



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101193912 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 10

(21) 申请号 200680020846. 5

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 03. 10

A61P 35/02(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

10-2005-0077906 2005. 08. 24 KR

60/679, 910 2005. 05. 11 US

11/312, 126 2005. 12. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 12. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2006/000870 2006. 03. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02006/121240 EN 2006. 11. 16

(73) 专利权人 狄诺纳有限公司

地址 韩国首尔

(72) 发明人 朴圣会 郑景天 崔银玲 朴承杓

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

C07K 14/705(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

(56) 对比文件

TKACZUK J. 等. The CBF. 78 monoclonal antibody to human sialophorin has distinct properties giving new insights into the marker and its activation pathway. 《Tissue Antigens》. 1999, 第 54 卷第 1-15 页.

PARK WS 等. Production and the characterization of monoclonal antibody against CD43, K06. 《Tissue antigens》. 2004, 第 63 卷 (第 1 期), 第 46-53 页.

数据库提交. Leukosialin. 《EBI Uniprot Database》. 1990, 登录号 P16150.

审查员 周霞

权利要求书 2 页 说明书 13 页

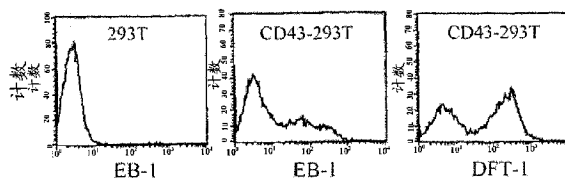
序列表 2 页 附图 7 页

(54) 发明名称

急性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤特异的 CD43 表位及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种在人急性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤细胞上表达的 CD43 表位及其用途。更具体地, 本发明涉及一种在人急性白血病、淋巴母细胞性淋巴瘤细胞表达, 但不在成熟造血细胞、造血干细胞和非造血细胞上表达的 CD43 表位, 还涉及它在急性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤上的诊断和治疗应用。



1. 一种由 CD43 表位组成的分离的多肽,其中所述 CD43 表位的氨基酸序列为 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2。
2. 根据权利要求 1 的分离的多肽,其中所述 CD43 表位为 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。
3. 一种特异性结合 CD43 表位的单克隆抗体,其中所述 CD43 表位的氨基酸序列为 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2。
4. 一种特异性结合由 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列组成的多肽的单克隆抗体。
5. 根据权利要求 3 的单克隆抗体,其中所述抗体特异性结合由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的多肽。
6. 根据权利要求 3 的单克隆抗体,其中所述抗体是通过用所述 CD43 表位免疫动物,并且筛选与所述 CD43 表位特异性结合的抗体而产生的。
7. 根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体,其中所述抗体为人或动物单克隆抗体。
8. 根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。
9. 根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体,其中所述抗体用选自放射性同位素、发光物质、酶和染色物质的化合物标记。
10. 根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体,其中所述抗体用荧光物质标记。
11. 根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体,其中所述抗体被连接到选自放射性同位素、毒性化学物质和抗肿瘤剂的毒性物质上。
12. 根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体,其中所述抗体被连接到毒性蛋白质上。
13. 根据权利要求 12 的单克隆抗体,其中所述抗体与所述毒性蛋白质结合以产生融合蛋白。
14. 一种产生权利要求 3 或 4 的单克隆抗体的细胞。
15. 权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体用于制备诊断急性白血病的试剂盒的用途,其中,在使用所述试剂盒时,进行包括将生物样品中的白血病细胞与所述 CD43 表位单克隆抗体孵育,并检测对所述 CD43 表位单克隆抗体的阳性免疫反应的步骤。
16. 根据权利要求 15 的用途,其中所述阳性免疫反应的检测可以用检测酶反应、发光或辐射的装置确认。
17. 根据权利要求 15 的用途,其中所述阳性免疫反应的检测可以用检测荧光的装置确认。
18. 权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体用于制备诊断具有白血病急性发作的慢性白血病的试剂盒的用途。
19. 权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体用于制备诊断淋巴母细胞性淋巴瘤的试剂盒的用途。
20. 权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体用于制备治疗急性白血病的药物的用途。
21. 根据权利要求 20 用途,其中所述 CD43 表位单克隆抗体被连接到选自放射性同位素、毒性化学物质和抗肿瘤剂的毒性物质上。
22. 根据权利要求 20 用途,其中所述 CD43 表位单克隆抗体被连接到毒性蛋白质上。
23. 权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体用于制备治疗具有白血病急性发作的慢性白血病的药物的用途。
24. 权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体用于制备治疗淋巴母细胞性淋巴瘤的药物

的用途。

25. 一种治疗急性白血病的药物组合物,包括权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体和一种可药用载体。

26. 一种治疗具有白血病急性发作的慢性白血病的药物组合物,包括权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体和一种可药用载体。

27. 一种治疗淋巴母细胞性淋巴瘤的药物组合物,包括权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体和一种可药用载体。

28. 一种白血病诊断试剂盒,包括权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体。

29. 一种淋巴瘤诊断试剂盒,包括权利要求 3 或 4 的 CD43 表位单克隆抗体。

急性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤特异的 CD43 表位及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以提交到美国专利商标局的美国临时申请 60/679,910(提交日 2005 年 5 月 11 日)和 11/312,126(提交日 2005 年 12 月 20 日),和提交到韩国知识产权局的韩国专利申请 2005-0077906(提交日 2005 年 8 月 24 日)作为优先权基础并享有这些申请的权益,这些申请的全部内容通过引用的方式纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种人急性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤细胞上表达的 CD43 表位及其用途。具体而言,本发明涉及一种在人急性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤细胞上表达、但不在成熟造血细胞和造血干细胞上表达的 CD43 表位,还涉及它在急性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤细胞的诊断和治疗上的用途。

背景技术

[0004] CD43 分子也被称为涎福林或白涎蛋白,它是一种在除红细胞外的大多数造血细胞中表达的细胞表面分子。人 CD43 具有粘蛋白样的胞外域(235 个氨基酸(aa)、跨膜域(23 个 aa)和胞质内域(123 个 aa),三者均由一个外显子编码(Pallant et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1989,86 :1328-32;Shelley et al., Proc Natl Acad Sci USA 1989,86 :2819-23)。人 CD43 的胞外域富含氨基酸丝氨酸(46 个残基)和苏氨酸(47 个残基),它们大部分携带大约 80 个 O-连接的糖链。另外,CD43 携带 1 个 N-连接的糖链。这些 O-聚糖的结构在不同类型的细胞之间不同(Carlsson et al., J Biol Chem. 1986,261 :12787-95)。

[0005] CD43 基因由被一个 378 bp 的内含子分开的两个外显子组成,藉此,整个翻译产物由第二个外显子编码(Shelley et al., Biochem J. 1990,270 :569-76)。CD43 已经被认为是限于除红细胞外的大部分白细胞、血小板和造血干细胞的特异性白细胞型标记(Remold-0' Donnell et al., Blood. 1987,70 :104-9;Fukuda, Glycobiology. 1991, 1 :347-56)。然而,已经证明 CD43 在非造血源的人肿瘤细胞中表达,所述人肿瘤细胞为例如人宫颈癌细胞系(CaSKI)、人肺癌细胞系(A549)、人乳腺癌细胞系(MCF7)、人纤维肉瘤细胞系(HT 1080)和人结肠腺癌细胞系(COLO205、HT 29、Caco-2、DLD-1 和 SW480)(Fernandez-Rodriguez et al., Tumour Biol. 2002,23 :193-201)。CD43 还在人结肠癌组织中表达(Sikut et al, Int J Cancer. 1999,82 :52-8;Jung et al, Korean J Pathol. 38 :8-14)。

[0006] 生物合成研究表明,具有大约 40kDa 的预测大小(包括一个 N-聚糖)的 CD43 前体在电泳时在 54kDa 的分子量处形成明显迁移条带。该前体随后被转化为一个成熟的糖基化分子,其分子量由于不同的糖基化作用而从 115kDa 到最高至 200kDa 以上不等。胸腺细胞、CD4+T 淋巴细胞和单核细胞主要表达 115kDa 的同种型,而 130kDa 的形式大部分在激活的 CD4+T 细胞、CD8+ 静息细胞和激活 T 细胞、嗜中性粒细胞、血小板和 B 细胞上存在

(Rosenstein et al., Immunol Res. 1999, 20 :89-99)。在同一细胞的表面似乎可以有多种的同种型共表达。被严格调节的翻译后 O 糖基化模式产生了在不同细胞类型中差异表达的这些特征性分子量同种型。特别地,核心 2 β -1,6-N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 (C2GnT) 的表达使得 130 kDa CD43 同种型在胸腺细胞和 T 细胞中表达 (Piller et al., J Biol Chem. 1988, 263 :15146-50)。

[0007] 直到最近,多于 17 种的抗-人 CD43 抗体已经被报道。这些抗体大部分与胞外域上的糖表位作用,并且所有已知的抗-CD43 抗体检测到在成熟造血细胞上表达的 CD43 蛋白质(表 1)。因此,它们对检测或消除白血病或淋巴瘤细胞是无效的。

[0008] 表 1

[0009]

抗-CD4 抗体	CD43- 阳性细胞	CD43- 阴性细胞	表位	* 参考文献
T305	激活的 CD4 ⁺ T 细胞、 CD8 ⁺ T 细胞、胸腺细胞、骨髓中的髓细胞前体	粒细胞、红细胞、 血小板	核心-2	1,2
L10	T 细胞、胸腺细胞、B 细胞系、单核细胞、嗜中性粒细胞、 血小板	红细胞	1-78 唾液 酸酶抗性	3
L2	T 细胞、胸腺细胞、B 细胞系、单核细胞、嗜 中性粒细胞、 血小板	红细胞	1-78	
84-3C1	骨髓细胞、胸腺细胞、 T 细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞	血小板、 红细胞	对唾液酸酶 敏感的糖	4
MEM-59	大部分的白细胞、 CD34 ⁺ 骨髓细胞		对神经氨酸 酶敏感的糖	5,6
MT-1, L60	T 细胞、单核细胞	B 细胞	对神经氨酸	7
DFT1	T 细胞、单核细胞	B 细胞	酶敏感的糖	
1G10	T 细胞、NK 细胞、粒细胞	B 细胞、 红细胞		8
CBF. 78 RDF/AD-9, 161-46	单核细胞和粒细胞的亚型、 T 细胞 T 细胞、单核细胞、粒细胞 T 细胞、单核细胞、粒细胞	B 细胞 B 细胞	对神经氨酸 酶具有抗性 对神经氨酸 酶敏感的糖 对神经氨酸 酶具有抗性	9
4D2	COLO 205, K562, Jurkat		细胞内 (337-343)	10
4D1	激活的 CD4 ⁺ T 细胞、单核细胞	B 细胞	核心-2 糖	Mukasa et al., 1999

[0010] *1. Fox et al., J Immunol. 1983, 131 :762-7 ;2. Saitoh et al., Blood. 1991, 77 :1491-9 ;3. Remold-O' Donnell et al., Blood. 1987, 70 :104-9 ;4. Borche et al., Eur J Immunol. 1987, 17 :1523-6 ;5. Stefanova et al., Folia Biol (Praha). 1988, 34 :255-65 ;6. Alvarado et al., Eur J Immunol. 1995, 25 :1051-5 ;7. Stross et al, J Clin Pathol. 1989, 42 :953-61 ;8. Horejci et al., 1997, In Kishimoto T, et al, Leucocyte Typing, Vol. VI :White Cell Differentiation Antigens 494. Garland, New York and London ;9. Tkaczuk et al., Tissue Antigens. 1999, 54 :1-15 ;10. Sikut et al., Int J Cancer. 1999, 82 :52-8 ;11. Mukasa et al, Int Immunol. 1999, 11 :259-68.

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴

母细胞性淋巴瘤相关的 CD43 表位,其中该表位在人急性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤细胞上表达,但不在成熟的造血细胞和造血干细胞上表达。因此,本发明提供一种 CD43 表位的分离的多肽,包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

[0012] 本发明的另一个目的是提供识别 CD43 表位的物质。优选地,本发明提供一种与包括 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 CD43 表位特异性结合的抗体或其片段。所述抗体或其片段优选特异性结合包括 SEQ IDNO :2 的氨基酸序列的多肽。

[0013] 本发明的第三个目的是提供一种产生识别 CD43 表位的物质的方法。

[0014] 本发明的第四个目的是提供用于急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤诊断的物质。

[0015] 本发明的第五个目的是提供一种对急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤进行诊断的方法。因此,本发明提供一种诊断急性白血病的方法,包括将生物样品中的白血病细胞与抗 -CD43 表位抗体一起孵育,并检测对抗 -CD43 表位抗体的阳性反应。本发明提供一种诊断具有白血病急性发作的慢性白血病的方法,包括将生物样品中的白血病细胞与抗 -CD43 表位抗体一起孵育,并检测对抗 -CD43 表位抗体的阳性反应。本发明提供一种诊断淋巴母细胞性淋巴瘤的方法,包括将生物样品中的淋巴瘤细胞与权利要求 6 的抗 -CD43 表位抗体一起孵育,并检测对抗 -CD43 表位抗体的阳性反应。

[0016] 本发明的第六个目的是提供一种能杀死急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤的肿瘤细胞的药物组合物。

[0017] 本发明的第七个目的是提供一种通过应用本发明的诊断物质进行 诊断的方法。

[0018] 另外,本发明提供一种应用本发明的治疗物质进行治疗的方法。

附图说明

[0019] 通过在与附图一起考虑时参照下面的详细描述,本发明可得到更好的理解,从而对本发明更为完整的理解及与之相伴的许多优点可容易地显而易见,其中:

[0020] 图 1 是通过杂交瘤克隆的上清液进行的、胸腺的免疫组织化学染色的照片,所述杂交瘤克隆产生特异性针对 CD43 表位的 EB-1 单克隆抗体。

[0021] 图 2 是 EB-1 单克隆抗体在人胸腺细胞表面的反应性的三色流式细胞术照片。

[0022] 图 3 是 EB-1 单克隆抗体在人外周血白细胞和脐带血造血干细胞表面的反应性的三色流式细胞术照片。

[0023] 图 4 是 EB-1 单克隆抗体在人骨髓细胞表面的反应性的三色流式细胞术照片。

[0024] 图 5 是 BB-1 单克隆抗体在人 CD43 转染的 29T 细胞系表面的反应性的单色流式细胞术照片。

[0025] 图 6 是用或者不用唾液酸酶处理时 EB-1 单克隆抗体在人 Mol t-4 细胞系表面的反应性的单色流式细胞术照片。

[0026] 图 7 是用或者不用唾液酸酶处理时,人胸腺细胞和 Mol t-4 细胞系的细胞溶胞产物在 SDA-PAGE 分析后、经 EB-1 单克隆抗体免疫印迹的照片。

[0027] 图 8 是 11 种类型的 CD43 缺失突变体示意图。

[0028] 图 9 是 11 种类型的 CD43 缺失突变体的 SDA-PAGE 分析后、用 EB-1 单克隆抗体和抗 -GST 多克隆抗体进行的免疫印迹的照片。

- [0029] 图 10 是 EB-1 单克隆抗体在人白血病细胞表面的反应性的单色流式细胞术照片。
- [0030] 图 11 是用 EB-1 单克隆抗体对淋巴母细胞性淋巴瘤组织进行免疫组织化学染色的照片。
- [0031] 图 12 是 EB-1 单克隆抗体和抗-人 I 类 MHC 单克隆抗体在 RAG-1 缺陷型小鼠的外周血中的白血病细胞表面的反应性的双色流式细胞术照片,所述 RAG-1 缺陷型小鼠通过静脉内途径注射 CCRF-CEM 细胞并用 EB-1 或对照抗体处理。
- [0032] 图 13 是用 CD43 表位免疫小鼠产生的两种其他抗-CD43 抗体 (EB-2 和 EB-3) 在 CD43 转染的 ETA 细胞系、人胸腺细胞、人外周血白细胞和人白血病样品的表面的反应性的单色流式细胞术照片。
- [0033] 图 14 是 5 种类型的 CD43 缺失型突变体的 SDA-PAGE 分析后的、用 EB-2 和 EB-3 单克隆抗体进行免疫印迹的照片。

具体实施方式

[0034] 本发明提供一种在急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤的肿瘤细胞上表达、但不在成熟的造血细胞和造血干细胞上表达的 CD43 表位。本发明的 CD43 优选为人 CD43,其序列已经被提交到 NCBI GenBank,登记号为 No. M61827。CD43 表位是任何包括 SEQ ID NO :1 氨基酸序列 (下文中,EP6) 并且更优选包括 SEQ ID NO :2 氨基酸序列 (下文中,EP9) 的多肽。

[0035] EP6 :Pro Leu Tip Thr Ser Ile (SEQ ID NO :1)

[0036] EP9 :Glu Gly Ser Pro Leu Tip Thr Ser Ile (SEQ ID NO :2)。

[0037] 在一个优选的实施方式中,本发明提供一个长度小于 200 个氨基酸、更优选长度小于 100 个氨基酸、更优选长度小于 50 个氨基酸的多肽,包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。

[0038] 本发明也提供了基本上由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的多肽。本发明也提供了由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的多肽。

[0039] 该 CD43 表位 (EP6 和 EP9) 可以从人组织纯化、通过化学合成或者由生物技术产生。

[0040] 而且,本发明提供了识别本发明的 CD43 表位的物质。该物质选自抗体、其片段和配体,并且所述抗体优选地选自单克隆抗体和多克隆抗体,更优选地,抗体来源于人和动物。

[0041] 所述抗体包括含抗原识别区域 (V_H 和 V_L) 的抗体的一部分,因此具有优先识别抗原的能力。另外,它也包括抗体片段,例如 $F(ab')_2$ 、Fab 和 Fv。优选地,抗体片段 (Fv) 包含抗体的单链多肽片段 (被称为单链 Fv),它通过在 V_H 和 V_L 两个多肽之间插入增加热稳定性的连接肽制备得到。

[0042] 本发明进一步提供了识别本发明的 CD43 表位的嵌合抗体。本文使用的术语“嵌合抗体”是指这样一种抗体:其中来源于一个物种的抗体的可变区与来源于另外一个物种的抗体的恒定区结合,或者是指 CDR 移植抗体。嵌合抗体通过重组 DNA 技术构建,例如 Shaw, et al., J. Immun., 138 :4534 (1987), Sun, LK., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 214-218 (1987) 中对嵌合抗体有所描述。

[0043] 其他已知的技术可以被用来产生 CDR 移植抗体和嵌合抗体。“CDR”或“互补决定区”或“高变区”被定义为抗体的轻链和重链上的这样一种氨基酸序列,所述氨基酸序列形成有助于形成抗原结合位点的三维的环结构。

[0044] 本文使用的术语“CDR 移植”抗体是指具有这样一段氨基酸序列的抗体:其中在轻链和/或可变域中的一个或多个 CDR 序列的至少一部分被来自一种抗体的 CDR 序列的类似部分取代,所述抗体对给定的抗原或受体具有一种不同的结合特异性。

[0045] 术语“轻链可变区”和“重链可变区”分别指轻链和重链的 N-末端部分的区域或结构域,对于每种抗体,它们具有各不相同的一级氨基酸序列。抗体的可变区由轻链和重链的氨基末端结构域组成,它们折叠在一起形成抗体的三维结合位点。

[0046] 据报道,类似的 CDR 序列是被“移植”到底物或受体抗体上。“供体”抗体是提供 CDR 序列的抗体,接受置换序列的抗体是“底物”抗体。用这里提供的教导并结合本领域已知的方法(见 Borrebaeck, C. A., *Antibody Engineering: A Practical Guide*, W. H. Freeman and Company, New York, 1992, 通过引用纳入),本领域的技术人员可以容易地产生这些 CDR 移植抗体。

[0047] 本发明还提供识别本发明的 CD43 表位的人源化抗体。本文使用的术语“人源化抗体”是指包含非人类(例如鼠类)抗体和人抗体的序列的抗体形式。这些抗体是包含来自非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。通常,人源化抗体可包括至少一个可变区、通常两个可变域的几乎全部,其中所有的或几乎所有的高变环与非类人免疫球蛋白的高变区对应,并且所有的或几乎所有的 FR 区域为人免疫球蛋白序列的 FR 区域。任选地,人源化抗体也可以包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常包括人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。参见例如美国专利 4,816,567(Cabilly);Queen et al. (1989)Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033;和 ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH(Oxford University Press 1996)。

[0048] 在本发明的一个优选的实施方案中,抗体与由 SEQ ID NO:1 中显示的氨基酸序列组成的肽相结合。

[0049] 抗体或其片段可以进一步包括选自放射性同位素、毒素、荧光物质和染色物质的标记物质。荧光物质的实例有荧光素-5-异硫氰酸(FITC)、藻红蛋白(PE)、别藻蓝蛋白(APC)和生物素,但是不局限于这些。

[0050] 抗体或其片段可以进一步包括选自放射性同位素、毒性化学物质、毒性蛋白质和抗肿瘤剂的毒性物质。抗体或其片段与毒性蛋白质结合产生融合蛋白。毒性蛋白质的实例包括蓖麻毒蛋白、皂草毒蛋白、多花白树毒蛋白、苦瓜毒蛋白、白喉类毒素和假单胞菌毒素,但是不局限于这些。

[0051] 本发明也提供产生该物质的一种方法,并且提供产生该抗体的细胞。产生该抗体或其片段的方法包括如下步骤:(a)用包含 CD43 表位的多肽、蛋白质或者蛋白质片段或表达 CD43 表位的细胞免疫动物,(b)从该免疫的动物提取脾细胞,(c)将脾细胞与骨髓瘤细胞融合,并(d)筛选产生针对 CD43 表位的抗体的杂交瘤细胞。该物质可以通过体外培养或将产生该物质的细胞注射到动物中获得。该物质可以从腹膜内注射产生该物质的细胞的动物的腹水中获得。该物质可以通过离子交换色谱或亲和柱色谱从培养上清液或腹水中纯化。

[0052] 在一个实施方案中,本发明涉及一种治疗急性白血病、具有白血病急性发作的慢

性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤的药物组合物,包括抗 CD43 表位抗体或其片段和可药用载体。

[0053] 根据本发明的抗体或其片段的给药可以使用药物组合物的任何可接受的给药模式进行。因此,给药例如可以是,抗原识别物质可以以固体、半固体、冻干粉剂的形式,或者以液体剂型,例如片剂、栓剂、丸剂、软弹性明胶胶囊和硬明胶胶囊、粉剂、溶液、悬浮液、或气雾剂等等,优选以适合精确剂量的简单给药的单位剂型,口服给予或更优选通过肠胃外途径给予患者。该药物组合物通常包括常规的药物载体或赋形剂和作为活性药剂(或其中一种活性药剂)的本发明的抗体,并且另外可以包括其他医学试剂、药用试剂、载体、佐剂、稀释剂、运载体或它们的组合。这些可药用的赋形剂、载体或添加剂以及用于各种给药模式的药物组合物的制备方法是本领域的技术人员所熟知的。活性组分的合适剂量可以基于受试者的状况选择,例如每天从 3mg 到 6,000mg。

[0054] 在一个实施方案中,本发明涉及一种使用抗体或其片段治疗急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤的方法,所述抗体或其片段选自抗体、抗体片段、单链多肽抗体片段和配体。该抗体或抗体片段优选选自单克隆抗体和多克隆抗体,并且更优选地,它来源于人和动物。优选地,该抗体或其片段进一步包括选自放射性同位素、毒性化学物质、毒性蛋白和抗肿瘤剂的毒性物质。

[0055] 而且,本发明提供了一种使用抗体或其片段进行急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤诊断的方法。该方法包括如下步骤:(a) 将抗体或其片段与生物样品中的细胞一起孵育,并(b) 检测显示出针对该抗体的阳性反应的样品。肿瘤优选为急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病或淋巴母细胞性淋巴瘤。

[0056] 另外,本发明提供了一种利用该物质的急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤的诊断试剂盒。除了该物质外,该诊断试剂盒可包括检测抗原-抗体反应的方法。该检测方法优选地选自流式细胞术、免疫组织化学、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)、荧光免疫测定(FIA)和发光免疫测定(LIA)。该检测方法包括标记物质,选自酶(例如辣根过氧化物酶(HRP))、荧光物质(例如 FITC)、发光物质(例如鲁米诺、异氨基苯二酰肼和光泽精)和同位素(例如 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 和 ^{131}I),但是并不认为以任何方式仅限于这些。抗原识别物质的反应性可以利用检测酶反应、荧光、发光或辐射的装置确定。该诊断试剂盒可以被做成包含抗体或其片段的流式细胞术试剂盒、免疫组织化学试剂盒、ELISA 试剂盒或条带试剂盒(strip kit)。

[0057] 参考如下的实施例对本发明作进一步地更详细地解释。然而,这些实施例并不能以任何方式解释为对本发明的范围的限制。

[0058] 实施例 1

[0059] 为了研究胸腺细胞上的特异性细胞表面蛋白质,按照以下实施例,将人胸腺细胞给予至 Balb/c 小鼠体内,以产生针对人胸腺细胞的抗体。

[0060] 10^7 个人胸腺细胞经腹膜内给予至 Balb/c 小鼠并将其免疫,六周内每两周免疫一次。在最后一次给药后 3 天取出该 Balb/c 小鼠的脾脏来制备脾细胞悬液。通过将人胸腺细胞免疫的 Balb/c 的脾细胞与对 9-氮鸟嘌呤具有抗性的 SP2/0-Ag14 小鼠骨髓瘤细胞融合产生单克隆抗体。细胞融合方法参照 Koeler 和 Milstein 的方法(Koeler&Milstein Nature, 1975, 256, 495-497)。用 50% 的聚乙二醇 4000 使 10^8 个脾细胞与 10^7 个骨髓瘤细胞融合。

洗涤细胞并将其重新悬浮于 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养基中, 该培养基含 20% 牛血清白蛋白、100 μ M 的次黄嘌呤、0.44 μ M 氨基蝶呤和 16 μ M 脱氧胸腺嘧啶苷 (HAT 培养基)。将细胞接种到四个 96-孔板上并且在 37°C 和 5% CO₂ 的培养箱中培养。经过两周时间当集落形成后, 制备上清液并且用免疫组织化学和流式细胞术观察抗体的反应性。

[0061] 每孔含有 10⁵ 个以上细胞的孔被认为是阳性组。从含有高反应性抗体的孔中收集细胞, 并且通过有限稀释法以每个孔 0.5 个细胞进行亚克隆以产生具有高反应性抗体的稳定的杂交瘤克隆。这个杂交瘤克隆分泌抗体至培养基中, 存储上清液为下一步备用。

[0062] 实施例 2

[0063] 为了在实施例 1 产生的杂交瘤克隆中发现分泌可识别胸腺细胞上的特异性细胞表面抗原的抗体的克隆, 根据通过将抗生物素蛋白和生物素结合的抗生物素蛋白-生物素复合物 (ABC) 染色法, 利用实施例 1 产生的杂交瘤克隆的上清液, 在 4 μ m 厚的新鲜组织切片和福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片上进行免疫过氧化物酶染色。单克隆细胞的上清液用作一抗。石蜡包埋的组织在除去石蜡之后用正常小鼠血清处理, 并且保持 1 小时以防止非特异性背景染色。在加入一抗后, 将它们放置过夜并用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤三次。加入用作二抗的生物素化的山羊抗小鼠免疫球蛋白。在室温下放置 1 小时, 用 PBS 洗涤三次。然后加入链亲和素和辣根过氧化物酶的缀合物。将 DAKO 生产的 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) 和 H₂O₂ 溶液加入到染色细胞中, 处理 20 分钟并用 PBS 洗涤三次。盖上盖玻片后在光学显微镜下观察。

[0064] 选出产生特异性针对人胸腺细胞的抗体的杂交瘤克隆系。具有识别胸腺细胞的抗体的一个克隆叫做 EB-1。图 1 是用产生 EB-1 抗体的杂交瘤克隆的上清液进行胸腺免疫组织化学染色的照片。如图 1 所示, 大部分的胸腺细胞被阳性染色。胸腺细胞的细胞表面被强染色, 因此 EB-1 抗体识别的抗原是细胞表面抗原。

[0065] 实施例 3

[0066] 为了根据胸腺细胞的发育阶段评估 EB-1 抗体的反应性, 进行了流式细胞术。将在心外科手术中从患者体内摘除的人胸腺充分地剪碎, 制备成单细胞的悬浮液。将 1 \times 10⁶ 个细胞悬浮于 100 μ l PBS 中, 并且分装到各测试管中。加入 100 μ l EB-1 培养上清液并搅拌。使该溶液在 4°C 下反应 30 分钟, 以 1,500rpm 离心 5 分钟, 沉淀用 PBS 洗涤两次以除去未反应的抗体。将该沉淀悬浮于含稀释的二抗 (FITC-缀合的山羊抗-30 小鼠 Ig, 由 Zymed 生产) 的 50 μ l 溶液中, 在 4°C 避光反应 30 分钟。洗涤两次以后, 将沉淀悬浮于含藻红蛋白 (PE)-缀合的抗-CD8 抗体和别藻蓝蛋白 (APC)-缀合的抗 CD4 抗体的 50 μ l 溶液中, 在 4°C 避光反应 30 分钟, 然后洗涤两次。最后, 在离心后, 向细胞沉淀中加入 200 μ l PBS。根据 CD4 和 CD8 的表达模式将胸腺细胞分成四种亚型 (即 CD4⁻CD8⁻ 双阴性胸腺细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性胸腺细胞和 CD4⁺CD8⁻ 或 CD4⁻CD8⁺ 单阳性胸腺细胞), 用流式细胞术分析 EB-1-阳性细胞的比率和 EB-1 染色的强度。图 2 显示三色流式细胞术分析的结果, 显示了 EB-1 对所有胸腺细胞亚型的反应性, 特别地, 在双阳性胸腺细胞上的染色强度最高。在图 2 中, 实线表示 EB-1 抗体的染色, 实心直方图表示无关抗体的阴性染色图。

[0067] 实施例 4

[0068] 为了获得 EB-1 分泌型杂交瘤克隆分泌的高浓度的抗体, 制备腹水。在将 0.5ml 的

降植烷 (pristine) 通过腹膜内途径给予 Balb/c 小鼠体内后三周, 用含 10% 牛血清的 DMEM 培养 10^7 个 EB-1 杂交瘤克隆。在 2 到 3 周后, 收集腹水。这时抗体的浓度是 5 到 10mg/ml。因为有许多污染蛋白质, 例如腹水中的白蛋白, 仅纯化对人胸腺细胞有应答的免疫球蛋白。为了从含大量抗体的腹水中纯化抗体, 进行 Q-Sepharose 色谱和羟基磷灰石 (Bio-gel HTP Gel, 由 Pharmacia 生产) 色谱过程, 所述腹水是从经腹膜内途径给予了 EB-1 单克隆杂交瘤细胞的 Balb/c 小鼠获得的。

[0069] 在冰上, 向每 10ml 腹水中缓慢加入 3.14g 硫酸铵 (用 50% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀)。将混合物以 15,000rpm 离心 30 分钟, 重新悬浮于去离子水中并用 1 升缓冲液 (20mM 磷酸盐, pH7.4) 透析。将该溶液经过并吸附于预先用缓冲液 (20mM 磷酸盐, pH7.4) 平衡过的 Q-Sepharose 柱, 然后使缓冲液再次通过该柱以除去柱中的游离蛋白质, 在这之后用缓冲液 I (20mM 磷酸盐, pH7.4) 和缓冲液 II (20mM 磷酸盐和 8.5 M NaCl, pH7.4) 以 0 M 到 0.8 M NaCl 的线性梯度洗脱柱中吸附的蛋白质。每个级分在 SDA-PAGE 中进行电泳, 收集含 EB-1 抗体的级分。

[0070] 该级分然后用缓冲液 (20mM 磷酸盐, pH6.8) 透析, 并且通过预先用缓冲液 (20mM 磷酸盐, pH6.8) 平衡过的羟磷灰石柱。缓冲液 (20mM 磷酸盐, pH6.8) 中的级分经过柱子以除去游离蛋白质, 并且用缓冲液 III (20mM 磷酸盐, pH6.8) 和缓冲液 (300mM 磷酸盐, pH6.8) 以 0 到 0.3M 的磷酸盐线性梯度洗脱。每个级分在 SDS-PAGE 中进行电泳, 收集含多于 95% 的 EB-1 抗体的级分。收集的 EB-1 抗体用合适的缓冲液透析并存储。经过重复实验, 从 1ml 的腹水制备得到 5 至 10mg 的 BB-1 抗体。

[0071] 实施例 5

[0072] 使用实施例 4 所纯化的 EB-1 抗体作为一抗, 根据实施例 3 的流式细胞分析实施本实施例, 来研究 EB-1 抗体是否对胸腺之外的正常白细胞产生反应。对于此分析, 将纯化的 EB-1 抗体直接结合到 FITC 或 PE, 在这种情况下不需要使用二抗来获得荧光, 或者生物素-缀合的 EB-1 抗体与荧光-缀合的链亲和素结合使用。

[0073] 下面的表 2 显示正常外周血白细胞、培养在含 $10 \mu\text{g/ml}$ 植物凝集素 (PHA) 或 $5 \mu\text{g/ml}$ 抗-CD3 抗体的培养基中的激活的外周血单核细胞、正常脾细胞、正常胸腺细胞和脐带血中的 $\text{CD}34^+\text{AC}133^+$ 造血干细胞的细胞表面上 EB-1 抗体的反应性。除了胸腺细胞外, 所有这些细胞都对 EB-1 抗体呈阴性。正常白细胞的流式细胞分析的代表性结果在图 3 中显示, 其中实线代表 EB-1 抗体的染色, 实心直方图表示无关抗体的阴性染色图。

[0074] 表 2

[0075]

细胞	EB-1- 阳性
外周血细胞	
红细胞	-*
淋巴细胞	-
单核细胞	-
粒细胞	-
血小板	-
激活的外周血	
PHA (10 μ g/ml)	-
抗 CD3 抗体 (5 μ g/ml)	-
脾细胞	
胸腺细胞	-
脐带血中的 CD34 ⁺ AC 133 ⁺ 造血	++*
干细胞	-

* 阴性染色

** 多于 90% 细胞阳性染色

PHA, 植物凝集素

[0076] 实施例 6

[0077] 使用实施例 4 所纯化的 EB-1 抗体作为一抗, 根据实施例 2 的免疫组织化学测定法实施本实施例, 以确定 EB-1 抗体是否对胸腺之外的正常组织产生反应。下面的表 3 显示 EB-1 抗体在各个不同组织中的反应性。除了胸腺细胞之外, 所有其他组织包括外周淋巴组织、小脑、胰、卵巢和睾丸、皮肤、肺、肾上腺和肾均为阴性染色。

[0078] 表 3

[0079]

器官	例数	EB-1 阳性数
淋巴系统		
淋巴结	18	0
扁桃体	3	0
胸腺	6	6
脾	4	0
冲经系统		
大脑	4	0
小脑	4	0
消化系统		
食管	3	0
胃	10	0
小肠	2	0
大肠	2	0
肝	7	0
胰	4	0
阑尾	4	0
生殖系统		
睾丸	2	0
卵巢	8	0
子宫	4	0
其他		
肺	8	0
肾	9	0
肾上腺	5	0
皮肤	4	0

[0080] [0084] 实施例 7

[0081] 使用实施例 4 所纯化的 EB-1 抗体作为一抗, 根据实施例 3 的流式细胞分析实施本实施例, 来研究 EB-1 抗体是否对正常骨髓细胞产生反应。对于此分析, 将生物素 - 缀合的 EB-1 抗体和 APC- 缀合的链霉亲和素, 与 FITC- 缀合的抗 CD10、抗 CD33、抗 CD38、抗 CD71 或抗 AC133 和 PE- 缀合 - 抗 CD34 结合使用。图 4 是三色流式细胞分析的结果, 其中对 CD34⁺ 细

胞设门。多能干细胞被定义为骨髓或脐带血中的 CD34⁺AC133⁺ (图 4A) 或 CD34⁺CD38^{-/-} (图 4B) 细胞, 并且它们完全不会显示出对 EB-1 抗体的反应性。另外, 含有几乎所有的集落形成细胞 (例如能够形成粒细胞、红细胞、单核细胞、巨核细胞 (CFU-GEMM)、CFU-GM 和爆发集落形成单位红细胞的祖细胞) 的 CD34⁺CD33⁺ 细胞 (图 4D) 和 CD34⁺CD71^亮 红细胞定向祖细胞 (图 4E) 也没有被 EB-1 抗体染色。相反, 在大部分的淋巴定向 CD34⁺CD10⁺ 前体 (图 4C) 上观察到 EB-1 抗体的阳性染色。

[0082] 总结本结果, EB-1- 反应性被限制在胸腺细胞和骨髓中的部分造血前体中, 但是在包括成熟外周血细胞和造血干细胞的其他任何造血细胞和非造血组织中不存在。

[0083] 实施例 8

[0084] 为了明确 EB-1 抗体识别的抗原, 使用 Invitrogen 生产的 poly(A)+RNA 和 pcDNA3 表达载体制备人胸腺细胞的 cDNA 文库。该文库包含 3.5×10^6 个独立集落。使用的宿主菌的菌株是大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) MC1061/P3。质粒 pMIK/D3T 31 的构建是通过将 Gb3 合酶克隆 pD3T 31 (Haraguchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994, 91:10455-9) 的 XhoI 片段插入到 pMIK/Neo 表达载体中。

[0085] 如前所述 (Davis et al., Methods in Molecular Biology, Elsevier Science, New York 1986:285-289), 先扩增 cDNA 文库的质粒并使用 DEAE-葡聚糖将其与质粒 pMIK/D3T-31 一起转染到 293T 细胞中。10-cm 的培养皿上 1.5×10^6 个未完全汇合的 293T 细胞用 cDNA 文库质粒和 pMIK/D3T-31 各 8 μ g 共转染。在 60h 后, 转染的细胞从培养皿上解离并且与 1:200 稀释的 EB-1 抗体在冰上共孵育 45 分钟。如前所述 (Wysocki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1978, 75:2844-8), 将细胞接种于包被了山羊抗小鼠 IgM 的培养皿上。将从长于培养皿中细胞 (panned cell) 获得的质粒 DNA 转化到 293T 中。扩增得到的质粒 DNA 被再次转染, 并且同样的步骤被再重复 4 次。之后制得每个包含 30 个集落的 96 个孔 (pool) 并通过 EB-1 反应性进行筛选。最后, 筛选出来自两个阳性孔的 17 个克隆, 并且利用微量 DEAE-葡聚糖转染和免疫荧光测定分离在 293T 上产生 EB-1 反应性的三个单克隆。

[0086] 分离的 cDNA 质粒用 XhoI 和 HindIII 消化, 并且克隆进噬菌粒 BlueScript (pBSK) KS(+) 载体中。该克隆的缺失型突变体用 Kilo-Sequence 缺失试剂盒制备。使用 T3/T7 染料引物或者四个其他常用的双脱氧终止子进行双脱氧核苷酸终止测序, 用的是 Applied Biosystems 生产的 PRISM 染料终止子循环测序试剂盒和 377 型 DNA 测序仪。通过这个方法鉴定的 DNA 序列的 Blast 检索表明 EB-1 抗体识别的抗原是人 CD43。

[0087] 为了确认 EB-1 抗体识别的人 CD43 抗原, 用 EB-1 抗体和一种已知的抗 CD43 抗体 DFT-1 对人 CD43 转染的 293T 细胞染色。如图 5 所示, EB-1 抗体对野生型 293T 细胞不反应, 而 CD43 转染的 293T 细胞被 EB-1 和 DFT1 两种抗体染色。因此, EB-1 是抗人 CD43 的单克隆抗体。

[0088] 因为 CD43 是高度糖基化的蛋白质, 所以我们研究了对 CD43 分子的唾液酸酶处理是否改变 EB-1 抗体对 CD43 抗原的免疫反应性。图 6 显示经过或未经过唾液酸酶处理的 Mol1-4 细胞的流式细胞分析。虚线表示无关抗体的阴性染色曲线, 细实线和粗实线分别表示 EB-1 抗体对未经过和经过唾液酸酶处理的 Mol1-4 细胞的免疫反应性。BB-1 抗体对 Mol1-4 细胞的免疫反应性不受唾液酸酶处理的影响。

[0089] 为了确认这些结果,进行了 SDS-PAGE 和 Western 印迹。将 1×10^7 个经过或未经过唾液酸酶处理的人胸腺细胞或 Molt-4 肿瘤细胞悬浮于 1ml 的裂解缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 0.5% w/v Nonidet P-40 和 1mM 苯甲磺酰氟 (PMSF)) 中, 4°C 下振摇 30 分钟, 并且在 13,000g 下离心 15 分钟除去细胞核。在还原的条件下, 在 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 上电泳分离上清液。分离胶的丙烯酰胺的浓度是 10%, 并使用合适分子量的标记。蛋白质向硝酸纤维素膜的电泳转移在 45V 下进行 16 小时。在蛋白转移以后, 该硝酸纤维素膜用含 5% 脱脂乳和 0.05% 吐温 20 的 PBS 的封闭缓冲液孵育两个小时, 然后与经封闭缓冲液稀释、浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 EB-1 抗体孵育过夜。该膜用洗涤缓冲液 (含 0.05% 吐温 20 的 PBS) 冲洗三次, 并且与亲和纯化的山羊抗小鼠免疫球蛋白 G 孵育 1h, 该免疫球蛋白 G 缀合有辣根过氧化物酶, 并由封闭缓冲液 1 : 3000 稀释。在洗涤三次以后, 每个反应蛋白带用 Amersham Pharmacia Biotech 生产的增强化学发光 (ECL) 试剂盒检测。图 7 显示胸腺细胞 (A&B) 和 Molt-4 细胞 (C&D) 的溶胞产物采用 EB-1 抗体的 SDA-PAGE 和 Western 印迹分析。泳道 A 和 C 表示未经过唾液酸酶处理的细胞溶胞产物的电泳, 而泳道 B 和 D 是经过唾液酸酶处理的溶胞产物的电泳。EB-1 抗体识别经过和未经过唾液酸酶处理的两种 CD43 分子。这说明 EB-1 抗体可能识别 CD43 分子的未糖基化的区域。

[0090] 实施例 9

[0091] 为了确定 EB-1 抗体识别的 CD43 表位, 构建 CD43 突变体。人 CD43 基因的编码序列从 CD43cDNA 扩增得到并被用来构建表达载体。例如, 为了产生谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)-融合蛋白, 通过将 PCR 片段克隆进 Pharmacia 生产的 pGEX-2T 载体中来构建 CD43 重组质粒。PCR 扩增用的引物的选择是基于 GeneBank 中的序列, 并且经过修饰以包含 BamHI 和 EcoRI 或者和 BglIII 限制性位点, 以易于克隆。纯化的 PCR 产物和 pGEX-2T 载体都被 BamHI 和 BglIII 或者和 EcoRI 在 37°C 下消化过夜, 用由生产的 T4 DNA 连接酶在 16°C 连接过夜, 并且接着用来转化大肠埃希氏菌感受态 TOP10F' 细胞。图 8 显示出 11 个 CD43 缺失型突变体的示意图。例如, pGEX1-253 表示包含人 CD43 的第 1 到第 253 个氨基酸的 pGEX-2T 载体。

[0092] 为了表达含人 CD43 序列的 GST 融合蛋白, 用重组质粒转化的大肠埃希氏菌 TOP10 细胞在含 $50 \mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB (Luria broth) 培养基中 37°C 培养过夜。过夜培养的细胞用含相同浓度的氨苄青霉素的新鲜 LB 培养基稀释 20 倍, 并在 37°C 下培养 3 到 4h, 直至光密度值达到 0.6。在培养物中加入终浓度 1mM 的 IPTG 以诱导基因表达。37°C 下持续振摇孵育 4h 之后, 4°C 下 6000g 离心 15 分钟沉淀细胞, 然后每克沉淀细胞用 3ml 的裂解缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 100mM NaCl) 重新悬浮。悬浮液中加入终浓度 0.2mM 的 PMSF, 冰育 30min。

[0093] 为了用 EB-1 抗体进行 CD43 突变体的 Western 印迹, GST-CD43 融合蛋白每个溶胞产物的等份试样用 10% 的十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 随后被印迹到硝酸纤维素膜上。该硝酸纤维素膜用 EB-1 抗体或抗-GST 多克隆抗体染色, 并且每个反应蛋白带用根据实施例 8 的方法的增强化学发光检测。图 9 显示用 EB-1 (A) 和抗-GST (B) 抗体进行的 CD43 突变体的 Western 印迹分析。泳道 1 代表 pGEX1-253、泳道 2 为 pGEX1-98、泳道 3 为 pGEX1-87、泳道 4 为 pGEX1-81、泳道 5 为 pGEX1-75、泳道 6 为 pGEX1-70、泳道 7 为 pGEX70-99、泳道 8 为 pGEX71-81、泳道 9 为 pGEX73-81、泳道 10 为 pGEX76-81、泳道 11 为 pGEX73-80、泳道 12 为 pGEX2T, 以及泳道 13 为人胸腺细胞溶胞产物。如图 9 中所示,

pGEX73-81 包含通过 EB-1 进行 CD43 抗原识别的最小序列,因此针对 EB-1 抗体的 CD43 表位是 CD43 的第 73 到第 81 位氨基酸序列。该序列如下:Glu Gly Ser Pro LeuTrp Thr Ser Ile(SEQ ID NO:2)。因此,从 EB-1 抗体识别的表位不在成熟血细胞、造血干细胞、骨髓中的造血前体的亚型或任何非造血组织中表达这一角度来看,该序列是非常有用的。

[0094] 实施例 10

[0095] 实施例 3、5、6 和 7 显示,EB-1 免疫反应性局限于骨髓中除造血干细胞之外的造血前体的亚型。在本实施例中,根据实施例 3 的流式细胞分析,对 EB-1 抗体识别的 CD43 表位白血病细胞上的表达进行研究。来自白血病患者的外周血被收集在 EDTA 管中,并且红细胞和成熟粒细胞用 Amersham Pharmacia Biotech 生产的 Ficoll-Hypaque 离心除去。该纯化的细胞用 FITC-缀合的 EB-1 染色并用流式细胞仪分析。下面的表 4 是采用流式细胞术并利用 EB-1 抗体进行的白血病样品的标记分析的结果。在 38 个白血病病例(包括急性骨髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)和具有白血病急性发作的慢性骨髓性白血病(CML))中的 31 例(81.6%),肿瘤细胞都被 EB-1 抗体染色。图 10 示出使用了 EB-1 抗体的白血病细胞代表性流式细胞染色图。实线表示 EB-1 抗体的染色,实心直方图表示无关抗体的阴性染色图。

[0096] 表 4

[0097]

白血病类型	例数	EB-1 阳性	
例数	%		
AML	22	20	90.9
M1	6	6	100.0
M2	8	7	87.5
M3	1	1	100.0
M4	4	4	100.0
其他	3	2	66.7
ALL	13	9	69.2
具有白血病急性发作的 CML	3	2	66.7
全部	38	31	81.6

[0098] 使用实施例 4 所纯化的 EB-1 抗体作为一抗,根据实施例 2 的免疫组织化学分析实施本实施例,以研究 EB-1 抗体是否对淋巴母细胞性淋巴瘤细胞有反应。图 11 显示出使用 EB-1 抗体的淋巴母细胞性淋巴瘤组织代表性免疫染色图。总体来说,9 个淋巴母细胞性淋巴瘤病例中有 4 例(44.4%)表现出 EB-1 抗体染色阳性。

[0099] 因此,EB-1 抗体及其 CD43 表位可能是各类急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤的有力的诊断和治疗工具。

[0100] 实施例 11

[0101] 为了确定 EB-1 抗体的治疗能力,开发了 EB-1 免疫毒素和人白血病模型。为了产生免疫毒素,将 Sigma 生产的皂草毒蛋白和 EB-1 抗体通过化学插入的巯基(SH)基团间的二硫键缀合(Polito et al.,2004)。通过将 300 μ l 体积的 PBS 中的 2×10^5 个 CCRF-CEM 细胞注射到 RAG-1-缺陷型小鼠的尾静脉中建立小鼠的人白血病模型。一周以后,每隔一天(即第 7、9、11 和 13 天),通过快速浓注(在 300 μ l 体积的 PBS 中)至尾静脉,每只小鼠用四个 100 μ g 剂量的 EB-1 抗体、EB-1-皂草毒蛋白免疫毒素或者无关抗体处理。在 CCRF-CEM 细胞静脉注射后四周,根据实施例 3 和 10 的流式细胞分析,用 FITC 缀合的 EB-1 抗体和 PE-缀合的抗人 I 类 MHC 抗体,对从眼眶后网状组织(retro-orbital plexus)取得的血样染色。图 12 是小鼠血液中的白细胞的流式细胞分析的代表性结果。在对照小鼠中,

23.4%的外周血细胞是人 CD43 和人 I 类 MHC 双阳性的 CCRF-CEM 细胞,其中 CCRF-CEM 细胞在 EB-1-皂草毒蛋白免疫毒素处理的小鼠中的减少最高到 1.3%。与对照小鼠的白血病细胞负荷相比,仅用 EB-1 抗体处理的小鼠的白血病细胞负荷也降低大约 2 倍。因此,EB-1 抗体可提供治疗急性白血病细胞的有效工具,这是通过将毒性物质送递到肿瘤细胞、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或其他机制实现。

[0102] 实施例 12

[0103] EB-1 抗体识别 CD43 的第 73 至第 81 位的氨基酸序列即 Glu Gly SerPro Leu Trp Thr Ser Ile (SEQ ID NO:2)。本实施例的进行是为了开发对白血病和淋巴瘤的诊断和治疗有用的新的抗-CD43 抗体。编码包括 SEQ ID NO:2 在内的 CD43 的第 70 至第 98 位的氨基酸序列的 DNA 片段被克隆到 pQE-40 载体中,并且随后被用于转化感受态的大肠埃希氏菌 TOP10F' 细胞。转化的 TOP10F' 细胞根据实施例 9 的方法培养,并且通过使大肠埃希氏菌溶胞产物通过 Amersham PharmaciaBiotech 生产的 Nickel 柱,将 CD43 融合蛋白从大肠埃希氏菌溶胞产物中纯化出来。将 100 μg SY-CD43 融合蛋白与完全弗氏佐剂混合并通过腹膜内途径给予至 Balb/c 小鼠并将其免疫。四周以后,与不完全弗氏佐剂混合的另外 2 个 100 μg 剂量的 SY-CD43 融合蛋白间隔两周经腹膜内给药。在最后的加强免疫后三天,从免疫小鼠中取脾并且根据实施例 1 的融合方法制备杂交瘤细胞。杂交瘤细胞的培养上清通过流式细胞术用人 CD43-转染的鼠 EL4 细胞筛选,选出两个与 CD43-转染的 EL4 细胞反应的杂交瘤克隆,并分别命名为 EB-2 和 EB-3。图 13 显示使用了 EB-2 和 EB-3 抗体的 CD43-转染的 EL4 细胞系、人胸腺细胞、人外周血细胞和人急性白血病细胞的流式细胞分析。CD43-转染的 EL4 细胞系、人胸腺细胞和人急性白血病细胞为阳性,但是人外周血细胞对 EB-2 和 EB-3 抗体两者均呈阴性。因此,EB-2 和 EB-3 抗体两者的染色模式与 EB-1 的类似。

[0104] 实施例 13

[0105] 根据使用了 CD43 缺失型突变体的实施例 9 的 SDS-PAGE 和 Western 印迹进行本实施例,以确定 EB-2 和 EB-3 抗体识别的 CD43 表位。图 14 显示采用了 EB-2 和 EB-3 的 CD43 突变体的 Western 印迹分析。EB-3 抗体的 CD43 表位与 EB1 的类似。即,EB-1 抗体和 EB-3 抗体的最小表位都是 CD43 的第 73 至第 81 位的氨基酸序列 (SEQ IDNO:2;Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile)。然而,EB-2 抗体可识别比 EB-1 和 EB-3 更短的肽序列。EB-2 的最小表位是 CD43 的第 76 至第 81 位的氨基酸序列。其序列如下:Pro Leu Trp Thr Ser Ile (SEQ IDNO:1)。

[0106] 通过确定该 CD43 表位是否在组织检查或外周血检查中表达,本发明的 CD43 表位可用于急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤的诊断,原因在于本发明的 CD43 表位不存在于正常的非造血组织、成熟血细胞和除胸腺细胞外的激活的外周血中。本发明的 CD43 表位可以用作急性白血病、具有白血病急性发作的慢性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤治疗的靶物质,因为它不在造血干细胞和除胸腺细胞和骨髓中造血前体的亚型的正常组织中表达。

[0107] 具有生物学活性的多肽的例示性实施方案的描述是对本发明的说明。但是,由于对于本领域技术人员而言改变是显而易见的,因此本发明并不旨在局限于以上的具体实施方案。本发明的范围在以下的权利要求中限定。

序列表

<110> 狄诺纳有限公司

<120> 急性白血病和淋巴母细胞性淋巴瘤特异的 CD43 表位及其用途

<130>OP060571KR

<150>US 60/679, 910

<151>2005-05-11

<150>KR 10-2005-0077906

<151>2005-08-24

<150>US 11/312, 126

<151>2005-12-20

<160>2

<170>KopatentIn 1.71

<210>1

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>EP 6

<400>1

Pro Leu Trp Thr Ser Ile

1

5

<210>2

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>EP 9

<400>2

Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile

1

5

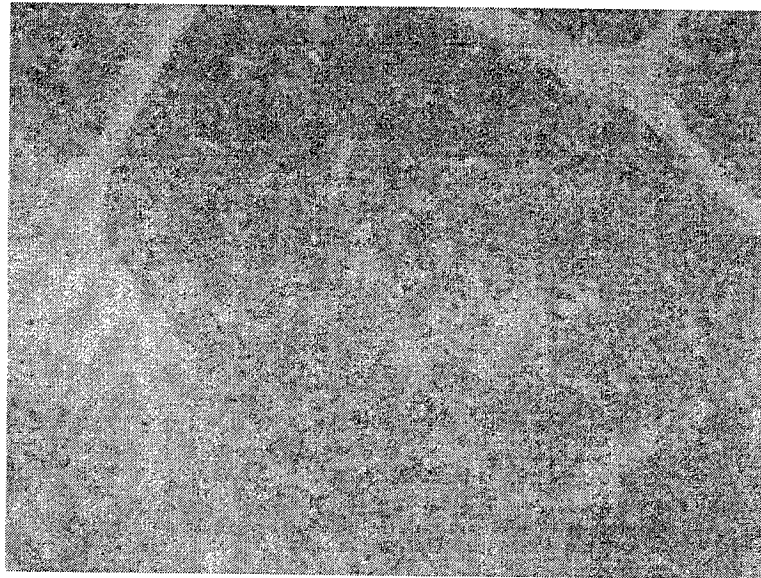


图 1

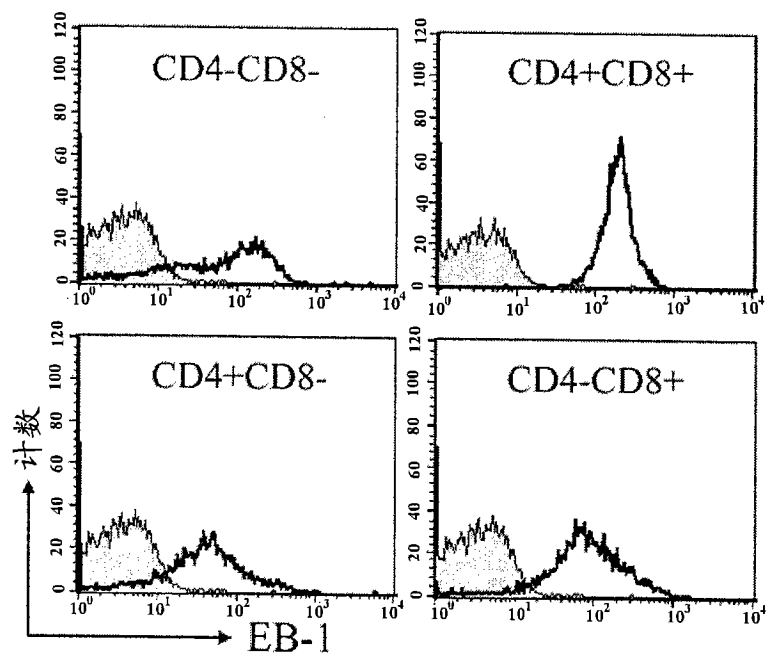


图 2

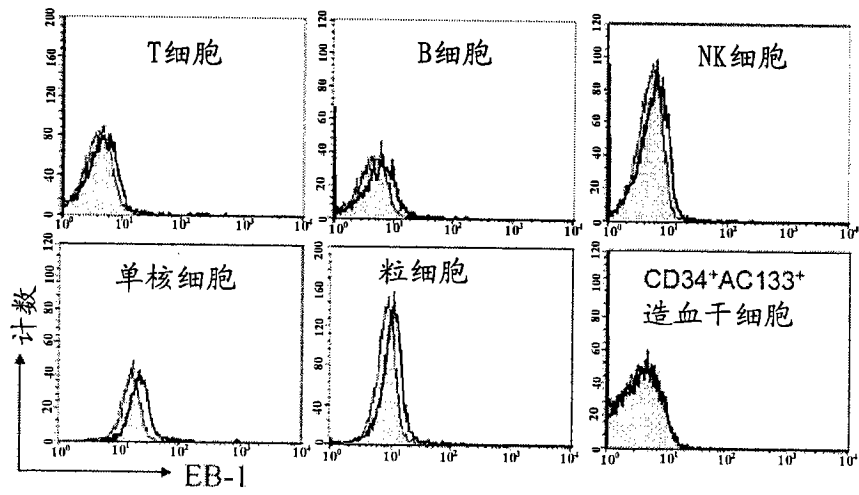


图 3

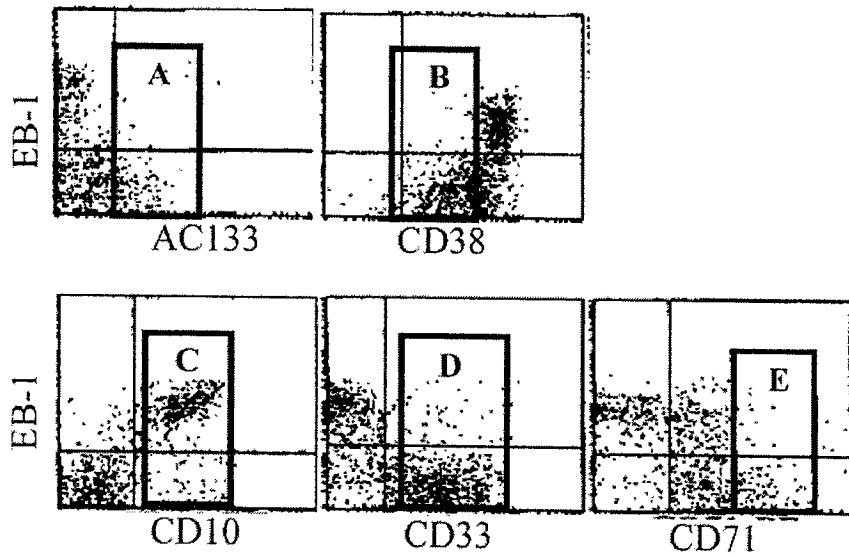


图 4

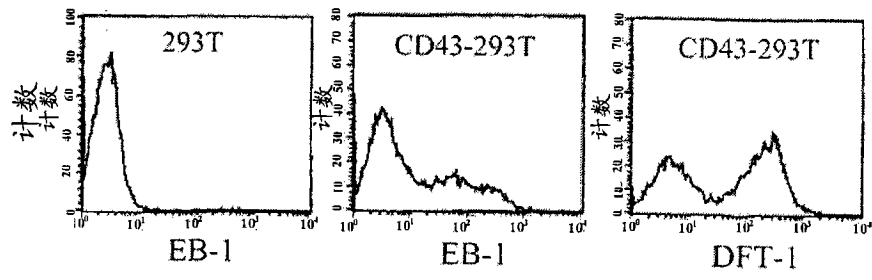


图 5

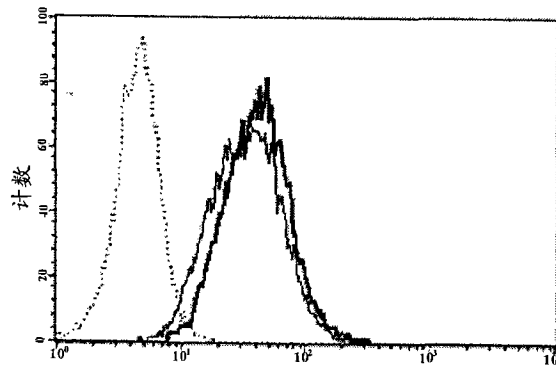


图 6

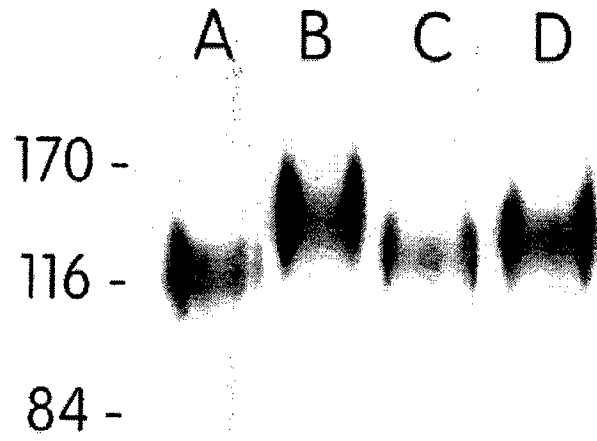


图 7

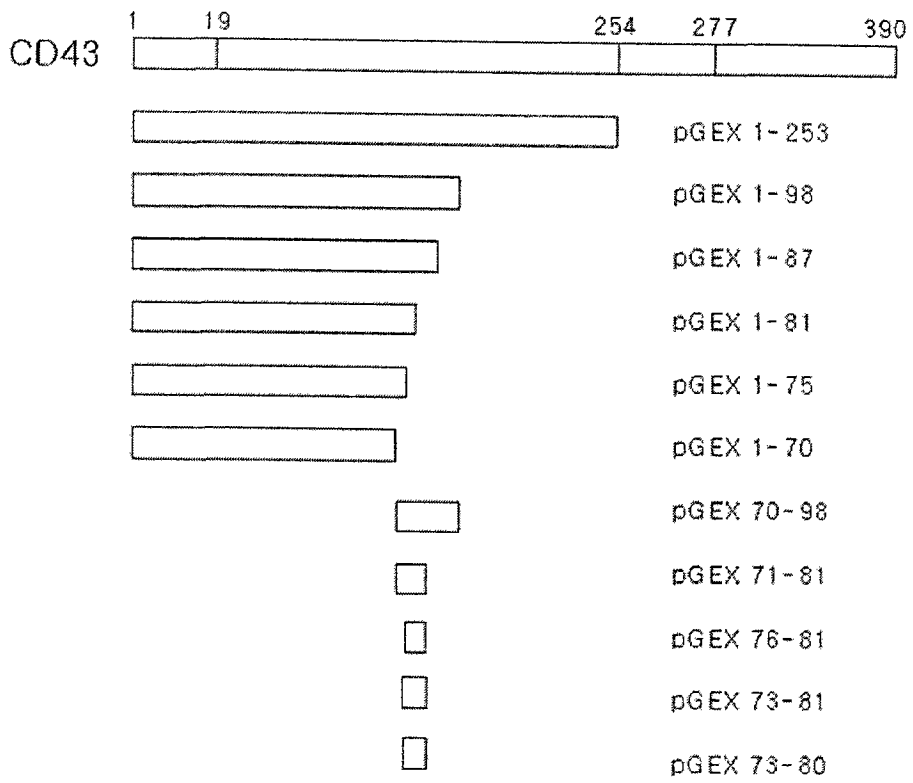


图 8

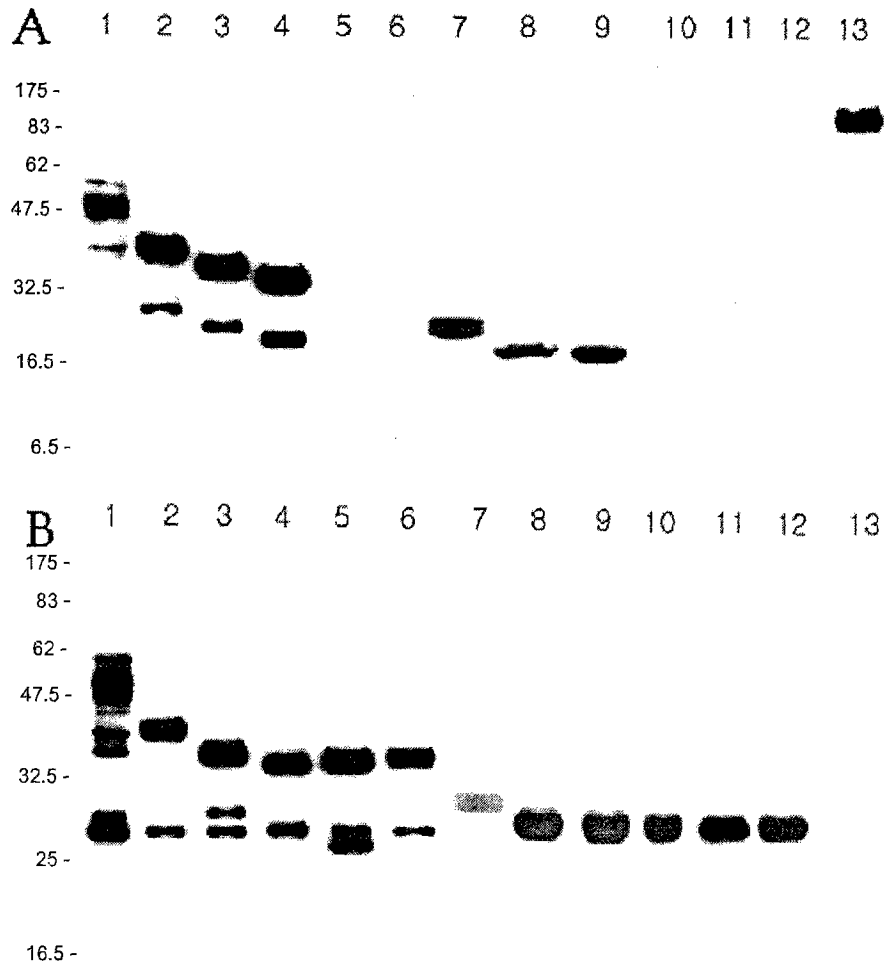


图 9

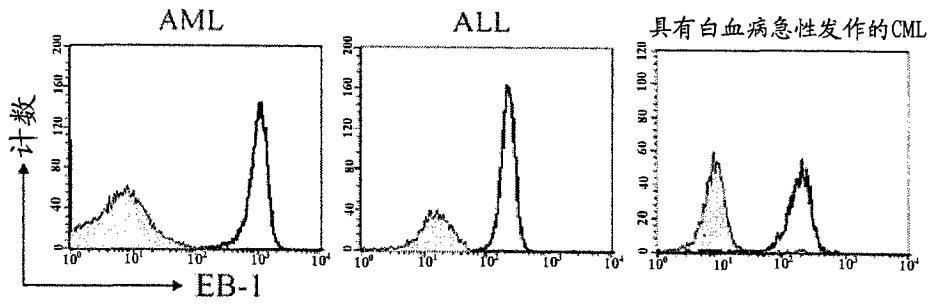


图 10

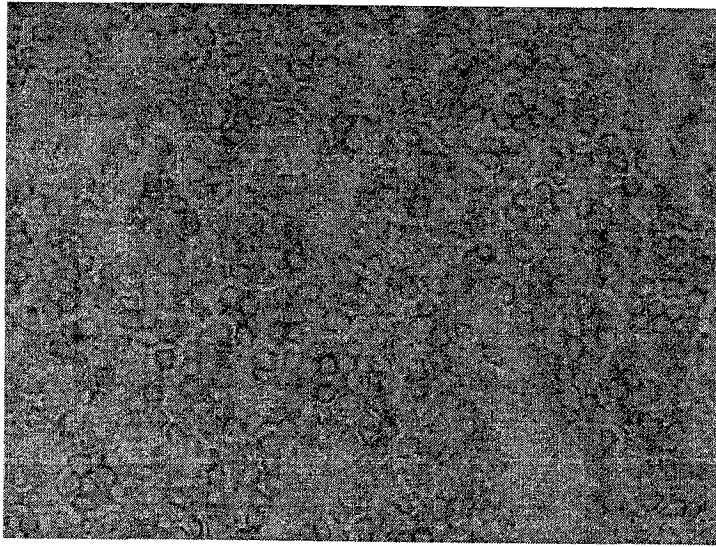


图 11

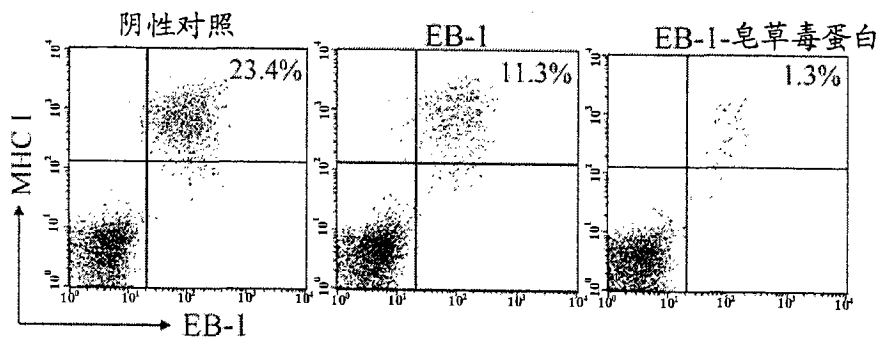


图 12

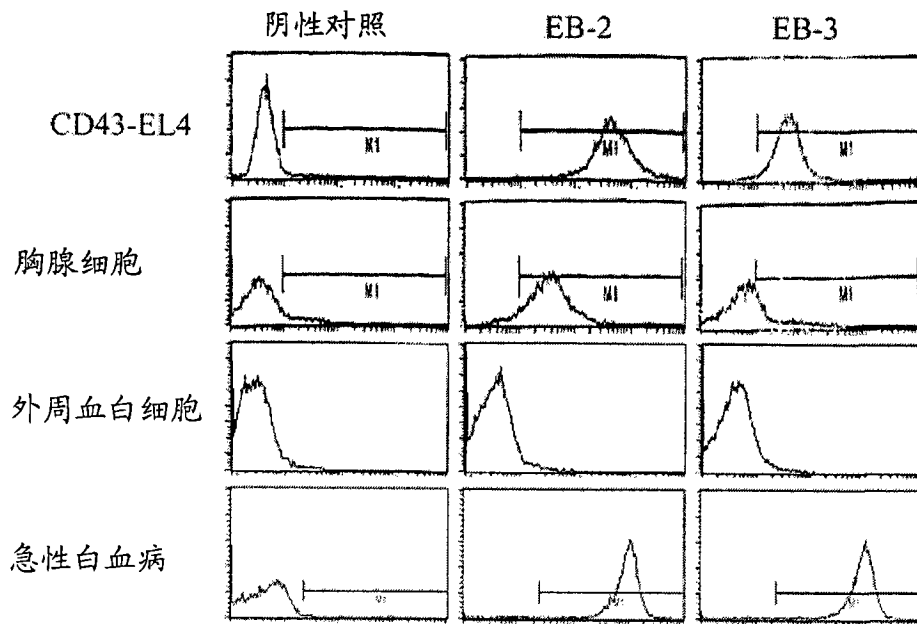


图 13

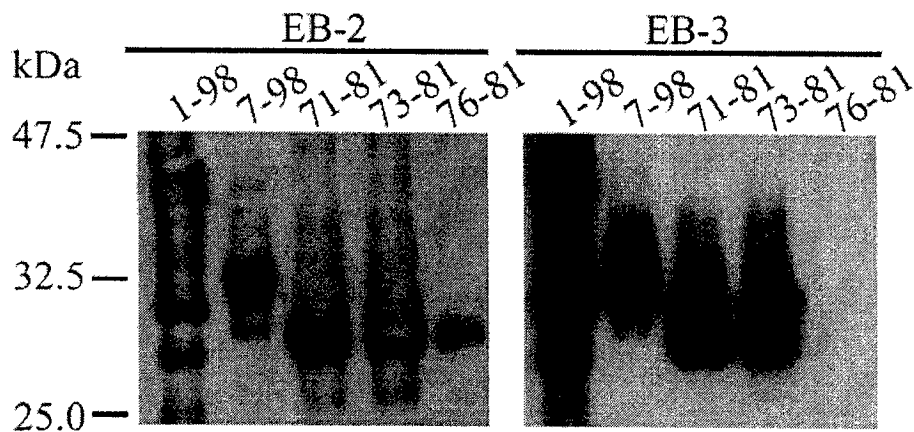


图 14

专利名称(译)	急性白血病和淋巴瘤母细胞性淋巴瘤特异的CD43表位及其用途		
公开(公告)号	CN101193912B	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN200680020846.5	申请日	2006-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	狄诺纳有限公司		
申请(专利权)人(译)	狄诺纳有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	狄诺纳有限公司		
[标]发明人	朴圣会 郑景天 崔银玲 朴承杓		
发明人	朴圣会 郑景天 崔银玲 朴承杓		
IPC分类号	C07K14/705 C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/395 A61K47/68 A61K2039/505 C07K7/06 C07K16/2896 G01N33/532 G01N33/57426 G01N2333/70596		
代理人(译)	姜建成		
审查员(译)	周霞		
优先权	1020050077906 2005-08-24 KR 60/679910 2005-05-11 US 11/312126 2005-12-20 US		
其他公开文献	CN101193912A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种在人急性白血病和淋巴瘤母细胞性淋巴瘤细胞上表达的CD43表位及其用途。更具体地，本发明涉及一种在人急性白血病、淋巴瘤母细胞性淋巴瘤细胞表达，但不在成熟造血细胞、造血干细胞和非造血细胞上表达的CD43表位，还涉及它在急性白血病和淋巴瘤母细胞性淋巴瘤上的诊断和治疗应用。

