



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101652388 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 25

(21) 申请号 200880008268. 2

(22) 申请日 2008. 03. 13

(30) 优先权数据  
07005180. 0 2007. 03. 13 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日  
2009. 09. 14

(86) PCT申请的申请数据  
PCT/EP2008/002021 2008. 03. 13

(87) PCT申请的公布数据  
W02008/110372 EN 2008. 09. 18

(73) 专利权人 苏黎世大学  
地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 C·埃斯林格尔 S·金茨勒  
I·阿贝拉 A·齐佩利乌斯  
D·耶格 A·克努特  
R·M·D·尼奇 H·莫赫  
N·格贝尔斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247  
代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.  
C07K 16/00 (2006. 01)  
C07K 16/30 (2006. 01)

(56) 对比文件  
WO 0020460 A, 2000. 04. 13,  
WO 0020460 A, 2000. 04. 13,  
US 2005142620 A1, 2005. 06. 30,  
US 2005142620 A1, 2005. 06. 30,  
US 6252052 B1, 2001. 06. 26,  
US 6252052 B1, 2001. 06. 26,  
WO 2005000870 A, 2005. 01. 06,  
WO 2005116645 A, 2005. 12. 08,

US 2006235207 A1, 2006. 10. 19,  
Held G et al. A high-affinity antibody binding the specificity of T-cell receptor to a MHC-class I displayed epitope of the tumor-specific antigen NY-ESO-1. 《proceedings of the annual meeting of the american association for cancer research》. 2003, 第 44 卷

Held G et al. A high-affinity antibody binding the specificity of T-cell receptor to a MHC-class I displayed epitope of the tumor-specific antigen NY-ESO-1. 《proceedings of the annual meeting of the american association for cancer research》. 2003, 第 44 卷

Tureci et al. humoral immune responses of lung cancer patients against tumor antigen NY-ESO-1. 《cancer letters》. 2006, 第 236 卷 (第 1 期),  
刘志青. NY-ESO-1 单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》. 2006, E059-254.  
Stockert e et al. a survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. 《journal of experimental medicine》. 1998, 第 187 卷 (第 8 期),  
Zeng G et al. dominant B cell epitope from NY-ESO-1 recognized by sera from a wide spectrum of cancer patients: implications as a potential biomarker.

(续)

(续)

审查员 刘睿

权利要求书2页 说明书20页  
序列表8页 附图4页

(54) 发明名称  
单克隆人肿瘤特异性抗体

(57) 摘要  
本发明提供了识别肿瘤相关抗原 NY-ESO-1

的新的人肿瘤特异性抗体及其片段、衍生物和变体。另外,描述了用于治疗肿瘤的包含此类抗体及其模拟物的药物组合物。

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*A61K 39/395* (2006.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

*G01N 33/53* (2006.01)

(56) 对比文件

《international journal of cancer》.2005, 第 114 卷 (第 2 期),

Zeng G et al. dominant B cell epitope from NY-ESO-1 recognized by sera from a wide spectrum of cancer patients: implications as a potential biomarker.

《international journal of cancer》.2005, 第 114 卷 (第 2 期),

Jager e et al. monitoring CD8 T cell

responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. 《proceedings of the national academy of sciences of the united states of america》.2000, 第 97 卷 (第 9 期),

Valmori et al. identification of B cell epitopes recognized by antibodies specific for the tumor antigen NY-ESO-1 in cancer patients with spontaneous immune responses. 《clinical immunology》.2005, 第 117 卷 (第 1 期),

kawabata ryohei et al. antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. 《international journal of cancer》.2007, 第 120 卷 (第 10 期),

1. 人的、人源化、鼠的、异种的或嵌合的人-鼠抗体或其抗原结合片段,其能够识别肿瘤相关抗原NY-ESO-1,在其可变重链区中包含SEQ ID NO:5的互补决定区CDR1、SEQ ID NO:6的CDR2和SEQ ID NO:7的CDR3并且在其轻链可变区中包含SEQ ID NO:8的互补决定区CDR1、SEQ ID NO:9的CDR2和SEQ ID NO:10的CDR3。

2. 权利要求1的抗体或抗原结合片段,其结合至SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列所限定的表位。

3. 权利要求1或2的抗体或抗原结合片段,其选自单链Fv片段(scFv)、F(ab')片段、F(ab)片段和F(ab')<sub>2</sub>片段。

4. 权利要求1至3中任一项的抗体或抗原结合片段,其包含根据SEQ ID NO:2的V<sub>H</sub>区和根据SEQ ID NO:4的V<sub>L</sub>区的氨基酸序列。

5. 权利要求1至4中任一项的抗体或抗原结合片段,其具有至少10<sup>-9</sup>M的结合亲和力。

6. 多核苷酸,其编码至少权利要求1至5中任一项的抗体或抗原结合片段的免疫球蛋白链的可变区。

7. 包含权利要求6的多核苷酸的载体。

8. 包含权利要求6的多核苷酸或权利要求7的载体的宿主细胞。

9. 制备抗体或其抗原结合片段或免疫球蛋白链的方法,所述方法包括:

(a) 培养权利要求8的细胞;并

(b) 从培养物中分离所述抗体或其抗原结合片段或免疫球蛋白链。

10. 由权利要求6的多核苷酸编码的或通过权利要求9的方法可获得的抗体、其免疫球蛋白链或抗原结合片段。

11. 权利要求1至5或10中任一项的抗体或抗原结合片段,其被可检测地标记。

12. 权利要求11的抗体或抗原结合片段,其中所述可检测的标记选自酶、放射性同位素、荧光团和重金属。

13. 权利要求1至5或10至12中任一项的抗体或抗原结合片段,其附着到药物。

14. 组合物,其包含权利要求1至5或10至13中任一项的抗体或抗原结合片段。

15. 权利要求14的组合物,其为药物组合物并进一步包含药学上可接受的载体。

16. 权利要求15的药物组合物,其进一步包含用于治疗肿瘤的其他活性剂。

17. 诊断组合物,其包含权利要求1至5或10至13中任一项的抗体或其抗原结合片段,以及任选地在基于免疫或核酸的诊断方法中常规使用的试剂。

18. 权利要求1至5或10至13中任一项的抗体或抗原结合片段的用途,用于制备治疗或预防肿瘤发展、减轻肿瘤相关症状、诊断或筛选受试者的肿瘤的存在或测定受试者发生肿瘤的危险性的药物组合物或诊断组合物。

19. 权利要求18的用途,其中所述药物组合物通过静脉内、肌内、皮下、腹膜内、鼻内途径或以气雾剂形式施用。

20. 治疗有效量的肿瘤抗原结合分子在制备用于诊断和/或治疗受试者中肿瘤相关疾病的药物组合物或诊断组合物的用途,该分子包含权利要求1至5或10至13中任一项的抗体或其抗原结合片段。

21. 权利要求18-20任一项的用途,其中所述肿瘤包含原发乳腺癌和/或转移瘤。

22. 用于诊断肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包含权利要求1至5或10至13中任一项的抗

体或抗原结合片段,任选地具有试剂和 / 或使用说明书。

23. 包含权利要求 1 至 5 中任一项的抗体的肿瘤抗原结合分子的用途,用于制备在体内检测肿瘤或将治疗和 / 或诊断剂靶向肿瘤的药物组合物或诊断组合物。

## 单克隆人肿瘤特异性抗体

### 发明领域

[0001] 本发明一般涉及新的肿瘤特异性结合分子,特别是各自识别肿瘤抗原和肿瘤相关抗原的人抗体及其片段、衍生物和变体。另外,本发明涉及包含此类结合分子、抗体及其模拟物的药物组合物,用于治疗多种肿瘤,特别是黑素瘤、乳腺癌和转移瘤。

### [0002] 发明背景

[0003] 针对肿瘤的体液免疫应答以相对较高的频率发生(1,2)。通过利用来自癌症病人的血清筛选自体表达文库对该现象进行了利用,从而鉴定出多种肿瘤相关抗原(taa)(1)。目前将这些taa中的几种用作T细胞抗原用于诱导病人中的抗肿瘤CTL反应(3,4)。目前对于这种将细胞的、大多数情况下细胞毒性免疫反应作为治疗策略的偏爱正重新予以考虑,并设计新的疫苗从而也能够诱导抗体反应。在某种程度上,这种概念的转变也许是受到近期多种用于肿瘤治疗的单克隆抗体例如司徒曼布(Herceptin)和贝伐单抗(Avastin)的成功的影响(5)。尽管针对假定的肿瘤学相关的靶标已经特异性地生产出这些单克隆抗体,但自发或经疫苗接种而发生于癌症病人中的抗体形成不同种类的分子,其治疗有效性难以评估。这主要是由于缺乏直接的实验方法来进行其分离和随后在体外和人类癌症的动物模型中的表征。

[0004] 因此,需要克服上述局限并提供针对癌症中所涉及抗原的治疗和诊断抗体。

### [0005] 发明概述

[0006] 本发明利用癌症病人的肿瘤特异性免疫反应用于肿瘤抗原和肿瘤相关抗原(taa)特异性人单克隆抗体的分离。特别地,根据本发明所进行的实验在从黑素瘤病人分离taa NY-ESO-1特异性的单克隆抗体上获得了成功,所述病人显示出针对NY-ESO-1的血清滴度和部分临床反应。使用利用组织微阵列(TMA)的免疫组织化学(IHC)来分别分离肿瘤抗原和taa特异性的人抗体。

[0007] 因而本发明涉及能够识别肿瘤相关抗原NY-ESO-1的人抗体、抗原结合片段和类似的抗原结合分子。而且,本发明涉及包含所述抗体的组合物并涉及利用该组合物的免疫治疗和免疫诊断方法。

[0008] 在本发明特别优选的实施方案中,人抗体或其抗原结合片段证实了以如图4所述的可变区 $V_H$ 和/或 $V_L$ (SEQ ID NOs:2和4)为特征的抗体的免疫结合特性。备选地,抗体是人源化的、异种的、或嵌合的人-鼠抗体,后者对于动物中的诊断方法和研究是特别有用的。还包括包含抗体或其活性片段、或者激动剂和同源分子、或者备选地其拮抗剂的治疗组合物,以及利用这些组合物在预防、诊断或治疗肿瘤中使用此类组合物的方法,其中对需要此类治疗的病人施用有效量的组合物。

[0009] 抗体的抗原结合片段可以是单链Fv片段、F(ab')片段、F(ab)片段、和F(ab')<sub>2</sub>片段,或者其他抗原结合片段。在特定的实施方案中,抗体或其片段是人IgG同种型抗体。

[0010] 当然,本发明延伸至永生化的B记忆性淋巴细胞和B细胞,其分别产生具有如下所述的独特和唯一特性的抗体。

[0011] 本发明还涉及编码至少本发明抗体的免疫球蛋白链的可变区的多核苷酸。优选

地,所述可变区包含如图 4 所述的  $V_H$  和 / 或  $V_L$  可变区的至少一个互补决定区 (CDR) (SEQ ID NOs :5 到 10)。

[0012] 因此,本发明还包括包含所述多核苷酸的载体和经其转化的宿主细胞,以及其用于生产对指示和 / 或引起肿瘤、尤其是黑素瘤或乳腺癌的抗原特异性的抗体和等效结合分子的用途。

[0013] 可将抗体、免疫球蛋白链、其结合片段和结合所述抗体的抗原分别用于肿瘤免疫治疗和诊断用的药物和诊断组合物。然而上述组合物在制备药物中的用途是优选的。

[0014] 因此,提供用于治疗或预防癌性疾病例如原发性乳腺癌和转移瘤的方法是本发明的特别目的。该方法包含对受试者施用有效浓度的抗体或抗体衍生物,其中所述抗体靶向肿瘤组织和细胞。

[0015] 另外,本发明的实施方案将从下面的描述和实施例中变得显而易见。而且,本发明的描述,当必要或合适时,可利用申请人于 2007 年 3 月 13 日向欧洲专利局提交的更早的欧洲专利申请 EP07005180.0 中的公开内容进行补充。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1 :记忆 B 细胞培养孔 12D7 含有 NY-ESO-1 特异性抗体。测定了通过记忆 B 细胞培养物条件化的培养基中 NY-ESO-1 特异性人抗体的存在。A)ELISA 中显示出全长重组 NY-ESO-1。B) 在对 NY-ESO-1 阳性乳癌 (mc) 和 NY-ESO-1 阴性对照组织 (ct) 的免疫组织化学中,所显示的是用两个 ELISA 阳性记忆 B 细胞孔 (9D1、12D7) 的条件培养基所获得的染色。C) 通过用来自培养孔 12D7 的 B 细胞条件培养基对 NY-ESO-1 阳性组织的染色、随后通过针对 IgG 亚类 IgG1-4 的二级抗体证实了孔 12D7 中所含的 NY-ESO-1 特异性抗体是 IgG1 亚类的抗体。

[0018] 图 2 :通过培养的记忆 B 细胞的单细胞 RT-PCT 获得的重组人抗体 12D74 号克隆在 ELISA 中和组织切片上特异性识别 NY-ESO-1。在显示全长 NY-ESO-1 的 A)ELISA 中检测了从经免疫球蛋白重链和轻链表达载体转染的 293T HEK 细胞收获的上清液 (SN) 对于 NY-ESO-1 的特异性,所述表达载体表达 4 号克隆 12D7。ELISA 值指示了未稀释的 SN(1 :12D7.4SN)、1/10 稀释液 (2 :12D7.4SN) 以及 1/100 稀释液 (3 :12D7.4SN)。为了比较,还显示了利用以 1/100 稀释度使用的病人血浆获得的 ELISA 信号,从所述病人中获得记忆 B 细胞培养物 (4)。作为对照,(5) 显示了通过以与 12D7.4 相同的方式产生的不相关重组抗体转染获得的 SN 对 NY-ESO-1 包被的 ELISA 板的结合的缺失以及 4 号 12D7 克隆对不相关抗原包被的 ELISA 板的结合的缺失。B) 对 NY-ESO-1 阳性乳癌 (mc) 和对 NY-ESO-1 阴性对照组织 (ct) 的免疫组织化学显示出重组 4 号 12D7 克隆对乳癌的特异性结合。

[0019] 图 3 :人单克隆抗体 Manhattan 的特征。利用跨越包被于 ELISA 板上的整个 NY-ESO-1 蛋白质的重叠肽进行表位作图。A)Manhattan 特异结合跨越 NY-ESO-1 蛋白质 N 端的 11 至 30 个氨基酸的肽。B) 病人 C1 的血清识别位于 NY-ESO-1N 端和中央区的多个肽片段。C) 利用 NY-ESO-1<sub>11-30</sub> 肽的竞争性 ELISA 实验测定 Manhattan 的亲合力为  $KD = 10^{-10}$ 。D) 利用 humAb Manhattan 进行的 NY-ESO-1 阳性细胞系 SK-MEL-37 的免疫荧光染色显示出 NY-ESO-1 染色与核标志物 Hoechst 的共定位。对照抗体 (特异于 MOG 的人重组 8-15c5) 不结合。

[0020] 图 4 :可变区 (即抗体 12D7 的重链和  $\kappa$  轻链) 的氨基酸和核苷酸序列。加下划

线的是互补决定区 (CDRs)。

[0021] 发明详述

[0022] 本发明一般涉及抗体及其抗原结合片段,其显示出如实施例 3 中举例说明的抗体所述的免疫学结合特性和 / 或生物学特性。在本文中,术语“免疫学结合特性”或抗体与抗原的其它结合特性,在其所有的语法形式中均指的是抗体的特异性、亲和性、交叉反应性、和其它结合特性。当然,本发明延伸至抗体生产细胞系以及重组细胞。本发明进一步涉及包含本发明的结合分子的诊断测定法和试剂盒、并涉及基于此的治疗方法。

[0023] 根据本发明,基本上如申请人于 2008 年 1 月 7 日提交的共同未决的国际申请 PCT/EP2008/000053 “提供疾病特异性结合分子和靶标的方法”中所公开的(其公开内容并入本文作为参考),通过利用鉴定、验证和生产肿瘤诊断和治疗用的结合分子的方法,从在 ELISA 中和自体肿瘤切片上对 NY-ESO-1 血清反应阳性的黑素瘤病人中克隆得到对于肿瘤相关抗原 NY-ESO-1 特异的人抗体。抗体候选物的筛选是在 ELISA 和利用组织微阵列技术的改造的肿瘤组织上完成的。所获得的组织反应性人单克隆抗体显示出结合至 NY-ESO-1 的 N 端, NY-ESO-1 也被肿瘤相关抗原 LAGE-1 所共享,参见实施例 3。

[0024] 除非另有说明,术语“癌症”和“肿瘤”在本文中可互换使用。仅仅为了清楚且不限本发明的范围,下面实施方案中的大多数讨论的是关于人抗体和抗体样分子,其代表了用于按照本发明开发治疗和诊断试剂的优选结合分子。然而,可以理解用于本发明上下文中的术语“抗体”及其片段也可以指结合至人来源的肿瘤(相关)抗原 NY-ESO-1 的其它非抗体结合分子,包括但不限于激素、受体、配体、主要组织相容性复合体(MHC)分子、伴侣分子例如热激蛋白(HSPs)、以及细胞-细胞粘附分子例如钙黏着蛋白、整联蛋白、C 型凝集素和免疫球蛋白(IgG)超家族的成员、

[0025] 最初 NY-ESO-1 是利用基于抗体的克隆技术(SEREX,见下文)在食管癌病人中鉴定出来的。最近可以显示出 NY-ESO-1 可代表最具免疫原性的 CT 抗原,因为在高百分比的患有 NY-ESO-1 表达肿瘤的病人中可观察到自发的细胞和体液免疫反应(Gnjatic 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA100(2003),8862-8867;Jager 和 Knuth, Breast 14(2005),631-635)。

[0026] 因为 CT 抗原选择性地表达于人肿瘤细胞和睾丸的精原细胞中,它们代表了用于癌症病人中免疫疗法途径的有希望的一组靶标抗原。在它们中间, NY-ESO-1 显示出强免疫原性并已知其可诱导患有黑素瘤和卵巢、乳腺、肺以及膀胱癌的病人中有效的体液和细胞免疫反应,这使得它成为主动癌症免疫疗法的理想靶标。有关肿瘤抗原和肿瘤相关抗原的核苷酸和氨基酸序列以及来源、主要文献等参见合适的数据库例如 EMBL 托管的 UniProtKB/Swiss-Prot,其中 NY-ESO-1 的入口可在主编号 P78358 下找到。

[0027] 在特别优选的实施方案中,本发明的抗体结合至 SEQ ID NO:11 所给出的氨基酸序列所限定的表位,该序列代表了 NY-ESO-1 蛋白质的第 11 至 30 个氨基酸残基。

[0028] 抗体及其模拟物的重组生产的方式和方法以及筛选竞争性结合分子(其可以是或可以不是抗体)的方法是本领域中已知的,也可参见实施例。然而,如本文所述,特别是关于人的治疗应用,本发明的抗体是人抗体,意味着所述抗体的应用基本上不存在另外对于嵌合和甚至人源化抗体所观察到的人抗鼠抗体(HAMA)反应。

[0029] 然而,如所附的实施例 3 所示的,已经鉴定和克隆了抗体,其显示出与其同源抗原的特别高的结合亲和力,相互作用平衡解离常数(KD)在更小的纳摩尔范围内。优选地,本

发明的结合分子与其同源抗原的结合亲和力大约是至少  $10^{-7}$ M, 更优选地至少  $10^{-8}$ M, 特别优选地  $10^{-9}$ M 和甚至更优选地至少  $10^{-10}$ M。

[0030] 本发明举例证明了抗 -NY-ESO-1 抗体及其结合片段, 其特征可为在其可变区, 即结合结构域中包含至少一个可变区 VH 和 / 或 VL 的互补决定区 (CDR), 上述的 VH 和 / 或 VL 包含图 4 中所述的 (VH) (SEQ ID NO :2) 和 (VL) (SEQ ID NO :4) 的氨基酸序列。如图 4 中所述的  $V_H$  和 / 或  $V_L$  区域的上述氨基酸序列的示例性的一组 CDRs 在 SEQ ID NOS :5 至 10 中给出。然而, 如下面所讨论的, 本领域技术人员可清楚地知道可使用另外的或备选的 CDRs, 在 CDR2 和 CDR3 的情况中, 它们在其氨基酸序列上与 SEQ ID NOS :5 至 10 所述的序列具有一个、两个、三个甚至更多氨基酸的不同。

[0031] 在一项实施方案中, 本发明的抗体是包含如图 4 所述的  $V_H$  和 / 或  $V_L$  区域的氨基酸序列的任意一种抗体。备选地, 本发明的抗体是抗体或其抗原结合片段, 其与至少一种具有图 4 所述  $V_H$  和 / 或  $V_L$  区域的抗体竞争结合 NY-ESO-1 抗原。那些抗体可以是鼠抗体, 然而人源化的、异种的、或嵌合的人 - 鼠抗体是优选的, 特别是对于治疗应用。抗体的抗原结合片段可以是例如单链 Fv 片段 (scFv)、F(ab') 片段、F(ab) 片段、或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

[0032] 因此, 对于一些应用仅需要抗体的可变区, 其可通过用合适的试剂来处理抗体从而产生 Fab'、Fab、或 F(ab')<sub>2</sub> 部分来获得。此类片段对于例如涉及将免疫球蛋白的免疫特异性部分偶联至检测试剂 (例如放射性同位素) 上的免疫诊断方法中的用途是足够的。

[0033] 作为直接从永生 B 细胞或 B 记忆细胞的培养物中获得免疫球蛋白的备选, 可将永生细胞用作重排的重链和轻链基因座的来源, 用于随后表达和 / 或基因操作。重排的抗体基因可从合适的 mRNAs 反转录而产生 cDNA。如果希望, 重链恒定区可替换为其不同的同种型或完全除去。可将可变区连接起来从而编码单链 Fv 区。可将多个 Fv 区连接起来以提供对多个靶标的结合能力, 或者可使用嵌合的重链和轻链组合。一旦可获得遗传物质, 如上所述设计保持其结合目的靶标的能力的类似物是简单的。用于克隆抗体可变区和产生重组抗体的方法是本领域技术人员已知的, 并且在例如 Gilliland 等人, *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20 ; Doenecke 等人, *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792 中有所描述。

[0034] 一旦合适的遗传物质得以获得并且若期望的话, 经修饰从而编码类似物, 可将编码序列, 包括那些至少编码重链和轻链可变区的编码序列插入载体上所含的表达系统中, 所述载体可转染至标准的重组宿主细胞中。可使用多种此类宿主细胞, 然而为有效加工, 哺乳动物细胞是优选的。用于该目的的典型的哺乳动物细胞系包括 CHO 细胞、HEK293 细胞、或 NSO 细胞。然后通过适于宿主细胞生长和编码序列表达的培养条件下培养修饰的重组宿主来生产抗体或类似物。然后通过从培养物中分离来回收抗体。优选将表达系统设计为包括信号肽, 以便所获得的抗体分泌进培养基, 然而, 细胞内的生产也是可能的。

[0035] 在另一实施方案中, 本发明涉及肽形式和翻译后修饰形式的 NY-ESO-1 抗原, 其被上文所述的本发明的抗体所识别, 其中抗原优选是在长度上由至少 6-50、且优选不超过 10-100 个氨基酸组成的肽, 其含有同源表位。最优选地, 本发明的抗原包含 SEQ ID NO :11 的氨基酸序列且由大约 10 至 30 个氨基酸组成, 并且优选长度不超过大约 20 个氨基酸。该分子足够大以便在无任何翻译后修饰形式的情况下是抗原性的, 因此当与佐剂组合 (或无佐剂) 时其在前体和翻译后修饰的形式下均可用作免疫原。可使用这些抗原和肽来确定样品例如血清或血液中是否存在抗体。优选地, 本发明的抗原能够引发人的体液反应。

[0036] 根据上面所述,本发明还涉及编码本发明抗原或结合分子(对于抗体,优选至少上述抗体的免疫球蛋白链的可变区)的多核苷酸。通常,多核苷酸编码的所述可变区包含所述抗体可变区的 $V_H$ 和/或 $V_L$ 区域的至少一个互补决定区(CDR)。本领域技术人员已知抗体的每个可变区(重链 $V_H$ 和轻链 $V_L$ )包含三个高变区,有时称为互补决定区或“CDRs”,其两侧为四个相对保守的构架区或“FRs”,且指的是抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。抗体的人IgG亚型的高变区或CDRs包含轻链可变区中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变区中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)的氨基酸残基(如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md(1991)所述),和/或那些来自高变环的残基,即轻链可变区中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变区中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)(如Chothia等人, *J. Mol. Biol.* 196(1987), 901-917所述的)。构架或FR区是那些不同于高变区并支撑高变区的可变区残基。术语“特异性结合”指的是抗体结合预定的抗原。通常,抗体以 $10^{-7}M$ 或更低的解离常数( $K_D$ )结合,并以低于其结合至非特异抗原(例如,BSA、酪蛋白、或其它任何特定的多肽)的 $K_D$ 至少两倍的 $K_D$ 结合至预定的抗原。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异性的抗体”与术语“特异地结合至抗原的抗体”在本文中可互换使用。如本文所用的,“高特异性”结合意味着抗体对特异性靶标表位(即taaNY-ESO-1)的相对 $K_D$ 比抗体结合其它配体的 $K_D$ 低至少10倍。优选地,抗体以 $10^{-9}M$ 或更低的解离常数( $K_D$ )结合其同源NY-ESO-1抗原。

[0037] 抗体对抗原的亲合力或亲合力可利用任何合适的方法(参见例如Berzofsky等人“*Antibody-Antigen Interactions*” In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y(1984), Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company New York, N Y(1992))以及本文所述的方法来用实验测定。如果在不同条件(例如盐浓度、pH)下测定,所测定的特定抗体-抗原相互作用的亲合力可能不同。因此,亲合力和其它抗原结合参数(例如 $K_D$ 、IC50)的测定优选利用抗体和抗原的标准化溶液和标准化缓冲液来进行。

[0038] 本领域技术人员将容易地理解,具有上述可变区的抗体可变区可用于其它多肽或具有所希望特异性和生物学功能的抗体的构建。因此,本发明还包括包含上述可变区的至少一种CDR的多肽和抗体,且其有利地具有与所附实施例中所述的抗体基本上相同或相似的结合特性。本领域技术人员将容易理解,可根据本领域已知的方法(例如欧洲专利申请EP0451216A1和EP0549581A1中所述),利用本文所述的可变区或CDRs来构建抗体。而且,本领域技术人员知道可通过在CDRs内部或高变环(如Kabat所述其与CDRs部分重叠)内部进行氨基酸取代来提高结合亲合力(Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196(1987), 901-917)。因此,本发明还涉及其中一个或多个所述CDRs包含一个或多个、优选不超过两个氨基酸取代的抗体。优选地,本发明的抗体在其免疫球蛋白链的一条或两条中包含如SEQ ID N0s :5-10中所述的可变区的两个或全部三个CDRs。

[0039] 编码上述抗体的本发明的多核苷酸可为例如DNA、cDNA、RNA或合成生产的DNA或RNA或重组生产的嵌合核酸分子,其包含单独或组合形式的那些多核苷酸中的任一种。优选所述多核苷酸是载体的一部分。此类载体可进一步包含基因例如标记基因,其允许在合适宿主细胞和合适条件下选择所述载体。

[0040] 优选地,可将本发明的多核苷酸有效连接至允许在原核或真核细胞中表达的表达控制序列上。所述多核苷酸的表达包括将多核苷酸转录成可翻译的 mRNA。确保在真核细胞(优选哺乳动物细胞)中表达的调节元件是本领域技术人员公知的。它们通常包含确保转录起始的调节序列和任选确保转录终止和转录稳定的 poly-A 信号。其它的调节元件可包括转录以及翻译增强子,和 / 或天然相关的或异源性启动子区。

[0041] 在此方面,本领域技术人员将容易理解,编码至少轻链和 / 或重链可变区的多核苷酸可编码两条免疫球蛋白链或仅其中之一的可变区。另外,所述多核苷酸可在相同启动子的控制下,或可单独受到控制进行表达。允许在原核宿主细胞中表达的可能的调节元件包含例如大肠杆菌 (*E. coli*) 中的  $P_L$ 、lac、trp 或 tac 启动子,且允许在真核宿主细胞中表达的调节元件的实例有酵母中的 AOX1 或 GAL1 启动子、或者在哺乳动物和其它动物细胞中的 CMV-、SV40-、RSV- 启动子、CMV- 增强子、SV40- 增强子或珠蛋白内含子。

[0042] 除了负责转录起始的元件之外,此类调节元件还可包含转录终止信号,例如多核苷酸下游的 SV40-poly-A 位点或 tk-poly-A 位点。而且,取决于所用的表达系统,可将能够引导多肽进入细胞区室或分泌其进入培养基的前导序列添加至本发明多核苷酸的编码序列上,且这是本领域公知的。在合适的阶段将前导序列与翻译、起始和终止序列组装起来,且优选能够引导所翻译蛋白质或其部分分泌进入周质空间或胞外培养基的前导序列。任选地,异源序列可编码融合蛋白,其包括赋予目的特性(例如稳定或所表达重组产物的简化的纯化)的 C 或 N 端鉴定肽。关于这一点,合适的表达载体是本领域公知的,例如 Okayama-Berg cDNA 表达载体 pcDV1 (Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen) 或 pSPORT1 (GIBCO BRL)。

[0043] 优选地,在能够转化或转染真核宿主细胞的载体中表达控制序列将是真核启动子系统,但用于原核宿主的控制序列也可使用。一旦已将载体掺入合适的宿主,就将宿主维持在适于所述核苷酸序列高水平表达的条件下,且如希望,接下来可收集和纯化免疫球蛋白轻链、重链、轻 / 重链二聚体或完整抗体、结合片段或其它免疫球蛋白形式,参见 Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N. Y., (1979)。

[0044] 而且,本发明涉及载体,特别是遗传工程中常规使用的质粒、粘粒、病毒和噬菌体,其包含编码抗原或优选本发明抗体的免疫球蛋白链的可变区的多核苷酸;任选地与编码本发明抗体其它免疫球蛋白链的可变区的多核苷酸组合。优选地,所述载体是表达载体和 / 或基因转移或靶向载体。来源于病毒例如逆转录病毒、痘苗病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、或牛乳头瘤病毒的表达载体可用于将本发明的多核苷酸或载体递送到靶细胞群体。可使用本领域技术人员公知的方法来构建重组病毒载体,参见例如, Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. 和 Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1994) 中所述的技术。备选地,可将本发明的多核苷酸和载体重构入脂质体用于递送至靶细胞。可通过公知的方法将含有本发明多核苷酸(例如,免疫球蛋白链的重链和 / 或轻链可变区的编码序列和表达对照序列)的载体转移进宿主细胞,所述方法取决于细胞宿主的类型而不同。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其它细胞宿主,参见上述 Sambrook。

[0045] 本发明进一步涉及用本发明多核苷酸或载体转化的宿主细胞。所述宿主细胞可

为原核或真核细胞。存在于宿主细胞中的本发明的多核苷酸或载体可整合进入宿主细胞的基因组,也可保持在染色体外。宿主细胞可为任原核或真核细胞,例如细菌、昆虫、真菌、植物、动物或人细胞。优选的真菌细胞是例如,酵母菌属的那些,特别是酿酒酵母种。术语“原核”是指包括所有可经 DNA 或 RNA 分子转化或转染用于表达本发明抗体或相应免疫球蛋白链的细菌。原核宿主可包括革兰氏阴性细菌以及革兰氏阳性细菌例如,大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌和枯草芽孢杆菌。术语“真核”是指包括酵母、高等植物、昆虫和优选哺乳动物细胞,最优选 HEK293、NSO 和 CHO 细胞。取决于重组生产方法中所用的宿主,由本发明多核苷酸编码的抗体或免疫球蛋白链可为糖基化或者也可为非糖基化的。本发明的抗体或相应的免疫球蛋白链也可包括起始的甲硫氨酸残基。利用本领域技术人员通常已知的任何技术可将本发明的多核苷酸用于转化或转染宿主。而且,用于制备融合的、有效连接的基因并在例如哺乳动物细胞和细菌中表达它们的方法是本领域公知的 (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。本文所述的遗传构建体和方法可用于在真核或原核宿主中表达本发明的抗体或相应的免疫球蛋白链。通常,将含有启动子序列(其促使所插入的多核苷酸有效转录)的表达载体用于宿主。表达载体通常含有复制起点、启动子和终止子、以及能够提供转化细胞的表型选择的特定基因。DNA 序列的合适的来源细胞及用于免疫球蛋白表达和分泌的宿主细胞可从多种来源获得,例如美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (“*Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*,” Fifth edition (1985) Rockville, Maryland, U. S. A., 将其并入本文作为参考)。另外,包含本发明细胞的转基因动物,优选哺乳动物可用于本发明抗体的大规模生产。

[0046] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及生产本发明的抗原或抗体或其结合片段或免疫球蛋白链的方法,所述方法包括:

[0047] (a) 培养上述细胞,并

[0048] (b) 从培养物中分离所述抗原、抗体或其结合片段或免疫球蛋白链。

[0049] 可将转化的宿主在发酵罐中生长并根据本领域已知的技术进行培养从而实现最佳的细胞生长。一旦表达,可根据本领域的标准方法对本发明的完整抗体、其二聚体、单独的轻链和重链、或其它免疫球蛋白形式进行纯化,所述标准方法包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等,参见“*Protein Purification*”, Springer Verlag, N. Y. (1982)。然后可从生长培养基、细胞裂解物或细胞膜级分中分离本发明的抗体或其相应的免疫球蛋白链。例如本发明重组表达的抗体或免疫球蛋白链的分离和纯化可通过任何常规的方式例如制备色谱分离和免疫学分离(例如,涉及使用针对例如本发明抗体恒定区的单克隆或多克隆抗体的那些方法)。可将本发明的抗体进一步偶联至其它部分上用于例如药物靶向和成像应用,这对本领域技术人员而言将是显而易见的。这种偶联可在抗体或抗原表达后利用化学方法偶联至连接位点,或者可在 DNA 水平上将偶联产物工程化进入本发明的抗体或抗原。然后在合适的宿主系统表达 DNAs,并收集所表达的蛋白质并在必要时复性。

[0050] 对于药物用途而言,至少大约 90-95% 均一性的基本上纯的免疫球蛋白是优选的,98-99% 或更高的均一性是最优选的。一旦按所期望的部分纯化或纯化到均一,则可将抗体治疗性(包括体外地)使用或开发和开展测定方法。

[0051] 本发明还涉及用于生产能够表达本发明抗体或其相应免疫球蛋白链的细胞的方

法,其包括用本发明的多核苷酸或载体遗传工程化细胞。通过本发明的方法获得的细胞可用于例如检测本发明抗体与其抗原的相互作用。

[0052] 如前所述,免疫球蛋白或其编码 cDNAs 可经进一步修饰。因此,在另一实施方案中,本发明的方法包括生产嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、Fab 片段、双特异性抗体、融合抗体、标记抗体或这些中任一种的模拟物的任一步骤。相应的方法是本领域技术人员已知的,并在例如 Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 中有所描述。当通过噬菌体展示技术获得所述抗体的衍生物时,可使用 BIAcore 系统中所用的表面等离子共振来增加与本文所述的任一抗体结合至相同表位的噬菌体抗体的效率 (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7(1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183(1995), 7-13)。嵌合抗体的生产在例如国际申请 W089/09622 中有所描述。生产人源化抗体的方法在例如欧洲申请 EP-A10239400 和国际申请 W090/07861 中有所描述。根据本发明所使用的其它来源的抗体即所谓的异种抗体。生产异种抗体,例如在小鼠中产生人抗体的一般原理在例如国际申请 W091/10741、W094/02602、W096/34096 和 W096/33735 中有所描述。如上所述,本发明的抗体除完整的抗体之外可以多种形式存在,包括,例如 Fv、Fab 和 F(ab)<sub>2</sub>, 以及以单链形式存在,参见例如国际申请 W088/09344。

[0053] 可利用本领域已知的常规技术对本发明的抗体或其相应的免疫球蛋白链进行进一步修饰,例如,通过单独或组合利用氨基酸缺失、插入、取代、添加、和 / 或重组和 / 或其它本领域已知的修饰。将此类修饰引入涉及免疫球蛋白链氨基酸序列的 DNA 序列的方法是本领域技术人员已知的,参见,例如 Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. 和 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1994)。本发明抗体的修饰包括在一个或多个组成性氨基酸上的化学和 / 或酶衍生,包括侧链修饰、主链修饰、以及 N 端和 C 端修饰,所述修饰包括乙酰化、羟基化、甲基化、酰胺化、以及碳水化合物或脂质部分、辅助因子的连接,等等。同样,本发明包括嵌合蛋白质的生产,所述蛋白质包含融合至位于羧基端的异源分子 (例如免疫刺激配体) 的位于氨基端的所述抗体或其片段,相应的技术细节参见例如国际申请 W000/30680。

[0054] 另外,本发明包含小肽,其包括含有如上所述的结合分子的那些,例如含有任一所述抗体可变区的 CDR3 区域,特别是重链的 CDR3,因为经常观察到重链 CDR3 (HCDR3) 是具有更高程度可变性的区域且为抗原抗体相互作用的主要参与者。此类肽可容易地合成或通过产生根据本发明有用的结合剂的重组方式来生产。此类方法是本领域普通技术人员所公知的。肽可例如利用自动化肽合成仪 (其可商业上获得) 来合成。肽可通过重组技术来生产,所述技术通过将表达肽的 DNA 掺入表达载体并用表达载体转化细胞来生产肽。

[0055] 因此,本发明涉及任一结合分子、抗体或结合片段,其可通过上述方法来获得并展示出所述特性,即其特异性识别 NY-ESO-1, 且为对于治疗用途优选保持基本上人的构架以便避免在病人中的免疫原性。

[0056] 在本发明的另一实施方案中,抗体、免疫球蛋白链或其结合片段或者抗原是经可检测标记的。标记试剂可直接或间接偶联至本发明的抗体或抗原上。间接偶联的一个实例是通过使用间隔区部分。而且,本发明的抗体可包含另外的结构域,所述结构域是通过共价或非共价键连接的。该连接可根据本领域已知的方法和上述方法以遗传融合为基础,或者

可通过例如化学交联（如例如国际申请 W094/04686 中所述）来完成。包含本发明抗体的融合蛋白中存在的其它结构域可优选通过柔性接头来连接，有利地多肽接头，其中所述多肽接头包含多个亲水的、肽键连接的氨基酸，其长度足以跨越所述另一结构域的 C 端和本发明抗体的 N 端，反之亦然。可通过多种方法将治疗或诊断活性试剂偶联至本发明抗体或其抗原结合片段上。这包括，例如，包含通过共价方法（例如肽键）偶联至治疗或诊断活性试剂的本发明抗体可变区的单链融合蛋白。另外的实例包括下述分子，其包含共价或非共价偶联至其它分子的至少一个抗原结合片段，所述分子包括下面非限制性举例证明列表中的那些分子。Trauneker, *Int. J. Cancer* Surp. SuDP 7(1992), 51-52 描述了双特异性试剂 janusin, 其中针对 CD3 的 Fv 区偶联至可溶性 CD4 或其它配体例如 OVCA 和 IL-7 上。类似地，可将本发明抗体的可变区构建进 Fv 分子并偶联至备选配体（例如所引用的文献中列举的那些）上。Higgins, *J. Infect Disease* 166(1992), 198-202 描述了由 OKT3 交联至针对 GP120V3 区域中的特异序列的抗体组成的异缀合物抗体。此类异缀合物抗体还可利用至少本发明方法的抗体中所含的可变区来构建。特异性抗体的其它实例包括 Fanger, *Cancer Treat. Res.* 68(1993), 181-194 和 Fanger, *Crit. Rev. Immunol.* 12(1992), 101-124 中所述的那些。本领域中已广泛描述作为免疫毒素的包括常规抗体的缀合物。可通过常规偶联技术将毒素偶联至抗体上，或可作为融合蛋白来生产含有蛋白质毒素部分的免疫毒素。可将本发明的抗体用于相应方法来获得此类免疫毒素。此类免疫毒素的说明是由 Byers, *Seminars Cell. Biol.* 2(1991), 59-70 和 Fanger, *Immunol. Today* 12(1991), 51-54 所述的那些。

[0057] 上述融合蛋白可进一步包含蛋白酶的可切割接头或切割位点。这些间隔部分又可为非水溶性的或水溶性的 (Diener 等人, *Science* 231(1986), 148), 并且可经选择从而使药物在靶位点从抗原释放。用于免疫疗法的可偶联至本发明抗体和抗原的治疗剂的实例有药物、放射性同位素、凝集素、和毒素。可缀合至本发明抗体和抗原的药物包括通常被称作药物的化合物例如丝裂霉素 C、道诺霉素、和长春花碱。在将本发明的放射性同位素连接的抗体或抗原用于例如肿瘤免疫疗法中时，某些同位素可更优于其它同位素，这取决于例如白细胞分布以及稳定性和放射等因素。取决于自身免疫反应，一些放射体可优于其它。通常，发射  $\alpha$  和  $\beta$  粒子的放射性同位素在免疫疗法中是优选的。优选的是短程、高能量  $\alpha$  放射体例如  $^{212}\text{Bi}$ 。用于治疗目的的可结合至本发明抗体或抗原的放射性同位素的实例有  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{At}$ 、 $^{211}\text{Pb}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{109}\text{Pd}$  和  $^{188}\text{Re}$ 。可偶联至本发明抗体或抗原的其它治疗剂以及活体外和体内治疗方案是本领域普通技术人员已知的或可容易确定的。只要适当，本领域技术人员可使用编码任一上述抗体、抗原或相应载体的多核苷酸，代替蛋白材料自身。

[0058] 因此，此处所鉴定的抗体和结合结构域的生物活性表明它们具有足够的亲和力从而使其成为将药物分别定位至表达患病细胞和组织的合适表面结构的细胞的潜在候选物。这种对细胞的靶向和结合对于治疗或诊断活性剂的递送和基因治疗 / 基因递送是有用的。具有本发明抗体的分子 / 粒子将特异结合表达 NY-ESO-1 抗原的细胞 / 组织，并因此能够具有诊断和治疗用途。因此，本发明的抗体或抗原可被标记（例如，荧光、放射性、酶、核磁性的、重金属）并用于在体内或体外检测特异靶标，包括“免疫化学”类似的体外测定。在体内可将它们以类似于核医学成像技术的方式用于检测表达 NY-ESO-1 抗原的组织、细胞、或其它物质。因此，本发明的另一实施方案涉及本发明抗体或其结合片段用于制备组合物的用途，所述组合物用于体内检测肿瘤或将治疗和 / 或诊断试剂靶向肿瘤。

[0059] 而且,本发明涉及包含前述本发明的抗体或结合片段或抗原或其化学衍生物或者本发明的多核苷酸、载体或细胞的组合物。本发明的组合物可进一步包含药学上可接受的载体。术语“化学衍生物”描述了含有通常不是基础分子一部分的其它化学部分的分子。此类部分可增强基础分子的溶解度、半衰期、吸收等。备选地,该部分可削弱基础分子的不理想的副作用或降低基础分子的毒性。而且,本发明的药物组合物可包含其它抗肿瘤药剂,例如白介素或干扰素,取决于药物组合物的预定用途。因此,在本发明特别优选的实施方案中涉及本发明的抗体或结合片段、或具有与本发明的任一抗原、多核苷酸、载体或细胞基本上相同的结合特异性的结合分子的用途,用于制备用于治疗或预防肿瘤发展、用于减轻肿瘤相关症状、用于诊断或筛选存在肿瘤的受试者、或用于确定受试者发生肿瘤的风险的药物组合物或诊断组合物。可设计所述药物组合物来静脉内、肌内、皮下、腹膜内、鼻内、肠胃外施用或以气雾剂形式施用,也参见下文。

[0060] 因此,在一项实施方案中,本发明涉及治疗或预防受试者中肿瘤发展、用于减轻肿瘤相关症状、用于诊断或筛选受试者肿瘤的存在、或用于确定受试者发生肿瘤的风险的方法,该方法包括对所述受试者施用有效量的任一前述的本发明的抗体、抗原、多核苷酸、载体或细胞。特别地,根据本发明的治疗和诊断应用包括黑素瘤和乳腺癌,并且最适合用于靶向包含原发乳腺癌和 / 或转移瘤的肿瘤。除非另有说明,术语“肿瘤”、“癌症”、“癌”等在本文中可互换使用。

[0061] 因此,本发明包括包含上述人抗体的至少一种 CDR 的肿瘤抗原结合分子的任一种用途,特别是用于诊断和 / 或治疗肿瘤相关的疾病。优选地,所述结合分子是本发明的抗体或其免疫球蛋白链。另外,本发明涉及任一上文所述抗体的抗独特型抗体。这些是结合至独特的抗原肽序列的抗体或其它结合分子,所述抗原肽序列定位于抗原结合位点附近的抗体的可变区。

[0062] 在另一实施方案中,本发明涉及诊断组合物,其包含本发明的上述抗体、抗原结合片段、多核苷酸、载体或细胞中的任一种,以及任选地用于检测的合适方式,例如常规用于免疫的试剂或基于诊断方法的核酸。本发明的抗体例如适合用于免疫测定,在所述测定中它们可以以液相方式或结合至固相载体。可使用本发明抗体的免疫测定法的例子为直接或间接形式的竞争性和非竞争性免疫测定。此类免疫测定的例子有放射免疫测定 (RIA)、夹层 (免疫测定)、流式细胞术和蛋白质印迹测定。可将本发明的抗原和抗体结合至多种不同的载体上并用于分离特异结合在其上的细胞。众所周知的载体的例子包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、尼龙、直链淀粉、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁石。为进行本发明,载体的性质可为可溶或不溶的。有许多不同的标记和标记的方法是本领域技术人员已知的。可用于本发明的标记类型的例子包括酶、放射性同位素、胶态金属、荧光化合物、化学发光化合物、和生物荧光化合物,也可参见上文所述的实施方案。

[0063] 通过另一实施方案,本发明的结合抗体还可用于个体中肿瘤的诊断方法,通过从所测试个体中获得体液样品并在能够形成抗原 - 抗体复合物的条件下将体液样品与本发明的抗体相接触来实施所述方法,所述样品可以是血液样品、淋巴样品或任何其它体液样品。然后通过本领域已知的方法测定此类复合物的水平,显著高于对照样品的水平指示出所测试个体中的肿瘤。本发明的抗体所结合的特异抗原也可以相同的方式使用。因此,本

发明涉及包括本发明抗体或抗原的体外免疫测定。本发明优选的实施方案涉及癌症,特别是黑素瘤和乳腺癌的确定。这些方法涉及对 NY-ESO-1 的测定。

[0064] 在一项实施方案中,本发明涉及用于确定癌性状况(例如患有表达肿瘤(相关)抗原 NY-ESO-1 的肿瘤的病人中癌性状况的消退、进展或发作)的方法,其包括用特异结合所述抗原的抗体测定从所述病人取出的样品,并将获得的值与在测试从病人取出的先前样品之后获得的先前值相比较,其中存在的任何差异表明所述癌性状况的变化。根据本发明可使用的相应方法公开于国际申请 W001/07917 中。备选地,此方法可利用本发明的抗体来完成。

[0065] 在另一实施方案中,本发明涉及测定样品中癌细胞例如乳腺癌细胞的方法,其包括通过用本发明的抗体测定 NY-ESO-1 的存在来测定所述样品中 NY-ESO-1 的表达,其中 NY-ESO-1 的表达表明所述样品中存在癌细胞。根据本发明可改编的类似方法在关于 SCP-1、NY-ESO-1 和 SSX-2 的美国专利号 6,338,947 中有所描述。

[0066] 在该上下文中,本发明还涉及特别设计用于此目的的方法。例如,可使用基于蛋白质或抗体的阵列,其例如载有本发明的抗原以便检测患有肿瘤特别是转移瘤的病人中存在的自身抗体,或者载有本发明的抗体或等同的抗原结合分子。微阵列免疫测定的设计在 Kusnezow 等人, *Mol. Cell Proteomics* 5(2006), 1681-1696 中有所概述。因此,本发明还涉及载有本发明的抗体或抗原的微阵列。

[0067] 本发明还分别提供了药物和诊断包装或试剂盒,其包含装有一种或多种上述成分(即本发明的抗体或其结合片段、抗原、多核苷酸、载体或细胞)的容器。与该容器相关的可以是以管理药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式存在的通知,该通知反映出该机构对用于人类给药的生产、使用或销售的认可。另外或备选地,该试剂盒包含用于合适的诊断测定中的试剂和/或说明书。本发明的组合物即试剂盒当然特别适于诊断、预防和治疗伴随有肿瘤相关抗原 NY-ESO 的存在的疾病,特别适合于治疗上述肿瘤。

[0068] 本文所用的术语“治疗”等通常意味着获得希望的药理和/或生理效果。该效果可以是预防性的,也就是完全或部分防止疾病或其症状,和/或可以是治疗性的,也就是部分或完全治愈疾病和/或该疾病导致的副作用。本文所用的术语“治疗”涵盖了哺乳动物特别是人类中疾病的任何治疗,并包括:(a) 防止可能倾向患上该病但还未被诊断为患有该病的受试者中疾病的发生;(b) 抑制疾病,即阻止其发展;或(c) 减轻疾病,即引起疾病的消退。另外,术语“受试者”或“病人”是指需要治疗状况、紊乱或疾病的哺乳动物,优选人。

[0069] 本发明的药物组合物可根据本领域公知的方法来配制,参见例如 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472。合适的药物载体的实例是本领域中公知的,并包括磷酸缓冲盐溶液、水、乳液、例如油/水乳液、多种湿润剂、无菌溶液等。包含此类载体的组合物可通过公知的常规方法来制备。可将这些药物组合物以合适的剂量施用给受试者。合适组合物的施用可通过不同方式(例如,通过静脉内、腹膜内、皮下、肌内、局部或皮内施用)实现。气雾剂制剂(例如鼻喷雾制剂)包括具有防腐剂和等渗剂的活性剂的纯化的水溶液或其它溶液。优选将此类制剂调整至与鼻粘膜相容的 pH 和等渗状态。用于直肠或阴道给药的制剂可以具有合适载体的栓剂来呈现。

[0070] 给药方案将由主治医生和临床因素来确定。如医药领域所公知的,任一病人的剂

量取决于多种因素,包括病人的体形大小、身体表面积、年龄、待施用的具体化合物、性别、给药时间和途径、一般健康以及所同时施用的其它药物。典型的剂量可为例如 0.001 至 1000  $\mu\text{g}$  的范围(或在该范围内用于表达或抑制表达的核酸);然而,在此示例性范围之下或之上的剂量是可以预见的,特别是考虑到上述因素。通常,作为规律施用药物组合物的方案应当是在每天 1  $\mu\text{g}$  至 10mg 单位的范围。如果方案是连续注入,也应当分别在每千克体重每分钟 1  $\mu\text{g}$  至 10mg 单位的范围内。通过周期性评估可监测进展。用于肠胃外施用的制剂包括灭菌的水溶液或非水性溶液、混悬剂、和乳剂。非水性溶剂的实例有丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油、和可注射的有机酯例如油酸乙酯。水溶性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏、或不挥发性油。静脉内载体包括液体和营养补充物、电解质补充物(例如基于林格氏葡萄糖的那些),等等。也可存在防腐剂和和其它添加剂,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、和惰性气体等。另外,本发明的药物组合物可包含其它药剂,例如抗肿瘤剂和细胞毒性药物,取决于药物组合物的目的用途。此外,还可将药物组合物制成疫苗,例如如果本发明的药物组合物包含本发明的抗体则用于被动免疫,或者包含同源抗原用于主动免疫。使用肿瘤相关抗原例如 NY-ESO-1 治疗癌症的疫苗制剂在例如国际申请 WO2005/105139 中有所描述。另外,共同施用或顺序施用其它药剂可以是所期望的。

[0071] 治疗有效剂量或量指的是足以改善症状或状况的活性成分的量。此类化合物的治疗效力或毒性可通过标准药物方法用细胞培养物或实验动物来测定,例如 ED50(在 50% 的群体中治疗有效的剂量)和 LD50(50% 的群体致死的剂量)。治疗和毒性效果之间的剂量比例为治疗指数,其可用比例 LD50/ED50 来表达。优选地,组合物中的治疗剂以足以防止细胞的转移和瘤生长的量存在。

[0072] 根据本发明的药物组合物可优选用于肿瘤和癌症(包括但不限于黑素瘤、原发乳腺癌、肝细胞癌和转移瘤)的治疗。

[0073] 本发明的说明书和实施例公开和包含了这些和其它实施方案。涉及根据本发明所使用的任何一种材料、方法、用途和化合物的文献可从公共图书馆和数据库中获取,利用例如电子装置。例如可使用公共数据库“Medline”,其由位于美国国立卫生研究院的国家生物信息中心和/或国家医学图书馆所主办。其它数据库和网址例如属于欧洲分子生物学实验室(EMBL)一部分的欧洲生物信息学中心(EBI)是本领域技术人员已知的,并且也可利用因特网搜索引擎来获得。Berks, TIBTECH 12(1994), 352-364 给出了生物技术的专利信息概述以及对回溯检索和对当前了解有用的专利信息相关来源的探索。

[0074] 上述公开内容一般性描述了本发明。除非另有说明,赋予本文所用的术语的定义为 Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, 2000 修订且 2003 重印, ISBN 0198506732 中所提供的定义。贯穿本说明书的全文引用了几篇文件。全部的文献引文可在说明书的末尾、权利要求书之前找到。因此将所有引用文献的内容(包括本申请中引用的文献参考资料、出版的专利、公开的专利申请、以及厂家说明书、使用说明等)并入本文作为参考;然而,不承认所引用的任何文件实际上是关于本发明的现有技术。

[0075] 通过参考下面的特定实施例可获得更加完整的理解,本文提供所述实施例仅仅为了举例说明,并且不意在限制本发明的范围。

## 实施例

[0076] 接下来的实施例进一步举例说明本发明,但并决不应理解为限制本发明范围。常规方法例如本文所述的那些方法的详细说明可在引用的文献中找到,也可参见由 Beers 和 Berkow(Merck&Co., Inc. 2003) 编辑的" TheMerck Manual of Diagnosis and Therapy" 第 17 版。

[0077] 除非另有说明,本发明的实施将使用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术,其属于领域的技术范畴内。为进一步详述本发明实施中有用的常规技术,实施者可参考细胞生物学和组织培养方面的标准教科书和综述;也可参见实施例中所引用的参考文献。分子和细胞生物化学中的一般方法可在如下所述的标准教科书中找到:Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 第三版(Sambrook 等, Harbor Laboratory Press 2001);Short Protocols inMolecular Biology, 第四版(Ausubel 等 eds., John Wiley&Sons 1999);DNA Cloning, Volumes I and II(Glover ed., 1985);OligonucleotideSynthesis(Gait ed., 1984);Nucleic Acid Hybridization(Hames and Higginseds. 1984);Transcription And Translation(Hames 和 Higgins eds. 1984);Culture Of Animal Cells(Freshney 和 Alan, Liss, Inc., 1987);GeneTransfer Vectors for Mammalian Cells(Miller 和 Calos, eds.); CurrentProtocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition(Ausubel 等 eds.);and Recombinant DNA Methodology(Wu, ed., Academic Press).Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(Millerand Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory);Methods InEnzymology, Vols. 154 and 155(Wu 等, eds.);Immobilized Cells AndEnzymes(IRL Press, 1986);Perbal, A Practical Guide To MolecularCloning(1984);the treatise, Methods In Enzymology(Academic Press, Inc., N. Y.);Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer 和 Walker, eds., Academic Press, London, 1987);Handbook OfExperimental Immunology, Volumes I-IV(Weir 和 Blackwell, eds., 1986).Protein Methods(Bollag 等, John Wiley&Sons 1996);Non-viral Vectorsfor Gene Therapy(Wagner 等 eds., Academic Press 1999);Viral Vectors(Kaplitt&Loewy eds., Academic Press 1995);Immunology MethodsManual(Lefkovits ed., Academic Press 1997);以及 Cell and TissueCulture: Laboratory Procedures in Biotechnology(Doyle&Griffiths, JohnWiley&Sons 1998)。在本公开内容中涉及的遗传操作作用的试剂、克隆载体和试剂盒可从销售商处获得,例如 BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich、和 ClonTech。细胞培养和培养基收集的通用技术在 LargeScale Mammalian Cell Culture(Hu 等, Curr. Opin. Biotechnol. 8(1997), 148);Serum-free Media(Kitano, Biotechnology 17(1991), 73);Large ScaleMammalian Cell Culture(Curr. Opin. Biotechnol. 2(1991), 375); 和 Suspension Culture of Mammalian Cells(Birch 等, Bioprocess Technol. 19(1990), 251);Extracting information from cDNA arrays,Herzel 等, CHAOS 11(2001), 98-107 中有所概述。

[0078] 补充的方法

**[0079] 病人材料**

[0080] 将不必进行例行的组织病理学分析的肿瘤材料以及正常组织冷冻于液氮中。根据地方伦理委员会认可和病人签字的知情同意,从病人 C1 收集了用于分离记忆 B 细胞的血清和血液。

**[0081] 记忆 B 细胞培养**

[0082] 通过两步筛选方法从人外周血淋巴细胞分离得到记忆 B 细胞。利用 MACS 技术 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) 使用 pan B 细胞标志物 CD22 进行 B 细胞的阳性筛选。用 MACS 缀合的抗人 CD22mAbs、藻红蛋白缀合的 mAbs 抗人 IgD 和 APC 缀合的抗体抗人 IgM、IgA、CD3、CD8、CD56 (Becton Dickinson, Basel, Switzerland) 标记 PBL。利用 midiMACS 装置和 LS 柱 (Miltenyi) 通过阳性选择 CD22<sup>+</sup> 阳性细胞来分离 pan B 细胞,随后利用 MoFlo 细胞分选仪 (DakoCytomation, Fort Collins, USA) 筛选藻红蛋白和 APC 阴性细胞。然后在 B 细胞培养基中存在 CpG2006 (6, 15) 的情况下,用含有获自 B95-8 细胞的上清液的 EBV 孵育 CD22 阳性的 IgM、IgD、IgA 阴性的 B 细胞,所述培养基含有补充了 10% 胎牛血清的 RPMI 1640。在 B 细胞培养基中以每孔 50 个细胞将细胞接种于 30000 个辐射供给 PBL 之上,所述 PBL 从志愿者供体制备。

[0083] 培养 2 周之后,通过 ELISA 和在 NY-ESO-1 阳性自体或非自体组织切片上筛选记忆 B 细胞培养物的条件培养基中 NY-ESO-1 特异性抗体的存在。

**[0084] ELISA**

[0085] 用 25  $\mu$  l/ 孔的 PBS 中的 1  $\mu$  g/ml 重组 NY-ESO-1 蛋白在 4 $^{\circ}$ C 过夜包被 96 孔带状孔微平板 (Corning, NY, USA)。用 PBS-T 洗涤平板并在 4 $^{\circ}$ C 用含有 5% 奶粉 (Rapilait, Migros, Switzerland) 的 PBS 封闭过夜。室温下将 B 细胞条件培养基、病人血清和重组抗体制备物孵育 2 小时。利用驴抗人 IgG-HRP 二级抗体 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK) 测定人抗体对 NY-ESO-1 的结合,随后利用 TMB 底物溶液 (TMB, Sigma, Buchs, Switzerland) 测定 HRP 活性。

**[0086] 表位作图 ELISA**

[0087] 将跨越整个 NY-ESO-1 蛋白质的 20mer 肽用于包被 Maxisorp ELISA 平板 (Nunc, Rochester, NY), 在每个相邻的肽 (Peptides&Elephants, Nuthetal, Germany) 之间共有 10 个氨基酸的重叠。利用辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人 IgG+IgM (Nunc, Rochester, NY) 检测人重组抗体 Manhattan 或病人血清 (用 PBS 以 1 : 500 稀释)。

**[0088] 竞争性 ELISA**

[0089] 饱和实验鉴定出人单克隆抗体 Manhattan 对 NY-ESO-111-30 肽的半最大结合浓度为  $1 \times 10^{-9}$  M 或 0.15  $\mu$  g/ml。在竞争性实验中,将增加浓度的 NY-ESO-111-30 肽与 0.15  $\mu$  g/ml 浓度的 Manhattan 混和,然后将混合物转移至包被有 NY-ESO-111-30 的 ELISA 平板。

**[0090] 免疫组织化学**

[0091] 在石蜡包埋的 NY-ESO-1 阳性肿瘤组织和健康对照组织中冲出测定为直径 0.6mm 的肿瘤组织圆柱体。将肿瘤组织和健康对照组织的圆柱体所形成的一对放置在 2 $\times$ 4 网格的每个位置,其尺寸与 B 细胞培养板和常规多道移液器的微量滴定形式相一致。

[0092] 在福尔马林固定的、石蜡包被的组织上进行免疫组织化学。对所有切片实施热抗原恢复。在室温下利用多克隆兔抗人 IgG (Dako, Baar, Switzerland) 封闭非特异性荧光

30min,随后在1%的低脂奶(Rapilait, Migros, Switzerland)中10min进行第二次封闭。将一级抗体或B细胞条件培养基在4℃过夜孵育。利用Cy3缀合的针对人IgG的二级抗体(JacksonImmunoResearch Europe Ltd., Soham, UK)来显示人抗体与NY-ESO-1的结合。利用Cy3-或HRP缀合的链霉抗生物素蛋白(Sigma, Buchs, Switzerland)来显示生物素标记的重组人抗体Manhattan的染色。将小鼠抗NY-ESO-1单克隆抗体(Zymed, South San Francisco, USA)用作NY-ESO-1抗原的存在的阳性对照。

[0093] 在倒置荧光显微镜(Leica, Heerbrugg, Switzerland)上进行免疫荧光的分析。

#### [0094] 单细胞 RT-PCR

[0095] 将从记忆B细胞培养物获得的单细胞存放于PCR管中。利用特异于免疫球蛋白G重链、 $\kappa$ -轻链和 $\gamma$ -轻链恒定区的引物制备cDNA。根据标准方案进行免疫球蛋白重链和轻链可变区的PCR扩增(7,16)。利用半嵌套式PCR方法扩增免疫球蛋白重链和轻链可变区。用特异于IgG恒定区的引物和特异于重链和轻链Ig可变区家族的保守构架1区的引物库来进行第一轮PCR(7)。随后,如所述的使用半嵌套式PCR,所述PCR是利用含有限制性位点的特异于IgG恒定区的嵌套引物和特异于重链和轻链Ig可变区家族的构架1的引物(8)。将免疫球蛋白重链和轻链PCR产物克隆进含有IgG1、IgKappa或IgLambda的恒定区的载体。

#### [0096] 抗体生产和纯化

[0097] 在补充有10%超低IgG FCS、1%青霉素-链霉素和1%L-谷氨酰胺的DMEM(Invitrogen, Basel, Switzerland)中培养293-T人胚肾细胞。通过标准的磷酸钙沉淀法进行编码免疫球蛋白重链和轻链的质粒DNA的共转染。其后将细胞培养在补充有1% Nutridoma SP的无血清D-MEM(Roche, Rotkreuz, Switzerland)中。培养后8天收集上清液并利用快速蛋白质液相层析(FPLC)(Amersham Biosciences, Upsala, Sweden)在G蛋白柱(Amersham Biosciences, Upsala, Sweden)上纯化IgG。根据厂家说明书对纯化的Manhattan抗体进行生物素标记(SIGMA, Buchs, Switzerland)。

#### [0098] SK-MEL-37 肿瘤细胞的免疫荧光

[0099] 将SE-MEL-37细胞培养在显微镜载玻片上,在室温下用甲醛固定并用1% Triton X-100透化处理。在室温下用10%山羊血清封闭1h后,用PBS/1%山羊血清/0.2% Triton X-100中的1 $\mu$ g/ml的Manhattan或阴性对照抗体(以重组形式表达的具有人Fc区的hu8-18c5(17))在4℃下过夜孵育细胞。利用山羊抗人IgG Alexa **Fluor**® 546(1:300, Molecular Probes, Leiden, Netherland)在室温下染色1h以显示结合的抗体。利用Leica SP5显微镜进行显微镜检查。

#### [0100] 实施例1:来自黑素瘤病人PBL的NY-ESO-1特异性B细胞的鉴定

[0101] 通过在ELISA中和在组织活检获得的自体淋巴结切片上针对taaNY-ESO-1的血清滴度来选择黑素瘤病人。用表达全长NY-ESO-1的重组痘苗病毒接种后,观察到了通过肝脏中两个NY-ESO-1阳性转移瘤的消退所证实的部分临床反应。从病人中收集50ml外周血并分离代表Ig转换的记忆B细胞的表面IgM/IgD双阴性B细胞,并在利用改良的EB病毒转染方案永生之后培养这些细胞(6)。获得了100000个记忆B细胞并将其以每孔50个细胞种入96孔微量滴定板中。培养3周后,在培养孔中观察到了生长的克隆,并测定B细胞培养物条件化的培养基中NY-ESO-1特异性抗体的存在。作为第一轮筛选,进行了利用重组

全长 NY-ESO-1 作为抗原的 ELISA。如果 ELISA 信号超过了背景信号的 3 倍,则将其列为阳性。该方法从全部 2000 个孔中鉴定出 9 个 ELISA 阳性的记忆 B 细胞培养物孔。ELISA 所获得的信噪比的例子在图 1A 中有所描述。随后利用 NY-ESO-1 阳性肿瘤组织在免疫组织化学中测定 ELISA 阳性培养物。组织筛选的方案由 8 对封固在载玻片上的 NY-ESO-1 阳性乳癌组织和作为对照的健康乳房组织的组织柱组成。由于该测定的微型化,15  $\mu$ l 的 B 细胞条件培养基足以开展该测定。在同一载片上比较几个记忆 B 细胞培养物与阴性对照的条件培养基的能力使得荧光染色评估变得容易。

[0102] 对此组织测定中的 9 个 ELISA 阳性 B 细胞培养物的评估鉴定出一个培养物,其与其它 8 个相比获得了更高的染色强度。这在图 1B 中进行了图示说明,其中将用组织阳性培养物 12D7 获得的免疫荧光与用孔 9D1 获得的免疫荧光进行了比较,所述 9D1 被评定为无组织反应性的。

[0103] 由于关于 NY-ESO-1 特异性抗体的 IgG 亚类信息在分子克隆步骤中将已丢失,所以通过免疫组织化学利用 NY-ESO-1 阳性组织切片结合亚类特异性二级抗体抗人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 在此步骤中进行了测定。如图 1C 中所示,仅仅在用二级抗体抗 IgG1 时观察到对 NY-ESO-1 的组织染色。

[0104] 实施例 2:培养的记忆 B 细胞所分泌的 NY-ESO-1 特异性抗体的分子克隆

[0105] 先前对所鉴定的抗原特异性 EBV 转化的人记忆 B 细胞进行细胞克隆的尝试并未成功。因此,本发明涉及以从孔 12D7 收获的单一种类细胞的 RT-PCR 为基础的分子克隆策略,以便分离造成上述染色模式的抗体克隆。收获了 32 个细胞并将其以单细胞形式直接贮存于 PCR 管中。

[0106] 在 cDNA 合成之后,利用嵌套式 PCR 方法 (7) 扩增人免疫球蛋白重链和轻链可变区。收获了 32 个分选细胞中的 16 个细胞的重链和  $\kappa$  轻链序列。任何细胞的  $\lambda$  轻链可变区的 PCR 均未得到产物。序列分析鉴定出 4 种不同的抗体克隆,根据它们的相对丰度进行了编号。在 16 个细胞中的 8 个中发现了克隆 1,在 4 个细胞中发现了克隆 2,而克隆 3 和 4 均在两个细胞中被发现。

[0107] 然后测定,当以重组抗体表达时这四个克隆之一是否获得了如利用 B 细胞培养孔 12D7 的条件培养基所观察到的类似 NY-ESO-1 染色。为此,将重链和轻链可变序列克隆至提供了人 IgG1 重链和人  $\kappa$  轻链的恒定区的抗体表达载体 (8)。使用了 IgG1 的恒定区,因为孔 12D7 的条件培养基中所鉴定出的 NY-ESO-1 特异性抗体经测定为这种亚类 (图 1C)。

[0108] 通过在 ELISA 中和 NY-ESO-1 阳性组织切片上对重组抗体的再筛选进行了四个克隆的功能分析。为此,将四个克隆的重链和相应的轻链表达载体转染至 293HEK 细胞中,并在 ELISA 和免疫组织化学中直接检测转染细胞的上清液。如在抗人 -IgG-ELISA 中所测试的,所有四种上清液均产生功能性 IgG1。尽管克隆 1-3 在 ELISA 中未能显示出对 NY-ESO-1 的任何结合,4 号克隆却是直至所测试的最终稀释度 (1/100) 均为阳性 (图 2A)。该克隆还显示出在利用 NY-ESO-1 阳性组织切片的免疫组织化学中的特异染色 (图 2B)。

[0109] 这证明如在患者中发生的原始 NY-ESO-1 特异性抗体的免疫球蛋白可变区序列已经被找回。为简便起见,将克隆 12D7No. 4 命名为“Manhattan”并利用从瞬时转染的 HEK 细胞中获得的 G 蛋白纯化的材料进行进一步表征。

[0110] 实施例 3:NY-ESO-1 特异性人单克隆抗体 Manhattan 以  $10^{-10}$  的 KD 结合肽

NY-ESO-1<sub>11-30</sub>

[0111] 为鉴定 Manhattan 所识别的 NY-ESO-1 上的表位,利用跨越完整 NY-ESO-1 蛋白质的重叠肽进行了 ELISA。如图 3A 中所示,Manhattan 结合至代表了来自 NY-ESO-1 蛋白质的 11 至 30 位氨基酸的肽,但却不结合跨越氨基酸 1-20 或 21-40 的两相邻肽。这表明 Manhattan 所识别的表位位于 NY-ESO-1 的 20 位氨基酸左右的这两个肽的连接处。其中该表位还可被病人 C1 血清中所含的抗体识别(图 3B)。

[0112] 通过竞争性 ELISA 利用递增浓度的可溶性 NY-ESO-1<sub>11-30</sub> 肽竞争平板结合的肽来测定 Manhattan 的亲和力。如图 3C 中所述,Manhattan 与其同源肽相互作用的抗原结合平衡解离常数(KD)在较小的纳摩尔范围内。

[0113] 作为用于表征人单克隆抗体 Manhattan 的最后测定,对 NY-ESO-1 阳性细胞系 SK-MEL-37 进行了免疫荧光分析(9)。用 Manhattan 对细胞系的染色导致与利用核标志物 Hoechst 所获的染色共定位的核信号。

[0114] 结论

[0115] 以上实验提供了用于从人受试者的外周血淋巴细胞(PBLs)直接鉴定和分子克隆抗体的一般方法。本发明的方法可通过从黑素瘤病人中分离针对肿瘤相关抗原 NY-ESO-1 的人单克隆抗体来证实。从筛选短期永生化人记忆 B 细胞的培养物所分泌的抗体开始,鉴定出了在 ELISA 中和对 NY-ESO-1 阳性组织的免疫组织化学中呈阳性的培养物。在此初步筛选之后进行了分子克隆步骤以便鉴定和分离分泌在初步筛选中所检测的抗体的 B 细胞的单个克隆。如在单细胞 RT-PCR 之后通过序列分析所揭示的,孔 12D7 中仅存在 4 个不同的克隆,这表明最初所接种的 50 个细胞中仅有很少数是永生化和存活的。

[0116] 重组候选抗体的随后第二轮筛选致使鉴定出了单一单克隆抗体,其与由来源于病人 PBL 的培养的记忆 B 细胞所产生的原始抗体有相同染色模式。因此,能够成功地重新获得与病人中原始存在的相同的抗体。命名为“Manhattan”的该抗体识别 20 位氨基酸附近的 N 端表位,该表位为 NY-ESO-1 和 taa LAGE-1 所共享(9)。该表位还被病人 C1 的血清所识别,这支持了 Manhattan 作为存在于病人中的抗体的真正拷贝的这一观念。

[0117] 到目前为止 Manhattan 是第一个针对 NY-ESO-1 的人单克隆抗体,其也可成为分别针对肿瘤抗原和肿瘤相关抗原的第一个病人来源的亲和力成熟的抗体。本发明的新方法避免了 B 细胞的 EBV 转化所固有的一些困难,例如遗传不稳定性和低克隆效率(6,10)。尽管从 EBV 永生化 B 细胞中分离人单克隆抗体已在先前的研究中成功完成(6),但值得一提的是,在本发明的上述方法之前,在利用 EBV 转化和细胞克隆技术从同一病人中分离 NY-ESO-1 特异性抗体方面的先前尝试是失败的,尽管在细胞筛选中鉴定出了大量的记忆 B 细胞培养物。

[0118] 本发明的第二个目的是分离具有组织反应性的针对肿瘤相关抗原 NY-ESO-1 的抗体。这是由下述观察所启发的,即病人血清含有与从组织活检取出的 NY-ESO-1 阳性自体组织反应的抗体。为此,将微阵列技术用于记忆 B 细胞培养物的筛选。这与免疫组织化学的常规方法相比具有几个优势。首先,单一载片上的几个重复位置的可用性允许测定和比较几个样品。第二,在阴性组织旁边放置阳性组织的可能性大大增强了测定灵敏度,这是关键性的特性,因为利用记忆 B 细胞培养物的条件培养基培养常常导致非常弱的染色。第三,该测定形式的小型化需要更少的条件培养基,这也是决定性的因素,因为记忆 B 细胞培养物

的培养体积通常少于 200  $\mu$  l。

[0119] 病人血清和人单克隆抗体 Manhattan 识别固定化组织切片这一观察到的事实可能与体内情形至少在如下方面并不相关,所述方面为通过诱导由免疫效应机制所诱导的抗体在细胞水平上清除 NY-ESO-1 阳性细胞的直接治疗作用。NY-ESO-1 已被描述为胞内抗原 (11),并且在本研究中,至少在细胞系 SK-Me-37 中, NY-ESO-1 显示出定位于核内。在该背景中,利用生物素化的 Manhattan 对活的 SK-Me-37 的表面染色为阴性的。

[0120] Manhattan 的分离构成针对病人来源的肿瘤特异性抗体的治疗有效性评估的主要步骤。有几种可能的情况,据此这类抗体能够介导治疗效果。首先,其可作为佐剂用于其它疫苗方案。将 Manhattan 与 NY-ESO-1 共同施用所形成的免疫复合物能够引起细胞免疫反应诱导的增强 (12)。

[0121] 第二种可能性处理此类抗体在肿瘤病人中的病理生理作用。NY-ESO-1 经常诱导体液反应,其与病人的不良预后相关 (13)。由于随肿瘤生长抗原丰度增加,尽管这可能是仅有的相关性,还是可以假定此 B 细胞反应的致耐受性作用。根据这一情况,由坏死的或凋亡的肿瘤细胞释放的游离抗原将诱导强烈的 B 细胞反应,然后由于 Fc 受体介导的对免疫复合物的摄入, B 细胞将呈递抗原 (14)。由于 B 细胞可以是弱的 APC,该递呈可导致 NY-ESO-1 反应性 T 细胞耐受性的诱导,并因此防止肿瘤排斥。在肿瘤发展的早期施用重组 Manhattan F(ab)s 可干扰 B 细胞对抗原的摄入,因为 F(ab) 不能被 Fc 受体结合但仍能捕获抗原。这反过来又能防止 NY-ESO-1 特异性 T 细胞中的耐受性诱导。

[0122] 参考文献

[0123] 1. Sahin, U. , Tureci, O. , Schmitt, H. , Cochlovius, B. , Johannes, T. , Schmits, R. , Stenner, F. , Luo, G. , Schobert, I. , and Pfreundschuh, M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 :11810-11813, 1995.

[0124] 2. Jager, E. , Chen, Y. T. , Drijfhout, J. W. , Karbach, J. , Ringhoffer, M. , Jager, D. , Arand, M. , Wada, H. , Noguchi, Y. , Stockert, E. , Old, L. J. , and Knuth, A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1 : definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) -A2-binding peptide epitopes. *JExp Med*, 187 :265-270, 1998.

[0125] 3. Stevenson, F. K. Update on cancer vaccines. *Curr Opin Oncol*, 17 :573-577, 2005.

[0126] 4. Davis, I. D. , Chen, W. , Jackson, H. , Parente, P. , Shackleton, M. , Hopkins, W. , Chen, Q. , Dimopoulos, N. , Luke, T. , Murphy, R. , Scott, A. M. , Maraskovsky, E. , McArthur, G. , MacGregor, D. , Sturrock, S. , Tai, T. Y. , Green, S. , Cuthbertson, A. , Maher, D. , Miloradovic, L. , Mitchell, S. V. , Ritter, G. , Jungbluth, A. A. , Chen, Y. -T. , Gnjatic, S. , Hoffman, E. W. , Old, L. J. , and Cebon, J. S. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4+ and CD8+ T cell responses in humans. *PNAS* 10.1073/pnas.10110697101, 101 :10697-10702, 2004.

[0127] 5. Harris, M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *The Lancet Oncology*, 5 :292, 2004.

- [0128] 6. Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M. R., Murphy, B. R., Rappuoli, R., and Lanzavecchia, A. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med*, 10 :871–875, 2004.
- [0129] 7. Owens, G. P., Ritchie, A. M., Burgoon, M. P., Williamson, R. A., Corboy, J. R., and Gilden, D. H. Single-Cell Repertoire Analysis Demonstrates that Clonal Expansion Is a Prominent Feature of the B Cell Response in Multiple Sclerosis Cerebrospinal Fluid. *J Immunol*, 171 :2725–2733, 2003.
- [0130] 8. Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., and Nussenzweig, M. C. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*, 301 :1374–1377, 2003.
- [0131] 9. Chen, Y. T., Gure, A. O., Tsang, S., Stockert, E., Jager, E., Knuth, A., and Old, L. J. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 :6919–6923, 1998.
- [0132] 10. Kuppers, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.*, 3 :801–812, 2003.
- [0133] 11. Schultz-Thater, E., Noppen, C., Gudat, F., Durmuller, U., Zajac, P., Kocher, T., Heberer, M., and Spagnoli, G. C. NY-ESO-1 tumour-associated antigen is a cytoplasmic protein detectable by specific monoclonal antibodies in cell lines and clinical specimens. *Br J Cancer*, 83 :204–208, 2000.
- [0134] 12. Woelbing, F., Kostka, S. L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A. P., Knop, J., Udey, M. C., and von Stebut, E. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc $\gamma$  receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J. Exp. Med.*, 203 :177–188, 2006.
- [0135] 13. Jager, E., Stockert, E., Zidianakis, Z., Chen, Y. T., Karbach, J., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Old, L. J., and Knuth, A. Humoral immune responses of cancer patients against " Cancer-Testis " antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int J Cancer*, 84 :506–510, 1999.
- [0136] 14. Preiss, S., Kammertoens, T., Lampert, C., Willimsky, G., and Blankenstein, T. Tumor-induced antibodies resemble the response to tissue damage. *Int J Cancer*, 115 :456–462, 2005.
- [0137] 15. Hartmann, G. and Krieg, A. M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol*, 164 :944–953, 2000.
- [0138] 16. Barbas III, C. F. *Phage Display A Laboratory Manual.*, Dennis R. Burton, Jamie K. Scott & Gregg J. Silverman (eds.) 2001). Dennis R. Burton, Jamie K. Scott & Gregg J. Silverman (eds.) 2001), 2001.
- [0139] 17. Schluesener, H. J., Sobel, R. A., Linington, C., and Weiner, H. L. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces

---

relapses and demyelination in central nervous system autoimmunedisease. J Immunol, 139 :4016-4021, 1987.

[0001]

## 序 列 表

&lt;110&gt; 苏黎世大学

&lt;120&gt; 单克隆人肿瘤特异性抗体

&lt;130&gt; UN12A01/P-WO

&lt;150&gt; EP 07 005 180.0

&lt;151&gt; 2007-03-13

&lt;160&gt; 11

&lt;170&gt; PatentIn 版本 3.4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; V\_区

&lt;222&gt; (1).. (354)

&lt;223&gt; 12D7-可变重 (Vh)链序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (354)

&lt;400&gt; 1

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gta	cgg	cct	ggg	ggg	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Gly	
1			5						10					15		

tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	agc	ttt	att	gat	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ile	Asp	Tyr	
			20						25					30		

ggc	atg	agt	tgg	gtc	cgc	caa	gtt	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtc	144
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40					45				

[0002]

gct ggc atg aat tgg agc ggc gat aaa aaa ggt cat gcg gag tct gtg 192  
 Ala Gly Met Asn Trp Ser Gly Asp Lys Lys Gly His Ala Glu Ser Val  
 50 55 60

aag ggc cga ttc atc att tcc aga gac aac gcc aag aac acc ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

cta gaa atg agc agc cta aga gtc gaa gac acg gcc ctg tat ttt tgt 288  
 Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys  
 85 90 95

gcg aga ggg gag tat agc aat cgg ttc gac ccc cgg ggc cgg gga acc 336  
 Ala Arg Gly Glu Tyr Ser Asn Arg Phe Asp Pro Arg Gly Arg Gly Thr  
 100 105 110

ctg gtc acc gtc tcc tca 354  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ile Asp Tyr  
 20 25 30

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

Ala Gly Met Asn Trp Ser Gly Asp Lys Lys Gly His Ala Glu Ser Val  
 50 55 60

[0003]

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

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

Ala Arg Gly Glu Tyr Ser Asn Arg Phe Asp Pro Arg Gly Arg Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 3

<211> 336

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> V\_区

<222> (1)..(336)

<223> 12D7-可变κ轻(Vkappa)链序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 3

gat att gtg atg acc cag act cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga 48  
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15

cag ccg gcc tcc ctc tcc tgc agg tct agt caa agc ctc gta ttc act 96  
Gln Pro Ala Ser Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Thr  
20 25 30

gat gga aac acc tac ttg aat tgg ttt cag cag agg cca ggc caa tct 144  
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

[0004]

cca cgg cgc cta att tat aag gtc tct tct cgt gac cct ggt gtc ccc 192  
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Asp Pro Gly Val Pro  
 50 55 60

gac aga ttc agc ggc act ggg tca ggc act gat ttc aca ctg gaa atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile  
 65 70 75 80

agc agg gtg gag gct gag gat att ggg gtt tac tac tgc atg caa ggg 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ile Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

acg cac tgg cct ccg att ttt ggc cag ggg acc aag gtg gag atc aaa 336  
 Thr His Trp Pro Pro Ile Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

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

Gln Pro Ala Ser Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Thr  
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Asp Pro Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile  
 65 70 75 80

[0005]







<210> 11  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 肽

<220>  
<221> 肽  
<222> (1)..(20)  
<223> 来自 NY-ESO-1 蛋白质的肽，对应于成熟 NY-ESO-1 蛋白质的氨基酸残基 11 到 30；见例如 UniProtKB/Swiss-Prot 入口主要检索号 P78358

<400> 11

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

Pro Gly Gly Asn  
                  20

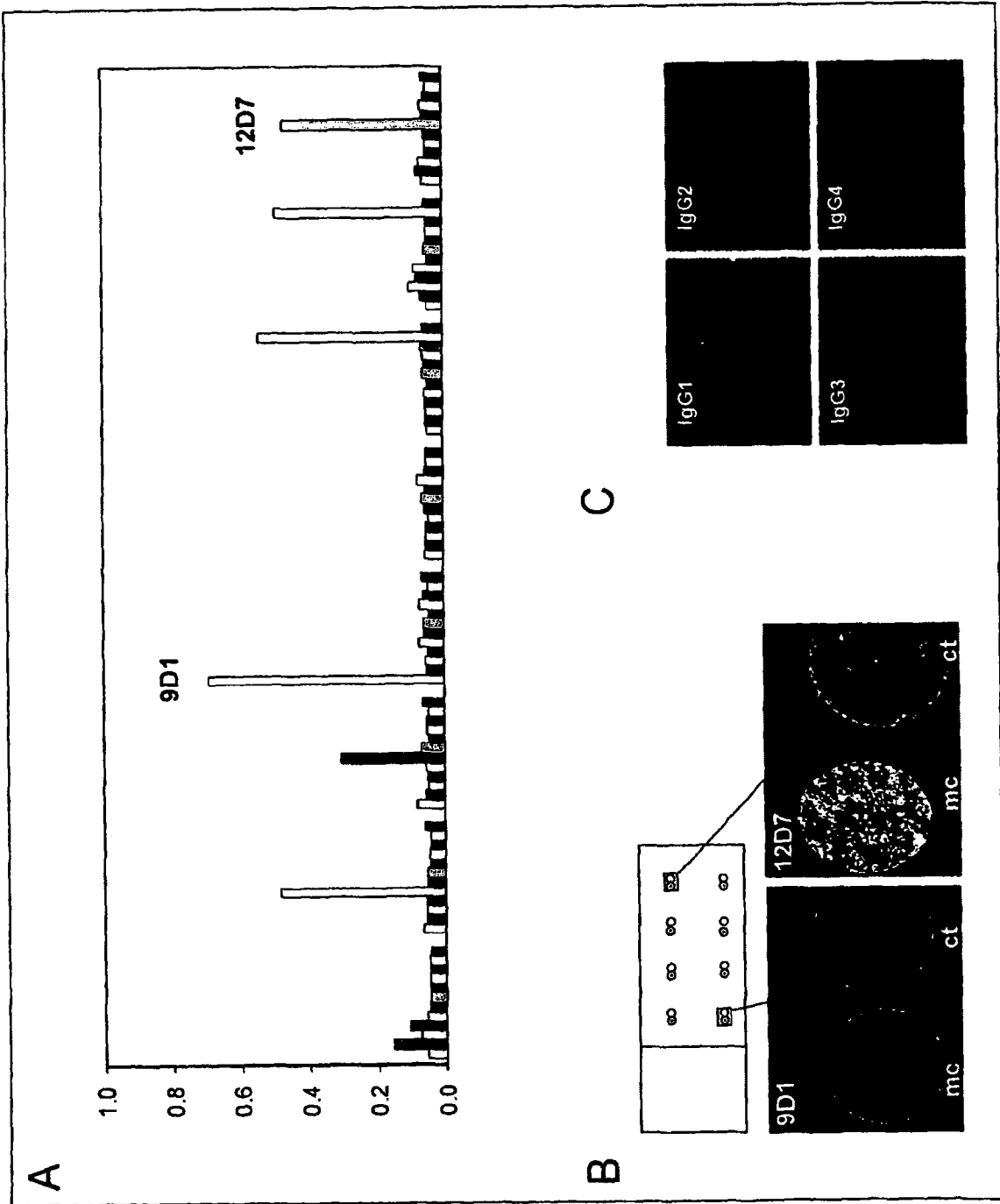


图 1

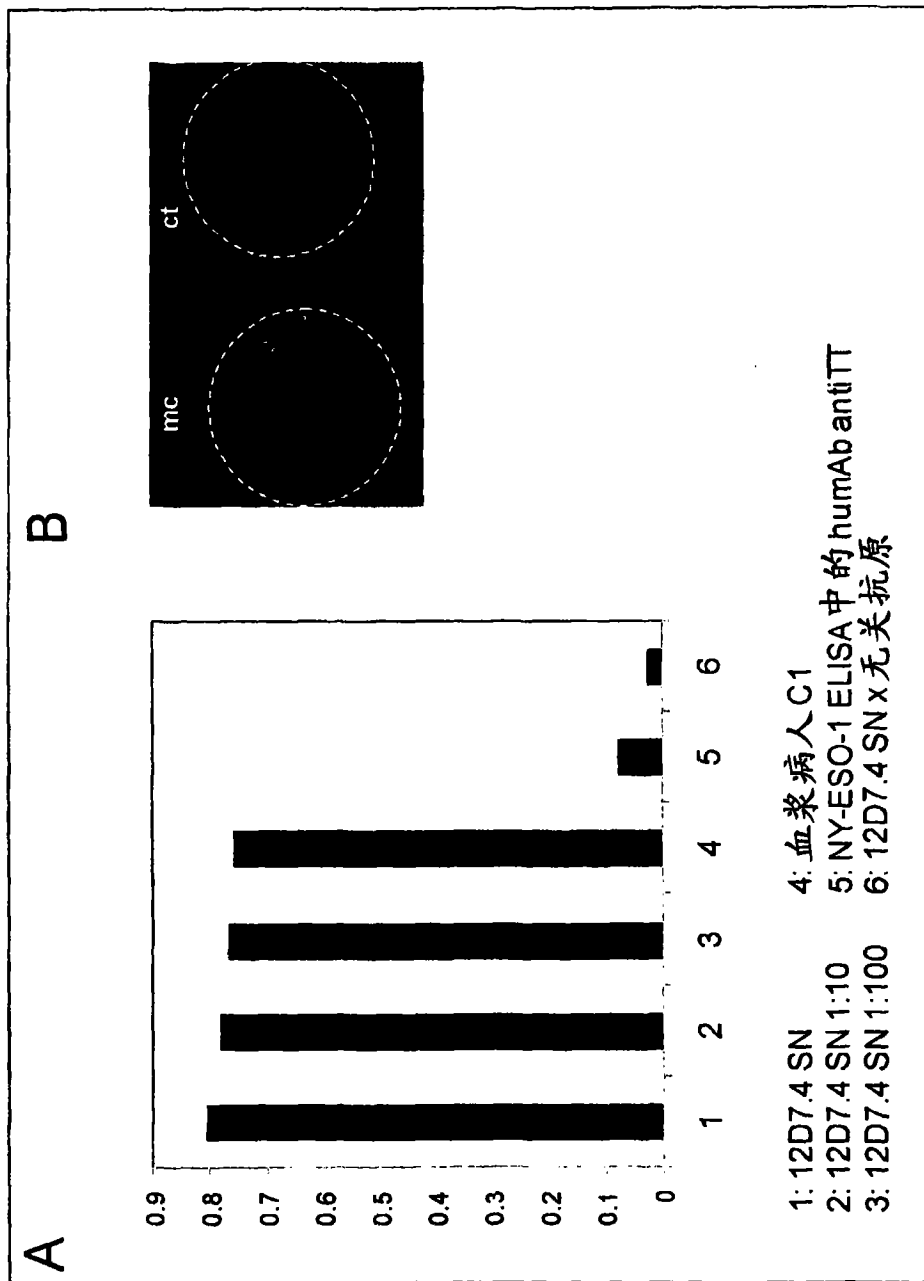


图 2

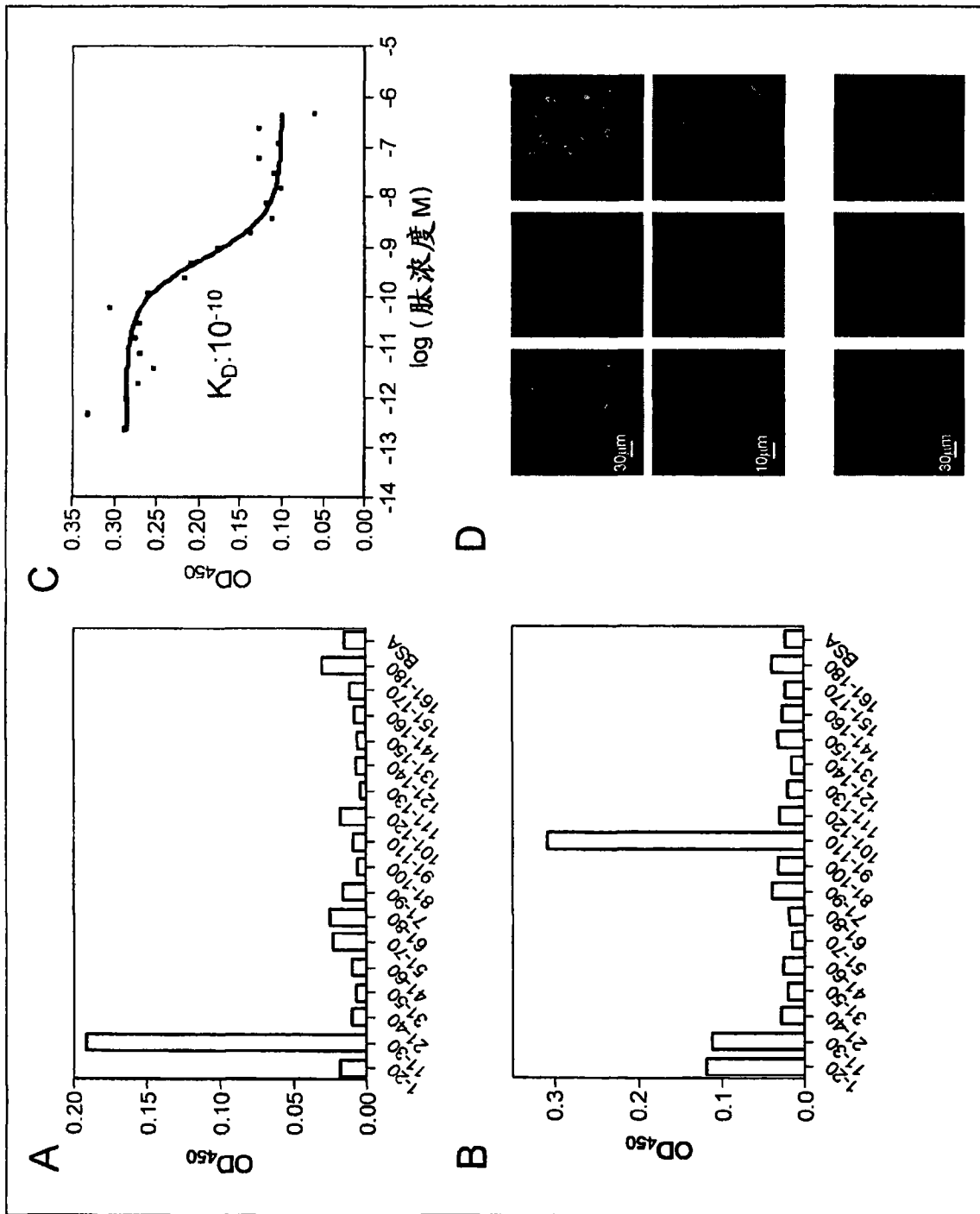


图 3

## 12D7 VH 链

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
 QVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFSFIDYGMSWVRQVPGKGLEWVAGMNWSGDKKG  
 -----FR3-----CDR3-----JH-----  
HAESVKGRFIISRDNAKNTLYLEMSLRVEDTALYFCARGEYSNRFDPRGRGTLVTVSS

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCAGCTTTATTGATTATGGCATGAGTTGGGTCCGCCAAGTCCAG  
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGCTGGCATGAATTGGAGCGGCGATAAAAAAGGTCATGCGGAG  
 TCTGTGAAGGGCCGATTCATCATTTCAGAGACAACGCCAAGAACACCCTGTATCTAGAAAT  
 GAGCAGCCTAAGAGTCGAAGACACGGCCCTGTATTTTTGTGCGAGAGGGGAGTATAGCAATC  
 GGTTTCGACCCCGGGGCCGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

## 12D7 VκL 链

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2--  
 DIVMTQTPLSLPVTLGQPASLSCRSSQSLVFTDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSSR  
 --FR3-----CDR3-----JK-----  
DPGVPDRFSGTGSGTDFTLAISRVEAEDIGVYYCMOGTHWPPIFGQGTKVEIK

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCCT  
 CTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATTCAGTGGAAACACCTACTTGAATTGGTTTC  
 AGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCACGGCGCCTAATTTATAAGGTCTCTTCTCGTGACCCTGGT  
 GTCCCGACAGATTCAGCGGCACTGGGTGAGGCACTGATTTCACACTGGAAATCAGCAGGGT  
 GGAGGCTGAGGATATTGGGGTTTACTACTGCATGCAAGGGACGCACTGGCCTCCGATTTTG  
 GCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAA

图 4

专利名称(译)	单克隆人肿瘤特异性抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN101652388B</a>	公开(公告)日	2013-12-25
申请号	CN200880008268.2	申请日	2008-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	苏黎世大学		
申请(专利权)人(译)	苏黎世大学		
当前申请(专利权)人(译)	苏黎世大学		
[标]发明人	C埃斯林格尔 S金茨勒 I阿贝拉 A齐佩利乌斯 D耶格 A克努特 RMD尼奇 H莫赫 N格贝尔斯		
发明人	C·埃斯林格尔 S·金茨勒 I·阿贝拉 A·齐佩利乌斯 D·耶格 A·克努特 R·M·D·尼奇 H·莫赫 N·格贝尔斯		
IPC分类号	C07K16/00 C07K16/30 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K2317/21 C07K16/3053 C07K16/30 A61K45/06 A61K49/0002 A61P15/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P43/00		
审查员(译)	刘睿		
优先权	2007005180 2007-03-13 EP		
其他公开文献	CN101652388A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了识别肿瘤相关抗原NY-ESO-1的新的人肿瘤特异性抗体及其片段、衍生物和变体。另外，描述了用于治疗肿瘤的包含此类抗体及其模拟物的药物组合物。

