



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103987729 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 13

(21) 申请号 201280049869. 4

(22) 申请日 2012. 10. 10

(30) 优先权数据

PCT/IL2011/000808 2011. 10. 11 IL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 04. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2012/050402 2012. 10. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/054331 EN 2013. 04. 18

(83) 生物保藏信息

PTA-12130 2011. 09. 28

(71) 申请人 堤乐哈修门医学研究基础建设及服
务有限公司

地址 以色列拉玛特甘

申请人 希凯姆生物治疗有限公司

雷蒙特亚特特拉维夫大学有限公司

(72) 发明人 加尔·马克尔 泰希莱·本摩西
亚伊尔·沙比尔 伊拉娜·曼德尔
雅各布·沙克特 罗纳·奥尔藤贝格

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

C07K 16/30 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

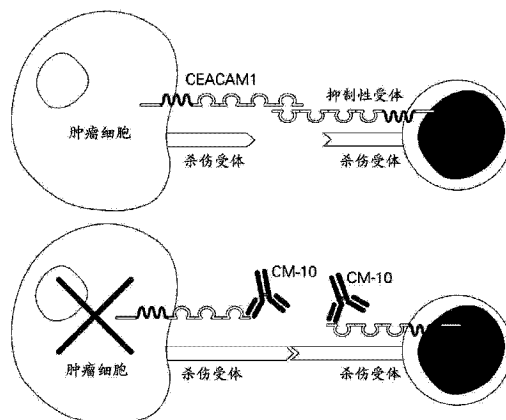
权利要求书4页 说明书36页
序列表16页 附图21页

(54) 发明名称

癌胚抗原相关细胞粘附分子 (CEACAM) 的抗
体

(57) 摘要

本发明提供了抗体和具有抗体的至少抗原结
合部分的分子, 该抗体和分子识别蛋白 CEACAM1
的特定表位且任选地还结合 CEACAM 蛋白家族
的其他亚型。公开的抗体和抗体片段通过特定 CDR
序列被表征。还提供了此类抗体和抗体片段的制
备方法和在治疗和诊断中的用途。



1. 一种识别人 CEACAM1 的单克隆抗体或其抗体片段,所述单克隆抗体或其抗体片段具有包含 SEQ ID NO:1 中列出的序列的重链 CDR1、包含 SEQ ID NO:2 中列出的序列的重链 CDR2、包含 SEQ ID NO:3 中列出的序列的重链 CDR3、包含 SEQ ID NO:4 中列出的序列的轻链 CDR1、包含 SEQ ID NO:5 中列出的序列的轻链 CDR2 和包含 SEQ ID NO:6 中列出的序列的轻链 CDR3,以及其类似物和衍生物。

2. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:7 中列出的序列的重链 CDR1、具有 SEQ ID NO:8 中列出的序列的重链 CDR2 和具有 SEQ ID NO:9 中列出的序列的重链 CDR3。

3. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:13 中列出的序列的重链 CDR1、具有 SEQ ID NO:14 中列出的序列的重链 CDR2 和具有 SEQ ID NO:15 中列出的序列的重链 CDR3。

4. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:10 中列出的序列的轻链 CDR1、具有 SEQ ID NO:11 中列出的序列的轻链 CDR2 和具有 SEQ ID NO:12 中列出的序列的轻链 CDR3。

5. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:16 中列出的序列的轻链 CDR1、具有 SEQ ID NO:17 中列出的序列的轻链 CDR2 和具有 SEQ ID NO:18 中列出的序列的轻链 CDR3。

6. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段具有 SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 中列出的 CDR 序列。

7. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段具有 SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 中列出的 CDR 序列。

8. 一种根据权利要求 1-7 中任一项所述的单克隆抗体或其片段的类似物或衍生物,所述类似物或衍生物与所述单克隆抗体的抗原结合部分具有至少 90% 序列同一性。

9. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:26 中列出的序列的重链可变域序列,或与所述重链序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物或衍生物。

10. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:28 中列出的序列的轻链可变域序列,或与所述轻链序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物或衍生物。

11. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:26 中列出的序列的重链可变域和具有 SEQ ID NO:28 中列出的序列的轻链可变域,或与所述抗体或片段序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物或衍生物。

12. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含:

i. 选自以下组成的组的构架序列:小鼠 IgG2a、小鼠 IgG2b、小鼠 IgG3、人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3;以及

ii. 具有 SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 中列出的序列的 6 个 CDR;或具有 SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 中列出的序列的 6 个 CDR;以及与所述 CDR 序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物,其中所述单克隆抗体或片段以至少约 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 的亲合力与至少两个 CEACAM 亚型结合。

13. 根据权利要求 12 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段能够以至少约 10^{-8} M 的亲合力与 CEACAM1 结合。

14. 根据权利要求 13 所述的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段能够以至少约 5×10^{-7} M 的亲合力与 CEACAM3 和 CEACAM5 中的至少一个结合。

15. 根据权利要求 12 所述的单克隆抗体或其片段,其中所述单克隆抗体或片段为嵌合单克隆抗体。

16. 根据权利要求 15 所述的嵌合单克隆抗体或其片段,所述嵌合单克隆抗体或其片段包含选自自由以下组成的组的源自人的恒定区:人 IgG1、人 IgG2、和人 IgG3。

17. 根据权利要求 16 所述的嵌合单克隆抗体或其片段,所述嵌合单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 中列出的序列的 6 个 CDR;或具有 SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 中列出的序列的 6 个 CDR;以及与所述 CDR 序列具有至少 95% 序列同一性的其类似物和衍生物,其中所述单克隆抗体以至少约 10^{-8} M 的亲合力与 CEACAM1 结合。

18. 根据权利要求 17 所述的嵌合单克隆抗体或其片段,所述嵌合单克隆抗体或其片段包含人 IgG1 亚型的恒定区亚类。

19. 根据权利要求 17 所述的嵌合单克隆抗体或其片段,所述嵌合单克隆抗体或其片段包含 SEQ ID NO:30 中列出的重链序列。

20. 根据权利要求 17 所述的嵌合单克隆抗体或其片段,所述嵌合单克隆抗体或其片段包含 SEQ ID NO:31 中列出的轻链序列。

21. 根据权利要求 17 所述的嵌合单克隆抗体或其片段,所述嵌合单克隆抗体或其片段包含 SEQ ID NO:30 中列出的重链序列和 SEQ ID NO:31 中列出的轻链序列。

22. 一种识别 CEACAM1 的单克隆抗体,所述单克隆抗体从 2011 年 9 月 28 日以 ATCC 保藏号 PTA-12130 保藏的质粒中包含的重链和轻链的 DNA 序列制备。

23. 一种识别 CEACAM1 的单克隆抗体,或包含至少抗原结合部分的其片段,所述单克隆抗体或其片段能够结合与具有 SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 中列出的 6 个 CDR 序列;或具有 SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 中列出的 6 个 CDR 序列的单克隆抗体结合的 CEACAM1 分子上相同的表位。

24. 根据权利要求 23 所述的单克隆抗体或其片段,其中所述抗体与分别具有序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 和 YPNASLLIQNVT (SEQ ID NO:33) 的人 CEACAM1 的残基 17-29 和 68-79 内的表位反应。

25. 根据权利要求 23 所述的单克隆抗体或其片段,其中与所述单克隆抗体结合的所述 CEACAM1 分子上的所述表位是包含序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 和 YPNASLLIQNVT (SEQ ID NO:33) 内的氨基酸残基的表位。

26. 根据权利要求 23 所述的单克隆抗体或其片段,其中与所述单克隆抗体结合的所述 CEACAM1 分子上的所述表位包含序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 的至少 4 个氨基酸。

27. 根据权利要求 23 所述的单克隆抗体或其片段,其中与所述单克隆抗体结合的所述 CEACAM1 分子上的所述表位是序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 和 PNASLLI (SEQ ID NO:34) 内的表位。

28. 一种 6-20 个氨基酸的分离的肽序列,所述分离的肽序列包含来自序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 的至少 3 个氨基酸和来自序列 YPNASLLIQNVT (SEQ ID

NO:33) 的至少 3 个氨基酸,或与所述亲本序列具有至少 85% 同源性的类似物或衍生物。

29. 根据权利要求 28 所述的分离的肽,所述分离的肽包含来自序列 VLLL VHNLPQQLF (SEQ ID NO:32) 的至少 6 个氨基酸。

30. 根据权利要求 28 所述的分离的肽,所述分离的肽包含序列 VLLL VHNLPQQLF (SEQ ID NO:32) 和 PNASLLI (SEQ ID NO:34) 的氨基酸。

31. 根据权利要求 28 所述的分离的肽用于制备识别 CEACAM1 的抗体的用途。

32. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸编码根据权利要求 1-27 中任一项所述的单克隆抗体或抗体片段。

33. 根据权利要求 32 所述的分离的多核苷酸序列,所述分离的多核苷酸序列包含 SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:27 中列出的 DNA 序列或与所述序列具有至少 90% 序列同一性的其类似物。

34. 一种质粒,所述质粒包含至少一种根据权利要求 32 所述的分离的多核苷酸序列。

35. 根据权利要求 34 所述的质粒,所述质粒于 2011 年 9 月 28 日以 ATCC 保藏号 PTA-12130 被保藏。

36. 一种药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的根据权利要求 1-27 中任一项所述的单克隆抗体或片段;和药学上可接受的载体。

37. 根据权利要求 36 所述的药物组合物,所述药物组合物用于治疗与 CEACAM1、CEACAM3 或 CEACAM5 的表达、激活或功能相关的疾病或疾患。

38. 根据权利要求 37 所述的药物组合物,其中所述疾病或疾患为细胞增殖性疾病或疾患。

39. 根据权利要求 38 所述的药物组合物,其中所述细胞增殖性疾病或疾患为选自由以下组成的组的癌症:胃肠癌、结肠直肠癌 (CRC)、胰腺癌、非小细胞肺癌 (NSCL)、乳腺癌、甲状腺癌、胃癌、卵巢癌和子宫癌。

40. 根据权利要求 38 所述的药物组合物,其中所述细胞增殖性疾病或疾患为选自由以下组成的组的癌症:黑色素瘤、胰腺癌、肺癌和骨髓瘤。

41. 一种诊断组合物,所述诊断组合物包含至少一种根据权利要求 1-27 中任一项所述的单克隆抗体或抗体片段;和任选的载体或赋形剂。

42. 一种预防、减弱或治疗与 CEACAM 的表达、激活或功能相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向有相应需要的受试者施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的根据权利要求 36 所述的药物组合物。

43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述疾病或疾患为癌症。

44. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述疾病或疾患为病毒感染。

45. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述药物组合物中包含的分离的抗体或抗体片段被附着至细胞毒性部分并且所述疾病为癌症。

46. 根据权利要求 46 所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用表达 CEACAM1 的淋巴细胞。

47. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述淋巴细胞包含 T 细胞、NK 细胞或肿瘤浸润淋巴细胞。

48. 一种免疫调节的方法,所示方法包括使表达 CEACAM1 的淋巴细胞与根据权利要求

1-27 中任一项所述的抗体或抗体片段接触。

49. 一种抑制表达 CEACAM 的肿瘤细胞迁移的方法,所述方法包括使所述表达 CEACAM 的肿瘤细胞与根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体或抗体片段接触,从而抑制表达 CEACAM 的肿瘤细胞迁移。

50. 一种抑制 CEACAM 同型或异型蛋白-蛋白相互作用的方法,所述方法包括使表达 CEACAM1 的淋巴细胞与根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体或抗体片段接触,从而抑制 CEACAM1 同型或异型蛋白-蛋白相互作用。

51. 一种用于增加患有癌症的受试者的响应或存活的持续时间或进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含根据权利要求 1-27 中任一项所述的单克隆抗体或抗体片段的组合物和抗肿瘤组合物,其中所述抗肿瘤组合物包含至少一种化学治疗剂,据此所述抗体和所述抗肿瘤组合物的共施用有效增加存活的持续时间或进展。

52. 一种用于诊断有相应需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括使源自所述受试者的生物样品与根据权利要求 41 所述的诊断组合物接触,其中超过预定阈值的复合物形成指示所述受试者中的癌症。

53. 一种用于诊断与 CEACAM 表达相关的疾病或疾患的方法被提供,所述方法包括步骤:

i. 将生物样品与根据权利要求 1-27 中任一项所述的单克隆抗体或抗体片段一起孵育;

ii. 使用可检测的探针检测结合的 CEACAM;

iii. 将 (ii) 的量与获自含有已知量的 CEACAM 的参考样品的标准曲线比较;

iv. 由所述标准曲线计算所述生物样品中 CEACAM 的量;以及

v. 将 (iv) 的量与正常 CEACAM 的量比较。

54. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的单克隆抗体或抗体片段用于诊断、预防或治疗细胞增殖性或血管发生相关的疾病或疾患或病毒感染的用途。

55. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的单克隆抗体或抗体片段用于制备用于治疗与 CEACAM 的表达或激活相关的疾患或疾病的药剂的用途。

56. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的单克隆抗体或抗体片段用于制备用于诊断细胞增殖性或血管发生相关的疾病或疾患或病毒感染的诊断组合物的用途。

癌胚抗原相关细胞粘附分子 (CEACAM) 的抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及在涉及癌胚抗原相关细胞粘附分子 (CEACAM) 的表达、激活或功能的疾病中有用的治疗和诊断抗体。特别地,本发明提供了具有特定互补决定区 (CDR) 和相对于识别 CEACAM1 的其他抗体改善的特性的抗体。

[0002] 发明背景

[0003] 跨膜蛋白癌胚抗原相关细胞粘附分子 1 (CEACAM1, 也称为胆汁糖蛋白 (BGP)、CD66a 和 C-CAM1) 是癌胚抗原家族 (CEA) 的成员,癌胚抗原家族 (CEA) 也属于免疫球蛋白超家族。CEACAM1 与其他已知 CEACAM 蛋白包括 CD66a (CEACAM1)、CD66e (CEACAM6) 和 CD66e (CEACAM5、CEA) 蛋白相互作用。CEACAM1 在从上皮细胞至造血起源的细胞 (例如,免疫细胞) 范围的一系列细胞上表达。

[0004] 许多不同的功能已被归因于 CEACAM1 蛋白。显示了 CEACAM1 蛋白在某些结肠癌、前列腺癌以及其他类型的癌症中是过表达的。另外的数据支持 CEACAM1 在血管发生与转移中的重要参与。CEACAM1 还在先天性与适应性免疫应答的调节中起作用。例如,CEACAM1 被证明为人肠上皮内包含的激活的 T 细胞的抑制性受体 (W099/52552 和 Morales 等人, J. Immunol. 1999, 163, 1363-1370)。另外的报道显示通过与单克隆抗体 (mAb) 交联的 T 细胞受体或通过淋病奈瑟氏菌 Opa 蛋白的 CEACAM1 接合 (engagement) 抑制 T 细胞的激活或增殖。

[0005] 黑色素瘤是色素生成细胞 (黑素细胞) 的恶性肿瘤,主要由于广泛的转移,是全球 75% 的皮肤癌相关的死亡率的原因。转移性黑色素瘤 (MM) 微弱地响应大多数抗癌方案,且 MM 患者的平均总的存活平均数为 8.5 个月。存在 CEACAM1 的过表达可与不良预后相关,并在大多数转移性黑色素瘤病例中被检测到的证据。CEACAM1 很少被正常的黑素细胞表达,但经常被发现于黑色素瘤细胞上。原发性皮肤黑色素瘤病变中 CEACAM1 的表达强烈预测具有不良预后的转移性疾病的形成。此外,与健康供体相比,观察到源自患有转移性黑色素瘤的某些患者的 NK 细胞上增加的 CEACAM1 的表达。

[0006] 证据表明,CEACAM1 可在病毒感染中起重要作用。例如,Markel 等人 (J. Clinical Investigation 2002, 110, 943-953) 表明,从 CMV- 感染的患者的蜕膜分离的淋巴细胞以增加的水平表达 CEACAM1 蛋白。在蜕膜淋巴细胞上增加的 CEACAM1 的表达可减弱局部免疫应答,并作为由病毒形成的以主要避免被激活的蜕膜淋巴细胞识别并清除的另一种机制。Albarran-Somoza 等人 (Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2006, 54, 1393), 研究了 CEACAM1 在人乳头瘤病毒 (HPV) 感染的情况下的宫颈癌及癌前病变中的蛋白表达模式,表明与低级别 SIL 和正常宫颈组织相比,CEACAM1 免疫染色在高级别鳞状上皮内病变 (SIL) 中被显著增加。作者表明 CEACAM1 的上调可与高级别 SIL 中 HPV DNA 的整合有关,且 CEACAM1 可能是 SIL 和宫颈癌进展中的重要生物标志物。总之,该证据表明,CEACAM1 在各种病毒感染中起重要作用。此外,CEACAM1 的过表达可作为各种病毒感染的标志物。

[0007] W02007/063424 与美国专利申请号 20070110668 公开了用于调节免疫系统的方法,并且特别地用于调节特定免疫应答,包括调节淋巴细胞活性的方法。这些方法包含

CEACAM1 蛋白功能的负调控与正调控两部分。

[0008] 美国专利申请号 20070071758 教导了用于通过负调控 CEACAM1 蛋白的活性,诸如例如通过使用 CEACAM1 特异性免疫球蛋白,增强癌症治疗中肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 疗法的功效的方法和组合物。

[0009] 美国专利申请号 20080108140 公开了调节特异性免疫应答以在自身免疫性疾病和需要组织移植的疾病的建立保护性免疫的方法。特别地,该申请涉及通过提高 CEACAM1 蛋白在靶组织中的功能浓度 (functional concentration) 以靶向的方式抑制免疫应答。

[0010] 美国专利申请号 20040047858 公开了能够通过 CEACAM1 调节 T 细胞活性的特异性抗体以及其在治疗免疫应答相关疾病 (例如,移植物抗宿主病、自身免疫性疾病、癌症等) 中的用途。

[0011] 美国专利申请号 20020028203、20050169922 和 20080102071 公开了结合 T 细胞抑制性受体分子并调节 (即,增强或抑制) T 细胞活性 (例如,细胞毒性和增殖) 的组合物,诸如胆汁糖蛋白结合剂,以及使用此类组合物诸如用于治疗疾病 (例如,自身免疫性疾病、免疫缺陷、癌症等) 的方法。

[0012] 本发明发明人的 WO2010/125571 公开了由特定杂交瘤细胞产生的鼠 (murine) 单克隆抗体。该 mAb 对 CEACAM1 具有高度选择性且不会与 CEACAM 家族的其他成员交叉反应。

[0013] 识别 CEACAM1 的已知抗体都不具有本发明的单克隆抗体的结合特异性谱。因此,对提供识别 CEACAM 蛋白的特定亚组 (subset) 的抗体存在未满足的需求,所述抗体可在涉及 CEACAM 表达或激活的疾病中被诊断和治疗使用。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明公开了识别 CEACAM 亚型的特定组的单克隆抗体。有利地,本发明的抗体显示结合 CEACAM1 以及选自 CEACAM5 和 CEACAM3 的至少一种另外的亚型。本发明的抗体特征为具有独特的 CDR 序列和构架组合以及结合 CEACAM1 分子内新鉴定的表位。本发明的单克隆抗体的独特的特异性,拓宽了其用于治疗与诊断另外类型的恶性肿瘤和病毒感染的治疗效用。本发明还提供了用于鉴定和分离此类抗体的方法,此类抗体的制备方法,以及其治疗与诊断用途。

[0016] 根据本发明的单克隆抗体具有 CDR 的特定组合,并具有相对于已知抗 CEACAM1 抗体的独特的特性和改善的特异性及效力。

[0017] 根据一个方面,本发明提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或包含至少其抗原结合部分的其抗体片段,具有包含 SEQ ID NO:1、2 和 3 中列出的序列的重链 CDR 以及包含 SEQ ID NO:4、5 和 6 中列出的序列的轻链 CDR,以及其类似物和衍生物。

[0018] 根据一些实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或抗体片段,该单克隆抗体或抗体片段具有包含 SEQ ID NO:1 中列出的序列的重链 CDR1、包含 SEQ ID NO:2 中列出的序列的重链 CDR2、包含 SEQ ID NO:3 中列出的序列的重链 CDR3、包含 SEQ ID NO:4 中列出的序列的轻链 CDR1、包含 SEQ ID NO:5 中列出的序列的轻链 CDR2、和包含 SEQ ID NO:6 中列出的序列的轻链 CDR3,以及其类似物与衍生物。

[0019] 根据一些实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,该单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:7、8 和 9 中列出的序列的重链 CDR。

[0020] 根据一些实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,该单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:13、14 和 15 中列出的序列的重链 CDR。

[0021] 根据一些实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,该单克隆抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:10、11 和 12 中列出的序列的轻链 CDR。

[0022] 根据一些实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,其中轻链 CDR 具有 SEQ ID NO:16、17 和 18 中列出的序列。

[0023] 根据其他实施方案,提供了单克隆抗体,该单克隆抗体具有 SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 中列出的 CDR 序列。

[0024] 根据又其他实施方案,提供了单克隆抗体,该单克隆抗体具有 SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 中列出的 CDR 序列。

[0025] 与参考序列的抗原结合部分具有至少 90% 序列同一性的单克隆抗体或其片段的类似物和衍生物也在本发明的范围内。

[0026] 根据一些实施方案,提供了与参考序列的抗原结合部分具有至少 95% 序列同一性的单克隆抗体或其片段的类似物和衍生物。根据特定实施方案,抗体包含具有 SEQ ID NO:26 中列出的序列的重链可变域序列:

[0027] QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNNLIEWVKRPGQGLEWIGVINPGSGDTNYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARGDYGGFAVDYWGGTSTVSS,

[0028] 或与重链序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物或衍生物。

[0029] 根据又另一个实施方案,抗体包含具有 SEQ ID NO:28 中列出的序列的轻链可变域序列:

[0030] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDTATYFCQQGKSLPRTFGGGTKLETK,

[0031] 或与轻链序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物或衍生物。

[0032] 根据特定实施方案,抗体或其片段包含具有 SEQ ID NO:26 中列出的序列的重链可变域和具有 SEQ ID NO:28 中列出的序列的轻链可变域,或与抗体或片段序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物或衍生物。

[0033] 本发明包含从杂交瘤细胞或其他生物系统分离的单克隆抗体,以及重组或合成制备的单克隆抗体。根据本发明的单克隆抗体可包含来自任何哺乳动物物种,包括但不限于小鼠、大鼠和人的恒定区。根据本发明的单克隆抗体包括嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体、异种抗体、以及包含抗体的至少抗原结合部分的抗体片段。根据特定实施方案,抗体片段选自自由以下组成的组:Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、dAb、分离的 CDR 区、单链抗体、“双抗体”、以及“线性抗体”。

[0034] 根据一些特定实施方案,本发明提供了单克隆抗体或抗体片段,所述单克隆抗体或抗体片段包含:

[0035] i. 选自自由以下组成的组的构架序列:小鼠 IgG2a、小鼠 IgG2b、小鼠 IgG3、人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3;以及

[0036] ii. 一组具有 SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 中列出的序列的 6 个 CDR;或一组

具有 SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 中列出的序列的 6 个 CDR ;以及与所述 CDR 序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物,其中单克隆抗体或片段以至少约 5×10^{-7} M 的亲合力与至少两个 CEACAM 亚型结合。

[0037] 根据一些实施方案,单克隆抗体或其片段以至少约 5×10^{-7} M 的亲合力与至少两个 CEACAM 亚型结合。

[0038] 根据其他实施方案,单克隆抗体或其片段以至少约 10^{-8} M 的亲合力与 CEACAM1 结合。

[0039] 根据一些特定实施方案,单克隆抗体为嵌合单克隆抗体。

[0040] 根据一些实施方案,嵌合抗体包含源自人的恒定区。

[0041] 根据一些实施方案,嵌合抗体的人恒定区选自以下组成的组:人 IgG1、人 IgG2、以及人 IgG3。

[0042] 根据特定实施方案,提供了识别 CEACAM1 的嵌合或人源化单克隆抗体,所述嵌合或人源化单克隆抗体包含具有 SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 中列出的序列的 6 个 CDR ;或具有 SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 中列出的序列的 6 个 CDR ;以及与所述 CDR 序列具有至少 95% 序列同一性的其类似物和衍生物,以及选自人 IgG1、人 IgG2 和人 IgG3 的恒定区亚类,其中单克隆抗体以至少约 5×10^{-7} M 的亲合力与至少两个 CEACAM 亚型结合。

[0043] 根据特定实施方案,嵌合或人源化单克隆抗体或其片段,包含人 IgG1 亚型的恒定区亚类。

[0044] 根据另一个特定实施方案,提供了嵌合单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,所述嵌合单克隆抗体或其片段包含 SEQ ID NO:30 中列出的重链序列。

[0045] 根据又另一个特定实施方案,提供了嵌合单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,所述嵌合单克隆抗体或其片段包含 SEQ ID NO:31 中列出的轻链序列。

[0046] 根据又另一个特定实施方案,提供了嵌合单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,所述嵌合单克隆抗体或其片段具有 SEQ ID NO:30 中列出的重链序列,和 SEQ ID NO:31 中列出的轻链序列。

[0047] 根据特定实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体,所述单克隆抗体从 2011 年 9 月 28 日以 ATCC 保藏号 PTA-12130 保藏的质粒中包含的重链和轻链 DNA 序列制备。

[0048] 根据一些实施方案,本发明的单克隆抗体呈现与一个以上的 CEACAM 亚型特异性结合。根据一些实施方案,单克隆抗体与至少两个不同的 CEACAM 亚型结合。根据一些特定实施方案,单克隆抗体与 CEACAM1 以及 CEACAM3 与 CEACAM5 中的至少一个结合。根据特定实施方案,单克隆抗体与 CEACAM1 和 CEACAM5 结合。根据另一个特定实施方案,单克隆抗体与 CEACAM1 和 CEACAM3 结合。根据又其他实施方案,根据本发明的单克隆抗体与 CEACAM 亚型 1、3 和 5 结合。

[0049] 根据特定实施方案,根据本发明的单克隆抗体不与 CEACAM4 和 CEACAM6 结合。

[0050] 根据又另一个方面,本发明提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体、或包含至少抗原结合部分的其片段,所述单克隆抗体或其片段能够结合与针对 CEACAM1 的具有 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:30 中列出的重链序列和作为 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:31 列出的轻链序列的单克隆抗体结合的 CEACAM1 分子上相同的表位。

[0051] 根据一些实施方案,单克隆抗体与分别具有序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32)

和 YPNASLLIQNVT (SEQ ID NO:33) 的人 CEACAM1 的残基 17-29 和 68-79 内的表位反应。

[0052] 根据一些实施方案,单克隆抗体与其结合的 CEACAM1 分子上的表位是包含序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 和 YPNASLLIQNVT (SEQ ID NO:33) 内的氨基酸残基的表位。

[0053] 根据其他实施方案,根据本发明的单克隆抗体结合包含序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 的至少 4 个氨基酸的表位。

[0054] 根据又其他实施方案,根据本发明的单克隆抗体结合序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 和 PNASLLI (SEQ ID NO:34) 内的表位。

[0055] 根据一些实施方案,单克隆抗体或其片段与具有 SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 中列出的 6 个 CDR 序列的抗体结合的相同的表位结合。

[0056] 根据又其他实施方案,单克隆抗体或其片段与具有 SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 中列出的 CDR 序列的抗体结合的相同的表位结合。

[0057] 根据特定实施方案,单克隆抗体或其片段与从 2011 年 9 月 28 日以 ATCC 保藏号 PTA-12130 保藏的 DNA 序列制备的抗体所结合的相同的表位结合。

[0058] 根据又另一个方面,本发明提供了包含来自序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 的至少 3 个氨基酸和来自序列 YPNASLLIQNVT (SEQ ID NO:33) 的至少 3 个氨基酸的 6-20 个氨基酸的分离的肽序列。与亲本序列具有至少 85%、90%、95% 或 98% 的同源性的所述肽的类似物和衍生物也在本发明的范围内。

[0059] 根据一些实施方案,分离的肽包含来自序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 的至少 6 个氨基酸。

[0060] 根据又其他实施方案,分离的肽包含序列 VLLLVHNLPPQLF (SEQ ID NO:32) 和 PNASLLI (SEQ ID NO:34) 的氨基酸。

[0061] 分离的肽用于制备单克隆或多克隆抗体的用途以及其在诊断或治疗中的用途也在本发明的范围内。

[0062] 编码根据本发明的具有 CEACAM1 亲和力和特异性的抗体或抗体片段的核酸分子也在本发明的范围内。

[0063] 根据这个方面,公开了编码识别 CEACAM1 的抗体或其抗体片段的分离的多核苷酸序列。

[0064] 根据一些实施方案,分离的多核苷酸序列包含 SEQ ID NO:25 中列出的 DNA 序列或与所述 DNA 序列具有至少 90% 序列同一性的其类似物。根据其他实施方案,分离的多核苷酸序列包含 SEQ ID NO:27 中列出的 DNA 序列或与所述 DNA 序列具有至少 90% 序列同一性的其类似物。

[0065] 还公开了包含编码根据本发明的单克隆抗体或其片段的至少一个多核苷酸序列的质粒以及包含这些质粒的宿主细胞。

[0066] 根据特定实施方案,公开了 2011 年 9 月 28 日以 ATCC 保藏号 PTA-12130 保藏的包含 SEQ ID NO:25 与 27 中列出的多核苷酸序列的质粒。

[0067] 在另一个方面,本发明涉及可用于预防、减弱或治疗与 CEACAM1、CEACAM3 或 CEACAM5 的表达、激活或功能相关的疾病或疾患的药物组合物。根据本发明的药物组合物包含治疗有效量的识别 CEACAM1、CEACAM3 或 CEACAM5 的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其抗体片段;以及药学上可接受的载体。

[0068] 根据一些实施方案,药物组合物包含能够以至少 10^{-8} kD 的结合亲和力与 CEACAM1 结合的单克隆抗体。

[0069] 根据另外的实施方案,药物组合物包含能够以至少约 10^{-8} kD 的亲和力与 CEACAM1 结合并以至少约 5×10^{-7} M 的亲和力与 CEACAM3 和 CEACAM5 中的至少一个结合的单克隆抗体。

[0070] 根据特定实施方案,药物组合物包含能够以至少约 5×10^{-7} kD 的亲和力与 CEACAM1、CEACAM3 和 CEACAM5 结合的单克隆抗体。

[0071] 根据某些实施方案,与 CEACAM1、CEACAM3 和 / 或 CEACAM5 的表达、激活或功能相关的疾病或疾患为细胞增殖性疾病或疾患。根据一些实施方案,细胞增殖性疾病或疾患为癌症。

[0072] 根据一些实施方案,与 CEACAM5 过表达相关的癌症选自以下组成的组:胃肠癌、结肠直肠癌 (CRC)、胰腺癌、非小细胞肺癌 (NSCL)、乳腺癌、甲状腺癌、胃癌、卵巢癌和子宫癌。

[0073] 根据特定实施方案,与 CEACAM1 过表达相关的癌症是黑色素瘤、胰腺癌、所有类型的肺癌和多发性骨髓瘤。

[0074] 根据本发明的药物组合物可作为独立的治疗被施用或除了任何其他治疗剂的治疗之外被施用。根据特定实施方案,根据本发明的抗体作为治疗方案的部分与至少一种抗癌剂联合被施用至有相应需要的受试者。根据本发明的药物组合物可与其他剂一起或单独被施用。

[0075] 在另一个方面,本发明提供了可用于检测受试者中选自由以下组成的组中的至少一种 CEACAM 亚型的诊断组合物:CEACAM1、CEACAM3 和 CEACAM5。根据本发明的诊断组合物包含治疗有效量的对 CEACAM1、CEACAM3 或 CEACAM5 具有至少约 5×10^{-7} M 的亲和力的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其抗体片段;以及任选的载体或赋形剂。

[0076] 在又另一个方面,本发明涉及预防、减弱或治疗与 CEACAM 的表达、激活或功能相关的疾病或疾患的方法,该方法包含向有相应需要的受试者施用包含治疗有效量的 CEACAM 的抗体;和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0077] 根据一些实施方案,疾病或疾患为细胞增殖性疾病或疾患。根据某些实施方案,细胞增殖性疾病或疾患为癌症。根据特定实施方案,单克隆抗体或其片段对 CEACAM1 的具有至少约 10^{-8} M 的亲和力,且癌症为黑色素瘤。

[0078] 根据其他实施方案,单克隆抗体或其片段对 CEACAM5 具有至少约 5×10^{-7} M 的亲和力,且癌症选自以下组成的组:胃肠癌、结肠直肠癌 (CRC)、胰腺癌、非小细胞肺癌 (NSCL)、乳腺癌、甲状腺癌、胃癌、卵巢癌、骨髓瘤和子宫癌。

[0079] 根据另外的实施方案,与 CEACAM1 的过表达相关的疾病或疾患为病毒感染。

[0080] 根据一些实施方案,病毒感染由选自以下组成的组的病毒引起:DNA 病毒,诸如但不限于巨细胞病毒 (CMV)、腺病毒、肝炎病毒和人乳头瘤病毒 (HPV);以及 RNA 病毒诸如但不限于流感病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV)。

[0081] 根据本发明的一个方面,提供了免疫调剂的方法,该方法包括使表达 CEACAM 的淋巴细胞与抗体或抗体片段接触。

[0082] 根据本发明的一个方面,提供了抑制表达 CEACAM 的肿瘤细胞的迁移的方法,该方法包括使表达 CEACAM 的肿瘤细胞与抗体或抗体片段接触,从而抑制表达 CEACAM 的肿瘤细

胞的迁移。

[0083] 根据一些实施方案,肿瘤细胞包含黑色素瘤肿瘤细胞。

[0084] 根据本发明的一个方面,提供了治疗癌症的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的抗体或抗体片段,从而治疗受试者中的癌症。

[0085] 根据本发明的一个方面,提供了抑制 CEACAM 同型或异型蛋白-蛋白相互作用的方法,该方法包括使表达 CEACAM1 的淋巴细胞与抗体或抗体片段接触,从而抑制 CEACAM1 同型或异型蛋白-蛋白相互作用。

[0086] 根据一些实施方案,分离的抗体或抗体片段被附着至细胞毒性部分。

[0087] 根据一些实施方案,细胞毒性部分包含细胞毒素、趋化因子、化学治疗组合物、促细胞凋亡、干扰素、放射性部分、或其组合。

[0088] 根据一些实施方案,抗体或抗体片段被附着至可鉴定的部分。

[0089] 根据一些实施方案,癌症细胞相比未受影响的细胞特征为 CEACAM1 的过表达。

[0090] 根据一些实施方案,治疗癌症的方法还包括向受试者施用淋巴细胞。

[0091] 根据一些实施方案,淋巴细胞包含 T 细胞或 NK 细胞。根据一些实施方案,淋巴细胞表达 CEACAM1。根据其他实施方案,表达 CEACAM1 的淋巴细胞是肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)。根据其他实施方案,表达 CEACAM1 的淋巴细胞是细胞毒性 T 细胞。

[0092] 本发明的抗体可被用于阻断免疫效应细胞(表达 CEACAM 的淋巴细胞,例如,肿瘤浸润细胞、T 细胞或 NK 细胞)和靶细胞(例如,表达 CEACAM 的病理细胞诸如癌细胞)的任一个或二者上的 CEACAM。作为适合此疗法的候选物的癌细胞的实例包括,但不限于,黑色素瘤、肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌、胰腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓癌、卵巢癌、子宫癌、肉瘤、胆管癌、或子宫内膜细胞癌。

[0093] 根据本发明的另一个方面,提供了使得表达 CEACAM 的肿瘤细胞对免疫调节敏感的方法。该方法包括使表达 CEACAM 的肿瘤细胞(例如,黑色素瘤、肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌、胰腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓癌、卵巢癌、子宫癌、肉瘤、胆管癌或子宫内膜细胞癌)与以上描述的抗体或抗体片段接触,从而使得表达 CEACAM 的肿瘤细胞对免疫调节敏感。

[0094] 另外或可选地,本发明还设想通过使表达 CEACAM1 的淋巴细胞与本文描述的抗体或抗体片段接触的免疫调节的方法(例如,抑制 CEACAM1 同型或异型蛋白-蛋白相互作用)。

[0095] 本发明教导的治疗或预防方法,可离体(例如,在基于 T 细胞的过继性免疫治疗中使用)或在体内被实现。

[0096] 本发明一些实施方案的抗体可具有独立于上述其免疫调节活性的抗癌活性。

[0097] 在另一个方面,本发明提供了用于提高患有癌症的受试者的响应或存活的持续时间或进展的方法,该方法包括向受试者施用有效量的包含识别 CEACAM 的抗体和抗肿瘤组合物的组合物,其中所述抗肿瘤组合物包含至少一种化学治疗剂,据此,抗体和抗肿瘤组合物的共施用有效增加响应或存活的持续时间或进展。

[0098] 此外,本发明提供了用于治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括向受试者施用有效量的包含针对 CEACAM 的抗体和抗肿瘤组合物的组合物,据此针对 CEACAM 的抗体和抗肿瘤组合物的共施用有效增加受试者的组中的响应发生率。

[0099] 除了治疗应用外,本发明的抗体还可被用于诊断应用。

[0100] 因此,根据另外的方面,提供了用于诊断有相应需要的受试者中的癌症的方法,该方法包括使源自受试者的生物样品(体内、体外或离体)与本文描述的抗体或抗体片段接触,其中超过预定阈值的复合物形成指示受试者中的癌症。根据一些实施方案,癌症细胞相比未受影响的细胞特征为 CEACAM 的过表达。

[0101] 根据特定实施方案,诊断的癌症选自由以下组成的组:黑色素瘤、胰腺癌、肺癌和骨髓瘤。

[0102] 根据另一个特定实施方案,测量的蛋白是 CEACAM5,且诊断的癌症选自由以下组成的组:胃肠癌、结肠直肠癌(CRC)、胰腺癌、非小细胞肺癌(NSCL)、乳腺癌、甲状腺癌、胃癌、卵巢癌和子宫癌。

[0103] 如提及的,本发明的方法在足够形成免疫复合物的条件下实现,此类条件(例如,合适的浓度、缓冲液、温度、反应时间)以及优化此类条件的方法是本领域技术人员已知的且本文公开了实施例。如本文所用的短语“免疫复合物”是指包含本发明的抗体和 CEACAM 的复合物。可直接的或通过检测可被附着至抗体的可鉴定(可检测)的部分确定本发明的免疫复合物的存在或水平。

[0104] 将测试的细胞(例如,有相应需要的受试者的细胞)中的免疫复合物的水平与预定阈值比较。将领会的是,本发明的抗体还可被用于测量血清可溶性 CEACAM 的量。不管怎样,阈值可基于已知的参考水平和/或对照细胞或血清中的水平被确定。对照细胞可获自对照、健康受试者(例如,未患癌症的受试者)、或获自疾病开始前或治疗后的相同受试者。根据本发明的一些实施方案,对照受试者是相同的物种,例如人,优选与如有相应需要的受试者相匹配的相同年龄、体重、性别等。

[0105] 为了便于诊断,以上的教导可与本领域熟知的诊断癌症的其他方法包括但不限于成像、分子测试和手术活组织检查结合。

[0106] 根据本发明的另一个方面,提供了用于检测或定量 CEACAM 的存在的方法。因此,本发明还提供了用于使用识别 CEACAM 的抗体诊断与 CEACAM 的表达相关的病症的方法。根据本发明的诊断方法可根据特定实施方案在体外或离体进行。根据本发明的抗体还可被用于配置筛选方法。例如,ELISA 测定法可被构建用于通过本领域已知的标准方法使用单克隆和多克隆抗体测量多肽的分泌或细胞相关的水平。

[0107] 根据一个实施方案,提供了用于检测或定量 CEACAM 的存在的方法,该方法包含步骤:

[0108] i. 将生物样品与针对 CEACAM 的抗体或包含至少抗原结合部分的其抗体片段一起孵育;

[0109] ii. 使用可检测的探针检测结合的 CEACAM;

[0110] iii. 将(ii)的量与获自含有已知量的 CEACAM 的参考样品的标准曲线进行比较;以及

[0111] iv. 由标准曲线计算样品中 CEACAM 的量。

[0112] 根据另一个实施方案,提供了用于诊断与 CEACAM 的表达相关的疾病或疾患的方法,该方法包含步骤:

[0113] i. 将生物样品与针对 CEACAM 的抗体或包含至少抗原结合部分的其抗体片段一起孵育;

- [0114] ii. 使用可检测的探针检测结合的 CEACAM；
- [0115] iii. 将 (ii) 的量与获自含有已知量的 CEACAM 的参考样品的标准曲线进行比较；
- [0116] iv. 由标准曲线计算生物样品中 CEACAM 的量；以及
- [0117] v. 将 (iv) 的量与正常 CEACAM 的量进行比较。
- [0118] 根据一些实施方案，生物样品是哺乳动物受试者的体液。根据特定实施方案，哺乳动物受试者是人。
- [0119] 本发明的抗体还可在用于评价患者中 CEACAM 水平以及用于预测治疗效果的筛选检验中被使用。用本发明的抗体的筛选检验可允许确定 CEACAM 的水平，并因此预测治疗结果和设计适当的治疗方案。
- [0120] 根据其他实施方案，评价 CEACAM1、CEACAM3 和 CEACAM5 中的至少一个的水平。根据特定实施方案，评价 CEACAM1 的水平。
- [0121] 根据本发明的一些实施方案，抗体或抗体片段被附着至可鉴定部分。
- [0122] 将领会的是，抗体、或其片段与可鉴定部分的此类附着可根据本领域熟知的方法使用化学缀合、或通过重组 DNA 技术来实现。
- [0123] 可鉴定部分可以为结合对的一个成员，其通过其与结合对的另外的成员的相互作用是可鉴定的，和直接被可视化的标记物。在一个实施例中，结合对的成员是通过相应标记的抗体被鉴定的抗原。在一个实施例中，标记物是荧光蛋白或产生比色反应的酶。
- [0124] 本发明的另一个方面涉及针对 CEACAM 的抗体或其抗体片段用于诊断或治疗细胞增殖性或血管发生相关的疾病或疾患或病毒感染的用途。
- [0125] 根据一个实施方案，细胞增殖性疾病是黑色素瘤。
- [0126] 根据其他实施方案，细胞增殖性疾病或疾患是选自以下组成的组的癌症：胃肠癌、结肠直肠癌 (CRC)、胰腺癌、非小细胞肺癌 (NSCL)、乳腺癌、甲状腺癌、胃癌、卵巢癌、子宫癌和骨髓瘤。
- [0127] 根据一个实施方案，本发明提供了针对 CEACAM 的抗体或包含至少抗原结合部分的其抗体片段用于制备用于治疗与 CEACAM 的表达或激活相关的疾病或疾患的药物的用途，所述疾病或疾患包括但不限于癌症和病毒感染。
- [0128] 本发明还涉及针对 CEACAM 的抗体或其抗体片段用于制造用于诊断细胞增殖性或血管发生相关的疾病或疾患或病毒感染的诊断组合物的用途。
- [0129] 现有技术中关于 CEACAM1、CEACAM3 和 CEACAM5 抗体的基本所有已知的或预想的用途，都可通过本发明的抗体实现，本发明的抗体显示具有对这些蛋白的改善的亲合力和优越的抑制性，以及在间接免疫调节中对携带 CEACAM1 的细胞的影响。这些用途包括诊断、预防和治疗技术。
- [0130] 从下文给出的详细描述，本发明的另外的实施方案和适用性的全部范围将变得明显。
- [0131] 附图简述
- [0132] 图 1 为显示嵌合抗体 CM10 的轻链和重链的 SDS-PAGE 图像。
- [0133] 图 2 显示 CM10 与纯化的 hCEACAM1 的特异性结合曲线。
- [0134] 图 3 显示如通过流式细胞术分析检测的 CM10 与 CEACAM1 的特异性结合。
- [0135] 图 4 证实了 CM10 阻断细胞间的 CEACAM1-CEACAM1 相互作用。通过 ELISA 测量了

各种 CM10 浓度存在下孵育的效应细胞(表达 CEACAM1 的 BW/221 细胞)的小鼠 IL-2 分泌。

[0136] 图 5 显示 CM10 增强 CEACAM1 阳性黑色素瘤细胞的特异性杀伤活性。

[0137] 图 6 显示 CM10 刺激肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的杀伤活性。

[0138] 图 7 显示 CM10 增强 NK 细胞对 CEACAM1 阳性黑色素瘤细胞系的杀伤活性。

[0139] 图 8 CM10 免疫调节效应抑制肿瘤的体内生长。箭头指示施用时间(CM10 圆形、TIL 三角形、CM10 和 TIL 空心正方形)。

[0140] 图 9 是 CM10 免疫调节作用模式的示意图。

[0141] 图 10 表示如通过抗 CEACAM1 抗体测定的肿瘤中 CEACAM1 结合强度的水平。

[0142] 图 11 显示每个细胞结合的 CM10 分子的定量。

[0143] 图 12 证实 CM10 对 PBMC 增殖没有影响。结果表示来自用于每个处理的三个供体的平均增殖率。

[0144] 图 13 展示 CM10 与 CEACAM 家族蛋白之间结合的 FACS 分析。CEACAM1、5、6 和 8 由 721. 221 细胞表达,且 CEACAM3 和 4 由 HEK293T 细胞表达。

[0145] 图 14 表示黑色素瘤细胞系中补体依赖性细胞毒性(CDC)检验的结果。

[0146] 图 15 显示 CM10 增强 CEACAM1 和 HLA-A2 阳性黑色素瘤细胞存在下 TIL 的颗粒酶 B 分泌。

[0147] 图 16 显示 CM10 阻断 CEACAM1-CEACAM5 相互作用。

[0148] 图 17 展示 CM10 增强 HLA 限制性的 T 细胞杀伤。

[0149] 图 18 显示 CM10 的免疫调节活性抑制肿瘤的体内生长。

[0150] 图 19 :表示 CM10 增强 NK 细胞对 CEACAM1 阳性的胰腺癌细胞系 COLO-357 和 BXP33 的杀伤活性。

[0151] 图 20 :显示 CM10 增强 CEACAM1 阳性的胰腺癌细胞系存在下 NK 细胞的颗粒酶 B 分泌。

[0152] 发明详述

[0153] 本发明提供了识别 CEACAM1 的抗体,所述抗体包含具有改善的和独特的特异性、选择性、亲和力和 / 或活性的 CDR 序列的特定组。

[0154] 根据本发明的抗体以高于其他抗 -CEACAM1 抗体的亲和力结合 CEACAM1,它们阻断 CEACAM1 的功能,而不是所有抗 CEACAM 抗体都能完成的,且本发明的抗体比多克隆抗 CEACAM 抗体更有效。此外,根据本发明的抗体有效对抗癌症细胞,特别是黑色素瘤细胞:抗体使得黑色素瘤细胞对淋巴细胞更敏感、抑制黑色素瘤的体内生长速率,一种当抗体与体内过继性 T 细胞转移结合时被增强的效应。

[0155] 本文首次显示,根据本发明的抗 -CEACAM1 抗体的体内抗黑色素瘤效应是组合的直接抗肿瘤效应和使得细胞对反应性淋巴细胞更敏感的免疫调节效应。

[0156] 根据本发明的抗体、片段和衍生物可被用于诊断、免疫调节和癌症治疗的有效工具。

[0157] 抗体抑制 CEACAM1 的嗜同性相互作用(homophilic interaction),如通过共孵育免疫效应细胞和表达 CEACAM1 的靶细胞并检验 IL-2 的分泌以及通过体外杀伤检验确定的。

[0158] 本发明的抗体显示增强 CM10 增强 HLA 限制性 T 细胞杀伤,并增强特异性靶细胞存在下颗粒酶 B(参与介导靶细胞的细胞凋亡的丝氨酸蛋白酶)从效应 NK 细胞和 T 细胞

的分泌,因此使得观察到的由抗体增强的靶细胞杀伤成为可能。抗体还以剂量依赖的方式抑制 CEACAM1 与 CEACAM5 之间的结合,因此可被用于治疗表达高水平的 CEACAM5 并利用 CEACAM1-CEACAM5 轴 (axis) 抑制免疫细胞的恶性肿瘤。

[0159] 此外,本文显示,根据本发明的抗体有效抑制黑色素瘤细胞的侵袭。此外,根据本发明的抗体单独地或与反应性淋巴细胞联合的体内施用显示有效抑制黑色素瘤肿瘤的生长。过继性人 T 细胞转移与单克隆抗体注射的联合相比于同种型对照组表现出显著的协同作用并强烈抑制异种移植物的生长。

[0160] 根据本发明另外的方面,提供了具有与本文定义的抗体相同的结合特异性和选择性的分离的抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含具有以上描述的特定 CDR 区段的抗原识别结构域。根据该方面,分离的抗体或抗体片段通过其特定 CDR 区段序列能够结合与以上描述的抗体结合的 CEACAM1 蛋白相同的表位决定簇。

[0161] 本文同时公开了与根据本发明的单克隆抗体结合的表位的建议序列 (proposed sequence),和源自该表位的可被用于培养另外的单克隆抗体的建议的分离的肽 (proposed isolated peptide)。

[0162] 单克隆抗体 (mAb) 可被设计为选择性靶向肿瘤细胞,且在结合之后引起各种响应。这些剂可以以不同的方式破坏肿瘤细胞,诸如阻断肿瘤细胞增殖或激活免疫系统。根据本发明的嵌合单克隆抗体被设计为特异性结合 CEACAM1 蛋白和其他 CEACAM 亚型蛋白并中和其各种功能,以及诱导肿瘤细胞的特异性死亡。不希望被任何理论束缚,表明根据本发明的单克隆抗体还通过激活针对癌细胞的免疫系统起作用。

[0163] 临床和生物学证据均强调 CEACAM1 是作为用于开发靶向免疫疗法的有希望的靶。CEACAM1 未被发现于正常黑素细胞上,但经历新表达 (neo-expression) 且广泛表达于绝大多数转移性黑色素瘤样本上。之前已从机理上显示,CEACAM1 通过抑制 NK 细胞和 T 细胞的效应功能保护黑色素瘤细胞。

[0164] 本文首次显示,CM10 是以高亲和力与人 CEACAM1 结合的嵌合单克隆抗体。在体外,CM10 以剂量依赖的方式有效阻断 CEACAM1-嗜同性相互作用,并促进由 T 细胞和 NK 细胞杀伤 CEACAM1 阳性黑色素瘤细胞。此外,当与黑色素瘤反应性人 T 淋巴细胞 (肿瘤浸润淋巴细胞, TIL) 一起全身性施用时,CM10 显著抑制黑色素瘤异种移植物的体内生长。不希望被任何理论束缚,这与表明的作用机理一致;消除肿瘤细胞与激活的淋巴细胞的免疫保护性相互作用。

[0165] 一些证据报道,CEACAM1 由各种各样的上皮细胞表达,包括结肠、前列腺、乳腺、肾等。通过 IHC 广泛检查了正常组织和肿瘤组织上的 CEACAM1 表达谱已被执行。相比于正常人组织中测试的绝大多数组织的未染色,表达分析显示黑色素瘤细胞中的强染色。然而,在一些器官的限制性部位观察到一些选择性染色。当多种定量方法被用于定量结合到恶性和正常原代细胞的 CM10mAb 分子的数目时,可在正常细胞中检测到非常低的 CM10 分子,其可表明 CM10 主要结合到患者的肿瘤细胞。此外,显示 CM10 对原代细胞的增殖没有任何影响,且其完全或几乎完全不能诱导 CDC 或 ADCC,指示单克隆抗体在人受试者中的潜在安全性。

[0166] 由于 CM10 具有免疫调节活性,因此评价了可能的免疫相关副作用。PBMC 激活之后,激活的淋巴细胞上的 CEACAM1 被上调 (Gray-Owen 和 Blumberg 2006, Nat Rev Immunol 6, 433-46)。离体人 PBMC 增殖检验显示,CM10 对幼稚和激活的 PBMC 增殖反应无影

响。

[0167] CEACAM1 阻断相对于消除产生的抑制机制的主要优势是对邻近肿瘤的预期选择性,并且因此相比于其他一般的免疫毒性剂具有较少的不良事件。

[0168] 如本发明中显示的,CM10 显示令人鼓舞的活性和安全特性,并且是用于癌症免疫治疗的有希望的候选物且可被用作选择性增强一些恶性肿瘤诸如黑色素瘤和非小细胞肺癌中内源性免疫应答的抗肿瘤特性的策略。

[0169] 与另外的 CEACAM 亚型的结合增加了抗体的治疗特性,因此其可被用于诊断和治疗未广泛表达 CEACAM1 但表达例如 CEACAM5 的其他类型的恶性肿瘤。

[0170] 已发现 CEACAM5 在高百分比的许多人类肿瘤中过表达,包括 90% 的胃肠癌、结肠直肠癌 (CRC) 和胰腺癌,70% 的非小细胞肺癌细胞和 50% 的乳腺癌。其还在甲状腺癌、胃癌、卵巢癌和子宫癌中过表达 (Thompson, Grunert 等人 1991, J Clin Lab Anal 5, 344-66)。CEACAM5 甚至用作 CRC 和结肠癌术后监控中的肝转移的临床标志物 (Duffy 2001, Clin Chem 47, 624-30)。CM10 能够结合 CEACAM5 的证据是非常重要的,并且可将可由 CM10 治疗的可能适应症由 4-5 种类型的恶性肿瘤扩展至超过 10 种。已进入临床试验的抗-CEACAM5 剂包括缀合至毒性物质诸如放射性物质的用于各种恶性肿瘤的诊断目的和治疗二者的抗-CEACAM5 抗体。由此看来,即使这些毒性缀合的形式也未显示安全问题,其可指示 CEACAM5 是安全的靶。

[0171] 鼠 IgG 亚类的人对应物基于生物学和功能活性中的相似性。鼠 IgG2a 和 IgG2b 与人 IgG1 和 IgG3 共有固定补体和结合蛋白抗原的能力 (Hussain 等人, 1995, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 726-732)。由于其结合至肥大细胞的特性,鼠 IgG1 和人 IgG4 被认为是相似的。人 IgG4 是唯一的不会激活补体的人 IgG 亚类,而亚类 IgG1 和 3 在激活补体方面是最有效的。对于小鼠,亚类 IgG2a 和 IgG2b 是有活性的而 IgG1 和可能的 IgG3 是无活性的 (Clark MR., Chem Immunol. 1997;65:88-110)。

[0172] 识别 CEACAM1 的一些已知的单克隆抗体是小鼠 IgG1 亚型。作为小鼠 IgG1 的人等同物是 IgG4,将预期创建包含人 IgG4 恒定构架的嵌合抗体。出人意料地,根据本发明的一些实施方案,嵌合单克隆抗体包含人 IgG1 恒定构架。

[0173] 根据一个方面,本发明提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体,或包含至少抗原结合部分的其抗体片段,该单克隆抗体或其抗体片段包含含有选自以下组成的组的序列的至少一个重链 CDR:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3,以及含有选自以下组成的组的序列的至少一个轻链 CDR:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6,以及其类似物和衍生物。

[0174] 根据一些实施方案,公开了与参考序列的序列具有至少 90% 序列同一性的单克隆抗体或其片段的类似物和衍生物。

[0175] 根据其他实施方案,公开了与参考序列具有至少 95% 序列同一性的单克隆抗体或其片段的类似物和衍生物。

[0176] 根据又其他实施方案,公开了与参考抗体的 CDR 序列具有至少 98% 序列同一性的单克隆抗体或其片段的类似物和衍生物。

[0177] 根据一个实施方案,抗体或抗体片段包含含有选自以下组成的组的序列的至少两个重链 CDR:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3,以及含有选自以下组成的组

的序列的至少一个轻链 CDR :SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6,以及与单克隆抗体或其片段的序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物。

[0178] 根据其他实施方案,抗体或抗体片段包含含有选自以下组成的组的序列的至少一个重链 CDR :SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3,以及含有选自以下组成的组的序列的至少两个轻链 CDR :SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6,以及与单克隆抗体或其片段的序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物。

[0179] 根据又其他实施方案,抗体或抗体片段包含含有选自以下组成的组的序列的至少两个重链 CDR :SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3,以及含有选自以下组成的组的序列的至少两个轻链 CDR :SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6,以及与单克隆抗体或其片段的序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物。

[0180] 根据一些实施方案,抗体或抗体片段包含源自选自以下组成的组的序列的至少 5 个氨基酸的至少一个重链 CDR 序列 :SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20 和 SEQ ID NO:21,和源自选自以下组成的组的序列的至少 5 个氨基酸的至少一个轻链 CDR 序列 :SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24,以及与单克隆抗体或其片段的序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物。

[0181] 根据其他实施方案,抗体或其片段的抗体结合位点由以下组成 :选自 SEQ ID NO:7、8、9、13、14 和 15 组成的组的 3 个重链 CDR 和选自 SEQ ID NO:10、11、12、16、17、18 组成的组的 3 个轻链 CDR 以及与抗体结合位点具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物。

[0182] 根据又其他实施方案,抗体结合位点由 SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 的 6 个 CDR 组成。

[0183] 根据其他实施方案,抗体结合位点由 SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 的 6 个 CDR 组成。

[0184] 根据本发明的 CDR 序列使用以下两种不同算法的方法来鉴定 :IMGT 算法 (Lefranc 等人,1999,Nucleic Acids Research,27,209-212);以及 KABAT 算法 (Wu TT 和 Kabat E. A.,1970,J. Exp. Med. 132,211-250)。公开了由两种方法显示的序列。

[0185] 根据一些实施方案,根据本发明的抗体或其片段的重链 CDR1 选自 NNLE (SEQ ID NO:7) 和 GYAFTNNL (SEQ ID NO:13)。

[0186] 根据一些实施方案,根据本发明的抗体或其片段的重链 CDR2 选自 VINPGSGDTNYNEKFKG (SEQ ID NO:8) 和 INPGSGDT (SEQ ID NO:14)。

[0187] 根据一些实施方案,根据本发明的抗体或其片段的重链 CDR3 选自 GDYYGGFAVDY (SEQ ID NO:9) 和 ARGDYYGGFAVDY (SEQ ID NO:15)。

[0188] 根据一些实施方案,根据本发明的抗体或其片段的轻链 CDR1 选自 RTSQDIGNYLN (SEQ ID NO:10) 和 QDIGNY (SEQ ID NO:16)。

[0189] 根据一些实施方案,根据本发明的抗体或其片段的轻链 CDR2 选自 YTSRLHS (SEQ ID NO:11) 和 YTS (SEQ ID NO:17)。

[0190] 根据一些实施方案,根据本发明的抗体或其片段的轻链 CDR3 选自 QQGKSLP (SEQ ID NO:12) 和 QQGKSLPRT (SEQ ID NO:18)。

[0191] 根据一些实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分

的其片段,其中重链 CDR 由 SEQ ID NO:7、8 和 9 的序列组成。

[0192] 根据一些实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,其中重链 CDR 由 SEQ ID NO:13、14 和 15 的序列组成。

[0193] 根据一些实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,其中轻链 CDR 由 SEQ ID NO:10、11 和 12 的序列组成。

[0194] 根据一些实施方案,提供了识别 CEACAM1 的单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,其中轻链 CDR 由 SEQ ID NO:16、17 和 18 的序列组成。

[0195] 根据特定实施方案,抗体包含重链可变域序列:

[0196] 根据特定实施方案,抗体或其片段包含由 SEQ ID NO:26 组成的重链可变域序列和由 SEQ ID NO:28 组成的轻链可变域序列,或与抗体或片段序列具有至少 90% 序列同一性的其类似物或衍生物。

[0197] 根据一些特定实施方案,本发明提供了单克隆抗体或抗体片段,所述单克隆抗体或抗体片段包含一组选自 i. SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 以及 ii. SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 的 6 个 CDR;以及与所述 CDR 序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物,以及选自以下的构架序列:小鼠 IgG2a、小鼠 IgG2b、小鼠 IgG3、人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3,其中单克隆抗体以至少约 5×10^{-7} M 的亲合力与至少两个 CEACAM 亚型结合。

[0198] 根据特定实施方案,提供了识别 CEACAM1 的嵌合单克隆抗体,该嵌合单克隆抗体包含选自由以下组成的组的至少一个 CDR 序列:SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 和 18;以及与所述 CDR 序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物,以及选自以下的恒定区序列:人 IgG1、人 IgG2 和人 IgG3,其中单克隆抗体以至少约 5×10^{-7} M 的亲合力与至少两个 CEACAM 亚型结合。

[0199] 根据特定实施方案,提供了识别 CEACAM1 的嵌合或人源化单克隆抗体,该嵌合或人源化单克隆抗体包含一组选自 i. SEQ ID NO:13、14、15、16、17 和 18 以及 ii. SEQ ID NO:7、8、9、10、11 和 12 的 6 个 CDR;以及与所述 CDR 序列具有至少 97% 序列同一性的其类似物和衍生物,以及选自以下的恒定区亚类:人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3,其中单克隆抗体以至少约 5×10^{-7} M 的亲合力与至少两个 CEACAM 亚型结合。

[0200] 根据又一个特定实施方案,提供了嵌合单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,所述单克隆抗体或其片段包含根据 SEQ ID NO:30 的重链序列。

[0201] 根据又一个特定实施方案,提供了嵌合单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,所述单克隆抗体或其片段包含根据 SEQ ID NO:31 的轻链序列。

[0202] 根据又一个特定实施方案,提供了嵌合单克隆抗体或包含至少抗原结合部分的其片段,所述单克隆抗体或其片段包含根据 SEQ ID NO:30 的人 IgG1 重链序列,以及根据 SEQ ID NO:31 的人 IgG1 轻链序列。

[0203] 定义

[0204] 术语“CEACAM1”被用于指 CEACAM1 基因例如 NP_001020083.1、NP_001703.2 的蛋白产物。在人中,迄今为止已检测 11 个不同的 CEACAM1 剪接变体。单个 CEACAM1 同种型关于胞外免疫球蛋白-样结构域的数目(例如,具有 4 个胞外免疫球蛋白-样结构域的 CEACAM1 被称为 CEACAM1-4)、膜锚和 / 或其胞质尾区的长度(例如,具有长胞质尾区的 CEACAM1-4 被称为 CEACAM1-4L 且具有短胞质尾区的 CEACAM1-4 被称为 CEACAM1-4S)而不同。CEACAM1 的

N-末端结构域紧接在信号肽之后开始,并且其结构被认为是 IgV-型。例如,在 CEACAM1 注解 P13688 中,N-末端 IgV-型结构域包含从氨基酸 35 至 142 的 108 个氨基酸。该结构域被鉴定为负责嗜同性结合活性 (Watt 等人, 2001, Blood. 98, 1469-79)。包括这些剪接变体的所有变体都包含在术语“CEACAM1”内。

[0205] “抗-CEACAM1 抗体”、“识别 CEACAM1 的抗体”、“抗 CEACAM1 的抗体”、或“针对 CEACAM1 的抗体”是以足够的亲和力和特异性与 CEACAM1 蛋白结合的抗体。典型地,根据本发明教导的抗体能够以约 10^{-8} 或 10^{-9} M 的最小亲和力结合 CEACAM1。本发明的一些单克隆抗体能够以约 5×10^{-7} M 的最小亲和力结合 CEACAM3、5 和 / 或 8。

[0206] 优选地,本发明的抗-CEACAM1 抗体可被用作靶向和干扰疾病或病症中的诊断或治疗剂,其中所述疾病或病症涉及 CEACAM1 的表达或活性。

[0207] “抗原”是能够引起抗体形成并被抗体结合的分子或分子的部分。抗原可具有一个或一个以上的表位。以上提及的特异性反应意图表示抗原将以高度选择性的方式与其相应的抗体,而不是与可由其他抗原引起的多个其他抗体反应。根据本发明的抗原是 CEACAM1 蛋白或其片段。

[0208] 根据本发明的术语“抗原决定簇”或“表位”是指与特定抗体特异性反应的抗原分子的区域。应用本领域已知的方法,可单独地或与载体部分联合地使用源自表位的肽序列,以免疫动物并产生另外的多克隆或单克隆抗体。源自表位的分离的肽可被用于诊断方法以检测抗体并当要求抑制所述抗体时被用作治疗剂。

[0209] 抗体,或免疫球蛋白,包含通过二硫键连接在一起的两条重链和两条轻链,每条轻链都通过二硫键被连接至“Y”形构型中的各自的重链。抗体的蛋白水解消化产生 Fv (可变片段) 结构域和 Fc (可结晶片段) 结构域。抗原结合结构域, Fab, 包含多肽序列变化的区域。术语 $F(ab')_2$ 表示两个 Fab' 臂通过二硫键连接在一起。抗体的中心轴被称为 Fc 片段。每条重链在一端具有可变域 (V_H), 随后为多个恒定域 (C_H)。每条轻链在一端具有可变域 (V_L), 且在其另一端具有恒定域 (C_L), 轻链可变域对准重链的可变域且轻链恒定域对准重链的第一恒定域 (CH1)。每对轻链和重链的可变域都形成抗原结合位点。轻链和重链上的结构域具有相同的一般结构并且每个结构域都包含 4 个构架区,所述构架区的序列是相对保守的,由 3 个被称为互补决定区 (CDR1-3) 的高变结构域连接。这些结构域有助于抗原结合位点的特异性和亲和力。重链的同种型 (γ 、 α 、 δ 、 ϵ 或 μ) 决定了免疫球蛋白种类(分别地 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM)。轻链是在所有抗体种类中发现的两种同种型 (kappa, κ 或 lambda, λ) 中的任一种。

[0210] 术语“抗体”以最广泛的意义被使用,并包括单克隆抗体(包括全长或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们呈现期望的生物学活性。

[0211] 根据本发明的抗体是包含至少抗体的抗原结合部分的分子。根据本发明的一种抗体或多种抗体包括完整的抗体,诸如多克隆抗体或单克隆抗体 (mAb), 以及其蛋白水解片段诸如 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段。本发明的范围还包括嵌合抗体; 人和人源化抗体; 重组和工程化抗体, 以及其片段。此外, 编码抗体的可变区的 DNA 可被插入编码其他抗体的 DNA 中以产生嵌合抗体。单链抗体也落入在本发明的范围之内。

[0212] “抗体片段”仅包含完整抗体的部分, 通常包括完整抗体的抗原结合位点并因

此保留结合抗原的能力。由本发明的定义所包含的抗体片段的实例包括：(i) 具有 VL、CL、VH 和 CH1 结构域的 Fab 片段；(ii) Fab' 片段，其是在 CH1 结构域的 C- 末端具有一个或多个半胱氨酸残基的 Fab 片段；(iii) 具有 VH 和 CH1 结构域的 Fd 片段；(iv) 具有 VH 和 CH1 结构域以及在 CH1 结构域的 C- 末端具有一个或多个半胱氨酸残基的 Fd' 片段；(v) 具有抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域的 Fv 片段；(vi) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段 (Ward 等人, Nature 1989, 341, 544-546)；(vii) 分离的 CDR 区域；(viii) 包含在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab' 片段的二价片段, F(ab')₂ 片段；(ix) 单链抗体分子 (例如单链 Fv; scFv) (Bird 等人, Science 1988, 242, 423-426; 以及 Huston 等人, PNAS (USA) 1988, 85, 5879-5883)；(x) 具有两个抗原结合位点的“双抗体”，包含连接至相同多肽链中的轻链可变域 (VL) 的重链可变域 (VH) (参见, 例如, EP404, 097; W093/11161; 以及 Hollinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444-6448)；(xi) 包含一对串联的 Fd 片段 (VH-CH1-VH-CH1) 的“线性抗体”，其连同互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区 (Zapata 等人, Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062; 以及美国专利号 5, 641, 870)。

[0213] 单链抗体可以是具有抗原结合能力并包含与免疫球蛋白轻链和重链的可变区同源或类似的氨基酸序列的单链复合多肽, 即连接的 V_H-V_L 或单链 Fv (scFv)。

[0214] 如本文所用的“中和抗体”是指具有针对特定受体或配体靶的抗原结合位点的分子, 能够降低或抑制 (阻断) 活性或通过受体的信号传导, 如根据本说明书通过体内或体外检验确定的。

[0215] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本同质的抗体群, 即, 组成群的单个抗体除了可以以较少量存在的可能天然发生的突变之外是相同的, 获得的抗体。单克隆抗体是针对单个抗原高度特异性的。此外, 相比典型地包含针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制品 (preparation), 每种单克隆抗体都针对抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆”不应被解释为需要通过任何特定方法制备抗体。mAb 可通过本领域技术人员已知的方法获得。例如, 待根据本发明使用的单克隆抗体可通过 Kohler 等人, Nature 1975, 256, 495 首次描述的杂交瘤方法来制备, 或可通过重组 DNA 方法来制备 (参见, 例如, 美国专利号 4, 816, 567)。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson 等人, Nature 1991, 352, 624-628 或 Marks 等人, J. Mol. Biol., 1991, 222:581-597 描述的技术从噬菌体抗体文库中分离。

[0216] 本发明的 mAb 可以是包含 IgG、IgM、IgE、IgA 的任何免疫球蛋白种类。产生 mAb 的杂交瘤可在体外或体内培养。mAb 的高滴度可在体内制备获得, 其中将来自单个杂交瘤的细胞腹腔注射到 pristine-primed Balb/c 小鼠以产生含有高浓度的期望 mAb 的腹水液。同种型 IgM 或 IgG 的 mAb 可使用本领域技术人员熟知的柱层析方法从此类腹水液、或从培养物上清液中纯化。

[0217] 本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体以及此类抗体的片段, 只要它们呈现期望的生物学活性, 其中重链和 / 或轻链的部分与源自特定物种的抗体或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相应序列相同或与其同源, 而链的剩余部分与源自另一个物种的抗体或属于另一个抗体种类或亚类的抗体中的相应序列相同或与其同源 (美国专利号 4, 816, 567; 以及 Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。此外, 可进行互补决定区 (CDR) 移植以改变包括亲和力或特异性的抗体分子的某些特性。CDR 移植的非限制性

实例公开于美国专利 5, 225, 539。

[0218] 嵌合抗体是其不同部分源自不同的动物物种的分子, 诸如具有源自鼠 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的分子。具有基本来自人抗体(称为受体抗体)的可变区构架残基和基本来自小鼠抗体(称为供体抗体)的互补决定区的抗体还被称为人源化抗体。嵌合抗体主要被用于降低应用中的免疫原性和增加制备中的产量, 例如, 其中来自杂交瘤的鼠 mAb 具有较高的产量而在人中也具有较高的免疫原性, 则使得人/鼠嵌合 mAb 被使用。嵌合抗体及其制备方法是本领域已知的(例如, PCT 专利申请 W086/01533、W097/02671、W090/07861、W092/22653 以及美国专利 5, 693, 762、5, 693, 761、5, 585, 089、5, 530, 101 和 5, 225, 539)。

[0219] 非人(例如, 鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在大多数情况下, 人源化抗体是其中来自受者的高变区的残基被来自非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的高变区的残基所替代的具有期望特异性、亲和力和能力(capacity)的人免疫球蛋白(受者抗体(recipient antibody))。在某些情况下, 人免疫球蛋白的构架区(FR)残基被相应的非人残基所替代。此外, 人源化抗体可包含在受者抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步完善(refine)抗体的性能。通常, 人源化抗体将包含至少一个且典型两个可变域的基本全部, 其中全部或基本全部高变环都对应于非人免疫球蛋白的高变环, 并且全部或基本全部 FR 都是人免疫球蛋白序列的 FR。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)、通常地人免疫球蛋白的恒定区的至少部分。关于另外的详细描述, 参见 Jones 等人, Nature 1986, 321, 522-525; Riechmann 等人, Nature 1988, 332, 323-329; 以及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992, 593-596。

[0220] “人抗体”是具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列的抗体, 和/或已使用用于制备如本文公开的人抗体的任何技术制备的抗体。人抗体的该定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可使用本领域已知的各种技术制备人抗体。在一个实施方案中, 人抗体选自噬菌体文库, 其中该噬菌体文库表达人抗体(Vaughan 等人, Nature Biotechnology 1996, 14, 309-314; Sheets 等人, PNAS(USA), 1998, 95, 6157-6162); Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 1991, 227, 381; Marks 等人, J. Mol. Biol., 1991, 222, 581)。人抗体还可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物例如小鼠中来制备, 其中所述小鼠的内源性免疫球蛋白基因已被部分或完全失活。当攻击(challenge)时, 观察到人抗体产生, 其在所有方面都非常类似于在人中观察到的, 包括基因重排、组装和抗体谱(antibody repertoire)。该方法被描述于, 例如, 美国专利号 5, 545, 807、5, 545, 806、5, 569, 825、5, 625, 126、5, 633, 425、5, 661, 016, 以及以下科学出版物: Marks 等人, Bio/Technology 10:779-783(1992); Lonberg 等人, Nature 368:856-859(1994); Morrison, Nature 368:812-13(1994); Fishwild 等人, Nature Biotechnology 14:845-51(1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826(1996); Lonberg 和 Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93(1995)。可选地, 可通过永生化的产生针对靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞(此类 B 淋巴细胞可从个体回收或可在体外被免疫)来制备人抗体。参见, 例如, Cole 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985); Boerner 等人, J. Immunol., 147(1):86-95(1991); 以及美国专利号 5, 750, 373。

[0221] 术语“单链可变片段(scFv)”意指用短的(通常是丝氨酸、甘氨酸)接头连接在一起的免疫球蛋白的重链和轻链的可变区的融合。单链抗体可以是具有抗原结合能力并包含与免疫球蛋白轻链和重链的可变区同源或相似的氨基酸序列的单链复合多肽(连接的 V_H - V_L 或单链 Fv(scFv))。 V_H 和 V_L 二者都可以拷贝天然单克隆抗体序列,或链的一条或两条可以包含美国专利 5,091,513 中描述的 CDR-FR 构建体类型,该专利的全部内容通过引用并入本文。与轻链和重链的可变区类似的单独的多肽通过多肽接头维持在一起。制备此类单链抗体特别是其中编码 V_H 链和 V_L 链的多肽结构的 DNA 是已知的方法,可以根据例如美国专利 4,946,778、5,091,513 和 5,096,815 中描述的方法来实现,这些专利各自的全部内容都通过引用并入本文。

[0222] 如本文所用的,“具有抗体的抗原结合部分的分子”旨在不仅包括任何同种型和由任何动物细胞系或微生物产生的完整免疫球蛋白分子,而且包括其抗原结合反应部分,包括但不限于,Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、其重链和/或轻链的可变部分、Fab 微型-抗体(参见 W093/15210、美国专利申请 08/256,790、W096/13583、美国专利申请 08/817,788、W096/37621、美国专利申请 08/999,554,这些专利申请的全部内容都通过引用并入本文)、二聚的双特异性微型-抗体(参见 Muller 等人,1998)和掺入此反应部分的嵌合或单链抗体、以及其中此抗体反应部分已被物理插入的分子或细胞的任何其他类型,诸如嵌合 T 细胞受体或具有此受体的 T 细胞,或通过包含此反应部分的分子的部分开发以递送治疗部分的分子。可通过任何已知技术包括但不限于酶解、肽合成或重组技术提供此类分子。

[0223] 根据本发明的抗体可通过使用常规方案向动物、优选非人动物施用 CEACAM1、或具有表位的片段、类似物或表达的细胞获得。对于单克隆抗体的制备,可使用本领域已知的提供通过连续细胞系培养物产生抗体的任何技术。实例包括各种技术,诸如以下文献中的那些技术:Kohler, G. 和 Milstein, C., Nature 256:495-497 (1975); Kozbor 等人, Immunology Today 4:72 (1983); Cole 等人., pg. 77-96 于 MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. (1985) 中。

[0224] 除了体内产生抗体的常规方法之外,可使用噬菌体展示技术体外产生抗体。重组抗体的此制备相比常规的抗体制备要快的多,并且它们可针对大量抗原被产生。此外,当使用常规方法时,许多抗原被证明是非免疫原性或剧毒的,并因此不能被用于在动物中产生抗体。此外,重组抗体的亲和力成熟(即,增强亲和力和特异性)是非常简单并相对快的。最后,在一个选择过程中就可产生大量的针对特定抗原的不同抗体。为了产生重组单克隆抗体,人们可使用所有基于展示文库的不同方法以产生具有不同抗原识别位点的抗体的大的库(pool)。此文库可以以下面数种方式制备:人们可以通过克隆重链种系基因库中合成的 CDR3 区产生合成谱(synthetic repertoire),并因此产生大的抗体谱,具有各种特异性的重组抗体片段可从其中选择。人们可使用人类的淋巴细胞库作为用于抗体文库构建的起始材料。构建人 IgM 抗体的幼稚谱(naive repertoires)并因此创建大的多样性的人类文库是可能的。这种方法已被广泛地成功用于选择针对不同抗原的大量抗体。用于噬菌体文库构建和重组抗体选择的方案在熟知的参考文本 Current Protocols 于 Immunology, Colligan 等人(编著.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), 第 17 章, 第 17.1 节中提供。

[0225] 非人抗体可通过本领域已知的任何方法被人源化。在一种方法中,非人互补决定

区 (CDR) 被插入人抗体或共有抗体构架序列中。然后, 可将另外的修改引入抗体构架以调节亲和力和免疫原性。

[0226] 例如, Queen 等人的美国专利 5, 585, 089 公开了人源化免疫球蛋白以及制备其的方法, 其中人源化免疫球蛋白包含来自供体免疫球蛋白的互补决定区 (CDR) 以及来自人受体免疫球蛋白重链和轻链的重链和轻链可变区构架, 其中所述人源化免疫球蛋白包含来自供体免疫球蛋白构架的 Kabat 和 Chothia CDR 之外的氨基酸, 其中所述供体氨基酸取代受体免疫球蛋白重链或轻链构架中的相应氨基酸。

[0227] Winter 的美国专利 5, 225, 539 还公开了改变的抗体或其抗原结合片段以及制备其的方法, 其中抗体或抗原结合片段的可变域具有第一免疫球蛋白重链或轻链可变域的构架区和第二免疫球蛋白重链或轻链可变域的互补决定区, 其中所述第二免疫球蛋白重链或轻链可变域在抗原结合特异性、抗原结合亲和力、物种、种类或亚类方面不同于所述第一免疫球蛋白重链或轻链可变域。

[0228] 与本发明的抗体特异性免疫反应的抗 - 独特型抗体也被包括。

[0229] 用于单链抗体制备的技术 (美国专利号 4, 946, 778) 可被调整以制备针对本发明的多肽或多核苷酸的单链抗体。并且, 转基因小鼠或其他生物体诸如其他哺乳动物, 可被用于表达针对本发明的多肽或多核苷酸免疫特异性的人源化抗体。

[0230] 可选地, 噬菌体展示技术可被用于从筛选具有抗 -CEACAM1 的人 PCR 扩增的淋巴细胞的 v- 基因的谱或从文库选择对本发明的多肽具有结合活性的抗体基因 (McCafferty, 等人, 1990, Nature348, 552-554; Marks, 等人, 1992, Biotechnology10, 779-783)。这些抗体的亲和力也可通过例如链改组 (chain shuffling) 被改善 (Clackson 等人, 1991, Nature352:628)。

[0231] 可采用上述抗体以分离或鉴定表达多肽的克隆, 以通过例如亲和层析纯化多肽。

[0232] 本发明还提供了根据本发明的抗体分子的保守的氨基酸变体。还可制备保存编码的蛋白的总体分子结构的根据本发明的变体。考虑到构成公开的蛋白产物的单个氨基酸的性质, 一些合理的取代将被本领域技术人员认可。可基于例如涉及的残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和 / 或两亲性的性质方面的相似性进行氨基酸取代, 即“保守取代”。

[0233] “疾患”是指将从抗体的治疗受益的任何病症。这包括慢性和急性病患或疾病, 包括使哺乳动物易患所讨论的疾患的那些病理病症。本文待被治疗的疾患的非限制性实例包括良性肿瘤和恶性肿瘤; 白血病和淋巴样恶性肿瘤; 神经元疾患、神经胶质疾患、星形细胞疾患、下丘脑疾患和其他腺疾患、巨噬细胞疾患、上皮疾患、基质疾患和囊胚腔疾患; 以及炎症、血管发生、免疫性疾患或通透性过高状态。

[0234] 术语“治疗有效量”是指有效治疗哺乳动物中的疾病或疾患的药物的量。在癌症的情况下, 药物的治疗有效量可减少癌细胞的数目; 减小肿瘤大小; 抑制 (即, 一定程度的减缓并优选地停止) 癌细胞浸润到周围器官中; 抑制 (即, 一定程度的减缓并优选地停止) 肿瘤转移; 一定程度上抑制肿瘤生长; 和 / 或一定程度上减轻与疾患相关的一种或多种症状。在一定程度上, 药物可预防现有癌细胞生长和 / 或杀伤现有癌细胞, 其可以是抑制细胞生长的和 / 或细胞毒性的。关于癌症的治疗, 体内疗效可通过例如评价存活时间、疾病进展时间 (TTP)、应答率 (RR)、应答持续时间、和 / 或生活质量被测量。

[0235] “治疗”是指治疗性处理和预防性或防范性措施两方面。需要治疗的人包括已经患

有疾患的人以及其中疾患待被预防的人。

[0236] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常特征为不受调控的细胞生长的生理病症。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更特定的实例包括黑色素瘤、肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌、胰腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、卵巢癌、子宫癌、肉瘤、胆管癌、或子宫内膜癌。

[0237] 根据一些实施方案,本发明的抗体被附着至细胞毒性部分或治疗部分。细胞毒性部分或治疗部分可以是,例如,细胞毒性部分、毒性部分、细胞因子部分、双特异性抗体部分、细胞毒素、趋化因子、化学疗法、促凋亡、干扰素、放射性部分、或其组合,其实例在下文提供。

[0238] 术语“抗肿瘤组合物”是指可用于治疗癌症的组合物,所述组合物包括能够抑制或预防肿瘤生长或功能和/或造成肿瘤细胞破坏的至少一种活性治疗剂。适于用于治疗癌症的抗肿瘤组合物的治疗剂包括但不限于,化学治疗剂、放射性同位素、毒素、细胞因子诸如干扰素、以及靶向与肿瘤细胞相关的细胞因子、细胞因子受体或抗原的拮抗剂。优选地,治疗剂是化学治疗剂。

[0239] 如本文所用的,术语“诊断”是指确定病理的存在或不存在、分类病理或症状、确定病理的严重程度、监测病理进展、预测病理结果和/或恢复前景。

[0240] 药理学

[0241] 本发明还涉及用于人类医疗用途的药物制剂,所述药物制剂包含识别 CEACAM1 的至少一种抗体作为活性剂,用于制备用于治疗、诊断或预防本文所述的各种病症的治疗或诊断组合物。

[0242] 在此类药物和医药制剂中,活性剂优选与一种或多种药学上可接受的载体以及任选任何其他治疗成分一起使用。载体在与制剂的其他成分是相容的且不会过度有害于其接受者的意义下而言必须是药学上可接受的。活性剂以有效实现如上所述的期望的药理学作用的量被提供,并以适于实现期望的日剂量的量被提供。

[0243] 通常,包含抗体的抗原结合部分或包含包括拟肽(peptidomimetic)的另一种多肽的本发明的分子将被悬浮于无菌盐水溶液中用于治疗用途。药物组合物可选地可被配制以控制活性成分(包含抗体的抗原结合部分的分子)的释放,或以延长其在患者系统中的存在。许多适合的药物递送系统是已知的并包括,例如,可植入的药物释放系统、水凝胶、羟甲基纤维素、微胶囊、脂质体、微乳剂、微球等。控释制品可通过使用聚合物复合或吸附根据本发明的分子而制备。例如,生物相容的聚合物包括乙烯-醋酸乙烯共聚物的基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酸酐共聚物的基质。根据本发明的分子,即抗体或抗体片段从此类基质的释放速率,取决于该分子的分子量、基质内的分子的量、以及分散的颗粒的大小。

[0244] 本发明的药物组合物可通过任何适合的方法,诸如口服、局部、鼻内、皮下、肌内、静脉内、动脉内、关节内、病灶内或胃肠外施用。通常,静脉内(i.v.)、关节内、局部或肠胃外施用将是优选的。

[0245] 对于本领域普通技术人员将明显的是,根据本发明的分子的治疗有效量将尤其取决于施用时间表、所施用分子的单位剂量、该分子是否与其他治疗剂联合施用、患者的免疫状态和健康、所施用的分子的治疗活性以及治疗医师的判断。如本文所用,“治疗有效量”是指经过一段时间后缓解与被治疗的疾患相关的一种或多种症状所需的分子的量。

[0246] 尽管本发明的分子的适合剂量取决于施用途径、分子的类型(多肽、多核苷酸、有机分子等)、患者的年龄、体重、性别或病症而变化,且最后应由医师确定,在口服施用的情况下,日剂量通常可以在约 0.01mg/kg 体重至约 500mg/kg 体重、优选约 0.01mg/kg 体重至约 50mg/kg 体重、更优选约 0.1mg/kg 体重至约 10mg/kg 体重之间。在肠胃外施用的情况下,日剂量通常可以在约 0.001mg/kg 体重至约 100mg/kg 体重、优选约 0.001mg/kg 体重至约 10mg/kg 体重、更优选约 0.01mg/kg 体重至约 1mg/kg 体重之间。日剂量可以以例如每日 1-4 次单独施用的典型方案被施用。施用的其他优选方法包括约 0.01mg/kg 体重至约 100mg/kg 体重的关节内施用。在例如 Goodman 和 Gilman 的: *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 第 8 版, Pergamon Press, 1990; 以及 Remington 的 *Pharmaceutical Sciences*, 第 17 版, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990 中描述了达到有效量中的各种考虑因素。

[0247] 组合化学治疗的适合的剂量方案是本领域已知的并在例如, Saltz 等人, *Proc ASCO*1999, 18, 233a 以及 Douillard 等人, *Lancet*2000, 355, 1041-7 中描述。

[0248] 将作为活性成分的本发明的分子溶解、分散或混合在药学上可接受的并与熟知的活性成分是相容的赋形剂中。适合的赋形剂是,例如,水、盐水、磷酸盐缓冲的盐水(PBS)、右旋糖、甘油、乙醇等以及其组合。其他适合的载体是本领域技术人员熟知的。此外,如果需要,组合物可包含少量的辅助物质诸如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂。

[0249] 根据本发明的药物组合物可与抗肿瘤组合物一起施用。根据特定实施方案,抗肿瘤组合物包含至少一种化学治疗剂。可以与根据本发明的抗体一起施用或单独施用的化学治疗剂,可包括本领域已知的呈现抗癌活性的任何此类剂,包括但不限于:米托蒽醌、拓扑异构酶抑制剂、纺锤体毒素长春药类(vincas):长春碱、长春新碱、长春瑞滨(紫杉酚(taxol))、紫杉醇、多西他奇;烷化剂:氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、美法仑、异环磷酰胺;氮甲喋呤;6-巯基嘌呤;5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨;鬼臼毒素类:依托泊苷、伊立替康、拓扑替康、达卡巴嗪;抗生素类:多柔比星(阿霉素)、博来霉素、丝裂霉素;亚硝基脲类:卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀、表柔比星、伊达比星、柔红霉素;无机离子类:顺铂、卡铂;干扰素、天冬酰胺酶;激素类:他莫昔芬、亮丙瑞林、氟他胺和醋酸甲地孕酮。

[0250] 根据特定实施方案,化学治疗剂是选自以下组成的组:烷化剂、抗代谢物、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物及相关抑制剂、长春花生物碱、表鬼臼毒素、抗生素类、L-天冬酰胺酶、拓扑异构酶抑制剂、干扰素、铂配位络合物(platinum coordination complex)、蒽醌取代的脲、甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、肾上腺皮质类固醇、黄体制剂(progestin)、雌激素、抗雌激素、雄激素、抗雄激素和促性腺激素释放激素类似物。根据另一个实施方案,化学治疗剂选自以下组成的组:5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸(LV)、伊立替康、奥沙利铂、卡培他滨、紫杉醇和多西他奇。两种或多种化学治疗剂可以以混合物被使用以与抗-CEACAM1 抗体的施用联合被施用。

[0251] 下列实施例旨在说明如何制备和使用本发明的化合物和方法,且不得以任何方式被解释为限制。现在,尽管本发明将结合其特定实施方案被描述,但明显的是,许多修改和变化对本领域技术人员将是明显的。因此,旨在包含落入所附权利要求的精神和宽范围内的所有此类修改和变化。

实施例

[0252] 用于制备和表征抗体的方法是本领域熟知的。下面的描述是为了例证用于根据本发明的抗-CEACAM1 抗体的制备、表征和使用的技术。

[0253] 通常,本文使用的术语以及本发明使用的实验室方法包括分子、生物化学、微生物学和重组 DNA 技术。此类技术在文献中被充分解释。参见,例如,“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook 等人,1989;“Current Protocols in Molecular Biology”第 I-III 卷 Ausubel, R. M., 编著 1994; Ausubel 等人,“Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland 1989; Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York 1988; Watson 等人, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren 等人(编著)“Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, 第 1-4 卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1998; 如以下中列出的方法: 美国专利号 4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659 和 5,272,057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, 第 I-III 卷 Cellis, J. E., 编著 1994; “Current Protocols in Immunology”第 I-III 卷 Coligan J. E., 编著 1994; Stites 等人(编著), “Basic and Clinical Immunology”(第 8 版), Appleton & Lange, Norwalk, CT 1994; Mishell 和 Shiigi(编著), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., New York 1980; 可用的免疫检验在专利和科学文献中被广泛描述, 参见, 例如, 美国专利号 3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771 和 5,281,521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., 编著(1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D. 和 Higgins S. J., 编著 1985; “Transcription and Translation” Hames, B. D. 和 Higgins S. J., 编著 1984; “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., 编著 1986; “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., 1984 以及 “Methods in Enzymology” 第 1-317 卷, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA 1990; Marshak 等人, “Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual” CSHL Press 1996。其中的方法被认为是本领域熟知的。

[0254] 实施例 1: 识别 CEACAM 的单克隆抗体的制备及表征

[0255] 以纳摩尔浓度在体外有效地阻断 CEACAM1 的嗜同性相互作用的单克隆抗体通过用重组人 CEACAM1 蛋白免疫小鼠被制备。产生 CEACAM1 阻断抗体的杂交瘤被制备并被再克隆数次以生产稳定的克隆。

[0256] 识别 CEACAM1 的一种示例性单克隆抗体的 DNA 和氨基酸序列由 Fusion Antibodies Ltd 确定。使用 RNA 提取方案从杂交瘤细胞沉淀提取 mRNA 并从沉淀提取总 RNA。采用寡聚(dT)引物通过逆转录从 RNA 制备 RT-PCR-cDNA。使用可变域引物的 PCR 反应被用于扩增单克隆抗体 DNA 的 VH 区和 VL 区二者。

[0257] VH 和 VL 产物被克隆入 Invitrogen 测序载体 pCR2.1 并被转化入 TOP10 以确认阳性转化子。挑选被选择的菌落并通过测序分析。所得 DNA 和氨基酸序列被确定为:

[0258] 可变重链 (VH)

[0259] VH 结构域的 DNA 序列：

[0260] ATGGGATGGACCTTGGTCTTTCTCTTTCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTTCACTCCCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCACTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCTTCTACTAATAACTTGATAGAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGAAGTGGTGATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAACACTGCCATACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGATTACTACGGTGGCTTTGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCCGTTTATCCCTTGGCCCCTGGAAGCTTGGG (SEQ ID NO:25)

[0261] VH 结构域的氨基酸序列：

[0262] QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNNLIEWVKRPGQGLEWIGVINPGSGDTNYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARGDYGGFAVDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:26)

[0263] 可变轻链 (VL)

[0264] VL 结构域的 DNA 序列：

[0265] ATGGTGTCTCAGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGAACCAGATGTGATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGACAAGTCAGGACAT TGGCAATTATTTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTAC ACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAA GAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAAACAGGGTAAAGCCTTCCTCGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGTTGGAAT CAAACCGGTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAG TCGTGTGCTTCTTGAACAATTCTACCCCAGAGA (SEQ ID NO. 27)

[0266] VL 结构域的氨基酸序列：

[0267] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKSLPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO28)

[0268] N-末端氨基酸测序和质谱分析被用于确认 VL 和 VH 的身份(identities)。

[0269] 实施例 2 :N-末端氨基酸序列的证实

[0270] 通过埃德曼降解法 (Edman degradation method) 进行轻链的氨基酸序列分析,以证实该单克隆抗体之一的轻链的 N-末端序列。所得 N-末端序列为 :DIQMTQTTSS (SEQ ID NO:29),其与基于 DNA 序列的 N-末端的预期序列一致。

[0271] 实施例 3 :互补决定区 (CDR) 序列

[0272] 使用两种不同算法的方法鉴定 CDR 区段：

[0273] 1. IMGT 算法 (Lefranc 等人,1999,Nucleic Acids Research, 27, 209-212)；

[0274] 2. KABAT 算法 (Wu TT 和 Kabat E. A., 1970, J. Exp. Med. 132, 211-250)。

[0275] 表 1 概述了使用这两种方法确定的 CDR 序列以及使用这两种方法鉴定的序列的最小共有序列和合并的序列。

[0276] 表 1. CDR 序列

[0277]

	VH1	VH2	VH3	VL1	VL2	VL3
IMGT	GYAFTNNL (SEQ ID NO: 13)	INPGSGDT (SEQ ID NO: 14)	ARGDYYGGF (SEQ ID NO: 15)	QDIGNY (SEQ ID NO: 16)	YTSTR (SEQ ID NO: 17)	QQGKSLPR T (SEQ ID NO: 18)
KABAT	NNLIE (SEQ ID NO: 7)	VINPGSGDTN YNEKFKG (SEQ ID NO: 8)	GDYYGGFAV DY (SEQ ID NO: 9)	RTSQDIGNYL N (SEQ ID NO: 10)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 11)	QQGKSLP (SEQ ID NO: 12)
合并的 序列	GYAFTNNLIE (SEQ ID NO: 19)	VINPGSGDTN YNEKFKG (SEQ ID NO: 20)	ARGDYYGGF AVDY (SEQ ID NO: 21)	RTSQDIGNYL N (SEQ ID NO: 22)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 23)	QQGKSLPR T (SEQ ID NO: 24)
共有序 列	X ₁ NNLX ₂ * (SEQ ID NO: 1)	INPGSGDT (SEQ ID NO: 2)	GDYYGGFAV DY (SEQ ID NO: 3)	QDIGNY (SEQ ID NO: 4)	YTSTR (SEQ ID NO: 5)	QQGKSLP (SEQ ID NO: 6)

[0278] * 其中 X₁ 不存在或是 Thr (T) 且 X₂ 不存在或是 Ile (I)

[0279] 实施例 4: 嵌合单克隆抗体的设计和制备

[0280] 可变重链和轻链 (SEQ ID NO25 和 27) 的 DNA 序列被用于构建嵌合抗体, 该嵌合抗体包含人 IgG1 同种型恒定域和恒定轻链 (CL) 人 Igκ 结构域。尽管亲本单克隆抗体是小鼠 IgG1 且其人等同物是 IgG4, 人 IgG1 构架被用于构建本发明的一些嵌合抗体。轻链和重链的 DNA 序列被合成并被克隆到表达载体 pFUSION-DHFR1 中分别的启动子下。

[0281] CHO 细胞的瞬时转染

[0282] 于 37℃, 将悬浮的 CHO 细胞 (Invitrogen, UK) 在 250 和 500ml 的通风锥形瓶 (vented Erlenmeyer flask, Corning, Netherlands) 中的 Pro CHO5 无血清培养基 (Lonza, UK) 中, 以 130rpm、8% 的 CO₂ 下培养。于转染当天, 以 2.0×10⁶ 个细胞 /ml 的密度接种细胞, 使用聚乙烯亚胺 (Polysciences Inc, PA, US) 将 2.5g/ml 的质粒 DNA (Geneart, Germany) 转染到细胞内。将转染的培养物在 130rpm、8% 的 CO₂、37℃ 下持续 9-10 天培养。在培养物收获之前, 将上清液在 4,000rpm 下持续 40 分钟旋转。

[0283] 两个单独批次中的培养基被收获并纯化。将培养基通过 0.8μm 的 gyrodisc 过滤器过滤, 并使用 1ml 的蛋白 A 柱纯化。通过 FPLC 纯化抗体。320ml 样品以 0.2mls/min 被装载过夜, 并在 17 个小时后增加到 0.5mls/min。用 pH3.0 的 Gly/HCL 洗脱缓冲液洗脱之前, 用 PBS 以 0.5mls/min 洗涤 / 平衡柱。观测到良好的峰并通过 Bradford 检验定量级分 1 至 5。Bradford 检验显示蛋白存在于级分 1-4 中, 其被汇集并在 1 升的 PBS 中透析过夜以进行缓冲液交换 (4℃, 120RPM)。对于 4ml 样品, 观测到 1.823mg/ml 的浓度, 因此约 7.32mg 的总产量被纯化。在第二批中, Bradford 检验的结果显示蛋白存在于级分 1-3 中, 其被汇集并被透析。从 320ml 条件培养基中纯化约 7.32mg 的总产量 (A 批)。从 910ml 培养物中纯化约 15.74mg 的总产量 (B 批)。总的瞬时表达产生约 23mg 的纯化的蛋白。浓度确定和 SDS/PAGE 分析后, 产生 19.65mg 的嵌合抗体。将纯化的抗体样品通过 SDS-PAGE 分析以评价纯度。图 1 描绘了 SDS-PAGE 凝胶图像, 显示嵌合抗体的轻链和重链。MS 分析显示, CM10 重链的分子量为 48.6KDa 且轻链的分子量为 23.3KDa。

[0284] 指定为 CM10 的所得抗体,具有以下重链和轻链氨基酸序列:

[0285] 重链氨基酸序列(无信号肽):

[0286]

QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNNLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSG
DTNYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARGDYYGGFAVDYWG

QGTSVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMTSRTPEV
TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:30)

[0287] 可变域呈黑体,根据 IMGT 的 CDR 以下划线标出。

[0288] 轻链氨基酸序列(无信号肽):

[0289]

DIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSG
VPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQOGKSLPRTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

[0290] 可变域呈黑体,根据 IMGT 的 CDR 以下划线标出。

[0291] 含有指定为 CM10 的示例性嵌合单克隆抗体的重链和轻链的 DNA 序列的质粒于 2011 年 9 月 28 日以 ATCC 保藏号 PTA-12130 被保藏。

[0292] 实施例 5:嵌合单克隆抗体 CM10 的亲合力表征

[0293] CM10 与纯化的人 CEACAM1 的结合

[0294] 使用纯化的人 CEACAM1 在 ELISA 检验中测试了 CM10 与人 CEACAM1 的结合特异性。使用 CM10 的 23 份两倍稀释液的间接 ELISA 被用于产生特异性结合曲线。图 2 中所示的结果代表来自三次重复的平均 O. D. $\pm$ SE。从其他 10 个独立实验获得类似的结果。

[0295] 为了测试该嵌合处理是否影响抗体的结合亲和力,通过竞争性 ELISA 和 BIAcore 分析评价嵌合抗体 CM10 的 CEACAM1 结合。

[0296] 关于 ELISA,重组纯化的人 CEACAM1 被结合到平板上。化学生物素化的 CM10 以恒定的浓度被用作示踪剂,并与渐增浓度的未标记的 CM10 竞争。在孵育和洗涤后,用 StrepAvidin-HRP 缀合物显影平板并与作为 HRP 底物的 TMB 进行显色反应。

[0297] 使用 50ng/ml 的示踪剂,检测的 CM10 的表观亲和力值为 1.2-1.6nM。

[0298] BIAcore 分析

[0299] 每个抗体都通过 NHS-EDC 偶联化学被固定到 Biacore3000 仪器的 CM5 传感器芯片的单通道上。

[0300] 不同浓度(0.19nM、0.39nM、0.78nM、1.56nM、3.12nM、6.25nM、12.5nM 和 25nM)的重组 CEACAM1 以 50 μ l/min 流经芯片。电泳缓冲液为 PBS-ET (10mM p- 缓冲液 pH7.4、150mM NaCl、3.4mM EDTA 和 0.005% 吐温 20)。使用 BIAevaluation 软件 3.0 分析数据,且由 3 个独立的实验计算的 CM10-CEACAM1 亲和力的 KD 值为 (KD):4.07-5.05nM (平均 4.56nM)。

[0301] CM10 与膜结合的内源性 CEACAM1 的结合特异性

[0302] 为了测试 CM10 与膜结合的内源性 CEACAM1 的结合,进行 FACS 分析。筛选一些人黑色素瘤细胞系的 hCEACAM1 表达,526me1 细胞系被用作阳性对照且 003me1 被用作阴性对照系。用 CM10 染色 526me1、003me1、Malme3M、Skme15 和 A375 细胞系。空白直方图代表 mAb 染色,而较暗的直方图代表背景染色。每个直方图中,至少 5000 个细胞被用于分析 CEACAM1 表达。

[0303] 如从图 3 可领会的,CM10 检测到膜结合的内源性 CEACAM1。Malme3M 和 Skme15 细胞系显示 CEACAM1 的高表达,而在 A375 黑色素瘤细胞系中未能够检测到表达。

[0304] 结论

[0305] 成功地实施了嵌合处理。嵌合抗体以 1.4nM 的亲和力结合 CEACAM1,如通过两种不同的方法验证的。测试 CM10 与各种黑色素瘤细胞系的结合特异性的 FACS 分析显示,该抗体保留了其生物结合能力。

[0306] 实施例 6. 评价 CM10 的活性

[0307] 阻断细胞-细胞相互作用的检验

[0308] 确定抗 CEACAM1mAb 阻断 CEACAM1 细胞-细胞相互作用的能力的检验,使用了被包含融合到小鼠 α -链的人 CEACAM1 的细胞外部分的嵌合分子 (BW/CEACAM1) 稳定转染的鼠 T 细胞 (BW 细胞)。CEACAM1 通过 BW/CEACAM1 细胞与稳定转染了 CEACAM1 的 B 细胞 (221/CEACAM1) 的共孵育的接合,导致通过 α -链介导的小鼠 IL-2 的分泌。

[0309] 将效应细胞(表达 CEACAM1 的 BW)在 CM10 或 PBS 的存在下在冰上持续 30 分钟孵育。孵育后,效应细胞与表达 CEACAM1 的靶细胞 (221+) 或对 CEACAM1 阴性的靶细胞 (221-) 过夜共培养。小鼠 IL-2 分泌通过商业 ELISA 被测定。图 4 中示出的结果表示来自重复孔的平均 IL-2 分泌。如图中所示,当加入 CM10 后,CEACAM1 介导的 T 细胞和 B 细胞之间的细胞-细胞相互作用以剂量依赖的方式被消除,如通过 IL-2 分泌的阻断指示的。

[0310] 体外免疫调节杀伤检验

[0311] T 细胞杀伤检验:黑色素瘤反应性 T 细胞 TIL (肿瘤浸润淋巴细胞 (Tumor Infiltrating Lymphocyte),源自黑色素瘤患者)可破坏具有匹配的 HLA 的黑色素瘤细胞。TIL 购自 Shiba 医疗中心的 ELLA Institute 并根据临床实验室方案培养。CFSE-标记的黑色素瘤细胞 (Skme15) 与 CM10 (10 μ g/ml) 在冰上持续 30 分钟预孵育。添加 TIL 用于 37°C 下另外的 10 小时孵育。杀伤的百分比通过 CFSE 标记的黑色素瘤细胞的 PI-染色被确定。效应子与靶的比为 5:1。在另一个检验中,CFSE 标记的黑色素瘤细胞与 CM10 在冰上持续 30 分钟预孵育。添加 TIL 用于 37°C 下另外的 5 小时孵育。杀伤的百分比通过 CFSE 标记的黑色素瘤细胞的 PI-染色被确定。结果表示来自每个处理的三个重复的孔的 % 特异性杀伤的平均值 $\pm$ SE。效应子与靶的比为 5:1。

[0312] 图 5 中描述的结果显示, T 细胞的杀伤活性在抗 CEACAM1mAb, CM10 的存在下被增强。此外,在 TIL 不能够杀伤任何黑色素瘤细胞的检验条件中(短孵育或低 TIL 比),CM10 的添加刺激了 TIL 的杀伤活性,而用 IgG1 同种型对照未能够检测到杀伤(图 6)。

[0313] NK 细胞杀伤检验

[0314] 自然杀伤细胞 (NK 细胞) 是可通过释放称为穿孔素和颗粒酶的小蛋白破坏恶性肿瘤细胞的一类细胞毒性淋巴细胞,穿孔素和颗粒酶通过细胞凋亡导致靶细胞死亡。NK 细胞

可通过一些不同的通路被激活,其中靶细胞中不存在细胞因子、FC受体、以及MHC类1。靶细胞上的针对各种配体的一些激活与抑制受体调节NK细胞的最终的细胞毒性活性。NK92MI细胞是购自ATCC的独立于IL-2的NK细胞系。

[0315] NK92MI与CM10(0.2 μ g/ml、1 μ g/ml或5 μ g/ml)或同种型匹配对照Ab(5 μ g/ml)在37℃持续30分钟孵育,添加表达CEACAM1的靶细胞持续另外的5小时。杀伤的百分比通过经典LDH释放检验被确定。结果表示来自每个处理的三个重复孔的%细胞毒性的平均值 $\pm$ SE。效应子与靶的比为2.5:1。

[0316] 图7中描述的检验显示,与PBS或同种型匹配的IgG相比,CM10强烈增强NK细胞对表达CEACAM1的2种黑色素瘤细胞系(SKMe15和G361)的杀伤活性。在2种其他的CEACAM1+黑色素瘤细胞系中和在不同的效应子与靶(E:T)的比下显示类似的结果。

[0317] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

[0318] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)是免疫系统的效应细胞(主要是NK细胞)借以主动裂解已被特定抗体结合的靶细胞的细胞介导的免疫性机制。为了评价CM10的安全性,我们已进行了初步ADCC检验,其中在3个黑色素瘤细胞系(CEACAM1阳性细胞系:G361和SKme15和CEACAM1阴性细胞系:SKme128)中检查了CM10诱导ADCC的能力。

[0319] 相比于阳性对照抗体(在预实验中显示ADCC活性的抗CEACAM1的多克隆Ab),检查CM10诱导ADCC的能力。同种型匹配的抗体用作阴性对照(hIgG1K)。结果表明,CM10在所测试的环境中不会触发ADCC。

[0320] 补体依赖性细胞毒性

[0321] 补体蛋白在血液中被发现,并且其作用“补充”抗体的工作。补体依赖性细胞毒性(CDC)是其中结合到靶细胞表面的抗体固定补体,导致在靶细胞膜上创建孔并最终导致细胞裂解的膜攻击复合物的组装的杀伤细胞的机制。

[0322] 为了评价CM10的安全性,在表达CEACAM1的两种黑色素瘤细胞系(SKme128和SKme15)中检查CM10诱导CDC的能力。商业汇集的人血清被用作补体蛋白来源。与Daudi细胞孵育的商业单克隆抗体利妥昔单抗被用作该检验的阳性对照且商业IgG1K被作为CM10的同种型匹配对照。将黑色素瘤细胞系-SKMEL5和SKMEL28或阳性对照Daudi细胞分别与CM10或利妥昔单抗在室温下持续1小时孵育,随后以50%的终浓度添加正常人血清用于在加湿培养箱中孵育另外的2小时(37℃,5%的CO₂)。裂解的细胞的百分数通过碘化丙啶(PI)染色来确定。结果(图14)表示一式两份进行的2个单独实验的平均值 $\pm$ S.E,显示CM10在所测试的环境中并没有诱导CDC裂解。

[0323] 体内功效实验

[0324] 本实验的目的是测试CM10对体内黑色素瘤细胞的直接效应,以及评价在异种移植环境中缺失的免疫调节效应。

[0325] 异种移植实验的校准

[0326] 使用了购自“ATCC”的CEACAM1阳性人黑色素瘤细胞系(SKme15)和来自“Harlan laboratories”的鼠龄匹配的小鼠NOD-SCID。进行校准检验以监测肿瘤生长并找到最佳TIL方案。SKme15黑色素瘤细胞经SC(皮下)注射到SCID-NOD小鼠并通过物理测量监测肿瘤体积。当肿瘤体积达到100mm³时,将小鼠分为5个随机的组。以两个不同的浓度IT(肿瘤内)注射或以一个浓度(20 $\times$ 10⁶/小鼠)IV(Intra Venus,静脉内)注射TIL,而一组

仅接受一次注射,且第二组接受 2 次 TIL 注射。每个 TIL 注射后为 5 天的 hIL-2 施用。校准实验显示,TIL 的 IV 注射相比 IT 施用对肿瘤大小具有较高的影响。另外,重复的 TIL 方案提供了相对于单次注射更好的肿瘤生长抑制,如可从 T 细胞半衰期预测的。基于该数据,TIL 将在以后的异种移植实验中通过 IV 注射每 10 天施用一次。

[0327] CM10 的体内免疫调节、抗癌活性

[0328] 将人 CEACAM1 阳性 SKme15 黑色素瘤细胞 SC 注射到 SCID-NOD 小鼠。当肿瘤达到约 100mm^3 的体积时,将小鼠随机分配到以下治疗组之一:a) 每周一次 IV 注射 PBS;b) 每周一次 IV 注射 0.45mg 的 CM10;c) 3 次 IV 注射 20×10^6 个抗肿瘤反应性人 T 细胞 (TIL) 以及每周一次 IV 注射 PBS;d) 3 次 IV 注射 20×10^6 个抗肿瘤反应性人 T 细胞以及每周一次 IV 注射 0.45mg 的 CM10。对实验设置不知情的工作人员每周 2-3 次测量肿瘤的体积。图 8 的结果表示来自 6-10 只小鼠/组的平均肿瘤体积 $\pm$ SE。箭头表示施用时间(CM10 圆形、TIL 三角形、CM10 和 TIL 空心正方形)。如所显示的,使用单独的 CM10 或单独的 TIL 观察到肿瘤生长的中等抑制,但当相比于对照治疗时,差异没有达到统计学显著性。引人注目地,过继性人 T 细胞转移与 CM10 注射的联合表现出显著的协同作用,并强烈抑制异种植物的生长。这一观察结果与显示 CM10 对 T 细胞杀伤的增强作用的体外数据(图 5 和 6)一致。

[0329] 在 TIL 存在下用 CM10 治疗的组中观察到显著的生长抑制。这些结果加强抗 CEACAM1mAb 在不同细胞系中的免疫刺激效应,并显示 CM10 可被用作有希望的免疫调节抗体。这一观察结果与显示 CM10 通过 T 细胞对黑色素瘤细胞杀伤的刺激效应的体外数据一致。

[0330] 结论

[0331] 已知 CEACAM1 为淋巴细胞激活的调节基因。CM10 是阻断两个 CEACAM1 分子之间相互作用的抗体(图 4),并因此消除由 CEACAM1 介导的抑制性信号,导致对肿瘤细胞的较强的细胞毒性淋巴细胞激活(图 6 和 7)。体内异种移植的结果(图 8)加强 CM10 的免疫刺激性质并显示在 TIL 的存在下用 CM10 处理的小鼠中的肿瘤的显著的生长抑制。图 9 中展示的方案显示 CM10 的作用方式的非限制性理论:阻止 CEACAM1-CEACAM1 相互作用,使得能够激活通过免疫系统细胞的杀伤信号。

[0332] 实施例 7:CM10 的体外安全性评价

[0333] CM10 对正常人体细胞的作用

[0334] 为了逃避免疫系统,癌细胞改变了许多分子的表达。一些证据已显示,CEACAM1 的表达在黑色素细胞的恶性转化过程中是递增的。根据文献,CEACAM1 也在正常的细胞上表达,因此定位 CM10 在身体内的可能结合部位并鉴定 CM10 与正常细胞结合是否可导致任何不希望的结果是重要的。

[0335] 正常人体组织的交叉反应性

[0336] 在本研究中,检查了抗-CEACAM1mAb 在含有正常和恶性黑色素瘤样品的人组织微阵列中的结合强度。使用标准病理学评分系统评价结合强度。通过标准 IHC 方法分析了包含 100 例恶性黑色素瘤(原发、转移)和良性痣的组织微阵列(TMA)的抗 CEACAM1 结合强度。从 0 到 +3 分级每个肿瘤核心。如图 10 中所示,在超过 50% 的黑色素瘤样品并在 65% 的转移性黑色素瘤样品中观察到抗-CEACAM1mAb 的结合强度。

[0337] 多个正常人体器官组织微阵列(TMA)包括 33 种类型的正常器官,每一种类型采

集自 3 个正常人个体。年龄介于 2-67 岁之间,43 个样本源自女性且 57 个样本源自男性。以下的组织为抗 -CEACAM1mAb 结合阴性的:大脑、小脑、卵巢、胰腺、甲状旁腺、脑垂体、甲状腺、扁桃体、骨髓、脾、胸腺、肺、心肌、胃、骨骼肌、皮肤、外周神经、间皮和视网膜。在一些器官、主要是形成中空的内脏器官中的管道或腺体的上皮细胞的腔侧检测到细胞特异性染色,诸如:小肠的刷状缘、某些顶端结肠腺体、乳腺导管上皮细胞、肝胆小管、肾小管的内表面、少数子宫内膜腺体、唾液腺的腔部分。此外,在肾上腺皮质、前列腺腺体的顶端面、睾丸的 Leidig 细胞和胰腺中的单个分散的细胞中观察到一些低的细胞染色。发现为阳性的免疫系统的仅有细胞是毛细血管内的中性粒细胞。在组织和淋巴器官中没有发现淋巴细胞的染色。最后,弱至中等的阳性染色被发现在选择性部位包括:卵巢、肾上腺、肾的小血管的内皮细胞中,而罕见于胰腺、前列腺、脑垂体和子宫内膜。

[0338] 相比于正常人体组织中绝大多数测试的组织的未染色, IHC 分析显示黑色素瘤细胞的强的抗 CEACAM1 染色。然而,在中空脏器的管道或腺体的上皮细胞的腔面(luminal aspect)观察到一些选择性染色。该细胞面对于通过外周血施用的抗体一般是较少可及的。

[0339] 结合的 CM10 分子 / 细胞的定量

[0340] 为了定量结合到每个细胞类型的 CM10 分子的精确数目,使用 QuantiBRITE 试剂盒。使用该试剂盒, MFI (平均荧光强度) 被直接转化为结合的分子 / 细胞的数目。被发现对于抗 -CEACAM1 结合是阳性的组织的三种人原代细胞购自 ATCC。HUVEC 细胞,以代表见于上皮细胞的阳性染色;原代前列腺上皮细胞,由于前列腺的顶端表面呈阳性染色,以及原代肾近曲小管上皮细胞,由于小管的内表面被染色为阳性。更详细地, SkMel5、G361、Malme3M、NK92MI、HUVEC、肾原代细胞以及前列腺原代细胞根据 ATCC 方案培养。根据制造商的方案, CM10 被缀合至 PE 分子 (RPE LYNX Rapid Conjugation Kits Serotec), 并以 QuantiBRITE PE 磁珠试剂盒 (BD) 的方式被使用 ($1 \mu\text{g/ml}$), 以通过流式细胞术确定 ABC (结合的抗体 / 细胞)。相比于黑色素瘤细胞系,使用流式细胞术分析了所指示的原代细胞中的结合的 CM10 分子 / 细胞的数目。计数每个细胞系的至少 10000 个细胞。

[0341] 定量分析(图 11, 结果表示 2-3 个独立实验的平均值 $\pm$ SE) 显示, CEACAM1 阳性黑色素瘤细胞结合 20,000-50,000 之间的 CM10 分子,而已被报道表现一些 CEACAM1 表达的正常内皮细胞和上皮细胞(例如 HUVEC、肾和前列腺),仅结合达到 2,000 个 CM10 分子。此外,高数目的 CM10 抗体被结合至 NK 细胞 (~ 20000), 其与显示激活的淋巴细胞中高 CEACAM1 表达的公布的数据关联。这些结果加强 CM10 (原代细胞中的低表达) 的安全性以及其在激活的淋巴细胞介导的细胞裂解中作为参与者 (player) 的活性 (NK 结果)。

[0342] 人原代细胞在 CM10 存在下的增殖

[0343] 由于在正常组织中发现一些阳性染色,因此检查了 CM10 对原代细胞生长的影响。HUVEC 和原代前列腺细胞根据 ATCC 方案被培养并使用 XTT 标准检验监测细胞增殖。未能够检测到对细胞增殖的影响。

[0344] 概述

[0345] 鉴定了抗 CEACAM1mAb 对正常组织和黑色素瘤细胞的结合谱。CEACAM1 不存在于正常的黑素细胞,但经历新表达并在绝大多数的转移性黑色素瘤样品中广泛表达(图 10),在其他正常器官中,在一些组织的特定细胞中存在 CEACAM1 的限制性表达。测量结合到细胞的 CM10 分子的数目的定量分析,显示正常人原代细胞上的非常少量的结合的 CM10 (图

11)。这些结果暗示,注射到患者的大多数 CM10 分子由于表达差异将主要靶向癌细胞而不是正常组织。此外,CM10 对细胞增殖、CDC 活性没有影响并具有微不足道的或低的 ADCC 活性,表明 CM10 与非靶细胞的结合将不会导致不想要的细胞结果。

[0346] CM10 对免疫系统的影响

[0347] CM10 是阻断 2 个 CEACAM1 分子之间的相互作用的免疫刺激抗体,并通过这样做介导针对肿瘤细胞的淋巴细胞的刺激。验证抗体将不会引起可造成严重不良事件的免疫系统的释放的刺激(unleashed stimulation)是重要的。在正常淋巴细胞中,细胞膜上存在 CEACAM1 的忽略的表达,只有在细胞激活之后,CEACAM1 才被动员至膜,在膜上其对激活的淋巴细胞快速并强烈地上调(Gray-Owen 和 Blumberg2006, Nat Rev Immunol6, 433-46)。如以上显示的,未观察到与正常淋巴组织(脾、胸腺、骨髓)或与淋巴细胞的交叉反应性;尽管如此,进行了各种体外和离体免疫毒性分析以辅助预测潜在的副作用。

[0348] CM10 对人淋巴细胞增殖的影响

[0349] 评价体外免疫调节抗体的安全性的最常见的方式之一是通过检查其对正常人 PBMC (外周血单核细胞)的增殖和细胞因子分泌的影响。来自 3 名不相关的供体的人 PBMC 被分离并与使用 3 种不同浓度(2 μ g/ml、20 μ g/ml 或 200 μ g/ml)的 CM10 或与对照 mAb IgG1K(200 μ g/ml)以 8 个重复的孔持续 60 分钟孵育。将 PHA(1 μ g/ml)加入到 4 个检验的重复的孔并持续 96 小时孵育细胞。3H- 胸苷的掺入被用于检验细胞增殖。模拟刺激的细胞和仅 PHA 刺激的细胞分别用作检验的阴性和阳性对照。评价了静息态淋巴细胞以及激活态淋巴细胞(PHA 处理的)中的增殖。模拟刺激的细胞和仅 PHA 刺激的细胞分别用作检验的阴性和阳性对照。结果(图 12)清楚地显示,CM10 对幼稚或激活的人淋巴细胞的增殖没有影响。除了 PBMC 增殖研究之外,评价了 CM10 对来自人 PBMC 的细胞因子分泌的影响。细胞因子分泌研究确定了 CM10 的免疫调节作用并有助预测潜在的副作用。

[0350] 实施例 8. CM10 选择性组(selectivity panel)

[0351] 使用过表达不同 CEACAM 家族蛋白的细胞系和流式细胞术分析进行结合谱的表征。

[0352] 在人类中,CEA 家族由位于染色体 19q13.2 上的 18 个基因和 11 个假基因编码。一些密切相关的成员属于 CEACAM 家族(CEACAM1、3、4、5、6、7、8),并被各种人细胞类型差别表达。CEACAM 蛋白参与支配正常细胞和癌细胞的生长和分化的多种粘附介导的效应(Gray-Owen 和 Blumberg2006, Nat Rev Immunol6, 433-46)。家族中的密切相关的蛋白共享从 45% 直至某些成员之间 90% 的相似性之间变化的高的氨基酸相似性。

[0353] 使用标准的 FACS 方案,使用缀合至生物素分子的 CM10 和链霉亲和素 APC (Strep-Avidin APC)作为第二剂。用生物素化的 CM10(1 μ g/ml)以及作为第二剂的链霉亲和素 APC 染色表达 CEACAM1、5、6、8 的 721.221 细胞或瞬时表达 CEACAM3、4 的 HEK293T。空白直方图表示 mAb 染色,而红色直方图表示背景染色。在每个直方图中使用至少 10000 个细胞以分析 CM10 结合。通过染色细胞的 MFI 除以背景染色的 MFI 来计算 FAB。图 13 中所示结果清楚地显示,CM10 牢固结合到表达 CEACAM1 的细胞。在表达 CEACAM3 和 5 的细胞中观察到中等染色。表达 CEACAM4、6、8 的细胞中显示弱的或忽略的结合。

[0354] 结论

[0355] CM10 是被开发以识别人 CEACAM1 的 mAb, CEACAM1 是被发现与一般癌症、且特别

地黑色素瘤相关的蛋白。已鉴定出一些恶性肿瘤包括黑色素瘤、NSCLC、甲状腺癌和胃癌中 CEACAM1 的过表达。证据显示,CEACAM1 的过表达可与黑色素瘤和 NSCLC 患者的不良预后相关。

[0356] 已发现 CEACAM5 在高百分比的许多人类肿瘤,包括 90% 的胃肠癌、结肠直肠癌 (CRC) 和胰腺癌、70% 的非小细胞肺癌细胞和 50% 的乳腺癌中过表达。其还在甲状腺癌、胃癌、卵巢癌和子宫癌中过表达 (Thompson, Grunert 等人 1991, J Clin Lab Anal5, 344-66)。CEACAM5 甚至用作 CRC 和结肠癌的术后监控中的肝转移的临床标志物 (Duffy2001, Clin Chem47, 624-30)。CM10 能够结合 CEACA5 的证据是非常重要的,且可将可被 CM10 治疗的可能适应症从 4-5 种恶性肿瘤扩展至超过 10 种。已经进入临床试验的抗 -CEACAM5 剂包括缀合至毒性物质诸如放射性物质的用于各种恶性肿瘤的诊断目的和治疗的抗 -CEACAM5 抗体。由此看来,即使这些毒性缀合形式也未显示安全问题,其可以指示 CEACAM5 是安全的靶 (Liersch, 等人 2005, J Clin Oncol23(27), 6763-70 ;Ychou, 等人 2008, Clin Cancer Res14(11), 3487-93)。另一方面,这些试剂都不靶向肿瘤的免疫调节,其可通过可结合 CEACAM1 和 CEACAM5 二者的抗体诸如 CM10 被靶向。

[0357] 实施例 9 :CM10 的表位作图

[0358] 为了重建靶分子的非连续表位,合成了结构肽的文库。靶分子是具有以下序列的人 CEACAM1 分子的 N- 结构域 :

[0359] 1 QLTTESM PFN VAEGKEYLLL VHNLPQQFLG YSWYKGERVD GNRQIVGYAI50

[0360] 51 GTQQATPGPA NSGRETIYPN ASLLIQNVTQ NDTGFYTLQV IKSDLVNEEA100

[0361] 101 TGQFHVYP108 (SEQ ID NO:35).

[0362] 使用允许结构肽成为单环、双环、三环、片层样折叠、螺旋样折叠以及其组合的 Pepscan's Chemically Linked Peptides on Scaffolds (CLIPS) 技术合成文库 (Timmerman 等人 2007, J. Mol. Recognit. 20:283 - 99 和 Slootstra 等人 1996, Molecular Diversity1:87 - 96)。CLIPS 模板被偶合到半胱氨酸残基。肽中的多个半胱氨酸的侧链被偶合到一个或两个 CLIPS 模板。例如,将 0.5mM 的 T2CLIPS 模板 1, 3- 双(溴甲基) 苯的溶液溶解于碳酸氢铵 (20mM, pH7.9) / 乙腈 (1:1 (v/v))。将该溶液加至肽阵列。CLIPS 模板将与存在于肽阵列 (具有 3 μ l 孔的 455 孔板) 的固相结合肽中的 2 个半胱氨酸的侧链结合。肽阵列在溶液中被轻轻摇动 30 至 60 分钟同时被完全覆盖在溶液中。最后,用过量的 H₂O 彻底洗涤肽阵列,并在含有 1%SDS/0.1% β - 巯基乙醇的 PBS (pH7.2) 的断裂缓冲液 (disrupt-buffer) 中以 70°C 声处理 (sonicated) 30 分钟,随后在 H₂O 中声处理另外的 45 分钟。携带肽的 T3CLIPS 以相似的方式被制备,但用 3 个半胱氨酸。

[0363] 合成总计 3002 个肽,其包括 :结合全蛋白的两个不同区的 CLIPS 基质组,其中天然半胱氨酸被丙氨酸取代 ;长度为 6、10、15、20、25 和 33 的线性肽组 ;长度为 15 的线性肽组,其中中间的残基 (middle residue) 被丙氨酸取代 ;长度为 15 的 CLIPS 构象环组,其中天然半胱氨酸被丙氨酸取代 ;以及长度为 15 的具有中间的残基被丙氨酸取代的 CLIPS 构象环组,其中天然半胱氨酸被丙氨酸取代。

[0364] 在基于 PEPSCAN 的 ELISA 中测试了抗体与各合成肽的结合。将肽阵列与一抗 (CM10) 溶液一起孵育 (4°C 过夜)。洗涤后,于 25°C 将肽阵列与 1/1000 稀释的抗体过氧化物酶缀合物一起孵育 1 小时。洗涤后,添加过氧化物酶底物 2, 2' - 连氮 - 二 -3- 乙基苯

并噻唑磺酸 (ABTS) 和 2 微升 / 毫升的 3% H_2O_2 。1 小时后, 测量颜色显影。用电荷耦合器件 (CCD) - 相机和图像处理系统定量颜色显影。

[0365] 获自 CCD 相机的值的范围从 0 至 3000mAU, 类似于标准的 96 孔板的酶标仪 (ELISA-reader)。定量结果并存储于 Peplab 数据库。提取结合值用于使用数据的图示法的分析, 其中二维图中的变量所采取的值被表示为颜色。

[0366] 基于观察到的结合模式, CM10. S91 的表位的核心由残基₁₇VLLL VHNLPQQLF₂₉组成。在₆₈YPNASLLIQNVT₇₉附近的序列上观察到第二结合区域。当将所观察到的结合模式与靶蛋白的可用晶体结构相比较时, 提出了 CM10. S91 的非连续表位由₁₇VLLL VHNLPQQLF₂₉ (核心) 连同₆₈PNASLLI₇₅ (支撑体) 组成。

[0367] 实施例 10 : 评价 CM10 活性的另外的实验

[0368] 作为潜在的 PD 标志物的效应细胞的颗粒酶 B 分泌

[0369] 强大的药效学 (PD) 标志物的发展对于改善药物在临床试验中的成功是关键, 并有助于选择最佳药物剂量以平衡疗效和毒性。PD 标志物在分子通路中通常邻近药物靶并被用于测量药物的效果而不管治疗效果。颗粒酶 B 是当识别特异性靶时由细胞毒性 T 细胞 (CTL) 和 NK 细胞的细胞质颗粒释放的丝氨酸蛋白酶。其继而介导靶细胞的细胞凋亡。我们试图确定 CM10 是否增强特异性靶细胞存在下从效应 NK 细胞和 T 细胞的颗粒酶 B 分泌, 从而使观察到的通过抗体增强的靶细胞杀伤成为可能。

[0370] 将 TIL 与 CM10 (0.2 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 或 10 $\mu\text{g/ml}$) 或同种型匹配的对照 Ab (IPI- 易普利姆玛 (IPI-Ipilimumab) 10 $\mu\text{g/ml}$) 在 37°C 持续 30 分钟孵育; 表达 CEACAM1 和 HLA-A2-SKMEL5 的靶阳性黑色素瘤细胞以 2.5:1 的效应子与靶的比被添加用于过夜孵育。通过 ELISA 法测量颗粒酶 B 分泌。结果表示来自 6 次重复 / 处理的颗粒酶 B 释放值的平均值 $\pm$ SE。类似的结果见于另一个独立实验。

[0371] 如图 15 中所示, TIL 分泌低的初始水平的颗粒酶 B, 其在单独的 CM10 存在下仍然是低的。只有当靶细胞被添加到 TIL 时, 颗粒酶 B 显著升高。然而, CM10 能够显著增加颗粒酶 B 分泌, 超过高的初始水平。当 NK92MI 细胞用作效应细胞时观察到类似的结果, 表明 CM10 可以以相似的方式增强颗粒酶 B 从 NK 细胞的分泌。颗粒酶 B 作为 CM10 治疗的 PD 标志物的用途还在包括体内模型和患者样品的补充的实验组中被检查。

[0372] CM10 阻断 CEACAM1-CEACAM5 相互作用

[0373] 已发现癌胚抗原 (CEA、CEACAM5、和 CD66e) 与多种类型的癌症, 特别是结肠直肠癌、以及胃肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、甲状腺癌、胃癌和卵巢癌相关。该分子已被开发成为用于癌症诊断和治疗的靶。

[0374] MHC-I- 缺陷的黑色素瘤细胞系和 NK 细胞之间的嗜同性 CEACAM1 的相互作用显著抑制通过 NK 细胞的癌细胞杀伤 (Markel 等人 J Immunol. 2002; 168:2803 - 2810)。类似地, CEACAM5 在 HLA I- 类缺陷的 721. 221 细胞中的被迫表达还抑制 NK 介导的细胞毒性 (Stern 等人 J Immunol. 2005; 174:6692 - 6701), 表明 CEACAM5-CEACAM1 嗜异性相互作用也能够触发免疫细胞中抑制性 CEACAM1 的信号传导。

[0375] 将 CEACAM1 阳性细胞系 (SKMe15) 与不同浓度的同种型对照或 CM10 一起孵育, 未结合的 CM10 被洗涤两次, 随后与具有或不具有可溶性生物素化的 CEACAM5 一起孵育。生物素化的 CEACAM5 与细胞的结合通过第二链霉素亲和素-APC 和 FACS 分析被检测。结果表示重

复孔的平均值 $\pm$ SE。在两个其他独立实验中获得类似的结果。

[0376] 图 16 的结果显示, CM10 以剂量依赖的方式抑制 CEACAM1 与 CEACAM5 之间的结合。因此 CM10 可被用于治疗表达高水平的 CEACAM5 并利用 CEACAM1-CEACAM5 轴抑制免疫细胞的恶性肿瘤。

[0377] CM10 增强 HLA 限制性 T 细胞杀伤

[0378] 细胞毒性 T 细胞破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞, 并且也参与移植物排斥。这些细胞通过结合至与存在于身体的几乎每个细胞表面的 HLA 分子相关的抗原识别其靶。受感染的或恶性肿瘤细胞的杀伤需要几个通路的募集 (recruitment) 以产生适当的应答。

[0379] 这组检验试图确定 CM10 是否增强为 HLA 限制性的或可选地导致免疫系统的一般刺激的“天然”CTL 活性。

[0380] 将 TIL 与 CM10 (0.2 μ g/ml、1 μ g/ml、5 μ g/ml 或 10 μ g/ml) 或同种型匹配的对照抗体于 37°C 孵育 30 分钟。将表达 CEACAM1 和 HLA-A2 的靶黑色素瘤细胞 SKMEL5 与具有或不具有阻断单克隆抗体的 HLA-A2 预孵育 1 小时, 并以 2.5:1 的效应子与靶的比被加入用于过夜孵育。通过标准 LDH 释放检验确定杀伤。结果表示来自每个处理 3 次重复的 LDH 释放值的平均值 $\pm$ S.E。

[0381] 图 17 中的结果显示, 在阻断抗体 HLA-A2 存在下, CM10 不能通过 TIL 增加黑色素瘤细胞杀伤, 并且 CM10 的活性是 HLA 限制性的。类似的结果见于另一个独立实验。因此表明, 根据这些结果, CM10 将改善 CTL 在体内针对肿瘤细胞的活性, 并且将不会促进免疫系统的非特异性激活。

[0382] CM10 的免疫调节活性抑制体内肿瘤生长

[0383] 评价新型抗癌剂的体内作用的最广泛使用的模型之一, 是人肿瘤异种移植物模型。在该模型中, 人肿瘤细胞被移植到不会排斥人细胞的免疫受损的小鼠的皮肤下。取决于注射的细胞的数目和细胞的生长速率, 经过几个星期肿瘤形成, 且可在体内研究对适当的治疗方案的响应。包括在肿瘤形成的早期阶段治疗的模型的优势是有机会检查试剂在可更加类似于患者中的转移扩散的环境中的影响和鉴定治疗对初期肿瘤植入的影响。

[0384] 因此, 在预防治疗方案下检查了移植人黑色素瘤细胞的 SCID-NOD 小鼠中 CM10 的体内免疫调节活性。根据图 18 中所示的 5 个处理组随机化 SCID-NOD 小鼠。在第 0 天 SC 注射 6×10^6 个 SKmel5 细胞 (黑色素瘤细胞系)。用如图中所示的抗体 / TIL 处理小鼠。箭头表示施用的时间; 细箭头表示抗体 -0.25mg/ 小鼠 / 注射 (CM10、IgG 对照及易普利姆玛对照) 且宽箭头表示 TIL (20×10^6 个细胞 / 小鼠 / 注射)。每周 2-3 次盲法 (blindly) 测量肿瘤体积。结果表示来自 8-9 只小鼠 / 组的平均肿瘤体积 $\pm$ SE。

[0385] 图 18 显示, 过继性人 T 细胞转移与 CM10 注射的联合表现显著的协同作用, 并且相比于同种型对照组强烈抑制异种移植物的生长 (69%TGI)。结果显示, CM10 作为单一的剂也具有作用 (第 32 天时的 45%TGI), 并可能通过抑制增殖、血管发生或通过其他生物通路直接作用于肿瘤细胞或肿瘤环境。

[0386] 在实验终止当日, 确定同一组实验中肿瘤的总重量。获得的结果支持体积测量, 并显示 TIL+CM10 治疗的组的肿瘤负荷的急剧减少以及还显示 CM10 治疗的组中的肿瘤重量的统计学显著减少。

[0387] CM10 增强 NK 细胞对 CEACAM1- 阳性胰腺癌细胞系的免疫调节杀伤活性

[0388] 初步筛选显示,胰腺癌细胞系和患者样本表达高水平的 CEACAM1 (来自胰腺癌样本的 94% 为 CEACAM1 阳性)。因此,进行实验以检查 CM10 是否能够增强免疫细胞抗胰腺癌细胞系活性。通过将用各种浓度的 CM10 预处理的 NK92MI 细胞与不同的 CEACAM1 阳性靶胰腺癌细胞系的共培养进行杀伤检验。将 NK92MI 与 CM10 (0.2 μ g/ml、1 μ g/ml 或 10 μ g/ml) 或同种型匹配的对照 Ab (10 μ g/ml) 于 37°C 孵育 30 分钟;A. 表达 CEACAM1 的靶细胞以 2.5:1 的效应子与靶的比被添加用于另外的 5 小时 (COLO-357) 或以 5:1 的效应子与靶的比被添加用于过夜 (BXP3)。结果表示如通过经典 LDH 释放检验确定的来自每个处理的三次重复的 % 细胞毒性的平均数 $\pm$ SE。

[0389] 图 19 中所示的结果显示,尽管通过 NK 细胞的胰腺癌细胞的杀伤相对较低,CM10 将该活性从基线细胞毒性 (PBS 或对照 Ab) 增强直至 2 倍。类似的结果见于另外两个系。

[0390] CM10 增强 CEACAM1 阳性胰腺癌细胞系存在下 NK 细胞的颗粒酶 B 分泌

[0391] 该实验旨在确定,CM10 是否能够类似于黑色素瘤细胞地增强胰腺癌细胞存在下颗粒酶 B 从 NK 细胞的分泌。在与杀伤检验类似的环境中,用各种浓度的 CM10 预处理 NK 细胞,且然后与 4 种不同的靶胰腺癌细胞系一起共培养。通过特异 ELISA 分析上清液中的颗粒酶 B 含量。将 NK92MI 与 CM10 (0.2 μ g/ml、1 μ g/ml 或 10 μ g/ml) 或同种型匹配的对照抗体 (10 μ g/ml) 于 37°C 孵育 30 分钟。表达 CEACAM1 的靶胰腺细胞以 2.5:1 的效应子与靶的比被添加用于另外的 5 小时 A. (COLO-357 和 ASPC-1) 和 B. (SU8686) 或 10:1 的 E:T C. (BXP3)。通过 ELISA 测量颗粒酶 B 分泌。结果表示来自每个处理的 2-6 次重复的颗粒酶 B 释放值的平均值 $\pm$ S.E。

[0392] 图 20 清楚地显示,CM10 增加胰腺癌细胞存在下颗粒酶 B 从 NK 细胞的分泌。

[0393] 实施例 11:人源化抗体和人抗体

[0394] 人源化抗体通常具有用非人 CDR 移植的人构架。因此,人源化抗体具有从非人来源引入到其的一个或多个氨基酸序列。这些非人氨基酸残基常常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变域。人源化可基本遵循 Winter 及其同事的方法,通过取代啮齿动物 CDR 或 CDR 序列为人抗体的相应序列进行 (Jones 等人, *Nature*, 321:522-525, 1986; Riechmann 等人, *Nature*, 332:323-327, 1988; Verhoeyen 等人, *Science*, 239:1534-1536, 1988)。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利号 4,816,567),其中基本小于完整的人可变域 (substantially less than an intact human variable domain) 已被来自非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代的人抗体。

[0395] 待被用于制备人源化抗体的人轻链与重链可变域二者的选择对于降低抗原性是非常重要的。根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知人可变域序列的整个文库筛选啮齿类动物抗体的可变域的序列。然后,将最接近啮齿动物的序列的人序列接受为用于人源化抗体的人构架 (FR) (Sims 等人, *J. Immunol.*, 151:2296, 1993; Chothia 等人, *J. Mol. Biol.*, 196:901, 1987)。另一种方法使用源自轻链或重链的特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定构架。相同的框架可被用于几种不同的人源化抗体 (Carter 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285, 1992; Presta 等人, *J. Immunol.*, 151:2623, 1993)。

[0396] 更为重要的是,抗体被人源化并保留对抗原的高亲和力和其他良好生物学性质。为了实现这一目标,根据优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序

列和各种概念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通常是可用的并是本领域技术人员熟知的。图解并展示所选的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可用的。这些展示的检查容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,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,FR 残基可以从接受者和输入序列中被选择并被组合以便实现所需抗体特征,诸如对靶抗原的增加的亲和力。一般而言,CDR 残基直接地并最实质地参与影响抗原结合。

[0397] 可选地,现在,产生在免疫之后能够在没有内源免疫球蛋白生成的情况下产生人抗体的全部所有组成成分的转基因动物(例如,小鼠)是可能的。例如,已描述了,嵌合与种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致完全抑制内源抗体产生。人种系免疫球蛋白基因阵列在此种系突变小鼠中的转移将导致在抗原攻击后人抗体的产生(例如, Jakobovits 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551, 1993; Jakobovits 等人, Nature, 362:255-258, 1993; Bruggermann 等人, Year in Immuno., 7:33, 1993; 和 Duchosal 等人 Nature 355:258, 1992。人抗体也可源自噬菌体展示文库(Hoogenboom 等人, J. Mol. Biol., 227:381, 1991; Marks 等人, J. Mol. Biol., 222:581-597, 1991; Vaughan 等人 Nature Biotech 14:309, 1996)。

[0398] 实施例 12. 抗体片段

[0399] 多种技术已被开发用于抗体片段的制备。传统上,这些片段经由完整抗体的蛋白水解消化而获得(例如, Morimoto 等人, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117, 1992 和 Brennan 等人, Science, 229:81, 1985)。然而,这些片段现在可直接通过重组宿主细胞产生。例如,抗体片段可以从上文讨论的噬菌体抗体库中分离。可选地, Fab'-SH 片段可直接从大肠杆菌(E. coli)中回收,并被化学偶合以形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等人, Bio/Technology 10:163-167, 1992)。根据另一种方法, F(ab')₂ 片段可以直接从重组宿主细胞培养物中分离。用于制备抗体片段的其他技术对于本领域技术人员将是明显的。在其他实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。

[0400] 实施例 13. 抗 CEACAM 抗体抗病毒感染的效应

[0401] 以下实验被用于确定 CM10 抗病毒感染的潜力。实验包括不同的靶细胞、各种病毒和一些体内和体外模型。

[0402] **检测/诊断**:通过 FACS 分析、RT-PCR 和免疫组织化学检查 CEACAM 在感染不同病毒类型的细胞系和原代细胞中的表达水平。

[0403] **预防**:将靶细胞与抗 CEACAM 抗体一起与孵育,并确定病毒感染后的病毒载量或病毒复制。

[0404] **治疗**:病毒感染后,将被感染的细胞与免疫系统细胞一起孵育,并检查效应细胞的杀伤能力和病毒载量。此外,在病毒性感染并用抗 CEACAM 的抗体治疗后,确定体内病毒载量及复制和总的存活。

[0405] 以上特定实施方案的描述将非常充分地揭示本发明的一般性质,以至于其他人无需过度实验便可通过应用现有知识,容易地修改和/或调整此类特定实施方案用于各种应用且不偏离一般概念,并因此,此类调整和修改应该并意图被包含在所公开的实施方案的等同物的含义和范围内。被理解的是,本文所采用的措辞或术语是用于描述性目的而非限制性目的。用于实施各种公开的功能的方法、材料和步骤可采取多种替代性形式而不偏离

本发明。

[0001]

序列表

<110> 提乐哈修门医学研究基础建设及服务有限公司
希凯姆生物治疗有限公司

<120> 癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)的抗体

<130> CCAM 004 PCT-1

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X 不存在或为 Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X 不存在或为 Ile

<400> 1

Xaa Asn Asn Leu Xaa

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr

1 5

[0002]

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 3

Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 4

Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
1 5

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 5

Tyr Thr Ser Arg
1

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 6

Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro
1 5

[0003]

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 7

Asn Asn Leu Ile Glu
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 8

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 9

Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

[0004]

<400> 10

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 11

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 12

Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro
1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 13

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Asn Leu
1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

[0005]

<400> 14

Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr
1 5

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 15

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 16

Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
1 5

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 17

Tyr Thr Ser Arg
1

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

[0006]

<400> 18

Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro Arg Thr
1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 19

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Asn Leu Ile Glu
1 5 10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 20

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 21

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 22

[0007]

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 22

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 23

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 24

Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro Arg Thr

1 5

<210> 25

<211> 467

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组 DNA

<400> 25

atgggatgga ccttggtctt tctctttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt tcactcccag 60

gtccagctgc agcagtctgg agctgagctg gtaaggctg ggacttcagt gaagggtgcc 120

[0008]

tgaaggett ctggatacgc cttcactaat aacttgatag agtgggtaaa acagaggcct 180
ggacagggcc ttgagtggat tggagtgatt aatcctggaa gtggtgatac taactacaat 240
gagaagttea agggeaagge aacactgaet gcagacaaat cctccaacac tgcctacatg 300
cagctcagea gectgacate tgatgactct ggggtctatt tetgtgcaag aggggattac 360
tacggtggct ttgctgtgga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcagcc 420
aaaacgacac ccccatccgt ttateccttg gccctggaa gcttggg 467

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多肽

<400> 26

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Asn
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0009]

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 27

<211> 488

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组 DNA

<400> 27

aiggtgtcct cagctcagtt cccttggtctc ctgttgcctt gttttcaagg aaccagatgt 60

gataccaga tgacacagac tacatctctc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 120

atcagttgca ggacaagtea ggacattggc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 180

gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 240

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 300

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaaaagcc ttctctggac gtctgggtgga 360

ggcaccaagt tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat ctctccacca 420

tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caactctac 480

cccagaga 488

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

[0010]

<220>

<223> 重组多肽

<400> 28

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 29

[0011]

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
1 5 10

<210> 30

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多肽

<400> 30

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Asn
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

[0012]

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

[0013]

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 31

<211> 214

[0014]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多肽

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Ser Leu Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

[0015]

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人(*Homo sapiens*)

<400> 32

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe
1 5 10

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr
1 5 10

<210> 34
<211> 7

[0016]

<212> PRT

<213> 智人

<400> 34

Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile

1 5

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu

1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser

20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr

35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg

50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln

65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val

85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro

100 105

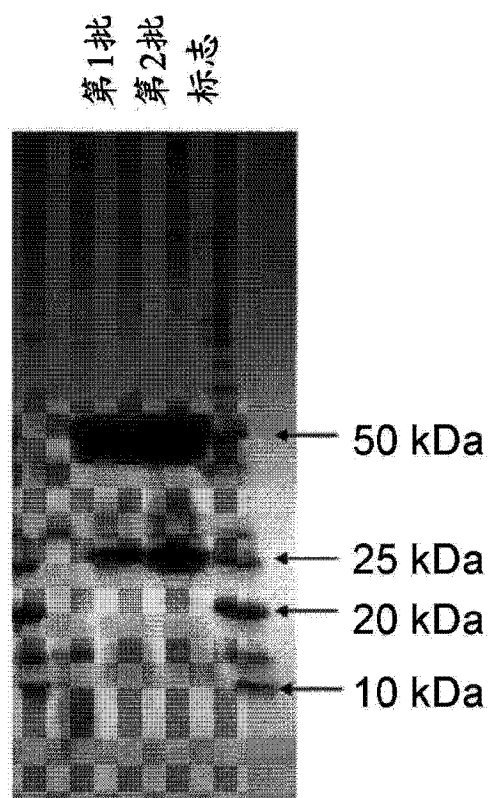


图 1

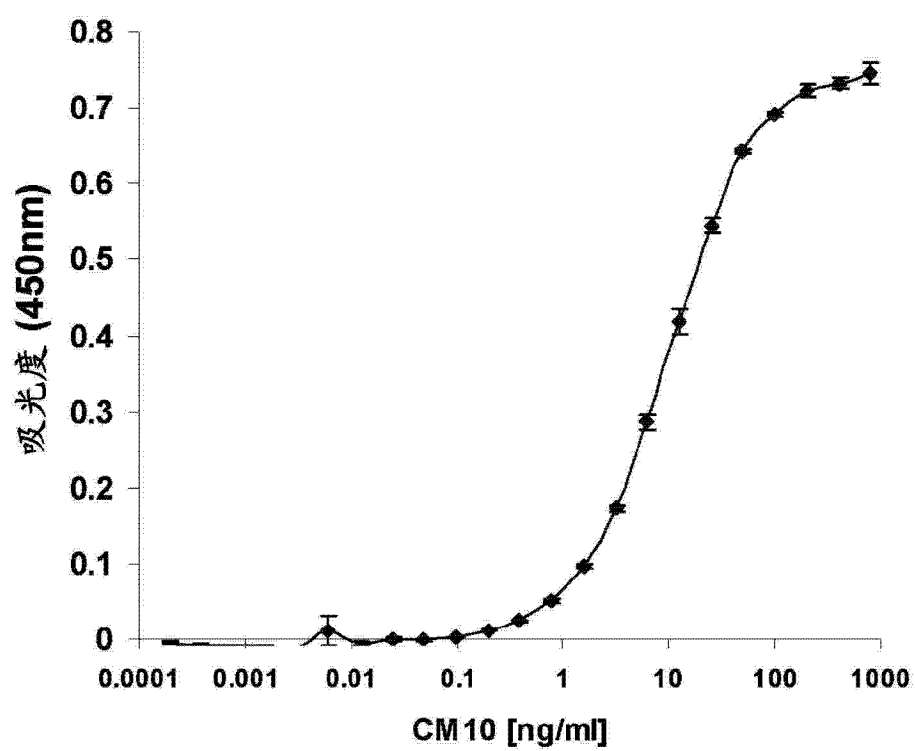


图 2

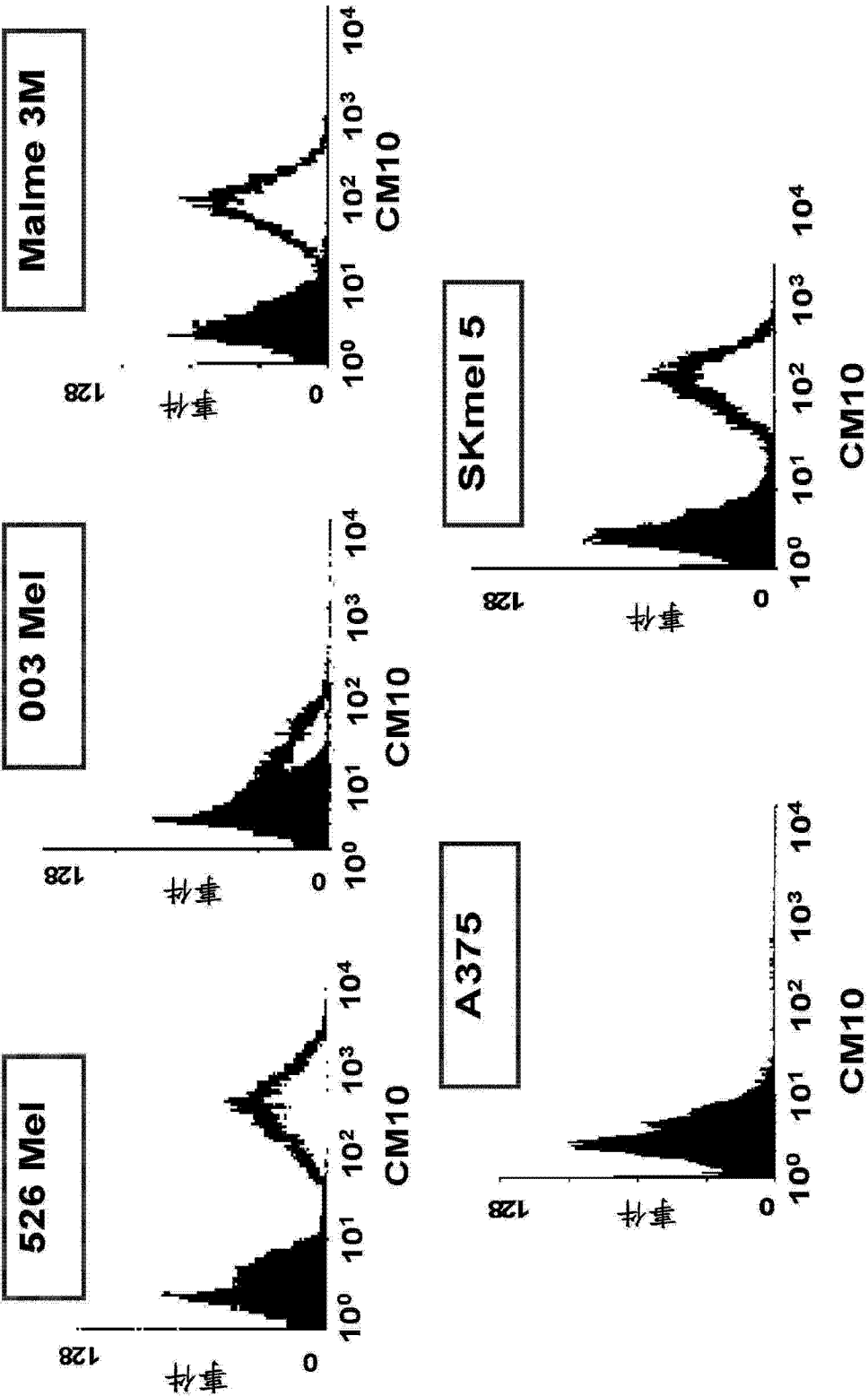


图 3

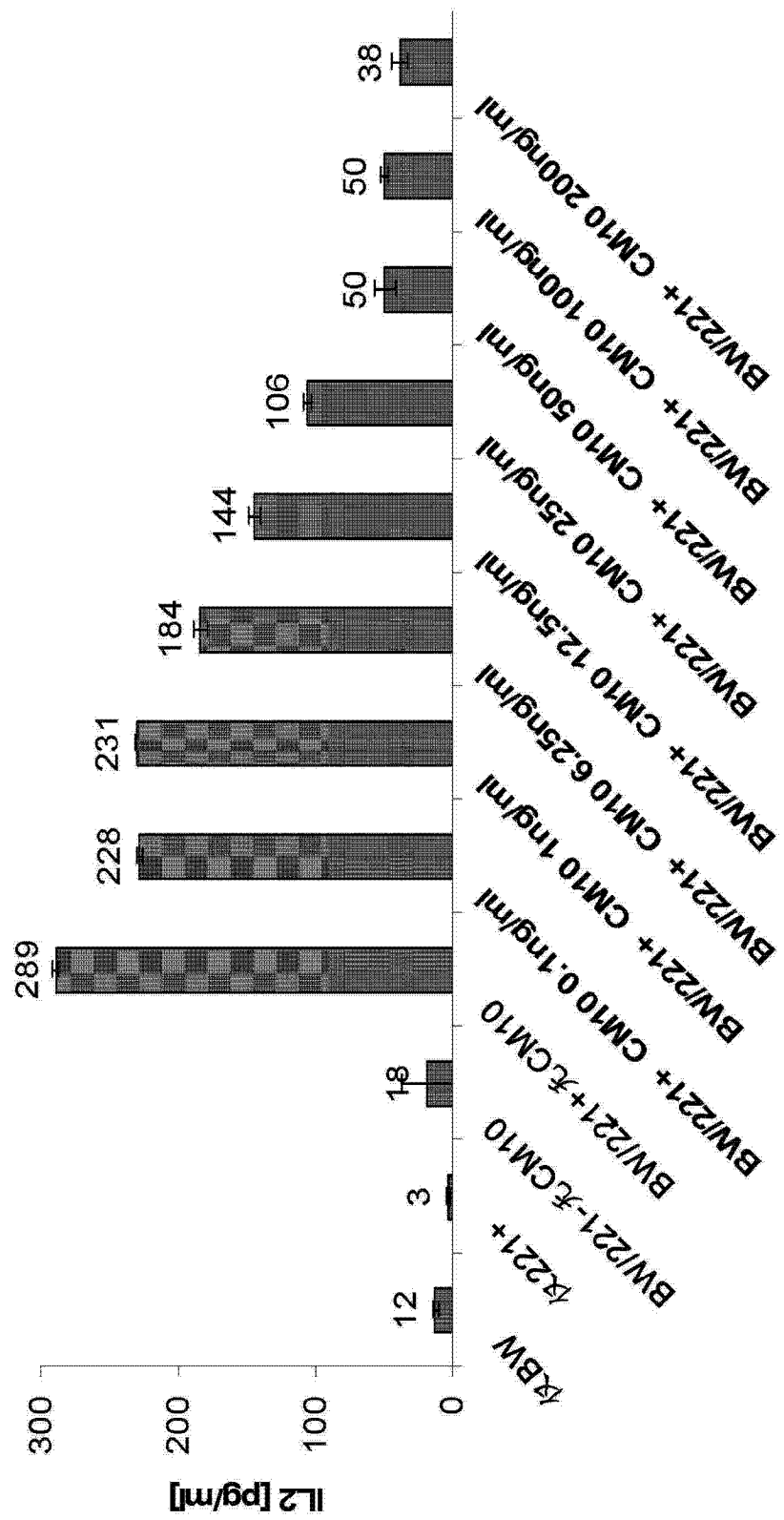


图 4

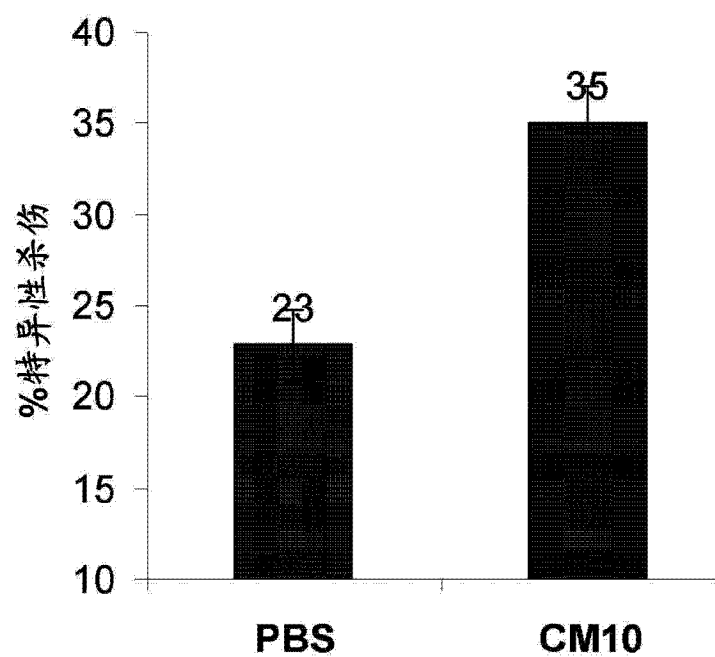


图 5

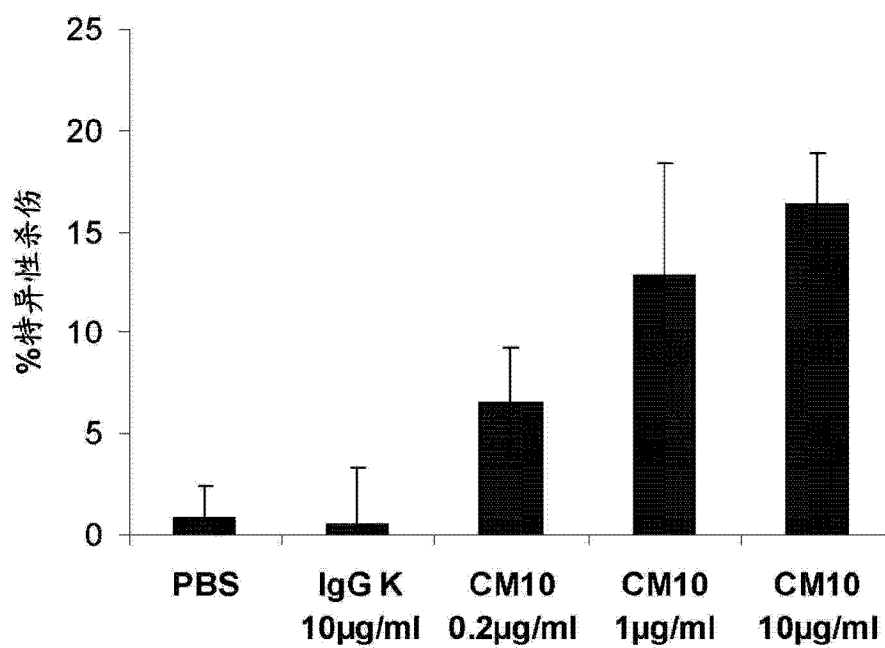


图 6

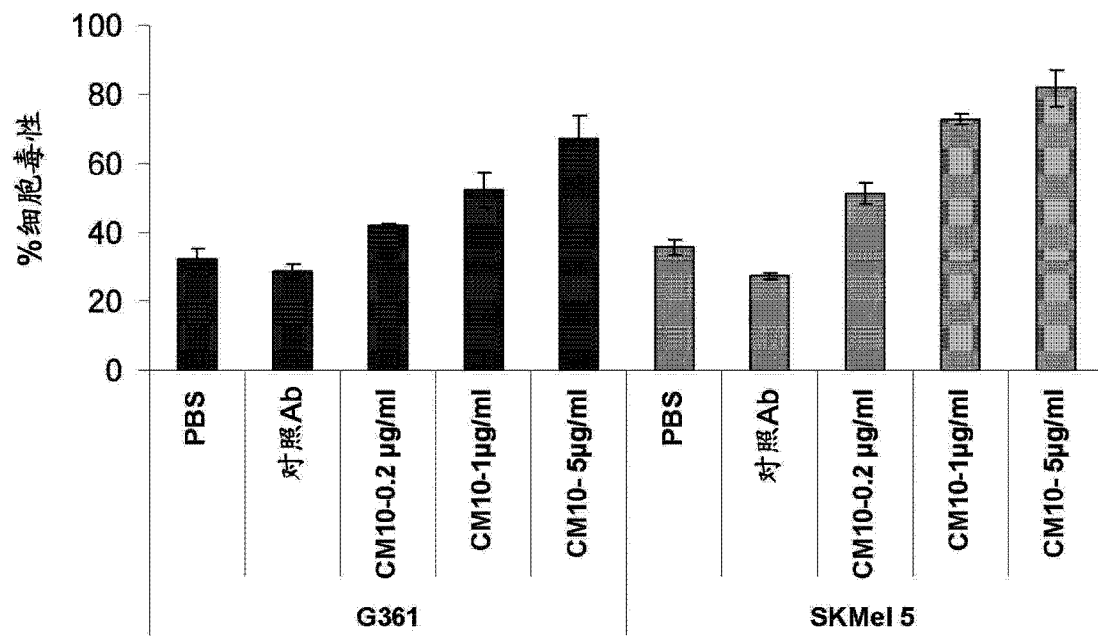


图 7

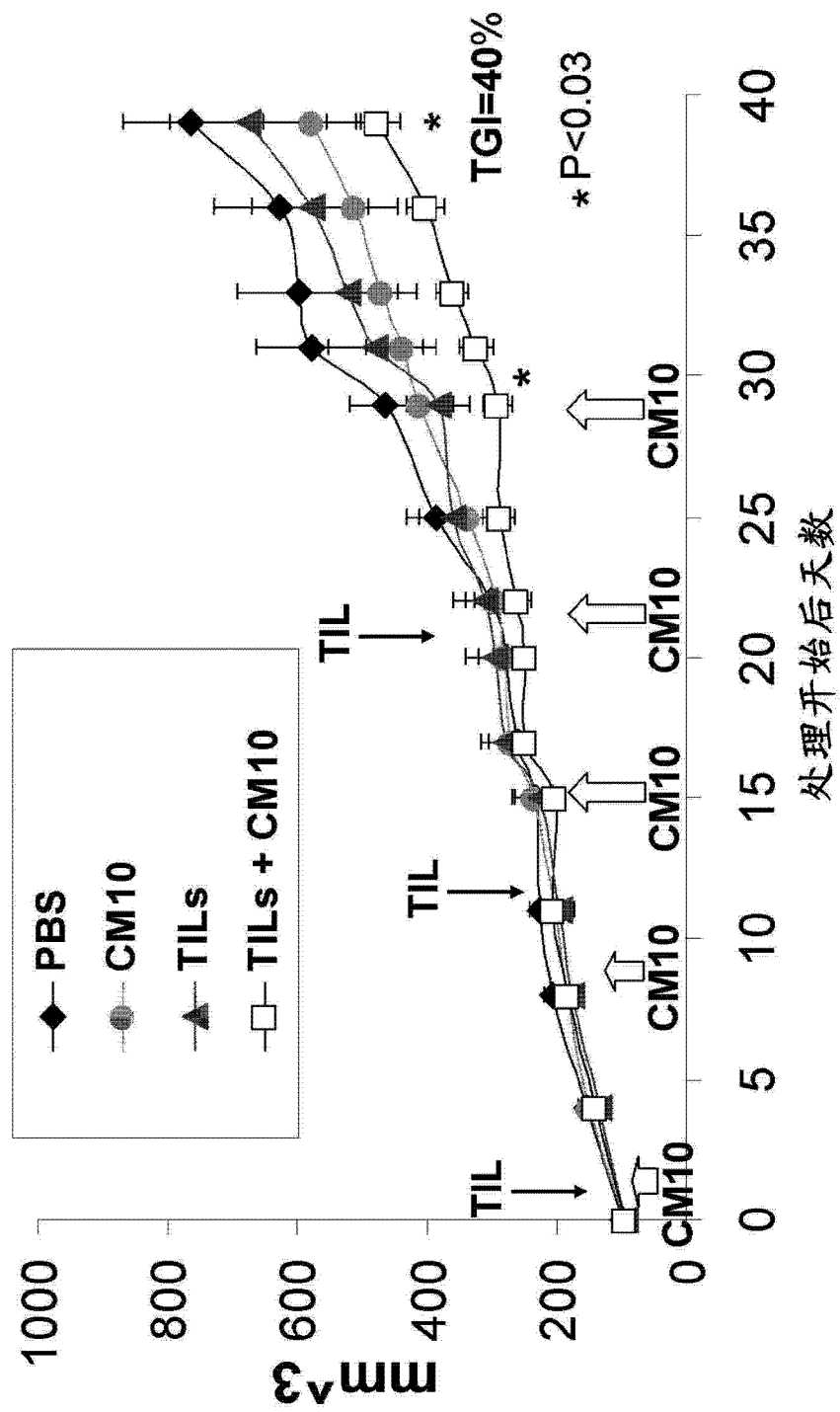


图 8

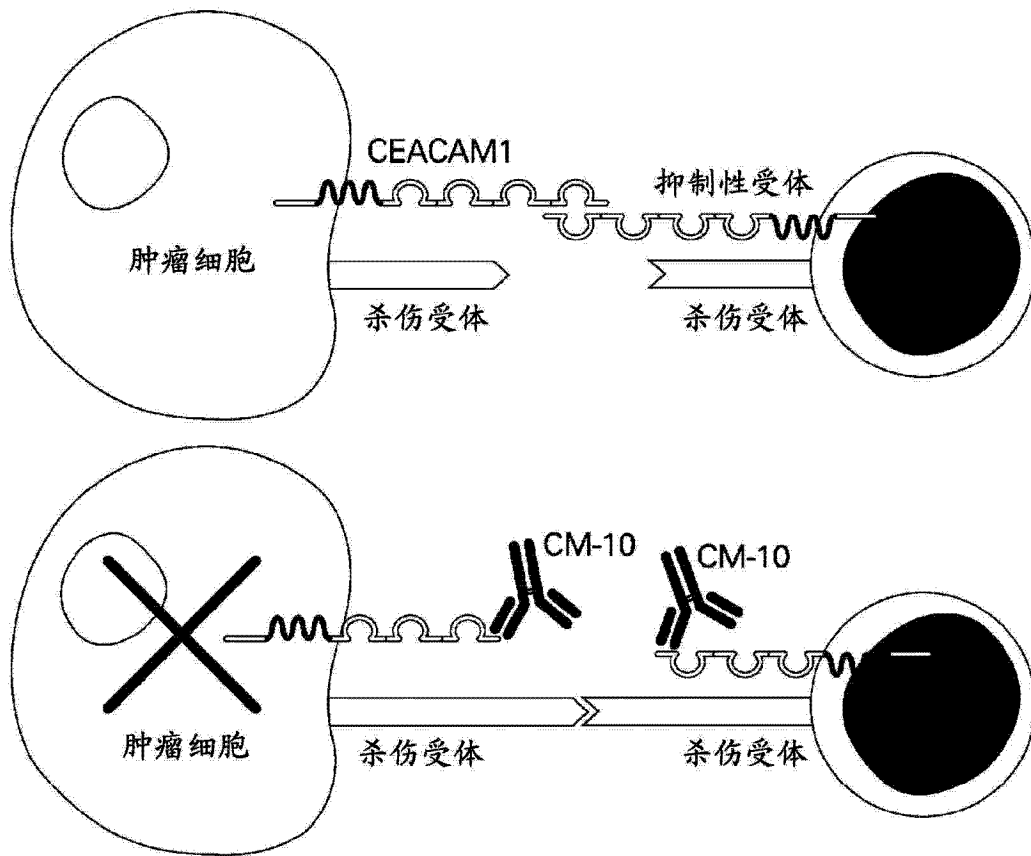


图 9

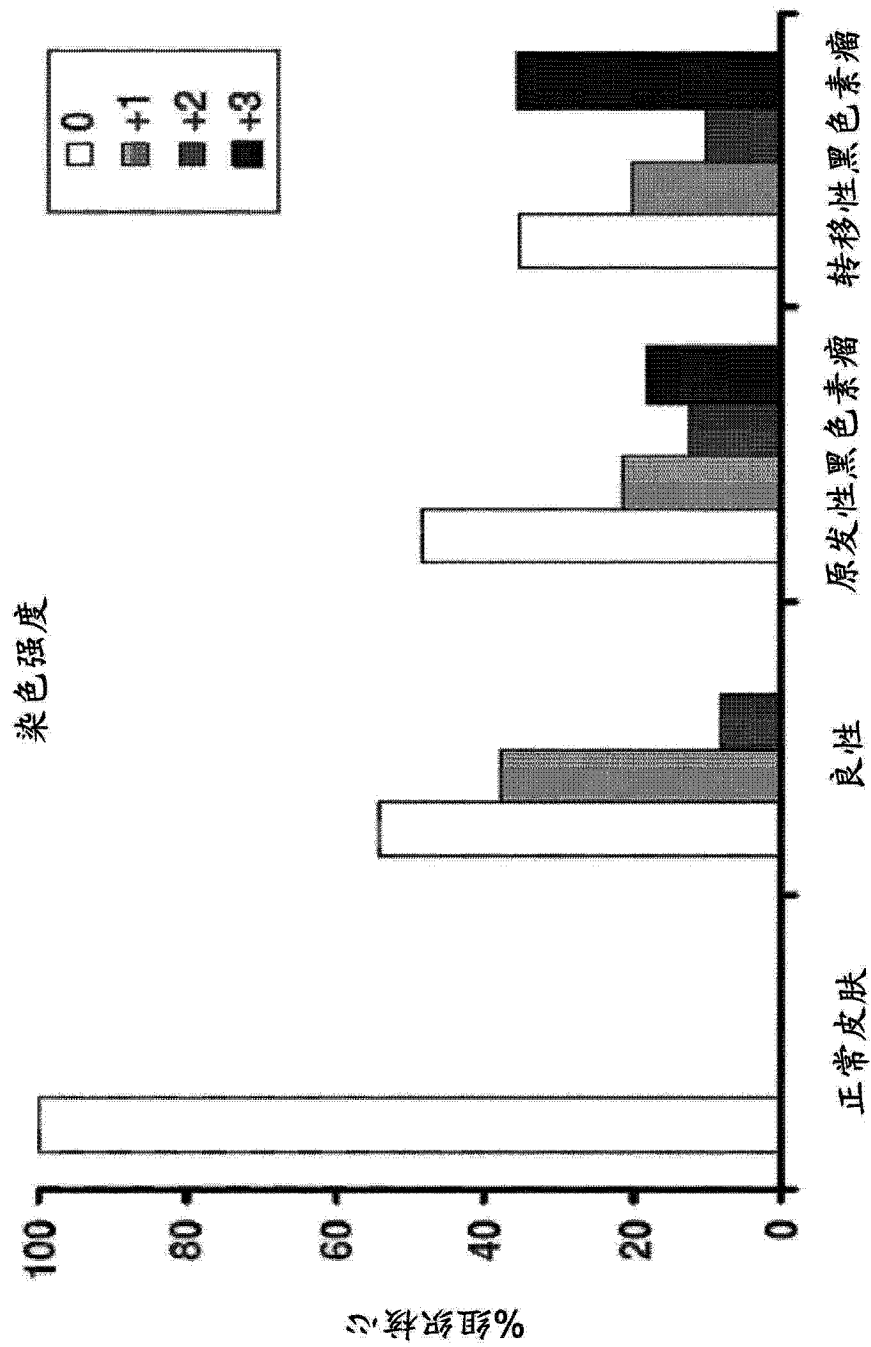


图 10

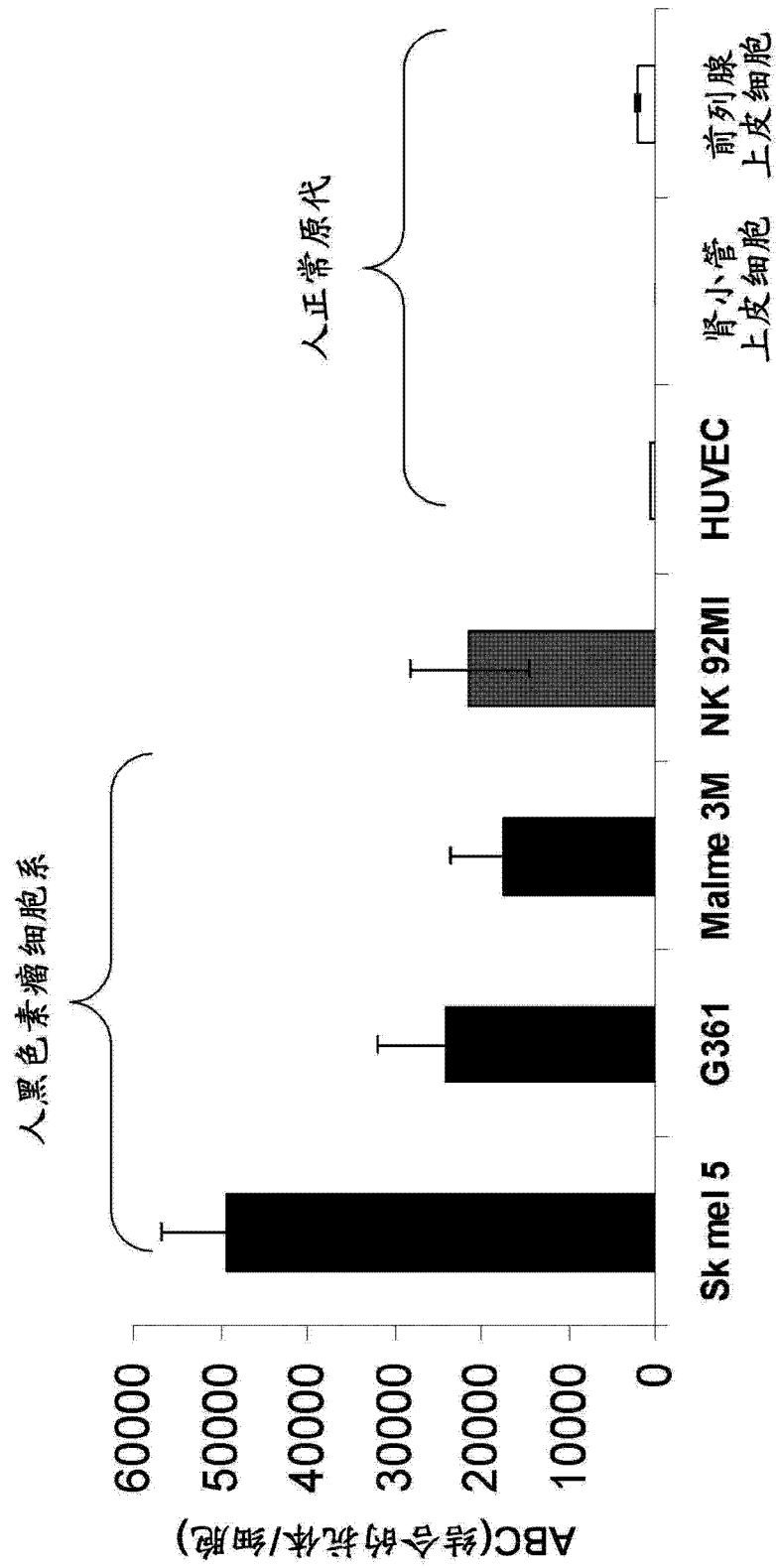


图 11

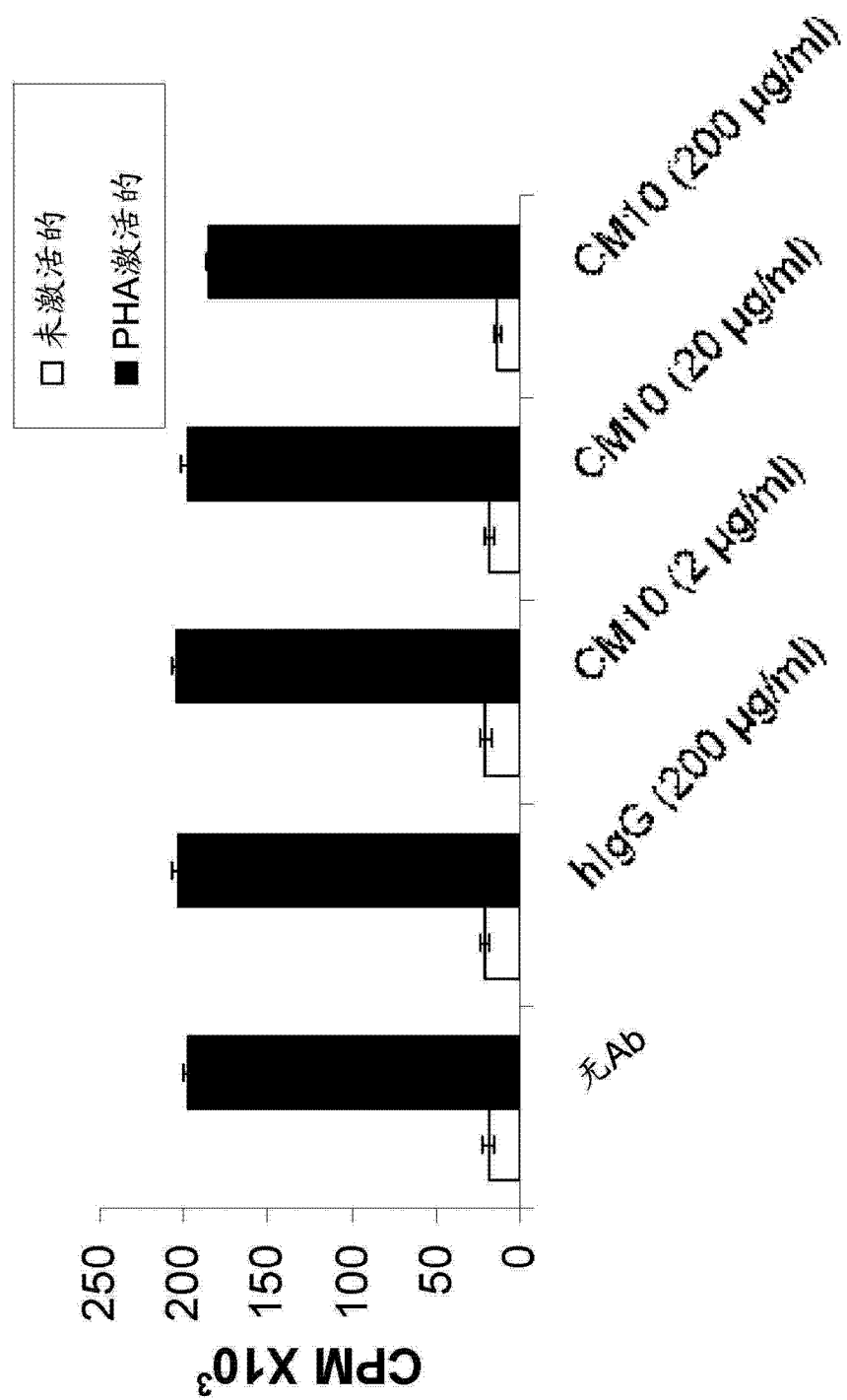


图 12

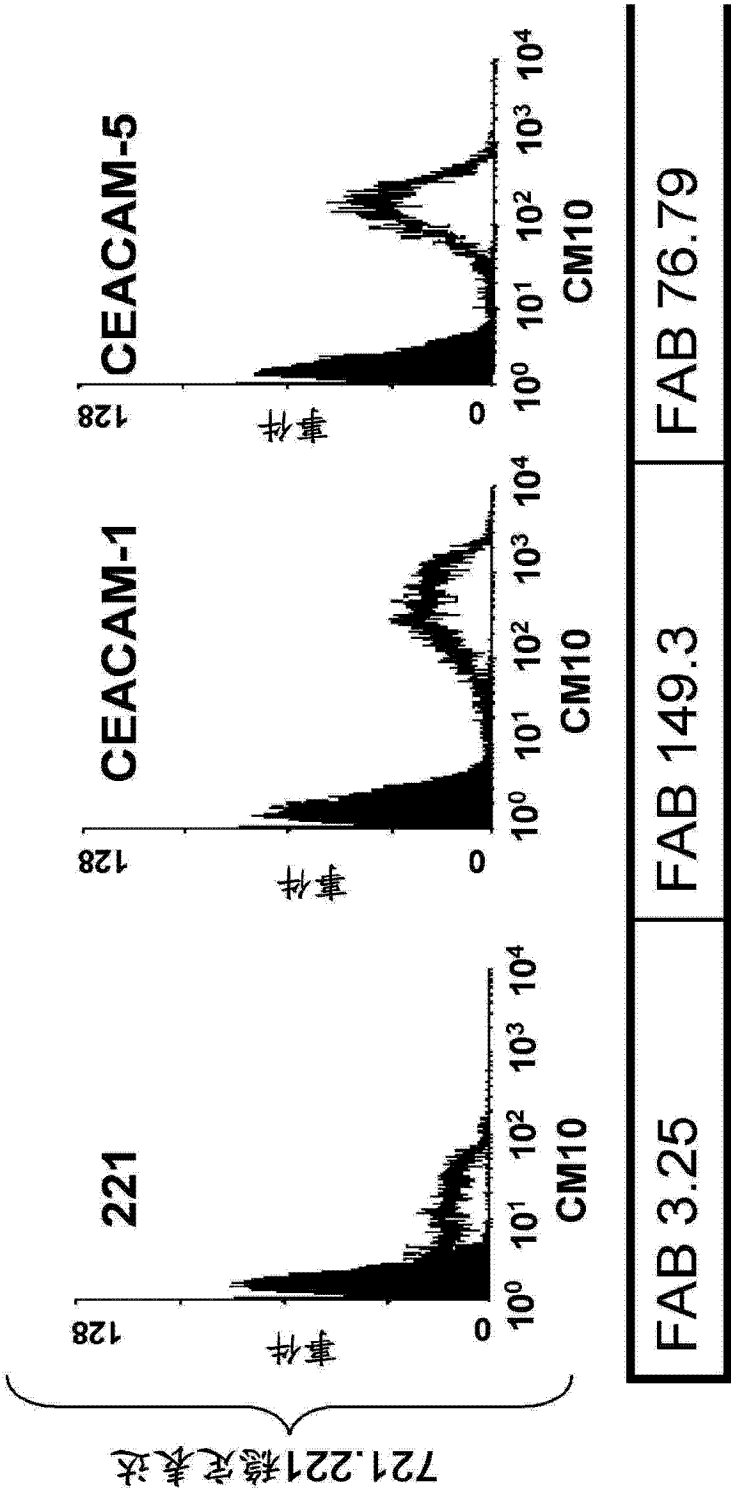


图 13

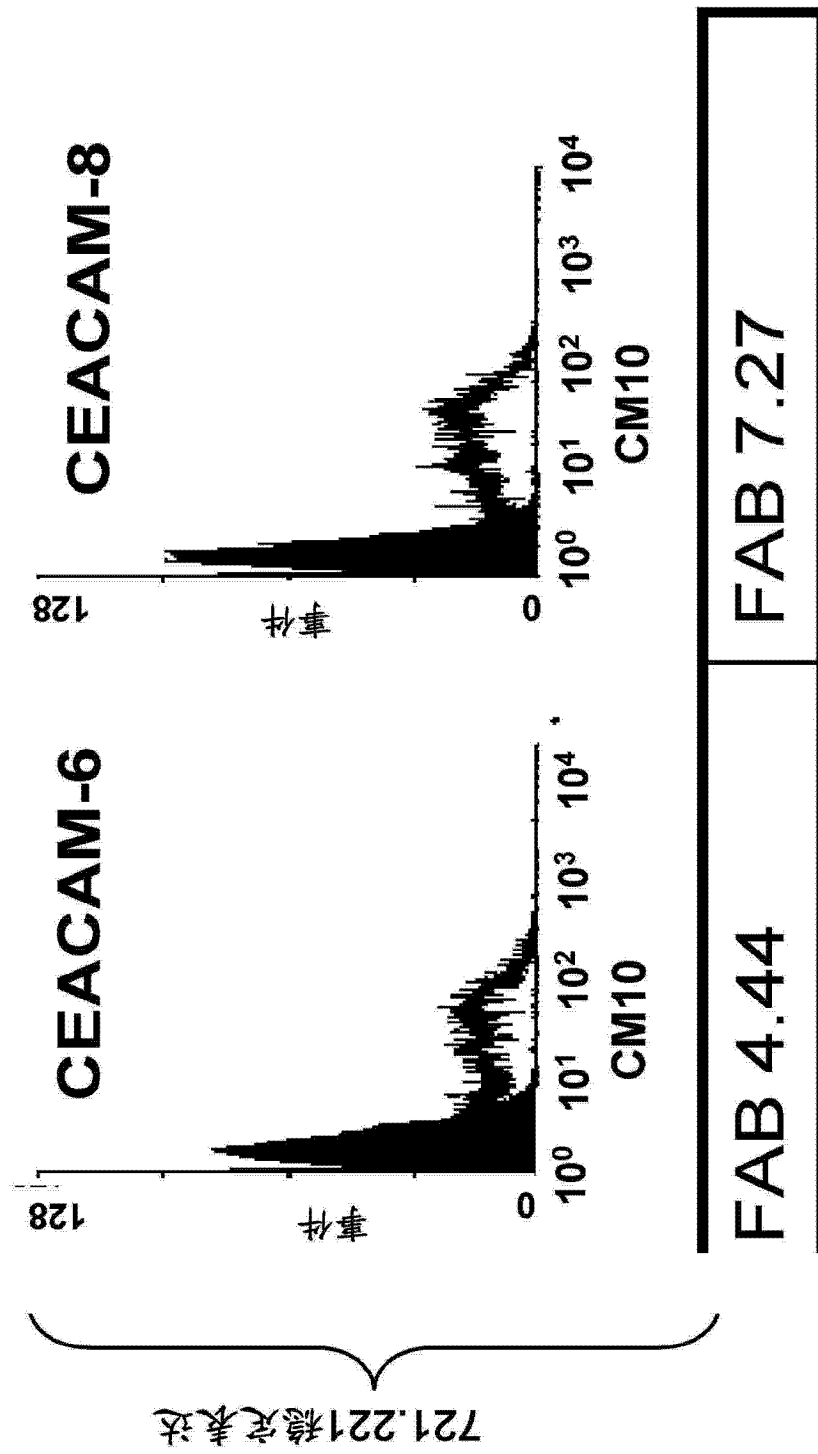
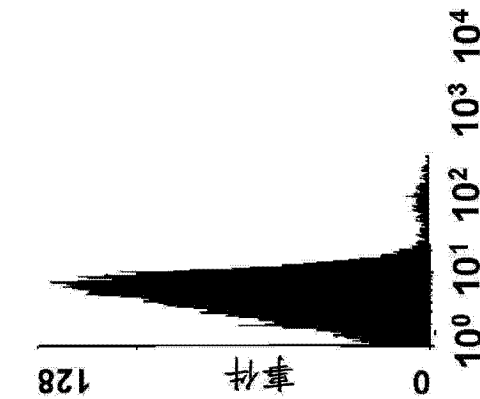
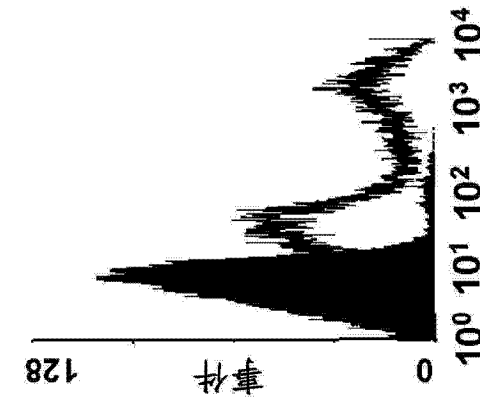
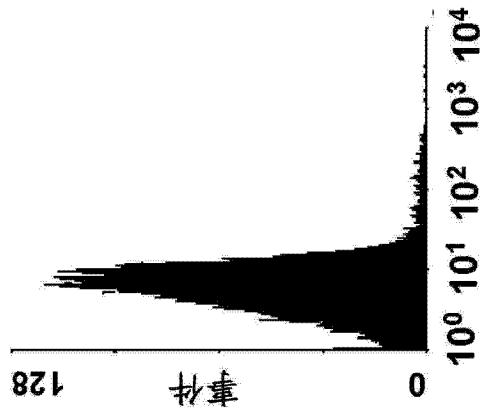


图 13 接上页

CEACAM-4

CEACAM-3

HEK 293T



HEK 293T瞬时表达

FAB 1.02

FAB 19.8

FAB 1.1

图 13 接上页

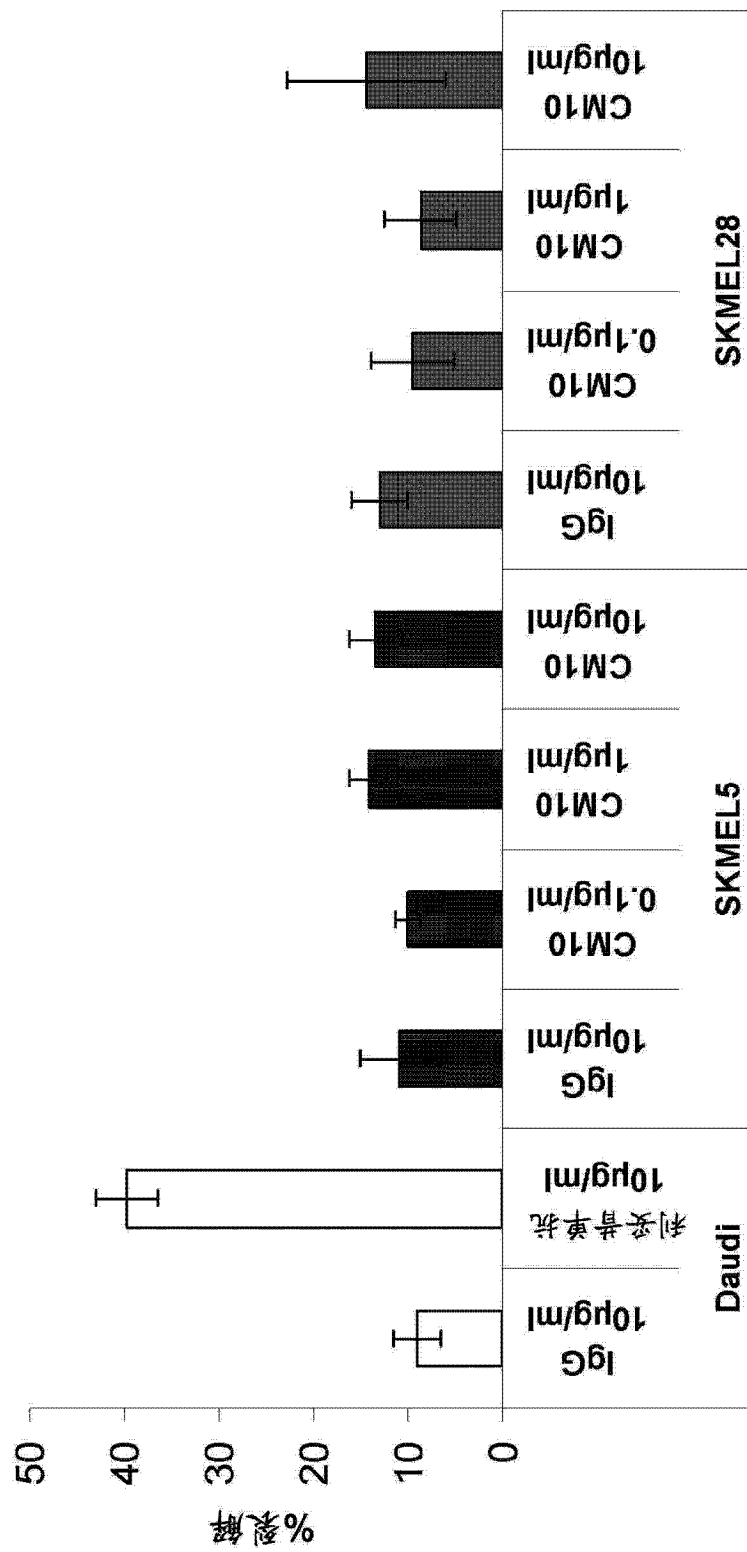


图 14

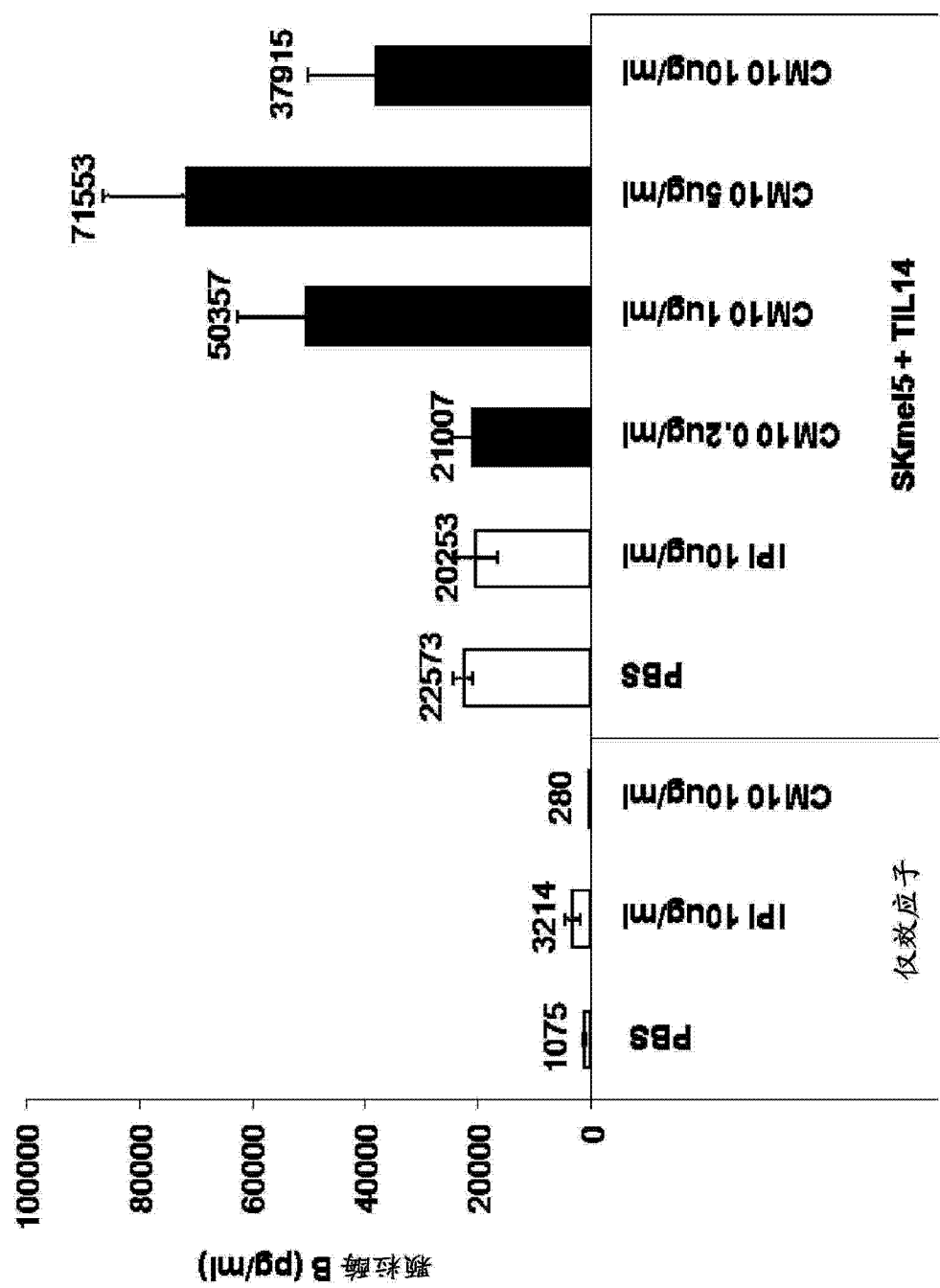


图 15

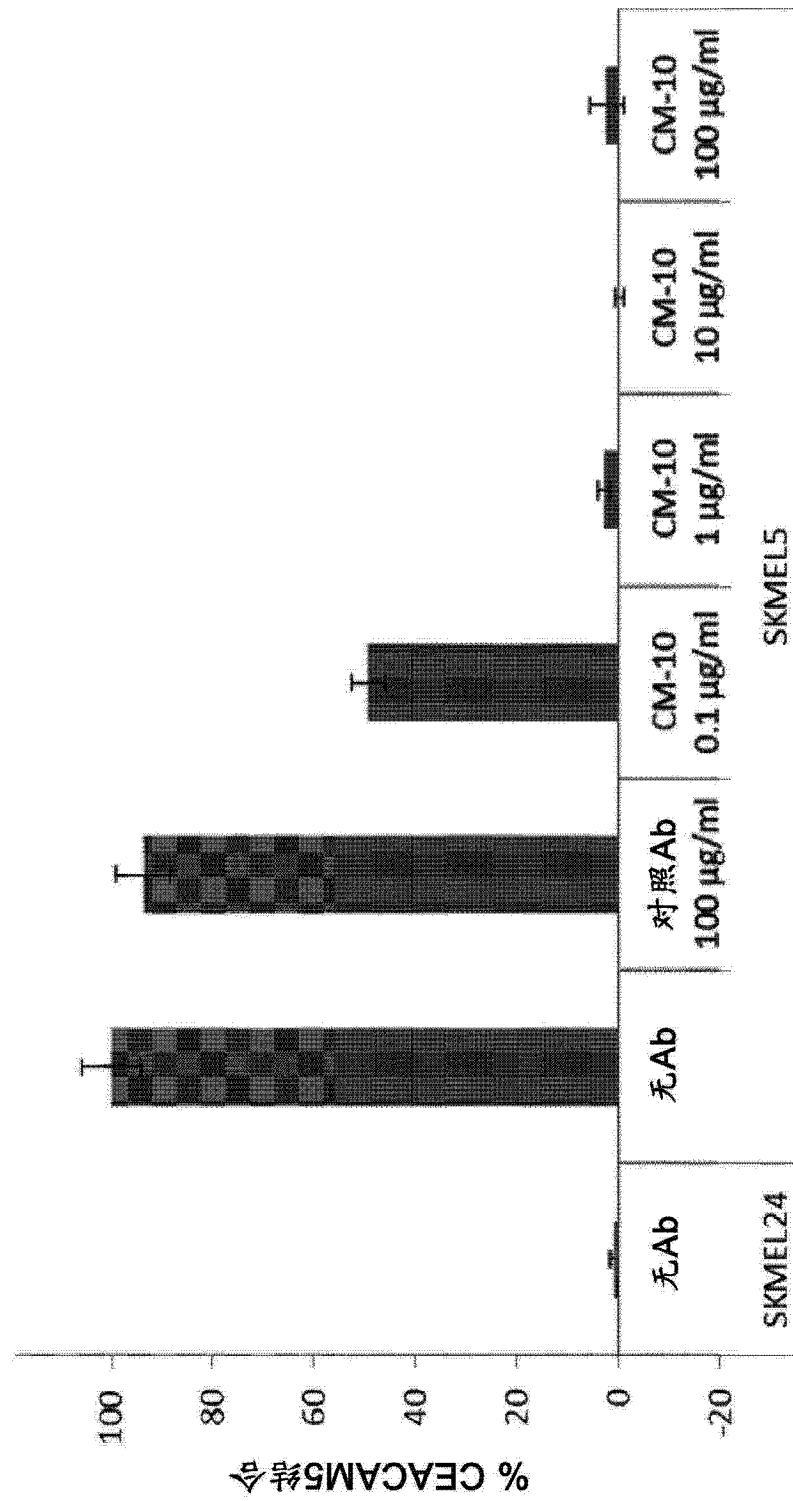


图 16

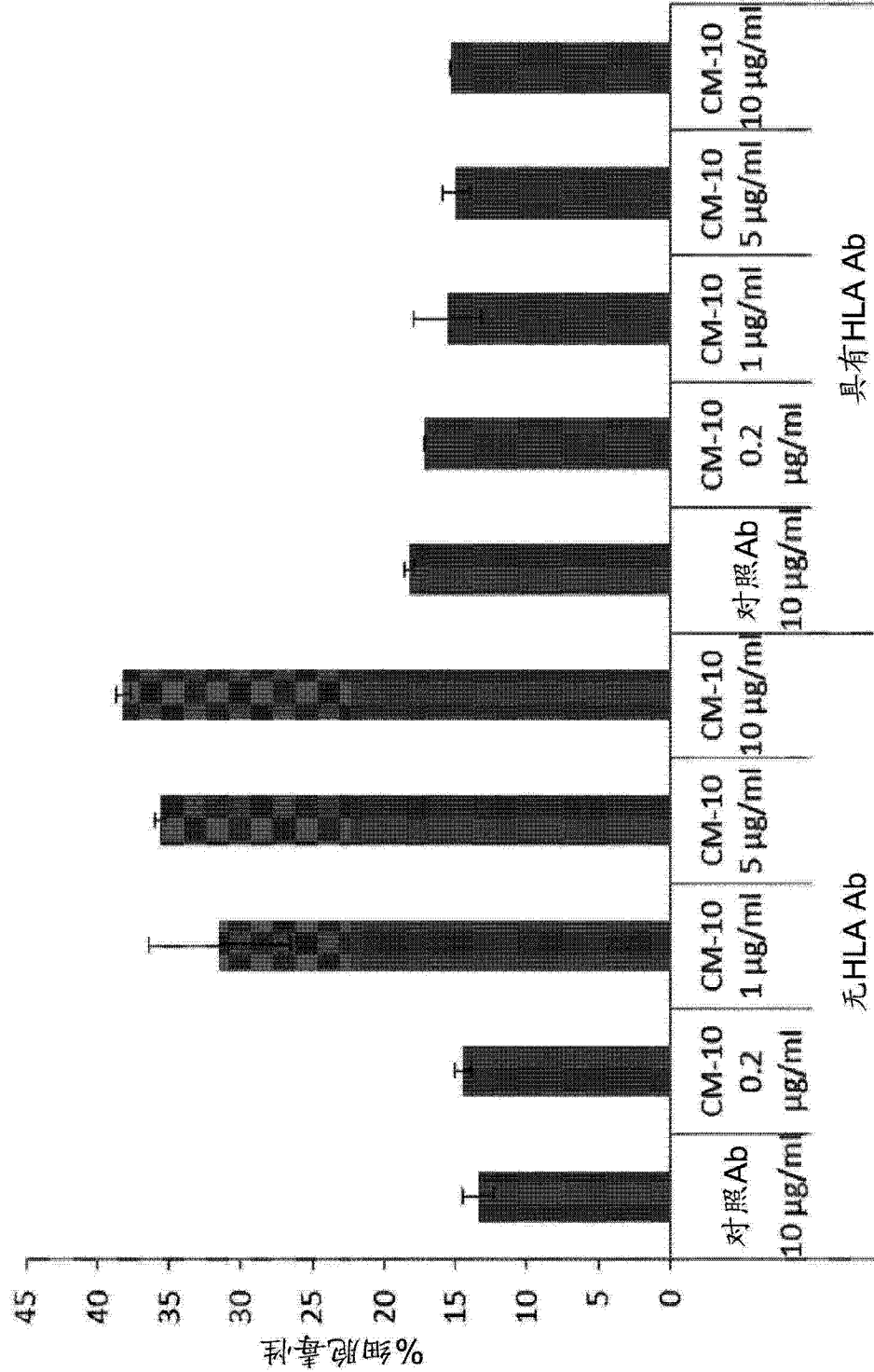


图 17

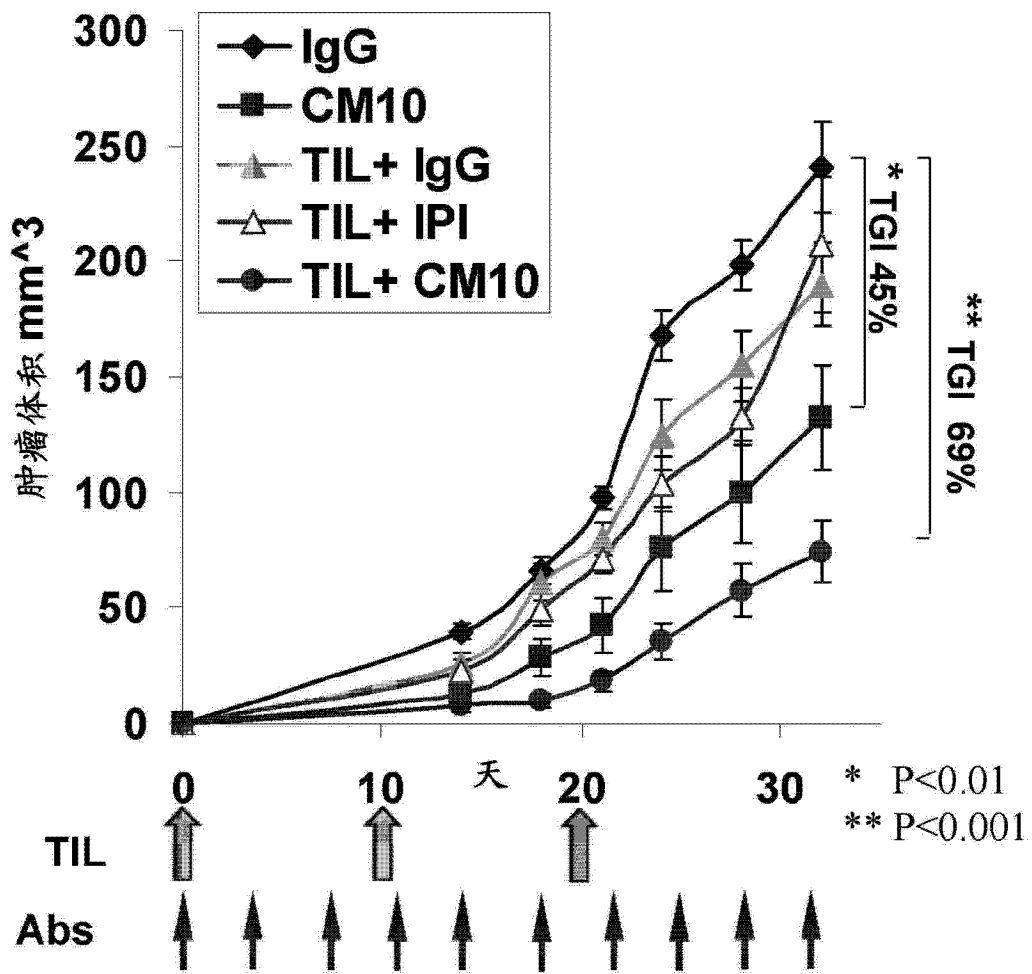


图 18

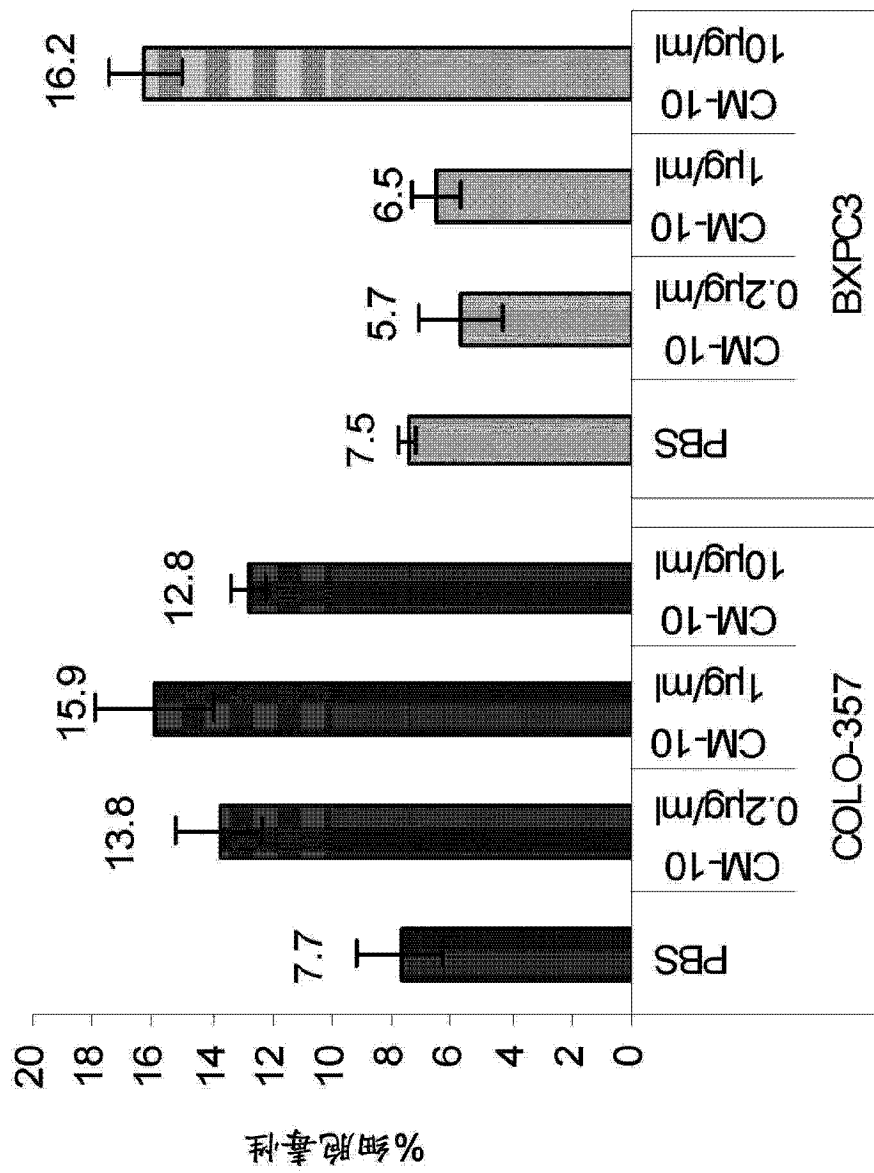


图 19

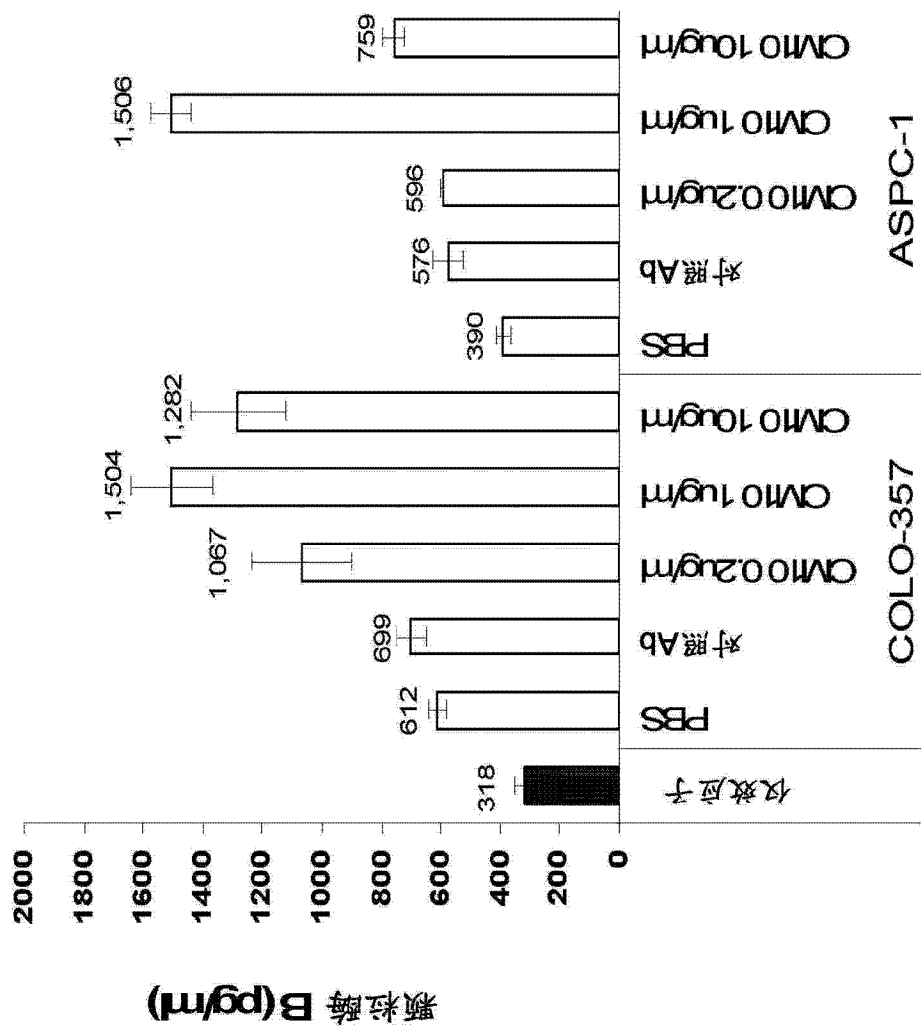


图 20

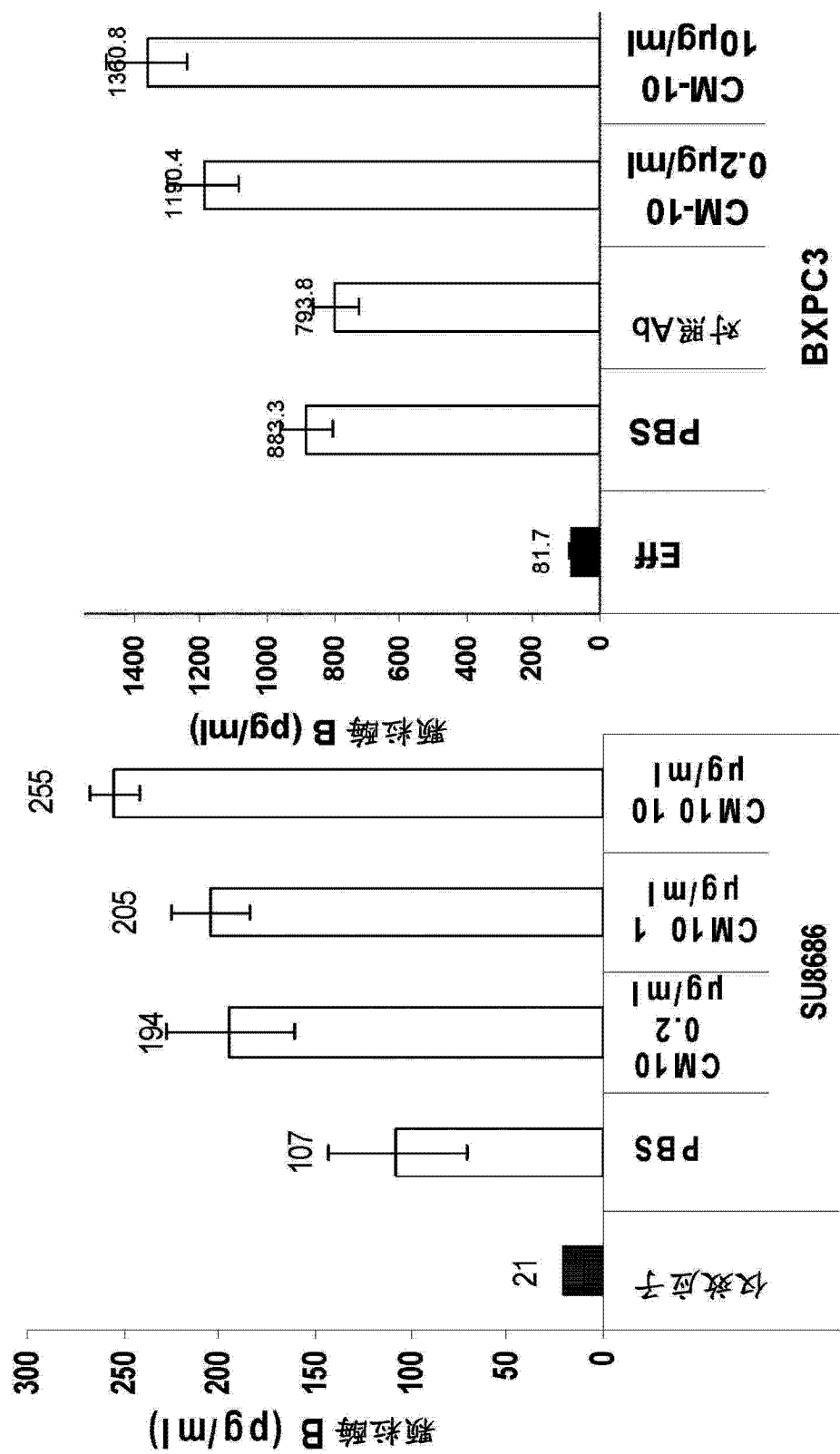


图 20 接上页

专利名称(译)	癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)的抗体		
公开(公告)号	CN103987729A	公开(公告)日	2014-08-13
申请号	CN201280049869.4	申请日	2012-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	特尔哈肖梅尔医学研究基础设施和服务有限公司 希凯姆生物治疗有限公司 特拉维夫大学拉莫特有限公司		
申请(专利权)人(译)	堤乐哈修门医学研究基础建设及服务有限公司 希凯姆生物治疗有限公司 雷蒙特亚特特拉维夫大学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	堤乐哈修门医学研究基础建设及服务有限公司 希凯姆生物治疗有限公司 雷蒙特亚特特拉维夫大学有限公司		
[标]发明人	加尔马克尔 泰希莱本摩西 亚伊尔沙比尔 伊拉娜曼德尔 雅各布沙克特 罗纳奥尔藤贝格		
发明人	加尔·马克尔 泰希莱·本摩西 亚伊尔·沙比尔 伊拉娜·曼德尔 雅各布·沙克特 罗纳·奥尔藤贝格		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/30 A61K39/395 G01N33/53 A61P35/00		
CPC分类号	A61K35/17 G01N33/686 C07K16/42 C07K2317/92 C07K16/3007 A61K2039/505 A61K39/39566 C07K2317/76 C07K2317/73 A61K45/06 C07K2317/24 A61P1/04 A61P1/18 A61P11/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/00 C07K16/28 C07K16/30 G01N33/53		
代理人(译)	王思琪 郑霞		
优先权	PCT/IL2011/000808 2011-10-11 WO		
其他公开文献	CN103987729B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了抗体和具有抗体的至少抗原结合部分的分子，该抗体和分子识别蛋白CEACAM1的特定表位且任选地还结合CEACAM蛋白家族的其他亚型。公开的抗体和抗体片段通过特定CDR序列被表征。还提供了此类抗体和抗体片段的制备方法和在治疗和诊断中的用途。

