



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118510542 A

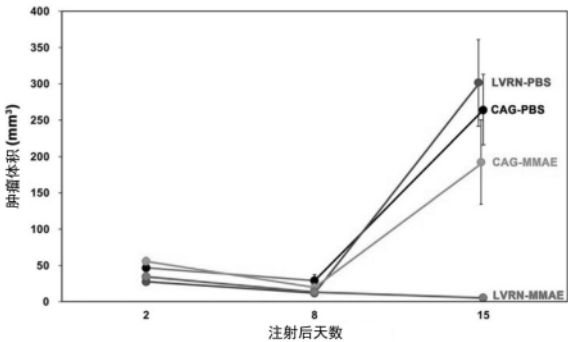
(43) 申请公布日 2024. 08. 16

(21) 申请号 202380015930.1	(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
(22) 申请日 2023.01.04	公司 11021
(30) 优先权数据	专利代理师 张国梁
2022-000160 2022.01.04 JP	(51) Int.Cl.
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61K 45/00 (2006.01)
2024.07.01	A61K 39/395 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	A61K 47/68 (2006.01)
PCT/JP2023/000019 2023.01.04	A61P 35/00 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据	A61P 35/02 (2006.01)
W02023/132333 JA 2023.07.13	A61P 35/04 (2006.01)
(71) 申请人 藤原浩	C07K 14/47 (2006.01)
地址 日本	C07K 16/28 (2006.01)
(72) 发明人 藤原浩	C07K 16/40 (2006.01)
	C12Q 1/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书39页
序列表（电子公布） 附图16页

(54) 发明名称
用于处置癌的药物组合物

(57) 摘要
用于处置癌的药物组合物,其包含与laeverin结合的物质;鉴定癌的复发和/或转移的方法;损害表达laeverin的癌细胞的物质的鉴定方法;鉴定对癌的复发和/或转移产生影响的因子的方法;以及laeverin作为癌干细胞的生物标记物的应用。



1. 用于处置癌的药物组合物,其包含与laeverin结合的物质。
2. 权利要求1中所述的药物组合物,其中,所述与laeverin结合的物质包含抗laeverin抗体。
3. 权利要求2中所述的药物组合物,其中,所述抗laeverin抗体包含:
 - (A)
包含下列的重链可变区:
含有氨基酸序列:GYSFTDYI (序列编号1) 的CDR-H1;
含有氨基酸序列:INPYHAGI (序列编号2) 的CDR-H2;和
含有氨基酸序列:ARGSNYVYYYAMD (序列编号3) 的CDR-H3,和/或
包含下列的轻链可变区:
含有氨基酸序列:SSVSY (序列编号4) 的CDR-L1;
含有氨基酸序列:ATS的CDR-L2;和
含有氨基酸序列:QQWSSNPPT (序列编号5) 的CDR-L3,
 - (B)
包含下列的重链可变区:
含有氨基酸序列:GYTFTSYW (序列编号11) 的CDR-H1;
含有氨基酸序列:IDPYDSET (序列编号12) 的CDR-H2;和
含有氨基酸序列:ARDYGSRYYAMD (序列编号13) 的CDR-H3,和/或
包含下列的轻链可变区:
含有氨基酸序列:ENVVTY (序列编号14) 的CDR-L1;
含有氨基酸序列:GAS的CDR-L2;和
含有氨基酸序列:QQGYSTP (序列编号15) 的CDR-L3,
 - (C)
包含下列的重链可变区:
含有氨基酸序列:GYTFTSYW (序列编号11) 的CDR-H1;
含有氨基酸序列:IDPYDSET (序列编号12) 的CDR-H2;和
含有氨基酸序列:ARDYGSRYYAMD (序列编号13) 的CDR-H3,和/或
包含下列的轻链可变区:
含有氨基酸序列:STISY (序列编号16) 的CDR-L1;
含有氨基酸序列:DTS的CDR-L2;和
含有氨基酸序列:QQWSSNPP (序列编号17) 的CDR-L3,或
 - (D)
包含下列的重链可变区:
含有氨基酸序列:GYTFTDYY (序列编号18) 的CDR-H1;和
含有氨基酸序列:IYPRSGHS (序列编号19) 的CDR-H2,和/或
包含下列的轻链可变区:
含有氨基酸序列:QSLLYSNIQKNY (序列编号20) 的CDR-L1;
含有氨基酸序列:WAS的CDR-L2;和
含有氨基酸序列:QQYYSTP (序列编号21) 的CDR-L3。

4. 权利要求2或3中所述的药物组合物,其中,所述抗laeverin抗体具有ADCC活性或CDC活性。

5. 权利要求1~4的任一项中所述的药物组合物,其中,所述与laeverin结合的物质包含细胞毒剂。

6. 权利要求5中所述的药物组合物,其中,所述细胞毒剂包含选自放射性同位素、化疗剂、毒素、和酶的至少1种。

7. 权利要求1~6的任一项中所述的药物组合物,其中,所述癌是复发癌、转移癌、或抗性癌、或绒毛膜癌、胎盘部位滋养细胞肿瘤、卵巢癌、输卵管癌、子宫癌、宫颈癌、乳癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤、大肠癌、前列腺癌、或白血病。

8. 分析癌的复发、转移或抗性的方法,其包括:

应用与laeverin结合的物质,检测有需要的对象来源的生物体样本中的表达laeverin的癌细胞,和

基于检测结果,分析癌的复发、转移或抗性。

9. 损害表达laeverin的癌细胞的物质的鉴定方法,其包括:

在可与被验物质接触的条件下培养表达laeverin的癌细胞,和

基于培养结果,将所述被验物质鉴定为损害表达laeverin的癌细胞的物质。

10. 鉴定对癌的复发、转移或抗性产生影响的因子的方法,其包括:将表达laeverin的癌细胞与不表达laeverin但与所述癌细胞起源相同的癌细胞比较,鉴定遗传因子或蛋白性因子的差异。

11. laeverin作为癌干细胞的生物标记物的应用。

用于处置癌的药物组合物

技术领域

[0001] 本公开涉及药物领域。更具体地,本公开涉及用于处置癌的药物组合物。本公开涉及分析癌的复发、转移或抗性的方法。本公开涉及鉴定损害表达laeverin的癌细胞的物质的方法。本公开涉及鉴定对癌的复发、转移或抗性产生影响的因子的方法。本公开涉及laeverin作为癌干细胞的生物标记物的应用。

背景技术

[0002] 通过早期发现癌、接受适当的处置,癌患者的生存率提高。癌细胞有时从肿瘤组织离开进入血管中,转移到其它组织。认为血中循环肿瘤细胞(CTC)是癌的转移和复发的主要原因。

[0003] laeverin是在胎盘的绒毛外滋养层细胞(EVT)中表达的独特糖蛋白(专利文献1和非专利文献1~6)。

[0004] 许多不能手术的癌用化学疗法和放射线疗法治疗。但是,用这些疗法难以完全排除癌细胞。对这些疗法有抗性的癌细胞可参与癌的复发和/或转移。作为参与癌的复发和/或转移的癌细胞,癌干细胞受到关注。癌干细胞存在于肿瘤内,可存在于脱离自身增殖期的静止期(G0期)。此外,癌干细胞具有自身增殖能力,可分裂为与自身相同的癌干细胞、和分化的癌细胞。这样的分裂称为不对称分裂。由于癌干细胞具有这些特征,可对化学疗法等通常的癌疗法有抗性。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:特开2005-160473号公报

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:Fujiwara H,et.al., "Promoting Roles of Embryonic Signals in Embryo Implantation and Placentation in Cooperation with Endocrine and Immune Systems. Int J Mol Sci.2020Mar 10;21(5):1885.doi:10.3390/ijms21051885.

[0010] 非专利文献2:Horie A,et.al.,Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation.Hum Reprod.2012May;27(5):1267-76.doi:10.1093/humrep/des068.

[0011] 非专利文献3:Fujiwara H,et.al.,Human extravillous trophoblasts express laeverin,a novel protein that belongs to membrane-bound gluzincin metallopeptidases.Biochem Biophys Res Commun.2004Jan 23;313(4):962-8.

[0012] 非专利文献4:Maruyama M,et.al.,Histidine 379of human laeverin/aminopeptidase Q,a nonconserved residue within the exopeptidase motif,defines its distinctive enzymatic properties.J Biol Chem.2009Dec11;284(50):34692-702.doi:10.1074/jbc.M109.066712.

[0013] 非专利文献5:Maruyama M,et.al.,Laeverin/aminopeptidase Q,a novel

bestatin-sensitive leucine aminopeptidase belonging to the M1 family of aminopeptidases. J Biol Chem. 2007 Jul 13; 282(28):20088-96. doi:10.1074/jbc.M702650200.

[0014] 非专利文献6: Imakawa K, et al., Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. Nature. 1987 Nov 26-Dec 2; 330(6146):377-9. doi:10.1038/330377a0.

发明内容

[0015] 发明要解决的问题

[0016] 本公开的1个目的是提供用于处置癌的新药物组合物。本公开的1个目的是提供分析癌的复发、转移或抗性的新方法。本公开的1个目的是提供鉴定损害表达laeverin的癌细胞的物质的新方法。本公开的1个目的是提供鉴定对癌的复发、转移或抗性产生影响的因子的新方法。本公开的1个目的是提供癌干细胞的新生物标记物。

[0017] 用于解决问题的手段

[0018] 本发明人为了寻找在血中循环肿瘤细胞(CTC)中起重要作用的基因,关注于支架非依赖性地可增殖的癌细胞中表达水平变化的基因。本发明人发现,laeverin在通过粘附培养支架依赖性地培养的癌细胞中不表达,但在通过浮游培养支架非依赖性地培养的癌细胞中表达,和在生物体样本来源的CTC中表达。本发明人发现,表达laeverin的癌细胞参与淋巴结转移。本发明人进一步发现,表达laeverin的癌细胞表达参与T细胞的功能抑制和调节性T细胞的分化诱导的吡啶胺2,3-双加氧酶-1(ID01)。此外,本发明人发现,通过与表达laeverin的细胞接触,单核细胞分化诱导为表达ID01的树突细胞。这些知识显示,表达laeverin的癌细胞形成可避免来自免疫系统的攻击的肿瘤微环境(TME)。本发明人基于这些知识发现,表达laeverin的癌细胞在复发、转移或抗性中起重要作用,从而完成本发明。

[0019] 本发明人进一步发现,在原发灶肿瘤组织的内部,被坏死的癌细胞包围而生存的癌细胞表达laeverin。本发明人认为,这些表达laeverin的癌细胞抑制自身的细胞增殖速度等而可在周围的癌细胞死亡的环境下生存。这种特性与癌干细胞的特性类似。如上述,显示表达laeverin的癌细胞避免来自淋巴管和淋巴结、以及血管内的免疫系统的攻击而可转移。基于这些知识,本发明人发现,表达laeverin的癌细胞可为癌干细胞,从而完成本发明。

[0020] 本公开提供下述的发明。

[0021] [项1] 用于处置癌的药物组合物,其包含与laeverin结合的物质。

[0022] [项2] 项1中记载的药物组合物,其中,前述与laeverin结合的物质包含抗laeverin抗体。

[0023] [项3] 项2中记载的药物组合物,其中,前述抗laeverin抗体包含:

[0024] (A) 包含含有氨基酸序列:GYSFTDYI(序列编号1)的CDR-H1、含有氨基酸序列:INPYHAGI(序列编号2)的CDR-H2、和含有氨基酸序列:ARGSNYVYYYAMD(序列编号3)的CDR-H3的重链可变区,和/或包含含有氨基酸序列:SSVSY(序列编号4)的CDR-L1、含有氨基酸序列:ATS的CDR-L2、和含有氨基酸序列:QQWSSNPPT(序列编号5)的CDR-L3的轻链可变区,

[0025] (B) 包含含有氨基酸序列:GYTFTSYW(序列编号11)的CDR-H1、含有氨基酸序列:IDPYDSET(序列编号12)的CDR-H2、和含有氨基酸序列:ARDYGSRYAMD(序列编号13)的CDR-

H3的重链可变区,和/或包含含有氨基酸序列:ENVVTY(序列编号14)的CDR-L1、含有氨基酸序列:GAS的CDR-L2、和含有氨基酸序列:GQGYSYP(序列编号15)的CDR-L3的轻链可变区,

[0026] (C) 包含含有氨基酸序列:GYTFTSYW(序列编号11)的CDR-H1、含有氨基酸序列:IDPYDSET(序列编号12)的CDR-H2、和含有氨基酸序列:ARDYGSRYAMD(序列编号13)的CDR-H3的重链可变区,和/或包含含有氨基酸序列:STISY(序列编号16)的CDR-L1、含有氨基酸序列:DTS的CDR-L2、和含有氨基酸序列:QQWSSNPP(序列编号17)的CDR-L3的轻链可变区,或

[0027] (D) 包含含有氨基酸序列:GYTFTDYY(序列编号18)的CDR-H1、和含有氨基酸序列:IYPRSGHS(序列编号19)的CDR-H2的重链可变区,和/或包含含有氨基酸序列:QSLLYSNIQKNY(序列编号20)的CDR-L1、含有氨基酸序列:WAS的CDR-L2、和含有氨基酸序列:QQYYSYP(序列编号21)的CDR-L3的轻链可变区。

[0028] [项4] 项2或项3中记载的药物组合物,其中,前述抗laeverin抗体具有ADCC活性或CDC活性。

[0029] [项5] 项1~项4的任一项中记载的药物组合物,其中,前述与laeverin结合的物质包含细胞毒剂。

[0030] [项6] 项5中记载的药物组合物,其中,前述细胞毒剂包含选自放射性同位素、化疗剂、毒素、和酶的至少1种。

[0031] [项7-1] 项1~项6的任一项中记载的药物组合物,其中,前述癌是复发癌、转移性癌、或抗性癌、或绒毛膜癌、胎盘部位滋养细胞肿瘤、卵巢癌、输卵管癌、子宫癌、宫颈癌、乳腺癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤、大肠癌、前列腺癌、或白血病。

[0032] [项7-2] 项1~项6的任一项中记载的药物组合物,其用于预防癌的复发、转移或抗性。

[0033] [项8] 分析癌的复发、转移或抗性的方法,其包括:

[0034] 应用与laeverin结合的物质,检测有需要的对象来源的生物体样本中的表达laeverin的癌细胞,和

[0035] 基于检测结果,分析癌的复发、转移或抗性。

[0036] [项9] 损害表达laeverin的癌细胞的物质的鉴定方法,其包括:

[0037] 在可与被验物质接触的条件下培养表达laeverin的癌细胞,和

[0038] 基于培养结果,将前述被验物质鉴定为损害表达laeverin的癌细胞的物质。

[0039] [项10] 鉴定对癌的复发、转移或抗性产生影响的因子的方法,其包括:将表达laeverin的癌细胞与不表达laeverin但与前述癌细胞起源相同的癌细胞比较,鉴定遗传因子或蛋白性因子的差异。

[0040] [项11] laeverin作为癌干细胞的生物标记物的应用。

[0041] 附图简单说明

[0042] [图1] 图1a~图1c是粘附培养的MCF7细胞中的laeverin(LVRN)染色图像(图1a)、核染色图像(图1b)、和相位差图像与laeverin染色图像的重叠图像(图1c)。图1d~图1f是粘附培养的、过度表达laeverin的Swan71细胞中的laeverin染色图像(图1d)、核染色图像(图1e)、和相位差图像与laeverin染色图像的重叠图像(图1f)。

[0043] [图2] 图2a和图2b分别是浮游培养的MCF7细胞球体中应用作为单克隆抗laeverin抗体的5-23抗体的laeverin染色图像和核染色图像。图2c和图2d分别是浮游培养的MCF7细

胞球体中应用抗LVRN抗体的laeverin染色图像和核染色图像。图2a~图2d的右下的条是显示50 μ m的比例尺。

[0044] [图3]图3a~图3d是粘附培养的A375细胞的相位差图像(图3a)、laeverin染色图像(图3b)、核染色图像(图3c)、和前述图像的重叠图像(图3d)。图3e~图3h是浮游培养的A375细胞球体的相位差图像(图3e)、laeverin染色图像(图3f)、核染色图像(图3g)、和前述laeverin染色图像与核染色图像的重叠图像(图3h)。图3i~图3l是粘附培养的A2780细胞的相位差图像(图3i)、laeverin染色图像(图3j)、核染色图像(图3k)、和前述图像的重叠图像(图3l)。图3m~图3p是浮游培养的A2780细胞球体的相位差图像(图3m)、laeverin染色图像(图3n)、核染色图像(图3o)、和前述laeverin染色图像与核染色图像的重叠图像(图3p)。图3a~图3p的右下的条是显示50 μ m的比例尺。

[0045] [图4]图4a是显示浮游培养的A375细胞株(球体)中的前述mRNA转录产物相对于粘附培养的A375细胞株(单层)中的laeverin mRNA的转录产物量(标准化为1)的相对量的条形图。图4b是显示A2780细胞株中的laeverin mRNA转录产物的相对量的条形图。图4c是显示CaSki细胞株中的laeverin mRNA转录产物的相对量的条形图。图4d是显示SiHa细胞株中的laeverin mRNA转录产物的相对量的条形图。

[0046] [图5]图5a是显示laeverin阳性的球体(白箭头)的荧光图像。图5b是显示图5a的球体(白箭头)为EpCAM阳性的荧光图像。图5c是显示图5a的球体(白箭头)为CD45阴性的荧光图像。图5d是图5a~5c的荧光图像的重叠图像。图5a~图5d中白四边形包围的图像是用白箭头显示的球体的放大图像。图5a~图5d的右下的条是显示20 μ m的比例尺。

[0047] [图6]图6是显示癌细胞球体中的laeverin(LVRN)和IDO1的各自相对的转录水平的条形图。

[0048] [图7]图7a是显示在可与Swan71细胞直接接触的条件下培养的THP-1细胞中的4种的基因(OAS2、IFIT1、IFIT3和ISG15)的相对表达水平的条形图。图7b是显示在不能与Swan71细胞直接接触的条件下培养的THP-1细胞中的前述基因的相对表达水平的条形图。

[0049] [图8]图8a是显示在各种浓度的重组laeverin(rLVRN)的存在下培养的THP-1细胞中的4种的基因(OAS2、IFIT1、IFIT3和ISG15)的相对表达水平的条形图。图8b是显示在rLVRN固定珠(◆:rLVRN+珠)或游离型rLVRN(■:rLVRN)的存在下培养的THP-1细胞中的前述基因的相对表达水平的条形图。

[0050] [图9]图9a~图9c是分别显示在INF- β (图9a)、INF- γ (图9b)、和rLVRN(图9c)的存在下培养的THP-1细胞中的ISG15的相对表达水平的条形图。

[0051] [图10]图10a上图和下图分别是在添加PBS和rLVRN的培养基中培养的被验者A来源的外周血单核细胞(PBMCs)来源的CD14阳性细胞的显微镜照片。图10b上图和下图分别是在添加PBS和rLVRN的培养基中培养的被验者B来源的PBMCs来源的CD14阳性细胞的显微镜照片。

[0052] [图11]图11a~图11c是显示在rLVRN存在下培养的CD14阳性细胞(图11a)、PBMCs(图11b)、THP-1(图11c)中的基因表达的条形图。

[0053] [图12]图12a是与在rLVRN存在下培养的PBMCs有关的CD14和HLA-DR的散点图。图12b是与图12a的Q1分级有关的CD83的散点图。

[0054] [图13]图13a是显示通过Hanging Drop法培养的黑色素瘤细胞A375(1,000细胞/

培养基滴20 μ L)中的laeverin表达的染色图像。图13b是显示在pHrodo缀合抗LVRN抗体的存在下用Hanging Drop法培养的黑色素瘤细胞A375(10细胞/培养基滴20 μ L)中的抗LVRN抗体的细胞内掺入的染色图像。

[0055] [图14]图14a是在缀合单甲基溴瑞他汀E(MMAE)的5-23抗体的存在下培养的、卵巢癌细胞SKOV3的球体的碘化丙啶(PI)染色图像。图14b是在5-23抗体的存在下培养的、SKOV3球体的PI染色图像。图14c是SKOV3球体的PI染色图像。图14d是未进行PI染色的SKOV3球体的图像。

[0056] [图15]图15a是淋巴结转移初期部位的染色图像。图15b是图15a中用带*的实线包围的区域的放大图像。图15c是图15a中用带**的实线包围的区域的放大图像。图15d是淋巴结转移成立的部位的染色图像。图15e是图15d中用实线包围的区域的放大图像。

[0057] [图16]图16a是输出淋巴管附近的淋巴结的淋巴管内皮染色图像。淋巴管内皮通过Podoplanin染色。图16b是输出淋巴管附近的淋巴结的HE染色图像。图16c是输出淋巴管附近的淋巴结的染色图像。图16d是图16c中用带*的实线包围的区域的放大图像。图16e是图16c中用带**的实线包围的区域的放大图像。

[0058] [图17]图17a是原发灶肿瘤中的坏死部分的染色图像。图17b是图17a中用带*的实线包围的区域的放大图像。图17c是图17a中用带**的实线包围的区域的放大图像。图17d是原发灶肿瘤中的坏死部分以外的部位的HE染色图像。图17e是原发灶肿瘤中的坏死部分以外的部位的染色图像。

[0059] [图18]图18a是化学疗法(TC疗法)应用后的卵巢癌切片的HE染色图像。图18b是前述化学疗法应用后的卵巢癌切片的应用抗laeverin抗体的免疫染色图像。图18c是化学疗法(DC疗法)应用后的卵巢癌切片的HE染色图像。图18d是前述化学疗法应用后的卵巢癌切片的应用抗laeverin抗体的免疫染色图像。

[0060] [图19]图19是显示癌细胞移植小鼠中的肿瘤尺寸的折线图。

[0061] [图20]图20是显示癌细胞株中形成的球体中laeverin的表达水平的一系列条形图。

[0062] 发明的具体实施方式

[0063] (药物组合物)

[0064] 本公开的1个方式涉及用于处置癌的药物组合物,其包含与laeverin结合的物质。

[0065] 术语“laeverin”或“LVRN”意味着鉴定为胎盘的绒毛外滋养层细胞(EVT)的细胞表面抗原的糖蛋白。laeverin的氨基酸序列可以从公共机构提供的数据库站点获得。laeverin在例如同源性检索软件(例如BLAST、FASTA)中应用默认参数计算的情形中,包括与序列编号10中记载的氨基酸序列具有80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上的序列同一性的蛋白。laeverin包括导入天然突变、并且具有其功能的突变体。突变可以是规定的氨基酸序列中的缺失、取代或添加或它们的组合。

[0066] 人的laeverin本质上例如由990个氨基酸(序列编号10)组成。本质上由序列编号10中记载的氨基酸序列组成的laeverin例如可以包含糖基化等翻译后修饰。laeverin例如只要具有其功能,可以包括序列编号10中记载的氨基酸序列中具有突变、与序列编号10中记载的氨基酸序列显示至少85%以上(优选90%以上、更优选95%以上、97%以上、98%以

上、或99%以上)的序列同一性的氨基酸序列。

[0067] 术语“序列同一性”意味着在最佳比对(排列)的2个多核苷酸序列间或2个氨基酸序列间一致的氨基酸或核苷酸的比例。序列同一性可以应用商业的或公开可得的软件、例如BLAST+计算。氨基酸的“缺失”意味着规定的氨基酸序列中任意位置的氨基酸残基丢失。氨基酸的“添加”意味着在规定的氨基酸序列中任意位置追加或插入氨基酸残基。氨基酸的“取代”意味着规定的氨基酸序列中任意位置的氨基酸残基置换为另一氨基酸残基。氨基酸的取代例如可以是保守取代。

[0068] “与laeverin结合的物质”包括以规定的结合能力与laeverin结合的任何物质。与laeverin结合的物质例如,以 10^{-6} M以下、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、或 10^{-10} M以下的解离常数与由序列编号10中记载的氨基酸序列(MGPPSSSGFYVSHAVALLLAGLVAALLLALAVLAALYGHCEVPPSELP GLRDSEAEPPPLRQKPTPTPKPSSARELAVTTTPSNWRPPGPWDQLRLPPWLVLPHYDLELWPQLRPDELPAAGSLPFTGRVNITVRCTVATSRLLLHSLFQDCERA EVRGPLSPGTGNATVGRVPVDDVWFALDTEYMLVLESEPLKPGSSYELQLSFSGLVKEDLREGLFLNVYTDQGERRALLASQLEPTFARYVFPCFDEPALKATFNITMIIHPSYVALSNMPKLGQSEKEDVNGSKWTVTTFSTTPHMPYTLVAFVICDYDHVNRTERGKEIRI WARKDAIANGSADFALNITGPIFSFLEDLFNISYSLPKTDIIALSSFDNHAMENWGLMIFDESGLLLEPKDQLTEKKTLISYVVSHEIGHQWFGNLVTMNWWNIWLNEGFASYFEFEVINYNPKLPRNEIFFSNILHNILREDHALVTRAVAMKVENFKTSEIQELFDIFTYSKGASMARMLSCFLNEHLFVSALKSYLKTFSSYNAEQDDLWRHFQMAIDDQSTVILPATIKNIMDSWTHQSGFPVITLNVSTGVMKQEPFYLENIKNRTLLTSNDTWIVPILWIKNGTTQPLVWLDQSSKVFPEMQVSDSDHDWVILNLNMTGYRVNYDKLGWKKLNQQLEKDKAIPVIHRLQLIDDAFSLSKNNYIEIETALELT KYLAEEDEIIVWHTVLVNLVTRDLVSEVNIYDIYSLKRYLLKRLNLIWNIYSTIIRENVLALQDDYLALISLEKLFVTACWLGL EDCLQLSKELFAKWDHPENEIPYPIKDVVLCYGIAGSDKEWDILLNTYTNTTNKEEKIQLAYAMSCSKDPWILNRYMEYAISTSPFTSNETNIEVVASSEVGRYVAKDFLVNNWQAVSKRYGTQSLINLIYTIGRTVTTDLQIVELQQFFSNMLEEHQPIRVHANLQTIKNENLKNKKLSARIAAWLRNT)组成的laeverin结合。与laeverin结合的物质例如,以规定的结合能力与laeverin结合、但与laeverin以外的物质实质上不结合。与laeverin以外的物质“实质上不结合”的物质包括以 10^{-4} M以上的解离常数与laeverin以外的物质结合的物质。与laeverin以外的物质实质上不结合的物质例如,以 10^{-3} M以上或 10^{-2} M以上的解离常数与laeverin以外的物质结合的物质。

[0069] 与laeverin结合的物质例如具有10kDa以上、20kDa以上、30kDa以上、50kDa以上、75kDa以上、100kDa以上、125kDa以上、150kDa以上、175kDa以上、或200kDa以上的分子量。与laeverin结合的物质例如具有不足500kDa、不足450kDa、不足400kDa、不足350kDa、不足300kDa、不足250kDa、或不足200kDa的分子量。

[0070] 与laeverin结合的物质例如是低分子化合物、蛋白(例如抗体)、DNA、RNA、低分子干扰RNA、或反义寡核苷酸。与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体或laeverin结合的受体或它们的片段。与laeverin结合的物质例如是单克隆抗laeverin抗体或多克隆抗laeverin抗体。抗laeverin抗体例如是人抗体或人源化抗体。与laeverin结合的物质例如是与抗laeverin抗体竞争的、任意抗原结合部分,或包含抗原结合部分的融合蛋白。

[0071] 术语“抗体”意味着可以经由位于免疫球蛋白分子的可变区的至少1个抗原识别位点与靶标结合的物质。抗体例如是完整多克隆抗体或单克隆抗体、或嵌合抗体、或它们的抗原结合部分。抗原结合部分例如是Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、包含互补性决定区(CDR)的片段、

单链抗体(scFv)、二体(diabody)、三体(triabody)、或四体(tetrabody)。抗体例如是包含IgG、IgA或IgM的任意类型抗体或其抗原结合片段。抗体的“可变区”意味着抗体轻链(V_L)的可变区或抗体重链(V_H)的可变区。抗体重链或抗体轻链的可变区包含3个互补性决定区(CDR)和4个框架区(FR)。

[0072] CDR例如可以应用National Center for Biotechnology Information (NCBI)的IgBLAST鉴定。抗体的重链可变区包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。抗体的轻链可变区包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0073] 术语“单克隆抗体”意味着从实质上同种的抗体群得到的抗体。实质上同种的抗体不排除包含天然突变的抗体。单克隆抗体可以按照公知的方法配制。

[0074] 术语“人源化抗体”意味着全部或部分非人起源,为了避免或最小化人中的免疫应答,将其非人起源的重链和轻链的框架区内的氨基酸取代的抗体。人源化抗体例如包含恒定结构域中的人 C_H 结构域和 C_L 结构域或本质上由恒定结构域中的人 C_H 结构域和 C_L 结构域组成。人源化抗体例如包含人起源的恒定结构域。

[0075] 术语“人抗体”意味着由框架区和CDR区组成的可变区以及恒定区都是人起源的抗体。术语“嵌合抗体”意味着特定物种起源的恒定区或其一部分的氨基酸置换为另一物种起源的氨基酸的抗体。嵌合抗体例如是可变区起源于小鼠、恒定区起源于人的抗体。

[0076] 抗体例如可以通过从天然源(例如脊椎动物)分离而配制。抗体例如可以从人、猴、猪、马、兔、狗、猫和小鼠等哺乳动物;鸡等鸟类;鲨鱼等鱼类;或美洲驼等骆驼科动物配制。抗体例如可以按照基因工程技术等技术人工制备。抗体例如可以通过基于对laeverin的结合能力从抗体文库选择而配制。抗体例如可以应用噬菌体展示法配制。

[0077] 包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质由于可以有效抑制或停止表达laeverin的癌细胞的增殖、或杀死或破坏前述癌细胞而优选。用于处置癌的药物组合物优选包含显示抗体依赖性细胞毒性(ACDD活性)或补体依赖性细胞毒性(CDC活性)的抗laeverin抗体。用于处置癌的药物组合物优选包括包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质。

[0078] 术语“抗体依赖性细胞毒性(ACDD活性)”意味着免疫系统的免疫细胞损害靶标细胞的活性。ACDD活性通过具有与抗体的Fc区结合的Fc受体的免疫细胞(例如巨噬细胞和天然杀伤细胞)杀伤具有Fc区的抗体结合的靶标细胞(例如,表达laeverin的癌细胞)实现。术语“补体依赖性细胞毒性(CDC活性)”意味着通过与补体系统蛋白结合损害靶标细胞的活性。CDC活性通过使与抗体的Fc区结合的补体成分溶解具有Fc区的抗体结合的靶标细胞(例如,表达laeverin的癌细胞)实现。术语“Fc区”意味着用作为蛋白分解酶的木瓜蛋白酶部分分解完整抗体得到的片段所对应的区。

[0079] 与laeverin结合的物质例如是具有ACDD活性或CDC活性的抗laeverin抗体。前述抗laeverin抗体例如包含Fc区。前述抗laeverin抗体例如是单克隆抗体或多克隆抗体,优选单克隆抗体。包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如包含具有ACDD活性或CDC活性的抗laeverin抗体、和后述的细胞毒剂。包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如包含具有ACDD活性或CDC活性的抗laeverin抗体、与选自放射性同位素、化疗剂、酶或它们的片段、和毒素的至少1种。

[0080] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体(例如小鼠抗体、人源化抗体、或人抗体),其包含:

- [0081] 包含下列的重链可变区：
- [0082] 含有或由氨基酸序列：GYSFTDYI (序列编号1) 组成的CDR-H1；
- [0083] 含有或由氨基酸序列：INPYHAGI (序列编号2) 组成的CDR-H2；和
- [0084] 含有或由氨基酸序列：ARGSNVYYYAMD (序列编号3) 组成的CDR-H3，和/或
- [0085] 包含下列的轻链可变区：
- [0086] 含有或由氨基酸序列：SSVSY (序列编号4) 组成的CDR-L1；
- [0087] 含有或由氨基酸序列：ATS组成的CDR-L2；和
- [0088] 含有或由氨基酸序列：QQWSSNPPT (序列编号5) 组成的CDR-L3。
- [0089] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体 (例如，抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv)，其包含：
- [0090] 含有或本质上由氨基酸序列：MSSPQPLKTLTLMGGSWIFLFLLSGTAGAHSEIQLQQTGPPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYIMLVWKQSHGKSLEWIGNINPYHAGISYNLKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARGSNVYYYAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWVPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGYSYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK (序列编号6) 组成的重链可变区，和/或
- [0091] 含有或由氨基酸序列：MDFQVQIFSLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVSYSMHWYQQKPGSSPKPWIFATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (序列编号7) 组成的轻链可变区。序列编号6中记载的氨基酸序列 (也称为5-23抗体HC) 包含序列编号1中记载的氨基酸序列、序列编号2中记载的氨基酸序列、和序列编号3中记载的氨基酸序列。序列编号7中记载的氨基酸序列 (也称为5-23抗体LC) 包含序列编号4中记载的氨基酸序列和序列编号5中记载的氨基酸序列。
- [0092] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体 (例如小鼠抗体、人源化抗体、或人抗体)，其包含：
- [0093] 包含下列的重链可变区：
- [0094] 含有或由氨基酸序列：GYTFTSYW (序列编号11) 组成的CDR-H1；
- [0095] 含有或由氨基酸序列：IDPYDSET (序列编号12) 组成的CDR-H2；和
- [0096] 含有或由氨基酸序列：ARDYGSRYAMD (序列编号13) 组成的CDR-H3，和/或
- [0097] 包含下列的轻链可变区：
- [0098] 含有或由氨基酸序列：ENVVTY (序列编号14) 组成的CDR-L1；
- [0099] 含有或由氨基酸序列：GAS组成的CDR-L2；和
- [0100] 含有或由氨基酸序列：GQGYSYP (序列编号15) 组成的CDR-L3。
- [0101] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体 (例如小鼠抗体、人源化抗体、或人抗体)，其包含：
- [0102] 包含下列的重链可变区：
- [0103] 含有或由氨基酸序列：GYTFTSYW (序列编号11) 组成的CDR-H1；

- [0104] 含有或由氨基酸序列:IDPYDSET (序列编号12) 组成的CDR-H2;和
- [0105] 含有或由氨基酸序列:ARDYGSRYAMD (序列编号13) 组成的CDR-H3,和/或
- [0106] 包含下列的轻链可变区:
- [0107] 含有或由氨基酸序列:STISY (序列编号16) 组成的CDR-L1;
- [0108] 含有或由氨基酸序列:DTS组成的CDR-L2;和
- [0109] 含有或由氨基酸序列:QQWSSNPP (序列编号17) 组成的CDR-L3。
- [0110] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体 (例如小鼠抗体、人源化抗体、或人抗体),其包含:
- [0111] 包含下列的重链可变区:
- [0112] 含有或由氨基酸序列:GYTFTDYY (序列编号18) 组成的CDR-H1;和
- [0113] 含有或由氨基酸序列:IYPRSGHS (序列编号19) 组成的CDR-H2,和/或
- [0114] 包含下列的轻链可变区:
- [0115] 含有或由氨基酸序列:QSLLYSNIQKNY (序列编号20) 组成的CDR-L1;
- [0116] 含有或由氨基酸序列:WAS组成的CDR-L2;和
- [0117] 含有或由氨基酸序列:QQYYSYP (序列编号21) 组成的CDR-L3。
- [0118] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体 (例如,抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:
- [0119] 含有或本质上由氨基酸序列:MGWSYIILFLLATATCVHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTVHMQLSLTSSEDSAVYHCARDYGSRYAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIEPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIKPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK (序列编号22) 组成的重链可变区,和/或
- [0120] 含有或由氨基酸序列:MGIKMESQTLVFISILLWLYGADGNIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTVYSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQGYSPYTFGGG TKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKWIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (序列编号23) 组成的轻链可变区。序列编号22中记载的氨基酸序列 (也称为94-2/129-5抗体HC) 包含序列编号11中记载的氨基酸序列、序列编号12中记载的氨基酸序列、和序列编号13中记载的氨基酸序列。序列编号23中记载的氨基酸序列 (也称为94-2抗体LC) 包含序列编号14中记载的氨基酸序列和序列编号15中记载的氨基酸序列。
- [0121] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体 (例如,抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:
- [0122] 含有或本质上由氨基酸序列:MGWSYIILFLLATATCVHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTVHMQLSLTSSEDSAVYHCARDYGSRYAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIEPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIKPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAP

IEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDG SYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (序列编号22) 组成的重链可变区,和/或

[0123] 含有或由氨基酸序列:MDFQVQIFSFLISASV IISRGQIVLTQSPTIMSVSPGEKVTMTCSASS TISYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK LASGVPARFSGSGSGTSYSLTITSMGAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKL EIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC (序列编号24) 组成的轻链可变区。序列编号24中记载的氨基酸序列(也称为129-5抗体LC)包含序列编号16中记载的氨基酸序列和序列编号17中记载的氨基酸序列。

[0124] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体(例如,抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:

[0125] 含有或本质上由氨基酸序列:MEWIWIFL FILSGTAGVHSQVQLQQSGAELAGPGTSVRLSCKA SGYTFTDYYIDWVKQRTGQGLEWIGE IYPRSGH SKYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCALYY YGSSHWFA YWGQGLTVTSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTTVDKKLEPSGP ISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFI FPPNIKDVLMISLTPKVT CVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQH QDWM SKEF KCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFPNGDISVEWTSNGHTEENYKDTA PVLDSG SYFIYSKLN MKTSKWEKTD SFSCNVRHEGLKNYYL KKTISRSPGK (序列编号25) 组成的重链可变区,和/或

[0126] 含有或由氨基酸序列:MDSQAQVLM LLLLWVSGTCGDIVMSQSPSSLTVSVGERVTMSCRSSQSL LYSNIQKNYLA WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPTFG GGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSM SSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC (序列编号26) 组成的轻链可变区。序列编号25中记载的氨基酸序列(也称为5-23J抗体HC)包含序列编号18中记载的氨基酸序列和序列编号19中记载的氨基酸序列。序列编号26中记载的氨基酸序列(也称为5-23J抗体LC)包含序列编号20中记载的氨基酸序列和序列编号21中记载的氨基酸序列。

[0127] 与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如抗原结合部分或重链可变区),其包含重链的CDR-H1(含有或本质上由序列编号1中记载的氨基酸序列组成)、CDR-H2(含有或本质上由序列编号2中记载的氨基酸序列组成)和CDR-H3(含有或本质上由序列编号3中记载的氨基酸序列组成)。与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如抗原结合部分或轻链可变区),其包含轻链的CDR-L1(含有或本质上由序列编号4中记载的氨基酸序列组成)、CDR-L2(含有或本质上由氨基酸序列ATS组成)和CDR-L3(含有或本质上由序列编号5中记载的氨基酸序列组成)。与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如,抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:重链的CDR-H1(含有或本质上由序列编号1中记载的氨基酸序列组成)、CDR-H2(含有或本质上由序列编号2中记载的氨基酸序列组成)和CDR-H3(含有或本质上由序列编号3中记载的氨基酸序列组成),和轻链的CDR-L1(含有或本质上由序列编号4中记载的氨基酸序列组成)、CDR-L2(含有或本质上由氨基酸序列ATS组成)和CDR-L3(含有或本质上由序列编号5中记载的氨基酸序列组成)。

[0128] 与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如抗原结合部

分或重链可变区),其包含:重链的CDR-H1(含有或本质上由序列编号11中记载的氨基酸序列组成)、CDR-H2(含有或本质上由序列编号12中记载的氨基酸序列组成)和CDR-H3(含有或本质上由序列编号13中记载的氨基酸序列组成)。与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如抗原结合部分或轻链可变区),其包含:轻链的CDR-L1(含有或本质上由序列编号14或16中记载的氨基酸序列组成)、CDR-L2(含有或本质上由氨基酸序列ATS或WAS组成)和CDR-L3(含有或本质上由序列编号15或17中记载的氨基酸序列组成)。与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如,抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:重链的CDR-H1(含有或本质上由序列编号11中记载的氨基酸序列组成)、CDR-H2(含有或本质上由序列编号12中记载的氨基酸序列组成)和CDR-H3(含有或本质上由序列编号13中记载的氨基酸序列组成)、和轻链的CDR-L1(含有或本质上由序列编号14中记载的氨基酸序列组成)、CDR-L2(含有或本质上由氨基酸序列ATS组成)和CDR-L3(含有或本质上由序列编号15中记载的氨基酸序列组成)。与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如,抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:重链的CDR-H1(含有或本质上由序列编号11中记载的氨基酸序列组成)、CDR-H2(含有或本质上由序列编号12中记载的氨基酸序列组成)和CDR-H3(含有或本质上由序列编号13中记载的氨基酸序列组成),和轻链的CDR-L1(含有或本质上由序列编号16中记载的氨基酸序列组成)、CDR-L2(含有或本质上由氨基酸序列DTS组成)和CDR-L3(含有或本质上由序列编号17中记载的氨基酸序列组成)。

[0129] 与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如抗原结合部分或重链可变区),其包含:重链的CDR-H1(含有或本质上由序列编号18中记载的氨基酸序列组成)和CDR-H2(含有或本质上由序列编号19中记载的氨基酸序列组成)。与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如抗原结合部分或轻链可变区),其包含:轻链的CDR-L1(含有或本质上由序列编号20中记载的氨基酸序列组成)、CDR-L2(含有或本质上由氨基酸序列WAS组成)和CDR-L3(含有或本质上由序列编号21中记载的氨基酸序列组成)。与laeverin结合的物质例如是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体(例如,抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:重链的CDR-H1(含有或本质上由序列编号18中记载的氨基酸序列组成)和CDR-H2(含有或本质上由序列编号19中记载的氨基酸序列组成),和轻链的CDR-L1(含有或本质上由序列编号20中记载的氨基酸序列组成)、CDR-L2(含有或本质上由氨基酸序列WAS组成)和CDR-L3(含有或本质上由序列编号21中记载的氨基酸序列组成)。

[0130] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体(例如,小鼠抗体、人源化抗体或人抗体),其包含:含有或本质上由相对于序列编号6中记载的氨基酸序列具有至少70%(例如,75%以上、80%以上、85%以上、优选90%以上、更优选95%以上)的序列同一性的氨基酸序列组成的重链、和/或含有或本质上由相对于序列编号7中记载的氨基酸序列具有至少70%(例如,75%以上、80%以上、85%以上、优选90%以上、更优选95%以上)的序列同一性的氨基酸序列组成的轻链,前述重链包含含有或由序列编号1中记载的氨基酸序列组成的CDR-H1、含有或由序列编号2中记载的氨基酸序列组成的CDR-H2和含有或由序列编号3中记载的氨基酸序列组成,和前述轻链包含含有或由序列编号4中记载的氨基酸序列组成的CDR-L1、含有或由氨基酸序列ATS组成的CDR-L2、和含有或由序列编号5中记载的氨基酸组

成的CDR-L3。

[0131] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体(例如,抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:

[0132] 由核苷酸序列:ATGTCCTCTCCACAGCCCCTGAAGACACTGACTCTAACCATGGGAGGGAGCTGGA
TCTTTCTCTTCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGCCACTCTGAGATCCAGCTGCAGCAGACTGGACCTGAGCTGGT
GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCCGGTTATTCATTCACTGACTACATCATGCTCTGGGTG
AAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTAATCCTTACCATGCTGGTATTAGCTACAATCTGA
AGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCTTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGTCTGACATC
TGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGAGTAATTACGTCTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAA
GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCC
AACTAACTCCATGGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTC
TGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGTCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTG
ACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGCCAGCAGCACCAAGGTGG
ACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCAT
CTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCCAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGC
AAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGG
AGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGA
GTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCG
AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGA
TAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACAC
TCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCA
GGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTC
CTGGTAAA(序列编号8)编码的重链可变区,和/或

[0133] 由核苷酸序列:ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAA
TGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATTCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGAC
TTGCAGGGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCCTGGATT
TTTGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTATTCTCTCA
CAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCGACGTTCCGG
TGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAG
TTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGA
TTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCAT
GAGCAGCACCTCAGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACA
TCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT(序列编号9)编码的轻链可变区。序列编
号8中记载的核苷酸序列编码序列编号6中记载的氨基酸序列。序列编号9中记载的核苷酸
序列编码序列编号7中记载的氨基酸序列。

[0134] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体(例如,抗原结合部分、或Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:

[0135] 由核苷酸序列:ATGGGATGGAGCTATATCATCCTCTTCTTGTTAGCAACAGCTACATGTGTCCACT
CCCAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTC

TGGCTACACGTTACCAGCTACTGGATGAACTGGGTTAGGCAGAGGCCTGAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGG
ATTGATCCTTACGATAGTGAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCATTTTGACTGTAGACAAATCCT
CCAGTACAGTCCACATGCAACTAAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATCACTGTGCAAGAGACTACGG
TAGTAGGTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCA
TCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCT
ATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCT
GCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGC
AACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCA
TATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGAC
TCCCAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGAT
GTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTC
CCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAG
ATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGT
GGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAG
CAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCAC
AACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCACTCTCCTGGTAAATGA (序列编号27) 编码的重链可变区,和/
或

[0136] 由核苷酸序列:ATGGGCATCAAGATGGAATCACAGACTCTGGTCTTCATATCCATACTGCTCTGGT
TATATGGAGCTGATGGGAACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAC
CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTTACTTATGTTTCTGGTATCAACAGAAAACAGAGCAGTCTCCTAAA
CTGCTGATATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATT
TCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGACAGATTATCACTGTGGACAGGGTTACAGCTATCCGTA
CACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCC
AGTGAGCAGTTAATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCA
AGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCAC
CTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACT
CACAAGACATCAACTTACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG (序列编号28) 编码的轻链
可变区。序列编号27中记载的核苷酸序列编码序列编号22中记载的氨基酸序列。序列编号
28中记载的核苷酸序列编码序列编号23中记载的氨基酸序列。

[0137] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体(例如,抗原结合部分、或Fab、
Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:

[0138] 由核苷酸序列:ATGGGATGGAGCTATATCATCCTCTTCTTGTTAGCAACAGCTACATGTGTCCACT
CCCAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTC
TGGCTACACGTTACCAGCTACTGGATGAACTGGGTTAGGCAGAGGCCTGAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGG
ATTGATCCTTACGATAGTGAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCATTTTGACTGTAGACAAATCCT
CCAGTACAGTCCACATGCAACTAAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATCACTGTGCAAGAGACTACGG
TAGTAGGTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCA
TCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCT

ATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTT
GCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGC
AACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCA
TATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGAC
TCCCAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGAT
GTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCGCTCAGTCAGTGAACCTC
CCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAG
ATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGT
GGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAG
CAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCAC
AACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA (序列编号27) 编码的重链可变区,和/
或

[0139] 由核苷酸序列:ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAA
TATCCAGAGGACAAATTGTTCTACCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGTATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGAC
CTGCAGTGCCAGCTCAACTATAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATT
TATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCA
CAATCACCAGCATGGGGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCACGTTCTGG
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAG
TTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGA
TTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCAT
GAGCAGCACCTCAGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACA
TCAACTTCACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG (序列编号29) 编码的轻链可变区。序
列编号29中记载的核苷酸序列编码序列编号24中记载的氨基酸序列。

[0140] 与laeverin结合的物质例如是抗laeverin抗体(例如,抗原结合部分、或Fab、
Fab'、F(ab')₂、或Fv),其包含:

[0141] 由核苷酸序列:ATGGAATGGATCTGGATCTTTCTCTTCATCCTCTCAGGAACTGCAGGTGTCCACT
CCCAGGTTTCAAGTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGGGGCCGGGACTTCAAGTGGGCTGTCTGCAAGGCTTC
TGGCTACACCTTCACTGACTACTACATAGACTGGGTGAAGCAGAGGACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAG
ATTTATCCTAGAAGTGGTCATTCTAAGTACAACGAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCCACTGACTGCAGACAAATCCT
CCAGCACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCCCTCTATTACTA
CGGCAGTAGTCACTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCA
TCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCT
ATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTT
GCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGC
AACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACACCGGTGGACAAAAAATTGAGCCAGCGGGCCATTTCAACAATCAACC
CCTGTCTCCATGCAAGGAGTGTACAAAATGCCAGCTCCTAACCTCGAGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCC
TCCAAATATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGACACCAAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGAT
GACCCAGACGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGG

ATTACAACAGTACTATCCGGGTGGTCAGCACCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAA
ATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCATCACCCATCGAGAGAACCATCTCAAAAATTAAAGGGCTAGTCAGAGCT
CCACAAGTATACATCTTGCCGCCACCAGCAGAGCAGTTGTCCAGGAAAGATGTCAGTCTCACTTGCCCTGGTCGTGG
GCTTCAACCCTGGAGACATCAGTGTGGAGTGGACCAGCAACGGGCATACAGAGGAGAACTACAAGGACACCGCACC
AGTCCTGGACTCTGACGGTTCTTACTTCATATATAGCAAGCTCAATATGAAAACAAGCAAGTGGGAGAAAACAGAT
TCCTTCTCATGCAACGTGAGACACGAGGGTCTGAAAAATTACTACCTGAAGAAGACCATCTCCCGGTCTCCGGGTA
AATGA (序列编号30) 编码的重链可变区, 和/或

[0142] 由核苷酸序列: ATGGATTACAGGCCCAGGTTCTTATGTTACTGCTGCTATGGGTATCTGGTACCT
GTGGGGACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAACTGTGTCAGTTGGAGAGAGGGTTACTATGAGCTGCAG
GTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAACATTCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCGGGGCAGTCT
CCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGA
CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTA
TCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCA
CCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCA
ATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGA
CAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAG
GCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG (序列编号31) 编码
的轻链可变区。序列编号30中记载的核苷酸序列编码序列编号25中记载的氨基酸序列。序
列编号31中记载的核苷酸序列编码序列编号26中记载的氨基酸序列。

[0143] “细胞毒剂”包括可抑制或停止细胞的增殖、或杀死或破坏细胞的物质。细胞毒剂
例如可以是: 放射性同位素 (例如, At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 或 Lu
的放射性同位素); 化疗剂 (例如, 单甲基澳瑞他汀E (MMAE)、甲氨蝶呤、吉西他滨、阿霉素、长
春花生物碱、顺铂、异环磷酰胺 (Ifosfamide)、达卡巴嗪、卡铂、博来霉素、紫杉醇、卡铂、长
春瑞滨、伊立替康 (CPT-11)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素、厄洛替
尼或其它嵌入剂、或成长抑制剂); 核酸分解酶等酶、或其片段; 毒素 (例如, 包含细菌、真菌、
植物或动物起源的小分子毒素或酶活性毒素、或它们的片段和/或突变体); 或它们的组合。

[0144] “包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质”例如可以通过使与laeverin结合的物质
与细胞毒剂结合而制备。前述结合例如可以是直接结合或间接结合。直接结合例如是共
价键。直接结合例如通过过碘酸法、戊二醛法、马来酰亚胺法和N-羟基琥珀酰亚胺法形成。
与laeverin结合的物质与细胞毒剂的直接结合例如包括, 与laeverin结合的物质与细胞毒
剂经由接头以共价键结合。间接结合例如是非共价结合。间接结合例如经由生物素-链霉抗
生物素蛋白的结合形成。

[0145] 包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如包含: 至少1种抗laeverin抗体, 和选
自放射性同位素和化疗剂、酶或它们的片段、和毒素的至少1种 (例如, 1种、2种或3种以上)
细胞毒剂。包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如包含: 1种与laeverin结合的物质,
和选自放射性同位素、化疗剂、酶或它们的片段、和毒素的1种细胞毒剂。包含细胞毒剂的与
laeverin结合的物质例如包含: 抗laeverin抗体, 和化疗剂或放射性同位素或它们的组合。
包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如包含抗laeverin抗体和化疗剂。

[0146] 包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如包含1个与laeverin结合的物质和至

少1个(例如,1个、2个或3个以上)细胞毒剂。包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如包含:1个抗laeverin抗体,和选自放射性同位素、化疗剂、酶或它们的片段、和毒素的1种细胞毒剂的多个。包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如包含:1个抗laeverin抗体、和多个化疗剂或放射性同位素或它们的组合。包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如包含1个抗laeverin抗体和多个或1个化疗剂。

[0147] 术语“癌细胞”意味着显示不受控制的细胞增殖和/或侵袭的特性的细胞。癌细胞例如支架依赖性或非依赖性增殖。癌细胞可形成聚集多个细胞的浮游细胞块。癌细胞例如是血中循环肿瘤细胞(CTC)。术语“血中循环肿瘤细胞”或“CTC”意味着从原发灶肿瘤组织或转移肿瘤组织分离、在血流中循环的癌细胞。癌细胞例如是血管内或淋巴管内存在的表达laeverin的癌细胞。

[0148] 术语“IDO1”或“吡啶胺2,3-双加氧酶-1”意味着将色氨酸代谢为犬尿氨酸的犬尿氨酸途径的限速酶(参见日本药理杂志(Folia Pharmacol.Jpn.)142,85-88(2013))。肿瘤细胞中IDO1高表达时,前述肿瘤细胞周边的T细胞和NK细胞抑制其增殖,或凋亡(参见日本药理杂志(Folia Pharmacol.Jpn.)142,85-88(2013))。通过IDO1,诱导调节性T细胞(Treg)的分化。Treg通过在表达IDO1的癌细胞的周边环境聚集,前述癌细胞的生存被助长(Liu et al.,Targeting the IDO1 pathway in cancer:from bench to bedside.Journal of Hematology&Oncology(2018)11:100)。在接受头颈部鳞状细胞癌的治疗的对象群中,从血液中的CTC检测到编码IDO1的mRNA的对象组与未检测到该mRNA的对象组相比,总生存期短(Economopoulou P,et.al.,Prognostic impact of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)mRNA expression on circulating tumour cells of patients with head and neck squamous cell carcinoma.ESMO Open.2020May;5(3):e000646.doi:10.1136/esmoopen-2019-000646.PMID:32414944;PMCID:PMC7232623.)。IDO1例如可以通过检测或定量编码IDO1的mRNA测定。前述mRNA例如可以用应用逆转录酶的定量PCR(RT-qPCR)检测或定量。

[0149] 本公开的实施例显示,在复发和/或转移癌患者来源的血液样本中,存在表达laeverin的CTC。本公开此外显示,前述CTC表达吡啶胺2,3-双加氧酶-1(IDO1)。可通过本公开的药物组合物处置的癌例如是检测到表达laeverin的癌细胞(例如CTC)的对象中的癌。可通过本公开的药物组合物处置的癌例如是检测到表达laeverin和IDO1的癌细胞(例如CTC和在淋巴管内浮游的癌细胞)的对象中的癌。通过本公开的药物组合物处置的癌例如是用化学疗法和/或放射线疗法处置后的癌。

[0150] 本公开的实施例提示,表达laeverin的癌细胞通过自身表达的IDO1和在前述癌细胞周边可从单核细胞分化诱导的树突细胞中表达的IDO1,形成能够避免来自免疫系统的攻击的肿瘤微环境(TME)。本公开的实施例提示,与laeverin结合的物质可抑制IDO1在前述癌细胞中表达,和通过与前述癌细胞接触阻止从单核细胞分化为表达IDO1的树突细胞。通过与laeverin结合的物质与癌细胞的细胞膜上的laeverin结合,例如因其结合产生的空间位阻,前述癌细胞可避免来自免疫系统的攻击的TME的形成被抑制,前述癌细胞可接受来自免疫系统的攻击。因此,与laeverin结合的物质可以在用于处置癌的药物组合物的制备中利用。

[0151] 术语“癌”意味着广范围的肿瘤。肿瘤例如包括肺癌、前列腺癌、乳癌、乳腺癌、胰腺

癌、胃癌、直肠癌、结肠癌、大肠癌、甲状腺癌、肝癌、胆癌、神经胶质瘤、神经胶质母细胞瘤、子宫癌、宫颈癌、肾癌、卵巢癌、输卵管癌、食道癌、黑色素瘤、肉瘤、血液癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌。本公开的实施例显示,表达或可以表达laeverin(例如,在淋巴管内浮游等对细胞的生存苛刻的状况下或在化疗剂的存在下)的癌细胞在癌的转移(例如全身转移)和/或复发(例如局部复发)中起重要作用。通过本公开的药物组合物预防或处置的癌例如是复发癌、转移性癌、或抗性癌。

[0152] 本公开的实施例显示,胎盘部位滋养细胞肿瘤表达laeverin。此外,本公开的实施例显示,外周血单核细胞之中B细胞和单核细胞表达laeverin。通过本公开涉及的药物组合物预防或处置的癌例如是绒毛膜癌、胎盘部位滋养细胞肿瘤、卵巢癌、输卵管癌、子宫癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、大肠癌、前列腺癌、或白血病。前述癌例如,绒毛膜癌、胎盘部位滋养细胞肿瘤、卵巢癌、输卵管癌、子宫癌、宫颈癌、或白血病。前述癌例如是绒毛膜癌、胎盘部位滋养细胞肿瘤、卵巢癌、输卵管癌、子宫癌、或宫颈癌。前述癌例如是绒毛膜癌或胎盘部位滋养细胞肿瘤。本公开涉及的药物组合物例如包含可以缀合细胞毒剂的与laeverin结合的物质(例如,MMAE缀合抗laeverin抗体)。

[0153] 本公开的实施例显示,抗laeverin抗体自身(不含细胞毒剂)在卵巢癌细胞中诱导细胞死亡。此外,本公开的实施例显示,抗laeverin抗体(不含细胞毒剂)在乳癌细胞株和黑色素瘤中不诱导细胞死亡。通过包含不含细胞毒剂的与laeverin结合的事物的药物组合物预防或处置的癌例如是绒毛膜癌、胎盘部位滋养细胞肿瘤、卵巢癌、输卵管癌、子宫癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、大肠癌、前列腺癌、或白血病。前述癌例如,绒毛膜癌、胎盘部位滋养细胞肿瘤、卵巢癌、输卵管癌、子宫癌、或宫颈癌。前述癌例如是卵巢癌、输卵管癌、子宫癌、或宫颈癌。

[0154] “癌的复发”或“复发癌”意味着,癌对包含化学疗法和/或外科手术的处置应答后,癌细胞在原发部位或远端部位的任一或其两者中增殖,或存在该增殖的可能性。局部复发癌意味着,对前述处置应答后癌细胞在原发部位增殖,或存在该增殖的可能性。“癌的转移”或“转移癌”意味着,癌细胞从身体的1个部分(例如子宫)扩散到身体的另一部分(例如肺),或存在该扩散的可能性。复发癌或转移癌例如是,参照公知的基准鉴定为具有复发或转移的危险性的癌、或复发或转移的癌。转移癌可以是进行包含外科手术的处置后的癌,也可以是未处置的癌。

[0155] “抗性癌”意味着,尽管包含化学疗法或免疫疗法等生物学疗法的癌疗法应用于对象,癌细胞也在前述对象中增殖,或存在该增殖的可能性。“癌疗法”包括哺乳动物中癌的治疗中使用的治疗剂(例如,放射性同位素和化疗剂(包含免疫治疗剂))、放射线疗法、和外科手术等外科干预。

[0156] “药物组合物”是包含用于预防或处置癌的至少1种有效成分、和药物上容许的载体的混合物。本公开涉及的药物组合物例如包含本公开涉及的与laeverin结合的物质、和药物上容许的载体。药物组合物在不损害本公开涉及的与laeverin结合的事物的效果的范围,可以与用于预防或处置癌的其它有效成分(例如化疗剂)联用。联用包括在施用本公开涉及的与laeverin结合的物质之前、之后、或同时施用前述其它有效成分。在癌是抗性癌的情形中,本公开涉及的药物组合物可以在化学疗法等癌疗法应用后或应用中施用。

[0157] 药物组合物例如可以是固体形态或液体形态。药物组合物例如可以是胶囊剂、锭

剂、粉剂、液剂、悬浮剂、注射剂、或栓剂。药物组合物可以按照公知的方法配制。药物组合物例如可以通过将本公开涉及的与laeverin结合的物质与药物上容许的载体混合而配制。本公开涉及的药物组合物可以通过公知的施用方法向对象施用。公知的施用方法例如包括经口施用和非经口施用。非经口施用例如包括肌肉内施用、腹腔内施用、静脉注射、和皮下施用。

[0158] “进行处置”或“处置”包括：除去、轻减或缓解对象中至少1种症状，延长总生存期，延长应答持续时期，延缓疾病的进展，或预防或延缓症状的发作。癌的处置例如包括癌的症状的轻减、或完全根除。癌的处置例如包括复发癌、转移癌、或抗性癌的预防或处置。

[0159] 本方式的1个实施方式提供用于处置复发癌、转移癌、抗性癌的药物组合物。通过将本公开涉及的药物组合物施用于患有癌的对象，可以处置前述对象中的癌。本公开的1个方式提供癌的处置方法，其包括向有需要的对象施用本公开涉及的药物组合物。本方式中，有需要的对象包括有处置或预防复发癌、转移癌、或抗性癌的需要对象。有需要的对象例如可以是接受癌疗法后的癌患者，也可以是接受癌疗法前的癌患者。本公开的另一方式提供预防癌的复发和/或转移的方法，其包括向有需要的对象施用本公开涉及的药物组合物。本方式涉及的药物组合物包含本公开涉及的与laeverin结合的物质，优选地，前述与laeverin结合的物质包含本公开涉及的细胞毒剂。

[0160] 术语“药物上容许的载体”意味着，在对象中安全性高、过敏反应性小的本公开涉及的治疗剂以外的任意成分。药物上容许的载体例如包含适于药物施用的水性或非水性溶剂、溶液（例如生理盐水）、防冷冻剂（例如甘油）、水溶性高分子（例如葡聚糖）、或缓冲剂（例如磷酸缓冲液）。

[0161] “对象”例如是人、人以外的哺乳动物。人以外的哺乳动物例如是：小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠等啮齿类；黑猩猩等非人灵长类；牛、山羊、绵羊等偶蹄目；马等奇蹄目；兔、狗、猫等宠物动物。对象例如是人或非人灵长类（例如，黑猩猩、猴、大猩猩、长臂猿和猩猩）。对象优选人。

[0162] （分析癌的复发、转移或抗性的方法）

[0163] 本公开的1个方式提供方法，其包括：应用与laeverin结合的物质检测有需要的对象来源的生物体样本中的表达laeverin的癌细胞，和基于检测结果分析癌的复发、转移或抗性。

[0164] “有需要的对象”例如，基于特定诊断标准被专家鉴定为患有癌症的对象。有需要的对象例如，可以是癌的分期（例如国际抗癌联盟（UICC）提出的TNM分类）中，患有I期、II期、III期、或IV期的癌的对象。有需要的对象例如可以是患有II期、III期或IV期的癌的对象。有需要的对象例如是患有III期或IV期的癌的对象。

[0165] “生物体样本”包括从对象采集的任意组织、组织片或体液。生物体样本例如是，期待包含表达laeverin的癌细胞的组织、组织片或体液。生物体样本例如是从对象采集的组织、组织片或体液自身，也可以是对其实施保存处理或杂质的除去处理的样本。生物体样本例如是，原发灶肿瘤组织的一部分、转移肿瘤组织的一部分、包含淋巴结的淋巴组织、组织匀浆、体液（例如，血液、包含血细胞成分的分级、淋巴液、胰液、胆汁、腹水）。生物体样本例如是淋巴液或淋巴组织。生物体样本例如是全血或包含外周血单核细胞的级分。包含外周血单核细胞的级分例如可以将全血提供给密度梯度离心分离和比重离心（例如：

Ficoll-Paque (注册商标)、Lymphoprep (注册商标)) 而配制。生物体样本优选血液样本或淋巴液,更优选血液样本。

[0166] 术语“表达laeverin的癌细胞”意味着表达膜结合型laeverin的癌细胞。表达laeverin的癌细胞可以是单一癌细胞的状态,或可以是包含多个表达laeverin的癌细胞的细胞块(也称为“球体”)的状态。前述球体例如可以包含表达laeverin的癌细胞和不表达laeverin的癌细胞。前述球体例如本质上由表达laeverin的癌细胞组成。前述球体例如仅由表达laeverin的癌细胞组成。

[0167] 表达laeverin的癌细胞例如可支架非依赖性地增殖。表达laeverin的癌细胞例如在血中可生存。表达laeverin的癌细胞例如在淋巴管或淋巴结内可生存。表达laeverin的癌细胞例如在肿瘤组织内部、在被死亡细胞包围的环境下可生存。表达laeverin的癌细胞例如可支架非依赖性地增殖,并且可支架依赖性地增殖。表达laeverin的癌细胞优选表达ID01。表达laeverin的癌细胞例如是CTC。表达laeverin的癌细胞与不表达laeverin的癌细胞比较基因表达模式,可以作为用于鉴定参与癌的复发和/或转移的基因的材料而利用。基因表达模式例如可以应用DNA微阵列分析。

[0168] 本方式中与laeverin结合的物质优选包含标记物质。术语“标记物质”意味着发出可捕获或可检测信号的物质。标记物质例如可以是荧光染料、磁性粒子、或它们的组合。可捕获信号例如可以是磁信号。可检测信号例如可以是光信号。

[0169] 术语“荧光物质”意味着,吸收激发光、发出比激发光的波长长的波长的光(荧光)的物质。荧光物质例如可以是荧光素、罗丹明、德克萨斯红、四甲基罗丹明、羧基罗丹明、藻红蛋白、6-FAM(商标)、Alexa Fluor(注册商标)。术语“磁性粒子”包括由没有磁场、但在暴露于磁场时形成磁偶极子的材料构成的粒子。磁性粒子例如具有约1nm~约1 μ m、约1nm~约100nm、约1nm~约10nm的粒径。磁性粒子例如由氢氧化铁、氧化铁水合物、氧化铁、混合氧化铁或铁构成。磁性粒子例如是粒径2~3nm的磁性粒子。

[0170] “检测”包括定性或定量地找到特定物质(例如,蛋白、核酸、细胞),和/或持续监测已经找到的物质。生物体样本中的表达laeverin的癌细胞的检测例如包括:将与laeverin结合的物质与前述生物体样本混合,计数前述与laeverin结合的物质所结合的癌细胞。生物体样本中的表达laeverin的癌细胞的检测例如包括:将结合了发出荧光信号的标记物质的与laeverin结合的物质与前述生物体样本混合,将前述混合液提供给FACS,计数前述与laeverin结合的物质所结合的癌细胞。前述分析方法中表达laeverin的癌细胞的检测在体外进行。

[0171] 复发、转移或抗性的分析包括,例如在检测结果显示生物体样本中存在表达laeverin的癌细胞的情形中,分析为有癌的复发、转移或抗性的危险性。癌的复发、转移或抗性的分析包括,例如在检测结果所示生物体样本中的表达laeverin的癌细胞的个数比阈值多的情形中,分析为有癌的复发和/或转移的危险性。阈值例如基于包含癌的种类、对象的年龄、体重、遗传背景、和性别的各种因子预先确定。

[0172] 本公开涉及的分析方法可以基于阈值和表达laeverin的癌细胞的检测结果或测定结果自动的或半自动地实施。因此,医生以外的医疗工作者(例如医疗信息技师、临床工程技术人员或临床检查技师)可以实施本公开涉及的分析方法。本公开涉及的分析方法不包括例如医生对人的诊断行为。不包括医生对人的诊断行为的本公开涉及的分析方法相当

于医生以外的医疗工作者提供用于医生诊断为复发癌、转移癌、或抗性癌的信息的方法。

[0173] 本公开的1个方式提供方法,其提示用于诊断对象是复发癌、转移癌、或抗性癌的信息。前述方式涉及的方法包括:应用与laeverin结合的物质检测有需要的对象来源的生物体样本中的表达laeverin的癌细胞,和基于检测结果提示用于诊断或鉴定癌的复发、转移或抗性的信息。

[0174] 通过本方式分析为抗性癌的对象可以包括在化学疗法等癌疗法应用后或应用中施用本公开涉及的药物组合物。通过本方式分析为癌的复发和/或转移的对象可以诊断或鉴定为患有复发癌和/或转移癌。因此,本公开的1个方式提供诊断或鉴定对象是否患有复发癌和/或转移癌的方法。前述方式涉及的方法包括:应用与laeverin结合的物质检测有需要的对象来源的生物体样本中的表达laeverin的癌细胞,和基于检测结果诊断或鉴定前述对象是否患有复发癌和/或转移癌。前述诊断方法或鉴定方法中表达laeverin的癌细胞的检测在体外进行。

[0175] 在1个实施方式中,在前述生物体样本是血液样本(例如全血样本、血浆样本或血清样本)的情形中,表达laeverin的癌细胞是血中循环肿瘤细胞(CTC)。因此,本公开的1个方式提供诊断或鉴定对象是否具有CTC的方法。前述方式涉及的方法包括:应用与laeverin结合的物质检测有需要的对象来源的血液样本(例如,全血样本、血浆样本或血清样本)中的表达laeverin的血中循环肿瘤细胞,和基于检测结果诊断或鉴定前述对象是否具有CTC。

[0176] 本公开的1个方式提供鉴定癌干细胞是否存在的方法。前述方式涉及的方法包括:应用与laeverin结合的物质检测有需要的对象来源的生物体样本中的表达laeverin的癌细胞,和基于检测结果鉴定癌干细胞是否存在。

[0177] 通过本方式分析为复发癌、转移癌、或抗性癌的对象可以实施预防或治疗复发癌、转移癌、或抗性癌的方法。因此,本公开的1个方式提供预防或治疗癌的复发、转移或抗性的方法,其包括:应用与laeverin结合的物质检测有需要的对象来源的生物体样本中的表达laeverin的癌细胞;基于检测结果,分析或鉴定前述对象为复发、转移或抗性;和向分析或鉴定为癌的复发、转移或抗性的对象,施用本公开涉及的药物组合物或用于处置癌的药物组合物。前述用于处置癌的药物组合物例如可以包含公知的抗癌剂、或公知的免疫治疗剂、或它们的组合剂。前述用于处置癌的药物组合物可以包含与laeverin结合的物质。

[0178] (鉴定损害表达laeverin的癌细胞的物质的方法)

[0179] 本公开的1个方式提供鉴定损害表达laeverin的癌细胞的物质的方法,其包括:在可与被验物质接触的条件下培养表达laeverin的癌细胞,和基于培养结果将前述被验物质鉴定为损害表达laeverin的癌细胞的物质。

[0180] “被验物质”例如,低分子化合物、蛋白(例如抗体)、DNA、RNA、低分子干扰RNA、或反义寡核苷酸。被验物质例如,与laeverin结合。被验物质优选以规定的结合能力与laeverin结合,并且具有细胞毒性的特性。被验物质例如是包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质。包含细胞毒剂的与laeverin结合的物质例如,细胞毒剂和与laeverin结合的物质直接结合。

[0181] 表达laeverin的癌细胞例如可以从癌细胞株或生物体样本配制。生物体样本例如,癌患者来源的血液或淋巴液等体液或肿瘤组织或其一部分。癌细胞株例如可以从生物体样本按照公知的方法配制。癌细胞株例如可商购得到。生物体样本可以应用公知的方法

从对象得到。

[0182] 表达laeverin的癌细胞的配制包括：例如，应用包含标记物质的与laeverin结合的物质（以下也称为“laeverin检测试剂”），从生物体样本取得表达laeverin的癌细胞。前述配制方法包括：例如，将生物体样本与laeverin检测试剂混合，形成前述癌细胞与前述laeverin检测试剂的复合物，基于前述复合物中的前述laeverin检测试剂来源的信号取得前述复合物。前述复合物的取得例如可以应用单细胞/组织挑取装置、FACS、或MACS或它们的组合进行。表达laeverin的癌细胞的配制方法包括：例如，除去生物体样本中的至少1个杂质，浓缩作为目标的表达laeverin的癌细胞。表达laeverin的癌细胞例如可以是CTC。CTC可以按照从自对象采集的血液样本（例如，全血样本、血浆样本或血清样本）、从前述生物体样本配制表达laeverin的癌细胞的方法或本公开的实施例中记载的配制方法配制。

[0183] 表达laeverin的癌细胞的配制例如，可以通过浮游培养配制癌细胞株。浮游培养包括，例如，将癌细胞株在低吸附性培养板中振荡、同时培养。浮游培养包括，例如，将癌细胞株在低吸附性管中旋转、同时培养。浮游培养包括，例如，通过Hanging drop法培养。癌细胞株的浮游培养可以在公知的细胞培养条件下实施。用Hanging drop法的培养包括在公知的培养条件下培养1天~3天、1天~2天或1天。

[0184] 公知的细胞培养条件包括，例如在37℃、5%CO₂下维持。培养温度例如是37℃。CO₂浓度例如是5%。浮游培养例如，应用基本培养基或添加了添加剂的培养基。“基本培养基”可以按照公知的方案配制，或可以商购得到。基本培养基例如是，Dulbecco改良Eagle培养基（DMEM）、最小必需培养基（MEM）、或基本培养基Eagle（BME）。添加剂例如包括血清、生长因子或营养素或它们的组合。

[0185] 在可与被验物质接触的条件下的表达laeverin的癌细胞的培养包括，例如，在基本培养基中添加被验物质的培养基中培养。前述培养例如是粘附培养或浮游培养。前述培养例如是粘附培养。前述培养例如是浮游培养。

[0186] 将被验物质鉴定为损害表达laeverin的癌细胞的物质包括，在培养结果例如以下所示的情形中，将被验物质鉴定为抑制或停止癌细胞的增殖、或杀死或破坏癌细胞的物质。

[0187] 在表达laeverin的癌细胞的数目在培养前与培养后相同的情形中，可以将被验物质鉴定为能够停止表达laeverin的癌细胞的增殖的物质。在表达laeverin的癌细胞的数目在培养后比培养前减少的情形中，可以将被验物质鉴定为能够杀死或破坏表达laeverin的癌细胞的物质。在与添加被验物质的培养基中培养的表达式laeverin的癌细胞的增殖率相比、不含被验物质的培养基中培养的表达式laeverin的癌细胞（阴性对照）的增殖率小的情形中，可以将被验物质鉴定为抑制表达式laeverin的癌细胞的增殖的物质。增殖率是培养后的细胞数相对于培养前的细胞数的比例。

[0188] （鉴定对癌的复发、转移或抗性产生影响的因子的方法）

[0189] 本公开的1个方式提供鉴定对癌的复发、转移或抗性产生影响的因子的方法，其包括：将表达式laeverin的癌细胞与不表达式laeverin但与前述癌细胞起源相同的癌细胞比较，鉴定遗传因子或蛋白性因子的差异。

[0190] 表达式laeverin的癌细胞例如可以从癌细胞株或生物体样本配制。表达式laeverin的癌细胞例如，可以通过应用laeverin检测试剂从生物体样本（肿瘤组织或肿瘤组织片）取得表达式laeverin的癌细胞而配制。表达式laeverin的癌细胞例如，可以通过将癌细胞株浮游培

养而配制。

[0191] 术语“不表达laeverin的癌细胞”意味着,显示粘附培养的癌细胞株中的laeverin的表达量的不足2倍的表达量的癌细胞。该上下文中laeverin的表达量是编码laeverin的mRNA的量。编码laeverin的mRNA量通过RT-qPCR测定。编码laeverin的mRNA量例如是相对于编码肌动蛋白等的mRNA标准化的值。不表达laeverin的癌细胞例如是,显示绒毛外滋养层细胞(EVT)来源的Swan71细胞中的laeverin的表达量的不足2倍的表达量的癌细胞。不表达laeverin的癌细胞例如,可以是单一细胞的状态,或可以是细胞块(例如球体)的状态。

[0192] 不表达laeverin的癌细胞例如,可以从癌细胞株或生物体样本配制。前述配制方法例如,可以通过将癌细胞株粘附培养而配制。前述配制方法包括,例如,将生物体样本与laeverin检测试剂混合,形成前述癌细胞与前述laeverin检测试剂的复合物,和基于从癌细胞未检测到前述laeverin检测试剂来源的信号取得前述癌细胞。前述配制方法可以进一步包括,基于检测到前述复合物中的前述laeverin检测试剂来源的信号取得前述复合物。前述复合物的取得、和不结合laeverin检测试剂的癌细胞、即不表达laeverin的癌细胞的取得分别地例如,可以应用单细胞/组织挑取装置、FACS、或MACS或它们的组合进行。

[0193] 本方式中,不表达laeverin的癌细胞是与表达laeverin的癌细胞起源相同的癌细胞。该上下文中的术语“相同起源”意味着,表达laeverin的癌细胞和不表达laeverin的癌细胞来源于相同的动物物种,且来源于相同的原发灶肿瘤组织。相同的动物物种例如,可以是相同的个体,或可以是不同的个体。来源于相同的原发灶肿瘤组织的癌细胞例如,可以是不表达laeverin的癌细胞与表达laeverin的癌细胞共同来源于相同的原发灶肿瘤组织,或可以是一个来源于原发灶肿瘤组织、另一个来源于转移肿瘤组织。

[0194] 遗传因子包含例如,基因序列中的突变、转录的有无或其程度、和对DNA甲基化等化学修饰。蛋白性因子包含例如,对组蛋白甲基化和泛素化等化学修饰、表达的有无或其程度、和糖基化等翻译后修饰。

[0195] 遗传因子或蛋白性因子的差异的鉴定不排除鉴定遗传因子的差异和蛋白性因子的差异两者。遗传因子或蛋白性因子的差异的鉴定例如,可以通过比较遗传因子的测定结果或蛋白性因子的测定结果进行。测定结果例如,可以是电子数据。本公开的1个方式提供鉴定对癌的复发、转移或抗性产生影响的因子的方法,其包括:将关于表达laeverin的癌细胞中遗传因子或蛋白性因子的测定结果、与关于不表达laeverin但与前述癌细胞起源相同的癌细胞中前述因子的测定结果比较,鉴定遗传因子或蛋白性因子的差异。

[0196] (laeverin作为癌干细胞的生物标记物的应用)

[0197] 本公开的1个方式提供laeverin作为癌干细胞的生物标记物的应用。本公开的另一方式提供由laeverin组成的癌干细胞的生物标记物。

[0198] 本公开的实施例显示,在原发灶肿瘤组织的内部,被坏死的癌细胞包围的生存的癌细胞表达laeverin。提示这些表达laeverin的癌细胞抑制自身的细胞增殖速度等而可在周围的癌细胞死亡的环境下生存。此外,本公开的实施例显示,表达laeverin的癌细胞进入淋巴管和血管内,避免来自免疫系统的攻击,同时在体内循环,可转移至与原发灶肿瘤组织不同的脏器(例如淋巴结)。进一步,本公开的实施例显示,转移组织内的癌细胞不表达或弱表达laeverin,进一步,从转移组织脱离的癌细胞强表达laeverin。进一步,本公开的实施例显示,对化疗剂有抗性的癌细胞表达laeverin。这些特征考虑为癌的复发和/或转移的原

因,与癌干细胞具备的特征相似。因此,laeverin可作为癌干细胞的生物标记物利用。

[0199] 如上述,本公开的实施例显示,表达laeverin的癌细胞进入淋巴管或血管内,可转移至与原发灶肿瘤组织不同的脏器。该特征与癌的复发和/或转移的机制对应。因此,laeverin可作为癌的复发和/或转移的生物标记物利用。本公开的1个方式提供laeverin作为癌的复发和/或转移的生物标记物的应用。本公开的另一方式提供由laeverin组成的癌的复发和/或转移的生物标记物。

[0200] 术语“癌干细胞”意味着具有静止期的癌细胞。术语“静止期”意味着生存细胞密度大致恒定(即测定误差内)的时期。处于静止期的癌干细胞例如,生存细胞密度大致恒定至少24小时(例如,36小时以上)。癌干细胞在脱离静止期处于增殖期时可非对称分裂。术语“非对称分裂”意味着产生彼此不同的子细胞的细胞分裂。在癌干细胞的非对称分裂中,可产生癌干细胞和从癌干细胞分化的癌细胞。术语“增殖期”意味着生存细胞密度增加的时期。增殖期可通过形态测定或生化测定分为DNA的合成期(S期)、分裂期(M期)、和这些期之间的Gap期(G1期和G2期)。

[0201] 术语“生物标记物”意味着,由细胞、组织、或体液中存在的肽(包含蛋白)或核酸(包含基因或其转录产物)等生物体内物质组成的物质,根据其存在量、浓度可为疾病的存在、变化、进展度、治疗效果的程度的指标的状态。本公开中的生物标记物是laeverin。laeverin例如,作为转移癌、复发癌或抗性癌的生物标记物利用。laeverin例如,作为癌干细胞的生物标记物利用。

[0202] laeverin作为生物标记物的应用包括,例如,为了鉴定癌干细胞是否存在,检测有需要的对象来源的生物体样本中表达laeverin的癌细胞是否存在。laeverin作为生物标记物的应用包括,为了鉴定对象为癌的复发、转移或抗性,检测前述对象来源的生物体样本中表达laeverin的癌细胞是否存在。表达laeverin的癌细胞可以按照公知的免疫学的方法、特别是本公开中记载的方法(例如实施例中记载的方法)检测和/或测定。

[0203] 本说明书中的术语“包含”意味着,存在列举的要素和/或步骤,也可以追加其它要素和/或步骤。本说明书中的术语“由……组成”意味着,存在列举的要素和/或步骤,排除其它要素和/或步骤。本说明书中的术语“本质上由……组成”意味着,存在列举的要素和/或步骤,其它要素和/或步骤可以在不影响药物组合物、和鉴定方法的新技术的特征的范围追加。本说明书中的术语“实质上不含”不排除“完全不含”。

[0204] 除非特别指明,本公开涉及的特定方式中实施方式的说明和术语的说明也适用于本公开中的其它方式中的实施方式和术语。

[0205] 以下,记载了具体实施例,但它们显示本公开的优选实施方式,不限定所附权利要求书范围中记载的发明。

[0206] [实施例1]癌细胞球体中的laeverin表达

[0207] (材料)

[0208] 作为乳腺癌细胞,应用MCF7细胞株、SKBR3细胞株和BT20细胞株。作为黑色素瘤细胞,应用A375细胞株和SK-MEL28细胞株。作为子宫体癌细胞,应用HEC6细胞株和HEC108细胞株。作为卵巢癌细胞,应用SKOV3细胞株。

[0209] (粘附培养)

[0210] 将癌细胞在粘附细胞用培养皿中在37℃预培养。在达到90~100%汇合的情形中

回收培养细胞。将回收的培养细胞以每1孔为 1×10^5 个细胞的方式接种,在37℃静置培养24小时。

[0211] (浮游培养)

[0212] 将预先培养的癌细胞在浮游细胞用培养皿或超低粘附培养板中以每1孔为 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞的方式接种,在37℃培养形成球体。回收培养细胞,移入烧瓶。将前述烧瓶在波动式振荡器中在37℃培养24~72小时。

[0213] (荧光免疫染色法)

[0214] 将粘附培养或浮游培养的细胞应用4%低聚甲醛固定。应用抗laeverin抗体(具体地,应用单克隆5-23抗体(10 μ g/ml)或抗LVRN抗体)和用Alexa488缀合的绵羊抗小鼠IgG抗体研究固定的细胞中的laeverin表达。核染色应用Hoechst33342。粘附培养上述的各癌细胞株(比较例1~8)。作为阳性对照,应用作为绒毛外滋养层细胞(EVT)来源的Swan71细胞的、过度表达laeverin的Swan71 LVRN。

[0215] 粘附培养的MCF7细胞(比较例1)不表达laeverin(图1a)。粘附培养的阳性对照表达laeverin(图1d)。在其它细胞株中也进行同样的试验(比较例2~8)。粘附培养的其它细胞株也不表达laeverin。laeverin的免疫染色应用5-23抗体。这些结果总结于下述的表。

[0216] [表1]

[0217]	细胞株	培养细胞的状态	laeverin表达
比较例1	MCF7	粘附细胞	否
比较例2	SKBR3	粘附细胞	否
比较例3	BT20	粘附细胞	否
比较例4	A375	粘附细胞	否
比较例5	SK-MEL28	粘附细胞	否
比较例6	HEC6	粘附细胞	否
比较例7	HEC108	粘附细胞	否
比较例8	SKOV3	粘附细胞	否
试验例1	MCF7	球体	是
试验例2	SKBR3	球体	是
试验例3	BT20	球体	是
试验例4	A375	球体	是
试验例5	SK-MEL28	球体	是
试验例6	HEC6	球体	是
试验例7	HEC108	球体	是
试验例8	SKOV3	球体	是

[0218] 否:不能确认laeverin的表达

[0219] 是:能够确认laeverin的表达

[0220] 将上述癌细胞株分别浮游培养,形成球体(试验例1~8)。MCF7细胞球体(试验例1)表达laeverin(图2a和图2c)。关于其它细胞株也进行同样的试验(试验例2~8)。通过浮游培养形成球体的细胞株全部表达laeverin。laeverin的免疫染色应用5-23抗体或抗LVRN抗体。这些结果总结于上述的表。

[0221] 实施例1显示,癌细胞在通过粘附培养支架依赖性地增殖的情形中不表达laeverin,但在通过浮游培养支架非依赖性地增殖的情形中表达laeverin。实施例1显示,癌细胞的球体(细胞块)表达laeverin。

[0222] [实施例2-1]癌细胞球体中的laeverin的表达量

[0223] 将各培养细胞与实施例1同样地粘附培养或浮游培养(72小时的振荡培养),研究培养癌细胞中的laeverin的表达水平(图3)。在通过粘附培养支架依赖性地培养的A375细胞株(图3a~d)和A2780细胞株(图3i~l)中,未观察到laeverin的表达(图3b和图3j)。在通过浮游状态支架非依赖性地培养的癌细胞球体中(图3e~h和m~p),观察到laeverin的表达(图3f和图3n)。这些结果与实施例1中的结果相同。

[0224] (RT-qPCR)

[0225] 将A375细胞株和A2780细胞株分别粘附培养。回收培养细胞,分别回收总RNA。同样地,将前述细胞分别应用波动式振荡器浮游培养,形成球体。回收前述球体,分别回收总RNA。应用回收的各总RNA,用RT-qPCR测定编码laeverin的mRNA的量。前述mRNA的量反映laeverin的表达水平。RT-qPCR中,应用扩增laeverin序列的引物组和逆转录酶。A375细胞中,与粘附培养的情形相比,在浮游培养的情形中,laeverin的表达量也多约14倍(图4a)。在A2780细胞的情形中也同样地,在浮游培养的情形中,laeverin的表达量多约8倍(图4b)。

[0226] CaSki细胞株和SiHa细胞株分别是被人乳头瘤病毒16(HPV16)感染的宫颈癌细胞株。将前述细胞分别粘附培养,回收培养细胞。将前述细胞分别浮游培养(用超低粘附培养板振荡培养24小时),形成球体。回收前述球体。从回收的粘附培养细胞和浮游培养细胞(球体),分别回收总RNA。应用总RNA,研究laeverin的表达水平。其结果,前述细胞球体中的laeverin的表达量比粘附培养的相同细胞中的表达量多约3.5倍(图4c和图4d)。

[0227] 实施例1和实施例2显示,即使不表达laeverin的癌细胞,通过浮游培养支架非依赖性地增殖时,也表达laeverin或其表达亢进。

[0228] [实施例2-2]

[0229] (材料)

[0230] 作为黑色素瘤细胞,应用A375细胞株。作为结肠癌细胞,应用HCT116细胞株。作为乳癌细胞,应用HCC38细胞株。作为前列腺癌细胞,应用LNCap细胞株、DU145细胞株和PC-3细胞株。

[0231] (球体形成)

[0232] 将预先培养的癌细胞在超低粘附培养板中以每1孔为 1×10^5 个细胞的方式接种,在37℃培养3~4天形成球体。回收培养细胞,移入烧瓶。将前述烧瓶在波动式振荡器中在37℃培养7天。

[0233] (荧光免疫染色法)

[0234] 将形成的球体以与实施例1同样的方法提供给荧光免疫染色法,关于该球体是否表达laeverin进行试验。laeverin的免疫染色应用5-23抗体。

[0235] 实施例2-2显示,形成球体的黑色素瘤细胞(A375)、结肠癌细胞(HCT116)、乳癌细胞(HCC38)和前列腺癌细胞(LNCap、DU145和PC-3)表达laeverin。这些结果总结于以下的表。

[0236] [表2]

[0237]		细胞株	培养细胞的状态	laeverin表达
	试验例9	A375	球体	是
	试验例10	HCT116	球体	是
	试验例11	HCC38	球体	是
	试验例12	LNCap	球体	是
	试验例13	DU145	球体	是
	试验例14	PC-3	球体	是

[0238] 否:不能确认laeverin的表达

[0239] 是:能够确认laeverin的表达

[0240] (RT-qPCR)

[0241] 以与实施例2同样的方法用RT-qPCR测定浮游培养的球体中的前述癌细胞中laeverin的表达水平。此外,用RT-qPCR测定粘附培养的单层中的前述癌细胞中laeverin的表达量。各表达水平相对于Hprt1的表达水平标准化(图20)。

[0242] 图20显示,实施例2-1中应用的癌细胞通过形成球体表达laeverin。具体地,对于黑色素瘤细胞株A375,与单层中的laeverin表达水平相比,球体中的laeverin表达水平也多约79倍。同样地,对于结肠癌细胞株HCT116,球体中的表达水平多约33倍。对于乳癌细胞株HCC38,球体中的表达水平多约37倍。对于前列腺癌细胞株LNCap、DU145和PC-3,分别地,球体中的表达水平多约7倍、约11倍和约13倍。

[0243] 实施例1和实施例2-2显示,各种癌(例如,乳腺癌、黑色素瘤、子宫体癌、卵巢癌、结肠癌、乳癌和前列腺癌)的细胞通过形成球体高表达laeverin。

[0244] [实施例3]血中循环肿瘤细胞(CTC)中的laeverin表达

[0245] (分离CTC的方法)

[0246] 从被验者来源的外周血样本回收包含外周血单核细胞(PBMCs)的级分。从前述级分除去表达CD45的PBMCs,配制浓缩了血中循环肿瘤细胞(CTC)的血液样本。从前述血液样本鉴定共表达laeverin和EpCAM的CTC。通过分离鉴定的CTC,配制CTC。

[0247] 更具体地,CTC的分离用以下的程序进行。

[0248] 从被验者采集外周血7ml,将采集的全血提供给应用Ficoll-Paque(注册商标)的密度梯度离心分离和比重离心,从全血配制外周血单核细胞(PBMCs)。将前述外周血单核细胞与小鼠/单克隆抗LVRN抗体(10 μ g/ml)和兔/多克隆抗EpCAM抗体(10 μ g/ml)混合,将得到的混合液在室温温育30分钟。将前述混合液与Alexa488缀合/山羊抗小鼠IgG抗体(1:500稀释)和CF555缀合/山羊抗兔IgG抗体(1:500)混合,将前述混合液在室温温育30分钟。将前述混合液与固定了抗CD45抗体的磁珠混合,将得到的混合液在4℃温育15分钟。温育后,将前述混合液与BV421缀合抗CD45抗体混合,将得到的混合液在4℃进一步温育30分钟。

[0249] 将温育后的前述混合液提供给磁细胞分离装置(MACS),通过除去CD45阳性细胞,浓缩CD45阴性细胞。将浓缩的细胞分注到96孔的细胞成像板的各孔,用荧光显微镜观察。在观察的细胞中,将满足CTC基准的细胞鉴定为血中循环肿瘤细胞(CTC)。

[0250] 应用的CTC基准是LVRN阳性和/或EpCAM阳性,CD45阴性。从显示CTC的存在的孔回收包含CTC的培养液,在35mm培养皿上制备前述培养液的液滴。应用Unipick(注册商标)单细胞/组织挑取装置,从前述液滴中的细胞群中分离和回收满足CTC基准的细胞。

[0251] (样品A和B)

[0252] 患者A患有IIIB期的宫颈癌,具有多发性淋巴结转移。患者A同时接受化学放射线疗法(CCRT)后,癌复发。癌复发后,接受应用紫杉醇和卡铂的抗癌剂的组合的疗法(TC疗法),随后,接受应用顺铂和长春瑞滨的抗癌剂的组合的疗法(NP疗法),进一步,接受应用伊立替康(CPT-11)的疗法。CPT-11疗法中止后,从患者A采集外周血样本(样品A)。

[0253] 患者B患有IIIC期的子宫体癌,具有多发性脑转移、皮肤转移和淋巴结转移。患者B接受腹式子宫单纯全切术(ATH)、双侧附件切除术(BSO)、大网膜切除术(OMT)、盆腔淋巴结廓清(PLAN)和主动脉旁淋巴结廓清(PAN)后,癌复发,接受TC疗法,随后,接受应用多柔比星和顺铂的抗癌剂的组合的疗法(AP疗法)。AP疗法后接受最佳支持护理(BSC)期间,从患者B采集外周血样本(样品B)。

[0254] 按照前述鉴定血中循环肿瘤细胞的方法,鉴定样品A和样品B中的CTC。图5中,白箭头所示细胞块表达laeverin(图5a)、表达EpCAM(图5b)、并且不表达CD45(图5c)。图5显示,前述细胞块是表达laeverin的CTC。

[0255] 关于样品A和样品B,按照前述CTC基准鉴定CTC。其结果,样品A中鉴定8个CTC,样品B中鉴定15个CT。样品A中鉴定的8个CTC之中,2个形成细胞块,6个作为单一细胞存在。样品A中鉴定的8个CTC之中,仅EpCAM阳性的CTC为1个,仅LVRN阳性的CTC为1个,EpCAM和LVRN两者阳性的CTC为6个。样品B中鉴定的15个CTC之中,2个形成细胞块,13个作为单一细胞存在。样品B中鉴定的15个CTC之中,仅EpCAM阳性的CTC为4个,仅LVRN阳性的CTC为2个,EpCAM和LVRN两者阳性的CTC为9个。样品B中,观察到包含CD45阳性的白细胞的CTC细胞块。这些结果总结于下述的表。

[0256] [表3]

样品	CTC 的数目	细胞块 的数目	单一细胞 的数目	LVRN- & EpCAM+	LVRN + & EpCAM-	LVRN + & EpCAM+
A	8	2	6	1	1	6
B	15	2	13	4	2	9

[0258] [实施例4]追加的生物体样本中的CTC中的laeverin表达

[0259] (样品C)

[0260] 患者C患有IIIB期的宫颈癌,具有肝转移和多发性淋巴结转移。宫颈癌的分期为IIIB期后,从患者C采集外周血样本(样品C)。

[0261] (用于CTC回收的改良方法)

[0262] 应用实施例3的CTC配制方法的改良方法从样品C分离CTC。在实施例3的CTC的分离方法中,通过除去表达CD45的PBMCs浓缩CTC,但在改良方法中,通过回收表达EpCAM的癌细

胞浓缩CTC。

[0263] 改良方法中的从样品C分离CTC用以下的程序进行。

[0264] 从被验者采集外周血,从采集的外周血回收外周血单核细胞。将回收的外周血单核细胞应用2%低聚甲醛进行细胞固定。将包含固定的细胞的样本与小鼠/单克隆抗LVRN抗体(10 μ g/ml)、Alexa488缀合抗小鼠IgG抗体(1:500稀释)和BV421缀合抗CD45抗体混合,将得到的混合液在4℃温育30分钟。将前述混合液与结合了磁珠的抗EpCAM抗体混合,将得到的混合液在4℃温育30分钟。将前述混合液提供给磁细胞分离装置(MACS),浓缩EpCAM阳性细胞。将包含浓缩的细胞的培养液10 μ L的液滴滴加到用液体石蜡包被的玻璃底皿,形成14个液滴。用荧光显微镜观察液滴中的细胞,将LVRN阳性并且CD45阴性的细胞鉴定为血中循环肿瘤细胞(CTC)。应用Unipick(注册商标)单细胞/组织挑取装置,从显示CTC的存在的液滴分离和回收CTC。

[0265] 从样品C分离5个CTC(laeveryin阳性并且CD45阴性)。分离和回收5个CTC之中的3个CTC。混合3个CTC,应用Single Cell Whole Genome Amplification Kit扩增全基因组DNA。应用扩增HPV16(E6/E7)的引物组,从扩增的基因组DNA扩增DNA片段。应用相同的引物组,从CTC分离前的外周血样本扩增的DNA扩增产物的链长(131bp)、与从分离后的CTC扩增的DNA扩增产物的链长(131bp)一致。该结果显示,表达laeveryin的CTC是被HPV16感染的癌细胞,通过CTC分离的改良方法,可以分离目标CTC。

[0266] (另一改良方法)

[0267] 在上述的改良方法中,用2%低聚甲醛固定细胞后,应用抗LVRN抗体和抗CD45抗体,分离表达laeveryin、并且不表达CD45的细胞。在另一改良方法中,用2%低聚甲醛固定细胞后,应用抗LVRN抗体和抗CD45抗体和Hoechst,分离表达laeveryin、并且不表达CD45的细胞。

[0268] 在另一改良方法中,从被验者来源的外周血样本回收包含外周血单核细胞(PBMCs)的级分。将前述级分中的细胞应用2%低聚甲醛固定。从固定的细胞回收表达EpCAM的细胞,配制浓缩CTC的血液样本。从前述血液样本,鉴定表达laeveryin、不表达CD45、并且用Hoechst染色的CTC。通过分离鉴定的CTC,配制CTC。

[0269] (样品D)

[0270] 患者D患有IVB期的宫颈癌,具有多发性淋巴结转移(骨髓、主动脉旁和锁骨上淋巴结)、左下肢DVT、外颌静脉血栓、左胰腺病(留置输尿管支架)。从患者D采集的癌组织片显示为HPV16型阳性的鳞状细胞癌。患者D接受应用顺铂和紫杉醇的抗癌剂的组合的疗法(TP疗法),随后,接受Keytruda(注册商标)(帕博利珠单抗)。接受Keytruda后,从患者D采集外周血样本(样品D)。

[0271] 应用样品D实施另一改良方法,从1ml的样品D,鉴定56个CD45阴性的CTC。该结果显示,样品D非常富含CTC。前述56个CTC之中表达laeveryin的细胞是3个。混合LVRN阳性的CTC。应用Single Cell Whole Genome Amplification Kit从得到的混合物扩增全基因组DNA(基因组DNA-p)。混合5个laeveryin阴性的CTC,配制LVRN阴性的CTC混合物。进一步配制2个LVRN阴性的CTC混合物。与上述同样地,从3个LVRN阴性的CTC混合物分别扩增全基因组DNA(基因组DNA-n1、-n2、和-n3)。应用扩增HPV16(E6/E7)的引物组,从扩增的基因组DNA(基因组DNA-p、-n1、-n2、和-n3)扩增DNA片段。

[0272] 应用相同的引物组,从CTC分离前的外周血样本扩增的DNA扩增产物的链长(131bp)、与从提取自分离后的CTC混合物的全基因组DNA(基因组DNA-p、-n1、-n2、和-n3)扩增的DNA扩增产物的链长(131bp)一致。该结果显示,用CTC分离的另一改良方法分离的CTC是感染HPV16的癌细胞,无论表达或不表达laeverin。

[0273] 在实施例3的CTC的分离方法中,通过除去表达CD45的PBMCs,浓缩CTC。用实施例3的CTC的分离方法鉴定的样品A中的8个CTC之中,仅表达EpCAM的CTC为1个(12.5%)。此外,样品B中,15个CTC之中仅表达EpCAM的CTC为4个(约27%)。在实施例4的另一改良方法中,56个CTC之中,仅表达EpCAM的CTC为53个(约95%)。在改良方法和另一改良方法中,通过回收表达EpCAM的细胞,浓缩CTC。这些结果提示,在实施例3的CTC的分离方法中,丢失EpCAM阳性的CTC的可能性。进一步,这些结果提示,在浓缩CTC的工序中,通过回收表达laeverin的细胞,可以更有效回收表达laeverin的CTC的可能性。

[0274] 实施例3和4显示,在血中循环的单一癌细胞或癌细胞块表达laeverin。

[0275] 样品A中,8个CTC之中不表达laeverin的CTC为1个(12.5%),样品B中,15个中为4个(约27%)。样品D中,56个中为53个(约95%)。对象A、对象B和对象D均具有转移癌,对象A患有IIIB期的宫颈癌,对象B患有IIIC期的子宫体癌,对象D患有IVB期的宫颈癌。考虑这些,提示在更晚期的期的癌中,即使不表达laeverin的癌细胞,也可在血中循环。相反,提示在更早期的期的癌中,表达laeverin的癌细胞可在血中循环,但不表达laeverin的癌细胞难以在血中循环。

[0276] [实施例5] laeverin对免疫细胞系统的作用

[0277] 与实施例1同样地,将CaSki细胞株在超低粘附培养板中进行24小时的振荡培养,形成浮游状态的癌细胞球体。通过RT-qPCR分别研究CaSki细胞球体中编码laeverin和吡哆胺2,3-双加氧酶-1(IDO1)的mRNA的量(图6)。对于laeverin(LVRN)的表达水平,与粘附培养CaSki细胞的情形相比,浮游培养也多约4倍(图6左侧LVRN)。该结果与实施例2的结果(图4c)同样。对于IDO1的表达水平,与粘附培养CaSki细胞的情形相比,浮游培养也多约23倍(图6右侧IDO1)。该结果显示,在表达laeverin的癌细胞球体中,IDO1的表达亢进。

[0278] 肿瘤细胞中的IDO1表达诱导肿瘤周边环境下的调节性T细胞(Treg)的分化,可助长癌细胞的生存(Liu et al., Targeting the IDO1 pathway in cancer: from bench to bedside. Journal of Hematology & Oncology (2018) 11:100)。IDO1分解色氨酸。色氨酸是T细胞的功能和生存所必需的。由于高表达IDO1的肿瘤细胞分解其周边存在的色氨酸,T细胞在前述肿瘤细胞周边其活性被抑制。基于这些,实施例5提示,表达laeverin的癌细胞或包含前述癌细胞的球体高表达IDO1,结果诱导Treg的分化,可避免来自免疫系统的攻击。

[0279] 实施例3~5提示,表达laeverin的癌细胞由于表达IDO1而可以避免血中的来自免疫系统的攻击,由此,可以在血中循环并在与原发性肿瘤组织不同的部位增殖。这显示,表达laeverin的癌细胞对癌的复发和/或转移起重要作用。

[0280] [实施例6] laeverin表达细胞对单核细胞来源细胞的作用

[0281] 将过度表达laeverin的Swan71细胞的转化体(Swan71__LVRN)与人单核细胞来源细胞株THP-1共培养。共培养在Swan71__LVRN细胞与THP-1细胞可接触的条件下进行。回收培养的THP-1细胞,提取mRNA。应用前述mRNA进行微阵列分析。与前述同样地,将Swan71细胞(对照)与THP-1共培养,关于培养的THP-1进行微阵列分析。与与对照共培养的THP-1细胞相

比,在与Swan71__LVRN共培养的THP-1细胞中,在多种基因中表达增加。

[0282] 前述多种的基因之中,关于4个基因,应用RT-qPCR研究其表达量(图7)。前述4个基因是:2'-5'-寡腺苷酸合成酶2(OAS2),干扰素诱导的蛋白、具有Tetratricopeptide重复序列1(IFIT1),IFIT3,和干扰素刺激基因、15kDa(ISG15)。

[0283] 在Swan71__LVRN细胞与THP-1细胞可接触的条件下共培养。回收培养的THP-1细胞,提取mRNA。将提取的mRNA提供给RT-qPCR,研究各基因的表达量。研究的4个基因的表达量显著增加(图7a)。除了在Swan71__LVRN细胞与THP-1细胞无法接触的条件下培养,与前述同样地,研究各基因的表达量。该培养中,包含外泌体的液性成分在包含各细胞的级分间可移动。研究的4个基因的表达量没有显著差异(图7b)。

[0284] 实施例6显示,通过与表达laeverin的细胞接触,单核细胞中特定的基因的表达增加。

[0285] [实施例7]可溶性laeverin对单核细胞来源细胞的作用

[0286] laeverin有膜结合型laeverin和分泌型laeverin。配制使分泌型laeverin与His标签融合的重组laeverin(rLVRN)。应用添加rLVRN的培养基,培养THP-1细胞。测定培养的THP-1细胞中的前述4种的基因的表达水平。其结果显示,测定的基因的表达水平随rLVRN的添加量增加而增加(图8a)。此外,前述基因的表达水平伴随添加rLVRN培养的时间的增加(4小时、8小时和12小时)而增加。

[0287] 将THP-1细胞在用荧光染料标记的rLVRN的存在下培养,显微镜下观察。其结果,观察到THP-1细胞内存在的rLVRN。该结果显示,laeverin掺入单核细胞。

[0288] 将rLVRN与结合His标签的珠混合,配制固定rLVRN的珠。将THP-1细胞在rLVRN固定珠或游离型rLVRN的存在下培养。测定培养THP-1细胞中的前述4种的基因的表达水平。与通过游离型rLVRN诱导的前述4种的基因的表达水平(■)相比,通过珠中固定的rLVRN诱导的前述4种的基因的表达水平(◆)被显著抑制(图8b)。该结果提示,对于通过laeverin的单核细胞中的前述基因的表达诱导,仅laeverin与单核细胞接触是不够的,laeverin掺入细胞内是必需的。

[0289] 实施例6和7的结果显示,单核细胞通过掺入laeverin高表达特定基因。

[0290] [实施例8]可溶性laeverin对人外周血单核细胞的作用

[0291] 将包含淋巴细胞和单核细胞的人外周血单核细胞(PBMCs)在rLVRN的存在下培养,测定OAS2、IFIT1、IFIT3和ISG15的4种基因的表达水平。与THP-1细胞中的结果同样,前述4种的基因的表达被诱导。

[0292] 研究laeverin在PBMCs的哪种细胞类型中诱导ISG15的表达。

[0293] 用Ficoll处理3ml的EDTA血配制PBMCs。将前述PBMCs应用2ml的RPMI培养基在浮游细胞用Dish中培养24小时后,在培养基中添加rLVRN1.5μg/ml、INF-β1000IU/ml或PBS(阴性对照)。进一步培养24小时,将ISG15用藻红蛋白(PE)染色。将PE染色的PBMCs提供给BD FACS Aria(商标)Fusion细胞分选仪,分为单核细胞分级和淋巴细胞分级。

[0294] 单核细胞分级中的测定显示,添加PBS的培养细胞中13.4%的单核细胞表达ISG15。分别显示,rLVRN中95.0%和INFβ中95.4%的单核细胞表达ISG15。淋巴细胞分级中的测定分别显示,PBS中29.4%、rLVRN中91.8%、和INFβ中92.6%的淋巴细胞表达ISG15。这些结果显示,laeverin在单核细胞分级和淋巴细胞分级两者中诱导ISG15的表达,和在

laeverin与INF β 之间,单核细胞分级和淋巴细胞分级中的ISG15的表达诱导没有差异。

[0295] 研究laeverin在B细胞、T细胞、和CD14阳性单核细胞的任一中是否诱导ISG15的表达。

[0296] 用Ficoll处理3ml的EDTA血配制PBMCs。将前述PBMCs应用2ml的RPMI培养基在浮游细胞用Dish中培养12小时后,在培养基中添加rLVRN1.5 μ g/ml或PBS(阴性对照)。进一步培养24小时,用PE染色ISG15,用FITC染色CD14单核细胞,用藻蓝蛋白(APC)染色作为B细胞标记物的CD19,用Brilliant Violet421(商标)(BV421(商标))染色作为T细胞标记物的CD3。将染色的PBMCs提供给BD FACS Aria(商标)Fusion细胞分选仪,分别分为CD14阳性单核细胞分级、CD19阳性B细胞分级和CD3阳性T细胞分级(CD4和CD8)。

[0297] 关于CD14阳性单核细胞分级,添加PBS的培养细胞中的平均荧光强度是1,622,与之相对,添加rLVRN的培养细胞中的平均荧光强度是42,287。关于CD19阳性B细胞分级,添加PBS的培养细胞中的平均荧光强度是478,与之相对,添加rLVRN的培养细胞中的平均荧光强度是3,031。关于CD3阳性T细胞分级,添加PBS的培养细胞中的平均荧光强度是372,与之相对,添加rLVRN的培养细胞中的平均荧光强度是3,678。这些结果显示,laeverin在CD14阳性单核细胞分级、CD19阳性B细胞分级和CD3阳性T细胞分级的任一中都诱导ISG15的表达,显示CD14阳性单核细胞分级中的ISG15的表达诱导是显著的。

[0298] 为了进一步鉴定rLVRN诱导ISG15的表达的细胞,进行细胞免疫染色。

[0299] 用Ficoll处理3ml的EDTA血配制PBMCs。将前述PBMCs应用添加rLVRN1.5 μ g/ml的2ml的RPMI培养基在浮游细胞用Dish中培养。培养24小时后回收细胞,用4%低聚甲醛处理10分钟而固定。将固定的细胞应用包含0.1%氘的PBS实施10分钟膜通透处理。ISG15用PE染色。应用针对以下的标记物的小鼠或兔抗体作为初次抗体,应用由Alexa488标记的抗小鼠或抗兔抗体作为二次抗体。应用CD14作为单核细胞系标记物。应用CD19作为B细胞标记物。应用CD4作为T细胞标记物。应用CD8作为T细胞标记物。进一步用Hoechst染色细胞核。

[0300] 用荧光显微镜观察细胞染色后的样本。观察到laeverin在CD14阳性单核细胞、CD19阳性细胞B细胞、CD4阳性T细胞和CD8阳性T细胞的全部中诱导ISG15的表达。

[0301] 关于rLVRN掺入哪类细胞诱导ISG15的表达进行研究。此外,关于通过rLVRN是否ISG15的表达诱导时间依赖性地变化进行研究。

[0302] 用Ficoll处理3ml的EDTA血配制PBMCs。将前述PBMCs应用2ml的RPMI培养基在浮游细胞用Dish中培养24后,在培养基中添加用FITC标记的rLVRN1.5 μ g/ml,进一步培养4小时或24小时。回收培养细胞,提供给BD FACS Aria(商标)Fusion细胞分选仪,将PBMCs分为单核细胞分级和淋巴细胞分级。

[0303] 淋巴细胞分级中,掺入FITC标记rLVRN的细胞在rLVRN添加4小时后为0.7%,添加24小时后为0.6%。单核细胞分级中,掺入FITC标记rLVRN的细胞在rLVRN添加4小时后为25.4%,添加24小时后为96.6%。这些结果显示,laeverin掺入单核细胞,但不掺入淋巴细胞。此外,显示laeverin时间依赖性地掺入单核细胞。

[0304] 实施例8提示,laeverin在掺入单核细胞后,在单核细胞和淋巴细胞中诱导ISG15等特定基因。

[0305] [实施例9]通过laeverin从单核细胞分化诱导为树突细胞

[0306] 研究在掺入laeverin的单核细胞中,产生哪种作用。

[0307] 用Ficoll处理3ml的EDTA血配制PBMCs。将前述PBMCs应用10ml的RPMI培养基在浮游细胞用Dish中培养。回收培养细胞,在得到的细胞悬浮液中混合CD14 Micro Beads。将前述混合液提供给Magnetic Activated Cell Sorting (MACS),取得CD14阳性细胞。将取得的CD14阳性细胞2重分注到培养孔,在各孔中添加rLVRN1.5 μ g/ml或PBS。培养24小时后,用显微镜观察培养细胞。从培养细胞提取RNA,将前述RNA提供给RT-qPCR,研究IFIT1、IFIT3、ISG15和OAS2的4种基因的表达水平。

[0308] 在rLVRN的存在下培养人外周血单核细胞来源的CD14阳性细胞时(图10a和10b的下图),与PBS存在下培养的情形比较(图10a和b的上图),观察到簇形成等形态变化。这些显微镜照片提示,单核细胞分化为树突细胞。

[0309] 下表显示,相对于PBS存在下培养的CD14阳性细胞中的前述4种的基因的表达水平,rLVRN的存在下培养的CD14阳性细胞中的前述基因的相对表达水平。下述表显示,通过laeverin,CD14阳性细胞中前述基因的表达被诱导。

[0310] [表4]

[0311]

	IFIT1	IFIT3	ISG15	OAS2
被验者A	2077	278	113	61
被验者B	7231	254	491	116
被验者C	37	13	31	7
被验者D	1448	145	613	135
平均值	2698	173	312	80
标准偏差	3140	121	284	58

[0312] 显微镜观察和RT-qPCR的结果提示,通过laeverin单核细胞分化为树突细胞,分化的树突细胞中前述4种的基因的表达被诱导的可能性。被验者C中,通过laeverin前述4种的基因的表达诱导的影响小。被验者C处于不孕治疗中。

[0313] 树突细胞(DC)相应于抗原呈递的方式可分类为下列4种:MHC I类依赖性地呈递外来抗原的树突细胞(XCR1⁺DC)、MHC II类依赖性地呈递抗原的树突细胞(CD11b⁺DC)、病毒感染时进行大量的I型IFN产生的浆细胞样树突细胞(pDC)、和炎症时从外周血液中的单核细胞分化的树突细胞(moDC)。人和小鼠中共通的各树突细胞标记物示于以下的表。

[0314] [表5]

[0315]

XCR1 ⁺ DC	CD11b ⁺ DC	pDC	moDC
MHC II类	MHC II类	MHC II类	MHC II类
CD11b(-)	CD11b(+)	CD123	CD11c
CD11c	CD11c	CD4	CD11b
FLT3	FLT3	CD14	CX ₃ CR1
XCR1	CD11b	TLR7	
CLEC9A	CX3CR1	TLR9	
CD14	CD14		
CCR7	CD4		
TLR3	CCR7		

[0316] 研究通过laeverin分化的树突细胞是哪类树突细胞。

[0317] 将PBMCs来源的CD14阳性细胞在rLVRN的存在下培养,从培养CD14阳性细胞提取RNA。应用提取的RNA,关于特定的基因(CD14、CD11c、CD123、CD80和CD86)进行RT-qPCR(图11a)。关于rLVRN的存在下培养的PBMCs、和rLVRN的存在下培养的THP-1,也同样地进行RT-qPCR(图11b和11c)。

[0318] 显示CD14阳性细胞中CD14的表达水平降低,CD123、CD80和CD86的表达水平上升,以及CD11c的表达水平无变化(图11a)。外周血单核细胞(PBMCs)中,显示与CD14阳性细胞类似的前述特定基因的表达模式,但前述基因的表达水平的变化比CD14阳性细胞显著(图11a和11b)。THP-1中,PBMCs和CD14阳性细胞显示不同倾向的前述特定基因的表达水平的变化(图11a~11c)。

[0319] 实施例9显示,laeverin使PBMCs来源的CD14阳性细胞分化为树突细胞,前述树突细胞与CD14阳性细胞相比,可分化为以表达水平降低的CD14(↓)、表达水平增加的CD123(↑)、CD80(↑)和CD86(↑)、以及表达水平不变化的CD11c(→)为特征的树突细胞。

[0320] 关注CD11c和CD123时,通过laeverin分化诱导的树突细胞是CD11c(+)CD123(+)。如表4所示,由于XCR1⁺DC、CD11b⁺DC和moDC是CD11c(+)CD123(-),考虑通过laeverin分化诱导的树突细胞与这些树突细胞子集不同。由于pDC是CD11c(-)CD123(+),考虑通过laeverin分化诱导的树突细胞与pDC子集不同。

[0321] [实施例10]通过laeverin从PBMCs化诱导的树突细胞

[0322] 研究通过laeverin从人外周血单核细胞(PBMCs)分化诱导的树突细胞的细胞标记物。

[0323] 用Ficoll处理3ml的EDTA血配制PBMCs。将前述PBMCs应用2ml的RPMI培养基在浮游细胞用Dish中培养24小时。在培养液中添加rLVRN1.5μg/ml或PBS(对照),进一步培养24小时。回收培养细胞,应用用BV421标记的抗CD14抗体、用PE标记的抗HLA-DR抗体、和用APC标记的抗CD83抗体染色。利用CD14作为单核细胞系标记物、利用HLA-DR作为抗原呈递细胞(APC)标记物、和利用CD83作为成熟树突细胞标记物。将染色的培养细胞提供给BD FACS Aria(商标)Fusion细胞分选仪。

[0324] 添加rLVRN的培养基中培养的成人女性a来源的PBMCs在高表达HLA-DR、并且不表达或低表达CD14的分级(Q1:HLA-DR(+)CD14(-))中包含19.3%的细胞群(图12a)。Q1分级中高表达CD83的细胞群(CD83(+))是22.6%(图12b)。添加PBS的培养液中培养的成人女性a来源的PBMCs在Q1分级中包含12.2%的细胞群,在Q1分级中高表达CD83的细胞群是6.5%。关于成人男性b来源的PBMCs,也进行与前述同样的试验。这些结果总结于以下的表。

[0325] [表6]

[0326]

样本	添加成分	Q1 分级中的 细胞群 [%]	Q1 分 级 中 的 CD83(+)细胞群 [%]
成人女性 a 来源 的 PBMCs	PBS	12.2	6.5
	rLVRN	19.3	26.6
成人男性 b 来源 的 PBMCs	PBS	15.1	6.8
	rLVRN	6.5	21.4

[0327] 在成人女性a来源的PBMCs中,通过将添加成分PBS替换为rLVRN,HLA-DR(+)CD14(-)(Q1分级)的细胞群从12.2%增加至19.3%。在成人男性b来源的PBMCs中,相同细胞群从15.1%减少至6.5%。这些结果显示,通过rLVRN,HLA-DR(+)CD14(-)的细胞群不一定增加。

[0328] 在成人女性a来源的PBMCs中,通过将添加成分PBS替换为rLVRN,Q1分级中的CD83(+)的细胞群从6.5%增加至26.6%。在成人男性b来源的PBMCs中,相同细胞群从6.8%增加至21.4%。这些结果提示,从PBMCs通过laeverin诱导的细胞是表达成熟树突细胞标记物的树突细胞。

[0329] 研究通过laeverin从PBMCs分化诱导的树突细胞的追加的细胞标记物。

[0330] 与上述同样地,培养PBMCs,将培养细胞提供给BD FACS Aria(商标)Fusion细胞分选仪。培养细胞应用用FITC标记的抗CD14抗体、用PE标记的抗HLA-DR抗体、用APC标记的抗CD11c抗体、和用BV421标记的抗CD123抗体染色。利用CD14作为单核细胞系标记物,利用HLA-DR作为抗原呈递细胞(APC)标记物,利用CD11c作为树突细胞标记物(主要是moDC),和利用CD123作为树突细胞标记物(主要是pDC)。

[0331] 添加rLVRN的培养基中培养的成人女性c来源的PBMCs在Q1分级(HLA-DR(+)CD14(-))中包含17.3%的细胞群。Q1分级中高表达CD11c和CD123的细胞群(CD11c(+)CD123(+))是50.7%。添加PBS的培养液中培养的成人女性c来源的PBMCs在Q1分级中包含15.2%的细胞群,在Q1分级中高表达CD11c和CD123的细胞群是3.2%。这些结果总结于以下的表。

[0332] [表7]

	样本	添加成分	Q1 分级中的 细胞群 [%]	Q1 分级中的 CD11c(+) CD123(+)细胞群 [%]
[0333]	成人女性 c 来源 的 PBMCs	PBS	15.2	3.2
		rLVRN	17.3	50.7

[0334] 在成人女性c来源的PBMCs中,通过将添加成分PBS替换为rLVRN,HLA-DR (+) CD14 (-) (Q1分级)的细胞群从15.2%增加至17.3%。Q1分级中的CD11c (+) CD123 (+)的细胞群从3.2%显著增加至50.7%。

[0335] FACS分析显示,通过在rLVRN存在下培养,从单核细胞分级全体看来,CD11c (+) 分级中CD123 (+)的细胞群增加。在增加的CD11c (+) CD123 (+) 细胞群中,显示CD14 (+) HLA-DR (+)的细胞群是约90%。这些结果显示,样本间有变动,但通过rLVRN,CD11c (+) 分级中CD123 (+) 细胞群增加。

[0336] 实施例10显示,在laeverin存在下培养的PBMCs中的CD14 (-) 细胞群中,CD83 (+) 的树突细胞增加。实施例10显示,不论CD14阳性细胞或阴性细胞,单核细胞分级中CD11c (+) CD123 (+) 的树突细胞都增加。

[0337] 关注CD123和CD11c时,从在laeverin存在下培养的PBMCs分化诱导的树突细胞是CD123 (+) CD11c (+)。如表4所示,由于XCR1+DC、CD11b+DC和moDC是CD11c (+) CD123 (-),考虑通过laeverin分化诱导的树突细胞与这些树突细胞子集不同。由于pDC是CD11c (-) CD123 (+),考虑通过laeverin分化诱导的树突细胞与pDC子集不同。该结果是与实施例9相同的结果。

[0338] [实施例11]分化诱导的树突细胞中的IDO1的表达水平

[0339] 将被验者来源的PBMCs在rLVRN的存在下培养,通过RT-qPCR研究培养细胞中的吲哚胺2,3-双加氧酶-1 (IDO1) 的表达量。将从PBMCs取得的CD14阳性细胞在rLVRN的存在下培养,与上述同样地,研究培养细胞中的IDO1的表达量 (n=2)。也应用添加PBS替代rLVRN的培养基,研究培养的PBMCs (阴性对照) 中的IDO1的表达量。计算相对于阴性对照的、各培养条件下的培养细胞中的IDO1的相对表达水平 (表7)。

[0340] [表8]

	PBMCs + rLVRN	(第 1 次尝试) CD14 阳性细胞 + rLVRN	(第 2 次尝试) CD14 阳性细胞 + rLVRN
被验者 A		1314	671
被验者 B		31652	1168
[0341] 被验者 C	26	380	170
被验者 D		221	53
被验者 E	101		
被验者 F	5.5		
平均值	44	8392	516
标准偏差	50	15514	511

[0342] 将PBMCs在laeverin的存在下培养时,观察到ID01的表达水平显著增加。将CD14阳性细胞在laeverin的存在下培养时,观察到ID01的表达水平显著增加。

[0343] 实施例9和11提示,CD14阳性细胞通过掺入laeverin,可分化为高表达ID01的树突细胞。

[0344] [实施例12]抗laeverin抗体对表达laeverin的癌细胞的作用

[0345] 对表达laeverin的癌细胞应用抗laeverin抗体。通过应用单克隆抗laeverin抗体,观察细胞表面的laeverin向细胞内的掺入。将黑色素瘤细胞A375(培养液滴20 μ L中1,000个细胞)通过hanging drop法培养1天。培养的A375细胞形成细胞块。A375细胞块中观察到表达laeverin的A375细胞(图13a)。将黑色素瘤细胞A375(培养液滴20 μ L中10个细胞)在pHrodo缀合抗LVRN抗体的存在下通过hanging drop法培养1天。培养的A375细胞形成2~3个细胞块,观察到表达laeverin的A375细胞。在表达laeverin的A375细胞中,观察到pHrodo缀合抗LVRN抗体的细胞内掺入(图13b)。在本实施例中应用的全部3种抗体(包含5-23抗体)中观察到通过抗laeverin抗体的细胞膜laeverin的细胞内掺入。

[0346] 细胞表面的laeverin的减少不能充分诱导从单核细胞向表达ID01的树突细胞的分化,由此,提示前述癌细胞暴露于来自免疫系统的攻击。该结果提示,抗laeverin抗体可有效处置鉴定了表达laeverin的癌细胞的存在复发的复发癌和/或转移癌。

[0347] 通过微阵列研究过度表达laeverin的Swan71细胞的转化体(Swan71__LVRN)、和应用5-23抗体的前述转化体中基因表达模式的差异。5-23抗体的应用导致Swan71-LVRN中特定的4种基因和ID01基因的表达量的减少。通过抗laeverin抗体的癌细胞中的ID01基因表达的减少不能充分诱导通过前述癌细胞避免来自免疫系统的攻击,由此,提示前述癌细胞

暴露于来自免疫系统的攻击。该结果提示,抗laeverin抗体可有效处置鉴定了表达laeverin的癌细胞的存在的复发癌和/或转移癌。

[0348] 将卵巢癌细胞株SKOV3浮游培养,形成球体(图14a上段)。配制将作为细胞毒剂的单甲基溴瑞他汀E(MMAE)与作为单克隆抗laeverin抗体的5-23抗体缀合的MMAE缀合5-23抗体。将前述癌细胞球体在MMAE缀合5-23抗体的存在下培养7天。随后,将前述癌细胞球体用碘化丙啶(PI)染色。观察到用碘化丙啶(PI)染色的细胞(即细胞死亡)(图14a中段)。该结果提示,包含细胞毒剂的抗laeverin抗体可有效处置鉴定了表达laeverin的癌细胞的存在的复发癌和/或转移癌。

[0349] 关于乳腺癌细胞株SKBR3和黑色素瘤SK-MEL28,也与SKOV3同样地,形成癌细胞球体,在MMAE缀合5-23抗体的存在下培养。其结果,在两者的癌细胞球体中,观察到用PI染色的细胞(即细胞死亡)。这些结果提示,通过包含细胞毒剂的抗laeverin抗体的复发癌和/或转移癌的处置在各个种类的癌中有效。

[0350] 图14b中段显示,在MMAE非缀合5-23抗体单独的存在下培养的卵巢癌细胞球体中,存在PI染色的细胞(即细胞死亡)。该结果提示,抗laeverin抗体自身(不与细胞毒剂缀合)可处置复发癌和/或转移癌。通过抗laeverin抗体自身的细胞死亡诱导作用在乳腺癌细胞株SKBR3、黑色素瘤SK-MEL28中未观察到。这些结果提示,根据癌的种类,抗laeverin抗体自身有诱导表达laeverin的癌细胞中细胞死亡的作用。

[0351] [实施例13]参与淋巴结转移的表达laeverin的癌细胞

[0352] 采集具有转移癌的卵巢癌患者的淋巴结周边的组织,进行免疫染色。图15显示输入淋巴管附近的淋巴结的免疫染色图像。图16显示输出淋巴管附近的淋巴结的免疫染色图像。图15b显示输入淋巴管内存在浮游癌细胞块。图15c显示构成前述细胞块的癌细胞表达laeverin。图15d和图15e显示,转移的淋巴结内的肿瘤部位存在表达量小的laeverin表达癌细胞。图16a和图16b显示,从转移的淋巴结内的肿瘤部位脱离的癌细胞块在输出淋巴管内存在。图16c~图16e显示,构成输出淋巴管内存在的癌细胞块的癌细胞表达laeverin。图16c显示,淋巴结内的转移灶中存在的癌细胞不表达laeverin。

[0353] 实施例13显示,从作为原发灶的卵巢癌肿瘤部位脱离的表达laeverin的癌细胞可通过输入淋巴管到达淋巴结,到达淋巴结的表达laeverin的癌细胞在淋巴结内增殖形成转移肿瘤组织(包含laeverin的表达水平低的癌细胞和不表达laeverin的癌细胞),和从转移肿瘤组织脱离的表达laeverin的癌细胞可通过输出淋巴管进一步转移。此外,实施例13显示,参与淋巴结转移的癌细胞在淋巴管内浮游等对细胞的生存严苛的状况下强表达laeverin,在如转移灶可粘附生存的状况下弱表达或不表达laeverin。

[0354] 淋巴管和淋巴结中免疫细胞聚集,其免疫功能高。本说明书的实施例显示,表达laeverin的癌细胞可以通过癌细胞自身表达IDO1避免来自免疫系统的攻击,可以通过将与laeverin接触的单核细胞分化诱导为表达IDO1的树突细胞进一步避免来自免疫系统的攻击。这些知识显示,表达laeverin或能够表达laeverin的癌细胞包含淋巴结转移,对癌的转移和/或复发、特别是全身转移可起重要作用。

[0355] [实施例14]在原发灶肿瘤组织的内部、被坏死细胞包围而生存的癌细胞

[0356] 具有转移癌的卵巢癌患者的原发灶肿瘤组织包含广范围的坏死部分(图17a)。在原发灶肿瘤组织的内部被坏死细胞包围的区域发现残存肿瘤。前述残存肿瘤表达laeverin

(图17b)。在坏死部分中,未观察到laeverin的表达(图17c)。在包括坏死部分的外侧生存的癌细胞的区域中,未观察到laeverin的表达(图17d和图17e)。

[0357] 在原发灶肿瘤组织的内部被坏死细胞包围的残存肿瘤部分观察到血管。坏死部分未观察到血管。

[0358] 实施例14显示,即使在如癌细胞坏死的对细胞的生存严苛的状况下,表达laeverin的癌细胞也可生存,或这样的严苛状况下时,能够表达laeverin的癌细胞表达laeverin而维持生存。实施例13和14的结果提示,能够表达laeverin的癌细胞在对细胞的生存严苛的状况下时表达laeverin而维持生存。实施例14中,表达laeverin的癌细胞的周边存在血管。该结果提示,通过血液中注入的抗癌剂,可处置对癌的复发和/或转移可起重要作用的表达laeverin的癌细胞。

[0359] [实施例15]化学疗法抗性的癌细胞中的laeverin

[0360] (样品E)

[0361] 卵巢癌IIIC期的患者接受TC疗法作为新辅助疗法(NAC)后,作为肿瘤缩小术(IDS)接受腹式子宫单纯全切术(ATH)、双侧附件切除术(BSO)和大网膜切除术(OMT)。前述患者在IDS后接受TC疗法。将IDS中切出的卵巢作为样品E。准备切出的卵巢的切片,进行HE染色和应用抗laeverin抗体的免疫染色。

[0362] 在TC疗法后的卵巢癌中,观察到坏死的肿瘤组织和残存的小肿瘤组织(图18a)。前述残存的肿瘤组织的大部分被坏死的肿瘤组织包围。残存的肿瘤组织由表达laeverin的癌细胞构成(图18b)。

[0363] (样品F)

[0364] 卵巢癌IIIC期的患者在接受作为NAC的多西他赛和卡铂的组合疗法(DC疗法)后,作为IDS接受ATH、BSO、OMT和低位直肠前切除术。前述患者在IDS后接受DC疗法。前述患者在前述DC疗法1年后,复发腹膜播散。将IDS中切出的卵巢作为样品F。准备切出的卵巢的切片,进行HE染色和应用抗laeverin抗体的免疫染色。

[0365] 在DC疗法后的卵巢癌中,观察到坏死的主要组织内离存在的几个癌细胞(图18c)。前述癌细胞被坏死的肿瘤组织包围。前述癌细胞表达laeverin(图18d)。

[0366] 实施例15显示,化学疗法抗性的癌细胞表达laeverin。该结果显示,表达laeverin的癌细胞或能够表达laeverin的癌细胞对包含化学疗法的癌疗法有抗性,对癌的复发和/或转移、特别是局部复发可起重要作用。

[0367] [实施例16]癌细胞移植小鼠中抗laeverin抗体的作用

[0368] 以表达laeverin的方式转化卵巢癌细胞株A2780,制备A2780 LVRN。作为对照,在A2780中转染空载体CAG,制备A2780 CAG(对照)。

[0369] 在雌性Balb/c nu/nu小鼠(6~8周龄)的右侧的2处,每1处注入 5×10^6 个细胞/100 μ L的A2780 LVRN。在相同小鼠的左侧的2处,每1处注入 5×10^6 个细胞/100 μ L的A2780 CAG,制备癌细胞移植小鼠。制备10只癌细胞移植小鼠。

[0370] 在注入A2780的2天和8天后,在5只癌细胞移植小鼠中经尾注入MMAE缀合5-23抗体(10mg/kg),测定肿瘤尺寸。在注入A2780的2天和8天后,在5只残余癌细胞移植小鼠中经尾注入PBS,测定肿瘤尺寸。

[0371] 在A2780注入的15天后,测定10只癌细胞移植小鼠的肿瘤尺寸。

[0372] 图19显示,在A2780 LVRN移植小鼠中施用PBS的情形中,A2780LVRN注入后第15天的肿瘤尺寸为约300mm³。显示在A2780 LVRN移植小鼠中施用MMAE缀合5-23抗体的情形中,A2780 LVRN注入后第15天目视未观察到肿瘤。

[0373] 实施例16显示,在体内由表达laeverin的癌细胞形成的肿瘤通过包含化疗剂的抗laeverin抗体处置。

[0374] [实施例17]表达laeverin的癌

[0375] 从患有胎盘部位滋养细胞肿瘤 (PSTT) 的3名患者分别采集PSTT组织。从前述PSTT组织配制冷冻切片。将前述冷冻切片应用5-23抗体免疫染色。前述免疫染色阐明,laeverin在全部肿瘤组织中表达。

[0376] 实施例17显示,包含抗laeverin抗体的药物组合物可以处置表达laeverin的肿瘤(例如,PSTT)。

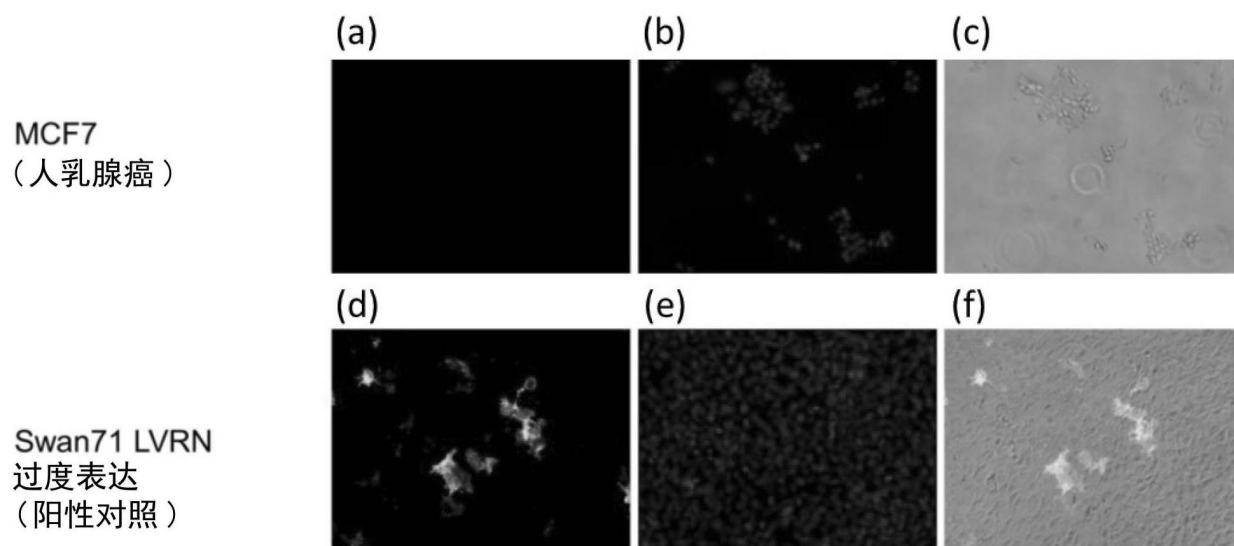


图1

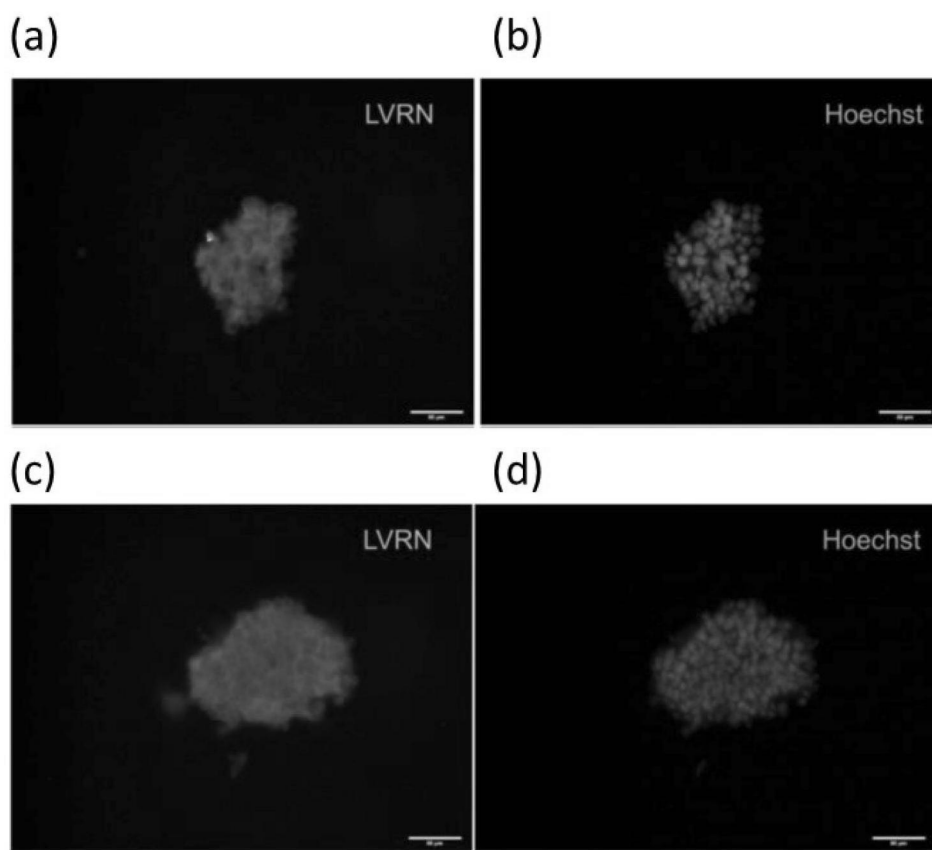


图2

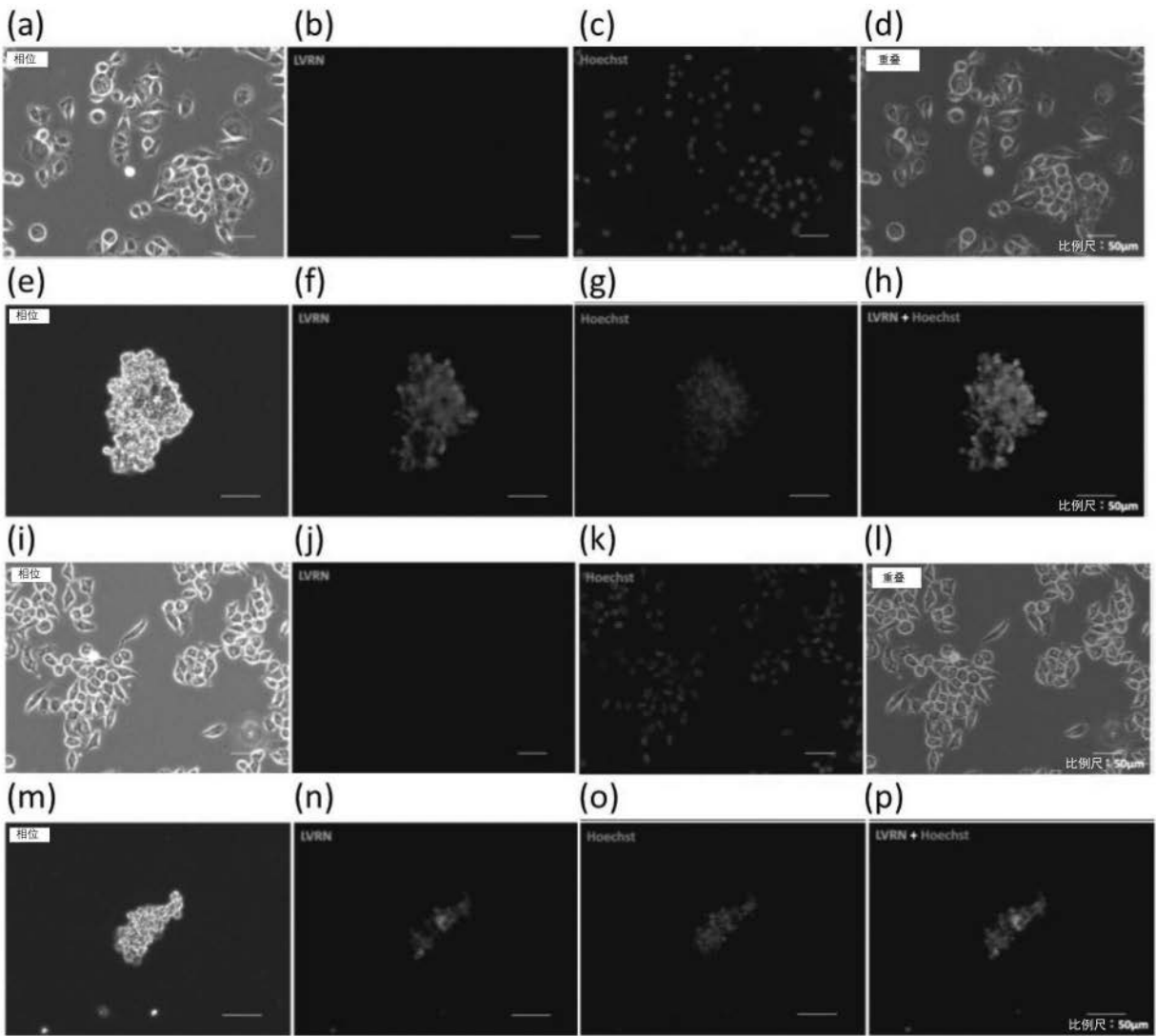


图3

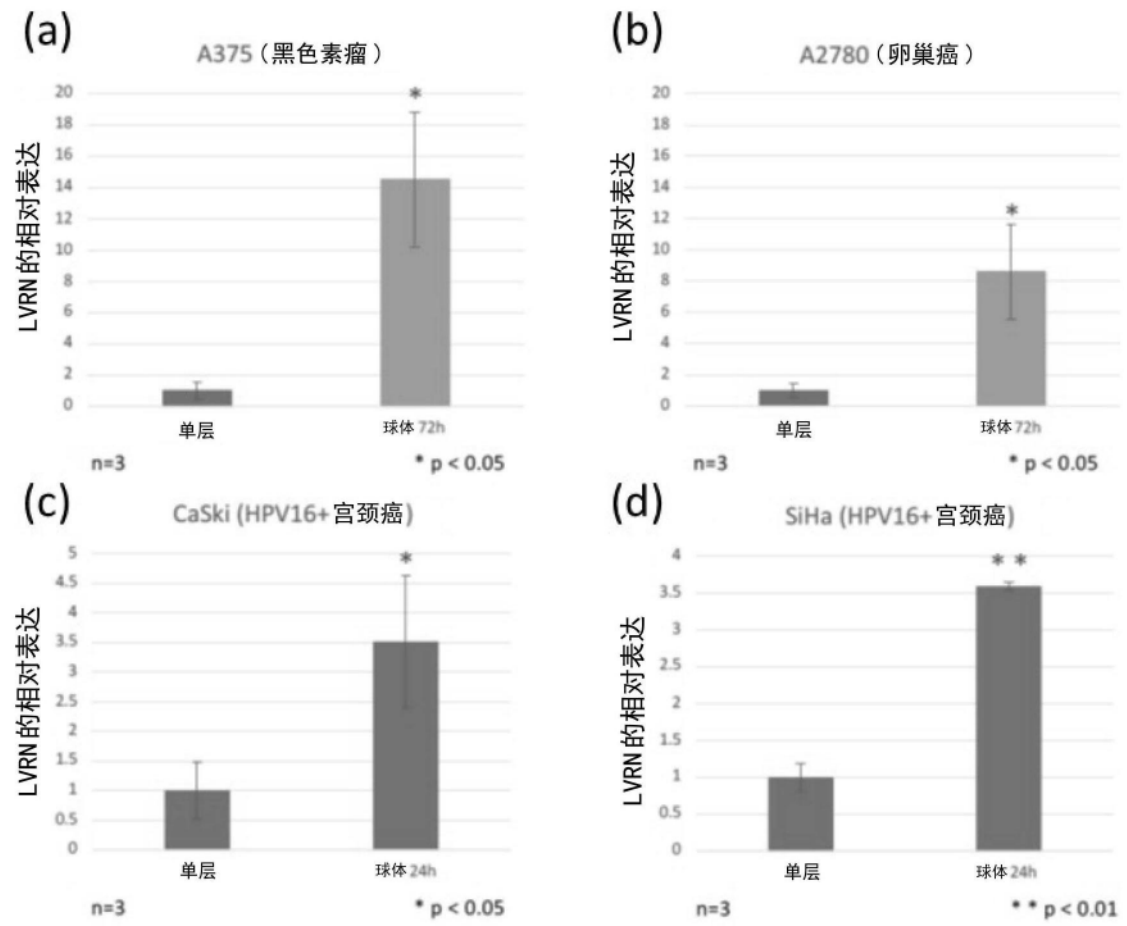


图4

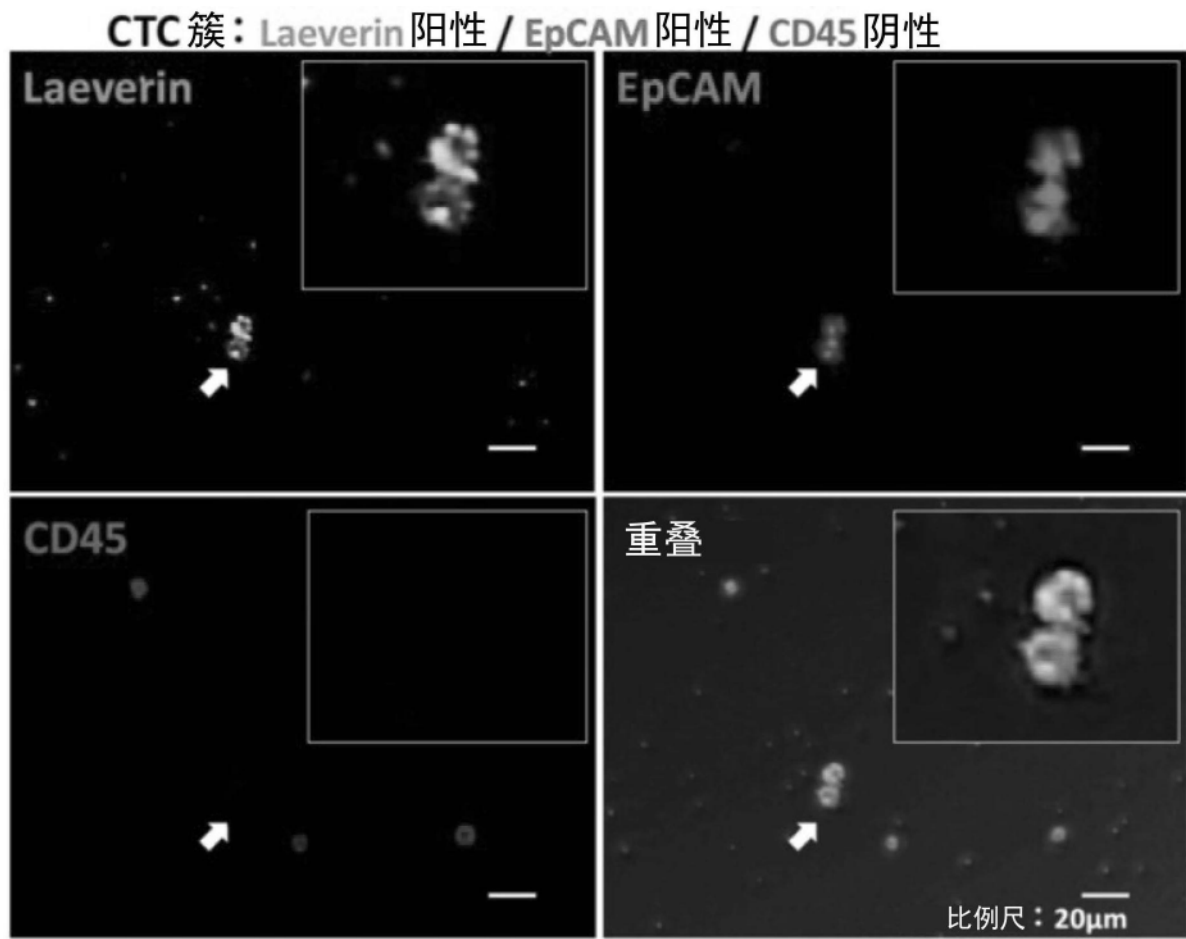


图5

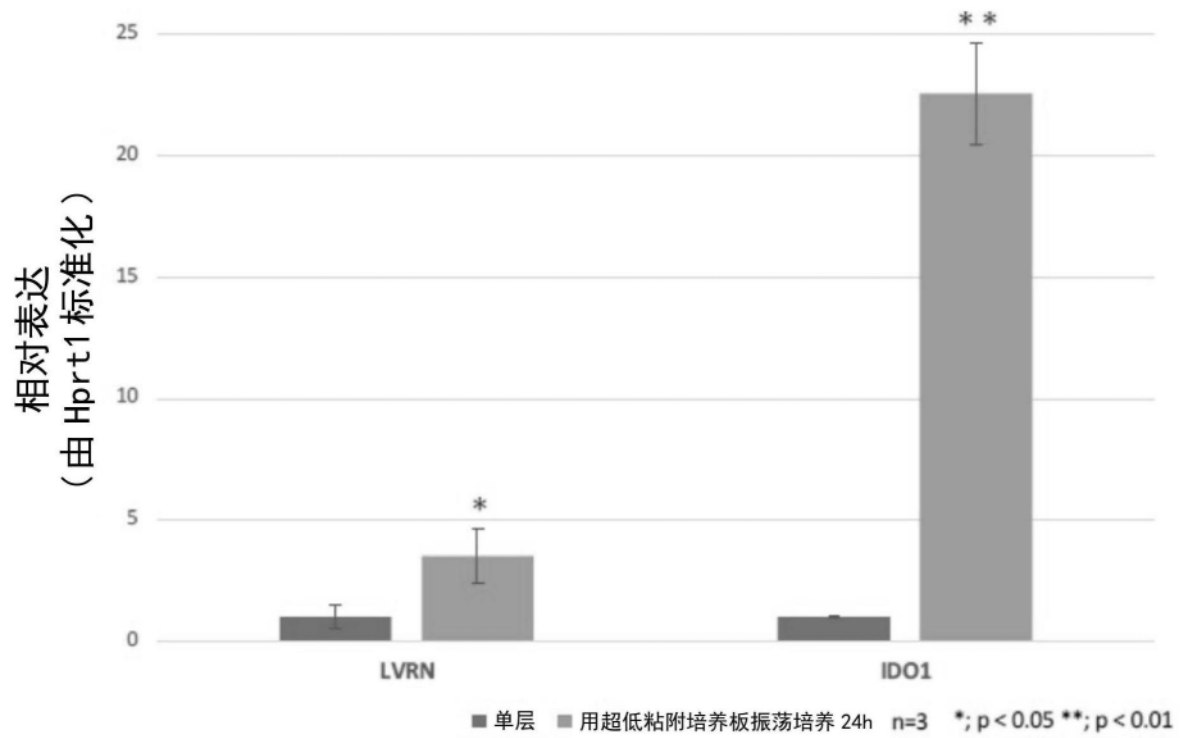


图6

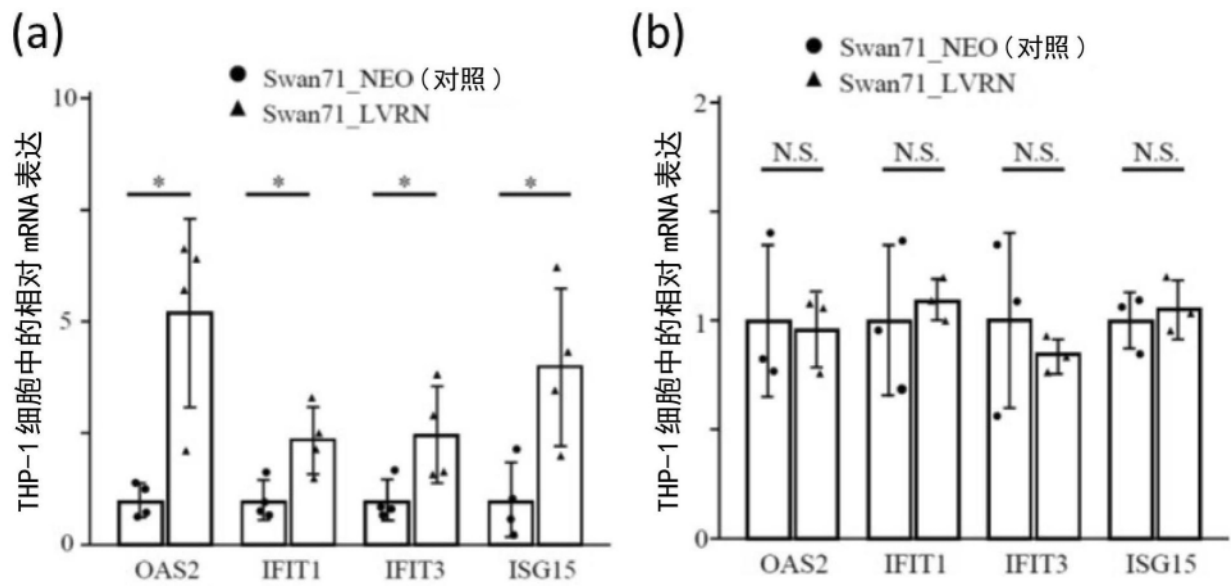


图7

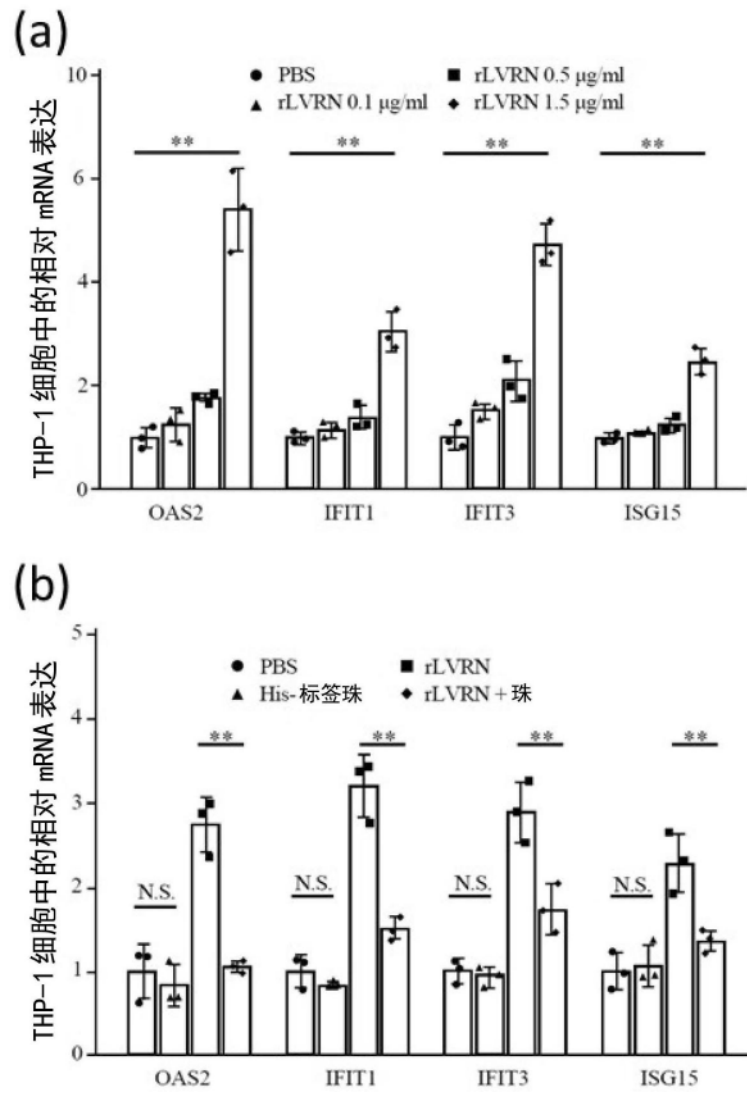


图8

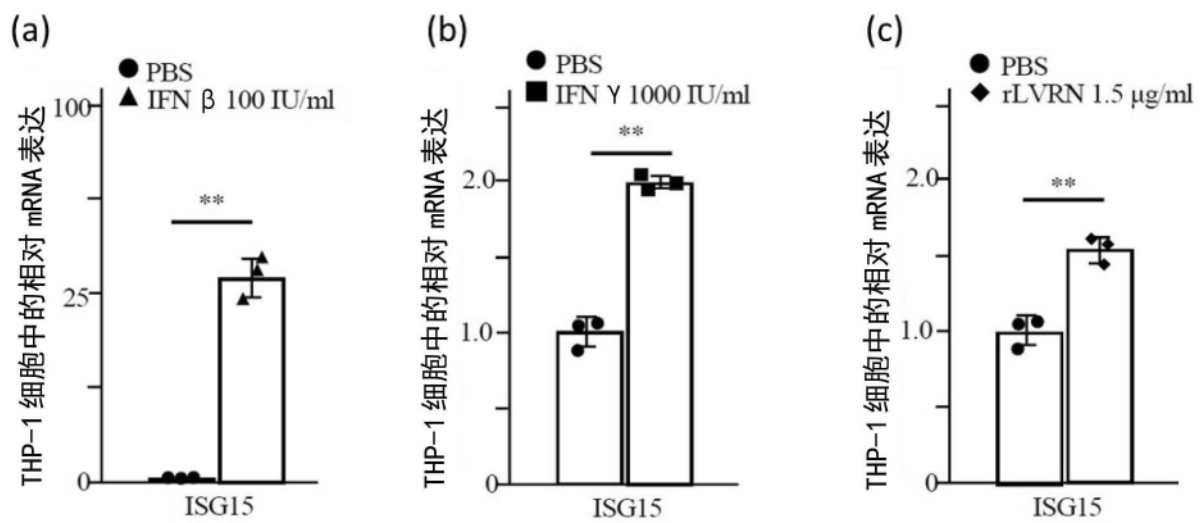


图9

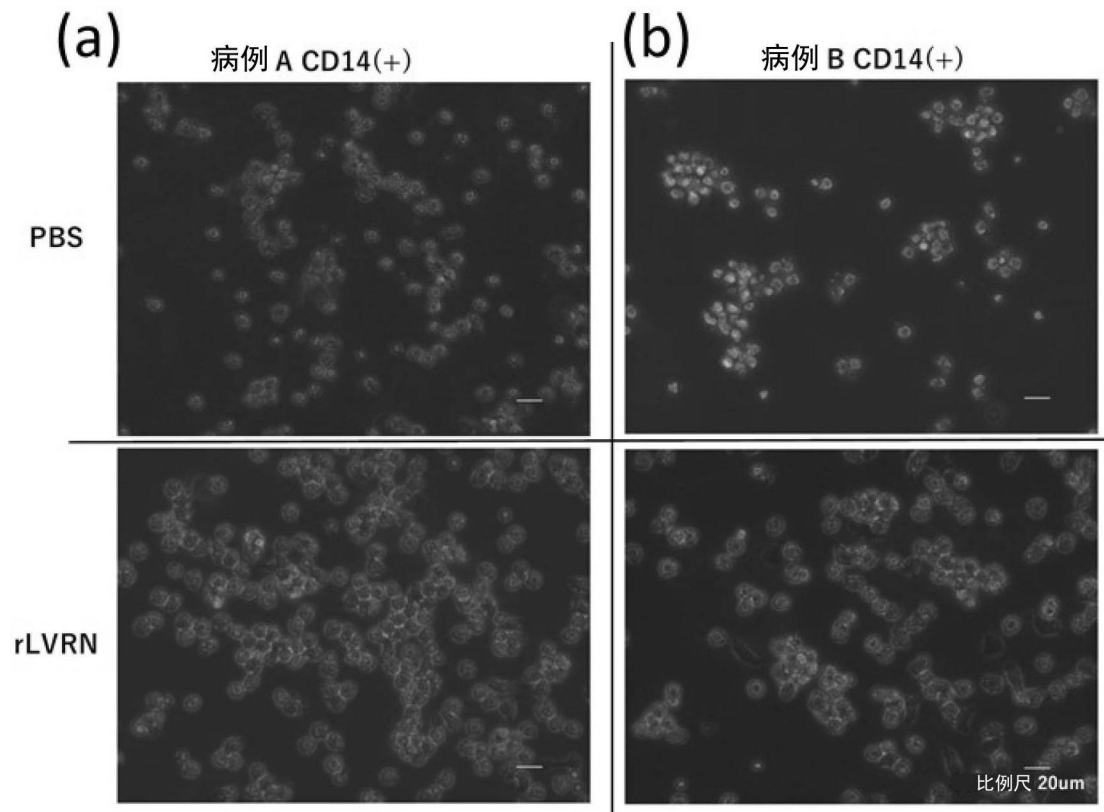


图10

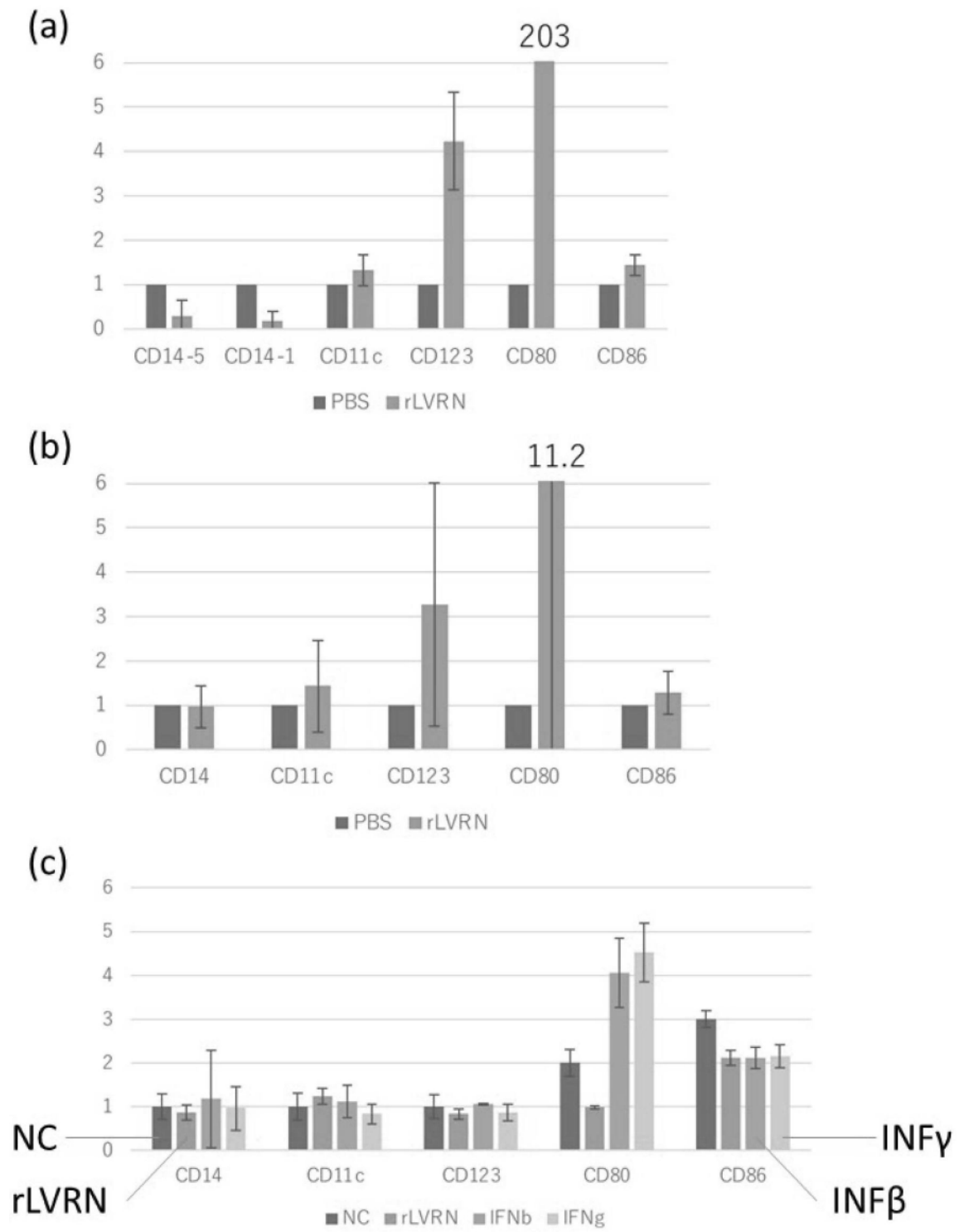


图11

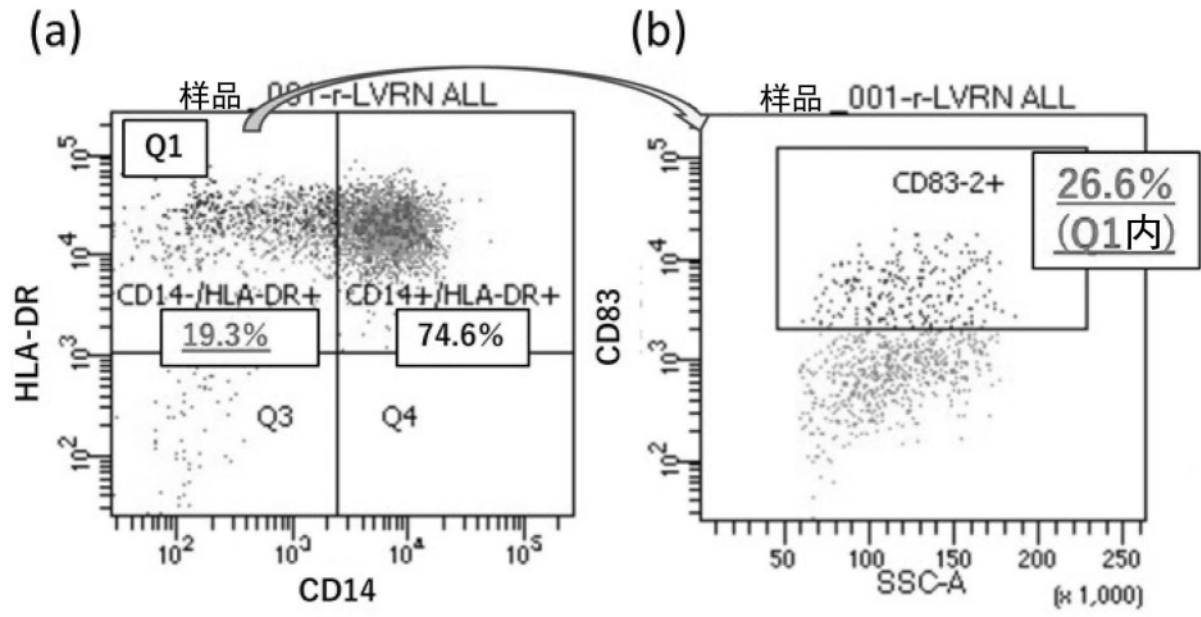


图12

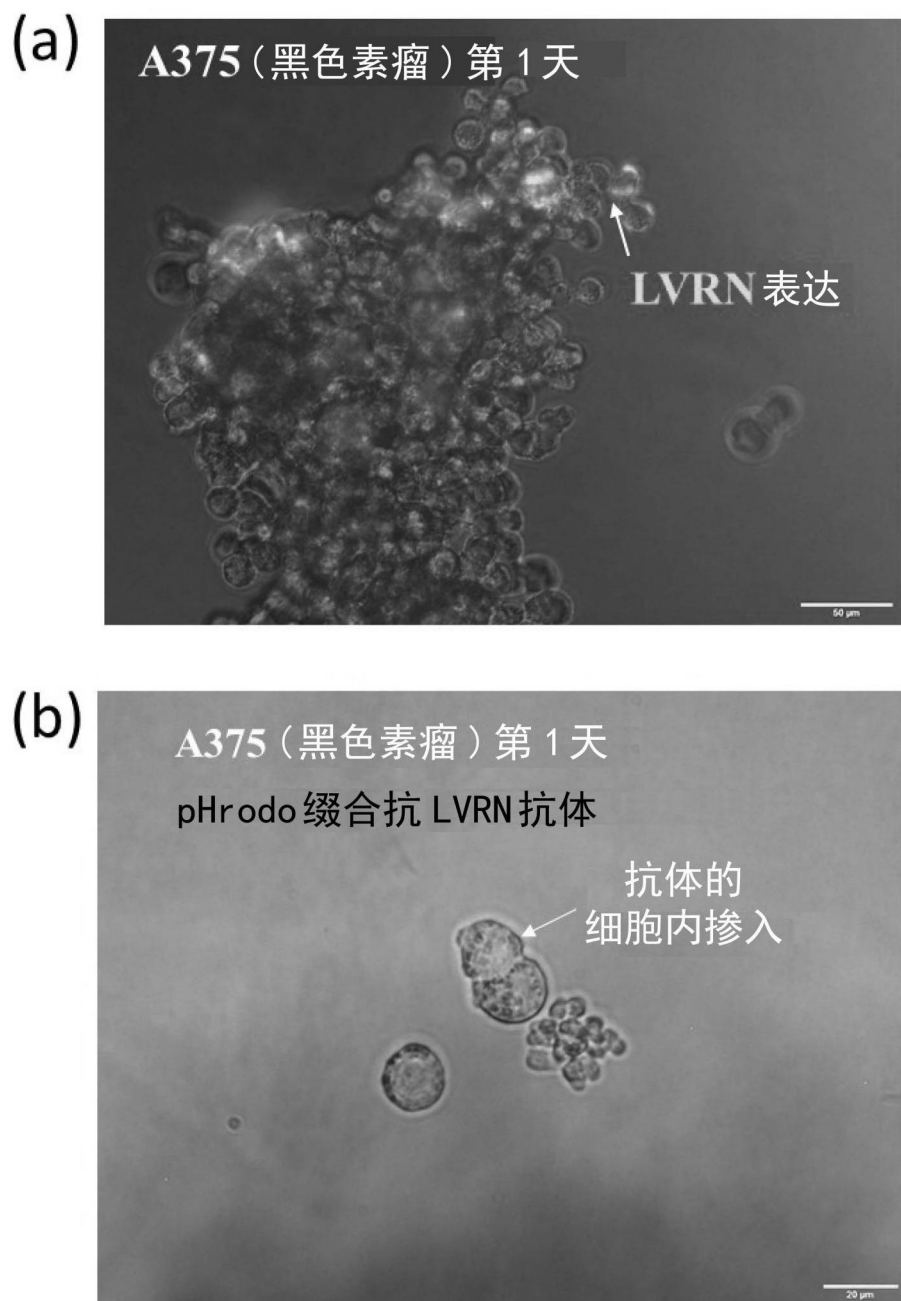


图13

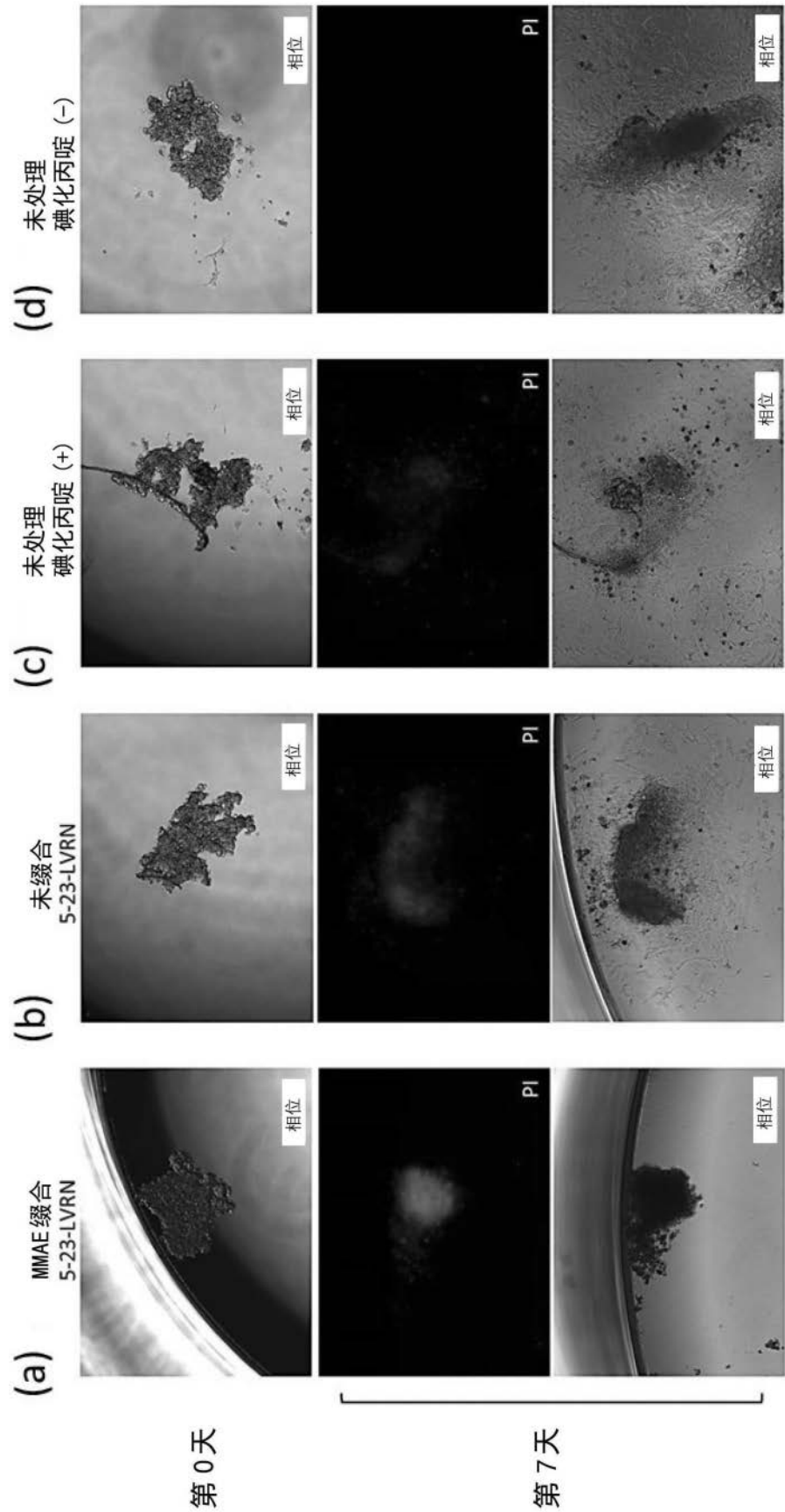


图14

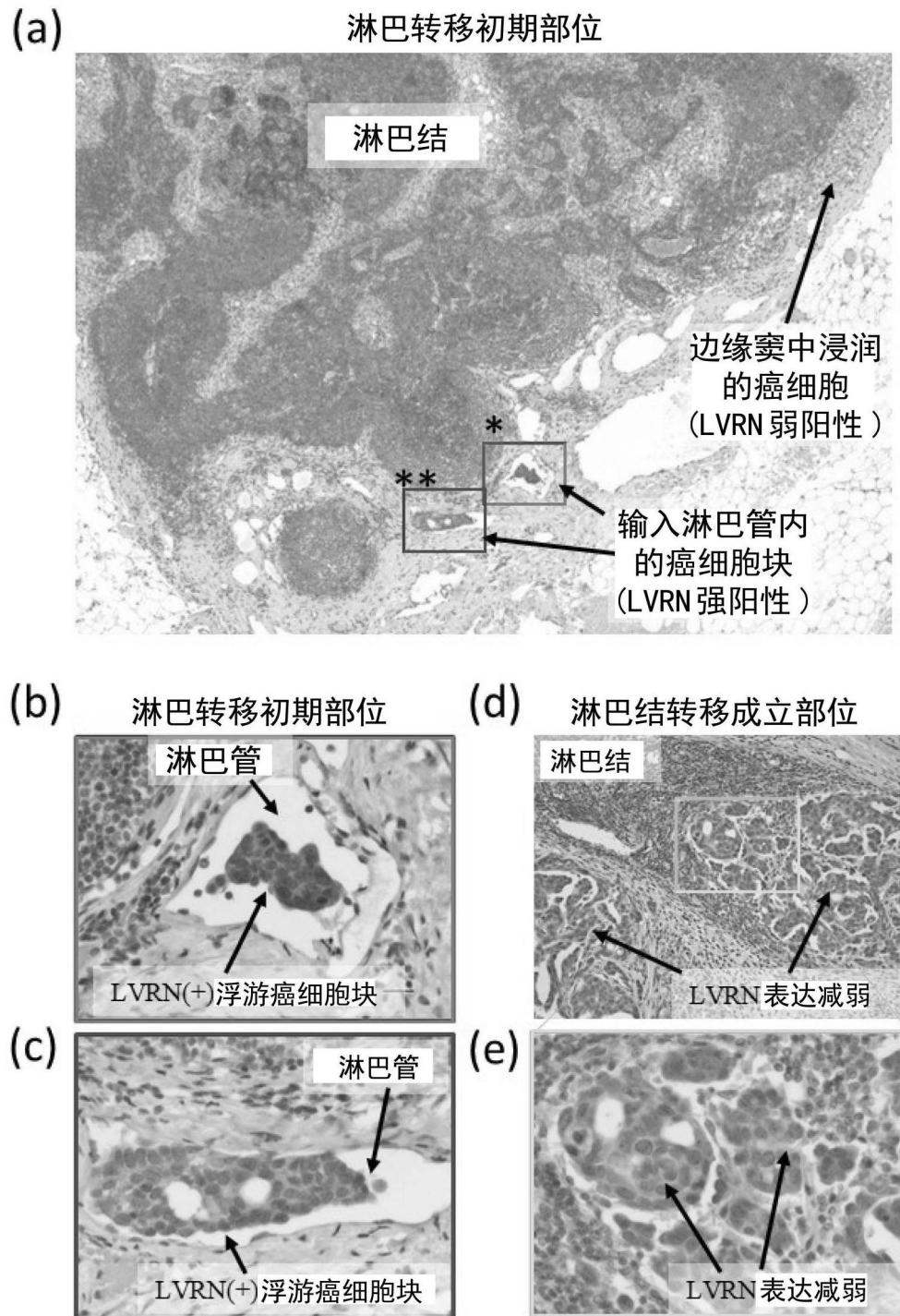


图15

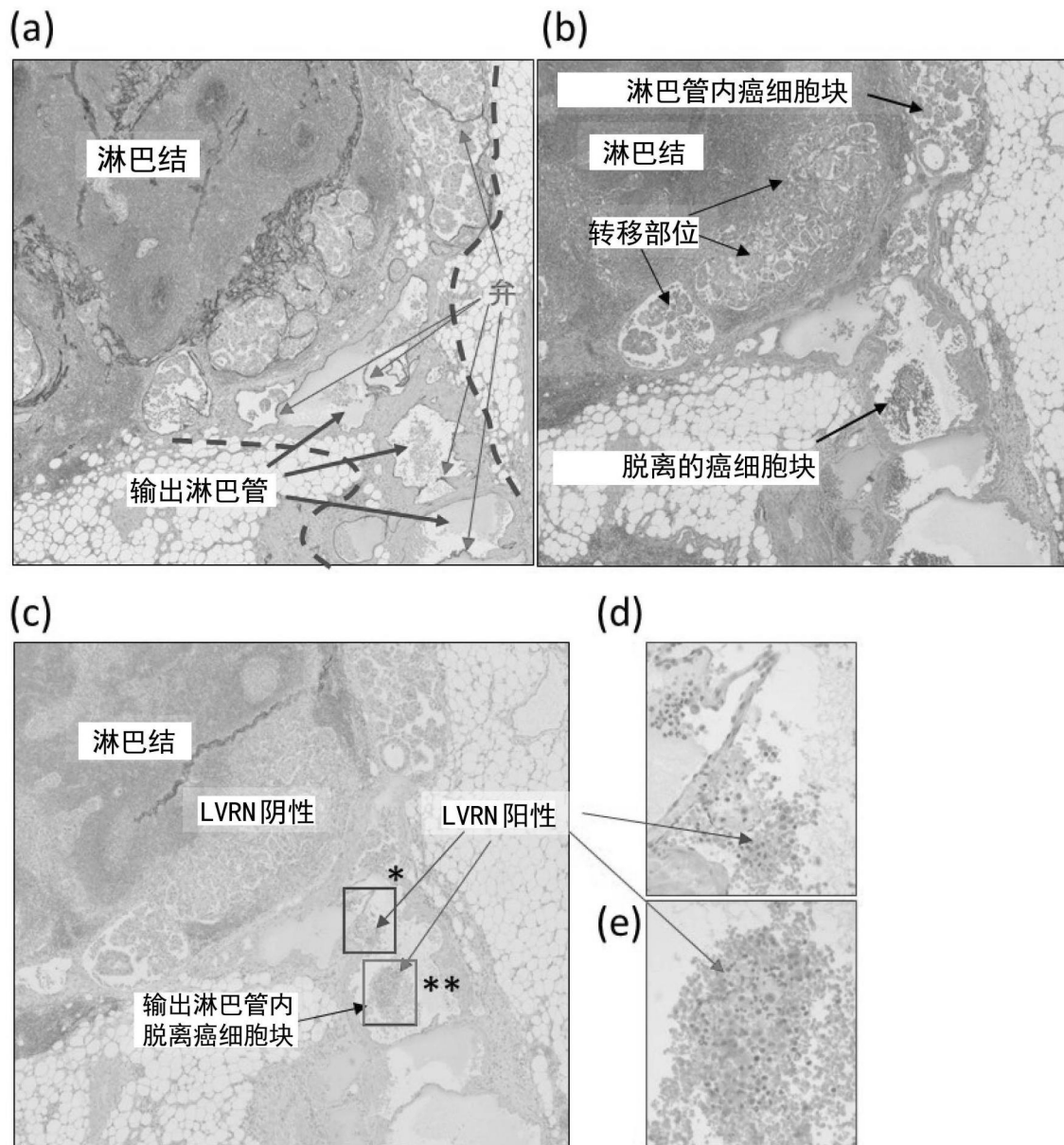


图16

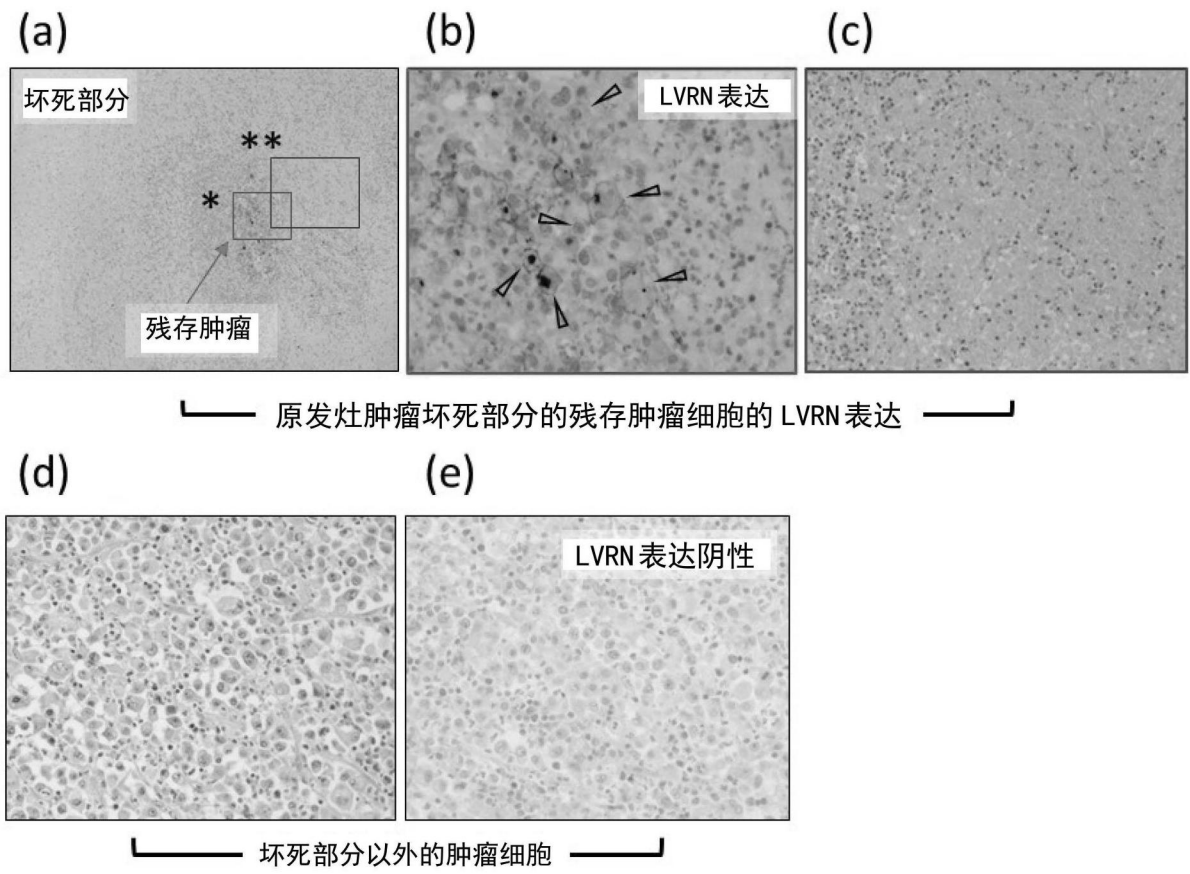


图17

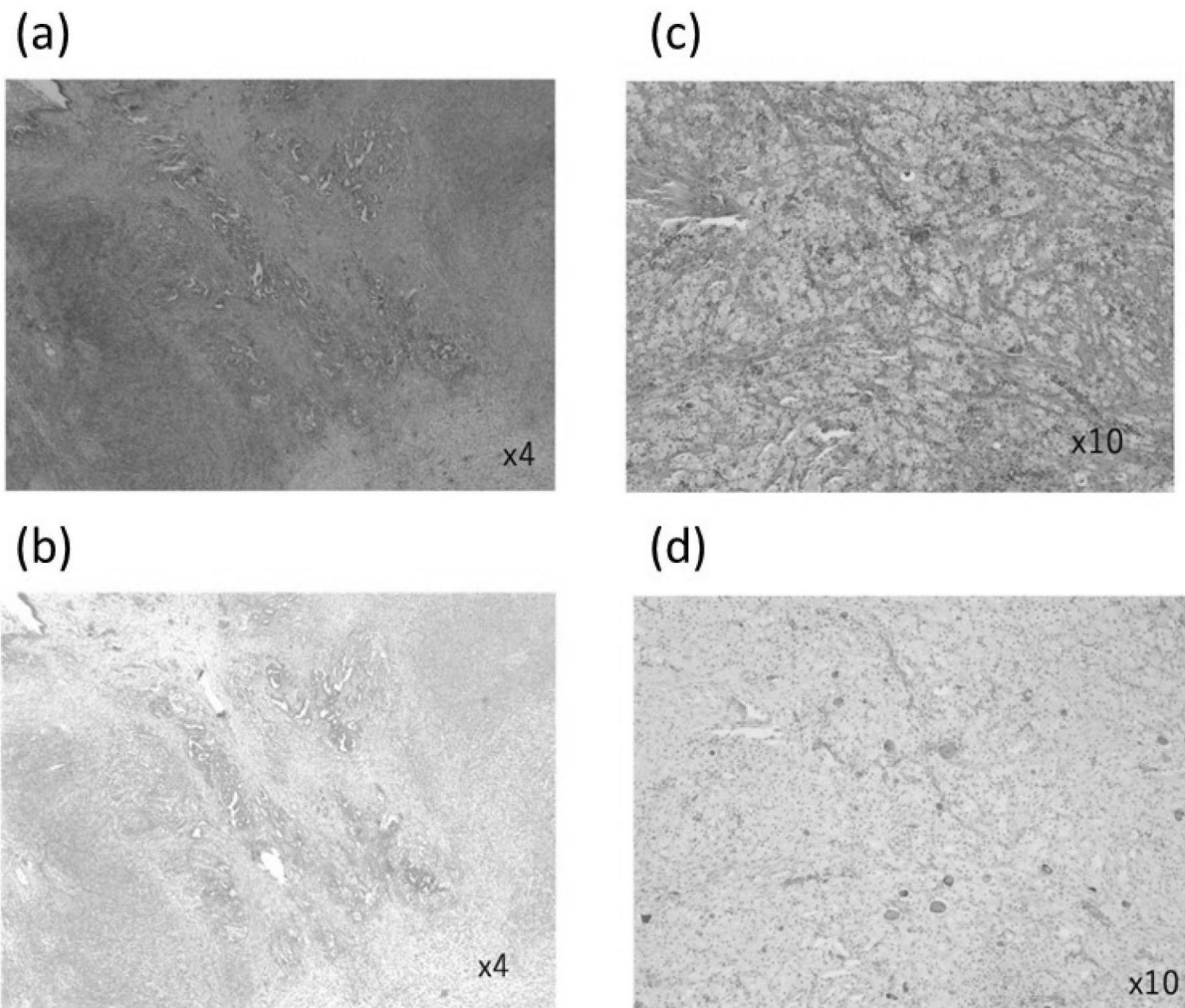


图18

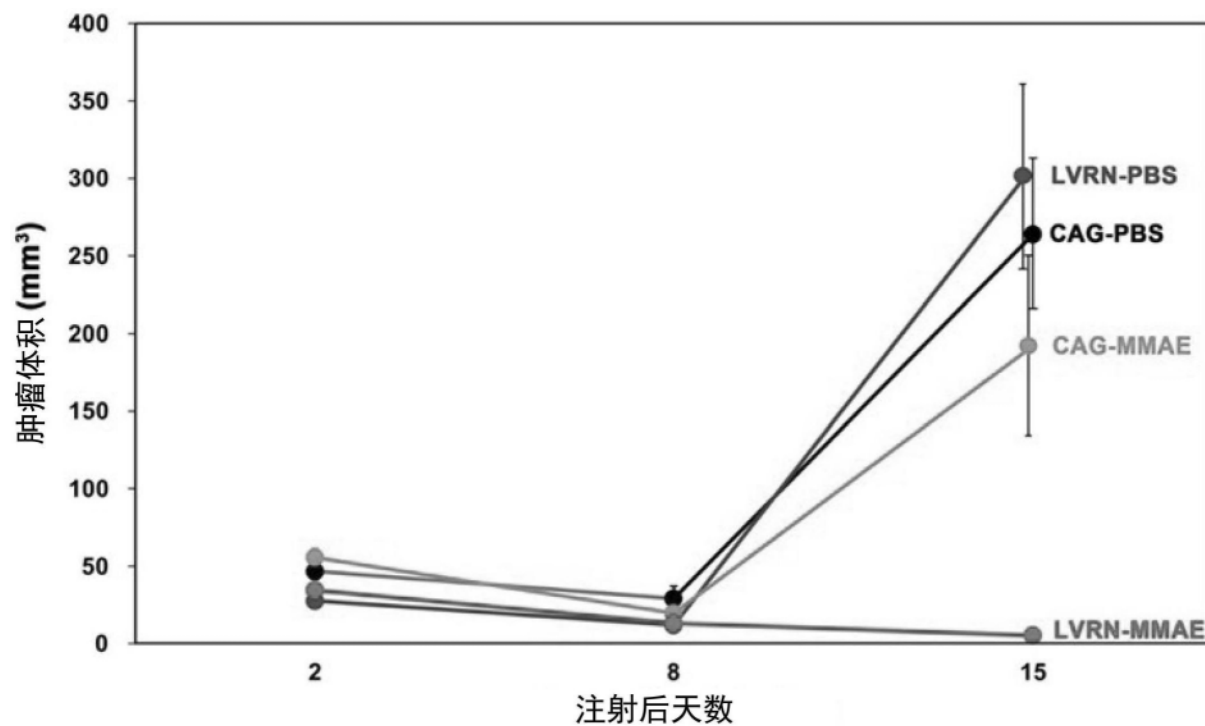


图19

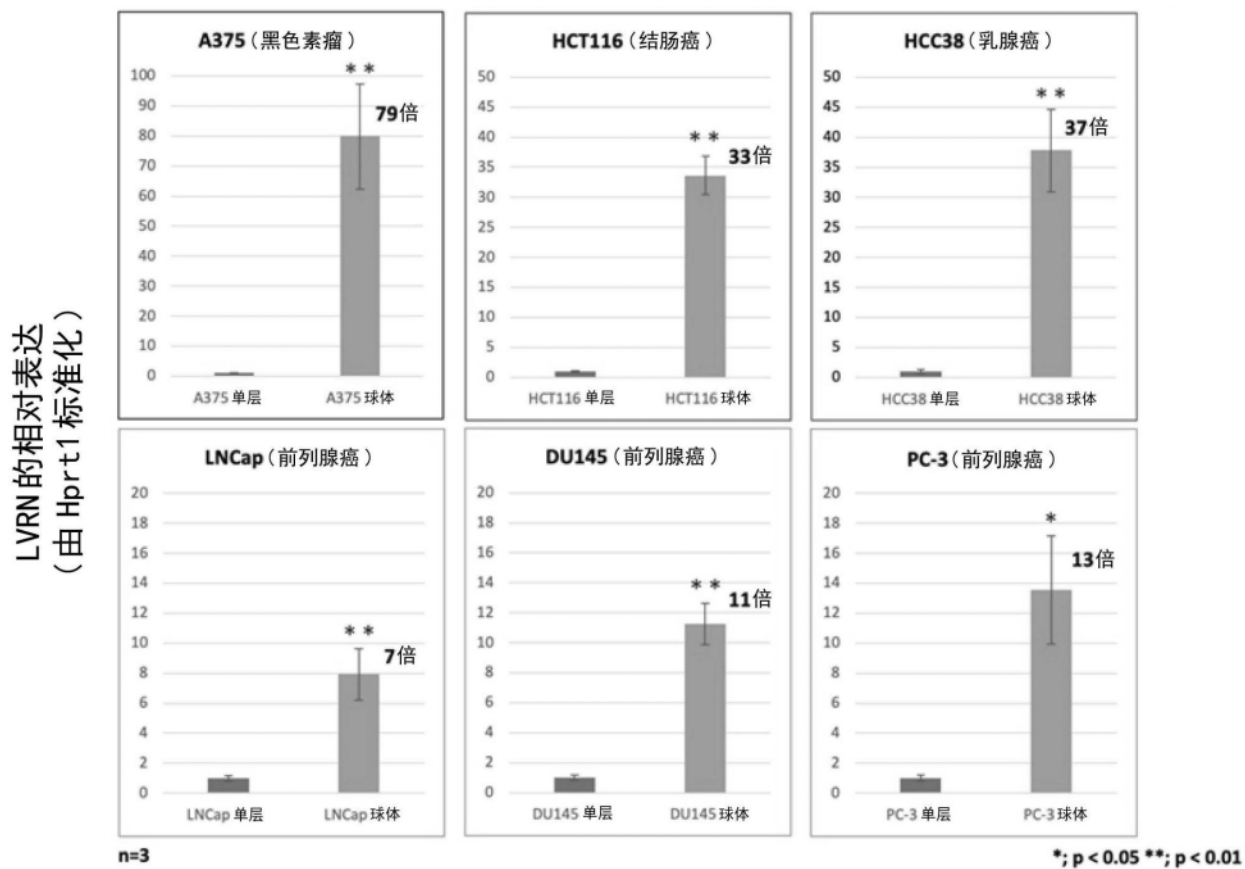


图20