

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[21] 申请号 200780027496.X

[43] 公开日 2009年7月22日

[11] 公开号 CN 101490088A

[22] 申请日 2007.6.20
[21] 申请号 200780027496.X
[30] 优先权
[32] 2006.6.22 [33] US [31] 60/805,589
[86] 国际申请 PCT/US2007/071688 2007.6.20
[87] 国际公布 WO2007/149932 英 2007.12.27
[85] 进入国家阶段日期 2009.1.20
[71] 申请人 健泰科生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 丹尼尔·K·柯克霍弗
拉杰什·维杰

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴

权利要求书 4 页 说明书 70 页 附图 11 页

[54] 发明名称

用于靶向 HEP SIN 的方法和组合物

[57] 摘要

提供了抗 HEP SIN 单克隆抗体及使用这些抗体的方法。

细胞系	同种型 ²	表位组	直接 ELISA ⁴	FACS(荧光中值)	
				LaCap-34 ¹ MAb (log ₁₀)	LaCap-17 ³ MAb (log ₁₀)
3H10.1.2	κ IgG1	A	[+]	112.4	50.2
1D5.1.9	κ IgG1	B	[+]	189.4	32.8
1P21.1	κ IgG2b	A	[+]	86.6	10.6
1B7.1.1	κ IgG1	C	[+]	7.1	4.8
3H1.1.1	κ IgG2b	A	[+]	112.4	18.6

¹LaCap-34 抗 HEP SIN 病毒和 HEP SIN 病毒的 LaCap
²LaCap-17 抗 HEP SIN 病毒和 HEP SIN 病毒的 LaCap
³Isocitip (Roche Diagnostics Corporation, IN, USA) 和 m Ab-1D SP 抗 HEP SIN 病毒 (Zymo Laboratories, CA, USA)
⁴人 HEP SIN 病毒
⁵LaCap-34 对照荧光中值: 6.3
⁶LaCap-17 对照荧光中值: 4.5

1. 一种分离的抗体，该抗体包含至少一种如下高变区(HVR)序列，其选自下述杂交瘤细胞系所生成抗体的HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2和LC-HVR3，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473，其中所述分离的抗体结合人HEPSIN。
2. 一种分离的抗体，该抗体包含下述杂交瘤细胞系所生成抗体的重链和/或轻链可变域序列，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473，其中所述分离的抗体结合人HEPSIN。
3. 一种免疫球蛋白多肽，该免疫球蛋白多肽包含至少一种如下高变区(HVR)序列，其选自下述杂交瘤细胞系所生成抗体的HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2和LC-HVR3，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473，其中所述免疫球蛋白多肽结合人HEPSIN。
4. 一种免疫球蛋白多肽，该免疫球蛋白多肽包含下述杂交瘤细胞系所生成抗体的重链和/或轻链可变域序列，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473，其中所述免疫球蛋白多肽结合人HEPSIN。
5. 一种分离的抗体，该抗体与下述杂交瘤细胞系所生成的抗体结合人HEPSIN上的相同表位，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473。
6. 一种分离的抗体，该抗体与下述杂交瘤细胞系所生成的抗体竞争结合人HEPSIN，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473。
7. 上述权利要求中任一项的抗体，其中全长IgG形式的所述抗体以150nM或更好的 EC_{50} 结合亲和力特异性结合人HEPSIN。
8. 权利要求7的抗体，其中所述 EC_{50} 结合亲和力为120nM或更好。

9. 权利要求7的抗体, 其中所述EC₅₀结合亲和力为100nM或更好。
10. 权利要求7的抗体, 其中所述EC₅₀结合亲和力为75nM或更好。
11. 权利要求7的抗体, 其中所述EC₅₀结合亲和力为50nM或更好。
12. 上述权利要求中任一项的抗体, 其中所述抗体特异性结合天然、部分变性或变性形式的HEPSIN。
13. 上述权利要求中任一项的抗体, 其中所述抗体结合可溶性的或附着于细胞的HEPSIN。
14. 上述权利要求中任一项的分离的抗体, 其中该抗体不是2006年出版的Cancer Research第66卷第3611-3619页所记载的抗HEPSIN抗体(例如如图4所例示的抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21和/或A24)或PCT公开文本WO2004/033630所披露的分离的HEPSIN抗体(例如第93页和图15A-D所提到的抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1和/或72H6)。
15. 上述权利要求中任一项的分离的抗体, 其中该抗体不与2006年出版的Cancer Research第66卷第3611-3619页所记载的抗HEPSIN抗体(例如如图4所例示的抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21和/或A24)或PCT公开文本WO2004/033630所披露的分离的HEPSIN抗体(例如第93页和图15A-D所提到的抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1和/或72H6)竞争结合人HEPSIN。
16. 上述权利要求中任一项的分离的抗体, 其中该抗体不与2006年出版的Cancer Research第66卷第3611-3619页所记载的抗HEPSIN抗体(例如如图4所例示的抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21和/或A24)或PCT公开文本WO2004/033630所披露的分离的HEPSIN抗体(例如第93页和图15A-D所提到的抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1和/或72H6)结合HEPSIN上的相同表位。
17. 一种HEPSIN抗体, 该HEPSIN抗体由下述杂交瘤细胞系的抗体编码序列所编码, 所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473。
18. 一种核酸分子, 该核酸分子包含编码上述权利要求中任一项的抗体的核酸序列。
19. 一种宿主细胞, 该宿主细胞包含权利要求18的核酸分子。

20. 一种细胞系，该细胞系能够生成权利要求1-17中任一项的HEPSIN抗体。
21. 一种生成权利要求1-17中任一项的抗体的方法，包括在所述抗体生成的条件下培养包含编码该抗体的核酸的宿主细胞。
22. 一种组合物，该组合物包含有效量的权利要求1-17中任一项的抗体和载体。
23. 一种诊断HEPSIN在样品中存在的方法，包括使所述样品与权利要求1-17中任一项的抗体接触。
24. 一种用于治疗与HEPSIN表达调节异常有关的疾病或疾患的方法，该方法包括给患者施用有效量的权利要求1-17中任一项的抗体，其中该抗体是连接有异源药剂的。
25. 权利要求24的方法，其中所述异源药剂是治疗剂。
26. 权利要求24的方法，其中所述异源药剂是标记物、细胞毒剂和/或放射性同位素。
27. 权利要求24的方法，其中所述患者是哺乳动物患者。
28. 权利要求27的方法，其中所述患者是人。
29. 权利要求24的方法，其中所述疾病是癌症。
30. 权利要求29的方法，其中所述癌症选自前列腺癌和卵巢癌。
31. 一种包括测定受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞的方法，其中所述细胞的存在表明所述受试者患有与HEPSIN表达调节异常有关的病症。
32. 一种预测受试者对与HEPSIN表达调节异常有关的疾病疗法的响应性的方法，所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞，其中所述细胞的存在表明该受试者会对所述疗法有响应。
33. 一种用于在接受与HEPSIN表达调节异常有关的疾病治疗的受试者中监测轻微后遗症的方法，所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞，其中所述细胞的检出表明存在轻微后遗症。
34. 一种用于在受试者中检测与HEPSIN表达调节异常有关的疾病的疾病状态的方法，所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞，其中所述细胞的检出表

明该受试者的疾病处于疾病状态。

35. 一种用于评价受试者发生与HEPSIN表达调节异常有关的病症的素因的方法，所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品种中的HEPSIN表达水平高的细胞，其中所述细胞的检出表明所述受试者具有发生所述病症的素因。
36. 一种用于在受试者中诊断与HEPSIN表达调节异常有关的病症的方法，所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品种中的HEPSIN表达水平高的细胞，其中所述细胞的检出表明所述受试者患有所述病症。
37. 一种阵列或蛋白质芯片，该阵列或蛋白质芯片包含一种或多种依照权利要求1-17中任一项的抗HEPSIN抗体或其能够结合HEPSIN的片段。
38. 一种试剂盒，该试剂盒包含权利要求37的阵列或蛋白质芯片和说明书，该说明书关于使用该阵列或芯片通过测定获自所述受试者的样品中的HEPSIN表达水平是否比正常参照样品种中的HEPSIN表达水平高来检测受试者中与HEPSIN表达调节异常有关的病症。

用于靶向HEPSIN的方法和组合物

相关申请的交叉引用

本申请依照35 USC §119要求2006年6月22日提交的美国临时申请No. 60/805,589的优先权，将其全部内容收入本文作为参考。

发明领域

本发明涉及抗HEPSIN抗体的领域，更具体地，涉及对于诊断学和其它HEPSIN靶向目的特别有用的抗HEPSIN抗体。

发明背景

HEPSIN是在上皮细胞表面上表达的II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP)。这种417个氨基酸的蛋白质由短的N末端胞质结构域、跨膜结构域和逆向C末端蛋白酶结构域紧密包装的单个清除受体富含半胱氨酸结构域构成(1)。HEPSIN的生理学功能尚不清楚。尽管其在胚胎发生的很早阶段中表达(2)，但HEPSIN缺陷小鼠是能存活的，且发育正常(3,4)。发现了HEPSIN对肝再生和凝固相关生理学功能不是必需的(3,4)。然而，已经将HEPSIN与卵巢癌[(5); WO2001/62271]和前列腺癌联系起来。数项基因表达研究鉴定HEPSIN为前列腺癌中最高度诱导的基因之一(6-11)。发现了HEPSIN RNA水平在正常前列腺和良性增生中是低的，但在前列腺癌瘤中（特别是在晚期中）强烈升高(8-10)。使用单克隆抗HEPSIN抗体的HEPSIN蛋白染色显示出HEPSIN表达在骨转移部位处和后期原发性肿瘤中最高(12)，这与下述发现一致，即升高的HEPSIN RNA水平与较高的Gleason等级和肿瘤进展有关(7-10,13)。

关于HEPSIN在前列腺癌中作用的实验证据来自Klezovitch等(14)的最近研究，其证明在非转移性前列腺癌的小鼠模型中，HEPSIN过表达导致了原发性肿瘤进展和转移。吸引人的是，HEPSIN过表达与基膜破裂有关(14)，这指出下述可能性，即HEPSIN活性以某种方式与基膜成分降解有联系。在体外，HEPSIN能够将潜在的生长因子肝细胞生长因子原(pro-HGF)转变成其活性双链形式(HGF)，其诱导Met受体信号传导[(15); (16); WO2006/014928]。由

于已经将HGF/Met途径与侵入性肿瘤生长和转移联系起来，因此HEPSIN过表达活化前列腺癌中的HGF/Met轴是可能的(15,16)。还显示出HEPSIN在体外切割其它底物，主要是凝固相关蛋白质(15,17)。然而，它们在肿瘤发生中的作用尚不知晓。

HEPSIN在前列腺癌和其它癌症中的强烈表达使之成为多种疾病（特别是癌症）的有吸引力的诊断标志物。此外，TTSP家族的其它成员诸如Matriptase和TMPRSS2自细胞表面脱落，而且已经在人乳汁中检测到脱落的Matriptase (18)。根据与这些TTSP的结构相似性，使用合适的检测系统在人体液中检测出肿瘤衍生HEPSIN是可能的。

明显的是，HEPSIN表达与多种疾病有关，且可能在多种疾病的病因学中发挥作用。HEPSIN表达与疾病的多项特征（诸如癌症的特定阶段和恶性程度）有关。在复杂疾病诸如癌症的临床管理中最困难的挑战之一是在患者中准确且及早地鉴定疾病。如此，虽然已经产生了一些表观结合HEPSIN的抗体(例如Tsuji等, *J. Biol. Chem.* (1991), 266(25):16948-16953; Torres-Rosado等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993), 90:7181-7185; WO2004/035733; WO2002/064839; WO2004/033630)，但清楚的是，得到在体外和在体内检测和/或靶向HEPSIN的有效且灵活的组合物和方法会是有益的。本文所提供的发明涉及此类组合物和方法。

完整收录本文中所引用的所有参考文献（包括专利申请和出版物）作为参考。

发明概述

本发明提供了能够在体外和在体内结合和/或靶向可溶性HEPSIN蛋白和细胞结合的HEPSIN蛋白的新抗体。产生了一组单克隆抗人HEPSIN抗体，其结合多种形式的HEPSIN且结合HEPSIN的不同表位。这些抗体具有多种用途，包括在用于测量生物学样品中HEPSIN水平的灵敏检测系统中的用途。

一方面，本发明提供了一种分离的免疫球蛋白多肽，其包含至少一种、二种、三种、四种、五种或所有如下高变区(HVR)序列，其选自下述杂交瘤细胞系所生成抗体的HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2和LC-HVR3序列，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473，其中

所述分离的免疫球蛋白多肽特异性结合人HEPSIN。例如，一方面，本发明提供了一种分离的抗体，该抗体包含至少一种、二种、三种、四种、五种或所有如下高变区(HVR)序列，其选自下述杂交瘤细胞系所生成抗体的HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2和LC-HVR3序列，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473，其中所述分离的抗体特异性结合人HEPSIN。在一个实施方案中，本发明提供了一种分离的抗体，该抗体包含至少一种、两种或所有选自HC-HVR1、HC-HVR2和HC-HVR3的HC-HVR，和至少一种、两种或所有选自LC-HVR1、LC-HVR2和LC-HVR3的LC-HVR。在一个实施方案中，本发明分离的抗体中的HVR序列是保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469的杂交瘤细胞系所生成抗体的HVR序列。在一个实施方案中，本发明分离的抗体中的HVR序列是保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7470的杂交瘤细胞系所生成抗体的HVR序列。在一个实施方案中，本发明分离的抗体中的HVR序列是保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7471的杂交瘤细胞系所生成抗体的HVR序列。在一个实施方案中，本发明分离的抗体中的HVR序列是保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7472的杂交瘤细胞系所生成抗体的HVR序列。在一个实施方案中，本发明分离的抗体中的HVR序列是保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7473的杂交瘤细胞系所生成抗体的HVR序列。

一方面，本发明提供了一种分离的免疫球蛋白多肽，其包含下述杂交瘤细胞系所生成抗体的重链和/或轻链可变域序列，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473，其中所述分离的免疫球蛋白多肽特异性结合人HEPSIN。例如，一方面，本发明提供了分离的抗体，其包含下述杂交瘤细胞系所生成抗体的重链和/或轻链可变域序列，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473，其中所述分离的抗体特异性结合人HEPSIN。在一个实施方案中，分离的抗体包含保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469的杂交瘤细胞系所生成抗体的重链和/或轻链可变域序列。在一个实施方案中，分离的抗体包含保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)

且保藏号为PTA-7470的杂交瘤细胞系所生成抗体的重链和/或轻链可变域序列。在一个实施方案中，分离的抗体包含保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7471的杂交瘤细胞系所生成抗体的重链和/或轻链可变域序列。在一个实施方案中，分离的抗体包含保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7472的杂交瘤细胞系所生成抗体的重链和/或轻链可变域序列。在一个实施方案中，分离的抗体包含保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7473的杂交瘤细胞系所生成抗体的重链和/或轻链可变域序列。

一方面，本发明提供了下述杂交瘤细胞系的抗体编码序列所编码的单克隆抗HEPSIN抗体，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473。

一方面，本发明提供了一种分离的单克隆抗体，其与下述杂交瘤细胞系所生成的抗体结合人HEPSIN上的相同表位，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473。一方面，本发明提供了一种分离的抗体，其与下述杂交瘤细胞系所生成的任何抗体结合人HEPSIN上的不同表位，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473。

一方面，本发明提供了一种分离的单克隆抗体，其与下述杂交瘤细胞系所生成的抗体竞争结合人HEPSIN，所述杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)且保藏号为PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472或PTA-7473。

在一个实施方案中，本发明的抗体特异性结合位于人HEPSIN胞外结构域序列中的抗原(性)决定簇或表位。在一个实施方案中，所述胞外结构域序列包含人HEPSIN的Arg⁴⁵至Leu⁴¹⁷。在一个实施方案中，所述抗原决定簇或表位位于HEPSIN的蛋白酶结构域中。在一个实施方案中，本发明的抗体没有特异性结合HEPSIN的A链。

在一个实施方案中，本发明的抗体特异性结合人HEPSIN，但没有实质性抑制体内和/或体外HEPSIN酶活性。在一个实施方案中，所述酶活性包括切割HEPSIN的多肽底物。

在本发明抗体的一个实施方案中，全长IgG形式的所述抗体以约150nM

或更好的结合亲和力特异性结合人HEPSIN。在一个实施方案中，结合亲和力是约120nM或更好。在一个实施方案中，结合亲和力是约100nM或更好。在一个实施方案中，结合亲和力是约75nM或更好。在一个实施方案中，结合亲和力是约50nM或更好。在一个实施方案中，结合亲和力是约25nM或更好。在一个实施方案中，所述结合亲和力值是通过直接ELISA获得的（例如以EC₅₀表示，如下文实施例所述的直接ELISA所测量）。

本发明的抗体可以处于许多种形式。例如，本发明的抗体可以是单克隆抗体，其是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。本发明的抗体可以是全长或其片段（例如包含抗原结合构件的片段）。

在一个实施方案中，本发明的抗体不是2006年出版的Cancer Research第66卷第3611-3619页所记载的抗HEPSIN抗体（例如如图4所例示的抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21和/或A24）或PCT公开文本WO2004/033630所披露的分离的HEPSIN抗体（例如第93页和图15A-D所提到的抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1和/或72H6）。

在一个实施方案中，本发明的抗体不与2006年出版的Cancer Research第66卷第3611-3619页所记载的抗HEPSIN抗体（例如如图4所例示的抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21和/或A24）或PCT公开文本WO2004/033630所披露的分离的HEPSIN抗体（例如第93页和图15A-D所提到的抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1和/或72H6）竞争结合人HEPSIN。

在一个实施方案中，本发明的抗体不与2006年出版的Cancer Research第66卷第3611-3619页所记载的抗HEPSIN抗体（例如如图4所例示的抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21和/或A24）或PCT公开文本WO2004/033630所披露的分离的HEPSIN抗体（例如第93页和图15A-D所提到的抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1和/或72H6）结合人HEPSIN上的相同表位。

一方面，本发明提供了包含一种或多种本发明的抗体和载体的组合物。在一个实施方案中，所述载体是药学可接受的。

一方面，本发明提供了编码本发明免疫球蛋白多肽（例如抗体）的核酸。

一方面，本发明提供了包含本发明核酸的载体。

一方面，本发明提供了包含本发明核酸或载体的宿主细胞。载体可以是任何类型，例如重组载体，诸如表达载体。可以使用多种宿主细胞之任一种。

在一个实施方案中，宿主细胞是原核细胞，例如大肠杆菌。在一个实施方案中，宿主细胞是真核细胞，例如哺乳动物细胞，诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

一方面，本发明提供了用于制备本发明抗体的方法。例如，本发明提供了制备抗HEPSIN抗体（其如本文中所定义的包括全长和其片段）的方法，所述方法包括在合适的宿主细胞中表达编码所述抗体（或其片段）的本发明重组载体，并回收所述抗体。

一方面，本发明提供了一种制品，该制品包含容器和装于容器内的组合物，其中该组合物包含一种或多种本发明的抗体。在一个实施方案中，所述组合物包含本发明的核酸。在一个实施方案中，包含本发明免疫球蛋白多肽（例如抗体）的组合物还包含载体，所述载体在有些实施方案中是药学可接受的。在一个实施方案中，本发明的制品还包含关于给受试者施用所述组合物（例如抗体）的说明书。

一方面，本发明提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含第一个容器，其装有包含一种或多种本发明抗体的组合物；和第二个容器，其装有缓冲液。在一个实施方案中，所述缓冲液是药学可接受的。在一个实施方案中，包含抗体的组合物还包含载体，所述载体在有些实施方案中是药学可接受的。在一个实施方案中，试剂盒还包含关于使用所述组合物（例如抗体）来检测和/或测量样品中HEPSIN的说明书。在一个实施方案中，试剂盒还包含关于给受试者施用所述组合物（例如抗体）的说明书。

一方面，本发明的抗体是连接至毒素（诸如细胞毒剂）的。这些分子可以与添加剂/增强剂（诸如化疗剂、放射或类固醇）组合配制或施用。

一方面，本发明提供了一种检测HEPSIN在样品中存在的方法，包括使所述样品与本发明的抗体接触。在一个实施方案中，抗体与所述样品的结合表明该样品中存在有HEPSIN。

一方面，本发明提供了一种诊断疾病的方法，该方法包括通过使样品与本发明抗体接触来测定组织细胞的测试样品中的HEPSIN水平，由此该抗体所结合的HEPSIN表明HEPSIN在该样品中的存在和/或量。

另一方面，本发明提供了一种测定个体是否有风险患上疾病（例如与HEPSIN表达调节异常有关的疾病）的方法，该方法包括通过使测试样品与本发明抗体接触来测定组织细胞的测试样品中的HEPSIN水平，并由此测定

该样品中存在的HEPSIN的量，其中与包含与所述测试样品相同细胞起源的正常组织的对照样品相比，所述测试样品中HEPSIN的水平更高表明所述个体有风险患上所述疾病。

在本发明方法的一个实施方案中，HEPSIN水平是根据测试样品中所述抗体结合的HEPSIN量所指出的HEPSIN多肽量来测定的。任选地，本方法中所采用的抗体可以是可检测标记的、附着于固体支持物的、等等。

一方面，本发明提供了一种使本发明的抗体结合至存在于体液（例如血液）中的HEPSIN的方法。

又一方面，本发明涉及一种使本发明的抗体结合至表达HEPSIN的细胞的方法，其中该方法包括使所述细胞与所述抗体在适于所述抗体结合HEPSIN的条件下接触，并容许它们之间的结合。在一个实施方案中，所述抗体不抑制HEPSIN与其配体的相互作用。

一方面，本发明提供了一种将药剂（例如诊断剂或治疗剂）靶向宿主中的HEPSIN结合组织(HEPSIN-associated tissue)，该方法包括给该宿主施用与本发明抗体连接形式的所述药剂，由此使该药剂靶向该宿主中的HEPSIN结合组织。在一个实施方案中，结合HEPSIN的抗体能够特异性结合位于细胞上的HEPSIN（或是在体外或是在体内），例如在HEPSIN存在于细胞表面上时。

一方面，本发明提供了下述方法，该方法包括测定受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样样品中的HEPSIN表达水平高的细胞，其中所述细胞的存在表明所述受试者患有与HEPSIN调节异常（例如过表达）有关的病症。

一方面，本发明提供了预测受试者对如下疗法的响应性的方法，所述疗法用于与HEPSIN调节异常（例如过表达）有关的病症，所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样样品中的HEPSIN表达水平高的细胞，其中所述细胞的存在表明该受试者会响应所述疗法。

一方面，本发明提供了一种用于在接受与HEPSIN调节异常（例如过表达）有关的疾病治疗的受试者中监测轻微后遗症(minimal residual disease)的方法，所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样样品中的HEPSIN表达水平高的细胞，其中所述细胞的检出表明存在所述轻微后遗症。

一方面,本发明提供了一种用于在受试者中检测与HEPSIN调节异常(例如过表达)有关的疾病状态的方法,所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞,其中所述细胞的检出表明所述受试者中存在所述疾病状态。

一方面,本发明提供了一种用于评估受试者发生与HEPSIN调节异常(例如过表达)有关的病症的素因(predisposition)的方法,所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞,其中所述细胞的检出表明所述受试者具有发生所述病症的素因。

一方面,本发明提供了一种用于在受试者中诊断与HEPSIN调节异常(例如过表达)有关的病症的方法,所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞,其中所述细胞的检出表明所述受试者患有所述病症。

一方面,本发明提供了一种用于辨别受试者中与HEPSIN调节异常(例如过表达)有关的疾病的早期和后期阶段(early and late stage)(例如恶性程度、早期或晚期阶段、等等)的方法,所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞,其中所述细胞的检出表明所述受试者患有后期阶段的所述疾病。

一方面,本发明提供了一种用于辨别受试者中与HEPSIN调节异常(例如过表达)有关的疾病的非侵入性或侵入性阶段(noninvasive or invasive stage)的方法,所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞,其中所述细胞的检出表明所述受试者患有侵入性阶段的所述疾病。

一方面,本发明提供了一种用于辨别受试者中与HEPSIN调节异常(例如过表达)有关的疾病的非转移性和转移性阶段的方法,所述方法包括测定所述受试者是否包含HEPSIN表达水平比正常参照样品中的HEPSIN表达水平高的细胞,其中所述细胞的检出表明所述受试者患有转移性阶段的所述疾病。

所述方法中用于检查HEPSIN表达的步骤可以以多种测定法形式进行,包括免疫组织化学、ELISA和印迹测定法。任选地,所述组织或细胞样品包含疾病组织或细胞。

本发明的方法提供了可用于确定适当临床干预步骤(如果适当和在适当

时(if and as appropriate))的信息。因此,在本发明方法的一个实施方案中,所述方法还包括基于HEPSIN表达评估结果的临床干预步骤。例如,适当的干预可包括预防和治疗步骤,或对任何当时流行的(then-current)预防或治疗步骤的调整,这些根据本发明方法获得的HEPSIN表达信息来实施。

本发明更进一步的方法包括治疗哺乳动物中与HEPSIN调节异常(例如过表达)有关的病症(诸如癌症)的方法,包括如下步骤:自所述哺乳动物获得组织或细胞样品,对所述组织或细胞检查HEPSIN的表达(例如表达量),和在测定出所述组织或细胞样品表达HEPSIN(例如其中HEPSIN的表达量比参照(对照)样品中的HEPSIN表达量高)后,给所述哺乳动物施用有效量的治疗剂。任选地,所述方法包括给所述哺乳动物施用有效量的靶向治疗剂(例如结合和/或阻断HEPSIN活性的抗体和/或它的相应配体和/或底物)和第二种治疗剂(例如细胞毒剂等)。

对本领域技术人员显而易见的是,在本发明的任何方法中,虽然检测出HEPSIN表达升高会正面地表明疾病的特征(例如疾病的存在、阶段或程度),但未检测出HEPSIN表达升高通过提供所述疾病的相反(reciprocal)表征也会是有教益的。

一方面,本发明提供了一种阵列/探针集合,其包含一种或多种能够特异性结合HEPSIN的抗体(例如本发明的抗体)。

一方面,本发明提供了一种试剂盒,其包含本发明的组合物和说明书,该说明书关于使用所述组合物来检测与HEPSIN调节异常(例如过表达)有关的病症,这通过测定HEPSIN表达水平是否比正常参照样样品中的HEPSIN表达水平高来进行。在一个实施方案中,本发明的组合物是一种阵列/探针集合,其包含一种或多种能够特异性结合HEPSIN的抗体(例如本发明的抗体)。在一个实施方案中,本发明的组合物包含特异性检测HEPSIN的抗体。在一个实施方案中,本发明的组合物包含特异性结合HEPSIN至少一部分的抗体。

附图简述

图1. 抗HEPSIN抗体的表征。

图2. HAI-2抑制HEPSIN和uPA的 K_i^{app} 值。

图3. HEPSIN结合ELISA。将抗体添加至用可溶性HEPSIN包被的微量滴定板。如下检测所结合的抗体,即使用辣根过氧化物酶偶联的抗小鼠IgG,

接着添加BioFX TMB底物。

图4. 通过竞争结合ELISA进行的表位测定。将生物素化抗体和摩尔过量的未标记抗体添加至用可溶性HEPSIN包被的微量滴定板。如下检测所结合的生物素化抗体,即使用辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素,接着添加BioFX TMB底物。

图5. 抗体3H10.1.2结合LnCaP细胞上的HEPSIN的直方图。LnCaP-34细胞表达所转染的HEPSIN和内源性HEPSIN,而LnCaP-17细胞仅表达内源性HEPSIN。将细胞悬浮液与3H10.1.2抗体一起温育,并在FACScan上用PE偶联的F(ab')₂抗小鼠IgG检测表面结合的抗体。对照只与PE偶联物一起温育。

图6. 显色底物测定法。将500nM抗体与可溶性HEPSIN (0.25nM)一起温育30分钟。然后测量针对对硝基苯胺底物S2366的HEPSIN酶活性,并以活性分数(fractional activity) (v_i/v_0)表示。HEPSIN抑制剂KD1 (50nM)用作阳性对照。

图7. uPA原活化测定法。将抗体(710nM)与0.5nM HEPSIN一起温育30分钟,并添加uPA原(100nM)以开始反应。在多个时间点取出等分试样,并在测定法的第二个阶段中使用uPA底物S2444测定所形成的uPA浓度。自斜率计算uPA形成的速率(表1)。HEPSIN抑制剂KD1 (71nM)用作阳性对照。

图8. 使用单克隆抗体对重组体可溶性HEPSIN的免疫印迹。通过还原条件下的SDS-PAGE分析HEPSIN,并在转移到硝酸纤维素膜上后,用抗HEPSIN单克隆抗体检测。指出了HEPSIN B链(蛋白酶结构域)的位置和分子量标准($M_r \times 10^3$)。

图9. 天然人HEPSIN的氨基酸序列的一个实施方案。

图10A和B. 天然人HEPSIN的氨基酸序列的另一个实施方案。

本发明的实施方式

通用技术

除非另有说明,本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些都在本领域的技术范围内。文献中充分阐述了这些技术,诸如“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”,第2版(Sambrook等,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M. J. Gait编,1984);“Animal Cell Culture”(R. I. Freshney编,1987);“Methods

in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel等编, 1987, 及定期更新); “PCR: The Polymerase Chain Reaction” (Mullis等编, 1994); “A Practical Guide to Molecular Cloning” (Perbal Bernard V., 1988); “Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbas等, 2001)。

定义

术语“HEPSIN”在用于本文时涵盖能够以与野生型HEPSIN类似的方式进行pro-HGF切割的天然序列多肽、多肽变体、及天然序列多肽和多肽变体的片段(本文中有进一步定义)。本文所述HEPSIN多肽可以从多种来源分离, 诸如人组织类型或其它来源, 或者通过重组或合成方法制备。术语“HEPSIN”、“HEPSIN多肽”、“HEPSIN酶”和“HEPSIN蛋白”还包括本文中所公开的HEPSIN多肽的变体。

“天然序列HEPSIN多肽”包括与衍生自自然界的相应HEPSIN多肽具有相同氨基酸序列的多肽。在一个实施方案中, 天然序列HEPSIN多肽包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列(见图9)。在一个实施方案中, 天然序列HEPSIN多肽包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列(见图10)。此类天然序列HEPSIN多肽可以从自然界分离, 或者可通过重组或合成手段生成。术语“天然序列HEPSIN多肽”明确涵盖天然存在的截短或分泌形式的特定HEPSIN多肽(例如胞外结构域序列)、该多肽的天然存在变体形式(例如可变剪接形式)和天然存在等位变体。

“HEPSIN多肽变体”或其变异意指与本文中所公开的天然序列HEPSIN多肽序列具有至少约80%氨基酸序列同一性的HEPSIN多肽, 一般是本文中所定义的活性HEPSIN多肽。此类HEPSIN多肽变体包括例如在天然氨基酸序列的N-或C-末端添加或删除一个或多个氨基酸残基的HEPSIN多肽。通常, HEPSIN多肽变体与本文中所公开的天然序列HEPSIN多肽序列具有至少约80%的氨基酸序列同一性, 或者至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。通常, HEPSIN变体多肽的长度为至少约10个氨基酸, 或者长度为至少约20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、

250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600个氨基酸，或更多。任选的是，HEPSIN变体多肽与天然HEPSIN多肽序列相比具有不超过一处保守氨基酸替代，或者与天然HEPSIN多肽序列相比具有不超过2、3、4、5、6、7、8、9或10处保守氨基酸替代。

关于肽或多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后，且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时，候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行，例如使用公众可得到的计算机软件，诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可决定用于测量对比的适宜参数，包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然而，为了本发明的目的，%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2获得的，如美国专利第6,828,146号中所记载的。

“分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的一种成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质，可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在一个实施方案中，将抗体纯化至(1)根据例如Lowry法的测定，抗体重量超过95%，在有些实施方案中重量超过99%，(2)足以通过使用例如转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度，或(3)根据还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE及使用例如考马斯蓝或银染色，达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在，那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而，分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

在用于本文时，术语“抗HEPSIN抗体”指能够结合HEPSIN的抗体。

短语“基本上相似”、“基本上相同”、“等同”或“基本上等同”在用于本文时表示两个数值（例如一个与某分子有关而另一个与参照/比较分子有关）之间足够高的相似程度，以致本领域技术人员会认为在用所述数值（例如Kd值、抗病毒效应、等）所测量的生物学特性背景内两个数值之间的差异具有很小的或没有生物学和/或统计学显著性。作为参照/比较分子该数值的

函数，所述两个数值之间的差异优选小于约50%，优选小于约40%，优选小于约30%，优选小于约20%，优选小于约10%。

短语“实质性降低”或“实质性不同”在用于本文时表示两个数值（通常一个与某分子有关而另一个与参照/比较分子有关）之间足够高的差异程度，以致本领域技术人员会认为在用所述数值（例如K_d值或IC₅₀值）所测量的生物学特性背景内两个数值之间的差异具有统计学显著性。作为参照/比较分子该数值的函数，所述两个数值之间的差异优选大于约10%，优选大于约20%，优选大于约30%，优选大于约40%，优选大于约50%。

“结合亲和力”通常指分子（例如抗体）的单一结合位点与其结合配偶体（例如抗原）之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明，在用于本文时，“结合亲和力”指反映结合对的成员（例如抗体与抗原）之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可用解离常数(K_d)来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量，包括本文中所描述的那些。低亲和力抗体通常缓慢的结合抗原且趋于容易解离，而高亲和力抗体通常更快速的结合抗原且趋于保持更长时间的结合。本领域知道测量结合亲和力的多种方法，其中任一种都可用于本发明的目的。下文描述了具体的示例性实施方案。

在一个实施方案中，依照本发明的“K_d”或“K_d值”是通过如下测定法所述使用Fab型式的感兴趣抗体及其抗原进行的放射性标记抗原结合测定法(RIA)来测量的：通过在存在未标记抗原的滴定系列的条件下，用最小浓度的¹²⁵I标记抗原平衡Fab，然后用抗Fab抗体包被的平板捕捉结合的抗原来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(Chen,等, J Mol Biol 293: 865-881 (1999))。为了确定测定条件，用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5μg/ml捕捉用抗Fab抗体(Cappel Labs)包被微量滴定板(Dynex)过夜，随后用PBS中的2% (w/v)牛血清清蛋白在室温（约23°C）封闭2-5小时。在非吸附平板(Nunc #269620)中，将100pM或26pM [¹²⁵I]-抗原与连续稀释的感兴趣Fab混合（例如与Presta等, Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)中抗VEGF抗体, Fab-12的评估一致）。然后将感兴趣Fab保温过夜；不过，保温可持续更长时间（例如65个小时）以保证达到平衡。此后，将混合物转移至捕捉板以进行室温保温（例如1小时）。然后除去溶液，并用含0.1% Tween-20的PBS洗板8次。平板干燥后，加入150μl/孔闪烁液(MicroScint-20; Packard)，然后在Topcount伽马计数器(Packard)上对平板计数

10分钟。选择各Fab给出小于或等于最大结合之20%的浓度用于竞争性结合测定法。依照另一实施方案， K_d 或 K_d 值是通过表面等离子共振测定法使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25°C使用固定化抗原CM5芯片在约10个响应单位(RU)测量的。简而言之，依照供应商的说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。用10mM乙酸钠pH 4.8将抗原稀释至5 μ g/ml (约0.2 μ M)，然后以5 μ l/分钟的流速注入至获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后，注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量，在25°C以约25 μ l/分钟的流速注入在含0.05% Tween-20的PBS (PBST)中两倍连续稀释的Fab (0.78nM至500nM)。使用简单一对朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore Evaluation Software 3.2版)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(K_d)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如Chen, Y., 等, J Mol Biol 293: 865-881 (1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法，结合速率超过 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定，即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计(a stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯的测量，在存在浓度渐增的抗原的条件下，测量PBS, pH 7.2中的20nM抗抗原抗体 (Fab形式)在25°C的荧光发射强度 (激发=295nm; 发射=340nm, 16nm带通)的升高或降低。

依照本发明的“结合速率”(on-rate, rate of association, association rate)或“ k_{on} ”也可通过上文所述相同的表面等离子共振技术使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25°C使用固定化抗原CM5芯片在约10个响应单位(RU)来测定。简而言之，依照供应商的说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。用10mM乙酸钠pH 4.8将抗原稀释至5 μ g/ml (约0.2 μ M)，然后以5 μ l/分钟的流速注入至获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后，注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量，在25°C以约25 μ l/分钟的流速注入在含0.05% Tween-20的PBS (PBST)中两倍连续稀释的Fab (0.78nM至500nM)。使用简单一对朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore Evaluation Software 3.2版)通过

同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(Kd)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如Chen, Y.,等, J Mol Biol 293: 865-881 (1999)。然而,如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$,那么结合速率优选使用荧光淬灭技术来测定,即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯的测量,在存在浓度渐增的抗原的条件下,测量PBS, pH 7.2中的20nM抗抗原抗体(Fab形式)在25°C的荧光发射强度(激发=295nm; 发射=340nm, 16nm带通)的升高或降低。在一个实施方案中,依照本发明的“Kd”或“Kd值”是通过如下测定法所述使用Fab型式的抗体及抗原分子进行的放射性标记抗原结合测定法(RIA)来测量的:通过在存在未标记抗原的滴定系列的条件下,用最小浓度的 ^{125}I 标记抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的平板捕捉结合的抗原来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(Chen,等, J Mol Biol 293: 865-881 (1999))。为了确定测定条件,用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5 μ g/ml捕捉用抗Fab抗体(Cappel Labs)包被微量滴定板(Dynex)过夜,随后用PBS中的2% (w/v)牛血清清蛋白在室温(约23°C)封闭2-5小时。在非吸附平板(Nunc #269620)中,将100pM或26pM [^{125}I]-抗原与连续稀释的感兴趣Fab混合(与Presta等, Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)中抗VEGF抗体, Fab-12的评估一致)。然后将感兴趣Fab保温过夜;不过,保温可持续更长时间(例如65个小时)以保证达到平衡。此后,将混合物转移至捕捉板以进行室温保温1小时。然后除去溶液,并用含0.1% Tween-20的PBS洗板8次。平板干燥后,加入150 μ l/孔闪烁液(MicroScint-20; Packard),然后在Topcount伽马计数器(Packard)上对平板计数10分钟。选择各Fab给出小于或等于最大结合之20%的浓度用于竞争性结合测定法。依照另一实施方案, Kd或Kd值是通过表面等离子共振测定法使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25°C使用固定化抗原CM5芯片在约10个响应单位(RU)测量的。简而言之,依照供应商的说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。用10mM乙酸钠pH 4.8将抗原稀释至5 μ g/ml(约0.2 μ M),然后以5 μ l/分钟的流速注入至获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后,注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,在25°C以约25 μ l/分钟的流速注入在含0.05%

Tween-20的PBS (PBST)中两倍连续稀释的Fab (0.78nM至500nM)。使用简单一对一朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore Evaluation Software 3.2版)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(Kd)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如Chen, Y.,等, J Mol Biol 293: 865-881 (1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定, 即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计(a stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯的测量, 在存在浓度渐增的抗原的条件下, 测量PBS, pH 7.2中的20nM抗抗原抗体 (Fab形式) 在25°C的荧光发射强度 (激发=295nm; 发射=340nm, 16nm带通) 的升高或降低。

在一个实施方案中, 依照本发明的“结合速率”(on-rate, rate of association, association rate)或“ k_{on} ”也可通过上文所述相同的表面等离子共振技术使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25°C使用固定化抗原CM5芯片在约10个响应单位(RU)来测定。简而言之, 依照供应商的说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。用10mM乙酸钠pH 4.8将抗原稀释至5 μ g/ml (约0.2 μ M), 然后以5 μ l/分钟的流速注入至获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后, 注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量, 在25°C以约25 μ l/分钟的流速注入在含0.05% Tween-20的PBS (PBST)中两倍连续稀释的Fab (0.78nM至500nM)。使用简单一对一朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore Evaluation Software 3.2版)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(Kd)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如Chen, Y.,等, J Mol Biol 293: 865-881 (1999)。然而, 如果根据上文表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 那么结合速率优选使用荧光淬灭技术来测定, 即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯的测量, 在存在浓度渐增的抗原的条件下, 测量PBS, pH 7.2中的20nM抗抗原抗体 (Fab形式) 在25°C的荧光发射强度 (激发=295nm; 发射=340nm, 16nm带通) 的升高或降低。

术语“载体”在用于本文时意指能够运输与其连接的其它核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”，指其中可连接另外的DNA区段的环状双链DNA环。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体，其中可将另外的DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其所导入的宿主细胞中自主复制（例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其它载体（例如非附加型哺乳动物载体）可在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中，由此随着宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导与其可操作连接的基因表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”（或简称为“重组载体”）。通常，在重组DNA技术中有用的表达载体常常是质粒形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是载体的最常用形式。

“多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用，指任何长度的核苷酸聚合物，包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经过修饰的核苷酸或碱基、和/或其类似物，或者是可通过DNA或RNA聚合酶或者通过合成反应掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可包含经过修饰的核苷酸，诸如甲基化核苷酸及其类似物。

“抗体” (Ab)和“免疫球蛋白” (Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。虽然抗体展现出对特定抗原的结合特异性，但是免疫球蛋白包括抗体和一般缺乏抗原特异性的其它抗体样分子二者。后一类多肽例如由淋巴系统以低水平生成而由骨髓瘤以升高的水平生成。

术语“抗体”和“免疫球蛋白”以最广义互换使用，包括单克隆抗体（例如全长或完整单克隆抗体）、多克隆抗体、单价、多价抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体，只要它们展现出期望的生物学活性），而且还可以包括某些抗体片段（如本文中更为详细描述）。抗体可以是嵌合的、人的、人源化的和/或亲和力成熟的。

根据其重链恒定域的氨基酸序列，抗体（免疫球蛋白）可归入不同的类。免疫球蛋白有五大类：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其中有些可进一步分为亚类（同种型），例如IgG1、IgG2、IgA1和IgA2等。将与不同类的免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的，一般性描述于例如Abbas等, Cellular and Mol. Immunology, 第4版 (2000)。抗体可以是抗体与一种或多种其它蛋白质或肽共价或非共价关联而形成的更大融合分子的一部分。

术语“全长抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用，指基本上完整形式的抗体而非如下文所定义的抗体片段。该术语具体指重链包含Fc区的抗体。

“抗体片段”只包含完整抗体的一部分，其中所述部分优选保留该部分存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项、优选大多数或所有功能。在一个实施方案中，抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点，如此保留结合抗原的能力。在另一个实施方案中，抗体片段，例如包含Fc区的抗体片段，保留通常与Fc区存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项生物学功能，诸如FcRn结合、抗体半衰期调控、ADCC功能和补体结合。在一个实施方案中，抗体片段是体内半衰期与完整抗体基本上相似的单价抗体。例如，这样的抗体片段可包含一个抗原结合臂且其与能够赋予该片段以体内稳定性的Fc序列相连。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体包含基本上相同的氨基酸序列，除了可以极小量存在的可能的天然存在突变外。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原。此外，与典型的包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物不同，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体，其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及此类抗体的片段，只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利第4,816,567号; Morrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。

非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在一个实施方案中，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和/或能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类动物的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言，人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域，其中所有或基本上所

有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones等, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature* 332:323-329 (1988); 及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。还可参见以下综述及其引用的参考文献: Vaswani和Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle和Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

术语“高变区”、“HVR”或“HV”在用于本文时指抗体可变域中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环的区域。术语“HVR”或“HV”前面的字母“HC”和“LC”分别指重链和轻链的HVR或HV。通常,抗体包含六个高变区:三个在VH中(H1、H2、H3),三个在VL中(L1、L2、L3)。本文中使用且涵盖许多高变区的叙述。Kabat互补决定区(CDR)是以序列变异性为基础的,而且是最常用的(Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia改为指结构环的位置(Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM高变区代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,而且得到Oxford Molecular的AbM抗体建模软件的使用。“接触”高变区是以对可获得的复合物晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些高变区中每一个的残基。

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
---	-----	-----	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Kabat编号方式)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia编号方式)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

“框架”或“FR”残基指可变域中除本文中所定义的高变区残基外的这些残基。

抗体的“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。这些结构域一般是抗体的最易变部分且包含抗原结合位点。

“人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成人抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

“亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个HVR中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的抗体。在一个实施方案，亲和力成熟的抗体具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知规程来生成。Marks等, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)记载了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。以下文献记载了CDR和/或框架残基的随机诱变: Barbas等, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier等, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton等, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson等, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); Hawkins等, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

“阻断性”抗体(blocking antibody)或“拮抗性”抗体(antagonist antibody)指抑制或降低其所结合的抗原的生物学活性的抗体。优选的阻断性抗体或拮抗性抗体实质或完全抑制抗原的生物学活性。

“激动性抗体(agonist antibody)”在用于本文时指模拟感兴趣多肽的至少一项功能性活性的抗体。

“病症”指任何会受益于治疗的疾患。这包括慢性和急性病症或疾病，包括那些使哺乳动物倾向于所讨论病症的病理状况。本文中待治疗的病症的非限制性例子包括癌症和其它细胞增殖性病症。

术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中，细胞增殖性病症指癌症。

“肿瘤”在用于本文时指所有赘生性细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性病症”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。

术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长/

增殖不受调控的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝瘤(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、及各种类型的头颈癌。

在用于本文时，“治疗”或“处理”指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预，可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防或降低炎症和/或组织/器官损伤、减缓疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、及免除或改善预后。在有些实施方案中，本发明的抗体用于延迟疾病或病症的发生/发展。

“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。

本发明的物质/分子的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子在个体中引发期望响应的能力等因素而变化。治疗有效量还指该物质/分子的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的，因此预防有效量将低于治疗有效量。

术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。

术语“诊断”在用于本文时指鉴定分子或病理状态、疾病或疾患，诸如鉴定细胞增殖性病症（例如癌症）。术语“预后”在用于本文时指预测可归因于病症的疾病症状的可能性，包括例如疾病的复发、复发、和耐药性。术语“预测”在用于本文时指患者将对一种药物或一组药物有好的或不好的响应的可能性。在一个实施方案中，预测涉及那些响应的程度。在一个实施方案中，预测涉及患者在治疗（例如用特定治疗剂的治疗）后是否存活或改善和/或存活或改善某段时间不复发疾病的可能性。本发明的预测方法在临床上可用于做出治疗决定，为任何特定患者选择最适宜的治疗形式。本发明的预测方法是有价值的工具，用于预测患者是否可能对治疗方案有好的响应，诸

如给定的治疗方案，包括例如施用给定的治疗剂或组合、手术干预、类固醇治疗等，或用于预测患者在治疗方案后是否可能长期存活。

“患者响应”可利用表明对患者有益处的任何终点来评估，包括但不限于：(1)在某种程度上抑制疾病进展，包括减缓和完全阻滞；(2)减少疾病事件和/或症状数目；(3)减小损伤尺寸；(4)抑制（即降低、减缓或完全阻止）疾病细胞渗入临近的外周器官和/或组织；(5)抑制（即降低、减缓或完全阻止）疾病扩散；(6)减轻细胞增殖、侵入或转移，其可以但不必造成疾病损伤的消退或消融；(7)在某种程度上减轻一种或多种与病症有关的症状；(8)延长治疗后无疾病表现的长度；和/或(9)降低治疗后给定时间点的死亡率。

术语“样品”在用于本文时指获得自或衍生自感兴趣受试者的组合物，其包含有待例如根据物理、生化、化学和/或生理特征来表征和/或鉴定的细胞和/或其它分子实体。例如，短语“疾病样品”及其各种变化形式指得自感兴趣受试者的任何样品，预计或已知其包含待表征的细胞和/或分子实体。

“组织或细胞样品”指从受试者或患者的组织得到的相似细胞的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织，像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品；血液或任何血液组分；体液，诸如脑脊液、羊膜液（羊水）、腹膜液（腹水）、或间隙液；来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。组织样品还可以是原代的或培养的细胞或细胞系。任选的是，组织或细胞样品是从疾病组织/器官得到的。组织样品可能包含在自然界中天然不与该组织混杂的化合物，诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。

术语“持家基因”指所编码的蛋白质的活性对维持细胞功能来说是至关重要的一组基因。这些基因通常在所有细胞类型中相似表达。持家基因包括但不限于甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、Cyp1、清蛋白、肌动蛋白例如 β -肌动蛋白、微管蛋白、亲环蛋白、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HRPT)、L32、28S、和18S。

为本发明目的，组织样品的“切片”指一块或一片组织样品，例如从组织样品上切下来的一薄片组织或细胞。应当了解，可以制作多片组织样品切片并依照本发明进行分析，前提是应当了解，本发明包括将组织样品的同一切片用于形态学和分子两个水平的分析或者针对蛋白质和核酸二者进行分析的方法。

“关联”或“联系”指以任何方式将第一分析或方案的性能和/或结果与第二分析或方案的性能和/或结果进行比较。例如，可以将第一分析或方案的结果用于实施第二分析或方案，和/或，可以使用第一分析或方案的结果来决定是否应当实施第二分析或方案。就蛋白质结合分析或方案的实施方案而言，可以使用蛋白质结合分析或方案的结果来决定是否应当实施特定治疗方案。

术语“标记物”在用于本文时指与试剂诸如抗体直接或间接偶联或融合，以便于检测它所偶联或融合的试剂的化合物或组合物。标记物可以是自身可检测的（例如放射性同位素标记物或荧光标记物），或者在酶标记物的情况中，可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

一般示例性技术

包含靶蛋白的样品可通过本领域公知的方法获得，而且它们适于特定类型和位置的感兴趣疾病。组织活检通常用于获得有代表性的疾病组织碎片。或者，可以已知或认为包含感兴趣疾病细胞的组织/流体的形式间接获取细胞。例如，疾病损伤的样品可通过切除术、支气管镜检、细针抽吸、支气管刷检、或从痰/唾液、胸膜液或血液中获得。可从疾病组织或从其它身体样品诸如尿、痰或血清中检测出蛋白质靶物。上述用于检测疾病样品中靶蛋白的同样技术可用于其它身体样品。疾病细胞从疾病损伤部位脱落下来，并出现在这些身体样品中。通过筛选这些身体样品，可实现对于这些疾病的简单早期诊断。另外，通过对这些身体样品测试靶蛋白，可更容易地监测治疗的进程。

在一个实施方案中，本发明的方法可用于检测任何与HEPSIN调节异常（例如过表达）有关的病症。本发明的诊断方法对临床医生来说是有用的，由此他们可决定合适的疗程。例如，较之展现出相对更低的表达水平的样品，来自受试者的样品展现出本文中所公开的HEPSIN的高水平表达可能说明要用更积极的治疗方案。本发明的方法可用于多种情况，包括例如用于在药物开发期间帮助选择患者，用特定治疗方案治疗患者个体时预测成功的可能性，用于评估疾病进展，用于监测治疗功效，用于确定患者个体的预后，用于评估个体发生特定病症（例如癌症）的素因，用于区分疾病阶段等。

本发明的典型方法和测定法

本文中所公开的方法和测定法致力于检验哺乳动物组织或细胞样品中HEPSIN的表达，其中测定出HEPSIN的表达预示或指示该组织或细胞是否对基于HEPSIN抑制剂使用的治疗敏感。

如上所述，患病人细胞类型的有些群体与HEPSIN（其与多种病症有关）的异常表达有关。因此认为所公开的方法和测定法可以为获得可用于评估治疗患者的适宜或有效疗法的数据和信息提供便利的、有效的、且潜在划算的手段。例如，已经诊断有HEPSIN相关疾患的患者可以进行活检以获得组织或细胞样品，而且可以通过多种体外测定法检验样品以测定患者的细胞是否会对治疗剂诸如HEPSIN抑制剂（例如抗HEPSIN抗体）敏感。

本发明提供了用于预测哺乳动物组织或细胞样品（诸如癌细胞）对抗HEPSIN抑制剂的敏感性的方法。在所述方法中，获取哺乳动物组织或细胞样品，并检验HEPSIN的表达。所述方法可以以多种测定法格式进行，包括免疫组织化学测定法。在所述组织或细胞中测出HEPSIN的表达则预示该组织或细胞会对HEPSIN抑制剂疗法敏感。

如下所述，可以通过许多方法来分析样品中HEPSIN的表达，这些方法许多是本领域已知的且本领域技术人员理解的，包括但不限于免疫组织化学和/或Western分析、基于血液的定量测定法（例如血清ELISA）（用以检验例如蛋白质表达水平）。用于评估蛋白质状态的典型方案可见于例如Ausubel等编，1995，《Current Protocols In Molecular Biology》，单元15（免疫印迹）等。

下文出于例示目的提供了关于检测样品中HEPSIN的方案。

本发明的任选方法包括检验或测试哺乳动物组织或细胞样品中HEPSIN存在的方案。可以采用多种方法来检测HEPSIN，包括例如免疫组织化学分析、免疫沉淀、Western印迹分析、分子结合测定法、ELISA、ELIFA、荧光活化的细胞分选(FACS)等等。例如，检测组织或细胞样品中HEPSIN表达的一种任选方法包括使样品接触本发明的抗体、其HEPSIN反应性片段、或包含本发明抗体的抗原结合区的重组蛋白；然后检测样品中HEPSIN蛋白的结合。

在本发明的具体实施方案中，使用免疫组织化学和染色方案来检验样品

中HEPSIN蛋白的表达。组织切片的免疫组织化学染色已经显示为评估或检测样品中蛋白质存在的可靠方法。免疫组织化学(“IHC”)技术利用抗体来探查和显现原位细胞抗原，一般通过显色或荧光方法。

对于样品制备，可以使用来自哺乳动物(典型的是人类患者)的组织或细胞样品。样品的例子包括但不限于组织活检、血液、肺吸出物、痰或唾液、淋巴液等。可以通过本领域已知的多种规程来获得样品，包括但不限于手术切除、抽吸或活检。组织可以是新鲜的或冷冻的。在一个实施方案中，样品是固定和包埋在石蜡或类似物中的。

可以通过常规方法来固定(即保存)组织样品(参见例如“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology,” 第3版(1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) 编, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel编, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.)。本领域技术人员将领会，固定剂的选择由样品是用于组织学染色还是其它分析的目的来决定。本领域技术人员还将领会，固定时长取决于组织样品的大小和所使用的固定剂。例如，可以使用中性缓冲的福尔马林、Bouin氏液或低聚甲醛来固定样品。

一般而言，将样品首先固定，然后通过酒精递增系列脱水，用适宜切片介质渗透和包埋使得该组织样品可以切片。适宜切片介质会包括容许在期望检测条件下检测HEPSIN的介质。或者，可以将组织切片并将所得切片固定。例如，可以通过常规方法学将组织样品包埋和加工(参见例如“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”, 见上文)。一旦将组织样品包埋，就可以用切片机等等将样品切片(参见例如“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”, 见上文)。对于此规程，例如，切片的厚度范围可以是约3微米至约5微米。一旦切片，就可以通过数种标准方法将切片附着至载玻片。载玻片粘合剂的例子包括但不限于硅烷、明胶、聚L-赖氨酸等等。

任选的是，在样品制备后，可以使用IHC来分析组织切片。IHC可以联合别的技术进行，诸如形态学染色和/或荧光原位杂交。可利用IHC的两种常用方法，即直接和间接测定法。依照第一种测定法，直接测定抗体对靶抗原

(例如HEPSIN)的结合。此直接测定法使用经过标记的试剂,诸如荧光标签或酶标记的一抗,其可以在没有进一步抗体相互作用的情况下显现。在一种典型的间接测定法中,未偶联的一抗结合至抗原,然后经过标记的二抗结合至一抗。若二抗偶联有酶标记物,则添加显色或荧光底物以提供抗原显现。因为数个二抗可以与一抗上的不同表位起反应,所以发生了信号放大。

用于免疫组织化学的一抗和/或二抗通常用可检测模块标记。可利用许多标记物,一般可分成以下几类:

(a) 放射性同位素,诸如³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I。例如,可使用Current Protocols in Immunology,卷1和2, Coligen等编, Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. 1991中记载的技术用放射性同位素标记抗体,并可使用闪烁计数来测量放射性。

(b) 胶体金颗粒。

(c) 荧光标记物,包括但不限于稀土螯合物(钕螯合物)、德州红、若丹明、荧光素、丹酰、丽丝胺、伞形酮、藻红蛋白、藻蓝蛋白、或商品化荧光团诸如SPECTRUM ORANGE7和SPECTRUM GREEN7和/或上述任一种或多种的衍生物。例如,可使用Current Protocols in Immunology,见上文中披露的技术使荧光标记物与抗体偶联。可使用荧光计对荧光进行定量。

(d) 可利用各种酶-底物标记物且美国专利第4,275,149号中提供了有关它们中的一些的综述。酶一般催化可使用多种技术测量的显色底物的化学改变。例如,酶可以催化可通过分光光度法测量的底物颜色改变。或者,酶可以改变底物的荧光或化学发光。上文描述了用于对荧光改变进行定量的技术。化学发光底物通过化学反应变成电子激发态,然后可发射可测量(例如使用化学发光计)或给荧光受体提供能量的光。酶标记物的例子包括萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;美国专利No. 4,737,456)、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮类、苹果酸脱氢酶、尿素酶、过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。用于使酶与抗体偶联的技术描述于O'Sullivan等, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, 于: Methods in Enzym., J. Langone和H. Van Vunakis编, Academic Press, New York, 73:

147-166 (1981)。

酶-底物组合的例子包括例如:

(i) 辣根过氧化物酶(HRPO)与作为底物的过氧化氢, 其中过氧化氢氧化染料前体(例如邻苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB));

(ii) 碱性磷酸酶(AP)与作为显色底物的对硝基苯基磷酸酯; 和

(iii) β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)与显色底物(例如对硝基苯基- β -D-半乳糖苷)或荧光底物(例如4-甲基伞形基- β -D-半乳糖苷)。

本领域技术人员可利用许多其它酶-底物组合。有关它们的一般性综述参见美国专利No. 4,275,149和4,318,980。

有时, 将标记物与抗体间接偶联。熟练技术人员了解实现这一目的的多种技术。例如, 可将抗体与生物素偶联, 而且可以将上述四大类标记物中的任一种与亲合素偶联, 或反之亦然。生物素选择性结合亲合素, 由此标记物可与抗体以这种间接方式偶联。或者, 为了实现标记物与抗体的间接偶联, 将抗体与小型半抗原偶联, 并将上述不同类型的标记物之一与抗半抗原抗体偶联。由此, 可实现标记物与抗体的间接偶联。

在上文讨论的样品制备规程外, 可能还需要在IHC之前、期间或之后对组织切片进行进一步的处理。例如, 可以实施表位修复法, 诸如在柠檬酸盐缓冲液中对组织样品进行加热(参见例如Leong等, *Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996))。

在任选的封闭步骤后, 将组织切片在合适条件下暴露于第一抗体足够时间, 使得第一抗体结合至组织样品中的靶蛋白抗原。实现这一目的的适宜条件可以通过常规实验来确定。抗体与样品的结合程度通过使用上文讨论的任一种可检测标记物来测定。优选的是, 标记物是酶标记物(例如HRPO), 其催化显色底物诸如3,3'-二氨基联苯胺色原体(chromogen)的化学变化。优选的是, 将酶标记物偶联至特异性结合第一抗体的抗体(例如第一抗体是家兔多克隆抗体, 第二抗体是山羊抗家兔抗体)。

任选的是, IHC分析中用于检测HEPSIN表达的抗体是用以主要结合HEPSIN而生成的抗体, 包括例如本发明的抗体。任选的是, 所述抗HEPSIN抗体是单克隆抗体。抗HEPSIN抗体在本领域易于获得, 包括各种商业来源, 而且也可以使用本领域已知的常规技术生成。

可以将如此制备的标本放置好并盖上盖玻片。然后进行载玻片评估, 例

如利用显微镜，并且可以采用本领域常规使用的染色强度标准。例如，染色强度标准可以如下评估：

表A

染色样式	得分
在细胞中没有观察到染色。	0
在超过10%的细胞中检测到微弱/刚刚可察觉的染色。	1+
在超过10%的细胞中观察到弱至中等的染色。	2+
在超过10%的细胞中观察到中等至强的染色。	3+

在备选方法中，可以在足以使抗体-HEPSIN复合物形成的条件下使样品接触对HEPSIN特异性的抗体，然后检测所述复合物。可以以多种方式来检测HEPSIN的存在，诸如通过Western印迹和ELISA规程，其用于测定极其广泛的组织和样品，包括血浆或血清。可利用多种使用此类测定法的免疫测定技术，参见例如美国专利第4,016,043号；第4,424,279号和第4,018,653号。这些包括非竞争性类型的单位点和双位点或“三明治/夹心式”测定法，以及传统的竞争性结合测定法。这些测定法也包括经标记抗体对靶生物标志物的直接结合。

三明治测定法是最有用且常用的测定法之一。三明治测定技术有许多变化形式，本发明意图涵盖所有这些变化形式。简言之，在一种典型的正向测定法(forward assay)中，将未标记的抗体固定化在固体基片上，使待测试的样品接触所结合的分子。温育足以容许抗体-抗原复合物形成的合适长度的一段时间后，添加对抗原特异性的、用能够生成可检测信号的报告分子标记的第二抗体并温育足以使另一复合物即抗体-抗原-经标记抗体形成的一段时间。洗去任何未反应的物质，并通过由报告分子生成的信号的观察结果来测定抗原的存在。结果可以是定性的，即通过可见信号的简单观察，或者可以量化，即通过与包含已知量HEPSIN的对照样品比较。

正向测定法的变化形式包括同时测定法，其中将样品和经标记抗体二者同时添加至所结合的抗体。这些技术是本领域技术人员所熟知的，包括任何显而易见的微小变化。在一种典型的正向三明治测定法中，将具有针对抗原的特异性的第一抗体或是共价的或是被动的结合至固体表面。所述固体表面典型地是玻璃或聚合物，最常用的聚合物是纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。所述固体支持物可以是管、珠、微孔板的盘、

或适于实施免疫测定法的任何其它表面的形式。结合过程是本领域众所周知的，一般由交联、共价结合或物理吸附组成，清洗聚合物-抗体复合物，为测试样品做好准备。将待测样品的等分试样添加至固相复合物，并在合适条件（例如室温至40°C，诸如25°C和32°C之间，含两端值）下温育足够时间（例如2-40分钟或过夜，如果更方便的话）以容许抗体中存在的任何亚基结合。温育期后，将抗体亚基固相清洗并干燥并与对抗原的一部分特异性的第二抗体一起温育。所述第二抗体连接有用于指示第二抗体对抗原结合的报道分子。

一种备选方法牵涉将样品中的靶蛋白质固定化，然后将固定化的靶物暴露于未标记的或用报道分子标记的特异性抗体。根据靶物的量和报道分子信号的强度，所结合的靶物可以是通过用抗体直接标记而可检测的。或者，将经标记的、对第一抗体特异性的第二抗体暴露于靶物-第一抗体复合物以形成靶物-第一抗体-第二抗体三元复合物。该复合物通过报道分子发射的信号来检测。“报道分子”在用于本说明书时指通过其化学本质提供分析上可鉴定的信号从而容许检测抗原所结合抗体的分子。这类测定法中最常用的报道分子是酶、荧光团或含放射性核素的分子（即放射性同位素）和化学发光分子。

在酶免疫测定法的情况中，有酶偶联至第二抗体，一般通过戊二醛或高碘酸盐或酯的手段。然而，正如易于领会的，有极其多种不同偶联技术可供技术人员使用。常用的酶包括辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等等。与特定酶一起使用的底物一般选择成在被相应的酶水解后生成可检测的颜色变化。合适的酶的例子包括碱性磷酸酶和过氧化物酶。也有可能采用荧光底物，其生成荧光产物而非上文所述显色底物。在所有情况中，将酶标记的抗体添加至第一抗体-分子标志物复合物，容许结合，然后洗去过量的试剂。然后将含有适宜底物的溶液添加至抗体-抗原-抗体复合物。底物与第二抗体所连接的酶起反应，给出定性可视信号，其可以进一步量化，通常通过分光光度法，以给出样品中存在的靶抗原的量的指示。或者，可以将荧光化合物（诸如荧光素和罗丹明）化学偶联至抗体而不改变其结合能力。在被特定波长的光照射而激活后，荧光团标记的抗体吸收光能，在分子中诱导激发状态，接着以光学显微镜在视觉上可检测的特征性颜色发光。在EIA中，容许荧光标记的抗体结合至第一抗体-抗原复合物。洗去未结合的

试剂后，将剩余的三元复合物然后暴露于适宜波长的光，所观察到的荧光指示存在感兴趣的靶抗原。免疫荧光和EIA技术都是本领域已完善建立的。然而，也可以采用其它报道分子，诸如放射性同位素、化学发光或生物发光分子。

上文所述技术也可用于检测HEPSIN的表达。

在测出组织或细胞样品表达指示该组织或细胞样品会对HEPSIN抑制剂处理敏感的HEPSIN后，可以对哺乳动物施用有效量的抑制剂以治疗侵扰该哺乳动物的病症。本文所述哺乳动物中各种病理疾患的诊断可以由熟练从业人员实施。诊断技术是本领域可利用的，其容许例如诊断或检测哺乳动物中的疾病。

HEPSIN抑制剂可以依照已知方法施用，诸如静脉内施用（如推注或一段时间的连续输注），通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、表面或吸入路径。任选的是，施用可以使用各种商品化装置经由迷你泵输注来实施。

HEPSIN抑制剂的有效剂量和进度表可以凭经验确定，而且做出此类决定在本领域技术范围内。可以采用单个或多个剂量。例如，HEPSIN抑制剂单独使用的有效剂量或量的范围可以是每天约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重或更多。剂量的物种间定标可以以本领域已知方式进行，例如参见Mordenti等, *Pharmaceut. Res.*, 8:1351 (1991)。

在采用体内施用HEPSIN抑制剂时，正常剂量可以在每天约 $10\text{ng}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 哺乳动物体重或更多的范围内变化，优选约 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 至 $10\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ ，取决于施用路径。文献中提供了关于投递的特定剂量和方法的指导，参见例如美国专利第4,657,760号；第5,206,344号；或第5,225,212号。预期不同配制剂会对不同治疗化合物和不同病症是有效的，而且例如靶向一种器官或组织的施用可能必需采用与靶向另一种器官或组织的施用不同方式的投递。

本发明的方法中还可以采用别的疗法。一种或多种其它疗法可以包括但不限于施用细胞毒剂和所讨论特定病症的其它标准护理方案。可以采用所述其它疗法作为与HEPSIN抑制剂不同的药剂。

为了用于上文所描述或提议的应用，本发明还提供了试剂盒或制品。此类试剂盒可以包括载体，其隔室化以紧密排列一个或多个容器，诸如药管、药瓶等，每个容器装有本发明方法中将使用的不同成分之一。例如，所述容

器之一可以装有可检测标记或可以可检测标记的探针。此类探针可以是本发明的抗体。

本发明的试剂盒典型地包括上文所述容器和一个或多个其它容器，其中装有从商业和使用者观点看需要的材料，包括缓冲剂、稀释剂、滤器、针头、注射器和印有使用说明书的包装插页。容器上可以有标签以指出该组合物用于特定疗法或非治疗性应用，而且还可以指出体外或体内使用的用法，诸如上文所述。

本发明的试剂盒具有许多实施方案。一个典型的实施方案是包括容器、所述容器上的标签、和所述容器内的组合物的试剂盒，其中所述组合物包含能结合HEPSIN的第一抗体，所述容器上的标签指出该组合物可用于评估至少一种类型的哺乳动物细胞中HEPSIN的存在，及使用抗体来评估至少一种类型的哺乳动物细胞中HEPSIN存在的说明书。该试剂盒可以进一步包含一套用于制备组织样品并将抗体应用于组织样品的同一切片的说明书和材料。该试剂盒可以包括第一抗体和第二抗体二者，其中所述第二抗体偶联有标记物，例如酶标记物。

试剂盒中的其它任选成分包括一种或多种缓冲液（例如封闭缓冲液、清洗缓冲液、底物缓冲液等）、其它试剂（诸如可以被酶标记物化学改变的底物，例如色原）、表位修复液、对照样品（阳性和/或阴性对照）、对照载玻片等。

抗体 - 一般地

一般而言，本发明的抗HEPSIN抗体可用于多种情况，包括作为试剂用于检测和分离HEPSIN，诸如检测各种细胞类型和组织中的HEPSIN表达，包括测定细胞群中的HEPSIN密度和分布，及基于HEPSIN表达的细胞分选。又一方面，本发明的抗HEPSIN抗体可用于开发与受试抗体具有相似结合活性样式的HEPSIN拮抗剂。例如，本发明的抗HEPSIN抗体可用于测定和鉴定具有相同HEPSIN结合特征的其他抗体。又例如，本发明的抗HEPSIN抗体可用于鉴定与本文中所例示的抗体结合基本上相同HEPSIN表位（包括线性和构象表位）的其他抗HEPSIN抗体。

候选抗体的生成可以使用本领域常规技术来实现，包括本文中所记载的，诸如杂交瘤技术和筛选结合物分子的噬菌体展示库。这些方法是本领域

已经确立的。

简言之，本发明的抗HEPSIN抗体可以通过使用组合库来筛选具有期望活性的合成抗体克隆来制备。在原理上，合成抗体克隆通过筛选噬菌体文库来选择，该噬菌体文库所包含的噬菌体展示融合至噬菌体外壳蛋白的各种抗体可变区(Fv)片段。通过针对期望抗原的亲亲和层析来淘选此类噬菌体文库。表达能够结合期望抗原的Fv片段的克隆吸附至抗原，如此与文库中不结合性克隆分开。然后从抗原上洗脱下结合性克隆，并可通过抗原吸附/洗脱的更多循环来进一步富集。本发明的任何抗HEPSIN抗体可以如下获得，即设计合适的抗原筛选规程以选择感兴趣噬菌体克隆，接着使用来自感兴趣噬菌体克隆的Fv序列和以下文献中记载的合适恒定区(Fc)序列构建全长抗HEPSIN抗体克隆，Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 卷1-3。还可参见PCT公开文本WO03/102157及其引用的参考文献。

在一个实施方案中，本发明的抗HEPSIN抗体是单克隆的。本发明的范围还涵盖本文中所提供的抗HEPSIN抗体的抗体片段，诸如Fab、Fab'、Fab'-SH和F(ab')₂片段，及其变异。这些抗体片段可以通过传统手段来创建，诸如酶促消化，或者可以通过重组技术来生成。此类抗体片段可以是嵌合的、人的或人源化的。这些片段可用于本文所列诊断和治疗目的。

单克隆抗体可以从基本上同质的抗体群获得，即构成群体的抗体个体是相同的，除了可能以极少量存在的可能的天然存在突变。如此，修饰语“单克隆”表明抗体不是不同的抗体的混合物的特征。

本发明的抗HEPSIN单克隆抗体可以使用多种本领域已知方法来制备，包括首先由Kohler等, Nature, 256:495 (1975)记载的杂交瘤法，或者它们可以通过重组DNA法来制备（例如美国专利第4,816,567号）。

载体、宿主细胞和重组方法

为了重组生产本发明的抗体，分离编码它的核酸，并将其插入可复制载体，用于进一步克隆（DNA扩增）或表达。可使用常规规程容易的分离编码抗体的DNA并测序（例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针）。可利用许多载体。载体的选择部分取决于将要使用的宿主细胞。一般地，优选的宿主细胞是原核或真核（通常是哺乳动物）起

源的。

使用原核宿主细胞生成抗体 载体构建

可使用标准重组技术来获得编码本发明多肽（抗体）的多核苷酸序列。可从抗体生成细胞诸如杂交瘤细胞分离期望的多核苷酸序列并测序。或者，可使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。一旦得到，将编码多肽的序列插入能够在原核宿主中复制并表达异源多核苷酸的重组载体。为了本发明，可使用本领域可获得的且知道的许多载体。适宜载体的选择将主要取决于将要插入载体的核酸的大小和将要载体转化的具体宿主细胞。根据其功能（扩增或表达异源多核苷酸，或二者兼之）及其与它在其中驻留的具体宿主细胞的相容性，每种载体含有多种构件。载体构件通常包括但不限于：复制起点、选择标志基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入片段、和转录终止序列。

一般而言，与宿主细胞一起使用的质粒载体包含衍生自与这些宿主相容物种的复制子和控制序列。载体通常携带复制位点，以及能够在转化细胞中提供表型选择的标志序列。例如，通常用衍生自大肠杆菌物种的质粒pBR322转化大肠杆菌。pBR322包含编码氨苄青霉素(Amp)和四环素(Tet)抗性的基因，由此提供轻松鉴定转化细胞的手段。pBR322、其衍生物、或其它微生物质粒或噬菌体还可包含或经修饰而包含可被微生物生物体用于表达内源蛋白质的启动子。Carter等的美国专利第5,648,237号中详细记载了用于表达特定抗体的pBR322衍生物的例子。

另外，可将包含与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体用作这些宿主的转化载体。例如，可使用噬菌体诸如λGEM.TM.-11来构建可用于转化易感宿主细胞诸如大肠杆菌LE392的重组载体。

本发明的表达载体可包含两种或更多启动子-顺反子对，它们编码每一种多肽构件。启动子是位于顺反子上游（5'）的非翻译调控序列，它调控顺反子的表达。原核启动子通常分成两类，诱导型的和组成性的。诱导型启动子指响应培养条件的变化（例如营养物的存在与否或温度变化）而启动受其控制的顺反子的升高水平转录的启动子。

众所周知受到多种潜在宿主细胞识别的大量启动子。通过限制酶消化切下源DNA中的启动子并将分离的启动子序列插入本发明的载体，由此可将选

择的启动子与编码轻链或重链的顺反子DNA可操作连接。天然启动子序列和许多异源启动子都可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在有些实施方案中，使用异源启动子，因为与天然靶多肽启动子相比，它们通常容许所表达靶基因的更高转录和更高产量。

适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子、 β -半乳糖苷酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、和杂合启动子诸如tac或trc启动子。然而，在细菌中有功能的其它启动子（诸如其它已知的细菌或噬菌体启动子）也是合适的。它们的核苷酸序列已经发表，由此熟练工作人员能够使用提供任何所需限制性位点的接头或衔接头将它们与编码靶轻链和重链的顺反子可操作连接（Siebenlist等, Cell 20: 269 (1980)）。

在本发明的一个方面，重组载体内的每个顺反子都包含指导所表达多肽穿膜转运的分泌信号序列构件。一般而言，信号序列可以是载体的构件，或者它可以是插入载体的靶多肽DNA的一部分。为了本发明而选择的信号序列应当是受到宿主细胞识别并加工（即被信号肽酶切除）的信号序列。对于不识别并加工异源多肽的天然信号序列的原核宿主细胞，将信号序列用选自例如下组的原核信号序列替换：碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp、或热稳定的肠毒素II (STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP。在本发明的一个实施方案中，表达系统的两个顺反子中都使用的信号序列是STII信号序列或其变体。

在另一方面，依照本发明的免疫球蛋白的生成可在宿主细胞的细胞质中发生，因此不需要在每个顺反子内存在分泌信号序列。在那点上，免疫球蛋白轻链和重链在细胞质内表达、折叠和装配而形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株（如大肠杆菌trxB⁻菌株）提供有利于二硫键形成的细胞质条件，从而容许所表达蛋白质亚基的正确折叠和装配。Proba和Pluckthun, Gene 159: 203 (1995)。

本发明的抗体还可使用如下表达系统来生成，其中所表达多肽构件的数量比率可以受到调控，从而将分泌且正确装配的本发明抗体的产量最大化。这种调控是至少部分通过同时调控多肽构件的翻译强度而实现的。

Simmons等的美国专利第5,840,523号中公开了用于调控翻译强度的一种技术。它在顺反子内利用翻译起始区(TIR)的变体。对于指定TIR，可创建具有一定范围翻译强度的一系列氨基酸或核酸序列变体，由此提供针对特定链

的期望表达水平调节此因素的方便手段。可通过常规诱变技术导致能改变氨基酸序列的密码子变化来生成TIR变体，尽管沉默的核苷酸序列变化是优选的。TIR中的改变可包括例如Shine-Dalgarno序列的数目或间距的改变，及信号序列中的改变。用于生成突变型信号序列的一种方法是在编码序列的开端生成不改变信号序列氨基酸序列的“密码子库”（即变化是沉默的）。这可通过改变每个密码子的第三个核苷酸位置来实现；另外，有些氨基酸，诸如亮氨酸、丝氨酸、和精氨酸，具有多种第一个和第二个位置，这可在建库中增加复杂性。Yansura等，METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158 (1992)中详细记载了这种诱变方法。

优选地，对于载体中的每个顺反子，生成具有一定范围TIR强度的一组载体。这个有限集合提供了每条链的表达水平以及期望抗体产物的产量在各种TIR强度组合下的比较。可通过量化报道基因的表达水平来测定TIR强度，Simmons等的美国专利第5,840,523号中有详细描述。根据翻译强度的比较，选择期望的各个TIR在表达载体构建物中进行组合。

适于表达本发明抗体的原核宿主细胞包括古细菌（Archaeobacteria）和真细菌（Eubacteria），诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。有用细菌的例子包括埃希氏菌属（*Escherichia*）（例如大肠埃希氏菌（*E. coli*））、芽孢杆菌属（*Bacillus*）（例如枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*））、肠杆菌属（*Enterobacteria*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）（例如铜绿假单胞菌（*P. aeruginosa*））物种、鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）、粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescans*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、变形菌属（*Proteus*）、志贺氏菌属（*Shigella*）、根瘤菌属（*Rhizobium*）、透明颤菌属（*Vitreoscilla*）、或副球菌属（*Paracoccus*）。在一个实施方案中，使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中，使用大肠杆菌细胞作为本发明的宿主。大肠杆菌菌株的例子包括菌株W3110（Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 卷2, Washington, D.C., 美国微生物学学会, 1987, 第1190-1219页；ATCC保藏号27,325）及其衍生物，包括具有基因型W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac Iq lacL8* $\Delta ompT\Delta(nmpc-fepE)$ *degP41 kan^R*的菌株33D3（美国专利第5,639,635号）。其它菌株及其衍生物，诸如大肠杆菌294（ATCC 31,446）、大肠杆菌B、大肠杆菌 λ 1776（ATCC 31,537）和大肠杆菌RV308（ATCC 31,608）也是合适的。这些例子只是例示而非限制。本领域知道用于构建具有指定基因型的任何上述细菌衍生物的方法，参见例如Bass

等, *Proteins* 8: 309-314 (1990)。通常必需考虑复制子在细菌细胞中的可复制性来选择适宜的细菌。例如, 在使用众所周知的质粒诸如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410来提供复制子时, 大肠杆菌、沙雷氏菌属、或沙门氏菌属物种可能适于用作宿主。通常, 宿主细胞应当分泌最小量的蛋白水解酶类, 而且可能希望在细胞培养中掺入额外的蛋白酶抑制剂。

抗体生成

用上述表达载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

转化即将DNA导入原核宿主, 使得DNA能够进行复制, 或是作为染色体外元件或是通过染色体成分。根据所用宿主细胞, 使用适于这些细胞的标准技术进行转化。采用氯化钙的钙处理通常用于具有坚固细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用聚乙二醇/DMSO。使用的还有一种技术是电穿孔。

在本领域知道的且适于培养选定宿主细胞的培养基中培养用于生成本发明多肽的原核细胞。合适培养基的例子包括添加了必需营养补充物的LB培养基(Luria broth)。在有些实施方案中, 培养基还含有根据表达载体的构建而选择的选择剂, 以选择性容许包含表达载体的原核细胞生长。例如, 向用于培养表达氨苄青霉素抗性基因的细胞的培养基中添加氨苄青霉素。

除了碳、氮、和无机磷酸盐来源以外, 还可含有适当浓度的任何必需补充物, 或是单独加入或是作为与另一种补充物或培养基的混合物, 诸如复合氮源。任选的是, 培养基可含有一种或多种选自下组的还原剂: 谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸盐/酯、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。

在合适的温度培养原核宿主细胞。例如, 对于培养大肠杆菌, 优选的温度范围是约20°C至约39°C、优选约25°C至约37°C、优选约30°C。主要取决于宿主生物体, 培养基的pH可以是范围为约5至约9的任何pH。对于大肠杆菌, pH可以是约6.8至约7.4、或约7.0。

如果本发明的表达载体中使用诱导型启动子, 那么在适于激活启动子的条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一个方面, 使用PhoA启动子来控制多肽的转录。因而, 为了诱导, 在磷酸盐限制培养基中培养经过转化的宿主细胞。在一个实施方案中, 磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基(参见例如Simmons等, *J. Immunol. Methods* 263: 133-147 (2002))。根据所采用的载体构建物, 可采用多种其它诱导物, 正如本领域所知道的。

在一个实施方案中,所表达的本发明多肽分泌到宿主细胞的周质中并从中回收。蛋白质回收通常牵涉破坏微生物,通常通过诸如渗透压震扰(osmotic shock)、超声处理或裂解等手段。一旦细胞遭到破坏,可通过离心或过滤清除细胞碎片或整个细胞。可以通过例如亲和树脂层析进一步纯化蛋白质。或者,蛋白质可能转运到培养液中并从中分离。可从培养液清除细胞,并将培养物上清液过滤和浓缩,用于进一步纯化所生成蛋白质。可使用普遍知道的方法诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和Western印迹测定法进一步分离和鉴定所表达多肽。

在本发明的一个方面,通过发酵过程大量进行抗体生产。多种大规模补料-分批发酵规程可用于生产重组蛋白。大规模发酵具有至少1000升的容量,优选约1,000至100,000升的容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧和养分,尤其是葡萄糖(优选的碳源/能源)。小规模发酵通常指在体积容量不超过约100升的发酵罐中进行的发酵,范围可以是约1升至约100升。

在发酵过程中,通常在将细胞在合适条件下培养至期望密度(如OD₅₅₀约180-220,在此阶段细胞处于早期稳定期)后启动蛋白质表达的诱导。根据所采用的载体构建物,可使用多种诱导物,正如本领域知道的和上文描述的。可在诱导前将细胞培养更短的时间。通常将细胞诱导约12-50小时,但是可使用更长或更短的诱导时间。

为了提高本发明多肽的产量和质量,可修改多项发酵条件。例如,为了改善所分泌抗体多肽的正确装配和折叠,可使用过度表达伴侣蛋白诸如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD和/或DsbG)或FkpA(具有伴侣活性的一种肽基脯氨酰-顺式,反式-异构酶)的额外载体来共转化宿主原核细胞。已经证明伴侣蛋白促进在细菌宿主细胞中生成的异源蛋白质的正确折叠和溶解度。Chen等, *J. Biol. Chem.* 274: 19601-19605 (1999); Georgiou等, 美国专利第6,083,715号; Georgiou等, 美国专利第6,027,888号; Bothmann和Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275: 17100-17105 (2000); Ramm和Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275: 17106-17113 (2000); Arie等, *Mol. Microbiol.* 39: 199-210 (2001)。

为了将所表达异源蛋白质(尤其是对蛋白水解敏感的异源蛋白质)的蛋白水解降至最低,可将蛋白水解酶缺陷的某些宿主菌株用于本发明。例如,可修饰宿主细胞株,在编码已知细菌蛋白酶的基因中进行遗传突变,诸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及

其组合。可以获得有些大肠杆菌蛋白酶缺陷菌株, 参见例如Joly等, (1998) 见上文; Georgiou等, 美国专利第号5,264,365号; Georgiou等, 美国专利第5,508,192号; Hara等, *Microbial Drug Resistance* 2: 63-72 (1996)。

在一个实施方案中, 在本发明的表达系统中使用蛋白水解酶缺陷且经过过度表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株作为宿主细胞。

抗体纯化

在一个实施方案中, 进一步纯化本文中生成的抗体以获得基本上同质的制备物, 用于进一步的测定和使用。可采用本领域知道的标准蛋白质纯化方法。下面的规程是合适纯化规程的例示: 免疫亲和或离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅土或阳离子交换树脂诸如DEAE上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、和使用例如Sephadex G-75的凝胶过滤。

一方面, 将固定化在固相上的蛋白A用于本发明抗体产物的免疫亲和纯化。蛋白A是来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的41kD细胞壁蛋白质, 它以高亲和力结合抗体Fc区。Lindmark等, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)。蛋白A固定化其上的固相可以是具有玻璃或石英表面的柱子, 或者可控孔径玻璃柱或硅胶柱。在有些应用中, 柱子用诸如甘油等试剂包被, 用以有可能防止污染物的非特异粘附。

作为纯化的第一步, 可以将衍生自如上所述细胞培养物的制备物施加到蛋白A固定化固相上, 使得感兴趣抗体特异性结合至蛋白A。然后清洗固相以清除与固相非特异性结合的污染物。最后通过洗脱从固相回收感兴趣抗体。

使用真核宿主细胞生成抗体:

载体构件通常包括但不限于如下一种或多种: 信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

(i) 信号序列构件

在真核宿主细胞中使用的载体还可在感兴趣成熟蛋白质或多肽的N端包含信号序列或具有特异性切割位点的其它多肽。一般选择受到宿主细胞识别并加工 (即被信号肽酶切除) 的异源信号序列。在哺乳动物细胞表达中, 可利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导, 例如单纯疱疹病毒gD信号。

将这些前体区的DNA连接到编码抗体的DNA的读码框中。

(ii) 复制起点

通常，哺乳动物表达载体不需要复制起点构件。例如，SV40起点通常可能只因包含早期启动子才使用。

(iii) 选择基因构件

表达和克隆载体可包含选择基因，也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质：(a)赋予对抗生素或其它毒素的抗性，例如氨基青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素；(b)补足相应的营养缺陷；或(c)提供不能从复合培养基获得的关键营养物。

选择方案的一个例子利用药物来阻滞宿主细胞的生长。经异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质，如此幸免于选择方案。此类显性选择的例子使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个例子是能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择标志，诸如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白I和II（例如灵长类金属硫蛋白基因）、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

例如，可以首先通过将所有转化子在含有甲氨蝶呤（Mtx，DHFR的一种竞争性拮抗剂）的培养基中进行培养来鉴定经DHFR选择基因转化的细胞。在采用野生型DHFR时，适宜的宿主细胞包括例如DHFR活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系（例如ATCC CRL-9096）。

或者，可通过在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷抗生素例如卡那霉素、新霉素或G418的培养基中培养细胞来选择经编码抗体、野生型DHFR蛋白、和另一种选择标志诸如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)的DNA序列转化或共转化的宿主细胞（特别是包含内源DHFR的野生型宿主）。参见美国专利4,965,199。

(iv) 启动子构件

表达和克隆载体通常包含受到宿主生物体识别的启动子，且其与编码感兴趣多肽（例如抗体）的核酸可操作连接。已知真核细胞的启动子序列。事实上，所有真核基因都具有富含AT区，它位于起始转录的位点上游约25至30个碱基处。在许多基因的转录起点上游70至80个碱基处发现的另一种序列是CNCAAT区，其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'端是AATAAA序列，它可能是向编码序列的3'端添加聚腺苷酸(polyA)尾的信号。所有这些序列合适的插入真核表达载体中。

在哺乳动物宿主细胞中由载体转录抗体多肽可以受到例如从病毒（诸如

多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒（诸如2型腺病毒）、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒、和猿病毒40 (SV40)）基因组获得的、来自异源哺乳动物启动子（例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子）的、或来自热休克启动子的启动子的控制，倘若这些启动子与宿主细胞系统相容的话。

方便的以SV40限制性片段的形式获得SV40病毒的早期和晚期启动子，该片段还包含SV40病毒复制起点。方便的以HindIII E限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利第4,419,446号中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。美国专利第4,601,978号中记载了该系统的一种修改。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素cDNA还可参见Reyes等, Nature 297: 598-601 (1982)。或者，可使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

(v) 增强子元件构件

常常可以通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码本发明抗体多肽的DNA的转录。现在知道来自哺乳动物基因（珠蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素）的许多增强子序列。然而，通常使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括SV40复制起点晚期侧的增强子（bp 100-270）、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982)。增强子可剪接到载体中，位于抗体多肽编码序列的5'或3'位置，但是一般位于启动子的5'位点。

(vi) 转录终止构件

在真核宿主细胞中使用的表达载体通常还包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA非翻译区的5'端和偶尔的3'端获得。这些区域包含在编码抗体的mRNA的非翻译区中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见WO94/11026及其中公开的表达载体。

(vii) 宿主细胞的选择和转化

适于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞包括本文描述的高等真核细胞，包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养（组织培养）中的繁殖已经成为常规规程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子有经SV40转化的猴肾

CV1系 (COS-7, ATCC CRL 1651)、人胚肾系 (293细胞或为悬浮培养而亚克隆的293细胞, Graham等, J. Gen. Virol. 36: 59 (1977))、幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10)、中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980))、小鼠塞托利(Sertoli)细胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980))、猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL 70)、非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL 1587)、人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2)、犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34)、牛鼠(buffalo rat)肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)、人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75)、人肝细胞 (Hep G2, HB 8065)、小鼠乳瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51)、TRI细胞 (Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982))、MRC 5细胞、FS4细胞和人肝癌 (hepatoma)系 (Hep G2)。

为了生成抗体, 用上文所述表达或克隆载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

(viii) 宿主细胞的培养

可在多种培养基中培养用于生成本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如Ham氏F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和Dulbecco氏修改Eagle氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外, 可使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基: Ham等, Meth. Enz. 58: 44 (1979); Barnes等, Anal. Biochem. 102: 255 (1980); 美国专利第4,767,704号; 第4,657,866号; 第4,927,762号; 第4,560,655号; 第5,122,469号; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利Re. 30,985。任何这些培养基可根据需要补充激素和/或其它生长因子 (诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂 (诸如HEPES)、核苷酸 (诸如腺苷和胸苷)、抗生素 (诸如GENTAMYCIN™药物)、痕量元素 (定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以适宜浓度含有本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件诸如温度、pH等即为表达而选择的宿主细胞先前所用的, 这对于普通技术人员是显然的。

(ix) 抗体的纯化

在使用重组技术时, 可在细胞内生成抗体, 或者直接分泌到培养基中。

如果在细胞内生成抗体，那么首先一般通过例如离心或超滤清除微粒碎片，或是宿主细胞或是裂解片段。如果抗体分泌到培养基中，那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器（例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元）浓缩来自这些表达系统的上清液。可在任何上述步骤中包括蛋白酶抑制剂诸如PMSF以抑制蛋白水解，而且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

可使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析（一般可接受的纯化技术是亲和层析）来纯化从细胞制备的抗体组合物。亲和试剂诸如蛋白A作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2、或 γ 4重链的抗体（Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)）。蛋白G推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3（Guss等, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)）。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖，但是可使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯容许获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含CH3结构域，则可使用Bakerbond ABX™树脂（J. T. Baker, Phillipsburg, NJ）进行纯化。根据待回收的抗体，也可使用其它蛋白质纯化技术诸如离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅土上的层析、肝素SEPHAROSE™上的层析、阴离子或阳离子交换树脂（诸如聚天冬氨酸柱）上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

在任何初步纯化步骤之后，可将含有感兴趣抗体和污染物的混合物在必要时进行进一步的纯化步骤，例如低pH疏水相互作用层析，使用pH约2.5-4.5的洗脱缓冲液，一般在低盐浓度（例如约0-0.25M盐）进行。

应当注意，一般而言，用于制备供研究、测试和临床使用的抗体的技术和方法是本领域已完善建立的，与上文是一致的和/或本领域技术人员认为对于特定的感兴趣抗体是适宜的。

活性测定法

可通过本领域知道的多种测定法对本发明的抗体表征它们的物理/化学特性和生物学功能。

可通过一系列测定法进一步表征纯化的抗体，包括但不限于N端测序、氨基酸分析、非变性大小排阻高压液相层析(HPLC)、质谱、离子交换层析和木瓜蛋白酶消化。

在必要时，对抗体分析它们的生物学活性。在有些实施方案中，对本发

明的抗体测试它们的抗原结合活性。本领域知道的且可用于本文的抗原结合测定法包括但不限于使用诸如Western印迹、放射免疫测定法、ELISA（酶联免疫吸附测定法）、“三明治”免疫测定法、免疫沉淀测定法、荧光免疫测定法和蛋白A免疫测定法等技术的任何直接或竞争性结合测定法。

在一个实施方案中，本发明涵盖具有一些但非所有效应器功能的改良抗体，这使得它在抗体体内半衰期是重要的但某些效应器功能（诸如补体和ADCC）是不必要的或有害的许多应用中成为期望的候选物。在某些实施方案中，测量抗体的Fc活性以确保只保留了期望的特性。可进行体外和/或体内细胞毒性测定法以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消减。例如，可进行Fc受体(FcR)结合测定法以确认抗体缺乏FcγR结合（因此有可能缺乏ADCC活性）但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞，NK细胞，只表达FcγRIII，而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)第464页表3总结了造血细胞上的FcR表达。美国专利第5,500,362号或第5,821,337号中记载了用于评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定法的例子。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外，可在体内评估感兴趣分子的ADCC活性，例如在动物模型中，诸如Clynes等, *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998)中所公开的。还可进行C1q结合测定法以确认抗体不能结合C1q且因此缺乏CDC活性。为了评估补体激活，可进行CDC测定法，例如如Gazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)中所述。还可使用本领域知道的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定。

人源化抗体

本发明涵盖人源化抗体。本领域知道用于人源化非人抗体的多种方法。例如，人源化抗体可具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称为“输入”残基，它们通常取自“输入”可变域。基本上可遵循Winter及其同事的方法进行人源化（Jones等, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann等, *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen等, *Science* 239: 1534-1536 (1988)），即用（非人）高变区序列替代人抗体的相应序列。因而，此类“人源化”抗体是嵌合抗体（美国专利4,816,567），其中显著少于完整的人可变域用非人物种的相应序列替代。在实践中，人源化抗体通常是如下人抗体，其中有些高变区残基和可能的有些FR残基用啮齿类抗体类似位点的

残基替代。

用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变域的选择对于降低抗原性可能是重要的。依照所谓的“最适(best-fit)”方法,用啮齿类抗体的可变域序列对已知人可变域序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架(Sims等, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架。相同框架可用于数种不同的人源化抗体(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992); Presta等, J. Immunol. 151: 2623 (1993))。

一般进一步希望抗体在人源化后保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了达到此目的,依照一种方法,通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。通常可获得免疫球蛋白三维模型,这是本领域技术人员所熟悉的。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。通过检查这些显示图像容许分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可以从受体序列和输入序列中选出FR残基并组合,从而得到期望的抗体特征,诸如对靶抗原的亲合力升高。一般而言,高变区残基直接且最实质的牵涉对抗原结合的影响。

抗体变体

一方面,本发明提供了在包含Fc区的Fc多肽的界面中包含修饰的抗体,其中所述修饰便于和/或促进异二聚化。这些修饰包括在第一Fc多肽中引入隆起(protuberance),在第二Fc多肽中引入空穴(cavity),其中所述隆起可位于所述空穴中,从而促进第一和第二Fc多肽的复合。用于生成具有这些修饰的抗体的方法是本领域已知的,例如美国专利No. 5,731,168中所记载的。

在有些实施方案中,涵盖本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。抗体的氨基酸序列变体是通过将适宜的核苷酸变化引入抗体核酸或通过肽合成制备的。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基删除和/或插入和/或替代。可进行任何删除、插入和替代组合以获得最终的构建物,倘若最终的构建物具有期望的特征。可在制备序列时将氨基酸改变引入受试抗体氨基酸序列。

可用于鉴定抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的方法有“丙氨酸扫描诱变”，如Cunningham和Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989)中所述。这里，鉴定一个残基或一组靶残基（例如带电荷的残基，诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸）并用中性或带负电荷的氨基酸（例如丙氨酸或多聚丙氨酸）替代，以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体，推敲那些对替代展示出功能敏感性的氨基酸位置。如此，尽管用于引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的，然而突变本身的本质不必预先决定。例如，为了分析指定位点处突变的后果，在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变，并对所表达免疫球蛋白筛选期望的活性。

氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端的融合，长度范围由一个残基至包含上百或更多残基的多肽，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括将抗体的N或C端与酶（例如用于ADEPT）或延长抗体血清半衰期的多肽融合。

另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替代。最有趣进行替代诱变的位点包括高变区，但是也涵盖FR改变。表A中“优选替代”栏显示了保守替代。如果此类替代导致生物学活性变化，那么可导入表B中称为“例示替代”的更多实质变化，或如下文参照氨基酸分类进一步所述，并筛选产物。

表B

原始残基	例示替代	优选替代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg

Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

对抗体生物学特性的实质性修饰可通过选择对维持以下方面的效果差异显著的替代来实现：(a) 替代区域中多肽主链的结构，例如（折叠）片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或(c) 侧链的体积。根据其侧链特性的相似性，氨基酸可如下分组（A. L. Lehninger, 于《Biochemistry》，第2版，第73-75页，Worth Publishers, New York, 1975）：

- (1) 非极性的：Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)
- (2) 不带电荷、极性的：Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)
- (3) 酸性的：Asp (D)、Glu (E)
- (4) 碱性的：Lys (K)、Arg (R)、His(H)

或者，根据共同的侧链特性，天然发生残基可如下分组：

- (1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性、亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性的：Asp、Glu;
- (4) 碱性的：His、Lys、Arg;
- (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro;
- (6) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

非保守替代需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的。还可将此类

替代残基引入保守替代位点，或者更优选的是引入剩余（非保守）位点。

一类替代变体牵涉替代亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体会具有改变（例如改进）的生物学特性。用于生成此类替代变体的一种便利方法牵涉使用噬菌体展示的亲和力成熟。简而言之，将数个高变区位点（例如6-7个位点）突变，在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。将如此生成的抗体展示在丝状噬菌体颗粒上，作为与各个颗粒内包装的至少部分噬菌体外壳蛋白（例如M13基因III产物）的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性（例如结合亲和力）。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可进行扫描（例如丙氨酸扫描）诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者/另外，分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点可能是有益的。所述接触残基及邻近残基是依照本领域已知的技术（包括本文详述的技术）进行替代的候选位点。一旦产生这样的变体，使用本领域已知的技术（包括本文所述的技术）对该组变体进行筛选，可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

编码抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域知道的多种方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离（在天然发生氨基酸序列变体的情况中），或者通过对较早制备的变体或非变异型式的抗体进行寡核苷酸介导的（或定点）诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。

可能希望在本发明抗体的Fc区中引入一处或多处氨基酸修饰，由此生成Fc区变体。Fc区变体可包括在一个或多个氨基酸位置（包括铰链半胱氨酸）包含氨基酸修饰（例如替代）的人Fc区序列（例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区）。

依照此描述和本领域的教导，在有些实施方案中，本发明的抗体与野生型对应抗体相比可在例如Fc区中包含一处或多处改变。与它们的野生型对应物相比，这些抗体仍会基本上保留治疗功效所需要的相同特性。例如，认为可在Fc区中进行会导致C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性（CDC）改变（即或是增强或是削弱）的某些改变，例如WO99/51642中所述。还可参见关注Fc区变体其它例子的Duncan和Winter, *Nature* 322: 738-40 (1988); 美国专利5,648,260; 美国专利5,624,821; 及WO94/29351。

免疫偶联物

一方面,本发明提供了包含偶联有细胞毒剂的抗体的免疫偶联物或抗体-药物偶联物(ADC),所述细胞毒剂诸如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射偶联物)。

抗体-药物偶联物在癌症治疗中用于局部递送细胞毒性或细胞抑制性药剂(即用于杀死或抑制肿瘤细胞的药物)的用途(Syrigos和Epenetos, *Anticancer Research* 19: 605-614 (1999); Niculescu-Duvaz和Springer, *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172 (1997); 美国专利4,975,278)容许将药物模块靶向递送至肿瘤,并在那儿进行细胞内积累,而系统施用这些未经偶联的药物试剂可能在试图消除的肿瘤细胞以外导致不可接受的对正常细胞的毒性水平(Baldwin等, *Lancet* 603-05 (1986年3月15日); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", 于《*Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*》, A. Pinchera等编,第475-506页,1985)。由此试图获得最大功效及最小毒性。多克隆抗体和单克隆抗体皆有报道可用于这些策略(Rowland等, *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-87 (1986))。这些方法中所使用的药物包括道诺霉素(daunomycin)、多柔比星(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)和长春地辛(vindesine)(Rowland等, 1986, 见上文)。抗体-毒素偶联物中所使用的毒素包括细菌毒素诸如白喉毒素、植物毒素诸如蓖麻毒蛋白、小分子毒素诸如格尔德霉素(geldanamycin)(Mandler等, *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581 (2000); Mandler等, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028 (2000); Mandler等, *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791 (2002))、美登木素生物碱类(EP 1391213; Liu等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1996))、和加利车霉素(Lode等, *Cancer Res.* 58: 2928 (1998); Hinman等, *Cancer Res.* 53: 3336-3342 (1993))。毒素可通过包括微管蛋白结合、DNA结合或拓扑异构酶抑制在内的机制发挥其细胞毒性和细胞抑制性效果。有些细胞毒药物在与大的抗体或蛋白质受体配体偶联时趋于失活或活性降低。

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idex)是由针对在正常和恶性B淋巴细胞表面上发现的CD20抗原的鼠IgG1 κ 单克隆抗体与通过硫脲接头-螯合剂所结合的¹¹¹In或⁹⁰Y放射性同位素构成的抗体-放射性同位素偶联物

(Wiseman等, Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7): 766-77 (2000); Wiseman等, Blood 99(12): 4336-42 (2002); Witzig等, J. Clin. Oncol. 20(10): 2453-63 (2002); Witzig等, J. Clin. Oncol. 20(15): 3262-69 (2002))。尽管ZEVALIN具有针对B细胞非何杰金氏(Hodgkin)淋巴瘤(NHL)的活性, 然而施药在大多数患者中导致严重且长时间的血细胞减少。MYLOTARG™(gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), 即由huCD33抗体与加利霉素连接而构成的抗体-药物偶联物, 在2000年批准用于经注射治疗急性骨髓性白血病 (Drugs of the Future 25(7): 686 (2000); 美国专利4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001)。Cantuzumab mertansine (Immunogen Inc.), 即由huC242抗体经二硫化物接头SPP与美登木素生物碱药物模块DM1连接而构成的抗体-药物偶联物, 在测试用于治疗表达CanAg的癌症诸如结肠癌、胰腺癌、胃癌和其它癌。MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), 即由抗前列腺特异膜抗原(PSMA)单克隆抗体与美登木素生物碱药物模块DM1连接而构成的抗体-药物偶联物, 在测试用于前列腺肿瘤潜在治疗。将多拉司他汀(dolastatin)的合成类似物auristatin肽, auristatin E (AE)和单甲基auristatin (MMAE)与嵌合单克隆抗体cBR96 (对肿瘤上的Lewis Y特异性的)和cAC10(对血液学恶性肿瘤上的CD30特异性的)偶联(Doronina等, Nature Biotechnology 21(7): 778-784 (2003)), 且正在进行治疗性开发。

本文中(上文)描述了可用于生成免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌*Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白(ricin)A链、相思豆毒蛋白(abrin)A链、蒴莲根毒蛋白(modeccin)A链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(*Aleutites fordii*)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)毒蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(croton)、肥皂草(*saponaire officinalis*)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。参见例如1993年10月28日公布的WO 93/21232。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。例子包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备, 诸如N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP), 亚氨基硫烷(IT), 亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚

氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性整合剂。参见WO 94/11026。

本文还涵盖抗体与一种或多种小分子毒素诸如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素生物碱类(maytansinoids)、多拉司他汀(dolostatins)、aurostatins、单端孢霉素(trichothecene)和CC1065及这些毒素具有毒素活性的片段的偶联物。

美登素和美登木素生物碱类

在有些实施方案中,免疫偶联物包含偶联有一个或多个美登木素生物碱分子的本发明抗体。

美登木素生物碱类是通过抑制微管蛋白多聚化来发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素最初从东非灌木齿叶美登木(Maytenus serrata)分离得到(美国专利3,896,111)。随后发现某些微生物也生成美登木素生物碱类,诸如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利4,151,042)。例如下列美国专利公开了合成美登醇及其衍生物和类似物: 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 及4,371,533。

美登木素生物碱类药物模块在抗体药物偶联物中是有吸引力的药物模块,因为它们:(i)相对易于通过发酵或发酵产物的化学修饰、衍生化来制备;(ii)易于用适于通过非二硫化物接头的偶联的官能基衍生化;(iii)在血浆中稳定;且(iv)有效针对多种肿瘤细胞系。

美登木素生物碱类药物模块的例示性实施方案包括DM1、DM3和DM4。例如下列专利公开了包含美登木素生物碱类的免疫偶联物及其制备方法和治疗用途:美国专利5,208,020; 5,416,064; 及欧洲专利EP 0 425 235 B1,明确将其公开内容收入本文作为参考。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)记载了包含与针对人结肠直肠癌的单克隆抗体C242连接的

称为DM1的美登木素生物碱的免疫偶联物。发现该偶联物具有针对培养的结肠癌细胞的高度细胞毒性，而且在体内肿瘤生长测定法中显示出抗肿瘤活性。Chari等, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)记载了其中美登木素生物碱经二硫化物接头与结合人结肠癌细胞系上抗原的鼠抗体A7或结合HER-2/neu癌基因的另一种鼠单克隆抗体TA.1偶联的免疫偶联物。在体外在人乳癌细胞系SK-BR-3上测试了TA.1-美登木素生物碱偶联物的细胞毒性，该细胞系每个细胞表达 3×10^5 个HER-2表面抗原。药物偶联物达到了与游离美登木素生物碱药物程度相似的细胞毒性，这可通过增加每个抗体分子偶联的美登木素生物碱分子数目来提高。A7-美登木素生物碱偶联物在小鼠中显示低系统性细胞毒性。

抗体-美登木素生物碱偶联物可通过将抗体与美登木素生物碱分子化学连接且不显著削弱抗体或美登木素生物碱分子的生物学活性来制备。参见例如美国专利No. 5,208,020，明确将其公开内容收入本文作为参考。每个抗体分子偶联平均3-4个美登木素生物碱分子在增强针对靶细胞的细胞毒性中显示功效，且对抗体的功能或溶解度没有负面影响，尽管预计甚至每个抗体偶联一分子毒素也将较之裸抗体的使用增强细胞毒性。美登木素生物碱类在本领域是众所周知的，而且可通过已知技术合成或从天然来源分离。例如美国专利5,208,020和上文提及的其它专利及非专利发表物中公开了合适的美登木素生物碱类。优选的美登木素生物碱类有美登醇和美登醇分子的芳香环或其它位置经过修饰的美登醇类似物，诸如各种美登醇酯。

本领域知道许多连接基团可用于制备抗体-美登木素生物碱偶联物，包括例如美国专利5,208,020或欧洲专利0 425 235 B1; Chari等, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992); 2004年10月8日提交的美国专利申请No. 10/960,602中所公开的，明确将其公开内容收入本文作为参考。包含接头构件SMCC的抗体-美登木素生物碱类偶联物可以如2004年10月8日提交的美国专利申请No. 10/960,602中所披露的来制备。连接基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳定基团，正如上文所述专利中所公开的，二硫化物和硫醚基团是优选的。本文中描述和例示了别的连接基团。

可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和美登木素生物碱的偶联物，诸如N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)，琥珀酰亚氨基

-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC), 亚氨基硫烷(IT), 亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。特别优选的偶联剂包括但不限于N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)(Carlsson等, Biochem. J. 173: 723-737 (1978))和N-琥珀酰亚氨基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP), 由此提供二硫化物连接。

根据连接的类型, 可将接头附着于美登木素生物碱分子的多个位置。例如, 可使用常规偶联技术通过与羟基的反应来形成酯连接。反应可发生在具有羟基的C-3位置、经羟甲基修饰的C-14位置、经羟基修饰的C-15位置、和具有羟基的C-20位置。在一个优选的实施方案中, 在美登醇或美登醇类似物的C-3位置形成连接。

Auristatin和多拉司他汀

在有些实施方案中, 免疫偶联物包含与多拉司他汀类(dolastatins)或多拉司他汀肽类似物及衍生物auristatin类偶联的本发明抗体(美国专利No. 5,635,483; 5,780,588)。多拉司他汀类和auristatin类已经显示出干扰微管动力学、GTP水解、及核和细胞分裂(Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)且具有抗癌(US 5,663,149)和抗真菌(Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)活性。多拉司他汀或auristatin药物模块可经由肽药物模块的N(氨基)末端或C(羧基)末端附着于抗体(WO 02/088172)。

例示性的auristatin实施方案包括N-末端连接的单甲基auristatin药物模块DE和DF, 披露于“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, 2004年11月5日提交的美国流水号10/983,340, 明确将其公开内容完整收入本文作为参考。

例示性的auristatin实施方案有MMAE和MMAF。包含MMAE或MMAF和各种接头构件(本文中进一步描述的)的别的例示性的实施方案包括Ab-MC-vc-PAB-MMAF、Ab-MC-vc-PAB-MMAE、Ab-MC-MMAE和Ab-MC-MMAF。

典型的是, 基于肽的药物模块可通过在两个或更多氨基酸和/或肽片段之

间形成肽键来制备。此类肽键可依照例如肽化学领域众所周知的液相合成法来制备(参见E. Schröder和K. Lübke, *The Peptides*, 卷1, pp 76-136, 1965, Academic Press)。auristatin/多拉司他汀药物模块可依照以下文献中的方法来制备: US 5,635,483; US 5,780,588; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R.,等 *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; 及 Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784; “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, 2004年11月5日提交的美国流水号10/983,340, 将其完整收入本文作为参考(披露了例如制备诸如MMAE和MMAF偶联至接头的单甲基缬氨酸化合物的接头和方法)。

加利车霉素

在其它实施方案中, 免疫偶联物包含偶联有一个或多个加利车霉素分子的本发明抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度生成双链DNA断裂。关于加利车霉素家族偶联物的制备参见美国专利5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; 和5,877,296 (都授予美国Cyanamid公司)。可用的加利车霉素结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基- γ_1^I 、PSAG和 θ_1^I (Hinman等, *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993); Lode等, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998); 及上述授予美国Cyanamid公司的美国专利)。可与抗体偶联的另一种抗肿瘤药物是QFA, 它是一种抗叶酸药物。加利车霉素和QFA都具有胞内作用位点, 且不易穿过质膜。因此, 这些试剂经由抗体介导的内化了的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒效果。

其它细胞毒剂

可与本发明抗体偶联的其它抗肿瘤剂包括BCNU、链佐星(streptozocin)、长春新碱(vincristine)、5-氟尿嘧啶、美国专利5,053,394、5,770,710中记载的统称为LL-E33288复合物的试剂家族、及埃斯波霉素类(esperamicins) (美国专利5,877,296)。

可用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌*Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白(ricin) A链、相思豆毒蛋白(abrin) A链、蒴莲根毒蛋白(modeccin) A链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(*Aleutites fordii*)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美

洲商陆(*Phytolaca americana*)毒蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(*saponaire officinalis*)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。参见例如1993年10月28日公布的WO 93/21232。

本发明还涵盖抗体和具有核酸降解活性的化合物(例如核糖核酸酶或DNA内切核酸酶,诸如脱氧核糖核酸酶;DNA酶)之间形成的免疫偶联物。

为了选择性破坏肿瘤,抗体可包含高度放射性原子。多种放射性同位素可用于生成放射偶联抗体。例子包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。在将偶联物用于检测时,可包含放射性原子用于闪烁照相研究,例如 ^{99m}Tc 或 I^{123} ,或是包含自旋标记物用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,MRI),诸如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

可以已知方式将放射性标记物或其它标记物掺入偶联物。例如,可生物合成肽,或是通过化学氨基酸合成法合成肽,其中使用牵涉例如氟-19代替氢的合适氨基酸前体。可经肽中的半胱氨酸残基来附着标记物,诸如 ^{99m}Tc 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 。可以经赖氨酸残基来附着钇-90。IODOGEN法(Fraker等(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57)可用于掺入碘-123。

《*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*》(Chatal, CRC Press, 1989)详细记载了其它方法。

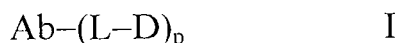
可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒剂的偶联物,诸如N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP),琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC),亚氨基硫烷(IT),亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异硫氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如Vitetta等, *Science* 238: 1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见WO94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒药物的“可切割接头”。

例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头 (Chari等, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992); 美国专利 5,208,020)。

本发明的化合物明确涵盖但不限于用下列交联剂制备的ADC: 商品化 (例如购自Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, U.S.A.) 的BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC和sulfo-SMPB、和SVSB (琥珀酰亚氨基-(4-乙烯基砷)苯甲酸酯)。见2003-2004年度应用手册和产品目录(Applications Handbook and Catalog)第467-498页。

抗体-药物偶联物的制备

在本发明的抗体-药物偶联物(ADC)中,将抗体(Ab)经接头(L)与一个或多个药物模块(D)偶联,例如每个抗体偶联约1个至约20个药物模块。可采用本领域技术人员知道的有机化学反应、条件和试剂通过数种路径来制备通式I的ADC,包括:(1)抗体的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应,形成Ab-L,随后与药物模块D反应;和(2)药物模块的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应,形成D-L,随后与抗体的亲核基团反应。本文中描述了用于制备ADC的别的方法。

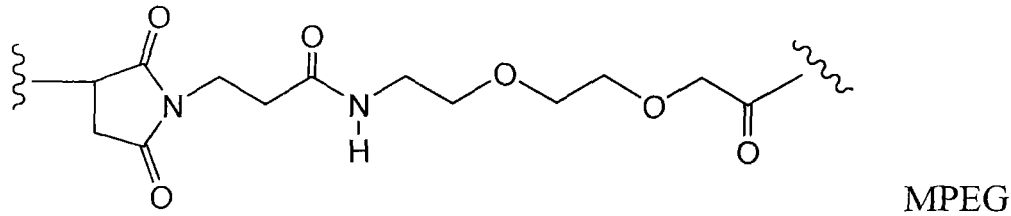
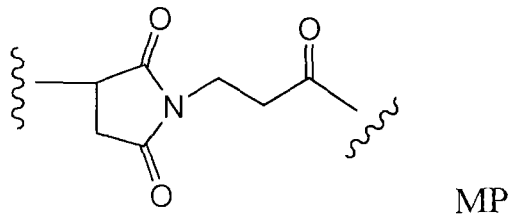
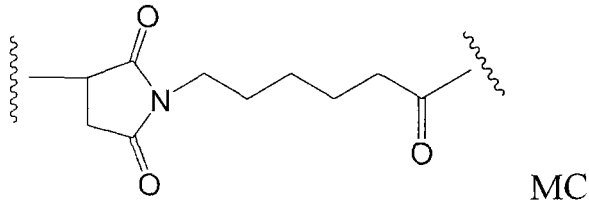


接头可以由一种或多种接头构件构成。例示性的接头构件包括6-马来酰亚氨基己酰基("MC")、马来酰亚氨基丙酰基("MP")、缬氨酸-瓜氨酸("val-cit")、丙氨酸-苯丙氨酸("ala-phe")、对氨基苄氧羰基("PAB")、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯("SPP")、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1羧酸酯("SMCC")、和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯("SIAB")。本领域知道别的接头构件,本文也描述了一些。还可参见"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", 2004年11月5日提交美国流水号10/983,340, 将其完整内容收入本文作为参考。

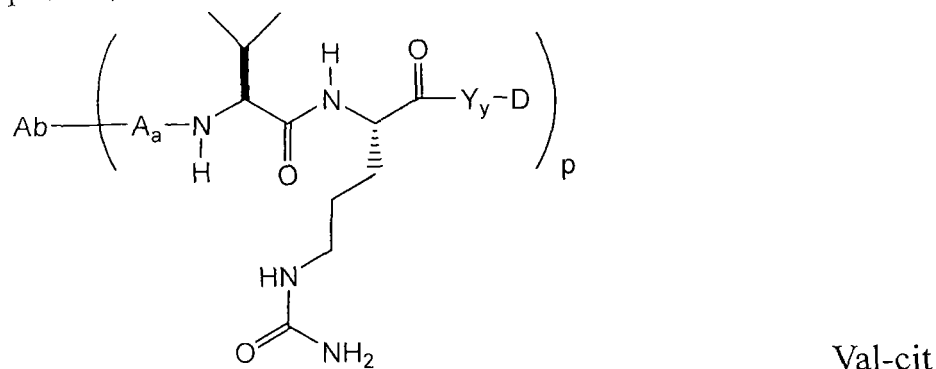
在有些实施方案中,接头可包含氨基酸残基。例示性的氨基酸接头构件包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性的二肽包括:缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)。例示性三肽包括:甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。构成氨基酸接

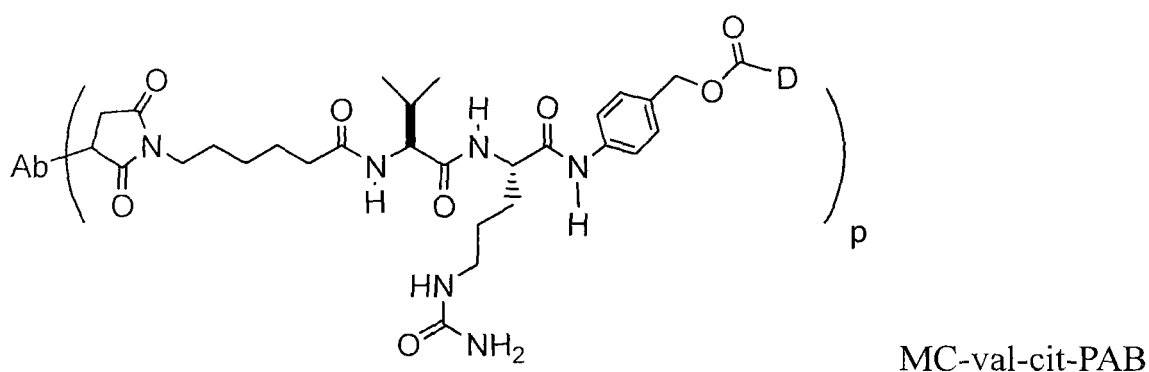
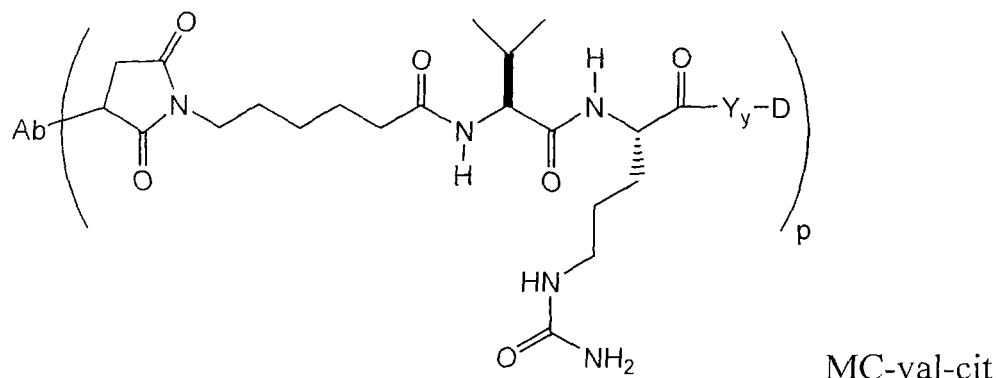
头构件的氨基酸残基包括那些天然存在的氨基酸，以及次要的氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物，诸如瓜氨酸。氨基酸接头构件可以在它们的特定酶（例如肿瘤相关蛋白酶，组织蛋白酶B、C和D，或纤溶酶蛋白酶）的酶促切割的选择性方面进行设计和优化。

例示性的接头构件结构显示如下（其中波浪线指示共价附着至ADC其它构件的位点）：



别的例示性的接头构件和缩写包括（其中描绘了抗体(Ab)和接头，而且p为1到约8）：





抗体的亲核基团包括但不限于：(i) N末端氨基；(ii) 侧链氨基，例如赖氨酸；(iii) 侧链巯基，例如半胱氨酸；和(iv) 糖基化抗体中糖的羟基或氨基。氨基、巯基、和羟基是亲核的，能够与接头模块上的亲电子基团反应而形成共价键，而接头试剂包括：(i) 活性酯类，诸如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物；(ii) 烃基和苯甲基卤化物，诸如卤代乙酰胺；(iii) 醛类、酮类、羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原的链间二硫键，即半胱氨酸桥。可通过还原剂诸如DTT（二硫苏糖醇）处理使抗体具有与接头试剂偶联的反应活性。每个半胱氨酸桥理论上将如此形成两个反应性硫醇亲核体。可经由赖氨酸与2-亚氨基硫烷（Traut氏试剂）的反应，导致胺转变为硫醇，从而将额外亲核基团引入抗体。可以通过导入一个、两个、三个、四个、或更多个半胱氨酸残基（例如制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的突变型抗体）而将反应性硫醇基团导入抗体（或其片段）。

还可通过修饰抗体来生成本发明的抗体-药物偶联物，即引入可与接头试剂或药物上的亲核取代基反应的亲电子模块。可用例如高碘酸盐氧化剂氧化糖基化抗体的糖，从而形成可与接头试剂或药物模块的胺基团反应的醛或酮基团。所得亚胺Schiff碱基团可形成稳定的连接，或者可用例如硼氢化物试剂还原而形成稳定的胺连接。在一个实施方案中，糖基化抗体的碳水化合物

物部分与半乳糖氧化酶或偏高碘酸钠的反应可在蛋白质中生成羰(醛和酮)基团,它可与药物上的适宜基团反应(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中,包含N末端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质可与偏高碘酸钠反应,导致在第一个氨基酸处生成醛(Geoghegan和Stroh, Bioconjugate Chem. 3: 138-146 (1992); US 5362852)。此类醛可与药物部分或接头亲核体反应。

同样,药物模块上的亲核基团包括但不限于:胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯、和芳基酰肼基团,它们能够与接头模块上的亲电子基团反应而形成共价键,而接头试剂包括:(i) 活性酯类,诸如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物;(ii) 烷基和苯甲基卤化物,诸如卤代乙酰胺;(iii) 醛类、酮类、羧基、和马来酰亚胺基团。

或者,可通过例如重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒剂的融合蛋白。DNA的长度可包含各自编码偶联物两个部分的区域,或是彼此毗邻或是由编码接头肽的区域分开,该接头肽不破坏偶联物的期望特性。

在又一个实施方案中,可将抗体与“受体”(诸如链霉亲和素)偶联从而用于肿瘤预先靶向,其中对患者施用抗体-受体偶联物,接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶联物,然后施用与细胞毒剂(例如放射性核苷酸)偶联的“配体”(例如亲和素)。

如下用MC-MMAE通过偶联本文中提供的任何抗体来制备抗体(Ab)-MC-MMAE。用过量的100mM 二硫苏糖醇(DTT)处理溶于500mM 硼酸钠和500mM 氯化钠pH 8.0的抗体。于37°C温育约30分钟后,通过Sephadex G25树脂上的洗脱更换缓冲液并用含1mM DTPA的PBS洗脱。通过溶液在280nm处的吸光度测定还原的抗体浓度,并通过与DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI)的反应及412nm处的吸光度测定硫醇浓度,由此检查硫醇/抗体值。使溶于PBS中的还原的抗体在冰上变冷。将溶于DMSO的药物接头试剂马来酰亚胺氨基己酰基-单甲基auristatin E (MMAE)即MC-MMAE在乙腈和水中稀释至已知浓度,并加至冷却的PBS中的还原的抗体2H9。约1小时后,加入过量的马来酰亚胺以淬灭反应并覆盖任何未反应的抗体硫醇基团。通过离心超滤将反应混合液浓缩,通过PBS中的G25树脂的洗脱将2H9-MC-MMAE纯化和脱盐,在无菌条件下通过0.2 μ m滤器过滤,并冷冻供贮存。

抗体-MC-MMAE可以遵循为制备Ab-MC-MMAE而提供的方案通过用

MC-MMAF偶联本文中提供的任何抗体来制备。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAE可以遵循为制备Ab-MC-MMAE而提供的方案通过用MC-val-cit-PAB-MMAE偶联本文中提供的任何抗体来制备。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAF可以遵循为制备Ab-MC-MMAE而提供的方案通过用MC-val-cit-PAB-MMAF偶联本文中提供的任何抗体来制备。

如下用SMCC-DM1通过偶联本文中提供的任何抗体来制备抗体-SMCC-DM1。将纯化的抗体用琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC, Pierce Biotechnology, Inc)衍生化以引入SMCC接头。具体而言,用7.5个摩尔当量的SMCC (20mM, 在DMSO中, 6.7mg/ml)处理50mM 磷酸钾/ 50mM 氯化钠/ 2mM EDTA, pH 6.5中的20mg/ml抗体。在氩气下于环境温度搅动2小时后,将反应混合液通过用50mM 磷酸钾/ 50mM 氯化钠/ 2mM EDTA, pH 6.5平衡的Sephadex G25柱过滤。合并并测定含有抗体的级分。

将如此制备的抗体-SMCC用50mM 磷酸钾/ 50mM 氯化钠/ 2mM EDTA, pH 6.5稀释至终浓度约10mg/ml,并与DM1在二甲基乙酰胺中的10mM溶液反应。将反应液在氩气下于环境温度搅动16.5小时。然后将偶联反应混合液通过用1x PBS pH6.5平衡的Sephadex G25凝胶过滤柱(1.5 x 4.9 cm)过滤。根据252nm和280nm处的吸光度的测量, DM1药物/抗体比率(p)可以是约2-5。

如下用SPP-DM1通过偶联本文中提供的任何抗体来制备Ab-SPP-DM1。将纯化的抗体用N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯衍生化以引入二硫代吡啶基。用SPP (2.3ml乙醇中的5.3个摩尔当量)处理44.7ml含NaCl (50mM)和EDTA (1mM)的50mM磷酸钾缓冲液(pH 6.5)中的抗体(376.0mg, 8mg/mL)。在氩气下于环境温度温育90分钟后,将反应混合液通过用35mM 柠檬酸钠, 154mM NaCl和2mM EDTA平衡的Sephadex G25柱凝胶过滤。然后合并并测定含有抗体的级分。抗体的修饰程度如上所述测定。

将抗体-SPP-Py (约10 μ mol可释放的2-硫代吡啶基团)用上文35mM柠檬酸钠缓冲液pH6.5稀释至终浓度约2.5mg/ml。然后向抗体溶液中加入3.0mM 二甲基乙酰胺(DMA, 在最终的反应混合液中为3% v/v)中的DM1 (1.7个当量, 17 μ mol)。让反应在氩气下于环境温度进行约20小时。将反应液加载至用35mM 柠檬酸钠, 154mM NaCl, pH 6.5平衡的Sephacryl S300凝胶过滤柱(5.0cm x 90.0cm, 1.77L)。流速可以为约5.0ml/min,收集了65份级分(各20.0ml)。通过测量252nm和280nm处的吸光度来测定每个抗体分子连接的

DM1药物分子的数目(p'), 可以是每个2H9抗体约2-4个DM1药物模块。

如下用BMPEO-DM1通过偶联本文中提供的任何抗体来制备抗体-BMPEO-DM1。可以用双马来酰亚胺试剂BM(PEO)₄ (Pierce Chemical)修饰抗体, 在抗体的表面上留下未反应的马来酰亚胺基团。这可如下来实现, 将BM(PEO)₄在50% 乙醇/水混合液中溶解至浓度10mM, 以10倍摩尔过量加至在磷酸盐缓冲盐水中以大约1.6mg/ml (10微摩尔)的浓度含有抗体的溶液, 并让其反应1小时以形成抗体-接头中间体, 2H9-BMPEO。通过在30mM 柠檬酸盐 pH 6及150mM NaCl缓冲液中凝胶过滤(HiTrap柱, Pharmacia)来除去过量的BM(PEO)₄。将大约10倍摩尔过量的DM1溶于二甲基乙酰胺(DMA)并加至2H9-BMPEO中间体。也可采用二甲基甲酰胺(DMF)来溶解药物模块试剂。让反应混合液反应过夜, 然后在PBS中凝胶过滤或透析以除去未反应的DM1。通过在PBS中的S200柱上凝胶过滤来除去高分子量聚集体并供应纯化的2H9-BMPEO-DM1。

抗体衍生物

可进一步修饰本发明的抗体以包含本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质模块。在一个实施方案中, 适于抗体衍生化的模块是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖苷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)、和右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性, 聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量, 而且可以是分支的或不分支的。附着到抗体上的聚合物数目可以变化, 而且如果附着了超过一个聚合物, 那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言, 可根据下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型, 包括但不限于待改进抗体的具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

药用配制剂

通过将具有期望纯度的抗体与任选的生理学可接受载体、赋形剂或稳定剂混合来制备包含本发明抗体的治疗用配制剂, 以水溶液、冻干或其它干燥

剂型的形式贮存(《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第16版,Osol,A.编,1980)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐、组氨酸和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反荷离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的超过一种活性化合物,优选活性互补且彼此没有不利影响的。合适的是,此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第16版,Osol,A.编,1980。

用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有本发明免疫球蛋白的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质以定型产品的形式存在,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利3,773,919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够持续释放分子100天以上,但是某些水凝胶释放蛋白质

的时间较短。当封装的免疫球蛋白在体内长时间维持时，它们可能由于暴露于37°C的潮湿环境而变性或聚集，导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如，如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换而形成分子间S-S键，那么可通过修饰巯基、自酸性溶液冻干、控制含水量、采用适宜添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

下文是本发明方法和组合物的实施例。应当理解，根据上文提供的一般描述，可实施各种其它实施方案。

实施例

材料和方法

试剂

uPA原购自Cortex Biochem (San Leandro, CA)，uPA（高分子量形式）购自American Diagnostica (Greenwich, CT)，而显色底物S2444和S2366购自Diapharma (Westchester, OH)。衍生自肝细胞生长因子活化剂抑制剂-1B (HAI-1B)的Kunitz结构域抑制剂KD1是在大肠杆菌中生成的，如所记载的(19)。T.inPro细胞购自Expression System LLC (Woodland, CA)。镍-次氨基三乙酸树脂购自Qiagen Inc (Chatsworth, CA)，而Q-Sepharose购自GE Healthcare (Piscataway, NJ)。可溶形式的肝细胞生长因子活化剂抑制剂-2 (HAI-2)是重组表达并纯化的，如所记载的(16)。

包含整个胞外结构域的可溶形式HEPSIN是通过使用杆状病毒表达系统生成的。如下构建了分泌型加His标签的HEPSIN cDNA，即融合编码蜜蜂蜂毒肽信号序列(Met¹-Tyr²⁰)的cDNA与编码人HEPSIN胞外结构域(Arg⁴⁵-Leu⁴¹⁷)的cDNA。将最终的cDNA构建体插入杆状病毒表达载体且在多角体蛋白启动子的控制下，并在T.in.Pro细胞中表达。通过镍-次氨基三乙酸亲和层析纯化Hepsin，基本上如所记载的(20)。使用1mM 叠氮化钠、0.3M NaCl和15mM 咪唑来条件化含Hepsin的培养基，并使用NaOH将pH调节至pH 6.5。将预带电荷(pre-charged)的镍-次氨基三乙酸树脂添加至培养基(4ml树脂/1L培养基)。通过在4°C轻轻地搅拌2小时来实施分批吸附(batch absorption)。在让树脂沉降1小时后，倾去上清液，并将树脂填充入柱。如下清洗该柱，即用最低限度的10个柱体积PBS/0.3M NaCl pH 7.4，接着用10个柱体积25mM 咪唑、0.3M

NaCl、1mM 叠氮化钠 pH 8.0。用250mM 咪唑、0.3M NaCl、1mM 叠氮化钠 pH 8.0洗脱蛋白质。将合并的级分在10mM Tris、1mM 叠氮化钠 pH 8.0中稀释60倍，并调节至最终pH 8.0且电导率低于2.0mS/cm。以0.1ml树脂/mg蛋白质将所述蛋白质加载到Q-Sepharose FF上。用最低限定的10个柱体积20mM Tris、2mM 叠氮化钠 pH 8.0清洗柱，并用20mM Tris、2mM 叠氮化钠 pH 8.0中的0-1M NaCl梯度洗脱HEPSIN。

单克隆抗HEPSIN抗体的生成

用RIBI佐剂(Ribi Immunochem Research Inc., MO, USA)中的纯化的HEPSIN使5只Balb/c小鼠(Charles River Laboratories, MA, USA)超免疫。将来自5只小鼠的淋巴结的B细胞与小鼠骨髓瘤细胞(X63.Ag8.653; 美国典型培养物保藏中心, MD, 美国)融合, 如先前所述的(12)。10-14天之后, 收获上清液, 并用HEPSIN结合ELISA且通过使用LnCaP-34细胞的FACS来筛选抗体生成, 其中结肠直肠细胞系HPAC(美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA)作为阴性对照。将5个阳性克隆(在第二轮单细胞每孔克隆化(Elite 1 Sorter, Beckman Coulter, CA, USA)后显示出最高免疫结合和特异性)放大, 用于INTEGRA CELLline 1000(Integra Biosciences, AG, Switzerland)中的纯化。将上清液通过蛋白A亲和层析来纯化, 无菌过滤(0.2 μ m孔径; Nalge Nunc International, NY, USA), 并在4 $^{\circ}$ C贮存于PBS中。

HEPSIN结合ELISA

将微量滴定板(Nalge Nunc International, NY, USA)用100 μ l/孔0.05M碳酸盐缓冲液pH9.6中的HEPSIN (1 μ g/ml)在4 $^{\circ}$ C包被过夜。将平板用PBS/0.05% (v/v) Tween 20清洗, 随后用PBS/0.5% (w/v) BSA/0.05% (v/v) Tween 20封闭。将100 μ l培养物上清液添加至每个孔, 并在RT温育1小时。清洗平板, 并用100 μ l/孔PBS/0.5% BSA/0.05% Tween 20中1:5000稀释的辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠IgG (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA)检测所结合的抗体(温育30分钟)。又一清洗步骤后, 添加BioFX TMB底物(BioFX Laboratories, MD, USA), 温育5分钟, 并用BioFX停止溶液(BioFX Laboratories, MD, USA)停止反应。然后在微量板读板仪上测量630nm处的吸光度。

过表达HEPSIN的LnCaP细胞的生成

人前列腺癌瘤细胞系LnCaP-FGC (LnCaP)获自美国典型培养物保藏中心(Manassas, VA)。将细胞培养在加10%胎牛血清(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)的RPMI 1640培养基(ATCC, Manassas, VA)中。将稳定表达萤火虫萤光素酶基因(LnCaP-luc)的LnCaP克隆用于HEPSIN转染实验。为了建立LnCaP-luc细胞系,将萤光素酶基因以EcoRI/XhoI cDNA片段的形式亚克隆,插入pMSCVneo表达载体(BD Biosciences-Clontech, Mountain View, CA)。使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)用萤光素酶构建体转染LnCaP细胞。用500 μ g/ml遗传霉素(Invitrogen)选择细胞,并通过使用Luclite试剂盒(PerkinElmer, Boston, MA)对克隆筛选生物发光活性。选择产生最强发光信号的克隆LnCaP-luc,供Hepsin转染实验用。

将全长HEPSIN的cDNA插入含有嘌呤霉素抗性基因的哺乳动物表达载体供抗生素选择用(Genentech, South San Francisco, CA)。用编码带C末端Flag标签的全长HEPSIN的构建体转染LnCaP-luc克隆,并用0.5 μ g/ml嘌呤霉素(Sigma-Adrich)选择细胞。使用抗Flag单克隆抗体(Sigma-Adrich)通过FACS对克隆分析HEPSIN表面表达。选择两种克隆即高HEPSIN表达子LnCaP-34和低HEPSIN表达子LnCaP-17,供使用抗HEPSIN单克隆的研究用。

FACS分析

用PBS清洗汇合的细胞层,并用细胞解离液(Sigma-Aldrich Inc. MO, USA)使细胞脱离。用PBS清洗细胞,并在PBS/1% (v/v) FBS中重悬至 $0.5-1.0 \times 10^7$ 细胞/ml。将100 μ l细胞悬浮液与培养物上清液或纯化的抗体在冰上一起温育40分钟。将细胞用PBS清洗两次,之后与PBS/1%FBS (v/v)中1:1000稀释的PE偶联的F(ab')₂山羊抗小鼠IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. PA, USA)一起温育。将平板在冰上温育30分钟,用PBS清洗细胞两次。将细胞沉淀物重悬于1%福尔马林(Richard Allen Scientific, MI, USA),并在FACSscan (Becton and Dickinson Biosciences, CA, USA)上测量抗体结合。

测定同种型(isotyping)

通过使用两种商品化试剂盒即mono-AB-ID SP试剂盒(Zymed Laboratories, CA, USA)和小鼠单克隆抗体同种型测定试剂盒Isostrip (Roche

Diagnostics Corporation, IN, USA)来测定纯化的单抗的同种型。

单克隆抗体的生物素化

将生物素经由长链生物素的N-羧基琥珀酰亚胺酯(LCB-NHS, Pierce, USA)共价偶联至IgG。将LCB-NHS溶解于DMSO (2mg/ml), 并以100 μ g生物素:1mg抗体的比率添加, 并温育2小时。通过在4 $^{\circ}$ C针对PBS的大量透析来除去游离的生物素。然后将生物素化抗体无菌过滤, 并贮存在4 $^{\circ}$ C。

通过竞争结合ELISA进行的抗体表位测定

将微量滴定板用100 μ l/孔0.05M碳酸盐缓冲液pH9.6中的HEPSIN(1 μ g/ml)在4 $^{\circ}$ C包被过夜。用PBS/0.05% (v/v) Tween 20清洗平板, 并用PBS/0.5% BSA/0.05% Tween 20封闭30分钟。将未标记的纯化的抗体(20 μ g/ml)在RT温育1小时, 接着添加生物素化抗体(2 μ g/ml)。温育1小时后, 用1:5000稀释的辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素(Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., PA, USA)检测生物素化抗体。在微量板读板仪上测量630nm处的吸光度。

HEPSIN的uPA原活化

将可溶形式的bi-Kunitz抑制剂HAI-2用作停止试剂, 供uPA原活化测定法用。HAI-2确实有力地抑制HEPSIN活性, 而不是uPA活性, 正如酶测定法中所证实的。将HAI-2与0.5nM HEPSIN或10nM uPA在Hepes缓冲液(20mM Hepes pH7.5, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.01% Triton X-100)中在室温一起温育30分钟。添加显色底物S2366 (用于HEPSIN)或S2444 (用于uPA), 其浓度对应于它们各自的 K_m 值 (其在分开的实验中测定)。添加底物后, 在动态(kinetic)微量板读板仪(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)上测量405nm处的吸光度增加。通过将数据拟合至供紧密结合抑制用的方程(22,23)来测定 K_i^{app} 值。

在uPA原活化测定法中, 将纯化的抗体或KD1与HEPSIN一起温育30分钟, 并通过添加uPA原来开始反应。在这种混合物中, 反应物的浓度如下: 0.5nM HEPSIN、100nM uPA原、710nM抗体和71nM KD1。在不同时间点, 取出50 μ l等分试样, 并添加至0.15ml Hepes缓冲液中的HAI-2以停止反应。添加50 μ l S2444 (2.5mM)后, 在动态微量板读板仪(Molecular Devices, Sunnyvale,

CA)上测量405nm处的吸收增加。自酶转化的uPA原的标准曲线来测定各个时间点形成的uPA浓度，并计算uPA形成的线性速率。所有测量是在室温实施的。

显色底物测定法

将纯化的抗体或HAI-1B衍生的KD1抑制剂(19)与0.25nM HEPSIN在Hepes缓冲液中一起温育30分钟。在添加显色底物S2366后监测酶活性。反应物的终浓度为：0.25nM HEPSIN、500nM 抗体、50nM KD1和0.25mM S2366。在动态微量板读板仪上测量405nm处的吸光度增加，且以酶活性分数(fractional enzyme activity) (v_i/v_0)表示结果。所有测量是在室温实施的。

免疫印迹

对于免疫印迹实验，在还原性条件下通过4-20% SDS-PAGE分析重组体可溶性HEPSIN。使用Bio-Rad半干转移系统(Bio-Rad Semi Dry Transfer System)将蛋白质转移至硝酸纤维素滤膜(Invitrogen)上。如下检测HEPSIN，即使用小鼠单克隆抗Hepsin抗体(2D5、3H10、1F2、1E7、3H1)，接着用HRP偶联的山羊抗小鼠抗体(Pierce; Rockford, IL)和ECL (GE Healthcare; Piscataway, NJ)增强。

结果

生成了5种单克隆抗HEPSIN抗体。在直接ELISA型结合测定法中，它们显示出对HEPSIN的强烈结合(图3)。最弱的结合物为1E7.1.1。实施了交叉阻断实验以鉴定抗体的相对结合表位。抗体3H1.1.1、3H10.1.2和1F2.1.1彼此抑制结合HEPSIN(图4)，这表明它们分享共同的表位，所述表位称为表位A。2D5.1.9和1E7.1.1不被任何其它抗体所抑制(图4)，这表明它们结合分开的表位，所述表位分别称为表位B和C(图1)。测定了抗体同种型，并显示于图1。生成了2种LnCaP细胞系以检查抗体是否识别在细胞表面上表达的HEPSIN。根据实时RT-PCR结果，我们发现了LnCaP-34细胞系过表达HEPSIN，而LnCaP-17细胞系仅表达内源水平的HEPSIN(数据未显示)。5种抗体的FACS分析显示出它们全部结合细胞表面。1E7.1.1是最弱的结合物，这与直接结合ELISA结果一致。与LnCaP-34细胞较高的HEPSIN RNA表达一

致,所述抗体与这些细胞给出较强的荧光信号,如较高的平均荧光强度所示的(图1)。这是通过图5中的直方图所例证的,图5显示了3H10.1.2对两种LnCaP细胞系的结合。所述结果证明了所述抗体能够识别在细胞表面上表达的全长天然HEPSIN以及重组体可溶形式。接着,我们测定了所述抗体是否干扰HEPSIN酶功能。在使用对硝基苯胺底物S2366的显色底物测定法中,抗体在500nM浓度时无一干扰HEPSIN活性(图6)。作为阳性对照,我们使用了有力的HEPSIN抑制剂KD1,其在50nM的浓度完全抑制了HEPSIN活性(图6)。此外,在HEPSIN依赖性uPA原活化测定法中检查了所述抗体。通过使用Kunitz型抑制剂HAI-2(其有力地抑制HEPSIN而非uPA(图2)),我们能够在不同时间点停止反应,并在测定法第二阶段中定量所形成的uPA。在存在抗体或KD1时uPA形成的线性速率显示于图7。无一抗体显著抑制uPA形成速率,然而KD1完全抑制了所述反应(图7中的表1)。这些结果表明了所述抗体即不干扰HEPSIN介导的小合成底物活化也不干扰大分子底物活化。因此,结合表位必然位于HEPSIN活性位点以外,并且抗体结合对活性位点构象没有变构影响,至少不到会对uPA原或S2366底物的加工有害的程度。

免疫印迹实验显示出所述抗体结合HEPSIN的30kDa蛋白酶结构域(= B链)(图8)。用所述抗体未检测出20kDa A链(图8),这表明结合表位包含在蛋白酶结构域中。

本文所述抗HEPSIN单克隆抗体结合可溶性的HEPSIN和细胞表面表达的HEPSIN二者。它们结合位于HEPSIN蛋白酶结构域上的三种不同的表位区。酶动力学结果表明它们在活性位点区以外结合,这可以容许抗体结合,即使HEPSIN活性位点由内源性抑制剂所占据。这对于血液或尿液中HEPSIN的检测可能是重要的,因为肿瘤衍生的HEPSIN可以与类似Matriptase的内源性抑制剂形成复合体,Matriptase是作为人乳汁中的Matriptase:HAI-1复合体而分离的(18)。另外,所述抗体结合变性的或部分变性的HEPSIN的能力可以容许已经经受了某种程度降解和/或变性的肿瘤衍生HEPSIN的检测。

下列杂交瘤已经保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC)):

细胞系	ATCC编号	保藏日期
抗体4544 (3H10.1.2)	PTA-7472	2006年4月5日
抗体4545 (2D5.1.9)	PTA-7470	2006年4月5日
抗体4546 (1F2.1.1)	PTA-7471	2006年4月5日
抗体4547 (1E7.1.1)	PTA-7473	2006年4月5日
抗体4548 (3H1.1.1)	PTA-7469	2006年4月5日

这些保藏是依据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约(Budapest Treaty)及其(布达佩斯条约)实施细则的规定进行的。这保证了自保藏之日起保存存活保藏物30年。这些细胞系可根据布达佩斯条约的条款通过ATCC获得,并服从Genentech公司与ATCC之间的协议,它保证了在有关美国专利授权后或者在任何美国或外国专利申请向公众公开后,以两者中居先者为准,公众可永久且不受限制的获得所述细胞系,而且保证了依据35 USC §122及依照它的管理章程(包括37 CFR §1.14,特别要提及886 OG 638)由美国专利和商标局长批准的个人将有资格获得所述细胞系。

本申请的受让人已同意,若保藏的细胞系在合适条件下培养时丢失或遭到破坏,则他将在接到通知后迅速用同一细胞系的样本更换。所保藏细胞系的可获得性并不解释为对违反任何政府的机构依据其专利法所授予的权利实施本发明的许可。

参考文献的部分列表

1. Somoza, J. R., Ho, J. D., Luong, C., Ghate, M., Sprengeler, P. A., Mortara, K., Shrader, W. D., Sperandio, D., Chan, H., McGrath, M. E., and Katz, B. A. (2003) *Structure* 11(9), 1123-1131
2. Vu, T. K., Liu, R. W., Haaksma, C. J., Tomasek, J. J., and Howard, E. W. (1997) *J Biol Chem* 272(50), 31315-31320
3. Yu, I. S., Chen, H. J., Lee, Y. S., Huang, P. H., Lin, S. R., Tsai, T. W., and Lin, S. W. (2000) *Thromb Haemost* 84(5), 865-870
4. Wu, Q., Yu, D., Post, J., Halks-Miller, M., Sadler, J. E., and Morser, J. (1998) *J Clin Invest* 101(2), 321-326
5. Tanimoto, H., Yan, Y., Clarke, J., Korourian, S., Shigemasa, K., Parmley, T. H., Parham, G. P., and O'Brien, T. J. (1997) *Cancer Res* 57(14), 2884-2887
6. Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2001) *Nature* 412(6849), 822-826
7. Luo, J., Duggan, D. J., Chen, Y., Sauvageot, J., Ewing, C. M., Bittner, M. L., Trent, J. M., and Isaacs, W. B. (2001) *Cancer Res* 61(12), 4683-4688
8. Magee, J. A., Araki, T., Patil, S., Ehrig, T., True, L., Humphrey, P. A., Catalona, W. J., Watson, M. A., and Milbrandt, J. (2001) *Cancer Res* 61(15), 5692-5696
9. Stamey, T. A., Warrington, J. A., Caldwell, M. C., Chen, Z., Fan, Z., Mahadevappa, M., McNeal, J. E., Nolley, R., and Zhang, Z. (2001) *J Urol* 166(6), 2171-2177
10. Stephan, C., Yousef, G. M., Scorilas, A., Jung, K., Jung, M., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Kishi, T., Nakamura, T., Loening, S. A., and Diamandis, E. P. (2004) *J Urol* 171(1), 187-191
11. Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Kern, S. G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Jr., and Hampton, G. M. (2001) *Cancer Res* 61(16), 5974-5978
12. Xuan, J. A., Schneider, D., Toy, P., Lin, R., Newton, A., Zhu, Y., Finster, S., Vogel, D., Mintzer, B., Dinter, H., Light, D., Parry, R., Polokoff, M.,

- Whitlow, M., Wu, Q., and Parry, G. (2006) *Cancer Res* 66(7), 3611-3619
13. Chen, Z., Fan, Z., McNeal, J. E., Nolley, R., Caldwell, M. C., Mahadevappa, M., Zhang, Z., Warrington, J. A., and Stamey, T. A. (2003) *J Urol* 169(4), 1316-1319
 14. Klezovitch, O., Chevillet, J., Mirosevich, J., Roberts, R. L., Matusik, R. J., and Vasioukhin, V. (2004) *Cancer Cell* 6(2), 185-195
 15. Herter, S., Piper, D. E., Aaron, W., Gabriele, T., Cutler, G., Cao, P., Bhatt, A. S., Choe, Y., Craik, C. S., Walker, N., Meininger, D., Hoey, T., and Austin, R. J. (2005) *Biochem J* 390(Pt 1), 125-136
 16. Kirchhofer, D., Peek, M., Lipari, M. T., Billeci, K., Fan, B., and Moran, P. (2005) *FEBS Lett* 579(9), 1945-1950
 17. Kazama, Y., Hamamoto, T., Foster, D. C., and Kisiel, W. (1995) *J Biol Chem* 270(1), 66-72
 18. Lin, C. Y., Anders, J., Johnson, M., and Dickson, R. B. (1999) *J Biol Chem* 274(26), 18237-18242
 19. Shia, S., Stamos, J., Kirchhofer, D., Fan, B., Wu, J., Corpuz, R. T., Santell, L., Lazarus, R. A., and Eigenbrot, C. (2005) *J Mol Biol* 346(5), 1335-1349
 20. Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J. M., Corpuz, R. T., Lazarus, R. A., and Moran, P. (2003) *J Biol Chem* 278(38), 36341-36349
 21. Hongo, J. A., Mora-Worms, M., Lucas, C., and Fendly, B. M. (1995) *Hybridoma* 14(3), 253-260
 22. Morrison, J. F. (1969) *Biochim Biophys Acta* 185(2), 269-286
 23. Olivero, A. G., Eigenbrot, C., Goldsmith, R., Robarge, K., Artis, D. R., Flygare, J., Rawson, T., Sutherlin, D. P., Kadkhodayan, S., Beresini, M., Elliott, L. O., DeGuzman, G. G., Banner, D. W., Ultsch, M., Marzec, U., Hanson, S. R., Refino, C., Bunting, S., and Kirchhofer, D. (2005) *J Biol Chem* 280(10), 9160-9169

细胞系	同种型 ³	表位组	直接 ELISA ⁴	FACS(荧光中值)	
3H10.1.2	κ, IgG1	A	[+]	LnCaP-34 ^{1,5} +MAB (1μg/ml) 113.4	LnCaP-17 ^{2,6} +MAB (1μg/ml) 30.2
2D5.1.9	κ, IgG1	B	[+]	189.4	32.8
1F2.1.1	κ, IgG2b	A	[+]	86.6	10.6
1E7.1.1	κ, IgG1	C	[+]	7.1	4.8
3H1.1.1	κ, IgG2b	A	[+]	112.4	10.6

¹LnCaP-34-经荧光素酶和 Hepsin 共转染的 LnCaP

²LnCaP-17:过表达荧光素酶及内源性 Hepsin 的 LnCaP

³ Isostrip (Roche Diagnostics Corporation, IN, USA) 和 m AB-ID SP 试剂盒 (Zymed Laboratories, CA USA)

⁴ 人 Hepsin-His8

⁵LnCap-34 对照荧光中值: 6.3

⁶LnCap-17 对照荧光中值: 4.5

图 1

蛋白酶	HA I-2 K_i^{app} (nM) \pm SD
Hep sin	0.26 ± 0.04
u-PA	$>1,000$

图 2

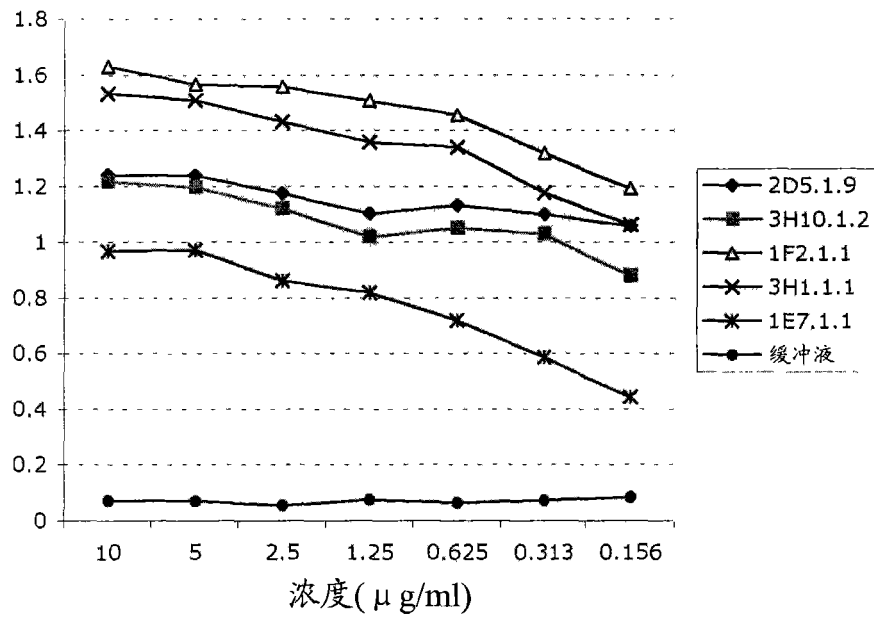


图 3

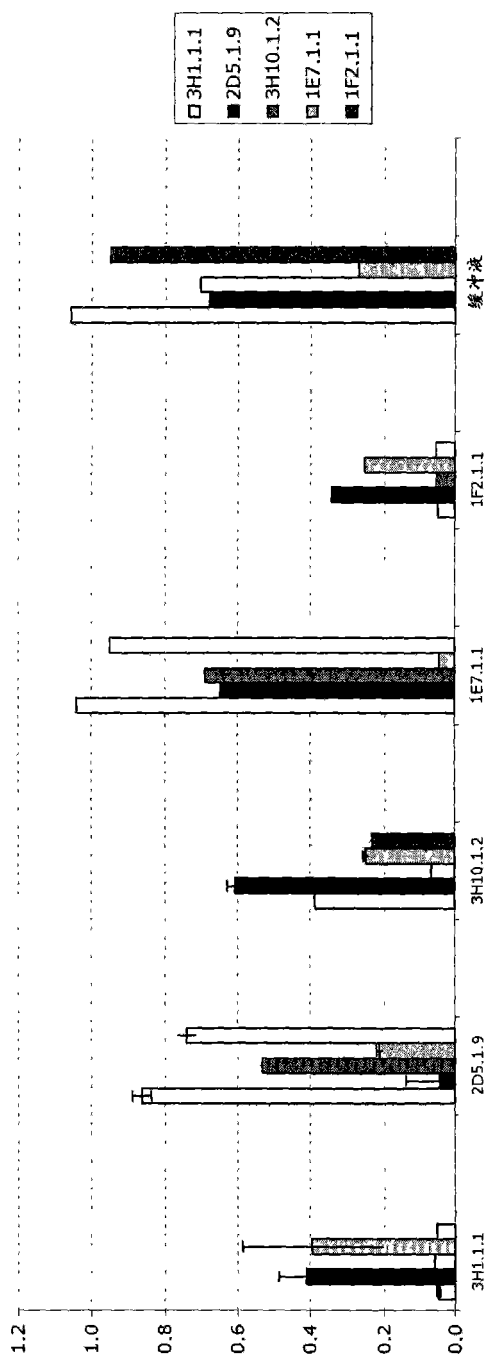


图 4

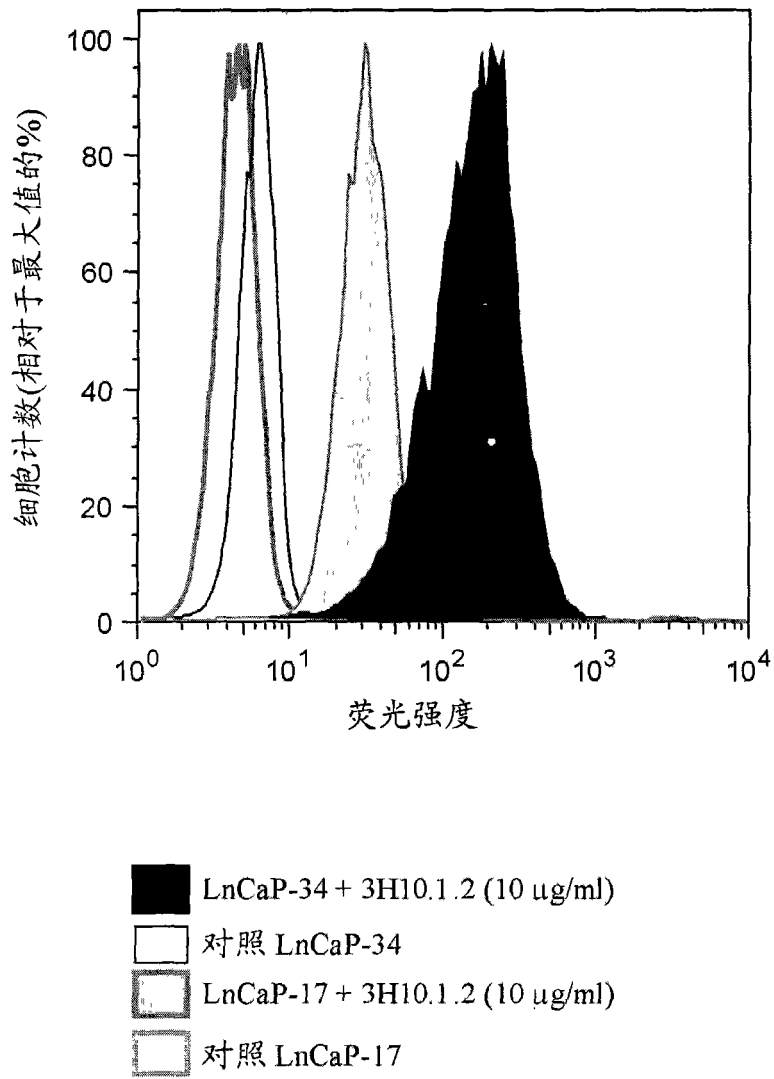


图 5

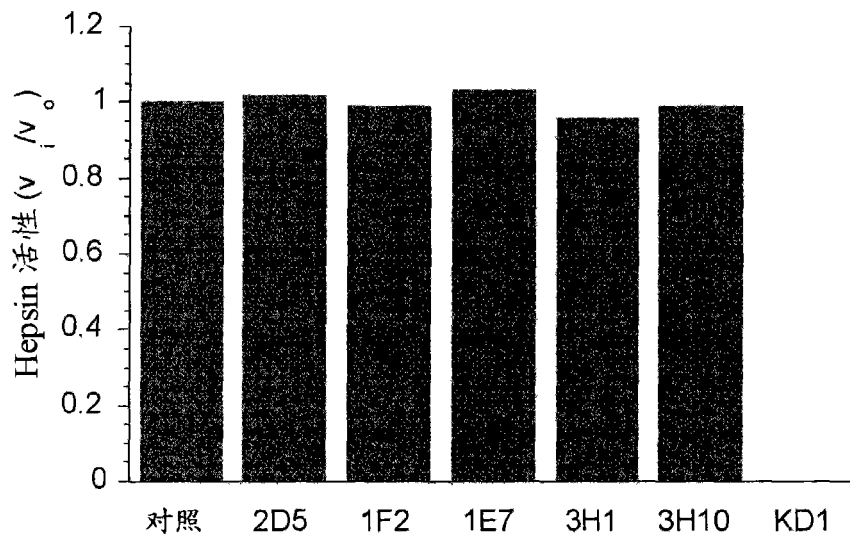


图 6

表 1

	nM uPA/分
对照	1.19
2D5	1.11
1F2	0.87
1E7	1.05
3H1	1.14
3H10	1.12
KD1	-0.03

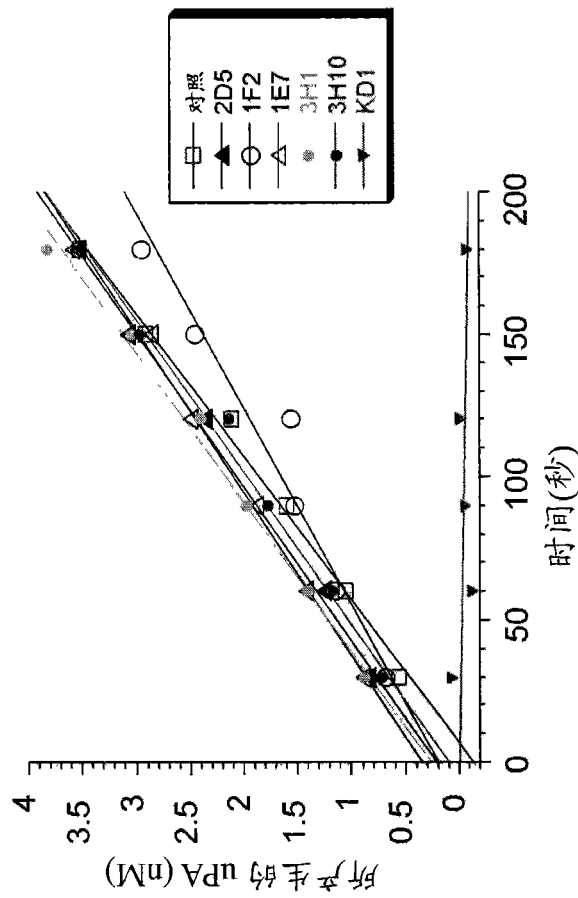


图 7

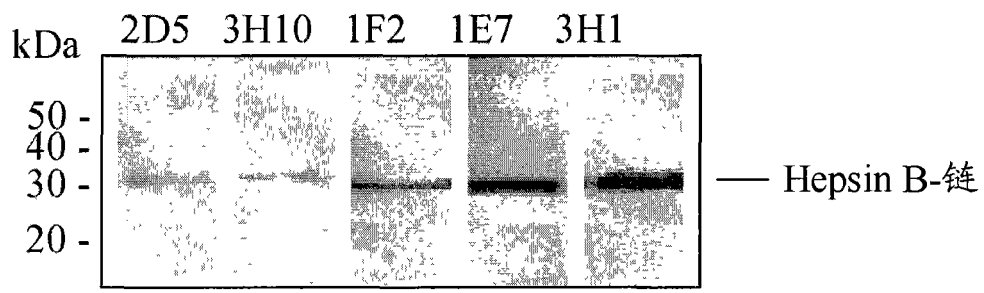


图 8

MAQKEGGRTVPCCSRPKVAALTAGTLLLLTAIGAASWAIIVLLRSDQEPLYPVQVSSAD
ARLMVFDKTEGTWRLLCSSRSNARVAGLSCEEMGFLRALTHELDVRTAGANGTSGFCV
DEGRLPHTQRLLLEVISVDCPRGRFLAAICQDCGRRKLPVDRIVGGRDTSLGRWPWQVSL
RYDGAHLCCGSLLSGDWVLTAAHCFPERNRVLSRWRVFAGAVAQASPHGLQLGVQAVVYH
GGYLPFRDPNSEENSNDIALVHLSSPLPLTEYIQPVCLPAAGQALVDGKICTVTGWGNTQ
YYGQQAGVLQEARVPIISNDVCNGADFYGNQIKPKMFCAGYPEGGIDACQGDSSGGPFVCE
DSISRTPRWRLCGIVSWGTCALAQKPGVYTKVSDFREWFQAIKTHSEASGMVTQL

(SEQ ID NO:1)

图 9

Met Ala Gln Lys Glu Gly Gly Arg Thr Val Pro Cys Cys Ser Arg Pro
 1 5 10 15
 Lys Val Ala Ala Leu Thr Ala Gly Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ala Ile
 20 25 30
 Gly Ala Ala Ser Trp Ala Ile Val Ala Val Leu Leu Arg Ser Asp Gln
 35 40 45
 Glu Pro Leu Tyr Pro Val Gln Val Ser Ser Ala Asp Ala Arg Leu Met
 50 55 60
 Val Phe Asp Lys Thr Glu Gly Thr Trp Arg Leu Leu Cys Ser Ser Arg
 65 70 75 80
 Ser Asn Ala Arg Val Ala Gly Leu Ser Cys Glu Glu Met Gly Phe Leu
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr His Ser Glu Leu Asp Val Arg Thr Ala Gly Ala Asn
 100 105 110
 Gly Thr Ser Gly Phe Phe Cys Val Asp Glu Gly Arg Leu Pro His Thr
 115 120 125
 Gln Arg Leu Leu Glu Val Ile Ser Val Cys Asp Cys Pro Arg Gly Arg
 130 135 140
 Phe Leu Ala Ala Ile Cys Gln Gly Glu Ile Leu Lys Leu Arg Thr Leu
 145 150 155 160
 Ser Phe Arg Pro Leu Gly Arg Pro Arg Pro Leu Lys Leu Pro Arg Met
 165 170 175
 Gly Pro Cys Thr Phe Arg Pro Pro Arg Ala Gly Pro Ser Leu Gly Ser
 180 185 190
 Gly Asp Leu Gly Ser Ser Pro Leu Ser Pro Pro Pro Ala Asp Pro Cys
 195 200 205
 Pro Thr Asp Cys Gly Arg Arg Lys Leu Pro Val Asp Arg Ile Val Gly
 210 215 220
 Gly Arg Asp Thr Ser Leu Gly Arg Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg
 225 230 235 240

图 10A

专利名称(译)	用于靶向HEPSIN的方法和组合物		
公开(公告)号	CN101490088A	公开(公告)日	2009-07-22
申请号	CN200780027496.X	申请日	2007-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
[标]发明人	丹尼尔K柯克霍弗 拉杰什维杰		
发明人	丹尼尔·K·柯克霍弗 拉杰什·维杰		
IPC分类号	C07K16/30 G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	C07K16/40 A61K2039/505 C07K16/3069 C07K16/30		
优先权	60/805589 2006-06-22 US		
其他公开文献	CN101490088B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了抗HEPSIN单克隆抗体及使用这些抗体的方法。

细胞系	同种型 ¹	表位 ²	蔗糖 ELISA ³	FACS(荧光中值)	
				LnCaP-34 ⁴ +MAB (1µg/ml)	LnCaP-17 ⁵ +MAB (1µg/ml)
3H10.L3	κ, IgG1	A	[+]	112.4	30.2
2D6.L9	κ, IgG1	B	[+]	109.4	32.8
1P2.L3	κ, IgG2b	A	[+]	86.6	10.6
1B7.L3	κ, IgG1	C	[+]	7.1	4.8
3M1.L1	κ, IgG2b	A	[+]	112.4	10.8

¹LnCaP-34 膜蛋白表达细胞系
Hepato 细胞系的 LnCaP

²LnCaP-17 细胞系表达膜蛋白
Hepato 细胞系的 LnCaP

³Incept (Koch
Diagnostic Corporation,
IN, USA) 和 m AB-2D
SP 试剂盒 (Zymed
Laboratories, CA USA)

⁴A, Hepato-34

⁵LnCaP-34 对照荧光中值: 6.3

⁶LnCaP-17 对照荧光中值: 4.3