



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102713623 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201180006262. 3

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所  
11313

(22) 申请日 2011. 01. 20

代理人 郝文博

(30) 优先权数据

(51) Int. Cl.

61/297, 303 2010. 01. 22 US

G01N 33/53(2006. 01)

61/323, 944 2010. 04. 14 US

A61K 39/00(2006. 01)

61/350, 567 2010. 06. 02 US

61/375, 119 2010. 08. 19 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 07. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/021825 2011. 01. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02011/091113 EN 2011. 07. 28

(71) 申请人 免疫医疗公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·V·戈德 D·M·戈登堡

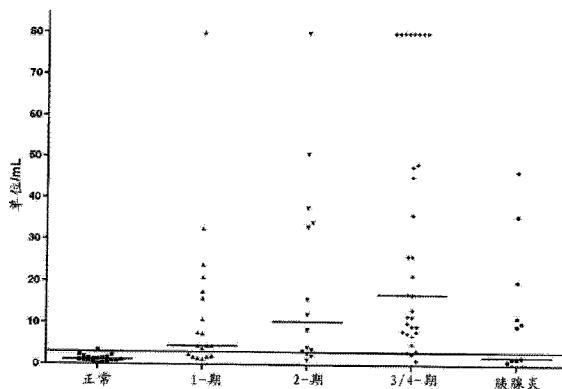
权利要求书 2 页 说明书 80 页 附图 19 页

(54) 发明名称

早期胰腺腺癌的检测

(57) 摘要

本发明描述了使用抗胰腺癌抗体或其片段, 例如鼠、嵌合、人源化或人 PAM4 抗体的组合物和方法。题述抗体表现出许多新的并且有用的诊断特征, 例如以高特异性结合到胰腺癌和其它癌症上, 但不结合到正常胰腺组织上, 以及结合到高百分比的早期胰腺癌上。在优选的实施方案中, 所述抗体结合到胰腺癌粘蛋白上。所述抗体和片段可用于检测和诊断早期胰腺癌。在优选的实施方案中, 所述抗胰腺癌抗体可用于血清样品的免疫测定, 其中所述免疫测定可以检测血清中早期胰腺癌的标记。更优选在免疫测定前用有机相例如丁醇萃取血清。



1. 一种检测或诊断胰腺癌的方法,其包括:
  - a) 从个体获取血液、血清或血浆样品 ;和
  - b) 利用抗胰腺癌抗体进行免疫测定从而检测所述样品中胰腺癌粘蛋白的存在 ;其中所述胰腺癌粘蛋白的存在指示所述个体患有胰腺癌,并且所述血清免疫测定可以检测早期胰腺癌。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定可以检测 1A 期、1B 期和 2 期胰腺癌。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定可以检测 80% 或更多的总胰腺癌。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定可以检测 60% 或更多的 1 期胰腺癌。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定可以检测 54% 的 1A 期胰腺癌。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定可以检测 75% 的 1B 期胰腺癌。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定可以检测 86% 的 2 期胰腺癌。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定可以检测 90% 或更多的 3 期和 4 期胰腺癌。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定对于未患胰腺癌或胰腺炎的对照个体的假阳性率为 5% 或更小。
10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定对于患有慢性胰腺炎的个体的假阳性率为 38% 或更小。
11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血清免疫测定可以检测无症状个体的胰腺腺癌。
12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述样品是血清样品,并且所述方法进一步包括在进行所述免疫测定之前对所述血清样品进行有机相萃取。
13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述有机相是丁醇。
14. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述免疫测定检测 PanIN-1A、PanIN-1B、PanIN-2、侵袭性胰腺腺癌、胰腺癌、粘液性囊性赘生物 (MCN)、胰腺内粘液性赘生物 (IPMN) 和导管内乳头状粘液性瘤变的存在。
15. 一种检测或诊断胰腺癌的方法,其包括:
  - a) 向个体施用抗体构建体,所述抗体构建体包含与嵌合 PAM4 (cPAM4) 抗体结合到相同的表位上或者与嵌合 PAM4 (cPAM4) 抗体竞争结合到胰腺癌粘蛋白上的至少一种抗胰腺癌抗体或抗原结合片段,所述嵌合 PAM4 (cPAM4) 抗体包含轻链可变区 CDR 序列 CDR1 (SASSSVSSSYLY, (SEQ ID NO:1)、CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2) 和 CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3), 以及重链可变区 CDR 序列 CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4)、CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) 和 CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6) ;和
  - b) 检测结合到胰腺癌细胞上的所述抗体构建体。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中使所述抗体构建体在体内或体外暴露于所述样品。
17. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述抗胰腺癌抗体或其片段结合到包含

氨基酸序列 WTNITKAYPLP (SEQ ID NO:29) 的线性肽上, 或者结合到包含氨基酸序列 ACPEWWGTTT (SEQ ID NO:30) 的环状肽上。

18. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述抗体构建体是双特异性或多特异性抗体, 其包含 (i) 至少一种 PAM4 抗体或其抗原结合片段; 和 (ii) 至少一种结合到可靶向构建体上的半抗原上的抗体或片段; 并且所述方法进一步包括施用连接至至少一种诊断剂的可靶向构建体。

19. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段缀合到至少一种诊断剂上。

20. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述诊断剂选自由放射性核素、造影剂、荧光剂、化学发光剂、生物发光剂、顺磁离子、酶和光敏诊断剂组成的组。

21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述诊断剂是选自由以下组成的组的放射性核素:  $^{110}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{120}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{51}\text{Mn}$ 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 $^{83}\text{Sr}$ , 或其它  $\gamma$  发射体、 $\beta$  发射体或正电子发射体。

22. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中所述放射性核素是  $^{18}\text{F}$ , 并且所述方法进一步包括 PET 成像。

23. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述顺磁离子选自由以下组成的组: 铬 (III)、锰 (II)、铁 (III)、铁 (II)、钴 (II)、镍 (II)、铜 (II)、钆 (III)、钆 (III)、镱 (III)、钆 (III)、钆 (II)、铽 (III)、镱 (III)、钆 (III) 和铟 (III)。

24. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述诊断剂是选自由异硫氰酸荧光素、若丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺组成的组的荧光标记化合物, 或选自由鲁米诺、异鲁米诺、芳族吡啶鎓酯、咪唑、吡啶鎓盐和草酸酯组成的组的化学发光标记化合物, 或选自由萤光素、萤光素酶和水母发光蛋白组成的组的生物发光化合物。

25. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述方法用于手术中、内窥镜检查或血管内程序。

26. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述抗体构建体是 DNL (停靠和锁定) 构建体, 其包含 (i) 至少一个拷贝的嵌合、人 or 人源化 PAM4 抗体或其片段, 其中所述 PAM4 抗体或其片段包含轻链可变区 CDR 序列 CDR1 (SASSVSSSYLY, (SEQ ID NO:1)、CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2) 和 CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3), 以及重链可变区 CDR 序列 CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4)、CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) 和 CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6); 以及 (ii) 至少一个拷贝的半抗原结合抗体或其片段。

27. 根据权利要求 26 所述的方法, 其中所述半抗原结合抗体是 h679 抗体或 h734 抗体。

28. 根据权利要求 26 所述的方法, 其中所述 DNL 构建体包含两个拷贝的每个均连接至 DDD 部分的 PAM4Fab 片段, 和一个拷贝的连接至 AD 部分的 h679Fab 片段, 其中所述两个拷贝的 DDD 部分形成二聚体, 所述二聚体结合到所述 AD 部分上从而形成所述 DNL 构建体。

## 早期胰腺腺癌的检测

[0001] 相关申请

[0002] 根据美国法典第 35 篇第 119 条 (e) 款, 本申请要求 2010 年 1 月 22 日提交的美国临时申请 61/297, 303、2010 年 4 月 14 日提交的 61/323, 944、2010 年 6 月 2 日提交的 61/350, 567 以及 2010 年 8 月 19 日提交的 61/375, 119 的权益。上面引用的每篇优先权申请均以引用的方式整体并入本文。

[0003] 有关联邦政府资助的研究或开发的申明

[0004] 这项工作部分由 NIH 基金 R01-CA096924 资助。美国政府可享有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

### 发明领域

[0006] 本发明涉及抗胰腺癌抗体的用途, 所述抗体以高选择性结合到胰腺癌细胞上从而检测和 / 或诊断胰腺腺癌, 优选地最早期的胰腺腺癌。更优选地, 基于抗体的测定能够检测约 85% 或更多的胰腺腺癌, 对健康对照的假阳性率为 5% 或更低。在特定实施方案中, 所述方法和组合物可用来通过筛检来自受试者的血清样品来检测和 / 或诊断胰腺腺癌, 并优选可通过血清样品分析检测 60% 或更多的 I 期胰腺癌以及 80% 或更多的 II 期胰腺癌。

[0007] 在优选实施方案中, 所述抗胰腺癌抗体与 PAM4 抗体竞争结合到胰腺癌粘蛋白上, 所述 PAM4 抗体包含轻链可变区互补决定区 (CDR) 序列 CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1)、CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2) 和 CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3), 以及重链 CDR 序列 CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4)、CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) 和 CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6)。最优选地, 所述抗胰腺癌抗体是人源化 PAM4 (hPAM4) 抗体, 其包含轻链 CDR 序列 CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1)、CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2) 和 CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3), 以及重链 CDR 序列 CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4)、CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) 和 CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6), 以及人抗体构架区 (FR) 和恒定区序列。

[0008] 相关领域

[0009] 胰腺癌是主要发生于胰腺导管细胞的胰腺恶性生长。这种疾病是排在第九位的最常见癌症形式, 但它分别是排在第四和第五位的男性和女性癌症死亡的主要原因。胰腺癌几乎总是致命的, 5 年存活率小于 3%。

[0010] 胰腺癌最常见的症状包括黄疸、腹痛和体重减轻, 这些症状与其它表现症状 (presenting factor) 都是非特异性的。因而, 在肿瘤生长早期诊断出胰腺癌常常是困难的, 需要大量的诊断性检查, 时常包括探查术。内窥镜超声成像和计算机断层成像是目前可用的最好的非侵入性诊断胰腺癌的手段。然而, 小肿瘤的可靠检测以及胰腺癌和局灶性胰腺炎的区分是困难的。目前, 绝大多数胰腺癌患者处于晚期时才被诊断出来, 此时肿瘤已从囊向外延伸, 侵袭周围器官和 / 或已经广泛转移。Gold 等, Crit. Rev. Oncology/Hematology, 39:147-54 (2001)。该疾病的晚期检测是常见的, 早期胰腺癌诊断在临床上是

罕见的。这很重要,因为胰腺癌的晚期检测导致存活率低下。

[0011] 可用的胰腺癌现行治疗程序没有导致治愈或明显提高存活时间。手术切除是提供存活机会的唯一方式。然而,由于肿瘤负荷大,仅 10% 至 25% 的患者是“治愈性切除”的候选者。对于接受手术治疗的那些患者,5 年存活率仍然很低,平均仅约为 10%。

[0012] 胰腺癌的早期检测和诊断以及对该疾病的适当分期将会提供提高的存活优势。许多实验室已试图基于肿瘤相关标记至血流中的释放以及活检样本内的标记物质的检测来开发诊断程序。对于胰腺癌,先前表征的最好的肿瘤相关标记是针对 CA19.9 的免疫测定。在 70% 的胰腺癌患者中发现这种唾液酸化 Le<sup>a</sup> 表位结构水平升高,但并未在任何所检查的局灶性胰腺炎样本中发现。然而,发现 CA19.9 水平在许多其它恶性和良性病状中也升高,所以目前该测定不能用于诊断。该测定对于监测有用,手术后 CA19.9 血清水平持续增加指示不良预后。已经报道,用于在不同的发展期进行诊断的许多其它单克隆抗体 (MAb) 的免疫测定。这些抗体包括但不限于 DUPAN2、SPAN1、B72.3、Ia3 和各种抗 -CEA (癌胚抗原,或 CEACAM5) 抗体。

[0013] 抗体,特别是 MAb 和工程化抗体或抗体片段已被全面测试,并被证明在检测和治疗包括癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病、炎性疾病或心血管疾病在内的各种人病症中具有价值 [Filpula 和 McGuire, Exp. Opin. Ther. Patents (1999) 9:231-245]。抗体或抗体源性试剂的临床应用主要取决于它们与特定病症相关的特异性靶抗原结合的能力。选择性对于在人病症的检测和治疗阶段期间将诊断剂或治疗剂递送至靶部位是有价值的,特别是如果所述诊断剂或治疗剂对机体正常组织有毒性时更是如此,所述诊断剂或治疗剂为例如药物、毒素、细胞因子、激素、激素拮抗剂、酶、酶抑制剂、寡核苷酸、生长因子、放射性核素、血管生成抑制剂或金属。放射性标记抗体已在包括卵巢癌、结肠癌、甲状腺髓样癌和淋巴瘤在内的许多恶性肿瘤的应用中取得了一些成功。这项技术也被证明对胰腺癌有用。然而,先前报道的抗胰腺癌抗原的抗体到目前为止还没有成功地用于胰腺癌的有效治疗或早期检测和 / 或诊断。

[0014] 本领域仍然需要与正常胰腺组织和其它正常组织相比对胰腺癌和其它类型的癌症表现出高选择性的抗体。特别地,仍然需要这样的抗体,其可用作胰腺癌,优选最早期胰腺癌的有效诊断和 / 或治疗工具,并且在靶抗原中的摄取增强,与健康个体血液中的组分的结合降低,并从而也为正常组织和细胞提供最佳的保护,使其免受当这些组分缀合到此类抗体上时有毒治疗剂的损害。将此类抗体用来检测体液 (特别是血液) 中的胰腺癌相关抗原,可以改进这种疾病的较早期诊断,只要它明显区别于良性疾病,并且还可以监测治疗反应,并且还可潜在地通过指示疾病负荷来改善预后。

[0015] 概述

[0016] 在各种实施方案中,本发明涉及结合到胰腺癌细胞上,而很少或不结合到正常细胞或非赘生性胰腺癌细胞上的抗体、抗原结合抗体片段和融合蛋白。优选地,所述抗体结合到最早期胰腺癌上,对 PanIN-1A 的检测率为约 54%,对 Pan1B 的检测率为 75%,对 PanIN-2 的检测率为 86%。更优选地,所述抗体结合到 80% 至 90% 或更多的人侵袭性胰腺腺癌、导管内乳头状粘液性瘤变 (neoplasia)、PanIN-1A、PanIN-1B 和 PanIN-2 病变上。最优选地,所述抗体可以区分早期胰腺癌和非恶性病状例如胰腺炎。此类抗体特别可用于癌症的早期检测以及早期胰腺癌和良性胰腺病状的鉴别诊断。在优选的实施方案中,此类抗体可用于体

内或离体分析来自疑似患有早期胰腺癌或某些其它癌症的个体的样品。更优选地,所述抗体可用于通过分析血清样品检测和诊断早期胰腺癌。

[0017] 所述抗体、抗体片段或融合蛋白可以通过用粘蛋白免疫和 / 或选择而获得,并优选对人胰腺癌粘蛋白有反应性。因此,所述抗体、抗体片段或融合蛋白优选结合到与胰腺癌细胞相关的抗原上。更优选地,所述抗体、抗体片段或融合蛋白可以结合到表达于胰腺癌中的粘蛋白例如 MUC-1 或 MUC-5 上。

[0018] 在替代实施方案中,所述抗体、抗体片段或融合蛋白可以结合到合成肽序列上,例如结合到噬菌体展示肽上。可结合到抗胰腺癌抗体上的示例性肽包括但不限于 WTWNITKAYPLP (SEQ ID NO:7) 和 ACPEWWGTTC (SEQ ID NO:8)。此类合成肽可以是线形或环状的,并且可能与或不与结合到内源性胰腺癌抗原上的抗体竞争。合成肽序列某些位置中的氨基酸对于抗体结合性而言可能不如其它氨基酸关键。例如,在 SEQ ID NO:7 中,位于肽序列的位置 7、8 和 11 处的残基 K、A 和 L 可以改变,同时仍然保留抗体结合性。类似地,在 SEQ ID NO:8 中,该序列的位置 8 和 9 处的苏氨酸残基可以改变,但位置 9 处苏氨酸的置换可显著影响抗体对所述肽的结合。

[0019] 所述抗体与靶胰腺癌抗原的结合可以通过用如二硫苏糖醇 (DTT) 和 / 或高碘酸盐的试剂处理靶抗原来抑制。因而,所述抗体与胰腺癌抗原的结合可能取决于二硫键的存在和 / 或靶抗原的糖基化状态。在更优选的实施方案中,题述抗体识别的表位与报道的其它粘蛋白特异性抗体例如 MA5 抗体、CLH2-2 抗体和 / 或 45M1 抗体没有交叉反应性 (参见,例如, Major 等, *J Histochem Cytochem.* 35:139-48, 1987; Dion 等, *Hybridoma* 10:595-610, 1991)。

[0020] 题述抗体或片段可以是裸抗体或片段,或者优选缀合到至少一种治疗和 / 或诊断剂上以便将所述试剂递送至靶组织。在替代实施方案中,PAM4 抗体或片段可以是双特异性融合蛋白或抗体的一部分,所述双特异性融合蛋白或抗体具有针对靶细胞抗原的第一结合位点和针对缀合到可靶向构建体上的半抗原的第二结合位点。可靶向构建体继而可以连接至可用于预靶向技术的至少一种治疗和 / 或诊断剂。

[0021] 在优选的实施方案中,题述抗体、抗体片段或融合蛋白包含鼠、嵌合、人源化或人 PAM4 抗体或片段,其包含轻链可变区 CDR 序列 CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1)、CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2) 和 CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3), 以及重链可变区 CDR 序列 CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4)、CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) 和 CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6)。

[0022] 特定实施方案可以涉及使用鼠 PAM4 抗体的组合物和方法,所述鼠 PAM4 抗体优选包含如图 1A 和 1B 中所公开的鼠 PAM4 可变区序列 (SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12)。此类鼠 PAM4 抗体或片段可用于体外或离体诊断技术,例如来自疑似患有胰腺癌或其他类型的癌症的受试者的组织样品的免疫组织化学分析或体液样品的免疫测定。

[0023] 其它特定实施方案可以涉及使用嵌合 PAM4 抗体的组合物和方法,所述嵌合 PAM4 抗体包含连接至人抗体恒定区序列的鼠可变区序列。所述嵌合 PAM4 抗体或片段优选包含图 2A 和 2B 中所示的 cPAM4 可变区序列 (SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14)。此类嵌合抗体在人中的免疫原性小于鼠抗体,同时保留了亲本鼠抗体的抗原结合特异性。用于癌症的诊断性和 / 或治疗性治疗的嵌合抗体是本领域熟知的。



由萤光素、萤光素酶和水母发光蛋白组成的组的生物发光化合物。在另一个实施方案中,所述诊断免疫缀合物用于手术中、内窥镜检查或血管内肿瘤诊断。

[0030] 另一个实施方案是癌细胞靶向性治疗免疫缀合物,其包含结合到至少一种治疗剂上的抗体或其片段或融合蛋白。优选地,所述治疗剂选自放射性核素、免疫调节剂、激素、激素拮抗剂、酶、如反义寡核苷酸或 siRNA 的寡核苷酸、酶抑制剂、光敏治疗剂、如药物或毒素的细胞毒性剂、血管生成抑制剂和促凋亡剂组成的组。在使用一种以上的治疗剂的实施方案中,所述治疗剂可以包含多个拷贝的相同治疗剂或者不同治疗剂的组合。

[0031] 在一个实施方案中,寡核苷酸,例如抑制 bcl-2 表达的反义寡核苷酸或 siRNA 描述于美国专利第 5,734,033 号(其实例部分以引用方式并入本文)中,可以缀合到免疫缀合物或抗体融合蛋白的治疗剂部分上或者形成免疫缀合物或抗体融合蛋白的治疗剂部分。或者,所述寡核苷酸可以与裸或缀合的抗胰腺癌抗体或抗体片段例如 PAM4 抗体同时施用或相继施用。在优选的实施方案中,所述寡核苷酸是针对癌基因或癌基因产物如 bcl-2、p53、ras 或其它熟知的癌基因的反义寡核苷酸。

[0032] 在优选的实施方案中,所述治疗剂是细胞毒性剂,如药物或毒素。还优选地,所述药物选自自由以下组成的组:氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸酯、亚硝基脲、吉西他滨、三氮烯、叶酸类似物、蒽环霉素、紫杉烷、COX-2 抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶抑制剂、表鬼臼毒素、铂配位复合物、长春花生物碱、取代脲、甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素拮抗剂、内皮细胞抑制素(endostatin)、紫杉醇、喜树碱、SN-38、多柔比星及其类似物、抗代谢物、烷化剂、抗有丝分裂物质、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、mTOR 抑制剂、热休克蛋白(HSP90)抑制剂、蛋白酶体抑制剂、HDAC 抑制剂、促凋亡剂、甲氨蝶呤、CPT-11 及其组合。

[0033] 在另一个优选的实施方案中,所述治疗剂是毒素,其选自自由以下组成:蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、 $\alpha$  毒素、皂草素、核糖核酸酶(RNA 酶)、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素-A、商陆抗病毒蛋白、白树毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素及其组合。或者免疫调节剂,其选自自由以下组成的组:细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、造血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、干细胞生长因子、红细胞生成素、血小板生成素及其组合。

[0034] 或者,所述治疗剂是酶,其选自自由以下组成的组:苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 $\delta$ -V-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。此类酶可以,例如与以相对无毒形式施用并在靶位被所述酶转化成细胞毒性剂的前药组合使用。在其它替代实施方案中,药物可以被受试者内源酶转化成毒性较低的形式,但可被所述治疗酶再转化成细胞毒性形式。

[0035] 其它治疗剂包括放射性核素,例如  $^{14}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{77}\text{As}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{80}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{95}\text{Ru}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{103\text{m}}\text{Rh}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{105}\text{Ru}$ 、 $^{107}\text{Hg}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{109}\text{Pt}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 $^{119}\text{Sb}$ 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{126}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{133}\text{I}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{152}\text{Dy}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{161}\text{Ho}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{165}\text{Tm}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{167}\text{Tm}$ 、 $^{168}\text{Tm}$ 、 $^{169}\text{Er}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{mOs}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{192}\text{Ir}$ 、 $^{194}\text{Ir}$ 、 $^{197}\text{Pt}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{203}\text{Hg}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{211}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、

$^{212}\text{Pb}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{215}\text{Po}$ 、 $^{217}\text{At}$ 、 $^{219}\text{Rn}$ 、 $^{221}\text{Fr}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、 $^{224}\text{Ac}$ 、 $^{225}\text{Ac}$  或  $^{255}\text{Fm}$ 。

[0036] 还涵盖多价、多特异性抗体或其片段，其包含至少一个对 PAM4 靶抗原有亲和性的结合位点，和一个或多个对半抗原分子有亲和性的半抗原结合位点。优选地，所述抗体或其片段为嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体或其片段。所述半抗原分子可以缀合到用于递送一种或多种治疗和 / 或诊断剂的可靶向构建体上。在某些优选的实施方案中，所述多价抗体或其片段可以通过停靠和锁定 (DNL) 技术制备，如下面的实施例中所描述的。并入 hPAM4 抗体片段的示例性 DNL 构建体命名为 TF10，如下所述。

[0037] 还涵盖双特异性抗体或其片段，其包含至少一个对 PAM4 靶抗原有亲和性的结合位点，和至少一个对可靶向构建体 / 缀合物有亲和性的结合位点，所述可靶向构建体 / 缀合物选自自由以下组成的组：

[0038] DOTA-D-Asp-D-Lys (HSG) -D-Asp-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 271) ；

[0039] DOTA-D-Glu-D-Lys (HSG) -D-Glu-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 277) ；

[0040] DOTA-D-Tyr-D-Lys (HSG) -D-Glu-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 288) ；

[0041] DOTA-D-Ala-D-Lys (HSG) -D-Glu-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 0281) ；

[0042] NOTA-ITC 苄基 -D-Ala-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 449) ；

[0043] NODA-Ga-D-Ala-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP460) ；

[0044] NOTA-D-Ala-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 461) ；

[0045] NOTA-D-Asp-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 462) ；

[0046] NOTA-D-Ala-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 465) ；

[0047] C-NETA- 琥珀酰基 -D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP467) ；

[0048] S-NETA-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 469) ；和

[0049] L-NETA- 琥珀酰基 -D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP470) ，

[0050] 其能够携带至少一种诊断剂和 / 或治疗剂。其它适用的可靶向构建体公开于，例如美国专利第 6,576,746 号、第 6,962,702 号、第 7,052,872 号、第 7,138,103 号、第 7,172,751 号、第 7,405,320 号、第 7,597,876 号、第 7,563,433 号，以及 2008 年 12 月 24 日提交的美国专利申请序列第 12/343,655 号、2009 年 4 月 30 日提交的美国专利申请序列第 12/433,212 号、2009 年 6 月 17 日提交的美国专利申请序列第 12/485,998 号、2009 年 8 月 14 日提交的美国专利申请序列第 12/541,527 号以及 2010 年 12 月 1 日提交的美国专利申请序列第 12/958,889 号中，这些专利和专利申请的实施例部分都以引用方式并入本文。

[0051] 其它实施方案涉及包含至少两种本文所述的抗胰腺癌抗体及其片段的融合蛋白。或者，所述融合蛋白或其片段可以包含至少一种第一抗胰腺癌抗体或其片段和至少一种第二 MAb 或其片段。优选地，第二 MAb 结合到肿瘤相关抗原上，所述肿瘤相关抗原例如选自自由以下组成的组：CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、Le<sup>a</sup>、路易斯抗原 Le (y)、CSAp、胰岛素样生长因子 (IGF)、上皮糖蛋白 -1 (EGP-1)、上皮糖蛋白 -2 (EGP-2)、CD-80、胎盘生长因子 (PlGF)、碳酸酐酶 IX、肌腱蛋白、IL-6、HLA-DR、CD40、CD74 (例如，milatuzumab)、CD138 (多配体聚糖 -1)、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、TAG-72、EGFR、血小板衍生生长因子 (PDGF)、血管生成因子 (例如，VEGF 和 PlGF)、癌基因产物 (例如，bcl-2、Kras、p53)、cMET、HER2/neu，以及与胃癌和结肠直肠癌相关的抗原。所述抗体融合蛋白或其片段可以进一步包含至少一种诊断剂和 / 或治疗剂。

[0052] 本文还描述了包含编码如本文所述的抗胰腺癌抗体、融合蛋白、多特异性抗体、双特异性抗体或其片段的核酸的 DNA 序列。其它实施方案涉及包含所述抗体编码 DNA 序列的表达载体和 / 或宿主细胞。在某些优选的实施方案中,所述宿主细胞可以为用突变 Bc1-2 基因,例如用三重突变 Bc1-2 基因 (T69E、S70E、S87E) 转化的、已适应于细胞转化和在无血清培养基中生长的 Sp2/0 细胞系。(参见,例如,美国专利第 7, 531, 327 号、第 7, 537, 930 号和第 7, 608, 425 号,其中每篇的实施例部分均以引用方式并入本文)。

[0053] 另一个实施方案涉及将诊断或治疗剂或其组合递送至靶的方法,其包括 (i) 提供包含缀合到至少一种诊断剂和 / 或治疗剂上的抗胰腺癌抗体或片段例如 PAM4 抗体或片段的组合物,和 (ii) 将本文要求保护的抗体、抗体片段或融合蛋白中的任一者的诊断或治疗缀合物施用给需要它的受试者。

[0054] 还涵盖将诊断剂、治疗剂或其组合递送至靶的方法,其包括:(a) 向受试者施用对 PAM4 抗原具有亲和性并包含一个或多个半抗原结合位点的多价、多特异性或双特异性抗体或其片段中的任一者;(b) 等待足够长的时间以便未结合到 PAM4 抗原上的抗体从受试者血流中清除;和 (c) 向所述受试者施用包含诊断剂、治疗剂或其组合并可结合到所述抗体的结合位点上的载体分子。优选地,所述载体分子结合到所述抗体的一个以上的结合位点上。

[0055] 本文描述了用于诊断或治疗癌症的方法,其包括 (a) 向受试者施用对 PAM4 抗原具有亲和性并包含一个或多个半抗原结合位点的本文要求保护的多价、多特异性抗体或其片段中的任一者;(b) 等待足够长的时间以便未结合抗体从受试者血流中清除;和 (c) 向所述受试者施用包含诊断剂、治疗剂或其组合并可结合到所述抗体的结合位点上的载体分子。在优选的实施方案中,所述癌症是胰腺癌。还优选地,所述方法可用于手术中鉴定患病组织、经内窥镜检查鉴定患病组织,或血管内鉴定患病组织。

[0056] 另一个实施方案是治疗受试者的恶性肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的结合到 PAM4 抗原上并任选地缀合到至少一种治疗剂上的抗体或其片段。所述抗体或其片段可以替代地为裸抗体或其片段。在更优选的实施方案中,所述抗体或其片段在施用如上所述的另一种治疗剂之前施用、与它同时施用或在它之后施用。

[0057] 本文涵盖诊断受试者的恶性肿瘤,特别是癌症的方法,其包括 (a) 向所述受试者施用包含可结合到 PAM4 抗原上的抗体或其片段的诊断缀合物,其中所述 MAbs 或其片段缀合到至少一种诊断剂上;和 (b) 检测结合到胰腺癌细胞或其它恶性肿瘤细胞上的标记抗体的存在,其中所述抗体的结合是对胰腺癌或另一种恶性肿瘤的存在诊断。在优选的实施方案中,所述抗体或其片段结合到胰腺癌上,而不结合到正常胰腺组织、胰腺炎或其它非恶性病状上。在次优选的实施方案中,所述抗体或其片段以与非恶性细胞相比显著较高的水平结合到癌细胞上,允许癌症与非恶性病状的鉴别诊断。在最优选的实施方案中,所述诊断剂可以通过 PET 成像检测的 F-18 标记分子。

[0058] 在更优选的实施方案中,使用抗胰腺癌抗体例如 hPAM4 抗体允许在恶性疾病最早期以高特异性和敏感度检测和 / 或诊断胰腺癌。优选地,所述诊断抗体或片段能够标记至少 70%,更优选至少 80%,更优选至少 90%,更优选至少 95%,最优选约 100% 的高分化、中分化和低分化的胰腺癌以及 90% 或更多的侵袭性胰腺腺癌。有用的抗胰腺癌抗体优选能够检测 85% 或更多的 PanIN-1A、PanIN-1B、PanIN-2、IPMN 和 MCN 前驱病变。最优选地,使用抗胰腺癌抗体的免疫测定能够检测 89% 或更多的总 PanIN、86% 或更多的 IPMN 以及 92% 或更多的

MCN。

[0059] 替代实施方案是通过体外分析血液、血浆或血清样品检测个体中的 PAM4 抗原和 / 或诊断个体的胰腺癌的方法。优选地,在针对利用抗胰腺癌抗体例如 PAM4 抗体的免疫检测处理样品之前,使用有机溶剂例如丁醇对它进行有机相萃取。有机相萃取之后,采用本领域已知的多种免疫测定技术中的任一种,例如 ELISA、三明治免疫测定、固相 RIA 和类似技术对所萃取的水相分析所述样品中 PAM4 抗体的存在。令人惊讶地,有机相萃取除去了可结合到 PAM4 靶抗原上的 PAM4 抑制剂,使得新鲜血清样品中的 PAM4 靶抗原能被检测到。更令人惊讶地,利用本文所述的体外分析技术,可以分析血清样品来检测和 / 或诊断处于胰腺腺癌最早期的受试者的胰腺癌。这些意外结果提供了第一种基于血清的诊断早期胰腺癌的存在测定技术。

[0060] 另一个实施方案是治疗受试者的癌细胞的方法,其包括向所述受试者施用包含可结合到 PAM4 抗原上的裸抗体或其片段或者裸抗体融合蛋白或其片段的组合物。优选地,所述方法进一步包括施用选自自由以下组成的组的第二裸抗体或其片段:CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、抗-CEA、抗-CEACAM6、抗-EGP-1、抗-EGP-2、抗-Le<sup>a</sup>、由路易斯抗原 Le(y) 定义的抗体,以及针对以下的抗体:CSAp、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、TAG-72、EGFR、CD40、HLA-DR、CD74、CD138、血管生成因子(例如,VEGF 和胎盘样生长因子(PiGF))、胰岛素样生长因子(IGF)、肌腱蛋白、血小板衍生生长因子、IL-6、癌基因产物、cMET 和 HER2/neu。

[0061] 又其它实施方案涉及诊断受试者的恶性肿瘤的方法,其包括(i)用包含可结合到 PAM4 抗原上的抗体或其片段的组合物对来自所述受试者的样本进行体外诊断分析;和(ii)检测结合到样本中恶性肿瘤细胞上的抗体或片段的的存在。优选所述恶性肿瘤是癌症。还优选所述癌症是胰腺癌。

[0062] 附图简述

[0063] 图 1. 鼠 PAM4 抗体的可变区 cDNA 序列和推导的氨基酸序列。图 1A 示出鼠 PAM4V<sub>k</sub> 的 DNA (SEQ ID NO:9) 序列和氨基酸 (SEQ ID NO:10) 序列。图 1B 示出鼠 PAM4 V<sub>H</sub> 的 DNA (SEQ ID NO:11) 序列和氨基酸 (SEQ ID NO:12) 序列。由相应 DNA 序列编码的氨基酸序列在核苷酸序列之下以单字母密码子给出。核苷酸序列的编号位居右侧。CDR 区中的氨基酸残基用粗体和下划线表示。利用 Kabat Ig 分子编号对氨基酸残基进行编号,如氨基酸残基上面的编号所示。用字母编号的氨基酸残基是根据 Kabat 编号方案定义的插入残基。插入残基具有与前面残基之前的数字相同的数字。例如,图 1B 中的残基 82、82A、82B 和 82C 分别表示为 82、A、B, 和 C。

[0064] 图 2. 在 Sp2/0 细胞中表达的嵌合 PAM4(cPAM4) 重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。图 2A 示出 cPAM4 V<sub>k</sub> 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)。图 2B 示出 cPAM4 V<sub>H</sub> 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)。该序列以单字母密码子给出。CDR 区中的氨基酸残基用粗体和下划线表示。氨基酸的编号与图 1 相同。

[0065] 图 3. 人抗体、PAM4 和 hPAM4 的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列比对。图 3A 示出人抗体 Walker (SEQ ID NO:15) 与 PAM4 (SEQ ID NO:10) 和 hPAM4 (SEQ ID NO:16) 的 V<sub>k</sub> 氨基酸序列比对,图 3B 示出人抗体 Wi12 (FR1-3) (SEQ ID NO:17) 和 NEWM (FR4) (SEQ ID NO:18) 与 PAM4 (SEQ ID NO:12) 和 hPAM4 (SEQ ID NO:19) 的 V<sub>H</sub> 氨基酸序列比对。圆点表示

与人或人源化抗体相应残基相同的 PAM4 的残基。方框内区域代表 CDR 区。hPAM4 的 N 端和 C 端残基（加下划线）都用所用的分期载体固定。利用 Kabat Ig 分子编号方案对残基进行编号，如同图 1。

[0066] 图 4. 在 Sp2/0 细胞中表达的人源化 PAM4 (hPAM4) 重链可变区和轻链可变区的 DNA 序列和氨基酸序列。图 4A 示出 hPAM4V<sub>K</sub> 的 DNA (SEQ ID NO:20) 序列和氨基酸 (SEQ ID NO:16) 序列，图 4B 示出 hPAM4 V<sub>H</sub> 的 DNA (SEQ ID NO:21) 序列和氨基酸 (SEQ ID NO:19) 序列。核苷酸序列的编号位居右侧。由相应 DNA 序列编码的氨基酸序列以单字母密码子给出。CDR 区中的氨基酸残基用粗体加下划线表示。利用 Kabat Ig 分子编号方案对氨基酸残基进行编号，如同图 1A 和图 1B。

[0067] 图 5. 人源化 PAM4 抗体 hPAM4 与嵌合 PAM4 cPAM4 的结合活性比较。hPAM4 用菱形表示，cPAM4 用实心圆表示。当与结合到 CaPan1 抗原上的 <sup>125</sup>I-cPAM4 竞争时，结果表明 hPAM4 抗体和 cPAM4 的相当的结合活性。

[0068] 图 6. 用分次 <sup>90</sup>Y-hPAM4 加吉西他滨治疗的不宜手术的转移性胰腺癌患者在治疗前（左侧）和治疗后（右侧）的 PET/CT 融合图像。圆圈指示原发病变的位置，其显示在治疗后 PET/CT 强度显著降低。

[0069] 图 7. 用分次 <sup>90</sup>Y-hPAM4 加吉西他滨治疗的不宜手术的转移性胰腺癌患者在治疗前（左侧）和治疗后（右侧）的 3D PET 图像。箭头指向原发病变位置（右侧）和转移瘤位置（左侧），每个均显示在用放射性标记 hPAM4 加吉西他滨治疗之后 PET 图像强度显著降低。

[0070] 图 8. 在存在或不存在预靶向性 TF10 双特异性抗胰腺癌粘蛋白抗体的情况下，利用 <sup>111</sup>In- 标记的 diHSG 肽 (IMP 288) 的肿瘤体内成像。图 8A- 小鼠示出肿瘤位置（箭头）。图 8B 示出在存在（上面）或不存在（下面）TF10 双特异性抗体的情况下利用 <sup>111</sup>In- 标记 IMP 288 检测到的肿瘤。

[0071] 图 9. TF10、PAM4-IgG、PAM4-F(ab')<sub>2</sub> 和单价 bsPAM4 化学缀合物 (PAM4-Fab' x 抗-DTPA-Fab') 的示例性结合曲线。与靶粘蛋白抗原的结合通过 ELISA 测定法测量。

[0072] 图 10. CaPan1 人胰腺癌异种移植体 (~0.25g) 的免疫闪烁成像。(A) 注射双特异性 TF10 (80 μg, 5.07x10<sup>-10</sup>mol)，接着在 16 小时后施用 <sup>111</sup>In-IMP-288 (30 μCi, 5.07x10<sup>-11</sup>mol) 的小鼠的图像。该图像是在 3 小时后获取的。增加图像本底的强度从而使其与施用单独 <sup>111</sup>In-IMP-288 (30 μCi, 5.07x10<sup>-11</sup>mol) 时获得的图像强度匹配。(B) 在给予单独 <sup>111</sup>In-IMP-288 的小鼠中未观察到靶向。(C) 给予 <sup>111</sup>In-DOTA-PAM4-IgG (20 μCi, 50 μg)、在 24 小时之后成像的小鼠图像。虽然可见肿瘤，但在这个时间点仍然存在相当强的本底活性。

[0073] 图 11. 荷有 CaPan1 人胰腺癌异种移植体（预靶向和 IgG 动物组的平均肿瘤重量 +/-SD 分别为 0.28 +/-0.21 和 0.10 +/-0.06g) 的裸小鼠中 <sup>111</sup>In-DOTA-PAM4-IgG (20 μCi, 50 μg) 和 TF10- 预靶向的 <sup>111</sup>In-IMP-288 (80 μg, 5.07x10<sup>-10</sup>mol TF10, 16 小时后 30 μCi, 5.07x10<sup>-11</sup>mol <sup>111</sup>In-IMP-288) 的延长生物分布。

[0074] 图 12. 用 0.15mCi <sup>90</sup>Y-hPAM4IgG 或者 0.25 或 0.50mCi TF10- 预靶向的 <sup>90</sup>Y-IMP-288 对所形成的 CaPan1 肿瘤 (~0.4cm<sup>3</sup>) 进行的单次治疗的治疗活性。

[0075] 图 13. 吉西他滨对 PT-RAIT 疗法的增强作用。

[0076] 图 14. 西妥昔单抗与吉西他滨和 PT-RAIT 的组合作用。

[0077] 图 15. 利用基于 PAM4 的免疫测定的胰腺癌鉴别诊断。红色线表示基于 ROC 分析

选定的阳性结果的截断水平。

[0078] 图 16. 来自健康志愿者和处于不同分期的胰腺癌个体的患者血清中 PAM4 抗原的频率分布。

[0079] 图 17. PAM4 血清免疫测定的 ROC 曲线。

[0080] 图 18. PAM4 免疫测定的准确度确定为在 2.40 单位 /mL 的截断值处或之上测得的标称浓度的 10% 范围内。计算得线性趋势, 方程为  $y=0.965x+0.174$ , 拟合优度  $r^2=0.999$ 。

[0081] 图 19. 患者血清中 PAM4 反应性抗原根据病期的频率分布。截断值 =2.4 单位 /mL (红色线)。示出每个研究组的中位值 (单位 /mL)。

[0082] 图 20. 针对基于 PAM4 的免疫测定执行情况在接受者操作特征 (ROC) 曲线; 胰腺腺癌与健康成体的比较。提供了曲线下面积 (AUC) 和 95% 置信限的值。

[0083] 详述

[0084] 定义

[0085] 除非另有说明, 否则“一个”或“一种”表示一个 (种) 或多个 (种)。

[0086] 本文所用的“约”表示加或减 10%。例如“约 100”将包括介于 90 和 110 之间的任何数字。

[0087] 本文所述的术语“PAM4 抗体”包括鼠 PAM4 抗体、嵌合 PAM4 抗体、人源化 PAM4 抗体和人 PAM4 抗体。在优选的实施方案中, PAM4 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:6 的 CDR 序列。

[0088] 本文所用的“PAM4 抗原”是被 PAM4 抗体结合的抗原。在优选的实施方案中, 通过用 DTT 或高碘酸盐处理 PAM4 抗原来抑制或阻止 PAM4 抗体的结合。在更优选的实施方案中, PAM4 抗原是由胰腺癌细胞表达的粘蛋白如 MUC-1 或 MUC-5 的表位。

[0089] 本文所用的“抗胰腺癌抗体”是表现出与 PAM4 抗体相同的诊断、治疗和结合特征的抗体。在优选的实施方案中, “抗胰腺癌抗体”与 PAM4 抗体结合到相同的表位上。

[0090] “非内分泌性胰腺癌”一般是指由外分泌胰腺产生的癌症。该术语不包括胰腺胰岛素瘤, 而包括胰腺癌、胰腺腺癌、腺鳞癌、鳞状细胞癌和巨细胞癌以及前驱病变, 如胰腺上皮内瘤变 (PanIN)、粘液性囊性赘生物 (MCN) 和胰腺内粘液性赘生物 (IPMN), 它们是赘生性的, 但还不是恶性的。术语“胰腺癌”和“非内分泌性胰腺癌”在本文互换使用。

[0091] 本文所述的抗体是指全长 (即, 天然存在或通过正常免疫球蛋白基因片段重组方法形成的) 免疫球蛋白分子 (例如, IgG 抗体) 或免疫球蛋白分子的免疫活性 (即, 特异性结合) 部分如抗体片段。

[0092] 抗体片段是抗体的一部分, 如  $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab、Fv、sFv 等。无论何种结构, 抗体片段所结合的抗原都与全长抗体所识别的抗原相同。术语“抗体片段”也包括由抗体可变区组成的分离片段, 如由重链和轻链可变区组成的“Fv”片段, 以及其中轻和重可变区由肽接头 (“scFv 蛋白”) 连接的重组单链多肽分子。

[0093] 裸抗体是未缀合到治疗或诊断剂上的抗体或其片段。一般地, 抗体分子的 Fc 部分提供效应子功能, 例如补体介导的细胞毒性 (CDC) 和 ADCC (抗体依赖性细胞毒性), 其启动可导致细胞裂解的机制。然而, Fc 部分可能不是治疗功能所需要的, 而是其它机制如信号诱导的凋亡发挥作用。裸抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体以及融合蛋白和某些重组抗体, 例如嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0094] 嵌合抗体是重组蛋白,其含有包括来源于一种物种的抗体,优选啮齿动物抗体的互补决定区(CDR)的可变结构域,而所述抗体分子的恒定结构域来源于人抗体恒定结构域。对于兽医学应用,所述嵌合抗体的恒定结构域可以来源于其它物种如猫或狗的恒定结构域。

[0095] 人源化抗体是重组蛋白,其中来自一种物种的抗体,例如啮齿动物抗体的CDR已从所述啮齿动物抗体的重和轻可变链转移到人重和轻可变结构域(例如,构架区序列)中。所述抗体分子的恒定结构域来源于人抗体的恒定结构域。在某些实施方案中,可以将亲本(啮齿动物)抗体的有限数量的构架区氨基酸残基置换到人抗体构架区序列中。

[0096] 人抗体是例如从已经过“工程化”从而在响应于抗原攻击时产生特定人抗体的转基因小鼠获得的抗体。在这种技术中,将人重链和轻链基因座元件引入来源于胚胎干细胞系的小鼠品系中,所述胚胎干细胞系含有内源性鼠重链和轻链基因座的靶向性破坏。该转基因小鼠可以合成对特定抗原具有特异性的人抗体,并且该小鼠可以用来生成抗体分泌杂交瘤。从转基因小鼠获取人抗体的方法在Green等, *Nature Genet.* 7:13(1994), Lonberg等, *Nature* 368:856(1994), 和 Taylor等, *Int. Immun.* 6:579(1994) 中有描述。全人抗体也可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术构建,所有这些技术都是本领域已知的。参见,例如, McCafferty等, *Nature* 348:552-553(1990), 该文献描述了从未免疫供体的免疫球蛋白可变结构域基因库于体外生成抗体及其片段的方法。在这种技术中,将抗体可变结构域基因框内克隆到丝状噬菌体的较大或较小外壳蛋白基因中,并作为功能抗体片段展示在噬菌体颗粒表面上。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对编码表现出这些特性的抗体的基因的选择。以这种方式,噬菌体模拟B细胞的某些特性。噬菌体展示可以以多种形式进行,关于它们的综述参见,例如 Johnson和 Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:5564-571(1993)。人抗体也可以由体外激活的B细胞产生。参见美国专利第5,567,610号和第5,229,275号,其实施例部分以引用方式并入本文。

[0097] 治疗剂是与抗体部分单独、同时或相继施用或者缀合到抗体部分,即抗体或抗体片段或亚片段上,并且可用于治疗疾病的化合物、分子或原子。治疗剂的实例包括抗体、抗体片段、细胞毒性剂、药物、毒素、核酸酶、激素、免疫调节剂、促凋亡剂、抗血管生成剂、硼化合物、光敏剂或染料和放射性同位素。下面更详细地描述了有用的治疗剂。

[0098] 诊断剂是分子、原子或其它可检测部分,其可以通过缀合到抗体部分或可靶向构建体上施用,并且对于通过定位含有靶抗原的细胞来检测或诊断疾病有用。有用的诊断剂包括但不限于放射性同位素、染料、造影剂、荧光化合物或分子和磁共振成像(MRI)或正电子发射断层成像(PET)扫描用增强剂(例如,顺磁离子)。优选地,所述诊断剂选自放射性同位素、用于磁共振或PET成像的增强剂和荧光化合物组成的组。为了用放射性金属、顺磁离子或其它诊断阳离子加载抗体组分,可能需要使它与具有连接多个螯合基团以结合所述离子的长尾的试剂反应。这样的尾可以是具有可结合螯合基团的侧基的聚合物,例如聚赖氨酸、多糖或其它衍生化链或可衍生链,所述螯合基团为例如乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、DOTA、NOTA、NETA、卟啉、聚胺、冠醚、双缩氨基硫脲、聚脲,和已知可用于此目的的相似基团。采用标准化学方法使螯合物偶联至抗体。所述螯合物通常通过能够以使免疫反应性损失最小、聚集和/或内部交联最小的方式与所述分子形成键的基团

连接至抗体。用于使螯合物缀合到抗体上的其它较不寻常的方法和试剂公开在美国专利第 4,824,659 号中,该专利的实施例部分以引用方式并入。特别有用的金属螯合物组合包括 2- 苄基 -DTPA 及其单甲基和环己基类似物,它们与总能量范围为 60 至 4,000keV 的诊断同位素一起用于放射成像,所述同位素为例如  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 。所述螯合物在与非放射性金属例如锰、铁和钆复合时可与本发明抗体一起用于 MRI。大环螯合物如 NOTA(1,4,7-三氮杂环壬烷 -N,N',N''-三乙酸)、DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸)和 TETA(对溴乙酰胺基 - 苄基 - 四乙胺四乙酸)可分别与多种金属和放射性金属,最特别是与镓、钷和铜的放射性核素一起使用。可通过根据目标金属调整环的大小而使此类金属螯合物复合物变得非常稳定。本发明包括其它环类型的螯合物如大环聚醚,它们对于稳定地结合核素如用于放射免疫疗法 (RAIT) 的  $^{223}\text{Ra}$  有价值。最近,用可用于 PET 成像的  $^{18}\text{F}$  原子标记几乎任何分子的通用技术描述于美国专利第 7,563,433 号中,该专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0099] 免疫缀合物是缀合到至少一种治疗剂和 / 或诊断剂上的抗体、抗体片段或抗体融合蛋白。所述诊断剂和 / 或治疗剂如上所定义。

[0100] 表达载体是包含在宿主细胞中表达的基因的 DNA 分子。通常,基因表达处于某些调节元件的控制之下,所述调节元件包括组成型启动子或诱导型启动子、组织特异性调节元件和增强子。据说此种基因“可操作地连接至”调节元件。

[0101] 重组宿主可以是含有克隆载体或表达载体的任何原核或真核细胞。这个术语还包括经基因工程化从而在宿主细胞染色体或基因组中含有克隆基因的那些原核或真核细胞以及转基因动物。合适的哺乳动物宿主细胞包括骨髓瘤细胞,例如 SP2/0 细胞和 NS0 细胞,以及中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、杂交瘤细胞系和其它可用于表达抗体的哺乳动物宿主细胞。此外,用于表达 mAb 和其它融合蛋白的特别有用的宿主细胞是用凋亡抑制剂如 Bcl-EEE 基因转染并适应于在无血清条件下生长和进一步转染的 SP2/0 细胞,如美国专利第 7,531,327 号、第 7,537,930 号和第 7,608,425 号中描述的,这些专利的实施例部分以引用方式并入本文。

[0102] PAM4 抗体

[0103] 本发明各种实施方案涉及相对于正常或良性胰腺组织以非常高的选择性与胰腺癌反应的抗体。所述抗胰腺癌抗体及其片段优选针对来自人胰腺肿瘤的粗粘蛋白制剂产生,虽然可以利用部分纯化或甚至纯化的粘蛋白。此类抗体的非限制性实例为 PAM4 抗体。

[0104] 鼠 PAM4 (mPAM4) 抗体通过采用来源于异种移植的 RIP-1 人胰腺癌的胰腺癌粘蛋白作为免疫原来制备。(Gold 等, Int. J. Cancer, 57:204-210, 1994)。如下所讨论,抗体交叉反应性和免疫组织化学染色研究表明 PAM4 抗体识别靶胰腺癌抗原上的独特的新表位。免疫组织化学染色研究,例如实施例 2 中所描述的研究,已证明 PAM4 MAbs 结合到由乳腺癌、胰腺癌和其它癌症细胞表达的抗原上,与正常人组织的结合受限;然而,最高的表达通常来自胰腺癌细胞。因而, PAM4 抗体对胰腺癌有相对特异性,并优先结合胰腺癌细胞。PAM4 抗体与可内化的靶表位起反应。这个表位主要由与胰腺癌相关而与局灶性胰腺炎或正常胰腺组织无关的抗原表达。PAM4 抗体与 PAM4 抗原的结合通过用 DTT 或高碘酸盐处理所述抗原来抑制。在动物模型中使用放射性标记 PAM4MAbs 进行的定位和治疗研究已证明肿瘤靶向性和治疗效力。

[0105] PAM4 抗体结合到 PAM4 抗原上, PAM4 抗原由许多器官和肿瘤类型表达, 但优先表达于胰腺癌细胞中。利用例如实施例 3 中的 PAM4MAb 进行的研究表明, 所述抗体表现出数种重要的特性, 使其成为临床诊断和治疗应用的良好候选物。PAM4 抗原提供了对于胰腺癌和其它癌症的诊断和治疗有用的靶。PAM4 抗体显然识别出胰腺癌抗原的表位, 其与由非 PAM4 抗胰腺癌抗体 (CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、CEACAM5、B72.3、抗 -Le<sup>a</sup> 和其它抗路易斯抗原) 识别的表位不同。

[0106] 令人惊讶地, 下面的实施例表明患有非常早期的胰腺癌患者的血清中存在可检出浓度的 PAM4 抗原。还令人惊讶的是, 新鲜人血清中似乎存在可结合到 PAM4 抗原上的 PAM4 抗体的内源性抑制剂。所述抑制剂通过长期冷冻储存血清样品除去, 或通过对新鲜血清进行有机相萃取除去。这些意外的结果为利用血液、血清或血浆样品进行的相对非侵入性的胰腺癌早期测试提供了基础。

[0107] 对于治疗使用, 适合于与 PAM4 抗体组合使用或结合使用的抗体包括, 例如, 抗体 CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、抗 -CEA、抗 -CEACAM6、抗 -Le<sup>a</sup>、抗 -HLA-DR、抗 -CD40、抗 -CD74、抗 -CD138, 和由路易斯抗原 Le(y) 定义的抗体, 或针对以下的抗体: 结肠特异性抗原 -p (CSAp)、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、EGP-1、EGP-2、HER2/neu、EGFR、血管生成因子 (例如 VEGF 和 PlGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、肌腱蛋白、血小板衍生生长因子和 IL-6 及癌基因产物 (bcl-2、Kras、p53)、cMET, 以及针对肿瘤坏死物质的抗体, 例如授予 Epstein 等的专利 (美国专利第 6,071,491 号、第 6,017,514 号、第 5,019,368 号和第 5,882,626 号) 中描述的。此类抗体可用于补充 PAM4 抗体免疫检测和免疫治疗方法。当在 PAM4 抗体施用之前施用、与 PAM4 抗体一起施用或在 PAM4 抗体施用之后施用时, 这些和其它治疗剂可以与抗胰腺癌抗体如 PAM4 抗体协同作用。

[0108] 在治疗应用中, 与抵抗肿瘤细胞的效应细胞功能有关的免疫调节剂激动或拮抗性抗体也可以与单独的 PAM4 抗体组合使用, 或者与其它肿瘤相关性抗体组合使用, 一个实例是针对 CD40 的抗体。Todryk 等, *J. Immunol Methods*, 248:139-147 (2001); Turner 等, *J. Immunol*, 166:89-94 (2001)。此外, 也可使用针对标记或癌基因产物 (例如, bcl-2、Kras、p53、cMET) 的抗体, 或针对血管生成因子, 如 VEGFR 和胎盘样生长因子 (PlGF) 的抗体。

[0109] 另一种可结合到 PAM4 抗原不同表位上的 PAM4 样抗体的可利用性对于可用来检测临床样品中 PAM4 抗原的双决定簇酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的开发是重要的。ELISA 实验描述于实施例 1 和 5 中。

[0110] 本文所述的鼠 PAM4 抗体、嵌合 PAM4 抗体、人源化 PAM4 抗体和全人 PAM4 抗体及其片段是用于诊断和 / 或治疗方法中的示例性抗胰腺癌抗体。下面的实施例公开了人源化 PAM4 抗体的构建和使用的优选实施方案。因为非人单克隆抗体可以被宿主识别为外源蛋白, 并且重复注射可以导致有害的超敏反应, 所以鼠抗体序列的人源化可以减少患者可能经历的不良免疫反应。对于基于鼠的单克隆抗体, 这通常称为人抗小鼠抗体 (HAMA) 响应。优选将人源化抗胰腺癌抗体或其片段的构架区中的某些人残基用它们的鼠对应物替代。还优选将来自两种不同人抗体的构架序列的组合用于 V<sub>H</sub>。所述抗体分子的恒定结构域来源于人抗体的恒定结构域。

[0111] 抗体制备

[0112] 针对特定抗原的单克隆抗体可以通过本领域技术人员已知的方法获得。参见,

例如, Kohler 和 Milstein, Nature 256:495(1975), 和 Coligan 等, (编著), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 第1卷, 第2.5.1-2.6.7页 (John Wiley & Sons 1991) (在下文称为“Coligan”)。简言之, 抗胰腺癌 MAbs 可以通过如下方法获得: 给小鼠注射包含来自胰腺癌的粘蛋白例如 PAM4 抗原的组合物, 通过取出血清样品来证实抗体产生的存在, 取出脾脏从而获得 B 淋巴细胞, 使 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合从而产生杂交瘤, 克隆所述杂交瘤, 选择产生针对 PAM4 抗原的抗体的阳性克隆, 培养产生针对 PAM4 抗原的抗体的克隆, 和从杂交瘤培养物中分离出抗胰腺癌抗体。

[0113] 在初始产生针对所述免疫原的抗体之后, 可以对所述抗体进行测序, 随后通过重组技术来制备所述抗体从而产生嵌合抗体或人源化抗体。鼠抗体和抗体片段的嵌合是本领域技术人员熟知的。来源于嵌合单克隆抗体的抗体组分的使用减少与鼠恒定区的免疫原性相关的潜在问题。

[0114] 克隆鼠免疫球蛋白可变结构域的通用技术在例如以下出版物中有描述: Orlandi 等, Proc Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833(1989), 其以引用方式并入本文。一般而言, 鼠抗体的  $V_k$  (轻链可变区) 和  $V_H$  (重链可变区) 序列可以通过多种分子克隆程序, 例如 RT-PCR、5'-RACE 和 cDNA 文库筛选获得。具体地, 通过 RT-PCR, 通过 PCR 扩增从杂交瘤细胞中克隆出鼠 PAM4 MAbs 的  $V_H$  和  $V_k$  序列, 然后通过 DNA 测序测定它们的序列。为了证实它们的真实性, 可以按照 Orlandi 等, (Proc Natl. Acad. Sci., USA, 86:3833, 1989) 所述使克隆的  $V_k$  和  $V_H$  基因在细胞培养物中表达为嵌合 Ab。

[0115] 在优选的实施方案中, 嵌合 PAM4 抗体或抗体片段包含鼠 PAM4MAbs 的互补决定区 (CDR) 和构架区 (FR) 以及人抗体的轻链和重链恒定区, 其中嵌合 PAM4 的轻链可变区的 CDR 包含: 包含 SASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列的 CDR1、包含 STSNLAS (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列的 CDR2, 和包含 HQWNRYPYT (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列的 CDR3; 并且嵌合 PAM4 MAbs 的重链可变区的 CDR 包含: 包含 SYVLH (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列的 CDR1、包含 YINPYNDGTQYNEKFKG (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列的 CDR2 和包含 GFGGSYGFAY (SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列的 CDR3。来源于嵌合单克隆抗体的抗体组分的使用减少与鼠恒定区的免疫原性相关的潜在问题。

[0116] 鼠抗体和抗体片段的人源化也是本领域技术人员熟知的。生成人源化 MAbs 的技术公开在例如以下文献中: Carter 等, Proc Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285(1992), Singer 等, J. Immun. 150:2844(1992), Mountain 等, Biotechnol Genet Eng Rev. 10:1(1992), 和 Coligan 第 10.19.1-10.19.11 页, 这些文献以引用方式并入本文。例如, 可以通过将来自小鼠免疫球蛋白重和轻可变链的鼠互补决定区转移到人可变结构域中, 然后取代鼠对应物构架区中的人残基, 产生人源化单克隆抗体。除了人恒定区序列之外, 人构架区序列的使用还进一步减少诱导 HAMA 反应的概率。

[0117] 按照 Leung 等 (Mol Immunol. 32:1413(1995)) 所描述, 可以基于如上所述获得的 PAM4 可变区序列, 设计和构建人源化 PAM4 抗体, 该文献以引用方式并入本文。实施例 1 描述了用于构建 hPAM4 MAbs 的人源化方法。

[0118] 用于制备 hPAM4 抗体的引物的核苷酸序列在下面的实施例 1 中有讨论。在优选的实施方案中, 人源化 PAM4 抗体或抗体片段包含上面所公开的轻链和重链 CDR 序列 (SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:6)。还优选所述人源化抗体的轻链和重链可变区的 FR 包含至少一种被

鼠 PAM4 MAb 的所述相应 FR 取代的氨基酸。

[0119] 全人抗体,例如人 PAM4 可以从转基因非人动物中获得。参见,例如, Mendez 等, *Nature Genetics*, 15:146-156(1997); 美国专利第 5,633,425 号。例如,可从具有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中回收人抗体。通过灭活内源免疫球蛋白基因和引入人免疫球蛋白基因座,将小鼠体液免疫系统人源化。人免疫球蛋白基因座极其复杂,并包含大量的不连续区段,这些不连续区段总共几乎占据人基因组的 0.2%。为了确保转基因小鼠能够产生足够的抗体库,必须将人重链和轻链基因座的大部分引入小鼠基因组中。这以分步法完成,从在种系构型中含有人重链或轻链免疫球蛋白基因座的酵母人工染色体(YAC)的形成开始。因为每个插入片段大小约为 1Mb,所以 YAC 构建需要免疫球蛋白基因座的重叠片段的同源重组。通过使含有 YAC 的酵母球芽与小鼠胚胎干细胞融合将一个含有重链基因座而另一个含有轻链基因座的两个 YAC 单独地引入小鼠中。然后将胚胎干细胞克隆显微注射到小鼠囊胚中。根据通过其种系传输 YAC 的能力筛选所得嵌合雄鼠,然后使其与鼠抗体产生缺陷型小鼠品种。繁育两个转基因品系,一个含有人重链基因座,另一个含有人轻链基因座,产生在响应于免疫时产生人抗体的后代。然而,这些技术不是限制性的,也可以采用本领域已知的生成抗体的其它方法,例如使用噬菌体展示来生成抗胰腺癌抗体。

[0120] 可以采用本领域已知的方法通过细胞培养技术生成抗体。在一个实例中,转染瘤培养物适应于无血清培养基。为了生成人源化抗体,使用 HSFM 使细胞在滚瓶内生长成 500ml 培养物。离心培养物,并通过 0.2  $\mu$ m 膜过滤上清液。使过滤的培养基以 1ml/min 的流速通过蛋白 A 柱(1x3cm)。然后用约 10 个柱体积的 PBS 洗涤树脂,并用含有 10mM EDTA 的 0.1M 甘氨酸缓冲液(pH 3.5)从柱上洗脱蛋白 A 结合的抗体。将 1.0ml 级分收集在含有 10  $\mu$ l 3 M Tris(pH 8.6)的管中,从 280/260nm 处的吸光度确定蛋白质浓度。汇集峰级分,对 PBS 透析,例如用 Centricon 30 过滤器(Amicon, Beverly, MA)浓缩抗体。通过 ELISA 测定抗体浓度,并使用 PBS 将其浓度调节至约 1mg/ml。向样品中适当地加入 0.01%(w/v)叠氮化钠作为防腐剂。

[0121] 可以通过多种良好建立(well-established)的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化抗体。此类分离技术包括使用蛋白 A 琼脂糖凝胶的亲和色谱、体积排阻色谱和离子交换色谱。参见,例如, Coligan 第 2.7.1-2.7.12 页和第 2.9.1-2.9.3 页。另外,参见 Baines 等, "Purification of Immunoglobulin G(IgG)", 于 *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, 第 10 卷,第 79-104 页(The Humana Press, Inc. 1992)。

[0122] 可以通过本领域技术人员熟知的多种技术表征抗胰腺癌 MAb。例如,可以利用间接酶免疫测定、流式细胞仪分析、ELISA 或蛋白质印迹分析验证抗体结合至 PAM4 抗原的能力。

[0123] 抗体片段

[0124] 抗体片段是抗体的抗原结合部分,例如 F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、Fab、Fv、sFv、scFv 等。识别特定表位的抗体片段可以通过已知技术产生。F(ab')<sub>2</sub> 片段,例如可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生。这些和其它方法描述于,例如 Goldenberg, 美国专利第 4,036,945 号和第 4,331,647 号以及其中所包含的参考文献中。另外,参见 Nisonoff 等, *Arch Biochem. Biophys.* 89:230(1960); Porter, *Biochem. J.* 73:119(1959), Edelman 等, 于 *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 第 1 卷,第 422 页(Academic Press 1967), 和 Coligan 第 2.8.1-2.8.10 页和第 2.10.-2.10.4 页。或者,可以构建 Fab' 表达文库(Huse 等,

1989, Science, 246:1274-1281), 以允许快速且容易地鉴定出具有所需特异性的单克隆 Fab' 片段。

[0125] 单链 Fv 分子 (scFv) 包含  $V_L$  结构域和  $V_H$  结构域。 $V_L$  结构域和  $V_H$  结构域联合形成靶结合位点。这两个结构域通过肽接头 (L) 进一步共价连接。如果  $V_L$  结构域是 scFv 分子的 N 端部分, 则 scFv 分子表示为  $V_L$ -L- $V_H$ , 或者如果  $V_H$  结构域是 scFv 分子的 N 端部分, 则 scFv 分子表示为  $V_H$ -L- $V_L$ 。用于制备 scFv 分子和设计合适的肽接头的方法描述于美国专利第 4, 704, 692 号, 美国专利第 4, 946, 778 号, R. Raag 和 M. Whitlow, "Single Chain Fvs." FASEB, 第 9 卷 :73-80 (1995) 以及 R. E. Bird 和 B. W. Walker, Single Chain Antibody Variable Regions, TIBTECH, 第 9 卷 :132-137 (1991)。

[0126] 其它抗体片段, 例如单结构域抗体片段是本领域已知的, 并可以用于要求保护的构建体中。可以例如采用标准免疫技术从骆驼 (camel)、羊驼 (alpaca) 或美洲驼 (llama) 中获得单结构域抗体 (VHH)。(参见, 例如, Muyldermans 等, TIBS 26:230-235, 2001; Yau 等, J Immunol Methods 281:161-75, 2003; Maass 等, J Immunol Methods 324:13-25, 2007)。该 VHH 可以具有强大的抗原结合能力, 并可以与常规  $V_H$ - $V_L$  对所不可及的新表位相互作用。(Muyldermans 等, 2001)。羊驼血清 IgG 含有约 50% 的只有骆驼重链的 IgG 抗体 (HCAb) (Maass 等, 2007)。可以用已知抗原如 TNF- $\alpha$  免疫羊驼, 然后可以分离出结合到靶抗原上并中和靶抗原的 VHH (Maass 等, 2007)。已鉴定出扩增几乎所有羊驼 VHH 编码序列的 PCR 引物, 并可以将它用来构建羊驼 VHH 噬菌体展示文库, 可利用所述文库通过本领域熟知的标准生物淘选技术 (Maass 等, 2007) 分离抗体片段。

[0127] 可通过使全长抗体蛋白水解或者通过在大肠杆菌或另一宿主中表达编码所述片段的 DNA 来制备抗体片段。可采用常规方法, 用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全长抗体获得抗体片段。例如, 可以通过用胃蛋白酶酶裂解抗体来产生抗体片段, 从而提供称为  $F(ab')_2$  的约 100Kd 片段。这种片段可以利用硫醇还原剂和任选的用作由二硫键裂解形成的巯基的保护基进一步裂解, 从而产生约 50Kd Fab' 单价片段。或者, 利用木瓜蛋白酶的酶裂解直接产生两个单价 Fab 片段和一个 Fc 片段。

[0128] 也可以使用裂解抗体的其它方法, 如分离重链从而形成单价轻链-重链片段, 片段的进一步裂解, 或其它酶、化学或遗传技术, 只要所述片段可结合到由完整抗体识别的抗原上即可。

[0129] 抗体融合蛋白和多价抗体

[0130] 包含目标抗胰腺癌抗体的融合蛋白可以通过多种常规程序制备, 范围为从官能团之间的戊二醛连接至更多特定连接。包含本文所述的融合蛋白的抗体和 / 或抗体片段优选彼此直接共价结合或通过接头部分, 通过抗体或片段上的一个或多个官能团, 例如胺、羧基、苯基、硫醇或羟基而共价结合。除戊二醛之外, 还可以使用各种常规接头, 例如, 二异氰酸酯、二异硫氰酸酯、双(羟基琥珀酰亚胺)酯、碳二亚胺、马来酰亚胺羟基琥珀酰亚胺酯等。

[0131] 用于生成融合蛋白的一个简单方法是在戊二醛的存在下混合抗体或抗体片段。初始的希夫 (schiff) 碱键合可以例如通过用硼氢化物将其还原成仲胺来稳定化。可以用二异硫氰酸酯或碳二亚胺代替戊二醛作为非位点特异性接头。在一个实施方案中, 抗体融合蛋白包含抗胰腺癌 MAb 或其片段, 其中所述 MAb 可结合到 PAM4 抗原上。这种融合蛋白及其

片段优先结合胰腺癌细胞。这种单价单特异性 MA b 可用于直接靶向抗原,其中所述 MA b 连接至治疗剂、诊断剂或其组合,并且将蛋白质直接施用给患者。

[0132] 所述融合蛋白可以替代地包含可结合到 PAM4 抗原不同表位上的至少两种抗胰腺癌 MA b。例如,所述 MA b 可以产生抗原特异性双链抗体、三链抗体和四链抗体,它们对于 PAM4 抗原是多价的但为单特异性的。两个或更多个 scFv 分子的非共价缔合可以形成功能性双链抗体、三链抗体和四链抗体。单特异性双链抗体是相同 scFv 的同型二聚体,其中每个 scFv 均包含来自所选抗体的  $V_H$  结构域,其通过短接头连接至相同抗体的  $V_L$  结构域。双链抗体是由两个 scFv 的非共价缔合形成的二价二聚体,产生两个 Fv 结合位点。三链抗体是由三个 scFv 形成的三价三聚体,产生三个结合位点,四链抗体是由四个 scFv 形成的四价四聚体,产生四个结合位点。已使用含有包含  $V_H1$ -接头- $V_L1$  的重组基因构建体的表达载体制备数种单特异性双链抗体。参见, Holliger 等, Proc Natl. Acad. Sci USA 90:6444-6448(1993); Atwell 等, Molecular Immunology 33:1301-1302(1996); Holliger 等, Nature Biotechnology 15:632-631(1997); Helfrich 等, Int J Cancer 76:232-239(1998); Kipriyanov 等, Int J Cancer 77:763-772(1998); Holiger 等, Cancer Research 59:2909-2916(1999)。构建 scFv 的方法公开在美国专利第 4,946,778 号(1990)和美国专利第 5,132,405 号(1992)中,每篇专利的实施例部分以引用方式并入本文。基于 scFv 生成多价单特异性抗体的方法公开在美国专利第 5,837,242 号(1998)、美国专利第 5,844,094 号(1998)和 WO-98/44001(1998)中,每篇专利的实施例部分以引用方式并入本文。所述多价单特异性抗体融合蛋白结合到两个或更多个相同类型的表位上,所述表位可以位于相同的抗原或不同的抗原上。增加的化合价允许额外的相互作用、增加的亲和性和更长的停留时间。这些抗体融合蛋白可以用于直接靶向系统中,其中所述抗体融合蛋白缀合到治疗剂、诊断剂或其组合上,并直接施用给需要它的患者。

[0133] 优选的实施方案是多价多特异性抗体或其片段,其包含一个或多个对 PAM4 靶表位有亲和性的抗原结合位点,和一个或多个另外的针对与胰腺癌相关的其它表位的结合位点。这种融合蛋白是多特异性的,因为它结合至少两个不同的表位,该表位可位于相同或不同的抗原上。例如,所述融合蛋白可以包含一个以上的抗原结合位点,第一抗原结合位点对 PAM4 抗原表位有亲和性,第二抗原结合位点对另一种靶抗原如 TAG-72 或 CEA 有亲和性。另一个实例是可包含 CA19.9MAb(或其片段)和 PAM4 MA b(或其片段)的双特异性抗体融合蛋白。此种融合蛋白将对 CA19.9 和 PAM4 抗原具有亲和性。所述抗体融合蛋白及其片段可以用于直接靶向系统中,其中所述抗体融合蛋白缀合到治疗剂、诊断剂或其组合上,并直接施用给需要它的患者。

[0134] 另一个优选的实施方案是多价多特异性抗体,其包含至少一个对 PAM4 抗原表位有亲和性的结合位点和至少一个对半抗原分子有亲和性的半抗原结合位点。例如,双特异性融合蛋白可以包含 679MAb(或其片段)和 PAM4 MA b(或其片段)。单克隆 679 抗体以高亲和性结合到含有三肽部分组胺琥珀酰亚胺甘氨酸(HSG)的分子上。如上所述,此种双特异性 PAM4 抗体融合蛋白可以例如通过获得来自 679 的  $F(ab')_2$  片段来制备。用 DTT 温和地还原 679 $F(ab')_2$  片段的链间二硫桥键,需小心避免轻链-重链键合形成,从而形成  $Fab'-SH$  片段。该 SH 基团用过量的双马来酰亚胺接头(1,1'-(亚甲基二-4,1-亚苯基)双-马来酰亚胺)活化。将 PAM4 MA b 转化成  $Fab'-SH$ ,然后使其与活化的 679  $Fab'-SH$  片段反应从

而获得双特异性抗体融合蛋白。双特异性抗体融合蛋白例如这种蛋白可以用于亲和性增强系统中,其中所述靶抗原用融合蛋白进行预靶向,随后用连接至含有一种或多种 HSG 半抗原的载体部分(可靶向构建体)的诊断或治疗剂靶向。在替代的优选实施方案中,基于 DNL 的 hPAM4-679 构建体,如 TF10 可以按照下面的实施例中所描述的方法制备和使用。

[0135] 双特异性抗体可以通过多种常规方法和基因工程制备,所述常规方法为例如完整 IgG 或优选  $F(ab')_2$  片段的混合物的二硫化物裂解和重新形成,一个以上的杂交瘤融合以形成产生具有一种以上的特异性的抗体的多瘤(polyoma)。已通过氧化裂解由不同抗体的还原裂解产生的 Fab' 片段来制备双特异性抗体融合蛋白。这可有利地如下进行:将由两种不同的抗体的胃蛋白酶消化产生的两种不同的  $F(ab')_2$  片段混合,还原裂解从而形成 Fab' 片段混合物,接着氧化重新形成二硫键从而产生 Fab' 片段混合物,其包括含有对每个原始表位有特异性的 Fab' 部分的双特异性抗体融合蛋白。制备抗体融合蛋白的通用技术可见于例如 Nisonoff 等, Arch Biochem Biophys. 93:470(1961), Hammerling 等, J Exp Med. 128:1461(1968), 和美国专利第 4,331,647 号。

[0136] 更具选择性的键合可以通过使用异型双功能接头如马来酰亚胺羟基琥珀酰亚胺酯实现。所述酯与抗体或片段的反应将使所述抗体或片段上的氨基衍生化,然后所得衍生物可以与,例如具有游离巯基的抗体 Fab 片段(或具有通过例如 Traut 试剂附接在其上的巯基的较大片段或完整抗体)反应。此种接头与同一抗体中的基团交联的可能性较小,并提高键合的选择性。

[0137] 将抗体或片段在远离抗原结合位点的位点处连接是有利的。这可以通过,例如对如上所述的裂解的链间巯基进行连接来完成。另一种方法涉及使具有氧化糖部分的抗体与另一种具有至少一个游离胺官能的抗体反应。这产生初始希夫碱键合,所述希夫碱键合优选通过还原成仲胺来稳定化,例如通过硼氢化物还原,从而形成最终的复合物。对于小分子,此类位点特异性键合公开在美国专利第 4,671,958 号中,而对于较大附加物则公开在美国专利第 4,699,784 号中,每篇专利的实施例部分以引用方式并入本文。

[0138] 具有长度大于 12 个氨基酸残基的接头(例如,15 个或 18 个残基接头)的 ScFv 允许在同一链上的  $V_H$  和  $V_L$  结构域之间相互作用,一般形成单体、二聚体(称为双链抗体)和少量较高质量的多聚体的混合物(Kortt 等人, Eur J Biochem. (1994) 221:151-157)。然而,具有 5 个或更少氨基酸残基的接头的 ScFv 阻止同一链上的  $V_H$  和  $V_L$  结构域内配对,迫使与不同链上的  $V_H$  和  $V_L$  结构域配对。介于 3 个残基和 12 个残基之间的接头主要形成二聚体(Atwell 等, Protein Engineering(1999) 12:597-604)。对于介于 0 个残基和 2 个残基之间的接头,形成 scFv 的三聚体(称为三链抗体)、四聚体(四链抗体)或更高的寡聚结构;然而,除接头长度之外,寡聚化的确切模式似乎还取决于 V 结构域的组成和取向。

[0139] 最近,用于构建几乎任何组合中的抗体、抗体片段和/或其它效应部分的混合物的新技术已描述于美国专利第 7,550,143 号、第 7,521,056 号、第 7,534,866 号、第 7,527,787 号和第 7,666,400 号中,每篇专利的实施例部分以引用方式并入本文。该技术一般称为停靠和锁定(DNL),涉及在其 N 或 C 端包含两个互补肽序列之一的融合蛋白的生成,所述两个互补肽序列称为二聚化和停靠结构域(DDD)序列和锚定结构域(AD)序列。在优选的实施方案中,DDD 序列来源于 cAMP 依赖性蛋白激酶的调节亚基,而 AD 序列来源于 A 激酶锚定蛋白(AKAP)的序列。DDD 序列形成结合到 AD 序列上的二聚体,这允许三聚体、四聚

体、六聚体或多种其它复合物中的任一种的形成。通过将效应部分如抗体或抗体片段连接至 DDD 和 AD 序列,可以由任何所选的抗体或抗体片段的组合形成复合物。DNL 复合物可以通过形成二硫键或其它键合而共价稳定化。

[0140] 已知抗体

[0141] 可以利用包含任何已知抗-TAA 抗体的抗原结合可变区序列的双特异性抗体,其包括但不限于 hPAM4(美国专利第 7,282,567 号)、hA20(美国专利第 7,251,164 号)、hA19(美国专利第 7,109,304 号)、hIMMU31(美国专利第 7,300,655 号)、hLL1(美国专利第 7,312,318 号)、hLL2(美国专利第 7,074,403 号)、hMu-9(美国专利第 7,387,773 号)、hL243(美国专利第 7,612,180 号)、hMN-14(美国专利第 6,676,924 号)、hRS7(美国专利第 7,238,785 号)、hMN-3(美国专利第 7,541,440 号)、hMN-15(2010 年 7 月 29 日提交的美国专利申请序列第 12/846,062 号)和 hR1(2010 年 3 月 12 日提交的美国专利申请序列第 12/772,645 号),所列举的每篇专利或专利申请的实施例部分均以引用方式并入本文。

[0142] 其它有用的抗体可以从多种已知来源商购获得。例如,多种抗体分泌杂交瘤是得自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection)(ATCC, Manassas, VA)。针对包括但不限于肿瘤相关抗原的各种疾病靶的大量抗体已经保藏在 ATCC 和 / 或具有公开的可变区序列并且可用于要求保护的方法和组合物中。参见,例如,美国专利第 7,312,318 号、第 7,282,567 号、第 7,151,164 号、第 7,074,403 号、第 7,060,802 号、第 7,056,509 号、第 7,049,060 号、第 7,045,132 号、第 7,041,803 号、第 7,041,802 号、第 7,041,293 号、第 7,038,018 号、第 7,037,498 号、第 7,012,133 号、第 7,001,598 号、第 6,998,468 号、第 6,994,976 号、第 6,994,852 号、第 6,989,241 号、第 6,974,863 号、第 6,965,018 号、第 6,964,854 号、第 6,962,981 号、第 6,962,813 号、第 6,956,107 号、第 6,951,924 号、第 6,949,244 号、第 6,946,129 号、第 6,943,020 号、第 6,939,547 号、第 6,921,645 号、第 6,921,645 号、第 6,921,533 号、第 6,919,433 号、第 6,919,078 号、第 6,916,475 号、第 6,905,681 号、第 6,899,879 号、第 6,893,625 号、第 6,887,468 号、第 6,887,466 号、第 6,884,594 号、第 6,881,405 号、第 6,878,812 号、第 6,875,580 号、第 6,872,568 号、第 6,867,006 号、第 6,864,062 号、第 6,861,511 号、第 6,861,227 号、第 6,861,226 号、第 6,838,282 号、第 6,835,549 号、第 6,835,370 号、第 6,824,780 号、第 6,824,778 号、第 6,812,206 号、第 6,793,924 号、第 6,783,758 号、第 6,770,450 号、第 6,767,711 号、第 6,764,688 号、第 6,764,681 号、第 6,764,679 号、第 6,743,898 号、第 6,733,981 号、第 6,730,307 号、第 6,720,15 号、第 6,716,966 号、第 6,709,653 号、第 6,693,176 号、第 6,692,908 号、第 6,689,607 号、第 6,689,362 号、第 6,689,355 号、第 6,682,737 号、第 6,682,736 号、第 6,682,734 号、第 6,673,344 号、第 6,653,104 号、第 6,652,852 号、第 6,635,482 号、第 6,630,144 号、第 6,610,833 号、第 6,610,294 号、第 6,605,441 号、第 6,605,279 号、第 6,596,852 号、第 6,592,868 号、第 6,576,745 号、第 6,572,856 号、第 6,566,076 号、第 6,562,618 号、第 6,545,130 号、第 6,544,749 号、第 6,534,058 号、第 6,528,625 号、第 6,528,269 号、第 6,521,227 号、第 6,518,404 号、第 6,511,665 号、第 6,491,915 号、第 6,488,930 号、第 6,482,598 号、第 6,482,408 号、第 6,479,247 号、第 6,468,531 号、第 6,468,529 号、第 6,465,173 号、第 6,461,823 号、第 6,458,356 号、第 6,455,044 号、第 6,455,040 号、第 6,451,310 号、第 6,444,206 号、第 6,441,143 号、第 6,432,404

号、第 6, 432, 402 号、第 6, 419, 928 号、第 6, 413, 726 号、第 6, 406, 694 号、第 6, 403, 770 号、第 6, 403, 091 号、第 6, 395, 276 号、第 6, 395, 274 号、第 6, 387, 350 号、第 6, 383, 759 号、第 6, 383, 484 号、第 6, 376, 654 号、第 6, 372, 215 号、第 6, 359, 126 号、第 6, 355, 481 号、第 6, 355, 444 号、第 6, 355, 245 号、第 6, 355, 244 号、第 6, 346, 246 号、第 6, 344, 198 号、第 6, 340, 571 号、第 6, 340, 459 号、第 6, 331, 175 号、第 6, 306, 393 号、第 6, 254, 868 号、第 6, 187, 287 号、第 6, 183, 744 号、第 6, 129, 914 号、第 6, 120, 767 号、第 6, 096, 289 号、第 6, 077, 499 号、第 5, 922, 302 号、第 5, 874, 540 号、第 5, 814, 440 号、第 5, 798, 229 号、第 5, 789, 554 号、第 5, 776, 456 号、第 5, 736, 119 号、第 5, 716, 595 号、第 5, 677, 136 号、第 5, 587, 459 号、第 5, 443, 953 号和第 5, 525, 338 号, 其中的每篇专利的实施例部分均以引用方式并入本文。这些仅为示例性的, 多种其它抗体及其杂交瘤是本领域已知的。技术人员将会意识到, 针对几乎任何疾病相关抗原的抗体序列或抗体分泌杂交瘤都可以通过在 ATCC、NCBI 和 / 或 USPTO 数据库中简单地检索针对选定的目标疾病相关靶的抗体而获得。可以采用本领域熟知的标准技术, 对克隆的抗体的抗原结合结构域进行扩增、切除、连接到表达载体中、转染到适应的宿主细胞中并用于蛋白质生成。

#### [0143] 预靶向

[0144] 双特异性或多特异性抗体可以用于预靶向技术中。预靶向是多步骤过程, 最初开发用于解决直接靶向抗体的血液清除缓慢, 导致对正常组织如骨髓造成不期望的毒性的问题。利用预靶向, 放射性核素或其它治疗剂连接至小递送分子 (可靶向构建体或可靶向缀合物) 上, 这种小分子可在几分钟内从血液中清除。首先施用具有针对可靶向构建体和靶抗原的结合位点的预靶向双特异性或多特异性抗体, 使游离抗体从循环中清除, 然后施用可靶向构建体。

[0145] 预靶向方法是本领域熟知的, 例如, 如以下所公开的: Goodwin 等, 美国专利第 4, 863, 713 号; Goodwin 等, J. Nucl. Med. 29:226, 1988; Hnatowich 等, J. Nucl. Med. 28:1294, 1987; Oehr 等, J. Nucl. Med. 29:728, 1988; Klibanov 等, J. Nucl. Med. 29:1951, 1988; Sinitsyn 等, J. Nucl. Med. 30:66, 1989; Kalofonos 等, J. Nucl. Med. 31:1791, 1990; Schechter 等, Int. J. Cancer 48:167, 1991; Paganelli 等, Cancer Res. 51:5960, 1991; Paganelli 等, Nucl. Med. Commun. 12:211, 1991; 美国专利第 5, 256, 395 号; Stickney 等, Cancer Res. 51:6650, 1991; Yuan 等, Cancer Res. 51:3119, 1991; 美国专利第 6, 077, 499 号; 美国专利第 6, 090, 381 号; 美国专利第 6, 472, 511 号; 和美国专利第 6, 962, 702 号。

[0146] 治疗或诊断受试者的疾病或病症的预靶向方法可以通过如下提供: (1) 向受试者施用双特异性抗体或抗原结合抗体片段; (2) 任选地向受试者施用清除组合物, 并允许所述组合物从循环中清除抗体; 和 (3) 向受试者施用含有一种或多种螯合或化学结合的治疗剂或诊断剂的可靶向构建体。该技术也可以用于抗体依赖性酶前药疗法 (ADEPT), 方法是施用缀合到可靶向构建体上的酶, 接着施用可被所述酶转化成活性形式的前药。

#### [0147] 抗体的治疗和诊断用途

[0148] 某些实施方案涉及诊断或治疗受试者的恶性肿瘤的方法, 其包括向受试者施用抗胰腺癌 MAbs、融合蛋白或其片段, 其中所述 MAbs、融合蛋白或片段结合到至少一种诊断剂和 / 或治疗剂上。还优选诊断或治疗癌症的方法, 其包括向受试者施用包含一个或多个针对

PAM4 抗原的抗原结合位点和一个或多个半抗原结合位点的多价多特异性抗体或其片段,等待足够长的时间以便未结合抗体从受试者血流中清除;和然后向受试者施用包含诊断剂、治疗剂或其组合并可结合到定位抗体的半抗原结合位点上的载体分子。在更优选的实施方案中,所述癌症是非内分泌性胰腺癌。

[0149] MAb 在体外诊断中的用途是熟知的。参见,例如, Carlsson 等, *Bio/Technology* 7(6):567(1989)。例如,可以利用 MAb 检测来自活检样品的组织中肿瘤相关抗原的存在。采用诸如放射免疫测定、酶联免疫吸附测定和荧光免疫测定的技术,MAb 也可用来测量临床流体样品中肿瘤相关抗原的量。下面进一步详细讨论体外和体内诊断方法。

[0150] 肿瘤靶向的 MAb 和毒素的缀合物可以用来在体内选择性地灭杀癌细胞 (Spalding, *Bio/Technology* 9(8):701(1991); Goldenberg, *Scientific American Science & Medicine* 1(1):64(1994))。例如,在实验性动物模型中进行的治疗研究已证明携带细胞毒放射性核素的抗体的抗肿瘤活性 (Goldenberg 等, *Cancer Res.* 41:4354(1981), Cheung 等, *J. Nat'l Cancer Inst.* 77:739(1986), 和 Senekowitsch 等, *J. Nucl. Med.* 30:531(1989))。在优选的实施方案中,所述缀合物包含  $^{90}\text{Y}$  标记的 hPAM4 抗体。所述缀合物可任选地与一种或多种其它治疗剂结合施用。在优选的实施方案中,将  $^{90}\text{Y}$  标记的 hPAM4 与吉西他滨或 5-氟尿嘧啶一起施用给胰腺癌患者。在进一步优选的实施方案中,  $^{90}\text{Y}$  缀合到用于连接至 hPAM4 的 DOTA 螯合物上。在又进一步优选的实施方案中,  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-hPAM4 与吉西他滨以分次给药方式组合,包括,例如其中重复的较低的低毒性剂量的吉西他滨与较低的分次剂量的  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-hPAM4 组合的治疗周期。

[0151] 因为能耐受,所以这种分次给药方案的重复周期是适用的。举例来说,每周 4 剂  $200\text{mg}/\text{m}^2$  吉西他滨与每周 3 剂  $8\text{mg}/\text{m}^2$   $^{90}\text{Y}$ -DOTA-hPAM4 组合,构成单个治疗周期,后者开始于吉西他滨施用的第二周。每种组分的又其它较高和较低的剂量也可构成分次剂量,分次剂量由评估造血毒性的常规方式确定(参见,例如,美国专利第 6,649,352 号、第 7,112,409 号、第 7,279,289 号、第 7,465,551 号),因为这两种药剂的骨髓抑制作用可以累加。此种治疗干预的医师可以根据患者的骨髓状态和总体健康状态,根据包括先前暴露于骨髓抑制治疗剂在内的许多因素调整这些剂量。这些原则也可应用于放射性标记 hPAM4 与包括放射增敏药物例如 5-氟尿嘧啶和顺铂在内的其它治疗剂的组合。

[0152] 嵌合抗体、人源化抗体和人抗体及其片段已用于体内治疗和诊断方法。因此涵盖将诊断剂或治疗剂或其组合递送至靶的方法,其包括 (i) 提供包含缀合到至少一种诊断剂和 / 或治疗剂上的抗胰腺癌抗体或其片段(如嵌合、人源化或人 PAM4 抗体)的组合物,和 (ii) 将所述诊断或治疗抗体缀合物施用给受试者。在优选的实施方案中,抗胰腺癌抗体及其片段是人源化或全人的。

[0153] 另一个实施方案涉及治疗恶性肿瘤的方法,其包括施用裸抗胰腺癌抗体、抗体片段或融合蛋白,例如 PAM4 抗体,单独施用或与一种或多种其它治疗剂结合施用。所述其它治疗剂可以在所述抗体之前、与所述抗体同时,或在所述抗体之后加入。在优选的实施方案中,所述治疗剂是吉西他滨,并且在更优选的实施方案中,吉西他滨与 hPAM4 放射性缀合物一起按分次给药方案给予,以低于每周给予一次持续 6 周的吉西他滨的常规  $800\text{--}1,000\text{mg}/\text{m}^2$  剂量的剂量。例如,当与分次治疗剂量的  $^{90}\text{Y}$ -PAM4 组合时,重复输注旨在用作放射增敏剂的  $200\text{--}380\text{mg}/\text{m}^2$  吉西他滨分次剂量。技术人员将会意识到,本文描述和要求保护的抗体、

融合蛋白和/或其片段可以与包括但不限于热休克蛋白质 90 (Hsp90) 的任何已知或描述的治疗剂一起施用。

[0154] 在另一种形式的多元模式治疗中,受试者接受与标准癌症化疗结合的免疫缀合物。例如,“CVB”(1.5g/m<sup>2</sup> 环磷酰胺、200-400mg/m<sup>2</sup> 依托泊苷 (Etoposide) 和 150-200mg/m<sup>2</sup> 卡莫司汀 (carmustine)) 是用于治疗非霍奇金淋巴瘤的治疗方案。Patti 等, Eur. J. Haematol. 51:18(1993)。其它合适的组合化疗方案是本领域技术人员熟知的。参见,例如, Freedman 等, “Non-Hodgkin’s Lymphomas,” 于 CANCER MEDICINE, 第 2 卷, 第三版, Holland 等(编), 第 2028-2068 页 (Lea& Febiger 1993)。举例来说,中间级非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 治疗的第一代化疗方案包括 C-MOPP(环磷酰胺、长春新碱、甲基苄肼 (procarbazine) 和强的松 (prednisone)) 和 CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和强的松)。有用的第二代化疗方案为 m-BACOD(甲氨喋呤、博莱霉素、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、地塞米松和甲酰四氢叶酸 (leucovorin)), 而合适的第三代治疗方案为 MACOP-B(甲氨喋呤、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、强的松、博莱霉素和甲酰四氢叶酸)。另外有用的药物包括丁酸苯酯、苯达莫司汀 (bendamustine) 和 苔藓抑制素 -1 (bryostatins-1)。

[0155] 本发明涵盖包括融合蛋白及其片段在内的抗胰腺癌抗体及其片段作为裸抗体或抗体片段的单独施用,或作为多元模式治疗施用。优选地,所述抗体是人源化或全人 PAM4 抗体或其片段。多元模式治疗进一步包括利用裸抗胰腺癌抗体进行的免疫治疗,其中施用裸抗体、融合蛋白形式或作为免疫缀合物的其它抗体作为补充。例如,人源化或全人 PAM4 抗体可以与另一种裸抗体,或缀合到同位素、一种或多种化疗剂、细胞因子、毒素或其组合上的人源化 PAM4 抗体或其它抗体组合。例如,本发明涵盖裸或缀合 PAM4 抗体或其片段的治疗,所述治疗在其它胰腺肿瘤相关抗体的治疗之前,与其组合或在其之后进行,所述其它胰腺肿瘤相关抗体例如 CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、抗 -Le<sup>a</sup> 抗体,和针对其它路易斯抗原(例如 Le(y)) 的抗体,以及针对以下的抗体:癌胚抗原 (CEA 或 CEACAM5)、CEACAM6、结肠特异性抗原 -p (CSAp)、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、HLA-DR、CD40、CD74、CD138、HER2/neu、EGFR、EGP-1、EGP-2、血管生成因子(例如 VEGF、PlGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、肌腱蛋白、血小板衍生生长因子和 IL-6 及癌基因产物(例如 bcl-2、Kras、p53)、cMET,以及针对肿瘤坏死物质的抗体。

[0156] 这些实体瘤抗体可以是裸抗体或缀合到尤其是药物、毒素、同位素、放射性核素或免疫调节剂上的抗体。可以构建许多不同的抗体组合,它们可以以裸或缀合形式使用。或者,不同的裸抗体组合可以用于与连续给予、同时给予或相继给予的其它治疗剂例如细胞毒性药物或辐射组合施用。

[0157] 所述抗体及其片段的施用可以通过静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、胸膜内、鞘内、通过区域导管灌注,或直接病变内注射进行。当通过注射施用所述抗体时,所述施用可以是连续输注或单次或多次快速推注。

[0158] 可以配制本发明的免疫缀合物用于静脉施用,经由例如快速推注射或连续输注施用。优选地,本发明抗体在少于约 4 小时的时间内输注,更优选在少于约 3 小时的时间内输注。例如,前 25-50mg 可以在 30 分钟内,优选甚至 15 分钟内输注,其余部分在接下来的 2 至 3 小时内输注。注射制剂可以单位剂量形式存在于例如安培瓶或多剂量容器中,其中添加有防腐剂。该组合物可以采取诸如在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳剂的形式,

并可以含有配制剂例如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。或者,活性成分可以呈粉末形式,其在使用前用合适的媒介物例如无菌无热原水构建 (constitution)。

[0159] 可以采用另外的药学方法控制治疗缀合物的作用持续时间。可以通过使用聚合物来复合或吸附免疫缀合物来制备控释制剂。例如,生物相容性聚合物包括乙烯-醋酸乙烯共聚物基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酞共聚物基质。Sherwood 等, *Bio/Technology* 10:1446 (1992)。免疫缀合物或抗体从此种基质释放的速率取决于免疫缀合物或抗体的分子量、基质内免疫缀合物或抗体的量和分散颗粒的大小。Saltzman 等, *Biophys. J.* 55:163 (1989); Sherwood 等, 出处同上。其它固体剂型描述于以下文献中: Ansel 等, *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS*, 第 5 版 (Lea &Febiger 1990), 和 Gennaro (编), *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 第 18 版 (Mack Publishing Company 1990), 及其修订版。

[0160] 一般而言,免疫缀合物对于人的施用剂量将根据诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医学病状和以往病史等因素而变化。期望为接受者提供在约 1mg/kg 至 25mg/kg 范围内的作为单次静脉输注的免疫缀合物、抗体融合蛋白的剂量,但如情况需要也可以施用较低或较高的剂量。对于 70kg 患者而言 1-20mg/kg 的剂量例如为 70-1,400mg,或者对于 1.7-m 患者为 41-824mg/m<sup>2</sup>。这个剂量可以根据需要重复给予,例如,每周一次持续 4 至 10 周、每周一次持续 8 周,或每周一次持续 4 周。它也可以根据维持疗法的需要,以更低的频率给予,例如每隔一周一次持续数月,或者每月或每季度一次持续几个月。

[0161] 或者,抗体可以按照每 2 周或 3 周一剂施用,总共重复至少 3 剂。或者,所述抗体可以每周施用 2 次,持续 4 至 6 周。如果将所述剂量减低至约 200-300mg/m<sup>2</sup> (对于 1.7-m 患者为 340mg/剂,或者对于 70kg 患者为 4.9mg/kg),则它可以每周施用一次或甚至两次,持续 4 至 10 周。或者,可以减少给药日程 (dosage schedule),即,每 2 或 3 周一剂持续 2 至 3 个月。然而,已经确定,在重复给药周期内即使较高的剂量例如每周一次或每 2 至 3 周一剂的 20mg/kg 也可以通过缓慢的静脉输注施用。所述给药方案可任选地以其它间隔重复,并且可以通过各种肠胃外途径给药,并可适当地调整剂量和方案。

[0162] 免疫缀合物

[0163] 抗胰腺癌抗体及其片段可以缀合到至少一种用于治疗或诊断的治疗和 / 或诊断剂上。对于免疫疗法,目标是将细胞毒性剂量的放射性、毒素、抗体和 / 或药物递送至靶细胞,同时将暴露于非靶组织的量减至最小。优选将抗胰腺癌抗体用于诊断和 / 或治疗胰腺肿瘤。

[0164] 可采用本领域已知的多种技术,使所述抗体、抗体片段和融合蛋白中的任一者与一种或多种治疗或诊断剂缀合。可以使一种或多种治疗或诊断剂连接至每种抗体、抗体片段或融合蛋白上,例如通过使试剂缀合到所述抗体 Fc 区中的糖部分上进行。如果不存在 Fc 区 (例如在使用某些抗体片段时),则可以将糖部分引入到抗体或抗体片段的轻链可变区中,治疗剂或诊断剂可连接至所述糖部分。参见,例如, Leung 等, *J Immunol.* 154:5919 (1995); Hansen 等, 美国专利第 5,443,953 号 (1995), Leung 等, 美国专利第 6,254,868 号, 每篇专利的实施例部分均以引用方式并入本文。

[0165] 使肽与抗体组分经由抗体糖部分缀合的方法是本领域技术人员熟知的。参见,例如, Shih 等, *Int J Cancer* 41:832 (1988); Shih 等, *Int J Cancer* 46:1101 (1990); 和 Shih

等,美国专利第 5,057,313 号,其实施例部分以引用方式并入本文。通用方法涉及使具有氧化糖部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能并加载有多种治疗剂如肽或药物的载体聚合物反应。这种反应产生初始希夫碱(亚胺)键合,该键合可以通过还原成仲胺从而形成最终缀合物来稳定化。

[0166] 抗体融合蛋白或多特异性抗体包含两种或更多种抗体或其片段,它们中的每种均可连接至至少一种治疗剂和/或诊断剂。因此,所述抗体融合蛋白的一种或多种抗体或其片段可以具有一种以上连接的治疗和/或诊断剂。进一步地,所述治疗剂不必相同,而可以是不同的治疗剂,例如可以将药物和放射性同位素连接至同一融合蛋白。例如,IgG 可用  $^{131}\text{I}$  放射性标记并且可连接至药物。可以将  $^{131}\text{I}$  并入到 IgG 的酪氨酸和连接至 IgG 赖氨酸的  $\epsilon$  氨基的药物中。也可以将治疗剂和诊断剂都连接至还原 SH 基团和连接至抗体的糖侧链。或者,双特异性抗体可以包含一种针对疾病抗原的抗体或其片段,和另一种针对连接至可靶向构建体的半抗原的抗体或其片段,以便用于如上所述的预靶向技术中。

[0167] 治疗剂或诊断剂可以通过二硫键的形成而连接在还原抗体组分的铰链区。作为替代,可以使用异型双功能交联剂如 N-琥珀酰基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP) 将此类试剂连接至抗体组分。Yu 等, *Int. J. Cancer* 56:244(1994)。此种缀合的通用技术是本领域熟知的。参见,例如, Wong, *CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING* (CRC Press 1991); Upešlaciš 等, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," 于 *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS*, Birch 等(编), 第 187-230 页 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," 于 *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION*, Ritter 等(编) 第 60-84 页 (Cambridge University Press 1995)。

[0168] 点击化学

[0169] 将螯合部分、药物或其它官能团连接至抗体、片段或融合蛋白的替代方法涉及点击化学反应的使用。点击化学途径最初被设想为通过以模块化方式将小亚基接合在一起来迅速产生复杂物质的方法。(参见,例如, Kolb 等, 2004, *Angew Chem Int Ed* 40:3004-31; Evans, 2007, *Aust J Chem* 60:384-95)。各种形式的点击化学反应是本领域已知的,如 Huisgen 1,3-偶极环加成铜催化反应 (Tornøe 等, 2002, *J Organic Chem* 67:3057-64), 这通常称为“点击反应”。其它替代反应包括环加成反应,例如 Diels-Alder 反应、亲核取代反应(尤其对于小的张力环,如环氧和氮丙啶化合物)、尿素化合物的羰基化学形成反应,和涉及碳-碳双键如巯基-炔反应中的炔烃的反应。

[0170] 叠氮化物-炔烃 Huisgen 环加成反应在还原剂的存在下使用铜催化剂催化连接至第一分子的末端炔基的反应。在包含叠氮化物部分的第二分子的存在下,该叠氮化物与活化炔烃反应从而形成 1,4-二取代的 1,2,3-三唑。该铜催化的反应在室温下进行,并且具有足够的特异性以致反应产物通常不需要纯化。(Rostovstev 等, 2002, *Angew Chem Int Ed* 41:2596; Tornøe 等, 2002, *J Org Chem* 67:3057)。叠氮和炔烃官能团对于水性介质中的生物分子在很大程度上是惰性的,使得该反应在复合溶液中进行。所形成的三唑是化学稳定的,并且没有发生酶裂解,使得点击化学产物在生物系统中高度稳定。虽然铜催化剂对活细胞有毒性,但基于铜的点击化学反应可以在体外用于免疫缀合物形成。

[0171] 已建议将无铜点击反应用于生物分子的共价修饰。(参见,例如, Agard 等, 2004, JAm Chem Soc 126:15046-47) 无铜点击反应使用环张力代替铜催化剂来促进 [3+2] 叠氮化物-炔烃环加成反应(同上)。例如,环辛炔是包含内部炔键的 8-碳环结构。该封闭环结构诱导乙炔的显著键角变形,其与叠氮基高度反应从而形成三唑。因而,环辛炔衍生物可用于无铜点击反应(同上)。

[0172] 另一类无铜点击反应在 Ning 等(2010, Angew Chem Int Ed49:3065-68) 中有报道,涉及张力促进的炔烃-硝酮环加成反应。为了解决原始环辛炔反应速率慢的问题,将吸电子基团与三键邻接(同上)。此种取代的环辛炔实例包括二氟化环辛炔、4-二苯并环辛醇和氮杂环辛炔(同上)。替代的无铜反应涉及张力促进的炔烃-硝酮环加成从而得到 N-烷基化异噁唑啉(同上)。该反应据报道具有异常迅速的反应动力学并用于位点特异性的肽和蛋白质修饰的一锅三步骤方案(同上)。硝酮由合适的醛与 N-甲基羟胺缩合制备,该环加成反应在乙腈和水的混合物中进行(同上)。这些和其它已知点击化学反应可以用来在体外将整合部分连接至抗体或其它靶向分子。

#### [0173] 治疗剂

[0174] 多种多样的治疗剂可以同时或相继施用,或者有利地缀合到本发明抗体上,例如,药物、毒素、寡核苷酸、免疫调节剂、激素、激素拮抗剂、酶、酶抑制剂、放射性核素、血管生成抑制剂、促凋亡剂,等等。此处列举的治疗剂是可用于缀合到抗体、片段或融合蛋白上或者与如上所述的裸抗体独立施用的那些试剂。

[0175] 治疗剂包括,例如化疗药物,如长春花生物碱、蒽环霉素、吉西他滨、表鬼臼毒素、紫杉烷、抗代谢物、烷化剂、抗生素、SN-38、COX-2 抑制剂、抗有丝分裂物质、抗血管生成和细胞凋亡剂,特别是多柔比星、甲氨蝶呤、紫杉醇、CPT-11、喜树碱、蛋白酶体抑制剂、mTOR 抑制剂、HDAC 抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂,和其它来自这些和其它类别的抗癌剂的药物。

[0176] 其它有用的癌症化疗药物包括氮芥、烷基磺酸酯、亚硝基脲、三氮烯、叶酸类似物、COX-2 抑制剂、抗代谢物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、铂配合物、mTOR 抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、HDAC 抑制剂、喜树碱和激素。合适的化疗剂描述于 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 19 版 (Mack Publishing Co.1995), 以及 GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 第 7 版 (MacMillan Publishing Co. 1985), 以及这些出版物的修订版中。其它合适的化疗剂,例如实验用药物是本领域技术人员已知的。

[0177] 在优选的实施方案中,喜树碱和相关化合物,例如 SN-38 的缀合物可以缀合到 hPAM4 或其它抗胰腺癌抗体上,例如如美国专利第 7,591,994 号和 2006 年 3 月 23 日提交的美国专利申请序列 11/388,032 中所公开的,其每个的实施例部分以引用方式并入本文。

[0178] 在另一个优选的实施方案中,hPAM4 抗体缀合到吉西他滨上,吉西他滨可以在裸或缀合的嵌合、人源化或人 PAM4 抗体之前、之后或同时给予。优选地,所述缀合的 hPAM4 抗体或抗体片段缀合到放射性核素上。

[0179] 毒素可以来源于动物、植物或微生物。毒素,例如假单胞菌外毒素也可以复合到抗胰腺癌的免疫缀合物和 hPAM4 抗体的治疗剂部分上,或者形成抗胰腺癌的免疫缀合物和 hPAM4 抗体的治疗剂部分。其它适用于此类缀合物或其它融合蛋白制备的毒素包括蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶 (RNA 酶)、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 A、商陆

抗病毒蛋白、白树毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。参见,例如, Pastan 等, Cell 47:641(1986), Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43(1994), Sharkey 和 Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 56:226(2006)。另外的适用毒素是本领域技术人员已知的,公开在美国专利第 6,077,499 号中,其实施例部分以引用方式并入本文。

[0180] 免疫调节剂,例如细胞因子,也可以缀合到所述免疫缀合物的治疗剂部分上或者形成所述免疫缀合物的治疗剂部分,或者可以与抗体、抗体片段或融合蛋白一起施用但没有缀合到所述抗体、抗体片段或融合蛋白上。所述融合蛋白可以包含结合到不同抗原上的一种或多种抗体或其片段。例如,所述融合蛋白可以结合 PAM4 抗原以及结合免疫调节细胞或因子。或者,受试者可以接受裸抗体、抗体片段或融合蛋白和独立施用的细胞因子,所述细胞因子可在施用所述裸抗体之前、同时或之后施用。本文所用的术语“免疫调节剂”包括细胞因子、淋巴因子、单核因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、造血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、甲状旁腺激素、甲状腺素、胰岛素、胰岛素原、松弛素、松弛素原、卵泡刺激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)、促黄体激素(LH)、肝生长因子、前列腺素、成纤维细胞生长因子、促乳激素、胎盘催乳素、OB 蛋白、转化生长因子(TGF)、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、胰岛素样生长因子(IGF)、促红细胞生成素、促血小板生成素、肿瘤坏死因子(TNF)、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、苗勒氏管抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、激活素、血管内皮生长因子、整联蛋白、白介素(IL)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $\beta$ 、干扰素- $\gamma$ 、S1 因子、IL-1、IL-1cc、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21 和 IL-25、LIF、kit 配体、FLT-3、血管抑制素、血小板反应蛋白、内皮细胞抑制素和 LT。

[0181] 所述治疗剂可以包含可用于治疗患病组织的一种或多种放射性同位素。特别有用的治疗放射性核素包括但不限于  $^{111}\text{In}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{77}\text{As}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{169}\text{Er}$ 、 $^{194}\text{Ir}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$  和  $^{211}\text{Pb}$ 。优选所述治疗放射性核素的衰变能量对于俄歇发射体在 20 至 6,000keV 的范围内,优选在 60 至 200keV 的范围内,对于  $\beta$  发射体为 100 至 2,500keV,对于  $\alpha$  发射体为 4,000 至 6,000keV。有用的  $\beta$  粒子发射核素的最大衰变能量优选为 20 至 5,000keV,更优选 100 至 4,000keV,最优选 500 至 2,500keV。还优选基本上为俄歇发射粒子衰变的放射性核素。例如,Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m 和 Ir-192。有用的  $\beta$  粒子发射核素的衰变能量优选 <1,000keV,更优选 <100keV,最优选 <70keV。还优选基本上为产生  $\alpha$  粒子衰变的放射性核素。此类放射性核素包括但不限于 Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213 和 Fm-255。有用的  $\alpha$  粒子发射放射性核素的衰变能量优选为 2,000 至 10,000keV,更优选为 3,000 至 8,000keV,最优选为 4,000 至 7,000keV。

[0182] 例如, $^{67}\text{Cu}$  由于其 61.5 小时的半衰期和充足的  $\beta$  粒子和  $\gamma$  射线供应而被认为是用于放射免疫疗法的较有前途的放射性同位素之一,可以利用螯合剂对溴乙酰氨基- $\gamma$ -氨基-四乙胺四乙酸(TETA)使它缀合到抗体上。或者,可以利用二亚乙基三胺五乙酸(DTPA),或更优选利用 DOTA 使发射高能  $\beta$  粒子的  $^{90}\text{Y}$  可偶联至抗体、抗体片段或融合蛋白。使  $^{90}\text{Y}$  缀

合到抗体或可靶向构建体上的方法是本领域已知的,并可以采用任何此类已知的方法。(参见,例如,美国专利第 7, 259, 249 号,其实施例部分以引用方式并入本文。另外参见 Lindén 等, Clin Cancer Res. 11:5215-22, 2005; Sharkey 等, J Nucl Med. 46:620-33, 2005; Sharkey 等, J Nucl Med. 44:2000-18, 2003)。

[0183] 另外的潜在的治疗放射性同位素包括  $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{224}\text{Ac}$ 、 $^{126}\text{I}$ 、 $^{133}\text{I}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{113}\text{mIn}$ 、 $^{95}\text{Ru}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{105}\text{Ru}$ 、 $^{107}\text{Hg}$ 、 $^{203}\text{Hg}$ 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{165}\text{Tm}$ 、 $^{167}\text{Tm}$ 、 $^{168}\text{Tm}$ 、 $^{197}\text{Pt}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{169}\text{Yb}$  等。

[0184] 在另一个实施方案中,放射增敏剂可以与裸或缀合抗体或抗体片段组合使用。例如,放射增敏剂可以与放射性标记抗体或抗体片段组合使用。当与用单独的放射性标记抗体或抗体片段治疗相比时,放射增敏剂的加入可以增强效力。放射增敏剂描述于 D. M. Goldenberg (编), CANCER THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODIES, CRC Press (1995) 中。可用于这个技术的其它典型的目标放射增敏剂包括吉西他滨、5-氟尿嘧啶和顺铂,它们已经与外部照射组合用于包括胰腺癌在内的多种癌症的治疗。因此,我们已研究被认为是吉西他滨放射增敏剂量(在 4 周内,每周一次  $200\text{mg}/\text{m}^2$ ) 的剂量的吉西他滨与分次剂量的  $^{90}\text{Y}$ -hPAM4 组合的组合,已观察到在被证明能很好耐受(无 3-4 级毒性,根据 NCI-CTC v. 3 标准)的单个周期的这种组合治疗后胰腺癌减轻的客观证据。

[0185] 通常将会按相似的方式产生具有加载硼附加物的载体用于供热中子激活疗法的抗体或其片段。然而,等到非靶向的免疫缀合物清除之后才执行中子照射将是有利的。可以利用结合到抗胰腺癌抗体上的抗独特型抗体加速清除。有关这种一般原理的描述,参见美国专利第 4, 624, 846 号。可以将硼附加物例如碳硼烷连接至抗体。如本领域熟知的,可以用侧挂型侧链上的羧基官能制备碳硼烷。可以通过激活碳硼烷的羧基并与载体上的胺缩合,实现碳硼烷与载体例如氨基葡聚糖的连接。然后使中间缀合物缀合到抗体上。施用抗体缀合物后,硼附加物由热中子照射激活并转化成放射性原子,放射性原子通过  $\alpha$  发射衰变从而产生高毒性短程效应。

[0186] 干扰 RNA

[0187] 另一类治疗剂是 RNAi 或 siRNA。RNA 干扰 (RNAi) 由 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 介导,并由与催化 RISC 成分 argonaute 相互作用的短双链 RNA 分子启动 (Rand 等, 2005, Cell 123:621-29)。RNAi 分子的类型包括微 RNA (miRNA) 和小干扰 RNA (siRNA)。RNAi 物种可以通过互补碱基配对与信使 RNA (mRNA) 结合,并通过转录后基因沉默抑制基因表达。结合到互补 mRNA 物种上后, RNAi 诱导 RISC 的 argonaute 成分裂解所述 mRNA 分子。除其它特征外, miRNA 和 siRNA 的差异在于对特定基因靶的特异性程度,其中 siRNA 相对而言对特定靶基因有特异性,而 miRNA 抑制多个 mRNA 物种的翻译。

[0188] 已尝试将 RNAi 抑制选定基因表达的治疗用途用于多种疾病状态,例如黄斑变性和呼吸道合胞病毒感染 (Sah, 2006, Life Sci 79:1773-80)。已表明 siRNA 在宿主细胞中起着抵抗病毒感染的作用,并已对 siRNA 作为抗病毒治疗的途径进行广泛地研究(参见,例如, Zhang 等, 2004, Nature Med 11:56-62; Novina 等, 2002, Nature Med 8:681-86; Palliser 等, 2006, Nature 439:89-94)。也已尝试将 siRNA 用于癌症治疗。Fujii 等 (2006, Int J Oncol 29:541-48) 用针对 HPV E6 和 E7 的 siRNA 转染 HPV 阳性宫颈癌细胞,并抑制了肿瘤生长。已报道乳腺癌细胞中 siRNA 介导的异粘蛋白 (metadherin) 表达敲低抑制实验性肺

转移 (Brown 和 Ruoslahti, 2004, *Cancer Cell* 5:365-74)。

[0189] 已尝试提供靶向的 siRNA 递送以便减少脱靶毒性的可能性。Song 等 (2005, *Nat Biotechnol* 23:709-17) 使用针对 HIV 包膜蛋白的鱼精蛋白缀合的 Fab 片段将 siRNA 递送至循环细胞。Schiffelers 等 (2004, *Nucl Acids Res* 32:e149) 使 RGD 肽缀合到纳米粒子上从而将抗-VEGFR2 siRNA 递送至肿瘤并抑制裸小鼠的肿瘤血管生成和生长速率。Dickerson 等使用抗-EphA2 受体肽官能化的纳米凝胶, 用针对 EGFR 的 siRNA 来增加卵巢癌细胞对化疗的敏感度。树状高分子缀合的磁性纳米粒子已应用于反义存活素寡脱氧核苷酸的靶向递送 (Pan 等, 2007, *Cancer Res* 67:8156-63)。

[0190] 技术人员将会意识到任何 siRNA 或干扰 RNA 物种都可以连接至题述抗体。针对多种多样的靶的 siRNA 和 RNAi 物种是本领域已知的, 而且在要求保护的方法和组合物中可以利用任何此类已知的寡核苷酸物种。

[0191] 具有潜在用途的已知 siRNA 物种包括对 IKK- $\gamma$  有特异性的那些 (美国专利第 7, 022, 828 号); VEGF、Flt-1 和 Flk-1/KDR (美国专利第 7, 148, 342 号); Bcl2 和 EGFR (美国专利第 7, 541, 453 号); CDC20 (美国专利第 7, 550, 572 号); 转导素 ( $\beta$ )-样 3 (美国专利第 7, 576, 196 号); KRAS (美国专利第 7, 576, 197 号); 碳酸酐酶 II (美国专利第 7, 579, 457 号); 补体成分 3 (美国专利第 7, 582, 746 号); 白介素-1 受体相关激酶 4 (IRAK4) (美国专利第 7, 592, 443 号); 存活素 (美国专利第 7, 608, 7070 号); 过氧化物歧化酶 1 (美国专利第 7, 632, 938 号); MET 原癌基因 (美国专利第 7, 632, 939 号);  $\beta$  淀粉样前体蛋白 (APP) (美国专利第 7, 635, 771 号); IGF-1R (美国专利第 7, 638, 621 号); ICAM1 (美国专利第 7, 642, 349 号); 补体因子 B (美国专利第 7, 696, 344 号); p53 (7, 781, 575), 和载脂蛋白 B (7, 795, 421), 其中的每篇专利的实施例部分均以引用方式并入本文。

[0192] 另外的 siRNA 物种可得自己知商业来源, 例如 Sigma-Aldrich (St Louis, MO)、Invitrogen (Carlsbad, CA)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、Ambion (Austin, TX)、Dharmacon (Thermo Scientific, Lafayette, CO)、Promega (Madison, WI)、Mirus Bio (Madison, WI) 和 Qiagen (Valencia, CA), 以及许多其它商业来源。siRNA 物种的其它公开可用来源包括 Stockholm Bioinformatics Centre 的 siRNAdb 数据库、MIT/ICBP siRNA 数据库、Broad Institute 的 RNAi Consortium shRNA 文库, 和 NCBI 的 Probe 数据库。例如, NCBI Probe 数据库中存在 30,852 个 siRNA 物种。技术人员将会意识到对于任何目标基因, siRNA 物种已被设计或者可以容易地利用公开可用软件工具进行设计。任何此类 siRNA 物种都可以利用题述 DNL 复合物递送。

[0193] 已报道的示例性 siRNA 物种在表 1 中列出。虽然 siRNA 是作为双链分子递送的, 但为简单起见仅在表 1 中给出正义链序列。

[0194] 表 1. 示例性 siRNA 序列

靶	序列	SEQ ID NO
VEGF R2	AATGCGGCGGTGGTGACAGTA	SEQ ID NO:22
VEGF R2	AAGCTCAGCACACAGAAAGAC	SEQ ID NO:23
CXCR4	UAAAUCUCCUGCCCACCCdTdT	SEQ ID NO:24
CXCR4	GGAAGCUGUUGGCUGAAAAdTdT	SEQ ID NO:25
PPAR $\alpha$	AAGACCAGCCUCUUUGCCCAG	SEQ ID NO:26
发动蛋白 2	GGACCAGGCAGAAAACGAG	SEQ ID NO:27
[0195] 连环蛋白	CUAUCAGGAUGACGCGG	SEQ ID NO:28
E1A 结合 蛋白	UGACACAGGCAGGCUUGACUU	SEQ ID NO:29
纤溶酶原 激活剂	GGTGAAGAAGGGCGTCCAA	SEQ ID NO:30
K-ras	GATCCGTTGGAGCTGTTGGCGTA GTT CAAGAGACTCGCCAACAGCTCCA	SEQ ID NO:31

	ACT TTTGGAAA	
选蛋白 1	AGGTGGTGTTAACAGCAGAG	SEQ ID NO:32
载脂蛋白 E	AAGGTGGAGCAAGCGGTGGAG	SEQ ID NO:33
载脂蛋白 E	AAGGAGTTGAAGGCCGACAAA	SEQ ID NO:34
Bcl-X	UAUGGAGCUGCAGAGGAUGdTdT	SEQ ID NO:35
Raf-1	TTTGAATATCTGTGCTGAGAACA CA GTTCTCAGCACAGATATTCTTTTT	SEQ ID NO:36
热休克转 录因子 2	AATGAGAAAAGCAAAAGGTGCC CTGTCTC	SEQ ID NO:37
IGFBP3	AAUCAUCAUCAAGAAAGGGCA	SEQ ID NO:38
硫氧还蛋 白	AUGACUGUCAGGAUGUUGCdTdT	SEQ ID NO:39
CD44	GAACGAAUCCUGAAGACAUCU	SEQ ID NO:40
[0196] MMP14	AAGCCTGGCTACAGCAATATGCC TGTCTC	SEQ ID NO:41
MAPKAP K2	UGACCAUCACCGAGUUUAUdTdT	SEQ ID NO:42
FGFR1	AAGTCGGACGCAACAGAGAAA	SEQ ID NO:43
ERBB2	CUACCUUUCUACGGACGUGdTdT	SEQ ID NO:44
BCL2L1	CTGCCTAAGGCGGATTTGAAT	SEQ ID NO:45
ABL1	TTAUUCCUUCUUCGGGAAGUC	SEQ ID NO:46
CEACAM1	AACCTTCTGGAACCCGCCAC	SEQ ID NO:47
CD9	GAGCATCTTCGAGCAAGAA	SEQ ID NO:48
CD151	CATGTGGCACCGTTTGCCT	SEQ ID NO:49
半胱天冬 酶 8	AACTACCAGAAAGGTATACCT	SEQ ID NO:50
BRCA1	UCACAGUGUCCUUUAUGUAdTdT	SEQ ID NO:51
p53	GCAUGAACCGGAGGCCCAUTT	SEQ ID NO:52
CEACAM6	CCGGACAGTTCCATGTATA	SEQ ID NO:53

[0197] 诊断剂

[0198] 在本申请的上下文中，术语“诊断”或“检测”可以互换使用。诊断通常是指确定组织的具体组织学状态，而检测是识别含有特定抗原的组织、病变或生物并探明它们的位置。

[0199] 通过使所述抗体连接至酶上可以可检测地标记所述抗体和片段。当在合适底物的存在下孵育抗体-酶缀合物时，酶部分与底物反应从而产生可例如通过分光光度计、荧光计或视觉方式检测的化学部分。可用于可检测地标记抗体的酶实例包括苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 $\delta$ -V-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

[0200] 所述免疫缀合物可以包含可用于检测患病组织的一种或多种放射性同位素。特

别有用的诊断放射性核素包括但不限于  $^{110}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{120}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{51}\text{Mn}$ 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 $^{83}\text{Sr}$ ，或其它  $\gamma$ 、 $\beta$  或正电子发射体，其衰变能量优选在 20 至 4,000keV 的范围内，更优选在 25 至 4,000keV 的范围内，甚至更优选在 25 至 1,000keV 的范围内，还更优选在 70 至 700keV 的范围内。有用的正电子发射放射性核素的总衰变能量优选 <2,000keV，更优选 <1,000keV，最优选 <700keV。可用作利用  $\gamma$  射线检测的诊断剂的放射性核素包括但不限于： $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{197}\text{Hg}$  和  $^{201}\text{Tl}$ 。有用的  $\gamma$  射线发射放射性核素的衰变能量优选为 20–2000keV，更优选 60–600keV，最优选 100–300keV。

[0201] 诊断受试者的癌症的方法可以通过施用诊断免疫缀合物和检测连接至定位于癌症或肿瘤的免疫缀合物的诊断标记来完成。所述抗体、抗体片段和融合蛋白可以缀合到诊断剂上，或者可以使用连接至诊断剂的可靶向构建体以预靶向技术施用。可用作诊断剂的放射性试剂在上文有讨论。合适的非放射性诊断剂是适合于磁共振成像、X 射线、计算机断层成像或超声的造影剂。磁成像剂包括，例如，与包括 2- 苄基 -DTPA 及其单甲基和环己基类似物在内的金属螯合物组合复合的非放射性金属，如锰、铁和钆。参见 2001 年 10 月 10 日提交的美国专利申请序列第 09/921,290 号，其实施例部分以引用方式并入本文。也可以使用其它成像剂，例如 PET 扫描核苷酸，优选  $^{18}\text{F}$ 。

[0202] 造影剂可用作诊断剂，所述造影剂为，例如，包括例如钆离子、镧离子、镱离子、铁离子、锰离子或其它的对比标记在内的 MRI 造影剂、CT 造影剂和超声造影剂。适用的顺磁离子包括铬 (III)、锰 (II)、铁 (III)、铁 (II)、钴 (II)、镍 (II)、铜 (II)、钆 (III)、钆 (III)、镱 (III)、钆 (III)、钆 (II)、钆 (III)、镱 (III)、钆 (III) 和钆 (III)，特别优选钆。

[0203] 可用于其它环境如 X 射线成像中的离子包括但不限于镧 (III)、金 (III)、铅 (II) 和铋 (III)。荧光标记包括若丹明、荧光素和肾造影剂。若丹明、荧光素通常经由异硫氰酸酯中间体连接。

[0204] 金属也可用于诊断剂中，包括用于磁共振成像技术的金属。这些金属包括但不限于：钆、锰、铁、铬、铜、钴、镍、镱、镱、镱、铋、钆和钆。为了用放射性金属或顺磁离子加载抗体，可能需要使它与具有连接多个整合基团以结合所述离子的长尾的试剂反应。这样的尾可以是具有可结合整合基团的侧基的聚合物，例如聚赖氨酸、多糖或其它衍生化链或可衍生化链，所述整合基团为，例如乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、卟啉、聚胺、冠醚、双缩氨基硫脲、聚脲，和已知可用于此目的的相似基团。

[0205] 采用标准化学方法，使螯合物偶联至抗体、融合蛋白或其片段。螯合物通常通过能使免疫反应性损失最小、聚集和 / 或内部交联最小的方式与所述分子形成键的基团连接至抗体。用于使螯合物缀合到抗体上的其它较不寻常的方法和试剂公开在 1989 年 4 月 25 日授予 Hawthorne、题目为 "Antibody Conjugates" 的美国专利第 4,824,659 号中，其实施例部分以引用方式并入。特别有用的金属螯合物组合包括 2- 苄基 -DTPA 及其单甲基和环己基类似物，它们与总能量范围 20 至 2,000keV 的诊断同位素一起使用。相同的螯合物在与非放射性金属例如锰、铁和钆复合时可用于 MRI。大环螯合物如 NOTA、DOTA 和 TETA 可分别与多种金属和放射性金属，最特别是与镱、钆和铜的放射性核素一起使用。可通过根据目标金属调整环的大小而使此类金属螯合物复合物变得非常稳定。本发明包括其它环类型的

螯合物如大环聚醚,它们对于稳定地结合核素如用于 RAIT 的  $^{223}\text{Ra}$  有价值。

[0206] 不透射线材料和造影材料可用来增强 X 射线和计算机断层成像,并且包括碘化合物、钡化合物、镓化合物、铊化合物等。具体化合物包括钡、泛影酸盐、乙碘油、柠檬酸镓、碘卡酸、碘西他酸、碘达胺、碘肥胺、碘沙酸、碘古酰胺、碘海醇、碘帕醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘磺拉胺葡甲胺、iosemetic acid、碘酞硫、碘替酸、碘他拉酸、碘曲西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、碘泊酸盐、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影酸盐、丙碘酮和氯化亚铊。

[0207] 所述抗体、抗体片段和融合蛋白也可以用荧光化合物进行标记。通过将所述抗体暴露于适当波长的光下并检测所产生的荧光,确定荧光标记 MAb 的存在。荧光标记化合物包括 Alexa 350、Alexa 430、AMCA、氨基吡啶、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、5-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素、5-羧基-2',4',5',7'-四氯荧光素、5-羧基若丹明、6-羧基若丹明、6-羧基四甲基氨基、级联蓝 (Cascade Blue)、Cy2、Cy3、Cy5、6-FAM、丹磺酰氯、荧光素、异硫氰酸荧光素、荧光胺、HEX、6-JOE、NBD(7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑)、俄勒冈绿 (Oregon Green) 488、俄勒冈绿 500、俄勒冈绿 514、太平洋蓝 (Pacific Blue)、酞酸、对酞酸、异酞酸、甲酚固紫 (cresyl fast violet)、甲酚蓝紫 (cresyl blue violet)、亮甲酚蓝、对氨基苯甲酸、藻红、酞菁、酞醛 (phthaldehyde)、偶氮甲碱、花青、黄嘌呤、琥珀酰荧光素、稀土金属穴合物、三联吡啶二胺钼、钼穴合物或螯合物、二胺、双花青、La Jolla 蓝染料、别藻蓝蛋白 (allophycocyanin)、allophycocyanin B、藻蓝蛋白 C、藻蓝蛋白 R、硫胺素、藻红蓝蛋白、藻红蛋白 R、REG、若丹明绿、异硫氰酸若丹明、若丹明红、ROX、TAMRA、TET、TRIT(四甲基若丹明异硫醇)、四甲基若丹明和德克萨斯红。荧光标记的抗体特别可用于流式细胞仪分析,但也可以用于内窥镜检查和血管内检测方法。

[0208] 或者,通过使所述抗体偶联至化学发光化合物可以可检测地标记所述抗体、抗体片段和融合蛋白。通过检测化学反应过程中产生的发光的存在,确定化学发光标识的 MAb 的存在。化学反光标记化合物的实例包括鲁米诺、异鲁米诺、芳族吡啶鎓酯、咪唑、吡啶鎓盐和草酸酯。

[0209] 类似地,生物发光化合物也可用于标记这里的抗体和片段。生物发光是一类在生物系统中发现的化学发光,其中催化蛋白增加化学发光反应的效率。通过检测发光的存在来确定生物发光蛋白的存在。可用于标记的生物发光化合物包括萤光素、萤光素酶和水母发光蛋白。

[0210] 因此,描述了诊断受试者的恶性肿瘤的方法,其包括用包含抗胰腺癌 MAb、融合蛋白或其片段的组合物对来自受试者的样本(流体、组织或细胞)进行体外诊断分析。可利用免疫组织化学,通过检测结合抗体的存在来检测细胞或组织中 PAM4 抗原的存在。优选被诊断的恶性肿瘤是癌症。最优选所述癌症是胰腺癌。

[0211] 另外,可使连接有可检测标记例如荧光分子或细胞毒性剂例如重金属或放射性核素的螯合剂,例如 DTPA、DOTA、TETA 或 NOTA 或合适的肽缀合到受试者抗体上。例如,通过使光敏剂或染料缀合到抗体融合蛋白上,可以获得治疗有用的免疫缀合物。荧光组合物例如荧光染料,和其它对可见光敏感的发色团或染料例如卟啉已用来检测病变和通过将合适的光导向病变来治疗所述病变。在治疗中,这称为光辐射、光线疗法或光动力学疗法 (Jori 等(编), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER

DISEASES (Libreria Progetto 1985); van den Bergh, Chem. Britain 22:430 (1986))。此外,单克隆抗体已与光活化染料偶联用于实现光线疗法。Mew 等, J. Immunol. 130:1473 (1983); idem., Cancer Res. 45:4380 (1985); Oseroff 等, Proc Natl. Acad. Sci. USA 83:8744 (1986); idem., Photochem. Photobiol. 46:83 (1987); Hasan 等, Prog. Clin. Biol. Res. 288:471 (1989); Tatsuta 等, Lasers Surg. Med. 9:422 (1989); Pelegrin 等, Cancer 67:2529 (1991)。

[0212] 缀合到抗体上或用于双特异性预靶向方法中的荧光性和放射性试剂特别可用于内窥镜检查、手术中或血管内检测与患病组织或细胞簇例如恶性肿瘤相关的靶向抗原,如 Goldenberg 的美国专利第 5,716,595 号、第 6,096,289 号和第 6,387,350 号中所公开的,每篇专利的实施例部分均以引用方式并入本文,特别是  $\gamma$ 、 $\beta$  和正电子发射体。当允许内窥镜检查的结构例如结肠遭到蔓延时可以使用内窥镜检查。可用于正电子发射断层成像的放射性核素包括但不限于: F-18、Mn-51、Mn-52m、Fe-52、Co-55、Cu-62、Cu-64、Ga-68、As-72、Br-75、Br-76、Rb-82m、Sr-83、Y-86、Zr-89、Tc-94m、In-110、I-120 和 I-124。有用的正电子发射放射性核素的总衰变能量优选 <2,000keV,更优选低于 1,000keV,最优选 <700keV。可用作利用  $\gamma$  射线检测的诊断剂的放射性核素包括但不限于: Cr-51、Co-57、Co-58、Fe-59、Cu-67、Ga-67、Se-75、Ru-97、Tc-99m、In-111、In-114m、I-123、I-125、I-131、Yb-169、Hg-197 和 Tl-201。有用的  $\gamma$  射线发射放射性核素的衰变能量优选为 20-2000keV,更优选 60-600keV,最优选 100-300keV。

#### [0213] 体外诊断

[0214] 本发明涵盖抗胰腺癌抗体在体外筛选生物样品以确定 PAM4 抗原的存在方面的用途。在此类免疫测定中,所述抗体、抗体片段或融合蛋白可以以液相利用或者结合到固相载体上,如下所述。为了体外诊断,可以利用任何类型的抗体例如鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体,因为不用考虑宿主免疫响应。

[0215] 用于确定生物样品是否含有 PAM4 抗原的筛选方法的一个实例是放射性免疫测定 (RIA)。例如,在一种形式的 RIA 中,将所测试的物质与 PAM4MAb 在放射性标记 PAM4 抗原的存在下混合。在这种方法中,测试物质的浓度将与结合到所述 MAbs 上的标记 PAM4 抗原的量成反比,而与游离的标记 PAM4 抗原的量直接相关。其它合适的筛选方法对于本领域技术人员是显而易见的。

[0216] 或者,可以进行体外测定,其中使抗胰腺癌抗体、抗体片段或融合蛋白结合到固相载体上。例如,可以将 MAbs 连接至聚合物例如氨基葡聚糖,以便将所述 MAbs 连接至不溶性支持物例如聚合物包被的珠、板或管。

[0217] 其它合适的体外测定对于本领域技术人员是显而易见的。可检测标记抗体和 PAM4 抗原的具体浓度、孵育温度和时间,以及其它测定条件可以根据包括样品中 PAM4 抗原的浓度、样品性质等在内的各种因素而变化。抗胰腺癌抗体样品的结合活性可以根据熟知的方法测定。本领域技术人员将能够采用常规实验确定每一测定的操作和最佳分析条件。

[0218] 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 可以测定生物样品中 PAM4 抗原的存在 (例如,Gold 等, J Clin Oncol. 24:252-58, 2006)。在直接竞争性 ELISA 中,使纯或半纯抗原制剂结合到不溶于所测试流体或细胞提取物的固相支持物上,并加入一定量的可检测标记的可溶性抗体从而允许对在固相抗原和标记抗体之间形成的二元复合物进行检测和 / 或定量。

[0219] 对比之下,“双决定簇”ELISA,也称为“双位点 ELISA”或“三明治测定法”,需要少量的抗原并且该测定不需要充分地纯化抗原。因而,在检测临床样品中的抗原方面,双决定簇 ELISA 优于直接竞争性 ELISA。参见,例如,双决定簇 ELISA 在定量测定活检样本中 c-myc 癌蛋白中的用途。Field 等, *Oncogene* 4:1463(1989); Spandidos 等, *AntiCancer Res.* 9:821(1989)。

[0220] 在双决定簇 ELISA 中,使一定量的未标记 MAb 或抗体片段(“捕获抗体”)结合到固相支持物上,使测试样品与所述捕获抗体接触,并加入一定量的可检测标记的可溶性抗体(或抗体片段),从而允许对在捕获抗体、抗原和标记抗体之间形成的三元复合物进行检测和/或定量。在本发明背景下,抗体片段是可结合到 PAM4 抗原表位上的抗胰腺癌抗体 MAb 的一部分。进行双决定簇 ELISA 的方法是熟知的。参见,例如,Field 等,出处同上, Spandidos 等,出处同上,和 Moore 等,“Twin-Site ELISAs for fos and myc Oncoproteins Using the AMPAK System,”于 *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*,第 10 卷,第 273-281 页(The Humana Press, Inc. 1992)。

[0221] 在双决定簇 ELISA 中,所述可溶性抗体或抗体片段必须结合到与捕获抗体所识别的表位不同的 PAM4 表位上。可以进行双决定簇 ELISA 以确定活检样品中是否存在 PAM4 抗原。或者,可以进行所述测定,以定量测定临床体液样品中存在的 PAM4 抗原的量。所述定量测定可以通过包括稀释纯化的 PAM4 抗原来进行。

[0222] 抗胰腺癌 MAb、融合蛋白及其片段也适用于制备测定试剂盒。此种试剂盒可以包括载体装置,该载体装置被隔开以在密闭区室中容纳一个或多个容器装置,例如小瓶、管等,每个所述容器装置均包括免疫测定的独立元件。

[0223] 也可以利用题述抗体、抗体片段和融合蛋白来检测由组织学样本制备的组织切片中 PAM4 抗原的存在。可以利用此种原位检测来测定所检查组织中 PAM4 抗原的存在以及测定所检查组织中的 PAM4 抗原的分布。原位检测可以通过将可检测标记的抗体施加到冷冻组织切片上来完成。研究表明 PAM4 抗原保存在石蜡包埋的切片中。原位检测的通用技术是技术人员熟知的。参见,例如, Ponder, “Cell Marking Techniques and Their Application,”于 *MAMMALIAN DEVELOPMENT: A PRACTICAL APPROACH* 113-38 Monk(编)(IRL Press 1987),和 Coligan 第 5.8.1-5.8.8 页。

[0224] 抗体、抗体片段和融合蛋白可以用任何合适的标记部分进行可检测地标记,所述标记部分例如放射性同位素、酶、荧光标记、染料、发色团、化学发光标记、生物发光标记或顺磁标记。

[0225] 标记部分可以是采用  $\gamma$  计数器或闪烁计数器等方式或通过放射自显影检测的放射性同位素。在优选的实施方案中,诊断缀合物是  $\gamma$ 、 $\beta$  或正电子发射同位素。本说明书中的标记部分是指将在预定条件下产生信号的分子。标记部分的实例包括放射性同位素、酶、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记和顺磁标记。

[0226] 标记部分与抗胰腺癌抗体的结合可以采用本领域已知的标准技术完成。在这方面的典型方法描述于 Kennedy 等, *Clin Chim Acta* 70:1(1976), Schurs 等, *Clin. Chim. Acta* 81:1(1977), Shih 等, *Int J Cancer* 46:1101(1990) 中。

[0227] 上述体外和原位检测方法可以用来协助病理病状的诊断或分期。例如,此类方法可用来检测表达 PAM4 抗原的肿瘤,例如胰腺癌。体内诊断/检测

[0228] 用放射性标记 MAb 进行体内诊断成像的各种方法是熟知的。在免疫闪烁成像技术中,例如,用  $\gamma$  发射放射性同位素标记抗体,并将其引入患者中。利用  $\gamma$  照相机检测  $\gamma$  发射放射性同位素的位置和分布。参见,例如, Srivastava(编), RADIOLABELED MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMAGING AND THERAPY(Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," 于 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 18 版, Gennaro 等(编), 第 624-652 页 (Mack Publishing Co., 1990), 和 Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," 于 BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY 227-49, Pezzuto 等(编) (Chapman & Hall 1993)。

[0229] 对于诊断成像,放射性同位素可以直接或通过利用中间官能团间接地结合到抗体上。有用的中间官能团包括螯合剂,例如乙二胺四乙酸和二亚乙基三胺五乙酸。例如,参见, Shih 等, 出处同上, 和美国专利第 5, 057, 313 号。

[0230] 通过选择最小半衰期、体内最低保留的最佳组合的同位素以及允许检测和准确测量的同位素的最低数量,使递送至患者的辐射剂量保持在尽可能低的水平。可以结合到抗胰腺癌抗体上并且适合于诊断成像的放射性同位素的实例包括  $^{99m}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$  和  $^{18}\text{F}$ 。

[0231] 题述抗体、抗体片段和融合蛋白也可以用顺磁离子和多种放射学造影剂进行标记,以便用于体内诊断。对磁共振成像特别有用的造影剂包含钆、锰、镓、镧或铁离子。另外的试剂包括铬、铜、钴、镍、铈、铊、铟或钪。抗体及其片段也可以缀合到超声造影剂/增强剂上。例如,一种超声造影剂是脂质体。还优选所述超声造影剂是气体填充的脂质体。

[0232] 在优选的实施方案中,双特异性抗体可以缀合到造影剂上。例如,所述双特异性抗体可以包含一种以上的超声成像中使用的图像增强剂。在另一个优选的实施方案中,所述造影剂是脂质体。优选所述脂质体包含共价连接至所述脂质体外表面的二价 DTPA- 肽。

[0233] 药学上适合的赋形剂

[0234] 在治疗应用中,可以采用另外的药学方法控制抗胰腺癌抗体的作用持续时间。可以通过使用聚合物来复合或吸附抗体、抗体片段或融合蛋白来制备控释制剂。例如,生物相容性聚合物包括乙烯-醋酸乙烯共聚物基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚醚共聚物基质。Sherwood 等, Bio/Technology 10:1446(1992)。抗体、抗体片段或融合蛋白从此种基质释放的速率取决于抗体、抗体片段或融合蛋白的分子量、基质内抗体的量和分散颗粒的大小。Saltzman 等, Biophys. J. 55:163(1989); Sherwood 等, 出处同上。其它固体剂型描述于以下文献中: Ansel 等, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 第 5 版 (Lea & Febiger 1990), 和 Gennaro(编), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 18 版 (Mack Publishing Company 1990), 及其修订版。

[0235] 待递送至受试者的抗体、其片段或融合蛋白可以包含一种或多种药学上适合的赋形剂、一种或多种另外的成分或它们的一些组合。所述抗体可以根据制备药学上有用的组合物的已知方法配制,从而将所述免疫缀合物或裸抗体与药学上适合的赋形剂混合成混合物。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上适合的赋形剂的一个实例。其它适合的赋形剂是本领域技术人员熟知的。参见,例如, Ansel 等, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 第 5 版 (Lea & Febiger 1990), 和 Gennaro(编), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 18 版 (Mack Publishing Company 1990), 及其修订版。

[0236] 所述免疫缀合物或裸抗体可以配制用于静脉施用,经由例如快速推注射或连续

输注施用。注射制剂可以以单位剂量形式存在于例如在安培瓶或多剂量容器中，其中添加有防腐剂。所述组合物可以采取诸如在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳剂的形式，并可以含有配制剂，例如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。或者，活性成分可以呈粉末形式，其在使用前用合适的媒介物例如无菌无热原水构建。

[0237] 所述免疫缀合物、裸抗体、其片段或融合蛋白也可以通过皮下或其它肠胃外途径施用给哺乳动物。在优选的实施方案中，所述抗体或其片段以每剂 20 至 2000 毫克蛋白质的剂量施用。此外，所述施用可以通过连续输注或者通过单次或多次快速推注进行。一般而言，免疫缀合物、融合蛋白或裸抗体对于人的施用剂量将根据诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医学病状和以往病史等因素而变化。通常，期望为接受者提供在约 1mg/kg 至 20mg/kg 范围内的作为单次静脉或输注的免疫缀合物、抗体融合蛋白或裸抗体的剂量，但如情况需要也可以施用较低或较高的剂量。这个剂量可以根据需要重复给予，例如，每周一次持续 4 至 10 周，优选每周一次持续 8 周，更优选每周一次持续 4 周。它也可以以更低的频率给予，例如每隔一周一次持续数月，或者可以以更高的频率给予，例如每周 2 次或 3 次。所述剂量可以通过各种肠胃外途径给予，并可适当地调整剂量和方案。

#### [0238] 试剂盒

[0239] 各种实施方案可以涉及含有适合于治疗或诊断患者的患病组织的组分的试剂盒。示范性试剂盒可以含有至少一种如本文所述的抗体、抗原结合片段或融合蛋白。如果含有用于施用的组分的组合物未被配制成经由消化道递送例如通过口服递送，则可包括能够通过某些其它途径递送试剂盒组分的设备。用于诸如肠胃外递送的应用的一种类型的设备是用于将组合物注射进受试者身体的注射器。也可以使用吸入设备。在某些实施方案中，抗胰腺癌抗体或其抗原结合片段可以以含有抗体的无菌液体制剂或冻干制品的预灌封注射器或自动注射笔形式提供。（例如，Kivitz 等，Clin. Ther. 2006, 28:1619-29）。

[0240] 所述试剂盒组分可以一起包装或者分装在两个或更多个容器中。在一些实施方案中，所述容器可以是含有适合于重构 (reconstitution) 的组合物的无菌冻干制剂的小瓶。试剂盒也可以含有一种或多种适合于重构和 / 或稀释其它试剂的缓冲剂。可以使用的其它容器包括但不限于袋、盘、盒、管等。试剂盒组分可以包装到容器内并保持无菌。可以包括的另一组成部分是试剂盒的使用说明书。

## 实施例

[0241] 下面的实施例仅说明本发明的实施方案，而不限制权利要求的范围。所述实施例讨论了利用示范性抗胰腺癌单克隆抗体（例如，PAM4）进行的研究。利用 PAM4 MAbs 进行的临床研究已证明患者中的大多数胰腺癌病变被靶向，并且不存在正常组织摄取的现象。剂量测定法表明向肿瘤递送 10 至 20cGy/mCi 是可能的，其中肿瘤与红骨髓的剂量比为 3:1 至 10:1。该数据表明 PAM4 可用于治疗胰腺癌。

#### [0242] 实施例 1. 人源化 PAM4 MAbs

[0243] 在优选的实施方案中，要求保护的方法和组合物利用抗体 hPAM4，hPAM4 是针对胰腺癌粘蛋白产生的鼠 PAM4 MAbs 的人源化 IgG。利用鼠 PAM4 序列的人源化来降低人抗小鼠抗体 (HAMA) 响应。为了生成人源化 PAM4，将鼠互补决定区 (CDR) 从小鼠免疫球蛋白的重和轻可变链转移到人构架区 (FR) 抗体序列中，接着用它们的鼠对应物替代某些人 FR 残基。

人源化单克隆抗体适用于体外和体内诊断和治疗方法。

[0244] 鼠 PAM4MAb (图 1A 和 1B) 的可变区构架序列与 Kabat 数据库中的已知人抗体的比较表明, PAM4  $V_K$  和  $V_H$  的 FR 分别与人抗体 Walker  $V_K$  和 Wi12  $V_H$  的 FR 具有最高程度的序列同一性。因此, 分别选择 Walker  $V_K$  和 Wi12  $V_H$  FR 作为鼠 PAM4  $V_K$  和  $V_H$  的 CDR 移植到其中的人构架 (图 3)。然而, 用人抗体的 FR4 序列 NEWM 替代 Wi12 FR4 序列, 供 PAM4 重链人源化用 (图 3B)。将推定 CDR 两侧的 PAM4 FR 中的几个氨基酸残基保留在 hPAM4 中, 基于考虑到这些残基对 Ag 结合的影响比其它 FR 残基大。这些残基为  $V_K$  的 21M、47W、59P、60A、85S、87F 和 100G, 以及  $V_H$  的 27Y、30P、38K、48I、66K、67A 和 69L。hPAM4  $V_K$  (SEQ ID NO:16) 和  $V_H$  (SEQ ID NO:19) 的 DNA 和氨基酸序列分别在图 3A 和 3B 中示出。

[0245] 使用长寡核苷酸合成和 PCR 的组合, 按照 Leung 等 (Leung 等, 1994) 所描述的改进策略构建设计的 hPAM4 的  $V_K$  和  $V_H$  基因 (图 4)。为了构建 hPAM4  $V_H$  结构域, 在自动化 DNA 合成仪 (Applied Biosystems) 上合成两种长寡核苷酸, hPAM4  $V_H$  A (173-mer) 和 hPAM4 $V_H$  B (173-mer)。

[0246] hPAM4  $V_H$  A 表示 hPAM4  $V_H$  结构域的核苷酸 17-189。

[0247] 5'-AGTCTGGGGC TGAGGTGAAG AAGCCTGGGGCCTCAGTGAA GGTCTCCTGC GAGGCTTCTG GATACACATTCCCTAGCTAT GTTTTGCACT GGGTGAAGCA GGCCCTGGACAAGGGCTTG AGTGGATTGG ATATATTAAT CCTTACAATGATGGTACTCA GTACAATGAGAAG-3' (SEQ ID NO:54)

[0248] hPAM4  $V_H$ B 表示与核苷酸 169-341 互补的 hPAM4  $V_H$  结构域的负链。

[0249] 5'-AGGGTCCCT GGCCCCAGTA AGCAAATCCGTAGCTACCAC CGAAGCCTCT TGCACAGTAA TACACGGCCGTGTCGTCAGA TCTCAGCCTG CTCAGCTCCA TGTAGGCTGTGTTGATGGAC GTGTCCCTGG TCAGTGTGGC CTTGCCTTTGAACTTCTCAT TGTACTGAGT ACC-3' (SEQ ID NO:55)

[0250] hPAM4 $V_H$ A 和  $V_H$ B 的 3'-端序列 (21 个核苷酸残基) 彼此互补。在定义的 PCR 条件下, 使 hPAM4 $V_H$ A 和  $V_H$ B 的 3'-端退火形成位于长寡核苷酸其余部分两侧短双链 DNA。每个退火端均用作单链 DNA 转录的引物, 产生由 hPAM4  $V_H$  的核苷酸 17-341 组成的双链 DNA。将这种 DNA 在两种短寡核苷酸 hPAM4  $V_H$ BACK 和 hPAM4  $V_H$ FOR 的存在下进一步扩增从而形成全长 hPAM4  $V_H$ 。加下划线部分是用于亚克隆的限制位点, 如图 4B 所示。

[0251] hPAM4  $V_H$ BACK 5'-CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGGGCT GAG GTG A-3' (SEQ ID NO:56)

[0252] hPAM4  $V_H$ FOR 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCCCTG GCC CCA-3' (SEQ ID NO:57)

[0253] 将极少量 hPAM4  $V_H$ A 和  $V_H$ B (凭经验确定) 在 10  $\mu$  L 10X PCR 缓冲液 (500mM KCl、100mM Tris HCl 缓冲液 pH 8.3、15mM MgCl<sub>2</sub>)、2  $\mu$  mol hPAM4  $V_H$ BACK 和 hPAM4  $V_H$ FOR, 以及 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.) 的存在下进行扩增。对这种反应混合物进行 3 个聚合酶式链反应 (PCR) 循环, 所述聚合酶式链反应循环由 94°C 变性 1 分钟, 45°C 退火 1 分钟和 72°C 聚合 1.5 分钟组成。这个操作程序之后接着 27 个 PCR 反应循环, 所述 PCR 反应循环由 94°C 变性 1 分钟、55°C 退火 1 分钟和 72°C 聚合 1 分钟组成。对 hPAM4  $V_H$  的双链 PCR 扩增产物进行凝胶纯化、用 PstI 和 BstEII 限制位点进行限制性消化, 并将其克隆到重链分期载体  $V_H$ pBS2 的互补 PstI/BstEII 限制位点中, 在  $V_H$ pBS2 中,  $V_H$  序列用编码翻译起始密码子的 DNA 序列完全装配, 然后将分泌信号肽框内连接在

5' - 端并将内含子序列框内连接在 3' - 端。V<sub>H</sub>pBS2 是 V<sub>H</sub>pBS 的修饰分期载体 (Leung 等, Hybridoma, 13:469, 1994), 其中在翻译起始密码子上游的 16 位碱基处引入 XhoI 限制位点以便利于接下来的亚克隆步骤。将装配的 V<sub>H</sub> 基因作为 XhoI-BamHI 限制片段亚克隆到表达载体 pdHL2 中, 该表达载体含有处于 IgH 增强子和 MT1 启动子控制之下的人 IgG 重链和轻链的表达盒, 以及作为选择和扩增标记的小鼠 d/fr 基因。因为 pdHL2 的重链区缺乏 BamHI 限制位点, 所以这种连接需要使用接头来提供介于可变链的 BamHI 位点和 pdHL2 载体中存在的 HindIII 位点之间的桥。所得表达载体命名为 hPAM4 V<sub>H</sub>pdHL2。

[0254] 为了构建人源化 V<sub>K</sub> 序列的全长 DNA, 如上所述合成 hPAM4 V<sub>K</sub>A (157-mer) 和 hPAM4 V<sub>K</sub>B (156-mer)。如上所述通过两种短寡核苷酸 hPAM4 V<sub>K</sub>BACK 和 hPAM4 V<sub>K</sub>FOR 扩增 hPAM4 V<sub>K</sub>A 和 V<sub>K</sub>B。

[0255] hPAM4 V<sub>K</sub>A 表示 hPAM4 V<sub>K</sub> 结构域的核苷酸 16-172。

[0256] 5'-CAGTCTCCAT CCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATGAC CTGCAGTGCC AGCTCAAGTGTAAGTTCCAG CTACTTGTAC TGGTACCAAC AGAAACCAGGGAAAGCCCC AA ACTCTGGA TTTATAGCAC ATCCAACCTGGCTTCTG-3' (SEQ ID NO:58)

[0257] hPAM4 V<sub>K</sub>B 表示与核苷酸 153-308 互补的 hPAM4 V<sub>K</sub> 结构域的负链。

[0258] 5'-GTCCCCCTC CGAACGTGTA CGGGTACCTATTCCTACTGAT GGCAGAAATA AGAGGCAGAA TCTTCAGGTTGCAGACTGCT GATGGTGAGA GTGAAGTCTG TCCCAGATCCACTGCCACTG AAGCGAGCAG GGACTCCAGA AGCCAGGTTGGATGTG-3' (SEQ ID NO:59)

[0259] hPAM4 V<sub>K</sub>A 和 V<sub>K</sub>B 的 3'-末端序列 (20 个核苷酸残基) 彼此互补。在定义的 PCR 条件下, 使 hPAM4 V<sub>K</sub>A 和 V<sub>K</sub>B 的 3'-端退火形成位于长寡核苷酸其余部分两侧的短双链 DNA。每个退火端均用作单链 DNA 转录的引物, 产生由 hPAM4 V<sub>K</sub> 的核苷酸 16-308 组成的双链 DNA。将这种 DNA 在两种短寡核苷酸 hPAM4 V<sub>K</sub>BACK 和 hPAM4V<sub>K</sub>FOR 的存在下进一步扩增从而形成全长 hPAM4 V<sub>K</sub>。加下划线部分是用于亚克隆的限制位点, 如下所述。

[0260] hPAM4 V<sub>K</sub>BACK 5'-GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT CCATCC TCC CTG-3' (SEQ ID NO:60)

[0261] hPAM4 V<sub>K</sub>FOR 5'-TTA GAT CTC CAG TCG TGT CCC CCC TCCGAA CGT-3' (SEQ ID NO:61)

[0262] 将 hPAM4 V<sub>K</sub> 的凝胶纯化 PCR 产物用 PvuII 和 BglIII 进行限制性消化, 并将其克隆到轻链分期载体 V<sub>K</sub>pBR2 的互补 PvuII/BclI 位点中。V<sub>K</sub>pBR2 是 V<sub>K</sub>pBR 的修饰分期载体 (Leung 等, Hybridoma, 13:469, 1994), 其中在翻译起始密码子上游的 16 位碱基处引入 XbaI 限制位点。将装配的 V<sub>K</sub> 基因作为 XbaI-BamHI 限制片段亚克隆到含有 V<sub>H</sub> 序列的表达载体 hPAM4 V<sub>H</sub>pdHL2 中。所得表达载体命名为 hPAM4pdHL2。

[0263] 约 30 μg hPAM4pdHL2 通过用 SalI 消化而线性化, 并通过 450V 和 25 μF 下的电穿孔将其转染到 Sp2/0-Ag14 细胞中。将转染的细胞涂布到 96 孔板中, 并在 CO<sub>2</sub> 细胞培养孵育器中孵育 2 天, 然后针对 MTX 抗性进行选择。在 2 至 3 周开始选出存活的菌落, 并通过 ELISA 测定针对人抗体分泌进行筛选。简言之, 将来自存活菌落的上清液 (~100ul) 加入到用山羊抗人 IgG F(ab')<sub>2</sub> 片段特异性 Ab 预先包被的 ELISA 微孔板的孔中。将该板在室温下孵育 1 小时。通过用洗涤缓冲液 (含有 0.05% 吐温 -20 的 PBS) 洗涤三次去除未结合蛋白。向该孔中加入辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人 IgG Fc 片段特异性 Ab。接着孵育 1 小

时,洗涤后,向该孔中加入含有 4mM 邻苯二胺二盐酸盐 (OPD) 和 0.04%PBS 中的  $H_2O_2$  的的底物溶液 (100  $\mu$  L/ 孔)。避光显色 30 分钟,通过加入 50  $\mu$  L4N  $H_2SO_4$  溶液终止反应。通过在 ELISA 读板器上读出 490nm 处的吸光度来测量结合的人 IgG。扩充阳性细胞克隆,并通过在蛋白 A 柱上进行亲和色谱,从细胞培养上清液中纯化出 hPAM4。

[0264] 通过在用胰腺癌细胞提取物包被的微量滴定板中的 ELISA 测定证实 hPAM4 的 Ag 结合活性。利用 PAM4 抗原包被的板进行 ELISA 竞争性结合测定以评估与由鼠 V 和人 C 结构域组成的嵌合 PAM4 的 Ag 结合活性相比较的 hPAM4 的 Ag 结合活性。向所述包被的孔中加入与不同浓度的 cPAM4 或 hPAM4 混合的恒定量的 HRP 缀合的 cPAM4,并在室温下孵育 1 至 2 小时。加入含有 4mM 邻苯二胺二盐酸盐和 0.04% $H_2O_2$  的底物溶液之后,通过读出 490nm 处的吸光度揭示结合到 CaPan1 Ag 上的 HRP 缀合的 cPAM4 的量。如图 4 中的竞争性测定所示, hPAM4 和 cPAM4 抗体表现出相似的结合活性。

[0265] 实施例 2 :免疫组织化学染色研究

[0266] 对正常成体组织的免疫组织化学表明 PAM4 反应性表位局限于胃肠道,在这里染色弱,但是为阳性 (表 2)。包括胰腺管、胰腺小管、胰腺腺泡和胰岛细胞在内的正常胰腺组织呈阴性染色。以组织匀浆物作为抗原的基于 PAM4 的酶免疫测定总的来说支持所述免疫组织学数据 (表 3)。PAM4 表位不存在于正常胰腺和其它非胃肠道组织中。在赘生性组织中,PAM4 与 25 个胰腺癌中的 21 个 (85%) (表 4 和表 5),以及与 26 个结肠癌中的 10 个有反应性,但与胃、肺、乳腺、卵巢、前列腺、肝或肾的肿瘤 (表 5) 只有有限的反应性。PAM4 反应性似乎与肿瘤分化阶段关联,其中在高分化的胰腺癌中观察到的染色百分比高于在中分化或低分化的肿瘤中所观察到的。一般地,低分化的肿瘤占有所有胰腺癌的不到 10%。

[0267] 这些研究表明,PAM4 反应性和组织分布 (正常和癌症) 与所报道的 CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2 和 B72.3 抗体和针对路易斯抗原的抗体的反应性和组织分布不同。所得数据与利用这些 MAbs 中的某些进行的交叉阻断研究一起表明,PAM4 MAbs 识别独特的新表位。当与 CA19.9、DUPAN2 和抗 -Le<sup>a</sup> 抗体识别的抗原进行比较时,PAM4 抗原似乎在其组织分布上更加受到限制,并且与较高百分比的胰腺肿瘤有反应性。此外,它在等量浓度下得到较高的总体反应强度,并且与较高百分比的胰腺肿瘤内的细胞有反应性。最后,发现 PAM4 仅与 12 个慢性胰腺炎样本中的 3 个有弱反应性,而 CA19.9 和 DUPAN2 与所有 12 个样本都有强反应性。虽然意识到特异性部分依赖于所采用测定的类型和所检查组织的范围和数量,但 PAM4 判别正常胰腺组织和赘生性胰腺组织的能力、它与高百分比的癌症样本反应的能力、所述反应的高强度,和区分早期胰腺癌和良性病状例如胰腺炎的能力是这种示例性抗胰腺癌抗体的重要特征。

[0268] 表 2. 利用 MAbs PAM4 进行的正常成体组织免疫过氧化物酶染色

[0269]

组织	染色
	反应
胰腺 (22) <sup>a</sup>	-

胰腺管	-
胰腺腺泡	-
胰岛	-
颌下腺 (2)	-
食管 (2)	-
胃 (3)	+ 粘液分泌细胞
十二指肠 (3)	+ 杯状细胞
空肠 (3)	+ 杯状细胞
回肠 (3)	+ 杯状细胞
结肠 (5)	+ 杯状细胞
肝脏 (3)	-
胆囊 (2)	-
支气管 (3)	-
肺 (3)	-
心脏 (3)	-
脾脏 (3)	-
肾脏 (3)	-
膀胱 (3)	-
前列腺 (2)	-
睾丸 (2)	-
子宫 (2)	-
卵巢 (2)	-

[0270]

[0271] <sup>a</sup> - 括号中为所检查的个体样本数

[0272] 表 3. 经 EIA 测定的单克隆抗体 PAM4 与正常成体组织匀浆物的反应性

[0273]

组织	$\mu\text{g/g}$ 组织 <sup>a</sup>
胰腺	6.4
食管	8.1
胃	61.3
十二指肠	44.7
空肠	60.6
结肠	74.5
肝脏	0.0
胆囊	5.6
心脏	3.7
脾脏	3.4
肾脏	6.6
膀胱	4.9
甲状腺	3.5
肾上腺	1.3
输尿管	2.6
睾丸	3.9
CaPan1 胰腺肿瘤	569

[0274]

[0275] a - 数值是来自两个尸检样本的平均值

[0276] 表 4. 几种单克隆抗体与胰腺肿瘤的免疫组织化学反应性

[0277]

	分化	PAM4	CA19.9	Le <sup>a</sup>	DUPAN2
1	W	+++	-	-	+++
2	M	++	+++	+++	+

3	M	+	-	+	+
4	M	+++	+++	+++	+
5	M	++	+	-	-
6	M	+	ND	ND	ND
7	M*	+++	+++	+++	+++
8	M	+	-	-	+++
9	M	++	+	++	-
10	M*	++	++	++	+++
11	M	++	+++	+++	+
12	M	++	+	+	+++
13	M	+	+++	+++	+
14	M	++	+	+	++
15	M	+++	+	+	++
16	M	+	+	++	-
17	M	-	+	+	-
18	M	++	++	++	++
19	M	+++	+	+++	++
20	M	+	-	-	-
21	M	+++	+++	+	++
22	P	+	+	+	+++
23	P	-	-	-	-
24	P	-	-	-	-
25	P	-	-	+	-
总数		21/25	17/24	18/24	16/24

[0278] - :阴性 ;+ :5-20% 的组织被染色 ;++ :21-50% 的组织被染色 ;

[0279] +++ :>50% 的组织被染色 ;W, M, P :高分化、中分化或低分化 ;

[0280] \* :转移组织 ;ND :未进行。

[0281] 表 5. 利用 MAb PAM4 进行的赘生性组织免疫过氧化物酶染色

[0282]

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

[0283] 实施例 3. 放射性标记 PAM4 的体内生物分布和肿瘤靶向

[0284] 用涵盖预期分化范围的一系列的四种不同异种移植的人胰腺肿瘤,进行 PAM4 的初始生物分布研究。所用四种肿瘤系 AsPc1、BxPc3、Hs766T 和 CaPan1 中的每一种显示肿瘤内  $^{131}\text{I}$ -PAM4 浓度 (第 3 天,范围 :21%-48%ID/g) 显著 ( $P<0.01-0.001$ ) 高于同时施用的非特异性的同种型匹配的 Ag8 抗体 (第 3 天,范围 :3.6%-9.3%ID/g)。利用该生物分布数据评价对肿瘤的潜在辐射剂量 :对于 AsPc1、BxPc3、Hs766T 和 CaPan1,注射剂量分别为 12,230cGy/mCi、10,684cGy/mCi、6,835cGy/mCi 和 15,843cGy/mCi。鉴于实际最大耐受剂量 (MTD) 为 0.7mCi, PAM4 可以为每个异种移植的肿瘤模型提供相当大的拉德剂量。在每种肿瘤系中,放射性标记 PAM4 的血液水平显著 ( $P<0.01-0.001$ ) 低于非特异性 Ag8。PAM4 对血液的潜在辐射剂量比 Ag8 对血液的潜在辐射剂量低 1.4-4.4 倍。当将 PAM4 对肿瘤的辐射剂量归一化至 PAM4 的血液剂量时,肿瘤所接受的剂量分别比血液的高 2.2、3.3、3.4 和 13.1 倍。重要地,对非肿瘤组织的潜在辐射剂量最小。

[0285] 采用 CaPan1 肿瘤模型,将 PAM4 的生物分布与抗 -CEA 抗体 MN-14 进行比较。在早期时间点,肿瘤内的 PAM4 浓度比 MN-14 浓度高得多,在第 3 天时肿瘤 :血液比值对于 PAM4 为  $12.7 \pm 2.3$ ,相比之下,对于 MN-14 为  $2.7 \pm 1.9$ 。虽然在早期时间点肿瘤内的 PAM4 摄取显著高于 MN-14 (第 1 天 -- $P<0.001$  ;第 3 天 -- $P<0.01$ ),但是剂量测定分析表明,在 14 天的研究期间内 PAM4 对肿瘤的剂量仅比 MN-14 对肿瘤的剂量高出 3.2 倍。这是由于 PAM4 从肿瘤中迅速清除,致使在较晚时间点肿瘤中存在的这两种抗体的浓度相似。也在 BxPc3 和

Hs766T 肿瘤模型中观察到 PAM4 从肿瘤中迅速清除,但未在 AsPc1 肿瘤模型中观察到。这些观察结果与所报道的其它抗粘蛋白抗体例如 G9 和 B72.3 在结肠直肠癌中的结果不同,其中每种抗体都表现出比 MN-14 抗体长的保留时间。对 PAM4 代谢研究的结果表明,在初始结合到肿瘤细胞上后,抗体迅速释放,可能发生异化或者作为抗原:抗体复合物脱落。血液清除也非常迅速。这些数据表明,对于治疗应用, $^{131}\text{I}$  可能是不适当选择的同位素。可频繁施用的短寿命同位素例如  $^{90}\text{Y}$  或  $^{188}\text{Re}$  可能是更有效的试剂。

[0286] PAM4 没有显示出靶向正常组织的证据,除了在 CaPan1 肿瘤模型中,在这里观察到少量但统计学显著性的脾脏摄取(在第 3 天,范围为 3.1-7.5%ID/g)。这种类型的脾脏靶向已在抗粘蛋白抗体 B72.3 和 CC49 的临床应用中观察到。重要地,这些研究还报道了脾脏靶向既不影响抗体的肿瘤摄取,也不干扰核扫描的解释。这些研究表明,脾脏靶向既不是由脾脏中的交叉反应性抗原引起,也不是由 Fc 受体的结合引起,而是由下面可能性中的一种或多种引起:直接靶向脾脏中捕获的抗原,或者间接摄取在血液中形成的或从肿瘤部位释放的抗原:抗体复合物。后者要求血液中存在免疫复合物。然而,当通过将放射性标记抗体作为天然物质洗脱的凝胶过滤(HPLC, GF-250 柱)检查早至 5 分钟和迟至 7 天的样本时并未观察到免疫复合物。鉴于 CaPan1 肿瘤产生比所检查的其它肿瘤细胞系高出 100 至 1000 倍的大量的 PAM4 反应性抗原这一事实,前者的解释似乎更可能。这些其它肿瘤细胞系中缺乏 PAM4 的脾脏靶向表明,这个现象与过多抗原的产生有关。通过将蛋白质剂量从原始 2  $\mu\text{g}$  剂量增加至 10  $\mu\text{g}$  剂量,可以克服脾脏靶向。推测较大量的脾脏捕获的抗原与未标记的 PAM4 复合,而不与放射性标记抗体复合。增加蛋白质剂量对于 PAM4 对肿瘤组织或非肿瘤组织的靶向没有不良影响。实际上,蛋白质剂量增加至 100  $\mu\text{g}$  时,是 CaPan1 肿瘤内放射性标记 PAM4 浓度的两倍以上。

[0287] 实施例 4. 无胸腺裸小鼠中原位胰腺肿瘤模型的开发

[0288] 为了更接近动物模型中胰腺癌的临床表现,我们通过将肿瘤细胞直接注射到胰头中而开发出原位模型。原位 CaPan1 肿瘤进行性生长,没有出现明显的症状,直至产生腹水,并在 10 至 14 周死亡。到移植后 3 至 4 周时,动物形成可触知的约 0.2g 的肿瘤。在生长的 8 周内,观察到约 1.2g 的原发性肿瘤以及进入肝脏和脾脏中的转移瘤(1-3 个转移瘤/动物;每个肿瘤 <0.1g)。在 10 至 14 周时,产生腹水的隔膜接种是明显的。腹水形成和偶发性黄疸通常是肿瘤生长的第一个明显的指征。这时肿瘤会相当大,有 1 至 2g 重,大多数情况下动物会在 3 至 4 周后死亡。

[0289] 施用给荷有 4 周龄原位肿瘤(约 0.2g)的动物的放射性标记  $^{131}\text{I}$ -PAM4 表现出对原发性肿瘤的特异性靶向,定位指数第 1 天为  $7.9 \pm 3.0$ ,在第 14 天增加至  $22.8 \pm 15.3$ 。没有观察到特异性靶向其它组织的证据。在一种观察到肿瘤转移到肝脏和脾脏的情况下,这两种转移瘤都被靶向并且具有高浓度的放射性标记抗体。另外,大约一半的动物在切口部位形成皮下肿瘤。在同一动物的原位和皮下肿瘤靶向上没有观察到显著性差异,并且无论动物是否带有另外的皮下肿瘤都没有在原位肿瘤靶向上观察到显著性差异。PAM4 的估计辐射剂量对于原发性肿瘤和血液分别为 6,704cGy/mCi 和 1,655cGy/mCi。

[0290] 实施例 5. 胰腺癌的实验性放射免疫疗法

[0291] 利用在无胸腺小鼠中作为皮下异种移植植物生长的 CaPan1 肿瘤进行  $^{131}\text{I}$ -PAM4 治疗用途的初步研究。在实验中,向荷有 0.25g 肿瘤的动物施用 350  $\mu\text{Ci}$   $^{131}\text{I}$ -PAM4,还将其与相

似剂量的非特异性 Ag8 的治疗效果进行比较。向荷有  $1\text{cm}^3$  肿瘤的动物施用的  $^{131}\text{I}$ -PAM4 的 MTD 是  $700\ \mu\text{Ci}$ 。到 5 周和 6 周时,经 PAM4 治疗的动物显示出肿瘤显著消退,甚至在 27 周时,8 只动物中有 5 只仍保持无瘤。未治疗动物和经 Ag8 治疗的动物显示出肿瘤生长迅速进展,但在这两个对照组间观察到显著性差异。在 7 周,来自未治疗组的肿瘤自开始时间点生长了  $20.0\pm 14.6$  倍,而经  $^{131}\text{I}$ -Ag8 治疗的肿瘤仅生长了  $4.9\pm 1.8$  倍。在这个时间点,PAM4 肿瘤已消退到其原始大小的  $0.1\pm 0.1$  倍,与未治疗动物 ( $P<0.001$ ) 和经非特异性 Ag8- 治疗的动物 ( $P<0.01$ ) 均有显著性差异。

[0292] 这些数据表明,CaPan1 肿瘤对  $^{131}\text{I}$ -PAM4 的治疗敏感。结果,也就是说肿瘤的消退或进展取决于包括原始肿瘤大小在内的数个因素。因而,对荷有 0.25g、0.5g、1.0g 或 2.0g CaPan1 肿瘤负荷的动物组用单剂  $350\ \mu\text{Ci}$   $^{131}\text{I}$ -PAM4 进行治疗。大多数带有原始大小为 0.25g 和 0.5g 的肿瘤的动物(每组 10 只动物中的 9 只)显示出治疗后肿瘤消退或生长抑制长达至少 16 周。在 1.0g 肿瘤组中,7 只动物中的 5 只显示没有肿瘤生长长达 16 周,而在 2.0g 肿瘤组中,9 只动物中的 6 只显示没有肿瘤生长长达 6 周,之后肿瘤开始生长。虽然单剂  $350\ \mu\text{Ci}$  对于较大肿瘤不是那么有效,但是单剂可能不是大肿瘤的合适方案。

[0293] 毒性研究表明,给予多个周期的放射免疫疗法的能力,这对于较大的肿瘤负荷可能更有效。给予荷有平均 1.0g CaPan1 肿瘤的动物单剂  $350\ \mu\text{Ci}$   $^{131}\text{I}$ -PAM4、在零时间点和 4 周时给予 2 剂,或者不治疗。未治疗组的平均存活时间为  $3.7\pm 1.0$  周(存活时间定义为肿瘤达到  $5\text{cm}^3$  的时间)。早在 3 周就有动物死亡,无动物存活超过 6 周。单剂  $350\ \mu\text{Ci}$   $^{131}\text{I}$ -PAM4 使存活时间显著地增加至  $18.8\pm 4.2$  周 ( $P<0.0001$ )。动物死亡范围从 13 周延长至 25 周。在 26 周的研究期结束时,没有动物活着。

[0294] 观察到与单剂组相比,两剂组的存活时间显著性增加。在 26 周时间点,有一半动物活着,肿瘤大小为  $1.0\text{--}2.8\text{cm}^3$ ,自原始肿瘤大小的平均肿瘤生长速率为  $1.6\pm 0.7$  倍。对于那些在 26 周没有存活着的动物,平均存活时间 ( $17.7\pm 5.3$  周)与单剂组相似。

[0295] 还采用原位肿瘤模型,进行利用 PAM4 的治疗研究。对荷有 4 周龄原位肿瘤(估计肿瘤重量为 0.25g)的动物组不加以治疗,或者用单剂  $350\ \mu\text{Ci}$   $^{131}\text{I}$ -PAM4 或  $350\ \mu\text{Ci}$   $^{131}\text{I}$ -非特异性 Ag8 进行治疗。到 10 周时,未治疗动物的死亡率 50%,并且在第 15 周时无存活者。在肿瘤生长 4 周时施用非特异性  $^{131}\text{I}$ -Ag8 的动物显示在 7 周时的死亡率为 50%,并且在第 14 周时无存活者。虽然这两组之间没有统计学差异(logrank 分析),但经 Ag8 治疗的动物可能发生辐射中毒。放射性标记 PAM4 与未治疗动物或经 Ag8 治疗的动物相比具有显著存活优势 ( $P<0.001$ ),16 周即实验结束时的存活率为 70%。此时处死存活动物从而测定肿瘤大小。所有动物的肿瘤平均重量为 1.2g,以及 7 只动物中的 4 只中明显出现一个或两个小 ( $<0.1\text{g}$ ) 转移瘤。生长 16 周时,这些肿瘤比 8 周龄肿瘤更有代表性。

[0296] 实施例 6. **GEMZAR®** 化疗与  $^{131}\text{I}$ -PAM4 实验性放射免疫疗法的组合形式

[0297] 将吉西他滨(**GEMZAR®**)与  $^{131}\text{I}$ -PAM4 放射免疫疗法组合使用的初步研究作为测试板阵列(checkerboard array)进行;单剂吉西他滨(0、100、200、500mg/kg)与单剂  $^{131}\text{I}$ -PAM4 ([MTD= $700\ \mu\text{Ci}$ ]100%、75%、50%、0%的 MTD)。发现组合 MTD 是 500mg/kg 吉西他滨和  $350\ \mu\text{Ci}$   $^{131}\text{I}$ -PAM4 (50%MTD)。根据体重减轻测量的毒性达到被认为无毒的最大值;即,体重减轻了 20%。虽然组合的治疗方案比单独的吉西他滨更显著有效,但该治疗没有单独的放射免疫疗法有效。用低剂量的吉西他滨和放射免疫疗法进行下一步的研究,以检查是否可

以观察到真正的协同治疗作用。在第 0、3、6、9 和 12 天给荷有约  $1\text{cm}^3$  (约体重的 5%) 肿瘤的小鼠施用  $100\text{mg/kg}$  吉西他滨,并在第 0 天给予  $100\ \mu\text{Ci}^{131}\text{I-PAM4}$ 。观察到与单独的吉西他滨相比,肿瘤的统计学显著性 ( $P<0.0001$ ) 消退 (5 个肿瘤中的 2 个小于  $0.1\text{cm}^3$ ) 和 / 或生长抑制的治疗效果。因而,在治疗剂的剂量较低时,吉西他滨和放射免疫疗法的组合出人意料地似乎存在协同作用。另外注意到,依据体重,未观察到毒性。需要时,所述组合治疗方案可以以多个周期递送,其中第 2 个治疗周期开始于第 4 周,如对上述单独的放射免疫疗法研究所做的处理一样。

[0298] 实施例 7. PAM4 抗体与转染的细胞系的结合

[0299] 转染的胰腺细胞

[0300] 利用如 Hudson 等 (Amer. J. Pathol. 148, 3:951-60, 1996) 中所公开的和得自 Dr. M. A. Hollingsworth (Univ. of Nebraska Medical Center, Omaha, NE) 的 MUC-1 编码 cDNA, 转染不表达 MUC-1 粘蛋白的 PanC1 人胰腺腺癌细胞。MUC-1 cDNA 编码 MUC-1 的 30 个串联重复序列 (30TR) 或 42 个串联重复序列 (42TR) 形式 (Hudson 等, 1996; Lidell 等, FEBS J. 275:481-89, 2008)。除了所编码的串联重复序列的数目之外, MUC-1 序列是相同的。

[0301] 通过对细胞培养上清液的酶免疫测定, 检查用 30TR 或 42TR MUC-1 或对照载体 (无插入片段或反向插入片段) 转染的 PanC1 细胞或未转染 PanC1 细胞与 PAM4 抗体的反应性。未转染 PanC1 细胞和对照转染的 PanC1 细胞都没有产生可通过免疫测定的可检出水平的 PAM4 反应性粘蛋白 (未示出)。然而, 30TR 和 42TR MUC-1 转染的细胞都与 PAM4 抗体有高反应性 (未示出)。

[0302] 利用更敏感的免疫测定再次检查转染的 PanC1 细胞。简言之, 使细胞在 T75 烧瓶中生长直至它们达到约 80%-90% 的汇合度 (初始接种后的约 4 至 5 天)。此时, 收集废弃培养基, 高速离心, 并用于通过酶免疫测定对 PAM4 反应性粘蛋白进行定量。还收集细胞并进行计数。来自 Dr. Hollingsworth 的 PanC1 亲本细胞系和得自美国模式培养物保藏所 (Manassas, VA) 的单独的 PanC1 细胞系以及载体对照产生少量但可检出数量的 PAM4 反应性粘蛋白 (分别为  $0.87\pm 0.17$ 、 $0.54\pm 0.17$  和  $0.02\pm 0.02\ \mu\text{g/mL}/10^6$  个细胞), 而 30TR-MUC-1 基因转染的细胞产生  $14.17\pm 2.22\ \mu\text{g/mL}/10^6$  个细胞 (30TR-MUC-1 基因转染的培养基与所有其它样品比较,  $P<0.0003$  或更好)。

[0303] 已报道用 MUC-1 cDNA 转染 PanC1 细胞除了增加所转染 PanC1 细胞的 MUC-1 表达之外, 还对细胞蛋白表达产生次生效应, 例如增加转染细胞 (Hudson 等, 1996, Abstract) 中, 但仅增加用较大 (42TR) MUC-1 cDNA 转染的细胞中的细胞角蛋白 8 和 18 的水平 (Hudson 等, 1996, 第 956 页, 第 1 栏, 第 3 段)。

[0304] 转染的肾细胞

[0305] MUC-1 基因转染的 HEK-293 (人胚胎肾细胞) 产生的 MUC-1 与 MA5 单克隆抗体有反应性, 但与 PAM4 无反应性 (未示出)。然而, 如上所讨论, 表达非常低水平的内源性 MUC-1 的 MUC-1 转染的 PanC1 细胞合成的 MUC-1 与 PAM4 有强反应性, 而与 MA5 无反应性。利用数种细胞系的上清液时, 异源性三明治免疫测定 (PAM4  $\rightarrow$  MA5 和 MA5  $\rightarrow$  PAM4 捕获 / 探针) 没有运行产生信号。使用多克隆抗粘蛋白抗血清作为探针, 用 PAM4 或 MA5 MAb 作为捕获试剂时, 确实提供了有效的免疫测定。使用多克隆作为探针, 这两种 MAb 在它们各自的免疫测定中的交叉阻断表明这些 MAb 与独立表位有反应性。

[0306] 该数据表明 PAM4 和 MA5 表位没有共表达于相同的抗原分子中,并且 PanC1 细胞系可以具有产生 PAM4 表位的生物合成过程,而 HEK-293 细胞没有。MUC-1 蛋白核心的转录后修饰的差异(特异性糖基转移酶的表达/活性)可能是产生这些研究结果的原因。

[0307] 实施例 8. 试剂处理对 PAM4 抗原的免疫反应性的影响

[0308] 用 DTT 处理胰腺粘蛋白 PAM4 抗原(室温下 15 分钟),这完全破坏了它与 PAM4 的反应性(DTT-EC<sub>50</sub>, 0.60±0.00 μM)。MUC-1 内唯一的半胱氨酸(胱氨酸桥)存在于跨膜结构域内,并且应当是 DTT 不可及的。MUC-1 的分泌形式不含跨膜结构域,因而没有分子内胱氨酸桥。来自高碘酸盐氧化处理,即室温下用 0.05M 高碘酸钠处理 PAM4 抗原 2 小时的数据得出,与 PAM4 抗体的免疫反应性丧失 40%(未示出)。进一步的高碘酸盐研究显示,与 PAM4 抗体的免疫反应性丧失了高达 60%(未示出)。高碘酸盐和 DTT 研究结果表明 PAM4 表位从构象上依赖于某些极小的糖基化形式,并可能受分子间二硫键形成影响。

[0309] 实施例 9. PAM4 抗原的分布和交叉反应性

[0310] PanIN 内 PAM4 表位的表达对于 MUC-1 是非典型的。它与所报道的通过市售 MAb-CLH2-2 检测的 MUC-5ac 的表达相似。然而,将 PAM4 作为捕获试剂和 MAb-CLH2-2 作为探针的尝试性三明治免疫测定给出阴性结果。虽然这可能表明 PAM4 和 CLH2-2 表位可能重叠,因而彼此阻断,但 CLH2-2 被报道与 42/66 (64%) 的胃癌有反应性,而 PAM4 MAb 仅与 6/40 (15%) 的胃癌有反应性,当然这些仅为局灶反应性。

[0311] 在 EIA(用 PAM4 作为捕获试剂)中使用市售 45M1,抗-MUC-5ac MAb 作为探针试剂提供了阳性结果,表明这两个表位可能存在于相同的抗原分子上。阻断研究(任一方向)表明由 45M1 和 PAM4 结合的表位实际是两个不同的表位,因为没有观察到阻断。由来自侵袭性胰腺癌的核心组成的组织微阵列标记已证明个体患者样本中 45M1 和 PAM4 表位的表达具有显著性差异。在 28 个样本当中,仅在 17 个病例(61%)中观察到一致性。PAM4 与 24/28 病例(86%)有反应性,而 45M1 与 13/28(46%)病例有反应性(未示出)。

[0312] 这可能是因为在有关 MUC-1 基因转染的上述研究(实施例 7)中,MUC-1 的表达可能已经上调另一种粘蛋白的表达,或者以某种其它方式影响 PAM4 表位的暴露。高碘酸盐研究结果与糖基化作为 PAM4 抗原与 PAM4 抗体免疫反应的一个因素相一致。因而,利用核粘蛋白(apomucin)的研究结果对于抗原测定可能不是决定性的。

[0313] 虽然基于 EIA 捕获,PAM4 抗体似乎与 45M1 抗-MUC-5ac MAb 结合至相同的抗原蛋白,但注意到 MUC-5ac 对胰腺癌没有特异性,并且还在许多正常组织(除了 PAM4 与其有反应性的胃粘膜以外的正常组织)中发现 MUC-5ac。例如,在正常肺组织、结肠组织和其它组织中发现 MUC-5ac。PAM4 抗体不结合到正常肺组织上,除了上面指出的在少数样品中以及有限和极少量的结合的情况之外。

[0314] 至于 DTT 和高碘酸盐的影响,可能是因为肽核心二硫桥键总是相同的,不论是什么组织产生该蛋白质。特异性氨基酸序列应当以特定方式折叠,而与组织来源无关。然而,糖基化形式可能会根据组织来源的不同而不同。

[0315] 实施例 10. 噬菌体展示肽与 PAM4 抗体的结合

[0316] 用两种不同的噬菌体展示肽文库检查 PAM4 抗体结合。第一种是由 12 个氨基酸序列组成的线性肽文库,第二种是由通过二硫桥键环合的 7 个氨基酸序列组成的环状肽。我们交替地针对 hPAM4 和 hLL2(抗-CD22 抗体的阴性选择)淘选各个文库,总共淘选 4 轮,然

后筛选与 hPAM4 和 mPAM4 有反应性,而对 hLL2 有很小或没有反应性的噬菌体展示的肽。丢弃以非特异性方式结合(即,结合到依帕珠单抗 [hLL2] 上)的噬菌体。

[0317] 对于线性噬菌体展示的肽,鉴定出序列 WTWNITKAYPLP (SEQ ID NO:7) 30 次(在 35 个测序噬菌体中),每次均显示与 PAM4 抗体有反应性。进行突变分析,其中如上构建基于这个序列并在每个位置具有 7.5% 的简并性的文库,并进行淘选和筛选。注意到所获得的 PAM4 结合呈阳性的 19 个肽序列的变化性,其中 7 个与亲本序列相同,5 个具有序列 WTWNITKEYPQP (SEQ ID NO:62),其余几个是独特存在的。表 6 显示这种突变分析的结果。上面一排列出鉴定的序列,下面一排列出其中的每种氨基酸在那个位置被鉴定出的频率。亲本序列最频繁出现(加粗),下一个最高变化是位置 8 处的 A 被 E 置换和位置 11 处的 L 被 Q 置换。这些置换似乎对免疫反应性没有很大影响。

[0318] 表 6. 结合到 PAM4 抗体上的线性肽的噬菌体展示氨基酸序列 (SEQ ID NO:113) 变化

	<b>W</b>	<b>T</b>	<b>W</b>	<b>N</b> <b>D</b>	<b>I</b>	<b>T</b> <b>R</b>	<b>K</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>N</b> <b>G</b>	<b>A</b> <b>E</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>C</b>	<b>Y</b> <b>T</b>	<b>P</b> <b>R</b>	<b>L</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>C</b>	<b>P</b>
[0319]	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>18</b> 1	<b>19</b>	<b>17</b> 2	<b>14</b> 1 2 1 1	<b>10</b> 5 1 1 1 1	<b>18</b> 1	<b>17</b> 2	<b>11</b> 5 1 1 1	<b>19</b>
	出现次数(在所分析的 19 个序列中)											

[0320] 利用噬菌体展示的环状文库获得的结果与线性文库显著不同(表 7)。所检查的 35 个肽序列的 33 个中存在序列 ACPEWWGTTC (SEQ ID NO:63)。环状文库分析给出下列结果(带星号位置无变化并且没有经受文库中的选择压力(selective pressure))。

[0321] 表 7. 结合到 PAM4 抗体上的线性肽的噬菌体展示氨基酸序列 (SEQ ID NO:114) 变化

	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>P</b> <b>Y</b>	<b>E</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>G</b> <b>S</b>	<b>T</b> <b>G</b> <b>S</b>	<b>T</b> <b>M</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>P</b>	<b>C</b>
[0322]										

[0323]	出现次数(在所分析的19个序列中)	*	*	33 2	35	35	35	34 1	29 5 1	28 4 1 1 1	*
--------	-------------------	---	---	---------	----	----	----	---------	--------------	------------------------	---

[0324] 两个半胱氨酸(在位置2和10处)形成二硫桥键。位置9处的T被任何氨基酸置换都极大地影响免疫反应性。与在共有肽序列C末端表现出同源性的上面所示的环状肽序列相比,序列GTTGTTTC(SEQ ID NO:64)在MUC-5ac蛋白内朝向氨基末端存在。然而,环状肽与PAM4抗体的免疫反应性仅为线性序列与PAM4抗体的免疫反应性的10%。线性和环状共有序列都与半胱氨酸关联,这可能或可能不与DTT对PAM4抗原免疫反应性的影响有关。

[0325] 本文报道的结果表明,PAM4表位依赖于可由二硫桥键产生的特定构象,以及特定糖基化形式。

[0326] 实施例11. 在胰腺炎样本中的胰腺癌的免疫组织学

[0327] 数种病理病状使患者容易罹患胰腺癌,例如胰腺炎、糖尿病、抽烟和许多其它病理状况。在这种预先选定的组的患者中,筛选措施对于胰腺瘤变的早期检测特别重要。我们检查9个来自初步诊断患有慢性胰腺炎的患者慢性胰腺炎组织样本。我们采用抗-CD74MAb、LL1作为炎性浸润的指示剂,MAb-MA5作为胰腺导管和腺泡细胞的阳性对照。然而,这两个对照MAb提供了与胰腺炎一致的免疫组织学证据,在任何情况下PAM4都不与炎性胰腺组织反应。然而,在一个病例中,该组织样本中还存在中分化的胰腺腺癌。PAM4使得这个肿瘤内的增生性细胞为强染色。在第二个病例中,当发炎组织呈PAM4阴性时,鉴定出PAM4标记的小PanIN前驱病变。在这个后者样本中PanIN的标记与诊断为患有非恶性疾病的患者的胰腺瘤变的早期检测一致。这些结果表明,利用PAM4抗体可以在良性胰腺组织的背景下以高敏感度和选择性对胰腺瘤变进行检测和/或诊断。

[0328] 实施例12. 对患有不宜手术并且转移的胰腺癌的治疗

[0329] 患者118-001,CWG是63岁男性,2007年11月被诊断为患有IV期胰腺腺癌伴有多个肝脏转移瘤。他同意采取组合的放射免疫疗法和吉西他滨化疗作为第一治疗策略,给予他 $6.5\text{mCi}/\text{m}^2$   $^{90}\text{Y}$ -hPAM4组合 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 吉西他滨的第一治疗周期,其中吉西他滨在1-4周每周给予一次, $^{90}\text{Y}$ -hPAM4在2-4周每周给予一次(3剂)。2个月后,重复相同的治疗周期,因为在第一个治疗周期之后未观察到较大的毒性。在第一个治疗周期后的4周,令人惊讶地观察到原发性肿瘤和3个肝脏转移瘤中的2个直径减小的CT证据,并且这与FDG-PET扫描的SUV值的显著性减小一致,其中4个肿瘤中的3个此时恢复到正常本底SUV水平(图6和图7)。该患者的CA-19.9水平从治疗前的1,297降低到77的低水平,进一步支持该治疗是有效的。表8显示利用 $^{90}\text{Y}$ -hPAM4的放射免疫疗法组合吉西他滨化疗对这位患者的治疗效果。令人惊讶和意外地,如此低剂量的缀合到抗体上的放射性核素,组合如此低的无毒性剂量的吉西他滨甚至在单个疗程的这种治疗之后就表现出这样的抗肿瘤活性。

[0330] 表8. 利用 $^{90}\text{Y}$ -hPAM4的放射免疫疗法组合吉西他滨化疗对转移性胰腺癌的治疗效果

肿瘤位置	基线最长直径(cm)	Tx后4周的最长直径(cm)	基线 PET (SUV)	Tx后4周的PET (SUV)
胰腺尾(原发性)	4.5	4.3	9.2	4.2
[0331] 左侧肝转移瘤	1.9	1.9	4.1	本底
右侧后部肝转移瘤	1.7	1.6	3.7	本底
右侧中央肝转移瘤	1.9	1.2	3.2	本底

[0332] 实施例 13. 对患有不宜手术的转移性胰腺癌的治疗

[0333] 一位 56 岁男性患者, 患有广泛的不宜手术的胰腺腺癌, 伴有直径为 1 至 4cm 范围的数个肝脏转移瘤、体重明显减轻 (体重 30 磅或以上)、轻度黄疸、嗜睡和乏力以及需要药物治疗的腹痛, 每周给他输注 4 次各 200mg/m<sup>2</sup> 剂量的吉西他滨。在最后 3 次吉西他滨输注中, 以 10mCi/m<sup>2</sup> <sup>90</sup>Y 和 20mg 抗体蛋白的剂量施用 <sup>90</sup>Y-DOTA-hPAM4 放射性标记人源化抗体, 在 2 小时内静脉输注。2 周后, 给予该患者由每周静脉输注 3 剂 600mg/m<sup>2</sup> 组成的吉西他滨化疗疗程。4 周后对该患者进行评估, 该患者患有轻度白细胞减少症 (2 级), 无其它超过基线的较大的血液或酶变化, 但血液 CA19.9 滴度有所改善, 从 5,700 降低到 1,200, 而且黄疸减轻, 总主观症状得到改善。接着在 3 周后重复给予较低剂量吉西他滨 (每周 1 次 x4 周) 与 3 剂 <sup>90</sup>Y-DOTA-hPAM4 的治疗周期。4 周后, 重新评估该患者, CT 和 PET 扫描证实总肿瘤质量 (原发性癌症和转移瘤) 减少约 40%, CA19.9 滴度进一步降低至 870。该患者恢复食欲和活力, 并能够返回到更多的日常活动中而不需要止痛药。在开始这项实验性治疗后他的体重增加 12 磅。6 周后, 重复扫描和血液值表明这种反应得到保持。

[0334] 实施例 14. 用于预靶向的停靠和锁定 (DNL) 构建体的制备

[0335] DDD 和 AD 融合蛋白

[0336] DNL 技术可以用来制备包含几乎任何抗体或其片段或其他效应部分的二聚体、三聚体、四聚体、六聚体等。对于某些优选的实施方案, IgG 抗体或 Fab 抗体片段可以作为含有二聚化和停靠结构域 (DDD) 序列或锚定结构域 (AD) 序列的融合蛋白生成。虽然在某些优选的实施方案中, DDD 和 AD 部分作为融合蛋白生成, 但技术人员将会意识到在要求保护的方法和组合物的范围内可以采用其它缀合方法, 例如化学交联或点击化学。

[0337] 双特异性抗体可以通过将第一抗体的 Fab-DDD 融合蛋白与第二抗体的 Fab-AD 融合蛋白组合来形成。或者, 可以制备组合 IgG-AD 融合蛋白和 Fab-DDD 融合蛋白的构建体。该技术不是限制性的, 任何有用的蛋白质或肽都可以作为 AD 或 DDD 融合蛋白生成以便并入 DNL 构建体中。如果利用化学交联, 则 AD 和 DDD 缀合物不限于蛋白质或肽, 并可以包含可采用本领域已知的任何交联技术交联至 AD 或 DDD 序列的任何分子。在某些示例性实施方案中, 聚乙二醇 (PEG) 或其它聚合物部分可以并入到 DNL 构建体中, 如下面进一步详细描述。

[0338] 对于预靶向应用, 可将含有针对与患病组织相关的抗原, 例如肿瘤相关抗原 (TAA)

的结合位点的抗体或片段,与结合可靶向构建体上的半抗原的第二抗体或片段组合,所述可靶向构建体上连接有治疗剂和/或诊断剂。将基于 DNL 的双特异性抗体施用给受试者,允许循环抗体从血液中清除并定位于靶组织,然后加入缀合的可靶向构建体,所述缀合的可靶向构建体结合到用于诊断或治疗的定位的抗体上。

[0339] 可以为每种 Fab 或 IgG 融合蛋白开发独立的转基因细胞系。模块一经生成,便可以根据需要将模块纯化或者保持在细胞培养上清液中。生成之后,可将任何 DDD 融合蛋白模块与任何 AD 融合蛋白模块组合从而产生双特异性 DNL 构建体。对于不同类型的构建体,可以利用不同的 AD 或 DDD 序列。示例性 DDD 和 AD 序列提供在下面。

[0340] DDD1:

[0341] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:65)

[0342] DDD2:

[0343] CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:66)

[0344] AD 1:QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:67)

[0345] AD2:CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:68)

[0346] 技术人员将会意识到,DDD1 和 DDD2 包含蛋白激酶 A 人 RII  $\alpha$  形式的 DDD 序列。然而,在替代实施方案中,DDD 和 AD 部分可以基于蛋白激酶 A 人 RI  $\alpha$  形式的 DDD 序列,和相应的 AKAP 序列,如下面 DDD3、DDD3C 和 AD3 中所示例。

[0347] DDD3

[0348] SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:69)

[0349] DDD3C

[0350] MSCGGSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:70)

[0351] AD3

[0352] CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC (SEQ ID NO:71)

[0353] 表达载体

[0354] 质粒载体 pdHL2 已用于生成许多抗体和基于抗体的构建体。参见, Gillies 等, *J Immunol Methods* (1989), 125:191-202; Losman 等, *Cancer (Phila)* (1997), 80:2660-6。双顺反子哺乳动物表达载体指导 IgG 的重链和轻链合成。该载体序列对于许多不同的 IgG-pdHL2 构建体而言大部分相同,而仅在可变结构域 ( $V_H$  和  $V_L$ ) 序列上存在差异。利用本领域技术人员已知的分子生物学工具,可以将这些 IgG 表达载体转化成 Fab-DDD 或 Fab-AD 表达载体。为了产生 Fab-DDD 表达载体,将重链的铰链、CH2 和 CH3 结构域的编码序列用编码铰链的前 4 个残基、14 个残基的 Gly-Ser 接头和人 RII  $\alpha$  的前 44 个残基(称为 DDD1)的序列替代。为了产生 Fab-AD 表达载体,将 IgG 的铰链、CH2 和 CH3 结构域的序列用编码铰链的前 4 个残基、15 个残基的 Gly-Ser 接头和称为 AKAP-IS 的 17 个残基的合成 AD(称为 AD1)的序列替代,所述 17 个残基的合成 AD 采用生物信息学和肽阵列技术产生并显示以非常高的亲和性 (0.4nM) 结合 RII  $\alpha$  二聚体。参见 Alto 等, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A* (2003), 100:4445-50。

[0355] 设计两个穿梭载体以促进 IgG-pdHL2 载体转化为 Fab-DDD1 或 Fab-AD1 表达载体,如下所述。

[0356] CH1 的制备

[0357] 使用 pdHL2 质粒载体作为模板,通过 PCR 扩增 CH1 结构域。左侧 PCR 引物由 CH1 结构域的上游 (5') 端和 SacII 限制核酸内切酶位点组成,所述 SacII 限制核酸内切酶位点是 CH1 编码序列的 5'。右侧引物由编码铰链 (PKSC (SEQ ID NO:115)) 前 4 个残基的序列组成,所述残基后面是 4 个甘氨酸和丝氨酸,最后两个密码子 (GS) 包含 Bam HI 限制位点。将 410 bp PCR 扩增引物克隆到 **PGEMT®** PCR 克隆载体 (**PROMEGA®**, Inc.) 中,并根据 T7 (5') 方向的插入片段来筛选克隆。

[0358] 命名为  $(G_4S)_2$ DDD1 (公开为 SEQ ID NO:116 的 ' $(G_4S)_2$ ') 的双链寡核苷酸由 Sigma **GENOSYS®** (Haverhill, UK) 合成,以编码 DDD1 的氨基酸序列,所述氨基酸序列前面是接头肽的 11 个残基,前两个密码子包含 BamHI 限制位点。终止密码子和 EagI 限制位点附接于 3' 端。下面示出编码的多肽序列。

[0359] GSGGGSGGGGSHIQIPPLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:72)

[0360] 合成在其 3' 端有 30 个碱基对重叠的命名为 RIIA1-44 上和 RIIA1-44 下的两个寡核苷酸,并对它们进行组合从而包含 174bp DDD1 序列的中心 154 个碱基对。使该寡核苷酸退火,并用 Taq 聚合酶对其进行引物延伸反应。引物延伸之后,通过 PCR 扩增双链体。将该扩增引物克隆到 **PGEMT®** 中,并根据 T7 (5') 方向的插入片段进行筛选。

[0361] 合成双链寡核苷酸,以编码 AD1 的氨基酸序列,所述氨基酸序列前面是接头肽的 11 个残基,前两个密码子包含 BamHI 限制位点。终止密码子和 EagI 限制位点附接于 3' 端。下面示出编码的多肽序列。

[0362] GSGGGSGGGGSQIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:73)

[0363] 合成编码上述肽序列的两个互补重叠的寡核苷酸,命名为 AKAP-IS 上和 AKAP-IS 下,并使其退火。通过 PCR 扩增该双链体。将扩增引物克隆到 **PGEMT®** 载体中并根据 T7 (5') 方向的插入片段进行筛选。

[0364] 连接 DDD1 与 CH1

[0365] 利用 BamHI 和 NotI 限制酶从 **PGEMT®** 中切除编码 DDD1 序列的 190bp 片段,然后将其连接到 **CHI-PGEMT®** 中的相同位点处从而产生穿梭载体 **CHI-DDD1-PGEMT®**。

[0366] 连接 AD1 与 CH1

[0367] 利用 BamHI 和 NotI 从 **PGEMT®** 中切除含有 AD1 序列的 110bp 片段,然后将其连接到 **CHI-PGEMT®** 中的相同位点处从而产生穿梭载体 **CHI-AD1-PGEMT®**。

[0368] 将 CHI-DDD1 或 CHI-AD1 克隆到基于 pdHL2 的载体中

[0369] 利用这种模块设计,可以将 CHI-DDD1 或 CHI-AD1 并入到 pdHL2 载体中的任何 IgG 构建体中。将整个重链恒定结构域用上述构建体之一替代,通过从 pdHL2 中除去 SacII/EagI 限制片段 (CH1-CH3),并将它用从各自的 pGemT 穿梭载体中切除的 CHI-DDD1 或 CHI-AD1 的 SacII/EagI 片段替代。

[0370] 构建 h679-Fd-AD1-pdHL2

[0371] h679-Fd-AD1-pdHL2 是用于生成 h679Fab 的表达载体,其中 AD1 经由 14 个氨基酸残基构成的柔性 Gly/Ser 肽间隔序列偶联至 Fd 的 CH1 结构域的羧基末端。将含有 h679 的可变结构域的基于 pdHL2 的载体转化为 h679-Fd-AD1-pdHL2,通过将 SacII/EagI 片段用利用 SacII 和 EagI 从 CHI-AD1-SV3 穿梭载体中切除的 CHI-AD1 片段替代。

[0372] 构建 C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2

[0373] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2 是用于生成稳定二聚体的表达载体,所述稳定二聚体包含两个拷贝的融合蛋白 C-DDD1-Fab-hMN-14,其中 DDD1 经由柔性肽间隔序列在 CH1 羧基末端连接至 hMN-14Fab。将已用于生成 hMN-14 IgG 的质粒载体 hMN-14(I)-pdHL2 转化为 C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2,通过用 SacII 和 EagI 限制核酸内切酶进行消化从而除去 CH1-CH3 结构域,并插入利用 SacII 和 EagI 从 CH1-DDD1-SV3 穿梭载体中切除的 CH1-DDD1 片段。

[0374] 已采用同样的技术生成用于多种多样的已知抗体的 Fab 表达的质粒,所述已知抗体例如 hLL1、hLL2、hPAM4、hR1、hRS7、hMN-14、hMN-15、hA19、hA20 和许多其它抗体。一般地,抗体可变区编码序列存在于 pdHL2 表达载体中,如上所述转化所述表达载体以生成 AD 或 DDD 融合蛋白。可以将包含此种抗体中任何一种的 Fab 片段的 AD 融合蛋白和 DDD 融合蛋白,以大约 2 个 DDD 融合蛋白 /1 个 AD 融合蛋白的比率组合,从而产生包含第一抗体的两个 Fab 片段和第二抗体的一个 Fab 片段的三聚 DNL 构建体。

[0375] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2

[0376] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2 是用于生成 C-DDD2-Fab-hMN-14 的表达载体,其具有 DDD2 的二聚化和停靠结构域序列,所述 DDD2 经由 14 个氨基酸残基 Gly/Ser 肽接头附接至 hMN-14 的 Fd 羧基末端。分泌的融合蛋白由通过 DDD2 结构域的非共价相互作用而固定在一起的两个相同拷贝的 hMN-14Fab 构成。

[0377] 所述表达载体如下进行工程化。合成性制备两个重叠的互补寡核苷酸,其包含接头肽的一部分和 DDD2 的残基 1-13 的编码序列。使所述寡核苷酸退火并用 T4PNK 磷酸化,在 5' 和 3' 端产生分别适合于与用限制核酸内切酶 BamHI 和 PstI 消化的 DNA 连接的突出端。

[0378] 将所述双链 DNA 与通过用 BamHI 和 PstI 消化而制备的穿梭载体 **CHI-DDD1-PGEMT®** 连接,从而产生穿梭载体 **CHI-DDD2-PGEMT®**。用 SacII 和 EagI 从 **CHI-DDD2-PGEMT®** 中切除 507bp 片段,并将其与通过用 SacII 和 EagI 消化而制备的 IgG 表达载体 hMN-14(I)-pdHL2 连接。最终的表达构建体命名为 C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2。已采用类似的技术产生许多不同人源化抗体的 Fab 片段的 DDD2 融合蛋白。

[0379] h679-Fd-AD2-pdHL2

[0380] h679-Fab-AD2 经设计作为 B 与作为 A 的 C-DDD2-Fab-hMN-14 配对。h679-Fd-AD2-pdHL2 是用于生成 h679-Fab-AD2 的表达载体,其具有 AD2 的锚定结构域序列,所述 AD2 经由 14 个氨基酸残基 Gly/Ser 肽接头附接至 CH1 结构域的羧基末端。AD2 具有一个位于 AD1 的锚定结构域序列之前的半胱氨酸残基和另一个位于 AD1 的锚定结构域序列之后的半胱氨酸残基。

[0381] 所述表达载体如下进行工程化。合成性制备两个重叠的互补寡核苷酸 (AD2 上和 AD2 下),其包含 AD2 和接头序列的一部分的编码序列。使所述寡核苷酸退火并用 T4PNK 磷酸化,在 5' 和 3' 端产生分别适合于与用限制核酸内切酶 BamHI 和 SpeI 消化的 DNA 连接的突出端。

[0382] 将所述双链 DNA 连接到通过用 BamHI 和 SpeI 消化制备的穿梭载体 **CHI-AD1-PGEMT®** 中,从而产生穿梭载体 **CHI-AD2-PGEMT®**。利用 SacII 和

EagI 限制酶从所述穿梭载体中切除含有 CH1 和 AD2 编码序列的 429 碱基对片段, 并将其连接到通过用这些相同的酶消化制备的 h679-pdHL2 载体中。最终的表达载体命名为 h679-Fd-AD2-pdHL2。

[0383] 实施例 15. 从多个抗体生成 AD 和 DDD 连接的 Fab 和 IgG 融合蛋白

[0384] 采用前述实施例中描述的技术, 构建表 9 中示出的 IgG 和 Fab 融合蛋白, 并将其并入到 DNL 构建体中。所述融合蛋白保留了亲本抗体的抗原结合特征, 并且所述 DNL 构建体表现出所并入抗体或抗体片段的抗原结合活性。

[0385] 表 9. 包含 IgG 或 Fab 的融合蛋白

[0386]

融合蛋白	结合特异性
C-AD1-Fab-h679	HSG
C-AD2-Fab-h679	HSG
C-(AD) <sub>2</sub> -Fab-h679	HSG
C-AD2-Fab-h734	钢-DTPA
C-AD2-Fab-hA20	CD20
C-AD2-Fab-hA20L	CD20
C-AD2-Fab-hL243	HLA-DR
C-AD2-Fab-hLL2	CD22
N-AD2-Fab-hLL2	CD22
C-AD2-IgG-hMN-14	CEACAM5
C-AD2-IgG-hR1	IGF-1R
C-AD2-IgG-hRS7	EGP-1
C-AD2-IgG-hPAM4	MUC
C-AD2-IgG-hLL1	CD74
C-DDD1-Fab-hMN-14	CEACAM5
C-DDD2-Fab-hMN-14	CEACAM5
C-DDD2-Fab-h679	HSG

C-DDD2-Fab-hA19	CD19
C-DDD2-Fab-hA20	CD20
C-DDD2-Fab-hAFP	AFP
C-DDD2-Fab-hL243	HLA-DR
C-DDD2-Fab-hLL1	CD74
C-DDD2-Fab-hLL2	CD22
C-DDD2-Fab-hMN-3	CEACAM6
C-DDD2-Fab-hMN-15	CEACAM6
C-DDD2-Fab-hPAM4	MUC
C-DDD2-Fab-hR1	IGF-1R
C-DDD2-Fab-hRS7	EGP-1
N-DDD2-Fab-hMN-14	CEACAM5

[0387]

[0388] 实施例 16. 用于 DNL 的序列变体

[0389] 在某些优选的实施方案中, 并入到 DNL 构建体中的 AD 和 DDD 序列包含如上所讨论的 AD1、AD2、AD3、DDD1、DDD2、DDD3 或 DDD3C 的氨基酸序列。然而, 在替代实施方案中, AD 和 / 或 DDD 部分的序列变体可以用于构建 DNL 复合物。例如, 人 PKA DDD 序列仅存在 4 个变体, 与 PKA RI $\alpha$ 、RII $\alpha$ 、RI $\beta$  和 RII $\beta$  的 DDD 部分相对应。RII $\alpha$  DDD 序列是上面公开的 DDD1 和 DDD2 的基础。这四种人 PKA DDD 序列在下面示出。所述 DDD 序列表示 RII $\alpha$  的残基 1-44、RII $\beta$  的残基 1-44、RI $\alpha$  的残基 12-61 和 RI $\beta$  的残基 13-66。(注意 DDD1 的序列是通过对人 PKA RII $\alpha$  DDD 部分稍作修饰而得到的。)

[0390] PKA RI $\alpha$

[0391] SLRECELYVQKHNIQALLKDVSIQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKKEAK (SEQ ID NO:74)

[0392] PKA RI $\beta$

[0393] SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFEEKLEKEENRQILA (SEQ ID NO:75)

[0394] PKA RII $\alpha$

[0395] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID NO:76)

[0396] PKA RII $\beta$

[0397] SIEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID NO:77)

[0398] AD 和 DDD 结构域的结构功能关系已经是调查的主题。(参见, 例如, Burns-Hamuro 等, 2005, Protein Sci 14:2982-92; Carr 等, 2001, J Biol Chem 276:17332-38; Alto

等,2003,Proc Natl Acad Sci USA100:4445-50;Hundsrucker 等,2006,Biochem J 396:297-306;Stokka 等,2006,Biochem J 400:493-99;Gold 等,2006,Mol Cell 24:383-95;Kinderman 等,2006,Mol Cell 24:397-408,其中的每篇文献均以引用方式整体并入本文。)

[0399] 例如,Kinderman 等(2006)检查了 AD-DDD 结合相互作用的晶体结构,并且得出结论:人 DDD 序列含有许多对于二聚体形成或 AKAP 结合重要的保守氨基酸残基,在下面 SEQ ID NO:65 中加下划线标出。(参见 Kinderman 等,2006 中的图 1,该文献以引用方式并入本文。)技术人员将会意识到,在设计 DDD 序列的序列变体时,期望避免改变加下划线残基中的任何一个,而可以对对于二聚化和 AKAP 结合不太关键的残基进行保守性氨基酸置换。

[0400] SHIQIPPLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:65)

[0401] Alto 等(2003)对各种 AKAP 蛋白的 AD 序列进行生物信息学分析,以设计称为 AKAP-IS 的 RII 选择性 AD 序列(SEQ ID NO:67),其对 DDD 的结合常数为 0.4nM。AKAP-IS 序列被设计为结合到 PKA 上的 AKAP 的拮抗剂。在 AKAP-IS 序列中,其置换往往会降低对 DDD 的结合的残基在 SEQ ID NO:67 中加下划线标出。技术人员将会意识到,在设计 AD 序列的序列变体时,期望避免改变加下划线残基中的任何一个,而可以对对于 DDD 结合不太关键的残基进行保守性氨基酸置换。

[0402] AKAP-IS 序列

[0403] QIEYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:67)

[0404] Gold(2006)利用结晶学和肽筛选开发 SuperAKAP-IS 序列(SEQ ID NO:78),其对 PKA 的 RII 同种型表现出与 RI 同种型相比高 5 个数量级的选择性。加下划线残基指示相对于 AKAP-IS 序列的氨基酸置换的位置,所述氨基酸置换增强对 RII  $\alpha$  的 DDD 部分的结合。在这个序列中,N-末端 Q 残基编号为残基号 4,C-末端 A 残基是残基号 20。可以进行置换以影响对 RII  $\alpha$  的亲性的残基是残基 8、11、15、16、18、19 和 20(Gold 等,2006)。在某些替代实施方案中,认为可以用 SuperAKAP-IS 序列置换 AKAP-IS AD 部分序列以制备 DNL 构建体。可以置换 AKAP-IS AD 序列的其它替代序列在 SEQ ID NO:79-81 中示出。相对于 AKAP-IS 序列的置换加下划线标出。可以预料,与 SEQ ID NO:68 中所示的 AD2 序列一样,AD 部分也可以包括另外的 N-末端残基半胱氨酸和甘氨酸以及 C-末端残基甘氨酸和半胱氨酸。

[0405] SuperAKAP-IS

[0406] QIEYVAKQIVDYAIHQQA(SEQ ID NO:78)

[0407] 替代 AKAP 序列

[0408] QIEYKAKQIVDHAIHQQA(SEQ ID NO:79)

[0409] QIEYHAKQIVDHAIHQQA(SEQ ID NO:80)

[0410] QIEYVAKQIVDHAIHQQA(SEQ ID NO:81)

[0411] Gold 等的图 2 公开了另外的来自多种 AKAP 蛋白的 DDD 结合序列,如下面所示。

[0412] RII-特异性 AKAP

[0413] AKAP-KL

[0414] PLEYQAGLLVQNAIQQAI(SEQ ID NO:82)

[0415] AKAP79

[0416] LLIETASSLVKNAIQLSI(SEQ ID NO:83)

- [0417] AKAP-Lbc
- [0418] LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO:84)
- [0419] RI- 特异性 AKAP
- [0420] AKAPce
- [0421] ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO:85)
- [0422] RIAD
- [0423] LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO:86)
- [0424] PV38
- [0425] FEELAWKIAKMIWSDVF (SEQ ID NO:87)
- [0426] 双重特异性 AKAP
- [0427] AKAP7
- [0428] ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO:88)
- [0429] MAP2D
- [0430] TAEVSARIVQVVTAEAV (SEQ ID NO:89)
- [0431] DAKAP1
- [0432] QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO:90)
- [0433] DAKAP2
- [0434] LAWKIAKMIWSDVMQQ (SEQ ID NO:91)
- [0435] Stokka 等 (2006) 也开发了结合到 PKA 上的 AKAP 的肽竞争剂, 如 SEQ ID NO:92-94 中所示。所述肽拮抗剂命名为 Ht31 (SEQ ID NO:92)、RIAD (SEQ ID NO:93) 和 PV-38 (SEQ ID NO:94)。Ht-31 肽对 PKA 的 RII 同种型表现出较大亲和性, 而 RIAD 和 PV-38 对 RI 表现出较大亲和性。
- [0436] Ht31
- [0437] DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO:92)
- [0438] RIAD
- [0439] LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO:93)
- [0440] PV-38
- [0441] FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO:94)
- [0442] Hundsrucker 等 (2006) 开发了另外其它结合到 PKA 上的 AKAP 的肽竞争剂, 其对 PKA 的 RII 形式的 DDD 的结合常数低至 0.4nM。各种 AKAP 拮抗肽的序列提供在 Hundsrucker 等的表 1 中, 复制在下表 10 中。AKAPIS 表示合成 RII 亚基结合肽。所有其它肽都来源于所指示的 AKAP 的 RII 结合结构域。
- [0443] 表 10. AKAP 肽序列

[0444]

	<u>肽序列</u>
AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:67)
AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (SEQ ID NO:95)
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:96)
Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG (SEQ ID NO:97)
AKAP7 $\delta$ -wt-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:98)
AKAP7 $\delta$ -L304T-pep	PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:99)
AKAP7 $\delta$ -L308D-pep	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:100)
AKAP7 $\delta$ -P-pep	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:101)
AKAP7 $\delta$ -PP-pep	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:102)
AKAP7 $\delta$ -L314E-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY (SEQ ID NO:103)
AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO:104)
AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (SEQ ID NO:105)
AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (SEQ ID NO:106)
AKAP9-pep	LEKQYQEQLLEEVAKVIVSMSIAFA (SEQ ID NO:107)

	AKAP10-pep	NTDEAQEELAWKIAKMIIVSDIMQQA (SEQ ID NO:108)
	AKAP11-pep	VNLDKKAFLAEKIVAEAEIEKAEREL (SEQ ID NO:109)
[0445]	AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIIQTAVDQF (SEQ ID NO:110)
	AKAP14-pep	TQDKNYEDELTOVALALVEDVINYA (SEQ ID NO:111)
	Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH (SEQ ID NO:112)

[0446] 不同 AKAP 蛋白的 AD 结构域中高度保守的残基在下面通过参考 AKAP IS 序列 (SEQ ID NO:67) 加下划线指示。所述残基与 Alto 等 (2003) 所观察到的相同, 添加了 C-末端丙氨酸残基。(参见, Hundsrucker 等 (2006) 的图 4, 该文献以引用方式并入本文。) 对 RII DDD 序列有特别高的亲和性的肽拮抗剂的序列为 AKAP-IS、AKAP7  $\delta$ -wt-pep、AKAP7  $\delta$ -L304T-pep 和 AKAP7  $\delta$ -L308D-pep 的那些。

[0447] AKAP-IS

[0448] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:67)

[0449] Carr 等 (2001) 检查了来自人和非人蛋白的不同 AKAP 结合 DDD 序列之间的序列同源性程度, 并在所述 DDD 序列中鉴定出在不同 DDD 部分中似乎最高度保守的残基。这些残基在下面通过参考 SEQ ID NO:65 的人 PKA RII  $\alpha$  DDD 序列加下划线指示。特别保守的残基通过用斜体进一步指示。所述残基与 Kinderman 等 (2006) 提出的对于对 AKAP 蛋白的结合而言重要的残基重叠但不相同。技术人员将会意识到, 在设计 DDD 的序列变体时, 最优选避免改变最保守的残基 (斜体表示), 也优选避免改变保守的残基 (加下划线), 而可以考虑对未加下划线也未用斜体表示的残基进行保守性氨基酸置换。

[0450] SHIQ *IP* P GL TE LL Q G Y TNEVLR Q QP P DL VE FA VE YF TR L REA R A (SEQ ID NO:65)

[0451] 技术人员将会意识到, 可以利用 DNL 构建体的抗体部分或接头部分中的这些和其它氨基酸置换来增强所得 DNL 构建体的治疗特性和 / 或药物动力学特性。

[0452] 实施例 17. TF2DNL 预靶向构建体的产生

[0453] 通过使 C-DDD2-Fab-hMN-14 与 h679-Fab-AD2 反应获得三聚 DNL 构建体, 命名为 TF2。如下产生试验批量的 TF2, 产率 >90%。将蛋白质 L-纯化的 C-DDD2-Fab-hMN-14 (200mg) 与 h679-Fab-AD2 (60mg) 以 1.4:1 的摩尔比混合。总蛋白质浓度为在含有 1mM EDTA 的 PBS 中的 1.5mg/ml。后续步骤涉及 TCEP 还原、HIC 色谱、DMSO 氧化和 IMP 291 亲和色谱。在加入 TCEP 之前, SE-HPLC 没有显示出 a<sub>2</sub>b 形成的任何证据。5mM TCEP 的加入迅速导致 a<sub>2</sub>b 复合物的形成, 与二元结构所预期的 157kDa 蛋白质一致。通过 IMP 291 亲和色谱 (未示出) 将 TF2 纯化至接近均质性。IMP 291 是含有 679Fab 结合到其上的 HSG 半抗原的合成肽 (Rossi

等, 2005, Clin Cancer Res 11:7122s-29s)。IMP 291 未结合级分的 SE-HPLC 分析表明  $a_4$ 、 $a_2$  和游离  $\kappa$  链已从产物 (未示出) 中除去。

[0454] 非还原 SDS-PAGE 分析表明大部分 TF2 作为大的共价结构存在, 其相对迁移率与 IgG (未示出) 接近。另外的条带表明在所述实验条件 (未示出) 下二硫化物的形成不完全。还原 SDS-PAGE 表明在非还原凝胶中明显的任何另外的条带都是产物相关的 (未示出), 因为仅代表 TF2 的组成多肽的条带是明显的 (未示出)。然而, 四种多肽中的每一种的相对迁移率太靠近以至于不能分离。MALDI-TOF 质谱 (未示出) 揭示 156, 434Da 的单峰, 其在 TF2 计算质量 (157, 319Da) 的 99.5% 之内。

[0455] 通过 **BIACORE®** 分析测定 TF2 的功能性。将 TF2、C-DDD1-hMN-14+h679-AD1 (用作非共价  $a_2b$  复合物的对照样品) 或 C-DDD2-hMN-14+h679-AD2 (用作未还原的  $a_2$  和 b 组分的对照样品) 稀释至  $1 \mu\text{g/ml}$  (总蛋白质), 并使其通过用 HSG 固定化的传感器芯片。对 TF2 的响应大约为这两个对照样品的两倍, 表明对照样品中仅 h679-Fab-AD 组分结合到并保留在传感器芯片上。随后注入的 WI2IgG、针对 hMN-14 的抗独特型抗体证明仅 TF2 具有与 h679-Fab-AD 紧密缔合的 DDD-Fab-hMN-14 组分, 如另外的信号响应所指示的。由 WI2 与固定在传感器芯片上的 TF2 的结合产生的响应单位的额外增加对应于两个全功能性结合位点, 每个均由 C-DDD2-Fab-hMN-14 的一个亚基贡献。这由 TF2 结合 WI2 的两个 Fab 片段 (未示出) 的能力证实。

[0456] 实施例 18. 用于预靶向的 TF10 双特异性抗体的生成

[0457] 采用类似的方案产生三聚 TF10DNL 构建体, 其包含两个拷贝的 C-DDD2-Fab-hPAM4 和一个拷贝的 C-AD2-Fab-679。TF10 中的癌症靶向抗体组分来源于 hPAM4, 一种已作为放射性标记 MAb 被详细研究的人源化抗胰腺癌粘蛋白 MAb (例如, Gold 等, Clin. Cancer Res. 13:7380-7387, 2007)。半抗原结合的组分来源于 h679, 一种人源化抗 - 组胺 - 琥珀酰 - 甘氨酸 (HSG) MAb。采用如上所述的所公开的用于生成 (抗 CEA) $_2$ x 抗 HSG bsAb TF2 的方法来生成 TF10 双特异性 ([hPAM4] $_2$ xh679) 抗体。TF10 构建体带有两个人源化 PAM4Fab 和一个人源化 679Fab。

[0458] 两种融合蛋白 (hPAM4-DDD 和 h679-AD2) 独立地表达于稳定转染的骨髓瘤细胞中。合并组织培养上清液, 导致 2 倍摩尔过量的 hPAM4-DDD。将该反应混合物在使用 1mM 还原型谷胱甘肽的温和还原条件下于室温孵育 24 小时。还原后, 通过使用 2mM 氧化型谷胱甘肽的温和氧化来完成 DNL 反应。通过使用以高特异性结合到 h679Fab 上的 IMP 291- 亲和凝胶树脂的亲色谱来分离 TF10。

[0459] 已针对正进入临床试验的 hPAM4 IgG 和抗 -CEA x 抗 -HSG bsMAb 检查了全面的组织组织学和血液细胞结合板 (panel)。在 1/3 的样本中, hPAM4 结合被限制成以非常弱的结合力结合到膀胱和胃上 (没有发现体内结合), 对正常组织没有结合归因于抗 -CEA x 抗 -HSG bsMAb。此外, 针对带有 H1 和 H2 组胺受体的细胞系的体外研究表明, IMP 288 二 -HSG 肽没有拮抗或激动活性, 并且在 2 个不同物种中进行的动物研究表明, 与所述组胺组分相关的肽在比成像所用剂量高 20,000 倍的剂量下没有药理活性。因此, HSG- 组胺衍生物不具有药理活性。

[0460] 实施例 19. 采用预靶向技术使用 TF10 双特异性抗体和  $^{111}\text{In}$ - 标记肽的成像研究

[0461] 下面的研究证明采用预靶向技术使用并入了 hPAM4 的双特异性抗体和标记肽

进行体内成像的可行性。如前述实施例中所述制备包含两个拷贝的 C-DDD2-Fab-hPAM4 和一个拷贝的 C-AD2-Fab-679 的 TF10 双特异性抗体。采用预靶向技术使用 TF10 和  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 肽,对荷有 0.2 至 0.3g 人胰腺癌异种移植物的裸小鼠进行成像。图 8 所示结果证明,采用 bsMAb 预靶向方法使用  $^{111}\text{In}$ - 标记的二 -HSG 肽 IMP-288 在动物模型中检测到的肿瘤轮廓有多清晰。图 8 顶部的六只动物接受 2 种不同剂量的 TF10 (与给定肽摩尔数的摩尔比为 10:1 和 20:1),并在第二天给予它们  $^{111}\text{In}$ - 标记的二 HSG 肽 (IMP 288)。图 8 底部的另 3 只动物仅接受  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 (无预靶向)。图像是在注射标记肽后 3h 获取的,该图像显示出预靶向动物中 0.2 至 0.3g 肿瘤的清晰定位,给予单独  $^{111}\text{In}$ - 肽的动物中没有肿瘤定位。肿瘤摄取平均为 20-25%ID/g,其中肿瘤 / 血液比值超过 2000:1,肿瘤 / 肝脏比值为 170:1,且肿瘤 / 肾脏比值为 18/1。

[0462] 实施例 20. 用于预靶向和  $^{18}\text{F}$  标记的靶向肽的生成

[0463] 在多种实施方案中, $^{18}\text{F}$  标记的蛋白质或肽采用新技术制备并用于诊断和 / 或成像研究,例如 PET 成像。用于  $^{18}\text{F}$  标记的新技术涉及  $^{18}\text{F}$ - 金属复合物,优选  $^{18}\text{F}$ - 铝复合物的制备,所述复合物整合到整合部分例如 DOTA、NOTA 或 NETA 或者其衍生物上。可以采用本领域熟知的缀合技术,使整合部分连接至蛋白质、肽或任何其它分子。在某些优选的实施方案中,首先在溶液中形成  $^{18}\text{F}$ -Al 复合物,然后使其连接至已经缀合到蛋白质或肽上的整合部分。然而,在替代实施方案中,可以首先使铝连接至整合部分,然后加入  $^{18}\text{F}$ 。

[0464] 肽合成

[0465] 采用 Fmoc 策略通过固相肽合成法合成肽。通过使用允许差异化脱保护的 Fmoc/Aloc 保护基将基团添加至二氨基氨基酸的侧链。Aloc 基团按照 Dangles 等 (J. Org. Chem. 1987, 52:4984-4993) 的方法除去,除了以与所用乙酸的 1:1 比例加入哌啶之外。按照 McBride 等 (美国专利申请公布第 2005/0002945 号,其实施例部分以引用方式并入) 中描述的方法制备不对称的四叔丁基 DTPA。

[0466] 三叔丁基 DOTA、不对称的四叔丁基 DTPA、ITC- 苄基 DTPA、p-SCN-Bn-NOTA 和 TACN 得自 **MACROCYCLICS®** (Dallas, TX)。DiBocTACN、NODA-GA(tBu)<sub>3</sub> 和 NO2AtBu 购自 Chematech (Dijon, France)。Aloc/Fmoc 赖氨酸和 Dap (二氨基丙酸衍生物 (也称 Dpr)) 得自 **CREOSALUS®** (Louisville, KY) 或 **BACHEM®** (Torrance, CA)。Sieber 酰胺树脂得自 **NOVABIOCHEM®** (San Diego, CA)。其余 Fmoc 氨基酸得自 **CREOSALUS®**、**BACHEM®**、**PEPTECH®** (Burlington, MA)、**EMD BIOSCIENCES®** (San Diego, CA)、**CHEM IMPEX®** (Wood Dale, IL) 或 **NOVABIOCHEM®**。氯化铝六水合物购自 **SIGMA-ALDRICH®** (Milwaukee, WI)。其余溶剂和试剂购自 **FISHER SCIENTIFIC®** (Pittsburgh, PA) 或 **SIGMA-ALDRICH®** (Milwaukee, WI)。 $^{18}\text{F}$  由 IBA **MOLECULAR®** (Somerset, NJ) 供应。

[0467] IMP 272 的  $^{18}\text{F}$ - 标记

[0468] 制备并用  $^{18}\text{F}$  标记的第一种肽是 IMP 272:

[0469] DTPA-Gln-Ala-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH<sub>2</sub>MH<sup>+</sup>1512

[0470] 如 (美国专利第 7, 534, 431 号,其实施例部分以引用方式并入本文) 所述合成 IMP 272。

[0471] 乙酸盐缓冲溶液 - 将 1.509g 乙酸稀释在 ~160mL 水中,并通过添加 1M NaOH 调节

pH, 然后稀释至 250mL 从而制备 0.1M pH 4.03 溶液。

[0472] 乙酸铝缓冲溶液 - 通过将 0.1028g  $\text{AlCl}_3$  六水合物溶解在 42.6mL DI 水中来制备铝溶液。将 4mL 铝溶液的等分试样与 16mL 0.1M pH4NaOAc 溶液混合从而提供 2mM Al 储液。

[0473] IMP 272 乙酸盐缓冲溶液 - 将 0.0011g 肽、 $7.28 \times 10^{-7}$ mol IMP 272 溶解在 364  $\mu\text{L}$  0.1M pH 4 乙酸盐缓冲溶液中从而获得 2mM 肽储液。

[0474] IMP 272 的 F-18 标记 - 将 3  $\mu\text{L}$  铝储液的等分试样放入 REACTI-VIAL™ 中并使其与 50  $\mu\text{L}$   $^{18}\text{F}$  (按原样) 和 3  $\mu\text{L}$  IMP 272 溶液混合。将溶液在 110°C 的加热块中加热 15min, 并通过反相 HPLC 分析。HPLC 分析 (未示出) 显示 93%  $^{18}\text{F}$  是游离的, 7%  $^{18}\text{F}$  结合到肽上。向反应液中加入另外的 10  $\mu\text{L}$  IMP 272 溶液, 再次加热并通过反相 HPLC (未示出) 分析。HPLC 跟踪显示, 8%  $^{18}\text{F}$  位于空隙体积中, 92% 的活性连接至肽。将肽溶液的剩余部分与 150  $\mu\text{L}$  PBS 在室温下孵育 ~1 小时, 然后通过反相 HPLC 检查。HPLC (未示出) 显示, 58%  $^{18}\text{F}$  未结合, 而 42%  $^{18}\text{F}$  仍连接至肽。该数据表明  $^{18}\text{F}$ -Al-DTPA 复合物在与磷酸盐混合时可能是不稳定的。

[0475] 通过将标记肽溶液加到 1cc (30mg) WATERS® HLB 柱 (料号 186001879) 上并用 300  $\mu\text{L}$  水洗涤从而除去未结合的 F-18, 如此纯化标记肽。通过用 2x 100  $\mu\text{L}$  1:1 EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  洗涤柱来洗脱肽。将纯化的肽在水中在 25°C 孵育, 并通过反相 HPLC (未示出) 分析。HPLC 分析显示  $^{18}\text{F}$ -标记的 IMP 272 在水中不稳定。在水中孵育 40min 后, 约 17% 的  $^{18}\text{F}$  从肽中释放, 而 83% 保留 (未示出)。

[0476] 该肽 (16  $\mu\text{L}$  2mM IMP 272, 48  $\mu\text{g}$ ) 用  $^{18}\text{F}$  标记, 并通过体积排阻 HPLC 分析它对抗体的结合。体积排阻 HPLC 显示, 该肽结合 hMN-14x 679, 但不结合无关的双特异性抗体 hMN-14x734 (未示出)。

[0477] 利用其它金属的 IMP 272  $^{18}\text{F}$  标记

[0478] 将 ~3  $\mu\text{L}$  金属储液的等份试样 ( $6 \times 10^{-9}$ mol) 放入聚丙烯锥形瓶中, 并与 75  $\mu\text{L}$   $^{18}\text{F}$  (按原样) 混合, 在室温下孵育 ~2min, 然后与 20  $\mu\text{L}$  2mM ( $4 \times 10^{-8}$ mol) IMP 272 溶液在 0.1M pH 4NaOAc 缓冲液中混合。将该溶液在 100°C 的加热块中加热 15min, 并通过反相 HPLC 分析。IMP 272 用铟 (24%)、镓 (36%)、锆 (15%)、镧 (37%) 和钇 (2%) (未示出) 标记。这些结果证明,  $^{18}\text{F}$  金属标记技术不限于铝配体, 而还可以利用其它金属。对于不同的金属配体, 可以利用不同的螯合部分来优化 F-18- 技术缀合物的结合。

[0479] 血清稳定的  $^{18}\text{F}$ - 标记肽 IMP 449 的生成和使用

[0480] 在 Sieber 酰胺树脂上制备肽 IMP448D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)- $\text{NH}_2$ MH<sup>+</sup>1009, 通过将下列氨基酸以所示的顺序加入到该树脂上进行: 添加 Aloc-D-Lys (Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH, 裂解 Aloc, 添加 Fmoc-D-Tyr (But)-OH、Aloc-D-Lys (Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH, 裂解 Aloc, 添加 Fmoc-D-Ala-OH, 最后裂解 Fmoc 从而制备所需的肽。然后从树脂上裂解肽并通过 HPLC 纯化从而产生 IMP 448, 然后使 IMP 448 偶联至 ITC- 苄基 NOTA。将 0.0757g ( $7.5 \times 10^{-5}$ mol) 肽 IMP 448 与 0.0509g ( $9.09 \times 10^{-5}$ mol) ITC 苄基 NOTA 混合, 并溶解在 1mL 水中。然后向搅拌的肽 /NOTA 溶液中缓慢地加入无水碳酸钾 (0.2171g)。在加入所有碳酸盐之后反应液的 pH 为 10.6。将该反应物在室温下搅拌过夜。14 小时后, 小心地用 1M HCl 淬灭反应, 并通过 HPLC 纯化从而获得 48mg IMP 449。

[0481] IMP449 的  $^{18}\text{F}$  标记

[0482] 将肽 IMP 449 (0.002g,  $1.37 \times 10^{-6}$ mol) 溶解在 686  $\mu\text{L}$  (2mM 肽溶液) 0.1M NaOAc pH

4.02 中。将 3 微升的 2mM Al 在 pH 4 乙酸盐缓冲液中的溶液与 15  $\mu$  L, 1.3mCi  $^{18}\text{F}$  混合。然后将该溶液与 20  $\mu$  L 2mMIMP 449 溶液混合,并在 105 $^{\circ}\text{C}$  下加热 15min。反相 HPLC 分析显示, 35%( $t_{\text{r}} \sim 10\text{min}$ ) 的活性连接至肽,65% 的活性从柱中的空隙体积中洗脱 (3.1min, 未示出), 表明大部分活性与该肽无关。将粗制的标记混合物 (5  $\mu$  L) 与汇集的人血清混合,并在 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育。15min 后取出等分试样,并通过 HPLC 分析。HPLC 显示 9.8% 的活性仍连接至肽 (从 35% 下降)。1 小时后取出另一等分试样,并通过 HPLC 分析。HPLC 显示 7.6% 的活性仍连接至肽 (从 35% 下降)。这基本上与 15min 的跟踪结果相同 (数据未示出)。

[0483] 高剂量  $^{18}\text{F}$  标记

[0484] 使用纯化 IMP 449 进行的进一步研究证明, $^{18}\text{F}$  标记的肽在 37 $^{\circ}\text{C}$  人血清中高度稳定 (91%, 未示出) 至少 1 小时,并且在 37 $^{\circ}\text{C}$  人血清中部分稳定 (76%, 未示出) 至少 4 小时。进行另外的研究,其中在作为稳定剂的抗坏血酸的存在下制备 IMP 449。在这些研究 (未示出) 中,金属  $^{-18}\text{F}$ - 肽复合物在 37 $^{\circ}\text{C}$  血清中 4 小时后没有显示可检测到的分解。在注射  $^{18}\text{F}$  标记的肽后 30min,发现小鼠尿中含有结合到肽上的  $^{18}\text{F}$  (未示出)。这些结果证明本文公开的  $^{18}\text{F}$  标记的肽在用于  $^{18}\text{F}$  成像研究的近似体内条件下表现出足够的稳定性。

[0485] 对于在不存在抗坏血酸情况下的研究,将  $\sim 400 \mu$  L 水中的  $\sim 21\text{mCi } ^{18}\text{F}$  与 9  $\mu$  L 0.1M pH 4NaOAc 中的 2mM  $\text{AlCl}_3$  混合。加入 60  $\mu$  L (0.01M,  $6 \times 10^{-7}\text{mol}$ , 在 0.5NaOH pH 4.13 中) 肽 IMP 449,并将该溶液加热至 110 $^{\circ}\text{C}$  持续 15min。然后通过如下方式纯化粗制的标记肽: 将反应溶液放入 1cc **WATERS®** HLB 柱桶中并用水洗脱从而除去未结合的  $^{18}\text{F}$ ,接着用 1:1EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  洗脱  $^{18}\text{F}$  标记的肽。使粗制的反应溶液通过柱进入废小瓶中,并用 3x1mL 级分的水 (18.97mCi) 洗涤柱。然后将 HLB 柱放在新小瓶上,并用 2x200  $\mu$  L 1:1EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  洗脱从而收集标记肽 (1.83mCi)。在所有洗脱完成之后,该柱保留了 0.1mCi 的活性。将纯化的  $^{18}\text{F}$ - 标记肽的等分试样 (20  $\mu$  L) 与 200  $\mu$  L 汇集的人血清混合,并在 37 $^{\circ}\text{C}$  下加热。通过反相 HPLC 分析等分试样。结果显示  $^{18}\text{F}$ - 标记的纯化 IMP 449 在 37 $^{\circ}\text{C}$  人血清中孵育 0 小时、1 小时 (91% 标记肽)、2 小时 (77% 标记肽) 和 4 小时 (76% 标记肽) 时的相对稳定性 (未示出)。还观察到, $^{18}\text{F}$ - 标记的 IMP 449 在 TFA 溶液中是稳定的,TFA 溶液在反相 HPLC 色谱中偶尔使用。对于本文所述的示例性  $^{18}\text{F}$  标记分子,观察到它在 TFA 中的稳定性和在人血清中的稳定性之间似乎存在一般相关性 (general correlation)。这些结果证明,根据本文所公开的方法生成的  $^{18}\text{F}$  标记肽在人血清中显示足够的稳定性,使其能成功地用于体内标记和成像研究,例如利用 PET 扫描来检测标记细胞或组织的研究。最后,因为 IMP 449 肽含有对辐射分解敏感的硫脲键合,所以通过 RP-HPLC 观察到数种产物。然而,当向反应混合物中加入抗坏血酸时,产生的副产物显著减少。

[0486] 实施例 21. 使用预靶向性 TF10 DNL 构建体和  $^{18}\text{F}$  标记肽的体内研究

[0487]  $^{18}\text{F}$  标记 IMP 449 制备如下。将  $\sim 0.5\text{mL}$  的 54.7mCi  $^{18}\text{F}$  与 3  $\mu$  L 0.1M pH 4NaOAc 缓冲液中的 2mM Al 的混合。3min 后,加入 10  $\mu$  L 0.5M pH 4NaOAc 缓冲液中的 0.05M IMP 449,并将该反应物在 96 $^{\circ}\text{C}$  的加热块中加热 15min。用注射器除去反应内容物。然后通过 HPLC 在  $\text{C}_{18}$  柱上纯化粗制的标记肽。流速为 3mL/min。缓冲液 A 是在水中的 0.1%TFA,缓冲液 B 是在含有 0.1%TFA 的水中的 90% 乙腈。梯度是经 15min 从 100%A 至 75/25A:B。首先洗脱的标记肽与未标记肽之间的保留时间 ( $t_{\text{r}}$ ) 差异为约 1min。将 HPLC 洗脱物收集为 0.5min (mL) 级分。标记肽的  $t_{\text{r}}$  为 6 至 9min,这取决于所用的柱。通过将目标级分用水稀释两倍并将溶

液放入 1cc **WATERS®** HLB 柱桶中,如此进一步处理 HPLC 纯化的肽样品。用 3x1mL 水洗脱柱筒从而除去乙腈和 TFA,接着用 400  $\mu$  L 1:1EtOH/H<sub>2</sub>O 洗脱 <sup>18</sup>F 标记肽。纯化的 [A1<sup>18</sup>F] IMP 449 作为单峰在分析 HPLC C<sub>18</sub> 柱上洗脱(未示出)。

[0488] 将荷有四个缓慢生长的 sc CaPan1 异种移植物的 **TACONIC®** 裸小鼠用于体内研究。给 3 只小鼠注射 TF10 (162  $\mu$  g),接着在 18h 后注射 [A1<sup>18</sup>F] IMP 449。TF10 是用于肿瘤成像研究的人源化双特异性抗体,其对 PAM-4 定义的肿瘤抗原二价结合,而对 HSG 单价结合(参见,例如,Gold 等,2007, J. Clin. Oncol. 25(18S):4564)。给 1 只小鼠注射单独的肽。肽注射后 1 小时,剖检所有小鼠。立即进行组织计数。对平均分布进行对比,结果显示在肿瘤靶向性双特异性抗体的存在下定位于肿瘤的 <sup>18</sup>F 标记肽的水平明显高于任何正常组织(数据未示出)。

[0489] 给予单独 [A1<sup>18</sup>F] IMP 449 的动物或处于预靶向环境下的动物的组织摄取类似(数据未示出)。与给予单独肽的动物相比较,在 1 小时时,预靶向动物中人胰腺癌异种移植植物 CaPan1 的摄取增加 5 倍 (4.6 $\pm$ 0.9%ID/g 与 0.89%ID/g)。此时获得优异的肿瘤/非肿瘤比值(例如,肿瘤/血液和肝脏的比值分别为 23.4 $\pm$ 2.0 和 23.5 $\pm$ 2.8)。

[0490] 结果证明,<sup>18</sup>F 标记肽与含有 PAM4 的抗体构建体例如 TF10 DNL 构建体的结合使用为用于执行体内成像例如 PET 成像分析的 <sup>18</sup>F 标记提供了合适的靶向性。

[0491] 实施例 22. 使用 TF10 的进一步成像研究

[0492] 概述

[0493] 临床前和临床研究已经证明放射性标记 mAb-PAM4 在胰腺癌的核成像和放射免疫治疗中的应用。我们已在本文检查 TF10 构建体在预靶向放射性标记肽从而改进成像和治疗的能力。在荷有 CaPan1 人胰腺癌异种移植物的裸小鼠中,进行放射性标记 TF10 和 / 或 TF10 预靶向的半抗原-肽 (IMP-288) 的生物分布研究和核成像。<sup>125</sup>I-TF10 从血液中迅速清除,到 16 小时时其水平降低至 <1% 注射剂量 / 克 (ID/g)。在这个时间点,肿瘤摄取为 3.47 $\pm$ 0.66%ID/g,并且在任何正常组织中都没有累积。为了证明预靶向途径的实用性,在施用 TF10 后 16 小时,施用 <sup>111</sup>In-IMP-288。在放射性标记肽施用后第 3 小时,成像显示肿瘤内的摄取非常高,没有显示出任何正常组织中增积物的证据。在仅给予 <sup>111</sup>In-肽的动物中观察到无靶向性。在 16 小时时,TF10-预靶向的 <sup>111</sup>In-IMP-288 的肿瘤摄取为 24.3 $\pm$ 1.7%ID/g,而对于单独的 <sup>111</sup>In-IMP-288 仅为 0.12 $\pm$ 0.002%ID/g。对于肿瘤/血液比值,预靶向组 (3 小时时为 ~ 1,000:1) 显著性地高于 <sup>111</sup>In-PAM4-IgG (24 小时时为 ~ 5:1 ;P<0.0003)。辐射剂量估算表明,TF10/<sup>90</sup>Y-肽预靶向将比 <sup>90</sup>Y-PAM4-IgG 提供更大的抗肿瘤作用。因而,该结果支持:与直接放射性标记 PAM4-IgG 相比,TF10 预靶向可以提供改进的供胰腺癌早期检测、诊断和治疗用的成像 (Gold 等, Cancer Res 2008, 68(12):4819-26)。

[0494] 我们已鉴定出存在于由 >85% 的侵袭性胰腺腺癌表达的粘蛋白上的独特的生物标记,所述侵袭性胰腺腺癌包括早期 I 疾病和前驱病变、胰腺上皮内瘤变和导管内乳头状粘液性瘤变 (Gold 等, Clin Cancer Res 2007, 13:7380-87)。如通过 mAb-PAM4 检测的特定表位 (Gold 等, Int J Cancer 1994, 57:204-10) 在正常和炎性胰腺组织以及大多数其它恶性组织中是不存在的。因而,所述表位的检测为胰腺瘤变的存在的诊断提供了高可能性。使用 <sup>131</sup>I- 和 <sup>99m</sup>Tc- 标记鼠 PAM4 IgG 或 Fab' 进行的早期临床研究分别表明,对 10 位患有侵袭性胰腺腺癌患者中的 8 位特异性靶向 (Mariani 等, Cancer Res 1995, 55:5911s-15s; Gold 等,

Crit Rev Oncol Hematol 2001, 39:147-54)。两位阴性患者当中,一位患有不表达PAM4-表位的低分化的胰腺癌,而另一位患者后来发现患有胰腺炎,而不是恶性病变。

[0495] 因此, PAM4 对胰腺癌的高特异性对早期疾病的检测和诊断有用。除了改进检测之外,还发现  $^{90}\text{Y}$ -PAM4 IgG 对治疗裸小鼠中大的人胰腺癌异种移植物有效 (Cardillo 等, Clin Cancer Res 2001, 7:3186-92), 并且观察到  $^{90}\text{Y}$ -PAM4 IgG 在与吉西他滨组合时进一步提高治疗反应 (Gold 等, Clin Cancer Res 2004, 10:3552-61; Gold 等, Int J Cancer 2004, 109:618-26)。最近完成针对吉西他滨治疗失败的患者的 I 期治疗试验, 发现  $^{90}\text{Y}$ -人源化 PAM4 IgG 的最大耐受剂量为  $20\text{mCi}/\text{m}^2$  (Gulec 等, Proc Amer Soc Clin Onc, 43rd Annual Meeting, J Clin Oncol 2007, 25(18S):636s)。虽然在 8 周或 8 周后所有患者都表现出疾病进展, 但在数个病例中观察到初始的肿瘤收缩。临床研究正在进行中, 以评价  $^{90}\text{Y}$ -hPAM4 IgG 与放射增敏剂量的吉西他滨组合的分次给药方案。

[0496] 我们在本文报道基于 PAM4 对胰腺癌的靶向特异性的新型重组人源化双特异性单克隆抗体 (mAb) TF10 的开发。这种构建体也结合到独特的合成半抗原组胺-琥珀酰-甘氨酸 (HSG) 上, 组胺-琥珀酰-甘氨酸已并入在可以用适合于单光子发射计算机断层成像 (SPECT) 和正电子发射断层扫描 (PET) 成像以及适合于治疗目的的各式各样的放射性核素进行放射标记的许多小肽中 (Karacay 等, Clin Cancer Res 2005, 11:7879-85; Sharkey 等, Leukemia 2005, 19:1064-9; Rossi 等, Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103:6841-6; McBride 等, J Nucl Med 2006, 47:1678-88)。这些研究说明在成像或治疗应用中这种新构建体靶向胰腺癌的潜力。

[0497] 方法和材料

[0498] 如上所述制备 TF2 和 TF10 双特异性 DNL 构建体和 IMP 288 靶向肽。碘化钠 ( $^{125}\text{I}$ ) 和氯化铟 ( $^{111}\text{In}$ ) 得自 **PERKIN-ELMER®**。采用 Iodogen 法按常规用  $^{125}\text{I}$  标记 TF10, 并通过利用体积排阻螺旋柱纯化。如上所述用  $^{111}\text{InCl}$  对 DOTA-肽和 DOTA-PAM4-IgG 进行放射性标记 (Rossi 等, Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103:68416; McBride 等, J Nucl Med 2006, 47:1678-88)。通过体积排阻高效液相色谱来检查放射性标记产物的纯度, 其中游离未结合同位素的量通过瞬时 TLC 测定。

[0499] 对于 TF10 分布研究, 给荷有 s. c. CaPan1 人胰腺癌异种移植物的 ~20g 的雌性无胸腺裸小鼠 (**TACONIC®** Farms) 注射  $^{125}\text{I}$ -TF10 ( $10\ \mu\text{Ci}$ ;  $40\ \mu\text{g}$ ,  $2.50 \times 10^{-10}\text{mol}$ )。在各个时间点剖检小鼠组 ( $n=5$ ), 取出肿瘤和非肿瘤组织并在  $\gamma$  计数器中进行计数从而测定注射剂量百分比 / 克组织 (%ID/g), 利用这些值计算血清除率和肿瘤 / 非肿瘤比值。

[0500] 对于预靶向生物分布研究, 使用摩尔比为 10:1 的双特异性 mAb / 放射性标记肽。例如, 给一组荷有 s. c. CaPan1 人胰腺癌异种移植物的无胸腺裸小鼠施用 TF10 ( $80\ \mu\text{g}$ ,  $5.07 \times 10^{-10}\text{mol}$ ), 而未对第二组治疗。在 TF10 注射后 16 小时, 施用  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 半抗原-肽 ( $30\ \mu\text{Ci}$ ,  $5.07 \times 10^{-11}\text{mol}$ )。在数个时间点剖检小鼠, 取出肿瘤和非肿瘤组织并在  $\gamma$  计数器中进行计数从而测定 %ID/g。从这些数据计算肿瘤 / 非肿瘤比值。为了比较生物分布、核成像和潜在的治疗活性, 在单独的研究中, 给予小鼠组  $^{111}\text{In}$ -DOTA-PAM4-IgG ( $20\ \mu\text{Ci}$ ,  $50\ \mu\text{g}$ ,  $3.13 \times 10^{-10}\text{mol}$ )。假设在零时间点无活性, 从时间-活性曲线计算放射剂量估算值。利用学生 t 试验评估显著性差异。

[0501] 为了进行核免疫闪烁成像, 放射性标记肽注射后 3 小时或者放射性标记

hPAM4-IgG 注射后 24 小时,用配备有  $^{111}\text{In}$  用中能准直器的双头 Solus  $\gamma$  照相机 (ADAC Laboratories) 对荷瘤小鼠进行成像。总共对小鼠成像 100,000cpm 或 10min,不论哪个先进行。

[0502] 结果

[0503] 双特异性 mAb TF10 的体外表征。 TF10 与靶粘蛋白抗原的结合通过 ELISA 分析 (图 9)。结果表明二价 TF10、PAM4-IgG 和 PAM4-F(ab')<sub>2</sub> 的结合曲线几乎相同 (计算得半最大结合量分别为  $1.42 \pm 0.10 \text{ nmol/L}$ 、 $1.31 \pm 0.12 \text{ nmol/L}$  和  $1.83 \pm 0.16 \text{ nmol/L}$ ; 对于所有  $P > 0.05$ ), 而单价 bsPAM4 化学缀合物 (PAM4-Fab' x 抗 -DTPA-Fab') 具有显著较低的亲合力 (半最大结合量为  $30.61 \pm 2.05 \text{ nmol/L}$ ; 与 TF10 比较  $P = 0.0379$ ), 表明 TF10 以二价模式结合。结合到粘蛋白上的  $^{125}\text{I}$ -TF10 的免疫活性级分为 87%, 发现未结合 TF10 为 9%, 游离碘化物为 3% (未示出)。90% 的  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 结合到 TF10 上 (未示出)。在结合到 TF10 上的总  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 中, 当加入过量的粘蛋白 ( $200 \mu\text{g}$ ) 时, 92% 以较高分子量洗脱, 仅 3% 与非粘蛋白反应性 TF10 级分一起洗脱。另外 5% 的放射性标记肽在游离肽体积中洗脱。这些放射性标记肽在不存在 TF10 的情况下都没有结合到粘蛋白抗原上 (未示出)。

[0504] 荷有 CaPan1 肿瘤的裸小鼠中的  $^{125}\text{I}$ -TF10 生物分布。 TF10 表现出从血液中迅速清除, 开始在 1 小时时为  $21.03 \pm 1.93 \text{ ID/g}$ , 在 16 小时时降至仅  $0.13 \pm 0.02 \text{ ID/g}$ 。计算得生物学半衰期为 2.19 小时 [95% 置信区间 (95%CI), 2.11 - 2.27 小时]。组织摄取揭示在 1 小时时肝脏、脾脏和肾脏中的活性增强, 到 16 小时时活性也同样迅速地清除 [对于肝脏、脾脏和肾脏,  $T_{1/2}$  分别为 2.09 小时 (95%CI, 2.08 - 2.10)、2.84 小时 (95%CI, 2.49 - 3.29) 和 2.44 小时 (95%CI, 2.28-2.63)]。胃中的活性最有可能反映出放射性碘的增积和排泄, 表明放射性碘化 TF10 活跃地异化, 推测在肝脏和脾脏中异化, 从而解释它从血液中迅速清除的原因。然而, 到 16 小时时, 胃中放射性碘的浓度低于  $1 \text{ ID/g}$ 。给予  $^{125}\text{I}$ -TF10 并在 16 小时剖检的 5 只非荷瘤裸小鼠组表现出类似的组织分布, 表明肿瘤没有影响正常组织的双特异性 mAb 分布和清除 (数据未示出)。当然, 在检查的初始时间点之前可能会有差异出现。TF10 的肿瘤摄取在注射后 6 小时达到峰值 ( $7.16 \pm 1.10 \text{ ID/g}$ ), 在 16 小时时已降至半最大结合量 ( $3.47 \pm 0.66 \text{ ID/g}$ )。肿瘤摄取在接下来的 32 小时内再次降低近 2 倍, 但然后在接下来的 24 小时内是稳定的。

[0505] TF10 预靶向的、 $^{111}\text{In}$  标记的肽的生物分布。 虽然 TF10 的肿瘤摄取在 6 小时达到最大, 但先前的经验提示, 放射性标记肽需要在 TF10 的血液水平已清除至  $< 1 \text{ ID/g}$  的时间点 (即, 16 小时) 给予。血液中 TF10 的水平较高将会导致不可接受的放射性标记肽在血液中的高结合 (即, 低肿瘤 / 血液比值), 而在较晚时间施用肽将意味着 TF10 在肿瘤中的浓度降低, 结果导致肿瘤中放射性标记肽的浓度降低。因而, 利用 16 小时间隔进行初步预靶向研究。将  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 量保持恒定 ( $30 \mu\text{Ci}$ ,  $5.07 \times 10^{-11} \text{ mol}$ ), 给予增加量的 TF10, 以便表示为摩尔比的 TF10 和 IMP-288 的施用剂量在 5:1 至 20:1 内变化 (表 11)。

[0506] 表 11. 单独的  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 (无 TF10) 或用不同量的 TF10 预靶向的  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 的生物分布

[0507]

	3 小时时的%ID/g(平均值±SD)			
	5:1	10:1	20:1	无 TF10
肿瘤	19.0 ± 3.49	24.3 ± 1.71	28.6 ± 0.73	0.12 ± 0.00
肝脏	0.09 ± 0.01	0.21 ± 0.12	0.17 ± 0.01	0.07 ± 0.00
脾脏	0.12 ± 0.04	0.16 ± 0.07	0.26 ± 0.10	0.04 ± 0.01
肾脏	1.59 ± 0.11	1.72 ± 0.24	1.53 ± 0.14	1.71 ± 0.22
肺	0.19 ± 0.06	0.26 ± 0.00	0.29 ± 0.04	0.03 ± 0.00
血液	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
胃	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01
小肠	0.12 ± 0.08	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02
大肠	0.23 ± 0.10	0.39 ± 0.08	0.25 ± 0.08	0.33 ± 0.02
胰腺	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
肿瘤重量 (g)	0.12 ± 0.03	0.32 ± 0.09	0.27 ± 0.01	0.35 ± 0.03

[0508] 在 3 小时时, 血液中  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 的量几乎检测不到 (0.01%)。当施用的双特异性 mAb 量增加 4 倍时, 肿瘤摄取从  $19.0 \pm 3.49\% \text{ID/g}$  增加至  $28.55 \pm 0.73\% \text{ID/g}$  (在不同组之间, 对于每个 TF10/ 肽比值的比较均观察到统计学显著性差异;  $P < 0.03$  或更好), 而正常组织的摄取没有任何明显增加。给予 TF10 的动物中的肿瘤摄取比给予单独  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 时高 >100 倍。对预先施用或未预先施用 TF10 的动物的正常组织中  $^{111}\text{In}$  活性进行比较显示绝对值相似, 该值在大多数情况下没有显著性差异。这表明到 16 小时时, 双特异性 mAb 已从所有正常组织中完全清除, 从而避免这些组织中明显的肽摄取。肿瘤/血液比值 >2,000:1, 肿瘤与其它组织的比值超过 100:1。甚至肿瘤/肾脏比值超过 10:1。在 TF10/肽比值为 20:1 时, 肿瘤摄取的放射性同位素最高, 对非肿瘤组织的靶向最低; 然而, 就信号强度和对比率而言, 所述 TF10/肽比值中的任一个都可以用来实现对肿瘤的优异靶向。选择 10:1 比值用于进一步研究, 因为在 10:1 ( $24.3 \pm 1.71\% \text{ID/g}$ ) 和 20:1 ( $28.6 \pm 0.73\% \text{ID/g}$ ) 比值之间, 放射性标记肽的肿瘤摄取的绝对差并不是明显差异的。

[0509] 给予双特异性 mAb/肽比值为 10:1 的 TF10- 预靶向的  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 的动物, 或给予单独  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 肽的动物的图像在图 10 中示出。这些肿瘤中的大多数肿瘤的直径  $\leq 0.5 \text{cm}$ , 重  $\sim 0.25 \text{g}$ 。该图像显示出 TF10- 预靶向的动物中肿瘤的高强度摄取 (图 10A)。增加 TF10- 预靶向的动物的图像本底强度从而使其与从给予单独  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 的动物获取的图像强度匹配 (图 10B)。然而, 当为 TF10- 预靶向的小鼠优化图像时, 信号强度和对比率太高以至于在动物身体内未观察到另外的活性。在给予单独  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 的动物中未

观察到肿瘤定位,甚至在增加图像强度时亦是如此(图 10C)。

[0510] 进行另外的实验以评估与 TF10- 预靶向的  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 肽的动力学相比较的靶向性  $^{111}\text{In}$ -hPAM4 全-IgG 的动力学。 $^{111}\text{In}$ - 肽的肿瘤摄取在所检查的初始时间点,即在 3 小时时最高 ( $15.99 \pm 4.11\% \text{ID/g}$ ),而放射性标记肽的血液浓度仅为  $0.02 \pm 0.01\% \text{ID/g}$ ,提供  $946.3 \pm 383.0$  的肿瘤 / 血液比值。随着时间的推移,放射性肽从肿瘤中清除,生物半衰期为 76.04 小时。在非肿瘤组织当中,肾脏的摄取最高,在 3 小时时平均为  $1.89 \pm 0.42\% \text{ID/g}$ ,随着时间的推移平稳地下降(生物半衰期为 33.6 小时)。肝脏摄取开始为  $0.15 \pm 0.06\% \text{ID/g}$ ,随着时间的推移基本上保持不变。与 TF10- 预靶向的  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 相比, $^{111}\text{In}$ -hPAM4-IgG 从血液中清除较慢,尽管它在前 24 小时内的大量清除,从 3 小时时的  $30.1\% \text{ID/g}$  减少至 24 小时的仅  $11.5 \pm 1.7\% \text{ID/g}$ 。脾脏的可变化的提高的摄取表明,该抗体可能通过靶向所分泌的已被脾脏捕获的粘蛋白而从血液中除去。肿瘤摄取在 48 小时时达到峰值,为  $80.4 \pm 6.1\% \text{ID/g}$ ,并在整个监测期内保持高水平。高肿瘤摄取与预期的 IgG 血液清除较快速的清除一起,使得 24 小时内的肿瘤 / 血液比值为  $5.2 \pm 1.0$ 。图 10C 示出  $^{111}\text{In}$ -PAM4-IgG 施用后 24 小时的动物图像,说明肿瘤可以在这个早期可视化,但腹部内仍存在相当强的活性。与  $^{111}\text{In}$ -hPAM4-IgG 相比,对于 TF10- 预靶向的  $^{111}\text{In}$ - 标记半抗原 - 肽的肿瘤 / 非肿瘤比值大多较高,除了肾脏,在这里肿瘤 / 肾脏比值在较晚的时间时在使用  $^{111}\text{In}$ -IMP-288 和  $^{111}\text{In}$ -hPAM4-IgG 的情况下类似。然而,对于 TF10- 预靶向的  $^{111}\text{In}$ -IMP-288,肿瘤 / 肾脏比值在 3 小时时足够高(例如,~ 7:1)从而容易辨别肿瘤和正常组织。

[0511] 图 11 阐明用于递送放射性核素 ( $^{90}\text{Y}$ ) 的直接和预靶向方法的潜在治疗能力。虽然当使用剂量为其各自最大耐受剂量(对于  $^{90}\text{Y}$ -hPAM4 为  $0.15\text{mCi}$ ,而对于 TF10- 预靶向的  $^{90}\text{Y}$ -IMP-288 为  $0.9\text{mCi}$ ) 的 PAM4-IgG 和预靶向 TF10 递送放射性同位素时,前者情况下肿瘤内放射性同位素的浓度 ( $\% \text{ID/g}$ ) 似乎比后者高,但它们对肿瘤的辐射剂量相似(对于  $^{90}\text{Y}$ -PAM4-IgG 和 TF10- 预靶向的  $^{90}\text{Y}$ -IMP-288 分别为  $10,080$  和  $9,229\text{cGy}$ )。预靶向方法的优势在于血液中异常低的活性 ( $9\text{cGy}$ ),比使用  $^{90}\text{Y}$ -hPAM4 IgG ( $1,623\text{cGy}$ ) 的情况低近 200 倍。同样重要的是注意到,对肝脏以及其它非肿瘤器官的辐射剂量在使用 TF10- 预靶向的  $^{90}\text{Y}$ -IMP-288 的情况下要低得多。唯一例外的是肾脏,在这里辐射剂量在这两种方案下在它们的各自最大剂量(对于  $^{90}\text{Y}$ -PAM4-IgG 和 TF10- $^{90}\text{Y}$ -IMP-288 分别为  $612$  和  $784\text{cGy}$ ) 情况下相似。该数据表明对于  $^{90}\text{Y}$ -PAM4-IgG,与大多数其它放射性标记全 IgGmAb 一样,剂量限制性毒性为血液学毒性;然而,对于 TF10 预靶向方案,剂量限制性毒性为肾脏毒性。

[0512] 讨论

[0513] 经常发现现行诊断方式例如提供解剖图像的超声、计算机断层成像 (CT) 和磁共振成像 (MRI) 技术,以及代谢环境 PET 成像提供了检测胰腺肿块的高敏感度。然而,这些数据在大多数情况下都基于对已经表现出临床症状的群体中  $>2\text{cm}$  的病变的检测。在胰腺癌的进展中,此时的预后非常不乐观。为了改善患者治疗效果,检测无症状患者中的小的早期胰腺赘生物 (neoplasm) 是必要的。

[0514] 利用 mAb 靶向途径成像,例如本文所述的利用 mAb-PAM4 成像可以提供对这些小的早期癌症的诊断。最重要的是 mAb 的特异性。我们已经提供相当多的数据,包括组织样本的免疫组织化学研究 (Gold 等, Clin Cancer Res 2007;13:7380-7;Gold 等, Int J Cancer 1994;57:204-10) 和患者血清的免疫测定 (Gold et al., J Clin

Oncol2006;24:252 - 8), 证明 mAb-PAM4 与生物标记有高反应性, 生物标记的存在为胰腺瘤变的诊断提供了高可能性。此外, 我们确定虽然 PAM4 与正常成体胰腺组织没有反应性, 也与活动性胰腺炎没有反应性, 但与胰腺内最早期的赘生性进展 (胰腺上皮内瘤变 1 和导管内乳头状粘液性瘤变) 有反应性, 并且生物标记在整个侵袭性胰腺腺癌进展过程中保持高水平表达 (Gold 等, Clin Cancer Res 2007;13:7380 - 7)。利用荷有人胰腺肿瘤异种移植物的无胸腺裸小鼠进行的临床前研究已证明, 放射性标记的鼠、嵌合和人源化形式的 PAM4 的特异靶向性。

[0515] 在当前的研究中, 我们已检查下一代、重组、基于双特异性 PAM4 的构建体, TF10, 其对于 PAM4 臂是二价, 而对于抗 HSG 半抗原臂是单价。这种称为停靠和锁定的预靶向系统构建体具有数个重要特征, 包括它的普遍适用性和易合成性。然而, 对于本发明的考虑, 与先前报道的化学构建体的主要差别为化合价, 其提供了增强的肿瘤抗原结合能力, 以及重要地, 它的药物动力学。TF10 从非肿瘤组织中清除比对所述化学缀合物观察到的清除快得多。所述双特异性构建体的血液水平达到低于 1%ID/g 所需的时间对于所述化学构建体为注射后 40 小时, 而对于 TF10 为注射后 16 小时。预靶向性试剂的较迅速的清除提供了肿瘤 / 血液比值的极大提高, 同时保持肿瘤部位的高信号强度 (%ID/g)。

[0516] 除了提供一种早期检测和诊断的方式之外, 该结果支持 TF10 预靶向性系统在癌症治疗中的应用。在对肿瘤和非肿瘤组织的有效辐射剂量方面的考虑偏爱所述预靶向方法胜于直接放射性标记 PAM4-IgG。剂量估算表明这两种递送系统具有不同的剂量限制毒性: 对于直接放射性标记 PAM4 的骨髓中毒性与对于 TF10 预靶向系统的肾脏毒性。这对于未来临床开发作为治疗剂的放射性标记 PAM4 有重要意义。

[0517] 吉西他滨, 胰腺癌首选的一线药物, 可对肿瘤细胞提供显著的放射增敏作用。在先前的研究中, 我们已证明吉西他滨和直接放射性标记 PAM4-IgG 的组合与任一单独臂相比都提供协同抗肿瘤作用 (Gold 等, Clin Cancer Res 2004, 10:3552 - 61; Gold 等, Int J Cancer 2004, 109:618 - 26)。这种组合的剂量限制因素为重叠的血液学毒性。然而, 因为 TF10 预靶向的剂量限制器官似乎是肾脏而不是血液学组织, 所以与吉西他滨的组合应当是毒性较低的, 从而允许施用增加量的放射性同位素, 结果抗肿瘤效力增大。

[0518] 在临床前模型中利用 TF10 预靶向所获得的成像优于利用直接放射性标记 DOTA-PAM4-IgG 所获得的成像, 这提供了利用这种成像系统进行临床试验的令人信服的理由。肿瘤靶向性 mAb 对胰腺赘生物的特异性, 与双特异性抗体平台 (platform) 技术一起对改善患者总体治疗效果具有很大的潜力, 所述双特异性抗体平台技术提供了使各种成像化合物缀合到 HSG- 半抗原 - 肽上的能力, 所述成像化合物用于 SPECT ( $^{111}\text{In}$ )、PET ( $^{68}\text{Ga}$ )、超声 (Au), 或为其它造影剂, 或为用于这方面的  $^{90}\text{Y}$  或用于治疗的其他放射性核素 (Goldenberg 等, J Nucl Med2008, 49:15863)。特别地, 我们相信, 基于 TF10 的免疫 PET 程序将在筛检有罹患胰腺癌的高风险 (例如, 遗传倾向、慢性胰腺炎、吸烟者等) 的个体方面有较大的临床价值, 并且可以作为追踪从常规技术获得可疑腹部图像的患者和 / 或出现由于存在特异性生物标记所产生的提示或生物化学检查异常的患者的手段。当用作追踪这些患者的进行性医学计划的一部分时, 胰腺癌的早期检测可以实现。最后, 与吉西他滨组合时, TF10 预靶向与直接放射性标记 PAM4-IgG 相比可以为控制肿瘤生长提供更好的机会。

[0519] 实施例 23. 利用吉西他滨和用 TF10 预靶向的  $^{90}\text{Y}$ - 标记肽对胰腺癌异种移植物的

## 治疗

### [0520] 概述

[0521] 当前正在 I/II 期试验中检查  $^{90}\text{Y}$ -hPAM4 IgG 与吉西他滨组合对治疗 III/IV 期胰腺癌患者的效果。我们公开了用于预靶向放射性核素的新途径,其能够将类似量的放射活性递送至胰腺癌异种移植物,但血液学毒性较小,并且更适合于与吉西他滨组合。给荷有  $\sim 0.4\text{cm}^3$  scCaPan1 人胰腺癌的裸小鼠施用重组 bsMAb, TF10, 1 天后施用  $^{90}\text{Y}$ -标记的半抗原-肽 (IMP-288)。在这种治疗中添加各种剂量和给药方案的吉西他滨,并且监测肿瘤进展直至 28 周。单独的 0.7mCi PT-RAIT 仅产生血细胞计数的瞬时 60% 减少,而给予单独的 0.9mCi PT-RAIT 的动物和给予 0.7mCi PT-RAIT+6mg 吉西他滨 (人等效量  $\sim 1000\text{mg}/\text{m}^2$ ) 的动物在 9 个月后没有表现出有关肾毒性的组织学证据。单独的单剂 0.25 或 0.5mCi PT-RAIT 可以分别完全消融 20% 和 80% 的肿瘤。在标准吉西他滨治疗方案 (6mg, 每周 1 次 x3 周; 休息 1 周, 重复 3 次) 中添加每月一次的分次 PT-RAIT (在每个吉西他滨循环开始时给予 0.25mCi/剂), 使得肿瘤达到  $3.0\text{cm}^3$  的中位时间与单独 PT-RAIT 相比显著性增大。检查在 PT-RAIT 中添加非细胞毒性放射增敏剂量的吉西他滨治疗方案的其它治疗计划也表现出与单独 PT-RAIT 相比显著提高的治疗反应。该结果表明 PT-RAIT 是一种治疗胰腺癌的有前途的新途径。当前的数据表明 PT-RAIT 与吉西他滨组合将会增强治疗反应。

### [0522] 方法

[0523] 如上所述制备 TF10 双特异性抗体。对于预靶向,向荷有人胰腺腺癌细胞系 CaPan1 的裸小鼠给予 TF10。在足以使 TF10 从血液中清除的时间 (16 小时) 之后,施用放射性标记的二价 HSG-肽。小分子量 HSG-肽 ( $\sim 1.4\text{kD}$ ) 在几分钟内从血液中清除,进入血管外空间,在这里它可以结合到预靶向的 TF10 bsMAb 的抗-HSG 臂上。在几个小时内, >80% 的放射性标记 HSG-肽排泄到尿中,留下定位于肿瘤的肽和存在于正常组织中的微量肽。

### [0524] 结果

[0525] 图 12 阐明了源自用 0.15mCi  $^{90}\text{Y}$ -hPAM4 IgG 或者 0.25 或 0.50mCi TF10-预靶向的  $^{90}\text{Y}$ -IMP-288 对所形成的 ( $\sim 0.4\text{cm}^3$ ) CaPan1 肿瘤进行的单次治疗的治疗活性。在 0.5-mCi 预靶向剂量与 0.15-mCi 剂量的直接放射性标记 IgG 之间观察到类似的抗肿瘤活性,但是这种水平的直接缀合物的血液学毒性严重 (未示出),而所述预靶向剂量仅是中等毒性 (未示出)。事实上,使用  $^{90}\text{Y}$ -IMP-288 时用于预靶向的 MTD 在裸小鼠中至少为 0.9mCi。

[0526] 图 13 示出吉西他滨与 PT-RAIT 的组合在抗肿瘤治疗上的协同作用。腹膜内给予小鼠人等效剂量的  $1000\text{mg}/\text{m}^2$  (6mg) 吉西他滨 (GEM), 每周一次持续 3 周,然后在休息 1 周后,重复这个治疗方案 2 次。在这 3 个治疗周期中的每一个中,在给予第一剂 GEM 后 1 天,给予 PT-RAIT (0.25mCi TF 10-预靶向的  $^{90}\text{Y}$ -IMP-288)。单独的 Gem 对肿瘤进展 (存活时间基于肿瘤进展达到  $3.0\text{cm}^3$  的时间) 没有显著影响。单独的 PT-RAIT 与未治疗动物相比提高了存活时间,但 GEM 与 PT-RAIT 组合的治疗方案使中位存活时间增加近 10 周。因为血液学毒性对于 PT-RAIT 不是剂量限制性的,但它是吉西他滨治疗的限制因素之一,所以这些研究表明可以在标准 GEM 疗法中添加 PT-RAIT,具有增强反应的潜在性。吉西他滨加 PT-RAIT 的显著协同作用是令人惊讶且出乎意料的。

[0527] 进一步的研究检查了施用时序对吉西他滨加 PT-RAIT 抗肿瘤作用增强效应的影响。在给予 0.25mCi TF10-预靶向的  $^{90}\text{Y}$ -IMP-288 前 1 天或后 1 天,给予单剂 6-mg 剂量的

GEM(未示出)。这项研究证实对于GEM已为人所熟知的事,即,放射增敏最好在辐射之前给予。对于单独的PT-RAIT方案和其中吉西他滨在放射性肽施用后22小时给予的PT-RAIT加吉西他滨方案,受治疗小鼠的存活时间百分比表现出很小的差异。然而,在施用PT-RAIT前19小时施用吉西他滨导致存活时间显著增加(未示出)。

[0528] 单剂PT-RAIT(0.25mCi)与西妥昔单抗(1mg,每周一次,腹膜内施用;7周)组合,或者与西妥昔单抗+GEM(6mg,每周一次x3周)组合治疗荷有CaPan1的动物,结果显示GEM+西妥昔单抗组合与PT-RAIT一起提供了较好的初步反应(图14),但与仅将单独的西妥昔单抗加入到PT-RAIT中相关的反应是令人鼓舞的(图14),因为它与PT-RAIT+GEM一样好或者优于它(图14)。因为这项研究中的整体存活时间优良,在这项研究结束时,即24周后每组中仅2个肿瘤进展达到 $>2.0\text{cm}^3$ ,所以这些结果表明在加入到PT-RAIT中时西妥昔单抗的潜在作用。

[0529] 实施例24. 分次预靶向放射免疫疗法(PT-RAIT)对胰腺癌治疗的作用

[0530] 我们评价了利用 $^{90}\text{Y}$ -DOTA-di-HSG肽(IMP-288)和TF10的分次治疗。使用TF10和放射性标记IMP-288,在荷有 $0.32\text{--}0.54\text{cm}^3$ 的s.c. CaPan1人胰腺癌异种移植物的裸小鼠中进行研究。在治疗中,将TF10-预靶向的 $^{90}\text{Y}$ -IMP-288[A]给予一次(在第0周给予 $0.6\text{mCi}$ ),或者[B]分次给予(在第0和1周给予 $0.3\text{mCi}$ ),或者[C](在第0、1和2周给予 $0.2\text{mCi}$ ),或者[D](在0、1和4周给予 $0.2\text{mCi}$ )。

[0531] 观察到大多数小鼠,组[A]、[B]、[C]和[D]中分别9/10、10/10、9/10和8/10小鼠的肿瘤消退( $>90\%$ )。在组[A]中,50%小鼠的肿瘤消退在3.7周时达到最大,相比之下,在[B]、[C]和[D]中分别在6.1、8.1和7.1周时达到最大。一些肿瘤表现出再生长,在14周时,在分次治疗组( $2\times 0.3\text{mCi}$ )中观察到最佳的治疗反应,其中6/10小鼠无肿瘤(NT),相比之下, $3\times 0.2\text{mCi}$ 组中的3/10小鼠和 $1\times 0.6\text{mCi}$ 组中的1/10小鼠无肿瘤。未观察到较大的体重减轻,分次PT-RAIT提供了用于治疗胰腺癌并且毒性极低的另一种替代方式。

[0532] 实施例25.  $^{90}\text{Y}$ -hPAM4放射免疫疗法(RAIT)加放射增敏吉西他滨(GEM)对晚期胰腺癌(PC)的治疗

[0533] 在临床前研究中, $^{90}\text{Y}$ -hPAM4,一种对PC高度特异的人源化抗体,在晚期疾病患者中表现出瞬时性活性,并且GEM增强了RAIT的作用。这项研究评价了 $^{90}\text{Y}$ -hPAM4加GEM的重复治疗周期对未经治疗的不可切除的PC患者的治疗作用。根据队列(cohort)逐渐增加 $^{90}\text{Y}$ -剂量,其中重复给予患者4周-周期(每周一次 $200\text{mg}/\text{m}^2$ GEM,在第2-4周每周一次 $^{90}\text{Y}$ -hPAM4),直至疾病进展或产生不可接受的毒性。利用CT、FDG-PET和CA19.9血清水平进行反应评估。

[0534] 在接受第一种2剂量水平( $6.5$ 和 $9.0\text{mCi}/\text{m}^2$   $^{90}\text{Y}$ -hPAM4 $\times 3$ )的8位患者(3F/5M, 56-72y. o.)中,血液学毒性已经为瞬时性1-2级。2位患者对初步治疗有反应,FDG SUV和CA19.9减小,CT显示病变消退。这两位患者分别在9和11个月之后,在总共3和4个周期之后,到现在一直保持着良好的体力状态,无另外的毒性。第3位患者在初步治疗之后,经PET和CT鉴定具有稳定的反应并且CA19.9水平降低,现在正在接受第二周期。4位其它患者表现出早期疾病进展,其余患者仍在评价之中。在血液学毒性极低,甚至在4个治疗周期后也极低的初始 $^{90}\text{Y}$ -剂量水平下,在分次 $^{90}\text{Y}$ -hPAM4 RAIT加低剂量吉西他滨表现出治疗活性之后继续逐渐增加剂量。

[0535] 实施例 26. 使用 Mab-PAM4 的胰腺癌早期检测和体外免疫测定

[0536] 利用 PAM4 抗体进行免疫组织化学研究。利用染色的组织切片获得的结果表明, PAM4 与正常胰腺管、胰腺小管和胰腺腺泡组织无反应(未示出)。相比之下,在针对相同组织样品使用 MA5 抗体时,正常胰腺导管和胰腺腺泡组织呈弥漫型阳性染色(未示出)。在高分化或中分化的胰腺腺癌的组织切片中,PAM4 染色呈阳性,大多数是细胞质染色,但细胞表面处增强。同一组织切片中的正常胰腺组织未被染色。

[0537] 表 12 显示利用 PAM4 MAb 对各个分化阶段的胰腺腺癌样品进行的免疫组织化学分析的结果。总体而言,对所有胰腺癌样品的检测率为 87%,对高分化的胰腺癌的检测率为 100%,对中分化的胰腺癌的检测率为近 90%。

[0538] 表 12PAM4 标记形式

[0539]

癌症	n	局灶型	弥漫型	总计
高分化	13	2	11	13(100%)
中分化	24	6	15	21(88%)
低分化	18	5	9	14(78%)
总计	55	13	35	48(87%)

[0540] 表 13 表明 PAM4 免疫组织化学染色还检测到非常高百分比的胰腺癌前驱病变,包括 PanIn-1A 至 PanIN-3、IPMN(导管内乳头状粘液性赘生物)和 MCN(粘液性囊性赘生物)。总体而言,PAM4 染色检测到所有胰腺前驱病变的 89%。这些结果证明,基于 PAM4 抗体的免疫检测能够通过体外分析检测到近 90%的胰腺癌和前驱病变。在 PanIN 发展的最早期观察到 PAM4 表达。在 IPMN 和 MCN 样品中观察到强染色(未示出)。PAM4 表位以高浓度(强弥漫型染色)存在于极大多数胰腺腺癌中。PAM4 与最早期的包括 PanIN-1、IPMN 和 MCN 在内的胰腺癌前驱病变有弥漫型强反应性,而与正常胰腺组织没有反应性。综合来看,这些结果表明利用 PAM4 抗体的诊断和 / 或检测能够以高特异性检测最早期的胰腺癌发展。

[0541] 表 13PAM4 标记形式

[0542]

	n	局灶型	弥漫型	总计
PanIn-1A	27	9	15	24(89%)
PanIn-1B	20	4	16	20(100%)
PanIn-2	11	6	4	10(91%)
PanIn-3	5	2	0	2(40%)
总 PanIn	63	21	35	56(89%)

IPMN	36	6	25	31 (86%)
MCN	27	3	22	25 (92%)

[0543]

[0544] 开发出针对血清样品中PAM4抗原的基于酶的免疫测定。图15示出利用PAM4免疫测定对胰腺癌与正常组织以及其它类型的癌症进行鉴别诊断的结果。对胰腺癌样本(n=53)与包括胰腺炎、乳腺癌、卵巢癌和结肠直肠癌以及淋巴瘤在内的所有其它样本(n=233)进行比较,结果显示对胰腺癌的检测灵敏度为77.4%,检测特异性为94.3%。

[0545] 图15的数据在表14中以表格形式呈现。

[0546] 表14. 患者血清中的PAM4-反应性粘蛋白

[0547]

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

[0548] 利用表14中的数据构建ROC曲线(未示出)。检查包括53位胰腺癌患者在内的共计283位患者,并对胰腺癌患者和所有其它样品中的循环PAM4抗原的存在进行比较,ROC曲线提供的AUC为 $0.88 \pm 0.03$  (95%ci, 0.84-0.92), P值 $<0.0001$ ,即对于胰腺癌与非胰腺癌样品的判别有高度显著性差异。对胰腺癌与其它肿瘤和正常组织进行比较,基于PAM4的血清测定显示出77%的灵敏度和95%的特异性。

[0549] 对来自正常患者、“早期”(1期)胰腺癌和所有胰腺癌样品的血清样品中的PAM4抗原浓度进行比较。样本包括13个来自健康志愿者的血清样本、12个来自1期胰腺癌的血清样本、13个来自2期胰腺癌的血清样本以及25个来自3/4期(晚期)胰腺癌的血清样本。使用8.8单位/ml(红线)的截断值,如通过ROC曲线统计分析确定的。PAM4抗原浓度的频率分布在图16中示出,该图示出92%的“早期”1期胰腺癌位于用于诊断胰腺癌的截断线的上面。基于PAM4的测定的ROC曲线在图17中示出,该图示出PAM4测定检测胰腺癌的灵敏度为81.6%,特异性为84.6%。

[0550] 这些结果证实,基于PAM4抗体结合的酶免疫测定可以检测和定量测定胰腺癌患者血清中的PAM4反应性抗原。该免疫测定对胰腺癌有高灵敏度和特异性。利用PAM4免疫测定可以检测到大多数I期疾病患者。

[0551] 总之,采用 PAM4 抗体的免疫组织学程序鉴定出约 90% 的侵袭性胰腺癌及其前驱病变, PanIN、IPMN 和 MCN。用于定量测定人患者血清中的 PAM4 抗原的基于 PAM4 的酶免疫测定对早期胰腺癌的检测表现出高敏感度和特异性。由于 PAM4 对胰腺癌的高特异性,因此粘蛋白生物标记可以用作供成像剂和治疗剂在体内靶向的靶。用于检测“早期”胰腺癌的免疫 PET 成像可以用来在早期,在胰腺癌可被更有效地治疗的时候诊断出胰腺癌。利用人源化 PAM4 抗体构建体的放射免疫疗法,优选与放射增敏剂组合使用来治疗胰腺癌。

[0552] 实施例 27. 对人血清中 PAM4 抗原的体外检测的进一步研究

[0553] 在某些实施方案中,优选通过体外分析可通过非侵入性技术获得的样品例如血液、血浆或血清样品,检测受试者中 PAM4 抗原的存在和/或诊断受试者中胰腺癌的存在。此种离体分析可优选用于,例如其中没有先验理由相信个体的特定部位有胰腺肿瘤的筛检程序。本研究的目的在于开发用于检测处于最早期的胰腺癌的可靠、准确、基于血清的测定。

[0554] 概述

[0555] 利用基于 PAM4 的免疫测定,对健康志愿者 (N=19)、已知诊断为患有胰腺腺癌的患者 (N=68) 和初步诊断患有慢性胰腺炎的患者 (N=29) 的血清中的抗原进行定量。对胰腺腺癌检测的敏感度为 82%,对健康对照的假阳性率为 5%。晚期疾病患者的抗原水平显著地高于早期疾病患者 ( $P < 0.01$ ),对于 3/4 期晚期疾病、2 期疾病和 1 期疾病,诊断敏感度分别为 91%、86% 和 62%。我们也评价了慢性胰腺炎血清,发现 38% 为抗原阳性。但这个观察结果与免疫组织化学研究结果不一致,免疫组织化学研究结果表明炎性胰腺组织不产生 PAM4 抗原。而且,其组织样本可供病理解释用的数位血清阳性胰腺炎患者表现出增生性前驱病变的证据。

[0556] 这些结果表明,PAM4 血清测定可以用来检测早期胰腺腺癌,并且 PAM4 抗原的阳性血清水平不是来源于炎性胰腺组织,而是可以提供亚临床胰腺瘤变的证据。

[0557] 材料和方法

[0558] 人样本血清 (N=68) 得自确诊患有胰腺腺癌、在 Johns Hopkins Medical Center, Baltimore, MD 接受治疗的患者,并冷冻储存 <5 年。这些患者中的每一位均经历腺手术切除,为准确诊断和分期提供了机会。对于 1 期疾病,在胰腺外没有观察到增生性细胞。然而,胰腺腺癌患者在出现症状时可能已患有未检测到的微转移疾病,包括报告患有 1 期疾病的那些患者。为此,我们评价了随访存活数据。所有患者都被描述成患有 1 期疾病,存活至少 1 年 (距离最后记录的随访时间),中位存活时间为 2.70 年 (第 25 百分位数 = 1.32 年),相比之下,最近的 SEER 数据 (2002–2006) 报道了通过手术切除治疗的 1 期疾病患者的中位存活时间为 1.42 年。

[0559] 共 29 个来自诊断为患有慢性胰腺炎的患者血清样本得自 Johns Hopkins Medical Center and Zeptomatrix Corp. (Franklin, MA)。在 Center for Molecular Medicine and Immunology, 健康志愿者 (N=19) 提供了用作对照样本的血液。所有样本都经过识别信息消除处理 (de-identified), 提供给调查者的唯一临床数据是疾病的诊断和分期、随访存活时间以及原发性肿瘤的大小。

[0560] 试剂从 CaPan1, 一种作为异种移植物生长于无胸腺裸小鼠中的人胰腺癌中分离出人胰腺粘蛋白制品。简言之,将 1g 组织在 10mL 含有 0.5M 氯化钠的 0.1M 碳酸氢铵中匀化。然后离心样品从而获得上清液,将上清液在 **SEPHAROSE®-4B-CL** 柱上进行分级,将空

隙体积材料在羟磷灰石上色谱分离。用去离子水彻底透析未吸附级分,然后冻干。用含有 0.15M 氯化钠的 0.01M 磷酸钠缓冲液 (pH, 7.2) (磷酸盐缓冲盐水 [PBS]) 制备 1mg/mL 溶液,将其用作免疫测定标准品的储液。如上所述 (Gold 等, *Cancer Res* 43:235-38, 1983),通过免疫家兔制备多克隆抗粘蛋白抗血清。纯化 IgG 级分,并通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和分子筛高效液相色谱评估它的纯度。与 MUC-1 蛋白核心有反应性的鼠 MA5 抗体得自 Immunomedics, Inc. (Morris Plains, NJ)。非结合同种型匹配的对照抗体 Ag8 从 P3X63-Ag8 鼠骨髓瘤中纯化。

[0561] 样品制备所有测定都以盲测方式进行。为了制备用于免疫测定的样本,将 300  $\mu$ L 血清放入 2.0mL 微量离心管中并用等体积的 1-丁醇萃取。将该管剧烈涡旋 2min,此时加入 300  $\mu$ L 氯仿,再次涡旋该管 2min;操作中包括后者步骤的目的是翻转水层和有机层。然后将该管在微量离心机 (microfuge) 中以 12,000rpm 的设定离心 5min。将上面的水层移入干净管中,并将该样品以 1:2 稀释在 2.0%(w/v) 酪蛋白钠盐在 0.1M pH 7.2 磷酸钠缓冲液 (PBS) 中的溶液中以用于免疫测定,所述缓冲液内含有 0.15M 氯化钠。

[0562] 酶免疫测定在 96 孔聚乙烯板中进行免疫测定,所述聚乙烯板已用 100  $\mu$ L PBS 中的 20  $\mu$ g/mL 人源化 -PAM4 IgG 包被,在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后通过加入 200  $\mu$ L 2.0%(w/v) PBS 中的酪蛋白溶液封闭孔,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5h。去除孔中的封闭溶液,并用 250  $\mu$ L 含有 0.1%(v/v) 吐温 -20 的 PBS 洗涤该板 5 次。将标准品或未知样本,100  $\mu$ L 一式三份加入到合适的孔中,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5h。然后按上面方式用 PBS-吐温 -20 洗涤该板 5 次。

[0563] 然后向每个孔中加入在 1.0%(w/v) PBS 中的酪蛋白中稀释至 5  $\mu$ g/mL 的多克隆家兔抗粘蛋白抗体,所述 PBS 内含有 50  $\mu$ g/mL 非特异性人 IgG,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1h。然后,按上面方式洗涤孔中的多克隆抗体,并向孔中加入在 PBS 中的 1.0%(w/v) 酪蛋白溶液中按 1:2000 稀释的过氧化物酶标记的驴抗家兔 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA),所述 PBS 内也含有 50  $\mu$ g/mL 人 IgG,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1h。按上面方式洗涤该板后,向孔中加入 100  $\mu$ L 3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液,并在室温下孵育 30min。通过加入 50  $\mu$ L 4.0N 硫酸终止反应,并利用 SPECTRA-MAX<sup>®</sup> 250 分光光度计 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 读取 450nm 波长处的光密度。因为 PAM4-粘蛋白具有相当大的微不均一性,所以我们选择以任意单位 /mL 形式报道我们的结果,基于从异种移植的 CaPan-1 人胰腺肿瘤纯化的初始参考标准品。

[0564] 免疫组织化学在 superfrost plus 防脱载玻片 (Thermo Scientific, Waltham, MA) 上将得自 Cooperative Human Tissue Network 的石蜡包埋的样本切成 4 微米切片。然后将组织切片在 pH 9.0 Tris 缓冲液, Target Retrieval Solution (Dako, Carpinteria, CA) 中加热至 95 $^{\circ}$ C 持续 20min,然后使其冷却至室温,并然后在室温下用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 淬灭 15min。然后使用 10  $\mu$ g/mL 的一抗,利用 ABC VECTASTAIN<sup>®</sup> 试剂盒 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 标记该组织。由两位病理学者使用与胰腺腺癌生物标记较早期研究所报道的一致范例 (paradigm) 独立地对载玻片进行评分 (Gold 等, 2007, *Clin Cancer Res* 13:7380-87): 0- 阴性, <1% 的组织被标记; 1-1%-25% 的组织呈弱局灶标记; 2-1%-25% 的组织呈强局灶标记; 3->25% 的组织呈弱弥漫标记; 4->25% 的组织呈强弥漫标记。仅考虑将合适的组织组分 (例如腺癌细胞、正常导管等) 用于评估。

[0565] 统计学分析由免疫测定数据生成标准曲线,进行回归分析从而插补未知样品的浓

度 (Prism 4.0 software, GraphPad, La Jolla, CA)。通过利用 Med-Calculator 统计软件包 (7.5 版) (Med-Calculator, Mariakerke Belgium) 生成接受者操作特征 (ROC) 曲线。利用学生 t 试验比较任何两个组的变量。利用 Cochran-Armitage 试验检测检测率和病期之间的趋势。

#### [0566] 结果

[0567] 免疫测定的准确度和精度在不连续的几天 (N=7) 评价 15.60、6.20、2.50 和 1.00 单位 /mL 标称浓度的一组对照标准品, 以确定准确度和精度。对标准品的曲线拟合一般得到  $r^2 > 0.990$  的拟合优度值。计算得, 准确度在前三种浓度的标称值的 8% 之内, 但对于 1.00 单位 /mL 的标准品而言下降至约 22%。对这一系列对照的标称与测量的单位 /mL 进行线性回归分析, 得到斜率为 0.965, y 截距为 0.174 的趋势线 ( $r^2 = 0.999$ ), 其中 1.00 的斜率和 0.00 的 y 截距将构成 100% 准确度 (图 18)。对于两个最低浓度的标准品, 标称和恢复的质量之间的平均绝对差值等于  $0.190 \pm 0.173$  单位 /mL, 表明 EIA 的最小绝对误差为约 0.2 单位 /mL。对于这四个对照标准品, 变异系数 (CV) 值分别为 6.40%、4.85%、12.0% 和 66.4%。综合来看, 该数据表明, PAM4 免疫测定提供的准确度和再现性水平在建议的分析物免疫测定测量的参考 (guideline) 范围之内; 准确度和精度在截断值 (2.40 单位 /mL) 之上的浓度的 15% 范围内, 并且在该截断值的 20% 范围内。为了进一步测试这点, 我们检查了 3 个血清样品, 其中的 2 个来自健康对照, 在不同的 3 天采集的。从这两个健康对照得到的平均结果为  $0.27 \pm 0.06$  和  $0.30 \pm 0.27$  单位 /mL, 每个均与 EIA 的最小绝对误差接近, 结果具有高的 CV, 分别为 21.65% 和 88.19%。另一个患者血清样品的平均值为  $19.45 \pm 2.51$  单位 /mL, CV 为 12.9%。

[0568] 患者血清中抗原的定量 在上面实施例 26 中所报道的初步研究中, 基于 PAM4 血清的免疫测定对胰腺癌的表现敏感度为 77%, 特异性为 94%。我们评价了一组新的 24 个来自被诊断为患有胰腺腺癌患者的血清样品。这些血清样品中仅 2 个具有视为阳性的水平的 PAM4 反应性抗原。因此, 我们考虑和评估免疫测定没有按预期那样进行的原因, 包括免疫测定试剂的质量, 可能是因为抗原从血清中降解和 / 或除去、抗原以免疫复合物形式存在或者被阻断物质结合。我们发现冷冻储存很短时间 (<5 年) 的新鲜人血清和 / 或样本中存在一种物质, 该物质似乎结合到 PAM4 反应性表位上并阻断它与 PAM4 抗体的结合, 因而妨碍免疫测定的检测。从掺有 5-20 单位 /mL 浓度的 PAM4 抗原的新鲜正常人血清 (N=2) 回收的抗原的百分比大约为 33% 或更小。

[0569] 在一系列报道中, Slomiany 和同事公开了胃粘蛋白具有共价结合和 / 或缔合的脂质和脂肪酸 (Slomiany 等, 1984, Arch Biochem Biophys 229:560-67; Slomiany 等, 1986, Biochem Biophys Res Commun 141:387-93; Zalesna 等, 1989, Biochem Int 18:775-84), 并且这些脂质和脂肪酸对粘蛋白的物理化学性质有特定影响。而且, 据报道, 脂肪酸合成酶水平和活性在胰腺腺癌中显著增高, 其它形式的癌症和病理病状也属于这种情况 (Walter 等, 2009, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 19:2380-85)。因为阻断物质可能是脂质性质的, 所以我们对来自 24 位胰腺腺癌患者组并且已冷冻储存 <5 年的血清进行有机萃取。如上所述, 在没有预先萃取的情况下, 24 个样本中仅 2 个 (8.3%) 具有视为阳性水平的 PAM4 抗原, 而在有机萃取之后, 24 个样本中的 22 个 (92%) 具有阳性水平的 PAM4 抗原。

[0570] 我们还可以从实施例 26 中所报道的研究重新评价已冷冻储存 >15 年的 10 个胰腺

腺癌患者血清以证实前面的结果。在经过萃取或未经萃取的情况下,所有 10 个样本都具有视为阳性水平的抗原。进行回归分析从而比较来自经萃取和非经萃取的血清的配对结果,得到斜率为 1.10 的趋势线 ( $r^2=0.94$ ),表明萃取或不萃取这些长期冷冻血清,结果是类似的。据认为,样本的长期储存导致抑制物质的降解或者结合到表位上的能力降低并且导致表位暴露。在免疫测定之前,所有进一步的血清测试都是利用经过有机萃取处理的样本进行。

[0571] 针对 PAM4 反应性抗原评价的样本包括根据病期划分的确诊患有胰腺腺癌的 68 位患者:21 位患者处于 1 期;14 位患者处于 2 期;以及 33 位患者处于 3 和 4 期(晚期)。另外,包括 19 个从健康成体志愿者采集的血清和 29 个诊断为患有慢性胰腺炎的患者作为对照组。点阵图(图 19)中所示的最大浓度为 80 单位/mL,因为没有足够量的血清来进行另外的稀释研究。虽然上面实施例 26 中报道的截断值为 10.2 单位/mL,但是因为采用了有机萃取程序并且 EIA 方案有所不同(试剂浓度,缓冲液中包括人 IgG),所以我们选择独立于前面的结果对当前的数据组进行处理。通过用于比较所有胰腺腺癌样本与健康成体的 ROC 曲线统计(图 20)计算得,阳性截断值为 2.4 单位/mL。对胰腺腺癌检测的总敏感度为 82%,曲线下面积为  $0.92 \pm 0.03$  (95%CI=0.84 - 0.97)。在这个水平的敏感度下,观察到健康对照组的假阳性率为 5%,单一阳性病例所具有的循环抗原为 3.65 单位/mL,略高于截断值。因为血清量不足,所以未能进行用来与 PAM4 免疫测定结果进行比较的 CA19-9 免疫测定。

[0572] 如表 15 所示,对早期 I 期胰腺腺癌的检测的敏感度相对高,21 个样本中的 13 个(62%)高于截断值。与预料的一样,该检测率低于在 2 期患者(86%)与晚期 3 期或 4 期患者(91%)组观察到的检测率。对于检测率与病期,观察到统计学显著性趋势 ( $P<0.01$ )。我们认为这最有可能是由肿瘤大小或肿瘤负担所导致的。1 期、2 期和 3/4 期组的平均肿瘤大小分别为  $2.14 \pm 1.02\text{cm}^3$ 、 $3.36 \pm 1.18\text{cm}^3$  和  $3.45 \pm 1.06\text{cm}^3$ 。虽然 2 期和 3/4 期组之间肿瘤大小没有统计学显著性差异 ( $P>0.41$ ),但是当将这两组中的每组与 1 期肿瘤大小相比较时,均观察到统计学显著性差异 ( $P<0.004$  或更好)。然而,应注意单独的肿瘤大小与血清中的抗原浓度无相关性 ( $r^2=0.0065$ )。

[0573] 报告为 I 期的样本可以根据肿瘤大小划分为 1A 期 (N=13) 和 1B 期 (N=8) 亚组,这两个亚组的检测率分别为 54% 和 75%;但强调需要谨慎,因为每个亚组中的患者数量小。1A 期的平均肿瘤大小为  $1.41 \pm 0.58\text{cm}^3$  (范围:  $0.4\text{cm}^3 - 2.0\text{cm}^3$ ),而 1B 期的平均肿瘤大小为  $3.15 \pm 0.44\text{cm}^3$  (范围:  $2.5\text{cm}^3 - 4\text{cm}^3$ );对于这两个组的比较  $P<0.001$ 。虽然整体而言,1A 期疾病的肿瘤大小小于 1B 期疾病的肿瘤大小,但单独的肿瘤大小与血液中的 PAM4 抗原浓度之间没有明显的统计相关性 ( $r^2=0.03$ )。而且,重要的是注意到,在 13 个 1A 期样本中,7 个阳性病例中的 4 个具有大大高于截断值的 PAM4 抗原水平,在 17.65-32.65 单位/mL 范围内。

[0574] 表 15. 患者血清中的 PAM4 反应性抗原

	N	中位值 (单位/mL)	真阳性	T-试验(P 值) <sup>a</sup>
<b>总胰腺癌</b>	68	9.85	81%	<0.001
<b>1 期</b>	21	4.53	62%	<0.002
--- <b>1A 期</b>	13	3.96	54%	<0.02
--- <b>1B 期</b>	8	6.05	75%	<0.02
<b>2 期</b>	14	10.39	86%	<0.005
<b>3/4 期</b>	33	13.37	91%	<0.001
<b>慢性胰腺炎</b>	29	1.28	(38% FP)	
<b>健康志愿者</b>	19	1.18	(5% FP)	
a-所有比较都是与健康志愿者的比较				

[0576] 我们还评价了一组 29 个初步诊断患有慢性胰腺炎的患者血清。当将通过正常和胰腺腺癌患者的 ROC 评价确定的 2.4 单位 /mL 作为截断值时,11 位胰腺炎患者 (38%) 为阳性。直接与胰腺腺癌样本相比较的胰腺炎血清的 ROC 曲线分析所得的曲线下面积为  $0.77 \pm 0.05$  (95%CI=0.68-0.85)。胰腺炎组的中位值为 1.28 单位 /mL,与健康志愿者组 (1.18 单位 /mL) 相当,但大大低于 (低 3.5 倍)1 期胰腺腺癌组 (4.53 单位 /mL)。应注意,我们较早的胰腺炎样本研究结果提示低得多的假阳性率,仅 5%。然而,那些胰腺炎样本冷冻储存时间少于 5 年,而且在分析之前没有经过有机相萃取处理。

[0577] 活检和 / 或手术样本从 14 个慢性胰腺炎样本获得,其中的 6 个来自被视为循环 PAM4 抗原呈阳性的患者。在这 6 个阳性病例中的 3 个中,在组织切片内鉴定出前驱病变。然后考虑所述阳性血清测试结果是由胰腺炎引起,还是由赘生性前驱病变的存在引起。我们对另外的 30 个来自诊断为患有胰腺炎的患者活检样本进行免疫组织化学分析。在这 30 个样本中,通过利用 PAM4 染色鉴定出 (在不同的样本中鉴定出) 一个侧面 (frank) 侵袭性胰腺腺癌和一个大的 PanIN-2-3 病变,而周围的腺泡 - 导管化生 (ADM) 和正常组织都呈阴性 (数据未示出)。在其余 28 个样本中,19 个具有足够用于评价的量的薄壁组织,其中的 16 个表现出 ADM 证据。PAM4 在除了这 2 个病例之外的全部病例中都呈阴性,并且在这些病例的每个中,样本内的 ADM 仅呈非常弱的局灶性标记 (数据未示出)。

[0578] 讨论

[0579] 采用组织样本免疫组织学分析和循环抗原 EIA 的实施例 26 中所报道的研究证明,PAM4 反应性表位是侵袭性胰腺腺癌的生物标记并且在胰腺瘤变 (即, PanIN-1) 的最早期表达。它在正常胰腺组织 (胰腺导管、胰腺腺泡和胰岛细胞) 内没有检测到,在所检查的大多数非胰腺癌 (乳腺癌、肺癌、胃癌和其它癌症) 中也没有检测到。因而,血清中的 PAM4 表位浓度的升高提供了针对胰腺腺癌的高阳性似然比,为 16.8。前面的研究缺少有关病期的临床信息。因此,直到现在我们仍无法评价所述免疫测定在检测潜在可治愈的早期疾病方面的价值。

[0580] 我们在本文报道利用血清样品进行的基于 PAM4 的 EIA 可以检测出患有早期胰腺腺癌的患者,并可以准确地判别无疾病个体。检测早期胰腺腺癌的测定敏感度对于 1 期疾

病患者为 62%，对于 2 期疾病患者为 86%，并且血清水平一般随着病期的进展而提高。高百分比的 1 期和 2 期疾病患者在临床上无症状。我们推测利用 PAM4 血清测定检测处于这些早期阶段的肿瘤生长可改善患者的生存前景。

[0581] 这项研究中的癌症患者都经历手术切除，提供了对每位患者进行准确分期的机会。然而，许多胰腺癌患者在出现症状时都被怀疑患有微转移疾病，即使他们没有出现组织学明显的区域淋巴结转移。这突出了早期检测研究，特别是低发病率疾病例如胰腺腺癌的早期检测研究中的普遍问题。定义明确的样本的自然增长是有问题的。这些胰腺癌中的许多是在存在慢性胰腺炎、胆囊炎和增生性前驱病变以及其它病状的情况下发生的，这进一步使问题复杂化。

[0582] 在 29 个初步诊断患有慢性胰腺炎的患者血清中，鉴定出 38% 呈 PAM4 抗原阳性。然而，在这些血清阳性患者中，其组织样本可供病理解释用的数位患者表现出增生性前驱病变的证据。而且，在比较通过免疫组织学得到的组织反应性和通过免疫测定得到的抗原血清水平时观察到不一致。根据免疫组织化学，仅 10% 的可评价样本表现出 ADM 内呈 PAM4 染色的证据，尽管它的强度比在绝大多数胰腺腺癌样本中所观察到的弱得多 (Gold 等, 2007, Clin Cancer Res 13:7380-87)。所以，该结果表明血清内阳性水平的 PAM4 抗原可能不是来源于炎性胰腺组织，而是可以提供亚临床胰腺瘤变例如 PanIN 病变的证据，并且至少阳性结果提供了对这些患者临床随访的理由。

[0583] 从基因工程化胰腺腺癌动物模型得到的研究表明，人胰腺瘤变可能是在 PanIN-1 病变之前出现 (Leach, 2004, Cancer Cell 5:7-11)。ADM 是在由 Zhu 等 (2007, Am J Pathol 171:263-73) 描述的突变 KRAS 靶向模型中观察到的最早的变化。另一方面，Shi 等 (2009, Mol Cancer Res 7:230-36) 报道，虽然 KRAS 基因突变可发生在 ADM 内，但它们主要发生在与 PanIN 病变相关的 ADM 内。该作者认为这可能是通过 PanIN 逆行延伸至周围 ADM 而发生的。迄今为止，还没有确凿的证据证明 ADM 进展成 PanIN。PAM4 与两位胰腺炎患者的 ADM 有反应性这一事实值得关注。

[0584] 目前，胰腺癌的普通人群筛查被视为在医学或经济上不值得，因为该疾病实在是太罕见。然而，人们对于筛查预测罹患胰腺腺癌的风险增加的患者有相当大的兴趣。数项研究已经证明，筛查具有强大的胰腺癌家族史的个体可以鉴定出适合手术切除的胰腺前驱增生生物 (Canto 等, 2006, Clin Gastroenterol Hepatol 4:766-81; Canto, 2005, Clin Gastroenterol Hepatol 3:S46-58; Brentnall 等, 1999, Ann Intern Med 131:247-55)。例如，胰腺癌患者亲属罹患胰腺癌的风险显著地高于普通人群 (Shi 等, 2009, Arch Pathol Lab Med 133:365-74)。低百分比的家族性胰腺癌患者带有 PALB2 (BRCA2 的配偶体和定位体) 突变和胰腺癌易患基因 (Tischkowitz 等, 2009, Gastroenterology 137:1183-86)。类似地，患有持久性慢性胰腺炎的患者罹患胰腺癌的风险增加，并且在早发 (青少年) 遗传性胰腺炎患者当中的风险超过 30% (Lowenfels 等, 1993, New Eng J Med 328:1433-37; Lowenfels 等, 1997, J Natl Cancer Inst 89:442-46)。已在家族非典型多痣 (FAMMM) 综合征个体中观察到高出 20 至 34 倍的风险 (Rutter 等, 2004, Cancer 101:2809-16)。此外，数项研究已证明，符合一定标准的糖尿病个体罹患胰腺癌的风险显著增加 (Pannala 等, 2009, Lancet Oncol 10:88-95)。通过利用 PAM4 免疫测定纵向监控这些患者可以为瘤变提供早期检测。所述免疫测定的第二潜在用途可以是作为一种检测治疗后

疾病复发,特别是据推测肿瘤局限于胰腺的那些患者在手术切除后的复发的手段。

[0585] PAM4 抗体的相对高特异性提供了一种靶向成像剂和治疗剂并具有高肿瘤摄取和高肿瘤 / 非肿瘤比值的方式。我们已证明 PAM4 作为用于胰腺癌核成像和放射免疫疗法的直接放射性标记试剂或双特异性预靶向试剂的潜力。此外,最近报道了用于评价分次给药的  $^{90}\text{Y}$ -PAM4 全 IgG (clivatuzumab tetraxetan) 与放射增敏吉西他滨治疗方案的组合的临床 1b 期试验的初步结果 (Pennington 等, 2009, J Clin Oncol 27:15s, abstract 4620)。在 22 位 3/4 期 (大部分 4 期) 疾病患者中, 68% 表现出疾病控制的证据, 其中根据 RECIST 标准, 23% 的患者具有部分反应。因而, 基于 PAM4 的免疫测定得到的阳性结果提供了继续进行 PAM4 靶向成像和治疗的理由, 从而提供个性化治疗。

[0586] 基于 PAM4 的免疫测定可以鉴定所有分期的胰腺腺癌患者中的大多数。虽然在当前研究与 CA19.9 进行直接比较是不可能的, 但是前面在一组有限的胰腺腺癌血清 (N=41) 中对这两种生物标记进行的比较证明, 在 71% 患者样本中为阳性的 PAM4 抗原水平与在 59% 样本中为阳性的 CA19.9 抗原水平之间存在统计学显著性差异 ( $P < 0.01$ )。一般而言, 据认为 CA19.9 缺少提供胰腺腺癌早期检测和 / 或诊断所需的敏感度和特异性。然而, 该测定在根据指示不良预后的 CA19.9 血清水平持续升高进行的处理法 (management) 中确实有用。类似地, 我们最近以摘要形式 (Pennington 等, 2009, J Clin Oncol 27:15s, abstract 4620) 报道了循环 PAM4 抗原水平在预测抗肿瘤反应方面的用途。

[0587] 这些结果表明样本储存的条件 (例如, 冷冻保存时间) 可以对所研究表位的可及性有显著的影响。对于基于 PAM4 的免疫测定, 脂肪酸或脂质物质也许能结合所述特定表位并干扰免疫测定。然而, 这种材料也可能是低分子量肽或其它可溶于有机溶剂中的物质。通过对血清进行有机萃取除去这种物质的能力使得 PAM4 免疫测定可再现。另外, 提出了有关循环抑制剂 :PAM4 抗原相互作用的生物学意义的问题。然而, 当使用 PAM4 抗体作为体内靶试剂 (例如, 放射免疫疗法) 时, 循环 PAM4 抗原的存在不是一个因素, 因为已在迄今评价的大多数患者中观察到放射性标记 PAM4 对肿瘤生长部位的靶向。因而, 肿瘤内的 PAM4 抗原似乎不受阻断物质影响。

[0588] 对于本领域技术人员而言明显的, 可以对本发明产品、组合物、方法和过程作出各种修改和改变。因而, 本发明涵盖此类修改和修改, 条件是它们在所附权利要求或其等价形式的范围内。

**PAM4 V<sub>k</sub>**

GATATGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCGCACTCTCTGGGGAGAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGT 90  
 1 D I V M T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S 27 A  
 20  
 TCCAGCTACTTGTACTGGTACCAGCAGAGCCAGGATCCTCCCCCAACTCTGGATTATAGCACATCCAACTGGCTTCGGAGTCCCT 180  
 30 S S Y L Y W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P 50  
 40  
 GCTGGCTTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGPAAGATGCTGCCCTCTTATTCTGCCAT 270  
 60 A R F S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A S Y F C H 80  
 70  
 CAGTGGAAATAGGTACCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA 324  
 90 Q W N R Y P Y T F G G G T K L E I K 107  
 100  
 CDR3

图 1A. 鼠 PAM4VK 的核苷酸和氨基酸序

**PAM4 V<sub>H</sub>**

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

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

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

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

图 1B. 鼠 PAM4VH 的核苷酸和氨基酸序列

1 DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSSLYLYWYQQKPGSSPKLWIY 40  
 CDR1  
 50 STSNLASGVPARFSGSGTSYSLTISSEAEADAASYFCHQWNRYPTFG 90  
 CDR2  
 100 GGTKLEIKR 108

图 2A. cPAM4VK

1 QVQLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYTFPSYVLHWVKQKPGQGLEWIGY 50  
 CDR1  
 52 A INPYNDGTQYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSRLTSEDSAVYCARGF 90  
 CDR2  
 100 A B GGSYGFA YWGQGTLITVSS 110 113  
 CDR3

图 2B. cPAM4VH

Walker V <sub>K</sub>	1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ-SISNYLSWYQQK	27 A	30
PAM4 V <sub>K</sub>		••V•••••AIM•••PEK••M••S••SSVS•S••Y•••••		
hPAM4 V <sub>K</sub>		••L••••••••••••••M••S••SSVS•S••Y•••••		
Walker V <sub>K</sub>	40	PGKAPKLLIYAASSLQSGVTSRFRFSGSGTDFTLTISLQ	60	70
PAM4 V <sub>K</sub>		••SS••W••ST•N•A••PA••••••••SYS••••ME		
hPAM4 V <sub>K</sub>		•••••W••ST•N•A••PA••••••••••••••••••		
Walker V <sub>K</sub>	80	PEDSATYICQQSYSTLITFGQGRLEIK-	100	108
PAM4 V <sub>K</sub>		A••A•S•F•H•WNRYPY••G•K••••-		
hPAM4 V <sub>K</sub>		••••S•F•H•WNRYPY••G•••••••R		

图 3A. WalkerVH, PAM4VK 和人源化 PAM4VH 的氨基酸序列



PvuII  
 1 GACATCCAGCTGACCCAGTCCATCCTCCCTGCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGAAGT 90  
 10 D I Q L T Q S P S L S A S V G D R V T M T C S A S S V S 27 A  
 20 TCCAGCTACTTGTACTGGTACCAACAGAAACCCAGGGAAGCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT 180  
 30 S S Y L Y W Y Q Q K P G K A P K L W I Y S T S N L A S G V P 50  
CDR1  
 60 GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGACAGACTTCACCTCCACCATCAGCAGTCTGCCAACCTGGAAGATTCTGCCCTTTATTTCTGCCAT 270  
 70 A R F S G S G T D F T L T I S S L Q P E D S A S Y F C H  
BglII/BclI  
 90 CAGTGGAAATAGGTACCCGTACACCGTTCGGAGGGGGGACACGACTGGAGATCAAACGA 108  
 100 Q W N R Y P Y T F G G G T R L E I K R  
CDR3 327

图 4A. hPAM4VK 的核苷酸序列

PstI

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCGAGGCTTCTGGATAACACATTCCCT 90  
 1 10 20 30  
 Q V Q L Q Q S G A E V K K P G A S V K V S C E A S G Y T F P  
 AGCTAIGTTTTGCACCTGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCTTGAAGTGGATGGATAFAATTAATCCTTACATGATGGTACTCAGTAC 180  
 40 50 52 A  
S Y V L H W V K Q A P G Q G L E W I G Y I N P Y N D G T Q Y  
 CDR1  
 AATGAGAAGTTCAAAGGCARGGCCACTGACCCAGGACACGTCATCAACACAGCCCTACATGGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGAC 270  
 60 70 80 82 A B C  
N E K F K G K A T L T R D T S I N T A Y M E L S R L R S D D  
 ACGGCCGTATTACTGTGCAAGAGGCTTCGGTGGTAGCTACGGATTTCCTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCCGCTCTCCTCA 357  
 90 100 A B 110 103  
T A V Y Y C A R G F G G S Y G F A Y W G Q G T L V T V S S  
 CDR3

BstEII

图 4B. hPAM4 VH 的核苷酸序列

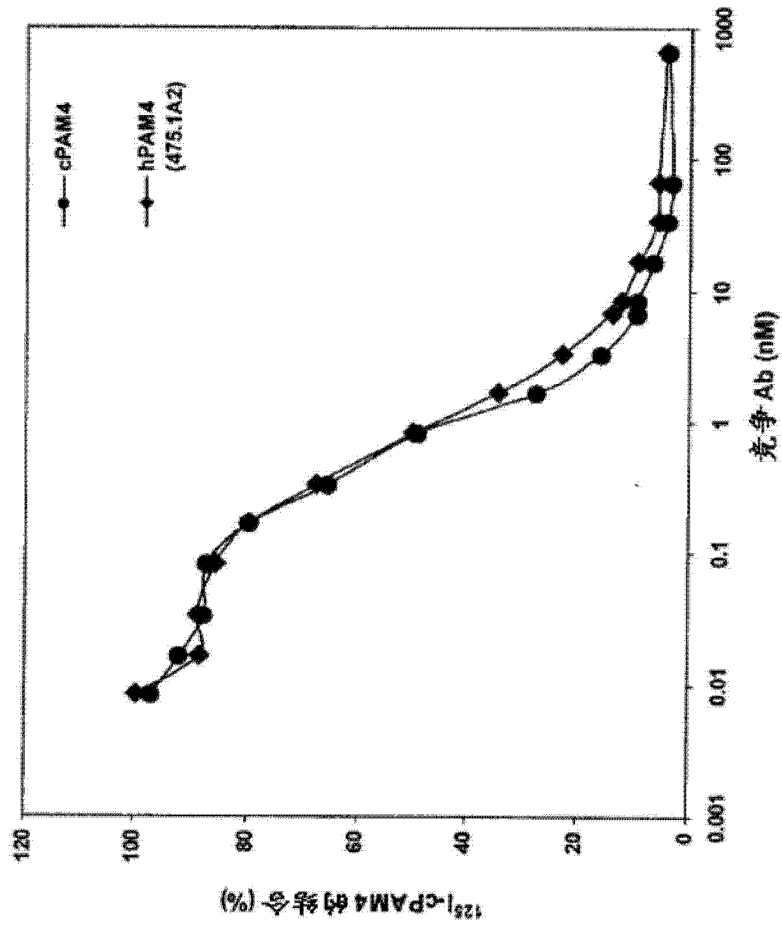


图 5. 人源化 PAM4 和嵌合 PAM4 的结合活性

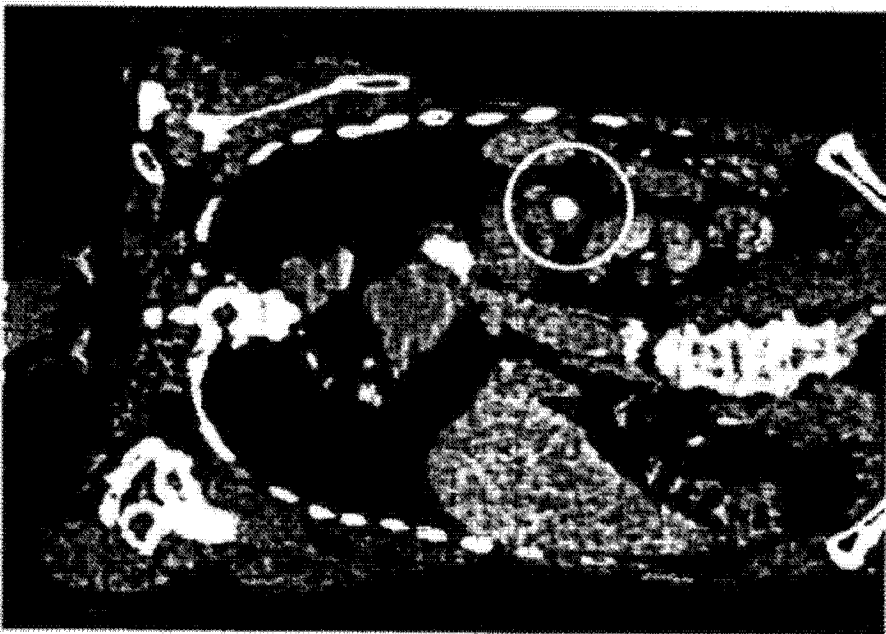
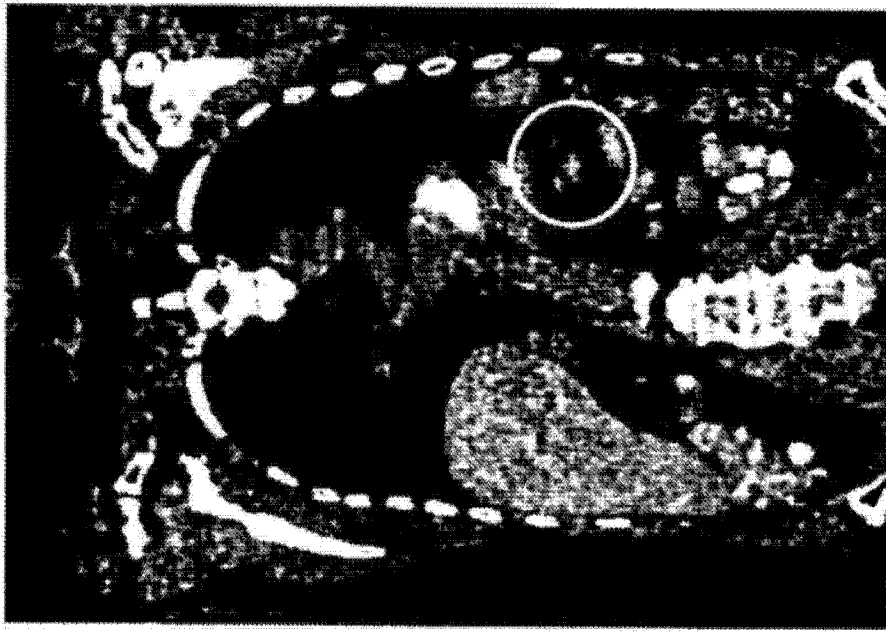


图 6

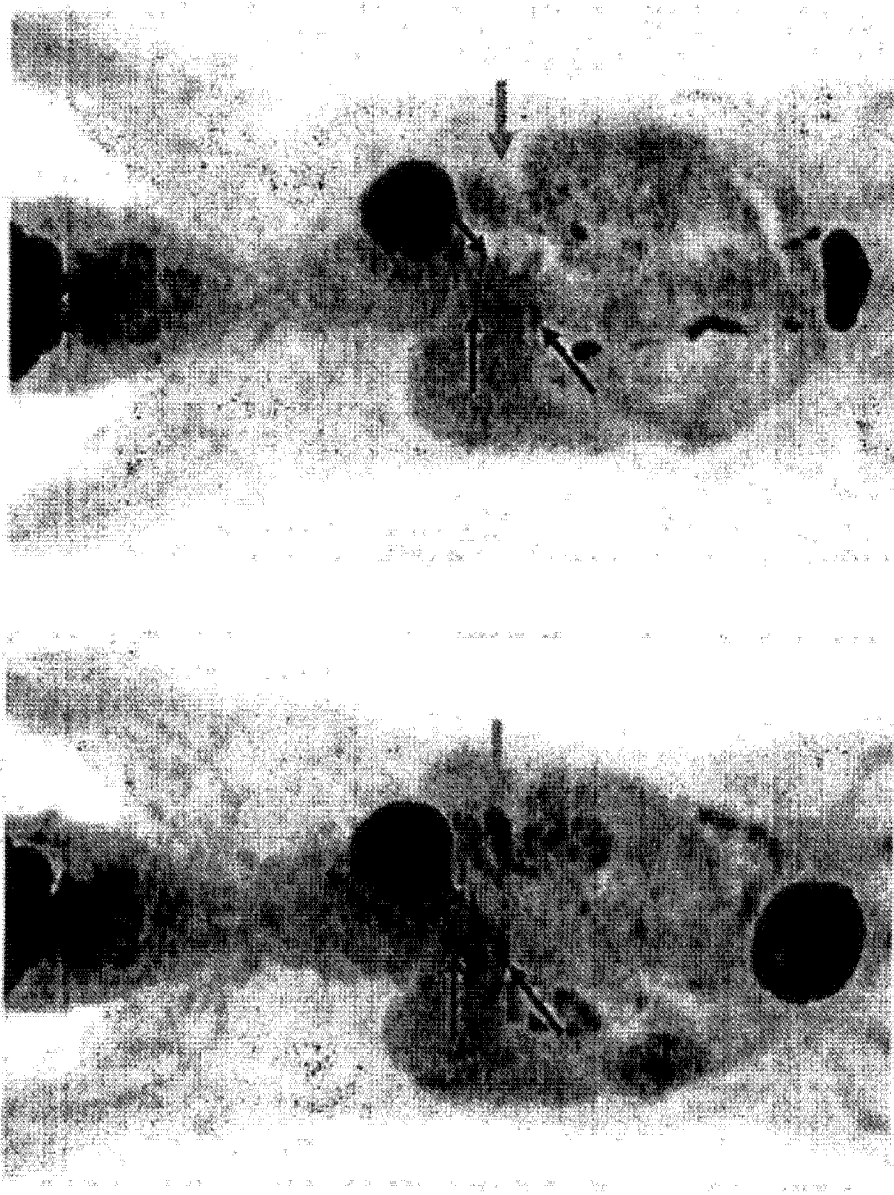


图 7

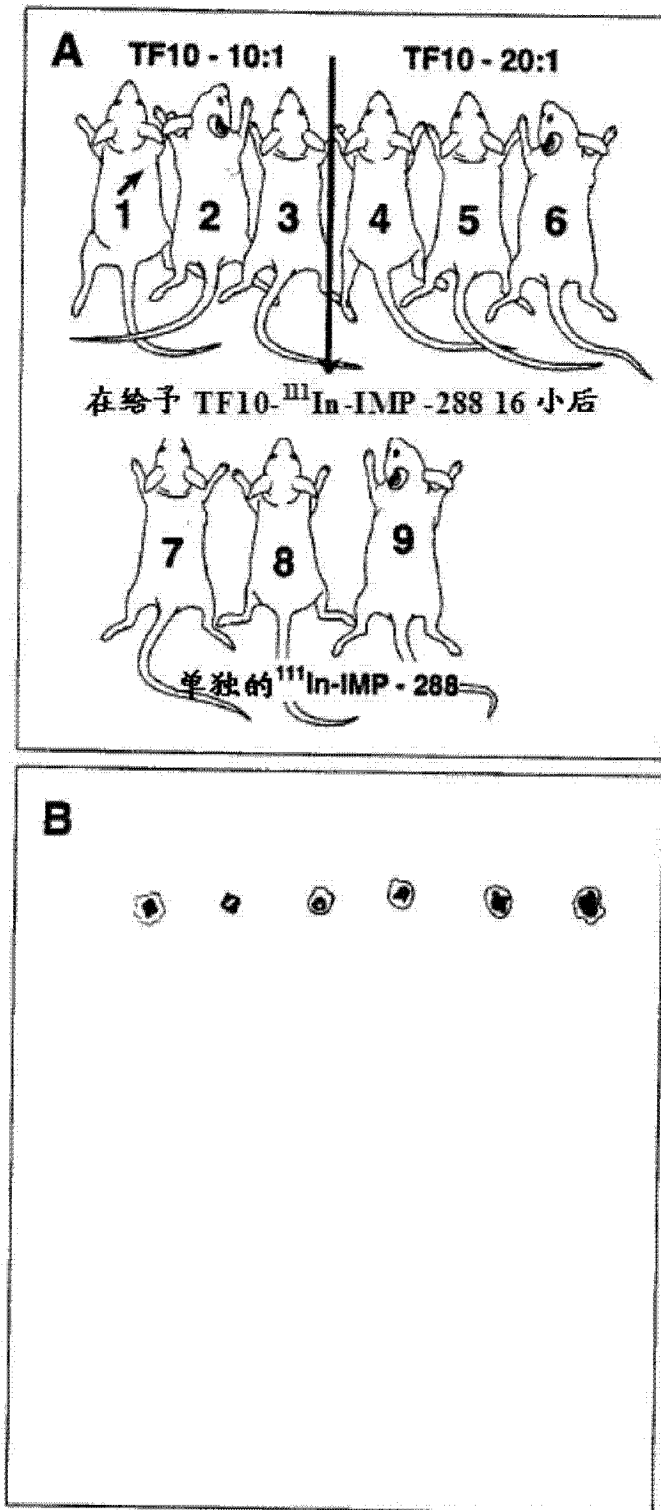


图 8

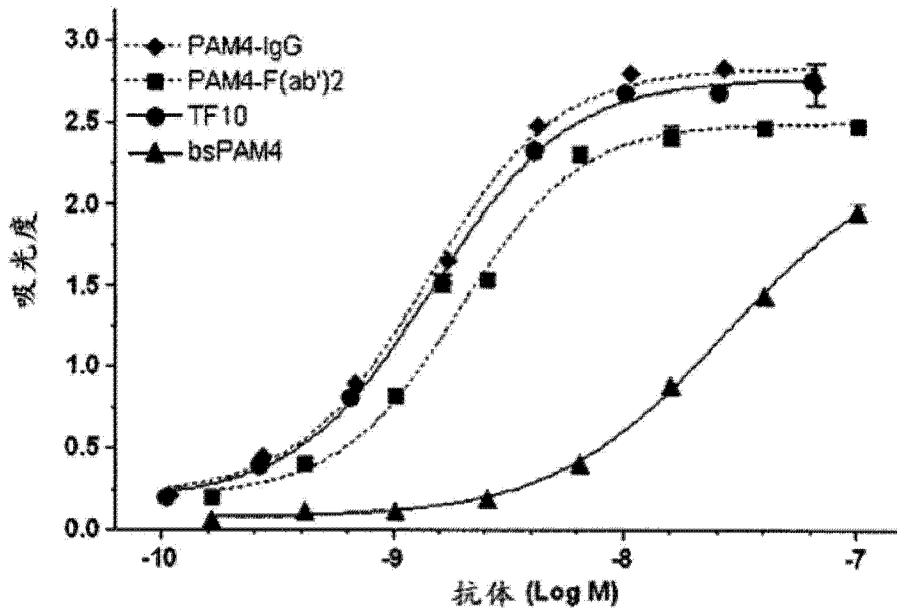


图 9

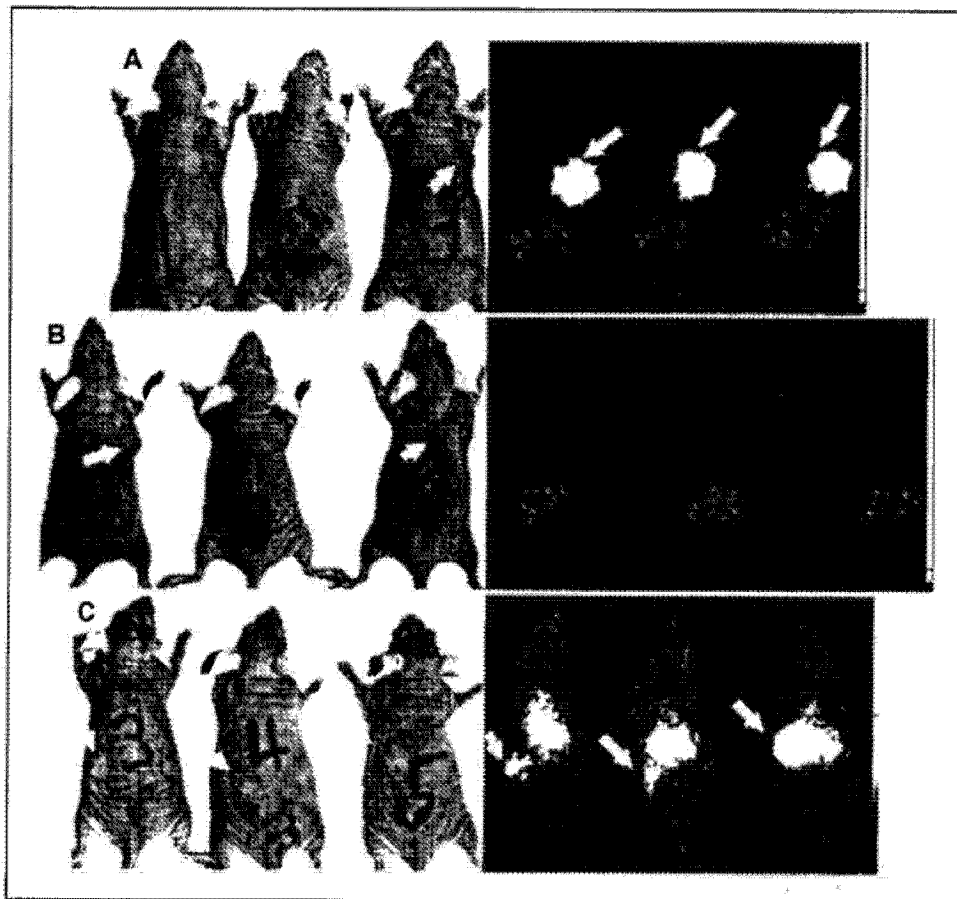


图 10

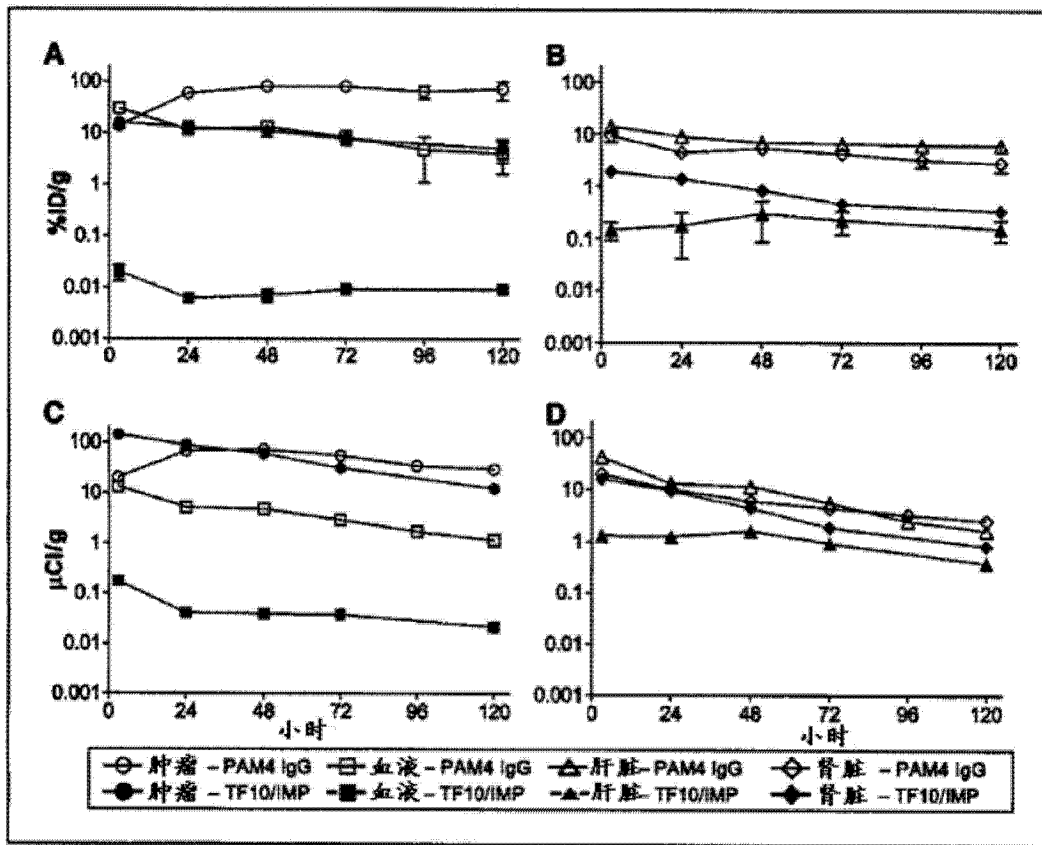


图 11

图 4 TF10- 预靶向的 <sup>90</sup>Y-IMP 288 和 <sup>90</sup>Y-hPAM4 对荷有 scCaPan1 胰腺癌的裸小鼠的治疗

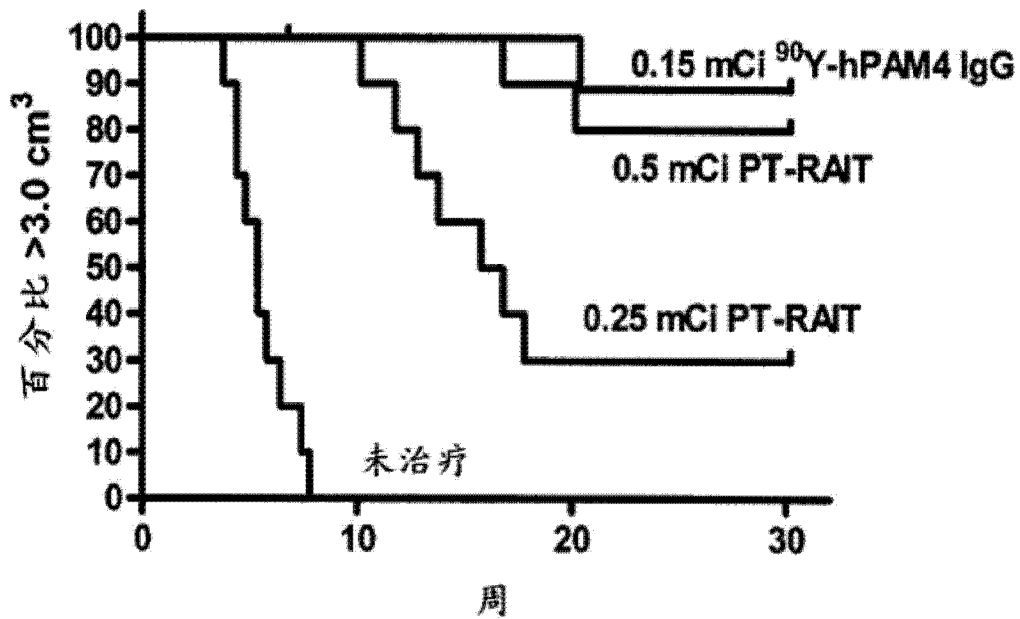


图 12

未治疗与单独的 Gem : P = 0.652  
单独的 PT-RAIT 与未治疗 : P = 0.042  
PT-RAIT + GEM 与单独的 PT-RAIT : P = 0.004

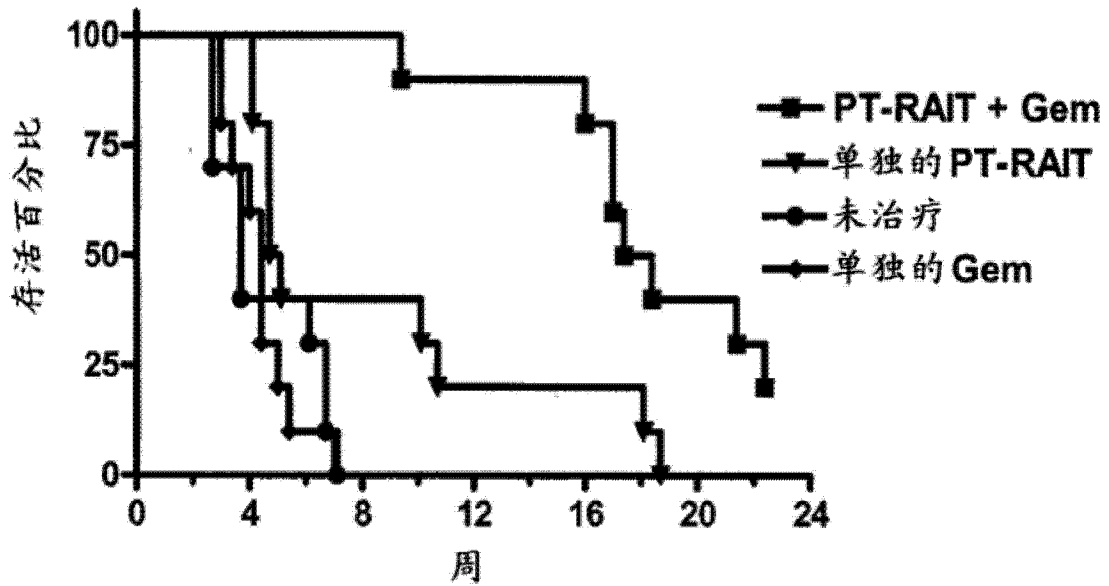


图 13

西妥昔单抗, GEM, PT-RAIT  
(平均值 +/- SE; N = 8-9)

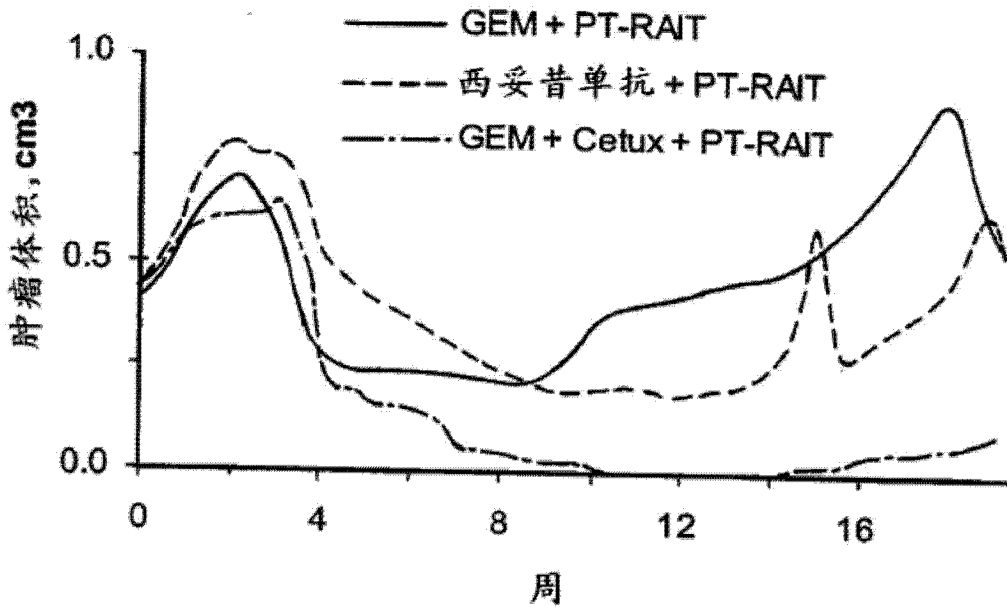


图 14



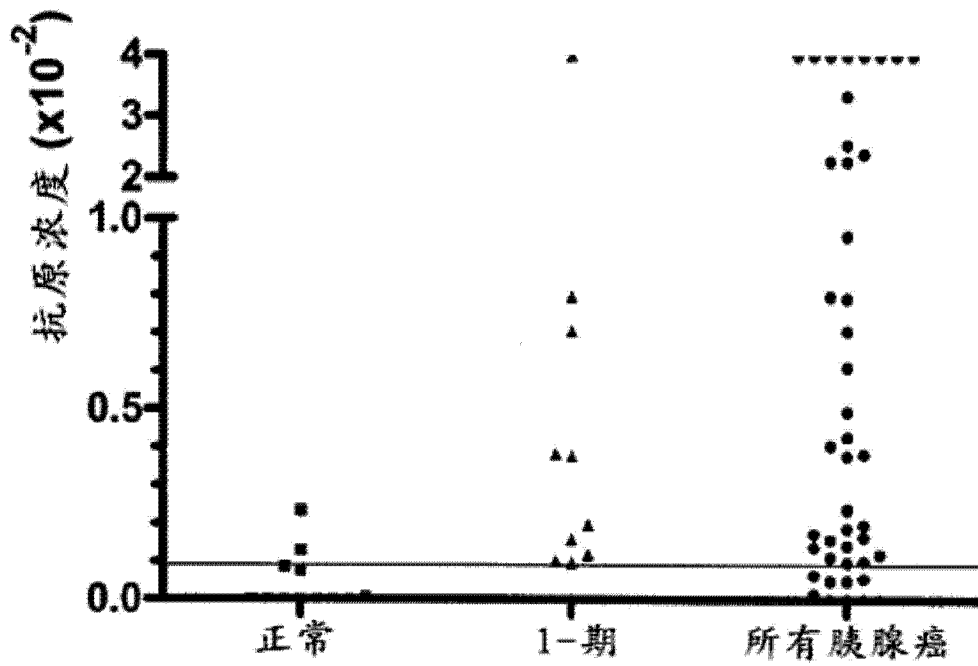


图 16

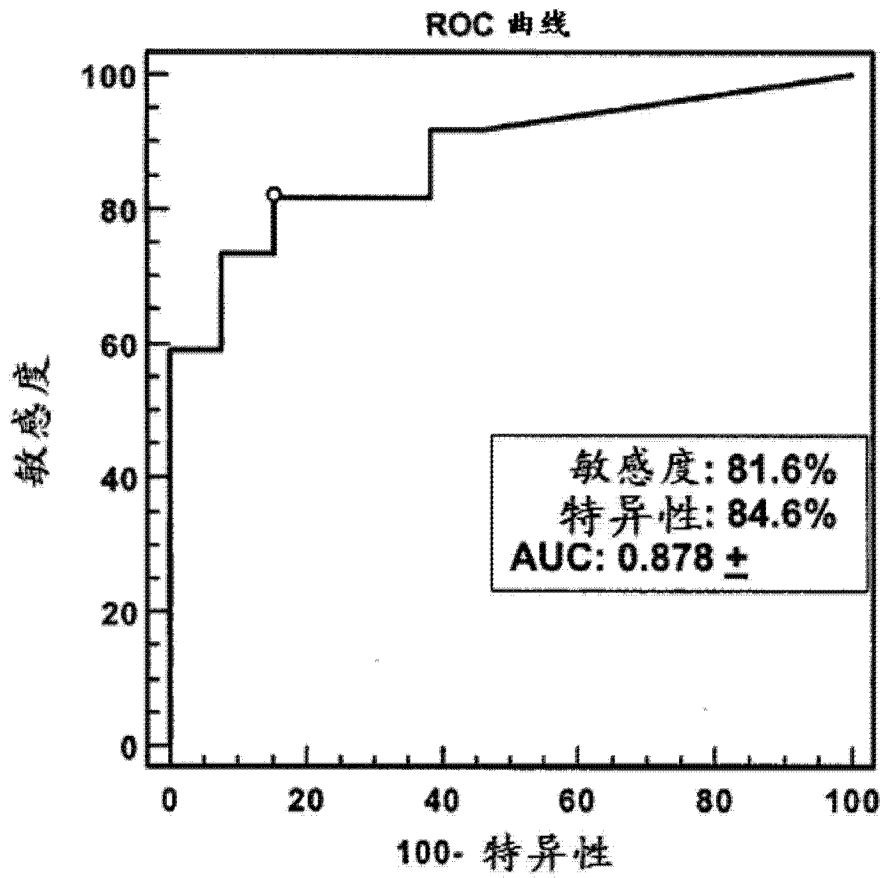


图 17

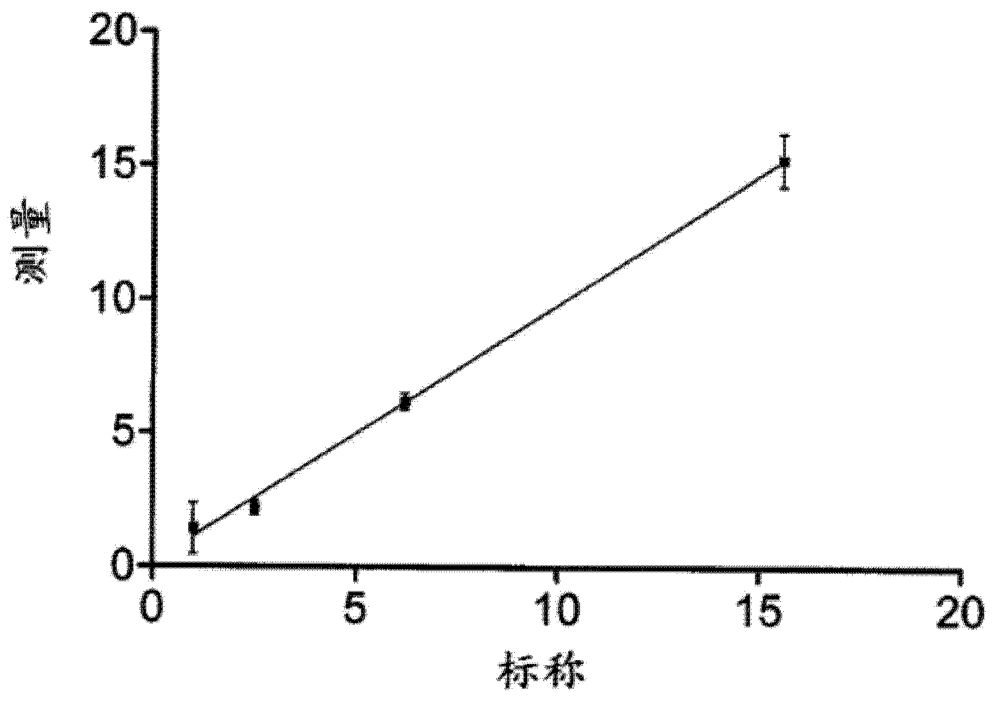


图 18

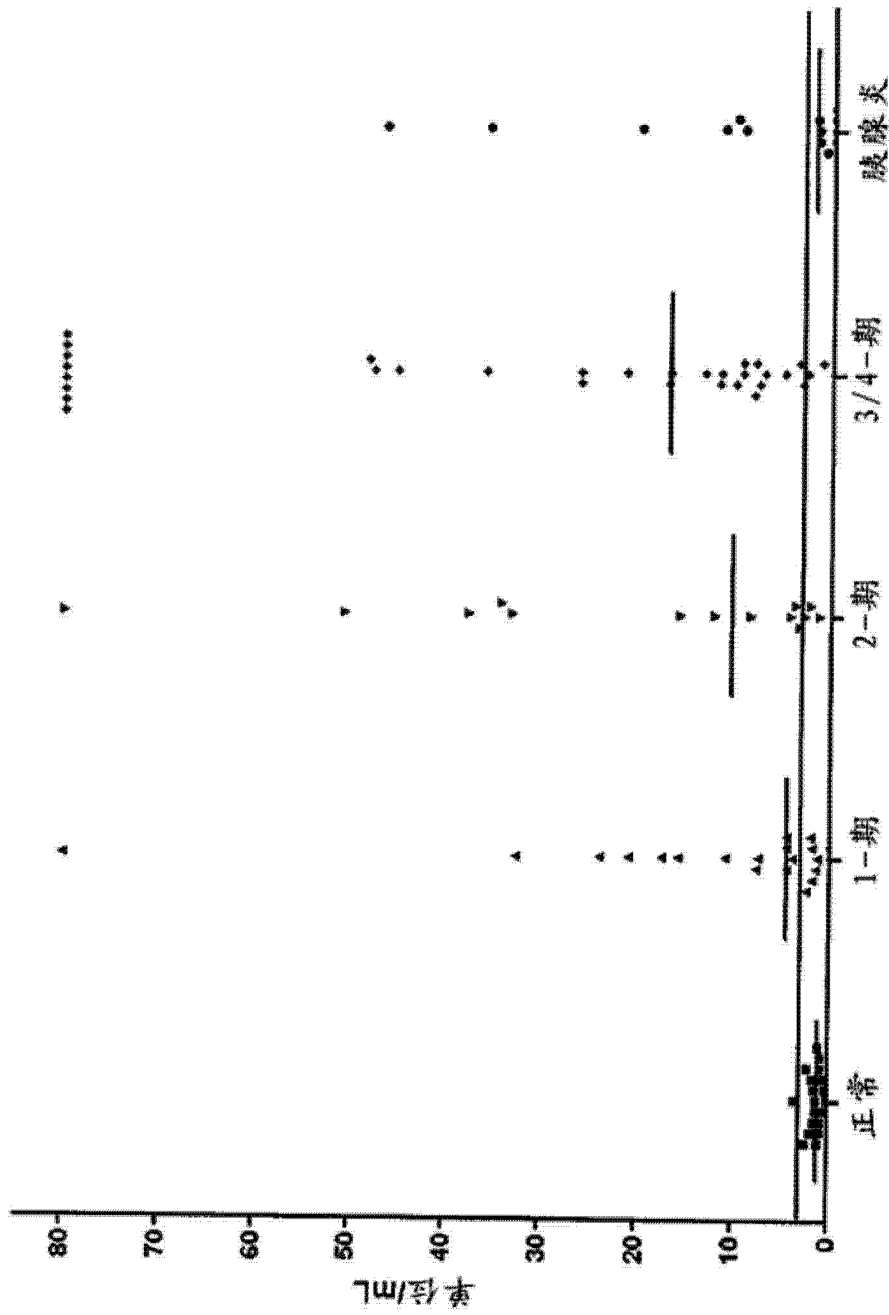


图 19

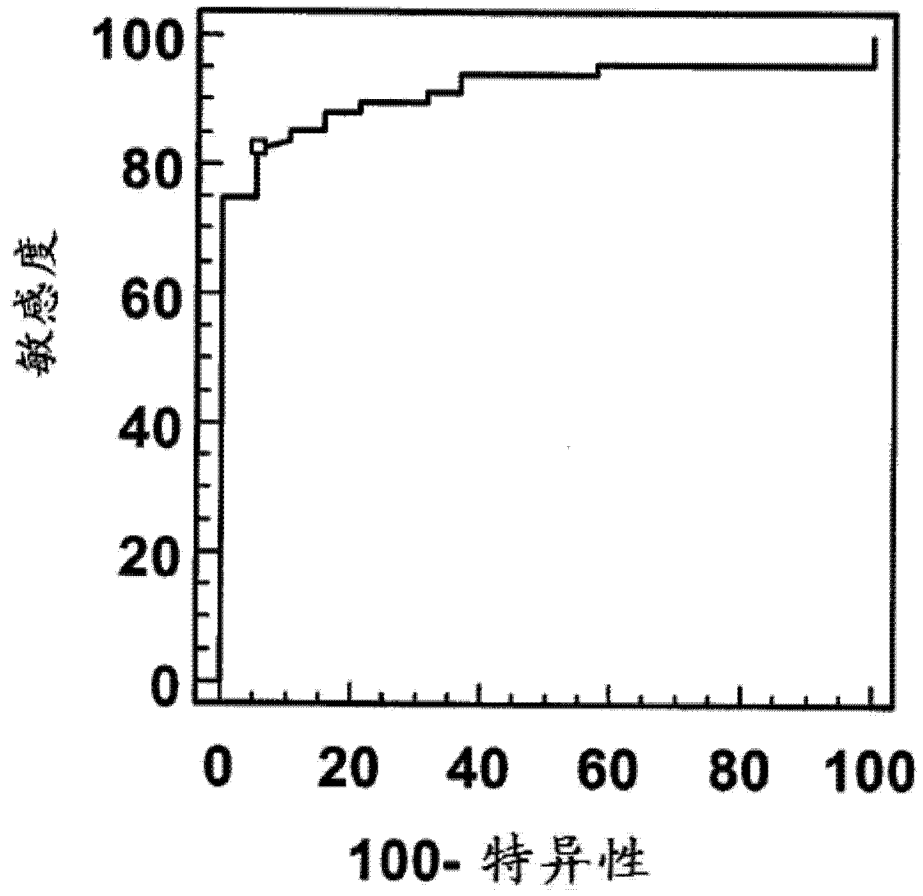


图 20

专利名称(译)	早期胰腺腺癌的检测		
公开(公告)号	<a href="#">CN102713623A</a>	公开(公告)日	2012-10-03
申请号	CN201180006262.3	申请日	2011-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
[标]发明人	DV戈德 DM戈登堡		
发明人	D·V·戈德 D·M·戈登堡		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00		
CPC分类号	G01N33/57488 C07K2317/31 A61K47/48746 C07K2317/565 G01N33/57438 C07K16/3092 A61K51/109 B82Y5/00 A61K51/0406 A61K51/088 C07K2317/55 A61K51/08 A61K51/0491 B82Y15/00 C07K2317/54 C07K16/44 A61K2039/507 C07K16/303 A61K2039/505 C07K2317/24 A61K47/6897 A61K49/0058 A61K51/1018 G01N2333/4725		
代理人(译)	郝文博		
优先权	61/297303 2010-01-22 US 61/323944 2010-04-14 US 61/350567 2010-06-02 US 61/375119 2010-08-19 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明描述了使用抗胰腺癌抗体或其片段，例如鼠、嵌合、人源化或人PAM4抗体的组合物和方法。题述抗体表现出许多新的并且有用的诊断特征，例如以高特异性结合到胰腺癌和其它癌症上，但不结合到正常胰腺组织上，以及结合到高百分比的早期胰腺癌上。在优选的实施方案中，所述抗体结合到胰腺癌粘蛋白上。所述抗体和片段可用于检测和诊断早期胰腺癌。在优选的实施方案中，所述抗胰腺癌抗体可用于血清样品的免疫测定，其中所述免疫测定可以检测血清中早期胰腺癌的标记。更优选在免疫测定前用有机相例如丁醇萃取血清。

