm 滤器滤清上清液。使用 GradiFrac 系统 (Pharmacia Biotech) 将上清液装入 G 蛋白柱中。用 5-10 倍柱体积的结合缓冲液洗柱。用洗脱缓冲液洗脱抗体并收集 2ml 级分。得到级分的 OD₂₈₀ 读数并合并含有单克隆抗体的级分。加入 1/20 体积的 3M Tris 中和洗脱的单克隆抗体级分。于 4℃在 1×PBS 中透析样品 (每 3 小时更换缓冲液,共换 3 次)。无菌过滤 (0.2 μm) 纯化的单克隆抗体并储存于 2-8℃。

[0228] 从杂交瘤上清液中纯化小鼠抗 KID3 单克隆抗体后,测试其与人胚肾细胞的结合。如上文所述制备细胞样品并与多种浓度的抗体孵育。孵育后洗涤细胞,以 0.1ml 稀释剂重悬并与 1pg 缀合了 FITC 的山羊抗小鼠 IgG (ab')₂ 片段在 4℃孵育 30 分钟。洗涤细胞,以 0.5ml FACS 稀释剂重悬并用 FACScan 细胞分选仪 (Becton Dickinson;San Jose,CA) 分析。FACScan 直方图中的右移说明纯化的抗体仍与人胚肾细胞结合。

[0229] 在其他实施方案中,使用活细胞 ELISA 测试小鼠抗 KID3 与 KID3 的结合。使用以下方法,但也可应用本领域普遍已知的其他方法。在含有 10 %胎牛血清 (FBS) 的培养基中培养细胞 (SKOV3、SKBR3、SKMES、SW480、HT-29 和 HPAF-II——均购自 ATCC, Bethesda, MD), 以在用组织培养物处理过的 96 孔组织培养平板 (Falcon) 上汇合。洗涤以使细胞不含培养基,并与 50 μl 所需浓度的所需抗体在含有 1% BSA 和 0.1%叠氮化钠的 Hank's 平衡盐溶

液 (HBSS) 中室温孵育 1 小时。然后在与缀合了辣根过氧化物酶 (HRP) 的第二抗体 (稀释于 HBSS 中, 每孔 $50\ \mu\text{l}$) 室温孵育 30 分钟以前, 每孔用 $100\ \mu\text{l}$ HBSS 洗涤细胞三次。最后用 HBSS 洗涤细胞三次并向平板中加入每孔 $100\ \mu\text{l}$ 变色底物 (TMB 底物, KPL)。每孔加入 $100\ \mu\text{l}$ 1M 磷酸中止变色反应。显色的平板在 0. D. 450nm 处读数。

[0230] 产生抗体小鼠抗 KID3 的杂交瘤 ATCC 编号为 PTA-4860。

[0231] 实施例 4. 免疫组织化学方法

[0232] 将来自癌症患者的冻存组织样品包埋于 OCT 化合物中, 并用干冰在异戊烷中迅速冷冻。用 Leica 3050CM 切片机切成 $5\ \mu\text{m}$ 厚的冰冻切片, 并融裱在包被了 vectabound 的载玻片上。在 -20°C 用乙醇固定切片并在室温下过夜晾干。固定的切片储存于 -80°C 待用。对于免疫组织化学, 取出组织切片并首先于室温下在封闭缓冲液 (PBS、5% 正常山羊血清、0.1% Tween20) 中孵育 30 分钟, 接着与稀释于封闭缓冲液 ($1\ \mu\text{g/ml}$) 中的小鼠抗 KID3 和对照单克隆抗体孵育 120 分钟。然后用封闭缓冲液洗涤切片三次。用山羊抗小鼠 IgG+IgM(H+L)F(ab')₂-过氧化物酶缀合物以及过氧化物酶的底物检测结合的单克隆抗体, 所述底物为 0.1M 醋酸钠缓冲液 (pH 5.05) 和 0.003% 过氧化氢 (Sigma 目录号 H1009) 中的二氨基联苯 (1mg/ml , Sigma 目录号 D 5637)。经染色的载玻片以苏木素复染并在 Nikon 显微镜下检查。

[0233] 在一些情况下, 在使用适当的抗原决定簇修复方法之后, 将包埋于石蜡的甲醛固定组织用于免疫组织化学。这些抗原决定簇修复方法之一描述于 Mangham 和 Isaacson, Histopathology 35:129-33(1999)。本领域技术人员可以使用其他抗原决定簇修复和 / 或检测的方法。得到了使用冰冻组织或适当时固定的组织的抗原修复和 polyMICA 检测的类似实验的结果。评估了抗 KID3 抗体与多种正常和癌组织的结合。在全部情况下, 抗体与固定组织的结合都与冰冻组织的情况相符。冰冻组织的结果仅在二者在对照中不匹配时使用。

[0234] 为便利起见, 下文表 1 中显示了使用不同来源的冰冻手术组织的若干实验中组合结果的概括。列出了与小鼠抗 KID3 结合的肿瘤数 / 测试总数并在括号中显示了阳性结合的百分数。

[0235]

表 1. 在主要肿瘤类型中小鼠抗 KID3 结合的发生率概况

肿瘤类型	阳性比率
结肠癌	13/15(87%)
胰腺癌	5/5(100%)
卵巢癌	5/5(100%)
乳腺癌	6/20(30%)
前列腺癌	7/18(39%)
肺（非小细胞型）	7/20(35%)
肾细胞癌	4/13(31%)
腺癌，NOS	1/2(50%)
上皮癌，NOS	2/5(40%)
鳞状细胞癌（转移灶，原发位点未知）	1/1(100%)
甲状腺癌	0/2
膀胱癌	0/1
肉瘤样癌	0/1
骨肉瘤	0/1
尤因肉瘤	0/1
单相滑膜肉瘤	0/1
黑素瘤/明细胞肉瘤	0/4

[0236] 使用 IHC 和抗 KID3 抗体筛选了额外的组织样品以进一步表征 KID3 的表达。简言之，超过 90% 的人结肠、胃和胰腺癌临床样品与抗 KID3 抗体结合，说明表达 KID3。超过 64% 的评估样品在整个肿瘤上皮中均一表达 KID3（定义为肿瘤上皮中超过 75% 的染色）。在多种组织（一般为相应 KID3 阳性腺癌发生的组织）中正常无角质化上皮可变表达（均一性小于 10%）KID3。取自心血管、内分泌、血液淋巴、神经肌肉和中枢神经系统的正常人组织不表达 KID3。肿瘤中 KID3 的表达模式与相应正常上皮中的不同。正常上皮中 KID3 表达主要在胞质中，而正常的极性上皮（如结肠和胃）中的膜 KID3 表达主要限制在顶膜。相反，肿瘤（如胃和结肠腺癌）倾向于在其膜结构域中表达 KID3，从高分化肿瘤中的基底外侧发展到低分化肿瘤中的贯穿整个膜表达。

[0237] 实施例 5. 免疫组织化学结果

[0238] 使用单克隆抗体小鼠抗 KID3 测试与来自不同类型组织的多种细胞系的反应性。结果中弱阳性染色评分为“+”、中等阳性染色为“++”、强阳性染色为“+++”，阴性染色为“-”。

[0239] 如 WO 01/43869 所述使用 CellArray™ 技术得到免疫组织化学的结果。将来自不同来源细胞系的细胞从培养表面除去（不使用蛋白酶），填充并包埋于 OCT 化合物中。冰冻细胞并切片，然后使用标准 IHC 流程染色。

[0240] 为方便起见，表 2 汇集了小鼠抗 KID3 抗体与多种来源的人正常和肿瘤细胞系结合的结果。表二呈现的实验包括使用本文所述方法的 FACS、活细胞 ELISA 和 CellArray™ 结合实验。

[0241]

表 2: 小鼠抗 KID3 抗体与已建立的人肿瘤和正常细胞系的结合						
细胞名称	ATCC 号	器官	细胞类型	与小鼠抗 KID3 的反应性		
				Cell Arra y	FACS	活细胞 ELISA
BT-474	HTB-20	乳腺	导管癌	-	+	-
HMEC	CC-2551 *	乳腺	正常人乳腺	-		

[0242]

			上皮			
MCF-7	HTB-22	乳腺	腺癌	-	+	-
MDA-MB-175-VII	HB-25	乳腺	导管癌	-		
MDA-MB-361	HB-27	乳腺	腺癌	-		
SK-BR-3	HTB-30	乳腺	腺癌	-	-	-
Colo-205	CCL-222	结肠	腹水结肠 直肠腺癌	+	+	++
HT-29	HTB-38	结肠	结肠 直肠腺癌	+	+	++
HuSBT	RAVEN	结肠	Raven 开发的 结肠 直肠株系		+	
SW480	CCL-228	结肠	结肠 直肠腺癌	-	+	-
SW-948	CCL-237	结肠	结肠 直肠腺癌	+		
HuVEC	Primary	内皮 细胞	正常成人	-		
293	CRL-1573	肾	以腺病毒 5 DNA 转化	-		
786-O	CRL-1932	肾	肾细胞腺癌	-	+	
A-498	HTB-44	肾	癌	-	-	-
Caki-2	HTB-47	肾	明细胞癌	-	+	+
COS-7	CRL-1651	非洲 绿猴肾	SV40 病毒转化	-		
9979	RAVEN	肺	Raven 开发	+/-		

[0243]

			的肺癌株系			
A-549	CCL-185	肺	癌	-	+	-
Cal30	RAVEN	肺	人小细胞肺癌	-	-	
CaLu3	HTB-55	肺	腺癌	-	+	+
SK-MES-1	HTB-58	肺	鳞癌	-	-	-
ES-2	CRL-1978	卵巢	癌	-	-	-
OV-90	CRL-11732	卵巢	腺癌		+	+
OVCA2	RAVEN	卵巢	Raven 开发的卵巢癌株系		-	-
SK-OV3	HTB-77	卵巢	腺癌	-	+	-
9926	RAVEN	胰腺	腺癌	-	-	-
AsPC-1	CRL-1682	胰腺	腺癌	-		
HPAF-II	CRL-1997	胰腺	腺癌	-	+	-
Hs 700T	HTB-147	胰腺	腺癌	-	+	-
SU-86-86	CRL-1837	胰腺	导管癌		+	++
22Rv1	CRL-2505	前列腺	癌	-		
DU 145	HTB-81	前列腺	腺癌	-	+	-
LNCaP	CRL-1740	前列腺	癌	-	+	-
PC3	CRL-1435	前列腺	腺癌	+/-		
TDH-1	Raven	前列腺	Raven 开发的前列腺癌株系	+/-		
Hs 746T	HTB-135	胃	癌	-	-	-
NCI-N87	CRL-5822	胃	癌	+	+	+
SNU-16	CRL-5974	胃	癌		+	

[0244] * CC-2551Bio-Whittaker

[0245] 实施例 6. 小鼠抗 KID3 与肿瘤和正常组织的结合

[0246] 将手术切除得到的正常和肿瘤组织（人）如实施例 4 冰冻并封固。用 Leica3050CM

切片机将冰冻切片切成 5 μ m 厚度并融裱于包被了 vectabound 的载玻片上。在 -20℃ 用乙醇固定并在室温下晾干过夜。在 Nikon 显微镜下观察载玻片。使用 PolyMICA™ 检测试剂盒测定小鼠抗 KID3 与组织的结合。以 1 μ g/ml 的终浓度使用第一抗体小鼠抗 KID3。

[0247] 结果中的弱阳性染色评分为“1+”、中等阳性染色为“2+”、强阳性染色为“3+”，阴性染色为“-”。病灶染色标为“Foc.”。表 3 显示用小鼠抗 KID3 对正常组织染色的结果。表 4 显示小鼠抗 KID3 抗体与肿瘤组织样品的结合。

[0248]

表 3: 小鼠抗 KID3 与正常组织结合概况		
组织	IHC 染色水平 (低: 1+ 至 高: 3+)	备注
肾上腺	阴性	
骨髓	无高于背景的信号	背景显示分散的 3+ 细胞
脑	阴性	
乳腺	3+ 50% 导管/小叶上皮	尖端和整个细胞染色
结肠	3+ 粘膜	
十二指肠	3+ 粘膜	
心	阴性	
肾	3+ 分散的小管 (集合管)	
肝	3+ 胆管	
肺	2+ 很少的肺泡细胞 ; 极少 2-3+ 支气管上皮	
卵巢	病灶(<10%) + 卵泡上皮	
胰腺	3+ 管 ; +/- 少数腺泡	
前列腺	3+ 病灶(<5%) 上皮 1+ 病灶 (-50%) 上皮	

[0249]

骨骼肌	阴性	
皮肤	3+ 汗腺亚型	
脾	无高于背景的信号	背景显示分散的 3+细胞
胃	2+ foveolar 细胞	
胸腺	阴性	
子宫	3+ 表面上皮	增殖期子宫内膜

[0250]

表 4. 小鼠抗 KID3 与肿瘤组织结合概述

肿瘤类型		样 品 ID	IHC 染色水平 (低:1+到高: 3+)	备注
结肠	腺癌, 低分化	27FD	病灶 1-3+ (<10%)	
	腺癌, 中分化	1C62	3+	
	腺癌, 低分化	4ECD	病灶 3+ (<10%)	
	腺癌, 中分化	13FB	病灶 3+ (-20%)	
	腺癌, 中分化	689F	2+	
	腺癌, 2 级	358	3+	
	腺癌, 3 级	832	病灶 2-3+	
	腺癌, 2 级	1047	病灶 1-2+ (~ 10%)	
	转移腺癌, 分级未报导	216	病灶 2-3+ (~ 50%)	转移至卵巢
	腺癌, 2 级	1110	2+	3+基质
	转移腺癌, 分级未报导	1567	+/-	2-3+粘蛋白, 肿瘤 转移至肝
	转移腺癌, 分级未报导	1237	3+	转移至肝
胰腺	转移腺癌, 分级未报导	374	+/-	病灶粘蛋白+; 转 移位点为肺
	转移腺癌, 3 级	1781	+/-到 1+	转移位点为腹股 沟
	腺癌, 中分化	2D19	3+	
	腺癌, 中分化	38AC	2+	少许坏死
	导管癌 腺癌, 低分化	7378	3+	

[0251]

	导管癌 腺癌, 低 分化	71FA	1-3+ (多数 1+)	3+基质
	导管癌 腺癌, 低 分化	736D	+/-到 1+	3+基质
肺	小细胞癌(scc), 中分 化	E27	阴性	
	小细胞癌, 低分化	34B	病灶 3+ (<10%)	
	大细胞癌, 分级未报导	380E	病灶 2+ (<1%)	
	大细胞癌, 分级未报导	1495	阴性	
	腺癌, 低分化	62C4	病灶 3+ (~ 30%)	小组织 (Little tissue)
	腺癌, 中分化	425	阴性	Scat 3+ 巨噬细胞
	腺癌, 中-低分化	273	病灶 2-3+ (~ 30%)	
	小细胞癌 3 级	1191	阴性	
	腺癌, 分级未报导	606	阴性	
	小细胞癌, 2 级	602	阴性	
	小细胞癌, 3 级	265	病灶 1+ (~ 30%)	
	小细胞癌, 分级未报导	41	阴性	
	腺癌, 2 级	680	病灶 3+ (~ 40%)	局部坏死
	小细胞癌, 3 级	917	阴性	
	小细胞癌, 2 级	597	阴性	
	非小细胞, 3 级	942	阴性	
	小细胞癌, 3 级	749	阴性	
	转移腺癌, 2 级	401	病灶 3+ (~50%)	转移至肺胸膜

[0252]

乳腺	导管癌, SBR II 级	5277	阴性	
	导管癌; nuc3、hist 3	1537	2+	
	腺癌 nos; nuc3、hist3	1520	阴性	
	腺癌 nos; nuc3、hist3	1691	阴性	
	导管癌; nuc3、hist3	702	阴性	
	导管癌; nuc2、hist 2	5140	阴性	
	导管癌; nuc3、hist3	1531	阴性	
	原位管癌(DCIS), nuc 3	5119	1-2+ (~60%)	
	导管癌, Nott 2 级 (6-7)	1442	阴性	
	导管癌; nuc3、hist3	5184	病灶+/- (~20%)	
	导管癌; nuc3、hist3	90D	阴性	
	导管癌, III 级	805A	阴性	
	小叶癌; nuc 1、hist2	2F25	2+	
	导管癌, III 级	6AB3	阴性	
前 列 腺	腺癌, gleason 3+3	9344	+/-到 1+	
	腺癌, gleason 4+5	5110	阴性	
	腺癌, gleason 4+3	1626	阴性	
	腺癌, gleason 4+5	5749	+/-到 1+	
	腺癌, gleason 4+5	1597	阴性	
	腺癌, gleason 4+5	6722	+/-至 1+	

[0253]

	腺癌, gleason 3+3	1703	阴性	+/-增生
	腺癌, gleason 3+4	846	阴性	
	腺癌, gleason 4+5	481	阴性	
	腺癌, gleason 3+4	5093	+/-至 1+	
	腺癌, gleason 4+3	521U	阴性	
	腺癌, gleason 3+4	1886	阴性	
	腺癌, gleason 3+5	1137U	病灶 2+(<10%)	
	腺癌, gleason 4+5	1D2C	阴性	
卵巢	浆液性腺癌, FIGO 2 级	2C18	极少 1-2+($\ll$ 1%)	
	浆液性腺癌, 低分化	BOE	少量 1-2+ (<5%)	
	浆液性腺癌, 分级未报导	3EB7	病灶 2+ (<10%)	
	浆液性腺癌, FIGO 3 级	5562	病灶 2-3+ (~ 40%)	
肾	肾细胞癌, Fuhrman (4 级中的) 3 级	2907U	病灶 2-3+ (<10%)	
	肾细胞癌, Fuhrman (4 级中的) 4 级	8009	阴性	
	肾细胞癌, Fuhrman (4 级中的) 4 级	B23	阴性	
	肾细胞癌, (4 级中的) 2 级	48E0	阴性	
	肾细胞癌, (4 级中的) 3 级	4835U	阴性	

[0254] 除非另外指出,乳腺癌分级为 NSABP,结肠癌分级为 AJCC

[0255] 实施例 7. 分离含有 KID3 的蛋白质

[0256] 为鉴定小鼠抗 KID3 反应针对的表位,进行免疫沉淀实验 (Ippt)。为进行 Ippt,用总计 30ml 裂解缓冲液 (1ml 每瓶) 裂解 30 瓶 175cm² 瓶的 Colo205 细胞。裂解缓冲液由以 2% Triton X-100 增强的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS+)、蛋白酶抑制剂混合物 (每 5ml 裂解

缓冲液 1 片完全 mini 无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物 (Roche Molecular Biochemicals))、0.1% 叠氮钠和 2mM PMSF 组成。在通过由 1ml G 蛋白 (AmershamPharmacia) 组成的柱之前, 在 4℃ 下以 24000×g 将细胞裂解液离心 30 分钟。然后在 4℃ 将预清除过的 Colo205 裂解液与吸附了小鼠抗 KID3 的 G 蛋白 (在室温下将 10 μg 小鼠抗 KID3 与 5 μl G 蛋白预孵育 30 分钟) 孵育 2 小时。然后用裂解缓冲液将珠子 (预清除 G 蛋白珠子和吸附了小鼠抗 KID3 的 G 蛋白珠子) 洗涤三次, 然后用 30 μl SDS 样品缓冲液 (3% SDS、20% 甘油、10mM DTT、2% 溴酚蓝、0.1M Tris、pH 8.0) 洗脱。用 SDS-PAGE 将 25 μl 洗脱液分开并通过考马斯染色显影。用 SDS-PAGE 将 5 μl 洗脱液分开并另外转移到硝酸纤维素上用于 western 印迹。

[0257] 用小鼠抗 KID3 检测印迹并用 Western Blotting 试剂盒 (Invitrogen 目录号 WB7103) 显色以证实表位识别。通过使用针对小鼠抗 KID3 的小鼠 IgG 和小鼠抗 KID3 洗脱液的 western 印迹, 观察到了小鼠抗 KID3 洗脱液独有的从 90kDa 到 250kDa 范围内的高度糖基化蛋白质。通过考马斯染色, 观察到了大量非常微弱但是小鼠抗 KID3 独有的点, 典型的为约 100kD 到约 200kDa 高度糖基化蛋白质。

[0258] 用干净的手术刀片将从 SDS-PAGE 胶染色的蛋白质条带切出置于干净的 Eppendorf 管中。在通过质谱鉴定蛋白质以前将切出的条带储存在 -20℃。

[0259] 实施例 8. 使用串联质谱法 (MS/MS) 表征小鼠抗 KID3 结合的表位。

[0260] 如实施例 7 所述分离小鼠抗 KID3 结合的表位并根据 Kane 等, 2002 的方法用于串联质谱法。用 SDS-PAGE 分开蛋白质, 并用胶体考马斯蓝试剂 (Invitrogen) 将胶染色。用胰蛋白酶消化凝胶中的目的蛋白质。如 Wu 等, 2000 所述, 通过离子阱质谱 (Thermo-Finnigan LCDQ DECA XP) 上的毛细管液相层析 MS/MS 测序胰蛋白酶肽。

[0261] 另外, 在本发明的应用中也可以使用其他本领域普遍已知的质谱法, 如 MALDI 质谱法。

[0262] 质谱实验的结果说明小鼠抗 KID3 特异性条带由多种蛋白质组成。

[0263] 实施例 9. 鉴定 KID3 的其他表征实验

[0264] 为考查具有 KID3 的蛋白质的碳水化合物特性, 使用 N- 葡聚糖酶、O- 葡聚糖酶、sialidase 和岩藻糖苷酶 (Prozyme, CA) 将对小鼠抗 KID3 具有反应性的两种大小不同的蛋白质制品 (一种制剂含有 85-100kDa 范围的蛋白质, 另一种制剂含有大于 100kDa 的蛋白质) 去糖基化。使用根据生产商流程的方法, 尽管也可以应用本领域普遍已知的其他方法。以使用小鼠抗 KID3 的 western 印迹分离时, 用 N- 葡聚糖酶处理的 85kDa-100kDa 蛋白质制剂显示无小鼠抗 KID3 反应性。以使用小鼠抗 KID3 的 western 印迹分离时, 用 N- 葡聚糖酶处理的大于 100kDa 蛋白质制剂的小鼠抗 KID3 反应性显示出约 60% 的降低。以使用小鼠抗 KID3 的 western 印迹分离时, 用 N- 葡聚糖酶处理大于 100kDa 蛋白质制剂的进一步处理显示无小鼠抗 KID3 反应性。这些结果说明 KID3 可能为含有或不含岩藻糖的 N 连接碳水化合物。

[0265] 将纯化的含 KID3 的蛋白质在微滴定板 (NUNC Maxisorb, NUNC) 上固定, 并用含有 1% BSA 的 HBSS 封闭。将非唾液酸化和唾液酸化形式的针对 Lewis 抗原 LeA、LeB、LeX 和 LeY 产生的抗体 (Calbiochem, San Diego, CA) 引入封闭过的平板。稀释与封闭缓冲液后, 以 20 μg/ml、50 μl/孔使用这些抗体, 并在室温下与含有 KID3 的蛋白质结合 1 小时。一小时的孵育之后, 用 HBSS 洗涤平板两次, 并将 HBSS 中 1 : 1000 使用的缀合 HRP 的第二抗体

(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Pennsylvania) 引入一半的平板条件中。另一半中以 50 μ l/孔的体积引入缀合 HRP 的抗生物素蛋白链菌素 (2 μ g/ml) 和 2 μ g/ml 的生物素化的小鼠抗 KID3 的混合物。将生物素化的小鼠抗 KID3 稀释于 HBSS 中,在室温下使第二抗体和小鼠抗 KID3 在平板上反应 30 分钟。在 30 分钟的孵育结束时,用 HBSS 洗涤平板并在每孔中加入 100 μ l 底物溶液 (TMB 底物, KPL, Cleveland, OH)。观察颜色变化并在室温下 5 分钟后用 100 μ l 1M 磷酸中止反应。平板在 O.D. 450nm 处读数。实验得到的数据说明针对 Lewis 抗原 LeA 产生的抗体识别表达 KID3 的蛋白质。然而,针对 LeA 的抗体不能竞争小鼠抗 KID3 的同一位点。这说明 KID3 可能与 LeA 同时出现,但实际为不依赖 Lewis 抗原的表位。

[0266] 实施例 10. 小鼠抗 KID3 对结肠癌细胞系的作用

[0267] 在存在或不存在不同量的测试或对照纯化抗体时使用单层生长的细胞来评估抗体在体外减少单层培养细胞数目的能力,使用 MTT 评估细胞数目的改变。MTT 是测定线粒体酶活性的染料,并与相对有活力的细胞数相关。将目的细胞转移并培养于 96 孔平板中添加了 10% 胎牛血清的 F12/DMEM(1 : 1) 生长培养基中。在 96 孔平板中转移了三份以下密度的以下细胞系:分别为 1500 和 1800 个细胞/孔的 Colo205 和 Calu3。转移后立即加入小鼠抗 KID3。细胞在 5% CO₂/空气的增湿培养箱中在 37°C 下培养 5 天。实验的最后,将 MTT 溶于 PBS(5mg/ml) 并以 1 : 10 的稀释比直接加入孔中。将平板放回并孵育 4 小时。孵育后,移去培养基并加入 100 μ l DMSO 溶解沉淀。平板在平板读数器上于 540 处读数。

[0268] 小鼠抗 KID3 通过诱导肿胀细胞死亡途径以剂量依赖性的方式抑制结肠癌细胞 Colo205 的生长。然而,终浓度 10pg/ml 的小鼠抗 KID3 不抑制肺癌细胞 Calu3(小鼠抗 KID3 不与其结合)或 HT29(表达低水平 KID3 的另一结肠癌株系)。图 4 显示了根据本实施例的方法测定抗 KID3 抗体能力的若干体外实验的结果。图 5 显示与化学治疗剂伊立替康和 5FU 组合的抗 KID3 抗体的体外活性。

[0269] 实施例 11. 小鼠抗 KID3 和缀合了毒素的抗小鼠 IgG 的内化作用

[0270] Mab-ZAP(Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) 为与肥皂草毒蛋白(抑制蛋白质合成的毒素)缀合的抗小鼠 IgG。该毒素不能透过细胞膜。如果单克隆抗体与可内化的细胞表面抗原决定簇结合,则毒素缀合物可以与结合的单克隆抗体结合并被内化,最终杀死细胞。由于毒活性的展现依赖于内化作用,Mab-ZAP 可以用于评估给定的表面抗原是否可作为任何毒素的合适靶标,所述毒素依赖于内化作用以表达细胞毒效应。由此,Mab-ZAP 可作为这些内化依赖性毒素(如美登木素生物碱和加利车霉素)的模型。

[0271] 为测试肿瘤细胞对小鼠抗 KID3 和缀合肥皂草毒蛋白的抗小鼠 IgG 的内化以及肥皂草毒蛋白内化后杀死肿瘤细胞的效力,用 10mM EDTA 从储存瓶中移出人结肠肿瘤细胞 Colo205 并离心。在合适的培养基中以 50000 个细胞/ml 重悬细胞,并在 96 孔平板中每孔加入 100 μ l。立即在适当的孔中以 10 $\times$ 浓度加入抗体小鼠抗 KID3,以得到 10 μ g/ml 的终浓度。室温下 15 分钟后在适当的孔中以 10 $\times$ 浓度加入 Mab-ZAP(目录号 IT-04, Advanced Targeting Systems, San Diego CA),以得到 0.001nM 到 10nM 的终浓度。培养四天后,加入 MTT(储存于 5mg/ml PBS, 1 : 10 稀释到孔中)在 37°C 培养 4 小时。然后从所有孔中移去培养基并加入 100 μ l/孔的 DMSO。轻轻摇晃平板以溶解蓝色 MTT 沉淀并将平板置于平板读数器上于 540nm 处读数。

[0272] 当加入多于 0.01nM 的 Mab-ZAP 时,与不存在小鼠抗 KID3 时相比,存在小鼠抗 KID3 时 Colo205 的染色减弱,说明存在小鼠抗 KID3 和 Mab-ZAP 时,人结肠肿瘤细胞 Colo205 的生长被抑制,且小鼠抗 KID3 和缀合毒素的抗小鼠 IgG 被内化到 Colo205 中。当以 10nM 使用 Mab-ZAP 时,MTT 染色降低约 90%,对应于小鼠抗 KID3 和 Mab-ZAP 的结合抑制了约 90% 的 Colo205 生长。图 6 显示了根据本实施例的方法的内化实验的结果。

[0273] 实施例 12:裸鼠中抗 KID3 抗体对人结肠肿瘤 (Colo205 和 HT29) 细胞的效力

[0274] 在裸鼠 (nu/nu) 的肾囊中植入人结肠肿瘤细胞。对于经处理的动物,在左肾中植入 Colo205 肿瘤细胞,在右肾中植入 HT29 肿瘤细胞。每个肾中植入一个移植物 (胶原凝胶中的 500000 个细胞)。使移植物生长两天。在第三天以 100mg/kg 的负荷剂量腹膜内注射抗 KID3 单克隆抗体小鼠抗 KID3 克隆,接着每两天一次给药三次。对照小鼠只注射盐水。最后一次注射后三天,处死动物并检查带有移植物的肾。将移植物及其周围区域固定并包埋于石蜡块中并穿过整个移植物区域切片。

[0275] 在使用类似流程的另一实验中,将 Colo205 肿瘤 (肾囊下胶原凝胶中的 500000 个细胞) 安置两天,接着在第三天给予 100mg/kg 的负荷剂量和每两天 3-50mg/kg 的剂量。在这些实验中,在最后一次给药后 4 天收获肾。图 1 中显示了一些肾囊中植入了 Colo205 人结肠肿瘤细胞的动物的肾。图 1 中上图来自对照 (未处理) 动物,而下图来自 KID3 处理的动物。

[0276] 图 2 显示了评价肾囊模型中的 Colo205 结肠肿瘤细胞对抗 KID3 抗体应答率的若干肾囊实验结果的图示表示。在该图中, (CR) 表示完全应答,指任何切片中未见到肿瘤细胞;PR 表示部分应答,指肿瘤大小 < 对照的 50%;NR 表示无应答,指得到的肿瘤大小为对照的 50-100%。图 1 显示的结果评分为部分应答,并标记为 Colo205-2。

[0277] 实施例 13. 人结肠肿瘤皮下模型中 KID3 抗体的抗肿瘤效力。

[0278] 该研究设计用于测定结肠癌皮下模型中抗 KID3 抗体的剂量响应性抗肿瘤数据。用细胞毒性化学治疗剂氟尿嘧啶作为阳性对照。

[0279] 胰蛋白酶消化培养的 Colo205 人结肠癌细胞,用培养基洗涤、旋转离心并以每毫升培养基 1 亿个细胞重悬 (每 0.05mL 体积中 5 百万个细胞),然后混合到等体积的 **Matrigel®** 中,以得到 0.1mL 的终注射体积。在研究中对 72 只 NCR. nu/nu 纯合小鼠腹膜内给药。分组为 (1) 0.2mL 盐水对照,每周两次,共处理 10 次, (2) 50mg/kg 抗 KID3 抗体,每周两次,共处理 10 次, (3) 50mg/kg 氟尿嘧啶 (5FU),每周一次,共处理 4 次, (4) 35mg/kg 氟尿嘧啶 (5FU),每周一次,共处理 4 次, (5) 50mg/kg 抗 KID3 抗体,每周两次,共处理 10 次,加 50mg 的氟尿嘧啶 (5FU),每周一次,共处理 4 次 (6) 50mg/kg 的抗 KID3 抗体,每周两次,共 10 次处理,加 35mg/kg 氟尿嘧啶 (5FU),每周一次,共处理 4 次。

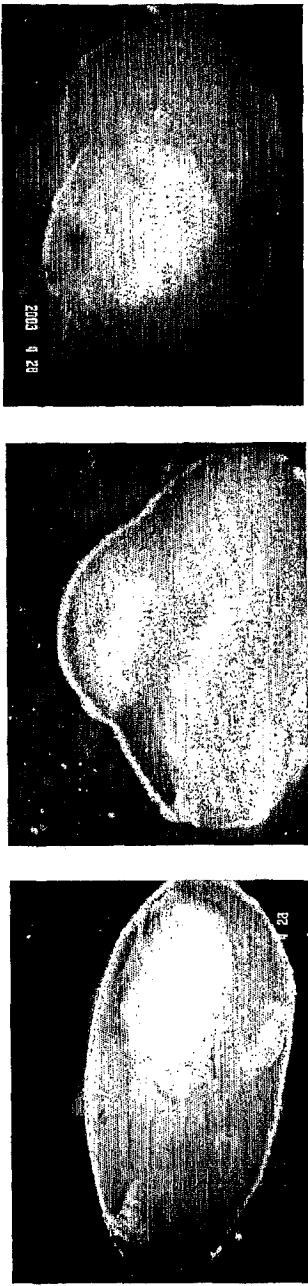
[0280] 评价肿瘤随时间的生长以测定抗肿瘤活性。治疗开始之前肿瘤可触知。在处理结束后继续喂养抗体处理相应的动物以测定肿瘤再生长的时间。

[0281] 图 3 显示该实验的结果。可以看出所有的处理组都比盐水更高效地抑制肿瘤细胞的生长。

[0282] 应该理解本文所述的实施例和实施方案仅用于说明目的,本领域技术人员可提出其各种修饰和改变,并包含于本申请的精神和范围中。本文引用的所有出版物、专利和专利申请为了所有目的在本文中以相同的程度整体引入为参考,就如同每一个单独的出版物、

专利或专利申请被引入为参考一样。

肾囊模型中 KLD3 抗体对人结肠瘤系
Colo205 的效力
未处理的



KLD3 处理的



图 1

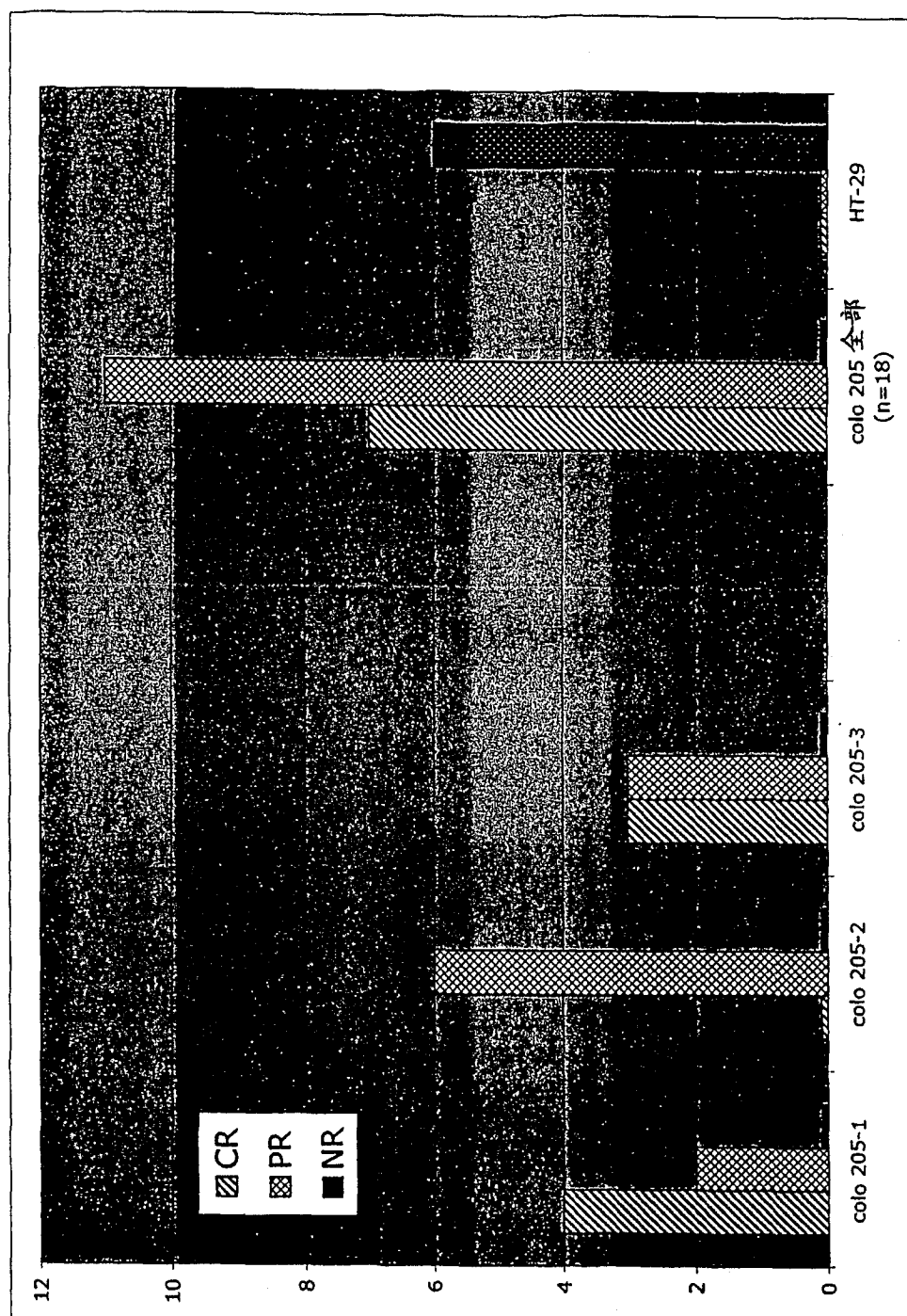


图 2

皮下模型中 KID3 对人结肠瘤系 Colo205 的效力

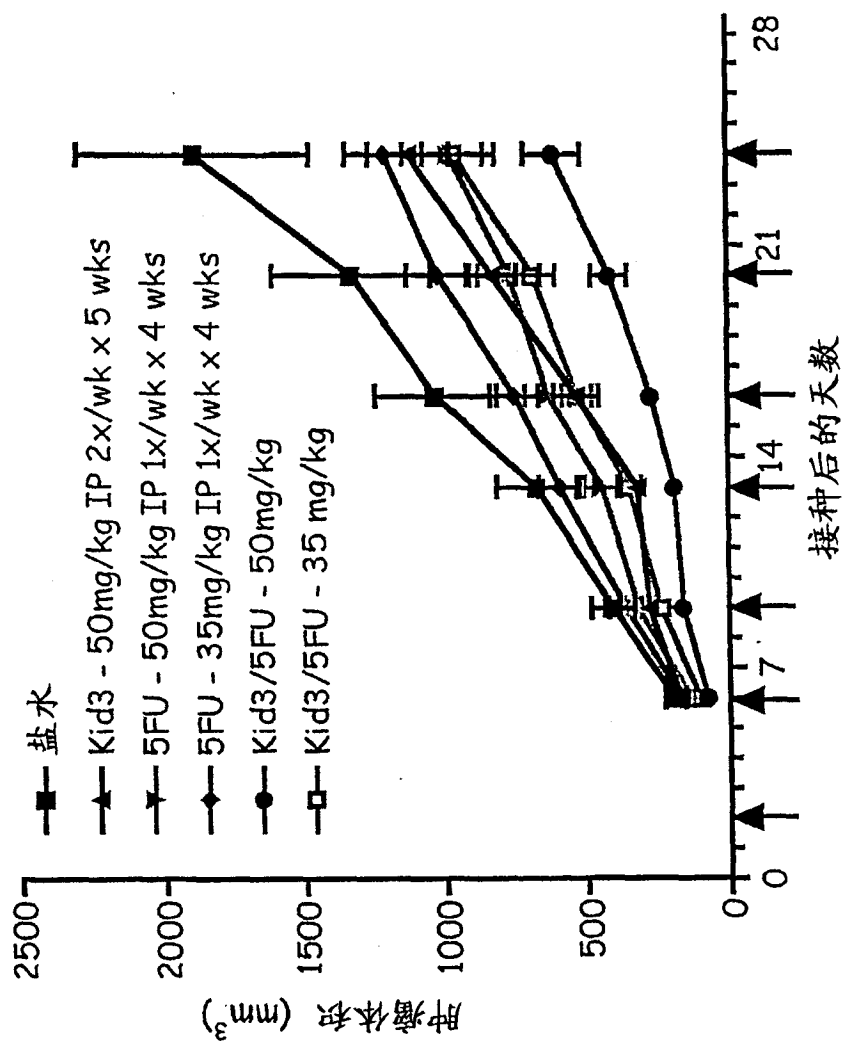


图 3

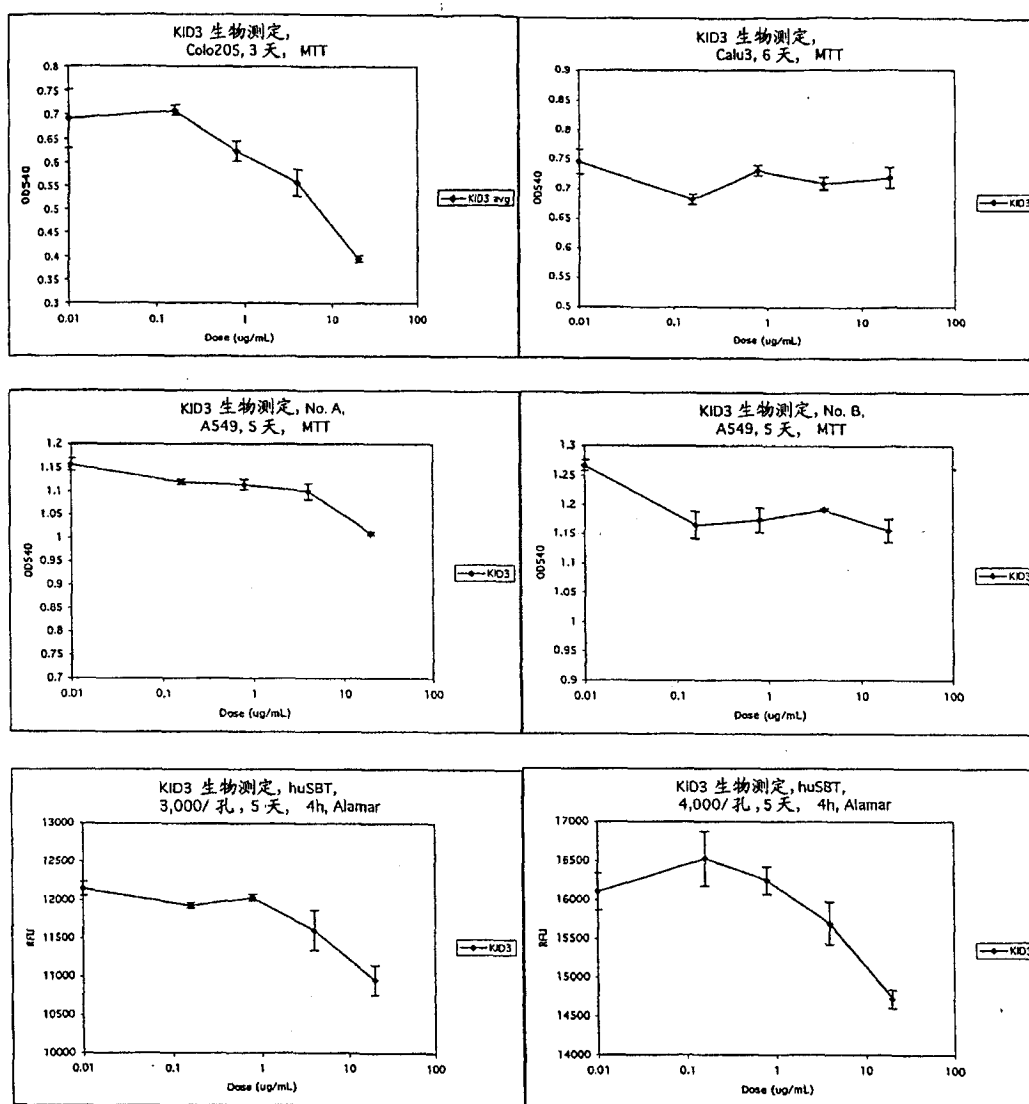


图 4

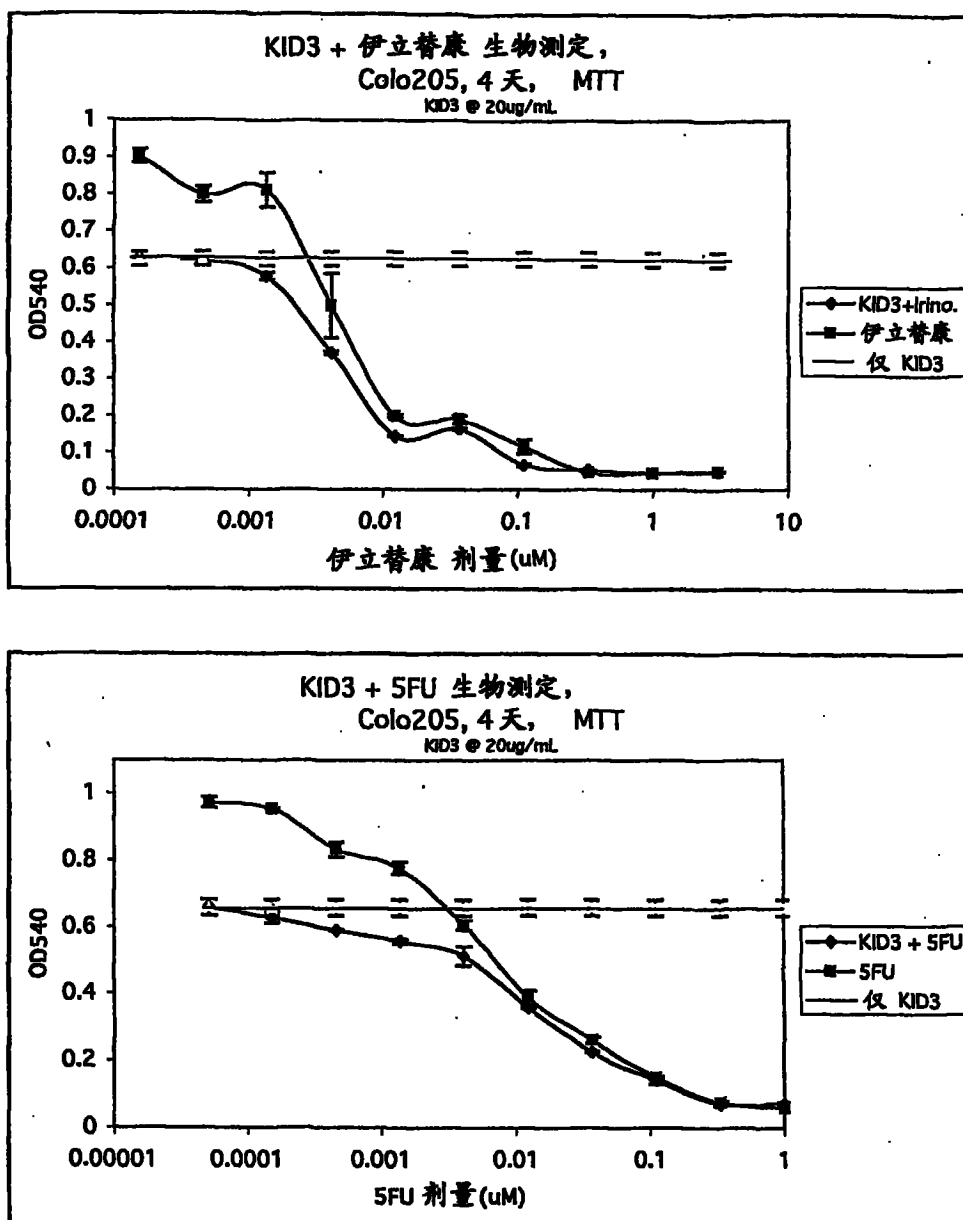


图 5

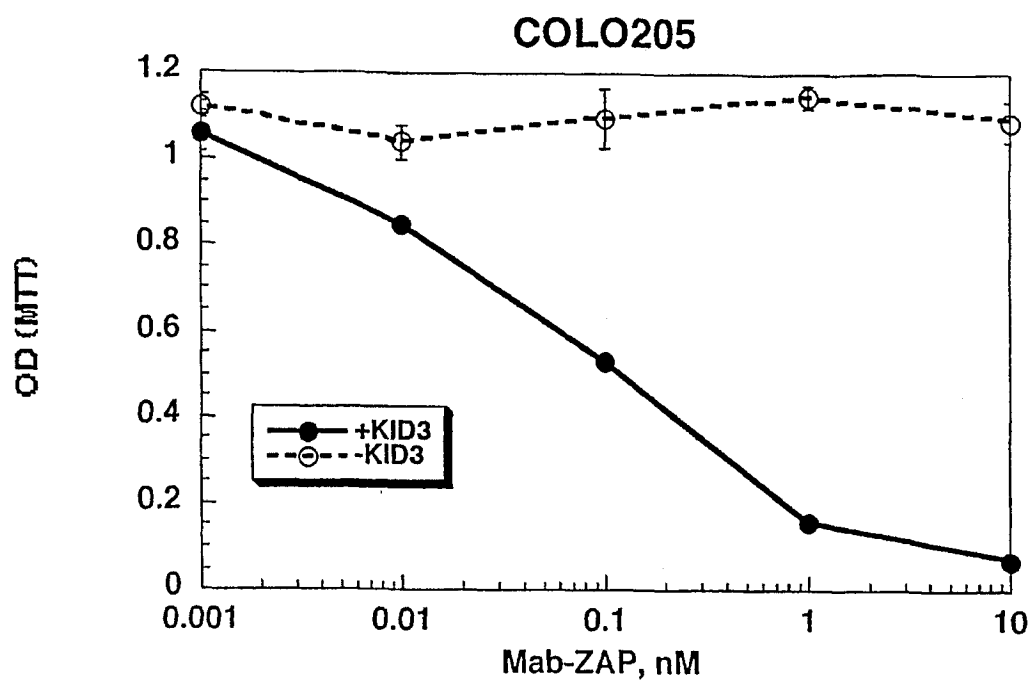


图 6

	M	E	K	D	T	L	L	L	W	V	L	L	L	W	V
1	ATGGAGAAA	GACACACTC	CTGCTATGG	GTCCTGCTT	CTCTGGGTT										
	TACCTCTTT	CTGTGTGAG	GACGATACC	CAGGACGAA	GAGACCCAA										
	P	G	S	T	G	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S
46	CCAGGTTCC	ACAGGTGAC	ATTGTGCTG	ACCCAATCT	CCAGCTTCT										
	GGTCCAAGG	TGTCCACTG	TAACACGAC	TGGGTTAGA	GGTCGAAGA										
	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A
91	TTGGCTGTG	TCTCTAGGG	CAGAGGGCC	ACCATCTCC	TGCAGAGCC										
	AACCGACAC	AGAGATCCC	GTCTCCCGG	TGGTAGAGG	ACGTCTCGG										
	S	E	S	V	D	N	Y	G	I	S	Y	M	N	W	F
136	AGCGAAAGT	GTTGATAAT	TATGGCATT	AGTTATATG	AACTGGTTC										
	TCGCTTTCA	CAACTATTA	ATACCGTAA	TCAATATAC	TTGACCAAG										
	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	V	L	I	Y	A	A
181	CAACAGAAA	CCAGGACAG	CCACCCAAA	GTCCTCATC	TATGCTGCA										
	GTTGTCTTT	GGTCCTGTC	GGTGGGTTT	CAGGAGTAG	ATACGACGT										
	S	N	Q	G	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G
226	TCCAACCAA	GGATCCGGG	GTCCCTGCC	AGGTTTAGT	GGCAGTGGG										
	AGGTTGGTT	CCTAGGCCC	CAGGGACGG	TCCAAATCA	CCGTCACCC										
	S	G	T	D	F	S	L	N	I	H	P	M	E	E	D
271	TCTGGGACA	GACTTCAGC	CTCAACATC	CATCCTATG	GAGGAGGAT										
	AGACCTGT	CTGAAGTCG	GAGTTGTAG	GTAGGATAC	CTCCTCCTA										
	D	T	A	M	Y	F	C	Q	Q	S	K	E	V	P	W
316	GATACTGCA	ATGTATTTT	TGTCAGCAA	AGTAAGGAG	GTTCCGTGG										
	CTATGACGT	TACATAAAG	ACAGTCGTT	TCATTCTCT	CAAGGCACC										
	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A
361	ACGTTTCGGT	GGAGGCACC	AAGCTCGAG	ATCAAACGG	ACTGTGGCT										
	TGCAAGCCA	CCTCCGTGG	TTCGAGCTC	TAGTTTGCC	TGACACCGA										
	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
406	GCACCATCT	GTCTTCATC	TTCGCGCCA	TCTGATGAG	CAGTTGAAA										
	CGTGGTAGA	CAGAAGTAG	AAGGGCGGT	AGACTACTC	GTCAACTTT										
	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P
451	TCTGGAACT	GCCTCTGTT	GTGTGCCTG	CTGAATAAC	TTCTATCCC										
	AGACCTTGA	CGGAGACAA	CACACGGAC	GACTTATTG	AAGATAGGG										
	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S
496	AGAGAGGCC	AAAGTACAG	TGGAAGGTG	GATAACGCC	CTCCAATCG										
	TCTCTCCGG	TTTCATGTC	ACCTTCCAC	CTATTGCGG	GAGGTTAGC										
	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S
541	GGTAACTCC	CAGGAGAGT	GTCACAGAG	CAGGACAGC	AAGGACAGC										
	CCATTGAGG	GTCCTCTCA	CAGTGTCTC	GTCCTGTCG	TTCCTGTCTG										
	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y
586	ACCTACAGC	CTCAGCAGC	ACCCTGACG	CTGAGCAAA	GCAGACTAC										
	TGGATGTCG	GAGTCGTCG	TGGGACTGC	GACTCGTTT	CGTCTGATG										
	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L
631	GAGAAACAC	AAAGTCTAC	GCCTGCGAA	GTCACCCAT	CAGGGCCTG										
	CTCTTTGTG	TTTCAGATG	CGGACGCTT	CAGTGGGTA	GTCCCGGAC										
	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	*	
676	AGCTCGCCC	GTCACAAAG	AGCTTCAAC	AGGGGAGAG	TGTTAG										
	TCGAGCGGG	CAGTGTTTC	TCGAAGTTG	TCCCCTCTC	ACAATC										

图 7

	M	G	V	L	I	L	L	W	L	F	T	A	F	P	G
1	ATGGGAGTG	CTGATTCTT	TTGTGGCTG	TTCACAGCC	TTTCCTGGT										
	TACCCTCAC	GACTAAGAA	AACACCGAC	AAGTGTCGG	AAAGGACCA										
	I	L	S	D	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V
46	ATCCTGTCT	GATGTGCAG	CTTCAGGAG	TCGGGACCT	GGCCTGGTG										
	TAGGACAGA	CTACACGTC	GAAGTCCTC	AGCCCTGGA	CCGGACCAC										
	K	P	S	Q	S	L	S	L	T	C	T	V	T	G	Y
91	AAACCTTCT	CAGTCTCTG	TCCCTCACC	TGCACTGTC	ACTGGCTAC										
	TTTGGAAGA	GTCAGAGAC	AGGGAGTGG	ACGTGACAG	TGACCGATG										
	S	I	T	S	D	Y	A	W	N	W	I	R	Q	F	P
136	TCAATCACC	AGTGATTAT	GCCTGGAAC	TGGATCCGG	CAGTTTCCA										
	AGTTAGTGG	TCACTAATA	CGGACCTTG	ACCTAGGCC	GTCAAAGGT										
	G	N	K	L	E	W	M	G	Y	I	S	Y	S	G	S
181	GGAAACAAA	CTGGAGTGG	ATGGGCTAC	ATAAGCTAC	AGTGGTAGC										
	CCTTTGTTT	GACCTCACC	TACCCGATG	TATTCGATG	TCACCATCG										
	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	S	I	T	R
226	ACTAGCTAC	AACCCATCT	CTCAAAAGT	CGAGTCTCT	ATCACTCGA										
	TGATCGATG	TTGGGTAGA	GAGTTTTC	GCTCAGAGA	TAGTGAGCT										
	D	T	S	K	N	Q	F	F	L	Q	L	N	S	V	T
271	GACACATCC	AAGAACCAG	TTCTTCCTG	CAGTTGAAT	TCTGTGACT										
	CTGTGTAGG	TTCTTGCTG	AAGAAGGAC	GTCAACTTA	AGACACTGA										
	T	E	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	F	Y	Y	R
316	ACTGAGGAC	ACAGCCACA	TATTACTGT	GCAAGATTC	TACTATAGG										
	TGACTCCTG	TGTCGGTGT	ATAATGACA	CGTTCTAAG	ATGATATCC										
	Y	A	D	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T
361	TACGCCGAC	TACTTTGAC	TACTGGGGC	CAAGGCACC	ACTCTCACA										
	ATGCGGCTG	ATGAAACTG	ATGACCCCG	GTTCCGTGG	TGAGAGTGT										
	V	S	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A
406	GTCTCCTCA	GCTAGCACC	AAGGGCCCA	TCGGTCTTC	CCCCTGGCA										
	CAGAGGAGT	CGATCGTGG	TTCCCGGGT	AGCCAGAAG	GGGGACCGT										
	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C
451	CCCTCCTCC	AAGAGCACC	TCTGGGGGC	ACAGCGGCT	CTGGGCTGC										
	GGGAGGAGG	TTCTCGTGG	AGACCCCGG	TGTCGCCGA	GACCCGACG										
	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
496	CTGGTCAAG	GACTACTTC	CCCGAACCG	GTGACGGTG	TCGTGGAAC										
	GACCAGTTC	CTGATGAAG	GGGCTTGGC	CACTGCCAC	AGCACCTTG										
	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L
541	TCAGGCGCC	CTGACCAGC	GGCGTGCAC	ACCTTCCCG	GCTGTCCTA										
	AGTCCGCGG	GACTGGTCC	CCGCACGTG	TGGAAGGGC	CGACAGGAT										
	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P
586	CAGTCCTCA	GGACTCTAC	TCCCTCAGC	AGCGTGGTG	ACTGTGCCC										
	GTCAGGAGT	CCTGAGATG	AGGGAGTCG	TCGCACCAC	TGACACGGG										
	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H
631	TCCAGCAGC	TTGGGCACC	CAGACCTAC	ATCTGCAAC	GTGAATCAC										
	AGGTCGTCG	AACCCGTGG	GTCTGGATG	TAGACGTTG	CACTTAGTG										
	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S
676	AAGCCCAGC	AACACCAAG	GTGGACAAG	AAAGTTGAG	CCCAAATCT										
	TTCGGGTCG	TTGTGGTTC	CACCTGTTC	TTTCAACTC	GGGTTTAGA										

图 8A

	C D K	T H T	C P P	C P A	P E L
721	TGTGACAAA	ACTCACACA	TGCCCACCG	TGCCCAGCA	CCTGAAGTC
	ACACTGTTT	TGAGTGTGT	ACGGGTGGC	ACGGGTCGT	GGACTTGAG
	L G G	P S V	F L F	P P K	P K D
766	CTGGGGGGA	CCGTCAGTC	TTCCTCTTC	CCCCCAAAA	CCCAAGGAC
	GACCCCCCT	GGCAGTCAG	AAGGAGAAG	GGGGGTTTT	GGGTTCCTG
	T L M	I S R	T P E	V T C	V V V
811	ACCCTCATG	ATCTCCCGG	ACCCCTGAG	GTCACATGC	GTGGTGGTG
	TGGGAGTAC	TAGAGGGCC	TGGGGACTC	CAGTGTACG	CACCACCAC
	D V S	H E D	P E V	K F N	W Y V
856	GACGTGAGC	CACGAAGAC	CCTGAGGTC	AAGTTCAAC	TGGTACGTG
	CTGCACTCG	GTGCTTCTG	GGACTCCAG	TTCAAGTTG	ACCATGCAC
	D G V	E V H	N A K	T K P	R E E
901	GACGGCGTG	GAGGTGCAT	AATGCCAAG	ACAAAGCCG	CGGGAGGAG
	CTGCCGCAC	CTCCACGTA	TTACGGTTC	TGTTTCGGC	GCCCTCCTC
	Q Y N	S T Y	R V V	S V L	T V L
946	CAGTACAAC	AGCACGTAC	CGTGTGGTC	AGCGTCCTC	ACCGTCCTG
	GTCATGTTG	TCGTGCATG	GCACACCAG	TCGCAGGAG	TGGCAGGAC
	H Q D	W L N	G K E	Y K C	K V S
991	CACCAGGAC	TGGCTGAAT	GGCAAGGAG	TACAAGTGC	AAGGTCTCC
	GTGGTCTTG	ACCGACTTA	CCGTTCTCT	ATGTTACAG	TTCCAGAGG
	N K A	L P A	P I E	K T I	S K A
1036	AACAAAGCC	CTCCCAGCC	CCCATCGAG	AAAACCATC	TCCAAAGCC
	TTGTTTCGG	GAGGGTCGG	GGGTAGCTC	TTTTGGTAG	AGGTTTCGG
	K G Q	P R E	P Q V	Y T L	P P S
1081	AAAGGGCAG	CCCCGAGAA	CCACAGGTG	TACACCCTG	CCCCCATCC
	TTTCCCGTC	GGGGCTCTT	GGTGTCCAC	ATGTGGGAC	GGGGGTAGG
	R D E	L T K	N Q V	S L T	C L V
1126	CGGGATGAG	CTGACCAAG	AACCAGGTC	AGCCTGACC	TGCCTGGTC
	GCCCTACTC	GACTGGTTC	TTGGTCCAG	TCGGACTGG	ACGGACCAG
	K G F	Y P S	D I A	V E W	E S N
1171	AAAGGCTTC	TATCCCAGC	GACATCGCC	GTGGAGTGG	GAGAGCAAT
	TTTCCGAAG	ATAGGGTCG	CTGTAGCGG	CACCTCACC	CTCTCGTTA
	G Q P	E N N	Y K T	T P P	V L D
1216	GGGCAGCCG	GAGAACAAC	TACAAGACC	ACGCCTCCC	GTGCTGGAC
	CCCGTCGGC	CTCTTGTTG	ATGTTCTGG	TGCGGAGGG	CACGACCTG
	S D G	S F F	L Y S	K L T	V D K
1261	TCCGACGGC	TCCTTCTTC	CTCTACAGC	AAGCTCACC	GTGGACAAG
	AGGCTGCCG	AGGAAGAAG	GAGATGTCT	TTGAGTGG	CACCTGTTC
	S R W	Q Q G	N V F	S C S	V M H
1306	AGCAGGTGG	CAGCAGGGG	AACGTCTTC	TCATGCTCC	GTGATGCAT
	TCGTCCACC	GTCGTCCCC	TTGCAGAAG	AGTACGAGG	CACTACGTA
	E A L	H N H	Y T Q	K S L	S L S
1351	GAGGCTCTG	CACAACCAC	TACACGCAG	AAGAGCCTC	TCCCTGTCT
	CTCCGAGAC	GTGTTGGTG	ATGTGCGTC	TTCTCGGAG	AGGGACAGA
	P G K	*			
1396	CCGGGTAAA	TGA			
	GGCCCATTT	ACT			

图 8B

专利名称(译)	KID3及与其结合的KID3抗体		
公开(公告)号	CN101048425B	公开(公告)日	2012-12-26
申请号	CN200480033872.2	申请日	2004-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	雷文生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	雷文生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	雷文生物技术公司		
[标]发明人	TW梁 许晓琳		
发明人	T·W·梁 D·T·洛 许晓琳		
IPC分类号	C07K16/00 C07H21/04 G01N33/53 A61K39/395 C07K C07K16/30		
CPC分类号	C07K2317/77 A61K2039/505 C07K2317/73 C07K16/30 A61P1/04 A61P3/10 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08		
代理人(译)	郑霞		
优先权	60/504441 2003-09-18 US		
其他公开文献	CN101048425A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供疾病和癌症相关表位KID3的鉴定和表征。本发明还提供与KID3结合的单克隆抗体家族，诊断和治疗多种表达KID3的人癌症和疾病的方法。