



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102137681 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 03

(21) 申请号 200980134258. 8

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 08. 07

C07K 16/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/087, 463 2008. 08. 08 US

12/343, 655 2008. 12. 24 US

61/144, 227 2009. 01. 13 US

12/418, 877 2009. 04. 06 US

(56) 对比文件

US 2008/0171067 A1, 2008. 07. 17, SEQ ID NO:2 和 4.

US 2005/0014207 A1, 2005. 01. 20, 第 15 和 152 段.

GOLD et al..A Novel Bispecific, Trivalent Antibody Construct for Targeting Pancreatic Carcinoma. 《Cancer Research》. 2008, 第 68 卷 (第 12 期), 摘要, 第 4819 页右栏第 2 段

第 4820 页图 1

第 4820 页左栏第 2 段

第 4821 左栏第 4 段.

GOLD et al.PAM4-Reactive MUC1 Is a Biomarker for Early Pancreatic Adenocarcinoma. 《Clinical Cancer Research》. 2007, 第 13 卷 (第 24 期), 摘要.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2011. 03. 01

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/053192 2009. 08. 07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02010/017500 EN 2010. 02. 11

(73) 专利权人 埃姆诺医药有限公司
地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·M·戈登伯格 H·J·汉森
C-H·张 D·V·戈尔登

审查员 包宁疆

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公司 72001
代理人 郭文洁

(51) Int. Cl.
A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书4页 说明书77页
序列表36页 附图12页

(54) 发明名称
抗胰腺癌抗体

(57) 摘要

本文描述的是组合物和使用抗胰腺癌抗体或其片段 (如鼠源、嵌合、人源化或人源 PAM4 抗体) 的方法。所述抗体显示出许多新颖和实用的治疗特性, 如与胰腺癌及其它癌的结合具有高特异性, 但与正常或良性的胰腺组织的结合则不然, 且与大比例的早期胰腺癌结合。在优选的实施例中, 所述抗体与胰腺癌粘蛋白结合。所述抗体及片段可用于检测、诊断和 / 或治疗癌 (如胰腺癌)。同与 Lewis 抗原结合的诸如 CA19. 9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72. 3 和 Lea^a 及 Le(y) 抗体之类的其它已知抗体相比, 所述抗体 (如与 PAM4 抗原结合的 PAM4 抗体) 显示出独特的细胞及组织分布。

1. 一种抗体构建体, 包含至少一种与胰腺癌细胞结合而不与正常的胰腺组织或胰腺炎或良性的胰腺组织结合的人源化或人抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗胰腺癌抗体或其片段能与包含氨基酸序列 WTNITKAYPLP (SEQ ID NO:29) 的线状肽或与包含氨基酸序列 ACPEWWGTTC (SEQ ID NO:30) 的环状肽结合。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体构建体, 其中所述抗胰腺癌抗体与 PanIN-1A、PanIN-1B、PanIN-2、侵袭性胰腺癌、胰腺癌、粘液性囊性肿瘤 (MCN)、胰内粘液性肿瘤 (IPMN) 和导管内乳头状粘液性肿瘤结合。

3. 根据权利要求 1 所述的抗体构建体, 其中所述构建体是包含附着于一个第二抗体片段部分的拷贝的两个 PAM4 抗体片段部分的拷贝的三聚 DNL (对接和锁定) 构建体。

4. 根据权利要求 3 所述的抗体构建体, 其中每个 PAM4 抗体片段部分包含 PAM4Fab 片段和第二抗体片段部分, 所述 PAM4Fab 片段附着于 DDD2 (SEQ ID NO:34) 序列, 所述第二抗体片段部分包含附着于 AD2 (SEQ ID NO:36) 序列的 Fab 片段, 且所述 DDD2 序列的二聚体与所述 AD2 序列结合, 从而形成三聚构建体。

5. 根据权利要求 4 所述的抗体构建体, 其中所述 PAM4 抗体片段是 hPAM4Fab 片段, 所述第二抗体片段与肿瘤相关抗原 (TAA) 或半抗原结合。

6. 根据权利要求 1 所述的抗体构建体, 其中所述抗胰腺癌抗体或其片段与 PAM4 抗原结合。

7. 如权利要求 1 所述的抗体构建体在制备治疗胰腺癌的药物中的用途。

8. 根据权利要求 7 所述的用途, 其中所述抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段与 80% 或更多的人侵袭性胰腺癌、导管内乳头状粘液性肿瘤、PanIN-1A、PanIN-1B 和 PanIN-2 结合。

9. 根据权利要求 7 所述的用途, 其中所述抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段与 PanIN-1A、PanIN-1B 和 PanIN-2 结合, 但不与胰腺炎结合。

10. 根据权利要求 7 所述的用途, 其中所述抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段是裸抗体或其片段。

11. 根据权利要求 10 所述的用途, 还包括对所述个体施用至少一种治疗剂。

12. 根据权利要求 7 所述的用途, 其中所述抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段与至少一种治疗剂共轭。

13. 根据权利要求 12 所述的用途, 其中所述治疗剂选自放射性核素、免疫调节剂、激素、激素拮抗剂、酶、反义寡核苷酸、siRNA、酶抑制剂、光敏治疗剂、细胞毒素剂、药物、毒素、血管生成抑制剂和促凋亡剂。

14. 根据权利要求 13 所述的用途, 其中所述药物选自氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲、吉西他滨、三氮烯、叶酸类似物、蒽环霉素、紫杉烷、COX-2 抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶抑制剂、表鬼臼毒素、铂配位络合物、长春花生物碱、取代脲、甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素拮抗剂、内皮抑素、紫杉醇、喜树碱、SN-38、阿霉素及其类似物、抗代谢物、烷化剂、抗有丝分裂物、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、mTOR 抑制剂、热休克蛋白 (HSP90) 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、HDAC 抑制剂、促凋亡剂、甲氨喋呤和 CPT-11。

15. 根据权利要求 13 所述的用途, 其中所述毒素选自蓖麻毒素、相思豆毒素、 α 毒素、皂草素、核糖核酸酶 (RNA 酶)、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 A、商陆抗病毒蛋白、白树素、白喉

毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。

16. 根据权利要求 13 所述的用途,其中所述免疫调节剂选自细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、集落刺激因子(CSF)、白细胞介素(IL)、干扰素(IFN)、干细胞生长因子、促红细胞生成素、促血小板生成素、肿瘤坏死因子(TNF)、粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 和定名为“SL 因子”的干细胞生长因子。

17. 根据权利要求 16 所述的用途,其中所述细胞因子选自人体生长激素、N- 蛋氨酸人体生长激素、牛生长激素、甲状旁腺激素、甲状腺素、胰岛素、胰岛素原、松弛素、松弛素原、糖蛋白促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)、黄体化激素(LH)、胎盘生长因子(PIGF)、肝细胞生长因子、前列腺素、成纤维细胞生长因子、催乳素、胎盘生乳素、OB 蛋白、肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β 、苗勒氏抑制物、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、激活素、血管内皮生长因子、整合素、促血小板生成素(TPO)、NGF- β 、血小板生长因子、TGF- α 、TGF- β 、胰岛素样生长因子-I、胰岛素样生长因子-II、促红细胞生成素(EPO)、骨诱导因子、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、巨噬细胞-CSF(M-CSF)、IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-25、LIF、FLT-3、血管抑素、血小板反应素、内皮抑素、TNF- α 和LT。

18. 根据权利要求 12 所述的用途,其中所述放射性核素选自 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{152}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{161}Ho 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}Pb 、 ^{58}Co 、 $^{80\text{m}}\text{Br}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{103\text{m}}\text{Rh}$ 、 ^{109}Pt 、 ^{119}Sb 、 $^{189\text{m}}\text{Os}$ 、 ^{192}Ir 、 ^{219}Rn 、 ^{215}Po 、 ^{221}Fr 、 ^{217}At 、 ^{255}Fm 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{143}Pr 、 ^{57}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{76}Br 和 ^{169}Yb 。

19. 根据权利要求 12 所述的用途,还包括对所述个体施用不与所述抗胰腺癌抗体或抗原结合片段共轭的第二治疗剂。

20. 根据权利要求 19 所述的用途,其中所述抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段与放射性核素共轭,且所述第二治疗剂是在施用所述抗胰腺癌抗体或片段之前对所述个体施用的放射敏化剂。

21. 根据权利要求 10 所述的用途,其中所述抗体构建体是包含至少一个PAM4抗体或其抗原结合片段和至少一个与靶向性构建体上的半抗原结合的抗体或片段的双特异性或多特异性抗体,且所述用途还包括施用附着于至少一种治疗剂的靶向性构建体。

22. 根据权利要求 21 所述的用途,其中所述抗体构建体是包含附着于一个 679 抗体片段部分的拷贝的两个 PAM4 抗体片段部分的拷贝的三聚 DNL (对接和锁定) 构建体,且所述靶向性构建体包含至少一种 HSG 半抗原。

23. 根据权利要求 7 所述的用途,其中所述抗体构建体包含与肿瘤相关抗原(TAA)结合的第二抗体或其抗原结合片段。

24. 根据权利要求 23 所述的用途,其中所述第二抗体选自 CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、抗 Le^a 抗体、抗诸如 Le(y) 之类的其它 Lewis 抗原的抗体、针对癌胚抗原(CEA)的抗体、CEACAM6、结肠特异性抗原-p(CSAp)、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、HLA-DR、CD40、CD74、CD-80、CD138、HER2/neu、EGFR、EGP-1、EGP-2、血管生成因子、

VEGF、P1GF、胰岛素样生长因子 (ILGF)、碳酸酐酶 IX、腱生蛋白、血小板源生长因子、IL-6、癌基因产物、bcl-2、Kras、p53、HER2/neu、cMET 和针对肿瘤坏死物质的抗体。

25. 如权利要求 1 所述的抗体构建体在制备检测或诊断胰腺癌的药物中的用途。

26. 根据权利要求 25 所述的用途,其中所述抗胰腺癌抗体与 PanIN-1A、PanIN-1B、PanIN-2、侵袭性胰腺癌、胰腺癌、粘液性囊性肿瘤 (MCN)、胰内粘液性肿瘤 (IPMN) 和导管内乳头状粘液性肿瘤结合。

27. 根据权利要求 25 所述的用途,其中所述抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段与 80% 或更多的人侵袭性胰腺癌、导管内乳头状粘液性肿瘤、PanIN-1A、PanIN-1B 和 PanIN-2 结合。

28. 根据权利要求 25 所述的用途,其中所述抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段与 PanIN-1A、PanIN-1B 和 PanIN-2 结合,但不与胰腺炎结合。

29. 根据权利要求 25 所述的用途,其中所述抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段与至少一种诊断剂共轭。

30. 根据权利要求 29 所述的用途,其中所述诊断剂选自放射性核素、造影剂、荧光剂、化学发光剂、生物发光剂、顺磁离子、酶和光敏诊断剂。

31. 根据权利要求 30 所述的用途,其中所述诊断剂是选自以下的放射性核素:¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁸F、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、^{94m}Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、^{52m}Mn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、^{82m}Rb、⁸³Sr 或其它 γ -、 β -或正电子-发射体。

32. 根据权利要求 31 所述的用途,其中所述放射性核素是 ¹⁸F,且所述用途还包括 PET 成像。

33. 根据权利要求 30 所述的用途,其中所述顺磁离子选自铬 (III)、锰 (II)、铁 (III)、铁 (II)、钴 (II)、镍 (II)、铜 (II)、钆 (III)、钆 (III)、镱 (III)、钆 (III)、钆 (II)、铽 (III)、镱 (III)、铽 (III) 和铽 (III)。

34. 根据权利要求 30 所述的用途,其中所述诊断剂是选自异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺的荧光标记化合物或选自鲁米诺、异鲁米诺、芳族吖啶酯、咪唑、吖啶盐和草酸酯的化学发光标记化合物或选自萤光素、萤光素酶和水母发光蛋白的生物发光化合物。

35. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述方法用于外科手术中、内窥镜检查中或血管内的程序。

36. 根据权利要求 25 所述的用途,其中所述抗体构建体是包含附着于一个 679 抗体片段部分的拷贝的两个 PAM4 抗体片段部分的拷贝的三聚 DNL (对接和锁定) 构建体,且所述用途还包括对所述个体施用包含至少一种 HSG 半抗原的靶向性构建体,其中所述靶向性构建体与至少一种诊断剂共轭。

37. 根据权利要求 36 所述的用途,其中所述诊断剂是 ¹⁸F,且所述用途还包括 PET 成像。

38. 一种 DNL 构建体,包含第一融合蛋白与第二融合蛋白,其中所述第一融合蛋白包含附着于 DDD 肽或 AD 肽的如权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段,当所述第一融合蛋白包含 DDD 肽时,所述第二融合蛋白包含 AD 肽,或者当所述第一融合蛋白包含 AD 肽时,所述第二融合蛋白包含 DDD 肽。

39. 根据权利要求 38 所述的 DNL 构建体,其中所述 DDD 肽是 DDD2 肽 (SEQ ID NO:34),

所述 AD 肽是 AD2 肽 (SEQ ID NO:36)。

40. 根据权利要求 38 所述的 DNL 构建体,其中所述第二融合蛋白与聚乙二醇 (PEG) 部分共轭。

41. 根据权利要求 38 所述的 DNL 构建体,其中所述第二融合蛋白包含细胞因子部分。

42. 根据权利要求 41 所述的 DNL 构建体,其中所述细胞因子部分是干扰素 - α 2b。

43. 根据权利要求 38 所述的 DNL 构建体,其中所述第二融合蛋白包含 h679 抗体或其抗原结合片段。

44. 根据权利要求 38 所述的 DNL 构建体在生产用于治疗、检测或诊断胰腺癌的药物方面的用途。

45. 根据权利要求 5 所述的抗体构建体,其中所述半抗原是 HSG,第二抗体是 679 抗体。

46. 根据权利要求 5 所述的抗体构建体,其中所述第二抗体与选自如下的 TAA 结合: Lewis 抗原、Le(y)、癌胚抗原或 (CEACAM5)、CEACAM6、结肠特异性抗原 -p (CSAp)、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、HLA-DR、CD40、CD74、CD-80、CD138、HER2/neu、EGFR、EGP-1、EGP-2、血管生成因子、VEGF、PlGF、胰岛素样生长因子、碳酸酐酶 IX、腱生蛋白 (tenascin)、血小板源生长因子、IL-6、致癌基因产物、bcl-2、Kras、p53、cMET 和肿瘤坏死因子。

47. 根据权利要求 5 所述的抗体构建体,其中所述第二抗体选自 hA20、hA19、hIMMU31、hLL1、hLL2、hMu-9、hL243、hMN-14、hRS7、hMN-3、hR1、CA19. 9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72. 3 和 CC49。

抗胰腺癌抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 12 月 24 日提交的美国专利申请 12/343,655、2009 年 4 月 6 日提交的美国专利申请 12/418,877、2008 年 8 月 8 日提交的序列号为 61/087,463 的美国临时专利申请以及 2009 年 1 月 13 日提交的序列号为 61/144,227 的美国临时专利申请的优先权。以上所引用的各优先权申请的内容全文以引用的方式并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 本项工作部分地获得 NIH 拨款 R01-CA54425 的支持。在本发明中,美国政府可享有某些权利。

背景技术

技术领域

[0005] 本发明涉及鼠源、嵌合、人源化及人源抗体及其片段,该抗体及其片段以高选择性和高频率与胰腺癌细胞结合,与其它癌细胞结合的程度较低,且与正常的胰腺细胞或胰腺炎的结合不明显。在优选的实施例中,该抗体或片段是 PAM4 抗体或片段。所述抗体可用于癌症(特别是胰腺癌)的检测、诊断和治疗。在具体的实施例中,所述抗体可用于早期胰腺癌的检测和/或诊断。

[0006] 相关技术

[0007] 胰腺癌是胰腺的恶性生长,主要发生在胰管细胞内。这种疾病是第九大常见形式的癌症,还分别是男性和女性癌症死亡的第四和第五大主要原因。胰腺癌几乎总是致命性的,五年的生存率不到 3%。

[0008] 胰腺癌最常见的症状包括黄疸、腹部疼痛以及体重减轻,这些与其它表现因素一起在本质上是非特异性的。因此,在肿瘤生长的早期诊断胰腺癌常常是困难的,需要大量的诊断性病情检查,很多时候包括探查性手术。内镜超声检查术和计算断层照相法是当前可用的胰腺癌诊断的最好的非侵入性方式。然而可靠地检测小肿瘤以及区别胰腺癌与局灶性胰腺炎是困难的。目前大部分胰腺癌患者在晚期被诊断出来,此时肿瘤已经扩散到囊体的外部,从而侵害周围的器官和/或已经广泛地转移(Gold 等人, Crit. Rev. Oncology/Hematology, 39 :147-54(2001))。在临床环境下,该疾病的晚期检测是常见的,而早期胰腺癌诊断是罕见的。

[0009] 当前可用的胰腺癌的治疗程序均不能达到痊愈之目的,也不会显著延长生存时间。手术切除是提供生存机会的唯一形式。然而,由于肿瘤负荷较大,仅有 10%至 25%的患者适合“根治性切除术”。对于那些经过手术治疗的患者来说,五年生存率仍然很低,平均仅约为 10%。

[0010] 胰腺癌的早期检测和诊断以及该疾病的适当分期将提供增强的生存优势。许多实验室正在进行诊断程序的开发,这种开发是基于肿瘤相关标记物向血流中的释放以及检测活检标本中的标记物质。对于胰腺癌来说,最佳的肿瘤相关标记物是 CA19.9 的免疫测定。

在 70% 的胰腺癌患者中发现高水平的这种涎化 Lea 表位结构,但在任何所检查的局灶性胰腺炎标本中却没有发现。然而,在许多其它恶性和良性病症中也发现 CA19.9 水平提高了,因此目前该测定尚不能用于诊断。然而,该测定对于监测是有用的,术后 CA19.9 血清水平的持续增加表明预后不良。在不同的癌症发展阶段,已经报道了许多其它单克隆抗体 (MAb) 以及用于诊断的免疫测定。这些抗体包括但不限于 DUPAN2、SPAN1、B72.3、Ia3 和各种抗 CEA (癌胚抗原或 CEACAM5) 抗体。

[0011] 已经对抗体 (特别是 MAb) 和基因工程抗体或抗体片段进行了广泛的测试,并显示出它们在包括癌症、自身免疫疾病、传染病、炎症性疾病和心血管疾病在内的各种人类疾病的检测和治疗中很有价值 [Filpula 和 McGuire, Exp. Opin. Ther. Patents (1999) 9: 231-245]。抗体或抗体衍生制剂的临床效用主要取决于其共同与特定疾病相关的特异性靶抗原结合的能力。在人类疾病的检测和治疗阶段期间,特别是如果诊断或治疗剂对体内正常组织有毒时,选择性对于将诊断或治疗剂 (如药物、毒素、细胞因子、激素、激素拮抗剂、酶、酶抑制剂、寡核苷酸、生长因子、放射性核素、血管生成抑制剂或金属) 递送至靶位置来说是有价值的。在包括卵巢癌、结肠癌、甲状腺髓样癌和淋巴瘤在内的许多恶性肿瘤中使用放射性标记抗体已经取得了一定的成功。还证明了这种技术对胰腺癌也是有效的。然而,先前报道的针对胰腺癌抗原的抗体迄今并没有成功地用来有效地治疗或早期检测和 / 或诊断胰腺癌。

[0012] 一种建议的将制剂递送至靶位点的方法 (称为直接靶向) 是设计用来以携带诊断或治疗剂的抗体靶向特异性抗原的技术。就肿瘤来说,直接靶向方法利用通过其抗原识别靶肿瘤的标记抗肿瘤单特异性抗体。该技术涉及将标记的单特异性抗体注射给患者并使抗体定位于靶肿瘤以获得诊断或治疗效果。未结合的抗体从体内清除。

[0013] 另一种建议的解决方案被称为“亲和力增强系统” (AES), 是设计用来克服由携带诊断或治疗剂的抗体直接靶向肿瘤的缺陷的技术 [美国专利 No. 5, 256, 395 (1993), Barbet 等人, Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 14:153-166 (1999)]。AES 利用标记的二价半抗原和识别靶肿瘤及标记半抗原两者的抗肿瘤 / 抗半抗原双特异性抗体。具有更高价数的半抗原和具有更高特异性的抗体也可用于此程序。该技术涉及把抗体注射给患者并使其定位于靶肿瘤。在使未结合的抗体从血流中清除的足够量的时间过后,施用标记的半抗原。半抗原与位于靶细胞位点的抗体-抗原复合物结合,从而获得诊断或治疗效果,而未结合的半抗原则迅速从体内清除。Barbet 提到了二价半抗原可与双特异性抗体交联的可能性 (当后者与肿瘤表面结合时)。作为结果,标记的复合物更稳定,并且在肿瘤处停留的时间更长。

[0014] 本领域中需要这样的抗体,与正常的胰腺组织和其它正常组织相比,该抗体对胰腺癌和其它类型的癌症表现出高选择性。具体来说,仍然需要这样的抗体,其可用作胰腺癌的诊断和 / 或治疗工具 (优选在疾病的早期),并且在靶抗原处显示出增强的吸收,与健康个体血液中的成分结合减少,并因此在有毒治疗剂与这种抗体共轭时,其也对正常的组织和细胞提供最佳的保护。使用这种抗体检测体液 (特别是血液) 中的胰腺癌相关抗原可改善这种疾病的早期诊断,只要它能够将这种疾病与良性疾病很好地区分开来就行,同时也可用来监测对治疗的反应,并且也有可能通过指示疾病负担而加强预后。

发明内容

[0015] 在各种实施例中,本发明涉及与胰腺癌细胞结合而很少或不与正常或非肿瘤性胰腺细胞结合的抗体、抗原结合抗体片段及融合蛋白。优选地,抗体与诸如 PanIN-1A 和 1B 以及 PanIN-2 的最早期的胰腺癌结合。更优选地,抗体与 80% 至 90% 或更多的人侵袭性胰腺癌、导管内乳头状粘液性肿瘤、PanIN-1A、PanIN-1B 和 PanIN-2 病变结合。最优选地,抗体可区分早期胰腺癌与诸如胰腺炎之类的非恶性病症。这种抗体对癌症的早期检测及早期胰腺癌与良性胰腺病症之间的鉴别诊断特别有用。在优选的实施例中,这种抗体可用于疑似患有早期胰腺癌或某些其它癌症的个体之样本的体内或体外分析。

[0016] 所述抗体、抗体片段或融合蛋白可以是通过用粘蛋白免疫和 / 或选择而获得的,且优选对胰腺癌的粘蛋白是反应性的。因此,所述抗体、抗体片段和融合蛋白优选与和胰腺癌细胞相关的抗原结合。更优选地,所述抗体、抗体片段或融合蛋白可与在胰腺癌中表达的粘蛋白(如 MUC-1 或 MUC-5)结合。在某些实施例中,所述抗体、抗体片段或融合蛋白可与用 MUC-1 抗原转染并表达 MUC-1 抗原的细胞结合。

[0017] 在可供选择的实施例中,所述抗体、抗体片段或融合蛋白可与合成肽序列结合,例如与噬菌体展示肽结合。可与抗胰腺癌抗体结合的示例性肽包括但不限于 WTNITKAYPLP(SEQ ID NO :29) 和 ACPEWWGTTC(SEQ ID NO :30)。这种合成肽可以是直链的或环状的,并且可以同与内源性胰腺癌抗原结合的抗体竞争或不竞争。合成肽序列的某些位置上的氨基酸对于抗体结合来说可能没有其它氨基酸那样重要。例如,在 SEQ ID NO :29 中,可改变肽序列的位置 7、8 和 11 上的残基 K、A 和 L 而仍然保持抗体结合。类似地,在 SEQ ID NO :30 中,可改变序列的位置 8 和 9 上的苏氨酸残基,尽管位置 9 上的苏氨酸的取代可显著地影响与肽的抗体结合。

[0018] 在其它优选的实施例中,抗体与靶胰腺癌抗原的结合受到用诸如二硫苏糖醇(DTT) 和 / 或高碘酸盐之类的试剂处理靶抗原的抑制。因此,抗体与胰腺癌抗原的结合可取决于二硫键的存在与否和 / 或靶抗原的糖基化状态。在更优选的实施例中,由目标抗体所识别的表位不与其它报告的粘蛋白特异性抗体(如 MA5 抗体、CLH2-2 抗体和 / 或 45M1 抗体)发生交叉反应(参见例如 Major 等人, J Histochem Cytochem. 35 :139-48, 1987 ;Dion 等人 Hybridoma 10 :595-610, 1991)。

[0019] 目标抗体或片段可以是裸抗体或片段,或者优选与至少一种治疗和 / 或诊断剂共轭以用于将制剂递送至靶组织。在可供选择的实施例中,PAM4 抗体或片段可以是双特异性融合蛋白或抗体的一部分,具有对于靶细胞抗原的第一结合位点和对于与靶向性构建体共轭的半抗原的第二结合位点。靶向性构建体可转而附着于至少一种可用在预靶向技术中的治疗和 / 或诊断剂。

[0020] 在优选的实施例中,目标抗体、抗体片段或融合蛋白包含鼠源、嵌合、人源化或人源 PAM4 抗体或片段。这种 PAM4 抗体或片段优选包含:鼠源 PAM4 抗体的 CDR 序列,如轻链可变区 CDR 序列 CDR1(SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO :1)、CDR2(STSNLAS, SEQ ID NO :2) 和 CDR3(HQWNRYPYT, SEQ ID NO :3);以及重链可变区 CDR 序列 CDR1(SYVLH, SEQ ID NO :4)、CDR2(YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO :5) 和 CDR3(GFGGSYGFAY, SEQ ID NO :6)。

[0021] 具体的实施例可涉及鼠源 PAM4 抗体的组合物和使用方法,鼠源 PAM4 抗体优选包含如图 1A 和图 1B 所公开的鼠源 PAM4 可变区序列(SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :11)。这种

鼠源 PAM4 抗体或片段可用于离体或体外诊断技术,如组织样本的免疫组织化学分析或体液样本的免疫测定,上述样本取自疑患有胰腺癌或其它类型癌症的受试者。

[0022] 其它具体的实施例可涉及嵌合 PAM4 抗体的组合物和使用方法,所述嵌合 PAM4 抗体包含附着于人源抗体恒定区序列的鼠源可变区序列。优选地,嵌合 PAM4 抗体或片段包含图 2A 和图 2B 所示的 cPAM4 可变区序列 (SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13)。这种嵌合抗体在人体中比鼠源抗体的免疫原性要低,同时保持母体鼠源抗体的抗原结合特异性。嵌合抗体用于癌症的诊断和 / 或治疗是本领域中熟知的。

[0023] 又一具体的实施例可涉及人源化 PAM4 抗体或其片段的组合物和使用方法,所述人源化 PAM4 抗体或其片段包含如上讨论的鼠源 PAM4MAb 的互补决定区 (CDR) 以及人源抗体框架区 (FR) 和恒定区序列。在优选的实施例中,人源化 PAM4 抗体或其片段的轻链和重链可变区的 FR 包含至少一个从鼠源 PAM4MAb 的相应 FR 上取代的氨基酸。还更优选的是,人源化 PAM4 抗体或其片段可包含至少一个选自鼠源 PAM4 重链可变区的氨基酸残基 5、27、30、38、48、66、67 和 69 的氨基酸残基 (图 1B) 和 / 或至少一个选自鼠源 PAM4 轻链可变区的氨基酸残基 21、47、59、60、85、87 和 100 的氨基酸 (图 1A)。最优选的是,人源化 PAM4 抗体或其片段包含图 4B 的 hPAM4VH 氨基酸序列 (SEQ ID NO:19) 和图 4A 的 hPAM4V_K 氨基酸序列 (SEQ ID NO:16)。

[0024] 在可供选择的实施例中,抗胰腺癌抗体可以是同与嵌合 PAM4 (cPAM4) 抗体相同的抗原决定簇 (表位) 结合的鼠源、嵌合、人源化或人源抗体。如下面所讨论, cPAM4 抗体是包含轻链可变区 CDR 序列 CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1)、CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2) 和 CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3) 以及重链可变区 CDR 序列 CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4)、CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) 和 CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6) 的抗体。可通过本领域已知的多种技术识别与相同抗原决定簇结合的抗体,例如通过使用 cPAM4 抗体作为竞争抗体和人胰腺粘蛋白作为靶抗原的竞争性结合研究 (参见,例如下面的段落 [0214] 的实例 1)。阻断 (竞争) 与 cPAM4 抗体的人胰腺粘蛋白结合的抗体被称为交叉阻断抗体。优选地,用包含人胰腺癌粘蛋白的提取物通过免疫法制备这种交叉阻断抗体。

[0025] 另一实施例是癌细胞靶向诊断免疫共轭物,其包含与至少一种诊断 (或检测) 剂结合的抗胰腺癌抗体、抗体片段或融合蛋白。

[0026] 优选地,诊断剂选自放射性核素、造影剂、荧光剂、化学发光剂、生物发光剂、顺磁离子、酶和光敏诊断剂。还更优选地,诊断剂是能量在 20 至 4000keV 之间的放射性核素或选自 ¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁸F、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、^{94m}Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、^{52m}Mn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、^{82m}Rb、⁸³Sr 或其它 γ -、 β - 或正电子发射体的放射性核素。在特别优选的实施例中,如下面的实例所述,诊断放射性核素 ¹⁸F 用于标记和 PET 成像。¹⁸F 可通过以下方式附着于抗体、抗体片段或肽,与诸如铝之类的金属络合,¹⁸F- 金属络合物与同靶向蛋白、肽或其它分子共轭的螯合部分结合。

[0027] 同样优选的是,诊断剂是顺磁离子,如铬 (III)、锰 (II)、铁 (III)、铁 (II)、钴 (II)、镍 (II)、铜 (II)、钆 (III)、钆 (III)、镱 (III)、钆 (III)、钆 (II)、铽 (III)、镱 (III)、钪 (III) 和铟 (III),或者是不透辐射的材料,如钡、泛影酸盐、乙碘油、柠檬酸镱、碘卡酸、碘西他酸、碘达胺、胆影酸、碘沙酸、碘古酰胺、碘海醇、碘帕醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法

酸、碘丝酸、碘砒葡胺、碘舒美酸 (iosemeti c acid)、碘酞硫、碘替酸、碘他拉酸、碘曲西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、碘泊酸盐、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影盐、丙碘酮和氯化亚铊。

[0028] 还在其它实施例中,诊断剂是荧光标记化合物、化学发光标记化合物或生物发光化合物,其中荧光标记化合物选自异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺;化学发光标记化合物选自鲁米诺、异鲁米诺、芳族吖啶酯、咪唑、吖啶盐和草酸酯;生物发光化合物选自荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白。在另一实施例中,诊断免疫共轭物用于外科手术中、内窥镜检查或血管内肿瘤诊断。

[0029] 另一实施例是癌细胞靶向治疗免疫共轭物,其包含与至少一种治疗剂结合的抗体或其片段或融合蛋白。优选地,治疗剂选自放射性核素、免疫调节剂、激素、激素拮抗剂、酶、诸如反义寡核苷酸或 siRNA 之类的寡核苷酸、酶抑制剂、光敏治疗剂、诸如药物或毒素的细胞毒素剂、血管生成抑制剂和促凋亡剂。在使用不止一种治疗剂的实施例中,治疗剂可包含同一治疗剂的多个拷贝或者另外包含不同治疗剂的组合。

[0030] 在一个实施例中,诸如反义分子或抑制 bcl-2 表达的 siRNA(如美国专利 No. 5,734,033 中所述,该专利的实例部分以引用的方式并入本文)之类的寡核苷酸可与免疫共轭物或抗体融合蛋白共轭,或者形成免疫共轭物或抗体融合蛋白的治疗剂部分。或者,寡核苷酸可与裸的或共轭的抗胰腺癌抗体或抗体片段(如 PAM4 抗体)同时或相继地施用。在优选的实施例中,寡核苷酸是针对致癌基因或致癌基因产物(如 bcl-2、p53、ras 或其它熟知的致癌基因)的反义寡核苷酸。

[0031] 在优选的实施例中,治疗剂是细胞毒素剂,如药物或毒素。还优选的是,所述药物选自氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲、吉西他滨、三氮烯、叶酸类似物、蒽环霉素、紫杉烷、COX-2 抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶抑制剂、表鬼臼毒素、铂配位络合物、长春花生物碱、取代脲、甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素拮抗剂、内皮抑素、紫杉醇、喜树碱、SN-38、阿霉素及其类似物、抗代谢物、烷化剂、抗有丝分裂物、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、mTOR 抑制剂、热休克蛋白 (HSP90) 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、HDAC 抑制剂、促凋亡剂、甲氨蝶呤、CPT-11 以及它们的组合。

[0032] 在另一优选的实施例中,治疗剂是选自蓖麻毒素、相思豆毒素、 α 毒素、皂草素、核糖核酸酶 (RNA 酶)、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 A、商陆抗病毒蛋白、白树素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素以及它们的组合的毒素。或者是选自细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、集落刺激因子 (CSF)、干扰素 (IFN)、干细胞生长因子、促红细胞生成素、促血小板生成素以及它们的组合的免疫调节剂。

[0033] 在其它优选的实施例中,治疗剂是选自 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 和 ^{211}Pb 以及它们的组合的放射性核素。还优选的是随俄歇发射粒子充分衰变的放射性核素。例如,Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m 和 Ir-192。可用的 β -粒子发射核素的衰变能优选 $< 1,000\text{keV}$,更优选 $< 100\text{keV}$,最优选 $< 70\text{keV}$ 。还优选的是随 α -粒子的生成充分衰变的放射性核素。这种放射性核素包括但不限于 Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213 和 Fm-255。可用的 α -粒

子发射放射性核素的衰变能优选为 2,000–10,000keV,更优选为 3,000–8,000keV,最优选为 4,000–7,000keV。有用的其它可能的放射性同位素包括 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{150}Br 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 ^{113}In 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 ^{121}mTe 、 ^{122}mTe 、 ^{125}mTe 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{199}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{169}Yb 等。在其它的实施例中,治疗剂是选自色原和染料的光敏治疗剂。

[0034] 或者,治疗剂是选自苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -V-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 α -磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶的酶。这种酶例如可以和前体药物结合使用,该前体药物以相对无毒性的形式施用并由酶在靶位点转化为细胞毒素剂。在其它替代形式中,药物可由受试者体内的内源性酶转化为毒性较低的形式,但是也可由治疗酶重新转化为细胞毒素的形式。

[0035] 还可设想的是多价多特异性抗体或其片段,其包含至少一个对 PAM4 靶抗原具有亲和力的结合位点以及一个或多个对半抗原分子具有亲和力的半抗原结合位点。优选地,抗体或其片段是嵌合、人源化或全人抗体或其片段。半抗原分子可与靶向性构建体共轭以用于递送一种或多种治疗和/或诊断剂。在某些优选的实施例中,如下面的实例所述,多价抗体或其片段可以通过对接和锁定 (dock-and-lock, DNL) 技术制备。如下所述,将结合了 hPAM4 抗体片段的示例性 DNL 构建体表示为 TF10。

[0036] 还可设想的是双特异性抗体或其片段,其包含至少一个对 PAM4 靶抗原具有亲和力的结合位点和至少一个对选自以下的靶向性构建体/共轭物具有亲和力的结合位点:

[0037] DOTA-D-Asp-D-Lys (HSG)-D-Asp-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP271)、

[0038] DOTA-D-Glu-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP277)、

[0039] DOTA-D-Tyr-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP 288)、

[0040] DOTA-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP 0281)、

[0041] NOTA-ITC benzyl-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP 449)、

[0042] NODA-Ga-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP460)、

[0043] NOTA-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP 461)、

[0044] NOTA-D-Asp-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP 462)、

[0045] NOTA-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP 465)、

[0046] C-NETA-succinyl-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP467)、

[0047] S-NETA-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP469) 和

[0048] L-NETA-succinyl-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP470),

[0049] 其能够携带至少一种诊断和/或治疗剂。其它适用的靶向性构建体公开在例如专利号为 6,576,746、6,962,702、7,052,872、7,138,103、7,172,751 和 7,405,320 的美国专利以及序列号为 12/112,289 的美国专利申请中,以上内容每个的实例部分以引用的方式并入本文。

[0050] 其它实施例涉及包含至少二个如本文描述的抗胰腺癌抗体和其片段的融合蛋白或其片段。或者,融合蛋白或其片段可包含至少一个第一抗胰腺癌抗体或其片段以及至少

一个第二 MAb 或其片段。优选地,第二 MAb 与肿瘤相关抗原结合,所述肿瘤相关抗原例如选自 CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、Lea、Lewis 抗原 Le(y)、CSAp、胰岛素样生长因子 (ILGF)、上皮糖蛋白 -1 (EGP-1)、上皮糖蛋白 -2 (EGP-2)、CD-80、胎盘生长因子 (PlGF)、碳酸酐酶 IX、腱生蛋白 (tenascin)、IL-6、HLA-DR、CD40、CD74 (例如, milatuzumab)、CD138 (多配体聚糖 -1)、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、TAG-72、EGFR、血小板源生长因子 (PDGF)、血管生成因子 (例如 VEGF 和 PlGF)、致癌基因产物 (例如, bcl-2、Kras、p53)、cMET、HER2/neu 以及与胃癌和结肠直肠癌相关的抗原。抗体融合蛋白或其片段可进一步包含至少一种诊断和 / 或治疗剂。

[0051] 本文还描述了包含编码本文所述的抗胰腺癌抗体、融合蛋白、多特异性抗体、双特异性抗体或其片段的 DNA 序列。其它实施例涉及包含编码 DNA 序列的抗体的表达载体和 / 或宿主细胞。在某些优选的实施例中,宿主细胞可以用突变 Bcl-2 基因,例如三倍突变 Bcl-2 基因 (T69E, S70E, S87E) 转化的 Sp2/0 细胞系,已经使所述基因适应于细胞转化和在无血清培养基中生长。(参见,例如,2005 年 7 月 25 日提交的美国专利申请 No. 11/187,863 (现在授权的美国专利 No. 7,531,327)、2006 年 7 月 14 日提交的 No. 11/487,215 (现在授权的美国专利 No. 7,537,930) 以及 2007 年 10 月 24 日提交的 No. 11/877,728,这些专利中的每个的实例部分以引用的方式并入本文。

[0052] 另一实施例涉及向靶物质递送诊断或治疗剂或其组合的方法,包括 (i) 提供包含与至少一种诊断和 / 或治疗剂共轭的抗胰腺癌抗体或片段 (如 PAM4 抗体或片段) 的组合物,以及 (ii) 对有需要的受试者施用本文中请求保护的抗体、抗体片段或融合蛋白中的任一种的诊断或治疗共轭物。

[0053] 还可设想对靶物质递送诊断剂、治疗剂或它们的组合的方法,包括:(a) 对受试者施用多价多特异性或双特异性抗体或其片段中的任何一种,该多价、多特异性或双特异性抗体或其片段具有对 PAM4 抗原 的亲和力,且包含一个或多个半抗原结合位点;(b) 等待足够量的时间以便使未与 PAM4 抗原结合的抗体从受试者血流中清除;以及 (c) 对所述受试者施用包含与抗体的结合位点结合的诊断剂、治疗剂或其组合的载体分子。优选地,载体分子与抗体的不止一个结合位点结合。

[0054] 本文描述了诊断或治疗癌症的方法,包括:(a) 对受试者施用本文请求保护的多价、多特异性抗体或其片段中的任何一种,该多价多特异性抗体或其片段具有对 PAM4 抗原的亲和力,且包含一个或多个半抗原结合位点;(b) 等待足够量的时间以便使未结合的抗体从受试者血流中清除;以及 (c) 对所述受试者施用包含与抗体的结合位点结合的诊断剂、治疗剂或其组合的载体分子。在优选的实施例中,所述癌是胰腺癌。还优选的是,该方法可用于病变组织的术中鉴定、病变组织的内窥镜鉴定或病变组织的血管内鉴定。

[0055] 另一实施例是治疗受试者恶性肿瘤的方法,包括对所述受试者施用治疗上有效量的抗体或其片段,该抗体或其片段与 PAM4 抗原结合,任选与至少一种治疗剂共轭。或者抗体或其片段可以为裸抗体或其片段。在更优选的实施例中,在施用如上所述的另一种治疗剂之前、同时或之后施用所述抗体或片段。

[0056] 本文考虑到诊断受试者恶性肿瘤尤其是胰腺癌的方法,包括 (a) 对所述受试者施用包括与 PAM4 抗原结合的抗体或其片段的诊断共轭物,其中所述 MAb 或其片段与至少一种诊断剂共轭;以及 (b) 检测结合至胰腺癌细胞或其它恶性肿瘤细胞的标记抗体的存在与

否,其中抗体的结合用于诊断胰腺癌或其它恶性肿瘤的存在与否。在优选的实施例中,抗体或片段与胰腺癌结合而不与正常胰腺组织、胰腺炎或其它非恶性肿瘤结合。在次优选的实施例中,与非恶性肿瘤细胞相比,抗体或片段以显著较高的水平与癌细胞结合,从而使得可以从非恶性肿瘤中鉴别诊断癌症。在最优选的实施例中,诊断剂可以是通过 PET 成像检测的 F-18 标记的分子。

[0057] 在更优选的实施例中,诸如 hPAM4 抗体的抗胰腺癌抗体的使用使得可在恶性疾病的早期以高特异性和灵敏度检测和 / 或诊断胰腺癌。优选地,诊断抗体或片段可以标记至少 70%、更优选至少 80%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、最优选约 100% 的高、中和低分化的胰腺癌以及 90% 或更多的侵袭性胰腺癌。所使用的抗胰腺癌抗体优选可以检测 85% 或更多的 PanIN-1A、PanIN-1B、PanIN-2、IPMN 和 MCN 癌前病变。最优选的是,使用抗胰腺癌抗体的免疫测定可以检测 89% 或更多的全部 PanIN、86% 或更多的 IPMN 以及 92% 或更多的 MCN。

[0058] 可供选择的实施例涉及通过血液、血浆或血清样本的体外分析而检测个体中 PAM4 抗原和 / 或诊断个体中胰腺癌的方法。优选地,在使用诸如 PAM4 抗体的抗胰腺癌抗体处理样本以用于免疫检测之前,使用诸如丁醇的有机溶剂对样本进行有机相提取。继有机相提取之后,使用诸如 ELISA、夹心法免疫测定、固相 RIA 及类似技术的本领域已知的多种免疫测定技术中的任一种来分析水相,以确定样本中是否存在 PAM4 抗原。

[0059] 另一个实施例涉及治疗受试者癌细胞的方法,包括对所述受试者施用包括与 PAM4 抗原结合的裸抗体或其片段或裸抗体融合蛋白或其片段的组合物。优选地,该方法进一步包括施用第二裸抗体或其片段,其选自 CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、抗-CEA、抗-CEACAM6、抗-EGP-1、抗-EGP-2、抗-Le^a、由 Lewis 抗原 Le(y) 定义的抗体、以及抗 CSAp、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、TAG-72、EGFR、CD40、HLA-DR、CD74、CD138、血管生成因子(如,VEGF 和胎盘样生长因子(P1GF))、胰岛素样生长因子(ILGF)、髓生蛋白、血小板源生长因子、IL-6、致癌基因产物、cMET 和 HER2/neu 的抗体。

[0060] 又一个实施例涉及诊断受试者中恶性肿瘤的方法,包括(i)用包括与 PAM4 抗原结合的抗体或其片段的组合物对来自所述受试者的标本进行体外诊断化验,以及(ii)检测标本中与恶性肿瘤细胞结合的抗体或片段的的存在与否。优选地,恶性肿瘤是癌。更优选的是,癌是胰腺癌。

[0061] 附图简述

[0062] 图 1. 鼠源 PAM4 抗体的可变区 cDNA 序列和推导的氨基酸序列。图 1A 示出鼠源 PAM4Vk 的 DNA (SEQ ID NO :8) 和氨基酸 (SEQ ID NO :9) 序列。图 1B 示出鼠源 PAM4VH 的 DNA (SEQ ID NO :10) 和氨基酸 (SEQ ID NO :11) 序列。由对应的 DNA 序列编码的氨基酸序列以字母代码给出在核苷酸序列的下方。核苷酸序列的编码在右侧给出。CDR 区的氨基酸残基以加粗并以下划线的形式给出。如氨基酸残基上方的编码所示,对氨基酸残基使用 Kabat Ig 分子编码。用字母编码的氨基酸残基为由 Kabat 编码方案所定义的插入残基。插入残基与前一个残基的前面的位数相同。例如,图 1B 中残基 82、82A、82B 和 82C 分别以 82、A、B 和 C 表示。

[0063] 图 2. Sp2/0 细胞中表达的嵌合 PAM4 (cPAM4) 重链和轻链可变区的氨基酸序列。图 2A 示出 cPAM4Vk 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :12)。图 2B 示出 cPAM4VH 的氨基酸序列 (SEQ

ID NO:13)。序列以一个字母代码给出。CDR 区的氨基酸残基以粗体和下划线的形式示出。氨基酸的编码与图 1 相同。

[0064] 图 3. 人源抗体、PAM4 和 hPAM4 的重链和轻链可变区的氨基酸序列的对比。图 3A 示出人源抗体 Walker (SEQ ID NO:14) 与 PAM4 (SEQ ID NO:9) 和 hPAM4 (SEQ ID NO:16) 的 V_k 氨基酸序列对比, 且图 3B 示出人源抗体 Wi12 (FR1-3) (SEQ ID NO:17) 和 NEWM (FR4) (SEQ ID NO:28) 与 PAM4 (SEQ ID NO:11) 和 hPAM4 (SEQ ID NO:19) 的 VH 氨基酸序列对比。圆点表示与人源或人源化抗体的对应残基相同的 PAM4 的残基。框形区表示 CDR 区。hPAM4 的 N- 和 C- 端残基 (下划线) 通过所用的分期载体 (staging vector) 固定。与图 1 中一样使用 Kabat Ig 分子编码方案来编码残基。

[0065] 图 4. Sp2/0 细胞中表达的人源化 PAM4 (hPAM4) 重链和轻链可变区的 DNA 和氨基酸序列。图 4A 示出 hPAM4 V_k 的 DNA (SEQ ID NO:15) 和氨基酸 (SEQ ID NO:16) 序列, 且图 4B 示出 hPAM4 VH 的 DNA (SEQ ID NO:18) 和氨基酸 (SEQ ID NO:19) 序列。核苷酸序列的编码在右侧给出。由对应的 DNA 序列编码的氨基酸序列以一个字母代码给出。CDR 区的氨基酸残基以粗体和下划线的形式示出。与图 1A 和图 1B 中一样将 Kabat Ig 分子编码方案用于氨基酸残基。

[0066] 图 5. 与嵌合 PAM4 的 cPAM4 相比, 人源化 PAM4 抗体的 hPAM4 的结合活性。hPAM4 以菱形示出而 cPAM4 以封闭的圆示出。结果指出当与 ^{125}I -cPAM4 竞争与 CaPan1 抗原结合时, hPAM4 抗体和 cPAM4 的比较结合活性。

[0067] 图 6. 患有不能手术的转移性胰腺癌的患者用分次 ^{90}Y -hPAM4 加吉西他滨治疗的治疗前 (左侧) 和治疗后 (右侧) 的 PET/CT 融合图像。圆圈表示原发病灶的位置, 其显示治疗后 PET/CT 强度的显著降低。

[0068] 图 7. 患有不能手术的转移性胰腺癌的患者用分次 ^{90}Y -hPAM4 加吉西他滨治疗的治疗前 (左侧) 和治疗后 (右侧) 的 3D PET 图像。箭头指向原发病灶 (右边) 和转移 (左边) 的位置, 其中的每一个显示用放射性标记的 hPAM4 加吉西他滨治疗后 PET 图像强度的显著降低。

[0069] 图 8. 使用或不使用预靶向 TF10 双特异性抗胰腺癌粘蛋白抗体的情况下, 使用 ^{111}In 标记的 diHSG 肽 (IMP288) 的肿瘤体内成像。图 8A- 显示肿瘤位置 (箭头) 的小鼠。图 8B 显示在 TF10 双特异性抗体 存在 (上方) 和不存在 (下方) 的情况下用 ^{111}In - 标记的 IMP288 检测到的肿瘤。

[0070] 图 9. TF10、PAM4-IgG、PAM4-F(ab')₂ 和单价 bsPAM4 化学共轭物 (PAM4-Fab' x anti-DTPA-Fab') 的示例性结合曲线。通过 ELISA 试验测定与靶粘蛋白抗原的结合。

[0071] 图 10. CaPan1 人胰腺癌异种移植物 (~0.25g) 的免疫闪烁成像。(A) 注射双特异性 TF10 (80 μg , $5.07 \times 10^{-10}\text{mol}$) 然后 16 小时后施用 ^{111}In -IMP-288 (30 μCi , $5.07 \times 10^{-11}\text{mol}$) 的小鼠图像。图像拍摄于 3 小时后。增强图像的背景强度以与单独施用 ^{111}In -IMP-288 (30 μCi , $5.07 \times 10^{-11}\text{mol}$) 时得到的图像强度相当。(B) 单独施用 ^{111}In -IMP-288 的小鼠中没有观察到靶向。(C) 施用 ^{111}In -DOTA-PAM4-IgG (20 μCi , 50 μg) 24 小时后拍摄的小鼠图像。尽管肿瘤是可见的, 但是此时仍显示相当的本底放射性。

[0072] 图 11. 携带有 CaPan1 人胰腺癌异种移植物的裸小鼠中 ^{111}In -DOTA-PAM4-IgG (20 μCi , 50 μg) 和 TF10- 预靶向 ^{111}In -IMP-288 (80 μg , $5.07 \times 10^{-10}\text{mol}$)

的 TF10 然后 16 小时后施用 $30 \mu\text{Ci}$, $5.07 \times 10^{-11} \text{mol}$ 的 ^{111}In -IMP-288) 的扩展生物分布 (动物的预靶向和 IgG 组的平均肿瘤重量分别为 $\pm\text{SD}$, 0.28 ± 0.21 和 $0.10 \pm 0.06 \text{g}$)。

[0073] 图 12. 用 0.15mCi 的 ^{90}Y -hPAM4IgG, 或 0.25 或 0.50mCi 的 TF10 预靶向 ^{90}Y -IMP-288 对确诊的 ($\sim 0.4 \text{cm}^3$) CaPan1 肿瘤的单次治疗的治疗活性。

[0074] 图 13. PT-RAIT 疗法的吉西他滨增强作用效果。

[0075] 图 14. 西妥昔单抗与吉西他滨和 PT-RAIT 组合的效果。

[0076] 图 15. 使用基于 PAM4 的免疫测定的胰腺癌鉴别诊断。红线显示根据 ROC 分析的为阳性结果所选的截止水平。

[0077] 图 16. 健康志愿者和患有各期胰腺癌的个体的患者血清中 PAM4 抗原的频率分布。

[0078] 图 17. PAM4 血清免疫测定的 ROC 曲线。

具体实施方式

[0079] 定义

[0080] 除非另外指明,“一个”或“一种”指一个(种)或多个(种)。

[0081] 如本文所用,“约”指正或负 10%。例如“约 100”将包括 90 和 110 之间的任何数。

[0082] 术语“基本上小于”指至少小于 90%、更优选 95%、更优选 98%、更优选 99%、更优选 99.9%。

[0083] 如本文所用,术语“PAM4 抗体”包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人源 PAM4 抗体。在优选的实施例中,PAM4 抗体或其抗原结合片段包括 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:6 的 CDR 序列。

[0084] 如本文所用,“PAM4 抗原”是由 PAM4 抗体结合的抗原。在优选的实施例中,用 DTT 或高碘酸盐处理 PAM4 抗原抑制或阻止 PAM4 抗体的结合。在更优选的实施例中,PAM4 抗原是由胰腺癌细胞表达的粘蛋白的表位,诸如 MUC-1 或 MUC-5。

[0085] 如本文所用,“抗胰腺癌抗体”是具有与 PAM4 抗体相同的诊断、治疗和结合特性的抗体。在优选的实施例中,“抗胰腺癌抗体”与 PAM4 抗体一样结合于相同的表位。

[0086] “非内分泌胰腺癌”通常指产生于外分泌胰腺的癌症。该术语不包括胰腺胰岛瘤并包括胰腺癌、恶性胰腺癌、腺鳞状癌、鳞状上皮细胞癌和巨大细胞癌以及诸如胰腺上皮内瘤变(PanIN)、粘液性囊性肿瘤(MCN)和胰内粘液性肿瘤(IPMN)的癌前病变,其是肿瘤但还不是恶性的。术语“胰腺癌”和“非内分泌胰腺癌”在本文中互换使用。

[0087] 如本文所述,抗体指全长的(即,天然存在的或由正常免疫球蛋白基因片段重组过程形成的)免疫球蛋白分子(即,IgG 抗体)或免疫球蛋白分子的免疫活性(即,特异性结合)部分,如抗体片段。

[0088] 抗体片段是抗体的一部分,诸如 $\text{F(ab}')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 sFv 等等。不管结构如何,抗体片段与由全长抗体识别的同一抗原结合。术语“抗体片段”还包括由抗体的可变区构成的独立片段,诸如由重链和轻链的可变区和重组单链多肽分子构成的“ Fv ”片段,其中所述重链和轻链可变区由肽连接基(“ scFv 蛋白”)连接。

[0089] 裸抗体是不与治疗或诊断剂共轭的抗体或其片段。通常来讲,抗体分子的 Fc 部分提供效应器功能,诸如补体介导性细胞毒性(CDC)和 ADCC(抗体依赖性细胞毒性),这将运用机理从而使得细胞溶解。然而,可能不要求使用诸如信号诱导细胞凋亡的其它机理使 Fc

部分发挥治疗功能。裸抗体包括多克隆和单克隆抗体以及融合蛋白和某些重组抗体,诸如嵌合抗体、人源化抗体或人源抗体。

[0090] 嵌合抗体是含有可变域的重组蛋白,可变域包括衍生自一个物种的抗体(优选啮齿类动物抗体)的互补决定区(CDR),而抗体分子的恒定域衍生自人源抗体的恒定域。对于兽医应用,嵌合抗体的恒定域可衍生自诸如猫或狗之类的其它物种的恒定域。

[0091] 人源化抗体是重组蛋白,其中将一个物种的抗体(例如啮齿类动物抗体)的CDR从啮齿类动物抗体的可变重链和轻链转变为人源重链和轻链可变域(例如骨架区序列)。抗体分子的恒定域衍生自人源抗体的恒定域。在某些实施例中,母体(啮齿类动物)抗体的有限数量的骨架区氨基酸残基可被取代进入人源抗体骨架区序列。

[0092] 人源抗体是例如衍生自转基因小鼠的抗体,该转基因小鼠已被“基因改造”以响应于抗原刺激而产生特异性人源抗体。在这种技术中,将人源重链和轻链基因座元件引入衍生自胚胎干细胞系的小鼠细胞株中,该胚胎干细胞系包含内源性鼠源重链和轻链基因座的定向破坏。转基因小鼠可合成对特定抗原特异的人源抗体,并且小鼠可用来产生分泌人源抗体的杂交瘤细胞。Green等, *Nature Genet.* 7:13(1994)、Lonberg等, *Nature* 368:856(1994)和Taylor等, *Int. Immun.* 6:579(1994)描述了从转基因小鼠获得人源抗体的方法。还可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建全人源抗体,所有这些方法在本领域中都是已知的。参见例如McCafferty等, *Nature* 348:552-553(1990),由未免疫供体的免疫球蛋白可变域基因谱型体外产生人源抗体或其片段。在本技术中,将抗体可变域基因在框内克隆到丝状噬菌体的主或次外壳蛋白基因上,并以功能性抗体片段展示在噬菌体粒子的表面。由于丝状粒子含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,基于抗体的功能性特性的选择也导致编码表现那些特性的抗体的基因的选择。这样,噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行,供参考,可以参见例如Johnson和Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:556-571(1993)。也可以通过体外活化B细胞而产生人源抗体。参见美国专利No. 5,567,610和No. 5,229,275,以上各专利的实例部分以引用的方式并入本文。

[0093] 治疗剂是化合物、分子或原子,其与抗体部分单独、同时或相继施用或与抗体部分(即,抗体或抗体片段或亚片段)共轭,并且该治疗剂在疾病治疗中很有用。治疗剂的实例包括抗体、抗体片段、药物、毒素、核酸酶、激素、免疫调节剂、促凋亡剂、抗血管生成剂、硼化合物、光敏剂或染料和放射性同位素。使用的治疗剂在下面进行更详细地描述。

[0094] 诊断剂是分子、原子或其它可检测部分,其可与抗体部分或靶向构建体共轭而施用,并且可通过定位包含靶抗原的细胞而用于检测或诊断疾病。有用的诊断剂包括但不限于放射性同位素、染料(诸如使用生物素-链霉亲和素复合物)、造影剂、荧光化合物或分子以及用于磁共振成像(MRI)或正电子发射断层扫描(PET)的增强剂(例如,顺磁性离子)。优选地,诊断剂选自放射性同位素、用在磁共振成像中的增强剂和荧光化合物。为了用放射性金属或顺磁性离子负荷抗体组分,有必要使抗体组分和具有长尾的试剂反应,该长尾附着有多个用于结合离子的螯合基团。这样的尾可以是诸如聚赖氨酸、多聚糖或其它具有侧基的衍生的或可衍生的链的聚合物,该侧基可结合螯合基团,诸如例如乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、DOTA、NOTA、NETA、卟啉、聚胺、冠状醚、双缩氨硫脲、聚脒以及已知可用于此目的的有用的类似基团。使用标准的化学方法将螯合物连接到抗体

上。螯合物通常通过基团连接于抗体,从而以最低的免疫活性损失和最小的凝集和 / 或内部交联与分子形成键。其它更独特的用于将螯合物与抗体共轭的方法和试剂公开在美国专利 No. 4, 824, 659 中,该专利的实例部分以引用的方式并入本文。尤其有用的金属 - 螯合物组合包括 2- 苄基 -DTPA 及其一甲基和环己基类似物,它们在通常能量范围为 60keV 至 4000keV 内与诸如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{18}F 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 和 ^{76}Br 的诊断同位素一起使用以用于放射成像。当与诸如锰、铁和钆的非放射性金属络合时,相同的螯合物当与本发明的抗体一同使用时对 MRI 有用。诸如 NOTA(1,4,7- 三氮杂环壬烷 -N, N', N'' - 三醋酸)、DOTA(1,4,7,10- 四氮杂环十二烷四醋酸)和 TETA(p- 溴乙酰氨基 - 苄基 - 四乙胺四醋酸)的巨环螯合物与多种金属和放射金属一起使用,更特别是分别与镓、铟和铜之类的放射性核素一起使用。可以通过对受关注的金属调整环的大小而使这些金属 - 螯合物络合物很稳定。本发明包括诸如巨环聚醚的其它环形螯合物,此类环形螯合物因稳定结合诸如 ^{223}Ra 的核素以用于放射免疫治疗 (RAIT) 而受到关注。最近,在 PET 成像中使用的 ^{18}F 原子实质上标记任何分子的一般实用的技术已在美国专利申请序列号 12/112, 289 (现在发布的美国专利 No. 7, 563, 433) 中有所描述,该专利的实例部分以引用的方式并入本文。

[0095] 免疫共轭物是与至少一种治疗和 / 或诊断剂共轭的抗体、抗体片段或融合蛋白。诊断剂可包括放射性核素或非放射性核素、造影剂 (诸如用于磁共振成像、计算机断层扫描或超声),并且放射性核素可以是 γ -、 β -、 α -、俄歇电子或正电子放射同位素。治疗剂可以是用于治疗诸如癌症的病情的任何制剂,在下面进行更详细地描述。

[0096] 表达载体是包括在宿主细胞中所表达的基因的 DNA 分子。通常,基因表达在某些调控元件的控制下进行,调控元件包括组成型或诱导型启动子、组织特异性调控元件和增强子。据说这样的基因“可操作地连接到”调控元件。

[0097] 重组宿主可以是任何含有克隆载体或表达载体的原核细胞或真核细胞。该术语还包括那些经基因工程改造以在宿主细胞染色体或基因组中含有一个或多个克隆基因的原核或真核细胞以及转基因动物。合适的哺乳动物宿主细胞包括诸如 SP2/0 细胞和 NS0 细胞的骨髓瘤细胞、以及中国地鼠卵巢 (CHO) 细胞、杂交瘤细胞株和其它可用于表达抗体的哺乳动物宿主细胞。如在 2005 年 7 月 25 日提交的 11/187, 863 (现在发布的美国专利 No. 7, 531, 327)、2006 年 7 月 14 日提交的 11/487, 215 (现在发布的美国专利 No. 7, 537, 930) 以及 2007 年 10 月 24 日提交的 11/877, 728 中所描述,对表达 mAb 和其它融合蛋白也特别有用的是 Sp2/0 细胞,该 Sp2/0 细胞用诸如 Bcl-EEE 基因的凋亡抑制剂转染,而且适合在无血清条件下生长并进一步转染,以上各专利的实例部分以引用的方式并入本文。

[0098] 如本文所用,术语抗体融合蛋白是重组产生的抗原结合分子,其中两个或更多个具有相同或不同特异性的相同或不同的天然抗体、单链抗体或抗体片段连接。融合蛋白的化合价表示融合蛋白具有的与抗原或表位结合的结合臂或位点的全部数量,即,单价的、二价的、三价的或多价的。抗体融合蛋白的多价指可在结合抗原中充分利用多种 相互作用,并因此增强结合至抗原的亲合力。特异性表示多少个抗原或表位可与抗体融合蛋白结合,即,单特异性的、双特异性的、三特异性的、多特异性的。利用这些定义,天然抗体例如 IgG 是二价的,原因是其有两个结合臂,但其是单特异性的,原因是其为一个抗原结合。单特异性的多价融合蛋白具有不止一个表位结合位点,但是仅与同一抗原上的相同或不同的表位

结合,例如具有两个结合位点的双链抗体与同一抗原发生反应。融合蛋白可包括不同抗体组分的多价或多特异性组合或相同抗体组分的多个拷贝。融合蛋白可另外包括治疗剂。适用于此类融合蛋白的治疗剂的例子包括免疫调节剂(“抗体-免疫调节剂融合蛋白”)和毒素(“抗体-毒素融合蛋白”)。一种优选的毒素包括核糖核酸酶(RNA 酶),优选重组 RNA 酶。

[0099] 多特异性抗体是可以同时与至少两个具有不同结构的靶结合的抗体,该不同的结构例如,两个不同的抗原、同一抗原上两个不同的表位、或半抗原和 / 或抗原或表位。多特异性的多价抗体是具有不止一个结合位点的构建体,并且该结合位点具有不同的特异性。

[0100] 双特异性抗体是可以同时与两个不同的靶结合的抗体。双特异性抗体(bsAb)和双特异性抗体片段(bsFab)可具有至少一个特异性地结合至例如与肿瘤相关的抗原的臂,以及至少一个特异性地结合至携带治疗或诊断剂的靶向共轭物的其它臂。采用分子工程可产生多种双特异性融合蛋白。

[0101] PAM4 抗体

[0102] 本发明的各个实施例涉及以高选择性与胰腺癌反应的抗体,这与正常或良性的胰腺组织相反。抗胰腺癌抗体或其片段优选由人胰腺肿瘤的粗粘蛋白制剂进行培养而得,尽管也可使用部分纯化或均匀纯化的粘蛋白。这种抗体的非限制性实例是 PAM4 抗体。

[0103] 通过采用衍生自异种移植植物 RIP-1 人胰腺癌作为免疫原而研发了鼠源 PAM4(mPAM4)抗体(Gold 等,Int. J. Cancer, 57 :204-210, 1994)。如下所述,抗体交叉反应和免疫组织化学染色研究表明 PAM4 抗体识别靶胰腺癌抗原上的唯一和新型表位。如在实例 2 中描述的那些免疫组织化学染色研究显示:PAM4 Mab 与由乳腺、胰腺和其它癌细胞所表达的抗原结合,而与正常人组织的结合有限,然而,最高的表达通常由胰腺癌细胞实现。因此, PAM4 抗体对胰腺癌具有相对的特异性,并优选结合胰腺癌细胞。PAM4 抗体与可内在化的靶表位反应。该表位主要通过胰腺癌相关的抗原而不是与局灶性胰腺炎或正常胰腺组织相关的抗原而表达。通过用 DTT 或高碘酸盐处理抗原可抑制 PAM4 抗体与 PAM4 表位的结合。在动物模型中使用放射性标记 PAM4MAb 的定位和治疗研究显示肿瘤靶向和治疗功效。

[0104] PAM4 抗体与 PAM4 抗原结合,这通过许多器官和肿瘤型表达,但是优选表达在胰腺癌细胞中。诸如实例 3 中用 PAM4MAb 的研究表明该抗体表现几种重要的特性,从而使得该抗体成为临床诊断和治疗应用的良好候选物。PAM4 抗原对胰腺癌和其它癌症的诊断和治疗提供有用的靶。PAM4 抗体明显地识别胰腺癌抗原的表位,而该胰腺癌抗原表位与被非 PAM4 抗胰腺癌抗体(CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、CEACAM5、B72.3、抗-Le^a和其它抗-Lewis 抗原)识别的表位不同。

[0105] 适合与 PAM4 抗体结合或共同使用的抗体包括,例如,抗体 CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、抗-CEA、抗-CEACAM6、抗-Le^a、抗-HLA-DR、抗-CD40、抗-CD74、抗-CD138、以及由 Lewis 抗原 Le(y)定义的抗体、或结肠特异性抗原 -p(CSAp)的抗体、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、EGP-1、EGP-2、HER2/neu、EGFR、血管生成因子(例如, VEGF 和 PlGF)、胰岛素类生长因子(ILGF)、腱生蛋白、血小板源生长因子和 IL-6、以及致癌基因的产物(bcl-2、Kras、p53)、cMET、和诸如 Epstein 等发明的专利(美国专利 No. 6,071,491、No. 6,017,514、No. 5,019,368 和 No. 5,882,626)中描述的肿瘤坏死物质的

抗体。这类抗体对补充 PAM4 抗体免疫检测和免疫治疗方法会非常有用。当在 PAM4 抗体的施用之前、一起或之后施用,这些和其它治疗剂可以与诸如 PAM4 抗体的抗胰腺癌抗体协同起作用。

[0106] 在治疗应用中,单独结合 PAM4 抗体或结合其它与肿瘤相关的抗体(一个例子是 CD40 的抗体)的抗体也非常有用,所述抗体对与对肿瘤细胞的效应器细胞功能有关的免疫调节剂有竞争性或颉抗性。Todryk 等, *J. Immunol Methods*, 248 :139-147 (2001) ;Turner 等, *J. Immunol*, 166 :89-94 (2001))。抗致癌基因的标记物或产物(例如 bcl-2、Kras、p53、cMET)的抗体,或抗血管生成因子的抗体,诸如 VEGFR 和胎盘类生长因子(P1GF)也很有用。

[0107] 与不同的 PAM4 抗原的表位结合的另一种 PAM4 样抗体的可获得性对双决定簇酶联免疫吸附试验(ELISA)是重要的,其用于检测临床样本中的 PAM4 抗原。在实例 1 和 5 中描述了 ELISA 试验。

[0108] 描述于本文的鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源 PAM4 抗体及其片段对用于诊断和/或治疗方法的抗胰腺癌抗体是示例性的。下面的实例公开了人源化 PMA4 抗体的构造和使用的优选实施例。由于非人源单克隆抗体可被人类宿主识别为外源蛋白质,并且重复注射会导致有害的超敏反应,因此鼠源抗体序列的人源化可以减少患者可能经受的不利的免疫反应。对于鼠基单克隆抗体,这通常被称为人抗鼠抗体(HAMA)反应。优选地,人源化抗胰腺癌抗体或其片段的骨架区有些人残基被与其相对应的鼠残基取代。也优选的是两种不同的人源抗体的骨架序列的组合用于 VH。抗体分子的恒定域衍生自人源抗体的那些。

[0109] 另一个优选的实施例是诸如人源 PAM4 抗体的人源抗胰腺癌抗体。人源抗体是例如衍生自转基因小鼠的抗体,该转基因小鼠已被“基因改造”以响应于抗原刺激而产生特异性人源抗体。在这种技术中,将人源重链和轻链基因座元件引入衍生自胚胎干细胞系的小鼠细胞株中,该胚胎干细胞系包含内源性重链和轻链基因座的定向破坏。转基因小鼠可合成对人源抗原特异的人源抗体,并且小鼠可用来产生分泌人源抗体的杂交瘤细胞。Green 等, *Nature Genet.* 7 :13 (1994), Lonberg 等, *Nature* 368 :856 (1994) 和 Taylor 等, *Int. Immun.* 6 :579 (1994) 描述了从转基因小鼠获得人源抗体的方法。

[0110] 还可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体显示技术来构建全人源抗体,所有这些技术在本领域中都是已知的。参见例如 McCafferty 等, *Nature* 348 :552-553 (1990) 由未免疫供体的免疫球蛋白可变域基因谱型体外产生人源抗体或其片段。在该技术中,将抗体可变域基因在框内克隆到丝状噬菌体的主或次外壳蛋白基因上,并以功能性抗体片段展示在噬菌体粒子的表面。由于丝状粒子含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,基于抗体的功能性特性的选择也导致编码表现那些特性的抗体的基因的选择。这样,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行,供参考,可以参见例如 Johnson 和 Chiswell, *Current Opiniiion in Structural Biology* 3 :5564-571 (1993)。

[0111] 抗体制备

[0112] 特异性抗原的单克隆抗体可以通过本领域的技术人员已知的方法获得。参见例如 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256 :495 (1975) 及 Coligan 等(编著), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, 第一卷,第 2.5.1-2.6.7 页 (John Wiley & Sons 1991) (下文称“Coligan”)。简言之,通过给小鼠注射含有诸如 PAM4 抗原的胰腺癌的粘蛋白的组合

物、除去血清样本验证抗体产生的存在与否、除去脾以获得 B 淋巴细胞、使 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞、克隆杂交瘤细胞、挑选产生 PAM4 抗原的抗体的阳性克隆、培养产生 PAM4 抗原的抗体的克隆、并从杂交瘤细胞培养物中分离抗胰腺癌抗体,从而可获得抗胰腺癌 MAb。

[0113] 初步培养免疫原的抗体之后,抗体可被定序并随后可通过重组技术制备以产生嵌合或人源化抗体。鼠源抗体和抗体片段的嵌合是本领域技术人员所已知的。衍生自嵌合的单克隆抗体的抗体组分的使用减少了与鼠恒定区的免疫原性相关的潜在问题。

[0114] 用于克隆鼠免疫球蛋白可变域的常用技术描述在例如出版物 Orlandi 等, Proc Natl Acad Sci USA 86:3833(1989) 中,该出版物以引用的方式并入本文。一般而言,鼠源抗体的 V_k (可变轻链) 和 V_H (可变重链) 序列可以通过多种诸如 RT-PCR、5' -RACE 和 cDNA 库筛选的分子克隆程序获得。特别地,通过 RT-PCR 从杂交瘤细胞由 PCR 扩增克隆鼠源 PAM4MAb 的 V_H 和 V_k 序列,并且它们的序列通过 DNA 定序而确定。如 Orlandi 等, (Proc Natl Acad Sci, USA, 86:3833, 1989) 所述,为确定它们的真实性,克隆的 V_H 和 V_k 基因可在细胞培养物中表达为嵌合 Ab, 如 Orlandi 等 (Proc Natl Acad Sci, USA, 86:3833, 1989) 所描述。

[0115] 在优选的实施例中,嵌合 PAM4 抗体或抗体片段包括鼠源 PAM4MAb 的互补决定区 (CDR) 和骨架区 (FR) 以及人源抗体的轻链和重链恒定区,其中嵌合 PAM4 的轻链可变区的 CDR 包括具有氨基酸序列 SASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:1) 的 CDR1、具有氨基酸序列 STSNLAS (SEQ ID NO:2) 的 CDR2 和具有氨基酸序列 HQWNRYPYT (SEQ ID NO:3) 的 CDR3; 而嵌合 PAM4MAb 的重链可变区的 CDR 包括具有氨基酸序列 SYVLH (SEQ ID NO:4) 的 CDR1、具有氨基酸序列 YINPYNDGTQYNEKFKG (SEQ ID NO:5) 的 CDR2 和具有氨基酸序列 GFSGSYGFAY (SEQ ID NO:6) 的 CDR3。衍生自嵌合单克隆抗体的抗体组分的使用减少与鼠恒定区的免疫原性相关的潜在问题。

[0116] 鼠源抗体和抗体片段的人源化对本领域的技术人员来说也是已知的。制备人源化 MAb 的技术公开在,例如 Carter 等, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285(1992)、Singer 等, J. Immunol. 150:2844(1992)、Mountain 等, Biotechnol Bioeng Rev. 10:1(1992) 以及 Coligan 第 10.19.1-10.19.11 页,以上各文献以引用的方式并入本文。例如,可通过将鼠免疫球蛋白的可变重链和可变轻链的鼠互补决定区转移到人可变域,然后以相对应的鼠残基取代骨架区内人残基从而制备人源化单克隆抗体。除了人恒定区序列,人骨架区序列的使用进一步减少诱导 HAMA 反应的机会。

[0117] 根据如上所述得到的 PAM4 可变区序列,如 Leung 等 (Mol Immunol. 32:1413(1995)) 所述可以设计并构建人源化 PAM4 抗体,该文献以引用的方式并入本文。实例 1 描述了用来构建 hPAM4MAb 的人源化过程。

[0118] 用于制备 hPAM4 抗体的引物的核苷酸序列在下面的实例 1 中进行讨论。在优选的实施例中,人源化 PAM4 抗体或抗体片段包括上面公开的轻链和重链 CDR 序列 (SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:6)。还优选的是,人源化抗体的轻链和重链可变区的 FR 包括至少一个由鼠源 PAM4MAb 所述对应的 FR 取代氨基酸。

[0119] 例如人源 PAM4 的全人源抗体可以从转基因非人类的动物而获得。参见例如 Mendez 等, Nature Genetics, 15:146-156(1997)、美国专利 No. 5,633,425。例如,可从具

有人免疫球蛋白基因座的转基因鼠中回收人源抗体。通过失活内源免疫球蛋白基因并引入人免疫球蛋白基因座而人源化鼠体液免疫系统。人免疫球蛋白基因座极其复杂并包括大量不连续片段,该大量不连续片段一起几乎占到人基因组的 0.2%。为确保转基因小鼠可以产生足量的抗体谱,必须将人重链和轻链基因座的大部分引入鼠基因组。该过程逐步完成,其以含有生殖细胞系结构中人重链或轻链免疫球蛋白基因座的酵母人工染色体(YAC)的形成开始。由于每个插入物的大小约为 1Mb,因此 YAC 构建需要免疫球蛋白基因座的重叠片段的同源重组。将一个含有重链基因座和一个含有轻链基因座的两个 YAC 通过含 YAC 酵母球芽与鼠胚胎干细胞的融合而分别引入小鼠。然后将胚胎干细胞克隆显微注射入鼠胚胎。对所得的嵌合雄鼠筛选其通过生殖细胞系传递 YAC 的能力

[0120] 因具有通过它们的生殖细胞系传递 YAC 的能力而筛选所得的嵌合雄鼠,并用在鼠源抗体制备中有缺陷的小鼠进行繁殖。繁殖两种转基因菌株,一种包含人重链基因座而另一种包含人轻链基因座,从而产生响应于免疫的人源抗体的后代。

[0121] 使用本领域中已知的方法可以通过细胞培养技术制备抗体。在一个实例中,转染瘤培养物用于无血清培养基。对于人源化抗体的制备而言,使用 HSFM 在转瓶中细胞可生长为 500ml 的培养物。对培养基进行离心并通过 0.2 μ m 的膜对上清液进行过滤。过滤的培养基以 1ml/min 的流速通过蛋白质 A 柱 (1x3cm)。然后用约 10 柱体积的 PBS 洗涤树脂,并用含有 10mM 的 EDTA 的 0.1M 甘氨酸缓冲液 (pH 3.5) 从柱上洗脱蛋白质 A 结合抗体。将 1.0ml 的馏分收集在含有 10 μ l 的 3M Tris (pH 8.6) 的试管中,并且蛋白质浓度由 280/260nm 下的吸光度确定。收集峰值馏分,用 PBS 透析,例如用 Centricon 30 过滤器 (Amicon, Beverly, MA) 浓缩抗体。用 ELISA 确定抗体浓度,并且用 PBS 将其浓度调节到约 1mg/ml。方便地将 0.01% (重量/体积) 的叠氮化钠加到样本中作为防腐剂。

[0122] 抗体可通过多种已知的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化。这类分离技术包括使用蛋白 A 亲和层析法、尺寸排阻层析法和离子交换层析法。参见例如 Coligan 第 2.7.1-2.7.12 页和第 2.9.1-2.9.3 页。另外,参见 Baines 等, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 第 10 卷中的 "Purification of Immunoglobulin G(IgG)", 第 79-104 页 (The Humana Press, Inc. 1992)。

[0123] 抗胰腺癌 MAbs 可以通过多种本领域技术人员所已知的技术来表征。例如,抗体结合到 PAM4 抗原的能力可以使用间接酶免疫测定法、流式细胞分析、ELISA 或蛋白质印迹分析来验证。

[0124] 抗体片段

[0125] 抗体片段是抗体的抗原结合部分,诸如 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 $F(ab)_2$ 、 Fab 、 Fv 、 sFv 、 $scFv$ 等等。可以通过已知技术产生识别特异表位的抗体片段。例如,可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化而制备 $F(ab')_2$ 片段。这些和其它方法描述在,例如 Goldenberg 的美国专利 No. 4,036,945 和 No. 4,331,647 以及其包含的参考文献中。另外,参见 Nisonoff 等, Arch Biochem. Biophys. 89:230 (1960)、Porter, Biochem. J. 73:119 (1959)、Edelman 等,在 METHODS IN ENZYMOLOGY 第 1 卷中,第 422 页 (学术出版社,1967) 以及 Coligan 第 2.8.1-2.8.10 页和第 2.10-2.10.4 页。或者,可以构建 Fab' 表达文库 (Huse 等, 1989, Science, 246:1274-1281) 以使得快速和容易地识别具有所需特异性的单克隆 Fab' 片段。

[0126] 单链 Fv 分子 ($scFv$) 包括 VL 域和 VH 域。VL 域和 VH 域缔合以形成靶结合位点。这

两个域进一步由肽连接基 (L) 共价连接。如果 VL 域是 scFv 分子的 N 端部分, 则 scFv 分子表示为 VL-L-VH; 或如果 VH 域是 scFv 分子的 N 端部分, 则 scFv 分子则表示为 VH-L-VL。用于制备 scFv 分子和设计合适的肽连接基的方法描述在美国专利 No. 4, 704, 692、美国专利 No. 4, 946, 778、R. Raag 和 M. Whitlow, " SingleChain Fvs" .FASEB Vol 9 :73-80(1995) 以及 R. E. Bird 和 B. W. Walker, Single Chain Antibody Variable Regions, TIBTECH, Vol 9 :132-137(1991) 中。

[0127] 其它抗体片段, 例如单域抗体片段, 在本领域是已知的并且可用在所请求保护的构建体中。可采用标准免疫技术例如从骆驼、羊驼或美洲驼中获得单域抗体 (VHH)。(参见例如 Muyldermans 等, TIBS 26 : 230-235, 2001、Yau 等, J Immunol Methods 281 :161-75, 2003、Maass 等, J Immunol Methods 324 :13-25, 2007)。VHH 可具有有效的抗原结合能力并且可与对常规 VH-VL 隐蔽的新型表位相互作用 (Muyldermans 等, 2001)。羊驼血清 IgG 包含约 50% 的骆驼科重链仅有的 LgG 抗体 (HCAb) (Maass 等, 2007)。可用已知的诸如 TNF- α 的抗原免疫羊驼, 而且可分离与靶抗原结合并中和靶抗原的 VHH (Maass 等, 2007)。扩增几乎所有羊驼 VHH 编码序列的 PCR 引物已经被识别并可用来构建羊驼 VHH 噬菌体展示库, 该羊驼 VHH 噬菌体展示库可用于采用本领域所已知的标准筛选技术来分离抗体片段 (Maass 等, 2007)。

[0128] 抗体片段也可以通过全长抗体的蛋白质水解或在大肠杆菌或其它宿主中表达编码该片段的 DNA 而制备。可通过常规方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全长抗体而获得抗体片段。例如, 通过用胃蛋白酶使抗体酶裂解而制备抗体片段以得到大约 100kd 的片段, 表示为 F(ab')₂。可使用硫醇还原剂进一步裂解该片段, 并可选为由二硫键的裂解所得到的巯基基团的保护基, 以产生大约 50Kd 的 Fab' 单价片段。或者, 使用胃蛋白酶的酶裂解直接产生两个单价 Fab 片段和一个 Fc 片段。

[0129] 另一种形式的抗体片段是编码单个互补决定区 (CDR) 的肽。CDR 是抗体可变区的片段, 其在结构上与和抗体结合的表位互补并比可变区的其它部分更可变。因此, CDR 有时被称为高变区。可变区包括三个 CDR。CDR 可通过构建编码受关注抗体的 CDR 的基因而获得。制备这种基因的方式例如是使用聚合酶链反应 (PCR) 以从抗体产生细胞的 RNA 合成可变区。参见, 例如 Larrick 等, Methods :A Companion to Methods in Enzymology 2 :106(1991)、MONOCLONAL ANTIBODIES :PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter 等 (编著) 中第 166-179 页, Courtenay-Luck, " Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies, " (剑桥大学出版社, 1995)、以及 MONOCLONAL ANTIBODIES :PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch 等 (编著) 中第 137-185 页, Ward 等, " Genetic Manipulation and Expression of Antibodies, " (Wiley-Liss, Inc. 1995)。

[0130] 只要片段与由完整抗体识别的抗原结合, 也可使用其它裂解抗体的方法, 如分离重链以形成单价轻-重链片段、片段的进一步裂解或其它酶、化学或基因技术。

[0131] 抗体融合蛋白

[0132] 包括受关注抗胰腺癌抗体的融合蛋白可通过多种常规程序来制备, 从戊二醛连接到官能团之间更特异的连接。通过抗体或片段上的一个或多个官能团, 例如氨基、羧基、苯基、硫醇或羟基, 包括本文所述的融合蛋白的抗体和 / 或抗体片段彼此优选直接或通过

连接基部分相互共价结合。除戊二醛之外,可使用多种常规连接基,例如二异氰酸酯、二异硫氰酸酯 (diisothiocyanate)、二(羟基琥珀酰亚胺)酯、碳二亚胺、羟基马来酰亚胺 (maleimidehydroxy) 琥珀酰亚胺酯等等。

[0133] 制备融合蛋白的简单方法是在存在戊二醛存在时将抗体或片段混合。起始席夫碱 (Schiff base) 连接,例如可通过硼氢化物还原至仲胺而稳定。可使用二异硫氰酸酯或碳二亚胺取代戊二醛作为非位点特异性连接基。在一个实施例中,抗体融合蛋白包括抗胰腺癌 MAb 或其片段,其中 Mab 与 PAM4 抗原结合。融合蛋白和其片段优先结合胰腺癌细胞。这种单价单特异性 MAb 用于抗原的直接靶向,其中 MAb 附着于治疗剂、诊断剂或它们的组合,而且将蛋白质直接施用给患者。

[0134] 相反,融合蛋白可包括至少两个与 PAM4 抗原的不同表位结合的抗胰腺癌 MAb。例如,MAb 可产生抗原特异性双链抗体、三链抗体和四链抗体,它们是多价的但对 PAM4 抗原单特异性的。两个或多个 scFv 分子的非共价缔合可形成功能性双链抗体、三链抗体和四链抗体。单特异性抗体是同一 scFv 的同源二聚体,其中每个 scFv 包括所选抗体的 VH 域,其通过短连接基连接到同一抗体的 VL 域。双链抗体是由两个 scFv 的缔合而形成的二价二聚体,产生两个 Fv 结合位点。三链抗体由三个 scFv 形成三价三聚体而得到,产生三个结合位点;并且四链抗体是四个 scFv 的四价四聚体,产生四个结合位点。使用含有重组基因构建体(含有 VH1-连接基-VL1)的表达载体已经制备了若干单特异性双链抗体。参见 Holliger 等,Proc Natl. Acad. Sci USA 90:6444-6448(1993)、Atwell 等, Molecular Immunology 33:1301-1302(1996)、Holliger 等, Nature Biotechnology 15:632-631(1997); Helfrich 等, Int J Cancer 76:232-239(1998); Kipriyanov 等, Int J Cancer 77:763-772(1998)、Holiger 等, Cancer Research 59:2909-2916(1999)。构建 scFv 的方法描述于美国专利 No. 4,946,778(1990) 和美国专利 No. 5,132,405(1992) 中,以上各专利的实例部分以引用的方式并入本文。基于 scFv 制备多价单特异性抗体的方法公开在美国专利 No. 5,837,242(1998)、美国专利 No. 5,844,094(1998) 和 WO-98/44001(1998) 中,以上各专利的实例部分以引用的方式并入本文。多价单特异性抗体融合蛋白与可位于同一抗原或不同抗原上的两个或更多个同种类型的表位结合。增加的化合价允许其它的相互作用、增强的亲和力和更长的停留时间。这些抗体融合蛋白可用在直接靶向系统中,其中抗体融合蛋白与治疗剂、诊断剂或它们的组合共轭并直接施用给对其有需求的患者。

[0135] 优选的实施例是多价多特异性抗体或其片段,其包括一个或多个对 PAM4 靶表位有亲和力的抗原结合位点,以及一个或多个与胰腺癌相关的其它表位的其它结合位点。由于这种融合蛋白与至少两个不同的表位结合,所以其是多特异性的,上述两个不同的表位可位于相同或不同的抗原上。例如,融合蛋白可包括不止一个抗原结合位点,第一位点对 PAM4 抗原表位具有亲和力,而第二位点对诸如 TAG-72 或 CEA 的其它靶抗原具有亲和力。另一个例子是双特异性抗体融合蛋白,其可包括 CA19.9MAb(或其片段)和 PAM4MAb(或其片段)。这样的融合蛋白将对 CA19.9 以及 PAM4 抗原具有亲和力。抗体融合蛋白和其片段可用在直接靶向系统中,其中抗体融合蛋白与治疗剂、诊断剂或它们的组合共轭并直接施用给对其有需求的患者。

[0136] 另一个优选的实施例是多价多特异性抗体,其包括至少一个对 PAM4 靶表位有亲和力的结合位点和至少一个对半抗原分子有亲和力的半抗原结合位点。例如,双特异性融

合蛋白可包括 679MAb(或其片段)和 PAM4MAb(或其片段)。单克隆 679 抗体以高亲和力和与包含三肽部分组胺琥珀酰胺甘氨酸胺(histamine succinyl glycyI)(HSG)的分子结合。这样的双特异性 PAM4 抗体融合蛋白,例如,可通过从如上所述的 679 获得 $F(ab')_2$ 片段而制备。用 DTT 缓慢地还原 679 $F(ab')_2$ 片段的链间二硫键以形成 $Fab' -SH$ 片段,其中要注意避开轻-重链连接。用过量的双马来酰亚胺连接基(1,1'-(亚甲基二-4,1-亚苯基)双马来酰亚胺)激活一个或多个 SH 基团。PAM4MAb 转化为 $Fab' -SH$,然后与活化的 679 $Fab' -SH$ 片段反应以得到双特异性抗体融合蛋白。诸如这样的双特异性抗体融合蛋白可用在亲和力增强系统中,其中用融合蛋白预靶向靶抗原,随后用附着于包含一个或多个 HSG 半抗原的载体部分(靶向构建体)的诊断或治疗剂靶向。在替代的优选实施例中,可以制备诸如 TF10 的 DNL 基 hPAM4-679 构建体并按下面实例所述而使用。

[0137] 可通过多种常规方法和基因工程来制备双特异性抗体,常规方法例如全 IgG、或优选 $F(ab')_2$ 片段的混合物的二硫化物裂解和改造,融合不止一种杂交瘤细胞以形成多瘤病毒,其产生具有不止一种特异性的抗体。通过 Fab' 片段的氧化裂解已经制备了双特异性抗体融合蛋白,该 Fab' 片段得自不同抗体的还原裂解。这可以有利地进行,方式是混合两种不同的由两种不同抗体的胃蛋白酶消化而产生的 $F(ab')_2$ 片段,还原裂解以形成 Fab' 片段的混合物,然后进行二硫键的氧化改造以产生包括双特异性抗体融合蛋白的 $F(ab')_2$ 片段混合物,该双特异性抗体融合蛋白包含对每个原表位特异的 Fab' 部分。例如在 Nisonoff 等,Arch Biochem Biophys. 93:470(1961)、Hmmerling 等,J Exp Med. 128:1461(1968) 以及美国专利 No. 4,331,647 中可以找到制备抗体融合蛋白的一般技术。

[0138] 通过使用诸如羟基马来酰亚胺琥珀酰亚胺酯的异双官能连接基可得到更具选择性的连接。使酯和抗体或片段反应将在抗体或片段上衍生氨基,并且该衍生物可以随后和例如具有游离巯基基团的抗体 Fab 片段(或具有通过例如 Traut 试剂附加到其上的巯基基团的较大片段或完整抗体)反应。这样的连接基不太可能交联于同一抗体中的基团并改善连接的选择性。

[0139] 连接位于远离抗原结合位点的位点上的抗体或片段是有利的。如上所述,这可以通过例如至裂解的链间巯基基团的连接来完成。另一方法涉及使具有氧化的碳水化合物部分的抗体与具有至少一种游离胺功能的抗体反应。这产生起始席夫碱连接,其优选通过还原至仲胺,例如通过硼氢化物还原而稳定以形成最终复合物。对于小分子,这种位点特异性连接公开在美国专利 No. 4,671,958 中,而对于较大的附加物则公开在美国专利 No. 4,699,784 中,以上各专利的实例部分以引用的方式并入本文。

[0140] 具有长度大于 12 个氨基酸残基的连接基(例如 15 个或 18 个残基连接基)的 ScFv 允许在同一链上的 VH 和 VL 域之间的相互作用,并且通常形成单体、二聚体(称为双链抗体)和少量较大质量多聚体的混合物(Kortt 等,Eur J Biochem. (1994) 221:151-157)。然而,具有长度为 5 个或更少氨基酸残基的连接基的 ScFv 抑制同一链上的 VH 和 VL 域的分子内的配对,迫使与不同链上的 VH 和 VL 域的配对。3 个和 12 个残基之间的连接基主要形成二聚体(Atwell 等,ProteinEngineering(1999) 12:597-604)。通过 0 和 2 个残基之间的连接基形成三聚体的(称为三链抗体)、四聚体的(称为四链抗体)或更低聚物的结构的 scFv;然而,除连接基长度之外,低聚反应的准确模式看来还取决于组合物以及 V 域的取向。

[0141] 最近,以几乎任何所需的组合构建抗体、抗体片段和 / 或其它效应器部分的混合物的新技术已经描述于 2006 年 3 月 24 日提交的美国专利申请序列号 11/389,358(现在发布的美国专利 7,550,143)、2006 年 3 月 28 日提交的 11/391,584(现在发布的美国专利 7,521,056)、2006 年 6 月 29 日提交的 11/478,021(现在发布的 7,534,866)、2006 年 12 月 5 日提交的 11/633,729(现在发布的美国专利 7,527,787)、以及 2007 年 10 月 26 日提交的 11/925,408,以上各专利的实例部分以引用的方式并入本文。一般被称为对接和锁定的技术涉及融合蛋白的制备,该融合蛋白在它们的 N 端或 C 端具有两个互补肽序列中的一个,被称为二聚和停靠域 (DDD) 和锚定域 (AD) 序列。在优选的实施例中,DDD 序列衍生自 cAMP 依赖的蛋白激酶的调节亚基,而 AD 序列衍生自 A 型激酶锚定蛋白 (AKAP) 的序列。DDD 序列形成与 AD 序列结合的二聚体,这使得形成三聚体、四聚体、六聚体或多种其它复合物中的任一种。通过将诸如抗体或抗体片段的效应器部分附着于 DDD 和 AD 序列,复合物可由抗体或抗体片段的任何所选组合而形成。通过形成二硫键和其它连接可使 DNL 复合物共价稳定。

[0142] 可使用包括任何已知的抗 TAA 抗体的抗原结合可变区序列的双特异性抗体,包括但不限于 hPAM4(美国专利 No. 7,282,567)、hA20(美国专利 No. 7,251,164)、hA19(美国专利 No. 7,109,304)、hIMMU31(美国专利 No. 7,300,655)、hLL1(美国专利 No. 7,312,318)、hLL2(美国专利 No. 7,074,403)、hMu-9(美国专利 No. 7,387,773)、hL243(美国专利申请 No. 11/368,296)、hMN-14(美国专利 No. 6,676,924)、hRS7(美国专利 No. 7,238,785)、hMN-3(美国专利申请序列号 10/672,278) 和 hR1(2009 年 1 月 20 日提交的美国临时专利申请序列号 61/145,896),以上所引用各专利或申请的实例部分以引用的方式并入本文。

[0143] 所使用的其它抗体可从很多已知的来源商购获得。例如,多种抗体分泌杂交瘤细胞株可得自 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)。许多抗各种疾病靶的抗体,包括但不限于与肿瘤相关的抗原,所述抗原已存放于 ATCC 和 / 或已经公布了可变区序列并且在所要求保护的方法和组合物中可用。参见,例如,美国专利 No. 7,312,318、7,282,567、7,151,164、7,074,403、7,060,802、7,056,509、7,049,060、7,045,132、7,041,803、7,041,802、7,041,293、7,038,018、7,037,498、7,012,133、7,001,598、6,998,468、6,994,976、6,994,852、6,989,241、6,974,863、6,965,018、6,964,854、6,962,981、6,962,813、6,956,107、6,951,924、6,949,244、6,946,129、6,943,020、6,939,547、6,921,645、6,921,645、6,921,533、6,919,433、6,919,078、6,916,475、6,905,681、6,899,879、6,893,625、6,887,468、6,887,466、6,884,594、6,881,405、6,878,812、6,875,580、6,872,568、6,867,006、6,864,062、6,861,511、6,861,227、6,861,226、6,838,282、6,835,549、6,835,370、6,824,780、6,824,778、6,812,206、6,793,924、6,783,758、6,770,450、6,767,711、6,764,688、6,764,681、6,764,679、6,743,898、6,733,981、6,730,307、6,720,15、6,716,966、6,709,653、6,693,176、6,692,908、6,689,607、6,689,362、6,689,355、6,682,737、6,682,736、6,682,734、6,673,344、6,653,104、6,652,852、6,635,482、6,630,144、6,610,833、6,610,294、6,605,441、6,605,279、6,596,852、6,592,868、6,576,745、6,572,856、6,566,076、6,562,618、6,545,130、6,544,749、6,534,058、6,528,625、6,528,269、6,521,227、6,518,404、6,511,665、6,491,915、6,488,930、6,482,598、6,482,408、6,479,247、6,468,531、6,468,529、6,465,173、6,461,823、6,458,356、6,455,044、6,455,040、

6, 451, 310、6, 444, 206、6, 441, 143、6, 432, 404、6, 432, 402、6, 419, 928、6, 413, 726、6, 406, 694、6, 403, 770、6, 403, 091、6, 395, 276、6, 395, 274、6, 387, 350、6, 383, 759、6, 383, 484、6, 376, 654、6, 372, 215、6, 359, 126、6, 355, 481、6, 355, 444、6, 355, 245、6, 355, 244、6, 346, 246、6, 344, 198、6, 340, 571、6, 340, 459、6, 331, 175、6, 306, 393、6, 254, 868、6, 187, 287、6, 183, 744、6, 129, 914、6, 120, 767、6, 096, 289、6, 077, 499、5, 922, 302、5, 874, 540、5, 814, 440、5, 798, 229、5, 789, 554、5, 776, 456、5, 736, 119、5, 716, 595、5, 677, 136、5, 587, 459、5, 443, 953、5, 525, 338, 以上各专利的实例部分以引用的方式并入本文。这些仅仅是示例性的并且许多其它抗体及其杂交瘤细胞在本领域中是已知的。技术人员将认识到可通过对 ATCC、NCBI 和 / 或 USPTO 数据库简单的检索而获得几乎抗任何疾病相关抗原的抗体序列或抗体分泌杂交瘤细胞, 上述数据库含有抗所选受关注的与疾病相关靶的抗体。使用本领域已知的标准技术, 可将克隆抗体的抗原结合域扩增、切除或结扎到表达载体中、转染到适合的宿主细胞中并用于产生蛋白质。

[0144] 预靶向

[0145] 双特异性或多特异性抗体可用在预靶向技术中。预靶向是多步过程, 起初其是研发用以解决直接靶向抗体的血液缓慢清除, 其对诸如骨髓的正常组织具有不良毒性。使用预靶向将放射性核素或其它治疗剂附着于可在数分钟内从血液清除的小递送分子(靶向构建体或靶向共轭物)。首先施用对靶向构建体以及靶抗原具有的结合位点的预靶向双特异性或多特异性抗体, 使游离的抗体从循环中清除, 然后施用靶向构建体。

[0146] 预靶向方法在本领域是已知的, 例如公开在 Goodwin 等, 美国专利 No. 4, 863, 713、Goodwin 等, J. Nucl. Med. 29 :226, 1988、Hnatowich 等, J. Nucl. Med. 28 :1294, 1987、Oehr 等, J. Nucl. Med. 29 :728, 1988、Klibanov 等, J. Nucl. Med. 29 :1951, 1988、Sinitzyn 等, J. Nucl. Med. 30 :66, 1989、Kalofonos 等, J. Nucl. Med. 31 :1791, 1990、Schechter 等, Int. J. Cancer 48 :167, 1991、Paganelli 等, Cancer Res. 51 :5960, 1991、Paganelli 等, Nucl. Med. Commun. 12 :211, 1991、美国专利 No. 5, 256, 395、Stickney 等, Cancer Res. 51 :6650, 1991、Yuan 等, Cancer Res. 51 :3119, 1991、美国专利 No. 6, 077, 499、美国专利序列号 09/597, 580、美国专利序列号 10/361, 026、美国专利序列号 09/337, 756、美国专利序列号 09/823, 746、美国专利序列号 10/116, 116、美国专利序列号 09/382, 186、美国专利序列号 10/150, 654、美国专利 No. 6, 090, 381、U. S. Pat. No. 6, 472, 511、美国专利序列号 10/114, 315、美国临时专利申请 No. 60/386, 411、美国临时专利申请 No. 60/345, 641、美国临时专利申请 No. 60/3328, 835、美国临时专利申请 No. 60/426, 379、美国专利序列号 09/823, 746、美国专利序列号 09/337, 756、美国临时专利申请 No. 60/342, 103 和美国专利 No. 6, 962, 702 中。

[0147] 可提供治疗或诊断受试者疾病或紊乱的预靶向方法, 方式为:(1) 向受试者施用双特异性抗体或抗原结合抗体片段;(2) 可选地向受试者施用清除组合物, 并且使组合物从循环中清除抗体;以及(3) 向受试者施用包含一种或多种螯合或化合治疗剂或诊断剂的靶向构建体。该技术也可用于抗体依赖性酶前体药物疗法(ADEPT), 方式是施用与靶向构建体共轭的酶, 然后施用通过酶转化为活性形式的前体药物。

[0148] 表达载体和宿主细胞

[0149] 表达载体是包括在宿主细胞中所表达的基因的 DNA 分子。通常, 基因表达在某些

调控元件的控制下进行,调控元件包括组成型或诱导型启动子、组织特异性调控元件和增强子。据说这样的基因“可操作地连接到”调控元件。启动子是指指导结构基因转录的 DNA 序列。结构基因是被转录为信使 RNA (mRNA) 的 DNA 序列,然后信使 RNA 被翻译为肽或蛋白质。如果启动子是可诱导型启动子,那么响应于诱导剂转录的速率增加。相反,如果启动子是组成型启动子,那么转录的速率不受诱导剂的调控。增强子是不管其相对于转录起始位点的距离或取向而可增加转录效率的 DNA 调控元件。

[0150] 单独的 DNA 分子是没有并入细胞或有机体的染色体 DNA 的 DNA 片段。在优选的实施例中,待表达的 DNA 序列将被包装进表达载体并转染到宿主细胞,在宿主细胞中其优选地并入宿主细胞染色体 DNA。例如通过化学合成较短的寡核苷酸并装配成蛋白质编码序列而构建任何所选序列的核酸的方法在本领域是已知的。作为另外一种选择,可以使用限制性核酸内切酶切割受关注的 DNA 序列并拼接在一起以制备所选的蛋白质编码序列。在所编码的蛋白序列中产生特定变化的其它技术(诸如定点诱变)也是已知的。

[0151] 克隆载体是 DNA 分子,诸如质粒、粘粒或噬菌体,其具有在宿主细胞中自主复制的能力。克隆载体通常包含一个或少数限制性核酸内切酶识别位点以及标记物基因,其中在所述限制性核酸内切酶位点上外源 DNA 序列可以可测的方式插入而没有损失载体的基本生物功能,所述标记物基因适用于用克隆载体转化的细胞的识别和选择。标记物基因通常包括对四环素、氨苄青霉素、卡那霉素或其它抗生素有耐药性的基因。重组宿主可以是包含克隆载体或表达载体的任何原核或真核细胞。这个术语还包括那些已经被基因工程改造的原核或真核细胞以在宿主细胞的染色体或基因组中包含一个或多个克隆基因。

[0152] 合适的宿主细胞包括微生物或哺乳动物宿主细胞。优选的宿主是人细胞系 PER.C6,其研发用于产生 MAbs 和其它融合蛋白。因此,优选的实施例是包括 DNA 序列的宿主细胞,该 DNA 序列编码抗胰腺癌 MAbs、共轭物、融合蛋白或其片段。使用包含 Ad 血清型 5 (Ad5) E1A- 和 E1B- 编码序列 (Ad5 核苷酸 459-3510) 的质粒转染原发人胚胎视网膜细胞,并在人磷酸甘油酸激酶 (PGK) 启动子的控制下产生 PER.C6 细胞 (WO 97/00326)。

[0153] 可使用其它哺乳动物宿主细胞,包括诸如 SP2/0 细胞和 NS0 细胞的骨髓瘤细胞、以及中国地鼠卵巢 (CHO) 细胞、杂交瘤细胞株和其它可用于表达抗体的哺乳动物宿主细胞。如在 2005 年 7 月 25 日提交的美国专利申请序列号 11/187,863 (现在发布的美国专利 No. 7,531,327)、2006 年 7 月 14 日提交的 11/487,215 (现在发布的美国专利 No. 7,537,930) 和 2007 年 10 月 24 日提交的 11/877,728 中所描述,对表达 mAb 和其它融合蛋白也特别有用的是 Sp2/0 细胞,该 Sp2/0 细胞用诸如 Bcl-EEE 基因的凋亡抑制剂转染,且适合在无血清条件下生长并进一步转染。以上各专利的实例部分以引用的方式并入本文。在某些情况下,可通过将宿主细胞暴露于适当浓度的甲氨蝶呤而扩增凋亡抑制剂和 / 或待表达的结构基因。已经报道转染有 Bcl-EEE 并适应在无血清培养基中生长的 Sp2/0 细胞在培养物中表现延长的寿命、较高的细胞密度和显著高的蛋白质产生速率 (美国专利 No. 7,531,327、美国专利 No. 7,537,930、2007 年 10 月 24 日提交的美国专利序列号 11/877,728)。

[0154] 用于治疗 and 诊断的抗体

[0155] 某些实施例涉及诊断或治疗受试者恶性肿瘤的方法,包括向受试者施用抗胰腺癌 MAbs、融合蛋白或其片段,其中 MAbs、融合蛋白或片段与至少一种诊断和 / 或治疗剂结合。还优选的是诊断或治疗癌症的方法,包括向受试者施用多价多特异性抗体或其片段,其包括

一个或多个对 PAM4 抗原的抗原结合位点和一个或多个半抗原结合位点,等待足够量的时间使未结合的抗体从受试者血流中清除;然后向受试者施用包括诊断剂、治疗剂或它们的组合的载体分子,其与所局部抗体的半抗原结合位点结合。在更优选的实施例中,癌症是非内分泌胰腺癌。

[0156] 已知 MAb 用于体外诊断。参见,例如 Carlsson 等, *Bio/Technology* 7(6): 567(1989)。例如,可用 MAb 从活检样本中检测组织中与肿瘤相关抗原的存在有否。通过使用诸如放射免疫测定法、酶联免疫吸附试验和荧光免疫测定法的技术,MAb 也可用于测量临床液体样本中与肿瘤相关的抗原的量。

[0157] 可使用肿瘤靶向 MAb 和毒素的共轭物在体内选择性地杀死癌细胞 (Spalding, *Bio/Technology* 9(8):701(1991)、Goldenberg, *Scientific American Science & Medicine* 1(1):64(1994))。例如,在实验动物模型中的治疗研究已经证明了携带细胞毒素放射性核素的抗体的抗肿瘤活性。(Goldenberg 等, *Cancer Res.* 41:4354(1981)、Cheung 等, *J. Nat'l Cancer Inst.* 77:739(1986) 和 Senekowitsch 等, *J. Nucl. Med.* 30:531(1989))。在优选的实施例中,共轭物包括 ^{90}Y 标记的 hPAM4 抗体。该共轭物可任选地与一种或多种其它治疗剂结合施用。在优选的实施例中,将 ^{90}Y 标记的 hPAM4 和吉西他滨或 5-氟二氧嘧啶一起施用给患有胰腺癌的患者。在另一个优选的实施例中, ^{90}Y 与 DOTA 螯合物共轭从而用于附着于 hPAM4。在又一个优选的实施例中, ^{90}Y -DOTA-hPAM4 与包括治疗周期的吉西他滨以分次剂量结合,诸如用多次量、更少和较小毒性的剂量的吉西他滨与更少和分次剂量的 ^{90}Y -DOTA-hPAM4 结合。

[0158] 根据耐药性,示出了这种分次剂量疗程的重复循环。以示例的方式,4 周剂量 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 的吉西他滨和 3 周剂量 $8\text{mg}/\text{m}^2$ 的 ^{90}Y -DOTA-hPAM4 结合,后者在吉西他滨施用的第二周开始,这构成一个治疗周期。由于两种制剂的骨髓抑制效应可以累积,各组分的更高或更低的其它剂量可构成分次剂量,其由评估造血毒性的常规方法确定。基于多种因素,包括之前暴露于骨髓抑制治疗剂,在这种治疗干预中熟练的医师会根据患者的骨髓状态和一般健康状态对这些剂量进行调整。这些原则也可以应用于放射性标记的 hPAM4 和其它治疗剂的组合,其它治疗剂包括诸如 5-氟二氧嘧啶和顺铂的放射增敏药物。

[0159] 嵌合、人源化和人源抗体及其片段已经用于体内治疗和诊断方法。因此考虑到向目标递送诊断或治疗剂或它们的组合的方法,包括 (i) 提供包括抗胰腺癌抗体或其片段的组合物,诸如与至少一种诊断和/或治疗剂共轭的嵌合、人源化和人源抗体,以及 (ii) 向受试者施用诊断或治疗剂抗体共轭物。在优选的实施例中,抗胰腺癌抗体及其片段是人源化的或完全人源的。

[0160] 本文还描述了癌细胞靶向诊断或治疗共轭物,包括例如与至少一种诊断剂或至少一种治疗剂结合的嵌合、人源化或人源 PAM4MAb 或其片段。优选地,诊断共轭物是光敏诊断剂、超声检测剂、MRI 造影剂或诸如 ^{18}F 或 ^{68}Ga 的 PET 放射性核素。更优选的是,诊断剂是能量在 20keV 和 $4,000\text{keV}$ 之间的放射性核素。

[0161] 另一个实施例涉及用于治疗恶性肿瘤的方法,包括单独或与一种或多种其它治疗剂结合施用裸抗胰腺癌抗体、抗体片段或融合蛋白(诸如 PAM4 抗体)。可在抗体的施用之前、之中或之后添加其它治疗剂。在优选的实施例中,治疗剂是吉西他滨,并在更优选的实施例中,按分次剂量疗程将吉西他滨和 hPAM4 放射共轭物 (radioconjugate) 一起施用,所

用剂量低于按周施用 6 周的常规 800–1,000mg/m² 的吉西他滨的剂量。例如,当与分次治疗剂量的 ⁹⁰Y-PAM4 结合时,以多分次剂量输注旨在用作放射增敏剂的 200–380mg/m² 的吉西他滨。熟练的技术人员将认识到本文所描述并要求保护的抗体、融合蛋白和 / 或其片段可以和任何已知或描述的包括但不限于热休克蛋白 90 (Hsp90) 的治疗剂一起施用。

[0162] 用于治疗的组合包含至少一种人源化或完全人源的抗胰腺癌抗体或其片段,其为单独的并非共轭的、或共轭的或非共轭的、并与诸如其它人源化或嵌合抗体、人源抗体、治疗剂或免疫调节剂的其它抗体或其片段结合。对于相同或不同表位或抗原的裸或共轭抗体也可以与一个或多个抗胰腺癌抗体或其片段结合。

[0163] 因此,本发明设想施用抗胰腺癌抗体及其片段,包括融合蛋白及其片段,作为裸抗体或抗体片段单独施用,或作为多模式疗法而施用。优选地,抗体是人源化或完全人源 PAM4 抗体或其片段。多模式疗法进一步包括使用裸抗胰腺癌抗体补充施用其它抗体的免疫疗法,其它抗体的形式为裸抗体、融合蛋白或为免疫共轭物。例如,人源化或完全人源 PAM4 抗体可以和其它裸抗体、或人源化 PAM4 或其它抗体相结合,其中其它抗体与同位素、一种或多种化学治疗剂、细胞因子、毒素或它们的组合共轭。例如,本发明考虑到裸或共轭 PAM4 抗体或其片段的治疗,其在其它与胰腺肿瘤相关的抗体的施用之前、之中或之后进行,其中与其它胰腺肿瘤相关的抗体为诸如 CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、抗 -Le^a 抗体、和其它 Lewis 抗原 (例如,Le(y)) 的抗体、以及抗癌胚抗原 (CEA 或 CEACAM5)、CEACAM6、结肠特异性抗原 -p (CSAp)、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、HLA-DR、CD40、CD74、CD138、HER2/neu、EGFR、EGP-1、EGP-2、血管生成因子 (例如,VEGF、PlGF)、胰岛素样生长因子 (ILGF)、腱生蛋白、血小板源生长因子和 IL-6、以及致癌基因产物 (例如 bcl-2、Kras、p53)、cMET 以及用于肿瘤坏死物质的抗体。这些实体肿瘤抗体可以是裸的或共轭至尤其是药物、毒素、同位素、放射性核素或免疫调节剂。可构建许多不同的抗体组合,并且以裸的或共轭的形式使用。或者,可采用不同的裸抗体组合与其它诸如细胞毒素药物的治疗剂或与辐射结合施用,连续、同时或相继给药。

[0164] 本文所述的抗体直接靶向 PAM4 阳性肿瘤。抗体选择性地与胰腺癌或其它癌症抗原结合,并且随着分子上结合位点的增加,对靶细胞的亲和力增强,而且在所需位置观察到较长的停留时间。此外,迅速从体内清除非抗原结合分子,并且将正常组织的暴露降低到最低限度。多特异性抗体用在 AES 系统中,其中抗 -PAM4 抗体预靶向阳性肿瘤用于随后特异递送诊断或治疗剂。可由包含肽的组胺琥珀酰胺甘氨酸胺 (HSG) 携带制剂。由鼠源单克隆抗体指定的 679 以高亲和力与包含三肽 HSG 半抗原的分子结合 (Morel 等, *Molecular Immunology*, 27, 995–1000, 1990) 并且可用于与 hPAM4 形成双特异性抗体;但甚至更优选的是使用人源化版本的 679。还可以使用诸如 In-DTPA 或 NOTA 的替代半抗原。双特异性抗体选择性地与靶抗原结合,使得在所需位置上具有增强的亲和力和较长的停留时间。而且,迅速从体内清除非抗原结合抗体,并且将正常组织的暴露降低到最低限度。PAM4 和其它胰腺癌抗体可用于诊断和 / 或治疗哺乳动物癌症。诊断需要使用已知技术来检测结合、标记的抗体或片段的进一步的步骤。

[0165] 在本申请的上下文中,术语“诊断”或“检测”可互换使用。然而诊断通常指的是定义组织的特定组织学状态,检测识别和定位包含特定抗原的组织、病变或有机体。

[0166] 抗体及其片段可通过以下方式进行施用:静脉内注射、动脉内注射、腹膜内注射、

肌肉注射、皮下注射、胸膜内注射、鞘内注射、通过部位导管输注、或直接病灶内注射。当通过注射施用抗体时,可通过连续输注或单次或多次团注进行施用。

[0167] 裸抗体疗法

[0168] 裸抗胰腺癌抗体及其片段的功效可以通过用一种或多种其它裸抗体或与一种或多种治疗剂(包括药物、毒素、免疫调节剂、激素、寡核苷酸、激素拮抗剂、酶、酶抑制剂、治疗性放射性核素、血管生成抑制剂等)共轭的一种或多种免疫共轭物来补充这些裸抗体而增强,这些是同时或依次或根据规定的用药方案施用的。或者,裸抗体可与没有附着于其它抗体的治疗剂共同施用。可用于补充裸抗胰腺癌抗体的抗体可被导向同样的癌细胞或导向可用来增强选择的裸抗体的抗肿瘤功效的免疫调节细胞(例如,CD40+ 细胞)。

[0169] 免疫共轭物、治疗和诊断剂

[0170] 抗胰腺癌抗体及其片段可与至少一种用于治疗或诊断的治疗和/或诊断剂共轭。对于免疫治疗,目的是为了将细胞毒性剂量的辐射、毒素、抗体和/或药物递送至靶细胞,同时最大限度地减少与非靶组织的接触。优选地,抗胰腺癌抗体用于诊断和/或治疗胰腺肿瘤。

[0171] 利用本领域中的各种技术可以将任何抗体、抗体片段和融合蛋白与一种或多种治疗或诊断剂共轭。一种或多种治疗或诊断剂可附着于每个抗体、抗体片段或融合蛋白。如果缺少Fc区(例如某些抗体片段),可以将碳水化合物部分引入可附着治疗或诊断剂的抗体或抗体片段的轻链可变区。参见,例如Leung等,J Immunol. 154:5919(1995);Hansen等,美国专利No. 5,443,953(1995),Leung等,美国专利No. 6,254,868,每个专利的实例部分以引用的方式并入本文。

[0172] 通过抗体碳水化合物部分使肽与抗体组分共轭的方法是本领域技术人员已知的。参见例如,Shih等,Int J Cancer 41:832(1988);Shih等,Int J Cancer 46:1101(1990);和Shih等,美国专利No. 5,057,313,该专利的实例部分以引用的方式并入本文。一般的方法涉及使具有氧化的碳水化合物部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能团并载有多种治疗剂(如肽或药物)的载体聚合物反应。该反应导致初始席夫碱(亚胺)键,其可以通过还原到仲胺以形成最终共轭物而稳定化。

[0173] 抗体融合蛋白或多特异性抗体包含两个或多个抗体或其片段,每个抗体或其片段都可附着于至少一种治疗和/或诊断剂。因此,抗体融合蛋白的一个或多个抗体或其片段可具有不止一个附着的治疗和/或诊断剂。此外,治疗剂无需都一样,而可以是不同的治疗剂,例如可以使药物和放射性同位素附着于相同的融合蛋白。特别是,IgG可用¹³¹I来进行放射性标记并附着于药物上。¹³¹I可以结合到IgG的酪氨酸和附着于IgG赖氨酸的ε氨基的药物当中。治疗和诊断剂也都可附着于还原的SH基团和抗体的碳水化合物侧链上。或者,双特异性抗体可包含针对疾病抗原的一个抗体或其片段和针对附着于靶向性构建体的半抗原的另一抗体或其片段,用于如上所述的预靶向技术中。

[0174] 各种诊断和治疗剂可同时或依次施用,或有利地与本发明的抗体共轭,例如药物、毒素、寡核苷酸、免疫调节剂、激素、激素拮抗剂、酶、酶抑制剂、放射性核素、血管生成抑制剂等。这里所述的治疗剂是那些也适用于与裸抗体分开施用的药剂。治疗剂包括例如化学治疗药物,如长春花生物碱、蒽环霉素、吉西他滨、表鬼臼毒素、紫杉烷、抗代谢物、烷化剂、抗生素、SN-38、COX-2抑制剂、抗有丝分裂物、抗血管生成和细胞凋亡剂(特别是阿霉

素)、甲氨蝶呤、紫杉醇、CPT-11、喜树碱衍生物 (camptothecans)、蛋白酶抑制剂、mTOR 抑制剂、HDAC 抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂以及由这些及其它类抗癌制剂中提取的药物等。其它适用于同时或依次施用或用于制备免疫共轭物和抗体融合蛋白的癌化学治疗药物包括氮芥、烷基磺酸盐、亚硝基脲、三氮烯、叶酸类似物、COX-2 抑制剂、抗代谢物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、铂配位络合物、mTOR 抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、HDAC 抑制剂、喜树碱、激素等。在 REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), 和 GOODMAN AND GILMAN' S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985) 以及这些出版物的修订版中描述了合适的化学治疗剂。其它合适的化学治疗剂 (如试验性药物) 是本领域技术人员已知的。

[0175] 在优选的实施例中, 喜树碱和相关化合物的共轭物 (如 SN-38) 可与 hPAM4 或其它抗胰腺癌抗体共轭, 例如 2008 年 2 月 6 日提交的美国专利申请 No. 12/026, 811 和 2006 年 3 月 23 日提交的美国专利申请 No. 11/388, 032 中公开的那样, 上述每个专利申请的实例部分以引用的方式并入本文。

[0176] 在另一优选的实施例中, hPAM 抗体与吉西他滨共轭。在另一实施例中, 在裸抗体或共轭嵌合、人源化或人源 PAM4 抗体之前、之后或同时提供吉西他滨。优选地, 共轭的 hPAM4 抗体或抗体片段与放射性核素共轭。

[0177] 毒素可来源于动物、植物或微生物。毒素 (如假单胞菌外毒素) 也可与抗胰腺癌和 hPAM4 抗体的免疫共轭物络合, 或者形成抗胰腺癌和 hPAM4 抗体的免疫共轭物的治疗剂部分。其它适合用于制备这种共轭物或其它融合蛋白的毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶 (RNA 酶)、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 A、商陆抗病毒蛋白、白树素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。参见例如 Pastan 等, Cell 47:641 (1986), Goldenberg, CA—A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994), Sharkey 和 Goldenberg, CA—A Cancer Journal for Clinicians 56:226 (2006)。适合使用的其它毒素是本领域技术人员已知的, 公开在美国专利 No. 6, 077, 499 中, 该专利的实例部分以引用的方式并入本文。

[0178] 免疫调节剂 (如细胞因子) 也可与免疫共轭物共轭或形成免疫共轭物的治疗剂部分, 或可与抗体、抗体片段或融合蛋白施用, 但不与它们共轭。融合蛋白可包含一个或多个与不同抗原结合的抗体或其片段。例如, 融合蛋白可与 PAM4 抗原以及免疫调节细胞或因子结合。或者, 受试者可接受裸抗体、抗体片段或融合蛋白和单独施用的细胞因子, 所述单独施用的细胞因子可在施用裸抗体之前、同时或之后施用。本文中所使用的术语“免疫调节剂”包括细胞因子、淋巴因子、单核因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、集落刺激因子 (CSF)、干扰素 (IFN)、甲状旁腺激素、甲状腺素、胰岛素、胰岛素原、松弛素、松弛素原、促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH)、黄体化激素 (LH)、肝细胞生长因子、前列腺素、成纤维细胞生长因子、催乳素、胎盘生乳素、OB 蛋白、转化生长因子 (TGF)、TGF- α 、TGF- β 、胰岛素样生长因子 (ILGF)、促红细胞生成素、促血小板生成素、肿瘤坏死因子 (TNF)、TNF- α 、TNF- β 、苗勒抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、激活素、血管内皮生长因子、整合蛋白、白细胞介素 (IL)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、S1 因子、IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21 和 IL-25、LIF、kit 配体、FLT-3、血管抑素、血小板反应蛋白、内皮抑素和 LT

等。

[0179] 或者,抗体和片段可以通过将抗体与酶连接而可检测地标记。当在适当底物存在的条件下培养抗体酶共轭物时,酶部分与底物发生反应生成可以通过例如分光光度法、荧光测定法或视觉方法检测的化学部分。可用于可检测地标记抗体的酶的例子包括苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -V 型类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 α -磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 α -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、糖化酶和乙酰胆碱酯酶。

[0180] 治疗或诊断剂可以通过二硫键的形成附着于还原抗体组分的铰链区。作为另外的选择,可以采用异双官能交联剂(如 N-琥珀酰基 3-(2-吡啶二巯基)丙酸盐(SPDP))将这种试剂附着于抗体组分。Yu 等 Int. J. Cancer 56:244(1994)。这种共轭的一般技术是本领域中熟知的。参见例如,Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Uppeslacis 等, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS 中的 "Modification of Antibodies by Chemical Methods," Birch 等 (eds.), 第 187-230 页 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION 中的 "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," Ritter 等 (编辑), 第 60-84 页 (Cambridge University Press 1995)。或者,治疗或诊断剂可以通过抗体的 Fc 区中的碳水化合物部分共轭。碳水化合物基团可用于提高与硫醇基结合的相同试剂的载量,或者碳水化合物部分可用于结合不同的肽。

[0181] 免疫共轭物可以包含一种或多种适用于检测病变组织的放射性同位素。特别有用的诊断放射性核素包括但不限于: ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 或其它 γ -、 β -或正电子发射体,优选具有 20 至 4,000keV 范围内的衰变能,更优选具有 25 至 4,000keV 范围内的衰变能,甚至更优选具有 25 至 1,000keV 范围内的衰变能,还更优选具有 70 至 700keV 范围内的衰变能。有用的正电子发射的放射性核素的总衰变能优选 < 2,000keV,更优选在 1,000keV 以下,最优选 < 700keV。利用 γ -射线检测作为诊断剂的有用的放射性核素包括但不限于: ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{75}Se 、 ^{97}Ru 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{169}Yb 、 ^{197}Hg 和 ^{201}Tl 。有用的发射 γ -射线的放射性核素的衰变能优选为 20-2,000keV,更优选为 60-600keV,最优选 100-300keV。

[0182] 免疫共轭物可以包含一种或多种适用于治疗病变组织的放射性同位素。特别有用的治疗放射性核素包括但不限于: ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 和 ^{211}Pb 。治疗放射性核素优选具有 20 至 6,000keV 范围内的衰变能,对于俄歇发射体,优选具有 60 至 200keV 范围内的衰变能,对于 β 发射体,优选具有 100 至 2,500keV 范围内的衰变能,对于 α 发射体,优选具有 4,000 至 6,000keV 范围内的衰变能。有用的发射 β -粒子的核素的最大衰变能优选为 20 至 5,000keV,更优选为 100-4,000keV,最优选为 500-2500keV。还优选的是随俄歇发射粒子充分衰变的放射性核素。例如 Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、

Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m 和 Ir-192。有用的发射 β -粒子的核素的衰变能优选 $< 1,000\text{keV}$ ，更优选 $< 100\text{keV}$ ，最优选 $< 70\text{keV}$ 。还优选的是随 α -粒子的生成充分衰变的放射性核素。这种放射性核素包括但不限于：Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213 和 Fm-255。有用的发射 α -粒子的放射性核素的衰变能优选为 $2,000\text{--}10,000\text{keV}$ ，更优选为 $3,000\text{--}8,000\text{keV}$ ，最优选为 $4,000\text{--}7,000\text{keV}$ 。

[0183] 例如， ^{67}Cu 由于其 61.5 小时的半衰期和能充足地供应 β 粒子和 γ 射线的原因而被视为是更有希望用于放射免疫治疗的放射性同位素之一，可以利用螯合剂、对溴乙酰氨基苄基四乙胺四乙酸 (TETA) 使之与抗体共轭。Chase, 见上文。或者，可以通过二乙撑三胺五乙酸 (DTPA) 或更优选使用 DOTA 使发射高能 β 粒子的 ^{90}Y 与抗体、抗体片段或融合蛋白偶联。将 ^{90}Y 与抗体或靶向性构建体共轭的方法是本领域中已知的，可以采用任何这种已知的方法（参见，例如美国专利 No. 7, 259, 249, 该专利的实例部分以引用的方式并入本文。还参见 Lindn 等, Clin Cancer Res. 11 :5215-22, 2005 ;Sharkey 等, J Nucl Med. 46 :620-33, 2005 ;Sharkey 等, J Nucl Med. 44 :2000-18, 2003.）。

[0184] 其它有潜力的治疗放射性同位素包括 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 ^{113}mIn 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 ^{121}mTe 、 ^{122}mTe 、 ^{125}mTe 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{199}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{169}Yb 等。

[0185] 在另一实施例中，放射敏化剂可以与裸抗体或共轭抗体或抗体片段组合使用。例如，放射敏化剂可以与放射标记的抗体或抗体片段组合使用。与单独用放射标记抗体或抗体片段进行治疗相比，添加放射敏化剂可增强疗效。放射敏化剂在 D. M. Goldenberg (编辑), CANCER THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODIES, CRC Press (1995) 中有所描述。可用于这种技术的其它典型的放射敏化剂包括吉西他滨、5-氟尿嘧啶和顺铂，并已在包括胰腺癌在内的不同癌症的治疗中与体外照射组合使用。因此，我们已经研究了吉西他滨以被认为是吉西他滨的放射敏化剂量（每周一次 $200\text{mg}/\text{m}^2$ ，四周）与分次剂量的 ^{90}Y -hPAM4 结合的组合，并且已经观察到在单疗程的这种组合之后胰腺癌有所减少的客观证据，证实这种组合的耐受性良好（根据 NCI-CTC v. 3 标准，没有 3-4 级毒性）。

[0186] 具有用于热中子活化治疗的载有硼附加物的载体的抗体或其片段一般会以类似的方式受到影响。然而，有利的是在进行中子照射之前等待，直到非靶向免疫共轭物清除。可以利用与抗胰腺癌抗体结合的抗独特型抗体加快清除。参见美国专利 No. 4, 624, 846 中对这个一般原理的描述。例如，可以使硼附加物（如碳硼烷）附着于抗体。可以制备碳硼烷，使侧链上带有羧基官能团，这在本领域中是熟知的。可以通过活化的碳硼烷的羧基并与载体上的胺缩合来实现碳硼烷对载体（如氨基葡聚糖）的附着。然后中间共轭物与抗体共轭。在施用抗体共轭物之后，硼附加物通过热中子照射被活化并转换为放射性原子，所述放射性原子通过 α -发射产生衰变，从而产生高毒性的短程影响。

[0187] 可以通过施用诊断免疫共轭物并检测附着于定位在癌或肿瘤处的免疫共轭物的诊断标记来完成在受试者中诊断癌症的方法。抗体、抗体片段和融合蛋白可与诊断剂共轭，或者可以在预靶向技术中利用附着于诊断剂的靶向性构建体施用之。上面讨论了可作为诊断剂使用的放射性试剂。合适的非放射性诊断剂是适用于磁共振成像、X 射线、计算机断层

扫描或超声波的造影剂。磁成像剂包括例如非放射性金属（如锰、铁和钆），与包括 2- 苄基 -DTPA 及其一甲基和环己基类似物的金属 - 螯合物组合络合。参见 2001 年 10 月 10 日提交的 U. S. Ser. No. 09/921, 290, 其实例部分以引用的方式并入本文。也可以使用其它成像剂，如 PET 扫描核苷酸，优选 ¹⁸F。

[0188] 造影剂（如包括例如钆离子、镧离子、镱离子、铁离子、锰离子或其它类似标记的MRI造影剂、CT造影剂和超声波造影剂）可用作诊断剂。适合使用的顺磁离子包括铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钼(III)、钆(III)、铈(III)、钪(III)、钆(III)、钆(II)、铽(III)、镱(III)、钪(III)和铟(III),特别优选钆。

[0189] 在诸如 X 射线成像之类的其它情况中有用的离子包括但不限于镧 (III)、金 (III)、铅 (II) 和铋 (III)。荧光标记包括罗丹明、荧光素和肾造影剂。罗丹明和荧光素经常通过异硫氰酸酯中间体连接。

[0190] 金属在诊断剂中也有用,包括那些用于磁共振成像技术的金属。这些金属包括但不限于:钆、锰、铁、铬、铜、钴、镍、镓、铟、铊、铀和钼。为了在抗体上加载放射性金属或顺磁离子,可能需要使之与具有附着多个用于结合离子的螯合基团的长尾的试剂反应。这种尾可以是聚合物,如聚赖氨酸、多聚糖,或其它具有侧基的衍生化或可衍生化链,所述侧基上可以结合螯合基团,如已知适用于此目的的乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、卟啉、多胺、冠醚、二缩氨基硫脲、聚脲等。

[0191] 利用标准的化学过程使螯合物偶合于抗体、融合蛋白或其片段。螯合物通常是通过以能够在免疫活性损失最小且聚集和 / 或内部交联最少的情况下与分子成键的基团与抗体连接。用于使螯合物与抗体共轭的其它更不常见的方法及试剂公开在 1989 年 4 月 25 日授予 Hawthorne 的题为 “Antibody Conjugate” 的美国专利 No. 4, 824, 659 中, 该专利的实例部分以引用的方式并入本文。特别有用的金属 - 螯合物组合包括 2- 苄基 -DTPA 及其一甲基和环己基类似物, 其在 20 至 2, 000keV 的一般能量范围内与诊断同位素一起使用。当与诸如锰、铁和钆的非放射性金属络合时, 相同的螯合物适用于 MRI。诸如 NOTA、DOTA 和 TETA 的大环螯合物可用于多种金属及射电金属, 最特别是分别用于镓、钷和铜的放射性核素。通过对所关注的金属定制环的大小可以使这种金属 - 螯合物复合体非常稳定。可用来稳定地结合核素 (如用于 RAIT 的 ^{223}Ra) 的其它环型螯合物 (如大环聚醚) 涵盖在本发明中。

[0192] 不透射线和造影材料用于增强 X 射线和计算机断层扫描, 包括碘化合物、钡化合物、镓化合物、铈化合物等。具体的化合物包括钡、泛影酸盐、乙碘油、柠檬酸镓、碘卡明酸、碘酸胺酸、碘达酸、胆影酸、碘沙酸、碘古酰胺、碘海醇、碘帕醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘硃葡胺、碘舒美酸、碘酞硫、碘替酸、异泛影酸、碘托西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、碘泊酸盐、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影钠、丙碘酮和氯化亚铈。

[0193] 也可以用荧光化合物来标记抗体、抗体片段和融合蛋白。荧光标记的 MAbs 的存在是通过将抗体暴露在适当波长的光线下并检测由此产生的荧光来确定的。荧光标记化合物包括 Alexa 350、Alexa 430、AMCA、氨吡啶、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、5-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素、5-羧基-2',4',5',7'-四氯荧光素、5-羧基荧光素、5-羧基罗丹明、6-羧基罗丹明、6-羧基四甲基氨基、瀑布蓝 (Cascade Blue)、Cy2、Cy3、Cy5、6-FAM、丹磺酰氯、荧光素、异硫氰酸荧光素、荧光胺、HEX、6-JOE、NBD (7-硝基苯-2-氧杂-1,3-二唑)、俄勒冈绿 488、

俄勒冈绿 500、俄勒冈绿 514、太平蓝、邻苯二甲酸、对苯二甲酸、间苯二甲酸、甲酚固紫、甲酚蓝紫、亮甲酚蓝、对氨基苯甲酸、赤藓红、酞菁、酞醛、偶氮甲碱、青色素、黄嘌呤、琥珀荧光素、稀土金属穴合物、钨三联胺二胺、钨穴合物或螯合物、二胺、双菁、拉霍亚蓝染料、别藻蓝素、allocoocyanin B、藻蓝蛋白 C、藻蓝蛋白 R、硫胺素、藻红蓝素、藻红蛋白 R、REG、罗丹明绿、异硫氰酸罗丹明、罗丹明红、ROX、TAMRA、TET、TRIT(四甲基罗丹明 isothiol)、四甲基罗丹明和得克萨斯州红。荧光标记抗体对于流式细胞仪分析是特别有用的,但也可用于内窥镜和血管内的检测方法。

[0194] 或者,抗体、抗体片段和融合蛋白可以通过将抗体偶合于化学发光化合物而可被检测地标记。化学发光标记的 MAbs 的存在是通过检测在化学反应过程中出现的发光的存在来确定的。化学发光标记化合物的例子包括鲁米诺、异鲁米诺、芳族吖啶酯、咪唑、吖啶盐和草酸酯。

[0195] 类似地,发光化合物可用于标记抗体及其片段。生物发光是一种在生物系统中发现的化学发光,在所述生物系统中催化蛋白提高了化学发光反应的效率。生物发光蛋白的存在是通过检测发光的存在确定的。适用于标记的生物发光化合物包括荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白。

[0196] 因此,描述了诊断受试者体内的恶性肿瘤的方法,该方法包括使用包含抗胰腺癌 MAbs、融合蛋白或其片段的组合物对来自受试者的样本(流体、组织或细胞)进行离体诊断测定。免疫组织化学可用于通过结合抗体的存在来检测 PAM4 抗原在细胞或组织中的存在。更优选地,所述癌是胰腺癌。

[0197] 此外,螯合剂(如 DTPA、DOTA、TETA 或 NOTA)或合适的肽(其带有可检测的标记,如荧光分子)或细胞毒素剂(如重金属或放射性核素)可以与目标抗体共轭。例如,治疗上有用的免疫共轭物可以通过光敏剂或染料与抗体融合蛋白共轭来获得。荧光组分(如荧光色素)和其它色原或染料(如对可见光敏感的卟啉)已被用来通过将合适的光导向病灶来检测和治疗病变。在治疗中,这被称为光辐射、光线疗法或光动力疗法(Jori 等(eds.) PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES(Libreria Progetto 1985);van denBergh, Chem. Britain 22:430(1986))。此外,为了实现光疗,已经将单克隆抗体与光活化染料耦合。Mew 等, J. Immunol. 130:1473(1983);idem., Cancer Res. 45:4380(1985);Oseroff 等, Proc Natl. Acad. Sci. USA 83:8744(1986);idem., Photochem. Photobiol. 46:83(1987);Hasan 等, Prog. Clin. Biol. Res. 288:471(1989);Tatsuta 等, Lasers Surg. Med. 9:422(1989);Pelegrin 等, Cancer 67:2529(1991)。

[0198] 为了获得治疗的目的,按照治疗有效量对患者施用抗胰腺癌抗体及其片段。如果施用的量在生理上来讲是显著的,则被认为是按照“治疗有效量”来施用抗体。如果试剂的存在导致在接受患者的生理上产生可检测的变化,则在生理上来讲其是显著的。

[0199] 诊断剂是可与抗体、抗体片段或融合蛋白或靶向性构建体共轭施用的分子或原子,其适用于通过定位含疾病相关抗原的细胞而进行诊断/检测。有用的诊断剂包括但不限于放射性同位素、染料(如用生物素-链亲和素复合物)、不透射线材料(例如碘、钡、镓和铈化合物等)、造影剂、荧光化合物或分子和用于磁共振成像(MRI)的增强剂(例如,顺磁离子)。U. S. Pat. No. 6,331,175 描述了 MRI 技术和与 MRI 增强剂共轭的抗体的制备。优选地,诊断试剂选自用于核成像、内窥镜检测和血管内检测的放射性同位素、用于磁共振成像

或超声检查的增强剂、用于 X 射线和计算机断层扫描的不透射线和造影剂以及用于荧光检查（包括内窥镜荧光检查）的荧光化合物。与抗体共轭或用于双特异性预靶向方法中的荧光剂和放射性试剂特别适用于与诸如恶性肿瘤的病变组织或细胞群相关的靶抗原的内视镜检测、术中检测或血管内检测，如 Goldenberg 的美国专利 5,716,595、6,096,289 和美国专利申请 No. 09/348,818 中所公开的那样，上述每个的实例部分以引用的方式并入本文，特别是有 γ -、 β - 和正电子的发射体的实例部分。当有向允许内窥镜的组织（如结肠）伸展时，可以使用内窥镜。对正电子发射断层扫描术有用的放射性核素包括但不限于： ^{18}F 、 ^{51}Mn 、 ^{52}Mn 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{82}Rb 、 ^{83}Sr 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{110}In 、 ^{120}I 和 ^{124}I 。有用的正电子发射放射性核素的总衰变能优选 $< 2,000\text{keV}$ ，更优选在 $1,000\text{keV}$ 以下，最优选 $< 700\text{keV}$ 。作为利用 γ -射线检测的诊断剂有用的放射性核素包括但不限于： ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{75}Se 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{114}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{169}Yb 、 ^{197}Hg 和 ^{201}Tl 。有用的 γ -射线发射放射性核素的衰变能优选为 $20\text{--}2,000\text{keV}$ ，更优选为 $60\text{--}600\text{keV}$ ，最优选为 $100\text{--}300\text{keV}$ 。

[0200] 离体诊断

[0201] 本发明设想使用抗胰腺癌抗体来离体筛选生物样本以确定 PAM4 抗原的存在。在这种免疫测定中，抗体、抗体片段或融合蛋白可用于液相或与固相载体结合，如下所述。为了离体诊断的目的，由于没有考虑宿主免疫反应，所以可以采用任何类型的抗体，如鼠源、嵌合、人源化或人源抗体。

[0202] 用于确定生物样本是否含 PAM4 抗原的筛选方法的一个实例是放射免疫测定法 (RIA)。例如，在 RIA 的一种形式中，在放射性 PAM4 抗原存在的情况下使被测物质与 PAM4MAb 混合。在此方法中，测试物质的浓度与结合于 MAb 的标记 PAM4 抗原量成反比，并直接与游离的标记 PAM4 抗原量相关。其它合适的筛选方法对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0203] 或者，可以进行离体测定，其中抗胰腺癌抗体、抗体片段或融合蛋白与固相载体结合。例如，MAb 可附着于聚合物（如氨基葡聚糖），以便使 Mab 连接于不溶性载体（聚合物涂层珠、板或管）。

[0204] 其它合适的离体测定对本领域技术人员来说是显而易见的。可改变可检测的标记抗体和 PAM4 抗原的具体浓度、培养的温度和时间以及其它测定条件，这取决于包括样本中的 PAM4 抗原的浓度、样本的性质等在内的各种因素。抗胰腺癌抗体样本的结合活性可根据已知的方法来确定。本领域技术人员通过例行实验能够确定每次测定的有效和最佳测定条件。

[0205] PAM4 抗原在生物样本中的存在可用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 来确定（如，Gold 等 J Clin Oncol. 24:252-58, 2006）。在直接竞争 ELISA 中，纯抗原制剂或半纯抗原制剂与在被测的流体或细胞提取物中不溶解的固体载体结合，添加一定量的可检测的标记可溶性抗体以允许对在固相抗原和标记抗体之间形成的二元复合物进行检测和 / 或定量。

[0206] 与此相反，“双决定簇”ELISA 法（也称“双位点 ELISA 法”或“夹心式测定法”）要求少量的抗原，且测定不需要抗原的过度纯化。因此，双决定簇 ELISA 用于检测临床样本中的抗原的直接竞争 ELISA 是优选的。参见例如，双决定簇 ELISA 用于活检标本中的 c-myc 癌蛋白的定量，Field 等，Oncogene 4:1463(1989)；Spandidos 等，AntiCancer Res. 9:

821(1989)。

[0207] 在双决定簇 ELISA 中,一定量的未标记 MA b 或抗体片段(“捕获抗体”)与固体载体结合,使测试样本与捕获抗体接触,添加一定量的可检测的标记可溶性抗体(或抗体片段)以允许对在捕获抗体、抗原和标记抗体之间形成的三元复合物进行检测和/或定量。在这样的情况下,抗体片段是与 PAM4 抗原的表位结合的抗胰腺癌 MA b 的一部分。双决定簇 ELISA 的实施方法是已知的。参见例如,Field 等,上文,Spandidos 等,上文,以及 Moore 等,“Twin-Site ELISAs for fos and mycOncoproteins Using the AMPAK System”(METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 273-281, The Humana Press, Inc. 1992)。

[0208] 在双决定簇 ELISA 中,可溶性抗体或抗体片段必须与不同于由捕获抗体识别的表位的 PAM4 表位结合。可进行双决定簇 ELISA 以确定 PAM4 抗原是否存在于活检样本中。或者,可进行所述测定以对临床体液样本中存在的 PAM4 抗原的量进行定量。定量测定的进行可包括稀释纯化的 PAM4 抗原。

[0209] 抗胰腺癌 MA b、融合蛋白及其片段也适于制备测定试剂盒。这种试剂盒可包括间隔化的承载装置,用以在封闭的空间中接受一个或多个容器装置(如小瓶、管等),每个所述容器装置都包括独立的免疫测定单元。

[0210] 目标抗体、抗体片段和融合蛋白还可以用来检测 PAM4 抗原在由组织标本制备的组织切片中的存在。这种原位检测可用于确定 PAM4 抗原的存在和确定 PAM4 抗原在受检组织中的分布。原位检测可以通过将可检测的标记抗体施用到冷冻组织切片上来完成。研究表明,PAM4 抗原在石蜡包埋的切片中是保守的。原位检测的一般技术是普通技术人员已知的。参见,例如,Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application," in MAMMALIAN DEVELOPMENT: A PRACTICAL APPROACH 113-38 Monk(ed.) (IRL Press 1987) 和 Coligan(第 5.8.1-5.8.8 页)。

[0211] 抗体、抗体片段和融合蛋白可以用任何适当的标记物部分可检测地标记,该标记物部分包括例如放射性同位素、酶、荧光标记、染料、发色团、化学发光标记、生物发光标记或顺磁标记。

[0212] 标记物部分可以通过诸如使用 γ 射线计数器或闪烁计数器的方法或通过自动射线照相术来检测的放射性同位素。在优选的实施例,诊断共轭物是 γ -、 β -或正电子发射同位素。本说明书中的标记物部分指在预定条件下产生信号的分子。标记物部分的例子包括放射性同位素、酶、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记和顺磁标记。

[0213] 可以使用本领域中已知的标准技术来完成标记物部分与抗胰腺癌抗体的结合。在这方面的典型方法描述在 Kennedy 等,Clin Chim Acta 70:1(1976),Schurs 等,Clin. Chim. Acta 81:1(1977),Shih 等,Int J Cancer 46:1101(1990)中。

[0214] 上述的离体和原位检测方法可用于帮助进行病情的诊断或分期。例如,这种方法可用于检测表达 PAM4 抗原的肿瘤(如胰腺癌)。

[0215] 体内诊断/检测

[0216] 利用标记 MA b 进行体内诊断成像的各种方法是已知的。在免疫闪烁法的技术中,例如,用发射 γ 射线的放射性同位素来标记抗体并引入患者体内。伽马照相机用于检测发射 γ 射线的放射性同位素的位置和分布。参见,例如 Srivastava(ed.), RADIOLABELED MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMAGING AND THERAPY (Plenum Press 1988),

REMINGTON ' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 中的 Chase, " Medical Applications of Radioisotopes, " 18th Edition, Gennaro 等 (eds.), pp.624-652 (Mack Publishing Co., 1990), 和 BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY 227-49 中的 Brown, " Clinical Use of Monoclonal Antibodies, " Pezzuto 等 (eds.) (Chapman & Hall 1993)。

[0217] 关于诊断成像, 放射性同位素可以直接或通过使用中间官能团间接与抗体结合。有用的中间官能团包括诸如乙二胺四乙酸和二乙烯三胺五醋酸的螯合剂。例如参见, Shih 等, 上文, 和美国专利 No. 5, 057, 313。

[0218] 通过选择同位素而将递送至患者的辐射剂量保持在尽可能低的水平, 用以实现最短半衰期、体内最少保留量与最少同位素量的最佳组合, 这样可以进行检测和精确的测量。可以与抗胰腺癌抗体结合并适合诊断成像的放射性同位素的例子包括 ^{99m}Tc 、 ^{111}In 和 ^{18}F 。

[0219] 为了体内诊断的目的, 目标抗体、抗体片段和融合蛋白也可以用顺磁离子和各种放射性造影剂来标记。特别适用于磁共振成像的造影剂包括钆离子、锰离子、镝离子、铟离子或铁离子。另外的试剂包括铬、铜、钴、镍、镱、铈、钽或钼。抗体或其片段也可以与超声造影剂 / 增强剂共轭。例如, 一种超声造影剂是脂质体。还优选的是, 超声造影剂为充气的脂质体。

[0220] 在优选的实施例中, 双特异性抗体可以与造影剂共轭。例如, 双特异性抗体可包含不止一种在超声成像中使用的图像增强剂。在另一优选的实施例中, 造影剂是脂质体。优选地, 脂质体包含共价附着于脂质体外表面的二价 DTPA- 肽。

[0221] 药学上合适的辅料

[0222] 可采用另外的制药方法控制抗胰腺癌抗体在治疗应用中作用的持续时间。可以通过使用聚合物络合或吸附抗体、抗体片段或融合蛋白 来制备缓释制剂。例如, 生物相容性聚合物包括乙烯 - 醋酸乙烯酯共聚物基质和硬脂酸二聚体与癸二酸的聚酸酐共聚物基质。Sherwood 等, Bio/Technology 10 :1446 (1992)。抗体、抗体片段或融合蛋白从这种基质中的释放速率取决于抗体、抗体片段或融合蛋白的分子量、基质内的抗体量和分散粒子的大小。Saltzman 等, Biophys. J. 55 :163 (1989) ; Sherwood 等, 上文。其它固体剂型描述于 : Ansel 等, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), 和 Gennaro (ed.), REMINGTON ' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), 及其修订版本。

[0223] 递送至受试者的抗体、其片段和融合蛋白可包含一种或多种药学上合适的辅料、一种或多种其它成分或上述的某种组合。可以根据已知的方法配制抗体以制备药学上有用的组合物, 据此使免疫共轭物或裸抗体与药学上合适的辅料结合为混合物。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上合适的辅料的一个例子。其它合适的辅料是本领域中熟知的。参见例如, Ansel 等, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), 和 Gennaro (ed.), REMINGTON ' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), 及其修订版本。

[0224] 可以配制通过例如团注或连续输注来进行静脉注射用的免疫共轭物或裸抗体。可以单位剂型提供注射制剂, 例如在安瓿或多剂量容器中, 同时加有防腐剂。组合物的形式可以为在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液, 且可以包含诸如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂的配制剂。或者, 在使用前, 活性成分可以为与合适的载体 (例如, 无菌无热原水) 配

合的粉末形式。

[0225] 也可以通过皮下或其它非肠道途径对哺乳动物施用免疫共轭物、裸抗体、其片段或融合蛋白。在优选的实施例中,以每剂 20 至 2000 毫克蛋白的剂量来施用抗体或其片段。此外,施用可以是连续输注或 单次或多次团注。一般来说,对人施用的免疫共轭物、融合蛋白或裸抗体的剂量会因诸如患者的年龄、体重、身高、性别、一般健康状况和以前的病史等因素而变化。通常情况下,虽然根据实际情况可能会施用较低或较高的剂量,但是希望为接受者提供单次静脉注射或输注的剂量范围在约 1mg/kg 至 20mg/kg 的免疫共轭物、抗体融合蛋白或裸抗体。此剂量可根据需要重复,例如,每周一次,持续四到十周;优选为每周一次,持续八周;更优选地,每周一次,持续四周。施用频率也可以更低,如隔一周一次,持续数月,或更频繁,如一周两次或三次。剂量可通过各种非肠道途径来施用,其中剂量和施用时间可以适当调整。

[0226] 试剂盒

[0227] 各种实施例可涉及包含适合治疗或诊断患者的病变组织的组分的试剂盒。示例性试剂盒可包含至少一种本文所述的抗体、抗原结合片段或融合蛋白。如果含施用组分的组合物没有配制成通过消化道来递送(如通过口服),则可以包括能够通过一些其它途径来递送试剂盒组分的装置。用于诸如非肠道递送应用的一类装置是用于将组合物注入受试者体内的注射器。也可以使用吸入装置。在某些实施例中,抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段可以通过含有抗体的无菌液体制剂或冻干制剂的预装注射器或自动注射笔的形式来提供(例如, Kivitz 等, Clin. Ther. 2006, 28 :1619-29)。

[0228] 试剂盒组分可以包装在一起,或分装在两个或多个容器中。在一些实施例中,容器可以是含有适合进行重组的组合物的无菌冻干制剂的小瓶。试剂盒还可包含一种或多种适合进行重组和/或对其它试剂进行稀释的缓冲液。其它可使用的容器包括但不限于小袋、托盘、箱、管等。试剂盒组分可以无菌地包装和保持在容器内。可以包括的另外有试剂盒的使用说明。

[0229] 实例

[0230] 以下实例是对本发明实施例的说明,不是对权利要求范围的限制。所讨论的实例采用示例性抗胰腺癌单克隆抗体(PAM4)进行研究。使用 PAM4MAb 的临床研究已经表明大多数胰腺癌病在患者中已定位,并且没有在正常组织中吸收的迹象。剂量测定表明有可能对肿瘤递送 10 至 20cGy/mCi,肿瘤与红骨髓剂量比为 3 : 1 至 10 : 1。数据显示 PAM4 适用于治疗胰腺癌。

[0231] 实例 1 人源化 PAM4MAb

[0232] 在优选的实施例中,请求保护的方法和组合物利用抗体 hPAM4,其是针对胰腺癌粘蛋白培养的鼠源 PAM4MAb 的人源 IgG。利用鼠源 PAM4 序列的人源化来减少人抗鼠抗体(HAMA)反应。为产生人源化 PAM4,将鼠互补决定区(CDR)从小鼠免疫球蛋白的重链可变区和轻链可变区转移到人框架区(FR)的抗体序列,接下来是用其鼠源配对物替换一些人 FR 残基。人源化单克隆抗体适合用于离体和体内诊断和治疗方法。

[0233] 鼠源 PAM4MAb 的可变区框架序列(图 1A 和 1B)与 Kabat 数据库中的已知人源抗体的比较显示,PAM4V_K和 V_H的 FR 分别对人源抗体 Walker V_K和 W12V_H的 FR 表现出最高程度的序列同源性。因此,选择 Walker V_K和 W12V_H的 FR 为 PAM4V_K和 V_H的鼠源 CDR 分别

移植到其中的人框架(图3)。然而,人源抗体 NEWM 的 FR4 序列被用来替换 W12FR4 序列,用于 PAM4 重链的人源化(图3B)。PAM4FR 中侧面环绕假定的 CDR 的几个氨基酸残基被保留在 hPAM4 中,这是基于这些残基比其它 FR 残基对 Ag 结合的影响更大的考虑。这些残基是 V_K 的 21M、47W、59P、60A、85S、87F 和 100G 以及 VH 的 27Y、30P、38K、48I、66K、67A 和 69L。hPAM4V_K(SEQ ID NO:16) 和 VH(SEQ ID NO:19) 的 DNA 和氨基酸序列分别示于图 3A 和 3B。

[0234] 由 Leung 等描述的改进策略(Leung 等,1994) 被用来采用长寡核苷酸合成与 PCR 的组合为 hPAM4 构建设计的 V_K 和 VH 基因(图4)。为构建 hPAM4VH 域,在 DNA 自动合成器(Applied Biosystem) 上合成两条长寡核苷酸, hPAM4VHA(173-mer) 和 hPAM4VHB(173-mer)。

[0235] hPAM4VHA 代表 hPAM4VH 域的 nt17 至 189。

[0236] 5' -AGTCTGGGGC TGAGGTGAAG AAGCCTGGGGCCTCAGTGAA GGTCTCCTGC GAGGCTTCTG GATACACATTCCCTAGCTAT GTTTTGCACCT GGGTGAAGCA GGCCCCTGGACAAGGGCTTG AGTGGATTGG ATATATTAAT CCTTACAATGATGGTACTCA GTACAATGAG AAG-3' (SEQ ID NO:20)

[0237] hPAM4VHB 代表与 nt169 至 341 互补的 hPAM4VH 域的负链。

[0238] 5' -AGGGTTCCTT GGCCCCAGTA AGCAATCCGTAGCTACCAC CGAAGCCTCT TGCACAGTAA TACACGGCCGTGTCGTCAGA TCTCAGCCTG CTCAGCTCCA TGTAGGCTGTGTTGATGGAC GTGTCCCTGG TCAGTGTGGC CTTGCCTTTGAACCTTCTCAT TGTACTGAGT ACC-3' (SEQ ID NO:21)

[0239] hPAM4VHA 的 3' -末端序列(21nt 残基) 和 VHB 彼此互补。在规定的 PCR 条件下, hPAM4VHA 和 VHB 的 3' -端退火形成两侧由长寡核苷酸的其余部分环绕的短双链 DNA。每个退火端都充当单链 DNA 转录的引物,产生由 hPAM4VH 的 nt17 至 341 组成的双链 DNA。在两个短寡核苷酸、hPAM4VHBACK 和 hPAM4VHFOR 存在的情况下,该 DNA 被进一步扩增,形成全长 hPAM4VH。下划线的部分是图 4B 所示的亚克隆的限制位点。

[0240] hPAM4VHBACK 5' -CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGGGCT GAG GTG A-3' (SEQ ID NO:22)

[0241] hPAM4VHFOR 5' -TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCCCTG GCC CCA-3' (SEQ ID NO:23)

[0242] 在 10 μL 的 10X PCR 缓冲液(500mM KCl,100mM Tris HCl 缓冲液, pH 8.3,15mM MgCl₂)、2 μmol 的 hPAM4VHBACK 和 hPAM4VHFOR 和 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.) 存在的情况下,将最少量的 hPAM4VHA 和 VHB(由经验确定) 扩增。这一反应混合物经过三个由在 94℃变性 1 分钟、45℃退火 1 分钟和 72℃聚合 1.5 分钟构成的聚合酶链反应(PCR) 循环。紧随这个步骤的是进行 27 个由在 94℃变性 1 分钟、55℃退火 1 分钟和 72℃聚合 1 分钟构成的 PCR 反应循环。hPAM4VH 的双链 PCR 扩增产物被凝胶纯化、以 PstI 和 BstEII 限制位点进行限制性消化并克隆到重链分期载体 VHpBS2 的互补 PstI/BstEII 限制位点,其中 VH 序列用编码翻译起始密码子的 DNA 序列完全装配,分泌信号肽符合读框地配接在 5' 端,而内含子序列符合读框地配接在 3' 端。VHpBS2 是 VHpBS 的修饰的分期载体(Leung 等,Hybridoma,13:469,1994),XhoI 限制位点在翻译起始密码子上游十六碱基处引入其中,以便于进行下一个亚克隆步骤。装配的 VH 基因作为 XhoI-BamHI 限制片段亚克隆到表达载体 pDHL2,该表达载体含有处于 IgH 增强子和 MT1 启动子控制之下的 IgG 重链和轻链的表达盒以及小鼠 d/fr 基因作为选择和扩增的标记。由于 pDHL2 的重链区缺

乏 BamHI 限制位点,因此该配接需要使用连接子以在可变链的 BamHI 位点与 pdHL2 载体中存在的 HindIII 位点之间提供桥接。所得表达载体表示为 hPAM4VHpdlHL2。

[0243] 为构建人源化 V_k 序列的全长 DNA,如上所述地合成 hPAM4VKA(157-MER) 和 hPAM4VKB(156-mer)。如上所述,通过两个短寡核苷酸 hPAM4VKBACK 和 hPAM4VKFOR 来扩增 hPAM4VKA 和 VKB。

[0244] hPAM4VKA 代表 hPAM4V_k 域的 nt16 至 172。

[0245] 5' -CAGTCTCCAT CCTCCCTGTC TGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATGAC CTGCAGTGCC AGCTCAAGTG TAAGTTCCAGCTACTTGTAC TGGTACCAAC AGAAACCAGG GAAAGCCCCCAAACCTCTGGA TTTATAGCAC ATCCAACCTG GCTTCTG-3' (SEQ ID NO :24)

[0246] hPAM4VKB 代表与 nt153 至 308 互补的 hPAM4V_k 域的负链。5' -GTCCCCCCTC CGAACGTGTA CGGGTACCTA TTCCACTGATGGCAGAAATA AGAGGCAGAA TCTTCAGGTT GCAGACTGCTGATGGTGAGA GTGAAGTCTG TCCCAGATCC ACTGCCACTGAAGCGAGCAG GGA CTCCAGA AGCCAGGTTG GATGTG-3' (SEQ ID NO :25)

[0247] hPAM4VKA 和 VKB 的 3' -末端序列 (20nt 残基) 彼此互补。在规定的 PCR 条件下, hPAM4VKA 和 VKB 的 3' -端退火,形成两侧由长寡核苷酸的其余部分环绕的短双链 DNA。每个退火端都充当单链 DNA 转录的引物,产生由 hPAM4VK 的 nt 16 至 308 组成的双链 DNA。在两个短寡核苷酸、hPAM4VKBACK 和 hPAM4VKFOR 存在的情况下,该 DNA 被进一步扩增,形成全长 hPAM4V_k。下划线的部分是如下所述的亚克隆的限制位点。

[0248] hPAM4VKBACK 5' -GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT CCA TCCTCC CTG-3' (SEQ ID NO :26)

[0249] hPAM4VKFOR 5' -TTA GAT CTC CAG TCG TGT CCC CCC TCC GAA CGT-3' (SEQ ID NO :27)

[0250] 以 PvuII 和 BgIII 限制性消化 hPAM4V_k 的凝胶纯化的 PCR 产物并克隆到轻链分期载体 VKpBR2 的互补 PvuII/BclI 位点。VKpBR2 是 VKpBR 的修饰的分期载体 (Leung 等, Hybridoma, 13 :469, 1994), XbaI 限制位点在翻译起始密码子上游十六碱基处引入其中。装配的 V_k 基因作为 XbaI-BamHI 限制片段亚克隆到含 VH 序列、hPAM4VHpdlHL2 的表达载体。所得表达载体表示为 hPAM4pdHL2。

[0251] 大约 30g 的 hPAM4pdHL2 通过用 SalI 消化而线性化,并通过在 450V 和 25 μ F 下的电穿孔转染到 Sp2/0-Ag14 细胞。将转染的细胞接种到 96 孔板中,在 CO₂ 细胞培养箱中培养两天,然后进行 MTX 抗性选择。在两至三周开始选择存活的菌落,并通过 ELISA 测定筛选人源抗体分泌。简言之,向用山羊抗人 IgG F(ab')₂ 片段特异性 Ab 预涂布的 ELISA 微孔板的孔中加入来自存活菌落的上清液 (~100 μ l)。板在室温下培养一小时。通过用洗涤缓冲液 (含 0.05% 的 Tween-20 的 PBS) 洗涤三次除去未结合的蛋白质。向孔中加入辣根过氧化物酶共轭的山羊抗人 Fc 片段特异性 Ab。经培养一小时,洗涤后向孔中加入在 PBS 中含 4mM 邻苯二胺二盐酸盐 (OPD) 和 0.04% H₂O₂ 的底物溶液 (100 μ L/孔),允许在黑暗中显色 30 分钟,通过加入 50 μ L 的 4N H₂SO₄ 溶液使反应停止。通过在 ELISA 读板器上读取 490nm 的吸光度来测定结合的人 IgG。扩增阳性细胞克隆,通过在蛋白质 A 柱上进行亲和色谱法从细胞培养物上清液中纯化出 hPAM4。

[0252] 在涂以胰腺癌细胞提取物的微量滴定板中通过 ELISA 测定证实 hPAM4 的 Ag- 结

合活性。开发使用涂 PAM4 抗原的板进行的 ELISA 竞争结合测定以评价 hPAM4 的 Ag 结合亲和力,并将其与由鼠 V 和人 C 域组成的嵌合 PAM4 的所述亲和力进行比较。将与不同浓度的 cPAM4 或 hPAM4 混合的定量的 HRP 共轭 cPAM4 添加到经涂布的孔中并在常温下培养 1-2 小时。在加入含 4mM 的邻苯二胺二盐酸盐和 0.04% 的 H_2O_2 的底物溶液之后,通过读取 490nm 的吸光度来显示与 CaPan1Ag 结合的 HRP 共轭 cPAM4 的量。如图 4 中的竞争测定所示,hPAM4 和 cPAM4 抗体显示出类似的结合活性。

[0253] 实例 2 免疫组织化学染色研究

[0254] 在正常成人组织上进行的免疫组织化学表明,PAM4 活性表位被限制于染色弱但仍呈阳性的胃肠道(表 1)。包括导管、小管、腺泡和岛细胞在内的正常胰腺组织的染色呈阴性。以组织均质物为抗原的基于 PAM4 的酶免疫测定一般支持免疫组织数据(表 2)。PAM4 表位不在正常胰腺组织及其它非胃肠道组织中存在。在肿瘤组织中,PAM4 可与 25 个胰腺癌中的 21 个(85%)(表 3 和表 4)和 26 个结肠癌中的 10 个反应,但与胃肺、乳腺、卵巢、前列腺、肝或肾的肿瘤的反应性有限(表 4)。PAM4 反应性似乎与肿瘤分化的阶段有关,在分化良好的胰腺癌中观察到的染色比在中度分化或分化差的肿瘤中观察到的染色比例更高。一般来说,分化差的肿瘤占有所有胰腺癌的不超过 10%。

[0255] 这些研究已经表明,PAM4 反应性和组织分布(正常和癌)与所报道的 CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2 和 B72.3 抗体以及针对 Lewis 抗原的抗体不同。所述数据连同用这些 MAb 中的一些进行的交叉阻断研究 表明,PAM4MAb 识别独特的新型表位。当与由 CA19.9 抗体、DUPAN2 抗体和抗 Le^a 抗体识别的抗原相比时,PAM4 抗原似乎更受限于其组织分布,且可与更大比例的胰腺肿瘤反应。此外,在浓度相当的情况下,其给出更高的总反应强度,且可与更高比例的胰腺肿瘤内细胞反应。最后,发现 PAM4 仅可与十二个慢性胰腺炎样本中的三个微弱反应,而 CA19.9 和 DUPAN2 则可与所有十二个样本强烈反应。虽然人们认识到特异性部分取决于所采用的测定类型和受检组织的范围及数量,但 PAM4 区别正常与肿瘤胰腺组织的能力、其与大比例癌样本反应的能力、反应的高强度以及区别早期胰腺癌与良性病症(如胰腺炎)的能力都是这种示例性抗胰腺癌抗体的重要特征。

[0256] 表 1 用 MAb PAM4 对正常成人组织进行的免疫过氧化物酶染色

[0257]

组织	染色 反应
胰腺 (22) ^a	-
导管	-
腺泡	-
胰岛	-
颌下腺 (2)	-
食道 (2)	-
胃 (3)	+ 粘液分泌细胞
十二指肠 (3)	+ 杯状细胞
空肠 (3)	+ 杯状细胞
回肠 (3)	+ 杯状细胞
结肠 (5)	+ 杯状细胞
肝脏 (3)	-
胆囊 (2)	-
支气管 (3)	-

肺 (3)	—
心脏 (3)	—
脾脏 (3)	—
肾脏 (3)	—
膀胱 (3)	—
前列腺 (2)	—
睾丸 (2)	—
子宫 (2)	—
卵巢 (2)	—

[0258] ^a- 括号中为检查的个体样本的数目

[0259] 表 2 通过 EIA 测定的单克隆抗体 PAM4 与正常成人组织均质物的反应性

[0260]

组织	μ g/g 组织 ^a
胰腺	6.4
食道	8.1
胃	61.3
十二指肠	44.7
空肠	60.6
结肠	74.5
肝脏	0.0
胆囊	5.6
心脏	3.7
脾脏	3.4
肾脏	6.6
膀胱	4.9
甲状腺	3.5
肾上腺	1.3
尿管	2.6
睾丸	3.9
CaPan1 胰腺肿瘤	569

[0261] ^a- 是两个尸检样本的平均值

[0262] 表 3 若干单克隆抗体与胰腺肿瘤的免疫组织化学反应性

[0263]

	分化	PAM4	CA19.9	Le ^a	DUPAN2
1	W	+++	—	—	+++
2	M	++	+++	+++	+
3	M	+	—	+	+
4	M	+++	+++	+++	+
5	M	++	+	—	—
6	M	+	ND	ND	ND
7	M*	+++	+++	+++	+++
8	M	+	—	—	+++
9	M	++	+	++	—
10	M*	++	++	++	+++
11	M	++	+++	+++	+
12	M	++	+	+	+++
13	M	+	+++	+++	+
14	M	++	+	+	++
15	M	+++	+	+	++
16	M	+	+	++	—

17	M	-	+	+	-
18	M	++	++	++	++
19	M	+++	+	+++	++
20	M	+	-	-	-
21	M	+++	+++	+	++
22	P	+	+	+	+++
23	P	-	-	-	-
24	P	-	-	-	-
25	P	-	-	+	-
TOTAL		21/25	17/24	18/24	16/24

[0264] - :阴性 ;+ :5-20%的组织被染色 ;++ :21-50%的组织被染色 ;

[0265] +++ :> 50%的组织被染色 ;W, M, P :分化良好、中度或差 ;

[0266] * :转移性组织 ;ND :未测定

[0267] 表 4 用 MAb PAM4 对肿瘤组织进行免疫过氧化物酶染色

[0268]

癌组织	阳性 / 总数
胰腺	21/25
结肠	10/26
胃	1/5
肺	1/15
乳腺	0/30
卵巢	0/10
前列腺	0/4
肝脏	0/10
肾脏	0/4

[0269] 实例 3 放射性标记的 PAM4 的体内生物分布和肿瘤靶向

[0270] PAM4 的初步生物分布研究是在覆盖预期分化范围的一系列四种不同的异种移植人胰腺癌肿瘤中进行的。所采用的四个肿瘤细胞系 (AsPc1、BxPc3、Hs766T 和 CaPan1) 中的每个都显示出在肿瘤内的 ^{131}I -PAM4 的浓度 (范围 :第三天为 21% -48% ID/g) 显著 ($P < 0.01-0.001$) 高于同时施用的非特异性同型匹配的 Ag⁸ 抗体 (范围 :第三天为 3.6% -9.3% ID/g)。生物分布数据用于估计对 12, 230、10, 684、6, 835 肿瘤的潜在辐射剂量和分别对 AsPc1、BxPc3、Hs766T 和 CaPan1 的 15, 843cGy/mCi 注射剂量。实际最大耐受剂量 (MTD) 为 0.7mCi, PAM4 可以为每个异种移植肿瘤模型提供大辐射剂量。在每个肿瘤细胞系中,放射性标记 PAM4 的血中浓度显著 ($P < 0.01-0.001$) 低于非特异性 Ag8。由 PAM4 对血液的潜在辐射剂量比由 Ag8 的低 1.4-4.4 倍。当由 PAM4 对肿瘤的辐射剂量标准化为由 PAM4 的血液剂量时,肿瘤接收分别比血液高 2.2、3.3、3.4 和 13.1 倍的剂量。重要的是,对于非肿瘤组织的潜在辐射剂量是最低限度的。

[0271] 利用 CaPan1 肿瘤模型对 PAM4 的生物分布与抗 CEA 抗体、MN-14 进行比较。肿瘤内 PAM4 的浓度比早期时间点上的 MN-14 的浓度高很多,在第三天产生的肿瘤 :血液比例对 PAM4 为 12.7 ± 2.3 ,相比之下对 MN-14 为 2.7 ± 1.9 。虽然在早期时间点上肿瘤内的 PAM4 吸收显著显高 MN-14 (第一天 $-P < 0.001$;第三天 $-P < 0.01$),但是在十四天研究期间,剂量分析表明 PAM4 对肿瘤的辐射剂量仅比 MN-14 高 3.2 倍。这是由于 PAM4 从肿瘤中的快速清除,这样在稍后的时间点上,在肿瘤内便出现了两种抗体的相似浓度。由 PAM4 从肿瘤中的

快速清除也见于 BxPc3 和 Hs766T 肿瘤模型,但没有 AsPc1 模型。这些观测不像其它抗粘蛋白抗体的报告情况,例如大肠癌中的 G9 和 B72.3,其中与 MN-14 抗体相比,每个都表现出较长的保留时间。对 PAM4 代谢的研究结果表明在最初与肿瘤细胞结合之后,抗体迅速释放,可能被异化或成为抗原:抗体复合物。血液清除也非常迅速。这些数据表明 ^{131}I 可能不是同位素治疗应用的合适选择。可以频繁施用的短寿命同位素(如 ^{90}Y 或 ^{188}Re)可能是更有效的试剂。

[0272] 除了在 CaPan1 肿瘤模型中以外,没有显示 PAM4 靶向正常组织的迹象,在 CaPan1 肿瘤模型中观察到了虽然小但统计上显著的脾吸收(范围:第三天为 3.1-7.5% ID/g)。在抗粘蛋白抗体 B72.3 和 CC49 的临床应用中,已经观察到这种类型的脾靶向。重要的是,这些研究还报告了脾靶向不影响抗体的肿瘤吸收也不干扰核扫描的解释。这些研究表明了脾靶向不是由于脾内的交叉反应性抗原也不是由于通过 Fc 受体的结合所引起的,而是由以下一种或多种可能性引起的:截留在脾中的抗原的直接靶向或抗原:抗体复合物(形成在血液中或从肿瘤部位释放)的间接吸收。后者会要求免疫复合物在血液中的存在。然而,当通过凝胶过滤(HPLC, GF-250 柱)早至五分钟和晚至七天时检查的样本时没有观察到这些;放射性标记的抗体洗脱为原生材料。前者的解释似乎更可能是鉴于以下事实:CaPan1 肿瘤产生了大量的 PAM4 反应性抗原,比其它所检测的肿瘤细胞系高 100 至 1000 倍。这些其它肿瘤细胞系中缺乏由 PAM4 进行的脾靶向表明这一现象与产生过量的抗原有关。脾靶向可以通过将蛋白剂量从原来的 $2\mu\text{g}$ 增加到 $10\mu\text{g}$ 来克服。可能是较多量脾截留的抗原与未标记的 PAM4 而不是与放射性标记的抗体复合。增加蛋白质的剂量不会对 PAM4 对肿瘤或非肿瘤组织的靶向产生不利影响。实际上,蛋白质的剂量增加至 $100\mu\text{g}$ 使 CaPan1 肿瘤内的放射性标记的 PAM4 的浓度增加了一倍以上。

[0273] 实例 4 无胸腺裸鼠中的正位胰腺肿瘤模型的开发

[0274] 为了使动物模型中的胰腺癌的临床表现更相似,我们通过将肿瘤细胞直接注入胰头开发了正位模型。正位 CaPan1 肿瘤无明显症状地逐渐生长,直至在十到十四周出现腹水和死亡。植入 3 至 4 周后,动物出现了大约 0.2g 的可以摸到的肿瘤。在八周的生长期,观察到大约 1.2g 的原发性肿瘤和并转移到肝和脾(1-3 个转移性肿瘤/动物;每个肿瘤 $< 0.1\text{g}$)。在十到十四周,隔膜的色斑与腹水的发展很明显。腹水形成和偶发性黄疸病往往是肿瘤生长的第一明显指征。此时的肿瘤较大(1 至 2g),动物最多只存活三至四周就死亡。

[0275] 施用到携带四周龄正位肿瘤(大约 0.2g)的动物的放射性标记的 ^{131}I -PAM4 显示其对原发瘤的特异性靶向,其中第一天的定域指数为 7.9 ± 3.0 ,在第十四天定域指数上升至 22.8 ± 15.3 。没有发现对其它组织的特异性靶向的证据。在观察到肿瘤转移到肝和脾的一个实例中,两个转移肿瘤都被靶向并具有高浓度的放射性标记抗体。此外,大约一半的动物在切口处出现了皮下肿瘤。在同一动物体内的正位肿瘤和皮下肿瘤的靶向没有发现有明显的差异,不论动物是否具有其它的皮下肿瘤,都可以观察到正位肿瘤的靶向没有明显的差异。PAM4 对原发性肿瘤和血液的估计辐射剂量分别为 6,704 和 1,655cGy/mCi。实例 5 胰腺癌的实验性放射免疫治疗

[0276] 对用于治疗 ^{131}I -PAM4 的初步研究是使用 CaPan1 肿瘤来进行的,所述的 CaPan1 肿瘤是在无胸腺小鼠中作为皮下异种移植瘤生长的。在对相似剂量的非特异性 Ag8 的治疗

效果进行比较的实验中,具有 0.25g 肿瘤的动物被施用了 350 μ Ci 的 ^{131}I -PAM4。对具有 1cm³ 的肿瘤的动物施用 ^{131}I -PAM4 的 MTD 为 700 μ Ci。在第周五周和第六周的时,用 PAM4 治疗的动物显示出了显著的肿瘤退化,甚至在第二十七周的时候,八个剩余肿瘤中有五个肿瘤消退了。虽然在未治疗的动物和 Ag8 治疗的动物的两个对照组之间有明显的差异,但是未治疗的动物以及 Ag8 治疗的动物出现了肿瘤生长的迅速恶化。在第七周,未治疗组的肿瘤已经从初始的时间点生长了 20.0 ± 14.6 倍,而 ^{131}I -Ag8 治疗的肿瘤只生长了 4.9 ± 1.8 倍。在这个时间点上,PAM4 肿瘤消退到原来大小的 0.1 ± 0.1 倍,相对未治疗 ($P < 0.001$) 的动物和非特异性 Ag8- 治疗的 ($P < 0.01$) 动物都有明显的差异。

[0277] 这些数据显示了 CaPan1 肿瘤对用 ^{131}I -PAM4 进行治疗的敏感。其结果(即在肿瘤消退或恶化)由包括最初肿瘤大小在内的若干因素决定。因此,用单剂量为 350 μ Ci 的 ^{131}I -PAM4 来治疗携带重达 0.25g、0.5g、1.0g 或 2.0g 的 CaPan1 肿瘤的动物的组。大部分(每组 10 只动物中的 9 只)携带初始大小为 0.25g 和 0.5g 肿瘤的动物都在治疗后的至少十六周时显示出肿瘤的退化或生长的抑制。在携带 1.0g 的肿瘤的动物组中,七个中的五个显示出肿瘤在十六周期间没有生长,在携带 2.0g 的肿瘤动物组中,九个中的六个显示出肿瘤发生恶化之前的六周期间没有出现肿瘤生长。350 μ Ci 的单剂量对于较大的肿瘤不是很有效,所以单剂量对于较大肿瘤可能不是适当的方案。

[0278] 毒性研究表明了可以进行对较大的肿瘤更有疗效的多周期放射免疫疗法的能力。对携带平均重达 1.0g 的 CaPan1 肿瘤的动物施用单剂量的 350 μ Ci ^{131}I -PAM4、双剂量(在零时间和四周时)或不对其进行治疗。没有治疗的组的平均存活时间为 3.7 ± 1.0 周(存活时间由肿瘤长到达 5cm³ 的时间而定)。这些动物最早的是在三周的时候死亡,没有动物可以存活六周。单剂量的 350 μ Ci ^{131}I -PAM4 使存活时间显著延长为 18.8 ± 4.2 周 ($P < 0.0001$)。动物死亡的时间范围从十三周延长到二十五周。没有一个动物能够在二十六周的研究期的结束的时候依然活着。

[0279] 与施用了单剂量的动物组相比,施用了双剂量的动物组的存活时间明显延长了。一半动物在第二十六周的时候都活着,其中肿瘤的大小为 1.0 至 2.8cm³,平均的肿瘤增长率是初始的肿瘤大小的 1.6 ± 0.7 倍。对于那些在第二十六周没有存活的动物来说,平均存活时间 (17.7 ± 5.3 周) 与施用了单剂量的动物组的平均存活时间相似。

[0280] 还使用正位肿瘤模型进行 PAM4 治疗的研究。或者不治疗或者用单剂量的 350 μ Ci 的 ^{131}I -PAM4 或 350 μ Ci 的 ^{131}I -非特异性 Ag8 来治疗携带四周龄的正位肿瘤(估计肿瘤的重量为 0.25g) 的动物组。第十周的时候,没有被治疗的动物的死亡率为 50%,在第十五周的时候,所有的动物都死亡了。对于在肿瘤生长的第四周施用了非特异性 ^{131}I -Ag 的动物,其在第七周的死亡率为 50%,在第十四周的时候,所有的动物都死亡了。虽然在统计上(时序分析)这两组之间没有显著差异,但是在 Ag8 治疗的动物中有可能发生放射毒性。与未治疗的或 Ag8 治疗的动物相比,放射性标记 PAM4 提供了重要的生存优势 ($P < 0.001$),其中在第十六周的时候,即实验结束的时候,存活率为 70%。此时,处死幸存的动物以确定肿瘤的大小。所有的动物都有平均重量为 1.2g 的肿瘤以及一个或两个小 ($< 0.1\text{g}$) 转移肿瘤(在七个动物中的四个中很明显)。在肿瘤生长的第十六周,这些肿瘤更多的是八周大的肿瘤的代表。

[0281] 实例 6GEMZAR 化疗和 ^{131}I -PAM4 实验性放射免疫的综合疗法

[0282] 进行作为测试板阵列的吉西他滨 (GEMZAR) 与 ^{131}I -PAM4 放射免疫治疗的综合使用; 单剂量的吉西他滨 (0、100、200、500mg/kg) vs. 单剂量的 ^{131}I -PAM4 ([MTD = 700 μCi] 100%、75%、50%、0% 的 MTD。发现合并的 MTD 是 500mg/kg 吉西他滨与 350 μCi 的 ^{131}I -PAM4 (50% 的 MTD) 的合并。通过体重的减少来测量的毒性在最大时 (即减少 20% 的体重) 被认为是无毒的。虽然综合治疗方法明显比单独施用吉西他滨单更有疗效, 但是治疗效果却没有比单独用放射免疫治疗的效果好。下一个研究是以低剂量的吉西他滨和放射免疫治疗来检查是否能观察到真实的协同治疗效果。携带约 1cm^3 (约为体重的 5%) 的肿瘤的无胸腺裸鼠在刚开始、第三天、第六天、第九天和第十二天被施用 100mg/kg 的吉西他滨, 刚开始时候施用 100 μCi 的 ^{131}I -PAM4。与单独施用吉西他滨相比较, 观察到的疗效是: 肿瘤在统计上明显消退 (五个肿瘤中的两个小于 0.1cm^3) 和 / 或肿瘤的生长得到抑制。因此, 低剂量的治疗剂会出现令人惊讶的吉西他滨和放射免疫治疗相结合的协同效应。此外根据体重的标准, 没有观察到毒性。如上文所述的单独的放射免疫治疗研究, 如果需要的话, 这种组合治疗方法可以经过几个周期来完成, 其中包括从第四周开始的第二周期。

[0283] 实例 7 用双特异性 cPAM4x734 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - 或 ^{111}In 标记肽半抗原进行的预靶向

[0284] 为了用预靶向方法进行胰腺癌的成像, 我们制备了由嵌合 PAM4 (cPAM4) Fab' 和鼠源 734 (m734) Fab' 组成的双特异性的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 抗体 (bsMAb)。鼠源 734 抗体识别 In-DTPA 复合体。此 bsMAb 用 ^{125}I (7 μCi) 标记并注射到具有人胰腺癌异种移植瘤 (CaPan1) 的无胸腺裸鼠中。由嵌合利妥昔 (抗 CD20 的单克隆抗体) 和 m734 制备的非靶向的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ bsMAbF 用 ^{131}I 来标记并作为对照一起注射。在不同的时间点 (第 4、24、36、48 和 72 小时注射后) 对小鼠进行剖检, 将组织取出并计算以确定每克的注入剂量百分比 (% ID/g)。与对照 bs- 利妥昔 ($P < 0.032$ 或更高) 相比, bsPAM4 在每个时间点对肿瘤的吸收率明显更高。我们过去施用这种类型的预靶向系统的经验表明: 不到 1% 的 ID/g 的血中浓度可以获得良好的肿瘤和非肿瘤的比例。在施用 bsPAM4 后的 36 小时的时候, 血中浓度为 $1.10 \pm 0.40\%$ ID/g, 其在注射后 48 小时的时候降为 $0.56 \pm 0.08\%$ ID/g。在这两个时间点的肿瘤吸收度分别为 $6.43 \pm 1.50\%$ ID/g 和 $5.37 \pm 2.38\%$ ID/g。这些值明显高于对照 bs- 利妥昔 (rituximab), 其中在第 36 小时和 48 小时的时候, bs- 利妥昔在肿瘤中的浓度分别为 $0.65 \pm 0.33\%$ ID/g 和 $0.47 \pm 0.19\%$ ID/g ($P < 0.018$ 和 $P < 0.0098$)。然而血液清除率却非常相似且无明显差异。

[0285] 基于这些数据, 对在施用了 bsMAb 的后的第 40 小时的时候注射了放射性标记肽半抗原的 CaPan1 荷瘤小鼠进行了预靶向实验。使用了两个肽 (IMP-192 和 IMP-156), 其中每个都包含由 734MAb 识别的二价 DTPA, 但是其中一个具有对稳定结合 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (IMP-192) 具有特异性的额外的基团。在施用放射性标记肽半抗原 ($34.5\mu\text{Ci}$; 1.5×10^{-11} 摩尔; bsMAb : 肽 = 10 : 1) 之后的 40 小时后对荷瘤小鼠 (肿瘤大小约为 0.30cm^3) 施用 ^{125}I -bsPAM4 (6 μCi)。一组小鼠接受了 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - 标记 IMP192 的治疗, 而第二组小鼠接受了 ^{111}In - 标记 IMP156 的治疗。非特异性靶向的对照包括了两组在施用放射性标记肽之前接受了 ^{125}I -bs- 利妥昔的小鼠和另外两组单独接受了 ^{111}In 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记肽的小鼠。

[0286] 小鼠在施用肽之后的 3 和 24 小时的时候被处死, 对肿瘤和各组织确定 % ID/g。与我们以前的研究结果相一致, bsPAM4 在肿瘤中的浓度明显高于非靶向的对照 bsRituximab, 分别为 $8.2 \pm 3.4\%$ 和 $0.3 \pm 0.08\%$ ID/g ($P < 0.0001$)。这意味着 ^{111}In -IMP156

的肿瘤吸收明显提高 ($20.2 \pm 5.5\%$ ID/g vs. $0.9 \pm 0.1\%$ ID/g, $P < 0.0001$)。在用 bsPAM4 预靶向的小鼠中 ^{99m}Tc -IMP192 对肿瘤的吸收也明显高于那些用 bs-利妥昔 (rituximab) 预靶向的小鼠中的 ^{99m}Tc -IMP 192 对肿瘤的吸收 ($16.8 \pm 4.8\%$ ID/g vs. $1.1 \pm 0.2\%$ ID/g, $P < 0.0005$)。当单独施用肽时, 每种肽的肿瘤吸收都明显低于那些接受了 bsPAM4 的小鼠的肿瘤吸收 (^{99m}Tc -IMP 192 和 ^{111}In -IMP156 的吸收分别为 $0.2 \pm 0.05\%$ ID/g 和 $0.1 \pm 0.03\%$ ID/g, $P < 0.0004$ 和 $P < 0.0001$)。

[0287] 与 3 小时的时间点一样, 在注射了肽之后的 24 小时的时候 (bsMAb 施用后 64 小时), 肿瘤中的 bsPAM4 比 bs-利妥昔 (rituximab) 明显要多 (分别为 $6.4 \pm 2.2\%$ ID/g vs. $0.2 \pm 0.09\%$ ID/g; $P < 0.0001$)。在这个时间点, 在 bsPAM4 预靶向的小鼠的肿瘤中的 $11.1 \pm 3.5\%$ ID/g ^{111}In -IMP156 和 $12.9 \pm 4.2\%$ ID/g ^{99m}Tc -IMP 192 vs. bs-利妥昔 (rituximab) 预靶向的肿瘤中的 $0.50.2\%$ ID/g 和 $0.4 \pm 0.03\%$ ID/g (分别为 $P < 0.0008$ 和 $P < 0.0002$)。在单独接受了肽的小鼠体中, 肿瘤中的 ^{99m}Tc -IMP192 ($0.06 \pm 0.02\%$ ID/g, $P < 0.0007$) 和 ^{111}In -IMP156 ($0.09 \pm 0.02\%$ ID/g, $P < 0.0002$) 明显低于 bsPAM4 预靶向的肽。

[0288] 表 5 早期时间点的肿瘤：非肿瘤组织比

[0289]

	预靶向 ^{111}In -肽 (3小时)		预靶向 ^{99m}Tc -肽 (3小时)		^{125}I -bsPAM4 F(ab') ₂ (4小时)	
组织	平均值	($\pm$ STD)	平均值	($\pm$ STD)	平均值	($\pm$ STD)
肿瘤	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00

[0290]

肝脏	36.07	11.74	16.66	7.19	2.34	0.61
脾脏	33.40	20.62	14.62	9.12	2.15	.074
肾脏	7.79	2.81	8.13	3.33	1.10	.020
肺	44.55	12.99	15.75	5.85	1.58	.037
血液	36.47	8.28	9.93	5.21	0.47	0.11
骨骼	123.24	40.00	---	---	---	---
W. Bone	378.00	124.57	---	---	---	---
胰腺	155.55	30.07	73.29	32.85	4.65	1.23
肿瘤						
重量 (g) (STD)	0.189	(0.070)	0.174	(0.040)	0.179	(0.139)

[0291] 表 5 列出了这些组的各组织的肿瘤：非肿瘤比 (T : NT), 每个都在施用了放射性标记产品后的早期时间点。重要的是要注意在施用了 bsPAM4xm734F(ab')₂ 后的第四个小时, 肿瘤：血液比小于 2 : 1。但是在施用后的第三个小时的时候, 对于所有的检查组织, 预靶向的 ¹¹¹In-IMP156 和 ^{99m}Tc-IMP192 具有明显高的肿瘤：非肿瘤比, 特别是肿瘤：血液比等于 36 : 1 和 9 : 1, (分别为 P < 0.001 和 P < 0.011)。当我们在 24 小时时间点上检查肿瘤：血液比时, 预靶向 ¹¹¹In-IMP156 和 ^{99m}Tc-IMP192 具有明显高的比例值 - 分别为 274 : 1 和 80 : 1, vs. 单独用 ¹²⁵I-bsPAM4 时的 4 : 1 (P < 0.0002)。这些数据有力地证明了通过短半衰期、高能量的放射性同位素利用该预靶向 bsPAM4 方法的能力, 其中所述同位素将高辐射剂量递送到非肿瘤组织上, 对非肿瘤的辐射剂量最少。

[0292] 实例 8PAM4 抗体与转染细胞系的结合

[0293] 转染胰腺细胞

[0294] 不表达 MUC-1 粘蛋白的 PanC1 人胰腺癌细胞用编码 cDNA 的 MUC-1 来转染, 如 Hudson 等 (Amer. J. Pathol. 148, 3 : 951-60, 1996) 中所披露, 并从 Dr. M. A. Hollingsworth (Univ. of Nebraska Medical Center, Omaha, NE) 购买。MUC-1 cDNA 编码 MUC-1 的 30 串联重复序列 (30TR) 或 42 串联重复序列 (42TR) (Hudson 等, 1996 ; Lidell 等, FEBS J. 275 : 481-89, 2008)。除了编码的串联重复序列的数目外, MUC-1 序列都是相同的。

[0295] 通过细胞培养的上清液的酶免疫测定来检查用 30TR 或 42TRMUC-1 转染的 PanC1 细胞或对照载体（没有插入或逆转插入）或未转染的 PanC1 细胞与 PAM4 抗体的反应性。无论是未转染的 PanC1 细胞还是转染的 PanC1 细胞都没有通过免疫测定产生可检测级别的 PAM4 反应性粘蛋白（未显示）。但是，30TR 和 42TR MUC-1 转染的细胞均与 PAM4 抗体高度反应（未显示）。

[0296] 使用更加敏感的免疫测定来对转染的 PanC1 细胞进行复查。简言之，细胞在 T75 瓶中生长，直到它们达到约 80% -90% 的融汇为止（从最初接种的第 ~ 4-5 天）。在此时，收集用过的培养基，高速离心，并通过酶免疫测定用于 PAM4 反应性粘蛋白的定量。还收集细胞并计数。源自 Hollingsworth 博士的亲代细胞系和从 American Type Culture Collection (Manassas, VA) 获得的单独的 Panc1 细胞系以及载体对照产生了低的但是可检测量的 PAM4 反应性粘蛋白（分别为 0.87 ± 0.17 、 0.54 ± 0.17 和 $0.02 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}/10^6$ 细胞），而 30TR-MUC-1 基因转染的细胞产生了 $14.17 \pm 2.22 \mu\text{g/mL}/10^6$ 细胞（30TR-MUC-1 基因转染的培养基与所有其它样本相比， $P < 0.0003$ 或更高）。

[0297] 据报道，PanC1 细胞与 MUC-1cDNA 的转染除了通过转染的 PanC1 细胞提高了 MUC-1 的表达，同时也对于细胞蛋白的表达具有副效应—如提高转染细胞 (Hudson 等, 1996, 摘要) 中，但仅在用较大的 (42TR) MUC-1cDNA 转染的细胞 (Hudson 等 1996, pg. 956, col. 1, 3rd 段落) 中的细胞角蛋白 8 和 18 的水平。

[0298] 转染的肾细胞

[0299] MUC-1 基因转染的 HEK-293 (人胚胎肾细胞) 产生可与 MA5 单克隆抗体反应但不与 PAM4 反应的 MUC-1 (未显示)。但是，如上所述，表达非常低水平的内源性 MUC-1 的 MUC-1 转染的 PanC1 细胞合成了可与 PAM4 强烈反应但不与 MA5 反应的 MUC-1。异源夹心免疫测定 (PAM4 → MA5 和 MA5 → PAM4 捕获 / 探针) 没有用来来自几个细胞系的上清液产生信号。作为探针的多克隆抗粘蛋白抗血清的使用提供了有效的免疫分析，该探针带有作为捕获剂的 PAM4 或 MA5MAb。在它们各自的免疫分析中的这两个 MAb 的交叉阻断表明了这些 MAb 都可与独立的位表发生反应。

[0300] 数据表明在同一抗原分子中没有共同表达 PAM4 和 MA5 表位，而 PanC1 细胞系可拥有产生 HEK-293 细胞不能产生的 PAM4 表位的生物合成过程。MUC-1 核心蛋白的翻译后的修饰的差异（特异性糖基转移 酶的表达 / 活性）可能是这些调查结果的原因。

[0301] 实例 9 对 PAM4 抗原的免疫活性的试剂治疗效果

[0302] 用 DTT 进行的胰腺粘蛋白 PAM4 抗原的治疗（室温下进行 15 分钟）彻底摧毁了与 PAM4 (DTT-EC50, $0.60 \pm 0.00\text{M}$) 的反应。MUC-1 内的唯一半胱氨酸（胱氨酸桥）存在于跨膜域内，且不会进入 DTT。MUC-1 的分泌形式不包含跨膜域，因此也没有分子间胱氨酸桥梁。来自用 0.05M 的高碘酸盐在室温下进行 2 小时的 PAM4 抗原的高碘酸盐氧化治疗的数据显示 40% 的与 PAM4 抗体的免疫反应损失（未显示）。进一步的高碘酸盐研究显示了 60% 的与 PAM4 抗体的免疫反应的损失（未显示）。高碘酸盐和 DTT 研究的结果表明了 PAM4 表位一致地取决于一些最小形式的糖基化，并且会受到分子间二硫键形成的影响。

[0303] 实例 10 PAM4 抗原的分布和交叉反应性

[0304] PAM4 表位在 PanIN 内的表达对于 MUC-1 是非典型的。如通过市售的 MA5-CLH2-2 检测的一样，这类似于 MUC-5ac 报告的表达。然而，用 PAM4 捕获和 MA5-CLH2-2 为探针的尝

试夹心免疫测定产生了消极的结果。虽然这可能表明了 PAM4 和 CLH2-2 表位会部分重叠,从而会互相抑制,但是据报道,CLH2-2 与 42/66(64%)胃癌反应,而 PAM4MAb 显示了只与 6/40(15%)的胃癌反应,其中只有病灶反应性。

[0305] 使用市售的 45M1(一种抗 MUC-5ac MAb)作为探针试剂(用 PAM4 作为捕获剂)提供了阳性结果,这表明这两个表位可在同一个抗原分子上存在。阻断研究(两个方向)表明了由于观察到没有发生阻断,所以通过 45M1 和 PAM4 结合的表位其实是两个不同的表位。由来自侵袭性胰腺癌的核心组成的组织微阵列表明了个体患者的样本中的 45M1 和 PAM4 表位的表达的明显差异。在 28 个样本中,只在 17 例(61%)的样本中观察到了一致性。PAM4 可与 24/28 例(86%)反应,而 45M1 可与 13/28 例(46%)反应(未显示)。

[0306] 在上述关于 MUC-1 基因转染的研究中(实例 8),MUC-1 的表达可上调另一种粘蛋白的表达或以一些其它方式影响 PAM4 表位的暴露是有可能的。高碘酸研究的结果与在 PAM4 抗原与 PAM4 抗体进行免疫反应中作为因子的糖基化是一致的。因此,核粘蛋白的研究结果不能确定抗原测定。

[0307] 虽然基于 EIA 捕获剂,PAM4 抗体似乎可以与同 45M1 抗-MUC-5acMAb 相同的抗原蛋白结合,但是应注意 MUC-5ac 对胰腺癌没有特异性,并且在一些正常组织(而不是与 PAM4 反应的胃粘膜)中发现了 MUC-5ac。例如,在正常的肺组织、结肠组织及其它组织中发现了 MUC-5ac。除了上述有限或最少量几个样本中所示的以外,PAM4 抗体没有与正常的肺组织结合。

[0308] 关于 DTT 和高碘酸盐的影响,无论什么组织产生蛋白,有可能肽核心二硫键都是一致的。特定的氨基酸序列应该以特定的方式折叠,而与组织来源无关。然而,糖基化模式可能随组织来源而不同。

[0309] 实例 11PAM4 抗体的噬菌体展示肽结合

[0310] 用两种不同的噬菌体展示肽库来检测 PAM4 抗体结合。其中第一种是由 12 个氨基酸序列组成的线性肽库,第二种是由 7 个由二硫桥键环化的氨基酸序列组成的环肽。我们选择了交替对抗 hPAM4 和 hLL2 的个体肽库(用抗 CD22 的抗体进行阴性选择)的各个库,然后筛选可与 hPAM4 和 mPAM4 反应且几乎对 hLL2 不反应的噬菌体展示肽。摒弃了以非特异性方式(即,与依帕珠单抗[hLL2]结合)进行的噬菌体结合。

[0311] 对于线性噬菌体展示肽,序列 WTNITKAYPLP(SEQ ID NO:29)被确定了 30 次(35 测序噬菌体),每次都显示了与 PAM4 抗体的反应性。如前述,在对基于该序列的肽库和在每个位置具有 7.5%的退化的肽库进行构建、选择和筛选时进行突变分析。在有助于 PAM4 结合的 19 个获得的肽序列中发生了变异,其中 7 个与亲本序列一致,5 个具有序列 WTNITKEYPQP(SEQ ID NO:31),其余的独立存在。表 6 示出了该突变分析的结果。上排列出了确定的序列,下排列出了与每个氨基酸在那个位置上与其一致的序列。亲本序列发生变异的频率最高,下一个最高变异在位置 8 上,E 是 A 的替代物,在位置 11 上,Q 是 L 的替代物。没有发现这些替代物对于免疫反应有任何大的影响。

[0312] 表 6 通过线性肽与 PAM4 抗体结合发生的噬菌体展示氨基酸序列变异(SEQ ID NO:60)

[0313]

	W	T	W	N D	I	T R	K R T N G	A E T R F C	Y T	P R	L Q I M C	P
发生的 数量(19 个分析 的序列 中的数 量)	1919	1919	1919	18 1	1919	17 2	14 1 2 1 1	10 5 1 1 1	18 1	17 2	11 5 1 1 1	1919

[0314] 噬菌体展示的环境与线性库明显不同(表7)。序列 ACPEWWGTTC(SEQ ID NO :30)存在于所检查的 35 个肽序列中的 33 中。环境的分析显示了以下结果(标星号的位置是变异的,且不会受到库中选择压力)

[0315] 表 7 通过线性肽与 PAM4 抗体结合而发生的噬菌体展示氨基酸序列变异(SEQ ID NO :60)

[0316]

	A	C	P Y	E	W	W	G S	T G S	T M S Q P	C
发生的数量(19个分析 的序列中的数量)	*	*	33 2	35	35	35	34 1	29 5 1	28 4 1 1	*

[0317] 两个半胱氨酸（在位置 2 和 10）形成了二硫键。在位置 9 用任何氨基酸对 T 的代替都极大地影响免疫反应。与上述所示的环肽序列相比，

[0318] 序列 GTTGTC (SEQ ID NO :32) 存在于朝向氨基端的 MUC-5ac 中，所述的环肽序列在共有肽序列的 C- 末端显示了同源性。但是，环肽只显示了约 10% 的线性序列与 PAM4 抗体的免疫反应。线性和环共有序列均与半胱氨酸相关联，这可能会或可能不会涉及到 DTT 对于 PAM4 抗原免疫反应的影响。

[0319] 本文所报告的结果表明 PAM4 抗原依赖于可能是通过二硫键以及特定的糖基化模式产生的特定构象。

[0320] 实例 12 胰腺炎样本中的胰腺癌的免疫组织学

[0321] 几种病情（如胰腺炎、糖尿病、吸烟等）使患者易患胰腺癌。在该预先选定的患者组中，筛选措施对于提取检查胰腺肿瘤形成特别重要。我们检查了从接受了这种疾病的初步诊断的患者中提取的 9 个慢性胰腺炎组织。我们采用了抗 CD74MAb-LL1 作为炎性浸润的指示剂，并采用 MAb-MA5 作为胰腺导管细胞和腺泡细胞的阳性对照组。然而这两个对照 MAb 却提供了与胰腺炎一致的免疫组织证据，在任何情况下，PAM4 都不会与发炎的胰腺组织发生反应。然而，在第一种情况下，中分化的胰腺癌也同时存在于组织样本中。PAM4 使肿瘤细胞在该肿瘤中发生了强烈染色。在第二种情况下，发炎组织却对 PAM4 呈阴性，小 PanIN 前体病灶被确定用 PAM4 标记。PanIN 在后面的样本中的标记与对被诊断患有非恶性疾病的患者进行胰腺肿瘤的早期检查一致。这些结果表明了使用 PAM4 抗体的检测和 / 或诊断可以利用针对良性胰腺组织的类型的胰腺肿瘤的高灵敏度和高选择性来进行。

[0322] 实例 13 对患有不能进行手术治疗的转移胰腺癌的治疗

[0323] 患者 118-001-CWG 是位患有 IV 期胰腺癌的 63 岁男性患者,在 2007 年 11 月的诊断中发现了多发性肝转移。他同意接受合并的放射免疫治疗和吉西他滨化疗作为第一治疗方案,然后接受一个治疗周期的 $6.5\text{mCi}/\text{m}^2$ 的 ^{90}Y -hPAM 和 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 的吉西他滨,因此,在第 1-4 周的时候,每周施用一次吉西他滨,在第 2-4 周的时候 (3 剂),每周施用一次 ^{90}Y -hPAM4。两个月之后,因为在第一个治疗周期之后没有发现重大不良反应,所以重复同样的治疗周期。在第一个治疗周期之后的 4 周后,通过 CT 出人意料地发现了原发肿瘤和 3 个肺转移瘤中的 2 个肿瘤的直径有所减小的证据,其中在此时,4 个肿瘤中的 3 个肿瘤恢复到了正常的背景 SUV 水平 (图 6 和图 7)。患者的 1,297 的预处理 CA-19.9 水平下降到 77 的低水平,进一步的支持治疗是有效的。表 8 示出了对该患者进行的 ^{90}Y -hPAM4 和吉西他滨化疗的结合放射免疫治疗的疗效。令人惊讶和出乎人预料的是:这种低剂量的与共轭抗体的放射性核素与这种低剂量的无毒的吉西他滨的结合在即使仅进行了单个治疗周期的治疗之后也显示出了如此高的抗肿瘤活性。

[0324] 表 8 ^{90}Y -hPAM4 和吉西他滨化疗的结合放射免疫治疗对于转移性胰腺癌的疗效

[0325]

肿瘤部位	基线最长直径(cm)	Tx后4周最长直径(cm)	基线 PET(SUV)	Tx 后 4 周 PET(SUV)
胰腺尾 (原发)	4.5	4.3	9.2	4.2
L肝met	1.9	1.9	4.1	背景
R后肝met	1.7	1.6	3.7	背景
R 中心肝met	1.9	1.2	3.2	背景

[0326] 实例 14 对患有不能进行手术治疗的转移胰腺癌的治疗

[0327] 一位 56 岁的男性患者患有不能进行手术治疗的胰腺癌,且体内有数个直径范围在 1 至 4cm 的肝转移肿瘤,其症状表现为体重急剧下降 (降了 30 磅或更多),轻度黄疸,嗜睡和虚弱,每周对其注射剂量为 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 的吉西他滨。在进行最后三次的吉西他滨注射的时候,以剂量为 $10\text{mCi}/\text{m}^2$ 的 ^{90}Y 施用 ^{90}Y -DOTA-hPAM4 放射性标记人源抗体,在静脉注射两小时的时候,施用 20mg 的抗体蛋白。两周后,给予患者一个治疗周期的吉西他滨化疗 (由通过静脉注射进行每周三次剂量为 $600\text{mg}/\text{m}^2$ 的化疗组成)。然后在 4 周后对患者进行评估,发现了轻度的白细胞减少,没有其它超过基线的重大血液或酶变化,但是显示了在 5,700 至 1,200 范围内的血液 CA19.9 滴度的提高和黄疸病症的减少,整体主观病症有所改善。在 3 周之后,重复施用低剂量的吉西他滨 (每周 4) 和 3 剂量的 ^{90}Y -DOTA-hPAM4。四周之后,对患者进行评估,CT 和 PET 扫描结果显示了总的肿瘤块减小了约 40%,进一步 CA19.9 滴度降为

870。患者恢复了食欲及活动,并且无需止痛药物即能恢复进行正常的日常活动。患者在开始试验性治疗后即增重 12 磅。重复扫描和血值表明这种反应会持续 6 周。

[0328] 实例 15 制备用于预靶向的对接和锁定 (DNL) 构建体

[0329] DDD 和 AD 融合蛋白

[0330] DNL 技术可以被用来制备二聚体、三聚体、四聚体、六聚体等,包括几乎任何抗体或其片段或其它效应物部分。对于某些优选的实施例,IgG 抗体或 Fab 抗体片段可以作为包含二聚和对接域 (DDD) 或锚定域 (AD) 序列的融合蛋白质被生产。虽然在优选的实施例中,DDD 和 AD 部分作为融合蛋白被生产,但是技术人员将会意识到可以在本专利的方法和组分范围内采用其它诸如化学交联的共轭方法。

[0331] 双特异性抗体可通过结合第一抗体的 Fab-DDD 融合蛋白和第二抗体的 Fab-AD 融合蛋白而形成。或者,构建体可被制备为结合 IgG-AD 融合蛋白和 Fab-DDD 融合蛋白的构建体。该技术不是限制性的,任何可用的蛋白质或肽可生产为 AD 或 DDD 融合蛋白,用于结合到 DNL 构建体当中。当使用化学交联法时,AD 和 DDD 的共轭物不限于蛋白质或肽,可包含用任何本领域已知的技术可交联到 AD 或 DDD 序列的任何分子。在一些示例性的实施例中,聚乙二醇 (PEG) 或其它聚合物部分可并入 DNL 构建体中,如下的进一步详述。

[0332] 对于预靶向应用,包含与患病组织相关的抗原(如肿瘤相关抗原(TAA))的结合位点的抗体或片段可与结合靶向性构建体上的抗原且附着有治疗和/或诊断剂的第二抗体或片段结合。将基于 DNL 的双特异性抗体施用于受试者,允许循环抗体从血液中清除并定位到靶组织,添加共轭的靶向性构建体并将其与结合定位抗体上进行诊断或治疗。

[0333] 可为每个 Fab 或 IgG 融合蛋白发展独立的转基因细胞系。一旦产生了模块,如果需要可以纯化模块或保留在细胞培养上清液中。生产之后,任何 DDD 融合蛋白模块可与任何 AD 融合蛋白模块结合以生成双特异性 DNL 构建体。对于不同类型的构建体,可以使用不同的 AD 或 DDD 序列。示例性 DDD 和 AD 序列如下。

[0334] DDD1 :SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :33)

[0335] DDD2 :CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :34)

[0336] AD1 :QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO :35)

[0337] AD2 :CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO :36)

[0338] 表达载体

[0339] 质粒载体 pdHL2 已被用于生产许多抗体和基于抗体的构建体。参见 Gillies 等, *J Immunol Methods* (1989), 125 :191-202 ; Losman 等, *Cancer (Phila)* (1997), 80 :2660-6。双顺哺乳动物表达载体指导 IgG 的重链和轻链的合成。对于很多不同的 IgG-pdHL2 构建体,大部分载体序列都相同,只有可变区 (VH 和 VL) 序列不同。利用本领域的技术人员熟知的分子生物工具,这些 IgG 表达载体可以转换为 Fab-DDD 或 Fab-AD 表达载体。为了生成 Fab-DDD 表达载体,用于编码重链的铰链区、CH2 区和 CH3 区的序列被编码铰链的前 4 个残基、第 14 个残基 Gly-Ser 接头和人 RII α (指 DDD1) 的前 44 个残基的序列来替换。为了生成 Fab-AD 表达载体,IgG 的铰链区、CH2 区和 CH3 区被铰链的前 4 个残基、第 15 个残基 Gly-Ser 接头和被称为 AKAP-IS 的第 17 个残基合成 AD (指 AD1) 代替。参见,Alto,等 *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A* (2003), 100 :4445-50。

[0340] 设计了两个穿梭载体以帮助 IgG-pdHL2 载体到 Fab-DDD1 载体或 Fab-AD1 载体的

转换,如下所述。

[0341] CH1 的制备

[0342] 利用 pdHL2 质粒载体作为模板,通过 PCR 来扩增 CH1 区域。左侧 PCR 引物由 CH1 区域的上游(5')端和 SacII 限制性内切酶位点组成,所述内切酶位点是 CH1 编码序列中的 5'。右侧引物由编码铰合(PKSC)的 4 个甘氨酸,其次是 4 个氨基乙酸和丝氨酸组成,最后两个密码子(GS)包括 Bam HI 限制位点。410bp PCR 扩增引物克隆到克隆载体(PROMEGA, Inc.)的 PGEMT PCR 上,并针对插入物,在 T7(5')方向筛选克隆物。

[0343] $(G_4S)_2$ DDD1(如 SEQ ID NO:37 所披露的 $(G_4S)_2$)的构建

[0344] 双链寡核苷酸,指定的 $(G_4S)_2$ DDD1(如 SEQ ID NO:37 所披露的 $(G_4S)_2$),由 Sigma GENOSYS(Haverhill, UK)合成,利用组成 BamHI 限制酶切位点的前两个密码子为连接肽的 11 个残基后面的 DDD1 的氨基酸残基序列编码。在 3' 端添加终止密码子和 EagI 限制酶切位点。编码的多肽序列如下所示:

[0345] GSGGGSGGGGSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:38)

[0346] 两个寡核苷酸,表示为 RIIA1-44 顶和 RIIA1-44 底,由 30 碱基对在其 3' 端重叠,被合成(Sigma **GENOSYS®**)并合并包含 174bp DDD1 序列的中央 154 碱基对。寡核苷酸经过退火和与 Taq 聚合酶的引物延伸反应。以下引物延伸,双链由 PCR 扩增。扩增引物被克隆到 **PGEMT®**上并针对插入物,在 T7(5')方向进行筛选。

[0347] $(G_4S)_2$ -AD1($(G_4S)_2$,披露为 SEQ ID NO:37)的构建双链寡核苷酸,表示为 $(G_4S)_2$ -AD1($(G_4S)_2$,披露为 SEQ ID NO:37),由(Sigma GENOSYS)合成,利用组成 BamHI 限制位点的前两个密码子为连接肽的 11 个残基后面的 AD1 的氨基酸残基序列编码。在 3' 端添加终止密码子和 EagI 限制位点。编码的多肽序列如下所示:

[0348] GSGGGSGGGGSQIEYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:39)

[0349] 两个编码上述肽序列的互补重叠寡核苷酸,表示为 AKAP-IS 顶和 AKAP-IS 底,进行合成和退火处理。双链由 PCR 扩增。扩增引物克隆到 PGEMT 载体上,并针对插入物,在 T7(5')方向进行筛选。

[0350] 用 CH1 配接 DDD1

[0351] 用 BamHI 和 NotI 限制性内切酶将编码 DDD1 序列的 190bp 片段从 PGEMT 上切下,然后在 CH1-PGEMT 中将其配接到相同位点上,以生成穿梭载体 CH1-DDD1-PGEMT。

[0352] 用 CH1 配接 AD1

[0353] 用 BamHI 和 NotI 将包含 AD1 序列的 110bp 片段从 PGEMT 上切下,然后在 CH1-PGEMT 中将其配接到相同位点上,以生成穿梭载体 CH1-DDD1-PGEMT。

[0354] 将 CH1-DDD1 或 CH1-AD1 克隆到基于 pdHL2 的载体上

[0355] 通过这种模块化设计,CH1-DDD1 或 CH1-AD1 可以在 pdHL2 载体中合并到任何 IgG 构建体上。通过将 SacII/EagI 限制片段(CH1-CH3)从 pdHL2 上去除并将其用 CH1-DDD1 或 CH1-AD1 的 SacII/EagI 替换的方式,用上述构建体将整个重链不变区域替换,所述 CH1-DDD1 或 CH1-AD1 是从相应的 pGemT 穿梭载体上切下来的。

[0356] h679-Fd-AD1-pdHL2 的构建

[0357] h679-Fd-AD1-pdHL2 是通过由 14 个氨基酸残基组成的柔性 Gly/Ser 间隔肽利用偶联于 Fd 的 CH1 区域的羧基末端的 AD1 来生产 h679Fab 的表达载体。通过用

CH1-AD1 片段替换 SacII/EagI 片段将含有 h679 的可变区域的基于 pdHL2 的载体转化为 h679-Fd-AD1-pdHL, 所述 CH1-AD1 片段是利用 SacII 和 EagI 从 CH1-AD1-SV3 穿梭载体上切下来的。

[0358] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2 的构建

[0359] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2 是生产包括融合蛋白

[0360] C-DDD1-Fab-hMN-14 的 2 个拷贝的稳定二聚体的表达载体, 在所述融合蛋白中, 通过柔性的间隔肽将 DDD1 链接到 CH1 的羧基末端的 hMN-14Fab。利用 SacII 和 EagI 限制性内切酶进行酶切消化将质粒载体 hMN-14(I)-pdHL2(已经用于生产 hMN-14IgG) 转化为 C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2, 以去除 CH1-CH3 区域和 CH1-DDD1 片段的插入物, 所述 CH1-DDD1 片段是利用 SacII 和 EagI 从 CH1-DDD1-SV3 穿梭载体上切下来的。

[0361] 同样的技术已经用于生产用于各种已知抗体的 Fab 表达的质粒, 如 hLL1、hLL2、hPAM4、hR1、hRS7、hMN-14、hMN-15、hA19、hA20 等。一般来说, 编码序列的抗体可变区域存在于 pdHL2 表达载体中,

[0362] 如上所述, 为了进行 AD-融合蛋白或 DDD-融合蛋白的生产, 可将表达载体转化。可将包括任何这种抗体的 Fab 片段的 AD-融合蛋白或 DDD-融合蛋白合并生成包括第一抗体的 2 个 Fab 片段和第二抗体的一个 Fab 片段的三聚体 DNL 结构, 大致比例为每一个 AD-融合蛋白 2 个 DDD-融合蛋白。

[0363] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2

[0364] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2 是生产 C-DDD2-Fab-hMN-14 的表达载体, 所述 C-DDD2-Fab-hMN-14 拥有通过 14 氨基酸残基 Gly/Ser 连接肽在 hMN-14 的 Fd 的羧基端添加的 DDD2 的二聚和对接域序列。分泌的融合蛋白由 DDD2 域的非共价相互作用一起保留的 hMN-14Fab 的两个同样的拷贝组成。

[0365] 表达载体的设计如下。两个重叠的、互补的寡核苷酸是人工合成的, 其中所述的寡核苷酸包括部分连接肽 (GGGSGGGCG, SEQ IDNO:40) 的编码序列和 DDD2 的残基 1-13。利用 T4PNK 对寡核苷酸进行退火和磷酸化处理, 这样可分别引起在与利用限制性内切酶 BamHI 和 PstI 消化的 DNA 连接兼容的 5' 端和 3' 端上形成延伸。

[0366] 双链 DNA 与穿梭载体 CH1-DDD1-PGEMT 连接, 所述 DNA 是利用 BamHI 和 PstI 进行消化制备的, 以生成穿梭载体 CH1-DDD2-PGEMT。507bp 片段是利用 SacII 和 EagI 从 CH1-DDD2-PGEMT 上切下来的, 并与 IgG 表达载体 hMN-14(I)-pdHL2 连接, 所述载体是通过 SacII 和 EagI 进行消化而制备的。最终表达构建体表示为 C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2。类似的技术已被用来生成许多不同人化抗体的 Fab 片段的 DDD2 融合蛋白。

[0367] h679-Fd-AD2-pdHL2

[0368] h679-Fab-AD2 被设计用来作为 B 与作为 A 的 C-DDD2-Fab-hMN-14 配对。h679-Fd-AD2-pdHL2 是生产 h679-Fab-AD 的表达载体, 所述 h679-Fab-AD 拥有通过 14 氨基酸残基 Gly/Ser 连接肽在 CH1 区域的羧基端添加的 AD2 的锚定域序列。AD2 具有一个 AD1 的锚定域序列之前的半胱氨酸残基和另一个 AD1 的锚定域序列之后的半胱氨酸残基。

[0369] 表达载体的设计如下。两个重叠的、互补的寡核苷酸 (AD2 顶和 AD2 底) 是人工合成的, 其中所述的寡核苷酸包括 AD2 和编码序列和部分连接肽序列。利用 T4PNK 对寡核苷酸进行退火和磷酸化处理, 这样可分别引起在与利用限制性内切酶 BamHI 和 PstI 消化的 DNA

连接兼容的 5' 端和 3' 端上形成延伸。

[0370] 双链 DNA 与穿梭载体 CH1-AD1-PGEMT 连接, 所述 DNA 是利用 BamHI 和 PstI 进行消化制备的, 以生成穿梭载体 CH1-AD2-PGEMT。含有 CH1 和 AD2 编码序列的 429 碱基对片段是利用 SacII 和 EagI 限制性内切酶从穿梭载体上切下来的, 并连接到 h679-pdHL2 载体, 所述载体是通过同样的内切酶进行消化而制备的。最终表达载体是 h679-Fd-AD2-pdHL2。

[0371] TF2DNL 预靶向构建体的生成

[0372] 表示为 TF2 的三聚 DNL 构建体是通过 C-DDD2-Fab-hMN-14 与 h679-Fab-AD 反应得到的。TF2 的试验批量以大于 90 % 的产量生成, 如下所述。蛋白 L- 纯化的 C-DDD2-Fab-hMN-14 (200mg) 以 1.4 : 1 的摩尔比与 h679-Fab-AD2 (60mg) 混合。总蛋白浓度在含有 1mMEDTA 的 PBS 为 1.5mg/ml。后续步骤涉及 TCEP 还原、疏水作用 (HIC) 层析、DMSO 氧化和 IMP291 亲和层析。在添加 TCEP 之前, SE-HPLC 并没有表现出任何 a_2b 编队的证据。迅速添加 5mM 的 TCEP 会引起与核二元结构所需要的 157kDa 蛋白一致的 a_2b 复合体的编队。IMP291 亲和层析 (未示出) 将 TF2 纯化至接近同质。IMP291 是含有 679Fab 所连接 (Rossi 等, 2005, ClinCancer Res 11:7122s-29s) 的 HSG 半抗原的合成肽。IMP 291 的未连接部分的 SE-HPLC 分析表明了 a_4 、 a_2 和自由 K 链从产物 (未示出) 上的去除。

[0373] 非还原 SDS-PAGE 分析表明了大多数的 TF2 是作为一个大的共价结构而存在, 其相对流动性接近 IgG (未示出) 的相对流动性。附加谱带建议二硫键的形成在实验条件 (未示出) 下是不完整的。还原 SDS-PAGE 显示任何非还原凝胶上明显的附加谱带都是相关的产物 (未示出), 由于只有代表 TF2 的组成多肽的谱带是明显的 (未示出)。然而, 四个多肽中的每一个的相对流动性都过于接近以致被溶解。MALDI-TOF 质谱分析 (未示出) 揭示了 156, 434Da 的单峰, 所述单峰是 99.5% 的 TF2 的计算质量 (157, 319Da) 范围内。

[0374] 通过 **BIACORE®** 试验确定 TF2 的功能。将 TF2、

[0375] C-DDD1-hMN-14+h679-AD1 (用作非共价 a_2b 络合物的对照样本) 或 C-DDD2-hMN-14+h679-AD2 (用作未还原的 a_2 和 b 组分的对照样本) 稀释到 1 μ g/ml (总蛋白质), 并通过用 HSG 固定的传感器芯片 (sensorchip)。TF2 的反应大约是两个对照样本的两倍, 表明仅对照样本中的 h679-Fab-AD 组分会与传感器芯片结合并留在传感器芯片上。如其它信号响应所表明, 随后 WI2IgG (hMN-14 的抗独特性抗体) 的注射证明仅 TF2 具有与 h679-Fab-AD 紧密关联的 DDD-Fab-hMN-14 组分。由 WI2 与固定在传感器芯片上的 TF2 的结合而得到的响应单元的另外增加对应两个全功能结合位点, 每个由 C-DDD2-Fab-hMN-14 的一个亚组构成。这通过 TF2 与 WI2 的两个 Fab 片段结合的能力而确认 (未示出)。

[0376] 用于预靶向的 TF10 双特异性抗体的制备

[0377] 用类似的方案产生三聚体 TF10DNL 构建体, 包括

[0378] C-DDD2-Fab-hPAM4 的两个拷贝和 C-AD2-Fab-679 的一个拷贝。TF10 中的癌症靶向抗体组分衍生自 hPAM4, 其作为放射性标记 MAb 已经被详细研究的人源化抗胰腺癌粘蛋白 MAb (例如, Gold 等, Clin. Cancer Res. 13:7380-7387, 2007)。半抗原结合组分衍生自 h679, 其是人源化抗组胺琥珀酰胺甘氨酸胺 (HSG) MAb。如上所述, 使用为制备 (抗 CEA) $_2$ × 抗 HSG bsAb TF2 而公开的方法制备 TF10 双特异性 ([hPAM4] $_2$ × h679) 抗体。TF10 构建体携带两个人源化 PAM4Fab 和一个人源化 679Fab。

[0379] 在稳定转染的骨髓瘤细胞中独立地表达两种融合蛋白

[0380] (hPAM4-DDD 和 h679-AD2)。合并组织培养物上清液得到两倍摩尔过量的 hPAM4-DDD。在用 1mM 还原谷胱甘肽的温和还原条件下使反应混合物在室温下培养 24 小时。还原之后,用 2mM 氧化谷胱甘肽通过温和氧化完成 DNL 反应。使用 IMP 291 蓝胶 (affigel) 树脂通过亲和层析法分离 TF10,其以高特异性与 h679Fab 结合。

[0381] 已经对全组织组织学和血细胞结合板进行了 hPAM4IgG 和正进入临床试验的抗-CEA×抗-HSG bsMAb 的检查。在 1/3 的标本中 hPAM4 结合被限制为与膀胱和胃的非常微弱的结合(在体内未见结合),而没有与正常组织结合归因于抗-CEA×抗-HSG bsMAb。此外,对携带 H1 和 H2 组胺受体的细胞系的体外研究显示与 IMP 288di-HSG 肽没有拮抗或竞争活性,并且在两个不同种属的动物研究显示,剂量比用于成像的剂量高 20000 倍时,与组胺组分相关的肽没有药理学活性。因此,HSG 组胺衍生物没有药理学活性。

[0382] 实例 16. 对使用 TF10 双特异性抗体和 ^{111}In -标记肽的预靶向的成像研究

[0383] 下面的研究证明使用预靶向技术的体内成像的可行性,其中预靶向技术使用双特异性抗体并入 hPAM4 和标记肽。如之前实例所述制备包括 C-DDD2-Fab-hPAM4 的两个拷贝和 C-AD2-Fab-679 的一个拷贝的 TF10 双特异性抗体。使用 TF10 和 ^{111}In -IMP-288 肽的预靶向,对携带有 0.2g 至 0.3g 人胰腺癌异种移植物的裸鼠进行成像。图 8 示出的结果表明使用 ^{111}In 标记的 diHSG 肽 (IMP 288),的 bsMAb 预靶向方法可在动物模型中检测到清晰描绘的肿瘤。图 8 中顶部的 6 只动物接受两种不同剂量的 TF10(与所施用肽的摩尔比为 10 : 1 和 20 : 1),并在第二天对它们施用 ^{111}In 标记的 diHSG 肽 (IMP 288)。图 8 底部的另外 3 只动物仅接受 ^{111}In -IMP-288(未预靶向)。注射标记肽 3h 后拍照,显示在预靶向动物中 0.2-0.3g 肿瘤的清晰定位,而单独施用 ^{111}In -肽的动物中没有定位。肿瘤摄取平均为 20-25% ID/g,而肿瘤/血液比超过 2000 : 1,肿瘤/肝脏比为 170 : 1 以及肿瘤/肾脏比为 18/1。

[0384] 实例 17. 用于预靶向和 ^{18}F 标记的靶向肽的制备

[0385] 在多个实施例中,通过新型技术制备 ^{18}F 标记的蛋白质或肽,其用于诊断和/或成像研究,诸如 PET 成像。用于 ^{18}F 标记的新型技术涉及制备 ^{18}F -金属络合物,优选为 ^{18}F -铝络合物,其整合至诸如 DOTA、NOTA 或 NETA 或其衍生物的整合部分。使用本领域已知的共轭技术可使整合部分附着于蛋白质、肽或任何其它分子上。在某些优选的实施例中, ^{18}F -Al 络合物首先在溶液中形成,然后附着于已经与蛋白质或肽共轭的整合部分。然而,在替代的实施例中,可以先使铝附着于整合部分上,然后加入 ^{18}F 。

[0386] 肽合成

[0387] 采用 Fmoc 方案通过固相肽合成而合成肽。通过使用 Fmoc/Aloc 保护基向二氨基氨基酸的侧链加上基团以允许差别去保护。除向所用的乙酸中以 1 : 1 的比例加入哌啶外,Aloc 基团通过 Dangles 等 (J. Org. Chem. 1987, 52 : 4984-4993) 的方法来去除。如 McBride 等 (美国专利申请公开号美国 2005/0002945,其实例部分以引用的方式并入本文) 所述制备非对称四叔丁基 DTPA。

[0388] 三叔丁基 DOTA、对称四叔丁基 DTPA、ITC-苯甲基 DTPA、p-SCN-Bn-NOTA 和 TACN 可购自 **MACROCYCLICS®** (Dallas, TX)。

[0389] DiBocTACN、NODA-GA(tBu)₃ 和 NO₂AtBu 可购自 CheMatech (法国第戎)。Aloc/Fmoc 赖氨酸和 Dap (二氨基丙酸衍生物 (也称为 Dpr)) 可购自 **CREOSALUS®** (Louisville,

KY) 或 **BACHEM®** (Torrance, CA)。Sieber Amide 树脂可购自 **NOVABIOCHEM®** (San Diego, CA)。其余的 Fmoc 氨基酸可购自 **CREOSALUS®**、**BACHEM®**、**PEPTECH®**

[0390] (Burlington, MA)、EMD **BIOSCIENCES®** (San Diego, CA)、CHEM **IMPEX®** (Wood Dale, IL) 或 **NOVABIOCHEM®**。六水氯化铝可购自 **SIGMA-ALDRICH®** (Milwaukee, WI)。剩下的溶剂和试剂可购自 **FISHER SCIENTIFIC®** (Pittsburgh, PA) 或 **SIGMAALDRICH®** (Milwaukee, WI)。由 IBA **MOLECULAR®** (Somerset, NJ) 提供 ^{18}F 。

[0391] ^{18}F 标记的 IMP 272

[0392] 制备并用 ^{18}F 标记的第一肽是 IMP 272：

[0393] DTPA-Gln-Ala-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)- NH_2MH^+ 1512

[0394] 如 (McBride 等, 美国专利申请公开号 20040241158, 其实例部分以引用的方式并入本文) 所述合成 IMP272。

[0395] 醋酸盐缓冲溶液 - 将 1.509g 醋酸稀释在 $\sim 160\text{mL}$ 水中, 通过加入 1MNaOH 调节 pH, 然后稀释到 250mL 以制备 pH 为 4.03 的 0.1M 溶液。

[0396] 醋酸铝缓冲溶液 - 通过将 0.1028g 六水 AlCl_3 溶解在 42.6mL DI 水中而制备铝溶液。在 pH4 时, 4mL 等分试样的铝溶液与 16mL 的 0.1MNaOAc 溶液混合而得到 2mM Al 原液。

[0397] IMP272 醋酸盐缓冲溶液 - 将 0.0011g ($7.28 \times 10^{-7}\text{mol}$) 的肽 IMP272 溶解在 $364\mu\text{L}$ 的 0.1M pH 4 醋酸盐缓冲溶液中而得到肽的 2mM 原液。

[0398] F-18 标记的 IMP272 - 将 $3\mu\text{L}$ 等分试样的铝原液置于

[0399] **REACTI-VIAL™** 中并与 $50\mu\text{L}^{18}\text{F}$ (按来样计算) 和 $3\mu\text{L}$ IMP 272 溶液混合。在加热器中在 110°C 下加热溶液 15 分钟并用反相 HPLC 进行分析。HPLC 分析 (未示出) 显示 93% 的 ^{18}F 游离以及 7% 的 ^{18}F 与肽结合。将另外 $10\mu\text{L}$ IMP 272 溶液加到反应中, 再次加热并用反相 HPLC 进行分析 (未示出)。HPLC 踪迹显示 8% 的 ^{18}F 在空隙体积中并且 92% 的 ^{18}F 活性附着在肽上。室温下将肽溶液的剩余部分和 $150\mu\text{L}$ LPBS 一起培养 $\sim 1\text{h}$, 然后用反相 HPLC 进行检查。HPLC (未示出) 显示 58% 的 ^{18}F 未结合并且 42% 的 ^{18}F 仍附着于肽。数据表明 ^{18}F -Al-DTPA 络合物当与磷酸盐混合时可能不稳定。

[0400] 通过将标记肽溶液涂敷在 1cc (30mg) **WATERS®** HLB 柱 (编号: 186001879) 上并用 $300\mu\text{L}$ 水洗涤以移除未结合的 F-18 从而纯化标记肽。通过用 $2 \times 100\mu\text{L} 1 : 1\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 洗涤柱从而洗脱肽。在水中在 25°C 下培养纯化的肽, 并通过反相 HPLC 进行分析 (未示出)。HPLC 分析显示 ^{18}F 标记的 IMP 272 在水中不稳定。在水中培养 40 分钟后, 从肽释放约 17% 的 ^{18}F , 而 83% 的 ^{18}F 被保留 (未示出)。

[0401] 用 ^{18}F 标记肽 ($16\mu\text{L} 2\text{mM}$ IMP 272, $48\mu\text{g}$) 并用尺寸排阻 HPLC 分析抗体结合。尺寸排阻 HPLC 显示肽与 hMN-14 $\times$ 679 结合但未与不相关的双特异性抗体 hMN14 $\times$ 734 (未示出) 结合。

[0402] 用其它金属对 IMP 272 的 ^{18}F 标记

[0403] 将 $\sim 3\mu\text{L}$ 等分试样的金属原液 ($6 \times 10^{-9}\text{mol}$) 置于聚丙烯锥形瓶中并与 $75\mu\text{L}^{18}\text{F}$ (按来样计算) 混合, 在室温下培养 ~ 2 分钟, 然后与 $20\mu\text{L}$ 的 2mM ($4 \times 10^{-8}\text{mol}$) IMP 272 溶液在 0.1M pH4 的 NaOAc 缓冲液中混合。在加热器中在 100°C 下加热溶液 15 分钟并

通过反相 HPLC 进行分析。用铟 (24%)、镓 (36%)、锆 (15%)、镧 (37%) 和钇 (2%) 标记 IMP272(未示出)。这些结果表明 ^{18}F 金属标记技术不限制于铝配体,但也可以利用其它金属。使用不同的金属配体,可利用不同的螯合部分以优化 F-18-金属共轭物的结合。

[0404] 血清稳定 ^{18}F 标记肽 IMP 449 的制备和用途

[0405] 以所示的顺序通过向树脂添加下列氨基酸至 Sieber Amide 树脂上 制备肽 IMP 448D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)- $\text{NH}_2\text{MH}^+1009$:Aloc-D-Lys (Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH、裂解 Aloc、Fmoc-D--Tyr (But)-OH、Aloc-D-Lys (Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH、裂解 Aloc、Fmoc-D-AlaOH、进行最终 Fmoc 裂解以制备所需的肽。然后从树脂上裂解肽并用 HPLC 纯化以制备 IMP448,然后将 IMP448 连接至 ITC-苯甲基 NOTA。将 0.0757g ($7.5 \times 10^{-5}\text{mol}$) 的肽 IMP 448 与 0.0509g ($9.09 \times 10^{-5}\text{mol}$) 的 ITC 苯甲基 NOTA 混合并溶解在 1mL 水中。然后在搅拌的肽/NOTA 溶液中缓慢加入无水碳酸钾 (0.2171g)。加入所有的碳酸盐之后,反应溶液的 pH 为 10.6。使反应物在室温下搅拌过夜。14h 后用 1M HCl 小心地使反应物骤冷并通过 HPLC 纯化以得到 48mg 的 IMP449。

[0406] ^{18}F 标记的 IMP449

[0407] 将肽 IMP 449 (0.002g, $1.37 \times 10^{-6}\text{mol}$) 溶解在 686 μL (2mM 肽溶液) 0.1M pH4.02 的 NaOAc 中。将 3 微升的 2mM Al 溶液在 pH 4 醋酸盐缓冲液中与 15 μL 1.3mCi ^{18}F 混合。然后将所得溶液与 20 μL 的 2mM IMP449 溶液混合并在 105°C 下加热 15 分钟。反相 HPLC 分析显示 35% ($t_R \sim 10$ 分钟) 的 ^{18}F 活性附着于肽上而且 65% 的 ^{18}F 活性在柱的空隙体积上被洗脱 (3.1 分钟,未示出),这表明大部分活性与肽不相关。将粗标记混合物 (5 μL) 与合并的人血清混合并在 37°C 下培养。15 分钟后取出一份等分试样并用 HPLC 进行分析。HPLC 分析显示 9.8% 的 ^{18}F 活性仍附着于肽 (从 35% 降至 9.8%)。1h 后取出另一份等分试样并用 HPLC 进行分析。HPLC 分析显示 7.6% 的 ^{18}F 活性仍附着于肽 (从 35% 降至 7.6%),这与 15 分钟的踪迹基本相同 (数据未示出)。

[0408] 大剂量 ^{18}F 标记

[0409] 对纯化的 IMP449 的进一步研究表明 ^{18}F 标记肽于 37°C 下在人血清中非常稳定 (91%,未示出) 至少 1 小时,并于 37°C 下在人血清中部分稳定 (76%,未示出) 至少 4 小时。还进行了其它研究,其中在抗坏血酸作为稳定剂的情况下制备 IMP 449。在这些研究 (未示出) 中,显示 37°C 下 4h 后在血清中没有金属 ^{18}F -肽络合物的可检测到的分解。注射 ^{18}F 标记肽 30 分钟后发现小鼠尿液中含有与肽结合的 ^{18}F (未示出)。这些结果表明在接近体内的环境下,本文公开的 ^{18}F 标记肽显示具有足够的稳定性以用于 ^{18}F 成像研究。

[0410] 对于没有抗坏血酸的研究,将在 $\sim 400 \mu\text{L}$ 水中的 $\sim 21\text{mCi } ^{18}\text{F}$ 在 0.1M pH4 的 NaOAc 中与 9 μL 2mM AlCl_3 混合。加入 60 μL 的肽 IMP449 (0.01M, $6 \times 10^{-7}\text{mol}$ 在 0.5NaOH pH 4.13 中) 并加热溶液到 110°C 达 15 分钟。然后纯化粗标记肽,方式是将反应溶液置于 1cc **WATERS®** HLB 柱的桶中,用水洗脱以移除未结合的 ^{18}F ,然后用 EtOH/ H_2O (1 : 1) 洗脱 ^{18}F 标记肽。通过柱将粗反应溶液抽至废液瓶中,并用 $3 \times 1\text{mL}$ 馏分的水 (18.97mCi) 洗涤柱。然后将 HLB 柱放置到新瓶上并用 $2 \times 200 \mu\text{L}$ 的 EtOH/ H_2O (1 : 1) 洗脱以收集标记肽 (1.83mCi)。当所有洗脱完成后,柱保留 0.1mCi 的活性。将一份等分试样纯化的 ^{18}F 标记肽 (20 μL) 与 200 μL 的合并人血清混合并在 37°C 下加热。通过反相 HPLC 分析等分试样。结果显示 37°C 下,时间为零、1 小时 (91% 标记肽)、2 小时 (77% 标记肽) 和 4 小时 (76% 标记

肽) 在人血清中培养时, ^{18}F 标记的纯化 IMP 449 相对稳定性(未示出)。同时也观察到 ^{18}F 标记的 IMP 449 在 TFA 溶液中稳定,其偶尔用在反相 HPLC 层析的过程中。对于本文描述的示例性 ^{18}F 标记分子,在 TFA 中和在人血清中观察到的稳定性显示广义的相关性。这些结果表明根据本文公开的方法制备的 ^{18}F 标记肽在人血清中显示足够的稳定性,从而成功地用于体内标记和成像研究,例如用 PET 扫描检测标记细胞或组织。最后,由于 IMP449 肽包含对辐解敏感的硫脲键,所以通过 RP-HPLC 观察到若干种产物。然而,当在反应混合物中加入抗坏血酸时,产生的副产物明显减少。

[0411] 实例 18. 对预靶向 TF10DNL 构建体和 ^{18}F 标记肽的体内研究

[0412] 按如下方法制备 ^{18}F 标记 IMP449。在 $\sim 0.5\text{mL}$ 溶液中的 $54.7\text{mCi } ^{18}\text{F}$ 在 0.1M NaOAc pH 4 缓冲液中与 $3\mu\text{L } 2\text{mM Al}$ 混合。3 分钟后,加入在 0.5M pH4NaOAc 缓冲液中的 $10\mu\text{L } 0.05\text{M IMP499}$, 并且将反应物在 96°C 加热器中加热 15 分钟。用注射器移除反应内容物。然后在 C_{18} 柱上通过 HPLC 纯化粗标记肽。流速为 3mL/分钟 。缓冲液 A 是在水中的 0.1% TFA, 缓冲液 B 是在水中的 90% 乙腈和 0.1% TFA。15 分钟内,梯度从 100% A 到 A : B 为 : $75/25$ 。首先洗脱的标记肽和未标记肽之间在停留时间(t_{R}) 上有约 1 分钟之差。以 $0.5\text{分钟}(\text{mL})$ 的馏分收集 HPLC 洗脱液。依据所使用的柱,标记肽的 t_{R} 为 6 分钟至 9 分钟。进一步处理 HPLC 纯化肽样本,方式是在水中二倍稀释受关注馏分并且将溶液置于 $1\text{cc WATERS}^{\text{®}}$ HLB 柱的桶内。用 $3\times 1\text{mL}$ 水洗脱滤筒以移除乙腈和 TFA, 然后用 $400\mu\text{L EtOH/H}_2\text{O}(1:1)$ 洗脱 ^{18}F 标记肽。纯化 $[\text{Al}^{18}\text{F}] \text{IMP } 449$ 在分析 HPLC C_{18} 柱上洗脱为单一峰(未示出)。

[0413] 将携带四种缓慢生长的 sc CaPan1 异种移植物的 **TACONIC**[®] 裸鼠用在体内研究中。对其中三只小鼠注射 TF10($162\mu\text{L}$), 18h 后注射 $[\text{Al}^{18}\text{F}] \text{IMP } 449$ 。TF10 是用在肿瘤成像研究的人源化双特异性抗体,其以二价与定义肿瘤抗原的 PAM-4 结合并以单价与 HSG 结合(参照例如, Gold 等, 2007, J. Clin. Oncol. 25(18S):4564)。对一只小鼠单独注射肽。注射肽 1h 后对所有小鼠进行尸体解剖。立即对组织进行计数。显示动物 #2 在股骨中具有高的计数。将股骨转移到新瓶中并和旧空瓶一起重新计数。重新计数表明计数存在于组织上。将股骨破碎,其上附着大块肌肉。平均分布的比较显示在存在肿瘤靶向双特异性抗体的情况下,位于肿瘤中的 ^{18}F 标记肽的水平显著高于在任何正常组织中的水平。

[0414] 单独施用 $[\text{Al}^{18}\text{F}] \text{IMP } 449$ 或在预靶向情形中的动物中,组织摄取相似(表 9)。当与单独施用肽 ($4.6\pm 0.9\%$ ID/g 相对 0.89% ID/g) 比较时,1h 在人胰腺癌异种移植植物(CaPan1) 的摄取在预靶向动物中增加 5 倍。这时达到异常的肿瘤 / 非肿瘤比例(例如,肿瘤 / 血液和肿瘤 / 肝脏的比值分别为 23.4 ± 2.0 和 23.5 ± 2.8)。

[0415] 表 9 : 肽注射 1h 后的组织摄取,平均值和个体动物 :

[0416]

TF10 (162μg)->418h->[A1 ¹⁸ F] IMP 449 (10 :1)							单独施用[A1 ¹⁸ F]
组织	n	平均值	SD	动物 1	动物 2	动物 3	动物1
肿瘤	3	4.591	0.854	4.330 (0.675 g)	5.546 (0.306g)	3.898 (0.353g)	0.893 (0.721 g)
(质量)							
肝脏	3	0.197	0.041	0.163	0.242	0.186	0.253
脾脏	3	0.202	0.022	0.180	0.224	0.200	0.226
肾脏	3	5.624	0.531	5.513	6.202	5.158	5.744
肺	3	0.421	0.197	0.352	0.643	0.268	0.474
血液	3	0.196	0.028	0.204	0.219	0.165	0.360
胃	3	0.123	0.046	0.080	0.172	0.118	0.329
小肠	3	0.248	0.042	0.218	0.295	0.230	0.392
大肠	3	0.141	0.094	0.065	0.247	0.112	0.113
胰腺	3	0.185	0.078	0.259	0.194	0.103	0.174
脊柱	3	0.394	0.427	0.140	0.888	0.155	0.239
股骨	3	3.899	4.098	2.577	8.494	0.625	0.237
脑	3	0.064	0.041	0.020	0.072	0.100	0.075
肌肉	3	0.696	0.761	0.077	1.545	0.465	0.162

[0417] 结果表明,与含有 PAM4 抗体构建体(诸如 TF10DNL 构建体)的 PAM4 结合的 ¹⁸F 标记肽提供合适的靶向 ¹⁸F 标记以进行体内成像,诸如 PET 成像分析。

[0418] 实例 19. 用 TF10 的进一步成像研究

[0419] 概要

[0420] 临床前研究和临床研究已经证明放射性标记 mAb-PAM4 用于胰腺癌的细胞核成像

和免疫放射治疗的应用。在本文中我们已经检查了新型的基于 PAM4 的双特异性单克隆抗体 (mAb) 构建体 (TF10) 预靶向放射性标记肽的能力,该放射性标记肽用于改进成像和治疗。TF 10 是人源化的双特异性 mAb,对 mAb-PAM4 是二价的,对 mAb-679 是单价的,并与组胺琥珀酰胺甘氨酸胺半抗原反应。在携带人胰腺癌异种移植物 (CaPan1) 的裸鼠中进行放射性标记的 TF10 和 / 或 TF10 预靶向的半抗原 - 肽 (IMP-288) 的生物分布研究和细胞核成像。 ^{125}I -TF10 迅速从血液中清除,其水平经过 16 小时后降低到 $< 1\%$ 的每克注射剂量 (ID/g)。这时肿瘤摄取量为 $3.47 \pm 0.66\%$ ID/g,并在任何正常组织中没有累积。为表明预靶向方法的有效性,在施用 TF 10 16 小时后施用 ^{111}In -IMP-288。施用放射性标记肽后 3 小时,成像显示在肿瘤内有强烈的摄取,而在任何正常组织中没有增加的证据 (实例 16)。在仅施用 ^{111}In -肽的动物中没有观察到靶向作用 (实例 16)。TF10 预靶向的 ^{111}In -IMP-288 的肿瘤摄取为 $24.3 \pm 1.7\%$ ID/g,而对于单独施用 ^{111}In -IMP-288,肿瘤摄取在 16 小时仅为 $0.12 \pm 0.002\%$ ID/g。预靶向基团的肿瘤 / 血液比例 (在 3 小时为 $\sim 1,000 : 1$) 显著高于 ^{111}In PAM4-IgG (在 24 小时为 $\sim 5 : 1$; $P < 0.0003$)。辐射剂量估计表明 TF10/ ^{90}Y -肽预靶向将比 ^{90}Y -PAM4-IgG 提供更高的抗肿瘤效应。因此,结果支持,与直接放射性标记 PAM4-IgG 相比,TF10 预靶向可对胰腺癌的早期检测、诊断和治疗提供改进的成像 (Gold 等, *Cancer Res* 2008,68(12):4819-26)。

[0421] 我们已经识别在由 $> 85\%$ 的侵袭性胰腺癌表达的粘蛋白上存在一种罕见的生物标记,侵袭性胰腺癌包括早期 I 期疾病和癌前病变、胰腺上皮内瘤变和导管内乳头状粘液性肿瘤 (Gold 等, *Clin Cancer Res* 2007,13:7380-87)。由 mAb-PAM4 (Gold 等, *Int J Cancer* 1994,57:204-10) 检测到的特异性表位不存在于正常和炎症性胰腺组织以及大多数其它恶性组织。因此,表位的检测对是否存在胰腺肿瘤提供高的诊断可能性。使用分别用 ^{131}I 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的鼠源 PAM4IgG 或 Fab' 的早期临床研究显示 10 个患有侵袭性胰腺癌的患者中 8 个具有特异靶向 (Mariani 等, *Cancer Res* 1995,55:5911s-15s, Gold 等, *Crit Rev OncolHematol* 2001,39:147-54)。在两个阴性患者中,一个患有不表达 PAM4-表位的差异化的胰腺癌,而另一患者随后发现患有胰腺炎而非恶性病变。

[0422] 于是,对胰腺癌具有高特异性的 PAM4 用于早期疾病的检测和诊断。除改进的检测外, ^{90}Y -PAM4IgG 发现可有效治疗裸鼠中大的人胰腺癌异种移植物 (Cardillo 等, *Clin Cancer Res* 2001,7:3186-92),并且当与吉西他滨结合时,观察到治疗反应的进一步提高 (Gold 等, *Clin Cancer Res* 2004,10:3552-61, Gold 等, *Int J Cancer* 2004,109:618-26)。最近完成了对吉西他滨治疗失败的患者的阶段 I 治疗试验,发现 ^{90}Y -人源化 PAM4IgG 的最大耐受剂量为 $20\text{mCi}/\text{m}^2$ (Gulec 等, *Proc Amer Soc Clin Onc*, 43rd Annual Meeting, *J Clin Oncol* 2007,25(18S):636s)。尽管所有患者在第 8 周或第 8 周后显示疾病恶化,但在几个病例中也观察到肿瘤开始时缩小。现在正在进行临床研究以评估 ^{90}Y -hPAM4IgG 的分次剂量与放射敏化剂量的吉西他滨结合的方案。

[0423] 基于 PAM4 对胰腺癌的靶向特异性,在本文中我们报道新型的重组人源化双特异性单克隆抗体 (mAb) TF 10 的发展。这个构建体还与罕见的合成半抗原 (组胺琥珀酰胺甘氨酸胺) (HSG) 结合,组胺琥珀酰胺甘氨酸胺已经被并入许多可用多种放射性核素放射性标记的小的肽中,其中放射性核素适用于单光子发射计算机断层摄影术 (SPECT) 和正电子发射断层摄影术 (PET) 成像以及适于治疗目的 (Karacay 等, *Clin Cancer Res* 2005,11:

7879-85、Sharkey 等, Leukemia 2005, 19 :1064-9、Rossi 等, Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103 :6841-6、McBride 等, J Nucl Med 2006, 47 :1678-88)。这些研究表明这种新构建靶向胰腺癌应用于成像或治疗的潜力。

[0424] 方法和材料

[0425] 如上所述制备 TF2 和 TF10 双特异性 DNL 构建体和 IMP 288 靶向肽。从 PERKIN-ELMER® 获得碘化钠 (^{125}I) 和氯化铟 (^{111}In)。通过 iodogen 方法用 ^{125}I 常规标记 TF10, 并用尺寸排阻离心柱进行纯化。如之前所述, 用 $^{111}\text{InCl}$ 进行 DOTA-肽和 DOTA-PAM4-IgG 的放射性标记 (Rossi 等, Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103 :6841-6、McBride 等, J Nucl Med 2006, 47 :167888)。通过尺寸排阻型高效液相色谱法检查放射性标记产物的纯度, 用由瞬时 TLC 确定的游离的未结合同位素的量。

[0426] 对于 TF10 分布研究, 对携带人胰腺癌异种移植单链 CaPan1 的 ~ 20g 雌性无胸腺裸鼠 (TACONIC® Farms) 注射 ^{125}I -TF10 ($10 \mu\text{Ci}$; $40 \mu\text{g}$, $2.50 \times 10^{-10} \text{mol}$)。在各个时间点, 对小鼠组 ($n = 5$) 进行尸体解剖, 移除肿瘤和非肿瘤组织并在伽马计数器中计数以确定每克组织注射剂量的百分比 (% ID/g), 使用这些值计算血液清除率和肿瘤 / 非肿瘤比例。

[0427] 对于预靶向生物分布研究, 使用摩尔比为 10 : 1 的双特异性 mAb / 放射性标记肽。

[0428] 例如, 对一组携带人胰腺癌异种移植单链 CaPan1 的无胸腺裸鼠施用 TF10 ($80 \mu\text{g}$, $5.07 \times 10^{-10} \text{mol}$), 而第二组未进行治疗。注射 TF10 16h 后, 施用 ^{111}In -IMP-288 半抗原-肽 ($30 \mu\text{Ci}$, $5.07 \times 10^{-11} \text{mol}$)。在几个时间点对小鼠进行尸体解剖, 移除肿瘤和非肿瘤组织并在伽马计数器中计数以确定 % ID/g。由这些数据计算肿瘤 / 非肿瘤的比例。在独立的研究中, 对小鼠组施用 ^{111}In -DOTA-PAM4-IgG ($20 \mu\text{Ci}$, $50 \mu\text{g}$, $3.13 \times 10^{-10} \text{mol}$) 以用于比较生物分布, 细胞核成像和电位治疗活性之目的。假设在时间零时没有活性, 由时间-活性曲线计算辐射剂量估算。用学生 t 测试评估显著的差异。

[0429] 为进行细胞核免疫闪烁成像, 在注射放射性标记的肽 3h 后或注射放射性标记的 hPAM4-IgG 24h 后, 用装配有用于 ^{111}In (ADAC 实验室) 的中能量准直仪的双头 Solus 伽马照相机对携带肿瘤的小鼠进行成像。对小鼠成像总共 100,000cpm 或 10 分钟, 两者之中取先达到者。

[0430] 结果

[0431] 双特异性 mAb TF10 的体外表征。通过 ELISA 对 TF10 与靶粘蛋白抗原的结合进行分析 (图 9)。结果显示对二价 TF10、PAM4-IgG 和 PAM4-F(ab')₂ (半最大结合分别计算为 1.42 ± 0.10 、 1.31 ± 0.12 和 $1.83 \pm 0.16 \text{nmol/L}$, 对于所有的值, $P > 0.05$) 具有几乎相同的结合曲线, 而单价 bsPAM4 化学共轭物 (PAM4-Fab' × 抗 DTPA-Fab') 具有显著较低的亲和力 (和 TF10 相比较, 半最大结合为 $30.61 \pm 2.05 \text{nmol/L}$; $P = 0.0379$), 表明 TF10 以二价方式结合。与粘蛋白结合的 ^{125}I -TF10 的免疫反应部分为 87%, 发现 9% 为未结合的 TF10, 并且 3% 为游离的碘化物 (未示出)。百分之九十的 ^{111}In -IMP-288 与 TF10 结合 (未示出)。在与 TF10 结合的全部 ^{111}In -IMP-288 中, 当加入过量的粘蛋白 ($200 \mu\text{g}$) 时, 92% 以较高分子量被洗脱, 仅 3% 用不与粘蛋白反应的 TF 10 部分洗脱。另外 5% 的放射性标记肽在游离的肽体积中被洗脱。不存在 TF10 时, 没有放射性标记肽与粘蛋白抗原结合 (未示出)。

[0432] 在携带 CaPan1 肿瘤的裸鼠中 ^{125}I -TF10 的生物分布。TF10 展示快速地从血液清

除,开始在 1 小时为 $21.03 \pm 1.93\%$ ID/g,而在 16 小时减小到仅为 $0.13 \pm 0.02\%$ ID/g。生物半衰期计算为 2.19 小时 [95% 置信区间 (95% CI), 2.11–2.27 小时]。肝脏、脾脏和肾脏中的组织摄取显示在 1 小时有增强的活性,其经过仅 16 小时清除 [对于肝脏、脾脏和肾脏分别为 $T_{1/2} = 2.09$ 小时 (95% CI, 2.08–2.10), 2.84 小时 (95% CI, 2.49–3.29) 以及 2.44 小时 (95% CI, 2.28–2.63)]。在胃中的活性很可能反映放射性碘的增积和排泄,这表明假定在肝脏和脾脏中的经放射性碘处理的 TF 10 被活性地代谢分解,从而解释其从血液中的快速清除的原因。然而,经过 16 小时,胃中放射性碘的浓度就在 1% ID/g 以下。施用 ^{125}I -TF10 并在 16 小时进行尸体解剖的五只非肿瘤携带裸鼠组显示有相似的组织分布,表明肿瘤没有影响双特异性 mAb 分布和从正常组织的清除 (数据未示出)。当然,可能在检查的初始时间点之前发生差异。TF 10 的肿瘤摄取在注射后 6 小时达到峰值 ($7.16 \pm 1.10\%$ ID/g) 并且在 16 小时减小到半最大结合 ($3.47 \pm 0.66\%$ ID/g)。在接下来的 32 小时内,肿瘤摄取再次降低接近 2 倍,但之后在 24 小时内是稳定的。

[0433] TF10 预靶向的 ^{111}In 标记肽的生物分布。尽管 TF10 的最大肿瘤摄取发生在 6 小时,但是先前的经验表明在 TF10 的血液水平清除到 $< 1\%$ ID/g (即,16 小时) 的时间点时,需要施用放射性标记肽。血液中较高的 TF 10 水平会导致血液中放射性标记肽的不可接受的高度结合 (即低肿瘤 / 血液比例),而在后来的时间施用肽将意味着肿瘤中 TF 10 的浓度会随着肿瘤中放射性标记肽浓度的随后降低而减少。所以,使用 16 小时间隔进行最初的预靶向研究。 ^{111}In -IMP-288 的量保持不变 ($30 \mu\text{Ci}$, $5.07 \times 10^{-11}\text{mol}$),增加 TF 10 的施用量,因此 TF 10 的施用剂量和表达的 IMP-288 的摩尔比在 5 : 1 到 20 : 1 之间 (表 10)。

[0434] 表 10. 单独 (没有 TF10) 或用不同量的 TF 10 预靶向的 ^{111}In -IMP-288 的生物分布

[0435] 3h% ID/g (平均值 $\pm$ SD)

[0436]

	5:1	10:1	20:1	No
肿瘤	19.0±3.49	24.3±1.71	28.6±0.73	0.12±0.00
肝脏	0.09±0.01	0.21±0.12	0.17±0.01	0.07±0.00
脾脏	0.12±0.04	0.16±0.07	0.26±0.10	0.04±0.01
肾脏	1.59±0.11	1.72±0.24	1.53±0.14	1.71±0.22
肺	0.19±0.06	0.26±0.00	0.29±0.04	0.03±0.00
血液	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.00	0.00±0.00
胃	0.03±0.02	0.02±0.02	0.01±0.00	0.02±0.01
小肠	0.12±0.08	0.08±0.03	0.04±0.01	0.06±0.02
大肠	0.23±0.10	0.39±0.08	0.25±0.08	0.33±0.02
胰脏	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00
肿瘤重量(g)	0.12±0.03	0.32±0.09	0.27±0.01	0.35±0.03

[0437] 在 3 小时, 血液中 ^{111}In -IMP-288 的量几乎检测不到 (0.01%)。随着所施用的双特异性 mAb 的量增加 4 倍 (观察到统计学上的用于比较各组的每个 TF10/ 肽比例的显著差异, $P < 0.03$ 或更显著), 肿瘤摄取从 $19.0 \pm 3.49\%$ ID/g 增加到 $28.55 \pm 0.73\%$ ID/g, 但是正常组织摄取没有任何明显的增加。施用 TF10 动物中的肿瘤摄取比当单独施用 ^{111}In -IMP-288 时高 > 100 倍。对在之前接受或不接受 TF 10 施用的动物的正常组织中 ^{111}In 活性的比较显示相似的绝对值, 该活性在大多数实例中没有显著差异。这说明经过 16 小时已经从所有正常组织中充分清除了双特异性 mAb 以避免在这些组织中明显的肽摄取。肿瘤 / 血液比例为 $> 2,000 : 1$, 而其它组织与血液的比例超过 $100 : 1$ 。甚至肿瘤 / 肾脏比例超过 $10 : 1$ 。具有对非肿瘤组织最小靶向的放射性同位素的最高肿瘤摄取来自 $20 : 1$ 的比例, 然而, 在信号强度和对照比例这两方面, 任何一个 TF10/ 比例可用于达到对肿瘤的异常靶向。由于放射性标记肽的肿瘤摄取的绝对差异在比例为 $10 : 1$ ($24.3 \pm 1.71\%$ ID/g) 和 $20 : 1$ ($28.6 \pm 0.73\%$ ID/g) 之间没有本质差异, 所以选择比例为 $10 : 1$ 用于进一步研究。

[0438] 图 10 示出以双特异性 mAb/ 肽的比例为 $10 : 1$ 施用 TF10 预靶向 ^{111}In -IMP-288 或单独施用 ^{111}In -IMP-288 肽的动物的图像。这些肿瘤的大多数直径为 $\leq 0.5\text{cm}$, 重 $\sim 0.25\text{g}$ 。图像显示 TF10 预靶向动物肿瘤中的高度强烈摄取 (图 10A)。增加 TF10 预靶向动物的图像背景的亮度以匹配对单独施用 ^{111}In -IMP-288 动物所拍摄的图像的亮度 (图 10B)。然而, 当对 TF10 预靶向小鼠进行图像优化时, 信号强度 and 对比度如此之高以致于在体内没有

观察到其它的活性。甚至当图像亮度增强时,在单独施用 ^{111}In -IMP-288 的动物中观察不到肿瘤定位(图 10C)。

[0439] 与 TF10 预靶向 ^{111}In -IMP-288 肽的动力学相比较,进行另外试验以评估靶向 ^{111}In -hPAM4 完整 IgG 的动力学。在所检查的最初时间点 3 小时 ($15.99 \pm 4.11\%$ ID/g) 时, ^{111}In 肽的肿瘤摄取是最高的,而放射性标记肽的血液浓度仅为 $0.02 \pm 0.01\%$ ID/g,给出平均肿瘤/血液比例为 946.3 ± 383.0 。随着时间推移,放射性标记肽从肿瘤中清除,其生物半衰期为 76.04 小时。在非肿瘤组织之间,肾脏中的摄取最高,在 3 小时平均为 $1.89 \pm 0.42\%$ ID/g 并随着时间推移伴随稳定的减少(生物半衰期,33.6 小时)。肝脏摄取在 $0.15 \pm 0.06\%$ ID/g 时开始并且随时间推移基本保持不变。

[0440] 与 TF10 预靶向的 ^{111}In -IMP-288 相反,虽然在开始的 24 小时内具有实质的清除, ^{111}In -hPAM4-IgG 从血液中清除较慢,从 3 小时的 30.1% ID/g 降低到 24 小时的仅 $11.5 \pm 1.7\%$ ID/g。脾脏中可变的提高的摄取表明抗体可以从血液中通过靶向包在脾脏中的分泌粘蛋白移除。在 48 小时、 $80.4 \pm 6.1\%$ ID/g 时肿瘤摄取达到峰值,并且在监控期间的持续时间内保持提高的水平。高肿瘤摄取配合 IgG 的比预期血液清除更快的清除,在 24 小时内得到肿瘤/血液比为 5.2 ± 1.0 。图 10C 示出施用 ^{111}In -PAM4-IgG 24 小时后动物的图像,其说明在该早期时间肿瘤可见,但是在腹部内仍有相当的活性。除肾脏外,当与 ^{111}In -hPAM4-IgG 相比时,对于 TF10 预靶向 ^{111}In 标记的半抗原-肽,肿瘤/非肿瘤比例大部分较高,而在肾脏内,在后期 ^{111}In -IMP-288 和 ^{111}In -hPAM4-IgG 的肿瘤/肾脏比例相似。然而,对于 TF10 预靶向的 ^{111}In -IMP-288,3 小时,肿瘤/肾脏比例足够高(例如 $\sim 7:1$),从而可以容易地从正常组织中识别肿瘤。

[0441] 图 11 说明直接和预靶向方法递送放射性核素 (^{90}Y) 的潜在的治疗能力。在它们各自的最大耐受剂量(对 ^{90}Y -hPAM4 为 0.15mCi 和对 TF10 预靶向 ^{90}Y -IMP-288 为 0.9mCi) 时,虽然通过 PAM4-IgG 递送时,肿瘤中放射性同位素的浓度($\%$ ID/g)好像比通过预靶向 TF 10 递送更高,但是对肿瘤的辐射剂量相似(对于 ^{90}Y -PAM4-IgG 和 TF10 预靶向 ^{90}Y -IMP-288 分别为 10,080 和 9,229)。预靶向方法的优点将是血液中异常低的活性(9cGy),比用 ^{90}Y -hPAM4-IgG($1,623\text{cGy}$) 几乎少 200 倍。同样值得注意的是使用 TF10 预靶向的 ^{90}Y -IMP-288,对肝脏以及其它非肿瘤器官的辐射剂量会非常低。例外的是肾脏,其中在各自最大剂量时,两个方案的辐射剂量将相似(对 ^{90}Y -PAM4-IgG 和 TF10- ^{90}Y -IMP-288 分别为 612 和 784cGy)。数据表明如使用大多数其它放射性标记的完整 IgG mAb 一样,对于 ^{90}Y -PAM4-IgG,剂量限制性毒性将在血液,然而,对于 TF10 预靶向方案,剂量限制性毒性在肾脏。

[0442] 讨论

[0443] 已经日常地发现提供解剖图像的当前诊断形式,诸如超声波、计算机化断层显像(CT)和磁共振成像(MRI)技术以及代谢环境的 PET 成像,在胰腺团块检测中提供高灵敏度。然而,这些数据在极大程度上是基于已经表现临床症状的种群中病变 $> 2\text{cm}$ 的检测。此时在胰腺癌的发展中,预测相当令人沮丧。为改善患者的治疗效果,对无症状患者早期的小的胰腺肿瘤的检测是必要的。

[0444] 使用诸如在本文中所述的 mAb-PAM4 的靶向 mAb 的成像方法可用于这些早期的小的癌症肿瘤的诊断。mAb 的特异性是最重要的。我们已经给出重要的数据,包括组织样本的

免疫组织化学研究 (Gold 等, Clin Cancer Res 2007 ;13 :7380-7、Gold 等, Int J Cancer 1994 ;57 :204-10) 和患者血清的免疫分析 (Gold 等, J Clin Oncol 2006 ;24 :252-8), 以显示 mAb-PAM4 对生物标记有高度反应活性, 而生物标记的存在提供胰腺肿瘤的高诊断可能性。此外, 我们确定虽然 PAM4 不与正常成年胰腺组织或活性胰腺炎反应, 但是与胰腺内肿瘤进程的最早阶段 (胰腺上皮内瘤变 1 和导管内乳头状粘液性肿瘤) 反应, 并且在发展到侵袭性胰腺癌的过程中生物标记保持高水平表达 (Gold 等, ClinCancer Res 2007 ;13 :7380-7)。对携带人胰腺肿瘤异种移植物的无胸腺裸鼠进行的临床前研究已经显示放射性标记的鼠源、嵌合和人源化版本的 PAM4 的特异性靶向。

[0445] 在当前的研究中, 我们已经检查了下一代重组、双特异性、基于 PAM4 的构建体 TF10, 其对 PAM4 是二价的, 对抗 HSG 半抗原是单价的。这种命名为对接和锁定的预靶向系统的构建体有几个重要特征, 包括它的一般适用性和合成容易性。然而, 对于现在的考虑, 与之前报道的化学构建体的主要不同在于化合价, 其提供与肿瘤抗原增加的结合, 和重要的药物代谢动力学。观察到 TF10 比化学共轭物从非肿瘤组织的清除快很多。对于化学构建体, 双特异性构建体在血液中的水平达到 少于 1% ID/g 的时间为 40 小时, 而对于 TF10 是 16 小时。预靶向剂的更快清除已经大大地改进了肿瘤 / 血液比例, 而同时在肿瘤部位保持高信号强度 (% ID/g)。

[0446] 除提供早期检测和诊断的方法外, 结果支持用于癌症治疗的 TF10 预靶向系统的使用。考虑对肿瘤和非肿瘤组织的有效辐射剂量, 使其有利于预靶向方法而不是直接地被放射性标记的 PAM4-IgG。剂量评估表明两种递送系统具有不同的剂量限制毒性: 直接放射性标记 PAM4 有骨髓中毒性, 而 TF 10 预靶向系统对肾脏有毒性。这对放射性标记 PAM4 作为治疗剂的未临床发展有重要意义。选为胰腺癌的前药的吉西他滨可以提供对于肿瘤细胞的显著的辐射敏化。在之前的研究中, 我们示出与单独使用每种相比, 吉西他滨和直接放射性标记 PAM4-IgG 的组合提供协同的抗肿瘤效应 (Gold 等, Clin Cancer Res 2004, 10 :3552-61、Gold 等, Int J Cancer 2004, 109 :618-26)。使用这种组合的剂量限制因素与血液毒性相重叠。然而, 由于 TF 10 预靶向的剂量限制器官好像是肾脏而不是血液组织, 与吉西他滨的组合应该毒性较小, 因此允许增加施用随后具有较大的抗肿瘤功效的放射性同位素。

[0447] 当与直接放射性标记 DOTA-PAM4-IgG 相比, 在临床前模型中用 TF10 预靶向达到的较好的成像提供有力的论据以用这个成像系统进行临床试验。用于胰腺肿瘤的肿瘤靶向 mAb 的特异性与双特异性抗体平台技术相结合, 提供高潜力以改善总体患者治疗效果, 其中双特异性抗体平台技术提供将各种成像化合物共轭至用于 SPECT (^{111}In)、PET (^{68}Ga)、超声波 (Au) 或其它造影剂, 或用于物质 ^{90}Y 或其它用于治疗的 放射性核素的 HSG- 半抗原 - 肽的能力 (Goldenberg 等, J Nucl Med 2008, 49 :158-63)。特别是, 我们相信基于 TF 10 的免疫 PET 程序将对筛选处于胰腺癌高风险发展的个体 (例如, 遗传倾向、慢性胰腺炎、吸烟者等) 以及随访患者的方法有主要的临床价值, 其中患者具有得自常规技术的可疑腹部图像和 / 或具有由于一个或多个特殊生物标记或异常生物化学结果的存在的适应症。当作为正在进行的医疗计划的一部分用于追踪这些患者时, 可达到胰腺癌的早期检测。最后, 与吉西他滨相结合, TF10 预靶向可提供比直接放射性标记 PAM4-IgG 更好的机会用于控制肿瘤生长。

[0448] 实例 20. 用吉西他滨和使用 TF10 预靶向的 ^{90}Y 标记肽的胰腺癌异种移植物的治疗

[0449] 概要

[0450] 当前,在患有 III/IV 期胰腺癌的患者中以 I/II 期试验检查 ^{90}Y -hPAM4IgG 与吉西他滨的组合。我们公开了用于预靶向放射性核素的新方法,该放射性核素可以向胰腺癌异种移植递送相似量的放射性但具有较小的血液毒性,当与吉西他滨组合时有更大的可塑性。对携带 $\sim 0.4\text{cm}^3$ 单链 CaPan1 人胰腺癌的裸鼠施用重组 bsMAb,TF10,一天后施用 ^{90}Y 标记的半抗原-肽 (IMP-288)。对这个治疗增加各种剂量和疗程的吉西他滨,并且监测肿瘤发展一直到 28 周。单独施用 0.7mCi PT-RAIT 仅在血液计数中产生短暂的 60% 损失,并且单独施用 0.9mCi PT-RAIT 和施用 0.7mCi PT-RAIT+6mg 吉西他滨 (人相当于 $\sim 1000\text{mg}/\text{m}^2$) 的动物 9 个月后没有肾脏毒性的组织学证据。单个剂量的 0.25 或 0.5mCi PT-RAIT 可单独地分别完全消除 20% 和 80% 的肿瘤。对标准吉西他滨方案 (每周 $6\text{mg} \times 3$, 断开 1 周, 重复 3 次) 增加每月分次的 PT-RAIT (在每个吉西他滨周期的开始施用 0.25mCi/ 剂量) 比单独 PT-RAIT 显著增加了肿瘤的中时以达到 3.0cm^3 。检查加到 PT-RAIT 的吉西他滨的非细胞毒性放射敏化剂量方案的其它治疗计划比单独 PT-RAIT 也在治疗响应方面显示显著的改善。结果显示 PT-RAIT 对于治疗胰腺癌是有希望的新方法。当前数据表明将 PT-RAIT 与吉西他滨结合将增强治疗响应。

[0451] 方法

[0452] 如上所述制备 TF10 双特异性抗体。对于预靶向,对携带人源性胰腺癌细胞系 CaPan 1 的裸鼠施用 TF10。允许足够时间使 TF10 从血液清除之后 (16h),施用放射性标记二价 HSG 肽。小分子量的 HSG 肽 ($\sim 1.4\text{kD}$) 在几分钟内从血液清除,进入在其中小分子量的 HSG 肽可以与预靶向 TF10bsMAb 的抗 HSG 部分结合的血管外空间。在几个小时内, $> 80\%$ 的放射性标记 HSG 肽从尿液中排泄,在正常组织中留下微量的肿瘤定位肽。

[0453] 结果

[0454] 图 12 表明用 0.15mCi 的 ^{90}Y -hPAM4IgG 或 0.25 或 0.50mCi 的预靶向 TF10 的 ^{90}Y -IMP-288 对已生长的 ($\sim 0.4\text{cm}^3$) CaPan 1 肿瘤的单一治疗得出的治疗活性。对比 0.15-mCi 剂量的直接放射性标记 IgG,观察到 0.5-mCi 预靶向剂量的相似抗肿瘤活性,但是这个水平的直接共轭物具有严重血液毒性 (未示出),而预靶向剂量仅为中等毒性 (未示出)。事实上,用 ^{90}Y -IMP-288 预靶向的 MTD 在裸鼠中至少为 0.9mCi。

[0455] 图 13 显示吉西他滨和 PT-RAIT 的组合对抗肿瘤治疗具有协同效应。每周通过腹腔给药对小鼠施用相当人剂量的 $1000\text{mg}/\text{m}^2$ (6mg) 吉西他滨 (GEM),施用 3 周,停止 1 周后,重复此方案 2 次。在 3 个治疗周期中的每个,在第一个 GEM 剂量后 1 天施用 PT-RAIT (0.25mCi 的 TF10 预靶向 ^{90}Y -IMP-288)。单独的 Gem 对肿瘤发展没有显著的影响 (存活率是基于发展到 3.0cm^3 时的时间)。相对于未治疗的动物,单独的 PT-RAIT 改善存活,但是将 GEM 与 PT-RAIT 方案结合提高平均存活率将近 10 周。由于对 PT-RAIT 血液毒性是非剂量限制性的,但却是吉西他滨治疗的限制之一,这些研究表明可将 PT-RAIT 加到标准 GEM 治疗中有增强反应的潜力。吉西他滨加上 PT-RAIT 的显著协同效应是令人惊讶的和出乎意料的。

[0456] 进一步的研究检查了施用吉西他滨加上 PT-RAIT 的时间安排对于抗肿瘤效应的增强效果。在 0.25mCi 的 TF10 预靶向 ^{90}Y -IMP-288 施用一天前或一天后施用单个 6mg 剂量的 GEM (未示出)。该研究用 GEM 确认已经熟知的是即,最好是在辐射之前进行辐射敏化。单独施用 PT-RAIT 以及施用 PT-RAIT 并在放射性标记肽施用 22 小时后施用吉西他滨,小鼠

的存活率在存活时间上显示稍微不同。然而,在 PT-RAIT 之前 19 小时施用吉西他滨导致存活的实质增加(未示出)。

[0457] 在携带 CaPan1 的动物中施用单一的 PT-RAIT (0.25mCi) 与西妥昔单抗(每周 1mg ip, 7 周)或与西妥昔单抗+GEM(每周 6mg×3)结合,显示 GEM+ 西妥昔单抗与 PT-RAIT 的结合提供较好的起始响应(图 14),但是与仅单独加到 PT-RAIT 的西妥昔单抗关联的反应是令人鼓舞的(图 14),因为它与 PT-RAIT+GEM 一样或更好。由于在这个研究中的总体存活率极好,当研究终止后的 24 周时,每组中仅有两个肿瘤发展到 > 2.0cm³,所以这些结果表明当加到 PT-RAIT 中时西妥昔单抗的潜在作用。

[0458] 实例 21. 用于胰腺癌治疗的分次预靶向放射性免疫疗法 (PT-RAIT) 的效果

[0459] 我们评估用 ⁹⁰Y-DOTA-di-HSG 肽 (IMP-288) 和 TF10 的分次治疗。在携带人胰腺癌异种移植物 s. c. CaPan1 0.32-0.54cm³ 的裸鼠中使用 TF10 和放射性标记 IMP-288 进行研究。对于治疗,施用 TF10 预靶向 ⁹⁰Y-IMP-288 [A] 一次(在第 0 周,0.6mCi)或 [B] 分次(在第 0 和 1 周,0.3mCi,)、[C](在第 0、1 和 2 周,0.2mCi)或 [D](在第 0、1 和 4 周,0.2mCi)。

[0460] 在大多数小鼠中观察到肿瘤退化(> 90%),在组 [A]、[B]、[C] 和 [D] 中分别是 9/10, 10/10, 9/10 和 8/10。在组 [A] 中,第 3.7 周时 50% 的小鼠达到最大肿瘤退化,相对于 [B]、[C] 和 [D] 中分别是第 6.1、8.1 和 7.1 周。一些肿瘤显示再生长。在第 14 周,在分次组 (2×0.3mCi) 中观察到最好的治疗响应,6/10 的小鼠没有肿瘤 (NT),相对于 3×0.2mCi 组的 3/10 和 1×0.6mCi 组的 1/10。没有观察到主要的体重减少。分次 PT-RAIT 以最小毒性提供治疗胰腺癌的另外供替代的选择。

[0461] 实例 22. 晚期胰腺癌 (PC) 的 ⁹⁰Y-hPAM4 放射免疫治疗 (RAIT) 加放射敏化吉西他滨 (GEM) 治疗

[0462] 对 PC 高度特异的人源化抗体 ⁹⁰Y-hPAM4 在患有晚期疾病的患者内显示短暂活性,并且在临床前研究中, GEM 增强 RAIT。该研究评估在患有未治疗不可切除 PC 的患者中 ⁹⁰Y-hPAM4 加 GEM 的重复治疗周期。通过在同期群组逐步升高 ⁹⁰Y 剂量,对患者重复 4 周的周期(每周施用 200mg/m²GEM 一次,在第 2-4 周,每周施用 ⁹⁰Y-hPAM4 一次)直到恶化或不可接受的毒性。响应评估使用 CT、FDGPET 和 CA19.9 血清水平。

[0463] 在第一个 2 剂量水平 (6.5 和 9.0mCi/m²90YhPAM4×3) 的 8 个患者 (3F/5M, 56-72y. o.) 中,血液毒性已经是瞬时等级 1-2。两个患者对用 FDGSUV 的初始治疗有响应并且 CA19.9 减少,而且通过 CT 显示病变退化。9 和 11 月后并且分别总共 3 和 4 个周期之后,两个患者现在都持续良好的功能状态而没有另外的毒性。通过 PET 和 CT 具有稳定的响应并且在初始治疗之后 CA19.9 水平减少的第三个患者现在正在进行第二个周期。其他 4 个患者具有早期疾病恶化,并且仍然在评估剩下的患者。分次的 RAIT、⁹⁰Y-hPAM4 和低剂量的吉西他滨在起始 ⁹⁰Y 剂量水平、以最小的血液毒性、甚至在四个疗程后展示了治疗活性之后,继续逐步加大剂量。

[0464] 实例 23. 用 Mab-PAM4 和体外免疫分析的胰腺癌早期检测

[0465] 用 PAM4 抗体进行免疫组织化学研究。由染色的组织切片得到的结果显示 PAM4 不与正常胰腺导管,小导管和腺泡组织反应(未示出)。相反,使用 MA5 抗体应用到相同的组织样本显示正常胰腺导管和腺泡组织的弥漫性阳性染色(未示出)。在分化良好和中度分化的胰腺癌组织切片中, PAM4 染色为阳性,大部分细胞质被染色但细胞表面明暗度增强。

相同组织切片中的正常胰腺组织未被染色。

[0466] 表 11 表明用 PAM4Mab 在分化各个时期的胰腺癌样本的免疫组织化学分析结果。总体上讲,对所有的胰腺癌样本有 87% 的检测率,分化良好的为 100% 检测,并且中度分化的胰腺癌为几乎 90% 的检测。

[0467] 表 11 PAM4 标记模式

[0468]

癌症	n	病灶	扩散	总计
分化良好	13	2	11	13(100%)
中度分化	24	6	15	21(88%)
分化差	18	5	9	14(78%)
总计	55	13	35	48(87%)

[0469] 表 12 显示 PAM4 免疫组织化学染色液也检测到非常高百分比的胰腺癌癌前病变,包括 PanIn-1A 至 PanIN-3、IPMN(导管内乳头状粘液性肿瘤)和 MCN(粘液性囊性肿瘤)。PAM4 染色总共检测到所有胰腺癌前病变的 89%。这些结果证明通过体外分析,基于 PAM4 抗体的免疫检测可以检测差不多 90% 的胰腺癌和癌前病变。在 PanIN 发展的最早期观察到 PAM4 表达。在 IPMN 和 MCN 样本中观察到强烈染色(未示出)。在大部分胰腺癌中,PAM4 表位以高浓度存在(强弥漫染色)。PAM4 显示对最早期胰腺癌癌前病变(包括 PanIN-1、IPMN 和 MCN)有弥漫、强烈活性,但对正常胰腺组织没有活性。合起来看,这些结果显示用 PAM4 抗体的诊断和/或检测可以以非常高的特异性检测胰腺癌发展的最早阶段。

[0470] 表 12 PAM4 标记模式

[0471]

	n	病灶	扩散	总计
PanIn-1A	27	9	15	24(89%)
PanIn-1B	20	4	16	20(100%)
PanIn-2	11	6	4	10(91%)
PanIn-3	5	2	0	2(40%)
总计 PanIn	63	21	35	56(89%)
IPMN	36	6	25	31(86%)
MCN	27	3	22	25(92%)

[0472] 发展了用在血清样本中 PAM4 抗原的基于酶的免疫分析。图 15 显示对胰腺癌相对于正常组织和其它类型的癌症,使用 PAM4 免疫分析的鉴别诊断结果。

[0473] 结果显示将胰腺癌(n=53)与所有其它样本(n=233)(包括胰腺炎以及乳腺癌、卵巢癌和结肠直肠癌和淋巴瘤)相比较,胰腺癌的检测敏感度为 77.4%,检测特异性为 94.3%。图 15 的数据以表格的形式给出在表 13 中。

[0474] 表 13. 患者血清中与 PAM4 反应的粘蛋白

[0475]

	n	平均值	SD	中值	范围	# 阳性 (%)
正常	43	0.1	0.3	0.0	0-2.0	0 (0)
胰腺炎	87	3.0	11.5	0.0	0-63.6	4 (5)
胰腺癌	53	171	317	31.7	0-1000	41(77)
结肠直肠癌	36	3.3	7.7	0.0	0-37.8	5 (14)
乳腺癌	30	3.7	10.1	0.0	0-53.5	2 (7)
卵巢癌	15	1.8	4.3	0.0	0-16.5	1 (7)
淋巴瘤	19	12.3	44.2	0.0	0-194	1 (5)

[0476] 用来自表 13 的数据构建 ROC 曲线 (未示出)。检查总共 283 个患者 (其中包括 53 个患有胰腺癌), 并将患有胰腺癌患者中循环 PAM4 抗原的存在与所有其它样本进行比较, ROC 曲线给出 AUC 为 0.88 ± 0.03 (95% ci, 0.84-0.92), p 值 < 0.0001 , 即对于从非胰腺癌样本中鉴别胰腺癌的极显著差异。将胰腺 CA 与其它肿瘤和正常组织比较, 基于 PAM4 的血清试验显示敏感度为 77% 并且特异性为 95%。

[0477] 对来自正常患者的、“早期”(I 期)胰腺癌和所有胰腺癌样本的血清样本的 PAM4 抗原浓度进行比较。样本包括 13 个来自健康受试者的血清样本、12 个来自 I 期胰腺癌的血清样本、13 个来自 II 期胰腺癌的血清样本和 25 个来自 III/IV 期 (晚期) 胰腺癌的血清样本。如通过 ROC 曲线统计分析确定, 使用截断值为 8.8 单位 /ml (红线)。在图 16 中示出 PAM4 抗原浓度的频率分布, 显示对于胰腺癌的诊断, 92% 的“早期”I 期胰腺癌在截断线之上。在图 17 中示出基于 PAM4 试验的 ROC 曲线, 其表明在胰腺癌检测中, PAM4 试验的敏感度为 81.6%, 特异性为 84.6%。

[0478] 这些结果确认基于 PAM4 抗体结合的酶免疫分析可以检测并定量胰腺癌患者血清中与 PAM4 反应的抗原。免疫分析显示胰腺癌的高特异性和敏感性。使用 PAM4 免疫分析可测在 I 期疾病的大多数患者。

[0479] 总之, 采用 PAM4 抗体的免疫组织学程序识别大约 90% 的侵袭性胰腺癌和其癌前病变 PanIN、IPMN 和 MCN。用以定量人类患者血清中的 PAM4 抗原的基于 PAM4 的酶免疫分析显示对早期胰腺癌的检测有高敏感性和特异性。由于 PAM4 对胰腺癌的高特异性, 粘蛋白生物标记也可以用作体内的靶向显像剂和治疗剂的目标。用于检测“早期”胰腺癌的免疫 PET 成像用于可被更有效地治疗的早期胰腺癌的诊断, 早期胰腺癌可被更有效地治疗。用来源化 PAM4 抗体构建体的放射免疫治疗优选地与放射敏化剂结合, 用于胰腺癌的治疗。

[0480] 实例 24. 聚乙二醇化 DNL 构建体

[0481] 在某些实施例中, 优选可制备包含聚乙二醇化形式的抗体或免疫共轭物的构建体。这种聚乙二醇化构建体可通过 DNL 技术来制备。

[0482] 在一优选的方法中, 使要聚乙二醇化的效应物部分 (如 hPAM4Fab) 连接 DDD 序列以生成 DDD 模块。用互补 AD 序列对具有理想分子尺寸的 PEG 试剂进行衍生化, 将所得到的 PEG-AD 模块与 DDD 模块结合以生成聚乙二醇化共轭物, 所述聚乙二醇化共轭物由单个 PEG

通过形成在 DDD 与 AD 之间的二硫键定点拴系于两个 Fab 拷贝或其它效应物部分组成。PEG 试剂可以在一端用甲氧基封端 (m-PEG), 可以是直链或支链的, 并且可以含有以下官能团中的一种: 丙醛、丁醛、邻吡啶基硫酯 (OPTE)、N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、噻唑烷-2- 硫酮、琥珀酰亚胺碳酸酯 (SC)、马来酰亚胺或邻二硫吡啶 (OPPS)。效应物部份中可能有用于聚乙二醇化的是酶、细胞因子、趋化因子、生长因子、肽、适体、血红蛋白、抗体及抗体片段。该方法不是限制性的, 许多种试剂可以用所公开的方法及组合物进行聚乙二醇化。可以从商业渠道获得各种型号以及用多种活性部份衍生化的 PEG, 下面会更详细地讨论到。

[0483] 生成 PEG-AD2 模块

[0484] IMP350 :CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC(SS-tbu)-NH₂ (SEQ IDNO :41)

[0485] 采用 Fmoc 方法在肽合成器上以 Sieber Amide 树脂按 0.1mmol 的规模制备结合 AD2 序列的 IMP350。从 C- 末端开始, 所用的被保护的氨基酸为 Fmoc-Cys(t-Buthio)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OBut)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(But)-OH、Fmoc-Glu(OBut)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH 和 Fmoc-Cys(Trt)-OH。从树脂上切下肽并通过反相 (RP)-HPLC 进行纯化。

[0486] 合成 PEG₂₀-IMP350

[0487] 在 pH 值为 7.81 的 7mL 的 1M Tris 缓冲液中使 IMP350(0.0104g) 与 0.1022g 的 mPEG-OPTE(20Da, **NEKTAR®** Therapeutics) 混合。然后加入 1mL 乙腈以溶解一些悬浮物。在室温下搅拌反应 3h, 然后加入 0.0527g 的 TCEP, 连同 0.0549g 半胱氨酸。搅拌反应混合物 1.5h, 然后在用甲醇在水中的 20% 溶液平衡的 PD-10 脱盐柱上纯化。洗脱样本、冷冻并冻干以得到 0.0924g 粗 PEG20-IMP350 (MH+23508, 按 MALDI)。

[0488] 合成 IMP362 (PEG₂₀-IMP360)

[0489] MP360 :CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC(SS-tbu)G-EDANS (SEQID NO :42) MH⁺2660

[0490] 采用 Fmoc 方法在肽合成器上以 Fmoc-Gly-EDANS 树脂按 0.1mmol 的规模合成结合 AD2 序列的 IMP 360。使用 0.23g 的 Fmoc-Gly-OH、0.29g 的 HATU、26 μL 的 DIEA、7.5mL 的 DMF 和 0.57g 的 EDANS 树脂 (**NOVABIOCHEM®**), 以手动的方式把 Fmoc-Gly-OH 加入到树脂中。在室温下混合反应 2.5 小时, 用 DMF 和 IPA 洗涤树脂以除去过量的试剂。从 C- 末端开始, 所用的被保护的氨基酸为 Fmoc-Cys(t-Buthio)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OBut)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(But)-OH、Fmoc-Glu(OBut)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH 和 Fmoc-Cys(Trt)-OH。从树脂上切下肽并通过 RP-HPLC 进行纯化。

[0491] 关于合成 IMP362, 在 pH 值为 7.81 的 7mL 的 1M Tris 缓冲液中使 IMP360(0.0115g) 与 0.1272g 的 mPEG-OPTE(20Da, **NEKTAR®** Therapeutics) 混合。然后加入乙腈 (1mL) 以溶解一些悬浮物。在室温下搅拌反应 4h, 然后加入 0.0410g 的 TCEP, 连同 0.0431g 半胱氨酸。搅拌反应混合物 1h, 并在用甲醇在水中的 20% 溶液平衡的 PD-10 脱盐柱上纯化。洗脱样本、冷冻并冻干以得到 0.1471g 粗 IMP362 (MH+23713)。

[0492] 合成 IMP413 (PEG₃₀-IMP360)

[0493] 关于合成 IMP 413, 在 pH 值为 7.81 的 7mL 的 1M Tris 缓冲液中使 IMP 360 (0.0103g) 与 0.1601g 的 mPEG-OPTE (30kDa, **NEKTAR®** Therapeutics) 混合。然后加入乙腈 (1mL) 以溶解一些悬浮物。在室温下搅拌反应 4.5h, 然后加入 0.0423g 的 TCEP, 连同 0.0473g 半胱氨酸。搅拌反应混合物 2h, 接下来透析两天。对透析物进行冷冻并冻干以得到 0.1552g 粗 IMP413 (MH⁺ 34499)。

[0494] 合成 IMP421

[0495] IMP 421

[0496] Ac-C-PEG₃-C(S-tBu)GQIEYLAKQIVDNAIQQAGC(S-tBu)G-NH₂ (SEQID NO :43)

[0497] 在 **NOVASYN®** TGR 树脂 (487.6mg, 0.112mmol) 上制备肽 IMP421, 即 MH+2891, 方式是按所示顺序向树脂中加入以下的氨基酸: Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Cys(t-Buthio)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OBut)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(But)-OH、Fmoc-Glu(OBut)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Cys(t-Buthio)-OH、Fmoc-NH-PEG₃-COOH、Fmoc-Cys(Trt)-OH。将 N-末端氨基酸保护为乙酰基衍生物。然后从树脂上切下肽并通过 RP-HPLC 纯化, 产生 32.7mg 白色固体。

[0498] 合成 IMP457

[0499] 按标准的化学方法合成结合 AD2 序列的 IMP 421 (SEQ IDNO :43)。往 15.2mg (5.26 μmol) IMP 421 (F.W. 2890.50) 和 274.5mg (6.86 μmol) mPEG2-MAL-40K 在 1mL 乙腈的溶液中加入 pH 值为 7.8 的 7mL 的 1M Tris, 使之在室温下反应 3h。过量的 mPEG2-MAL-40K 用 49.4mg 的 L-半胱氨酸淬灭, 接下来用 59.1mg 的 TCEP 进行一小时的 S-S-tBu 脱保护。反应混合物在 2-8℃ 过夜透析, 使用进入到 5L 的 5mM 醋酸铵 (pH 值为 5.0) 的两个 3-12mL 容量的 10K **SLIDE-A-LYZER®** 透析盒 (进入到每个盒中 4mL)。次日对 5mM 醋酸铵 (pH 值为 5.0) 再作出三次 5L 缓冲液的变化, 每次透析持续至少 21/2h。将纯化产物 (19.4mL) 转入到两个 20mL 闪烁瓶里面, 冷冻并冻干以产生 246.7mg 白色固体。MALDI-TOF 给出 mPEG2-MAL-40K42,982 和 IMP-45745,500 的结果。

[0500] 实例 25. 通过 DNL 生成聚乙二醇化 hPAM4

[0501] 制备具有两个 hPAM4Fab 的拷贝与 20kDa PEG 偶联的 DNL 结构。DNL 反应进行的方式是, 对 250mM 咪唑、0.02% Tween 20、150mM NaCl、1mM EDTA、50mM NaH₂PO₄ (pH 7.5) 中的 hPAM4Fab-DDD2 添加 10 倍摩尔过量的还原且冻干的 IMP362。室温下在黑暗中经 6h 后, 黑暗中在 4℃ 下以 CM 上样缓冲液 (150mM NaCl, 20mM NaAc, pH 4.5) 透析反应混合物。溶液装载到以 CM 上样缓冲液预平衡的 1-mL Hi-Trap CM-FF 柱 (**AMERSHAM®**) 上面。装载样本后, 用 CM 上样缓冲液将柱洗涤至基线, 接下来用 15mL 的 0.25M NaCl、20mM NaAc (pH 4.5) 洗涤。以 12.5mL 的 0.5M NaCl、20mM NaAc (pH 4.5) 洗脱聚乙二醇化 hPAM4。

[0502] 通过考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 分析共轭过程。在非还原性条件下, 考马斯亮蓝染色的凝胶表明反应混合物中存在主带, 该主带在未结合或 0.25M NaCl 洗涤部分中不存在, 但在 0.5M NaCl 部分中很明显。用于检测 IMP362 上的 EDANS 标记的荧光成像显示该带含有 IMP362 和反应混合物中过量 IMP362 的存在以及未结合部分。DNL 反应导致 IMP362 与

hPAM4Fab 的二聚体的位点特异性共价配合。在打破二硫键的还原性条件下, DNL 结构的组分解体。(hPAM4Fab)₂-PEG 构建体的计算 MW 与通过 MALDI TOF 确定的相符合。总的来说, DNL 反应导致生成近乎定量的匀质产物, 通过阳离子交换色谱法纯化后的纯度 > 90%。

[0503] 另一 DNL 反应进行的方式是, 对 250mM 咪唑、0.02% Tween 20、150mM NaCl、1mM EDTA、50mM NaH₂PO₄ (pH 7.5) 中的 hPAM4Fab-DDD2 添加 10 倍摩尔过量的还原且冻干的 IMP457。在室温下经 60h 后, 向反应混合物中添加 1mM 氧化的谷胱甘肽, 然后将其再保持 2h。用 CM 上样缓冲液 (150mM NaCl, 20mM NaAc, pH 4.5) 按 1 : 20 稀释混合物, 并用醋酸滴定至 pH 4.5。把溶液装载到以 CM 上样缓冲液预平衡的 1-mL Hi-Trap CM-FF 柱 (AMERSHAM®) 上面。装载样本后, 用 CM 上样缓冲液将柱洗涤至基线, 接下来用 15mL 的 0.25M NaCl、20mM NaAc (pH 4.5) 洗涤。以 20mL 的 0.5M NaCl、20mM NaAc (pH 4.5) 洗脱聚乙二醇化产物。把 DNL 构建体浓缩至 2mL 并渗滤到 0.4M PBS (pH 7.4) 里。通过 SDS-PAGE 确定, 最终的聚乙二醇化 hPAM4Fab₂ 构建体的纯度为大约 90%。

[0504] 按就在上面所述的方式, 使用 IMP413 而不是 IMP362 制备具有两个 hPAM4Fab 的拷贝与 30kDa PEG 偶联的 DNL 构建体。如上所述地纯化聚乙二醇化的 hPAM4 Fab₂ DNL 构建体, 获得大约 90% 的纯度。聚乙二醇化 DNL 构建体可用于上面针对非聚乙二醇化形式的 hPAM4 所述的治疗方法。

[0505] 实例 26. 生成基于干扰素 (IFN)-α 2b 的 DDD 模块

[0506] 通过 PCR 扩增 IFN-α 2b 的 cDNA 序列, 导致具有下列特征的序列, 其中 XbaI 和 BamHI 是限制性位点, 信号肽是 IFN-α 2b 原生的, 而 6His 是六聚组氨酸标记 (SEQ ID NO : 59) : XbaI---信号肽---IFN α 2b---6His---BamHI (6His 公开为 SEQ ID NO : 59)。所得到的分泌蛋白由 IFN-α 2b 在其 C-末端与由 SEQ ID NO : 44 组成的多肽融合而构成。

[0507] KSHHHHHHSGGGGSGGGCGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA α SEQ ID NO : 44)

[0508] 使用全长人 IFN α 2b cDNA 克隆 (INVITROGEN® Ultimate ORFhuman clone cat#HORF01Clone ID IOH35221) 为模板、如下的寡核苷酸为引物实施 PCR 扩增 :

[0509] IFNA2Xba I 左

[0510] 5' -TCTAGACACAGGACCTCATCATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGG-3' (SEQ ID NO : 45)

[0511] IFNA2BamHI 右

[0512] 5' GGATCCATGATGGTGTATGATGGTGTGACTTTTCCTTACTTCTTAACTTTCTTGC-3' (SEQ ID NO : 46)

[0513] 把 PCR 扩增引物克隆到 PGEMT® 载体 (PROMEGA®) 当中。制备 DDD2-pdHL2 哺乳动物表达载体, 用于通过以 XbaI 和 Bam HI 限制性内切酶消化而与 IFN-α 2b 连接。用 XbaI 和 Bam HI 从 PGEMT® 上切除 IFN-α 2b 扩增引物并连接到 DDD2-pdHL2 载体当中以生成表达载体 IFN-α 2b-DDD2-pdHL2。

[0514] 通过以 SalI 酶消化使 IFN-α 2b-DDD2-pdHL2 线性化, 并通过电穿孔转染到 Sp/EEE 骨髓瘤细胞当中 (参见美国专利 7, 537, 930)。通过 ELISA 发现两个克隆具有可检测水平的 IFN-α 2b。使两个克隆中表示为 95 的一个适应于在无血清培养基中生长而基本上不降低生产率。随后通过五周的时间将甲氨蝶呤 (MTX) 浓度从 0.1 μ M 提高到 0.8 μ M 而扩增克隆。在此阶段, 通过限制稀释对其进行亚克隆, 最高产的亚克隆 (95-5) 扩增。使用商业

化 rIFN- α 2b (CHEMICON® IF007, Lot06008039084) 为标准, 在摇瓶中生长的 95-5 的生产率估计为 2.5mg/L。以 0.8 μ M MTX 将克隆 95-5 扩增到含总共 20L 无血清 Hybridoma SFM 的 34 个滚瓶中, 并使之达到末期培养。通过离心使上清液澄清并过滤 (0.2 μ M)。滤液渗滤进入 1X 结合缓冲液 (10mM 咪唑, 0.5M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, pH 7.5), 并在制备时浓缩到 310mL, 用于通过固定化金属亲和色谱法 (IMAC) 进行纯化。将浓缩物装载至 30-mLNi-NTA 柱, 该柱已经 Tween 20 在 1X 结合缓冲液中的 0.02% 溶液 500mL 的清洗, 然后经 290mL 的 30mM 咪唑、0.02% Tween 20、0.5M NaCl、50mM NaH₂PO₄ (pH 7.5) 清洗。产物用 110mL 的 250mM 咪唑、0.02% Tween 20、150mM NaCl、50mM NaH₂PO₄ (pH 7.5) 洗脱。纯化大约 6mg 的 IFN α 2b-DDD2。

[0515] 在还原性条件下通过 SDS-PAGE 确定 IFN- α 2b-DDD2 的纯度 (未显示)。IFN- α 2b-DDD2 是最重度染色的带, 占总蛋白质的大约 50% (未显示)。产物解体为 M_r ~ 26kDa 的双联体, 这与计算的 IFN- α 2b-DDD2-SP 的 MW (26kDa) 相符。存在有 M_r 为 34kDa 的一个主要污染物和许多微弱的污染带 (未显示)。

[0516] 例 27. 通过 DNL 生成 hPAM4Fab-(IFN- α 2b)₂

[0517] 建立 C-H-AD2-IgG-pdHL2 表达载体

[0518] pdHL2 哺乳动物表达载体已被用于介导许多重组 IgGs 的表达。生成质粒穿梭载体以促进将任何 IgG-pdHL2 载体转化成 C-H-AD2-IgG-pdHL2 载体。以 pdHL2 载体为模板、寡核苷酸 Fc BglIII 左和 Fc Bam-EcoRI 右为引物扩增 Fc (CH2 和 CH3 域) 的基因。

[0519] Fc BglIII 左

[0520] 5' -AGATCTGGCGCACCTGAACTCCTG-3' (SEQ ID NO :47) Fc Bam-EcoRI 右

[0521] 5' -GAATTCGGATCCTTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3' (SEQ IDNO :48)

[0522] 在 PGEMT® PCR 克隆载体中克隆扩增引物。从 PGEMT® 上切除 Fc 插入片段并与 AD2-pdHL2 载体连接以生成穿梭载体 Fc-AD2-pdHL2。

[0523] 生成 hPAM4 IgG-AD2

[0524] 为了将任何 IgG-pdHL2 表达载体转化为 C-H-AD2-IgG-pdHL2 表达载体, 从前者上切除 861bp BsrGI/NdeI 限制性片段, 并用从 Fc-AD2-pdHL2 载体上切除的 952bp BsrGI/NdeI 限制性片段替换。BsrGI 切于 CH3 域, NdeI 切于表达盒的下游 (3')。这种方法用于生成 hPAM4IgG-AD2 蛋白。

[0525] 生成 hPAM4IgG-(IFN- α 2b)₂ 构建体

[0526] DNL 反应进行的方式是, 对 250mM 咪唑、0.02% Tween 20、150mM NaCl、1mM EDTA、50mM NaH₂PO₄ (pH 7.5) 中的 IFN- α 2b-DDD2 添加还原且冻干的 hPAM4IgG-AD2。室温下在黑暗中经 6h 后, 黑暗中以 4℃ 下以 CM 上样缓冲液 (150mM NaCl, 20mM NaAc, pH 4.5) 透析反应混合物。溶液装载到以 CM 上样缓冲液预平衡的 1-mL Hi-Trap CM-FF 柱 (AMERSHAM®) 上面。装载样本后, 用 CM 上样缓冲液将柱洗涤至基线, 接下来用 15mL 的 0.25M NaCl、20mM NaAc (pH 4.5) 洗涤。以 12.5mL 的 0.5M NaCl、20mM NaAc (pH 4.5) 洗脱产物。DNL 反应导致 hPAM4IgG 与 IFN- α 2b 的二聚体的位点特异性共价配合。IgG 和 IFN- α 2b 部分在 DNL 构建体中均保持其各自的生理活性。这种技术可用来将任何细胞因子或其它生理活性蛋白或肽附着于 hPAM4, 用于向胰腺癌或表达 PAM4 抗原的其它癌的靶向递送。

[0527] 实例 28. AD 和 DDD 序列变体

[0528] 在某些优选的实施例中,如上所述,结合到 DNL 复合体当中的 AD 和 DDD 序列包含氨基酸序列 AD2 α SEQ ID NO:36) 和 DDD2(SEQ ID NO:34)。然而,在可供选择的实施例中,AD 和 / 或 DDD 部分的序列变体可用来构建细胞因子 -Mab DNL 复合体。AD 和 DDD 域的结构 - 功能关系一直是研究的主题。(参见例如, Burns-Hamuro 等,2005, Protein Sci 14:2982-92; Carr 等,2001, J Biol Chem 276:17332-38; Alto 等,2003, Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50; Hundsrucker 等,2006, Biochem J 396:297-306; Stokka 等,2006, Biochem J 400:493-99; Gold 等,2006, Mol Cell 24:383-95; Kinderman 等,2006, Mol Cell 124:397-408)。

[0529] 例如,Kinderman 等 (2006) 研究了 AD-DDD 结合相互作用的晶体结构并得出结论,人 DDD 序列含许多在二聚体形成或 AKAP 结合中重要的保守氨基酸残基,在下面的 SEQ ID NO:33 中加下划线表示(参见 Kinderman 等,2006 的图 1)。技术人员将会意识到,在设计 DDD 序列的序列变体时,期望是避免改变任何加下划线的残基,而对在二聚和 AKAP 结合中不那么重要的残基可以进行保守的氨基酸替换。

[0530] 来自蛋白激酶 A 的人 DDD 序列

[0531] SHIQIPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:33)

[0532] Alto (2003) 等对各种 AKAP 蛋白的 AD 序列进行了生物信息学分析,用以设计称为 AKAP-IS (SEQ ID NO:35) 的 RII 选择性 AD 序列,对 DDD 的结合常数为 0.4nM。AKAP-IS 序列被设计为 AKAP 与 PKA 结合的肽拮抗剂。在 AKAP-IS 序列中,替换时趋于减少与 DDD 结合的残基在下面的 SEQ ID NO:35 中加下划线表示。

[0533] AKAP-IS 序列

[0534] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:35)

[0535] 类似地,Gold (2006) 利用晶体学方法和肽筛选开发了 SuperAKAP-IS 序列 (SEQ ID NO:49),其对 PKA 的 RII 亚型显示出与 RI 亚型相比高出五个数量级的选择性。加下划线的残基表明相对于 AKAP-IS 序列的氨基酸替换的位置,这种替换增强了与 RII α 的 DDD 部分的结合。在此序列中,N 末端 Q 残基编号为 4 号残基,C 末端 A 残基为 20 号残基。可进行替换以影响对 RII α 的亲力的残基是残基 8、11、15、16、18、19 和 20 (Gold 等,2006)。可设想在某些可供选择的实施例中,SuperAKAP-IS 序列可以替换 AKAP-IS AD 部分序列以制备细胞因子 -Mab DNL 构建体。可替换 AKAP-IS AD 序列的其它可供选择的序列显示在 SEQ ID NO:50-52 中。加下划线表示相对于 AKAP-IS 序列的替换。可以预料,如同 SEQ ID NO:49 中所示的 AKAP-IS 序列一样,AD 部分也可以包含另外的 N 末端残基半胱氨酸和甘氨酸以及 C 末端残基甘氨酸和半胱氨酸。

[0536] SuperAKAP-IS

[0537] QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO:49)

[0538] 可供选择的 AKAP 序列

[0539] QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:50)

[0540] QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:51)

[0541] QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:52)

[0542] Stokka 等 (2006) 也开发了 AKAP 与 PKA 结合的肽竞争体,示于 SEQ ID NO:53-55。肽拮抗剂表示为 Ht31 (SEQ ID NO:53)、RIAD (SEQ ID NO:54) 和 PV-38 (SEQ ID NO:55)。

Ht-31 肽对 PKA 的 RII 亚型表现出较大的亲和力,而 RIAD 和 PV-38 对 RI 显示出较高的亲和力。

[0543] Ht31

[0544] DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO :53)

[0545] RIAD

[0546] LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO :54)

[0547] PV-38

[0548] FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO :55)

[0549] Hundsruker 等 (2006) 开发了又一些 AKAP 与 PKA 结合的肽竞争体,与 PKA 的 RII 形式的 DDD 的结合常数低至 0.4nM。各种 AKAP 拮抗肽的序列在 Hundsruker 等的表 1 (以引用的方式并入本文) 中给出。在下面通过参照 AKAP IS 序列 (SEQ ID NO :35) 加下划线表示不同 AKAP 蛋白的 AD 域当中高度保守的残基。根据 Alto 等 (2003) 的观察,所述残基与增加的 C 末端丙氨酸残基相同 (参见 Hundsruker 等 (2006) 的图 4,以引用的方式并入本文)。对 RII DDD 序列具有特别高亲和力的肽拮抗剂的序列示于 SEQ ID NO :56-58。

[0550] AKAP-IS

[0551] QIEYLAKQIVD~~NAIQQA~~ (SEQ ID NO :35)

[0552] AKAP7 δ -wt-pep

[0553] PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO :56)

[0554] AKAP7 δ -L304T-pep

[0555] PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO :57)

[0556] AKAP7 δ -L308D-pep

[0557] PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO :58)

[0558] Carr 等 (2001) 检查了人和非人蛋白质的不同 AKAP 结合 DDD 序列之间的序列同源度,并且识别了在不同 DDD 部分当中似乎最高度保守的 DDD 序列中的残基。这些在下面参照人 PKA RII α DDD 序列 SEQ IDNO :33 加下划线表示。斜体进一步表示特别保守的残基。所述残基与 Kinderman 等 (2006) 提出的对与 AKAP 蛋白质结合有重要性的残基部分重叠,但不完全相同。

[0559] SHIQIPPLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :33)

[0560] 技术人员会意识到,在一般情况下,在不同蛋白质的 DDD 和 AD 序列中高度保守的那些氨基酸残基是这样的氨基酸残基,优选可在进行氨基酸替换时保持它们不变,而可更容易地改变不那么高度保守的残基以产生本文所述的 AD 和 / 或 DDD 序列的序列变体。

[0561] 技术人员会意识到, DNL 构建体的抗体部分或连接部分中的这些以及其它氨基酸替换可用来提高所得 DNL 构建体的治疗和 / 或药物动力学性质。

[0562] 实例 29. 人血清中的 PAM4 抗原的离体检测

[0563] 在某些实施例中,优选的是通过样品的离体分析检测在受试者体内 PAM4 抗原的存在与否和 / 或诊断胰腺癌的存在与否,所述样品可通过非侵入性技术获得,如血液、血浆或血清样品。这种体外分析例如在筛选程序中可能是优选的,这时没有先验的理由相信个体在特定的位置具有胰腺肿瘤。

[0564] 研究最初是用于分析之前已经冷冻储存多年的患者血清样品进行的 (Gold 等,

J. Clin Oncol 2006, 24 :252-58)。以单克隆抗体 PAM4 为捕获剂,多克隆抗粘蛋白抗体为探针,制定离体酶免疫测定。患者血清得自健康人、成年急性和慢性胰腺炎患者以及胰腺癌及其它形式的癌患者,对其进行 PAM4 抗原测量。

[0565] 方法

[0566] 试剂—人胰腺粘蛋白制剂分离自 CaPan1,这是人胰腺癌在无胸腺裸鼠中生长的移植瘤。简言之,在含 0.5M 氯化钠的 0.1M 碳酸氢铵 10mL 中均化 1g 组织。然后离心样本以得到上清液,所述上清液在 **SEPHAROSE®**-4B-CL 柱上进行分级,空隙体积材料在羟磷灰石上色谱分离。未吸附的级分以去离子水充分透析,然后冷冻干燥。在含 0.15M 氯化钠的 0.01M 磷酸钠缓冲液 (pH, 7.2) (磷酸盐缓冲盐水 [PBS]) 中制备 1mg/mL 的溶液并用作免疫测定标准的原液。通过兔的免疫制备多克隆抗粘蛋白抗血清,如前所述 (Gold 等, Cancer Res 43 :235-38,1983)。纯化 IgG 级分,并通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和分子筛高效液相色谱法估计纯度。CA19-9 定量用试剂盒购自 **PANOMICS®** Inc (Redwood City, CA)。

[0567] 酶免疫测定—血清得自加入经伦理委员会批准并由 Garden State Cancer Center (Belleville, NJ) 进行的临床试验的患者,以及得自人体组织合作网络东区 (美国国家癌症研究所 [NCI]、美国国家卫生研究所,马里兰州贝塞斯达)。为进行免疫测定,用 100 μ L 的 PAM4 抗体 (在 PBS 中 20 μ g/mL) 涂布 96 孔聚乙烯基板并在 4°C 进行过夜培养。次日早晨从板上清除捕获抗体。然后通过添加酪蛋白-钠盐在 PBS 中的 1% (重量/体积 [w/v]) 溶液 200 μ L 封孔并在 4°C 过夜培养。清除孔中的酪蛋白,板用 250 μ L 含 0.05% (体积/体积 [v/v]) Tween-20 的 PBS 洗涤 5x。按 1 : 2 在酪蛋白于 PBS 中的 1% (w/v) 溶液中稀释标准或未知样本,把 100 μ L 加到适当的孔中,板在 37°C 培养 1.5 小时。此时如已经提到的那样用 PBS-Tween-20 洗涤板五次。把在酪蛋白于 PBS 中的 0.1% (w/v) 溶液中稀释到 5 μ g/mL 的多克隆兔抗粘蛋白抗体加到每个孔中,板在 37°C 培养 1 小时。然后如本文中所述洗涤孔中的多克隆抗体,往孔中添加在酪蛋白于 PBS 中的 0.1% (w/v) 溶液中以 1 : 1000 稀释的过氧化物酶标记的驴抗兔 IgG,在 37°C 培养 1 小时。在如前所述洗涤板后,往孔中加入 100 μ L 由邻苯二胺 (0.8mg/mL) 和过氧化氢 (在 0.1M Tris-HCl 中 0.3% v/v [pH 8.0]) 组成的溶液,板在室温下于黑暗中培养 30 分钟。通过加入 25 μ L 的 4.0N 硫酸使反应停止,使用 **SPECTRA-MAX®** 250 分光光度计在 490nm 波长处读取光密度。按制造商的程序进行 CA19-9 测定。通过进行回归分析生成标准曲线以确定未知样本的浓度。通过利用 **MED-CALC®** 统计软件包 (7.5 版; **MED-CALC®**, Mariakerke Belgium) 生成受试者操作特征 (ROC) 曲线。

[0568] 结果

[0569] 基于 PAM4 的免疫测定的开展和表征—我们选择基于由异种移植 CaPan1 人胰腺肿瘤纯化的粘蛋白初始参考标准,以任意单位/mL 记录结果。免疫测定的检测下限为 1.0 单位/mL,饱和发生于粘蛋白浓度在 100 单位/mL 以上。线性范围确定为 1.5 单位/mL 至 25 单位/mL 抗原 (未显示)。由 20 单位/mL (CV = 8.0%) 和 8 单位/mL (CV = 3.8%) 的参考标准计算批间 (n = 5) 变异系数 (CV)。20 和 8 单位/mL 标准的平均回收率分别为 17.5 ± 2.8 和 7.1 ± 1.9

[0570] 患者样本中的 PAM4 活性粘蛋白的水平

[0571] 对包括 53 位胰腺癌患者在内的总共 283 位患者的血清检查 PAM4 抗原的存在与否。对不同疾病组确定血清粘蛋白浓度的频率分布（图 16）。计算受试者操作特征（ROC）曲线（未显示），曲线下方的面积（AUC）确定为 0.88 ± 0.03 (95% CI, 0.84 至 0.92), $P < .0001$ (见实例 23)，这是区别胰腺癌与非胰腺癌样本的极显著差异。在 10.2 单位 /mL 的临界值，灵敏度和特异度分别计算为 77% 和 95% (实例 23)，与健康、良性及非胰腺癌组相比，阳性诊断概率比 (+DLR) 为 13.7。

[0572] 表 13 中给出的数据表明，胰腺癌组的中值及平均值比所有其它组的大 10 倍以上，即使绝大多数非胰腺癌病例处于疾病的晚期也是如此。53 位胰腺癌患者中，41 位在 10.2 单位 /mL 临界值处呈阳性。在此相同的临界值，没有呈阳性的健康样本，87 位胰腺炎患者中只有四位 (5%) 呈阳性。ROC 曲线分析显示出高特异性，区别胰腺癌与正常及胰腺炎患者组的差别显著（未显示）。

[0573] PAM4 与 CA19.9 免疫测定的比较 -53 位胰腺癌样本中，由于某些样本的量不足，只有 41 个可供 PAM4 活性粘蛋白和 CA19-9 两者的评定。这些当中，24 个 (59%) 视为是 CA19-9 阳性的（在 35 单位 /mL 的临界值）。如同 PAM4 免疫测定，没有健康样本是 CA19-9 阳性的。然而，87 个胰腺炎样本中，37% 是 CA19-9 阳性的（未显示）。区别胰腺癌与胰腺炎血清样本的 ROC 分析给出 AUC 为 0.67 ± 0.05 (95% CI, 0.58 至 0.75)，对于 CA19-9 测试，特异度为 63%，+DLR 为 1.6 (未显示)。此同一亚组胰腺癌和胰腺炎血清中的 PAM4 活性粘蛋白的统计分析与较早讨论的组分析差别不大；此亚组的灵敏度略有减少 (71%)，但仍保持高特异度 (96%)，如 +DLR (15.4) (未显示)。PAM4 与 CA19-9 值之间不存在相关性。四个 PAM4 阳性胰腺炎样本中的两个也是 CA19-9 阳性的。ROC 曲线的直接成对比较导致统计上的显著性差异 ($P < .003$)，PAM4 免疫测定显示出区别胰腺癌患者与胰腺炎患者的极佳灵敏度和特异度（未显示）。

[0574] 由分析前在 -80°C 冷冻且冷冻数年期的血清样本得到的结果最初是不能用较新鲜的血清样本重复出来的。对得自患有已知胰腺癌的个体的新鲜血清样本或换有胰腺癌粘蛋白的新鲜血清样本进行的 PAM4 抗体免疫测定通常会导致假阴性结果。据观察，冷冻储存的样本解冻后通常分离成脂质和水性组分。在对其余的水性组分进行 PAM4 免疫测定之前通过离心除去脂质组分。在用较新鲜血清样本进行初步研究中，血清未分离，对全血清进行免疫测定。

[0575] 为了重现冷冻和长期储存的效果，对较新鲜血清样本进行有机相萃取以除去血脂及其它疏水组分。虽然相萃取是用丁醇进行的，技术人员会意识到，所述技术是没有这样限制的，也可以用本领域中已知的替代性有机溶剂进行。本领域中已知的示例性有机溶剂包括不与水混溶的其它醇、氯仿、己烷、苯、DMF (二甲基甲酰胺)、DMSO (二甲基亚砷) 和醚。

[0576] 为进行血清样本的有机相萃取，在 1.5mL 微型离心管中放入 300 μL 血清，然后加入 300 μL 正丁醇，在 5 分钟萃取过程中将管紧紧地封闭并强力地涡旋若干次。在萃取结束时，打开管并加入 300 μL 氯仿。将管紧紧地封闭，强力地涡旋管，然后在桌面上高速旋转离心 5 分钟。打开管，把 200 μL 上层水相转移到干净管中。加入等体积的免疫测定稀释剂 (2% 酪蛋白) (1 : 2 稀释的未知血清) 并用作上述免疫测定方案中的抗原。利用有机相萃取得到 PAM4 抗原检测和胰腺癌诊断的结果，所述结果与经历上述长期冷冻储存的样品的结果相当（未显示）。用新鲜血清样本时，有机组分与基于 PAM4 的免疫测定的干扰在对福

尔马林固定、石蜡包埋的组织切片进行的免疫组织学测定中没有观察到,后者通常是在免疫测定之前用有机溶剂萃取进行的。干扰组分在分布于血清时似乎是有限的,没有观察到对与固体肿瘤原位结合的 PAM4 抗体的干扰。

[0577] 实例 30. 对 PAM4 的交叉阻断抗体的制备及测定

[0578] 在裸鼠中生长和收获异种移植的 RIP1 人胰腺癌的肿瘤。按 Gold 等所述 (Int J Cancer 1994, 15 :204-10) 提取人胰腺癌粘蛋白,并用于根据标准的方案 (Harlow and Lane, Antibodies :A Laboratory Manual, Ch. 5, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.) 对小鼠进行免疫。由免疫的小鼠制备产生杂交瘤细胞的抗体并进行筛选,用于与人 胰腺癌粘蛋白结合。扩增阳性克隆并利用实例 1 中所述的竞争结合测定来测试单克隆抗体对 cPAM4 的交叉阻断活性。通过竞争与人胰腺癌粘蛋白的结合识别对 cPAM4 的交叉阻断抗体。

[0579] ***

[0580] 本领域技术人员显而易见的是,可以对本发明的产品、组合物、方法及过程进行各种修改和变化。因此,本发明旨在包括这种修改和变化在内,只要它们落于所附权利要求书及其等同表述的范围内即可。

[0001]

序列表

<110> GOLDENBERG, DAVID M.
HANSEN, HANS J.
CHANG, CHIEN-HSING
GOLD, DAVID V.

<120> 抗胰腺癌抗体

<130> IMM313W01

<140>

<141>

<150> 12/418,877

<151> 2009-04-06

<150> 61/144,227

<151> 2009-01-13

<150> 12/343,655

<151> 2008-12-24

<150> 61/087,463

<151> 2008-08-08

<160> 61

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

[0002]

<400> 1

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成人源化PAM4抗体片段

<400> 2

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成人源化PAM4抗体片段

<400> 3

His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0003]

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 4

Ser Tyr Val Leu His

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成人源化PAM4抗体片段

<400> 5

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成人源化PAM4抗体片段

<400> 6

Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 4

[0004]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 7

Phe Lys Tyr Lys

1

<210> 8

<211> 324

<212> DNA

<213> 小鼠属

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 8

gat att gtg atg acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct ggg 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt tcc agc 96

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

tac ttg tac tgg tac cag cag aag cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg 144

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp

35 40 45

att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt 192

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag 240

[0005]

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

gct gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat cag tgg aat agg tac ccg 288
Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro
85 90 95

tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 324
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 9

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

[0006]

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro

85

90

95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 10

<211> 357

<212> DNA

<213> 小鼠属

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (357)

<400> 10

gag gtt cag ctg cag gag tct gga cct gag ctg gta aag cct ggg gct

48

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac aca ttc cct agc tat

96

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Ser Tyr

20

25

30

gtt ttg cac tgg gtg aag cag aag cct ggg cag ggc ctt gag tgg att

144

Val Leu His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

gga tat att aat cct tac aat gat ggt act cag tac aat gag aag ttc

192

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

aaa ggc aag gcc aca ctg act tca gac aaa tcg tcc agc aca gcc tac

240

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

[0007]

atg gag ctc agc cgc ctg acc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt	288
Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga ggc ttc ggt ggt agc tac gga ttt gct tac tgg ggc caa ggg	336
Ala Arg Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
act ctg atc act gtc tct gca	357
Thr Leu Ile Thr Val Ser Ala	
115	
<210> 11	
<211> 119	
<212> PRT	
<213> 小鼠属	
<400> 11	
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Ser Tyr	
20 25 30	
Val Leu His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

[0008]

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Ile Thr Val Ser Ala

115

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 12

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20

25

30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp

35

40

45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50

55

60

[0009]

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Ser Tyr
20 25 30

Val Leu His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0010]

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Ile Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 14			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 14			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Thr Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			

[0011]

65	70	75	80
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Leu Ile			
85	90	95	

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
100	105

<210> 15

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 15

gac atc cag ctg acc cag tet cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga	48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	

gac aga gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt tcc agc	96
Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser	
20 25 30	

tac ttg tac tgg tac caa cag aaa cca ggg aaa gcc ccc aaa ctc tgg	144
Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp	
35 40 45	

att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt	192
---	-----

[0012]

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50

55

60

ggc agt gga tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa

240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

65

70

75

80

cct gaa gat tct gcc tct tat ttc tgc cat cag tgg aat agg tac ccg

288

Pro Glu Asp Ser Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro

85

90

95

tac acg ttc gga ggg ggg aca cga ctg gag atc aaa cga

327

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 16

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 16

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20

25

30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp

35

40

45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

[0013]

50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln		
65	70	75 80
Pro Glu Asp Ser Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro		
	85	90 95
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg		
	100	105
<210> 17		
<211> 108		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 17		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		
	20	25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
	50	55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		

[0014]

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	

Ala Arg Gly Pro Arg Leu Leu Ala Asp Val Leu Leu	
100	105

<210> 18

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 18

cag gtg cag ctg cag cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc	48		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15

tca gtg aag gtc tcc tgc gag gct tct gga tac aca ttc cct agc tat	96	
Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Ser Tyr		
20	25	30

gtt ttg cac tgg gtg aag cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg att	144	
Val Leu His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45

gga tat att aat cct tac aat gat ggt act cag tac aat gag aag ttc	192
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe	

[0015]

50	55	60	
aaa ggc aag gcc aca ctg acc agg gac acg tcc atc aac aca gcc tac			240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
atg gag ctg agc agg ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt			288
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
gca aga ggc ttc ggt ggt agc tac gga ttt gct tac tgg ggc cag gga			336
Ala Arg Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
acc ctg gtc acc gtc tcc tca			357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 19			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列描述: 合成多肽			
<400> 19			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Ser Tyr			
20	25	30	
Val Leu His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	

[0016]

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 173

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 20

agtctggggc tgaggtgaag aagcctgggg cctcagtga ggtctctctgc gaggttctg 60

gatacacatt ccctagctat gttttgcaact gggatgaagca ggcccttgga caagggttg 120

agtggattgg atatattaat ccttacaatg atggtactca gtacaatgag aag 173

[0017]

<210> 21		
<211> 173		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述：合成多核苷酸		
<400> 21		
agggttcctt ggccccagta agcaaatccg tagctaccac cgaagcctct tgcacagtaa	60	
tacacggccg tgtcgtcaga tctcagcctg ctacagctcca tgtaggctgt gttgatggac	120	
gtgtccctgg tcagtgtggc cttgcctttg aacttctcat tgtactgagt acc	173	
<210> 22		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸		
<400> 22		
caggtgcagc tgcagcagtc tggggctgag gtga	34	
<210> 23		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述：寡核苷酸		
<400> 23		
tgaggagacg gtgaccaggg ttcctggcc cca	33	

[0018]

<210> 24

<211> 157

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 24

cagtctccat cctccctgtc tgcattctgta ggagacagag tcaccatgac ctgcagtgcc 60

agctcaagtg taagttccag ctacttgtac tggtagcaac agaaaccagg gaaagccccc 120

aaactctgga tttatagcac atccaacctg gcttctg 157

<210> 25

<211> 156

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 25

gtccccctc cgaacgtgta cgggtaccta ttccactgat ggcagaaata agaggcagaa 60

tcttcaggtt gcagactgct gatggtgaga gtgaagtctg tcccagatcc actgccactg 120

aagcgagcag ggactccaga agccaggttg gatgtg 156

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

[0019]

<220>

<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸

<400> 26

gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctg

33

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸

<400> 27

ttagatctcc agtcgtgtcc cccctccgaa cgt

33

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

[0020]

<400> 29
Trp Thr Trp Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 30
Ala Cys Pro Glu Trp Trp Gly Thr Thr Cys
1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 31
Trp Thr Trp Asn Ile Thr Lys Glu Tyr Pro Gln Pro
1 5 10

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成肽

[0021]

<400> 32

Gly Thr Thr Gly Thr Thr Cys

1 5

<210> 33

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 33

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr

1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala

20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala

35 40

<210> 34

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 34

Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly

1 5 10 15

[0022]

Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe
20 25 30

Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40 45

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 35

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 36

Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile
1 5 10 15

[0023]

Gln Gln Ala Gly Cys

20

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 37

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 38

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 38

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Ile Gln Ile

1 5 10 15

Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr Thr Val Glu Val Leu

20 25 30

Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala Val Glu Tyr Phe Thr

35 40 45

[0024]

Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala

50

55

<210> 39

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 39

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Glu Tyr

1

5

10

15

Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln Ala

20

25

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Cys Gly

1

5

10

<210> 41

<211> 21

[0025]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21).. (21)

<223> Cys(SS-tButhio)

<220>

<223> C-端酰胺化

<400> 41

Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile

1

5

10

15

Gln Gln Ala Gly Cys

20

<210> 42

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21).. (21)

<223> Cys(SS-tButhio)

[0026]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22).. (22)

<223> Gly-EDANS

<400> 42

Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile

1

5

10

15

Gln Gln Ala Gly Cys Gly

20

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<220>

<223> N-端乙酰化

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> Cys-(polyethylene glycol)3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223> Cys(S-tButhio)

<220>

<221> MOD_RES

[0027]

<222> (22)..(22)

<223> Cys(S-tButhio)

<220>

<223> C-端酰胺化

<400> 43

Cys Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala

1 5 10 15

Ile Gln Gln Ala Gly Cys Gly

20

<210> 44

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 44

Lys Ser His His His His His His Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu

20 25 30

Gln Gly Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val

35 40 45

Glu Phe Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala

50 55 60

[0028]

<210> 45

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 45

tctagacaca ggacctcatc atggccttga cctttgcttt actgg

45

<210> 46

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 46

ggatccatga tggatgatgat ggtgtgactt ttccttactt cttaaacttt ctgac

55

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 47

agatctggcg cacctgaact cctg

24

[0029]

<210> 48
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 48
gaattcggat cctttacccg gagacaggga gag 33

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 49
Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Tyr Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 50

[0030]

Gln Ile Glu Tyr Lys Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 51

Gln Ile Glu Tyr His Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 52

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

[0031]

Ala

<210> 53

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 53

Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu

1 5 10 15

Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala Tyr

20

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 54

Leu Glu Gln Tyr Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala

1 5 10 15

Thr Glu

[0032]

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 55

Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val

1

5

10

15

Phe Gln Gln Cys

20

<210> 56

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 56

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn

1

5

10

15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20

25

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

[0033]

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 57

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Thr Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn

1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20 25

<210> 58

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 58

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Asp Val Glu Asn

1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20 25

<210> 59

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成6xHis标签

[0034]

<400> 59

His His His His His His

1

5

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Asn or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Thr or Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Lys, Arg, Thr, Asn or Gly

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Glu, Thr, Arg, Phe or Cys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Tyr or Thr

[0035]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10).. (10)

<223> Pro or Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11).. (11)

<223> Leu, Gln, Ile, Met or Cys

<400> 60

Trp Thr Trp Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro

1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3).. (3)

<223> Pro or Tyr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7).. (7)

<223> Gly or Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8).. (8)

[0036]

<223> Thr, Gly or Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Thr, Met, Ser, Gln or Pro

<400> 61

Ala Cys Xaa Glu Trp Trp Xaa Xaa Xaa Cys

1

5

10

PAM4 V_k

GATATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGCTCTGCATCTCTGGGAGAGGTCAACATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGT 90
 1 10 20 27 A
 D I V M T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S
 CDR1

TCCAGCTACTTGTACTGTTACCCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAACTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT 180
 30 40 50
S S Y L Y W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P
 CDR2

GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCTCTTATTTCTGCCAT 270
 60 70 80
 A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A S Y F C H

CAGTGGAAATAGGTACCCGTACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA 324
 90 100 107
Q W N R Y P Y T F G G G T K L E I K
 CDR3

图 1A. 鼠源 PAM4VH 的核苷酸和氨基酸序列

PAM4 V_H

GAGGTTTCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCCCT 90
 1 10 20 30
 E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V K M S C K A S G Y T F P

AGCTATGTTTTGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTACTCAGTAC 180
 40 50 52 A
S Y V L H W V K Q K P G Q G L E W I G Y I N P Y N D G T Q Y
 CDR1 CDR 2

AATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCGTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCCGCTGACCTCTGAGGAC 270
 60 70 80 82 A B C
N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y M E L S R L T S E D

TCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGCTTCGGTGGTAGCTACGGATTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGATCACTGTCTCTGCA 357
 90 100 A B 110 113
 S A V Y Y C A R G F G G S Y G F A Y W G Q G T L I T V S A
 CDR3

图 1B. 鼠源 PAM4VH 的核苷酸和氨基酸序列

```

      1          10          20          27 A  30          40
DIQLTQSPA10IM20SASPGEKVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIY
                                CDR1
      50          60          70          80          90
STSNLASGV60PARFSGSGSGTSYSLTIS70SMEAEDAASYFCHQWNRYPYTFG
                                CDR2                                CDR3
     100          108
GGTKLEIKR

```

图 2A. cPAM4VH

```

      1          10          20          30          40          50
QVQLQESGP10ELVKPGASVKMSCKASGYTFPSYVLHWVKQKPGQGLEWIGY
                                CDR1
     52 A          60          70          80  82 A B C          90
INPYNDGTQYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSR80LTSEDSAVYYCARGF
                                CDR2
     100 A B          110  113
GGSYG100FAYWGQGT110LITVSS
                                CDR3

```

图 2B. cPAM4VH

	1	10	20	27 A	30
Walker V _K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQ-SISNYLSWYQQK			
PAM4 V _K	••V•••••AIM•••P•EK•M••	S•SSVS•S•Y•••••			
hPAM4 V _K	•••L••••••••••••••••	M•S•SSVS•S•Y•••••			

	40	50	60	70
Walker V _K	PGKAPKLLIYAASSLQSGVTSRFS	SGSGSGTDFTLTISLQ		
PAM4 V _K	••SS•••W••ST•N•A•••PA••••••••	SYS•••••ME		
hPAM4 V _K	••••••W••ST•N•A•••PA••••••••	••••••••••••		

	80	90	100	108
Walker V _K	PEDSATYYCQ	QSYSTLITFCQGTRLEIK-		
PAM4 V _K	A•A•S•F•H•WNRYPY•••G•K••••-			
hPAM4 V _K	•••••S•F•H•WNRYPY•••G•••••R			

图 3A. WalkerVH、PAM4VH 和人源化 PAM4VH 的氨基酸序列

	1	10	20	30	40
Wil2 V _H	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV	SCKASGGTFS	SYAIS	WVRQA	
PAM4 V _H	E●●●QE●●P●LV●●●A●●M●●●●●Y●●P●●VLH●●K●K				
hPAM4 V _H	●●●●Q●●●●●●●●●●A●●●●●E●●Y●●P●●VLH●●K●●				
		50	52 A	60	70
Wil2 V _H	PGQGLEWMG	GIIP	IFGTANYA	QKFQGR	VTITADESTSTAY
PAM4 V _H	●●●●●●●I●Y●N●YNDGTQ●NE●●K●KA●L●S●K●S●●●●				
hPAM4 V _H	●●●●●●●I●Y●N●YNDGTQ●NE●●K●KA●L●R●T●IN●●●				
	80	82 A B C	90	100 A B	
Wil2 V _H	MELSSLRSED	TAVYYCARG	PRLLADVLL		
PAM4 V _H	●●●●R●T●●●S●●●●●●●●●●F	GGSYGFAY			
hPAM4 V _H	●●●●R●●●D●●●●●●●●●●F	GGSYGFAY			
	103	110	113		
NEWM V _H	WGQGT	LVTVSS			
PAM4 V _H	●●●●●●●I●●●A				
hPAM4 V _H	●●●●●●●●●●				

图 3B. Wil2VH、PAM4VH、人源化 PAM4VH 和 NEWM VH 的氨基酸序列

PvuII

GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGT 90

1 10 20 27 A

D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T M T C **S A S S V S** CDR1

TCCAGCTACTTGTACTGGTACCAACAGAAACAGGGAAAGCCCCAACTCTGGATTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT 180

30 40 50

S S Y L Y W Y Q Q K P G K A P K L W I Y **S T S N L A S G V P** CDR2

GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCTGCCTCTTATTTCTGCCAT 270

60 70 80

A R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D S A S Y F C **H**

BglII/BclI

CAGTGGAAATAGGTACCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACACGACTGGAGATCAAACGA 327

90 100 108

Q W N R Y P Y T F G G G T R L E I K R CDR3

图 4A. hPAM4VH 的核苷酸序列

PstI
 CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCGAGGCTTCTGGATACACATTCCCT 90
 1 10 20 30
 Q V Q L Q Q S G A E V K K P G A S V K V S C E A S G Y T F P
 AGCTATGTTTGGCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTACTCAGTAC 180
 40 50 52 A
 S Y V L H W V K Q A P G Q G L E W I G Y I N P Y N D G T Q Y
 CDR1 CDR2
 AATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACCAGGGACAGTCCATCAACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGAC 270
 60 70 80 82 A B C
 N E K F K G K A T L T R D T S I N T A Y M E L S R L R S D D
 BstEII
 ACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGGCTTCGGTGGTAGCTACGGATTGCTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA 357
 90 100 A B 110 103
 T A V Y Y C A R G F G G S Y G F A Y W G Q G T L V T V S S
 CDR3

图 4B. hPAM4VH 的核苷酸序列

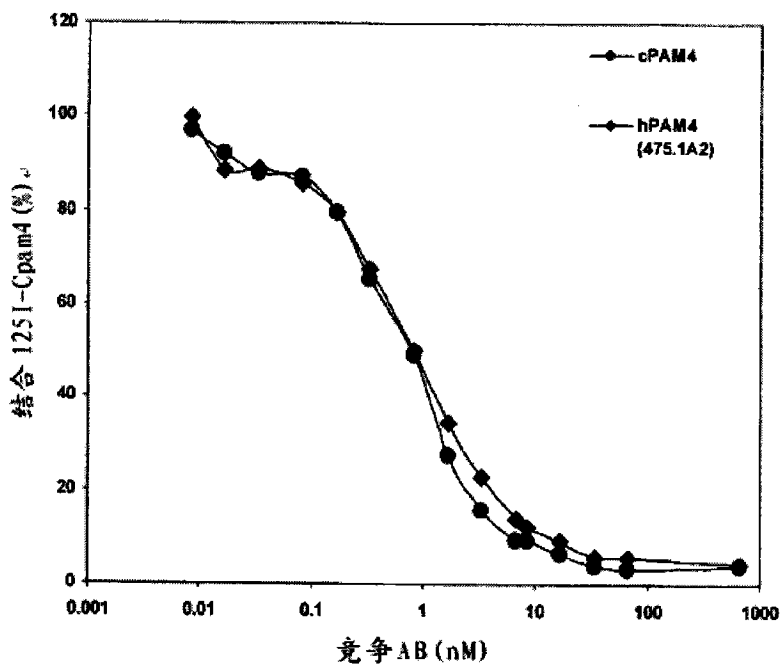


图 5. 人源化 PAM4 和嵌合 PAM4 的结合活性

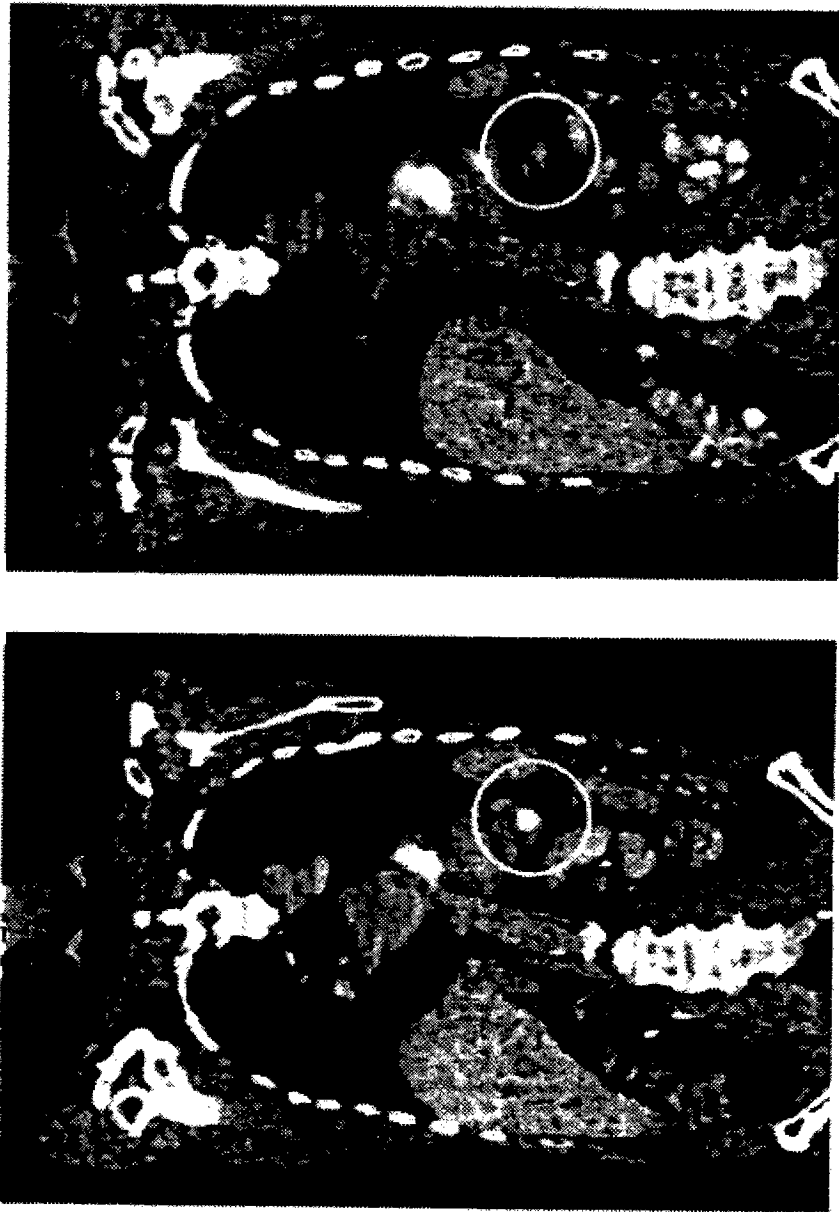


图 6



图 7

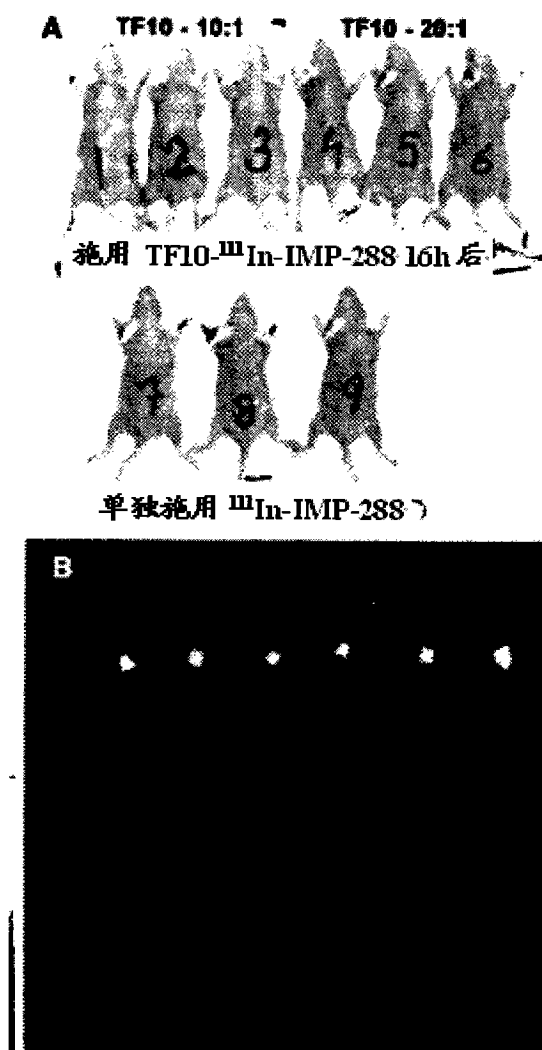


图 8

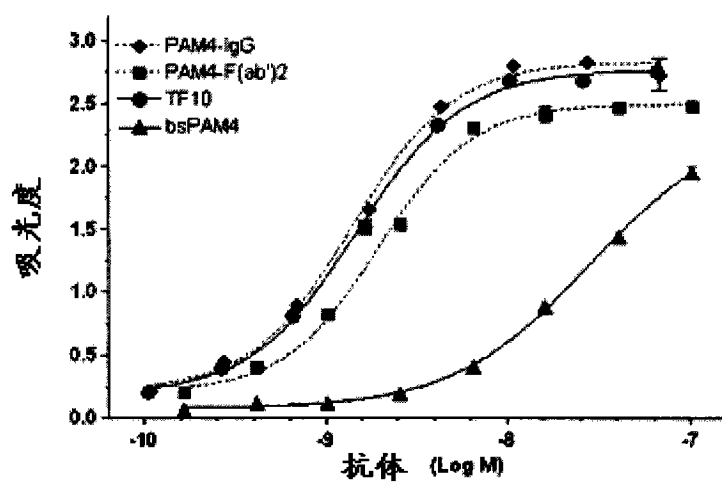


图 9

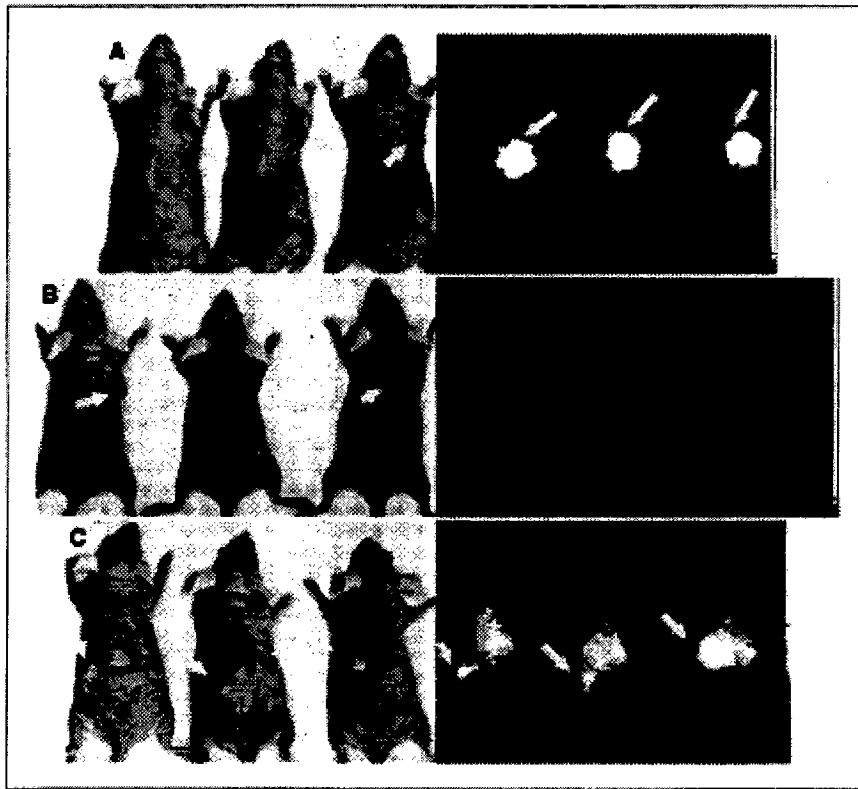


图 10

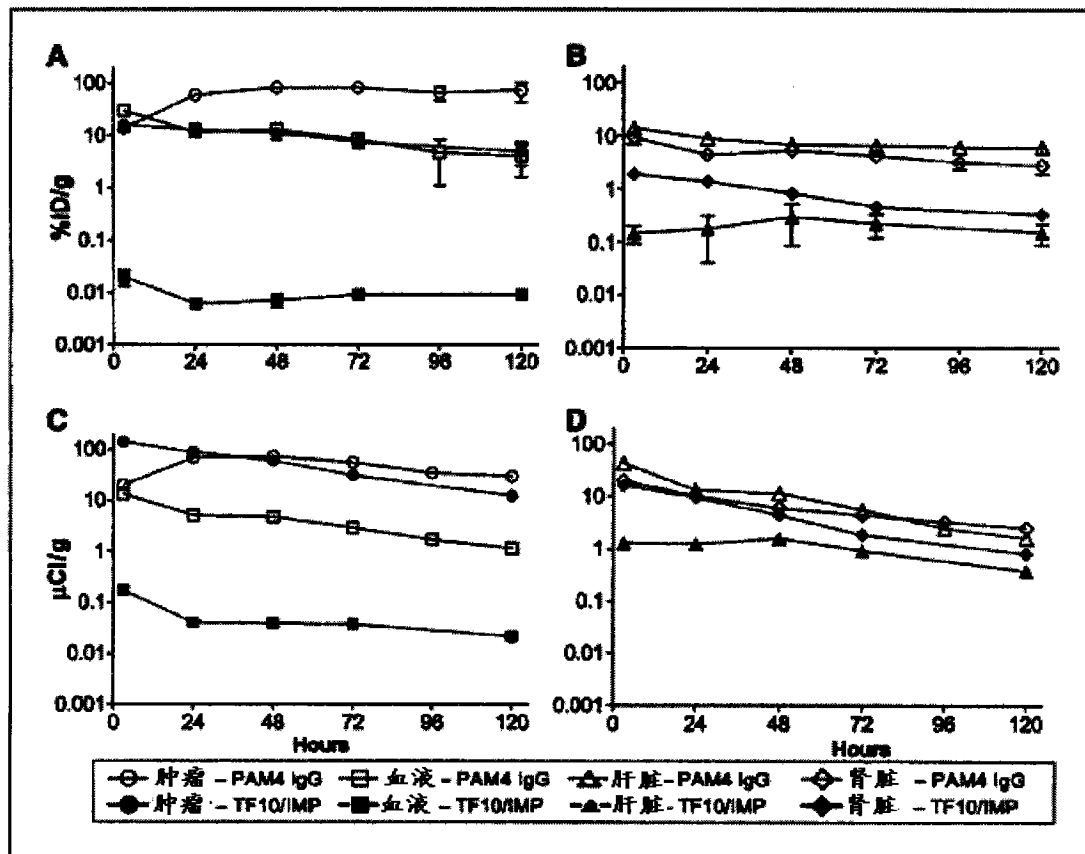


图 11

图 4 携带 sc-CaPan1 胰腺癌裸鼠中的 TF10-预靶向
 ^{90}Y -IMP288 和 ^{90}Y -hPAM4

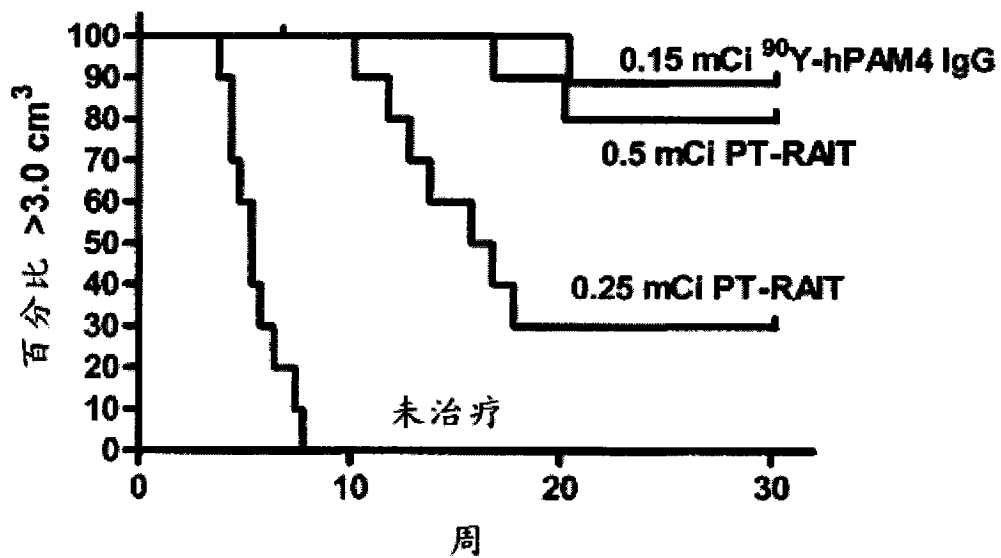


图 12

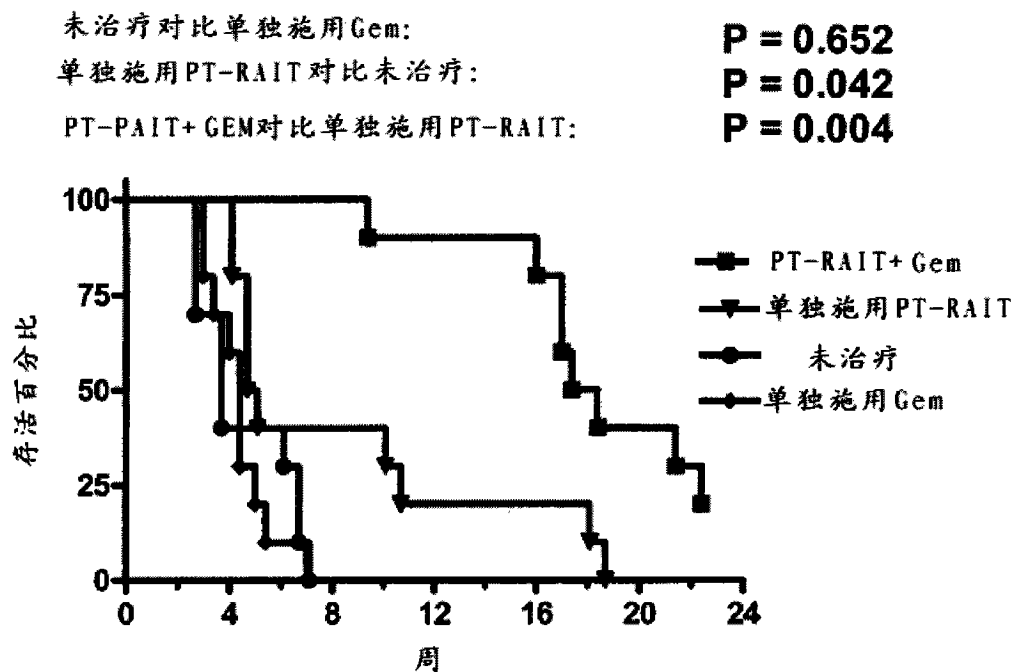


图 13

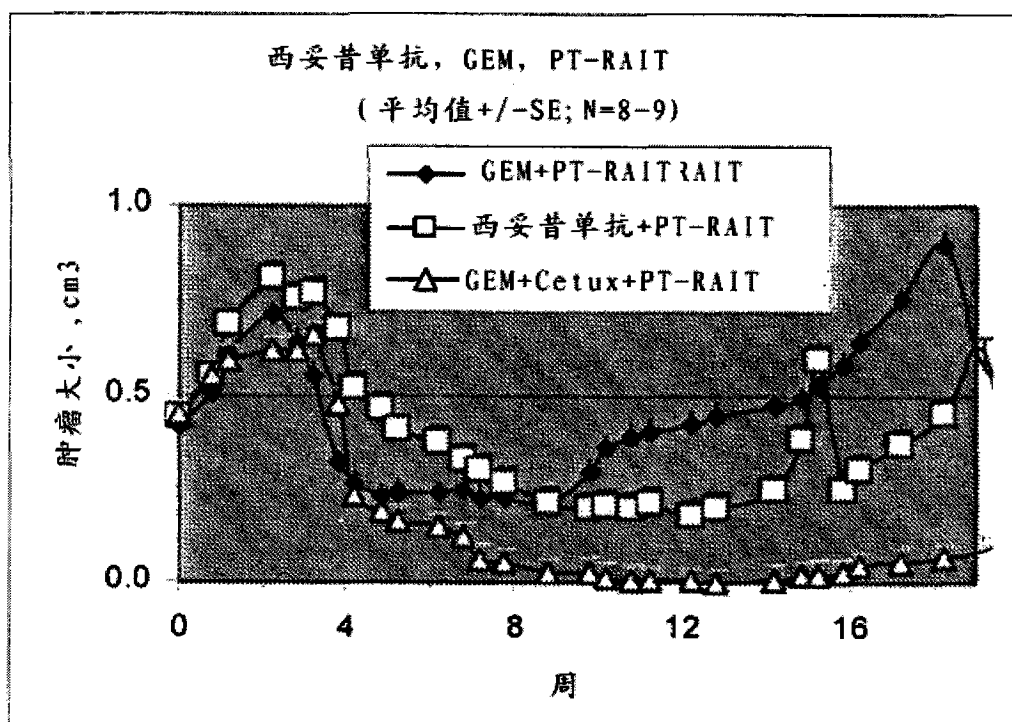


图 14

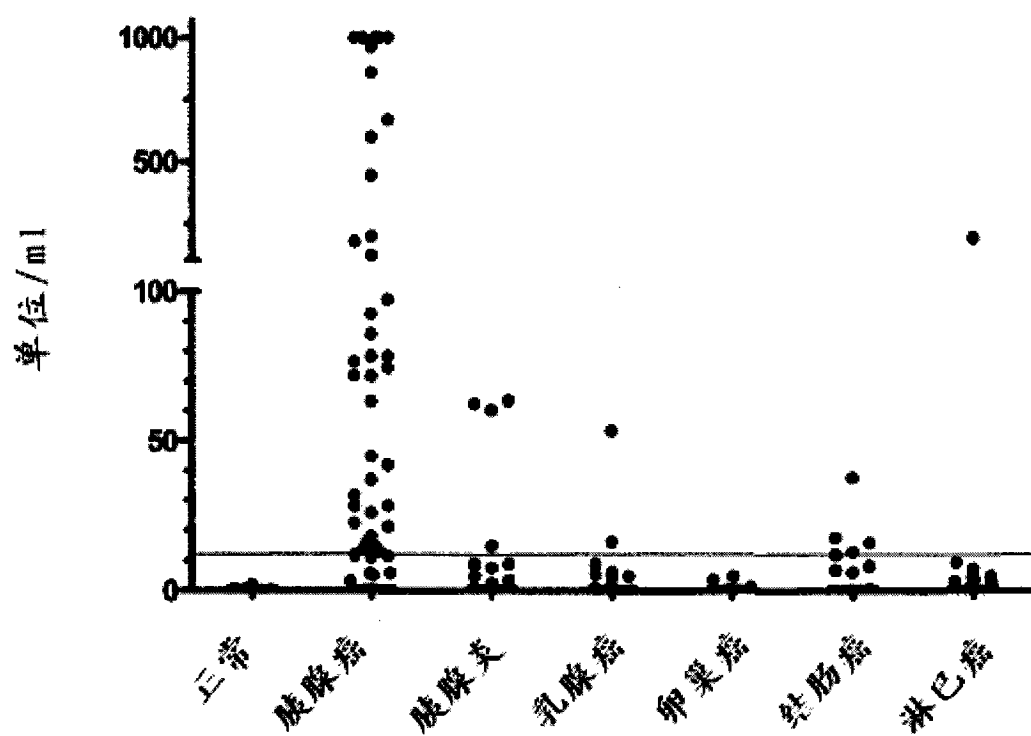


图 15

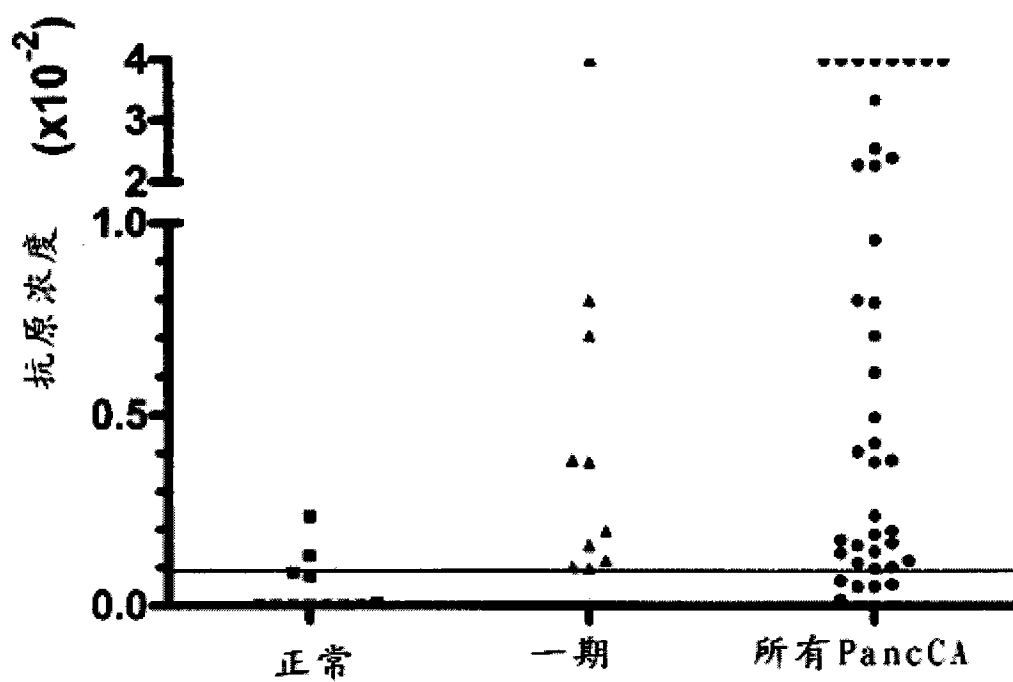


图 16

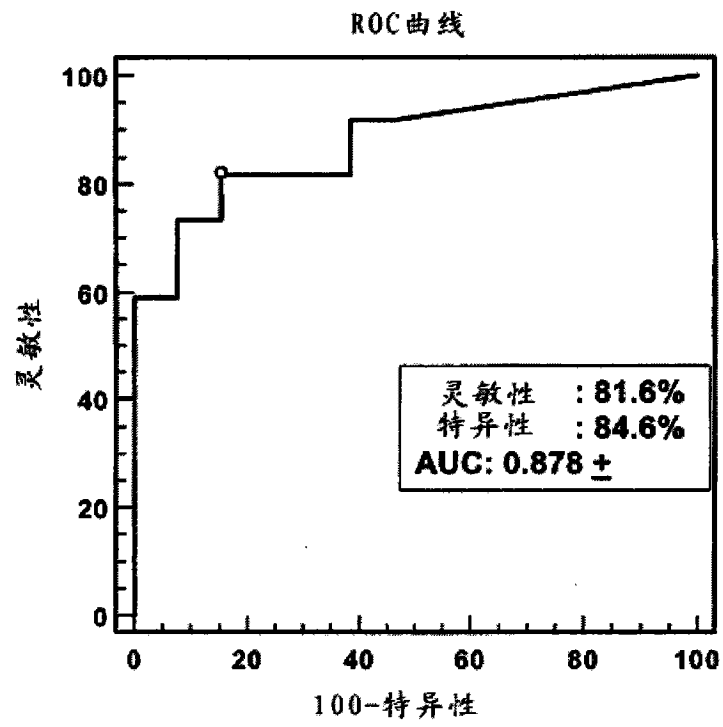


图 17