



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101743255 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 200880024518.1  
 (22) 申请日 2008.07.14  
 (30) 优先权数据  
 60/949,942 2007.07.16 US  
 (85) PCT申请进入国家阶段日  
 2010.01.13  
 (86) PCT申请的申请数据  
 PCT/CA2008/001289 2008.07.14  
 (87) PCT申请的公布数据  
 W02009/009882 EN 2009.01.22  
 (71) 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司  
 地址 瑞士巴塞尔  
 (72) 发明人 戴维·S·F·扬 海伦·P·芬德利  
 苏珊·E·哈恩  
 (74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
 公司 11021  
 代理人 王旭

(51) Int. Cl.  
 C07K 16/30(2006.01)  
 A61K 39/395(2006.01)  
 A61K 47/48(2006.01)  
 A61K 51/10(2006.01)  
 A61P 35/00(2006.01)  
 A61P 37/04(2006.01)  
 C07K 16/18(2006.01)  
 C07K 16/28(2006.01)  
 C07K 16/46(2006.01)  
 C07K 19/00(2006.01)  
 C12N 5/16(2006.01)  
 C12P 21/08(2006.01)  
 G01N 33/53(2006.01)  
 G01N 33/574(2006.01)  
 G01N 33/577(2006.01)

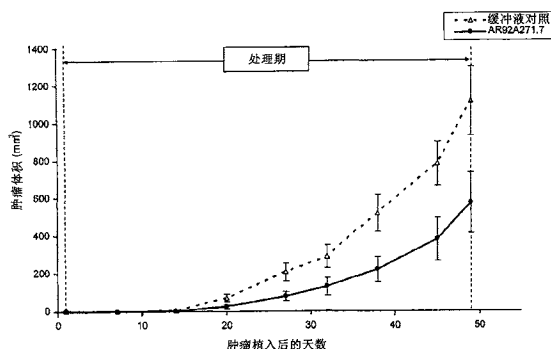
权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 3 页

(54) 发明名称

抗癌细胞毒性单克隆抗体

(57) 摘要

抗体介导的癌细胞杀死是治疗癌症的有效方法。当用肺腺癌细胞免疫时,筛选小鼠中产生的抗体,以获得作为终点的针对多种癌细胞系的细胞毒性。分离由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤 AR92A271.7 产生的抗癌细胞毒性单克隆抗体,其对肺癌细胞系具有细胞毒性,且在人肺癌的动物模型中减少肿瘤负荷。所述单克隆抗体还结合若干癌细胞系。存在单克隆抗体与非癌细胞系的低但可检测的结合,然而,在该非癌细胞系中不诱导细胞毒性。该单克隆抗体可以用于辅助对癌症进行分段和诊断,并且可以用来治疗原发瘤和肿瘤转移。所述细胞毒性单克隆抗体还可以用于将毒素、酶、放射性化合物、以及造血细胞递送到癌细胞,从而进一步辅助减少肿瘤负荷。



1. 由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体。
2. 由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体的人源化抗体,或由所述人源化抗体产生的抗原结合片段。
3. 由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体的嵌合抗体,或由所述嵌合抗体产生的抗原结合片段。
4. 以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的分离的杂交瘤细胞系。
5. 在选自人肿瘤的组织样品中起始抗体诱导的癌细胞细胞毒性的方法,所述方法包括:
  - 提供来自所述人肿瘤的组织样品;
  - 提供由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体,由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体的人源化抗体,由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体的嵌合抗体,或其 CDMAB,所述 CDMAB 特征在于竞争性抑制所述分离的单克隆抗体与其靶抗原结合的能力;和
  - 使所述分离的单克隆抗体、所述人源化抗体、所述嵌合抗体或其 CDMAB 与所述组织样品接触;
  - 其中所述分离的单克隆抗体、所述人源化抗体、所述嵌合抗体或其 CDMAB 与所述组织样品的结合诱导细胞毒性。
6. 权利要求 1 的分离的单克隆抗体的 CDMAB。
7. 权利要求 2 的人源化抗体的 CDMAB。
8. 权利要求 3 的嵌合抗体的 CDMAB。
9. 权利要求 1、2、3、6、7 或 8 中任一项的分离的抗体或其 CDMAB,所述分离的抗体或其 CDMAB 与选自由下列各项组成的组中的成员缀合:细胞毒性部分、酶、放射性化合物、和造血细胞。
10. 在哺乳动物中治疗易受抗体诱导的细胞毒性影响的人肿瘤的方法,其中所述人肿瘤表达抗原的至少一个表位,其特异性结合由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体或其 CDMAB,所述 CDMAB 特征在于竞争性抑制所述分离的单克隆抗体与其靶抗原结合的能力,所述方法包括对所述哺乳动物以有效导致所述哺乳动物肿瘤负荷减小的量施用所述单克隆抗体或所述其 CDMAB。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述分离的单克隆抗体与细胞毒性部分缀合。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述细胞毒性部分是放射性同位素。
13. 权利要求 10 的方法,其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 激活补体。
14. 权利要求 10 的方法,其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 介导抗体依赖性细胞毒作用。
15. 权利要求 10 的方法,其中所述分离的单克隆抗体是人源化的。
16. 权利要求 10 的方法,其中所述分离的单克隆抗体是嵌合的。
17. 一种单克隆抗体,其能够特异性结合与由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体结合的表位相同的一个或多个表位。
18. 在哺乳动物中治疗人肿瘤的方法,其中所述人肿瘤表达抗原的至少一个表位,其特异性结合由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体或其

CDMAB, 所述 CDMAB 特征在于竞争性抑制所述分离的单克隆抗体与其靶抗原结合的能力, 所述方法包括对所述哺乳动物以有效导致所述哺乳动物肿瘤负荷减小的量施用所述单克隆抗体或其 CDMAB。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体与细胞毒性部分缀合。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述细胞毒性部分是放射性同位素。

21. 权利要求 18 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 激活补体。

22. 权利要求 18 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 介导抗体依赖性细胞毒作用。

23. 权利要求 18 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体是人源化的。

24. 权利要求 18 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体是嵌合的。

25. 在哺乳动物中治疗人肿瘤的方法, 其中所述人肿瘤表达抗原的至少一个表位, 其特异性结合由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体或其 CDMAB, 所述 CDMAB 特征在于竞争性抑制所述分离的单克隆抗体与其靶抗原结合的能力, 所述方法包括对所述哺乳动物以有效导致所述哺乳动物肿瘤负荷减小的量施用与至少一种化疗剂联合的所述单克隆抗体或其 CDMAB。

26. 权利要求 25 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体与细胞毒性部分缀合。

27. 权利要求 26 的方法, 其中所述细胞毒性部分是放射性同位素。

28. 权利要求 25 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 激活补体。

29. 权利要求 25 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 介导抗体依赖性细胞毒作用。

30. 权利要求 25 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体是人源化的。

31. 权利要求 25 的方法, 其中所述分离的单克隆抗体是嵌合的。

32. 确定在选自人肿瘤的组织样品中的癌细胞存在的结合测定方法, 所述癌细胞特异性结合由具有 IDAC 保藏号 290507-04 的杂交瘤细胞系 AR92A271.7 生产的分离的单克隆抗体、由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体的人源化抗体、或由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体的嵌合抗体, 所述结合测定方法包括:

提供来自所述人肿瘤的组织样品;

提供至少一种所述分离的单克隆抗体、所述人源化抗体、所述嵌合抗体或其 CDMAB, 其识别与由具有 IDAC 保藏号 290507-04 的杂交瘤细胞系 AR92A271.7 生产的分离的单克隆抗体所识别的那些表位相同的一个或多个表位;

使至少一种所述提供的抗体或其 CDMAB 与所述组织样品接触; 和

确定所述至少一种所提供的抗体或其 CDMAB 与所述组织样品的结合;

由此指示所述癌细胞在所述组织样品中的存在。

33. 单克隆抗体用于减小人肿瘤负荷的应用, 其中所述人肿瘤表达抗原的至少一个表位, 其特异性结合由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体或其 CDMAB, 所述 CDMAB 特征在于竞争性抑制所述分离的单克隆抗体与其靶抗原结合的能力, 所述应用包括对所述哺乳动物以有效导致所述哺乳动物人肿瘤负荷减小的量施用所述单克隆抗体或其 CDMAB。

34. 权利要求 33 的方法,其中所述分离的单克隆抗体与细胞毒性部分缀合。
35. 权利要求 34 的方法,其中所述细胞毒性部分是放射性同位素。
36. 权利要求 33 的方法,其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 激活补体。
37. 权利要求 33 的方法,其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 介导抗体依赖性细胞毒作用。
38. 权利要求 33 的方法,其中所述分离的单克隆抗体是人源化的。
39. 权利要求 33 的方法,其中所述分离的单克隆抗体是嵌合的。
40. 单克隆抗体用于减小人肿瘤负荷的应用,其中所述人肿瘤表达抗原的至少一个表位,其特异性结合由以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤生产的分离的单克隆抗体或其 CDMAB,所述 CDMAB 特征在于竞争性抑制所述分离的单克隆抗体与其靶抗原结合的能力,所述应用包括对所述哺乳动物以有效导致所述哺乳动物人肿瘤负荷减小的量与至少一种化疗剂联合施用所述单克隆抗体或其 CDMAB。
41. 权利要求 40 的方法,其中所述分离的单克隆抗体与细胞毒性部分缀合。
42. 权利要求 41 的方法,其中所述细胞毒性部分是放射性同位素。
43. 权利要求 40 的方法,其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 激活补体。
44. 权利要求 40 的方法,其中所述分离的单克隆抗体或其 CDMAB 介导抗体依赖性细胞毒作用。
45. 权利要求 40 的方法,其中所述分离的单克隆抗体是人源化的。
46. 权利要求 40 的方法,其中所述分离的单克隆抗体是嵌合的。
47. 有效用于治疗人癌性肿瘤的组合物,所述组合物以组合方式包括:  
权利要求 1,2,3,6,7,8,或 17 中任一项的抗体或 CDMAB ;  
所述抗体或其抗原结合片段的缀合物,所述抗体或其抗原结合片段与选自由下列各项组成的组的成员缀合:细胞毒性部分、酶、放射性化合物、和造血细胞;和  
需要量的药用载体;  
其中所述组合物有效用于治疗所述人癌性肿瘤。

## 抗癌细胞毒性单克隆抗体

[0001] 合作研究协议声明

[0002] 本发明,如由本文的权利要求所限定,由参与 Arius 研究公司 (AriusResearch Inc.) 和 Takeda 药物有限公司 (Takeda Pharmaceutical Company Limited) 之间的联合研究协议 (“协议”) 的团体在该协议范围内进行的活动而产生的。该协议在本发明日期之前生效。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及分离和生产减轻癌性疾病的抗体 (CDMAB), 并且涉及这些 CDMAB 任选地与一种或多种化疗剂联合在治疗和诊断过程中的应用。本发明还涉及使用本发明的 CDMAB 的结合测定方法。

[0004] 发明背景

[0005] 作为癌症治疗的单克隆抗体:患有癌症的每个个体都是独特的,并且患有与其它癌症不同的癌症,正如个人的身份一样。尽管如此,目前的治疗法以相同的方法治疗患有同种类型的癌症、处于相同的阶段的所有患者。这些患者中至少有 30%将在一线治疗中失败,由此导致以后几轮的治疗和增加治疗失败、转移、以及最终死亡的可能性。较好的治疗方法应该是对于特定的个体量身定制的治疗法。目前本身适于量身定制的唯一的疗法是手术。化疗和放射治疗不能对患者进行量身定做,并且手术本身在大部分情形中不足以产生治愈。

[0006] 随着单克隆抗体的出现,由于每种抗体可以针对单个表位,则开发量身定制的治疗法的方法的可能性变得更加现实。此外,产生针对独特限定特定个体的肿瘤的表位群的抗体组合也是可能的。

[0007] 已经认识到在癌症细胞和正常细胞之间的显著不同是在于癌症细胞包含对转化的细胞特异的抗原,科学团体长期认为单克隆抗体可以设计成通过特异性与这些癌症抗原结合而特异性靶向转化的细胞;因此产生这样的信心:单克隆抗体可以作为“魔力子弹 (Magic Bullets)”来消除癌细胞。然而,现在广泛认识到,没有任何一种单个的单克隆抗体可以在所有癌症情形中起作用,并且单克隆抗体可以被配置为一类作为靶向癌症治疗。已经表明按照本文公开的发明的教导分离的单克隆抗体以有益于患者的方式减轻癌性疾病过程,例如通过减少肿瘤负荷的方式,并且在本文中应该不同地称为减轻癌性疾病的抗体 (CDMAB) 或“抗癌”抗体。

[0008] 目前,癌症患者通常具有很少的治疗选择。对癌症治疗法的管理方法已经在全球生存和发病率中产生了改善。然而,对于特定的个体,这些改善的统计学没有与他们个人情况的改善必然相关。

[0009] 因此,如果采用能够使执业者独立于处于同一团体中的其他患者而治疗每种肿瘤的方法,这将允许产生仅使治疗适合该名个体的独特方法。这样的治疗疗程理想地将增加治愈率,并且产生更好的结果,由此满足长期渴望的需要。

[0010] 历史上,多克隆抗体已经进行了应用,在治疗人类癌症中具有有限的成功。已经使

用人血浆治疗淋巴瘤和白血病,但是存在很少延长的好转或反应。此外,与化疗相比,缺少再现性,并且没有任何其它的益处。实体瘤诸如乳腺癌、黑素瘤和肾细胞癌也已经使用人血液、黑猩猩血清、人血浆和马血清进行治疗,具有相对不可预知的和无效的结果。

[0011] 对于实体瘤,已经存在单克隆抗体的许多临床试验。在 20 世纪 80 年代,对于人乳腺癌存在至少 4 种临床试验,其使用针对特异抗原的抗体或基于组织选择性,在至少 47 名患者中仅产生一名响应者。直到 1998 年才出现使用人源化的抗 Her2/neu 抗体 (**Herceptin<sup>®</sup>**)与顺铂组合的成功的临床试验。在该试验中,评估 37 名患者的响应,其中约四分之一具有部分响应率,另外四分之一具有较小或稳定的疾病发展。在所述响应者中对发展的中值时间是 8.4 个月,中值响应持续 5.3 个月。

[0012] **Herceptin<sup>®</sup>**在 1998 年核准与**Taxol<sup>®</sup>**组合用于一线应用。临床研究结果显示,与仅接受**Taxol<sup>®</sup>**的组(3.0 个月)相比,对于接受抗体治疗加**Taxol<sup>®</sup>**的那些的疾病发展的中值时间(6.9 个月)增加。在中值存活中也存在稍微的增加;对于**Herceptin<sup>®</sup>**加**Taxol<sup>®</sup>**治疗组相对于单独的**Taxol<sup>®</sup>**治疗组为 22 个月相对于 18 个月。另外,与单独的**Taxol<sup>®</sup>**相比较,在抗体加**Taxol<sup>®</sup>**组合组中,在完全(8%相对于 2%)和部分响应者(34%相对于 15%)的数量中存在增加。然而,与单独的**Taxol<sup>®</sup>**治疗相比较,用**Herceptin<sup>®</sup>**和**Taxol<sup>®</sup>**治疗导致更高的心脏中毒的发生(分别为 13%相对于 1%)。此外,**Herceptin<sup>®</sup>**治疗法只对过量表达(通过免疫组化(IHC)分析确定)人表皮生长因子受体 2(Her2/neu)的患者,患有转移乳腺癌的患者的大约 25%中有效;所述人表皮生长因子受体 2 是一种受体,其目前具有未知的功能或生物学重要的配体。因此,对于患有乳腺癌的患者仍然存在大量未满足的需求。即使可以受益于**Herceptin<sup>®</sup>**治疗的那些仍然需要化疗,并且因此仍然必须处理,至少在某种程度上,处理这种治疗的副作用。

[0013] 研究结肠直肠癌的临床试验包括针对糖蛋白和糖脂靶点的抗体。抗体如 17-1A,其对于腺癌具有某种特异性,已经在六十多名患者中进行了 2 期临床试验,仅有 1 名患者具有部分响应。在其它试验中,在使用额外的环磷酰胺的方案中,使用 17-1A 在 52 名患者中仅产生 1 例完全响应和 2 例较小的响应。迄今为止,17-1A 的 III 期临床试验尚未表现出作为 III 期结肠癌的辅助治疗的提高的功效。最初核准用于成像的人源化鼠单克隆抗体的应用也没有产生肿瘤衰减。

[0014] 仅在最近,使用单克隆抗体的结肠直肠癌临床研究产生了一些积极的结果。在 2004 年,**ERBITUX<sup>®</sup>**核准用于患有表达 EGFR 的转移结肠直肠癌的患者的二线治疗,所述患者对基于伊立替康的化疗不起反应(refractory)。来自两组(two-arm)II 期临床研究和单组研究的结果表明,**ERBITUX<sup>®</sup>**与伊立替康组合分别具有 23%和 15%的响应率,疾病发展的中值时间分别为 4.1 个月和 6.5 个月。来自同一两组 II 期临床研究和另一单组研究的结果表明,仅用**ERBITUX<sup>®</sup>**治疗分别导致 11%和 9%的响应率,疾病发展的中值时间分别为 1.5 个月和 4.2 个月。

[0015] 因此,在瑞士和美国,**ERBITUX<sup>®</sup>**与伊立替康组合治疗,并且在美国,单独的**ERBITUX<sup>®</sup>**治疗,已经被核准作为在一线伊立替康治疗中失败的结肠癌患者的二线治疗。因此,如同**Herceptin<sup>®</sup>**,在瑞士只核准治疗作为单克隆抗体和化疗的组合。另外,在瑞士和

美国只核准治疗作为二线治疗用于患者。此外,在 2004 年,AVASTIN<sup>®</sup>被核准与静脉内基于 5- 氟尿嘧啶的化疗组合用作转移性结肠直肠癌的一线治疗。III 期临床研究结果表现出与仅用 5- 氟尿嘧啶治疗的患者相比,用 AVASTIN<sup>®</sup>加 5- 氟尿嘧啶治疗的患者中值存活延长(分别为 20 个月相对于 16 个月)。然而,同样如同 Herceptin<sup>®</sup>和 ERBITUX<sup>®</sup>,治疗仅被核准作为单克隆抗体和化疗的组合。

[0016] 对于肺癌、脑癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和胃癌还继续存在极差的结果。对于非小细胞肺癌的最有希望的最近的结果来自 II 期临床试验,其中治疗包括与杀细胞药多柔比星缀合的单克隆抗体(SGN-15 ;dox-BR96,抗 - 唾液酸(sialyl)-LeX),其与化疗药 TAXOTERE<sup>®</sup>组合。TAXOTERE<sup>®</sup>是唯一一种 FDA 核准的化疗药,用于肺癌的二线治疗。原始数据显示与单独的 TAXOTERE<sup>®</sup>相比提高的整体存活时间。在本研究征募的 62 名患者中,三分之二接受 SGN-15 与 TAXOTERE<sup>®</sup>组合,而其余三分之一接受单独的 TAXOTERE<sup>®</sup>。对于接受 SGN-15 与 TAXOTERE<sup>®</sup>组合的患者,中值整体存活时间是 7.3 个月,而与之比较的接受单独的 TAXOTERE<sup>®</sup>的患者是 5.9 个月。对于接受 SGN-15 加 TAXOTERE<sup>®</sup>的患者的整体存活时间为 1 年和 18 个月的分别为 29%和 18%,而与之比较的对于接受单独的 TAXOTERE<sup>®</sup>的患者分别为 24%和 8%。计划了进一步的临床试验。

[0017] 临床前,对于黑素瘤使用单克隆抗体已经存在一些有限的成功。这些抗体中很少已经达到临床试验阶段,并且迄今为止没有一种已经被核准或在 III 期临床试验中表现出有利的结果。

[0018] 治疗疾病的新药的发现受到在 30,000 种已知的基因产物中缺少相关靶点的鉴定的阻碍,所述 30,000 种已知的基因可能有助于疾病的发病机理。在肿瘤学研究中,潜在的药物靶点通常由于它们在肿瘤细胞中过量表达的事实来简单地选择。然后筛选这样鉴定的靶点与多种化合物的相互作用。在潜在的抗体治疗的情形中,这些候选化合物通常衍生于根据 Kohler 和 Milstein 所述的基本原理(1975,自然(Nature),256,495-497, Kohler 和 Milstein)的单克隆抗体产生的常规方法。从用抗原(例如,全细胞,细胞级分,纯化的抗原)免疫的小鼠收集脾细胞,并且与无限增殖的杂交瘤配偶体融合。筛选所得到的杂交瘤,并且针对最亲和性地与所述靶点结合的抗体的分泌进行选择。针对癌细胞的许多治疗和诊断抗体,包括 Herceptin<sup>®</sup>和 RITUXIMAB,已经使用这些方法产生,并且基于它们的亲和性进行选择。这种方法中的缺点是双重的。首先,对治疗或诊断抗体结合选择适当的靶点受到关于组织特异性致癌过程的极少的知识以及用于鉴定这些靶点的所得到的过于单纯化的方法的限制,所述过于单纯化的方法如通过过量表达进行选择。第二,与受体以最大的亲和力结合的药物分子通常具有起始或抑制信号的最大可能性的假设可能不总是这种情形。

[0019] 尽管一些关于乳腺癌和结肠癌的治疗的进展,但是作为单一药剂或共同治疗的有效抗体治疗的鉴定和开发对于所有类型的癌症尚是不充足的。现有专利:

[0020] 美国专利号 5,750,102 公开这样一种方法,其中来自患者肿瘤的细胞用 MHC 基因转染,所述 MHC 基因可克隆自来自该患者的细胞或组织。然后,使用这些转染的细胞免疫该患者。

[0021] 美国专利号 4,861,581 公开这样一种方法,所述方法包括下列步骤:获得单克隆抗体,所述单克隆抗体对哺乳动物的肿瘤细胞和正常细胞的内部细胞成分是特异性的,但

是对外部成分不是特异性的；标记所述单克隆抗体，使所标记的抗体与已经接受治疗的哺乳动物组织接触以杀死肿瘤细胞；并且通过测量所标记的抗体与退化的肿瘤细胞的内部细胞成分的结合而确定治疗的功效。在制备针对人细胞内抗原的抗体时，专利权所有人认为恶性细胞代表这样的抗原的便利的来源。

[0022] 美国专利号 5, 171, 665 提供一种新型抗体及其生产方法。具体地，该专利教导形成这样的单克隆抗体，所述单克隆抗体具有与人肿瘤相关的蛋白质抗原例如结肠和肺的那些强结合而与正常细胞以弱得多的程度结合的能力。

[0023] 美国专利号 5, 484, 596 提供一种癌症治疗方法，所述方法包括从人癌症患者手术取出肿瘤组织，处理所述肿瘤组织以获得肿瘤细胞，辐射所述肿瘤细胞以成为存活的但非肿瘤发生性的，并且使用这些细胞制备用于患者的疫苗，所述疫苗能够抑制原发瘤的复发而且同时抑制转移。该专利教导开发与肿瘤细胞的表面抗原反应的单克隆抗体。如在第 4 栏 45 行等描述的，专利权所有人在开发用于人肿瘤形成的表达单克隆抗体的活性特异性免疫治疗中使用自生的肿瘤细胞。

[0024] 美国专利号 5, 693, 763 教导一种糖蛋白抗原，其是人癌症特有的，并且不依赖于起源的上皮组织。

[0025] 美国专利号 5, 783, 186 涉及在表达 Her2 的细胞中诱导程序性细胞死亡的抗-Her2 抗体，产生所述抗体的杂交瘤细胞系，使用所述抗体治疗癌症的方法和包括所述抗体的药物组合物。

[0026] 美国专利号 5, 849, 876 描述了用于产生针对黏蛋白抗原的单克隆抗体的新杂交瘤细胞系，所述黏蛋白抗原由肿瘤和非肿瘤组织来源纯化。

[0027] 美国专利号 5, 869, 268 涉及产生人淋巴细胞的方法，所述人淋巴细胞产生对目的抗原特异性的抗体，产生单克隆抗体的方法，以及由所述方法产生的单克隆抗体。该专利特别涉及有效用于癌症诊断和治疗的抗-HD 人单克隆抗体的生产。

[0028] 美国专利号 5, 869, 045 涉及与人癌症细胞反应的抗体、抗体片段、抗体缀合物和单链免疫毒素。这些抗体作用的机制是两面性的，原因在于分子与在人癌症表面上存在的细胞膜抗原反应，并且此外，原因在于所述抗体具有在癌症细胞内部内在化的能力，随后结合，使它们特别有效用于形成抗体-药物和抗体-毒素缀合物。在它们的未修饰形式中，所述抗体还在特定的浓度表现出细胞毒性特征。

[0029] 美国专利号 5, 780, 033 公开自体抗体用于肿瘤治疗和预防的应用。然而，这种抗体是来自年老的哺乳动物的抗核自体抗体。在这种情形中，认为该自体抗体是在免疫系统中发现的一种自然抗体类型。因为该自体抗体来自“年老的哺乳动物”，不存在所述自体抗体实际来自被治疗的患者的要求。另外，该专利公开了来自年老的哺乳动物的天然和单克隆抗核自体抗体，和产生单克隆抗核自体抗体的杂交瘤细胞系。

[0030] 发明概述

[0031] 本申请利用在 U. S. 6, 180, 357 专利中教导的生产患者特异性抗癌抗体的方法分离杂交瘤细胞系，所述杂交瘤细胞系编码减轻癌性疾病的单克隆抗体。这些抗体可以针对一种肿瘤特异性制备，并且因此使得癌症治疗的量身定制成为可能。在本申请的情形中，具有杀伤细胞（细胞毒性）或抑制细胞生长（抑制细胞）特性的抗癌抗体在下文中称为细胞毒性的。这些抗体可以用于辅助癌症的分阶段和诊断，并且可以用于治疗肿瘤转移。这些

抗体还可以用于通过预防治疗的方式用于预防癌症。与根据传统药物发现样本 (paradigm) 产生的抗体不同,以这种方式产生的抗体可以靶向这样的分子和途径,所述分子和途径先前没有显示出对于恶性组织的生长和 / 或存活是必需的。此外,这些抗体的结合亲和力适合起始可能不易受更强的亲和性相互作用影响的细胞毒性事件的需要。此外,将标准化疗形式如放射性核素与本发明的 CDMAB 缀合也在本发明的范围内,由此集中在所述化疗药物的应用。所述 CDMAB 也可以与毒素、细胞毒性部分、酶例如生物素缀合的酶、或造血细胞缀合,由此形成抗体缀合物。

[0032] 个体化的抗癌治疗的前景将在患者的管理方式中引起改变。可能的临床方案 (scenario) 是在出现时获得肿瘤样品,并且储存。从该样品,肿瘤可以由一组预先存在的减轻癌性疾病的抗体而分类。将患者进行常规分阶段,但是可用的抗体可以用于将患者进一步分阶段。患者可以立即用现有的抗体进行治疗,并且使用本发明描述的方法或通过利用噬菌体展示文库与本发明公开的筛选方法联合,可以产生一组对肿瘤特异性的抗体。由于其它肿瘤可能携带一些与被治疗的肿瘤相同的表位,故将产生的所有抗体加入到抗癌抗体文库中。按照该方法产生的抗体可以有效用于治疗许多患有与这些抗体结合的癌症的患者中的癌性疾病。

[0033] 除了抗癌抗体之外,患者可以选择接受目前推荐的治疗作为多形式治疗方案的一部分。通过本方法分离的抗体对非癌症细胞是相对无毒的事实允许以使用高剂量抗体组合,单独地,或与常规治疗组合使用。高治疗指数还允许在短时间范围内再次治疗,这应该降低耐受治疗的细胞出现的可能性。

[0034] 如果患者对初始的治疗疗程没有反应或发展了转移,则可以重复产生针对肿瘤的特异性抗体的方法,进行再次治疗。此外,所述抗癌抗体可以与从该患者获得的红血细胞缀合,并且重新输注用于治疗转移。对于转移癌存在很少有效的治疗,并且转移通常预示着导致死亡的最坏结果。然而,转移癌通常充分地血管化,通过红血细胞递送抗癌抗体可以具有将所述抗体集中在肿瘤部位的作用。甚至在转移之前,大部分癌症细胞依赖于宿主的血液供应它们的生存,并且与红血细胞缀合的抗癌抗体还可以有效针对原位肿瘤。备选地,所述抗体可以与其它造血细胞缀合,如淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞、天然杀伤细胞等。

[0035] 存在 5 类抗体,并且每类与其重链赋予的功能相关。通常认为由裸抗体杀伤癌症细胞通过抗体依赖性细胞毒作用或补体依赖性细胞毒性进行介导。例如,鼠 IgM 和 IgG2a 抗体可以通过结合补体系统的 C-1 成分而激活人补体,由此激活可以导致肿瘤消退的补体激活经典途径。对于人抗体,最有效的补体激活抗体通常是 IgM 和 IgG1。IgG2a 和 IgG3 同种型的鼠抗体有效募集具有 Fc 受体的细胞毒性细胞,其将导致由单核细胞、巨噬细胞、粒细胞和某些淋巴细胞进行的细胞杀伤。IgG1 和 IgG3 同种型的人抗体介导 ADCC。

[0036] 抗体介导的癌症杀伤的另一种可能的机制可以通过使用催化细胞膜中的不同化学键的水解的抗体以及其相关的糖蛋白或糖脂,即所谓的催化抗体进行。

[0037] 存在 3 种抗体 - 介导的癌症细胞杀伤的其它机制。第一种是使用抗体作为疫苗来诱导机体产生针对存在于癌症细胞上的推定的抗原的免疫反应。第二种是使用这样的抗体,所述抗体靶向生长受体,并且干扰它们的功能,或下调所述受体,以致有效地丧失其功能。第三种是所述抗体对细胞表面部分的直接连接的作用,所述细胞表面部分的直接连接可能导致直接的细胞死亡,诸如死亡受体如 TRAIL R1 或 TRAIL R2 的连接,或整联蛋白分子

如  $\alpha V \beta 3$  的连接等。

[0038] 癌症药物的临床应用基于所述药物在对患者的可接受的危险模式下的益处。在癌症治疗中,通常是在益处之后最追求生存,然而,除了延长生命之外,还存在许多其它公认的益处。这些其它的益处,其中治疗没有不利地影响生存,包括症状减轻,针对不利事件的保护,复发时间的延长或没有疾病的生存,并且延长发展的时间。这些标准通常被接受,并且管理团体如美国食品及药品管理局 (F. D. A.) 核准产生这些益处的药物 (Hirschfeld 等. 肿瘤学 / 血液学的重要综述 (Critical Reviews in Oncology/Hematology) 42 : 137-143 2002)。除了这些标准之外,公认还存在其它的可以预示这些类型的益处的终点 (endpoint)。部分地,由美国 F. D. A. 授予的加速的核准流程承认存在可能预测患者益处的替代品。到 2003 年年末,在这种流程下已经核准了 16 种药物,并且这些中有 4 种已经继续获得了完全的核准,即,随后的研究已经表明由替代品终点预测的直接的患者益处。确定药物在实体瘤中的作用的一个重要的终点是通过测量针对治疗的响应而评估肿瘤负荷 (Therasse 等. 国家癌症研究所杂志 (Journal of the National Cancer Institute) 92(3) : 205-216 2000)。关于所述评估的临床标准 (RECIST 标准) 已由癌症国际专家组实体瘤工作组的响应评估标准公布。与适当的对照组相比较,对肿瘤负荷具有证明的的作用的药物,如根据 RECIST 标准所述的目标响应所示,最终倾向于产生直接的患者益处。在临床前设定中,肿瘤负荷通常更直接进行评估和记录。因为临床前研究可以转换成临床设定,在临床前模型中产生延长的生存的药物具有最大的预测临床用途。与产生针对临床治疗的积极响应类似,在临床前设定中减少肿瘤负荷的药物还可能对疾病具有显著的直接影响。尽管延长生存是在癌症药物治疗的临床结果后最追求的,但是存在其它的益处,其具有临床应用,并且清楚地,可能与疾病发展的延迟、延长的生存或二者相关的肿瘤负荷减少还可以导致直接的益处和具有临床影响 (Eckhardt 等. 发展的治疗学: 目标化合物的临床试验设计成功与失败 (Developmental Therapeutics: Successes and Failures of Clinical Trial Designs of Targeted Compounds) ; ASCO 教育书, 第 39 次年会, 2003, 第 209-219 页)。

[0039] 本发明描述了 AR92A271.7 的开发和应用, AR92A271.7 通过其在细胞毒性测定中和在人癌症的动物模型中的作用而鉴定。本发明描述了这样的试剂, 所述试剂与靶分子上的一个或多个表位特异性结合, 且作为裸抗体还具有针对恶性肿瘤细胞而不针对正常细胞的体外细胞毒性特性, 并且其作为裸抗体还直接介导肿瘤生长的抑制。另一个进步是使用抗癌抗体诸如靶向表达同源抗原标记的肿瘤的抗体来获得肿瘤生长抑制, 以及其它积极的癌症治疗终点。

[0040] 总之, 本发明教导 AR92A271.7 抗原作为治疗剂靶标的应用, 在施用, 其可以在哺乳动物中减少表达所述抗原的癌症的肿瘤负荷。本发明还教导 CDMAB (AR92A271.7)、以及它们的衍生物、及其抗原结合片段、和其诱导细胞毒性的配体的应用, 其靶向它们的抗原, 以减少在哺乳动物中表达所述抗原的癌症的肿瘤负荷。此外, 本发明还教导在癌性细胞中检测 AR92A271.7 抗原的应用, 所述应用可以有效用于携带表达该抗原的肿瘤的哺乳动物的诊断、治疗预测、和预后。

[0041] 因此, 本发明的一个目的是利用产生针对来源于特定个体的癌性细胞或一种或多种特定的癌症细胞系的减轻癌性疾病的抗体 (CDMAB) 的方法, 以分离杂交瘤细胞系, 和所述杂交瘤细胞系编码的相对应的分离的单克隆抗体及其抗原结合片段, 所述 CDMAB 对于癌

症细胞是细胞毒性的,但是同时对于非癌性细胞相对是无毒的。

[0042] 本发明的另一个目的是教导减轻癌性疾病的抗体,其配体和抗原结合片段。

[0043] 本发明的另一个目的是产生减轻癌性疾病的抗体,其细胞毒性通过抗体依赖性细胞毒作用介导。

[0044] 本发明的另一个目的是产生减轻癌性疾病的抗体,其细胞毒性通过补体依赖性细胞毒作用介导。

[0045] 本发明的另一个目的是产生减轻癌性疾病的抗体,其细胞毒性是它们催化细胞的化学键水解的能力的功能。

[0046] 本发明的另一个目的是产生减轻癌性疾病的抗体,所述抗体有效用于癌症诊断、预后和监测的结合测定。

[0047] 本发明的其它目的和优点将通过下述描述变得清楚,其中通过举例说明和实施例的方式描述本发明的某些实施方案。

[0048] 附图简述

[0049] 图 1 比较杂交瘤上清针对细胞系 A549, NCI-H23, NCI-H460, MDA-MB-231 和 Hs888. Lu 的细胞毒性百分数和结合水平。

[0050] 图 2 描述 AR92A271.7 与癌症和正常细胞系的结合。将数据列表以将平均荧光强度表示为高于同种型对照增加的倍数。

[0051] 图 3 包括针对若干癌症和非-癌细胞系的 AR92A271.7 和抗-EGFR 抗体的代表性 FACS 柱状图。

[0052] 图 4 显示在预防性 A549 肺癌模型中 AR92A271.7 对肿瘤生长的作用。垂直的虚线表示施用抗体的时间期间。数据点表示平均值  $\pm$  SEM。

[0053] 图 5 显示在预防性 A549 肺癌模型中 AR92A271.7 对体重的影响。数据点表示平均值  $\pm$  SEM。

[0054] 发明详述

[0055] 一般地,当用于概述、描述、实施例和权利要求中时,下述词语或短语具有所示的定义。

[0056] 术语“抗体”以最宽泛的意义使用,并且特别涵盖,例如,单一的单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、和中和抗体、去免疫的(de-immunized)、鼠、嵌合的或人源化的抗体),具有多表位特异性的抗体组合物,单链抗体,免疫缀合物和抗体片段(见下文)。

[0057] 当用于本发明时,术语“单克隆抗体”是指从一群基本上均一的抗体获得的抗体,即,除了可能以较少量存在的可能天然存在的突变之外,构成(comprising)所述群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一的抗原性位点。此外,多克隆抗体制剂包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体,与所述多克隆抗体制剂相反,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性,因为单克隆抗体可以不被其它抗体污染地合成,所以单克隆抗体是有利的。修饰词“单克隆”表示该抗体的特征是从基本上均一的抗体群体获得,并且不被解释为抗体的生产需要通过任何特定的方法。例如,按照本发明使用的单克隆抗体可以通过由 Kohler 等,自然(Nature),256:495(1975)首先描述的杂交瘤(鼠或人)方法制备,或可以通过重组 DNA 方法(参见,例如,美国专利号 4,816,567)制备。“单克隆抗体”还可以从噬菌体抗体文库分离,例如,使用 Clackson 等,自然(Nature),352:

624-628(1991) 和 Marks 等, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.), 222 :581-597(1991) 中所述的技术。

[0058] “抗体片段”包括完整抗体的一部分, 优选地包括其抗原-结合或可变区。抗体片段的实例包括小于全长的抗体, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 和 Fv 片段; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子; 单链抗体, 单结构域抗体分子, 融合蛋白, 重组蛋白和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0059] “完整的”抗体是一种包括抗原-结合可变区以及轻链恒定结构域 (C<sub>L</sub>) 和重链恒定结构域 C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2 和 C<sub>H</sub>3 的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域 (例如, 人天然序列恒定结构域) 或其氨基酸序列变体。优选地, 完整的抗体具有一种或多种效应子功能。

[0060] 取决于它们的重链恒定结构域的氨基酸序列, 完整抗体可以指定为不同的“种类”。存在 5 种主要类别的完整抗体: IgA, IgD, IgE, IgG, 和 IgM, 并且它们中的一些可以进一步分成“亚类”(同种型), 例如, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 和 IgA2。与不同种类的抗体相对应的重链恒定结构域分别叫作  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , 和  $\mu$ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是公知的。

[0061] 抗体“效应子功能”是指归因于抗体的 Fc 区 (天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区) 的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括 C1q 结合; 补体依赖性细胞毒性; Fc 受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体 (例如, B 细胞受体; BCR) 的下调, 等。

[0062] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应, 其中表达 Fc 受体 (FcRs) 的非特异性细胞毒性细胞 (例如, 天然杀伤 (NK) 细胞, 嗜中性粒细胞, 和巨噬细胞) 识别在靶细胞上的结合的抗体, 并且随后引起该靶细胞的裂解。介导 ADCC 的主要细胞, 即 NK 细胞, 仅表达 Fc  $\gamma$  RIII, 而单核细胞表达 Fc  $\gamma$  RI, Fc  $\gamma$  RII 和 Fc  $\gamma$  RIII。FcR 在造血细胞上的表达总结在 Ravetch 和 Kinet, 免疫学年度综述 (Annu. Rev. Immunol) 9 : 457-92(1991) 的第 464 页表 3 中。为了评估目的分子的 ADCC 活性, 可以进行体外 ADCC 测定, 诸如在美国专利号 5, 500, 362 或 5, 821, 337 中所述的测定。对于所述测定有用的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。备选地, 或另外地, 目的分子的 ADCC 活性可以在体内进行评估, 例如, 在动物模型中, 诸如在 Clynes 等. PNAS(USA) 95 : 652-656(1998) 中公开的动物模型中。

[0063] “效应细胞”是表达一种或多种 FcRs 并且执行效应子功能的白细胞。优选地, 该细胞至少表达 Fc  $\gamma$  RIII 并且执行 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的实例包括外周血单核细胞 (PBMC), 天然杀伤 (NK) 细胞, 单核细胞, 细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞; 其中 PBMCs 和 NK 细胞是优选的。效应细胞可以从其天然来源分离, 例如, 从血液或 PBMCs 分离, 如本发明所述。

[0064] 术语“Fc 受体”或“FcR”用来描述结合抗体的 Fc 区的受体。优选的 FcR 是天然人 FcR 序列。此外, 优选的 FcR 是一种结合 IgG 抗体的 FcR ( $\gamma$  受体), 并且包括 Fc  $\gamma$  RI, Fc  $\gamma$  RII, 和 Fc  $\gamma$  RIII 亚类的受体, 包括等位基因变体和这些受体的可变剪接形式。Fc  $\gamma$  RII 受体包括 Fc  $\gamma$  RIIA (“激活受体”) 和 Fc  $\gamma$  RIIB (“抑制受体”), 它们具有主要在它们的细胞质结构域不同的相似的氨基酸序列。激活受体 Fc  $\gamma$  RIIA 在其细胞质结构域包含免疫受体基于酪氨酸的激活基序 (ITAM)。抑制受体 Fc  $\gamma$  RIIB 在其细胞质结构域包含免疫受体基于

酪氨酸的抑制基序 (ITIM)。(参见在 M. Daéron, 免疫学年度综述 (Annu. Rev. Immunol.) 15 : 203-234(1997) 中的综述)。FcRs 在 Ravetch 和 Kinet, 免疫学年度综述 (Annu. Rev. Immunol) 9 :457-92(1991); Capel 等, 免疫学方法 (Immunomethods) 4 :25-34(1994); 和 de Haas 等, 实验室临床医学杂志 (J. Lab. Clin. Med.) 126 :330-41(1995) 中综述。其它 FcRs, 包括将在将来鉴定的那些, 包含在本发明的术语“FcR”中。该术语还包括新生儿受体, FcRn, 其负责将母亲的 IgGs 转运到胎儿 (Guyer 等, 免疫学杂志 (J. Immunol.) 117 :587(1976) 和 Kim 等, 欧洲免疫学杂志 (Eur. J. Immunol.) 24 :2429(1994))。

[0065] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在存在补体的条件下分子裂解靶点的能力。补体激活途径通过补体系统的第一成分 (C1q) 同与同源抗原复合的分子 (例如, 抗体) 的结合而起始。为了评估补体激活, 可以进行 CDC 测定, 例如, 如在 Gazzano-Santoro 等, 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods) 202 :163(1996) 中所述。

[0066] 术语“可变”是指这样的事实, 即可变结构域的某些部分在序列上在抗体之间大量不同, 并且用在每种特定的抗体对于其特定的抗原的结合和特异性中。然而, 在抗体的整个可变结构域中可变性不是均匀分布的。它集中在轻链和重链可变结构域内称为高变区的三个片段中。可变结构域的更高度保守的部分称为构架区 (FRs)。天然重链和轻链的可变结构域分别包括 4 个 FRs, 其主要采取  $\beta$ -折叠构型, 通过三个高变区连接, 其形成环连接, 并且在某些情形中形成  $\beta$ -折叠结构的一部分。每条链中的高变区通过 FRs 紧密相邻保持在一起, 并且与另一条链的高变区一起有助于形成抗体的抗原-结合位点 (见 Kabat 等, 免疫学兴趣的蛋白的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版. 公共卫生服务 (Public Health Service), 全国卫生研究所 (National Institutes of Health), Bethesda, Md. pp15-17 ;48-53(1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合, 但是表现出多种效应子功能, 诸如在抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 中的抗体参与。

[0067] 当用于本发明时, 术语“高变区”是指抗体负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包括来自“互补性决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (例如, 在轻链可变结构域中的残基 24-34(L1), 50-56(L2) 和 89-97(L3) 和在重链可变结构域中的 31-35(H1), 50-65(H2) 和 95-102(H3); Kabat 等, 免疫学兴趣的蛋白的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版. 公共卫生服务 (Public Health Service), 全国卫生研究所 (National Institutes of Health), Bethesda, Md. pp 15-17 ;48-53(1991)) 和 / 或来自“高变环”的那些残基 (例如, 在轻链可变结构域中的残基 26-32(L1), 50-52(L2) 和 91-96(L3) 和在重链可变结构域中的 26-32(H1), 53-55(H2) 和 96-101(H3); Chothia 和 Lesk, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 196 :901-917(1987))。“构架区”或“FR”残基是除了如本文所定义的所述高变区残基之外的那些可变结构域残基。木瓜蛋白酶消化抗体产生两种相同的抗原-结合片段, 其称为“Fab”片段, 每个具有单个抗原-结合位点, 和剩余的“Fc”片段, 它的名称反应了它容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生  $F(ab')_2$  片段, 其具有两个抗原-结合位点, 并且仍然能够交联抗原。

[0068] “Fv”是包含完整的抗原-识别和抗原-结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密、非共价缔合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体组成。正是在这种构型中每个可变结构域的三个高变区相互作用, 以限定在  $V_H$ - $V_L$  二聚体表面上的抗原-结合位点。笼统地, 6 个高变区赋予抗体的抗原-结合特异性。然而, 甚至单个可变结构域 (或仅包括对抗

原特异的 3 个高变区的 Fv 的一半) 具有识别和结合抗原的能力, 尽管是以比完整的结合位点低的亲和力结合。Fab 片段还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域 (CH I)。Fab' 片段不同于 Fab 片段, 其通过在重链 CH1 结构域的羧基端添加几个残基而不同, 所述添加的残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab' -SH 在本发明中是 Fab' 的名称, 其中恒定结构域的半胱氨酸残基携带至少一个游离的巯基 (thiol) 基团。F(ab')<sub>2</sub> 抗体片段最初作为一对 Fab' 片段产生, 其在它们之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0069] 基于它们的恒定结构域的氨基酸序列, 来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”可以被指定为两种明显不同的类型中的一种, 所述两种明显不同的类型称为 kappa (κ) 和 lambda (λ)。

[0070] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包括抗体的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 结构域, 其中这些结构域存在于单一的多肽链中。优选地, Fv 多肽还包括在 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 结构域之间的多肽连接体, 其使得 scFv 能够形成用于抗原结合的理想结构。对于 scFv 的综述, 参见 Plückthun, 在单克隆抗体的药理学 (The Pharmacology of Monoclonal Antibodies) 中, 卷 113, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, 纽约, 第 269-315 页 (1994)。

[0071] 术语“双抗体”是指具有两个抗原-结合位点的小抗体片段, 所述片段包括与在同一多肽链 (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) 中的可变轻链结构域 (V<sub>L</sub>) 连接的可变重链结构域 (V<sub>H</sub>)。通过使用太短而不允许在同一条链中的两个结构域之间成对的连接体, 迫使所述结构域与另一条链的互补结构域成对, 并且产生两个抗原-结合位点。例如, 在 EP 404, 097; WO 93/11161; 和 Hollinger 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 90 :6444-6448 (1993) 中更充分地描述了双抗体。

[0072] “分离的”抗体是一种已经被鉴定并且与其天然环境的成分分离和 / 或从中回收的抗体。它的天然环境的污染成分是干扰抗体的诊断或治疗应用的物质, 并且可以包括酶、激素、和其它蛋白或非蛋白溶质。因为将不存在抗体天然环境的至少一种成分, 分离的抗体包括在重组细胞内原位的抗体。然而, 一般地, 分离的抗体应该通过至少一个纯化步骤制备。

[0073] 与目的抗原“结合”的抗体是一种能够以充足的亲和力结合所述抗原的抗体, 以便所述抗体通过靶向表达所述抗原的细胞而有效用作治疗或诊断剂。在所述抗体是一种结合抗原性部分的抗体的情形中, 与其它受体相反, 它通常优先结合所述抗原性部分, 并且不包括偶然发生的结合, 如非特异性 Fc 接触, 或不包括与其它抗原所常见的翻译后修饰结合, 并且可以是一种不与其它蛋白显著交叉反应的抗体。用于检测与目的抗原结合的抗体的方法在本领域中是公知的, 并且可以包括, 但不限于, 如 FACS、细胞 ELISA 和蛋白质印迹的测定。

[0074] 当用于本发明时, 表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换地使用, 并且所有这样的名称包括后代。还应该理解, 由于故意的或偶然的突变, 所有的后代在 DNA 内容物上可能不是精确相同的。包括在初始转化的细胞中筛选的具有相同功能或生物学活性的突变的后代。这将通过使用不同名称的上下文变得清楚。

[0075] “治疗或处理”是指治疗性治疗和预防或预防性措施, 其中目的是预防或减缓 (减轻) 目的病理症状或病症。需要治疗的那些包括已经患有病症的那些, 以及倾向于患有病症的那些, 或要预防病症的那些。因此, 在本发明中待治疗的哺乳动物可以已经诊断患有病

症或可以是倾向于或易受病症影响的。

[0076] 术语“癌症”和“癌性的”是指或描述哺乳动物中的生理状况，所述生理状况的典型特征在于失控的细胞生长或死亡。癌症的实例包括，但不限于，癌，淋巴瘤，胚细胞瘤，肉瘤，和白血病或淋巴恶性病。所述癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌（例如，上皮鳞状细胞癌），肺癌，包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌，腹膜癌，肝细胞癌，胃癌 (gastric or stomach cancer)，包括胃肠癌，胰腺癌，成胶质细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，肝细胞瘤，乳腺癌，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾脏或肾癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝的癌症，肛门癌，阴茎癌，以及头颈癌。

[0077] “化疗剂”是有效用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的实例包括烷基化试剂，如塞替派和环磷酰胺 (CYTOXAN™)；烷基磺酸酯如白消安，英丙舒凡，和派泊舒凡；吡啶类如苯佐替派 (benzodopa)，卡波醌，美妥替派 (meturedopa)，和乌瑞替派 (uredopa)；ethylenimines 和 methylamelamines，包括六甲蜜胺，曲他胺，三亚乙基磷酰胺，塞替派 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine)；氮芥 (nitrogen mustards) 如苯丁酸氮芥，萘氮芥 (chlornaphazine)，cholophosphamide，雌莫司汀，异环磷酰胺，氮芥 (mechlorethamine)，盐酸氧氮芥，美法仑，新氮芥，苯芥胆甾醇，泼尼莫司汀，曲磷胺，乌拉莫司汀；亚硝基脲 (nitrosureas) 如卡莫司汀，氯脲菌素，福莫司汀，洛莫司汀，尼莫司汀，雷莫司汀；抗生素如阿克拉霉素 (aclacinomysins)，放线菌素，authramycin，偶氮丝氨酸，博来霉素，放线菌素 C，calicheamicin，carabycin，carnomycin，嗜癌霉素，色霉素，放线菌素 D，柔红霉素，地托比星，6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸，多柔比星，表柔比星，依索比星，伊达比星，马塞罗霉素，丝裂霉素，麦考酚酸，诺拉霉素，橄榄霉素，培洛霉素，potfiromycin，嘌罗霉素，三铁阿霉素，罗多比星，链黑霉素，链佐星，杀结核菌素，乌苯美司，净司他丁，佐柔比星；抗代谢物如甲氨喋呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU)；叶酸类似物如 denopterin，甲氨喋呤，喋罗呤，三甲曲沙；嘌呤类似物如氟达拉滨，6-巯鸟嘌呤，thiamiprine，硫鸟嘌呤；嘧啶类似物如安西他滨，阿扎胞苷，6-氮尿苷，卡莫氟，阿糖胞苷，二脱氧尿苷，去氧氟尿苷，依诺他滨，氟尿苷，5-FU；雄激素诸如卡普睾酮，屈他雄酮丙酸盐，环硫雄醇，美雄烷，睾内酯；抗肾上腺药 (anti-adrenals) 如氨鲁米特，米托坦，曲洛司坦；叶酸补偿物如 frolinic acid；醋葡醛内酯；羟醛磷酰胺配糖 (aldophosphamideglycoside)；5-氨基酮戊酸；安吡啶；bestrabucil；比生群；依达曲沙 (edatraxate)；defofamine；秋水仙胺；地吡醌；elformithine；依利醋铵；依托格鲁；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖；氯尼达明；米托胍脲；米托蒽醌；莫派达醇；尼曲吡啶；喷司他丁；异丙嗪 (phenamet)；吡柔比星；鬼臼酸；2-乙基酰肼 (2-ethylhydrazide)；丙卡巴肼；PSK®；雷佐生；西佐喃；锳螺胺；细格孢氮杂酸；三亚胺醌；2,2',2''-三氯三乙胺；乌拉坦 (urethan)；长春地辛；达卡巴嗪；甘露莫司汀；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；派泊溴烷；gacytosine；阿拉伯糖苷 (“Ara-C”)；环磷酰胺；塞替派；紫杉烷类，例如，紫杉醇 (TAXOL®，Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, 新泽西) 和多西他赛 (TAXOTERE®，Aventis, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, 法国)；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-巯鸟嘌呤；硫鸟嘌呤；甲氨喋呤；铂类似物如顺铂和卡铂；长春碱；铂；依托泊苷 (VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素 C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本；诺消灵 (novantrone)；替尼泊苷；道诺霉素；氨喋呤；适罗达；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑

制剂 RFS 2000 ;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO) ;视黄酸 ;esperamicins ;卡培他滨 ;以及任何上述物质的药用盐、酸或衍生物。下列物质也包含在本定义中,它们是 :作用调控或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素药剂,诸如抗雌激素药,包括例如他莫昔芬,雷洛昔芬,抑制芳香酶的 4(5)-咪唑,4-羟基他莫昔芬,曲沃昔芬,keoxifene, LY117018,奥那司酮,和托瑞米芬 (Fareston) ;和抗雄激素药诸如氟他胺,尼鲁米特,比卡鲁胺,亮丙立德,和戈舍瑞林 ;以及任何上述物质的药用盐、酸或者衍生物。

[0078] 用于治疗目的的“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人,小鼠,SCID,或裸鼠或小鼠品系,家畜和农场动物,以及动物园、运动或宠物动物,诸如绵羊、狗、马、猫、牛、等等。在本发明中优选地,所述哺乳动物是人。

[0079] “寡核苷酸”是长度短的、单链或双链的多脱氧核苷酸,其通过已知方法化学合成 (如磷酸三酯、亚磷酸酯、或亚磷酸酰胺化学,使用固相技术,如在 1988 年 5 月 4 日公布的 EP 266,032 中所述的,或通过脱氧核苷 H-磷酸酯中间物,如 Froehler 等,核酸研究 (Nucl. Acids Res.),14 :5399-5407,1986 所述)。然后在聚丙烯酰胺凝胶上纯化它们。

[0080] 按照本发明,非人 (例如鼠) 免疫球蛋白的“人源化的”和 / 或“嵌合的”形式是指这样的抗体,所述抗体包含特异的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段 (如 Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 或抗体的其它抗原-结合亚序列),与原始抗体相比较,其导致人抗-小鼠抗体 (HAMA)、人抗-嵌合抗体 (HACA) 或人抗-人抗体 (HAHA) 反应的减少,并且所述抗体包含来源于所述非人免疫球蛋白的、对再现所需要的作用是必需的必需部分 (例如,一个或多个 CDR(s)、抗原结合区、可变结构域等),同时保留与所述非人免疫球蛋白相当的结合特征。对于大部分,人源化的抗体是这样的人免疫球蛋白 (受体抗体),其中来自该受体抗体互补性决定区 (CDRs) 的残基被来自非人物种 (供体抗体) CDRs 的、具有需要的特异性、亲和性和能力的残基取代,所述非人物种如小鼠、大鼠或兔。在一些情形中,人免疫球蛋白的 Fv 构架区 (FR) 残基被相对应的非人 FR 残基取代。此外,所述人源化的抗体可以包括在受体抗体和在所引入的 CDR 或 FR 序列中都找不到的残基。进行这些修饰以进一步限定和最优化抗体性能。通常,所述人源化的抗体应该包括基本上不少于至少一个、和典型地两个可变结构域,其中所有或基本上所有的 CDR 区与非人免疫球蛋白的那些相对应,并且所有或基本上所有的 FR 残基是人免疫球蛋白共有序列的那些。所述人源化抗体优化地还应该包括至少一部分免疫球蛋白恒定区 (Fc),典型地是人免疫球蛋白的恒定区。

[0081] “去免疫的 (De-immunized)”抗体是对于给定的物种是无免疫原性的或较少免疫原性的免疫球蛋白。去免疫可以通过抗体的结构改变实现。可以使用本领域技术人员已知的任何去免疫技术。例如,用于使抗体去免疫性的一种适宜的技术记述在于 2000 年 6 月 15 日公布的 WO 00/34317 中。

[0082] 诱导“程序性细胞死亡”的抗体是一种通过任何方式诱导程序性细胞死亡的抗体,所述方式示例而不仅限于,膜联蛋白 V 的结合,胱天蛋白酶活性, DNA 的片段化,细胞收缩,内质网膨胀,细胞片段化和 / 或膜囊泡的形成 (称为凋亡小体)。

[0083] 当用于本文时,“抗体诱导的细胞毒性”应该理解为意指来源于由杂交瘤产生的杂交瘤上清或抗体的细胞毒性作用,所述作用不必与结合程度相关,所述杂交瘤以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC。

[0084] 在整个说明书中,备选地,杂交瘤细胞系以及由其产生的分离的单克隆抗体由它

们的内部命名 AR92A271.7 或保藏命名 IDAC 290507-04 指示。

[0085] 当用于本文时，“抗体-配体”包括这样的部分，所述部分表现出针对靶抗原的至少一个表位的结合特异性，并且其可以是完整的抗体分子、抗体片段、以及至少具有它的抗原-结合区或部分（即，抗体分子的可变部分）的任何分子，例如，Fv 分子，Fab 分子，Fab' 分子，F(ab')<sub>2</sub> 分子，双特异性抗体，融合蛋白，或特异性识别和结合由分离的单克隆抗体结合的抗原的至少一个表位的任何遗传工程分子，所述分离的单克隆抗体由命名为 IDAC290507-04 (IDAC 290507-04 抗原) 的杂交瘤细胞系产生。

[0086] 当用于本文时，“减轻癌性疾病的抗体” (CDMAB) 是指这样的单克隆抗体及其抗体-配体，所述单克隆抗体以有益于患者的方式减轻癌性疾病过程，例如，通过减少肿瘤负荷或延长肿瘤携带个体的生存的方式。

[0087] 当用于本文时，“抗原-结合区”意指分子识别靶抗原的部分。

[0088] 当用于本文时，“竞争性抑制”意指使用常规的交互 (reciprocal) 抗体竞争测定 (Belanger L., Sylvestre C. 和 Dufour D. (1973), 通过竞争性和夹心方法对  $\alpha$  胎蛋白的酶联免疫测定 (Enzyme linked immunoassay for alphafetoprotein by competitive and sandwich procedures). Clinica Chimica Acta 48,15) 能够识别和结合这样的决定簇位点，所述决定簇位点是由命名为 IDAC290507-04 的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体 (IDAC 290507-04 抗体) 所针对的。

[0089] 当用于本文时，“靶抗原”是 IDAC 290507-04 抗原或其部分。

[0090] 当用于本文时，“免疫缀合物”意指任何分子或 CDMAB，如与细胞毒素、放射性试剂、酶、毒素、抗肿瘤药或治疗药剂化学或生物学连接的抗体。所述抗体或 CDMAB 可以在分子的任何位置处与所述细胞毒素、放射性试剂、肿瘤药或治疗药物连接，只要它能够结合其靶点。免疫缀合物的实例包括抗体毒素化学缀合物和抗体-毒素融合蛋白。

[0091] 当用于本文时，“融合蛋白”意指任何嵌合蛋白，其中抗原结合区与生物活性分子如毒素、酶、或蛋白药物连接。

[0092] 为了更充分地理解本文所述的本发明，进行了下述描述。

[0093] 本发明提供特异性识别和结合 IDAC 290507-04 抗原的 CDMAB (即，IDAC 290507-04 CDMAB)。

[0094] 通过以保藏号 290507-04 保藏在 IDAC 的杂交瘤产生的分离的单克隆抗体的 CDMAB 可以以任何形式存在，只要它具有这样的抗原-结合区，所述抗原-结合区竞争性抑制由杂交瘤 IDAC 290507-04 产生的分离的单克隆抗体与其靶抗原的免疫特异性结合。因此，具有与 IDAC 290507-04 抗体相同的结合特异性的任何重组蛋白 (例如，融合蛋白，其中所述抗体与第二蛋白如淋巴因子或肿瘤抑制性生长因子结合) 均落入本发明的范围内。

[0095] 在本发明的一个实施方案中，所述 CDMAB 是 IDAC 290507-04 抗体。

[0096] 在其它实施方案中，所述 CDMAB 是抗原结合片段，其可以是 Fv 分子 (如单链 Fv 分子)、Fab 分子、Fab' 分子、F(ab')<sub>2</sub> 分子、融合蛋白、双特异性抗体、异种抗体或具有 IDAC 290507-04 抗体的抗原-结合区的任何重组分子。本发明的 CDMAB 针对所述 IDAC 290507-04 单克隆抗体针对的表位。

[0097] 本发明的 CDMAB 可以在分子内进行修饰，即，通过氨基酸修饰，以产生衍生物分子。化学修饰也可以是可能的。

[0098] 衍生物分子将保留所述多肽的功能特性,即,具有这样的取代的分子仍然允许所述多肽与所述 IDAC 290507-04 抗原或其部分结合。

[0099] 这些氨基酸取代包括,但不必要限于,本领域内已知为“保守的”氨基酸取代。

[0100] 例如,充分确定的蛋白质化学原理认为,通常可以在蛋白质内进行称为“保守氨基酸取代”的特定的(certain)氨基酸取代,而不改变该蛋白质的构象或功能。

[0101] 这样的变化包括用异亮氨酸(I),缬氨酸(V),和亮氨酸(L)中的任一种取代这些疏水性氨基酸中的任意其它一种;用天冬氨酸(D)取代谷氨酸(E),并且反之亦然;用谷氨酰胺(Q)取代天冬酰胺(N),并且反之亦然;和用丝氨酸(S)取代苏氨酸(T),并且反之亦然。其它取代也可以被认为是保守的,这取决于特定氨基酸的环境及其在蛋白质的三维结构中的作用。例如,甘氨酸(G)和丙氨酸(A)常常可以互换,同样丙氨酸和缬氨酸(V)也可以互换。相对疏水性的甲硫氨酸(M)常常可以与亮氨酸和异亮氨酸互换,并且有时可以与缬氨酸互换。赖氨酸(K)和精氨酸(R)常常在这样的情形中互换,在所述情形中,氨基酸残基的重要特征是其电荷,并且这两种氨基酸残基的不同的 pK' s 并不显著。在特定的情形中,还有其它的变化可以被认为是“保守的”。

[0102] 实施例 1

[0103] 杂交瘤生产 —— 杂交瘤细胞系 AR92A271.7

[0104] 依据布达佩斯条约,杂交瘤细胞系 AR92A271.7 于 2007 年 5 月 29 日保藏在加拿大国际保藏机构(the International Depository Authority of Canada, IDAC),加拿大卫生部微生物局(Bureau of Microbiology, Health Canada)(加拿大,马尼托巴省,温尼伯, Arlington 街 1015, R3E 3R2),保藏号为 290507-04。依据 37CFR 1.808,保藏者保证在授予专利时,施加在所保藏的材料公众可获得性上的所有约束均不能撤销。如果保藏机构不能发放存活的样品,替换保藏品。

[0105] 为了产生生产抗癌抗体 AR92A271.7 的杂交瘤,在 PBS 中制备冷冻的人肺腺癌肿瘤组织(Genomics Collaborative, Cambridge, MA)的单细胞混悬液。通过轻轻混合制备 IMMUNEASY™(Qiagen, Venlo, 荷兰)佐剂用于使用。通过皮下注射在 50 微升的抗原佐剂中的 200 万个细胞而免疫 5-7 周龄的 BALB/c 小鼠。在初次免疫后 2 和 5 周,用新鲜制备的抗原佐剂对免疫的小鼠进行腹膜内加强,浓度为 200 万个细胞 /50 微升。在最后一次免疫后 3 天,使用脾脏进行融合。通过将分离的脾细胞与 NS0-1 骨髓瘤配偶体融合而制备杂交瘤。对杂交瘤亚克隆,检测来自融合物的上清。

[0106] 为了确定该杂交瘤细胞分泌的抗体是 IgG 还是 IgM 同种型,使用 ELISA 测定。在 4°C 在 ELISA 平板中加入 100 微升 / 孔的山羊抗 - 小鼠 IgG+IgM(H+L) 过夜,所述山羊抗 - 小鼠 IgG+IgM(H+L) 在包被缓冲液(0.1M 碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液, pH 9.2-9.6)中,浓度 2.4 微克 / mL。将平板用洗涤缓冲液(PBS+0.05%吐温)洗涤 3 次。向平板加入 100 微升 / 孔的封闭缓冲液(在洗涤缓冲液中 5%牛奶),在室温下 1 小时,然后在洗涤缓冲液中洗涤 3 次。加入 100 微升 / 孔的杂交瘤上清,并且将平板在室温下温育 1 小时。平板用洗涤缓冲液洗涤 3 次,并且加入山羊抗 - 小鼠 IgG 或 IgM 辣根过氧化物酶缀合物的 1/100,000 稀释液(稀释在含有 5%牛奶的 PBS 中),100 微升 / 孔。在将平板在室温下温育 1 小时后,将平板用洗涤缓冲液洗涤 3 次。将 100 微升 / 孔的 TMB 溶液在室温下温育 1-3 分钟。加入 50 微升 / 孔 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止颜色反应,并且用 Perkin-Elmer HTS7000 平板读数仪在 450nm 下对

平板读数。如在图 1 中所示, AR92A271.7 杂交瘤主要分泌 IgG 同种型的抗体。

[0107] 为了确定由所述杂交瘤细胞分泌的抗体的亚类, 使用小鼠单克隆抗体同种型试剂盒 (HyCult 生物技术 (HyCult Biotechnology), Frontstraat, 荷兰) 进行同种型分型实验。将 500 微升缓冲液加入到包含大鼠抗 - 小鼠亚类特异性抗体的检测试验条 (test strip)。将 500 微升杂交瘤上清液加入到检测管, 并通过轻轻搅动浸没。通过与胶体粒子偶联的第二大鼠单克隆抗体直接检测捕获的小鼠免疫球蛋白。这两种蛋白质的组合产生用于分析同种型的视觉信号。抗 - 癌抗体 AR92A271.7 是 IgG2a、 $\kappa$  同种型的。

[0108] 在一轮限制性稀释后, 在细胞 ELISA 测定中检测杂交瘤上清的与靶细胞结合的抗体。检测了三种人肺癌细胞系、一种人乳腺癌细胞系和一种人非 - 癌肺细胞系: 分别为 A549, NCI-H23, NCI-H460, MDA-MB-231 和 Hs888. Lu。所有细胞系均从美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA) 获得。在使用前将接种的细胞固定。在室温下, 用含有  $MgCl_2$  和  $CaCl_2$  的 PBS 洗涤平板三次。向每个孔中加入 100 微升稀释在 PBS 中的 2% 低聚甲醛, 在室温下 10 分钟, 然后倒掉。将平板再在室温下用含有  $MgCl_2$  和  $CaCl_2$  的 PBS 洗涤三次。在室温下用 100 微升 / 孔在洗涤缓冲液 (PBS+0.05% 吐温) 中的 5% 牛奶封闭 1 小时。将平板用洗涤缓冲液洗涤三次, 并且以 75 微升 / 孔加入杂交瘤上清, 在室温下 1 小时。将平板用洗涤缓冲液洗涤 3 次, 并且加入 100 微升 / 孔与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗 - 小鼠 IgG 或 IgM 抗体的 1/25,000 稀释液 (稀释在含有 5% 牛奶的 PBS 中)。在室温下温育 1 小时后, 将平板用洗涤缓冲液洗涤 3 次, 并且将 100 微升 / 孔的 TMB 底物在室温下温育 1-3 分钟。用 50 微升 / 孔 2M  $H_2SO_4$  终止反应, 并且用 Perkin-Elmer HTS7000 平板读数仪在 450nm 下对平板读数。列在图 1 中的结果表示为与内部 (in-house) IgG 同种型对照相比高出背景的倍数, 所述内部 IgG 同种型对照先前已经表明不与所检测的细胞系结合。来自杂交瘤 AR92A271.7 的抗体显示出与测试细胞系的可检测的结合, 其具有与 A549 肺癌细胞系的最高可检测结合和与 Hs888. Lu 肺细胞系的最低可检测结合。

[0109] 与检测抗体结合联合, 在下述细胞系中检测杂交瘤上清的细胞毒性作用 (抗体诱导的细胞毒性): A549, NCI-H23, NCI-H460, MDA-MB-231 和 Hs888. Lu。钙荧光素 AM 从分子探针 (Molecular Probes) (Eugene, OR) 获得, 并且按照下文所述进行测定。在测定前将细胞以预先确定的适当的密度接种。2 天后, 将来自杂交瘤微量滴定板的 75 微升上清转移到细胞平板中, 并且在 5%  $CO_2$  培养箱中温育 5 天。抽空作为阳性对照的孔, 加入 100 微升溶解在培养基中的叠氮钠 ( $NaN_3$ , .01%, 西格玛 (Sigma), Oakville, ON), 或放线菌酮 (CHX, 0.5 微摩尔, 西格玛 (Sigma), Oakville, ON)。在处理 5 天后, 然后通过倒置将平板倒空, 并且吸干。从多通道挤压瓶向每个孔中分配含有  $MgCl_2$  和  $CaCl_2$  的室温 DPBS (Dulbecco's 磷酸盐缓冲液), 轻敲 3 次, 通过倒置倒空然后吸干。向每个孔中加入 50 微升稀释在含有  $MgCl_2$  和  $CaCl_2$  的 DPBS 中的荧光钙荧光素染料, 并且在 37°C 在 5%  $CO_2$  培养箱中温育 30 分钟。在 Perkin-Elmer HTS7000 荧光平板读数仪中对平板读数, 并且在 Microsoft Excel 中分析数据。结果列在图 1 中。来自 AR92A271.7 杂交瘤的上清对 NCI-H23 细胞产生 41% 的特异性细胞毒性。这是用阳性对照叠氮化钠和放线菌酮分别对 NCI-H23 获得的细胞毒性的 47% 和 132%。对非 - 癌肺细胞系 Hs888. Lu 不存在可观察到的细胞毒性。已知的非 - 特异性细胞毒素试剂放线菌酮和  $NaN_3$  如所料通常产生细胞毒性。

[0110] 来自图 1 的结果证明 AR92A271.7 的细胞毒性作用不与癌细胞类型上的结合水平

成比例。在四种测试的癌细胞系上存在可检测的结合,且细胞毒性仅与 NCI-H23 相关。如在表 1 中列表,AR92A271.7 在 Hs888.Lu 非癌人肺细胞系中不产生细胞毒性。

[0111] 实施例 2

[0112] 体外结合

[0113] 通过在 CL-1000 烧瓶 (BD 生物科学 (BD Biosciences), Oakville, ON) 中培养杂交瘤而生产 AR92A271.7 单克隆抗体,收集和再接种以两次 / 周进行。接着使用蛋白质 G 琼脂糖 4 Fast Flow (Protein G Sepharose 4 Fast Flow) (安玛西亚生物科学 (Amersham Biosciences), Baie d'Urfé, QC) 进行标准的抗体纯化步骤。使用人源化的、去免疫的、嵌合的或鼠单克隆抗体在本发明范围之内。

[0114] 通过流式细胞计数 (FACS) 评估 AR92A271.7 与肺 (A549, NCI-H23, NCI-H322M, NCI-H460 和 NCI-H520), 结肠 (Lovo), 乳腺 (MDA-MB-231), 胰腺 (BxPC-3), 前列腺 (PC-3) 和卵巢 (OVCAR-3) 癌细胞系, 和来自皮肤 (CCD-27sk) 和肺 (Hs888.Lu) 的非 - 癌细胞系的结合。全部细胞系获自美国典型培养物保藏中心 (American Type Tissue Collection) (ATCC, Manassas, VA)。

[0115] 通过最初用 DPBS (无  $\text{Ca}^{++}$  和  $\text{Mg}^{++}$ ) 清洗细胞单层, 为 FACS 准备细胞。然后使用细胞解离缓冲液 (Invitrogen, Burlington, ON) 在  $37^{\circ}\text{C}$  将细胞从它们的细胞培养板中移出。离心和收集后, 将细胞在  $4^{\circ}\text{C}$  重新混悬在包含  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  和 2% 胎牛血清的 DPBS 中 (染色培养基) 并计数, 等分为适当的细胞密度, 离心沉淀细胞并在存在检测抗体 (AR92A271.7) 或对照抗体 (同种型对照, 抗 -EGFR (c225, IgG1,  $\kappa$ , Cedarlane, Hombly ON)) 的条件下, 在  $4^{\circ}\text{C}$ , 重新混悬在染色培养基中。在冰上, 以 20 微克 / mL 评估同种型对照和检测抗体, 而以 5 微克 / mL 评估抗 -EGFR 30 分钟。加入 Alexa Fluor 546- 缀合的二次抗体前, 用染色培养基清洗细胞一次。然后, 在  $4^{\circ}\text{C}$ , 添加染色培养基中的 Alexa Fluor 546- 缀合抗体 30 分钟。再最后清洗细胞一次并重新混悬在固定培养基 (包含 1.5% 低聚甲醛的染色培养基) 中。通过利用 FACSarray™ 系统软件在 FACSarray™ 上运行样品评估细胞的流式细胞计数采样 (BD 生物科学 (BD Biosciences), Oakville, ON)。通过调节 FSC 和 SSC 检测器上的电压和振幅增加设置细胞正向 (FSC) 和侧向扩散 (SSC)。通过运行未染色的细胞调节用于荧光 (Alexa-546) 通道的检测器, 从而使细胞具有约 1-5 单位中等荧光强度的一致的峰。对于每份样品, 获得约 10,000 门控事件 (染色的固定细胞) 以进行分析, 并将结果显示在图 2 中。

[0116] 图 2 显示超过同种型对照的平均荧光强度倍数增加。图 3 编辑 AR92A271.7 抗体的代表性柱状图。AR92A271.7 被证明了与测试细胞系的结合。存在与肺 NCI-H23 (26.2- 倍), NCI-H322M (30.5- 倍) 和 NCI-H460 (28.1- 倍) 癌细胞系的强结合。还存在与肺 A549 (19.3- 倍) 和 NCI-H520 (14.5- 倍), 结肠 Lovo (18.3- 倍); 乳腺 MDA-MB-231 (18.0- 倍); 胰腺 BxPC-3 (9.5- 倍); 前列腺 PC-3 (6.5- 倍) 和卵巢 OVCAR-3 (16.3- 倍) 癌细胞系和非 - 癌皮肤 CCD-27sk (7.0- 倍) 和肺 Hs888.Lu (5.5- 倍) 细胞系的结合。这些数据证明 AR92A271.7 与具有不同抗原表达水平的若干不同细胞系具有最强的结合。非癌皮肤和肺细胞系上存在可检测但较低的抗原表达, 其与实施例 1 中的结合相一致。

[0117] 实施例 3

[0118] 使用 A549 细胞进行体内肿瘤实验

[0119] 实施例 1 证明 AR92A271.7 具有针对人肺癌细胞系的抗癌特性。为了证明针对人肺癌细胞系的体内功效,在 A549 肺癌异种移植模型中测试 AR92A271.7。参考图 4 和 5,对 6-8 周龄雌性 SCID 小鼠通过在右腰处皮下注射而植入在 100 微升 PBS 溶液中的 100 万人肺癌细胞 (A549)。将小鼠随机分成 2 个处理组,每组 10 只。在植入后那天,在用含有 2.7mM KCl, 1mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137mM NaCl 和 20mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  的稀释剂从储备的浓缩液稀释后,对每组腹膜内施用 300 微升体积的 20mg/kg 的 AR92A271.7 检测抗体或缓冲液对照。然后,在研究持续时间内,每周一次施用所述抗体和对照样品。约每隔 7 天用测径器测量肿瘤生长。在 8 剂量抗体注射后,结束本研究。在研究持续时间内,每周一次记录动物的体重。在研究结束时,按照 CCAC 指导将所有动物处死。

[0120] AR92A271.7 在人肺癌 A549 体内预防模型中减少肿瘤生长。如在第 49 天,即处理期间的最后一天时确定地,与缓冲液 - 处理的组相比,用 Arius 抗体 AR92A271.7 处理以 48.6% ( $p = 0.0387$ , t- 检验) 减少 A549 肿瘤生长 (图 4)。

[0121] 在整个研究过程中,不存在临床毒性迹象。以每周时间间隔测量的体重是健康和不能健壮生长 (thrive) 的替代品 (surrogate) (图 5)。在处理期结束时各组间不存在平均体重的显著差异。从研究开始到结束各组内不存在平均体重的显著差异。

[0122] 总之,在这种人肺癌异种移植模型中,AR92A271.7 是很好耐受的,并且减少肿瘤负荷。

[0123] 实施例 4

[0124] 竞争性结合剂的分离

[0125] 给定抗体,本领域普通技术人员可以产生竞争性抑制 CDMAB,例如竞争性抗体,其是一种识别相同表位的抗体 (Belanger L 等. *Clinica Chimica Acta* 48:15-18(1973))。一种方法需要 (entails) 用这样的免疫原进行免疫,所述免疫原表达被所述抗体识别的抗原。样品可以包括,但不限于,组织、分离的蛋白或细胞系。得到的杂交瘤可以使用竞争测定进行筛选,所述竞争测定是一种鉴定抑制测试抗体的结合的抗体的测定,诸如 ELISA, FACS 或蛋白质印迹。另一种方法可以使用噬菌体展示抗体文库,和淘选 (panning) 识别所述抗原的至少一个表位的抗体 (Rubinstein JL 等. *年度生物化学 (Anal Biochem)* 314: 294-300(2003))。在每种情形中,基于抗体置换初始标记抗体与其靶抗原的至少一个表位的结合的能力,选择抗体。因此,这样的抗体将如初始抗体一样具有识别抗原的至少一个表位的特征。

[0126] 实施例 5

[0127] 克隆 AR92A271.7 单克隆抗体的可变区

[0128] 可以确定由 AR92A271.7 杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体的重链 ( $V_H$ ) 和轻链 ( $V_L$ ) 的可变区的序列。使用标准方法,包括使用异硫氰酸胍进行的细胞溶解 (Chirgwin 等. *生物化学 (Biochem)*. 18:5294-5299(1979)), 可以从受试杂交瘤提取编码免疫球蛋白重链和轻链的 RNA。通过本领域内已知的 PCR 方法 (Sambrook 等, 编, *分子克隆 (Molecular Cloning)*, 第 14 章, 冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor laboratories Press), 纽约. (1989)), 可以使用 mRNA 制备 cDNA, 随后分离  $V_H$  和  $V_L$  基因。可以通过自动 Edman 测序独立地确定重链和轻链的 N 端氨基酸序列。还可以通过  $V_H$  和  $V_L$  片段的氨基酸测序而确定 CDRs 和侧翼 FRs 的其他片段。然后,设计合成的引物,用于从 AR92A271.7 单克隆抗体分离

V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 基因,并且可以将分离的基因连接到适当的载体中进行测序。为了产生嵌合的和人源化的 IgG,可以将可变轻链和可变重链结构域亚克隆到适当的载体中进行表达。

[0129] (i) 单克隆抗体

[0130] 使用常规方法容易地分离并测序编码单克隆抗体(如在实施例 1 中所述)的 DNA(例如,通过使用能够特异性结合编码所述单克隆抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞作为这样的 DNA 的优选来源。当分离时,所述 DNA 可以置于表达载体内,然后将其转染到宿主细胞中,如大肠杆菌(E. coli)细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或骨髓瘤细胞中,所述细胞不另外产生免疫球蛋白,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。也可以修饰所述 DNA,例如,通过取代人重链和轻链恒定结构域编码序列替换同源鼠序列。也可以使用合成蛋白质化学中的已知方法,包括含有交联剂的那些方法,体外制备嵌合抗体或杂交抗体。例如,可以使用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键构建免疫毒素。用于这一目的的适当试剂的实例包括亚氨基硫羟酸盐(iminothiolate)和甲基-4-巯基 butyrimidate。

[0131] (ii) 人源化的抗体

[0132] 人源化抗体具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“引入”的残基,其典型地来自“引入的”可变结构域。可以通过 Winter 及合作者的方法用啮齿类 CDRs 或 CDR 序列取代相对应的人抗体序列(Jones 等,自然(Nature)321:522-525(1986);Riechmann 等,自然(Nature)332:323-327(1988);Verhoeyen 等,科学(Science)239:1534-1536(1988);在 Clark,今日免疫学(Immunol. Today)21:397-402(2000)中的综述)进行人源化。

[0133] 可以通过使用母体和人源化序列的三维模型分析母体序列和不同概念人源化产物的方法而制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是本领域技术人员可获得的和熟悉的。图解和展示所选候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可获得的。这些展示的观察允许分析残基在所述候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式,可以从共有和引入序列中选择 FR 残基且组合 FR 残基,以便获得需要的抗体特征,如对靶抗原增加的亲和性。通常,CDR 残基直接且最显著地(most substantially)参与影响抗原结合。

[0134] (iii) 抗体片段

[0135] 已经开发了生产抗体片段的各种技术。这些片段可以通过重组宿主细胞产生(参考 Hudson,现代免疫学观点(Curr. Opin. Immunol.)11:548-557(1999);Little 等,今日免疫学(Immunol. Today)21:364-370(2000))。例如,Fab'-SH 片段可以直接从大肠杆菌回收,并且化学偶联以形成 F(ab')<sub>2</sub> 片段(Carter 等,生物技术(Biotechnology)10:163-167(1992))。在另一个实施方案中,使用亮氨酸拉链 GCN4 促进 F(ab')<sub>2</sub> 分子的组装而形成 F(ab')<sub>2</sub>。根据另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物分离 Fv, Fab 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

[0136] 实施例 6

[0137] 包括本发明的抗体的组合物

[0138] 本发明抗体可以用作预防/治疗癌症的组合物。所述包括本发明抗体的用于预防/治疗癌症的组合物是低毒性的,并且它们可以采用液体制剂的形式施用,或作为适用于人

或哺乳动物（例如，大鼠、兔、绵羊、猪、牛、猫、犬、猿猴、等等）的制剂的药物组合物口服或肠胃外（例如，静脉内、腹膜内、皮下、等等）施用。本发明抗体可以以本身施用，或可以作为适当的组合物施用。用于所述施用的组合物可以包含药用载体，和本发明抗体或其盐，稀释剂或赋形剂。这样的组合物以适于口服或肠胃外施用的药物制剂的形式提供。

[0139] 用于肠胃外施用的组合物的实例是可注射制剂、栓剂等。可注射制剂可以包括这样的剂型，诸如静脉内、皮下、皮内和肌肉注射，滴注，关节内注射等等。这些可注射制剂可以通过公知方法制备。例如，可注射制剂可以通过将本发明抗体或其盐溶解、混悬或乳化在常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中而制备。对于水性注射介质，存在如生理盐水，含有葡萄糖和其他辅助试剂的等渗溶液等，其可以与适当的增溶剂如醇（例如乙醇）、多元醇（例如，丙二醇、聚乙二醇）、非离子表面活性剂（例如，聚山梨酸酯 80，HCO-50（氢化蓖麻油的聚氧乙烯（50mols）加合物））等组合使用。对于油性介质，使用例如芝麻油、大豆油等，其可以与增溶剂如苯甲酸苄酯、苯甲醇等组合使用。这样制备的注射剂通常装在适当的安瓿中。用于直肠施用的栓剂可以通过将本发明抗体或其盐与常规用于栓剂的基质混合而制备。用于口服施用的组合物包括固体或液体制剂，具体为片剂（包括糖衣和薄膜包衣片剂），丸剂、粒剂、粉末制剂、胶囊（包括软胶囊）、糖浆、乳液、混悬液等。这样的组合物通过公知方法制备，并且可以包含常规用在药物制剂领域中的载体（vehicle）、稀释剂或赋形剂（excipient）。用于片剂的载体（vehicle）或赋形剂（excipient）的实例包括乳糖、淀粉、蔗糖、硬脂酸镁等。

[0140] 有利地，将上述用于口服或肠胃外应用的组合物制备成适于符合活性成分剂量的单位剂量的药物制剂。所述单位剂量制剂包括，例如，片剂、丸剂、胶囊、注射剂（安瓿）、栓剂、等等。所包含的前述化合物的量通常为 5-500mg/ 剂量单位形式；优选地特别是在注射液形式中含有约 5- 约 100mg 的上述抗体，并且对于其他形式含有 10-250mg 的上述抗体。

[0141] 前述包括本发明抗体的预防性 / 治疗性药剂或调节剂的剂量可以取决于下列各项而不同：被施用的受试者，目的疾病，病症，施用途径等等。例如，当用于治疗 / 预防目的时，例如，治疗 / 预防成年人中的乳腺癌时，有利地以约 0.01- 约 20mg/kg 体重、优选地约 0.1- 约 10mg/kg 体重且更优选地约 0.1- 约 5mg/kg 体重的剂量静脉内施用本发明的抗体，约 1-5 次 / 天，优选约 1-3 次 / 天。在其他肠胃外和口服施用中，所述药剂可以以与上述剂量相对应的剂量施用。当病症特别严重时，可以依据病症增加剂量。

[0142] 本发明抗体可以以其自身或以适当组合物的形式施用。用于施用的组合物可以包含药用载体与前述抗体或其盐，稀释剂或赋形剂。这样的组合物以适于口服或肠胃外施用（例如，血管内注射、皮下注射等）的药物制剂的形式提供。上述每种组合物还可以包含其他活性成分。此外，本发明抗体可以与其他药剂联合使用，所述其他药剂例如烷基化试剂（例如，环磷酰胺，异环磷酰胺，等），代谢拮抗剂（例如，甲氨喋呤，5- 氟尿嘧啶，等），抗肿瘤抗生素（例如，丝裂霉素，阿霉素，等），植物来源的抗肿瘤药（例如，长春新碱，长春地辛，泰素，等），顺铂，卡铂，依托泊苷，伊立替康，等。本发明抗体和上述药物可以同时或以交错的次数施用给患者。

[0143] 大量的事实表明 AR92A271.7 通过与癌症细胞系上存在的表位连接而介导抗癌作用。此外，可以表明，AR92A271.7 抗体可以用于检测表达与所述抗体特异性结合的表位的细胞；这使用所例举的但不限于 FACS、细胞 ELISA 或 IHC 的技术。

[0144] 本说明书中提及的所有专利和出版物象征本发明所属领域技术人员的水平。所有的专利和出版物通过引用结合于此,以如同每篇单独的出版物通过引用特别且独立地指明结合的相同程度结合。

[0145] 应该理解,尽管示例了本发明的某些形式,但是不限于本文所述和所示的部分的特定形式或安排。对于本领域技术人员来说,在不背离本发明的范围的条件下可以进行各种变化,并且本发明不应该被视为限于在本说明书中所示和所述的内容,这是显而易见的。

[0146] 本领域技术人员应该容易地理解本发明充分适合实施所述目标并且获得所提及的目的和益处以及其中固有的那些。本发明所述的任何寡核苷酸、肽、多肽、生物相关的化合物、方法、步骤和技术代表目前的优选实施方案,意欲是示例性的,并且不意欲作为对范围的限制。其中的变化和其他应用对于本领域技术人员而言是可以发生的,所述变化和其他应用包括在本发明的精神内,并且由后附的权利要求的范围限定。尽管已经联合特定优选实施方案对本发明进行了描述,但是应该理解所要求的本发明不应该不适当地限于所述特定实施方案。实际上,对于本领域技术人员是明显的实施本发明的所述模式的各种改进意欲被包括在后附权利要求的范围内。

[0147] 加拿大国际保藏机构

[0148] 国家微生物实验室,加拿大公共卫生机构

[0149] 1015Arlington Street 电话:(204)789-6030

[0150] Winnipeg,Manitoba Canada R3E 3R2 传真:(204)789-2018

[0151] 国际表格 IDAC/BP/4

[0152] 原始保藏情形中的收据

[0153] (按照布达佩斯条约细则 Rule 7.1 发布)

[0154] 附加原始保藏文本和存活证明复印件

[0155] 本国际保藏机构接受以下指定的微生物的保藏,其接收日期为 2007 年 5 月 29 日

[0156] 为(保藏者名称):Valerie Harris,阿瑞斯研究公司

[0157] 地址:55 York Street, Suite 1600, 多伦多, ON M5J 1R7

[0158] 保藏鉴定

[0159] 保藏者指定的参考:AR92A271.7

[0160] 本 IDA 指定的保藏号:290507-04

[0161] 以上证明的保藏物伴随:

[0162] 科学描述(详列):\_\_\_\_\_

[0163] 提议的分类命名(详列):\_\_\_\_\_

[0164] 授权代表 IDAC 的人员签名

[0165] \_\_\_\_\_

[0166] 日期:2007 年 5 月 29 日

[0167] 加拿大国际保藏机构

[0168] 国家微生物实验室,加拿大公共卫生机构

[0169] 1015Arlington Street 电话:(204)789-6030

[0170] Winnipeg,Manitoba Canada R3E 3R2 传真:(204)789-2018

[0171] 国际表格 IDAC/BP/9

- [0172] 存活证明
- [0173] (按照布达佩斯条约细则 Rule 10.2 发布)
- [0174] 发给存活证明的团体
- [0175] 名称 :Ferris Lander
- [0176] 地址 :2855 PGA Boulevard, Palm Beach Gardens, Florida 33410
- [0177] 保藏者
- [0178] 名称 :Valerie Harris, 阿瑞斯研究公司
- [0179] 地址 :55 York Street, Suite 1600, 多伦多, ON M5J 1R7
- [0180] 保藏鉴定
- [0181] 国际保藏机构给出的保藏号 :290507-04
- [0182] 原始保藏日期 (或最近的相关日期) :2007 年 5 月 29 日
- [0183] 存活测试
- [0184] 在 (最近的测试日期) 测试的以上鉴定的保藏物的存活性
- [0185] 在以上指定的日期, 该培养物是 :
- [0186]  存活
- [0187] 不再存活
- [0188] 进行存活测试的条件 (如果需要该信息并且测试的结果是阴性的, 则填写) :
- 
- [0189] 授权代表 IDAC 的人员签名
- [0190] \_\_\_\_\_
- [0191] 日期 :2007 年 6 月 18 日

	分泌 ELISA				细胞毒性								IgG 结合											
	倍数值		IgM		A549		NCI-H23		NCI-H460		MDA-MB-231		Hs888.Lu		A549		NCI-H23		NCI-H460		MDA-MB-231		Hs888.Lu	
	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
AR82A271.7	23.9	1.5	2	5	41	12	3	9	9	9	1	-19	14	6.8	5.4	6.4	4.8							
NaN <sub>3</sub>			36	18	87	10	72	10	23	25	61	23												
对照			39	11	31	45	45	30	31	22	86	15												

图 1

	IgG 结合																							
	A549		NCI-H23		NCI-H322M		NCI-H460		NCI-H620		LoVo		MDA-MB-231		BxPC-3		PC-3		OVCAR-3		CCD-27sk		Hs888.Lu	
	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV	倍数值	CV
AR82A271.7	19.3	26.2	30.5	28.1	14.5	18.3	18.0	9.5	6.5	16.3	7.0	5.5												

图 2

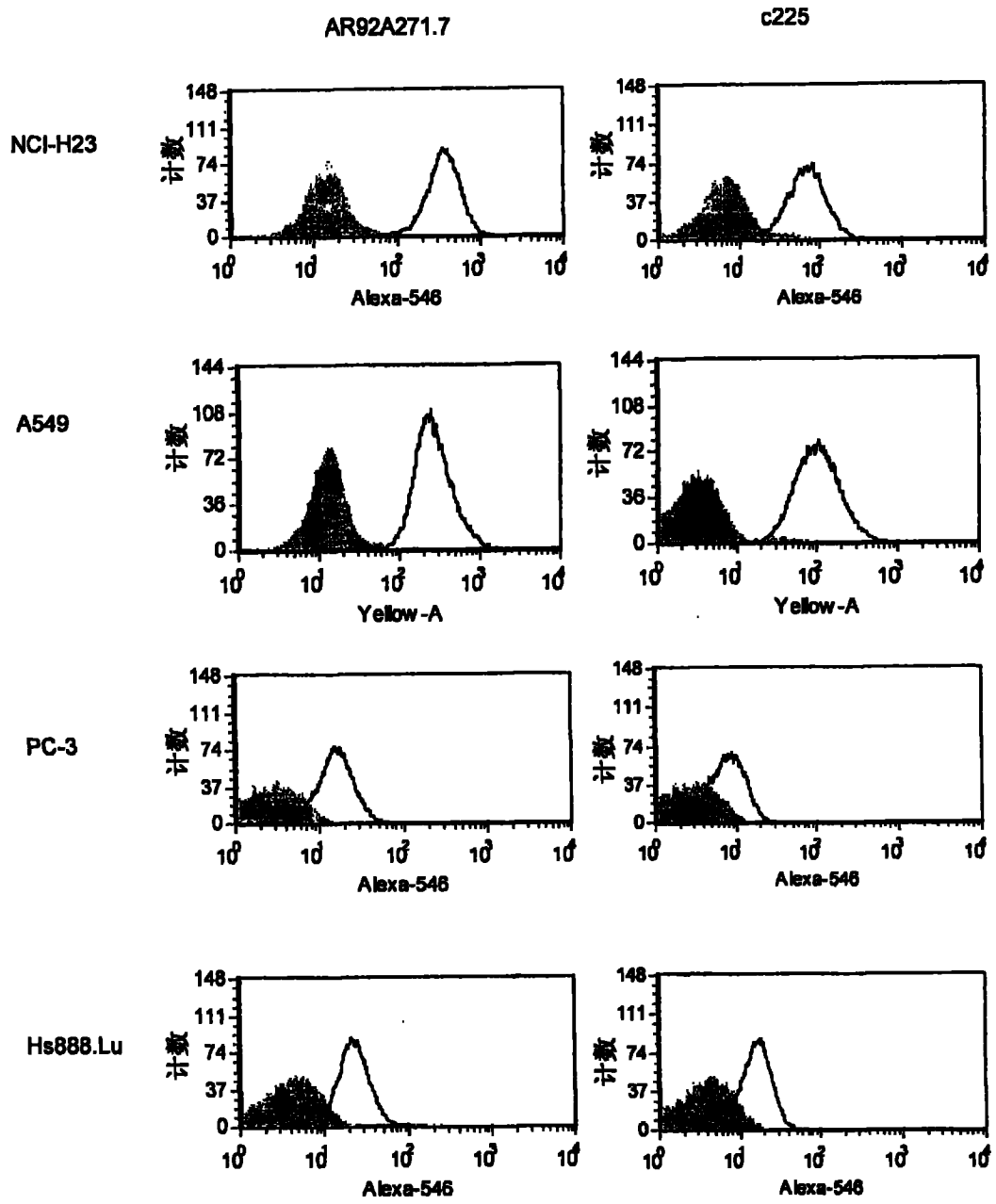


图 3

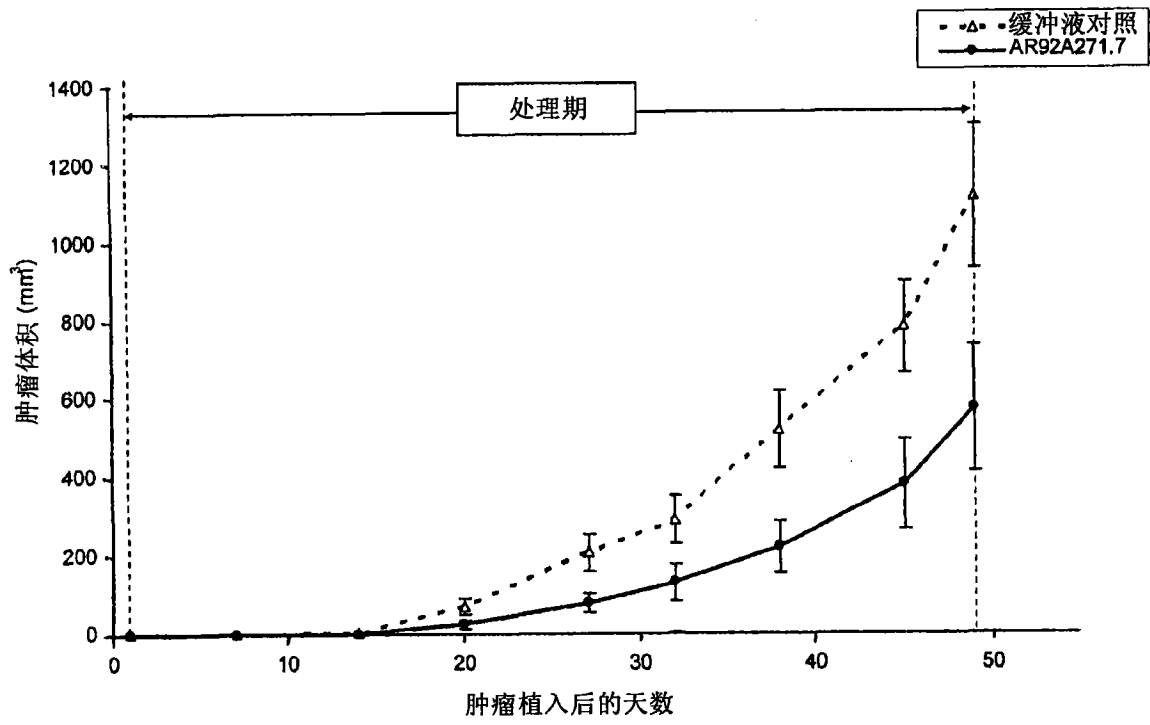


图 4

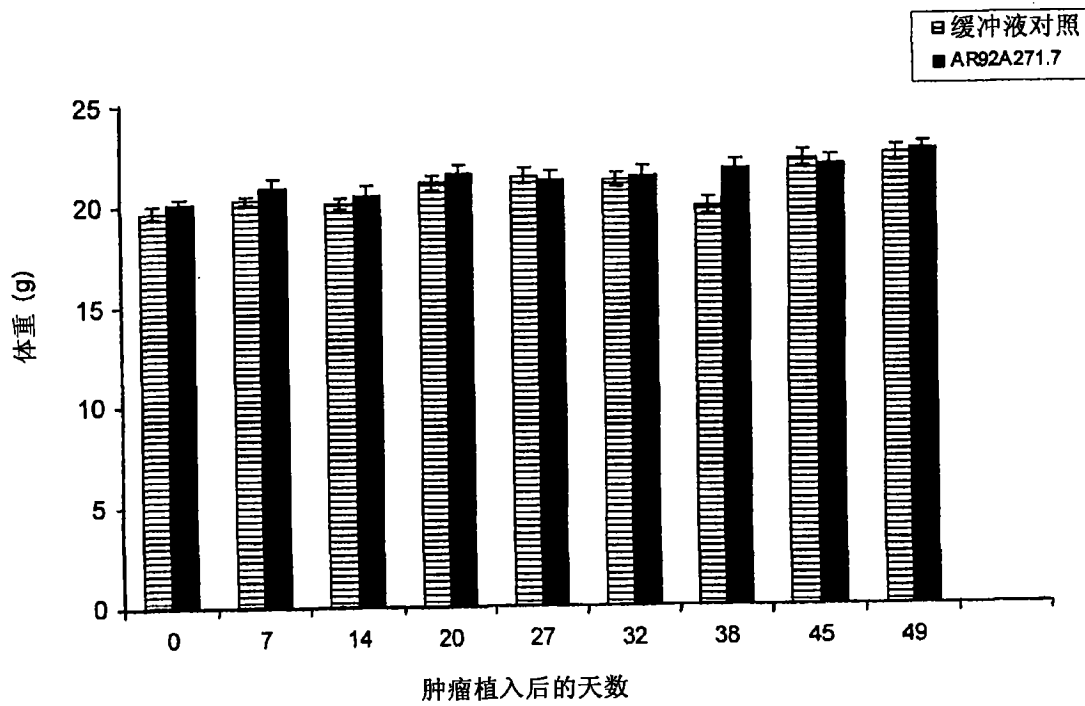


图 5

专利名称(译)	抗癌细胞毒性单克隆抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN101743255A</a>	公开(公告)日	2010-06-16
申请号	CN200880024518.1	申请日	2008-07-14
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	戴维SF扬 海伦P芬德利 苏珊E哈恩		
发明人	戴维·S·F·扬 海伦·P·芬德利 苏珊·E·哈恩		
IPC分类号	C07K16/30 A61K39/395 A61K47/48 A61K51/10 A61P35/00 A61P37/04 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C12N5/16 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	A61K47/48592 C07K16/3023 A61K2039/505 A61K51/1054 G01N33/57484 A61K47/6857 A61P35/00 A61P37/04		
代理人(译)	王旭		
优先权	60/949942 2007-07-16 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

抗体介导的癌细胞杀死是治疗癌症的有效方法。当用肺腺癌细胞免疫时，筛选小鼠中产生的抗体，以获得作为终点的针对多种癌细胞系的细胞毒性。分离由以保藏号290507-04保藏在IDAC的杂交瘤AR92A271.7产生的抗癌细胞毒性单克隆抗体，其对肺癌细胞系具有细胞毒性，且在入肺癌的动物模型中减少肿瘤负荷。所述单克隆抗体还结合若干癌细胞系。存在单克隆抗体与非癌细胞系的低但可检测的结合，然而，在该非癌细胞系中不诱导细胞毒性。该单克隆抗体可以用于辅助对癌症进行分段和诊断，并且可以用来治疗原发瘤和肿瘤转移。所述细胞毒性单克隆抗体还可以用于将毒素、酶、放射性化合物、以及造血细胞递送到癌细胞，从而进一步辅助减少肿瘤负荷。

