



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101970497 B

(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 200880015767.4
(22)申请日 2008.04.02
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101970497 A
(43)申请公布日 2011.02.09
(30)优先权数据
07105628.7 2007.04.04 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2009.11.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2008/053913 2008.04.02
(87)PCT国际申请的公布数据
W02008/122551 EN 2008.10.16
(73)专利权人 希格马托制药工业公司
地址 意大利罗马
(72)发明人 A·M·安娜斯塔斯
F·派特隆泽里 R·德桑提斯
S·阿尔波提
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 李瑛

(51)Int.Cl.
C07K 16/30(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
(56)对比文件
CN 1976951 A,2007.06.06,
CN 1976951 A,2007.06.06,
Jan-Erik Frodin,et al.Mab17-1A and
cytokines for the treatment of patients
with colorectal carcinoma.《Hybridoma and
Hybridomics》.2002,第21卷(第2期),第99-101
页.
P Went,et al.Frequent high-level
expression of the immunotherapeutic
target Ep-CAM in colon,stomach,prostate
and lung cancers.《British Journal of
Cancer》.2006,第94卷第128-135页.
王春艳,等.人上皮细胞黏附分子融合蛋白
真核表达载体的构建_表达及初步鉴定.《细胞与
分子免疫学杂志》.2004,第20卷(第6期),第765-
768页.
审查员 陶冶

权利要求书2页 说明书14页
序列表7页 附图7页

(54)发明名称
抗-EpCAM抗体及其用途
(57)摘要
命名为ST3232/10的鼠来源的抗-EpCAM抗体
呈现出适于治疗和诊断应用的特性。其显示出对
天然抗原的高亲和性和良好的肿瘤选择性。

1. 抗-EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段,其中所述抗体或抗体片段的重链可变区三个互补性决定区(CDR)的氨基酸序列分别是SEQ ID No.2、SEQ ID No.4和SEQ ID No.6,所述抗体或抗体片段的轻链可变区三个互补性决定区(CDR)的氨基酸序列分别是SEQ ID No.8、SEQ ID No.10和SEQ ID No.12。

2. 根据权利要求1的抗-EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段,其能够完全并持久地抑制EpCAM表达肿瘤的生长。

3. 根据权利要求2的抗-EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段,其是单克隆抗体、scFv、Fv片段、Fab片段、F(ab)₂片段、多聚抗体、或嵌合抗体。

4. 根据权利要求2的抗-EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段,其是人源化抗体。

5. 根据权利要求2的抗-EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段,其是含有表位结合区域的肽或蛋白水解片段。

6. 根据权利要求3的抗-EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段,其中所述单克隆抗体是通过根据布达佩斯条约在Advanced Biotechnology Center,热那亚,意大利,以No.PD06004保藏的杂交瘤细胞系来产生的。

7. 根据权利要求1-5中任一项的抗-EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段,其与标记物连接。

8. 编码权利要求1-7中任一项的抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段的核酸。

9. 根据权利要求8的核酸,包含以下序列:SEQ ID No.1、SEQ ID No.3、SEQ ID No.5、SEQ ID No.7、SEQ ID No.9和SEQ ID No.11,或其简并序列。

10. 含有权利要求8或9任一项的核酸的表达载体。

11. 用权利要求10的表达载体转化的分离的宿主细胞。

12. 一种杂交瘤细胞系,其根据布达佩斯条约以No.PD06004保藏在Advanced Biotechnology Center,热那亚,意大利。

13. 权利要求1-7中任一项的抗-EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段在制备用于治疗表达EpCAM的肿瘤的药物中的用途,其中所述肿瘤选自:纤维肉瘤或结肠癌。

14. 权利要求1至7中任一项的抗EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段在制备用于体外诊断表达EpCAM的肿瘤的药剂中的用途。

15. 权利要求1至7中任一项的抗EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段在制备用于体内诊断表达EpCAM的肿瘤的药剂中的用途。

16. 一种药物组合物,含有有效量的根据权利要求1至7任一项的抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段和药物学上可接受的载体。

17. 一种药物组合物,含有有效量的根据权利要求1至7任一项的抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段和药物学上可接受的稀释剂。

18. 权利要求16或17的药物组合物,其用于放射免疫治疗。

19. 根据权利要求16或17的药物组合物,其在同一或分开的单位剂量中含有至少另一种肿瘤特异性抗体。

20. 根据权利要求19的药物组合物,其中肿瘤特异性抗体是不同于权利要求1至7中任一项的抗体的EpCAM抗体。

21. 用作体内肿瘤诊断剂的可注射的可溶性组合物,其中含有权利要求1至7中任一一项的抗-EpCAM抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段。

22. 用于免疫检测样品中能够与根据权利要求1至7任一一项的抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段结合的抗原的诊断试剂盒,其中含有权利要求1至7中任一一项的抗体或其特异性结合EpCAM的抗体片段和抗原-抗体复合物检测装置。

抗-EpCAM抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及抗人EpCAM单克隆抗体及其功能性衍生物,用于获得它们的方法和材料,所述抗体用于表达EpCAM的肿瘤的诊断和治疗的用途以及含有所述抗体的适用于医疗领域的材料。

[0002] 发明背景

[0003] 能够选择性地识别在肿瘤部位超表达的抗原的抗体对肿瘤组织的靶向是所有抗肿瘤免疫治疗的目标。上皮细胞粘附分子(EpCAM,swissprot no.P16422)也称为肿瘤相关钙信号转导蛋白1,TROP-1,GA733-2等,是在单纯性上皮的基底外侧膜上表达的I型跨膜糖蛋白,其中其参与钙无关性嗜性细胞粘附。胞外结构域由一个上皮生长因子样重复,接着甲状腺球蛋白重复和半胱氨酸缺乏区域组成,而胞内结构域是26个氨基酸长,并且存在两个 α -辅肌动蛋白的结合位点,用于与肌动蛋白细胞骨架连接(Winter MJ等,2003)。来自成人恶性肿瘤的细胞强烈超表达EpCAM,如Went和同事(2006)最近证实的,其报道了对大量结肠、胃、前列腺和肺肿瘤样本所获得的免疫组织化学结果。EpCAM超表达细胞易于与正常的细胞隔离开来,这与增殖性和恶性表型的产生相关联(Winter等,2003)。基于这些数据,探究了靶向EpCAM用于免疫治疗的可能性。

[0004] 鼠IgG2a抗体,依决洛单抗,对EpCAM阳性细胞具有一定的抗体依赖性细胞毒性(ADCC),在德国被批准用于临床使用并用于治疗已经经历了医疗外科手术的结直肠或胰腺癌的患者。在Dukes' C结直肠癌患者的依决洛单抗治疗后,微小残留病的七年跟踪结果表明32%的降低死亡率和降低23%的复发率(Riethmuller G等,1998;Weiner LM等,1993)。然而,由于其有限的抗肿瘤功效(Punt CJ等,2002)以及打算将抗体用于用其他活性化疗化合物辅助的情况下提出了新的临床试验(Frodin JE等,2002),临床研究的整体结果导致取消该药物作为单药治疗。

[0005] 针对该靶的其他抗体已经用于临床前或临床环境中。MT-201(Adecatumumab)是完全的人单克隆IgG1抗体,对EpCAM具有适度的亲和性(Naundorf S等,2002)。使用结肠癌细胞系HT-29在裸鼠异种移植物模型中证明了其功效(Naundorf S等,2002)。对各种肿瘤细胞系的体外研究已经表明MT201通过ADCC和补体依赖性细胞毒性(CDC)来介导靶细胞裂解(Prang N等,2005)。该抗体目前处于治疗激素难治疗性前列腺癌的临床研发中(Obernedder R等,2006)。

[0006] ING-1是靶向EpCAM阳性细胞的高亲和性人工程化单克隆抗体。其已经用于标准治疗难治性晚期腺癌患者的I期临床试验中,而来自该研究的数据表明对EpCAM具有高亲和性同时对肿瘤细胞的细胞毒性更大的抗体也可以诱导急性胰腺毒性损伤,因此限制了它们用于全身性给药的治疗窗口(De Bono JS等,2004)。对于抗体亲和性与免疫治疗功效的关联性存在分歧的意见。Velders等(1998)在体外数据中提出了抗体亲和性和抗原密度对ADCC的影响,这通过比较两种对EpCAM具有不同亲和性的抗体来获得。从该研究获得的数据揭示了高亲和性抗体可能介导低抗原表达水平或在相当的结合水平的细胞杀伤,并具有较高的功效。因为靶抗原表达的异质性是所有肿瘤的共有特征,因此使用高亲和性抗体能改善临

床结果。这种可能的全身性毒性作用,与高亲和性抗-EpCAM抗体的治疗使用相关,可以通过预靶向策略来降低,这种策略包括追踪步骤,以在给定的时间消除循环抗体。或者,可以将高亲和性抗-EpCAM抗体的使用限制于局部区域治疗。

[0007] 已经研发了人源化单链Fv抗体片段, NR-LU-10, EpCAM抗原特异性的, 遗传工程化为抗生物素蛋白链菌素融合蛋白, 用于预靶向放射免疫性疗法或放射免疫导向乳房外科手术。临床前数据表明NR-LU-10后给予的单剂量的800 μ Ci 90 Y-DOTA-生物素, 治愈了带有建立的皮下人小细胞肺癌或结肠癌异种移植物的老鼠 (Goshorn S等, 2001)。在Burak WE Jr等(2001)的第二个报告中, 标记的NR-LU-10Fab的使用在10名患者的7名中, 在用于揭示肿瘤位置的术中探测中是有用的, 因此证实了其作为靶向剂的能力。

[0008] 尽管单克隆抗体在几种病理学中的临床成功, 实体肿瘤的免疫治疗仍然是不能令人满意的。预靶向抗体导向放射免疫疗法 (PAGRIT™) 是允许放射性同位素在肿瘤中限制性和扩大性累积的多重治疗方法。用作第一步的抗肿瘤单克隆抗体的特异性和亲和性是治疗功效的基础。

[0009] 申请人报道了ST2146抗腱糖蛋白单克隆抗体在低和高抗原表达的人异种移植肿瘤中特别高而特异性的累积 (De Santis等, Clinical Cancer Research, p. 2191, 2006年4月1日)。

[0010] 基于EP 0 496 074的教导, G. Paganelli等研发了这种三步预靶向方法, 用于肿瘤的全身性和局部性治疗 (Cremonesi M.等, Eur. J. Nucl. Med. 26 (2) : 110-120, 1999; Paganelli G.等, Eur. J. Nucl. Med. 26 (4) : 348-357, 1999; Paganelli G.等, Cancer Biother. & Radiopharm. 16 (3) : 227-235, 2001)。

[0011] 关于三步预靶向方法的其他参考文献是W094/04702和US5, 578, 287。

[0012] 三步预靶向治疗是基于静脉内按序给予生物素化的抗-腱糖蛋白单克隆抗体、抗生物素蛋白链菌素和 90 Y-标记的生物素, 并各自在抗生物素蛋白链菌素和 90 Y-标记的生物素之前, 两次追踪给予抗生物素蛋白和生物素化的白蛋白, 以降低非特异性背景。

[0013] 在医学领域中, 需要更多的并且改进的用于癌症诊断和治疗中, 如例如用于PAGRIT方法中的抗-EpCAM抗体。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及抗体和抗体片段, 其还可以含有附加部分和诊断剂, 含有这些抗体和抗体片段的组合物以及含有它们的诊断和治疗组合物, 它们在治疗和诊断中的用途以及制备这些抗体和抗体片段的方法。

[0016] 本发明的目的是抗-EpCAM抗体或其功能性衍生物, 其中抗体重链的可变区包含至少一个具有选自SEQ ID No. 2; SEQ ID No. 4或SEQ ID No. 6序列的互补性决定区 (CDR)。

[0017] 优选, 抗体重链的可变区包含至少两个具有选自SEQ ID No. 2; SEQ ID No. 4或SEQ ID No. 6序列的互补性决定区 (CDR)。

[0018] 仍然优选, 抗体重链的可变区包含全部三个具有SEQ ID No. 2; SEQ ID No. 4和SEQ ID No. 6序列的互补性决定区 (CDR)。

[0019] 本发明的再一个目的是抗-EpCAM抗体或其功能性衍生物, 其中抗体轻链的可变区包含至少一个具有SEQ ID No. 8; SEQ ID No. 10或SEQ ID No. 12序列的互补性决定区 (CDR)。

[0020] 优选, 抗体轻链的可变区包含至少两个具有SEQ ID No. 8; SEQ ID No. 10或SEQ ID

No.12序列的互补性决定区(CDR)。

[0021] 更优选,抗体轻链的可变区包含全部三个具有SEQ ID No.8;SEQ ID No.10和SEQ ID No.12序列的互补性决定区(CDR)。

[0022] 本发明的再一个目的是抗-EpCAM抗体或其功能性衍生物,其具有包含至少一个、两个或全部SEQ ID No.2;SEQ ID No.4或SEQ ID No.6序列的重链可变区和包含至少一个、两个或全部SEQ ID No.8;SEQ ID No.10或SEQ ID No.12序列的轻链可变区。

[0023] 优选,根据本发明的抗-EpCAM抗体或其功能性衍生物能够完全并持久地抑制EpCam表达肿瘤的生长。

[0024] 本发明还涉及通过突变CDR序列中的一个或多个氨基酸来产生所公开的CDR的突变体。已知CDR中适当确定单个氨基酸置换的位置足以改善亲和性。研究者已经使用定向突变使一些免疫球蛋白产物的亲和性增加了大约10倍。这种通过突变CDR来提高或降低(即,调节)抗体的亲和性的方法是公知的(参见,例如,Paul, W.E., 1993)。因此,对本发明的CDR进行氨基酸的置换、缺失或添加来提高或降低(即,调节)结合亲和性或特异性也在本发明的考虑范围内。

[0025] 为了简洁,根据本发明的优选抗体应当以名称ST3232/10来标识。尽管本发明聚焦于ST3232/10,但是作为本发明的范例,本领域的普通技术人员将认识到,一旦已知本发明的公开内容,就可以在本发明的范围内生产和使用其他相似的抗体,和ST3232/10的抗体片段以及这些相似抗体的抗体片段。本领域技术人员可以通过合理数量的实验来生产这些相似的抗体。

[0026] 优选,抗-EpCAM抗体是单克隆抗体。更优选,通过根据布达佩斯条约在Advanced Biotechnology Center,热那亚,意大利,以No.PD06004保藏的杂交瘤细胞系来产生。

[0027] 仍然优选,抗体是scFv、Fv片段、Fab片段、F(ab)2片段、多亚基抗体、肽或含有表位结合片段的蛋白水解片段。

[0028] 仍然优选,抗体是嵌合的,与另一种蛋白质融合或与药剂或标记物连接。更优选,嵌合蛋白是鼠-人嵌合体。优选,融合蛋白含有细胞因子、抗生物素蛋白家族的蛋白质、生物素、标记的生物素或其他效应蛋白。

[0029] 本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物可以与药剂连接。连接可以通过共价键或通过抗体-表位连接。例如,抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物可以与第二种抗体交联,其中第二种抗体可以对药剂具有亲和性。药剂可以是细胞毒性剂。如在此所用的术语“细胞毒性剂”指的是抑制或防止细胞功能和/或导致细胞破坏的物质。术语用来包括放射性同位素(例如,I、Y、Pr)、化疗剂和毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段。该药剂可以是化疗剂。化疗剂是用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括阿霉素、亚德里亚霉素、5-氟尿嘧啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷(“Ara-C”)、环磷酰胺、噻替派、白消安、Cytosin、紫杉酚、顺铂、美法仑、长春花碱、博来霉素、足叶乙甙、异环磷酰胺、丝裂霉素C、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞滨、卡波铂、替尼泊甙、道诺霉素、洋红霉素、氨基嘌呤、更生霉素、丝裂霉素、埃斯培拉霉素(参见美国专利No.4,675,187)、美法仑和其他相关的氮芥。药剂可以是细胞因子。术语细胞因子是由一个作为胞间介体作用于另一个细胞的细胞群体释放的蛋白质的上位术语。这样的细胞因子的实例是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子中包括生长激素,如人生长激素、N-甲硫氨酰基人生长激素和牛

生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH);肝生长因子;成纤维细胞生长因子;促乳泌素;胎盘催乳质;肿瘤坏死因子;缪勒管抑制物质;鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血栓形成素(TPO);神经生长因子,如NGF;血小板生长因子;转化生长因子(TGF);胰岛素样生长因子-I和II;促红细胞生成素(EPO);骨生成诱导因子;干扰素,如干扰素- α 、- β 和- γ ,集落刺激因子(CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白细胞介素(IL),如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12;肿瘤坏死因子;和其他多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。如在此所用的,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物活性等价物。

[0030] 对于诊断,本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物可以连上标记物,如连上可检测的化合物或组合物,其直接或间接缀合到抗体上。标记物可以是自身可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记),或在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0031] 更优选,抗体是人或人源化抗体。

[0032] 因此,本发明提供了特异性结合EpCAM的抗体或抗体片段或抗体嵌合体(如,例如,鼠-人嵌合体或与如细胞因子、抗生物素蛋白家族的蛋白质或其他效应蛋白的分子的融合蛋白)或免疫球蛋白分子。本发明提供了包含至少一个ST3232/10的可变轻链的CDR和/或ST3232/10的可变重链的CDR的抗体或抗体片段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子。本发明的抗体或抗体片段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子可以是抗体、Fv片段、Fab片段、F(ab)₂片段、单链抗体或多聚抗体。本发明的抗体或抗体片段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子可以是或来自IgM、IgD、IgG、IgA或IgE同种型。

[0033] 本发明的另一个目的是所述抗体的重组衍生物。特别地,优选的重组衍生物是其中鼠恒定区由人对对应物替代的那些(Ferrer C.等,1996)或其中鼠恒定区由生物活性部分替代的那些,生物活性部分如例如为抗生物素蛋白家族的成员(Penichet ML等,1999)、用于刺激肿瘤定向免疫效应物的生长因子(如例如G-CSF、GM-CSF),或其中鼠恒定区由药理活性部分替代的那些,药理活性部分如例如毒素、超抗原、细胞因子或用于提高抗肿瘤治疗功效的任何其他蛋白(DiMassimo A.M.等,1997;Parente D.等,1997)。

[0034] 用于获得所述重组衍生物的方法是本领域公知的。

[0035] 本发明的另一个目的是所述抗体的缀合衍生物。特别地,优选的缀合衍生物是其中生物活性部分通过常规方法与抗体连接的那些。生物活性部分的实例是抗生物素蛋白家族的成员,用于刺激肿瘤定向免疫效应物的生长因子(如,例如G-CSF、GM-CSF),药理活性部分,如例如毒素、超抗原、细胞因子或用于提高抗肿瘤治疗功效的任何其他蛋白、抗肿瘤药物、放射性同位素。

[0036] 根据本发明,单克隆抗-人EpCAM或其片段的重组衍生物或缀合物也称为“衍生物”。在本发明最特别优选的实施方案中,除了抗体和片段以外,其衍生物也是生物素化的。

[0037] 本发明的另外的目的是编码本发明的抗体或其功能性衍生物,或与以上核酸杂交或由其简并序列组成的核酸。

[0038] 优选,核酸包括至少一个以下的序列:SEQ ID No.1、SEQ ID No.3、SEQ ID No.5、

SEQ ID No.7、SEQ ID No.9和SEQ ID No.11。

[0039] 另一个实施方案涉及编码本发明的抗体或抗体片段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子产物的纯化核酸分子。可以使用常规技术制得编码本发明的免疫球蛋白产物的核酸分子。例如,可以使用寡核苷酸合成仪合成寡核苷酸,并连接在一起形成编码本发明的免疫球蛋白产物的功能开放阅读框。核酸分子一旦合成,可以将其克隆至核酸载体中。核酸载体,如质粒、粘粒、噬菌粒、酵母质粒、噬菌体载体、TI质粒等是本领域已知的。载体可以是表达载体。表达载体和表达系统可从供应商如Stratagene (La Jolla,CA) 购得。

[0040] 本发明的另一个目的是含有本发明的核酸的表达载体。

[0041] 本发明的再一个目的是用本发明的表达载体转化的宿主细胞。

[0042] 可以通过转染制得细胞。转染的方法是已知的,并且用于原核细胞和真核细胞转染的试剂盒可以购自商业来源(例如,Stratagene,La Jolla,CA)。

[0043] 本发明的另一个目的是产生本发明的抗EpCAM抗体的杂交瘤细胞系。优选,杂交瘤细胞系是根据布达佩斯条约在AdvancedBiotechnology Center,热那亚,意大利,以No.PD06004保藏的杂交瘤cST3232/10。

[0044] 用于制备单克隆抗体的方法是本领域技术人员知识范围内的,并且根据标准程序,包括培养以上的杂交瘤细胞系和分离抗体。

[0045] 本发明进一步的目的是本发明的抗EpCAM抗体用作药物。优选,用作抗肿瘤药物。更优选,肿瘤选自:结肠癌、乳癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌或肺癌。本发明的另一个实施方案涉及治疗肿瘤患者的方法,包括将本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物或本发明的核酸给予所述患者。用于癌症免疫治疗的方法是已知的。参见,例如,Old, L.J.Immunotherapy for Cancer (癌症的免疫治疗),Scientific American,1996年9月。可以将抗体缀合到生物素上并通过使用追踪剂如抗生物素蛋白从循环中除去,以防止全身性给药可能的毒性作用。

[0046] 在此还公开了治疗实体肿瘤的方法,其包括,首先,从患病的人患者的实体组织器官(例如,结肠)摘除实体肿瘤(例如,表达EpCAM的实体肿瘤),然后给予患者抗肿瘤剂,如本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物(例如,与EpCAM结合的抗体),其以治疗有效量选择性地对实体肿瘤细胞是毒性的。在本发明的实施方案中,通过将抗肿瘤剂放置于切除腔中进行给药步骤。

[0047] 本发明的另外的目的是含有有效量的根据本发明的抗体或其衍生物和药物学上可接受的载体或稀释剂的药物组合物。优选,本发明的药物组合物是用于放射性免疫治疗的。药物组合物是该领域中常规的,并可以由本领域技术人员仅根据一般性常识来制造。本发明中提及的参考文献中给出了药物组合物的实例。同样适用于诊断试剂盒。特别优选如以上提及的Paganelli等的论文和EP 0 496 074中公开的用于肿瘤放射性免疫治疗的试剂盒。

[0048] 本发明的范围中包括含有抗体和/或其片段和/或重组衍生物和/或缀合物并与至少一种药物学上可接受的赋形剂和/或载体混合的药物组合物。

[0049] 本发明的再一个方面是用于肿瘤的放射性免疫治疗的药物,将其给予患有表达EpCAM的肿瘤的患者,并且该药物包括所述单克隆抗体或其蛋白水解片段,或衍生物。在优选的实施方案中,所述单克隆抗体或其蛋白水解片段或衍生物是生物素化的,在更特别优

选的实施方式中,该药物适用于放射性免疫治疗,特别是用于进行三步预靶向方法,如在本领域中,例如在EP 0 496 074, Paganeili等,1999和美国专利No.5,968,405中所述的。在这后一个方面中,根据本发明的药物将是试剂盒的形式,所述试剂盒由4个小瓶组成,其中第一个小瓶含有生物素化的抗体或其片段或衍生物,第二个小瓶含有抗生物素蛋白,第三个小瓶含有生物素化的白蛋白,第四个小瓶含有放射性标记的生物素或生物素衍生物。Paganeili等,1999中提供了这种试剂盒。抗生物素蛋白包括抗生物素蛋白、抗生物素蛋白链菌素、PEG-抗生物素蛋白或PEG-抗生物素蛋白链菌素、野生型或去糖基化的双-或多抗生物素蛋白或双-或多抗生物素蛋白链菌素。放射性标记的生物素含有放射性核素,如在EP 0 496 074中所公开的,优选例如,在W002/066075中公开的⁹⁰Y生物素衍生物。Paganeili等,1999中公开了这种试剂盒。优选,小瓶适用于人注射。

[0050] 优选,组合物在相同单位剂量中或分开地含有至少另一种肿瘤特异性抗体。优选,肿瘤特异性抗体是不同于本发明抗体的EpCAM抗体。另一个实施方式涉及含有本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物的治疗组合物。可以以含有抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物和药学上可接受的载体或稀释剂的组合物的形式来提供本发明的免疫球蛋白产物。治疗组合物可以用于治疗哺乳动物如人的疾病。本发明还提供了治疗哺乳动物的方法,包括将治疗有效量的本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物给予哺乳动物,其中哺乳动物患有需要使用该抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物来治疗的疾病,如癌症。

[0051] 本发明的另一个目的是本发明的抗-EpCAM抗体用于诊断中。优选,作为抗肿瘤诊断。更优选,作为体内的抗肿瘤诊断。疾病的检测或诊断包括以下步骤:在允许所述抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物与EpCAM抗原之间形成复合物的条件下用本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物靶向来自患者的组织样本,并测定所述复合物的形成。根据本发明的抗体可以应用于各种类型的免疫或生化诊断技术中。例如,诊断技术包括(1)使用荧光抗体或化学染色方法,其中用染料例如荧光染料标记单克隆抗体,以允许可明显观察到单克隆抗体与抗原之间的连接的存在,(2)酶-抗体方法,使用酶替代荧光染料来标记单克隆抗体,(3)ELISA方法,使用蛋白标记的二抗来测量抗原的量等,(4)放射性免疫测定方法,其中用同位素标记单克隆抗体和(5)免疫沉淀方法,利用由抗原-抗体反应引起的聚集反应。

[0052] 诊断技术进一步包括Western印迹方法,其中通过电泳分级分离蛋白质,并通过单克隆抗体来检测。对于单克隆抗体,Western印迹方法在编码抗原蛋白的多核苷酸的直接克隆中是有利的。Western印迹方法包括各种改进,如Western方法, South Western方法, NorthWestern方法和West Western方法。

[0053] 在本发明的另一个实施方式中,抗体及其片段可以进一步含有附加的标记和/或诊断剂。所述标记和/或诊断剂是本发明所属领域的技术人员公知的。根据本发明的优选实施方式,所述抗体或其蛋白水解片段是生物素化的。

[0054] 本发明的另外的目的是用于体内肿瘤诊断的可注射的可溶性组合物,其含有本发明的抗-EpCAM抗体。

[0055] 本发明的另外的目的是免疫检测样品中能够与根据本发明的抗体或其衍生物结合的抗原的方法,其包括以下步骤:在适当条件下用根据权利要求1至14的抗体或其衍生物

培养样品,以具有抗原-抗体复合物,并检测抗原-抗体复合物。

[0056] 本发明的另外的目的是用于根据权利要求30的方法的诊断试剂盒,其含有根据权利要求1至14的抗体或其衍生物和抗原-抗体复合物检测装置。

[0057] 在本发明的另一个实施方案中,在治疗试剂盒中,将生物素化的抗体与其他EpCAM特异性抗体结合。或者,将生物素化的抗体与其他肿瘤特异性抗体结合。EP 0 496 074、Paganeelli等,1999和美国专利No.5,968,405中提供了这种试剂盒的一般教导。

[0058] 特别地,本发明还包括容器,任选包括多个隔间,含有生物素化抗体或其片段或衍生物,适用于三步预靶向方法的治疗试剂盒中的缓冲剂和试剂。

[0059] 本发明的另一个目的是所述单克隆抗体或片段,或其重组衍生物或缀合物或其生物素化衍生物用于制备诊断装置、用于检测表达EpCAM的疾病,特别是用于肿瘤体内成像的用途。

[0060] 如以下实施例中详细给出的,从相应的杂交瘤细胞克隆cST3232/10中获得ST3232/10。

[0061] 就本发明的工业方面而言,应当将在此公开的抗体适当地配制在药物组合物或诊断试剂盒中,如该技术领域中通常所做的。

[0062] 在下列描述中还应当参照以下附图通过非限制性实施例来详细地公开本发明。

[0063] 图1:在蛋白A柱(MabSelect SuRe,GE Healthcare)上纯化的cST3232/10收集物的4-12%BisTris SDS-PAGE(Precast,Invitrogen,USA)。泳道1-3:在非还原条件下的纯化的ST3232/10Mab;泳道4-6:在还原条件下的纯化的ST3232/10Mab。跑胶缓冲液1x MES。通过考马斯(Simplie Blu,Invitrogen,USA)进行凝胶染色。

[0064] 图2:纯化的ST3232/10在TSGK3000柱上的凝胶过滤,在pH7的PBS中跑胶。横坐标为时间(分钟),而纵坐标为毫吸收单位(mAU)。

[0065] 图3:抗EpCAM抗体的FACS特异性测试。用没有天然地表达EpCAM($1\mu\text{g}/10^6$ 细胞,1h 4°C)小鼠纤维肉瘤L细胞培养ST3232/10或其他对照抗体(M104,HT29/26和T16),该L细胞用人TROP-1分子(图A-C)、人TROP2分子(图D-F)或在没有引入外源蛋白时用空载体(图G-I)转染过。根据制造商的说明使用PE-缀合的二抗(BD,USA),并通过用7-AAD(FACSCalibur,BD Biosciences,USA)染色来评价细胞死亡率。使用TROP-1阳性细胞(图A),ST3232/10显示出阳性,而使用野生型L细胞或用TROP2分子转染的那些(分别为图G和D)显示出阴性。用其他EpCAM特异性抗体观察到相似的结果(图B、E、H:M104;C、I:HT29/26)。T16抗体用作TROP2-L细胞中的阳性对照(图F)。

[0066] 图4:MCF7乳房肿瘤细胞系上用Alexa488缀合的ST3232/10的共焦显微镜检查。将MCF7细胞涂布于15x15mm盖玻片上,通过在PBS/4%多聚甲醛中培养48小时后在室温下固定30分钟。然后将细胞透化并用抗体染色,通过共焦显微镜检查法分析几个视野。Alexa488-ST3232缀合物证明了预期的染色模式,细胞-细胞边界强度最高,以及分离斑块的染色。在图A和B中记录了两个分离斑块的实例。

[0067] 图5:ST3232/10和单克隆抗体HT29/26抗EpCAM对HT29结肠癌细胞系上表达的抗原的免疫反应性。数据表示为在用HT29结肠癌培养的两个抗体的递增浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$,对数标度,X轴)下的光密度(OD,在405nm测量的)变化(线性标度,Y轴)。

[0068] 图6:ST3232/10与固定于CM5传感器芯片上的EpCAM分子的胞外域结合的动力学分

析和参数。图A:注射的Mab浓度(500、250、62.5、15.6和7.8nM)作为时间(分钟,X轴)和共振单位(RU,Y轴)函数的传感图。图B:将BiaEvaluation软件中的二价模型用于数据拟合;对于每个时间点(X轴),图中记录了残数(Y轴),表示观察到的和预期的曲线之间的RU差异。动力学常数如下: $ka_1=7.75E+04\pm 297$, $kd_1=7.20E-05\pm 8.48E-06$, $K_D=9.3E-10$, $\chi^2=1.97$ 。

[0069] 图7:ST3232/10对人肿瘤和正常组织的反应性。例如,显示了结肠和肺癌(分别为图A和C)与其正常对应物(分别为图B和D)比较的免疫组织化学结果。人肿瘤组织强烈染色为棕色。

[0070] 图8:裸鼠中的异源移植物以及用ST3232/10与依决洛单抗(**Panorex®**)相比较的治疗。将用人Trop-1转染(L/Trop-1)或未转染(L/载体)的鼠L纤维肉瘤细胞皮下注入裸鼠中。接种那天,用200 μ g ST3232/10(L/载体+ST3232和L/Trop-1+ST3232)、依决洛单抗(L/Trop-1+Panorex)或无关鼠IgG(L/载体和L/Trop-1)治疗动物。在第7天、第15天和第22天进行其他三次给药,如箭头所示。监控肿瘤进展直至第50天。

[0071] 图9:裸鼠中的异种移植物以及用ST3232/10与M104抗体比较的治疗。将天然表达Trop-1的人结肠癌细胞系KM12-SM皮下植入裸鼠中。从接种那天开始,用200 μ g ST3232/10(ST3232组)、M104(M104组)或载体(对照组)进行四次治疗,一周一次。监控肿瘤进展直至第30天。

[0072] 方法

[0073] 杂交瘤细胞

[0074] 为了产生新的抗EpCAM的杂交瘤细胞克隆,用人EpCAM分子(NCBIRefSeq NM_002354)稳定转染的L鼠纤维肉瘤细胞系(Alberti S等,1988)使Balb/c小鼠免疫。通过标准方法(Cianfriglia M等,1986)将来自免疫小鼠的脾细胞与Sp2/0Ag14骨髓瘤细胞融合,并通过对表达EpCAM的肿瘤细胞系如HT29的细胞荧光测量来筛选杂交瘤群体。通过在含FCS的培养基中极限稀释两次和在无蛋白培养基(Animal Derived Component Free Medium HyClone,HyQRPerbio)中极限稀释四次来克隆EpCAM特异性杂交瘤。将源自第四次极限稀释克隆的阳性克隆之一命名为cST3232并在迷你生物反应器中发酵。cST3232细胞系的稳定性为98.65%。因此,选择阳性克隆cST3232/10并扩增用于进一步的研究。

[0075] 抗体

[0076] ST3232/10是通过商业试剂盒(Roche,德国)测定的IgG1/k同种型的鼠免疫球蛋白。使用退火到抗体恒定区的一对引物(5'-TGTC AAGAGCTTCAACAGGA-3'(SEQ ID NO:13),5'-AAGATGGATACAGTTGGTGC-3'(SEQ ID NO:14)),从环化的cDNA扩增 κ 轻链可变区,如M.Sassano等(1994)中所述的。

[0077] 使用退火到抗体恒定区的引物寡核苷酸鼠 γ 1CH1 5'-ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCAG-3'(SEQ ID NO:15)和寡核苷酸鼠 γ 1CH35'-GCACAACCACCATACTGAGAAG-3'(SEQ ID NO:16),从环化的cDNA扩增 γ 重链可变区,如M.Sassano等(1994)中所述的。

[0078] 使用以下的条件进行PCR:94 $^{\circ}$ C,40秒,62 $^{\circ}$ C,40秒,72 $^{\circ}$ C,1分钟,30个循环。

[0079] 使用TA克隆试剂盒双启动子PCR II(Invitrogen,#K2050-01),将扩增的片段在PCR II克隆载体中直接克隆。将含有 κ 轻链的九个克隆和含有 γ 重链可变区的7个克隆测序。在德国的MWG Biotech进行测序。对两条链都进行了测序。没有发现不确定性。

[0080] SDS-PAGE分析

[0081] 在非还原条件和还原条件下,将抗体在4-12%梯度的Bis TrisNuPAGE上跑胶,使用1xMES作为跑胶缓冲剂,并用考马斯溶液进行染色(所有试剂来自Invitrogen,USA)。

[0082] 色谱特征

[0083] 将ST3232/10以1ml/分钟的流速在TSGK3000柱(TosohBioscience GmbH, Stuttgart,德国)上过柱,使用PBS+NaN30.05%作为跑胶缓冲液。

[0084] 细胞转染

[0085] 根据Alberti S等,1988,进行使用Trop-1或Trop-2的转染。

[0086] FACS分析

[0087] 通过对一组人细胞系的流式细胞测量来分析与细胞表面上的天然Trop-1分子结合的ST3232/10。在96-孔V底平板中进行两步反应,使用约 3×10^5 细胞/孔。首先用1 μ g/孔的ST3232/10抗体培养细胞悬浮液;然后,用2 μ l PE-缀合的抗鼠二抗(550589, BD Pharmingen, Erembodegem, 比利时)。对于每一步,将细胞在4 $^{\circ}$ C下培养30分钟,用含有1% FCS的PBS洗涤。最后一次洗涤后,将细胞重悬浮于PBS中,用于使用带有专用软件的FACSArray仪器(BD Biosciences, Erembodegem, 比利时)来获取和分析。将其他Trop1、Trop2或无关抗体用作对照,并将7-AAD(BD Biosciences, Erembodegem, 比利时)加入样品中(5 μ l/ 10^6 细胞),用于生活力染色。

[0088] 共焦显微镜检查

[0089] 通过Alexafluor-488标记的ST3232/10将乳房肿瘤细胞系MCF7染色,并通过共焦显微镜检查法来分析。将MCF7细胞涂布于15x15mm的盖玻片上,并通过在PBS/4%多聚甲醛中培养48小时后在室温下固定30分钟。在含有0.05%皂苷的SM(PBS中10%血清)中在室温下透化30分钟后,将一抗(1 μ g ST3232-Alexa488/载玻片)在SM+皂苷中在室温下培养30分钟。在SM中洗涤3次后,将盖玻片固定好用于共焦显微镜检查。

[0090] 细胞ELISA

[0091] 最初用200 μ l/孔1xPBS,10%FCS将96孔平板在37 $^{\circ}$ C下阻断30分钟,然后接种100 μ l总体积中的250.000细胞/孔加一抗。将平板在37 $^{\circ}$ C下培养1小时,然后用1xPBS,1%FCS通过在2000rpm下离心几秒钟来洗涤三次。将碱性磷酸酶缀合的抗鼠IgG(Sigma A2429,1/1000稀释度)加入到一抗-细胞复合物中,并在室温下培养1小时,然后在洗涤五次后,将200 μ l pNpp底物(Sigma A3496)加入到每个孔中并在37 $^{\circ}$ C下培养30分钟。最后将平板离心并将170 μ l上清液转移至新的平板中,并使用ELISA分光光度计(SEAC Sirio S)在405nm下读数。

[0092] 表面等离子共振

[0093] 通过固定在CM5芯片上的可购得的嵌合融合蛋白Fc-EpCAM胞外域(R&D, USA)的表面等离子共振(SPR, Biacore X, Biacore, Uppsala, 瑞典)来评价ST3232/10对EpCAM的亲合性。通过二价模型(Biaevaluation软件, v.3.1, Biacore, Uppsala, 瑞典)来评价注射500-7.8nM浓度范围的ST3232/10获得的曲线。

[0094] 免疫组织化学

[0095] 将来自TRISTAR Technology实验室(USA)的冷冻切片用于选择性研究,这些切片为35个肺癌和10个正常肺(cod.#49561006),35个结直肠癌和10个正常结肠(cod.#49561004),35个卵巢癌和10个正常(cod.#49561006)和带有正常组织的载玻片(cod.#49561001)。将ST3232/10在阻断溶液(PBS+2.5%标准马血清)中稀释至5 μ g/mL。在复制载玻

片上使用与测试物质相同的浓度的同种型匹配负对照。

[0096] 根据制造商的说明来处理载玻片,并通过使用Vectastain ABC Elite试剂盒 cod.PK6102试剂盒(Vector Laboratories)来揭示抗体结合。组织水合后,通过将载玻片浸入0.3%过氧化氢酶溶液中5分钟来进行内源性过氧化物的淬灭。在PBS中洗涤5分钟x 3次并用PBS+2.5%马标准血清阻断切片后,将在阻断溶液中稀释至5 μ g/mL的一抗加入,在室温下持续2小时。用PBS洗涤3次后,用山羊抗鼠生物素缀合二抗将载玻片培养30分钟,然后用抗生物素蛋白-生物素复合物过氧化物酶培养30分钟。再次洗涤后,将载玻片在**Vector®** DAB/Ni底物试剂盒(Cat.SK-4100)中的新鲜DAB溶液中培养2分钟,在自来水中停止反应。通过浸入Meyer's苏木精中10秒钟来进行复染色。最后,将载玻片在75%、80%、95%或100%乙醇中分别脱水1分钟,在二甲苯中清洗,用合成的固定剂永久地固定,并用显微镜观察。

[0097] 体内模型:无胸腺裸鼠中的同种异体移植

[0098] 将用Trop-1转染的(L/Trop-1)或没有用人Trop-1转染的(L/载体)小鼠L纤维肉瘤细胞皮下注入三组无胸腺裸鼠中(10只动物/组)。接种那天,用200 μ g ST3232/10(L/载体+ST3232和L/Trop-1+ST3232)、依决洛单抗(L/Trop+Panorex)或无关小鼠IgG(L/载体和L/Trop-1)治疗动物。在第7天、第15天和第22天进行其他三次给药,如箭头所示的。在所有组中,通过卡尺测量来评价肿瘤生长直至第50天。

[0099] 体内模型:人结直肠细胞系的异种移植

[0100] 将天然表达Trop-1的人结肠癌细胞系KM12-SM皮下植入裸鼠中。从接种那天开始,使用200 μ g ST3232/10(ST3232组)、M104(M104组)或载体(对照组)来进行四次治疗,一周一次。监控肿瘤进展直至第30天。

[0101] 结果

[0102] 表I中显示了ST3232/10可变重链(VH)互补性决定区和可变轻链(VL)互补性决定区的序列。

[0103] 表I:ST3232/10抗体的VH和VL互补性决定区的序列

[0104]

	核苷酸序列	氨基酸序列
可变重链		
CDR1	AGCGGTATTACTGGAAC (SEQ ID 1)	SGYYWN (SEQ ID 2)
CDR2	TATATAAGTTACGACGGTAGGAATAAGTACAAC CCATATCTCAAAAAT (SEQ ID 3)	YISYDGRNKYNPYLKN (SEQ ID 4)
CDR3	GCCCTCGGGGGGATTACGATGCTTTGGACTGC (SEQ ID 5)	ALGGDYDALDC (SEQ ID 6)
可变轻链		
CDR1	AAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGT CTGTAAACAGTAGAAGTCAAAGAACTACTTG ACC (SEQ ID 7)	KVTMSCKSSQSLNRSQKNYLT (SEQ ID 8)
CDR2	TGGGCATCCACTAGGGAATCT (SEQ ID 9)	WASTRES (SEQ ID 10)
CDR3	CAGAATGATTATATTTATCCGCTCACG (SEQ ID 11)	QNDYIYPLT (SEQ ID 12)

[0105] 如通过SDS-PAGE分析和色谱特征所示(图1和2),证明了ST3232/10对于轻链和重链组成是同源的。实际上,将抗体重复三份在4-12%梯度Bis Tris NuPAGE上跑胶,使用1xMES作为跑胶缓冲液,并用考马斯溶液染色(所有试剂来自Invitrogen,USA),在非还原条件下(泳道1-3)显示了预期分子量的条带(150KDa)。在还原条件下(泳道4-6),只有对应于重链(50KDa)和轻链(25KDa)的两条条带可见,因此表明不存在其他污染产物。通过色谱特征证实了这种发现,其中观察到从TSGK3000柱上过柱的ST3232/10洗脱的单个均一峰(图2)。

[0106] 通过对用EpCAM(TROP-1)或高同源分子TROP2转染的不表达抗原的小鼠细胞系的FACS分析来评价ST3232/10对EpCAM家族成员的特异性。如图3中所示的,ST3232/10对EpCAM是特异性的,因为它只与Trop-1阳性细胞反应(图A),而不与Trop-1阴性细胞如L细胞(图G)或L-Trop2细胞(图D)反应。使用其他EpCAM特异性抗体观察到相似的结果(图B、E、H:M104; C、I:HT29/26)。将T16抗体用作TROP2-L细胞中的阳性对照(图F)。

[0107] 此外,ST 3232/10具有与其他EpCAM抗体如M104相当的结合活性(Klein C.E.等,1990)。通过对一组癌细胞系的细胞荧光检测研究证明了它们对天然抗原的高效识别,其中观察到不同水平的EpCAM分子(表II)。

[0108] 表II:使用ST3232/10或M104抗-TROP-1抗体对一组不同来源的肿瘤细胞系获得的FACS结果。

[0109]

细胞系(ATCC号)	肿瘤类型	ST3232/10	M104
HT 29 (HTB-38)	结肠癌	++++	++++
LoVo (CCL-229)	"	++++	++++
COL0320DMF	"	nd	-
SW 620 (CCL-227)	"	++++	++++
CACO-2 (HTB-37)	"	++++	++++
LS 174T (CL-188)	"	++++	++++
KB3-1 (由Dr.Cianfriglia,ISS,意大利,友情提供)	鼻咽癌	++++	++++
SKBR-3 (HTB-30)	乳房癌	++++	nd
MDA-MB-231 (HTB-26)	"	+++	nd
MDA-MB-468 (HTB-132)	"	+	nd
MCF10-2A (CRL-10781)	"	+++	nd
MCF7 (HTB-22)	"	+++	+++
SKOV-3 (HTB-77)	卵巢癌	+	nd
NIH:OVCA3 (HTB-161)	"	++++	++++
IGROV-1 (Tumor National Inst.,意大利)	"	-	-
SKMEL28 (HTB-72)	黑色素瘤	-	nd
U-118MG (HTB-15)	成胶质细胞瘤	-	nd

[0110] +++++100%阳性,+++>90%阳性,++>50%阳性,+>20%阳性,+/-<15%阳性,-阴性,nd=未测定。

[0111] 通过Alexafluor-488标记的ST3232/10将乳房肿瘤细胞系MCF7染色,并通过共焦显微镜检测来分析(图4)。Alexa488-ST3232/10缀合物证明了预期的染色模式,细胞-细胞

边界强度最大,和分离的斑块染色(图4A和B中显示的两个实施例)。

[0112] 与天然表达EpCAM的或用人转录产物转染的肿瘤细胞系上的其他可获得的抗-EpCAM抗体相比,通过细胞-ELISA来评价ST3232/10的免疫反应性。例如,对ST3232/10和HT29/26(Klein CE等,1990)抗-EpCAM抗体的HT29人结肠癌细胞系的细胞-ELISA显示于图5中。ST3232/10能够以剂量依赖性的方式结合HT29细胞上天然表达的EpCAM。在该测试中,HT29/26显示出结合EpCAM的亲合性比ST3232/10高,其他抗体也是如此(数据未显示)。

[0113] 通过表面等离子共振(SPR)评价ST3232/10对EpCAM的亲合性。通过二价模型评价注入500-7.8nM浓度范围的ST3232/10获得的曲线(图6A),显示出良好的匹配,如通过 χ^2 (1.97)和残余物<实验中记录的最高RU值(140)的<10%所证实的(图6B)。ST3232/10的 K_D 产生 $9.3E-10$ ($k_{on}=7.75E+04 \pm 297$; $k_{off}=7.2E-05 \pm 8.48E-06$)。ST3232/10对EpCAM的亲合性比依决洛单抗呈现的SPR评价的亲合性($K_D 2.55E-07$, Naundorf等,2002)高274倍,而对于已知的其他抗-Trop-1抗体没有在文献中获得亲合性信息。

[0114] 关于ST3232/10的内化,通过用EpCAM表达细胞系在4°C下培养抗体,然后使混合物在37°C下持续30-120分钟来进行FACS测试。对于4°C的对照样品,在37°C下培养的样品中,没有观察到阳性细胞比例或平均荧光强度的差异(表III),因此表明了缺乏EpCAM/抗体复合物的内化。

[0115] 表III:在LoVo细胞系中评价ST3232/10内化

[0116]

	阳性%亲本	MFI
4°C(对照)	98.5	3959
37°C 30'	99.2	4182
37°C, 60'	98.1	4092
37°C, 120'	98.2	4149

[0117] 通过对代表几种实体肿瘤和正常组织的组织微阵列切片的免疫组织化学研究了ST3232/10的选择性。结果概括于表IV和V中,并且图7中显示了实施例。

[0118] 表IV:ST3232/10对肿瘤的反应性

[0119]

	病例数	阳性(%)
肺	32	19 (59.3%)
结肠	34	32 (94.1%)
卵巢	35	31 (88.6%)
检查组织的总数	101	82 (81.2%)

[0120] 表V:ST3232/10对正常组织的反应性

[0121]

	病例数	阳性(%)
肺	8	1 (12.5%)
结肠	8	5 (62.5%)
卵巢	8	0 (0%)
检查组织的总数	24	6 (25.0%)

[0122] 与源自组织型匹配的正常器官的载玻片相比较(表V)评价了高发病率实体癌类型(表IV)的低温肿瘤载玻片。ST3232/10能够结合几乎全部的结肠(94.1%)和卵巢(88.6%)癌测试样品,以及大部分的肺(59.3%)癌载玻片。对于卵巢样本,ST3232/10对癌细胞的选择性非常高,其中没有一个正常组织与抗体反应,而88.6%的肿瘤样品对ST3232是阳性的。此外,在其他肿瘤类型中,相对正常细胞,ST3232/10对癌症的反应更明显,染色更强烈。相对正常组织的对结肠和肺肿瘤的选择性显示于图7中,对超表达EpCAM的肿瘤组织具有明显的阳性反应,而正常组织为阴性染色。

[0123] 将两种不同的动物模型用于研发对肿瘤细胞生长的体内抗体活性。在第一个实验中,给三组无胸腺裸鼠(10只动物/组)皮下(s.c.)移植鼠纤维肉瘤L-hTrop-1细胞系,并从接种那天开始,用ST3232/10、依决洛单抗或无关鼠IgG治疗,一周一次(200 μ g/鼠),持续4周。将没有用EpCAM转染的L细胞植入另外两组中,并用ST3232/10或对照抗体处理动物。如图8中所示的,与未转染的肿瘤(L/载体或L/载体+ST3232)相比,EpCAM表达肿瘤(L/Trop)具有更快的发展。此外,ST3232/10完全并持久地抑制了EpCAM表达肿瘤的生长,并且没有干扰EpCAM阴性肿瘤的生长。另一方面,依决洛单抗(Panorex)也改变了EpCAM表达肿瘤的生长。然而,在依决洛单抗治疗停止时,肿瘤快速生长。

[0124] 将用人结直肠细胞系KM12SM异种移植的裸鼠的第二个动物模型用来延伸和证实之前的结果。用ST3232/10、鼠IgG或另一种抗-EpCAM抗体M104来治疗小鼠,剂量和时间表与之前的实验相同(表VI,图9)。如表VI所示的,在ST3232/10治疗组中的肿瘤率(56%)低于其他两组的(90-100%)。

[0125] 表VI:成瘤率

[0126]

	成瘤率(%)
对照	100
M104	90
ST3232/10	56

[0127] 此外,如图9中所示的,与其他组相比较,ST3232/10减缓了肿瘤生长并延长了产生肿瘤的潜伏期。这些结果支持ST3232/10直接治疗效果的假设,而不是与靶分子简单结合。

[0128] 参考文献

[0129] Alberti S等,1988,PNAS 85:8391-8394

[0130] Burak WE Jr等,2001,Tumori 87:142-146

[0131] Cianfriglia M.等,1986,Methods Enzymol.121:193210

[0132] De Bono JS等,2004,Clin Cancer Res 10:7555-7565

[0133] Di Massimo A.M.等,1997,Br J Cancer 75:822-828

[0134] Ferrer C.等,1996,J.Biotechnol.52:51-60

[0135] Frodin JE等,2002,Hybrid Hybridomics 21:99-101

[0136] Goshorn S等,2001,Cancer Biot Radiopharm 16:109-123

[0137] Klein CE等,1990,J Invest Dermatol 95:74-82.

[0138] Naundorf S等,2002,Int J Cancer 100:101-110

[0139] Oberneder R等,2006,Eur J Cancer 42:2530-8

- [0140] Old,LJ,1996,Sci Am 275:136-143.
- [0141] Paganelli等,1999,Eur J Nucl Med 26:348-357
- [0142] Parente D.等,1997,Anticancer Research 17:4073-4074
- [0143] Paul,W.E.,Fundamental Immunology,Raven Press,NY,N.Y.1993,chapter 23
- [0144] Penichet ML.等,1999,J.Immunol,163:4421-4426
- [0145] Prang N等,2005,Br J Cancer 92:342-9
- [0146] Punt CJ等,2002,Lancet 360:671-7
- [0147] Riethmuller G等,1998,J Clin Oncol 16:1788-1794
- [0148] Sassano等,1994,Nucleic Acids Res 22:1768-1769
- [0149] Spizzo G等,2004,Breast Cancer Res Treat 86:207-213
- [0150] Velders等,1998,Br J Cancer 78:478-483
- [0151] Weiner LM等,1993,J Immunother 13:110-116
- [0152] Went等,2006,Br J Cancer,94:128-35
- [0153] Winter MJ等,2003,AJP 163:2139-2148

序列表

- <110> Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A
ANASTASI, Anna Maria
PETRONZELLI, Fiorella
DE SANTIS, Rita
- <120> 抗-EpCAM 抗体及其用途
- <130> PCT 102485
- <150> EP07105628.7
- <151> 2007-04-04
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 18
- <212> DNA
- [0001] <213> 人工的
- <220>
- <223> 合成的 CDR1 VH
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(18)
- <400> 1
agc ggt tat tac tgg aac 18
Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5
- <210> 2
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 合成的构建体

<400> 2

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn

1 5

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 CDR2 VH

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(48)

<400> 3

[0002] tat ata agt tac gac ggt agg aat aag tac aac cca tat ctc aaa aat 48
Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 4

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工的

<220>
<223> 合成的 CDR3 VH

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (33)

<400> 5
gcc ctc ggg ggg gat tac gat gct ttg gac tgc
Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Asp Ala Leu Asp Cys
1 5 10

33

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

[0003]

<400> 6

Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Asp Ala Leu Asp Cys
1 5 10

<210> 7
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的 CDR1 VL

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (69)

<400> 7
aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agt ctg tta aac agt aga

48

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工的

[0005] <220>
 <223> 合成的 CDR3 VL

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (27)

<400> 11
 cag aat gat tat att tat ccg ctc acg
 Gln Asn Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr
 1 5

27

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 12

	Gln	Asn	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	
	1				5					
	<210>	13								
	<211>	20								
	<212>	DNA								
	<213>	人工的								
	<220>									
	<223>	合成的引物								
	<400>	13								
		tgtcaagagc ttcaacagga								20
	<210>	14								
	<211>	20								
	<212>	DNA								
	<213>	人工的								
	<220>									
[0006]	<223>	合成的引物								
	<400>	14								
		aagatggata cagttggtgc								20
	<210>	15								
	<211>	22								
	<212>	DNA								
	<213>	人工的								
	<220>									
	<223>	合成的引物								
	<400>	15								
		atggagttag tttgggcagc ag								22
	<210>	16								
	<211>	22								
	<212>	DNA								
	<213>	人工的								

	<220>	
	<223> 合成的引物	
[0007]	<400> 16	
	gcacaaccac catactgaga ag	22

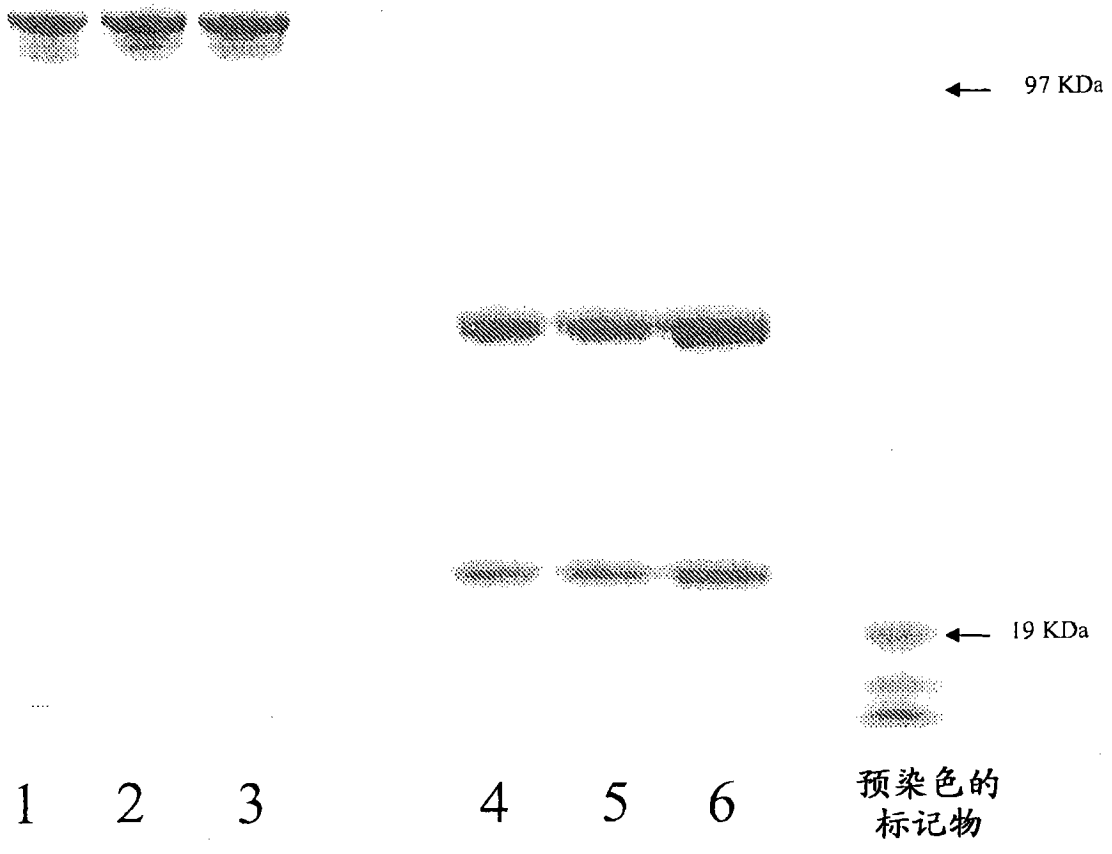


图1

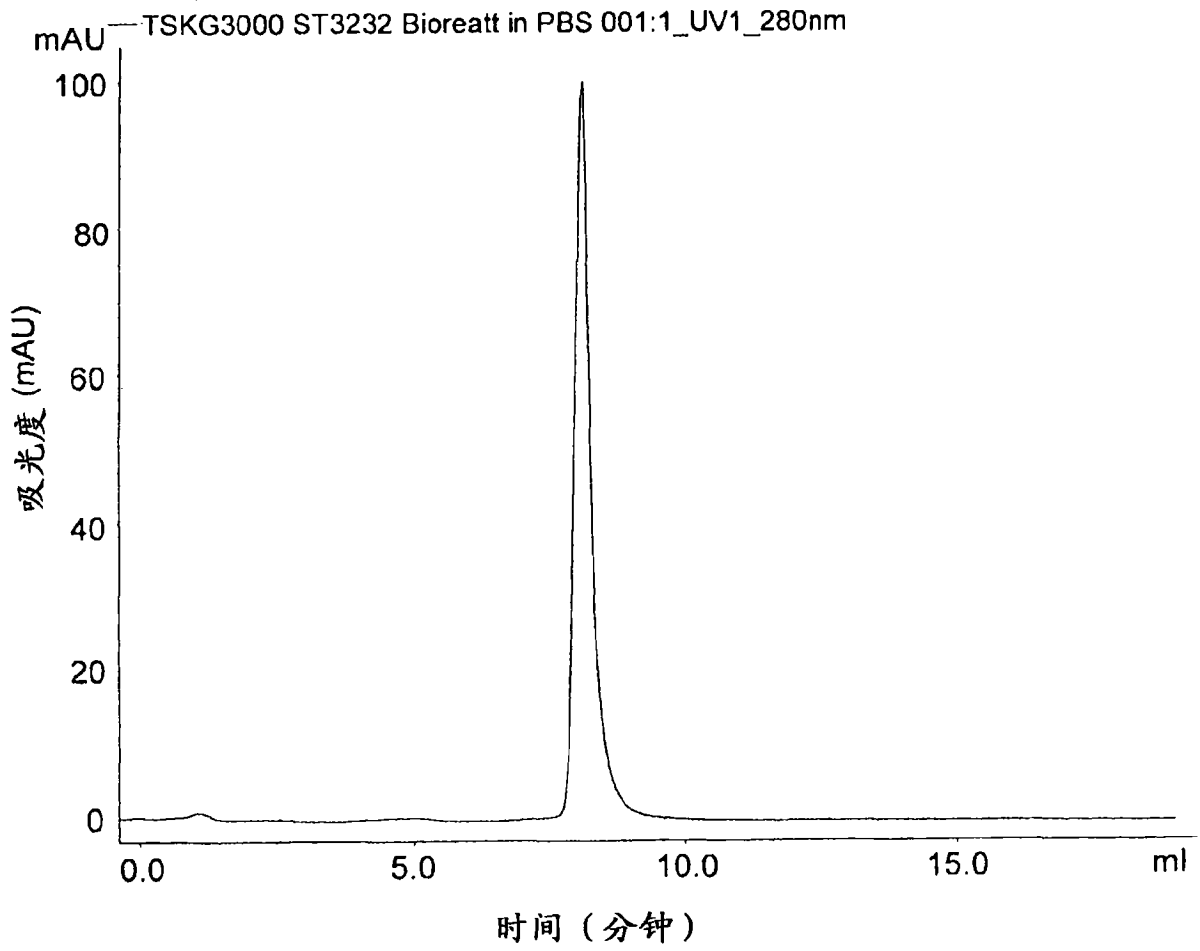


图2

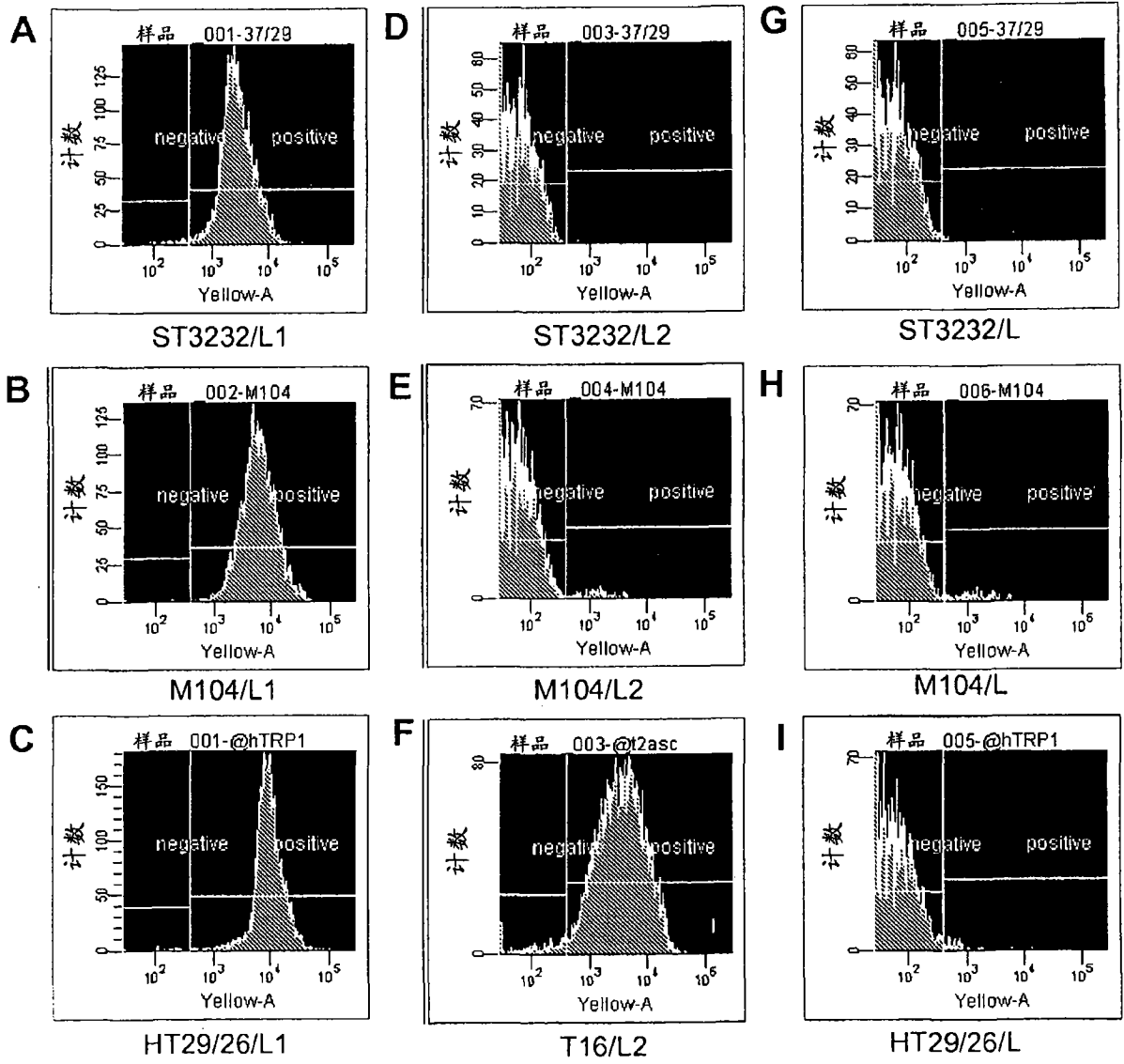


图3

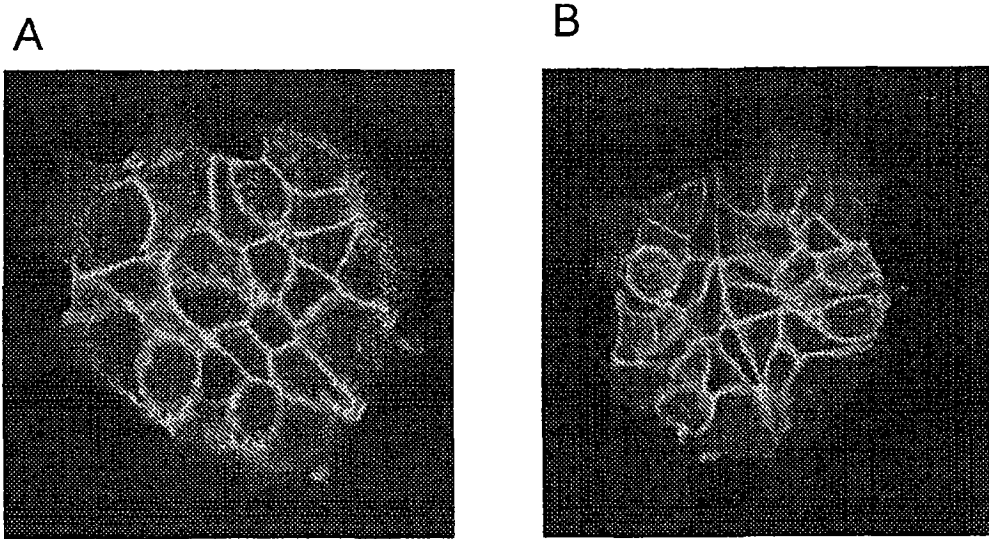


图4

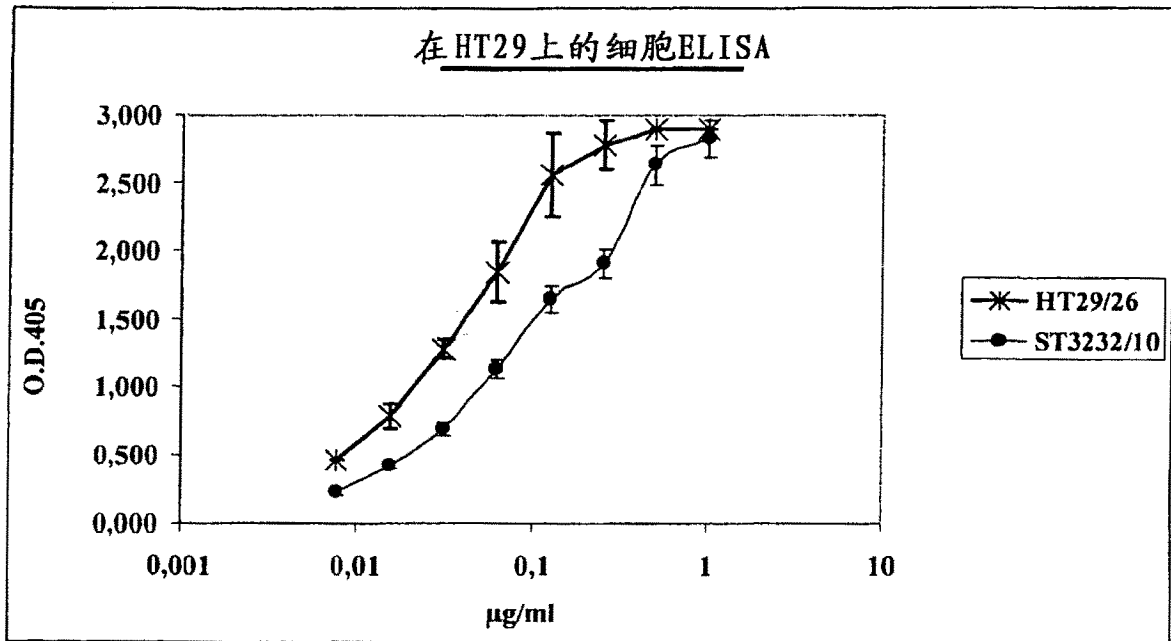


图5

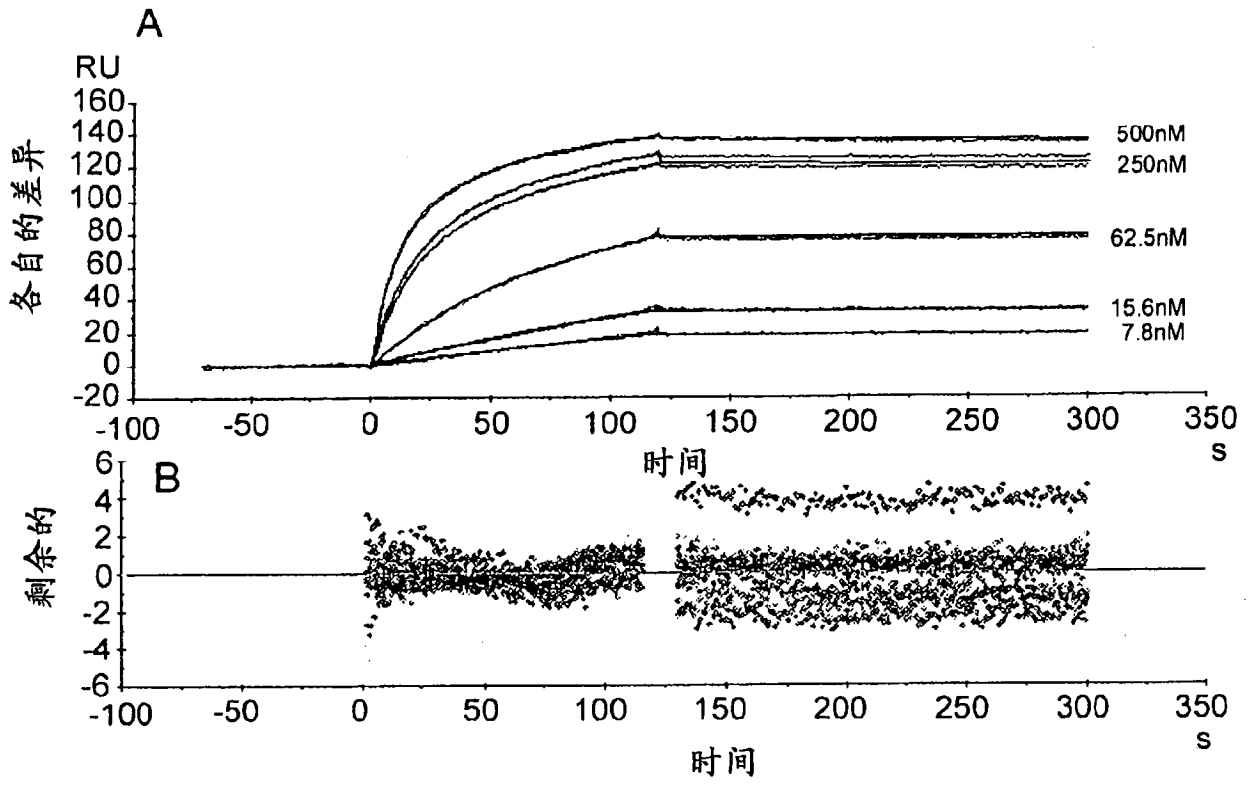


图6

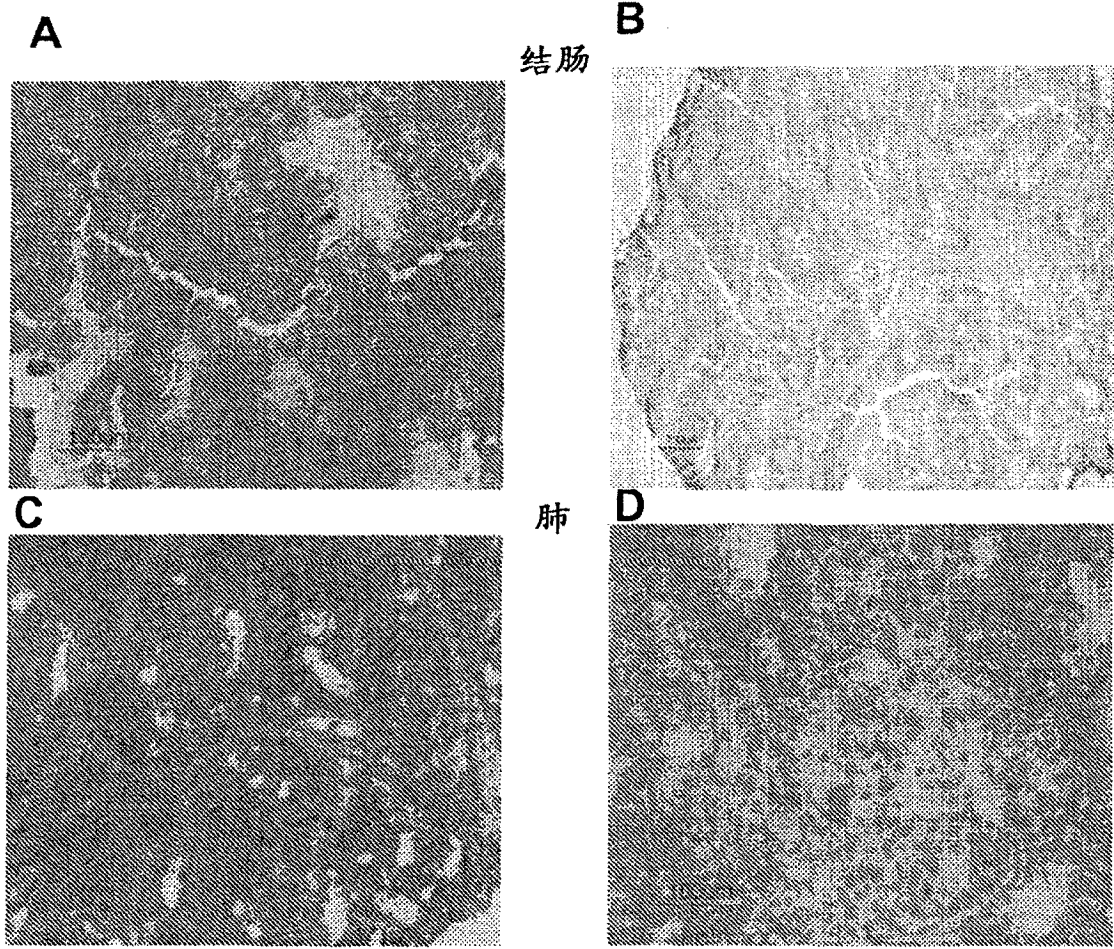


图7

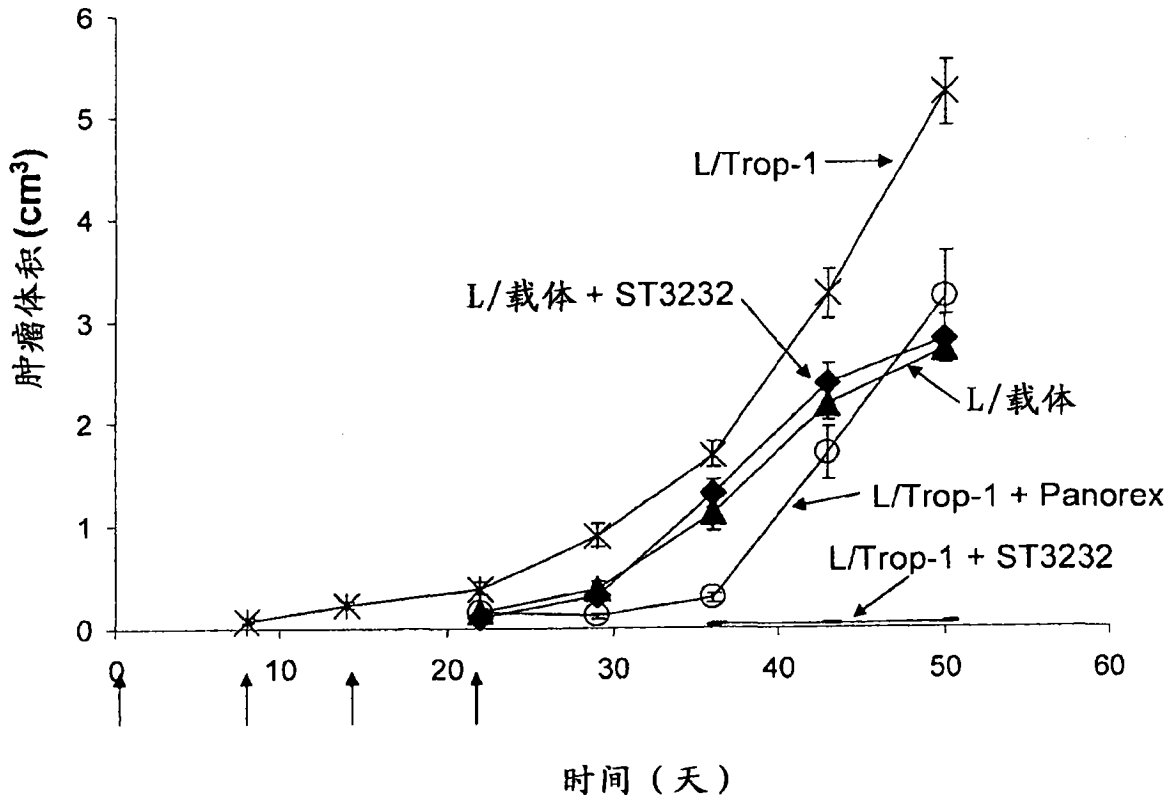


图8

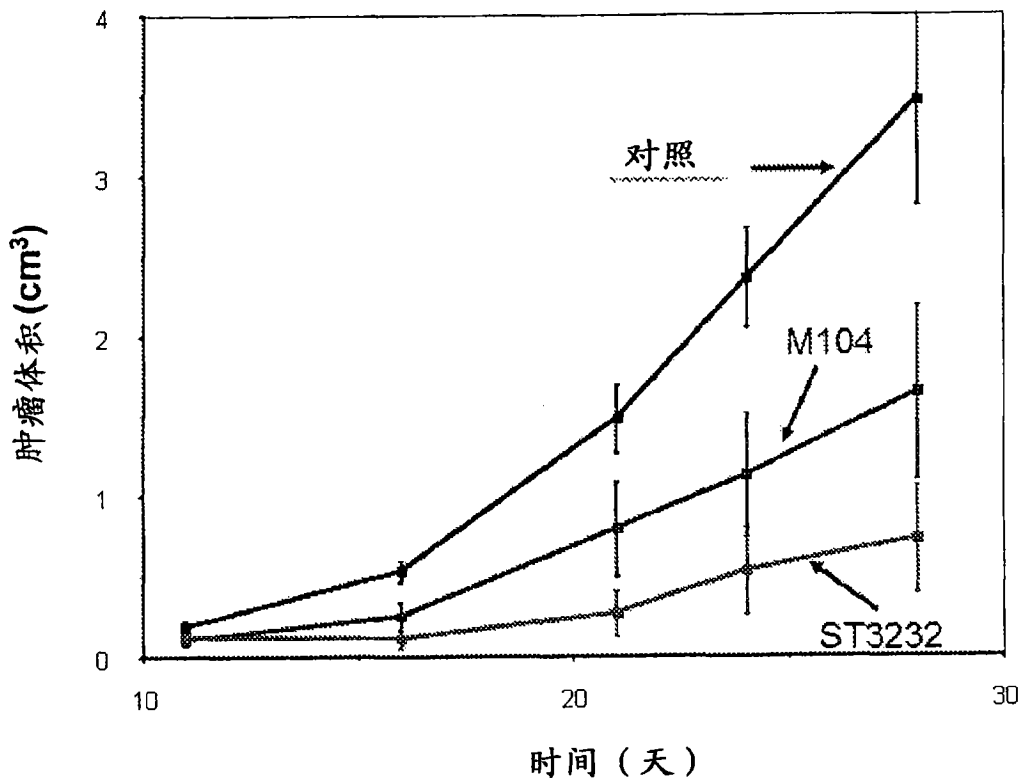


图9