

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680032303.5

[43] 公开日 2008 年 9 月 3 日

[11] 公开号 CN 101257923A

[22] 申请日 2006.7.5

[21] 申请号 200680032303.5

[30] 优先权

[32] 2005.7.6 [33] EP [31] PCT/EP2005/007371

[86] 国际申请 PCT/EP2006/006556 2006.7.5

[87] 国际公布 WO2007/003426 英 2007.1.11

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.4

[71] 申请人 马德里自治大学

地址 西班牙马德里

[72] 发明人 塞西莉亚·穆尼奥斯卡列哈

曼努埃尔·赫苏斯·阿方索佩雷斯

索尼娅·洛佩斯希拉尔

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 2 页 说明书 38 页 附图 7 页

[54] 发明名称

用于癌症治疗的抗 CCR7 受体的抗体

[57] 摘要

本发明公开了结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段能够选择性杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞、减弱表达 CCR7 受体的肿瘤细胞的迁移和/或阻断表达 CCR7 受体的肿瘤细胞的扩散。公开了所述抗体用于杀伤或诱导所述肿瘤的凋亡的用途，因此提供用于治疗其肿瘤细胞表达 CCR7 受体的癌症的可选疗法。

1. 结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段在制备用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的药物组合物中的用途。

2. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述肿瘤细胞是慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞或套细胞淋巴瘤(MCL)细胞。

3. 根据权利要求 1 或 2 中任一权利要求所述的用途，其中结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段与另外的治疗活性化合物联合使用。

4. 用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的方法，其包括将所述细胞接触结合所述 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。

5. 用于在需要所述治疗的个体中杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的方法，其包括对所述个体给予治疗有效量的结合所述 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法，其中所述肿瘤细胞是慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞或套细胞淋巴瘤(MCL)细胞。

7. 用于减弱表达 CCR7 受体的肿瘤细胞向次级淋巴组织迁移和/或阻断肿瘤细胞扩散进入次级淋巴组织的方法，其包括将所述肿瘤细胞接触结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。

8. 用于在需要所述治疗的个体中减弱表达 CCR7 受体的肿瘤细胞向次级淋巴组织迁移和/或阻断肿瘤细胞扩散进入次级淋巴组织的方法。

法，其包括对所述个体给予治疗有效量的结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的方法，其中所述肿瘤细胞是慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞或套细胞淋巴瘤(MCL)细胞。

10. 鉴定用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的化合物的方法，其包括

a) 将表达 CCR7 受体的细胞接触与抗 CCR7 抗体或其片段偶联的候选化合物，以及

b) 测定所述候选化合物是否杀伤所述表达 CCR7 受体的细胞，
其中杀伤所述表达 CCR7 受体的细胞的化合物是潜在可用于杀伤肿瘤细胞或诱导肿瘤细胞凋亡的化合物。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述细胞是慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞或套细胞淋巴瘤(MCL)细胞。

用于癌症治疗的抗 CCR7 受体的抗体

发明领域

本发明总体上涉及癌症治疗。更具体地，本发明涉及用 CCR7 受体的抗体治疗其肿瘤细胞是表达 CCR7 受体的细胞的癌症，该 CCR7 受体的抗体能够选择性杀伤所述肿瘤细胞、减弱所述肿瘤细胞的迁移和/或阻断所述肿瘤细胞的扩散。

发明背景

癌症是由不受控制的细胞分裂(或者存活或抗凋亡性增加)以及所述细胞侵入其它邻近组织(侵入)和扩散至在正常情况下不存在该细胞的身体其它区域(转移)的能力所表征的疾病，所述扩散通过淋巴管和血管，通过血流的循环，然后侵入身体其它部位的正常组织。根据它们是否能够通过侵入和转移扩散，肿瘤被分类为良性的和恶性的：两性肿瘤是不能够通过侵入和转移扩散的肿瘤，即它们只能在局部生长；而恶性肿瘤是能够通过侵入和转移扩散的肿瘤。

根据癌症所来源的细胞类型和细胞位置可以将癌症分类为数种类型，即癌(carcinomas)，其发生自覆盖身体外部和内部表面的细胞，例如皮肤、消化道或腺体；白血病，其从血液形成组织例如骨髓开始，并造成大量的异常血细胞产生并进入血流；淋巴瘤，其为起源自淋巴结和机体免疫系统的组织的癌症；黑素瘤，其发生在黑素细胞中；肉瘤(sarcoma)，其来自骨骼或肌肉的结缔组织；及畸胎瘤，其来自生殖细胞中。

能够通过手术、化疗、放疗、免疫治疗或其它方法治疗癌症。治疗方法的选择取决于肿瘤的位置和级别以及疾病的阶段。

在肿瘤治疗方案中待解决的显著问题是期望“杀伤全部细胞”。这指越是有效的治疗方案越接近于杀伤全部称为“克隆发生”恶性细胞的细胞，即具有不受控制生长和导致可以通过治疗去除的肿瘤块形

成的能力的细胞。

另一肿瘤治疗策略是使用“免疫毒素”，其中使用抗肿瘤细胞抗体递送毒素至肿瘤细胞。然而，与上述化疗方法相同，免疫毒素疗法也有明显的缺点。例如，抗原阴性或抗原缺陷细胞能够存活并重建肿瘤或导致进一步转移。即使原发癌被完全除去，恶性肿瘤也经常是转移的。从原发肿瘤起始，在身体的或远或近的位置形成恶性肿瘤转移，是癌症最严重的后果之一且目前没有满意的治疗方法。目前拥有的癌症治疗方法在防止转移方面效果有限或产生严重的不期望的副作用。

尽管诸如抗细胞剂、毒素和凝结因子的治疗剂向肿瘤块的特异递送代表了癌症治疗方法中的显著进步，但依然存在另外的或甚至可选疗法的空间。鉴定另外的允许特异体内肿瘤破坏的靶标自然会有助于扩大靶标选择的数目。

癌症治疗的新治疗策略正向使用特异治疗发展，包括抗肿瘤细胞表达的不同抗原的单克隆抗体(mAb)，其可能有希望治愈所述疾病。

免疫治疗中的抗原选择必须考虑抗原的肿瘤特异性、肿瘤细胞表面的抗原密度及抗原调节或抗原-抗体复合体的内化，其能够降低产生细胞死亡的能力。在大多数情况下，认为补体依赖的细胞溶解(CDC)和抗体依赖的细胞介导的细胞毒(ADCC)是造成未偶联 mAbs 的临床使用的原因，尽管在其它情况中诱导凋亡或细胞周期阻滞可能也起重要作用。

癌症细胞可以表达某些分子受体。不同研究显示 CC 趋化因子受体 7 (CCR7)在不同肿瘤细胞中表达，例如 B 细胞慢性淋巴性白血病、非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、恶性乳腺肿瘤等等。此外，看起来 CCR7 受体在诸如胃癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、T 细胞白血病细胞等不同癌症的淋巴结转移中起作用。因此，能够选择所述趋化因子受体(CCR7)作为癌症的 mAb 治疗的可能靶标。

CCR7 是 7 个跨膜结构域 G 蛋白偶联受体(GPCR)。G 蛋白偶联受体家族(GPCRs)包括激素、神经递质、生长因子和病毒的受体[Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors (新的淋巴细胞特异性 CC 趋化因子及其受体). J Leukoc

Biol. 1997; 62:634-644; Kim CH, Pelus LM, White JR, Applebaum E, Johanson K, Broxmeyer HE. CK beta-11/macrophage inflammatory protein-3 beta/EBI1-ligand chemokine is an efficacious chemoattractant for T and B cells (CK β -11/巨噬细胞炎性蛋白 3 β /EBI1 配体趋化因子是 T 细胞和 B 细胞的有效化学吸引物). J Immunol. 1998; 160:2418-2424; Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, *et al.* Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites (在不同解剖位置表达的不同趋化因子选择性募集未成熟和成熟树突状细胞). J Exp Med. 1998; 188:373-386; Willmann K, Legler DF, Loetscher M, *et al.* The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7 (趋化因子 SLC 在淋巴结的 T 细胞区域和粘膜淋巴组织表达并通过 CCR7 吸引活化的 T 细胞). Eur J Immunol. 1998; 28:2025-2034; Yoshida R, Nagira M, Imai T, *et al.* EBI1-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of lymphocytes: activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC (EBI1 配体趋化因子(ELC)吸引多种淋巴细胞:活化的 T 细胞强烈上调 CCR7 且向 ELC 有效迁移). Int Immunol. 1998; 10:901-910; Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, *et al.* Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation (树突状细胞成熟期间趋化因子受体表达的快速和协调的转变). Eur J Immunol. 1998; 28:2760-2769].

肿瘤细胞表达 CCR7 受体的白血病的例子是慢性淋巴细胞白血病(CLL)，最常见的人成年白血病类型。所述白血病是 B 细胞白血病，由强烈抗凋亡的 CD5⁺B 细胞的单一克隆的积累所表征，所述抗凋亡是由于涉及细胞程序性死亡的细胞外或细胞内信号传导的失调造成的。尽管其非常低的增殖指数，外周血淋巴细胞计数达到大于 $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ 的值且白血病细胞显示入侵淋巴结、脾和骨髓的明显倾向。

对 CLL 的治疗基于使用嘌呤类似物作为第一线方案，特别是氟拉达滨，单独或联合使用。至今，仅有的导致比氟拉达滨更高完全好转

率的治疗联合为利妥昔单抗，一种抗 CD20 单克隆抗体，与氟拉达滨或氟拉达滨和环磷酰胺联用。此外，在 CLL 患者中使用上述联合达到骨髓吸出物的分子好转，产生了 CLL 潜在地可以不通过干细胞移植而治愈的可能性。获得最好的初始应答和除去接受自体移植的患者的接种体中的 CLL 细胞构成了 CLL 的一些主要治疗挑战。

套细胞淋巴瘤(MCL)是 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的激进亚型。细胞被表征为 CD20+ CD5+ CD23-以及 t(11;14)和细胞周期素 D1 过表达。通常用利妥昔单抗-CHOP (环磷酰胺、羟基柔红霉素、Oncovin 和泼尼松)和随后的干细胞移植或通过利妥昔单抗-HyperCVAD (环磷酰胺、长春新碱、盐酸阿霉素和地塞米松)。然而，在大多数情况下 MCL 未被治愈，清楚表明需要新的治疗方法。

最近证实了显示临床淋巴结病变的 CLL 患者在体外具有较高的 CLL 细胞对 CCR7 配体、自稳趋化因子 CCL19 (MIP3- β)和 CCL21 (6Ckine)的迁移性应答。因此，利用 CCR7 单克隆抗体阻断 CLL 细胞进入次级淋巴组织可能是另一个优势。同样，从这个角度，表达异位 CCR7 的非淋巴样肿瘤具有向次级淋巴器官转移的能力，而缺乏此分子或其它参与向次级淋巴器官归巢的趋化因子受体的肿瘤呈现最小的结节扩散。

因此，亟需其他的癌症疗法，特别是表达 CCR7 受体的癌症和肿瘤细胞。有利地，所述疗法应允许体内特异肿瘤破坏，例如通过杀伤肿瘤细胞、减弱肿瘤细胞的迁移和/或阻断肿瘤细胞的扩散。

发明内容

本发明基于 CCR7 受体在某些肿瘤细胞中高度表达的发现，其在淋巴细胞进入包括淋巴结(LN)在内的次级淋巴器官中发挥主要作用，而且它的表达限于幼稚 T 淋巴细胞和幼稚 B 淋巴细胞，以及成熟的树突状细胞(DC)，因此在癌症、特别是肿瘤细胞表达 CCR7 受体的癌症的治疗中，所述 CCR7 受体成为使用单克隆抗体的令人感兴趣的靶点。发明者惊奇地观察到 CCR7 的单克隆抗体，即识别 CCR7 受体上的表位并且能够与所述 CCR7 受体结合的抗体，在体外能够杀伤 CLL 和

MCL 细胞,即表达 CCR7 受体的肿瘤细胞,但基本上不能杀伤表达 CCR7 的非肿瘤细胞,例如 T 淋巴细胞。

因此,本发明总体上涉及使用结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞的细胞凋亡,该抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途;在具体的实施方案中,待治疗的癌症以表达 CCR7 受体的肿瘤细胞为特征。

因此,一方面,本发明涉及与 CCR7 受体结合的抗体,或其抗原结合片段在制备药物组合物中的用途,该药物组合物用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞的细胞凋亡。

另一方面,本发明涉及杀伤表达 CCR7 的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 的肿瘤细胞凋亡的方法,该方法包括将所述细胞与结合所述 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段接触。

另一方面,本发明涉及在需要所述治疗的个体中杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞的细胞凋亡的方法,所述方法包括给予所述个体治疗有效量的结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。

另一方面,本发明涉及减弱表达 CCR7 受体的肿瘤细胞向次级淋巴组织迁移和/或阻断肿瘤细胞扩散进入次级淋巴组织的方法,该方法包括将所述肿瘤细胞与结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段接触。

另一方面,本发明涉及在需要所述治疗的个体中减弱表达 CCR7 受体的肿瘤细胞向次级淋巴组织迁移和/或阻断肿瘤细胞扩散进入次级淋巴组织的方法,所述方法包括给予所述个体治疗有效量的结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。

另一方面,本发明涉及鉴定用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的化合物的方法,包括:

a) 将表达 CCR7 受体的细胞和与抗 CCR7 受体的抗体或其片段结合的候选化合物相接触,且

b) 确定所述候选化合物是否杀伤所述的表达 CCR7 受体的细胞,

其中，杀伤所述的表达 CCR7 受体的细胞的化合物，为潜在用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的化合物。

附图简要说明

图 1 中，图 A 显示 CCR7 的表面表达在 CLL 细胞上要高于在正常的 B 和 T 淋巴细胞上的表达。通过流式细胞计(FCM)分析 11 名 CLL 患者和 6 名健康供者的外周血样品以区分不同的淋巴细胞群，其相应的 CCR7 表面密度以平均荧光强度(MFI)测量。柱以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示；在图 B 中，抗 CCR7 单克隆抗体并没有造成受体的胞饮。将来自 CLL 患者的外周血单个核细胞(PBMC)与抗 CCR7 单克隆抗体(2 μ g/ml)、IgM 单克隆抗体(克隆 2H4)和 IgG2a 单克隆抗体(克隆 150503)，或与作为阳性对照的 CCR7 的生理受体之一的 CCL19 (1 μ g/ml)一同孵育 30 秒到 60 分钟的不同时间。然后，使用 FCM，在电子设门的 CD19+CD5+ CLL 细胞中测定 CCR7 MFI。曲线代表 CCR7 相对于基础 CCR7 MFI 的表达。显示了代表性的例子。

图 2 显示抗 CCR7 单克隆抗体均介导 CLL 细胞的强烈和特异的补体依赖的细胞溶解(CDC)。将来自 CLL 患者的 PBMC 与抗 CCR7 单克隆抗体或其同种型对照(IC)一起孵育，然后暴露于家兔补体 1 小时。通过 7-AAD 掺入和 FCM 分析在电子设门 CLL 细胞和正常 T 细胞中测定细胞溶解。柱代表 11 个病例的平均值 $\pm$ 标准差。(A) 抗 CCR7 IgM 单克隆抗体 (2 μ g/mL)，(B) 抗 CCR7 IgG 单克隆抗体 (2 μ g/mL)。

图 3A 显示来自代表性套细胞淋巴瘤细胞(MCL)患者的肿瘤细胞中的 CCR7 表面表达(黑线)，其通过包括相应 IC (灰线)的流式细胞术测量，且图 3B 显示在抗 CCR7 单克隆抗体或其各自的 IC 存在下 MCL 细胞的 CDC。显示了 4 个病例的平均值 $\pm$ 标准差。

图 4 描述 CDC 的剂量效应曲线。用来自 CLL 患者(n=5)和健康供者(n=2)的 PBMC 用浓度为 0.5 μ g/mL 至 16 μ g/mL 的抗 CCR7 单克隆抗体进行 CDC 测定。通过 7-AAD 掺入和 FCM 分析在电子设门的 CLL 细胞、来自 CLL 患者的 T 细胞和来自健康供者的 B 和 T 细胞中测定

CDC 造成的细胞溶解的百分比。线条代表细胞溶解的平均值。(A) 抗 CCR7 IgM 单克隆抗体, (B) 抗 CCR7 IgG 单克隆抗体。

图 5 显示 CDC 能力与 CCR7 表达水平相关。CLL 细胞的 CCR7 表面密度与在和家兔补体孵育 1 小时后的溶解的百分比相关($r = 0.602$, $P = 0.025$, $n = 11$), 该溶解是由于 $2 \mu\text{g/mL}$ 的抗 CCR7 IgM 单克隆抗体介导的 CDC。

图 6 显示鼠抗 CCR7 IgG 单克隆抗体不介导 CLL 细胞的 ADCC。先与抗 CCR7 IgG 单克隆抗体 ($2 \mu\text{g/mL}$)、IC 或利妥昔单抗(作为阳性对照)孵育的 CLL 细胞被暴露于人自然杀伤细胞(NK) 4 小时。然后, 通过 7-AAD 掺入和 FCM 分析在电子设门 CLL 细胞中测定死亡细胞。柱显示 6 个实验的平均值 $\pm$ 标准差。

图 7 显示抗 CCR7 单克隆抗体不诱导淋巴细胞的增殖。来自健康供者的 PBMC 与抗 CCR7 单克隆抗体、IC、抗 CD3 单克隆抗体加 IL2 或仅与培养基一起培养 72 小时。通过 $[^3\text{H}]$ -胸苷掺入测定在培养的最后 16 小时内的 DNA 合成。柱代表重复三次的 6 个病例的平均值 $\pm$ 标准差。

图 8 显示抗 CCR7 单克隆抗体阻断 CLL 和 MCL 细胞响应 CCL19 或 CCL21 的迁移。在用 $2 \mu\text{g/mL}$ 的抗 CCR7 IgG (黑色柱)、IgM (灰色柱)单克隆抗体或无单克隆抗体(白色柱)预孵育细胞 30 分钟后, 如方法部分中所述进行趋化性测定。(A) 比较 CLL 细胞响应 CCL19 ($1 \mu\text{g/mL}$) 的迁移、基础迁移和在 CXCL12 (100 ng/mL)存在下的迁移, CXCL12 为不受抗 CCR7 单克隆抗体影响的趋化因子受体 CXCR4 的配体。显示了代表性病例。(B) 比较 MCL 细胞响应 CCR7 配体 CCL19 ($1 \mu\text{g/mL}$) 和 CCL21 ($1 \mu\text{g/mL}$)的迁移和基础迁移。显示了代表性病例。

发明详细描述

本发明总体上涉及结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗癌症, 特别是肿瘤细胞表达 CCR7 受体的癌症的药物组合物中的用途, 所述治疗通过杀伤所述肿瘤细胞或诱导所述肿瘤细胞的凋亡。

因此,一方面,本发明涉及结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段在制备用于杀伤表达 CCR 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR 受体的肿瘤细胞凋亡的药物组合物中的用途。

待治疗癌症的肿瘤细胞是表达 CCR7 受体的肿瘤细胞。其肿瘤细胞表达 CCR7 受体的癌症类型的说明性、非限制性实例包括慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡型淋巴瘤、大 B 细胞淋巴瘤、AIDS 相关淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤(lymphoplasmacytic lymphoma)、伯基特淋巴瘤、B 细胞急性原始淋巴细胞性淋巴瘤、霍奇金病、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤、蕈样肉芽肿病、慢性骨髓增生性疾病的暴发、骨髓增生异常综合征的暴发、癌症例如乳腺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、胃癌或头颈的鳞状细胞癌和结肠癌。

能够通过常规方法鉴定表达 CCR7 受体的肿瘤细胞;例如,能够根据 López-Giral S.等人公开的方法(Journal of Leukocyte Biology, Vol 76, Aug. 2004, 462-471)通过流式细胞术分析 CCR7 受体的表面表达。

本文所用的“治疗癌症”指抑制或控制肿瘤细胞的增殖,所述肿瘤细胞是表达 CCR7 受体的肿瘤细胞。该术语包括,在其他情况中,杀伤所述肿瘤细胞、诱导所述肿瘤细胞的凋亡、减弱所述肿瘤细胞向次级淋巴组织的迁移和/或阻断所述肿瘤细胞扩散进入次级淋巴组织。

根据本发明,对 CCR7 受体特异的即结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段,在本文中有时称为本发明的抗体,能够用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡。因此,本发明的抗体能够用于制备用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的药物组合物。因此,本发明提供用于治疗癌症,特别是其肿瘤细胞表达 CCR7 受体的癌症的可选方法。

本文所用的术语“杀伤肿瘤细胞”指通过特异溶解所述细胞来特异清除肿瘤细胞例如表达 CCR7 受体的肿瘤细胞的机制。所述溶解或细胞毒性通常是由募集所述肿瘤细胞的补体蛋白(CDC)或例如 NK 细胞(ADCC)的效应细胞介导的,在用抗 CCR7 抗体处理所述肿瘤细胞后所述蛋白和 NK 细胞分别能够特异靶向所述肿瘤细胞和造成所述肿瘤细胞的溶解。

本文所用的术语“诱导肿瘤细胞凋亡”指表达 CCR7 受体的肿瘤细胞在经抗 CCR7 抗体处理后经历凋亡即细胞程序性死亡所通过的机制。

本文所用的术语“本发明的抗体”指对靶分子，即 CCR 受体(抗原)显示特异结合活性的 γ 球蛋白或其片段。因此，本发明的抗体能够结合 CCR7 的表位；通常，形成表位需要至少 6、8、10 或 12 个连续氨基酸，然而，包括非连续氨基酸的表位可以需要例如至少 15、25 或 50 个氨基酸。术语“本发明的抗体”例如包括多克隆抗体、单克隆抗体、工程化的或经修饰的抗体、嵌合抗体、人源化抗体、灵长动物源化抗体、人抗体、例如 Fab、F(ab')₂、单链 Fv(scFv)片段的抗体片段、双价小分子抗体(diabodies)双特异性抗体和异源偶联抗体。此外，本发明的抗体还可以与其它化合物偶联，例如治疗剂、毒素等等。可以通过多种方法产生这些抗体，包括杂交瘤培养、在细菌和哺乳动物细胞培养物中重组表达和在转基因动物中重组表达。还能够通过从表达在展示系统中的序列文库中选择序列来产生抗体，所述展示系统例如丝状噬菌体、细菌、酵母或核糖体。在文献中有关于选择具体产生方法的丰富指导，例如 Chadd and Chamow, Curr. Opin. Biotechnol., 12: 188-194 (2001)。制备方法的选择取决于若干因素，包括期望的抗体结构、抗体上糖部分的重要性、容易培养和纯化以及成本。使用标准表达技术可以产生许多不同的抗体结构，包括全长抗体、抗体片段例如 Fab 和 Fv 片段、以及包含来自不同物种的组分的嵌合抗体。不具有效应物功能和具有有限的药代动力学活性的小分子抗体片段，例如 Fab 和 Fv 片段，可以在细菌表达系统中产生。单链 Fv 片段显示低免疫原性且被从血液中快速清除。

特异结合 CCR7 受体的表位的本发明抗体能够被治疗性使用，也能够用于免疫化学测定，例如免疫荧光测定、流式细胞术、Western 印迹、ELISAs、放射免疫测定、免疫组化测定、免疫沉淀或本领域已知的其它免疫化学测定。能够使用多种免疫测定来鉴定具有期望特异性的抗体。本领域公知多种用于竞争性结合或免疫放射分析的实验方案。这些免疫测定通常涉及测量免疫原和特异结合 CCR7 受体免疫原

的抗体之间的复合物形成。

本发明的抗体可以是多克隆抗体。例如能够在一次或多次注射免疫剂优选佐剂之后在哺乳动物例如非人哺乳动物中产生这些多克隆抗体。通常,通过一系列皮下或腹膜内注射将免疫剂和/或佐剂注射到哺乳动物中。免疫剂可以包括 CCR7 受体或其片段或其融合蛋白或者可以包括表达 CCR7 受体的细胞。或者,富集 CCR7 受体或其片段的粗蛋白制剂能够被用于产生抗体。这些蛋白、片段或制剂在适当佐剂的存在下被引入非人哺乳动物中。免疫原给药的其它形式是作为细胞表面的跨膜蛋白(方法描述在例如 Spiller *et al.* J. Immunol. Methods, 224: 51-60 (1999)中)。这些细胞可以是在其细胞膜上天然表达抗原或在其中能够在用 DNA 构建体转染细胞后得到此表达的每一个,该 DNA 构建体含有编码抗原的 DNA 序列、其在细胞中的充分表达所必需的 DNA 序列以及其它 DNA 序列。不仅当细胞膜是抗原表达的天然位点时此方法是可行的,甚至当抗原一旦在细胞中合成,就由被加到抗原编码序列的信号肽指引到这些位置时此方法也是可行的。如果血清含有针对不期望表位的多克隆抗体,那么能够通过免疫亲和层析纯化多克隆抗体。

或者,所述抗体可以是单克隆抗体。可以通过杂交瘤产生单克隆抗体,其中用免疫剂免疫小鼠、仓鼠或其它适合的宿主动物来引出产生或能够产生特异结合免疫剂的抗体的淋巴细胞,例如 Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)。免疫剂通常包括 CCR7 受体或其片段或其融合蛋白且任选地包括载体或富集了 CCR7 受体或其片段或表达 CCR7 受体的粗蛋白制剂。这些蛋白、片段或制剂在适合佐剂的存在下被引入非人哺乳动物。免疫原给药的其它形式是作为细胞表面的跨膜蛋白(方法描述在例如 Spiller *et al.* J. Immunol. Methods, 224: 51-60 (1999)中)。这些细胞可以是在其细胞膜上天然表达抗原或在其中能够在用 DNA 构建体转染细胞后得到此表达的每一个,该 DNA 构建体含有编码抗原的 DNA 序列、其在细胞中的充分表达所必需的 DNA 序列以及其它 DNA 序列。不仅当细胞膜是抗原表达的天然位点时此方法是可行的,甚至当抗原一旦在细胞中表达就由被加到抗原编码序列的

信号肽指引到这些位置时此方法也是可行的。或者，可以在体外免疫淋巴细胞。通常，如果非人哺乳动物来源是期望的，则使用脾细胞或淋巴结细胞，如果人源是期望的，则使用外周血淋巴细胞(“PBLs”)。使用诸如聚乙二醇的合适融合试剂将淋巴细胞与永生化细胞系融合，产生杂交瘤细胞。通常，永生化细胞系是大鼠、小鼠、牛或人源的骨髓瘤细胞。在合适的培养基中培养杂交瘤细胞，该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞的生长或存活物质。使用有限稀释法分离克隆，并且可以通过常规技术分析培养杂交瘤细胞的培养基(上清液)中抗 CCR7 受体的单克隆抗体的存在，例如通过细胞流式术或通过免疫沉淀或通过其它体外结合测定，例如 RIA 或 ELISA。还能够作为动物体内的腹水瘤体内培养克隆。

优选地，由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定确定，例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)或通过免疫荧光技术，例如荧光显微法或流式细胞术。

通过常规免疫球蛋白纯化方法从培养基、腹水液或血清适当地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体，所述方法例如蛋白 A 琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析。

还可以通过重组 DNA 方法制备单克隆抗体，例如在 US 4,816,567 中描述的。能够使用常规方法从 CCR7 受体特异的杂交瘤细胞分离编码本发明单克隆抗体的 DNA 及测序，例如通过能够特异结合编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针。杂交瘤为这些 DNA 的优选来源。一旦分离，DNA 可以被插入到表达载体中，然后该载体被转染到宿主细胞中，例如猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不产生另外免疫球蛋白的骨髓瘤细胞，以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。

产生反应性抗靶分子的特异抗体或抗体片段的另一方法为筛选表达在细菌、酵母、丝状噬菌体、核糖体或核糖体亚基及其它的展示系统中的编码免疫球蛋白基因或其部分的表达文库。这些方法通常使用得自诸如健康供者、患者或健康或不健康的动物的多种来源的抗体序列或抗体片段序列的大文库。这些序列被克隆和表达在适当系统中并

通过其对抗原的结合亲和性被选择。以描述了多种选择具有期望特性的抗体或片段的方法，例如中和、激动等等(Fernández, Curr. Op. Biotech., 15: 364-373 (2004); Schmidt, Eur. J. Biochem., 268: 1730-1738 (2001))。在一个实施方案中，还能够通过重组方法产生作为本发明杂交瘤特征的抗体和抗体片段，所述重组方法通过提取信使 RNA、构建 cDNA 文库和选择编码抗体分子片段的克隆。

工程化的或经修饰的抗体：

许多方法使用分子生物学和遗传学技术，例如对遗传学和免疫球蛋白结构的良好了解，构建免疫球蛋白分子的不同修饰以改良其特性用于临床或其它用途。它们中的一些倾向于降低分子在要使用的物种中的免疫原性且得到的分子具有与该物种更加同源的序列。已使用了多种方法获得人源的单克隆抗体，避免了在健康人体中的伦理不允许的举动。在其它方法中，减小了分子量和大小，例如为了提高分子向实体瘤的分布。其它可能性为在分子中结合用于多于一个靶分子的结合结构域(双特异性抗体或三特异性的等等)，或者结合抗体或片段与具有期望功能的另一分子，例如毒性剂、激素、生长因子、免疫调节剂(免疫抑制剂或免疫刺激剂)、细胞生长抑制剂等等。通常，所有得到的分子保留至少一个抗体可变结构域，其赋予作为抗原-抗体结合特征的高特异性和亲和性。这样的构建的一些实例为：

嵌合抗体：

这些指用来自某些物种(通常是产生单克隆抗体的哺乳动物)的抗体的可变区和其它物种(将要使用嵌合抗体的物种)的恒定区构建的抗体。这样的构建的目的是获得具有原始单克隆抗体但具有较小免疫原性且在待治疗个体中被更好耐受的抗体，其具有增加的血清半衰期且其能够被识别用于效应免疫机制，即补体、细胞毒细胞的 Fc 受体或其它显示物种特异性的免疫球蛋白的特异受体。

人源化抗体：

“人源化抗体”指衍生自非人抗体，通常是鼠抗体的保留母体抗体的抗原结合特性但在人中有较小免疫原性的抗体。这可以通过多种方法达成，包括(a) 嫁接完整的非人可变区到人恒定区上产生嵌合抗体；(b) 仅嫁接非人互补决定区(CDRs)到人框架和保留或未保留关键框架残基的恒定区中；以及(c) 移植完整的非人可变结构域，但通过取代表面残基用人样部分遮盖它们。

本领域已经描述了用于人源化非人抗体的方法。优选地，人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基经常被称为“输入”残基，其通常取自“输入”可变结构域。

基本上能够根据 Winter 和同事的方法(Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988))进行人源化，通过用超变区序列替代人抗体的对应序列。实践中，人源化抗体通常是其中某些超变区残基和可能某些框架区(FR)残基被来自啮齿动物抗体的类似位点的残基替代的人抗体。用于制备人源化抗体的、轻链和重链的人可变区结构域的选择对于减小免疫原性保留对抗原的特异性和亲和性是非常重要的。根据所称的“最适”方法，用啮齿动物抗体的可变结构域的序列筛选已知人可变区结构域序列的全部文库。与啮齿动物的序列最接近的人序列被接受为人源化抗体的人框架区(FR) (Suns *et al.*, J Immunol., 151:2296 (1993), Chothia *et al.*, J Mol Biol, 196:901 (1987))。另一方法使用衍生自轻链或重链的特定亚群的所有人抗体的共有序列的特定框架区。同样的框架区可以用于若干种不同的人源化抗体(Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993))。

更重要的是抗体被人源化，保留对抗原的高亲和性和其它有利的生物学特性。为达成此目的，根据优选方法，通过使用母体和人源化序列的三维模型分析母体序列和各种概念上的人源化产物的方法制备人源化抗体。

灵长类源化的抗体：

此方法中使得抗体与人更加相似的进一步步骤是制备所称的灵长类源化的抗体，即被工程化以含有猴(或其它灵长动物)抗体，特别是食蟹猴抗体的可变重链和轻链结构域的重组抗体，且其含有人恒定结构域序列，优选人免疫球蛋白 $\gamma 1$ 或 $\gamma 4$ 恒定结构(或 PE 变体)。在 Newman *et al.*, *Biotechnology*, 10: 1458-1460 (1992); US 5,658,570 和 US 6,113,898 中描述了这些抗体的制备。已报道这些抗体展示与人抗体的高度同源性，即 85-98%，显示人效应功能，具有减小的免疫原性，且可能显示对人抗原的高亲和性。Newman, *Biotechnology*, 10: 1455-1460 (1992)公开了产生重组抗体的另一高效方法。

人抗体：

“人抗体”指含有完整人轻链和重链以及恒定区的抗体，通过任何已知的标准方法产生。

作为除人源化之外的另一选择，能够产生人抗体。例如，目前可以产生经过免疫能够在不存在内源免疫球蛋白产生下产生人抗体的全部库的转基因动物(例如小鼠)。例如，已经描述了在嵌合和种系突变体小鼠中删除抗体重链连接区 PH 基因导致内源抗体产生的完全抑制。在这些种系突变体小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在免疫后产生人抗体。例如参见，Jakobovits *et al.*, *Proc. Mad. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993)。

或者，能够使用噬菌体展示技术(McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990))体外产生来自供者的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库的人抗体和抗体片段。根据此技术，抗体 V 结构域被符合读框地克隆到诸如 M13 或 fd 的丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中，并作为功能抗体片段被展示在噬菌体颗粒的表面上。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝，所以基于抗体功能特性的选择还导致选择编码显示那些特性的抗体的基因。因此，噬菌体模拟 B 细胞的某些特性。能够以多种形式进行噬菌体展示；关于其综述，例如参见 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)。

还可以通过体外活化的 B 细胞或用人细胞重建其免疫系统的 SCID 小鼠产生人抗体。

一旦获得人抗体，其编码 DNA 序列就能够被分离、克隆并引入到适当表达系统中，即细胞系，优选来自哺乳动物，其随后表达并释放人抗体到培养基中，能够从该培养基中分离抗体。

抗体片段：

抗体片段是抗体的片段，例如 Fab、F(ab')₂、Fab'和 scFv。已经开发了多种产生抗体片段的技术。传统上，通过完整抗体的蛋白水解消化衍生这些片段，但近来能够通过重组宿主细胞直接产生这些片段。在其它实施方案中，选择的抗体是单链 Fv (scFv)片段，其还可以是单特异性的或双特异性的。

抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段，每一个具有单一的抗原结合位点，以及剩余的“Fc”片段，其名称反应出其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点且仍然能够交联抗原的 F(ab')₂ 片段。

“Fv”是最小的含有完整抗原识别和抗原结合位点的抗体片段。该区域由一条重链和一条轻链可变结构域的紧密、非共价连接的二聚体组成。在这种构型下每一可变结构域的三个超变区相互作用以确定 VH-VL 二聚体表面上的抗原结合位点。总的说来，这六个超变区赋予抗体的抗原结合特异性。然而，甚至单一可变结构域(或包含三个对抗原特异的超变区的半个 Fv)也具有识别和结合抗体的能力，尽管比完整结合位点的亲和性低。

Fab 片段还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域 (CH1)。Fab'片段与 Fab 片段的不同在于 Fab'片段中增加了重链 CH1 结构域羧基末端的包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸的少数残基。Fab'-SH 是本文中对恒定结构域的半胱氨酸具有至少一个自由巯基的 Fab'的命名。F(ab')₂ 抗体片段最初是作为 Fab'片段对产生的，该 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

“单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 结构域，其中这些结构域存在于单多肽链中。优选地，Fv 多肽还包含 VH 和 VL 结构域之间的多肽连接物，其使得 scFv 能够形成用于抗原结合的期望结构。关于 scFv 的综述，参见 Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, N. Y., pp. 269-315 (1994)。

术语“双价小分子抗体(diabodies)”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段，那些片段包含在同一多肽链中(VH-VL)与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用足够短使得同一链上的两个结构域不能配对的连接物，强迫该结构域与另一链的互补结构域配对并创造出两个抗原结合位点。双价小分子抗体在例如 EP 404,097、WO 93/11161 和 Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)中有更详细的描述。

本发明包括的结合 CCR7 受体的抗体的功能片段保留衍生该片段的全长抗体的至少一种结合功能和/或调节功能。优选的功能片段保留相应全长抗体的抗原结合功能(例如结合哺乳动物 CCR7 受体的能力)。特别优选的功能片段保留抑制哺乳动物 CCR7 受体的一种或多种特征功能的能力，所述特征功能例如结合活性、信号传导活性和/或刺激细胞应答。例如，在一个实施方案中，功能片段能够抑制 CCR7 与一个或多个其配体的相互作用和/或能够抑制一种或多种受体介导的功能。

双特异性抗体：

双特异性抗体是对至少两种不同的表位具有结合特异性的抗体。实例性双特异性抗体可以结合 B 细胞表面标志物的两种不同表位。其它的这样的抗体可以结合第一 B 细胞标志物且进一步结合第二 B 细胞表面标志物。或者，抗 B 细胞标志物结合臂可以与结合白细胞上触发分子的臂组合以将细胞防御机制集中到 B 细胞，白细胞上的触发分子例如 T 细胞受体分子(例如 CD2 或 CD3)或 IgG 的 Fc 受体(FcγR)，例如 FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)和 FcγRIII (CD16)。双特异性抗体还可以被用于将细胞毒试剂定位到 B 细胞。这些抗体具有 B 细胞标志物

结合臂和结合细胞毒试剂(例如皂草素、抗干扰素 α 、长春花生物碱、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。双特异性抗体能够被制备为全长抗体或抗体片段(例如 $F(ab)_2$ 双特异性抗体)。

本领域已知制备双特异性抗体的方法。全长双特异性抗体的传统生产是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中所述两条链具有不同的特异性(Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机搭配,这些杂交瘤(四源杂交瘤)产生 10 种不同抗体分子的可能混合物,其中仅有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤完成的正确分子的纯化是比较困难的,并且产物产率低。在 WO 93/08829 和 Traunecker *et al.*, *EMBO J*, 10:3655-3659 (1991)中公开了相似的方法。

根据不同的方法,具有期望结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合位点)被融合到免疫球蛋白恒定结构域序列。优选地,该融合是利用包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定结构域。优选在至少一个融合中存在含有轻链结合所必需位点的第一重链恒定区(CH1)。编码免疫球蛋白重链融合的 DNA 以及,如果需要,编码免疫球蛋白轻链的 DNA 被插入到分别的表达载体中,并且被共转染到合适的宿主生物中。这提供了当在构建中使用不等比例的三种多肽链以提供最佳产率时,调节实施方案中的三种多肽片段的相互比例的很大灵活性。然而,当等比例表达至少两种多肽链导致高产率时或当比例不特别重要时,有可能将两种或全部三种多肽链的编码序列插入到一个表达载体中。

双特异性抗体包括交联的或“异偶联物”抗体。例如,异偶联物中的抗体之一能够与抗生物素蛋白耦合,另一个与生物素耦合。例如提出这样的抗体将免疫系统细胞靶向不想要的细胞。异偶联物抗体可以使用任何方便的交联方法制备。本领域公知合适的交联剂和许多交联技术,且 US 4,676,980 公开了合适的交联剂。

文献中还描述了从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,能够使用化学键制备双特异性抗体。

抗体偶联:

癌症的细胞毒化疗或放疗受到因为所述治疗不具有对恶性细胞的选择性而导致对敏感正常细胞的毒性而产生的严重的、有时致命的副作用。避免这些问题的一种方法是将治疗剂和抗体或其它识别肿瘤相关抗原的配体偶联。这增加恶性细胞暴露于配体靶向的治疗剂并减少正常细胞暴露于配体靶向的治疗剂。参见 Allen, Nature, 2: 750-763 (2002)。

治疗剂还可以是免疫抑制剂, 即抑制或遮蔽本文中接受治疗的哺乳动物的免疫系统的物质。这将会包括抑制细胞因子产生、下调或抑制自身抗原表达或遮蔽 MHC 抗原的物质。

治疗剂还可以是细胞毒性剂, 即抑制或防止细胞的功能和/或造成细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素、化疗剂和毒素, 化疗剂即可用于癌症治疗的化学化合物, 毒素例如细菌、真菌、植物或动物源的小分子毒素或酶活性毒素或其片段。

治疗剂还可以是细胞因子、激素、生长因子、坏死因子, 即由一群细胞释放的、作为细胞间介质(mediators)作用于另一细胞或甚至同一细胞群的蛋白或多肽。如本文中所用, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物和天然序列细胞因子的生物活性等价物的蛋白和多肽。

治疗剂还可以是前药, 其指药物活性物质的前体或衍生形式, 该药物活性物质与母体药物相比对肿瘤细胞具有较小的细胞毒性且能够被酶促活化或转化成更具活性的母体形式。

抗体和一种或多种小分子毒素的偶联物。在本发明的一个优选实施方案中, 拮抗剂与一个或多个毒素分子偶联。能够使用的酶促活化的毒素及其片段包括白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白 A 链、相思子毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α 带曲毒素(sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素(dianthin)蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、多花白树毒

蛋白、mitogellin、restrictocin、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(neomycin)和 tricothecene。

本发明还涉及与具有溶核活性的化合物(例如核糖核酸酶或 DNA 内切酶例如脱氧核糖核酸酶; DNA 酶)或其它能够破坏细胞结构或细胞器且因此杀伤细胞或减小细胞存活力的化合物偶联的抗体。

还可以将本发明的抗体与将前药转化为活性抗癌药物的前药活化剂偶联。这些偶联物的试剂组分包括任何能够作用于前药以便于将其转化为其活性更强的细胞毒形式的试剂。

或者, 能够使用本领域公知的重组 DNA 技术构建至少与本发明的酶的功能活性部分连接、至少包含本发明拮抗剂的抗原结合区的融合蛋白(例如参见 Neuberger *et al.*, Nature, 312:604-608 (1984))。

可以用多种双功能蛋白耦合剂或连接物制备抗体和细胞毒试剂的偶联物。该连接物可以是促进细胞毒药物在细胞内释放的“可切割连接物”。例如, 可使用易酸解连接物、肽酶敏感连接物、二甲基连接物或含有二硫键的连接物。

或者, 例如可以通过重组技术或肽合成制备包含抗体和细胞毒试剂的融合蛋白。

其它潜在有用的修饰:

还涉及本文描述的蛋白或肽拮抗剂的氨基酸序列修饰。例如, 可能期望提高抗体的结合亲和性和/或其它生物学特性。通过向抗体编码核酸中引入适当地核苷酸改变, 或通过肽合成来制备抗体的氨基序列变体。这样的修饰例如包括拮抗剂氨基酸序列中残基的删除和/或插入和/或替代。进行删除、插入和替代的任意组合以完成最终构建体, 条件是最终构建体具有期望的特征。氨基酸变化还可以改变拮抗剂的翻译后加工, 例如改变糖基化位点的数目或位置。

氨基酸序列插入包括长度从一个残基到含有一百或更多残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有 N 末端蛋氨酸残基的拮抗剂或与细胞毒多肽融合的拮抗剂。拮抗剂分子的其它插入变体包括与酶的拮抗剂

的 N 或 C 末端的融合，或增加拮抗剂的血清半衰期的多肽。

另一类型的变体是氨基酸替代变体。这些变体中，拮抗剂分子的至少一个氨基酸残基被不同的残基取代。抗体拮抗剂的用于替代诱变的最感兴趣位点包括超变区，但也考虑 FR 的改变。

抗体的另一类型的氨基酸变体是改变拮抗剂的原始糖基化模式。改变指删除在拮抗剂中发现的一个或多个糖部分，和/或添加在拮抗剂中不存在的一个或多个糖基化位点。多肽的糖基化通常是 N 连接或 O 连接的。N 连接指糖部分连接到天冬酰胺的侧链上。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸，其中 X 是除脯氨酸之外的任何氨基酸，是糖部分酶促连接到天冬酰胺侧链的识别序列。因此，在多肽中存在这些三肽序列的任何一个创造出潜在的糖基化位点。O 连接糖基化指单糖或单糖衍生物 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接到羟基氨基酸上，最常见丝氨酸或苏氨酸，尽管也可以使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。通过改变氨基酸序列使得其含有一个或多个上述的三肽序列(用于 N 连接糖基化位点)方便地完成向抗体中加入糖基化位点。还可通过向原始抗体的序列添加或用一个或多个丝氨酸或苏氨酸替代来进行改变(用于 O 连接糖基化位点)。通过多种本领域已知的方法制备编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下)或通过寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR 诱变和拮抗剂的较早制备变体或非变体版本的盒式诱变。

可能期望修饰本发明使用的抗体以提高效应物功能，例如，以便于增强抗体的 ADCC 和/或 CDC。这可以通过向抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸替代完成。

通过若干单糖或单糖衍生物形成加入到例如抗体的糖蛋白的氨基酸骨架上的糖基基团，导致能够在来自不同哺乳动物或组织的细胞中产生的同一抗体上不同的组成。此外，已经显示糖基的不同组成能够影响介导抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒(ADCC)和/或补体依赖的细胞毒(CDC)的效力。因此有可能通过研究不同来源的抗体的糖基化模式来提高那些特性。这类方法的实例是 Niwa *et al.*, Cancer Res.

2004 Mar 15;64(6):2127-33。

或者或另外地，可以将半胱氨酸引入 Fc 区中，由此允许在此区域中形成链间二硫键。由此产生的同型二聚体抗体可能具有提高的内化能力和/或增强的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖的细胞性细胞毒 (ADCC)。参见 Caron *et al.*, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992)和 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)。还可以使用异双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤能力的同型二聚体抗体，如 Wolff *et al.* Cancer Research 53:2560-2565 (1993)所述。或者，具有双 Fc 区的抗体能够被工程化且可能因此具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。

为了增加抗体的血清半衰期，可以例如如 US 5,739,277 所述将补救受体结合表位并入抗体(特别是抗体片段)中。如本文中所用，术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子(例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)的 Fc 区的负责提高 IgG 分子的体内血清半衰期的表位。

优选地，本发明的抗体，例如单克隆抗体、Fv 片段、Fab 片段或其它衍生自本发明的单克隆抗体的结合组合物，对 CCR7 具有高亲和性。可以通过常规技术测量单克隆抗体和相关分子对 CCR7 受体的亲和性。

抗体对抗原的亲和性能够被定义为抗体结合所述抗原的有效性。抗原 - 抗体结合是可逆结合，因此当两种分子在同一溶液中稀释足够时间后，此溶液达到平衡，其中抗原 - 抗体复合物(AgAb)、游离抗原(Ag)和游离抗体(Ab)的浓度恒定。因此比例 $[AgAb]/[Ag]*[Ab]$ 也是常数，定义为称为 K_a 的结合常数，其能够被用于比较一些抗体对其各自表位的亲和力。

测量亲和力的通常方法为实验测定结合曲线。这包括测量抗体 - 抗原复合物的量，其为游离抗原浓度的函数。有两种进行该测量的常见方法：(i) 使用 Scatchard 分析的经典平衡透析以及(ii) 表面等离子体振子(plasmon)共振方法，其中抗体或抗原被结合到导电表面上且抗原或抗体分别影响此表面的电特性。

经常只需要测定结合同一表位的两种或更多种单克隆抗体的相对

亲和力。在该情况下, 可以进行竞争测定, 其中单克隆抗体之一的系列稀释与恒定量的配体孵育, 然后加入用适合示踪剂标记的第二单克隆抗体。结合此单克隆抗体并洗涤未结合抗体后, 测量第二单克隆抗体的浓度并对第一单克隆抗体的浓度作图, 用 Scatchard 方法分析。实例是 Tamura *et al.*, J. Immunol. 163: 1432-1441 (2000)。

此外, 本发明的抗体能够用于检测 CCR7 受体。这些检测方法有利地应用于肿瘤细胞是表达 CCR7 受体的细胞的癌症的诊断和/或预后。

此外, 本发明的抗体能够用于通过诸如免疫荧光、流式细胞术、亲和层析或免疫沉淀的标准技术鉴定表达 CCR7 受体的细胞。例如, 本发明的抗体能够有助于表达 CCR7 受体的肿瘤细胞的鉴定。此外, 本发明的抗体能够用于鉴定表达 CCR7 受体的肿瘤细胞以评价其在特定组织中的水平。因此, 本发明的抗体能够诊断地用于检测组织中表达 CCR7 受体的细胞的水平, 其作为临床检查过程的一部分, 例如为了确定给定治疗方案的效果。能够通过耦合(即物理地连接)抗体与标记基团辅助检测。

如下文所述, 在特定实施方案中, 本发明的抗体能够用于与诸如细胞因子、止痛剂、免疫抑制剂和/或化疗剂的另外的治疗活性化合物组合。联合给药包括使用分开的配方或单一药物配方的共给药和以任何顺序的连续给药, 其中优选地存在两种(或全部)活性剂同时发挥其生物学活性的时间阶段。

在其它方面, 本发明涉及用于对个体给药的药物组合物, 有时称为本发明的药物组合物, 包括本发明的抗体或其药物衍生物或前药以及药物可接受的载体、佐剂或媒介物, 所述本发明的抗体即结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。所述药物组合物通过被给予患有癌症的个体能够用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡。本文所用的术语“个体”指被分类为哺乳动物的所有动物, 包括但不限于家畜或农场动物、灵长类和人。该个体优选为任何年龄或种族的男性或女性人类。

本文所用的术语“药物可接受的载体”旨在包括与药物给药相容

的任何和所有溶剂、分散介质、包被物、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等等。本领域公知将这些介质和试剂用于药物活性物质。除了与活性化合物不相容的任何常规介质或试剂外，预期其在组合物中的使用。可接受的载体、赋形剂或稳定剂是在所用的剂量和浓度下对受者无毒的，且包括缓冲液，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂(例如氯化十八烷基二甲基苯基铵；氯化己烷双胺；苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚、丁醇或卞醇；对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇和间甲酚)；小分子量(小于约10个残基)多肽；蛋白，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和包括葡萄糖、甘露糖或糊精在内的其它糖；螯合剂例如EDTA；糖类例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐抗衡离子例如钠；金属配合物(例如Zn-蛋白配合物)；和/或非离子表面活性剂例如TWEEN™、PLURONIC™或聚乙二醇(PEG)。

可以在同一制剂中给予本发明的抗体，或者可以在不同制剂中给予本发明的抗体。给药可以是同时的或顺序的，并且可以在任意顺序下有效。

还可以将补充活性成分掺入到本发明的药物组合物中。因此，在特定实施方案中，本发明的组合物还可以根据接受治疗的特定适应症的需要含有多于一种的活性化合物，优选那些具有不负面相互影响的补充活性的化合物。例如，可能期望进一步提供化疗剂、细胞因子、止痛剂或免疫抑制剂。这些其它活性剂的有效量依赖于存在于药物组合物中的本发明的抗体的量、疾病或病症的类型或治疗方法及其它因素等等。

在实施方案中，本发明的抗体与保护所述化合物不从身体中被快速清除的载体一起制备，该载体例如控释制剂，包括植入物和微包裹的递送系统。能够使用生物可降解的、生物相容的聚合物，例如乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙二醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这些

制剂的方法对于本领域技术人员是明显的。还能够从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc 购得材料。脂质体混悬液(包括利用针对病毒抗原的单克隆抗体被靶向受感染细胞的脂质体)也能够被用作药物可接受的载体。能够根据本领域技术人员已知的方法制备这些, 例如 U.S. 4,522,811 中所述。

本发明的抗体(或其片段)的给药途径可以是口服、肠胃外、通过吸入或局部的。

本文所用的术语“肠胃外”包括静脉、腹膜内、肌内、皮下、直肠或阴道给药。皮下和肌内形式的肠胃外给药通常是优选的。

“吸入”指鼻内和口腔吸入给药。这些给药的适合剂型, 例如气雾制剂或定量吸入器, 可以通过常规技术制备。

此外, “局部的”指非全身性给药并包括向表皮外部、口腔应用本发明的抗体, 以及向耳、眼和鼻中以及不显著进入血流的部位滴注抗体。

“全身性给药”指口服、静脉、腹膜内和肌内给药。当然, 治疗或预防作用所需的抗体的量根据所选择的抗体、接受治疗的疾病状态的性质和严重性以及患者而变化。

此外, 抗体可以通过脉动注射适当地给药, 例如使用逐渐减少剂量的抗体。优选地, 通过注射给予制剂, 最优选静脉或皮下注射, 部分依赖于给药是短时的还是长期的。

因此, 在特定实施方案中, 本发明的药物组合物可以是适于口服给药的给药形式, 固体或液体。适于口服给药的适合剂型可是是片剂、胶囊剂、糖浆剂或溶液, 并且可以含有本领域已知的常规赋形剂, 例如结合剂例如糖浆、阿拉伯树胶、明胶、山梨醇或聚乙烯吡咯烷酮; 填料, 例如乳糖、糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨醇或甘氨酸; 压片润滑剂, 例如硬脂酸镁; 崩解剂, 例如淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙酸钠或微晶纤维素; 或药物可接受润湿剂例如十二烷基硫酸钠。可以通过混合、填充或压片的常规方法制备固体口服组合物。可以使用重复的混合操作使活性剂遍布使用大量填充剂的组合物中。这样的操作在本领域中是常规的。例如通过湿法或干法成粒及任选地包被来制备片剂, 该包被根据通常制药实践中公知的方法, 特别是使用肠溶

包衣。

在另一实施方案中,可以使本发明的药物组合物适合于肠胃外给药,例如适当单位剂型的无菌溶液、混悬液或冻干产品。适于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(当水适合时)或分散物以及用于无菌注射溶液或分散物的当场制备的无菌粉末。对于静脉给药,适合的载体包括生理盐水、抑菌水、CremophorEM (BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的且流动性应达到容易注射的程度。组合物在生产和储存条件中必须是稳定的且使其保存不受到例如细菌和真菌的微生物的污染。载体能够是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇的药物可接受多元醇,及其适当的混合物。例如能够通过使用例如卵磷脂的包衣和使用表面活性剂来保持适当的流动性,包衣的使用通过在分散物的情况下保持需要的颗粒大小来保持流动性。对微生物作用的防止能够通过多种抗菌剂和抗真菌剂来实现,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等等。在许多情况下,优选在组合物中包括等张剂,例如糖、例如甘露糖醇、山梨醇的多元醇、氯化钠。能够通过组合物中包括例如单硬脂酸铝和明胶的延迟吸收的试剂来达到注射组合物的延长吸收。

能够通过将需要量的活性化合物(例如多肽或抗体)并入适当溶剂中及随后的过滤灭菌来制备无菌注射溶液,该适当溶剂根据需要含有上文列举的成分中的一种或组合。通常,通过将活性化合物并入无菌媒介物中来制备分散物,该无菌媒介物含有来自上文所列举的基本分散介质和必需的其它成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下,制备的优选方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生来自之前无菌过滤溶液的活性成分加上任何另外的期望成分的粉末。

在特定实施方案中,所述药物组合物被通过静脉(IV)或皮下(SC)给药。可以使用足够的赋形剂例如填充剂、缓冲剂或表面活性剂。将使用西班牙药典和美国药典以及类似参考文献中描述或指出的标准方法制备上述制剂。

将药物组合物,即口服或肠胃外组合物组方为易于给药和剂量一

致的单位剂型是特别有利的。本文所用单位剂型指适于作为用于待治疗个体的单位剂量的物理上不连续的单位；每一单位含有与必需的药物载体联合的、经计算产生期望治疗效果的预定量的活性化合物。本发明的单位剂型的规格受到活性化合物的独特特征和要达到的特定治疗效果以及复合这些活性化合物用于治疗个体的领域中固有限制的控制并直接依赖于这些因素。

通常本发明抗体的有效给药量取决于所选化合物的相对效力、接受治疗的疾病的严重性和患者的体重。然而，通常每日给予活性化合物一次或多次，例如每日 1、2、3 或 4 次，通常日总剂量为 0.001 mg/kg 体重/日至 1000 mg/kg 体重/日，优选约 0.01 mg/kg 体重/日至约 100 mg/kg 体重/日，最优选约 0.05 mg/kg 体重/日至 10 mg/kg 体重/日。

除了对患者给予抗体，本发明预期通过基因治疗给予抗体。WO96/07321 涉及使用基因治疗产生细胞内抗体。

所述药物组合物能够与说明书一起被包括在容器、包装或分配器中用于给药。

本发明的抗体和药物组合物可以与其它药物联用以提供联合治疗。所述其它药物可以组成同一组合物的一部分，或作为用于在同一时间或不同时间给药的分开的组合物。

本发明的抗体和药物组合物将会用于治疗医学状态，例如与癌症相关的病症或疾病，具体地，用于治疗癌症，所述癌症的特征为肿瘤细胞表达 CCR7 受体，更具体地，用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡。对本发明的治疗易感的、肿瘤细胞表达 CCR7 受体的说明性非限制性癌症包括慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡型淋巴瘤、大 B 细胞淋巴瘤、AIDS 相关淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、B 细胞急性原始淋巴细胞性淋巴瘤、霍奇金病、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤、蕈样肉芽肿病、慢性骨髓增生性疾病的暴发、骨髓增生异常综合征的暴发、乳腺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、胃癌或头颈的鳞状细胞癌和结肠癌。在优选实施方案中，对本发明的治疗易感的癌症包括乳腺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、胃癌或头颈的鳞状细胞癌和结肠癌。在最优选的实

施方案中,对本发明的治疗易感的癌症包括滤泡型淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、慢性骨髓增生性疾病的暴发和骨髓增生异常综合征的暴发。在其它最优选的实施方案中,根据本发明治疗的癌症包括 CLL 和 MCL。

在特定实施方案中,本发明的抗体可以与本文所述的医学状态的其它治疗联合,例如化疗、放疗、免疫疗法或手术方法,包括烷基化剂、抗代谢药、抗激素、用于多种症状的治疗剂,例如镇痛剂、利尿剂、抗利尿剂、抗病毒剂、抗生素、细胞因子、营养补充剂、贫血治疗剂、凝血治疗剂、骨治疗剂、精神病学和心理学治疗剂等等。

为了实现自体骨髓或干细胞移植,可以在用抗 CCR7 抗体治疗后从所述患者收集骨髓或外周血干细胞。

还可使用细胞因子治疗患者,为了在给予本发明的抗体之前上调 CCR7 或癌性 B 细胞表面上的其它靶蛋白的表达。为了刺激免疫效应物功能,还可以在给予清除抗体或放射标记的抗体的同时或之前或之后给予细胞因子。

在一个实施方案中,化疗方案可用来补充本文公开的疗法,且可以与所述放射标记的抗体同时或以任意顺序来顺序给药。化疗方案可以选自 CHOP (环磷酰胺、多柔比星(也称为羟基柔红霉素)、长春新碱(也称为硫酸长春新碱)和泼尼松)、ICE (去甲氧基柔红霉素、阿糖胞苷和依托泊甙)、Mitozantrone、阿糖胞苷、DVP (柔红霉素、长春新碱和泼尼松)、ATRA (全反式视黄酸)、去甲氧基柔红霉素、hoelzer 化疗方案、La 化疗方案、ABVD (博来霉素、达卡巴嗪、多柔比星和长春新碱)、CEOP (环磷酰胺、表柔吡星、长春新碱和泼尼松龙)、2-CdA (2-氯脱氧腺苷)、FLAG & IDA (氟拉达滨、阿糖胞苷、非格司亭和去甲氧基柔红霉素)、(有或没有随后的 G-CSF (粒细胞集落刺激因子)治疗)、VAD (长春新碱、多柔比星和地塞米松)、M & P (左旋溶肉瘤素和泼尼松)、C (环磷酰胺)-每周一次、ABCM (盐酸阿霉素、博来霉素、环磷酰胺和丝裂霉素-C)、MOPP (氮芥、长春新碱、泼尼松和丙卡巴肼)和 DHAP (地塞米松、阿糖胞苷和顺铂)。优选的化疗方案是 CHOP。

因此,在其它方面,本发明涉及治疗癌症特别是肿瘤细胞表达

CCR7 受体的癌症的方法，其包括对需要所述治疗的个体给予治疗有效量的本发明抗体，即结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段，或给予治疗有效量的本发明的药物组合物。在特定实施方案中，所述癌症的特征为肿瘤细胞表达 CCR7 受体。根据本发明治疗的说明性非限制性癌症包括 CLL、MCL、滤泡型淋巴瘤、大 B 细胞淋巴瘤、AIDS 相关淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、B 细胞急性原始淋巴细胞性淋巴瘤、霍奇金病、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤、蕁样肉芽肿病、慢性骨髓增生性疾病的暴发、骨髓增生异常综合征的暴发、乳腺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、胃癌或头颈的鳞状细胞癌和结肠癌。在优选实施方案中，根据本发明治疗的癌症包括乳腺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、胃癌或头颈的鳞状细胞癌和结肠癌。在最优选的实施方案中，根据本发明治疗的癌症包括滤泡型淋巴瘤、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、慢性骨髓增生性疾病的暴发和骨髓增生异常综合征的暴发。在其它最优选的实施方案中，根据本发明治疗的癌症包括 CLL 和 MCL。

在其它方面，本发明涉及杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的方法，其包括将所述细胞接触本发明的抗体，即结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。在特定实施方案中，所述肿瘤细胞是表达 CCR7 受体的肿瘤细胞，例如 CLL 和 MCL 细胞。

在其它方面，本发明涉及在需要所述治疗的个体中杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的方法，其包括对所述个体给予治疗有效量的本发明的抗体，即结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。

在其它方面，本发明涉及减弱表达 CCR7 受体的肿瘤细胞向次级淋巴组织迁移和/或阻断肿瘤细胞扩散进入次级淋巴组织的方法，其包括将所述肿瘤细胞接触本发明的抗体，即结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。

在其它方面，本发明涉及在需要所述治疗的个体中减弱表达 CCR7 受体的肿瘤细胞向次级淋巴组织迁移和/或阻断肿瘤细胞扩散进

入次级淋巴组织的方法，其包括对所述个体给予治疗有效量的结合 CCR7 受体的抗体或其抗原结合片段。

关于易于用本发明方法治疗的表达 CCR7 受体的肿瘤细胞、抗体、给药方案和剂量的信息在前文已述及。在特定实施方案中，易于用上述方法治疗的表达 CCR7 受体的肿瘤细胞是 CLL 或 MCL 细胞。

在所有情况下，短语“治疗有效量”指如前所述定义的对治疗癌症有效的量；所述量能够是足以实现期望反应或改善例如转移或原发肿瘤进展、大小或生长的症状或指征的量。针对特定个体的治疗有效量可以根据例如接受治疗的疾病状态、个体的整体健康状况、给药方法、途径和剂量以及副作用的严重程度等因素变化。例如，效果会导致定量上至少约 10%，优选至少 20%、30%、50%、70%或甚至 90% 或更多的变化。当在组合中时，治疗有效量是相对组分组合的比例且效果不限于单一组分。

治疗有效量通常将调节症状至少约 10%；通常至少约 20%；优选至少约 30%；或更优选至少约 50%。或者，迁移的调节指多种细胞类型的迁移或运行受到影响。这些将导致例如受影响细胞数目的统计学显著的和可定量的变化。这可能是在一段时间内或靶区域内受影响的靶细胞数目的减少。还可以监测原发肿瘤进展的速度、大小、扩散或生长。

上述任何治疗方法可用在需要这些治疗的任何个体中，例如包括诸如犬、猫、牛、马、兔、猴，且最优选人的哺乳动物。

在其它方面，本发明涉及鉴定用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导表达 CCR7 受体的肿瘤细胞凋亡的化合物的方法，其包括

a) 将表达 CCR7 受体的细胞与偶联至抗 CCR7 抗体或其片段的候选化合物接触，以及

b) 确定所述候选化合物是否杀伤表达 CCR7 受体的所述细胞，

其中杀伤表达 CCR7 受体的所述细胞的化合物是潜在可用于杀伤表达 CCR7 受体的肿瘤细胞或诱导肿瘤细胞凋亡的化合物。

事实上，任何表达 CCR7 受体的细胞，肿瘤细胞或非肿瘤细胞，均能够用于进行上述方法。在特定实施方案中，所述表达 CCR7 受体

的细胞是 CLL 或 MCL 细胞。

能够通过任何常规方法测定表达 CCR7 受体的细胞的死亡，例如根据此说明书中实施例所公开的方法。

以下实施例用来说明本发明。

实施例

针对 CCR7 的抗体作为治疗 CLL 的工具

I. 材料和方法

样品、试剂和流式细胞术(FCM)

在告知同意后获得来自 CLL (慢性淋巴细胞白血病)和 MCL (套细胞淋巴瘤)患者和健康供者的外周血样品。通过标准四色 FCM 进行全血细胞的最初免疫表型表征,该标准四色 FCM 使用针对下列人表面抗原的单克隆抗体(mAbs): CD45、CD19、 κ 轻链、 λ 轻链、CD20、CD23、CD5 和 CD3 (全部购自 BD Biosciences, San Jose, CA)。弃去单核亚群中 CLL 或 MCL 细胞少于 60%的样本。随后在电子设门的肿瘤 B 细胞或正常 T 和 B 淋巴细胞中进行 CCR7 表达分析。

藻红蛋白(PE)-偶联的小鼠抗人 CCR7 购自 R&D Systems (McKinley Place, MN)。在所有情况中均包括适当的同种型对照。在 FACScalibur 流式细胞仪上使用 CellQuest 软件(BD Biosciences)分析免疫荧光染色。

通过聚蔗糖(Ficoll)密度梯度离心(Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain)分离外周血单个核细胞(PBMC)。

纯化的鼠抗人 CCR7 mAbs (此后称为“抗 CCR7 mAbs”)是从 BD Biosciences (150503 克隆, IgG2a 同种型)和 R&D Systems (2H4 克隆, IgM 同种型)获得。在细胞周期分析和细胞存活力测定中使用的 DNA 染料 7-氨基放线菌素 D (7-AAD)得自 BD Biosciences。重组人趋化因子 CCL19 和 CXCL12 购自 R&D Systems。

受体胞吞测定

为了研究抗 CCR7 mAbs 的结合是否造成趋化因子受体(CCR7)的内化,用 2 $\mu\text{g/mL}$ 的抗 CCR7 mAbs 在 37°C、5% CO_2 空气下孵育 5×10^5 CLL 细胞不同时间(从 30 秒至 1 小时)。CCR7 的生理配体之一且造成其内吞的 CCL19 被用作阳性对照。在使用酸洗(0.1 M 甘氨酸、0.15 M NaCl、pH=2.5)清除结合的 mAb 或 CCL19 之后,如上所述通过 FCM 分析测定 CLL 细胞上的 CCR7 表达。

补体依赖的细胞毒(CDC)

将含有 10^5 细胞的 50 μL PBMC 悬浮物和 0.5 mg/mL 至 16 mg/mL 的所需浓度的纯化抗 CCR7 mAbs 或同种型对照(IC)接种在 96 圆底孔板中。在 37°C 孵育 30 分钟后,离心并洗涤细胞。然后,加入在 RPMI 1640 培养基中稀释到 25%的幼兔补体(Serotec, Oxford, UK)。37°C 下 1-2 小时后,用异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的抗 CD 19、别藻蓝蛋白(APC)偶联的抗 CD5 mAb 和 7- AAD 对细胞进行染色。两种表面标志物均允许 FCM 分辨 CLL 细胞、MCL 细胞和 T 细胞群,且 7-AAD 用作存活力排除染料。在每一群中分别测量非存活细胞的百分比,且使用热灭活补体的溶解百分比根据公式[1]计算特异溶解

$$\text{特异溶解}(\%) = 100 \times \frac{(A - B)}{(100 - B)} \quad [1]$$

其中	A: 使用补体的死亡细胞%
	B: 使用灭活补体的死亡细胞%

抗体依赖的、细胞介导的细胞毒(ADCC)

自然杀伤(NK)细胞分离自从血沉棕黄层(buffy coats)获得的 PBMC。对 NK 细胞的阳性选择通过 PE 偶联的抗 CD56 mAb 染色和随后的使用抗 PE 耦合的微珠 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany)的磁性细胞分选进行。通过 FCM 测量的 NK 细胞的纯度为 95%至 98%。在使用 NK 细胞(作为细胞溶解的效应物)、在 5 至 40 之间的不同效-靶(E/T)比下、在存在或不存在抗 CCR7 mAb 或其同种型

对照下孵育 CLL 细胞(靶细胞) 4 小时后, 用 FCM 测量抗 CCR7 依赖的、细胞介导的细胞毒。然后, 用 FITC 偶联抗 CD19 mAb、PE 偶联抗 CD56 mAb 和 7-AAD 对细胞进行染色以分辨 CLL 细胞和效应 NK 细胞, 并分析 CLL 细胞的存活力。孵育中未使用 NK 细胞的 CLL 细胞用作自发死亡的对照, 并且如 CDC 测定计算特异溶解。

趋化作用测定

之前使用 2 $\mu\text{g/mL}$ 抗 CCR7 mAbs 孵育 30 分钟的 CLL 和 MCL 细胞响应 CCL19、CCL21 和 CXCR4 的配体 CXCL12 的趋化作用在 Transwell(跨井)细胞培养室(直径 6.5 mm、厚度 10 μm 、孔直径 5 μm , Costar, Cambridge, MA) 中测定。对于趋化作用测定, 将 5×10^5 肿瘤细胞悬浮在 100 μl 的含 0.5% BSA 的 RPMI 1640 中, 被加入到培养室的上部隔室中且趋化因子以最适浓度(对于 CXCL12 为 100 ng/mL 且对于 CCL 19 和 CCL21 为 1 $\mu\text{g/mL}$)被加入到下部小室中的 600 μl 相同培养基中。允许迁移在 37°C、5% CO_2 空气下进行 4 小时。从下部隔室中回收迁移的细胞, 用 FITC 偶联的抗 CD19 mAb 染色, 并且在用 Trucount 管(BD Biosciences)校准流速后用 FCM 计数 60 秒。在设门的 B 细胞群中分析事件并与细胞的初始悬浮物中的细胞数目进行比较, 以计算输入的百分比($100 \times \text{迁移细胞的数目} / \text{在初始悬浮物中计数的细胞数目}$)。每一样品重复测量两次。

凋亡和细胞周期分析

在某些实验中, 将抗 CCR7 mAbs 以 2 $\mu\text{g/mL}$ 稀释在 50 μL 含有 10^5 CLL 细胞的培养悬浮物中。在其它实验中, 通过在 RPMI 1640 中孵育过夜使抗 CCR7 mAbs 附着到 96 平底孔板中。然后, 洗涤该板并加入 10^5 CLL 细胞。在两种情况下, 细胞均在 37°C 下孵育最长 48 小时。细胞用冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤, 用 FITC 偶联的抗 CD 19 mAb 染色, 重悬在 0.5 mL PBS 中并稀释在 5 mL 冰冷的 70%乙醇中用于在 -20°C 下固定过夜。第二天, 离心固定的细胞, 洗涤并用 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 7-AAD 染色用于 DNA 含量分析。获得最少 10,000 个总事件并用

Cell-Quest Pro 软件(BD Biosciences)分析。简而言之,使用 7-AAD 荧光的脉冲区域和脉冲宽度对 CD 19 阳性事件设门并弃去双重谱线。在 7-AAD 荧光柱状图中分析作为凋亡细胞的亚 G₁ 峰的百分比。

增殖测定

从健康供者分离 PBMC 并在事先用抗 CCR7 mAbs 及其相应的同种型对照包被的 96 孔板中培养 72 小时。还包括例如抗 CD3 加 IL2 的阳性对照。所有的测量均重复三次。在培养的最后 16 小时中用每孔 1 μ Ci 的 [³H]-胸苷(Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Germany)标记细胞。然后收集细胞并进行闪烁计数。

统计分析

所有的统计检验均在 SPSS version 8.0 进行。Wilcoxon 和 Kendall's W 非参数检验用于比较大多数测定中不同处理的结果。对于 [³H]-胸苷增殖测定,进行 ANOVA 用于组间比较。计算 Pearson 相关系数以研究 CCR7 平均荧光强度(MFI)和 CDC 中溶解百分比之间的关系。

II. 结果

抗 CCR7 mAbs 不诱导其标靶的内化

使用非偶联形式的治疗性 mAbs 不仅需要高密度的靶抗原,还需要在细胞表面存在抗原-抗体复合物以活化补体或结合细胞毒细胞的 Fc 受体,即 mAb 与抗原的结合不诱导其内化是重要的,因为这可能降低 mAb 的治疗效果。就此方面,已经暗示了抗体与某些趋化因子受体的结合能够导致受体的胞吞及随后在抗体降解后受体的蛋白水解或再表达。发明人分析了 mAbs 与 CCR7 的结合是否产生其在 CLL 细胞的内吞。CLL 细胞表面的 CCR7 表达在 CLL 细胞中比在正常 B 细胞或 T 细胞中高 2-4 倍(图 1A)且在与抗 CCR7 mAbs 一起孵育长至 60 分钟的不同时间不下降(图 1B)。相反,其在与 1 μ g/mL 作为阳性对照的 CCL19 一起孵育,前 5 分钟下降了约 60%。

在体外抗 CCR7 mAbs 介导 CLL 和 MCL 细胞的强烈和特异的 CDC

由补体蛋白(CDC)或例如 NK 细胞的效应细胞(ADCC)的募集介导的细胞毒是所提出的通过非偶联治疗性 mAbs 体内清除肿瘤细胞的主要机制。因此,用来自不同患者的 CLL 和 MCL 样本测试了抗 CCR7 mAbs 介导 CDC 的效能。非常高比例的用抗 CCR7 IgM mAb 预孵育的 CLL 细胞在用兔补体处理 1 小时后被杀伤(图 2A)。类似地, IgG 同种型的抗 CCR7 mAb 也介导显著的 CDC (图 2B)。

与 CLL 相似, MCL 细胞也表达显著水平的 CCR7 (图 3A), 并且 CDC 实验显示两种抗 CCR7 mAbs 均有效地杀伤 CCR7 阳性 MCL 细胞(图 3B)。当使用同样同种型的无关免疫球蛋白时没有观察到显著的 CDC (图 2A、图 2B 和图 3B)。

尽管 IgG 同种型的抗 CCR7 mAb 造成 CDC 的效能相对较低, 但动力学测定证明其补体活化能力能够通过延长与补体源孵育的时间而显著提高(数据未显示)。这可能是由于 IgG2a 同种型的 mAb 对补体级联的活化较慢。

CCR7 并不限于 CLL 或 MCL 细胞, 还表达在某些正常淋巴亚群, 主要是幼稚 B 细胞和幼稚 T 细胞中, 其可能对由抗 CCR7 mAbs 介导的细胞毒易感。有趣的是, 由抗 CCR7 mAbs 介导的 CDC 在 CLL 细胞中比在来自同一患者的 T 细胞中显著增高(对于 IgM mAbs, $P=0.001$, 对于 IgG mAbs, $P=0.016$)。类似地, 当用与上述相同的实验条件处理时, 甚至在用更高剂量的两种抗 CCR7 mAbs 处理时, 来自健康供者的 B 细胞和 T 细胞对补体活性耐受, 如剂量-效应测定所证明(图 4A 和 4B)。对于来自 CLL 患者的几乎不遭受溶解的 T 细胞更是如此(图 4A 和 4B), 可能由于在这些样品中存在的 CLL 细胞对补体的高和快的消耗。另一方面, 浓度低至 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的两种抗 CCR7 mAbs 均足以介导 CLL 细胞的 CDC (图 4A 和 4B)。

一种可能的解释是存在对 CDC 活性的不同敏感性, 由于 CCR7 在正常 T 和 B 细胞中的表达比在 CLL 细胞中要低得多(图 1A)。事实上, CCR7 在 CLL 细胞中的表达水平与不同样品对 CDC 的敏感性(图

5)显著($r = 0.602$, $P=0.025$, $n=11$)相关,证实了抗原密度在选择免疫治疗的靶标中的重要性。

此外,看起来 CDC 活性的差异不与例如 CD55 或 CD59 的补体调节蛋白的差异表达有关,因为它们的表达水平在不同的 CLL 样本之间以及在来自这些患者的 CLL 细胞和 T 细胞之间非常相似(数据未显示)。

CLL 细胞的体外 ADCC

介导治疗性 mAbs 的有益作用的其它主要机制是由细胞介导的细胞毒(ADCC)。因此,发明人测试了 NK 细胞造成用抗 CCR7 IgG mAb 预先处理的 CLL 细胞溶解的能力。在用 5 至 40 的 E/T 比进行的 6 个实验中,当与相同同种型的无关免疫球蛋白相比(平均溶解 = $12\% \pm 5$, $n=6$),在此抗 CCR7 mAb 的存在下(平均溶解 = $13\% \pm 1$, $n=6$)未观察到显著的 ADCC (图 6)。这可能与鼠 Fc 受体对鼠 mAbs 的低亲和性有关。相反,利妥昔单抗,一种公知的嵌合抗 CD20 mAb, IgG1 同种型,介导针对 CLL 细胞的 ADCC,其平均溶解 = $34\% \pm 2$ ($n=6$) (图 6)。未测试抗 CCR7 IgM mAb 存在下的 ADCC,因为此同种型不有效介导这种类型的细胞毒。

响应抗 CCR7 mAbs 的凋亡和增殖

不断增加的证据表明治疗性 mAbs 的很大部分的有益反应是由于对细胞周期或靶细胞存活的作用。通过细胞 DNA 的 7-AAD 染色和亚 G_1 峰分析来研究抗 CCR7 mAbs 对 CLL 细胞的凋亡的作用。用可溶抗 CCR7 IgM mAb 处理 24 小时的 CLL 细胞的凋亡速率与用 IC 处理的 CLL 细胞的凋亡没有显著不同(数据未显示)。类似地,通过施加抗 CCR7 mAbs 的结合至 48 小时所产生的 CCR7 的交联未诱导凋亡(数据未显示)。

为了研究细胞响应抗 CCR7 mAbs 的增殖,用来自健康供者的 PBMC 进行了的经典 $[^3H]$ -胸苷摄取增殖测定,因为 CLL 细胞在孵育 48-72 小时后具有高自发凋亡速率。这些测定揭示了在用 IgM 同种型

的抗 CCR7 mAb 孵育后, [³H]-胸苷向细胞中的掺入中度增加, 这与用 IgM IC 得到的结果无显著不同。相反, IgG 同种型的抗 CCR7 mAb 或其 IC 均不诱导增殖(图 7)。作为阳性对照, PBMC 响应使用抗 CD3 mAb 加 IL2 的孵育增殖。

抗 CCR7 mAbs 抑制 CLL 和 MCL 细胞的体外迁移

CCR7 不仅在幼稚淋巴细胞和成熟树突状细胞的生理归巢中起主要作用, 还在表达其的肿瘤(癌)细胞特别是 CLL 和 MCL 细胞的转移性迁移中起主要作用。为了阻断这些疾病向淋巴组织扩散, 中和此趋化因子受体的功能可能是 CLL 和 MCL 患者中感兴趣的。就此方面, 发明人分析了抗 CCR7 mAbs 中和 CLL 和 MCL 细胞响应 CCL19 或 CCL21 的体外迁移。IgG 同种型的抗 CCR7 mAb 非常有效地阻断这些细胞向 CCL19 或 CCL21 的迁移, 而 IgM 同种型的抗 CCR7 mAb 略微减少迁移(图 8A-B)。

在这些测定中, CLL 细胞响应 CXCL12 (趋化因子受体 CXCR4 的配体)的迁移不受到所使用的两种 mAbs 的影响。

III. 讨论

来自发明人的前述数据显示 B 细胞淋巴组织增生性病症中的趋化因子受体 CCR7、CXCR4 和 CXCR5 的表达水平根据组织学亚型是非常异质的, 并且与淋巴结(LN)参与显著相关, 因为这些分子介导淋巴细胞向次级淋巴组织的进入和定位。CCR7 的表达在 CLL 和套细胞淋巴瘤中特别高, 解释了这些疾病入侵 LNs 的高倾向。类似地, 近期的研究报道了 CCR7 在来自其它血液肿瘤或非血液实体瘤的恶性细胞上的表达, 该血液肿瘤例如霍奇金病、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤和蕈样肉芽肿病, 该非血液实体瘤例如乳腺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、胃癌或头颈的鳞状细胞癌或结肠癌。有趣的是, 在所有情况下, 此表达与向淋巴组织的迁移和转移的特征性模式相关。

这些数据表明使用 CCR7 作为免疫治疗中的治疗靶标的可能性,

不仅因为其在某些恶性细胞中的高密度及其在正常组织中的有限表达，还因为其在疾病进展和致病性中的关键作用。

已经接受 CDC 为当靶抗原高度表达时非偶联治疗性 mAb 作用的主要机制，因为相信 CDC 比 ADCC 需要多约 10 倍的表面抗原密度。因此，发明人分析了抗 CCR7 mAbs 固定补体和介导抗来自 CLL 患者的 CLL 细胞、MCL 细胞和正常 T 细胞的细胞毒的能力。他们的结果显示 CLL 和 MCL 细胞的重要溶解是由于补体固定造成的，而几乎无 T 细胞破坏，甚至在饱和浓度的抗 CCR7 mAbs 和补体的条件下。这可能是由于与 CLL 细胞相比，CCR7 在 T 细胞上的表达较低。就此方面，发明人发现了在相同实验条件下，CLL 细胞表面的 CCR7 密度和溶解细胞的百分比紧密相关($p=0.025$, $r=0.602$)。重要的是，这些结果表明用抗 CCR7 mAbs 治疗 CLL 或 MCL，甚至在低浓度下，可能导致有效清除肿瘤细胞而不溶解表达该分子(CCR7)的正常淋巴细胞。有可能假设由于抗 CCR7 mAbs 治疗的次级免疫缺陷不会非常重要，因为 CCR7 阴性效应淋巴细胞保持不被扰乱。对作为从 CCR7 缺陷小鼠到用抗 CCR7 mAbs 治疗的 CLL 或 MCL 患者的特征的免疫缺陷的推断在某种方式上是困难的，因为这些个体已经发展出了在 CCR7 敲除中缺乏的免疫记忆。

与关于 CDC 的发现不同，IgG 同种型的抗 CCR7 mAb 不是 ADCC 的活化物，可能由于其鼠来源。尽管如此，公知分子工程技术使得开发嵌合或人源化抗体以提高临床特点是可能的，该临床特点例如 mAb 介导通过单核细胞、中性粒细胞和 NK 细胞的 Fc 受体的细胞毒的能力。在任何情况下，目前都在讨论 ADCC 在 CLL 的免疫治疗中的重要性，由于这些患者中恶性细胞的强烈扩增和 T 细胞和 NK 细胞的功能缺陷。就此方面，最近发表了若干方法以扩增和活化来自健康供者或 CLL 患者的细胞毒淋巴细胞和 NK 细胞以利用该治疗性 mAbs 的作用机制。

阻断靶抗原的功能组成了治疗性 mAbs 的另一作用机制。在本发明中，阻断性抗 CCR7 mAbs 可能具有另外的优势：抑制涉及淋巴瘤和表达其的其它非血液肿瘤的可能的主要分子的功能。就此方面，公知利妥昔单抗(rituximab)或阿来组单抗(alemtuzumab)均不能非常有

效地在 CLL 患者中减少淋巴结病。

这些结果为阻断性抗 CCR7 mAbs 可以减弱向 LN 迁移并因此除通过 CDC 或 ADCC 杀伤细胞外还阻断肿瘤扩散的那些病理学开辟了新的治疗机会。

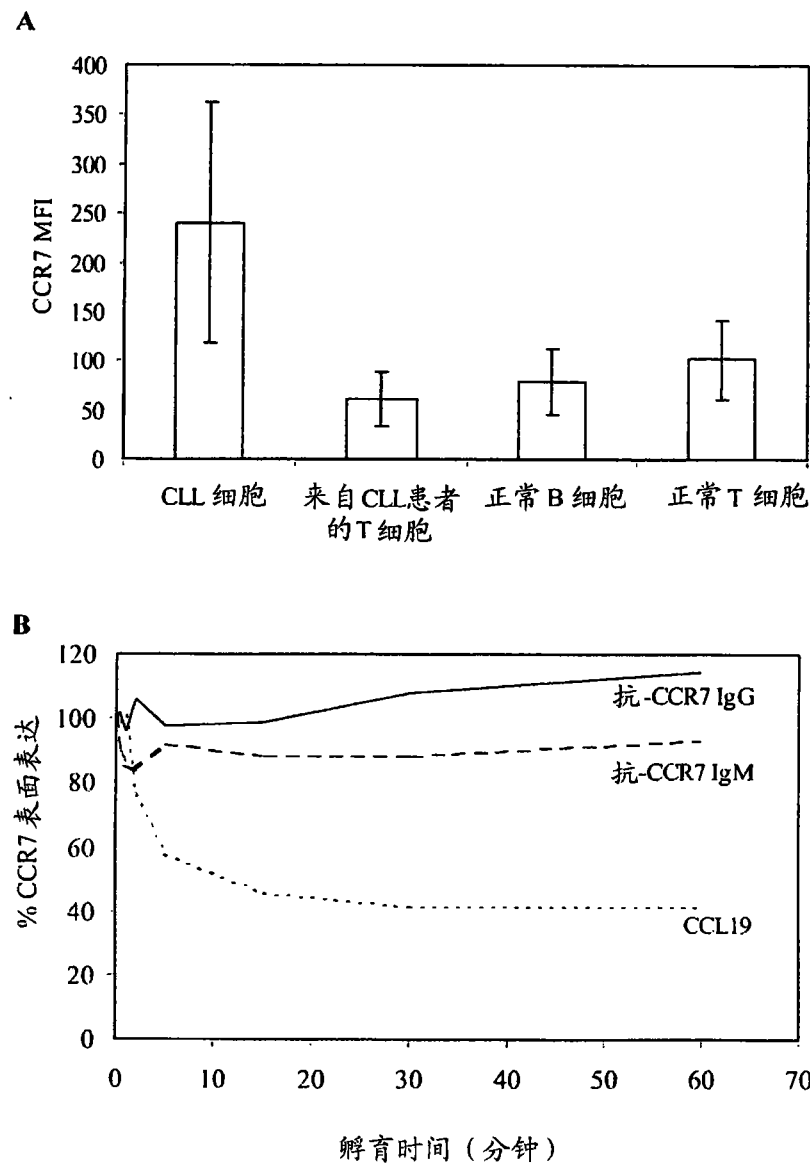


图 1

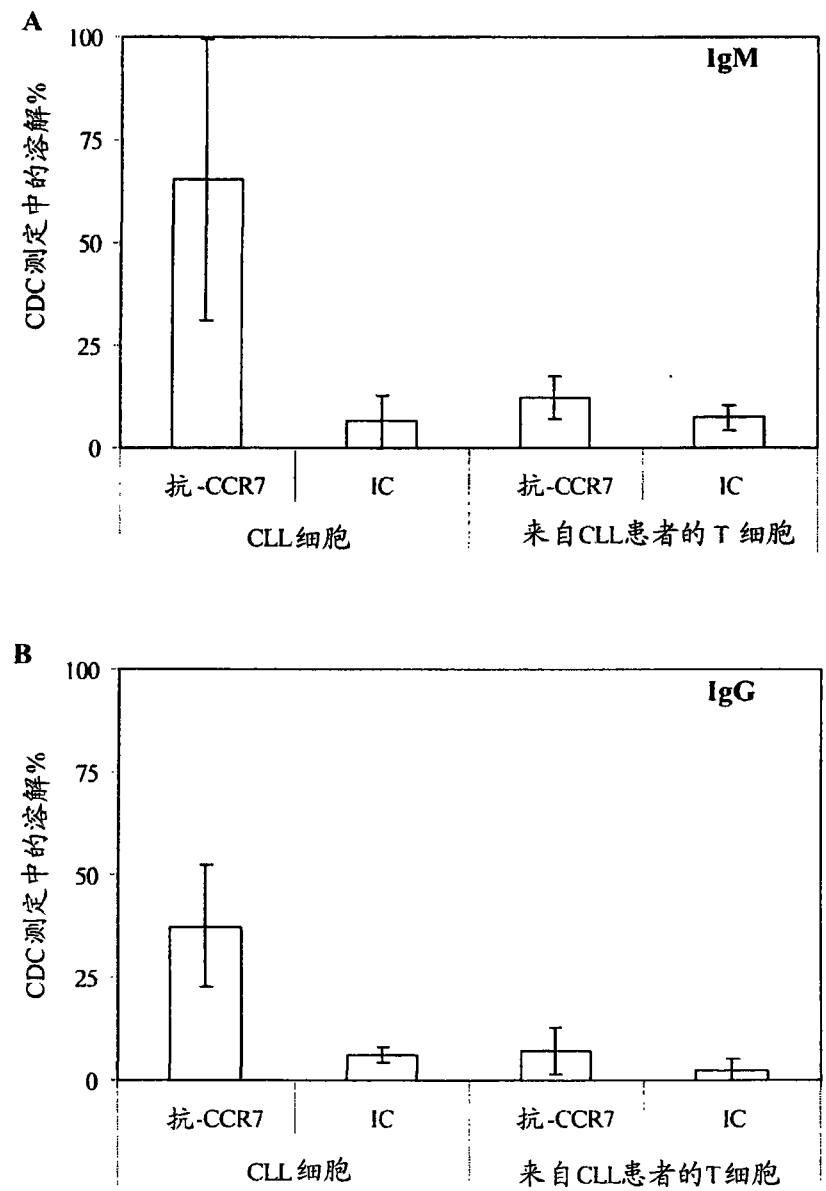


图 2

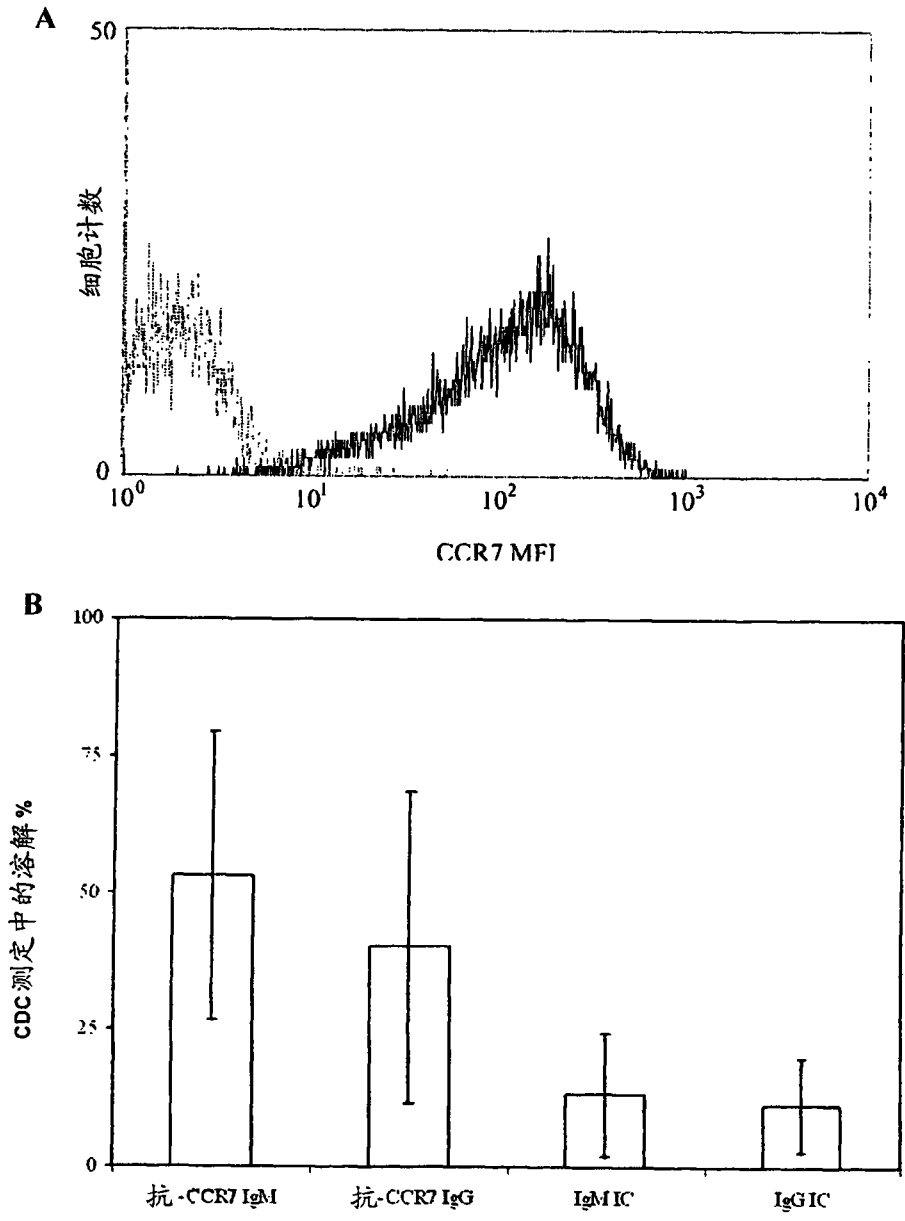


图 3

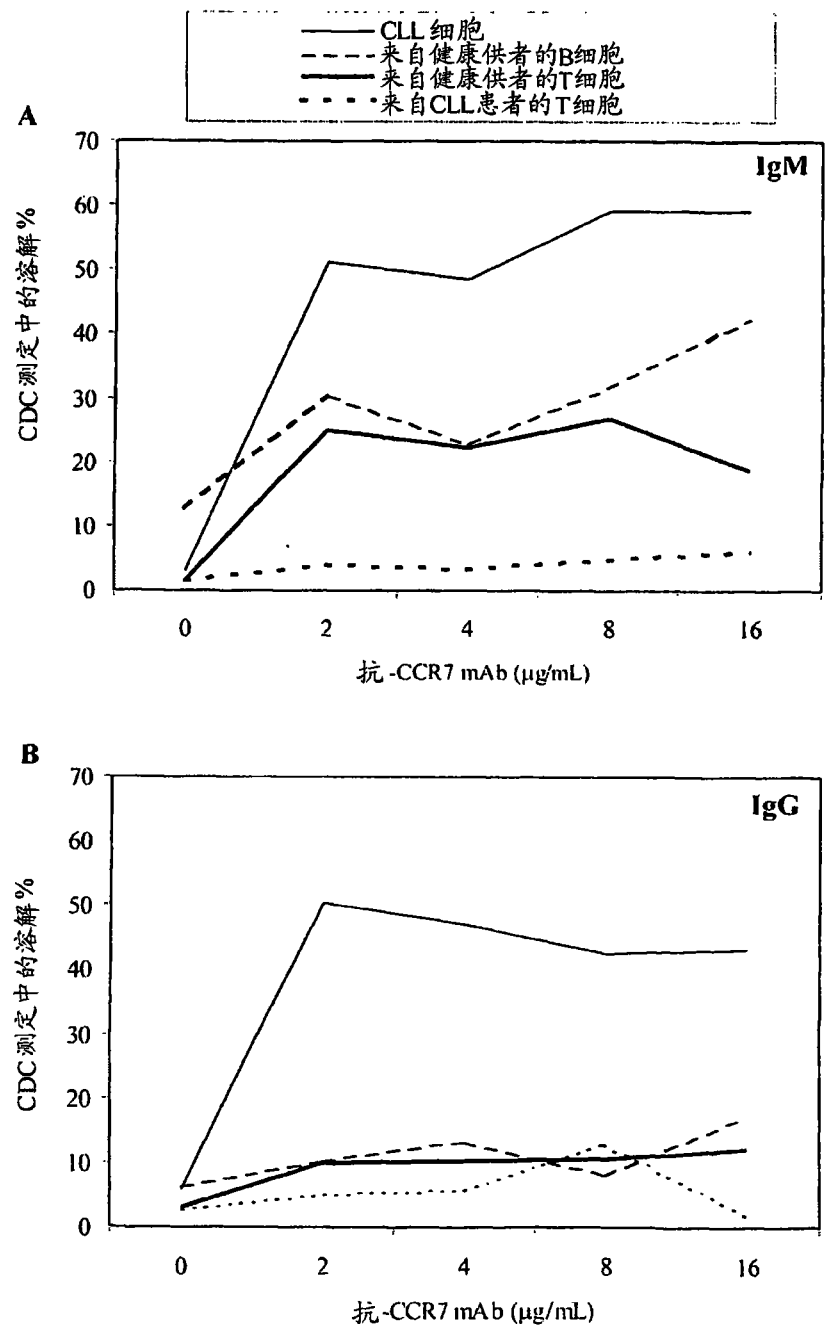


图 4

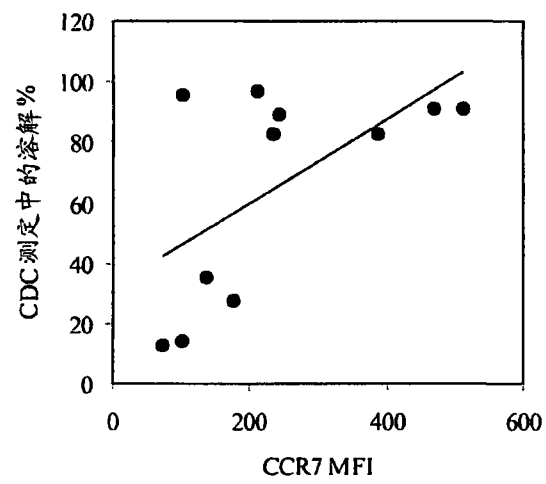


图 5

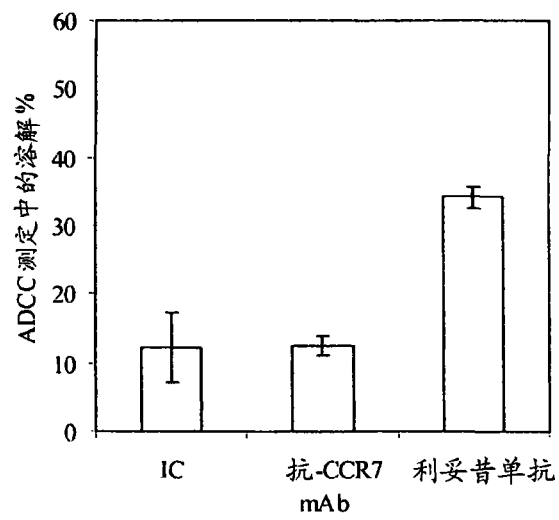


图 6

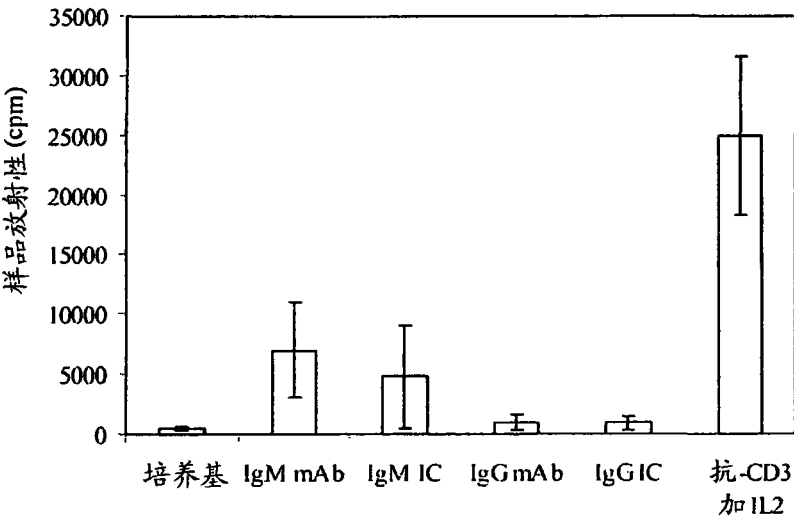


图 7

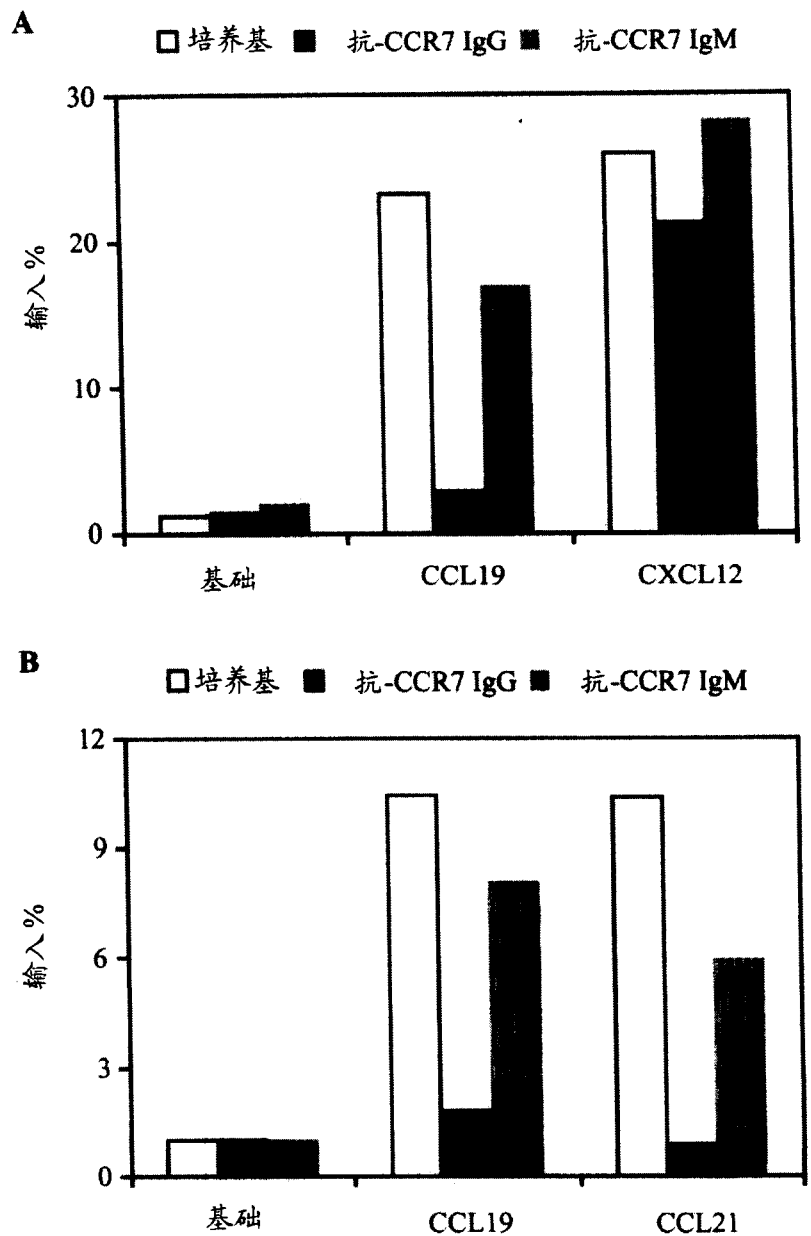


图 8