



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101778867 A

(43) 申请公布日 2010.07.14

---

(21) 申请号 200880018487.9 (51) Int. Cl.  
(22) 申请日 2008.06.06 *C07K 16/30* (2006.01)  
(30) 优先权数据 *A61P 35/00* (2006.01)  
60/942,777 2007.06.08 US *C07K 16/32* (2006.01)  
(85) PCT申请进入国家阶段日 *G01N 33/53* (2006.01)  
2009.12.01 *A61K 39/395* (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据  
PCT/EP2008/057112 2008.06.06

(87) PCT申请的公布数据  
W02008/148884 EN 2008.12.11

(71) 申请人 地中海大学  
地址 法国马赛  
申请人 法国国家健康与医疗研究院  
依奈特制药公司

(72) 发明人 莉迪·克雷申切 劳伦特·戈捷  
多米尼克·隆巴尔多 埃里克·马斯  
本杰明·罗西

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限  
责任公司 11240  
代理人 吴贵明 张英

权利要求书 5 页 说明书 41 页 序列表 13 页  
附图 19 页

---

(54) 发明名称  
用于治疗胰腺肿瘤的组合物和方法

(57) 摘要  
本发明涉及用于制备适用于治疗癌症的抗原结合化合物的方法、抗原结合化合物以及它们的应用。

1. 一种生产适用于治疗癌症的抗原结合化合物的方法,所述方法包括:
  - i) 提供特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽的抗原结合化合物;
  - ii) 测试所述抗原结合化合物对表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的促凋亡活性;
  - iii) 如果确定所述抗原结合化合物对表达 BSDL 或 FAPP 的细胞具有促凋亡活性,则选择所述抗原结合化合物;以及
  - iv) 产生一些所选择的抗原结合化合物。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括这样的步骤,所述步骤包括测试所述抗原结合化合物对于诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的 ADCC 活性的能力,并且如果确定所述抗原结合化合物具有诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的 ADCC 活性的能力,则选择所述抗原结合化合物。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,进一步包括其中制备所述抗原结合化合物以用于给予人的步骤。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中,所述用于给予人的制备包括将所述化合物与药用载体一起配制。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述表达 BSDL 或 FAPP 的细胞是肿瘤细胞。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中,所述肿瘤细胞获自一位或多位患有癌症的患者。
7. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述细胞在脂筏中表达 BSDL 和 / 或 FAPP。
8. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述细胞是使得能表达 BSDL 或 FAPP 的重组细胞。
9. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述细胞是 SOJ-6 细胞。
10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,在没有免疫效应细胞的情况下进行步骤 ii)。
11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述免疫效应细胞是 NK 细胞。
12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,步骤 ii) 包括确定所述抗原结合化合物是否在所述表达 BSDL 或 FAPP 的细胞中调节凋亡或细胞增殖调节蛋白的活性或水平。
13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,所述调节蛋白是半胱天冬酶或 Bcl-2 家族成员。
14. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,步骤 iv) 包括在适宜的培养基中培养产生所述抗原结合化合物的宿主细胞并回收所述抗原结合化合物。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述抗原结合化合物是抗体,而所述宿主细胞是产生所述抗体的杂交瘤。
16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述抗原结合化合物并不包括细胞毒性剂如放射性同位素、毒性多肽、或毒性小分子。
17. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述抗原结合化合物是特异性地结合 BSDL 或 FAPP 多肽的抗体。
18. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述抗原结合化合物与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。
19. 根据权利要求 17 所述的方法,其中,所述抗体具有 IgG 同种型的重链恒定区。
20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,所述 IgG 同种型是人 IgG1 同种型。
21. 根据权利要求 17 所述的方法,其中,所述抗体是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中,所述抗体包括抗体 16D10 或另一种抗体的可变区,其中所述另一种抗体与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。

23. 根据权利要求 21 所述的方法,其中,所述抗体是抗体 16D10 的嵌合重组形式,其中重链恒定区的 C $\mu$  2、C $\mu$  3、以及 C $\mu$  4 结构域已被人 IgG1 序列替换。

24. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,所述抗体是二价抗体。

25. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,所述抗体基本上没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞内化。

26. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,所述抗体能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤 (ADCC)。

27. 根据权利要求 19 所述的方法,进一步包括另外的步骤,其中评估了通过所述表达 BSDL 或 FAPP 的细胞进行的所述抗体的内化,其中所述抗体基本上没有被所述细胞内化的发现证实了所述抗体适用于治疗癌症。

28. 根据权利要求 19 所述的方法,进一步包括另外的步骤,其中评估了所述抗体诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤 (ADCC) 的能力,其中所述抗体能够诱导所述细胞的所述细胞介导杀伤的发现证实了所述抗体适用于治疗癌症。

29. 一种根据权利要求 1 至 28 中任一项所述的方法生产的抗原结合化合物。

30. 根据权利要求 29 所述的抗原结合化合物,其中,所述抗原结合化合物与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。

31. 根据权利要求 29 所述的抗原结合化合物,其中,所述化合物是不同于抗体 16D10 的抗体。

32. 一种药物组合物,包括根据权利要求 29 所述的抗原结合化合物、以及药用载体。

33. 一种抗体,结合于 BSDL 或 FAPP 多肽并且能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制其增殖,其中所述抗体与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽,并且其中所述抗体是不同于 16D10 的抗体。

34. 根据权利要求 33 所述的抗体,其中,所述抗体是二价的。

35. 根据权利要求 33-34 所述的抗体,其中,所述抗体具有 IgG 同种型的重链恒定区。

36. 根据权利要求 35 所述的抗体,其中,所述抗体具有人 IgG 同种型的重链恒定区。

37. 根据权利要求 35-36 所述的抗体,其中,所述抗体具有能够结合于 Fc 受体的重链恒定区。

38. 根据权利要求 37 所述的抗体,其中,所述抗体能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤 (ADCC)。

39. 一种由两个重链和两个轻链构成的二价抗体,其中所述重链包括能够结合于 Fc 受体的 IgG 重链恒定区,并且其中所述抗体:

(a) 能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制其增殖;

(b) 能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤 (ADCC); 以及

(c) 与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。

40. 一种二价抗体,包括:(a) 包括可变区的重链,其中所述可变区包括来自 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列、融合于人 IgG 链恒定区的一个或多个 CDR; 以及 (b) 包括可变区的轻链,其中所述可变区包括来自 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列、可选地融合于人卡巴链恒定区的

一个或多个 CDR。

41. 根据权利要求 33 至 40 所述的抗体,其中,所述重链包括来自 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列的 CDR1、CDR2 以及 CDR3,而所述轻链包括来自 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列的 CDR1、CDR2 以及 CDR3。

42. 根据权利要求 41 所述的抗体,其中,所述重链包括 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列。

43. 根据权利要求 41 或 42 所述的抗体,其中,所述轻链包括 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列。

44. 根据权利要求 42 所述的抗体,其中,所述抗体由包括 SEQ ID NO :1 的核酸序列产生。

45. 根据权利要求 43 所述的抗体,其中,所述抗体由包括 SEQ ID NO :2 的核酸序列产生。

46. 根据权利要求 40 至 45 所述的抗体,其中,所述重链恒定区或 IgG 同种型是人 IgG1。

47. 根据权利要求 40 至 45 所述的抗体,其中,所述重链恒定区或 IgG 同种型是非人 IgG 同种型。

48. 根据权利要求 46 所述的抗体,其中,所述重链恒定区包括至少 90% 相同于 SEQ ID NO :15 的氨基酸序列。

49. 根据权利要求 40 至 48 所述的抗体,其中,所述轻链恒定区包括至少 90% 相同于 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列。

50. 一种二价抗体,包括:(a) 重链,所述重链包括 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列;以及(b) 轻链,所述轻链包括来自 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的一个或多个 CDR。

51. 根据权利要求 33 至 50 所述的抗体,其中,所述抗体并不包括选自由放射性同位素、毒性多肽、以及毒性小分子组成的组中的细胞毒性剂。

52. 根据权利要求 33 至 51 所述的抗体,其中,所述抗体能够诱导胰腺肿瘤细胞的凋亡或抑制其增殖。

53. 根据权利要求 52 所述的抗体,其中,所述抗体调节凋亡或细胞增殖调节蛋白在表达 BSDL 或 FAPP 的细胞中的活性或水平。

54. 根据权利要求 53 所述的抗体,其中,所述调节蛋白是半胱天冬酶或 Bcl-2 家族成员。

55. 根据权利要求 33 至 54 所述的抗体,其中,所述抗体基本上没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞内化。

56. 根据权利要求 33 至 55 所述的抗体,其中,所述抗体是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

57. 根据权利要求 33 至 56 所述的抗体,其中,所述抗体结合于表达 BSDL 或 FAPP 的细胞,并具有至少 80 分钟的半衰期。

58. 根据权利要求 57 所述的抗体,其中,所述表达 BSDL 或 FAPP 的细胞是 SOJ-6 细胞。

59. 根据权利要求 33 至 58 所述的抗体,其中,所述抗体具有低于 10 纳摩尔的与 BSDL 表位或 FAPP 表位的结合亲和力。

60. 根据权利要求 33 至 59 所述的抗体,其中,所述抗体包括 IgG<sub>1</sub> 区,其中所述 IgG<sub>1</sub> 区已被修饰成增加与 Fc 受体的结合。

61. 根据权利要求 33 至 59 所述的抗体,其中,所述抗体被低岩藻糖基化。

62. 一种药物组合物,包括根据权利要求 33 至 61 所述的抗体、以及药用载体。

63. 一种试剂盒,包括 62 所述的抗体、以及在治疗胰腺癌时使用所述抗体的说明书。
64. 根据权利要求 29 至 62 所述的抗体或药物组合物在制备药物中的应用。
65. 一种二价抗体,具有低于 10 纳摩尔的与 BSDL 表位或 FAPP 表位的结合亲和力并且与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。
66. 根据权利要求 65 所述的抗体,其中,所述抗体具有 IgG 同种型的重链恒定区。
67. 根据权利要求 43 所述的抗体,其中,所述表达 BSDL 或 FAPP 的细胞是 SOJ-6 细胞。
68. 一种结合物,包括根据权利要求 29 至 31、33 至 61 或 65 至 67 中任一项所述的抗体以及可检测标记。
69. 根据权利要求 68 所述的结合物,其中,所述可检测标记选自放射性同位素、荧光染料、抗原-抗体对的成员、不同于 BSDL 或 FAPP 多肽的抗体、凝集素-碳水化合物对的成员; 抗生物素蛋白;生物素;受体-配体对的成员;或分子印记聚合物-分子印迹系统的成员。
70. 一种表达根据权利要求 33 至 61 或 65 至 67 所述的抗体的宿主细胞。
71. 一种试剂盒,包括根据权利要求 29 至 31、33 至 61 或 65 至 67 所述的抗体、以及在诊断胰腺癌中使用所述抗体的说明书。
72. 根据权利要求 29 至 31、33 至 61 或 65 至 67 所述的抗体在用于检测表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞中的应用。
73. 根据权利要求 72 所述的应用,其中,所述细胞是胰腺癌细胞。
74. 根据权利要求 29 至 31、33 至 61 或 65 至 67 所述的抗体在用于诊断胰腺癌的方法中的应用。
75. 一种诱导癌细胞的凋亡或抑制癌细胞的增殖、或治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括:
  - a) 确定所述癌症或癌细胞是否表达 BSDL 或 FAPP 多肽并且适合于用促凋亡或抗细胞增殖剂进行治疗;以及
  - b) 在肯定确定了所述癌症或癌细胞表达 BSDL 或 FAPP 多肽并且适合于用促凋亡或抗细胞增殖剂进行治疗的情况下,使所述癌症或癌细胞与有效量的根据权利要求 29 至 31 或 33 至 61 所述的抗原结合化合物接触。
76. 根据权利要求 75 所述的方法,其中,所述接触所述癌症或癌细胞的步骤包括给予所述患者药物有效量的所述抗原结合化合物。
77. 根据权利要求 76 所述的方法,其中,所述药物有效量是在所述患者中足以诱导癌细胞凋亡或抑制癌细胞增殖的量。
78. 根据权利要求 75 所述的方法,其中,所述接触是在没有或相对缺乏免疫效应细胞的情况下进行的。
79. 根据权利要求 78 所述的方法,其中,所述免疫效应细胞是 NK 细胞。
80. 根据权利要求 75 所述的方法,其中,体外进行所述接触。
81. 根据权利要求 76 所述的方法,进一步包括给予所述患者化疗药剂。
82. 根据权利要求 76 所述的方法,其中,所述患者是免疫缺失的患者。
83. 根据权利要求 75 所述的方法,其中,所述抗原结合化合物是抗体。
84. 根据权利要求 83 所述的方法,其中,所述抗体是二价 IgG 抗体。
85. 根据权利要求 83 所述的方法,进一步包括这样的步骤,其中评估了通过表达 BSDL

或 FAPP 的细胞进行的所述抗体的内化、或所述抗体诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤 (ADCC) 的能力,其中所述抗体基本上没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞内化或能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤的发现表明所述抗体适用于治疗所述患者。

86. 根据权利要求 75 所述的方法,其中,所述癌症或癌细胞具有 Bcl-2 家族成员调节异常。

87. 根据权利要求 86 所述的方法,其中,所述 Bcl-2 家族成员调节异常是 Bcl-2 的过度表达或 Bax 的降低的表达。

88. 根据权利要求 75 所述的方法,其中,所述癌症或癌细胞对化疗药剂是有抗性的。

89. 根据权利要求 75 所述的方法,其中,所述癌症或癌细胞是胰腺癌。

## 用于治疗胰腺肿瘤的组合物和方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及来自胰腺结构的糖肽、抗体以及其在诊断和治疗中的应用。

### 背景技术

[0002] 外分泌胰腺的癌症（其占超过 20% 的消化道癌）是癌症的最具侵袭性形式之一。在法国，例如，每年诊断 4,000 个新病例。另外，它的频率在世界的许多地区正显著上升。存活率不超过 20%（1 年）和 3%（5 年），并且在诊断以后平均生存期为 3 至 4 个月。这种低存活率源自许多原因，包括以下事实：肿瘤的深层解剖位置、缺少敏感和特异性早期生物标志物、以及其无症状性导致几乎总是较晚得到诊断。此外，胰腺癌进展非常快速，主要通过腹腔和肝脏转移瘤的形成。目前，并没有充分的治疗选择来治疗胰腺癌。

[0003] 已探索了两种不同的方式来治疗胰腺癌：化学放疗和免疫疗法。化学放疗临床试验包括将吉西他滨（gemcitabine）加入到标准化学放疗方案中；这已显示可以稍微改善患者的总生存。将埃罗替尼（erlotinib）加入到吉西他滨中仅提供适度的改善。通常，化学放疗，虽然显示某些积极结果，但仍然呈现较差的治疗选择。

[0004] 免疫疗法临床试验已包括直接接种疫苗，其中使用整体胰腺癌细胞、可溶性 VEGF 或 EGFR、来自 MUC1 的肽、胃泌素、以及间皮素。也已尝试间接免疫疗法方式，例如通过缔合抗体于 VEGF（阿瓦斯汀（Bevacizumab））或 EGFR（西妥昔单抗（Cetuximab）），其中借助于药物如吉西他滨、酪氨酸激酶抑制剂（埃罗替尼）、微管去稳定剂（泰索帝（Taxotere））、或环磷酰胺（环磷酰胺制剂（Cytoxan））。这样的试验正在进行中。

[0005] 虽然在鉴定有用的诊断和治疗标志物的努力中相对于恶性胰腺上皮细胞已产生了许多单克隆抗体（例如，Span-1、Du-Pan-2、CA 19-9、CAR-3、CA242、以及 CO-TL1），但几乎没有对胰腺肿瘤细胞真正具有特异性，并且它们的反应性经常取决于患者的基因型（参见，例如，Kawa et al. (1994) Pancreas ;9 :692-7）。因此，这种类型的大多数标志物不能为外分泌胰腺癌的有效诊断或治疗提供显著的益处。

[0006] 在先前的研究中，已经表明，人胰腺肿瘤细胞过度表达胚胰腺泡蛋白（FAPP），胆盐依赖性脂肪酶（BSDL）的一种癌胚形式，其伴随糖基化改变，而糖基化改变导致许多糖表位（glycotope，一种包括碳水化合物的表位。表位又是抗原决定簇，通常是通过免疫系统，特别地通过抗体、B 细胞或 T 细胞识别的高分子）的特异性表达，如 16D10 和 J28 糖表位。研究还表明，在胰腺肿瘤 SOJ-6 细胞的表膜上存在 32kDa 肽，其伴随由单克隆抗体 mAb16D10 识别的糖表位。

[0007] 因此本领域非常需要新的方式和工具，用于治疗外分泌胰腺和其它形式的癌症。本发明解决了这些和其它需要。

### 发明内容

[0008] 本发明尤其来自以下惊人的发现：结合 BSDL 或 FAPP 多肽的抗原结合化合物能够诱导细胞凋亡和 / 或减慢表达 BSDL 或 FAPP 多肽的肿瘤细胞的增殖（应当明了，如在本文中

使用的,短语“BSDL 或 FAPP”不是排他性的,即,它还可以指“BSDL 和 / 或 FAPP”或“BSDL 和 FAPP”),从而导致细胞死亡或停止它们的生长和增殖。当通过结合至 BSDL 或 FAPP 的抗体来触发细胞凋亡时,所形成的程序性细胞死亡由至少半胱天冬酶(胱冬裂酶,半胱天冬蛋白酶, caspase)-3、半胱天冬酶 -9、半胱天冬酶 -8 活化和 / 或多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP) 切割加以介导。另外,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的减少伴随 Bax 蛋白的增加,这表明半胱天冬酶活化受 Bcl-2 蛋白家族的控制。因此,本发明的化合物特别可用于诱导癌细胞的凋亡,或用于治疗患有癌症的患者(包括癌细胞),其表达 BSDL 或 FAPP 并且其易感于细胞凋亡(例如,它们表达半胱天冬酶 -3、半胱天冬酶 -9、半胱天冬酶 -8、PARP 等)。当本发明的化合物抑制细胞增殖时,它至少通过封闭在 G1/S 处的细胞来进行,例如通过增加 p53 活性和降低细胞周期蛋白 D1 水平,例如通过激活 GSK-3 $\beta$ 。因此,本发明的化合物特别可用于停止癌细胞的增殖,或用于治疗患有癌症的患者(包括癌细胞),其表达 BSDL 或 FAPP 并且其易感于 p53 或 GSK-3 $\beta$  介导的 G1/S 细胞周期阻滞。

[0009] 重要的是,本发明的化合物能够直接靶向肿瘤细胞,尤其是表达 BSDL 或 FAPP 的胰腺肿瘤细胞,并引起它们的死亡(经由细胞凋亡)和 / 或停止它们的增殖。显著地,由于这些效应仅取决于化合物与 BSDL 或 FAPP 多肽的相互作用,所以它们甚至可以用“裸”化合物(尤其是抗体)进行,即没有被有毒化合物修饰或衍生化的化合物。另外,当化合物是抗体时,它们可以有效地靶向肿瘤细胞,甚至不依靠肿瘤细胞的免疫细胞介导杀伤 (ADCC) (但应该强调的是,ADCC 还可以在许多情况下发生,进一步增强治疗效力)。因此,本发明的化合物特别可用于具有受损免疫系统的患者,例如患有 AIDS 的患者、接受化疗的患者、或接受免疫抑制药物治疗的患者。

[0010] 虽然本发明的化合物可以是任何类型的分子实体(例如,多肽、小分子),其可以特异性地结合至表达 BSDL 或 FAPP 的细胞并从而诱导它们的凋亡或抑制它们的生长和增殖,但本发明的优选化合物是抗体。特别优选的抗体是二价 IgG 抗体,因为它们通常可以不仅直接减少靶细胞数目(通过细胞凋亡或通过抑制细胞增殖),而且包含 Fc 尾部并具有足够的结合亲和力以诱导通过 ADCC 来杀伤细胞。另外,已发现,某些抗 BSDL 或抗 FAPP 抗体,尤其是多聚抗体如 IgM 抗体,倾向于被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞快速内化,因而不能有效地诱导 ADCC。因此,通过选择适当的抗体(二价 IgG 抗体,其靶向 BSDL 或 FAPP,最优选由抗体 16D10 识别的 FAPP 表位),可以通过两种独立的机制(细胞凋亡诱导 / 细胞周期抑制和 ADCC) 来靶向表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞。因此这些发现一起提供了意想不到的方式来产生特别有效的抗原结合化合物,最优选抗体,其尤其具有所期望的促凋亡或抗细胞增殖特性以及通常地 ADCC 诱导效应。描述了制备和使用这样的抗原结合化合物的方法,以及示例性的抗原结合化合物。

[0011] 本发明提供了使用抗原结合化合物的方法;例如,本发明提供了一种用于诱导细胞死亡或抑制细胞增殖的方法,包括将细胞如表达 BSDL 或 FAPP 多肽的癌细胞暴露于抗原结合化合物,其以有效量结合 BSDL 或 FAPP 多肽,以诱导细胞死亡或抑制细胞增殖。应当明了,对于本发明来说,“细胞增殖”可以指细胞生长或增殖的任何方面,例如,细胞生长、细胞分裂、或细胞周期的任何方面。细胞可以处于细胞培养物中或在哺乳动物中,例如患有癌症的哺乳动物。本发明还提供了一种用于诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制其增殖的方法,包括将细胞暴露于抗原结合化合物(例如,外源性抗体),其以有效量结合如

本文描述的 BSDL 或 FAPP 多肽,以诱导细胞凋亡或抑制细胞的增殖。因此,本发明提供了一种用于治疗患有病症(特征在于 BSDL 或 FAPP 多肽的表达,例如,胰腺癌)的哺乳动物的方法,包括将药物有效量的本文披露的抗原结合化合物给予哺乳动物。在优选的实施方式中,化合物是抗体,例如二价 IgG 抗体,其并没有显著地被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞内化,因而可有效地诱导细胞的 ADCC。在优选的实施方式中,抗体具有结合于表达 BSDL 或 FAPP 的细胞(例如,SOJ-6 细胞)的细胞表面的至少 40、60、80、100、120 分钟、或更长时间的半衰期。在其它优选的实施方式中,抗体与 BSDL 表位或 FAPP 表位(优选由 16D10 特异性地识别的表位)的结合亲和力为 50、40、30、20、10、5、1、或更少纳摩尔。

[0012] 本发明提供了这样的方法,该方法用于生产抗原结合化合物,尤其是抗体,其特异性地结合 BSDL 或 FAPP 多肽并且其可用于治疗胰腺癌。利用本发明的方法生产的抗原结合化合物能够特异性地靶向胰腺肿瘤细胞或任何其它细胞,其表达 BSDL 或 FAPP 多肽,尤其是在 BSDL 和 / 或 FAPP 多肽上的由抗体 16D10 识别的表位。抗原结合化合物可以限制细胞增殖的病理效应,其中通过诱导细胞凋亡或抑制细胞增殖,以及可选地还通过中和扩大细胞的效应(仅借助于结合),通过靶向它们加以破坏(通过免疫系统)(例如,借助于 ADCC),和 / 或通过杀伤细胞,其中直接通过使它们与细胞毒性剂接触,如放射性同位素、毒素、或药物。还提供了利用抗原结合化合物来治疗表达 BSDL 或 FAPP 多肽的癌症(或与 BSDL 或 FAPP 的表达有关的病症)的方法。在优选的实施方式中,抗体具有结合于表达 BSDL 或 FAPP 的细胞(例如,SOJ-6 细胞)的细胞表面的至少 40、60、80、100、120 分钟、或更长时间的半衰期。在其它优选的实施方式中,抗体具有 50、40、30、20、10、5、1、或更小纳摩尔的与 BSDL 表位或 FAPP 表位(优选由 16D10 特异性地识别的表位)的结合亲和力。在其它优选的实施方式中,抗体是不同于 16D10 的抗体。

[0013] 在另一种实施方式中,因为抗原结合化合物能够诱导肿瘤细胞的死亡和 / 或阻滞它们的生长,所以结合 BSDL 和 / 或 FAPP 多肽的化合物可以用于已确认的肿瘤,以便减小或限制这样的肿瘤的容积,例如胰腺癌,例如在能够或不能外科手术切除或减体的肿瘤中,或在胰腺癌中,其中肿瘤已确认或已扩散,例如其中胰腺癌被归类为至少 I 期癌症和 / 或其中在胰腺中肿瘤的尺寸在任何方向为 2cm 或更小,或其中胰腺癌被归类为至少 2 期癌症和 / 或其中在胰腺中的肿瘤尺寸在任何方向大于 2cm,其中胰腺癌被归类为 2 期癌症和 / 或癌症已开始生长进入胰腺周围的附近组织,但不在附近淋巴结内,其中胰腺癌被归类为 3 期癌症和 / 或可能已生长进入胰腺周围的组织,或其中胰腺癌被归类为 4 期癌症和 / 或已生长进入邻近器官。在已进展超过原位癌的肿瘤中杀伤或停止肿瘤细胞的生长的能力在胰腺癌中是显著的,因为这样的癌症经常在发展的晚期被诊断。

[0014] 显著地,在某些实施方式中,因为结合 BSDL 或 FAPP 多肽的抗原结合化合物,尤其是在当使用抗体的情况下,将不只取决于免疫细胞介导的细胞杀伤(例如 ADCC),所以预期,结合 BSDL 或 FAPP 多肽的抗原结合化合物可以有效地用于具有不足或抑制免疫系统的患者,和 / 或连同另外的抗肿瘤剂,尤其是治疗剂,其已知对免疫系统具有不利影响。例如,无免疫应答的(免疫缺失)患者(例如,患有 HIV 感染)、接受免疫抑制药物的患者(例如,在移植以后或作为用于自身免疫性疾病的治疗)、或接受化疗药物的患者尤其是用这样的化合物加以治疗的良好候选者。

[0015] 另外,因为本发明的结合 BSDL 或 FAPP 多肽并具有促凋亡或抗增殖作用的抗原结

合化合物可以消除或停止胰腺肿瘤细胞的生长,所以可以期望在本文提供的体外和体内方法中结合本文披露的抗原结合化合物与其它抗增生和 / 或促凋亡剂,以便增强各自的促凋亡或抗细胞增殖活性,并且还使得细胞可以例如首先经受生长停滞,然后通过促凋亡化合物加以根除。

[0016] 因此,本发明提供了一种抗原结合化合物,其特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽,并且其能够诱导细胞凋亡或抑制胰腺肿瘤细胞的增殖。优选地,抗原结合化合物结合于在 BSDL 或 FAPP 多肽上与抗体 16D10 相同的表位。在一种实施方式中,抗原结合化合物与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽(例如,竞争结合于分离的糖肽或竞争结合于表达它的细胞)。在一种实施方式中,化合物是不同于抗体 16D10 的抗体。

[0017] 在本发明的方法的一种实施方式中,由抗原结合化合物识别的 BSDL 或 FAPP 多肽是 BSDL 的 C 端肽。在另一种实施方式中,抗原结合化合物特异性地结合 BSDL 或 FAPP 多肽,其包括一个或多个重复的 11 个氨基酸的 C 端肽序列或由其组成,其包含具有 7 个氨基酸的通常不变部分,其中 7 个氨基酸具有序列 Ala Pro Pro ValPro Pro Thr 和糖基化位点。所述通常不变部分可选地在任一侧旁侧有经常被谷氨酸取代的甘氨酸并且在 N 端侧包含氨基酸 Asp 和 Ser。

[0018] 在一种优选的实施方式中,抗原结合化合物是“裸露的”,并且没有用放射性同位素、有毒肽或毒性小分子加以功能化(例如,“裸露的”抗体)。在另一种实施方式中,抗原结合化合物是一种细胞毒性抗原结合化合物并且包括一种元件,其选自放射性同位素、有毒肽、以及毒性小分子组成的组。在另一种实施方式中,抗原结合化合物是一种抗体,其是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在另一种实施方式中,放射性同位素、有毒肽、或毒性小分子直接附着于抗原结合化合物。

[0019] 在另一种实施方式中,抗原结合化合物是一种抗体,例如,二价嵌合或人源化抗体。在一种这样的实施方式中,抗体包括抗体 16D10 的可变(抗原结合)结构域。在一种优选的实施方式中,抗体包括 Fc 尾部。在其它优选的实施方式中,抗体具有结合于表达 BSDL 或 FAPP 的细胞(例如,SOJ-6 细胞)的细胞表面的至少 40、60、80、100、120 分钟、或更长时间的半衰期。在其它优选的实施方式中,抗体与 BSDL 表位或 FAPP- 表位(优选由 16D10 特异性地识别的表位)结合亲和力为 50、40、30、20、10、5、1、或更少纳摩尔。在另一种优选的实施方式中,抗体没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞(例如,SOJ-6 细胞)显著内化,因此能够诱导靶(表达 BSDL 或 FAPP)细胞的细胞介导杀伤(ADCC)。在另一种优选的实施方式中,抗体被低岩藻糖基化(hypofucosylated)。

[0020] 因此,本发明提供了一种治疗患有胰腺癌患者的方法,该方法包括给予患者药物有效量的根据本发明的抗原结合化合物,其特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。本发明还提供了一种用于治疗患者的方法,该方法包括 a) 评估患者体内的胰腺癌,以及 b) 如果确定癌症处于需要杀伤癌细胞、诱导癌细胞凋亡、或抑制癌细胞的生长或增殖的时期,例如其中癌症被确立、外科手术可治疗的、非外科手术可治疗的、进展超过原位癌、和 / 或具有至少 2cm 的直径和 / 或归类为至少 1 期,则将抗原结合化合物(例如,抗体)给予患者,其特异性地结合 BSDL 或 FAPP 多肽并且其能够诱导胰腺肿瘤细胞的凋亡或抑制胰腺肿瘤细胞的生长或增殖。在一种实施方式中,化合物是抗体,例如,二价 IgG 抗体(在该实施方式和其它实施方式中,优选包含 Fc 尾部),其没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞显著内化并且其能够诱导靶

胞的细胞介导杀伤 (ADCC)。

[0021] 在一种实施方式中,本发明提供了一种生产适用于治疗癌症的抗原结合化合物的方法,所述方法包括:i) 提供抗原结合化合物,其特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽;ii) 测试抗原结合化合物的促凋亡或抗细胞增殖活性的能力;iii) 如果确定抗原结合化合物具有促凋亡或抗细胞增殖活性,则选择抗原结合化合物;以及可选地 iv) 生产一些所选择的抗原结合化合物。在一种实施方式中,在步骤 iii) 中选择的化合物是抗体,并且在步骤 iv) 以前被变得适合于给予人,例如通过对其进行人源化或嵌合。可选地,在步骤 i) 中提供多种抗原结合化合物,并且在步骤 ii) 中对于每种抗原结合化合物测试其诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的增殖的能力。通常,步骤 ii) 将涉及标准测定,其中使细胞,例如表达 BSDL 或 FAPP 的细胞,优选肿瘤细胞如 SOJ-6 细胞或获自患有胰腺癌患者的细胞,与化合物接触,然后评估细胞的增殖或存活,并经常连同已知细胞凋亡或细胞生长/周期调节基因的活性的分析。

[0022] 在另一种实施方式中,本发明提供了一种生产适用于治疗癌症的抗体的方法,所述方法包括:i) 提供抗体,其特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 肽;ii) 测试抗体的促凋亡或抗细胞增殖活性;iii) 测试抗体诱导细胞(例如表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞)的免疫细胞介导杀伤(ADCC)的能力;iv) 如果确定抗原结合化合物具有促凋亡或抗细胞增殖活性并且能够诱导细胞(例如,表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞)的 ADCC,则选择抗体;以及可选地 v) 生产一些所选择的抗原结合化合物。在一种实施方式中,在步骤 v) 以前,使在步骤 iv) 中选择的抗体变得适合于给予人,例如通过对其进行人源化或嵌合。可选地,在步骤 i) 中提供多种抗原结合化合物,然后在步骤 ii) 中对于每种抗原结合化合物测试其诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的增殖的能力。在优选的实施方式中,抗体是 IgG。另外,抗体优选为二价抗体。在另一种优选的实施方式中,抗体并不与非肿瘤组织交叉反应,所述非肿瘤组织选自扁桃腺、唾液腺、周围神经、淋巴结、眼、骨髓、卵巢、输卵管、甲状旁腺、前列腺、脾、肾、肾上腺、睾丸、胸腺、输尿管、子宫、以及膀胱组成的组。

[0023] 在另一种实施方式中,本发明提供了一种生产适用于治疗癌症的抗体的方法,所述方法包括:i) 提供一种抗体,其特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽;ii) 测试抗体的促凋亡或抗细胞增殖活性;iii) 测试细胞,例如,表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞,对抗体的内化;iv) 如果确定了抗原结合化合物具有促凋亡或抗细胞增殖活性并且没有被细胞,例如表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞显著内化,则选择抗体;以及可选地 v) 生产一些所选择的抗原结合化合物。在一种实施方式中,在步骤 v) 以前,使在步骤 iv) 中选择的抗体适用于给予人,例如通过对其进行人源化或嵌合。可选地,在步骤 i) 中提供多种抗原结合化合物,然后在步骤 ii) 中对于每种抗原结合化合物测试其诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的增殖的能力。在优选的实施方式中,抗体是 IgG。另外,抗体优选为二价抗体(并且包含 Fc 尾部)。在另一种优选的实施方式中,抗体并不与非肿瘤组织交叉反应,所述非肿瘤组织选自扁桃腺、唾液腺、周围神经、淋巴结、眼、骨髓、卵巢、输卵管、甲状旁腺、前列腺、脾、肾、肾上腺、睾丸、胸腺、输尿管、子宫、以及膀胱组成的组。在优选的实施方式中,抗体具有至少 40、60、80、100、120 分钟、或更长时间的结合于表达 BSDL 或 FAPP 的细胞(例如,SOJ-6 细胞)的细胞表面的半衰期。在其它优选的实施方式中,抗

体具有 50、40、30、20、10、5、1、或更少纳摩尔的与 BSDL 表位或 FAPP 表位（优选由 16D10 特异性地识别的表位）的结合亲和力。在其它优选的实施方式中，抗体被低岩藻糖基化。

[0024] 在另一种实施方式中，本发明提供了一种生产适用于治疗癌症的抗原结合化合物的方法，所述方法包括：i) 生产一些抗原结合化合物，其特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽；ii) 测试来自所述一些抗原结合化合物的样品的促凋亡或抗细胞增殖活性；iii) 如果确定了抗原结合化合物具有促凋亡或抗细胞增殖活性，则选择所述一些抗原结合化合物用作药物和/或用于制备药物；以及可选地 iv) 制备所述一些抗原结合化合物用于给予人，可选地将一定量的所选择的抗原结合化合物与药用载体一起配制。

[0025] 在另一种实施方式中，本发明提供了一种生产适用于治疗癌症的抗原结合化合物的方法，所述方法包括：i) 提供多种抗原结合化合物，其特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽；ii) 测试每种抗原结合化合物的促凋亡或抗细胞增殖活性的能力；iii) 选择能够诱导所述细胞的凋亡或抑制所述细胞的增殖的抗原结合化合物；以及 iv) 可选地，使抗原结合化合物适合于给予人；和/或可选地 v) 制备一些所选的抗原结合化合物。在一种实施方式中，该方法包括另外的步骤，其中化合物是抗体，并且评估表达 BSDL 或 FAPP 的细胞对抗体的内化，其中在步骤 iii) 中选择的抗体基本上没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞内化的发现证实了，其适用于治疗癌症。在另一种实施方式中，该方法包括另外的步骤，其中化合物是抗体，并且评估了抗体诱导细胞（例如，表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞）的细胞介导杀伤 (ADCC) 的能力，其中在步骤 iii) 中选择的抗体能够诱导细胞（例如，表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞）的 ADCC 的发现证实了其适用于治疗癌症。

[0026] 在另一种实施方式中，本发明提供了一种生产抗原结合化合物的方法，包括：i) 提供抗原结合化合物，其特异性地结合于肿瘤细胞，该肿瘤细胞表达获自 1 位或多位患有胰腺癌患者的 BSDL 或 FAPP 多肽；ii) 测试抗原结合化合物相对于获自 1 位或多位患有胰腺癌患者的肿瘤细胞的促凋亡或抗细胞增殖活性；iii) 如果抗原结合化合物诱导获自 1 位或多位患者的大量的肿瘤细胞的凋亡或抑制其增殖，则使抗原结合化合物适合于给予人；以及 iv) 可选地生产一定量的适合人的抗原结合化合物。在一种实施方式中，该方法包括另外的步骤，其中化合物是抗体，并且评估了表达 BSDL 或 FAPP 的细胞对抗体的内化，其中在步骤 iii) 中所使用的抗体基本上没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞内化的发现证实了其适用于治疗胰腺癌。在另一种实施方式中，该方法包括另外的步骤，其中化合物是抗体，并且评估了抗体诱导表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞的细胞介导杀伤 (ADCC) 的能力，其中在步骤 iii) 中所使用的抗体能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞的 ADCC 的发现证实了其适用于治疗胰腺癌。

[0027] 在本发明的任何方法的一种实施方式中，该方法可以包括在步骤 i) 以前用 BSDL 或 FAPP 多肽免疫非人哺乳动物（例如，小鼠、大鼠、兔、用于人 Ig 基因的转基因小鼠等）的步骤。在另一种实施方式中，该方法包括在步骤 i) 以前产生抗原结合化合物的文库（例如借助于噬菌体展示法等）并选择结合 BSDL 或 FAPP 多肽的抗原结合化合物的步骤。

[0028] 在本发明的任何方法的一种实施方式中，步骤 i) 和/或步骤 ii) 的抗原结合化合物或抗体并不包含细胞毒性剂如放射性同位素、毒性多肽、或毒性小分子。

[0029] 可以按照各种可获得方法的任何方法来测试每种抗原结合化合物或抗体诱导细胞凋亡或抑制其增殖的能力。例如，所述测试可以包括但不限于检测靶细胞（例如，肿瘤细

胞、SOJ-6 细胞、表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞) 的死亡、检测核碎裂、检测活性(例如, 半胱天冬酶活化) 或增加和 / 或降低与细胞凋亡有关的蛋白质水平。类似地, 可以按照各种可获得方法的任何方法来测试化合物对细胞生长或增殖的影响, 例如, 计数细胞数、密度、DNA 复制、有丝分裂指数、测量与细胞生长或增殖有关的蛋白质或其它分子的水平、或细胞生长或增殖的任何其它度量。

[0030] 在本发明的任何方法的一种实施方式中, 促凋亡或抗细胞增殖活性的测试包括确定抗原结合化合物是否诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制其生长或增殖。可选地, 细胞表达在脂筏 (lipid raft) 中的 BSDL 或 FAPP 多肽。可选地, 使细胞表达 BSDL 或 FAPP 多肽。可选地, 细胞是肿瘤细胞系。可选地, 细胞是胰腺癌细胞, 可选地 SOJ-6 细胞。可选地, 细胞是获自一位或多位患有癌症(例如, 外分泌胰腺癌) 患者的肿瘤细胞。

[0031] 在本发明的任何方法的一种实施方式中, 可以在没有免疫效应细胞、尤其是 NK 细胞存在的条件下, 进行抗原结合化合物是否诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制其增殖的确定。

[0032] 在本发明的任何方法的一种实施方式中, 促凋亡或抗细胞生长或增殖活性的测试包括确定抗原结合化合物是否在表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞中调节凋亡或细胞增殖调节蛋白或标记的活性或水平。优选地, 对于细胞凋亡, 调节蛋白是半胱天冬酶或 Bcl-2 家族成员。对于细胞生长或增殖, 调节蛋白或标记可以是, 例如, PCNA、Ki-67、细胞周期蛋白如细胞周期蛋白 D(例如, 细胞周期蛋白 D1)、E2F、Rb、p53、MCM6、GSK-3 $\beta$ 、Bcl10、或 BrdU 掺入。

[0033] 在本发明的任何方法的一种实施方式中, 使抗原结合化合物适合于给予人包括使抗 BSDL 或 FAPP 抗体成为嵌合抗体、人抗体、或人源化抗体。使化合物适合于给予人还可以包括将化合物与药用载体一起配制。

[0034] 在本发明的任何方法的一种实施方式中, 生产一些抗原结合化合物包括在适宜的培养基中培养表达抗原结合化合物的细胞并回收 (recovering) 抗原结合化合物。可选地, 细胞是用来表达抗原结合化合物的重组宿主细胞。在一种实施方式中, 化合物是单克隆抗体并且细胞是杂交瘤。

[0035] 在本发明的任何方法的一种实施方式中, 抗原结合化合物, 尤其是由所述方法生产的抗原结合化合物, 并不包括细胞毒性剂如放射性同位素、毒性多肽、或毒性小分子。在一种实施方式中, 抗原结合化合物是特异性地结合 BSDL 或 FAPP 多肽的抗体。在本发明的任何方法的一种实施方式中, 抗原结合化合物与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。在本发明的任何方法的一种实施方式中, 化合物是不同于 16D10 的抗体。在本发明的任何方法的另一种实施方式中, 化合物是抗体 16D10 的嵌合版本、人版本、或人源化版本。

[0036] 在本发明的任何方法的一种实施方式中, 抗原结合化合物, 优选抗体, 具有 Fc 受体结合部分, 优选 IgG 同种型(可选地人 IgG 同种型) 的重链恒定区。在一种优选的实施方式中, 抗体是 IgG1 抗体。本发明还涵盖抗体的片段和衍生物, 其具有基本上相同的抗原特异性和活性(例如, 其可以结合于与亲代抗体相同的抗原)。这样的片段包括但不限于 Fab 片段、Fab' 2 片段、CDR 以及 ScFv。当化合物是抗体时, 该抗体通常是, 例如, 嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一种优选的实施方式中, 抗体是重组嵌合抗体。在一种这样的实施方式中, 抗 BSDL 或 FAPP 抗体(例如, 16D10) 的小鼠重链的结构域 Cu2、Cu3、以及 Cu4 被人 IgG(例如 IgG1) 替换。在另一种优选的实施方式中, 抗体是嵌合抗体, 其中小鼠抗 BSDL

或 FAPP 抗体（例如，16D10）的恒定区被重链和轻链的人 IgG1 恒定区替换。

[0037] 在某些实施方式中，本发明的化合物是多聚（即交联）IgG 抗体。在优选的实施方式中，抗体是四聚的（两个重链和两个轻链），因而是二价的。在特别优选的实施方式中，抗体能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞的凋亡或抑制其增殖。在特别优选的实施方式中，抗体能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞的凋亡或抑制其增殖，并且基本上没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞内化。在其它特别优选的实施方式中，抗体能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的肿瘤细胞的凋亡或抑制其增殖，并且还能够在诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤（ADCC）。在其它特别优选的实施方式中，抗体并不与组织交叉反应，所述组织选自扁桃腺、唾液腺、周围神经、眼、骨髓、卵巢、输卵管、甲状旁腺、前列腺、脾、肾、肾上腺、睾丸、胸腺、输尿管、子宫、以及膀胱组成的组。在其它优选的实施方式中，抗体具有至少 40、50、60、70、80、100、120、150、200 分钟、或更长时间的结合于表达 BSDL 或 FAPP 的细胞（例如，SOJ-6 细胞）的表面的半衰期。在其它优选的实施方式中，抗体具有 50、40、30、20、10、5、1、或更少纳摩尔的与 BSDL 或 FAPP 表位（例如，由 16D10 识别的表位）的结合亲和力。

[0038] 在另一种实施方式中，本发明涵盖按照本发明的任何方法生产的抗原结合化合物。

[0039] 本发明还涵盖药物剂型（pharmaceutical formulations），其包括任何抗原结合化合物，尤其是本发明的任何抗体，以及药用载体，正如试剂盒一样。试剂盒可以例如包括化合物和其使用说明，例如用于治疗胰腺癌。试剂盒可以包括化合物和载体；试剂盒可以包括在制造的（例如，玻璃、塑料或其它）容器中的化合物。还涵盖表达抗体的细胞，例如，杂交瘤。

[0040] 在一种实施方式中，本发明的抗原结合化合物或抗体与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。本发明还涵盖抗体的片段和衍生物，其具有与抗体 16D10 基本上相同的抗原特异性和活性（例如，其可以结合于与亲代抗体相同的抗原）。这样的片段包括但不限于 Fab 片段、Fab' 2 片段、CDR 以及 ScFv。

[0041] 在一种实施方式中，本发明的组合物和 / 或方法明确排除抗体 16D10，尤其是由这样的细胞产生的 IgM 抗体 16D10，其于 2004 年 3 月 16 日保藏在巴黎的 Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM)，编号为 I-3188。

[0042] 因此，在另一种实施方式中，本发明提供了一种抗体，优选一种分离的抗体，其结合于 BSDL 或 FAPP 多肽并且其能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制其增殖，其中抗体与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽，并且其中抗体不是 16D10。

[0043] 在另一种实施方式中，本发明提供了一种由两个重链和两个轻链构成的二价抗体，其中重链包括能够结合于 Fc 受体的 IgG 重链恒定区，并且其中抗体：(a) 能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的凋亡或抑制其增殖；(b) 能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤（ADCC）；以及 (c) 与抗体 16D10 竞争结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。

[0044] 在另一种实施方式中，本发明提供了一种二价抗体，其包括：(a) 包含可变区的重链，其中可变区包括来自氨基酸序列 SEQ ID NO :7（融合于人 IgG 链恒定区）的一个或多个 CDR；以及 (b) 包含可变区的轻链，其中可变区包括来自氨基酸序列 SEQ ID NO :8（可选地融合于人卡巴链恒定区）的一个或多个 CDR。

[0045] 可选地，本文中的任何抗体可以进一步通过没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞显著

内化来表征。在另一种实施方式中,本文中的任何抗体可以进一步通过还能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤 (ADCC) 来表征,本文中的任何抗体可以进一步表征为没有包括细胞毒性剂如放射性同位素、毒性多肽、或毒性小分子,本文中的任何抗体可以进一步通过能够诱导胰腺肿瘤细胞的凋亡或抑制其增殖来表征,本文中的任何抗体可以进一步通过能够在表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞中调节凋亡调节蛋白的活性或水平来表征。在另一种实施方式中,本文中的任何抗体可以进一步通过能够调节半胱天冬酶或 Bcl-2 家族成员的活性或水平来表征。在另一种实施方式中,抗体在表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞中调节细胞增殖或生长调节蛋白的活性或水平。在另一种实施方式中,抗体在表达 BSDL 或 FAPP 的细胞(其选自由 GSK-3 $\beta$ 、细胞周期蛋白 D1、以及 p53 组成的组)中调节细胞增殖或生长调节蛋白的活性或水平。在另一种实施方式中,本文中的任何抗体可以进一步表征为具有 IgG 同种型(可选地人 IgG 或 IgG1 同种型)的重链恒定区。在另一种实施方式中,本文中的任何抗体可以进一步通过为四聚抗体来表征。在另一种实施方式中,本文中的任何抗体可以进一步表征为是二价抗体。在另一种实施方式中,本文中的任何抗体可以进一步表征为是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。在另一种实施方式中,本文中的任何抗体可以进一步表征为被低岩藻糖基化。

[0046] 在任何本文描述的抗体的一种实施方式中,抗体结合于表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的表面,其中半衰期为至少 40、60、80、100、120、180、240 分钟、或更长时间。在另一种实施方式中,抗体结合于 BSDL 或 FAPP 表位,其中结合亲和力为至少 50、40、30、20、10、5、或 1 纳摩尔。

[0047] 本发明还涵盖一种药物组合物,其包括任何本文描述的抗原结合化合物或抗体、以及药用载体。在另一个方面,本发明涵盖一种试剂盒,该试剂盒包括本发明的抗原结合化合物或抗体,以及说明书,其说明如何利用所述抗原结合化合物或抗体来治疗或诊断胰腺或表达 FAPP 或 BSDL 的病理特征,例如胰腺癌。在另一种实施方式中,还提供了细胞,例如,杂交瘤。

[0048] 在其它方面,提供了一种诱导癌细胞的凋亡或抑制其增殖、和 / 或治疗患有癌症的患者或个体的方法,该方法包括 :a) 确定促凋亡或抗细胞增殖剂是否适合于治疗癌症或癌细胞,以及 b) 在肯定确定的情况下,即癌症或癌细胞适合于用促凋亡或抗细胞增殖剂治疗,则用有效量的本发明的任何抗原结合化合物接触癌细胞。在又一个方面,本发明提供了一种诱导癌细胞的细胞凋亡或抑制其增殖和 / 或治疗患有癌症的患者的方法,该方法包括 :a) 确定癌症或癌细胞是否表达 BSDL 或 FAPP 多肽,以及 b) 在肯定确定的情况下,即癌症或癌细胞表达 BSDL 和 / 或 FAPP 多肽,则用有效量的本发明的任何抗原结合化合物接触癌细胞。可选地,在这些方法中,接触癌细胞的步骤包括给予患者药物有效量的本发明的抗原结合化合物。优选地,药物有效量是这样的量,其可以有效地诱导患者体内的癌细胞的凋亡或抑制其增殖。此外可选地在这些方法中,化合物是抗体,并且所述方法涉及另外的步骤,其中评估了表达 BSDL 或 FAPP 的细胞对抗体的内化,或其中评估了抗体诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤 (ADCC) 的能力,其中抗体基本上没有被内化或能够诱导表达 BSDL 和 / 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤的确定表明抗体适用于步骤 b)。在某些实施方式中,在没有或相对缺乏免疫效应细胞(例如,NK 细胞)的条件下进行接触,例如当体外进行这样的方法时或当在缺乏免疫系统的患者中进行上述方法时(例如,由于诸如 AIDS 的病

症,由于降低 NK 细胞水平的病症,由于给予化疗药剂,或由于使用免疫抑制剂,例如连同移植操作或自身免疫性疾病的治疗)。

[0049] 在另一个方面,本发明提供了一种降低患者体内肿瘤体积的方法,包括给予患者药物有效量的本发明的抗原结合化合物。

[0050] 在另一个方面,本发明提供了一种诱导表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞(可选地肿瘤细胞)的凋亡或抑制其增殖的方法,包括使所述细胞接触有效量的本发明的抗原结合化合物以诱导细胞的凋亡或抑制细胞的增殖。可选地,所述接触是在没有或相对缺乏免疫效应细胞(例如,NK 细胞)的条件下进行的,和/或体外进行的。可选地,该方法进一步包括确定抗原结合化合物是否能够诱导细胞的凋亡或抑制其增殖。可选地,化合物是抗体,其基本上没有被表达 BSDL 或 FAPP 的细胞内化和/或能够诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的细胞介导杀伤(ADCC),并且所述接触是在有免疫效应(例如,NK)细胞存在的条件下进行的。

### 附图说明

[0051] 图 1 说明 mAb16D10 刺激 SOJ-6 细胞的凋亡细胞死亡的能力(与 RPMI 和小鼠 IgM 相比;y 轴表示凋亡细胞的数目/cm<sup>2</sup>)。

[0052] 图 2 示出了通过 16D10 进行的细胞凋亡诱导,如用 CaspAceFITC-VAD-fmk 对胰腺 SOJ-6 细胞测得的,其中用或不用半胱天冬酶抑制剂(半胱天冬酶 9 :Z-LEHD-fmk,半胱天冬酶 8 :Z-IEDT-fmk,半胱天冬酶 3 :Z-DEVED-fmk,以及半胱天冬酶混合物 :Z-VAD-fmk)对胰腺 SOJ-6 细胞进行预处理,然后用 mAb16D10 加以处理;mAb16D10 通过半胱天冬酶 -3、半胱天冬酶 -8、以及半胱天冬酶 -9 来刺激细胞凋亡。

[0053] 图 3 示出了由 mAb16D10 诱导的 SOJ-6 细胞的凋亡,如通过 DAPI 染色所观察到的;RPMI 没有诱导细胞凋亡,顺铂诱导低水平的细胞凋亡,而抗体 16D10 诱导显著水平的细胞凋亡。

[0054] 图 4 示出了在凝胶上的结果,其说明,用 16D10 处理细胞可诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2 的减少并伴随 Bax 蛋白的增加,这表明半胱天冬酶活化受 Bcl-2 蛋白家族的控制。该实验还说明了 16D10 诱导的细胞凋亡是经由半胱天冬酶 8 和 9、以及多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)切割加以介导的。最左边的泳道表示在 RPMI 中的 SOJ-6 细胞,中间的泳道表示用抗体 16D10 温育的 SOJ-6 细胞,而最右边的泳道表示用顺铂温育的 SOJ-6 细胞。

[0055] 图 5 示出了 MTT 测定的结果,其中涉及用增加浓度的多克隆抗体 pAbL64(其识别人 BSDL/FAPP)处理 SOJ-6 胰腺肿瘤细胞。pAbL64 不能引起细胞生长或数目的降低(x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。

[0056] 图 6 示出了 MTT 测定的结果,其中涉及用增加浓度的多克隆抗体 J28 处理 SOJ-6 胰腺肿瘤细胞,其中多克隆抗体 J28 识别人 BSDL/FAPP,但本发明的发明人已证明其结合来自抗体 16D10 的 BSDL/FAPP 上的不同表位。J28 不能引起细胞生长或数目的降低(x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。

[0057] 图 7 示出了 MTT 测定的结果,其中涉及用增加浓度的多克隆抗体 16D10(IgM)(其识别人 BSDL/FAPP)处理 SOJ-6 或 PANC-1 胰腺肿瘤细胞。图 7 表明,16D10 不能引起 PANC-1 细胞的生长或数目的降低,其中 PANC-1 细胞并不表达 16D10 抗原但引起 SOJ-6 细胞的减少,其中 SOJ-6 细胞表达 FAPP(x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。

[0058] 图 8 示出了 MTT 测定的结果,其中涉及用增加浓度的对照 IgM 抗体处理 SOJ-6 或 PANC-1 胰腺肿瘤细胞,其表明对照 IgM 抗体不能引起 PANC-1 或 SOJ-6 细胞的生长或数目的降低(x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。

[0059] 图 9 示出了 MTT 测定的结果,其中涉及用增加浓度的抗体 16D10 或对照 IgM 抗体处理 SOJ-6 胰腺肿瘤细胞,其说明了 16D10 引起细胞的减少而对照 IgM 抗体则没有(x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。

[0060] 图 10 示出了 MTT 测定的结果,其中涉及用增加浓度的抗体 16D10 或对照 IgM 抗体、以及不同浓度的甲基- $\beta$ -环糊精(MBCD)并具有或没有抗体 16D10,来处理 SOJ-6 胰腺肿瘤细胞;当连同 16D10 一起使用时 MBCD 会降低或消除抗体 16D10 的细胞生长抑制活性。该数据表明, mAb16D10 刺激凋亡细胞死亡的能力取决于 16D10 抗原在膜脂 RAFT 微结构域中的定位。

[0061] 图 11 :mAb16D10 阻滞在 G1/S 期的细胞周期进展并调节 p53、细胞周期蛋白 D1、以及 GSK-3 $\beta$  的表达。将等量的细胞裂解液(50  $\mu$ g)装载到 SDS-PAGE 上,转移至硝化纤维素,并且在用 mAb16D10 处理以后用特异性抗体(p53、细胞周期蛋白 D1、磷酸-GSK-3 $\beta$  以及 GSK-3 $\beta$ )进行探测。 $\beta$ -肌动蛋白用作内部对照。每个实验进行三次(一式三份, in triplicate)。

[0062] 图 12 :膜筏结构的组织破坏会降低 mAb16D10 效应。以 8000 个细胞/孔接种 SOJ-6 细胞并生长过夜。用包含甲基- $\beta$ -环糊精(M $\beta$ CD)或菲律宾菌素(A)或鞘糖脂生物合成的代谢抑制剂(B)的新鲜培养基替换培养基 6 小时,然后用具有灭活 FBS(包含抗体)的新鲜培养基替换。通过 MTT 测定来确定细胞生存力。结果表示为三个独立实验的平均值  $\pm$ SD。

[0063] 图 13 :在 SOJ-6 和 PANC-1 细胞中, mAb16D10 处理对 E-钙粘着蛋白/ $\beta$ -联蛋白(连环蛋白)复合物的影响。用或不用 25  $\mu$ g/ml 的 mAb16D10 处理 SOJ-6 细胞 24 小时。通过 SDS-PAGE 分离(resolved)等量的细胞裂解液(50  $\mu$ g),转移至硝化纤维素,然后用特异性抗体(抗磷酸- $\beta$ -联蛋白、抗  $\beta$ -联蛋白、抗 E-钙粘着蛋白以及抗  $\beta$ -肌动蛋白)进行探测。

[0064] 图 14 示出了流式细胞术的结果,其表明,发现抗体 16D10 结合存在于 SOJ-6 细胞上的抗原。x 轴表示荧光强度而 y 轴表明计数。

[0065] 图 15 示出了流式细胞术的结果,其表明,抗体 16D10 并没有结合在 PANC-1 细胞上存在的抗原。x 轴表示荧光强度而 y 轴表示计数。

[0066] 图 16 示出了在 HEK293T 细胞中生产二价 16D10 嵌合抗体中所用的策略。

[0067] 图 17 示出了 16D10 VH 和 VL 克隆策略,包括 VH、CH1、IgG1-Fc、以及 VL 和 Ck 序列。

[0068] 图 18 示出了 16D10 和 Rec16D10 处理对 SOJ-6 细胞增殖的影响。

[0069] 图 19 示出了用来测试 Rec16D10 介导的 NK 细胞活化的策略。

[0070] 图 20 示出了通过 Rec16D10 对 NK 细胞的 CD 107 转移的诱导。

[0071] 图 21 示出了通过 Rec16D10 对 NK 细胞的 IFN- $\gamma$  分泌的诱导。

[0072] 图 22 示出了利用 Rec16D10 和其它抗体的组织交叉反应研究的结果。

[0073] 图 23 示出了由重组嵌合 IgG1 16D10 抗体诱导的 SOJ-6 细胞的凋亡,如通过膜联蛋白(Annexin)V 和 V/PI 染色所观测到的;细胞本身未经受或经受低细胞凋亡,并且每种衣霉素、IgM 抗体 16D10 以及 IgG1 抗体 16D10 均诱导显著水平的细胞凋亡。

[0074] 图 24 分别示出了 VH-16D10-HuIgG1 和 VL16D10-HuIgL Kappa 的序列。对于每个序列,以黑体示出 CDR1、CDR2 以及 CDR3。对于每个序列,可变区序列被加下划线,而其余序列分别对应于人 IgG1 和卡巴型的恒定区序列。

## 具体实施方式

### [0075] 定义

[0076] 如在本文中所使用的,除非另有规定,以下术语具有赋予它们的含义。

[0077] 如在本文中所使用的,术语“抗体”是指多克隆和单克隆抗体。取决于重链中恒定域的类型,抗体被指定为 5 个主要类型之一: IgA、IgD、IgE、IgG、以及 IgM。这些类型中的几个被进一步分为子类或同种型,如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等。示例性的免疫球蛋白(抗体)结构单元包括四聚体。每个四聚体由两个相同对的多肽链构成,每对具有一个“轻”链(约 25kDa) 和一个“重”链(约 50-70kDa)。因此,四聚体,例如, IgG 四聚体,是“二价的”,因为它们具有两个抗原识别位点。这样的二价四聚体,尤其是 IgG 四聚体,在本发明中是优选的,因为它们能够传送抗增殖/促凋亡活性并且能够诱导靶细胞的 ADCC(只要抗体包含 Fc 尾部并且因而能够结合于 Fc 受体)。每个链的 N 端限定约 100 至 110 或更多氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链( $V_L$ ) 和可变重链( $V_H$ ) 分别是指这些轻链和重链。对应于不同类型的免疫球蛋白的重链恒定域分别称作“ $\alpha$ ”、“ $\delta$ ”、“ $\epsilon$ ”、“ $\gamma$ ”以及“ $\mu$ ”。不同类型的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是众所周知的。IgG 和 / 或 IgM 是本发明中所采用的优选类型的抗体,其中 IgG 是特别优选的,因为它们是在生理状况下最常见的抗体并且因为它们最容易在实验室环境下制备。另外,已发现,多聚抗体如 IgM 抗体比四聚体形式如 IgG 四聚体被更快速地内化,因此较少有效地诱导肿瘤细胞的免疫细胞介导靶向(经由 ADCC)。IgG 四聚体还是更为特异的,即具有比多聚 IgM 抗体更少的非特异性结合。优选地,本发明的抗体是单克隆抗体。特别优选的是人源化、嵌合、人、或其它适合人的抗体。“抗体”还包括任何本文描述的抗体的任何片段或衍生物。

[0078] 术语“特异性地结合于”是指抗原结合化合物或抗体在竞争性结合测定中可以优选结合于结合配偶体,例如 BSDL 或 FAPP 多肽,如利用蛋白质的重组形式、其中的表位、或在有关靶细胞(例如,肿瘤细胞、SOJ-6 细胞等)的表面上存在的天然蛋白质加以评估的。竞争性结合测定以及用于确定特异性结合的其他方法在下文进一步加以描述并且是本领域众所周知的。

[0079] “适合人的”抗体是指任何抗体、衍生的抗体、或抗体片段,其可以安全地用于人类,例如用于本文描述的治疗方法。适合人的抗体包括所有类型的人源化、嵌合、或完全人抗体,或任何这样的抗体,其中至少抗体的一部分来自人类或用其它方式加以修饰以避免当使用天然非人抗体时通常引起的免疫反应。

[0080] “有毒”或“细胞毒性”肽或小分子涵盖任何化合物,其可以减慢、停止、或逆转细胞的增殖,以任何可检测的方式降低它们的活性,或直接或间接地杀伤它们。优选地,有毒或细胞毒性化合物通过直接杀伤细胞、通过引起细胞凋亡或通过其它方式来起作用。如在本文中所使用的,有毒“肽”可以包括任何肽、多肽、或它们的衍生物,包括具有非天然氨基酸或修饰连锁的肽衍生物或多肽衍生物。有毒“小分子”可以包括任何有毒化合物或元件,优选具有小于 10kD、5kD、1kD、750D、600D、500D、400D、300D、或更小的尺寸。

[0081] 本文中“免疫原性片段”是指任何多肽或肽片段,其能够引发免疫反应如 (i) 产生抗体,其结合所述片段和 / 或结合任何形式的包含所述片段的分子,包括膜结合受体和从其衍生的突变体, (ii) 刺激 T 细胞反应,其中涉及 T 细胞与双分子复合体反应,该复合体包含任何 MHC 分子和来自所述片段的肽, (iii) 转染的赋形剂 (vehicles) 的结合,如噬菌体或编码哺乳动物免疫球蛋白的细菌表达基因。可替换地,免疫原性片段还指能够引发如上述所定义的免疫反应的任何构建物,如通过共价偶联共轭于载体蛋白的肽片段、在其氨基酸序列中包含所述肽片段的嵌合重组多肽构建物,并且特别包括用 cDNA 转染的细胞,其中 cDNA 的序列包含编码所述片段的蛋白。

[0082] 对本发明来说,“人源化”抗体是指这样的抗体,其中一个或多个人免疫球蛋白的恒定和可变框架区与动物免疫球蛋白的结合区,例如 CDR 融合。这样的人源化抗体被设计成保持非人抗体 (从其衍生结合区) 的结合特异性,而且避免相对于非人抗体的免疫反应。

[0083] “嵌合抗体”是一种抗体分子,其中 (a) 恒定区、或其一部分被改变、替换或交换,使得抗原结合位点 (可变区) 被连接于不同或已改变类型的恒定区、效应子功能和 / 或物种、或完全不同的分子,其将新的性能赋予嵌合抗体,例如,酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或 (b) 可变区、或其一部分被具有不同或已改变抗原特异性的可变区改变、替换或交换。

[0084] “人”抗体是这样的抗体,该抗体获自转基因小鼠或其它动物,其已被“基因改造”以响应于抗原挑战产生特异性人抗体 (参见,例如,Green et al. (1994) Nature Genet 7 : 13 ;Lonberg et al. (1994) Nature 368 :856 ;Taylor et al. (1994) Int Immun 6 :579,将其全部教导以引用方式结合于本文)。完全人抗体还可以通过基因或染色体转染方法、以及噬菌体展示技术来构造,所有这些在本领域是已知的 (参见,例如,McCafferty et al. (1990) Nature 348 :552-553)。还可以通过体外活化的 B 细胞来产生人抗体 (参见,例如,美国专利第 5,567,610 和 5,229,275 号,将其全部内容以引用方式结合于本文)。

[0085] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物纯”是指这样的材料,其基本上或本质上没有通常伴随它的成分 (如在其天然状态所发现的)。典型地利用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高性能液相层析法来确定纯度和均匀性。作为存在于制剂 (preparation) 中的主要物种的蛋白是基本上纯化的。

[0086] 如在本文中所使用的,术语“生物样品”包括但不限于生物流体 (例如,血清、淋巴液、血液)、细胞样品或组织样品 (例如,骨髓或胰腺活检)。

[0087] 本文中术语“多肽”、“肽”以及“蛋白质”可互换使用以指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人造化学模拟物,以及指天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0088] 当针对例如细胞、核酸、蛋白质、或载体使用时,术语“重组体”是指细胞、核酸、蛋白质或载体通过引入异源核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质已被修饰,或细胞来自如此修饰的细胞。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然 (非重组) 形式中不存在的基因,或表达天然基因,其以其他方式被异常表达、表达不足或根本不表达。

[0089] 用于产生抗原结合化合物的一般方法

[0090] 术语“抗原结合化合物”是指一种分子,优选蛋白质分子,其特异性地结合于抗原,例如,BSDL 或 FAPP 多肽 (或糖变体或其其他变体或衍生物,如本文所定义的),并比其它化合物具有更大的亲合力和 / 或相对于非 BSDL 或 FAPP 多肽具有特异性或选择性。抗原结合

化合物可以是蛋白、肽、核酸、碳水化合物、脂质、或小分子量化合物，其优先结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。在一种优选的实施方式中，根据本发明的特异性结合剂是抗体，如多克隆抗体、单克隆抗体 (mAb)、嵌合抗体、CDR 嫁接抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、催化性抗体、人源化抗体、人抗体、“裸露”抗体、以及它们的片段、变体或衍生物，其单独或连同其他氨基酸序列（通过已知技术提供）。

[0091] 可以利用任何适宜的方法来获得特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽的抗原结合化合物。虽然在评估它们诱导细胞凋亡或抑制细胞增殖（例如，直接杀伤细胞、经由凋亡调节途径发信号、核碎裂、抑制细胞生长、抑制细胞周期）的能力以前，将通常测试它们与 BSDL 或 FAPP 多肽的结合，但应当明了，可以以任何适宜的次序进行测试，例如出于方便，其取决于测定的特性以及所涉及的抗原结合化合物。可以利用任何适宜的方式来鉴定本发明的化合物，例如利用高通量筛选来筛查大量分子的 BSDL 或 FAPP 结合活性或促凋亡或抗细胞增殖活性。可替换地，可以制备和测试较少数目的或甚至单独的分子，例如，一小组与具有期望性能的已知化合物有关的化合物或具有期望性能的已知化合物的衍生物。

#### [0092] 测试化合物的活性

[0093] 在获得抗原结合化合物以后，通常是评估其以下能力：与靶细胞相互作用，影响靶细胞的活性，和 / 或诱导靶细胞的凋亡或抑制靶细胞的增殖。可以在上述方法的任何适宜的阶段实施评估抗原结合化合物诱导靶细胞凋亡或抑制其增殖的能力，并且本文提供了实例。这种诱导细胞凋亡或抑制增殖的能力的评估可以用于一个或多个不同的步骤，其涉及用于治疗用途的抗体（或其它化合物）的鉴定、生产和 / 或开发。例如，可以在用来鉴定候选抗原结合化合物的筛选方法的背景中、或在其中选择抗原结合化合物并使其变得适合人（例如，在抗体的情况下变成嵌合的或人源化的）的方法中，评估促凋亡或抗细胞生长 / 增殖活性，其中已获得表达抗原结合化合物的细胞（例如，表达重组抗原结合化合物的宿主细胞），并评估其产生功能抗体（或其它化合物）的能力，和 / 或其中已产生一些抗原结合化合物并评估其活性（例如，以测试成批或大量的产物）。通常，将已知抗原结合化合物特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽。该步骤可以涉及测试多种（例如，利用高通量筛选方法的极大数目或更少数目）抗原结合化合物的促凋亡或抗细胞增殖活性，或测试单一化合物（例如，当提供了结合于 BSDL 和 / 或 FAPP 多肽的单抗体时）。

[0094] 因此，除结合于 BSDL 或 FAPP 多肽以外，还可以评估抗原结合化合物诱导靶细胞凋亡或抑制其增殖的能力。在一种实施方式中，将表达 BSDL 和 / 或 FAPP 多肽的细胞引入到平板中，例如，96 孔板，然后暴露于不同量的相关化合物（例如，抗体）。通过添加活体染料，即由完整细胞吸收的活体染料，如 AlamarBlue (BioSource International, Camarillo, CA)，然后洗涤以除去过量染料，可以借助于光密度来测量活细胞的数目（被抗体杀伤或抑制的细胞越多，则光密度越低）。（参见，例如，Connolly et al. (2001) J Pharm Exp Ther 298 : 25-33, 将其披露的全部内容以引用方式结合于本文）。另一个实例是使用染色剂来检测核碎裂；DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚) 可以用来结合 DNA，然后通过检测荧光来对片段化进行可视化。为了测量细胞增殖或生长，可以使用任何适宜的方法如确定细胞数或密度，确定有丝分裂指数，或用来确定在细胞周期中细胞的数目或它们的位置的任何其它方法。同样可以使用任何其它适宜的体外细胞凋亡测定、用来测量细胞增殖或存活的测定、或用来检测细胞活性的测定，正如可以使用体内测定，例如将抗体给予包含靶细胞的动物模

型（例如，小鼠），然后检测随着时间抗体给予对靶细胞的存活或活性的影响。

[0095] 可以用来确定抗原结合化合物是否具有促凋亡活性的测定还包括这样的测定，其确定化合物对细胞凋亡机制 (machinery) 的成分的影响。例如，如在本文的实施例中提供的，可以使用这样的测定，其用来检测与细胞凋亡有关的蛋白质的增加或减少。在一个实施例中，将细胞（例如，SOJ-6 细胞或其它表达 BDSL 和 / 或 FAPP 的细胞）暴露于抗原结合化合物，并测量促凋亡和 / 或抗凋亡蛋白的水平或活性，例如 Bcl-2 蛋白家族成员（例如，Bcl-2、Bax、Bac、Bad 等）、或半胱天冬酶（例如，半胱天冬酶 3、7、8 和 / 或 9）。并不表达 16D10 抗原的细胞可以可选地用作对照（例如，PANC-1 细胞）。在本发明的方法中可以使用任何抗原结合化合物，优选适合人的抗体，其可以可检测地停止或逆转肿瘤生长或者杀伤或停止肿瘤细胞的增殖（体外或体内）。优选地，抗原结合化合物能够杀伤或停止增殖（例如，在体外或体内防止靶细胞数目的增加），并且最优选地抗原结合化合物可以诱导这样的靶细胞的死亡，导致这样的细胞的总数目的减少。在某些实施方式中，抗体能够引起靶细胞的数目或靶细胞的增殖减少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%。靶细胞可以是，例如，表达 BDSL 或 FAPP 的细胞、表达 BDSL 或 FAPP 表位（由 16D 10 识别）的癌细胞、胰腺癌细胞、和 / 或 SOJ-6 细胞。

[0096] 因此，在一种优选的实施方式中，本发明提供了一种用于生产适用于治疗表达 BSDL 或 FAPP 多肽的增生症如胰腺癌的抗原结合化合物的方法，该方法包括以下步骤：a) 提供多种抗原结合化合物，其特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽；b) 测试抗原结合化合物进行结合以直接诱导大量靶细胞的凋亡或抑制其增殖的能力；c) 从所述多种抗原结合化合物选择和 / 或生产一种抗原结合化合物，其能够直接诱导靶细胞的凋亡或抑制其增殖。在任何本发明的方法中，“大量”可以指例如，30%、40%、50%，优选 60%、70%、80%、90% 或更高百分比的细胞。

[0097] 在获得抗原结合化合物以后，通常是评估其诱导 ADCC 的能力。测试抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 通常涉及评估细胞介导的细胞毒性反应，其中具有结合的抗 FAPP/BSDL 抗体的表达 FAPP/BSDL 的靶细胞（例如，SOJ-6 细胞或其它表达 BDSL 或 FAPP 的细胞）由携带 Fc 受体的效应细胞加以识别，并随后被溶解而无需涉及补体。并不表达 16D10 抗原的细胞可以可选地用作对照（例如，PANC-1 细胞）。在本文的实施例部分中描述了一种示例性的 ADCC 测定。当测试或没有测试抗原结合化合物是否具有诱导靶细胞的凋亡或抑制其增殖的能力时，可以测试诱导 ADCC 的能力。在测试抗原结合化合物的 (a) 诱导 ADCC 和 (b) 诱导靶细胞的凋亡或抑制其增殖的能力的情况下，可以以任何次序进行 (a) 和 (b) 的测定。

[0098] 在一种优选的实施方式中，本发明提供了一种用于生产适用于治疗表达 BSDL 或 FAPP 多肽的增生症如胰腺癌的抗原结合化合物的方法，该方法包括以下步骤：a) 提供多种抗原结合化合物，其特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽；b) 测试抗原结合化合物进行结合以诱导大量靶细胞的 ADCC 的能力；c) 从所述多种抗原结合化合物中选择和 / 或产生一种抗原结合化合物，其能够直接诱导靶细胞的 ADCC。在任何本发明的方法中，“大量”可以指例如，30%、40%、50%，优选 60%、70%、80%、90% 或更高百分比的细胞。

[0099] 通过不仅就它们对于 BSDL 或 FAPP 抗原的特异性而且就它们对于癌细胞（例如，胰腺癌细胞）的特异性来评估本发明的抗体或其它化合物。标准方法可以用来测试化合物或抗体在不同细胞或组织中的交叉反应性，包括在动物中的体内方法（例如，原位免疫

染色) 和利用分离的细胞或细胞系的体外方法(例如,蛋白质印迹)。在一种优选的实施方式中,本发明的抗体并不与非肿瘤组织进行交叉反应,所述非肿瘤组织选自扁桃腺、唾液腺、周围神经、淋巴结、眼、骨髓、卵巢、输卵管、甲状旁腺、前列腺、脾、肾、肾上腺、睾丸、胸腺、输尿管、子宫、以及膀胱组成的组。

#### [0100] 生产 BSDL 和 / 或 FAPP 多肽

[0101] 如本文所描述的,在某些实施方式中,获得抗原结合化合物(例如,小鼠的免疫)和 / 或评估抗原结合化合物(例如,评估与 BSDL 或 FAPP 多肽的结合)可以涉及 BSDL 或 FAPP 多肽的使用。可以以本领域已知的任何适宜的方法来制备 BSDL 或 FAPP 多肽。例如在 W02005/095594(将其披露的全部内容以引用方式结合于本文)中,提供了 BSDL 或 FAPP 多肽以及用于制备它们的示例性方法。BSDL 或 FAPP 多肽可以是全长 BSDL 或 FAPP 多肽或其一部分。BSDL 或 FAPP 多肽可以可选地被连接于另一个元件,其包括但不限于第二多肽、标记(tag)、聚合物、或任何其它适宜的分子。BSDL 或 FAPP 多肽通常将是糖肽。在一个实施例中,BSDL 或 FAPP 多肽包括或由糖肽组成,其中糖肽包括或衍生自 BSDL 的重复 C 端序列(在正常胰腺分泌物中存在的消化脂解酶)。在另一个实施例中,BSDL 或 FAPP 多肽包括或由糖肽组成,其中糖肽包括或衍生自 FAPP(BSDL 的一种癌胚形式)的重复 C 端序列,其中 FAPP 是胰腺病变的特异性标记。在某些实施方式中,BSDL 或 FAPP 多肽包括 11 个氨基酸的重复 C 端肽序列,其包括具有 7 个氨基酸(具有序列 Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr)的通常不变部分以及糖基化位点。所述通常不变部分在任一侧旁侧有经常被谷氨酸取代的甘氨酸并且包含在 N 端侧上的氨基酸 Asp 和 Ser。如在 W02005/095594 中所示出的,这样的具有糖肽结构的多肽可以通过宿主细胞的表达和分泌加以制备,例如来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,其包括基因构建物(包括 DNA 分子,其编码 C 端肽的一个或多个重复序列,尤其是 BSDL 的重组体,例如所有或部分的 16 个重复序列)以及还包括基因构建物如 DNA 分子,其编码至少一种具有糖基转移酶活性的酶,尤其选自由 Core 2 $\beta$  (1-6)N-乙酰基葡萄糖氨基转移酶,岩藻糖基转移酶 FUT3(其具有  $\alpha$  (1-3) 和  $\alpha$  (1-4) 岩藻糖基转移酶活性),或岩藻糖基转移酶 FUT7(其仅具有  $\alpha$  (1-3) 岩藻糖基转移酶活性),从而构成胰腺癌的所述特异性标记。在一个实例中,W02005/095594 提供了一种优选重组的、可以分离或纯化的糖肽,其包括 BSDL 或 FAPP 的 1 至 40 个重复 C 端多肽(由 11 个氨基酸构成),所述多肽被糖基化并携带糖基化表位,可选地与患有 I 型糖尿病的患者经诱导的抗体产生特异性免疫反应,并且纯化自人或动物来源的生物流体或重组体。可以通过在传统的宿主细胞(包括引发糖基化所需的酶促系统(enzymatic machinery))中进行表达来产生重组多肽,所述宿主细胞被基因修饰以便包括编码所述多肽的基因和编码一种或多种酶的基因,其中所述酶选自糖基转移酶并且尤其选自 Core2 $\beta$  (1-6)N-乙酰基葡萄糖氨基转移酶(缩写为 C2GnT)、 $\alpha$  (1-3) 半乳糖基转移酶、岩藻糖基转移酶 3(缩写为 FUT3) 以及岩藻糖基转移酶 7(缩写为 FUT7)。

#### [0102] 产生对 BSDL 或 FAPP 多肽具有特异性的单克隆抗体

[0103] 本发明涉及抗体、抗体片段、或抗体衍生物的生产、鉴定和 / 或应用,其中抗体、抗体片段、或抗体衍生物适用于人类并且靶向 BSDL 或 FAPP 多肽。可以通过本领域已知的各种技术中的任一种技术来生产本发明的抗体。通常,通过用包含 BSDL 或 FAPP 多肽的免疫原免疫非人类的动物(优选小鼠)来产生它们。BSDL 或 FAPP 多肽可以包括整个细胞或细胞膜、分离的 BSDL 或 FAPP 多肽、或 BSDL 或 FAPP 多肽的片段或衍生物,通常为免疫原性片

段,即,包含表位的多肽的一部分,其中表位暴露在表达多肽的细胞的表面上。这样的片段通常包含成熟多肽序列的至少 7 个连续氨基酸,甚至更优选地至少其 10 个连续氨基酸。应当明了,任何其它 BSDL 或 FAPP 蛋白,其有时或总是存在于所有或部分肿瘤细胞(在一些或所有患者中)的表面上,可以用于抗体的产生。在一个实例中,免疫原是 SOJ-6 细胞。在优选的实施方式中,用来产生抗体的 BSDL 或 FAPP 多肽是人糖肽。

[0104] 本发明的抗体可以是全长抗体或抗体片段或衍生物。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、以及 Fv 片段;双特异抗体(双抗体, diabodies);单链 Fv(scFv) 分子;仅包含一个轻链可变域的单链多肽,或其片段,其包含轻链可变域的三个 CDR,而没有相关的重链部分;仅包含一个重链可变区的单链多肽,或其片段,其包含重链可变区的三个 CDR,而没有相关的轻链部分;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。这样的片段和衍生物以及制备它们的方法在本领域是众所周知的。例如,胃蛋白酶可以用来消化铰链区中二硫键以下的抗体以产生 F(ab')<sub>2</sub>, Fab 的一种二聚体(其本身是通过二硫键连接于 V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub> 的轻链)。可以在温和条件下还原 F(ab')<sub>2</sub> 以断开铰链区中的二硫键,从而将 F(ab')<sub>2</sub> 二聚体转化成 Fab' 单体。Fab' 单体基本上是具有部分铰链区的 Fab(参见 Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993))。虽然各种抗体片段是根据完整抗体的消化来定义的,但技术人员将明了,这样的片段可以通过化学方法或通过利用重组 DNA 方法来重新合成。

[0105] 在优选的实施方式中,本发明的抗体是 IgG,例如, IgG1、抗体,并且是四聚(二价)抗体。这样的二价 IgG 抗体是优选的,因为它们相对容易制备和使用,并且它们结合各种性能,这使它们可以最大限度地靶向表达 BSDL/FAPP 的肿瘤细胞。尤其是,它们具有与表达 BSDL/FAPP 的肿瘤细胞足够的结合亲和力(优于,例如,单价形式;通常具有在纳摩尔水平,例如, 10<sup>-1</sup> 纳摩尔,的结合亲和力),使得它们可以有效地诱导细胞的凋亡或抑制其增殖。此外,因为它们包含 Fc 尾部,所以它们可以有效地诱导靶细胞的免疫细胞介导杀伤(ADCC)(虽然应当明了,此特点对于它们的效力来说并不是必要的,这是由于直接靶向表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的能力)。另外,二价抗 FAPP/BSDL IgG 抗体(与多聚,例如, IgM 形式相比)基本上没有被靶细胞内化,从而增强它们的 ADCC 介导性能。最后,因为本发明的二价抗 BSDL/FAPP 抗体有效地结合所有这些期望的特点,所以它们可以“裸露地”使用,即没有附着部分如细胞毒性肽或放射性同位素(虽然这样的修饰形式,其将引入用于杀伤表达 BSDL/FAPP 的靶细胞的又一种机制,也可以使用,但仍然属于本发明的范围内)。

[0106] 单克隆或多克隆抗体的制备在本领域是众所周知的,并且可以使用任何大量可用的技术(参见,例如, Kohler&Milstein, Nature 256:495-497(1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72(1983); Cole et al., pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(1985))。用于生产单链抗体的技术(美国专利第 4,946,778 号)可以适用于将抗体生产成期望的多肽,例如, BSDL 或 FAPP 多肽。此外,转基因小鼠、或其它生物如其它哺乳动物,可以用来表达人源化抗体、嵌合抗体、或类似修饰的抗体。可替换地,噬菌体展示技术可以用来鉴定抗体和异数 Fab 片段,其特异性地结合于所选的抗原(参见,例如, McCafferty et al., Nature 348:552-554(1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783(1992))。在一种实施方式中,该方法包括从文库或所有组成部分选择单克隆抗体或其片段或衍生物,其与 BSDL 或 FAPP 多肽进行交叉反应。例如,该所有组成部分可以是抗

体或其片段的任何（重组）所有组成部分，可选地通过任何适宜的结构（例如，噬菌体、细菌、合成复合物等）加以展示。

[0107] 用抗原免疫非人哺乳动物的步骤可以以本领域众所周知的任何方式来进行（参见，例如，E. Harlow and D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)）。通常，将免疫原悬浮或溶解在缓冲液中，可选地包含佐剂，如完全弗氏佐剂。用于确定免疫原的量、缓冲液的类型以及佐剂的量的方法对于本领域技术人员来说是熟知的，并且并不以任何方式限制本发明。

[0108] 类似地，足以刺激抗体生产的免疫的位置和频率在本领域也是众所周知的。在一种典型的免疫方案中，在第 1 天并在约 1 周后再次用抗原腹腔内注射非人类的动物。接着是在约 20 天回忆注射抗原，可选地连同佐剂如不完全弗氏佐剂。静脉内进行回忆注射并且可以重复连续多天。接着是在 40 天的促升注射（静脉内或腹腔内），通常没有佐剂。此方案导致在约 40 天以后产生抗原特异性抗体的 B 细胞的生产。还可以使用其它方案，只要它们导致表达抗体的 B 细胞的生产，其中抗体靶向在免疫中使用的抗原。

[0109] 在另一种实施方式中，从非免疫非人哺乳动物分离淋巴细胞，体外生长，然后暴露于细胞培养物中的免疫原。然后收获淋巴细胞并进行下文描述的融合步骤。

[0110] 对于单克隆抗体，对于本发明来说其是优选的，下一个步骤是从免疫非人哺乳动物分离细胞，例如，淋巴细胞、脾细胞、或 B 细胞，其后将那些脾细胞、或 B 细胞、或淋巴细胞融合于永生细胞，以便形成产生抗体的杂交瘤。因此，如在本文中所使用的，术语“由免疫动物制备抗体”包括从免疫动物获得 B 细胞 / 脾细胞 / 淋巴细胞，并利用那些细胞来产生表达抗体的杂交瘤，以及直接从免疫动物的血清获得抗体。例如从非人哺乳动物分离脾细胞是本领域众所周知的，并且例如涉及从麻醉的非人哺乳动物除去脾，将它切割成小片并从脾胶囊挤压脾细胞并通过细胞过滤器的尼龙网而进入适当的缓冲液，以便产生单细胞悬浮液。洗涤细胞，离心并再悬浮在裂解任何红血细胞的缓冲液中。再次离心溶液并最后将沉淀物中的剩余淋巴细胞再悬浮在新鲜缓冲液中。

[0111] 在分离和存在于单细胞悬浮液中以后，将产生抗体的细胞融合于永生细胞系。这通常是小鼠骨髓瘤细胞系，虽然可用于产生杂交瘤的许多其它永生细胞系在本领域是已知的。优选的小鼠骨髓瘤系包括但不限于那些小鼠骨髓瘤系，其来自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤，其可获自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. U. S. A., X63Ag8653 和 SP-2 细胞（可获自 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland U. S. A.）。利用聚乙二醇等实现融合。然后使所得的杂交瘤在选择性培养基中生长，其中选择性培养基包含一种或多种物质，其抑制非融合、亲代骨髓瘤细胞的生长或存活。例如，如果亲代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT)，则用于杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤、以及胸腺嘧啶 (HAT 培养基)，这些物质可防止 HGPRT 缺少细胞的生长。

[0112] 杂交瘤可以生长在巨噬细胞的饲养层上。巨噬细胞优选来自非人哺乳动物的同胞 (littermates)，其用来分离脾细胞并在平板接种杂交瘤前的数天通常用不完全弗氏佐剂等引发。融合方法描述在例如 (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986)) 中，将其披露的内容以引用方式结合于本文。

[0113] 使细胞可以生长在选择性培养基中足够长的时间用于集落形成和抗体生产。这通常在 7 至 14 天之间。然后测定杂交瘤集落的抗体生产,其中抗体特异性地识别期望的底物,例如 BSDL 和 / 或 FAPP 多肽。测定通常是比色 ELISA 型测定,虽然可以采用任何测定,其可以适于杂交瘤在其中生长的孔。

[0114] 其它测定包括免疫沉淀和放射免疫测定。检查对于期望的抗体生产为阳性的孔以确定是否存在一个或多个不同的集落。如果存在多于一个的集落,则可以再克隆和生长细胞以确保仅单细胞引起集落产生期望的抗体。通常再克隆和再测定具有单表观集落的阳性孔,以确保仅检测和产生一种单克隆抗体。

[0115] 然后还可以测定杂交瘤或杂交瘤集落的抗体的生产,其中抗体能够诱导细胞凋亡或抑制细胞周期。通常可以在该过程的任何阶段进行该测定,只要可以获得抗体并在体外测定中加以评估。然而,最优选地,在鉴定了特异性地识别 BSDL 和 / 或 FAPP 多肽的抗体以后,可以测试其诱导细胞凋亡或抑制细胞(例如,肿瘤细胞、SOJ-6 细胞、在其表面表达 BSDL 和 / 或 FAPP 多肽的任何细胞等)的生长或增殖的能力。还可以测试抗体的诱导 ADCC 的能力(例如,借助于 NK 细胞活化;参见实施例)。

[0116] 然后在适当的培养基(如 DMEM 或 RPMI-1640)中大量生长证实为产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤。可替换地,杂交瘤细胞可以体内生长,如动物中的腹水肿瘤。

[0117] 在足够生长以产生期望的单克隆抗体以后,从细胞分离出包含单克隆抗体(或腹水液体)的生长培养基,并纯化其中存在的单克隆抗体。通常通过凝胶电泳、透析、层析来进行纯化,其中使用 A 蛋白或 G 蛋白-琼脂糖凝胶,或连接于载体(如琼脂糖或琼脂糖凝胶珠)的抗小鼠 Ig(均描述在例如 Antibody Purification Handbook, Amersham Biosciences, publication No. 18-1037-46, Edition AC 中,将其披露的内容以引用方式结合于本文)。通常通过利用低 pH 缓冲液(pH 为 3.0 或更小的甘氨酸或乙酸盐缓冲液)从 A 蛋白/G 蛋白柱洗脱结合抗体,其中立即中和含抗体部分。如果需要,对这些部分进行汇集、透析、以及浓缩。

[0118] 在优选的实施方式中,编码抗体(其结合存在于 BSDL 或 FAPP 多肽上的决定子)的 DNA 分离自杂交瘤,置于适当的表达载体中用于转染到适当的宿主中。然后宿主用于重组生产抗体,其变体,其活性片段,或人源化或嵌合抗体,其包括抗体的抗原识别部分。取决于特定的实施方式,可以可选地评估由宿主细胞产生的抗体的诱导细胞凋亡或抑制细胞(其表达 BSDL 或 FAPP 多肽)增殖的能力,或在存在 NK 细胞和(表达 BSDL 或 FAPP 的)靶细胞的条件下诱导 ADCC(例如, NK 细胞活化)的能力。

[0119] 利用常规程序(例如,通过利用寡核苷酸探针,其能够特异性地结合于编码小鼠抗体的重链和轻链的基因),可以容易地对编码本发明的单克隆抗体的 DNA 进行分离和测序。在分离以后,可以将 DNA 放入表达载体中,其然后被转染到宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或骨髓瘤细胞(其并不以其他方式产生免疫球蛋白)中,从而在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达在本领域是众所周知的(参见,例如,Skerra et al. (1993) Curr. Op. Immunol. 5 :256; 以及 Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130 :151)。还可以通过选择免疫球蛋白的组合文库来产生抗体,如例如在 Ward et al. (1989) Nature 341 :544 中所披露的。

[0120] 在一种具体实施方式中,抗体结合与单克隆抗体 16D10 基本上相同的表位或决定

子（参见，例如，WO2005/095594，将其全部披露内容以引用方式结合于本文）。产生 IgM 抗体 16D10 的细胞于 2004 年 3 月 16 日保藏在巴黎的 Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) 中，编号为 I-3188。在某些实施方式中，抗体是不同于 16D10 的抗体。

[0121] 术语“结合于与单克隆抗体 x 基本上相同的表位或决定子”是指抗体“可以与 x 竞争”，其中 x 是 16D10 等。利用各种免疫筛选测定（其中可以评估抗体竞争）中的任何一种可以容易地鉴定一种或多种抗体，其结合于与所述的单克隆抗体基本上相同的表位。这样的测定在本领域中是常规的（参见，例如，美国专利第 5,660,827 号，将其以引用方式结合于本文）。应当明了，实际确定抗体所结合的表位决不需要鉴定这样的抗体，其结合于与所述的单克隆抗体相同或基本相同的表位。

[0122] 例如，在待检查的试验抗体获自不同来源的动物、或甚至具有不同 Ig 同种型的情况下，可以采用简单的竞争测定，其中对照（例如，16D10）和试验抗体被混合（或预吸附），并施加于包含含表位蛋白的样品，例如 BSDL 或 FAPP 多肽。基于 ELISA、放射免疫测定、蛋白质印迹的方案，以及 BIACORE 的使用（如描述在例如实施例部分中）适用于上述简单的竞争研究并且在本领域是众所周知的。

[0123] 在某些实施方式中，在施加于含抗原（例如，BSDL 或 FAPP 多肽）的样品以前，将对照抗体（例如，16D10）与不同量（例如，1 : 10 或 1 : 100）的试验抗体预混合一段时间。在其它实施方式中，可以在暴露于抗原样品期间简单混合对照和不同量的试验抗体。只要可以区分结合抗体与游离抗体（例如，通过利用分离或洗涤技术来消除未结合抗体）以及对对照抗体与试验抗体（例如，通过利用物种或同种型特异性二抗或通过用可检测标记特异性地标记对照抗体），则能够确定如果试验抗体减少对照抗体与抗原的结合，就表明试验抗体基本上识别与对照抗体相同的表位。在没有完全不相关抗体存在的条件下（标记）对照抗体的结合将是对照高值。通过温育标记对照抗体（例如，16D10）与完全相同类型的非标记抗体（例如，16D10），将获得对照低值，其中将发生竞争并减少标记抗体的结合。在试验测定中，在存在试验抗体的条件下，标记抗体反应性的显著降低表明了识别相同表位的试验抗体，即与标记对照抗体“交叉反应”的试验抗体。任何试验抗体，其在约 1 : 10 到约 1 : 100 之间的对照：试验抗体的任何比率减少标记对照与每种抗原的结合至少 50% 以上、优选 70%，被认为是结合于与对照基本上相同的表位或决定子的抗体。优选地，这样的试验抗体将减少对照抗体与抗原的结合至少 90%。

[0124] 在一种实施方式中，可以通过流式细胞术试验来评估竞争。首先用已知特异性地结合于受体（例如，表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞，以及 16D10 抗体）的对照抗体温育携带给定激活受体的细胞，然后用试验抗体进行温育，其中试验抗体已标记有，例如，荧光色素或生物素。如果用饱和量的对照抗体进行预温育所获得的结合是抗体在没有用对照抗体预温育的情况下所获得的结合的 80%，优选 50%、40% 或更少（荧光的平均值），则认为试验抗体与对照抗体竞争。可替换地，如果对于用饱和量待试验抗体预温育的细胞，用标记对照（通过荧光色素或生物素）获得的结合是在没有用上述抗体预温育的情况下获得的结合的 80%，优选 50%、40%、或更少，则认为试验抗体与对照竞争。

[0125] 在一种优选的实施例中，可以采用简单的竞争测定，其中试验抗体被预吸附并以饱和浓度施加至其上固定用于抗体结合的底物的表面，例如 BSDL 或 FAPP 多肽，或其包含表

位的部分, 已知其被 16D10 结合。上述表面优选为 BIACORE 芯片。然后使对照抗体 (例如, 16D10) 以底物饱和浓度与上述表面接触, 并测量对照抗体的底物表面结合。在没有试验抗体存在的条件下, 将对照抗体的这种结合与对照抗体与含底物表面的结合进行比较。在试验测定中, 在有试验抗体存在的条件下对照抗体与含底物表面的结合的显著减少表明了识别相同表位的试验抗体, 即, 与对照抗体“交叉反应”的试验抗体。减少对照抗体与包含抗原的底物的结合至少 30% 或更优选 40% 的任何试验抗体被认为是结合于与对照抗体基本上相同的表位或决定子的抗体。优选地, 这样的试验抗体将减少对照抗体与底物的结合至少 50%。应当明了, 对照和试验抗体的次序可以颠倒, 即对照抗体首先被结合于表面, 其后使试验抗体与上述表面接触。优选地, 对于底物抗原具有更高亲合力的抗体首先被结合于含底物的表面, 因为预期对于二抗 (假设抗体进行交叉反应) 所观测到的结合的减少将具有更大的幅度。这样的测定的另外的实例提供在实施例和 Saunal et al. (1995) *J. Immunol. Meth* 183 :33-41 中, 将其披露的内容以引用方式结合于本文。

[0126] 在鉴定了特异性地识别 BSDL 或 FAPP 多肽的抗体以后, 可以利用标准方法测试其结合于肿瘤细胞如 SOJ-6 细胞系或获自患有癌症 (如胰腺癌) 的患者的任何其它细胞的能力, 以及测试其诱导相同细胞的凋亡或抑制其增殖的能力。还可以评估细胞激活 NK 细胞或诱导表达 BSDL 或 FAPP 的靶细胞的 ADCC 的能力。

#### [0127] 产生适用于人类的抗体

[0128] 在获得单克隆抗体 (通常在非人类的动物中, 其可以特异性地结合于 BSDL 或 FAPP 多肽) 以后, 抗体将通常被修饰以使它们适合于人类的治疗应用。例如, 它们可以是人源化抗体、嵌合抗体、或利用本领域众所周知的方法选自人抗体的文库。这样的适合人的抗体可以直接用于本发明的治疗方法, 或可以进一步被衍生化。此外, 取决于本发明的特定实施方式, 可以在使它们适合于人类治疗应用以前和 / 或以后, 测试抗体的促凋亡或抗细胞增殖活性。

[0129] 在一种优选的实施方式中, 在插入表达载体以前, 例如, 通过用人重链和轻链恒定域的编码序列代替同源非人序列 (例如, Morrison et al. (1984) *PNAS* 81 :6851), 或通过非免疫球蛋白多肽的所有或部分编码序列共价连接于免疫球蛋白编码序列, 可以对产生本发明的抗体 (例如, 结合于与抗体 16D10 相同的表位的抗体) 的杂交瘤的 DNA 进行修饰。以该方式, 制备了“嵌合”或“杂交”抗体, 其具有原抗体的结合特异性。通常, 这样的非免疫球蛋白多肽代替本发明的抗体的恒定域。在一种特别优选的实施方式中, 本发明的抗体被人源化。根据本发明的抗体的“人源化”形式是特异性嵌合免疫球蛋白、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), 其包含来自小鼠或其它非人免疫球蛋白的最小序列。一般来说, 人源化抗体是人免疫球蛋白 (受体抗体), 其中来自受体的互补决定区 (CDR) 的残基被来自原抗体 (供体抗体) 的 CDR 的残基替换, 同时保持原抗体的期望的特异性、亲合力、以及能力。在某些情况下, 人免疫球蛋白的 Fv 框架残基可以被相应的非人残基替换。另外, 人源化抗体可以包括在受体抗体或在输入的 CDR 或框架序列中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善和优化抗体性能。通常, 人源化抗体将包括基本上所有的至少一个, 并且通常两个可变域, 其中所有或基本上所有的 CDR 区对应于原抗体的 CDR 区, 并且所有或基本上所有的 FR 区是人免疫球蛋白共有序列的 FR 区。对于进一步的详情, 参见 Jones et al. (1986) *Nature* 321 :522 ; Reichmann et al. (1988)

Nature 332 :323 ;Verhoeyen et al. (1988) Science 239 :1534 (1988) ;Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2 :593 ;将其全部内容以引用方式结合于本文。

[0130] 在制备人源化抗体中所使用的人可变域（轻链和重链两者）的选择对于减少抗原性是非常重要的。按照所谓的“最适合”方法，相对于已知的人可变域序列的整个文库来筛选本发明的抗体的可变域的序列。于是最接近小鼠的人序列视为人源化抗体的人框架（FR）（Sims et al. (1993) J. Immun., 151 :2296 ;Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196 :901）。另一种方法使用特定框架，其来自轻链或重链的特定亚组的所有人抗体的共有序列。该相同的框架可以用于多种不同的人源化抗体（Carter et al. (1992) PNAS 89 :4285 ; Presta et al. (1993) J. Immunol. 51 :1993）。

[0131] 进一步重要的是，抗体被人源化同时保留它们对 FAPP/BSDL、优选人 FAPP/BSDL、最优选由 16D10 特异性地识别的表位（例如，抗体可以与 16D10 竞争表位结合）的高亲和力、以及其它有利的生物学特性。为了实现这一目标，根据一种优选的方法，利用亲代和人源化序列的三维模型通过分析亲代序列和各种设想的人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可行的，并且是本领域技术人员熟悉的。可获得计算机程序，其说明和展示所选的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用，即，分析这样的残基，其影响候选免疫球蛋白结合它的抗原的能力。以这种方式，可以从共有和输入序列选择并结合 FR 残基，以便获得期望的抗体特性，如对于目标抗原的增加的亲和力。通常，CDR 残基直接并最显著涉及影响抗原结合。

[0132] 还可以按照各种其它技术来产生人抗体，如通过使用（为了免疫）其它转基因动物，其已被基因改造成表达人抗体所有组成部分。在这种技术中，人重链和轻链基因座的元件被引入到小鼠或其它动物中，以靶向破坏内源性重链和轻链基因座（参见，例如，Jakobovitz et al. (1993) Nature 362 :255 ;Green et al. (1994) Nature Genet. 7 :13 ; Lonberg et al. (1994) Nature 368 :856 ;Taylor et al. (1994) Int. Immun. 6 :579，将其全部披露内容以引用方式结合于本文）。可替换地，可以通过基因或染色体转染方法、或通过抗体所有组成部分的选择（利用噬菌体展示法）来构建人抗体。在这种技术中，抗体可变域基因被读框内克隆到丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中，并显示为在噬菌体颗粒的表面上的功能性抗体片段。由于丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝，所以基于抗体的功能特性的选择还导致基因的选择，其中基因编码呈现这些特性的抗体。以这种方式，噬菌体模拟 B 细胞的一些特性（参见，例如，Johnson et al. (1993) Curr Op Struct Biol 3 :5564-571 ;McCafferty et al. (1990) Nature 348 :552-553，将其全部披露内容以引用方式结合于本文）。还可以通过体外活化的 B 细胞来产生人抗体（参见，例如，美国专利第 5,567,610 号和第 5,229,275 号，将其全部披露内容以引用方式结合于本文）。

[0133] 在一种实施方式中，利用用于免疫的动物如 **XenoMouse®**（Abgenix, Fremont, CA）来制备“人源化”单克隆抗体。XenoMouse 是一种小鼠宿主，其已使它的免疫球蛋白基因被功能性人免疫球蛋白基因替换。因此，由这种小鼠或在形成自这种小鼠的 B 细胞的杂交瘤中产生的抗体已经被人源化。XenoMouse 描述在美国专利第 6,162,963 号（将其全部内容以引用方式结合于本文）中。利用 HuMAb-Mouse™（Medarex）可以获得一种类似的方法。

[0134] 本发明的抗体还可以被衍生为“嵌合”抗体（免疫球蛋白），其中重链和 / 或轻链

的一部分相同于或同源于原抗体中的相应序列,同时链的其余部分相同于或同源于在来自另一物种或属于另一种抗体类或子类的抗体、以及上述抗体的片段中的相应序列,只要它们呈现出期望的生物活性即可(参见,例如, Morrison et al. (1984) PNAS 81:6851; 美国专利第 4,816,567 号)。

[0135] 重组 16D10 抗体的结构特性

[0136] 在一种优选的实施方式中,本发明的抗体是嵌合或人源化 IgG 抗体,其是利用 16D10 抗体(或另一种抗体,其结合于与 16D10 相同的表位)的可变域序列(例如,整个可变域、其一部分、或 CDR)加以制备的。例如,抗体可以是 Rec 16d10 或等价抗体、嵌合抗体,其中 16D10 的小鼠重链恒定区的 Cu2、Cu3、Cu4 域已被人 IgG1Fc 替换。在另一种优选的实施方式中,抗体是嵌合抗体,其中抗 FAPP/BSL 抗体如 16D10 的 VH 和 VL 被重链和轻链的人 IgG(例如, IgG1) 恒定区替换。

[0137] 本发明的优选抗体是二价单克隆抗体,其包括 16D10 的可变区或 CDR,如在本文中产生、分离、以及结构和功能上表征和描述的。在一个实施例中,抗体是在实施例 9 中描述的嵌合抗体(rec16D10);在另一个实施例中,抗体是可替换的二价嵌合抗体,其由(两个)重链(包括融合于人 IgG1 恒定区的 16D10 的重链可变区)和(两个)轻链(包括融合于人 IgL 卡巴恒定区的 16D10 的轻链可变区)构成。这些抗体的全长、可变、以及 CDR 序列列在表 1 中。

[0138] 表 1

[0139]

抗体部分	SEQIDNO :
VH-16D10-HuIgG1 (来自实施例 9 的 rec16D10)	3
Rec16D10L 链 (来自实施例 9 的 rec16D10)	4
VH-16D10-HuIgG1 (可替换的 16D10 抗体)	5
VL16D10-HuIgL 卡巴 (可替换的 16D10 抗体)	6
16D10VH 区	7
16D10VL 区	8
16D10VHCDR1	9

抗体部分	SEQIDNO :
16D10VHCDR2	10
16D10VHCDR3	11
16D10VLCDR1	12
16D10VLCDR2	13
16D10VLCDR3	14

[0140] 因此,在一个方面,本发明提供了一种分离的单克隆抗体、或其抗原结合部分,包括:(a) 包括氨基酸序列的 VH 区,其中氨基酸序列选自 SEQ ID NO :3、5、7 以及 9-11 组成的组,以及 (b) 包括氨基酸序列的 VL 区,其中氨基酸序列选自 SEQ ID NO :4、6、8 以及 12-14 组成的组;其中抗体特异性地结合 BSDL 或 FAPP 多肽。优选的重链和轻链组合包括:(a) 包含 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的重链,以及 (b) 包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的轻链;(a) 包含 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的重链,以及 (b) 包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的轻链;以及 (a) 包含 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列的重链可变区,以及 (b) 包含 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0141] 在另一个方面,本发明提供了这样的抗体,其包括 16D10 的重链和轻链 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3、或它们的组合。利用 Kabat 系统描述了 CDR 区 (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。16D10 的重链 CDR 位于 SEQ ID NO :7 中的氨基酸位置 31-35 (CDR1; 对于 CDR1, Chotia 编号为 26-35)、位置 50-67 (CDR2) 以及位置 97-106 (CDR3)。16D10 的轻链 CDR 位于 SEQ ID NO :8 中的氨基酸位置 24-40 (CDR1)、位置 56-62 (CDR2) 以及位置 95-102 (CDR3)。

[0142] 因此,在另一个方面,本发明提供了一种分离的单克隆抗体、或其抗原结合部分,包括:(a) VH CDR1,其包括 SEQ ID NO :9 的氨基酸序列;(b) VH CDR2,其包括 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列;(c) VH CDR3,其包括 SEQ ID NO :11 的氨基酸序列;(d) VL CDR1,其包括 SEQ ID NO :12 的氨基酸序列;(e) VL CDR2,其包括 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列;以及 (f) VL CDR3,其包括 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列;其中抗体特异性地结合 FAPP 或 BSDL。优选地,所述抗体包括:重链可变区,其包括融合于人 IgG 链恒定区的 VHCDR1、VH CDR2 以及 VH CDR3;以及轻链可变区,其包括融合于人卡巴链恒定区的 VL CDR1、VH CDR2 以及 VH CDR3。优选地,所述人 IgG 链恒定区包括 SEQ ID NO 15 的氨基酸序列、或其一部分、或与其至少 80%、90% 或 95% 相同的序列。优选地,所述人卡巴链恒定区包括 SEQ ID NO 16 的氨基酸序列、或其一部分、或与其至少 80%、90% 或 95% 相同的序列。优选地,抗体是包括两个所述重链和两个所述轻链的四聚体。

[0143] 在某些实施方式中,本发明的抗体包括来自 VH J558.48 小鼠种系 H 链免疫球蛋白基因的 VH 区和 / 或来自 VK 8-27 小鼠种系 L 链免疫球蛋白基因的 VL 区。

[0144] 在一个方面,本发明提供了一种分离的单克隆抗体、或其抗原结合部分,包括:(a) 本文描述的 VH 区(例如,可变区、其部分、或包括本文描述的 VH CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的可变区),其融合于人 IgG 链恒定区,以及(b) 本文描述的 VL 区(即,可变区、其部分、或包括本文描述的 VH CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的可变区),其融合于人卡巴链恒定区;其中抗体特异性地结合 BSDL 或 FAPP 多肽。示例性的 IgG 链恒定区包括具有 SEQ ID NO:15 的序列的恒定区(其获自抗体利妥昔单抗 (Rituxan™, Genentech, CA)),或其一部分。示例性的人卡巴链恒定区包括具有 SEQ ID NO:16 的序列的恒定区(其获自抗体利妥昔单抗 (Rituxan™, Genentech, CA)),或其一部分。

[0145] 在又一种实施方式中,本发明的抗体包括重链和轻链可变区,其包含氨基酸序列,该氨基酸序列同源于本文描述的优选抗体的氨基酸序列,并且其中抗体保留本发明的抗 FAPP/BSDL 抗体的期望的功能特性。例如,本发明提供了一种分离的单克隆抗体、或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中:(a) VH 区包括一种氨基酸序列,其至少 80% 相同于选自由 SEQ ID NO:3、5、7 以及 9-11 组成的组中的氨基酸序列;(b) VL 区包括一种氨基酸序列,其至少 80% 相同于选自由 SEQ ID NO:4、6、8 以及 12-14 组成的组中的氨基酸序列;(c) 抗体特异性地结合于 FAPP 或 BSDL 多肽并且呈现出至少一种本文描述的功能特性,优选多种本文描述的功能特性。

[0146] 在其它实施方式中,CDR、VH 和 / 或 VL、或恒定区氨基酸序列可以 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同于以上陈述的序列。可以通过编码 SEQ ID NO:3 至 14 的 CDR、VH 和 / 或 VL、或 SEQ ID NO:15 和 16 的恒定区的核酸分子的诱变(例如,定位或 PCR 介导诱变)来获得一种抗体,该抗体具有 CDR、VH 和 / 或 VL 区,其与以上陈述序列的 CDR、VH 和 / 或 VL、或恒定区具有高(即,80% 或更大)同一性,接着测试编码改变抗体的保留功能(例如,FAPP/BSDL 结合亲和力、细胞凋亡的诱导或减慢肿瘤细胞的增殖、ADCC 的诱导)。

[0147] 两个序列之间的百分比同一性是由序列共享的相同位置的数目的函数(即, % 同一性 = 相同位置的数目 / 位置总数 × 100),考虑到间隙数目、以及每个间隙的长度,其中间隙需要被引入以获得两个序列的最优序列对比。可以利用序列分析软件中的数学算法来实现序列的比较以及确定两个序列之间的百分比同一性。蛋白质分析软件配对类似序列,其中利用相似性的度量,其被指定给各种取代、缺失以及其它修饰,包括保守氨基酸取代。

[0148] 两个氨基酸序列之间的百分比同一性可以例如利用 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) 算法来确定,其已结合到 GCG 软件包的 GAP 程序中(可在 <http://www.gcg.com> 处获得),其中利用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵,以及 16、14、12、10、8、6、或 4 的间隙权重和 1、2、3、4、5、或 6 的长度权重。

[0149] 还可以利用 FASTA 来比较多肽序列,其中使用默认或建议的参数。GCG 版本 6.1 中的一种程序,FASTA(例如,FASTA2 和 FASTA3)提供了在查询与搜索序列之间最佳重叠区的序列对比和序列百分比同一性 (Pearson, Methods Enzymol. 1990;183:63-98;Pearson, Methods Mol. Biol. 2000;132:185-219)。

[0150] 还可以利用 E. Meyers 和 W. Miller 的算法 (Comput. Appl. Biosci., 1988;11-17) (其已被结合到 ALIGN 程序(版本 2.0)中)来确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性,其中使用 PAM 120 权重残基表、12 的间隙长度罚分以及 4 的间隙罚分。

[0151] 用于比较一种序列与包含在数据库中的其它序列的另一种算法是计算机程序

BLAST,尤其是blastp,其中使用默认参数。参见例如,Altschul et al.,J. Mol. Biol. 1990 ; 215 :403-410 ;Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997 ;25 :3389-402(1997) ;均以引用方式结合于本文。本发明的蛋白质序列可以用作“查询序列”以进行对公共数据库的搜索,从而例如鉴定相关序列。可以利用 Altschul 等人 1990(上文)的 XBLAST 程序(版本 2.0)进行这样的搜索。可以用 XBLAST 程序进行 BLAST 蛋白质搜索,其中得分 = 50、字长 = 3,以获得同源于本发明的抗体分子的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带有间隙的序列对比,可以使用带有间隙的 BLAST,如在 Altschul 等人,1997(上文)中所描述的。当使用 BLAST 和带有间隙的 BLAST 程序时,可以使用各个程序(例如,XBLAST 和 NBLAST)的默认参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0152] 在某些实施方式中,本发明的抗体包括 VH 区(其包括 CDR1、CDR2 以及 CDR3 序列),以及 VL 区(其包括 CDR1、CDR2 以及 CDR3 序列),其中一个或多个这些 CDR 或可变区序列包括指定的基于本文描述的优选抗体(例如,16D10 和 SEQ ID NO 3-14 中的任何一种)的氨基酸序列、或其保守修饰,并且其中抗体保留本发明的抗 FAPP/BSDL 抗体的期望的功能特性。保守序列修饰可以是任何氨基酸修饰,其并不显著影响或改变包含氨基酸序列的抗体的结合特性。这样的保守修饰包括氨基酸取代、添加以及缺失。可以通过本领域已知的标准技术,如定位诱变和 PCR 介导诱变将修饰引入到本发明的抗体中。“保守”氨基酸取代通常是那些取代,其中氨基酸残基被具有侧链的氨基酸残基(具有类似的理化性质)替换。在本领域已定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(例如,天门冬氨酸、谷氨酸),具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸),具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸),具有  $\beta$ -分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0153] 因此,在本发明的抗体的 CDR 区内的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替换并且利用本文描述的功能测定可以测试所改变抗体的保留功能(即,在以上(c)、(d)以及(e)中陈述的功能)。

[0154] 编码 16D10 抗体重链和轻链可变区的核酸序列分别显示在 SEQ ID NO 1 和 2 中。在一种实施方式中,本发明提供了一种二价单克隆抗体,其包括 16D10 的重链可变区,其转录和翻译自核苷酸序列(包含 SEQ ID NO 1 或其片段)(例如,编码 16D10 VH 区的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的序列),以及 16D10 的轻链可变区,其转录和翻译自核苷酸序列(包含 SEQ ID NO 2 或其片段)(例如,编码 16D10 VL 区的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的序列)。在又一种优选的实施方式中,二价抗体包括在其重链中的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 或存在于抗体 16D10 中的重链可变区,其中抗体 16D10 于 2004 年 3 月 16 日保藏在巴黎的 Collection Nationale de Culture de Microorganismes(CNCM)中,编号为 I-3188,以及包括在其轻链中的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 或存在于所述抗体 16D10 中的轻链可变区,其中抗体 16D10 于 2004 年 3 月 16 日保藏在巴黎的 Collection Nationale de Culture de Microorganismes(CNCM)中,编号为 I-3188。

[0155] 恒定区优化

[0156] 鉴于本发明的抗体诱导表达 FAPP 或 BSDL 多肽的细胞的 ADCC 的能力,还可以借

助于增加它们的诱导 ADCC 的能力的修饰来制备本发明的抗体。典型的修饰包括修饰的人 IgG1 恒定区,其包括至少一个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、插入),和/或改变类型的糖基化,例如,低岩藻糖基化。这样的修饰可以例如增加结合于在效应(例如,NK)细胞上的 Fc $\gamma$ RIIIa。

[0157] 已证明,在恒定区中的某些改变的糖基化模式会增加抗体的 ADCC 能力。可以通过,例如,在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体,来完成这样的碳水化合物修饰。在本领域已描述了具有改变的糖基化机制的细胞并且可以用作宿主细胞,其中表达本发明的重组抗体,从而产生具有改变的糖基化的抗体。参见,例如, Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277 :26733-26740 ;Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17 : 176-1, 以及欧洲专利第 EP 1,176,195 号 ;PCT 公开号 WO 06/133148 ;WO 03/035835 ;WO 99/5434280 ;将其全部内容以引用方式结合于本文。

[0158] 通常,具有改变的糖基化的这样的抗体具有特定的 N-聚糖结构,其产生某些期望的性能,包括但不限于增强的 ADCC 和效应细胞受体结合活性,其是相比于非修饰抗体或具有天然存在的恒定区的抗体以及由小鼠骨髓瘤 NSO 和中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞 (Chuan and Robinson, *Current Opinion Biotechnol.* 2001, 12 :180-7) 产生的抗体、HEK293T 表达的抗体(如在本文的实施例部分中产生的)、或通常用来产生重组治疗性抗体的其它哺乳动物宿主细胞系所产生的抗体。

[0159] 在哺乳动物宿主细胞中产生的单克隆抗体在每个重链的 Asn297 处包含 N-连接的糖基化位点。在抗体上的聚糖通常是复杂的双触角结构,其具有非常低或没有等分 N-乙酰基氨基葡萄糖(等分 GlcNAc)和高水平的核心岩藻糖基化。聚糖末端包含非常低或没有末端唾液酸以及可变量的半乳糖。关于对抗体功能的糖基化的综述,参见例如, Wright & Morrison, *Trend Biotechnol.* 15 :26-31 (1997)。相当多的工作表明,抗体聚糖结构的糖组成的变化可以改变 Fc 效应子功能。有助于抗体活性的重要的碳水化合物结构被认为是岩藻糖残基,其借助于  $\alpha$ -1,6 键连接于 Fc 区 N-连接的低聚糖的最内部的 N-乙酰基氨基葡萄糖 (GlcNAc) 残基 (Shields et al., 2002)。Fc $\gamma$ R 结合需要存在低聚糖,其共价连接在 Fc 区中的保守 Asn297 处。最近已表明,非岩藻糖基化结构伴随显著增加的体外 ADCC 活性。

[0160] 组织学上,在 CHO 细胞中产生的抗体包含约 2 至 6% 的非岩藻糖基化群体。已报道 YB2/0 (大鼠骨髓瘤) 和 Lec13 细胞系 (CHO 系的一种凝集素突变体,其具有不足的 GDP-甘露糖 4,6-脱水酶,导致缺少 GDP 岩藻糖或 GDP 糖中间体,其是  $\alpha$ -6-岩藻糖基转移酶的底物) 可以产生具有 78 至 98% 非岩藻糖基化物种的抗体。在其它实例中, RNA 干扰 (RNAi) 或敲除技术可以用来基因改造细胞以降低 FUT8 mRNA 转录水平或完全敲除基因表达,并且已报道这样的抗体包含高达 70% 的非岩藻糖基化聚糖。在其它实例中,可以用糖基化抑制剂来处理产生抗体的细胞系 ;Zhou et al. *Biotech, and Bioengin.* 99 :652-665 (2008) 描述了用  $\alpha$ -甘露糖苷酶 I 抑制剂,高尔基体甘露糖苷酶 I 的抑制剂,来处理 CHO 细胞,导致产生具有非岩藻糖基化寡甘露糖型 N-葡聚糖的抗体。

[0161] 因此,在本发明的一种实施方式中,抗体将包括恒定区,该恒定区包括至少一个在 Fc 区中的氨基酸改变,其可以改善抗体结合于 Fc $\gamma$ RIIIa 和/或 ADCC。在另一个方面,本发明的抗体组合物包括本文描述的嵌合、人或人源化抗体,其中组合物中的至少 20%、30%、

40%、50%、60%、75%、85%或 95%的抗体具有恒定区,该恒定区包括缺乏岩藻糖的核心碳水化合物结构。

[0162] 虽然未衍生化或未修饰形式的抗体,尤其是 IgG1 或 IgG3 类型的抗体,或未衍生化抗体(包括在恒定区中的修饰以改善抗体结合于 FcγRIIIa 和 / 或 ADCC)预期会诱导表达 FAPP 或 BDSL 多肽的肿瘤细胞(如在来自胰腺癌患者的那些细胞中)的凋亡和 / 或抑制其增殖,但还可以制备衍生化的抗体以使它们具有细胞毒性。当使用这样的衍生化抗体的二价 IgG 形式时,它们可以因此以至少以下三种不同的方式靶向肿瘤细胞:通过 ADCC(例如,当抗体包括结合的 Fc 受体时,例如借助于它们的恒定区),通过诱导细胞凋亡或抑制细胞增殖,以及通过杀伤细胞(借助于细胞毒性部分)。在一种实施方式中,在抗体被分离并变得适用于人类以后,它们被衍生化以使它们对细胞具有毒性。以这种方式,将抗体给予癌症患者将导致抗体与表达 FAPP 和 / 或 BDSL 多肽的癌细胞的相对特异性结合,从而提供另外的方式来直接杀伤或抑制细胞。

#### [0163] 化合物在治疗中的应用

[0164] 利用本发明的方法生产的抗体在治疗表达 BDSL 或 FAPP 多肽的胰腺癌和 / 或肿瘤(例如,乳腺癌)方面是特别有效的。

[0165] 在一个方面,当实施本发明时,可以表征或评估患者体内的癌症。这对于确定根据本发明是否可以有利地治疗癌症是有用的。例如,因为本发明的抗原结合化合物具有促凋亡和抗细胞增殖活性,所以它们可以用来直接杀伤肿瘤细胞和 / 或减小或限制肿瘤的体积。抗原结合化合物在治疗表达 BDSL 或 FAPP 多肽的肿瘤(已扩散超过原位癌,在任何方向具有小于 2cm 的尺寸),和 / 或在治疗转移瘤和 / 或转移性肿瘤方面可能具有特别有利的特性。

[0166] 本发明的化合物很好适于治疗胰腺癌,其中诱导肿瘤细胞的死亡或减慢它们的生长或增殖是有利和 / 或必要的。这包括但不限于:胰腺癌,其中肿瘤被确立或已经扩散,其中癌症已进展超过原位癌,例如其中胰腺癌被归类为至少 I 期癌症和 / 或其中在胰腺中的肿瘤尺寸在任何方向为 2cm 或更小,或其中胰腺癌被归类为至少 2 期癌症和 / 或其中在胰腺中的肿瘤尺寸在任何方向大于 2cm,其中胰腺癌被归类为 2 期癌症和 / 或癌症已开始生长进入胰腺周围的附近组织,但不在附近淋巴结内部,其中胰腺癌被归类为 3 期癌症和 / 或可能已生长进入胰腺周围的组织,或其中胰腺癌被归类为 4 期癌症和 / 或已生长进入邻近器官。在已进展超过原位癌的肿瘤中杀伤或抑制肿瘤细胞的生长的能力在胰腺癌中是显著的,因为这样的癌症经常在发展的晚期被诊断。

[0167] 使用任何一种或多种常用方法来评估或表征胰腺癌。通常借助于试验和程序(其产生胰腺及其周围区域的图片)来诊断胰腺癌。用来查明是否癌细胞已在胰腺内和周围扩散的方法被称为分期。用来检测、诊断、以及分期胰腺癌的试验和程序通常同时进行。可以通过程序如胸部 x 射线、体检和病史、CT 扫描(CAT 扫描)、MRI(磁共振成像)、PET 扫描(正电子发射断层扫描)、超声内窥镜(EUS)、腹腔镜检查、内窥镜逆行胰胆管造影(ERCP)、经皮肝穿刺胆管造影(PTC)、和 / 或通过活检来评估疾病的分期以及是否可以通过手术来除去胰腺癌。在活检中,除去细胞或组织以便病理学家可以在显微镜下观察它们以检查癌症征兆,和 / 或可选地检查 BDSL 或 FAPP 多肽的表达。

[0168] 如本文所讨论的,利用 SDS-PAGE 和蛋白质印迹,本发明的发明人已证明,用 16D10

处理细胞会诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2 的减少以及促凋亡 Bax 蛋白的增加。还已证明,抗体会增加 p53 和 GSK-3 $\beta$  活性以及降低细胞周期蛋白 D1 水平。因此本发明的抗原结合化合物和方法可以有利地用于在细胞中调节 Bcl-2 家族成员蛋白活性的方法,优选在细胞中调节 Bcl-2 家族成员蛋白水平,优选降低 Bcl-2 蛋白表达和 / 或增加 Bax 蛋白表达。类似地,本发明的抗原结合化合物和方法还可以有利地用于在细胞中调节细胞周期活性和 / 或在 G1/S 转换处封闭细胞的方法,优选增加 p53 或 GSK-3 $\beta$  活性或和 / 或降低细胞周期蛋白 D1 水平。细胞可以是表达 BSDL 或 FAPP 多肽的任何细胞,优选肿瘤细胞(例如,胰腺肿瘤细胞),优选在脂筏中表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞。细胞可以是其中一种或多种 Bcl-2 家族成员的活性(或 p53、细胞周期蛋白 D1、或 GSK-3 $\beta$ )(例如,生物活性和 / 或蛋白表达)被异常调节的细胞(例如,肿瘤细胞),即,与正常细胞(例如,非肿瘤细胞)相比,活性被增加或降低,和 / 或特征在于相对于其它促或抗凋亡或者促或抗细胞周期蛋白的失衡。

[0169] 人 Bcl-2 家族的成员共享四个特征同源域(称为 Bcl-2 同源(BH)域)(命名为 BH1、BH2、BH3 以及 BH4)中的一个或多个。已知 BH 域对于功能是关键,并且这些域的缺失(经由分子克隆)会影响存活 / 凋亡率。抗凋亡 Bcl-2 蛋白,如 Bcl-2 和 Bcl-xL,保存所有四个 BH 域。BH 域还用来将促凋亡 Bcl-2 蛋白细分为那些具有多个 BH 域(例如,Bax、Bcl-xS 以及 Bak)的蛋白或那些仅具有 BH3 域(例如,Bid、Bim 以及 Bad)的蛋白。

[0170] Bcl-2 对于细胞凋亡过程是必不可少的,因为它抑制细胞死亡过程的引发。免疫组织化学染色已通常用来检测在肿瘤中 Bcl-2 家族成员的表达水平。已发现,在某些情况下,胰腺肿瘤可以过度表达 Bcl-2;这些肿瘤细胞预期会耐细胞凋亡。还已经表明,约 50%的胰腺肿瘤过度表达抗凋亡 Bcl-xL,并且 Bcl-xL 的增强表达与更短的患者存活有关,而 Bax 的正调节伴随更长的存活。

[0171] 在一个方面,本发明提供了一种治疗或杀伤表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞(具有 Bcl-2 家族成员调节异常)的方法,该方法包括使细胞与本发明的抗原结合化合物接触。在另一个方面,本发明提供了一种治疗具有肿瘤的患者(具有 Bcl-2 家族成员调节异常)的方法,该方法包括给予患者药物有效量的本发明的抗原结合化合物。

[0172] 在一个方面,本发明提供了一种治疗或杀伤表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的方法,该方法包括(a)确定细胞的特征是否在于 Bcl-2 家族成员调节异常,以及(b)如果细胞的特征在于 Bcl-2 家族成员调节异常,则使细胞与本发明的抗原结合化合物接触。在另一个方面,本发明提供了一种治疗具有肿瘤的患者(具有 Bcl-2 家族成员调节异常)的方法,该方法包括(a)确定是否患者患有特征为 Bcl-2 家族成员调节异常的肿瘤,以及(b)如果肿瘤的特征在于 Bcl-2 家族成员调节异常,则给予患者药物有效量的本发明的抗原结合化合物。

[0173] 在另一种实施方式中,本发明提供了一种治疗或杀伤表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的方法,该方法包括 a) 确定是否细胞的特征在于细胞周期蛋白 D1 的过度表达或缺乏 p53 或 GSK-3 $\beta$  活性,以及 b) 如果细胞的特征在于细胞周期蛋白 D1 的过度表达或缺乏 p53 或 GSK-3 $\beta$  活性,则使细胞与本发明的抗原结合化合物接触。在一种方法中,细胞是患有癌症(例如,胰腺癌)患者中存在的肿瘤细胞,并且该方法用来治疗上述患者。

[0174] 可以通过任何适宜的方法,例如基于免疫组织化学或核酸探针或引物的方式,来确定肿瘤或细胞是否具有 Bcl-2 家族成员调节异常(或改变的细胞周期蛋白 D1 或 p53 或 GSK-3 $\beta$  活性或水平),并且可以检测多个参数中的任何参数,如例如确定肿瘤或细胞是

否包含 (harbor) 能够产生 Bcl-2 家族成员调节异常 (或改变的细胞周期蛋白 D1 或 p53 或 GSK-3 $\beta$  活性或水平) 的突变, 突变的 Bcl-2 家族成员 (或细胞周期蛋白 D1 或 p53 或 GSK-3 $\beta$ ), Bcl-2 家族成员 (或细胞周期蛋白 D1 或 p53 或 GSK-3 $\beta$ ) 的增加或减少表达 (例如, 通过确定蛋白水平和 / 或转录物)。在一个方面, 调节异常包括抗凋亡 Bcl-2 家族成员 (例如, Bcl-2、Bcl-xL) 的增加的活性和 / 或促凋亡 Bcl-2 家族成员 (例如, Bax 等) 的降低的活性。

[0175] 如在 Giovannetti 等人 (2006) *Mol. Cancer. Ther.* 5(6) :1387-1395 中所总结的, 认为凋亡途径的调节可以是胰腺癌对抗癌化疗治疗 (处理) 仅显示有限敏感性的原因之一。Fahy 等人 (*British Journal of Cancer* (2003) 89, 391-397) 研究了 Bcl-2 和 Bax 在化疗敏感性中的调节。丝氨酸 / 苏氨酸激酶 AKT 的活化在胰腺癌中是常见的; 其抑制可以使细胞对化疗的凋亡效应敏感。Fahy 等人检查了在胰腺癌细胞中 NF- $\kappa$ B 转录因子的活化和 BCL-2 基因家族的随后的转录调节。磷脂酰肌醇-3 激酶或 AKT 的抑制导致 Bcl-2 的降低的蛋白水平和 Bax 的增加的蛋白水平。此外, AKT 的抑制降低了 NF- $\kappa$ B 的功能, 其能够转录调节 Bcl-2 基因。抑制该途径对胰腺癌细胞中的细胞凋亡的基础水平几乎没有影响, 但增加了化疗的凋亡效应。

[0176] 因此本发明的抗原结合化合物可以有利地用来使表达 BDSL 或 FAPP 多肽的细胞, 尤其是肿瘤细胞 (例如, 胰腺肿瘤细胞) 敏感于用化疗药物的治疗。药剂通常可以是任何药剂, 其要求细胞能够经受细胞凋亡以便是有效的。在一种优选的实施方式中, 该药剂是已知胰腺肿瘤或肿瘤细胞对其是或变得部分或完全抗性的药剂。在一种实施方式中, 本发明的抗原结合化合物可以用来治疗具有化疗抗性、表达 BDSL 或 FAPP 多肽的肿瘤患者。在另一种实施方式中, 本发明的抗原结合化合物可以用来治疗具有表达 BDSL 和 / 或 FAPP 多肽的肿瘤患者, 并连同化疗药物, 通常是作为其机制的一部分所需要的药物, 以致它的细胞靶能够经受细胞凋亡 (或对细胞凋亡没有抗性)。可选地, 肿瘤或患者已先前用化疗药剂加以治疗和 / 或肿瘤对用化疗药剂进行的治疗具有抗性 (即, 在没有用本发明的抗原结合化合物进行联合治疗的情况下)。在一个实施例中, 尤其是关于胰腺癌的治疗, 药剂是核苷类似物 (例如, 吉西他滨)。在另一个实施例中, 药剂是紫杉烷类化合物 (taxane) (例如, 紫杉醇和多西他赛及其类似物等)。在另一个实施例中, 药剂是抗代谢物、烷化剂、细胞毒性抗生素或拓扑异构酶抑制剂。虽然将明了, 本发明的抗原结合化合物和化疗药剂将经常分开给予, 但还涵盖包含本发明的抗原结合化合物和化疗药剂的组合物。这样的组合物可以用于本文描述的任何方法。

[0177] 在一个方面, 因此本发明提供了一种使表达 BDSL 或 FAPP 多肽的细胞对化疗药剂敏感的方法, 该方法包括使细胞与本发明的抗原结合化合物接触。在一个方面, 本发明提供了一种治疗或杀伤表达 BDSL 或 FAPP 多肽的细胞的方法, 该方法包括使细胞与本发明的抗原结合化合物和化疗药剂接触。在另一个方面, 本发明提供了一种治疗具有肿瘤的患者, 该方法包括联合给予患者药物有效量的本发明的抗原结合化合物和化疗药剂。如在本文中所使用的, 术语“联合”、“连同”或“组合疗法” (可互换使用) 是指这样的情况, 其中两种或更多种药剂 (例如, 本发明的抗原结合化合物和化疗药剂) 影响相同疾病的治疗或预防。术语“联合”、“连同”或“组合疗法”的使用并不限制将药剂给予患有疾病的受治疗者的次序。可以在给予患有疾病的受治疗者第二疗法以前 (例如, 5 分钟、15 分钟、30 分钟、45

分钟、1 小时、2 小时、4 小时、6 小时、12 小时、24 小时、48 小时、72 小时、96 小时、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、8 周、或 12 周以前)、同时、或随后(例如,5 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、6 小时、12 小时、24 小时、48 小时、72 小时、96 小时、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、8 周、或 12 周以后)给予第一疗法。

[0178] 此外,因为本发明的化合物可以有效地靶向表达 BSDL 或 FAPP 的细胞,其中简单地借助于它们结合于细胞,即无需细胞毒性部分或诱导 ADCC,所以它们特别可用于治疗患有缺陷免疫系统的患者(其可以被说成是具有“相对缺乏”的免疫细胞或免疫功能)。这样的患者可以包括患有影响其免疫系统的疾病或病症的患者,例如,先天或获得性免疫缺陷病、HIV 感染、淋巴瘤、白血病、慢性疲劳免疫功能障碍综合症、爱-巴病毒感染、病毒感染后疲劳综合症,或由于给予免疫抑制化合物,例如,连同移植,用于治疗障碍如自身免疫性疾病,或使用化疗药剂来治疗癌症。因此,本发明提供了一种治疗患有癌症的无免疫应答患者的方法,该方法包括给予患者药物有效量的本发明的抗原结合化合物。在优选的实施方式中,化合物是抗体。在其它实施方式中,抗体被衍生有细胞毒性部分以增强对表达 BSDL 或 FAPP 的细胞的直接杀伤。在某些实施方式中,该方法包括这样的步骤,其中癌细胞的样品是在给予步骤以前获自患者,并且证实了化合物结合于和/或诱导细胞凋亡或抑制细胞增殖的能力。在一种实施方式中,药物有效量是任何量,其足以诱导表达 BSDL 或 FAPP 的细胞(例如,获自患者的癌细胞)的凋亡或抑制其增殖。

[0179] 本发明还提供了组合物,例如,药物组合物,其包括在任何适宜载体中的任何本发明的化合物、抗体(包括其片段和衍生物),并且其含量可有效地抑制患者体内表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的增殖或活性、或有效地杀伤上述细胞。该组合物通常进一步包括药用载体。应当明了,本发明的将抗体和组合物给予患者的方法还可以用来治疗动物,或用来在用于人疾病的动物模型中测试任何本文描述的方法或组合物的效力。

[0180] 可用于这些组合物的药用载体包括但不限于离子交换剂,氧化铝,硬脂酸铝,卵磷脂,血清蛋白,如人血清白蛋白,缓冲物质如磷酸盐,甘氨酸,山梨酸,山梨酸钾,饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物,水,盐或电解质,如硫酸鱼精蛋白,磷酸氢二钠,磷酸氢钾,氯化钠,锌盐,胶体二氧化硅,三硅酸镁,聚乙烯吡咯烷酮,基于纤维素的物质,聚乙二醇,羧甲基纤维素钠,聚丙烯酸酯,蜡,聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物,聚乙二醇以及羊毛脂。

[0181] 根据另一种实施方式,本发明的抗体组合物可以进一步包括一种或多种另外的治疗剂,其包括通常用于特定的治疗用途(为此正给予抗体)的药剂(例如,胰腺癌)。另外的治疗剂将通常以典型地在单药治疗中该药剂用于待治疗的特定疾病或病症的量而存在于组合物中。

[0182] 关于实体肿瘤治疗,可以连同经典方式,如手术、放射治疗、化疗等来使用本发明。因此本发明提供了组合疗法,其中在手术或放射治疗的同时、以前、或以后,使用结合 BSDL 或 FAPP 多肽的化合物;或在常规化疗剂、放射治疗剂或抗血管生成剂、或靶向免疫毒素的同时、以前或以后,将化合物给予患者。可以以单一组合物或作为两种不同的组合物(利用不同的给药途径),将结合 BSDL 或 FAPP 多肽的化合物和抗癌药剂同时给予患者。

[0183] 当连同本发明的疗法使用一种或多种药剂(例如,抗癌药剂)时,并不要求组合结果是当分开进行每种治疗时所观测到的效果的相加。虽然至少加性效应通常是所期望的,但高于单一疗法之一的任何增加的肿瘤细胞增殖效应将是有利的。此外,并不特别要求组

合治疗呈现协同效应,虽然这当然是可能和有利的。用结合 BSDL 或 FAPP 多肽的化合物进行治疗可以在其它抗胰腺癌药剂治疗以前或以后,例如间隔为数分钟至数周和数月。

[0184] 因为本发明的结合 BSDL 或 FAPP 多肽的化合物直接对表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞而不是主要依赖于免疫介导机制(例如,ADCC)诱导细胞凋亡或抑制细胞增殖,所以预期,本发明的化合物可以连同已报道对免疫系统具有负面或抑制效应的药剂一起使用。例如,化疗可以用来治疗癌症,包括胰腺癌。各种化疗药剂可以用于本文披露的组合治疗方法。设想为示例性的化疗药剂包括干扰 DNA 复制、有丝分裂和染色体分离的药剂,以及破坏多核苷酸前体的合成和保真度的药剂。例如,药剂包括烷化剂、抗代谢物、细胞毒性抗生素、长春花生物碱、酪氨酸激酶抑制剂、金属蛋白酶以及 COX-2 抑制剂。已报道酪氨酸激酶抑制剂体内对患者免疫反应具有不利影响,并且已报道金属蛋白酶抑制剂具有血液毒性。另外,化合物可以有效地用于无免疫应答的患者,如患有 AIDS 的患者或患有其它免疫疾病的患者(例如,淋巴瘤、白血病),或用于接受免疫抑制药物的患者如环孢素、硫唑嘌呤(Imuran)、或皮质类固醇,连同器官移植或作为对免疫疾病的治疗如牛皮癣、类风湿性关节炎、或克罗恩病。

#### [0185] 化合物在诊断或预后中的应用

[0186] 如本文证明的,本发明的二价抗体特别有效地检测表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞(例如,乳腺癌),因为该抗体当具有二价形式时具有高亲合力,而没有对并不表达 BSDL 或 FAPP 多肽的组织非特异性染色。因此这些抗体将有利地用于诊断、预后和/或预测涉及表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的病态,包括胰腺病变如胰腺癌、胰腺炎以及 I 型糖尿病、以及乳腺癌和心血管疾病。例如,利用本发明的抗体可以表征或评估患者体内的胰腺(或乳腺)癌。这对于确定患者是否具有涉及表达 BSDL 或 FAPP 多肽的细胞的病理特征是有用的。该方法还可以用来确定是否具有这样的病理特征的患者可以用对表达 BSDL 或 FAPP 的细胞有效的疗法加以治疗。例如,该方法可以用来确定是否患者将响应于结合 BSDL 或 FAPP 的抗原结合化合物(例如,本发明的任何抗体)。

[0187] 因此本文描述的抗体可以用于检测(优选体外)胰腺病理特征,尤其是胰腺癌。这样的方法将通常涉及使来自患者的生物样品与根据本发明的抗体接触并检测免疫复合物的形成,其来自抗体与生物样品之间的免疫反应。优选地,生物样品是如通过活检获得的胰腺组织的样品(用于免疫组织化学测定的组织切片),或生物流体(例如,血清、尿、胰液或乳汁)。可以直接通过标记根据本发明的抗体或间接通过添加揭示根据本发明的抗体(二抗、链霉亲和素/生物素标记等)的存在的分子来检测复合物。例如,可以通过将抗体耦合于放射性或荧光标记来完成标记。对于本领域技术人员来说,这些方法是众所周知的。当检测癌症时,FAPP 或 BSDL 多肽存在于生物样品中的阳性确定将通常表明,患者对于胰腺病理特征(例如,胰腺癌)是阳性的。因此,本发明还涉及根据本发明的抗体在用于制备可以体内或体外用于检测胰腺病理特征的诊断组合物中的应用。

[0188] 本发明的抗体还将可用于确定是否主体适合于用靶向表达 FAPP 或 BSDL 多肽的细胞、或靶向 FAPP 或 BSDL 多肽本身的治疗药剂(治疗剂)进行治疗,或用于预测受治疗者对上述治疗的反应。优选地,治疗药剂是结合 FAPP 或 BSDL 多肽的抗原结合片段(例如,抗体、本发明的抗体)。

[0189] 本发明的抗体还将可用于评估具有癌症的受治疗者对用结合 FAPP 或 BSDL 多肽

的抗体进行治疗的反应;这样的方法将通常涉及评估是否患者具有表达 FAPP 或 BSDL 多肽(由本发明的抗体结合)的癌细胞, FAPP 或 BSDL 多肽的表达表明响应受治疗者。患者具有表达 FAPP 或 BSDL 的癌细胞的阳性确定表明,患者将是用结合 FAPP 或 BSDL 多肽的抗体(例如,本发明的抗体)进行治疗的阳性响应者。

[0190] 响应受治疗者的鉴定还使得这些方法可以用于治疗具有癌症的受治疗者。还可以评估是否患者具有表达 FAPP 或 BSDL 多肽(由本发明的抗体结合)的癌细胞,被本发明的抗体结合的 FAPP 或 BSDL 多肽的表达表明了响应受治疗者,以及用结合 FAPP 或 BSDL 多肽的抗体(例如,本发明的抗体)治疗所述受治疗者,其癌细胞表达 FAPP 或 BSDL 多肽。可以例如利用本文描述的诊断方法,如通过从患者获得生物样品并使样品与根据本发明的抗体接触,然后检测免疫复合物的形成(其来自所述抗体与所述生物样品之间的免疫反应),来评估是否患者具有表达 FAPP 或 BSDL 多肽的癌细胞。生物样品可以是胰腺组织(活检)的样品或生物流体(例如,血清、尿、胰液以及乳汁)。

[0191] 还涵盖用于胰腺病理特征、尤其是胰腺癌的诊断或预后试剂盒,其包括根据本发明的抗体。可选地,试剂盒包括用于诊断或预后的本发明的抗体、以及用于治疗的本发明的抗体。所述试剂盒可以另外包括借助其检测免疫复合物(来自生物样品与本发明的抗体之间的免疫反应)的方式,尤其是使得能够检测所述抗体的试剂。

[0192] 如本领域技术人员将明了的,化疗药剂的适当剂量将通常大约是已经在临床治疗中采用的量,其中单独或连同其它化疗药剂来给予化疗药剂。

[0193] 本发明的另外的方面和优点披露在以下实验部分中,其应被看作是说明性的而不是限制本申请的范围。

[0194] 实施例

[0195] 材料和方法

[0196] 抗体和其它试剂

[0197] POD 标记的抗兔 IgG、POD 标记的抗小鼠 IgG、以及对于兔和小鼠免疫球蛋白的其它抗体来自 Roche Diagnostics(Manheim, 德国)、Calbiochem(San Diego, CA) 或 Cell Signaling(Beverly, MA)。过氧化物酶(POD) 耦联山羊抗兔 IgG 和抗小鼠 IgG 分别来自 CellSignaling 和 Calbiochem(San Diego, CA)。相对于肌动蛋白和不相干的小鼠卡巴 IgM 的抗体、蛋白酶抑制剂的混合物、碘化丙啶以及阿非迪霉素来自 Sigma(St Louis, MO)。相对于 Bcl-2 的抗体获自 SantaCruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)。其它抗体(切割的半胱天冬酶 -3(Asp 175)、半胱天冬酶 -3、半胱天冬酶 -7(Asp175)、半胱天冬酶 -7、切割的半胱天冬酶 -9(Asp330)、半胱天冬酶 -9、切割的 PARP(Asp214)、PARP 以及 Bcl-2 来自 Cell Signaling(Beverly, MA)。RPMI1640、DMEM 培养基、青霉素、链霉素、胰蛋白酶-EDTA 以及液体分离非酶购买自 Cambrex(Cambrex Biosciences, Emerainville, 法国) 或 Lonza(Le Vallois-Perret, 法国)。半胱天冬酶抑制剂来自 Alexis(San Diego, CA) 或 Calbiochem。针对 Bax 和 E-钙粘着蛋白的抗体获自 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)。相对于  $\beta$ - 联蛋白的抗体获自 Abcam(Cambridge, UK)。异硫氰酸荧光素(FITC) 耦联的山羊抗小鼠 IgM 来自 Sigma。Alexa 耦联的山羊抗兔 IgG 和抗小鼠 IgG 来自 Molecular probes(Carlsbad, CA)。串珠镰孢菌素 B1、串珠镰孢菌素 B2、L-环丝氨酸、苯基 -2- 癸酰基氨基 -3- 吗啉基 -1- 丙醇(PDMP)、甲基 - $\beta$ - 环糊精(M $\beta$ CD)、菲律宾菌素、Triton X-100、

3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-溴化四唑 (MTT)、碘化丙啶 (PI) 以及阿非迪霉素获自 Sigma。蛋白酶抑制剂混合物片剂来自 Roche Diagnostic (Meylan, 法国)。DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吡啶, 二盐酸盐) 来自 Promega (Madison, WI)。

[0198] 单克隆抗体 mAb16D10, 其识别肽并且可以识别胰腺腺泡蛋白 (FAPP) 的 O-糖基化 C 端结构域, 胰腺胆盐依赖性脂肪酶 (BSDL) 的一种癌胚糖同种型 (glycoisoform, 仅与附着聚糖的数目或种类不同的蛋白的同种型), 以及多克隆抗体 (pAbL64), 其针对人 BSDL (和 FAPP), 是在我们的实验室制备, 如在 WO2005/095594 中所描述的。所有其它产品均具有最好的可获得等级。

[0199] 细胞和试剂

[0200] 在补充有丙酮酸钠 (1mM)、青霉素 (100U/ml)、链霉素 (100  $\mu$ g/ml) 以及 10% 热灭活的 FCS (PAN biotech) 的 DMEM (Gibco) 中培养 HEK293T 细胞。在补充有丙酮酸钠 (1mM)、青霉素 (100U/ml)、链霉素 (100  $\mu$ g/ml) 以及 10% 热灭活的 FCS (PAN biotech) 的 RPMI (Gibco) 中培养 SOJ-6 细胞。Lipofectamine 2000 试剂、Trizol、Superscript II 逆转录酶以及 pcDNA3.1 载体购自 Invitrogen。

[0201] 细胞培养

[0202] 细胞系 (SOJ-6 和 Panc-1) 来自人胰 (腺) 癌。在 37°C 下在补充有 10% FCS、青霉素 (100U/ml)、链霉素 (100  $\mu$ g/ml)、以及两性霉素 B (fongizone) (0.1%) 的 RPMI 1640 培养基中生长 SOJ-6 细胞, 其组成性表达 FAPP。在 37°C 下在补充有 10% FCS、谷氨酰胺 (2Mm)、青霉素 (100U/ml)、链霉素 (100  $\mu$ g/ml)、以及两性霉素 B (0.1%) 的 DMEM 培养基中生长并不表达 FAPP 的 PANC-1 细胞。在 37°C 下在补充有 10% 灭活 FCS、青霉素 (100U/ml)、链霉素 (100  $\mu$ g/ml)、以及两性霉素 B (0.1%) 的 RPMI 1640 培养基中生长表达 mAb16D10 的 16D10 杂交瘤。

[0203] 细胞死亡分析

[0204] 用在具有灭活 FCS 的 RPMI1640 中的 mAb16D10 或顺铂处理以后, 收获细胞, 用冰冷 PBS 洗涤, 然后在室温下在黑暗中再悬浮在 Isoflow 缓冲液中的冷碘化丙啶溶液 (0.5mg/ml) 中 10 分钟。利用 Coulter FACSCalibur 进行流式细胞术分析。

[0205] 细胞生长和增殖

[0206] 如先前描述的 (Mosmann et al., 1983 J Immunol Methods, 65(1-2):55-63), 利用 MTT 测定来确定细胞增殖。简单地说, 在 96 孔培养板中在适当的包含 10% FCS 的完全培养基中在亚汇合时接种细胞。通过具有 10% 灭活 FCS 的新鲜培养基更换培养基 24 小时, 包括增加浓度的针对 FAPP 的抗体 (pAbL64、mAbJ28 以及 mAb16D10)。用 PBS 洗涤细胞并在完全培养基中用 100  $\mu$ l 的 MTT (0.5mg/ml) 温育 3 小时, 用 PBS 洗涤并最后在 37°C 下用 DMSO 温育 30 分钟。通过利用 MR 5000 微量板分光光度计在 550nm 处测量吸光度来确定细胞生长。一式三份地进行所有独立的确定并与对照进行比较。

[0207] 用于 CD 107 转移和 IFN- $\gamma$  生产的流式细胞仪测定。

[0208] 单独或在有 rec16D10 (30  $\mu$ g/mL) 或 rituxan (B 细胞单克隆抗体) (10  $\mu$ g/mL) 存在的条件下, 以等于 1 的效应子 / 靶比率, 使解冻纯化的人 NK 细胞 (用 100UI/mL 的 IL-2 刺激或未刺激过夜) 与 SOJ-6 或 B221 细胞系进行混合。然后在 37°C 下在有 FITC 轭合的抗 CD107mAb (Becton Dickinson) 和莫能星 (sigma) 存在的条件下温育细胞 4 小时。在温

育以后,用包含 2mM EDTA 的 PBS 洗涤细胞以破坏细胞结合物并染色细胞外标记 (PC5 匹配的抗 CD56 和 PC7 匹配的抗 CD3,其购买自 Beckman coulter)。然后细胞被固定和透化,其中利用 IntraPrep 试剂 (Beckman Coulter)。利用购买自 Becton Dickinson 的 PE 匹配的抗 IFN- $\gamma$  来揭示细胞内 IFN- $\gamma$ 。然后用 FACScanto (Becton Dickinson) 来分析样品。

#### [0209] 流式细胞术

[0210] 在以下条件下,通过间接荧光来进行在 SOJ-6 和 PANC-1 细胞表面上的抗原的检测。通过在 37°C 下用非酶促解离液 (Calbiochem) 处理 15 分钟来从培养板释放细胞。在 4°C 下进行所有随后的步骤。用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤细胞,用 PBS 中的 2% 多聚甲醛固定 15 分钟,然后用 PBS 中的 1% BSA 洗涤 15 分钟。将抗原暴露于特异性抗体 2 小时,用 PBS 洗涤,并且最后用适当的 FITC 标记的二抗温育 45 分钟。然后洗涤细胞,再悬浮在 isoflow 缓冲液中,并用 Coulter FACSCalibur 装置加以分析。

[0211] 利用冷 PBS 1x/BSA 0.2% / 叠氮钠 0.05% 缓冲液洗涤细胞两次。在 1 小时期间并在 4°C 下,利用不同抗体进行染色到圆形 96 孔板中,其中使用  $5 \times 10^4$  个细胞 / 孔。然后在用第二试剂温育以前洗涤细胞两次。在两次洗涤以后,在收获以前,将细胞再悬浮到 PBS1X/甲醛 1% 中。用 FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) 获得染色并利用 FlowJo 软件分析结果。然后用 mAb16D10 或不相关的 IgM (用作阴性对照) 温育 SOJ-6 细胞,其中 SOJ-6 细胞被 5  $\mu$ g/ml 阿非迪霉素 (真核细胞核 DNA 复制的可逆抑制剂,其在 S 早期阻断细胞周期) 预处理 6 小时或未经预处理。借助于非酶促细胞解离溶液从培养板释放细胞,用 PBS<sup>+/+</sup> 洗涤,在 -20°C 下用 70% 乙醇固定,然后用 PBS<sup>+/+</sup> 洗涤。将细胞再悬浮在 isoflow 缓冲液中的 400  $\mu$ g/ml 碘化丙啶溶液中,然后在室温下温育 30 分钟,如已经描述的 [Mi-Lianet al., 2004]。通过流式细胞术检测细胞周期分布并通过 Mod Fit 软件 (Verity Software House, Inc., Topsham, ME) 进行分析。利用分别在 488nm 处和在 610nm 处的激发和发射来记录单一事件的红色荧光,以测量 DNA 指数。

[0212] 从 16D10 杂交瘤提取 RNA 和制备 cDNA

[0213] 将 16D10 杂交瘤细胞 ( $5 \times 10^6$  个细胞) 再悬浮在 1ml 的 Trizol 试剂中。通过添加 200  $\mu$ l 氯仿来进行 RNA 提取。在离心 (15 分钟,13,000rpm) 以后,借助于 500  $\mu$ l 异丙醇从水相沉淀 RNA。在温育 (10 分钟,RT) 和离心 (10 分钟,13,000) 以后,用 70% 乙醇洗涤 RNA 并再离心 (5 分钟,13,000rpm)。将 RNA 再悬浮在 H<sub>2</sub>O (无核糖核酸酶水) 中。利用 SuperscriptII 逆转录酶来获得 cDNA,其中使用 2  $\mu$ g 的特异性 RNA 并按照制造商的说明。通过 PCR 反应来检查 cDNA 质量,其中使用 5' GTG AAG GTC GGT GTG AAC GGA TT (SEQ ID NO :17) 和 3' CTA AGC AGT TGG TGG TGC AGG AT (SEQ ID NO :18) 寡核苷酸以扩增 GAPDH。

[0214] 16D10 抗体的 VH 和 VL 域的克隆

[0215] 通过 PCR 从 cDNA 扩增 16D10 抗体的 VL-Ck 域,其中使用 5' AAGCTAGCATGGAATCACAG ACTCAGGCT (SEQ ID NO :19) 和 3' AAGCGGCCGCCTAACACTCATTCTGTTGAAG (SEQ ID NO :20) 寡核苷酸。在 TA 克隆和测序以后,将序列克隆到在 NheI 与 NotI 限制位点之间的 pcDNA3.1 载体中。通过 PCR 从 cDNA 扩增 16D10 抗体的 VH-CH1 域,其中使用 5' AAGAATTCATGGAATGGAGCT GGGTCTTTC (SEQ ID NO :21) 和 3' AAGGTACCTGGAATGGGCACATGCAGATC (SEQ ID NO :22) 寡核苷酸。在 TA 克隆和测序以后,将序列克隆到在 EcoRI 与 KpnI 限制位点之间的 958cosFClink 载体中。

**[0216] 转染**

[0217] 在转染到 75cm<sup>2</sup> 烧瓶 (5×10<sup>6</sup> 个细胞 / 烧瓶) 以前 24 小时, 将 HEK-293T 细胞接种在没有抗生素的 DMEM 中。使用 15 μg 的 pcDNA3.1/VL-Ck 构建物和 15 μg 的 958cosFClink/VH-CH1 构建物进行转染, 其中按照制造商的说明使用 Lipofectamine 2000。为确保用于转染的 DNA 纯度, 使用了来自 Qiagen 的 Maxi 制备的无内毒素试剂盒。所使用的 Lipofectamine :DNA 比率固定为 2 : 1。在转染后的第 4、8、以及 12 天收获培养上清液。

**[0218] 抗体的纯化**

[0219] 利用 A 蛋白琼脂糖凝胶 CL-4B 珠 (GE Healthcare) 从上清液纯化 16D10。在 4°C 和旋转下进行批量纯化。然后在被装载到柱上以前, 在 4°C 和 1500rpm 下对珠进行离心 5 分钟。在 1X PBS 中充分洗涤以后, 在 4°C 下相对于 1X PBS 缓冲液透析过夜以前, 利用甘氨酸 0.1M pH 3 缓冲液洗脱抗体。

**[0220] SDS-PAGE 和蛋白质印迹**

[0221] 在 6 孔培养板的包含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中生长 SOJ-6 细胞。在亚汇合时, 除去培养基并用包含 10% 灭活 FCS 的新鲜 RPMI 培养基更换 24 小时。然后用 mAb16D10 或顺铂温育 SOJ-6 细胞 24 小时。在温育结束时, 用冰冷 PBS (没有 Na<sup>+</sup> 和 Mg<sup>++</sup>) 洗涤细胞三次, 收获然后通过离心沉淀。洗涤沉淀物两次并在 4°C 下溶解在 0.5ml 的裂解缓冲液 (10mM Tris-HCl pH 7.4、150mM NaCl、1% Triton X-100、1mM 苯甲脒以及磷酸酶抑制剂) 中。在溶解以后, 通过在 4°C 下以 10,000g 离心 10 分钟来澄清匀浆物。保存一个等分部分, 用于蛋白测定, 其中利用二辛可宁酸测定 (Pierce, Rockford, IL)。将在还原 SDS 缓冲液中的蛋白质 (50 μg / 泳道) 分离到 10、12、或 15% 聚丙烯酰胺上, 其中借助于 0.1% SDS (按照待分离蛋白质的分子量范围)。在电泳迁移以后, 对蛋白质进行银染色。可替换地, 利用 Mini Transblot 电泳细胞 (BioRad, Hercule, OR) 将蛋白质转移到硝化纤维素膜上, 并通过利用适当的一抗和二抗来免疫检测转移的蛋白。在洗涤以后, 按照制造商的说明 (Roche Diagnostics, 瑞士) 用化学发光底物来显影膜。在每个实验中, 通过省略一抗或通过利用非免疫血清来包括对照。

**[0222] 细胞凋亡和半胱天冬酶活性**

[0223] 在按照制造商的说明在培养基中添加最终浓度为 10 μM 的 CaspACE FITC-VAD-fmk 原位标记 (Promega) 以前, 用在包含灭活 FCS 的 RPMI 中的 mAb16D10 或小鼠 IgM 处理生长在 8 孔板 (聚苯乙烯容器, BD Falcon) 中的细胞 24 小时。然后用 PBS 洗涤细胞, 在 2% 多聚甲醛中固定 15 分钟, 然后再次洗涤。在半胱天冬酶作用于 FITC-VAD-fmk 以后, 凋亡细胞变成发荧光的, 然后在荧光显微镜下对 10 个现场随机检查的收集物一式三份确定荧光细胞的数目。用于实施例 14 的细胞凋亡测定 (通过嵌合重组 16D10 进行的细胞凋亡)

[0224] 在开始实验前 72 小时, 将 SOJ-6 细胞 (20. 10<sup>4</sup> 个细胞 / 孔) 接种到 24 孔板上。用 20 μg/ml 的 16D10IgM、或 20 μg/ml 的另外重组的 16D10IgG1 抗体 (该抗体包含 16D10 可变区, 其分别连接融合于重链和轻链的人 IgG1 恒定区和人卡巴轻链区)、25 μg/ml 衣霉素或 50 μg/ml 衣霉素温育细胞。在按照制造商的说明利用膜联蛋白 V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) 培养 24 小时以后, 进行膜联蛋白 V/PI 染色。用 FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) 获得染色, 然后利用 FlowJo 软件来分析结果。

[0225] 核染色

[0226] 在用 mAb 16D10 或顺铂处理以后,用冰冷 PBS 洗涤细胞,在  $-20^{\circ}\text{C}$  下用 70% 乙醇固定和透化 5 分钟,然后在室温下用在 PBS 中的稀释 1/1000 的 DAPI 溶液染色 1 分钟。然后用 PBS 洗涤细胞。通过荧光显微镜检查了细胞的核形态。

[0227] 统计分析

[0228] 所有数据表示为平均值  $\pm$  SD。利用非配对学生 t 检验来确定组之间的显著性差异。 $*P < 0.01$  的数值被视为统计显著的。

[0229] 实施例 1- 用 mAb16D10 处理的胰腺 SOJ-6 细胞经受通过细胞凋亡的细胞死亡 24 小时以上

[0230] 如本文描述的,研究了 mAb 16D10 刺激 SOJ-6 细胞的凋亡的细胞死亡的能力。观察到,抗体 16D10 导致 SOJ-6 细胞的凋亡(与 RPMI 和小鼠 IgM 相比,如图 1 所示,y 轴表示凋亡细胞的数目/cm<sup>2</sup>)。

[0231] 实施例 2-16D10 诱导的细胞凋亡通过半胱天冬酶 -3、半胱天冬酶 -8、以及半胱天冬酶 -9 活化来介导

[0232] 在该实验中,借助于作用于胰腺 SOJ-6 细胞的 CaspAceFITC-VAD-fmk 来测量由 16D10 诱导的细胞凋亡,其中用或不用半胱天冬酶抑制剂(半胱天冬酶 9 :Z-LEHD-fmk、半胱天冬酶 8 :Z-IEDT-fmk、半胱天冬酶 3 :Z-DEVED-fmk、以及半胱天冬酶混合物 :Z-VAD-fmk)对胰腺 SOJ-6 细胞进行预处理,然后用 mAb 16D10 对其进行处理。图 2 表明,mAb16D10 通过半胱天冬酶 -3、半胱天冬酶 -8 以及半胱天冬酶 -9 来刺激细胞凋亡。

[0233] 还可以通过 DAPI 染色来观察由 mAb16D10 诱导的 SOJ-6 细胞的凋亡。结果示在图 3 中,其中 RPMI 没有诱导细胞凋亡,顺铂诱导低水平的细胞凋亡,而抗体 16D10 诱导显著水平的细胞凋亡,如通过图 3 中的细胞上的轻着色所观察到的,其对应于核碎裂。

[0234] 实施例 3- 通过 Bcl-2 蛋白家族来控制 16D10

[0235] 利用如本文描述的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹,观察到,用 16D10 处理细胞诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2 的减少并伴随 Bax 蛋白的增加,这表明半胱天冬酶活化受 Bcl-2 蛋白家族的控制。该实验还证明了,16D10 诱导的细胞凋亡是经由半胱天冬酶 8 和 9、以及多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP) 切割加以介导。图 4 示出在凝胶上的结果,其中最左边的泳道表示在 RPMI 中的 SOJ-6 细胞,中间的泳道表示用抗体 16D10 温育的 SOJ-6 细胞,而最右边的泳道表示用顺铂温育的 SOJ-6 细胞。

[0236] 实施例 4-mAb 16D10,但不是抗体 pAbL64 和 mAb J28,其均针对 BDSL 和 / 或 FAPP,可以抑制胰腺肿瘤细胞生长

[0237] 利用本文描述的 MTT 测定来评估细胞生长。图 5 示出了用增加浓度的多克隆抗体 pAbL64(其识别人 BDSL 和 / 或 FAPP)对 SOJ-6 胰腺肿瘤细胞的处理。图 5 表明,pAbL64 不能引起细胞生长或数目的降低(x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。图 6 示出了用增加浓度的多克隆抗体 J28 对 SOJ-6 胰腺肿瘤细胞的处理,其中多克隆抗体 J28 识别人 BDSL 和 / 或 FAPP,但本发明的发明人先前已证明其结合来自抗体 16D 10 的 BDSL 和 / 或 FAPP 上的不同表位。图 6 表明,J28 不能引起细胞生长或数目的降低(x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。图 7 示出了用增加浓度的多克隆抗体 16D10(IgM)(其识别人 BDSL 和 / 或 FAPP)对 SOJ-6 或 PANC-1 胰腺肿瘤细胞的处理。图 7 表明,16D10 不能引起 PANC-1 细胞(其并不

表达 16D10 抗原) 生长或数目的降低, 但却引起 SOJ-6 细胞 (其表达 FAPP) 生长或数目的降低 (x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。图 8 示出了用增加浓度的对照 IgM 抗体对 SOJ-6 或 PANC-1 胰腺肿瘤细胞的处理, 其表明对照 IgM 抗体既不能引起 PANC-1 细胞也不能引起 SOJ-6 细胞的生长或数目的降低 (x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。图 9 示出了用增加浓度的抗体 16D10 或对照 IgM 抗体对 SOJ-6 胰腺肿瘤细胞的处理, 其表明 16D10 引起细胞减少而对照 IgM 抗体则没有 (x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。

[0238] 图 10 示出了用增加浓度的抗体 16D10 或对照 IgM 抗体、以及各种浓度的甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD) (具有或没有抗体 16D10) 对 SOJ-6 胰腺肿瘤细胞的处理, 其表明 16D10 引起细胞的减少而对照 IgM 抗体则没有 (x 轴是 mAb 浓度而 y 轴是细胞生长%)。当连同 16D10 一起使用时 MBCD 可降低或消除抗体 16D10 的细胞生长抑制活性。这些数据表明, mAb 16D10 刺激凋亡的细胞死亡的能力取决于 16D10 抗原在膜脂筏微结构域中的定位。

[0239] 实施例 5-mAb16D10 调节 SOJ-6 细胞的细胞周期以及细胞周期调节蛋白的表达。

[0240] 我们接着希望知道是否 mAb16D10 诱导的细胞凋亡是由于 (部分地) 细胞周期的阻滞。通过观测在没有或用阿非迪霉素预处理、没有或用 mAb16D10 处理 SOJ-6 细胞以后的 DNA 分布, 评估了在处理以后的 SOJ-6 细胞的细胞周期分布。每个实验一式三份进行三次。借助于流式细胞术, 我们使用了特异性 DNA 标记、碘化丙啶来确定细胞周期的不同时期。用 mAb16D10 处理 SOJ-6 细胞导致 G1/S 阻滞 (G1/S :96%) 和凋亡细胞的增加 (6%), 而在 G2/M 期的细胞百分比降低 (4%)。当通过阿非迪霉素使细胞在 G1/S 期同步时, 证实了这些结果。确实, 在阿非迪霉素处理以后, 还观察到细胞从 G2/M 到 G1/S 期以及从 G1/S 到凋亡的移动。在后一种情况下, 因为细胞被封闭在 G1/S 期, 所以移动发生在从 S 期到 G0/G1 期以及从 G0/G1 期到细胞凋亡。

[0241] 我们对 PANC-1 细胞进行了相同的实验, 并在 mAb16D10 处理以后没有观察到对细胞周期的影响。接着分析了不同细胞周期调节蛋白、尤其是 p53 和细胞周期蛋白 D1 的表达。正如预期的, 用 mAb16D10 处理细胞增加了 p53 的表达并降低了细胞周期蛋白 D1 的表达 (图 11)。因为通过 GSK-3 $\beta$  可以直接调节细胞周期蛋白 D1 表达 (Diehl et al., 1998 Genes Dev. 12(22) :3499-511), 所以我们接着集中于在用 mAb16D10 挑战以后这种激酶在 SOJ-6 细胞中的表达水平。虽然总 GSK-3 $\beta$  的表达是不变的, 但在用 mAb16D10 温育细胞以后观察到磷酸-GSK-3 $\beta$  (无活性形式) 的减少 (图 11)。这些结果一起表明, 用 mAb16D10 对细胞的处理会诱导 GSK-3 $\beta$  的活化, 从而导致细胞周期蛋白 D1 的降解并导致细胞在 G1/S 期的阻滞。

[0242] 实施例 6-膜筏结构的组织破坏降低了 mAb16D10 的抗增殖效应。

[0243] 多个研究已表明, BSDL 与人胰腺 SOJ-6 肿瘤细胞表面上的筏脂域有关 (Aubert-Jousset et al., 2004 Structure, 12(8) :1437-47)。用良好证明的药物进行的膜脂域的药理操作已用来研究脂筏在许多系统中的作用。为此, 我们使用了甲基- $\beta$ -环糊精 (M $\beta$ CD) 和菲律宾菌素, 描述分别用来消耗膜筏中的胆固醇或螯合胆固醇的药物 (Chenet et al., 2002 J Biol Chem. ;277(51) :49631-7)。如图 12A 所示, 在有甲基- $\beta$ -环糊精和菲律宾菌素存在的条件下 mAb16D10 的抗增殖效应会降低。

[0244] 鞘脂还参与筏结构; 因而, 我们使用了 (糖) 鞘脂生物合成的代谢抑制剂 (Aubert-Jousset et al., 2004)。虽然以有效浓度 (10  $\mu$ M) 进行了试验, 但 L-环-丝氨

酸 (LCS) (丝氨酸棕榈酰转移酶的抑制剂) 和串珠镰孢菌素 1 或 2 (都是二氢神经酰胺合成酶的抑制剂) 均不干扰 mAb16D10 的抗增殖效应 (图 12B)。我们接着试验了苯基 - 癸酰基亚氨基 - 吗啉基 - 丙醇 (PDMP), 鞘糖脂合成的一种抑制剂, 其作用于鞘糖脂合成的最后步骤 (Lefrancois et al., 2002, J Biol Chem. 277(19):17188-99)。如图 12B 所示, PDMP 削弱了 mAb16D10 对 SOJ-6 细胞增殖的影响。这些结果表明, 16D10 抗原可能位于富含胆固醇的微结构域中, 以及 16D10 抗原与这些微结构域的这种缔合可以是诱导细胞凋亡所必要的。然而, 这些微结构域的新合成似乎并不涉及这种途径。因此, 富含胆固醇的微结构域的完整性是在胰腺肿瘤细胞表面存在 16D10 抗原的先决条件。

[0245] 实施例 7-mAb16D10 在 SOJ-6 细胞中调节 E-钙粘着蛋白表达和  $\beta$ -联蛋白定位。

[0246] Roitbak 等人 (2005) 说明了,  $\beta$ -联蛋白和 E-钙粘着蛋白复合物与在人肾上皮细胞中的脂筏标记窖蛋白-1 有关。这些分子可以将发信号的作用赋予这些脂筏域。进行免疫印迹以检查通过胰腺肿瘤细胞进行的 E-钙粘着蛋白和  $\beta$ -联蛋白的表达。如图 13 所示, 与用不相关的 IgM 处理的细胞相比, 来自用 mAb16D10 处理的 SOJ-6 细胞的裂解液呈现高 E-钙粘着蛋白表达。通过免疫荧光显微镜证明了响应于 mAb16D10 处理在 SOJ-6 细胞的质膜处 E-钙粘着蛋白的过度表达, 其中用或不用 mAb16D10 处理 SOJ-6 细胞 24 小时, 洗涤, 用多聚甲醛固定, 并用 1% BSA 和 0.05% 皂甙 (在 PBS 中) 饱和, 在二抗 FITC 488nm 或 Alexa 594nm 以后, 用一抗 (抗 E-钙粘着蛋白、抗  $\beta$ -联蛋白、抗磷酸- $\beta$ -联蛋白) 进一步温育。用或未用 mAb16D10 处理的 PANC-1 细胞并不在它们的质膜处表达 E-钙粘着蛋白 (数据未示出)。此结果提示, E-钙粘着蛋白的过度表达依赖于在细胞表面存在 16D10 抗原以及用 mAb16D10 进行的处理。然而, mAb16D10 并不诱导  $\beta$ -联蛋白表达的显著变化 (图 13)。

[0247] 为了确定是否用 mAb16D10 进行的处理可以影响  $\beta$ -联蛋白的定位, 接着进行了荧光显微镜分析。在用 mAb16D10 处理 SOJ-6 细胞以后在胞质室中发现  $\beta$ -联蛋白, 而在未处理细胞中其定位在质膜处。许多研究已表明, 在没有 Wnt 信号的情况下,  $\beta$ -联蛋白的残基的磷酸化引导此蛋白至降解, 其中通过遍在蛋白依赖性蛋白酶体途径 (Aberle et al., 1997EMBO J. 16(13):3797-804 和 Orford et al., 1997Biol Chem. 272(40):24735-8)。确实, 在用 mAb16D10 处理的细胞中  $\beta$ -联蛋白被磷酸化 (图 13), 这提示  $\beta$ -联蛋白不能易位到细胞核以激活靶基因如细胞周期蛋白 D1 而是应被降解。此外,  $\beta$ -联蛋白可以由 GSK-3 $\beta$  加以调节, 其中 GSK-3 $\beta$  本身在用 mAb16D10 处理的细胞中被激活 (图 11)。这些结果证实了我们先前的实验, 其表明 mAb16D10 诱发在 G1/S 期的细胞周期阻滞。这些结果表明, mAb16D10 灭活  $\beta$ -联蛋白并恢复 E-钙粘着蛋白在人胰腺肿瘤细胞中的直接或间接表达。最后, 我们希望确定是否在筏微结构域中 E-钙粘着蛋白、 $\beta$ -联蛋白、以及 16D10 抗原的缔合是 mAb16D10 诱导细胞凋亡所需要的 (图 13)。

[0248] 实施例 8-SOJ-6 而不是 PANC-1 细胞表达由 16D10 识别的抗原

[0249] 如本文说明的, 在 SOJ-6 细胞中抗体 16D 10 能够抑制细胞生长但在 PANC-1 细胞中则不能。进行了流式细胞术实验以研究是否由 16D 10 识别的抗原存在于细胞表面上。结果示于图 14 和 15, 其分别表示 SOJ-6 细胞和 PANC-1 细胞。在图 14 中, 发现抗体 16D10 结合存在于 SOJ-6 细胞上的抗原, 而在图 15 中, 抗体 16D10 并不结合存在于 PANC-1 细胞上的抗原。在每种情况下, 将 16D10 结合与阴性对照和对照小鼠 IgM (Sigma) 进行比较。x 轴表示荧光强度而 y 轴表示计数。

[0250] 实施例 9- 在 HEK293T 细胞中二价 16D10 嵌合抗体的生产

[0251] 通过杂交瘤 DNA 的 RT-PCR 扩增获得对应于小鼠 16D10 抗体的 VH 和 VL 链的 cDNA。H:借助于人 IgG1-Fc, VH 和 CH1 域被扩增,克隆,测序以及亚克隆到读框内的 COS-fc-link 载体中。L:VL 和 Ck 域被扩增,克隆,测序以及亚克隆到 pcDNA3 表达载体中。

[0252] 产生了一种嵌合抗体,其包括小鼠 16D10 抗体的可变 (Fab2' 样) 域和人 IgG1 抗体的恒定 (Fc) 域。该抗体被称作 rec16D10。在 HEK293T 细胞中瞬时 (通过 958COS-Fc-link-VH-16D10 和 pcDNA3-VL-16D10 载体的共转染) 或稳定地 (通过利用 pcDNA6-Fc-VH-16D10 和 pcDNA3-VL-16D10 载体的共转染) 产生抗体。在 Prot-A 纯化以后,通过 SDS-PAGE 分析来确认所产生抗体的纯度和产率,并通过对 SOJ-6 细胞进行的 FACS 来确认活性。参见图 16、图 17。

[0253] 用胰蛋白酶温育 IgM 16D10 抗体和嵌合 rec16D10,以研究其对结合于 SOJ-6 细胞的影响。发现胰蛋白酶显著降低两种抗体与细胞的结合。

[0254] 实施例 10-IgM 16D10 的内化

[0255] 利用共焦显微镜进行的脉冲追踪实验用来评估在培养基中 IgM 16D10 抗体与活细胞的相互作用。(脉冲:在 4°C 下 30 分钟;追踪:在 37°C 的培养基中 0 或 2 小时。)。观察到,在两小时内,几乎所有的 mAb 都被内化。一部分 mAb 与 LAMP1 共定位。

[0256] 实施例 11- 抗体对细胞增殖的影响

[0257] 检查了 IgM 抗体 16D10 和嵌合抗体 rec16D10 对 SOJ-6 细胞增殖的影响。在不包含抗体、包含不同量的 16D10 或 rec16D10 抗体、或包含不相关的 IgG 抗体的培养基中温育细胞。25 或 50  $\mu$ g/ml 的抗体 16D10 减少细胞增殖大约 50%,而 25 和 50  $\mu$ g/ml 的 rec16D10 分别减少增殖大于 20%和大于 35% (图 18)。因此,Rec 16D10 和 16D10IgM 均对 SOJ-6 增殖具有直接的负面影响。

[0258] 实施例 12- 检查 rec16D10 激活 NK 细胞 (ADCC) 的能力

[0259] 用靶 SOJ-6 细胞连同 NK 细胞、用 IL-2 (100U/ml) 进行或不进行过夜处理来温育嵌合抗体 rec16D10 (30  $\mu$ g/ml) (图 19)。作为对照,与靶 B221 细胞一起使用 Rituxan 抗体 (10  $\mu$ g/ml)。以 1/1 (100000 个 NK/孔) 的比率使用效应细胞和靶细胞。用抗体和靶细胞温育来自两种供体 (NK1 和 NK2) 的解冻纯化的 NK 细胞。通过 CD 107 染色和 IFN- $\gamma$  分泌检查了 NK 细胞的活化。在 IL-2 处理以后并在有 SOJ-6 细胞存在的条件下,rec16D10 分别在大约 53%和 45%的 NK1 和 NK2 细胞中诱导 CD107 正染色 (相比于在不包含抗体或包含 Rituxan (B 细胞单克隆抗体) 的对照中的 < 30%和 < 20%) (图 20)。在类似条件下,大约 30%的 NK1 和 NK2 细胞分泌 IFN- $\gamma$  (相比于分别在 NK1 和 NK2 细胞中在没有抗体或包含 Rituxan 的情况下的小于 16%和 13%) (图 21)。这些结果说明了,在有靶细胞存在的条件下,二价抗体 (具有人 IgG Fc 部分) rec16D10 可以有效地激活 NK 细胞,并且因而可以诱导靶细胞的细胞介导杀伤 (ADCC)。

[0260] 实施例 13-IgM 16D10 和 IgG rec16D10 抗体的组织特异性

[0261] 通过检查各自对各种健康组织的染色,评估了 IgM 16D10 和嵌合 IgG rec16D10 抗体的染色特异性。IgM 抗体 16D10 对各种组织呈现正染色,上述组织包括扁桃腺、唾液腺、周围神经、眼、骨髓、卵巢、输卵管、甲状旁腺、前列腺、脾、肾、肾上腺、睾丸、胸腺、输尿管、子宫、以及膀胱。相反,用嵌合抗体 rec16D10 进行的染色对于每种这些健康组织均是阴性的。

因此,就缺乏非特异性交叉反应性而言,嵌合 IgG 抗体 rec16D10 优于 IgM 抗体 16D10(图 22)。

[0262] 实施例 14-16D10 和 rec16D10 与固定的 SOJ-6 细胞的结合

[0263] 在初步的 FACS 实验中,观察到规则的 16D10mAb 染色似乎稳定在固定的 SOJ-6 细胞上,这表明 IgM 形式结合于具有良好亲和力的细胞表面抗原。对于二价 16D10 形式,细胞表面结合是较少稳定的,其中平均半衰期为约 80 分钟。考虑到至今在 Innate Pharma 已研究的大多数抗体具有  $5 \times 10^5$  至  $5 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$  的  $K_{on}$  速率缔合常数,则可以估计重组 16D10 抗体二价亲合力为纳摩尔数量级(例如,10 至 1 纳摩尔),其与治疗性抗体的工业开发相容。

[0264] 实施例 15- 利用重组 16D10IgG1 诱导 SOJ-6 细胞的凋亡。

[0265] 在初步的实验中,观察到,二价、嵌合重组 16D10 抗体能够诱导 SOJ-6 细胞的凋亡,如在培养 2 小时以后通过膜联蛋白 V 和膜联蛋白 V/PI 染色所评估的。16D10 的 IgG1 和 IgM 形式均诱导 SOJ-6 细胞的凋亡。比较了两种抗体的凋亡活性,其中衣霉素和没有进行处理作为对照。结果示在图 23 中。

[0266] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请的全部内容均以引用方式结合于本文,如每个单独出版物或专利申请被明确和单独指出通过引用所结合的。

[0267] 虽然为清晰理解起见,通过举例说明和实施例已较详细地描述了前述发明,但根据本发明的教导,本领域技术人员容易明了,在不背离所附权利要求的精神或范围的情况下,可以对其进行某些变化和改进。

## P29244 序列表

&lt;110&gt; 地中海大学

法国国家健康与医学研究院

依奈特制药公司

&lt;120&gt; 用于治疗胰腺肿瘤的组合物和方法

&lt;130&gt;P29244INNA

&lt;140&gt;PCT/EP2008/057112

&lt;141&gt;2008-06-06

&lt;150&gt;US 60/942,777

&lt;151&gt;2008-06-08

&lt;160&gt;22

&lt;170&gt;PatentIn version 3.3

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt;411

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Mus musculus

&lt;400&gt;1

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccaactcccag	60
gttcagctgc agcagctctga cgctgagttg gtgaaacctg gggcttcagt gaagatatcc	120
tgcaaggctt ctggctacac ctactgac catgctattc actgggtgaa gcagaagcct	180
gaacagggcc tggaatggat tggatatatt tctcccggaa atgatgttat taagttcaat	240
gagaagttca agggcaagge cactgact gcagacaaat cctccagcac tgcctacatg	300
cagctcaaca gcctgacatc tgaggattct gcagtgtatt tctgtaagag atcagagggg	360
ggggtttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcaga g	411

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;399

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Mus musculus

&lt;400&gt;2

```

atggaatcac agactcaggt cttcctctcc ctgctgctct gggtatctgg tacctgtggg      60
aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact      120
atgagctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa cttcttggcc      180
tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg      240
gaatctgggtg tccctgatcg cttcacagge agtggatctg ggacagattt tactcttacc      300
atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcataata cctctcctcg      360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg      399

```

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;474

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工序列 (artificial sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 嵌合的 mus musculus/ 人类 (homo sapiens)

&lt;400&gt;3

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1           5           10           15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys
           20           25           30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
           35           40           45
Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu
           50           55           60
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Val Ile Lys Phe Asn
65           70           75           80
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
           85           90           95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
           100          105          110
Tyr Phe Cys Lys Arg Ser Glu Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
           115          120          125
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val
           130          135          140
Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Ser Pro Leu Ser Asp Lys Asn Leu Val
145          150          155          160

```

Ala Met Gly Cys Leu Ala Arg Asp Phe Leu Pro Ser Thr Ile Ser Phe  
165 170 175

Thr Trp Asn Tyr Gln Asn Asn Thr Glu Val Ile Gln Gly Ile Arg Thr  
180 185 190

Phe Pro Thr Leu Arg Thr Gly Gly Lys Tyr Leu Ala Thr Ser Gln Val  
195 200 205

Leu Leu Ser Pro Lys Ser Ile Leu Glu Gly Ser Asp Glu Tyr Leu Val  
210 215 220

Cys Lys Ile His Tyr Gly Gly Lys Asn Arg Asp Leu His Val Pro Ile  
225 230 235 240

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
260 265 270

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

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

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
355 360 365

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
405 410 415

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;239

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Mus musculus

&lt;400&gt;4

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Leu Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Thr Cys Gly Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala  
                   20                   25                   30  
 Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
                   35                   40                   45  
 Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
                   50                   55                   60  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
                   85                   90                   95  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
                   100                   105                   110  
 Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
                   115                   120                   125  
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro  
                   130                   135                   140  
 Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe  
 145                   150                   155                   160  
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp  
                   165                   170                   175  
 Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp  
                   180                   185                   190  
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys  
                   195                   200                   205  
 Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys  
                   210                   215                   220  
 Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 225                   230                   235

<210>5

<211>447

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的 mus musculus/ 人类 (homo sapiens)

<400>5

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	His	20	25	30	
Ala	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Tyr	Ile	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Val	Ile	Lys	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	85	90	95	
Lys	Arg	Ser	Glu	Gly	Gly	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	100	105	110	
Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	115	120	125	
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	130	135	140	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	145	150	155	160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	180	185	190	
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	195	200	205	
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	210	215	220	
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	225	230	235	240



	20		25		30														
Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln				
	35						40					45							
Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val				
	50						55					60							
Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr				
65					70					75				80					
Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln				
				85						90				95					
Tyr	Leu	Ser	Ser	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys				
				100						105				110					
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu				
				115						120				125					
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe				
				130						135				140					
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln				
145					150					155				160					
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser				
				165						170				175					
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu				
				180						185				190					
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser				
				195						200				205					
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg												
	210						215												

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;116

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Mus musculus

&lt;400&gt;7

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala				
1				5					10				15						
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	His				
				20					25				30						
Ala	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile				
				35					40				45						
Gly	Tyr	Ile	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Val	Ile	Lys	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe				

50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
	85	90
Lys Arg Ser Glu Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
	100	105
Leu Thr Val Ser		110
	115	

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;112

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Mus musculus

&lt;400&gt;8

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly		
1	5	10
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser		
	20	25
Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
	35	40
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
	50	55
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
65	70	75
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln		
	85	90
Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105
		110

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt;5

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Mus musculus

&lt;400&gt;9

Asp His Ala Ile His
1
5

<210>10

<211>18

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>10

Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Val Ile Lys Phe Asn Glu Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Gly Lys

<210>11

<211>10

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>11

Lys Arg Ser Glu Gly Gly Val Phe Asp Tyr

1                    5                    10

<210>12

<211>17

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>12

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu

1                    5                    10                    15

Ala

<210>13

<211>7

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>13

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1                    5

<210>14

<211>8

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>14

His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr

1 5

<210>15

<211>331

<212>PRT

<213>人类 (Homo sapiens)

<400>15

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser

1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

20 25 30

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

35 40 45

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

50 55 60

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln

65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

85 90 95

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

100 105 110

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn

145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 195 200 205  
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 210 215 220  
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 245 250 255  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 260 265 270  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 275 280 285  
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 290 295 300  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 305 310 315 320  
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210>16

<211>104

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>16

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg  
 100

<210>17

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223>PCR 引物

<400>17

gtgaaggtcg gtgtgaacgg att 23

<210>18

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>18

ctaagcagtt ggtggtgcag gat 23

<210>19

<211>29

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>19

aagctagcat ggaatcacag actcaggct 29

<210>20

<211>32

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>20

aagcggccgc ctaacactca tttctgttga ag 32

<210>21

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>21

aagaattcat ggaatggagc tgggtctttc 30

<210>22

<211>29

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<400>22

aaggtacctg gaatggcac atgcagatc 29

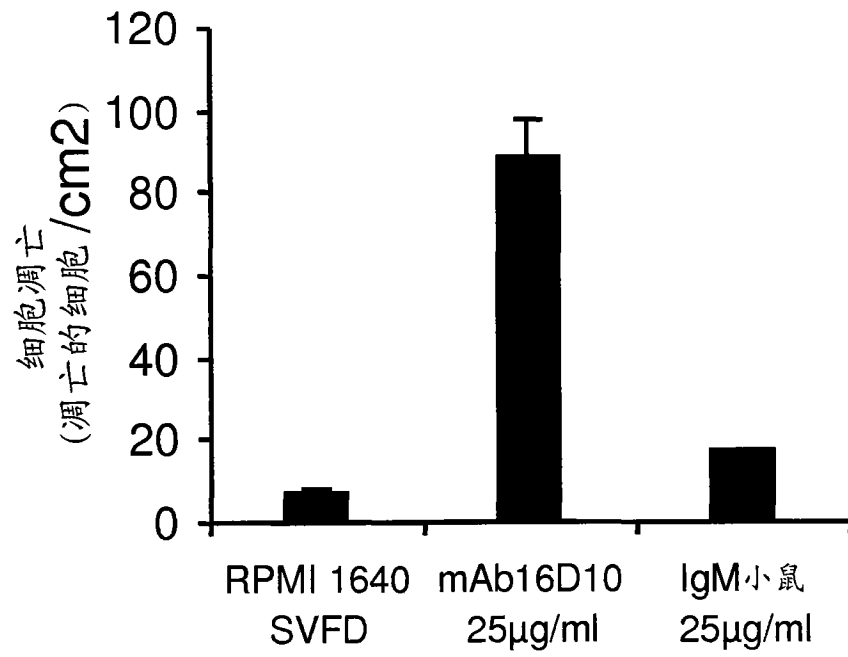


图 1

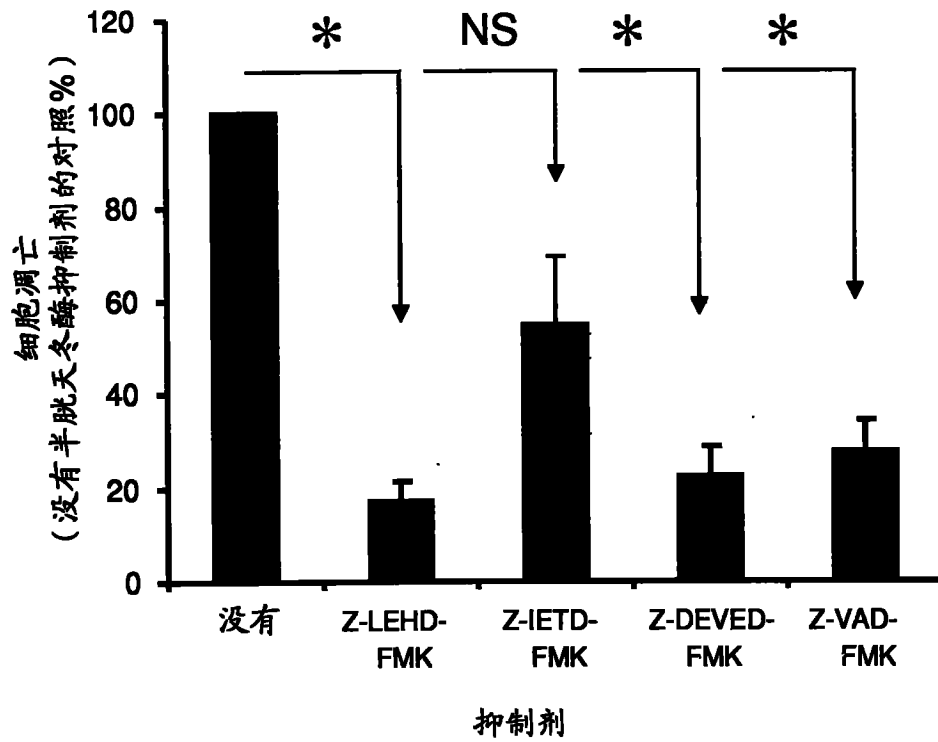


图 2

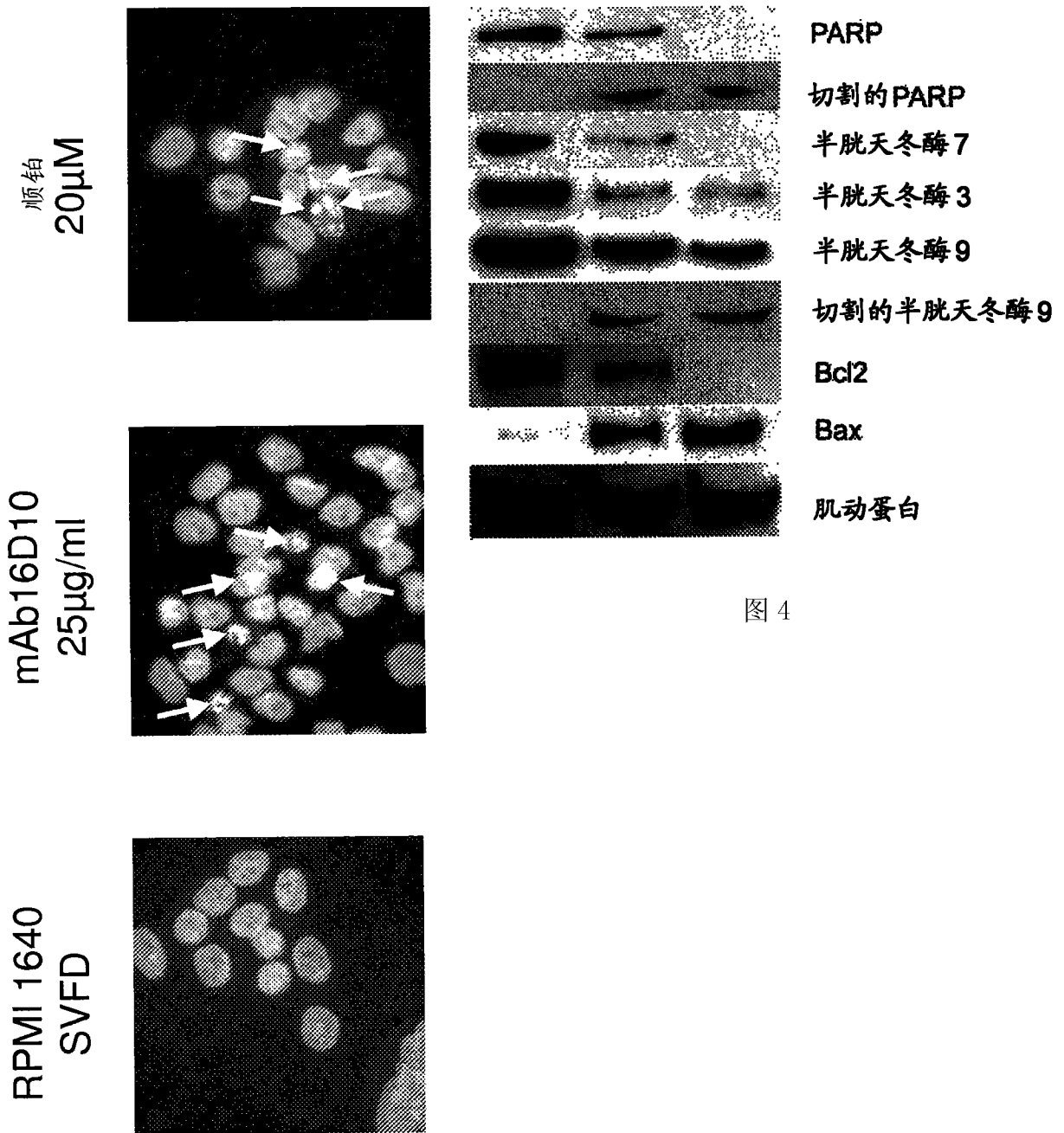


图 4

图 3

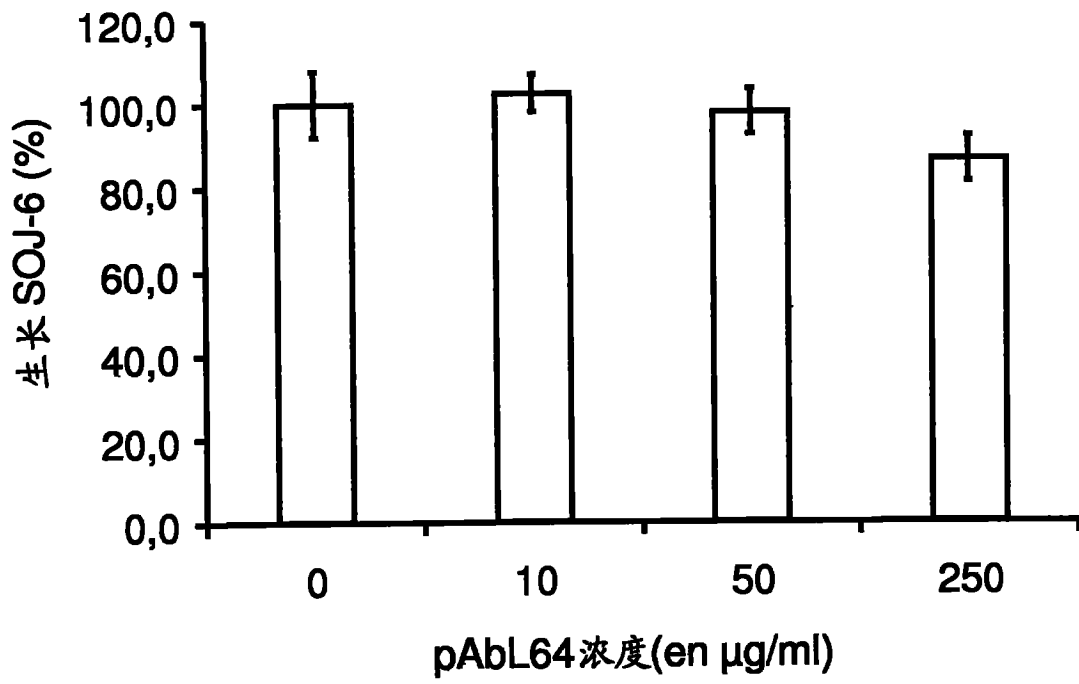


图 5

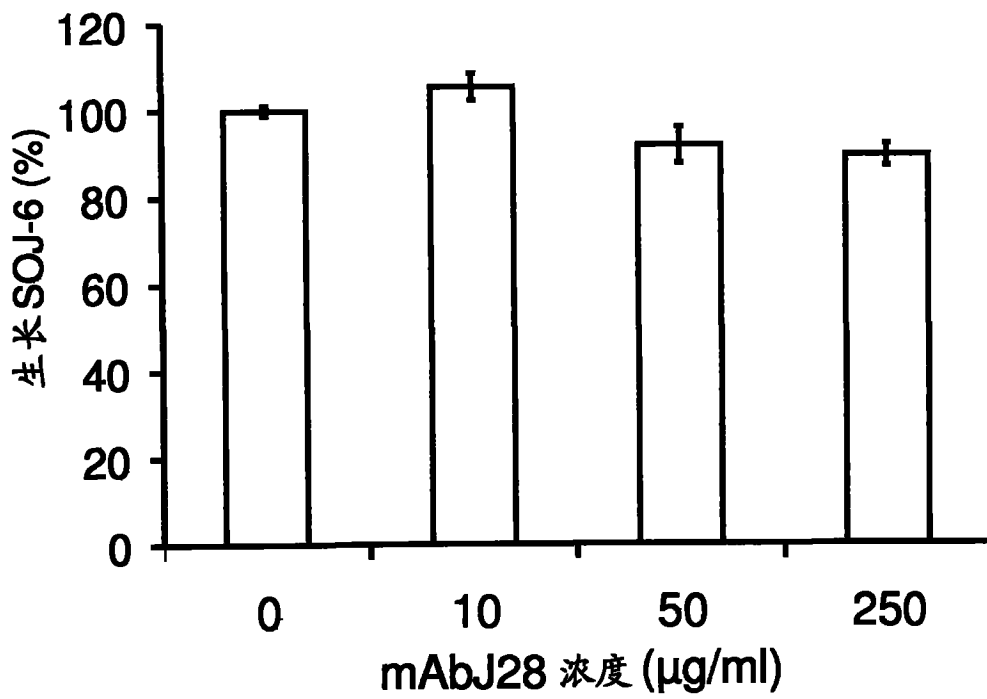


图 6

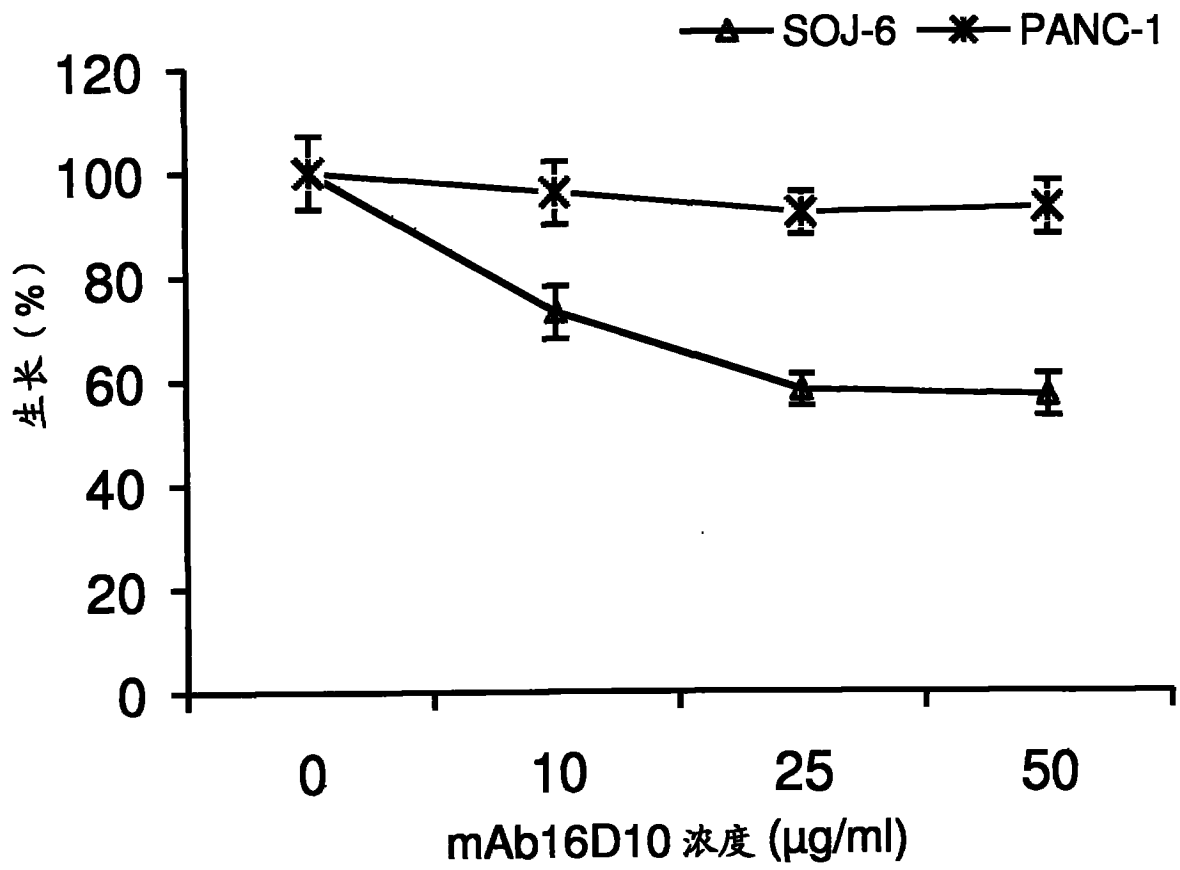


图 7

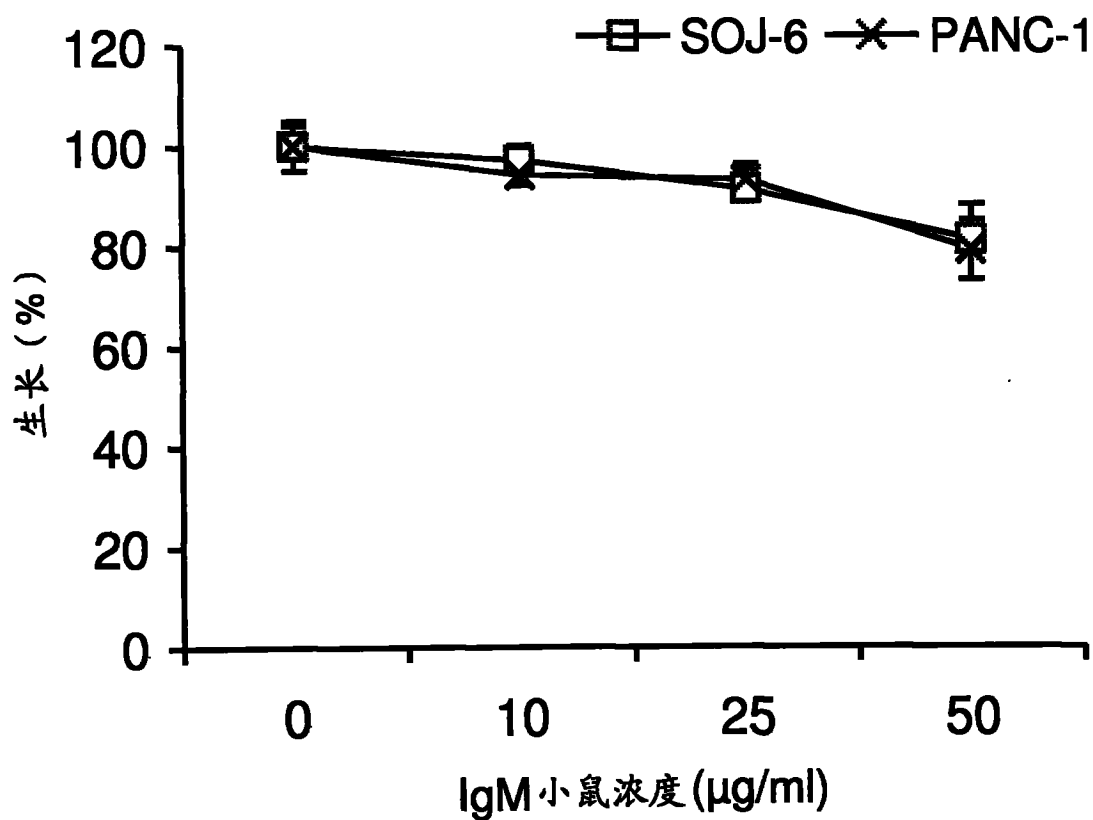


图 8

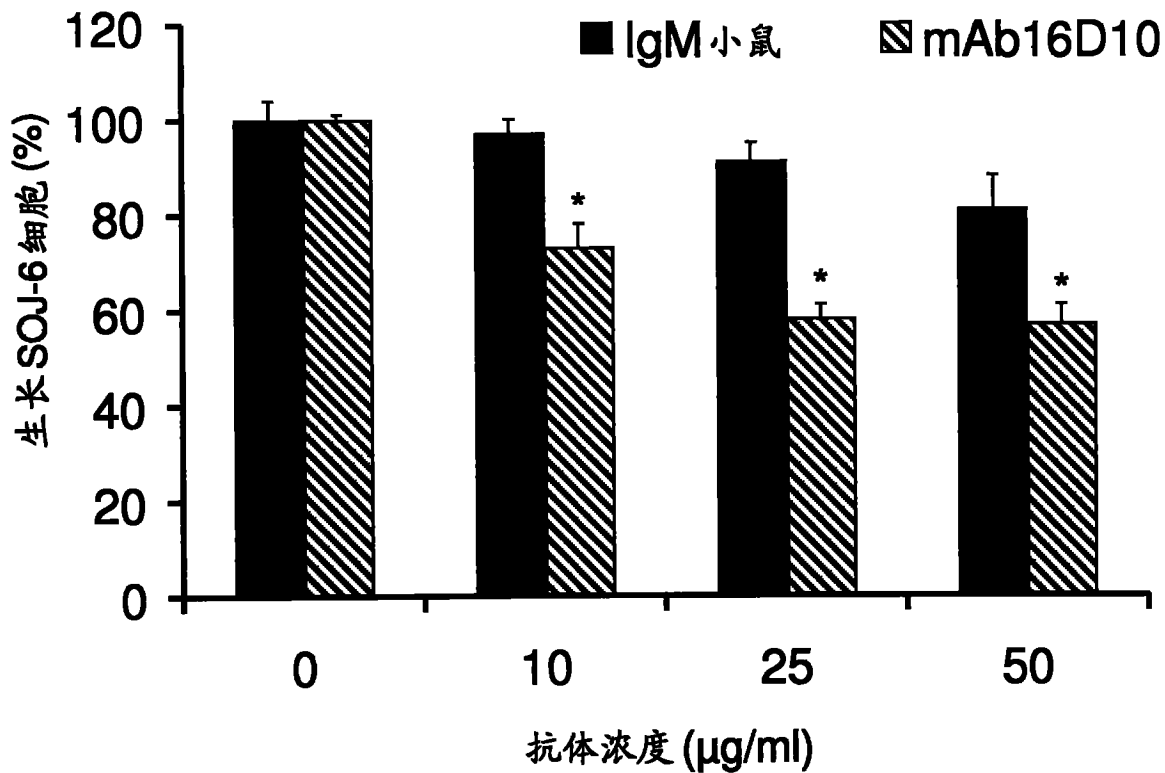


图 9

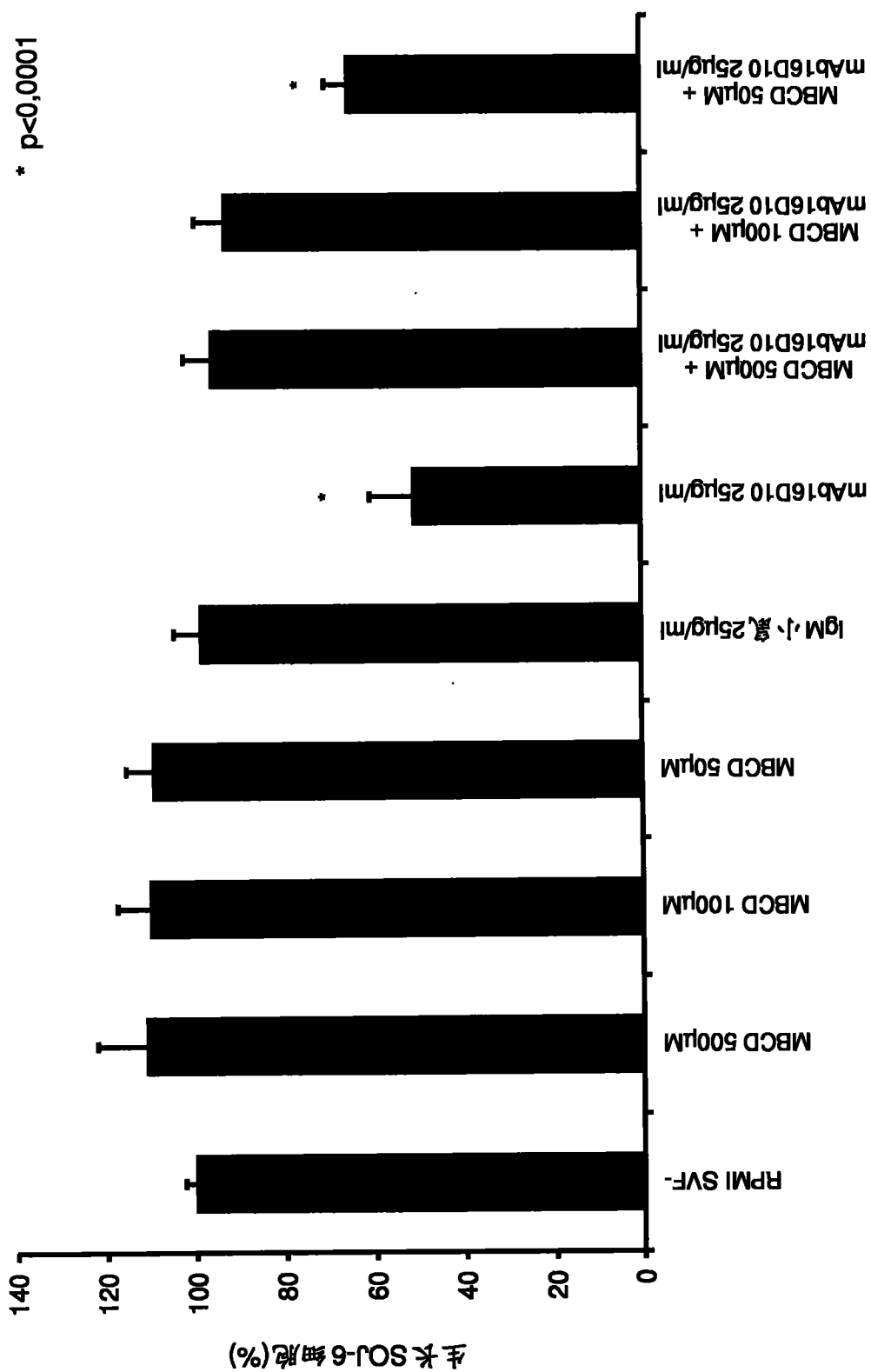


图 10

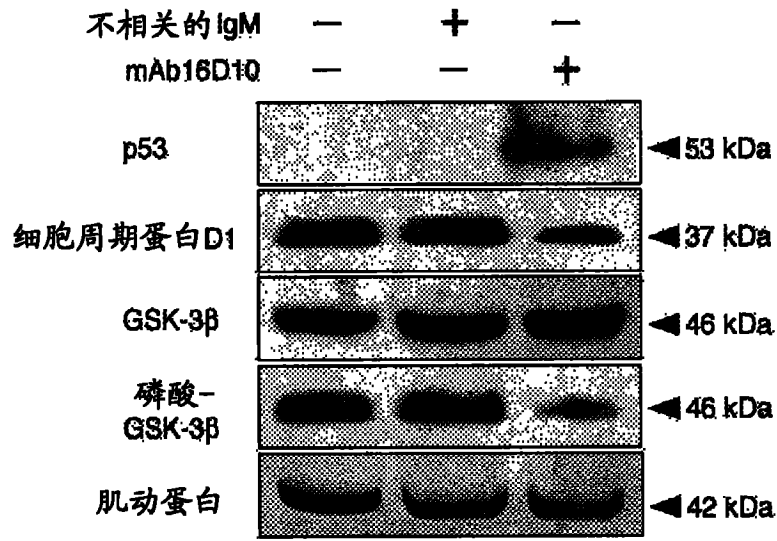


图 11

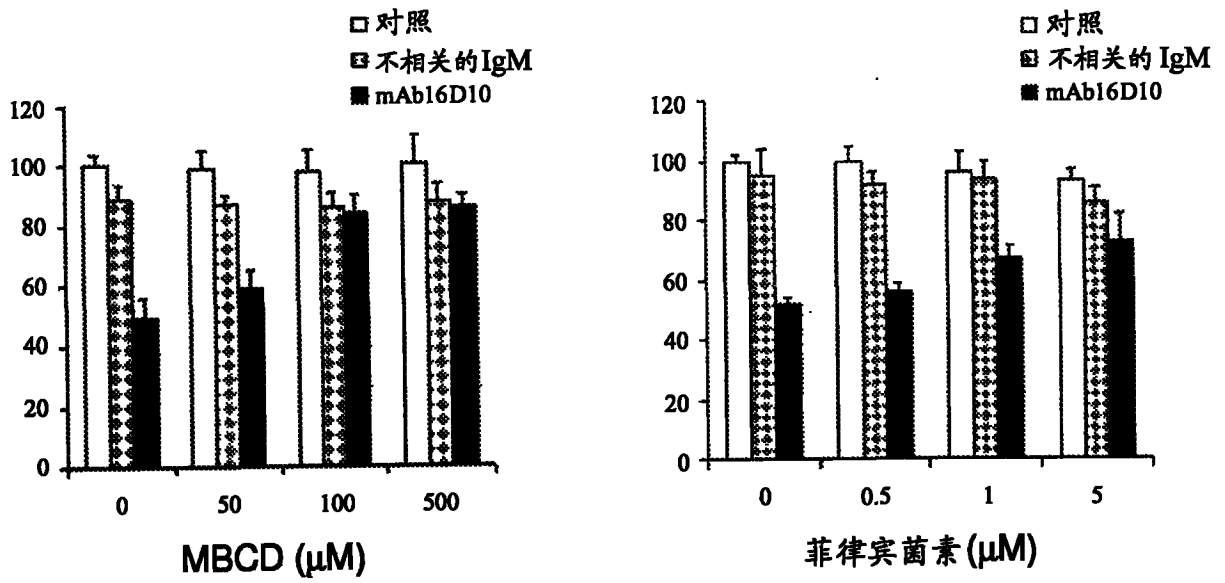


图 12A

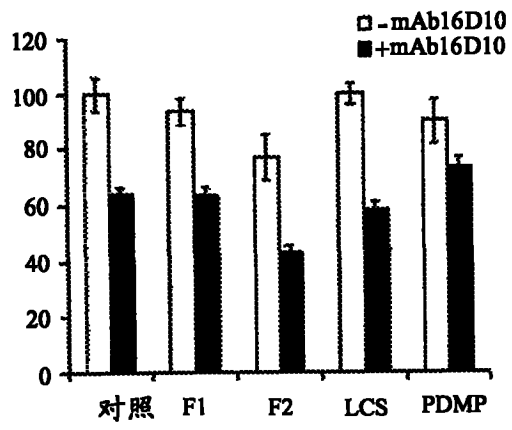


图 12B

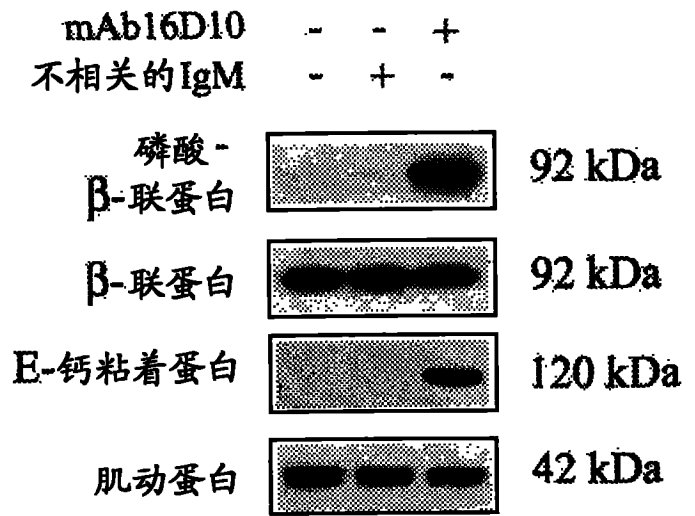


图 13

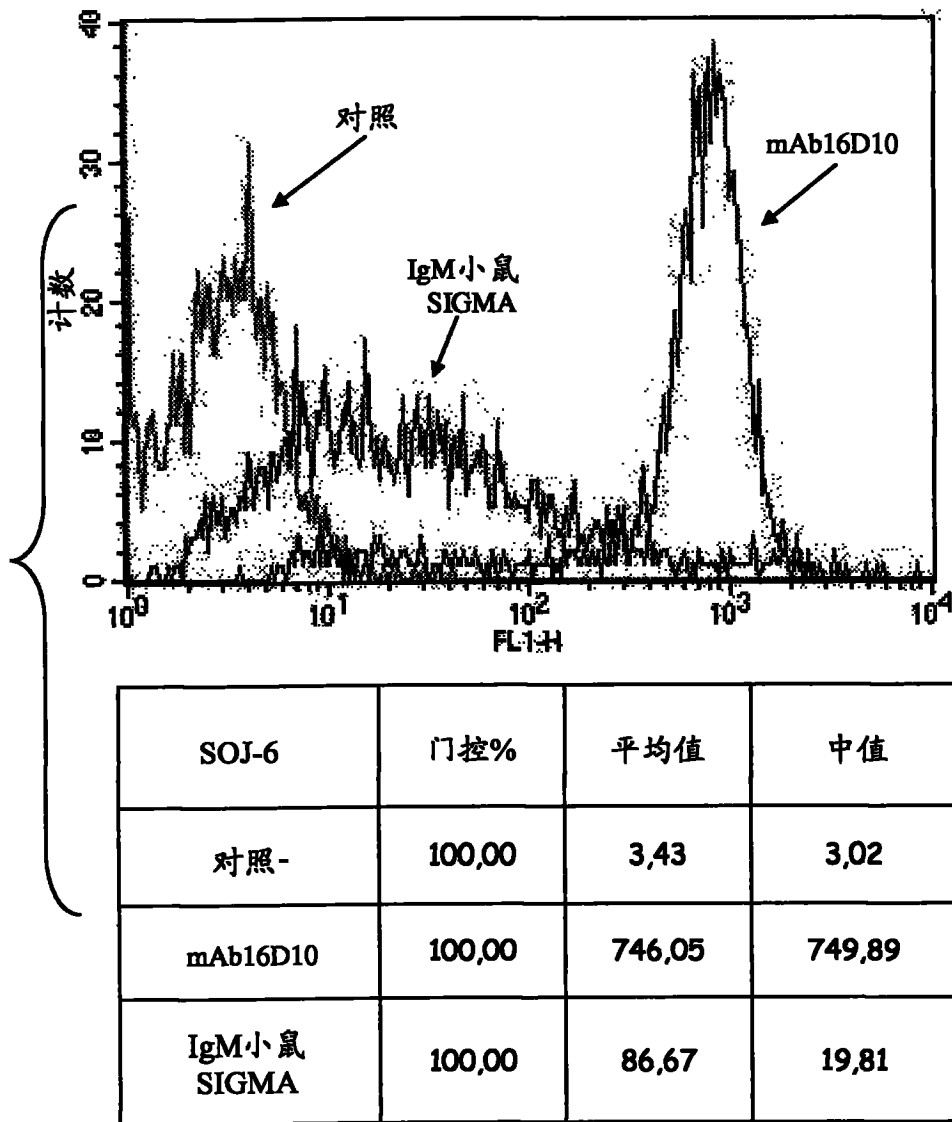


图 14

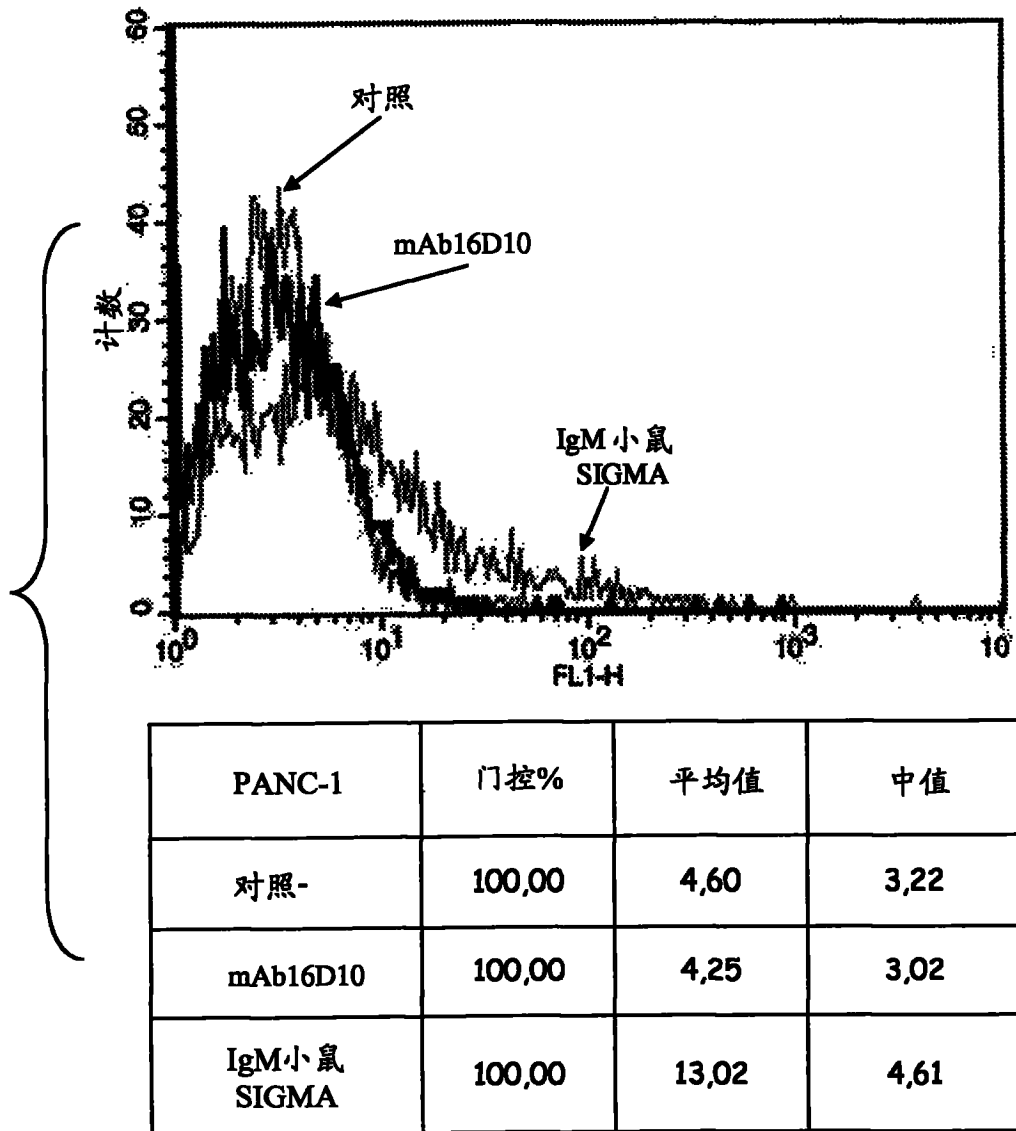


图 15

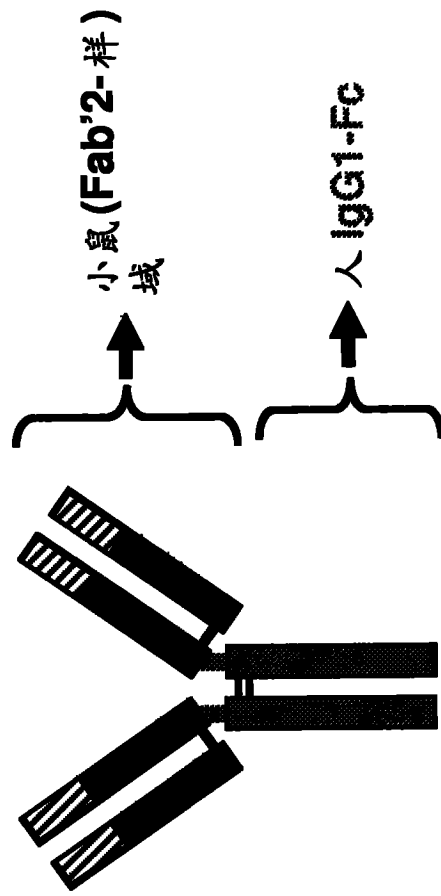


图 16

VH和CH1域用人IgG1-Fc (加下划线)读框内扩增、克隆、测序并亚克隆到COS-fc链载体中

MEWSSWVFFLFFLSSVTTGVVHSSQVQLQSSDAEILVKPGA SVKISS  
CKASSGKATLTAADKSSSTAKYMQLPNVEIQSWIGYISPIGNDVVKFN  
EKFKDYWGQGLTPSTISFTVSWNQSFNVEFLVSSCESEPTFLSKRLV  
AMGCLAATSLPSSILEGSDIYLVQGIHQYGGKNRD LRTGG  
KYLAEPKSA DKT ECPPEL LGGPSVFLFPKPKD LMLI  
SRTPEVTCVVDVSSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNS TYRVS VLV LTHQD WLNGK EYKCKVSSNKALPAPIE  
KTISKA KGP R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y  
PSSDI A V E W E S N G Q P P E N N Y K T T P P V L D S S D G S F F L Y S K L T V D  
KSSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\*

VL和Ck域被扩增、克隆、测序并亚克隆到pcDNA3表达载体中。

MSQTSQVFLSLVLSLWVSSGTCGNIMMTQSSPSSLA VSSAG EKVT  
MSCKSPDRFTLGSSTGTLTFAWYQKPKPQSWQAEQLAVYCHQYLSSTR  
YTFGGTLEIKRADIAGSERA TSGVPLNSSTQDSSKSSVCSF  
LSSTLTKDINVEYRRHNSYTC EATGHKTSSTSPIVKSSRNEC\*

图 17

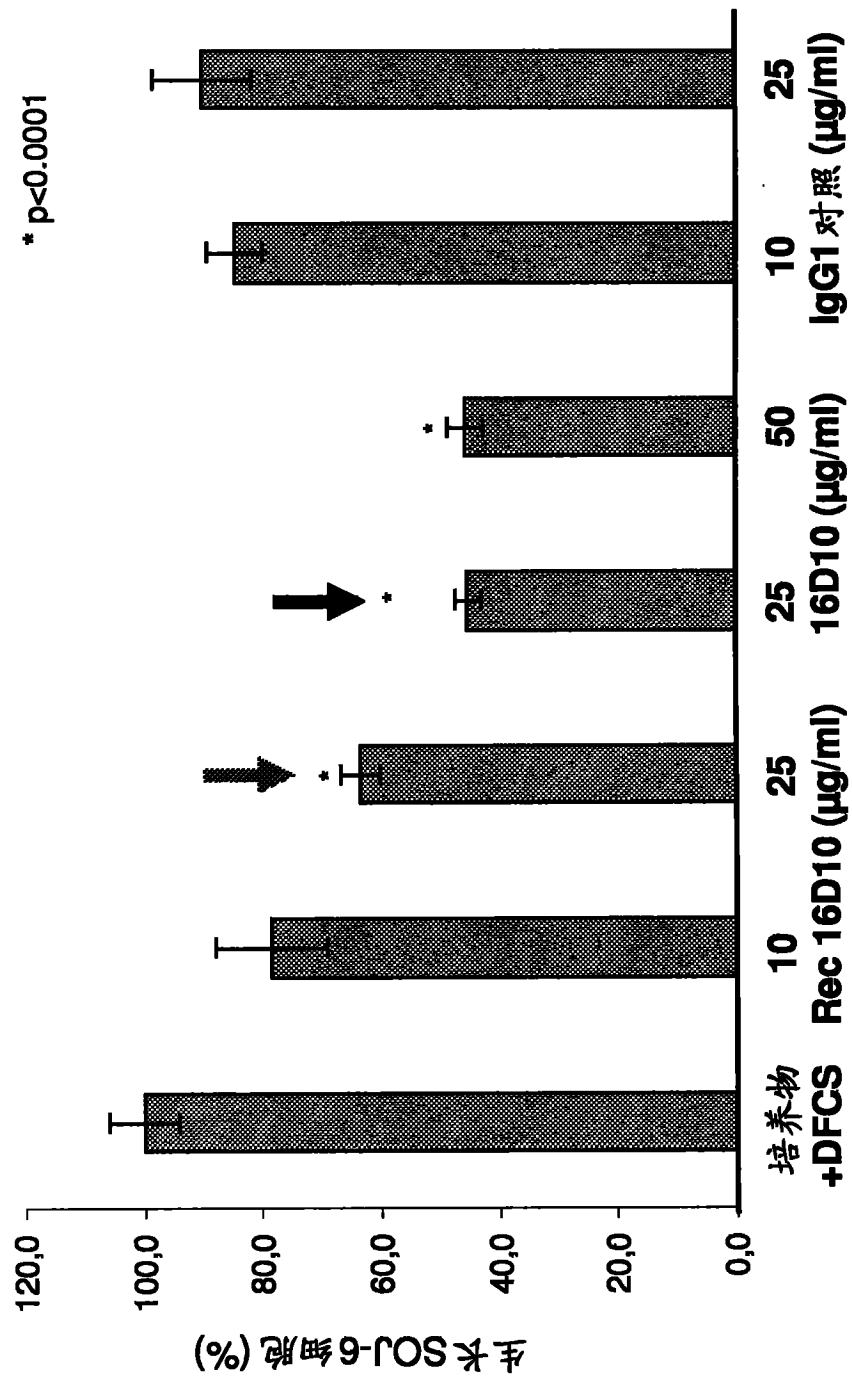


图 18

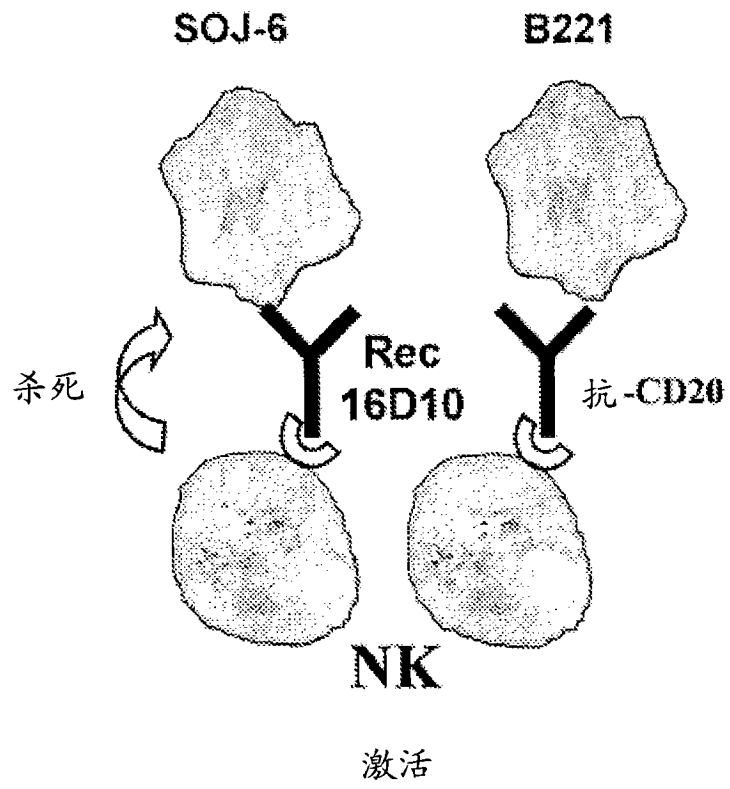


图 19

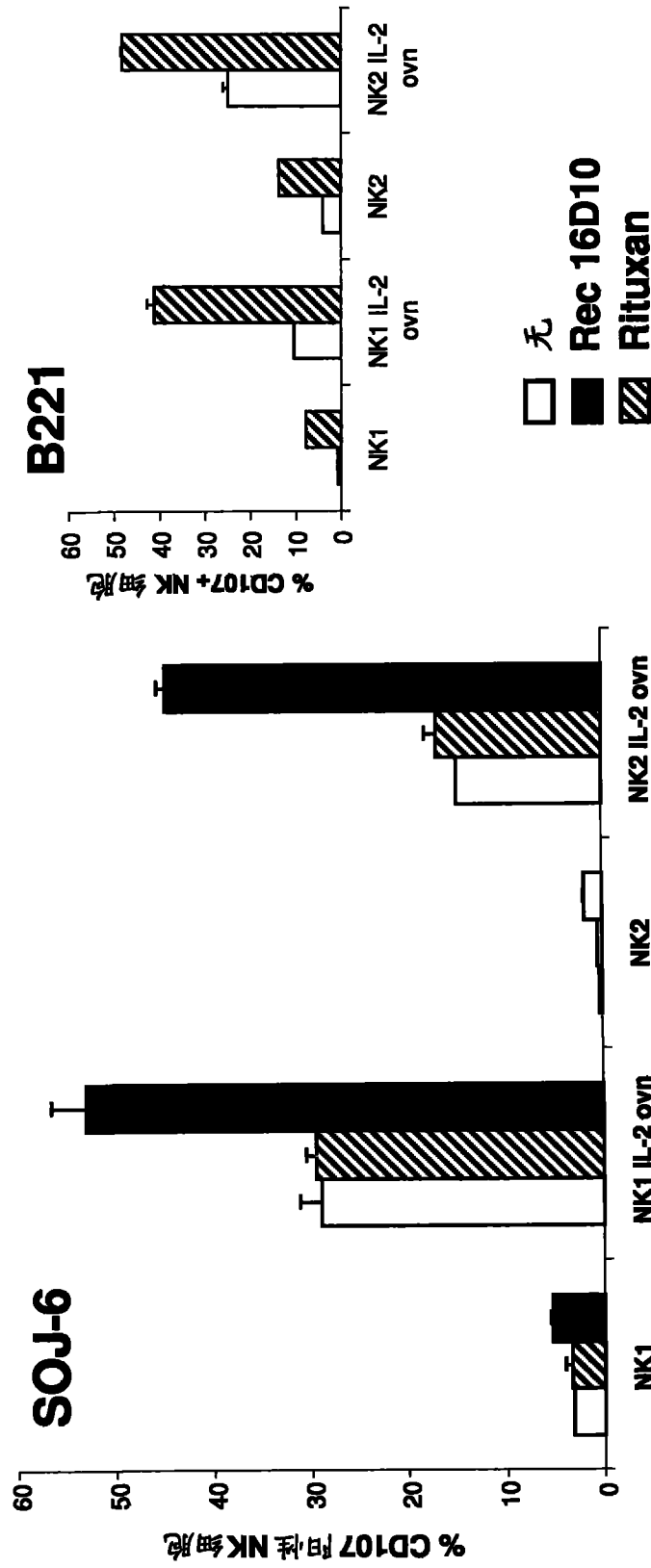


图 20

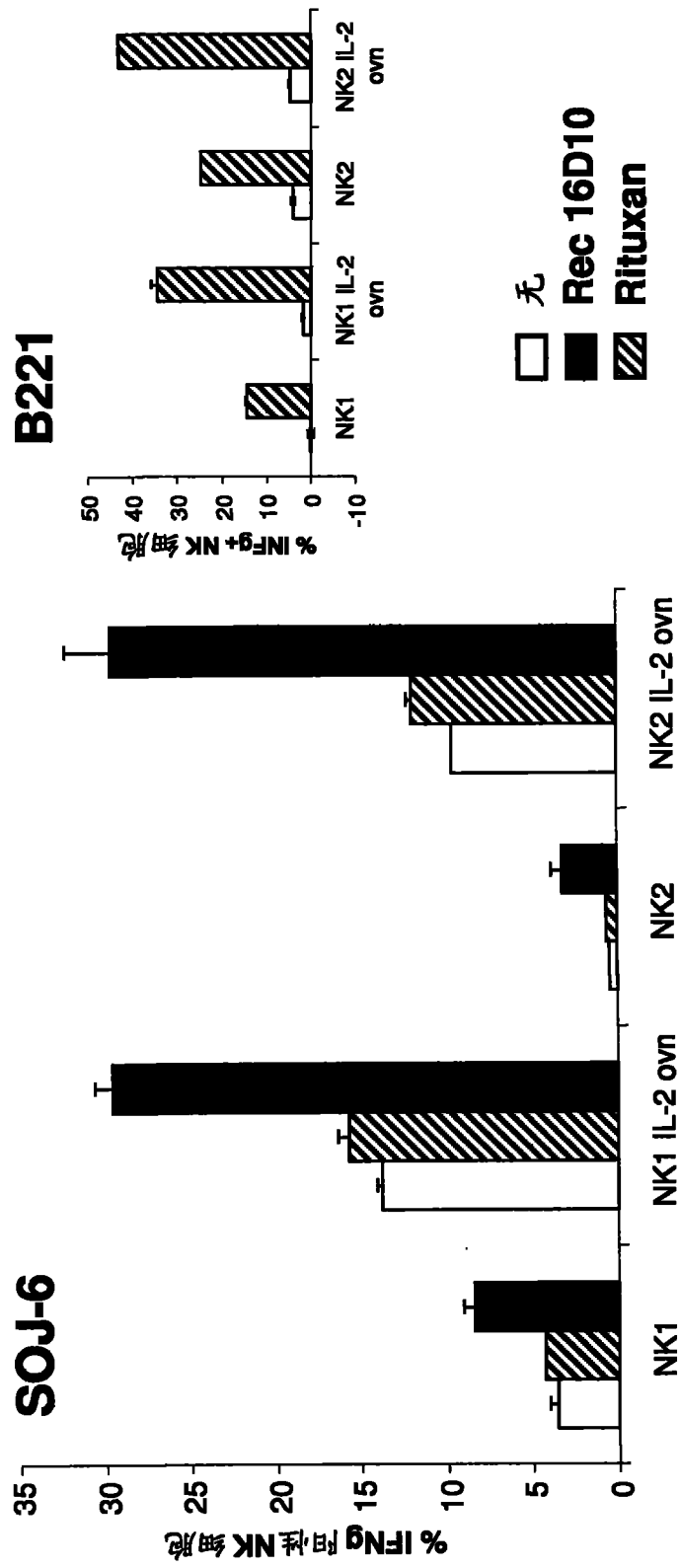
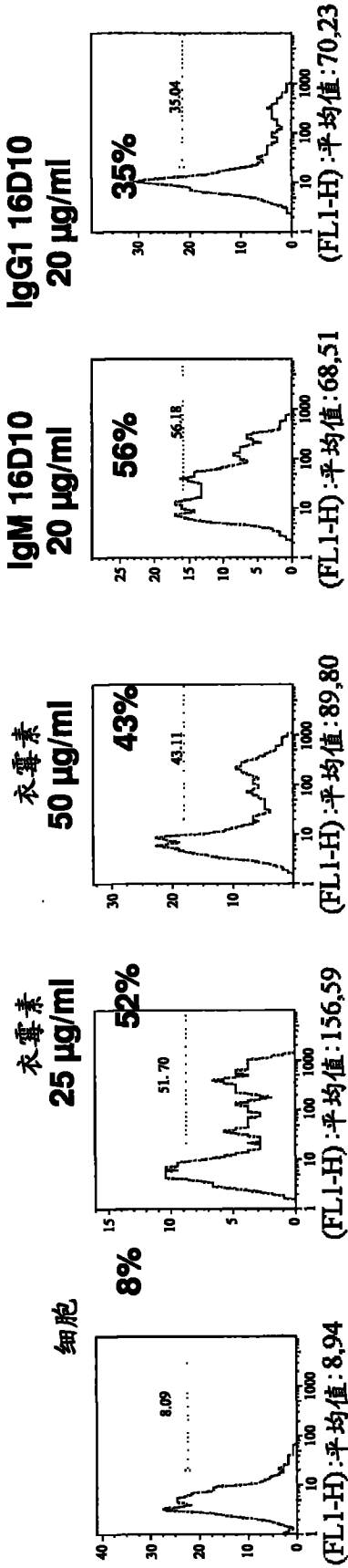


图 21

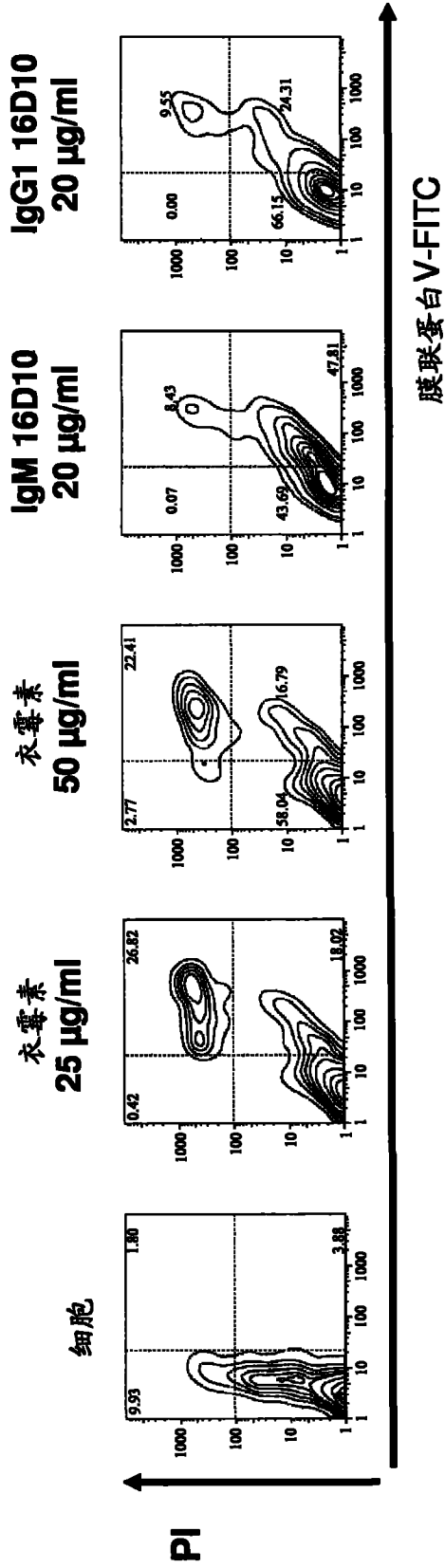
供体	组织	16D10 (IgM)	Rec16D10	J28	IgM 对照
5M95	扁桃体	+	-	+/-	++
5M95	唾液腺	++	-	+	++
5M95	周围神经	+	-	-	+
10M03	淋巴结	-	-	-	++
1F0F95	眼	+	-	-	++
5M95	骨髓	+	-	-	+/-
7F97	卵巢	+	-	-	++
7F97	输卵管	++	-	+	++
5M95	甲状腺旁腺	++	-	nd	nd
5M95	前列腺	++	-	+	++
7F97	脾	++	-	-	++
5M95	肾	+++	-	+/-	+++
5M95	肾上腺	+++	-	-	+++
12M04	睾丸	++	-	+/-	++
1F0F95	胸腺	++	-	-	++
5M95	输尿管	++	-	+/-	++
7F97	子宫	++	-	-	++
5M95	膀胱	++	-	+	+++

图 22

在24小时后的膜联蛋白V染色



在24小时后的膜联蛋白V/PI染色



膜联蛋白V-FITC

PI

图 23

**VH-16D10-HuIgG1**

**CDR1** **CDR2**

OVQLOQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHFWVKOKPEOGLEWIGYISPG

**CDR3**

NDVIKFNKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSEGGVFDYW

GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA

LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPK

SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK

FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY

TQKSLSLSPGK

**VL16D10-HuIgL 卡巴**

**CDR1**

NIMMTOSPSSLA VSAGEKVTMSCKSSOSVLYSSNOKNFLAWYOOKPGOSPKLLI

**CDR2** **CDR3**

YWASTRESGV PDRFTGSGSGTDFLT ISSVOAEDLAVYYCHOYLSSYTFGGGTK

LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN

SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR

图 24

专利名称(译)	用于治疗胰腺肿瘤的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101778867A</a>	公开(公告)日	2010-07-14
申请号	CN200880018487.9	申请日	2008-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	地中海大学 伊纳特医药公司		
申请(专利权)人(译)	地中海大学 依奈特制药公司		
当前申请(专利权)人(译)	地中海大学 依奈特制药公司		
[标]发明人	莉迪克雷申切 劳伦特戈捷 多米尼克隆巴尔多 埃里克马斯 本杰明罗西		
发明人	莉迪·克雷申切 劳伦特·戈捷 多米尼克·隆巴尔多 埃里克·马斯 本杰明·罗西		
IPC分类号	C07K16/30 A61P35/00 C07K16/32 G01N33/53 A61K39/395		
CPC分类号	C07K2317/77 C07K16/32 C07K16/303 C07K2317/732 C07K2316/95 C07K2317/73 C07K2317/56 C07K2317/24 A61P1/18 A61P35/00 A61P43/00 C07K2317/75		
代理人(译)	吴贵明 张英		
优先权	60/942777 2007-06-08 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于制备适用于治疗癌症的抗原结合化合物的方法、抗原结合化合物以及它们的应用。

