



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102272157 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 200980154121. 9

(22) 申请日 2009. 11. 09

(30) 优先权数据

61/112, 579 2008. 11. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 07. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/063748 2009. 11. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/054328 EN 2010. 05. 14

(73) 专利权人 研究发展基金会

地址 美国内华达州

(72) 发明人 彼得·C·格雷 G·沙尼

J·A·科尔博 W·维尔

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

代理人 武晨燕 迟姗

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1923276 A, 2007. 03. 07, 全文.

Gidi Shani et al. GRP78 and Cripto

Form a Complex at the Cell Surface and

Collaborate To Inhibit Transforming

Growth Factor β Signaling and Enhance

Cell Growth. 《MOLECULAR AND CELLULAR

BIOLOGY》. 2008, 第 28 卷 (第 2 期), 参见全文,

尤其是第 666 页摘要, 第 667 页右栏第 1 段, 以及

图 2-8.

Maria Philippova et al. Identification of Proteins Associating with Glycosylphosphatidylinositol-Anchored T-Cadherin on the Surface of Vascular Endothelial Cells: Role for Grp78/Bip in T-Cadherin-Dependent Cell Survival. 《Molecular and Cellular Biology》. 2008, 第 28 卷 (第 12 期), 参见全文,

尤其是第 4005 页右栏第 1 段第 1-2 行, 第 4012 页图 6.

Rolf D. Pettersen et al. CD47

Signals T Cell Death. 《THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY》. 1999, 第 162 卷参见全文, 尤其是摘要, 第 7 0 3 3 页.

Santa Cruz Biotechnology. anti-Grp78 IgG (N-20). 《Santa Cruz Biotechnology Product Catalog》. 2000, 1-2.

审查员 王岩

权利要求书1页 说明书61页

序列表2页 附图13页

(54) 发明名称

用于抑制 CRIPTO/GRP78 复合物形成和信号的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供用于治疗高增生性疾病的组合物和方法, 包括破坏高增生性细胞中的 Cripto/GRP78 复合物的形成。在某些实施方案中, 抗体和/或 siRNA 可用于抑制 Cripto/GRP78 结合, 任选地与其它癌症治疗相结合。还提供用于鉴定可选择性抑制 Cripto/GRP78 结合的治疗化合物的方法。

1. 选择性的 GRP78/Cripto 靶向性化合物在制备用于治疗受试者中高增生性疾病的药物中的用途,其中通过将细胞与所述药物接触所述药物抑制癌性细胞、癌前细胞或恶性细胞中 Cripto 信号以降低细胞增殖,所述的 GRP78/Cripto 靶向性化合物有效抑制 Cripto 和 GRP78 之间复合体的形成,其中所述靶向性化合物是结合 GRP78 的 N-20 表位的抗 GRP78 抗体,其中所述 N-20 表位由 GRP78 信号肽下游的前 50 个残基内的 20 个氨基酸组成。

2. 权利要求 1 的用途,其中抗体是人单克隆抗体或人源化单克隆抗体。

3. 权利要求 1 的用途,其中抗体是双特异性抗体。

4. 权利要求 1 的用途,其中抗体结合至报告分子。

5. 权利要求 4 的用途,其中报告分子是放射性配体或荧光性标签。

6. 权利要求 1 的用途,其中抗体是抗 GRP78scFv、F(ab) 或 F(ab)₂。

7. 权利要求 1 的用途,其中药物被配制用于全身施用、局部施用、部位施用、肠胃外施用、静脉内施用、腹膜内施用、通过吸入施用或者肿瘤内施用。

8. 权利要求 1 的用途,其中所述细胞是乳腺、结肠、胃、胰、肺、卵巢、子宫内膜、睾丸、膀胱、前列腺、头、颈、子宫颈、胃、胆囊或肾上腺皮质细胞。

9. 权利要求 1 的用途,其中高增生性疾病是癌症。

10. 权利要求 9 的用途,其中癌症选自乳腺癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、睾丸癌、膀胱癌、前列腺癌、头颈癌、宫颈癌、胆囊癌或肾上腺皮质癌。

11. 权利要求 9 的用途,其中药物被配制用于包括向受试者施用第二癌症治疗。

12. 权利要求 11 的用途,其中第二癌症治疗是化学治疗、放射治疗、基因治疗、免疫治疗或外科手术。

13. 权利要求 12 的用途,其中第二癌症治疗是化学治疗。

14. 权利要求 13 的用途,其中化学治疗是紫杉醇、顺铂或碳铂。

用于抑制 CRIPTO/GRP78 复合物形成和信号的组合物和方法

[0001] 本申请要求于 2008 年 11 月 7 日提出的美国临时申请系列号 61/112,579 的优先权,该申请的全部内容并入本文作为参考。

[0002] 本发明得到国家癌症研究所给与的 R01CA107420 的政府基金支持。政府具有本发明的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及分子生物学和医学领域。更加具体而言,其涉及对 Cripto/GSP78 信号破坏所涉及高增生性疾病的治疗。

背景技术

[0004] Cripto(Cripto-1, TDGF1) 是在胚胎发生过程中具有基本生理学作用的小的 GPI 锚定信号蛋白。其还在人肿瘤中高水平表达,并且与肿瘤引发和进展的数个方面相联系,包括增强的细胞增殖、迁移、侵袭、肿瘤血管发生和上皮间质转化 (EMT) (Strizzi 等,2005)。

[0005] 认为数个作用机制促成了 Cripto 的致癌作用基础 (Strizzi 等,2005)。例如,它通过与这些配体中的一些配体以及它们各自的信号受体形成复合体调节 TGF- β 超家族成员的信号。在该背景下, Cripto 在促进某些配体例如 Nodal 的信号 (Schier,2003 ; Shen 和 Schier,2000) 而抑制激活蛋白 (Adkins 等,2003 ;Gray 等,2003) 和 TGF- β 1 (Reddy 等,2003) 的信号中具有专一性作用。由于激活蛋白和 TGF- β 具有肿瘤抑制因子作用 (Pardali 和 Moustakas,2007),它们的信号被 Cripto 抑制提供了至少部分解释 Cripto 促进肿瘤生长的机制 (Adkins 等,2003 ;Gray 等,2003 ;Gray 等,2006)。相反地, Cripto 依赖的 Nodal 信号 将促成肿瘤生长和转移的晚期阶段,在该条件下细胞变成抵抗 TGF- β 配体的生长抑制作用 (Pardali 和 Moustakas,2007 ;Topczewska 等,2006)。

[0006] Cripto 也可以溶解形式从细胞释放并且以类似于分泌的生长因子的方式起作用 (Strizzi 等 2005)。在该方面,据报导,Cripto 和爪蟾的 Cripto 直向同源物 FRL-1 分别引起 erbB-4 (Bianco 等,1999) 和 FGFR-1 (Kinoshita 等,1995) 的磷酸化。然而,Cripto 不直接结合这些蛋白质,并且介导这些磷酸化事件的假定的 Cripto 受体还没有找到 (Bianco 等,1999 ;Kinoshita 等,1995)。在该方面,虽然 Cripto 拥有 EGF 样结构域并且类似于 EGF 受体的配体,但它不直接结合 EGF 受体家族的任何成员 (Bianco 等,1999)。此外,虽然 Cripto 结合细胞外的 GPI 锚定的蛋白聚糖磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -1 通过 c-Src 引起 MAPK 和 PI3K 途径的活化,但是仍没有鉴定出介导该作用的跨膜蛋白质 (Bianco 等,2003)。

[0007] 因此,虽然 Cripto 具有促进肿瘤生长的多种信号机制,但是已知其细胞表面结合配偶体似乎不能完全解释所报导的其致癌作用。考虑到高增生性疾病的明显的社会和经济影响,因此需要对高增生性疾病的改良治疗,并且对 Cripto 引起这些效应的机制的了解将得到改良的治疗和筛选方法。

发明内容

[0008] 本发明通过确定了 Cripto 可结合葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 并引起促进高增生性细胞的生长的下游信号而克服现有技术的局限性。因此,本发明提供可用于治疗疾病如癌症的 Cripto/GRP78 相互作用抑制剂。在另外的方面中,本发明提供用于筛选 Cripto/GRP78 复合物形成的调节剂的方法。

[0009] 本发明至少部分地基于这样一个令人惊奇的发现,即细胞表面的 GRP78 是 Cripto 结合配偶体并且是人肿瘤细胞、人胚胎干细胞和正常人乳腺上皮细胞中 Cripto 信号所必需的。因此,细胞表面 Cripto/GRP78 复合体代表着干细胞和肿瘤细胞中可以被治疗性靶向的新的和称心如意的靶标。发明人在下面进一步证明,细胞表面 Cripto/GRP78 相互作用对于 Cripto 共受体功能和肿瘤生长因子活性是必需的。结果表明,对细胞表面 GRP78 的敲低或免疫中和封闭了 Cripto 对激活蛋白、Nodal 和 TGF- β 信号的调节并阻止了 Cripto 对 c-Src/MAPK/PI3K 途径的活化。因此资料支持这样一种想法,即 GRP78 是对于 Cripto 信号必需的 Cripto 受体 / 共因子。重要的是,发明人首次证明 GRP78 存在于人 ES 细胞表面,其中它与 Cripto 共定位并且介导 Cripto 对激活蛋白和 Nodal 信号的相反作用。Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合对于 Cripto 增加细胞增殖和降低 E-钙黏着蛋白表达和细胞粘附的能力也是必需的,表明这些蛋白质会一起作用促进肿瘤生长和转移。发明人发现,激活蛋白 -A 和 Nodal 在 Cripto/GRP78 复合体存在下是促有丝分裂的而在 Cripto/GRP78 复合体缺乏时激活蛋白 -A 具有细胞抑制作用并且 Nodal 对增殖无作用。不希望被任何理论所束缚,该结果支持这样一个想法,即细胞表面 Cripto/GRP78 复合体通过协调 MAPK/PI3K 和 Smad2/3 途径之间的通讯调节细胞增殖。

[0010] 本发明的一个方面涉及用于抑制细胞中 Cripto 信号的方法,包括抑制 Cripto 和 GRP78 之间复合体形成的形成。方法将包括将至少所述细胞表面与选择性的 GRP78 靶向性化合物接触,其中所述抑制包括抑制 Cripto/GRP78 复合体在细胞表面上的形成。所述复合体的形成将被抗 GRP78 抗体抑制,并且抗 GRP78 抗体将结合 GRP78 的 N-20 表位。在某些实施方案中,抗 GRP78 抗体是人源化单克隆抗体。抗体可与报告分子,例如放射性配体或荧光标签缀合。所述复合体的形成将被抗 GRP78F(ab) 或 F(ab)₂,或 GRP78 靶向性 shRNA、siRNA 或 siNA (例如包括 SEQ ID NO :5 的 GRP78 靶向性 shRNA) 抑制。施用可以是全身性的、局部的、部位性的、肠胃外的、静脉内的、腹膜内的、通过吸入或者瘤内的。

[0011] 在某些实施方案中,方法进一步定义为降低细胞增殖的方法,包括细胞与有效量的优先结合 GRP-78 并抑制 GRP-78 结合 Cripto 并引起 Nodal 信号的能力的 GRP-78 靶向性化合物接触。方法可包括将至少所述细胞表面与 Cripto 靶向性化合物接触,其中 Cripto 靶向性化合物选择性地结合 Cripto 的 CFC 结构域或 GRP78-结合结构域中的表位并抑制 Cripto 与 GRP78 之间复合物的形成。Cripto 靶向性化合物可以是结合 Cripto 的 GRP78-结合结构域或 CFC 结构域中表位的抗体。方法可包括将至少所述细胞的表面与 shRNA 接触,其中 shRNA 包括 SEQ ID NO :4。靶向性化合物可以是不结合或基本不结合 Cripto 的 GRP78 突变体。GRP78 突变体可以是缺乏天然 GRP78 的氨基酸 19-68 位的 GRP78 突变体,例如 Δ 19-68 GRP78。在另外的实施方案中,GRP78 可以通过在 GRP78 的 19-68 位氨基酸区的一个或更多个替代或插入突变进行突变以产生不结合或者基本不结合 Cripto 的 GRP78 突变体。所述细胞可以衍生自选自下列的器官:乳腺、结肠、胃、胰脏、肺、卵巢、子宫内膜、睾丸、膀胱、前

列腺、头、颈、子宫颈、胃、胆囊和肾上腺皮质。细胞可以是癌性细胞、癌前细胞或恶性细胞，并且其中方法进一步定义为治疗高增生性疾病例如癌症的方法。癌症可以选自乳腺癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、睾丸癌、膀胱癌、前列腺癌、头颈癌、宫颈癌、胆囊癌或肾上腺皮质癌。

[0012] 在某些实施方案中，方法进一步定义为降低细胞增殖的方法。方法可包括降低细胞中由 Cripto 引起的 Nodal 信号、激活蛋白/TGF- β 信号或 c-Src/MAPK/PI3K 信号的方法。方法可包括向受试者施用第二治疗，例如化学治疗（例如紫杉醇、顺铂或碳铂）、放射治疗、基因治疗、免疫治疗或外科手术。

[0013] 方法可进一步定义为促进干细胞向神经元细胞分化的方法，其中细胞是干细胞，并且其中抑制 Cripto 与 GRP78 之间复合体的形成促进细胞向神经元细胞分化。细胞可以是人胚胎干细胞（例如 H9 或 BG02）或者诱导的多能干细胞（iPSC）。

[0014] 本发明的另一个方面涉及筛选 Cripto/GRP78 复合物形成的抑制剂的方法，包括：得到候选调节剂，将候选调节剂与 Cripto 和 GRP78 接触，并测量 Cripto/GRP78 复合体的形成，其中在候选调节剂存在下 Cripto/GRP78 复合体形成的减少或者 Cripto/GRP78 复合体信号的降低表明候选调节剂是 Cripto/GRP78 复合物形成的抑制剂。Cripto 和 GRP78 可以由细胞表达。在某些实施方案中，Cripto 和 GRP78 由细胞转基因性过表达。细胞可以是癌性细胞或癌前细胞。方法可包括测量 Cripto/GRP78 信号，其中 Cripto/GRP78 信号包括激活蛋白/TGF- β 信号、c-Src/MAPK/PI3K 信号或 PI3K/Akt/GSK3 β 信号。方法可包括测量 Cripto 和 GRP78 之间的结合，其中在候选调节剂存在下 Cripto/GRP78 结合的降低表明候选调节剂抑制 Cripto/GRP78 复合物形成。所述的测量结合可包括细胞表面生物素化作用/Co-IP 测定（例如如在 Shani 等 2008 中所述的那样）、¹²⁵I-Cripto 结合测定（例如在完整细胞中）、包括测量 Cripto 与固定化 GRP78 结合的测定（例如在多孔板中）、或者测量可溶性 Cripto 结合的 ELISA 测定。在许多实施方案中，包括将 Cripto 和 GRP78 用荧光团或猝灭剂标记并例如使用 FACS 测量荧光的荧光测定可以在本发明中使用。

[0015] 本发明的又一方面涉及人源化单克隆抗 GRP78 抗体，其中抗体结合 GRP78 中的 N-20 表位，并且其中所述结合抑制 Cripto/GRP78 复合体形成。抗体可以包含在药物组合物中，并且药物组合物可以配制成用于肠胃外、静脉内或瘤内施用。

[0016] 术语“抑制”、“降低”或“阻止”或者这些术语的任何变形，当在权利要求书和 / 或说明书中使用包括任何可测量的降低或者完全抑制以达到预期结果。

[0017] 如在说明书和 / 或权利要求书中使用的术语“有效的”意思是指足以达到想要的、期望的或预期的结果。

[0018] 当词语“a”或“an”在权利要求书和 / 或说明书中与术语“包括（包含）”结合使用时意思是指“一”，但是其还有“一或更多”、“至少一”和“一或一以上”的含义。

[0019] 考虑了就本发明的任何方法或组合物而言，在本说明书中讨论的任何实施方案可以实施，并且反之亦然。此外，本发明组合物可以用于实现本发明的方法。

[0020] 在本申请通篇中，术语“大约”用于指数值包括对于所采用测定数值的设备、方法所固有的误差变化，或者在研究受试者当中存在的变异。

[0021] 虽然本公开支持术语“或”的定义指仅仅备选方案和“和 / 或”，但是除非明确地指出是仅指备选方案或者备选方案相互排斥，否则术语“或”在权利要求书的使用意思是指

“和 / 或”。

[0022] 如在本说明书和权利要求书中所使用,词语“包含”(和包含的任何形式,例如复数和单数形式的“包含”)、“具有”(和具有的任何形式,例如复数和单数形式的“具有”)、“包括”(和包括的任何形式,例如复数和单数形式的“包括”)或“含有”(和含有的任何形式,例如复数和单数形式的“含有”)是包含在内的或开放式的并且不排除另外的、非描述的元素或方法步骤。

[0023] 根据下列详细的描述,本发明的其他目的、特征和优势将变得显而易见。然而,应当理解,详细的描述和表明本发明特定实施方案的特定实施例仅通过例证方式给出,因为根据该详细的描述,处于本发明精神和范围内的许多改变和修改对本领域技术人员而言将变得显而易见。

附图说明

[0024] 下列图构成本说明书的一部分,并且旨在进一步证明本发明的某些方面。通过参考一个或更多个这些附图并结合本文呈现的特定实施方案的详细描述可更好的理解本发明。

[0025] 图 1A-C. 新的 Cripto 结合蛋白的鉴定. 293T 细胞以空载体或 Cripto-Flag 转染,免疫沉淀在抗 Flag 珠上,然后以 Flag 肽洗脱。通过 SDS-PAGE 分离 Cripto 相关蛋白然后或者进行银染色 (A) 或者印迹在硝酸纤维素上并用抗 GRP78 或抗 Cripto 抗体探测 (C),如下面材料和方法中所述。将在 (A) 中指定为 a 和 b 的条带切下并进行质谱分析,如下面材料和方法中所述。对应于条带 a 的鉴定为 GRP78 的质量指纹数据示于 (B) 中。

[0026] 图 2A-D. Cripto 结合细胞表面上的 GRP78. 293T 细胞根据指示以的构建体转染 (A-D) 并且 P19 细胞 (D) 以细胞不渗透性 NHS-LC- 生物素标记。使用所标明的抗体对细胞裂解液进行免疫沉淀,然后用 Flag 肽 (肽洗脱液) 或者通过在样品缓冲液中加热珠洗脱。样品通过 SDS-PAGE 分离并且用抗生物素蛋白 -HRP 或者标明的抗体进行印迹,如下面材料和方法中所述。在一些情况中 (B 和 C),对过表达 GRP78 的 293T 细胞进行细胞表面生物素化作用,然后将所得到的细胞裂解液与载体或 Cripto-Flag 珠孵育。

[0027] 图 3A-C. 使用 RNA 干扰对 GRP78 表达的靶向性降低. HeLa 细胞以包含 GRP78shRNA (G1) 或空载体的慢病毒感染,并用如所标明的毒胡萝卜内酯处理或者不处理。(A) 通过使用抗 GRP78 或抗肌动蛋白的抗体的 Western 印迹分析细胞裂解液,如在材料和方法中所描述。(B) 柱表示每 100 个 GFP 阳性细胞中凋亡细胞的数量,如在材料和方法中所述。(C) 以载体或 G1shRNA 病毒感染的细胞以包含 Cripto-Flag 的病毒再次感染。使用抗 Flag 珠对来自这些细胞的裂解液进行免疫沉淀,然后用 Flag 肽洗脱。使用抗生物素蛋白 -HRP、抗 GRP78 和抗 Cripto 抗体对洗脱蛋白质进行 Western 印迹分析,如下面材料和方法中所述。

[0028] 图 4A-D. 内源 GRP78 表达的抑制增强 TGF- β 诱导的 Smad2 磷酸化. HeLa 细胞以包含靶向 GRP78 的 shRNA (G1) 或空载体的慢病毒感染,然后用如所标明的 5 μ M 毒胡萝卜内酯处理或者不处理。在毒胡萝卜内酯过夜处理之后,细胞根据指示以剂量的 TGF- β 1 处理 (A 和 B),然后通过 Western 印迹确定磷酸化 Smad2 和总的 Smad2 水平,如下面材料和方法中所述。备选地,按照所标明处理的相同的细胞以细胞不渗透性生物素标记,所得到的

裂解液用抗 GRP78 抗体 (抗 KDEL) 免疫沉淀,接着使用抗生物素蛋白-HRP 进行 Western 印迹 (C),或者使用抗 T β RI、抗 T β RII 或抗肌动蛋白抗体将裂解液直接进行 Western 印迹 (D),如在材料和方法中所述。

[0029] 图 5. GRP78 不直接结合 TGF- β 类型 I 和类型 II 受体. 293T 细胞以 p26-Flag、Cripto-Flag、T β RI-HA 或 T β RII-His 转染,然后使用如所标明的抗 Flag、抗 HA 或抗 His 抗体进行免疫沉淀。使用抗生物素蛋白-HRP 或标明的抗体对沉淀的蛋白质进行 Western 印迹分析,如下面材料和方法中所述。

[0030] 图 6A-D. Cripto 和 GRP78 协同抑制 TGF- β 信号. (A) 以空载体、GRP78、Cripto 或者 GRP78 和 Cripto 两者转染的 PC3 细胞根据指示以的 TGF- β 1 (10pM) 处理或者不处理。磷酸化 Smad2 (pSmad2) 和总 Smad2 (Smad2) 水平通过 Western 印迹测定,如下面材料和方法中所述。(B) 来自 (A) 的磷酸化 Smad2 条带使用光密度测定法定量并且相对于对应的 Smad2 条带标准化,如下面材料和方法中所述。(C) 使用如所标明和如在材料和方法中所述的抗 T β RII、抗 T β RI 和抗肌动蛋白抗体对 PC3 细胞裂解液进行 Western 印迹。(D) 将细胞铺于 96 孔板上,然后 8 天后测量细胞增殖,如下面材料和方法中所述。

[0031] 图 7A-D. GRP78 和 Cripto 协同抑制 TGF- β 对前列腺癌细胞贴壁不依赖性生长的抗增殖作用. 如下面材料和方法中所述,在媒介物或者增加剂量的 TGF- β 1 存在下,以载体、GRP78、Cripto 或者 GRP78 和 Cripto 两者转染的 PC3 细胞在贴壁不依赖性条件下于软琼脂中生长 15 天。数据表示为在缺乏或存在所标明剂量 TGF- β 1 下单一视野中计数的集落数 (A) 或者表示为在存在所标明 TGF- β 1 浓度下计数的集落数除以在缺乏 TGF- β 1 处理时所计数的集落数 (%基础) (B)。(C) 来自 100pM TGF- β 1 存在或缺乏情况下所标明视野的照片。(D) 图解 Cripto/GRP78 复合体致癌作用的模型。TGF- β 通过经 Smad2/3 途径发信号而潜在抑制许多细胞类型的增殖 (左)。Cripto 和 GRP78 相互作用形成复合体,并且协同作用减弱 TGF- β -依赖性 Smad 信号和生长抑制。此外,它们独立地增加细胞增殖/存活。在 Cripto 和 GRP78 存在下,TGF- β 还可增加细胞增殖 (虚线箭头)。

[0032] 图 8A-G. Cripto 和 GRP78 协同调节激活蛋白、Nodal 和 TGF- β 信号. 稳定表达 Cripto 和 / 或 GRP78shRNA 的 NCCIT 细胞通过使用所标明抗体的 Western 印迹 (A) 或者完整细胞表面 ELISA (B) 分析。同样的细胞以激活蛋白-A (C) 或 Nodal (D) 处理,并且磷酸化 Smad2 (pSmad2) 和 Smad2 的最终水平通过使用 pSmad2 和 Smad2 抗体的 Western 印迹测量。过表达所标明蛋白质和 / 或 shRNA 的 NCCIT 细胞 (E) 和 293T 细胞 (F, G) 以 Smad2 响应性萤光素酶报告分子转染并根据指示以剂量的 TGF- β 配体处理。所得到的萤光素酶活性相对于未处理样品标准化并表示为未处理样品的诱导倍数。

[0033] 图 9A-G. 人 ES 细胞中细胞表面 GRP78 介导 Cripto 信号. 使用所标明的抗体对 H9 人 ES 细胞进行完整细胞 ELISA (A) 或免疫荧光 (B)。在 (B) 中,抗 Cripto 染色是绿色的并且抗 GRP78 染色是红色的。(C) H9ES 细胞根据指示以的激活蛋白-A 或 Nodal 处理,并且通过使用 pSmad2 和 Smad2 抗体的 Western 印迹测量磷酸化 Smad2 (pSmad2) 和 Smad2 的最终水平。用 Smad2 响应性萤光素酶报告分子转染以空载体 (D) 或 Cripto shRNA (E) 稳定感染的 NCCIT 细胞,并如所标明在 N-20 抗体存在或缺乏情况下用标明剂量的 TGF- β 配体处理。所得到的萤光素酶活性相对于未处理样品标准化并表示为相对于未处理样品的诱导倍数。(F) 说明野生型 GRP78 和缺乏 N-20 表位的 Δ 19-68GRP78 构建体的简图。(F, G) 如所标明,

使用抗 HA、抗 Flag 和抗 GRP78 抗体对根据指示以构建体转染的 293T 细胞的裂解液进行免疫沉淀和 Western 印迹。 $^*p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ 。

[0034] 图 10A-F. Cripto 需要 GRP78 受体功能以激活 PI3K 和 MAPK 途径并促进 NCCIT 细胞增殖。稳定表达所标明 shRNA 的 NCCIT 细胞进行血清饥饿, 然后根据指示以剂量的可溶性 Cripto 与所标明的或者 PI3K 抑制剂 (LY2940002) (A) 或者 MEK1/2 抑制剂 (PD98059) (B) 处理。使用所标明的抗磷酸化 Akt (pAkt)、Akt、磷酸化 GSK3 β (pGSK3 β) 和肌动蛋白抗体 (A) 或磷酸化 ERK1/2 (pERK1/2) 和 ERK1/2 抗体 (B) 对细胞裂解液进行 Western 印迹。(C) 相同的 NCCIT 细胞以如所标明的 Cripto 处理, 生长 8 天, 然后使用 CyQuant 增殖测定试剂盒测量增殖。(D) 以 Cripto shRNA 感染的 NCCIT 细胞在一定范围剂量的 N-20 抗体或 IgG 对照存在下进行 ^{125}I -Cripto 结合。Cripto 特异性结合代表着被过量非标记可溶性 Cripto 封闭的 ^{125}I -Cripto 结合的量。以 Cripto shRNA 感染的 NCCIT 细胞进行 (E) 血清饥饿, 然后在所标明剂量 IgG 或抗 GRP78 (N-20) 预处理后根据指示以剂量的可溶性 Cripto 处理, 或者 (F) 在以 IgG 或抗 GRP78 (N-20) 抗体预处理后以可溶性 Cripto 处理。细胞另外生长 8 天并且使用 CyQuant 增殖测定试剂盒测定增殖。 $^*p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ 。

[0035] 图 11A-I. 在人乳腺上皮细胞中细胞表面 GRP78 的免疫中和阻止 Cripto 的肿瘤生长因子活性。以空载体感染的人乳腺上皮 MCF10A 细胞使用 IgG 或 N-20 抗体进行完整细胞 ELISA (A) 或者根据指示在一定范围剂量 N-20 抗体或对照 IgG 抗体存在下进行 ^{125}I -Cripto 结合 (B)。(C) 以空载体感染的 MCF10A 细胞进行血清饥饿, 然后如所标明, 根据指示以剂量的可溶性 Cripto、N-20 抗体和 / 或 IgG 处理。如所标明, 所得到的细胞裂解液以抗磷酸化 Tyr (pTyr) 抗体进行免疫沉淀并且以抗磷酸化 Src (pSrc, Y416) 或抗 Src 抗体进行 Western 印迹。(D) 以空载体感染的 MCF10A 细胞进行血清饥饿, 根据指示以剂量的可溶性 Cripto 处理, 然后细胞裂解液通过使用如所标明的磷酸化 Akt (pAkt) 和 Akt 抗体的 Western 印迹进行分析。(E) 来自空载体感染的或者 Cripto 感染的 MCF10A 细胞的细胞裂解液通过使用如所标明的 Cripto 和肌动蛋白抗体的 Western 印迹分析。以空载体或 Cripto (F) 或者以空载体 (G) 感染的 MCF10A 细胞根据指示以的可溶性 Cripto、IgG 和 / 或 N-20 抗体处理。细胞生长 8 天并且使用 CyQuant 增殖测定试剂盒测量增殖。(H) 以空载体或 Cripto 感染的 MCF10A 细胞在根据指示以 IgG 或 N-20 抗体预处理之后用可溶性 Cripto 处理。通过使用 E- 钙黏着蛋白和肌动蛋白抗体的 Western 印迹分析细胞裂解液。(I) 以空载体或 Cripto 感染的 MCF10A 细胞用 IgG 或 N-20 抗体预处理, 铺板并允许粘附。所得到的细胞粘附使用 CyQuant 粘附测定定量。 $^{***}p < 0.001$ 。

[0036] 图 12A-C. 在 NCCIT 和 MCF10A 细胞中激活蛋白 -A 和 Nodal 的促增殖作用需要 Cripto 和 GRP78。以空载体、Cripto 和 / 或 GRP78shRNA 感染的 NCCIT 细胞 (A, B) 和以空载体或 Cripto 感染的 MCF10A 细胞 (C) 根据指示在 IgG 或 N-20 抗体存在或缺乏情况下以激活蛋白 -A 或 Nodal 处理或不处理。细胞另外生长 8 天并且使用 CyQuant 增殖测定试剂盒测量增殖。 $^{***}p < 0.001$; $^{**}p < 0.005$; $^*p < 0.01$ 。

[0037] 图 13A-C. GRP78D19-68 抑制经由 erbB2、erbB4 和 PI3K 的 Cripto 信号。如所标明, 293T 细胞以空载体、ErbB2 和 / 或 ErbB4 表达载体连同葡萄糖 -6- 磷酸酶 - 萤光素酶 (G6Pase-Lux) 和 b- 半乳糖苷酶构建体转染细胞。此外, 细胞以 (A) 空载体、(B) GRP78 或 (C) GRP78 D19-68 转染。细胞不经处理或者如所标明以 Cripto (400ng/ml) 和 / 或 LY294002 (LY)

处理。所得到的荧光素酶活性相对于 b- 半乳糖苷酶表达标准化并且表示为相对于未处理样品的变化倍数。

[0038] 图 14A-B. 说明所提出的 Cripto/GRP78 信号机制和拮抗作用的模型。(A) 细胞表面 Cripto/GRP78 复合体是经由 MAPK/PI3K 和 Smad2/3 途径的致癌 Cripto 信号所必需的。Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合导致通过 ErbB2 和 ErbB4 的 cSrc/MAPK/PI3K 途径的活化。Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合还促进 Cripto 对由激活蛋白 /Nodal/TGF- β 配体所发出信号的影响,导致低水平的 Smad2/3 活化。(B) 打断细胞表面 Cripto/GRP78 复合体致癌功能的试剂包括 N-20 GRP78 抗体、GRP78 D19-68 突变体和 sALK4-L75A-Fc。

具体实施方式

[0039] 本发明通过提供用于抑制 Cripto/GRP78 复合物形成的方法和用于假定 Cripto/GRP78 复合体调节剂的筛选方法克服了现有技术中的局限性。Cripto 是在脊椎动物胚胎发生和人肿瘤进展中具有重要作用的多功能细胞表面蛋白质。虽然已经证明其调节多重信号途径,但是先前鉴定的其配偶体不能完全解释它的分子作用。发明人针对鉴定新的 Cripto 相互作用蛋白质开展筛选,结果鉴定出葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78),它是一种在肿瘤细胞表面上也表达的 ER 蛋白伴侣。如在下面实施例所示,Cripto 与 GRP78 在多种细胞系的细胞表面上相互作用并且它们的相互作用不依赖于先前在 ER 内的结合。使用 shRNA 对内源 GRP78 的敲低导致 TGF- β 信号增强,表明 GRP78 与 Cripto 一样抑制该途径。当 GRP78 和 Cripto 共表达时协同对抗 TGF- β 的反应,包括在贴壁依赖性或不依赖性条件下生长的前列腺癌细胞的 Smad 磷酸化和生长抑制。下面的实例进一步提供了证据表明,共表达 GRP78 和 Cripto 的细胞在软琼脂中比单独表达任一种蛋白的细胞生长快的多。

[0040] 对 GRP78/Cripto 复合物形成的抑制可以打断 Cripto 信号并且降低细胞增殖。细胞表面 GRP78 的丧失或免疫中和阻断了 Cripto 依赖性 Nodal 信号,激活蛋白 /TGF- β 信号的拮抗作用和 ERK/MAPK 和 PI3K/Akt/GSK3 β 途径的活化。发明人已经证明,GRP78 存在于人 ES 细胞的表面上,其中它与 Cripto 共定位并且介导 Cripto 对激活蛋白和 Nodal 信号的相反作用。此外,细胞表面 GRP78 的敲低或免疫中和阻断了 Cripto 引起增加的细胞增殖、降低的 E- 钙黏着蛋白表达和降低的细胞粘附的能力。发明人发现,虽然在细胞表面 Cripto/GRP78 复合体缺乏情况下激活蛋白 -A 是细胞抑制剂,但是在细胞表面 Cripto/GRP78 复合体存在情况下激活蛋白 -A 和 Nodal 均增加细胞增殖。这些资料共同表明细胞表面 GRP78 对于 Cripto 信号是必需的,并且支持了这样一个想法,即在正常胚胎发育和肿瘤发生过程中 GRP78 介导 Cripto 的功能。

[0041] Cripto

[0042] Cripto 是在发育和癌症进展过程中具有重要作用的 GPI 锚定信号蛋白 (Strizzi 等,2005)。在发育中的小鼠胚胎中,Cripto 对于前 - 后轴的正确建立和胚层形成和心脏发生是必需的。Cripto 还被认为是在多能性维持和分化中具有重要作用的胚胎干细胞的标志物 (Adewumi 等,2007 ;Strizzi 等,2005)。虽然在正常成人组织中 Cripto 表达通常低或缺乏,但是发现在许多人实体肿瘤中水平高并且过表达促进贴壁不依赖性生长、增殖、存活、迁移、侵袭、血管发生和 EMT (Strizzi 等,2005)。Cripto 还促进体内肿瘤生长,因为 MMTV-Cripto 和 WAP-Cripto 小鼠产生了乳腺肿瘤 (Strizzi 等,2005 ;Strizzi 等,2004 ;Sun

等,2005;Wechselberger 等,2005) 并且靶向 Cripto 的单克隆抗体降低肿瘤异种移植在裸鼠中的生长 (Adkins 等,2003;Xing 等,2004)。

[0043] 与其它生长因子类似, Cripto 在从其 GPI 锚中断裂之后可从细胞释放, 并且已经证明可溶形式的 Cripto 活化促有丝分裂的 ras/raf/MAPK 和 PI3K/Akt 途径 (Strizzi 等,2005)。Cripto 还充当 TGF- β 超家族成员例如 Nodal (Schier,2003;Shen,2007)、GDF1 (Cheng 等,2003) 和 GDF3 (Chen 等,2006) 的专一性共受体。该共受体功能是胚胎发育过程所必需的 (Schier,2003;Strizzi 等,2005) 并且在成体中可调节正常组织生长和重塑, 如通过 Cripto 和 Nodal 在怀孕和哺乳的乳腺中共表达的事实所表明 (Bianco 等,2002a)。Cripto 共受体功能还促进肿瘤生长, 因为最新表明 Nodal 信号在促进人黑素瘤和乳腺癌细胞的可塑性和致癌性中起着关键的作用 (Postovit 等,2008;Topczewska 等,2006)。Cripto 还抑制由激活蛋白 (Adkins) (Gray 等,2003;Kelber 等,2008) 和 TGF- β 1 (Gray 等,2006) 引起的信号并且抑制对人乳腺上皮细胞和前列腺癌细胞的 TGF- β 1- 依赖性抗增殖作用 (Gray 等,2006;Shani 等,2008)。因此, Cripto 可通过激活生长 / 存活途径和通过抑制肿瘤抑制基因途径促进肿瘤发生 (Strizzi 等,2005)。

[0044] GRP78

[0045] 发明人已经鉴定出 GRP78 作为新的 Cripto 结合配偶体, 并且表明这两种蛋白质形成抑制细胞抑制性 TGF- β 信号和促进肿瘤细胞生长的细胞表面复合体。GRP78 已经广泛表征为辅助蛋白质折叠、成熟和装配的 ER 蛋白伴侣并且还协调未折叠蛋白质反应 (UPR) (Bernales 等,2006;Lee,2005;Lee,2001)。GRP78 在低氧和营养物缺乏条件下被诱导, 并且发现在肿瘤细胞中水平高 (Lee,2007)。GRP78 在肿瘤发生中起着必需作用的证据第一次出现于如下证明中, 即用反义核酸对纤维肉瘤细胞中 GRP78 诱导的抑制致使它们在裸鼠中完全不能形成肿瘤, 而它们的体外生长不受影响 (Jamora 等,1996)。此外, 向纤维肉瘤和乳腺肿瘤细胞中递送由 GRP78 启动子驱动的自杀转基因导致完全消灭小鼠中的相当大的肿瘤 (Chen 等,2000;Dong 等,2004;Gazit 等,1999)。因此, 在实体肿瘤中建立的环境导致诱导 GRP78 并且其表达促进肿瘤生长。

[0046] 虽然 GRP78 主要位于 ER 中, 但是其可以作为跨膜蛋白质存在 (Reddy 等,2003) 并定位在人肿瘤细胞的质膜上, 这最初在以毒胡萝卜内酯处理后的人横纹肌肉瘤细胞中证明 (Delpino 和 Castelli,2002;Delpino 等,1998)。随后, 细胞表面蛋白质组的总图谱证实 GRP78 暴露于肿瘤细胞表面上 (Shin 等,2003)。的确, GRP78 已经显示与 MHC 类 I 一起在细胞表面上作为病毒的共受体起作用 (Triantafilou 等,2002) 并且作为纤维蛋白溶酶原衍生的 Kringle 5 结构域 (Davidson 等,2005) 和活化的 α_2 -巨球蛋白 (α_2 M) (Misra 等,2002;Misra 等,2004) 的受体起作用。值得注意的是, GRP78 受体功能显示引起生长途径的活化, 导致增加的细胞增殖和抗细胞凋亡行为 (Misra 等,2006;Misra 等,2005;Misra 等,2004)。GRP78 的此类受体功能从 GRP78 自身抗体的存在已经与增加的前列腺癌进展和降低的患者存活相联系观察中描绘出癌症相关的关联性 (Mintz 等,2003)。此外, GRP78 在癌症进展中的因果作用由如下发现支持, 即靶向质膜上 GRP78 的自杀肽被证明选择性地杀死肿瘤细胞 (Arap 等,2004)。重要的是, 这些发现验证了细胞表面 GRP78 作为癌症治疗的推定的靶标。

[0047] Cripto 和 GRP78 结合并引起促进细胞增殖的细胞内信号

[0048] 基于 Cripto 结合位于肿瘤细胞表面上的 GRP78 的证据,发明人评价了 GRP78 作为 Cripto 受体起作用的可能性。与该假设相一致并且如下面实例所示, Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合对于肿瘤细胞、ES 细胞和乳腺上皮细胞中的 Cripto 信号是必需的。

[0049] Cripto 与 GRP78 的结合导致几个下游细胞内信号途径的活化。例如,如下面实例所示, Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合对于 Cripto 作为专一性 Nodal 共受体和激活蛋白和 TGF- β 信号的拮抗剂的功能是必需的。GRP78 受体功能介导可溶性 Cripto 肿瘤生长因子活性,包括活化 c-Src/MAPK/PI3K 途径,增加细胞增殖,降低 E-钙黏着蛋白表达和降低细胞粘附。在 Cripto/GRP78 复合体存在情况下激活蛋白-A 和 Nodal 具有促增殖作用,而当 Cripto/GRP78 复合体被打断时激活蛋白-A 是抗增殖的。不希望被任何理论所束缚,这些发现表明, GRP78 作为细胞表面 Cripto 受体 / 共因子起作用,这对于 Cripto 对激活蛋白 / Nodal/TGF- β 和 MAPK/PI3K 信号途径的发育和致癌作用是必需的。

[0050] A. GRP78 和 Cripto 在细胞表面上形成复合体,其不需要先前在 ER 中结合。

[0051] 如下面实例中所证明, GRP78 与 Cripto 在细胞表面上形成复合体,这是一个有用的以及潜在治疗暗示的发现。该相互作用看起来是特异性的和排他性的,因为 GRP78 是所观察到的与 Cripto 共纯化的仅有的两种细胞表面蛋白质之一并且因为大小与 Cripto 相似的无关的跨膜蛋白不与 GRP78 共纯化。同样,在相同条件下 I 型和 II 型 TGF- β 受体均不能免疫沉淀 GRP78。结果还表明, Cripto/GRP78 结合不依赖于 GRP78ER 蛋白伴侣功能,因为在单独的细胞群体中这些蛋白质成熟和加工之后的无细胞环境中观察到它们的相互作用。该结果还支持在细胞表面上该复合体的存在,因为显示在这些条件下结合 Cripto 的 GRP78 来自于质膜。此外,该结果表明对于该特异性结合相互作用所需的信息可以完全包含在这两种蛋白质的三级结构中,并且预期使用特异性地打断它们相互作用的分子可以靶向肿瘤细胞。

[0052] 发明人发现,内源 Cripto 和内源 GRP78 可作为来自小鼠胚性癌细胞的复合体分离。不希望被任何理论所束缚,该发现进一步支持了对于它们作为质膜上信号共因子的相互作用的内在作用,并且再一次地反对 GRP78 只是在 ER 中过表达 Cripto 的折叠中起作用的可能性。发明人还通过免疫细胞化学探究了 Cripto 和 GRP78 在同一细胞中的定位并且发现 Cripto 和 GRP78 主要共定位于作为部分出现在细胞表面的斑点状结构中。这些发现支持 Cripto 和 GRP78 在质膜上一起起作用的结论,但是还表明,它们在对于信号蛋白质所普遍的囊泡运输过程中是相关的。此外,细胞表面染色的斑点状性质与先前显示两种蛋白质均与脂筏相关的报导一致 (Triantafilou 和 Triantafilou, 2003 ; Watanabe 等, 2007)。

[0053] B. GRP78 作为细胞表面受体起作用

[0054] GRP78 在 ER 中作为蛋白伴侣和 UPR 的协调者起着保护性作用,但是它还在细胞表面上表达,其在细胞表面上的功能理解甚少。细胞表面 GRP78 已经被鉴定为是人乳腺癌样品中的肿瘤特异性抗原,并且在前列腺癌患者血清中发现了靶向 GRP78 的自身抗体并且显示靶向 GRP78 的自身抗体充当癌症侵袭性增加的生物标志物 (Arap 等, 2004 ; Mintz 等, 2003)。而且,由融合至凋亡诱导序列的 GRP78 结合模体构成的嵌合肽抑制前列腺和乳腺癌小鼠模型中的肿瘤生长 (Arap 等, 2004 ; Liu 等, 2007)。资料表明 GRP78 不仅仅是肿瘤细胞的选择性细胞表面标志物,而且还是介导 Cripto 对激活蛋白 / Nodal/TGF- β 和 MAPK/PI3K 信号的效应的受体 / 共因子。虽然对 GRP78 和激活蛋白 / Nodal/TGF- β 信号之间存在功能

性联系的发现似乎是独特的,但是先前研究已经表明细胞表面 GRP78 具有受体活性并且可以介导生长 / 存活信号。例如,在 L-1210 前列腺癌细胞中,2-巨球蛋白 (2-M) 通过细胞表面 GRP78 发信号引起 MAPK 和 PI3K 途径活化,产生促增殖和抗细胞凋亡行为 (Misra 等,2006 ; Misra 等,2004)。来自前列腺癌患者血清的靶向 GRP78 的抗体类似地显示出活化 MAPK/PI3K 途径并且增加细胞增殖。有趣的是,细胞表面 GRP78 也显示在介导内皮细胞中经由 Akt 的 GPI 锚定的 T-钙黏着蛋白依赖性存活信号转导中具有必不可少的作用 (Philippova 等,2008)。Cripto、T-钙黏着蛋白和 GRP78 每一个定位在脂筏中,表明 GRP78 受体功能也许局限在这些质膜微域中。

[0055] 下面的结果表明,对于 Cripto 与 TGF- β 配体和它们的受体功能性相互作用的能力而言需要 GRP78。不希望被任何理论所束缚,发明人预期,GRP78 将充当质膜上的锚或支架,允许 Cripto 采用对于其与 TGF- β 配体以及它们的受体形成复合体并且改变它们的信号特性所需要的构象或定向。Cripto 的 CFC 介导与 GRP78 的结合以及与类型 I 信号受体 ALK4 和 ALK7 的结合。不希望被任何理论所束缚,发明人预期,Cripto 与 GRP78 或者 ALK4/7 之间的结合相互作用不是彼此排斥的,而是 GRP78 将促进 Cripto 与 ALK4/7 和配体如 Nodal 和激活蛋白之间复合物的形成。GRP78 除了作为 Cripto 对 TGF- β 配体信号的作用的必不可少的介导物的作用之外,结果还显示 GRP78 与可溶性 Cripto 偶联活化 MAPK/PI3K 途径。该发现表明,GRP78 或者作为跨膜受体起作用,或者与一种或者两者偶联。虽然通常认为 GRP78 是局限在 ER 腔内的可溶性蛋白质,但是表明相当大部分的 GRP78 作为具有两个推定跨膜螺旋的整合膜蛋白质存在 (Reddy 等,2003)。Reddy 等对 ER 微粒体使用有限的胰蛋白酶消化表明,膜相关 GRP78 的 N-末端和 C-末端区在 ER 腔内 / 细胞外,而蛋白质的中间三分之一在细胞质中 (Reddy 等,2003)。该罕见的跨膜拓扑学与这样的事实一致,即已经表明细胞外蛋白质结合 GRP78 的 N-末端或 C-末端附近 (Davidson 等,2005 ;Gonzalez-Gronow 等,2006 ;Jakobsen 等,2007 ;Philippova 等,2008)。

[0056] C. Cripto 结合 GRP78 的 N-末端附近

[0057] 下面的资料表明,Cripto 结合至 GRP78 的最 N-末端,因为 N-末端 N-20 抗体封闭结合并且缺乏 N-20 表位的 GRP78 缺失突变体不能够结合 Cripto。N-20 抗体还显示竞争性的封闭 Kringle 5 (Davidson 等,2005) 和 T-钙黏着蛋白 (Philippova 等,2008) 的细胞效应,表明这些蛋白质结合 GRP78 的 N-末端。此外,2-M 和促增殖性前列腺癌患者来源自身抗体结合至定位于 GRP78 的邻近 N-20 表位的 N-末端的部位 (Gonzalez-Gronow 等,2006)。这些细胞外蛋白质的每一种结合 GRP78 最 N-末端的事实表明它们具有相似的激活 GRP78 受体功能的方式并且它们还彼此竞争对 GRP78 的结合。

[0058] D. GRP78 结合 Cripto 的 CFC.

[0059] Cripto 和 GRP78 之间相互作用的特异性被如下证明进一步支持,即 Cripto 的 CFC 结构域对于 GRP78 结合似乎是必需的和足够的。该发现是值得注意的,因为它表明 Cripto 可通过其 EGF-样结构域结合 TGF- β ,如发明人先前证明的那样 (Gray 等,2006),而同时通过其 CFC 结构域结合 GRP78。发明人推测,包含 Cripto、GRP78、TGF- β 和 TGF- β 受体的更大级别的蛋白质复合体也可形成并导致 TGF- β 信号的降低和 / 或改变。此外,Cripto 的 CFC 结构域结合 GRP78 的观察进一步肯定了 GRP78 对 Cripto 通过其它 TGF- β 配体例如 Nodal 和激活蛋白调节信号的可能影响。例如,先前已经表明,Cripto 的 CFC 结构域特异性

地结合激活蛋白 /Nodal I 型受体 ALK4(Yeo 和 Whitman,2001),并且因此 GRP78 可与 ALK4 竞争与 Cripto 的结合。备选地,GRP78 可参与包含 ALK4、Cripto 和激活蛋白 /Nodal 的蛋白质复合体。

[0060] E.Cripto相关 GRP78的靶向敲低抑制 TGF- β 信号。

[0061] 多条线的证据表明,Cripto 和 GRP78 每一个促进肿瘤形成并且两种蛋白质均选择性地表达于癌细胞的细胞表面。如本文所述,现在已经发现,先前已经表明涉及促进肿瘤生长的这两种蛋白质在细胞表面形成复合体。该发现将这些蛋白质在物理上以及通过抑制 TGF- β 信号的机制上关联起来。

[0062] 最初,GRP78 在 TGF- β 信号中的作用通过开发能够降低与质膜上 Cripto 结合的 GRP78 水平的 shRNA 评价。该 shRNA (SEQ ID NO :5) 增强 TGF- β 依赖的 Smad2 磷酸化,这提供了内源 GRP78 可限制 TGF- β 信号的证据。据发明人所知,该发现是 GRP78 影响 TGF- β 信号的首次证明,并且重要的是,其构成了一个新的机制,通过该机制细胞表面的 GRP78 可传递其致癌信息。该结果还与内源 Cripto 在这些细胞中具有相似作用的先前证明不谋而合 (Gray 等,2006) 并且与 GRP78 结合细胞表面上的 Cripto 以对抗生长抑制性的 TGF- β 信号的假设相一致。

[0063] F.GRP78和 Cripto协同减弱细胞抑制性 TGF- β 信号并且增强人前列腺癌细胞的增殖。

[0064] 当 GRP78 和 Cripto 一起表达时比单独表达时更大程度地抑制 TGF- β - 依赖性 Smad2 磷酸化作用的证明表明它们一起作用抑制 TGF- β 信号。不希望被任何理论所束缚,由于 Smad 磷酸化的水平直接依赖于受体活化的程度,该结果表明 Cripto 和 GRP78 通过降低 TGF- β 激活其受体的能力发挥它们的抑制性效应。这样的解释得到如下事实的进一步支持,即 Cripto 和 / 或 GRP78 在这些细胞中的过表达不改变 TGF- β 受体水平。此外,未能检测到 GRP78 与其 I 型或 II 型 TGF- β 受体之间的相互作用表明 GRP78 可通过结合 Cripto 或者通过直接结合 TGF- β 或者两者发挥其对 TGF- β 信号的抑制性效应。

[0065] 发明人进一步地证明,Cripto 和 GRP78 协同起作用以增强细胞生长并抑制 TGF- β 的细胞抑制性效应。当细胞在贴壁依赖性条件下生长时,Cripto 和 GRP78 每一个减弱 TGF- β 的生长抑制性效应,并且有趣的是,它们的共表达导致 TGF- β 性质上从抗增殖转变成促增殖。虽然对于 Cripto 和 GRP78 对细胞对 TGF- β 的增殖反应的联合作用的机制尚未确立,但是已经显示 TGF- β 在其细胞抑制效应已经丧失的条件下增加增殖 / 存活 (Paradali 和 Moustakas,2007)。同样地,发明人发现,Cripto 和 GRP78 可协同封闭贴壁不依赖性条件下 TGF- β 的细胞抑制效应。然而,与在单层中观察到的不同,TGF- β 处理不能增强共表达 Cripto 和 GRP78 的细胞在软琼脂中的生长。另一个差异是,当 GRP78 和 Cripto 单独表达时并且更显著地当它们共表达时,在缺乏 TGF- β 处理的情况下,GRP78 和 Cripto 增加在软琼脂中的集落生长。

[0066] 因此,结果表明 GRP78 和 Cripto 以取决于特定生长条件而变的方式影响细胞生长和 TGF- β 反应性。与贴壁不依赖性条件相反,在生长在贴壁依赖性条件下的细胞中,不同的信号途径可响应环境而活化。例如,肿瘤细胞利用信号途径例如 FAK 和 Src 促进贴壁不依赖性生长和避免失巢凋亡 (Mitra 和 Schlaepfer,2006)。因此,虽然特定的机制有待阐明,但是从 TGF- β 发源的具有与特定生长环境明确相关的信号途径的信号集中可导致生长

效应的细微差别。不管发明人观察的差别如何,然而,发明人已经一致性的发现,当 Cripto 和 GRP78 蛋白质一起表达时 Cripto 和 GRP78 对 TGF- β 反应性的效应大于它们单独表达时。因此,细胞表面 Cripto-GRP78 复合体表现出在贴壁依赖性和贴壁不依赖性生长条件下抑制细胞抑制性 TGF- β 反应的明确且一致的作用。

[0067] TGF- β 是主要的肿瘤阻抑因子并且其细胞抑制功能的丧失与肿瘤起始和进展相关 (Pardali 和 Moustakas, 2007)。这种生长抑制性 TGF- β 信号的丧失将源于受体信号的减少, Smad 功能受损或者转录调节物或其它靶标的破坏,它们一起构成了细胞抑制性程序 (Siegel 和 Massague, 2003)。的确, TGF- β 信号频繁地加重了抵抗抗增殖效应的肿瘤的生长和扩散 (Pardali 和 Moustakas, 2007)。Cripto 和 GRP78 每一种已经单独涉及到人癌进展并且这些蛋白质中的每一个在肿瘤细胞表面上选择性表达。在此发明人已经提出证据证明这两种蛋白质在细胞表面上物理性相互作用。发明人还进一步提供了证明,即它们协同增强肿瘤细胞生长并且逆转 TGF- β 的肿瘤阻抑因子效应。不希望被任何理论所束缚,这些结果支持这样的想法,即该复合体导致恶性肿瘤增加并且其通过在受体水平抑制 TGF- β 信号赋予肿瘤细胞以竞争性增殖的优势。依据这些发现,预期细胞表面 Cripto-GRP78 复合体代表着具有重要治疗潜能的称心如意的靶标,因为其具有仅影响癌症细胞而不影响其正常组织对等物的固有选择性优势。

[0068] G. GRP78/Cripto/TGF- β 配体

[0069] 结果显示, GRP78 介导 Cripto 的共受体功能并且涉及细胞表面 GRP78 在胚胎发生和干细胞调节过程中的新的和必不可少的作用。在胚胎发育过程中 Cripto 作为 Nodal 和相关 TGF- β 配体的共受体起着至关重要的作用,并且在斑马鱼和小鼠中的遗传学研究已经表明 Cripto 和相关的 EGF-CFC 蛋白质对于中胚层和内胚层形成、心脏发生和左/右不对称性的建立是必不可少的。Cripto 还已经被公认为是胚胎干细胞的标志物并且在干细胞维持和分化中起着重要的作用。从 Cripto- 无效小鼠产生的 ESC 不能够经历心肌发生和自发分化成神经元。如在下面实例中所示,内源 GRP78 是 Cripto 信号包括 Cripto- 依赖性 Nodal 信号的必需的介导者。此外,发明人提供了证明,即 GRP78 出现在人 ES 细胞的表面上,它在表面上与 Cripto 共定位。对 hES 细胞上 GRP78 的抗体阻断封闭了 Nodal 信号,表明在这些细胞中对于 Nodal 信号需要 GRP78。这些结果支持靶向 Cripto 和 GRP78 之间的界面将有助于对 hES 细胞需要优先分化成神经元的神经变性疾病的基于细胞的治疗。

[0070] 数项研究也支持 Cripto 对促进肿瘤表型的激活蛋白 /Nodal/TGF- β 信号的调节作用 (Adkins 等, 2003 ; Gray 等, 2003 ; Gray 等, 2006 ; Salomon, 2006 ; Shani 等, 2008 ; Shen, 2003 ; Shukla 等, 2008 ; Topczewska 等, 2006)。Cripto 抑制 TGF- β 信号以及 TGF- β 对乳腺上皮细胞 (Gray 等, 2006) 和原代角质形成细胞 (Shukla 等, 2008) 的细胞抑制性效应。Cripto 还抑制 TGF- β 对前列腺癌细胞的抗增殖效应,这是一种被 GRP78 过表达所增强的效应 (Shani 等, 2008)。与 TGF- β 一样,激活蛋白 -A 抑制大多数上皮细胞的增殖并且已经提出激活蛋白 /TGF- β 信号的拮抗作为致癌性 Cripto 的机制。与之相反,已经证明 Nodal 促进黑素瘤和乳腺癌可塑性和致瘤性 (Hendrix 等, 2007 ; Postovit 等, 2008 ; Salomon, 2006 ; Topczewska 等, 2006) 并且结果表明这将需要经由 Cripto 和 GRP78 的信号。在本发明中,发明人已经证明使用 shRNA 或 N-20GRP78 封闭性抗体靶向 NCCIT 上的细胞表面 GRP78 消除了 Cripto 对通过激活蛋白、TGF- β 和 Nodal 的信号的影响。该影响可能是通过 Cripto 和

GRP78 之间的相互作用介导的,因为将两种蛋白质一起敲低比将任一个蛋白质单独敲低具有更深远的影响。重要的是,这是内源 Cripto 抑制激活蛋白 -A 和激活蛋白 -B 信号的首次证明并且证实了内源 Cripto 阻断通过 TGF- β 的信号的前证明。这些发现还支持 GRP78 具有作为 Cripto 共因子的新作用,这对于 Cripto 对激活蛋白 /Nodal/TGF- β 信号的潜在致癌效应是必需的。

[0071] H. GRP78介导 Cripto生长因子活性

[0072] Cripto 除了对激活蛋白 /Nodal/TGF- β 信号具有效应外,还激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和磷脂酰肌醇 -3- 激酶 (PI3K) 途径 (De Santis 等,1997 ;Ebert 等,1999 ; Strizzi 等,2005)。这些途径在大多数癌症中被异常活化并且广泛认为它们具有促进多种致癌后果包括增加肿瘤细胞存活和增殖的能力 (Dhillon 等,2007 ;Shaw 和 Cantley, 2006)。已经显示,用可溶性 Cripto 处理 HC-11 乳腺上皮细胞导致 SH2- 衔接蛋白 Shc 的酪氨酸磷酸化、Shc 与 Grb2 的结合以及 p42/44Erk/MAPK 途径的活化 (Kannan 等,1997)。可溶性 Cripto 还引起 PI3K 的 p85 调节亚基的磷酸化,导致 SiHa 颈癌细胞中 Akt 的磷酸化和活化 (Ebert 等,1999)。Cripto 不结合 EGF 受体家族成员 (Kannan 等,1997),并且据报导 MAPK/PI3K 途径被可溶性 Cripto 的活化是 ALK4- 不依赖性的 (Bianco 等,2002b)。在用可溶性 Cripto 处理细胞之后 c-Src 被活化并且 c-Src 活化对于 MAPK 和 PI3K 途径的 Cripto 依赖性活化是必需的 (Bianco 等,2003)。此外,据报导 GPI- 锚定蛋白聚糖磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -1 结合 Cripto 并促进 Cripto 依赖性 c-Src 活化 (Bianco 等,2003)。然而,尚未鉴定出介导 c-Src 活化和 MAPK/PI3K 信号的跨膜 Cripto 受体。下面的资料证明细胞表面 GRP78 介导 Cripto 的肿瘤生长因子活性。

[0073] Cripto/GRP78 复合体还影响 Akt/Erk 信号。对 NCCIT 细胞中 Cripto/GRP78 复合体的敲低或抗体破坏阻断了可溶性 Cripto 诱导 Akt、GSK3b 和 p42/44 的磷酸化。

[0074] I. Cripto/GRP78复合体转换激活蛋白 -A和 Nodal的增殖效应

[0075] 响应于激活蛋白、Nodal 和 TGF- β 配体的 Smad2/3 信号取决于细胞类型和细胞环境具有对细胞增殖、凋亡和分化可变性并且甚至具有相反的作用。Smad2/3 途径的肿瘤抑制因子功能已经被广泛表征,并且从其具有抑制多种细胞类型增殖的能力以及在一些情况下引起终末分化或凋亡的能力得出来的。现在已经广泛确立,Smad2/3 信号下游的细胞抑制性转录程序对于正常的组织稳态和肿瘤抑制是至关重要的,并且已经在数个类型的人癌症,包括乳腺癌中观察到该途径的破坏或改变。然而,激活蛋白 /Nodal/TGF- β 配体在肿瘤细胞已经变得抵抗 Smad2/3 途径的抗增殖效应的条件下加重肿瘤表型。肿瘤细胞通常分泌高水平的这些配体,这些配体作用于肿瘤细胞和肿瘤微环境内的其它细胞类型包括基质成纤维细胞、内皮细胞和免疫细胞。在该环境中 Smad2/3 的活化可引起增强的肿瘤细胞增殖、运动性、侵袭和上皮间质转化 (EMT) 以及增加的血管发生和降低的免疫监视。加在一起,这些效应可导致肿瘤生长和转移的增强并且产生针对阻断人癌症中 TGF- β 信号的治疗成就。

[0076] 发明人还显示,取决于细胞表面 Cripto/GRP78 复合体的存在与否,激活蛋白 -A 对细胞增殖具有相反的作用。在空载体感染的 NCCIT 细胞和其中 Cripto/GRP78 复合体完整的 Cripto- 过表达性 MCF10A 细胞中激活蛋白 -A 具有促增殖效应。相反,当通过敲低或 N-20 抗体阻断将这些细胞中的 Cripto/GRP78 复合体破坏时,激活蛋白 -A 具有抗增殖效应。

与激活蛋白-A一样,在表达完整 Cripto/GRP78 复合体的这些细胞中,Nodal 增强增殖。然而,与激活蛋白-A不同,Nodal 对其中 Cripto/GRP78 复合体被破坏的细胞的增殖没有影响。激活蛋白-A 和 Nodal 之间的这种差异可能反映出这样的一个事实,即 Cripto 对于 Nodal 信号是必需的而对于激活蛋白-A 信号是不需要的。这些资料表明,细胞表面上的 Cripto/GRP78 复合体可通过促进 Nodal 的促有丝分裂效应并引起激活蛋白-A 性质上从细胞抑制转变成促增殖而促进肿瘤生长。因此,Cripto 引起从上皮-细胞抑制性向间质-促增殖性转变的细胞反应,并且这类似于当肿瘤细胞变成对 Smad2/3 的细胞抑制效应抵抗时所观察到的情况。这些结果暗示了通过它激活蛋白和 Nodal 变成促肿瘤发生性的机制,并且该效应似乎是 GRP78 依赖性的。有趣的是,发明人发现,激活蛋白-A 和 Nodal 在 Cripto/GRP78 复合体存在下是促有丝分裂性的,然而在这些复合体缺乏情况下激活蛋白-A 具有细胞抑制性效应并且 Nodal 对增殖无影响。因此,细胞表面 Cripto/GRP78 复合体可促进 MAPK/PI3K 和 Smad2/3 途径之间的交叉通讯,使得细胞抑制性 Smad2/3 信号在性质上变成促增殖性的。因此,细胞表面 Cripto/GRP78 复合体作为细胞信号节点起作用以调节多种肿瘤和干细胞行为。

[0077] 如下事实支持 Cripto 和 GRP78 之间存在生物学相互作用,即 Cripto 和 GRP78 具有重叠的分布和功能。Cripto (Ding 等,1998) 和 GRP78 (Luo 等,2006) 敲除小鼠均是早期胚胎致死性的。Cripto 还可调节胚胎干细胞行为 (Minchiotti,2005) 并且发明人在此已经证明 Cripto 和 GRP78 在干细胞中共定位并且协同调节激活蛋白和 Nodal 信号。就此而论,发现 GRP78 对于作为多能性干细胞前体的胚胎内细胞团的增殖和存活是必需的 (Luo 等,2006)。此外,Cripto (Xu 等,1998 ;Xu 等,1999) 和 GRP78 (Mao 等,2006) 在发育中的心脏中显著表达并且它们中的每一个已经涉及到心脏发生。最后,向 Cripto 一样 (Strizzi 等,2005),GRP78 增加了恶性肿瘤并且通过增强肿瘤细胞存活、增殖和血管发生向肿瘤细胞提供了竞争性生长优势 (Dong 等,2008 ;Lee,2007)。重要的是, Cripto 和 GRP78 均选择性地表达于人肿瘤细胞的质膜上并在它们的正常组织对等物上不表达,并且它们中的每一个均独立地验证可作为体内的肿瘤特异性治疗靶标。因此,Cripto/GRP78 复合体代表着具有显著治疗潜力的新的且称心如意的靶标。

[0078] IV. Cripto/GRP78 相互作用的抑制剂

[0079] Cripto/GRP78 相互作用可以通过抑制 Cripto/GRP78 复合物形成和 / 或功能的 Cripto 靶向性化合物和 / 或 GRP78 靶向性化合物选择性地抑制。在某些实施方案中, Cripto 靶向性或 GRP78 靶向性化合物可以是抗体、双功能抗体、适体、抗体片段例如 f(ab) 或 f(ab)₂ 区、抑制性肽、小分子、反义分子或 siNA (例如 siRNA 或 shRNA)。这些化合物可以由技术人员通过测试 Cripto/GRP78 结合和 / 或下游信号被候选化合物改变的筛选法产生。在某些实施方案中,Cripto 靶向性化合物可特异性影响或结合 Cripto 的 CFC 结构域并且抑制 Cripto/GRP78 结合和 / 或信号。在另外的实施方案中,GRP78 靶向性化合物可与 GRP78 的 N- 末端区或最 N- 末端区,例如 GRP78 的 N-20 抗体表位结合或相互作用。

[0080] A. 抗体

[0081] 本发明的某些方面涉及选择性结合 Cripto 和 / 或 GRP78 的一种或更多种抗体。这些抗体可以用于治疗癌症 (例如黑素瘤、肝癌、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、NSCLC、头颈癌症)。此外,这些抗体可用于评估 Cripto 和 / 或 GRP78 在组织中,例如癌性组织或癌前组织中的

表达。在某些实施方案中，N-20 抗体或结合 GRP78 的 N-20 表位的抗体可用于靶向 GRP78 并破坏 Cripto/GRP78 复合体的形成。

[0082] 在某些实施方案中，希望产生抗所鉴定靶向性肽或它们的受体的抗体。适当的靶向性肽或受体或其部分可通过连接体、多连接体或衍生的氨基酸与一种或更多种试剂偶联、结合、连接、缀合或化学交联。这可以如下开展以致于产生双特异性或多价组合物或疫苗。进一步地构想，在制备这些组合物中使用的方法是本领域技术人员熟悉的并且将适宜向人施用，即可药用。优选的试剂是载体钥孔血蓝蛋白 (KLH) 或牛血清白蛋白 (BSA)。

[0083] 术语“抗体”用于指具有抗原结合区的任何抗体样分子，并且包括抗体片段例如 Fab'、Fab、F(ab')₂、单结构域抗体 (DAB)、Fv、scFv (单链 Fv) 等等。用于制备和使用多种基于抗体的构建体和片段的技术在本领域众所周知。用于制备和表征抗体的方法也是本领域众所周知的 (见例如 Harlow 和 Lane, 1988 ;通过参考并入本文)。

[0084] 在本发明的多个实施方案中，可以针对噬菌体展示文库得到和筛选来自一个或更多个患病个体的循环抗体。结合循环抗体的靶向性肽可充当天然抗原，例如位于靶组织内皮细胞表面上的受体蛋白质的模拟位。例如，在患有前列腺癌个体中的循环抗体可以结合特异性或选择性地位于前列腺肿瘤中的抗原。如在下面更详细地讨论，可以通过噬菌体展示针对此类抗体鉴定靶向性肽。此类靶向性肽可以用于通过例如使用已知技术如免疫亲和纯化、Western 印迹、电泳后的条带切除和蛋白质 / 肽测序和 / 或计算机同源性检索，鉴定被抗体识别的天然抗原。技术人员将认识到，针对疾病特异性或选择性抗原的抗体可用于多种应用中，例如疾病状态的检测、诊断和 / 或预后、患病组织成像和 / 或治疗剂的靶向递送。

[0085] 在某些实施方案中，Cripto 和 / 或 GRP78 抗体是单克隆抗体。单克隆抗体 (MAb) 被认为具有某些优势，例如重现性和大规模生产，并且通常优选使用它们。因此，本发明提供人、小鼠、猴、大鼠、仓鼠、兔甚至鸡来源的单克隆抗体。由于小鼠单克隆抗体具有易制备性和立即可用性，因此常优选小鼠单克隆抗体。

[0086] “人源化”抗体是本发明特别考虑的，它们是携带有人恒定区和 / 或可变区结构域的来自小鼠、大鼠或其它物种的嵌合抗体、双特异性抗体、重组和工程化抗体及其片段。用于开发针对患者疾病的“客户定制”抗体的方法同样也是已知的并且此类客户定制的抗体也在考虑之内。

[0087] 1. 用于抗体产生的方法

[0088] 可以使用本领域众所周知的技术制备 Cripto 和 / 或 GRP78 选择性抗体。例如，用于产生单克隆抗体 (MAb) 的方法通常以与制备多克隆抗体的方法相同的路线开始。简言之，以根据本发明的 LEE 或 CEE 组合物免疫动物并从所免疫动物收集抗血清来制备多克隆抗体。

[0089] 广范围的动物种类可以用于产生抗血清。有代表性地，用于产生抗血清的动物是兔、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠或山羊。动物的选择可以根据操作的难易程度、成本或预期的血清量决定，这将是本领域技术人员已知的。

[0090] 为了产生更强烈的免疫反应和帮助产生抗血清，特定免疫原成分的免疫原性可以通过使用称作佐剂的非特异性免疫反应刺激剂增强。适宜的佐剂包括所有可接受的免疫刺激化合物，例如细胞因子、趋化因子、辅因子、毒素、合胞体、合成的组合物或者编码此类佐

剂的 LEE 或 CEE。

[0091] 可以使用的佐剂包括 IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ -干扰素、GMCSP、BCG、氢氧化铝、MDP 化合物如 thur-MDP 和 nor-MDP、CGP (MTP-PE)、脂质 A 和单磷酰脂质 A (MPL)。还考虑了 RIBI, 其包含在 2% 鲨烯 / Tween 80 中的从细菌提取的 MPL、海藻糖二霉菌酸酯 (TDM) 和细胞壁支架 (CWS) 三种成分。甚至可以使用 MHC 抗原。示例性的常常优选的佐剂包括完全弗氏佐剂 (包含杀死的结核分枝杆菌的非特异性的免疫反应刺激剂)、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。

[0092] 除了佐剂之外, 还希望共同施用已经显示上调 T 细胞免疫或者下调抑制因子细胞活性的生物反应调节剂 (BRM)。此类 BRM 包括, 但不限于, 西咪替丁 (CIM; 1200mg/d) (Smith/Kline, PA); 低剂量环磷酰胺 (CYP; 300mg/m²) (Johnson/Mead, NJ), 细胞因子例如 γ -干扰素、IL-2 或 IL-12 或者编码涉及免疫辅助功能蛋白质的基因, 例如 B-7。

[0093] 用于产生多克隆抗体的免疫原组合物的量根据免疫原的性质以及用于免疫的动物而变化。可采用多种途径施用免疫原, 包括但不限于皮下、肌肉、真皮内、表皮内、静脉内和腹膜内。可以通过在免疫后不同点从所免疫动物抽取血液检测多克隆抗体的产生。

[0094] 还可以给于第二次加强剂量 (例如注射提供)。重复加强或滴定过程直到达到适宜的滴度。当得到所渴望水平的免疫原性时, 可将免疫的动物放血并将分离的血清储存, 和 / 或动物可以用于产生 MAbs。

[0095] 对于兔多克隆抗体的产生, 可以通过耳静脉或备选地通过心脏穿刺从动物中取血。使所取出的血液凝固, 然后离心从全细胞和血液凝块中分离血清部分。血清可以用于多种应用中, 或者通过众所周知的方法纯化想要的抗体部分, 例如使用另一抗体即结合至固体基质上的肽的亲合层析或者通过使用例如蛋白质 A 或蛋白质 G 层析。

[0096] 可以通过使用众所周知的技术, 例如在美国专利 4, 196, 265 中例证的那些技术容易地制备 MAbs, 该美国专利通过参考并入本文。有代表性地, 该技术涉及以所选择的免疫成分, 例如纯化或部分纯化的蛋白质、多肽、肽或结构域免疫适宜的动物, 而不管它是野生型的或者突变体成分。免疫成分以有效刺激抗体产生性细胞的方式施用。

[0097] 用于产生单克隆抗体 (MAbs) 的方法通常以与产生多克隆抗体的方法相同的路线开始。啮齿类例如小鼠和大鼠是优选的动物, 然而, 也可以使用兔、绵羊或青蛙细胞。使用大鼠可以提供某些优势 (Goding, 1986, 第 60-61 页), 但是优选小鼠, BALB/c 小鼠是最优选的, 因为这是最常规使用的并且通常得到更高百分比的适宜融合体。

[0098] 通常如上所述, 以抗原注射动物。抗原可以与佐剂混合, 例如弗氏完全佐剂或不完全佐剂。以同一抗原或者编码抗原的 DNA 进行加强施用将以大约两周的间隔进行。

[0099] 在免疫之后, 选择具有产生抗体潜能的体细胞, 特别是 B 淋巴细胞 (B 细胞) 用于 MAbs 生产方案中。这些细胞可以从活组织检查的脾脏、扁桃体或淋巴结中得到, 或者从外周血液样品得到。脾脏细胞和外周血细胞是优选的, 前者是 因为它们处于分裂中的浆母细胞阶段的抗体产生性细胞的丰富来源, 并且后者是因为外周血容易得到。

[0100] 通常将免疫一组动物, 并且具有最高抗体滴度的动物的脾脏将被取出并通过用注射器将脾脏匀浆得到脾脏淋巴细胞。有代表性地, 来自所免疫小鼠的脾脏包含大约 5×10^7 至 2×10^8 个淋巴细胞。

[0101] 然后将来自所免疫动物的抗体产生性 B 淋巴细胞与永生化骨髓瘤细胞的细胞融

合,骨髓瘤细胞通常与所免疫动物为同一物种。适用于杂交瘤产生融合方法中的骨髓瘤细胞系优选地是非抗体产生性的、具有高的融合效率和酶缺乏,酶缺乏使得它们不能够在支持仅想要的融合细胞(杂交瘤)生长的某些选择培养基中生长。

[0102] 可使用本领域技术人员已知的许多骨髓瘤细胞中的任何一种(Goding,第65-66页,1986;Campbell,第75-83页,1984)。例如,当免疫的动物是小鼠时,可以使用P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp210-Ag14、FO、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1.7和S194/5XX0Bu1;对于大鼠可使用R210、RCY3、Y3-Ag1.2.3、IR983F和4B210;并且与人细胞融合体相关的可使用U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2和UC729-6。

[0103] 一个优选的小鼠骨髓瘤细胞是NS-1骨髓瘤细胞系(也称作P3-NS-1-Ag4-1),其可以通过请求细胞系库编号GM3573容易地从NIGMS人基因突变细胞库中得到。可以使用的另一个小鼠骨髓瘤细胞系是8-氮鸟嘌呤抗性小鼠骨髓瘤SP2/0非生产者细胞系。

[0104] 用于产生抗体产生性脾脏或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂合体的方法通常包括在促进细胞膜融合的一种试剂或多种试剂(化学的或电的)存在下以2:1的比例混合体细胞与骨髓瘤细胞,虽然比例可以大约20:1至大约1:1变化。使用仙台病毒的融合方法已经由Kohler和Milstein描述(1975;1976),并且使用聚乙二醇(PEG)的那些方法,例如37%(v/v)PEG,由Geftter等描述(1977)。电诱导融合方法的使用也是适当的(Goding,第71-74页,1986)。

[0105] 融合过程通常以低的频率,大约 1×10^6 至 1×10^8 ,产生能存活的杂合体。然而,这不存在难题,因为通过在选择性培养基中培养,可存活的融合杂合体可与亲本、未融合的细胞(特别是正常情况下将连续无限分裂的未融合骨髓瘤细胞)区别开来。选择性培养基通常是在组织培养基中包含阻断核苷酸从头合成的试剂的培养基。示例性且优选的试剂是氨基蝶呤、甲氨蝶呤和偶氮丝氨酸。氨基蝶呤和甲氨蝶呤阻断嘌呤和嘧啶两者的从头合成,而偶氮丝氨酸仅阻断嘌呤的合成。当使用氨基蝶呤或甲氨蝶呤时,培养基补充有次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷作为核苷酸的来源(HAT培养基)。当使用偶氮丝氨酸时,培养基补充有次黄嘌呤。

[0106] 优选的选择培养基是HAT。仅能够利用核苷酸补救途径的细胞能够在HAT培养基中存活。骨髓瘤细胞缺乏补救途径的关键酶,例如次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT),并且因此它们不能存活。B细胞能够利用该途径,但是它们在培养时具有有限的寿命并通常在大约两周内死亡。因此,能够在选择培养基中存活的仅有的细胞是从骨髓瘤和B细胞形成的那些杂合体细胞。

[0107] 这种培养提供一群杂交瘤,从这些杂交瘤中可以选择特异性的杂交瘤。有代表性地,杂交瘤的选择可以如下开展,即通过在微量滴定板中进行单克隆稀释来培养细胞,接着测试各个克隆上清液(大约两周至三周之后)的预期反应性。测定将是敏感的、简单的和快速的,例如放射免疫测定、酶免疫测定、细胞毒性测定、空斑测定、斑点免疫结合测定等等。

[0108] 然后将所选择的杂交瘤进行连续稀释并克隆成各个抗体-产生性细胞系,然后克隆可以无限繁殖以提供MAb。细胞系可以用来以两个基本方式生产MAb。第一,可将杂交瘤样品注射入(常常注射入腹腔)用于提供最初融合的体细胞和骨髓瘤细胞的组织相容性动物类型中(例如同基因小鼠中)。任选地,在注射前,动物以碳氢化合物,特别是油类例如降植烷(四甲基十五烷)致敏。所注射的动物产生分泌由所融合细胞杂合体产生的特异性

单克隆抗体的肿瘤。然后可以抽取动物的体液,例如血清或腹水,以提供高浓度的 MAb。第二,各个细胞系可体外培养,其中 MAb 可天然地分泌进入培养基中,从培养基中可以容易地得到高浓度的 MAb。

[0109] 如果需要的话,通过任一种方法产生的 MAb 可以使用过滤、离心和多种层析方法如 HPLC 或亲和层析进一步纯化。本发明单克隆抗体的片段可以通过包括用酶例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化的方法和 / 或通过化学还原断裂二硫键从如此产生的单克隆抗体得到。备选地,本发明包括的单克隆抗体片段可以使用自动肽合成仪合成。

[0110] 还考虑了可使用分子克隆方法产生单克隆。在一个实施方案中,从所免疫动物脾脏分离的 RNA 制备组合的免疫球蛋白噬菌体文库,并且通过使用表达抗原的细胞和对照细胞淘洗选择表达适当抗体的噬菌粒。该方法相对于常规杂交瘤技术的优势是在一轮中可以产生和筛选大约 10^4 次量的抗体,并且通过 H 和 L 链组合产生新的特异性,这进一步提高发现适当抗体的机会。在另一实例中,LEE 或 CEE 可以用于在无细胞体系中体外产生抗原。这些可以用作用于筛选单链抗体文库的靶标。这可以极其快速地鉴定许多不同的抗体,而无需使用动物。

[0111] 备选地,本发明包括的单克隆抗体片段可以使用自动肽合成仪合成,或者通过在大肠杆菌中表达全长基因或基因片段合成。

[0112] 全部为人的单克隆抗体可以使用转基因动物产生,例如包括携带人 IgH 和 Igkappa 基因座部分,包括大多数可变区库,对于 Cmicro、Cdelta 和 Cgamma1、Cgamma2 或 Cgamma4 任一的基因,以及对于它们的功能必需的顺式元件的种系配置的巨碱基大小 YAC 的 XenoMouse (Green, 1999)。可以繁殖在遗传背景上小鼠免疫球蛋白产生不足的 IgH 和 Igkappa 转基因。在 XenoMouse 品系中的 Ig 转基因上编码的大且复杂的人可变区库支持开发大的外周 B 细胞分隔和产生多种与来自成人相似的初次免疫库。以人抗原免疫 XenoMouse 小鼠通常导致强烈的次级免疫反应,这可以最终作为具有亚纳摩尔亲和性的一大组抗原特异性的完全人 IgGkappa mAb 收集到。来自 XenoMouse 动物的单克隆抗体已经显示在体外和体内均具有治疗潜能,并且基于人临床试验似乎具有正常人抗体的药物代谢动力学。

[0113] 2. 抗体结合物

[0114] 本发明还提供选择性结合 Cripto 或 GRP78 的连接至至少一种试剂形成抗体结合物抗体,通常是单克隆类型的抗体。为了增加抗体分子作为诊断或治疗剂的有效性,抗体可以与至少一个想要的分子或部分共价结合或复合。此类分子或部分可以是,但不限于,至少一个效应子或报告分子。效应子分子包括具有所希望活性如细胞毒性活性的分子。连接至抗体的效应子分子的非限定性实例包括毒素、抗肿瘤剂、治疗酶、放射性标记的核苷酸、抗病毒剂、螯合剂、细胞因子、生长因子和寡或多核苷酸。相反,报告分子被定义为可使用测定法检测的任何部分。与抗体缀合的报告分子的非限定性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、生色团、发光分子、光亲和性分子、有色颗粒或者配体,例如生物素。

[0115] Cripto 和 / 或 GRP78 抗体可以用作抗体结合物的基础。除了抗体分子的抗原结合位点之外,抗体分子中用于结合生物活性分子的位点包括位于可变结构域中的可结合病原体、B 细胞超抗原、T 细胞共受体 CD4 和 HIV-1 包膜的位点 (Sasso 等, 1989 ; Shorki 等,

1991 ;Silvermann 等,1995 ;Cleary 等,1994 ;Lenert 等,1990 ;Berberian 等,1993 ;Kreier 等,1991)。此外,可变结构域参与抗体自身结合 (Kang 等,1988),并且包含由抗抗体识别的表位 (独特位) (Kohler 等,1989)。

[0116] 某些抗体结合物的实例是其中抗体被连接至可检测标记的那些结合物。“可检测标记”是由于它们的特异性功能特性和 / 或化学特征而可以被检测到化合物和 / 或元素,它们的使用使得与其连接的抗体可以被检测和 / 或根据需要进行进一步定量。另一个此类实例是包含连接至细胞毒性剂或抗细胞剂的抗体的结合物的形成,并且可以称作“免疫毒素”。

[0117] 抗体结合物通常优选作为诊断剂。抗体诊断通常分为两类,即用于体外诊断的那些,例如在多种免疫测定中,和 / 或用于体内诊断方案的那些,通常称作“抗体导向的成像”。

[0118] 许多适当的成像剂是本领域已知的,如用于附着抗体的方法的那些 (见例如美国专利 5,021,236,4,938,948,和 4,472,509,每一文献通过参考并入本文)。所使用的成像部分可以是顺磁离子;放射性同位素;荧光染料;NMR 可检测的物质;X 射线成像。

[0119] 以顺磁离子为例,可以以实例方式提到的离子例如铬 (III)、锰 (II)、铁 (III)、铁 (II)、钴 (II)、镍 (II)、铜 (II)、钆 (III)、钐 (III)、铈 (III)、钕 (III)、钷 (II)、铽 (III)、镱 (III)、铟 (III) 和 / 或铊 (III),其中钆是特别优选的。用于其它背景,如 X 射线成像的离子包括但不限于镧 (III)、金 (III)、铅 (II) 并且特别是铋 (III)。

[0120] 用于治疗 and / 或诊断应用的放射性同位素包括砷 ²¹¹、¹⁴碳、⁵¹铬、³⁶氯、⁵⁷钴、⁵⁸钴、铜 ⁶⁷、¹⁵²铈、镓 ⁶⁷、³氢、碘 ¹²³、碘 ¹²⁵、碘 ¹³¹、铟 ¹¹¹、⁵⁹铁、³²磷、镱 ¹⁸⁶、镱 ¹⁸⁸、⁷⁵硒、³⁵硫、铈 ^{99m}和 / 或钇 ⁹⁰。¹²⁵I 对于某些实施方案是优选的,并且铈 ^{99m}和 / 或铟 ¹¹¹由于它们能量低并且对大范围的检测具有适应性也是经常优选的。可以根据本领域众所周知的产生放射性标记的本发明单克隆抗体。例如,单克隆抗体可以通过与碘化钠和 / 或碘化钾和化学氧化剂如次氯酸钠,或酶性氧化剂如乳过氧化物酶接触被碘化。根据本发明的单克隆抗体可以通过配体交换过程以铈 ^{99m}标记,例如通过以亚锡溶液还原过铈酸盐,将还原的铈螯合在 Sephadex 柱上并且向该柱应用抗体。备选地,可以使用直接标记技术,例如 通过孵育过铈酸盐、还原剂例如 SnCl_2 、缓冲溶液如邻苯二甲酸钠-钾溶液和抗体。常用于将作为金属离子存在放射性同位素结合至抗体的中间的功能基是钆喷酸 (DTPA) 或乙二胺四乙酸 (EDTA)。

[0121] 在荧光标记中考虑用作结合物的包括 Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、俄勒冈绿 488、俄勒冈绿 500、俄勒冈绿 514、太平洋蓝、REG、罗丹明绿、罗丹明红、肾造影剂、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明、和 / 或德克萨斯红。

[0122] 本发明考虑的另一类型的抗体结合物是预期主要用于体外使用的那些,其中抗体与第二个结合配体和 / 或酶 (酶标签) 连接,当与生色底物接触时酶产生有色的产物。适宜的酶实例包括尿素酶、碱性磷酸酶、(辣根) 过氧化氢酶或葡萄糖氧化酶。优选的第二个结合配体是生物素和 / 或抗生物素蛋白和链亲和素化合物。此类标签的使用是本领域技术人员众所周知的并且描述于例如美国专利 3,817,837 ;3,850,752 ;3,939,350 ;3,996,345 ;4,277,437 ;4,275,149 和 4,366,241 中 ;每一美国专利通过参考并入本文。

[0123] 分子与抗体的位点特异性附着的另一已知方法包括抗体与基于半抗原的亲合性

标签的反应。基本上,基于半抗原的亲合性标签与抗原结合位点中的氨基酸反应,由此破坏了该位点并封闭特异性的抗原反应。然而,这并不是有利的,因为这导致抗原丧失结合抗体结合物。

[0124] 包含叠氮基的分子还可用于通过由低强度紫外线产生的活性氮烯中间体与蛋白质形成共价键 (Potter 和 Haley,1983)。具体而言,嘌呤核苷酸的 2- 和 8- 叠氮类似物已经用作位点定向光探针来鉴定粗细胞提取液中的核苷酸结合蛋白 (Owens 和 Haley,1987; Atherton 等,1985)。2- 和 8- 叠氮核苷酸也已经用于所 纯化蛋白质的核苷酸结合结构域作图 (Khatoon 等,1989;King 等,1989;以及 Dholakia 等,1989) 并且可以用作抗体结合剂。

[0125] 用于抗体附着或缀合至其结合物部分的数个方法是本领域已知的。一些附着方法涉及使用金属螯合复合物,采用例如有机螯合剂,如钆喷酸酐 (DTPA);二亚乙基三胺;N- 氯 -p- 甲苯磺酰胺;和 / 或 tetrachloro-3 α -6 α -diphenylglycouril-3 与抗体连接 (美国专利 4,472,509 和 4,938,948,每一美国专利通过参考并入本文)。单克隆抗体还可在偶联剂如戊二醛或高碘酸盐存在下与酶反应。带有荧光素标记物的结合物在这些偶联剂存在下或者通过与异硫氰酸酯反应制备。在美国专利 4,938,948 中,使用单克隆抗体实现乳腺肿瘤的成像并且可检测的成像部分使用连接体如对羟基苯甲亚胺酸甲酯或 3-(4- 羟基苯基)- 丙酸 -N- 琥珀酰亚胺酯与抗体连接。

[0126] 在另外的实施方案中,考虑了通过使用不改变抗体结合位点的反应条件向免疫球蛋白的 Fc 区选择性引入巯基的免疫球蛋白的衍生化。公开了根据该方法学产生的表现出改善的寿命、特异性和敏感性的抗体结合物 (美国专利号 5,196,066,通过参考并入本文)。在文献中已经公开了其中报告分子或效应子分子结合至 Fc 区糖残基的效应子或报告分子的位点特异性附着 (O' Shannessy 等,1987)。已经报导该方法产生当前处于临床评定中的有希望用于诊断和治疗的抗体。

[0127] 3. 双功能性抗体

[0128] 在某些实施方案中,双功能性抗体可以用于靶向 Cripto 和 / 或 GRP78。例如,双特异性的 Fc- 二聚体可用于靶向和结合 Cripto 和 GRP78 两者,并且构想这种结合将抑制随后的 Cripto/GRP78 复合体的信号,例如 Nodal 信号、激活蛋白 /TGF β 信号、ERK/MAPK 信号和 / 或 PI3K/Akt/GSK3 β 信号。在某些实施方案中,双功能性的或双特异性的抗体可以结合至少一部分的 Cripto EGF 样区、Cripto CFC 结构域、GRP78 的氨基酸 19-68,和 / 或 GRP78 的 N-20 区。备选地,包含 多个 scFv 分子的双链抗体、三链抗体或四链抗体可用于以例如增加的亲和性结合 Cripto 和 / 或 GRP78。

[0129] 位于双特异性抗体中 V 结构域之间不同长度的连接体可用于指导双链抗体 (例如大约 60kDa)、三链抗体 (例如大约 90kDa) 或四链抗体 (例如大约 120kDa) 的形成,如取决于所希望的特定应用,例如体内或体外成像或治疗所希望的那样以优化大小、柔性和效价 (Robinson 等 2008;Todorovska 等,2001)。多功能性抗体表现出对这些 scFv 多聚体增强的结合效价,导致高的亲和力和降低的脱落。在一些实施方案中,多功能性抗体可以有利地用于肿瘤靶向,因为大约 60-100kDa 的某些分子表现出与亲本 Ig (例如大约 150kDa) 相比增加的肿瘤渗透性和快速的清除率。

[0130] 在某些实施方案中,设计多特异性 Fv 模块以交联两个或更多个不同的靶抗原。这些双特异性和三特异性多聚体可以通过不同 scFv 分子的结合形成 (Dutertre 和 Teillaud,

2006 ;Plückthun 等,1997 ;Kortt 等,2001 ;Hudson 等,1999 ;Atwell 等,1996)。

[0131] B.Cripto/GRP78靶向性肽

[0132] Cripto 靶向性或 GRP78 靶向性蛋白质或肽可以用于抑制 Cripto/GRP78 复合体的形成和 / 或功能。例如,可以使用例如体外细胞噬菌体展示筛选肽文库以鉴定可结合 Cripto 和 / 或 GRP78 以抑制 Cripto/GRP78 复合物形成的肽或蛋白质。多种方法可以用于此目的,包括例如 Mintz PJ 等 Nat Biotechnol 2003 21(1)57-63 ;Kim Y 等 Biochemistry 45(31)9434-44 ;Jakobsen CG 等 Cancer Res 2007 67(19)9507-17 ;和 Gonzalez-Gronow M 等 Cancer Res 2006 66(23)11424-31 中描述的那些,它们通过参考并入本文。如本文中所使用,蛋白质或肽通常指,但不限于从基因翻译的大于大约 200 个氨基酸直至全长序列的蛋白质 ;大约 100 至 200 个氨基酸的多肽 ;和 / 或从大约 3 个至大约 100 个氨基酸的肽。为了方便起见,术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中互换使用。

[0133] 在某些实施方案中,包含 GRP78 的 N-20 表位的肽可用于结合 Cripto 并抑制 Cripto/GRP78 复合物的形成。如本文所示,GRP78 的 N-20 表位对于 Cripto/GRP78 结合是至关重要的 ;因此,包含 GRP78 的 N-20 表位的肽可用于竞争性地拮抗 Cripto/GRP78 复合物的形成。N-20 表位由 GRP78 信号肽下游的前 50 个残基内的 20 个氨基酸组成。N-20 抗体可以购自 Santa Cruz Biotechnology(CA,美国)。类似地,在另外的实施方案中,包含 Cripto 的 CFC 结构域的肽可用于结合 GRP78 并抑制 Cripto/GRP78 复合物的形成。如在下面实例中所示,Cripto 的 CFC 结构域对于 Cripto/GRP78 结合是至关重要的 ;因此,包含 Cripto 的 CFC 结构域的肽可用于竞争性地拮抗 Cripto/GRP78 复合物的形成。

[0134] 使用 ^{125}I - 标记的可溶性 Cripto 的结合测定法,例如在 Kelber 等中描述的那些,可用于本发明中。例如,Cripto 与完整 MCF10A 或 NCCIT 细胞的结合可被未标记的 Cripto 竞争性阻断,并且重要的是可被 N-20GRP78 抗体竞争性阻断。该测定法或其改良形式可用于筛选能够破坏 Cripto/GRP78 结合的肽。

[0135] 在某些实施方案中,至少一种蛋白质或肽的大小可包括,但不限于,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、大约 110、大约 120、大约 130、大约 140、大约 150、大约 160、大约 170、大约 180、大约 190、大约 200、大约 210、大约 220、大约 230、大约 240、大约 250、大约 275、大约 300、大约 325、大约 350、大约 375、大约 400、大约 425、大约 450、大约 475、大约 500、大约 525、大约 550、大约 575、大约 600、大约 625、大约 650、大约 675、大约 700、大约 725、大约 750、大约 775、大约 800、大约 825、大约 850、大约 875、大约 900、大约 925、大约 950、大约 975、大约 1000、大约 1100、大约 1200、大约 1300、大约 1400、大约 1500、大约 1750、大约 2000、大约 2250、大约 2500 或更多个氨基酸残基。

[0136] 如本文中所使用,“氨基酸残基”指本领域已知的任何天然存在的氨基酸、任何氨基酸衍生物或任何氨基酸模拟物。在某些实施方案中,蛋白质或肽的残基是连续的,没有任何非氨基酸打断氨基酸残基序列。在另外的实施方案中,序列可以包含一个或更多个非氨基酸部分。在特定的实施方案中,蛋白质或肽残基序列可被一个或更多个非氨基酸部分打

断。

[0137] 因此,术语“蛋白质或肽”包括包含在天然存在蛋白质中发现的 20 种常见氨基酸中至少一种或者至少一种修饰或罕见氨基酸,包括但不限于下表 2 所示的那些的氨基酸。

[0138]

表 2			
修饰的和罕见的氨基酸			
缩写	氨基酸	缩写	氨基酸
Aad	2-氨基己二酸	EtAsn	N-乙基天冬酰胺
Baad	3-氨基己二酸	Hyl	羟基赖氨酸
Bala	β -丙氨酸, β -氨基-丙酸	AHyl	别-羟基赖氨酸
Abu	2-氨基丁酸	3Hyp	3-羟基脯氨酸
4Abu	4-氨基丁酸, 哌啶酸	4Hyp	4-羟基脯氨酸
Acp	6-氨基己酸	Ide	异锁链赖氨酸
Ahe	2-氨基庚酸	Alle	别-异亮氨酸
Aib	2-氨基异丁酸	MeGly	N-甲基甘氨酸, 肌氨酸
Baib	3-氨基异丁酸	MeIle	N-甲基异亮氨酸
Apm	2-氨基庚二酸	MeLys	6-N-甲基赖氨酸
Dbu	2, 4-二氨基丁酸	MeVal	N-甲基缬氨酸

[0139]

表 2

修饰的和罕见的氨基酸

缩写	氨基酸	缩写	氨基酸
Des	锁链赖氨酸	Nva	正缬氨酸
Dpm	2, 2'-二氨基庚二酸	Nle	正亮氨酸
Dpr	2, 3-二氨基丙酸	Orn	鸟氨酸
EtGly	N-乙基甘氨酸		

[0140] 蛋白质或肽可以通过本领域技术人员已知的任何技术产生,包括通过标准分子生物学技术的蛋白质、多肽或肽的表达,蛋白质或肽从天然来源的分离,或者蛋白质或肽的化学合成。对应于不同基因的核苷酸和蛋白质、多肽和肽序列先前已经公开,并且可以在本领域普通技术人员已知的计算机化数据库中找到。一个此类的数据库是 the National Center for Biotechnology Information 的 Genbank 和 GenPept 数据库。对于已知基因的编码区可以使用本文所公开的技术或者本领域普通技术人员所已知的技术扩增和 / 或表达。备选地,蛋白质、多肽和肽的多种商业制剂是本领域技术人员已知的。

[0141] 1. 肽模拟物

[0142] 用于制备根据本发明的多肽的另一实施方案是使用肽模拟物。模拟物是模拟蛋白质二级结构元素的包含肽的分子。见例如 Johnson 等, (1993), 通过参考并入本文。肽模拟物应用的潜在原理是蛋白质的肽主链主要是以促进分子相互作用,例如抗体和抗原的那些相互作用的方式定向氨基酸侧链。预期肽模拟物允许类似于天然分子的分子相互作用。这些原理可用于改造具有本文所公开靶向性肽的许多天然特性,但具有改变并且甚至改良特性的第二代分子。

[0143] 2. 融合蛋白

[0144] 本发明另外的实施方案涉及融合蛋白。这些分子通常具有在 N- 或 C- 末端连接至第二多肽或蛋白质的全部或部分的靶向性肽的全部或相当大的部分。例如,融合可采用来自另外物种的前导序列以允许蛋白质在异源宿主中重组表达。另一有用的融合包括加入免疫活性结构域,例如抗体表位以促进融合蛋白质的纯化。在融合连接处或附近包含切割位点将利于在纯化后去除外来的多肽。其它有用的融合包括功能结构域的连接,例如酶的活性位点、糖基化结构域、细胞靶向性信号或跨膜区。在优选的实施方案中,本发明的融合蛋白包含连接至治疗蛋白质或肽的靶向性肽。可整合入融合蛋白内的蛋白质或肽的实例包括细胞抑制性蛋白质、杀细胞性蛋白质、促凋亡剂、抗血管生成剂、激素、细胞因子、生长因子、肽药物、抗体、抗体 Fab 片段、抗原、受体蛋白质、酶、凝集素、MHC 蛋白质、细胞粘附蛋白和结合蛋白。这些实例不意味着是限制性的并且考虑它们事实上处于本发明的范围之内,并且蛋白质或肽可整合入包含靶向性肽的融合蛋白中。产生融合蛋白的方法对本领域技术人员而言是众所周知的。此类蛋白质可以通过例如使用双功能交联剂的化学吸附、通过完整融

合蛋白的从头合成、或者通过编码靶向性肽的 DNA 序列与编码第二肽或蛋白质的 DNA 序列的结合然后通过完整融合蛋白的表达来产生。

[0145] 3. 蛋白质纯化

[0146] 在某些实施方案中,蛋白质或肽可以分离或纯化。在一个实施方案中,这些蛋白质可以用于产生用于以任何所列举标签(例如多聚体拉曼标签)标记的抗体。蛋白质纯化技术对本领域技术人员而言是众所周知的。这些技术在一个水平上涉及细胞、组织或器官的匀浆和粗分级分离至多肽和非多肽的分级分离。感兴趣的蛋白质或多肽可以使用层析和电泳技术进一步纯化以达到部分或完全纯化(或纯化至同质性)。特别适用于制备纯肽的分析方法是离子交换层析、凝胶排阻层析、HPLC(高效液相色谱)FPLC(AP Biotech)、聚丙烯酰胺凝胶电泳、亲和层析、免疫亲和层析和等电聚焦。通过亲和层析纯化受体蛋白质的实例描述于美国专利号 5,206,347 中,其全文通过参考并入本文。纯化多肽的更有效的方法之一是快速高效液相色谱(AKTA FPLC),或者甚至纯化的蛋白质或肽旨在指可与其他成分分离的组合物,其中蛋白质或肽以相对于其天然可得到的状态的任何程度被纯化。因此,分离或纯化的蛋白质或肽还指从其天然存在的环境游离的蛋白质或肽。通常,“纯化的”指已经经历分级分离以去除许多其它成分的蛋白质或肽组合物,并且组合物基本上保留了其表达的生物学活性。当使用术语“基本上纯化的”时,该名称指其中蛋白质或肽形成组合物的大部分成分,例如蛋白质构成组合物的大约 50%、大约 60%、大约 70%、大约 80%、大约 90%、大约 95%或更高的组合物。

[0147] 根据本公开,用于定量蛋白质或肽纯化程度的多种方法是本领域技术人员已知的。这包括例如,测定活性级分的比活性或通过 SDS/PAGE 分析评价级分内多肽的量。用于评价级分纯度的优选方法是计算级分的比活性,以将其与最初提取物的比活性相比较,并且因此计算纯度程度,在本文中通过“纯化倍数”评价。当然,用于表示活性量的实际单位将取决于选择开展纯化的特定测定技术和所表达的蛋白质或肽是否表现出可检测的活性。

[0148] 适用于蛋白质纯化的多个技术是本领域技术人员众所周知的。这包括例如使用硫酸铵、PEG、抗体等等的沉淀,或者通过热变性,接着是:离心;层析步骤例如离子交换、凝胶过滤、反相、羟基磷灰石和亲和层析;等电聚焦;凝胶电泳;和这些技术和其它技术的组合。如本领域所通常已知的那样,据信开展多个纯化步骤的顺序可以改变,或者某些步骤可以省略,并且仍然产生用于制备相当程度纯化的蛋白质或肽的适宜方法。

[0149] 通常不需要蛋白质或肽以它们最纯的状态提供。实际上,在某些实施方案中考虑了基本上纯的产物将具有实用性。部分纯化可通过使用更少的组合纯化步骤或者通过利用相同的一般纯化方案的不同形式实现。例如,应当意识到,利用 HPLC 装置开展的阳离子交换柱层析通常将比利用低压层析系统的相同技术产生更大“倍数”的纯化。表现出更低程度的相对纯化的方法在蛋白质产物的收回总量中或者在维持所表达蛋白质的活性中具有优势。

[0150] 亲和层析是依赖于待分离物质与其可特异性结合的分子之间的特异亲和性的层析方法。这是受体-配体类型的相互作用。通过共价偶联结合配偶体之一至不溶解的基质上合成柱材料。然后柱材料能够从溶液中特异性地吸附物质。通过改变条件至不发生结合的那些条件(例如改变的 pH、离子强度、温度等)进行洗脱。基质应该是自身不以任何明显程度吸附分子并且具有广范围化学、物理和热稳定性的物质。配体应该以如此方式偶联以

致于不影响其结合特性。配体还应当提供相对紧密的结合。并且应该可以洗脱物质,而不破坏样品或配体。

[0151] 4. 合成肽

[0152] 由于本发明的靶向性肽在大小上相对小,所以可以按照常规技术在溶液中或者在固体支持物上合成。多种自动合成仪可以商业性得到并且可以按照已知的方案使用。见例如, Stewart 和 Young, 1984 ; Tam 等, 1983 ; Merrifield, 1986 ; 以及 Barany 和 Merrifield, 1979, 每一文献通过参考并入本文。通常从大约 6 个直至大约 35 至 50 个氨基酸的短肽序列可以容易地通过此类方法合成。备选地,可以采用重组 DNA 技术,其中编码本发明肽的核苷酸序列被插入至表达载体中,被转化或转染进入适宜的宿主细胞中,并且在适宜表达的条件下培养。

[0153] C. 短干扰核酸

[0154] 本发明提供下调 Cripto 和 / 或 GRP78 表达的短干扰核酸 (例如 siRNA)。这些 Cripto 靶向性和 GRP78 靶向性 siNA 可以在药物组合物中向受试者施用 (例如肠胃外、静脉内或瘤内) 以治疗癌症。例如,如在下面实例中所示, shRNA 可有效地用于敲低 GRP78 (SEQ ID NO :5) 或 Cripto (SEQ ID NO :4) 信号并且破坏 Cripto/GRP78 复合物的形成。

[0155] “siNA”,如本文中所使用,定义为短干扰核酸。siNA 的实例包括但不限于 RNAi、双链 RNA 和 siRNA。siNA 可以抑制细胞中基因的转录。siNA 长度从 16 个至 50 或更多个核苷酸。在某些实施方案中, siNA 长度可以是 16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或 50 个核苷酸。siNA 可以包含核酸和 / 或核酸类似物。有代表性地, siNA 将抑制细胞内单一基因的翻译;然而,在某些实施方案中, siNA 将抑制细胞内一个以上基因的翻译。虽然在某些实施方案中, siNA 可用于破坏 Cripto/GRP78 相互作用,但是在另外的实施方案中反义核酸将用于靶向 Cripto 和 / 或 GRP78 以破坏 Cripto/GRP78 相互作用。

[0156] 在 siNA 内,核酸没有必要是相同的类型 (例如 siNA 可包含核苷酸和核苷酸类似物)。siNA 形成双链结构;双链结构可来自于部分或完全互补的两个单独的核酸。在本发明的某些实施方案中, siNA 可包含仅单一核酸或核酸类似物并且通过自身互补形成双链结构 (例如形成发夹环)。siNA 的双链结构可包含 16 至 500 或更多个连续核碱基。siNA 可包含 17 至 35 个连续核碱基,更优选 18 至 30 个连续核碱基,更优选 19 至 25 个核碱基,更优选 20 至 23 个连续核碱基,或者 20 至 22 个连续核碱基,或者 21 个连续核碱基与互补核酸 (其可以是同一核酸的另一部分或者是单独的互补核酸) 杂交以形成双链结构。

[0157] siNA (例如 siRNA) 是本领域众所周知的。例如, siRNA 和双链 RNA 已经描述于美国专利 6,506,559 和 6,573,099 以及美国申请 2003/0051263、2003/0055020、2004/0265839、2002/0168707、2003/0159161、2004/0064842 中,它们全文通过参考并入本文。

[0158] 1. 核酸

[0159] 本发明提供用于通过中性脂质体递送 siNA 的方法和组合物。由于 siNA 有核酸构成,所以与核酸有关的方法 (例如核酸产生、核酸修饰等) 可用于 siNA。

[0160] 术语“核酸”是本领域众所周知的。“核酸”如本文中所使用通常指包含核碱基的 DNA、RNA 分子 (即一链) 或其衍生物或类似物。核碱基包括,例如,在 DNA 中发现的天然存在的嘌呤或嘧啶碱基 (例如腺嘌呤“A”、鸟嘌呤“G”、胸腺嘧啶“T”或胞嘧啶“C”) 或在 RNA

中发现的天然存在的嘌呤或嘧啶碱基（例如 A、G、尿嘧啶“U”或 C）。术语“核酸”包括术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”，它们每一个是术语“核酸”的亚单位。术语“寡核苷酸”指长度大约 3 和大约 100 个核碱基之间的分子。术语“多核苷酸”指长度大于大约 100 个核碱基的至少一个分子。

[0161] 这些定义指单链或双链核酸分子。双链核酸通过完全互补性结合形成，虽然在一些实施方案中双链核酸可以通过部分或相当大的互补性结合形成。因此，核酸可包括包含特定序列的一个或更多个互补链或“互补物”的双链分子，有代表性地包含分子。如本文中所使用，单链核酸可以通过前缀“ss”表示并且双链核酸通过前缀“ds”表示。

[0162] 2. 核碱基

[0163] 如本文中所使用，“核碱基”指杂环碱基，例如在至少一种天然存在核酸（即 DNA 和 RNA）中发现的天然存在核碱基（即 A、T、G、C 或 U），和此类核碱基的天然或非天然存在衍生物和类似物。核碱基通常与至少一种天然存在核碱基以可替代天然存在核碱基配对的方式（例如 A 和 T、G 和 C 以及 A 和 U 之间的氢键）形成一个或更多个氢键（“复性”或“杂交”）。

[0164] “嘌呤”和 / 或“嘧啶”核碱基包括天然存在的嘌呤和 / 或嘧啶核碱基并且还包括它们的一种或多种衍生物和一种或多种类似物，包括但不限于，嘌呤或嘧啶被一个或跟多个烷基、羧烷基、氨基、羟基、卤素（即氟、氯、溴或碘）、巯基或烷硫基部分内取代的那些。优选的烷基（例如烷基、羧烷基等）部分包含从大约 1、大约 2、大约 3、大约 4、大约 5 至大约 6 个碳原子。嘌呤或嘧啶的其它非限定性实例包括脱氮嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、5-氟尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-氯鸟嘌呤、溴胸腺嘧啶、8-氨基鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤、8-甲基鸟嘌呤、8-硫鸟嘌呤、氮鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、5-乙基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-乙基尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-丙基尿嘧啶、硫尿嘧啶、2-甲基腺嘌呤、甲基硫腺嘌呤、N, N-二乙基腺嘌呤、氮杂腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-羟基腺嘌呤、6-羟基氨基嘌呤、6-硫嘌呤、4-(6-氨基己基 / 胞嘧啶) 等等。下面还提供一系列非限定性的嘌呤和嘧啶衍生物和类似物。

[0165]

表 1-嘌呤和嘧啶衍生物或类似物

缩写	修饰碱基描述	缩写	修饰碱基描述
ac4c	4-乙酰胞苷	Mam5s2u	5-甲氧氨基甲基-2-硫尿苷
Chm5u	5-(羧羟基甲基) 尿苷	Man q	β , D- mannosylqueosine
Cm	2'-O-甲基胞苷	Mcm5s2u	5-甲氧羰基甲基-2-硫尿苷
Cmnm5s2u	5-羧甲基氨基-甲基-2-硫尿苷	Mcm5u	5-甲氧羰基甲基尿苷
Cmnm5u	5-羧甲基氨基甲基尿苷	Mo5u	5-甲氧基尿苷
D	二氢尿苷	Ms2i6a	2-甲基硫-N6-异戊烯腺苷
Fm	2'-O-甲基假尿苷	Ms2t6a	N-((9- β -D-呋喃核糖基-2-甲基硫嘌呤-6-基)氨基甲酰基)苏氨酸
Gal q	β , D- galactosylqueosine	Mt6a	N-((9- β -D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)N-甲基-氨基甲酰基)苏氨酸
Gm	2'-O-甲基鸟苷	Mv	尿苷-5-羧乙酸甲酯
I	肌苷	o5u	尿苷-5-羧乙酸(v)
I6a	N6-异戊烯腺苷	Osyw	Wybutoxosine
mla	1-甲基腺苷	P	假尿苷
mlf	1-甲基假尿苷	Q	Queosine
mlg	1-甲基鸟苷	s2c	2-硫胞苷
mlI	1-甲基肌苷	s2t	5-甲基-2-硫尿苷
m22g	2,2-二甲基鸟苷	s2u	2-硫尿苷

[0166]

表 1-嘌呤和嘧啶衍生物或类似物			
缩写	修饰碱基描述	缩写	修饰碱基描述
m2a	2-甲基腺苷	s4u	4-硫尿苷
m2g	2-甲基鸟苷	T	5-甲基尿苷
m3c	3-甲基胞苷	t6a	N-((9-β-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)氨基甲酰基)苏氨酸
m5c	5-甲基胞苷	Tm	2'-O-甲基-5-甲基尿苷
m6a	N6-甲基腺苷	Um	2'-O-甲基尿苷
m7g	7-甲基鸟苷	Yw	Wybutosine
Mam5u	5-甲基氨基甲基尿苷	X	3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷, (acp3)u

[0167] 可以使用本文所述或者本领域普通技术人员已知的任何化学或天然合成方法将核碱基加在核苷或核苷酸中。

[0168] 3. 核苷

[0169] 如本文中所使用,“核苷”指包含共价连接至核碱基连接体部分的各个化学单位。“核碱基连接体部分”的非限定性实例是包含 5- 碳原子的糖 (即“5- 碳糖”),包括但不限于脱氧核糖、核糖、阿拉伯糖、或 5- 碳糖的衍生物或类似物。5- 碳糖衍生物或类似物的非限定性实例包括 2' - 氟 -2' - 脱氧核糖或其中碳代替糖环内氧原子的碳环糖。

[0170] 核碱基和核碱基连接体部分的不同类型的共价连接在本领域是已知的。通过非限定性实例的方式,包含嘌呤 (即 A 或 G) 或 7- 脱氮嘌呤核碱基的核苷有代表性地共价连接嘌呤或 7- 脱氮嘌呤的 9 位与 5- 碳糖的 1' - 位。在另外的非限定性实例中,包含嘧啶核碱基 (即 C、T 或 U) 的核苷有代表性地共价连接嘧啶的 1 位与 5- 碳糖的 1' - 位 (Kornberg 和 Baker, 1992)。

[0171] 4. 核苷酸

[0172] 如本文中所使用,“核苷酸”指还包含“主链部分”的核苷。主链部分通常共价连接核苷酸至包含核苷酸的另一分子,或者至另一核苷酸以形成核酸。天然存在核苷酸中的“主链部分”有代表性地包含磷部分,其共价连接至 5- 碳糖。主链部分的连接有代表性地发生在 5- 碳糖的 3' - 或 5' - 位。然而,其他类型的连接是本领域已知的,特别是当核苷酸包含天然存在 5- 碳糖的衍生物或类似物或者磷部分时。

[0173] 5. 核酸类似物

[0174] 核酸可包含核碱基的衍生物或类似物、核碱基连接体部分和 / 或在天然存在核酸中存在的主链部分,或者完全由它们组成。如本文中所使用,“衍生物”指化学修饰或改变形式的天然存在分子,而术语“模拟物”或“类似物”指结构上与天然存在分子或部分类似或

不类似但拥有相似功能的分子。如本文中所使用,“部分”通常指较大的化学或分子结构的较小的化学或分子成分。核碱基、核苷和核苷酸类似物或衍生物是本领域中众所周知的,并且已经被描述(见例如, Scheit, 1980, 通过参考并入本文)。

[0175] 包含 5- 碳糖和 / 或主链部分衍生物或类似物的核苷、核苷酸或核酸的另外的非限定性实例包括下列文献中的那些, 美国专利 5, 681, 947, 其描述了包含嘌呤衍生物的寡核苷酸, 其形成三螺旋和 / 或阻止 dsDNA 表达; 美国专利 5, 652, 099 和 5, 763, 167, 其描述了掺入有在 DNA 或 RNA 中发现的核苷的荧光类似物的核酸, 特别是用作荧光核酸探针; 美国专利 5, 614, 617, 其描述了在嘧啶环上具有替代基并具有增强的核酸酶稳定性的寡核苷酸类似物; 美国专利 5, 670, 663, 5, 872, 232 和 5, 859, 221, 其描述了用于核酸检测带有修饰的 5- 碳糖(即修饰的 2' - 脱氧呋喃部分)的寡核苷酸类似物; 美国专利 5, 446, 137, 其描述了可以用于杂交分析的, 包含至少一个在 4' 位被氢以外的取代基取代的 5- 碳糖部分的寡核苷酸; 美国专利 5, 886, 165, 其描述了含有具有 3' -5' 核苷酸间化学键的脱氧核糖核苷酸和具有 2' -5' 核苷酸间化学键的荷糖核苷酸的寡核苷酸; 美国专利 5, 714, 606, 其描述了修改的核苷酸间化学键, 其中核苷酸间化学键的 3' - 位氧被碳取代以增强核酸对核酸酶的抵抗; 美国专利 5, 672, 697, 其描述了包含一个或更多个 5' 甲叉磷酸酯核苷酸间化学键的增强核酸酶抵抗的寡核苷酸; 美国专利 5, 466, 786 和 5, 792, 847, 其描述了可包含药物或标签的取代基部分与寡核苷酸 2' 碳的键合以提供增强的核酸酶稳定性和递送药物或检测部分的能力; 美国专利 5, 223, 618, 其描述了具有连接临近 5- 碳糖部分 4' 和 3' 位的 2 或 3 碳主链化学键的寡核苷酸类似物以增强细胞吸收、对核酸酶的抵抗和与靶 RNA 的杂交; 美国专利 5, 470, 967, 其描述了至少一个氨基磺酸酯或磺酰胺核苷酸间化学键的用作核酸杂交探针的寡核苷酸; 美国专利 5, 378, 825、5, 777, 092、5, 623, 070、5, 610, 289 和 5, 602, 240, 其描述了包含 3 或 4 碳连接体部分代替磷酸二酯主链部分的寡核苷酸, 用于改善的核酸酶抵抗、细胞吸收和调节 RNA 表达; 美国专利 5, 858, 988, 其描述了连接至寡核苷酸 2' -O 位的疏水运载试剂以增强它们的膜渗透性和稳定性; 美国专利 5, 214, 136, 其描述了在 5' 末端与蒽醌缀合的具有增强的与 DNA 或 RNA 杂交、增强的核酸酶稳定性的寡核苷酸; 美国专利 5, 700, 922, 其描述了 PNA-DNA-PNA 嵌合体, 其中 DNA 包含 2' - 脱氧 - 赤 - 异戊烯呋喃糖核苷酸, 用于增强的核酸酶抵抗、结合亲和性和激活 RNA 酶 H 的能力; 以及美国专利 5, 708, 154, 其描述了 RNA 与 DNA 的连接以形成 DNA-RNA 杂合体。

[0176] 6. 聚醚和肽核酸

[0177] 在某些实施方案中, 考虑了包含核苷或核苷酸衍生物或类似物的核酸可以用于本发明的方法和组合物中。非限定性实例是美国专利 5, 908, 845 中描述的“聚醚核酸”, 其通过参考并入本文。在聚醚核酸中, 一个或更多个核碱基连接至聚醚主链的手性碳原子上。

[0178] 另一个非限定性实例是描述于美国专利 5, 786, 461、5, 891, 625、5, 773, 571、5, 766, 855、5, 736, 336、5, 719, 262、5, 714, 331、5, 539, 082 和 WO 92/20702 中的“肽核酸”, 也称作“PNA”、“基于肽的核酸类似物”或“PENAM”, 每一文献通过参考并入本文。与分子如 DNA 和 RNA 相比, 肽核酸通常具有增强的序列特异性、结合特性和对酶降解的抵抗 (Egholm 等, 1993; PCT/EP/01219)。肽核酸通常包含一个或更多个含有核碱基部分的核苷酸或核苷、非 5- 碳糖的核碱基连接体部分, 和 / 或非磷酸酯主链部分的主链部分。对于 PNA 所描述的核碱基连接体部分的实例包括氮杂氮原子、酰胺基和 / 或脲基链(见例如美国专利

5, 539, 082)。对于 PNA 所描述的主链部分的实例包括氨乙基甘氨酸、聚酰胺、聚乙基、聚硫代酰胺、聚亚磺酰胺或聚磺酰胺主链部分。

[0179] 在某些实施方案中,核酸类似物例如肽核酸可以用于抑制核酸扩增,例如在 PCR[™] 中,以减少假阳性和鉴别单碱基突变体,如美国专利 5, 891, 625 中所述。核酸类似物的其它修饰和用途在本领域是已知的,并且预期这些技术和核酸类似物类型可用于本发明中。在非限定性实例中,美国专利 5, 786, 461 描述了具有连接至 PNA 主链的氨基酸侧链的 PNA 以增强分子的可溶性。在另一实例中,PNA 的细胞吸收特性通过连接亲脂性基团增强。美国申请系列号 117, 363 描述了用于增强 PNA 的细胞吸收的数个烷基氨基部分。另一实例描述于美国专利 5, 766, 855、5, 719, 262、5, 714, 331 和 5, 736, 336 中,其描述了包含天然和非天然存在核碱基和烷基胺侧链的 PNA,其与天然存在核酸相比系列特异性、可溶性和 / 或结合亲和性改善。

[0180] 7. 核酸制备

[0181] 可通过本领域普通技术人员已知的任何技术制备核酸,例如化学合成、酶促生产或生物学生产。合成核酸(例如合成寡核苷酸)的非限定性实例包括通过例如 EP 266, 032(通过参考并入本文)中所描述的使用磷酸三酯、亚磷酸酯或亚磷酰胺化学和固相技术,或者通过由 Froehler 等, 1986 和美国专利 5, 705, 629(每一文献通过参考并入本文)中所描述脱氧核糖核苷 H- 磷酸酯中间体的体外化学合成产生的核酸。在本发明的方法中,可以使用一种或更多种寡核苷酸。多种不同的寡核苷酸合成机制已经描述于例如美国专利 4, 659, 774、4, 816, 571、5, 141, 813、5, 264, 566、4, 959, 463、5, 428, 148、5, 554, 744、5, 574, 146、5, 602, 244 中,每一美国专利通过参考并入本文。

[0182] 酶促生产核酸的非限定性实例包括在扩增反应中例如 PCR[™]由酶产生核酸(见例如美国专利 4, 683, 202 和美国专利 4, 682, 195, 每一文献通过参考并入本文),或者描述于美国专利 5, 645, 897 中的寡核苷酸合成,其通过参考并入本文。生物学生产核酸的非限定性实例包括在活细胞中生产重组核酸(即复制),例如重组 DNA 载体在细菌中复制(见例如, Sambrook 等 2001, 通过参考并入本文)。

[0183] 8. 核酸纯化

[0184] 核酸可以在聚丙烯酰胺凝胶上、氯化铯离心梯度上或者通过本领域普通技术人员已知的任何其它方法纯化(见例如, Sambrook 等, 2001, 通过参考并入本文)。

[0185] 在某些实施方案中,本发明涉及为分离的核酸的核酸。如本文中所使用,“分离的核酸”指经分离无,或者无一种或更多种细胞的大多数总基因组核酸和转录核酸的核酸分子(例如 RNA 或 DNA 分子)。在某些实施方案中,“分离的核酸”指经分离无,或者无大多数细胞成分或体外反应成分如大分子诸如脂类或蛋白质、小的生物分子等等的核酸。

[0186] 9. 杂交

[0187] 如本文中所使用,“杂交”或“能够杂交”理解为意思是指形成双链或三链分子或者具有部分双链或三链性质的分子。术语“复性”如本文中所使用与“杂交”同义。术语“杂交”或“能够杂交”包括术语“严格条件”或“高严格性”和术语“低严格性”或“低严格性条件”。

[0188] 如本文中所使用“严格条件”或“高严格性”是允许包含互补序列的一个或更多个核酸链之间或之内杂交但妨碍随机序列杂交的那些条件。严格条件容忍核酸和靶链之间小

的错配,如果存在的话。此类条件对于本领域普通技术人员而言是众所周知的,并优先用于需要高选择性的应用中。非限定性的应用包括分离核酸,例如基因或其核酸片段,或检测至少一种特异的 mRNA 转录物或其核酸片段等等。

[0189] 严格条件可以包括低盐和 / 或高温条件,例如在大约 50℃ 至大约 70℃ 的温度下大约 0.02M 至大约 0.15M NaCl 提供的条件。应当理解,所期望严格性的温度和离子强度部分地由一种或多种特定核酸长度、一种或多种靶序列的长度和核碱基、一种或多种核酸的电荷组成和杂交混合物中甲酰胺、四甲基氯化铵或其它一种或多种溶剂的存在或浓度决定。

[0190] 还应当理解,这些范围、组合物和杂交条件仅以非限定性实例的方式提到,并且对于特定杂交反应的所希望的严格性常常通过与一个或更多个阳性或阴性对照比较经验性确定。取决于所预期的应用,优选采用可变的杂交条件以达到核酸针对靶序列的可变程度的选择性。在非限定性实例中,在严格条件下不与核酸杂交的相关靶核酸的鉴定或分离可以通过在低温度和 / 或高离子强度下杂交实现。此类条件被称作“低严格性”或“低严格条件”,并且低严格性的非限定性实例包括在大约 20℃ 至大约 50℃ 的温度范围下在大约 0.15M 至大约 0.9M NaCl 下开展杂交。当然,本领域技术人员能够进一步修改低或高严格条件以适应特定应用。

[0191] D. 适体

[0192] 适体可以用于抑制 Cripto/GRP78 结合和 / 或信号。适体是选择性结合分子靶如蛋白质的单链核酸。适体可包含 DNA、RNA 和 / 或修饰核苷酸,虽然在某些实施方案中希望使用 DNA 适体或包含抗酶降解以便在体内施用至受试者时增加半寿期的修饰核苷酸的适体。

[0193] 使用单链核酸(适体)作为蛋白质的亲和性分子的想法显示进展适中。见 Tuerk 和 Gold, (1990); Ellington 和 Szostak (1990); 以及 Ellington 和 Szostak (1992)。概念基于短寡聚体 (20-80mer) 序列在靶存在下折叠成以高亲和性和特异性结合靶的独特的三维结构的能力。通过将组合化学与体外进化相组合的方法产生的适体通常称作 SELEX (指数富集的配体系统进化)。在蛋白质与 DNA 或 RNA 序列文库 (有代表性地大约 10^{14} 个分子的复杂性) 孵育之后,分离蛋白质-DNA 复合体,扩增 DNA,重复该过程直到样品富集有表现出对目的蛋白质具有高亲和性的序列。由于选择压对靶为高亲和性,具有低纳摩尔亲和性的适体可以得到。适体比基于蛋白质的亲和性试剂有优势,因为核酸具有增加的稳定性,再生容易 (PCR 或寡核苷酸合成) 和用于检测和固化的修饰简单。利用机器人的高通量适体生产方法也可以用于本发明中 (Cox 等, 2002)。

[0194] 在适体生产方案中的数个改变 (例如改变靶分配) 可以用于本发明。未结合的 DNA 分子可以通过如下方式从靶蛋白上去除: 1) 在膜上过滤 (Ellington 和 Szostak, 1992); 2) 柱层析,其中使用共价键或者亲和和标签将靶结合至基质上,例如琼脂糖上 (Ylera 等, 2002); 以及 3) 结合蛋白质至微量滴定板的孔中 (Drolet 等, 1999)。用于本发明的适体的生产方法还描述于美国专利 6,423,493; 美国专利 6,515,120; 美国专利 6,180,348; 美国专利 5,756,291 以及美国专利 7,329,742 中。

[0195] E. 小分子

[0196] 小分子也可用于抑制 Cripto/GRP78 结合和 / 或信号。在多种实施方案中,可以筛选一个或更多个小分子化学文库以鉴定选择性影响 Cripto/GRP78 相互作用的小分子。例

如,高通量筛选可以通过机器人自动进行以评价和 / 或鉴定可抑制 Cripto/GRP78 结合和 / 或信号的小分子。在某些实施方案中,Cripto/GRP78 结合的计算机模型设计可用于选择候选小分子用于测试。

[0197] 不希望被任何理论所束缚,发明人构想,GRP78 将以其作为蛋白伴侣的能力结合细胞表面上的 Cripto。在该例中,GRP78 将稳定 Cripto 分子或者促进对于发信号必需的 Cripto 构象;因此,GRP78 类似于对于数个癌基因的活性必需的具有蛋白伴侣功能的 HSP90。阻断 HSP90 的 ATP 结合位点的 HSP90 拮抗剂 处于临床试验中。在 GRP78 的典型蛋白伴侣功能对于其作为 Cripto 信号介导子功能必不可少的情况下,靶向 GRP78 ATP 结合结构域的小分子可在临床上采用。例如,(-)-表没食子儿茶酚没食子酸酯 (EGCG) 是具有数个抗癌特性的绿茶的主要成分。EGCG 已经显示特异性结合 GRP78 并且通过抑制其结合 ATP 的能力抑制其蛋白伴侣的功能 (Svetlana P 等 Cancer Res. 2006 66(18)9260-69)。因此可筛选 EGCG 衍生物以确定这些化合物是否可以破坏 Cripto/GRP78 复合物的形成。

[0198] V. 药物制剂

[0199] 本发明的药物组合物包含有效量的一种或更多种 Cripto 和 / 或 GRP78 靶向性试剂或溶解或分散于可药用载体内的另外的试剂。词语“可制药用或可药用”指当施用于动物例如人时,视情况而定,不产生不利的、变态的或其它不良的反应的分子实体和组合物。根据本公开,包含至少一种 Cripto 和 / 或 GRP78 靶向性试剂或另外的活性成分的药物组合物的制备将是本领域技术人员已知的,如由 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, University of the Sciences in Philadelphia 所例证,其通过参考并入本文。此外,对于动物(例如人)施用,应当理解制剂应当满足 FDA Office of Biological Standards 所要求的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0200] 如本文中所使用,“可药用载体”包括任何和全部的溶剂、分散介质、包衣剂、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延缓剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、诸如此类的材料及其组合,如本领域普通技术人员将理解的那样(见例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Printing Company, 1990, 第1289-1329页,通过参考并入本文)。除了任何常规载体与活性成分不相容时,否则考虑其在治疗或药物组合物中使用。

[0201] 取决于其是以固体、液体还是气溶胶形式,以及对于诸如注射的施用途径其是否需要无菌, Cripto 和 / 或 GRP78 靶向性试剂将包含不同类型的载体。本发明可以静脉内、真皮内、动脉内、腹膜内、损害部内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、直肠内、局部、瘤内、肌内、腹膜内、皮下、结膜下、囊泡内、通过黏膜、心包内、脐内、眼内、经口、局部、部位、吸入(例如气溶胶吸入)、注射、灌注、连续灌注、直接的靶细胞局部灌注浴、通过导管、通过灌洗、在乳剂中、在脂质组合物中(例如脂质体)或者如本领域普通技术人员所已知的其它方法或前述方法的任何组合施用(见例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19版, Mack Printing Company, 1995, 通过参考并入本文)。

[0202] 施用至动物患者的本发明组合物的实际剂量可以通过物理和生理因子如体重、疾病的严重性、待治疗疾病类型、先前或并行治疗措施、患者的特发症和施用途径确定。无论如何,负责施用的医师将确定对于组合物中一种或多种活性成分的浓度和各个受试者的一

次或多次的适当剂量。

[0203] 在某些实施方案中,药物组合物可包含例如,至少大约 0.1% 的活性化合物。在其它实施方案中,活性化合物可包含大约 2% 至大约 75% 之间的重量单位或大约 25% 至大约 60% 之间的重量单位,以及例如可从其导出的任何范围。在另外的非限定性实例中,剂量还可包含从大约 1 μ g/kg/ 体重、大约 5 μ g/kg/ 体重、大约 10 μ g/kg/ 体重、大约 50 μ g/kg/ 体重、大约 100 μ g/kg/ 体重、大约 200 μ g/kg/ 体重、大约 350 μ g/kg/ 体重、大约 500 μ g/kg/ 体重、大约 1mg/kg/ 体重、大约 5mg/kg/ 体重、大约 10mg/kg/ 体重、大约 50mg/kg/ 体重、大约 100mg/kg/ 体重、大约 200mg/kg/ 体重、大约 350mg/kg/ 体重、大约 500mg/kg/ 体重至大约 1000mg/kg/ 体重或更高每次施用,以及可从其导出的任何范围。在从本文所列数值导出的范围的非限定性实例中,大约 5mg/kg/ 体重至大约 100mg/kg/ 体重、大约 5 μ g/kg/ 体重至大约 500mg/kg/ 体重的范围等可以施用,基于上面描述的数值。

[0204] 在某些实施方案中,单克隆抗体可以以每 1-3 周大约 1-25mg/kg 的剂量向受试者(例如人患者)施用。在某些实施方案中,siNA(例如 siRNA)可以以大约 1-10mg/kg 的剂量以大约每天至大约每周的间隔施用。

[0205] 在任何情况下,组合物可包含多种抗氧化剂以延缓一种或更多种成分的氧化。另外,阻止微生物的作用可以通过防腐剂例如多种抗菌剂和抗真菌剂实现,包括但不限于对羟基苯甲酸酯(例如甲基对羟基苯甲酸酯、丙基对羟基苯甲酸酯)、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或其组合。

[0206] Cripto- 和 / 或 GRP78 靶向性试剂可以以游离碱形式、中性形式或盐形式配制在组合物中。可药用盐,包括酸加成盐,例如与蛋白质性成分的游离氨基形成的那些,或与无机酸例如盐酸或磷酸,或有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸或苦杏仁酸形成的那些。与游离羧基形成的盐还可以衍生自无机碱例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁;或者有机碱例如异丙胺、三甲基胺、组氨酸或普鲁卡因。

[0207] 在其中组合物是液体形式的实施方案中,载体可以是溶剂或分散介质,包括但不限于,水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、脂类(例如甘油三酯、植物油、脂质体)及其组合。可通过下列方式维持适当流动性,例如使用包衣剂如卵磷脂;通过分散于例如液体多元醇或脂类的载体中维持所需要的颗粒大小;通过使用表面活性剂例如羟基丙基纤维素;或此类方法的组合。在许多情况下,优选包括等渗试剂,例如糖、氯化钠或其组合。

[0208] 在其它实施方案中,在本发明中可以使用眼滴剂、鼻溶液或喷雾剂、气溶胶或吸入剂。此类组合物通常被设计成与靶组织类型相容。在非限定性实例中,鼻溶液通常是设计成以滴剂或喷雾剂向鼻道施用的水性溶液。鼻溶液如此制备以致于它们在许多方面与鼻分泌物相似,以致于维持正常的纤毛作用。因此,在优选的实施方案中,水性鼻溶液通常是等渗的或者具有稍微的缓冲能力以维持 pH 为大约 5.5 至大约 6.5。此外,抗微生物防腐剂,类似于在眼制剂、药物或适当的药物稳定剂中使用的那些,根据需要可以包含在制剂中。例如,多种商业的鼻制剂是已知的并且包括药物例如抗生素或抗组织胺。

[0209] 在某些实施方案中,Cripto 和 / 或 GRP78 靶向性试剂被制备成通过例如口服途径施用。在这些实施方案中,固体组合物可以包括例如溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊(例如硬或软壳明胶胶囊)、缓释制剂、颊组合物、锭剂、酞剂、混悬剂、糖浆剂、薄片剂或

其组合。口服组合物可以直接掺入到饮食食物中。用于口服施用的优选载体包括惰性稀释剂、可同化的可食用载体或其组合。在本发明的其它方面中,口服组合物可以制备成糖浆剂或酞剂。糖浆剂或酞剂可包括例如至少一种活性剂、甜味剂、防腐剂、调味剂、染料、防腐剂或其组合。

[0210] 在某些优选的实施方案中,口服组合物可以包含一种或更多种粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、调味剂及其组合。在某些实施方案中,组合物可以包含一种或更多种下列试剂:粘合剂,例如西黄蓍胶、阿拉伯胶、谷类淀粉、明胶或其组合;赋形剂,例如磷酸二钙、甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁或其组合;崩解剂,例如谷类淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸或其组合;润滑剂,例如硬脂酸镁;甜味剂,例如蔗糖、乳糖、糖精或其组合;调味剂,例如薄荷油、冬青油、樱桃调味剂、橙香精等;或者前述试剂的组合。当剂量单位形式是胶囊时,除了上述类型的材料之外,其还可包含载体例如液体载体。多种其它材料可以作为包衣存在或者修饰剂量单位的物理性状。例如,片剂、丸剂或胶囊可以以虫胶、糖或者两者包衣。

[0211] 适用于其它方式施用的另外的制剂包括栓剂。栓剂是用于插入至直肠、阴道或尿道内的通常含药的多种重量和性状的固体剂量形式。在插入后,栓剂软化、融化或者溶解在腔流体中。通常,对于栓剂,传统的栓剂可以包括例如聚 烯烃二醇、甘油三酯或其组合。在某些实施方案中,栓剂可以从包含大约 0.5%至大约 10%,并且优选大约 1%至大约 2%范围活性成分的混合物中形成。

[0212] 无菌可注射溶液通过将所需要量的活性化合物掺入到含有根据需要的多种上述其它成分的适当溶剂中,然后过滤除菌来制备。通常,分散剂通过将多种无菌活性成分掺入到包含基本分散介质和 / 或其它成分的无菌媒介物中来制备。在用于制备无菌可注射溶液、混悬液或乳液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥或者冷冻干燥技术,从其先前的无菌过滤液体介质得到活性成分和任何另外想要的成分的粉末。液体介质应当根据需要被适当缓冲,并且在以足够的盐或葡萄糖注射之前,首先用液体稀释剂赋予等渗性。还考虑了用于直接注射的高浓缩组合物的制备,其中构想使用 DMSO 作为溶剂以产生极其快速的渗透、向小区域递送高浓度的活性试剂。

[0213] 组合物必须是在制造和储存条件下稳定的,并且防止微生物如细菌和真菌的污染作用。应当意识到,内毒素污染应当最低限度地保持在安全水平,例如小于 0.5ng/mg 蛋白。

[0214] 在特定的实施方案中,可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延缓吸收的试剂例如单硬脂酸铝、明胶或其组合实现。

[0215] VI. 高增生性疾病

[0216] 可以使用破坏 Cripto/GRP78 相互作用的化合物治疗高增生性疾病,例如癌症。除了用于治疗癌症之外,破坏 Cripto/GRP78 相互作用的化合物可用于治疗其它高增生性疾病,包括银屑病、纤维化、肿瘤血管发生、表皮增殖降低 / 疤痕、粥样斑、动脉粥样硬化、风湿性关节炎、炎症和自身免疫病。“高增生性疾病”如本文中所使用指导致或表征为细胞异常生长或繁殖的疾病。高增生性疾病在受试者中可表现损害,例如癌前病变、良性肿瘤和癌症。

[0217] 多种癌症可以通过破坏癌细胞中 Cripto/GRP78 结合和 / 或相互作用治疗,例如通过将至少一些癌细胞与 Cripto 靶向性和 / 或 GRP78 靶向性化合物接触。可以以本发明的

化合物治疗或者通过本发明方法鉴定的癌症包括实体肿瘤、转移癌和 / 或非转移癌。癌症可以起源于膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、结肠、食道、胃肠道、齿龈、头、肾、肝脏、肺、鼻咽、颈、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫。在多个实施方案中,癌症可以被组织学分类为:新生物、恶性;癌;癌,未分化的;巨细胞癌和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基细胞癌;毛基质癌;移行细胞癌;乳头移行细胞癌;腺癌;胃泌素瘤,恶性;胆管上皮癌;肝细胞癌;组合的肝细胞癌和胆管上皮癌;小梁性腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉内腺癌;腺癌,家族性结肠息肉病;实质癌;类癌瘤,恶性;细支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸性细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱性细胞癌;透明细胞腺癌;粒细胞癌;滤泡性腺癌;乳头状或滤泡性腺癌;无囊包硬化腺癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附属器癌;大汗腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液囊腺癌;粘液腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;佩吉特病,乳腺的;腺泡细胞癌;腺鳞状癌;伴鳞状上皮化生的腺癌;胸腺瘤,恶性;卵巢基质肿瘤,恶性;泡膜细胞瘤,恶性;粒层细胞瘤,恶性;男性母细胞瘤,恶性;支持细胞癌;间质细胞瘤,恶性;脂细胞瘤,恶性;副神经节瘤,恶性;乳腺外副神经节瘤,恶性;嗜铬细胞瘤;血管球瘤;恶性黑素瘤;无黑色素黑素瘤;浅表扩散性黑素瘤;巨大色素痣内恶性黑素瘤;上皮样细胞黑素瘤;蓝痣,恶性;肉瘤;纤维肉瘤;纤维组织细胞瘤,恶性;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎横纹肌肉瘤;胞状横纹肌肉瘤;基质肉瘤;混合瘤,恶性;苗勒混合瘤;肾母细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;间叶瘤,恶性;勃勒纳肿瘤,恶性;叶状瘤,恶性;滑液肉瘤;间皮瘤,恶性;无性细胞瘤;胚胎癌;畸胎瘤,恶性;卵巢甲状腺肿,恶性;绒毛膜癌;中肾瘤,恶性;血管肉瘤;血管内皮瘤,恶性;kaposi 肉瘤;血管外皮细胞瘤,恶性;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁成骨肉瘤;软骨肉瘤;软骨母细胞瘤,恶性;间质软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;ewing 肉瘤;牙源性肿瘤,恶性;造釉细胞性牙肉瘤;成釉细胞瘤,恶性;造釉纤维肉瘤;松果体瘤,恶性;脊索瘤;神经胶质瘤,恶性;室管膜瘤;星细胞瘤;原浆性星形细胞瘤;纤维性星形细胞瘤;成星形细胞瘤;成胶质细胞瘤;少突胶质细胞瘤;成少突神经胶质细胞瘤;原始神经外胚层瘤;小脑肉瘤;神经节神经母细胞瘤;神经母细胞瘤;成视网膜细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;脑膜瘤,恶性;神经纤维肉瘤;神经鞘瘤,恶性;颗粒细胞瘤,恶性;恶性淋巴瘤;霍奇金病;霍奇金病;类肉芽肿;恶性淋巴瘤,小淋巴细胞性;弥漫性大细胞性恶性淋巴瘤;滤泡性恶性淋巴瘤;蕈样肉芽肿病;其它指定的非霍奇金淋巴瘤;恶性组织细胞增多症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠病;白血病;淋巴细胞白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞性白血病;髓细胞白血病;嗜碱性细胞性白血病;嗜酸性白血病;单核细胞性白血病;肥大细胞白血病;巨核细胞白血病;髓细胞肉瘤;或毛细胞白血病。

[0218] Cripto 和 GRP78 在许多人肿瘤中广泛过表达。虽然如此,预期 cancers of the 乳腺和前列腺癌症对通过抑制 Cripto/GRP78 复合物的形成而抑制细胞增殖特别敏感。

[0219] A. 组合治疗

[0220] 为了提高 Cripto 和 / 或 GRP78 靶向性试剂的有效性,希望将本发明的那些组合物和方法与在在治疗高增生性疾病中有效的试剂,例如抗癌剂相组合。“抗癌剂”能够通过如下方式负向影响受试者中的癌症,例如通过杀死一种或等多种癌细胞、诱导一种或更多种癌细胞的凋亡和 / 或坏死、降低一种或更多种癌细胞的生长率、降低转移灶的发生或数量、减

少肿瘤大小、抑制肿瘤生长、减少向肿瘤或一种或更多种细胞的血液供应、改变肿瘤间质微环境、促进抗一种或更多种癌细胞或肿瘤的免疫反应、阻止或抑制癌症进展、或提高患癌症受试者的寿命。抗癌剂包括例如,化学治疗剂(化学治疗)、放射治疗剂(放射治疗)、手术方法(外科手术)、免疫治疗剂(免疫治疗)、基因治疗剂(基因治疗)、激素治疗、其它生物试剂(生物治疗)和/或备选的治疗剂。

[0221] 更普遍地,此类试剂将以有效杀死或抑制癌细胞增殖的与 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂组合的量提供。该方法涉及将一种或多种细胞与一种或多种试剂和 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂接触,接触可以同时进行或者在当向细胞、组织或生物体分开施用 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂和试剂时产生想要的治疗益处的一定时间段内进行。这可如下实现,即通过将细胞、组织或生物体与包含 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂和一种或更多种试剂两者的单一组合物或药物制剂接触,或者通过将细胞与两种或更多种不同组合物或制剂接触,其中一种组合物包含 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂并且其它种组合物包含一种或更多种试剂。

[0222] 当术语“接触”和“暴露”适用于细胞、组织或生物体时,在本文用于描述这样的过程,即通过该过程 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂和/或另一试剂例如化学治疗剂或放射治疗剂的治疗构建体被递送至靶细胞、组织或生物体或者被置于与靶细胞、组织或生物体直接接触。为了实现细胞杀死或停滞,Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂和/或一种或更多种另外的试剂以有效杀死一种或多种细胞或者阻止它们分裂的组合量递送至一种或更多种细胞。

[0223] Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂可以从数分钟至数周的间隔早于、同时于和/或晚于一种或多种其它试剂。在 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂和一种或多种其它试剂分开施用至细胞、组织或生物体的实施方案中,通常确保有效的时间段没有在每次递送之间期满,以致于 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂和一种或多种试剂仍能够对细胞、组织或生物体施加有利的组合作用。例如,在此类情况下,考虑了可以将细胞、组织或生物体以与 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂基本同时(即小于大约一分钟内)与两种、三种、四种或更多种治疗法接触。在其它方面中,一种或更多种试剂可以如下施用,即与 Cripto 和/或 GRP78 靶向性试剂施用基本同时、之前和/或之后大约 1 分钟、大约 5 分钟、大约 10 分钟、大约 20 分钟、大约 30 分钟、大约 45 分钟、大约 60 分钟、大约 2 小时、大约 3 小时、大约 4 小时、大约 5 小时、大约 6 小时、大约 7 小时、大约 8 小时、大约 9 小时、大约 10 小时、大约 11 小时、大约 12 小时、大约 13 小时、大约 14 小时、大约 15 小时、大约 16 小时、大约 17 小时、大约 18 小时、大约 19 小时、大约 20 小时、大约 21 小时、大约 22 小时、大约 23 小时、大约 24 小时、大约 25 小时、大约 26 小时、大约 27 小时、大约 28 小时、大约 29 小时、大约 30 小时、大约 31 小时、大约 32 小时、大约 33 小时、大约 34 小时、大约 35 小时、大约 36 小时、大约 37 小时、大约 38 小时、大约 39 小时、大约 40 小时、大约 41 小时、大约 42 小时、大约 43 小时、大约 44 小时、大约 45 小时、大约 46 小时、大约 47 小时、大约 48 小时、大约 1day、大约 2 天、大约 3 天、大约 4 天、大约 5 天、大约 6 天、大约 7 天、大约 8 天、大约 9 天、大约 10 天、大约 11 天、大约 12 天、大约 13 天、大约 14 天、大约 15 天、大约 16 天、大约 17 天、大约 18 天、大约 19 天、大约 20 天、大约 21 天、大约 1 周、大约 2 周、大约 3 周、大约 4 周、大约 5 周、大约 6 周、大约 7 周或大约 8 周或更长以及可从其导出的任何范围内。

[0224] Cripto 和 / 或 GRP78 靶向性试剂和一种或更多种试剂的多种组合方案可以采用。此类组合的非限定性实例显示如下,其中包含 Cripto 和 / 或 GRP78 靶向性试剂的组合是“A”并且试剂是“B”:

[0225] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0226] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0227] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0228] Cripto 和 / 或 GRP78 靶向性试剂按照用于施用化学治疗的一般方案,必要时考虑到毒性向细胞、组织或生物体的施用。预期治疗循环将按需要重复。在特定的实施方案中,考虑了多种另外的试剂可与本发明任何组合施用。

[0229] 1. 化学治疗剂

[0230] 术语“化学治疗”使用药物治疗癌症。“化学治疗剂”用于指在癌症治疗中施用的化合物或组合。化学治疗的一种亚型称作涉及化学治疗与生物治疗相组合的生物化学治疗。

[0231] 化学治疗剂包括,但不限于,5- 氟尿嘧啶、博来霉素、白消安、喜树素、碳铂、苯丁酸氮芥、顺铂 (CDDP)、环磷酰胺、放线菌素、柔红霉素、阿霉素、雌激素受体结合剂、表鬼臼毒素 (VP16)、法呢基蛋白质转移酶抑制剂、吉西他滨、异环磷酰胺、氮芥、美法仑、丝裂霉素、诺维本、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴肼、雷洛昔芬、他莫昔芬、紫杉醇、替莫唑胺 (水性形式 DTIC)、反铂、长春碱和甲氨蝶呤、长春新碱、或前述治疗剂的任何类似物或衍生物。这些试剂或药物以它们在细胞内的活性方式分类,例如是否并且在什么阶段它们影响细胞周期。备选地,试剂可以基于其直接交联 DNA、嵌入至 DNA 或者通过影响核酸合成而诱导染色体和有丝分裂畸变的能力表征。大多数化学治疗剂处于下列几类中:烷基化试剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、皮质类固醇激素、有丝分裂抑制剂和亚硝基脲、激素试剂、混合试剂及其任何类似物或衍生物变体。

[0232] 施用的化学治疗剂和方法、剂量等是本领域技术人员众所周知的 (见例如 the “Physicians Desk Reference” Goodman 和 Gilman 的 “The Pharmacological Basis of Therapeutics”、“Remington’s Pharmaceutical Sciences”以及 “The Merck Index, Eleventh Edition”,每一文献中的相关部分通过参考并入本文),并且可以依据本公开与本发明组合。取决于所治疗受试者的情况,必要时改变剂量。无论如何,负责施用的人确定对于各个受试者的适宜剂量。特定化学治疗剂和剂量方案实例也在本文中描述。当然,本文所述的所有这些剂量和试剂是示例性的,而不是限制性的,并且技术人员可以针对特定患者或应用使用其它剂量或试剂。这些两点之间的任何剂量或可从其导出的范围也预期在本发明中使用。

[0233] 2. 放射治疗剂

[0234] 放射治疗剂包括引起 DNA 损伤的辐射和波,例如 α - 辐射、X- 射线、质子束治疗 (美国专利 5,760,395 和 4,870,287)、UV- 辐射、微波、电发射、放射性同位素等等。治疗可以通过以上形式的辐射照射局部的肿瘤部位实现。最有可能的是,所有这些试剂对 DNA 前体、DNA 复制和修复以及染色体的装配和维持具有广范围的损伤。

[0235] 施用的化学治疗剂和方法、剂量等是本领域技术人员众所周知的,并且可以根据本文公开与本发明组合。例如,对于 X- 射线的剂量范围从 50 至 200 伦琴的每日剂量持续

一段时间 (3 至 4 周), 至 2000 至 6000 伦琴的单次剂量。对于放射性同位素的剂量范围可很大程度上变化, 这取决于同位素的半寿期、所发射辐射的强度和类型以及被肿瘤细胞的吸收。

[0236] 3. 外科手术

[0237] 大约 60% 的癌症患者将经历一些类型的外科手术, 包括例如预防性、诊断或分期性、治疗和姑息性外科手术。外科手术, 并且特别是治疗性外科手术, 可以用于与其它治疗例如本发明和一种或更多种其它试剂相结合。

[0238] 治疗性外科手术包括其中全部或部分癌性组织被物理性去除、切下和 / 或破坏的切除术。进一步考虑, 外科手术可去除、切下或破坏浅表癌、初癌或附带量的正常组织。通过外科手术的治疗包括例如肿瘤切除术、激光外科手术、冷冻外科手术、电外科手术和显微镜控制的外科手术 (Mohs 外科手术)。肿瘤切除术指物理去除至少部分肿瘤。当部分或全部癌性细胞、组织或肿瘤被切除时在身体内形成腔。

[0239] 肿瘤或外科手术区域的进一步处理可以通过灌注、直接注射或区域局部应用另外的抗癌剂实现。此类治疗可以重复, 例如大约每 1 天、大约每 2 天、大约每 3 天、大约每 4 天、大约每 5 天、大约每 6 天或大约每 7 天、或大约每 1 周、大约每 2 周、大约每 3 周、大约每 4 周、或大约每 5 周或大约每 1 月、大约每 2 月、大约每 3 月、大约每 4 月、大约每 5 月、大约每 6 月、大约每 7 月、大约每 8 月、大约每 9 月、大约每 10 月、大约每 11 月或大约每 12 月。这些治疗的剂量也是可变的。

[0240] 4. 免疫治疗剂

[0241] 免疫治疗剂通常依赖于使用免疫效应子细胞和分子靶向和破坏癌细胞。免疫效应子可以是例如对肿瘤细胞表面上的一些标志物具有抗体特异性。抗体可独自充当治疗的效应子或者它招募其它细胞实际实行细胞杀伤。抗体还可以与药物或毒素缀合 (例如化学治疗剂、放射性核素、蓖麻毒蛋白 A 链、霍乱毒素、百日咳毒素等) 并且仅仅充当靶向试剂。此类抗体结合物被称作免疫毒素并且是本领域众所周知的 (见美国专利 5,686,072, 美国专利 5,578,706, 美国专利 4,792,447, 美国专利 5,045,451, 美国专利 4,664,911, 以及美国专利 5,767,072, 每一文献通过参考并入本文)。备选地, 效应子可以是携带直接或间接与肿瘤细胞靶相互作用的表面分子的淋巴细胞。效应子细胞包括细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞。

[0242] 在免疫治疗的一个方面中, 肿瘤细胞必须具有一些易于靶向的标志物, 即其在大多数其他细胞上不存在。存在许多肿瘤标志物, 并且这些标志物中许多可适用于在本发明背景中用于靶向。共有的肿瘤标志物包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿肿瘤相关抗原、胚胎抗原、酪氨酸酶 (p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸化 Lewis 抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B 和 p155。

[0243] 5. 基因治疗剂

[0244] 肿瘤细胞抗试剂例如化学治疗剂和放射治疗剂, 代表着临床肿瘤学中的主要问题。当前癌症研究中的一个目标是通过组合此类试剂与基因治疗找到改善一种或更多种抗癌试剂有效性的方法。例如, 当单纯疱疹 - 胸腺嘧啶核苷激酶 (HS-tK) 基因通过反转录病毒载体系统递送至脑肿瘤时成功地诱导了抗病毒剂更昔洛韦的易感性 (Culver 等, 1992)。在本发明背景中, 考虑了基因治疗同样也可与 Cripto 和 / 或 GRP78 靶向性试剂和 / 或其它试剂联合使用。

[0245] 6. 分子靶向治疗

[0246] 术语“靶向剂”意思是指用于通过靶向特异分子或信号途径治疗疾病的任何试剂（例如小分子和多肽，包括抗体）。抗 Cripto 和 / 或抗 GRP78 试剂与一种或更多种其它靶向试剂的组合可通过靶向对于癌细胞至关重要的多个途径而改善对癌症的治疗。

[0247] VII. 通过抑制 Cripto/GRP78 复合物形成促进神经元分化

[0248] 根据本发明抑制 Cripto/GRP78 复合物形成和 / 或功能还可用于促进干细胞的神经元分化。预期，实际上任何多能干细胞或细胞系，例如人胚胎干细胞或诱导的多能干细胞（iPS 细胞）的分化可通过破坏 Cripto/GRP78 复合物形成和 / 或信号而被影响。例如，人胚胎干细胞系 H1、H9、hES2、hES3、hES4、hES5、hES6、BG01、BG02、BG03、HSF1、HSF6、H1、H7、H9、H13B 和 / 或 H14 等可用于本发明中。还预期，随后可利用的干细胞系也可用于本发明中。其它胚胎干细胞，例如哺乳动物、小鼠、灵长类等也可用于本发明中。

[0249] 如本领域技术人员所意识到的那样，通常缩写为 iPS 细胞或 iPSC 的诱导的多能干细胞是通过插入某些基因人工地从非多能细胞，有代表性的是成体体细胞衍生的一种多能干细胞类型。据信，诱导的多能干细胞与天然多能干细胞如胚胎干细胞在许多方面相同，包括某些干细胞基因和蛋白质的表达、染色质甲基化模式、倍增时间、胚状体形成、畸胎瘤形成、有活性嵌合体形成、以及潜能和可分化性，但是它们与天然多能干细胞相关的完全程度仍有待于评价。先前已经描述了 IPS 细胞（见例如 Takahashi 等，2006；Takahashi 等，2007；Yu 等，2007）。

[0250] VIII. Cripto/GRP78 复合物形成和功能的调节剂的筛选

[0251] 本发明进一步包括用于鉴定 Cripto/GRP78 相互作用功能，例如 Cripto 和 GRP78 结合并产生下游信号的能力的调节剂的方法。这些测定法可包括随机筛选大的候选物质的文库；备选地，测定法可用于致力于根据结构特性选择的特定类型化合物，据信所述结构特性使得它们更适合调节 Cripto/GRP78 复合体的功能或形成。

[0252] 提高功能时意思是指可以测定 Cripto 与 GRP78 的结合和 / 或评价源自 Cripto/GRP78 复合体形成的一个或更多个下游信号（例如激活蛋白 /Nodal/TGF- β 信号）。例如，可以测定在候选调节剂存在或缺乏下的 Cripto/GRP 结合。

[0253] 为了鉴定 Cripto/GRP78 复合体调节剂，通常将确定 Cripto 和 GRP78 在候选物质存在和缺乏下的功能，调节剂定义为改变 Cripto/GRP78 复合体功能或形成的任何物质。例如，方法通常包括：

[0254] (a) 提供候选调节剂；

[0255] (b) 混合候选调节剂与分离的化合物或细胞，或适宜的试验动物；

[0256] (c) 测量候选调节剂是否能改变或破坏步骤 (c) 的细胞或动物中 Cripto/GRP78 结合和 / 或下游信号；和

[0257] (d) 比较在步骤 (c) 中测量的特征与在所述候选调节剂缺乏下化合物、细胞或动物的特征，

[0258] 其中所测量特征之间存在不同表明所述候选调节剂的确是化合物、细胞或动物的调节剂。

[0259] 在某些实施方案中，选择性破坏 Cripto/GRP78 结合和 / 或信号的候选调节剂可用于治疗高增生性疾病。可在无细胞系统中、分离的细胞中或者在生物体包括转基因动物中

开展测定。

[0260] 当然,应当理解,尽管没有找到有效的候选物,但是所有的本发明筛选方法本身是有用的。本发明提供筛选此类候选物的方法,不单单是发现它们的方法。

[0261] 1. 调节剂

[0262] 如本文中所使用,术语“候选物质”指可有效抑制或增强 Cripto/GRP78 复合物形成或活性的任何分子。候选物质可以是蛋白质或其片段、小分子、甚至核酸分子。经证明情况确实如此,即大多数有用的药物化合物将是结构上与 N-20 抗体相关的化合物、靶向 GRP78(例如 SEQ ID NO :5) 或 Cripto(例如 SEQ ID NO :4) 的 shRNA、从 Cripto 或 GRP78 衍生的肽、Cripto 的合成 CFC 结构域、可溶性 ALK4ECD 或其突变体 (I70A、L75A、P77A)、ECGC 或结构上与靶向 CFC 结构域上 GRP78 结合位点的 Cripto 抗体相关的化合物。使用先导化合物帮助开发改善的化合物被称作“推理性药物设计”并且不仅包括与已知抑制剂和激活剂的比较,而且还包括关于靶分子结构的预测。

[0263] 推理性药物设计的目的是产生生物活性多肽或靶化合物的结构类似物。当提到产生此类类似物时,可能是产生这样的药物,即比天然分子更有效或更稳定,其对改变具有不同的易感性或者其会影响多种其它分子的功能。在一个方法中,可产生靶分子或其片段的三维结构。这可通过 x-射线晶体学、计算机建模或者通过两种方法的组合实现。

[0264] 使用抗体证实靶化合物激活剂或抑制剂的结构也是可能的。原则上,该方法得到药效团,随后的药物设计可以基于此药效团。通过产生针对功能性药理学活性抗体的抗独特型抗体,完全绕开蛋白质晶体学是可能的。作为镜像的镜像,抗独特型的结合位点预期将是最初抗原的类似物。然后,抗独特型将用于从化学或生物性产生肽库中鉴定和分离肽。然后所选择的肽充当药效团。使用本文所述的用于产生抗体的方法,使用抗体作为抗原可产生抗独特型抗体。

[0265] 另一方面,可以从多种商业来源简单地获得小分子文库,据认为该小分子文库满足用于有用药物的基本标准以“野蛮强制”鉴定有用化合物。筛选此类文库,包括组合产生的文库(例如肽文库)是筛选大量的对于活性相关(和不相关)化合物的快速且有效的方式。组合方法还通过产生仿照活性设计的第二代、第三代和第四代化合物而不产生不良化合物向它们自身提供潜在药物的快速进化。

[0266] 候选化合物可包括天然存在化合物的片段或部分,或可以作为已知化合物的有效组合发现,否则其将是无活性的。建议从天然来源如动物、细菌、真菌、植物来源包括叶和皮以及海洋样品分离的化合物可以作为候选物测定潜在有用的药物试剂的存在。应当理解,待筛选的药物试剂还可从化学组合物或人造化合物衍生或合成。因此,应当理解,通过本发明鉴定的候选物质可以是肽、多肽、多核苷酸、小分子抑制剂或通过推理性药物设计从已知抑制剂或刺激剂设计的任何其它化合物。

[0267] 其它适宜的调节剂包括反义分子、核糖核酸酶和抗体(包括单链抗体),它们当中每一个将是靶分子特异性的。在本文件的别处更详细地描述此类化合物。例如,结合翻译或转录起始位点或者剪接点的反义分子将是理想的候选抑制剂。

[0268] 除了最初鉴定的调节性化合物外,发明人还考虑了其它立体化学相似的化合物可以配制成模拟调节剂结构的关键部分。包括肽调节剂的模拟肽的此类化合物可以以与初始调节剂相同的方式使用。

[0269] 根据本发明的抑制剂可以是这样的抑制剂,即对 Cripto/GRP78 复合体上游、下游或直接对其施加抑制性或激活性效应。不管通过本筛选方法鉴定的抑制剂或激活剂的类型如何,此化合物的抑制或激活效应导致与在不加入候选物质时所观察到的效应相比降低或抑制 Cripto/GRP78 复合物形成或活性。

[0270] 2. 体外测定

[0271] 运行的快速、廉价且简单的测定法是体外测定。此类测定通常使用分离的分子,可以快速且大数量运行,由此增加在短时间内可获得的信息量。可以使用许多种容器运行测定法,包括试管、板、皿和其它表面,例如试纸或珠。

[0272] 无细胞测定法的一个实例是结合测定法。虽然它不能直接解释功能,但是调节剂以特异方式结合靶分子的能力是具有相关生物学效应的强有力的证据。例如,因为立体的、变构的或电荷-电荷相互作用,所以分子与靶的结合它们自己本身会是抑制性的。靶可以是在溶液中游离的、固定至支持物上的、表达于细胞表面中或上的。靶或化合物任一种可以被标记,由此允许测定结合。通常,靶将是标记的,这降低了加标签会干扰或增强结合的机会。可开展竞争性结合形式,其中试剂之一被标记,并且可以测定游离标签的量对结合标签的量以测定结合效应。

[0273] 用于高通量筛选化合物的技术描述于 WO 84/03564 中。大量的小肽测试化合物在固体物质上合成,例如塑料钉或一些其它表面。结合的多肽通过多种方法检测。

[0274] 3. 细胞内测定

[0275] 本发明还考虑了在细胞中筛选化合物调节 Cripto/GRP78 复合物形成和 / 或功能的能力。对于此类筛选测定可采用多种细胞系,包括用于此目的的特别进行工程化改造的细胞。例如,基于本文所述的观察,癌症细胞和 / 或干细胞可以与候选 Cripto/GRP78 复合体调节剂接触。在其它实施方案中,细胞系可以被工程改造以过表达 Cripto 和 GRP78 以利于筛选假定的 Cripto/GRP78 复合体调节剂。GRP78 蛋白质是商业可获得的并且可以固定在多孔板表面以允许开发基于 ELISA 的测定法来测定可溶性 Cripto 的结合和 Cripto/GRP78 复合体调节剂的效应。备选地,发明人已经显示,可以测量可溶性 ¹²⁵I-Cripto 与表达 GRP78 的完整细胞在细胞表面上的结合(例如见 Kelber 等)。还可在该测定法中筛选 Cripto/GRP78 复合体调节剂以测量它们影响 Cripto/GRP78 结合和信号的能力。

[0276] 取决于测定法,可以需要培养。使用多种不同的生理测定法检查细胞。备选地,可开展分子分析,例如查看蛋白质表达、mRNA 表达(包括全细胞或 polyA RNA 的差异展示)及其它。

[0277] 4. 体内测定

[0278] 体内测定法涉及使用多种动物模型,包括已经被工程改造具有特定缺陷,或者携带有可以用于测量候选物质达到并影响生物体内不同细胞的能力的标志物的转基因动物。由于其大小、操作容易以及对它们的生理学和基因构成信息的原因,小鼠是优选的实施方案,特别是对于转基因学。然而,其它动物也是适宜的,包括大鼠、兔、仓鼠、豚鼠、沙土鼠、北美土拨鼠、猫、狗、绵羊、山羊、猪、牛、马和猴类(包括黑猩猩、长臂猿和狒狒)。用于调节剂的测定法可以使用来自这些物种的动物模型开展。

[0279] 在此类测定中,一种或更多种候选物质施用至动物中,并且与没有以一种或多种候选物质处理的相似动物相比,一种或多种候选物质改变一个或更多个特性的能力鉴定为

调节剂。特征可以是上面关于特定化合物（例如酶、受体、激素）或细胞（例如生长、致癌性、存活）所讨论的那些，或者是更广的指征例如行为、贫血、免疫反应等。

[0280] 本发明提供用于筛选影响 Cripto/GRP78 复合物形成和 / 或功能的候选物质的方法。在这些实施方案中，本发明涉及用于测定候选物质抑制 Cripto/GRP78 复合物形成和 / 或功能的能力的方法，通常包括步骤：向动物施用候选物质；和测定候选物质减少细胞增殖、高增生性疾病的发展或抑制、Cripto/GRP78 复合物形成和 / 或信号的一个或多个特征的能力。

[0281] 以测试化合物对这些动物的治疗涉及向动物施用适宜形式的化合物。施用可以通过为临床或非临床目的采用的任何途径，包括但不限于口、鼻、颊甚至局部施用。备选地，施用可以通过气管内滴注法、支气管滴注法、真皮内、皮下、肌肉、腹膜内或静脉内注射。特别考虑的途径是全身静脉内注射、通过血液或淋巴液补充的部位施用、或直接向受累部位施用。

[0282] 体内测定化合物的有效性将涉及多种不同标准。同样，测量毒性和剂量反应可以在动物中以比体外或细胞内测定意义更深远的方式开展。

[0283] IX. 实施例

[0284] 包括下列实施例以表明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当意识到，在下列实施例中公开的技术代表着发明人发现的在实施本发明中工作良好的技术，并且因此可以考虑构成其优选的实施方式。然而，根据本公开，本领域技术人员应当意识到，可以在不脱离本发明精神和范围的情况下对所公开的特定实施方案进行诸多修改，并仍得到相同或相似的结果。

[0285] 实施例 1

[0286] 材料和方法

[0287] 材料. NuPAGE 凝胶、分子量标准和 Cyquant 细胞增殖测定试剂盒来自 Invitrogen (San Diego, CA)。Sulfo-NHS-LC-生物素购自 Pierce (Rockford, IL)。TGF- β 1 购自 R&D systems (Minneapolis, MN)。抗 Flag (M2)、抗 HA (HA-7)、抗 His (His-1) 和抗总钙黏着蛋白抗体以及抗 Flag M2 凝胶珠、Flag 肽和毒胡萝卜内酯购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO)。抗 GRP78 (N-20 和 76-E6)、抗 T β RII (C16) 和蛋白质 G-PLUS-琼脂糖珠来自 Santa Cruz (Santa Cruz, CA)。抗 GRP78 (KDEL) 来自 Stressgen bioreagents (Ann Arbor, MI)。抗磷酸化 Smad2、抗 T β RI 和抗总肌动蛋白购自 Cell Signaling (Danvers, MA)。p26-Flag 表达构建体由 Kuo Fen Lee (Peptide Biology Laboratories, Salk Institute) 馈赠。抗 Cripto 的抗体 (6900) 针对跨小鼠 Cripto 氨基酸 81-97 位并且在 Cys 81 和 Cys 90 之间环化的肽产生。Smad2 抗血清针对在 Smad2 和 Smad3 之间保守的跨人 Smad3 氨基酸 159-175 位的肽产生。靶向 Flag 表位 (6643) 的多克隆抗血清针对 2X Flag 肽产生。兔多克隆抗 Cripto、抗 Smad2/3 和抗 Flag 抗血清由 Joan Vaughan (Peptide Biology Laboratories, Salk Institute) 生产。

[0288] 重组人激活蛋白 -A 使用由 J. Mather 博士 (Genentech, Inc.) 慷慨提供的稳定表达激活蛋白 -A 的细胞系产生，并由 Wolfgang Fischer (Peptide Biology Laboratory, Salk institute) 纯化。重组小鼠 Nodal、人 TGF- β 1、人激活蛋白 -B 和小鼠 Cripto 购自 R&D Systems (Minneapolis, MN)。蛋白 A- 和 G- 琼脂糖和磷酸肌醇 3- 激酶 (LY294002)

和 MAPK 或 Erk 激酶 (PD98059) 抑制剂购自 Calbiochem(San Diego, CA)。¹²⁵I-Cripto 使用如先前所描述的氯胺 T 方法制备 (Vaughan, 1993)。多克隆抗 Cripto 抗体 (6900) 在来自 Cripto 的表皮生长因子样结构域的肽 (⁸²CPPSFYGRNCEHDVRKE⁹⁸(SEQ ID NO:1)) 免疫的兔中产生。山羊 IgG、抗 GRP78(N-20) 和抗磷酸化酪氨酸 (PY99) 购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)。抗磷酸化 Smad2、抗 Smad2/3、抗总肌动蛋白、抗磷酸化 Akt、抗 Akt、抗磷酸化 GSK3b、抗磷酸化 Erk1/2、抗 Erk1/2、抗磷酸化 Src (Y416) 和抗 Src 购自 Cell Signaling Technologies, Inc. (Danvers, MA)。抗 HA、抗 Flag(M2) 和抗 Flag(M2) 琼脂糖购自 Sigma(St. Louis, MO)。辣根过氧化物酶连接的抗小鼠、抗山羊、抗兔 IgG、3,3',5'-tetramethylbenzidine 底物、化学发光底物 (Supersignal™) 以及 BCA 蛋白质测定试剂盒从 Pierce(Rockford, IL) 得到。

[0289] 表达构建体、细胞系和瞬时转染。野生型和突变体小鼠 Cripto-Flag 表达构建体已经在先前描述 (Gray 等, 2006)。还在慢病毒载体 pCSC(Miyoshi 等, 1998) 中产生 Cripto 构建体用于慢病毒生产。在该研究中使用的慢病毒载体由 Inder Verma(Salk Institute) 慷慨馈赠。TβRI-HA 和 TβRII-His 表达构建体由 Joan Massagué(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York) 馈赠。标准 PCR 技术用于产生在其 C 末端带有血凝素 (HA) 表位的人 GRP78 构建体。293T 细胞、P19 细胞和 HeLa 细胞生长在 DMEM 培养基中并且 PC3 细胞生长在 -K12 培养基中。培养基添加 10% 胎牛血清 (293T、HeLa 和 PC3) 或 7.5% 胎牛血清 (P19) 以及青霉素、链霉素和 L- 谷氨酰胺。对于瞬时转染, 将 293T 细胞铺于聚赖氨酸包被的 15cm 板中 (~ 10⁷ 个细胞 / 板), 然后在第二天达到 ~ 40-60% 汇合时使用 PEI 转染试剂转染, 如先前所描述 (Harrison 等, 2004)。

[0290] 在实施例 3 中使用下列培养方案。HEK 293T 细胞生长在 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中, 并且 NCCIT 细胞生长在 RPMI 1640 中。两种培养基添加有 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素和 L- 谷氨酰胺。MCF10A 细胞生长于 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 -F-12(50 : 50) 中, 培养基添加有 5% 供体马血清、20ng/mL EGF、10 μg/mL 胰岛素、0.5 μg/mL 氢化可的松和 100ng/mL 霍乱毒素。

[0291] 对于瞬时转染, 细胞 40% 和 60% 之间汇合的密度铺板并且对于 NCCIT 细胞使用 Lipofectamine 2000(Invitrogen) 并且对于 293T 细胞使用 Perfectin(Gene Therapy Systems) 根据厂商的说明书进行。对于病毒转导, 如先前所述产生慢病毒 (Miyoshi 等, 1998)。将包含病毒的培养基适当稀释得到 3 至 5 的感染复数, 用于产生包含递送载体的细胞集合, 并且通过使用荧光显微镜检测所感染细胞中的绿色荧光蛋白确定感染效率。

[0292] 质谱分析。将质量特异性条带从考马斯蓝染色的凝胶中切下。通过以 40% 水性正丙醇和 50% 水性乙腈处理将凝胶片进一步脱色。向脱色的凝胶片中, 加入 10 μl 碳酸氢铵溶液中的 100ng 胰蛋白酶 (20mM)。于 37℃ 消化 16h。将 1 微升上清液点在 MALDI 靶上并与 1 μl 的 α-氰基-羟基桂皮酸饱和溶液混合。干燥后, 在 Bruker Ultraflex TOF/TOF(Bruker Daltonics, Billerica, MA) 上以阳性反射 TOF 模式分析样品。使用 Mascot algorithm(Matrix Science, London, UK) 分析质量指纹数数据。

[0293] 荧光成像。293T 细胞 (35,000 每孔) 和 P19 细胞 (500,000 每孔) 铺于 12 孔板中并在以聚赖氨酸预处理的盖玻片上生长过夜。细胞以 KPBS 洗涤, 在 4% 多聚甲醛中固定然后在缓冲液 A(KPBS, 添加有 2% 驴血清和 0.2% Triton X-100) 中透化。293T 细胞以兔抗

Cripto(6900 ;1 : 600) 和山羊抗 GRP78(N-20sc-1050 ;1 : 400) 处理,而 P19 细胞以相同的抗 Cripto(6900 ;1 : 600) 和抗 GRP78(N-20sc-10501 : 125) 抗体以及小鼠抗总钙黏着蛋白(C1821, Sigma, 1/125) 在缓冲液 A 中于 4℃处理 48 小时。细胞以 KPBS 洗涤,然后分别用抗兔、抗山羊和抗小鼠在缓冲液 A 中于室温处理 1 小时。在于 KPBS 中进一步洗涤之后,在 DAPI 存在情况下将盖玻片封片并进行荧光检查。对于共焦成像,使用 Leica TCS SP2 AOBs 共焦系统(Leica, Wetzlar, 德国)。使用每一激发波长连续扫描收集图像以避免荧光团之间的任何扩散。

[0294] 慢病毒 shRNA 载体的设计和细胞系感染。人 GRP78 基因内的靶序列使用 S-fold 程序(<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>) 鉴定和选择。短发夹 RNA(shRNA) 的设计和慢病毒 shRNA 载体的生产如先前所述开展(Singer 等, 2005)。用于产生 GRP78 1(G1) shRNA 的 83-mer 如下: 5'-CTGTCTAGACAAAAACCATACATTCAAGTTGATTCTCTTGAAATCAACTGAATGTATGGTCGGGGATCTGTGGTCTCATACA-3'(SEQ ID NO:2)。对于病毒转导,慢病毒如先前所述产生(Miyoshi 等, 1998)。

[0295] 野生型 Cripto-Flag 表达构建体先前已经描述(Gray 等, 2006)。标准 PCR 技术用于产生在其 C-末端代有 HA 表位的人 GRP78 构建体。Δ 19-68GRP78-HA 构建体使用 PCR 技术产生,如先前所述(Harrison, CA 2003 JBC)。Cripto 构建体还在慢病毒载体 pCSC(Miyoshi HU 1998 J Virol) 中产生用于慢病毒的生产 and 细胞系的感染。人 Cripto 或 GRP78 基因内的靶序列使用 Sfold 程序(<http://sfoldwadsworth.org/sirna.pl>) 鉴定和选择。短发夹 RNA(shRNA) 的设计和慢病毒 shRNA 载体的生产基本上如先前所述开展(Singer 0 2005 Nat Neuro)。简言之,包含人 Cripto 或 GRP78shRNA 序列的 83-mer 寡核苷酸和 T3 寡核苷酸(5'-CTCGAAATTAACCTCACTAAAGGG-3'(SEQ ID NO:3)) 用于 PCR 扩增片段,然后被亚克隆入其中 shRNA 表达被 H1 启动子驱动的慢病毒载体中(Singer 0 2005 Nat Neuro)。用于产生 Cripto shRNA 和 GRP78 shRNA 载体的 83-mer 分别是 5'-CTGTCTAGACAAAAACAATGACTCTGAATTAAAGTCTCTTGAACCTTAATTCAGAGTCATTGCGGGGATCTGTGGTCTCATACA-3'(SEQ ID NO:4) 和 5'-CTGTCTAGACAAAAACCATACATTCAAGTTGATTCTCTTGAAATCAA CTTGAATGTATGGTCGGGGATCTGTGGTCTCATACA-3'(SEQ ID NO:5), 并且先前已经验证(Gray 等, 2006 ;Shani 等, 2008)。

[0296] 细胞裂解液和免疫沉淀。如先前所述在 RIPA 缓冲液中制备细胞裂解液(Gray 等, 2006)。对于免疫沉淀试验,1-5mg 蛋白质提取物通过蛋白质 G-PLUS-琼脂糖珠于 4℃预清除 2 小时。预清除的提取物按所标明与 40 μl 抗 FLAG M2 凝胶珠孵育或者 20 μl G-PLUS-琼脂糖以 15 μl 抗 GRP78(KDEL)、10 μl 抗 HA、或 25 μl 抗 His 于 4℃预清除 2 小时。随后以 RIPA 缓冲液洗涤免疫沉淀物 4 次并以 54K(50mM tris pH 7.9、150mM NaCl、0.5% Triton X-100) 缓冲液洗涤 2 次。然后通过如下任一种方式洗脱蛋白质,即通过在样品缓冲液中于 95℃加热珠子或者通过加入 50 μl Flag 肽(1 μg/μl) 接着通过在样品缓冲液中加热去除任何剩余的结合蛋白质。Western 印迹

[0297] 细胞表面生物素化。Sulfo-NHS-LC-生物素在 HDB 中以 0.5mg/ml 新鲜制备然后储存在冰上直至使用。附着的完整细胞以冰冷的 HDB 漂洗两次然后与生物素溶液在冰上孵育 30 分钟,使用足够的体积以完全覆盖细胞(例如对于 6-孔板 1ml/孔)。然后通过加入 1M Tris pH 7.5 使生物素/H B 溶液达到 50mM Tris 终浓度以淬灭生物素化反应。去除得到的溶液并在包含 50mM Tris 的 HDB 中漂洗细胞一次。然后细胞溶解于添加有标准蛋白酶

抑制剂的 RIPA 缓冲液中 (50mM TrisHCl, pH 7.4/150mM NaCl/1% NP40/0.5% 脱氧胆酸盐/0.1% SDS)。生物素化蛋白质通过 SDS PAGE 分离,印迹至硝酸纤维素上,并且然后在以抗生物素蛋白-HRP 和 ECL 处理后显色。

[0298] 细胞死亡测定. 对于每一细胞群体,根据细胞的形态计数三个视野中的凋亡细胞,每一视野包含至少 100 个 GFP 阳性细胞。确定为细胞凋亡的细胞数除以视野中 GFP 阳性细胞的总数,得到%凋亡细胞。

[0299] 蛋白质磷酸化. 细胞在 24 孔板中生长至汇合,以无血清培养基漂洗并且血清饥饿 4 小时。如所标明,加入适宜抑制剂或阻断性抗体 1 小时。细胞以标明剂量的 TGF- β 配体刺激 60 分钟或者以可溶性的 Cripto 刺激 10 分钟。通过加入添加有 20mM NaF、500 μ M 焦磷酸钠、1mM NaOrthothanitate 和标准蛋白酶抑制剂的 50 μ L 冰冷的放射免疫沉淀 (RIPA) 缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% 脱氧胆酸盐和 0.1% SDS) 收获细胞。然后向每一样品中加入 15mL 的 4 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液 (含二巯代苏糖醇),并且蛋白质通过 SDS-PAGE 分离并且印迹在硝酸纤维素上。印迹以抗磷酸化 Smad2 (1 : 500)、抗 Smad2/3 (1 : 1000)、抗磷酸化 Akt (1 : 500)、抗 Akt (1 : 500)、抗磷酸化 GSK3 β (1 : 500)、抗总肌动蛋白 (1 : 500)、抗磷酸化 Erk1/2 (1 : 500) 或抗 Erk1/2 (1 : 500) 抗体处理,结合以缀合有辣根过氧化物酶的抗兔或小鼠 IgG 处理,并且使用增强化学发光检测条带。

[0300] 如下开展 Smad2 磷酸化和 Western 印迹。以慢病毒稳定转染的 HeLa 细胞或 PC3 细胞以 200,000 个细胞/孔的密度铺于 6 孔板中。铺板 48h 后,细胞以 HDB 洗涤一次,在无添加剂的培养基中饥饿 4h,然后不再处理或者以 TGF- β_1 处理~分钟。裂解细胞并且通过如先前所述的 Western 印迹开展 Smad2 磷酸化测定 (Gray 等, 2006)。

[0301] 细胞增殖测定和在软琼脂中的集落形成. PC3 细胞以如上所述的 pCSC 慢病毒构建体稳定转染。细胞以 500 个细胞/孔的密度铺于 96 孔板中并且 24h 后细胞以 10pM TGF- β_1 处理或不处理。处理 8 天后,使用 Cyquant 细胞增殖试剂盒根据厂商的说明书测定细胞增殖。为了测量在软琼脂中的集落形成,96 孔板以 50 μ l/孔表面层制备,孔表面层包含再悬浮于 PC3 生长培养基中的 0.6% 琼脂 (Nobel)。然后向每一孔中加入 75 μ l/孔的包含 1,000 个稳定感染 PC3 细胞的 0.33% 琼脂/PC3 生长培养基,接着加入不同量 TGF- β_1 ,在琼脂固化之前得到特定的终浓度。向孔中再加入 100 μ l 的含或不含 TGF- β_1 的 PC3 生长培养基 15 天,然后通过显微镜观察集落并计数。使用架在倒置 Olympus CK40 显微镜上的 Canon EOS 400D 照相机设置成最低放大倍数拍摄指定细胞的照片。

[0302] 细胞表面蛋白质检测. 一式三份铺于 24 孔板中的完整细胞以 Hepes 解离缓冲液 (HDB) 洗涤,以 3% 牛血清白蛋白/HDB 封闭,并在 3% 牛血清白蛋白/HDB 中与抗 Cripto (6900 ; 1 : 200)、抗 GRP78 (N-20 ; 1 : 200) 或适宜阴性对照一级抗体室温孵育 2 小时。细胞以 HDB 洗涤并适宜的过氧化物酶缀合的二级抗体孵育。使用 3',5'-二甲基联苯胺过氧化物酶底物测量特异性抗体染色,如先前所述 (Gray 等, 2000 ; Kelber JA 等 2008 J. Biol. Chem. 283 (8) 4490-500)。

[0303] Smad2- 依赖的萤光素酶活性. 如先前所述,萤光素酶测定使用 A3- 萤光素酶报告分子开展 (Gray 等, 2003)。A3- 萤光素酶报告分子构建体包含 3 拷贝的来自非洲爪蛙 (*Xenopus laevis*) Mix. 2 启动子的与基本的 TATA 和和萤光素酶报告分子基因连接的激活

蛋白应答元件。NCCIT 细胞以 1×10^5 个细胞 / 孔铺于聚-D-赖氨酸包被的 24-孔板中,并在~24 小时后使用 200ng A3-萤光素酶、400ngFAST2 (FoxH1)、400ng CMV- β -半乳糖苷酶和 200ng 空载体 (pcDNA 3.0) 以 1.2 μ g DNA/孔一式三份转染 (Lipofectamine 2000)。在转染后~24 小时处理细胞,然后在处理后~16 小时收获。在冰上将细胞在增溶缓冲液 (1% Triton-X-100、25mM 甘氨酸、15mM MgSO_4 、4mM EGTA 和 1mM 二硫代苏糖醇) 中孵育 30 分钟,并且测量萤光素酶报告分子活性并向对于 CMV- β -半乳糖苷酶标准化。

[0304] 免疫共沉淀. 1×10^6 HEK 293T 细胞铺于 10-cm 板中。24 小时后,使用 Perfectin 以 12 μ g DNA/板 (6 μ g 载体和 6 μ g Cripto-Flag、WT GRP78-HA、 Δ 19-68 GRP78-HA 或 6 μ g Cripto-Flag 和 6 μ g WT GRP78-HA 或 Δ 19-68GRP78-HA) 转染细胞,并且在收获前将细胞再孵育 48 小时。在冰上将细胞裂解并刮到包含标准蛋白酶抑制剂的 0.8mL 冷 RIPA 缓冲液中。通过离心预清除细胞裂解物,并将 75 μ L 的总裂解物在 4 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液 (含二硫代苏糖醇) 中加热和冷冻,其中剩余的裂解物与 HA-或 Flag (M2)-琼脂糖 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。沉淀的复合体以冷的 RIPA 缓冲液洗涤 3 次,每次 1 小时,从珠上洗脱,然后通过 SDS-PAGE 分析并电转移至硝酸纤维素上,然后使用抗 Flag、HA 或 GRP78 (N-20) 抗体进行 Western 印迹。

[0305] 细胞增殖. 细胞以 500 (NCCIT) 或 200 (MCF10A) 个细胞 / 孔的密度铺于 96 孔板中,细胞一式四份根据指示以的阻断剂 (山羊 IgG 或抗 GRP78 (N-20)) 和生长因子的组合处理,或者不处理。处理后 8 天,使用 CyQUANT 细胞增殖试剂盒根据厂商说明书测量细胞增殖。

[0306] 细胞表面 Cripto 结合. 细胞以 4×10^5 个细胞 / 孔铺于以聚-D-赖氨酸包被的 24 孔板中。铺板 16 小时后,在孔中室温开展对完整细胞的结合。细胞在 Hepes 解离缓冲液 (HDB) (12.5mM Hepes (pH 7.4)、140mM NaCl 和 5mM KCl) 中洗涤,然后向每一孔中加入 200 μ L : 200 μ L 含 0.1% 牛血清白蛋白的结合缓冲液 (HDB 含 5mM MgSO_4 、1.5mM CaCl_2)、10 μ L 的结合缓冲液中不同稀释度的未标记竞争物 (25.0 μ g/mL 可溶性 Cripto) 和 40 μ L 125 I-Cripto (1×10^6 cpm/孔)。将板室温孵育 2h,然后以 HDB 漂洗孔,并且细胞在 1% SDS 中增溶并且使用计数器计数每一孔的 125 I-Cripto。

[0307] E-钙黏着蛋白表达和细胞粘附. MCF10A 细胞以 4×10^5 个细胞 / 孔铺于 6 孔板中。24 小时后细胞以山羊 IgG 或抗 GRP78 (N-20) 预处理 1 小时,然后以 400ng/mL 可溶性 Cripto 处理或者不处理。处理 48 小时后,细胞或者在包含标准蛋白酶抑制剂的冷 RIPA 缓冲液中裂解或者分析细胞粘附特性。细胞裂解物通过 SDS-PAGE 分析并且电转移至硝酸纤维素上,接着使用抗 E-钙黏着蛋白或总肌动蛋白抗体进行 Western 印迹。为了定量细胞粘附,~ 2×10^5 个细胞 / 孔一式四份铺于 96 孔板中并且于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。为分析所铺板的细胞的总数,从每一孔中去除培养基并且使用 CyQUANT 细胞增殖试剂盒根据厂商的说明书测量相对细胞数。使用从已经漂洗的板测量 (CyQUANT) 的相对细胞数计算粘附百分数。

[0308] 实施例 2

[0309] GRP78 和 Cripto 在细胞表面上形成复合体并且协同抑制 TGF- β 信号和增强细胞生长

[0310] Cripto 和 GRP78 在胚胎发育过程中起着至关重要的作用并且促进肿瘤的表型。经验证这些蛋白质中每一个可独立地作为细胞表面肿瘤特异性治疗的体内靶标的事实突出了这些蛋白质在肿瘤进展中的重要性。为了鉴定新的 Cripto 相互作用蛋白质,开展了使用

全长、膜锚定 Cripto 作为诱饵的蛋白质相互作用筛选。该筛选导致鉴定出 GRP78, 其是在癌症中负有重要责任的 ER 稳态的多功能调节剂。有趣的是, 虽然 GRP78 通常定位于 ER, 但是 GRP78 还选择性表达于肿瘤细胞的质膜上, 并且本文所给出的资料表明 Cripto 在细胞表面结合 GRP78。资料表明, 它们在无细胞体系中以不需要它们在 ER 内结合的方式相互作用。最后, 资料表明 GRP78 和 Cripto 协同减弱 TGF- β - 依赖性生长抑制效应和增强前列腺癌细胞在软琼脂中的集落生长。这些结果一起表明, 这两种蛋白质在细胞表面上形成复合体并且由此通过抑制 TGF- β 信号赋予肿瘤细胞的生长优势。

[0311] 针对鉴定新 Cripto 结合蛋白的筛选导致鉴定出葡萄糖调节蛋白 -78 (GRP78), 它是促进蛋白质折叠和装配并协调未折叠蛋白质反应 (UPR) 的 ER 蛋白伴侣。GRP78 在 ER 应激的条件例如葡萄糖缺乏和低氧下被强烈地诱导并且在这些条件占优势的肿瘤微环境中高度表达 (Lee, 2001 ; Lee, 2007 ; Li 和 Lee, 2006)。由 GRP78 启动子驱动的 HSVTK 自杀转基因向乳腺肿瘤细胞中的递送显示引起小鼠中相当大肿瘤的完全消除 (Dong 等, 2004)。已经显示 GRP78 在促进肿瘤细胞存活、化学抗性和恶性中负有重要的责任 (Lee, 2007 ; Li 和 Lee, 2006)。在纤维肉瘤 B/C10ME 细胞中使用反义核酸对 GRP78 诱导的抑制阻止这些细胞在裸小鼠中形成肿瘤 (Jamora 等, 1996)。同样, 当 GRP78 杂合小鼠正常发育时, 它们显示由于降低了 GRP78 水平的原因而抵抗转基因诱导的乳腺肿瘤生长 (Dong 等, 2008)。虽然 GRP78 通常限定于 ER 腔中, 但是 GRP78 定位于肿瘤细胞的质膜, 在此它具有与增强的细胞增殖、运动性和存活有关的受体功能 (Pizzo ref) (Lee, 2007 ; Li 和 Lee, 2006)。

[0312] GRP78 作为新 Cripto 结合蛋白的鉴定。为了鉴定新 Cripto 相关蛋白, 发明人已经采用了其中 Cripto 用作诱饵“拉下”细胞膜上其结合配偶体的策略。发明人对来自以空载体或 Cripto-Flag 转染的 293T 细胞的裂解物进行抗 Flag 免疫沉淀, 接着以 Flag 肽特异性洗脱所结合的蛋白质。由于其在温和条件下开展, 该洗脱允许另外的纯化步骤。如通过银染后观察, 以 $\sim 72\text{kDa}$ 和 $\sim 50\text{kDa}$ 迁移的两种蛋白质与 Cripto-Flag 共沉淀 (图 1A, 分别是标记的 a 和 b)。

[0313] 发明人接着使用质谱分析法鉴定这些 Cripto 相关蛋白。将 $\sim 72\text{kDa}$ 和 $\sim 50\text{kDa}$ 条带从凝胶上切下, 进一步脱色并进行凝胶内胰蛋白酶消化。然后通过 MALDI/TOF 分析分析样品并且使用 Mascot 算法 (Matrix Science, London, 英国) 表征质量指纹数据。对于大约 72kDa 条带的 55 的高命中得分是 GRP78, 也称作 BiP, 并且在质量指纹中指定总共 7 个肽, 肽质量误差宽容度 $< 0.1\text{Da}$ (图 1B)。在 $\sim 50\text{kDa}$ 的条带 (蛋白质 b) 还没有最终鉴定出。

[0314] GRP78 具有多重功能, 包括在介导 ER 中蛋白质折叠和应激反应中的突出作用 (Lee, 2001)。GRP78 在肿瘤发生中负有重要的责任 (Lee, 2007) 并且在本研究中发明人致力于其在结合 Cripto 和调节其功能中的潜在作用。为了明确地验证 GRP78 作为特异性 Cripto 结合配偶体的身份, 发明人重复了上述的免疫共沉淀过程, 并使用特异性抗 GRP78 或抗 Cripto 抗体对所沉淀蛋白质进行 Western 印迹。如图 1C 中所示, GRP78 存在于 Flag 肽洗脱物中, 表明其与 Cripto 特异性免疫共沉淀。

[0315] GRP78 在细胞表面上结合 Cripto。虽然认为 GRP78 主要作为 ER 相关蛋白质起作用 (Lee, 2001), 但是最近的数项研究已经证明在某些条件下 GRP78 还在癌细胞质膜上表达 (Lee, 2007)。为了测试 Cripto 和 GRP78 是否在细胞表面相互作用, 发明人以细胞不渗

透性生物素试剂标记完整细胞,并将所得到的细胞裂解物进行抗 Flag 免疫沉淀,接着用 Flag 肽洗脱并用抗生物素蛋白检测生物素化蛋白质。发明人使用 p75 神经营养蛋白受体的~26kDa 跨膜片段作为阴性对照,称为 p26-Flag。该无关蛋白质大小与 Cripto 类似并与 Cripto-Flag 一起经历相同的过程。如图 2A 中所示,生物素化形式的 GRP78 和蛋白质 b 与 Cripto 免疫共沉淀,但是不与 p26 免疫共沉淀,表明 Cripto 与 GRP78 和蛋白质 b 的结合是特异性的。GRP78 和 Cripto 被生物素化的事实表明它们在细胞表面上相互作用并且减少了它们的结合依赖于 GRP78 的蛋白伴侣活性的可能性。

[0316] 为了进一步表征 Cripto 结合细胞表面 GRP78 的能力,发明人测试了在无细胞体系中来自一群体细胞的 GRP78 是否结合从单独一群细胞分离的成熟 Cripto。293T 细胞以载体或 Cripto-Flag 感染,然后经受抗 Flag 免疫沉淀,接着彻底洗涤珠。与之相平行,以 GRP78 感染的单独一群 293T 细胞经受细胞表面生物素化作用并且来自这些细胞的裂解物与珠孵育,珠先前已经与载体或 Cripto-Flag 裂解物孵育。然后再次洗涤珠并且所结合的蛋白质用 Flag 肽洗脱并经受使用抗生物素蛋白-HRP、抗 GRP78 或抗 Cripto 抗体的 Western 印迹。如图 2B 中所示,Flag 肽特异性洗脱 Cripto-Flag 和大部分的结合 GRP78。此外,生物素化(即细胞表面标记的)GRP78 特异性地从先前接触 Cripto-Flag 裂解物的珠上洗脱,而未从接触载体裂解物的珠中洗脱。这些结果表明,来自细胞表面的 GRP78 和 Cripto 之间的相互作用在体外以不依赖于细胞或膜成分的方式发生。此外,由于生物素化 GRP78 和 Cripto 源自分开的细胞群体,它们的相互作用不依赖于在翻译机器 ER 中的先前结合或 GRP78 的任何蛋白伴侣功能。

[0317] Cripto 拥有两个介导蛋白质-蛋白质相互作用的模块结构域、EGF 样结构域和半胱氨酸丰富 CFC 结构域(Strizzi 等,2005)。为了进一步探究 Cripto 和 GRP78 之间的相互作用,发明人使用上面描述的方法(图 2B)细胞表面上的标记 GRP78 是否结合缺乏 EGF 样结构域(EGF)或 CFC 结构域(CFC)的 Cripto 突变体。在该实验中,发明人评价了来自一个细胞群体的生物素化、HA 标记 GRP78 结合来自分开的细胞群体的野生型和突变体形式 Cripto 的能力。如在图 2C 中所示,细胞表面 GRP78 以相似程度结合野生型 Cripto 和 Cripto EGF 突变体,但是不结合 Cripto CFC 突变体。因此,该结果表明,细胞表面来源的 GRP78 结合 Cripto 的 CFC 结构域。

[0318] 在证明过表达的 Cripto 和 GRP78 在细胞表面上以依赖于 Cripto 的 CFC 结构域的特异方式结合之后,发明人接着测试了这两种蛋白质是否在内源环境下结合。据报导,胚胎癌细胞系表达高水平的 Cripto 蛋白质并且发明人测试了小鼠胚胎癌 P19 细胞中内源 Cripto 和内源 GRP78 是否相互作用。发明人以如上所述的膜不渗透性生物素处理这些细胞并将裂解物用抗 Cripto 抗体或者作为阴性对照的兔 IgG 进行免疫沉淀。发明人使用以空载体或 Cripto-Flag 感染的 293T 细胞作为免疫沉淀的阳性对照。如图 2D 中所示,对 P19 细胞用抗 Cripto 进行免疫沉淀,接着使用抗 GRP78 进行 Western 印迹检测到对应于 GRP78 的条带,而以非免疫 IgG 进行的沉淀没能得到这样的结果。此外,所沉淀的 Cripto 和 GRP78 蛋白质是生物素化的,如通过用抗生物素蛋白-HRP 检测到它们所证明,这表明它们来自于细胞表面。使用过表达 Cripto-Flag 的 293T 细胞得到相似的结果,但是使用空载体细胞没能得到相似的结果(图 2D,右组),这验证了抗 Cripto 抗体的特异性。因此,内源 Cripto 和内源 GRP78 在小鼠胚胎癌 P19 细胞的细胞表面上特异性相互作用并且它们的相互作用不

需要任一蛋白质的过表达。

[0319] Cripto 和 GRP78 在细胞表面上共定位。这些蛋白质的细胞定位通过免疫荧光和共焦显微镜评价。起初,以空载体感染或者以 Cripto 和 GRP78 共感染的 293T 细胞以抗 Cripto 和抗 GRP78 抗体染色。在这些研究中,载体细胞表现出最小限度的、背景水平的 Cripto 染色并且弱的 GRP78 染色源自内源蛋白质的存在。与此相比,过表达 Cripto 和 GRP78 的 293T 细胞得到在细胞表面上显著共定位的两种蛋白质的显著的斑点染色。虽然斑点状结构的意义仍未确定,该结果明显证明了在过表达的 Cripto 和 GRP78 在完整 293T 细胞质膜上的结合。

[0320] 接着,发明人测试了当在 P19 细胞中以内源水平表达时,Cripto 和 GRP78 是否同样在细胞表面上结合。在此,在天然 P19 细胞中容易地检测到 Cripto 和 GRP78 两者。使用用作质膜标志物的抗总钙黏着蛋白抗体也将这些细胞染色。总体上,对于 Cripto 和 GRP78 的染色看起来主要在天然的斑点/囊泡中,其部分地但基本上共定位。重要的是,包含 Cripto 和 GRP78 两者的数个斑点状结构表现出与将它们置于这些细胞质膜上的总钙黏着蛋白重叠染色。Cripto 和 GRP78 两者在膜上和囊泡结构中的共定位表明它们不仅在质膜上结合而且在通常与细胞表面信号蛋白相关的内体/溶酶体运输和循环过程中结合。

[0321] Cripto 相关的 GRP78 是使用 shRNA 靶向。在证明了 Cripto 和 GRP78 在细胞表面上结合共因子之后,发明人接着确定 GRP78 是否调节已知的 Cripto 功能。为此目的,发明人开发了能够减少内源 GRP78 表达的短发夹 RNA (shRNA)。GRP78 被毒胡萝卜内酯诱导,这是增加胞质钙水平、引起 ER 应激和触发凋亡的化合物。在毒胡萝卜内酯处理之后,对 GRP78 的诱导减轻 ER 应激和延缓细胞的凋亡反应 (Jamora 等,1996)。因此,发明人最初测试了靶向 GRP78 的 shRNA (G1) 阻止毒胡萝卜内酯处理后 GRP78 诱导和功能的能力。如通过使用抗 GRP78 抗体的 Western 印迹所显示,毒胡萝卜内酯明显诱导 HeLa 细胞中的 GRP78 表达并且该诱导被 G1shRNA 阻断 (图 3A)。此外,如图 3B 中所示,与载体细胞相比,G1 感染的 HeLa 细胞显示出毒胡萝卜内酯诱导凋亡的显著增加,证明通过该 shRNA 敲低 GRP78 的功能后果。

[0322] 发明人接着致力于检查 G1shRNA 是否相似性地靶向与 Cripto 结合的细胞表面 GRP78 库。以空载体或 G1shRNA 感染的 HeLa 细胞随后以 Cripto-Flag 感染。然后将这些细胞进行细胞表面生物素化,接着进行抗 Flag 免疫沉淀和使用 Flag 肽进行特异性洗脱,如先前所述。所洗脱的蛋白质随后通过使用抗生物素蛋白-HRP、抗 GRP78 或抗 Cripto 抗体的 Western 印迹分析。如在图 3C 中所示,在 G1shRNA 构建体存在下,与 Cripto 免疫共沉淀的细胞表面生物素化 GRP78 的量相当大地减少。重要的是,这些结果表明 G1shRNA 可破坏细胞表面上 GRP78-Cripto 复合体的功能。

[0323] 靶向减少 GRP78 表达增强 TGF- β 依赖性 Smad2 磷酸化。发明人先前已经证明,使用 shRNA 敲低 HeLa 细胞中的内源 Cripto 引起 TGF- β 诱导的 Smad2 磷酸化的增加 (Gray 等,2006)。在此,发明人已经显示 GRP78 和 Cripto 在细胞表面上相互作用,增加 Cripto 和 GRP78 一致工作以抑制 TGF- β 信号的可能性。在证明了 G1shRNA 有效靶向 Cripto 结合的质膜上 GRP78 库之后,发明人接着测试了它是否类似于 Cripto shRNA 增强 TGF- β 信号。再次地,在 5 μ M 毒胡萝卜内酯缺乏 (图 4A) 或存在 (图 4B) 存在下测试以空载体或 G1 感染的相同 HeLa 细胞。在每一情况下,细胞以一定范围剂量的 TGF- β 1 处理细胞并且监测所得到的磷酸化 Smad2 和总 Smad2 水平。如在图 4A 中所示,在较低剂量下 (例如 1pM TGF- β 1),

与载体感染的细胞相比, G1shRNA 细胞对 TGF- β 具有更大的响应性。在毒胡萝卜内酯处理后, TGF- β 剂量响应关系基本上向右移 (图 4B)。再次地, 以 G1 感染的细胞对 TGF- β 具有更大的敏感性, 在 10pM TGF- β 1 时检测到显著的磷酸化 Smad2 条带。有趣的是, G1shRNA 对敏化细胞对 TGF- β 的效应在毒胡萝卜内酯存在下比在其缺乏下意义更深远。这表明, 毒胡萝卜内酯对细胞表面 GRP78 的诱导引起 TGF- β 信号的抑制, 这可被 G1shRNA 构建体阻断。

[0324] 为了测试毒胡萝卜内酯是否诱导被 G1 靶向的细胞表面 GRP78, 以载体或 G1 感染的相同的 HeLa 细胞以媒介物或毒胡萝卜内酯处理, 然后经历细胞表面生物素化作用。为了使生物素化 GRP78 可见, 将细胞裂解物以抗 GRP78 抗体进行免疫沉淀, 接着用抗生物素蛋白-HRP 进行 Western 印迹。如在图 4C 中所示, 毒胡萝卜内酯处理诱导细胞表面上的 GRP78 并且该诱导被 G1shRNA 构建体阻断。最后, 作为另外的对照, 发明人测试了 GRP78 敲低或诱导是否导致 I 型和 / 或 II 型 TGF- β 信号受体水平的改变。如图 4D 中所示, G1shRNA 存在和毒胡萝卜内酯处理均不明显影响受体水平, 一个例外是在毒胡萝卜内酯缺乏时, 载体细胞中 T β RI 水平稍微高于 G1 细胞中。然而, 由于 G1 细胞中磷酸化 Smad2 水平高于载体细胞中 (图 4A), 所以该差异与 TGF- β 信号无关。因此, GRP78 似乎不会通过改变这些受体的水平而影响 TGF- β 信号。总之, 这些资料第一次表明, 与内源 Cripto 相似, 内源 GRP78 抑制 TGF- β 信号。此外, 这些发现与细胞表面 GRP78-Cripto 复合体在阻断 TGF- β 信号中的新作用相一致。

[0325] GRP78 不直接结合 TGF- β 信号受体。GRP78 抑制 TGF- β 信号的发现增加了其通过直接结合 I 型和 / 或 II 型 TGF- β 信号受体而发挥此作用的可能性。发明人在上面已经显示, 内源细胞表面 GRP78 与 293T 细胞中过表达的 Cripto 和 P19 细胞中内源 Cripto 均免疫共沉淀。在此, 发明人还测试了 GRP78 是否相似性地与 T β RI 和 T β RII 免疫共沉淀。293T 细胞以 p26-Flag、Cripto-Flag、T β RI-HA 或 T β RII-His 转染并且表面蛋白质如前那样被生物素化。这些蛋白质中的每一个作为诱饵被免疫沉淀, 然后评价免疫复合体是否存在 GRP78。如在图 5 中所示, 抗生物素蛋白-HRP 组反映出这样的事实, 即相似量的这些不同的细胞表面诱饵蛋白质在这些 pull down 实验中被沉淀。然而, 仅 Cripto pull down 的内源 GRP78 被抗生物素蛋白-HRP 和抗 GRP78 抗体均检测到 (图 5)。因此, 在这些条件下, 细胞表面 GRP78 不结合 T β RI 或 T β RII, 而是表现出专一性地与 Cripto 结合。该结果表明, GRP78 通过其与任一信号受体的直接的、不依赖性的结合对 TGF- β 信号的效应不可能发生。

[0326] Cripto 和 GRP78 协同抑制 TGF- β 信号。已经显示 TGF- β 抑制人前列腺癌 PC3 细胞的贴壁依赖性和贴壁不依赖性生长 (Wilding 等, 1989)。因此, 发明人测试了 Cripto 和 GRP78 是否一起工作改变这些细胞中的 TGF- β 效应。首先, 发明人测试了 Cripto 和 GRP78 对 TGF- β 依赖性 Smad2 磷酸化的效应。如图 6A 中所示, 以 10pM TGF- β 1 处理载体感染的细胞引起 Smad2 磷酸化并且当 GRP78 或 Cripto 分别过表达时该效应被适当减弱。然而, 当细胞以 Cripto 和 GRP78 两者感染时, TGF- β 效应以大得多的程度被抑制。然后定量在图 6A 中出现的磷酸化 Smad2 条带的强度并针对响应的总 Smad2 水平进行标准化 (图 6B)。该定量显示, 在表达 GRP78 或 Cripto 的细胞中, TGF- β 信号分别被抑制 $\sim 40\%$ 和 $\sim 43\%$ 。与之相比, 共表达 GRP78 和 Cripto 的细胞显示 TGF- β -诱导的 Smad2 磷酸化减少 $\sim 74\%$ 。接着, 发明人测试了 Cripto 和 / 或 GRP78 的过表达是否影响这些细胞中的 TGF- β 信号受

体的水平。如在图 6C 中所示,这些受体的水平没有被明显地改变(图 6C)。这些资料加在一起进一步支持 GRP78 作为 TGF- β 拮抗剂的新作用并且表明 Cripto 和 GRP78 协同起作用抑制 TGF- β 信号。

[0327] 接着,发明人测量了 10pM TGF- β 1 缺乏或存在下所感染 PC3 细胞群体的相对增殖率。如图 6D 中所示,用 TGF- β 1 处理载体感染细胞降低增殖 $\sim 58\%$,而对单独表达 GRP78 或 Cripto 的处理分别降低增殖 $\sim 42\%$ 和 $\sim 19\%$ 。再次,当 GRP78 和 Cripto 在这些细胞中一起表达时,它们具有更强的效应。有趣的是,在该情况下,TGF- β 1 处理实际上引起细胞增殖 $\sim 31\%$ (图 6C)。重要的是,在此给出的数据证明,虽然 GRP78 和 Cripto 每一个减弱 TGF- β 的抗增殖效应,但是它们的共表达允许它们的物理性相互作用从而产生使 TGF- β 增强细胞生长的情况。

[0328] GRP78 和 Cripto 协同阻断 TGF- β 的抗增殖效应。最后,发明人测试了在 TGF- β 1 存在或缺乏下 GRP78 和 Cripto 对贴壁不依赖性生长的效应。将以空载体、GRP78、Cripto 或两者感染的相同的 PC3 细胞接种于存在增加剂量 TGF- β 1 的软琼脂中并且允许集落生长 15 天。如图 7A 中所示,TGF- β 1 以剂量依赖性方式抑制集落形成。为了突出 TGF- β 对每一细胞群体的相对效应,同一数据还表示为针对在 TGF- β 1 缺乏下的集落数量标准化的在 TGF- β 1 存在下的集落数量(图 7B)。从这些资料中可以得出两个主要结论。首先,在缺乏 TGF- β 处理情况下,表达 GRP78 或 Cripto 任一的细胞比载体细胞形成更多的集落并且这种增加在表达 GRP78 和 Cripto 两者的细胞极大地增强(图 7A)。第二,当 GRP78 和 Cripto 每一个具有单独阻断 TGF- β 的生长抑制性效果的一些能力时,则当它们一起表达时具有大得多的能力(表 7B)。共表达 GRP78 和 Cripto 减弱 TGF- β 的生长抑制性效应的程度通过这些集落的照片进一步得到例证。如图 7C 中所示,100pM TGF- β 1 足以急剧降低载体感染细胞的集落形成并且对单独表达 Cripto 或 GRP78 的细胞具有相似但更弱的抑制效应。与之相反,表达 GRP78 和 Cripto 两者的细胞似乎是更加抗拒 TGF- β 的细胞抑制性效应,如通过集落数量和大小所例证。再次,这些资料支持 GRP78 和 Cripto 在阻断 TGF- β 对贴壁不依赖性生长的抑制中的协同作用。

[0329] 图 7D 描述 GRP78 和 Cripto 作为细胞表面结合配偶体起作用限制 TGF- β 依赖性生长抑制和促进细胞增殖的模式。数据表明,Cripto 和 GRP78 以协同方式开展这些功能,推测是作为复合体,因为它们物理性相互作用并且因为它们的效应被协同增强。然而,资料没有完全排除这些蛋白质可部分地抑制 TGF- β 信号和它们自身引起增强的增殖的可能性。最后,TGF- β 除了具有活化细胞抑制性信号的能力之外,还报导在某些条件下 TGF- β 自身活化存活途径。这与 TGF- β 仅在 PC3 细胞共表达 Cripto 和 GRP78 两者时引起 PC3 细胞增殖增强的观察一致(图 7D,虚线箭头)。

[0330] 实施例 3

[0331] 细胞表面 GRP78 通过激活蛋白 /Nodal/TGF- β 和 MAPK/PI3K 途径介导干细胞和肿瘤细胞中的 Cripto 信号

[0332] Cripto 和 GRP78 协同调节激活蛋白 /Nodal/TGF- β 信号

[0333] Cripto 和 GRP78 每一个在胚胎发育过程中起着至关重要的作用并且两种蛋白质还促进肿瘤细胞增殖、存活和转移。上面将细胞表面 GRP78 鉴定为 Cripto 结合配偶体表明,这些蛋白质在正常胚胎发育和肿瘤进展中协同起作用。上面的实例显示 Cripto 和 GRP78

在 P19 细胞中形成细胞表面复合体 (Shani 等, 2008)。在此, 发明人已经测试了对于 Cripto 对 NCCIT 细胞中激活蛋白 /Nodal/TGF- β 信号的调节是否需要 Cripto 和 GRP78 之间的相互作用。产生了感染有空载体或者稳定表达靶向 Cripto 和 / 或 GRP78 的 shRNA 的 NCCIT 种群。这些 shRNA 相当大地降低 NCCIT 细胞中 Cripto 和 GRP78 蛋白质的水平, 如通过 Western 印迹 (图 8A) 或测定细胞表面上蛋白质水平的完整细胞表面 ELISA (图 8B) 所测定。重要的是, 敲低 Cripto 不影响细胞表面的 GRP78 水平并且反之亦然 (图 8B)。

[0334] 发明人使用这些细胞测试了敲低 Cripto 和 / 或 GRP78 是否会影响这些细胞中的激活蛋白 -A- 和 Nodal- 诱导的 Smad2 磷酸化。如在图 1C 中所示, 激活蛋白 -A- 诱导的 Smad2 磷酸化被敲低 Cripto 增强。这与 Cripto 抑制激活蛋白 -A 信号先前的证明 (Gray 等, 2003; Kelber 等, 2008) 一致并且首次证明内源 Cripto 作为激活蛋白拮抗剂起作用。有趣的是, 在 GRP78 敲低细胞中和 Cripto 和 GRP78 均被敲低的细胞中, 激活蛋白 -A- 依赖的 Smad2 磷酸化被相似性地增强, 这与这两种蛋白质在调节激活蛋白 -A 信号中的作用一致。与针对激活蛋白 -A 所观察到的结果相反, 敲低 Cripto 急剧降低 Nodal- 诱导的 Smad2 磷酸化而敲低 GRP78 适度降低 Nodal 信号 (图 8D)。将 Cripto 和 GRP78 一起敲低导致 Nodal- 诱导的 Smad2 磷酸化少于单独敲低 Cripto 所引起的磷酸化 (图 8D)。这些结果加在一起表明, GRP78 促进内源 Cripto 对激活蛋白 -A 和 Nodal 信号的相反效应。

[0335] 接着, 发明人使用相同的细胞测试敲低 Cripto 和 / 或 GRP78 是否影响激活蛋白 /Nodal/TGF- β 对 Smad2 响应性萤光素酶报告分子构建体的诱导。如图 8E 中所示, 以激活蛋白 -A-、激活蛋白 -B-、TGF- β 1 或 Nodal 处理空载体感染的 NCCIT 细胞引起相似的低水平萤光素酶诱导。敲低 Cripto 引起激活蛋白 -A-、激活蛋白 -B 和 TGF- β 1 信号的增强和 Nodal 信号的减弱。在稳定表达 GRP78shRNA 的细胞中观察到相似结果, 这与 GRP78 在对由这些配体引起的信号的 Cripto 依赖性调节中的作用相一致。与之相反, 敲低 Cripto 和 GRP78 两者引起急剧增加对 激活蛋白 -A-、激活蛋白 -B 和 TGF- β 1 的响应以及可检测的 Nodal 信号的丧失 (图 8E)。发明人还使用相同的 Smad2- 依赖性萤光素酶报告分子进一步探究了 293T 细胞中 Cripto 依赖性 Nodal 信号中对 GRP78 的需求。如图 8F 中所示, Cripto 过表达促进了这些细胞中的 Nodal 信号并且该信号在过表达的 GRP78 存在下被增强。此外, 如图 8G 中所示, 当内源 GRP78 被敲低时, 这些细胞中的 Cripto- 依赖性 Nodal 信号被减弱。这些结果与上面的 Smad2 磷酸化资料一起强有力地支持了 Cripto 和 GRP78 在调节激活蛋白 /Nodal/TGF- β 信号中的共同作用。

[0336] GRP78 与 Cripto 共定位并且介导人 ES 细胞中的 Cripto 信号。

[0337] Cripto 表达于人胚胎干细胞中 (hES), 在其中已经显示 Cripto 在调节增殖、分化和多能性中具有关键性的作用。在此, 发明人已经测试 GRP78 是否与 Cripto 共定位并调节 hES 细胞中的 Cripto 功能。如图 9A 中所示, GRP78 和 Cripto 均表达于 H9hES 细胞表面上, 如通过细胞表面 ELISA 所测量。发明人将 H9 细胞用 Cripto 和 GRP78 抗体进行免疫染色以测试这些蛋白质是否在质膜上共定位并且, 如图 9B 中所使, Cripto 和 GRP78 每一个表现出在细胞边缘附近的斑点状染色。重要的是, 对这些蛋白质的染色显示出高程度的重叠, 表明它们在细胞表面上共定位 (图 9B)。接着, 发明人测试了抗 GRP78 抗体是否会阻断对激活蛋白 -A 和 Nodal 信号的 Cripto 依赖性效应。该抗体 (N-20, Santa Cruz) 结合 H9 细胞中的细胞表面 GRP78 (图 9A) 并且已经报导阻断 GRP78 受体功能 (Davidson 等, 2005; Philippova

等,2008)。如图 9C 中所示,以 N-20 抗体处理 H9 细胞增加激活蛋白 -A- 诱导的 Smad2 磷酸化和降低 Nodal- 诱导的 Smad2 磷酸化,表明其阻断 Cripto 影响由这些配体引起信号的能力。与此相一致,以 N-20 抗体处理空载体感染的 NCCIT 细胞增强激活蛋白 -A-、激活蛋白 -B 和 TGF- β 1 信号并且降低 Nodal 信号(图 9D),而抗体处理 Cripto 敲低的细胞对这些配体的信号无影响(图 9E)。这些结果加在一起表明,细胞表面 GRP78 介导 hES 细胞中的 Cripto 信号,并且与 GRP78 敲低相类似,以 N-20 抗体靶向 GRP78 阻断激活蛋白 /Nodal/TGF- β 信号的 Cripto 依赖性调节。

[0338] 这些结果增加了 Cripto 和 N-20 抗体竞争性结合 GRP78 的可能性。由于 N-20 抗体靶向 GRP78 的前 50 个氨基酸内的表位,发明人产生了缺乏该区的 GRP78 突变体(Δ 19-68GRP78)并且测试了其结合 Cripto 的能力。图 9F 图解显示 N-20 表位的位置以及缺失它的 Δ 19-68GRP78 突变体。当使用 N-20 或 HA 抗体对过表达这些蛋白质的 293T 细胞的裂解物进行 Western 印迹时,N-20 抗体检测到野生型的 GRP78,但是没有检测到 N-20 表位缺失的 Δ 19-68GRP78 突变体(图 9F)。重要的是,如图 9G 中所示,虽然野生型 GRP78 与 Cripto 免疫共沉淀,但是 Δ 19-68GRP78 突变体不足以证明 N-20 抗体和 Cripto 共享对 GRP78 的结合位点并表明它们竞争对 GRP78 的结合。

[0339] 靶向 GRP78 受体功能阻断 NCCIT 细胞中 Cripto-依赖性 MAPK/PI3K 信号和有丝分裂发生

[0340] 接着,发明人测试了细胞表面 GRP78 是否介导可溶性 Cripto- 依赖性活化 MAPK/PI3K 途径。首先,发明人测试了敲低 Cripto 和 / 或 GRP78 对 NCCIT 细胞中 Akt、GSK3 β 和 ERK1/2 的可溶性 Cripto 依赖的磷酸化的影响。如 10A 中所示,空载体感染的细胞具有高的基础磷酸化 Akt 水平,其不受可溶性 Cripto 剂量增加影响。与之相反,在表达 Cripto shRNA 的细胞中基础磷酸化 Akt 水平检测不到,并且可溶性 Cripto 处理以剂量依赖方式增加这些细胞中的 Akt 磷酸化(图 10A)。与之相反,当 GRP78 被敲低并且特别是当 Cripto 和 GRP78 一起被敲低时,可溶性 Cripto 依赖的 Akt 磷酸化被阻断。可溶性 Cripto 依赖的 GSK3 β 磷酸化遵照对于 Akt 磷酸化所观察到的相同的方式,并且还可通过敲低 GRP78 急剧降低(图 10A)。最后,Cripto 诱导的 Akt 和 GSK3 β 的磷酸化被 LY 2940002 阻断并且因此依赖于 PI3K 的活化(图 10A)。

[0341] 发明人进一步测试了敲低 Cripto 和 / 或 GRP78 对可溶性 Cripto 依赖的 ERK1/2 磷酸化的影响。如图 10B 中所示,磷酸化 ERK1/2 的基础水平在空载体感染的 NCCIT 细胞中相对高并且可溶性 Cripto 处理不增加这些细胞中的 ERK 磷酸化。与之相反,磷酸化的 ERK1/2 在未处理的 Cripto shRNA 细胞中检测不到,但是以可溶性 Cripto 处理这些细胞引起显著的 ERK2(p42) 磷酸化。这与表明可溶性 Cripto 触发 ERK2 磷酸化的先前结果(Kannan 等,1997)一致。与 Cripto shRNA 细胞相似,基础的磷酸化 ERK 水平在敲低 GRP78 的细胞中以及在敲低 Cripto 和 GRP78 两者的细胞中低或检测不到(图 10B)。然而,以 Cripto 处理这些细胞不能够刺激 ERK 磷酸化,表明对于 MAPK 途径的 Cripto 依赖性活化和 ERK2 磷酸化需要 GRP78。这些结果与对于可溶性 Cripto 依赖性的 Akt 和 GSK3 β 磷酸化所观察的结果相似,表明 GRP78 在介导可溶性 Cripto 依赖性的 PI3K 和 MAPK 途径活化中起着相似的作用。

[0342] Cripto 肿瘤生长因子活性与增加的细胞增殖(Strizzi 等,2005)有关并且发明人测试了可溶性 Cripto 是否以 GRP78 依赖性方式促进 NCCIT 细胞的增殖。如在图 10C 中所

示,空载体感染的 NCCIT 细胞具有高的基础增殖率,其不被可溶性 Cripto 处理所影响。与此相反,敲低 Cripto,不管是单独敲低还是与敲低 GRP78 相组合相当大地降低 NCCIT 细胞的增殖率。重要的是,可溶性 Cripto 处理相当大地增强 Cripto 敲低细胞的增殖,但是对 Cripto 和 GRP78 均被敲低的细胞没有影响。该结果表明,与 Cripto 诱导的 MAPK 和 PI3K 信号相似,Cripto 的促增殖效应是 GRP78 依赖性的。

[0343] 发明人使用 N-20 抗体直接评价细胞表面 GRP78 在介导 Cripto 生长因子活性中的作用。最初,发明人测试了该抗体与可溶性 Cripto 竞争与稳定表达 CriptoshRNA 的 NCCIT 细胞结合的能力。如图 10D 中所示,¹²⁵I-Cripto 特异性地结合至这些细胞并且以剂量依赖性方式被 N-20 抗体取代,而不被对照 IgG 取代。这些资料与在图 9G 中所呈现的结果一起表明 Cripto 和 N-20 抗体直接竞争对 GRP78 上同一 N- 末端部位的结合。发明人继续测试 N-20 抗体阻断表达 Cripto shRNA 的 NCCIT 细胞中 Cripto 依赖性 Akt 磷酸化的能力。如图 10E 中所示,在这些细胞中可溶性 Cripto 依赖性 Akt 磷酸化几乎完全被 N-20 抗体阻断。发明人进一步探究了 Cripto 敲低细胞的 Cripto 依赖性增殖是否可用 N-20 抗体阻断。的确,如在图 10F 中所示,N-20 抗体降低这些细胞的基础增殖率并且其惊人地完全阻断可溶性 Cripto 处理的促增殖效应。这些数据一起表明,对于 NCCIT 细胞中可溶性 Cripto 依赖性 MAPK/PI3K 信号和促有丝分裂效应需要 Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合。

[0344] 细胞表面 GRP78介导乳腺上皮细胞中 Cripto肿瘤生长因子活性

[0345] Cripto 在 ~ 80% 的人乳腺癌中过表达并且促进乳腺上皮细胞中的肿瘤表型 (Strizzi 等,2005)。在此,发明人还测试了 GRP78 在介导缺乏内源 Cripto 表达的人乳腺上皮细胞系 MCF10A 细胞中致癌的 Cripto 信号中的作用。为了开展这些研究,发明人产生了稳定感染有空载体或 Cripto 的 MCF10A 细胞克隆。如图 11A 中所示,GRP78 表达于空载体感染的 MCF10A 细胞的表面上,如通过细胞表面 ELISA 所测量。此外,如图 11B 中所示,¹²⁵I-Cripto 特异性地结合空载体感染的 MCF10A 细胞并且以剂量依赖方式被 N-20 抗体取代。可溶性 Cripto 依赖的 ERK/MAPK 和 PI3K/Akt 途径的活化需要 c-Src 的上游活化 (Bianco 等,2003) 并且发明人测试了 N-20 抗体是否阻断 Cripto 依赖性的 c-Src 活化。如在图 11C 中所示,可溶性 Cripto 引起载体感染的 MCF10A 细胞中 c-Src 的 Y416 磷酸化并且这可通过将细胞与 N-20 抗体预孵育而被阻断。用可溶性 Cripto 对这些细胞的处理也引起 Akt 磷酸化 (图 11D)。这些资料一起表明,Cripto 与 MCF10A 细胞上的细胞表面 GRP78 的结合对于其活化 c-Src/MAPK/PI3K 途径的能力是必需的。

[0346] 接着,发明人测试了 Cripto 促进 MCF10A 细胞中肿瘤表型的能力是否依赖于其结合细胞表面 GRP78 的能力。如在上面所提到,Cripto 在载体感染的 MCF10A 细胞中的表达水平检测不到,但是在 Cripto 感染的细胞中高表达 (图 11E)。如在图 11F 中所示,Cripto 在 MCF10A 细胞中过表达引起细胞增殖的急剧增加,这可通过用 N-20GRP78 抗体处理被相当大地抑制。此外,如图 11G 中所示,用可溶性 Cripto 处理空载体感染的 MCF10A 细胞以通过用 N-20GRP78 抗体共处理而被完全阻断的方式增加它们的增殖。这些资料表明,Cripto 对 MCF10A 细胞的促增殖性效应需要 Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合。

[0347] Cripto 过表达引起乳腺上皮细胞的迁移和侵袭并且促进 EMT (Strizzi 等,2004)。E-钙黏着蛋白表达的丧失是 EMT 的标志并且发明人已经测试了细胞表面 GRP78 是否介导人乳腺上皮 MCF10A 细胞中 E-钙黏着蛋白的 Cripto 依赖性下调。如图 11H 中所示,在用可溶

性 Cripto 处理空载体感染的 MCF10A 细胞后 E-钙黏着蛋白表达被降低,并且在表达 Cripto 的细胞中年检测不到。然而,用 N-20GRP78 抗体处理逆转载体细胞中年可溶性 Cripto 对 E-钙黏着蛋白水平的影响并且极大地挽救 Cripto 过表达细胞中的 E-钙黏着蛋白表达(图 11H)。重要的是, Cripto 过表达细胞中, E-钙黏着蛋白表达被 N-20GRP78 抗体的挽救几乎完全被可溶性 Cripto 阻断,表明 Cripto 和 N-20 抗体功能性竞争对细胞表面 GRP78 的结合。E-钙黏着蛋白介导上皮细胞中的细胞-细胞粘附并且其丧失与侵袭、转移癌有关。因此,发明人测量了稳定感染有空载体或 Cripto 的 MCF10A 细胞中的细胞粘附并且测试了 N-20 抗体的效应。如图 11I 中所示,与载体细胞相比, Cripto 过表达细胞中细胞粘附降低~50%,这与 Cripto 引起 E-钙黏着蛋白下调的能力一致。虽然 N-20 抗体对载体感染的细胞的粘附没有影响,其完全阻断 Cripto 依赖性细胞粘附的降低,在该效应中涉及 GRP78(图 11I)。这些结果一起表明, Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合介导 Cripto 的肿瘤生长因子活性,包括其促进细胞增殖、降低 E-钙黏着蛋白表达和降低细胞粘附的能力。

[0348] Cripto 和 GRP78 之间的细胞表面相互作用介导激活蛋白和 Nodal 的促增殖效应

[0349] 发明人已经提供证据表明,细胞表面 Cripto/GRP78 复合体调节激活蛋白 /Nodal/TGF- β 信号,并且在此发明人已经测试了 Cripto 和 GRP78 如何协同影响激活蛋白 -A 和 Nodal-诱导的对细胞增殖的效应。如图 12A 中所示,激活蛋白 -A 和 Nodal 两者均增加空载体感染的 NCCIT 细胞的增殖。敲低 Cripto 和 / 或 GRP78 阻断这些配体的促增殖效应并且,有趣的是,引起激活蛋白 -A 而不是 Nodal 抑制细胞增殖。发明人测试了 N-20 抗体是否会具有与 Cripto 和 / 或 GRP78 敲低相似的效应。的确,如图 12B 中所示,激活蛋白 -A 和 Nodal 的促增殖效应在 N-20 抗体存在下被阻断并且激活蛋白 -A 再次从具有促增殖效应转向具有细胞抑制性效应。接着,发明人测试了 Cripto 和 GRP78 是否相似性地影响激活蛋白 -A 和 Nodal 对 MCF10A 细胞的增殖效应。如图 12C 中所示,激活蛋白 -A 相当大地抑制稳定转染有空载体的 MCF10A 细胞的增殖,而 Nodal 没有作用。过表达 Cripto 的 MCF10A 细胞与空载体细胞相比具有增加的增殖率并且生长不再被激活蛋白 -A 抑制。而是激活蛋白 -A 和 Nodal 每一个增强这些细胞的增殖(图 12C)。如图 12D 中所示, Cripto 过表达引起对激活蛋白 -A 和 Nodal 的促增殖响应的能力被使用 N-20 抗体处理细胞完全阻断并且该处理还引起激活蛋白 -A 抑制 MCF10A 细胞的增殖。因此, Cripto 和 GRP78 之间的细胞表面相互作用将激活蛋白 -A 和 Nodal 转变成促增殖的细胞因子并且颠倒了激活蛋白 -A 的细胞抑制性效应。

[0350] 缺乏 Cripto 结合的 GRP78 突变体抑制经由 EGF 受体和 PI3K 的 Cripto 信号

[0351] 发明人假设,细胞表面 GRP78 促进经由 EGF 受体的 Cripto 信号,并且测试了 GRP78、ErbB4 和 ErbB2 在介导 Cripto 依赖性活化 PI3K 中的作用。为了研究该假设,发明人使用 PI3K 可抑制性报告基因构建体,构建体包括与萤光素酶基因偶联的葡萄糖-6-磷酸酶启动子(G6Pase-Lux)。Cripto 处理对该报告基因构建体在以 ErbB2 或 ErbB4 转染的细胞中的活性具有很小的影响或者没有影响,但是降低以 ErbB2 和 ErbB4 共同转染的细胞中萤光素酶表达~50%(图 13A)。与此相反,在转染的 GRP78 存在下, Cripto 引起以 ErbB4 转染的细胞中萤光素酶表达减少~30%并且在以 ErbB4 和 ErbB2 两者转染的细胞中几乎完全阻断萤光素酶表达(图 13B)。该结果表明,GRP78 促进 ErbB2 和 ErbB4 下游 PI3K 途径的 Cripto 活化并且与证明细胞表面 GRP78 介导 Cripto 依赖性 Akt/PI3K 信号的先前资料一致。Cripto 和 GRP78 之间复合物的形成对于该效应似乎是必需的,因为缺乏 Cripto 结合的

GRP78 D19-68 突变体不促进经由 ErbB2 和 ErbB4 的信号 (图 13C)。而是,在转染的 ErbB2 和 ErbB4 存在下 GRP78 D19-68 突变体完全阻断 Cripto 信号 (比较图 13A 和 13C)。该结果表明,GRP78 D19-68 突变体以显性失活方式起作用以阻止内源 GRP78 促进 Cripto 响应,并且意味着该 GRP78 突变体作为具有治疗潜能的 Cripto 拮抗剂的可能作用。最后,如所预测,PI3K 抑制剂 LY294002 引起基础萤光素酶水平增加 (~2 倍) 并且完全阻断 Cripto 诱导的萤光素酶水平的降低 (图 13A-C)。

[0352] 细胞表面 GRP78 介导 Cripto 信号

[0353] 总体上,资料支持这样的模式 (图 14),其中细胞表面 Cripto/GRP78 复合体作为抑制肿瘤阻抑制因子功能和活化增殖 / 存活途径的生长控制节点起作用。在一方面,Cripto 和 GRP78 协同抑制响应激活蛋白和 TGF- β 的细胞抑制性 Smad2/3 信号并且引起这些配体采用促增殖效应。Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合对于与肿瘤细胞可塑性和致癌性相关连的 Cripto 依赖性 Nodal 信号也是必需的。在另一方面,Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合对于 Cripto 肿瘤生长因子活性包括引起 Src、ERK 和 Akt 磷酸化以及促进增殖、EMT 和迁移的能力是必需的。该模式突出了 Cripto/GRP78 复合体在促进肿瘤表型和靶向 Cripto 与细胞表面 GRP78 之间相互作用的潜在治疗益处中的双重作用。该模式还表明了发明人的理解,即 Cripto 与细胞表面 GRP78 的结合对于随后 Cripto 与 ErbB2/ErbB4 或激活蛋白 /Nodal/TGF- β / 受体复合体的相互作用是必需的 (图 14A)。资料表明,Cripto/GRP78 结合发生于这些 Cripto 信号的每一“枝”的上游,并且因此破坏 Cripto/GRP78 复合物形成的试剂将抑制致癌性 Cripto 对 Smad2/3 和 MAPK/PI3K 信号两者的效用 (图 14B)。

[0354] ***

[0355] 本文所公开并要求专利保护的所有组合物和方法可以根据本公开无需过度实验的情况下建立和实施。虽然本发明的组合物和方法已经以优选实施方案的方式描述,本领域技术人员显而易见的是,可以对本文所述组合物和方法以及方法步骤或方法步骤的顺序进行改变,而不脱离本发明的概念、精神和范围。更加具体而言,显而易见的是,化学或生理相关的某些试剂可以取代本文所述的试剂,并将得到相同或相似的结果。所有此类对本领域技术人员而言显而易见的相似取代和修改认为处于如后附权利要求书所定义的本发明的精神、范围和概念内。

[0356] 参考文献

[0357] 下列参考文献,以它们提供补充本文所述过程或其它细节的例证性过程或其它细节的程度明确地通过参考并入本文。

[0358] 美国专利 3,817,837

[0359] 美国专利 3,850,752

[0360] 美国专利 3,939,350

[0361] 美国专利 3,996,345

[0362] 美国专利 4,196,265

[0363] 美国专利 4,275,149

[0364] 美国专利 4,277,437

[0365] 美国专利 4,366,241

[0366] 美国专利 4,472,509

- [0367] 美国专利 4, 659, 774
- [0368] 美国专利 4, 664, 911
- [0369] 美国专利 4, 682, 195
- [0370] 美国专利 4, 683, 202
- [0371] 美国专利 4, 792, 447
- [0372] 美国专利 4, 816, 571
- [0373] 美国专利 4, 870, 287
- [0374] 美国专利 4, 938, 948
- [0375] 美国专利 4, 959, 463
- [0376] 美国专利 5, 021, 236
- [0377] 美国专利 5, 045, 451
- [0378] 美国专利 5, 141, 813
- [0379] 美国专利 5, 196, 066
- [0380] 美国专利 5, 206, 347
- [0381] 美国专利 5, 214, 136
- [0382] 美国专利 5, 223, 618
- [0383] 美国专利 5, 264, 566
- [0384] 美国专利 5, 378, 825
- [0385] 美国专利 5, 428, 148
- [0386] 美国专利 5, 446, 137
- [0387] 美国专利 5, 466, 786
- [0388] 美国专利 5, 470, 967
- [0389] 美国专利 5, 539, 082
- [0390] 美国专利 5, 539, 082
- [0391] 美国专利 5, 554, 744
- [0392] 美国专利 5, 574, 146
- [0393] 美国专利 5, 578, 706
- [0394] 美国专利 5, 602, 240
- [0395] 美国专利 5, 602, 244
- [0396] 美国专利 5, 610, 289
- [0397] 美国专利 5, 614, 617
- [0398] 美国专利 5, 623, 070
- [0399] 美国专利 5, 645, 897
- [0400] 美国专利 5, 652, 099
- [0401] 美国专利 5, 670, 663
- [0402] 美国专利 5, 672, 697
- [0403] 美国专利 5, 681, 947
- [0404] 美国专利 5, 686, 072
- [0405] 美国专利 5, 705, 629

- [0406] 美国专利 5, 708, 154
- [0407] 美国专利 5, 714, 331
- [0408] 美国专利 5, 714, 606
- [0409] 美国专利 5, 719, 262
- [0410] 美国专利 5, 736, 336
- [0411] 美国专利 5, 756, 291
- [0412] 美国专利 5, 760, 395
- [0413] 美国专利 5, 763, 167
- [0414] 美国专利 5, 766, 855
- [0415] 美国专利 5, 767, 072
- [0416] 美国专利 5, 773, 571
- [0417] 美国专利 5, 777, 092
- [0418] 美国专利 5, 786, 461
- [0419] 美国专利 5, 792, 847
- [0420] 美国专利 5, 858, 988
- [0421] 美国专利 5, 859, 221
- [0422] 美国专利 5, 872, 232
- [0423] 美国专利 5, 886, 165
- [0424] 美国专利 5, 891, 625
- [0425] 美国专利 5, 908, 845
- [0426] 美国专利 6, 180, 348
- [0427] 美国专利 6, 423, 493
- [0428] 美国专利 6, 506, 559
- [0429] 美国专利 6, 515, 120
- [0430] 美国专利 6, 573, 099
- [0431] 美国专利 7, 329, 742
- [0432] 美国专利 Serial 117, 363
- [0433] 美国专利申请 2002/0168707
- [0434] 美国专利申请 2003/0051263
- [0435] 美国专利申请 2003/0055020
- [0436] 美国专利申请 2003/0159161
- [0437] 美国专利申请 2004/0064842
- [0438] 美国专利申请 2004/0265839
- [0439] Adewumi 等, Nat. Biotechnol. , 25 :803-816, 2007.
- [0440] Adkins 等, J. Clin. Invest. , 112 :575-87, 2003.
- [0441] Arap 等, Cancer Cell, 6 :275-84, 2004.
- [0442] Atwell 等, Mol. Immunol. , 33 (17-18) :1301-1312, 1996.
- [0443] Bernales 等, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. , 22 :487-508, 2006.
- [0444] Bianco 等, Cancer Res. , 63 :1192-1197, 2003.

- [0445] Bianco 等, J. Biol. Chem. , 274 :8624-9, 1999.
- [0446] Bianco 等, J. Cell Physiol. , 190 :74-82, 2002b.
- [0447] Bianco 等, Mol. Cell Biol. , 22 :2586-2597, 2002a.
- [0448] Chen 等, Breast Cancer Res. Treat. , 59 :81-90, 2000.
- [0449] Chen 等, Development, 133 :319-329, 2006.
- [0450] Cheng 等, Genes Dev. , 17 :31-36, 2003.
- [0451] Cox 等, Comb. Chem. High Throughput Screen, 5(4) :289-99, 2002.
- [0452] Culver 等, Science, 256(5063) :1550-1552, 1992.
- [0453] Davidson 等, Cancer Res. , 65 :4663-4672, 2005.
- [0454] De Santis 等, Cell Growth Differ. , 8 :1257-1266, 1997.
- [0455] Delpino and Castelli, Biosci. Rep. , 22 :407-20, 2002.
- [0456] Delpino 等, Mol. Membr. Biol. , 15 :21-6, 1998.
- [0457] Dhillon 等, Oncogene, 26 :3279-3290, 2007.
- [0458] Ding 等, Nature, 395 :702-707, 1998.
- [0459] Dong 等, Cancer Res. , 68 :498-505, 2008.
- [0460] Dong 等, Hum. Gene Ther. , 15 :553-561, 2004.
- [0461] Drolet 等, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2(5) :271-278, 1999.
- [0462] Dutertre 和 Teillaud, J. Soc. Biol. , 200(4) :377-386, 2006.
- [0463] Ebert 等, Cancer Res. , 59 :4502-4505, 1999.
- [0464] Egholm 等, Nature, 365(6446) :566-568, 1993.
- [0465] Ellington 和 Szostak, Nature, 346(6287) :818-822, 1990.
- [0466] Ellington 和 Szostak, Nature, 355(6363) :850-852, 1992.
- [0467] EP 266, 032
- [0468] Froehler 等, Nucleic Acids Res. , 14(13) :5399-5407, 1986.
- [0469] Gazit 等, Cancer Res. , 59 :3100-6, 1999.
- [0470] Gonzalez-Gronow 等, Cancer Res. , 66 :11424-11431, 2006.
- [0471] Gray 等, Mol. Cell Biol. , 26 :9268-9278, 2006.
- [0472] Gray 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 :5193-5198, 2003.
- [0473] Harrison 等, J. Biol. Chem. , 279 :28036-44, 2004.
- [0474] Hendrix 等, Nat. Rev. Cancer, 7 :246-255, 2007.
- [0475] Hudson et al, . J. Immunol. Methods, 231(1-2) :177-89, 1999.
- [0476] Jakobsen 等, Cancer Res. , 67 :9507-9517, 2007.
- [0477] Jamora 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 :7690-7694, 1996.
- [0478] Kannan 等, J. Biol. Chem. , 272 :3330-3335, 1997.
- [0479] Kelber 等, J. Biol. Chem. , 283 :4490-4500, 2008.
- [0480] Kinoshita 等, Cell, 83 :621-630, 1995.
- [0481] Kortt 等, Biomol. Eng. , 18(3) :95-108, 2001.
- [0482] Lee, Cancer Res. , 67 :3496-3499, 2007.
- [0483] Lee, Cancer Res. , 67 :3496-9, 2007.

- [0484] Lee, Methods, 35 :373-81, 2005.
- [0485] Lee, Trends Biochem. Sci. , 26 :504-510, 2001.
- [0486] Li 和 Lee, Curr. Mol. Med. , 6 :45-54, 2006.
- [0487] Liu 等, Mol. Pharm. , 4(3) :435-47, 2007.
- [0488] Luo 等, Mol. Cell Biol. , 26 :5688-5697, 2006.
- [0489] Mao 等, J. Biol. Chem. , 281 :8877-8887, 2006.
- [0490] Minchiotti, Oncogene, 24 :5668-5675, 2005.
- [0491] Mintz 等, Nat. Biotechnol. , 21 :57-63, 2003.
- [0492] Misra 等, Cell Signal, 16 :929-938, 2004.
- [0493] Misra 等, J. Biol. Chem. , 277 :42082-7, 2002.
- [0494] Misra 等, J. Biol. Chem. , 280 :26278-86, 2005.
- [0495] Misra 等, J. Biol. Chem. , 281 :13694-13707, 2006.
- [0496] Mitra 和 Schlaepfer, Curr. Opin. Cell Biol. , 18 :516-23, 2006.
- [0497] Miyoshi 等, J. Virol. , 72 :8150-7, 1998.
- [0498] Pardali 和 Moustakas, Biochim. Biophys. Acta, 1775 :21-62, 2007.
- [0499] PCT 申请 PCT/EP/01219
- [0500] PCT 申请 WO 92/20702
- [0501] Philippova 等, Mol. Cell Biol. , 28(12) :4004-17, 2008.
- [0502] Plückthun 等 Immunotechnology, 3(2) :83-105, 1997.
- [0503] Postovit 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105 :4329-4334, 2008.
- [0504] Reddy 等., J. Biol. Chem. , 278 :20915-20924, 2003.
- [0505] Remington' s Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. , Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- [0506] Robinson 等, Br J Cancer. 99(9) :1415-25, 2008.
- [0507] Salomon, Nat. Med. , 12 :1231, 2006.
- [0508] Sambrook 等, In :Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- [0509] Schier, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. , 19 :589-621, 2003.
- [0510] Shani 等, Mol. Cell Biol. , 28 :666-677, 2008.
- [0511] Shaw 和 Cantley, Nature, 441 :424-430, 2006.
- [0512] Shen 和 Schier, Trends Genet. , 16 :303-309, 2000.
- [0513] Shen, Development, 134 :1023-1034, 2007.
- [0514] Shen, J. Clin. Invest. , 112 :500-502, 2003.
- [0515] Shin 等, J. Biol. Chem. , 278 :7607-16, 2003.
- [0516] Shukla 等, Mol. Cancer Res. , 6 :509-516, 2008.
- [0517] Siegel 和 Massague, Nat. Rev. Cancer, 3 :807-21, 2003.
- [0518] Singer 等, Nat. Neurosci. , 8 :1343-9, 2005.
- [0519] Strizzi 等, J. Cell Physiol. , 201 :266-276, 2004.
- [0520] Strizzi 等, Oncogene, 24 :5731-5741, 2005.

- [0521] Sun 等, Am. J. Pathol. ,167 :585-597, 2005.
- [0522] Takahashi 等, Cell,126 (4) :663-676, 2006.
- [0523] Takahashi 等, Cell,126 (4) :663-76, 2007.
- [0524] Todorovska 等, J. Immunol. Methods, 248 (1-2) :47-66, 2001.
- [0525] Topczewska 等, Nat. Med. ,12 :925-932, 2006.
- [0526] Triantafilou 和 Triantafilou, Virology, 317 :128-35, 2003.
- [0527] Triantafilou 等, J. Virol. ,76 :633-43, 2002.
- [0528] Tuerk 和 Gold, Science, 249 (4968) :505-510, 1990
- [0529] Vaughan, Endocrinol. ,132 (5) :2038-50, 1993.
- [0530] Watanabe 等, J. Biol. Chem. ,282 (43) :31643-55, 2007.
- [0531] Wechselberger 等, Oncogene, 24 (25) :4094-105, 2005. .
- [0532] Wilding 等, Mol. Cell Endocrinol. ,62 :79-87, 1989.
- [0533] Xing 等, Cancer Res. ,64 :4018-4023, 2004.
- [0534] Xu 等, Dev. Biol. ,196 :237-247, 1998.
- [0535] Xu 等, Development, 126 :483-494, 1999.
- [0536] Yeo 和 Whitman, Mol. Cell, 7 :949-57, 2001.
- [0537] Ylera 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. ,290 (5) :1583, 2002.
- [0538] Yu 等, Science, 318 :1917-1920, 2007.
- [0539] Mintz PJ 等 Nat Biotechnol 2003 21(1)57-63.
- [0540] Kim Y 等 Biochemistry 45(31)9434-44.
- [0541] Jakobsen CG 等 Cancer Res 2007 67(19)9507-17.
- [0542] Gonzalez-Gronow M 等 Cancer Res 2006 66(23)11424-31.

[0001]

序列表

<110> 彼得·C·格雷
G·沙尼
J·A·科尔博
W·维尔

<120> 用于抑制CRIPTO/GRP78复合物形成和信号的组合物和方法

<130> CLFR:334W0

<140> 未知

<141> 2009-11-09

<150> 61/112,579

<151> 2008-11-07

<160> 5

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 1

Cys	Pro	Pro	Ser	Phe	Tyr	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	His	Asp	Val	Arg	Lys
1				5					10					15	

Glu

<210> 2

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成引物

<400> 2

ctgtctagac aaaaaacat acattcaagt tgattctctt gaaatcaact tgaatgtatg 60

gtcggggatc tgtggtctca taca 84

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成引物

<400> 3

ctcgaaatta accctcacta aaggg 25

<210> 4

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成引物

<400> 4

ctgtctagac aaaaacaatg actctgaatt aaagtctctt gaactttaat tcagagtcac 60

[0002]

tgctggggatc tgtggtctca taca	84
<210> 5	
<211> 84	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 5	
ctgtctagac aaaaaacat acattcaagt tgattctctt gaaatcaact tgaatgtatg	60
gtcggggatc tgtggtctca taca	84

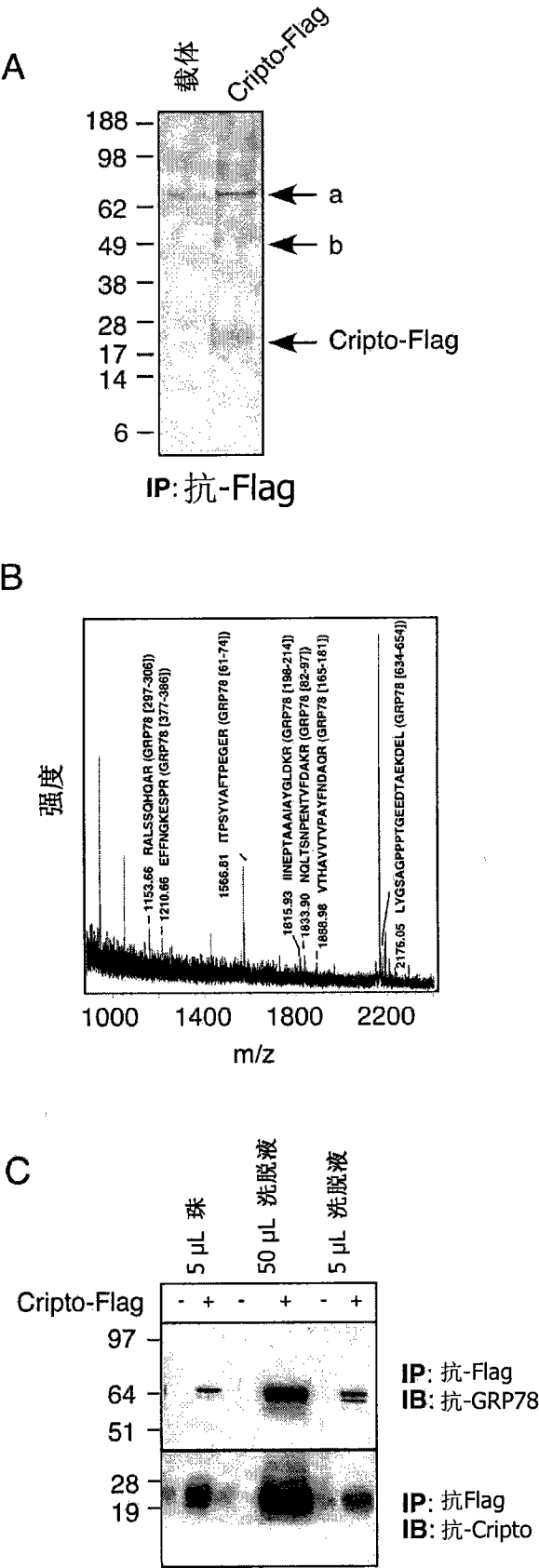


图 1A-C

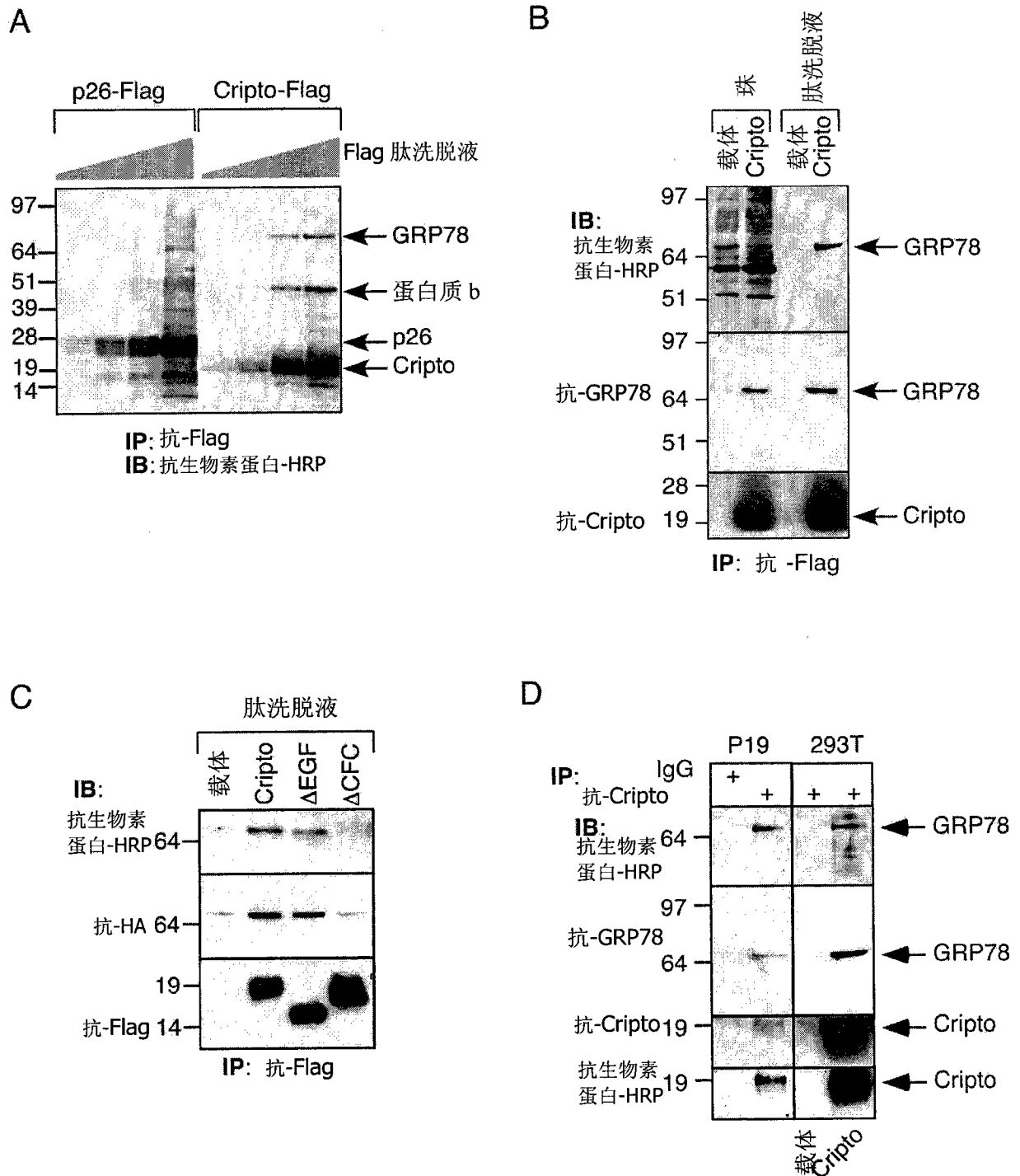


图 2A-D

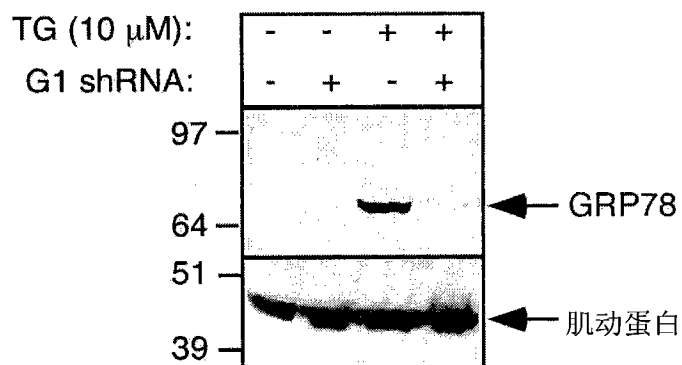
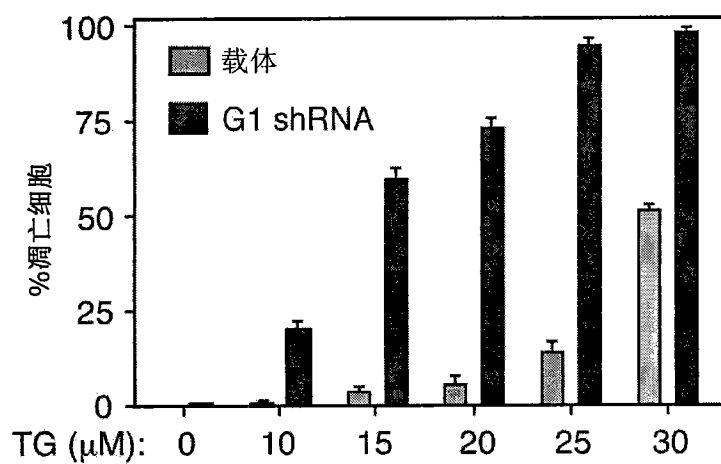
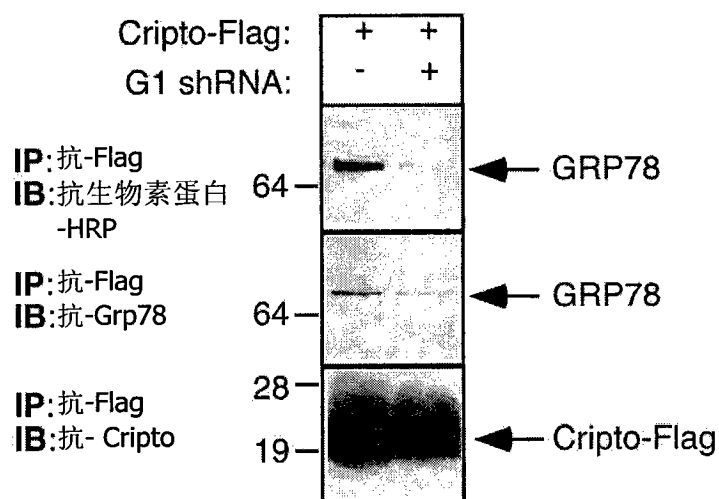
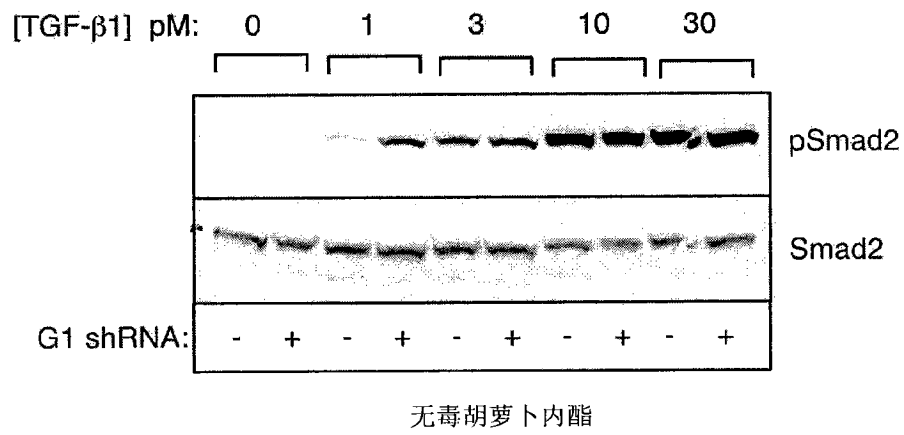
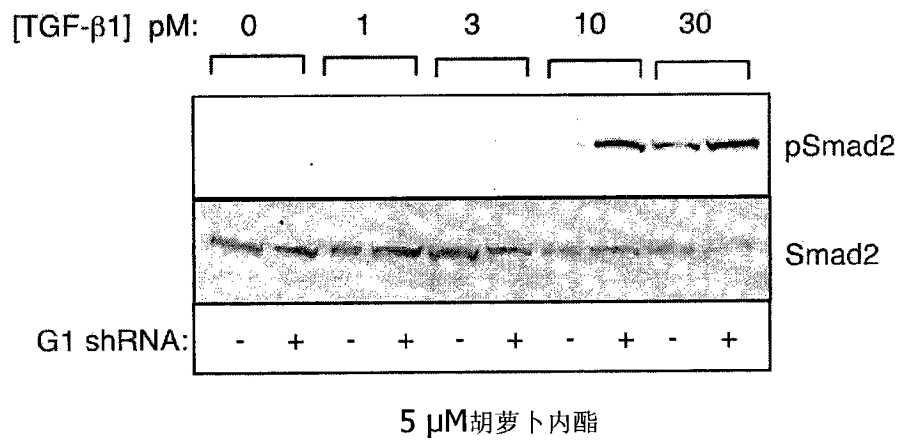
A**B****C**

图 3A-C

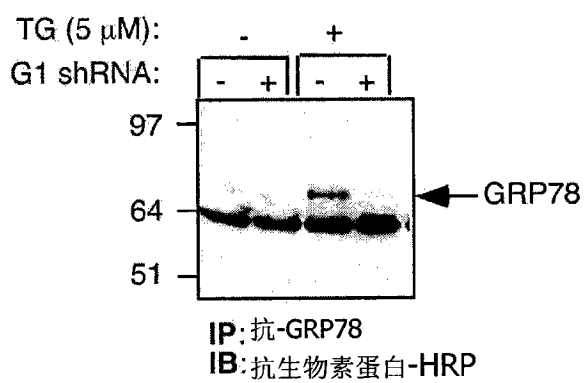
A



B



C



D

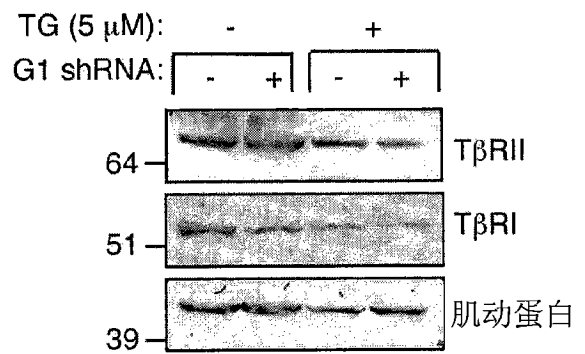


图 4A-D

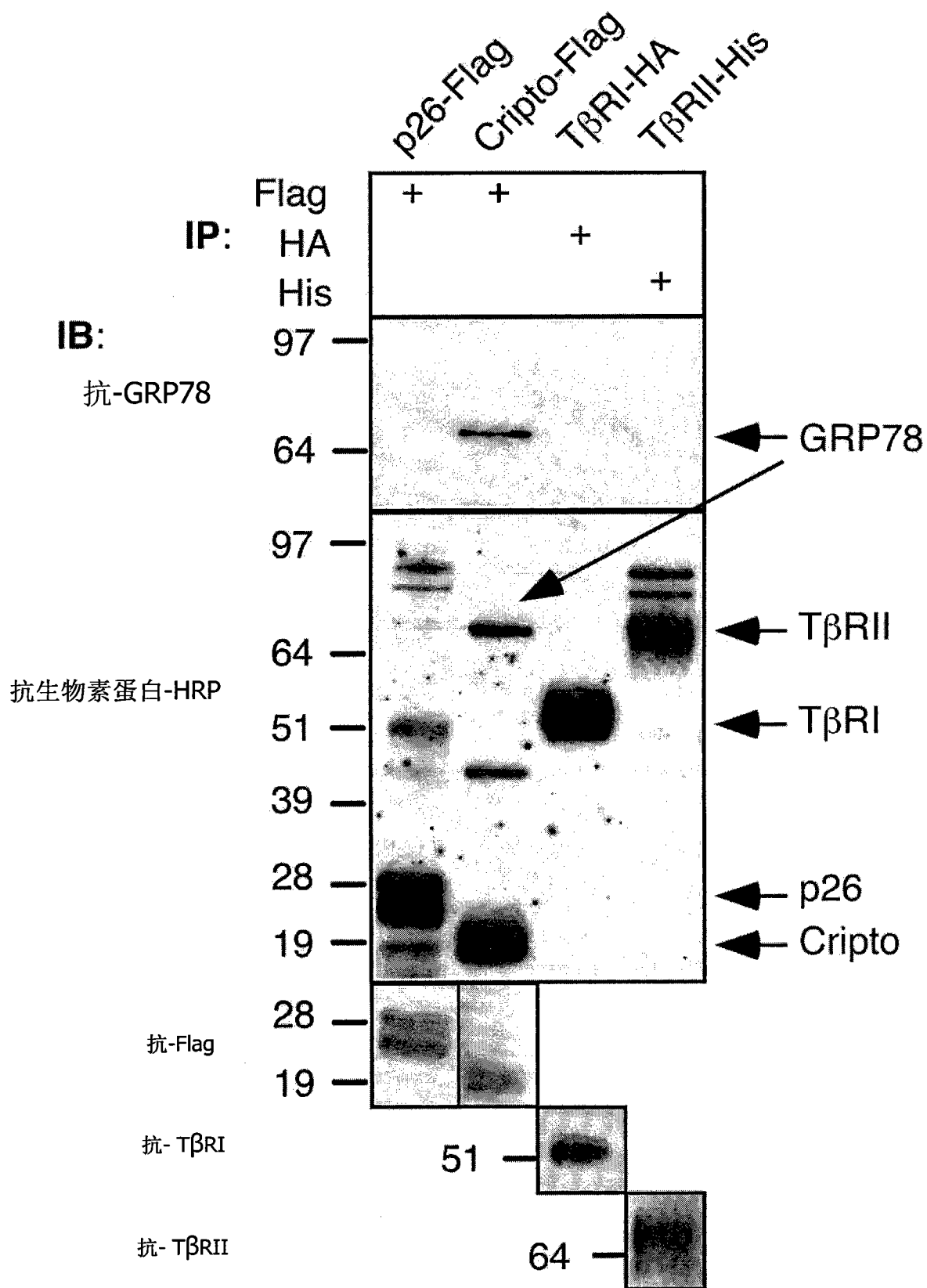


图 5

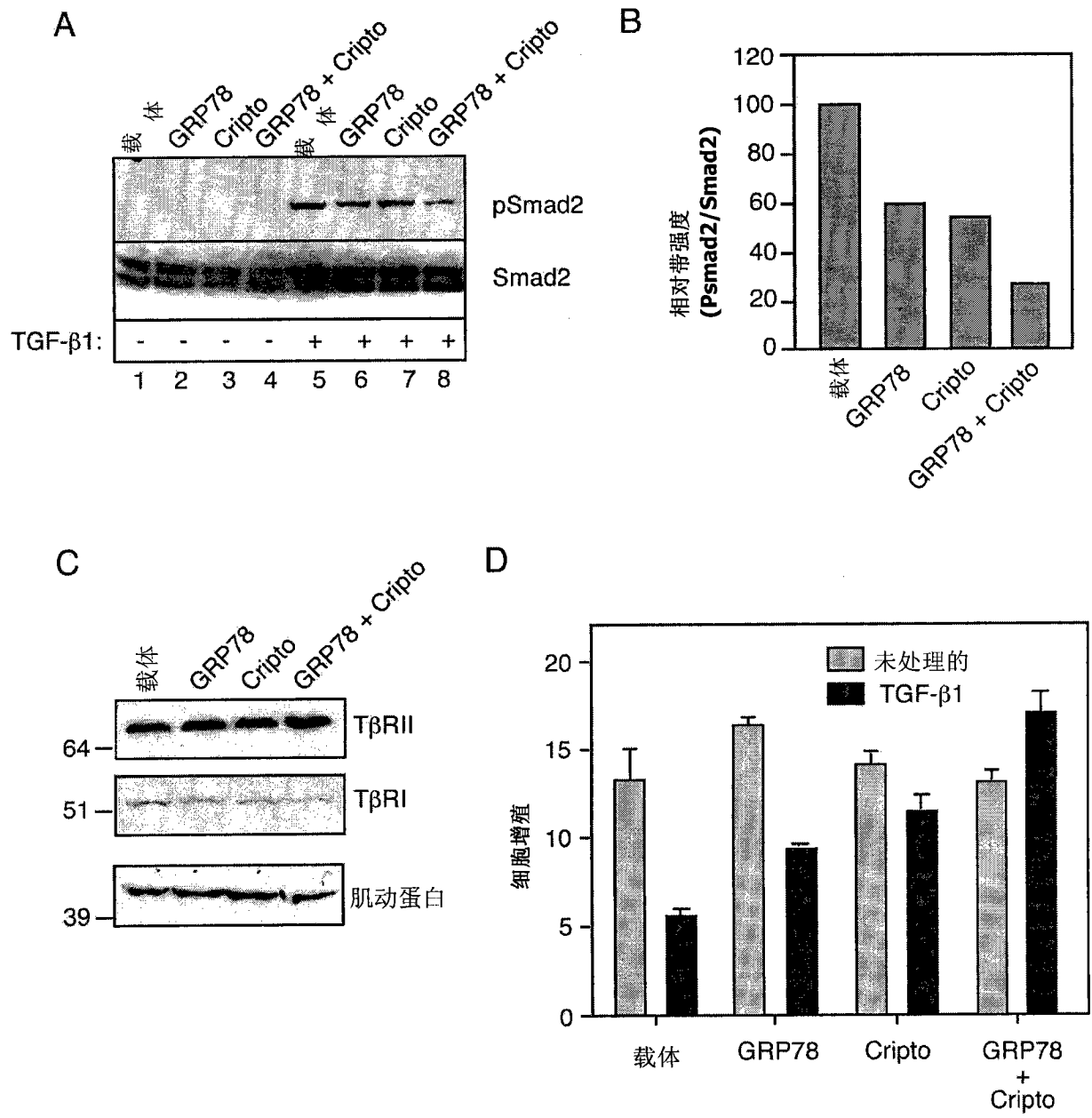


图 6A-D

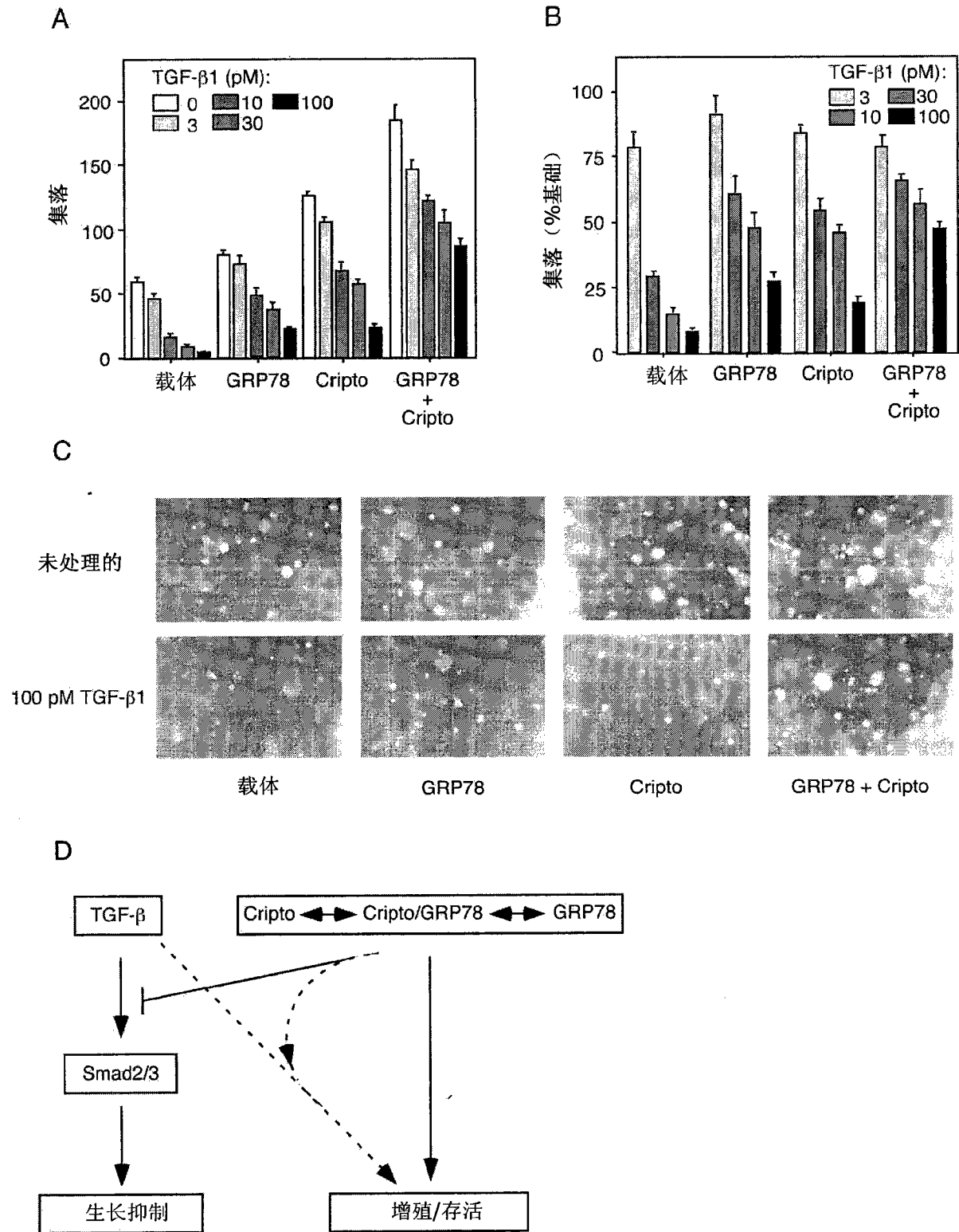


图 7A-D

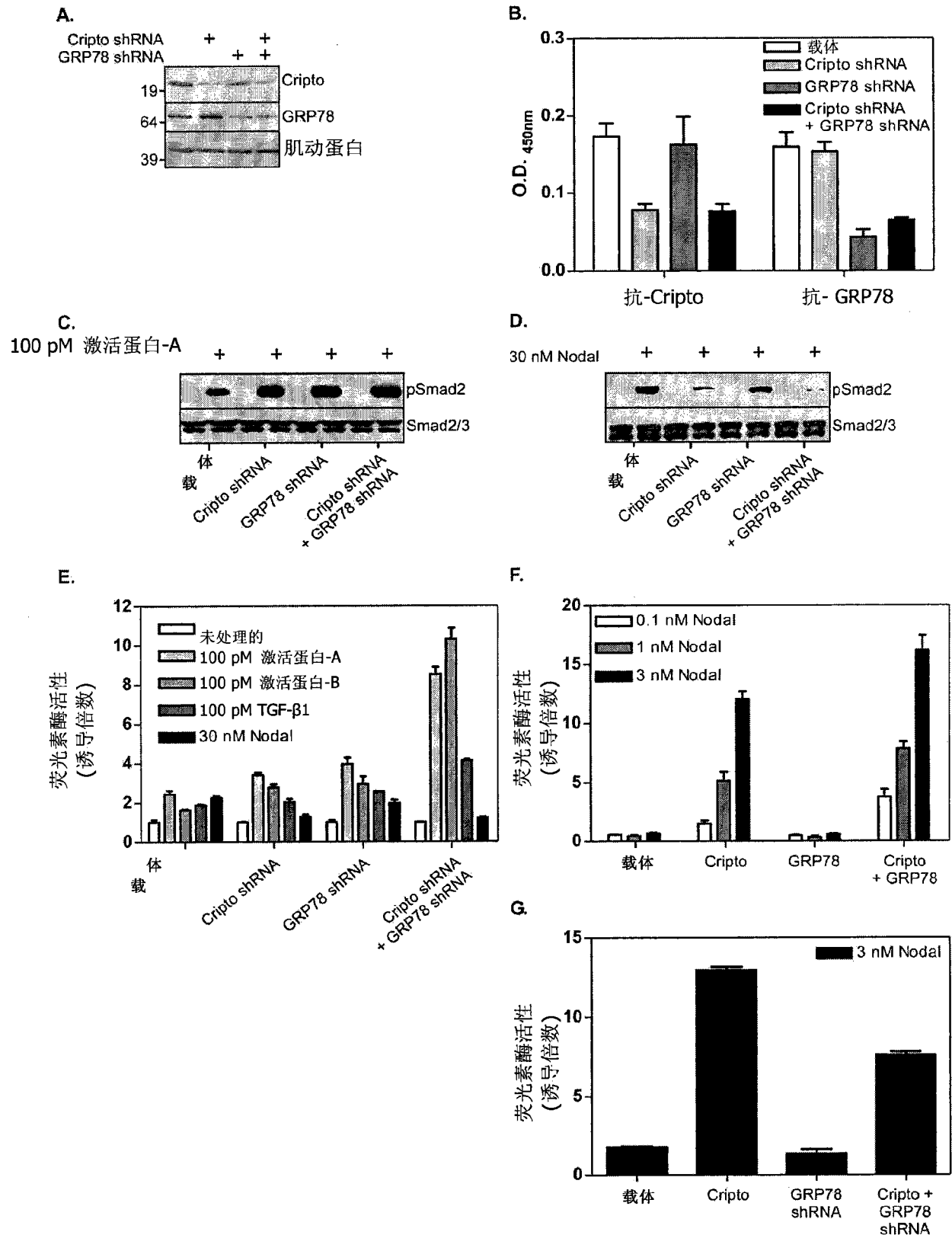


图 8A-G

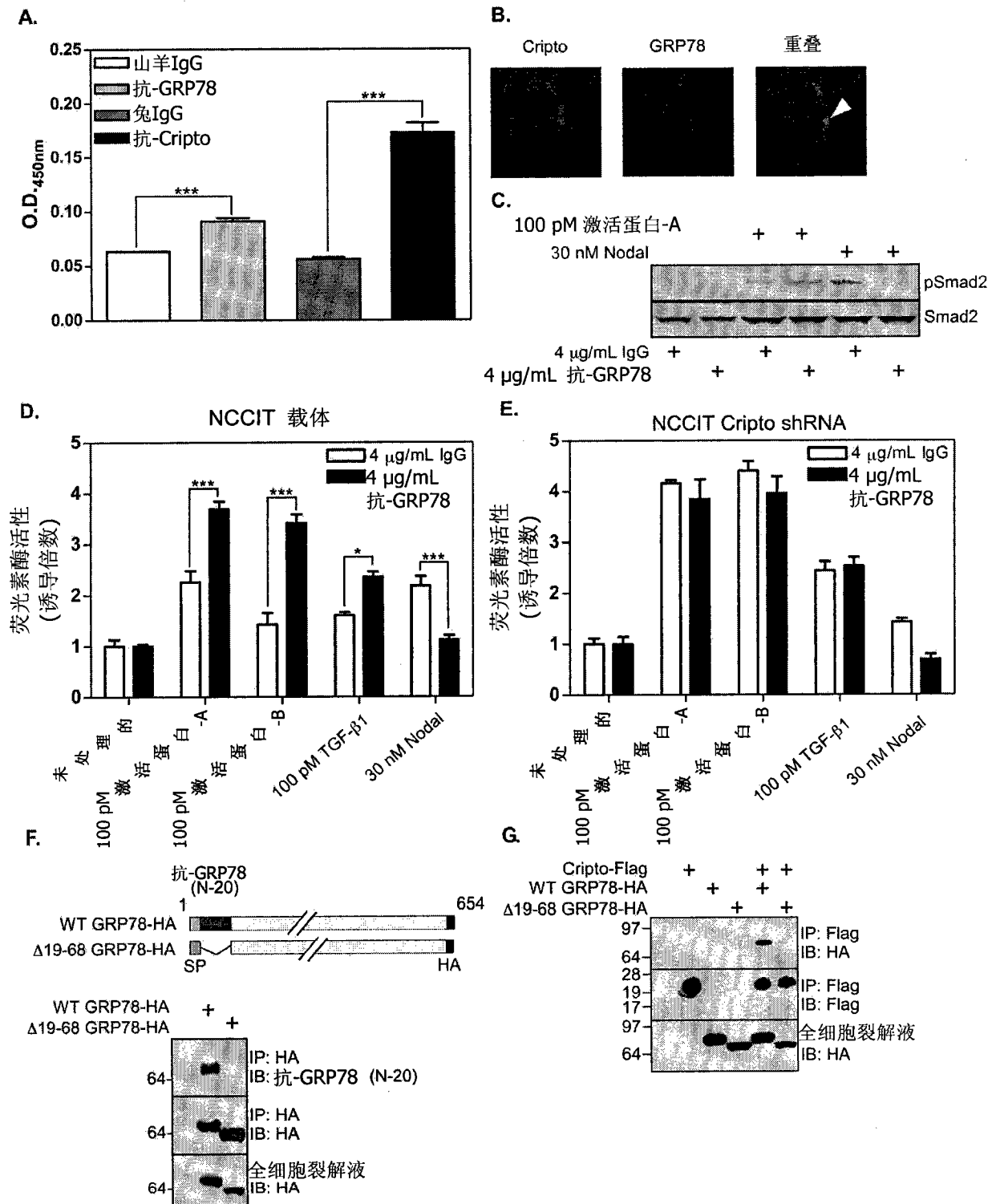
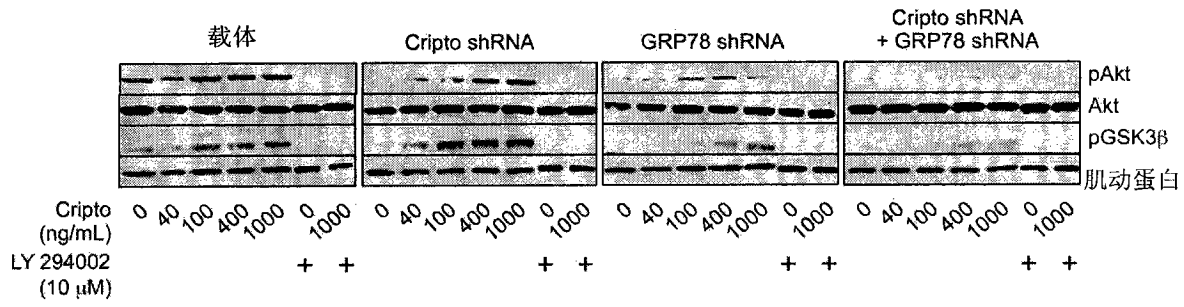
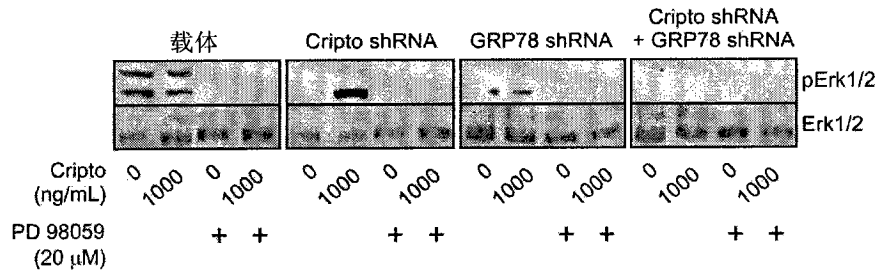


图 9A-G

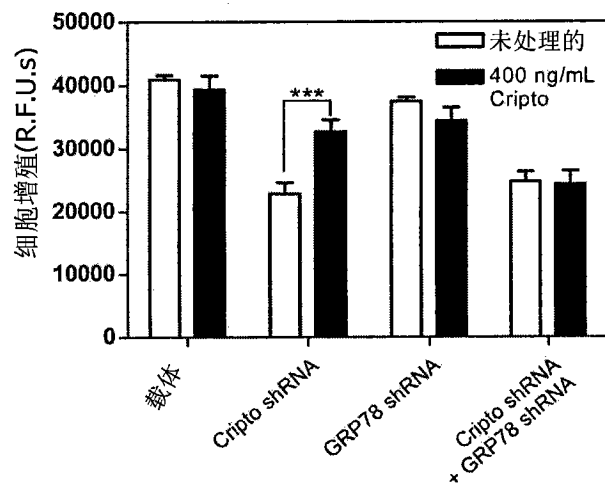
A.



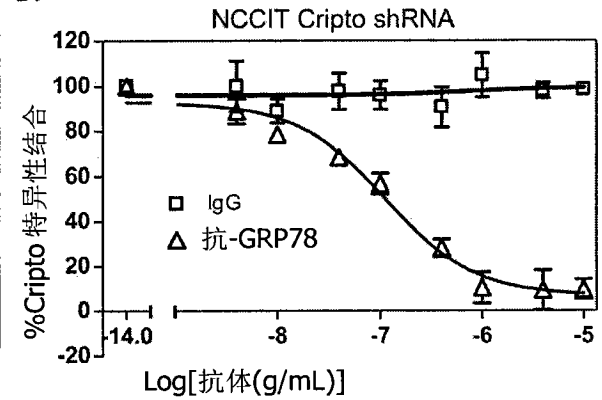
B.



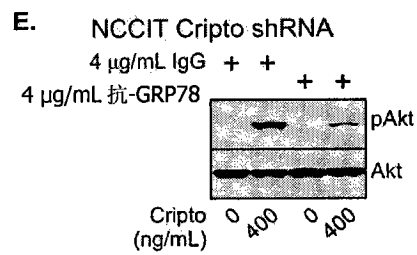
C.



D.



E.



F.

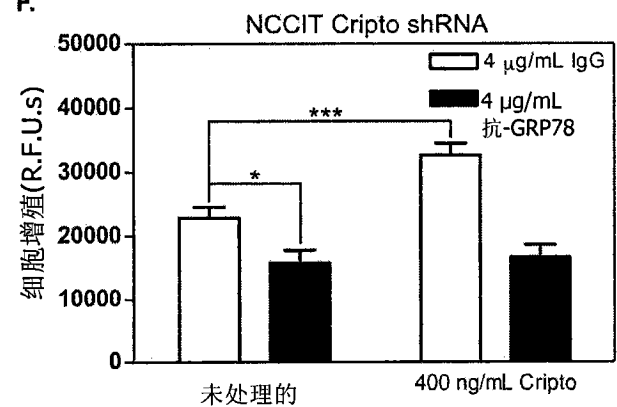


图 10A-F

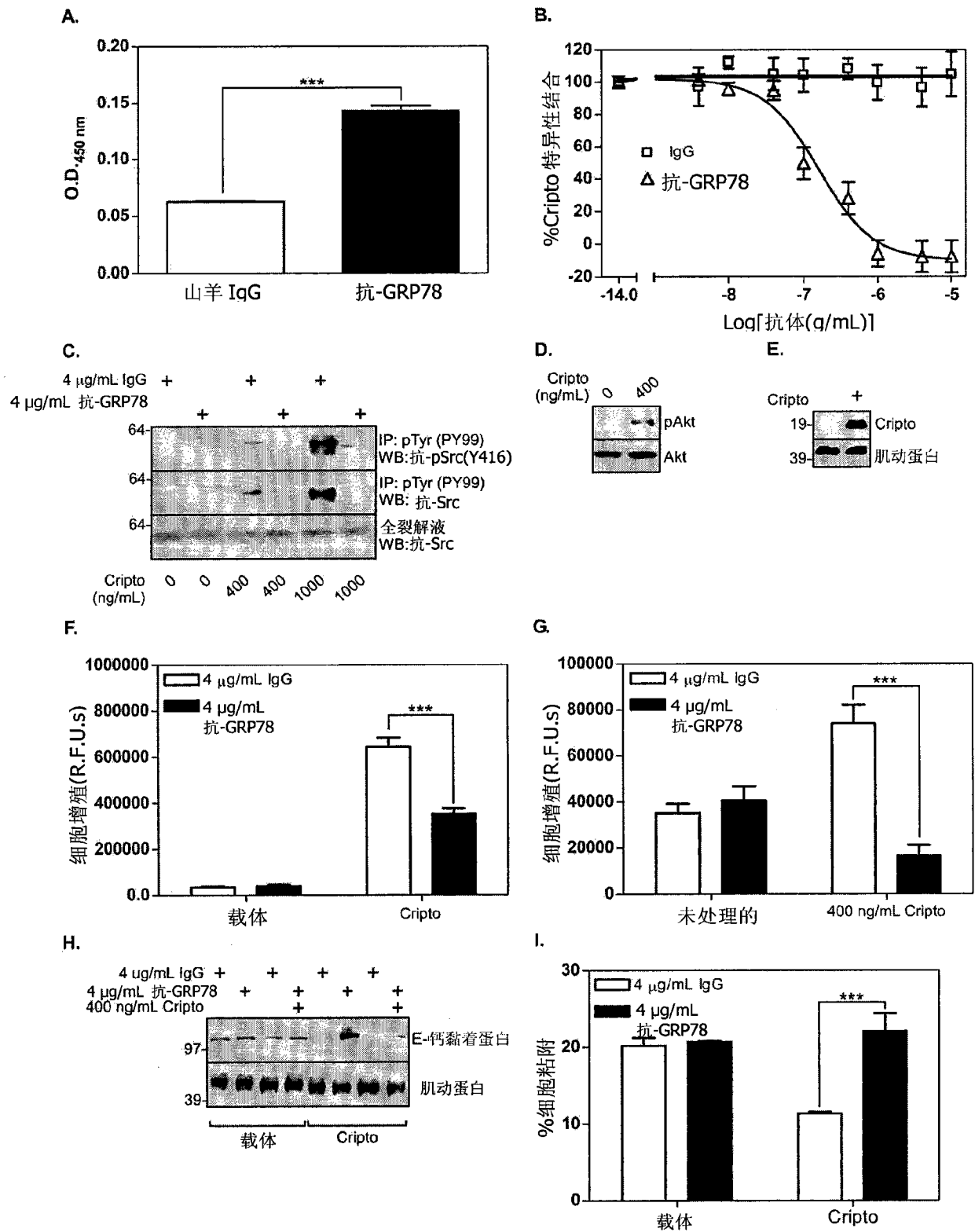


图 11A-I

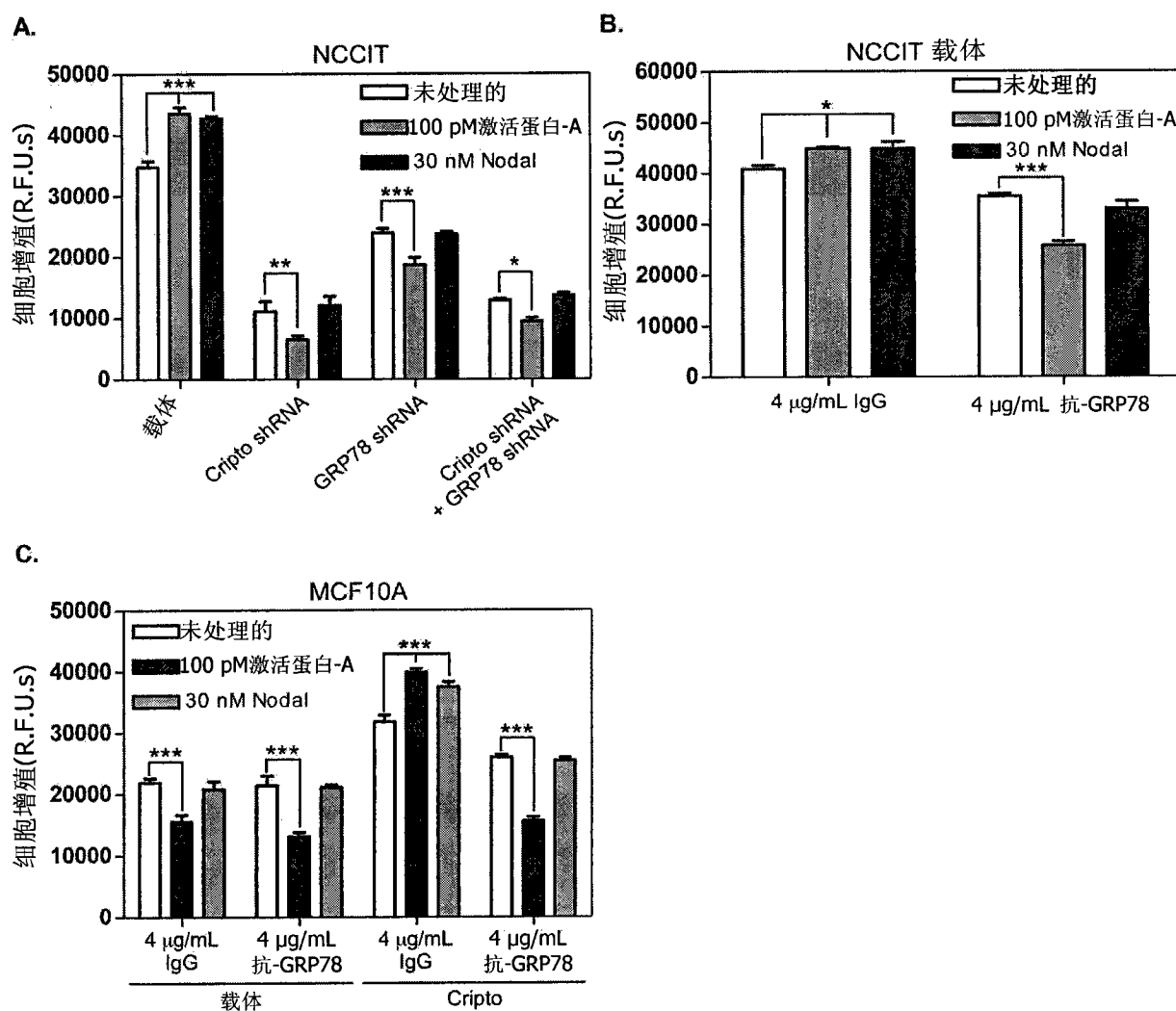


图 12A-C

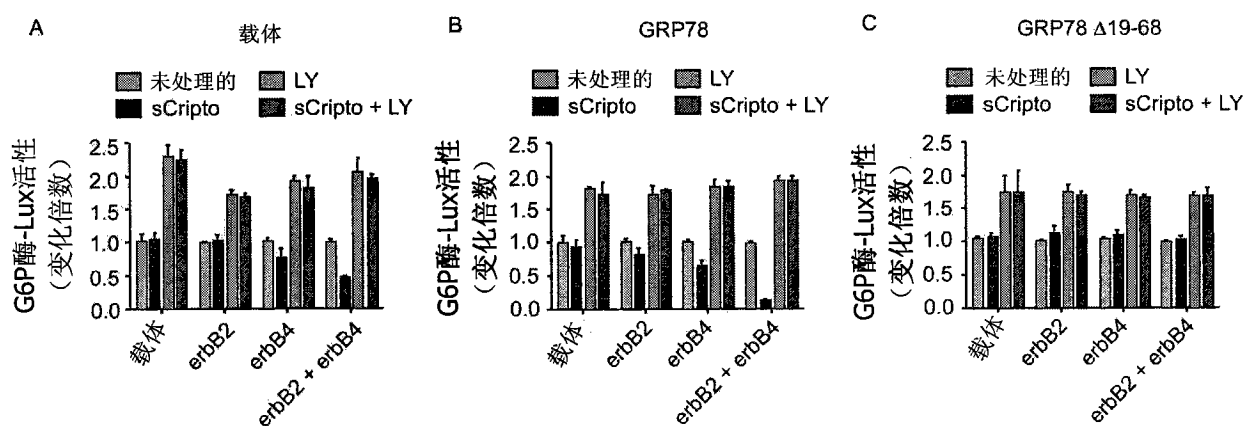


图 13A-C

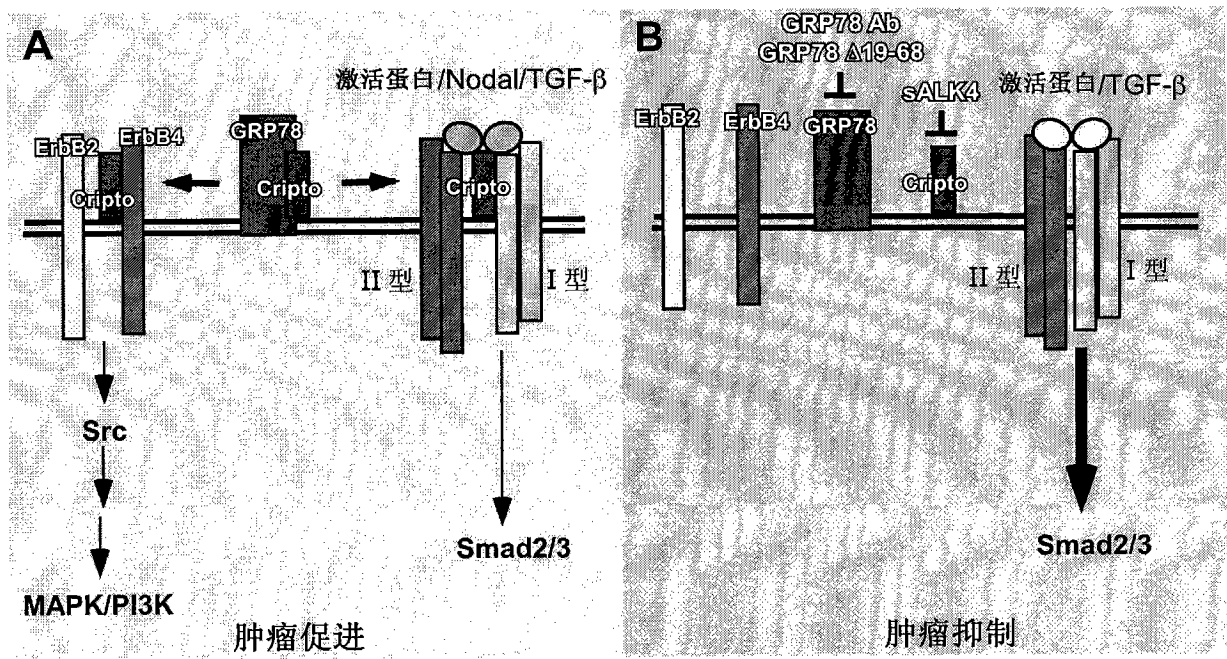


图 14A-B