



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102517252 A

(43) 申请公布日 2012.06.27

(21) 申请号 201110356262.8	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
(22) 申请日 2006.12.08	<i>A61P 37/02</i> (2006.01)
(30) 优先权数据	<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
0525214.3 2005.12.12 GB	<i>A61P 19/02</i> (2006.01)
(62) 分案原申请数据	<i>A61P 19/04</i> (2006.01)
200680051213.0 2006.12.08	<i>A61P 31/00</i> (2006.01)
(71) 申请人 生物发明国际公司	<i>A61P 31/18</i> (2006.01)
地址 瑞典隆德	
(72) 发明人 比约恩·弗伦多斯 罗兰·卡尔松	
(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司	
72003	
代理人 吴小瑛 营兴成	
(51) Int. Cl.	
<i>C12N 5/078</i> (2010.01)	
<i>C12N 5/0781</i> (2010.01)	
<i>C12N 5/07</i> (2010.01)	
<i>C12N 15/13</i> (2006.01)	
<i>C07K 16/28</i> (2006.01)	
<i>C07K 16/42</i> (2006.01)	
<i>G01N 33/53</i> (2006.01)	
<i>A61K 39/395</i> (2006.01)	

权利要求书 3 页 说明书 22 页
序列表 4 页 附图 15 页

(54) 发明名称
生物材料及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种生物材料及其用途。本发明提供了结合分子,包括与靶细胞的细胞表面抗原选择性结合的抗体分子,其中,一旦结合分子结合细胞表面的抗原,则诱导靶细胞的凋亡。也提供了用于诱导细胞凋亡的药物组合物、方法,以及其用途。

1. 诱导靶细胞细胞凋亡的方法,包括下列步骤:
 - a. 提供一种或多种展示细胞表面抗原 ICAM-1 的靶细胞;
 - b. 提供一种或多种结合分子,其选择性地与细胞表面 ICAM-1 结合,且一旦结合 ICAM-1,则诱导所述靶细胞的细胞凋亡;
 - c. 将 (a) 的靶细胞暴露于 (b) 的结合分子,以诱导靶细胞的细胞凋亡。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述的结合分子是抗体分子。
3. 诱导靶细胞细胞凋亡的方法,包括下列步骤:
 - a. 提供一种或多种展示细胞表面抗原 HLA-DR/DP 和 / 或表面 IgM 的靶细胞;
 - b. 提供一种或多种抗体分子,其选择性地与细胞表面 HLA-DR/DP 和 / 或表面 IgM 结合,且一旦结合 HLA-DR/DP 和 / 或表面 IgM,则诱导所述靶细胞的细胞凋亡;
 - c. 将 (a) 的靶细胞暴露于 (b) 的抗体分子,以诱导靶细胞的细胞凋亡。
4. 用于权利要求 1 或 2 所述方法中的结合分子,其选择性地与细胞表面 ICAM-1 结合,且一旦结合 ICAM-1,则诱导所述靶细胞的细胞凋亡。
5. 用于权利要求 3 所述方法中的抗体分子,其选择性地与靶细胞的细胞表面抗原结合,且一旦结合所述细胞表面抗原,则诱导所述靶细胞的细胞凋亡,其中所述细胞表面抗原为 HLA-DR/DP 和 / 或表面 IgM。
6. 根据权利要求 4 所述的结合分子,其中所述结合分子是抗体分子。
7. 根据权利要求 4 或 6 所述的结合分子,其中所述细胞表面抗原为 ICAM-1。
8. 根据权利要求 5 所述的抗体分子,其中所述细胞表面抗原为 HLA-DR/DP。
9. 根据权利要求 5 所述的抗体分子,其中所述细胞表面抗原为表面 IgM。
10. 根据权利要求 4-9 中任一项所述的结合分子或抗体分子,其中所述靶细胞是免疫细胞或上皮细胞。
11. 根据权利要求 10 所述的结合分子或抗体分子,其中所述免疫细胞是 B 淋巴细胞。
12. 根据权利要求 4-11 中任一项所述的结合分子或抗体分子,其中所述靶细胞与疾病有关。
13. 根据权利要求 12 所述的结合分子或抗体分子,其中所述疾病选自下组:癌症;自身免疫病,其包括但不限于风湿性关节炎和 SLE;急性和慢性炎症性疾病;败血症以及包括但不限于 HIV 的传染性疾病。
14. 根据权利要求 13 所述的结合分子或抗体分子,其中所述疾病是选自淋巴瘤(白血病、骨髓瘤)、胃癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、膀胱癌、脉络丛癌、胰腺癌、结肠癌和前列腺癌中的癌症。
15. 根据权利要求 6-14 中任一项所述的结合分子或抗体分子,其中所述抗体分子是 IgG。
16. 根据权利要求 15 所述的结合分子或抗体分子,其中所述单链抗体选自下组:IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄。
17. 根据权利要求 6-16 中任一项所述的结合分子或抗体分子,其中所述抗体分子是人抗体或人源化抗体。
18. 根据权利要求 6-17 中任一项所述的结合分子或抗体分子,其中所述抗体具有可变区,所述可变区具有图 9-11 中任一图的序列或具有其功能等同的同源物。

19. 根据权利要求 18 所述的结合分子或抗体分子,其中所述抗体具有可变区,所述可变区具有图 9 的序列或其功能等同的同源物。

20. 根据权利要求 18 所述的结合分子或抗体分子,其中所述抗体具有可变区,所述可变区具有图 10 的序列或其功能等同的同源物。

21. 根据权利要求 18 所述的结合分子或抗体分子,其中所述抗体具有可变区,所述可变区具有图 11 的序列或其功能等同的同源物。

22. 核酸,其具有编码权利要求 4-21 中任一项所述抗体分子的核苷酸序列。

23. 根据权利要求 22 所述的核酸,其具有图 9-11 中任一图的核苷酸序列。

24. 权利要求 4-21 中任一项所述的结合分子或抗体分子在诊断和 / 或治疗和 / 或预防疾病中的用途,所述诊断和 / 或治疗和 / 或预防要求破坏靶细胞。

25. 权利要求 4-21 中任一项所述的结合分子或抗体分子在制备用于治疗 and / 或预防疾病的药物中的用途,所述诊断和 / 或治疗和 / 或预防要求破坏靶细胞。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的用途,其中所述待治疗的疾病选自下组:癌症;自身免疫病,其包括但不限于风湿性关节炎和 SLE;急性和慢性炎症性疾病;败血症以及包括但不限于 HIV 的传染性疾病。

27. 根据权利要求 26 所述的用途,其中所述待治疗的疾病是选自淋巴瘤(白血病、骨髓瘤)、胃癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、膀胱癌、脉络丛瘤、胰腺癌、结肠癌和前列腺癌中的癌症。

28. 根据权利要求 24-27 中任一项所述用途,其中所述结合分子或抗体分子如权利要求 8 或 19 所定义,所述待治疗的疾病如权利要求 24 或 25 所定义。

29. 根据权利要求 24-27 中任一项所述的用途,其中所述的结合分子或抗体分子如权利要求 7 或 20 所定义,所述待治疗疾病是如权利要求 27 所定义的淋巴瘤。

30. 根据权利要求 24-27 中任一项所述的用途,其中所述的结合分子或抗体分子如权利要求 9 或 21 所定义,所述待治疗疾病是如权利要求 27 所定义的淋巴瘤。

31. 药物组合物,其包含权利要求 4-21 中任一项所定义的结合分子或抗体分子以及药学可接受载体、赋形剂或稀释剂。

32. 体外诱导靶细胞细胞凋亡的方法,包括下列步骤:

a. 提供一种或多种靶细胞;

b. 提供权利要求 4-21 中任一项所述的一种或多种结合分子或抗体分子;

c. 将 (a) 的靶细胞暴露于 (b) 的结合分子或抗体分子,以诱导靶细胞的细胞凋亡。

33. 根据权利要求 32 所述的方法,其中步骤 (a) 中提供的所述靶细胞是免疫细胞或上皮细胞。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中所述免疫细胞是 B 淋巴细胞。

35. 根据权利要求 32-34 中任一项所述的方法,其中所述靶细胞与疾病有关。

36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中所述疾病选自下组:癌症;自身免疫病,其包括但不限于风湿性关节炎和 SLE;急性和慢性炎症性疾病;败血症以及包括但不限于 HIV 的传染性疾病。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述疾病是选自淋巴瘤(白血病、骨髓瘤)、胃癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、膀胱癌、脉络丛瘤、胰腺癌、结肠癌和前列腺癌中的癌症。

38. 体内诱导靶细胞细胞凋亡的方法,包括下列步骤:
 - a. 提供一种或多种靶细胞;
 - b. 提供一种或多种权利要求 4-21 中任一项所述的结合分子或抗体分子;
 - c. 将 (a) 的靶细胞暴露于 (b) 的结合分子或抗体分子,以诱导靶细胞的细胞凋亡。
39. 根据权利要求 38 所述的方法,其中 (a) 中提供的所述的靶细胞是免疫细胞或上皮细胞。
40. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述免疫细胞是 B 淋巴细胞。
41. 根据权利要求 38-40 中任一项所述的方法,其中所述靶细胞与疾病有关。
42. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述疾病选自下组:癌症;自身免疫病,其包括但不限于风湿性关节炎和 SLE;急性和慢性炎症性疾病;败血症以及包括但不限于 HIV 的传染性疾病。
43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述疾病是选自淋巴瘤(白血病、骨髓瘤)、胃癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、膀胱癌、脉络丛瘤、胰腺癌、结肠癌和前列腺癌中的癌症。
44. 诱导细胞凋亡的方法,其基本上参照实施例和附图如本文所述。
45. 诱导细胞凋亡的结合分子或抗体分子,其基本上参照实施例和附图如本文所述。
46. 诱导细胞凋亡的结合分子或抗体分子的用途,其基本上参照实施例和附图如本文所述。
47. 诱导细胞凋亡的药物组合物,其基本上参照实施例和附图如本文所述。

生物材料及其用途

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 12 月 8 日,申请号为 200680051213.0,题目为“生物材料及其用途”的分案申请。

[0002] 本发明涉及与细胞凋亡诱导有关的分子和用于诱导细胞凋亡的药物组合物、方法及其用途。

[0003] 目前,抗体不但是用于靶向癌症的选择性蛋白治疗剂,也用于治疗其他的症候 (Brekke et al. Nat Rev Drug Discov 2003 ;2 :52-62)。抗体工程的出现为从合成噬菌体文库中产生人抗体提供了工具。由于人源的性质和更好的多样性,其表现出了降低的免疫原性且增高的特异性和亲和性 (Weiner et al. Nat Biotechnol 2005 ;23 :556-7)。天然文库 (naïve library) 特别引人注目,因为它们不依赖于新文库的免疫和重建,而可用于分离任何特异性的抗体,包括自身抗原 (Griffiths et al. Embo J1993 ;12 :725-34)。细胞表面受体目前组成了最成功的一类被当前治疗剂靶向的抗原,所述治疗剂包括小分子抑制剂和抗体。特别有意思的是细胞表面受体,其在靶细胞中独特表达或表现出增加的表达水平,并且另外能够向细胞中转死亡或生存信号。这种具有内在信号特性的、差异表达的受体使基于抗体靶向微生物感染的细胞、转化的细胞或其它的功能障碍的细胞成为可能。

[0004] 对于肿瘤的治疗,能在靶标肿瘤细胞中诱导细胞凋亡但不伤害正常组织的抗体特别有用。几种此类单抗已经被使用,其已在美国食品和药品管理局登记并且为常规的癌症治疗如淋巴瘤 (利妥昔单抗 (rituximab) 靶向 CD20) 或乳腺癌 (妥珠单抗 (trastuzumab) 或西妥昔单抗 (cetuximab) 分别靶向 Her-2 和 EGFR) 提供了替代。

[0005] 目前,在临床研究中,也存在其他的具有细胞凋亡诱导作用的抗体。然而,即便这些抗体在患者或者动物试验中显示有益作用,但仍然存在未能满足的临床需要。

[0006] 靶向 B 细胞肿瘤的抗独特型的免疫球蛋白是第一个实施于人的单克隆抗体治疗 (Miller et al. N Engl J Med 1982 ;306 :517-22)。已经表明通过被动抗体施用 (Riechmann et al. Nature 1988 ;332 :323-7) 或者用患者自身的肿瘤免疫球蛋白的主动接种 (Kwak et al. N Engl J Med 1992 ;327 :1209-15) 方法的肿瘤细胞破坏,赋予患有不同类型 B 细胞恶性肿瘤的患者肿瘤消退 (tumour regression) 或肿瘤休眠 (tumour dormancy)。最近的一篇文献描述了使用转基因小鼠产生完全的人抗独特型抗体 (Suarez et al. Mol Immunol 2004 ;41 :519-26),该小鼠在产生小鼠抗体和表达选择的人抗体链式基因座 (human antibody chain loci) 方面是有缺陷的。

[0007] 在本发明中,使用了竞争生物淘洗 (competition biopanning) 法,其中将全细胞形式的靶细胞抗原和膜囊 (membrane vesicles) 形式的过量相减细胞抗原 (excess subtractor cell antigen) 同时暴露于天然的 CoDeR® 抗体噬菌体文库 (W0 2004/023140 ;Soderlind et al. Nat Biotechnol 2000 ;18 :852-6),以重新得到并随后试验具有良好的 B 淋巴瘤靶细胞选择性的抗体片段。而且,试验的抗体在靶细胞但在非靶细胞中诱导细胞凋亡的能力,证明了所选择的结合分子的功能性。

[0008] 鉴定的特异性抗体包括 HLA-DR/DP (本发明的 B1 抗体) 和表面 IgM (本发明的 C11 抗体),以及 ICAM-1 (本发明的 B11 抗体),其是以前与细胞凋亡诱导无关的粘附分子。分

离的抗体在亚纳摩尔 (subnanomolar) 到纳摩尔 (nanomolar) 的范围内都具有亲和性,直接使他们成为用于靶向抗体治疗法的可能的选择。

[0009] 发明概述

[0010] 一方面,本发明提供了在靶细胞中诱导细胞凋亡的方法,其包括下列步骤:

[0011] a. 提供一种或多种展示细胞表面抗原 ICAM-1 的靶细胞;

[0012] b. 提供一种或多种结合分子,其选择性地与细胞表面 ICAM-1 结合,且一旦结合 ICAM-1,则诱导靶细胞的细胞凋亡;

[0013] c. 将 (a) 的靶细胞暴露于 (b) 的结合法分子中,诱导靶细胞的细胞凋亡。

[0014] 优选,结合分子是抗体分子。

[0015] 第二方面,本发明提供了在靶细胞中诱导细胞凋亡的方法,其包括下列步骤:

[0016] a. 提供一种或多种展示细胞表面抗原 HLA-DR/DP 和 / 或表面 IgM 的靶细胞;

[0017] b. 提供一种或多种抗体,其选择性地与细胞表面 HLA-DR/DP 和 / 或表面 IgM 结合,且一旦结合 HLA-DR/DP 和 / 或表面 IgM,则诱导靶细胞的细胞凋亡;

[0018] c. 将 (a) 的靶细胞暴露于 (b) 的抗体分子中,以诱导靶细胞的细胞凋亡。

[0019] 第三方面,本发明提供了结合分子,其选择性地与细胞表面 ICAM-1 结合,一旦结合 ICAM-1,则诱导靶细胞的细胞凋亡。或结合分子是选择性地与细胞表面 HLA-DR/DP 和 / 或表面 Ig M 结合的抗体分子。

[0020] ICAM-1 也称为 CD54,但出于本发明的目的,使用 ICAM-1。

[0021] 结合分子可来源于抗体并以在许多文库中已经广泛使用的抗体支架 (antibody scaffold) 为基础 [Clackson T et al, Nature. 1991Aug 15 ;352(6336) :624-8, Marks JD et al, J Mol Biol. 1991Dec 5 ;222(3) :581-97],但结合分子也可以来自其他的分子支架,如纤连蛋白支架 [Weng S et al., Proteomics. 2002Jan ;2(1) :48-57] 和蛋白 A 支架 [Nord K, et al, Nat Biotechnol 1997Aug ;15(8) :772-7, Hogbom M et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2003Mar 18 ;100(6) :3191-6]。这些支架中的每一个根据应用,有其自身的优势,例如,抗体支架可有利地用于产生难以与天然变异区分的变异。

[0022] 对抗体的基本结构,即最常用的支架,已经了解的相当透彻。大体上,框架区,其包括顺序排列成二个折叠片的 β 链,表现为一组可变环,就是所谓的互补决定区 (CDRs),其具有结合抗原分子的能力。尽管抗体在支架结构中可以变化,但最广泛的变异性见于 CDRs 中。抗体间良好的变异性是它们以特异性方式与大体上所有类型的分子结构相互作用的能力的基础。由于这种能力,抗体已经广泛用于产生在疾病的诊断 / 预后中具有适用性的特异粘合分子 (specific binder),并作为对确定的靶结构具有特异性的治疗剂 [Borrebaeck CA and Carlsson R, Curr Opin Pharmacol. 2001Aug ;1(4) :404-8]。

[0023] 另外,用于本发明的其他非抗体结合分子,是具有支架结构的分子,所述支架结构具有高度稳定性但允许在某些位置引入变异。另一个结合分子的实例是容忍变异的纤连蛋白结构域和 58 个氨基酸的大蛋白质 A 结构域。也有其他的允许某种程度变异的分子折叠。此类实例包括 I 型和 II 型主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 分子,以及最近鉴定的一类新颖的分子,即所谓的防卫素,其在基本结构上相似,而仍然在基因家族成员之间具有广泛的序列变异性,这表明它们适宜作为具有分子多样性的支架。另外,在 ICAM-1 作为靶分子的情况下,天然配体如 LFA-1 或其重组变体组成能在靶细

胞中诱导细胞凋亡的特异性结合分子。

[0024] 而且,结合分子可以是选择性结合靶细胞的细胞表面 ICAM-1 的任何分子,并且一旦结合,则诱导靶细胞的细胞凋亡。

[0025] 结合分子优选是抗体分子。

[0026] 在一个实施方案中,细胞表面抗原是 ICAM-1。

[0027] 本发明的筛选重新获得对 ICAM-1 特异的抗体 (B11),其是一个以前认为与细胞凋亡无关且认为在细胞中无助于固有的负信号特性 (intrinsic negative signaling properties) 的受体。

[0028] 确定 ICAM-1 作为细胞凋亡诱导分子是经设计以分离针对在靶细胞和非靶细胞之间差异表达的所有表面受体的特异性而筛选的直接结果,而无论并在没有它们各自的同一性的先前了解的情况下。已证实 ICAM-1 诱导的细胞凋亡为主动凋亡过程,该过程与线粒体膜的去极化有关。对于依赖和不依赖半胱氨酸蛋白酶 caspase 的细胞凋亡两者的线粒体膜的去极化已有记载 (Nagy et al. J Mol Med 2003 ;81 :757-65)。

[0029] 本发明的发现还表明,被 B11 抗体结合的表位在不同来源的 B 淋巴瘤组织中表达,并且与其他的外周血白细胞相比,其在某些 B 淋巴瘤细胞中被上调。重要的是,除了 B 淋巴瘤细胞外,表达 ICAM-1 的癌细胞在体外遭受 ICAM-1 特异性 B11 抗体时也经历了细胞凋亡 (参阅实施例 6)。

[0030] 以前的研究已经证明 ICAM-1 在正常人组织中的限制表达 (Smith et al. J Clin Pathol 1990 ;43 :893-900)。ICAM-1 与细胞和细胞的粘附有关,并通过与其受体 LFA-1 结合在免疫应答和炎症中起重要作用。针对 ICAM-1 的抗体已用于干扰病理免疫应答和炎症。已经表明小鼠抗 ICAM-1mAb 在猕猴 (cyhomolgus monkey) 的体内施用 (Cosimi et al J Immunol 1990 ;144 :4604-12),或在患有风湿性关节炎患者或者接受了肾移植患者的临床试验中的使用,没有明显的毒性 (Kavanaugh et al. Arthritis Rheum 1994 ;37 :992-9 ;Haug et al. Transplantation 1993 ;55 :766-72)。

[0031] ICAM-1 靶向可导致细胞凋亡这一新的发现表明,只要不同来源的癌症表达抗原,利用 ICAM-1 的特异性结合分子如抗体来治疗所述癌症是可能的。

[0032] 基于 ICAM-1 的表达,可潜在地用细胞凋亡诱导抗 ICAM-1 抗体如 B11 治疗的癌症类型包括 :B 淋巴瘤、骨髓瘤 (Huang et al. (1993) Hybridoma 12p661-75 ;Huang et al. , (1995) Cancer Res 55p610-6 ;Smallshaw et al, (2004) J Immunother 27p419-24)、胃癌 (Maruo et al, (2002) Int J Cancer 100p486-90)、乳腺癌 (Rosette et al, (2005) Carcinogenesis 26p943-50)、肝癌 (Sun et al, (1999) J Cancer Res Clin Oncol 125p28-34)、肺癌 (Grothey et al, (1998) Br J Cancer 77p801-7)、黑色素瘤 (Wang et al, (2005) Int J Cancer 27p419-24)、膀胱癌 (Roche et al, (2003) Thromb Haemost 89p1089-97) 以及前列腺癌 (Aalinkeel et al, (2004) Cancer Res 64p5311-21)。在肿瘤转移中,已确定了 ICAM-1 的表达,如同 Maruo 等 (Maruo et al, 2002)、Rosette 等 (Rosette et al, 2005)、Sun 等 (Sun et al, 1999)、Grothey 等 (Grothey et al, 1998)、Aalinkeel 等 (Aalinkeel et al, 2004) 所证明的,指出利用 ICAM-1 特异性抗体干扰转移过程是可能的。

[0033] 在另一个实施方案中,细胞表面抗体是 HLA-DR/DP。

[0034] HLA-DR/DP 通常存在于例如 B 细胞上,并发现在 B 淋巴瘤细胞中被上调。

[0035] 到目前为止,三种不同的 HLA-DR 特异性单克隆抗体已经进入临床试验阶段。其中最近增加的是完整的人 IgG₄ 1D09C3,其分离自与 n-CoDeR[®] 相比大小相似的天然噬菌体文库,但对纯化的抗原使用固相淘洗 (solid phase panning) (Nagy et al. Nat Med 2002 ; 8 :801-7)。

[0036] 在本发明中,已经确定了针对 HLA-DR/DP 的新的人抗体 (B1),其快速和高效地在血多 B 淋巴瘤细胞系中诱导细胞凋亡,据此,证明 HLA-DR/DP 与靶细胞中细胞凋亡的诱导有关。

[0037] B1 抗体结合许多不同来源的 B 淋巴瘤细胞系 (参阅实施例 1 和表 1),并且表示其在表达 HLA-DR/DP 抗原的细胞中诱导细胞凋亡。而且,当在 Raji B 淋巴瘤细胞系中试验时,所述 B1 抗体比利妥昔单抗更高效。当使用 B1 抗体的 IgG₄ 形式时,这点特别明显 (图 8)。

[0038] 根据已经获得的数据,这种抗体具有治疗表达 HLA-DR/DP 的 B 淋巴瘤细胞系的适宜特征。另外,与利妥昔单抗靶向风湿性关节炎和 SLE 相似,B1 抗体可有效消除处于障碍中的激活的 B 细胞,其中,表达 HLA-DR/DP 的 B 细胞是有害的。

[0039] 在另一个实施方案中,细胞表面抗原是表面 IgM。

[0040] 游离形式的 IgM 以大的四聚体结构存在,其较高的分子量倾向于将其限制于血管内。

[0041] 单聚体 IgM 可发现于 B 淋巴细胞的细胞壁上,并且作为抗原识别的抗体受体起作用。

[0042] 本发明的 C11 抗体,一旦和表达在 B 淋巴细胞上的表面 IgM 结合,则快速并高效地诱导细胞凋亡 (参阅实施例 1 和表 1)。与以前在治疗 B 淋巴瘤的临床中使用的独特型特异性抗 IgM 抗体相反,C11 抗体与表达在来自不同供体的 B 细胞上的非多态性表位结合,因此适宜用于治疗患有 B 淋巴瘤的患者,而不管 B 淋巴瘤的独特型。

[0043] 特别地,效应物分子例如抗 IgM 抗体也可能是任何类型的特异结合分子,其在不同独特型的表达 IgM 的细胞中引起细胞凋亡。

[0044] B1、B11 和 C11 IgG 诱导的细胞凋亡的动力学非常快,已观察到在一些细胞系中 3 小时后具有最大功效。快速的效应物功能对治疗功效非常重要,因为其由例如缺乏肿瘤抗原表达 (Uyttenhove et al. J. Exp. Med. 1983 ;157 :1040-52 ;Kennedy et al. Br J Haematol 2002 ;119 :412-6) 或表位突变 (Weiner et al. J Immunol 1989 ;142 :343-51 ; Bai et al. J. Clin. Invest. 2003 ;111 :1487-96) 而导致的肿瘤侵入的风险降至最低,并且潜在地限制治疗持续时期和副作用 (Robert et al Lancet Oncol 2005 ;6 :491-500)。

[0045] 优选地,靶细胞是免疫细胞或上皮细胞,并且有利地该免疫细胞是 B 淋巴细胞。

[0046] 方便地,该靶细胞与疾病有关。优选地,所述疾病选自下组:癌症、自身免疫病 (包括但不限于风湿性关节炎和 SLE)、急性和慢性炎症性疾病、败血症以及包括但不限于 HIV 的传染性疾病。

[0047] 有利地,所述疾病是选自淋巴瘤 (白血病、骨髓瘤)、胃癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、膀胱癌、脉络丛癌 (chorioid cancer)、胰腺癌 (pancreatic cancer)、结肠癌和前列腺癌中的癌症。

[0048] 如在本发明的定义部分所限定的,出于方便而使用术语抗体分子,除了其他的以外,还包括抗体、抗体片段和抗体衍生物。

[0049] 方便地,抗体分子是 IgG。IgG 可以是任何的 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄,但优选是任何的 IgG₁ 和 IgG₄。抗体分子优选是人源化的或人的。

[0050] 方便地,本发明的结合分子或抗体分子具有图 9-11 的可变区序列,或具有其功能上等同的同源物中任一个的序列。

[0051] 在本发明的一个实施方案中,该结合分子或抗体分子具有图 9 的可变区序列,或具有其功能上等同的同源物。

[0052] 在本发明的一个实施方案中,该结合分子或抗体分子具有图 10 的可变区序列,或具有其功能上等同的同源物。

[0053] 在本发明的一个实施方案中,该结合分子或抗体分子具有图 11 的可变区序列,或具有其功能上等同的同源物。

[0054] 第四方面,本发明提供了核酸,所述核酸具有编码任何以上的权利要求所要求保护的结合分子或抗体分子的核苷酸序列。

[0055] 通常,该核酸分子具有图 9-11 中任一个的核苷酸序列。

[0056] 第五方面,本发明提供了如本发明的第一或第二方面所限定的结合分子或抗体分子在诊断和 / 或治疗和 / 或预防需要破坏靶细胞的疾病中的用途。也提供了如本发明的第一或第二方面所限定的结合分子或抗体分子在制备用于治疗 and / 或预防需要破坏靶细胞的疾病的药物中的用途。

[0057] 在优选的实施方案中,该结合分子是抗体分子。

[0058] 方便地,待治疗的疾病选自下组:癌症、自身免疫疾病(包括但不限于风湿性关节炎和 SLE)、急性和慢性炎症性疾病、败血症和包括但不限于 HIV 的传染性疾病。

[0059] 方便地,待治疗的疾病选自淋巴瘤(白血病、骨髓瘤)、胃癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、膀胱瘤、脉络丛瘤、胰腺癌、结肠癌以及前列腺癌中的癌症。

[0060] 在本发明的一个实施方案中,所述结合分子或抗体分子特异性地与 ICAM-1 结合和 / 或具有图 10 的序列并且用于上文所述的疾病。

[0061] 在本发明的另一个实施方案中,该抗体分子特异性地与 HLA-DR/DP 结合,和 / 或具有图 9 的序列,并且用于淋巴瘤(白血病、骨髓瘤)、胃癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、膀胱瘤、脉络丛瘤、胰腺癌、结肠癌以及前列腺癌疾病中。

[0062] 第六方面,本发明提供了药物组合物,其包括本发明的结合分子或抗体分子和药学可接受载体、赋形剂或稀释剂。

[0063] 在优选的实施方案中,该结合分子是抗体分子。

[0064] 第七方面,本发明提供了体外诱导靶细胞细胞凋亡的方法,其包括下列步骤:

[0065] (i) 提供一种或多种靶细胞;

[0066] (ii) 提供一种或多种如本发明的第一个实施方案所限定的结合分子或抗体分子;

[0067] (iii) 将 (i) 的靶细胞暴露于 (ii) 的结合分子或抗体分子中,以诱导靶细胞的细胞凋亡。

[0068] 在优选的实施方案中,该结合分子是抗体分子。

[0069] 优选地,(i) 中提供的靶细胞是面向细胞或上皮细胞。有力地,所述免疫细胞是 B 淋巴细胞。

[0070] 方便地,靶细胞与疾病有关,并且其中所述疾病选自下组:癌症、自身免疫疾病(包括但不限于风湿性关节炎和 SLE)、急性和慢性炎症性疾病、败血症和包括但不限于 HIV 的传染性疾病。

[0071] 通常,所述疾病选自淋巴瘤(白血病、骨髓瘤)、胃癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、膀胱瘤、脉络丛瘤、胰腺癌、结肠癌以及前列腺癌中的癌症。

[0072] 所用术语的涵义

[0073] 术语“抗体分子”用于指抗体、抗体片段或抗体衍生物中的任何一种。其意在包括野生型抗体、合成抗体、重组抗体或杂交抗体(antibody hybrids),例如,但不限于,由免疫球蛋白轻和/或重链可变和/或恒定区的噬菌体展示(phage-display)所产生的单链修饰抗体分子,或其它的能在本领域技术人员熟知的免疫测定模式中抗原结合的免疫相互作用分子。

[0074] 术语“抗体片段”用于指抗体、抗体片段或抗体衍生物中的任何一种。其意在包括野生型抗体(即包含 4 条多肽链的分子)、合成抗体、重组抗体或杂交抗体,例如,但不限于,由免疫球蛋白轻和/或重链可变和/或恒定区的噬菌体展示所产生的单链修饰抗体分子,或其它的能在本领域技术人员熟知的免疫测定模式中抗原结合的免疫相互作用分子。

[0075] 术语“抗体衍生物”指任何修饰的抗体分子,其能在本领域技术人员所熟知的免疫测定模式中抗原结合,如抗体片段(如 Fab 或 Fv 片段),或通过加入一个或多个氨基酸而修饰的修饰抗体分子,或促进抗体与另一个肽或多肽、与大的载体蛋白或与固体支持体(如氨基酸酪氨酸、赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸和其衍生物,除其它以外还包括 NH₂-乙酰基或 COOH-末端氨基)偶联的其他分子。

[0076] 术语“ScFv 分子”指任何分子,其中 V_H 和 V_L 伴侣结构域通过弹性寡肽而连接。

[0077] 术语“核苷酸序列”或“核酸”或“多核苷酸”或“寡核苷酸”可互换使用,指核苷酸或这些核苷酸的序列的杂聚物。这些术语也指基因组来源或合成来源的 DNA 或 RNA,其可以是单链的或双链的,并且代表肽核酸或任何 DNA 样或 RNA 样材料的有义链或反义链。在本发明的序列中,A 是腺嘌呤,C 是胞嘧啶,T 是胸腺嘧啶,G 是鸟嘌呤,N 是 A、C、G 或 T(U)。可预期到是,当多核苷酸是 RNA 时,在本发明提供的序列中的 T(胸腺嘧啶)用 U(尿嘧啶)取代。通常,由本发明提供的核酸片段可由基因组的片段或短的寡核苷酸连接体、或由一系列寡核苷酸、或由单独的核苷酸组装,来提供能在重组的转录单元中表达的合成的核酸,所述重组的转录单元包括来源于微生物或病毒操纵子或真核基因的调控元件。

[0078] 术语“多肽”或“肽”或“氨基酸序列”指寡肽、肽、多肽或蛋白序列或其片段,并且指天然存在的或合成的分子。多肽“片段”、“部分”或“片段”是至少 5 个氨基酸,优选至少约 7 个氨基酸,更优选至少约 9 个氨基酸,最优选至少约 17 个或更多个氨基酸的氨基酸残基的一段。为了具有活性,任何多肽必须具有足够的长度来展示生物学和/或免疫学活性。

[0079] 如本文中所述的,术语“纯化的”或“基本上纯化的”表示:指定的核酸或多肽基本上不含有其他的生物大分子,如多核苷酸、蛋白质等。在一个实施方案中,纯化该多核苷酸或多肽,使其组成指定的生物大分子重量的至少 95%,更优选重量的至少 99%(但水、缓冲液和其他的小分子,特别是具有小于 1000 道尔顿分子量的分子可以存在)。

[0080] 如本文中所述的术语“分离的”指分离于至少一种其他组分(例如核酸或多肽的核酸或多肽,该组分与其天然来源中的核酸或多肽一起存在。在一个实施方案中,仅存在

(如果有什么区别的话) 溶剂、缓冲液、离子或正常存在于其溶液中的其他组分时, 通常可在该溶液中发现核酸或多肽。术语“分离的”和“纯化的”不包括存在于其天然来源中的核酸或多肽。

[0081] 术语“重组体”, 当在本发明中用于指多肽或蛋白质时, 其意指来自重组(如微生物的、昆虫的或哺乳动物的) 表达体系的多肽或蛋白质。“微生物的”指在细菌或真菌(如酵母) 表达系统中产生的重组多肽或蛋白质。作为产物, “重组微生物的”指基本上不含天然内源性物质的多肽或蛋白质, 并且不伴随相关的天然糖基化。在大多数细菌培养物(如 *E. coli*) 中表达的多肽或蛋白质没有糖基化修饰; 酵母中表达的多肽或蛋白质具有通常不同于哺乳动物细胞中表达的那些多肽或蛋白的糖基化模式。

[0082] 术语“选择性结合”和“结合选择性”表示, 本发明的抗体的可变区专一地识别和结合本发明的多肽(即, 不管在多肽家族中发现的序列的同一性、同源性或相似性如何, 能从其他相似的多肽中区分本发明的多肽), 但通过与抗体可变区外的序列(特别是该分子的恒定区中的序列) 相互作用, 其也可与其他的蛋白质相互作用(如, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 蛋白 A 或 ELISA 技术中的其他抗体)。测定本发明抗体的结合选择性的筛选分析在本领域中是熟知的并且是按常规实施的。对于此类分析的广泛讨论, 参阅 Harlow 等编辑的, *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N. Y. (1988), 第 6 章。也思考了识别和结合本发明多肽片段的抗体, 只要所述抗体对上述本发明的全长多肽是首先选择的。因为抗体对本发明的全长多肽是选择性的, 因此, 能识别片段的本发明的抗体是不管于蛋白家族中发现的固有的序列同一性、同源性或相似性如何, 而能从多肽的同一个多肽家族中区分多肽的抗体。

[0083] 术语“结合亲和性”包括抗体分子和抗原之间的结合强度的涵义。

[0084] 通过术语“免疫细胞”, 我们意指与宿主免疫应答或炎症应答有关的任何细胞, 包括但不限于 B 细胞和 T 细胞。

[0085] 通过术语“上皮细胞”, 我们意指上皮的细胞。上皮是由一层细胞组成的组织。上皮可发现附在身体的内自由表面(如内皮, 其附在血管内侧直线排列) 或外自由表面(如皮肤) 上。

[0086] 我们皮肤的最外层是由鳞状上皮细胞组成的, 如同衬在口和体腔 (*body cavities*) 内侧的粘膜一样。其他上皮细胞衬在肺、胃肠道、生殖道和尿道的内侧, 并且构成外分泌腺和内分泌腺。上皮细胞的功能包括分泌、吸收和保护。上皮细胞位于基膜 (*basal lamina*) 上。

[0087] 优选的实施方式

[0088] 体现本发明某些优选方面的实施例将参考附图进行描述, 其中:

[0089] 图 1: 通过差异的全细胞/细胞膜囊生物淘洗分离的 scFv 表现出了高度的靶细胞特异性

[0090] 通过差异生物淘洗而分离的 scFv 克隆在大肠杆菌 TOP10 细胞中表达并与 Ramos 细胞或 Jurkat 细胞和 (A) 为进行初级筛选而表达的 scFv 克隆或 (B) 72 个随机选择并再表达的 scFv 克隆一起温育。用抗 His MAb 和 Cy5- 抗小鼠多克隆 Ab 检测结合的 scFv。用 FMAT Macroconfocal High Throughput Screening 仪检测细胞的结合。细胞结合图示为靶 Ramos 细胞 (Y 轴) 对非靶 Jurkat 细胞 (X 轴) 的平均荧光强度。(C) 7 种独特的 scFv 克

隆与 Ramos 细胞（实心柱）和 Jurkat 细胞（空心柱）的结合。对照 scFv(ctr1) 未与任何细胞结合。

[0091] 图 2 :抗 Ramos scFv 的细胞凋亡诱导

[0092] 将 Ramos 淋巴细胞与抗 Ramos scFv、抗 His mAb 和抗小鼠多克隆 Ab 在冰上顺序温育（并不间断洗涤以除去过量的未结合抗体），并在 5% CO₂、37°C 的湿润空气中温育 24 小时。随后收获细胞，并用膜联蛋白 V-AF488 (AV) (Annexin V-AF488 (AV)) 和碘化丙啶 (PI) 进行组合染色。根据不同的 AV 和 PI 染色阳性（如图 2B 中正方形通道 (square gates) 所定义），将细胞评价为存活 (AV-PI- 实心圆，图 2C)、早期细胞凋亡 (AV+PI-，空心三角形，图 2C) 或晚期细胞凋亡 / 坏死 (AV+PI+，空心菱形图 2C)。通过图示 (A) 针对 Side Scatter 的 Forward Scatter (FSC-Height) 以及 (B) 针对 PI (FL-3) 的 AV (FL-1) 来表示结果。也表示了 scFv B1 和 F1 的滴定效果 (C)。将 7 种独特的 scFv 与各种浓度的 (D) Ramos 或 (E) Raji B 淋巴细胞在 37°C 一起温育 24 小时，并研究对细胞凋亡诱导的作用。三种 scFv, B1、B11 和 C11 表现出了对两种细胞系的滴定活性，而 scFv B10、C10 和 G12 的细胞凋亡诱导能力局限于 Ramos B 淋巴瘤细胞。

[0093] 图 3 :分离的抗体的特异性包括 HLA-DR/DP、IgM 和 ICAM-1

[0094] A) 用 0.5% v/v 的非离子去污剂 Triton X-1000 裂解 50-600×10⁶ 个 Raji B 淋巴瘤细胞，并用 100 μg B1 (泳道 1) 和 B11 (泳道 11) 的完整人 IgG1 形式免疫沉淀，随后用蛋白 A 琼脂糖 (Protein A Sepharose) 进行交联。来自 50×10⁶ 个细胞的 Ramos B 淋巴瘤细胞裂解物用于沉淀 20 μg C11 (泳道 3)。切除抗体特异性条带并进行胰蛋白酶消化并通过 MALDI-TOF 进行分析。

[0095] B) 分别通过与抗 HLA-DR/DP、抗 ICAM-1 或抗 IgM 抗体一起预温育封闭与 B 淋巴瘤细胞结合的 B1 IgG、B11 IgG 和 C11 IgG。

[0096] 为了证实抗体克隆 B1、B11 和 C11 的重新得到的 MALDI-TOF 抗原的同一性，进行用购买的抗体进行的封闭研究，并用流式细胞术进行分析。与多于 10 倍摩尔（与人抗体相比）的物种匹配的封闭抗体 (species-matched blocking antibodies) 一起预温育 1 小时，随后加入任何分离的人抗体克隆。30 分钟后，洗涤细胞，并通过 PE- 共轭的羊抗人 IgG (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA)，检测人抗体与细胞的结合。在该研究中，对于 B1，所用的封闭抗体是小鼠单克隆抗 HLA DR (Sigma, clone HK14) 或抗 CD40 (Beckton Dickinson, clone 5C3)；对于 B11，所用封闭抗体是兔多克隆抗 ICAM-1 (Abeam, ab7815-250) 或抗 CD22 (Abeam, ab25135-100)；对于 C11，所用的封闭抗体是羊多克隆抗 IgM (Zymed, South San Francisco, CA, USA, 62-7500) 或抗 IgG (Zymed, 62-8400)。

[0097] 图 4 :ICAM-1 是能介导细胞程序性死亡的 B 淋巴瘤相关的细胞表面受体

[0098] A. 将 2 μg/ml B11 或抗 FITC-8 (对照) IgG₁ 加入至 4×10⁵ 个 CL-01B 淋巴瘤细胞，在冰上温育 2 小时，随后加入 10 μg/ml 交联的第二 Fab' 2 羊抗人 Fc 抗体。细胞在 37°C 下温育 6 小时，通过两个独立的细胞凋亡分析，测定抗体温育的效果。通过与上文所述相似的 AV/PI (上组) 或通过与 5 μg/ml 线粒体膜区极化试剂 JC-1 在 RT 下一起温育 30 分 (下组)，来染色细胞。通过红 (y 轴) / 绿 (x 轴) 荧光强度比的降低，可检测细胞凋亡的诱导。(B) 显示了 B11 抗体与 B 淋巴瘤组织代表性结合的组织切片。将从患有间变性大细胞淋巴瘤 (Anaplastic Large Cell B Lymphoma) 获得的冰冻保存的组织用 B11 或 FITC-8 (对照)

scFv 抗体染色。用 DAB(褐色)检测抗体的结合。插入的图片显示用对照 scFv 进行的染色。(C) 将 CD45-PerCp-Cy5.5mAb 预标记的 Ramos 细胞与供给来源的 PBMCs 混合,并用荧光燃料共轭的 CD 特异抗体和 Alexa Flour 647Zenon 预标记的 B11 IgG1 或对照 FITC-8IgG1 对不同的细胞群进行染色。在 FL-4 通道中记录与不同细胞群结合的 IgG B11。

[0099] 图 5 :IgG B1 和 IgG B11 对 B 淋巴瘤细胞的亲和性

[0100] 在存在或不存在 0.2mg/ml 对应的未标记 IgG 蛋白的情况下,将 Raji (左组, IgG B1) 或 Ramos 细胞 (右组, IgG B11) 与递增量的放射性碘标记 IgG B1 或放射性碘标记的 IgG B11 蛋白一起温育。通过从总的结合中减去在存在未标记的竞争性蛋白情况下的结合,测定特异性结合。结合的 IgG B1 或 IgG B11 蛋白的量随着游离 IgG 蛋白量的增加而增加,分别在 ~30nM IgG B1 和 ~1nMIgG B11 时 (上组),达到饱和结合。Rosenthal-Scatchard 图分析 (较下的组) 证明了对于 IgG B1, ~30nM 的解离常数和每一个 Raji 细胞 400,000 个功能结合位点,以及对于 IgG B11 (Raji 细胞), ~0.3nM 的解离常数和每一个 Raji 细胞 47,400 个功能结合位点,

[0101] 图 6 :B1、B11、C11IgG₁ 与不同来源的肿瘤细胞系的结合

[0102] 通过流式细胞术,研究了 B1、B11、C11 抗体靶向的抗原在不同癌细胞系中的抗原分布。柱状图显示了利妥昔单抗抗 CD20Mab (第一行前面的大部分峰)、B1 IgG₁ (第二行的峰)、B11 IgG₁ (第三行的峰) 或 C11 IgG₁ (第四行后面大部分的峰) 与 MCF-7 乳腺癌细胞、HPAC 胰腺癌、PC-3 前列腺癌细胞、LS174T 结肠直肠癌细胞以及 THP-1 单细胞白血病细胞的结合,如所示的。

[0103] 图 7 :B11 IgG₁ 在癌细胞中的细胞凋亡诱导

[0104] 在 6 孔板中,在完全培养基 (Complete Growth Medium, RPMI 1640, 补充了 10% FCS、10mM HEPES 以及 2mM L-谷氨酸) 内将前列腺癌细胞系培养至 80% 的融合 (confluency)。将前列腺癌细胞系 DU145 培养于具有 Ear1' s 盐的 MEM 中,其补充了 10% FCS、1mM 丙酮酸钠以及 1mM 非必须氨基酸,并且将癌细胞系 MDA MB 435 的衍生物培养于补充了 10% FCS 的 DMEM 中。

[0105] 对于细胞凋亡分析,在 PBS 中洗涤细胞,并将连续稀释的 B11 IgG₁ (或 B1 IgG₁、妥珠单抗或用于对照的阴性对照抗体) 加入到每个孔中,并且使结合在 4°C 下 1-2 个小时的温育。洗涤细胞,加入完全培养基,该培养基含有 10 μg/ml 的交联抗体、Fab'2 羊抗人 Fab'2。将细胞在 37°C、具有 5% 的 CO₂ 的空气中温育 16-24 小时。通过胰蛋白酶化作用,收集细胞,并用 Alexa Fluor488-膜联蛋白 V (AF488-AV) 和碘化丙啶 (PI) 根据制造商的说明书进行染色。以下列公式,计算凋亡细胞的百分比: %凋亡细胞 = 100-% AF488-AV/PV-/-。

[0106] A) 等高图 (contour plots) 显示用 2 μg/ml IgG B11 或 IgG B1 如上述温育后,作为膜联蛋白 V 和碘化丙啶阳性的函数的 PC-3 细胞的相对分布。

[0107] B) 柱状图显示,与连续稀释的 B11 IgG₁ 或 20 μg/ml B1 IgG₁ 一起温育后,凋亡的 PC-3 细胞的平均百分比。

[0108] C) 柱状图显示,与无抗体的对照、10 μg/ml 阴性对照抗体、连续稀释的 B11 IgG₁ 或 10 μg/ml 妥珠单抗 IgG₁ 一起温育后,凋亡的 MDA MB435 细胞的平均百分比。

[0109] D) 柱状图显示,与无抗体的对照、10 μg/ml 阴性对照抗体、连续稀释的 B11 IgG₁ 或 10 μg/ml 妥珠单抗 IgG₁ 一起温育后,凋亡的 DU145 细胞的平均百分比。

[0110] 图 8 :在缺少交联剂的情况下,B1 IgG₁ 和 B1 IgG₄ 诱导对 Raji B 淋巴瘤细胞的直接细胞毒性

[0111] 将 Raji 细胞与 20、6.7 或 2.2 μg/ml 的 B1 IgG、B1 IgG₄、利妥昔单抗 IgG₁ 或对照 CT-17IgG₁ 一起温育 24 小时。收获细胞,并将存活力测定为膜联蛋白 V 和碘化丙啶的双重阴性细胞 (double negative cells)。

[0112] 图 9 :B1 抗体的 VH 和 VL 的序列 (核苷酸和氨基酸序列)

[0113] 图 10 :B11 抗体的 VH 和 VL 的序列 (核苷酸和氨基酸序列)

[0114] 图 11 :C11 抗体的 VH 和 VL 的序列 (核苷酸和氨基酸序列)

[0115] 实施例 1 :具有对与细胞表面受体有关的 B 淋巴瘤特异性的细胞凋亡诱导抗体的切片和筛选 (生物淘洗)

[0116] 细胞培养

[0117] 除非另有说明,在本研究中所用的细胞系是从 ATCC (Manassas, VA, USA) 或 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH (Braunschweig, Germany) 获得的,并培养于补充了 10% FCS、2mM L-谷氨酸、10mM HEPES 和 1mM 丙酮酸钠 (均来自 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 的 RPMI 1640 培养基中。Jurkat T 白血病细胞系 (clone E6-1、TIB-152、ATCC)、B 淋巴瘤细胞系 DOHH-2 (ACC47, DSMZ)、SC-I (ACC558, DSMZ)、WSU-NHL (ACC58, DSMZ)、JVM-2 (ACC12, DSMZ)、Jeko-1 (ACC553, DSMZ, 培养于 20% FCS 中)、Rec-1 (ACC 584, DSMZ)、SP-53 (Daibata et al. Cancer 1989 ;64 :1248-53)、RL (CRL-2261, ATCC)、Granta 519 (DSMZ)、NCEB-I (Saltman et al. Blood 1988 ;72 :2026-30)、BJAB (Menezes et al. Biomedicine 1975 ;22 :276-84)、Ramos (CRL-1596, ATCC)、Raji (CCL-86, ATCC)、Daudi (CCL-213, ATCC)、CL-01 (Cerutti et al. J Immunol 1998 ;160 :2145-57)、前 B 细胞淋巴瘤 KM-3/Reh (CRL-8286, ATCC) 以及多发性骨髓瘤 UC1AK (CRL-8083, ATCC, 培养于补充了 20% FCS 的 IMDM (Invitrogen) 中) 均不含支原体,将其培养于 37°C、5% CO₂ 的湿润空气中。将细胞维持在 2×10⁵-1×10⁶ 个细胞 /ml 之间。

[0118] Juarkat 细胞膜囊的制备

[0119] 通过在 500ml 桶 (bucket) (Corning Inc. Life Sciences, New York, USA) 中,以 300×g 离心 15 分钟,收获细胞,在 Dulbecco's PBS (Invitrogen) 中洗涤,并重悬浮于缓冲液 A (1mM NaHCO₃, 1.5mM MgAc, pH 7.4) 中。细胞的浓度大约是 5×10⁷ 个 Jurkat 细胞 /ml (在 100ml 缓冲液 A 中,是 5×10⁹ 个细胞)。

[0120] 通过在冰上 10-30 分钟的高渗透性休克处理 (缓冲液 A),实现细胞破碎,随后用氮空化弹 (Nitrogen cavitation bomb, (Parr Instrument Company, Moline, IL, USA) 对其进行氮空化。将细胞置于 0°C、40bar (4,000kPa) 的恒压下 15 分钟。

[0121] 将破碎的细胞收集于含有 500 μl 的 0.5M EDTA 的 50ml Sarstedt 管 (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) 中,来产生终浓度为 2.5nM 的 EDTA。加入 EDTA 预防膜囊的聚集。将均浆 (100ml) 分配于 4×25ml 的 Beckman 厚壁离心管 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) 中,将其在 4°C 以 1900×g (在 Sorvall SS34 离心机中 4,000rpm) 离心 10 分钟,以除去未破碎的细胞、细胞核以及重线粒体。

[0122] 收集上清液,并将颗粒状物重悬浮于含有 1mM EDTA 的 25ml NaHCO₃ 缓冲液中,并再次离心 (进一步回收颗粒状的粗 Jurkat 膜)。将 Jurkat 膜与来自第一次离心的膜合并。

用 Beckman 45Ti 型离心机 40,000rpm (约 200,000×g) 在 4℃, 将含有粗 Jurkat 膜囊的上清液超离心 2.5 小时。倒出上清液, 通过依靠着棉纸 (例如 Kleenex™) 倾斜试管的边缘, 除去剩余的缓冲液。

[0123] 在金属棒的辅助下, 将粗膜颗粒物转移至 Dounce 匀浆机中, 并通过在匀浆机中几次小心的敲打, 将其重悬浮于 2.5ml HES 缓冲液 (10mM HEPES, 1mM EDTA, 0.25M 蔗糖, pH 7.4) 中。从而获得含有 80-100mg 蛋白质的、浓度相当于 2×10^9 cells/ml 的膜悬浮物。

[0124] 通过全细胞 / 细胞膜囊竞争生物淘洗选择噬菌体 Abs

[0125] 将约 2×10^{13} 个噬菌体颗粒在 37℃ 预热 15 分钟, 并间断地混合, 14,000×g 离心 15 分钟以除去沉淀, 将上清液转移至新鲜的 Eppendorf 管中。加入脱脂奶, 至 2% 的终浓度 (w/v)。将来源于 2×10^9 个细胞 (第一轮选择; 第二轮和第三轮选择, 2×10^8 个细胞) 的 Jurkat 膜囊制备物在冰上解冻, 并与封闭的噬菌体颗粒混合。将该混合物在冰上温育 15 分钟。

[0126] 通过 4℃、1,200rpm 离心 6 分钟, 收获 5×10^7 (5×10^6 第二轮和第三轮) 个 Ramos 细胞。丢弃上清液并将 Ramos 细胞重悬浮于奶-噬菌体-Jurkat 膜囊混合物中。将悬浮液在 10℃、缓慢完全旋转的条件下温育 4 小时。

[0127] 将细胞 / 细胞膜囊 / 噬菌体混合物转移至 15ml 的 Falcon 管 (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) 中, 该 Falcon 管含有在底部的 0.5ml 100% (台盼蓝染色的) Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 以及 2% (w/v) BSA/PBS (Ficoll-柱) 中覆盖的 40% (v/v) 的 Ficoll 9.5ml。于 4℃、1,500rpm, 将试管离心 10 分钟。将试管从离心机中拿走并旋上试管的盖子并进行不透气密封。

[0128] 使用雪茄切碎机 (cigar-chopper) 切掉含有 100% Ficoll 的 Falcon 管的底部尖端。从而, 从试管中除去了包括膜囊片和细胞核的密度非常高的物质。随后, 小心地打开试管的盖子, 从而破坏试管内的真空并打开 (切割) 使得液体通过在试管底部开孔逐滴排出。

[0129] 将收获的细胞悬浮液在 PBS 中洗涤一次, 以除去多余的 Ficoll。将颗粒物重悬浮于 1ml 的 PBS 中 (不要在最终的洗涤后进行), 并将悬浮液重新装载于新鲜 Ficoll 柱的上部, 重复洗涤方法 (在第二轮和第三轮中 2 次)。

[0130] 通过在 PBS 中加入 150 μl 76mM 的柠檬酸 (pH 2.5), 从细胞中洗提噬菌体, 随后在室温下温育 5 分钟。通过加入 200 μl 的 1M Tris-HCl, pH 7.4, 中和该混合物。在将细胞 200×g 沉淀 5 分钟后, 保存洗提的噬菌体的上清液。通过在 1ml 胰蛋白酶中, 在室温下将细胞颗粒物重悬浮并温育 10 分钟进一步洗提噬菌体。

[0131] 在用 40 μl 11mg/ml 抑酶肽灭活后, 离心细胞, 保存含有洗提的噬菌体的上清液。洗提的噬菌体用于感染大肠杆菌 HB101F', 并将该细菌涂布于含有适当抗生素和葡萄糖的 TB 培养基上。计数细菌的菌落, 从平板中刮下, 并用作下一轮淘洗的接种体。

[0132] 向 scFv 模式的转化、scFv 的表达、纯化以及细胞结合的分析

[0133] 将三轮选择后获得的噬菌体库用 EagI 消化, 以除去基因 III。将所得的载体再连接。通过用 EcoRI 酶消化, 将含有再连接的、未切割的基因 III 的片段线性化。用由此而产生的 scFv 载体库基本上按更早时的描述 (Soderlind et al. Nat Biotechnol 2000; 18: 852-6) 转化 E. coli TOP10 细胞。

[0134] 将细菌涂布于大的 500cm² 琼脂平板上, 挑选单个克隆, 转移至 96 孔板中, 并使用自动化的系统 (Hallborn Biotechniques 2002; Suppl: 30-7), 通过 37℃、220rpm 过夜培

养,在 TB 培养基上表达。在含有适当抗生素的 TB 培养基中产生重组 scFv 片段。

[0135] 对于与 Ramos 靶细胞 (target Ramos cells) 和 Jurkat 非靶细胞 (Jurkat non-target cells) 结合的 scFv 克隆的初级筛选,将 5,000 个 Ramos 细胞或 Jurkat 细胞与 960 个 scFv 克隆的任一个一起温育,所述 scFv 来自第三轮选择并如上文所述而产生。将细胞与 0.5 μ g/ml 抗 6xHis mAb (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 和 0.7 μ g/ml Cy5-共轭的羊抗小鼠试剂 (Amersham Biosciences) 一起温育。在 8200 Cellular Detection System Fluorescence Macroconfocal High Throughput Screening (FMAT) 仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 中检测细胞的结合。

[0136] 初级筛选后,随机挑选 (即,不管在初级筛选中,靶细胞对非靶细胞的反应性) 72 个细菌克隆用于如以前所述的 DNA 测序 (Soderlind et al. Nat Biotechnol 2000, 18: 852-6.) (Soderlind et al, 2000)。为了通过流式细胞术评估细胞表面结合,将 Ramos 细胞和 Jurkat 细胞 (每个试验,两者都加入 2×10^5 个细胞) 与在含有 0.5% w/v BSA (DPBS-B) 的 PBS (Invitrogen) 中、浓度为 2-10 μ g/ml 的单个 scFv 克隆一起温育 1 小时。

[0137] 通过在 300 \times g 离心 60 分钟,洗涤细胞。随后将细胞分别与 FITC 共轭的 CD19mAb 和 PE 共轭的 CD3mAb (BD) 一起温育,从而使随后的靶细胞和非靶细胞的鉴定成为可能。在与生物素化的抗 6xHis mAb 一起温育后,通过与 RPE-Cy5-链霉抗生素 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) 一起温育,实现 scFv 结合的检测。将细胞与第二和第三试剂分别一起温育 40 分钟和 15 分钟。所有的温育在冰上使用冰冷的溶液进行。

[0138] 差异的全细胞 / 细胞膜囊淘洗

[0139] 本研究利用了新的淘洗方案,以分离靶向在其天然细胞表面构型中差异表达的抗原的抗体。三轮竞争生物淘洗后,利用来源于 Jurkat T 白血病细胞的全 Ramos B 淋巴瘤细胞和膜囊,分离重组的噬菌体 scFv。将它们转化为可溶的 scFv 并在 E. coli TOP10 细胞中表达。

[0140] 将重组 scFv 与靶 (Ramos) 或非靶 (Jurkat) 全细胞一起温育,并检测细胞的结合。抗体克隆对靶细胞抗原的特异性是显著的,因为已显示表达的 482 个 scFv 克隆以微弱至非常强烈范围内的强度选择性地与 Ramos 靶细胞结合 (图 1A)。仅确定了微弱地染色 Jurkat 非靶细胞的两个克隆 (图 1A)。

[0141] 我们接下来测定分离的噬菌体展示的 scFv 的基因型多样性。随机挑选 (即,不管如初级筛选中所测定的结合取向) 72 个 scFv 克隆用于 DNA 测序。

[0142] 通过 FMAT 技术,以靶细胞的特异性 (Ramos 对 Jurkat) 同时对克隆进行再表达和再评估,如图 18 所述。通过它们不同的 CDRH3 和 CDRL3 序列 (数据为显示) 所测定,鉴定了 7 种不同的抗体基因型。

[0143] 与等量的 Ramos 细胞和 Jurkat 细胞一起温育并通过抗标签抗体的方式检测 scFv 的结合后,通过三色流式细胞术分析,证实了抗 Ramos scFv 的高度特异性 (图 1C)。

[0144] 使用荧光染料共轭的 CD 特异性单克隆抗体,分别通过 CD19 和 CD3 的表达,鉴定靶细胞和非靶细胞。当与阴性对照 scFv 相比时,7 种基因型独特的 scFv 显示了与 Ramos 靶细胞的高度且可变的结合强度,但与 Jurkat 非靶细胞没有结合。

[0145] 细胞凋亡分析

[0146] 使用 Detoxigel 柱,根据制造商的说明书 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL,

USA),降低重组产生的 scFv 片段的脂多糖水平。通过 LAL 阿米巴样细胞的溶解产物分析 (Cambrex Bioscience, Walkersville, MD, USA),对剩余的内毒素水平进行定量。

[0147] 发现所有的样品含有不到 0.1IU/ml 的脂多糖。嵌合的抗 CD20 抗体 Mabthera™ (利妥昔单抗) 购买自隆德大学医院 (Lund University Hospital (Lund, Sweden))。将 2×10^5 个 B 淋巴瘤细胞 (Raji 或 Ramos) 或 Jurkat T 细胞与连续稀释且消毒的 scFv's 一起在培养基中,冰上温育 1 小时。

[0148] 将细胞顺序地与第二抗 6xHis mAb (5 μ g/ml) 和第三羊 Fab' 2 抗小鼠 Fab' 2 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) 一起温育。间断地洗涤确保除去过量的未结合的抗体试剂。在 37°C、5% CO₂ 的湿润空气中温育细胞 24 小时。

[0149] 当用全 IgGs 进行细胞凋亡诱导时,用与非 IgG 抗体同种型具有最小交叉反应性的羊 Fab' 2 抗人 Fc γ 抗体 (Jackson ImmunoResearch) 取代交联剂 (为了避免内源性 B 淋巴瘤相关的表面免疫球蛋白的非特异性交联),并如上文所述温育 6 小时。

[0150] 除非另有说明,通过用膜联蛋白 V Alexa Fluor 488 (AV) 和碘化丙啶 (PI) (两者都来自 Invitrogen 的分子探针) 组合染色以及随后的流式细胞术分析,来检测凋亡的细胞。将细胞鉴定为可变的 (AV-/PI-)、早期凋亡的 (AV+/PI-) 晚期凋亡的 / 坏死的 (AV+/PI+)。使用 FACSCalibur 仪 (BD Biosciences),分别在 FL1 和 FL2 或 FL3 通道中记录 AV 和 PI 信号 (如在下文中所表示的)。

[0151] 为了研究分离的 scFv 的功能性,基于用 scFv 和交联剂顺序地温育和洗涤细胞,我们建立了高通量细胞凋亡筛选分析。在图 2A-C 中,证明了在细胞凋亡分析中对 scFv 克隆和浓度的依赖,其中,将选择的 scFv 克隆 B1 的凋亡作用和 scFv 克隆 F1 的凋亡作用做了比较,该 scFv 克隆 F1 未显示细胞凋亡诱导。在用任何检查的 scFv 处理后,缺乏靶抗原表达的 Jurkat 细胞未死于细胞凋亡,证明细胞凋亡诱导依赖于与靶抗原的结合 (未显示数据)。

[0152] 利用已建立的 scFv-细胞凋亡分析,我们对 Ramos 和 Raji B 淋巴瘤细胞以细胞凋亡筛选克隆。将 scFv 诱导的凋亡作用与利妥昔单抗抗 CD20mAb 诱导的凋亡作用进行了比较 (图 2D)。鉴定三个 scFv 克隆 -B1、B11 和 C11,其诱导 Ramos 细胞和 Raji 细胞两者的显著细胞凋亡 (图 2D 和 E)。通过 scFv 诱导 Raji 细胞的细胞凋亡和与这些细胞的结合相关 (图 2D),因为不能结合 Raji 细胞的 scFv 克隆未诱导细胞凋亡。

[0153] 将 B1、B11 和 C11 克隆转化至完整的人 IgG1 抗体。重构型后,它们的特异性和功能性保持完整,如通过它们对广泛的 B 淋巴瘤细胞系的强烈结合和有利的细胞毒性 (表 1) 所证明。值得注意的是,细胞凋亡的诱导是快速的,几个细胞系在 3-6 小时后就达到膜联蛋白 V 阳性凋亡细胞的最大百分数 (表 1 以及未显示的数据)。

[0154] IgG 的产生和内毒素筛选分析

[0155] 通过克隆至修饰的 pCDNA3 载体将 scFv 抗体片段转化为全长的人 IgG1 λ 形式 (Norderhaug et al, J Immunol Methods 1997 ;204 :77-87),并用 Lipofectamine 2000 试剂根据制造商 (Invitrogen) 说明书转染至 HEK293 细胞。

[0156] 在 MabSelect 蛋白 A 柱 (Amersham Biosciences) 上,从失去效能的培养基 (spent cultivation medium) 中纯化人 IgG。通过 SDS-PAGE 分析所测定的制剂的纯度 > 98%。筛选抗体制剂,并通过 LAL 阿米巴样细胞溶解产物试验所测定的 (Cambrex Bioscience) 发现

其在本发明所用的浓度中含有 < 0.1IU/ml 的内毒素。

[0157] 实施例 2 : 抗体特异性分析

[0158] 抗原鉴定

[0159] 通过 B 淋巴瘤细胞裂解物的免疫沉淀鉴定靶向抗原的特性。通过离心收获细胞 (根据抗体和细胞系 $50-600 \times 10^6$ 个 /ml 溶解缓冲液), 在 PBS 中冲洗两次, 并温育于含有 0.5% v/v 去污剂 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 的裂解缓冲液 (Lysis Buffer, (25mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 以及完全的 EDTA-free 蛋白酶抑制剂混合物 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)) 中。

[0160] 将细胞碎片在常规的台式离心机中以 $16,000 \times g$ 、15 分钟旋转沉降, 通过旋转, 用 Protein A Sepharose 4Fast Flow (Amersham Biosciences) (1/10 反应体积) 预先除去杂质。对于每一个样品, 用 20-100 μ g 任何人抗体将 1ml 预先除去杂质的细胞溶解产物免疫沉淀 2 小时。再次加入 Protein A Sepharose 4Fast Flow, 并温育 30 分钟, 其中, 在裂解缓冲液中对免疫复合物 (immuno-complexes) 彻底洗涤后, 煮沸 5 分钟, 最后重悬浮于样品缓冲液 (IXNuPAGE LDS Sample Buffer, IX NuPAGE Sample Reducing Agent) 中, 并在 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel (均来自 Invitrogen) 中进行分离。

[0161] 染色 (Simply Blue Safestain, Invitrogen) 后, 将目标蛋白条带从 SDS-PAGE 中切除并进行胰蛋白酶消化, 如 Edvardsson 等所述 (Edvardsson et al. Electrophoresis 1999 ;20 :935-42)。

[0162] 简单来说, 对凝胶块 (gel plugs) 脱色, 并通过在搅拌的情况下, 用 200 μ l 150% 乙腈 (ACN) 洗涤 3 次来平衡。在 SpeedVac 浓缩器 (Savant, Farmingdale, NY, USA) 中干燥 15 分钟后, 通过加入 25 μ l 10mM DTT/100mM NH_4HCO_3 , 还原样品, 并在 56°C 温育 1 小时, 并且通过加入 25 μ l 55mM 乙酰胺 /100mM NH_4HCO_3 进行烷基化, 随后在室温下温育 45 分钟。

[0163] 两次在 100mM NH_4HCO_3 中洗涤 10 分钟的额外步骤, 随后在 50% v/v CAN 洗涤一次后, 在 SpeedVac 浓缩器内干燥凝胶块, 并再膨大, 并在含有 15 μ l 15ng/ μ l 胰蛋白酶 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 的 25mM NH_4HCO_3 中 37°C 消化过夜。通过加入 50% v/v ACN/1% v/v TFA 并在室温下温育 10 分钟, 来提取肽。将 1 μ l 提取物点样于 MALDI 样品平板上并进行干燥。将 1 μ l 基质溶液 (5mg/ml α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 溶解于 75% v/v ACN/1% v/v TFA 中) 点样于肽的上面。

[0164] 用 Applied Biosystems 4700Maldi Workstation 测定肽质量。使用 Mascot 搜索工具 (Matrixscience, UK), 通过肽质量指纹数据搜索, 鉴定肽。使用相似的方法, 鉴定 B10、C10 和 G12 克隆的抗原特异性, 除了 scFv's 和抗 His 包被的磁微珠 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) 用于免疫沉淀外。

[0165] 转化为完整的抗体形式后, B1、B11 和 C11 IgG 用于从 Raji 和 Ramos B 淋巴瘤细胞中沉淀抗原。IgG B1 沉淀了分别为大约 28kDa 和 34kDa 的两条带 (图 3A, 泳道 1)。制备含有这些条带的凝胶切片, 用胰蛋白酶消化, 并通过质谱测定法 (mass spectrometry) 进行分析, 从而将 HLADR/DP 鉴定为靶抗原。

[0166] 通过使用购买获得的单克隆抗体的 western 印迹法和 HLA-DR/DP 蛋白检测, 以及通过将细胞与商业上购买的 HLA-DR 特异性单克隆抗体一起预温育后, 阻抑 B1 IgG 的结合, 都证明了 IgG B1 对 HLA-DR/DP 的特异性 (图 3B)。

[0167] 用相似的方法,确定 IgG B11 和 C11 限定的抗原的特性。发现 IgG C11 沉淀 68kDa 的蛋白带,其被鉴定为 B 细胞受体 μ 链的膜结合形式(图 3A,泳道 3)。IgG B11 沉淀 90kDa 的蛋白带,其被鉴定为细胞内细胞粘附分子 1(ICAM-1)(图 3A,泳道 2)。利用购买获得的抗体,通过 MS-MS 分析、抗体阻抑研究(图 3B)和 western 印迹分析(数据未显示),证实了 IgG B11 对 ICAM-1 以及 C11 IgG 对 IgM 的特异性。

[0168] 利用 scFv 和用于免疫沉淀的抗 His 包被的磁微珠,测定克隆 B10、C10 和 G12 的特异性。三个 scFv 克隆沉淀了 68kDa 的蛋白条带,而且含有这些条带的胰蛋白酶消化的凝胶切片的 MS 分析,表明它们对表面 IgM 的特异性。推测这些抗体识别 Ramos IgM 独特型,因为它们中的任何一个都不与外周血 B 淋巴细胞或其他的 IgM 阳性 B 细胞系交叉反应。

[0169] 实施例 3:抗体的亲和性分析

[0170] B1 和 B11 免疫球蛋白的体外碘化

[0171] 用 Iodogen 预包被的碘化管(Pierce),在 PBS 中用 $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$ 碘化 1mg/ml 的 IgG₁ B1 或 IgG₁ B11 蛋白 10 分钟。通过在 PD-10 柱(Amersham Biosciences)上脱盐,除去游离的 $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$,产生 1000-1600cpm/ng 蛋白的特异放射活性。 $[^{125}\text{I}]\text{IgG}_1$ B1 和 $[^{125}\text{I}]\text{IgG}_1$ B11 用于测定抗体的亲和性。

[0172] IgG B1 和 IgG B11 亲和性常数的测定

[0173] 放射性碘标记的 IgG B1 或 IgG B11 与 B 淋巴瘤细胞 DPBS-B-hIgG(含有 0.2mg/ml 人 IgG 的 DPBS-B)在间断混合的情况下一起在冰上温育 2 小时。如果适合,在存在 0.2mg/ml 未标记的 IgG B1 或 IgG B11 蛋白的情况下,测定非特异性结合。分析进行 3 次重复。

[0174] 将细胞装载于单个试管中的 40% v/v Ficoll/DPBS-B 垫(cushion)上,4℃、400×g 离心 6 分钟。将样品在 -80℃ 冰冻。将试管切割为两半后,分离细胞颗粒物和细胞上清液,并在在 γ 计数器(gamma counter)中分别分析 ^{125}I -IgG 蛋白含量。

[0175] 如之前所述(Brix et al. J. Clin. Invest. 1998 ;102 :283-93),依照 Rosenthal 等(Anal Biochem 1967 ;20 :525-32)、Bylund 和 Yamamura(Methods in Neurotransmitter Analysed. New York :Raven Press Ltd.,1990)以及 Marquardt(J. Soc. Indust. Appl. Math 1963 ;11 :431-41),根据 Scatchard 图法分析(Scatchard plot analysis),测定每个细胞的抗体亲和性常数(Kd 值)和表位数。

[0176] 在存在或不存在 0.2mg/ml 对应的未标记的 IgG 蛋白的情况下,通过在 4℃ 时,将放射性碘标记的蛋白与 Raji 细胞或 Ramos 细胞一起温育,表征与 HLA-DR 和 ICAM-1 结合的 IgG₁ 和 IgG B11。通过从总的结合中减去非特异性结合(存在过量的未标记的 IgG 时的结合),计算 $[^{125}\text{I}]\text{IgG}$ 与细胞表面的特异性结合。

[0177] 在 ~30nM IgG B1 时,达到与 Raji 细胞的特异性 IgG B1 结合的饱和。Rosenthal-Scatchard 图分析(Rosenthal-Scatchard plot analysis)表明,~3nM 解离常数和 4000,000 功能结合位点/Raji 细胞,呈现二价表位-IgG 相互作用(图 5)。同样,测定 IgG B11 的解离常数为 ~0.2nM 和 47,400 个受体/Ramos 细胞。

[0178] 表 1. 完整的人 B1、B11、和 C11 IgG 抗体显示动态结合模式以及在各种 B 淋巴瘤细胞系中诱导细胞凋亡

[0179]

肿瘤分类	细胞系	抗体克隆—特异性							
		B1-HLADR/DP		B11-ICAM-1		C11-IgM		利妥昔单抗-CD20	
		MFI ^b	细胞凋亡诱导 ^a	MFI	细胞凋亡诱导	MFI	细胞凋亡诱导	MFI	细胞凋亡诱导
滤泡性淋巴瘤 (Follicular lymphoma)	DOHH-2	140	-	100	-	90	-	480	++
	WSU-NHL	280	+	0	-	60	-	790	+
	SC-1	170		0	-	50	-	50	-
	RL	50	-	100	-	210	-	200	+
套细胞淋巴瘤	Granta 519	370	++	260	+	60	+	360	+++
	JVM-2	650	+	100	-	10	-	520	+
	Rec-1	0	-	380	-	900	-	580	+
	SP-53	500	++	90	-	360	-	740	++
	NECB-1	750	+	340	+	10	-	430	+
	Jeko-1	1000	+++	30	+	1040	++	1160	+++
Burkitt's 淋巴瘤	Ramos	125	+	100	++	240	+++	300	+++
	Raji	550	+++	420	+	20	+	400	+
	Daudi	200	+	150	+	450	+	480	++
	BJAB	530	+	310	+	510	+	530	++
	CL-01	940	+++	600	++	60	+	970	++
前 B 细胞白血病	Reh/KM-3	240	+++	20	-	0	-	0	-
多发性骨髓瘤	MC/CAR	290	++	120	+	0	-	110	-

[0180] ^a细胞凋亡诱导；与任何和羊抗人 (gamma)Fc 特异性抗体交联的人抗体温育 6 小时后，通过存活细胞的百分比测定；-，未感染的存活力；+，95-80%；++，79-60%；+++，59-40%存活的细胞，与对照（人 FITC-8IgG₁）相比。结果基于三次独立试验中的两份样品。

[0181] ^bMFI；第二 RPE- 共轭的羊抗人 IgG 抗体的平均荧光强度。从每一个人抗体的 MFI 中减去对照人 FITC-8IgG 抗体的细胞系依赖 MFI 值。

[0182] 实施例 4：ICAM-1 是具有细胞凋亡诱导特性的 B 淋巴瘤相关抗原

[0183] 与 Ramos 细胞结合的 IgG 的流式细胞术分析

[0184] 通过在冰上温育 45 分钟，用 CD-45-PerCp-Cy5.5mAb 染色 Ramos 细胞 (13×10^6)，在 DPBS-B 中洗涤，并保存于冰上直到与未标记的纯化的 PBLs 混合。

[0185] 从隆德大学医院获得来自两位健康自愿者的淡黄色表皮 (buffy coats)。将淡黄

色表皮以 1 : 2 稀释在 PBS 中,通过 500×g(1500rpm Beckman Spinchron 离心机)离心 10 分钟洗涤,完全抽出上清液并重悬浮于含有 1%热失活的 FCS(DPBS-HI)的 DPBS 中。洗涤重复两次。通过与红细胞裂解液(BD Biosciences)在室温下温育 15 分钟,以裂解红细胞。通过 60×g(667rpm Beckman spinchron centrifuge)离心 10 分钟,洗涤细胞,并小心地抽出上清液。用台盼蓝染色并排除出死细胞后,在 Bürker 室中对细胞进行计数,在 DPBS-HI 中洗涤、沉淀,并重悬浮于含有 200 μg/ml 纯化的人 IgG 的 DPBS-B 中(封闭 Fc receptors)。

[0186] 对于每一个捐赠人和试验条件,将大约 2.5×10^6 个白细胞与 1.6×10^5 个 PerCpCy5.5 预标记的 Ramos 细胞混合。加入鼠单克隆 CD3-FITC、CD56-PE 以及 CD19-PerCpCy5.5 抗体(BD Biosciences),将混合物温育于冰上,直到加入标记的人 IgG。根据制造商的说明书,用 AF647Fab 片段(Molecular Probes, Invitrogen)标记 n-CoDeR 人 IgG 抗体和阳性对照抗 CD20 鼠人嵌合抗体利妥昔单抗。

[0187] 简单来说,将 4 μg 每一个 IgG B1、B11、C11 和利妥昔单抗抗体与 20 μl AF647-Fab 标记试剂在室温下一起温育 5 分钟。加入 20 μl 人 IgG 封闭剂和另外温育 5 分钟后,将 AF647 标记的 IgG 连续三倍稀释在 DPBS-B 中,将稀释的 IgG 蛋白加入混合的 Ramos/PBL 细胞溶液中。

[0188] 温育样品 1 小时,洗涤,重悬浮于 DPBS-B 中,适当校对和补偿四色分析仪器后,通过流式细胞术分析与不同细胞亚群的结合。Ramos 细胞鉴定为明显区别 B 淋巴细胞 PerCpCy5.5^{low} 种群的 PerCpCy5.5^{high} 种群。

[0189] 免疫组织化学

[0190] 从隆德大学病理系(Department of Pathology at Lund University(Lund, Sweden)获得患有间变性大细胞 B 淋巴瘤(Anaplastic Large Cell B lymphoma)(一位患者)、中心母细胞/中心细胞 B 非霍奇金淋巴瘤(Centroblastic/Centrocytic B non-Hodgkin lymphoma)(三位患者)和 B 细胞慢性淋巴细胞白血病(一位患者)患者的冷冻淋巴节活组织检查。将冷冻保存的组织的 8 μm 切片在 4℃下在丙酮中固定 10 分钟。通过用抗生物素和生物素(抗生物素/生物素封闭试剂盒,Invitrogen)依次各处理 20 分钟,封闭内源性生物素结合活性。

[0191] 将组织与 5 μg/ml 对照 scFv 或 B11scFv 一起温育 1 小时。洗涤后,将切片与生物素共轭的小鼠抗 His mAb(R&D Systems)一起温育 30 分钟。用 ABCComplex/HRP 试剂(Dako Cytomation)处理 30 分钟后且随后与 DAB 一起温育 5 分钟后,检测 scFv 的结合,

[0192] 使用在上部装置了 Leica DMR 可见光/荧光显微镜的 Leica DC 300F 数字照相机对切片照相。

[0193] 人组织的操作遵循隆德大学医院当地的伦理委员会的建议。

[0194] 线粒体膜去极化分析

[0195] 如以前所述(Kim et al. Mol Biol Cell 2004 ;15 :420-34),进行线粒体膜去极化分析。简单来说,将抗体处理的细胞与 5 μg/ml 的 JC-1 试剂(Molecular Probes)混合,室温下温育 30 分钟。在冰冷的 PBS 中将细胞洗涤 2 次,悬浮于 300 μl 的 PBS 中,并在 FACS Aria(BD Biosciences)上分析。分别通过 494/518nm(FL-1)和 595/615nm(FL-2)带通滤波器(bandpass filters),收集绿色和红色荧光。

[0196] ICAM-1 是免疫球蛋白超家族的糖蛋白(Marlin et al. Cell 1987 ;51 :813-9),该

蛋白家族能诱导双向信号 (Rothlein et al. J Immunol 1994 ;152 :2488-95 ;Vyth-Dreese et al Blood 1995 ;85 :2802-12)。以前并未证明 ICAM-1 与 B 淋巴瘤细胞的程序性死亡有关。

[0197] 因此,我们想证实 IgG B11 诱导的细胞死亡是主动过程,其通过除细胞膜磷脂酰丝氨酸易位以外的方式。

[0198] 选择线粒体膜去极化作为对细胞凋亡的确认,因为其是依赖或不依赖半胱氨酸蛋白酶 caspase 的细胞凋亡的共有特征,其可通过用 5,5',6,6' -四氯-1,1',3,3' 四甲基苯并咪唑-羰花青碘化物 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide) (JC-1 试剂) 染色细胞,来监控。

[0199] 与我们的膜联蛋白 V/ 碘化丙啶分析 (图 4A, 上组) 一致,用 JC-1 试剂染色后通过流式细胞术分析所测定发现 IgG B11 在 CL-01B 淋巴瘤细胞中诱导线粒体膜去极化 (图 4A, 下组)。

[0200] 为了排除这种可能性,即:ICAM-1 的表达是体外假象,是细胞培养期间全面上调的结果,我们检查了 IgG B11 与从患有不同的 B 淋巴瘤的 5 名不同患者中获得的组织的结合。

[0201] 通过免疫组织化学,IgG B11 表现出了与五种淋巴瘤组织的强烈结合 (tu4B),其强度与抗 HLA-DR/DP 抗体 IgG B1 (表 1) 相当或稍低。

[0202] 我们接下来检查了相对与剩余的外周血白细胞的结合,IgG B11 与 B 淋巴瘤的结合。选择 Ramos 作为代表性的 B 淋巴瘤细胞系,是基于其低档的表位表达但仍然对 B11 诱导的细胞凋亡具有显著敏感性。预标记的 Ramos 细胞与全血液外周血白细胞和 IgG B1、B11 或 C11 抗体中的任一个混合温育后,流式细胞术分析表明,IgG B11 表现出了与 Ramos 细胞的强烈结合。

[0203] 更重要的是,B11 表明了,相对正常的外周血白细胞,三种抗体与 Ramos B 淋巴瘤细胞的差异最大的结合 (最强的抗原上调,图 4C 以及未显示的数据)。IgG B11 结合在 0.1 μ g/ml 时已经达到最高点,并且相对单核细胞在 Ramos 细胞中被上调 3.7 倍 (MFI 654 对 176),相对外周血 B 淋巴细胞在 Ramos 细胞中被上调 8.3 倍 (MFI 654 对 78),以及与 NK 细胞相比被上调 23 倍。与其他监控的外周血白细胞子集的结合是阴性的。

[0204] 表 2. ICAM-1 在不同来源的 B 淋巴瘤组中强烈表达

[0205]

患者 ID	肿瘤分类	抗体克隆—特异性	
		B11-ICAM-1	B1-HLA-DR/DP
A	B-CLL ^c (低恶性非霍奇金淋巴瘤)	+	++
B	间变性大细胞 B 细胞淋巴瘤	++	+++
C	中心母细胞-中心细胞 B 非	+++	++

[0206]

	霍奇金淋巴瘤		
D	B-CLL/B-PLL ^d	++	+++
E	中心母细胞 B 非霍奇金淋巴瘤	++/+++	+++
F	中心母细胞-中心细胞 B 非霍奇金淋巴瘤	++	+++

[0207] ^cB-CLL = B- 慢性淋巴细胞白血病, ^dB-PLL = B- 前淋巴细胞白血病。+ 增加的数字表示更强的染色。

[0208] 实施例 5 :通过流式细胞术所测定的 B1、B11 和 C11 IgG₁ 在各种来源的肿瘤细胞系中的抗原分布

[0209] 研究了在不同癌细胞系中人抗体靶向的抗原的抗原分布,主要对于 B11。在 PBS 中洗涤细胞 (MCF-7 和 MDA MB 435S 乳腺癌细胞, JAR 和 JEG-3 绒癌细胞, A549 肺癌细胞, TCC-SUP 膀胱癌细胞, MDA MB 435 黑色素瘤细胞, HPAC、PANC-1 和 BxPC-3 胰腺癌细胞, PC-3 和 DU145 前列腺癌 PANC-1, LS174T、CaCo₂ 和 Lovo 直肠结肠癌细胞, 以及 THP-1 单核细胞白血病细胞), 并以 4×10^6 个细胞 /ml 重悬浮于完全培养基中 (200,000 个细胞 /50 μ l 样品)。将 B1 IgG₁、B11 IgG₁、C11 IgG₁、阴性对照 FITC-8IgG₁ 和利妥昔单抗抗 CD20Mab 在完全培养基中 (50 μ l / 样品) 中进行 3-10 倍的连续稀释 (10-0.1pg/ml)。将细胞与任一抗体在冰上温育 1 小时, 通过在 0.5% PBS/BSA 重悬浮来进行洗涤, 1200rpm 离心 5 分钟, 完全抽取上清液。在冰上, 将细胞与 PE 共轭的羊 F(ab')₂ 抗 - 人 IgG (Caltag Laboratories, 目录号 :H10104) 一起温育, 在 0.5% PBS/BSA 中进行 1/50 稀释, 30 分钟。重悬浮于 300 μ l 0.5% PBS/BSA 中后, 用 FACScan 仪器, 分析细胞的 IgG 结合。

[0210] 通过 B11 IgG 与这些细胞的强烈结合所证明, PC-3 前列腺癌细胞表现出了强烈的 ICAM-1 表达 (图 6)。也发现, 虽然与前列腺癌细胞相比强度较低, 但 MCF-7 乳腺癌细胞、HPAC 胰腺癌细胞以及 LS174T 直肠结肠癌细胞表达 ICAM-1。相反, THP-1 单核细胞白血病细胞不表达 ICAM-1。通过分别缺乏利妥昔单抗 IgG、B1 IgG 以及 C11 IgG 所证明, 发现最初试验的所有的癌细胞系对 CD20、HLA-DR/DP 以及 IgM 的表达是阴性的。对其他癌细胞系的进一步研究表明, 所有检查的细胞是 ICAM-1 表达阳性的 (表 3)。

[0211] 表 3. ICAM-1 在不同来源的癌细胞系中强烈表达

[0212]

肿瘤细胞类型	细胞系	MFI
绒毛膜癌	JAR	2000
	JEG-3	1600
前列腺癌	DU145	2200
	PC-3	1500
胰腺癌	BXPC-3	2000
	PANC-1	3800
结肠癌	CaCo2	800
	Lovo	1600
肺癌	A549	800
膀胱癌	TCC-SUP	3200
黑色素瘤	MDA MB 435	4000
乳腺癌	MDA MB 435S	800

[0213] 实施例 6 :在癌细胞中 B11 IgG₁ 的细胞凋亡诱导

[0214] 在实施例 5 中显示 B11 IgG₁ 强烈与癌细胞结合。本实施例检查了该抗体对癌细胞系的细胞凋亡诱导特性。

[0215] 在开始试验前 3 天,将细胞接种于具有完全生长培养基的 6 孔板上。在试验期,细胞是 50-75%融合的。用冰冷的 PBS 洗涤细胞,并与如所示的连续稀释(如图所示的,在 1ml 完全生长培养基中 20-0.02 μg/ml)的 B11 IgG₁、20 μg/ml 对照 B1 IgG₁、10 μg/ml 阴性对照 IgG₁ 或 10 μg/ml 妥珠单抗 IgG₁ 一起在 4℃温育 1-2 小时。用冰冷的 PBS 洗涤细胞,并加入第二 F(ab' s) 羊抗人 F(ab' s) 抗体(在完全培养基中稀释为 10 μg/ml)。将细胞在 37℃、5% CO₂ 的湿润空气中温育 16-24 小时。通过第一次分离上清液来收集全部的细胞,随后对剩余的粘附细胞进行 PBS 洗涤和胰蛋白酶作用。通过重悬浮于含有 10%热失活胎牛血清的 PBS 中来终止酶促反应。在冰冷的 PBS 中洗涤细胞,进行膜联蛋白 V/ 碘化丙啶染色,并分析存活力和细胞凋亡,如上述实施例 5 所述。

[0216] 显示 B11 IgG₁ 以特异且可滴定的方式在癌细胞系中诱导细胞凋亡(图 7)。对照 IgG B1,其不结合 PC-3 细胞(参阅实施例 5),也未在 PC-3 细胞中诱导细胞凋亡。阴性对照 IgG₁ 或妥珠单抗 IgG₁ 也未能在 DU145 或 MDA MB435 细胞中诱导细胞凋亡。

[0217] 实施例 7 :药用制剂和施用

[0218] 另一方面,本发明提供了包含本发明的第一方面的化合物与药学或兽医学上可接受的佐剂、稀释剂或载体混合的药用制剂。

[0219] 优选地,该制剂是单位剂量,其含有活性组分的每日剂量或单位、每日亚剂量或其适当的部分。

[0220] 本发明的化合物通常以下列形式口服施用或通过任何非肠道途径施用:含有活性组分的药物制剂形式,该活性成分任选为非毒性有机或无机的酸或碱、或加成盐的形式,制剂为药用可接受剂型。根据待治疗的疾病和患者以及施用途径,可以多变的剂量施用该组合物。

[0221] 在治疗人的过程中,可单独施用本发明的化合物,但通常以与适宜的药用赋形剂、稀释剂或载体混合的形式施用,所述的赋形剂、稀释剂或载体根据规定的施用途径和表征的药学实践来选择。

[0222] 例如,本发明的药物可以片剂、胶囊、卵形囊剂(ovules)、酏剂(elixirs)、溶液或混悬液的形式,口服、口腔或者舌下施用,所述形式可含有调味剂或着色剂,用于速释、缓释或控释用途。本发明的化合物也可以经由阴茎海绵体注射施用。

[0223] 此类片剂可含有佐剂,如微晶纤维素、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸氢钙和糖胶;崩解剂,如淀粉(优选玉米、马铃薯或木薯淀粉)、羧甲淀粉钠(sodium starch glycollate)、交联羧甲基纤维素钠(croscarmellose sodium)和某些复合硅酸盐;以及颗粒粘合剂(granulation binders),如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素(hydroxypropylmethylcellulose,HPMC)、羟丙基纤维素(hydroxy-propylcellulos,HPC)、蔗糖、明胶和阿拉伯树胶。另外,也可包括润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸、山嵛酸甘油酯和滑石。

[0224] 也可使用相似类型的固体组合物作为明胶胶囊中的填充物。在此情况下,优选的赋形剂包括乳糖、淀粉、纤维素、奶糖(milk sugar)或高分子量聚乙二醇。对于含水混悬液和/或酏剂,本发明的化合物也可以与各种甜味剂、调味剂、着色剂或染料组合;与乳化剂和/或悬浮剂组合;以及与稀释剂如水、乙醇、丙二醇和丙三醇或其组合进行组合。

[0225] 本发明的化合物也可以非肠道施用,例如,静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内(intrathecally)、心室内、胸骨内、头颅内、肌肉内或皮下施用,或也可通过输注技术施用。它们最好以无菌含水溶液的形式使用,所述溶液可含有其他的物质,如足够的盐或葡萄糖,以使该溶液与血液等渗。如果需要,该含水溶液可适当地进行缓冲处理(优选处理为pH 3-9)。在无菌的条件下制备合适的非肠道制剂可通过本领域熟练的技术人员熟知的标准药学技术来实现。

[0226] 适宜非肠道施用的制剂包括水性或非水性的无菌注射溶液,其可含有使该制剂与既定的接受者的血液等渗的抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和溶质;以及水性和非水性无菌混悬液,其可包括悬浮剂和增稠剂。该制剂可在单位剂量或多剂量包装容器内,如密封的安瓿和小瓶,并且保存于在直接使用前仅需要加入无菌液体载体(例如注射用水)冷冻干燥(冻干)的条件下。可根据上文所述类型的无菌粉、颗粒和片剂来制备临时注射溶液和混悬液。

[0227] 对于针对人类患者的口服或非肠道施用,本发明化合物的每日剂量水平通常是1mg/kg-30mg/kg。因此,例如,本发明化合物的片剂和胶囊,可含有一剂的活性化合物,用于一次施用单个或两个或多个单位剂量。医师可在任何情况下决定试剂的剂量,该剂量最适宜任何单个的患者,并且随着具体患者的年龄、体重和应答而变化。上述剂量是平均情况的范例。当然,存在个别的情况,其中更高或更低的剂量范围是应该的,并且在本发明的范围内。

[0228] 本发明的化合物也可以鼻内施用,或通过吸入施用,并且便利地以干粉吸入器或气雾剂喷射呈递的形式,用适宜的推进剂从受压的容器、泵、喷雾器(spray)或雾化器中递送,所述的推进剂为如二氯二氟甲烷、三氯一氟甲烷、二氯四氟乙烷、氢氟烷(hydrofluoroalkane)如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134A3或1,1,1,2,3,3,3,-七氟丙烷(HFA 227EA3)、二氧化碳或其他适宜的气体。在受压的气雾剂的情况下,可通过阀门递送计

量的量来测定剂量单位。受压的容器、泵、喷雾容器或喷雾器可含有活性化合物的溶液或混悬液,例如,使用乙醇和推进剂的混合物作为溶剂,其可另外含有润滑剂,如山梨醇三油酸酯(sorbitan trioleate)。可配制在吸入器或吹药器(insufflator)中使用的胶囊和药筒(cartridges,例如由明胶制备),其含有本发明的化合物和适宜的粉末基质(如乳糖、淀粉)的粉末混合物。

[0229] 优选配制气雾剂制剂或干粉制剂,使得每一次计量的剂量或“喷出”(puff)递送适当剂量的本发明化合物,向患者递送。应当认识到,气雾剂形式的每日总剂量针对不同患者而不同,并且在一天内以单个剂量或通常多个分开的剂量施用。

[0230] 可选地,以栓剂或阴道栓剂的形式施用本发明的化合物,或它们也可以以洗剂、溶液、乳剂、软膏(ointment)或撒布剂的形式局部应用。本发明的化合物也可以透皮施用,例如,通过使用皮肤贴(skin patch)。它们也可以通过眼睛途径施用,特别是对于治疗眼疾病。

[0231] 对于眼科应用,本发明的化合物可配制为等渗压的、pH调整的无菌生理盐水形式的微粉化的混悬液,或优选地,等渗压的、pH调整的无菌生理盐水形式的溶液,任选地与防腐剂如苯扎氯铵组合。可选地,它们也可配制成药膏,如凡士林药膏。

[0232] 对于局部应用于皮肤,可将本发明的化合物配制为含有活性化合物的适宜的软膏,所述的适宜化合物悬浮于或者溶解于例如具有下列一种或多种物质的混合物中:矿物油、液体凡士林(liquid petrolatum)、白色凡士林(white petrolatum)、丙二醇、聚乙烯聚丙烯化合物、乳化蜡(emulsifying wax)和水。可选地,可将其配制成适宜的洗剂或乳剂,悬浮或溶解于例如一种或多种下列物质的混合物中:矿物油、山梨醇单硬脂酸酯(sorbitan monostearate)、聚乙二醇、液体石蜡、聚山梨醇酯/盐60(polysorbate 60)、十六醇酯蜡(cetyl esters wax)、鲸蜡醇(cetearyl alcohol)、2-辛基十二烷醇(octyldodecanol)、苯甲醇和水。

[0233] 适宜在口腔中局部施用的制剂包括,含有调味成分通常为蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶中的活性成分的锭剂(lozenges);含有处于惰性成分如明胶和丙三醇或蔗糖和阿拉伯树胶中的活性成分的软锭剂(pastilles);以及含有处于适宜的液体载体中的活性成分的漱口液(mouth-washes)。

[0234] 通常,对于人,口服或局部施用本发明的化合物是优选的途径,因为最方便。对于接受者受累于吞咽障碍或受累于口服施用后影响药物吸收的情况,所述药物可非肠道施用,例如舌下或口腔施用。

[0235] 对于兽医学用途,可依据普通兽医学实践将本发明的化合物作为适宜的可接受制剂施用,且兽医学外科医生可以决定最适宜于具体动物的剂量方案和施用途径。

[0001]

序列表

<110> 生物发明国际公司(BioInvent International AB)
 <120> 生物材料及其用途

<130> BIOBH/P36612PC

<140> PCT/EP2006/012065
 <141> 08 12 2006

<150> GB 0525214.3
 <151> 12 12 2005

<160> 12

<170> SeqWin99

<210> 1
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggcctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactcgg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagagatggg 300
 ctactacccc ttgactactg gggccagggt caactggtea ccgtgagctc a 351

<210> 2
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser 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 Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Leu Leu Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 3
 cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggacce cggggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgttctg gaggcagctc caacatcgga gggaatgctg taaattggia tcagcagctc 120
 ccaggaacgg ccccctaaact cctcatctat gaaaataata agcgaccctc aggggtcctc 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagctcctc tggccatcag tgggtcctcg 240
 tccgaggatg aggttgatta ttactgcagc tcatatgctg tcagcaacaa ttctgaggtg 300
 ctattcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctagggt 336

<210> 4
 <211> 112

[0002]

<212> PRT
 <213> 智人

<400> 4
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn
 20 25 30
 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Glu Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Val Ser Asn
 85 90 95
 Asn Phe Glu Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 5
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 5
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcttgtcagc cctctggatt caccttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtggcattt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagatacagt 300
 ggctgttact ttgactactg gggccaaggt acactgttca cctgagactc a 351

<210> 6
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> (6)
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly 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 Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 7
 cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

[0003]

tctgtcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtatcagcag 120
 ctccccaggaa cggcccccaa actcctcctc tatgataaca acaatcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc 240
 cggtcggagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct cagtgccttg 300
 ctgttcggcg gaggaaccaa getgacggtc ctaggt 336

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Ala Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 9
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 9
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt caccttcggc agttatgaaa tgaactgggt ccgccaggt 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt atttatagcg gtggtagcac atactacgca 180
 gactccgtgg aaggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacact gccgtgtatt actgtgcgag agatacaaac 300
 ccgtaclact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggta cactggteac cgtgagctca 360

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr
 20 25 30
 Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Thr Asn Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0004]

<210>	11	
<211>	333	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	11	
	cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc cgggcagag ggtcaccatc	60
	tctgtttctg gaagcagctc caacatcgga aataatgctg taaactggta tcagcagctc	120
	ccaggaacgg cccccaact cctcatctat aggaataatc agcggcctc aggggtcct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggtcctcg	240
	tccgaggatg aggetgatta ttactgccag tcctatgaca gcagcctgaa tggccaagta	300
	ttcggcggag gaaccaagct gacagtccta ggt	333
<210>	12	
<211>	111	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	12	
	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
	1 5 10 15	
	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn	
	20 25 30	
	Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
	35 40 45	
	Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
	50 55 60	
	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg	
	65 70 75 80	
	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu	
	85 90 95	
	Asn Gly Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
	100 105 110	

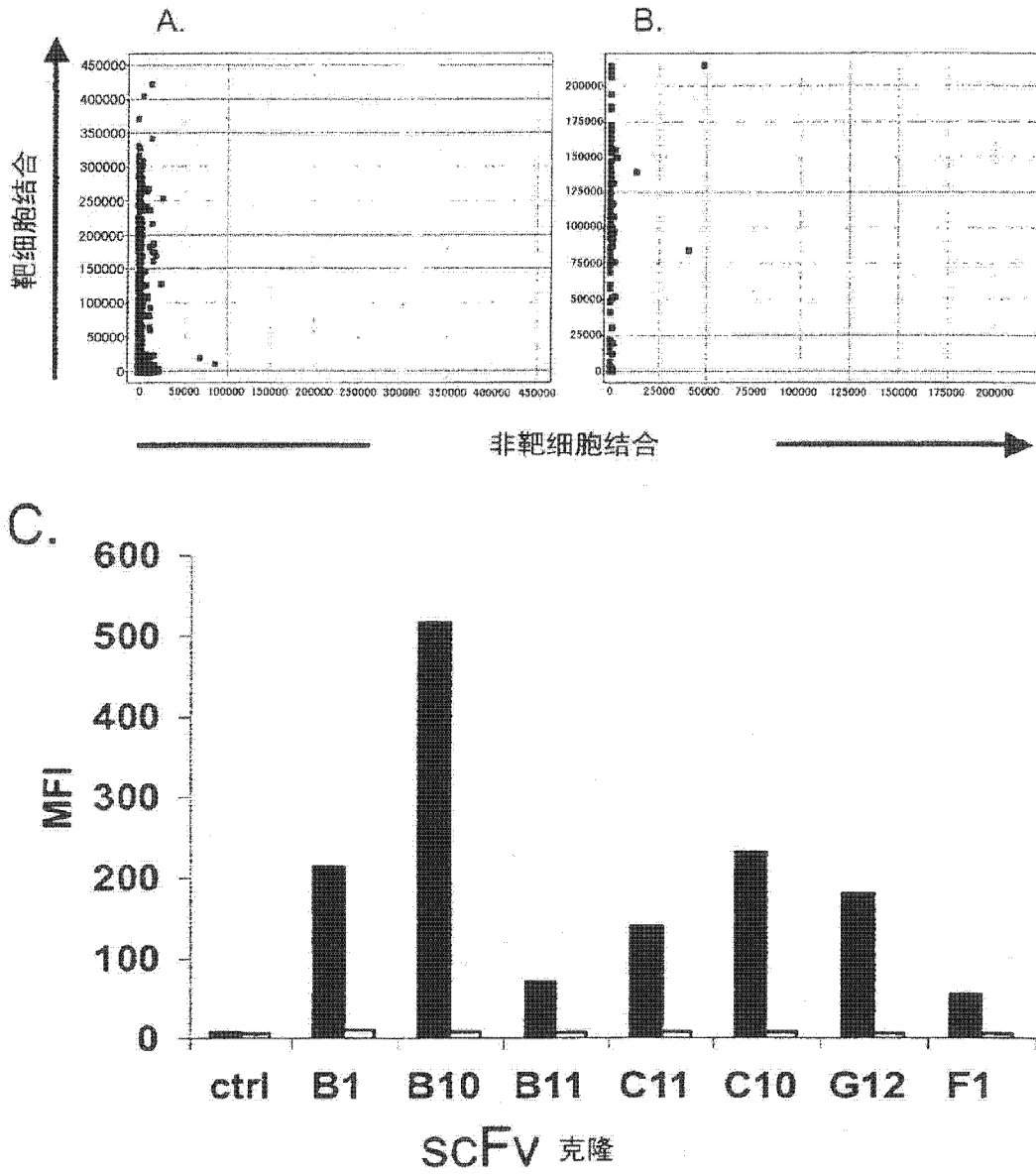


图 1

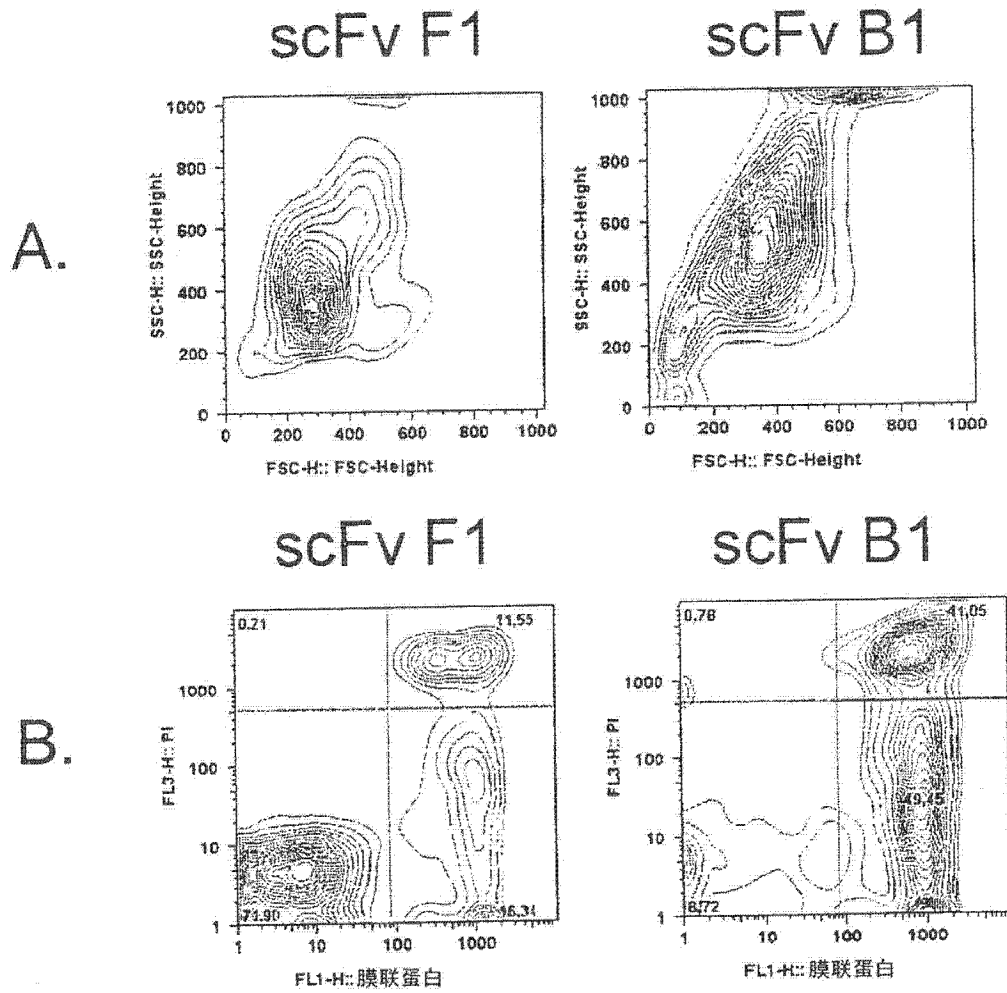


图 2

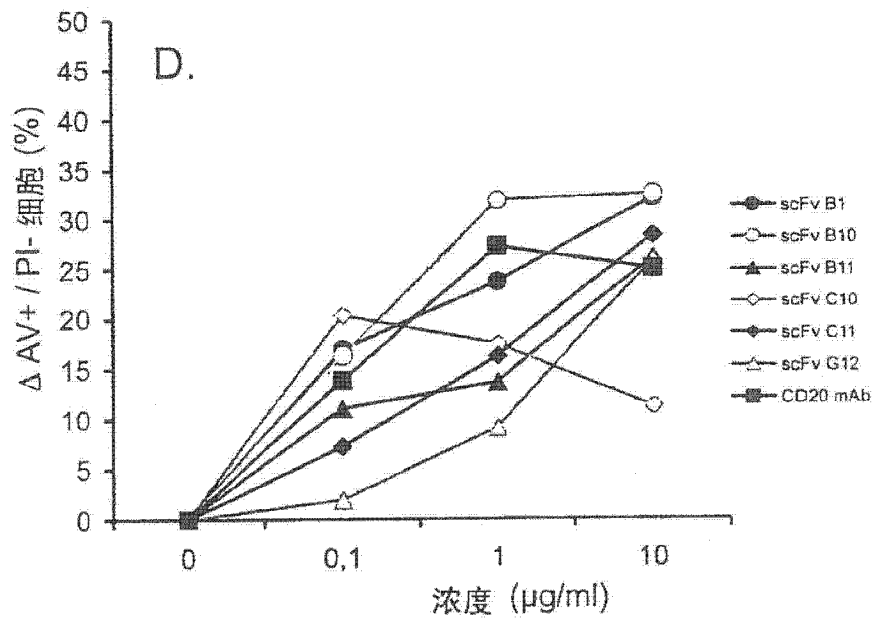
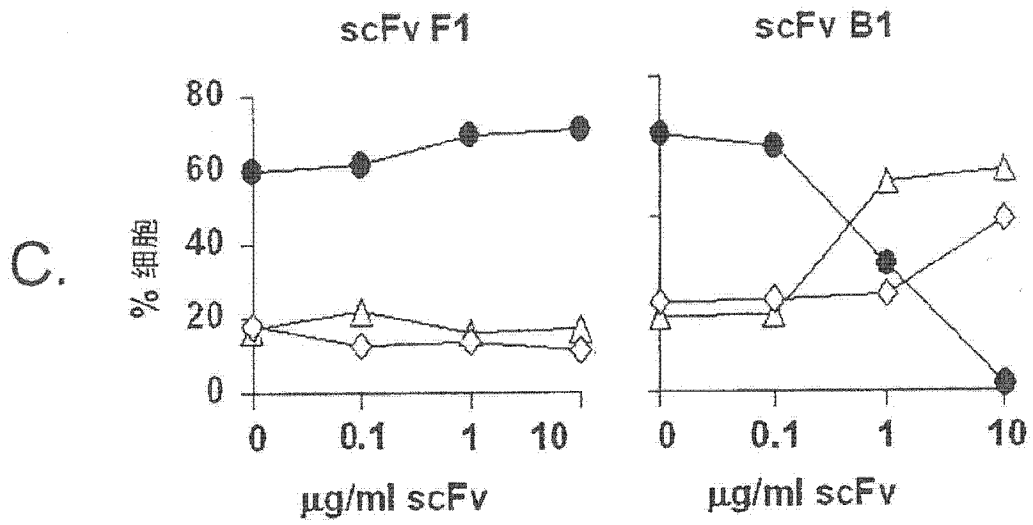


图2(续)

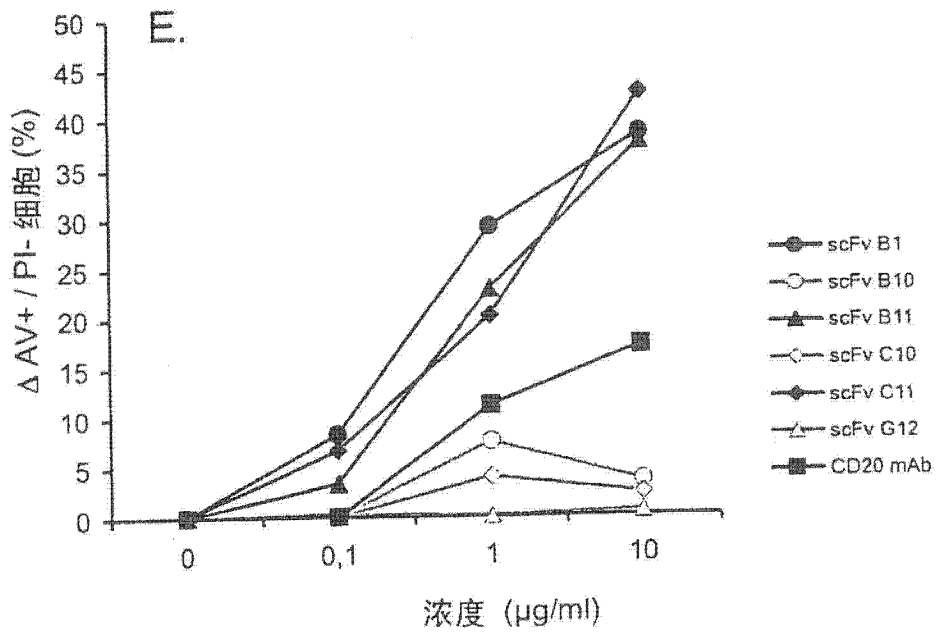


图2(续)

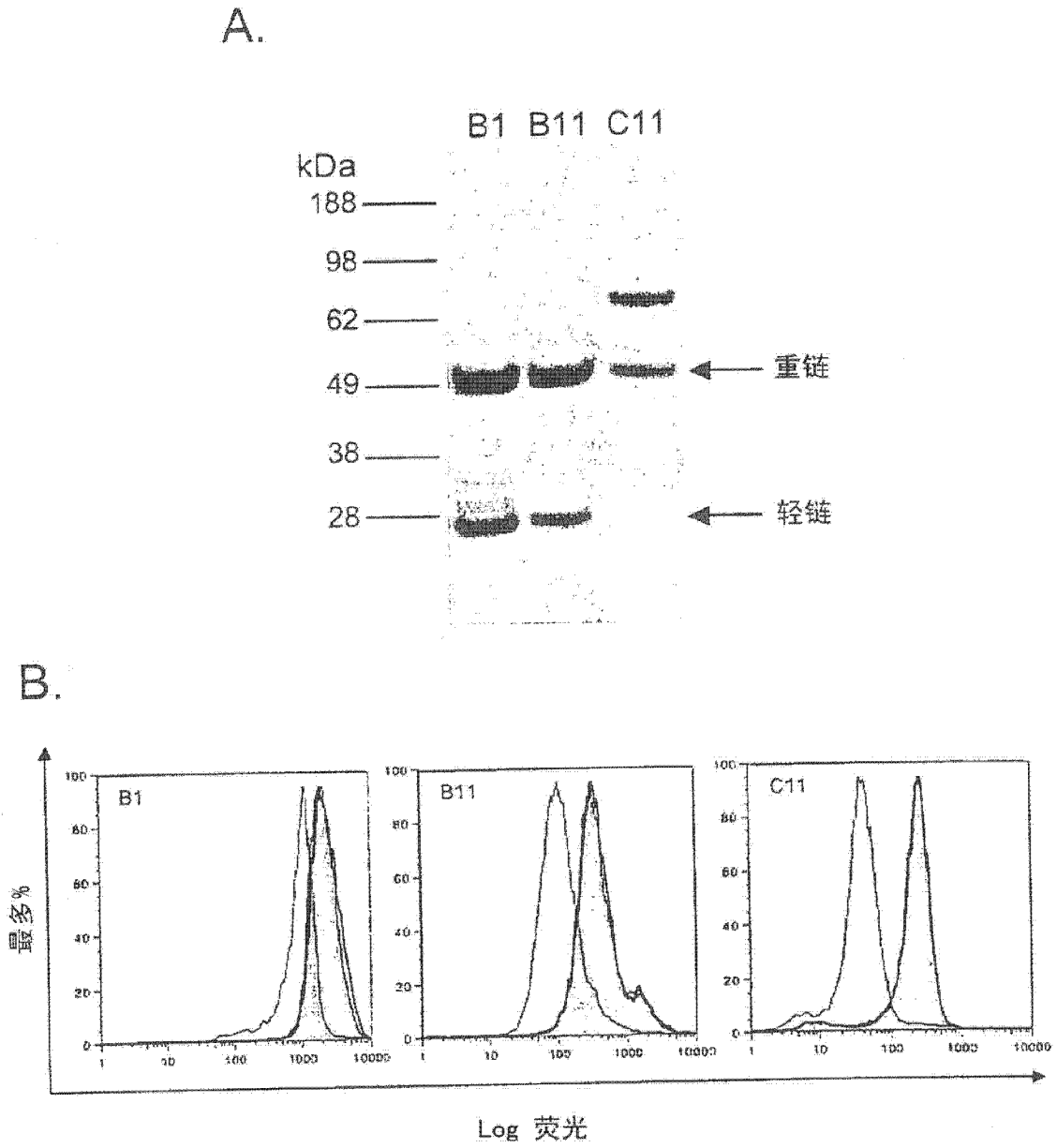


图 3

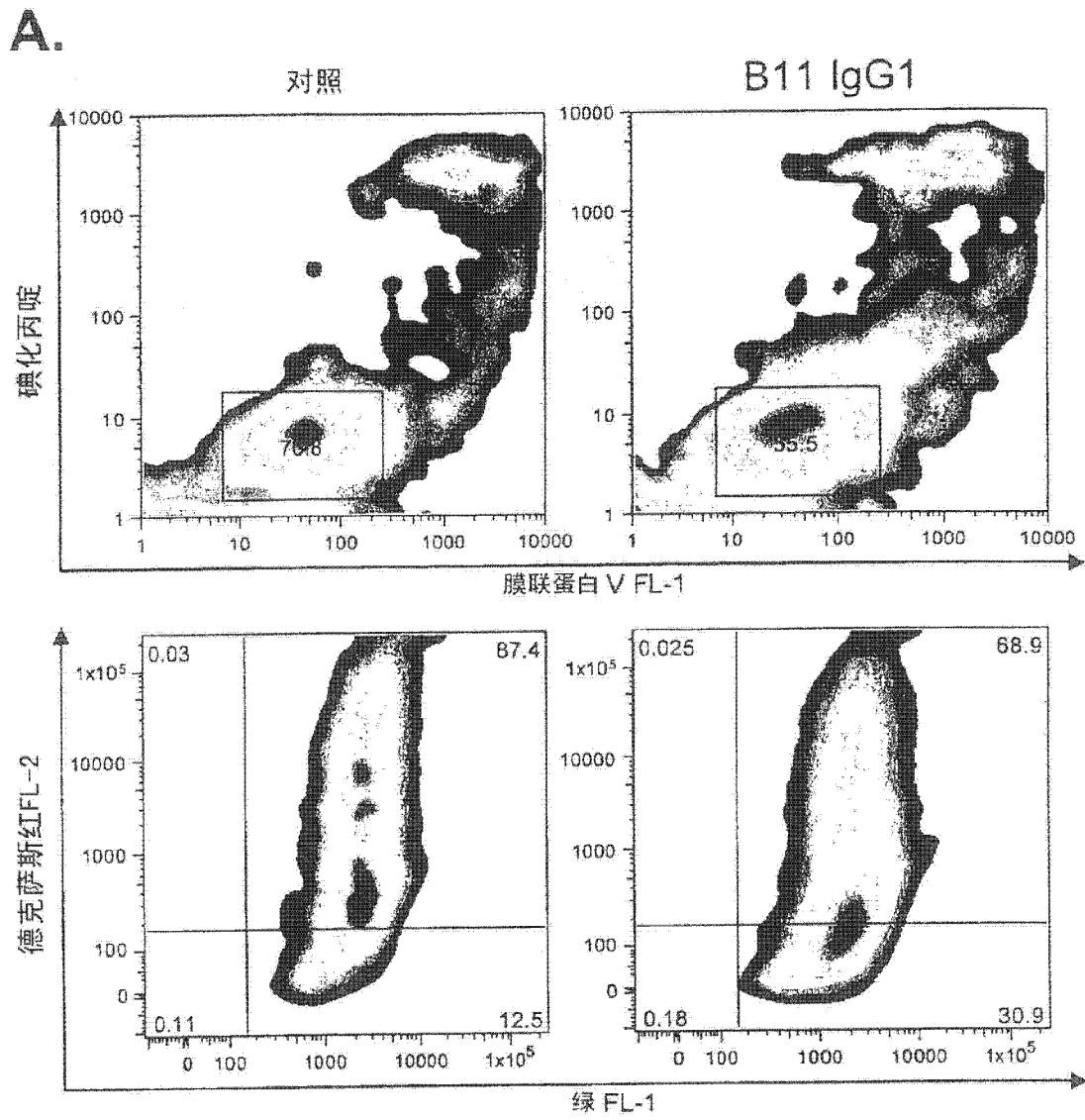


图 4

B.

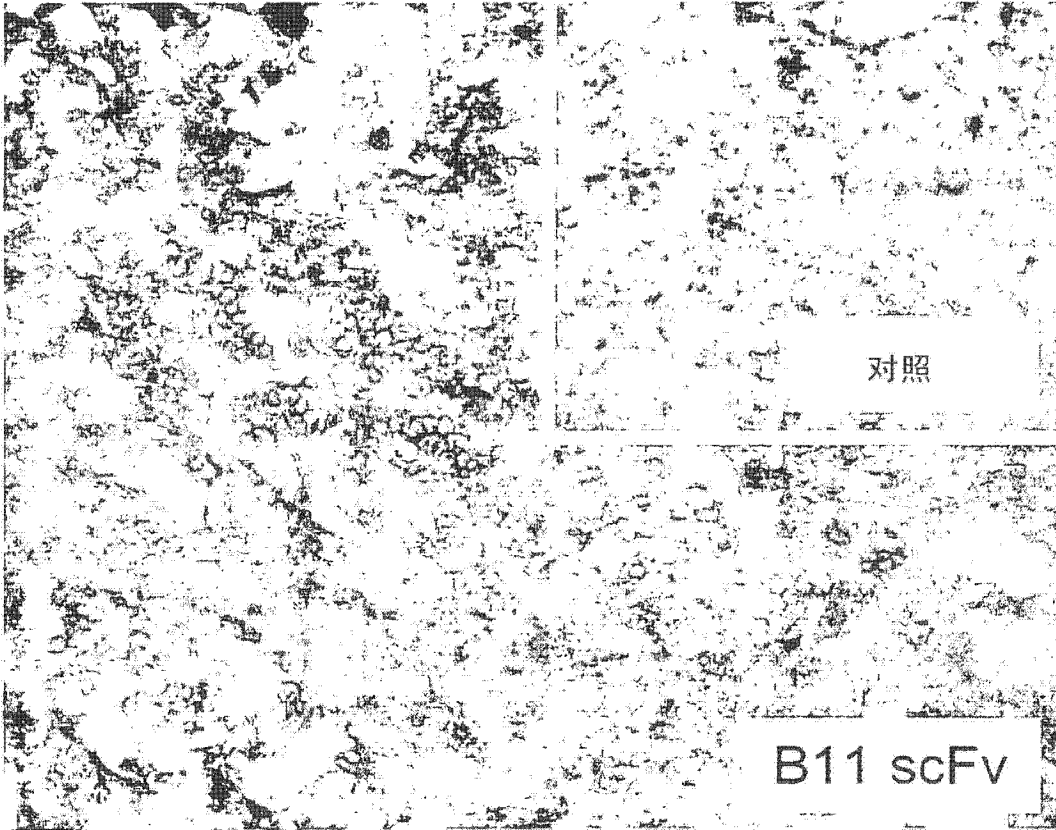


图4(续)

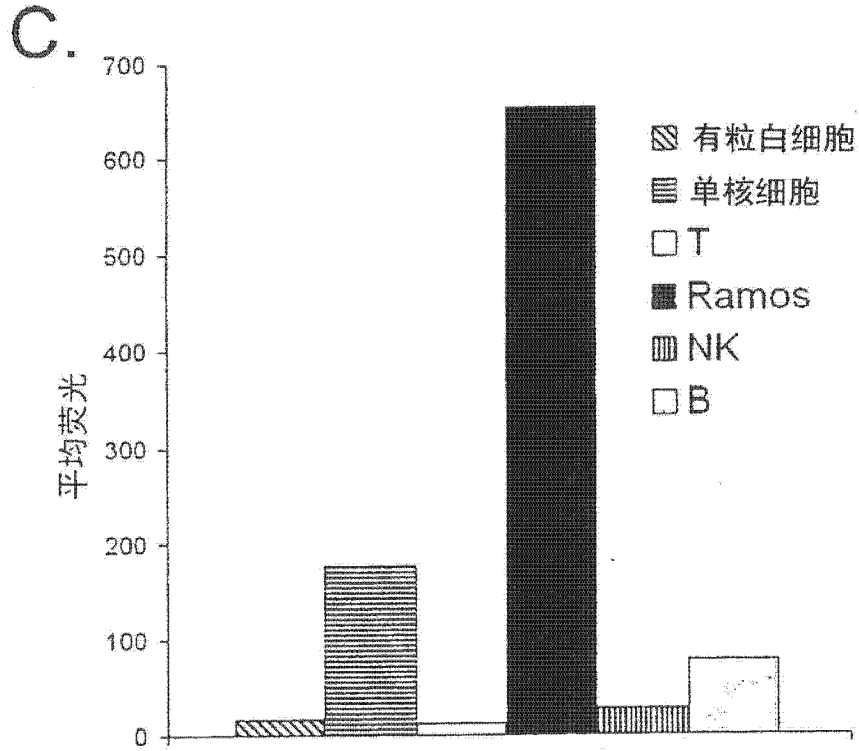


图4(续)

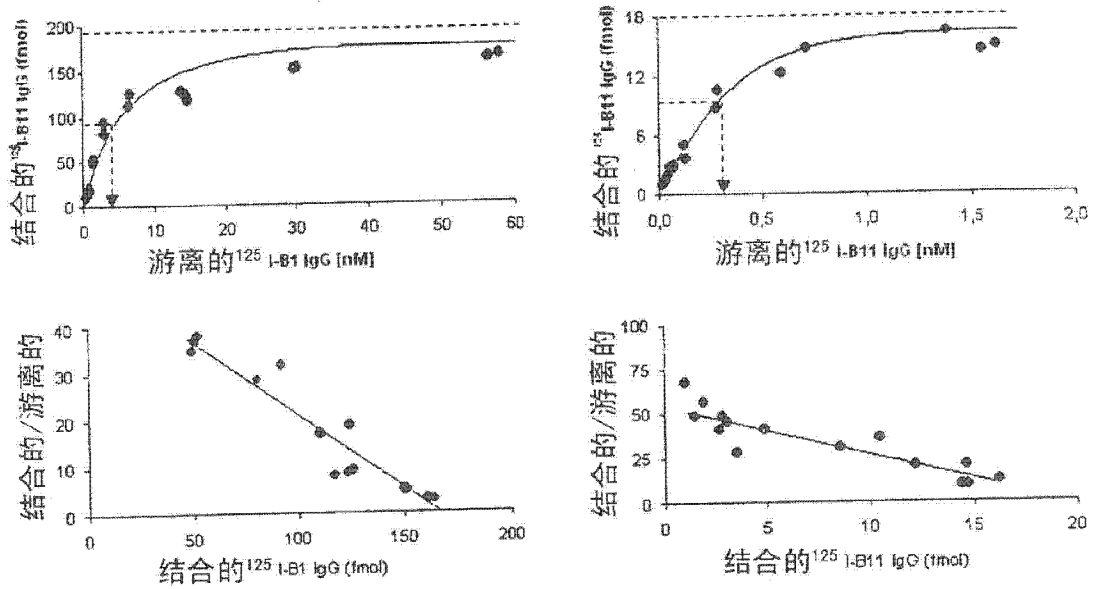


图5

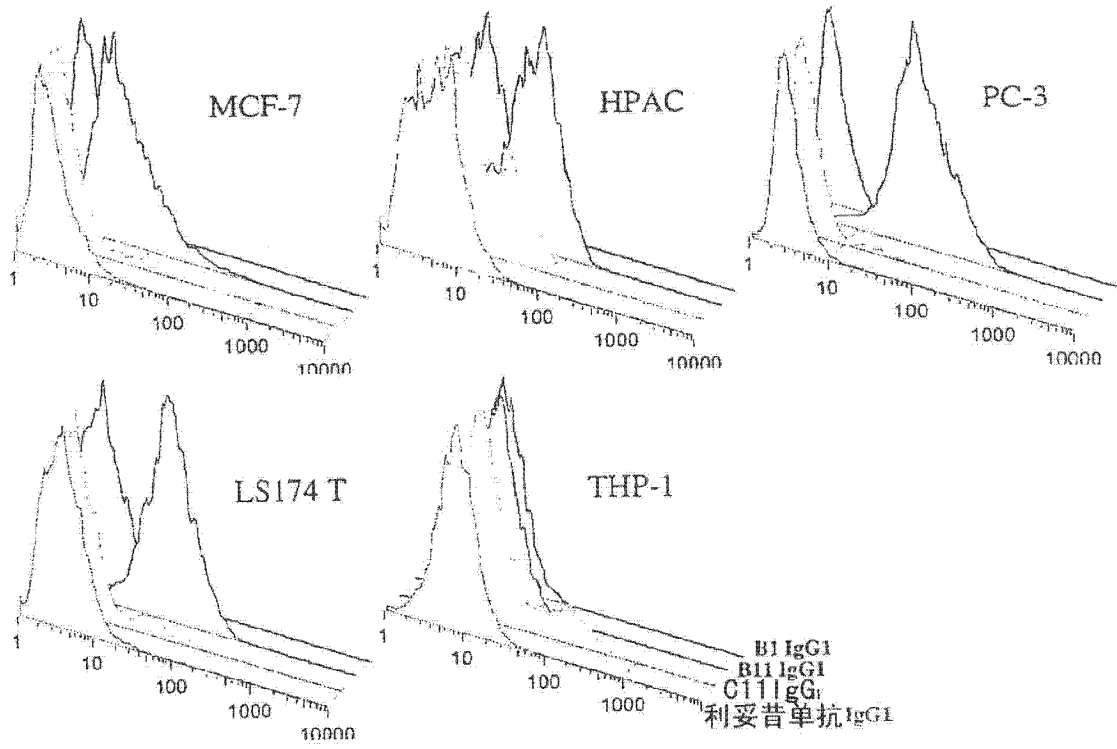
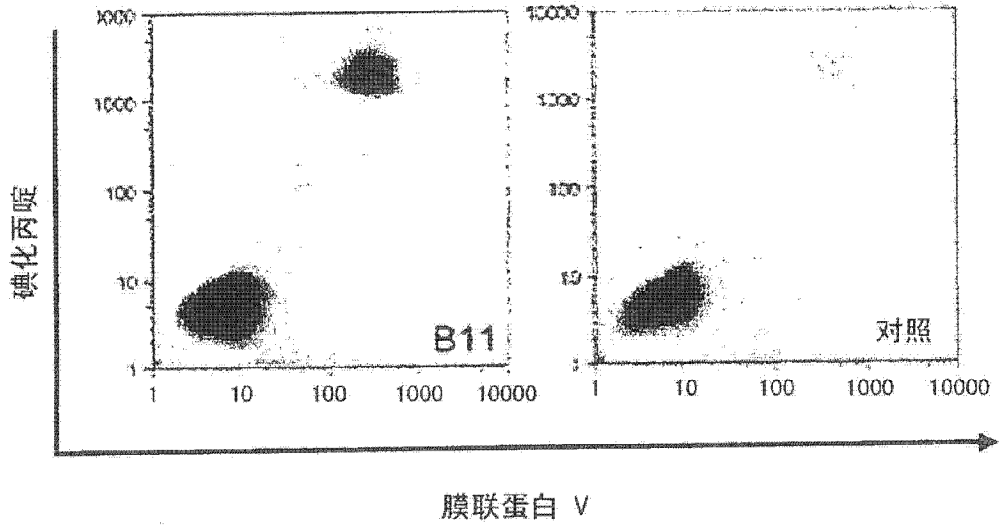


图 6

A.



B.

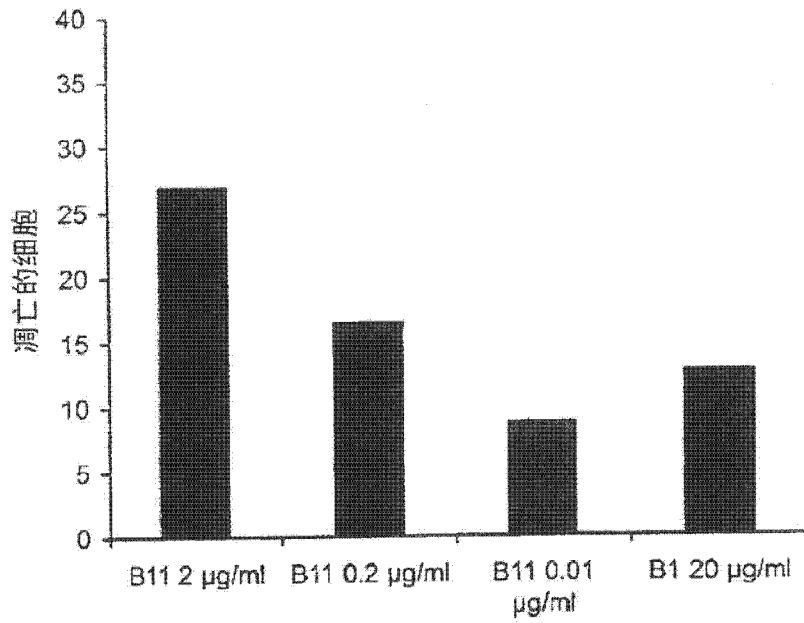
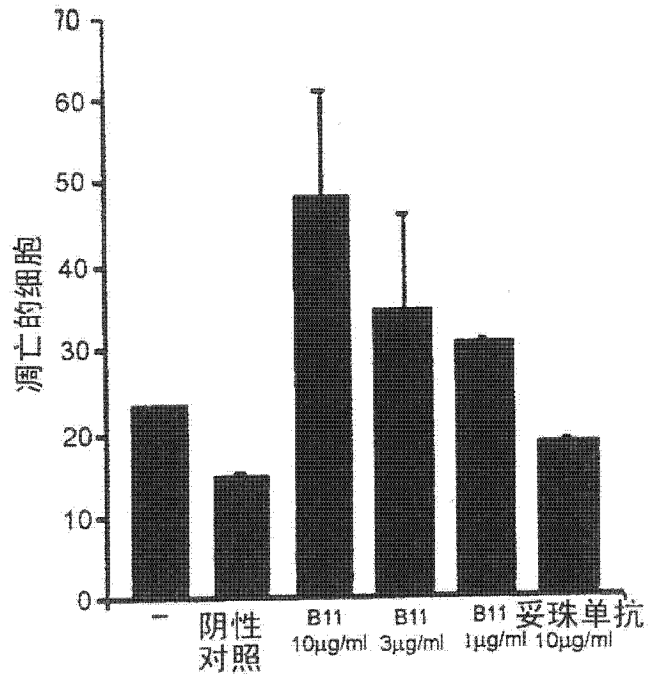


图 7

C.



D.

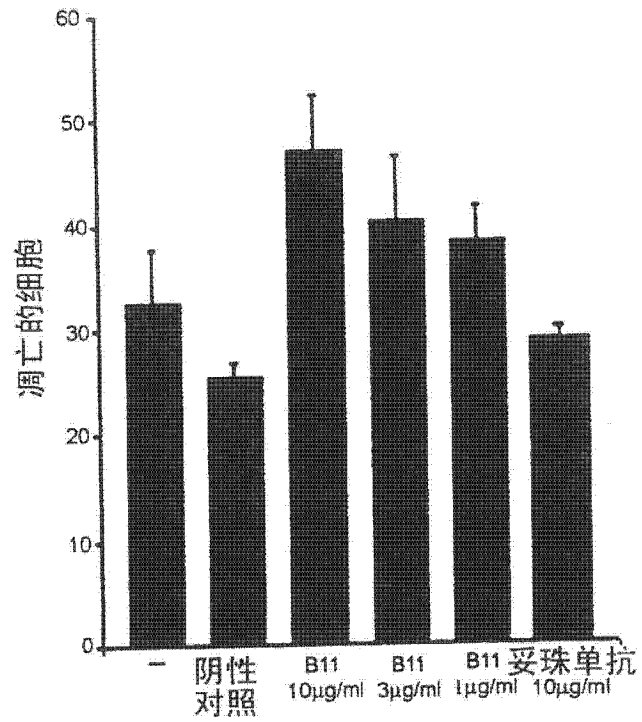


图7(续)

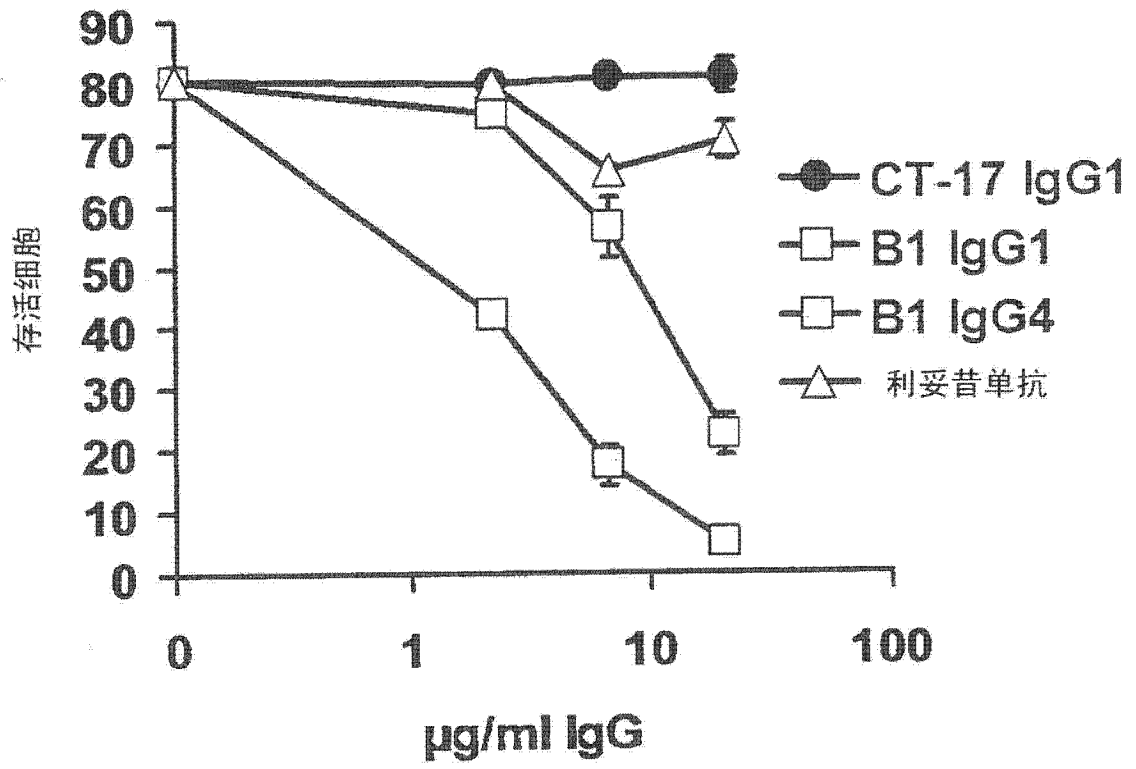


图 8

B1-VH

核苷酸序列

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT
AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC
CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGCTACTACCCCTTGACTAC
TGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

氨基酸序列

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISG
SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGLLPLDY
WGQGTLVTVSS

图 9

B1-VL

核苷酸序列

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGT
CACCATCTCTTGTCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAGGGAATGCTGTAAATT
GGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAATCCTCATCTATGAAAATAAT
AAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTC
AGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACT
GCAGCTCATATGCGGTCAGCAACAATTTGAGGGTGCTATTCGGCGGAGGAACC
AAGCTGACGGTCCTAGGT

氨基酸序列

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGGNAVNWYQQLPGTAPKLLIYENN
KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYAVSNNFEVLFGGGT
KLTVLG

图 9(续)

B11-VH

核苷酸序列

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATGGTAT
GATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTC
CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGATACAGTGGCTGGTACTTTGACTAC
TGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

氨基酸序列

EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVAFIY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARYSGWYFDY
WGQGT LVT VSS

图 10

B11-VL

核苷酸序列

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGT
CACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTAC
ACTGGTATCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGATAAC
ACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAC
CTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATT
ACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTCAGTGCTTGGCTGTTCCGGCGGAGGAACC
AAGCTGACGGTCCTAGGT

氨基酸序列

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDN
NNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSAWLFGGGT
KLTVLG

图 10(续)

C11-VH

核苷酸序列

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCGGCAGTTATGAAATGAACT
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGC
GGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGGAAGGCCGATTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATACAAACCCGTACTACTACTACGGT
ATGGACGTCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

氨基酸序列

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYEMNWVRQAPGKGLEWVSVIYS
GGSTYYADSV EGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNPYY YG
MDVWGQGT LVTVSS

图 11

C11-VL

核苷酸序列

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGT
CACCATCTCCTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAATAATGCTGTAACT
GGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGGAATAAT
CAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTC
AGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACT
GCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGAATGGTCAAGTATTCGGCGGAGGAACCAAG
CTGACAGTCCTAGGT

氨基酸序列

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYRNN
QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLNGQVFGGGTK
LTVLG

图 11(续)

专利名称(译)	生物材料及其用途		
公开(公告)号	CN102517252A	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	CN201110356262.8	申请日	2006-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	生物发明国际公司		
申请(专利权)人(译)	生物发明国际公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物发明国际公司		
[标]发明人	比约恩·弗伦多斯 罗兰·卡尔松		
发明人	比约恩·弗伦多斯 罗兰·卡尔松		
IPC分类号	C12N5/078 C12N5/0781 C12N5/07 C12N15/13 C07K16/28 C07K16/42 G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P31/00 A61P31/18		
CPC分类号	C07K16/2803 C07K16/4283 C07K16/2833 C07K2317/21 C07K2316/95 A61K2039/505 C07K16/2821 C07K2317/73 A61P19/02 A61P19/04 A61P29/00 C07K2317/622 C07K2317/732 C07K2317/75 C07K2317/94 A61P35/00 A61K39/395 C07K16/28		
优先权	2005025214 2005-12-12 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种生物材料及其用途。本发明提供了结合分子，包括与靶细胞的细胞表面抗原选择性结合的抗体分子，其中，一旦结合分子结合细胞表面的抗原，则诱导靶细胞的凋亡。也提供了用于诱导细胞凋亡的药物组合物、方法，以及其用途。