



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102186499 A

(43) 申请公布日 2011.09.14

(21) 申请号 200980141590.7

代理人 张广育 姜建成

(22) 申请日 2009.08.20

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 39/00(2006.01)

61/090,487 2008.08.20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.04.19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/054441 2009.08.20

(87) PCT申请的公布数据

W02010/022225 EN 2010.02.25

(71) 申请人 IBC 医药公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 C-H·张 D·M·古德伯格

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

权利要求书 5 页 说明书 38 页 附图 15 页

(54) 发明名称

用于癌症治疗的对接和锁定 (DNL) 疫苗

(57) 摘要

本发明涉及采用对接和锁定技术形成抗癌疫苗 DNL 复合体的方法和组合物。在优选的实施例中,抗癌疫苗 DNL 复合体包含:与树突状细胞结合的抗体部分,如抗 CD74 抗体或其抗原结合片段,其连接于 AD(锚定域)部分;和连接于 DDD(二聚及对接域)部分的异种抗原,如 CD20,其中两个 DDD 部分的拷贝形成与 AD 部分结合的二聚体,导致形成 DNL 复合体。该抗癌疫苗 DNL 复合体能够诱导针对表达异种抗原的癌细胞(如 CD138^{neg}CD20⁺MM 干细胞)的免疫反应,并且诱导癌细胞的细胞凋亡以及抑制其生长或将其消除。用于癌症治疗的对接和锁定 (DNL) 疫苗。

1. 一种 DNL(对接和锁定)抗癌疫苗复合体,包含:

a) 与树突状细胞结合的抗体部分,其中所述抗体部分连接于 DDD(二聚及对接域)部分,其中所述 DDD 部分具有来自蛋白激酶 A 的二聚及对接域的肽序列;和

b) 连接于 AD(锚定域)部分的异种抗原部分,其中所述 AD 部分具有来自 AKAP(A 激酶锚定蛋白)的锚定域的肽序列;

其中所述 DDD 部分形成二聚体,所述二聚体与所述 AD 部分结合以形成所述 DNL 复合体。

2. 根据权利要求 1 所述的 DNL 复合体,其中所述抗体部分是抗 CD74 抗体或其抗原结合片段。

3. 根据权利要求 1 所述的 DNL 复合体,其中所述异种抗原选自碳酸酐酶 IX、甲胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、A33 抗体特异性抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3- 抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、结肠特异性抗原-p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、EpCAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250 抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人体绒毛膜促性腺激素(HCG)及其亚单元、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、胰岛素生长因子-1(IGF-1)、KC4 抗原、KS-1 抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PAM-4 抗体特异性抗原、胎盘生长因子、p53、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素 2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL 受体、TNF- α 、Tn 抗原、TF(Thomson-Friedenreich) 抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B 纤连蛋白、WT-1、17-1A 抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、致癌基因标记物和致癌基因产物。

4. 根据权利要求 2 所述的 DNL 复合体,其中所述异种抗原是 CD20。

5. 根据权利要求 1 所述的 DNL 复合体,进一步包含所述 DDD 与 AD 部分之间的二硫键。

6. 根据权利要求 1 所述的 DNL 复合体,其中所述 DDD 部分包含选自 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 6 所述的 DNL 复合体,其中所述 DDD 部分包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11。

8. 根据权利要求 1 所述的 DNL 复合体,其中所述 AD 部分包含选自 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列。

9. 根据权利要求 8 所述的 DNL 复合体,其中所述 AD 部分包含氨基酸序列 SEQ ID NO:

13。

10. 根据权利要求 1 所述的 DNL 复合体,其中所述抗体部分选自 IgG 抗体和抗原结合抗体片段。

11. 根据权利要求 10 所述的 DNL 复合体,其中所述抗体部分是包含轻链可变互补决定区(CDR)序列 CDR1(RSSQSLVHRNGNTYLH;SEQ ID NO:1)、CDR2(TVSNRFS;SEQ ID NO:2)和 CDR3(SQSSHVPPT;SEQ ID NO:3)以及重链可变区 CDR 序列 CDR1(NYGVN;SEQ ID NO:4)、CDR2(WINPNTGEPTFDDDFKG;SEQ ID NO:5)和 CDR3(SRGKNEAWFAY;SEQ ID NO:6)的人化或嵌合 LL1 抗 CD74 抗体或其抗原结合片段。

12. 根据权利要求 4 所述的 DNL 复合体,其中所述 CD20 异种抗原部分包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7。

13. 根据权利要求 4 所述的 DNL 复合体,其中连接于 DDD 部分的抗 CD74 抗体部分形成第一融合蛋白,连接于 AD 部分的 CD20 异种抗原部分形成第二融合蛋白。

14. 根据权利要求 1 所述的 DNL 复合体,其中所述 DNL 复合体用于抗癌疫苗,所述抗癌疫苗能够诱导针对 CD138^{neg}CD20⁺MM 干细胞的免疫反应。

15. 根据权利要求 1 所述的 DNL 复合体,其中所述抗体部分与选自 CD209(DC-SIGN)、CD34、CD74、CD205、TLR 2(铎样受体 2)、TLR 4、TLR 7、TLR 9、BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4 和 HLA-DR 的抗原结合。

16. 一种 DNL 抗癌疫苗复合体,包含:

c) 与树突状细胞结合的抗体部分,其中所述抗体部分连接于 AD 部分,其中所述 AD 部分具有来自 AKAP(A 激酶锚定蛋白)的锚定域的肽序列;和

d) 连接于 DDD 部分的异种抗原部分,其中所述 DDD 部分具有来自蛋白激酶 A 的二聚及对接域的肽序列;

其中所述 DDD 部分形成二聚体,所述二聚体与所述 AD 部分结合以形成所述 DNL 复合体。

17. 根据权利要求 16 所述的 DNL 复合体,其中所述抗体部分的每一重链在其 C 末端连接于 AD 部分,且所述复合体包含一个抗体部分和四个异种抗原部分。

18. 根据权利要求 16 所述的 DNL 复合体,其中所述抗体部分与选自 CD209(DC-SIGN)、CD34、CD74、CD205、TLR 2(铎样受体 2)、TLR 4、TLR 7、TLR 9、BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4 和 HLA-DR 的抗原结合。

19. 根据权利要求 16 所述的 DNL 复合体,其中所述抗体部分与 CD74 结合。

20. 根据权利要求 19 所述的 DNL 复合体,其中所述抗体部分是包含轻链可变互补决定区(CDR)序列 CDR1(RSSQSLVHRNGNTYLH;SEQ ID NO:1)、CDR2(TVSNRFS;SEQ ID NO:2)和 CDR3(SQSSHVPPT;SEQ ID NO:3)以及重链可变区 CDR 序列 CDR1(NYGVN;SEQ ID NO:4)、CDR2(WINPNTGEPTFDDDFKG;SEQ ID NO:5)和 CDR3(SRGKNEAWFAY;SEQ ID NO:6)的人化或嵌合 LL1 抗 CD74 抗体或其抗原结合片段。

21. 根据权利要求 16 所述的 DNL 复合体,其中所述异种抗原选自碳酸酐酶 IX、甲胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、A33 抗体特异性抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3 抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、

CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CD27、CDK-4/m、CDKN2A、结肠特异性抗原 -p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸盐受体、G250 抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人体绒毛膜促性腺激素 (HCG) 及其亚单元、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、胰岛素生长因子 -1 (IGF-1)、KC4 抗原、KS-1 抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PAM-4 抗体特异性抗原、胎盘生长因子、p53、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素 -2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL 受体、TNF- α 、Tn 抗原、TF 抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B 纤连蛋白、WT-1、17-1A 抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、致癌基因标记物和致癌基因产物。

22. 根据权利要求 16 所述的 DNL 复合体,其中所述异种抗原是 CD20。

23. 一种治疗癌症的方法,包括:

- a) 获得根据权利要求 1 所述的抗癌疫苗 DNL 复合体;以及
- b) 对患有癌症的受试者施用所述复合体。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述癌症选自上皮癌、间质癌、血液系统癌、神经系统癌、癌瘤、黑色素瘤、肉瘤、神经母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、神经胶质瘤和骨髓瘤。

25. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述异种抗原是 CD20,且所述抗原部分是抗 CD74 抗体或其抗原结合片段。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述癌症是 B 细胞癌。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述癌症选自 B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、弥漫性 B 细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤和非何杰金氏淋巴瘤。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述癌症是多发性骨髓瘤。

29. 根据权利要求 23 所述的方法,进一步包括对所述受试者施用一种或多种治疗剂。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中在施用所述抗癌疫苗 DNL 复合体之前或同时对所述受试者施用所述治疗剂。

31. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述治疗剂连接于所述抗癌疫苗 DNL 复合体。

32. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述治疗剂选自放射性核素、免疫调节剂、抗血管生成剂、细胞因子、趋化因子、生长因子、激素、药物、前体药物、酶、寡核苷酸、siRNA、促凋亡剂、光敏治疗剂、细胞毒素剂、化学治疗剂、毒素、其它抗体及其抗原结合片段。

33. 根据权利要求 32 所述的方法,其中所述药物选自氮芥、乙撑亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲、吉西他滨、三氮烯、叶酸类似物、蒽环霉素、紫杉烷、COX-2 抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶抑制剂、表鬼臼毒素、铂配位络合物、长春花生物碱、取代脲、甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素拮抗剂、内皮他丁、紫杉酚、喜树碱、SN-38、阿霉素及

其类似物、抗代谢物、烷化剂、抗有丝分裂物质、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、mTOR 抑制剂、热休克蛋白 (HSP90) 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、HDAC 抑制剂、促凋亡剂、甲氨蝶呤和 CPT-11。

34. 根据权利要求 32 所述的方法,其中所述毒素选自蓖麻毒素、相思豆毒素、 α 毒素、皂草素、核糖核酸酶 (RNA 酶)、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 A、商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。

35. 根据权利要求 32 所述的方法,其中所述放射性核素选自 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{152}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{161}Ho 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}Pb 、 ^{58}Co 、 ^{80}mBr 、 ^{99}mTc 、 ^{103}mRh 、 ^{109}Pt 、 ^{119}Sb 、 ^{189}mOs 、 ^{192}Ir 、 ^{219}Rn 、 ^{215}Po 、 ^{221}Fr 、 ^{217}At 、 ^{255}Fm 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 ^{113}mIn 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 ^{121}mTe 、 ^{122}mTe 、 ^{125}mTe 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{143}Pr 、 ^{57}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{76}Br 和 ^{169}Yb 。

36. 根据权利要求 32 所述的方法,其中所述酶选自苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -V 型类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

37. 根据权利要求 32 所述的方法,其中所述免疫调节剂选自细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、集落刺激因子 (CSF)、白介素 (IL)、干扰素 (IFN)、干细胞生长因子、促红细胞生成素、促血小板生成素、肿瘤坏死因子 (TNF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 和被称为“S1 因子”的干细胞生长因子。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述细胞因子选自人生长激素、N- 蛋氨酸人生长激素、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、糖蛋白促卵泡素 (FSH)、促甲状腺素 (TSH)、黄体化激素 (LH)、胎盘生长因子 (PlGF)、肝细胞生长因子、前列腺素、成纤维细胞生长因子、催乳素、胎盘泌乳素、OB 蛋白、肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β 、繆勒氏管抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、激活素、血管内皮生长因子、整联蛋白、促血小板生成素 (TPO)、NGF- β 、血小板生长因子、TGF- α 、TGF- β 、胰岛素样生长因子-I、胰岛素样生长因子-II、促红细胞生成素 (EPO)、骨诱导因子、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、巨噬细胞-CSF (M-CSF)、IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-25、LIF、FLT-3、厄洛替尼、血小板反应蛋白、内皮他丁、TNF- α 和 LT。

39. 根据权利要求 28 所述的方法,进一步包括诱导针对 CD138^{neg}CD20⁺MM 干细胞的免疫反应。

40. 根据权利要求 28 所述的方法,进一步包括诱导 CD138^{neg}CD20⁺MM 干细胞的细胞凋亡。

41. 根据权利要求 28 所述的方法,其中所述能有效地抑制或消除 MM 干细胞。

42. 一种治疗癌症的方法,包括:

- a) 获得根据权利要求 16 所述的抗癌疫苗 DNL 复合体 ;以及
- b) 对患有癌症的受试者施用所述复合体。

用于癌症治疗的对接和锁定 (DNL) 疫苗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35U. S. C. 119(e) 要求 2008 年 8 月 20 日提交的序列号为 61/090, 487 的美国临时专利申请的权益, 该申请的全文以引用的方式并入本文。

背景技术

技术领域

[0003] 本发明涉及用于癌症 (如多发性骨髓瘤) 治疗的基于树突状细胞的体内靶向抗原的疫苗的设计和产生。在优选的实施例中, 通过对接和锁定 (DNL) 方法产生这些疫苗, 其中效应子部分连接于源自 AKAP 蛋白的锚定域 (AD) 和源自蛋白激酶 A (PKA) 的二聚及对接域 (DDD) 部分。DNL 复合体在 DDD 部分自发地二聚并与 AD 部分结合时产生, 所得到的复合体的 DDD 与连接 AD 的效应子之间的化学计量比为 2 : 1。在更优选的实施例中, 效应子部分包含人化抗 CD74 抗体和肿瘤相关异种抗原 (如 CD20 异种抗原)。在最优选的实施例中, 抗 CD74 抗体为 hLL1 抗体。DNL 构建体可用于制备药物组合物、用于产生针对癌症 (如多发性骨髓瘤 (MM)) 的疫苗以及用于诱导针对表达肿瘤抗原的细胞 (如患有多发性骨髓瘤和其它表达 CD20 的癌的患者中的 CD20 阳性癌细胞) 的免疫反应。

[0004] 相关技术

[0005] 多发性骨髓瘤 (MM) 是恶性血液肿瘤, 其特征是骨髓中的增生性浆细胞的克隆样增生。尽管 MM 对许多化学治疗剂有反应, 但其基本上仍难以治愈, 并且大多数患者最终会复发, 这是因为存在一小群 MM 癌干细胞, 这些癌干细胞可在经标准或高剂量化学治疗下存活, 并且对化学治疗药物具有抗性 (Reece 等, Leuk Lymphoma, 2008, 49 :1470-85)。此少量的 MM 癌干细胞构成微小的残留病变并引起复发, 最终导致所有治疗的失败。因此, 根除 MM 癌干细胞可长期控制或甚至治愈 MM。

[0006] 近来, 从 MM 患者的 MM 细胞系和初级骨髓中鉴别出一小群克隆型 B 细胞, 这些细胞不表达特性浆细胞表面抗原 CD138, 但确实表达 B 细胞抗原 CD20 (Matsui 等, Blood 2004, 103 :2332-6)。这一小群细胞对许多临床抗骨髓瘤药物有抗性, 并且能够进行离体克隆性生长 (Matsui 等, Blood 2004, 103 :2332-6; Matsui 等, Cancer Res. 2008, 68 :190-7) 以及在 3D 培养模型中克隆性生长 (Kirshner 等, Blood 2008, 112 :2935-45), 且能够离体地分化成 MM 细胞以及在植入 NOD/SCID 小鼠中 (初次移植和再次移植期间) 分化成 MM 细胞 (Matsui 等, Cancer Res. 2008, 68 :190-7)。因此已提出这些 CD138^{neg}CD20⁺ 细胞代表假定的多发性骨髓瘤癌干细胞 (Huff 和 Matsui, J Clin Oncol. 2008, 26 :2895-900)。

[0007] 类似于其它癌干细胞, MM 癌干细胞耐受许多化学治疗药物, 并且是肿瘤再生长和复发的原因 (Huff 和 Matsui, J Clin Oncol. 2008, 26 :2895-900; Yang 和 Chang, Cancer Invest. 2008, 26 :741-55)。需要可选择性地靶向并根除癌干细胞 (如 MM 干细胞) 的策略和方法。由于癌干细胞的多重抗药性, 免疫疗法和疫苗接种可提供潜在的方式根除这些细胞, 特别是在进行标准疗法和 / 或干细胞移植之后, 肿瘤负荷大幅减少之时。需要探索针对

性治疗多发性骨髓瘤的免疫疗法和疫苗接种的有效组合物及方法,特别是能够诱导针对 MM 癌干细胞的免疫反应、抑制或根除 MM 癌干细胞的组合物及方法。进一步需要探索针对性治疗一般癌症的免疫疗法和疫苗接种的有效组合物及方法。

发明内容

[0008] 本发明公开了用于针对癌干细胞(如 MM 干细胞)的疫苗的方法和组合物,所述组合物是通过采用对接和锁定(DNL)方法制备的(Chang 等,2007, Clin Cancer Res 13: 5586s-91s)。DNL 技术已用于产生适于体内应用的各种稳定和确定的复合体。在优选的实施例中,DNL 复合体包含连接于二聚及对接域(DDD)或锚定域(AD)部分的抗 CD74 抗体或其抗原结合片段(如 hLL1 抗体)。DDD 部分自发地二聚且每个 DDD 二聚体与 AD 部分结合。在更优选的实施例中,互补 AD 或 DDD 部分连接于 CD20 异种抗原(如下文进一步详述),结果形成包含抗 CD74 部分和 CD20 异种抗原部分的 DNL 复合体。然而,技术人员会意识到,根据癌症的情况,可利用不同的异种抗原和/或抗体或抗体片段。抗体组分将 DNL 复合体导向诸如树突状细胞(DC)的抗原呈递细胞(APC),而异种抗原组分的进程引起针对表达靶抗原的细胞的免疫反应。

[0009] 在请求保护的方法和组合物的范围内可以构建和使用具有不同结构和不同的靶抗原(如 CD20)与抗体或抗体片段之比的各种类型的 DNL 复合体,如以下当中所公开的那些:美国专利 No. 7, 550, 143(其第 28 栏第 30 行至第 44 栏第 28 行以引用的方式并入本文);美国专利 No. 7, 521, 056(其第 58 栏第 1 行至第 84 栏第 45 行以引用的方式并入本文);美国专利 No. 7, 534, 866(其第 31 栏第 1 行至第 36 栏第 38 行以引用的方式并入本文);美国专利 No. 7, 527, 787(其第 61 栏第 51 行至第 94 栏第 65 行以引用的方式并入本文)以及美国专利申请公开 No. 2009/006082(其 [0035] 段至 [0097] 段以引用的方式并入本文)。由三聚体、四聚体、五聚体、六聚体及其它结构组成的 DNL 复合体已经报道在以上引用的公布专利中。

[0010] 在最优选的实施例中,该抗癌疫苗 DNL 构建体包含人化或嵌合 LL1 抗 CD74 抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含轻链可变互补决定区(CDR)序列 CDR1(RSSQSLVHRNGNTYLH;SEQ ID NO:1)、CDR2(TVSNRFS;SEQ ID NO:2)和 CDR3(SQSSHVPPT;SEQ ID NO:3)以及重链可变区 CDR 序列 CDR1(NYGVN;SEQ ID NO:4)、CDR2(WINPNTGEPTFDDDFKG;SEQ ID NO:5)和 CDR3(SRGKNEAWFAY;SEQ ID NO:6)。适用于请求保护的 DNL 复合体的人化 LL1(hLL1)抗 CD74 抗体公开于美国专利 No. 7, 312, 318 中,该专利的第 35 栏第 1 行至第 42 第 27 行以及图 1 至图 4 以引用的方式并入本文。作为另外的选择,可利用其它抗 CD74 抗体或针对其它 APC 或 DC 相关抗原的抗体。

[0011] 适用于抗癌疫苗 DNL 复合体中的各种 CD20 异种抗原的序列是本领域中已知的,如鼠 CD20 序列(SEQ ID NO:7)。技术人员通过诸如 NCBI 蛋白质数据库(见例如,NCBI Accession No. NP_031667;P19437;AAA37394;BAE47068;ABA29631;BAD77809)之类的公知公用数据库可易于获得其它可能使用的 CD20 氨基酸序列。尽管本文提及了鼠 CD20 序列,但技术人员会意识到 CD20 氨基酸序列是已知的且可从多种物种中获得,并且可结合到抗癌疫苗 DNL 复合体当中。然而,技术人员会意识到,其它肿瘤相关抗原(TAA)在本领域中是已知的,并且可用于 DNL 复合体中来诱导针对表达不同 TAA 的肿瘤的免疫反应。

[0012] 具有潜在用途的已知 TAA 包括但不限于碳酸酐酶 IX、甲胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、A33 抗体特异性抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3- 抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、结肠特异性抗原-p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250 抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人体绒毛膜促性腺激素(HCG)及其亚单元、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4- 抗原、KS-1- 抗原、KS 1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PAM-4 抗体特异性抗原、胎盘生长因子、p53、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素-2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL 受体、TNF- α 、Tn 抗原、TF(Thomson-Friedenreich) 抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B 纤连蛋白、WT-1、17-1A- 抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、致癌基因标记物和致癌基因产物(见例如, Sensi 等, Clin Cancer Res 2006, 12:5023-32; Parmiani 等, J Immunol 2007, 178:1975-79; Novellino 等, Cancer Immunol Immunother 2005, 54:187-207)。诸如鼠蛋白氨基酸序列的异种抗原氨基酸序列可易于从诸如 NCBI 蛋白质数据库的公用数据库获得。

[0013] 技术人员会进一步意识到,有可能将其它已知的抗体或其抗原结合片段结合到抗癌疫苗 DNL 构建体当中。在优选的实施例中,抗体与由 APC、更优选由树突状细胞表达的抗原结合。多种与树突状细胞相关的抗原是本领域中已知的,这些抗原包括但不限于 CD209(DC-SIGN)、CD34、CD74、CD205、TLR 2(铎样受体 2)、TLR 4、TLR 7、TLR 9、BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4 和 HLA-DR。在优选的实施例中,靶抗原为 CD74。然而,已知其它类型的靶抗原与树突状细胞相关,且结合靶向任何这种备选抗原的抗体的抗癌疫苗 DNL 构建体可用于请求保护的方法和组合物中。在一些实施例中,抗癌疫苗 DNL 构建体可包含抗 CD74 抗体或其抗原结合片段以及另一抗树突状细胞抗体或片段。可用于抗癌疫苗 DNL 构建体的示例性抗体包括但不限于 hLL1(抗 CD74, 美国专利 No. 7,312,318) 和 hL243(抗 HLA-DR, 美国专利申请 No. 11/368,296), 这两者的实例部分均以引用的方式并入本文。

[0014] 优选使用嵌合抗体,因为它们具有人抗体恒定区序列,因此不会引起如鼠抗体那样强的人抗鼠抗体(HAMA)反应。甚至更优选使用人化抗体,以便进一步降低诱导 HAMA 反应的可能性。如下文所讨论,通过用相应的人抗体框架和恒定区序列取代鼠框架和恒定区序列使鼠抗体人化的技术在本领域内已熟知且已应用于许多鼠抗癌抗体中。抗体人化还可涉及用来自亲本鼠框架区序列的相应残基来取代一个或多个个人框架氨基酸残基。也如下文所讨论,用于产生人抗体的技术也已熟知,且这种抗体可结合到受试者抗癌疫苗构建体当中。

[0015] 在某些实施例中,可将抗癌疫苗 DNL 构建体与至少一种治疗剂联合施用,该治疗

剂可在构建体之前、与其同时或在其后施用。在优选的实施例中，治疗剂在抗癌疫苗之前施用。然而，在可供选择的实施例中，治疗剂可与 DNL 构建体联合施用或甚至与 DNL 构建体缀合。如下文更为详细的讨论，本领域已知的任何治疗剂均可与抗癌疫苗 DNL 构建体联合使用，这些治疗剂包括但不限于放射性核素、免疫调节剂、抗血管生成剂、细胞因子、趋化因子、生长因子、激素、药物、前体药物、酶、寡核苷酸、siRNA、促凋亡剂、光敏治疗剂、细胞毒素剂、化学治疗剂、毒素、其它抗体或其抗原结合片段。

[0016] 在一个优选的实施例中，治疗剂为细胞毒素剂，如药物或毒素。还优选的是，该药物选自氮芥、乙撑亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲、吉西他滨、三氮烯、叶酸类似物、蒽环霉素、紫杉烷、COX-2 抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶抑制剂、表鬼臼毒素、铂配位络合物、长春花生物碱、取代脲、甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素拮抗剂、内皮他丁、紫杉酚、喜树碱、SN-38、阿霉素及其类食物、抗代谢物、烷化剂、抗有丝分裂物质、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、mTOR 抑制剂、热休克蛋白 (HSP90) 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、HDAC 抑制剂、促凋亡剂、甲氨蝶呤、CPT-11 以及它们的组合。

[0017] 在另一优选的实施例中，治疗剂为选自以下的毒素：蓖麻毒素、相思豆毒素、 α 毒素、皂草素、核糖核酸酶 (RNA 酶)、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 A、商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素以及它们的组合。或者为选自以下的免疫调节剂：细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、菌落刺激因子 (CSF)、干扰素 (IFN)、干细胞生长因子、促红细胞生成素、促血小板生成素以及它们的组合。

[0018] 在其它优选的实施例中，治疗剂为选自 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 和 ^{211}Pb 及其组合的放射性核素。还优选的是随俄歇发射粒子而充分衰变的放射性核素。例如，Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m 和 Ir-192。有用的发射 β 粒子的核素的衰变能优选小于 1,000keV，更优选小于 100keV，最优选小于 $< 70\text{keV}$ 。还优选的是随 α 粒子产生而充分衰变的放射性核素。这种放射性核素包括（但不限于）Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213 和 Fm-255。有用的发射 α 粒子的放射性核素的衰变能优选为 2,000–10,000keV，更优选为 3,000–8,000keV，最优选为 4,000–7,000keV。可能应用的其它放射性同位素包括 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{199}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{169}Yb 等。在其它实施例中，治疗剂为选自发色团和染料的光敏治疗剂。

[0019] 作为另外的选择，治疗剂为选自以下的酶：苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -V 型类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。这种酶可与（例如）前体药物联合使用，这些前体药物可以相对无毒的形式施用并在靶位点由酶转化成细胞毒素剂。在其它可供选择的方案中，药物可通过受试者中的内源酶转化成低毒形式，但也可通过治疗酶再转化成细胞毒素形式。

[0020] 虽然在优选的实施例中,抗癌疫苗 DNL 复合体可用于治疗多发性骨髓瘤,但技术人员会意识到 CD20/ 抗 CD74 构建体可潜在地用于其它类型的疾病,如其它形式的 CD20⁺ 癌症,如 B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、滤泡性淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、弥漫性 B 细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤 (Burkitt lymphoma)、何杰金氏淋巴瘤 (Hodgkin' s lymphoma) 或非何杰金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin' s lymphoma)。若使用不同于 CD20 的肿瘤相关异种抗原,技术人员会意识到,使用请求保护的 DNL 复合体可靶向带有相关 TAA 的任何类型的癌。

[0021] 还有其它实施例涉及编码融合蛋白 (如抗体 -DDD 或异种抗原 -DDD 融合蛋白或者抗体 -AD 或异种抗原 -AD 融合蛋白) 的 DNA 序列、包含所述 DNA 序列的载体和宿主细胞以及制备用于产生抗癌疫苗 DNL 构建体的融合蛋白的方法。相关的实施例包括用于制备抗癌疫苗 DNL 构建体的融合蛋白、抗体 -DDD 或异种抗原 -DDD 融合蛋白或者抗体 -AD 或异种抗原 -AD 融合蛋白。在可供选择的实施例中,可通过例如抗体或抗体片段与 DDD 肽或 CD20 异种抗原与 AD 肽的化学交联形成 DNL 复合体的亚单元组分。就特定的实施例而言,融合蛋白或化学交联的缀合物可连接于诸如诊断剂的报告部分。多种诊断剂是本领域中已知的,如放射性核素、造影剂、荧光剂、化学发光剂、生物发光剂、顺磁离子、酶和光敏诊断剂。

[0022] 优选地,诊断剂为能量介于 20KeV 与 4,000KeV 的放射性核素或选自以下的放射性核素:¹¹⁰In、¹¹¹In、¹¹⁷Lu、¹⁸⁷Re、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、^{94m}Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、^{52m}Mn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、^{82m}Rb、⁸³Sr 或其它 γ -、 β - 或正电子发射体。

[0023] 还优选的是,诊断剂为顺磁离子,如铬 (III)、锰 (II)、铁 (III)、铁 (II)、钴 (II)、镍 (II)、铜 (II)、钆 (III)、钐 (III)、铽 (III)、钆 (III)、钆 (II)、铽 (III)、镱 (III)、铈 (III) 和铪 (III);或不透射线的材料,如钆、泛影酸盐 (diatrizoate)、乙碘油、柠檬酸镱、碘卡明酸、碘西他酸、碘达酸、胆影酸、碘沙酸、碘古酰胺 (iogulamide)、碘海醇、碘帕醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘酞葡胺、iosemetac acid、碘酞硫、碘得酸、异泛影酸、碘托西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、碘泊酸盐 (ipodate)、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影酸盐 (metrizoate)、丙碘酮和氯化亚铊。

[0024] 还在其它实施例中,诊断剂为选自异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺的荧光标记化合物、选自鲁米诺、异鲁米诺、芳族吖啶酯、咪唑、吖啶盐和草酸酯的化学发光标记化合物或选自萤光素、萤光素酶和水母发光蛋白 (aequorin) 的生物发光化合物。

具体实施方式

[0025] 定义

[0026] 如本文所用,术语“一”和“所述”可指单数或复数,除非上下文以其它方式明确其仅指单数。

[0027] 如本文所用,术语“约”是指数值增加或减少百分之十 (10%)。例如,“约 100”是指介于 90 与 110 之间的任何数值。

[0028] 抗体是指全长 (即天然存在的或通过正常免疫球蛋白基因片段重组方法形成的) 免疫球蛋白分子 (例如 IgG 抗体) 或免疫球蛋白分子的免疫活性的抗原结合部分 (如抗体

片段)。

[0029] 抗体片段是指抗体的一部分,如 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ 等。无论结构如何,抗体片段均与由完整抗体识别的相同抗原结合。因此,该术语与“抗原结合抗体片段”的使用含义相同。术语“抗体片段”还包括由可变区组成的分离片段,如由重链和轻链的可变区组成的“ Fv ”片段,以及其中轻链与重链的可变区通过肽连接体连接的重组单链多肽分子(“ $scFv$ 蛋白”)。如本文所用,术语“抗体片段”不包括无抗原结合活性的抗体部分,如 Fc 片段或单个氨基酸残基。其它抗体片段(例如单域抗体片段)是本领域中已知的且可用于请求保护的构建体中(见例如 Muyldermans 等, *TIBS* 26 :230-235, 2001 ;Yau 等, *J Immunol Methods* 281 :161-75, 2003 ;Maass 等, *J Immunol Methods* 324 :13-25, 2007)。

[0030] 术语抗体融合蛋白可指重组产生的抗原结合分子,其中具有相同或不同特异性的一个或多个相同或不同的单链抗体或抗体片段部分相连接。融合蛋白的价(valency)是指该融合蛋白所具有的与单抗原或表位结合的结合臂或位点的数目,即单价、二价、三价或多价。抗体融合蛋白的多价是指其可利用多种相互作用与抗原结合,从而提高与抗原结合的亲合力。特异性是指抗体融合蛋白能够结合的抗原或表位数,即单特异性、双特异性、三特异性、多特异性。根据这些定义,天然抗体,例如 IgG,由于其具有两个结合臂而为单价,但由于其与一个表位结合而为单特异性。单特异性的多价融合蛋白具有不止一个表位的结合位点,但仅与一个表位结合。融合蛋白可包含单抗体组分、不同抗体组分的多价或多特异性的组合或相同抗体组分的多个拷贝。融合蛋白可另外包含抗体或抗体片段以及治疗剂。适于这种融合蛋白的治疗剂的例子包括免疫调节剂和毒素。一种优选的毒素包含核糖核酸酶(RNA 酶),优选为重组 RNA 酶。然而,该术语不是限制性的,多种蛋白质或肽效应子可结合到融合蛋白当中。在另一非限制性实例中,融合蛋白可包含用于产生如下所述 DNL 构建体的 AD 或 DDD 序列。

[0031] 嵌合抗体是含有包括源自一个物种的抗体互补决定区(CDR)在内的可变域的重组蛋白质,该抗体优选为啮齿动物抗体,而抗体分子的恒定区源自人抗体的恒定区。就兽医应用而言,嵌合抗体的恒定区可源自其它物种,如猫或犬。

[0032] 人化抗体为重组蛋白质,其中将来自一个物种的抗体(如啮齿动物抗体)的 CDR 从啮齿动物抗体的重可变链和轻可变链转移至人重链和轻链可变域(例如框架区序列)当中。抗体分子的恒定域源自人抗体的恒定域。在某些实施例中,有限数目的来自亲本(啮齿动物)抗体的框架区氨基酸残基可取代到人抗体框架区序列当中。

[0033] 人抗体是例如从转基因小鼠中获得的抗体,这种小鼠已“经过改造”而可响应抗原刺激产生特异性人抗体。在此技术中,将人重链和轻链基因座的元件引入到源自胚胎干细胞系的小鼠品系当中,所述胚胎干细胞系具有内源鼠重链和轻链基因座的靶向断裂。转基因小鼠能够合成对特定抗原具有特异性的人抗体,这些小鼠可用于产生分泌人抗体的杂交瘤。从转基因小鼠中获得人抗体的方法由下列学者进行了描述:Green 等, *Nature Genet.* 7 :15(1994);Lonberg 等, *Nature* 368 :856(1994);和 Taylor 等, *Int. Immun.* 6 :579(1994)。也可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建全人抗体,所有这些技术都是本领域中是已知的。见例如, McCafferty 等, *Nature* 348 :552-553(1990),其描述了从未免疫供体的免疫球蛋白可变域基因谱中离体产生人抗体及其片段。在此技术中,将抗体可变域基因按阅读框架克隆到丝状噬菌体的主要或次要的外壳蛋白基因当中,并在噬菌体颗

粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,所以基于抗体功能特性的选择也导致对编码显示出那些特性的抗体的基因进行选择。以此方式,噬菌体模拟了 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种格式实施,作为回顾,见例如 Johnson 和 Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:5564-571(1993)。也可通过离体活化 B 细胞来产生人抗体。见美国专利 No. 5,567,610 和 No. 5,229,275,其实例部分以引用的方式并入本文。

附图说明

[0034] 图 1. hLL1 在人血 DC 亚群、B 细胞和单核细胞上的特异性结合。(A) 不同 APC 亚群的门控策略。(B) CD74 在 APC 中的表达。(C) hLL1 在细胞上的结合效率。数字代表平均荧光强度。

[0035] 图 2. CD74 在源于人单核细胞的未成熟(对比成熟)的 DC 中的表达,以及 hLL1 与源于人单核细胞的未成熟(对比成熟)的 DC 的结合效率。将源于人单核细胞的 DC(在 hGM-CSF 和 hIL-4 的存在下培养后第 5 天)用 FITC 标记的抗 CD74 抗体或 AlexaFluor488 标记的 hLL1 染色,同时结合用抗 HLA-DR 和 CD83 的荧光标记的 mAb 染色。对 HLA-DR 阳性细胞进行门控和分析。(A) CD74 在未成熟和 LPS 成熟的 DC 中的表达。(B) hLL1 与未成熟(对比 LPS 成熟)的 DC 的结合。(C) 在未成熟和成熟的 DC 中 CD83、HLA-DR、CD74 的表达以及 hLL1 结合的比较。

[0036] 图 3. hLL1 对 B 细胞恶性 Daudi 细胞和正常 DC 的细胞毒性效应的并列比较。(A) hLL1 对 Daudi 和 DC 的影响的比较。(B) 延长剂量时间后 hLL1 对 DC 的细胞活力的影响。(C) hLL1 对 Daudi 细胞的细胞毒性影响。(D) 显微图像显示 hLL1 对 DC 活力无影响。

[0037] 图 4. 通过 hLL1 对 DC 结构成熟度的适度增强。从源于人单核细胞在 hGM-CSF 和 hIL-4 的存在下第 5 天的 DC 中门控 HLA-DR 阳性细胞群。(A) 通过流式细胞术测量抗原呈递分子 HLA-DR、共刺激分子 CD54 和 CD86 的表达。(B) 抗原呈递分子 HLA-DR、共刺激分子 CD54 和 CD86 的表达水平。

[0038] 图 5. hLL1 对 DC 介导的 T 细胞增殖无显著影响。将经 hLL1 处理的 DC 与 CFSE 标记的异源 PBMC 共同培养 8 天(A) 或 11 天(B)。将扩增 T 细胞用针对 CD4 的 Percp 缀合 mAb 染色。分析了总 T 细胞、CD4⁺ 和 CD4⁺T 细胞的细胞增殖。

[0039] 图 6. 通过有利于朝 Th1 效应细胞分化的 hLL1 处理的 DC 对原态 CD4⁺T 细胞的极化。将采用磁珠分选柱(MACS)从人 PBMC 中分离的原态 CD4⁺T 细胞与 hLL1 处理的异源 DC 共同培养。不同时间点(第 11、13 和 18 天)后收获细胞,用 PMA 和离子霉素刺激,并通过用荧光标记的 hIFN- γ 和 hIL-4 抗体染色的细胞内细胞因子进行分析。对 Th1/Th2/Th0 细胞群进行门控和分析。确定在由 hLL1 处理的 DC 或由 GAH 交联的 hLL1 处理的 DC 刺激的 T 细胞中的流动细胞因子产量。(C) 示出在 DC/T 共培养后的不同天时,在没有或存在通过 GAH 交联的情况下在两个供体中的 Th1 响应的数据。(D) 通过 hLL1 来增加 Th1 群的剂量-效应曲线。

[0040] 用于治疗多发性骨髓瘤和其它癌症的疫苗

[0041] CD20 通常在 B 细胞谱系的细胞中表达。据最近报道,CD20 在从 MM 细胞系或临床标本中分离的 MM 细胞的小群中表达,这些 MM 细胞不表达特性浆细胞表面抗原 CD138,但具有

高度的产克隆潜能,并且对多种临床抗骨髓瘤药物具有抗性 (Matsui 等, Blood 2004, 103 : 2332-6 ; Matsui 等, Cancer Res. 2008, 68 : 190-7)。这些 CD20+CD138- 细胞能够离体地克隆性生长和在 3D 培养模型中克隆性生长 (Kirshner 等, Blood 2008, 112 : 2935-45), 并且能够离体地分化成 MM 细胞以及在植入 NOD/SCID 小鼠模型中 (初次移植和再次移植期间) 分化成 MM 细胞。因此已提出这些 CD138^{neg}CD20⁺ 细胞代表假定的多发性骨髓瘤干细胞。

[0042] 以异种抗原免疫作为打破对癌症免疫疗法的免疫耐受性的方法。许多肿瘤相关 Ag (TAA) 代表非先天免疫原性的组织分化 Ag。识别这些具有高亲合力的 TAA/ 自体 Ag 的 T 细胞在胸腺中被克隆性删除或者在外周被去能化 (anergized)。然而, 已证实用异种抗原进行免疫能够克服针对同源自体 Ag 的免疫耐受性。在 I 期临床试验中, 在用负载重组小鼠 PAP 的树突状细胞免疫的 21 名前列腺癌患者中, 有 11 名患者对同源自体 Ag 产生了 I 型 T 细胞增殖反应, 有 6 名患者表现出先发前列腺癌的临床稳定 (Fong 等, J Immunol. 2001, 167 (12) : 7150-6)。这些结果表明异种抗原免疫可打破人体中对自体 Ag 的耐受性, 从而在临床上取得显著的抗肿瘤效果。

[0043] CD20 作为针对 MM 的免疫治疗和疫苗接种的靶标。如上所述, CD20 为 MM 癌干细胞的标志。由于免疫耐受性的原因, 作为大多数分化阶段上在正常 B 细胞上表达的自体抗原在理论上难以通过疫苗策略被靶向。然而, 已在 B 细胞淋巴瘤的肿瘤攻击模型中通过针对 CD20 的异种 DNA 疫苗成功地实现了疫苗接种。尽管通过靶向 CD20 的疫苗可诱导针对 B 细胞的自身免疫, 但其不应引起较大的问题, 因为 B 细胞池并非重要和关键的组织, 可由其系祖细胞补充。基于这些考虑, 靶向 CD20 的治疗疫苗会有效地选择性根除 MM 癌干细胞。

[0044] 单克隆抗 CD20 抗体作为用于根除 MM 干细胞的潜在形式。CD20+MM 祖细胞的发现推动了若干小临床试验的开展, 用以测试利妥昔 (rituximab, 一种抗 CD20 单克隆抗体) 在 MM 患者中的功效。如 Kapoor 等 (Br J Haematol. 2008, 141 : 135-48) 所综述, 采用利妥昔的抗 CD20 疗法在大约 10% 的患有多发性骨髓瘤的 CD20+ 患者中诱导出局部反应。此外, 初步证据显示 50-57% 的 CD20+ 患者的病情稳定性持续 10-27 个月 (Kapoor 等, (Br J Haematol. 2008, 141 : 135-48)。此外, Bergua 等的病例报告 (Leukemia. 2008, 22 : 1082-3) 中将利妥昔与化学疗法联合使用, 治疗后未在免疫表型、骨髓穿刺或活组织检查中发现微小的残存病灶, 并且 CD20+ 浆细胞消失。这些结果证明有必要进行大规模的临床试验来确定此策略在治疗骨髓瘤中的作用。由于疫苗方法可诱导 CTL 反应, 因此预期可用于补充针对 CD20MM 干细胞的单克隆抗体治疗。

[0045] 将抗原体内靶向至树突状细胞及其它抗原呈递细胞作为用于疫苗接种和打破免疫耐受性的有效策略。作为专门的抗原呈递细胞, 树突状细胞 (DC) 在协调先天性免疫与适应性免疫中起关键作用, 并已用于产生有效疫苗 (Vulink 等, Adv Cancer Res. 2008, 99 : 363-407 ; O' Neill 等, Mol Biotechnol. 2007, 36 : 131-41)。将抗原体内靶向至 DC 代表了一种基于 DC 的疫苗接种的有前途的方法, 因为该方法可避免繁杂且昂贵的体外抗原负载和培养, 并有利于基于 DC 的免疫疗法的大规模应用 (Tacke 等, Nat Rev Immunol. 2007, 7 : 790-802)。更显著地, 体内 DC 靶向疫苗接种在诱导抗肿瘤免疫反应方面更有效, 并且可更有效地控制动物模型中的肿瘤生长 (Kretz-Rommel 等, J Immunother 2007, 30 : 715-726)。除 DC 外, B 细胞为能够激发 Th1/Th2 细胞 (Morris 等, J Immunol. 1994, 152 : 3777-3785 ; Constant, J Immunol. 1999, 162 : 5695-5703) 和通过交叉呈递激活 CD8 T 细胞 (Heit 等,

J Immunol. 2004, 172 :1501-1507 ;Yan 等, Int Immunol. 2005, 17 :869-773) 的另一种类型的有效抗原呈递细胞。据最近报道,将抗原体内靶向至 B 细胞打破 MUC1 的免疫耐受性 (Ding 等, Blood 2008, 112 :2817-25)。

[0046] CD74 作为用于靶向疫苗接种的潜在受体。一些在 DC 上表达的受体已用作体内抗原靶向的靶标,这些受体如甘露糖受体 (He 等, J. Immunol. 2007, 178, 6259-6267 ; Ramakrishna 等, J. Immunol. 2004, 172, 2845-2852)、CD205 (Bonifaz 等, J Exp Med. 2004, 199 :815-24)、DC-SIGN (Tacke 等, Blood 2005, 106 :1278-85) 和 LOX1 (Deineste 等, Immunity 2002, 17, 353-362) 等。CD74 是对正确折叠 MHC II 和将 MHC II-CD74 复合体靶向至核内体所必需的 II 型整合膜蛋白 (Stein 等, Clin Cancer Res. 2007, 13 :5556s-5563s ; Matza 等, Trends Immunol. 2003, 24 (5) :264-8)。CD74 表达不限于 DC,而是可见于几乎所有的抗原呈递细胞 (Freudenthal 等, Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87 :7698-702 ; Clark 等, J Immunol. 1992, 148 (11) :3327-35)。CD74 在 APC 中的广泛表达与在骨髓 DC 中的单一表达相比可具有一些优点,因为已报道将抗原靶向至其它 APC (如 B 细胞) 会打破免疫耐受性 (Ding 等, Blood 2008, 112 :2817-25),且靶向至类浆细胞 DC 会将抗原交叉呈递至原态 CD8 T 细胞。更重要的是,CD74 也在滤泡 DC 中表达 (Clark 等, J Immunol. 1992, 148 (11) :3327-35),这些滤泡 DC 是对将抗原呈递至 B 细胞至关重要的 DC 亚群 (Tew 等, Immunol Rev. 1997, 156 :39-52)。这种表达型使 CD74 成为用于体内靶向疫苗接种的极佳候选物。

[0047] 人化抗 CD74 单克隆抗体 hLL1 作为具有对接和锁定技术平台的新型靶向工具。下文更详细讨论的 DNL 技术提供将几乎任何选定的效应子部分连接到共价或非共价复合体当中的方法 (Goldenberg 等, J Nucl Med. 2008, 49 :158-63 ; Rossi 等, Proc Natl Acad Sci USA. 2006, 103 (18) :6841-6)。DNL 方法已产生了若干含与癌胚抗原 (CEA) 反应的 Fab 片段的三价双特异性结合蛋白,并且已通过预靶向策略成功地用于改善癌成像和放射免疫性治疗 (Goldenberg 等, J Nucl Med. 2008, 49 :158-63)。

[0048] hLL1 为针对人 CD74 的人化单克隆抗体 (Leung 等, Mol Immunol. 1995, 32 :1416-1427 ; Losman 等, Cancer 1997, 80 :2660-2666 ; Stein 等, Blood 2004, 104 :3705-11)。此 MAbs 在通过第二抗体交联时表现出针对 B 细胞恶性肿瘤的细胞毒性。裸 hLL1 还能控制 MM 小鼠模型中的肿瘤生长。然而,我们近来的数据表明,在存在或不存在交联作用时,hLL1 都没有针对人单核细胞源性 DC 的细胞毒性。但我们的初步数据显示,hLL1 能有效地结合血液 DC 和 B 细胞的不同亚群。其还可适度地诱导 DC 成熟并朝 Th1 效应子细胞极化原态 T 细胞分化,这表明其具有一些辅助活性,可以用作靶向工具的良好候选物。这使得通过 DNL 携带的 hLL1 抗体来构建靶向 APC 的基于 DNL 的肿瘤疫苗成为可能且可行。

[0049] 用于选择性消除癌干细胞的免疫疗法。癌干细胞能自我更新,具有不受限制的增殖能力,并且对多种治疗方法具有抗性。一个紧迫且值得关注的问题是,癌干细胞是否对免疫疗法敏感。就白血病而言,据报道 CD8 (+) 次要组织相容性抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞克隆可消除人急性骨髓性白血病干细胞 (Bonnet 等, Proc Natl Acad Sci U. S. A. 1999, 96 :8639-8644)。最近, Rosinski 等 (Blood 2008, 111 :4817-26) 报道 DDX36 编码的 H-Y 表位通过白血病干细胞表达,并且可通过 DDX36 特异性 CTL 识别,这可防止在 NOD/SCID 小鼠中植入人急性白血病 (Rosinski 等, Blood 2008, 111 :4817-26)。另一份报道指出,通过 mHA 特异性 CTL 克隆的离体预培养完全抑制 mHA 骨髓性白血病干细胞在 NOD/SCID γ c^{null} 小鼠中

的植入 (Kawase 等, Blood 2007, 110 :1055-63)。这些结果突出了免疫疗法可以成为选择性消除癌干细胞 (包括 MM 干细胞) 的潜在有效方法的前景, 该方法应可实现对这种恶性肿瘤的长期控制或甚至治愈这种恶性肿瘤。

[0050] 对接和锁定 (DNL) 方法

[0051] DNL 方法利用发生在 cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA) 的调节 (R) 亚单元与 A 激酶锚定蛋白 (AKAP) 的锚定域 (AD) 之间的特异性蛋白质 / 蛋白质相互作用 (Baillie 等, FEBS Letters. 2005 ;579 :3264 ;Wong 和 Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004 ;5 :959)。1968 年首次从兔骨骼肌中分离出 PKA, 其在由第二信使 cAMP 与 R 亚单元的结合所引导的研究最充分的信号转导途径之一中起核心作用 (Walsh 等, J. Biol. Chem. 1968 ;243 :3763)。全酶结构由被 R 亚单元保持于非活性形式的两个催化亚单元组成 (Taylor, J. Biol. Chem. 1989 ;264 :8443)。发现 PKA 的同工酶具有两种类型的 R 亚单元 (RI 和 RII), 每种类型均具有 α 和 β 异形体 (Scott, Pharmacol. Ther. 1991 ;50 :123)。R 亚单元仅被分离为稳定的二聚体, 并且已证实二聚域由前 44 个氨基末端残基组成 (Newlon 等, Nat. Struct. Biol. 1999 ;6 :222)。cAMP 与 R 亚单元的结合导致活性催化亚单元的释放, 从而得到广谱的丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性, 这些活性催化亚单元通过 PKA 经由其与 AKAP 的对接实现的区室化朝选定的底物定位 (Scott 等, J. Biol. Chem. 1990 ;265 :21561)。

[0052] 自从 1984 年表征首个 AKAP, 即微管相关蛋白 -2 以来 (Lohmann 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984 ;81 :6723), 已经在从酵母到人类的多个物种中鉴别出具有不同样结构的 50 多种 AKAP, 它们定位于各种亚细胞位点, 包括质膜、肌动蛋白细胞骨架、细胞核、线粒体和内质网 (Wong 和 Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004 ;5 :959)。AKAP 对 PKA 的 AD 为 14-18 个残基的两亲性螺旋 (Carr 等, J. Biol. Chem. 1991 ;266 :14188)。AD 的氨基酸序列在各 AKAP 之间差别很大, 据报道对 RII 二聚体的结合亲和力为 2 至 90nM (Alto 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003 ;100 :4445)。有意思的是, AKAP 只与二聚 R 亚单元结合。对于人 RII α , AD 与由 23 个氨基末端残基形成的疏水表面结合 (Colledge 和 Scott, Trends Cell Biol. 1999 ;6 :216)。因此, 人 RIIa 的二聚域和 AKAP 结合域均位于在本文中称为 DDD 的相同的 N-末端 44 氨基酸序列内 (Newlon 等, Nat. Struct. Biol. 1999 ;6 :222 ;Newlon 等, EMBO J. 2001 ;20 :1651)。

[0053] 作为连接体模块的人 RII α 的 DDD 和 AKAP 的 AD

[0054] 我们已经开发出利用人 RII α 的 DDD 和 AKAP 的 AD 作为极佳的连接体模块对用于将任何两个实体 (在下文中称为 A 和 B) 对接成非共价复合体的平台技术, 可通过将半胱氨酸残基引入 DDD 和 AD 的重要位置以促进二硫键的形成而将该非共价复合体进一步锁定成稳定束缚结构 (stably tethered structure)。“对接和锁定”技术的一般方法如下。通过使 DDD 序列与 A 的前体连接来构建实体 A, 得到以下称为 a 的第一组分。由于 DDD 序列会影响二聚体的自发形成, 因此 A 将由 a_2 组成。通过使 AD 序列与 B 的前体连接来构建实体 B, 得到以下称为 b 的第二组分。包含在 a_2 中的 DDD 的二聚模体将产生用于与包含在 b 中的 AD 序列结合的对位点, 从而促进 a_2 与 b 迅速缔合以形成由 a_2b 构成的二元三聚复合体。通过随后经由二硫桥共价固定两个实体的反应使这一结合事件不可逆, 该反应基于有效的局部浓度原理而非常有效地发生, 因为初始的结合相互作用会使置于 DDD 和 AD 二者上的活性硫醇基靠近 (Chmura 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001 ;98 :8480), 从而进行位点特异

性连接。

[0055] 在优选的实施例中,抗癌疫苗 DNL 构建体基于 a_2b 结构的变化,其中抗 CD74 抗体或 $F(ab')_2$ 或 $F(ab)_2$ 抗体片段(如 hLL1 抗体或片段)的每个重链在其 C-末端连接于 AD 部分的一个拷贝。由于每个抗体或片段具有两个重链,因此每个抗体或片段具有两个 AD 部分。CD20 异种抗原连接于互补的 DDD 部分。DDD 部分二聚化后,每个 DDD 二聚体与连接于 IgG 抗体的 AD 部分或连接于 $F(ab')_2$ 或 $F(ab)_2$ 片段的 AD 部分之一结合,从而得到每个 IgG 或 $F(ab')_2$ 或 $F(ab)_2$ 单元中有四个 CD20 异种抗原的化学计量。然而,技术人员会意识到可使用替换的复合体,如将 CD20 连接于 AD 序列,并将抗 CD74MAb 或片段连接于 DDD 部分,从而得到不同化学计量的效应子部分。例如,通过将 DDD 序列连接于 IgG 抗体或 $F(ab')_2$ 片段的每个重链的 C-末端,并将 AD 序列连接于 CD20 异种抗原,可构建包含一个 CD20 分子和一个抗 CD74 抗体或片段的 DNL 复合体。

[0056] 通过在远离两个前体的官能团处连接 DDD 和 AD,可预期这种位点特异性连接可保持两个前体的原始活性。此方法具有模块化的性质,并能潜在地用于位点特异性地和共价地连接多种物质。

[0057] 如下文实例所示,在优选的实施例中,效应部分为蛋白质或肽,该效应部分可连接于 DDD 或 AD 单元以形成融合蛋白或肽。已知有多种方法可形成融合蛋白,包括核酸合成、杂交和 / 或扩增,以产生编码目标融合蛋白的合成双链核酸。可将这种双链核酸插入表达载体中,用于通过标准的分子生物学技术产生融合蛋白(见例如 Sambrook 等, Molecular Cloning, A laboratory manual 第二版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。在这种优选的实施例中,AD 和 / 或 DDD 部分可连接于效应蛋白或肽的 N-末端或 C-末端。然而,技术人员会意识到,AD 或 DDD 部分与效应部分的连接位点可根据效应部分的化学性质和效应部分涉及其生理活性的部分而变化。例如,尽管 AD 或 DDD 部分可在保持抗原结合活性的同时连接于抗体或抗体片段的 N-末端或 C-末端,但与 C-末端的连接使 AD 或 DDD 部分的位置远离抗原结合位点,且似乎可能导致较强的结合相互作用(例如 Chang 等, Clin Cancer Res 2007, 13 :5586s-91s)。也可采用本领域中已知的技术进行多种效应部分的位点特异性连接,例如采用二价交联试剂和 / 或其它化学缀合技术。

[0058] 抗体和抗体片段

[0059] 在各实施例中,抗体或抗体的抗原结合片段可结合到抗癌疫苗 DNL 复合体当中。抗原结合抗体片段是本领域中已知的,如 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ 等,并且任何这种已知的片段均可使用。如本文所用,抗原结合抗体片段是指与由完整抗体或亲本抗体识别的相同抗原结合的抗体的任何片段。用于制备几乎任何的目标抗体或片段的 AD 和 / 或 DDD 缀合物的技术是已知的(例如美国专利 No. 7, 527, 787)。

[0060] 可使用未与治疗剂缀合的抗体或其片段,其被称为“裸”抗体或其片段。在可供选择的实施例中,抗体或片段可与一种或多种治疗剂和 / 或诊断剂缀合。许多这种治疗剂和诊断剂是本领域中已知的(如下文更为详细地讨论),并且任何这种已知的治疗剂或诊断剂均可使用。

[0061] 用于制备针对几乎任何靶抗原的单克隆抗体(例如 CD74)的技术是本领域中已知的。见例如 Kohler 和 Milstein, Nature 256 :495(1975);和 Coligan 等(编辑)CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY 第 1 卷第 2.5.1 至 2.6.7 页(John Wiley&Sons 1991)。简单而

言,单克隆抗体可以通过下列步骤来获得:向小鼠注射含有抗原的组合物,摘除脾脏以获得 B- 淋巴细胞,将 B- 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤,克隆杂交瘤,选出对抗原产生抗体的阳性克隆,培养对抗原产生抗体的克隆,以及从杂交瘤培养物中分离抗体。

[0062] 可以用多种完善的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化出 MAbs。这种分离技术包括使用蛋白 A 琼脂糖凝胶的亲色谱、尺寸排阻色谱和离子交换色谱。见例如, Coligan 在 2.7.1-2.7.12 页和 2.9.1-2.9.3 页所述。也可见 Baines 等, " Purification of Immunoglobulin G(IgG)", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 第 10 卷第 79 至 104 页 (The Humana Press, Inc. 1992)。

[0063] 在起始形成免疫原的抗体之后,抗体可以进行测序并随后用重组技术来制备。鼠抗体和抗体片段的人化和嵌合是本领域的技术人员熟知的。使用源自人化、嵌合或人抗体的抗体组分避免了与鼠恒定区的免疫原性相关的潜在问题。

[0064] 嵌合抗体

[0065] 嵌合抗体是重组蛋白质,其中人抗体的可变区被例如包括小鼠抗体的互补决定区 (CDR) 在内的小鼠抗体的可变区所取代。当施用给受试者时,嵌合抗体表现出免疫原性降低而稳定性增加。克隆鼠免疫球蛋白可变区的一般技术公开于例如 Orlandi 等的 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86 :3833(1989) 中。构建嵌合抗体的技术是本领域的技术人员所熟知的。举例而言, Leung 等, Hybridoma 13 :469(1994) 描述了通过将编码鼠 LL2(抗 CD22 单克隆抗体)的 V_{κ} 和 V_{η} 域的 DNA 序列与相应的人 κ 和 IgG₁ 恒定区域结合来产生 LL2 嵌合体。

[0066] 人化抗体

[0067] 产生人化 MAbs 的技术是本领域中所熟知的(见例如 Jones 等, Nature 321 :522(1986); Riechmann 等, Nature 332 :323(1988); Verhoeyen 等, Science 239 :1534(1988); Carter 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89 :4285(1992); Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12 :437(1992) 以及 Singer 等, J. Immun. 150 :2844(1993))。可通过将小鼠 CDR 从重可变链和轻可变链转移到人抗体的相应可变域来人化嵌合或鼠单克隆抗体。嵌合单克隆抗体中的小鼠框架区 (FR) 也用人 FR 序列取代。因为简单地将小鼠 CDR 转移至人 FR 中常常导致抗体亲和性的降低或者甚至是丧失,所以可能需要附加的修饰以恢复鼠抗体的原始亲和性。这可通过将 FR 区中的一个或多个人残基用其鼠对应物取代来完成,从而获得对其表位具有良好结合亲和性的抗体。见例如 Tempest 等, Biotechnology 9 :266(1991); 和 Verhoeyen 等, Science 239 :1534(1988)。一般来讲,不同于其鼠对应物且位置接近一个或多个 CDR 氨基酸残基或与其接触的人 FR 氨基酸残基为取代的候选物。

[0068] 人化 LL1(hLL1) 抗 CD74 抗体公开于美国专利 No. 7, 312, 318 中,该专利的第 35 栏第 1 行至第 42 第 27 行以及图 1 至图 4 以引用的方式并入本文。

[0069] 人抗体

[0070] 采用组合方法或用人免疫球蛋白基因座转化的转基因动物来产生全人抗体的方法是本领域中已知的(例如 Mancini 等, 2004, New Microbiol. 27 :315-28; Conrad 和 Scheller, 2005, Comb. Chem. High Throughput Screen. 8 :117-26; Brekke 和 Loset, 2003, Curr. Opin. Pharmacol. 3 :544-50)。全人抗体也可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建,所有这些技术在本领域中是已知的。见例如 McCafferty 等, Nature 348 :

552-553(1990)。预期这种全人抗体表现出比嵌合或人化抗体更少的副作用,并且在体内基本上起到内源性人抗体的作用。在某些实施例中,请求保护的方法和程序可利用通过这种技术产生的人抗体。

[0071] 在一个可供选择的方案中,噬菌体展示技术可用于产生人抗体(例如,Dantas-Barbosa等,2005,Genet. Mol. Res. 4 :126-40)。人抗体可产生自正常人或产生自显示特定疾病状态(例如癌)的人(Dantas-Barbosa等,2005)。由患病个体构建人抗体的优势在于,循环抗体谱可偏向(biased towards)针对疾病相关抗原的抗体。

[0072] 在此方法论的一个非限制性实例中,Dantas-Barbosa等(2005)构建了来自骨肉瘤患者的人Fab抗体片段的噬菌体展示库。通常,总RNA得自循环血淋巴细胞(Id.)。重组Fab克隆自 μ 、 γ 和 κ 链抗体谱并插入噬菌体展示库(Id.)。使用针对重链和轻链免疫球蛋白序列的特异性引物将RNA转化为cDNA,并用于制造Fab cDNA库(Marks等,1991,J Mol. Biol. 222 :581-97)。按照Andris-Widhopf等(2000, In :Phage Display Laboratory Manual,Barbas等(编辑)第1版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY第9.1至9.22页)进行库构建。最终的Fab片段用限制性内切酶消化并插入到噬菌体基因组以制造噬菌体展示库。可通过本领域中已知的标准噬菌体展示方法筛选这种库(见例如Pasqualini和Ruoslahti,1996,Nature 380 :364-366 ;Pasqualini,1999,The Quart. J. Nucl. Med. 43 :159162)。

[0073] 可以多种形式进行噬菌体展示,其综述见例如,Johnson和Chiswell,Current Opinion in Structural Biology 3 :5564-571(1993)。人抗体也可由离体活化的B细胞来产生。见美国专利No. 5,567,610和No. 5,229,275,其全文以引用的方式并入本文。技术人员会意识到,这些技术仅为示例性的,可以利用制造与筛选人抗体或抗体片段的任何已知方法。

[0074] 在另一个可供选择的方案中,采用标准的免疫方案,可以使用经基因工程改造产生人抗体的转基因动物来产生针对基本上任何免疫原性靶标的抗体。用于从转基因小鼠中获得人抗体的方法由下列学者进行了描述:Green等,Nature Genet. 7 :13(1994),Lonberg等,Nature 368 :853(1994);和Taylor等,Int. Immun. 6 :579(1994)。这种系统的非限制性例子有得自Abgenix(Fremont,CA)的XenoMouse®(例如Green等,1999,J. Immunol. Methods 231 :11-23)。在XenoMouse®和类似动物中,小鼠抗体基因已经被灭活并被功能性人抗体基因取代,而小鼠免疫系统的其余部分保持不变。

[0075] 用种系配置的(germline-configured)YAC(酵母人工染色体)转化XenoMouse®,所述YAC含有人IgH和Igkappa基因座的若干部分,包括大多数可变区序列,以及附加基因和调节序列。人可变区库可用来生成产生抗体的B细胞,其可以通过已知的技术被处理成杂交瘤。用靶抗原免疫的XenoMouse®通过正常的免疫反应产生人抗体,可以通过上面讨论的标准技术进行收获和/或生产。可得到多种品系的XenoMouse®,每种品系均能产生不同类的抗体。转基因方法产生的人抗体经证明具有治疗潜力,同时保留正常人抗体的药代动力学性质(Green等,1999)。技术人员会意识到请求保护的组合物和方法不限于使用XenoMouse®系统,而是可以利用已通过基因改造产生人抗体的任何转基因动物。

[0076] 抗体片段

[0077] 可以通过已知的技术来产生识别特异表位的抗体片段。抗体片段为抗体的抗原结

合部分,如 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 $F(ab)_2$ 、 Fab 、 Fv 、 sFv 等。 $F(ab')_2$ 片段可通过胃蛋白酶消化抗体分子产生,而 Fab' 片段可通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥产生。作为另外的选择,可构建 Fab' 表达库 (Huse 等,1989, Science,246 :1274-1281),以使得能快速和容易地鉴定具有所需特异性的单克隆 Fab' 片段。 $F(ab)_2$ 片段可通过木瓜蛋白酶消化由二硫还原得到的抗体和 Fab 片段来产生。

[0078] 单链 Fv 分子 ($scFv$) 包含 VL 域和 VH 域。 VL 域和 VH 域联合形成靶结合位点。这两个域进一步通过肽连接体 (L) 共价连接。用于制造 $scFv$ 分子和设计合适的肽连接体的方法在下列文献中进行了描述:美国专利 No. 4,704,692;美国专利 No. 4,946,778; R. Raag 和 M. Whitlow, "Single Chain Fvs." FASEB Vol 9 :73-80(1995);以及 R. E. Bird 和 B. W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions", TIBTECH, Vol 9 :132-137(1991)。

[0079] 用于产生单域抗体的技术是本领域中已知的,例如由 Cossins 等 (2006, Prot Express Purif 51 :253-259) 所公开。单域抗体 (VHH) 可通过标准免疫技术从骆驼、羊驼或大羊驼中获得 (见例如 Muyldermans 等, TIBS 26 :230-235,2001;Yau 等, J Immunol Methods 281 :161-75,2003;Maass 等, J Immunol Methods 324 :13-25,2007)。 VHH 可具有有效的抗原结合能力并可与常规 VH - VL 对接触不到的新表位相互作用 (Muyldermans 等, 2001)。羊驼血清 IgG 含约 50% 的只有骆驼科重链的 IgG 抗体 ($HCAb$) (Maass 等,2007)。羊驼可用已知的抗原免疫 (如 $TNF-\alpha$), 并且可将结合并中和靶抗原的 VHH 分离 (Maass 等, 2007)。已鉴定出扩增几乎所有羊驼 VHH 编码序列的 PCR 引物,并且这些引物可用于构建羊驼 VHH 噬菌体展示库,其可用于通过本领域中熟知的标准生物淘选技术来进行抗体片段分离 (Maass 等,2007)。

[0080] 可通过全长抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌 (*E. coli*) 或其它宿主中表达编码该片段的 DNA 来制备抗体片段。可以按常规方法通过全长抗体的胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化来获得抗体片段。这些方法由例如 Goldenberg, 美国专利 No. 4,036,945 和 No. 4,331,647 以及其中所包含的文献所描述。此外,见 Nisonoff 等, Arch Biochem. Biophys. 89 :230(1960);Porter, Biochem. J. 73 :119(1959);Edelman 等, METHODS IN ENZYMOLOGY 第 1 卷第 422 页 (Academic Press1967);和 Coligan,2.8.1-2.8.10 页和 2.10.-2.10.4 页。

[0081] 已知的抗体

[0082] 在某些实施例中,除 CD74 外,可以把针对其它抗原靶标的抗体结合到抗癌疫苗 DNL 复合体当中。针对肿瘤相关抗原的多种抗体是已知的,并且可通过商业渠道获得。例如,许多分泌抗体的杂交瘤细胞系得自美国模式培养物保藏所 (ATCC, Manassas, VA)。见例如美国专利号 7,312,318;7,282,567;7,151,164;7,074,403;7,060,802;7,056,509;7,049,060;7,045,132;7,041,803;7,041,802;7,041,293;7,038,018;7,037,498;7,012,133;7,001,598;6,998,468;6,994,976;6,994,852;6,989,241;6,974,863;6,965,018;6,964,854;6,962,981;6,962,813;6,956,107;6,951,924;6,949,244;6,946,129;6,943,020;6,939,547;6,921,645;6,921,645;6,921,533;6,919,433;6,919,078;6,916,475;6,905,681;6,899,879;6,893,625;6,887,468;6,887,466;6,884,594;6,881,405;6,878,812;6,875,580;6,872,568;6,867,006;6,864,062;6,861,511;6,861,227;6,861,226;6,838,282;6,835,549;6,835,370;6,824,780;

6, 824, 778 ;6, 812, 206 ;6, 793, 924 ;6, 783, 758 ;6, 770, 450 ;6, 767, 711 ;6, 764, 688 ;
6, 764, 681 ;6, 764, 679 ;6, 743, 898 ;6, 733, 981 ;6, 730, 307 ;6, 720, 15 ;6, 716, 966 ;
6, 709, 653 ;6, 693, 176 ;6, 692, 908 ;6, 689, 607 ;6, 689, 362 ;6, 689, 355 ;6, 682, 737 ;
6, 682, 736 ;6, 682, 734 ;6, 673, 344 ;6, 653, 104 ;6, 652, 852 ;6, 635, 482 ;6, 630, 144 ;
6, 610, 833 ;6, 610, 294 ;6, 605, 441 ;6, 605, 279 ;6, 596, 852 ;6, 605, 279 ;6, 596, 852 ;
6, 592, 868 ;6, 576, 745 ;6, 572, 856 ;6, 566, 076 ;6, 562, 618 ;6, 545, 130 ;6, 544, 749 ;
6, 534, 058 ;6, 528, 625 ;6, 528, 269 ;6, 521, 227 ;6, 518, 404 ;6, 511, 665 ;6, 491, 915 ;
6, 488, 930 ;6, 482, 598 ;6, 482, 408 ;6, 479, 247 ;6, 468, 531 ;6, 468, 529 ; ,6, 465, 173 ;
6, 461, 823 ;6, 458, 356 ;6, 455, 044 ;6, 455, 040 ;6, 451, 310 ;6, 444, 206 ;6, 441, 143 ;
6, 432, 404 ;6, 432, 402 ;6, 419, 928 ;6, 413, 726 ;6, 406, 694 ;6, 403, 770 ;6, 403, 091 ;
6, 395, 276 ;6, 395, 274 ;6, 387, 350 ;6, 383, 759 ;6, 383, 484 ;6, 376, 654 ;6, 372, 215 ;
6, 359, 126 ;6, 355, 481 ;6, 355, 444 ;6, 355, 245 ;6, 355, 244 ;6, 346, 246 ;6, 344, 198 ;
6, 340, 571 ;6, 340, 459 ;6, 331, 175 ;6, 306, 393 ;6, 254, 868 ;6, 187, 287 ;6, 183, 744 ;
6, 129, 914 ;6, 120, 767 ;6, 096, 289 ;6, 077, 499 ;5, 922, 302 ;5, 874, 540 ;5, 814, 440 ;
5, 798, 229 ;5, 789, 554 ;5, 776, 456 ;5, 736, 119 ;5, 716, 595 ;5, 677, 136 ;5, 587, 459 ;
5, 443, 953 ;5, 525, 332。

[0083] 这些抗体仅为示例性的,许多其它抗体及其杂交瘤是本领域中已知的。技术人员会意识到,可通过在 ATCC、NCBI 和 / 或 USPTO 数据库中简单检索针对选定的疾病相关目标靶的抗体来获得针对几乎任何肿瘤相关抗原的抗体序列或分泌抗体的杂交瘤。可采用本领域中熟知的标准技术,将克隆抗体的抗原结合域扩增、切下、连接到表达载体、转染到已适应的宿主细胞中以及用于蛋白生产。

[0084] 氨基酸取代

[0085] 在某些实施例中,本发明所公开的方法和组合物可涉及生产和使用具有一个或多个取代氨基酸残基的蛋白质或肽。例如,如以下工作实例所讨论,可以改变 AD 和 / 或 DDD 部分的序列以改善 DNL 复合体的形成和 / 或其体内稳定性。在其它实施例中,可通过取代一个或多个氨基酸残基来优化天然、嵌合、人化或人抗体的结构特性、物理特性和 / 或治疗特性。例如,本领域中熟知的是,可通过用亲本鼠抗体的相应 FR 氨基酸取代有限数目的人框架区 (FR) 氨基酸来改善人化抗体的功能特性。当框架区氨基酸残基近接 CDR 残基时尤其如此。

[0086] 在其它情况下,可通过有限数目的氨基酸取代来优化抗体的治疗特性,如对靶抗原的结合亲和性、抗体从其靶抗原中的解离或脱离的速率或甚至抗体诱导 CDC (补体依赖性细胞毒性) 或 ADCC (抗体依赖性细胞的细胞毒性) 的有效性。

[0087] 技术人员会意识到,一般而言,氨基酸取代通常涉及将氨基酸用另一种具有相对类似性质的氨基酸取代 (保守氨基酸取代)。各种氨基酸的特性和氨基酸取代对蛋白质结构和功能的影响已成为本领域中广泛研究和已知的课题。

[0088] 例如,可考虑氨基酸的疏水性指数 (hydropathic index) (Kyte&Doolittle,1982, J. Mol. Biol., 157:105-132)。氨基酸的相对疏水特性有助于所得蛋白质的二级结构,后者又限定蛋白质与其它分子的相互作用。对每种氨基酸根据其疏水性和电荷性质指定了一个疏水性指数 (Kyte&Doolittle,1982),即:异亮氨酸 (+4.5);缬氨酸 (+4.2);亮氨酸

(+3.8); 苯丙氨酸 (+2.8); 半胱氨酸 / 胱氨酸 (+2.5); 蛋氨酸 (+1.9); 丙氨酸 (+1.8); 甘氨酸 (-0.4); 苏氨酸 (0.7); 丝氨酸 (-0.8); 色氨酸 (-0.9); 酪氨酸 (-1.3); 脯氨酸 (-1.6); 组氨酸 (-3.2); 谷氨酸盐 (-3.5); 谷氨酰胺 (-3.5); 天冬氨酸盐 (-3.5); 天冬酰胺 (-3.5); 赖氨酸 (-3.9); 和精氨酸 (-4.5)。在进行保守取代时, 优选使用疏水性指数在 ± 2 范围内的氨基酸, 更优选使用疏水性指数在 ± 1 范围内的氨基酸, 甚至更优选疏水性指数在 ± 0.5 范围内的氨基酸。

[0089] 氨基酸取代还要考虑氨基酸残基的亲水性 (例如 U. S. Pat. No. 4, 554, 101)。已对氨基酸残基指定了亲水性值: 精氨酸 (+3.0); 赖氨酸 (+3.0); 天冬氨酸盐 (+3.0); 谷氨酸盐 (+3.0); 丝氨酸 (+0.3); 天冬酰胺 (+0.2); 谷氨酰胺 (+0.2); 甘氨酸 (0); 苏氨酸 (-0.4); 脯氨酸 (-0.5, ± 1); 丙氨酸 (-0.5); 组氨酸 (-0.5); 半胱氨酸 (-1.0); 蛋氨酸 (-1.3); 缬氨酸 (-1.5); 亮氨酸 (-1.8); 异亮氨酸 (-1.8); 酪氨酸 (-2.3); 苯丙氨酸 (-2.5); 色氨酸 (-3.4)。用其它具有类似亲水性的物质进行氨基酸的取代是优选的。

[0090] 其它考虑因素包括氨基酸侧链的大小。例如, 用具有较大侧链的氨基酸 (如色氨酸或酪氨酸) 取代具有紧凑侧链的氨基酸 (如甘氨酸或丝氨酸) 通常不是优选的。还考虑各种氨基酸残基对蛋白质二级结构的影响。通过实证研究, 不同氨基酸残基对蛋白质结构域采取 α -螺旋、 β -折叠或翻转二级结构的倾向性的影响已经确定, 并且是本领域中已知的 (见例如 Chou&Fasman, 1974, Biochemistry, 13:222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276; 1979, Biophys. J., 26:367-384)。

[0091] 基于这种考虑因素和大量的实证研究已建立了保守氨基酸取代表, 这些表在本领域中是已知的。例如, 精氨酸和赖氨酸; 谷氨酸盐和天冬氨酸盐; 丝氨酸和苏氨酸; 谷氨酰胺和天冬酰胺; 以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。作为另外的选择, 可为 Ala(A) leu, ile, val; Arg(R) gin, asn, lys; Asn(N) his, asp, lys, arg, gin; Asp(D) asn, glu; Cys(C) ala, ser; Gln(Q) glu, asn; Glu(E) gin, asp; Gly(G) ala; His(H) asn, gin, lys, arg; Ile(I) val, met, ala, phe, leu; Leu(L) val, met, ala, phe, ile; Lys(K) gin, asn, arg; Met(M) phe, ile, leu; Phe(F) leu, val, ile, ala, tyr; Pro(P) ala; Ser(S), thr; Thr(T) ser; Trp(W) phe, tyr; Tyr(Y) top, phe, thr, ser; Val(V) ile, leu, met, phe, ala。

[0092] 氨基酸取代的其它考虑因素包括残基是否位于蛋白内部或暴露在溶剂中。就内部残基而言, 保守取代包括 Asp 和 Asn; Ser 和 Thr; Ser 和 Ala; Thr 和 Ala; Ala 和 Gly; Ile 和 Val; Val 和 Leu; Leu 和 Ile; Leu 和 Met; Phe 和 Tyr; Tyr 和 Trp (见例如, PROWL 网站: rockefeller.edu)。就溶剂暴露的残基而言, 保守取代包括 Asp 和 Asn; Asp 和 Glu; Glu 和 Gln; Glu 和 Ala; Gly 和 Asn; Ala 和 Pro; Ala 和 Gly; Ala 和 Ser; Ala 和 Lys; Ser 和 Thr; Lys 和 Arg; Val 和 Leu; Leu 和 Ile; Ile 和 Val; Phe 和 Tyr (见例如 PROWL 网站: rockefeller.edu)。已构建各种矩阵来辅助氨基酸取代的选择, 如 PAM250 计分矩阵、Dayhoff 矩阵、Grantham 矩阵、McLachlan 矩阵、Doolittle 矩阵、Henikoff 矩阵、Miyata 矩阵、Fitch 矩阵、Jones 矩阵、Rao 矩阵、Levin 矩阵和 Risler 矩阵 (见例如 PROWL 网站: rockefeller.edu)。

[0093] 在确定氨基酸取代时, 还要考虑分子间键或分子内键的存在, 例如带正电的残基 (例如 His、Arg、Lys) 与带负电的残基 (例如 Asp、Glu) 之间形成的离子键 (盐桥) 或附近的半胱氨酸残基之间形成的二硫键。

[0094] 对技术人员而言, 在编码的蛋白质序列中将氨基酸取代为任何其它氨基酸的方

法是熟知的,仅需要进行常规的实验,例如通过定点诱变技术或通过合成和组装编码氨基酸取代物的寡核苷酸并将其拼接到表达载体构建体当中(例如 Sambrook 等, Molecular Cloning, A laboratory manual 第二版, Cold Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。

[0095] 治疗剂

[0096] 在某些实施例中,治疗剂(如细胞毒素剂、抗血管生成剂、促凋亡剂、抗生素、激素、激素拮抗剂、趋化因子、药物、前体药物、毒素、酶或其它试剂)可以用作本文所述抗癌疫苗 DNL 复合体的辅助治疗。有用的药物可以具有选自以下的药物特性:抗有丝分裂、抗激酶、烷基化、抗代谢、抗生、生物碱、抗血管生成、促凋亡剂及其组合。

[0097] 有用的示例药物可包括 5-氟尿嘧啶、阿普立啶(aplidin)、阿扎立平、阿纳托唑、蒽环霉素、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、苔藓抑素-1、白消安、刺孢霉素、喜树碱、卡铂、10-羟基喜树碱、卡莫司汀、西乐葆、瘤可宁、顺铂(CDDP)、Cox-2 抑制剂、依立替康(CPT-11)、SN-38、卡铂、克拉屈滨、喜树碱(camptothecans)、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯唑胺、多西他奇、更生霉素、柔红霉素、阿霉素、2-吡咯啉并阿霉素(2-pyrrolinodoxorubicin)(2P-DOX)、氰基吗啉代阿霉素(cyano-morpholino doxorubicin)、葡萄糖苷酸阿霉素(doxorubicin glucuronide)、葡萄糖苷酸表柔比星(epirubicin glucuronide)、雌氮芥、表叶毒素(epidophyllotoxin)、雌激素受体结合剂、依托泊苷(VP16)、葡萄糖苷酸依托泊苷(etoposide glucuronide)、磷酸依托泊苷(etoposide phosphate)、氟尿苷(FUdR)、3',5'-O-二油酰基-FUdR(FUdR-dO)、氟达拉滨、氟他米特、法尼基蛋白转移酶抑制剂、吉西他滨、羟基脲、去甲氧正定霉素、异环磷酰胺、L-天冬酰胺酶、来那度胺(lenolidamide)、亚叶酸、环己亚硝脲、二氯甲基二乙胺、美法仑、巯嘌呤、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、米拉霉素、丝裂霉素、米托坦、诺维本、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、喷司他丁、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、链佐星、它莫西芬、紫杉酚、替莫唑胺(temazolomide)(DTIC 的含水形式)、反铂、萨立多胺、硫鸟嘌呤、噻替派、替尼泊苷、托泊替康、尿嘧啶氮芥、长春瑞滨、长春花碱、长春新碱和长春花生物碱。

[0098] 有用的毒素可以包括蓖麻毒素、相思豆毒素、 α 毒素、皂草素、核糖核酸酶(RNA 酶)如豹蛙酶、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。

[0099] 在某些实施例中,治疗剂可以是免疫调节剂。免疫调节剂是存在时会改变、抑制或刺激身体免疫系统的试剂。有用的免疫调节剂可以包括细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、促红细胞生成素、促血小板生成素及其组合。特别有用的是诸如肿瘤坏死因子(TNF)的淋巴毒素、诸如白介素(IL)的成血因子、诸如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的集落刺激因子、诸如干扰素- α 、干扰素- β 或干扰素- γ 的干扰素以及诸如称为“S1 因子”的干细胞生长因子。

[0100] 在各实施例中,治疗剂可以包括一种或多种细胞因子,如淋巴因子、单核因子、生长因子和传统多肽激素。包括在细胞因子中的有生长激素,如人生长激素、N-蛋氨酸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)和黄体化激素(LH);胎盘生长因子(P1GF);肝细胞生长因子;前列腺素;成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘泌乳素;OB 蛋

白;肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β ;繆勒氏管抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整联蛋白;促血小板生成素(TPO);神经生长因子,如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II;促红细胞生成素(EPO);骨生成诱导因子;干扰素,如干扰素- α 、干扰素- β 和干扰素- γ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);白介素(IL,例如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-25;LIF;kit-配基或FLT-3;厄洛替尼;血小板反应蛋白;内皮他丁;肿瘤坏死因子(TNF,如TNF- α)和LT。有用的趋化因子可以包括RANTES、MCAF、MIP1- α 、MIP1- β 和IP-10。

[0101] 抗血管生成剂包括厄洛替尼、baculostatin、血管能抑制素、乳腺丝抑蛋白、抗VEGF抗体、抗PIGF肽和抗体、抗血管生长因子抗体、抗Flk-1抗体、抗Flt-1抗体和肽、抗Kras抗体、抗cMET抗体、抗MIF(巨噬细胞移动抑制因子)抗体、层粘连蛋白肽、纤连蛋白肽、纤溶酶原激活物抑制剂、组织金属蛋白酶抑制剂、干扰素、白介素-12、IP-10、Gro- β 、血小板反应蛋白、2-甲氧基雌甾二醇、多育曲菌素相关蛋白、羧胺三唑、CM101、马马司他、戊糖多硫酸盐、血管生成素-2、干扰素- α 、除莠霉素A、PNU145156E、16K催乳素片段、利诺胺(罗喹美克)、萨立多胺、己酮可可碱、染料木黄酮、TNP-470、内皮他丁、紫杉醇、accutin、厄洛替尼、西多福韦、长春新碱、博莱霉素、AGM-1470、血小板因子4或米诺环素会是有益的。

[0102] 其它有用的治疗剂可以包括寡核苷酸,特别是优选针对致癌基因和致癌基因产物的反义寡核苷酸,如bcl-2或p53。治疗性寡核苷酸的优选形式是siRNA。

[0103] 诊断剂

[0104] 诊断剂可选自放射性核素、放射造影剂、顺磁离子、金属、荧光标记物、化学发光标记物、超声造影剂和光敏剂。这种诊断剂是公知的,并且可以使用任何这种已知的诊断剂。诊断剂的非限制性例子可以包括放射性核素,如 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 或其它 γ -、 β -或正电子-发射体。有用的顺磁离子可以包括铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钇(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镨(III)、铈(III)或铟(III)。金属造影剂可以包括镧(III)、金(III)、铅(II)或铋(III)。超声造影剂可以包括脂质体,如充气脂质体。不透射线诊断剂可为选自钡化合物、镓化合物和铈化合物的化合物。各种荧光标记物是本领域中已知的,包括但不限于异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺。有用的化学发光标记物可以包括鲁米诺、异鲁米诺、芳族吡啶酯、咪唑、吡啶盐或草酸酯。

[0105] 免疫缀合物

[0106] 在某些实施例中,抗癌疫苗DNL构建体可以与一种或多种治疗或诊断剂缀合。治疗剂不需要相同,可以是不同的,例如药物和放射性同位素。例如, ^{131}I 可结合到抗体或融合蛋白的酪氨酸当中,而药物连接于赖氨酸残基的 ϵ -氨基。治疗和诊断剂还可以连接于例如还原的SH基和/或连接于碳水化合物侧链。许多用抗体或融合蛋白制造治疗或诊断剂的共价或非共价缀合物的方法是本领域中已知的,并且可以利用任何这种已知的方法。

[0107] 治疗或诊断剂可经由二硫键的形成而连接在还原抗体组分的铰链区。作为另外的

选择,这种试剂可使用异型双官能交联剂(如 N-琥珀酰基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP))来连接。Yu 等, Int. J. Cancer 56:244(1994)。这种缀合的通用技术是本领域中已知的。例如,参见 Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING(CRC Press 1991);Upeslakis 等,“Modification of Antibodies by Chemical Methods”, MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch 等(编辑),187-230 页(Wiley-Liss, Inc.1995);Price, “Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies,” MONOCLONAL ANTIBODIES:PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter 等(编辑),60-84 页(Cambridge University Press 1995)。作为另外的选择,治疗或诊断剂可以经由抗体的 Fc 区中的碳水化合物部分缀合。碳水化合物基团可用于增加与硫醇基结合的相同试剂的负载,或者碳水化合物部分可用于结合不同的治疗或诊断剂。

[0108] 通过抗体碳水化合物部分将肽与抗体组分缀合的方法是本领域技术人员熟知的。例如,参见, Shih 等, Int. J. Cancer 41:832(1988);Shih 等, Int. J. Cancer 46:1101(1990);和 Shih 等,美国专利 No. 5,057,313,它们全文以引用的方式并入本文。一般方法涉及使具有氧化的碳水化合物部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能团的载体聚合物反应。这一反应产生初始的席夫碱(亚胺)键,其可以通过还原到仲胺而稳定化,从而形成最终缀合物。

[0109] 如果用作免疫缀合物的抗体组分的抗体是抗体片段,则可以没有 Fc 区。然而,有可能将碳水化合物部分引入到全长抗体或抗体片段的轻链可变区。例如,参见,Leung 等, I Immunol. 154:5919(1995);Hansen 等,美国专利 No. 5,443,953(1995);Leung 等,美国专利 No. 6,254,868,它们全文以引用的方式并入本文。改造的碳水化合物部分用于连接治疗或诊断剂。

[0110] 在一些实施例中,可以将螯合剂连接于抗体、抗体片段或融合蛋白,并用于螯合治疗或诊断剂(如放射性核素)。示例性螯合剂包括但不限于 DTPA(如 Mx-DTPA)、DOTA、TETA、NETA 或 NOTA。缀合以及使用螯合剂将金属或其它配体连接于蛋白质的方法是本领域中熟知的(参见例如,美国专利申请 No. 12/112,289,其全文以引用的方式并入本文)。

[0111] 在某些实施例中,放射性金属或顺磁离子可以通过与具有长尾的试剂反应而连接于蛋白质或肽,所述的长尾可连接用于结合离子的诸多螯合基团。这样的尾可以是聚合物(如聚赖氨酸)、多糖或具有可结合螯合基团(例如已知可用于此目的的乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、卟啉、聚胺、冠醚、双缩氨基硫脲、聚脲等)的侧基的其它衍生化或可衍生化的链。

[0112] 螯合物可以直接连接于抗体或肽,例如,如美国专利 4,824,659 中所公开的,其公开内容以引用的方式并入本文。特别有用的金属-螯合物组合包括 2-苄基-DTPA 及其单甲基和环己基类似物,其与一般能量范围在 60 至 4,000keV 的诊断同位素(如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{18}F 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{76}Br)一起用于放射成像。当与非放射性金属(如锰、铁和钆)络合时,相同的螯合物可用于 MRI。大环螯合物(如 NOTA、DOTA 和 TETA)可与多种金属和射电金属一起使用,特别是分别与放射性核素镓、钷和铜一起使用。这种金属-螯合络合物可以通过使环的大小适应于所关注的金属而变得非常稳定。可用于稳定结合核素(如对于 RAIT 的 ^{223}Ra)的其它环形螯合物(如大环聚醚)包括在内。

[0113] 最近,已公开了可用于PET扫描技术的 ^{18}F 标记方法,例如通过使F-18与金属或其它原子(如铝)反应。 ^{18}F -Al 缀合物可以与直接连接于抗体或用于在预靶向方法中标记可靶向构建体的螯合基团(如DOTA、NOTA或NETA)络合。这种F-18标记技术公开在2008年4月30日提交的美国专利申请No. 12/112,289中,其全文以引用的方式并入本文。

[0114] 治疗处理的方法

[0115] 各种实施例涉及治疗受试者(如哺乳动物,包括人、驯养动物或宠物,如狗和猫)的癌症(如,多发性骨髓瘤)的方法。该方法可包括对受试者施用有效量的抗癌疫苗DNL构建体。在优选实施例中,抗癌疫苗DNL构建体包含抗-CD74抗体或其片段和CD20异种抗原,如在下面实例中进一步的详述。

[0116] 可以通过同时或顺序地施用有效量的另一种抗体来补充抗癌疫苗DNL构建体的施用,所述另一种抗体与靶细胞表面上的另一种抗原结合或与之反应。优选的附加MAb包括至少一种人化、嵌合或人MAb,其选自可与CD209(DC-SIGN)、CD34、CD74、CD205、TLR2(铯样受体2)、TLR 4、TLR 7、TLR 9、BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4和HLADR反应的MAb。各种有用的抗体是本领域技术人员已知的,如上面所讨论。例如,参见, Ghetie 等, Cancer Res. 48 :2610(1988); Hekman 等, Cancer Immunol. Immunother. 32 :364(1991); Longo, Curr. Opin. Oncol. 8 :353(1996); 美国专利 No. 5,798,554; No. 6,187,287; No. 6,306,393; No. 6,676,924; No. 7,109,304; No. 7,151,164; No. 7,230,084; No. 7,230,085; No. 7,238,785; No. 7,238,786; No. 7,282,567; No. 7,300,655; No. 7,312,318 和 美国专利申请公开 No. 20080131363; No. 20080089838; No. 20070172920; No. 20060193865; No. 20060210475; No. 20080138333 和 20080146784,各引用专利或申请的实例部分以引用的方式并入本文。

[0117] 在可供选择的实施例中,针对另一树突状细胞抗原的抗体或其片段(如,CD209(DC-SIGN)、CD34、CD205、TLR 2(铯样受体2)、TLR 4、TLR 7、TLR 9、BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4或HLA-DR)可替换DNL复合体中的抗CD74抗体。这种抗体可得自像美国模式培养物保藏所之类的公共来源或得自商业抗体供应商。例如,针对CD209(DC-SIGN)、CD34、BDCA-2、TLR2、TLR 4、TLR 7和TLR 9的抗体可以购自Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)。针对CD205和BDCA-3的抗体可以购自Miltenyi Biotec Inc. (Auburn, CA)。抗体的众多其它商业来源是本领域技术人员已知的。

[0118] 可以通过同时或顺序地施用至少一种治疗剂来进一步补充抗癌疫苗DNL构建体治疗。用于治疗多发性骨髓瘤的治疗剂包括地塞米松、萨立多胺/地塞米松、环磷酰胺、VAD(长春新碱、阿霉素和地塞米松)、DVd(DOXIL®(聚乙二醇化阿霉素)、长春新碱和还原的 schedule 地塞米松)、BCNU、美法仑、卡莫司汀、硼替佐米(VELCADE®)、泼尼松和皮质类固醇。单个治疗剂可单独使用,或以本领域中已知的各种组合的方式使用,如CP(环磷酰胺、泼尼松)、CT(环磷酰胺、萨立多胺)、VBMCP(长春新碱、BCNU、美法仑、环磷酰胺、美法仑)、VMCP(长春新碱、美法仑、环磷酰胺、泼尼松)、DT-PACE(地塞米松、萨立多胺、顺铂、阿霉素、环磷酰胺、依托泊苷)、MPT(美法仑、泼尼松、萨立多胺)、CVAD(环磷酰胺和VAD)、EDAP(依托泊苷、地塞米松、阿糖胞苷、顺铂)、MTD(美法仑、萨立多胺、地塞米松)、VT(VELCADE®,萨立多胺)、VDT(VELCADE®,阿霉素、萨立多胺)、VADT(VELCADE®,阿霉素、萨立多胺、地塞米松)或DCEP(地塞米松、环磷酰胺、依托泊苷、顺铂)。

[0119] 在干细胞移植之前进行的多发性骨髓瘤的化学治疗被称为诱导治疗。本文列出的某些化学治疗剂比其它更适于诱导治疗。可用于 MM 诱导治疗的化学治疗剂的例子包括地塞米松、萨立多胺 / 地塞米松、环磷酰胺、VAD 和 Dvd。因为 MM 常常对化学治疗具有抗性，治疗剂的施用可以按比常规化学治疗更高的剂量进行。这种高剂量化学治疗通常产生骨髓毒性，常与干细胞移植结合使用。MM 化学治疗的剂量和时程是本领域中公知的，可以结合抗癌疫苗 DNL 构建体的施用采取任何这种已知的剂量和 / 或时程。

[0120] 在 DNL 疫苗用于 MM 以外的其它类型癌症的情况下，其它化学治疗方案是已知的。例如，“CVB”（1.5g/m² 环磷酰胺、200-400mg/m² 依托泊苷和 150-200mg/m² 卡莫司汀）是用于治疗非何杰金氏淋巴瘤的方案。Patti 等，Eur. J. Haematol. 51:18(1993)。其它合适的组合化学治疗方案是本领域技术人员熟知的。参见例如 Freedman 等，“Non-Hodgkin's Lymphomas,” CANCER MEDICINE, VOLUME 2, 3rd Edition, Holland 等（编辑），2028-2068 页（Lea&Febiger 1993）。作为例示，治疗中度非何杰金氏淋巴瘤（NHL）的第一代化学治疗方案包括 C-MOPP（环磷酰胺、长春新碱、丙卡巴肼和泼尼松）和 CHOP（环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和泼尼松）。有用的第二代化学治疗方案是 m-BACOD（甲氨蝶呤、博来霉素、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、地塞米松和亚叶酸），而合适的第三代方案是 MACOP-B（甲氨蝶呤、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、泼尼松、博来霉素和亚叶酸）。针对其它类型癌症可用的化学治疗剂包括但不限于 5- 氟尿嘧啶、阿普立啶、阿扎立平、阿纳托唑、蒽环霉素、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、苔藓抑素 -1、白消安、刺孢霉素、喜树碱、卡铂、10- 羟基喜树碱、卡莫司汀、西乐葆、瘤可宁、顺铂、Cox-2 抑制剂、依立替康（CPT-11）、SN-38、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯唑胺、多西他奇、更生霉素、柔红霉素、阿霉素、2- 吡咯并阿霉素（2P-DOX）、氨基吗啉代阿霉素、葡糖苷酸阿霉素、葡糖苷酸表柔比星、雌氮芥、表叶毒素、雌激素受体结合剂、依托泊苷（VP 16）、葡糖苷酸依托泊苷、磷酸依托泊苷、氟尿苷（FudR）、3', 5' -O- 二油酰基 -FudR（FudR-dO）、氟达拉滨、氟他米特、法尼基蛋白转移酶抑制剂、吉西他滨、羟基脲、去甲氧正定霉素、异环磷酰胺、L- 天冬酰胺酶、来那度胺、亚叶酸、环己亚硝脲、二氯甲基二乙胺、美法仑、巯嘌呤、6- 巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、米拉霉素、丝裂霉素、米托坦、诺维本、亚硝基脲、丁酸苯酯、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、喷司他丁、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、链佐星、它莫西芬、紫杉酚、替莫唑胺（DTIC 的含水形式）、反铂、萨立多胺、硫鸟嘌呤、噻替派、替尼泊苷、托泊替康、尿嘧啶氮芥、长春瑞滨、长春花碱、长春新碱和长春花生物碱。

[0121] 配方

[0122] 可以根据已知制备药用组合物的方法来配制抗癌疫苗 DNL 构建体，由此使抗癌疫苗 DNL 构建体在混合物中与药用辅料结合。消毒磷酸盐缓冲盐水是药用辅料的一个例子。其它合适的辅料是本领域中公知的。参见例如 Ansel 等，PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea&Febiger 1990) 和 Gennaro（编辑）REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990) 及其修订版本。

[0123] 抗癌疫苗可以配制成用以通过例如团注或连续输注来进行静脉内施用。可以按单位剂型提供用于注射的制剂，例如在安瓶或多剂量容器中并添加防腐剂。组合物所采取的形式可以为例如在油或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液，并且可以含有配制剂，如悬浮

剂、稳定剂和 / 或分散剂。作为另外的选择,在使用前,活性成分可以为与合适的载体(例如消毒无热原水)配合的粉末形式。

[0124] 可以采用另外的制药方法来控制抗癌疫苗的作用持续时间。可以通过使用聚合物来复合或吸附抗癌疫苗 DNL 构建体来制备缓释制剂。例如,生物相容性聚合物包括乙烯-醋酸乙烯酯共聚物基质和硬脂酸二聚体与癸二酸的聚酸酐共聚物基质。Sherwood 等, Bio/Technology 10:1446(1992)。从这种基质中释放的速率取决于抗癌疫苗 DNL 构建体的分子量、基质内的抗癌疫苗量以及分散粒子的尺寸。Saltzman 等, Biophys. J 55: 163(1989); Sherwood 等, 上文。Other solid dosage forms are described in Ansel 等, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990) 和 Gennaro (编辑), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990) 及其修订版本。

[0125] 也可以对哺乳动物皮下或甚至通过其它非肠道途径施用抗癌疫苗 DNL 构建体。此外,施用可以通过连续输注或通过单次或多次团注进行。优选地,通过皮下注射方式以单次或多次团注施用抗癌疫苗。

[0126] 一般来讲,对人施用的抗癌疫苗 DNL 构建体的剂量随诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般体格状况和既往病史之类的因素而不同。可取的是为接受者提供的抗癌疫苗 DNL 构建体的剂量范围是单次施用为 1mg/kg 至 25mg/kg, 但视情况而定,也可以施用较低或较高的剂量。例如,对于 70kg 患者来说,1-20mg/kg 的剂量是 70-1,400mg, 或者对于 1.7m 患者来说,为 41-824mg/m²。为诱导免疫反应,根据需要可以重复该剂量。

[0127] 在优选实施例中,疫苗 DNL 构建体可用于癌症的治疗。癌症的例子包括但不限于肿瘤、淋巴瘤、成胶质细胞瘤、黑色素瘤、肉瘤和白血病、骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤。此类癌症的更具体的例子如下所述,包括:鳞状细胞癌(如,上皮鳞状细胞癌)、尤因肉瘤、维尔姆斯瘤、星形细胞瘤、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞癌、肝细胞癌、神经内分泌瘤、甲状腺髓质癌、分化型甲状腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。术语“癌症”包括原发恶性细胞或肿瘤(例如,其细胞尚未迁移到受试者体内初始恶性肿瘤或肿瘤部位以外的部位的那些)和次发性恶性细胞或肿瘤(例如,由转移-恶性细胞或肿瘤细胞迁移到不同于初始肿瘤部位的次发部位-引起的那些)。

[0128] 癌症或恶性肿瘤的其它例子包括但不限于:急性儿童成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、肾上腺皮质癌、成人(原发性)肝细胞癌、成人(原发性)肝癌、成人急性淋巴细胞性白血病、成人急性骨髓性白血病、成人何杰金氏淋巴瘤、成人淋巴细胞性白血病、成人非何杰金氏淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、艾滋病相关淋巴瘤、艾滋病相关恶性肿瘤、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干胶质瘤、脑肿瘤、乳腺癌、肾盂输尿管癌、中枢神经系统(原发性)淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星状细胞瘤、宫颈癌、儿童(原发性)肝细胞癌、儿童(原发性)肝癌、儿童急性成淋巴细胞白血病、儿童急性骨髓性白血病、儿童脑干胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童大脑星状细胞瘤、儿童颅外生殖细胞肿瘤、儿童何杰金氏病、儿童何杰金氏淋巴瘤、儿童小丘脑及视通路胶质瘤、儿童成淋巴细胞白血病、

儿童成神经管细胞瘤、儿童非何杰金氏淋巴瘤、儿童松果体及幕上原始神经外胚层肿瘤、儿童原发性肝癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视通路及下丘脑胶质瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、结肠癌、皮肤 T 淋巴细胞瘤、内分泌胰岛细胞癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室鼓膜瘤、上皮癌、食管癌、尤因肉瘤及相关肿瘤、外分泌胰腺癌、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳腺癌、高歇氏病、胆囊癌、胃癌、胃肠类肿瘤、胃肠肿瘤、生殖细胞肿瘤、妊娠性滋养层细胞瘤、毛细胞性白血病、头颈癌、肝细胞癌、何杰金氏淋巴瘤、高丙种球蛋白血症、咽下癌、肠癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波济氏肉瘤、肾癌、喉癌、唇及口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴增生性障碍、巨球蛋白血症、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、间皮瘤、转移性不明原发性颈部鳞状细胞癌、转移性原发颈部鳞状细胞癌、转移性颈部鳞状细胞癌、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤 / 浆细胞赘生物、骨髓增生异常综合征、粒细胞性白血病、骨髓性白血病、骨髓增生障碍、鼻腔及鼻旁窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非何杰金氏淋巴瘤、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、不明原发转移性颈部鳞状细胞癌、口咽癌、骨纤维 / 恶性纤维肉瘤、骨肉瘤恶性纤维组织细胞瘤、骨肉瘤 / 骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低度恶性潜能肿瘤、胰腺癌、异常蛋白血症、真性红细胞增多症、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂输尿管癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、伯克氏肉样肉瘤、塞扎莱综合征、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、颈部鳞状细胞癌、胃癌、幕上原发性神经外胚层及松果体肿瘤、T- 细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂及输尿管的移行细胞癌、移行肾盂及输尿管癌、滋养叶瘤、输尿管及肾盂细胞癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视通路及下丘脑胶质瘤、外阴癌、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、维尔姆斯氏瘤以及除了位于上面所列器官系统中的生瘤以外的任何其它的增生过多疾病。

[0129] 本文所述并要求保护的方法和组合物可用于治疗恶性或恶化前的症状以及防止恶化成肿瘤或恶性肿瘤状态,包括但不限于上述的那些疾病。这种用途显示在已知或疑似为肿瘤形成或癌症的前期病变的病症中,特别是已发生包括增生、转化的非肿瘤细胞生长,最具体地说,出现发育异常的情况(关于这种异常生长状态的综述,参见 Robbins 和 Angell, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, 68-79 页 (1976))。

[0130] 发育异常往往是癌症的先兆,主要见于上皮。其为非肿瘤细胞生长的最无序形式,涉及个体细胞一致性和细胞结构定向的丧失。发育异常典型地出现在有慢性刺激或炎症的地方。可以治疗的发育异常病症包括但不限于无汗性外胚层发育异常、面发育异常、窒息性胸廓发育异常、心房-手指发育异常、支气管肺发育异常、大脑发育异常、宫颈非典型增生、软骨外胚层发育异常、锁骨颅骨发育异常、先天性外胚叶发育异常、颅骨骨干发育异常、颅腕跗发育异常、颅骨干骺端发育异常、牙本质发育异常、骨干发育异常、外胚层发育异常、珐琅质发育异常、脑性眼球发育异常、偏侧骨骺发育异常、多发性骨骺发育异常、点状骨骺发育异常、上皮异常增生、面-指(趾)-生殖器发育异常、家族性颌骨纤维异常增殖症、家族性黏膜白色皱襞发育异常、纤维肌性发育异常、骨纤维异常增殖症、旺盛骨性发育异常、遗传性肾视网膜发育异常、出汗性外胚层发育异常、少汗性外胚叶发育异常、淋巴细胞减少性胸腺发育异常、乳腺发育异常、下腭面骨发育异常、干骺端发育异常、蒙底尼发育异常、单骨纤维发育异常、粘膜上皮发育异常(mucoepithelial dysplasia)、多发性骨骺发育异常、

眼耳脊椎发育异常、眼齿指发育异常、直肠椎骨发育异常 (culovertebral dysplasia)、牙源性发育异常、ophthalmomandibulomelic dysplasia、根尖周牙骨质异常增生、多发性骨纤维性发育异常、假性软骨发育不全性脊椎骨骺发育异常、视网膜发育不全、视-隔发育异常、脊椎骨骺发育异常和脑室桡骨发育异常。

[0131] 可以治疗的另外的肿瘤前病症包括但不限于良性异常增生疾病 (例如, 良性肿瘤、纤维囊性病、组织肥大、肠息肉或腺瘤和食管癌前病变)、粘膜白斑病、角化病、博文氏病、慢性光化性皮炎、日光性唇炎和日光性角化病。

[0132] 在优选实施例中, 本发明的方法用于抑制癌症 (特别是上面所列那些) 的生长、恶化和 / 或转移。

[0133] 另外的增生过多性疾病、病症和 / 或症状包括但不限于如下的恶性肿瘤及相关病症的恶化和 / 或转移: 白血病 (包括急性白血病 (例如, 急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病 (包括成髓细胞、前髓细胞、髓单核细胞、单核细胞和红白血病)) 及慢性白血病 (例如, 慢性髓细胞 (粒细胞) 白血病和慢性淋巴细胞性白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤 (如, 何杰金氏病和非何杰金氏病)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链病和实体瘤, 包括但不限于肉瘤和癌瘤, 如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳突状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室鼓膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0134] 试剂盒

[0135] 各实施例可涉及容纳适于治疗或诊断患者病变组织的组分的试剂盒。示例性试剂盒可以含有至少一种或多种如本文所述的抗癌疫苗构建体。如果含施用组分的组合物不是配制成经由消化道递送 (如通过口服), 则可以包括能够通过一些其它途径递送试剂盒组分的装置。对于诸如非肠道施用之类的应用而言, 一种类型的装置是用来向受试者体内注入组合物的注射器。也可以使用吸入装置。在某些实施例中, 可以以含消毒液制剂或冻干制剂的预装注射器或自动注射笔的形式提供治疗剂。

[0136] 试剂盒组分可以包装在一起或分装在一个或多个容器中。在一些实施例中, 容器可以是小瓶, 所述小瓶中含有适于调配的组合物的消毒冻干制剂。试剂盒还可以含有一种或多种适于调配和 / 或稀释其它试剂的缓冲剂。可以使用的其它容器包括但不限于袋、盘、盒、管等等。试剂盒组分可以消毒地包装并保存在容器内。可以包括在内的另一部分是用户使用试剂盒的使用说明书。

[0137] 表达载体

[0138] 另外一些实施例可以涉及包含编码抗癌疫苗构建体或其组成融合蛋白的核酸的 DNA 序列。融合蛋白可以包含连接于不同肽或蛋白质 (如, 用于 DNL 构建体形成的 AD 和 DDD 肽) 的抗 CD74 抗体或 CD20 异种抗原, 其将在下面的实例中更详细描述。作为另外的选择, 编码的融合蛋白可以包含连接于不同抗体或异种抗原的 DDD 或 AD 部分。

[0139] 各实施例涉及包含编码 DNA 序列的表达载体。载体可以含有编码人免疫球蛋白的轻链和重链恒定区以及铰链区的序列, 嵌合、人化或人可变区序列可连接于上述序列。载体可另外含有表达选定宿主细胞中的编码蛋白的启动子、增强子和信号或前导序列。特别有用的载体是 pdHL2 或 GS。更优选地, 轻链和重链恒定区以及铰链区可来自于人 EU 骨髓瘤免疫球蛋白, 其中任选地, 至少一个异型位置上的氨基酸被改成见于不同 IgG1 异型中的氨基酸, 且其中任选地, 基于 EU 数体系的 EU 的重链的氨基酸 253 可以用丙氨酸替换。参见 Edelman 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:78-85 (1969)。在其它实施例中, IgG1 序列可以转换为 IgG4 序列。

[0140] 本领域技术人员会意识到, 基因改造表达构建体并插入宿主细胞以表达改造的蛋白质的方法是本领域中公知的, 只需进行例行的试验。例如, 2005 年 7 月 25 日提交的美国专利申请 No. 11/187, 863、2005 年 10 月 20 日提交的 No. 11/253, 666 以及 2006 年 7 月 14 日提交的 No. 11/487, 215 中已描述了表达克隆抗体或片段的宿主细胞及方法, 它们每个的实例部分以引用的方式并入本文。

[0141] 实例

[0142] 提供下面的实例以说明 (但不限制) 本发明的权利要求。

[0143] 实例 1. 对接和锁定 (DNL) 构建体的制备

[0144] DDD 和 AD 融合蛋白

[0145] DNL 技术可以用来制备包含几乎任何抗体或其片段或其它效应子部分的二聚体、三聚体、四聚体、六聚体等。对于某些优选实施例而言, IgG 抗体、F(ab')₂ 抗体片段和异种抗原 (例如 CD20 异种抗原) 可以被制成含二聚及对接域 (DDD) 或锚定域 (AD) 序列的融合蛋白。尽管在优选实施例中, DDD 和 AD 部分被制成融合蛋白, 但本领域技术人员会意识到, 在权利要求的方法和组合物的范围内可以利用其它的缀合方法, 如化学交联。

[0146] 可以通过将例如抗 CD74 抗体的 Fab-DDD 融合蛋白与 CD20-AD 融合蛋白结合而形成 DNL 构建体。作为另外的选择, 可以制备将 IgG-AD 融合蛋白与 CD20-DDD 融合蛋白结合的构建体。所述技术不是限制性的, 任何可用的蛋白质或肽都可以制成用于结合到 DNL 构建体当中的 AD 或 DDD 融合蛋白。在利用化学交联的情况下, AD 和 DDD 缀合物不限于蛋白质或肽, 可以包括能通过本领域中已知的任何交联技术与 AD 或 DDD 序列交联的任何分子。

[0147] 可以为每个 DDD 或 AD 融合蛋白开发独立的转基因细胞系。一旦产生, 可根据需要纯化模块, 或保存在细胞培养上清液中。在产生之后, 可以将任何 DDD 融合蛋白模块与任何 AD 融合蛋白模块结合以产生 DNL 构建体。对于不同类型的构建体而言, 可以利用不同的 AD 或 DDD 序列。下面提供了示例性的 DDD 和 AD 序列。

[0148] DDD1:

[0149] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA

[0150] (SEQ ID NO:10)

[0151] DDD2:

[0152] CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA

[0153] (SEQ ID NO:11)

[0154] AD1:QIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:12)

[0155] AD2:CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:13)

[0156] 表达载体

[0157] 质粒载体 pdHL2 被用于产生多种抗体和基于抗体的构建体。参见 Gillies 等, J Immunol Methods(1989), 125:191-202; Losman 等, Cancer(Phila)(1997), 80:2660-6。双顺反子哺乳动物表达载体主导 IgG 的重链和轻链的合成。对许多不同的 IgG-pdHL2 构建体来说, 载体序列大部分是相同的, 区别仅在可变域 (VH 和 VL) 序列。使用本领域技术人员已知的分子生物学工具可以将这些 IgG 表达载体转变成 Fab-DDD 或 Fab-AD 表达载体。为了产生 Fab-DDD 表达载体, 重链的铰链、CH2 和 CH3 域的编码序列用编码铰链前 4 个残基、14 残基 Gly-Ser 连接体和人 RII α 的前 44 个残基的序列替换 (被称为 DDD1)。为了产生 Fab-AD 表达载体, IgG 的铰链、CH2 和 CH3 域的序列用编码铰链前 4 个残基、15 残基 Gly-Ser 连接体和称为 AKAP-IS 的 17 残基合成 AD 的序列替换 (被称为 AD1), 上述序列的产生利用了生物信息学和肽阵列技术, 显示出与 RII α 二聚体的高亲和力结合 (0.4nM)。参见 Alto 等, Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A(2003), 100:4445-50。

[0158] 设计两种穿梭载体以帮助 IgG-pdHL2 载体转为 Fab-DDD1 或 Fab-AD1 表达载体, 如下所述。

[0159] CH1 的制备

[0160] 使用 pdHL2 质粒载体为模板, 通过 PCR 扩增 CH1 域。左侧 PCR 引物由 CH1 域的上游 (5') 端和 SacII 限制性核酸内切酶位点组成, 该位点为 CH1 编码序列的 5'。右侧引物由编码铰链 (PKSC (SEQ ID NO:29) 的前 4 个残基且后面有 4 个甘氨酸和丝氨酸的序列组成, 最后两个密码子 (GS) 包含 Barn HI 限制性位点。将 410bp PCR 扩增引物克隆到 PGEMT® PCR 克隆载体 (PROMEGA®, Inc.), 并筛选用于 T7 (5') 方向的插入物的克隆。

[0161] 公开为 (SEQ ID NO:14) 的 $(G_4S)_2$ DDD1 ($(G_4S)_2$ 的构建

[0162] 由 Sigma GENOSYS® (Haverhill, UK) 合成双链寡核苷酸 (名称为 $(G_4S)_2$ DDD1 ($(G_4S)_2$, 公开为 SEQ ID NO:14)) 以编码前面有连接肽的 11 个残基的氨基酸序列 DDD 1, 前两个密码子包含 BamHI 限制性位点。终止密码子和 EagI 限制性位点附于 3' 端。编码的多肽序列在下面示出。

[0163] GSGGGGSGGGGSHIQQPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVE

[0164] YFTREAREARA (SEQ ID NO:15)

[0165] 合成两种寡核苷酸 (名称为 RIIA1-44 顶部和 RIIA1-44 底部, 由其 3' 端上的 30 个碱基对重叠) (Sigma GENOSYS®), 结合以包含 174bpDDD 1 序列的中央 154 碱基对。对寡核苷酸退火并使之经受与 Taq 聚合酶的引物延伸反应。引物延伸后通过 PCR 扩增双链。将扩增引物克隆到 PGEMT®, 并筛选用于 T7 (5') 方向的插入物。

[0166] 公开为 SEQ ID NO:14) 的 $(G_4S)_2$ -AD1 ($(G_4S)_2$ 的构建

[0167] 合成双链寡核苷酸 (名称为 $(G_4S)_2$ -AD1 ($(G_4S)_2$, 公开为 SEQ ID NO:14)) (Sigma GENOSYS®) 以编码前面有连接肽的 11 个残基的氨基酸序列 AD1, 前两个密码子包含 BamHI 限制性位点。终止密码子和 EagI 限制性位点附于 3' 端。编码的多肽序列在下面示出。

[0168] GSGGGGSGGGGSQIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:16)

[0169] 合成编码上述肽序列的两条互补重叠寡核苷酸 (名称为 AKAP-IS 顶部和 AKAP-IS 底部) 并退火。通过 PCR 扩增双链。将扩增引物克隆到 PGEMT® 载体并筛选用于 T7 (5') 方向的插入物。

[0170] 连接 DDD1 与 CH1

[0171] 用 BamHI 和 NotI 限制性内切酶从 PGEMT[®] 上切下编码 DDD1 序列的 190bp 片段, 然后连接到 CH1-PGEMT[®] 中的相同位点以产生穿梭载体 CH1-DDD1-PGEMT[®]。

[0172] 连接 AD1 与 CH1

[0173] 用 BamHI 和 NotI 从 PGEMT[®] 上切下含 AD 1 序列的 110bp 片段并连接到 CH1-PGEMT[®] 中的相同位点以产生穿梭载体 CH1-AD1-PGEMT[®]。

[0174] 将 CH1-DDD1 或 CH1-AD1 克隆到基于 pdHL2 的载体

[0175] 通过这种模块化设计可以将 CH1-DDD1 或 CH1-AD1 结合到 pdHL2 载体中的任何 IgG 构建体当中。通过将 SacII/EagI 限制性片段 (CH1-CH3) 从 pdHL2 中移除并用从相应的 pGemT 穿梭载体上切下的 CH1-DDD1 或 CH1-AD1 的 SacII/EagI 片段替换, 由此将整个重链恒定域被上述构建体之一替换。

[0176] h679-Fd-AD1-pdHL2 的构建

[0177] h679-Fd-AD1-pdHL2 是用以产生 h679 Fab 的表达载体, 后者带有经由 14 个氨基酸残基组成的柔性 Gly/Ser 肽间隔物与 Fd 的 CH1 域的羧基末端偶联的 AD1。通过用 CH1-AD1 片段替换 SacII/EagI 片段而将含 h679 的可变域的基于 pdHL2 的载体转变成 h679-Fd-AD1-pdHL2, 所述 CH1-AD1 片段是用 SacII 和 EagI 从 CH1-AD1-SV3 穿梭载体上切下的。

[0178] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2 的构建

[0179] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2 是用以产生含有两个融合蛋白 C-DDD1-Fab-hMN-14 的拷贝的稳定二聚体的表达载体, 其中 DDD1 经由柔性肽间隔物在 CH1 的羧基末端与 hMN-14 Fab 连接。通过用 SacII 和 EagI 限制性核酸内切酶消化以移除 CH1-CH3 域并插入 CH1-DDD1 片段, 由此将已被用来产生 hMN-14 IgG 的质粒载体 hMN-14(I)-pdHL2 转变成 C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2, 所述 CH1-DDD1 片段是用 SacII 和 EagI 从 CH1-DDD1-SV3 穿梭载体上切下的。

[0180] 已经利用相同的技术产生用于各种已知抗体 (如, hLL1、hLL2、hPAM4、hR1、hRS7、hMN-14、hMN15、hA19、hA20 及许多其它抗体) 的 Fab 表达的质粒。一般来讲, 抗体可变区编码序列存在于 pdHL2 表达载体, 并且如上所述转变该表达载体以产生 AD- 或 DDD- 融合蛋白。

[0181] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2 的构建

[0182] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2 是用以产生 C-DDD2-Fab-hMN-14 的表达载体, 后者具有经由 14 氨基酸残基 Gly/Ser 肽附于 hMN-14 的 Fd 的羧基末端的 DDD2 的二聚及对接域序列。分泌的融合蛋白由通过 DDD2 域的非共价相互作用保持在一起的两个相同的 hMN-14 Fab 的拷贝组成。

[0183] 表达载体的改造如下。以合成方式制备两条重叠互补的寡核苷酸, 所述寡核苷酸包含部分连接肽 (GGGSGGGCG, SEQ ID NO:17) 的编码序列和 DDD2 的 1-13 残基。寡核苷酸退火并用 T4 PNK 磷酸化, 在 5' 和 3' 端上产生悬垂部分, 所述悬垂部分对与分别用限制性核酸内切酶 BamHI 和 PstI 消化的 DNA 的连接是相容的。

[0184] 双链 DNA 与通过用 BamHI 和 PstI 消化制备的穿梭载体 CH1-DDD1-PGEMT[®] 连接以产生穿梭载体 CH1-DDD2-PGEMT[®]。用 SacII 和 EagI 从 CH1-DDD2-PGEMT[®] 上切下 507bp 片

段,并与通过用 SacII 和 EagI 消化制备的 IgG 表达载体 hMN-14(I)-pdHL2 连接。最终表达构建体被称为 C-DDD2-FdhMN-14-pdHL2。类似的技术已被用于产生许多不同人化抗体的 Fab 片段的 DDD2 融合蛋白。

[0185] h679-Fd-AD2-pdHL2 的构建

[0186] h679-Fd-AD2-pdHL2 是用以产生 h679-Fab-AD2 表达载体,后者具有经由 14 氨基酸残基 Gly/Ser 肽连接体附于 CH1 域的羧基末端的 AD2 的锚定域序列。AD2 在 AD1 的锚定域序列之前具有一个半胱氨酸残基,在其后具有另一个半胱氨酸残基。

[0187] 表达载体的改造如下。以合成方式制备两条重叠互补的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含 AD2 的编码序列和部分连接体序列。寡核苷酸退火并用 T4 PNK 磷酸化,在 5' 和 3' 端上产生悬垂部分,所述悬垂部分对与分别用限制性核酸内切酶 BamHI 和 SpeI 消化的 DNA 的连接是相容的。

[0188] 将双链 DNA 连接到通过用 BamHI 和 SpeI 消化制备的穿梭载体 CH1-AD1-PGEMT® 以产生穿梭载体 CH1-AD2-PGEMT®。用 SacII 和 EagI 限制性内切酶从穿梭载体上切下含 CH1 和 AD2 编码序列的 429 碱基对片段并连接到通过用那些相同的酶消化制备的 h679-pdHL2 载体。最终的表达载体是 h679-Fd-AD2-pdHL2。

[0189] TF2 三聚 DNA 构建体的产生

[0190] 通过使 C-DDD2-Fab-hMN-14 与 h679-Fab-AD2 反应获得被称为 TF2 的三聚 DNA 构建体。如下产生试验批量的 TF2,产率 > 90%。按 1.4 : 1 的摩尔比混合蛋白 L-纯化的 C-DDD2-Fab-hMN-14 (200mg) 与 h679-Fab-AD2 (60mg)。在含有 1mM EDTA 的 PBS 中的总蛋白浓度为 5mg/ml。后续步骤涉及 TCEP 还原、HIC 色谱法、DMSO 氧化和 IMP 291 亲和色谱法。在添加 TCEP 之前,SE-HPLC 不显示任何 a_2b 形成的迹象。添加 5mM TCEP 迅速导致形成与二元结构所预计的 157kDa 蛋白质一致的 a_2b 复合体。通过 IMP 291 亲和色谱法将 TF2 纯化到接近同质(未示出)。IMP 291 是含有 679Fab 与之结合的 HSG 半抗原的合成肽(Rossi 等, 2005, Clin Cancer Res 11:7122s-29s)。IMP291 未结合部分的 SE-HPLC 分析证实了 a_4 、 a_2 和游离 κ 链从产物中的移除(未示出)。

[0191] 非还原性 SDS-PAGE 分析证实了大部分 TF2 存在为大共价结构,IgG 结构的附近有相对的运动性(未示出)。还原性 SDS-PAGE 表明,因为只有表示 TF2 的组成多肽的带是明显的(未示出),所以在非还原凝胶中明显的任何附加带都与产物相关(未示出)。然而,四种多肽中的每种的相对运动性太接近而不能分辨。MALDI-TOF 质谱法(未示出)显示 156,434Da 的单峰,其在 TF2 计算质量(157,319Da)的 99.5%之内。

[0192] 通过 BIACORE® 试验确定 TF2 的官能度。将 TF2、C-DDD1-hMN-14+h679-AD1(用作非共价 a_2b 复合体的对照样品)或 C-DDD2-hMN-14+h679-AD2(用作未还原的 a_2 和 b 组分的对照样品)稀释到 1 μ g/ml(总蛋白),并通过用 HSG 固定的传感芯片。TF2 的响应是两个对照样品的大约两倍,表明只有对照样品中的 h679-Fab-AD 组分与传感芯片结合并保持在其上。随后注射 WI2 IgG(hMN-14 的抗个体基因型抗体)表明,只有 TF2 具有与 h679-Fab-AD 紧密结合的 DDD-Fab-hMN-14 组分,如附加的信号响应所指示的那样。由 WI2 与固定在传感芯片上的 TF2 结合引起的响应单元的额外增加与两个全功能结合位点相对应,每个所述结合位点由 C-DDD2-Fab-hMN-14 的一个亚单元提供。TF2 与 WI2 的两个 Fab 片段结合的能力证实了这一点(未示出)。

[0193] 实例 2. C_{H3} -AD2-IgG 表达载体

[0194] 产生质粒穿梭载体以帮助将任何 IgG-pdHL2 载体转变成 C_{H3} -AD2-IgG-pdHL2 载体。使用 pdHL2 载体为模板和以下的寡核苷酸引物,通过 PCR 扩增 Fc 的基因 (C_{R2} 和 C_{H3} 域):

[0195] Fc BglIII 左侧

[0196] AGATCTGGCGCACCTGAACTCCTG (SEQ ID NO :8)

[0197] Fc Bain-EcoRI 右侧

[0198] GAATTCGGATCCTTTACCCGGAGACAGGGAGAG (SEQ ID NO :9)。

[0199] 扩增引物在 pGemT PCR 克隆载体 (Promega) 中克隆。用 Xba I 和 Bam HI 从 pGemT 上切下 Fc 插入片段并与通过用 Xba I 和 Bam HI 消化 h679-Fab-AD2-pdHL2 (Rossi 等, Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103 :6841-6) 制备的 AD2-pdHL2 载体连接,从而产生穿梭载体 Fc-AD2-pdHL2。为了将 IgG-pdHL2 表达载体转变成 C_{H3} -AD2-IgG-pdHL2 表达载体,从前者上切下 861bp BsrG I/Nde I 限制性片段,并用从 Fc-AD2-pdHL2 载体上切下的 952bp BsrG I/Nde I 限制性片段替换。下面是已产生并用以生产重组人化 IgG-AD2 模块的 C_{H3} -AD2-IgG-pdHL2 表达载体的部分列表:

[0200] C_{H3} -AD2-IgG-hA20 (抗 CD20)

[0201] C_{H3} -AD2-IgG-hLL2 (抗 CD22)

[0202] C_{H3} -AD2-IgG-hL243 (抗 HLA-DR)

[0203] C_{H3} -AD2-IgG-hLL1 (抗 CD74)

[0204] C_{H3} -AD2-IgG-hR1 (抗 IGF-1R)

[0205] C_{H3} -AD2-IgG-h734 (抗 铈 -DTPA)。

[0206] 实例 3. C_{H3} -AD2-IgG 的生产

[0207] 稳定 $CH3$ -AD2-IgG 分泌细胞系的转染和选择

[0208] 所有细胞系生长在 Hybridoma SFM (Invitrogen, Carlsbad CA) 中。 C_{H3} -AD2-IgG-pdHL2 载体 (30 μ g) 通过用 Sal I 限制性核酸内切酶消化而线性化,并通过电穿孔 (450 伏, 25 μ F) 转染到 Sp2/0-Ag14 (2.8x10⁶ 细胞)。pdHL2 载体含允许通过甲氨蝶呤 (MTX) 克隆选择和基因扩增的二氢叶酸还原酶的基因。

[0209] 在转染之后,将细胞涂布在 96 孔板上,并在含 0.2 μ M MTX 的培养基中选择转基因克隆。使用涂以特定抗个体基因型 MAbs 的 96 孔微量滴定板,通过夹心 ELISA 对克隆进行 C_{H3} -AD2-IgG 产率的筛选。将推定克隆的条件培养基转移至微板的孔中,通过辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人 IgG (ab')₂ 进行融合蛋白的检测 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)。扩增给出最强信号的孔并最终用于生产。

[0210] C_{H3} -AD2-IgG 模块的生产和纯化

[0211] 为生产融合蛋白,以 2x10⁵ 细胞 /ml 接种滚瓶培养物,并在 5% CO₂ 和 37°C 下于滚瓶培养箱中进行培养,直到细胞活力下降到 25% 以下 (-10 天)。通过离心澄清肉汤培养物,过滤并通过超滤浓缩到 50 倍。为了纯化 C_{H3} -AD2-IgG 模块,将浓缩的上清液装载到蛋白 A (MAB 选择) 亲和柱上。柱用 PBS 冲洗至基线,用 0.1M 甘氨酸 (pH2.5) 洗脱融合蛋白。

[0212] 实例 4. DDD2-mCD20 (136-178) 的产生和 DDD2-mCD20 (136-178)-pdHL2 的构建

[0213] DDD2-mCD20 (136-178)-pdHL2 是 DDD2-mCD20 (136-178) 的表达载体,后者包含 DDD2-连接体 -mCD20 (136-178)-HHHHHH (HHHHHH 被公开为 SEQ ID NO :30)。小鼠

CD20 (mCD20) 的胞外域被称为 mCD20 (136-178), 包含下示序列的 136 至 178 氨基酸残基:

[0214] TLSHFLKMRRLELIQTSPYVDIYDCEPSNSSEKNSPSTQYCN (SEQ ID NO :18)

[0215] 小鼠 CD20 异种抗原的氨基酸序列在下面示出。

[0216] MSGPFPAPETKGPLAMQPAPKVNLRKRTSSLVGPTQSFFMRESKAL

[0217] GAVQIMNGLFHITLGGLLMIPTGVFAPICLSVWYPLWGGIMYIISG

[0218] SLLAAAAEKTSRKSLVKAKVIMSSLSLFAAISGIIISIMDILNMTLS

[0219] HFLKMRRLELIQTSPYVDIYDCEPSNSSEKNSPSTQYCNSIQSVFL

[0220] GILSAMLISAFFQKLVTAGIVENEWKRMCTRSKSNVLLSAGEKN

[0221] EQTIKMKEEIIELSGVSSQPKNEEEIEIIPVQEEEEEEAEINFPAPPQE

[0222] QESL PVENEIAP (SEQ ID NO :7)

[0223] 使用全长鼠 CD20 cDNA 克隆为模板和下示的两种引物, 通过 PCR 获得包含 mCD20 (136-178) 的核苷酸序列且两侧有 BamHI 和 XhoI 限制性位点的 DNA 片段。

[0224] 上游引物: BamHI mCD20 引物 (30-mer)

[0225] 5' -GGATCCACACTTCTCATTTTTTAAAAATG (SEQ ID NO :31)

[0226] 下游引物: XhoI mCD20 引物 (30-mer)

[0227] 5' -CTCGAGGTTACAGTACTGTGTAGATGGGGA (SEQ ID NO :32)

[0228] 将 PCR 扩增引物 (141bp) 克隆到 PGEMT[®] 载体 (PROMEGA[®])。制备 DDD2-pdHL2 哺乳动物表达载体, 例如, N-DDD2-hG-CSF-His-pdHL2, 用以通过用 XbaI 和 Bam HI 限制性核酸内切酶消化与扩增引物连接。用 XbaI 和 Barn HI 从 PGEMT[®] 上切下 mCD20- 扩增引物, 并连接到 DDD2-pdHL2 载体以产生表达载体 DDD2-mCD20 (136-178)-pdHL2。

[0229] 转染并筛选以获得表达 DDD2-mCD20 (136-178) 的克隆

[0230] 载体 DDD2-mCD20 (136-178) 通过用 SalI 酶消化而线性化, 并通过电穿孔稳定地转染到 SpESF 骨髓瘤细胞 (参见, 例如, 美国专利 7, 537, 930, 其实例部分以引用的方式并入本文)。通过 ELISA 发现许多克隆具有可检测水平的 DDD2-mCD20 (136-178), 由其中选出最佳生产的克隆并随后通过在五周内将甲氨蝶呤 (MTX) 浓度从 0.1 提高到 0.8 μ M 来进行扩增。在此阶段, 其通过限制稀释来亚克隆, 并扩增最高产的亚克隆。

[0231] 用 0.8 μ M MTX 将克隆扩增到含总共 20L 无血清 Hybridoma SFM 的 34 个滚瓶中, 并使之达到末期培养。通过离心使上清液澄清并过滤 (0.2 μ M)。滤液渗滤进入 1X 结合缓冲液 (10mM 咪唑, 0.5M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, pH 7.5), 并在制备时浓缩到 310mL, 用于通过固定化金属亲和色谱法 (IMAC) 进行纯化。将浓缩物装载至 30-mL Ni-NTA 柱, 该柱已经用 Tween 20 在 1X 结合缓冲液中的 0.02% 溶液 500mL 的清洗, 然后经 290mL 的 30mM 咪唑、0.02% Tween 20、0.5M NaCl、50mM NaH₂PO₄ (pH 7.5) 清洗。产物用 110mL 的 250mM 咪唑、0.02% Tween 20、150mM NaCl、50mM NaH₂PO₄ (pH 7.5) 洗脱。在还原条件下通过 SDS-PAGE 测定 DDD2-mCD20 (136-178) 的纯度。

[0232] 实例 5. 产生包含连接于四个 mCD20 (136-178) 的拷贝的 hLL1 IgG 的 74-mCD20 DNL 疫苗

[0233] 如实例 2 和实例 3 所述制备 C_{H3}-AD2-IgG-hLL1 (抗 CD74)。构建体包含连接于 hLL1 IgG 的每个重链 C 末端的 AD2 部分。如实例 4 所述制备 DDD2-mCD20 (136-178)。通过在含 1mM 还原谷胱甘肽的 PBS 中混合 hLL1 IgG-AD2 和 DDD2-mCD20 (136-178) 来进行 DNL 反应。

在次日加入氧化的谷胱甘肽至 2mM 的最终浓度,24 小时后在蛋白 A 柱上纯化反应混合物。在此实施例中,两个 DDD2-mCD20 的拷贝连接于每个 AD2 部分,产生包含一个 hLL1 IgG 部分和四个 mCD20 异种抗原部分的 DNL 复合体。

[0234] 在一个可供选择的实施例中,hLL1 的 Fab 连接于 DDD2,mCD20(136-178) 连接于 AD2。如上所述形成的 DNL 构建体导致形成名称为 hLL1-F(ab)₂-mCD20(136-178) 的 MM 疫苗,其包含连接于 hLL1 的两个 Fab 部分的单个 mCD20(136-178)。实例 6 描述了 AD2-mCD20(136-178) 的产生。

[0235] 对患有 MM 的受试者施用 74-mCD20(136-178) 或 hLL1-F(ab)₂-mCD20(136-178) 诱导针对 CD138^{neg}CD20⁺ 推定干细胞的免疫反应。免疫反应能有效地减少或消除受试者的 MM 病细胞。

[0236] 实例 6. 重组 AD2-mCD20(136-178) 的产生

[0237] AD2-mCD20(136-178)-pdHL2 是重组 AD2-mCD20(136-178) 的表达载体,后者包含 AD2-连接体-mCD20(136-178)-HHHHHH(HHHHHH 被公开为 SEQ ID NO:30)。使用全长鼠 CD20 cDNA 克隆为模板和下示的两种引物,通过 PCR 获得包含 mCD20(136-178) 的核苷酸序列且两侧具有 Bgl2 和 Eag1 限制性位点的 DNA 片段。

[0238] 上游引物:Bgl2_mCD20 引物(30-mer)

[0239] 5' -AGATCTACACTTTCTCATTTTTTAAAAATG(SEQ ID NO:33)

[0240] 下游引物:Eag1_mCD20 引物(48-mer)

[0241] 5' CGGCCGTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTTACAGTACTGTGT

[0242] AGATGG(SEQ ID NO:34)

[0243] 将 PCR 扩增引物(162bp) 克隆到 PGEMT[®] 载体 (PROMEGA[®])。制备 AD2-pdHL2 哺乳动物表达载体,例如,N-AD2-hTransferrin-His-pdHL2,用以通过用 Bgl2 和 Eag1 限制性核酸内切酶消化与扩增引物连接。用 Bgl2 和 Eag1 从 PGEMT[®] 上切下 mCD20-扩增引物,并连接到 AD2-pdHL2 载体,从而产生表达载体 AD2-mCD20(136-178)-pdHL2。如实例 4 所述获得表达 AD2-mCD20(136-178) 的克隆,并使用 Ni-select 由培养上清液纯化 AD2-mCD20(136-178)。

[0244] 实例 7. AD 和 DDD 序列变体

[0245] 在某些优选实施例中,结合到 DNL 复合体的 AD 和 DDD 序列包含氨基酸序列 AD2(SEQ ID NO:13) 和 DDD2(SEQ ID NO:11),如上所述。然而,在可供选择的实施例中,AD 和 / 或 DDD 部分的序列变体可用于构建细胞因子-MAb DNL 复合体。AD 和 DDD 域的结构-功能关系已成为研究的主题(参见,如,Burns-Hamuro 等,2005,Protein Sci 14:298292;Carr 等,2001,J Biol Chem 276:17332-38;Alto 等,2003,Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50;Hundsrucker 等,2006,Biochem J 396:297-306;Stokka 等,2006,Biochem J 400:493-99;Gold 等,2006,Mol Cell 24:383-95;Kinderman 等,2006,Mol Cell 24:397-408)。

[0246] 例如,Kinderman 等(2006) 检查了 AD-DDD 结合相互作用的晶体结构,并得出结论认为,人 DDD 序列含有许多在二聚体形成或 AKAP 结合中重要的保守氨基酸残基,在下面的 SEQ ID NO:10 中加以下划线(参见 Kinderman 等的图 1,2006)。本领域技术人员会意识到,在设计 DDD 序列的序列变体时,期望要避免改变任何加下划线的残基,而对在二聚和 AKAP 结合中不那么重要的残基可以进行保守的氨基酸替换。

[0247] 来自蛋白激酶 A 的人 DDD 序列

[0248] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :10)

[0249] Alto 等 (2003) 进行了各种 AKAP 蛋白的 AD 序列的生物信息学分析,用以设计被称为 AKAP-IS (SEQ ID NO :12) 的 RII 选择性 AD 序列,其对 DDD 的结合常数为 0.4nM。AKAP-IS 序列被设计为 AKAP 与 PKA 结合的肽拮抗剂。在 AKAP-IS 序列中,若进行替换往往会降低与 DDD 的结合性的残基在下面的 SEQ ID NO :12 中加下划线表示。

[0250] AKAP-IS 序列

[0251] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO :12)

[0252] 类似地,Gold (2006) 利用结晶学和肽筛选开发出 SuperAKAP-IS 序列 (SEQ ID NO :19),其显示出对 PKA 的 RII 异形体的选择性比 RI 异形体的高五个数量级。加下划线的残基表示相对于 AKAP-IS 序列的氨基酸替换位置,这种替换可提高 RII α 与 DDD 部分的结合性。在此序列中,N 末端 Q 残基被编为 4 号残基,C 末端 A 残基是 20 号残基。可以进行替换以影响 RII α 亲和力的残基是 8、11、15、16、18、19 和 20 号残基 (Gold 等,2006)。可设想在某些可供选择的实施例,SuperAKAP-IS 序列可以替换 AKAP-IS AD 部分序列以制备细胞因子-mAb DNL 构建体。可替换 AKAP-IS AD 序列的其它替代性序列示于 SEQ ID NO :20-22。相对于 AKAP-IS 序列的替换以下划线表示。可预计的是,与 SEQ ID NO :19 中所示的 AKAP-IS 序列一样,AD 部分也可以包括额外的 N-末端残基半胱氨酸和甘氨酸以及 C 末端残基甘氨酸和半胱氨酸。

[0253] SuperAKAP-IS

[0254] QIEYVAKQIVDYAIHQQA (SEQ ID NO :19)

[0255] 替代性 AKAP 序列

[0256] QIEYKAKQIVDHAHQQA (SEQ ID NO :20)

[0257] QIEYHAKQIVDHAHQQA (SEQ ID NO :21)

[0258] QIEYVAKQIVDHAHQQA (SEQ ID NO :22)

[0259] Stokka 等 (2006) 还开发了 AKAP 与 PKA 结合的肽竞争物,示于 SEQ ID NO :23-25。肽拮抗剂名称为 Ht31 (SEQ ID NO :23)、RIAD (SEQ ID NO :24) 和 PV-38 (SEQ ID NO :25)。Ht-31 肽显示出 PKA 对 RII 异形体更大的亲和力,而 RIAD 和 PV-38 显示出对 RI 更大的亲和力。

[0260] Ht31

[0261] DLTEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO :23)

[0262] RIAD

[0263] LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO :24)

[0264] PV-38

[0265] FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO :25)

[0266] Hundsrucker 等 (2006) 开发了另外其它的 AKAP 与 PKA 结合的肽竞争物,PKA 的 RII 形式对 DDD 的结合常数低至 0.4nM。各种 AKAP 肽拮抗剂的序列提供在 Hundsrucker 等 (以引用方式并入本文) 的表 1 中。在不同 AKAP 蛋白的 AD 域中高度保守的残基参照 AKAP IS 序列 (SEQ ID NO :12) 以下划线表示。所述残基与 Alto 等 (2003) 所观察的相同,加上 C 末端丙氨酸残基 (参见 Hundsrucker 等 (2006) 的图 4,其以引用方式并入本文)。具有特别高 RII DDD 序列亲和力的肽拮抗剂的序列示出在 SEQ ID NO :26-28 中。

[0267] AKAP-IS

[0268] QIEYLAKQIVDNIQQA (SEQ ID NO :12)

[0269] AKAP7 δ -wt-pep

[0270] PEDAEVLRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO :26)

[0271] AKAP7 δ -L304T-pep

[0272] PEDAEVLRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO :27)

[0273] AKAP7 δ -L308D-pep

[0274] PEDAEVLRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO :28)

[0275] Carr 等 (2001) 检查了来自人和非人蛋白的不同 AKAP 结合 DDD 序列之间的序列同源程度,并鉴别了 DDD 序列中看起来在不同 DDD 部分中最高度保守的残基。这些参照 SEQ ID NO :10 的人 PKA RII α DDD 序列加下划线表示。特别保守的残基用斜体字进一步指出。所述残基与 Kinderman 等认为对与 AKAP 蛋白结合重要的残基重叠但不完全相同。

[0276]

SHIQIPPGLTTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA

(SEQ ID NO:10)

[0277] 本领域技术人员会意识到,一般而言,在来自不同蛋白的 DDD 和 AD 序列中高度保守的那些氨基酸残基是优选在进行氨基酸替换中保持不变的那些,而更容易改变不那么高度保守的残基,以产生本文所述的 AD 和 / 或 DDD 序列的序列变体。

[0278] 本领域技术人员会意识到, DNL 构建体的抗体部分或连接体部分中的这些或其它氨基酸替换可以用来增强所得 DNL 构建体的治疗和 / 或药物动力学特性。

[0279] 实例 8. hLL1 对 DC 的影响 -hLL1 与 APC 的不同亚群的有效结合

[0280] 早期研究表明 CD74 在包括血液 DC、B 细胞、单核细胞在内的大多数抗原呈递细胞中表达。为了进一步表征 CD74 在 APC 中的表达模式,我们检查了 CD74 在人 PBMC 的不同亚群中以及在离体单核细胞源性 DC 中的表达。使用图 1A 所示的门控策略 (gating strategy), 我们发现所有的血液 DC 亚群、骨髓 DC 1 (MDC 1) 及 DC2 (MDC2) 和类浆细胞 DC (PDC) 均表达 CD74, MDC2 表达最高水平的 CD74 (图 1B)。CD74 也在单核细胞源性未成熟 DC 中表达,表达水平比在 LPS 成熟 DC 中高得多 (图 2A)。与 CD74 表达模式一致, hLL 1 与血液 DC 亚群、B 细胞、单核细胞和单核细胞源性未成熟 DC 高效结合 (图 1C、图 2B), 但不与 LPS 成熟 DC 结合 (图 2B、图 2C)。hLL1 在这些 APC 亚群中的结合效率与其 CD74 表达水平密切相关。这些数据提供了通过对接和锁定技术使用 hLL1 为靶载体将抗原体内靶向至 APC 的基础。

[0281] hLL1 对 CD74 的细胞毒性效应 - 表达恶性 B 细胞,但对正常 DC 没有影响

[0282] 因为 CD74 在未成熟 DC 中的高度表达,而 hLL1 与未成熟 DC 高效结合,如图 1A 和图 1B 所示,我们想知道 hLL1 是否在 DC 中具有与其在 CD74 表达 B 细胞淋巴瘤中相同的细胞毒性,后者在前面示出 (Stein 等, Blood 2004, 104 :3705-11)。为此目的,利用 MTS 试验和显微镜成像,将 hLL1 对 B 细胞恶性肿瘤 Daudi 细胞和人单核细胞源性 DC 的细胞活力的影响进行并列对比。结果表明,在存在 GAH (山羊抗人抗体) —用于 hLL1 交联的第二抗体—的情况下, hLL1 显著降低了 Daudi 细胞的细胞活力,但没有降低 DC 的细胞活力 (图 3A),如上所示, DC 通常表达高水平的 CD74。显微镜成像显示,用以 GAH 交联的 hLL1 处理的 Daudi 细胞集结并浓缩,而 DC 在相同处理后维持正常的形态 (图 3C、图 3D)。以 GAH 交联的 hLL1

对 Daudi 细胞的细胞毒性与 Stein 等 (2004) 的早期研究一致,显示 hLL1 在离体和体内对 B 细胞恶性肿瘤是有细胞毒性的。在细胞凋亡试验中进一步证实了 hLL1 加上 GAH 对 DC 没有细胞毒性,该试验显示亚二倍体细胞核群不受以 GAH 交联的 hLL1 的影响 (未示出)。

[0283] 为了进一步证实 hLL1 对 DC 没有细胞毒性,我们使用流式细胞仪进行了细胞凋亡试验。细胞核从用未成熟 DC 处理的 hLL1 获得,并用 PI 染色用于流式细胞仪分析。PI⁺ 粒子首先被门控,并且首先通排门控出低 SSC 粒子而排除碎屑。通过测量亚二倍体细胞核群来分析所得门控的细胞核的细胞凋亡 (图 2A)。结果证明 hLL1 在存在或不存在用于交联 (GAH, F(ab')₂ GAH IgG Fc γ -特异性) 的第二 mAb (20 μ g/ml) 的情况下对两个供体中的 DC 细胞凋亡没有影响 (图 2B、图 2C)。这些数据证明,不像其对 B 细胞恶性肿瘤的细胞毒性作用那样, hLL1 对同样表达 CD74 表面抗原的正常树枝状细胞具有很少细胞毒性。

[0284] 通过 hLL1 适度增强 DC 组成性成熟

[0285] 人 IgG 可以通过 FcR 连接与 DC 相互作用,并且根据所涉及的 FcR 的亚型,其可对 DC 成熟具有相反作用。作为人化 IgG, hLL1 不仅可以通过 CD74 也可以通过在 DC 上表达的 FcR 与人 DC 相互作用。为此,我们推测 hLL1 可以通过与 CD74 或 FcR 或两者相互作用来影响 DC 功能。为了研究这种情况,我们测试了在存在 hGM-CSF 和 hIL-4 的情况下, hLL1 在单核细胞的离体培养期间对 DC 组成性成熟的作用。

[0286] 因为 DC 成熟通常反映在其形态变化,所以我们也检查 hLL1 处理对 DC 形态是否有任何作用。如图 3B 所示,在不存在或存在 GAH 交联的情况下,用 hLL1 以不同剂量处理不同天数的 DC 看起来健康完整。hLL1 处理的 DC 显示出以纤维样细胞为特征的一些微小的形态变化,所述变化类似于 LPS 处理的 DC (未示出),但较不明显。

[0287] 因为成熟 DC 主要在抗原呈递和共刺激分子表达的上调、改变的细胞因子产生以及增强的 T 细胞刺激能力方面不同于未成熟 DC,我们随后研究了 hLL1 对 DC 中的抗原递呈分子 HLA-DR 和共刺激分子 (CD54 和 CD86) 的表达水平是否具有任何作用 (图 4)。结果显示 hLL1 可以在 0.05–5 μ g/ml 的 hLL1 浓度范围内以剂量依赖性方式上调 HLA-DR、CD54 和 CD86 (图 4A)。然而,因为在 5 μ g/ml hLL1 与 0 μ g/ml 相比的情况下,HLA-DR 和共刺激分子 (CD54 和 CD86) 的表达仅上调了 10% (图 4B),所以效果不强烈。在最高浓度 (50 μ g/ml) 条件下,HLA-DR、CD54 和 CD86 的表达与在 5 μ g/ml hLL1 下相比没有进一步的上调,而是略有减少 (图 4B)。这些结果表明,尽管不是非常有效,但 hLL1 可以增强 DC 的组成性成熟。

[0288] hLL1 处理的 DC 对 T 细胞扩增没有显著影响

[0289] 未成熟 DC 和成熟 DC 之间的功能差别在于,成熟 DC 有较强的刺激 T 细胞增殖和扩增的能力。因为 hLL1 可以通过上调 DC 中的 HLA-DR、CD54 和 CD86 的表达来增强组成性成熟 (图 4B),所以我们想确定是否可以通过被 DC 增强的 T 细胞扩增来反映这种 DC 成熟作用。如图 5 所示,用 0.05 至 50 μ g/ml hLL1 处理的 DC 不影响 DC 介导的 T 细胞扩增,包括总 T 细胞 (CD4⁺ 和 CD4⁺T 细胞) (图 5)。此结果表明 hLL1 增强的 DC 组成性成熟不够强烈,不能被转化为增强的 T 细胞刺激能力。

[0290] 原态 CD4⁺T 细胞通过 hLL1 处理 DC 向 Th1 效应子细胞的极化

[0291] 然而,DC 具有另一重要功能:极化原态 CD4⁺T 细胞,以分化为不同的效应子细胞 Th1、Th2、Th17 以及新定义的 Th17-1 细胞。Th1 细胞针对细胞内病原体和癌症的细胞免疫是至关重要的,而 Th2 细胞的诱导是体液免疫的原因。产生 IL-17 的 Th17 和 Th17-1 细

胞是其它的极化细胞群体,该细胞群体在对某些病原体和自身免疫炎症的免疫方面具有多种功能。这些效应子细胞的极化主要通过 DC 对 DC/T 细胞突触中的 T 细胞提供的 DC 分泌的细胞因子(所谓的“信号 3”)来介导。CD4⁺ 原态 T 细胞可以分化为介导不同效应子功能的 Th1、Th2 和 Th0 细胞,其中 Th1 效应子细胞在维持针对癌症和传染病的 CTL 反应方面发挥重要作用。我们已证明 0.05 至 50 μ g/ml 的 hLL1 可以以微弱但剂量依赖的方式增强 DC 组成性成熟,但用这些浓度的 hLL1 处理的 DC 不影响 DC 介导的 T 细胞扩增(图 5)。我们随后关注 hLL1 处理的 DC 是否可以影响 CD4⁺ 原态 T 细胞的极化。如图 5 所示, hLL1 处理的 DC 极化 CD4⁺ 原态 T 细胞,以向越来越多的 Th1 效应子细胞以及越来越少的 Th2 和 Tnp 细胞分化。这些结果表明 DC 可以通过 hLL1 被功能性调节。因为 Th1 在针对肿瘤和传染病的适应性免疫方面发挥关键作用, hLL1 在用于疫苗接种时可以具有辅剂样活性。

[0292] 实例 9. 74-mCD20 的离体特性—通过人 PBMC 中的 74-mCD20 诱导 hCD20 特异性免疫

[0293] CD20 是在 B 细胞中正常表达的自体抗原,其因免疫耐受性在理论上难以通过疫苗方法靶向。然而,已通过用编码人 CD20 胞外域的小基因 (Palomba 等, Clin Cancer Res 2005 ;11 :370-9) 或包含人 CD20 胞外域和含 QS21 辅剂的载体蛋白的缀合物 (Roberts 等, Blood 2002 ;99 :3748-55) 接种而在荷瘤小鼠中实现对 CD20 的特异性 T 细胞免疫反应。若干其它报道也证明使用异种抗原来打破免疫耐受性的可行性,如动物模型中 (Ding 等, Blood 2008 ;112 :2817-25 ;Soares 等, J Immunol 2001 ;166 :6555-63) 以及在患者中 (Ramanathan 等, Cancer Immunol Immunother 2005 ;54 :254-64) 的 MUC1 所示。为了测试 74-mCD20 是否可以成功诱导 hCD20 特异性免疫,并克服 CD20 的免疫耐受性,进行下面的试验。

[0294] 通过在存在 hGM-CSF 和 hIL-4 的情况下培养 5 天,从 PBMC 中产生人 DC。对未成熟 DC 加载 74-mCD20,并通过 LPS 加上 IFN- γ 而成熟化。成熟 DC 被用来刺激自体 PBMC 10 天。每周两次进行用相同加载 DC 的重新刺激。在最后一次重新刺激后,通过在由分选的 CD20 阳性 MM 癌干细胞刺激时测量细胞因子反应 (IFN- γ) 来检验 T 细胞的抗原特异性。T 细胞显示对 CD20 阳性 MM 癌干细胞的阳性反应,但对对照 CD20 阴性 MM 细胞没有阳性反应。

[0295] 74-mCD20 在离体的各种抗原递呈细胞中的特异性结合、内在化和细胞内定位

[0296] 我们的初步数据已显示 hLL1 与不同的 APC (包括骨髓 DC1 和骨髓 DC2、类浆细胞 DC、B 细胞和单核细胞) 有效和特异性地结合。为了证实 4-mCD20 在与 APC 结合方面具有与单独 hLL1 相同的效率和特异性,进行了下面的试验。

[0297] 使用 74-mCD20 和对照 M1-mCD20 (包含连接于四个 mCD20 的拷贝的抗 MUC1 抗体)。结合试验进行如下。简而言之,按制造商的说明,用 ZENONTM ALEXA FLUOR® 488 人 IgG 标记试剂盒 (INVITROGEN®) 标记 15 μ g 的 74-mCD20 或 M1-mCD20。书标记的制剂被用来染色人 PBMC,如下所述。

[0298] 在 4°C 用人 FcR 阻断试剂 (Miltenyi Biotec, 1 : 20 稀释) 对使用 FICOLL-PAQUETM 从血块黄层中分离的人 PBMC 处理 10 分钟。洗过的细胞用特异性标记的 mAb 染色,并通过流式细胞仪 (FACSCALIBURO) 分析。用于研究的标记 mAb 包括 FITC- 标记的抗 CD74 mAb ; ALEXA FLUOR® 488- 标记的 74-mCD20 ; ALEXAFLUOR® 488 标记的 M1-mCD20 ; PE 缀合的抗 CD19 mAb (用于 B 细胞) ; PE 缀合的抗 CD14 mAb (用于单核细胞) ; 和 APC 缀合的 mAb 至

BDCA-1 (用于 MDC1)、BDCA-2 (用于 PDC) 或 BDCA-3 (用于 MDC2)。门控策略被用于鉴别 B 细胞、单核细胞、MDC1、MDC2 和 PDC。数据通过 FlowJo 软件分析平均荧光强度和表达表面标记物的阳性细胞群。

[0299] 为了解 74-mCD20 是否被内在化到用以进一步处理成 MHC II 级呈递和 MHC I 级交叉呈递的内涵体,进行下面的试验。使 74-mCD20 或 M1-mCD20 与人 PBMC 混合,在 4℃ 下培养 1 小时,然后进行充分的冲洗。然后将细胞转到 37℃,在不同时间点 (0、15、30 或 45 分钟) 固定,并在进行或不进行前期透化的情况下用 ALEXAFLUOR® 标记的抗人 IgG 第二抗体染色。通过流式细胞仪确定平均荧光,通过从在不同时间点以固定和透化的细胞 (内在化且表面结合) 记录的荧光中减去固定细胞 (表面结合) 中的平均荧光来计算内在化的抗体量。

[0300] 结果显示 74-mCD20DNL 复合体在与 APC 结合方面具有与单独 hLL1 相同的效率和特异性。

[0301] 实例 10. 通过 74-mCD20 离体诱导 hCD20 特异性免疫反应

[0302] 将 CD34+ 人脐血细胞 (HLA A1 健康供体) 肝内注入受辐照的新生 Rag2-/- γ c-/- 小鼠以产生用于重组人适应性免疫系统 (包括人 T、B 和 DC 细胞以及构建的一级和二级淋巴器官) 的动物模型 (Huff 等, J Clin Oncol. 2008, 26 :2895900 ;Yang 和 Chang, Cancer Invest. 2008, 26 :741-55)。这些小鼠被称为 Hu-Rag2-/- γ c-/- 小鼠。

[0303] 为了评估由 74-mCD20 诱导的免疫反应,用 74-mCD20 或 M1-mCD20 (每个小鼠 50 μ g), 结合或不结合用于体内 DC 成熟的 CpG (每个小鼠 50 μ g), 每周对在 Rag2-/- γ c-/- 小鼠中重组的人 CD34+ 细胞免疫三次。在最后一次免疫之后五天,分离每个动物的脾细胞并用 HLA 配型 MM 癌干细胞重新刺激,用于产生细胞因子 (INF- γ), 通过用流式细胞仪的细胞内细胞因子染色进行评估。通过钙黄绿素 AM 释放试验评估针对 MM 癌干细胞的特异性细胞毒性,以 MM 癌干细胞为靶细胞。使用磁珠从 MM 细胞系 RPMI18226 中分离 CD20+MM 癌干细胞。通过用醛脱氢酶染色来验证干细胞特性。结果表明 74-mCD20 能够在体内诱导抗 hcd20 特异性免疫反应。

[0304] 实例 11. 74-mCD20 针对 MM 癌干细胞的治疗潜力:通过 hPBMC/NOD/SCID 小鼠模型或继承性转移的体内评价。

[0305] 体内评价 74-mCD20 的治疗效果的最佳方法是对可以同时支持 MM 生长以及人适应性免疫系统发育的动物模型进行免疫。因为人 CD34+ 细胞重组的 Rag2-/- γ c-/- 小鼠是有免疫能力的,其可能不支持 MM 生长,使用 hPBMC/NOD/SCID 小鼠模型检验 74-mCD20 对 MM 干细胞的治疗效果。NOD/SCID 小鼠已被 Matsui 等 (Blood 2004, 103 :2332-6 ;Cancer Res 2008, 68 :190-7) 用于植入克隆源性多发性骨髓瘤干细胞。

[0306] NOD/SCID 小鼠也被用于通过肿瘤细胞和 hPBMC 的共植入评价治疗效果。通过仔细地调节注入的细胞数量,这个模型可以同时支持肿瘤生长和 hPBMC 植入,并已被用于检验体内疫苗靶向 DC-SIGN 的效果。

[0307] 用 300cGy 照射四至六周龄雌性 NOD/SCID 小鼠 (Jackson Laboratories, Barr Harbor, Maine) (使用 137Cs γ 辐照器, 84cGy/min)。12-16 小时后,经由背侧尾部静脉注射分选的 CD20+MM 癌干细胞 (2 百万个)。同时,对小鼠皮下注入人 PBMC (3 百万个)、未成熟 DC (30,000) 和 DNL 疫苗的混合物。在某时间点 (天),将小鼠无痛处死,从长骨中收获骨髓,

通过人 CD138+MM 细胞染色来确定植入和治疗效果。

[0308] 为了进一步评价 74-mCD20 的治疗潜力,采用通过继承性转移的替代方法来检验疫苗引发的针对 MM 干细胞的细胞毒性。人 CD34+ 细胞重组的 Rag2-/- γ c-/- 小鼠用 74-mCD20 免疫,如上所述。收获脾细胞并经尾静脉注入植以 CD20+MM 癌干细胞的 NOD/SCID 小鼠内。在某时间点(天),将小鼠无痛处死,从长骨中收获骨髓,通过人 CD138+MM 细胞染色来确定植入和治疗效果。结果证实 74-mCD20 能够在体内诱导针对 CD20+MM 干细胞的免疫反应。

[0309] 实例 12. DDD2-mPAP 和 DNL 疫苗复合体的产生

[0310] 根据实例 4 的方法由鼠前列腺酸性磷酸酶产生 DDD2 缀合的 PAP 异种抗原。前面已公开了基于树枝状细胞的通过 PAP 异种抗原的疫苗接种的效力(Fong 等, J Immunol 2001, 167:7150-56)。如实例 4 所述构建 DDD2-mPAP-pdHL2 表达载体,并根据实例 4 所述在细胞培养物中表达 DDD2-mPAP 异种抗原融合蛋白。在 NCBI 数据库中(Accession No. AAF23171)公开了例如鼠前列腺酸性磷酸酶序列。如实例 4 所述,DDD2-mPAP-6His 融合蛋白被表达并通过固定化金属亲和色谱法(IMAC)纯化。

[0311] 根据实例 5 的方法来制备包含一个 CH3-AD2-IgG-hLL1(抗 CD74)的拷贝和四个 DDD2-mPAP 的拷贝的 DNL 构建体。hLL1 IgG 部分包含连接于 hLL1 IgG 的每个重链的 C 末端的 AD2 序列。通过在含 1mM 还原谷胱甘肽的 PBS 中混合 hLL1 IgG-AD2 和 DDD2-mPAP 来进行 DNL 反应。在次日,加入氧化的谷胱甘肽至 2mM 的最终浓度,24 小时后在蛋白 A 柱上纯化反应混合物。两个 DDD2-mPAP 的拷贝连接于每个 AD2 部分,产生包含一个 hLL1 IgG 部分和四个 mPAP 异种抗原部分的 DNL 复合体。

[0312] 对患有前列腺癌的受试者施用 DNL 疫苗抗 CD74-mPAP 诱导针对表达前列腺癌干细胞的 PAP 的免疫反应。所述免疫反应能有效地减少或消除受试者的前列腺癌细胞。

[0313] 实例 13. DDD2-mEGFR 和 DNL 疫苗复合体的产生

[0314] 根据实例 4 的方法由鼠 EGFR 产生 DDD2 缀合的 EGFR 异种抗原。前面已公开了 EGFR 异种抗原在诱导体液免疫反应方面的效力(Fang 等, Int J Mol Med 2009, 23:181-88)。如实例 4 所述构建包含鼠 EGFR 胞外域的 DDD2-mEGFR-pdHL2 表达载体,并根据实例 4 在细胞培养物中表达 DDD2-mEGFR 异种抗原融合蛋白。鼠 EGFR 序列公开在例如 NCBI 数据库中(Accession No. AAG43241)。如实例 4 所述,DDD2-mEGFR-6His 融合蛋白被表达并通过固定化金属亲和色谱法(IMAC)纯化。

[0315] 根据实例 5 的方法来制备包含一个 CH3-AD2-IgG-hLL1(抗 CD74)(抗 CD74)的拷贝和四个 DDD2-mEGF 的拷贝的 DNL 构建体。hLL1IgG 部分包含连接于 hLL1 IgG 的每个重链的 C 末端的 AD2 序列。通过在含 1mM 还原谷胱甘肽的 PBS 中混合 hLL1 IgG-AD2 和 DDD2-mEGFR 来进行 DNL 反应。在次日,加入氧化的谷胱甘肽至 2mM 的最终浓度,24 小时后在蛋白 A 柱上纯化反应混合物。两个 DDD2-mEGFR 的拷贝连接于每个 AD2 部分,产生包含一个 hLL1 IgG 部分和四个 mEGFR 异种抗原部分的 DNL 复合体。

[0316] 对带有表达 NSCLC 的 EGFR 的受试者施用 DNL 疫苗抗 CD74-mEGFR 诱导针对表达癌干细胞的 EGFR 的免疫反应。所述免疫反应能有效地减少或消除受试者的 EGFR 阳性癌细胞。

[0317] 本领域技术人员会意识到,可以根据本文所述的技术构建和利用基于 DNL 的疫苗,所述疫苗结合了对应于各种肿瘤相关抗原的异种抗原部分。

[0318] ***

[0319] 在无需进行过度实验的情况下,可以根据本发明的内容制造和使用本文所公开并要求保护的所有组合物和方法。尽管已按照优选实施例描述了所述组合物和方法,但是对本领域技术人员显而易见的是,在没有背离本发明的构思、实质和范围的情况下,本文所述方法的步骤或步骤顺序的变化可应用于所述组合物和方法。更具体地说,化学和生理学相关的某些试剂可以代替本文所述的试剂,同时可以达到相同或相似的结果。对本领域技术人员显而易见的是,所有这种相似的替换和修改被认为在由所附权利要求书所限定的本发明的实质、范围和构思内。

www.patviewer.com

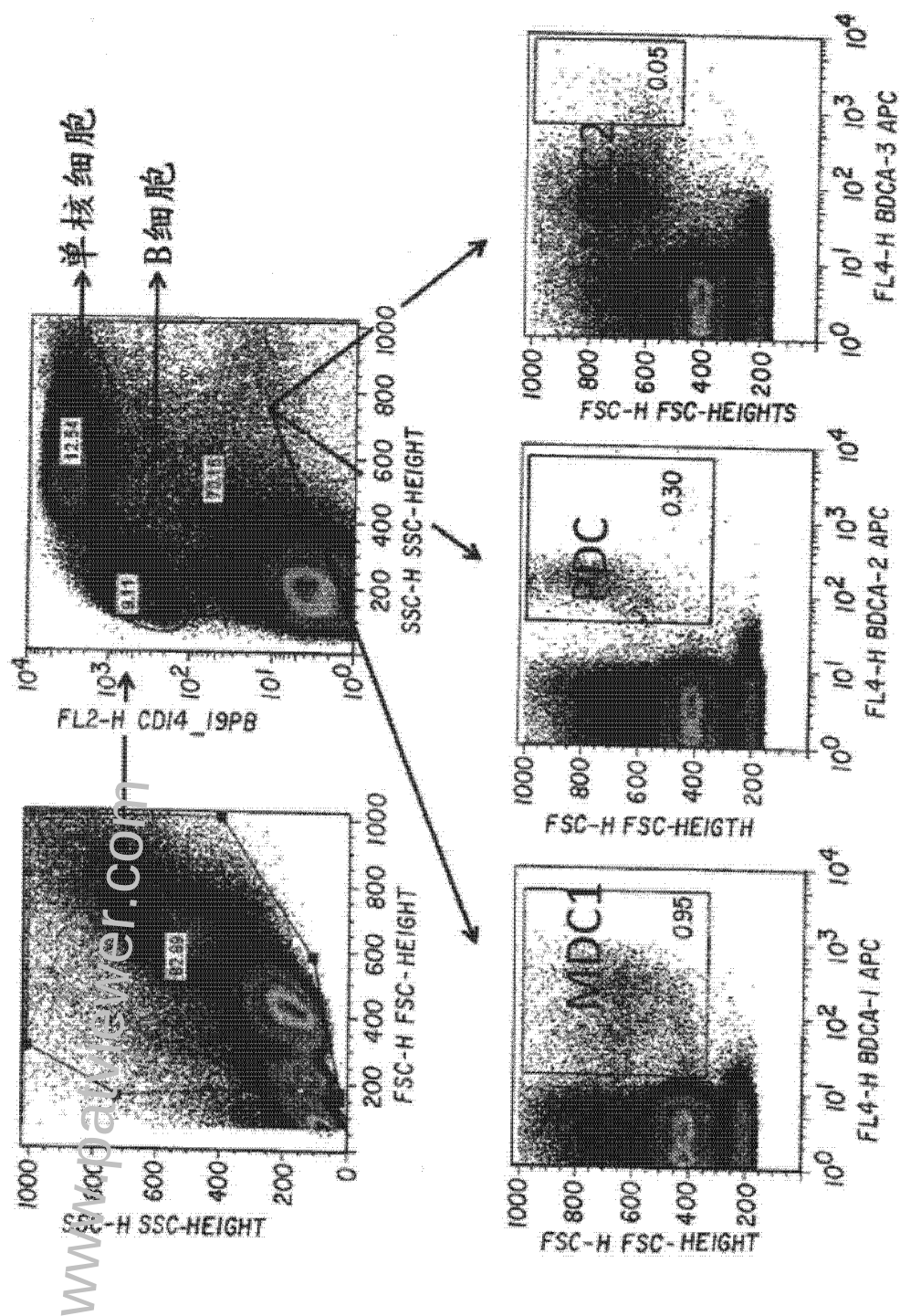


图 1A

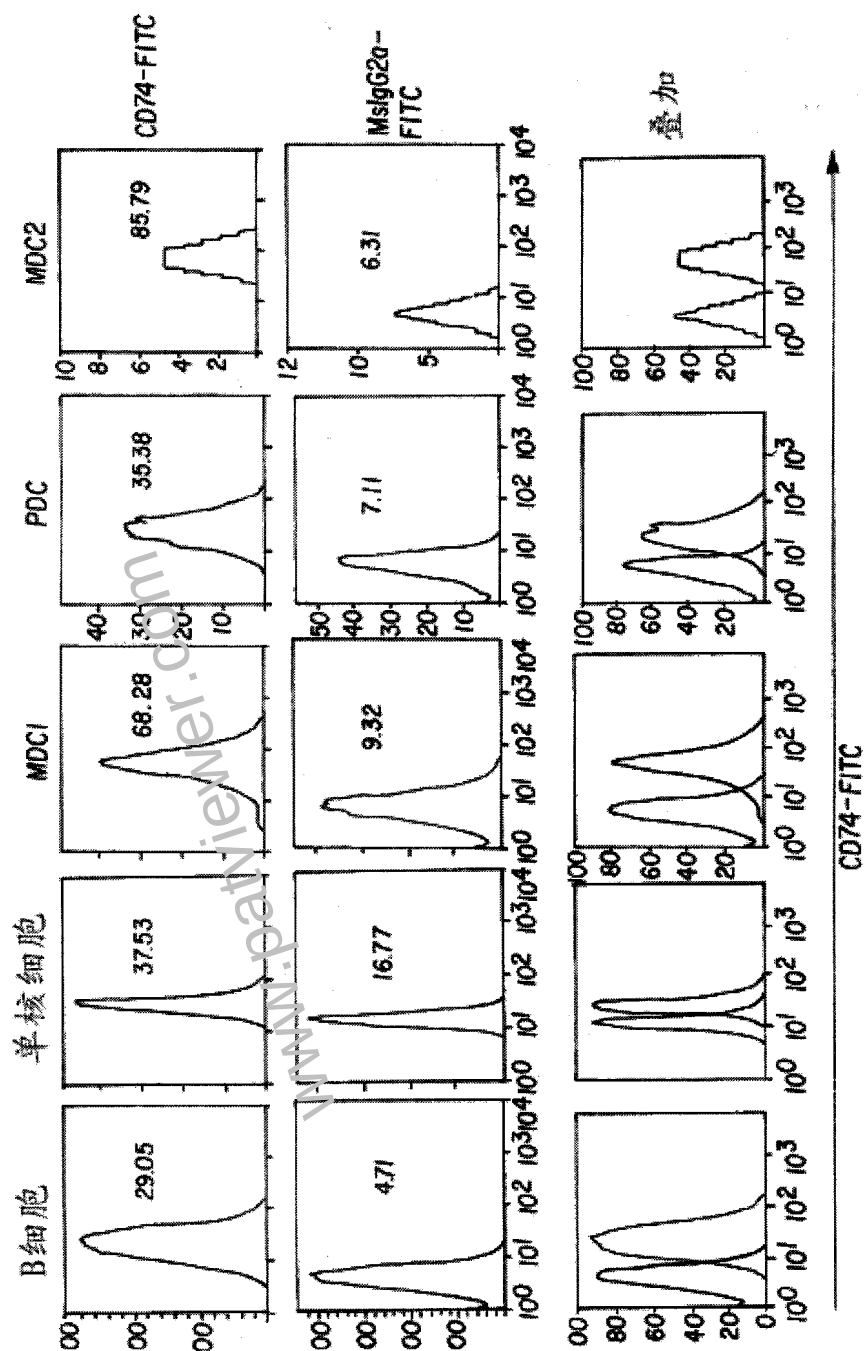


图 1B

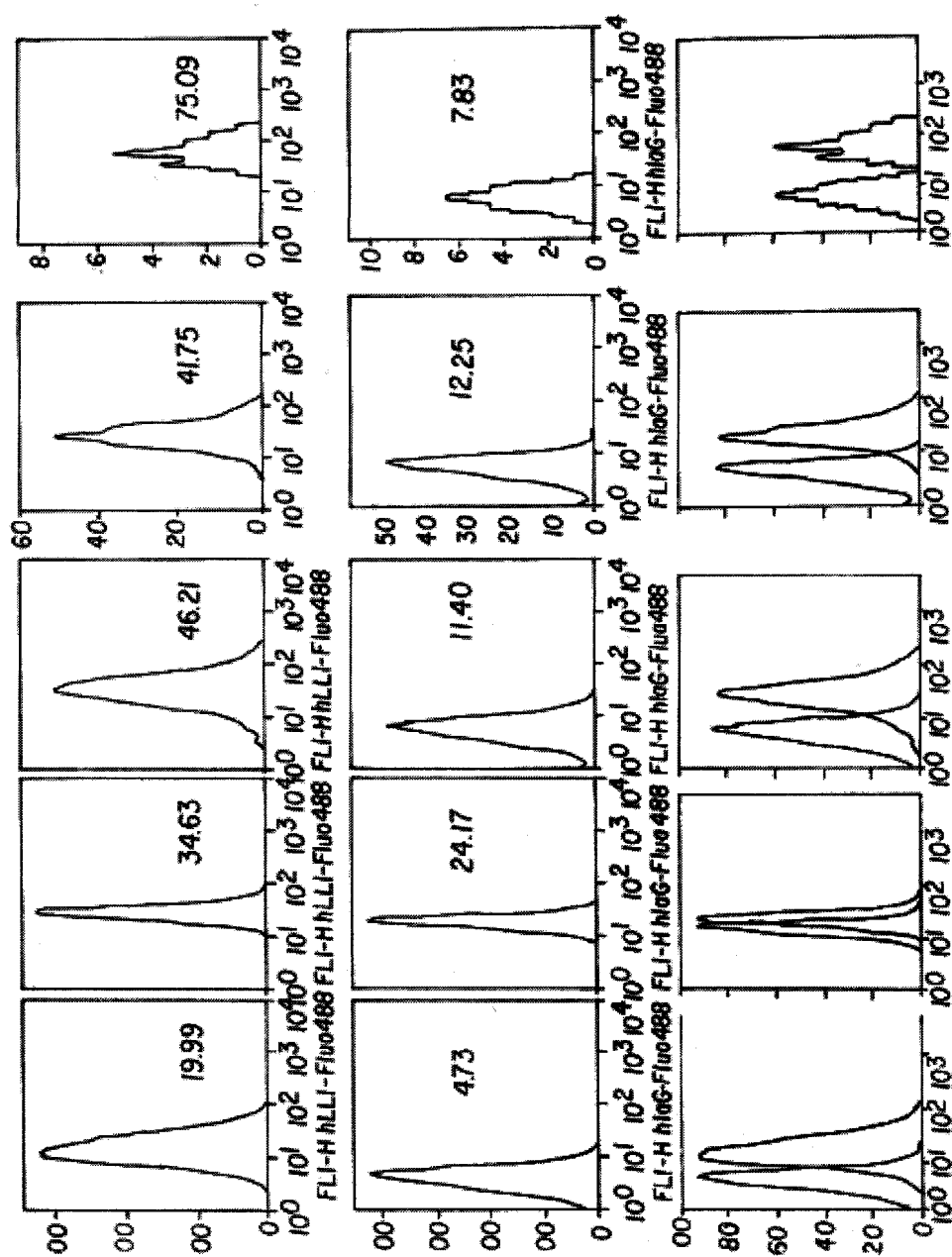


图 1C

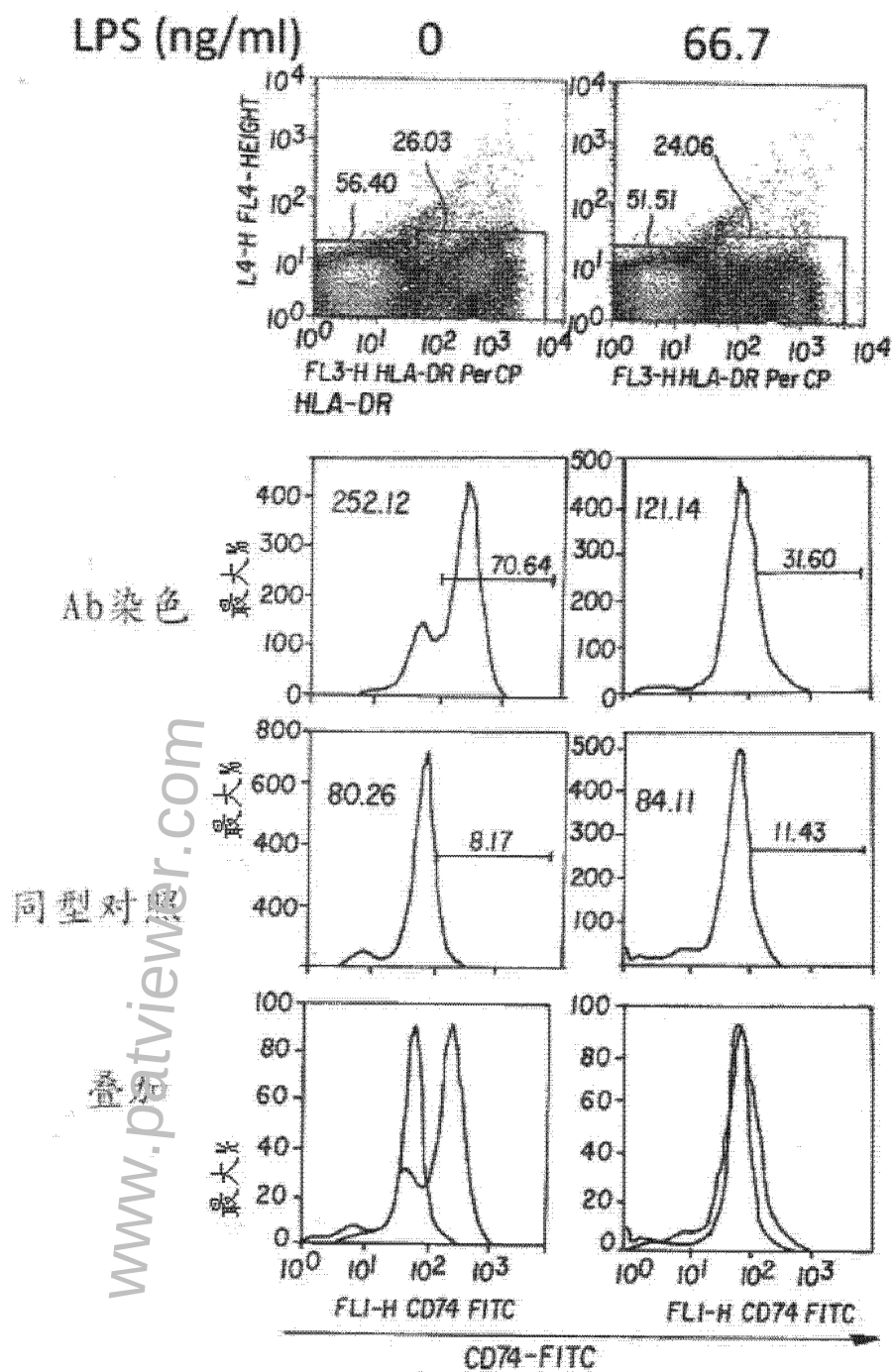


图 2A

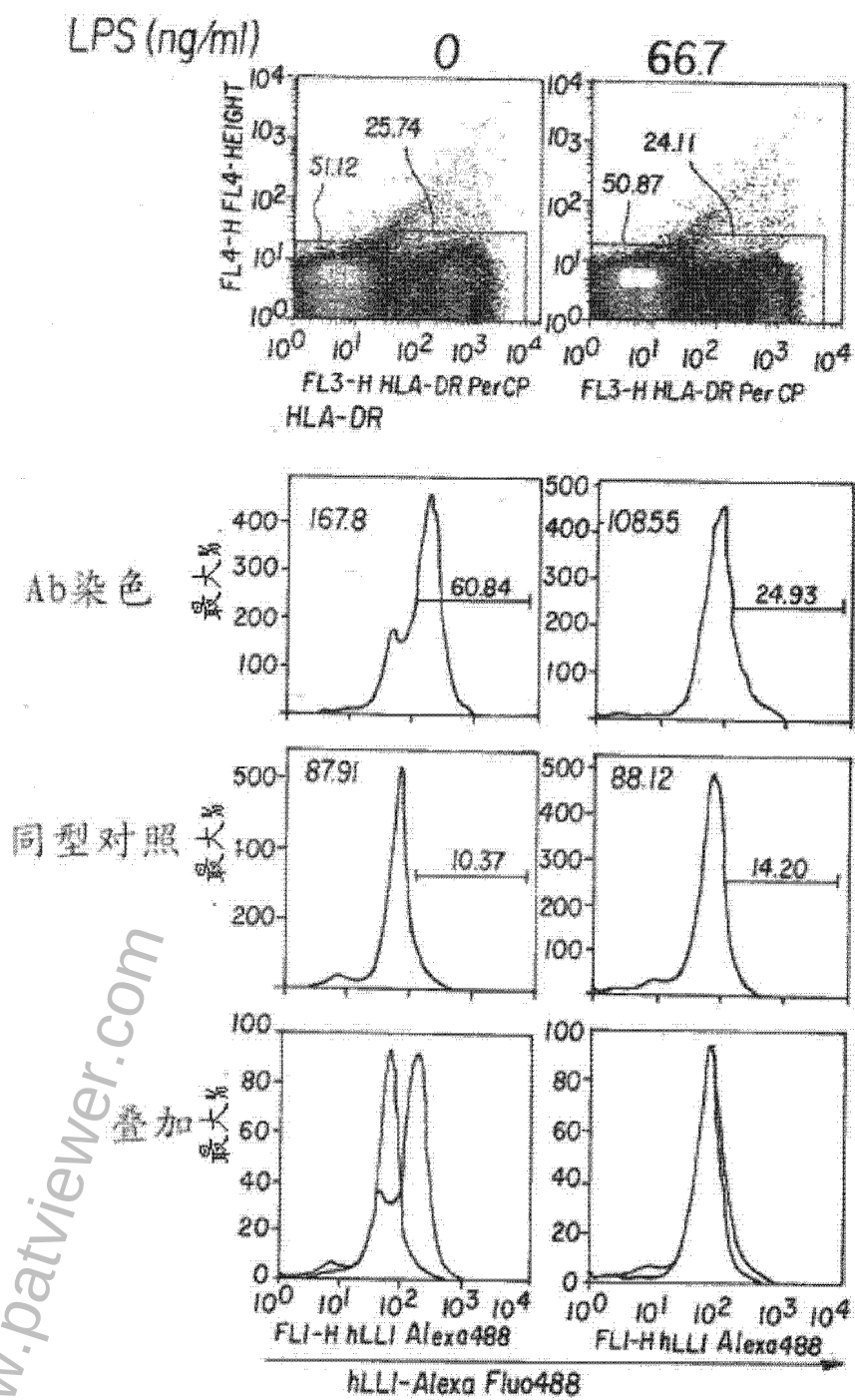


图 2B

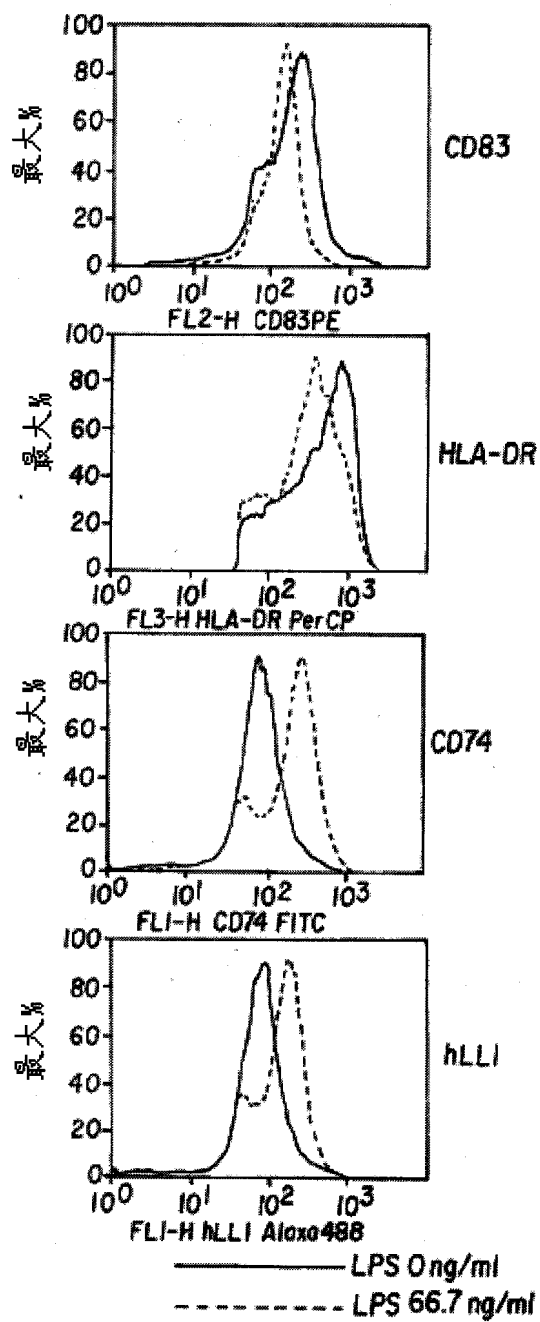


图 2C

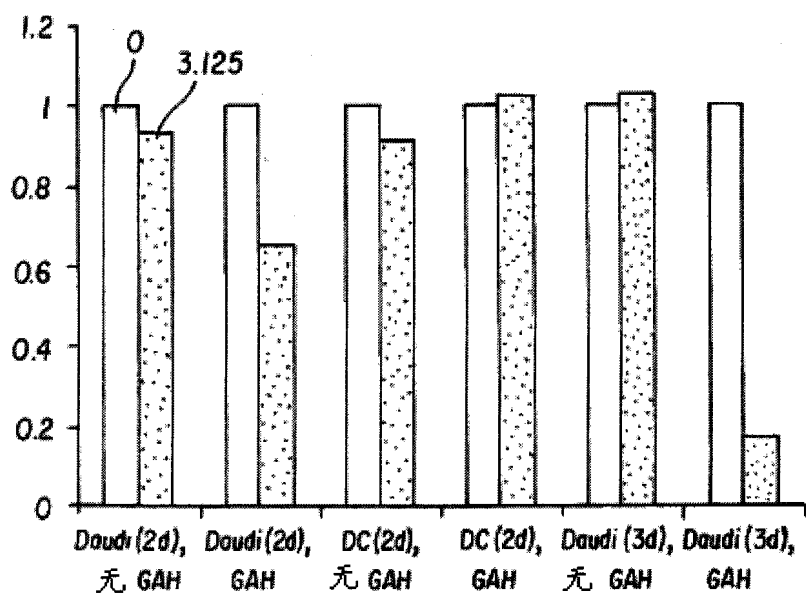


图 3A

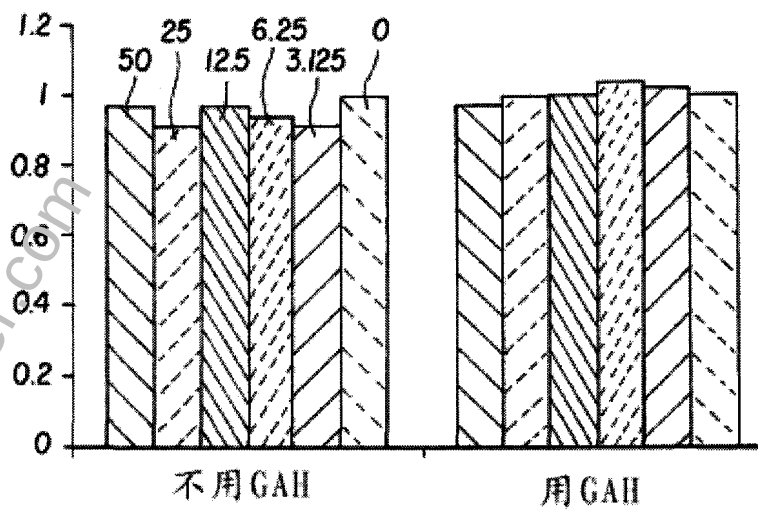


图 3B

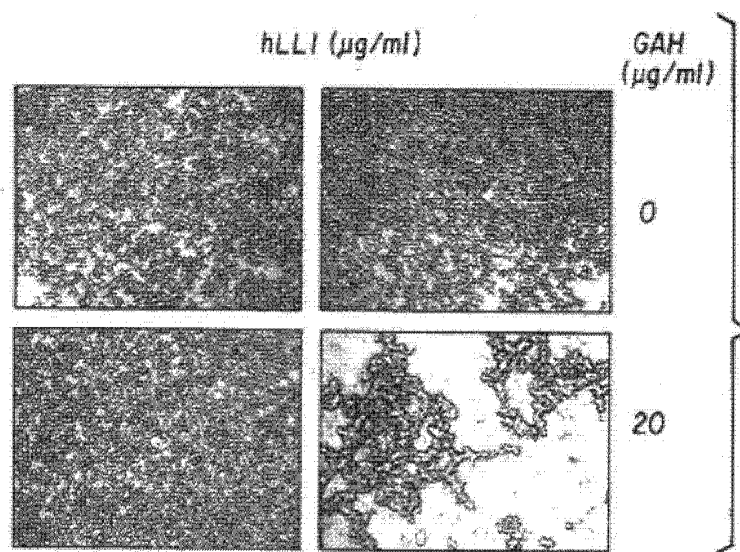


图 3C

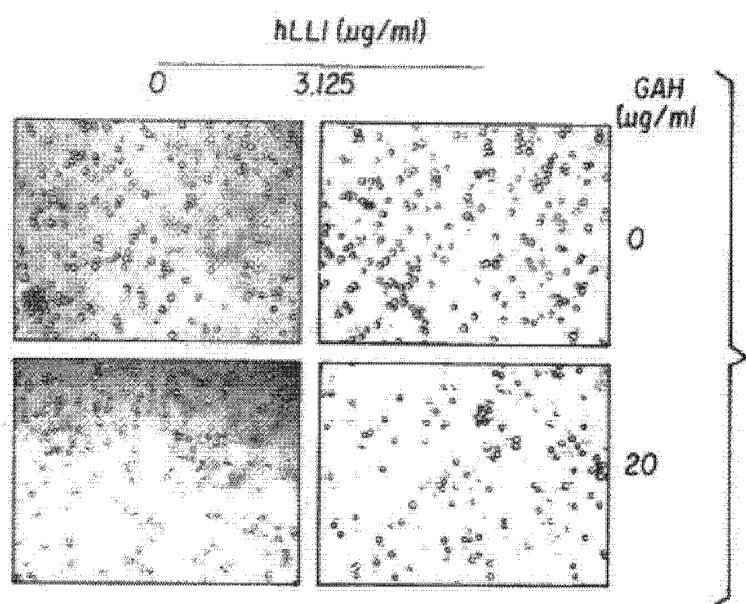


图 3D

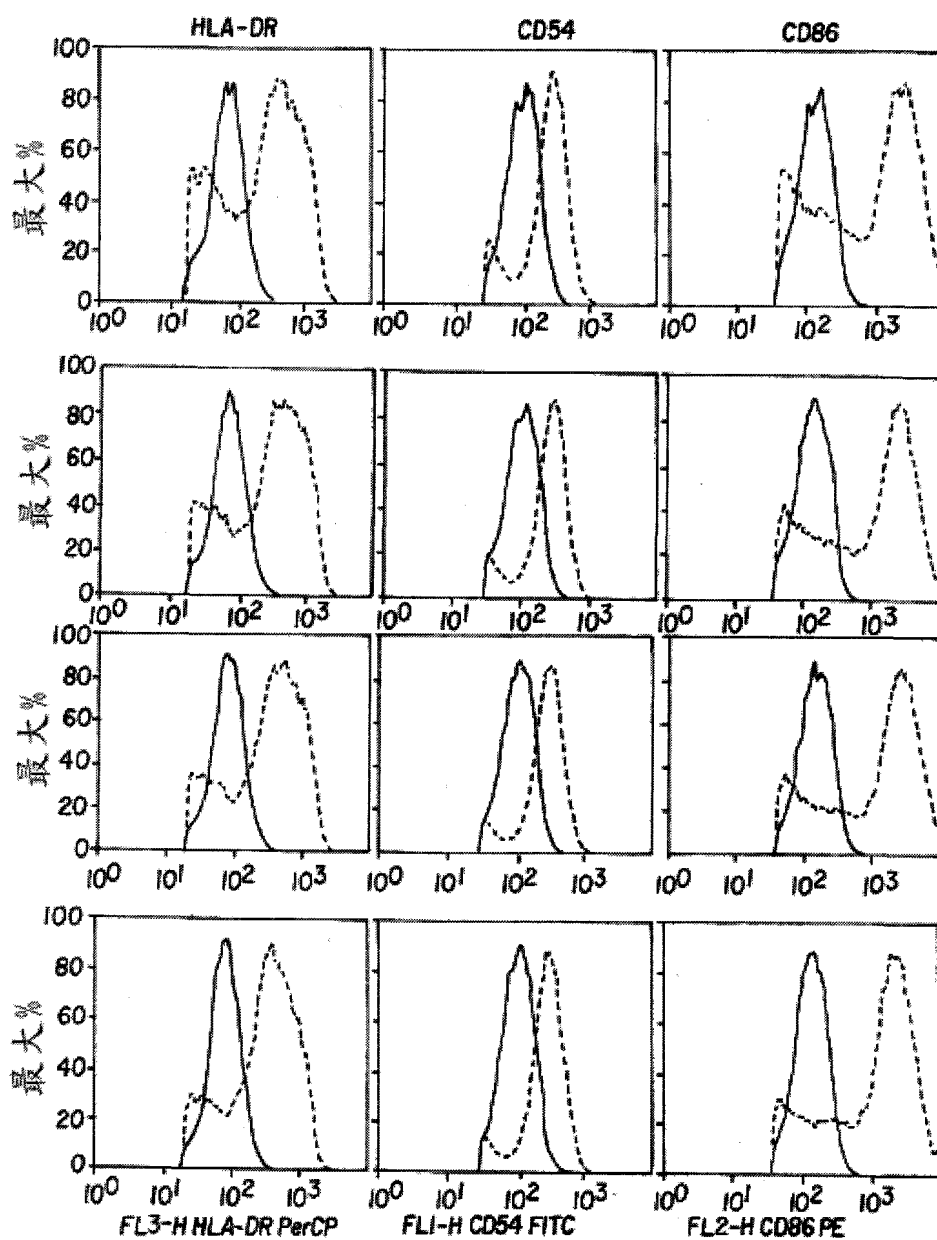


图 4A

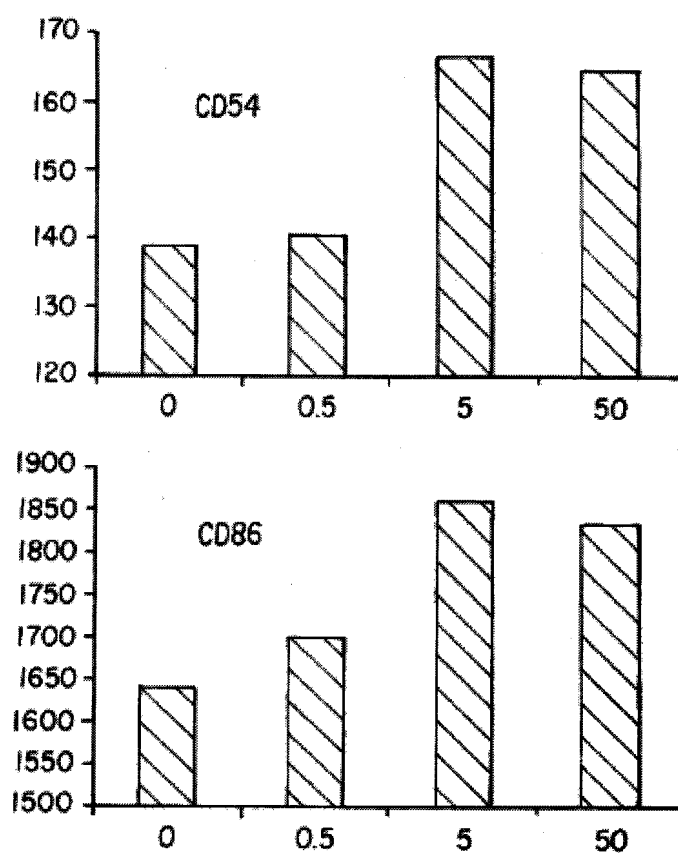


图 4B

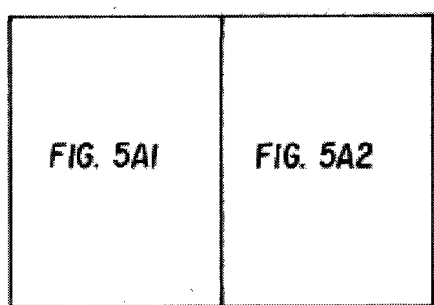


图 5A

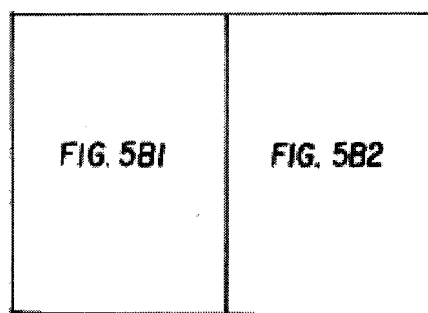


图 5B

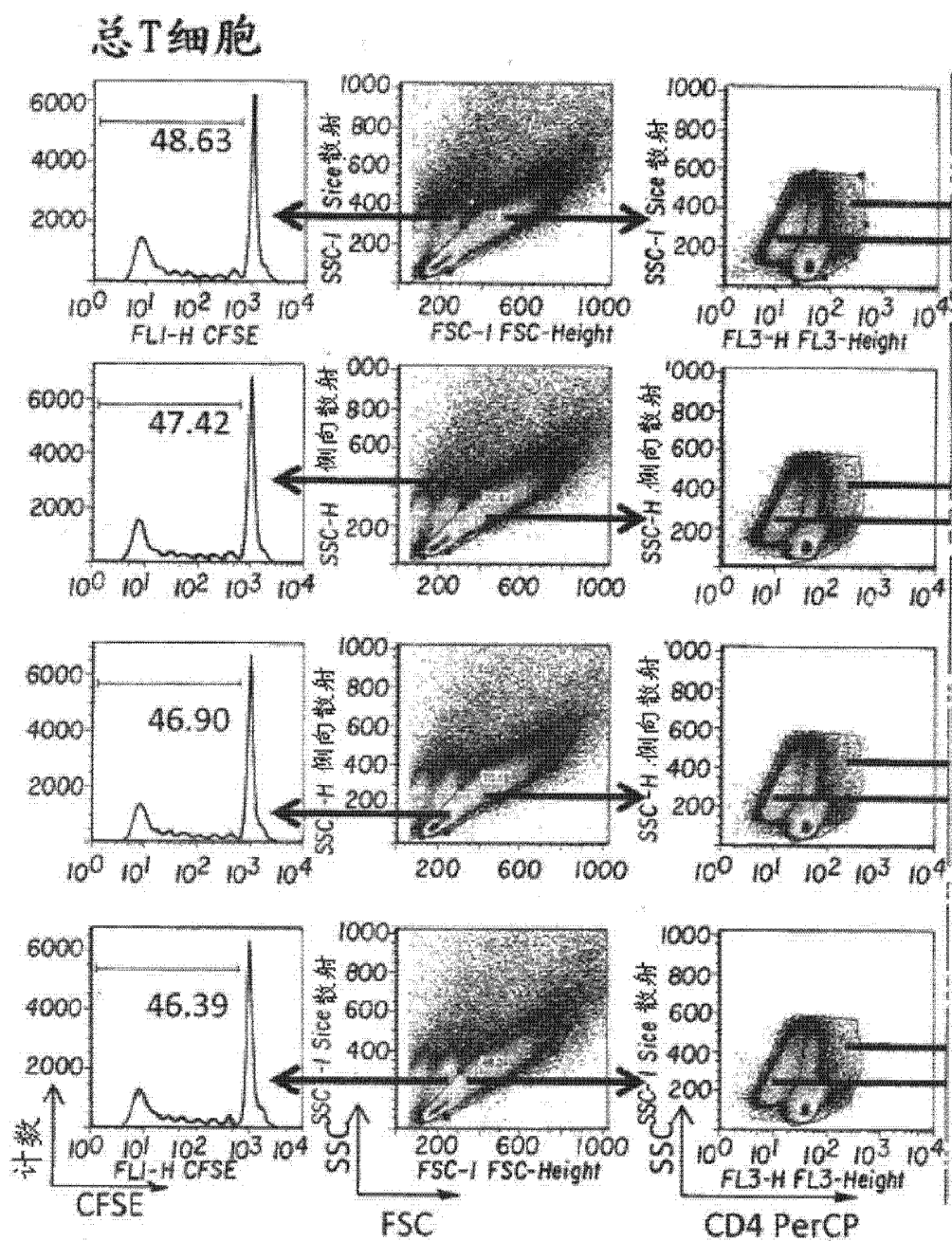


图 5A1

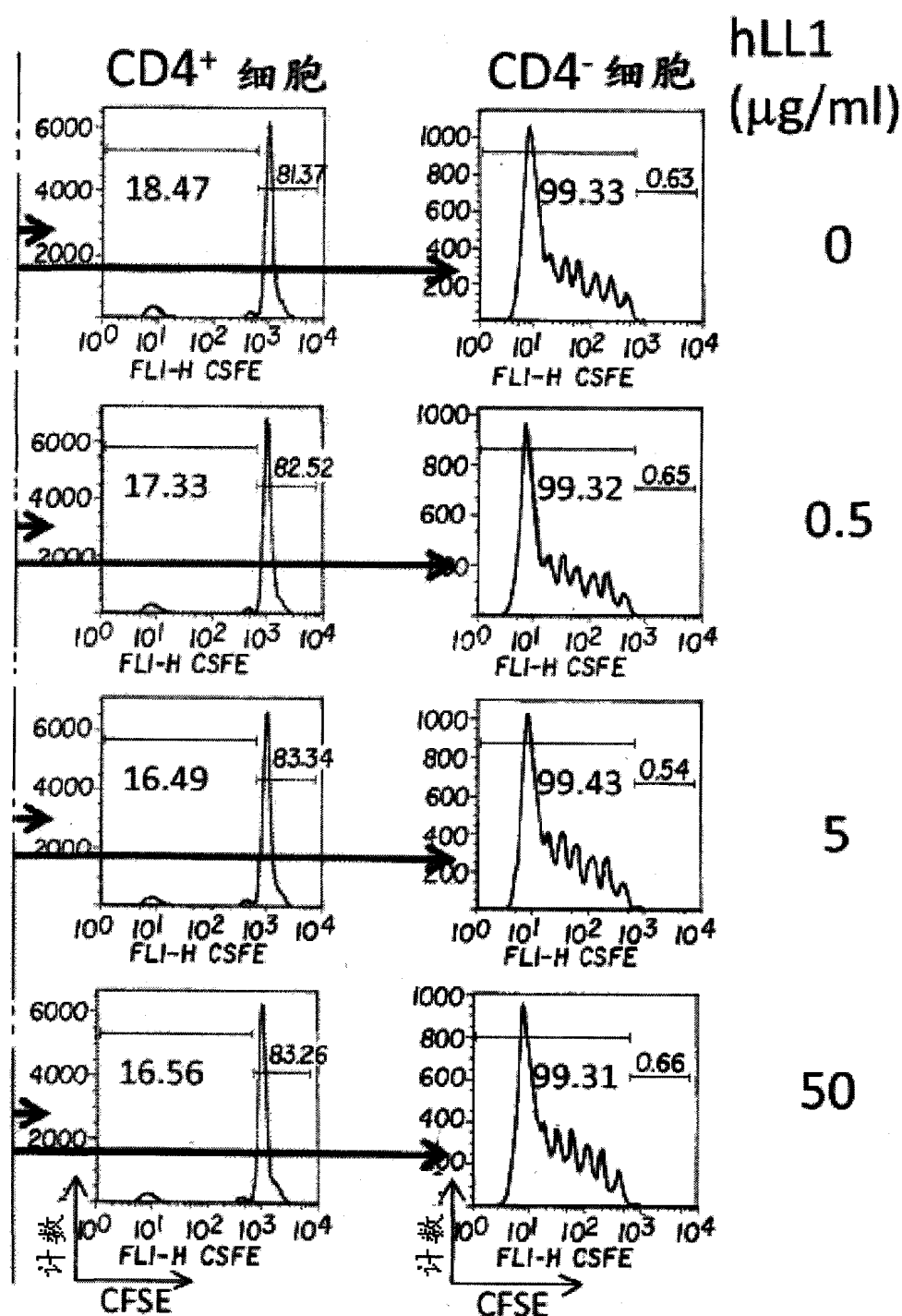


图 5A2

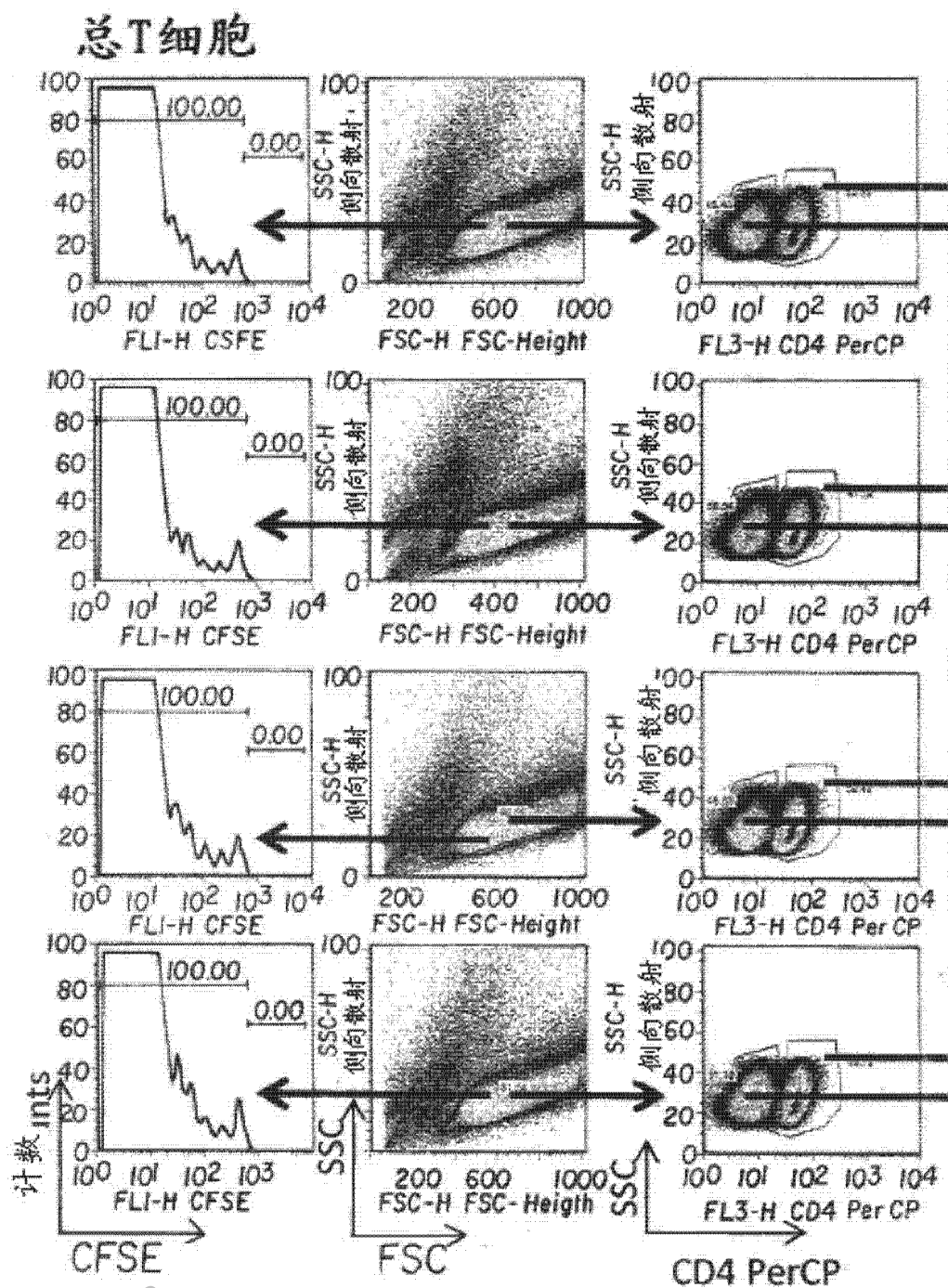


图 5B1

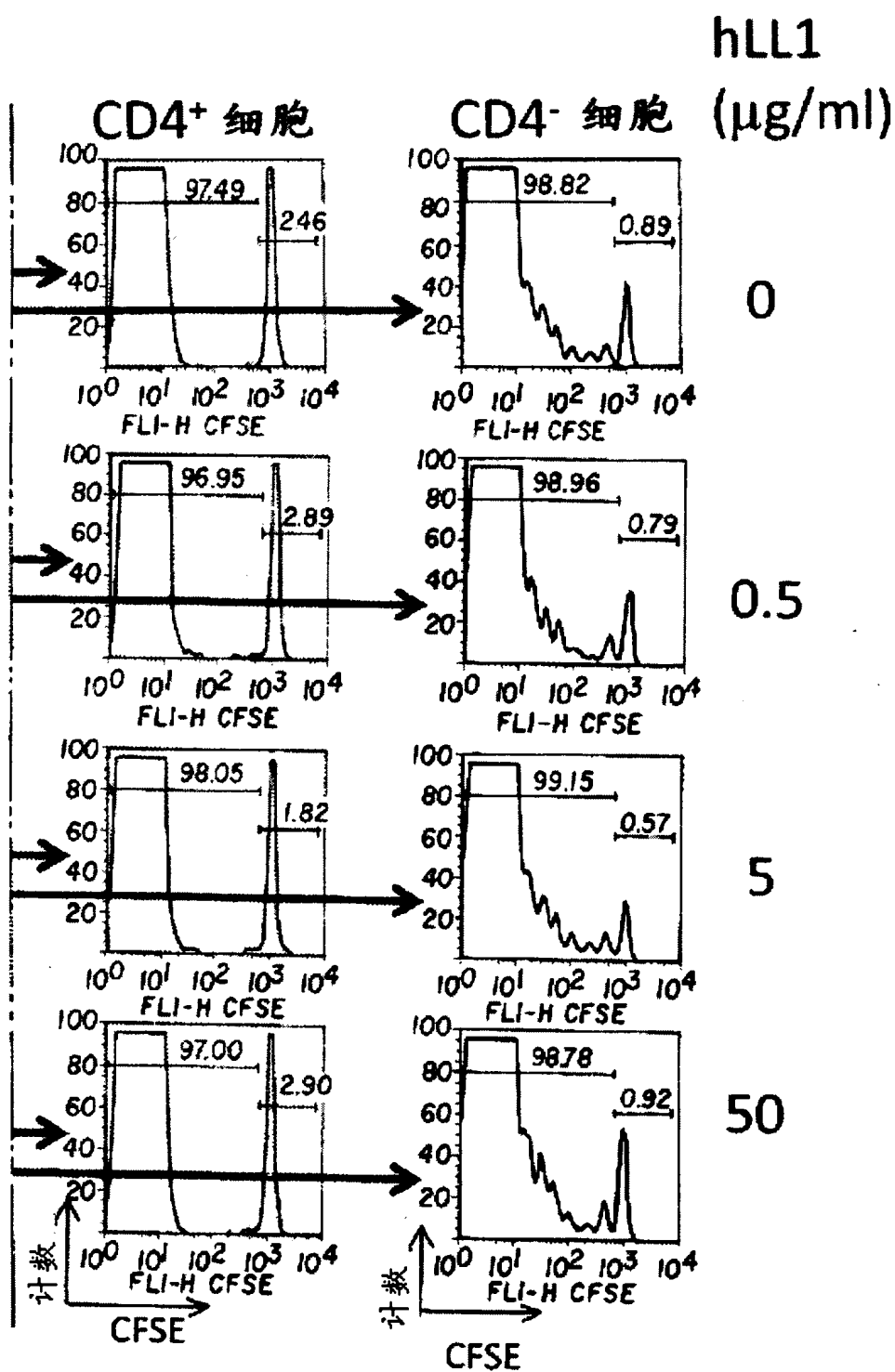


图 5B2

