



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105073777 B

(45) 授权公告日 2022.07.01

(21) 申请号 201480009127.8

(22) 申请日 2014.02.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105073777 A

(43) 申请公布日 2015.11.18

(30) 优先权数据
PCT/EP2013/000505 2013.02.20 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/000433 2014.02.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/127906 EN 2014.08.28

(83) 生物保藏信息
DSM ACC2737 2005.10.19
DSM ACC2738 2005.10.19
DSM ACC2739 2005.10.19
DSM ACC2740 2005.10.19
DSM ACC2741 2005.10.19
DSM ACC2742 2005.10.19
DSM ACC2743 2005.10.19
DSM ACC2745 2005.11.17
DSM ACC2746 2005.11.17
DSM ACC2747 2005.11.17
DSM ACC2748 2005.11.17
DSM ACC2808 2006.10.26
DSM ACC2809 2006.10.26
DSM ACC2810 2006.10.26

专利权人 TRON-美因茨约翰尼斯·古腾堡
大学附属转化肿瘤医学院公益有
限公司

(72) 发明人 尤格·萨因 欧兹兰·图勒茨
瑞塔·米特纳彻-克拉乌斯
史蒂芬·沃尔 史蒂芬·雅各布斯
科尔内利亚·海因茨

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101312989 A, 2008.11.26
CN 101312989 A, 2008.11.26
S. R. Alberts等.Gemcitabine and
oxaliplatin for patients with advanced or
metastatic pancreatic cancer: a North
Central Cancer Treatment Group (NCCTG)
phase I study.《Annals of Oncology》.2002,
第13卷第553-557页.
Cartwright T等.Cancer of the
pancreas: are we making progress? A
review of studies in the US Oncology
Research Network..《Cancer Control》.2008,
第15卷(第4期),第308-313页.

审查员 王航

(73) 专利权人 安斯泰来制药株式会社
地址 日本东京

权利要求书2页 说明书78页
序列表53页 附图54页

(54) 发明名称
用于治疗癌症的涉及抗密蛋白18.2抗体的
组合疗法

CLDN18.2的细胞相关的疾病的组合疗法,所述疾
病包括癌症疾病,如胰腺癌及其转移。

(57) 摘要
本发明提供了有效治疗和/或预防与表达

CN 105073777 B

1. 能够结合CLDN18.2的抗体与稳定或增加CLDN18.2表达的试剂在制备用于以组合疗法治疗或预防患者中胰腺癌的药物中的用途,其中所述胰腺癌为CLDN18.2阳性的,以及其中

(a) 所述抗体结合CLDN18.2并介导表达CLDN18.2的细胞的杀伤,其中所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区具有为SEQ ID NO:17的位点45-52的CDR1、为SEQ ID NO:17的位点70-77的CDR2、和为SEQ ID NO:17的位点116-126的CDR3,所述轻链可变区具有为SEQ ID NO:24的位点47-58的CDR1、为SEQ ID NO:24的位点76-78的CDR2、和为SEQ ID NO:24的位点115-123的CDR3,以及

(b) 所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂选自吉西他滨以及其盐或酯。

2. 如权利要求1所述的用途,其中CLDN18.2的表达位于癌细胞的细胞表面。

3. 如权利要求1或2所述的用途,其中所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂诱导细胞周期阻滞或诱导细胞在所述细胞周期的一个或多个时期积聚。

4. 如权利要求1或2所述的用途,其中所述组合疗法还包括施用紫杉烷。

5. 如权利要求4所述的用途,其中所述紫杉烷包括紫杉醇或白蛋白结合的紫杉醇。

6. 如权利要求1或2所述的用途,其中所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂诱导免疫原性细胞死亡。

7. 抗体与稳定或增加CLDN18.2表达的试剂在制备用于以组合疗法治疗或预防患者中胰腺癌的药物中的用途,其中所述胰腺癌为CLDN18.2阳性的,以及其中

(a) 所述抗体结合CLDN18.2并介导表达CLDN18.2的细胞的杀伤,其中所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区具有为SEQ ID NO:17的位点45-52的CDR1、为SEQ ID NO:17的位点70-77的CDR2、和为SEQ ID NO:17的位点116-126的CDR3,所述轻链可变区具有为SEQ ID NO:24的位点47-58的CDR1、为SEQ ID NO:24的位点76-78的CDR2、和为SEQ ID NO:24的位点115-123的CDR3,其中所述抗体结合于CLDN18.2的第一细胞外环,以及

(b) 所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂选自吉西他滨以及其盐或酯。

8. 如权利要求7所述的用途,其中所述组合疗法还包括施用刺激 $\gamma\delta$ T细胞的试剂,其中所述试剂是双膦酸盐。

9. 如权利要求8所述的用途,其中所述 $\gamma\delta$ T细胞为V γ 9V δ 2T细胞。

10. 如权利要求8或9所述的用途,其中所述刺激 $\gamma\delta$ T细胞的试剂为含氮的双膦酸盐。

11. 如权利要求8或10所述的用途,其中所述双膦酸盐是氨基双膦酸盐。

12. 如权利要求8所述的用途,其中所述刺激 $\gamma\delta$ T细胞的试剂选自唑来膦酸、氯膦酸、伊班膦酸、帕米膦酸、利塞膦酸、米诺膦酸、奥帕膦酸、阿仑膦酸、英卡膦酸及其盐。

13. 如权利要求8所述的用途,其中所述刺激 $\gamma\delta$ T细胞的试剂与白细胞介素-2组合施用。

14. 如权利要求1或7所述的用途,其中所述能够结合CLDN18.2的抗体通过以下一种或多种来介导细胞杀伤:补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、凋亡的诱导和增殖的抑制。

15. 如权利要求1或7所述的用途,其中所述能够结合CLDN18.2的抗体为选自以下的抗体:(i) 通过以保藏号DSMACC2810保藏的克隆产生的抗体和/或从以保藏号DSMACC2810保藏

的克隆获得的抗体, (ii) 为(i)中所述抗体的嵌合形式或人源化形式的抗体, 以及(iii) 包含(i)中所述抗体的抗原结合部分、抗原结合位点或可变区的抗体。

16. 如权利要求1或7所述的用途, 其中能够结合CLDN18.2的抗体是包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区的抗体, 所述抗体重链可变区包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列, 以及所述抗体轻链可变区包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

17. 如权利要求1或7所述的用途, 其中能够结合CLDN18.2的抗体是包含抗体重链和抗体轻链的抗体, 所述抗体重链包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列, 以及所述抗体轻链包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

18. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述组合疗法包括以至多1000mg/m²的剂量施用所述能够结合CLDN18.2的抗体。

19. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述组合疗法包括以300mg/m²至600mg/m²的剂量重复施用所述能够结合于CLDN18.2的抗体。

20. 如权利要求1或7所述的用途, 其中CLDN18.2具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

21. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述胰腺癌包括胰腺原发性癌症、胰腺晚期癌症或胰腺转移性癌症或其组合。

22. 如权利要求21所述的用途, 其中所述胰腺癌包括胰腺原发性癌症和胰腺转移性癌症的组合。

23. 如权利要求21所述的用途, 其中所述转移性癌症包括向淋巴结、卵巢、肝或肺或其组合的转移。

24. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述胰腺癌包括胰腺导管的癌症。

25. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述胰腺癌是来源于胰腺上皮细胞的恶性肿瘤。

26. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述胰腺癌是起源于胰腺腺组织的癌症。

27. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述胰腺癌是胰腺导管腺癌、胰腺粘液腺癌、胰腺神经内分泌癌或胰腺腺泡细胞癌、或其组合。

28. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述胰腺癌是吉西他滨治疗法部分或完全难以治疗的。

29. 如权利要求28所述的用途, 其中所述吉西他滨治疗法为吉西他滨单一疗法。

30. 如权利要求1或7所述的用途, 其中预防胰腺癌包括预防胰腺癌的复发。

31. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述患者已对胰腺癌进行手术。

32. 如权利要求1或7所述的用途, 其中所述患者具有包括在胰腺导管中开始恶性组织学变化的癌前胰腺损伤。

用于治疗癌症的涉及抗密蛋白18.2抗体的组合疗法

[0001] 胰腺癌为最致命的癌症之一。因为早期转移扩散的习性以及因为该疾病对辐射和化学疗法具有高度抗性,所以死亡率接近100%。考虑到每年在北美诊断出27,000个新病例以及在欧洲诊断出68000个新病例,急需研发新的治疗策略以降低胰腺癌患者的死亡率。

[0002] 紧密连接分子密蛋白(Claudin)18剪接变体2(密蛋白18.2(CLDN18.2))为紧密连接蛋白的密蛋白家族的成员。CLDN18.2为27.8kDa跨膜蛋白,其包括具有两个小的细胞外环的四个跨膜结构域。在正常组织中(除胃以外)不可通过RT-PCR检出CLDN18.2的表达。具有CLDN18.2特异性抗体的免疫组织化学显示胃为唯一的阳性组织。CLDN18.2为短暂分化的胃上皮细胞唯一表达的高度选择性胃谱系抗原。CLDN18.2保持在恶性转化的过程中,因此频繁地展示在人胃癌细胞的表面。此外,该泛肿瘤抗原在食道腺癌、胰腺癌和肺腺癌中以显著水平异位激活。

[0003] 抗CLDN18.2的嵌合IgG1抗体IMAB362已由Ganymed Pharmaceuticals AG研发。IMAB362识别具有高亲和力和特异性的CLDN18.2的第一细胞外结构域(ECD1)。IMAB362不结合任何其它密蛋白家族成员,包括密切相关的密蛋白18(CLDN18.1)的剪接变体1。IMAB362显示精确的肿瘤细胞特异性并绑定(bundle)四个独立的高效作用机制。在靶标结合后,IMAB362通过在肿瘤细胞表面通过靶标的交联诱导ADCC、CDC以及凋亡的诱导和增殖的直接抑制来介导细胞杀伤。因此,IMAB362有效裂解CLDN18.2-阳性细胞,包括体外和体内的人胃癌细胞系。

[0004] IMAB362的毒性和PK/TK概况已经在小鼠和食蟹猴中进行了充分地检测,包括剂量范围发现研究、在食蟹猴中的28天重复剂量毒性研究以及在小鼠中的3个月重复剂量毒性研究。在小鼠(最长治疗持续时间为每周施用持续3个月,最高剂量水平为400mg/kg)和食蟹猴(至多100mg/kg的每周施用至多5次)中,IMAB362 i.v.的重复剂量为良好耐受的。未诱导出全身毒性或局部毒性的体征。具体地,在任何毒性研究中未观测到胃毒性。IMAB362不诱导免疫激活和细胞因子释放。在雄性或雌性生殖器官上未记录不良作用。IMAB362不结合于没有靶标的组织。小鼠中的生物分布研究显示没有胃毒性的原因最有可能是在健康的胃上皮细胞的腔室部位处紧密连接的区隔化,这似乎极度损害IMAB362表位的可及性。

[0005] IMAB362处于早期临床测试中。已经在人中进行了I期临床研究。3名患者各自已经接受的5种剂量组群(33mg/m²,100mg/m²,300mg/m²,600mg/m²,1000mg/m²)的IMAB362单次静脉内施用并且观测了28天。IMAB362为极好耐受的,其中在患者中无相关安全性观察。在一名患者中,所有测量的肿瘤标记物在治疗之后的4周内显著减少。在进行的IIa临床研究中,重复给予IMAB362。

[0006] 在此我们呈现了显示出化学治疗剂可稳定或增加CLDN18.2在胰腺癌细胞表面表达,从而产生通过诸如IMAB362的抗-CLDN18.2抗体CLDN18.2的增强的可药性的数据。观测到抗-CLDN18.2抗体如IMAB362与特定化疗方案,特别是用于胰腺癌治疗的化疗方案的协同效应。用化疗法预先治疗的人癌细胞更易受抗体诱导的靶标特异性杀伤。在小鼠肿瘤模型中,具有抗-CLDN18.2抗体的肿瘤对照加上化疗优于具有抗-CLDN18.2抗体作为单一试剂的肿瘤对照。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明大体提供有效治疗和/或预防与表达CLDN18.2的细胞相关的疾病的组合疗法,所述疾病包括癌症疾病,如胃癌、食道癌、胰腺癌、肺癌如非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌以及胆囊癌及其转移,特别是胃癌转移如卵巢克鲁根勃氏瘤(Krukenberg tumor)、腹膜转移和淋巴结转移。特别优选的癌症疾病为胰腺癌及其转移。

[0009] 在一个方面,本发明提供了治疗或预防患者胰腺癌的方法,所述方法包括向所述患者施用:(i)能够结合CLDN18.2的抗体,以及(ii)稳定或增加CLDN18.2表达即水平的试剂。CLDN18.2的表达优选在癌细胞的细胞表面处。稳定或增加CLDN18.2表达的试剂可以在施用能够结合CLDN18.2的抗体之前、与能够结合CLDN18.2的抗体同时或在施用能够结合CLDN18.2的抗体之后或其组合施用。

[0010] 稳定或增加CLDN18.2表达的试剂可以为细胞毒性剂和/或细胞抑制剂。在一个实施方案中,所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂包括这样的试剂,所述试剂诱导细胞周期阻滞或诱导细胞在所述细胞周期的一个或多个时期积聚,优选在除了G1-期之外的所述细胞周期的一个或多个时期,如S-期、G2-期或其组合或者S-期或G2-期与G1-期的组合。稳定或增加CLDN18.2表达的试剂可以包括选自以下的试剂:核苷类似物、铂化合物、喜树碱类似物和紫杉烷、其前药、其盐及其组合。所述核苷类似物可以选自吉西他滨、5-氟尿嘧啶、其前药及其盐。所述铂化合物可以选自奥沙利铂、顺铂、其前药及其盐。所述喜树碱类似物可以选自伊立替康、拓扑替康、其前药及其盐。所述紫杉烷可以选自紫杉醇、多西他赛、其前药及其盐。所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂可以包括选自以下的试剂:吉西他滨、5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、伊立替康、紫杉醇、其前药、其盐及其组合。所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂可以包括奥沙利铂和5-氟尿嘧啶或其前药的组合、顺铂和5-氟尿嘧啶或其前药的组合、至少一种紫杉烷和奥沙利铂的组合、至少一种紫杉烷和顺铂的组合、至少一种紫杉烷和5-氟尿嘧啶或其前药的组合或者至少一种喜树碱类似物和5-氟尿嘧啶或其前药的组合。所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂可以包括吉西他滨和奥沙利铂的组合、吉西他滨和顺铂的组合、吉西他滨和卡铂的组合或奥沙利铂、5-氟尿嘧啶或其前药和伊立替康的组合。因此,本发明的方法可以包括施用吉西他滨和奥沙利铂的组合、吉西他滨和顺铂的组合、吉西他滨和卡铂的组合或者奥沙利铂、5-氟尿嘧啶或其前药和伊立替康的组合。在一个实施方案中,本发明的方法包括施用亚叶酸、5-氟尿嘧啶或其前药、伊立替康和奥沙利铂。所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂可以包括诱导免疫原性细胞死亡的试剂。所述诱导免疫原性细胞死亡的试剂可以包括奥沙利铂。

[0011] 在另一方面,本发明提供了治疗或预防患者癌症的方法,其包括向所述患者施用(i)能够结合CLDN18.2的抗体,以及(ii)吉西他滨。在一个实施方案中,所述癌症选自胃癌、食道癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌及其转移。所述癌症疾病可以为卵巢克鲁根勃氏瘤、腹膜转移和/或淋巴结转移。在一个实施方案中,所述癌症为腺癌,特别是晚期腺癌。在一个实施方案中,所述癌症为胰腺癌。

[0012] 在一个实施方案中,本发明的方法进一步包括施用刺激 $\gamma\delta$ T细胞的试剂。在一个实施方案中,所述 $\gamma\delta$ T细胞为V γ 9V δ 2T细胞。在一个实施方案中,所述刺激 $\gamma\delta$ T细胞的试剂为双磷酸盐(酯),如含氮的双磷酸盐(酯)(氨基双磷酸盐(酯))。在一个实施方案中,所述刺激 $\gamma\delta$ T细胞的试剂选自唑来膦酸、氯膦酸、伊班膦酸、帕米膦酸、利塞膦酸、米诺膦酸、奥帕

膦酸、阿仑膦酸、英卡膦酸及其盐。在一个实施方案中,所述刺激 $\gamma\delta$ T细胞的试剂与白细胞介素-2组合施用。

[0013] 本发明的方法可以进一步包括施用至少一种其它的化学治疗剂,其可以为细胞毒性剂。

[0014] 所述能够结合CLDN18.2的抗体可以结合于活细胞的表面上存在的CLDN18.2的天然表位。在一个实施方案中,所述能够结合CLDN18.2的抗体结合于CLDN18.2的第一细胞外环。在一个实施方案中,所述能够结合CLDN18.2的抗体通过补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、凋亡的诱导以及增殖的抑制中的一种或多种来介导细胞杀伤。在一个实施方案中,所述能够结合CLDN18.2的抗体为单克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体或抗体的片段。在一个实施方案中,当结合于细胞CLDN18.2,特别是结合于由细胞在其细胞表面上表达CLDN18.2时,所述抗体介导细胞杀伤,其中所述细胞优选为癌细胞,如本文所述的癌症的细胞。在一个实施方案中,所述能够结合CLDN18.2的抗体为选自以下的抗体:(i)通过以下保藏号保藏的克隆产生的抗体和/或可从以下保藏号保藏的克隆获得的抗体:DSM ACC2737、DSM ACC2738、DSM ACC2739、DSM ACC2740、DSM ACC2741、DSM ACC2742、DSM ACC2743、DSM ACC2745、DSM ACC2746、DSM ACC2747、DSM ACC2748、DSM ACC2808、DSM ACC2809或DSM ACC2810,(ii)为(i)中所述抗体的嵌合形式或人源化形式的抗体,(iii)具有(i)中所述抗体的特异性的抗体,以及(iv)包含(i)中所述抗体的抗原结合部分或抗原结合位点,特别是(i)中所述抗体的可变区,并且优选具有(i)中所述抗体的特异性的抗体。在一个实施方案中,所述抗体结合至治疗剂,如毒素、放射性同位素、药物或细胞毒性剂。

[0015] 在一个实施方案中,本发明的方法包括以至多 $1000\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用所述能够结合CLDN18.2的抗体。在一个实施方案中,本发明的方法包括以 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $600\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用所述能够反复结合于CLDN18.2的抗体。

[0016] 根据本发明,CLDN18.2优选具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

[0017] 在一个实施方案中,本文所述癌症为CLDN18.2阳性。在一个实施方案中,本文所述癌症的癌细胞为CLDN18.2阳性。在一个实施方案中,本文所述癌症的癌细胞在其细胞表面上表达CLDN18.2。

[0018] 在一个实施方案中,本文所述的胰腺癌包括原发性癌症、晚期癌症或转移性癌症或其组合,如胰腺原发性癌症和转移性癌症的组合。在一个实施方案中,本发明的方法用于同时治疗原发性癌症和转移性癌症,如胰腺原发性癌症和胰腺转移性癌症。在一个实施方案中,所述转移性癌症包括转移至淋巴结、卵巢、肝或肺或其组合。在一个实施方案中,所述胰腺癌包括胰腺导管的癌症。在一个实施方案中,所述胰腺癌包括腺癌或癌或其组合。在一个实施方案中,所述胰腺癌包括导管腺癌、粘液腺癌、神经内分泌癌或腺泡细胞癌或其组合。在一个实施方案中,所述胰腺癌是吉西他滨治疗法如吉西他滨单一疗法部分或完全难以治疗的。在一个实施方案中,预防胰腺癌包括预防胰腺癌的复发。

[0019] 在一个实施方案中,根据本发明,所述待治疗的患者已对胰腺癌进行手术。在一个实施方案中,所述患者具有癌前胰腺损伤,特别是包括在胰腺导管中开始恶性组织学变化的癌前胰腺损伤。在这些实施方案中,本发明的方法优选旨在预防恶性胰腺癌的形成。

[0020] 在另一方面,本发明提供了用于治疗或预防胰腺癌的药物制剂,其包含(i)能够结

合CLDN18.2的抗体;以及(ii)稳定或增加CLDN18.2表达的试剂。本发明的药物制剂还可以包含刺激 γ δ T细胞的试剂。所述能够结合CLDN18.2的抗体以及所述稳定或增加CLDN18.2表达的试剂,以及任选地,所述刺激 γ δ T细胞的试剂可以在药物制剂中以混合或彼此分开形式而存在。所述药物制剂可以以试剂盒的形式存在,所述试剂盒包括第一容器和第二容器,以及任选地,包括刺激 γ δ T细胞的试剂的容器,所述第一容器包括能够结合CLDN18.2的抗体,第二容器包括稳定或增加CLDN18.2表达的试剂。所述药物制剂还可以包括使用所述治疗或预防胰腺癌的制剂,特别是在本发明的方法中使用制剂的印刷说明书。药物制剂,特别是能够结合CLDN18.2的抗体,稳定或增加CLDN18.2表达的试剂以及刺激 γ δ T细胞的试剂的不同的实施方案如上文针对本发明的方法所述。

[0021] 在特定方面,本发明提供了药物制剂,其包含(i)能够结合CLDN18.2的抗体,以及(ii)吉西他滨。本发明的药物制剂还可以包含刺激 γ δ T细胞的试剂。所述能够结合CLDN18.2的抗体和吉西他滨,以及任选地,所述刺激 γ δ T细胞的试剂,可以在药物制剂中以混合或彼此分开形式而存在。所述药物制剂可以用于治疗或预防诸如胰腺癌的癌症。所述药物制剂可以以试剂盒的形式存在,其包括第一容器和第二容器,以及任选地,包括所述刺激 γ δ T细胞的试剂的容器,所述第一容器包括所述能够结合CLDN18.2的抗体,第二容器包括吉西他滨。所述药物制剂还可以包括使用所述治疗或预防诸如胰腺癌的癌症的制剂,特别是在本发明的方法中使用制剂的印刷说明书。药物制剂,特别是能够结合CLDN18.2的抗体,稳定或增加CLDN18.2表达的试剂以及刺激 γ δ T细胞的试剂的不同实施方案如上文针对本发明的方法所述。

[0022] 本发明还提供了在本文所述方法中使用的诸如能够结合CLDN18.2的抗体的试剂和/或稳定或增加CLDN18.2表达的本文所述的试剂。例如,本发明还提供了与诸如吉西他滨的稳定或增加CLDN18.2表达的试剂,以及任选地,刺激 γ δ T细胞的试剂共同施用的能够结合CLDN18.2的抗体。

[0023] 本发明的其它特征和优势将从以下详述和权利要求中显而易见。

[0024] 附图简述

[0025] 图1.将用于转导胰腺癌细胞系人CLDN18.2的慢病毒载体克隆于EF1 α 启动子的下游。将表达盒整合在长末端重复(5'和3'-LTR)之间,其使得病毒mRNA能够包装和逆转录。RSV:劳斯肉瘤病毒,使病毒mRNA不依赖于Tat产生。Amp:氨苄青霉素抗性基因。PGKp:灭瘟素的启动子。WPRE:早转录后调控元件;增强转基因表达。LTR:长末端重复,使得病毒包装。SV40A使转录终止以及mRNA聚腺苷酸化。pUC:细菌载体骨架。Bla:氨苄青霉素的启动子。

[0026] 图2.小鼠肺中胰腺细胞的转移分析。在用胰腺癌细胞i.v.注射小鼠之后的小鼠肺解剖示意图。

[0027] 图3.在正常和癌性胰腺组织中的CLDN18.2表达。用单克隆鼠35-22A抗体(0.2 μ g/ml)对福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的正常胰腺组织(A)以及胰腺癌组织(B)的染色。苏木精复染(2:00min)。放大率200x。

[0028] 图4.在正常和癌前胰腺组织中的CLDN18.2表达。不同的癌前结构(A)正常和PanIN1;(B)PanIN2;(C)PanIN3的43-14A染色。放大率200x。

[0029] 图5.初步研究-所分析的胰腺原发性肿瘤的CLDN18.2信号强度与阳性肿瘤细胞的量之间的相关性。每个点表示通过使用单克隆鼠35-22A抗体(0.2 μ g/ml)对FFPE切片进行染

色分析的胰腺原发性癌症病例。虚线标示10%的数值。

[0030] 图6.初步研究-CLDN18.2在原发性胰腺肿瘤组织和转移性胰腺肿瘤组织中的表达。使用(A)腺癌原发性肿瘤和(B)淋巴结转移的鼠单克隆35-22A抗体对FFPE组织切片(3 μ m)的染色。苏木精(Mayers)复染。

[0031] 图7.主要研究:所分析的胰腺原发性肿瘤的CLDN18.2信号强度与阳性肿瘤细胞的量之间的相关性。每个点表示通过使用单克隆鼠43-14A抗体(0.2 μ g/ml)对FFPE切片进行染色分析的胰腺导管腺癌原发性肿瘤(实心圆圈)或神经内分泌原发性肿瘤(空心圆圈)病例。

[0032] 图8.所分析的胰腺转移的CLDN18.2信号强度与阳性肿瘤细胞的量之间的相关性。每个点表示通过使用单克隆鼠43-14A抗体(0.2 μ g/ml)对FFPE切片进行染色分析的胰腺淋巴结(实心圆圈)或肝(空心圆圈)转移病例。虚线标示10%的值。

[0033] 图9.CLDN18.2在原发性和转移性胰腺肿瘤组织中的表达。对(A、C、E)腺癌原发性肿瘤和(B、D、F)淋巴结转移使用鼠单克隆43-14A抗体对FFPE组织切片(3 μ m)的染色。使用Mayers苏木精对切片进行复染。

[0034] 图10.图解分析-CLDN18.2在配对的胰腺原发性肿瘤和淋巴结转移性组织中的表达。

[0035] 图11.CLDN18.2在配对的胰腺原发性肿瘤和转移性组织中的表达。使用鼠单克隆43-14A抗体对(A)原发性腺癌,(B)肝转移和(C)淋巴结转移的FFPE组织切片(3 μ m)的染色。使用Mayers苏木精对切片进行复染。放大率200x。

[0036] 图12.胰腺癌细胞系中的CLDN18.2mRNA水平。(A)不同的胰腺CA细胞系、慢病毒转导的(LVT)细胞系(灰色柱)、胃癌细胞系KATO-III(阳性对照)和乳腺癌细胞系SKBR-3(阴性对照)的Q-PCR表达分析。使用基因特异性引物扩增CLDN18.2转录物。将显示相对表达水平高于 1×10^5 的内源性细胞系评分为CLDN18.2阳性(阴影柱)。NTC:H₂O对照样品。误差条:平均值+SD。(B-D)在Patu8988S(B)、Panc05.04(C)和所示的LVT细胞系(D)中的传代依赖性CLDN18.2表达分析。传代次数在各柱下方显示。

[0037] 图13.在胰腺癌细胞系的细胞裂解物中的CLDN18.2蛋白质水平。在12.5%SDS-PAGE上分离蛋白质。使用检测CLDN18.1和CLDN18.2的C-末端的CLDN18抗体(Zymed-MID)以及使用检测 β -肌动蛋白的上样对照抗体进行Western印迹分析。分别使用140秒(Pierce SuperSignal West Dura)和20秒(Pierce SuperSignal West Pico)的曝光时间。(A)在胰腺细胞系裂解物、阳性对照(HEK293-p740)和阴性对照细胞裂解物(SKBR-3)中检测CLDN18。(B)在未诱导的亲本细胞裂解物与慢病毒转导的(LVT)细胞系裂解物之间比较CLDN18.2表达。分别加入Patu8988S和SKBR-3作为阳性对照和阴性对照。

[0038] 图14.在胰腺癌细胞系中CLDN18表达的检测和细胞定位。对在盖玻片上生长的胰腺癌细胞系进行染色。抗体:35-22A(放大20x,在每副照片下方显示曝光时间)。将DAPI用于对细胞核进行染色(蓝色)。(A:AsPC1;B:BxPC3;C:CFPAC;D:DANG;E:HPAF-II;F:HUP-T3;G:HUP-T4;H:KCI-MOH;I:Panc1;J:Panc05.04;K:Panc02.04;L:Panc04.03;M:Patu8902;N:Patu8988S;O:Su86.86;P:Suit-2;Q:SW-1990;R:YAPC;S:胃癌对照细胞系KATO-III)。

[0039] 图15.在CLDN18.2转导的胰腺癌细胞系中CLDN18表达的检测和细胞定位。在固定和透化之后使用35-22A抗体在慢病毒转导的(LVT)胰腺癌细胞系中进行CLDN18检测。将标记为二抗的Alexa488或Alexa555用于检测。A:BxPC3-LVT;B:CAPAN1-LVT;C:DANG-LVT;D:

HPAC-LVT;E:MiaPaCa2-LVT;F:Patu8902-LVT;G:Suit-2-LVT;H:YAPC-LVT。

[0040] 图16. IMAB362结合至CLDN18.2阳性胰腺CA细胞系的细胞表面(药效动力学)。对表达CLDN18.2的胰腺癌细胞系(A,B,D,E)、慢病毒转导的胰腺细胞系(G-L)以及KATO-III胃癌对照细胞(C,F)进行IF分析。在自然条件下用IMAB362对细胞进行染色(D-E)并在固定和透化细胞之后与用35-22A染色进行比较(A-C)。将DAPI用于对细胞核进行染色。在每幅图中显示曝光时间。G:BxPC3-LVT;H:CAPAN1-LVT;I:DANG-LVT;J:MiaPaCa2-LVT;K:Patu8902-LVT;L:Suit2-LVT。

[0041] 图17. 在不同细胞系的异种移植肿瘤中的CLDN18.2表达。CLDN18.2在CAPAN1-LVT(A,B)、BxPC3-LVT(C,D)、PATU8988S-LVT(E,F)、MiaPaCa2-LVT(G,H)、YAPC-LVT(J,K)和DANG-LVT(L,M)异种移植肿瘤中的表达。用Zymed-MID抗体进行组织染色。放大透镜10x(A,C,E,G,J,L)和20x(B,D,F,H,K,M)。

[0042] 图18. Suit-2和MiaPaCa2胰腺癌细胞系的植入检查。将细胞注射至裸鼠的尾静脉内。在Suit-2(A-C)应用之后45天(A)、52天(B)、59天(C)或MiaPaCa2(D-F)注射之后59天(D)、66天(E)、73天(F)处死动物。制备肺并用MHC I类抗体(抗人MHC I,克隆EPR1394Y)染色来检测小鼠组织中的人细胞。

[0043] 图19. Patu8988S的转移植入分析。用 1×10^6 或 2×10^6 个细胞将Patu8988S细胞i.v.注射至Nu/Nu小鼠中并在x-轴下方显示的不同时间点分离小鼠的肺(A)和肝(B)。为计算每个组织制备物中存在的人DNA的%,通过以下制备标准曲线:将人DNA和小鼠DNA混合并制备产生100%(1)-0.0064%(7)的人DNA的 7×5 -倍稀释。

[0044] 图20. Patu8988S转移在小鼠肺组织中的IHC分析。将在其尾静脉中用Patu8988S细胞注射的小鼠在不同时间点(A-D=70天,E-H=86天)处死,分离肺组织,并用以1:1000稀释的MHC-I(EPR1394Y)抗体(A,B,E,F)或用0.2 μ g/ml的抗-密蛋白18(Zymed-Mid)(C,D,G,H)染色。放大率:A,C,E,G=10x,B,D,F,H=20x。

[0045] 图21. 吉西他滨处理的胰腺肿瘤细胞的IMAB362介导的凋亡。在48小时之后,通过在BxPC3~CLDN18上交联CLDN18.2来诱导凋亡。将BxPC3~CLDN18在培养基中或培养基+100ng/ml吉西他滨中培养。单核细胞的凋亡细胞部分发生移位。通过用喜树碱温育肿瘤细胞获得相似的移位。

[0046] 图22. IMAB362-诱导的ADCC活性对胰腺癌细胞的效能。(A)使用不同供体的PBMC,用CLDN18.2阳性胰腺癌细胞系进行ADCC。(B-F)用异位表达CLDN18.2的LVT胰腺细胞系以及相应的亲本细胞进行ADCC。(G)点图。

[0047] 图23. IMAB362-诱导的CDC活性对胰腺癌细胞的效能。(A)在4个独立的实验中,用健康人血清库作为补体来源,IMAB362和CLDN18.2阳性胰腺CDOK1-p740对照细胞进行CDC。(B)用CLDN18.2阳性(Patu8988S,DANG,Panc05.04)和CLDN18.2阴性(CAPAN1,Suit2,BxPC3,YAPC)胰腺细胞系进行CDC。(C)用异位表达的LVT细胞系进行CDC。(D)显示引起胰腺癌细胞系的半数最大裂解速率(EC50)的IMAB362浓度的点图。(E)用IMAB362对胰腺癌细胞系获得的最大杀伤率。

[0048] 图24. IMAB362治疗对皮下MiaPaCa2-LVT异种移植物的作用。各个治疗组通过将 1×10^7 MiaPaCa2-LVT细胞皮下注射至15只雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1nu小鼠的侧腹来接种MiaPaCa2-LVT异种移植肿瘤。在肿瘤细胞注射之后第三天,分别用200 μ g IMAB362或对照开

始治疗。半周一次用i.p.和i.v.交替注射继续治疗直至处死动物。(A) IMAB362治疗对肿瘤生长的作用。每周两次测量皮下肿瘤的尺寸(平均值+SEM)。(B) Kaplan-Meier存活图。当肿瘤体积达到1400mm³或肿瘤变成溃疡性时,处死小鼠。

[0049] 图25.皮下BxPC3-LVT异种移植物的IMAB362治疗。各个治疗组通过将1e7BxPC3-LVT细胞皮下注射至15只雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1nu小鼠的侧腹来接种BxPC3-LVT异种移植肿瘤。在肿瘤细胞注射之后第三天,分别用200μg IMAB362或对照开始治疗。半周一次用i.p.和i.v.交替注射继续治疗直至处死动物。(A) IMAB362治疗对肿瘤生长的作用。每周两次测量皮下肿瘤的尺寸(平均值+SEM,*p<0.05)。(B) Kaplan-Meier存活图。当肿瘤体积达到1400mm³或肿瘤变成溃疡性时,处死小鼠。

[0050] 图26.IMAB362治疗对Suit2-LVT胰腺转移生长的作用。将2x10⁶个Suit2-LVT肿瘤细胞静脉内注射至12只雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1nu小鼠/治疗组的尾静脉中。在肿瘤细胞注射之后第三天,用200μg IMAB362,200μg同种型对照或用等体积的PBS开始治疗。在移植后第42天处死动物。(A) qPCR分析(2-4个反应/样品的平均值)确定小鼠肺样品中存在的人DNA百分比。(B)覆盖小鼠肺表面的人细胞百分比通过测面法(planimetry)来确定。将人细胞在组织切片中用抗-人MHC-I类抗体进行免疫组织化学染色。*p<0.05(Kruskal-Wallis检验)。误差线:平均值±SD。

[0051] 图27.Patu8988S肺转移的Q-PCR和IHC分析。每只小鼠注射2x10⁶个Patu8988S细胞。在65天之后处死动物。空心圆圈:在63天之后处死小鼠。(A)用200μg IMAB362或盐水对照每半周治疗小鼠。用Q-PCR检测人DNA的量(ng),其由Ct值计算。(B)如A中所述的Q-PCR实验重复。在此由Ct值计算小鼠DNA中存在的人DNA百分比。(C)用IMAB362和同种型对照抗体(利妥昔单抗)治疗小鼠。由Ct值计算小鼠肺中存在的人DNA百分比。对于IMAB362组,检测到一个异常值(空心三角形)。通过包括或排除异常值来显示显著性。(D/E)为与C相同的实验。在此使用Image J程序来确定转移的表面。点图显示包括(D)或排除(E)异常值的IMAB362抑制的显著性。P-值:非配对的t-检验。误差线±SD

[0052] 图28.吉西他滨的剂量响应曲线。胰腺癌细胞系显示对吉西他滨非常不同的敏感性。将细胞系与不同浓度的吉西他滨接触4天并经由活力测定来分析增殖的抑制。

[0053] 图29.奥沙利铂的剂量响应曲线。胰腺癌细胞系显示对奥沙利铂非常不同的敏感性。将细胞系与不同浓度的奥沙利铂接触4天并经由活力测定来分析增殖的抑制。

[0054] 图30.用化学治疗剂处理对CLDN18.2表达(RNA)的作用。RNA为未处理的、Gem(1ng/ml)或Gem0x(Gem 1ng/ml+0x 10ng/ml)预处理的DANG(2天)细胞的RNA(A)或用Gem(10ng/ml)或Gem0x(Gem 10ng/ml+0x 100ng/ml)预处理3天的Patu8988S细胞的RNA(B)。将RNA转化成cDNA并以定量实时PCR分析CLDN18.2转录物水平。结果显示为与看家基因HPRT的转录物水平相比的相对单位。

[0055] 图31.化学疗法对胰腺癌细胞中CLDN18.2蛋白质水平的作用。针对用Zymed C-末端多克隆抗血清检测的CLDN18.2表达,分析来自未处理的(med)、Gem(1ng/ml)或Gem0x(Gem 1ng/ml+0x 10ng/ml)预处理的DANG细胞(A)或Patu8988S细胞(B)的总细胞裂解物的蛋白质。将肌动蛋白用来显示等量上样的蛋白质。

[0056] 图32.CLDN18.2细胞表面表达的FACS分析。培养基培养的(左侧)和Gem处理的(右侧)Patu8988S的CLDN18表达(实心直方图)在与Isotyp Co相比的覆盖图中显示。将

Patu8988S用吉西他滨(10ng/ml)处理3天。

[0057] 图33.用吉西他滨(Gem;2ng/ml)或吉西他滨+奥沙利铂(GemOx;1ng/ml+10ng/ml)处理两天或未经处理的DANG细胞的细胞周期分析。(A)吉西他滨处理导致处于S-期的细胞的细胞周期阻滞。划分每一个柱的区域以显示处于G0/G1、S和G2期的细胞的百分比。(B)Western印迹分析显示在用Gem处理之后CLDN18.2发生上调。

[0058] 图34.吉西他滨对Patu8988S细胞中的细胞周期(A)和CLDN18.2表达(B,C)的作用。Patu8988S细胞为未处理的用with吉西他滨(10ng/ml)处理2天。(A)划分每一个柱区域以显示处于G0/G1、S和G2期的细胞的百分比。将CLDN18.2的密度(x-轴)对细胞数目(y-轴)作图。(B)将未处理的(虚线)对比Gem处理的(实线)的CLDN18.2表达进行印迹。(C)显示处于G0/G1期的gem处理的Patu8988S细胞(虚线)对比处于S期的细胞(实线)的CLDN18.2表达。

[0059] 图35.化学疗法对胃癌细胞的作用。将Kato III细胞培养96小时导致细胞周期阻滞在G0/G1-期(a)以及CLDN18.2的下调(c)。导致细胞周期阻滞在细胞周期阻滞的不同时期的细胞抑制性化合物使CLDN18.2-表达稳定(c)。

[0060] 图36.化学疗法对胃癌细胞的作用。细胞抑制性化合物导致细胞周期阻滞在细胞周期的不同时期(S/G2-期(伊立替康)或G2-期(多西他赛))阻滞。划分每一个柱区域以显示处于G0/G1、S和G2期的细胞的百分比。

[0061] 图37.在DANG的化学疗法治疗之后IMAB362介导的ADCC的剂量响应曲线。(A)在用Gem或GemOx对DANG胰腺癌细胞预处理40h之后一名代表性供体的剂量响应曲线。(B)IMAB362介导的ADCC的EC50值(平均值)。P-值:非配对的t-检验。

[0062] 图38.化学疗法对胃癌细胞的作用。a:与培养基培养的靶细胞相比,用伊立替康、多西他赛或顺铂处理的细胞显示出较低水平的活细胞。b:与培养基培养的细胞相比,用伊立替康、多西他赛或顺铂处理的细胞中的CLDN18.2表达有所增加。c/d:用伊立替康、多西他赛或顺铂处理细胞增加IMAB362诱导ADCC的效能。

[0063] 图39.化学治疗剂对IMAB362介导的MiaPaCa2-LVT细胞的CDC的影响。图中显示2个独立测定的剂量响应曲线。将MiaPaCa2-LVT在培养基、Gem(10ng/ml)或GemOx(10ng/ml Gem+100ng/ml Ox)中培养70h。

[0064] 图40.化学疗法对IMAB362-诱导的CDC的作用。

[0065] 图41.与Gem或GemOx组合的IMAB362治疗对BxPC3-LVT异种移植物的作用。各个治疗组,通过将 8.5×10^6 BxPC3-LVT细胞皮下注射至10只雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1nu小鼠的侧腹来接种BxPC3-LVT异种移植肿瘤。在肿瘤细胞注射之后第三天,用化学疗法(分别为50mg/kg吉西他滨i.p.,50mg/kg吉西他滨加上5mg/kg奥沙利铂i.p.)开始治疗并每周继续保持六周。在注射化疗剂之后24h,将800 μ g IMAB362或对照静脉内施加至尾静脉。每周继续IMAB362治疗直至处死小鼠。(A)皮下BxPC3-LVT异种移植物的生长曲线。每周两次测量皮下肿瘤的尺寸(平均值+SEM)。(B)Kaplan-Meier存活图。当肿瘤体积达到1400mm³或肿瘤变成溃疡性时,处死小鼠。

[0066] 图42.通过将吉西他滨方案与IMAB362组合使抗肿瘤功效的增强。各个治疗组通过将 8.5×10^6 BxPC3-LVT细胞皮下注射至10只雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1nu小鼠的侧腹来接种BxPC3-LVT异种移植肿瘤。在肿瘤细胞注射之后第三天,用化学疗法(100mg/kg吉西他滨i.p.,或100mg/kg吉西他滨加上5mg/kg奥沙利铂i.p.)开始治疗并每周继续保持六周。在注

射化疗剂之后24h,将200 μ g (1/2剂量)或400 μ g (全剂量) IMAB362静脉内施加至尾静脉。半周一次用i.p.和i.v.交替注射继续IMAB362治疗直至处死小鼠。(A)皮下BxPC3-LVT异种移植物的生长曲线。每周两次测量皮下肿瘤的尺寸(平均值+SEM)。(B)Kaplan-Meier存活图。当肿瘤体积达到1400mm³或肿瘤变成溃疡性时,处死小鼠。

[0067] 图43.与吉西他滨组合的IMAB362治疗对MiaPaCa2-LVT异种移植物的作用。各个治疗组通过将5e6 MiaPaCa2-LVT细胞皮下注射至10只雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠的侧腹来接种MiaPaCa2-LVT异种移植肿瘤。在肿瘤细胞注射之后第4天,用化学疗法(50mg/kg吉西他滨i.p.)开始治疗并每周继续保持六周。在注射化疗剂之后24h,将200 μ g IMAB362或对照静脉内施加至尾静脉。半周一次用交替的i.p.和i.v.注射以继续IMAB362治疗直至处死小鼠。(A)皮下异种移植物的生长。每周两次测量肿瘤的尺寸(平均值+SEM)。(B)Kaplan-Meier存活图。当肿瘤体积达到1400mm³或肿瘤变成溃疡性时,处死小鼠。

[0068] 图44.与吉西他滨组合的IMAB362治疗对所建立的MiaPaCa2-LVT异种移植肿瘤的作用。通过将1e7 MiaPaCa2-LVT细胞皮下注射至雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠的侧腹来接种MiaPaCa2-LVT异种移植肿瘤。在皮下肿瘤接种之后第9天,将荷瘤小鼠重新安排于每组具有8只动物的同质治疗组中并开始治疗。半周一次用150mg/kg吉西他滨i.p.治疗小鼠4周。在吉西他滨注射之后24h,将200 μ g IMAB362或对照静脉内施加至尾静脉。半周一次用i.p.和i.v.交替注射继续用200 μ g IMAB362治疗直至处死小鼠。(A)每周两次测量皮下肿瘤的尺寸(平均值+SEM;**=p<0.01)。(B)Kaplan-Meier存活曲线。当肿瘤体积达到1400mm³或肿瘤变成溃疡性时(对数秩(Mantel-Cox)检验;**=p<0.01),处死小鼠。

[0069] 图45.与吉西他滨组合的IMAB362对Patu8988S异种移植模型中肺转移的作用。将2x10⁶个Patu8988S肿瘤细胞静脉内注射至各个治疗组的12只雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠的尾静脉中。在静脉内肿瘤细胞注射之后两周,半周一次用200 μ g IMAB362(i.v./i.p.)组合半周一次给予100mg/kg吉西他滨i.p.的持续治疗开始治疗4周。对照组半周一次用200 μ g同种型对照抗体组合100mg/kg吉西他滨治疗。在移植后第70天处死动物。(A)在IMAB362和同种型抗体治疗的小鼠的肺样品中人DNA的定量PCR分析(3个反应/样品的平均值)。对比同种型对照存在显著差异(P=0.0035,曼-惠特尼检验(Mann Whitney test))。(B)通过基于计算机的分析来确定覆盖小鼠肺表面的染色的人细胞的百分比。用抗人MHC-I抗体(克隆EPR1394Y)对石蜡包埋的肺组织进行免疫组织学染色(平均值 \pm SEM;P=0.0003,曼-惠特尼检验)。C和D:用抗MHC-I抗体对IMAB362+吉西他滨(C)或同种型抗体+吉西他滨(D)治疗的小鼠中的Patu8988s肺转移进行免疫组织学染色的实例。

[0070] 发明详述

[0071] 虽然下文详细描述了本发明,但应理解本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂,因为这些可以变化。也应理解本文使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并不旨在限制本发明的范围,本发明的范围将仅受所附权利要求限制。除非另外定义,否则本文中所有的全部技术与科学术语具有如本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0072] 在以下中,将描述本发明的要素。这些要素与具体的实施方案列出,然而,应理解它们可以以任何方式以及以任何数目组合以产生另外的实施方案。不同描述的实施例和优选实施方案不应解释成将本发明限制于仅明确描述的实施方案。应将该说明书理解为支持和涵盖实施方案,所述实施方案将明确描述的实施方案与任何数目的所公开和/或优选的

要素组合。此外,除非上下文另外指出,在本申请中所描述的所有要素的任何排列和组合应当被认为由本申请的说明书公开。

[0073] 优选地,将本文使用的术语定义为如“A multilingual glossary of biotechnological terms:(IUPAC Recommendations)”,H.G.W.Leuenberger,B.Nagel,and H. Kölbl,Eds.,Helvetica Chimica Acta,CH-4010 Basel,Switzerland,(1995)中所述。

[0074] 除非另外指出,本发明的实施将采用在领域的文献中(cf.,如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,J.Sambrook等编,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor 1989)所解释化学、生物化学、细胞生物学、免疫学以及重组DNA技术的常规方法。

[0075] 在整个说明书和下面的权利要求书中,除非上下文另外要求,词语“包含(comprise)”以及诸如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”的变型应理解为包含规定的成员、成员的整数或步骤或组、整数或步骤但不排除任何其它成员、成员的整数或步骤或组、整数或步骤,虽然在一些实施方案中,可以排除这样的其它成员、成员的整数或步骤或组、整数或步骤,即主题由包含的规定的成员、成员的整数或步骤或组、整数或步骤组成。术语“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“该/所述(the)”及在描述本发明的上下文中使用的相似的指示物(尤其在以下权利要求的上下文中)将被解释为覆盖单数和复数两者,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。本文数值的范围的列举仅旨在用作分别提及属于范围内的每个单独数值的速记方法。除非本文另外指出,将每个单独的数值并入说明书如同其在本文单独列举。本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有的实例或示例性语言(如,“诸如”)的使用仅仅意图更好地阐明本发明,并且不会对以其他方式要求保护的本发明范围构成限制。说明书中的语言不应解释为指出任何未要求保护的实施本发明的必需要素。

[0076] 在整个说明书的文本中引用若干文件。本文引用的每一份文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商说明书、说明书等),无论上文或下文,据此通过引用整体并入。不得将本文任何内容解释为允许本发明未经授权依靠现有发明先于此公开内容。

[0077] 术语“CLDN18”涉及密蛋白18并且包括任何变体,其包括密蛋白18剪接变体1(密蛋白18.1(CLDN18.1)) and 密蛋白18剪接变体2(密蛋白18.2(CLDN18.2))。

[0078] 术语“CLDN18.2”优选涉及人CLDN18.2,并且特别是涉及包含优选由根据序列表的SEQ ID NO:1的氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体组成的蛋白质。

[0079] 术语“CLDN18.1”优选涉及人CLDN18.1,并且特别是涉及包含优选由根据序列表的SEQ ID NO:2的氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体组成的蛋白质。

[0080] 根据本发明,术语“变体”特别是指突变体、剪接变体、构型、同种型、等位基因变体、物种变体和物种同源物,特别是天然存在的那些。等位基因变体涉及改变基因的正常序列,其意义经常是不清楚的。全基因测序经常鉴别给定基因的许多等位基因变体。物种同源物为与给定核酸或氨基酸序列来源的物种具有不同来源的物种的核酸或氨基酸序列。术语“变体”应涵盖任何翻译后修饰的变体和构型变体。

[0081] 根据本发明,术语“CLDN18.2阳性癌症”意指涉及表达CLDN18.2的癌细胞的癌症,优选在所述癌细胞的表面上表达CLDN18.2。

[0082] “细胞表面”根据领域中其通常意义使用,因此包括通过蛋白质和其它分子易接近

以结合的细胞的外部。例如,具有一个或多个细胞外部分的跨膜蛋白被视为在细胞表面上表达。

[0083] 如果CLDN18.2位于所述细胞的表面并且被加入至细胞的CLDN18.2-特异性抗体易接近而结合,则CLDN18.2在细胞的表面上表达。

[0084] 根据本发明,如果与在胃细胞或胃组织中的表达相比,表达水平较低,则CLDN18.2在细胞中基本上不表达。优选地,表达水平比在胃细胞或胃组织中的表达水平低10%,优选低5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%或甚至更低。优选地,如果表达水平超过在除胃之外的非癌性组织中的表达水平不大于2-倍,优选1.5-倍,并且优选不超过在所述非癌性组织中的表达水平,则CLDN18.2在细胞中基本上不表达。优选地,如果表达水平低于检测限和/或如果表达水平太低而不允许被加入至细胞的CLDN18.2-特异性抗体结合,则CLDN18.2在细胞中基本上不表达。

[0085] 根据本发明,如果表达水平超过在除胃之外的非癌性组织中的表达水平优选大于2-倍,优选为10-倍、100-倍、1000-倍或10000-倍,则CLDN18.2在细胞中表达。优选地,如果表达水平高于检测限和/或如果表达水平足够高从而允许被加入至细胞的CLDN18.2-特异性抗体结合,则CLDN18.2在细胞中表达。优选地,在细胞中表达的CLDN18.2在所述细胞的表面上表达或暴露在所述细胞的表面上。

[0086] 根据本发明,术语“疾病”是指任何病理学状态,其包括癌症,特别是本文所述那些形式的癌症。本文对癌症或癌症的特定形式的任何引用也包括其癌症转移。在优选实施方案中,根据本申请待治疗的疾病涉及表达CLDN18.2的细胞。

[0087] “与表达CLDN18.2的细胞相关的疾病”或相似表达意指根据本发明,CLDN18.2在患病组织或器官的细胞中表达。在一个实施方案中,CLDN18.2在患病组织或器官的细胞中的表达与在健康组织或器官中的状态相比有所增加。增加是指增加至少10%、特别是至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%或甚至更多。在一个实施方案中,表达仅在患病组织中发现,而在相应健康组织中的表达受阻抑。例如,CLDN18.2在胰腺癌组织中表达,而在非癌性胰腺组织中的表达不可检测。根据本发明,与表达CLDN18.2的细胞相关的疾病包括癌症疾病。此外,根据本发明,癌症疾病优选为其中癌细胞表达CLDN18.2的那些疾病。

[0088] 如本文所用,“癌症疾病”或“癌症”包括特征为异常调节的细胞生长、增殖、分化、粘附、和/或迁移的疾病。“癌细胞”意指通过迅速的、不受控制的细胞增殖的生长且在开始新生长的刺激停止之后继续生长的异常细胞。优选地,“癌症疾病”的特征为表达CLDN18.2的细胞并且癌细胞表达CLDN18.2。表达CLDN18.2的细胞优选为癌细胞,优选为本文所述癌症的癌细胞。

[0089] 根据本发明,“癌”为来源于上皮细胞的恶性肿瘤。

[0090] “腺癌”为起源于腺组织的癌症。该组织也为被称为上皮组织的较大组织类别的部分。上皮组织包括皮肤、腺和衬贴身体的腔和器官的多种其它组织。上皮在胚胎学上来源于外胚层、内胚层和中胚层。只要细胞具有分泌特性,它们就无须为腺的部分,则被分类成腺癌。这种癌的形式可在一些高等哺乳动物(包括人)中出现。良好分化的腺癌倾向于类似其来源的腺组织,而不良分化的腺癌可能不这样。通过对来自活检的细胞进行染色,病理学家将确定肿瘤是否为腺癌或一些其它类型的癌症。由于腺体在体内普遍存在的性质,腺癌可

在身体的许多组织中出现。虽然各个腺体可能并不分泌相同的物质,但只要存在对细胞的外分泌功能,就将其视为腺状的,因此其恶性形式被命名为腺癌。恶性腺癌侵袭其它组织并且经常转移(给予足够的时间做到这点)。

[0091] 胰腺(内胚层衍生的器官)为蛋白质和碳水化合物消化以及葡萄糖体内平衡的关键调节物。外分泌胰腺(该器官80%的组织块)由腺泡细胞和导管细胞的分支网络组成,所述腺泡细胞和导管细胞产生消化酶并将其递送至胃肠道。响应于来自胃和十二指肠的信号,在沿着导管网络的功能单位中排列的腺泡细胞合成酶并将其分泌至导管内腔。腺泡单位内导管附近为泡心细胞。内分泌胰腺由聚集在一起成为被称为胰岛的簇的四种特化的内分泌细胞类型组成,所述内分泌胰腺通过将激素分泌至血流来调节代谢和葡萄糖体内平衡。

[0092] 胰腺癌为源自转化细胞的恶性赘生物,所述转化细胞在形成胰腺的组织中产生。胰腺癌为美国第四大常见的癌症相关死亡的病因,为全世界第八大最常见的癌症相关死亡的病因。早期胰腺癌经常不会引起症状,而晚期症状通常为非特异性的且发生变化。因此,胰腺癌经常直至晚期才会被诊断出。胰腺癌具有不良预后:对于所有组合的阶段而言,第1年和第5年相对存活率分别为25%和6%。对于局部疾病而言,第5年存活大约为20%,而对于局部晚期和转移性疾病而言,中位存活期分别为约10个月和6个月,所述局部晚期和转移性疾病总体代表超过80%的个体。

[0093] 胰腺癌包括胰腺的外分泌组分内产生的腺癌(显示出腺体结构的肿瘤)以及由胰岛细胞产生的神经内分泌癌。

[0094] 胰腺癌、导管腺癌的最常见形式通常为特征在于显微镜检查时中度至不良分化的腺体结构。胰腺导管腺癌(PDAC)通常在胰腺的上端出现,同时浸润至周围的组织,包括淋巴、脾脏和腹膜腔,并转移至肝和肺。PDAC主要显示出具有导管样结构以及不同程度的细胞异型性和分化的腺体模式。较为少见的PDAC亚型包括胶质组织结构、腺鳞状组织结构或肉瘤样组织结构。经常在个体肿瘤内存在组织结构、肿瘤分级和分化程度的地区差别。甚至最小的原发性损伤通常显示出神经周围侵袭和淋巴-血管侵袭,表明早期远距离扩散的倾向。

[0095] 外分泌胰腺癌的第二大最常见类型为粘液腺癌。粘液腺癌产生大量的粘液素,所述粘液素在成像研究中产生囊性外观。

[0096] 胰腺神经内分泌肿瘤在胰腺的产生激素的细胞(胰岛细胞)中形成。腺泡细胞赘生物由胰腺的腺泡细胞产生。

[0097] 根据本发明,术语“癌症”还包括原发性肿瘤的癌症转移,如原发性胰腺癌。因此,如果进行参考,例如胰腺癌,还包括胰腺癌的转移,例如转移至肺、肝和/或淋巴结。

[0098] “转移”意指癌细胞从其初始部位扩散至身体的另一部位。转移的形成是非常复杂的过程并且取决于恶性细胞从原发性肿瘤的脱离,侵袭细胞外基质,穿透内皮基底膜以进入体腔和血管,然后通过血液输送之后,浸润靶器官。最后,新肿瘤在靶位点的生长取决于血管生成。甚至在去除原发性肿瘤之后还经常发生肿瘤转移,这是因为肿瘤细胞或组分可以保留并形成转移潜能。在一个实施方案中,根据本发明的术语“转移”涉及“远距离转移”,其涉及远离原发性肿瘤和局部淋巴结系统的转移。在一个实施方案中,根据本发明的术语“转移”涉及淋巴结转移。使用本发明的疗法可治疗的转移的一种特定形式为源自胰腺癌作

为原发部位的转移。在优选的实施方案中,这样的胰腺癌转移为转移至淋巴结,转移至肺和/或至转移肝。

[0099] 卵巢克鲁根勃氏瘤为不常见的卵巢转移性肿瘤,其占有卵巢肿瘤的1%至2%。卵巢克鲁根勃氏瘤为卵巢的转移性印戒细胞腺癌。胃为大多数卵巢克鲁根勃氏瘤病例(70%)的原发部位。结肠癌、阑尾癌和乳腺癌(主要为侵入性的小叶癌)为其次最常见的原发位置。已报道了源自胆囊癌、胆道癌、胰腺癌、小肠癌、瓦特氏壶腹癌、宫颈癌和膀胱/尿管癌的卵巢克鲁根勃氏瘤的罕见病例。

[0100] 难以治疗的癌症为恶性肿瘤,特定的治疗对于该恶性肿瘤为无效的,所述恶性肿瘤最初对治疗无反应,或随着时间的推移变得无反应。

[0101] “治疗”意指将化合物或组合物或化合物或组合物的组合施用于受试者以便预防或消除疾病,包括减小受试者中肿瘤的尺寸或肿瘤的数目;阻滞或减缓受试者中的疾病;抑制或减缓受试者中新疾病的形成;降低当前患有疾病或先前已患有疾病的受试者中症状和/或复发的频率或严重性;和/或延长,即增加受试者的寿命。

[0102] 特别地,术语“疾病的治疗”包括疾病或其症状的治愈、缩短持续时间、减轻、预防、减缓或抑制进展或恶化、或者预防或延迟发作。

[0103] 根据本发明的术语“患者”意指治疗的受试者,特别是患病受试者,包括人、非人灵长类或另一动物,特别是哺乳动物,如牛、马、猪、绵羊、山羊、犬、猫或诸如小鼠和大鼠的啮齿动物。在特定优选的实施方案中,患者为人。

[0104] 术语“稳定或增加CLDN18.2表达的试剂”是指这样的试剂或试剂组合,与未向细胞提供试剂或试剂组合的情形相比,向细胞提供所述试剂或试剂组合在所述细胞中产生增加的CLDN18.2的RNA和/或蛋白质水平,优选在细胞表面上产生增加的CLDN18.2蛋白质水平。优选地,所述细胞为癌细胞,特别是表达CLDN18.2的癌细胞,并且因此为CLDN18.2结合抗体的靶标,如本文所述的癌症类型(特别是胰腺癌)的细胞。术语“稳定或增加CLDN18.2表达的试剂”特别是指这样的试剂或试剂组合,与未向细胞提供试剂或试剂组合的情形相比,向细胞提供所述试剂或试剂组合在所述细胞的表面上产生较高密度的CLDN18.2。“稳定CLDN18.2的表达”特别包括试剂或试剂组合防止CLDN18.2表达的降低或减少CLDN18.2表达降低的情形,如,在未提供试剂或试剂组合的情况下,CLDN18.2的表达将降低,而提供试剂或试剂组合防止CLDN18.2表达的降低或减少CLDN18.2表达降低。“增加CLDN18.2的表达”特别包括试剂或试剂组合增加CLDN18.2表达的情形,如,在未提供试剂或试剂的组合的情况下,CLDN18.2的表达将降低、基本上保持恒定或增加,而与未提供试剂或试剂组合的情形相比,提供试剂或试剂组合增加CLDN18.2表达,使得与未提供试剂或试剂组合CLDN18.2的表达将降低、基本上保持恒定或增加的情况相比,所得到的表达更高。

[0105] 根据本发明,术语“稳定或增加CLDN18.2表达的试剂”包括化学治疗剂或化学治疗剂组合,如细胞抑制剂。化学治疗剂可以以下方式中的一种影响细胞:(1)破坏细胞的DNA使得它们不再复制,(2)抑制新DNA链的合成使得细胞不能复制,(3)停止细胞的有丝分裂过程使得细胞不能分裂成两个细胞。

[0106] 根据本发明,术语“稳定或增加CLDN18.2表达的试剂”优选涉及如下试剂或试剂组合,如细胞抑制性化合物或细胞抑制性化合物组合,向细胞(特别是癌细胞)提供所述试剂或试剂组合导致细胞阻滞或积聚在细胞周期的一个或多个时期,优选在除G1-期和G0-期之

外(优选除G1-期之外)的细胞周期的一个或多个时期,优选在细胞周期的一个或多个G2-期或S-期,诸如细胞周期的G1/G2-期、S/G2-期、G2-期或S-期。术语“细胞阻滞或积聚在细胞周期的一个或多个时期”意指在细胞周期的一个或多个时期的细胞百分比增加。每个细胞经历包括四个时期的周期以便自我复制。被称为G1的第一时期是细胞准备复制其染色体时。第二时期被称为S,在该时期中,出现DNA合成且DNA进行复制。下一时期为G2期,此时RNA和蛋白质复制。最后的时期为M期,其为真正细胞分裂的时期。在该最后的时期中,复制的DNA和RNA分离并移至细胞的各自末端,细胞实际上分裂成两个相同的功能细胞。为DNA破坏剂的化学治疗剂通常导致细胞在G1和/或G2期积聚。通过干扰DNA合成阻断细胞生长的化学治疗剂通常导致细胞在S-期积聚,所述化学治疗剂如抗代谢物。这些药物的实例为吉西他滨、6-巯嘌呤和5-氟尿嘧啶。

[0107] 根据本发明,术语“稳定或增加CLDN18.2表达的试剂”包括核苷类似物,如吉西他滨、5-氟尿嘧啶或其前药;铂化合物,诸如奥沙利铂和顺铂;紫杉烷如紫杉醇和多西他赛;和喜树碱类似物如伊立替康和拓扑替康;以及药物的组合,如包含一种或多种吉西他滨、奥沙利铂和5-氟尿嘧啶的药物的组合,如包含吉西他滨和奥沙利铂、吉西他滨和5-氟尿嘧啶、奥沙利铂和5-氟尿嘧啶的药物的组合或本文所述的其它药物组合。根据本发明,提及稳定或增加CLDN18.2表达的试剂,如提及核苷类似物、铂化合物、喜树碱类似物或紫杉烷,例如,提及吉西他滨、5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、伊立替康或紫杉醇,包括任何前药,如酯、盐或衍生物,如所述试剂的缀合物。实例为所述试剂与载体物质的缀合物,如蛋白质结合的紫杉醇,如白蛋白结合的紫杉醇。优选地,所述试剂的盐为药学上可接受的。

[0108] 在一个优选的实施方案中,“稳定或增加CLDN18.2表达的试剂”为或包括“诱导免疫原性细胞死亡的试剂”。

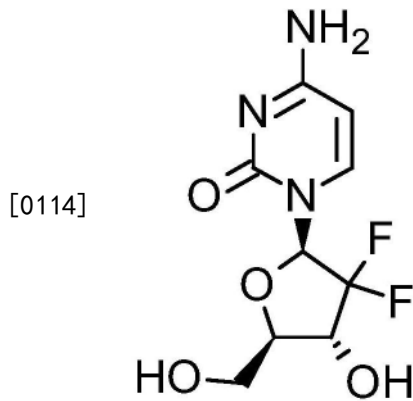
[0109] 在特定情况下,癌细胞可进入致死应力途径以激活肿瘤特异性免疫响应,所述致死应力途径连接至由免疫系统解码的时空限定信号组合的发射(Zitvogel L等(2010) Cell 140:798-804)。在这样的方案中,触发癌细胞以发出由固有免疫效应物(如树突细胞)感测的信号,从而触发涉及CD8+T细胞和IFN- γ 信号传导的同类免疫响应,使得肿瘤细胞死亡可以引发富有成效的抗癌免疫响应。这些信号包括在细胞表面的内质网(ER)伴侣钙网蛋白(CRT)的预凋亡暴露,ATP的预凋亡分泌,以及核蛋白HMGB1的凋亡后释放。总之,这些过程构成免疫原性细胞死亡(ICD)的分子决定簇。葱环类药物、奥沙利铂和 γ 辐射能够诱导限定ICD的所有信号,而例如,顺铂,其不足以诱导CRT从ER易位至死亡的细胞表面-需要ER应力的过程-需要通过毒胡萝卜素(ER应力诱导剂)补充。

[0110] 根据本发明,术语“诱导免疫原性细胞死亡的试剂”是指这样的试剂或试剂组合,当提供给细胞,特别是癌细胞时,所述试剂或试剂组合能够诱导细胞进入致死应力途径,其最终产生肿瘤特异性免疫响应。特别地,当提供给细胞时,诱导免疫原性细胞死亡的试剂诱导细胞发出时空限定的信号组合,特别地包括,在细胞表面的内质网(ER)伴侣钙网蛋白(CRT)的预凋亡暴露,ATP的预凋亡分泌,以及核蛋白HMGB1的凋亡后释放。

[0111] 根据本发明,术语“诱导免疫原性细胞死亡的试剂”包括葱环类药物和奥沙利铂。

[0112] 术语“核苷类似物”是指核苷的结构类似物,即包括嘌呤类似物和嘧啶类似物的类别。

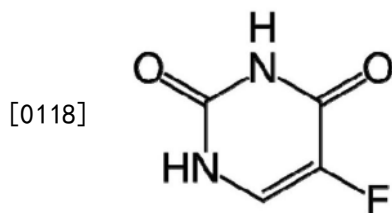
[0113] 术语“吉西他滨”为下式核苷类似物的化合物:



[0115] 特别地,所述术语是指化合物4-氨基-1-(2-脱氧-2,2-二氟-β-D-赤式戊呋喃糖基)嘧啶-2(1H)-酮或4-氨基-1-[(2R,4R,5R)-3,3-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)氧杂环戊-2-基]-1,2-二氢嘧啶-2-酮。

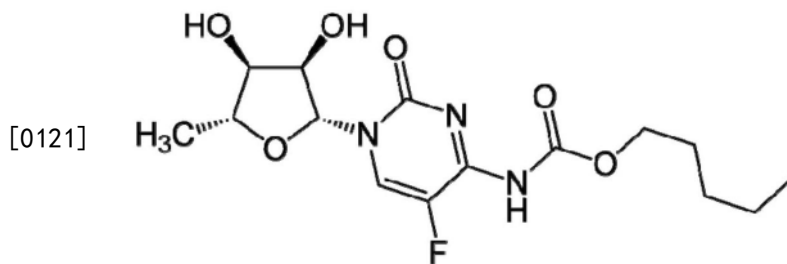
[0116] 根据本发明,吉西他滨优选通过静脉内途径施用。优选地,吉西他滨以0.5至2g/m²,优选0.8至1.5g/m²,更优选1至1.2g/m²身体表面积的剂量范围施用。例如,吉西他滨可以以1000mg/平方米的剂量8周中有7周每周一次给予,然后4周中有3周每周一次给予。

[0117] 术语“核苷类似物”包括氟嘧啶衍生物,如氟尿嘧啶及其前药。术语“氟尿嘧啶”或“5-氟尿嘧啶”(5-FU或f5U)(以商标名Adrucil,Carac,Efudix,Efudex和Fluoroplex售出)为下式嘧啶类似物的化合物:



[0119] 特别地,所述术语是指化合物5-氟-1H-嘧啶-2,4-二酮。

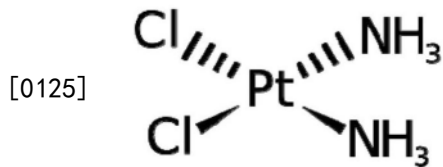
[0120] 术语“卡培他滨(capecitabine)”(Xeloda,Roche)是指在组织中被转化成5-FU的前药的化学治疗剂。可以口服施用的卡培他滨具有下式:



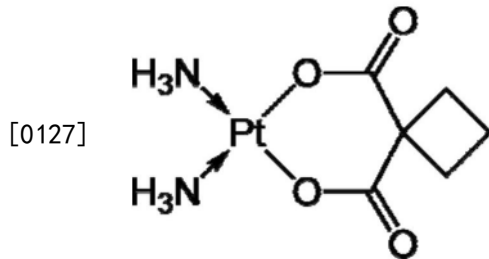
[0122] 特别地,所述术语是指化合物[1-(3,4-二羟基-5-甲基四氢呋喃-2-基)-5-氟-2-氧代-1H-嘧啶-4-基]氨基甲酸戊酯。

[0123] 根据本发明,术语“铂类化合物”是指在其结构中含有铂的化合物,如铂类配合物,并且包括诸如顺铂、卡铂和奥沙利铂的化合物。

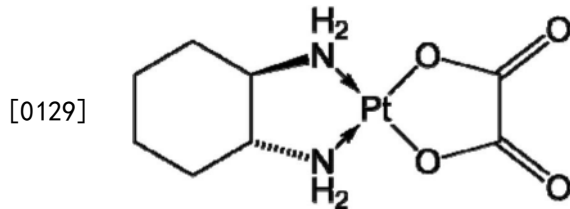
[0124] 术语“顺铂(cisplatin/cisplatinum)”是指下式化合物顺式二氯二氨合铂(II)(CDDP):



[0126] 术语“卡铂(carboplatin)”是指下式化合物顺式(1,1-环丁烷基二羧酸)二氨铂(II)：



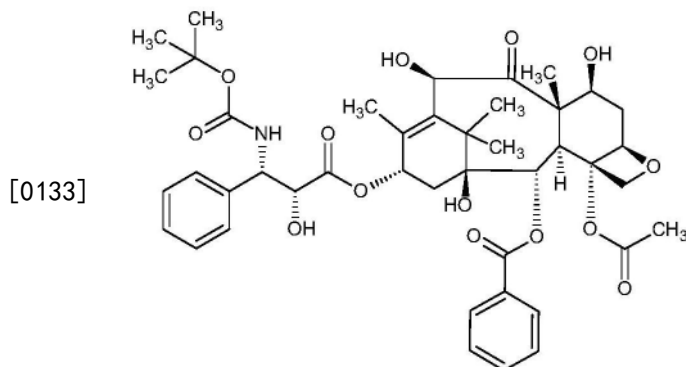
[0128] 术语“奥沙利铂(oxaliplatin)”是指为铂类化合物的化合物,所述铂类化合物与下式二氨基环己烷载体配体相配合：



[0130] 特别地,术语“奥沙利铂”是指化合物[(1R,2R)-环己烷-1,2-二胺](乙二酸-0,0')铂(II)。用于注射的奥沙利铂也以商品名Eloxatine上市。

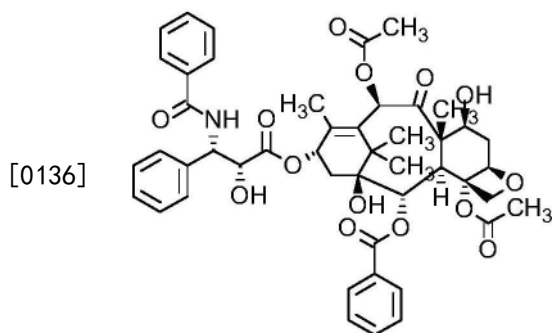
[0131] 紫杉烷为一类双萜化合物,其首次来自诸如紫衫属的植物的天然来源,但一些已人工合成。紫杉烷类药物的主要作用机制为破坏微管功能,从而抑制细胞分裂的过程。紫杉烷包括多西他赛(泰素帝(Taxotere))和紫杉醇(泰素(Taxol))。

[0132] 根据本发明,术语“多西他赛(docetaxel)”是指具有下式的化合物：



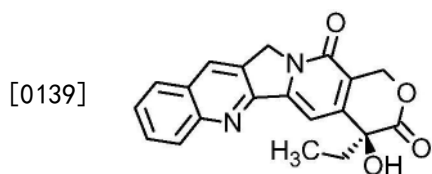
[0134] 特别地,术语“多西他赛”是指化合物1,7β,10β-三羟基-9-氧代-5β,20-环氧紫杉-11-烯-2α,4,13α-三基4-乙酸酯2-苯甲酸酯13-{(2R,3S)-3-[(叔丁氧基羰基)-氨基]-2-羟基-3-苯基丙酸酯}。

[0135] 根据本发明,术语“紫杉醇(paclitaxel)”是指具有下式的化合物：



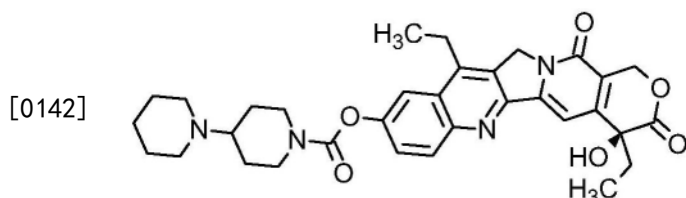
[0137] 特别地,术语“紫杉醇”是指化合物(2 α ,4 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α)-4,10-双-(乙酰基氧基)-13-{[(2R,3S)-3-(苯甲酰基氨基)-2-羟基-3-苯基丙酰基]氧基}-1,7-二羟基-9-氧代-5,20-环氧紫杉-11-烯-2-基苯甲酸酯。

[0138] 根据本发明,术语“喜树碱(camptothecin)类似物”是指化合物喜树碱(CPT;(S)-4-乙基-4-羟基-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-3,14-(4H,12H)-二酮)的衍生物。优选地,术语“喜树碱类似物”是指包含以下结构的化合物:



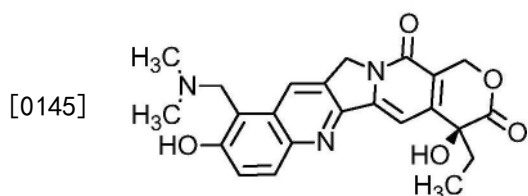
[0140] 根据本发明,优选的喜树碱类似物为DNA酶拓扑异构酶I(topo I)的抑制剂。根据本发明,优选的喜树碱类似物为伊立替康和拓扑替康。

[0141] 伊立替康(Irinotecan)为通过抑制拓扑异构酶I防止DNA解链的药物。在化学术语中,其为具有下式的天然生物碱喜树碱的半合成类似物:



[0143] 特别地,术语“伊立替康”是指化合物(S)-4,11-二乙基-3,4,12,14-四氢-4-羟基-3,14-二氧化代1H-吡喃并[3',4':6,7]-吲哚啉并[1,2-b]喹啉-9-基-[1,4'-二哌啶]-1'-羧酸酯。

[0144] 拓扑替康(topotecan)为下式的拓扑异构酶抑制剂:



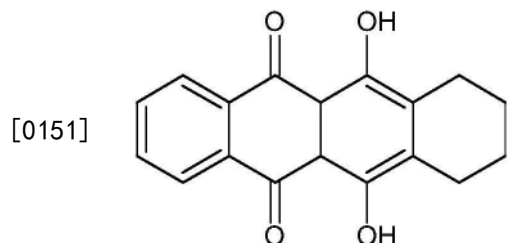
[0146] 特别地,术语“拓扑替康”是指化合物(S)-10-[(二甲基氨基)甲基]-4-乙基-4,9-二羟基-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-3,14(4H,12H)-二酮单盐酸盐。

[0147] 蒽环类药物(anthracyclines)为一类通常在癌症化学疗法中使用的药物,所述药物也为抗生素。在结构上,所有蒽环类药物共有常见的四环7,8,9,10-四氢并四苯-5,12-醌结构,并且通常在特定位点需要糖基化。

[0148] 蒽环类药物优选产生一种或多种以下作用机制：1. 通过嵌入DNA/RNA链的碱基对之间来抑制DNA和RNA合成，从而防止迅速生长的癌细胞复制。2. 抑制拓扑异构酶II酶，从而防止超卷曲DNA的松弛，并因此阻断DNA转录和复制。3. 产生破坏DNA和细胞膜的离子介导的游离氧自由基。

[0149] 根据本发明，术语“蒽环类药物”优选涉及试剂，优选涉及诱导凋亡的抗癌剂，优选通过抑制拓扑异构酶II中DNA的重结合诱导凋亡的抗癌剂。

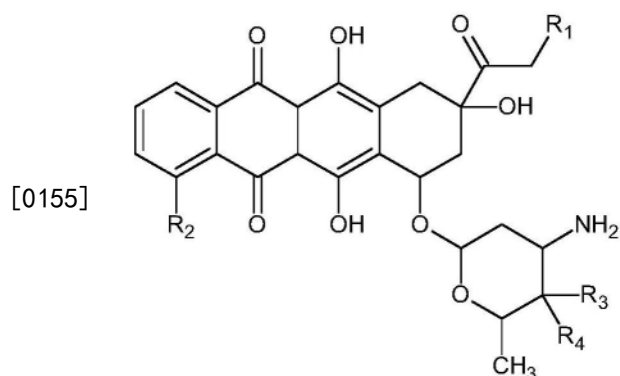
[0150] 优选地，根据本发明，术语“蒽环类药物”通常是指一类具有以下环结构的化合物，



[0152] 包括其类似物和衍生物、药用盐、水合物、酯、缀合物和前药。

[0153] 蒽环类药物和蒽环类药物类似物的实例包括但不限于柔红霉素(道诺霉素)、多柔比星(阿霉素)、表柔比星、伊达比星、紫红霉素(rhodomyacin)、吡柔比星(pyrrubicin)、戊柔比星、N-三氟-乙酰基多柔比星-14-戊酸酯、阿克拉霉素(aclacinomycin)、吗啉代多柔比星(吗啉代-DOX)、氰基吗啉代-多柔比星(氰基-吗啉代-DOX)、2-吡咯啉并-多柔比星(2-PDOX)、5-亚氨基道诺霉素、米托蒽醌和阿克拉霉素A(阿柔比星)。米托蒽醌为蒽二酮类化合物的成员，所述蒽二酮类化合物为缺少蒽环的糖部分但保留了允许插入DNA的平面多环芳族环结构的蒽环类似物。

[0154] 根据本发明，特别优选为蒽环类药物的是下式化合物：

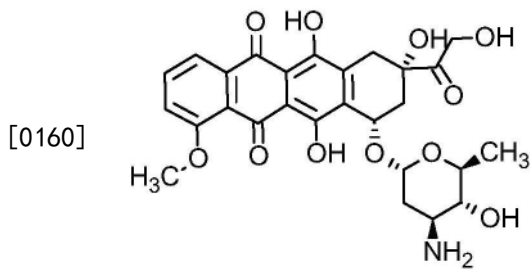


[0156] 其中

[0157] R_1 选自H和OH, R_2 选自H和OMe, R_3 选自H和OH, 并且 R_4 选自H和OH。

[0158] 在一个实施方案中, R_1 为H, R_2 为OMe, R_3 为H, 并且 R_4 为OH。在另一实施方案中, R_1 为OH, R_2 为OMe, R_3 为H, 并且 R_4 为OH。在另一实施方案中, R_1 为OH, R_2 为OMe, R_3 为OH, 并且 R_4 为H。在另一实施方案中, R_1 为H, R_2 为H, R_3 为H, 并且 R_4 为OH。

[0159] 在本发明的上下文中明确涵盖为蒽环类药物的是表柔比星。表柔比星为具有下式的蒽环药物：

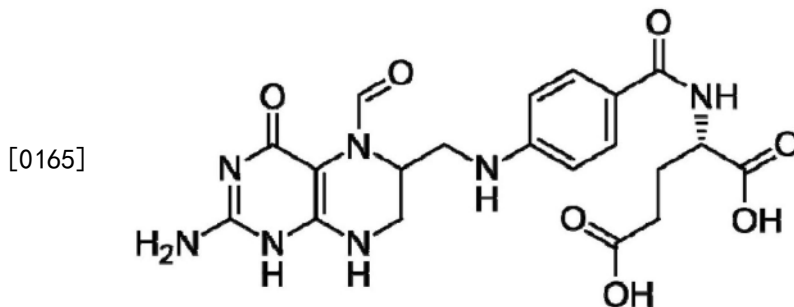


[0161] 在美国以商品名E11ence而在别处以商品名Pharmorubicin或Epirubicin Ebewe上市。特别地，术语“表柔比星”是指化合物(8R,10S)-10-[(2S,4S,5R,6S)-4-氨基-5-羟基-6-甲基-噁烷-2-基]氧基-6,11-二羟基-8-(2-羟基乙酰基)-1-甲氧基-8-甲基-9,10-二氢-7H-并四苯-5,12-二酮。在一些化学疗法方案中，表柔比星优于最常见的蒽环类药物多柔比星，因为其似乎引起较少副作用。

[0162] 根据本发明，稳定或增加CLDN18.2表达的试剂可以为化学治疗剂，特别是在癌症治疗中建立的化学治疗剂，可以为药物组合的一部分，如用于癌症治疗而建立的药物组合。这样的药物组合可以为在化学疗法中使用的药物组合，可以为如在FOLFIRINOX化学治疗方案中使用的药物组合。

[0163] 在FOLFIRINOX化学疗法中使用的药物组合包括亚叶酸、氟尿嘧啶、伊立替康(如，伊立替康盐酸盐)和奥沙利铂。奥沙利铂可以以85mg/平方米身体表面积被给予；伊立替康可以以180mg/平方米身体表面积被给予；亚叶酸钙可以以400mg/平方米身体表面积被给予；氟尿嘧啶可以以400mg/平方米身体表面积以丸剂被给予，随后5-氟尿嘧啶可以以2400mg/平方米身体表面积以优选46小时，优选每2周的连续输注被给予。

[0164] 术语“亚叶酸(folinic acid/leucovorin)”是指可与化学治疗剂5-氟尿嘧啶用于协同组合的化合物。因此，如果本文提及5-氟尿嘧啶或其前药的施用，在一个实施方案中，所述施用可以包括与亚叶酸共同施用。亚叶酸具有下式：



[0166] 特别地，所述术语是指化合物(2S)-2-{{[4-[(2-氨基-5-甲酰基-4-氧代-5,6,7,8-四氢-1H-蝶啶-6-基)甲基氨基]苯甲酰基]氨基}戊二酸}。

[0167] γ δ T细胞(gamma delta T细胞)代表在其表面具有独特的T细胞受体(TCR)的一小亚组的T细胞。大部分T细胞具有由被称为 α -TCR链和 β -TCR链的两个糖蛋白链组成的TCR。相比之下，在 γ δ T细胞中，TCR由一条 γ -链和一条 δ -链组成。该组的T细胞通常远不及 α β T细胞常见。人 γ δ T细胞在应力-监督响应如感染性疾病和自身免疫中起重要作用。肿瘤中转化-诱导的变化还被表明引起由 γ δ T细胞介导的应力-监督响应并增强抗肿瘤免疫。重要地，在抗原结合之后，在损伤部位处激活的 γ δ T细胞提供了介导其它效应细胞募集的细胞因子(如INF γ , TNF α)和/或趋化因子，并显示直接的效应物功能如细胞毒性(经由死亡受体和溶

细胞颗粒途径)和ADCC。

[0168] 外周血中的大部分 $\gamma\delta$ T细胞表达 $V\gamma 9V\delta 2$ T细胞受体(TCR $\gamma\delta$)。 $V\gamma 9V\delta 2$ T细胞是人和灵长类独有的并且被认为在感应由侵入病原体引起的“危险”中起早期且重要的作用,因为它们在许多急性感染中急剧扩增并且可以在几天内超过所有其它淋巴细胞,所述急性感染如在结核病、沙门氏菌病、埃利希体病、布鲁氏菌病、土拉菌病(tularemia)、李氏杆菌病、弓形体病和疟疾中。

[0169] $\gamma\delta$ T细胞响应于小的非肽磷酸化抗原(磷酸抗原),如在细菌中合成的焦磷酸以及在哺乳动物细胞中通过甲羟戊酸途径产生的异戊烯焦磷酸(IPP)。然而,正常细胞中IPP产量不足以激活 $\gamma\delta$ T细胞,肿瘤细胞中甲羟戊酸途径的失调导致IPP积聚并激活 $\gamma\delta$ T细胞。IPP也可通过氨基双膦酸盐而在治疗上增强,所述氨基双膦酸盐抑制甲羟戊酸途径酶——法尼基焦磷酸合酶(FPPS)。其中,唑来膦酸(ZA,唑来膦酸盐,ZometaTM,Novartis)表示这样的氨基双膦酸盐,已将其临床上施用于患者用于骨质疏松症和转移性骨病的治疗。在体外治疗PBMC之后,ZA特别由单核细胞吸收。IPP在单核细胞中积聚,它们分化成刺激 $\gamma\delta$ T细胞形成的抗原呈递细胞。在这种环境下,优选加入白细胞介素-2(IL-2)作为激活的 $\gamma\delta$ T细胞的生长和存活因子。最后,已描述某些烷基化胺(然而仅在毫摩尔浓度下)体外激活 $V\gamma 9V\delta 2$ T细胞。

[0170] 根据本发明,术语“刺激 $\gamma\delta$ T细胞的试剂”涉及在体外和/或体内刺激 $\gamma\delta$ T细胞(特别是 $V\gamma 9V\delta 2$ T细胞)形成的化合物,特别是通过诱导 $\gamma\delta$ T细胞的激活和扩增在体外和/或体内刺激 $\gamma\delta$ T细胞形成的化合物。优选地,所述术语涉及在体外和/或体内增加哺乳动物细胞产生异戊烯基焦磷酸(IPP)的化合物,优选通过抑制甲羟戊酸途径酶——法尼基焦磷酸合酶(FPPS)在体外和/或体内增加哺乳动物细胞产生异戊烯基焦磷酸(IPP)的化合物。

[0171] 刺激 $\gamma\delta$ T细胞的化合物的一种特定基团为双膦酸盐,特别是含氮的双膦酸盐(N-双膦酸盐;氨基双膦酸盐)。

[0172] 例如,用于本发明的合适的双膦酸盐可以包括一种或多种以下化合物,包括其类似物和衍生物、药用盐、水合物、酯、偶联物和前药:

[0173] [1-羟基-2-(1H-咪唑-1-基)乙烷-1,1-二基]双(膦酸),唑来膦酸,如唑来膦酸盐;

[0174] (二氯-磷酰基-甲基)膦酸,如氯膦酸盐;

[0175] {1-羟基-3-[甲基(戊基)氨基]丙烷-1,1-二基}双(膦酸),伊班膦酸,如伊班膦酸盐;

[0176] (3-氨基-1-羟基丙烷-1,1-二基)双(膦酸),帕米膦酸,如帕米膦酸盐;

[0177] (1-羟基-1-磷酰基-2-吡啶-3-基-乙基)膦酸,利塞膦酸,如利塞膦酸盐;

[0178] (1-羟基-2-咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基-1-磷酰基乙基)膦酸,米诺膦酸;

[0179] [3-(二甲基氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二基]双(膦酸),奥帕膦酸;

[0180] [4-氨基-1-羟基-1-(羟基-氧化-磷酰基)-丁基]膦酸,阿仑膦酸,如阿仑膦酸盐;

[0181] [(环庚基氨基)亚甲基]双(膦酸),英卡膦酸;

[0182] (1-羟基乙-1,1-二基)双(膦酸),依替膦酸,如依替膦酸盐;以及

[0183] {[4-氯苯基]硫}亚甲基}双(膦酸),替鲁膦酸。

[0184] 根据本发明,唑来膦酸(INN)或唑来膦酸盐(由Novartis以商品名Zometa,Zomera,Aclasta和Reclast出售)为特别优选的双膦酸盐。Zometa被用于预防患有诸如多发性骨髓

瘤和前列腺癌的癌症的患者骨折以及用于治疗骨质疏松症。也可将其用于治疗恶性高钙血症,并且可有助于治疗来自骨转移的疼痛。

[0185] 在一个特别优选的实施方案中,将根据本发明的刺激 γ δ T细胞的试剂与IL-2组合施用。已显示这样的组合在介导 γ 9 δ 2T细胞的扩增和激活中特别有效。

[0186] 白细胞介素-2 (IL-2) 为白细胞介素,即免疫系统中一类细胞因子信号传导分子。蛋白质吸引淋巴细胞,并且这为身体对微生物感染的自然反应且区分外源(非自身)和自身的部分。IL-2通过结合于由淋巴细胞表达的IL-2受体介导其作用。

[0187] 根据本发明,所使用的IL-2可以为支持 γ δ T细胞的刺激或使 γ δ T细胞能够刺激的任何IL-2并且可以来源于任何物种,优选为人。IL-2可以为分离的,重组产生的或合成的IL-2,可以为天然存在的或修饰的IL-2。

[0188] 术语“抗原”涉及诸如蛋白质或肽的试剂,其包含针对免疫响应被定向和/或待被定向的表位。在优选实施方案中,抗原为肿瘤相关的抗原,如CLDN18.2,即可以来源于细胞质、细胞表面和细胞核的癌细胞组分,特别是细胞内优选大量产生的那些抗原或在癌细胞上作为表面抗原的那些抗原。

[0189] 在本发明的上下文中,术语“肿瘤相关的抗原”优选涉及这样的蛋白质,所述蛋白质在正常条件下在有限数量的组织和/或器官中或在特定的发育阶段特异性表达,并且在一个或多个肿瘤或癌组织中表达或异常表达。在本发明的上下文中,肿瘤相关的抗原优选与癌细胞的细胞表面相关并且优选在正常组织中不表达或在正常组织中仅很少表达。

[0190] 术语“表位”是指分子中的抗原决定簇,即是指由免疫系统识别(例如由抗体识别)的分子中的部分。例如,表位为在抗原上分开的三维位点,所述位点被免疫系统识别。表位通常由分子(如氨基酸)的化学活性表面基团或糖侧链组成,并且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。构型表位和非构型表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,与前者的结合丧失而与后者的结合并不丧失。蛋白质(如CLDN18.2)的表位优选包括所述蛋白质的连续或不连续部分,并且优选为5至100,优选为5至50,更优选为8至30,最优选为10至25个氨基酸长度,例如,表位可以优选为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸长度。

[0191] 术语“抗体”是指包含通过二硫键互相连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,并且包括含有其抗原结合部分的任何分子。术语“抗体”包括单克隆抗体以及抗体的片段或衍生物,包括但不限于人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体(如scFv)和抗原结合抗体片段如Fab和Fab'片段,并且还包括抗体的所有重组形式,如在原核生物中表达的抗体,非糖基化抗体,以及如本文所述的任何抗原结合抗体片段和衍生物。每一条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。每一条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。VH和VL区可被进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的高变区,其散布在被称作框架区(FR)的较保守区域。每一条VH和VL由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白结合至宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)以及经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0192] 本文所述的抗体可以为人类抗体。如本文所用,术语“人类抗体”旨在包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本文所述的人类抗体可以包括并非由人种

系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变)。

[0193] 术语“人源化抗体”是指具有大体上来源于来自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点的分子,其中分子的其余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可以包括融合到恒定结构域的完整可变结构域或仅接枝到可变结构域中适当框架区的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以为野生型或被一个或多个氨基酸取代修饰,如修饰以与人免疫球蛋白更密切类似。一些人源化抗体形式保存所有CDR序列(例如,人源化小鼠抗体,其含有来自小鼠抗体的所有六个CDR)。其它形式具有一个或多个CDR,其相对于初始抗体发生改变。

[0194] 术语“嵌合抗体”是指那些抗体,其中重链和轻链的每一个氨基酸序列的一部分与来源于特定物种或属于特定类别的抗体中的相应序列同源,而所述链的其余区段与另一种的相应序列同源。通常,轻链和重链的可变区模拟来源于一种哺乳动物物种的抗体的可变区,而恒定部分与来源于另一哺乳动物物种的抗体的序列同源。这样的嵌合形式的一个明显优势为,使用容易获得的B-细胞或来自非人宿主生物体的杂交瘤,与来源于如人细胞制剂的恒定区组合的可变区可方便地源自目前已知的来源。虽然可变区具有易于制备的优势且特异性不受来源的影响,但当注射抗体时,来自人的恒定区比来自非人源的恒定区引发人受试者的免疫响应的可能性更小。然而,定义不限于该特定实例。

[0195] 术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“结合部分”)或抗体的“抗原结合片段”(或简称为“结合片段”)或相似的术语是指保留特异性结合于抗原能力的抗体的一个或多个片段。已显示可通过全长抗体的片段执行抗体的抗原结合功能。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含铰链区处通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) Fd片段,由VH和CH结构域组成;(iv) Fv片段,由抗体的单臂的VL和VH结构域组成,(v) dAb片段(Ward等(1989) *Nature* 341:544-546),其由VH结构域组成;(vi) 分离的互补决定区(CDR),以及(vii) 两个或更多个分离的CDR的组合,其可任选地通过合成接头连接。此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH通过单独的基因编码,但使用重组方法通过合成接头可将它们连接,所述合成接头使其能够成为单个蛋白质链,VL和VH区在所述单个蛋白质链中成对形成单价分子(被称为单链Fv(scFv);参见,如Bird等(1988) *Science* 242:423-426;和Huston等(1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5879-5883)。也旨在将这样的单链抗体涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”内。其它实例为结合结构域免疫球蛋白融合蛋白,其包括(i) 结合结构域多肽,其融合于免疫球蛋白铰链区多肽,(ii) 融合至铰链区的免疫球蛋白重链CH₂恒定区,以及(iii) 融合至CH₂恒定区的免疫球蛋白重链CH₃恒定区。结合结构域多肽可为重链可变区或轻链可变区。结合结构域免疫球蛋白融合蛋白在US2003/0118592和US2003/0133939中进一步公开。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并以与完整抗体相同的方式进行片段的实用性筛选。

[0196] 术语“双特异性分子”旨在包括具有两种不同结合特异性的任何试剂,如蛋白质、肽、或蛋白质复合物或肽复合物。例如,分子可以结合于(a) 细胞表面抗原及(b) 效应细胞表面上的Fc受体,或者与(a) 细胞表面抗原及(b) 效应细胞表面上的Fc受体相互作用。术语“多特异性分子”或“异种特异性分子”旨在包括具有多于两种不同结合特异性的任何试剂,如

蛋白质、肽或蛋白质复合物或肽复合物。例如,分子可以结合于(a)细胞表面抗原,(b)效应细胞表面上的Fc受体,以及(c)至少一种其它组分,或者与(a)细胞表面抗原,(b)效应细胞表面上的Fc受体,以及(c)至少一种其它组分相互作用。因此,本发明包括但不限于双特异性、三特异性、四特异性以及涉及CLDN18.2和其它靶标(如效应细胞上的Fc受体)的其它多特异性分子。术语“双特异性抗体”也包括双抗体。双抗体为二价的、双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但由于使用的接头太短而使相同链上的两个结构域之间不能配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见,如,Holliger,P等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.,等(1994)Structure 2:1121-1123)。

[0197] 可以将抗体偶联于治疗性部分或治疗剂,如细胞毒素、药物(如,免疫抑制剂)或放射性同位素。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害且特别是杀伤细胞的任何试剂。实例包括泰素、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同源物。用于形成抗体偶联物的合适的治疗剂包括但不限于抗代谢物(如,甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪(decarbazine)、烷化剂(如,氮芥、硫喷妥苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺式-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、葱环类药物(如,柔红霉素(原名为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(如,更生霉素(原名为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和氨基霉素(AMC)以及抗有丝分裂剂(如,长春新碱和长春碱)。在优选实施方案中,治疗剂为细胞毒性剂或放射毒性剂。在另一实施方案中,治疗剂为免疫抑制剂。在另一实施方案中,治疗剂为GM-CSF。在优选实施方案中,治疗剂为多柔比星、顺铂、博来霉素、硫酸盐、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺或蓖麻毒素A。

[0198] 也可将抗体偶联于放射性同位素,如碘-131、钷-90或铟-111以生成细胞毒性放射性药物。

[0199] 可将本发明的抗体偶联物用于修饰给定的生物响应,并且药物部分不应解释为局限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以为拥有期望的生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可以包括,例如,酶促活性毒素或其活性片段,如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或生物响应修饰剂,如,例如淋巴因子、白细胞介素-1(“IL-1”)、白细胞介素-2(“IL-2”)、白细胞介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其它生长因子。

[0200] 将这样的治疗性部分偶联于抗体的技术为熟知的,参见,如Arnon等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等(编),pp.243-56(Alan R.Liss,Inc.1985);Hellstrom等,“Antibodies For Drug Delivery”,Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等(编),pp.623-53(Marcel Dekker,Inc.1987);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications,Pinchera等(编),pp.475-506(1985);”

Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin等(编), pp.303-16 (Academic Press 1985) 以及 Thorpe 等, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

[0201] 如本文所用, 如果通过免疫动物或通过筛选免疫球蛋白基因库而从系统中获得抗体, 则抗体“来源于”特定的种系序列, 并且其中所述选定抗体的氨基酸序列与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少90%, 更优选为至少95%, 甚至更优选为至少96%、97%、98%或99%的同一性。通常, 来源于特定种系序列的抗体显示与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列差异不超过10个氨基酸, 更优选地, 不差异超过5个氨基酸或甚至更优选地, 差异不超过4、3、2或1个氨基酸。

[0202] 如本文所用, 术语“异种抗体”是指两种或更多种抗体, 其衍生物或连接在一起的抗原结合区, 其中的至少两个具有不同的特异性。这些不同的特异性包括在效应细胞上对Fc受体的结合特异性, 以及在靶细胞(如肿瘤细胞)上对抗原或表位的结合特异性。

[0203] 本文所述的抗体可以为单克隆抗体。如本文使用的术语“单克隆抗体”是指单分子组合物的抗体分子的制剂。单克隆抗体显示出单一结合特异性和亲和力。在一个实施方案中, 单克隆抗体通过融合至永生化细胞杂交瘤产生, 所述杂交瘤包括从非人动物(如小鼠)获得的B细胞。

[0204] 本文所述的抗体可以为重组抗体。如本文所用, 术语“重组抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有抗体, 诸如(a)从动物(如, 小鼠)中分离的抗体, 所述动物相对于免疫球蛋白基因或由其制备的杂交瘤为转基因的或转染色体的, (b)从转化以表达抗体的宿主细胞(如, 从转染瘤)分离的抗体, (c)从重组、组合的抗体库中分离的抗体, 以及(d)通过涉及将免疫球蛋白基因序列剪接至其它DNA序列的任何其它方法制备、表达、产生或分离的抗体。

[0205] 本文所述的抗体可以来源于不同的物种, 包括但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠和人。

[0206] 本文所述的抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体, 包括IgA, 如IgA1或IgA2、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgM和IgD抗体。在不同实施方案中, 抗体为IgG1抗体, 更具体为IgG1、 κ 或IgG1、 λ 同种型(即IgG1、 κ 、 λ)、IgG2a抗体(如, IgG2a、 κ 、 λ)、IgG2b抗体(如, IgG2b、 κ 、 λ)、IgG3抗体(如, IgG3、 κ 、 λ)或IgG4抗体(如, IgG4、 κ 、 λ)。

[0207] 如本文所用, 术语“转染瘤”包括表达抗体的重组真核宿主细胞, 如CHO细胞、NS/0细胞、HEK293细胞、HEK293T细胞、植物细胞或真菌(包括酵母细胞)。

[0208] 如本文所用, 相对于产生这样的抗体的转基因生物体限定“异种抗体”。该术语是指具有在并非由转基因生物体组成的生物体中发现的并且通常来源于除转基因生物体之外的物种的氨基酸序列或编码对应于该氨基酸序列的核酸序列的抗体。

[0209] 如本文所用, “异种杂合抗体(heterohybrid antibody)”是指具有不同生物来源的轻链和重链的抗体。例如, 具有与鼠轻链相关的人重链的抗体为异种杂合抗体。

[0210] 本发明包括如本文所述的所有抗体和抗体的衍生物, 出于本发明的目的, 其涵盖在术语“抗体”内。术语“抗体衍生物”是指任何修饰形式的抗体, 如, 所述抗体与另一试剂或抗体或抗体片段的偶联物。

[0211] 本文所述的抗体优选为分离的。如本文所用的“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(如,特异性结合于CLDN18.2的分离的抗体基本上不含特异性结合于除CLDN18.2之外的抗原的抗体)。然而,特异性结合于人CLDN18.2的表位、同种型或变体的分离的抗体可以与其它相关抗原(如,来自其它物种(如,CLDN18.2物种同源物))具有交叉反应性。而且,分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学物质。在本发明的一个实施方案中,“分离的”单克隆抗体的组合涉及具有不同特异性并且在良好限定的组合物或混合物中组合的抗体。

[0212] 根据本发明,术语“结合”优选涉及特异性结合。

[0213] 根据本发明,如果抗体对于预定靶标具有显著的亲和力并且在标准测定中结合于所述预定靶标,则抗体能够结合于预定靶标。“亲和力”或“结合亲和力”通常通过平衡解离常数(K_D)测量。优选地,术语“显著的亲和力”是指结合于预定靶标的解离常数(K_D)为 $10^{-5}M$ 或更小, $10^{-6}M$ 或更小, $10^{-7}M$ 或更小, $10^{-8}M$ 或更小, $10^{-9}M$ 或更小, $10^{-10}M$ 或更小, $10^{-11}M$ 或更小, $10^{-12}M$ 或更小。

[0214] 如果抗体对于所述靶标无显著的亲和力并且在标准测定中不会显著结合于所述靶标,特别是在标准测定中不可检测地结合于所述靶标,则抗体(基本上)不能结合于靶标。优选地,如果以至多 $2\mu g/ml$,优选为 $10\mu g/ml$,更优选为 $20\mu g/ml$,特别是 $50\mu g/ml$ 或 $100\mu g/ml$ 或更高的浓度存在,抗体不可检测地结合于所述靶标。优选地,如果抗体结合至所述靶标的 K_D 比抗体结合至能够结合的预定靶标的 K_D 高至少10-倍、100-倍、 10^3 -倍、 10^4 -倍、 10^5 -倍或 10^6 -倍,则抗体对于靶标不具有显著的亲和力。例如,如果抗体结合至抗体能够结合的靶标的 K_D 为 $10^{-7}M$,则抗体无显著亲和力的结合至靶标的 K_D 将至少为 $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-2}M$ 或 $10^{-1}M$ 。

[0215] 如果抗体能够结合于所述预定靶标而不能结合于其它靶标,即对其它靶标无显著的亲和力并且在标准测定中不会显著地结合于其它靶标,则抗体对于预定靶标为特异的。根据本发明,如果抗体能够结合于CLDN18.2,但(基本上)不能结合于其它靶标,则抗体对CLDN18.2为特异的。优选地,如果对于这样的其它靶标的亲和力和结合至这样的其它靶标的亲和力不会显著地超过对CLDN18.2-不相关蛋白质的亲和力或结合至CLDN18.2-不相关蛋白质的亲和力,则抗体对CLDN18.2为特异的,所述CLDN18.2-不相关蛋白如牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、人血清白蛋白(HSA)或非膜蛋白跨膜蛋白质(如MHC分子或转铁蛋白受体或任何其它指定的多肽)。优选地,如果抗体结合至所述靶标的 K_D 比抗体非特异性结合至靶标的 K_D 低至少10-倍、100-倍、 10^3 -倍、 10^4 -倍、 10^5 -倍或 10^6 -倍,则抗体对于预定靶标为特异的。例如,如果抗体结合至其非特异的靶标的 K_D 为 $10^{-7}M$,则结合于抗体非特异性的靶标的 K_D 为至少 $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-2}M$ 或 $10^{-1}M$ 。

[0216] 抗体与靶标的结合可使用任何合适的方法用实验方法确定;参见,例如,Berzofsky等,“Antibody-Antigen Interactions”In *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis *Immunology*, W.H. Freeman and Company New York, N Y (1992) 以及本文所述的方法。使用常规技术,诸如通过平衡透析;通过使用BIAcore2000仪器,使用制造商概述的一般程序;通过使用放射性标记的靶标抗原的放射性免疫测定;或通过技术人员已知的另一方法可以容易地确定亲和力。可以,例如通过Scatchard等(*Ann N.Y.Acad.Sci.*, 51:660 (1949))的方法分析亲和力数据。如果在不同条件

(如盐浓度、pH)下测量,测量的特定抗体-抗原相互作用的亲和力可发生改变。因此,亲和力以及其它抗原-结合参数,如 K_D 、 IC_{50} 的测量优选用抗体和抗原的标准溶液以及标准缓冲液进行。

[0217] 如本文所用,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(如,IgM或IgG1)。

[0218] 如本文所用,“同种型转换”是指抗体的类别或同种型从一种Ig类别变化至其它Ig类别中的一种的现象。

[0219] 如本文使用的适用于物体的术语“天然存在的”,是指可在自然界中发现的物体。例如,存在于可从天然来源分离且未由人在实验室进行特意修饰的生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列为天然存在的。

[0220] 如本文使用的术语“重排的”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型,其中在分别编码基本上完整的VH或VL结构域的构型中,V区段位于紧邻D-J或J区段。通过比较种系DNA可鉴定重排的免疫球蛋白(抗体)基因基因座;重排的基因座将具有至少一个重组的七聚物/九聚物同源物元件。

[0221] 如本文使用术语“未重排的”或“种系构型”涉及V区段时,是指其中V区段未进行重组以便紧邻D或J区段的构型。

[0222] 根据本发明,能够结合CLDN18.2的抗体为能够结合CLDN18.2中存在的表位的抗体,所述表位优选位于CLDN18.2的细胞外结构域内(特别是第一细胞外结构域)的表位,优选为CLDN18.2的氨基酸位点29至78。在特定实施方案中,能够结合CLDN18.2的抗体为能够结合以下表位的抗体:(i)在CLDN18.2上的表位,所述表位在CLDN18.1上不存在,优选SEQ ID NO:3,4和5,(ii)定位在CLDN18.2-环1上的表位,优选SEQ ID NO:8,(iii)定位在CLDN18.2-环2上的表位,优选SEQ ID NO:10,(iv)定位在CLDN18.2-环D3上的表位,优选SEQ ID NO:11,(v)涵盖CLDN18.2-环1和CLDN18.2-环D3的表位,或(vi)定位在CLDN18.2-环D3上的非糖基化表位,优选SEQ ID NO:9。

[0223] 根据本发明,能够结合CLDN18.2的抗体优选为能够结合CLDN18.2但不结合CLDN18.1的抗体。优选地,能够结合CLDN18.2的抗体对CLDN18.2为特异性的。优选地,能够结合CLDN18.2的抗体优选为能够结合在细胞表面上表达的CLDN18.2的抗体。在特别优选的实施方案中,能够结合CLDN18.2的抗体结合至活细胞表面上存在的CLDN18.2的天然表位。优选地,能够结合CLDN18.2的抗体结合至选自以下的一个或多个肽:SEQ ID NOs:1,3-11,44,46和48-50。优选地,能够结合CLDN18.2的抗体对前面提及的蛋白质、肽或其免疫原性片段或衍生物为特异的。能够结合CLDN18.2的抗体可以通过包括以下步骤的方法获得:用包含选自SEQ ID NO:1,3-11,44,46和48-50的氨基酸序列的蛋白质或肽,或者表达所述蛋白质或肽的核酸或宿主细胞来免疫动物。优选地,抗体结合癌细胞,特别是上文提及的癌症类型的细胞,并且,优选地,基本上不结合于非癌性细胞。

[0224] 优选地,能够结合CLDN18.2的抗体结合至表达CLDN18.2的细胞诱导或介导杀伤表达CLDN18.2的细胞。表达CLDN18.2的细胞优选为癌细胞,并且,特别为选自致瘤性的胃癌细胞、食道癌细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞、头颈癌细胞和胆囊癌细胞。优选地,抗体通过诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、凋亡和抑制表达CLDN18.2的细胞增殖中的一种或多种来诱导或介导杀伤细胞。优选地,ADCC介导的细胞裂解在存在效应细胞的情况下发生,在特定实施方

案中,所述效应细胞选自单核细胞(monocytes/mononuclear cells)、NK细胞和PMN。可通过在测定中使用溴脱氧尿苷(5-溴-2-脱氧尿苷,BrdU)确定细胞的增殖来在体外测量细胞增殖的抑制。BrdU为合成核苷,其为胸苷的类似物并且可被掺入至复制细胞新合成的DNA中(在细胞周期的S期期间),从而在DNA复制期间取代胸苷。使用例如对BrdU特异的抗体检测掺入的化学制剂表明活跃复制其DNA的细胞。

[0225] 在优选的实施方案中,本文所述的抗体可通过一个或多个以下性质表征:

[0226] a) 对CLDN18.2的特异性;

[0227] b) 与CLDN18.2的结合亲和力为约100nM或更小,优选地,约5-10nM或更小,更优选地,约1-3nM或更小,

[0228] c) 能够诱导或介导CLDN18.2阳性细胞上的CDC;

[0229] d) 能够诱导或介导CLDN18.2阳性细胞上的ADCC;

[0230] e) 能够抑制CLDN18.2阳性细胞的生长;

[0231] f) 能够诱导CLDN18.2阳性细胞的凋亡。

[0232] 在特别优选的实施方案中,能够结合CLDN18.2的抗体通过保藏在DSMZ(Mascheroder Weg 1b,31824Braunschweig,Germany;新地址:Inhoffenstr.7B,31824Braunschweig,Germany)且具有以下名称和保藏号的杂交瘤产生:

[0233] a.182-D1106-055,保藏号DSM ACC2737,2005年10月19日保藏

[0234] b.182-D1106-056,保藏号DSM ACC2738,2005年10月19日保藏

[0235] c.182-D1106-057,保藏号DSM ACC2739,2005年10月19日保藏

[0236] d.182-D1106-058,保藏号DSM ACC2740,2005年10月19日保藏

[0237] e.182-D1106-059,保藏号DSM ACC2741,2005年10月19日保藏

[0238] f.182-D1106-062,保藏号DSM ACC2742,2005年10月19日保藏,

[0239] g.182-D1106-067,保藏号DSM ACC2743,2005年10月19日保藏

[0240] h.182-D758-035,保藏号DSM ACC2745,2005年11月17日保藏

[0241] i.182-D758-036,保藏号DSM ACC2746,2005年11月17日保藏

[0242] j.182-D758-040,保藏号DSM ACC2747,2005年11月17日保藏

[0243] k.182-D1106-061,保藏号DSM ACC2748,2005年11月17日保藏

[0244] l.182-D1106-279,保藏号DSM ACC2808,2006年10月26日保藏

[0245] m.182-D1106-294,保藏号DSM ACC2809,2006年10月26日保藏,

[0246] n.182-D1106-362,保藏号DSM ACC2810,2006年10月26日保藏。

[0247] 根据本发明,优选的抗体为通过上述杂交瘤产生且从上述杂交瘤获得的那些抗体;即在182-D1106-055的情况下为37G11,在182-D1106-056的情况下为37H8,在182-D1106-057的情况下为38G5,在182-D1106-058的情况下为38H3,在182-D1106-059的情况下为39F11,在182-D1106-062的情况下为43A11,在182-D1106-067的情况下为61C2,在182-D758-035的情况下为26B5,在182-D758-036的情况下为26D12,在182-D758-040的情况下为28D10,在182-D1106-061的情况下为42E12,在182-D1106-279的情况下为125E1,在182-D1106-294的情况下为163E12和在182-D1106-362的情况下为175D10;以及其嵌合形式和人源化形式。

[0248] 下表中示出优选的嵌合抗体和它们的序列。

	克隆	mAb	同种型	可变区	嵌合抗体	
[0249]	重链	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:14
		163E12	182-D1106-294	IgG3	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:15
		125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:16
		166E2	182-D1106-308	IgG3	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:18
		175D10	182-D1106-362	IgG1	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:17
		45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:19
[0250]	轻链	43A11	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:21
		163E12	182-D1106-294	IgK	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:20
		125E1	182-D1106-279	IgK	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:22
		166E2	182-D1106-308	IgK	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:25
		175D10	182-D1106-362	IgK	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:24
		45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:23
		45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:26
		45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:27
		45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:28

[0251] 在优选的实施方案中,抗体,特别是根据本发明的嵌合形式的抗体,包括含有重链恒定区(CH)的抗体,所述重链恒定区(CH)包含来源于人重链恒定区的氨基酸序列,如由SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列或其片段。在进一步优选的实施方案中,抗体,特别是根据本发明的嵌合形式的抗体,包括含有轻链恒定区(CL)的抗体,所述轻链恒定区(CL)包含来源于人轻链恒定区的氨基酸序列,如由SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或其片段。在特别优选的实施方案中,抗体,特别是根据本发明的嵌合形式的抗体,包括含有CH和含有CL的抗体,所述CH包含来源于人CH的氨基酸序列,如由SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列或其片段,所述CL包含来源于人CL的氨基酸序列,如由SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或其片段。

[0252] 在一个实施方案中,能够结合CLDN18.2的抗体为嵌合的小鼠/人IgG1单克隆抗体,其包括 κ ,鼠可变轻链,人 κ 轻链恒定区同种异型Km(3),鼠重链可变区,人IgG1恒定区,同种异型G1m(3)。

[0253] 在某些优选实施方案中,嵌合形式的抗体包括含有重链和/或含有轻链的抗体,所述重链包含选自SEQ ID NO:14,15,16,17,18,19的氨基酸序列及其片段,所述轻链包含选自SEQ ID NO:20,21,22,23,24,25,26,27,28的氨基酸序列及其片段。

[0254] 在某些优选实施方案中,嵌合形式的抗体包括含有选自以下可能的(i)至(ix)的重链和轻链的组的抗体:

[0255] (i) 所述重链包含由SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列或其片段并且所述轻链包含

由SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列或其片段，

[0256] (ii) 所述重链包含由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列或其片段并且所述轻链包含由SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或其片段，

[0257] (iii) 所述重链包含由SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或其片段并且所述轻链包含由SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列或其片段，

[0258] (iv) 所述重链包含由SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列或其片段并且所述轻链包含由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列或其片段，

[0259] (v) 所述重链包含由SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列或其片段并且所述轻链包含由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列或其片段，

[0260] (vi) 所述重链包含由SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列或其片段并且所述轻链包含由SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列或其片段，

[0261] (vii) 所述重链包含由SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列或其片段并且所述轻链包含由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列或其片段，

[0262] (viii) 所述重链包含由SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列或其片段并且所述轻链包含由SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列或其片段，以及

[0263] (ix) 所述重链包含由SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列或其片段并且所述轻链包含由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列或其片段。

[0264] 如上文使用的“片段”或“氨基酸序列的片段”涉及抗体序列的一部分，即表示在N-和/或C-末端缩短的抗体序列的序列，当其替代抗体中的所述抗体序列时，保留所述抗体与CLDN18.2的结合，并且优选保留如本文所述的所述抗体的功能，如CDC介导的裂解或ADCC介导的裂解。优选地，氨基酸序列的片段包含至少80%，优选至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的来自所述氨基酸序列的氨基酸残基。选自SEQ ID NO:14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27和28的氨基酸序列的片段优选涉及在所述序列中除去N-末端处17、18、19、20、21、22或23个氨基酸的序列。

[0265] 在优选实施方案中，能够结合CLDN18.2的抗体包括重链可变区 (VH)，所述重链可变区 (VH) 包含选自SEQ ID NO:29,30,31,32,33,34的氨基酸序列及其片段。

[0266] 在优选实施方案中，能够结合CLDN18.2的抗体包括轻链可变区 (VL)，所述轻链可变区 (VL) 包含选自SEQ ID NO:35,36,37,38,39,40,41,42,43的氨基酸序列及其片段。

[0267] 在某些优选实施方案中，能够结合CLDN18.2的抗体包括选自以下可能的 (i) 至 (ix) 的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合：

[0268] (i) 所述VH包含由SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列或其片段并且所述VL包含由SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列或其片段，

[0269] (ii) 所述VH包含由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列或其片段并且所述VL包含由SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列或其片段，

[0270] (iii) 所述VH包含由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或其片段并且所述VL包含由SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列或其片段，

[0271] (iv) 所述VH包含由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列或其片段并且所述VL包含由SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列或其片段，

[0272] (v) 所述VH包含由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或其片段并且所述VL包含由

SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列或其片段,

[0273] (vi) 所述VH包含由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或其片段并且所述VL包含由SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列或其片段,

[0274] (vii) 所述VH包含由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或其片段并且所述VL包含由SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列或其片段,

[0275] (viii) 所述VH包含由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或其片段并且所述VL包含由SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列或其片段,

[0276] (ix) 所述VH包含由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或其片段并且所述VL包含由SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列或其片段。

[0277] 在优选实施方案中,能够结合CLDN18.2的抗体包括含有选自以下实施方案(i)至(vi)的一组互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH:

[0278] (i) CDR1:SEQ ID NO:14的位点45-52,CDR2:SEQ ID NO:14的位点70-77,CDR3:SEQ ID NO:14的位点116-125,

[0279] (ii) CDR1:SEQ ID NO:15的位点45-52,CDR2:SEQ ID NO:15的位点70-77,CDR3:SEQ ID NO:15的位点116-126,

[0280] (iii) CDR1:SEQ ID NO:16的位点45-52,CDR2:SEQ ID NO:16的位点70-77,CDR3:SEQ ID NO:16的位点116-124,

[0281] (iv) CDR1:SEQ ID NO:17的位点45-52,CDR2:SEQ ID NO:17的位点70-77,CDR3:SEQ ID NO:17的位点116-126,

[0282] (v) CDR1:SEQ ID NO:18的位点44-51,CDR2:SEQ ID NO:18的位点69-76,CDR3:SEQ ID NO:18的位点115-125,以及

[0283] (vi) CDR1:SEQ ID NO:19的位点45-53,CDR2:SEQ ID NO:19的位点71-78,CDR3:SEQ ID NO:19的位点117-128。

[0284] 在优选实施方案中,能够结合CLDN18.2的抗体包括含有选自以下实施方案(i)至(ix)的一组互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VL:

[0285] (i) CDR1:SEQ ID NO:20的位点47-58,CDR2:SEQ ID NO:20的位点76-78,CDR3:SEQ ID NO:20的位点115-123,

[0286] (ii) CDR1:SEQ ID NO:21的位点49-53,CDR2:SEQ ID NO:21的位点71-73,CDR3:SEQ ID NO:21的位点110-118,

[0287] (iii) CDR1:SEQ ID NO:22的位点47-52,CDR2:SEQ ID NO:22的位点70-72,CDR3:SEQ ID NO:22的位点109-117,

[0288] (iv) CDR1:SEQ ID NO:23的位点47-58,CDR2:SEQ ID NO:23的位点76-78,CDR3:SEQ ID NO:23的位点115-123,

[0289] (v) CDR1:SEQ ID NO:24的位点47-58,CDR2:SEQ ID NO:24的位点76-78,CDR3:SEQ ID NO:24的位点115-123,

[0290] (vi) CDR1:SEQ ID NO:25的位点47-58,CDR2:SEQ ID NO:25的位点76-78,CDR3:SEQ ID NO:25的位点115-122,

[0291] (vii) CDR1:SEQ ID NO:26的位点47-58,CDR2:SEQ ID NO:26的位点76-78,CDR3:SEQ ID NO:26的位点115-123,

[0292] (viii) CDR1:SEQ ID NO:27的位点47-58, CDR2:SEQ ID NO:27的位点76-78, CDR3:SEQ ID NO:27的位点115-123, 以及

[0293] (ix) CDR1:SEQ ID NO:28的位点47-52, CDR2:SEQ ID NO:28的位点70-72, CDR3:SEQ ID NO:28的位点109-117。

[0294] 在优选实施方案中, 能够结合CLDN18.2的抗体包括各自含有选自以下实施方案(i)至(ix)的一组互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH和VL的组合:

[0295] (i) VH:CDR1:SEQ ID NO:14的位点45-52, CDR2:SEQ ID NO:14的位点70-77, CDR3:SEQ ID NO:14的位点116-125, VL:CDR1:SEQ ID NO:21的位点49-53, CDR2:SEQ ID NO:21的位点71-73, CDR3:SEQ ID NO:21的位点110-118,

[0296] (ii) VH:CDR1:SEQ ID NO:15的位点45-52, CDR2:SEQ ID NO:15的位点70-77, CDR3:SEQ ID NO:15的位点116-126, VL:CDR1:SEQ ID NO:20的位点47-58, CDR2:SEQ ID NO:20的位点76-78, CDR3:SEQ ID NO:20的位点115-123,

[0297] (iii) VH:CDR1:SEQ ID NO:16的位点45-52, CDR2:SEQ ID NO:16的位点70-77, CDR3:SEQ ID NO:16的位点116-124, VL:CDR1:SEQ ID NO:22的位点47-52, CDR2:SEQ ID NO:22的位点70-72, CDR3:SEQ ID NO:22的位点109-117,

[0298] (iv) VH:CDR1:SEQ ID NO:18的位点44-51, CDR2:SEQ ID NO:18的位点69-76, CDR3:SEQ ID NO:18的位点115-125, VL:CDR1:SEQ ID NO:25的位点47-58, CDR2:SEQ ID NO:25的位点76-78, CDR3:SEQ ID NO:25的位点115-122,

[0299] (v) VH:CDR1:SEQ ID NO:17的位点45-52, CDR2:的位点SEQ ID NO:1770-77, CDR3:SEQ ID NO:17的位点116-126, VL:CDR1:SEQ ID NO:24的位点47-58, CDR2:SEQ ID NO:24的位点76-78, CDR3:SEQ ID NO:24的位点115-123,

[0300] (vi) VH:CDR1:SEQ ID NO:19的位点45-53, CDR2:SEQ ID NO:19的位点71-78, CDR3:SEQ ID NO:19的位点117-128, VL:CDR1:SEQ ID NO:23的位点47-58, CDR2:SEQ ID NO:23的位点76-78, CDR3:SEQ ID NO:23的位点115-123,

[0301] (vii) VH:CDR1:SEQ ID NO:19的位点45-53, CDR2:SEQ ID NO:19的位点71-78, CDR3:SEQ ID NO:19的位点117-128, VL:CDR1:SEQ ID NO:26的位点47-58, CDR2:SEQ ID NO:26的位点76-78, CDR3:SEQ ID NO:26的位点115-123,

[0302] (viii) VH:CDR1:SEQ ID NO:19的位点45-53, CDR2:SEQ ID NO:19的位点71-78, CDR3:SEQ ID NO:19的位点117-128, VL:CDR1:SEQ ID NO:27的位点47-58, CDR2:SEQ ID NO:27的位点76-78, CDR3:SEQ ID NO:27的位点115-123, 以及

[0303] (ix) VH:CDR1:SEQ ID NO:19的位点45-53, CDR2:SEQ ID NO:19的位点71-78, CDR3:SEQ ID NO:19的位点117-128, VL:CDR1:SEQ ID NO:28的位点47-52, CDR2:SEQ ID NO:28的位点70-72, CDR3:SEQ ID NO:28的位点109-117。

[0304] 在进一步优选的实施方案中, 能够结合CLDN18.2的抗体优选包含抗CLDN18.2的单克隆抗体(优选抗本文所述CLDN18.2的单克隆抗体)的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的一个或多个互补决定区(CDR), 优选至少CDR3可变区, 并且优选包含本文所述的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的一个或多个互补决定区(CDR), 优选至少CDR3可变区。在一个实施方案中, 所述一个或多个互补决定区(CDR)选自本文所述的一组互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。在特别优选的实施方案中, 能够结合CLDN18.2的抗体优选包含抗

CLDN18.2的单克隆抗体(优选抗本文所述CLDN18.2的单克隆抗体)的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,并且优选包含本文所述的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。

[0305] 在一个实施方案中,包含如本文所述的一个或多个CDR,一组CDR或CDR组的组合的抗体包含所述CDR连同其介入其间的框架区。优选地,所述部分还包括至少约50%的第一框架区和第四框架区中的任一个或两个,所述50%为第一框架区的C-末端50%和第四框架区的N-末端50%。通过重组DNA技术进行的抗体构建可导致残基N-或C-末端引入由接头编码的可变区,引入所述接头以促进克隆或其它操作步骤,包括引入接头以将本发明的可变区连接至其它蛋白质序列,包括免疫球蛋白重链、其它可变结构域(例如,在双抗体的产生中)或蛋白标记。

[0306] 在一个实施方案中,包含如本文所述的一个或多个CDR,一组CDR或CDR组的组合的抗体包含在人抗体框架中的所述CDR。

[0307] 本文中提及的包含相对于其重链的特定链、或特定区域或序列的抗体优选涉及其中所述抗体的所有重链包含所述特定链、区域或序列的情形。这相应地适用于抗体的轻链。

[0308] 如本文所用,术语“核酸”旨在包括DNA和RNA。核酸可以为单链的或双链的,但优选为双链的DNA。

[0309] 根据本发明,术语“表达”以其最通用意义使用并且包括RNA或RNA和蛋白质/肽的产生。其也包括核酸的部分表达。此外,可以瞬时或稳定地进行表达。

[0310] 本文相对于特定氨基酸序列(如在序列表中显示的那些)给出的教导应理解为还为了涉及所述特定序列的变体,从而产生功能上等效于所述特定序列的序列,如显示出等同于或相似于特定氨基酸序列的那些性质的氨基酸序列。一个重要的性质为保留抗体结合至其靶标或保持抗体的效应物功能。优选地,当相对于特定序列为变体的序列替代抗体中的特定序列时,所述序列保留所述抗体结合至CLDN18.2,并且优选保留如本文所述的所述抗体的功能,如CDC介导的裂解或ADCC介导的裂解。

[0311] 本领域技术人员将理解的是,特别是CDR、高变区和可变区的序列可被修饰而不会丧失结合CLDN18.2的能力。例如,CDR区与本文指定的抗体区为相同的或高度同源的。预期“高度同源的”为可以在CDR中进行1至5,优选1至4,如1至3或1或2个取代。另外,所述高变区和可变区可被修饰使得它们显示与本文明确公开的抗体区域基本同源。

[0312] 出于发明的目的,氨基酸序列的“变体”包括氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、氨基酸缺失变体和/或氨基酸取代变体。包括在蛋白质的N-末端和/或C-末端缺失的氨基酸缺失变体也被称为N-末端和/或C-末端截短变体。

[0313] 氨基酸插入变体包括将单个或两个或更多个氨基酸插入特定氨基酸序列。在具有插入的氨基酸序列变体的情况下,一个或多个氨基酸残基被插入至氨基酸序列的特定位点,但是也可能为所得产物适当筛选的随机插入。

[0314] 氨基酸添加变体包括一个或多个氨基酸(如1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸)的氨基-和/或羧基-末端融合。

[0315] 氨基酸缺失变体的特征在于从序列中去除一个或多个氨基酸,如去除1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。缺失可以在蛋白质的任何位置。

[0316] 氨基酸取代变体的特征在于序列中的至少一个残基被去除且另一残基插入其位

置。在同源蛋白质或肽之间并不保守的氨基酸序列位点中的修饰和/或用具有相似性质的其它氨基酸替代氨基酸应考虑偏好性。优选地,蛋白质变体中的氨基酸变化为保守性氨基酸变化,即,相似带电的氨基酸或不带电的氨基酸取代。保守性氨基酸变化涉及其中一种氨基酸家族的取代,所述氨基酸家族在其侧链为相关的。天然存在的氨基酸通常被划分为四个家族:酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸),碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸),非极性氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和无电荷极性氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时被共同分类为芳香族氨基酸。

[0317] 优选地,给定氨基酸序列与所述给定氨基酸序列的变体的氨基酸序列之间的相似性,优选同一性为至少约60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。优选考虑氨基酸区域的相似性或同一性,所述氨基酸区域为参考氨基酸序列整个长度的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。例如,如果参考氨基酸序列由200个氨基酸组成,则优选考虑至少约20个氨基酸、至少约40个氨基酸、至少约60个氨基酸、至少约80个氨基酸、至少约100个氨基酸、至少约120个氨基酸、至少约140个氨基酸、至少约160个氨基酸、至少约180个氨基酸或约200个氨基酸的相似性或同一性,优选考虑连续氨基酸的相似性或同一性。在优选的实施方案中,考虑参考氨基酸序列整个长度的相似性或同一性。用于确定序列相似性,优选序列同一性的比对可用本领域已知的工具进行,优选使用最佳序列比对,例如,使用Align,使用标准设置,优选EMBOSS::needle,Matrix:Blosum62,Gap Open 10.0,Gap Extend 0.5。

[0318] “序列相似性”表明为相同的或代表保守性氨基酸取代的氨基酸的百分比。两个氨基酸序列之间的“序列同一性”表明序列之间相同氨基酸的百分比。

[0319] 术语“百分比同一性”旨在表示在最佳比对之后获得的氨基酸残基的百分比,所述氨基酸残基在待比较的两个序列之间为相同的,该百分比为纯统计学的,并且两个序列之间的差异随机分布且分布在其整个长度上。通过将序列最佳比对之后比较这些序列,常规进行两个氨基酸序列之间的序列比较,通过区段或通过“比较窗口”进行所述比较以便鉴定和比较序列相似的局部区域。除人工之外,通过Smith和Waterman (1981, *Adv. Math.* 2, 482) 的局部同源性算法,通过Neddleman和Wunsch (1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443) 的局部同源性算法,通过Pearson和Lipman (1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444) 的相似性搜索方法或通过使用这些算法的计算机程序(GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N and TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), 可以产生用于比较的序列的最佳比对。

[0320] 百分比同一性通过以下计算:确定比较的两个序列之间相同位点的数目,将该数目除以比较的位点的数目,将结果乘以100,从而获得这些两个序列之间的百分比同一性。

[0321] 术语“转基因动物”是指具有包含一个或多个转基因,优选重链转基因和/或轻链转基因,或转染色体(整合或未整合至动物的天然基因组DNA)的基因组,并且优选能够表达所述转基因的动物。例如,转基因小鼠可具有人轻链转基因和人重链转基因或人重链转染色体,使得当用CLDN18.2抗原和/或表达CLDN18.2的细胞免疫时,小鼠产生人抗-CLDN18.2抗体。可将人重链转基因整合至小鼠的染色体DNA,如转基因小鼠,如HuMAb小鼠,如HCo7或

HCo12小鼠的情形,或可将人重链转基因保持在染色体外,如在WO 02/43478中所述的转染色体(如,KM)小鼠的情形。通过经历V-D-J重组和同种型转换,这样的转基因和转染色体小鼠能够产生CLDN18.2的人单克隆抗体的多个同种型(如,IgG,IgA和/或IgE)。

[0322] 如本文使用的“减少”、“降低”或“抑制”意指水平(如表达水平或细胞增殖水平)的整体下降或能够引起水平(如表达水平或细胞增殖水平)整体下降,优选5%或更高,10%或更高,20%或更高,更优选50%或更高,并且最优选75%或更高。

[0323] 诸如“增加”或“增强”的术语优选涉及增加或增强约至少10%,优选至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,更优选至少50%,甚至更优选至少80%并且最优选至少100%,至少200%,至少500%,至少1000%,至少10000%或甚至更多。

[0324] mAb作用的机制

[0325] 虽然以下提供了关于本发明抗体的治疗功效的潜在机制的考虑因素,但不应将其视为以任何方式限制本发明。

[0326] 本文所述的抗体优选与免疫系统的组分相互作用,优选通过ADCC或CDC。也可将本文所述的抗体用于靶向有效载荷(如,放射性同位素、药物或毒素),以直接杀伤肿瘤细胞或可与传统的化学治疗剂协同使用,从而通过互补的作用机制攻击肿瘤,所述作用机制可以包括由于化学治疗剂对T淋巴细胞的细胞毒性副作用而可能已经受损的抗肿瘤免疫响应。然而,本文所述的抗体也可以仅通过结合于细胞表面上的CLDN18.2发挥作用,由此如阻断细胞增殖。

[0327] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

[0328] ADCC描述了如本文所述的效应细胞(特别是淋巴细胞)的细胞杀伤能力,其优选需要由抗体标记的靶细胞。

[0329] 当抗体结合于肿瘤细胞上的抗原且抗体Fc结构域接合免疫效应细胞表面上的Fc受体(FcR)时,优选出现ADCC。已鉴定几种家族的Fc受体,特定的细胞群体特征性地表达限定的Fc受体。可将ADCC视为直接诱导可变量程度上即刻肿瘤破坏的机制,所述即刻肿瘤破坏导致抗原呈递并诱导肿瘤定向的T-细胞响应。优选地,ADCC的体内诱导将导致肿瘤定向T-细胞响应和宿主来源的抗体响应。

[0330] 补体依赖性细胞毒性

[0331] CDC为可由抗体定向的另一细胞-杀伤方法。IgM为补体激活的最有效的同种型。IgG1和IgG3也都在经由经典的补体-激活途径定向CDC上非常有效。优选地,在该级联中,抗原-抗体复合物的形成导致揭露参与诸如IgG分子的抗体分子的C_H2结构域紧密邻近的多个C1q结合位点(C1q为补体C1的三个亚组分之一)。优选地,这些揭露的C1q结合位点将先前低亲和力的C1q-IgG相互作用转化成其中一种高亲合力,这触发了涉及一系列其它补体蛋白质事件的级联,并导致效应-细胞趋化因子/活化剂C3a和C5a的蛋白水解释放。优选地,补体级联在形成膜攻击复合物时终止,这在细胞膜中产生利于水和溶质自由进出细胞的孔。

[0332] 抗体的产生和测试

[0333] 本文所述的抗体可通过多种技术产生,所述技术包括常规的单克隆抗体方法学,如,Kohler和Milstein(Nature 256:495,1975)的标准体细胞杂交技术。虽然体细胞杂交程序为优选的,但原则上,可采用用于产生单克隆抗体的其它技术,如病毒或B-淋巴细胞的致癌转化或使用抗体基因库的噬菌体展示技术。

[0334] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的优选动物系统为鼠系统。小鼠中产生杂交瘤为已非常良好建立的程序。分离用于融合的免疫脾细胞的免疫方案和技术为领域已知的。融合伴侣(如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也为已知的。

[0335] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的其它优选动物系统为大鼠和兔系统(如,在Spieker-Polet等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92:9348(1995)中所述,也参见Rossi等,Am.J.Clin.Pathol.124:295(2005))。

[0336] 在另一优选的实施方案中,使用携带人免疫系统而非小鼠系统的部分的转基因或转染色体小鼠,可生成单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括分别被称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在本文被共同称为“转基因小鼠”。在这样的转基因小鼠中产生人抗体可如W02004035607中对于CD20详细描述进行。

[0337] 然而,生成单克隆抗体的另一策略涉及从产生限定特异性抗体的淋巴细胞中直接分离编码抗体的基因,如参见Babcock等(1996;A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single,isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities)。对于重组抗体工程的详细内容也可参见Welschof和Kraus(Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8)以及Benny K.C.Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1。

[0338] 为生成抗体,如上所述,可用来源于抗原序列(即针对待被定向的抗体的序列)的载体-偶联的肽,重组表达的抗原或其片段和/或表达抗原的细胞的浓缩制剂来免疫小鼠,。可选地,可用编码抗原或其片段的DNA来免疫小鼠。在使用纯化或浓缩的抗原制剂免疫不会产生抗体的情况下,还可用表达抗原的细胞(如细胞系)来免疫小鼠,以促进免疫响应。

[0339] 在通过尾静脉或眶后采血获得的血浆和血清样品的免疫方案的过程中可监测免疫响应。可将具有足够免疫球蛋白滴度的小鼠用于融合。在处死之前3天,可用表达抗原的细胞腹膜内或静脉内强化小鼠,并去除脾脏以增加分泌特异性抗体的杂交瘤的比率。

[0340] 为生成产生单克隆抗体的杂交瘤,可从免疫的小鼠分离脾细胞和淋巴结细胞并融合至适当的永生化细胞系,如小鼠骨髓瘤细胞系。然后,可对所得的杂交瘤进行产生抗原-特异性抗体的筛选。然后,可通过ELISA对单个孔进行分泌抗体的杂交瘤的筛选。通过免疫荧光和FACS分析,使用表达抗原的细胞,可鉴定对抗原具有特异性的抗体。可将分泌抗体的杂交瘤重新接种,再次筛选,如果仍对单克隆抗体呈阳性,则可通过有限稀释进行亚克隆。然后,可将稳定的亚克隆在体外进行培养以在组织培养基中生成用于表征的抗体。

[0341] 使用,例如,如本领域熟知的重组DNA技术和基因转染方法的组合也可在宿主细胞转染瘤中产生抗体(Morrison,S.(1985)Science 229:1202)。

[0342] 例如,在一个实施方案中,可将目标基因(如,抗体基因)连接到表达载体,如在W0 87/04462,W0 89/01036和EP 338 841中公开的GS基因表达系统使用的如真核表达质粒,或本领域熟知的其它表达系统。可将具有克隆的抗体基因的纯化质粒引入真核宿主细胞,如CHO细胞、NS/O细胞、HEK293T细胞或HEK293细胞或者其它真核细胞,如植物来源的细胞、真菌细胞或酵母细胞。用于引入这些基因的方法可为领域中所述的方法,如电穿孔、脂质体(lipofectine/lipofectamine)或其它方法。在将这些抗体基因引入宿主细胞之后,可鉴定和选择表达抗体的细胞。这些细胞代表转染瘤,然后可扩增所述转染瘤的表达水平并扩大规模以产生抗体。可从这些培养物上清液和/或细胞中分离并纯化重组抗体。

[0343] 可选地,克隆的抗体基因可在其它表达系统中表达,所述表达系统包括原核细胞,如微生物体,如大肠杆菌。此外,抗体可在转基因非人动物中(如绵羊和兔的乳汁或母鸡的蛋)或在转基因植物产生;参见如Verma,R.,等(1998) *J. Immunol. Meth.* 216:165-181; Pollock,等(1999) *J. Immunol. Meth.* 231:147-157;以及Fischer,R.,等(1999) *Biol. Chem.* 380:825-839。

[0344] 嵌合化

[0345] 当用毒素或放射性同位素标记时,可将鼠单克隆抗体用作人的治疗性抗体。当重复应用时,非标记的鼠抗体在人中为高免疫原性的,从而导致治疗作用降低。主要的免疫原性由重链恒定区介导。如果各个抗体为嵌合的或人源化的,则鼠抗体在人中的免疫原性可降低或完全避免。嵌合抗体为这样的抗体,所述抗体的不同部分来源于不同的动物物种,如具有来源于鼠抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些抗体。通过将鼠抗体重链和轻链的可变区与人重链和轻链的恒定区连接来实现抗体的嵌合化(如,通过Kraus等在*Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-089603-918-8中所述)。在优选实施方案中,通过将人 κ -轻链恒定区连接至鼠轻链可变区来生成嵌合抗体。在另外优选实施方案中,通过将人 λ -轻链恒定区连接至鼠轻链可变区来生成嵌合抗体。用于生成嵌合抗体的优选重链恒定区为IgG1、IgG3和IgG4。用于生成嵌合抗体的其它优选重链恒定区为IgG2、IgA、IgD和IgM。

[0346] 人源化

[0347] 抗体主要通过氨基酸残基与靶抗原相互作用,所述氨基酸残基位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中。为此,各个抗体之间的CDR内部的氨基酸序列比CDR外部的序列更加多样。因为CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用,通过构建表达载体来表达模拟特异性天然存在的抗体的性质的重组抗体是可能的,所述表达载体包括接枝到来自具有不同性质的不同抗体的框架序列的特异性天然存在的抗体的CDR序列(参见,如,Riechmann,L.等(1998) *Nature* 332:323-327; Jones,P.等(1986) *Nature* 321:522-525;和Queen,C.等(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033)。这样的框架序列可从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库获得。这些种系序列将不同于成熟的抗体基因序列,因为它们不包括完全组装的可变基因,其在B细胞成熟期间通过V(D)J连接形成。种系基因序列在各个均匀分布的可变区处也不同于高亲和力二抗所有组成成分的序列。

[0348] 可使用标准的结合测定(如,ELISA、Western印迹、免疫荧光和流式细胞术分析)来确定抗体结合抗原的能力。

[0349] 为纯化抗体,可将选择的杂交瘤在用于单克隆抗体纯化的2升旋转瓶中生长。可选地,抗体可在基于透析的生物反应器中产生。可过滤上清液,且如果需要,在用蛋白质G-琼脂糖或蛋白质A-琼脂糖亲和层析之前,浓缩上清液。洗脱的IgG可通过凝胶电泳和高效液相色谱检测以确保纯度。可将缓冲液更换成PBS,使用1.43的消光系数可由OD280确定浓度。可等分单克隆抗体并将其保存在-80℃。

[0350] 为确定选择的单克隆抗体是否结合于独特的表位,可使用定向诱变或多位点定向诱变。

[0351] 为确定抗体的同种型,可进行具有不同商品化试剂盒的同种型ELISA(如,Zymed, Roche Diagnostics)。可将微量滴定板的孔用抗-小鼠IgG包被。在封闭之后,将板与单克隆

抗体或纯化的同种型对照在环境温度下反应2小时。然后,可将孔与小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG3、IgA或小鼠IgM-特异性过氧化物酶-偶联的探针反应。在洗涤之后,可将板用ABTS底物(1mg/ml)显色,并在OD405-650分析。可选地,可以如制造商所述使用IsoStrip小鼠单克隆抗体分型试剂盒(Roche,商品目录号1493027)。

[0352] 为证明免疫小鼠的血清中存在抗体或单克隆抗体结合于表达抗原的活细胞,可使用流式细胞术。可将天然表达抗原或在转染之后表达抗原的细胞系和缺少抗原表达的阴性对照(在标准生长条件下生长)与不同浓度的单克隆抗体在杂交瘤上清液或在含1%FBS的PBS中混合,并且可在4℃温育30min。在洗涤之后,APC-或Alexa647-标记的抗IgG抗体可在相同条件下结合至抗原-结合的单克隆抗体作为一抗染色。使用光和侧向散射性质的FACS仪器来对单个活细胞进行门控,通过流式细胞术可分析样品。为在单次测量中区分抗原-特异性单克隆抗体与非特异性结合剂,可采用共转染的方法。可如上所述,对用编码抗原和荧光标记物的质粒瞬时转染的细胞进行染色。可在与抗体-染色的细胞不同的荧光通道中检测转染细胞。因为大部分转染细胞表达两个转基因,所以抗原-特异性单克隆抗体优先结合于表达荧光标记物的细胞,而非特异性抗体以相当的比率结合未转染细胞。除流式细胞术测定以外,还可以使用荧光显微镜的替代测定,或者可以使用荧光显微镜的替代测定来代替流式细胞术测定。正如上文所述,可对细胞进行染色并通过荧光显微镜对其进行检测。

[0353] 为证明免疫小鼠的血清中存在抗体或单克隆抗体结合于表达抗原的活细胞,可使用免疫荧光显微镜分析。例如,在标准生长条件下,自发表达抗原或转染之后表达抗原的细胞系和缺少抗原表达的阴性对照在补充有10%胎牛血清(FCS),2mM L-谷氨酰胺,100IU/ml青霉素和100µg/ml链霉素的DMEM/F12培养基的腔室玻片中生长。然后,用甲醇或多聚甲醛固定细胞或将细胞静置不处理。然后,在25℃,可将细胞与针对抗原的单克隆抗体反应30min。在洗涤之后,可将细胞与Alexa555-标记的抗-小鼠IgG二抗(分子探针)在相同条件下反应。然后,通过荧光显微镜检查细胞。

[0354] 可制备来自表达抗原的细胞的细胞提取物和适当的阴性对照,并对其进行十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳。在电泳之后,将分开的抗原转移至硝酸纤维素膜,封闭并用待测试的单克隆抗体来探测。使用抗-小鼠IgG过氧化物酶可检测IgG结合并用ECL底物显影。

[0355] 抗体与抗原的反应性可进一步通过免疫组织化学以技术人员熟知的方式测试,所述方式为如,使用多聚甲醛或丙酮固定的来自非癌组织或癌组织样品的冰冻切片或用多聚甲醛固定的来自非癌组织或癌组织样品的石蜡包埋组织切片,所述非癌组织或癌组织样品为在常规的手术程序期间从患者获得的,或从携带用自发表达抗原或转染之后表达抗原的细胞系接种的异种移植肿瘤的小鼠获得的。对于免疫染色,根据供应商的说明书,随后可以对抗原有反应的抗体用辣根-过氧化物酶偶联的山羊抗-小鼠或山羊抗-兔抗体(DAKO)对其进行温育。

[0356] 可测试抗体介导吞噬作用的能力以及杀伤表达CLDN18.2的细胞。体外单克隆抗体活性的测试将在测试体内模型之前提供最初的筛选。

[0357] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0358] 简而言之,可将来自健康供体的多形核细胞(PMN)、NK细胞、单核细胞、单核细胞或其它效应细胞通过Ficoll Hypaque密度离心纯化,随后将污染的红细胞裂解。可将洗涤的

效应细胞悬浮在补充有10%热灭活的胎牛血清或者补充有5%热灭活的人血清的RPMI中,并与⁵¹Cr标记的表达CLDN18.2的靶细胞以效应细胞与靶细胞的不同比率相混合。可选地,可以用荧光增强配体(BATDA)来标记靶细胞。可通过荧光计测量具有从死细胞释放的增强配体的铈的高荧光螯合物。另一替代技术可以利用具有荧光素酶的靶细胞转染。然后,加入的荧光黄仅可被活细胞氧化。接着可以不同浓度加入纯化的抗-CLDN18.2 IgG。可将无关的人IgG用作阴性对照。测定可在37℃进行4至20小时,这取决于使用的效应细胞类型。通过测量⁵¹Cr释放或培养物上清液中EuTDA螯合物的存在,可测定样品的细胞溶解。可选地,由荧光黄的氧化引起的发光可为活细胞的量度。

[0359] 还可以以不同组合测试抗-CLDN18.2单克隆抗体,以确定多个单克隆抗体是否增强细胞溶解。

[0360] 补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0361] 使用多种已知的技术可测试单克隆抗-CLDN18.2抗体介导CDC的能力。例如,血清补体可以以技术人员已知的方式从血液获得。为确定mAb的CDC活性,可使用不同的方法。例如,可测量⁵¹Cr释放或可使用碘化丙啶(PI)排除测定评估增加的膜渗透性。简而言之,可洗涤靶细胞,并可将 5×10^5 /ml与不同浓度的mAb在室温或在37℃温育10-30min。然后,可将血清或血浆加入到20%(v/v)的最终浓度并将细胞在37℃温育20-30min。可将来自每一个样品的所有细胞加入到FACS管中的PI溶液中。然后,使用FACSArray,可通过流式细胞术分析立即分析混合物。

[0362] 在替代测定中,可在贴壁细胞上确定CDC的诱导。在该测定的一个实施方案中,在测定之前24h,在用组织-培养平底微量滴定板中以 3×10^4 个细胞/孔的密度接种细胞。第二天,去除生长培养基并将细胞以一式三份与抗体温育。将对照细胞用生长培养基或含0.2%皂苷的生长培养基温育,分别用于确定背景裂解和最大裂解。在室温温育20min之后,去除上清液并将含20%(v/v)人血浆或血清的DMEM(预温热至37℃)加入到细胞中,并在37℃再温育20min。将来自每一个样品的所有细胞都加入到碘化丙啶溶液(10μg/ml)中。然后,将上清液更换为含有2.5μg/ml溴化乙锭的PBS,并使用Tecan Safire,在600nm处测量在520nm处激发后的荧光发射。如下计算特异性裂解的百分比:特异性裂解% = (荧光样品-荧光背景)/(荧光最大裂解-荧光背景) x 100。

[0363] 单克隆抗体诱导的凋亡和细胞增殖抑制

[0364] 为测试引发凋亡的能力,可将单克隆抗-CLDN18.2抗体,例如,与CLDN18.2阳性肿瘤细胞(如SNU-16、DAN-G、KATO-III或CLDN18.2转染的肿瘤细胞)在37℃温育约20小时。可收获细胞,在膜联蛋白-V结合缓冲液(BD biosciences)中洗涤,并与膜联蛋白-V偶联的FITC或APC(BD biosciences)在暗处温育15min。可将来自每一个样品的所有细胞都加入到在FACS管中的PI溶液(10μg/ml于PBS中),并通过流式细胞术立即评估(如上)。可选地,可用商业上可获得的试剂盒来检测由单克隆抗体对细胞增殖的总体抑制。DELTA细胞增殖试剂盒(Perkin-Elmer, Cat.No. AD0200)为在微板中增殖细胞的DNA合成期间基于5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)掺入测量的非同位素免疫测定。使用铈标记的单克隆抗体检测掺入的BrdU。为允许抗体检测,使用Fix溶液将细胞固定并使DNA变性。将未结合的抗体洗掉并加入DELTA诱导剂以将铈离子从标记的抗体解离至溶液中,在溶液中它们与DELTA诱导剂的组分形成高荧光螯合物。所测量的荧光-在检测中利用时间分辨荧光测定术-与每个孔的细胞中的

DNA合成比例。

[0365] 临床前研究

[0366] 还可在体内模型中测试结合于CLDN18.2的单克隆抗体(如,在携带用表达CLDN18.2的细胞系(如DAN-G、SNU-16或KATO-III或转染后表达CLDN18.2的细胞系(如HEK293)接种的异种移植肿瘤的免疫缺陷的小鼠中),以确定其在控制表达CLDN18.2的肿瘤细胞生长中的功效。

[0367] 在体内研究中,在将表达CLDN18.2的肿瘤细胞异种移植至免疫受损的小鼠或其它动物之后,可使用本文所述的抗体来进行。可将抗体施用于无肿瘤的小鼠,随后注射肿瘤细胞,以测量抗体预防肿瘤形成或肿瘤相关症状的作用。可将抗体施用于荷瘤小鼠以确定各自的抗体降低肿瘤生长、转移或肿瘤相关症状的治疗功效。可将抗体应用与其它物质,如细胞抑制性药物、生长因子抑制剂、细胞周期阻断剂、血管生成抑制剂或其它抗体的应用相组合,以确定组合的协同功效和潜在毒性。为分析抗体介导的毒性副作用,可用抗体或对照试剂接种动物并充分研究可能与CLDN18.2-抗体疗法相关的症状。体内应用CLDN18.2抗体的可能的副作用特别包括在表达CLDN18.2的组织(包括胃)处的毒性。识别人和其它物种(如小鼠)中的CLDN18.2的抗体特别可用于预测通过在人中应用单克隆CLDN18.2-抗体介导的潜在副作用。

[0368] 由抗体识别的表位作图可如Glenn E.Morris(“Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology), ISBN-089603-375-9以及Olwyn M.R.Westwood, Frank C.Hay的“Epitope Mapping: A Practical Approach” Practical Approach Series, 248)所详述进行。

[0369] 本文所述的化合物和试剂可以以任何合适的药物组合物形式施用。

[0370] 药物组合物通常以均匀剂量的形式提供,并且可以以自身已知的方式制备。药物组合物可以为如溶液形式或悬浮液形式。

[0371] 药物组合物可以包含盐、缓冲物质、防腐剂、载体、稀释剂和/或赋形剂,所有这些优选为药学上可接受的。术语“药学上可接受的”是指不会与药物组合物的活性组分的作用相互作用的非毒性物质。

[0372] 为药学上不可接受的盐可以用于制备药学上可接受的盐,且包括在本发明内。这种药学上可接受的盐以非限制性方式包括由以下酸制备的那些盐:氢氯酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。也可以以碱金属盐或碱土金属盐,如钠盐、钾盐或钙盐制备药学上可接受的盐。

[0373] 用于药物组合物的合适的缓冲物质包括含乙酸盐、柠檬酸盐、硼酸盐和磷酸盐。

[0374] 用于药物组合物的合适的防腐剂包括苯扎氯铵、氯丁醇、对羟基苯甲酸酯和硫柳汞。

[0375] 可注射的制剂可以包括诸如乳酸林格氏溶液(Ringer Lactate)的药学上可接受的赋形剂。

[0376] 术语“载体”是指天然或合成性质的有机或无机组分,其中组合活性组分以便促进、增强或使其能够应用。根据本发明,术语“载体”也包括一种或多种相容的固体或液体填充物、稀释剂或包封物质,其适于施用于患者。

[0377] 用于胃肠外施用的可能的载体物质为,如无菌水、林格氏溶液、乳酸林格氏溶液、

无菌氯化钠溶液、聚亚烷基二醇、氢化萘,并且特别为生物相容的丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物。

[0378] 当在本文使用时,术语“赋形剂”旨在指明可以在药物组合物中存在且不是活性成分的所有物质,例如,如载体、结合剂、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、乳化剂、缓冲剂、调味剂或着色剂。

[0379] 本文所述的试剂和组合物可以经由任何常规途径(如通过胃肠外施用,包括通过注射或输注)施用。施用优选为胃肠外,如静脉内、动脉内、皮下、皮内或肌内。

[0380] 适合于胃肠外施用的组合物通常包含活性化合物的无菌水性制剂或无菌非水性制剂,其优选与接受者的血液等渗。相容载体和溶剂的实例为林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,通常将无菌的非挥发性油用作溶液或悬浮介质。

[0381] 以有效量施用本文所述的试剂和组合物。“有效量”是指单独或与其它剂量一起实现期望反应或期望作用的量。在治疗特定疾病或特定病患的情况下,期望的反应优选涉及抑制病程。这包括减缓疾病的进程,并且特别为中断或逆转疾病的进程。疾病或病患治疗中的期望反应还可以延迟所述疾病或所述病患的发作或者预防所述疾病或所述病患的发作。

[0382] 本文所述的试剂或组合物的有效量将取决于待治疗的病患、疾病的严重性、患者的个体参数(包括年龄、生理状况、尺寸和重量)、治疗的持续时间、伴随疗法的类型(如果存在的话)、具体的施用途径以及相似因素。因此,本文所述试剂的施用剂量可以取决于不同的这类参数。在用最初剂量使患者中的反应不充足的情况下,可以使用较高剂量(或通过不同的更局部化的施用途径实现的有效较高剂量)。

[0383] 可将本文所述的试剂和组合物施用于患者(如,体内)以治疗或预防多种病症,诸如本文所述的那些病症。优选的患者包括患有通过施用本文所述的试剂和组合物可得以修正(corrected)或减轻病症的人患者。这包括涉及特征为CLDN18.2表达模式改变的细胞的病症。

[0384] 例如,在一个实施方案中,可将本文所述的抗体用于治疗患有癌症疾病的患者,例如,如本文所述的特征为存在表达CLDN18.2的癌细胞的癌症疾病。

[0385] 还可以将根据本发明所述的药物组合物和治疗方法用于免疫或接种疫苗以预防本文所述的疾病。

[0386] 通过以下实施例进一步阐明本发明,不应将所述实施例解释为限制本发明的范围。

实施例

[0387] 实施例1:材料和方法

[0388] 1. 抗体

[0389] 表1:本文使用的抗体

	抗体	供应商 (商品目录号)	靶标	结合位点	克隆类型	物种	应用
[0390]	IMAB362	Ganymed	CLDN18.2	N-末端	单克隆	嵌合	ADCC, CDC, IF
	抗 密 蛋 白 18(MID)	Zymed #38-8100	CLDN18.1 CLDN18.2	C-末端 aa220-246	多克隆	兔	IF, IHC
	抗密蛋白 18 (C-末端)	Zymed #38-800	CLDN18.1 CLDN18.2	C-末端 aa240-262	多克隆	兔	WB
	43-14A	Ganymed	CLDN18.2	C- 末 端 aa248-262	单克隆	小鼠	IHC
[0391]	35-22A	Ganymed	CLDN18.2	C- 末 端 aa248-262	单克隆	小鼠	IF, IHC
	抗人 EPR1394Y	抗体在线	人 MHC-I	-	单克隆	兔	IHC
	β -肌动蛋白	SIGMA	肌动蛋白		单克隆	小鼠	WB

[0392] 2. 免疫组织化学 (IHC)

[0393] 使用前, 将组织切片(4 μ m厚)于2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0394] 在脱蜡处理之前, 将切片在58-60 $^{\circ}$ C下于干燥箱中保温1小时以熔化石蜡并定量去除水分, 从而改善组织粘附于玻片上(“烘干”)。

[0395] 脱蜡

[0396] 在熔化和干燥之后, 将玻片使用两次二甲苯步骤脱蜡(5分钟)并使用梯度降低的乙醇再水化(在环境温度为20-27 $^{\circ}$ C下):

[0397] • 在二甲苯浴中保持5(\pm 1)分钟;

[0398] • 将该步骤在新鲜浴中重复一次;

[0399] • 过量液体;

[0400] • 在无水乙醇中保持5(\pm 1)分钟;

[0401] • 用新鲜浴将该步骤重复一次;

[0402] • 去除过量液体;

[0403] • 在96%乙醇中保持5(\pm 1)分钟;

[0404] • 用新鲜浴将该步骤重复一次;

[0405] • 去除过量液体;

[0406] • 在80%乙醇中保持5(\pm 1)分钟;

[0407] • 去除过量液体;

[0408] • 在70%乙醇中保持5(\pm 1)分钟;

[0409] • 去除过量液体;

[0410] • 在蒸馏水或去离子水中保持5分钟;

[0411] 表位修复和猝灭

[0412] 在去除石蜡之后, 通过使用热诱导的表位修复方法来修复靶表位。因此, 将玻片放在装有200ml修复缓冲液(10mM柠檬酸缓冲液; 0.05%吐温-20; pH 6)的染色广口瓶中并在120 $^{\circ}$ C下于高压锅(PASCAL, Dako)中温育10分钟。然后, 从高压锅中取出广口瓶并在室温下于表位修复溶液中冷却10(\pm 1)min。在洗涤缓冲液(1x PBS)中漂洗玻片。

[0413] 在冷却之后, 将切片移入装有200ml猝灭溶液(含0.3%过氧化物酶的1x PBS)的染色广口瓶中并在室温温育15min, 随后在新鲜洗涤缓冲液中进行2x5分钟的洗涤步骤。

[0414] 封闭和抗体温育

[0415] 去除过量的洗涤缓冲液,将玻片用200 μ l封闭缓冲液(含10%山羊血清的1x PBS)覆盖,并在RT温育30分钟。去除封闭缓冲液并更换为200 μ l稀释的抗体溶液(在封闭缓冲液中稀释)。将玻片与一抗在2-8 $^{\circ}$ C温育过夜:

[0416] 表2:用于组织学分析的一抗的稀释-在组织学测定中使用的抗体的储备浓度和最终浓度

一抗稀释					
抗体	储备浓度	亚型	表位	表位序列	最终浓度
[0417] mumAb 43-14A	1 mg/ml	IgG2b	CLDN18 c-末端	TEDEVQSYPSKHDYV	0.5 μ g/mL
mumAb 35-22A	1 mg/ml	IgG2b	CLDN18 c-末端	TEDEVQSYPSKHDYV	0.2 μ g/mL

[0418] 第二天,去除一抗溶液,并用洗涤缓冲液洗涤切片3x 5min。然后,去除过量的洗涤缓冲液,加入200 μ l即用型二抗溶液(Power Vision HRP山羊- α -小鼠;Immunologic;NL)。将玻片在RT温育30min。去除过量的液体并在新鲜洗涤缓冲液中洗涤玻片3x 5min。

[0419] 底物反应和复染

[0420] 在去除过量的洗涤缓冲液之后,将切片用大约50-150 μ L新鲜制备的底物-发色溶液(VectorRed;Vector Labs)覆盖2min。去除过量的底物并用去离子水在广口瓶中温育玻片1-5min。

[0421] 随后,通过将切片浸入含200ml Mayer's 苏木精的广口瓶中保持2min进行组织的复染。然后,将切片置于自来水中保持5-10min以使细胞核变蓝。

[0422] 脱水和封固

[0423] 在进行复染之后,使用梯度升高的乙醇使切片脱水:

[0424] • 浸泡在70%乙醇中(大约5-10秒)

[0425] • 浸泡在80%乙醇中(大约5-10秒)

[0426] • 浸泡在96%乙醇中(大约5-10秒)

[0427] • 浸泡在96%乙醇中(大约5-10秒)

[0428] • 浸泡在无水乙醇中(大约5-10秒)

[0429] • 在二甲苯保持5min

[0430] • 在二甲苯保持5min

[0431] 为了固定样品,使用无水封固剂(X-TRA-Kit,Medite)。由最后一个装有二甲苯的广口瓶直接封固玻片并在RT下空气干燥。

[0432] 表3:用于组织学分析的组织微阵列

TMA ID	分销商	病例的数目	核心的数目	核心尺寸	厚度
[0433] PA961; 胰腺癌和正常组织微阵列	Biocat	96	96	1.5 mm	5 μ m
PA802; 多个胰腺癌组织阵列,单核心/病例	Biocat	78	80	1.5 mm	5 μ m
BIC14011; 胰腺上皮内瘤形成组织微阵列	Biocat	24	48	1.5 mm	5 μ m

[0434] 3. 细胞培养

[0435] 根据原始数据表和以下标准组织培养方法,将本文所示实验中的所有胰腺癌细胞

系和另外的对照细胞系在培养基中培养。表4中概述了条件。对于所有新获得的细胞系，测试细胞的支原体污染并制备主要的细胞库。

[0436] 表4. 人胰腺癌和对照细胞系的细胞培养条件

[0437] 1:LVT是指用慢病毒稳定转导的用于表达CLDN18.2的细胞系。

[0438] 2:在提及的烧瓶或培养皿中培养细胞2天或3天的接种密度。

[0439] 3:adM:将来自皮下肿瘤的细胞再培养

细胞系 ¹	烧瓶 / 培养皿	培养基	温育	接种密度	
				2天 ²	3天 ²
[0440] AsPC-1	T150	RPMI + 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	1e7	8e6
BxPC3 (ATCC)	T150	RPMI + 10mM HEPES + 1 mM 丙酮酸钠 + 4.5 g/L 葡萄糖(总计) + 10% FCS Gold	5% CO ₂ , 37°C	8e6	7e6

[0441]

细胞系 ¹	烧瓶 / 培养皿	培养基	温育	接种密度	
				2天 ²	3天 ²
BxPC3-LVT (ECACC)	T150	RPMI + 10 mM HEPES + 1 mM 丙酮酸钠 + 1x 碳酸氢钠 + 4.5 g/L 葡萄糖 + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 0.5 μg/ml(新鲜) 灭瘟素	5% CO ₂ , 37°C	1e7	8e6
BxPC3-LVT-荧光素酶	T150	RPMI + 10 mM HEPES + 1mM 丙酮酸钠 + 1x 碳酸氢钠 + 4.5 g/L 葡萄糖 + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 0.5 μg/ml 灭瘟素(新鲜) + 40 μg/ml 潮霉素(新鲜)	5% CO ₂ , 37°C	1e7	8e6
CAPAN1	T150	RPMI + 20% FCS	5% CO ₂ , 37°C	8e6	8e6
CAPAN1-LVT	T150	RPMI + 20% FCS + 1% Pen/Strep + 2.5 μg/ml 灭瘟素(新鲜)	5% CO ₂ , 37°C	1e7	8e6
CAPAN1-LVT-	T150	RPMI + 20% FCS + 1% Pen/Strep + 2.5 μg/ml 灭瘟素(新鲜) + 40 μg/ml 潮霉素	5% CO ₂ , 37°C	1e7	8e6
CHO-K1p740 MACS/FACS(24H5) Luci #2A5	15 cm	DMEM:F12 + 1% Pen/Strep + 10% FCS + 1.5mg/mL 遗传霉素(G-418)	7.5 % CO ₂ , 37°C	1.6e6	7e5
CFPAC-1	T150	伊斯科夫 (Iscove's) MDM + 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	5e6	3e6
DANG 1C5F2	15 cm	RPMI + 1% Pen/Strep + 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	4e6	2e6
DANG 1C5F2 LVT	15 cm	RPMI + 1% Pen/Strep + 10% FCS + 1 μg/ml 灭瘟素(新鲜)	5% CO ₂ , 37°C	4e6	2e6
HEK293p740#A5	15 cm	DMEM:F12 + 1% Pen/Strep + 10% FCS + 1.5mg/mL 遗传霉素(G-418)	7.5% CO ₂ , 37°C	8e6	5e6
HPAC	T150	DMEM:F12 +15 mM HEPES + 0.002mg/ml 人胰岛素 + 10 ng/mL EGF + 5% FCS	5% CO ₂ , 37°C	6e6	4e6
HPAC-LVT	T150	DMEM:F12 +15 mM HEPES + 0.002 mg/ml 人胰岛素 + 10 ng/mL EGF + 5% FCS + 1% Pen/Strep + 3.5 μg/ml 灭瘟素(新鲜)	5% CO ₂ , 37°C	6e6	4e6
HPAF-II	T150	MEM + 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	5e6	5e6
HUP-T3	T150	MEM + 1x MEM NEAA + 1 mM 丙酮酸钠 + 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	6e6	3e6
HUP-T4	T150	MEM + 1x MEM NEAA + 1 mM 丙酮酸钠 + 20% FCS	5% CO ₂ , 37°C	6e6	4e6
KATO III FGF-BP #12 adM ³	T150	RPMI + 1% Pen/Strep + 4 mM Glutamax(总计) + 20% FCS	7.5 % CO ₂ , 37°C	8e6	5e6
KP-2	T150	RPMI + 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	8e6	6e6
MiaPaCa-2	T150	MEM+ 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	1e7	8e6
MiaPaCa-2-LVT	T150	MEM+ 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1.5 μg/ml 灭瘟素	5% CO ₂ , 37°C	1e7	8e6
NUGC-4 sub 10cH11 subE10 Luci#2	T150	RPMI + 1% Pen/Strep + 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	8e6 C	5e6 C

细胞系 ¹	烧瓶 / 培养皿	培养基	温育	接种密度	
				2天 ²	3天 ²
Panc-1	T150	DMEM + 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	6e6 C	4e6 C
Panc03.27	T150	RPMI + 10 mM HEPES + 1 mM 丙酮酸钠 + 4.5 g/L 葡萄糖 + 0.01mg/mL 胰岛素 + 15% FCS	5% CO ₂ , 37°C	6e6 C	4e6 C
Panc05.04	T150	RPMI + 10 mM HEPES + 1 mM 丙酮酸钠 + 4.5g/L 葡萄糖 + 0.01 mg/mL 胰岛素 + 15% FCS	5% CO ₂ , 37°C	6e6 C	4e6 C
Panc05.04 亚克隆	T150	RPMI + 10 mM HEPES + 1 mM 丙酮酸钠 + 4.5 g/L 葡萄糖 + 0.01 mg/ml 胰岛素 + 15% FCS	5% CO ₂ , 37°C	7e6 C	5e6 C
Patu8902	T150	DMEM+ 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	5e6 C	4e6 C
Patu8902-LVT	T150	DMEM+ 10% FCS + 1% Pen/Strep + 9 μg/ml 灭瘟素(新鲜)	5% CO ₂ , 37°C	5e6 C	4e6 C
Patu8988T	T150	DMEM + 5% 马血清 + 5% FCS	5% CO ₂ , 37°C	3e6 C	1e6 C
Patu8988S	T150	DMEM + 5% 马血清 + 5% FCS	5-7.5% CO ₂ , 37°C	1.5e7	1e7
Su86.86	T150	RPMI + 10 mM HEPES + 1 mM 丙酮酸钠 + 4.5g/L 葡萄糖 + 10% FCS	5% CO ₂ , 37°C	5e6	3e6
Suit-2	T150	RPMI + 10% FCS(每次分离使用新的烧瓶)	5% CO ₂ , 37°C	1.5e7	1.2e7
Suit-2-LVT	T150	RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 5 μg/ml 灭瘟素(新鲜)(每次分离使用新的烧瓶)	5% CO ₂ , 37°C	1.5e7	1.2e7
SW1990	T150	莱博维茨(Leibovitz's)L-15 + 10% FCS	37°C	4e6	3e6
YAPC	T150	RPMI + 10% FCS Gold	5% CO ₂ , 37°C	1.5e7	1e7
YAPC-LVT	T150	RPMI + 10% FCS Gold + 1% Pen/Strep + 0.5 μg/ml 灭瘟素(新鲜)	5% CO ₂ , 37°C	1.5e7	1e7

[0442] 4. 胰腺细胞系的荧光素酶转染

[0444] 为了ADCC测定,用荧光素酶RNA瞬时转染胰腺癌细胞系。用ARCA帽产生该荧光素酶RNA(pST1-luc2mut-2hBgUTR-A121-EciI载体(pST1-109))并将其溶解在H₂O中。将RNA以22μl的等分试样于-80°C保存。对于所有的胰腺细胞系,确定最佳的电穿孔条件,从而产生最高的转染率和细胞活力。在每个测定中,用PBS/5mM EDTA分离细胞,并将溶解于250μl X-Vivo的2.5x10⁶个细胞与10μg RNA在冰冷的比色皿中混合。将细胞立即电穿孔(GenePulser Xcell, Biorad)并重悬于预先温热的测定介质中,从而将细胞调整成5x10⁵个细胞/ml。针对所有细胞系的测试电穿孔条件:

[0445] EP1:250V,475μF

[0446] EP2:200V,300μF

[0447] EP3:150V,300μF

[0448] EP4:200V,400μF

[0449] EP5:250V,950μF

[0450] 对照:0V,0μF

[0451] 在电穿孔之后,使用CASY或通过用台盼蓝对细胞进行染色并确定死细胞在

Neubauer室中的百分比来直接测定细胞的活力。将细胞以一式四份接种在白色的96-孔板中(2.5×10^4 个细胞/孔)并温育24h。随后,在加入荧光素混合物保持90min之后,在光度计(Tecan Infinite200)中测量荧光素酶活性。如果获得的RLU值 >1.000 ,则转染成功,因此ADCC可测量。

[0452] 5. 定量实时PCR(Q-PCR)

[0453] 为了分离来自胰腺癌细胞系的RNA,将细胞接种在10cm培养皿中并生长2-3天直至80%汇合。根据RNeasy®Mini Kit(Qiagen)提供的说明书分离RNA。按照SuperScript®III First Strand试剂盒(Invitrogen)提供的制造商说明书进行cDNA制备。将RNA和cDNA样品保存在 -80°C 。

[0454] 通过使用区分CLDN18.1与CLDN18.2异构体的PCR引物#5054s(5'-AGAGAGCTCTGGCTTCACCGAGTG-3')和#5060as(5'-CCAG AAGTTAGTCACCAGCATGTTGG-3')在40个循环的PCR反应中通过扩增oligo(dT)-引导的cDNA来进行CLDN18.2转录物的定量分析。用SYBR Green(QuantiTect SYBR Green PCR Kit,Qiagen)制备反应,所述SYBR Green插入双链DNA中。使用ABI-PRISM7900Sequence Detection System仪器和软件(Applied Biosystems)来进行反应和测量。

[0455] 使用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 算法计算CLDN18转录物相对于看家基因HPRT的相对表达水平。

[0456] 6. 蛋白质印迹分析

[0457] 为了分离胰腺癌细胞系的蛋白质,将细胞接种在10cm培养皿中并生长2-3天直至80%汇合。通过加入800 μl 4x SDS样品缓冲液(34%甘氨酸,250mM Tris pH6.8,5% β -巯基乙醇,8.2%SDS)使细胞裂解。为使基因组DNA分裂,将蛋白质样品在以下条件超声(sonified):输出控制:水平1,工作周期:70%保持20-25秒。在分光光度计中测量蛋白质浓度(在280nm处吸光)并在使用前将样品保存在 -80°C 。

[0458] 为在蛋白质印迹中检测CLDN18.2表达,在两个固定的玻璃板之间制备用于分离的12.5%聚丙烯酰胺凝胶(对于2块小的凝胶4.1ml 29:1丙烯酰胺/双丙烯酰胺,100 μl 10%SDS,2.5ml Tris pH8.8,3.2ml H_2O ,100 μl APS,10 μl TEMED)。在聚合之后,用浓缩胶(1.5ml 29:1丙烯酰胺/双丙烯酰胺,100 μl 10%SDS,2.5ml Tris pH6.8,5.8ml H_2O ,100 μl APS,10 μl TEMED)覆盖凝胶并将凝胶梳子置于玻璃板之间。在聚合之后,将凝胶用75 μg 各个蛋白质样品上样,所述蛋白质样品通过加入(1:20)4x SDS-样品缓冲液(250mM Tris-HCL,34%甘油,8.2%SDS,pH 6.8)和7.5 μl 大小标记物混合物(与6 μl SeaBlue Plus2 Prestained Standard混合的1.5 μl Magic Mark XP Western Standard)来制备。将凝胶在80V下于1x SDS电泳缓冲液(25mM Tris,0.192M甘氨酸,0.1%SDS)中电泳30min以及在180V下于1x SDS电泳缓冲液(25mM Tris,0.192M甘氨酸,0.1%SDS)中电泳60min。在硝酸纤维素膜上的凝胶半干印迹在160mA下于1x转移缓冲液(25mM Tris,0.192mM甘氨酸,20%MeOH)中进行90min。首先在5%奶粉/PBS中封闭印迹并在1%奶粉/PBS的溶液中加入一抗(0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗-密蛋白18(C-末端)或0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗- β -肌动蛋白)。将印迹在 4°C 温育过夜,在1x PBS/0.05%吐温20中洗涤3次10min,然后与标记的二抗在室温下于1%奶粉/PBS(以1:1000稀释的山羊-抗-兔IgG(FC))中温育1h。将印迹在1x PBS/0.05%吐温20中再次洗涤3次,通过加入1-3ml检测溶液(Pico and Dura Detection System(Pierce)保持1min并根据GA_056_Chemolumineszenzentwickler LAS3000在LAS-3000检测箱(增量:10秒,间隔时间:10秒,灵

敏度:高)中扫描印迹来进行检测。

[0459] 7. 流式细胞术 (FACS)

[0460] 用PBS/5mM EDTA或胰蛋白酶/EDTA从70-85%汇合的指数生长的培养物中来收获细胞。将细胞计数,离心5min(468g)并将沉淀物重悬于FACS缓冲液中(含2%FCS,0.1%叠氮化钠的PBS),将浓度调节至 2×10^6 /ml。将100 μ l细胞接种在圆底96孔板中并再次离心(5min,468g)。将IMAB362(或同种型对照利妥昔单抗)在50 μ l FACS-缓冲液中系列稀释0.1-200 μ g/ml(11个稀释梯度+无抗体对照),并在4 $^{\circ}$ C加入至细胞中保持30min。然后,在每个孔加入200 μ l FACS缓冲液并将板离心(5min,468g)。去除上清液并重复洗涤。将山羊抗-人二抗(FC特异性,与APC偶联的F(ab')₂(Dianova))在FACS缓冲液中稀释(1:100)并在每个孔加入30 μ l。将板在4 $^{\circ}$ C温育30min。在温育之后,将板用200 μ l FACS缓冲液再洗涤两次并将沉淀物最终重悬于100 μ l FACS缓冲液中,用于根据GA_018_BD FACS Array生物分析仪测量FACS Array Bioanalyzer(BD)。

[0461] 8. 慢病毒转导

[0462] 慢病毒载体构建:慢病毒属于RNA病毒,其稳定地整合入人基因组DNA的分裂细胞和非分裂细胞。将载体pLenti6.4(Invitrogen)用作主链。其含有用于选择阳性转导的细胞的灭瘟素基因。将融合至EF1 α 启动子的CLDN18.2克隆入生成pL64B42E(EF1 α -hClaudin18.2)-灭瘟素的载体的重组区域中(图1)。

[0463] 细胞系的选择:根据文献数据或先前体内测试的数据选择细胞系。选择标准包括在裸鼠皮下均匀生长和20-100天的治疗窗。整合已显示出CLDN18.2mRNA弱表达的三种细胞系(DANG,YAPC和BxPC3)和根据文献能够转移的三种细胞系(MiaPaCa-2,Patu8902和Suit-2)。随机选择两种其它的细胞系(HPAC,CAPAN1,已知在体内皮下肿瘤均匀生长)。

[0464] 灭瘟素选择条件的确定:对于所有细胞系,在进行转导之前确定慢病毒转导之后选择细胞所需的灭瘟素浓度。将胰腺癌细胞以高密度接种在6孔板中,在24h之后产生80-90%的汇合。将灭瘟素(储备液:10mg/ml,Invitrogen)以0.5-12 μ g/ml(5个稀释梯度+无灭瘟素对照)的范围渐增浓度加入至孔中。每3-4天更换培养基并在去除培养基之前在显微镜中分析细胞。记录死亡细胞的量和活细胞的状况。将细胞培养14天。优选在14天之后产生100%凋亡细胞的最低灭瘟素浓度来选择慢病毒转导的细胞。表4中示出了所建立的每一个LVT细胞系所需的灭瘟素浓度。

[0465] 包膜选择:对于慢病毒转导,将GFP-慢病毒对照载体pL64B42E-(EF1 α -GFP)-blast包装入不同的包膜颗粒(VSV-G,GALV,RD114,Mokola-G和Rabies-G)。取决于包膜中存在的蛋白质以及细胞膜的组成,粘附至靶标癌细胞或多或少有效。对于所有的胰腺癌细胞系,VSV-G包膜显示出最高的转导效率(68.5-91.2%)(表5)。因此,将CLDN18.2表达载体pL64B42E(EF1 α -hClaudin18.2)-灭瘟素包装入VSV-G包膜。感染生产者细胞并从培养基以高滴度(3.86×10^7 个颗粒/ml)分离病毒。将病毒上清液保存在-80 $^{\circ}$ C。

[0466] 表5:通过慢病毒转导生成CLDN18.2过表达的胰腺癌细胞系

细胞系	包膜测试(GFP 对照病毒载体)					pL64B42E(EF1 α -hCLAudin18.2) ¹ 的转导效率
	VSV-G	GALV	RD114a	Mokola-G	Rabies-G	
BxPC3-LVT	91.1	29.5	21.4	61.4	57.1	92.8%
CAPAN1-LVT	83.7	12.3	31.7	24.3	23.1	89.6%
[0467] DANG-LVT	91.2	41.3	13.8	33.7	41.4	87.5%
HPAC-LVT	77.7	38.4	49.6	72.8	61.5	97.3%
MiaPaCa-2-LVT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	96.3%
Patu8902-LVT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	93.0%
Suit2-LVT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	92.2%
YAPC-LVT	68.5	41.3	13.8	33.7	41.4	82.2%

[0468] ¹通过将载体包装入VSV-G包膜颗粒获得的效率,在感染之后2天测量。

[0469] 胰腺癌细胞系的慢病毒转导:对于胰腺癌靶细胞系的感染,用200 μ l 1xretrofectin® (20 μ g/ml, Takara Inc.) 包被24孔板,用parafilm®密封板并在4°C温育3-16h。用200ml PBS洗涤板并在RT用PBS/2%BSA封闭30min。将板再次洗涤,并通过在15°C下以2500rpm离心25min,上样300 μ l病毒上清液。去除上清液并将重复上样3次。将板用PBS最终洗涤一次并在每个孔中接种低传代的靶细胞。对于所有胰腺癌细胞系,每24孔接种 5×10^5 - 1×10^7 个细胞。将板在37°C温育2天。随后,分离细胞并使用FITC-标记的IMAB362抗体通过FACS确定转导效率。扩增细胞并对每个细胞系制备主要的细胞库。

[0470] 9. ADCC测定

[0471] 将胰腺癌靶细胞提前两天接种在烧瓶中以在ADCC开始的当天获得80-90%汇合的培养物。用荧光素酶RNA转染胰腺癌细胞并在50 μ l测定介质(含有20mM HEPES的如表4所述的培养基)中以 1×10^4 个细胞/孔的密度将其接种在白色96孔板中。另外,在所有测定中接种NUGC-4sub10cH11subE10Luci#2细胞(8000个细胞/孔)作为阳性对照。在加入抗体之前将细胞培养4-6h并纯化PBMC。

[0472] 由从健康供体获得的新鲜人血沉棕黄层来制备PBMC。将约3x 20-25ml血液用PBS稀释(1:2)并在50ml Falcon管中于4x 15ml Ficol-Paque Plus (GE Healthcare)上小心地分层。梯度离心(25min, 700g)。在离心之后,从中间层收集外周血单核细胞(PBMC),在PBS/2mM EDTA中洗涤,离心(5min, 468g),在PBS/2mM EDTA中再次重悬并离心(10min, 208g)以去除血小板。将沉淀重悬于50ml PBS/2mM EDTA中并计数细胞。将PBMC离心(5min, 468g)并且对于加入胰腺细胞而言,以 1.6×10^7 个细胞/ml的浓度重悬于X-Vivo-15培养基中,对于加入NUGC-4 sub 10cH11subE10 Luci#2细胞而言,以 1.28×10^7 个细胞/ml的浓度重悬于X-Vivo-15培养基中。

[0473] 将抗体(IMAB362和同种型对照抗体ch78H11 1H6)系列稀释(4.5倍)10次,从而产生200 μ g/ml-0.26ng/ml的浓度范围。将每一种稀释液25 μ l以一式四份加入至靶细胞中。在培养基和裂解对照孔中加入不含抗体的PBS。随后,在每个孔中加入25 μ l PBMC(E:T比=40:1)并将板在37°C, 5%CO₂下温育24h \pm 1h。

[0474] 第二天,将10 μ l 8%Triton X100/PBS溶液加入至裂解对照孔中并在所有其它孔中加入10 μ l PBS。最后,在每个孔中加入50 μ l新鲜制备的荧光素储备液(160mM HEPES, 1x PBS, 3.84mg/ml D-荧光素(BD Biosciences))并将板在RT下于暗处温育80min。使用微量滴定板读数器(Infinite200, Tecan, Switzerland)测量通过活细胞的荧光素酶由荧光黄氧化引起的发光。细胞毒性的百分比使用下式计算:

[0475] 特异性杀伤(%) = $100 - [(RLU_{\text{样品}} - RLU_{\text{triton}}) / (RLU_{\text{培养基对照}} - RLU_{\text{triton}})] \times 100$

[0476] 10. CDC

[0477] 如下进行CDC。

[0478] 将靶细胞(CHO-K1 p740 MACS/FACS (24H5) p3151 Luci#2A5)接种在96孔白色测定板的50 μ l测定介质中(10,000个细胞/孔),并且在加入样品之前,在37 $^{\circ}$ C,7.5%CO₂下于95%rH中生长24h+20min。每个96孔测定板包括总共3种不同的阴性对照(热灭活的血清,含有和不含IMAB362的血清以及具有同种型对照抗体(利妥昔单抗)的血清)和含有500ng/ml IMAB362的健康人血清库(lot#31032011)的阳性对照。在反应结束时,通过将0.8%Triton X100加入第二介质对照孔中引起全部裂解来形成另外的阳性对照。96孔测定板中的一种包括通过7个系列3.16倍稀释的IMAB362(10 000-31.8ng/ml)形成的功能性阳性对照。该对照产生靶细胞的S状剂量-依赖性裂解。在96孔深孔稀释板中同时制备所有样品(每个为200 μ l)。通过反向移液从每孔中取样3次以在测定板中生成一式三份。在将50 μ l每个测试项和对照项加入测定板之后,将板在37 $^{\circ}$ C,7.5%CO₂下于95%rH中温育80+5min。

[0479] 除了Triton-裂解对照孔外,向每孔加入10 μ l PBS。向每一个Triton-裂解对照孔加入10 μ l 0.8%Triton/PBS溶液。制备荧光素底物溶液(6114 μ l Aqua bidest,2496 μ l HEPES (1M),1998 μ l 1xDPBS,4992 μ l D-荧光素储备液(12mg/ml))。向每个孔中加入50 μ l荧光素底物溶液。将板在37 $^{\circ}$ C,7.5%CO₂下于95%rH中温育45min。将在微量滴定板读数器中测量板。

[0480] • 使用下式计算补体依赖性裂解:

[0481] 特异性裂解(%) = $100 - [(RLU_{\text{样品}} - RLU_{\text{triton}}) / (RLU_{\text{HSCM}} - RLU_{\text{triton}})] \times 100$

[0482] 测试胰腺癌细胞系的改进:

[0483] • 使用最佳条件用荧光素酶RNA转染胰腺癌细胞。对于每一个测试的细胞系,每孔接种 1.5×10^4 个细胞。

[0484] • 由于大部分胰腺癌细胞系难以分离和单一化,所以在第1天使用胰蛋白酶。

[0485] • 将测定板中的胰腺癌细胞在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂中培养。

[0486] • 用化学治疗剂预处理的细胞的CDC测定用以下浓度的IMAB362或作为同种型对照抗体ch78H11 1H6抗体进行:640000,160000,40000,10000,2500,625,156 and 39ng/ml。

[0487] 11. 增殖的抑制

[0488] 为分析每一种化学治疗剂的剂量-响应曲线,进行增殖测定。

[0489] 表6:分析吉西他滨或奥沙利铂功效的胰腺癌细胞系

[0490] 分析对每一种胰腺癌细胞系应用不同浓度的吉西他滨或奥沙利铂的增殖的抑制。

[0491]

细胞系	接种的细胞/孔
BxPC3-LVT	5000
BxPC3	5000
Panc05.04	5000
BxPC3-LVT	5000
CAPAN1-LVT	5000
DANG	2000
MiaPaCa-2-LVT	7000

Patu8988S	10000
Patu8988Sp3151#6	15000

[0492] 将细胞接种在96孔板中,并在4-6小时之后以以下浓度加入吉西他滨或奥沙利铂:1000ng/ml、500ng/ml、250ng/ml、100ng/ml和20ng/ml。将增殖测定在37℃和5%CO₂下温育4天。加入50μl XTT完全试剂(50份XTT+1份偶联试剂混合)并在37℃温育。在3h和4h之后用Tecan Safire进行吸光度的测量(细胞加上清液)。与设定为100%的培养基值相比计算增殖的抑制。在GraphPad Prism程序中计算吉西他滨和奥沙利铂的EC₅₀值。

[0493] 12. 用化学治疗药物培养胰腺癌细胞系的ADCC或CDC

[0494] 对于DANG 4,将6E+06细胞接种并在培养基或培养基+1ng/ml吉西他滨或1ng/ml吉西他滨+10ng/ml奥沙利铂中培养2天。将1-1.4E+07Patu8988S接种并在不含或含有10ng/ml吉西他滨或者与100ng/ml奥沙利铂组合的10ng/ml吉西他滨中培养。

[0495] 在ADCC开始的当天,遵循上文所述的方案并如上文所述在FACS分析中测定CLDN18的细胞表面表达。

[0496] 13. 细胞周期分析

[0497] 将细胞接种于六孔板中,在5-6小时后,加入化学治疗剂保持24h、48h或3天。将在介质中漂浮的细胞与经胰蛋白酶化的粘附细胞层组合。洗涤细胞。直接开始细胞周期分析或在如上文所述在开始细胞周期分析之前进行细胞表面染色。将细胞重悬于1ml PBS中并加入3ml 4%PFA。在将细胞于室温固定15min之后,沉淀并洗涤细胞。将RNase处理细胞重悬于加上0.05%Triton X-100的200μl RNase(10000U/ml)中并在37℃温育30min。加入1ml PBS,将样品离心并重悬于200μl PBS/PJ 50μg/ml中。在至少30min后,准备通过流式细胞术来分析样品。使用FlowJo软件来分析DNA含量直方图以确定细胞周期时期分布。

[0498] 14. 凋亡测定

[0499] 在指定处理之后,如制造商(PharMingen, San Diego, CA)所推荐,通过膜联蛋白V结合(检测试剂盒I)或通过DNA片段化测定(Apo-Direct)测量凋亡。简而言之,将漂浮在上清液中的细胞与经胰蛋白酶化的粘附级分组合,然后洗涤。将等分的5E+05细胞与膜联蛋白V-APC和PI在室温下于暗处温育15min。通过流式细胞术立即分析细胞。膜联蛋白V-APC和PI排除活细胞。早期凋亡细胞为膜联蛋白V-APC-阳性且PI-阴性,然而由于凋亡或坏死细胞死亡而不再存活的细胞为膜联蛋白V和PI阳性染色。使用FlowJo软件(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)定量每一个象限中的染色细胞百分比。

[0500] 基于DNA片段化的凋亡测定如下进行。将处理的细胞(粘附和漂浮)在70%冰冷EtOH中固定过夜。在洗涤之后,将10⁶个固定的细胞与末端脱氧核糖核苷转移酶(TdT)和FITC-dUTP在37℃温育90min以标记DNA断裂。将细胞漂洗,在室温下于暗处在RNase A/碘化丙啶中温育30min以对总DNA染色,然后通过流式细胞术来分析。消除由门控造成的分析的细胞双峰和团块。

[0501] 15. 体内研究

[0502] 遵循实验动物研究的国家规范和伦理指南进行所有体内实验。

[0503] 15.1 异种移植的治疗

[0504] 通过将含肿瘤细胞的200μl PBS皮下注射至雌性Hsd:无胸腺-Foxn1tm裸鼠的侧腹来接种异种移植肿瘤。将荷瘤小鼠用0μg、200μg、400μg或800μg抗体每周i.v.注射或每半周

交替i.v./i.p.注射来治疗。每周或每半周i.p.施用化学治疗剂。每半周监测肿瘤尺寸和动物健康。化学疗法处理结束时,继续施用抗体直至肿瘤体积达到 $>1400\text{mm}^3$ 或直至肿瘤变成溃疡性。将肿瘤样品冷冻保存或在4%福尔马林中固定用于随后分析。

[0505] 15.2转移测定

[0506] 在裸鼠中i.v.施用细胞之后,首先分析不同的胰腺癌细胞系形成转移的能力。对于这些植入分析,用 1×10^6 和/或 2×10^6 个细胞注射一组5-10只小鼠并在不同的时间点处死单只小鼠以发现转移植入和生长的时间点。

[0507] 每个治疗组用10-12只Hsd:无胸腺-Foxn1^{nu}裸鼠来进行转移治疗。用 2×10^6 个细胞(Patu8988S或Suit2-LVT)静脉内注射。一旦转移疾病的第一症状出现(体重减轻、虚弱、呼吸短促)或第一只小鼠死亡,就同时处死所有小鼠。

[0508] 组织的制备:对于植入研究,在不同的时间点处死小鼠,或一旦小鼠显示出转移性疾病的明显生理体征(体重减轻、虚弱、呼吸短促)就处死小鼠。其所有器官用于转移的宏观分析。仅Patu8988S和Suit-2细胞,肺和肺/肝分别展示出宏观可见的转移。将这些器官切成4个相等块,保存两块(肺:右上叶和左下叶)用于基因组DNA分离。其它两块用福尔马林固定并保存用于IHC分析(图2)。

[0509] 基因组DNA的制备和Q-PCR策略:基因组DNA从肺或肝组织提取。作为对照,基因组DNA也从人胰腺癌细胞Patu8988S以及未注射的阴性对照小鼠中分离。

[0510] Q-PCR策略基于转移中存在的人DNA的扩增。小鼠肺样品中人DNA的相对检测水平直接与转移的量和/或尺寸相关。由于该方法因以下事实存在偏见:转移不会在肺中均匀扩散,有时一片肺叶受到的影响比另一肺叶大,所以将肺的两个不同区域混合于一种DNA制备物中(图2)。

[0511] 用引物对#58615'-GGGATAATTTTCAGCTGACTAAACAG-3'和#58625'-TTCCGTTTAGTTAGGTGAGTTATC-3'特异性扩增人染色体17中存在但小鼠DNA中不存在的 α -卫星DNA进行Q-PCR反应。为生成标准曲线并作为阳性对照,将Patu8988S DNA与小鼠DNA混合,并制备5倍稀释,从而在小鼠DNA中产生100%、20%、4%、0.8%、0.16%、0.032%和0.0064%的人DNA。将曲线用于计算(线性回归)小鼠肺组织中存在的人转移DNA的量。Q-PCR反应在由20 μl (200ng)小鼠肺DNA,25 μl Sybr Green (Qiagen),1.6 μl 正义引物(10 μM)和1.6 μl 反义引物以及1.8 μl H₂O组成的50 μl 终体积中进行。

[0512] 实施例2:正常人胰腺组织和瘤人胰腺组织中的CLDN18.2表达

[0513] 为分析CLDN18.2在正常组织和胰腺肿瘤组织中的表达水平和模式,用两种鼠单克隆抗体试剂进行FFPE切片的组织学染色(图3)。

[0514] 通过在组织微阵列(TMA)上使用原型抗体35-22A进行探索性初步实验。TMA的主要缺点为斑点组织质量可变以及尺寸小,因此为样品的非代表性特征。这连同未充分优化的染色方案一起可导致低估阳性病例。

[0515] 用抗体43-14A进行主要的实验。在组织切片上进行这些染色并预评估肿瘤细胞的存在,所述组织切片(与TMA相比)较大。

[0516] 根据国际胰腺上皮内瘤变(PanIN)系统(PanIN-1A,-1B,-2,-3亚型)可对来源于胰腺导管的癌前损伤进行排名。

[0517] PanIN-1损伤(图4A)为扁平的,由具有基部定位的细胞核和丰富的核上粘液素的

高的柱状细胞组成。细胞核为小的且形状为圆形至椭圆形,被定向为垂直于基底膜。在非瘤扁平增生性损伤与不含异型性的扁平瘤损伤之间存在组织学重叠。

[0518] 亚型PanIN-1B的损伤具有乳头状、微乳头状或基部假复层结构,而在其它方面与PanIN-1A相同(Hruban等.Am J Surg Pathol.2001年5月;25(5):579-86.)。

[0519] PanIN-2损伤(图4B)为扁平或乳头状,具有典型的细胞核异常,包括一些极性的丧失、细胞核拥挤、增大的细胞核、假层理和色素过多。有丝分裂为罕见的,但当存在时,其为非管腔的(非顶端的)并且为典型的(Hruban等.Am J Surg Pathol.2001年5月;25(5):579-86.)。

[0520] PanIN-3损伤(图4C)通常为乳头状或微乳头状,然而,它们很少是扁平的。真筛状的小簇上皮细胞出芽到内腔且管腔坏死提示PanIN-3的诊断。损伤的特征在于细胞核极性的丧失、营养不良的杯状细胞(具有朝向内腔的细胞核和朝向基底膜的粘液细胞质的杯状细胞)、偶尔可为异常的有丝分裂、细胞核不规则和突出(巨大)的核仁(Hruban等.Am J Surg Pathol.2001年5月;25(5):579-86.)。

[0521] 使用不同来源的组织样品,用43-14A抗体来分析癌前组织中CLDN18.2的表达。

[0522] 在亚型PanIN-1,-2和-3的PanIN结构中频繁检测CLDN18.2,从而证明了CLDN18.2在癌前损伤中的早期表达(图4),其在后期为保守的。相比之下,在正常胰腺组织样品(包括胰腺的导管结构)中未观测到表达。

[0523] 总之,CLDN18.2为胰腺导管中开始恶性组织学变化的早期标记物。

[0524] 进行了两项研究以评估CLDN18.2在原发性胰腺癌中的表达。对于初步研究,用单克隆CLDN18.2特异性抗体35-22A对具有总计141个原发性胰腺癌病例的若干TMA进行染色。所分析TMA的整体质量并不令人满意。在修复期间部分丢失了许多斑点,用苏木精的不均匀复染提示为FFPE组织的次优组织处理。

[0525] 总体>48.9%的染色病例对CLDN18.2为阳性的,包括49.2%(65/132)的导管腺癌,50%(1/2)的腺泡细胞癌和3/7的神经内分泌癌(表7)。在不含其它细胞类型的任何背景下对肿瘤细胞膜进行染色(图6)。

[0526] 而且,我们观测到肿瘤内CLDN18.2表达强度与所染色肿瘤细胞的部分之间的相关性(表8,图5)。

[0527] 表7:初步研究:在胰腺癌亚型中分裂的CLDN18.2阳性病例的数目。

[0528] 使用单克隆鼠35-22A(0,2 μ g/ml)抗体对组织进行染色并检查CLDN18.2阳性肿瘤细胞。

[0529]

原发性胰腺CA	总计	阳性部分 $\geq 1\%$ [%]	染色强度 $\geq 2+$ [%]
总计	141	69[48.9]	62[43.9]
导管腺癌(PDAC)	132	65[49.2]	58[44.3]
腺泡细胞癌	2	1[50.0]	1[50.0]
神经内分泌癌	7	3[42.8]	3[42.8]

[0530] 表8:初步研究:对于所分析的胰腺原发性肿瘤,CLDN18.2信号强度与阳性肿瘤细胞的量之间的相关性。

[0531] 阳性原发性肿瘤病例的百分比与染色强度相关。根据较好可视化的阳性肿瘤细胞的量,将病例分组成六部分。

阳性细胞的%	信号强度			总计
	+	++	+++	
任何阳性	7	24	38	69
1-9%	3 [42.8]	6 [25.0]	1 [2.6]	10 [14.5]
10-39%	2 [28.6]	6 [25.0]	5 [13.2]	13 [18.8]
40-49%	0	0	1 [2.6]	1 [1.4]
50-59%	0	3 [12.5]	2 [5.3]	5 [7.3]
60-69%	0	2 [8.3]	5 [13.2]	7 [10.2]
70-100%	2 [28.6]	7 [29.2]	24 [63.1]	33 [47.8]

[0532] 表9:初步研究:CLDN18.2阳性肿瘤病例的分级。

[0533] 肿瘤细胞的分级描述了细胞外观和细胞分化的水平。1级描述了良好分化的细胞;2级描述了中度分化的细胞,3级描述了分化不良的细胞。

等级	总计病例	阳性部分 $\geq 1\%$ [%]	染色强度 $\geq 2+$ [%]
1	15	13 [86.7]	12 [80.0]
2	71	39 [54.9]	36 [50.7]
3	35	9 [25.7]	7 [20.0]

[0534] 使用质量受控的组织切片,用具有高灵敏度抗体43-14A的优化染色方案进行第二项研究。

[0535] 表10:主要研究-胰腺癌亚型中分组的CLDN18.2阳性病例的数目。

[0536] 使用鼠单克隆43-14A (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 抗体对组织进行染色并检查CLDN18.2阳性肿瘤细胞。

原发性CA	总计病例	阳性部分 $\geq 1\%$ [%]	染色强度 $\geq 2+$ [%]
总计	61	40 [65.6]	39 [63.9]
导管腺癌 (PDAC)	42	38 [90.5]	37 [88.1]
腺泡细胞癌	1	0	0
神经内分泌癌	18	2 [11.1]	2 [11.1]

[0537] 表A

原发性胆道CA	总计	阳性	阳性%
胆道癌	15	9	60

[0538] 表B

[0539] 分析了总计42个原发性导管胰腺癌样品。这些中约90% (42个病例中有38个) 对CLDN18.2为阳性的 (表10), 其中大部分 (>60%) 显示出+++的强信号强度 (图7, 表11)。还在此观测到CLDN18.2表达水平与阳性肿瘤细胞部分之间的相关性。大部分所分析的病例 (62%) 为3级肿瘤 (表12)。

[0540] 表11:主要研究:对于所分析的胰腺原发性肿瘤,CLDN18.2信号强度与阳性肿瘤细胞的量之间的相关性。阳性原发性肿瘤病例的百分比与染色强度相关。根据较好可视化的阳性肿瘤细胞的量,将病例分组成六部分。

	阳性细胞的%	信号强度			总计
		+	++	+++	
	任何阳性	1	13	26	40
	1-9%	1	2[15.4]	3[11.5]	6[15.0]
[0545]	10-39%	0	3[23.0]	4[15.4]	7[17.5]
	40-49%	0	2[15.4]	2[7.7]	4[10.0]
	50-59%	0	2[15.4]	4[15.4]	6[15.0]
	60-69%	0	2[15.4]	1[3.8]	3[7.5]
	70-100%	0	2[15.4]	12[46.2]	14[35.0]

[0546] 表12: 主要研究-CLDN18.2阳性肿瘤病例的分级。

[0547] 对于所分析的大部分肿瘤病例,可获得通过相应的病理学家进行的分级。肿瘤细胞的分级测量细胞外观和细胞分化的水平。1级描述了良好分化的细胞;2级描述了中度分化的细胞,3级描述了分化不良的细胞。

[0548]	等级	总计病例	阳性部分 $\geq 1\%$ [%]	染色强度 $\geq 2+$ [%]
	1	7	1 [14.3]	1 [14.3]
	2	25	15 [60.0]	15 [60.0]
	3	28	24 [85.7]	23 [82.1]

[0549] 大部分患者在晚期被诊断出胰腺癌。患者肿瘤已转移至淋巴结和其它器官,特别是转移至肝脏。在主要研究中,使用CLDN18.2特异性43-14A抗体,在免疫组织化学测定中分析胰腺癌的淋巴结和肝转移的79个FFPE组织样品。70.5%的淋巴结转移(31/44个病例)和68.6%的远距离肝转移(24/3个病例)显示出对CLDN18.2的明显肿瘤细胞染色(表13)。阳性肿瘤细胞的染色模式为膜性的,在一些病例中具有另外较弱的细胞质信号(图9)。根据原发性肿瘤分析的结果,在转移性样品中的CLDN18.2表达水平与CLDN18.2阳性肿瘤细胞部分之间存在相关性(图8)。

[0550] 在所分析肿瘤的分级与CLDN18.2的表达水平或阳性肿瘤细胞部分之间未发现相关性。

[0551] 表13: 通过靶器官分组的CLDN18.2阳性转移病例的数目。

[0552] 使用单克隆鼠43-14A (0.2 μ g/ml) 抗体对组织进行染色并检查CLDN18.2阳性肿瘤细胞。

[0553]	转移	总计	阳性部分 $\geq 1\%$ [%]	染色强度 $\geq 2+$ [%]
	总计	79	55 [69.6]	52 [65.8]
	胰腺至淋巴结	44	31 [70.5]	28 [63.6]
	胰腺至肝	35	24 [68.6]	24 [68.6]

[0554] 为测试阳性原发性肿瘤病例的CLDN18.2表达在同一患者中的转移是否为保守,使用抗体43-14A筛选配对原发性癌症/淋巴结转移双联体。

[0555] 表14: 在配对胰腺原发性肿瘤样品和淋巴结转移性肿瘤样品中的CLDN18.2表达-

分析肿瘤细胞中配对原发性腺癌样品和淋巴结(LN)转移样品的CLDN18.2表达。

患者ID	原发性TU	LN转移
H/2011/775 3S&8D	+++ (15%)	+++ (25%)
H/2011/2247 7C&7G	+++ (10%)	++ (25%)
H/2011/12675 4B&4L	+++ (10%)	++ (5) %
H/2010/15941 6SS&8H	+++ (90%)	+++ (90%)
H/2010/2986 2E&2G	+++ (5%)	+++ (40%)
H/2010/6709 9B&9F	+++ (70%)	+++ (10%)
H/2010/11569 5A&5G	+++ (80%)	++ (5%)
H/2008/380 4A&4G	+++ (60%)	+++ (90%)
H/2009/13538 5B&5E	+ (20%)	+ (10%)
H/2009/11847 7C&7F	+++ (15%)	++ (15%)
H/2009/23108 4A&4J	+++ (5%)	+++ (70%)
H/2009/4917 8E&8S	+++ (70%)	+++ (25%)
H/2009/214183C&3L	+++ (55%)	++ (70%)
H/2009/20336 2D&2F	+++ (80%)	+++ (90%)
H/2009/17768 2C&2E	++ (35%)	++ (20%)
H/2008/13194 3A&3J	+++ (35%)	+++ (10%)
H/2008/13074 3B&3C	+++ (50%)	+++ (50%)
H/2008/12082 6D&6G	+++ (1%)	-
H/2008/11178 5B&1SS	+++ (80%)	+++ (90%)
H/2008/28150 4B&4C	++ (15%)	++ (30%)
H/2007/5478 4A&4J	+++ (90%)	+++ (90%)
H/2007/6216 3B&3C	+++ (50%)	+++ (60%)
H/2007/9047 1B&1J	+++ (70%)	+++ (35%)
H/2007/13983 6C&6J	++ (15%)	++ (1%)
H/2007/14400 6C&6J	-	-
H/2006/5616 3J&3D	+++ (35%)	+++ (5%)
H/2006/9779 3D&3K	+ (5%)	+ (15%)

[0558] 在所分析的27个成对病例中,有25个(92.5%)的原发性肿瘤和淋巴结对对CLDN18.2均为阳性。在单个病例中,两个组织均为阴性,在一个其它病例中,原发性肿瘤对CLDN18.2为阳性,而转移为阴性。

[0559] 在所测试的26个阳性双联体中,有21个(80.7%)的原发性肿瘤和转移性肿瘤细胞的信号强度相同。在5个病例中,信号强度从+++降至++。

[0560] 在25个成对组织中,有11个(44%)在转移中的阳性肿瘤细胞数目与原发性肿瘤相比较低(表14)。

[0561] 总之,当原发性肿瘤细胞向转移性阶段发展时,CLDN18.2表达似乎为保守的。与原发性肿瘤相比,淋巴结转移中的总体强度和阳性肿瘤细胞部分仅略微较低(图10)。

[0562] 对于来源于原发性肿瘤的少量患者组织样品,可获得淋巴结转移和肝转移。将这

些配对的三联体 (triplet) 染色以测试CLDN18.2表达在远距离转移中的保守性。用抗体43-14A分析六个配对的三联体。

[0563] 表15:在配对的胰腺原发性肿瘤样品和转移性肿瘤样品中的CLDN18.2表达-分析肿瘤细胞中配对的原发性腺癌样品、肝转移样品和淋巴结 (LN) 转移样品的CLDN18.2表达。

患者ID	原发性肿瘤	淋巴结转移	肝转移
H/2011/17191-VA-VI-ISS	+++ (60%)	+++ (70%)	+++ (1%)
H/2010/14296 XA	+++ (5-10%)	-	-
H/2010/4157 VII A	++ (60%)	++ (30%)	+++ (90%)
H/2009/23598 VII B	+++ (40%)	-	-
H/2011/3590-III SS-VIIC-I	++ (20%)	-	-
H/2008/10701	+++ (90%)	+++ (100%)	+++ (90%)

[0565] 在6个三联体中,有3个三联体的所有三个组织样本对于其针对CLDN18.2的阳性得分具有可比性(图11)。在三个病例中,一部分肿瘤细胞在原发性损伤中为CLDN18.2阳性,然而转移性损伤未显示CLDN18.2染色(表15)。

[0566] 实施例3:用于体外和体内模型以及胰腺癌模型的人胰腺癌细胞系的靶表达

[0567] 细胞系的来源

[0568] 该临床前评估研究的主要目标为在合适的模型系统中分析IMAB362治疗的抑制作用。为鉴定可用于体外和体内表征IMAB362作用的CLDN18.2-阳性细胞系,筛选用于CLDN18.2表达的一组26个商业上可获得的胰腺癌细胞系并详细表征。在每个细胞系到来后立即制备用于实验用途的细胞库。它们来源于原发性胰腺癌(10个原发性胰腺癌中有6个为粘液腺癌),原发性癌(4),胰腺癌转移至肝(5)或脾脏(1),或分离自腹水(5)(参见表16)。这些细胞系中的若干(8)用慢病毒转导来表达CLDN18.2。

[0569]

表 16:胰腺细胞系的公开来源和细胞特征。

细胞系	供应者 ¹	人来源 ²	体内生长:		其他信息	细胞产物 ³	参考文献
			皮下肿瘤	转移			
AsPC1	ATCC	AS, ADCA	是	仅在 SCID 和 NOG 中原位移植或脾内注射之后	原位: 在肠、肾和腹膜中转移。 脾内: 肝转移	CEA, 胰腺癌相关的抗原, 胰腺特异性抗原, 粘液素	Chen WH 等. In Vitro: 18:24-34 (1982) Tan and Chu 等, 1985 Tumor Biol 6:89-98
BxPC3	ATCC	PT, ADCA	是	仅在脾内注射 NOG 之后, 而在 Nu/Nu, NOD/SCID 中不会	对囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)为阴性。	CEA, 胰腺癌相关的抗原, 胰腺特异性抗原, 粘液素	Tan MH 等. Cancer Invest. 4:15-23 (1986) Suemizu 等. Int. J. Oncol. 31:741-2007
BxPC3 (ECACC)	ECACC	PT, ADCA	是		在裸鼠中生成与原发胰腺癌可比的中度优良至不良分化的肿瘤致瘤性。	粘液素, CEA, 胰腺癌相关的抗原, 胰腺特异性抗原	Tan MH 等. Cancer Invest. 4:15-23 (1986)
CAPAN1	DSMZ	LM, D-ADCA	是	在 NOG 中脾内注射之后	对囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)为阳性的。耐 5-FU		Fogh 等. J. Natl. Cancer Inst. 58:209-214 (1977). Suemizu 等. Int. J. Oncol. 31:741-2007
CFPAC1	ATCC	LM, D-ADCA, 囊性纤维化	是	在 Nu/Nu 中原位移植之后	CF 基因的过量产物(囊性纤维化)。细胞具有 CF 突变的最常见形式。无 cAMP 激动剂、腺苷酸环化酶刺激剂或磷酸二酯酶抑制剂的作用。响应于 Ca ⁺⁺ 离子载体。卡培他滨和环巴胺敏感的	CEA, 胰癌胚抗原, 胰癌相关的抗原, Ca19-9, 上皮角蛋白	Schoumacher RA 等. Proc Natl. Acad. Sci. USA 87:4012-4016 (1990). Lee 等, Oncogene 2010, 29:56-67. Thayer 等, Nature 2003 425:851
DANG	DSMZ	CA	是	否			未公开
HPAFII	ATCC	AS, ADCA	是	在 SCID 中原位移植之后低的转移性	IL-22-R 阳性(经由 IL10 和 TGF-β1 抑制 NK 细胞作用)	粘液素 I 和粘液素 4	Kim YW 等. Pancreas 4:353-362, 1989, Curd 等, clin. Exp. Immunol.168 (2012)

[0570]

细胞系	供应者 ¹	人来源 ²	体内生长:		其他信息	细胞产物 ³	参考文献
			皮下肿瘤	转移			
HPAC	ATCC	ADCA	是	在 SCID 中原位移植之后的低转移性	来源于胰头。裸鼠中的肿瘤在组织学上类似于起源的肿瘤。用胰岛素、IGF-I、EGF 和 TGF α 刺激生长。通过地塞米松和糖皮质激素抑制生长。	EGF, 功能性糖皮质激素受体, 角蛋白, 胰腺导管上皮标记物(DU-PAN-2), 抗原(HMFG1, AUA1)肿瘤相关的抗原(CEA, CA-125, CA19-9)	Gower WJ 等, In vitro Cell Dev Biol 30A:151-161 (1994)
HUP-T3	DSMZ	AS, CA			来自不良分化的 ADCA	少量的 CEA, TGF β 2	Nishimura 等, Int. J. Pancreatol 13:31-41 (1993)
HUP-T4	DSMZ	AS, CA			来自良好分化的乳头管形 ADCA	大量的 CEA 和 CA19-9, TGF β 2	Nishimura 等, Int. J. Pancreatol 13:31-41 (1993) Schlingensiepen 等, Antisense Pharma GmbH
KCI-MOH	DSMZ	PT-ADCA	是(SCID)		来源于胰头。中度分化的、管状的。	细胞角蛋白	Mohammad 等, Pancreas 16: 19-25 (1998)
KP-2	JCRB	D-ADCA	是	(最低程度地)	中度分化的。可转移至与起源的肿瘤在组织学上相似的裸鼠。最低程度地转移。		Ikeda 等, J Cancer Res. 81:987-993 (1990)
KP-4	JCRB	D-CA	是	高度		甲状旁腺激素相关的肽(PTHrP)	Nishi 等, Int. J. Oncol. 5: 33-39 (1994)
MiaPaCa2	JCRB	PT-CA	是	否	未分化的, 对天冬酰胺酶敏感。		Yunis 等, Int. J. Cancer 19: 218-235 (1977)
Panc01	ATCC	PT, D-E-CA	是(NOD/SCID, NOG)	是, 在 NOG 中脾内注射之后			Suemizu 等, Int. J. Oncol. 31:741-2007
Panc02.03	ATCC	PT, ADCA	是(裸的/SCID)		来源于胰头。K-ras 致癌基因突变	细胞角蛋白	Jaffee 等, Cancer J. Sci. Am. 4: 194-203 (1998)
Panc03.27	ATCC	PT, ADCA	是(裸的/SCID)		来源于胰头。野生型 K-ras	细胞角蛋白	Jaffee 等, Cancer J. Sci. Am. 4: 194-203 (1998)
Panc04.03	ATCC	PT, ADCA	是(裸的)		来源于胰头。K-ras 致癌基因突变	细胞角蛋白	Jaffee 等, Cancer J. Sci. Am.

[0571]

细胞系	供应者 ¹	人来源 ²	体内生长:		其他信息	细胞产物 ³	参考文献
			皮下肿瘤 /SCID)	转移			
Panc05.04	ATCC	PT, ADCA	仅在基质 胶中移植 时		来源于胰头。K-ras 致癌基因突 变。皮下肿瘤对环巴胺敏感。	细胞角蛋白	4: 194-203 (1998) Jaffee 等, Cancer J. Sci. Am. 4: 194-203 (1998). Thayer 等, Nature 2003 425:851
Patu8902	DSMZ	PT, D-ADCA	是	是	II 级, 在小鼠中未分化的实体肿瘤。	分泌蛋白酶和组织蛋白酶 B, 表达 TGFβ2	Elsasser 等, Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 64: 1993, 201
Patu8988S	ATCC	LM, ADCA	是	仅肺	在小鼠中未分化的实体肿瘤。	细胞角蛋白, 无粘液素	Elsasser 等, Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 61:295-306 (1992)
Patu8988T	ATCC	LM, ADCA	是	否	在小鼠中具有管状结构的分化 的肿瘤(Patu8988S 的姐妹细胞 系), 在小鼠中非转移的。	高的粘液素分泌, 细胞角蛋 白	Elsasser 等, Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 61:295-306 (1992)
Suit2	HSRRB	LM, T-ADCA	是	高度	中度分化的管状、上皮样。在 裸鼠中高度转移的	CEA, CA19-9	Ywamura T. 等
Su86.86	ATCC	LM, D-ADCA	是 (原位)		在存在 IL-2 的情况下细胞通过 LAK 细胞可裂解细胞, 但 NK 细胞不会	CEA	Drucker BJ 等, In vitro Cell Dev Biol. 24:1179-1187, 1988
SW1990	ATCC	SM, ADCA	是		II 级, 来源于裸鼠中与原始肿 瘤在导管形态学上类似的外分 泌腺、上皮、肿瘤	粘液素, CEA	Kyriazis AP 等, Cancer Res. 43:4393-4401 (1983)
YPAC	DSMZ	AS, CA	是	是	在具有原始肿瘤的功能性特征 的裸鼠中形成肿瘤。	分泌炎性细胞因子, IL1 (自分泌), IL6, IL8	Yamada 等, Int J Cancer, 76: 1998, 141,

¹ATCC: 美国典型培养物保藏中心; HSRRB: 健康科学资源库, DSMZ: 德国微生物菌种保藏中心。

²PT: 原发性肿瘤, AS: 腹水, LM: 肝转移, SM: 脾脏转移, ADCA: 腺癌, D: 导管, T: 管状, E: 上皮状, CA: 胰腺癌

³CEA: 癌胚抗原, CA: 碳水化合物抗原, IL: 白细胞介素

[0572] 人胰腺癌细胞系中CLDN18.2转录物表达

[0573] 为鉴定表达CLDN18.2的胰腺细胞系, 使用结合于CLDN18.2的外显子1的正向引物

和结合于CLDN18的外显子3的反向引物,用定量实时PCR(RT-PCR)来测定转录物水平。将内源性表达CLDN18.2的人胃癌细胞系KATO-III和CLDN18.2阴性乳腺癌细胞系SKBR-3分别包括作为阳性对照和阴性对照。RT-PCR揭示在相对水平超过 1×10^5 的胰腺癌细胞系DANG、Panc03.27、Panc05.04、Patu8988S和YAPC中明显的内源性CLDN18.2表达。有趣地,Patu8988S细胞显示与胃CA KATO-III细胞相当的CLDN18.2表达水平($\sim 1 \times 10^8$) (图12A)。总之,我们在22个胰腺癌细胞系中检测出5个胰腺癌细胞系稳健表达CLDN18.2。

[0574] 除了内源性细胞系外,在转录物水平上分析异位表达CLDN18.2的LVT细胞系(图12A)。对于8个LVT细胞系,检测出6个LVT细胞系的相对CLDN18.2表达水平大于 1×10^8 。仅在HAPC-LVT和Suit2-LVT细胞中,表达水平在 1×10^5 之上。

[0575] 我们研究CLDN18.2表达在体外培养期间是否稳定。将Patu8988S、Panc05.04细胞和慢病毒转导的细胞系Suit2-LVT、MiaPaCa2-LVT和Patu8902-LVT传代多达15次并分析CLDN18.2转录物(图12B-D)。我们观测到CLDN18.2表达在具有较高传代次数的内源性细胞和转导的细胞中丧失。在转导的细胞中表达的丧失是最高的。因此,在可能体外实验的情况下,使用早期传代,并在下面植入实验中验证CLDN18.2在肿瘤异种移植物中的表达。

[0576] 人胰腺癌细胞系中CLDN18.2蛋白质表达

[0577] 在总细胞裂解物中CLDN18.2的检测

[0578] 除了转录物分析外,通过蛋白质印迹和IF在蛋白质水平分析CLDN18.2的表达。对于蛋白质印迹分析,使用CLDN18特异性抗体抗密蛋白18(C-末端)通过蛋白质印迹(WB)研究26个胰腺癌细胞系的细胞裂解物。SKBR-3细胞的裂解物再次被用作阴性对照,而用CLDN18.2(HEK293-p740)稳定转染的HEK293细胞的裂解物被用作阳性对照。在此,我们在Patu8988S、DANG和Panc05.04细胞中检测出高的蛋白质表达,从而证实了RNA数据。在Panc03.27和BxPC3细胞裂解物中可检测模糊条带。在RNA水平上被鉴定为阳性的YAPC细胞在蛋白质印迹中显示较小尺寸的模糊条带。所有其它细胞系为阴性的(图13)。

[0579] CLDN18在胰腺癌细胞中的细胞表达

[0580] 为获得支持性蛋白质表达数据,在将细胞固定和透化之后,通过免疫荧光(IF)研究胰腺癌细胞系并使用抗体35-22A检测。IF分析证实先前的RNA和蛋白质数据显示大部分胰腺癌细胞系对CLDN18.2染色为阴性的(图14)。在一些细胞系(像AsPC1、DANG、HUP-T3、HUP-T4、Panc01)中观察到核点,其最可能代表染色假象。在RNA和/或蛋白质水平上被鉴定为以低的CLDN18.2为特征的DANG、Panc03.27和BxPC3细胞在IF分析中为阴性的,所述IF分析具有较低的检测灵敏度。相比之下,Panc05.04、Patu8988S和KATO-III胃癌对照细胞的细胞膜和细胞质对CLDN18.2的染色呈强阳性。染色强度对于每种细胞是不同的,在群体内还检测出阴性细胞(图14J和N)。在LVT细胞系中,我们发现所有细胞中超过80%有强的膜染色。

[0581] 证实CLDN18.2在胰腺癌细胞中表达

[0582] 为证实CLDN18.2的表达并评估细胞表面上该靶标的量,通过非变性(native)染色方案,用IMAB362对内源性细胞系Panc05.04和Patu8988S以及LVT细胞系进行染色。虽然用IMAB362对Patu8988S、Panc05.04和KATO-III胃癌对照细胞进行染色不太强烈,与用35-22A染色细胞相比,阳性细胞的百分比降低(图16A-F),但IF分析证实CLDN18.2在胰腺癌细胞的表面表达。对于8个异位表达CLDN18.2的LVT胰腺癌细胞系,在几乎所有细胞上观察到明显

的膜染色(如在图16G-L中6个LVT细胞系显示)。

[0583] 总之,CLDN18.2表达分析导致将内源性表达胰腺癌细胞系Panc05.04和Patu8988S以及所有8种慢病毒转导的细胞系BxPC3-LVT、CAPAN1-LVT、DANG-LVT、MiaPaCa-2-LVT、Suit-2-LVT、Patu8902-LVT和YAPC-LVT鉴定为合适的CLDN18.2阳性细胞模型系统。

[0584] 胰腺癌异种移植和转移模型的形成

[0585] 用于鉴定合适的皮下胰腺癌肿瘤模型的植入研究

[0586] 进行具有不同胰腺癌细胞系总计37个植入研究以鉴定用于测试IMAB362的体内功效的合适的皮下异种移植模型。在所有测试的细胞系中,选择具有异位CLDN18.2表达的BxPC3-LVT、CAPAN1-LVT、MiaPaCa-2-LVT、HPAC-LVT、DANG-LVT和YAPC-LVT细胞系用于皮下异种移植模型,显示出高的植入率和同质肿瘤生长。另外,选择具有内源性表达CLDN18.2的Patu8988S和DANG细胞系的皮下异种移植模型用于测试IMAB362在体内的功效。Panc05.04细胞的皮下注射不会导致形成皮下肿瘤。

[0587] 表17:所测试的用于形成胰腺癌的皮下异种移植模型的植入条件概述

[0588]

细胞系	植入检查(EC)	日期	实验设定	结果	注解
BxPC3 ATCC	EC1_BxPC3 ATCC	2010.03.22	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb:NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 40%; 中位存活期 56 天	不推荐
BxPC3 ECACC	EC2_BxPC3 ECACC	2010.03.22	1e7 皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb:NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 中位存活期 63 天	皮下异种移植的合适条件
BxPC3-LVT	EC3_C179	2011.03.25	1e7 细胞皮下进入到 10 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 90%; 中位存活期 64 天	皮下异种移植的合适条件
CAPAN1	EC1_CAPAN1	2010.03.26	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 中位存活期 52 天	皮下异种移植的合适条件
CAPAN1-LVT	EC1_C186	2011.08.09	转移 测定。在 PBS 中的 1-2e6 细胞 i.v.进入到 10 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠内	在检测的肺和肝中无转移; 在肿瘤细胞注射后 72 天分析	不推荐
CAPAN2	EC1_CAPAN2	2010.04.06	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 中位存活期 100 天	皮下异种移植的合适条件

细胞系	植入检查 (EC)	日期	实验设定	结果	注解
DANG	EC3_C2	2007.02.08	1e7 细胞皮下进入到 3 只无胸腺小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 很有侵略性的肿瘤生长; 中位存活期 18 天	不是异种移植模型的适当条件
DANG	EC4_C2	2007.10.10	5e5-1e7 细胞皮下进入到 25 只无胸腺小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 很有侵略性的肿瘤生长; 中位存活期 16 至 23 天	不是异种移植模型的适当条件
DANG 亚克隆 1C5F2	EC5_C2	2010.06.01	2.5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 在荷瘤小鼠中为恶病质; 中位存活期 17 天	由于肿瘤恶病质而不推荐
DANG 亚克隆 1C5F2	EC6_C2	2011.02.10	5e4-2e5 细胞皮下进入到 15 只雌性 HsdCpb:NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	5e4 = 40% 成功率; 1e5, 2e5 = 100% 成功率; 中位存活期 26 至 39 天	由于肿瘤恶病质而不推荐
DANG 亚克隆 1C5F2	EC7_C2	2011.04.02	2e5 细胞皮下进入到 5 只雌性和 5 只雄性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内; 体重动力学	成功率 100%; 在荷瘤小鼠中为恶病质; 中位存活期 29 天	由于肿瘤恶病质而不推荐
DANG-LVT	EC1_C180	2011.03.21	5e6 细胞皮下进入到 10 只雌性 HsdCpb:NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 在荷瘤小鼠中为恶病质; 中位存活期 28 天	由于肿瘤恶病质而不推荐
Patu8902	EC1_C197	2011.07.25	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 快速的肿瘤生长; 中位存活期 21 天	异种移植模型的合适条件
Patu8902	EC2_C197	2011.07.25	实验转移测定。1-2e6 细胞静脉内注射到 10 只雌性 HsdCpb:NMRI-Foxn1nu 小鼠内	在肺或肝组织中无转移; 在肿瘤细胞注射之后 8 只小鼠死亡	不推荐转移测定
Patu8988S	EC1_C178	2011.03.15	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 异质肿瘤生长, 溃疡性肿瘤; 中位存活期 55 天	不推荐
Patu8988S	EC2_C178	2011.04.05	实验转移测定。1-2e6 细胞静脉内进入到 10 只雌性 HsdCpb:NMRI-Foxn1nu 小鼠内	非常缓慢的转移模型; 在 70 天之后分析	肺转移测定的合适模型

[0589]

细胞系	植入检查 (EC)	日期	实验设定	结果	注解
Patu8988S	EC3_C178	2011.06.10	2.5e6 - 1.5e7 细胞皮下进入到 15 只雌性 HsdCpb:NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	异质肿瘤生长; 缓慢的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 95.5 天	不推荐
Patu8988S(r ecult.)	EC1_C202	2011.08.11	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	异质肿瘤生长; 缓慢的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 88 天	不推荐
Patu8988S 亚克隆 17	EC1_C214	2011.11.28	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	异质肿瘤生长; 缓慢的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 54 天	不推荐
Patu8988S 亚克隆 22	EC1_C215	2011.11.28	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%, 异质肿瘤生长; 缓慢的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 47 天	由于异质和溃疡性肿瘤而不推荐; 所测试 PATU8988S 亚克隆最好的肿瘤生长曲线
Patu8988S 亚克隆 30	EC1_C216	2011.11.28	5e6 细胞皮下 into the 左侧腹内 of 5 雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠	异质肿瘤生长; 缓慢的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 35 天	不推荐
Patu8988S 亚克隆 34	EC1_C217	2011.11.28	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	异质肿瘤生长; 缓慢的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 49 天	不推荐
Patu8988S 亚克隆 41	EC1_C218	2011.11.28	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	异质肿瘤生长; 缓慢的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 108 天	不推荐
Patu8988S 亚克隆 adM#13	EC1_C237	2012.02.06	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	缓慢的肿瘤生长; 血性囊肿, 但并不溃疡; 中位存活期 73 天	皮下异种移植的合理模型
Patu8988S 亚克隆 adM#19	EC1_C238	2012.02.06	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	异质肿瘤生长; 缓慢的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 42 天	不推荐

[0590]

细胞系	植入检查 (EC)	日期	实验设定	结果	注解
Patu8988S 亚克隆 adM#1	EC1_C239	2012.02.13	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	异质肿瘤生长; 缓慢的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 77 天	不推荐
Patu8988S 亚克隆 adM#16	EC1_C240	2012.02.13	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	缓慢的肿瘤生长; 血性囊肿, 但并不溃疡; 中位存活期 66 天	皮下异种移植的合理模型
Patu8988S 亚克隆 adM#9	EC1_C241	2012.02.13	5e6 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	缓慢的肿瘤生长; 血性囊肿, 但并不溃疡; 中位存活期 59 天	皮下异种移植的合理模型
Suit2	EC1_C196	2011.07.25	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 快速的肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 35 天	不推荐
Suit2	EC2_C196	2011.07.25	实验转移测定。2exp6 细胞静脉内注入 10 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠	在肺、肝和肌肉中转移	肺转移测定的合适模型
Panc02.03	EC1_Panc 02.03	2010.05.12	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 中位存活期 54 天	皮下异种移植模型的合适条件
Panc03.27	EC2_Panc 03.27	2010.05.12	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 中位存活期 91 天	皮下异种移植模型的合适条件
Panc04.03	EC3_Panc 04.03	2010.06.17	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 中位存活期 39 天	皮下异种移植模型的合适条件
Panc05.04	EC4_Panc 05.04	2010.06.18	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	无皮下肿瘤生长	不推荐
Panc05.04	EC5_Panc 05.04	2011.05.09	悬浮在 RPMI 的 2e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	无皮下肿瘤生长	不推荐

[0591]

[0592]

细胞系	植入检查 (EC)	日期	实验设定	结果	注解
MiaPaCa2	EC1_C195	2011.07.25	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 中位存活期 42 天	皮下异种移植模型的合适条件
MiaPaCa2-LVT	EC1_C219	2011.11.18	5e6 或 1e7 细胞皮下进入到 10 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 中位存活期 40 天	皮下异种移植模型的合适条件
MiaPaCa2	EC2_C195	2011.07.25	实验转移测定. 2e6 细胞静脉内注入 10 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠	在肺、肝和淋巴结中转移	肺转移测定的合适模型
HPAC	EC1_HPAC	2010.04.19	1.5e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%; 中位存活期 29 天	皮下异种移植模型的合适条件
YAPC	EC1_YAPC	2010.05.10	1e7 细胞皮下进入到 5 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%, 很有侵略性的肿瘤生长; 同质肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 28 天	受限的异种移植模型
YAPC-LVT	EC2_YAPC	2010.05.10	5e5-7.5e6 细胞皮下进入到 20 只雌性 HsdCpb: NMRI-Foxn1nu 小鼠的左侧腹内	成功率 100%, 很有侵略性的肿瘤生长; 同质肿瘤生长; 溃疡性肿瘤; 中位存活期 27 天	受限的异种移植模型

[0593] 用于合适转移模型鉴定的植入研究

[0594] 为研究IMAB362对转移形成的作用,在裸鼠中建立转移性癌症模型。分析i.v.应用后胰腺癌细胞系转移的能力。如Mohanty和Xu 2010所述,将CAPAN1-LVT、MiaPaCa-2、Patu8988S、Patu8902和Suit-2细胞注入裸鼠的尾静脉。为确定转移植入的时间点和生长速率,在不同的时间点处死小鼠(表18)。

[0595] 表18:胰腺癌细胞系的转移植入分析

细胞系	细胞的#	小鼠的#	在第(#)天分析小鼠	在第(#)天小鼠死亡	分离和保存的器官	转移
Patu8902	1x10 ⁶	5	-	0(1), 1(3) 4(1)	n.d.	无
Patu8902	2x10 ⁶	5	-	0(1),1(3), 15(1)	n.d.	无
Patu8988S	1x10 ⁶	7	34, 51, 59, 66, 70, 86, 108	-	肺/肝	肺
[0596] Patu8988S	2x10 ⁶	8	34, 41, 51, 59, 66, 70, 86, 108	-	肺/肝	肺
Suit-2	2x10 ⁶	10	36(3), 45(3),52(2), 59(2)	-	肺/肝	肺/肝
CAPAN1-LVT	2x10 ⁶	5	72(1)	0(1), 1(3),	n.d.	n.d.
CAPAN1-LVT	1x10 ⁶	5	72(4)	2(1)	肺/肝	n.d.
MiaPaCa-2	2x10 ⁶	10	32(2), 52(2), 59(2), 66(2), 73(2)	-	肺/肝	无

[0597] Patu8902细胞和CAPAN1-LVT的植入分析并不可行,因为大部分小鼠几乎立即死亡。在72天之后,在用CAPAN-LVT细胞攻击的5只存活小鼠的肺和肝中未检测到宏观上可见的转移。相反地,Suit-2和MiaPaCa2细胞注射为良好耐受的。注射之后在不同的时间点处用IHC分析来分析这些小鼠的肺组织。在用MiaPaCa-2细胞攻击的小鼠中,长达73天之后未在肺中检测到转移,因此未将该细胞系选择成IMAB362治疗模型。Suit-2癌细胞转移到小鼠的肺中。整个组织检测到多个病灶。因此,将慢病毒转导CLDN18.2的Suit-2-LVT细胞系选择为模型系统以分析IMAB362治疗对转移形成的作用。

[0598] 除了Suit-2外,还分析了内源性表达CLDN18.2的Patu8988S细胞形成转移的能力。对每只小鼠i.v.注射2种不同的细胞数目(1x10⁶,2x10⁶)来进行植入检查。在不同的时间点分离肺和肝,如表18中所示。首先,使用Q-PCR分析获得的不同组织。通过扩增人染色体17的 α -卫星DNA来分析长达70天获得的肺和肝。肺的结果显示,在小鼠肺中的人DNA百分比随着时间明显增加,这与注射的细胞数目无关。通过i.v.应用1x10⁶或2x10⁶个细胞,在70天之后,可分别检测出5.8%和3.7%的人DNA(图19)。在肝中,几乎没有任何人DNA被扩增。在70天之后,百分比略微增加,但仍低于0.005%。

[0599] 为在Patu8988S转移中验证CLDN18.2表达,使用用于检测小鼠组织中人细胞的抗-人MHC I类抗体以及抗-密蛋白18(Mid)抗体对肺组织进行免疫组织化学染色。MHC-I染色显示:在小鼠肺组织切片中可检测到明显的转移病灶,但在肝切片中未检测到(图20)。此外,用抗-密蛋白18(Mid)抗体对在这些病灶中的细胞膜进行染色,显示IMAB362靶蛋白在这些细胞中明显表达。因此,除了Suit2-LVT模型外,选择该内源性转移模型用于IMAB362治疗研究。

[0600] 实施例4: IMAB362-介导的细胞杀伤作用

[0601] IMAB362交联诱导有效的凋亡

[0602] 结合于细胞表面靶标的抗体可以引发直接导致细胞死亡的异常信号传导。这样的信号传导事件可取决于靶表位,结合的化合价以及结合是否与靶标的交联相关。对于几种CD20阳性淋巴瘤细胞系,例如,仅在交联条件下观察到通过利妥昔单抗诱导的凋亡。当高亲和力Fc-受体-阳性免疫细胞与包被抗体的肿瘤细胞相互作用时,可以在体内发生这样的交联。

[0603] 如通过TUNEL测定所测量,IMAB362的交联在18-42小时内诱导人胃癌细胞NUGC-4和KATO-III的直接凋亡。凋亡的量级与抗体的剂量以及癌细胞的靶表达水平相关。用吉西他滨治疗导致肿瘤细胞的细胞周期阻滞,随后凋亡细胞死亡。图21中显示吉西他滨处理的胰腺肿瘤细胞的凋亡。

[0604] IMAB362-介导的对胰腺癌细胞的ADCC活性

[0605] IMAB362在募集和激活Fc γ -受体-阳性免疫效应细胞,诸如自然杀伤细胞中为高效的。IMAB362至靶细胞的结合通过在其Fc γ 受体结合于抗体后由效应细胞分泌的颗粒酶和成孔蛋白(perforin)来诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。这种作用机制的影响先前通过存在人外周血单核细胞(PBMC)的情况下,荧光素酶-和CLDN18.2-阳性胃CA细胞(如NUGC-4和KATO-III)与IMAB362温育24小时(效应物与靶标比率=40:1)显示。多达200 μ g/ml IMAB362的应用导致80-100%的最大裂解率。

[0606] 在此,我们测定对胰腺癌细胞系的IMAB362的ADCC活性。将渐增浓度的IMAB362与不同细胞系以40:1的E:T比率温育。在每个实验中加入不同供体的PBMC。表19中概述了所有细胞系的结果。在5个最初鉴定的CLDN18.2-阳性胰腺细胞系中,通过加入IMAB362和PBMC仅有效杀伤Patu8988S、Panc05.04和DANG(图22A)。虽然CLDN18.2表面表达在FACS中对于Panc05.04和DANG是不可检测的,但表达水平显著足以引起效应物细胞-依赖性杀伤(EC_{50} : Patu8988S:0.01-1.4 μ g/ml, DANG/Pan05.04:0.1-38 μ g/ml)。从这些数据可推断,仅表达相对RNA水平 $>5.5 \times 10^5$ 的细胞被有效裂解。

[0607] 还用LVT胰腺癌细胞系及其相应的亲本细胞系进行ADCC分析(图22B-F)。ADCC严格取决于IMAB362至靶标的特异性结合,因为仅CLDN18.2阳性靶细胞被IMAB362和PBMC杀伤。人胰腺癌细胞中由IMAB362诱导的半数最大杀伤和最大杀伤率在PBMC供体之间变化并且还取决于影响CLDN18.2表达水平的细胞的传代次数。

[0608] 图22G-H中显示引起靶细胞的半数最大杀伤率以及最大杀伤率的IMAB362浓度。在以高比率加入少量抗体后杀伤LVT胰腺CA细胞系,然而,对于DANG和Panc05,达到~50%的最大杀伤率需要最高的抗体浓度。对于Panc05.04,用亚克隆15D3(通过Panc05.04的有限稀释和FACS来选择的CLDN18.2阳性克隆)获得的结果包括在显示与用LVT细胞系相当的ADCC裂解率的图中。不幸的是,在继代培养细胞之后,该克隆中的CLDN18.2表达在体外迅速沉默,因此该克隆不会被用于进一步实验。

[0609] IMAB362-介导的针对胰腺癌细胞的CDC活性

[0610] 分析在ADCC测定中用IMAB362杀伤的胰腺癌细胞对IMAB362的补体依赖性裂解活性的敏感性。另外,在CDC中测试LVT细胞系和亲本株。

[0611] CDC活性通过抗原和IgM或IgG抗体的复合物(经典途径)或者通过微生物表面(旁路途径)激活。在经典途径中,补体C5被转化成C5b。过敏毒素C3a、C4a和C5b被释放,并通过C5b、C7、C8和C9的相继结合而形成膜攻击复合物(MAC)。该途径不但受可溶性蛋白质抑制,而且膜结合蛋白质(如CR1、DAF、MCP、CD59、CD55、CD46)保护自身组织。

[0612] 在每次测定中将用CLDN18.2(p740)和荧光素酶稳定转染的CHO-K1细胞用作测定阳性对照(图23A)。通过IMAB362和加入健康人血清库不会裂解细胞系DANG、BxPC3、YAPC、Patu8988S、Panc05.04、CAPAN1和Suit2(图23B)。虽然DANG、Patu8988S和Panc05.04细胞为CLDN18.2阳性,如在所有先前实验中所显示,但这些细胞不会以补体依赖性方式裂解。这最可能是由于以下事实:瘤细胞过表达一种或多种细胞膜结合补体抑制性蛋白质(如CD46、CD55和CD59)(Geis等,Curr Cancer Drug Targets,2010:922-931)。然而,如果这些抑制性蛋白质在肿瘤细胞上的表达影响抗体的临床结果,则疗法仍为矛盾的(Dzietczenia等.Med.Oncol.2010,27:743-6;Weng和Levy,Blood 200198:1352-7)。

[0613] 除了内源性细胞系外,在CDC测定中测试所有的LVT细胞系。如在图23中所显示,加

入至MiaPaCa-2-LVT、Suit2-LVT和CAPAN1-LVT的IMAB362和血清导致剂量-依赖性裂解,其中EC₅₀值范围为0.3µg/ml至2.6µg/ml。

[0614]

人胰腺癌细胞系中 CLDN18.2 表达的概况
表 19 胰腺癌细胞系的自身体外和体内特征。

细胞系	CLDN18.2 mRNA 水平 (RT-PCR)	CLDN18 蛋白水平 (WB) ¹	CLDN18 表面表达 (FACS) ²	CLDN18 胞定位 (IF) ³	ADCC ⁴		CDC		选择用于 IMAB362 治疗研究
					最大裂解 (%)	EC ₅₀ (ng/ml)	最大裂解 (%)	EC ₅₀ (ng/ml)	
AsPC1	2E1	-	0.14%	细胞质核点	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	否
BxPC3 (ATCC)	4.3E4	-	1.16%	n.d.	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	否
BxPC3 (ECACC)	2.9E4	+	0.90%	细胞质	n.m.-60	n.m.	n.d.	n.d.	细胞能够移入, 在 LVT 之后用于体内治疗
BxPC3 LVT	6.1E7	+++		细胞质 + 细胞膜	90.6 ± 6.4	47.7 ± 19.1	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 用于体内治疗
CAPAN1	8.0E2	-	0.54%	阴性 ²	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 在 LVT 之后用于体内治疗
CAPAN1-LVT	1.5E5	+++		细胞质 + 细胞膜	92.6 ± 5.5	65.03 ± 35.1	79.1	970.1	细胞能够移入, 用于体内治疗
CFPAC1	1.5E4	-	0.55%	阴性	0-1.5	n.m.	n.d.	n.d.	否
DANG	4.9E5	++	1.19%	细胞质核点	52.5 ± 7.8	4976.5 ± 4125.4	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 用于体内治疗 (缺点: 恶病质)
DANG-LVT	1.8E8	+++		细胞质 + 细胞膜	85.9 ± 11.7	52.3 ± 27.7	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 用于体内治疗
HPAFII	4.2E3	-	10.00%	阴性	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	选择单克隆失败(缺点: 恶病质)
HPAC	3.6E1	-	0.81%		0-22.2	n.m.-495.6	n.d.	n.d.	细胞能够移入, 在 LVT 之后用于体内治疗
HPAC-LVT	7.0E5	+++		细胞质 + 细胞膜	76.2 ± 19.4	116.8 ± 105.4	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 用于体内治疗

[0615]

细胞系	CLDN18.2 mRNA 水平 (RT-PCR)	CLDN18 蛋白水平 (WB) ¹	CLDN18 表面表达 (FACS) ²	CLDN18 细胞定位 (IF) ³	ADCC ⁴		CDC		选择用于 IMAB362 治疗研究
					最大裂解 (%)	EC ₅₀ (ng/ml)	最大裂解 (%)	EC ₅₀ (ng/ml)	
HUP-T3	1.3E4	-	0.23%	核点	n.m. 17.7	n.m.	n.d.	n.d.	否
HUP-T4	1.1E2	-	5.30%	核点	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	否
KCL-MO H	n.d.	-	n.d.	阴性 ²	n.m.-2.8	n.m.	n.d.	n.d.	否
KP-2	1	-	0.54%	阴性	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	否
KP-4	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	否
MiaPaCa 2	0	-	0.22%	阴性	n.m. 8.1	n.m.	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 在 LVT 之后用于体内治疗
MiaPaCa 2-LVT	1.7E8	+++		细胞质 + 细胞膜	78.1 ± 6.0	23.4 ± 12.3	78.4	340	细胞能够移入, 用于体内治疗
Panc01	5.3E1	-	65%	核点	0-4.5	n.m.	n.d.	n.d.	否
Panc02.0 3	n.d.	-	n.d.	阴性 ²	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	否
Panc03.2 7	2.7E5	+	7.30%	细胞质	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	细胞移入, 观察到一些 CLDN18.2 染色
Panc04.0 3	n.d.	-	1.38%	阴性 ²	n.m.-41.4	n.m.	n.d.	n.d.	否
Panc05.0 4	1.2E5	++	15%	细胞质 + 细胞膜	67.1 ± 6.8	5728.8 ± 4435.1	n.m.	n.m.	选择单克隆失败。细胞不能移入(标准程序)。
Patu8902	1.7E3	-	0.39%	阴性	n.m.-4.2	n.m.	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 在 LVT 之后用于植入
Patu8902-LVT	1.6E8	+++		细胞质 + 细胞膜	74.1 ± 16.4	49.2 ± 86.2	76.7	291.0	细胞能够皮下移入, 用于转移植入, 在 i.v.应用后小鼠死亡
Patu8988 S	3.9E5	+++	81.70%	细胞质 + 细胞膜	70.1 ± 22.1	174.8 ± 137.9	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 形成异质肿瘤/囊肿, 用于体内治疗 (针对皮下肿瘤和转移)

[0616]

细胞系	CLDN18.2 mRNA 水平 (RT-PCR)	CLDN18 蛋白水平 (WB) ¹	CLDN18 表面表达 (FACS) ²	CLDN18 细胞定位 (IF) ³	ADCC ⁴		CDC		选择用于 IMAB362 治疗研究
					最大裂解 (%)	EC ₅₀ (ng/ml)	最大裂解 (%)	EC ₅₀ (ng/ml)	
Patu8988 T	1.5E1	-	6.00%	核点	n.m. - 27.54	n.m. - 470.5	n.d.	n.d.	否
Suit2	1.0E4	-	0.41%	阴性	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 在 LVT 之后, 用于转移研究
Suit2-LV T	2.0E8	+++		细胞质 + 细胞膜	81.2 ± 7.6	73.2 ± 14.7	n.m.	n.m.	细胞能够皮下移入, 用于转移测定
Su86.86	3.2E4	-	1.51%	阴性	n.m. - 14.8	n.m. - 30.4	n.d.	n.d.	否
SW1990	1.8E1	-	2.53%	阴性	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	否
YPAC	1.5E5	(+)	0.23%	阴性	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 在 LVT 之后用于体内治疗
YAPC-LV T	2.5E8	+++		细胞质 + 细胞膜	91.5 ± 6.3	29.5 ± 15.7	n.m.	n.m.	细胞能够移入, 用于体内治疗

- 1: 使用抗-密蛋白 18(C-末端)抗体(Zymed)
- 2: 用 50 µg/ml IMAB362 对 2E5 细胞/100 µl 进行染色
- 3: 在固定和透化细胞上使用抗体 35-22A
- 4: 用至少 2 个供体获得的结果; n.m.: 不可测量的; n.d.未确定。

[0617] 实施例5: IMAB362对胰腺癌异种移植模型的功效

[0618] 在41个所测试的胰腺癌异种移植模型中选择10个来研究IMAB362在体内的功效。

使用具有CLDN18.2高表达的胰腺异种移植模型, IMAB362治疗显示高的抗肿瘤作用。这通过在左侧皮下治疗具有BxPC3-LVT或MiaPaCa-2-LVT异种移植的小鼠来研究。在用每半周注射200 μ g IMAB362进行肿瘤接种之后3天开始治疗。与用盐水对照治疗的小鼠相比, IMAB362治疗的小鼠显示显著地抑制肿瘤生长。另外, IMAB362治疗的小鼠的肿瘤生长抑制导致延长的中位数存活期(图24和图25)。IMAB362功效与治疗的持续时间相关。为检查对所建立肿瘤的作用, 在早期时间点开始IMAB362治疗比晚期治疗开始对肿瘤生长抑制的作用增加。此外, IMAB362的抗肿瘤作用取决于CLDN18.2靶表达的量。与使用表达高CLDN18.2的异种移植肿瘤抑制肿瘤生长相比, IMAB362介导的表达低CLDN18.2的肿瘤(如DANG和Patu8988S异种植物)的生长抑制降低。

[0619] 实施例6: 胰腺转移小鼠模型的治疗

[0620] 表20: 测试IMAB362对胰腺癌转移功效的治疗的概述

细胞系	实验编号 (日期)	治疗组	实验设定
Suit2-LVT	ET2_C220 (22.11.2011)	1. n=15; 200 μ g IMAB362 每半周 i.v./i.p. 2. n=15; 200 μ g 同种型对 照每半周 i.v./i.p. 3. n=15; PBS 每半周 i.v./i.p.	-将2e6 细胞 i.v. 注射至雌性 Hsd: 无胸 腺裸-Foxn1 tm 小鼠的尾静脉 -在肿瘤细胞注射之后 3 天开始治疗
Patu8988S	ET1_C178 (24.05.2011)	1. n=10; 200 μ g IMAB362 每半周 i.v./i.p. 2. n=10; PBS 每半周 i.v./i.p.	-将2e6 细胞 i.v. 注射至雌性 Hsd: 无胸 腺裸-Foxn1 tm 小鼠的尾静脉 -在肿瘤细胞注射之后 3 天开始治疗
Patu8988S	ET1_C178b (03.06.2011)	1. n=15; 200 μ g IMAB362 每半周 i.v./i.p. 2. n=15; 同种型对照每半 周 i.v./i.p.	-将2e6 细胞 i.v. 注射至雌性 Hsd: 无胸 腺裸-Foxn1 tm 小鼠的尾静脉 -在肿瘤细胞注射之后 3 天开始治疗

[0621] [0622] Suit2-LVT转移模型:

[0623] 用 2×10^6 个Suit2-LVT细胞静脉内注射小鼠, 并用如在表20中所示的200 μ g IMAB362、同种型对照抗体(IMAB027)或用PBS治疗。在35天之后, 第一只小鼠(同种型对照组)死亡。因此, 在第42天处死所有小鼠, 取肺和肝用于IHC和Q-PCR分析。

[0624] 将小鼠的肺中人DNA的Q-PCR分析以一式三份重复至少两次。与PBS和同种型对照治疗相比, 如果用IMAB362治疗小鼠, 则用获得的Ct值计算人DNA的百分比揭示在肺中检测的Suit2-LVT转移显著降低($P < 0.05$, 图26A)。为验证这些结果, 制备肺样品的组织切片并使用MHC-I抗体染色。使用ImageJ Program计算肺切片中阳性染色的细胞表面。对于IMAB362治疗, 与PBS治疗相比, 观测到显著的抑制($P < 0.05$), 从而验证了用Q-PCR获得的结果。然而, 对于同种型对照抗体, 差异并不显著(图26B)。该差异最可能是由于组织处理的不同: 与Q-PCR分析相比, 组织切片的IHC处理仅提供对非常小部分的肺的见解, 而对于所述Q-PCR分析, 基因组DNA从一半组织中提取。

[0625] 除了组织处理外, 可能的是, 结果表示靶向CLDN6的同种型对照抗体的意外抑制作用。为研究该选择, 在FACS中分析Suit2-LVT细胞的CLDN6表达和IMAB027结合。将200 μ g/ml IMAB362加入至Suit2-LVT细胞证实与细胞的结合较强, 然而加入200 μ g/ml IMAB027导致抗体与这些靶细胞的结合较弱, 从而表明CLDN6确实在这些细胞上弱表达。这些结果表明至少两种因素(组织处理和弱的IMAB027抑制)导致观测到与同种型对照抗体的差异。

[0626] Patu8988S转移模型

[0627] 为分析IMAB362治疗对Patu8988S体内转移的形成和生长的作用,用 2×10^6 个Patu8988S细胞注射每组10只小鼠。通过将IMAB362治疗与PBS处理的小鼠比较进行第一个实验。在各个组中,注射细胞之后有1只小鼠立即死亡。在其它18只小鼠中,与植入实验相比,转移形成非常迅速。在63天之后,由于健康状况差而处死PBS组中的前2只小鼠。在65天之后,处死所有其它小鼠。肺的光学分析揭示遍及肺组织的较大转移。在Q-PCR实验中分析转移的量(图27)。结果显示IMAB362抑制肺组织中转移的生长。

[0628] 通过将IMAB362治疗与同种型对照(利妥昔单抗)对照治疗比较进行每组11只小鼠的第二个实验。在本实验中,如在植入中所观测,转移形成缓慢。然而,出于可比性,在65天之后终止该第二个实验。在Q-PCR中再次分析肺组织,IMAB362再次降低转移的生长。IMAB362组的一只小鼠被鉴定为异常值,排除该异常值导致几乎显著($P=0.0588$)抑制。如Suit2-LVT转移实验所述,这些数据通过IHC表面分析验证。在此,可鉴定相同的异常值,并在t-检验中省略该数值,IMAB362的抑制也在显著(相同小鼠的数值)的边界($P=0.0691$)。

[0629] 实施例7:与化学疗法组合的IMAB362的主要药效学

[0630] 胰腺癌细胞对吉西他滨和奥沙利铂的敏感性

[0631] 将组成型表达CLDN18.2的胰腺癌细胞系(DANG, Patu8988S)和用CLDN18.2稳定转导的细胞(MiaPaCa-2-LVT, BxPC3-LVT)用于研究与化学治疗剂奥沙利铂或吉西他滨相组合的IMAB362的作用模式。

[0632] 化学上,吉西他滨(Gemzar,由Eli Lilly&Co出售)为核苷类似物。与5-氟尿嘧啶(5-FU)以及嘧啶的其它类似物一样,吉西他滨的三磷酸类似物在DNA复制期间替代核酸的结构单元中的一种。所述过程使阻滞肿瘤生长阻滞,因为仅一种另外的核苷可连接于“错误”核苷,从而导致凋亡。

[0633] 奥沙利铂通过在DNA中形成链间和链内交联发挥功能。DNA中的交联防止DNA复制和转录,从而导致细胞死亡(Graham, Joanne; Mushin, Mohamed; Kirkpatrick, Peter (January 2004). "Oxaliplatin". Nature Reviews Drug Discovery 3(1):11-2.)。

[0634] 吉西他滨和奥沙利铂的剂量响应曲线显示所测试胰腺肿瘤细胞系的不同敏感性(图28和图29)。

[0635] 表21:吉西他滨和奥沙利铂对胰腺癌细胞系的IC50值。

	IC50	
增殖的抑制	吉西他滨	奥沙利铂
[0636] BxPC3-LVT	~2 ng/ml	500-1000 ng/ml
Capan1-LVT	~1 ng/ml	~100 ng/ml
DANG	~1 ng/ml	~500 ng/ml
Patu8988S-luci#6	>100 ng/ml	>500 ng/ml
[0637] MiaPaCa-2-LVT	50 ng/ml	50-100 ng/ml

[0638] 为抑制Patu8988S的细胞增殖,高浓度的吉西他滨($IC_{50}>100ng/ml$)或奥沙利铂($IC_{50}>500ng/ml$)是必需的。DANG和BxPC3-LVT对吉西他滨反应非常敏感,但对奥沙利铂反应不敏感。MiaPaCa-2-LVT细胞对奥沙利铂反应最敏感,但对用吉西他滨治疗敏感性较低(图28,图29和表21)。

[0639] 化学治疗剂对胰腺癌细胞系中CLDN18.2表达的作用

[0640] 通过IMAB362结合触发的作用模式严格取决于其靶标CLDN18.2的存在和细胞表面密度。用吉西他滨(Gem)以及吉西他滨与奥沙利铂的组合(GemOx)预处理DANG和Patu8988S细胞,导致CLDN18.2的mRNA和蛋白质水平增加,这通过未处理的和化学疗法预处理的细胞的RT-PCR(图30)和蛋白质印迹(图31)分析显示。因此,如通过流式细胞术显示,在Gem或GemOx预处理的胰腺癌细胞系的表面上可被IMAB362靶向的CLDN18.2蛋白质的量增加(图32)。

[0641] 用吉西他滨处理DANG和Patu8988S导致CLDN18.2的上调。用Gem,Patu8988S显示CLDN18.2的上调较强,用GemOx,Patu8988S显示CLDN18.2的上调较低。

[0642] 化学治疗化合物对细胞周期和CLDN18.2表达的作用

[0643] 细胞周期进程是指细胞中一个有丝分裂与另一有丝分裂之间的事件的顺序。在静止期(G0/G1)之后为DNA合成期(S),然后为细胞增大期(G2)和DNA复制(M),之后细胞分裂成两个子代细胞。细胞机制的任何干扰可以抑制细胞周期在任何时期的所有周期进程。例如,特异性化学治疗剂可以阻断G2或M或G2和M(G2/M)的进程。

[0644] DANG或Patu8988S的吉西他滨处理导致细胞周期阻滞在S-期(图33,图34)。分析用Gem培养的Patu8988S。吉西他滨处理不仅导致细胞周期阻滞,而且还改变CLDN18.2的表达(图34B)。当将在S期的增殖细胞与在G0/G1期中的静止细胞比较时,在吉西他滨处理之后CLDN18.2密度的变化甚至更高(图34C)。在Patu8988S细胞中,CLDN18.2在细胞周期的所有时期表达。在用吉西他滨处理后,其表达甚至增加,其中在S期细胞群中发现最高水平的CLDN18.2/细胞。

[0645] 肿瘤细胞表型的扰动对治疗性抗体的生物有效性具有显著影响。ADCC和CDC为剂量相关的,因此靶结构CLDN18.2的增加为标准的化学治疗方案提供协同益处。

[0646] $37^{\circ}C$ 和5% CO_2 下,在含有或不含细胞抑制性化合物的情况下,将Kato III细胞(人胃肿瘤细胞系)在含有20%FCS(Perbio)和2mM Glutamax(Invitrogen)的RPMI 1640培养基(Invitrogen)中培养。在10或100ng/ml的浓度下测试5-FU(来自NeoCorp AG的Neofluor),在50或500ng/ml的浓度下测试奥沙利铂(Hospira)。 $37^{\circ}C$,5% CO_2 下,将 8×10^5 个Kato III细胞在6孔组织培养板中培养96小时而不改变培养基,或者培养72小时,随后在标准培养基中培养24小时以使细胞从细胞周期阻滞释放。用EDTA/胰蛋白酶收获细胞、洗涤并分析。

[0647] 对于CLDN18.2细胞的细胞外检测,用单克隆抗-CLDN18.2抗体IMAB362(Ganymed)或同种型匹配的对照抗体(Ganymed)对细胞进行染色。使用来自Dianova的第二试剂山羊-抗-huIgG-APC。

[0648] 基于细胞DNA含量的测量来测定细胞周期阶段。这允许区分处于细胞周期的G1-、S-或G2-期的细胞。在S-期中发生DNA复制,而在G2-期细胞生长并为有丝分裂做准备。遵循制造商的方案,使用来自BD Biosciences的CycleTEST PLUS DNA试剂盒来进行细胞周期分析。通过使用BD FACS CantoII(BD Biosciences)和FlowJo(Tree Star)软件进行流式细胞

术采集和分析。

[0649] 图35a和b中的柱状图显示细胞处于细胞周期的G1-、S-或G2-期的各自百分比。培养基培养的Kato III细胞显示细胞周期主要阻滞在G1-期。用5-FU处理的细胞主要在S-期阻断。奥沙利铂处理的Kato III细胞显示细胞主要在G1-和G2-期富集。如图35c中可见,细胞周期阻滞在S-期或G2-期导致CLDN18.2的稳定化或上调。一旦细胞从细胞周期的任何时期释放(图35b),Kato III细胞的细胞表面上CLDN18.2的表达上调(图35d)。

[0650] 用伊立替康或多西他赛将Kato III细胞预处理4天并分析CLDN18.2表达和细胞周期阻滞。用伊立替康处理细胞导致细胞生长的剂量依赖性抑制以及细胞周期阻滞在S/G2-期(图36)。用多西他赛处理细胞导致细胞生长的剂量依赖性抑制以及细胞周期阻滞在G2-期(图36)。

[0651] 化学疗法对IMAB362诱导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的作用

[0652] 用组成型表达CLDN18.2的胰腺癌细胞系Patu8988S和DANG进行一系列实验以研究吉西他滨(Gem)或吉西他滨+奥沙利铂(GemOx)对IMAB362-介导的ADCC的作用。将预处理细胞的IMAB362介导的细胞裂解的剂量-响应曲线与培养的培养基进行比较。

[0653] 与未处理的靶细胞相比,Gem(1ng/ml)或GemOx(Gem 1ng/ml+Ox10ng/ml)预处理的DANG(2天)的剂量响应曲线向上且向左移位(图37A)。用Gem或GemOx处理肿瘤细胞导致CLDN18.2上调和IMAB362介导的ADCC的较高易感性。我们可观测到用化学治疗剂处理之后DANG细胞的EC50值降低以及IMAB362-介导的ADCC的较高最大细胞裂解(图37B)。

[0654] 将来自健康人供体的外周血单核细胞(PBMC),包括NK细胞、单核细胞、单核细胞或其它效应细胞通过Ficoll Hypaque密度离心纯化。将洗涤的效应细胞接种在X-Vivo培养基中。在该设置中,将内源性表达CLDN18.2且为胃起源的Kato III细胞用作靶细胞。靶细胞稳定地表达荧光素酶(荧光黄),其仅被活细胞氧化。以不同浓度加入纯化的抗-CLDN18.2抗体IMAB362,并将其用作同种型对照抗体,即无关的chim huIgG1抗体。通过测量由荧光黄的氧化引起的发光来测定样品的细胞溶解,其在IMAB362诱导的细胞毒性之后留下的活细胞的量的数值。将用伊立替康(1000ng/ml)、多西他赛(5ng/ml)或顺铂(2000ng/ml)预处理3天的Kato III与未处理的培养基培养的靶细胞进行比较并量化IMAB362诱导的ADCC。

[0655] 与培养基培养的靶细胞相比,用伊立替康、多西他赛或顺铂预处理3天的Kato III细胞显示出较低水平的活细胞(图38a);与培养基培养的细胞相比,用伊立替康、多西他赛或顺铂预处理的细胞中的密蛋白18.2表达增加(图38b)。

[0656] 此外,用伊立替康、多西他赛或顺铂预处理Kato III细胞增加IMAB362诱导ADCC的效能(图38c,d)。

[0657] 化学疗法对IMAB362诱导的CDC的作用

[0658] IMAB362的CDC效能已通过存在人血清作为补体来源的情况下与靶细胞温育来表征。

[0659] 培养基培养的MiaPaCa-2-LVT显示对IMAB362特异性裂解的7665ng/ml的EC50值。与最大裂解增加相比,用Gem处理导致EC50降至4677ng/ml(图39)。

[0660] 通过用10ng/ml 5-FU和500ng/ml奥沙利铂(5-FU+OX)预处理KATO III胃癌细胞48小时来分析化学治疗剂对IMAB362-诱导的CDC的作用。图40中显示使用化学治疗预处理KATO III细胞的IMAB362-诱导的CDC的代表性剂量响应曲线。与未处理的细胞相比,将肿瘤

细胞预处理48小时增加IMAB362诱导CDC的效能,从而导致预处理的肿瘤细胞的较高最大细胞裂解。

[0661] 实施例8:在小鼠肿瘤模型中与化学疗法组合的IMAB362的功效

[0662] 在皮下胰腺癌异种移植模型中检查与Gem或GemOx组合的IMAB362的抗肿瘤活性,将其用于测试之前作为单一试剂的IMAB362的功效。

[0663] 与用盐水对照治疗的对照小鼠相比,用IMAB362治疗的BxPC3-LVT或MiaPaCa-2-LVT荷瘤裸鼠显示显著的肿瘤生长阻滞。在无另外的IMAB362治疗的情况下,用多达100mg/kg吉西他滨的化学疗法对BxPC3-LVT或MiaPaCa-2-LVT异种移植植物未显示出显著的治疗作用。相比之下,与单独用化学疗法治疗的小鼠相比,用50-100mg/kg吉西他滨加上IMAB362的组合治疗导致显著增加的肿瘤生长抑制,并导致荷瘤小鼠的存活延长(图41,图42,图43)。这些观测结果表明,存在通过吉西他滨和IMAB362免疫疗法的组合的协同治疗作用。

[0664] 当使用2x150mg/kg/周的高剂量的吉西他滨时,建立的MiaPaCa-2-LVT异种移植肿瘤在与IMAB362治疗无关的肿瘤生长中受到强烈地抑制(图44A)。然而,与用作为单一试剂的吉西他滨治疗的小鼠相比,用IMAB362和吉西他滨的组合疗法治疗的小鼠显示存活高度显著的延长(图44B)。

[0665] 实施例9:ZA/IL-2治疗导致大量V γ 9V δ 2 T-细胞扩增

[0666] 将PBMC在补充有300U/ml IL-2和含有或不含1 μ M唑来膦酸(ZA)的RPMI培养基中培养14天。在第0天和第14天,通过多色FACS测定CD3+淋巴细胞群体内V γ 9+V δ 2+T细胞的百分比和CD3+V γ 9+V δ 2+T细胞群体内CD16+细胞的百分比。

[0667] PBMC培养物中添加IL-2对于淋巴细胞的存活和生长是必需的。它们在供应有300U/ml IL-2的培养物中有效地扩增。使用V γ 9和V δ 2特异性抗体的FACS分析揭示,添加ZA/IL-2特异性诱导V γ 9V δ 2T细胞的积聚。在14天之后,CD3+淋巴细胞群可包括多达80%的V γ 9V δ 2T细胞。一部分V γ 9V δ 2T细胞表达CD16,而这些细胞在CD3+淋巴细胞群体内富集为10-700倍,这取决于供体。与不含ZA而生长的培养物相比,CD16+V γ 9+V δ 2+T细胞在培养物中富集更高10-600倍。我们得出结论,PBMC的体外ZA/IL-2治疗导致显著比例的 γ δ T细胞中ADCC-介导的Fc γ III受体CD16上调。

[0668] 与NK细胞相似,ZA/IL-2扩增的V γ 9V δ 2T细胞为CD16阳性,细胞结合抗体经由Fc γ RIII受体触发ADCC。为评估V γ 9V δ 2T细胞是否能够与IMAB362共同诱导有效的ADCC,进行了一系列实验。

[0669] 将来源于2种不同供体(#1和#2)的PBMC在含有300U/ml IL-2和含有或不含1 μ M ZA的培养基中培养。在14天之后,收获细胞并将渐增浓度(0.26ng/ml-200 μ g/ml)的IMAB362加入表达CLDN18.2的NUGC-4细胞中。在荧光素酶测定中测定特异性杀伤。用在300U/ml IL-2和含有或不含ZA中生长的27种供体进行ADCC测定,其中NUGC-4用作靶细胞。对于每种供体,由剂量-响应曲线计算EC₅₀值并在散点图中评分200 μ g/ml IMAB362剂量下的最大特异性杀伤率。

[0670] 使用用ZA/IL-2培养14天的PBMC,观测到针对CLDN18.2-阳性NUGC-4细胞的强的IMAB362-依赖性ADCC活性。使用ZA/IL-2-处理的PBMC培养物,ADCC取决于V γ 9V δ 2T细胞的存在。如果细胞在不含ZA的情况下培养,对于大部分供体而言,ADCC活性降低。在这些培养物中,残余的ADCC活性为NK-细胞依赖的。通过测试多于20个供体,与用单独的IL-2培养的

PBMC相比,ADCC测定揭示PBMC的ZA/IL-2治疗改善EC₅₀和最大特异性杀伤率。

[0671] 实施例10:与吉西他滨组合的IMAB362在小鼠转移模型中的功效

[0672] 为分析与吉西他滨治疗组合的IMAB362对Patu8988S体内肺转移的作用,用将 2×10^6 个Patu8988S细胞静脉内注入尾静脉来治疗每组12只Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠。在肿瘤细胞注射后14天,小鼠通过以下治疗4周:用200 μ g IMAB362或作为对照的PBS每半周(i.v./i.p.)加上每周剂量100mg/kg吉西他滨i.p.。保持用IMAB362或PBS治疗直至肿瘤细胞注射后70天处死小鼠。通过在制备的肺中人DNA的QPCR以及通过用抗-人MHC-I抗体(克隆EPR1394Y)的免疫组织学染色的光学分析来进行肺中所荷载异种移植肿瘤的分析。结果显示,用IMAB362加上吉西他滨治疗的小鼠在其肺中具有显著减少量的人DNA(图45A),以及针对人MHC-I复合物染色的肺切片表面显著小于用无关抗体加上吉西他滨治疗的小鼠的肺(图45B)。两种方法都揭示在IMAB362加上吉西他滨治疗的小鼠的肺中降低Patu8988s异种植物的肿瘤荷载,从而显示与IMAB362的组合显著优于用吉西他滨的单一疗法。

[0673]

申请人或代理人档案号342-73PCT

国际申请号

[0674] 关于微生物保藏或其它生物材料的说明(PCT细则13之二)

[0675]

A. 对说明书第 49 页, 第 3 行所述的已保藏的微生物或其它生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/>	
保藏单位名称 DSMZ-德国微生物菌种保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮编和国名) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
保藏日期 2005 年 10 月 19 日	保藏号 DSM ACC2737
C. 补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	
-与小鼠(小家鼠)脾细胞融合的小鼠(小家鼠)骨髓瘤 P3X63Ag8U.1 -分泌抗人密蛋白-18A2 抗体的杂交瘤	
D.本说明是为了下列指定国家作的(如果说明不是为所有指定家而作的)	
E. 补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提交(写出说明的类别, 如保藏的保藏号)	

由受理局填写

<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写

<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

PCT/RO/134 表(1998 年 7 月, 2004 年 1 月再版)

新的国际专利申请

咖尼米德制药股份公司等

[0676]

“用于治疗癌症的涉及抗密蛋白 18.2 抗体的组合疗法”

我们的档案号: 342-73 PCT

[0677]

生物材料附加页

[0678]

其它保藏证明:

[0679]

1) 保藏物 (DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742,

DSM ACC2743,DSM ACC-2745,DSM ACC2746,DSM ACC2747,DSM ACC2748)的保藏机构的名称和地址为:

[0680] DSMZ-德国微生物菌种保藏中心

[0681] Mascheroder Weg 1b

[0682] 38124 Braunschweig

[0683] DE

[0684] 2) 保藏物(DSM ACC2808,DSM ACC2809,DSM ACC2810)的保藏机构的名称和地址为:

[0685] DSMZ-德国微生物菌种保藏中心

[0686] Inhoffenstr.7B

[0687] 38124 Braunschweig

[0688] DE

[0689]

保藏日期	保藏号	以下说明在说明书中以下页中与保藏微生物相关
2005年10月19日	DSM ACC2738	第49页,第4行
2005年10月19日	DSM ACC2739	第49页,第5行
2005年10月19日	DSM ACC2740	第49页,第6行
2005年10月19日	DSM ACC2741	第49页,第7行
2005年10月19日	DSM ACC2742	第49页,第8行
2005年10月19日	DSM ACC2743	第49页,第9行
2005年11月17日	DSM ACC2745	第49页,第10行
2005年11月17日	DSM ACC2746	第49页,第11行
2005年11月17日	DSM ACC2747	第49页,第12行
2005年11月17日	DSM ACC2748	第49页,第13行
2006年10月26日	DSM ACC2808	第49页,第14行
2006年10月26日	DSM ACC2809	第49页,第15行
2006年10月26日	DSM ACC2810	第49页,第16行

[0690] 所有上文提及的保藏的其他说明:

[0691] -与小鼠(小家鼠)脾细胞融合的小鼠(小家鼠)骨髓瘤P3X63Ag8U.1

[0692] -分泌抗人密蛋白-18A2抗体的杂交瘤

[0693] 3) 保藏人:

[0694] 所有上文提及的保藏由以下提交:

[0695] 咖尼米德制药股份公司

[0696] Freiligrathstraße 12

[0697] 55131 Mainz

[0698] DE。

<110> 咖尼米德制药股份公司
TRON-美因茨约翰尼斯·古腾堡大学附属转化肿瘤医学院公益有限公司

<120> 用于治疗癌症的涉及抗密蛋白18.2抗体的组合疗法

<130> 342-73 PCT

<150> PCT/EP2013/000505

<151> 2013-02-20

<160> 54

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

[0001] Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1 5 10 15

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser

	100		105		110
	Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser				
	115		120		125
	Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val				
	130		135		140
	Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly				
	145		150		155 160
	Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe				
		165		170	175
	Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met				
		180		185	190
[0002]	Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala				
	195		200		205
	Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly				
	210		215		220
	Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile				
	225		230		235 240
	Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser				
		245		250	255
	Lys His Asp Tyr Val				
	260				
	<210> 2				
	<211> 261				
	<212> PRT				
	<213> 智人				
	<400> 2				

Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu
1 5 10 15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly
35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95

[0003] Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255

Lys His Asp Tyr Val
 260

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

[0004] Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn
 1 5 10

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln
 1 5 10

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe
 1 5 10

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly
 1 5 10

<210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile
 1 5 10

[0005]

<210> 8
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala
 1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser
 20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala
 35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
 50 55

<210> 9
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 9

Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys
1 5 10 15

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
20

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr
1 5 10 15

Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe
20 25 30

[0006]

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
35 40

<210> 11

<211> 153

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala
1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser
20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala
35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly

50

55

60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 13

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR产物的翻译

<400> 13

[0008]

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
35 40 45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
50 55 60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
65 70 75 80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
85 90 95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

	100		105						110								
	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
			115					120					125				
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
		130					135					140					
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
		145				150					155					160	
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
					165					170					175		
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
				180					185					190			
[0009]	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	
			195					200					205				
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
		210					215					220					
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	
		225				230					235					240	
	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
					245					250					255		
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
				260					265					270			
	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
			275					280					285				
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
		290					295					300					

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 14
<211> 466
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列的描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 14

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

[0010]

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220

[0011] Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

	325		330		335
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu				
	340		345		350
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				
	355		360		365
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu				
	370		375		380
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp				
	385		390		395
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val				
		405		410	
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp				
[0012]		420		425	
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His				
		435		440	
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro				
		450		455	
					460
	Gly Lys				
	465				
	<210> 15				
	<211> 467				
	<212> PRT				
	<213> 人工				
	<220>				
	<223> 人工序列的描述: 嵌合单克隆抗体				
	<400> 15				
	Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser				

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

[0013]

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

[0014] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

	405	410	415
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	420	425	430
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	435	440	445
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	450	455	460
	Pro Gly Lys		
	465		
	<210> 16		
	<211> 465		
	<212> PRT		
	<213> 人工		
[0015]	<220>		
	<223> 人工序列的描述: 嵌合单克隆抗体		
	<400> 16		
	Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly		
	1	5	10 15
	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg		
	20	25	30
	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
	35	40	45
	Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu		
	50	55	60
	Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn		
	65	70	75 80
	Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser		

	85	90	95
	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val 100	105	110
	Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 115	120	125
	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 130	135	140
	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 145	150	160
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp 165	170	175
[0016]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 180	185	190
	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser 195	200	205
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro 210	215	220
	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys 225	230	235
	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 245	250	255
	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 260	265	270
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 275	280	285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

[0017] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 17

<211> 467
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列的描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 17

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

[0018]

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

				165						170									175
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala			
				180					185					190					
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val			
			195					200					205						
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His			
		210					215					220							
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys			
	225					230					235					240			
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly			
					245					250						255			
[0019]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met			
				260					265					270					
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His			
			275					280					285						
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val			
		290					295					300							
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr			
	305					310					315					320			
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly			
					325					330					335				
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile			
				340					345					350					
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val			
			355					360					365						

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

[0020]

Pro Gly Lys
465

<210> 18
<211> 466
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列的描述：嵌合单克隆抗体

<400> 18

Met Glu Trp Arg Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val
1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
35 40 45

Asp Tyr Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu
 65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr
 85 90 95

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 100 105 110

Phe Cys Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

[0021] Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

	245	250	255
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 260	265	270
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 275	280	285
	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 290	295	300
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 305	310	315
	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 325	330	335
[0022]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 340	345	350
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 355	360	365
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 370	375	380
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 385	390	395
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 405	410	415
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp 420	425	430
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 435	440	445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 19
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列的描述：嵌合单克隆抗体

<400> 19

Met Asp Trp Ile Trp Ile Met Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

[0023]

Ile Gln Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val
 35 40 45

Phe Pro Phe Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly
 50 55 60

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

Gly Glu Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser
 85 90 95

Asn Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

[0024] Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

	325		330		335
	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala				
	340		345		350
	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro				
	355		360		365
	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln				
	370		375		380
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala				
	385		390		395
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr				
		405		410	
	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu				
[0025]		420		425	
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser				
		435		440	
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser				
		450		455	
	Leu Ser Pro Gly Lys				
	465				
	<210> 20				
	<211> 240				
	<212> PRT				
	<213> 人工				
	<220>				
	<223> 人工序列的描述: 嵌合单克隆抗体				
	<400> 20				
	Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser				

1	5	10	15
Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr	20	25	30
Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser	35	40	45
Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln	50	55	60
Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg	65	70	75
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	85	90	95
[0026] Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr	100	105	110
Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr	115	120	125
Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe	130	135	140
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys	145	150	155
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val	165	170	175
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln	180	185	190
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser	195	200	205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 21
<211> 235
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列的描述：嵌合单克隆抗体

<400> 21

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

[0027]

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

[0028]

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 22

<211> 234

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列的描述：嵌合单克隆抗体

<400> 22

Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Val Arg Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

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

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp
 100 105 110

Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

[0029] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 23

<211> 240
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列的描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 23

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

[0030]

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

	85	90	95
	Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr 100	105	110
	Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr 115	120	125
	Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe 130	135	140
	Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys 145	150	155
	Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val 165	170	175
[0032]	Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln 180	185	190
	Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser 195	200	205
	Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His 210	215	220
	Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225	230	235
	<210> 25		
	<211> 239		
	<212> PRT		
	<213> 人工		
	<220>		
	<223> 人工序列的描述：嵌合单克隆抗体		
	<400> 25		
	Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser		

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

[0033]

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 26
<211> 240
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列的描述：嵌合单克隆抗体

<400> 26

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

[0034]

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
100 105 110

His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

[0035]

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 27

<211> 240

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列的描述：嵌合单克隆抗体

<400> 27

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

[0036] Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 28

<211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列的描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 28

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
 1 5 10 15

Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
 20 25 30

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
 50 55 60

[0037]

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

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 100 105 110

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

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

	165		170		175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr					
	180		185		190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys					
	195		200		205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro					
	210		215		220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	225		230		
<210> 29					
<211> 117					
<212> PRT					
<213> 人工					
[0038] <220>					
<223> 人工序列的描述：PCR产物的翻译					
<400> 29					
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala					
1	5		10		15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr					
	20		25		30
Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe					
	50		55		60
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr					
65	70		75		80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys					

85

90

95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 30
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列的描述: PCR产物的翻译

<400> 30

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

[0039]

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列的描述: PCR产物的翻译

<400> 31

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

[0040]

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

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

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

Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 人工序列的描述：PCR产物的翻译

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0041]

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

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列的描述：PCR产物的翻译

<400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln 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 Thr Asp Tyr
 20 25 30

Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

[0042]

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR产物的翻译

<400> 34

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Phe
 20 25 30

Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp
 35 40 45

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

Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 35

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工

[0043]

<220>

<223> 人工序列的描述：PCR产物的翻译

<400> 35

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列的描述: PCR产物的翻译

<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

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

[0045]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

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

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

<210> 38
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列的描述: PCR产物的翻译

<400> 38

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

[0047]

<210> 40
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列的描述: PCR产物的翻译

<400> 40

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

<213> 人工

<220>

<223> 表位

<400> 45

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 表位

<400> 46

Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu
1 5 10 15

[0051]

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 表位

<400> 47

Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 表位

<400> 48

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser

	<400> 52 ccagaagtta gtcaccagca tgttgg	26
	<210> 53 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸	
[0053]	<400> 53 gggataattt cagctgacta aacag	25
	<210> 54 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸	
	<400> 54 ttccgttttag ttaggtgcag ttatc	25

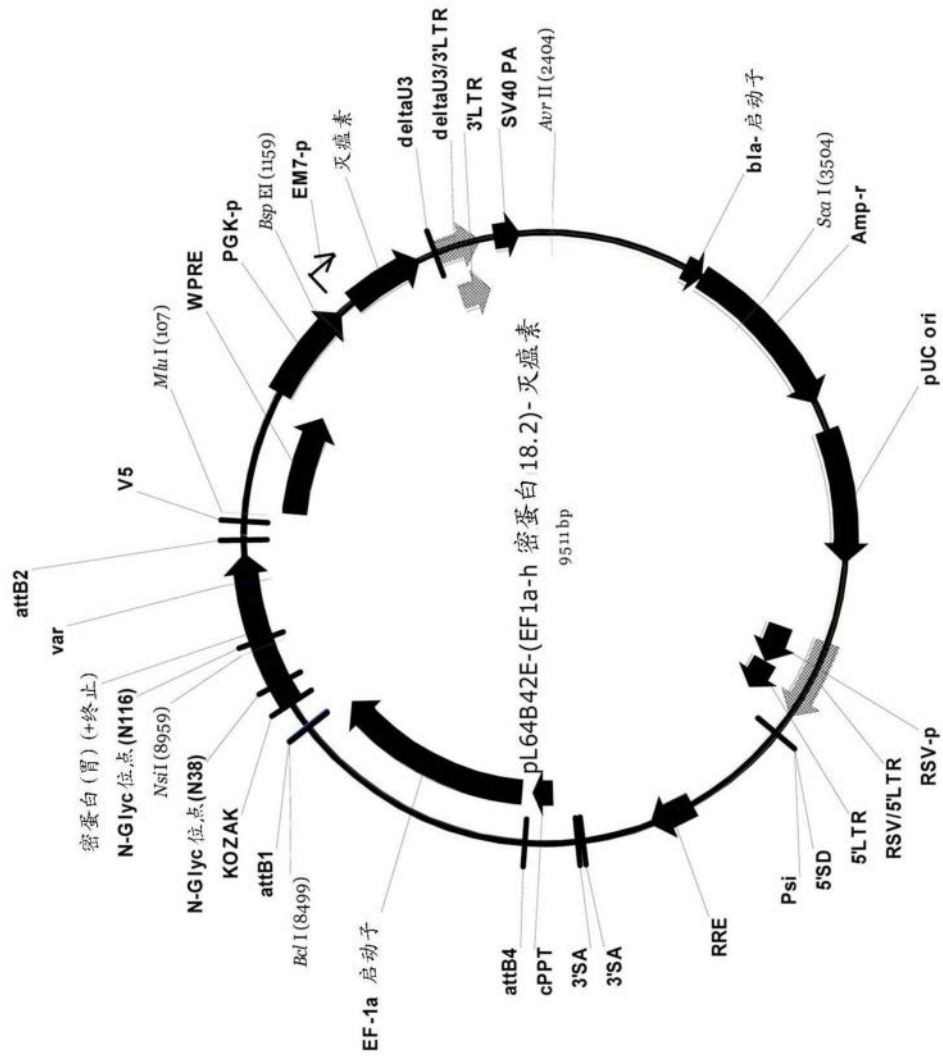


图1

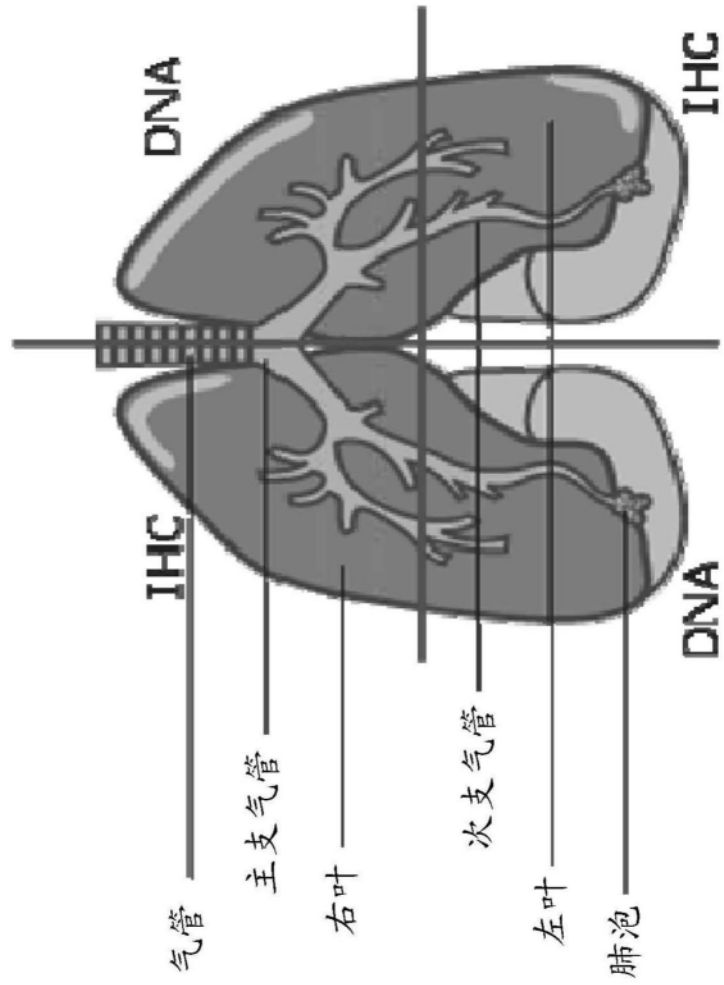


图2

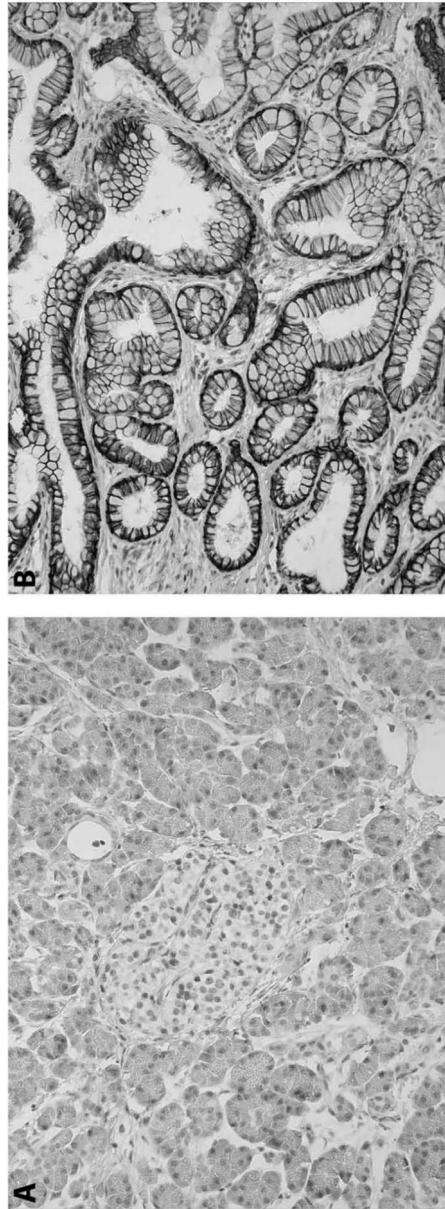


图3

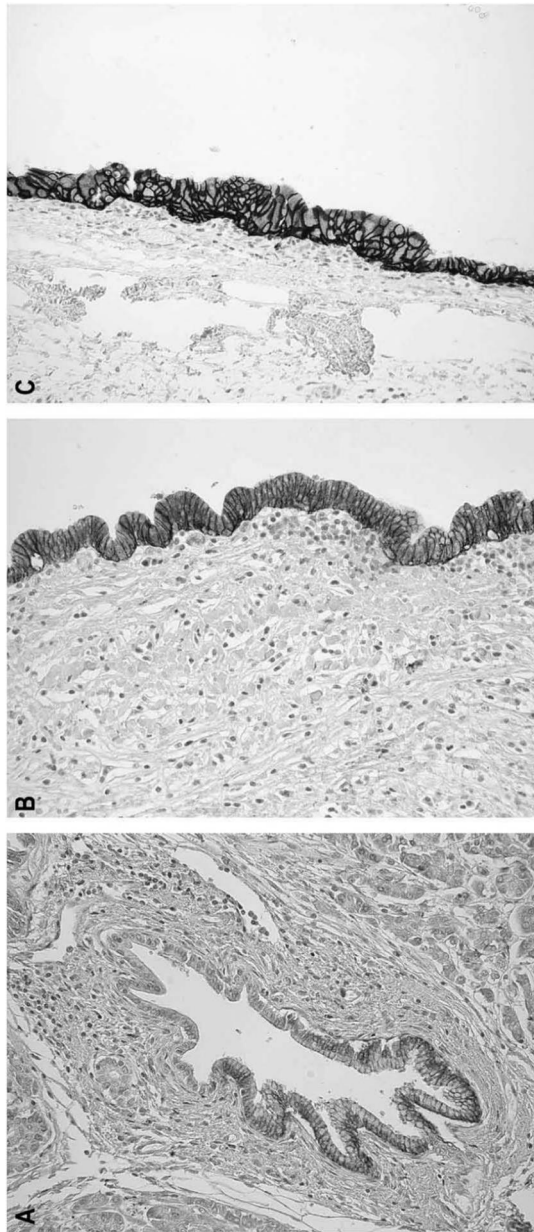


图4

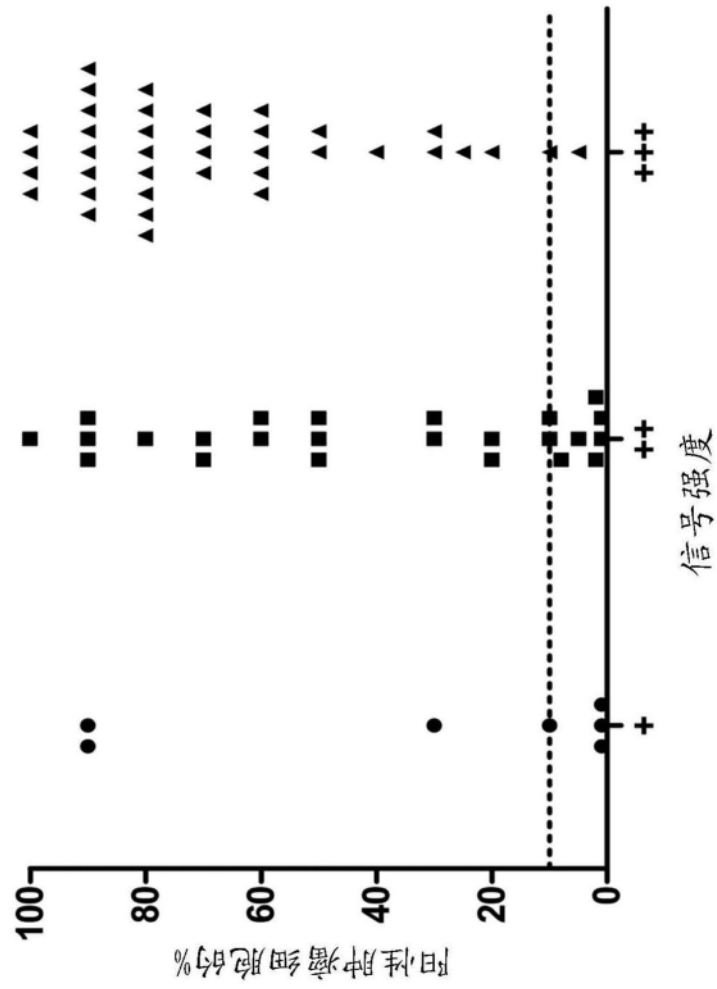


图5

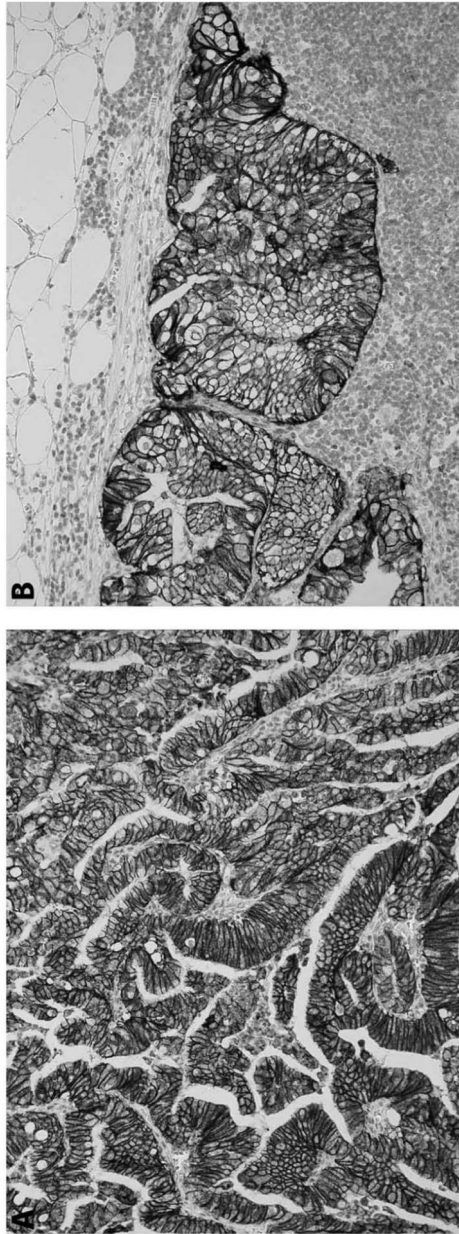


图6

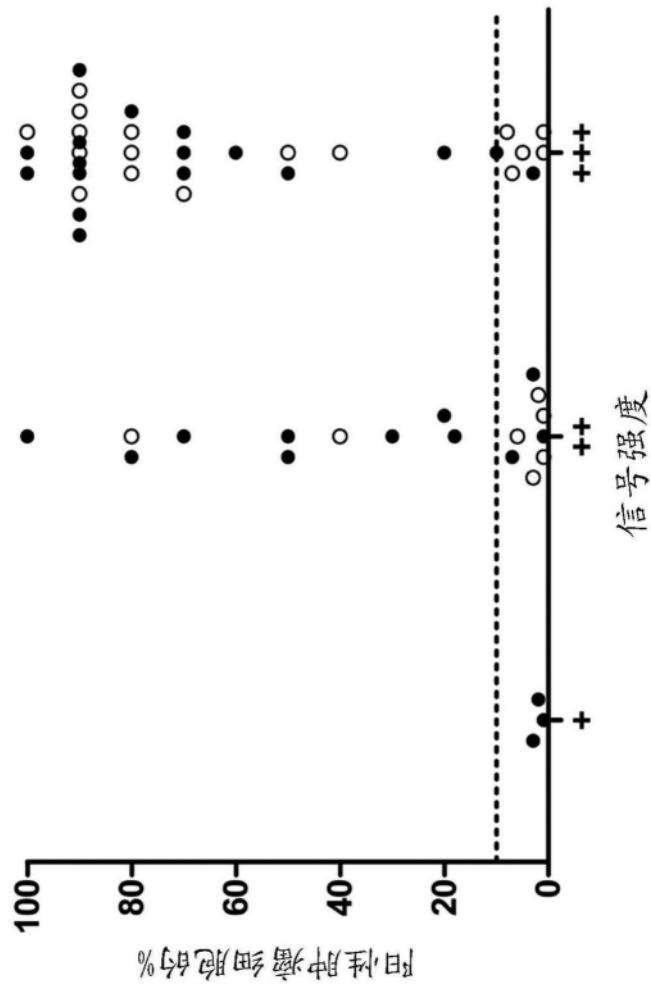


图8

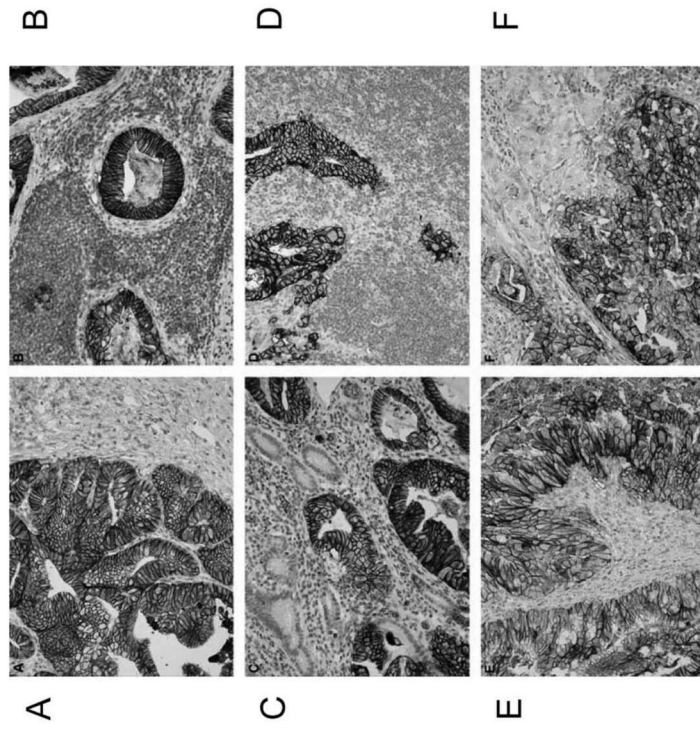


图9

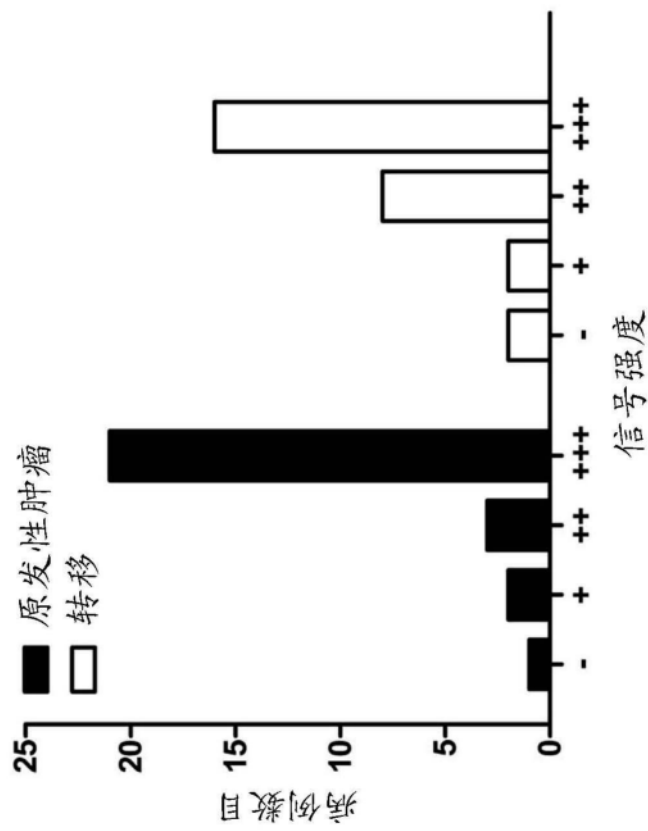


图10

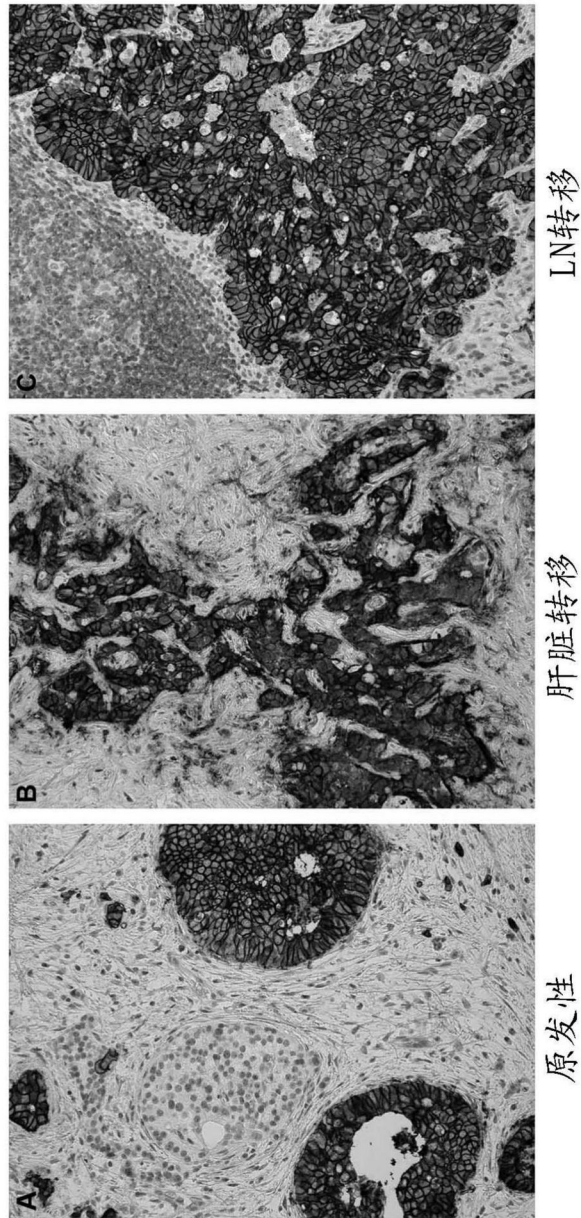
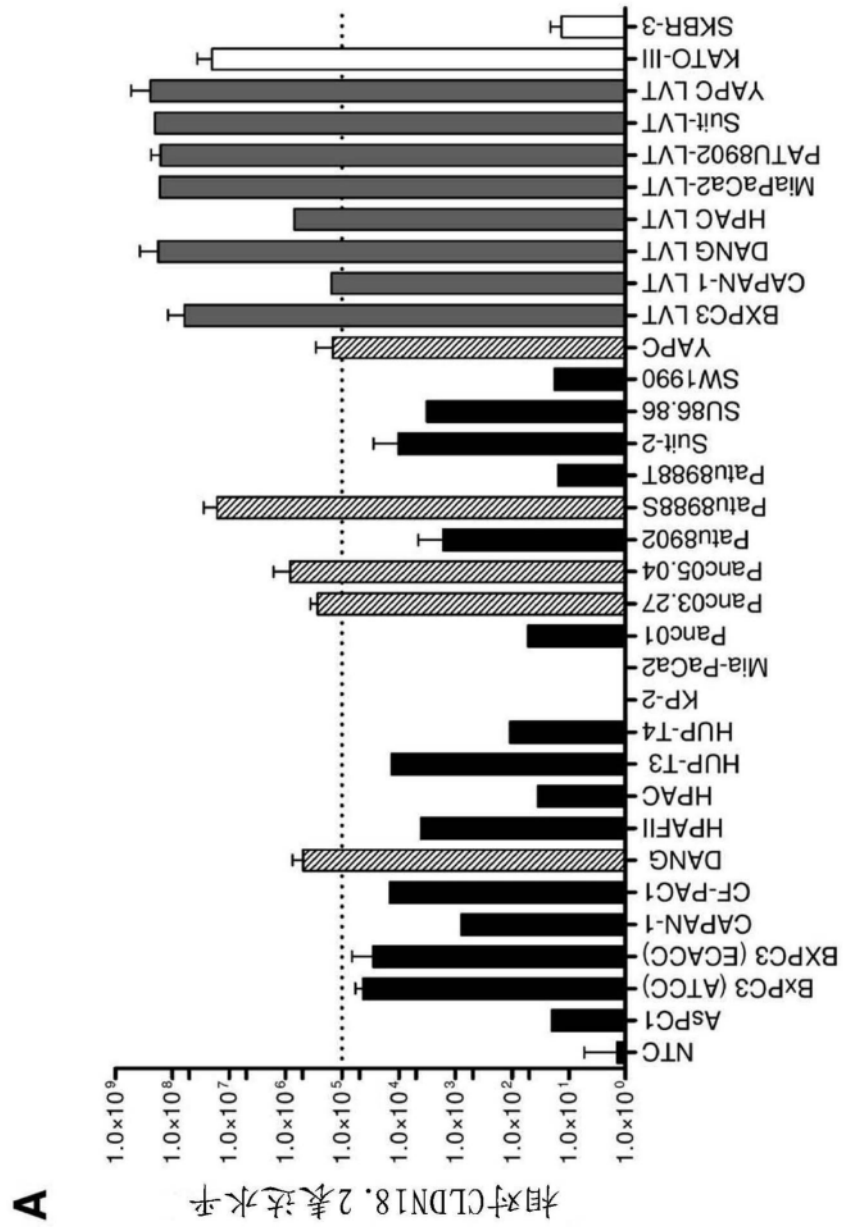


图11



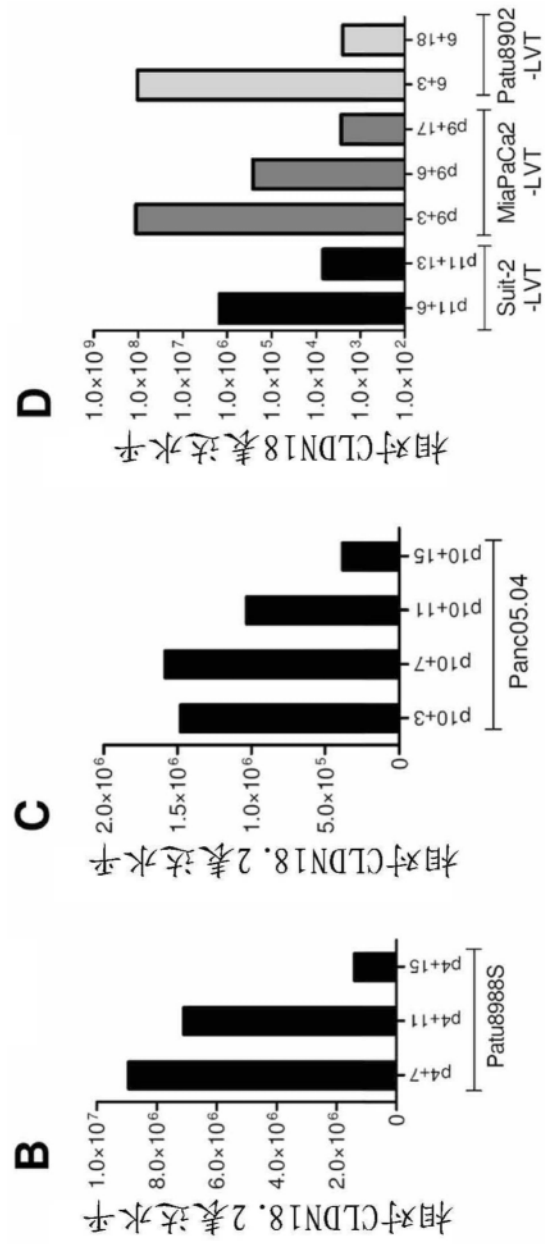


图12

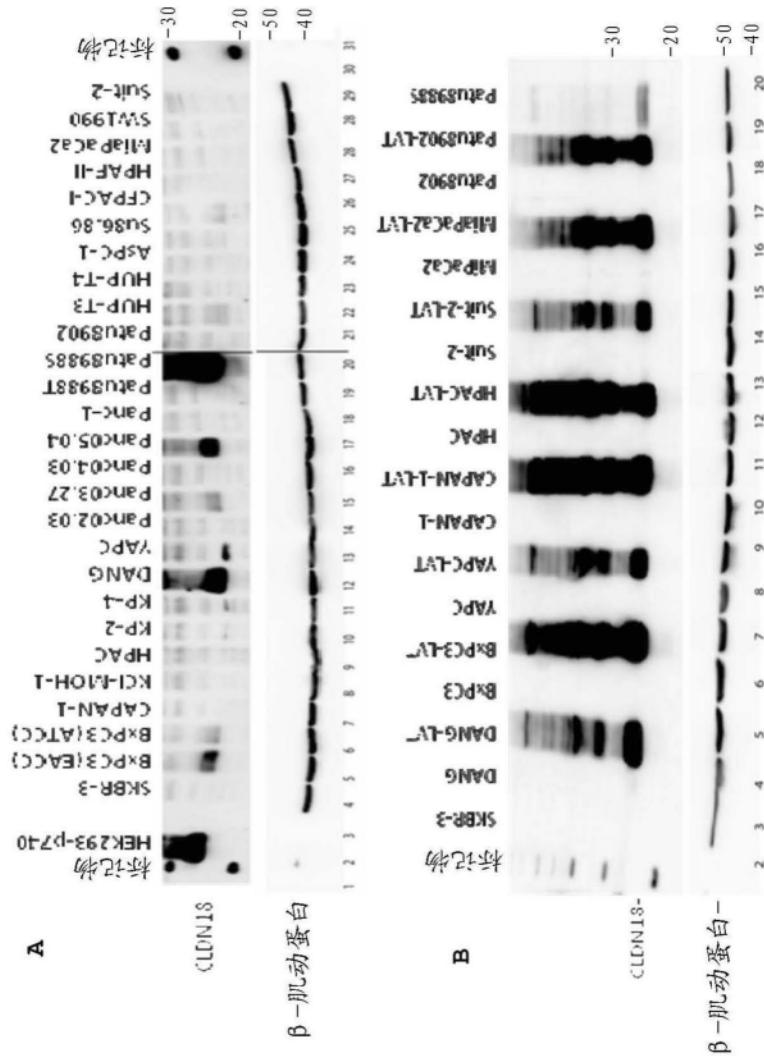


图13

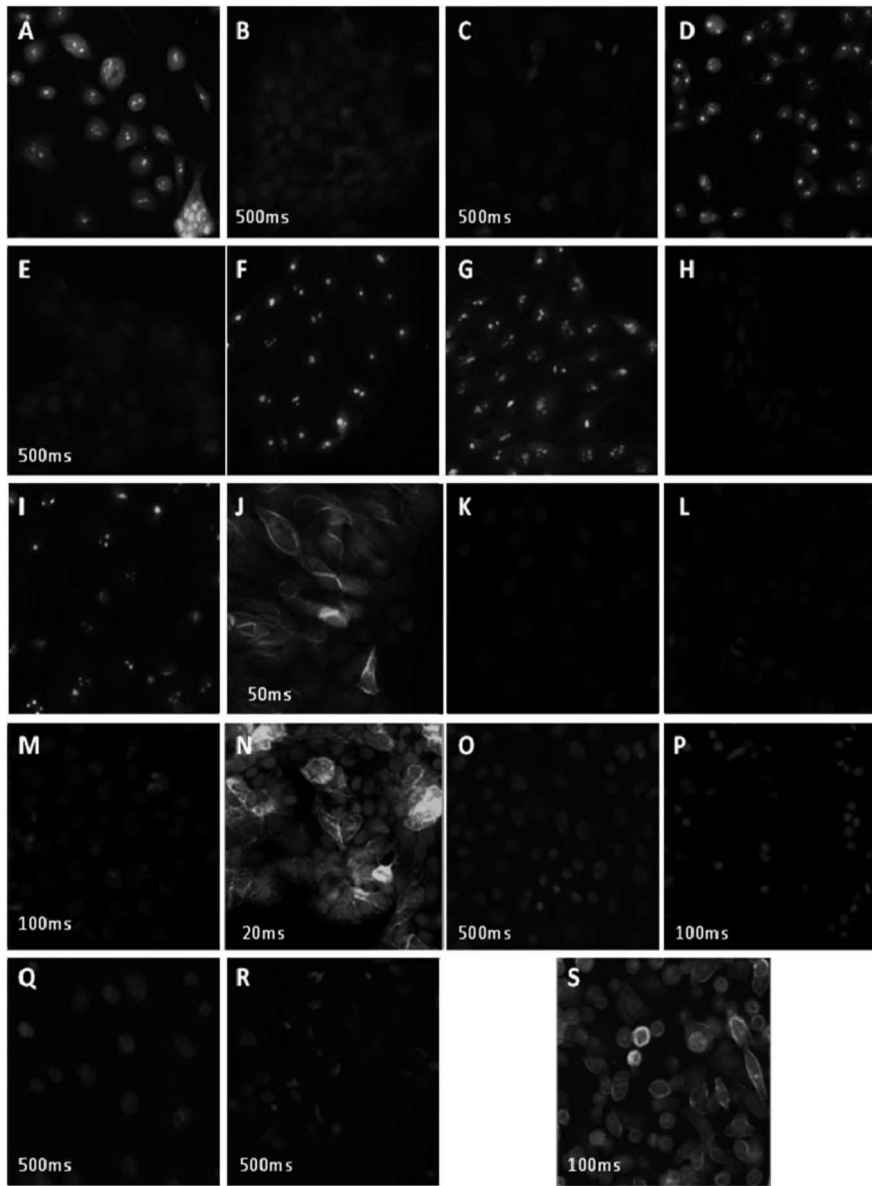
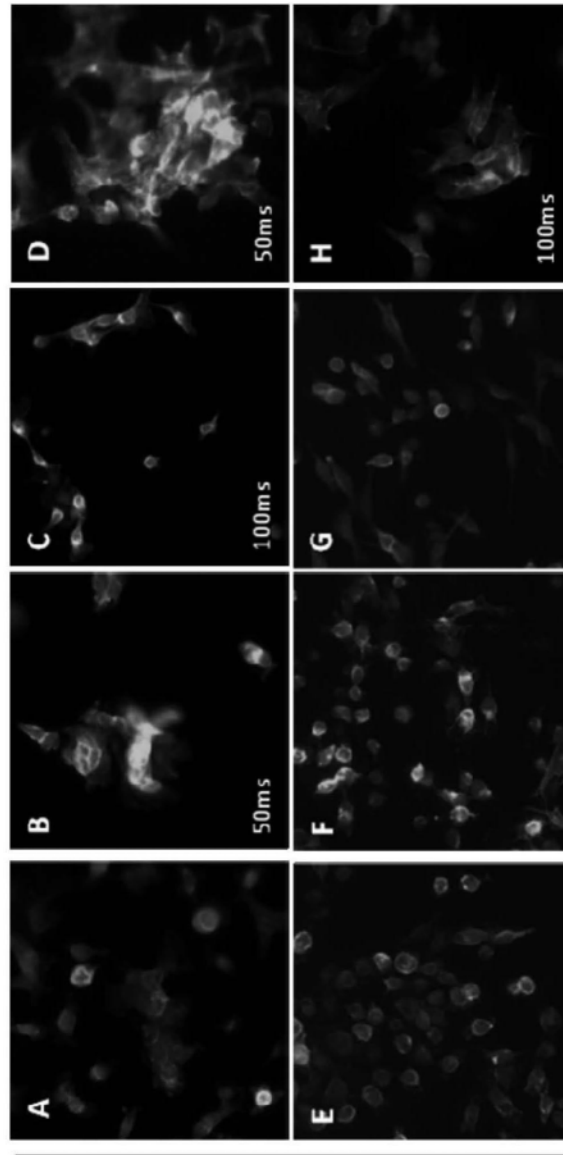
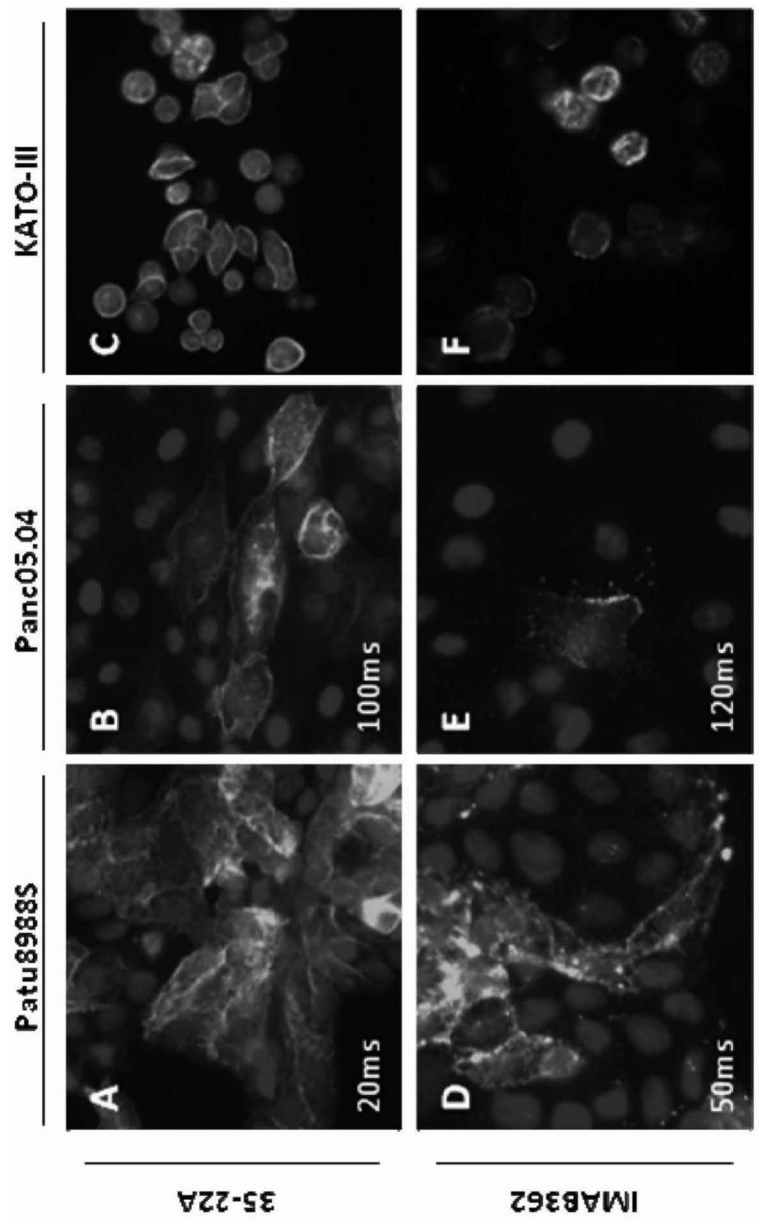


图14



LVT细胞系
35-22A

图15



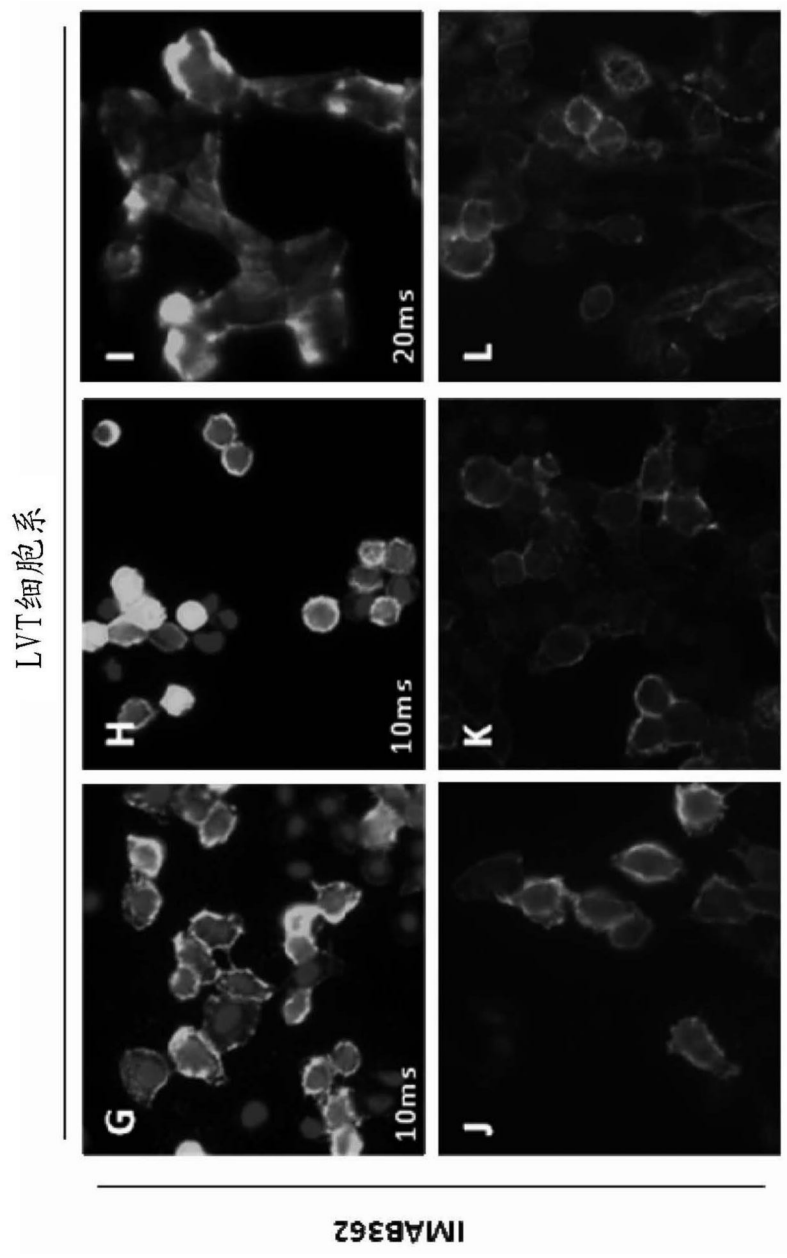


图16

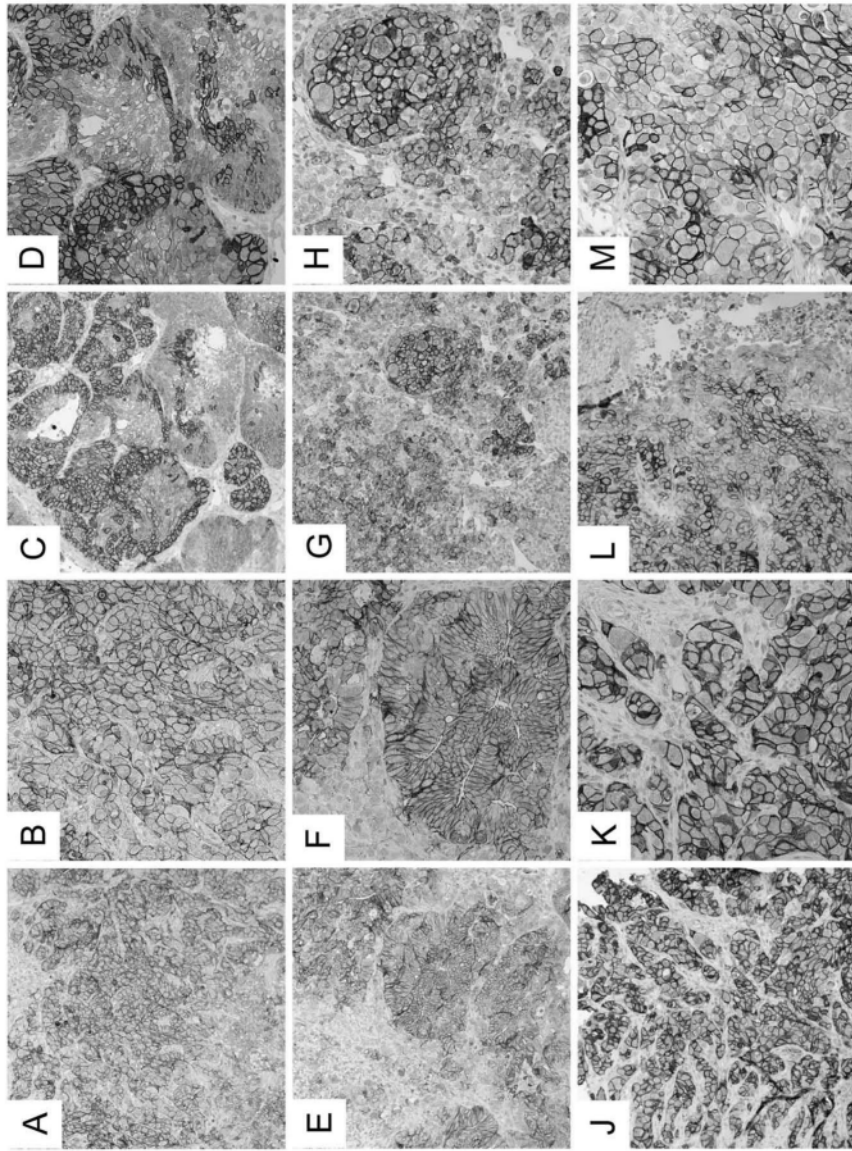


图17

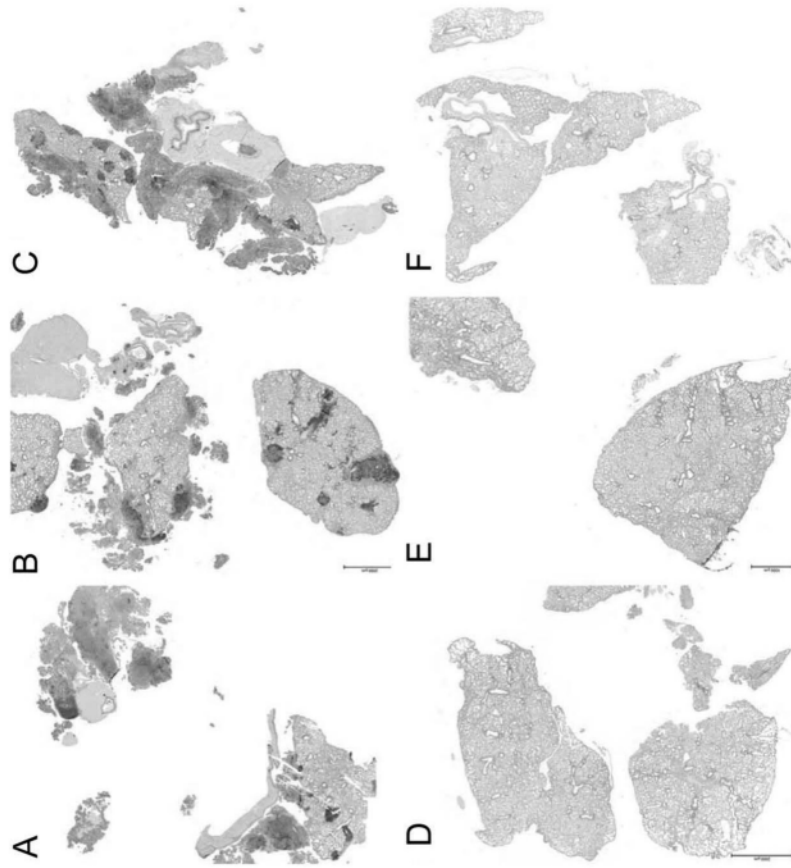


图18

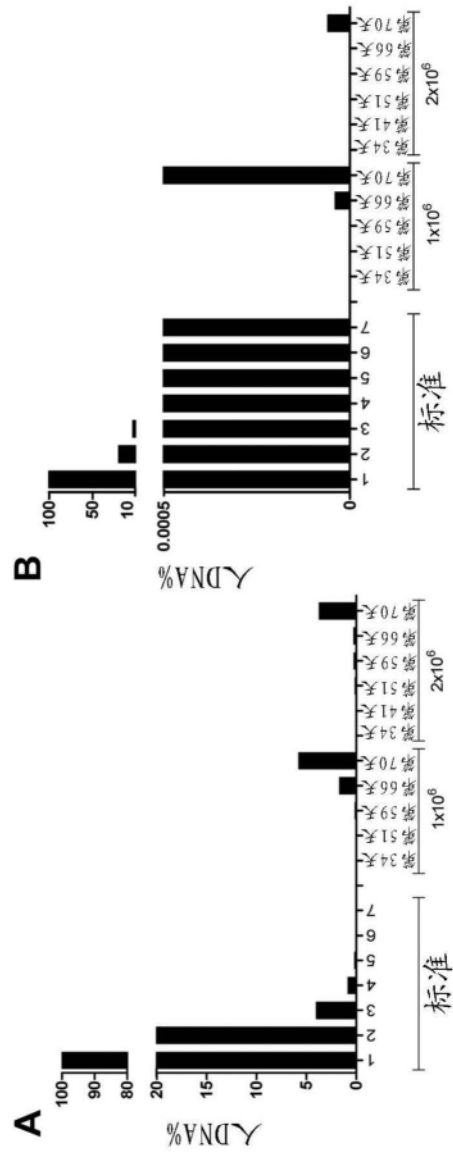


图19

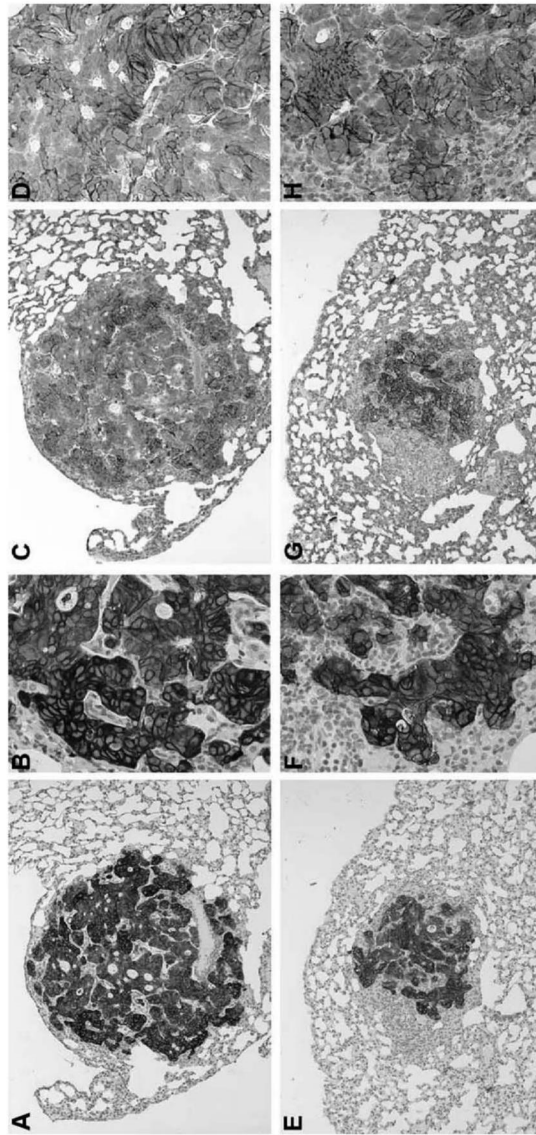


图20

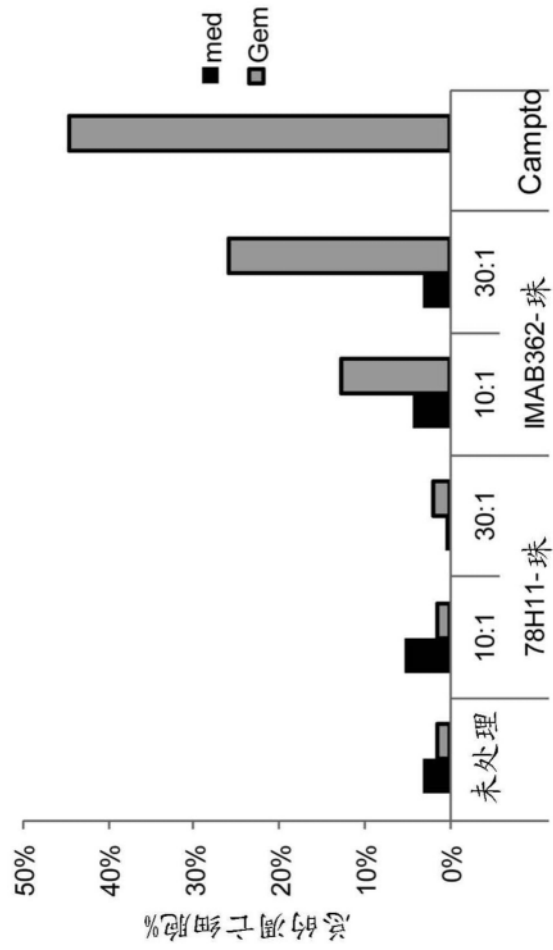
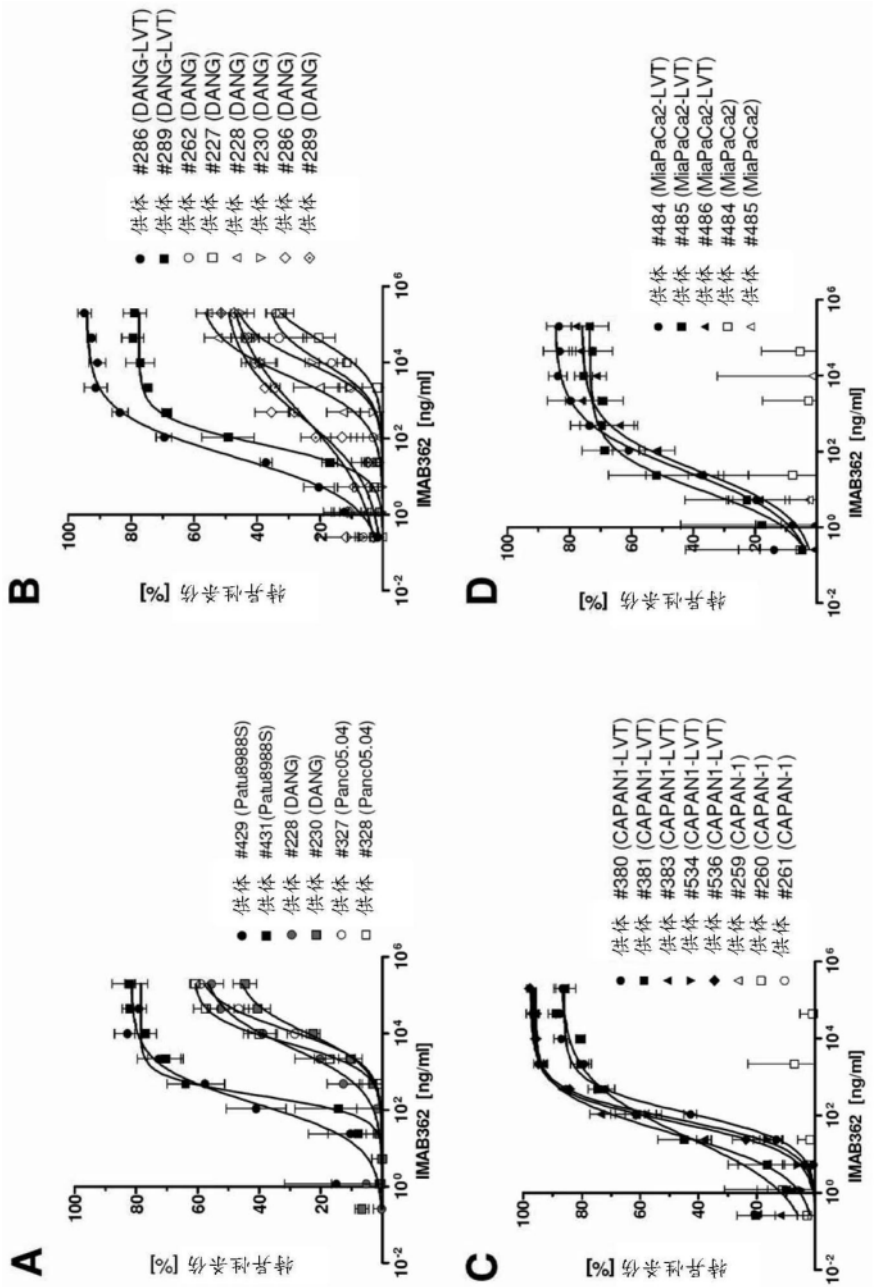


图21



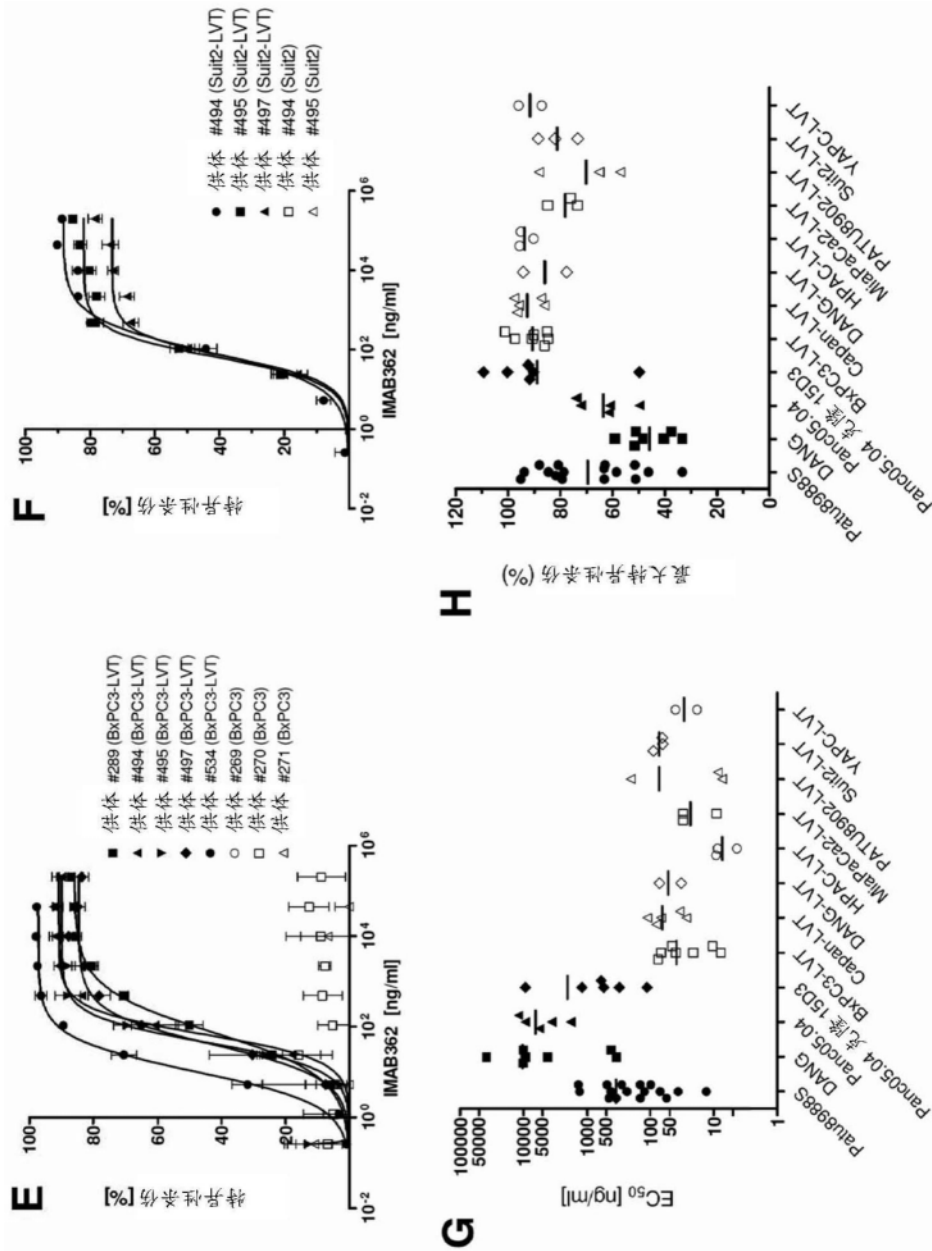
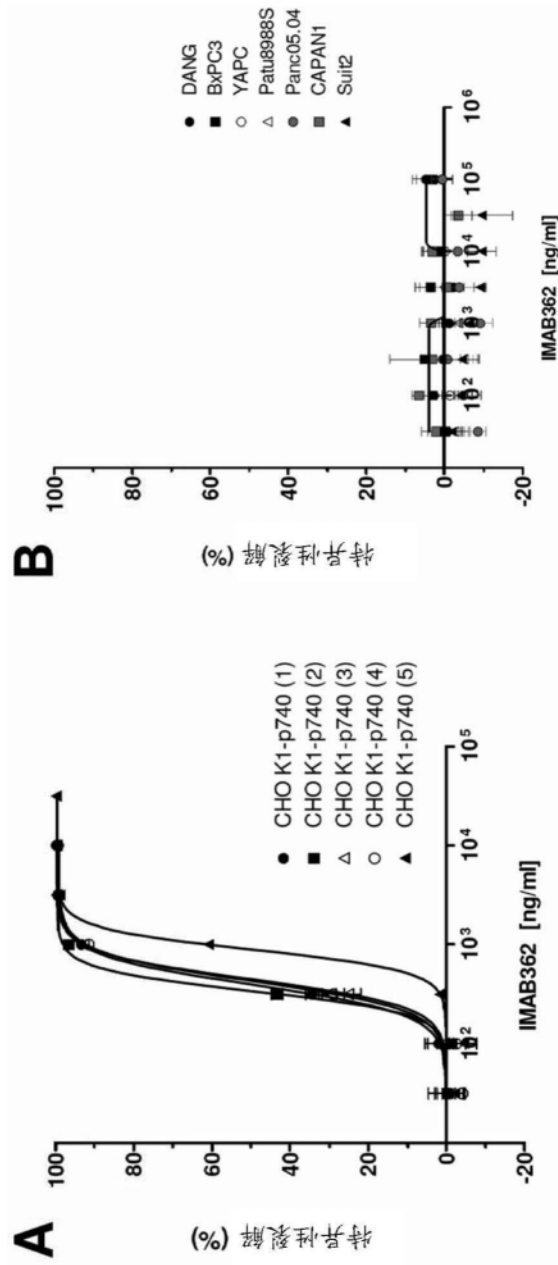


图22



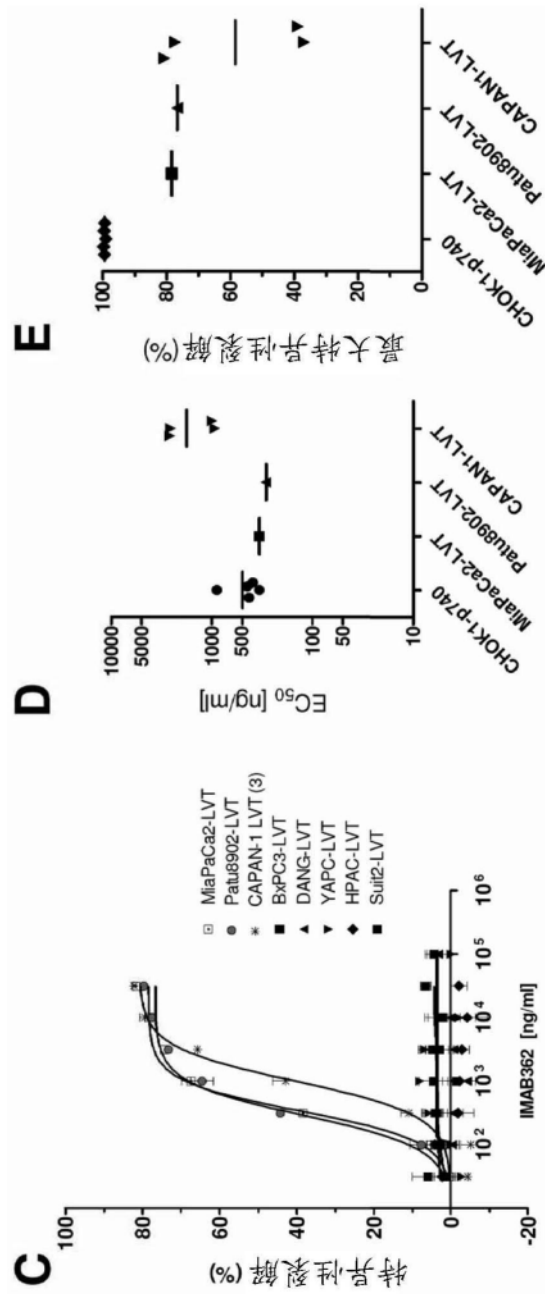


图23

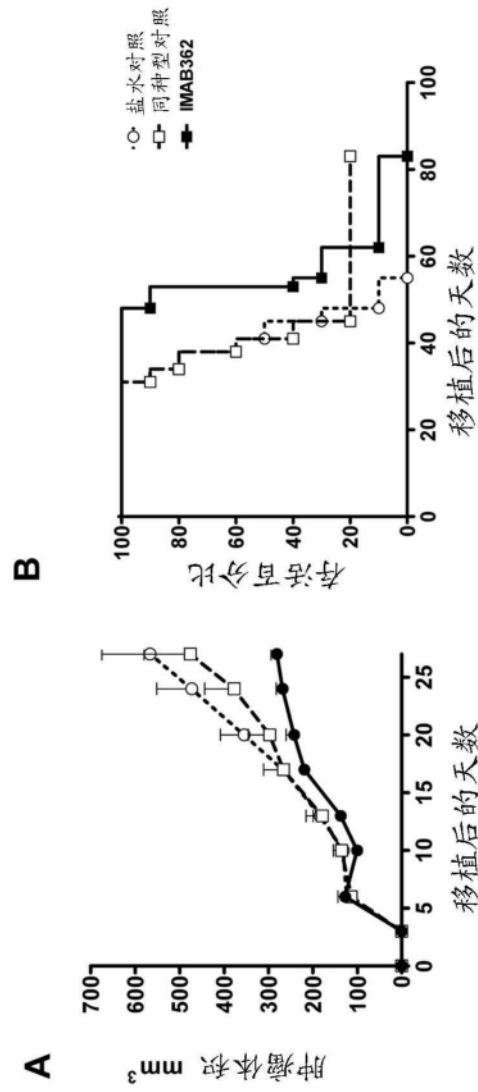


图24

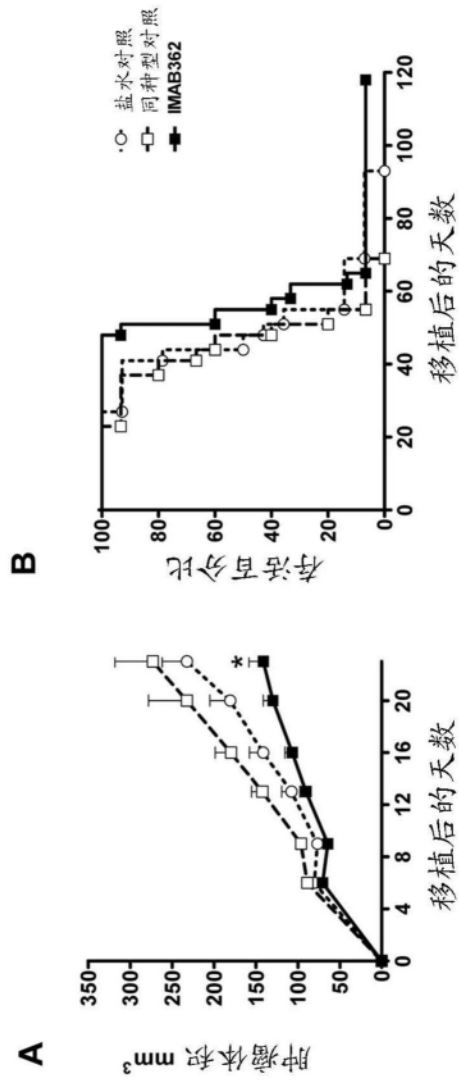


图25

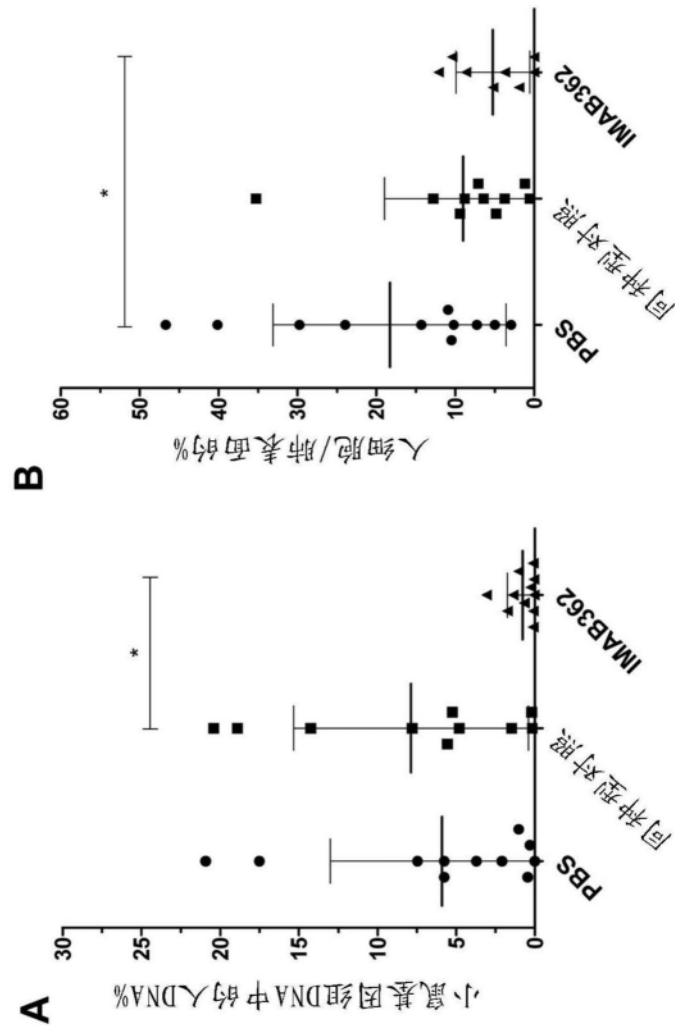
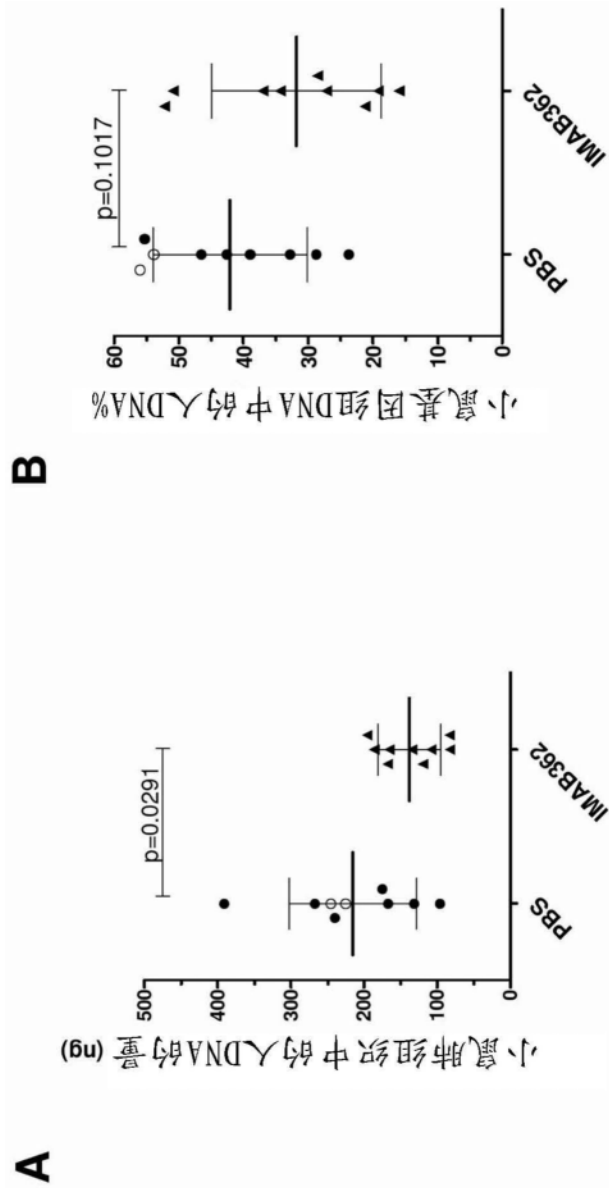


图26



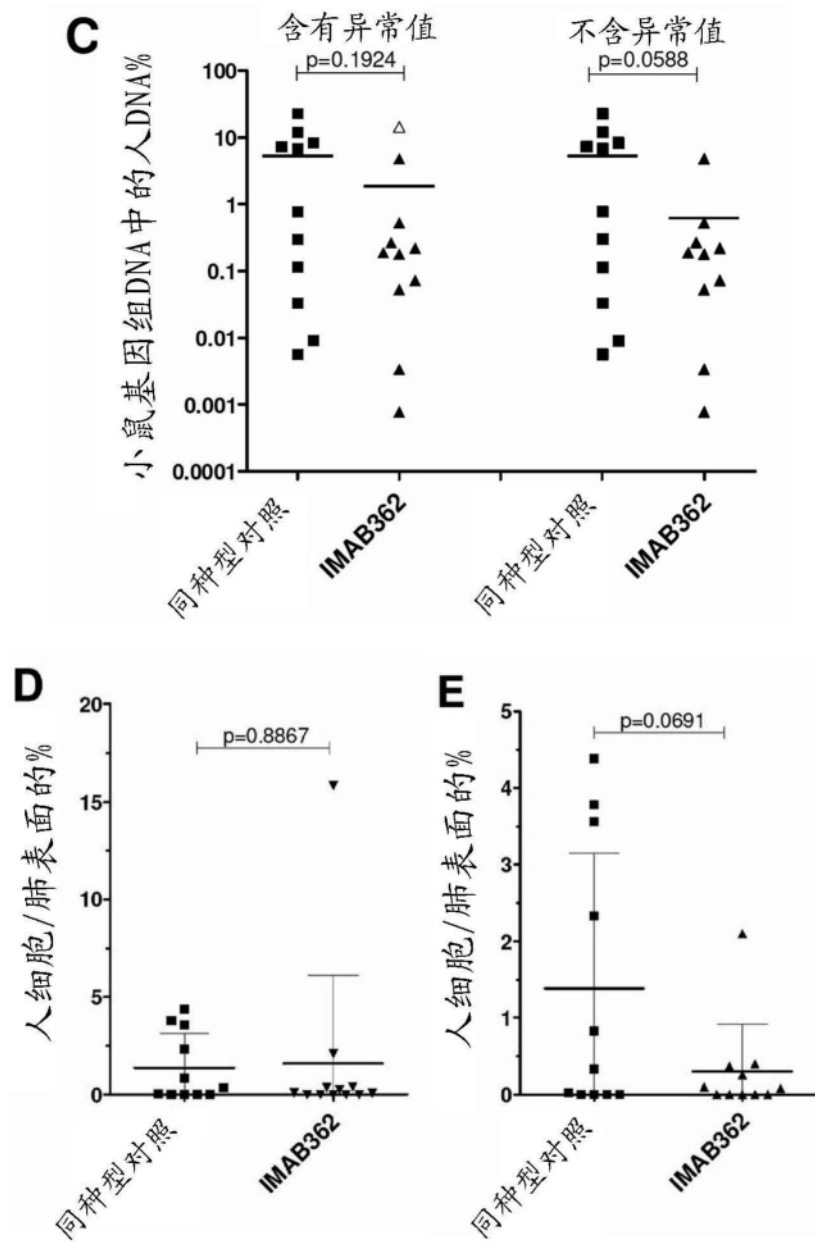


图27

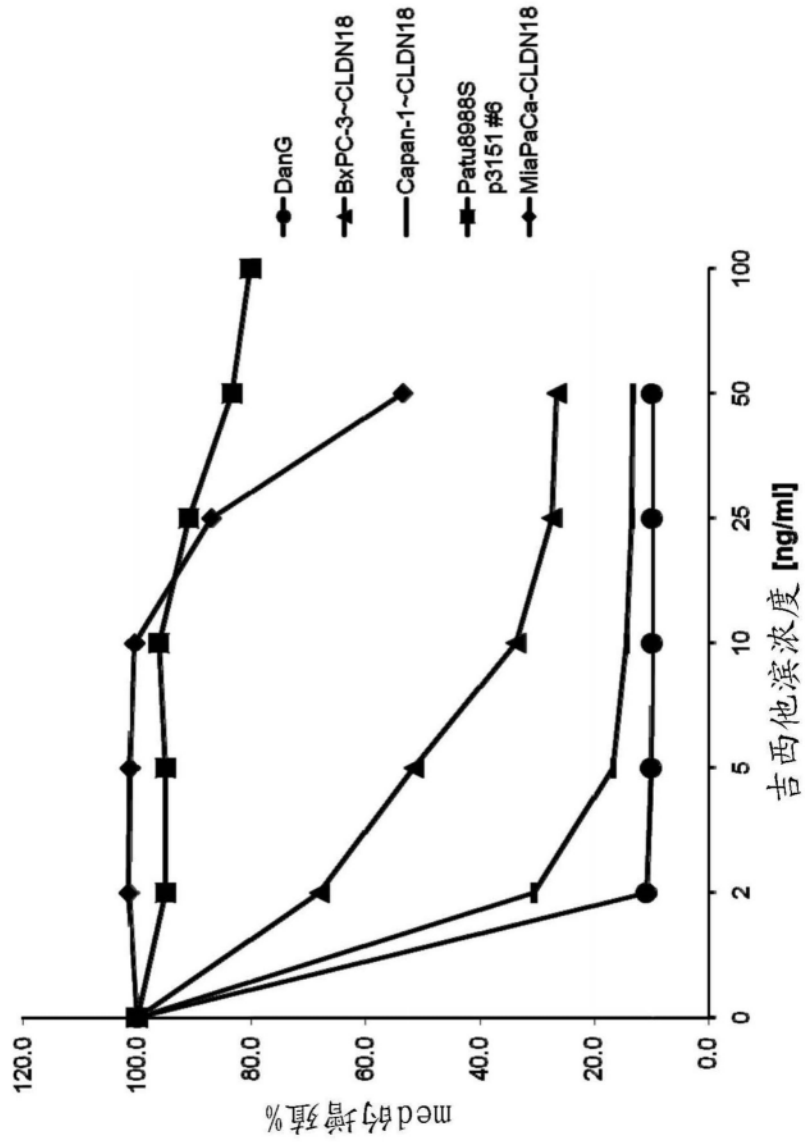


图28

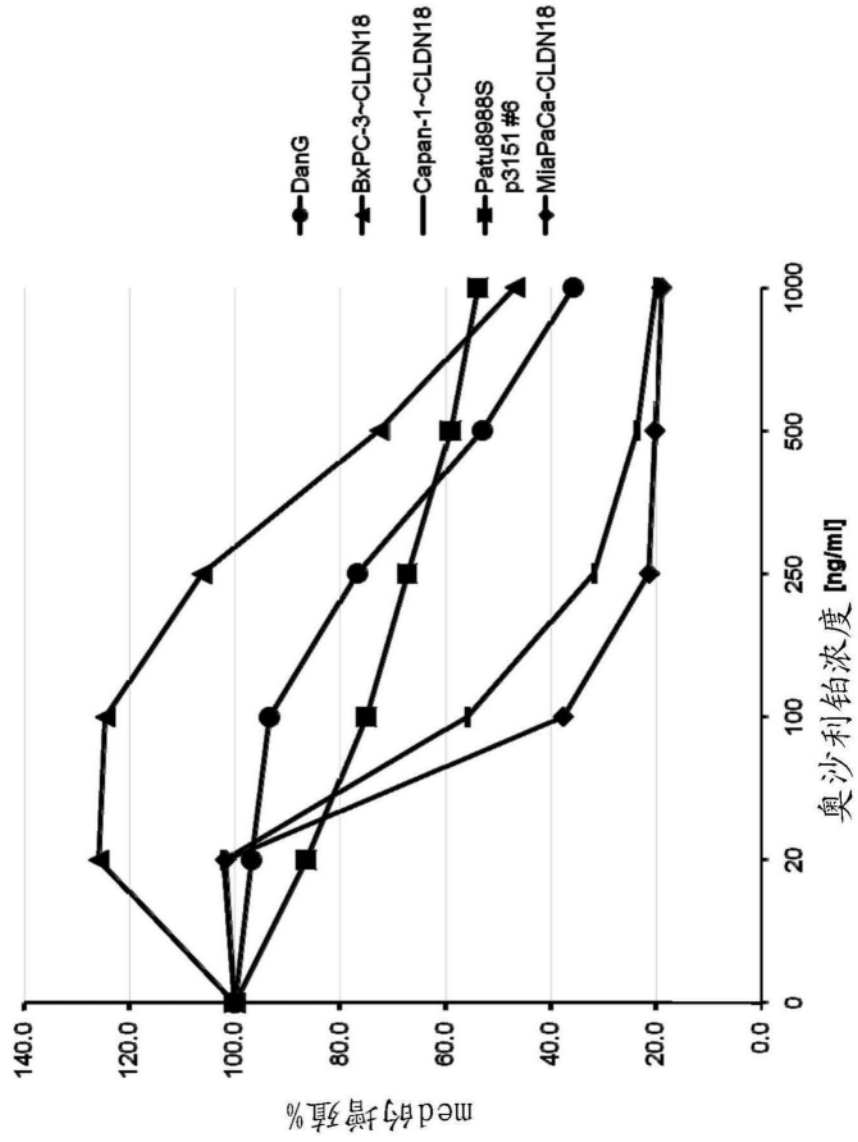


图29

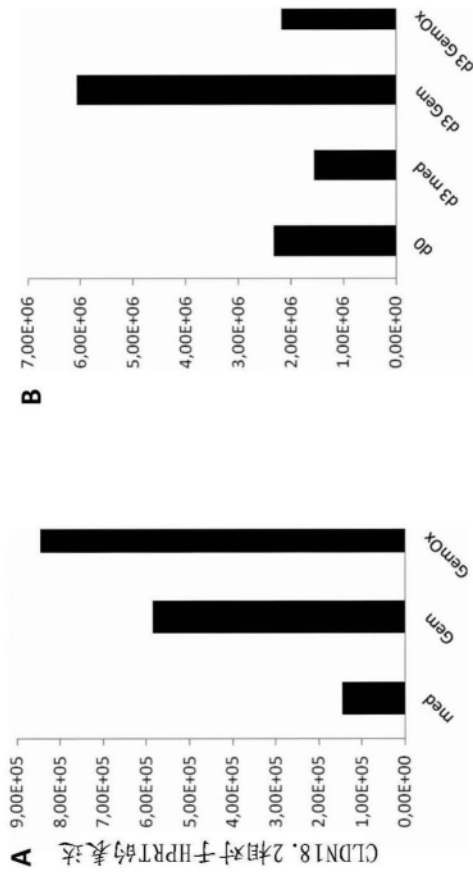


图30

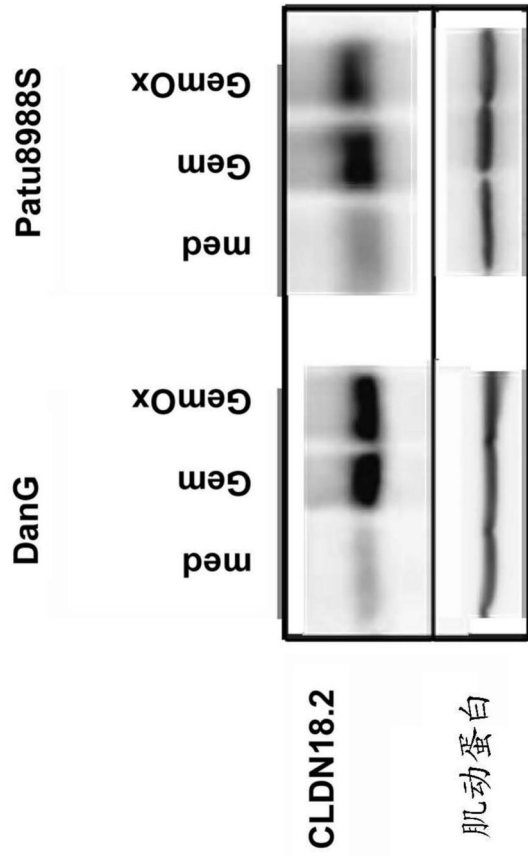


图31

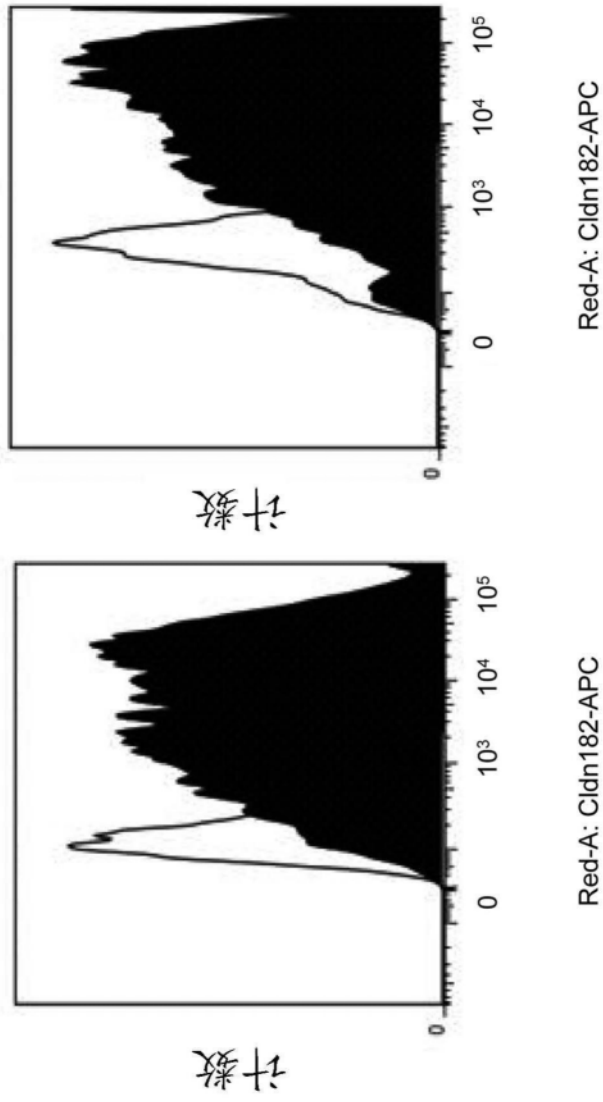


图32

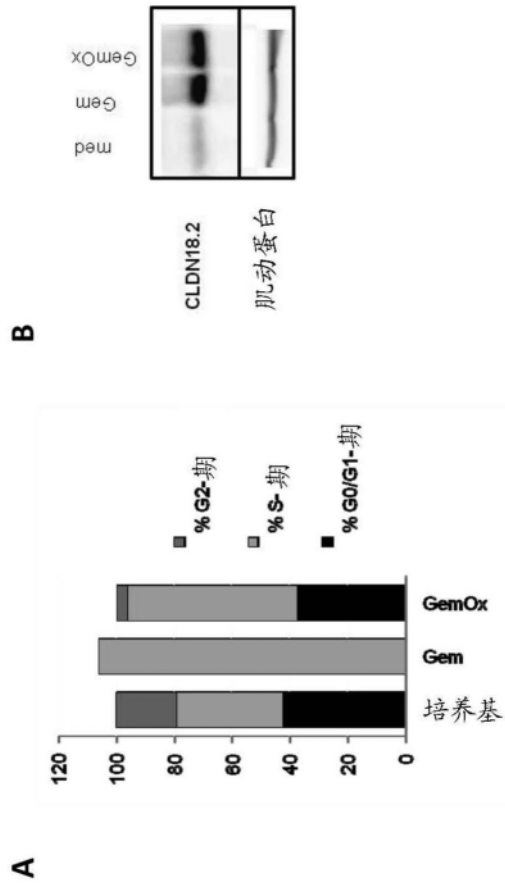


图33

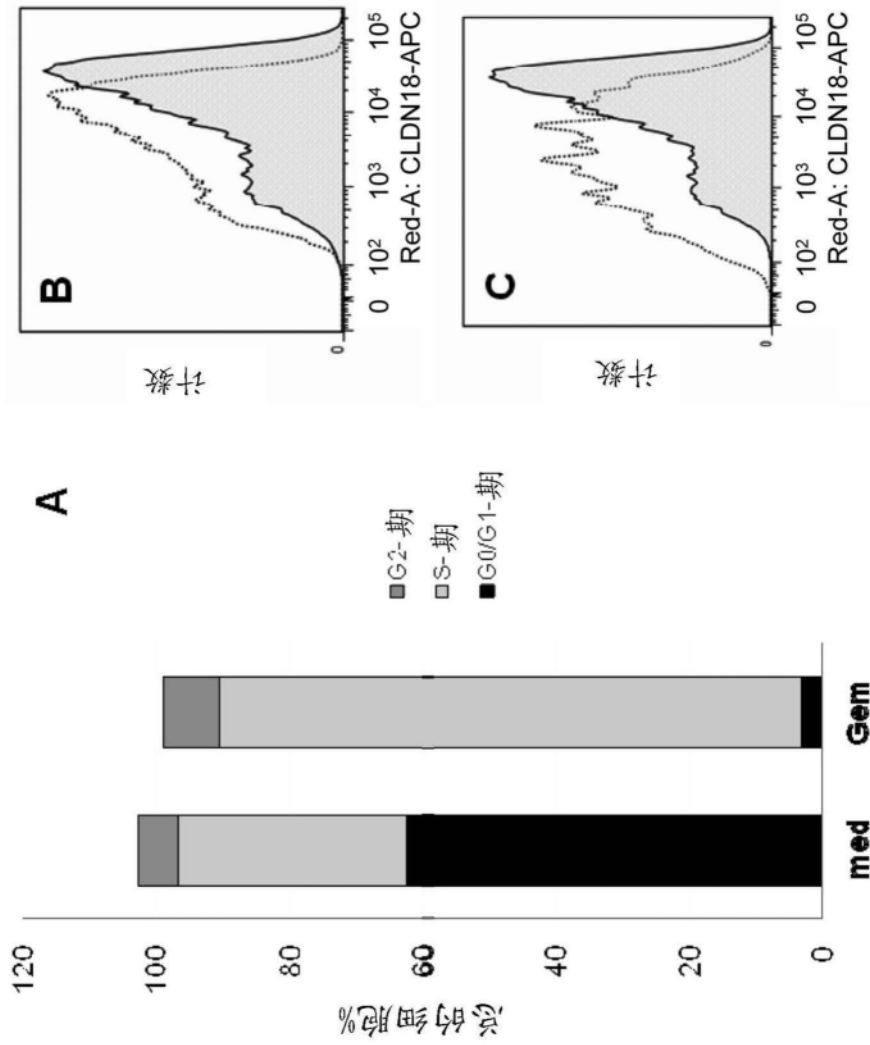
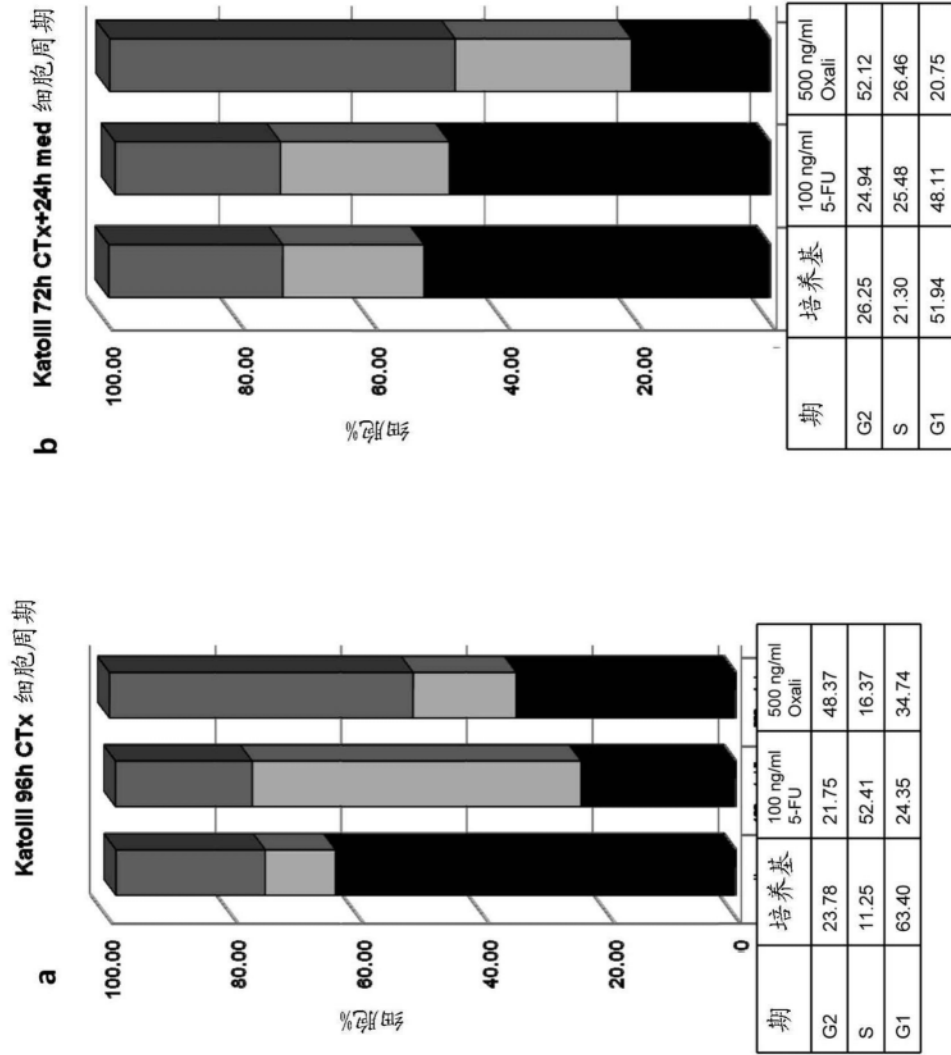
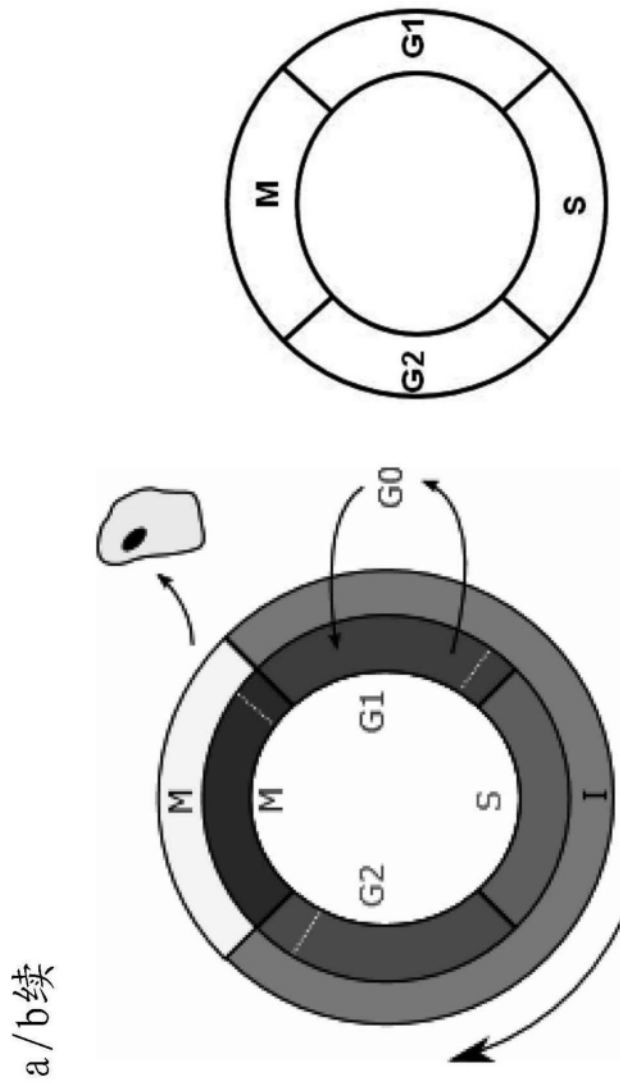


图34





a/b 续

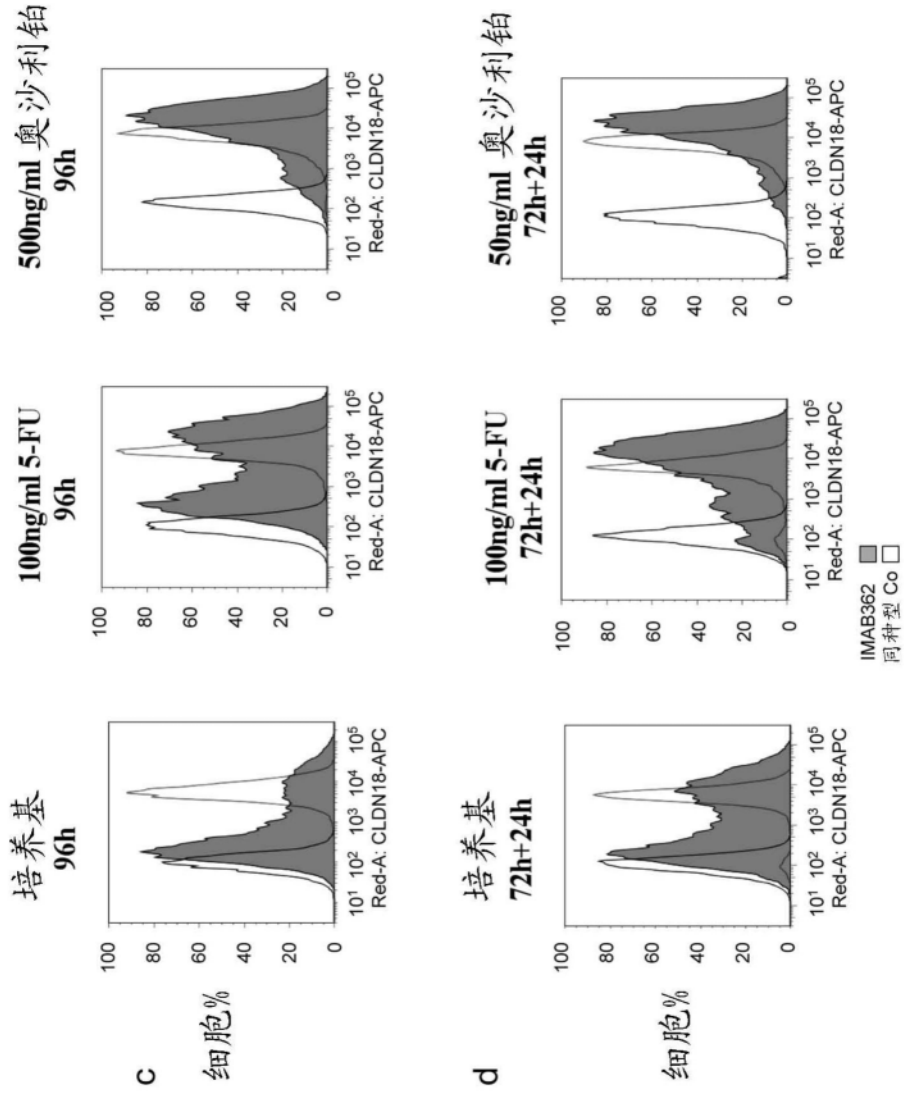


图35

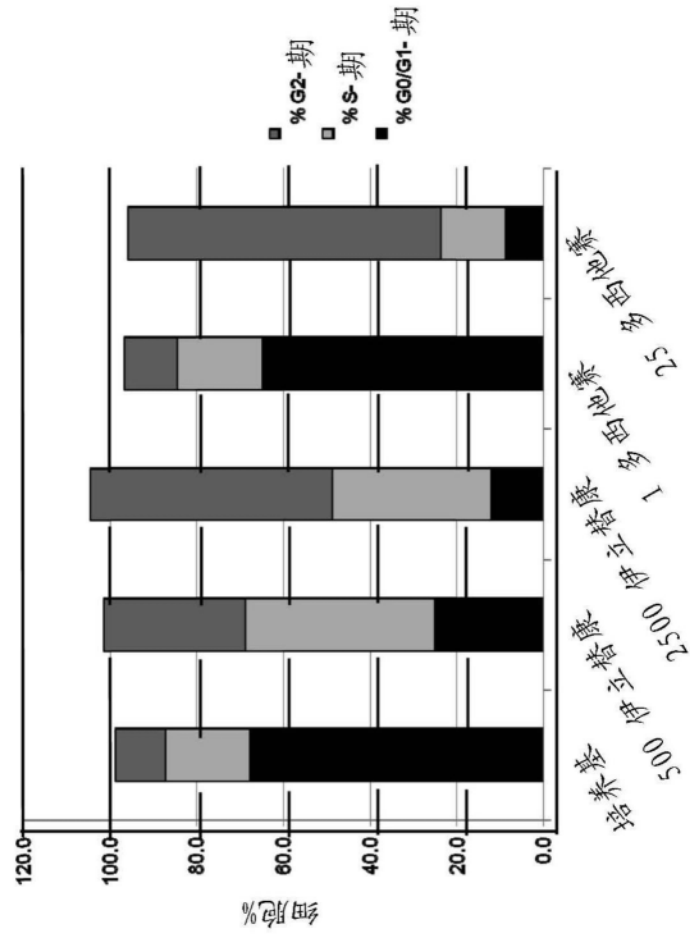


图36

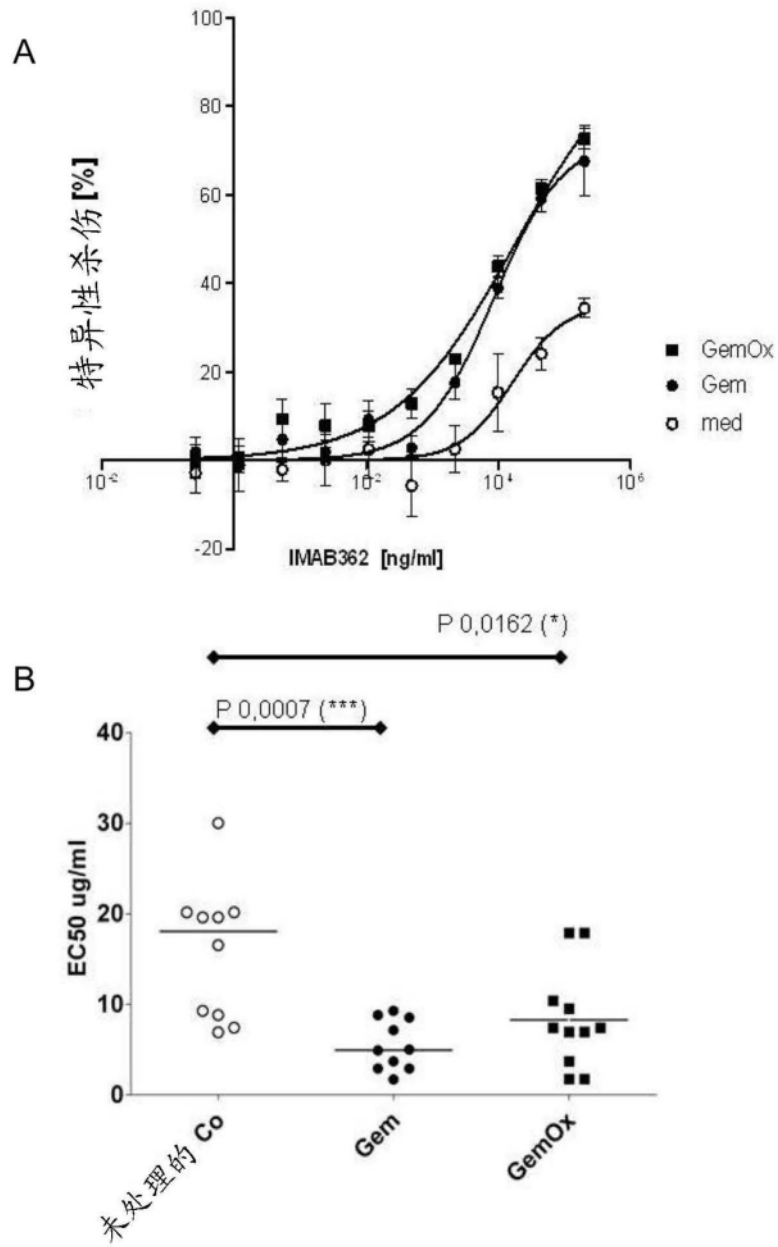
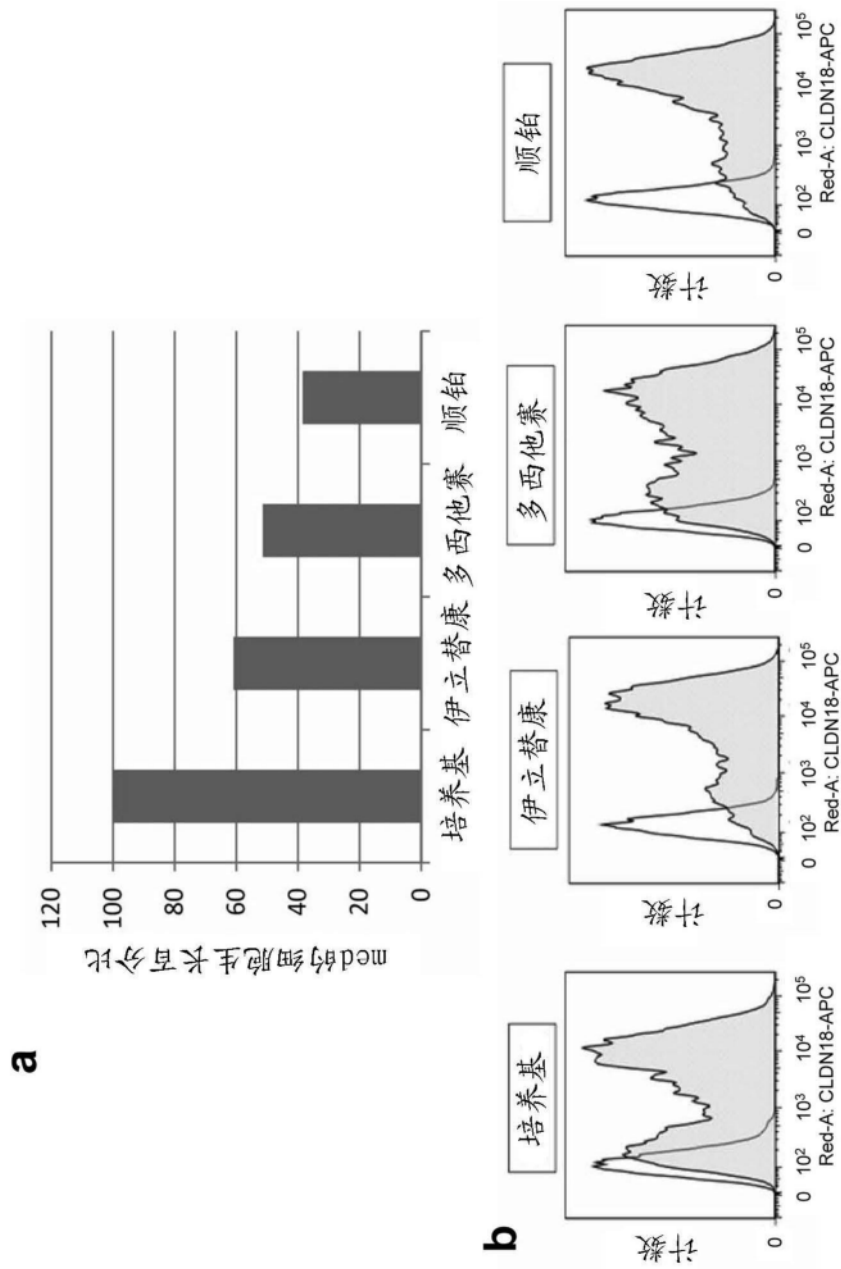
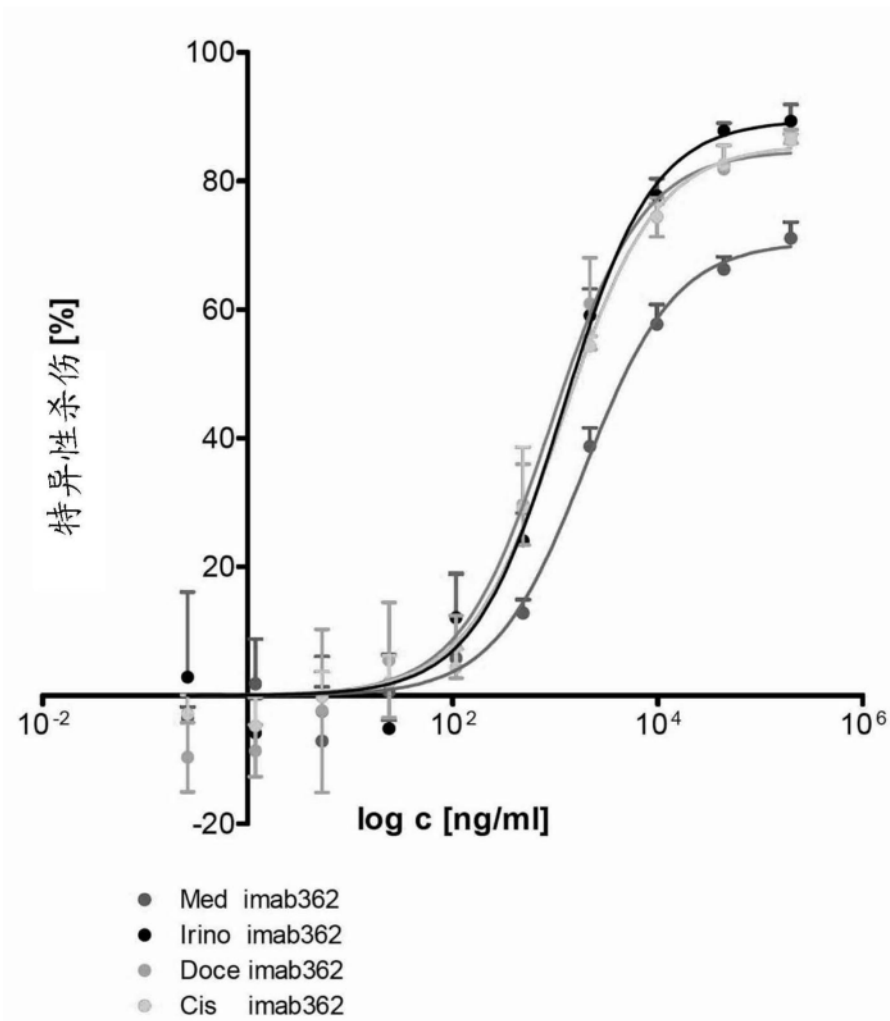


图37



C



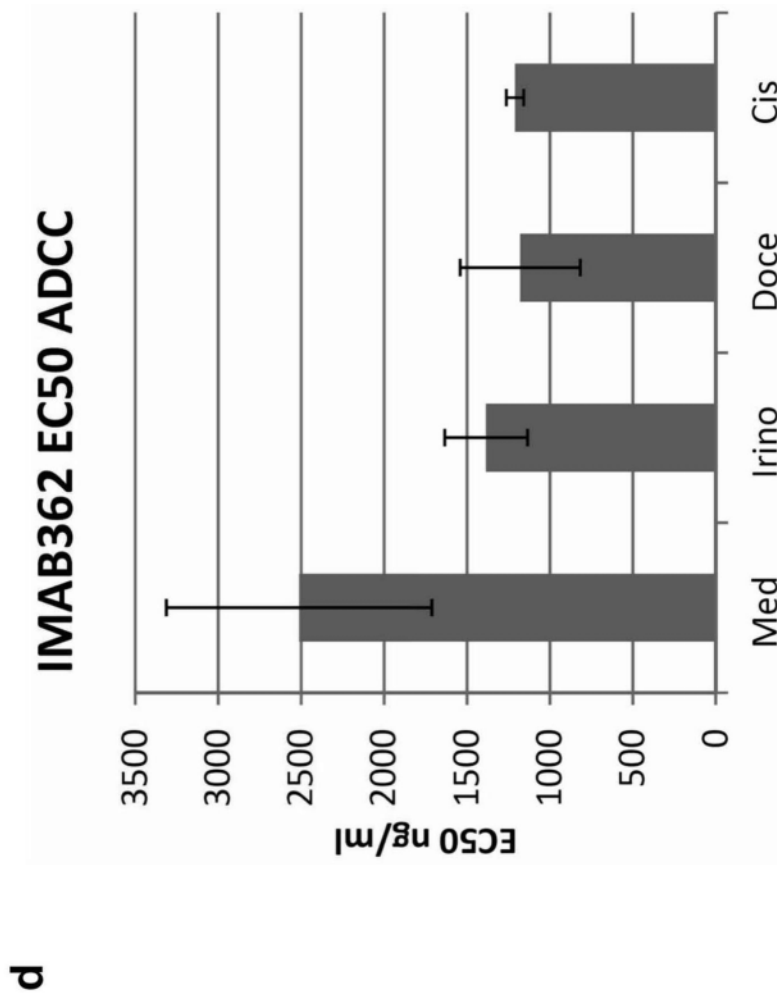


图38

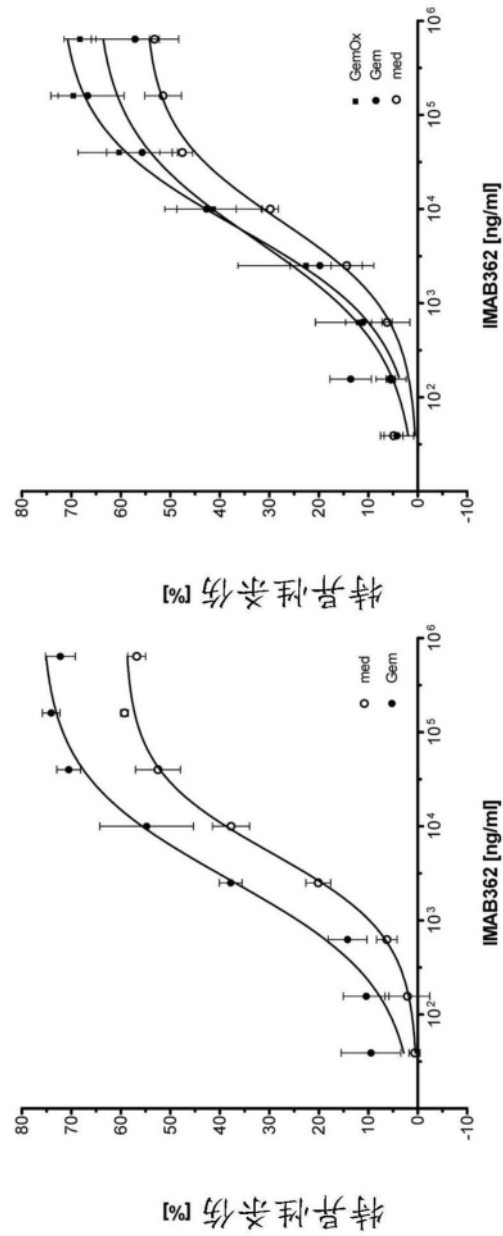


图39

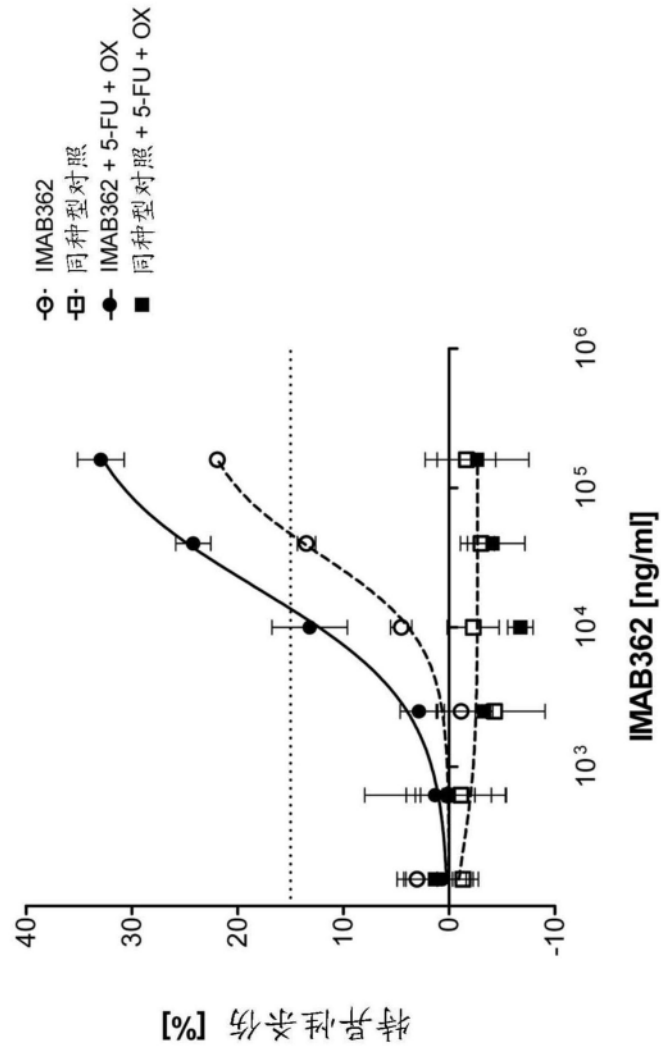


图40

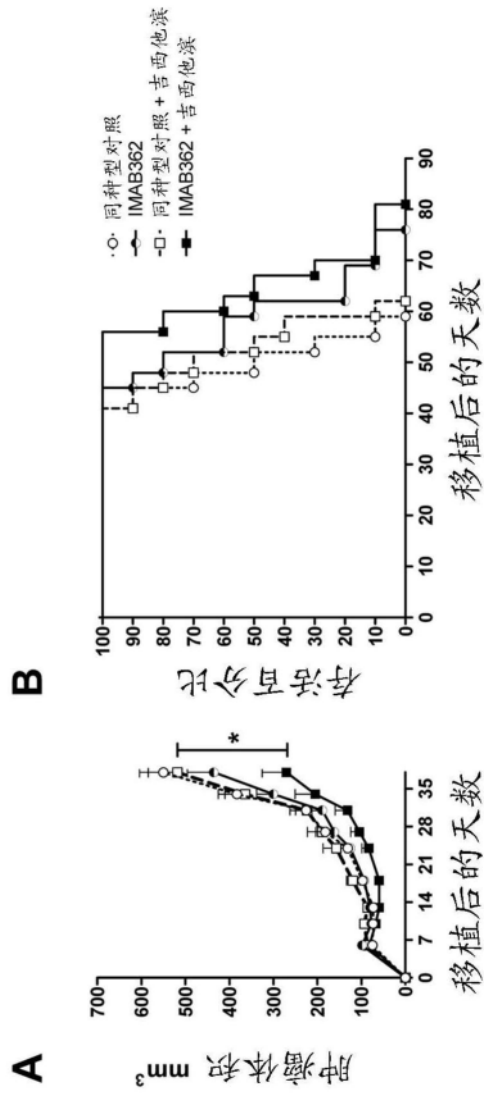


图41

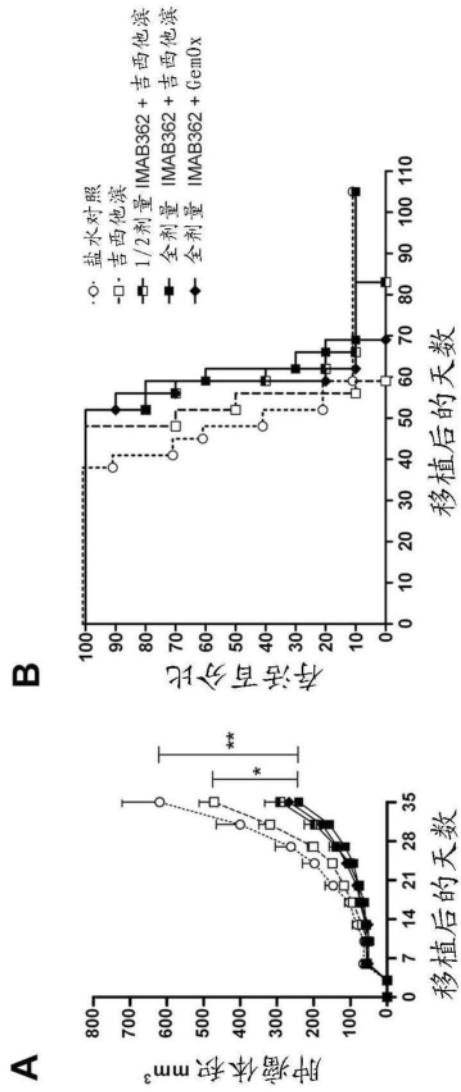


图42

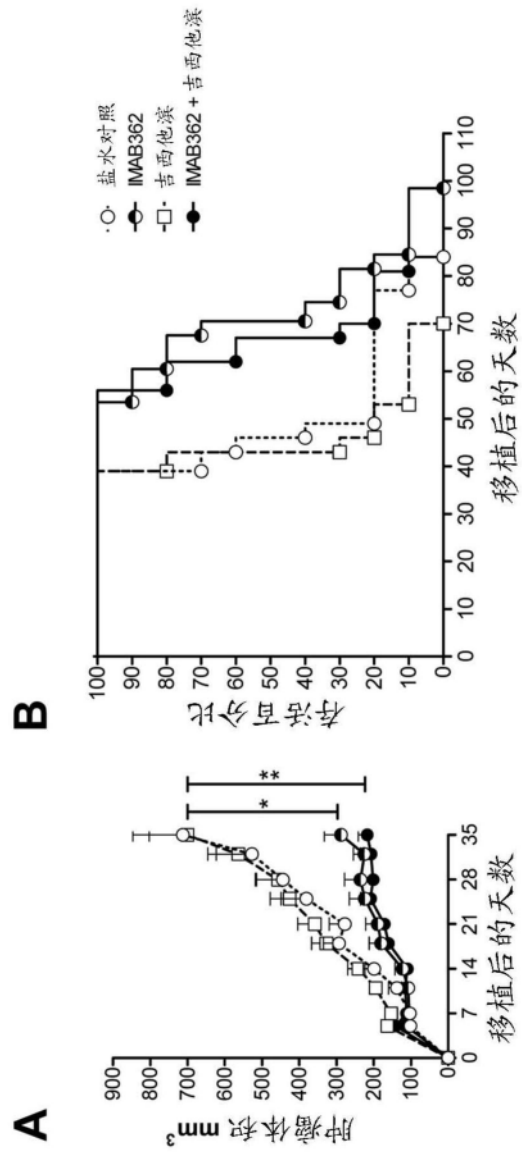


图43

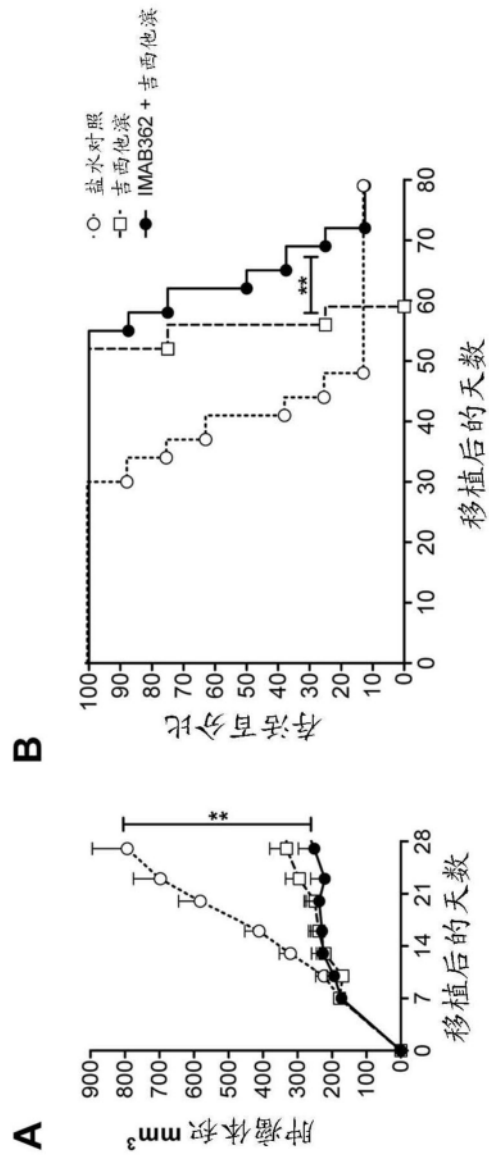
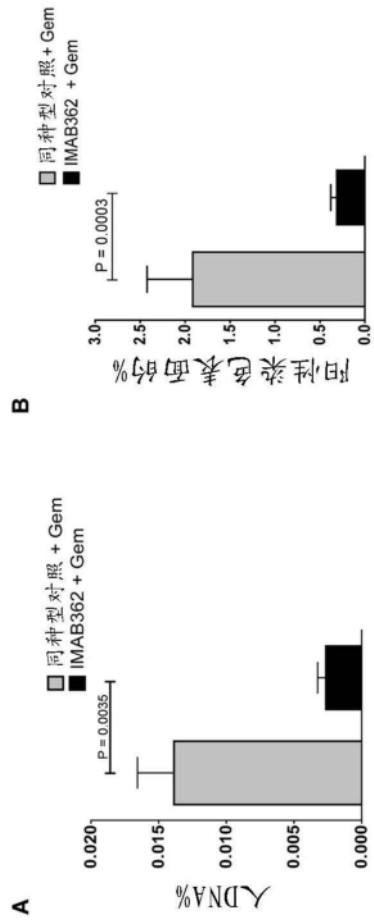
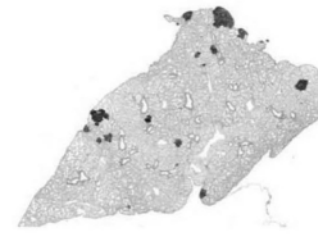
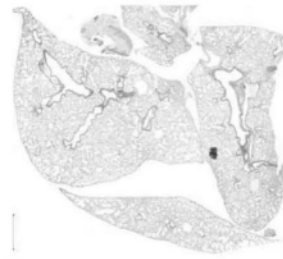


图44





D



C

图45