



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02825488.0

[43] 公开日 2005 年 4 月 13 日

[11] 公开号 CN 1606569A

[22] 申请日 2002. 10. 18 [21] 申请号 02825488.0

[30] 优先权

[32] 2001. 10. 18 [33] US [31] 60/343,657

[32] 2002. 5. 2 [33] US [31] 60/377,716

[86] 国际申请 PCT/US2002/033470 2002. 10. 18

[87] 国际公布 WO2003/033674 英 2003. 4. 24

[85] 进入国家阶段日期 2004. 6. 18

[71] 申请人 拜尔药品公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 T·塔克伊基

N·杜布瓦-斯特林费罗

J·E·默菲 J·林肯伯格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 徐雁漪

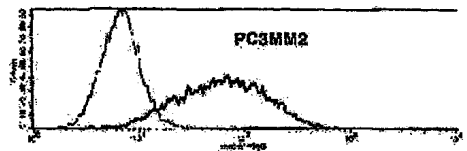
权利要求书 8 页 说明书 24 页 序列表 18 页
附图 9 页

[54] 发明名称 具有 MN 结合和细胞粘附中和活性的人类抗体

瘤细胞裂解。因此,所述抗体可用于治疗 MN 被上调的癌症,或者可用于诊断 MN 被上调的癌症。

[57] 摘要

本发明包括靶定蛋白聚糖结构域内的 GEEDLP 重复的单克隆人类 MN 抗体或 MN 抗体片段。所述 MN 细胞表面蛋白的蛋白聚糖结构域包括四个所述相同的 GEEDLP 重复。与需要的表位的结合是通过竞争 ELISA 证实的,其中,ELISA 信号可以通过与含有该重复的肽(PGEEDLPGEEDLP)一起温育而减弱 ELISA 信号。这种结合抑制作用还可以通过 Biacore 分析证实,其中,通过所述肽重复,可以抑制需要的抗体与固定化 MN 或蛋白聚糖肽的结合。除了与所述肽重复结合之外,人类抗-MN 抗体可以抑制 CGL-1 细胞与 MN 包被的塑料平板的细胞粘附。业已将人类抗 MN 抗体用于通过 FACS 和免疫组织化学方法诊断并且定量 MN 在癌细胞和肿瘤中的表达。还提供了一种例子,其中,人类抗 MN IgG1 通过抗体依赖型细胞介导的细胞毒性,介导肿



1. 一种纯化的人类抗体制剂，其中，所述抗体与MN蛋白结合。
2. 如权利要求1的纯化制剂，其中，所述抗体与MN蛋白的蛋白聚糖结构域结合。
- 5 3. 如权利要求1的纯化制剂，其中，所述抗体与MN蛋白的蛋白聚糖结构域内的GEEDLP重复区结合。
4. 如权利要求3的纯化制剂，其中，所述抗体以大约0.6 nM-大约1800 nM的 K_d 与所述人类MN蛋白结合。
5. 如权利要求3的纯化制剂，其中，所述抗体以大约0.6 nM-大约10 90 nM的 K_d 与所述人类MN蛋白结合。
6. 如权利要求1的纯化制剂，其中，所述人类抗体包括VH3-CDR3区，它包括选自SEQ ID NOS: 61-80的氨基酸序列。
7. 如权利要求1的纯化制剂，其中，所述人类抗体包括VH3-CDR1区，它包括选自SEQ ID NOS: 48-60的氨基酸序列。
- 15 8. 如权利要求1的纯化制剂，其中，所述人类抗体包括VH3-CDR3区，它包括SEQ ID NO: 64的氨基酸。
9. 如权利要求1的纯化制剂，其中，所述人类抗体包括VL λ 1-CDR3区，它包括SEQ ID NO: 81的氨基酸序列。
10. 如权利要求1的纯化制剂，包括VL λ 2-CDR1区，它包括选自20 SEQ ID NOS: 82-83的氨基酸序列。
11. 如权利要求1的纯化制剂，其中，所述人类抗体包括VL λ 2-CDR3区，它包括选自SEQ ID NOS: 84-89的氨基酸序列。
12. 如权利要求1的纯化制剂，其中，所述人类抗体包括选自SEQ ID NOS: 61和84，SEQ ID NOS: 62和87，SEQ ID NOS: 63和89，25 SEQ ID NOS: 64和84，SEQ ID NOS: 65和84，SEQ ID NOS: 66和85，SEQ ID NOS: 67和88的VH3-CDR3和VL2-CDR3氨基酸序列对。
13. 如权利要求1的纯化制剂，其中，所述人类抗体包括选自SEQ ID NOS: 61和86，SEQ ID NOS: 61和85，SEQ ID NOS: 61和87，SEQ ID NOS: 61和88，SEQ ID NOS: 61和89，SEQ ID NOS: 63和30 86，SEQ ID NOS: 63和85，SEQ ID NOS: 63和87，SEQ ID NOS: 63和88，以及SEQ ID NOS: 63和84的VH3-CDR3和VL2-CDR3氨基酸序列对。

14. 如权利要求1的纯化制剂,其中,所述人类抗体包括选自 SEQ ID NOS: 71和87, SEQ ID NOS: 61和87, SEQ ID NOS: 72和87, SEQ ID NOS: 73和87, SEQ ID NOS: 74和87, SEQ ID NOS: 75和87, SEQ ID NOS: 76和87, SEQ ID NOS: 77和87, SEQ ID NOS: 78和87, SEQ ID NOS: 79和87以及SEQ ID NOS: 80和87的VH3-CDR3和VL2-CDR3氨基酸序列。

15. 如权利要求1的纯化制剂,其中,所述人类抗体包括选自 SEQ ID NOS: 61和81, SEQ ID NOS: 69和81, 以及SEQ ID NOS: 70和81的VH3-CDR3和VL1-CDR3氨基酸序列。

16. 如权利要求1的纯化制剂,其中,所述人类抗体包括选自 SEQ ID NOS: 61和86和48, SEQ ID NOS: 61和86和49, SEQ ID NOS: 61和86和50, SEQ ID NOS: 61和86和51, SEQ ID NOS: 61和86和52, SEQ ID NOS: 61和86和53, SEQ ID NOS: 61和86和54, SEQ ID NOS: 61和86和55, SEQ ID NOS: 61和86和56, 以及SEQ ID NOS: 61和86和57的VH3-CDR3, VL2-CDR3, 和VH3-CDR1氨基酸序列。

17. 一种编码人类抗体的纯化制剂的核苷酸序列,其中,所述抗体与MN蛋白结合。

18. 如权利要求17的纯化制剂,其中,所述核苷酸序列包括选自 SEQ ID NOS: 1-13的VH3-CDR1区。

19. 如权利要求17的纯化制剂,其中,所述核苷酸序列包括VH3-CDR3区,它包括选自 SEQ ID NOS: 14-33的核苷酸序列。

20. 如权利要求17的纯化制剂,其中,所述核苷酸序列包括VL λ 1-CDR3区,它包括选自 SEQ ID NOS: 34-36的核苷酸序列。

21. 如权利要求17的纯化制剂,其中,所述核苷酸序列包括VL2-CDR1区,它包括选自 SEQ ID NOS: 37-38的核苷酸序列。

22. 如权利要求17的纯化制剂,其中,所述核苷酸序列包括VL λ 2-CDR3区,它包括选自 SEQ ID NOS: 39-44的核苷酸序列。

23. 如权利要求17的纯化制剂,其中,所述核苷酸序列包括选自 SEQ ID NOS: 1和14和41, SEQ ID NOS: 2和14和41, SEQ ID NOS: 3和14和41, 以及SEQ ID NOS: 4和14和41的VH3-CDR1, VH3-CDR3和VL2-CDR3核苷酸序列。

24. 如权利要求17的纯化制剂,其中,所述核苷酸序列包括选

自 SEQ ID NOS: 14 和 37 和 41, 以及 SEQ ID NOS: 14 和 38 和 41 的 VH3-CDR3, VL2-CDR1, 和 VL2-CDR3 核苷酸序列。

25. 如权利要求 17 的纯化制剂, 其中, 所述核苷酸序列包括选自 SEQ ID NOS: 14 和 41 和 1, SEQ ID NOS: 14 和 41 和 2, SEQ ID NOS: 5 14 和 41 和 3, SEQ ID NOS: 14 和 41 和 4, SEQ ID NOS: 14 和 41 和 5, SEQ ID NOS: 14 和 41 和 6, SEQ ID NOS: 14 和 41 和 7, SEQ ID NOS: 14 和 41 和 8, SEQ ID NOS: 14 和 41 和 9, SEQ ID NOS: 14 和 41 和 10 的 VH3-CDR3, VL2-CDR3 和 VH3-CDR1 核苷酸序列。

26. 如权利要求 17 的纯化制剂, 其中, 所述核苷酸序列包括选自 SEQ ID NOS: 14 和 39, SEQ ID NOS: 15 和 42, SEQ ID NOS: 16 和 44, SEQ ID NOS: 17 和 39, SEQ ID NOS: 18 和 39, SEQ ID NOS: 19 和 40, 以及 SEQ ID NOS: 20 和 43 的 VH3-CDR3, VL2-CDR3 核苷酸序列。

27. 如权利要求 17 的纯化制剂, 其中, 所述核苷酸序列包括选自 SEQ ID NOS: 14 和 34, SEQ ID NOS: 22 和 34, SEQ ID NOS: 22 和 35, SEQ ID NOS: 22 和 36, 以及 SEQ ID NOS: 23 和 34 的 VH3-CDR3, VL1-CDR3 核苷酸序列。

28. 如权利要求 17 的纯化制剂, 其中, 所述核苷酸序列包括选自 SEQ ID NOS: 14 和 41, SEQ ID NOS: 14 和 40, SEQ ID NOS: 14 和 42, SEQ ID NOS: 14 和 43, SEQ ID NOS: 14 和 44, SEQ ID NOS: 20 16 和 41, SEQ ID NOS: 16 和 40, SEQ ID NOS: 16 和 42, SEQ ID NOS: 16 和 43 以及 SEQ ID NOS: 16 和 39 的 VH3-CDR3, VL2-CDR3 核苷酸序列。

29. 如权利要求 17 的纯化制剂, 其中, 所述核苷酸序列包括选自 SEQ ID: 24 和 42, SEQ ID: 14 和 42, SEQ ID: 25 和 42, SEQ ID: 26 和 42, SEQ ID: 27 和 42, SEQ ID: 28 和 42, SEQ ID: 29 和 42, SEQ ID: 30 和 42, SEQ ID: 31 和 42, SEQ ID: 32 和 42, 以及 SEQ ID: 33 和 42 的 VH3-CDR3, VL2-CDR3 核苷酸序列。

30. 一种包括权利要求 17 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

31. 一种包括权利要求 18 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

32. 一种包括权利要求 19 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

33. 一种包括权利要求 20 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

5 34. 一种包括权利要求 21 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

35. 一种包括权利要求 22 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

10 36. 一种包括权利要求 23 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

37. 一种包括权利要求 24 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

38. 一种包括权利要求 25 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

15 39. 一种包括权利要求 26 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

40. 一种包括权利要求 27 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

20 41. 一种包括权利要求 28 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

42. 一种包括权利要求 29 的多核苷酸的表达载体, 其中, 所述载体编码 MN 结合抗体。

43. 一种包括权利要求 30 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

25 44. 一种包括权利要求 31 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

45. 一种包括权利要求 32 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

30 46. 一种包括权利要求 33 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

47. 一种包括权利要求 34 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

48. 一种包括权利要求 35 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

49. 一种包括权利要求 36 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

5 50. 一种包括权利要求 37 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

51. 一种包括权利要求 38 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

10 52. 一种包括权利要求 39 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

53. 一种包括权利要求 40 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

54. 一种包括权利要求 41 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

15 55. 一种包括权利要求 42 的表达载体的宿主细胞, 其中, 所述宿主细胞能表达 MN 结合抗体。

56. 一种制备人类抗体的方法, 包括以下步骤:

在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 31 的宿主细胞; 并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

20 57. 一种制备人类抗体的方法, 包括以下步骤:

在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 32 的宿主细胞; 并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

58. 一种制备人类抗体的方法, 包括以下步骤:

25 在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 33 的宿主细胞; 并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

59. 一种制备人类抗体的方法, 包括以下步骤:

在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 34 的宿主细胞; 并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

60. 一种制备人类抗体的方法, 包括以下步骤:

30 在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 35 的宿主细胞; 并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

61. 一种制备人类抗体的方法, 包括以下步骤:

在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 36 的宿主细胞；并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

62. 一种制备人类抗体的方法，包括以下步骤：

5 在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 37 的宿主细胞；并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

63. 一种制备人类抗体的方法，包括以下步骤：

在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 38 的宿主细胞；并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

64. 一种制备人类抗体的方法，包括以下步骤：

10 在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 39 的宿主细胞；并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

65. 一种制备人类抗体的方法，包括以下步骤：

在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 40 的宿主细胞；并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

15 66. 一种制备人类抗体的方法，包括以下步骤：

在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 41 的宿主细胞；并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

67. 一种制备人类抗体的方法，包括以下步骤：

20 在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 42 的宿主细胞；并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

68. 一种制备人类抗体的方法，包括以下步骤：

在能表达所述抗体的条件下培养权利要求 43 的宿主细胞；并且从所述宿主细胞培养物中纯化所述人类抗体。

25 69. 一种用于治疗 MN 蛋白在某些细胞中表达的人类疾病的方法，包括以下步骤：

a) 提供具有 MN 蛋白在某些细胞中表达的状况的人类；和

b) 给所述人类施用有效量的人 MN 抗体化合物，所述化合物包括 MN 抗体和细胞毒性剂，其中，所述细胞毒性剂能够在所述 MN 表达细胞中诱导细胞死亡。

30 70. 如权利要求 69 的方法，其中，所述疾病选自下组：肾细胞癌，食道癌，宫颈癌，恶性结肠癌，和非小细胞肺癌。

71. 如权利要求 69 的方法，其中，所述抗体包括选自 SEQ ID NOS:

61-80的 VH3-CDR3 区。

72. 如权利要求 69 的方法，其中，所述抗体包括选自 SEQ ID NOS: 48-60 的 VH3-CDR1 区。

73. 如权利要求 69 的方法，其中，所述抗体包括由 SEQ ID NO: 81 组成的 VL1-CDR3 区。

74. 如权利要求 69 的方法，其中，所述抗体包括选自 SEQ ID NOS: 82-83 的 VL2-CDR1 区。

75. 如权利要求 69 的方法，其中，所述抗体包括选自 SEQ ID NOS: 84-89 的 VL2-CDR3 区。

76. 一种检测测试制剂中 MN 抗原的方法，包括以下步骤：

- a) 让所述测试制剂与特异性结合 MN 抗原的抗体接触，和
- b) 分析所述测试制剂中抗体-MN 抗原复合物的存在。

77. 如权利要求 76 的方法，其中，所述抗体包括可检测的标记。

78. 如权利要求 76 的方法，其中，所述抗体与固体支持物结合。

79. 一种辅助诊断 MN 蛋白水平升高的疾病的方法，包括以下步骤：

- a) 让来自被怀疑患有所述疾病的患者的样品与结合 MN 的人类抗体接触；和

b) 分析抗体-MN 复合物的存在，检测出大于正常样品中复合物量的复合物量，可确定所述患者有可能患有所述疾病。

80. 如权利要求 79 的方法，其中，所述抗体包括可检测的标记。

81. 如权利要求 79 的方法，其中，所述抗体与固体支持物结合。

82. 如权利要求 79 的方法，其中，所述抗体包括选自 SEQ ID NOS: 61-80 的 VH3-CDR3 区。

83. 如权利要求 79 的方法，其中，所述抗体包括选自 SEQ ID NOS: 48-60 的 VH3-CDR1 区。

84. 如权利要求 79 的方法，其中，所述抗体包括由 SEQ ID NO: 81 组成的 VL1-CDR3 区。

85. 如权利要求 79 的方法，其中，所述抗体包括选自 SEQ ID NOS: 82-83 的 VL2-CDR1 区。

86. 如权利要求 79 的方法，其中，所述抗体包括选自 SEQ ID NOS: 84-89 的 VL2-CDR3 区。

87. 一种药物组合物，包括与 MN 蛋白结合的人类抗体和可以药用的载体。

具有 MN 结合和细胞粘附中和活性的人类抗体

5 本发明要求申请日为 2001 年 10 月 18 日的共同未决临时申请流水号 60/343657 和申请日为 2002 年 5 月 3 日的共同未决临时申请流水号 60/377716 的优先权，并且将它们收作参考。

本申请包括记录在 CD 上的序列列表，它是本申请的一部分。所述序列列表是 1.44 MB ASCII 文件，名称为“具有 MN 结合和细胞粘附中和活性的人类抗体”，是 2002 年 10 月建立的。

10

发明领域

本发明涉及 MN 结合人类抗体。

发明背景

15 MN 是一种细胞表面蛋白，它可以在多种临床癌样品中检测到，但是在相关器官的正常组织中缺乏。业已克隆了 MN cDNA (Pastorek, J. 等, *Oncogene* (1994), 9, 2877-2888), 并且推测的蛋白由信号肽, 蛋白聚糖相关序列, 碳酸酐酶结构域, 跨膜片段, 和短的细胞内尾组成。MN 通常是在胃和胆管粘膜中表达的 (Liao, S. Y., 等, *Am J Pathol* (1994), 145, 598-609), 并且在位于小肠中的高度增殖性正常细胞中表达 (Saarnio, J. 等, *J Histochem Cytochem* (1998) 46, 497-504)。不过, MN 是在 100% 肾细胞癌 (Liao, S. Y., *Cancer Res* (1997) 57, 2827-2831), 100% 的食道癌 (Turner, J. R. *Hum Pathol*, (1997) 28, 740-744), 超过 90% 的宫颈癌 (Liao, S. Y., 等, *Am J Pathol* (1994), 20 145, 598-609), 76% 的恶性结肠癌 (Saarnio, J. 等, *Am J Pathol* (1998) 153, 279-285), 80% 的非小细胞肺癌 (Vermylen, P. 等, *Eur Respir J* (1999), 14, 806-811), 以及在 48% 的乳腺癌 (Chia, S. K. 等, *J. Clin. Oncol.* (2001) 19, 3660-3668) 中异位表达的。

25 业已披露了针对 MN 的抗体。在小鼠模型中, 小鼠单克隆抗体 G250 能有效降低肾细胞癌肿瘤的尺寸 (van Dijk, J. 等, *Int J. Cancer* (1994) 56, 262-268)。然后, 将这种抗体制备成包括人类 Fc 区和小鼠可变区的嵌合抗体。嵌合 G250 抗体仅有 66% 是人类的, 导致了与相

30

当的完全人抗体相比，在人体中具有更大的免疫原性几率。因此，用33%的小鼠抗体治疗，可能导致人类抗小鼠免疫原性反应，使得抗癌治疗无效。由嵌合抗体产生的这些问题，明显产生了对针对MN的完全人类抗体的需要。

5

发明概述

本发明包括靶定蛋白聚糖结构域内的GEEDLP重复的单克隆人类MN抗体或MN抗体片段。所述MN细胞表面蛋白的蛋白聚糖结构域包括四个所述相同的GEEDLP重复。与需要的表位的结合是通过竞争ELISA证实的，其中，ELISA信号可以通过与含有该重复的肽(PGEEDLPGEEDLP)一起温育而减弱ELISA信号。这种结合抑制作用还可以通过Biacore分析证实，其中，通过所述肽重复，可以抑制需要的抗体与固定化MN或蛋白聚糖肽的结合。除了与所述肽重复结合之外，人类抗-MN抗体可以抑制CGL-1细胞与MN包被的塑料平板的细胞粘附。业已将人类抗MN抗体用于通过FACS和免疫组织化学方法诊断并且定量MN在癌细胞和肿瘤中的表达。还提供了一种例子，其中，人类抗MN IgG1通过抗体依赖型细胞介导的细胞毒性，介导肿瘤细胞裂解。因此，所述抗体可用于治疗MN被上调的癌症，或者可用于诊断MN被上调的癌症。

20

附图简述

图1 通过FACS分析的表达MN的PC3mm2人类前列腺癌细胞

图2 SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 83的序列识别

图3 Fab展示载体pMORPH18 Fab 1

图4 pMORPHx9-Fab1-FS的载体图

25

图5 用抗MN抗体MN-3阻断细胞粘附作用的图象

图6 MN抗体1-39的抗体结合对。展示了Biacore结合亲和力。

发明详述

本发明提供了与MN结合的人类抗体。所述抗体被用于多种诊断和治疗目的。所述目的包括：

人类MN抗体的特征

本文所说的“抗体”包括完整的免疫球蛋白分子（例如IgG1，

IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA), 以及它们的片段, 如 Fab, F(ab')₂, scFv, 和 Fv, 它们能与人类 MN 蛋白的表位特异性结合。能特异性结合 MN 的抗体所提供的检测信号, 至少比由在免疫化学测定中使用的其他蛋白所提供的检测信号强 5, 10, 或 20 倍。特异性结合人类 MN 的抗体, 优选不能在免疫化学测定中检测其他蛋白, 并且能够使 MN 从溶液中免疫沉淀。

在本说明书中对 VL2 和/或 VL3 的引用, 是为了说明轻链的 λ 类型。

与 MN 结合的人类抗体的 K_d , 可以用本领域已知的任何方法分析, 包括诸如实时双分子相互作用分析 (BIA) 的技术 (Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 2338-2345, 1991, 和 Szabo 等, Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705, 1995)。BIA 是一种用于实时研究生物特异性相互作用的技术, 而不用对任何相互作用剂进行标记 (例如 BIAcore™)。可以将光学现象表面细胞质等离子共振 (SPR) 的改变用作生物分子之间实时反应的指标。

在 BIAcore™分析中, 本发明的人类抗体能特异性地结合人类 MN, K_d 为大约 0.6 nM (6×10^{-10} nM)-大约 1800 nM (1.8×10^{-6} nM), 参见图 6。本发明的更优选的人类抗体, 能够以大约 0.6 nM-大约 90 nM 的 K_d 特异性地结合人类 MN, 本发明最优选的抗体能够以大约 4nM 的 K_d 结合人类蛋白。

正如所预想的, 本发明的抗体优选能与所述蛋白聚糖结构域内的 GEEDLP 重复结合, 所述结构域包括四个这样的相同的重复。与需要的表位的结合, 可以用本领域已知的任何方法证实, 包括诸如竞争 ELISA 的技术 (Zavada 等, Br. J. of Cancer 82, 1808-1813, 2000), 其中, 通过与含有这种重复的肽 (PGEEDLPGEEDLP) 共同温育, 可以减弱 ELISA 信号, 不过, 不会受到类似肽 (PSEEDSPREEDP) 的抑制, 这种肽同样存在于所述蛋白聚糖结构域内。这种形式的结合抑制, 还可以通过 BIAcore™技术证实, 其中, 需要的抗体与固定化的 MN 或蛋白聚糖肽的结合, 可以通过与所述肽重复温育而抑制。本发明的抗体优选还能够抑制 MN 表达细胞与 MN 包被的塑料平板 ELISA 的细胞粘附 (Zavada 等, Br. J. of Cancer 82, 1808-1813, 2000)。

本发明利用 Morphosys 噬菌体-抗体技术制备抗 MN 蛋白的完全的人类抗体。所述 Morphosys 文库是基于人类主链的, 大大降低了免疫原

性的可能性。

通过筛选 MorphoSys HuCAL Fab 文库，业已鉴定了具有 MN 结合和细胞粘附中和特征的多种人类抗体。将为了 HuCAL 文库而组装的 CDR 盒，设计成获得 5 个到 28 个氨基酸残基的长度分布，覆盖了从 95 号位置到 102 号位置的片段。Knappik 等，J. Mol. Biol. 296, 57-86, 2000。业已通过筛选 MorphoSys HuCAL Fab 文库，鉴定了具有上述 MN 结合和细胞粘附中和特征的多种人类抗体。将为了 HuCAL 文库而组装的 CDR 盒，设计成获得 5 个到 28 个氨基酸残基的长度分布，覆盖了从 95 号位置到 102 号位置的片段。Knappik 等，J. Mol. Biol. 296, 57-86, 2000。在本发明的某些实施方案中，人类抗体的 VH3-CDR3 区具有如图 2 中的 SEQ ID NOS: 61-80 所示出的氨基酸序列。在本发明的其他实施方案中，人类 MN 抗体的 VL λ 1-CDR3, VL λ 2-CDR3, 和 VL λ 2-CDR1 区具有如图 2 中的 SEQ ID NOS: 81-89 所示出的氨基酸序列，其中具有如 SEQ ID NOS: 48-60 所示的优化 VH3-CDR1 序列，这两种序列都在图 2 中示出。具有 MN 结合和细胞粘附中和活性的人类抗体如表 1 和 2 所示；在所述抗体内的可变区（CDR3 环）如表 1 和 2 所示。

获得人类抗体

可以按以下方法从 MorphoSys HuCAL 文库中鉴定上述具有 MN 结合和细胞粘附中和活性的人类抗体。将人类 MN 包被在微量滴定板上，并且与 MorphoSys HuCAL-Fab 噬菌体文库温育（参见实施例 1）。没有与 MN 结合的所述噬菌体连接的 Fabs，可以从所述平板上洗掉，仅留下与 MN 紧密结合的噬菌体。可以通过改变 pH，洗脱结合的噬菌体，并且通过感染大肠杆菌宿主而扩增。可以重复该淘选过程一次或两次，以便富集与 MN 紧密结合的噬菌体连接的抗体群。然后表达来自富集的合并物的 Fabs，纯化，并且通过 ELISA 分析筛选。然后利用 BiAcCore™ 分析检测所鉴定的命中物（hit）的结合，并且通过上述细胞粘附分析进一步筛选这些命中物。

HuCAL-Fab 文库的初步淘选还可以用 MN 作抗原在第一轮中进行，随后在第二轮中用与诸如 BSA 或运铁蛋白的载体蛋白融合的 MN 肽进行，而在第三轮中，再次用 MN 抗原进行。可用于淘选的人类 MN 肽包括人类 MN SEQ I. D. 45-47。所述肽序列源于 MN 蛋白聚糖序列，该序列

被认为与细胞粘附相关。

另外，淘选可以用 MN 表达细胞作抗原进行。例如，可以用生物素标记用 MN 抗原转染过的细胞。然后将所述转染过的细胞与未标记过的非 MN 转染的细胞混合，标记过的细胞：未标记过的细胞的比例为 1:

5 10。将噬菌体文库添加到所述细胞中，并且所述生物素化的，携带 MN 的细胞用与磁铁结合的链亲和素结合的磁珠固定。非特异性噬菌体被洗掉，并且通过消除所述磁场，特异性地洗脱携带 MN 的细胞。可以对所述特异性结合的噬菌体进行扩增，以便进行其他轮次的细胞淘选，或交替进行肽和/或蛋白淘选。

10 所述筛选方法的细节披露于下面的具体实施例中。本领域技术人员可以想到用于筛选高活性特异性抗体或抗体片段的其他选择方法，并且用于鉴定人类 MN 抗体。

具有上述特征的人类抗体，还可以从任何能表达所述抗体的细胞中纯化，包括用编码抗体的表达构建体转染过的宿主细胞。在能表达所述人类抗体的条件下培养所述宿主细胞。用本领域所熟知的方法，从正
15 常情况下与所述细胞中的抗体缔合的其他化合物中分离纯化的人类抗体，所述化合物如某些蛋白，碳水化合物，或脂类。所述方法包括，但不局限于大小排阻层析，硫酸铵分级分离，离子交换层析，亲和层析，和制备型凝胶电泳。纯化的人类抗体的制剂纯度为至少为 80%；优选所述制剂的纯度为 90%，95%，或 99%。可以通过本领域已知的任何方法评估所述制剂的纯度，如 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。本发明纯化的人类
20 抗体制剂可以包括具有上述 MN 结合和中和特征的一种以上类型的人类抗体。

另外，可以用化学方法生产人类抗体，以便合成它的氨基酸序列，
25 如利用固相技术进行直接肽合成 (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Roberge 等, Science 269, 202-204, 1995)。蛋白合成可以用人工技术或通过自动化方法进行。例如，自动化合成可以用 Applied Biosystems 431A 肽合成仪 (Perkin Elmer) 进行。人类抗体片段可任选地分别合成，并且用化学方法组合，以便产生完整长度的
30 分子。

可以通过制备型高效液相层析，基本纯化新合成的分子 (例如 Creighton, PROTEINS : STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES,

WH Freeman and Co. , New York, N. Y. , 1983)。可以通过氨基酸分析或测序,证实合成多肽的组成(例如,使用Edman降解方法)。

人类抗体治疗用途的评估

5 为了评估将特定抗体治疗性地用于治疗癌症的能力,例如,可以在小鼠异种移植肿瘤模型中体内测试所述抗体。如果需要,在治疗评估之前,可以将人类 Fab MN 抗体转化成 IgG1 抗体。这种转化披露于实施例 5 中,并且,治疗模型的一种例子详细披露于实施例 9 中。还可以利用实施例 13 中所披露的抗体依赖型细胞介导的细胞毒性分析测试用途。

编码人类 MN 抗体的多核苷酸

本发明提供了编码人类 MN 抗体的多核苷酸。例如,可以将所述多核苷酸用于生产多种用于治疗或诊断目的的抗体。

15 在 SEQ ID NOS: 14-33 中示出了可用于编码 VH-CDR3 区的多核苷酸。在 SEQ ID NOS: 34-44 中示出了可用于编码 VL-CDR3 区的多核苷酸。在图 2 中示出了从 MorphoSys HuCAL 文库中分离的编码本发明人类抗体重链和轻链的多核苷酸。在 SEQ ID NOS:1-13 中示出了其他优化的 VH3-CDR1 序列。

20 存在于宿主细胞中的本发明的多核苷酸可以与其他细胞成分,如膜成分,蛋白,和脂类分离。多核苷酸可以由细胞产生,并且用标准核酸纯化技术分离,或者用诸如聚合酶链式反应(PCR)的扩增技术合成,或使用自动化合成仪合成。用于分离多核苷酸的方法是常规方法,并且为本领域所公知。用于获得多核苷酸的任何这样的技术都可用于获得编码本发明抗体的分离的多核苷酸。例如,可以用限制酶和探针分离编码

25 所述抗体的多核苷酸。制剂中的分离的多核苷酸没有或至少 70, 80 或 90%不含其他分子。

本发明的人类抗体编码 cDNA 分子,可以通过标准分子生物学技术,用 mRNA 作模板制备。然后,可以用分子生物学技术领域所公知的,并且披露于诸如 Sambrook 等(1989)的手册中的分子生物学技术复制

30 cDNA 分子。诸如 PCR 的扩增技术,可用于获得所述多核苷酸的其他拷贝。

另外,可以用合成化学技术合成本发明的多核苷酸编码抗体。遗

传密码的简并性，使得能够合成其他核苷酸序列，该序列编码的抗体具有诸如分别在 SEQ ID NOS: 48-89 中所示出的 VH-CDR3, VH-CDR1 或 VL-CDR3, 轻链或重链氨基酸序列中的一个。

5 多核苷酸的表达

为了表达编码本发明人类抗体的多核苷酸，可以将所述多核苷酸插入包括转录和翻译所插入的编码序列所必需的元件的表达载体。可以将本领域技术人员所熟知的方法用于构建包括编码人类抗体的序列，和合适的转录和翻译控制元件的表达载体。所述方法包括体外重组 DNA 技术，合成技术，和体内遗传重组。例如，所述技术披露于以下文献中：Sambrook 等 (1989)，和 Ausubel 等，CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, JohnWiley & Sons, New York, N. Y. , 1995。还可参见下面的实施例 1-3。

可以采用多种表达载体/宿主系统，以便包括并且表达编码本发明人类抗体的序列。所述表达载体/宿主包括，但不局限于微生物，如用重组噬菌体转化过的细菌，质粒或粘粒 DNA 表达载体；用酵母表达载体转化过的酵母，用病毒表达载体（例如，杆状病毒）感染过的昆虫细胞系统，用病毒表达载体（例如，花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV）或细菌表达载体（例如 Ti 或 pBR322 质粒）转化过的植物细胞系统，或动物细胞系统。

所述控制元件或调控序列是载体的以下非翻译区——增强子，启动子，5'和 3'非翻译区——它们与宿主细胞蛋白相互作用，以便完成转录和翻译。所述元件的强度和特异性可以改变。根据所采用的载体系统和宿主，可以使用任意数量的合适的转录和翻译元件，包括组成型和诱导型启动子。例如，当在细菌系统中克隆时，可以使用诱导型启动子，如 BLUESCRIPT 噬菌粒 (Stratagene, LaJolla, Calif.) 或 pSPORT1 质粒 (Life Technologies) 的杂合 lacZ 启动子等。可以将杆状病毒多角体蛋白启动子用于昆虫细胞。可以将源于植物细胞基因组的启动子或增强子（例如，热激，RUBISCO，和储存蛋白基因）或源于植物病毒的启动子（例如，病毒启动子或前导序列）克隆到所述载体上。在所述哺乳动物细胞系统中，来自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子是优选的。如果必须制备包括多拷贝的编码人类抗体的核苷酸序列的细胞

系，基于 SV40 或 EBV 的载体，可以与合适的选择标记一起使用。

药物组合物

可以将上述任意人类 MN 抗体添加到含有可以药用的载体的药物组合物中。所述可以药用的载体优选是非致热性的。所述组合物单独施用或者与诸如稳定化合物的至少一种其他试剂组合施用，它可以在任何无菌的，生物相容性药物载体中使用，所述载体包括，但不局限于盐水，缓冲盐水，葡萄糖和水。可以采用多种含水载体，例如，0.4%的盐水，和 0.3%的甘油等。所述溶液是无菌的，并且通常不含颗粒状物质。所述溶液可以通过常规的、众所周知的消毒技术（例如，过滤）消毒。根据需要，所述组合物可以含有可以药用的辅助性物质，如 pH 调节和缓冲剂等，以便接近生理学条件。所述药物组合物中本发明抗体的浓度可以有很大的变化，即从低于大约 0.5 重量%，通常为或至少为 1 重量%到高达 15 重量%或 20 重量%，并且可以主要根据所选择的特定施用模式，根据流体体积，粘度等进行选择。参见美国专利 5,851,525。如果必要的话，在药物组合物中可以添加一种以上类型的人类抗体，例如，对 MN 结合具有不同 K_d 的抗体。

所述组合物可以单独给患者施用，或者与其他试剂，药物或激素组合施用。除了所述活性成分之外，上述药物组合物可以包括合适的可以药用的载体，包括赋形剂和有助于将所述活性化合物加工成可以药用的制剂的助剂。本发明的药物组合物可以通过多种途径中的任意一种施用，包括，但不局限于口服，静脉内，肌内，动脉内，髓内，鞘内，心室内，经真皮，皮下，腹膜内，鼻内，肠胃外，局部，舌下，或直肠方式。

在制备药物组合物之后，可以将它们放入合适的容器中，并且注明用于治疗适用的状况。所述标记包括施用量，频率和方法。

诊断方法

本发明还提供了诊断方法，通过该方法可以检测测试制剂中的人类 MN，包括，但不局限于血清，肺，肝，心脏，乳腺，肾，结肠，细胞培养系统，或无细胞系统（例如，组织匀浆物）的样品。例如，可以将所述诊断方法，用于诊断 MN 升高了的疾病。所述疾病包括，但不局

限于肾癌，食道癌，乳腺癌，宫颈癌，结肠癌和肺癌。在用于诊断时，当检测到来自患者的检测样品中的抗体-MN复合体量大于正常样品中的该复合体的量时，可以确定该患者可能患有所述疾病。在实施例 12 中披露了用于检测癌组织中 MN 的免疫组织化学方法。

5 让所述检测制剂与本发明的人类抗体接触，并且，然后分析所述检测制剂中抗体-MN 复合体的存在。如果必要的话，所述人类抗体可以包括可检测的标记，如荧光，放射性同位素，化学发光，或酶标记，如辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶或荧光素酶。在实施例 11 中示出用于检测 MN 表达肿瘤细胞的基于荧光素的分析方法。

10 所述抗体可任选地与固体支持物结合，由此可以适应实现该分析的自动化。合适的固体支持物包括，但不局限于玻璃或塑料载玻片，组织培养平板，微量滴定板孔，试管，硅芯片，或诸如珠子的颗粒（包括，但不局限于乳胶，聚苯乙烯或玻璃珠）。本领域公知的任何方法都可用于将所述抗体结合在所述固体支持物上，包括使用共价和非共价键，被
15 动吸附，或与所述抗体和固体支持物连接的成对的结合部分。MN 和抗体结合，可以在任何适合容纳所述反应剂的容器中进行。所述容器的例子包括微量滴定板，试管和微量离心试管。

治疗方法

20 本发明还提供了缓解 MN 升高了的疾病的症状的方法。所述方法包括，但不局限于肾癌，食道癌，乳腺癌，宫颈癌，结肠癌和肺癌。例如，参见(Liao, S. Y., *Cancer Res* (1997) 57, 2827-2831), (Turner, J. R. *Hum Pathol*, (1997) 28, 740-744), (Liao, S. Y. 等, *Am J Pathol* (1994), 145, 598-609), (Saarnio, J. 等, *Am J Pathol* (1998) 153,
25 279-285), 和 (Vermylen, P. 等, *Eur Respir J* (1999), 14, 806-811)。

在本发明的一种实施方案中，将治疗有效量的本发明的人类抗体给患有 MN 升高的疾病的患者施用，如患有上述癌症的患者。

治疗有效剂量的确定

30 治疗有效剂量的确定，在本领域技术人员的能力范围内。治疗有效剂量，表示与缺乏所述治疗有效剂量场合下的效力相比，用于有效治疗癌症的人类抗体的用量。

最初，治疗有效剂量可以用动物模型估计，所述动物模型通常是大鼠，小鼠，兔，狗或猪。还可以将所述动物模型用于确定施用的合适的浓度范围和途径。然后可以利用所述信息确定给人类施用的有用的剂量和途径。在实施例 9 中披露了皮下小鼠异种移植模型。

5 人类抗体的治疗效力和毒性，例如， ED_{50} （能在 50% 的群体中有效治疗的剂量）和 LD_{50} （使所述群体的 50% 死亡的剂量），可以在细胞培养物或实验动物中通过标准药理学方法确定。毒性与治疗作用的剂量比例是治疗指数，并且可以表达为 LD_{50}/ED_{50} 比值。

10 具有较大治疗指数的药物组合物是优选的。将从动物研究中获得的数据，用于配制供人类使用的多种剂量。在所述组合物中所包含的剂量优选在循环浓度范围内，其中包括少有或没有毒性的 ED_{50} 。在该范围内变化的剂量取决于所采用的剂型，患者的敏感性，以及施用途径。

确切剂量是由实施者根据与需要治疗的患者相关的因素决定的。对剂量和施用进行调整，以便提供足够水平的人类抗体或保持需要的作用。可以考虑的因素包括疾病状态的严重性，对象的一般健康状态，对象的年龄，体重和性别，饮食，施用的时间和频率，药物联合，反应敏感性，以及对治疗的耐受性/反应。长效药物组合物可以根据特定制剂的半衰期和清除速度，每 3-4 日施用一次，每周施用一次，或每 2 周施用一次。

20 可以构建编码本发明的人抗体的多核苷酸，并且用业已完善的技术导入来自体内的细胞或体内细胞。所述技术包括，但不局限于运铁蛋白-聚阳离子-介导的 DNA 转移，用裸露的或包被的核酸转染，脂质体介导的细胞融合，DNA-包被的乳胶珠的细胞内转运，原生质体融合，病毒感染，电穿孔，“基因枪”，和 DEAE 或磷酸钙介导的转染。

25 抗体的有效体内剂量为大约 $5\ \mu\text{g}$ -大约 $50\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 患者体重，大约 $50\ \mu\text{g}$ -大约 $5\ \text{mg}/\text{kg}$ 患者体重，大约 $100\ \mu\text{g}$ -大约 $500\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 患者体重，以及大约 200 -大约 $250\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 患者体重。为了施用编码所述抗体的多核苷酸，有效的体内剂量为大约 100ng -大约 $200\ \text{ng}$ ， $500\ \text{ng}$ -大约 $50\ \text{mg}$ ，大约 $1\ \mu\text{g}$ -大约 $2\ \text{mg}$ ，大约 $5\ \mu\text{g}$ -大约 $500\ \mu\text{g}$ ，以及大约
30 $20\ \mu\text{g}$ -大约 $100\ \mu\text{g}$ 的 DNA。

含有人类抗体的本发明药物组合物的施用模式，可以是能向所述宿主体内输送所述抗体的任何合适的途径。本发明的药物组合物特别适

用于肠胃外施用，即皮下，肌内，静脉内，或鼻内施用。

在本说明书中所引用的所有专利和专利申请，被专门收作本文参考。以上公开内容对本发明进行了一般性披露。通过参考以下具体实施方案，可以获得更完整的理解，提供这些实施例仅仅是用于说明目的，
5 而不是要限定本发明的范围。

实施例 1

人类组合抗体文库 (HuCAL-Fab 1) 的构建

HuCAL-Fab 1 的克隆。HuCAL-Fab 1 是 Fab 抗体片段形式的、完全合成的、组件形式的人类抗体文库。HuCAL-Fab 1 是由单链形式的抗体文库组装而成的 (HuCAL-scFv; Knappik 等, J. Mol. Biol. 296 (2000) 55)。将 HuCAL-Fab 1 克隆到噬菌粒表达载体 pMORPH18 Fab1 中 (图 3)。该载体包括 Fd 片段，它具有一个在 C-末端与丝状噬菌体的截短的基因 III 蛋白融合的 phoA 信号序列，并且还包含具有 ompA 信号序列的轻链
10 VL-CL。这两条链都受 lac 操纵子的控制。恒定结构域 C λ ，C κ ，和 CH 是与 HuCAL 的组件系统完全相容的合成基因 (Knappik 等, 2000)。

首先，通过分别用 EcoRV/DraIII 和 EcoRV/BsiWI 限制性消化，从 HuCAL-scFv 中分离 V λ 和 V κ 文库。将这些 V λ 和 V κ 文库克隆到分别用 EcoRV/DraIII 和 EcoRV/BsiWI 切割过的 pMORPH18 Fab1 中。在
20 连接，并且转化到大肠杆菌 TG-1 中之后，分别获得了 4.14×10^8 和 1.6×10^8 的文库大小，在这两种情况下，都超过了 HuCAL-scFv 的 VL 多样性。

类似地，通过用 StyI/MunI 进行限制消化，从 HuCAL-scFv 中分离 VH 文库。将 VH 文库克隆到用 StyI/MunI 切割过的 pMORPH18-V λ 和 V
25 κ 文库中。在连接并且转化到大肠杆菌 TG-1 中之后，获得了 2.09×10^{10} 的总的文库大小，具有 67% 的正确克隆 (通过对 207 个克隆进行测序而确定的)。

噬菌粒挽救，噬菌体扩增和纯化。在含有 $34 \mu\text{g/ml}$ 氯霉素和 1% 葡萄糖的 2 x TY 培养基 (2 x TY-CG) 中扩增 HuCAL-Fab。在 37°C 下，
30 以大约 0.5 的 OD600 进行辅助噬菌体感染 (VCSM13) 之后，进行离心，并且重新悬浮在 2 x TY/ $34 \mu\text{g/ml}$ 氯霉素/ $50 \mu\text{g/ml}$ 卡那霉素中，在 30°C 下，让细胞生长过夜。噬菌体是从上清液中通过 PEG-沉淀的

(Ausubel 等, 1998), 重新悬浮在 PBS/20%甘油中, 并且在 -80°C 中保存。两个淘选轮次之间的噬菌体扩增, 是按以下方法进行的: 用洗脱的噬菌体感染中对数期 TG1-细胞, 并且铺板到补充了 1%葡萄糖和 $34\ \mu\text{g/ml}$ 氯霉素的 LB-琼脂上。在 30°C 下温育过夜之后, 将克隆刮掉, 并且将 OD600 调整到 0.5。按上述方法添加辅助噬菌体。

实施例 2

固相淘选

在 PBS 中用人类 MN 蛋白对 MaxiSorp™微量滴定板 (Nunc) 的孔进行包被 ($2\ \mu\text{g/孔}$)。在用溶解在 PBS 中的 5%的脱脂奶粉封闭之后, 在 20°C 下添加按上述方法纯化的 $1-5\times 10^{12}$ HuCAL-Fab 噬菌体 1 小时。在进行若干洗涤步骤之后, 通过用 $100\ \text{mM}$ 三乙胺进行 pH 洗脱, 洗脱结合的噬菌体, 然后用 $1\ \text{M}$ TRIS-C1 pH 7.0 中和。按上述方法, 在各轮之间通过噬菌体扩增进行三轮淘选。

15

实施例 3

亚克隆选择的用于表达的 Fab 片段

将选择的 HuCAL Fab 片段的 Fab-编码插入片段, 亚克隆到表达载体 pMORPHx7_FS 中, 以便促进可溶性 Fab 的快速表达。用 XbaI/EcoRI 消化选择的 HuCAL Fab 克隆的 DNA 制剂, 由此切除 Fab 编码插入片段 (ompA-VL 和 phoA-Fd)。将纯化的插入片段亚克隆到 XbaI/EcoRI 切割的以前携带有 scFv 插入片段的载体 pMORPHx7 中, 得到了被称为 pMORPHx9_Fab1_FS 的 Fab 表达载体中 (图 4)。在该载体中表达的 Fabs 具有两个用于检测和纯化的 C-末端标记 (FLAG 和 Strep)。

25

实施例 4

通过 ELISA 鉴定 MN-结合 Fab 片段

用 $100\ \mu\text{l/孔}$ 的人类 MN 溶液对 Maxisorp ELISA 平板的孔进行包被, 所述溶液以 $5\ \mu\text{g/ml}$ 的浓度稀释在包被缓冲液中。在 30°C 下, 用 $0.5\ \text{mM}$ 的 IPTG 诱导各个 Fab 表达 12 小时。通过渗透压休克, 从周质中提取可溶性 Fab (Ausubel 等, 1998), 并且用于 ELISA 中。用抗-Fab 抗体检测 Fab 片段 (Dianova)。在添加辣根过氧化化酶-偶联的抗小

鼠 IgG 抗体和 POD 可溶性底物 (Roche Diagnostics) 之后, 读出在 370nm 波长下的值。

实施例 5

5 HuCAL 免疫球蛋白表达载体的构建

重链克隆。去除了 pcDNA3.1 + (Invitrogen) 的多克隆位点 (NheI/ApaI), 并且插入用于 HuCAL 设计的与所述限制位点相容的填充片段, 以便连接前导序列 (NheI/EcoRI), VH-结构域 (EcoRI/B1pI), 和免疫球蛋白恒定区 (B1pI/ApaI)。所述前导序列 (EMBL M83133) 具有 Kozak 序列 (Kozak, 1987)。将人类 IgG1 (PIR J00228), IgG4 (EMBL K01316), 和血清 IgA1 (EMBL J00220) 的恒定区, 分解成长度为大约 70 个碱基的重叠的寡核苷酸。导入沉默突变, 以便去除与 HuCAL 设计不相容的限制位点。通过重叠延伸-PCR 剪接所述寡核苷酸。

轻链克隆。用两个不同的填充片段取代 pcDNA3.1/Zeo+ (Invitrogen) 的多克隆位点。κ 填充片段提供了用于插入 κ-前导序列 (NheI/EcoRV), HuCAL-scFv Vκ-结构域 (EcoRV/BsiWI) 和 κ-链恒定区 (BsiWI/ApaI) 的限制位点。κ-填充片段中的相应的限制位点是 NheI/EcoRV (I-前导序列), EcoRV/HpaI (VI-结构域), 和 HpaI/ApaI (λ-链恒定区)。κ-前导序列 (EMBL Z00022) 以及 λ 前导序列 (EMBL L27692) 都具有 Kozak 序列。通过按上述方法重叠延伸-PCR 组装人类 κ- (EMBL J00241) 和 λ-链 (EMBL M18645) 的恒定区。

IgG-表达 CHO-细胞的制备。用 IgG 重链和轻链表达载体的等摩尔的混合物共转染 CHO-K1 细胞。通过限制稀释, 用 600 μg/ml G418 和 300 μg/ml Zeocin (Invitrogen) 选择双抗性转染体。通过捕获-ELISA 评估单克隆上清液的 IgG 表达 (参见下文)。在补充了 10% 超低 IgG-FCS (Life Technologies) 的 RPMI-1640 培养基中扩增阳性克隆。在将上清液的 pH 调节到 8.0 并且进行消毒过滤之后, 对该溶液进行标准蛋白 A 柱层析 (Poros 20 A, PE Biosystems)。

30 实施例 6

CDR3 文库的设计

Vλ 位置 1 和 2。构建具有它们的真实 N-末端的原始 HuCAL 主基因:

VL λ 1: QS (CAGAGC), VL λ 2: QS (CAGAGC), 和 VL λ 3: SY (AGCTAT)。在 W097/08320 中披露了包括所述氨基酸的序列。在 HuCAL 文库构建期间, 将前两个氨基酸换成了 DI, 以便有利于文库克隆 (EcoRI 位点)。所有 HuCAL 文库在 5' 末端都包括具有 EcoRV 位点 GATATC (DI) 的 VL λ 基因。所有 HuCAL κ 基因 (所述文库中的主基因和所有基因) 都包括位于 5' -末端的 DI。

VH 位置 1。构建具有它们的真实 N-末端的原始 HuCAL 主基因: 用 Q (=CAG) 作为第一个氨基酸的 VH1A, VH1B, VH2, VH4, 和 VH6, 和用 E (=GAA) 作为第一个氨基酸的 VH3 和 VH5。在 W097/08320 中披露了包括所述氨基酸的序列。在 HuCALFab1 文库中, 所有 VH 链包括位于所述一号位置上的 Q (=CAG)。

V κ 1/V κ 3 位置 85。由于用于导入 CDR3 文库的盒诱变方法 (Knappik 等, J. Mol. Biol. 296, 57-86, 2000), V κ 1 和 V κ 3 的 85 号位置可以是 T 或 V。因此, 在 HuCAL scFv 1 文库构建期间, V κ 1 和 V κ 3 的 85 号位置可以作以下变化: V κ 1 原始的, 85T (密码子 ACC); V κ 1 文库, 85T 或 85V (TRIM 密码子 ACT 或 GTT); V κ 3 原始的, 85V (密码子 GTG); V κ 3 文库, 85T 或 85V (TRIM 密码子 ACT 或 GTT); 将相同的变化应用于 HuCAL Fab1。

CDR3 设计。在表 1 和 2 中示出了保持恒定的所有 CDR3 残基。

CDR3 长度。所设计的 CDR3 长度分布如下。在图 2 中所示出的序列表中, 示出了改变了的残基。V κ CDR3, 8 个氨基酸残基 (89-96 号位置) (偶然有 7 个残基), 具有固定的 Q90; V λ CDR3, 8-10 个氨基酸残基 (89-96 号位置) (偶然有 7-10 个残基), 具有固定的 Q89, S90, 和 D92; 和 VH CDR3, 5-28 个氨基酸残基 (95-102 号位置) (偶然有 4-28 个残基), 具有固定的 D101。

实施例 7

用于表位作图的竞争 ELISA

在 4°C 下, 用 100 μ L 浓度为 5 μ g/mL 的溶解在 PBS 中的 MN 或 MN-肽偶联的 BSA, 对 Nunc Maxisorb 微量滴定板进行包被过夜。在室温下, 在微量滴定板振荡器上, 用 2 小时时间, 用溶解在 5%PBS 中的 5%脱脂乳封闭每一个孔。用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤所述平板。向每

一个孔中添加 200 μ L 抗体或抗体+蛋白聚糖肽 A, B, 或 C (SEQ ID 20-22)。优化抗体和蛋白聚糖肽的浓度, 以便能够最容易地确定 50% 的终点。在室温下, 在微量滴定板振荡器上, 用 1.5 小时时间温育所述抗体/肽混合物。用含有 0.05% Tween-20 的 TBS 快速洗涤 ELISA 平板 5 次。用过氧化物酶偶联的山羊抗-FabIgG (Sigma) 测试结合的抗体。在用 TBS-Tween 进一步洗涤之后, 添加 100 μ L 的 BM Blue POD 底物 (Roche)。在温育 30 分钟之后, 在 370nm 下读出吸收值。

实施例 8

10 细胞粘附分析

以 30 μ L 的液滴, 用 1.5 小时时间, 将溶解在 pH9.2 的 50mM 碳酸氢盐缓冲液中的 1 μ g/mL 纯化的 MN 吸附在细菌学 5 cm Petri 培养皿的底部。去掉所述液滴, 并且用 PBS 漂洗 3 次。然后用溶解在 DMEM 中的 50% 的胎牛血清封闭所述液滴。用 30 mL 的 20-100 μ g/mL 抗-MN IgGs 15 或用 PBS 和不相关的抗体作对照进一步处理所述液滴。在用 PBS 洗涤所述液滴之后, 用 30 μ L 的 CGL-1 细胞悬浮液 (10^5 细胞/mL) 温育斑点, 并且温育过夜。在用 PBS 洗涤所述液滴之后, 评估抗 MN 抗体阻断 CGL-1 细胞与 MN 包被的平板粘附的能力。在图 5 中示出了本实验的一种例子, 其中, 与对照 γ 球蛋白 (图 5B) 和无抗体处理 (图 5C) 相比, 20 μ g/ml 20 的抗-MN 抗体 MN-3 (图 5A) 能抑制细胞粘附。

实施例 9

皮下异种移植癌症模型

用免疫缺陷小鼠的皮下异种移植模型评估抗 MN 抗体的抗肿瘤作用。在补充了 10% FBS 的 DMEM 中, 以粘附培养物形式维持 HT-29 细胞。用存在于 0.1mL 培养基中的 1×10^7 细胞在右肋腹对 6-7 周龄的 SCID 小鼠进行皮下接种。每天以 500 μ g 的剂量通过腹膜内方式施用单克隆抗体。用 PBS 或不相关的单克隆抗体处理对照小鼠。用滑动卡尺每周 2 次测定肿瘤。通过比较抗 MN 抗体治疗和对照治疗的肿瘤的尺寸, 评估抗 30 肿瘤效力。

实施例 10

具有免疫偶联物的皮下异种移植癌症模型

用本领域已知的方法将抗 MN 抗体偶联在细胞毒性小分子上（例如，C. Liu 等，Proc. Natl. Acad. Sci. (1996), 93, 8618-8623）。

5 将 HT-29 细胞以贴壁培养物形式维持在补充了 10% FBS 的 DMEM 中。用存在于 0.1 mL 培养基中的 1×10^7 肿瘤细胞，在右肋腹皮下接种 6-7 周龄的 CB-17 SCID 小鼠。当肿瘤尺寸达到 65 立方毫米之后，连续 5 天，每天给动物注射 0.5 mg 的抗体偶联物。用 PBS，不相关的单克隆抗体或游离的未偶联的药物处理对照小鼠。用滑动卡尺每周 2 次测定肿瘤。

10 通过比较抗 MN 抗体治疗和对照治疗的肿瘤的尺寸，评估抗肿瘤效力。

实施例 11

荧光激活的细胞分选分析 (FACS 分析)

15 作为诊断工具，可以分析细胞的 MN 表达。对于贴壁细胞系来说，首先通过除去它们的培养基，使细胞与它们的培养烧瓶分离，用冰冷的 PBS 漂洗一次，并且根据细胞系用溶于 PBS 的 1mM EDTA 处理所述细胞 5-10 分钟（通过定期敲击所述烧瓶刺激）。通过离心使所述细胞沉降（1500 rpm, 5 分钟），并且用冰冷的染色缓冲液（10% FBS, 0.1% 叠氮化钠, PBS）洗涤所述细胞一次。以 $200 \mu\text{l}$ 中 1 百万个细胞的浓度将所述细胞重新悬浮在冰冷的染色缓冲液中。以 $3.2 \text{ E}-11$ 至 $3.2 \text{ E}-8 \text{ M}$ 的比例添加第一抗体，并且在冰上温育 1 小时。用冰冷的染色缓冲液洗涤未结合的抗体。将细胞沉淀物重新悬浮在 $200 \mu\text{l}$ 冰冷的染色缓冲液中，并且在每 $200 \mu\text{l}$ 细胞中添加 $20 \mu\text{l}$ FITC-偶联的抗-人类第二抗体

20 (Pharmingen)。在冰上温育 1 小时。洗涤未结合的抗体，并且将所述细胞重新悬浮在 $200 \mu\text{l}$ 溶解在染色缓冲液中的 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 的碘化丙锭 (PI) (Sigma) 中（以便控制死亡细胞）。通过 FACS 分析处理，以便排除摄取 PI 的细胞。如图 7 所示，通过 FACS 分析发现，PC3mm2 人类前列腺癌细胞能表达 MN。红线表示用人类抗 MN 抗体染色，而黑线表示对照，即同种型匹配的人类抗体。

25

30

实施例 12

肿瘤样品的免疫组织化学分析

可以将肿瘤切片用于检测 MN 表达。由于 MN 在癌中是高度表达的，并且在正常组织中存在低的表达水平，分析 MN 表达，可用于诊断和检测患者样品中的癌。为了分析组织切片，可以使用标准免疫组织化学技术。将含有 PC-3 前列腺癌的组织切片移植到 SCID 小鼠体内。将 20 μ g/mL 的抗 MN 抗体与脱蜡的石蜡切片一起温育，并且用过氧化物酶偶联的第二抗体对载玻片进行显影，并且用 DAB 生色剂进行显影。可以方便地观察到强的膜相关信号，并且是在前列腺癌细胞中 MN 高表达的特征。

10

实施例 13

抗体依赖型细胞介导的细胞毒性分析 (ADCC 分析)

抗 MN IgGs 的抗肿瘤活性，可以通过 ADCC 活性介导。用 250 ng/mL, 1000 ng/mL 或 2000ng/mL 人抗-MNIgG1 或对照人 IgG1 抗-地高辛抗体温育表达 MN 的 PC-3mm2 细胞和不表达 MN 的 HCT-116 细胞。以 50: 1, 25: 1 和 5: 1 的效应细胞: 靶细胞比例，将人类 PBMCs 添加到所述细胞中。进行铬-51 释放分析，以便测定靶细胞裂解的水平。在温育对照抗体，或没有抗体时在存在 HCT- 116 或 PC-3mm2 细胞的条件下观察到了少量的裂解。对于 50: 1, 25 : 1 和 5: 1 的靶细胞: 效应细胞比例来说，这种裂解的自发水平分别为 10-15%，5-10%，或 2-3%。类似地，在用抗 MN 抗体温育时，不表达 MN 的 HCT-116 细胞的裂解为 0-10%。不过，在用人抗 MN IgGs 温育时，PC-3mm2 细胞的裂解显著高于对照。在以 50:1 靶细胞: 效应细胞的比例使用 250 ng/mL, 1000 ng/mL 和 2000 ng/mL 时，观察到了 40, 50 和 60% 的裂解。类似地，在 25: 1 的比例下，观察到了 30, 33 和 38% 的裂解，最后，在 5: 1 的靶细胞: 效应细胞比例下，观察到了 8, 10 和 15% 的裂解。以上实验表明，人类抗 MN 抗体能介导抗肿瘤 ADCC 活性，并且可用于癌症的治疗性处理。

25

表 1 和 2
说明
有关 HuCAL 序列概述的说明 (HuCAL 文库 scFv1, scFv2, scFv3 和 Fab1)

1. 编号:	编号是根据 VBASE, 除了 V λ 位置 9 中的缺口。在 VBASE 中, 将所述缺口设定为位置 10。 还可参见 Chothia 等 (1992) J. mol. Biol., 227, 776-798, Tomlinson 等 (1995) EMBO J., 14, 4628-4638 和 Williams 等 (1996) J. Mol. Biol., 264, 220-232)。
2. 限制位点:	在所述蛋白序列概述中, 所提供的位点的位置只是近似的。 对于详细的位置来说, 使用所述 DNA 序列概述或载体 NTI 主基因序列文件 (可以参见共享的数据库)。
3. V λ 1 & 2:	业已构建了具有它们的真实 N-末端的原始 HuCAL 主基因: VL λ 1: QS (CAGAGC) VL λ 2: QS (CAGAGC) VL λ 3: SY (AGCTAT) 可以发现包括该氨基酸的序列, 即在专利申请和 PDB 结构模型文件中发现。 在 HuCAL 文库构建期间, 业已将前两个氨基酸换成了 DI, 以便有利于文库克隆 (EvoRV 位点) 所有 HuCAL 文库都包括 VL λ 基因, 在它的 5' 末端具有 EcoRV 位点 GATATC (DI) 所有 HuCAL κ 基因 (该文库中的主基因和所有基因) 在它的 5' 末端包括 DI。
4. VH 位置 1:	业已构建了具有它们的真实 N-末端的原始 HuCAL 主基因: VH1A, VH1B, VH2, VH4 和 VH6 具有作为第一个氨基酸的 Q (=CAG) VH3 和 VH5 具有作为第一个氨基酸的 E (=GAA) 所有与短的 FLAG 序列 (DYKD) 融合的 HuCAL VH 链在一号位置上都包括 E (=GAA) (HuCAL 文库 scFv1, 2 和 3) 在 HuCAL Fab1 文库中, 所有 VH 链在一号位置上都包括 Q (=CAG)
5. V κ 1/V κ 3 位置 85:	在 HuCAL scFv1 文库构建期间, 改变了 V κ 1 和 V κ 3 的 85 号位置: V κ 1 原始: 85T (密码子 ACC) V κ 1 文库: 85T 或 85V (TRIM 密码子 ACT 或 GTT) V κ 3 原始: 85V (密码子 GTG) V κ 3 文库: S5T 或 85V (TRIM 密码子 ACT 或 GTT) HuCAL scFv2 和 3 以及 HuCAL Fab1 在该位置上与 HuCALscFv1 相同
6. CDR3 设计:	在本序列概述中, 标明了保持恒定的所有 CDR3 残基
7. CDR3 长度:	以下是设计的 CDR3 长度分布。在本序列概述中, 改变了的残基在括弧中提供 (x) V κ CDR3: 8 个氨基酸残基 (89-96 号位置) (偶尔 7 个残基); 固定的 Q90 Q90 V λ CDR3: 8-10 个氨基酸残基 (89-96 号位置) (偶尔 7-10 个残基); 固定的 Q89, S90, D92 VH CDR3: 5-28 个氨基酸残基 (95-102 号位置) (偶尔 4-28 个残基); 固定的 D101

-
- <110> Toshihiko Takeuchi
 Nathalie Dubois-Stringfellow
 John E. Murphy
 Julie Rinkenberger
- <120> 具有 MN 结合和细胞粘附中和活性的人类抗体
- <130> MSB-7289
- <140> 10/273, 541
 <141> 2002-10-18
- <150> 60/434, 657
 <151> 2001-10-18
- <150> 60/377, 716
 <151> 2002-05-02
- <160> 89
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)
- <400> 1
 ggatttacct ttagcgagag ggccatgacc 30
- <210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人
- <400> 2
 ggatttacct ttagcgcggc catgatgacc 30
- <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人
- <400> 3

ggatttacct ttagegggag catgatggcc	30
<210> 4	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 4	
ggatttacct ttagcgactg ggcgatgacg	30
<210> 5	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 5	
ggatttacct ttgtgaagag catggtggtg	30
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 6	
ggatttacct ttagcaggaa cctgatgacc	30
<210> 7	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 7	
ggatttacct ttgagcggtg gatgggggcg	30
<210> 8	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 8	
ggatttacct ttagcaggag gatgatggtc	30
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 9	

ggatttacct ttagcaggtg gatgatggtc	30
<210> 10	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 10	
ggatttacct ttagcgagag catgatgacg	30
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 11	
ggatttacct ttagctggca catgatgacg	30
<210> 12	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 12	
ggatttacct ttagctccgt gatgatgacg	30
<210> 13	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 13	
ggatttacct ttagcgggag catgattacg	30
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 14	
tctgctactc gttttgatta t	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 15	

aatggtactc gtatggatgt t	21
<210> 16	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 16	
ggtattgttc gtggtatgga tcat	24
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 17	
ggtggttctc gttatgatgt t	21
<210> 18	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 18	
aatattacta agtctgattg tt	22
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 19	
ggtggtactc gttttgatta t	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 20	
aatggtcgta atcttgatta t	21
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 21	

actgctactc gttttgatta t	21
<210> 22	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 22	
aagcctttta ctggtaagta ttggggcat actggttttg atatt	45
<210> 23	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 23	
aaacctttta ctggtaagta ttggggcat actggttttg atatt	45
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 24	
aatggcctgc gtatggatgt t	21
<210> 25	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 25	
aatctgctgc gtatggatgt t	21
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 26	
aatgcggtgc gtatggatgt t	21
<210> 27	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 27	

aatgcatgac gtaggatgt t	21
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 28	
aatgccctcc gtaggatgt t	21
<210> 29	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 29	
aatgtgctgc gtaggatgt t	21
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 30	
ggggggacgc gtaggatgt t	21
<210> 31	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 31	
cagggcaccc gtaggatgt t	21
<210> 32	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 32	
aatggcgtgc gtaggatgt t	21
<210> 33	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 33	

aatggcatcc gtatggatgt t	21
<210> 34	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 34	
cagagccgtg actatgagaa gcctatgatt	30
<210> 35	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 35	
cagagccgag actatgagaa gcctatgatt	30
<210> 36	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 36	
cagagccgag actatgagaa gcctatgatt	30
<210> 37	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 37	
acgggtacta gcagcgatag gacgcgcccg ccgaagtacg cc	42
<210> 38	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 38	
acgggtacta gcagcgatgt gtccggcctc aacatcgtgt cc	42
<210> 39	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 39	

cagagctatg accgtgcttt taagtctggt	30
<210> 40	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 40	
cagagctatg accataagaa gactgag	27
<210> 41	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 41	
cagagctatg acatgtttgc tcgtgttatt	30
<210> 42	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 42	
cagagctatg accgtcttta taagaagctt	30
<210> 43	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 43	
cagagctatg accgggetta tegaattctt	30
<210> 44	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 44	
cagagctatg accgttctcg ttatget	27
<210> 45	
<211> 30	
<212> PRT	
<213> 人	
<400> 45	

Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
 20 25 30

<210> 46
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 46
 Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
 1 5 10

<210> 47
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 47
 Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro
 1 5 10

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 48
 Gly Phe Thr Phe Ser Glu Arg Ala Met Thr
 1 5 10

<210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 49
 Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala Met Met Thr
 1 5 10

<210> 50
 <211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 50

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Met Met Ala
1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 51

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Trp Ala Met Thr
1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Val Lys Ser Met Val Val
1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 53

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn Leu Met Thr
1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 54

Gly Phe Thr Phe Glu Arg Trp Met Gly Ala
1 5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 55

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Arg Met Met Val

1 5 10

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 56

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Trp Met Met Val

1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 57

Gly Phe Thr Phe Ser Glu Ser Met Met Thr

1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 58

Gly Phe Thr Phe Ser Trp His Met Met Thr

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 59

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Val Met Met Thr

1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 60
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Met Met Thr
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 61
Ser Ala Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 62
Asn Gly Thr Arg Met Asp Val
1 5

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 63
Gly Ile Val Arg Gly Met Asp His
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 64

Gly Gly Ser Arg Tyr Asp Val
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 65
Asn Ile Thr Lys Ser Asp Val
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 66
Gly Gly Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 67
Asn Gly Arg Asn Leu Asp Tyr
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 68
Thr Ala Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 69

Lys Pro Phe Thr Gly Lys Tyr Trp Gly His Thr Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 70

Lys Pro Phe Thr Gly Lys Tyr Trp Gly His Thr Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 71

Asn Gly Leu Arg Met Asp Val
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 72

Asn Leu Leu Arg Met Asp Val
1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 73

Asn Ala Val Arg Met Asp Val
1 5

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 74

Asn Ala Met Arg Met Asp Val

1 5

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 75

Asn Ala Leu Arg Met Asp Val

1 5

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 76

Asn Val Leu Arg Met Asp Val

1 5

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 77

Gly Gly Thr Arg Met Asp Val

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 78

Gln Gly Thr Arg Met Asp Val

1 5

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 79

Asn Gly Val Arg Met Asp Val

1 5

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 80

Asn Gly Ile Arg Met Asp Val

1 5

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 81

Gln Ser Arg Asp Tyr Glu Lys Pro Met Ile

1 5 10

<210> 82

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 82

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Arg Thr Arg Pro Pro Lys Tyr Ala

1 5 10

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 83

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Ser Gly Leu Asn Ile Val Ser

1 5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 84

Gln Ser Tyr Asp Arg Ala Phe Lys Ser Val

1 5 10

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 85

Gln Ser Tyr Gly His Lys Lys Thr Glu

1 5

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 86

Gln Ser Tyr Asp Met Phe Ala Arg Val Ile

1 5 10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 87

Gln Ser Tyr Asp Arg Leu Tyr Lys Lys Leu

1 5 10

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 88

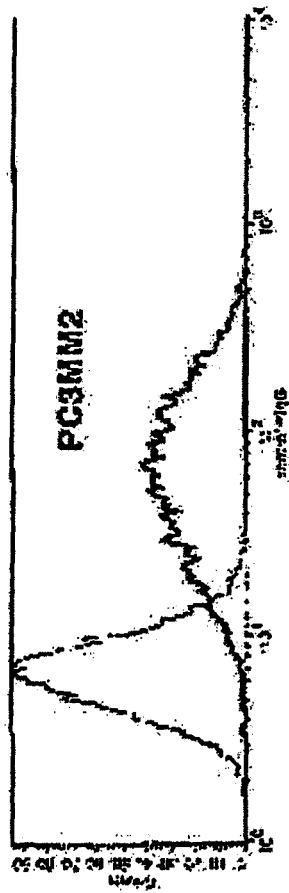


图 1

序列信息

SEQ I.D. #	序列信息	DNA序列
	VH3-CDR1	
1		GGATTACCTTTAGCGAGAGGGCCATGACC
2		GGATTACCTTTAGCGCGGCCATGATGACG
3		GGATTACCTTTAGCGGAGCATGATGGCC
4		GGATTACCTTTAGCGACTGGCCGATGACG
5		GGATTACCTTTGTGAAGAGCATGGTGGTG
6		GGATTACCTTTAGCAGGAACCTGATGACC
7		GGATTACCTTTAGCGGTGGATGGGGCG
8		GGATTACCTTTAGCAGGAGGATGATGGTC
9		GGATTACCTTTAGCAGGTGGATGGTC
10		GGATTACCTTTAGCGAGCATGATGACG
11		GGATTACCTTTAGCTGGCACATGATGACG
12		GGATTACCTTTAGCTCCGTGATGATGACG
13		GGATTACCTTTAGCGGAGCATGATGACG
	VH3-CDR3	
14		TCTGCTACTCGTTTTGATTAT
15		AATGGTACTCGTATGGATGTT
16		GGTATTGTCGTGGTATGGATCAT
17		GGTGGTCTCGTTATGATGTT
18		AATATTACTAAGTCTGATGTT
19		GGTGGTACTCGTTTTGATTAT
20		AATGGTCTGTAATCTTTGATTAT
21		ACTGCTACTCGTTTTGATTAT
22		AAGCCTTTACTGGTAAGTATGGGGTCATACTGGTTTGATATT
23		AAACCTTTACTGGTAAGTATGGGGTCATACTGGTTTGATATT
24		AATGGCCTGCGTATGGATGTT
25		AATCTGCTGCGTATGGATGTT
26		AATCGGGTGGTATGGATGTT
27		AATGCGATGCGTATGGATGTT
28		AATGCCCTCCGATGGATGTT
29		AATGTCTGCGTATGGATGTT
30		GGGGGACCGGATGGATGTT
31		CAGGGCACCCGATGGATGTT
32		AATGGCGTGGTATGGATGTT
33		AATGGCATCCGATGGATGTT



序列信息

	VL1-CDR3	
34	1	CAGAGCCGGTACTATGAGAAGCCTATGATT
35	2	CAGAGCCGAGACTATGAGAAGCCTATGATT
36	3	CAGAGCCGCGACTATGAGAAGCCTATGATT
	VL2-CDR1	
37	1	ACGGGTACTAGCAGCGGATAGGACGCGCCGCCGGAAGTACGCC
38	2	ACGGGTACTAGCAGCGGATGTCCGGCCTCAACATCGTGTC
	VL2-CDR3	
39	1	CAGAGCTATGACCGTGCCTTTAAGTCTGTT
40	2	CAGAGCTATGACCATAGAAGACTGAG
41	3	CAGAGCTATGACATGTTTCTCGTGTATT
42	4	CAGAGCTATGACCGTCTTTATAGAAGCTT
43	5	CAGAGCTATGACCGGCTTATCGACTTCTT
44	6	CAGAGCTATGACCGTCTCGTTATGCT
45	蛋白聚糖 A	GEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLP
46	蛋白聚糖 B	PGEEDLPGEEDLP
47	蛋白聚糖 C	PSEEDSPREEDP
	VH3-CDR1	
48	1	GFTFSERAMT
49	2	GFTFSAAMMT
50	3	GFTFSGSMMMA
51	4	GFTFSDWAMT
52	5	GFTFVKSMMV
53	6	GFTFSRNLMT
54	7	GFTFERWMGA
55	8	GFTFSRRMMV
56	9	GFTFSRWMV
57	10	GFTFSESMMT
58	11	GFTFSWHMMT
59	12	GFTFSSVMMT
60	13	GFTFSGSMMT

序列信息

			氨基酸序列
61	VH3-CDR3 1		SATRFDY
62	2		NGTRMDV
63	3		GIVRGMDH
64	4		GGSDYDV
65	5		NITKSDV
66	6		GGTRFDY
67	7		NGRNLDY
68	8		TATRFDY
69	9		KPFTGKYWGHTGFDI
70	10		KPFTGKYWGHTGFDI
71	11		NGLRMDV
72	12		NLLRMDV
73	13		NAVRMDV
74	14		NAMRMDV
75	15		NALRMDV
76	16		NVLRMDV
77	17		GGTRMDV
78	18		QGTRMDV
79	19		NGVRMDV
80	20		NGIRMDV
81	VL1-CDR3 1		QSRDYEKPMI
82	VL2-CDR1 1		TGTSSDRTRPKYA
83	2		TGTSSDVSGLNIVS
84	VL2-CDR3 1		QSYDRAFKSV
85	2		QSYGHKTE
86	3		QSYDMFARVI
87	4		QSYDRLYKKL
88	5		QSYDRAYRLL
89	6		QSYDRSRYA

Fab展示载体 pMORPH18 Fab 1

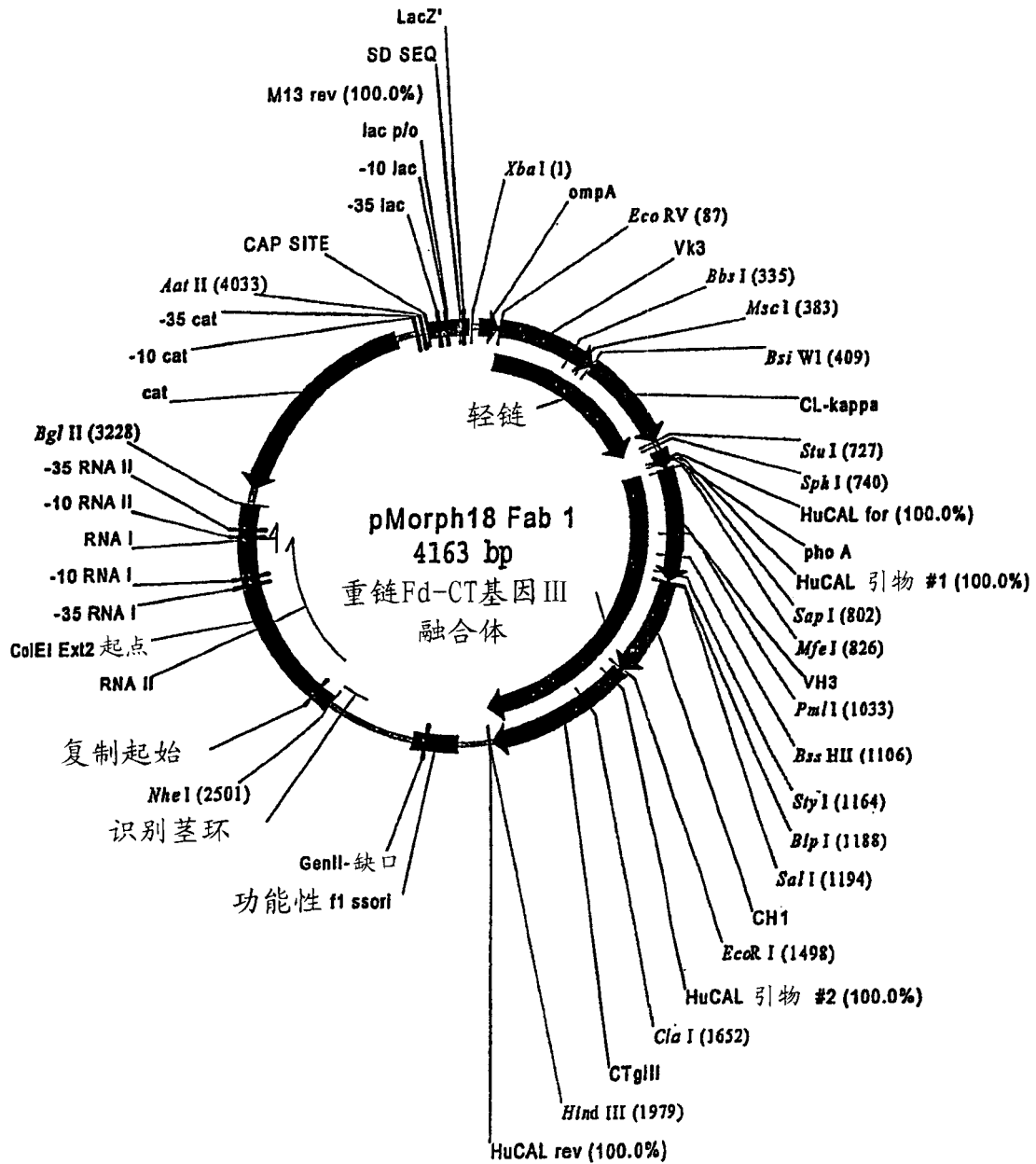


图 3

pMORPHx9_Fab1_FS 的载体图

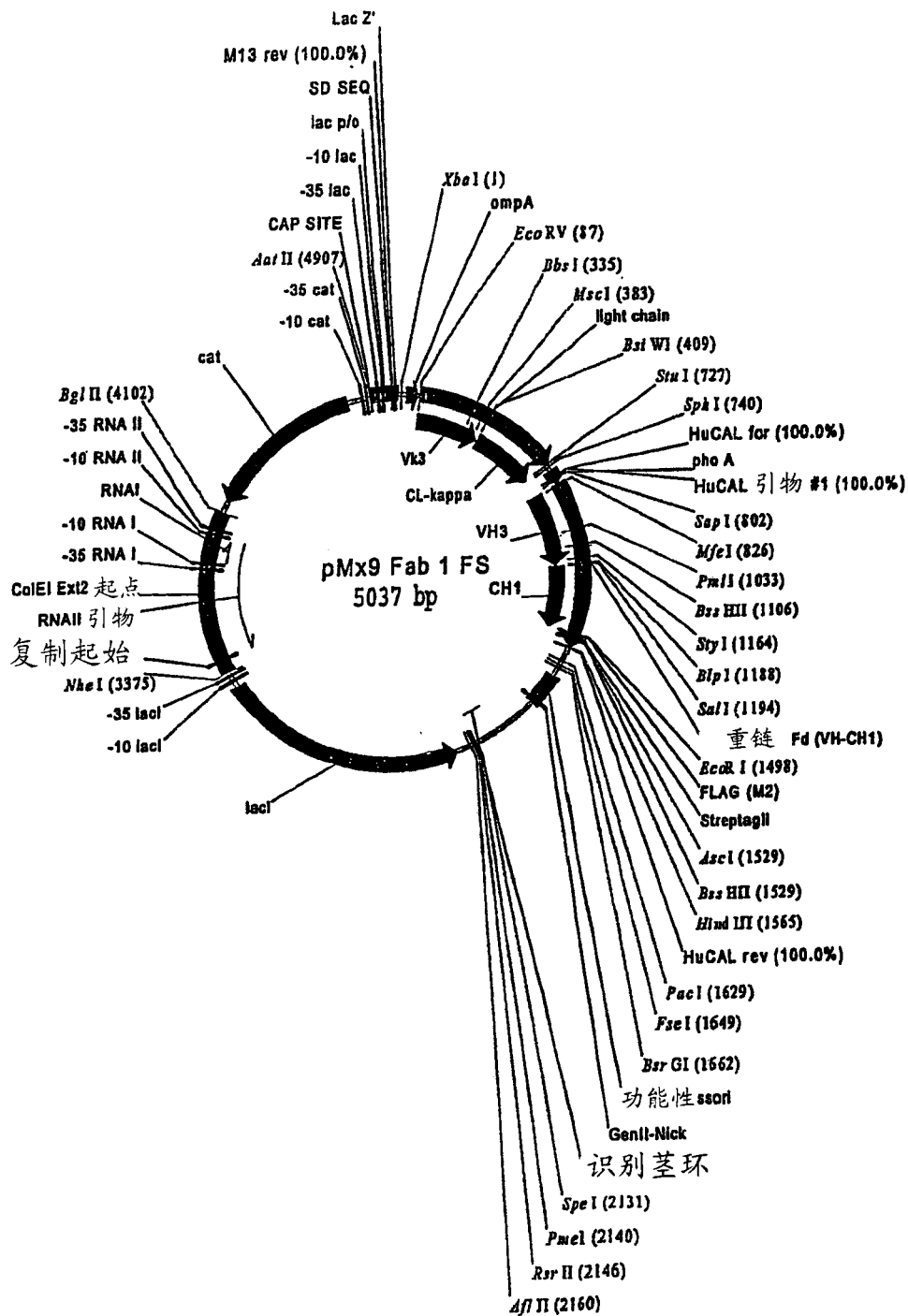
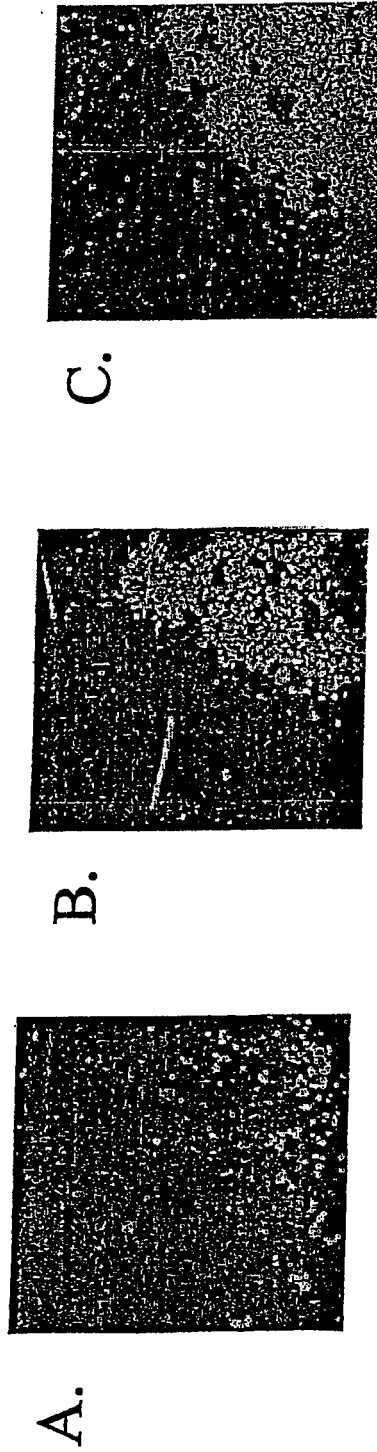


图 4

用抗-MN抗体MN-3阻断细胞粘附



A. 20 ug/mL Ab MN-3
B. 20 ug/mL 人类 γ 球蛋白
C. 无抗体处理

图 5

重链/轻链对		重链/轻链	在BIAcore中对人类MN蛋白聚糖肽标记的BSA的近似亲和力和	用蛋白聚糖肽B抑制ELISA信号 (1mg/ml)	MN细胞结合分析中的抑制 (100 μg/ml Fab)
1		VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-1	1.82E-06	75.00%	>95%
2		VH3-CDR3-2/VL2-CDR3-4	3.96E-08	93.00%	>95%
3		VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-6	4.65E-09	74.00%	>95%
4		VH3-CDR3-4/VL2-CDR3-1	6.40E-06	75.00%	ND
5		VH3-CDR3-5/VL2-CDR3-1	8.56E-07	32.00%	ND
6		VH3-CDR3-6/VL2-CDR3-2	ND	40.00%	ND
7		VH3-CDR3-7/VL2-CDR3-5	ND	51.00%	ND
8		VH3-CDR3-1/VL1-CDR3-1	ND	73.00%	ND
9		VH3-CDR3-9/VL1-CDR3-1	ND	ND	ND
10		VH3-CDR3-9/VL1-CDR3-2	ND	ND	ND
11		VH3-CDR3-9/VL1-CDR3-3	ND	ND	ND
12		VH3-CDR3-10/VL1-CDR3-1	ND	ND	ND
13		VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	6.03E-08	ND	ND
14		VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-2	ND	ND	ND
15		VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-4	9.00E-08	ND	ND
16		VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-5	9.90E-08	ND	ND
17		VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-6	ND	ND	ND
18		VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-3	ND	ND	ND
19		VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-2	ND	ND	ND
20		VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-4	ND	ND	ND
21		VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-5	ND	ND	ND
22		VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-1	ND	ND	ND
		ND = 未测定			

图 6

重链/轻链对

抗体	重链/轻链对	在BIAcore中对人类 MN蛋白聚糖肽标记 的BSA的近似亲和力	用蛋白聚糖肽B 抑制ELISA信号 (1mg/ml)	MN细胞结合 分析中的抑制 (100 ug/ml Fab)
23	VH3-CDR1-1/MH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	5.84E-09	ND	ND
24	VH3-CDR1-2/MH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	3.31E-09	ND	ND
25	VH3-CDR1-3/MH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	4.89E-09	ND	ND
26	VH3-CDR1-4/MH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	3.57E-09	ND	ND
27	VH3-CDR3-1/VL2-CDR1-1/VL2-CDR3-3	9.47E-09	ND	ND
28	VH3-CDR3-1/VL2-CDR1-2/VL2-CDR3-3	3.95E-09	ND	ND
29	VH3-CDR3-11/VL2-CDR3-4	8.19E-09	ND	ND
30	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-4	3.91E-09	ND	ND
31	VH3-CDR3-12/VL2-CDR3-4	1.23E-09	ND	ND
32	VH3-CDR3-13/VL2-CDR3-4	1.34E-09	ND	ND
33	VH3-CDR3-14/VL2-CDR3-4	1.23E-09	ND	ND
34	VH3-CDR3-15/VL2-CDR3-4	1.61E-09	ND	ND
35	VH3-CDR3-16/VL2-CDR3-4	1.31E-09	ND	ND
36	VH3-CDR3-17/VL2-CDR3-4	2.87E-09	ND	ND
37	VH3-CDR3-18/VL2-CDR3-4	2.82E-09	ND	ND
38	VH3-CDR3-19/VL2-CDR3-4	1.43E-09	ND	ND
39	VH3-CDR3-20/VL2-CDR3-4	1.55E-09	ND	ND
40	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-1	1.82E-08	ND	ND
41	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-2	5.70E-09	ND	ND
42	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-3	6.00E-10	ND	ND
43	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-4	N.D.	ND	ND
44	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-5	2.00E-09	ND	ND
45	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-6	6.00E-10	ND	ND
46	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-7	8.00E-10	ND	ND
47	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-8	4.10E-09	ND	ND
48	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-9	1.20E-09	ND	ND
49	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/MH3-CDR1-10	1.00E-09	ND	ND

图 6

专利名称(译)	具有MN结合和细胞粘附中和活性的人类抗体		
公开(公告)号	CN1606569A	公开(公告)日	2005-04-13
申请号	CN02825488.0	申请日	2002-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔药品公司		
申请(专利权)人(译)	拜尔药品公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜尔药品公司		
[标]发明人	T塔克伊基 JE默菲 J林肯伯格		
发明人	T·塔克伊基 N·杜布瓦-斯特林费罗 J·E·默菲 J·林肯伯格		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/00 C07K16/18 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/18 C07K16/3038 C07K2317/565 C07K2317/732		
代理人(译)	李波		
优先权	60/343657 2001-10-18 US 60/377716 2002-05-02 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明包括靶定蛋白聚糖结构域内的GEEDLP重复的单克隆人类MN抗体或MN抗体片段。所述MN细胞表面蛋白的蛋白聚糖结构域包括四个所述相同的GEEDLP重复。与需要的表位的结合是通过竞争ELISA证实的，其中，ELISA信号可以通过与含有该重复的肽(PGEEDLPGEEDLP)一起温育而减弱ELISA信号。这种结合抑制作用还可以通过Biacore分析证实，其中，通过所述肽重复，可以抑制需要的抗体与固定化MN或蛋白聚糖肽的结合。除了与所述肽重复结合之外，人类抗 - MN抗体可以抑制CGL - 1细胞与MN包被的塑料平板的细胞粘附。业已将人类抗MN抗体用于通过FACS和免疫组织化学方法诊断并且定量MN在癌细胞和肿瘤中的表达。还提供了一种例子，其中，人类抗MN IgG1通过抗体依赖型细胞介导的细胞毒性，介导肿瘤细胞裂解。因此，所述抗体可用于治疗MN被上调的癌症，或者可用于诊断MN被上调的癌症。

