



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103459420 B

(45)授权公告日 2016.09.28

(21)申请号 201180056980.1

E.帕察乌迪

(22)申请日 2011.09.27

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103459420 A

代理人 刘健 李进

(43)申请公布日 2013.12.18

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

(30)优先权数据

61/386764 2010.09.27 US

(56)对比文件

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.05.27

Stellas.Monoclonal antibody 4C5 prevents activation ofMMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular HSP90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits.《BMC Cell Biology》.2010,第11卷(第51期),摘要.

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2011/066791 2011.09.27

审查员 刘婷

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/041863 EN 2012.04.05

(73)专利权人 泽斯塔根股份有限公司
地址 瑞士埃斯帕利内斯

权利要求书2页 说明书27页
序列表7页 附图6页

(72)发明人 K.赛德拉 A.马马拉基

(54)发明名称

用于治疗肿瘤的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了治疗方法,其特征在于嵌合的人/小鼠抗体用于治疗肿瘤的用途。

1. 分离的嵌合抗体, 包含SEQ ID NO:4的序列, 其中所述嵌合抗体具有鼠 κ L链且缺乏重链, 其中所述鼠免疫球蛋白 κ 轻链恒定结构域(C κ)被对应的人C κ 结构域或其片段所替代, 且其中所述抗体特异性结合HSP90且能够降低肿瘤细胞的生长和/或侵袭性。

2. 分离的嵌合抗体, 包含与SEQ ID NO:4具有至少90%或95%同一性的氨基酸序列, 其中所述嵌合抗体具有鼠 κ L链, 其中所述鼠免疫球蛋白 κ 轻链恒定结构域(C κ)被对应的人C κ 结构域或其片段所替代, 其中所述抗体特异性结合HSP90且能够降低肿瘤细胞的生长和/或侵袭性, 且其中所述抗体包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、和SEQ ID NO:7的互补决定区。

3. 权利要求2的分离的嵌合抗体, 其中所述氨基酸序列与SEQ ID NO:4的序列具有至少95%同一性。

4. 权利要求1-3中任一项的嵌合抗体, 其中所述抗体是人源化抗体, 或者是从原核或真核细胞的培养物分离的。

5. 权利要求1-4中任一项的嵌合抗体, 其中所述抗体是二聚体或多聚体或其人可结晶片段(Fc)融合体。

6. 权利要求1-5中任一项的嵌合抗体, 其中相对于常规鼠抗体, 所述嵌合抗体具有降低的在人受试者中诱导免疫应答的能力。

7. 权利要求1-6中任一项的嵌合抗体, 其中分别使用癌细胞集落形成测定和伤口愈合测定, 通过检测肌动蛋白重排, 通过检测片状伪足发展, 或通过检测侵袭性的另一种形态标记而测定所述抗体或其片段降低生长和侵袭性的能力。

8. 分离的多肽, 包含SEQ ID NO:4的序列。

9. 分离的多核苷酸, 编码权利要求1-7中任一项的嵌合抗体。

10. 分离的多核苷酸, 编码权利要求8的分离的多肽。

11. 表达载体, 包含定位用于在细胞中表达的权利要求9或10的多核苷酸。

12. 细胞, 包含权利要求11的表达载体。

13. 权利要求12的细胞, 其中所述细胞是原核或真核细胞。

14. 用于产生权利要求1-7中任一项的嵌合抗体的方法, 所述方法包括在适于表达所述嵌合抗体的条件下培养权利要求12的细胞, 和从所述培养的细胞中分离所述嵌合抗体。

15. 权利要求1-7中任一项的嵌合抗体在制备药物中的用途, 所述药物用于降低肿瘤细胞的生长和/或侵袭性。

16. 权利要求1-7中任一项的嵌合抗体在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗具有肿瘤的受试者。

17. 权利要求1-7中任一项的嵌合抗体在制备药物中的用途, 所述药物用于在具有肿瘤的受试者中治疗或预防肿瘤进展或转移。

18. 权利要求16或17的用途, 其中所述肿瘤是癌细胞或存在于肿瘤中。

19. 权利要求18的用途, 其中所述癌症选自乳腺癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、结肠癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤和其他过表达HSP90的癌。

20. 权利要求16-18中任一项的用途, 其中所述嵌合抗体全身或局部施用于所述受试者。

21. 权利要求20的用途, 其中所述嵌合抗体与功能部分共价连接。

22. 权利要求21的用途, 其中所述功能部分是放射性的。

23. 权利要求21的用途,其中所述功能部分是化疗剂。

24. 权利要求16-18中任一项的用途,进一步包括将治疗有效量的一种或多种化疗剂施用于受试者。

25. 权利要求24的用途,其中所述一种或多种化疗剂选自乙酸阿比特龙、六甲蜜胺、脱水长春碱、奥里斯汀、贝沙罗汀、比卡鲁胺、BMS 184476、2,3,4,5,6-五氟-N-(3-氟-4-甲氧基苯基)苯磺酰胺、博莱霉素、N,N-二甲基-L-缬氨酰-L-缬氨酰-N-甲基-L-缬氨酰-L-丙-1-基脯氨酸-叔丁酰胺、恶病质素、西马多丁、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、酒石酸长春瑞滨、多烯紫杉醇、多西他赛、环磷酰胺、卡铂、卡莫司汀(BCNU)、顺铂、念珠藻素、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯唑胺(DTIC)、更生霉素、柔红霉素、地西他滨、多拉司他汀、多柔比星(阿霉素)、依托泊苷、5-氟尿嘧啶、非那雄胺、氟他胺、羟基脲和羟基脲紫杉醇、异环磷酰胺、利阿唑、氯尼达明、洛莫司汀(CCNU)、MDV3100、二氯甲基二乙胺(氮芥)、美法仑、羟乙基磺酸米伏布尔、根瘤菌素、sertenef、链脲霉素、丝裂霉素、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、尼鲁米特、奥那司酮、紫杉醇、泼尼氮芥、甲基苄肼、RPR109881、磷酸雌氮芥、他莫昔芬、他索纳明、紫杉醇、维甲酸、长春花碱、长春新碱、硫酸长春地辛、和长春氟宁。

26. 权利要求25的分离的人源化嵌合抗体,其中所述化疗剂是紫杉醇。

27. 权利要求15-18中任一项的用途,其中相对于常规鼠抗体,所述嵌合抗体具有降低的在人受试者中诱导免疫应答的能力。

28. 用于治疗肿瘤的药物组合物,包含治疗有效量的权利要求1-7中任一项的嵌合抗体和药学可接受的载体。

29. 用于治疗肿瘤的药物组合物,包含治疗有效量的权利要求8的分离的多肽和药学可接受的载体。

30. 用于治疗肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包含治疗有效量的权利要求1-7中任一项的嵌合抗体和使用所述试剂盒的说明书。

用于治疗肿瘤的组合物和方法

[0001] 交叉引用相关申请

[0002] 本申请要求2010年9月27日提交的美国临时专利申请号61/386,764的利益,该申请的完整内容通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 单克隆抗体(mAb)4C5是鼠抗体,其特异性识别热休克蛋白90(HSP90)的 α 同种型,并且在较小程度上特异性识别 β 同种型。最近,HSP90已经变为用于癌症治疗的非常有吸引力的药物靶点,因为其大部分客户蛋白(client proteins)被认为是获得恶性表型中的关键分子。此外,新出现的数据表明在癌细胞表面存在这种分子伴侣,提示在癌细胞的侵袭和转移中牵涉范围广泛的细胞外陪伴(extracellular chaperoning)现象。

[0005] 最初显示mAb 4C5通过影响肌动蛋白细胞骨架重排和形成迁移结构如片状伪足而在神经系统的发育过程中体外抑制细胞迁移过程。mAb 4C5选择性结合HSP90的表面池,并且显著降低黑色素瘤细胞侵袭和转移。此外,显示mAb 4C5在MDAMB453乳腺癌细胞中抑制HSP90和生长因子受体HER-2之间的细胞外相互作用,导致下游信号传递受损和癌细胞迁移和侵袭降低。最后,显示mAb 4C5抑制分泌的HSP90和MMP2酶原和MMP9酶原之间的功能相互作用,所述功能相互作用对于这些酶的活化是必需的,而这些酶的活化对于ECM降解和癌细胞侵袭和外渗是必要的。

[0006] 这些组合的数据提示,mAb 4C5 特异性抑制HSP90的细胞外池而不影响该分子伴侣的范围广泛的重要的细胞内作用的能力可以在人恶性肿瘤的治疗中具有临床益处。然而,鼠mAb不构成理想治疗剂。鼠mAb 在人临床试验中使用的一个显而易见的问题是产生人抗小鼠抗体应答的可能性。在人治疗剂中使用鼠来源的mAb的最初尝试受到阻碍,因为鼠抗体由人抗鼠抗体免疫应答(HAMA)所识别,并且患者的免疫系统缩短了治疗窗口。重组DNA技术的出现已经克服了这些障碍,这已经导致了嵌合抗体或人源化抗体的开发。

[0007] 发明概述

[0008] 如下所述,本发明提供了用于治疗肿瘤的治疗组合物和方法。在特定实施方案中,本发明提供了用于在肿瘤治疗中使用的嵌合的人/小鼠抗体。因为这样的抗体主要是人组成,所以相对于常规鼠抗体,它们具有降低的在人受试者中诱导免疫应答的能力。

[0009] 在一个方面,本发明提供了分离的嵌合抗体,其包含鼠 κ L链且缺乏重链,其中鼠免疫球蛋白 κ 轻链恒定区(C κ)被对应的人C κ 结构域或其片段所替代,其中所述抗体特异性结合HSP90且能够降低肿瘤细胞的生长和/或侵袭性。在一个实施方案中,鼠 κ L链与SEQ ID NO:2具有至少75%、85%、90%或95%同一性。在另一个实施方案中,鼠 κ L链含有SEQ ID NO:2。在另一个实施方案中,鼠 κ L链含有一个或多个鼠互补性决定区。在另一个实施方案中,鼠互补性决定区与SEQ ID NO:5、6、或7具有至少75%同一性。在另一个实施方案中,鼠轻链含有是SEQ ID NO:5、6、和/或7的一个或多个互补性决定区(CDR)。在另一个实施方案中,鼠轻链含有互补性决定区(CDR) SEQ ID NO:5、6、和7。在另一个实施方案中,抗体与SEQ ID NO:4具有至少75%、85%、95%或更高的氨基酸序列同一性。

[0010] 在另一个方面,本发明的特征在于含有SEQ ID NO:4或基本上由SEQ ID NO:4组成

的分离的嵌合抗体。在一个实施方案中,抗体是人源化抗体。在另一个实施方案中,抗体是从原核或真核细胞的培养物分离的。

[0011] 在上述方面的各个实施方案中,相对于常规鼠抗体,嵌合抗体具有降低的在人受试者中诱导免疫应答的能力。

[0012] 在上述方面的还有其他实施方案中,分别使用癌细胞集落形成测定(clonogenic assay)和伤口愈合测定(wound healing assay),通过检测肌动蛋白重排、通过检测片状伪足发生或通过检测侵袭的另一种形态标记而测定抗体或其片段降低生长和侵袭的能力。

[0013] 在另一个方面,本发明的特征在于含有SEQ ID NO:4的序列的分离的多肽。

[0014] 在另一个方面,本发明的特征在于编码任何前述方面的嵌合抗体的分离的多核苷酸。

[0015] 在另一个方面,本发明的特征在于编码前述方面的嵌合抗体或前述方面的分离的多肽的分离的多核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:3的序列。

[0016] 在另一个方面,本发明的特征在于含有被定位用于在细胞中表达的任何前述方面的多核苷酸的表达载体。

[0017] 在另一个方面,本发明的特征在于含有该表达载体的细胞(例如,原核或真核细胞)。

[0018] 在另一个方面,本发明的特征在于用于产生本发明的嵌合抗体的方法,该方法包括在适于表达嵌合抗体的条件下培养含有本发明的表达载体的细胞,和从培养的细胞中分离嵌合抗体。

[0019] 在另一个方面,本发明的特征在于降低肿瘤细胞的生长和/或侵袭的方法,该方法涉及将肿瘤细胞与任何前述方面的或本文以其他方式描述的嵌合抗体接触,从而降低肿瘤细胞的生长和/或侵袭。

[0020] 在另一个方面,本发明的特征在于治疗具有肿瘤的受试者的方法,该方法涉及将治疗有效量的任何前述方面的或本文以其他方式描述的嵌合抗体施用于受试者,从而治疗该受试者。

[0021] 在另一个方面,本发明的特征在于在具有肿瘤的受试者中治疗或预防肿瘤进展或转移的方法,该方法涉及将治疗有效量的任何前述方面的或本文以其他方式描述的嵌合抗体施用于受试者,从而在该受试者中治疗或预防肿瘤进展或转移。在一个实施方案中,肿瘤细胞是癌细胞或存在于肿瘤中。在另一个实施方案中,癌症是乳腺癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、结肠癌、非小细胞肺癌或淋巴瘤。在另一个实施方案中,嵌合抗体全身或局部施用。在另一个实施方案中,嵌合抗体与功能部分共价连接。在另一个实施方案中,功能部分是放射性的,或者是化疗剂。在另一个实施方案中,该方法进一步涉及将治疗有效量的一种或多种化疗剂施用于受试者。在上述方面的各种实施方案中,一种或多种化疗剂选自下列中的任何一种或多种:乙酸阿比特龙、六甲蜜胺、脱水长春碱、奥里斯汀(auristatin)、贝沙罗汀、比卡鲁胺、BMS 184476、2,3,4,5,6-五氟-N-(3-氟-4-甲氧基苯基)苯磺酰胺、博莱霉素、N,N-二甲基-L-缬氨酰-L-缬氨酰-N-甲基-L-缬氨酰-L-丙-1-基脯氨酸-叔丁酰胺、恶病质素、西马多丁、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、酒石酸长春瑞滨(3',4'-didehydro-4'-deoxy-8'-norvin-calceculin)、多烯紫杉醇(docetaxol)、多西他赛(doxetaxel)、环磷酰胺、卡铂、卡莫司汀(BCNU)、顺铂、念珠藻素、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯唑胺(DTIC)、更生霉素、柔

红霉素、地西他滨、多拉司他汀、多柔比星(阿霉素)、依托泊苷、5-氟尿嘧啶、非那雄胺、氟他胺、羟基脲和羟基脲紫杉醇、异环磷酰胺、利阿唑、氯尼达明、洛莫司汀(CCNU)、MDV 3100、二氯甲基二乙胺(氮芥)、美法仑、羟乙基磺酸米伏布尔(mivobulin isethionate)、根瘤菌素、sertenef、链脲霉素、丝裂霉素、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、尼鲁米特、奥那司酮、紫杉醇、泼尼氮芥、甲基苄肼、RPR109881、磷酸雌氮芥、他莫昔芬、他索纳明、紫杉醇、维甲酸、长春花碱、长春新碱、硫酸长春地辛、和长春氟宁。

[0022] 在上述方面的各个实施方案中,相对于常规鼠抗体,嵌合抗体具有降低的在人受试者中诱导免疫应答的能力。

[0023] 在另一个方面,本发明的特征在于用于治疗肿瘤的药物组合物,其包含治疗有效量的任何前述方面的或本文以其他方式描述的嵌合抗体。

[0024] 在另一个方面,本发明的特征在于用于治疗肿瘤的药物组合物,其包含治疗有效量的分离的多肽,所述分离的多肽包含SEQ ID NO:4。

[0025] 在另一个方面,本发明的特征在于用于治疗肿瘤的药物组合物,其包含治疗有效量的分离的多肽,所述分离的多肽包含选自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、和SEQ ID NO:7的一个或多个互补性决定区。

[0026] 在另一个方面,本发明的特征在于用于治疗肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包含治疗有效量的任何前述方面的或本文以其他方式描述的嵌合抗体或包含选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、和SEQ ID NO:7的序列的分离的多肽和用于在任何前述方面的方法中使用试剂盒的说明。

[0027] 附图概述

[0028] 图1A和1B显示,mAb 4C5是缺乏重链的 κ L链二聚体。图1A是在还原性和非还原性条件下运行且用对于小鼠 κ 链、小鼠Fab和Fc γ 特异性抗体探测的mAb 4C5的免疫印迹。从杂交瘤培养物分离的纯化的mAb 4C5进行在还原性和非还原性条件下的SDS-PAGE电泳和随后用抗小鼠 κ 链、抗小鼠Fab和抗Fc γ 抗体western印迹。在还原性电泳和随后用抗Fab抗体免疫印迹下,观察到单一的25 kDa免疫反应条带,其与用抗小鼠 κ 链抗体的western印迹所显示的对应于 κ L链的条带是相同的。在非还原性SDS-PAGE电泳和随后用抗 κ 和抗Fab抗体western印迹后,显示mAb 4C5以约50 kDa而非如常规IgG1分子以150 kDa迁移。在还原性和非还原性条件下电泳和随后用抗Fc γ 抗体western印迹后,没有检测到mAb 4C5免疫反应性。图1B是用重链探针杂交的4C5杂交瘤细胞RNA的Northern印迹。4C5杂交瘤衍生的RNA用重链放射标记的探针Northern印迹分析后没有检测到放射活性。2D10-和NS0-衍生的RNA分别充当阳性和阴性对照。

[0029] 图2显示mAb 4C5的核苷酸和推导的氨基酸序列。互补性决定区(CDR)加下划线。

[0030] 图3A和3B显示,小鼠-人嵌合4C5和重组小鼠4C5都表现出与亲本mAb 4C5类似的电泳迁移性。图3A是纯化的抗体在还原性条件下的Coomassie染色的SDS-PAGE。纯化的抗体在还原性条件下SDS-PAGE电泳和随后的Coomassie亮蓝-R染色显示在所有情况下对应于L链的约25 kDa条带。图3B是纯化的抗体在非还原性条件下的Coomassie染色的SDS-PAGE。在非还原性条件下,显示抗体作为L链二聚体迁移。rec 4C5:重组4C5,ch 4C5:嵌合4C5。

[0031] 图4A、4B和4C显示,重组和嵌合4C5特异性识别HSP90。图4A是MDAMB453裂解物用商业上获得的多克隆抗HSP90 α 抗体、mAb 4C5、重组和嵌合4C5探测的western印迹。在所有情

况下,观察到对应于HSP90的单一90 kDa免疫反应条带。图4B是MDAMB453裂解物的抗HSP90免疫沉淀物用mAb 4C5、重组4C5、和嵌合4C5探测的免疫印迹。MDAMB453细胞裂解物用抗HSP90免疫沉淀且用mAb 4C5、重组4C5、和嵌合4C5免疫印迹。在所有情况下,观察到单一的免疫反应条带。图4C是MDAMB453裂解物的mAb 4C5、重组4C5、和嵌合4C5免疫沉淀物用抗HSP90 α 探测的免疫印迹。MDAMB453细胞裂解物的反向免疫沉淀实验用mAb 4C5、rec 4C5和ch 4C5进行,且随后用抗HSP90 α 进行Western印迹。在所有情况下,都观察到单一的免疫反应条带,表明重组和嵌合4C5都保留mAb 4C5特异性且识别HSP90。

[0032] 图5A、5B、5C、和5D显示,重组和嵌合4C5结合到细胞表面且没有被MDAMB453细胞内化。图5A是MDAMB453细胞使用重组和嵌合4C5的免疫荧光染色的显微照片。标点免疫标记表明HSP90的表面池。使用mAb 4C5和抗HSP90 α 获得了类似结果。使用针对细胞内蛋白 β 微管蛋白的抗体进行阴性对照。(未显示)比例尺:20 μ m。图5B是与细胞内HSP90结合的重组和嵌合4C5的显微照片。与鼠抗体类似,在细胞通透后,重组和嵌合4C5也识别HSP90的细胞内池。在用4%多聚甲醛的固定条件和用0.1% Triton X-100的通透下进行MDAMB453细胞中细胞内HSP90的免疫荧光法检测。比例尺:20 μ m。图5C是检测抗体内化的显微照片。将细胞在37 $^{\circ}$ C下与抗体孵育不同的时间间隔,固定,且通透。使用荧光缀合的抗体显现抗体的结合。没有观察到mAb 4C5、重组4C5、和嵌合4C5抗体的内化 - 甚至在孵育24后。相比之下,在孵育8小时后在细胞内检测到抗HSP90 α 抗体。比例尺:20 μ m。图5D是用mAb 4C5、重组4C5、或嵌合4C5处理的源自MDAMB453细胞的细胞裂解物用针对ErbB2、Akt、cRaf、和HSP90的抗体探测的western印迹。肌动蛋白充当上样对照。与对照相比,用三种4C5抗体处理没有影响测试的细胞内激酶的水平。

[0033] 图6A、6B、6C、6D、6E、6F和6G显示重组和嵌合4C5都保留mAb 4C5的功能阻断特性且抑制MDAMB453乳腺癌和B16F10黑色素瘤细胞侵袭。图6A是体外伤口愈合测定结果的显微照片的子图。照片代表在刮擦形成后0时(左图)和48小时(右图)时获得的相差图,显示在对照培养物或包括抗HSP90 α 、mAb 4C5、重组4C5、或嵌合4C5的培养物中的MDAMB453细胞迁移。比例尺:200 μ m。图6B是伤口愈合测定结果的图示。与被认为导致100%的伤口闭合的对照培养物相比,在培养基中添加200 μ g/ml抗HSP90 α 和mAb 4C5分别导致48.57%和55.3%的伤口闭合抑制。在培养基中添加200 μ g/ml重组4C5或嵌合4C5分别导致46.51%和51.19%的伤口闭合抑制。条代表三次独立实验的平均值 \pm SEM。在单次实验中,一式三份测试每种条件。通过Student's T检验测试差异的统计学显著性。抗HSP90 α 、mAb 4C5、重组4C5和嵌合4C5的存在对伤口闭合具有统计学显著性影响(分别为 $p < 0,01$ 、 $p < 0,01$ 、 $p < 0,01$ 和 $p < 0,01$)。图6C是在刮擦形成后0时(左图)和24小时(右图)时获得的相差图的显微照片,显示在伤口愈合测定中在200 μ g/ml嵌合4C5存在的情况下B16 F10黑素瘤细胞侵袭。比例尺:200 μ m。图6D是嵌合4C5的浓度增加对伤口闭合的影响的图示。与被认为导致100%的伤口闭合的对照培养物相比,50 μ g/ml嵌合4C5的存在导致16%的侵袭抑制,而添加100 μ g/ml和200 μ g/ml嵌合4C5分别导致27,9%和52,3%的迁移抑制。图6E是使用台盼蓝染料显现的死细胞的显微照片。对照、mAb 4C5、抗HSP90 α 、和嵌合4C5处理的细胞与台盼蓝孵育以观察在每种情况下的细胞死亡率。比例尺,30 μ m。图6F是在固定、通透和用荧光标记的鬼笔环肽染色后,对照和嵌合4C5处理的细胞的显微照片。比例尺40 μ m。图6G是显示鬼笔环肽染色(F-肌动蛋白)的更高放大倍数。嵌合4C5有效地阻断片状伪足的扩散。比例尺:16 μ m。

[0034] 图7A和7B显示在集落形成测定中嵌合4C5显著降低由MDAMB231人乳腺癌细胞形成的每个个体集落中的细胞数量。图7A是集落形成测定结果的显微照片,其显示在对照或嵌合4C5处理的培养物中MDAMB231细胞的Giemsa染色的集落。图7B是嵌合4C5对每个集落中细胞数的影响的图示。当与对照培养物相比,观察到47.3%降低($P < 0.001$)。

[0035] 发明详述

[0036] 定义

[0037] “mAb 4C5”是指与SEQ ID NO:2具有至少75%、85%、90%、95%或者甚至99%氨基酸序列同一性的多肽,或其片段,其具有抗肿瘤活性和/或具有HSP90特异性结合活性。mAb 4C5是鼠抗体,其特异性识别人热休克蛋白90(HSP90)的 α 同种型,并且在较小程度上特异性识别 β 同种型。

[0038] 下面提供了SEQ ID NO:2的序列:

[0039] ELVMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQOKPGKSPKTLIYRANRL
VDGVPSRFSGSGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRLTFGAGTRLELKR
ADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYIKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSW

[0040] TDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK。

[0041] “嵌合4C5蛋白”是指与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少75%、85%、90%、95%或者甚至99%氨基酸序列同一性的多肽,或其片段,其具有抗肿瘤活性和/或具有HSP90特异性结合活性。通过用对应的人C_k结构域替代小鼠mAb 4C5 C_k而构建人-小鼠嵌合4C5抗体。

[0042] 下面提供了SEQ ID NO:4的序列:

[0043]

ELVMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQOKPGKSPKTLIYRANRL
VDGVPSRFSGSGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRLTFGAGTRLELKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0044] “嵌合4C5多核苷酸”是指编码嵌合4C5多肽的任何核酸分子。

[0045] “4C5 CDR1”是指与SEQ ID NO:5具有至少75%、85%、90%、95%或者甚至99%氨基酸序列同一性的多肽,其中包含4C5 CDR1的抗体具有HSP90特异性结合活性。下面提供了SEQ ID NO:5的序列:

[0046] KASQDINSYLS。

[0047] “4C5 CDR2”是指与SEQ ID NO:6具有至少75%、85%、90%、95%或者甚至99%氨基酸序列同一性的多肽,其中包含4C5 CDR2的抗体具有HSP90特异性结合活性。下面提供了SEQ ID NO:6的序列:

[0048] RANRLVD。

[0049] “4C5 CDR3”是指与SEQ ID NO:7具有至少75%、85%、90%、95%或者甚至99%氨基酸序列同一性的多肽,其中包含4C5 CDR3的抗体具有HSP90特异性结合活性。下面提供了SEQ ID NO:7的序列:

[0050] LQYDEFPRLT。

[0051] “HSP90特异性结合活性”是指本发明的抗体特异性结合HSP90多肽。

[0052] “改善(ameliorate)”是指减少、抑制、减弱、减小、阻滞、或稳定疾病的发展或进

展。

[0053] “类似物(analog)”是指不是相同的但是具有类似的功能或者结构特征的分子。例如,多肽类似物保留了对应的天然存在的多肽的生物活性,同时相对于天然存在的多肽具有增强类似物功能的某些生物化学修饰。这样的生物化学修饰可以增加其蛋白酶抗性、膜通透性或半衰期,而不改变,例如,配体结合。类似物可以包括非天然氨基酸。

[0054] 在本公开中,“包含(comprises、comprising)”、“含有(containing)”以及“具有(having)”等具有美国专利法指定的意义并且意味着“包括(includes、including)”等;“基本上由…组成(consisting essentially of或consists essentially)”同样具有美国专利法指定的意义并且该术语是开放性的,允许超出所叙述的存在,只要所叙述的基本或新特征不被超过叙述的存在改变,但是排除现有技术实施方案。

[0055] “嵌合抗体”是指包含至少两个不同多肽片段的抗体,第一个多肽片段来自鼠抗体且第二个多肽片段来自人抗体。第一和第二多肽片段中的每一个由核酸构建体编码并且可操作地连接,使得表达构建体之后,生成包含与人抗体片段连接的鼠抗体片段的功能性嵌合抗体。在一个实施方案中,鼠抗体片段包含一个或多个互补决定区,其中每一个都特异性结合HSP90。

[0056] 术语“细胞毒性部分”包括,但并不限于,相思豆毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、或其修饰的毒素。

[0057] “疾病(disease)”意味着损害或妨碍细胞、组织、或器官正常功能的任何状况或病症。在一个实施方案中,疾病是癌症或肿瘤。

[0058] “有效量(effective amount)”意味着相对于未治疗的患者,改善疾病的症状所需的量。用于实施本发明以治疗性地处理疾病的一种或多种活性化合物的有效量随施用方式,受试者的年龄、体重以及总体健康状况而变化。最终地,主治医生或者兽医会决定适当的量以及给药方案。这样的量被称为“有效(effective)”量。

[0059] “片段”意味着多肽或者核酸分子的部分。这部分包含,在某些实施方案中,参考核酸分子或多肽的整个长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%。片段可以包含10、20、30、40、50、60、70、80、90,或100、200、300、400、500、600、700、800、900,或1000个核苷酸或氨基酸。

[0060] “功能部分”是指具有改变、增强、或以其他方式变化靶向剂的能力以实现任何特定目的或使靶向剂能够实现新的目的的活性或特性的任何化合物、试剂、分子等。这些目的包括,但不限于,提供与肿瘤相关的疾病或病症的诊断和/或预后信息和/或治疗与肿瘤相关的疾病或病症。

[0061] “基本上相同”是指多肽或核酸分子表现出与参考氨基酸序列(例如,本文所述的氨基酸序列中的任一个)或核酸序列(例如,本文所述的核酸序列的任一个)的至少50%同一性。优选地,这样的序列与用于比较的序列在氨基酸水平或核酸至少60%、更优选为80%或85%、更优选90%、95%或甚至99%相同。

[0062] “分离的多核苷酸”意味着不含某种基因的核酸(例如,DNA),所述基因在衍生出本发明的核酸分子的有机体的天然存在的基因组中。因此该术语包括,例如,重组DNA,该重组DNA合并进入载体、自主复制质粒或病毒、或原核生物或真核生物的基因组DNA,或者该重组DNA作为不依赖于其他序列的分离的分子存在(例如,通过PCR或限制性内切核酸酶消化产

生的cDNA或者基因组的或cDNA的片段)。此外,该术语包括从DNA分子转录的RNA分子,以及对另外的多肽序列进行编码的杂合基因的一部分的重组DNA。

[0063] “分离的多肽”意味着本发明的已经从天然伴随它的组分中分离的多肽。典型地,当该多肽以重量计为至少60%时,将它从它天然关联的蛋白质和天然存在的有机分子中分离。在某些实施方案中,制剂是以重量计至少75%、至少90%、并且甚至是至少99%的本发明的多肽。本发明的分离的多肽可以,例如,通过从天然来源提取、通过对这样的多肽进行编码的重组核酸的表达、或通过化学合成蛋白质而得到。可以通过任何适当的方法测量纯度,例如,柱层析法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、或HPLC分析。

[0064] “标记”意味着在与疾病或病症相关联的表达水平或活性方面具有改变的任何蛋白质或多核苷酸。

[0065] “肿瘤”是指由细胞或组织的病理性增殖和其随后迁移其他组织或器官或其他组织或器官的侵袭为特征的疾病。肿瘤生长形成通常是不受控制且进行性的,在不引发正常细胞的增殖或引起正常细胞的增殖的停止条件下发生。肿瘤可以影响多种细胞类型、组织、或器官,包括但不限于选自下列的器官:膀胱、骨、脑、乳房、软骨、神经胶质、食道、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾、肝、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道、子宫、和阴道、或其组织或细胞类型。肿瘤包括癌症,如肉瘤、癌、或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。在一个实施方案中,肿瘤是乳腺癌或黑素瘤。

[0066] 侵袭周围组织或进入血流或淋巴管的肿瘤细胞在离初始肿瘤的一定距离处形成继发性肿瘤或转移。已经转移的肿瘤更难治疗,并且具有更差的预后。根据肿瘤的严重性(即,肿瘤大小和侵袭性),指定阶段编号I、II、III、或IV。第I阶段瘤是最不晚期的,并且具有最好的预后。第II阶段肿瘤通常包括更大的肿瘤,并且与有点较差的预后相关。第III和第IV阶段肿瘤已经传播超出它们的初始部位,并且具有最差的预后。

[0067] 在本文所使用的,“获得试剂”中的“获得”包括合成、购买、或以其他方式获得该试剂。

[0068] 如本文所使用的,“重组”包括提及使用表达编码多肽的异源多核苷酸的细胞产生的多肽。细胞产生重组多肽,因为它们已经通过引入适当的分离的核酸序列而遗传改变。该术语还包括提及已经通过引入异源核酸或将天然核酸改变为对于该细胞不是天然的形式、或者细胞源自如此修饰的细胞的细胞、或核酸、或载体。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式内没有被发现的基因,表达在天然形式内没有被发现的基因的突变体,或表达以其他方式异常表达、低表达或根本不表达的天然基因。

[0069] “减少”意味着至少10%、25%、50%、75%、或100%的负的改变。

[0070] “参考”指的是标准或者对照条件。

[0071] “参考序列”是定义的作为序列比较的基础的序列。参考序列可以是规定序列的子集或整体;例如全长cDNA或基因序列的区段、或该完整的cDNA或基因序列。对多肽而言,参考多肽序列的长度通常将是至少大约16个氨基酸,至少大约20个氨基酸,至少大约25个氨基酸,并且在某些实施方案中,大约35个氨基酸、大约50个氨基酸、或大约100个氨基酸。对核酸而言,参考核酸序列的长度通常将是至少大约50个核苷酸、至少大约60个核苷酸、至少大约75个核苷酸、并且甚至大约100个核苷酸或大约300个核苷酸或它们附近的或它们之间

的任一整数。

[0072] 序列同一性通常使用序列分析软件进行测量(例如,Genetics Computer Group的序列分析软件包, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST, BESTFIT, GAP,或PILEUP/PRETTYBOX程序)。这种软件通过将同源性程度分配给不同的取代、缺失、和/或其他修饰进行相同或相似序列的匹配。保守取代典型地包括以下组内的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;以及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其中在 e^{-3} 到 e^{-100} 之间的概率分数表示密切相关的序列。

[0073] 在本发明的方法中有用的核酸分子包括对本发明的多肽或其片段进行编码的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源性核酸序列100%相同,但是将典型地表现出基本的同一性。与内源性序列具有“基本同一性(substantial identity)”的多核苷酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。可用于本发明的方法中的核酸分子包括编码本发明的多肽或其片段的任何核酸分子。这样的核酸分子不必与内源核酸序列100%相同,但将通常表现出基本同一性。与内源序列具有“基本同一性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”意味着在各种的严谨条件下进行配对以便在互补的多核苷酸序列(例如,本文描述的基因)、或其部分之间形成双链分子。(例如,参见Wahl, G. M. 和 S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399);Kimmel, A. R.(1987) *Methods Enzymol.* 152:507)。

[0074] “杂交”意味着互补核碱基之间的氢键合,该氢键合可以为沃森-克里克(Watson-Crick)、霍氏(Hoogsteen)或反霍氏(reversed Hoogsteen)氢键合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是通过氢键的形成进行配对的互补核碱基。

[0075] 例如,严谨的盐浓度通常将是小于大约750 mM的氯化钠和75 mM的柠檬酸三钠、优选地是小于大约500 mM的氯化钠和50 mM的柠檬酸三钠、并且更优选地是小于大约250 mM的氯化钠和25 mM的柠檬酸三钠。在缺少有机溶剂(例如,甲酰胺)下可以获得低严谨杂交,而在至少大约35%的甲酰胺、并且更优选地是至少大约50%的甲酰胺存在下可以获得严谨杂交。严谨的温度条件将通常包括至少大约30°C、更优选地是至少大约37°C、并且最优选地是至少大约42°C的温度。不同的另外的参数,如杂交时间、去污剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS))浓度、以及载体DNA的包含或排除,对本领域的普通技术人员是众所周知的。需要通过组合这些各种的条件实现各种的严谨水平。在一个优选的实施方案中,杂交将会在30°C、在750 mM的氯化钠、75 mM的柠檬酸三钠、以及1%的SDS中发生。在一个更优选的实施方案中,杂交将会在37°C、在500 mM的氯化钠、50 mM的柠檬酸三钠、1%的SDS、35%的甲酰胺、以及100 mg/ml的变性的鲑精DNA(ssDNA)中发生。在一个最优选的实施方案中,杂交将会在42°C、在250 mM的氯化钠、25 mM的柠檬酸三钠、1%的SDS、50%的甲酰胺、以及200 μ g/ml的ssDNA中发生。这些条件的有用的变体对于本领域的普通技术人员将是显而易见的。

[0076] 对于大多数的应用,杂交之后的洗涤步骤也将会在严谨度方面不同。通过盐浓度和温度可以定义洗涤严谨条件。如上所述,通过降低盐浓度或增加温度可以增加洗涤严谨度。例如,用于洗涤步骤的严谨盐浓度将为优选地小于大约30 mM的氯化钠和3 mM的柠檬酸三钠、并且最优选地是小于大约15 mM的氯化钠和1.5 mM的柠檬酸三钠。用于洗涤步骤的严

谨的温度条件将通常包括至少大约25℃、更优选地是至少大约42℃、并且甚至更优选地是至少大约68℃的温度。在一个优选的实施方案中,洗涤步骤将会在25℃、在30 mM的氯化钠、3 mM的柠檬酸三钠、以及0.1%的SDS中发生。在一个更优选的实施方案中,洗涤步骤将会在42℃、在15 mM的氯化钠、1.5 mM的柠檬酸三钠、以及0.1%的SDS中发生。在一个更优选的实施方案中,洗涤步骤将会在68℃、在15 mM的氯化钠、1.5 mM的柠檬酸三钠、以及0.1%的SDS中发生。这些条件的另外的变体对于本领域的普通技术人员将是显而易见的。杂交技术对于本领域的普通技术人员是众所周知的并且描述于例如Benton和Davis(*science* 196:180, 1977);Grunstein和Hogness(*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72:3961, 1975);Ausubel等人(*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York, 2001);Berger和Kimmel(*Guide to Molecular Cloning Techniques*,1987, Academic Press, New York);以及Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York。

[0077] “基本上相同”意味着多肽或核酸分子表现出与参考氨基酸序列(例如,本文描述的任一氨基酸序列)或核酸序列(例如,本文描述的任一核酸序列)的至少50%的同一性。在某些实施方案中,这样的序列与用于比较的序列(即,与参考序列)在氨基酸水平或核酸上至少60%、80%或85%、90%、95%或甚至99%相同。

[0078] “特异性结合”意味着化合物或抗体识别并且结合本发明的多肽,但是基本上不识别并且结合天然地包括本发明的多肽的样品(例如,生物样品)中的其他分子。

[0079] “受试者”意味着哺乳动物,包括但不限于,人或非人类哺乳动物,如牛、马、犬、绵羊、或猫。

[0080] 如本文所使用的,“肿瘤”是指所有肿瘤细胞生长和增殖,无论恶性或良性,和所有癌前期和癌的组织。

[0081] 本文提供的范围理解为该范围内的所有值的简略表达。例如,将1至50的范围理解为包括下组的任一数、数的组合、或者下组的子范围,该组由以下各项组成:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50。

[0082] 如本文所使用的,术语“治疗(treat、treating、treatment等)”指的是减少或改善病症和/或与其相关联的症状。将被理解的是,尽管不能排除,但是治疗病症或状况并不要求完全地消除该病症、状况或与其相关联的症状。

[0083] 除非明确声明或从上下文显而易见,如本文所使用的,术语“或”被理解为包括性的。除非明确声明或从上下文显而易见,如本文所使用的,术语“一个、一种(a、an)”、和“该(the)”被理解为单数的或复数的。

[0084] 除非明确声明或从上下文显而易见,如本文所使用的,术语“大约”被理解为在本领域的正常容差范围内,例如,在平均数的2标准差之内。大约可以被理解为在声明值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或0.01%之内。除非从上下文显而易见,本文提供的所有数值被该术语大约修饰。

[0085] 本文的变量的任何定义中的一系列化学基团的陈述包括该变量作为任何单个基团或所列出基团的组合的定义。本文针对变量或方面的实施方案的陈述包括该实施方案作为任何单个的实施方案或与任何其他实施方案或其部分的组合。

[0086] 本文提供的任何组合物或方法可以与本文提供的一个或多个任何其他组合物和方法进行组合。

[0087] 本发明提供了具有抗肿瘤特性的多肽。本文所述的多肽包括对应于抗体轻链的小鼠 - 人嵌合体,其缺乏抗体重链,但保留了与HSP90 α 蛋白结合的能力。

[0088] 本发明是基于,至少部分基于,单克隆抗体4C5完全缺乏重链且由功能性 κ 轻链二聚体组成这一发现,和保留初始抗体特异性和功能特性的重组嵌合的小鼠 - 人抗体轻链的产生。具体而言,嵌合抗体在体外抑制表面HSP90的功能且降低乳腺癌和黑色素瘤细胞侵袭。这些结果表明,该嵌合抗体可用作抗癌剂,其具有降低的不良免疫原性作用。

[0089] 相应地,本发明提供了包含小鼠 - 人嵌合抗体的治疗组合物,和使用这样的抗体以预防、降低或消除肿瘤细胞(例如,乳腺癌和黑色素瘤细胞)的侵袭或以其他方式治疗肿瘤或其症状的方法。

[0090] 抗体

[0091] 选择性结合抗HSP90多肽的抗体(例如,嵌合4C5)可用于本发明的方法中。这样的抗体特别可用于降低或消除肿瘤细胞的生长和侵袭。特别地,这样的抗体可用于降低或消除肿瘤的发展和转移潜能。如本文下面所述,与HSP90多肽的结合降低肿瘤细胞中HSP90生物活性,如通过分析肿瘤细胞的集落形成能力和侵袭性所测定的。在一些实施方案中,通过使用集落形成测定分析肿瘤细胞集落在体外的生长而检测集落形成能力。在某些实施方案中,通过检测肿瘤细胞迁移进培养的伤口,通过检测肌动蛋白重排,或通过检测片状伪足的发展,而在体外测定侵袭性。在其他实施方案中,通过检测肿瘤细胞在动物模型中在体内的转移而测定侵袭性。

[0092] 制备抗体的方法是免疫学科学普通技术人员众所周知的。如本文所使用的,术语“抗体”不仅是指完整的抗体分子,而且还指保留免疫原结合能力的抗体分子的片段。这样的片段也是本领域众所周知的并且常规地体外和体内采用。相应地,如本文所使用的,术语“抗体”不仅是指完整的免疫球蛋白分子,而且还指众所周知的活性片段F(ab')₂和Fab。缺乏完整抗体的Fc片段的F(ab')₂和Fab片段更快速地从循环中清除,并且可能具有更少的完整抗体的非特异性组织结合(Wahl等人, J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)。在某些实施方案中,本发明的抗体包括嵌合抗体、人源化抗体、融合多肽、和非常规抗体。在其他实施方案中,本发明提供了杂合抗体,其中该抗体的一部分从第一种抗体(例如,鼠抗体)获得,而另一部分从不同的第二种抗体(例如,人抗体)获得。这样的抗体经常被称为“嵌合”抗体。这样的杂合体也可以使用人源化抗体形成。

[0093] 通常,完整的抗体被称为含有“Fc”和“Fab”区。Fc区参与补体活化,并且不参与抗原结合。已经酶促切割Fc'区或在没有Fc'区的情况下产生的抗体,被指定为“F(ab)₂”片段,保留了完整抗体的两个抗原结合位点。类似地,已经酶促切割Fc区或在没有Fc区的情况下产生的抗体,被指定为“Fab”片段,保留了完整抗体的抗原结合位点之一。Fab片段由共价结合的抗体轻链和抗体重链的部分组成,表示为“Fd”。Fd片段是抗体特异性的主要决定因素(单一的Fd片段可以与最高达10个不同的轻链结合,而不改变抗体特异性)。分离的Fd片段保留了与免疫原性表位特异性结合的能力。

[0094] 抗体可以通过本领域任何已知的方法利用HSP90或其免疫原性片段作为免疫原而制备抗体。获得抗体的一种方法是用免疫原免疫合适的宿主动物,并且遵循用于多克隆或

单克隆抗体生产的标准程序。免疫原将促进将免疫原呈递在细胞表面上。合适宿主的免疫可以以多种方式进行。可以在由宿主的免疫细胞摄取的递送载体中将编码HSP90多肽或其免疫原性片段的核酸序列提供给宿主。细胞将依次表达细胞表面上的受体,在宿主中生成免疫原性应答。可替代地,编码HSP90多肽或其免疫原性片段的核酸序列可以在细胞中体外表达,随后分离多肽并且将多肽施用于产生抗体的合适宿主中。

[0095] 可替代地,如果需要,针对HSP90多肽的抗体可以源自抗体噬菌体展示文库。噬菌体能够感染细菌并且在细菌内复制,其可以工程改造,当与人抗体基因组合时,以展示人抗体蛋白。噬菌体展示是制备噬菌体以在其表面上'展示'人抗体蛋白的过程。将来自人抗体基因文库的基因插入噬菌体群体中。每个噬菌体携带不同抗体的基因,并且因此在其表面上展示不同抗体。

[0096] 然后通过本领域任何已知方法制备的抗体可以从宿主纯化。抗体纯化方法可以包括盐沉淀(例如,用硫酸铵)、离子交换层析(例如,在中性pH在阳离子或阴离子交换柱上运行和用不连续梯度的渐增离子强度洗脱)、凝胶过滤层析(包括凝胶过滤HPLC)和亲和树脂如蛋白A、蛋白G、羟基磷灰石和抗免疫球蛋白上的层析法。

[0097] 抗体可以从工程改造以表达抗体的杂交瘤细胞方便地产生。制备杂交瘤的方法是本领域中众所周知的。杂交瘤细胞可以在合适的培养基中培养,并且经消耗的培养基可以用作抗体来源。编码目的抗体的多核苷酸可以依次从产生抗体的杂交瘤获得,并且然后抗体可以合成产生或者从这些DNA序列重组产生。为了产生大量抗体,获得腹水通常更方便。提高腹水的方法通常包括将杂交瘤细胞注入免疫原初的(naive)组织相容性或免疫耐受的哺乳动物,尤其是小鼠。可以通过先前施用合适的组合物(例如,姥鲛烷)而引发哺乳动物用于产生腹水。

[0098] 通过本发明的方法产生的抗体可以通过本领域已知的方法“人源化”。“人源化”抗体是其中至少部分序列已经从其初始形式改变以使之更像人免疫球蛋白的抗体。当生成非人动物(如鼠)抗体时,人源化抗体的技术是特别有用的。美国专利4,816,567、5,530,101、5,225,539、5,585,089、5,693,762 和5,859,205中提供了用于人源化鼠抗体的方法的实例。在一个实施方案中,用人序列替代重链和轻链C区。在另一个版本中,CDR区包含识别目的抗原的氨基酸序列,而可变构架区也已经被转化为人序列。公认的是,可以用非特异性或杂特异性抗体的对应区替代哺乳动物抗体的非CDR区,同时保留初始抗体的表位特异性。该技术可用于开发和使用其中非人CDR共价连接到人FR和/或Fc/pFc'区以产生功能性抗体的人源化抗体。在第三个版本中,通过设计人和小鼠可变区的共有序列并且转换CDR之外在共有序列之间的不同的残基而使可变区人源化。

[0099] 在一个实施方案中,通过将编码包含CDR(SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、和SEQ ID NO:7)的氨基酸的核酸序列与编码人构架区序列(FR1、FR2、和FR3)的核酸序列可操作地连接而生成人源化抗体。

[0100] 在其他实施方案中,本发明提供了“非常规抗体”。非常规抗体包括,但不限于,纳米抗体、线性抗体(Zapata等人, Protein Eng. 8(10):1057-1062,1995)、单结构域抗体、单链抗体、和具有多价的抗体(例如,双抗体、三抗体、四抗体和五抗体)。纳米抗体是已经进化为在轻链不存在的情况下具有完全功能的天然存在的重链的最小片段。纳米抗体具有常规抗体的亲和力和特异性,尽管它们仅为单链Fv片段的一半大小。组合它们的极端稳定性

和与人抗体构架的高度同源性,这种独特结构的后果在于,纳米抗体可以结合对于常规抗体无法接近的治疗目标。具有多价的重组抗体片段提供了与癌细胞的高结合抗体亲抗原性和独特的靶向特异性。这些多聚体scFvs(例如双抗体、四抗体)提供了相比于亲本抗体的改进,因为~60-100kDa大小的小分子提供了更快的血液清除和快速的组织摄取。参见Power等人,(Generation of recombinant multimeric antibody fragments for tumor diagnosis and therapy. *Methods Mol Biol*, 207, 335-50, 2003); 和Wu等人(Anti-carcinoembryonic antigen (CEA) diabody for rapid tumor targeting and imaging. *Tumor Targeting*, 4, 47-58, 1999)。

[0101] 已经描述了用于制备非常规抗体的各种技术。Kostelny等人(*J. Immunol.* 148 (5):1547-1553, 1992)描述了使用亮氨酸拉链产生的双特异性抗体。Hollinger等人(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993)描述了双抗体技术。Gruber等人(*J. Immunol.* 152:5368, 1994)描述了用于通过使用单链Fv(sFv)dimers制备双特异性抗体片段的另一种策略。Tutt等人(*J. Immunol.* 147:60, 1991)描述了三特异性抗体。单链Fv多肽抗体包括共价连接的H::VL异源二聚体,其可以从核酸表达,所述核酸包括如Huston, 等人(*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883, 1988)所述直接连接或通过编码肽的接头连接的编码V_H-和V_L-的序列。还参见美国专利号5,091,513, 5,132,405和4,956,778; 和美国专利公开号20050196754和20050196754。

[0102] 本发明的抗体特别可用于治疗肿瘤,包括乳腺癌和黑色素瘤,或其他肿瘤,包括但不限于成胶质细胞瘤、淋巴瘤、结肠癌、非小细胞肺癌等。因此,本发明提供了治疗肿瘤疾病和/或病症或其症状的方法,该方法包括向受试者(例如哺乳动物如人)施用治疗有效量的包含本文所述嵌合抗体的药物组合物。因此,一个实施方案是治疗患有或易患肿瘤疾病或病症或其症状的受试者的方法。该方法包括给哺乳动物施用足以治疗该疾病或病症或其症状的治疗量(或量)的本文的化合物的步骤,在这样的条件下使得该疾病或病症得以治疗。

[0103] 本文的方法包括给受试者(包括经鉴定需要此类治疗的受试者)施用治疗有效量的本文描述的化合物,或本文描述的组合物以产生这种效果。鉴定需要这样治疗的受试者可以是受试者或医疗保健专业人士的判断,并且可以是主观的(例如意见)或客观的(例如是通过测试或诊断方法可测量的)。

[0104] 本发明的治疗方法(包括预防治疗)总体上包括将治疗有效量的本文所述的嵌合抗体,施用于需要其的受试者(例如动物、人),包括哺乳动物,尤其是人。这种治疗将合适地施用于患有、具有、易患肿瘤疾病相关的转移或处于与肿瘤疾病相关的转移的风险中受试者,特别是人。那些“在危险中”的受试者的确定可以通过诊断测试或受试者或卫生保健提供者(例如基因测试、酶或蛋白标记、标记(如本文定义的)、家族病史等)的任何客观的或主观的确定来做出。

[0105] 在一个实施方案中,本发明提供了监控治疗进程的方法。该方法包括在患有或易患与肿瘤相关的病症或其症状的受试者中确定诊断标记(Marker)(例如本文描绘的、受本文的化合物调节的任何靶标,蛋白或其指示剂等)的水平或诊断措施(例如筛选、测定)的步骤,其中已对该受试者施用了治疗量的足以治疗这种疾病或其症状的本文的化合物。在本方法中确定的标记水平可以与健康正常对照或其他受折磨的患者中的已知标记水平相比较,以确定该受试者的疾病状况。在某些实施方案中,对受试者中的标记的第二水平在晚于

该第一水平的确定的一个时间点进行确定,并且对这两个水平进行比较以监测病程或该治疗的效力。在某些实施方案中,在开始本发明的治疗前对该受试者中的标记的治疗前水平进行确定;然后将标记的这个治疗前水平与治疗开始后的该受试者中的标记的水平进行比较,以确定该治疗的效力。

[0106] 重组多肽表达

[0107] 本发明提供了本发明的抗体(嵌合抗体),其可用于治疗肿瘤。具体而言,本发明提供了可以重组表达的人-小鼠嵌合4C5抗体。通常,通过用合适表达载体中的编码全部或部分多肽的核酸分子或其片段转化合适的宿主细胞而产生重组多肽。

[0108] 分子生物学领域的技术人员将理解,任何广泛多样的表达系统可用于提供重组蛋白。使用的确切宿主细胞对于本发明并不关键。可以在原核宿主(例如,大肠杆菌)或在真核宿主(例如,酿酒酵母、昆虫细胞,例如,Sf21细胞,或哺乳动物细胞,例如,NIH 3T3、HeLa、或COS细胞)中产生本发明的多肽。这样的细胞可以获得自范围广泛的来源(例如,美国典型培养物保藏中心,Rockland, Md.; 还参见例如,Current Protocol in Molecular Biology, New York:John Wiley and Sons, 1997)。转化或转染的方法和表达载体的选择将取决于选择的宿主系统。转化和转染的方法描述于,例如,Ausubel等人(同上);表达载体可以选自自由例如Cloning Vectors:A Laboratory Manual (P. H. Pouwels等人, 1985, 增刊1987)中提供的那些。

[0109] 存在用于产生本发明的多肽的多种表达系统。可用于产生这样的多肽的表达载体包括,但不限于,染色体、附加体和病毒衍生的载体,例如,衍生自细菌质粒、衍生自噬菌体、衍生自转座子、衍生自酵母附加体、衍生自插入元件、衍生自酵母染色体元件、衍生自病毒如杆状病毒、乳多空病毒,如SV40、牛痘病毒、腺病毒、禽痘病毒、伪狂犬病病毒和逆转录病毒的载体,和衍生自它们的组合的载体。

[0110] 用于产生多肽的一种特定的细菌表达系统是大肠杆菌pET表达系统(例如pET-28)(Novagen, Inc., Madison, Wis)。根据该表达系统,将编码多肽的DNA以设计允许表达的方向插入pET载体。由于编码这样的多肽的基因在T7调节信号的控制下,通过在宿主细胞中诱导T7 RNA聚合酶的表达而实现多肽的表达。这通常通过使用对IPTG诱导响应而表达T7 RNA聚合酶的宿主菌株而实现。一旦产生,然后根据本领域已知的标准方法,例如,本文所述的那些分离重组多肽。

[0111] 用于产生多肽的另一种细菌表达系统是pGEX表达系统(Pharmacia)。该系统采用GST基因融合系统,该系统被设计用于将基因或基因片段高水平表达为融合蛋白,以及快速纯化和回收功能性基因产物。目的蛋白融合于来自日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)的谷胱甘肽-S-转移酶蛋白的羧基末端,并且使用谷胱甘肽琼脂糖4B通过亲和层析从细菌裂解物中容易地纯化。可以在温和条件下通过用谷胱甘肽洗脱而回收融合蛋白。通过在谷胱甘肽-S-转移酶结构域的上游存在位点特异性蛋白酶的识别位点而促进从融合蛋白裂解该结构域。例如,可以用凝血酶裂解质粒pGEX-2T中表达的蛋白;可以用因子Xa裂解pGEX-3X中表达的那些。

[0112] 可替代地,在巴斯德毕赤酵母(一种甲基营养型酵母)中表达本发明的重组多肽。毕赤酵母能够代谢作为唯一碳源的甲醇。甲醇代谢的第一步是通过酶(醇氧化酶)将甲醇氧化成甲醛。由AOX1基因编码的该酶的表达由甲醇诱导。AOX1启动子可用于诱导的多肽表达,

或者GAP启动子可用于目的基因的组成型表达。

[0113] 一旦表达本发明的重组多肽,则将其分离,例如使用亲和层析将其分离。在一个实例中,可以将针对本发明的多肽产生的抗体(例如,如本文所述产生的)附着到柱子,并且用于分离重组多肽。在亲和层析之前可以通过标准方法进行具有多肽的细胞的裂解和分级分离(参见,例如,Ausubel等人,同上)。可替代地,使用序列标签,如与镍柱结合的六组氨酸标签分离多肽。

[0114] 一旦分离,重组蛋白可以,如果需要,进一步纯化,例如,通过高效液相层析法(参见,例如,Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology, 编辑, Work和Burdon, Elsevier, 1980)。本发明的多肽,特别是短肽片段,也可以通过化学合成产生(例如,通过Solid Phase Peptide Synthesis, 第2版, 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill中描述的方法)。多肽表达和纯化的这些一般技术也可以用来产生和分离有用的肽片段或类似物(本文描述的)。

[0115] 抗体及其类似物

[0116] 本发明进一步提供了抗体(例如,人/小鼠嵌合抗体)或其片段,其以如下方式进行修饰:增强或不抑制其降低肿瘤细胞的生长、增殖、或存活的能力。在一个实施方案中,本发明提供了用于通过产生改变而优化嵌合抗体的氨基酸序列或编码的嵌合抗体的核酸序列的方法。这些变化可以包括某些突变、缺失、插入、或翻译后修饰。在一个实施方案中,氨基酸序列被修饰以提高蛋白酶耐受性。相应地,本发明进一步包括本发明的任何天然存在的多肽的类似物。类似物可以与本发明的天然存在的多肽的差异在于氨基酸序列差异、在于翻译后修饰、或在于二者。本发明的类似物通常与本发明的天然存在的氨基酸序列的全部或部分显示出至少75%、85%、90%、95%或者甚至99%的同一性。序列比较的长度是至少10、13、15个氨基酸残基,至少25个氨基酸残基,和多于35个氨基酸残基。再次,在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序, e^{-3} 和 e^{-100} 之间的概率评分表明密切相关的序列。修饰包括多肽的体内和体外的化学衍生化,例如,乙酰化,羧化,磷酸化或糖基化;这样的修饰可以发生在多肽合成或加工期间或用分离的修饰酶处理后。类似物也可以与本发明的天然存在的多肽的差异在于一级结构的改变。这些包括天然的和诱导的基因变体(例如,由通过辐射或暴露于乙烷甲基硫酸酯或通过位点特异性诱变的随机诱变而导致的,如 Sambrook, Fritsch和Maniatis, Molecular Cloning:A Laboratory Manual (第2版), CSH Press, 1989,或Ausubel等人,同上)。还包括环化肽、分子和类似物,其含有除L-氨基酸以外的残基,例如D-氨基酸或者非天然存在的或合成的氨基酸,例如, β 或 γ 氨基酸。

[0117] 除全长多肽以外,本发明还包括本发明的多肽中任一种的片段。如本文所使用的,术语“片段”是指长度至少为5、10、13、或15个氨基酸。在其他实施方案中,片段是至少20个连续氨基酸,至少30个连续氨基酸,或至少50个连续氨基酸,和在其他实施方案中,至少为60至80或更多个连续氨基酸。本发明的片段可以通过本领域技术人员已知的方法生成,或可以由正常蛋白加工而导致(例如,从新生多肽去除对于生物活性不需要的氨基酸或通过可选择的mRNA剪接或可选择的蛋白加工事件去除氨基酸)。

[0118] 可以根据本发明的方法施用具有设计以模仿抗体功能活性(例如,抗肿瘤活性,抗原结合活性)的化学结构的抗体类似物。类似物设计的方法是本领域众所周知的,类似物的合成可以根据这样的方法进行:通过改变化学结构,使得获得的类似物表现出SEQ ID NO:2

或包含SEQ ID NO:2的嵌合抗体的抗肿瘤活性。在某些实施方案中,抗体类似物对于体内降解相对耐受,导致在施用后更长时间的治疗效果。用于测量功能活性的测定包括,但不限于下面的实施例中描述的那些。

[0119] 药物治疗

[0120] 本发明提供了可用于治疗肿瘤的嵌合抗体。在一个特定实施方案中,本发明的嵌合抗体可用于防止或降低肿瘤生长和肿瘤细胞侵入周围组织或以其他方式转移的倾向。对于治疗用途而言,本文描述的抗体可以全身性地给药,例如配制在药学上可接受的缓冲液如生理盐水中。在某些实施方案中,施用途包括,例如,在患者体内提供连续的、持续的药物水平的皮下注射、静脉内注射、腹膜内注射、肌内注射或皮内注射。使用在生理上可接受的载体中的、本文鉴定的治疗有效量的治疗剂来对人患者或其它动物进行治疗。对合适的载体以及它们的配制进行了描述,例如,在E. W. Martin著作的《雷明顿氏药学全书》(Remington's Pharmaceutical Sciences)中进行了描述。待施用的治疗剂的用量的变化取决于施用方式、该患者的年龄和体重,以及肿瘤的临床症状。总体上,尽管在某些情况下,由于该化合物特异性增加会需要较低的用量,但是用量会处于在与肿瘤相关的其他疾病的治疗中使用的其他试剂所使用的那些范围内。

[0121] 治疗方法

[0122] 本发明的抗体(例如,本文所述的鼠和人-鼠嵌合抗体)可用于预防或改善肿瘤疾病。在一种治疗方法中,将本文鉴定或描述的试剂施用于潜在的或实际的疾病影响的组织的部位或将其全身施用。施用的试剂的剂量取决于多种因素,包括个别患者的大小和健康。对于任何特定受试者,应当根据个体需要和施用或监督组合物施用的人的专业判断随着时间调整特定剂量方案。

[0123] 药物组合物的配制

[0124] 用于治疗肿瘤的化合物的施用可以通过使与其他组分组合的该治疗剂的浓度对改善、减少、或稳定肿瘤有效的任何合适的方式。该化合物可以任何合适量地包含于任何合适的载体物质中,并且总体上以该组合物总重的1-95%(按重量计)的量存在。该组合物可以是以适合于肠胃外(例如,皮下、静脉内、肌内、或腹膜内)施用途的剂型来提供。有利的施用方法是静脉内输注。这些药物组合物可以按常规药物实践(参见例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第20版),编辑A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 以及Encyclopedia of Pharmaceutical Technology编辑, J. Swarbrick和J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York)进行配制。

[0125] 本发明的药物组合物可以配制成在施用后基本上立刻释放出抗体或者在施用后任何预定的时间或时间段释放出抗体。后一种类型的组合物一般被称为控制释放制剂,它包括(i)在身体内在较长的时间期间内产生基本上恒定的药物浓度的制剂;(ii)预定的滞后时间后,在身体内在较长的时间期间内产生基本上恒定的药物浓度的制剂;(iii)在预定的时间期间,通过维持身体内相对恒定有效的水平,同时使相伴的与该活性物质的血浆水平波动(锯齿动力学模式)相关的不希望的副作用最小化,来维持作用的制剂;(iv)通过,例如,控释组合物与胸腺相邻或接触的空间放置来定位作用的制剂;(v)允许方便给药,使得,例如,每一个或两个星期给药一次的制剂;以及(vi)通过使用载体或化学衍生物的瘤形成以递送该治疗剂至具体细胞类型(例如瘤形成细胞)的制剂。对于某些应用而

言,控释制剂排除了对在白天频繁给药以维持血浆水平于治疗水平的需要。

[0126] 可以遵循许多策略中的任何一个,以便获得其中释放速率大于所谈论的化合物的代谢速率的控释。在一个实例中,控释是通过对各种配方参数和成分的合适选择来获得,包括,例如,不同的控释组合物和包衣类型。因此,将该治疗剂与合适的赋形剂配入施用后以受控方式释放该治疗剂的药物组合物中。实例包括单或多单位片剂或胶囊组合物、油溶液、悬浮液、乳剂、微胶囊、微球、分子复合物、纳米颗粒、贴剂、以及脂质体。

[0127] 肠胃外组合物

[0128] 该药物组合物可以以剂型、制剂通过注射、输注或植入(皮下、静脉内、肌内、腹膜内、等等)或经由合适的含有常规的、无毒的药学上可接受的载体和佐剂的递送装置或植入物进行肠胃外施用。此类组合物的配制和制备对药物配制领域的技术人员而言是众所周知的。配制方法可见Remington: The Science and Practice of Pharmacy,同上。

[0129] 可以用单位剂型(例如,在单剂量的安瓿中),或者用包括若干剂量的小瓶来提供肠胃外使用的组合物,并且其中可以加入合适的防腐剂(见下文)。该组合物的形式可以是溶液、悬浮液、乳液、输注装置、或用于植入的递送装置,或者它可以作为在使用前用水或其它合适的媒介物重构的干粉剂而提供。除减少或改善肿瘤的活性剂外,该组合物可以包含合适的肠胃外可接受的载体和/或赋形剂。一种或多种活性治疗剂可以掺入到用于控释的微球、微胶囊、纳米颗粒、脂质体等中。此外,该组合物可以包含悬浮、增溶、稳定、pH调节剂,张度调节剂,和/或分散剂。

[0130] 如上文所述,本发明的药物组合物可以是适合于无菌注射的形式。为了制备这样的组合物,将一种或多种合适的治疗剂溶解于或悬浮于肠胃外可接受的液体媒介物中。可以采用的可接受的媒介物和溶剂是水,通过加入适量的盐酸、氢氧化钠或合适的缓冲剂调整到合适的pH值的水,1,3-丁二醇,林格氏溶液,以及等渗氯化钠溶液和葡萄糖溶液。该水性制剂还可以包含一种或多种防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯)。在其中这些化合物之一仅少量或微溶于水的情况下,可以添加溶解增强剂或增溶剂,或该溶剂可包括10-60% w/w的丙二醇等。

[0131] 控释的肠胃外组合物

[0132] 控释的肠胃外组合物可以是水悬浮液,微球,微胶囊,磁性微球,油溶液,油悬浮液,或乳液形式。可替代地,该抗体可以掺入到生物相容的载体、脂质体、纳米颗粒、植入物、或输注设备中。

[0133] 用于制备微球和/或微胶囊的材料是,例如可生物降解的/可生物蚀解的聚合物如:聚泌乳激素、聚氰基丙烯酸异丁酯、聚2-羟基乙基-L-左旋谷氨酸、以及聚乳酸。当配制控释的肠胃外制剂时,可以使用的生物相容载体是碳水化合物(例如葡聚糖)、蛋白质(例如白蛋白)、脂蛋白或抗体。在植入物中使用的材料可以是非可生物降解的(例如聚二甲基硅氧烷)或可生物降解的(例如聚己内酯、聚乳酸、聚乙醇酸或聚邻醚或其组合)。

[0134] 用于口服的固体剂型

[0135] 用于口服的制剂包括含有与无毒的药学上可接受的赋形剂混合的一种或多种活性成分的片剂。此类制剂对技术人员而言是已知的。赋形剂可以是,例如,惰性稀释剂或填充剂(例如,蔗糖、山梨糖醇、糖、甘露醇、微晶纤维素、淀粉(包括马铃薯淀粉)、碳酸钙、氯化钠、乳糖、磷酸钙、硫酸钙、或磷酸钠);造粒剂和崩解剂(例如,纤维素衍生物(包括微晶纤

纤维素)、淀粉(包括马铃薯淀粉)、交联羧甲基纤维素钠、藻酸盐、或藻酸);结合剂(例如,蔗糖、葡萄糖、山梨糖醇、阿拉伯胶、藻酸、藻酸钠、明胶、淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、硅酸铝镁、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、或聚乙二醇);以及润滑剂,助流剂,和抗粘剂(例如,硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、硅酸盐、氢化植物油、或滑石)。其他药学上可接受的赋形剂可以是着色剂、调味剂、增塑剂、湿润剂、缓冲剂,等。

[0136] 这些片剂可以是无包衣的或它们可以通过已知技术包衣,来任选地延迟在胃肠道中的崩解和吸收并且从而提供在较长的时间内的持续作用。该包衣可以调适于以预定的模式释放该活性药物(例如,为了获得控释制剂),或者它可以调适于不释放该活性药物,直到通过胃后(肠溶包衣)。该包衣可以是糖包衣、膜包衣(例如,基于羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、甲基羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、丙烯酸酯共聚物、聚乙二醇和/或聚乙烯吡咯烷酮),或肠溶包衣(例如,基于甲基丙烯酸共聚物、乙酸邻苯二甲酸纤维素、甲基纤维素邻苯二甲酸羟丙酯、醋酸甲基纤维素琥珀酸羟丙酯、聚醋酸乙烯酯邻苯二甲酸酯、虫胶、和/或乙基纤维素)。此外,可以使用延时材料,例如,单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0137] 这些固体片剂组合物可以包含调适于使该组合物避免不需要的化学变化(例如,嵌合抗体的释放前的化学降解)的包衣。该包衣可以是以与在《制药技术百科全书》(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology,同上)中描述的相似方式应用于固体制剂形式。

[0138] 口服制剂还可以呈现为咀嚼片、或硬明胶胶囊,其中该活性成分与惰性固体稀释剂(例如,马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合,或呈现为软明胶胶囊,其中该活性成分与水或油介质混合,所述油介质例如,花生油,液体石蜡或橄榄油。可以使用例如混合器、流化床装置或喷雾干燥设备以常规方式用上述的按照片剂和胶囊剂的成分来制备粉剂和颗粒剂。

[0139] 控释的口服剂型

[0140] 可以将多种用于口服的控释组合物,例如,构建成通过控制该活性物质的溶解和/或扩散来释放嵌合抗体治疗剂。通过化合物的片剂、胶囊、丸剂、或颗粒制剂的适当包衣,或通过将该化合物掺入到合适的基质中,从而可以获得溶解或扩散的控释。控释包衣可以包含以上提到的这些包衣物质中的一种或多种和/或例如虫胶、蜂蜡、糖蜡、蓖麻蜡、巴西棕榈蜡、硬脂醇、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、棕榈酰硬脂酰甘油酯、乙基纤维素、丙烯酸树脂、d1-聚乳酸、醋酸丁酸纤维素、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、乙烯吡咯烷酮、聚乙烯、聚甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、2-羟甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯水凝胶、1,3-丁二醇、乙二醇甲基丙烯酸酯,和/或聚乙烯醇。在控释基质制剂中,该基质材料还可以包括,例如,水合甲基纤维素、巴西棕榈蜡和硬脂醇,卡波姆934(carbopol 934)、硅酮、三硬脂酸甘油酯、丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯、聚乙烯、和/或卤化氟烷。

[0141] 含有一种或多种治疗化合物的控释组合物还可以是飘浮片剂或胶囊形式(例如,在口服施用后,漂浮在胃内容物之上持续一定时间段的片剂或胶囊)。一种或多种化合物的飘浮片剂制剂可以通过将一种或多种化合物与赋形剂以及20-75% w/w的水状胶质(例如羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、或羟丙基纤维素)的混合物进行粒化来制备。然后将所得颗粒

压制成片剂。在与胃液接触后,该片剂在它的表面周围形成了基本上不透水的凝胶屏障。该凝胶屏障参与保持小于一的密度,从而使该片剂仍然漂浮在胃液中。

[0142] 联合治疗

[0143] 任选地,本发明的嵌合抗体治疗剂可以与任何其他化学治疗剂联合施用;此类方法对技术人员而言是已知的并且在E. W. Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中进行描述。

[0144] 试剂盒

[0145] 本发明提供了用于治疗或预防肿瘤的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包括含有以单位剂型的治疗有效量的嵌合抗体的治疗或预防组合物。在一些实施方案中,试剂盒包含无菌容器,在无菌容器中含有治疗或预防的细胞组合物;这样的容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、薄膜包装、或本领域已知的其他合适的容器。这样的容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔、或合适用于盛装药物的其他材料。

[0146] 如果需要,提供本发明的嵌合抗体联同用于将嵌合抗体施用于具有癌症(例如,黑色素瘤、乳腺癌)或发展癌症(例如,黑色素瘤、乳腺癌)的风险的受试者的说明。该说明将通常包括关于使用组合物用于治疗或预防肿瘤的信息。在其他实施方案中,该说明包括至少下列之一:治疗剂的描述;用于治疗或预防局部缺血或其症状的剂量时间表和施用;注意事项;警告;标志;禁忌症;过剂量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考文献。该说明可以直接印刷在容器上(如果存在),或作为施加到容器的标签,或者作为容器中或与容器提供的单独页、小册、卡片、或文件夹。

[0147] 除非另外指明,本发明的实施使用很好地处在技术人员的见识范围之内的分子生物学(包含重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术。此类技术在文献中给予充分地说明,所述文献如:

[0148] "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 第二版 (Sambrook, 1989);
 "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987);
 "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996),
 "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller 和 Calos, 1987); "Current
 Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain
 Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991).

[0149] 这些技术适用于本发明的多核苷酸和多肽的生产,以及,按照这样,可以被考虑用于制备和实施本发明。对具体实施方案特别有用的技术将在下面的部分进行讨论。

[0150] 给出以下的实施例是为了给本领域普通技术人员提供对如何进行和使用本发明的测定、筛选和治疗方法的完整的公开和说明,而不是旨在限定发明人认为是自己的发明的范围。

实施例

[0151] 实施例1:MAb 4C5缺乏重链。

[0152] 在还原性和非还原性SDS-PAGE下研究从杂交瘤培养物中分离的mAb 4C5的电泳迁移性。该分析显示,该鼠单克隆抗体不是常规的IgG分子。当纯化的mAb 4C5经受还原性SDS-

PAGE、然后为用抗小鼠Fab抗体的免疫印迹时,没有观察到分别对应于常规IgG抗体的抗体轻(L-)和重(H-)链的典型的25 kDa和50 kDa条带。反而看到约25 kDa的单一一条带(图1A)。有趣的是,在用抗 κ L链抗体免疫印迹后,获得相同的25 kDa单一一条带(图1A)。相应地,在非还原性电泳和随后用两种上述抗体免疫印迹后,显示mAb 4C5比常规IgG1分子显著更小,因为它以约50 kDa而不是150 kDa迁移(图1A)。最后,mAb 4C5在还原性和非还原性条件下电泳和随后用抗Fc γ 抗体western印迹分析后,没有检测到免疫反应性(图1A)。总而言之,这些数据表明,或者mAb 4C5缺乏其H链的部分,或者mAb 4C5完全没有H链。

[0153] 为了进一步探索这些可能性,进行了IgG1 H-链cDNA的Northern印迹分析以及PCR扩增。与阳性对照相比,当源自mAb 4C5杂交瘤和NS0骨髓瘤细胞的RNA(阴性对照)与H链探针杂交时没有检测到放射活性(图1B)。这些结果表明,mAb 4C5可能完全缺乏H链基因。H链PCR扩增实验进一步证实了这一点。为了扩增mAb 4C5的H链cDNA,分别在几个分开的PCR反应中测试针对基因的5'和3'的一组8种小鼠通用引物和polyA+引物。在所有测试的条件下,没有观察到特异性的H链PCR产物的扩增。这些组合数据表明,4C5mAb没有H链。

[0154] 实施例2: 构建人-小鼠嵌合抗体

[0155] 从4C5表达杂交瘤分离编码mAb 4C5的cDNA。使用通用小鼠L链引物进行从第一链cDNA模板初始扩增mAb 4C5 κ 链基因。然后将对应于全长mAb 4C5 L链的约650 bp PCR产物亚克隆到pComb3H载体的SacI和XbaI限制性位点中。克隆的mAb 4C5 L链的序列分析表明,它属于 κ 链亚组I(图2)。

[0156] 通过用对应的人C κ 结构域替代小鼠mAb 4C5 C κ 而构建人-小鼠嵌合4C5抗体。几种重组克隆的序列分析证实了嵌合小鼠-人4C5的成功构建。重组4C5和嵌合4C5抗体都以可溶形式表达于细菌上清液中,并且进行纯化。纯化抗体的电泳迁移性在还原性和非还原性条件下用SDS-PAGE进行测试,并且发现与初始mAb 4C5抗体的对应迁移性是类似的(图3)。

[0157] 实施例3: 嵌合4C5特异性识别HSP90。

[0158] 为了探索重组L链的特异性,在MDAMB453乳腺癌细胞裂解物中使用商业上可获得的多克隆抗HSP90 α 抗体(从Chemicon获得)、mAb 4C5、重组4C5和嵌合4C5进行western印迹分析。在所有情况下,都观察到单一相同的免疫反应条带(图4A),证实了小鼠重组L链和嵌合的人-小鼠L链保留了亲本mAb 4C5的特异性。通过在预先澄清的MDAMB453细胞裂解物中使用多克隆抗HSP90 α 进行的免疫沉淀实验和随后用mAb 4C5、重组4C5和嵌合4C5的免疫印迹进一步证实了这一点。在所有情况下,都观察到单一的免疫反应条带,表明嵌合轻链特异性识别HSP90(图4B)。当使用mAb 4C5、重组4C5和嵌合4C5进行免疫沉淀和随后用多克隆抗HSP90 α 抗体进行western印迹时,获得相同的结果(图4C)。在所有的实验中,使用无关小鼠IgG作为阴性对照。

[0159] 实施例4: 人/小鼠嵌合轻链抗体结合至细胞表面,并且没有被MDAMB453细胞内化

[0160] 以前的研究已经显示,mAb 4C5特异性结合表面HSP90。为了研究嵌合4C5抗体是否还保留了该特征,未固定的MDAMB453培养物与重组4C5和嵌合4C5 L-链孵育,并且在培养2小时后,将细胞小心洗涤、固定、并用荧光缀合的二级抗体标记。因此,一级抗体仅仅进入细胞的外表面。观察的典型标点的免疫染色证实了HSP90的细胞表面定位(图5A)。使用商业的抗HSP90 α 和当然的mAb 4C5获得了类似结果(图5A)。值得注意的是,与mAb 4C5类似,嵌合4C5以及重组4C5也识别细胞内HSP90,正如MDAMB453细胞的固定和通透后的免疫荧光法所

证明的(图5B)。最后,在各种时间间隔监测两种L链抗体与活MDAMB453的结合。在与抗体在37°C孵育后,将细胞固定、通透、并用荧光缀合的二级抗体染色。显示,与mAb 4C5类似并且与抗HSP90 α 相比,重组和嵌合4C5没有被内化,但保持结合在细胞表面上(图5C)。

[0161] 实施例5:嵌合轻链没有影响细胞内HSP90的功能

[0162] 通过监测某些HSP90细胞内客户蛋白(client proteins)的水平研究嵌合L链抗体的细胞不透性的重要性。迄今为止,已经鉴定了多于一百种细胞内HSP90客户蛋白。细胞通透的HSP90抑制剂诱导这些蛋白的降解,因为它们稳定性取决于细胞内HSP90功能。因为数据表明mAb4C5、重组4C5和嵌合4C5都可能是细胞不透的,检查它们影响三种充分表征的细胞内HSP90客户蛋白(Akt、cRaf、和ErbB2)的稳定性能力。将MDAMB453乳腺癌细胞与指定浓度的mAb 4C5、重组4C5或嵌合4C5孵育,随后通过western印迹监测Akt、cRaf和ErbB2水平。如图5D中所示,测试的抗体没有影响任何HSP90客户蛋白的稳态水平。

[0163] 实施例6:在伤口愈合测定中嵌合轻链抗体抑制MDAMB453和B16 F10癌细胞侵袭

[0164] 以前的研究已经显示,在伤口愈合测定中mAb 4C5抑制MDAMB453乳腺癌和B16 F10黑色素瘤细胞侵袭。为了确定嵌合抗体是否表现出与亲本mAb 4C5相同的功能特性,使用MDAMB453和B16 F10癌细胞进行体外伤口愈合测定。如图6A和6B中所示,与对照培养物相比,培养基中存在嵌合4C5显著降低48小时后迁移间隔内MDAMB453癌细胞侵袭的速率。MDAMB453侵袭的抑制率与当培养基中包括抗HSP90 α 以及亲本mAb 4C5和重组4C5时观察的抑制率是类似的(图6A和B)。在伤口愈合测定中使用B16 F10黑色素瘤细胞和渐增浓度的嵌合4C5获得了类似的结果(图6C和6D)。有趣的是,黑色素瘤细胞侵袭的抑制是剂量依赖性的,表明抗体的特异性(图6D)。对照培养物在单独的培养基中,或在含有200 μ g/ml无关IgG1抗体的培养基中生长。重要的是注意,在使用的两种类型的对照之间没有观察到统计学显著性差异。显示的对照值是两种类型的对照的平均值。

[0165] 应当指出的是,抗HSP90 α 抗体对MDAMB453细胞的侵袭率的抑制作用至少在很大部分是由于细胞死亡增加,正如台盼蓝染色所判断的(图6E)。相比之下,当用mAb 4C5和嵌合4C5处理培养物时,细胞死亡率与在对照培养物中观察的死亡率类似(图6E)。该结果进一步支持,嵌合4C5,与多克隆抗HSP90 α 抗体相比,没有被内化,因此不影响对于细胞存活重要的HSP90的细胞内池。

[0166] 最后,使用荧光标记的鬼笔环肽关于肌动蛋白重排动力学对上述培养物进行研究。当培养物暴露于嵌合L链时,观察到与对照培养物相比更少的细胞扩散,并且看到表明非迁移细胞的形态学。此外,当这些培养物以更高的放大率进行可视化时,与对照培养物中MDAMB453的板状伪足相比,板状伪足的发展和铺开更少(图6F和6G)。这些结果与以前公开的关于mAb 4C5对肌动蛋白重排和板状伪足发展的数据一致。

[0167] 实施例7 在集落形成测定中嵌合轻链抗体显著降低由MDAMB231人乳腺癌细胞形成的每个个体集落中的细胞数量。

[0168] 为了研究嵌合4C5影响MDAMB231人乳腺癌细胞形成集落的能力,进行集落形成测定。当培养物暴露于嵌合L链时,当与对照培养物相比时,观察到每个个体集落中的细胞数量的显著降低。该结果表明,嵌合抗体对人乳腺癌集落的发展具有抑制细胞生长的作用。

[0169] 本文报道的实验描述了命名为mAb 4C5的抗HSP90鼠单克隆抗体的克隆和测序。更重要的是,发现mAb 4C5不是常规的IgG分子,而是完全没有H链,并且由 κ 轻链二聚体组成。

这一点最初由在变性和非变性条件下的SDS-PAGE电泳所支持,所述电泳分别表明mAb 4C5在约26 - 和50-kDa的非常规的迁移。此外,当从产生mAb 4C5的杂交瘤细胞系分离的总RNA经受使用IgG1 H链cDNA放射性标记的探针的northern印迹杂交时,不能检测到放射性。与上述结果一致,使用通用的小鼠H链引物不能扩增到H链cDNA。最后,mAb 4C5的非凡性质得到了毫无疑问的证实,因为在细菌中表达的重组 κ 轻链被显示保留了亲本抗体的所有特性,包括抗原结合和癌细胞侵袭的体外抑制。

[0170] 这种单克隆抗体最初通过用15天龄的大鼠胚胎的脑膜部分免疫小鼠而产生(Thomaidou D, Patsavoudi E. Identification of a novel neuron-specific surface antigen in the developing nervous system, by monoclonal antibody 4C5. *Neuroscience*.1993; 53:813-27),并且显示它特异性识别并抑制表面HSP90在细胞迁移过程期间的功能(Sidera K, Samiotaki M, Yfanti E, Panayotou G, Patsavoudi E. Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J Biol Chem*.2004; 279:45379-88)。此外,显示mAb 4C5显著降低癌细胞的侵袭和转移的速率。更具体地,已表明,这种抗体抑制黑色素瘤细胞侵袭和转移(Stellas D, Karameris A, Patsavoudi E. Monoclonal antibody 4C5 immunostains human melanomas and inhibits melanoma cell invasion and metastasis. *Clin Cancer Res*.2007; 13:1831-8),以及表面HSP90与HER-2的胞外结构域的相互作用,导致下游信号传递受损和体外乳腺癌细胞侵袭速率的随后降低(Sidera K, Gaitanou M, Stellas D, Matsas R, Patsavoudi E. A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER-2. *J Biol Chem*.2008; 283:2031-41)。

[0171] 众所周知的是,鼠抗体由于它们的免疫原性而在人中的体内治疗的用途有限。使用产生嵌合小鼠-人和完全人抗体的基因工程方法已经克服了该问题。考虑到mAb 4C5的非常规性质结合在人源化过程期间抗体亲和力的频繁降低的事实,将鼠mAb重构为功能性的小鼠-人嵌合版本,与亲本抗体类似,所述嵌合版本与表面HSP90结合并抑制癌细胞侵袭。显示通过用对应的人C区替代亲本鼠抗体的C区而工程改造的嵌合抗体保留了亲本小鼠抗体的特异性和亲和力。

[0172] 已经是普遍接受的概念是,抗体分子对于其完全活性需要H和L链(Sastry L, Alting-Mees M, Huse WD, Short JM, Sorge JA, Hay BN, 等人. Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1989; 86:5728-32)。此外,H链被认为是结合自由能的最主要的贡献因素,而L链对抗原结合的贡献被认为是有限的(Novotny J, Bruccoleri RE, Saul FA. On the attribution of binding energy in antigen-antibody complexes McPC 603, D1.3, and HyHEL-5. *Biochemistry*.1989; 28:4735-49; Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*.1989; 341:544-6)。后者则被下列事实进一步支持:骆驼类(cameloids)具有完全缺乏L-链且由H链二聚体组成的一类功能完全的抗体(Hamers-

Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, 等人 Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363:446-8; Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26:230-5)。在这些发现的背景中, 单独的H-链显示与多种抗原以特定的方式相互作用(尽管亲和力比完整抗体更低), 这已经导致了使用源自H链的单一结构域抗体 (Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature*. 1991; 349:293-9)。

[0173] 在过去, 已经零星地显示L-链的抗原结合。无免疫球蛋白轻链的首次报道涉及所谓的Bence-Jones蛋白。这些被报道作为由从人患者的尿中收集的多发性骨髓瘤细胞表达的L链二聚体 (Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet*. 2003; 361:489-91)。此外, 大量的L-链在具有L链分泌肿瘤患者的细胞外液和组织中聚集 (Stevens FJ, Solomon A, Schiffer M. Bence Jones proteins: a powerful tool for the fundamental study of protein chemistry and pathophysiology. *Biochemistry*. 1991; 30:6803-5)。在1993年, Mei Sun等人 (Sun M, Li L, Gao QS, Paul S. Antigen recognition by an antibody light chain. *J Biol Chem*. 1994; 269:734-8) 报道, 从针对血管活性肠肽 (VIP) 的单克隆抗体纯化的L链显示出对VIP的序列特异性和高亲和力结合。相应地, Nishimura E等人 (Nishimura E, Mochizuki K, Kato M, Hashizume S, Haruta H, Shirahata S, 等人. Recombinant light chain of human monoclonal antibody HB4C5 as a potentially useful lung cancer-targeting vehicle. *Hum Antibodies*. 1999; 9:111-24) 报道了重组产生表现出与完整抗体相比显著更高的与抗原结合活性的 λ 轻链。此外, 作者提出证据: 这种重组轻链可以充当用于临床用途如肺癌的放射免疫成像和放射免疫治疗的潜在有用的载体。也已经报道, 由小鼠杂交瘤产生的抗体L链二聚体与人黑色素瘤组织反应 (Masat L, Wabl M, Johnson JP. A simpler sort of antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:893-6)。在1998年, Pereira B等人 (Pereira B, Benedict CR, Le A, Shapiro SS, Thiagarajan P. Cardiolipin binding a light chain from lupus-prone mice. *Biochemistry*. 1998; 37:1430-7) 显示, 单一L链可变序列含有对于心磷脂结合必要的所有决定因素, 其具有与完整抗体类似的亲和力。新近, Dubnovitsky AP等人 (Dubnovitsky AP, Kravchuk ZI, Chumanovich AA, Cozzi A, Arosio P, Martsev SP. Expression, refolding, and ferritin-binding activity of the isolated VL-domain of monoclonal antibody F11. *Biochemistry (Mosc)*. 2000; 65:1011-8) 报道, 针对铁蛋白的单克隆抗体的重组VL结构域保留了其抗原结合功能, 并且VL结构域的抗原结合常数与全长亲本抗体的抗原结合常数相当。

[0174] 本文报道的结果代表了L链二聚体具有功能阻断活性的首个实验证据。更具体地, 本工作表明, 由L链二聚体组成的重组和嵌合4C5具有高比活性, 正如通过使用乳腺癌细胞的免疫印迹和免疫荧光实验所检查的。此外, 与亲本抗体类似, 它们表现出功能阻断特性, 正如体外伤口愈合测定中所判断的。这些结果提供了对于L链抗体的临床应用中的综合方法的新的认识。当用于人治疗剂时, 重组L链抗体相对于通常抗体和VH抗体具有多种优势, 即, 容易和可重复的生产且具有恒定质量、更高溶解性和抗聚集性、从循环系统更快的清

除,等等。尤其在mAb 4C5的情况下,两个额外的属性使得其嵌合化对于治疗用途是有价值的。首先,其功能性特异性抑制位于细胞表面上的HSP90池而不干扰细胞内的HSP90功能的能力;其次,由于其主要的人组成导致的其在临床设置中免疫原性最低。因此,嵌合Ab 4C5的开发代表了在开发用于治疗人恶性肿瘤的新的HSP90抑制剂中的重要步骤。

[0175] 使用下列方法和材料获得了上述结果。

[0176] RNA 和DNA操作

[0177] 根据制造商的说明使用基于二氧化硅的纤维基质上的吸收从 10^7 杂交瘤细胞中分离总RNA(从Stratagene获得的Absolutely RNA Mini Prep试剂盒)。对于Northern印迹分析,将25 ug RNA在琼脂糖凝胶上通过电泳分离,转移至带正电荷的尼龙膜(从Biorad获得的Zeta-Probe),并与标记的1.2- kb重链IgG1a cDNA探针杂交。对于VH和VL抗体片段的扩增,根据制造商的说明通过逆转录合成并使用polyT寡核苷酸作为引物合成特定的第一链cDNA(从Roche 获得的用于RT-PCR的第一链cDNA合成试剂盒)。随后使用如表1所示的特异性小鼠免疫球蛋白引物通过PCR扩增cDNA。

[0178] 表1:鼠IgG1免疫球蛋白PCR引物

[0179]

重链Fd 3'引物
H3: 5'-AGG CTT ACT AGT ACA ATC CCT GGG CAC AAT-3'
重链可变5'引物
H5'1: 5'-AGG TCC AGC TGC TCG AGT CTG G-3'
H5'2: 5'-AGG TCC AGC TGC TCG AGT CAG G-3'
H5'3: 5'-AGG TCC AGC TTC TCG AGT CTG G-3'
H5'4: 5'-AGG TCC AGC TTC TCG AGT CAG G-3'
H5'5: 5'-AGG TCC AAC TGC TCG AGT CTG G-3'
H5'6: 5'-AGG TCC AAC TGC TCG AGT CAG G-3'
H5'7: 5'-AGG TCC AAC TTC TCG AGT CTG G-3'
H5'8: 5'-AGG TCC AAC TTC TCG AGT CAG G-3'
鼠κ轻链3'引物
L3': 5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CAT TCC TGT TGA A-3'
鼠轻链可变5'引物
L5'6: 5'-CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA-3'

[0180] 将扩增的L链cDNA片段插入pComb3H噬菌粒(Drs. C. F. Barbas和D. R. Burton

友情提供,The Scripps Research Institute, La Jolla, CA)的SacI/XbaI限制性位点,并在分子生物学与生物技术研究所(Institute of Molecular Biology and Biotechnology)(IMBB)的序列设施进行双向测序。重排的VL序列的种系对应物使用国家生物技术信息中心IgBLAST服务器(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)进行分析,并且使用ClustalW软件比对序列。

[0181] 小鼠-人嵌合Ab 4C5的构建

[0182] 通过将mAb 4C5 VL cDNA与人C κ 基因区段融合而构建小鼠-人嵌合抗体。简而言之,将mAb 4C5的 κ 轻链亚克隆到pBluescript SK质粒中,然后用含有人C κ 的BsgI/XbaI限制性片段替代含有小鼠C κ 区的BsgI/XbaI片段。最后,将mAb 4C5的嵌合 κ L链基因插入pComb3H的SacI/XbaI位点。所有DNA操作根据(Sambrook, J.,等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.1989)进行。

[0183] 小鼠和嵌合L链的表达和纯化

[0184] 如前所述,可溶性重组抗体轻链从个体细菌集落产生(Barbas, C.F. 3rd和Burton, D.R., Monoclonal Antibodies from Combinatorial Libraries, 1994),并且细菌周质级分根据(Charlton, K.A., Expression and Isolation of Recombinant Antibody Fragments in E. coli., Methods Mol. Biol. 2004; 248:245-54)进行提取,并且根据制造商的说明使用在FPLC AKTA系统(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)上的蛋白L柱(PIERCE, USA)通过亲和层析进行纯化。

[0185] 还原性和非还原性SDS-PAGE

[0186] 将含有抗体的FPLC级分合并在一起,并通过离心通过渗析膜(从Millipore 获得的Amicon Ultra离心过滤装置)而浓缩。如前所述,使用Laemmli不连续系统在还原性和非还原性条件下测试小鼠、重组和嵌合抗体的电泳迁移性(Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4., Nature.1970; 227:680-5)。抗体通过Coomassie-R染色或通过使用特异性二级HRP缀合的抗 κ 链抗体的western印迹进行显现。

[0187] 制备细胞裂解物、免疫沉淀和western印迹分析

[0188] 如前所述获得MDAMB453癌细胞裂解物并定量(Thomaidou, D.和Patsavoudi, E., Identification of a Novel Neuron-specific Surface Antigen in the Developing Nervous System, by Monoclonal Antibody 4C5., Neuroscience.1993; 53:813-27),将等量总蛋白进行SDS-PAGE并转移到硝酸纤维素上。将膜印迹,在室温下与含有0.05% Tween-20的tris-缓冲盐水("TBS")中的脱脂干奶(5%)孵育40 min以封闭非特异性结合位点,然后与特异性一级抗体在4℃孵育过夜。将膜用TBS中的0.3%牛血清白蛋白("BSA")洗涤,并且在室温下与辣根过氧化物酶标记的抗 κ 链二级抗体孵育2小时。用TBS洗涤后,如制造商所述,使用DAB或/和化学发光试剂(从Amersham 获得的ECL化学发光试剂)检测结合的抗体复合物,并且暴露于X射线胶片(从Kodak 获得的XOMAT-AR胶片)。

[0189] 如前所述进行免疫沉淀(Sidera, K.等人, A Critical role for HSP-90 in Cancer Cell Invasion Involves Interaction with the Extracellular Domain of HER-2., J. Biol. Chem., 2008; 283:2031-41)。简而言之,将等量预先澄清的MDAMB453

癌细胞裂解物与抗体在4℃孵育过夜。然后将免疫复合物在室温与蛋白G-琼脂糖孵育2小时,并用裂解缓冲液洗涤3次。结合的蛋白通过凝胶电泳和随后的western印迹进行分析。对于所有免疫沉淀实验,使用无关IgG进行阴性对照。

[0190] 细胞培养和免疫荧光

[0191] 将MDAMB453乳腺癌细胞系维持在补充10%胎牛血清(“FBS”)的RPMI中。对于免疫荧光研究中,将细胞以 5×10^4 细胞/孔的密度铺板在48孔板中的聚-L赖氨酸包被的盖玻片上,并在补充10% FBS的RPMI培养基中培养。24 h后,如前所述,将细胞固定并处理,用于间接免疫荧光(Thomaidou, D.和Patsavoudi, E., Identification of a Novel Neuron-specific Surface Antigen in the Developing Nervous System, by Monoclonal Antibody 4C5., Neuroscience.1993; 53:813-27)。如前报道,将活的MDAMB453细胞通过间接免疫荧光进行标记(Sidera, K.等人, Involvement of Cell Surface HSP90 in Cell Migration Reveals a Novel Role in the Developing Nervous System., J. Biol. Chem., 2004; 279:45379-88)。Alexa546标记的鬼笔环肽(Molecular Probes, Eugene, OR)用于显现F-肌动蛋白。对于所有实验,通过省略一级抗体或/和通过使用针对无关的神经元蛋白BM88的IgG2a单克隆抗体进行对照。免疫荧光通过使用Leica TSC共聚焦显微镜的共聚焦显微镜进行分析。

[0192] 抗体内化测定

[0193] MDAMB453细胞与相等浓度的抗体在培养的同时细胞孵育2、8和24小时。然后将细胞在RPMI中洗涤并固定。为了检测任何内化的抗体,用PBS中的0.1% Triton X-100将细胞通透,并且随后与Alexa488缀合的二级抗体(Molecular Probes, Eugene, OR)孵育。对于所有实验,如上所述进行对照。

[0194] 伤口愈合测定

[0195] 如前所述进行测定(Sidera, K.等人, A Critical role for HSP-90 in Cancer Cell Invasion Involves Interaction with the Extracellular Domain of HER-2., J. Biol. Chem., 2008; 283:2031-41)。简而言之,将MDAMB453和B16 F10分别以 1×10^5 和 2.5×10^5 细胞/孔的密度铺板在48孔板中聚-L赖氨酸包被的盖玻片上。24小时后,将培养基更换为无血清的RPMI,16小时后,通过用无菌黄色Gilson移液器尖端轻轻刮擦细胞单层而产生无细胞区域,从而导致形成约1 mm宽的无细胞区域。刮擦后立即,将培养基用含有抗HSP90 α 抗体、mAb 4C5、重组4C5或嵌合4C5的新鲜培养基替代。所有试剂保持在培养物中,持续测定的时间。

[0196] 对照培养物在单独的培养基(RPMI)中,或在含有针对无关蛋白BM88的IgG2a单克隆抗体(浓缩的无血清杂交瘤上清液)的培养基中生长。使用配备与计算机连接的LEICA DM300视频相机的Leica DM IL倒置显微镜,以给定的时间间隔显微镜监测在间隙内的癌细胞的迁移。使用Image Pro Plus分析软件通过获取和分析数字图像评价迁移距离,并表示为在对照培养物中细胞覆盖的百分比距离。使用Student's T检验进行统计学分析。

[0197] 台盼蓝染色

[0198] 在伤口愈合测定的结束点,将MDAMB453细胞与PBS中的0.4%台盼蓝孵育5分钟。除去过量的染料并且在Leica显微镜中观察细胞。

[0199] 集落形成测定

[0200] 如前所述进行集落形成测定(Franken N等人, .Clonogenic assay of cells in vitro Nature Protocols 2006;1;2315-2319)。简而言之,将MDAMB231单细胞悬浮液以500细胞/孔的密度接种于6孔培养板上,在单独的培养基中或在含有200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 嵌合4C5培养基中培养。培养基每三天更换一次,集落继续生长2周,然后用姬姆萨染色。

[0201] 其他实施方案

[0202] 从上述的描述中看出,很明显可以对本文描述的本发明进行变体和修改以使其适合于不同的用途和条件。这样的实施方案也在下述权利要求的范围内。

[0203] 在此的变量的任何定义中的一系列要素的详述包括作为所列出要素的任何单个要素或组合(或子组合)的那个变量的定义。本文的实施方案的详述包括作为任何单个实施方案或与任何其他实施方案或其部分结合的实施方案。

[0204] 通过引用并入

[0205] 本文引用的所有专利、公开的专利申请和其他参考文献的完整内容都在此处完整地通过引用清楚地并入本文。

[0206] 等同内容

[0207] 仅仅使用常规实验,本领域技术人员将认识到或者能够确定本文所述的特定程序的许多等同内容。这样的等同内容被视为在本发明的范围内,并被下列权利要求所涵盖。

[0208] 序列表

[0209] 序列表SEQ ID NO:1对应于mAb 4C5的核苷酸序列。

[0210]

```
GAGCTCGTCATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGA
GAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAAGCTG
GTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCGTGATCTATCGTGGCAAAC
AGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTGAGTGGCAGTGGATCTGGGCAA
GATTATCTCTCACCATCAACAGCCTGGAGTATGAAGATATGGGAATTTATT
ATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCTCGGCTCACGTTCCGGTGTCTGGGACCAG
GCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCA
TCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACA
ACTTCTATATCAAAGACATCAATGTCAAGTGGGAAGATTGATGGCAGTGAAC
GACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCA
CCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGAC
ATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTCACCCATTGT
CAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
```

[0211] 序列表SEQ ID NO:2对应于mAb 4C5的氨基酸序列。

[0212]

```
ELVMTQSPSSMYASLGERVTHICKASQDINSYLSWFQOKPGKSPKTLIYRANRL
VDGVPSRFRSGSGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLOYDEFPRLTFGAGTRLELKR
ADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFYIKDINVKWKIDGSERQNGVLNSW
TDQDSKSTYSMSSTLTTLKDEVERHINSYTC EATHKTTSTSPIVKSFNRNEC
```

[0213] 序列表SEQ ID NO:3对应于嵌合的4C5的核苷酸序列。

[0214]

```
GAGCTCGTCATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGA  
GAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAAGCTG  
GTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTGCAAAC  
AGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAA  
GATTATTCTCTCACCATCAACAGCCITGGAGTATGAAGATATGGGAATTTATT  
ATTGICTACAGTATGATGAGTTTCCTCGGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAG  
GCTGGAGCTGAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGICTTCATCTTCCCAGCA  
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGGACTGCCICTGTTGTGTGCCTGCTGAATA  
ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCC  
AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA  
CCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC  
ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCGTAC  
AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
```

[0215] 序列表SEQ ID NO:4对应于嵌合的4C5的氨基酸序列。

[0216]

```
ELVMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRL  
VDGVPSRFSGSGSQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRLTFGAGTRLELKR  
TVAAPSVMFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[0217] 序列表SEQ ID NO:5对应于4C5的CDR1的氨基酸序列：

[0218] KASQDINSYLS

[0219] 序列表SEQ ID NO:6对应于4C5的CDR2的氨基酸序列：

[0220] RANRLVD

[0221] 序列表SEQ ID NO:7对应于4C5的CDR3的氨基酸序列：

[0222] LQYDEFPRLT

序列表

<110> Bioanalytica SA
Sidera, Katerina
Mamalaki, Avgi
Patsavoudi, Evangelia

<120> 用于治疗肿瘤的组合物和方法

<130> M/52402-PCT

<150> US 61/386,764

<151> 2010-09-27

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 编码mAb 4C5的核苷酸序列

<400> 1

gagctcgtca tgaccagtc tccatcttc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtc ggacattaat agctatttaa gctggtcca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgatc tgggcaagat tattctetca ccatcaacag cctggagtat 240

gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttctctgget cacgttcggt 300

gctgggacca ggctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 360

ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagteg tgtgcttctt gaacaacttc 420

tatatcaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aatggcgctc 480

ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccttc 540

acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 600

acatcaactt cacccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgt 645

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> mAb 4C5的氨基酸序列

<400> 2

Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Tyr

65	70	75	80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg	85	90	95
Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala	100	105	110
Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser	115	120	125
Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Ile Lys Asp	130	135	140
Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val	145	150	155
Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met	165	170	175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser	180	185	190
Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys	195	200	205
Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys	210	215	

<210>	3	
<211>	645	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	嵌合4C5的核苷酸序列	
<400>	3	
	gagctcgtca tgaccagtc tccatcttc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact	60
	atcacttgca aggcgagtc ggacattaat agctatttaa gctggttcca gcagaaacca	120
	gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca	180
	aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcaacag cctggagtat	240
	gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttctctggct cacttcggt	300
	gctgggacca ggctggagct gaaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc	360
	ccatctgatg agcagttgaa atctgggact gcctctgttg tgtgctgct gaataacttc	420
	tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtactcc	480
	caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg	540
	acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcaagt cacccatcag	600
	ggcctgagtt cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt	645
<210>	4	
<211>	215	
<212>	PRT	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	嵌合4C5的氨基酸序列	

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 4C5的CDR1的氨基酸序列

<400> 5

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 4C5的CDR2的氨基酸序列

<400> 6

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1

5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 4C5的CDR3的氨基酸序列

<400> 7

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg Leu Thr

1

5

10

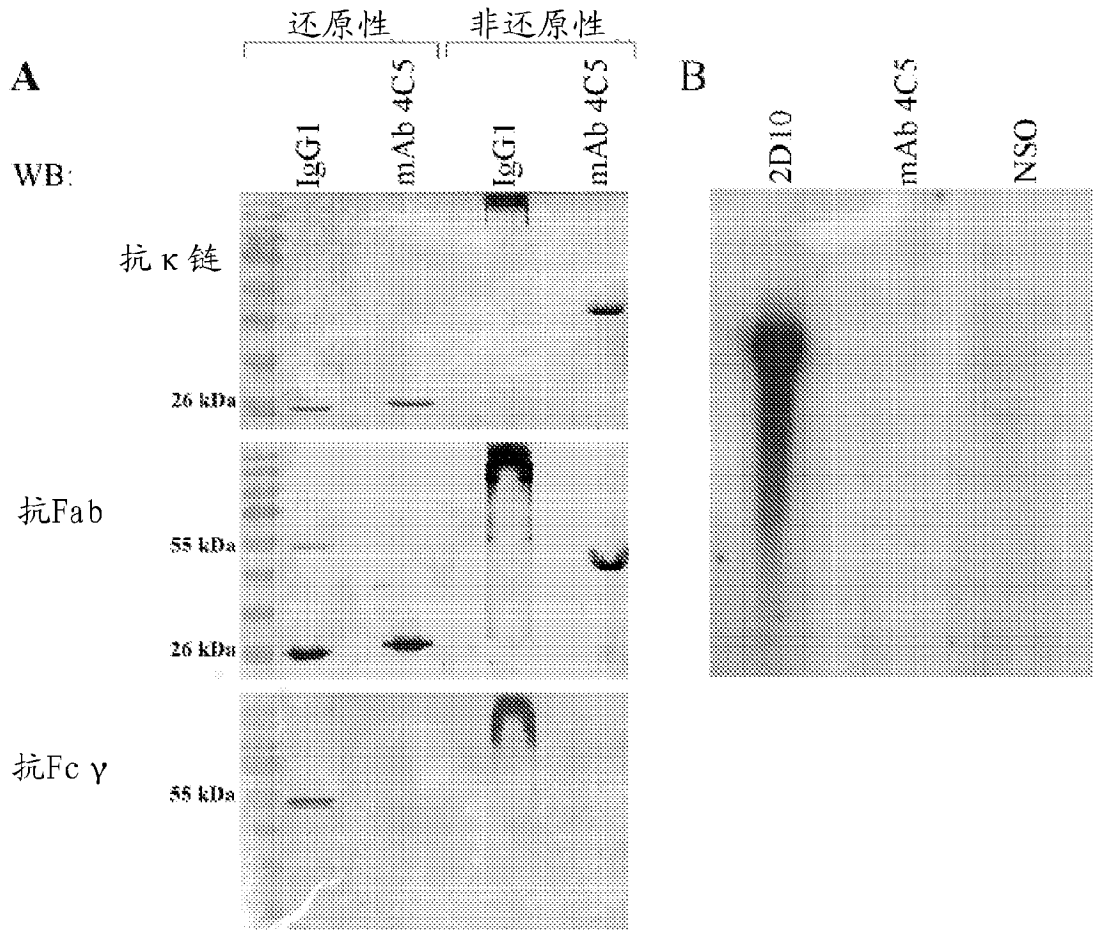


图 1

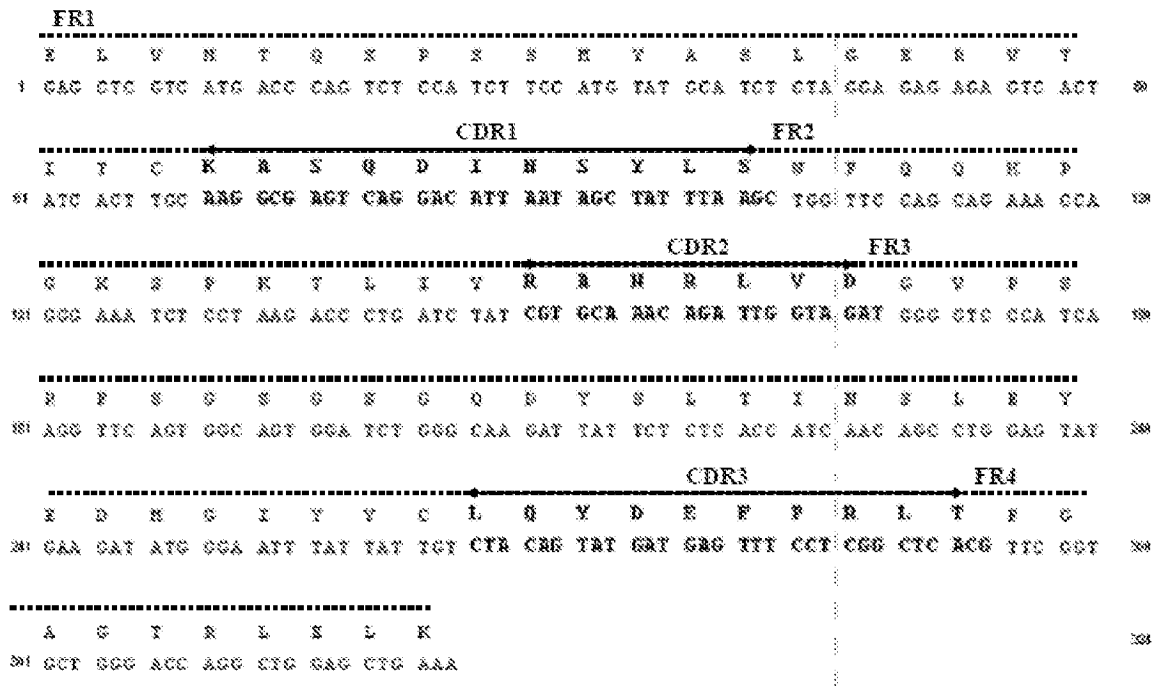


图 2

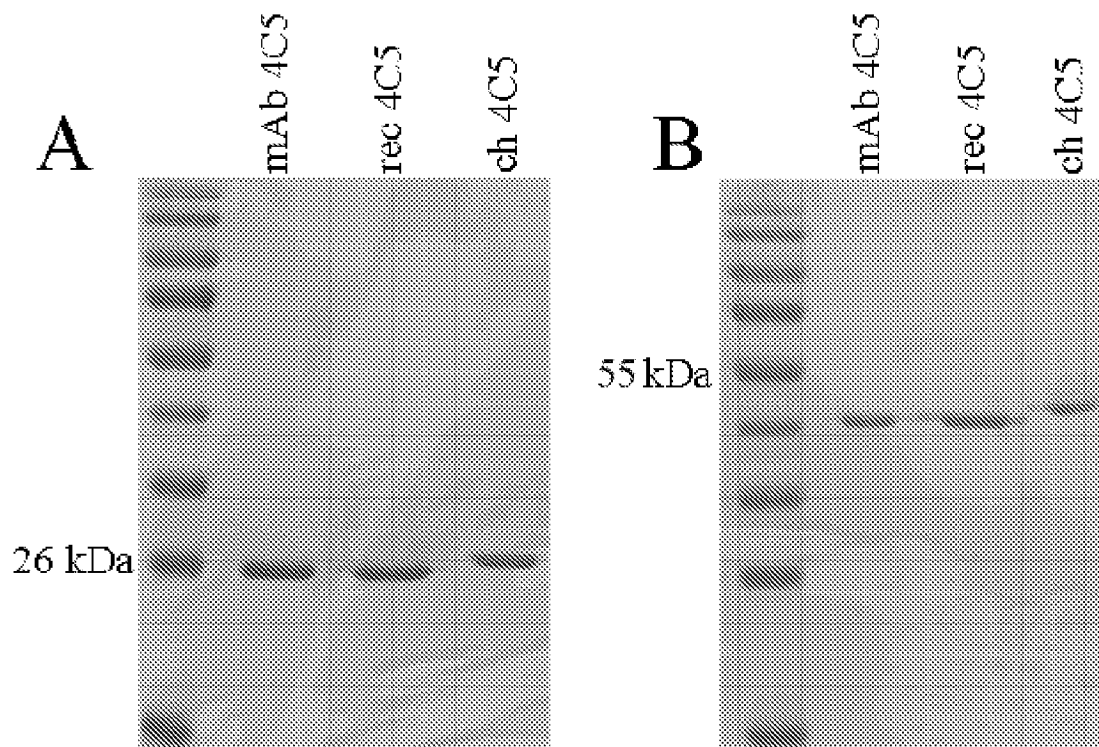


图 3

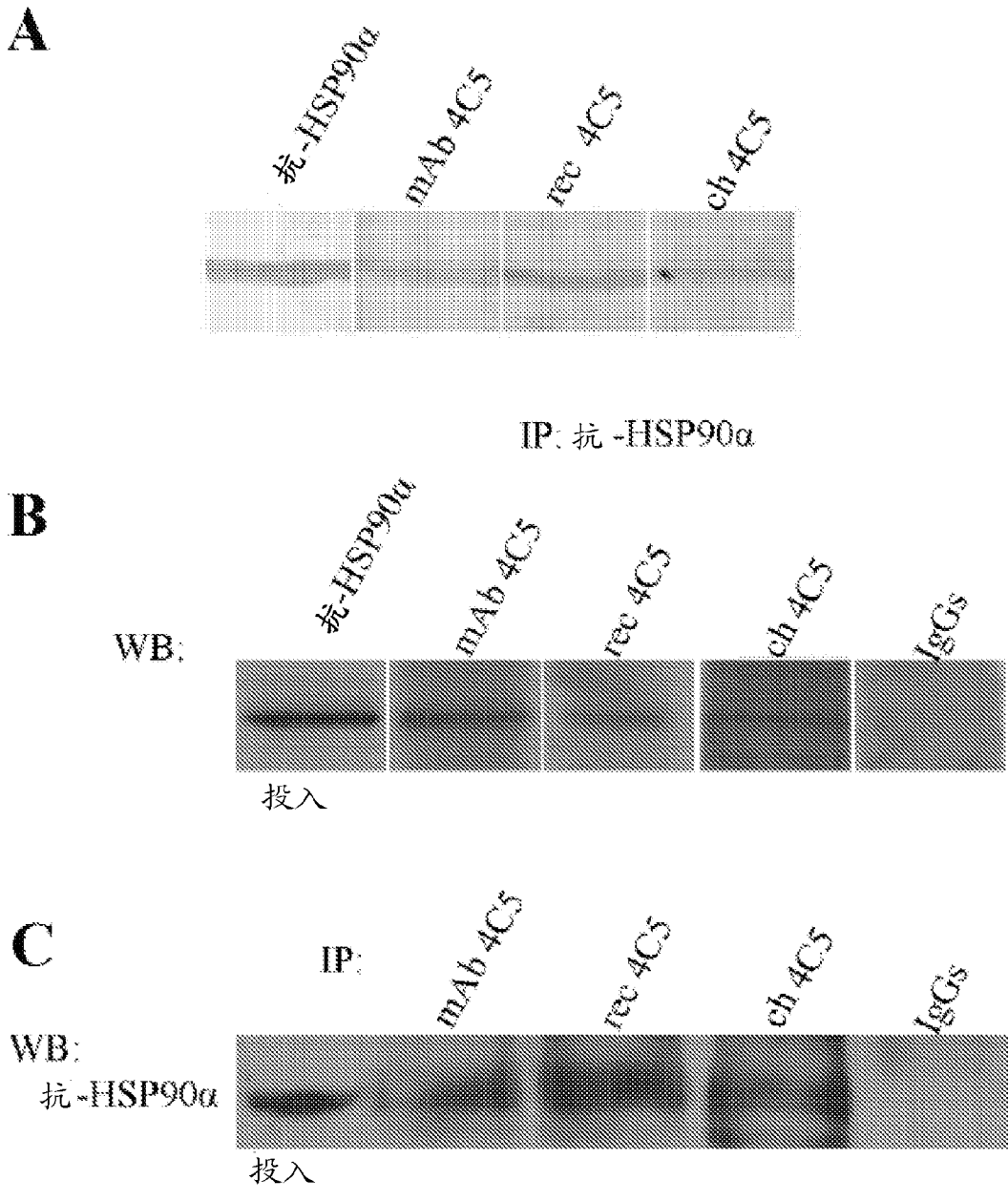


图 4

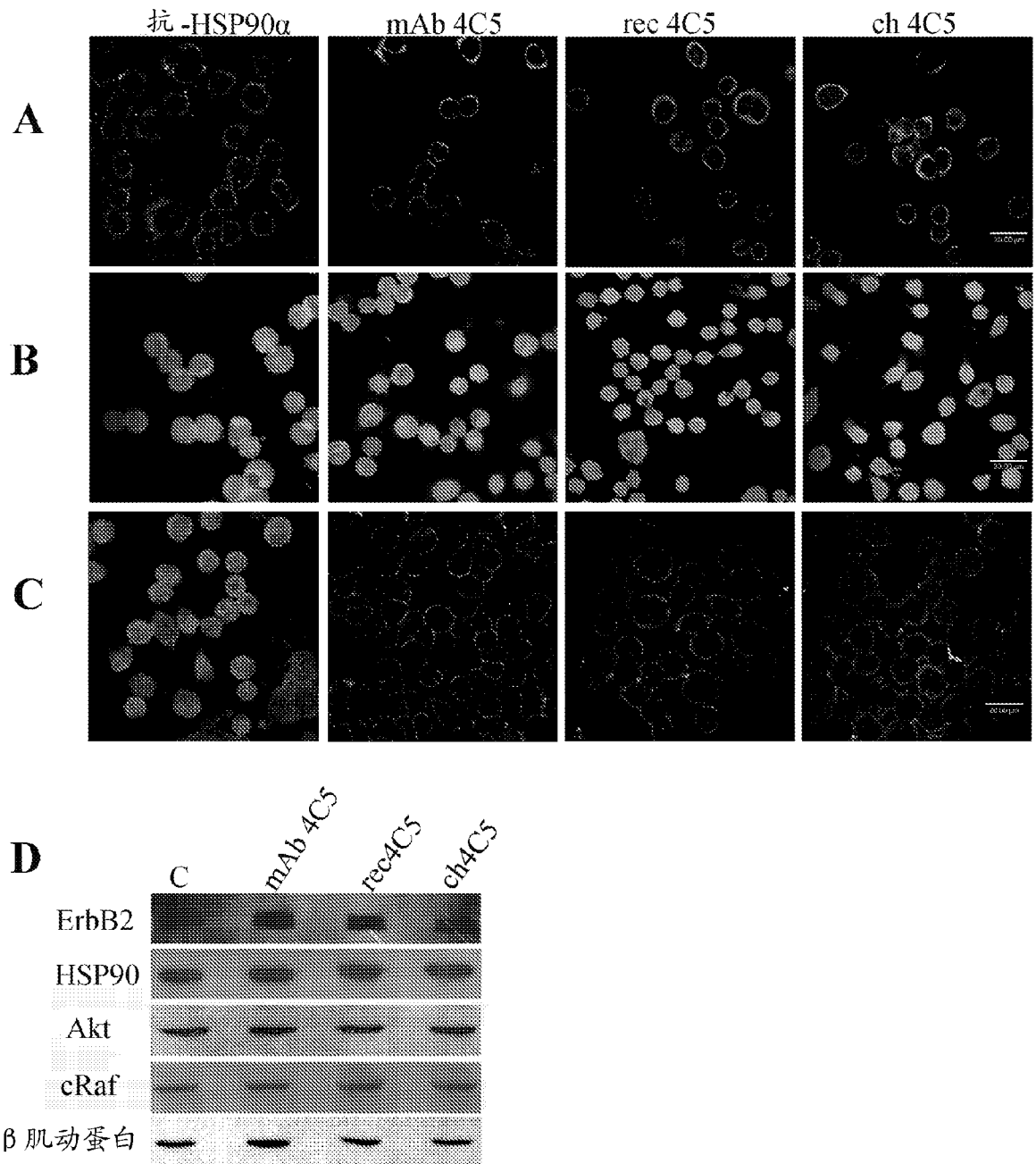


图 5

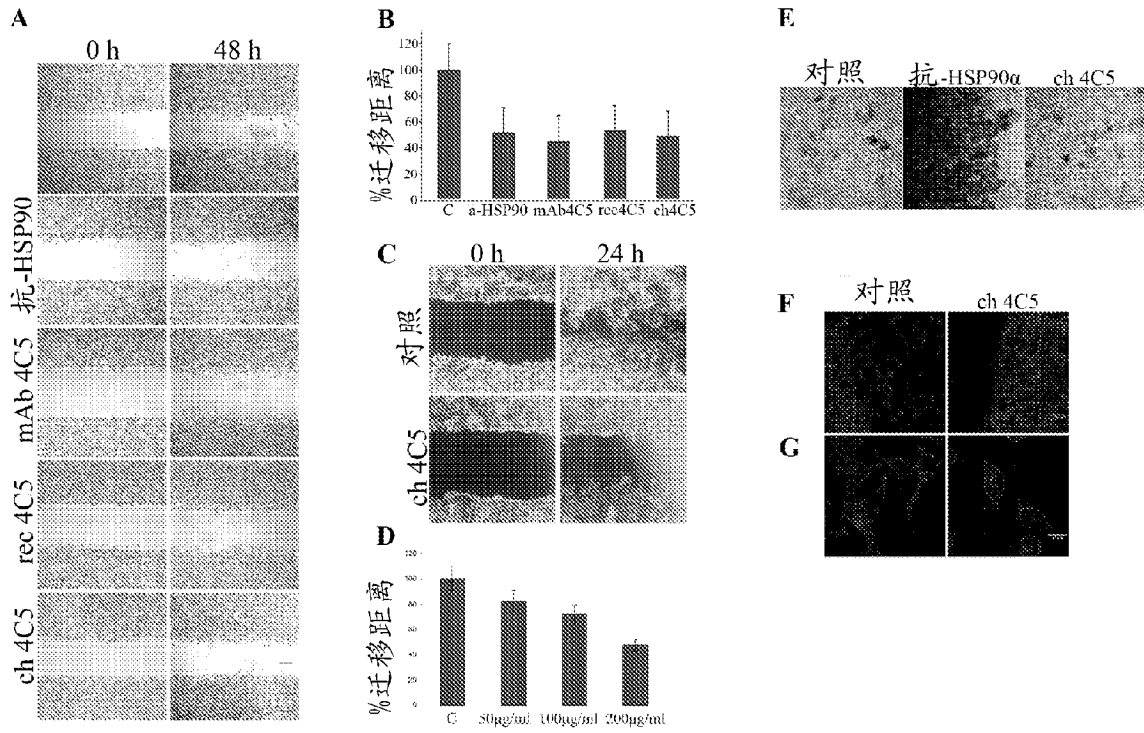
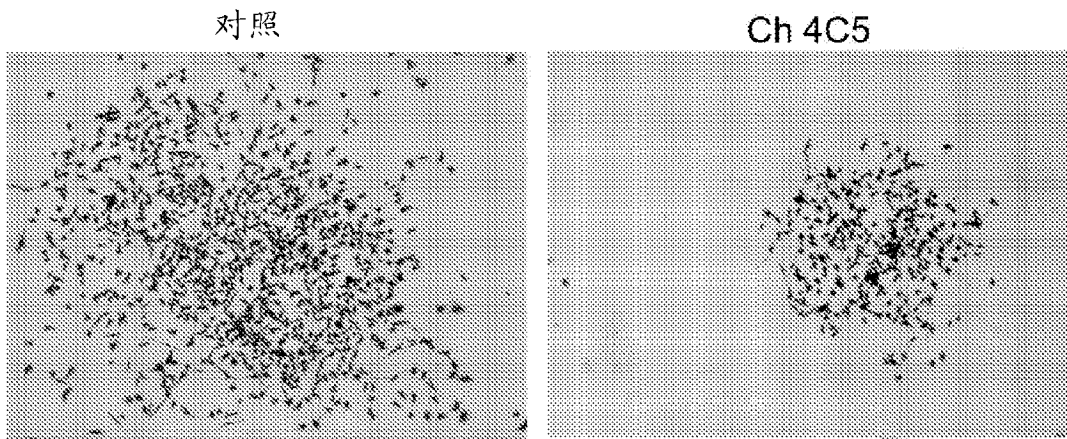


图 6

A



B

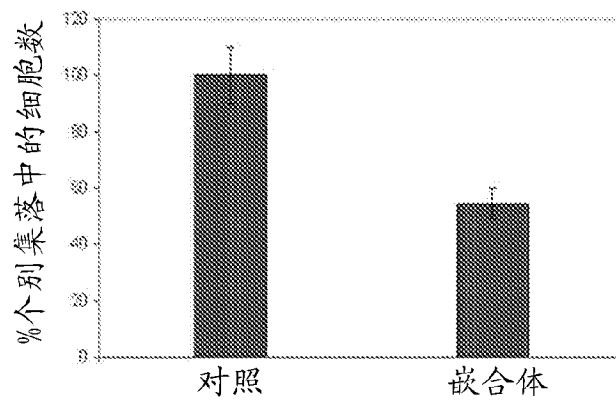


图 7