

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102300873 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 28

(21) 申请号 200980154469. 8

C12N 15/13(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 11. 10

(30) 优先权数据

61/113, 042 2008. 11. 10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 07. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/063881 2009. 11. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02010/054377 EN 2010. 05. 14

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 R·E·赖特尔 E·莱皮恩 A·M·吴

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 崔佳佳

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

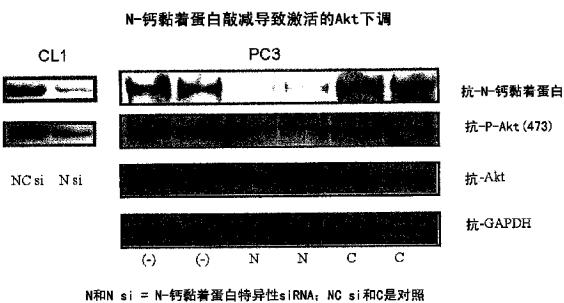
权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 10 页

(54) 发明名称

针对 N- 钙黏着蛋白的完全人抗体

(57) 摘要

本申请提供可用于癌症治疗和诊断方法的针对 N- 钙黏着蛋白的完全人抗体。



1. 一种包含 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段能结合 N- 钙黏着蛋白的胞外结构域 4。

2. 如权利要求 1 所述的抗体,其特征在于,所述片段是 scFv。

3. 如权利要求 1 所述的抗体,其特征在于,所述片段是双抗体。

4. 一种包含 SEQ ID NO :2、3、4、5、6、7、8 或 9 所示氨基酸序列的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段能结合 N- 钙黏着蛋白的胞外结构域 1-3。

5. 如权利要求 4 所述的抗体,其特征在于,所述片段是 scFv。

6. 如权利要求 4 所述的抗体,其特征在于,所述片段是双抗体。

7. 一种治疗癌症患者的方法,包括以下步骤:

(a) 获得具有患表达 N- 钙黏着蛋白癌症风险个体的测试组织样品;

(b) 测定所述测试组织样品中 N- 钙黏着蛋白存在与否或含量,与已知所述癌症阴性个体的对照组织样品作比较;其中 N- 钙黏着蛋白以正常或低水平表达,或者由一个细胞的亚组表达,或过表达;和

(c) 将有效量的权利要求 1 或 4 所述的 N- 钙黏着蛋白抗体或其片段给予具有患表达 N- 钙黏着蛋白癌症风险的个体。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述组织样品是前列腺或膀胱组织。

9. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述癌症是前列腺癌。

10. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述癌症是膀胱癌。

11. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述癌症是激素难治的前列腺癌。

12. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述抗体阻断激素难治的前列腺癌。

13. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述抗体阻断癌症干细胞。

14. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述癌症是转移性癌症。

15. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述抗体是单克隆抗体。

16. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述抗体是 scFv。

17. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述抗体是双抗体。

18. 一种诊断癌症患者的方法,包括以下步骤:

(a) 获得具有患表达 N- 钙黏着蛋白癌症风险个体的测试组织样品;

(b) 通过使样品与有效量的权利要求 1 或 4 所述的 N- 钙黏着蛋白抗体或其片段接触来测定所述测试组织样品中 N- 钙黏着蛋白存在与否或含量,与已知所述癌症阴性个体的对照组织样品作比较;藉此诊断表达 N- 钙黏着蛋白的所述癌症,其中 N- 钙黏着蛋白以正常或低水平表达,或者由细胞的亚组表达,或过表达。

19. 一种鉴定癌症干细胞的方法,包括以下步骤:

(a) 获得具有患表达 N- 钙黏着蛋白癌症风险个体的测试组织样品;

(b) 利用权利要求 1 或 4 所述的抗体,测定所述测试组织样品中癌症干细胞存在与否,与已知所述癌症阴性的个体的对照组织样品作比较;其中 N- 钙黏着蛋白以正常或低水平表达,或者由所述干细胞的亚组表达并且未过表达。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述组织样品是前列腺或膀胱组织。

21. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述癌症是前列腺癌。

22. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述癌症是膀胱癌。

23. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述癌症是激素难治的前列腺癌。
24. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述癌症是转移性癌症。
25. 一种分离的核酸,其包含编码权利要求 1 或 4 所述序列的核苷酸序列。
26. 一种分离的载体,其包含权利要求 25 所述的核酸。
27. 一种宿主细胞,其包含权利要求 26 所述的载体。

针对 N- 钙黏着蛋白的完全人抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 11 月 10 日提交的美国临时申请序列号 61/113,042 的优先权, 该申请通过引用纳入本文。

[0003] 对于联邦资助研发作出发明的权利的声明

[0004] NIH/NCI SOMI 培训基金 (Training Grant), R25 CA 098010, M. Phelps/A. Wu, 指导人 NIH/NCI UCLA 前列腺 SPORE, P50 CA 092131, R. Reiter/A. Wu. 政府对本发明享有一定权利。

[0005] 以光盘形式提交的序列表、表格或计算机程序列表附件的引用

[0006] 不适用。

[0007] 发明背景

[0008] 前列腺癌是美国男性中最常见的恶性肿瘤和癌症相关死亡的第二大主要原因。前列腺癌在生物学和临床上是异质性疾病。患此种恶性肿瘤的大部分男性携带缓慢生长的肿瘤, 这些肿瘤可能不影响个体的自然寿命, 然而某些人则患进展快速的转移性肿瘤。PSA 筛选受限于缺乏特异性和不能预测哪些患者具有发生激素难治转移性疾病的风险。近年研究提倡降低 PSA 的诊断阈值, 这样可能增加前列腺癌诊断数量, 更易于鉴定患有无痛和侵袭性癌症的患者 (Punglia 等., *N Engl J Med*, 349 :335-342(2003))。急需与临床结局相关的或可鉴定潜在侵袭性前列腺癌疾病患者的新的血清和组织标记物 (Welsh 等., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 :3410-3415(2003))。

[0009] 近年来表达模式研究提示, 原发性肿瘤中可能存在转移性与非转移性肿瘤的表达特征 (Ramaswamy 等., *Nat Genet*, 33 :49-54(2003); Sotiriou 等., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 :10393-10398(2003))。原发性肿瘤中也有一定频率的肿瘤具有倾向转移至特定器官的其它特征 (Kang 等., *Cancer Cell*, 3 :537-549(2003))。这些最近的观察提示可在早期疾病中鉴定到转移前或激素难治前列腺癌的新型标记物。生物学中这些标记物也可能对转移性或激素难治前列腺癌的发展有所作用。存在于原发性肿瘤中与结局相关在前列腺癌发展的生物学中有所作用的基因的最新例子包括 EZH2 和 LIM 激酶 (Varambally 等., *Nature*, 419 :624-629(2002); Yoshioka 等., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 :7247-7252(2003))。然而, 这两种基因均为非分泌型。

[0010] 为鉴定激素难治前列腺癌的新的候选血清或组织标记物, 我们以前曾比较过配对的激素依赖性与激素难治性前列腺癌的异种移植物的基因表达模式。免疫缺陷小鼠去势后, 从成骨细胞骨转移灶建立的 LAPC-9 异种移植物即从雄激素依赖性发展成不依赖性 (Craft 等., *Cancer Research*, In Press(1999))。曾利用其鉴定前列腺癌的候选治疗靶标。验证了表达有差异的基因, 然后检查它们与分泌蛋白或细胞表面蛋白的序列同源性。N- 钙黏着蛋白 (N-cad) 已鉴定为癌症的标记物。已有报道鉴定到激素难治前列腺癌和膀胱癌均表达 N- 钙黏着蛋白、并对其作了表征和初步验证 (WO/2007/109347)。

[0011] 胚胎发生中观察到一类细胞的移动需要丧失细胞间接触, 才能使单个细胞或一小组细胞通过胞外基质迁移。该过程称为上皮向间充质转变 (EMT)。EMT 也发生在病理学状

况时,例如上皮来源肿瘤细胞获得能动性和侵袭性表型。EMT 的标志是丧失 E-钙黏着蛋白和 N-钙黏着蛋白分子的重头表达。N-钙黏着蛋白促进肿瘤细胞的存活、迁移和侵袭,高水平的 N-钙黏着蛋白表达常与预后差相关。N-钙黏着蛋白也在内皮细胞中表达,在正常血管和肿瘤相关新生血管的成熟和稳定中起实质性作用。不断增加的实验证据提示 N-钙黏着蛋白是癌症的潜在治疗靶标。

[0012] 已在分子水平上研究了 N-钙黏着蛋白的功能。N-钙黏着蛋白的 N-末端胞外区域(160-724a. a) 含 5 个结构域 (ECD1-ECD5)。ECD1 和 ECD2 是细胞胞间粘附所需的最小结构域,但如果所有胞外结构域都参与时,则粘附水平增强。此外,研究显示 ECD4 的 69 个氨基酸部分是迁移和运动所必须的,但对细胞粘附没有作用 (Kim 等. J Cell Biol 2000)。

[0013] 因此,本发明提供诊断、预后和治疗表达 N-钙黏着蛋白癌症的靶向 N-钙黏着蛋白的组合物和方法,所述癌症包括但不限于前列腺癌和膀胱癌。本文也报告了针对 N-钙黏着蛋白胞外结构域的特异性抗体及其片段。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明提供针对 N-钙黏着蛋白的完全人抗体以供癌症,例如前列腺癌和膀胱癌的治疗和诊断方法。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1. 通过连续多轮淘选富集抗 N-钙黏着蛋白噬菌体展示抗体。

[0018] 图 2. PC3 细胞的 A14、C7、E4 和 D4 双抗体 (diabody) 染色。

[0019] 图 3. C7 双抗体与 N-钙黏着蛋白阴性细胞结合。

[0020] 图 4. E4 和 D4 双抗体与表达 N-钙黏着蛋白的细胞特异性结合。

[0021] 图 5. ¹²⁴I 标记 D4 Db 在 LAPC9 AI 肿瘤中的肿瘤定位。

[0022] 图 6. N-钙黏着蛋白活化 NF-κ B。

[0023] 图 7. N-钙黏着蛋白活化 NF-κ B。

[0024] 图 8. N-钙黏着蛋白在 C1 细胞的细胞表面表达。

[0025] 图 9. NF-κ B 定位于 N-钙黏着蛋白阳性细胞 (C1) 的细胞核。

[0026] 图 10. N-钙黏着蛋白表达导致诱导 IL-6、IL-8、TGF β 2 和 bcl-2。

[0027] 图 11. 被诱导基因与 N-钙黏着蛋白水平的相关性。

[0028] 图 12. N-钙黏着蛋白基因敲减导致 IL-6 和 IL-8 下调。

[0029] 图 13. N-钙黏着蛋白抗体处理后的 NF-κ B 活性。

[0030] 图 14. PC3 细胞中的 Ncad :抗体温育 48 小时后。

[0031] 图 15. N-钙黏着蛋白基因敲减导致活化 Akt 下调。

[0032] 图 16. N-钙黏着蛋白特异性抗体活化,然后下调 Akt 的活化。

[0033] 发明详述

[0034] 在此,我们报道了治疗癌症患者的方法和鉴定癌症干细胞的方法,其中所述癌细胞中 N-钙黏着蛋白以正常或较低水平表达,或者由癌细胞的亚组表达且不过表达。在此,我们也报道了 N-钙黏着蛋白胞外结构域的特异性抗体及其片段。

[0035] N-钙黏着蛋白的表达可促进前列腺和膀胱癌侵袭和转移以及前列腺癌发展成激素难治疾病。可单独或与其它小分子抑制剂 mTOR 和 EGFR 联用治疗性靶向 N-钙黏着蛋白。靶向 N-钙黏着蛋白有助于预防或控制发生侵袭性和转移性前列腺癌。

[0036] 本发明涉及以下发现,即与正常组织相比,N-钙黏着蛋白无需过表达即可作为治疗和诊断的靶标。其可以是低水平表达,也可仅由细胞亚组表达。我们发现即使靶向5%前列腺癌细胞的N-钙黏着蛋白也足以阻断前列腺癌发展成为去势耐受性。

[0037] 本发明也涉及作为癌症干细胞靶标的N-钙黏着蛋白。我们发现靶向5%或更少细胞的N-钙黏着蛋白足以阻断肿瘤发展。该发现与N-钙黏着蛋白是癌症干细胞的标记物以及抑制这些干细胞的N-钙黏着蛋白足以全面阻断肿瘤生长的假设相一致。

[0038] 本发明还涉及以下发现,即表达N-钙黏着蛋白的细胞比不表达N-钙黏着蛋白的细胞更具有致癌性,这与其作为癌症干细胞标记物相一致。N-钙黏着蛋白阳性细胞可产生N-钙黏蛋白阴性细胞,也与N-钙黏着蛋白是癌症干细胞的新型标记物的理论相一致。最后,肿瘤必须上调或获得N-钙黏着蛋白才能生长。即肿瘤干细胞必须获得上皮向间充质转变的特性才有致癌性。

[0039] 因此,N-钙黏着蛋白是一种特别有希望的治疗靶标。发现其在细胞表面,在许多上皮肿瘤中表达,并与侵袭性、转移性相关,还可能不依赖雄激素。因此,抗N-钙黏着蛋白的抗体特别优选用于治疗上皮癌症,包括但不限于泌尿生殖道(膀胱、前列腺)癌症,更具体地说,它们是侵袭性或转移癌症的治疗药物。在一些实施方式中,优选抗N-钙黏着蛋白胞外结构域的单克隆抗体。在进一步的实施方式中,这些癌症的治疗优选N-钙黏着蛋白的第四胞外结构域,第一到第三结构域,或第一和第二结构域的诸部分,第一胞外结构域(EC1)。在一些实施方式中,特别优选在这些治疗中采用抗胞外结构域4的抗体,因为发现该结构域对促运动性(pro-motility)和侵袭潜能至关重要(参见Kim等,J Cell Biol. 151(6): 1193-206(2000),关于各种N-钙黏着蛋白结构域的定义,通过引用全文纳入本文)。

[0040] 在此,我们描述了两种独立N-钙黏着蛋白重组蛋白的特异性人scFv的选择和表征:N-钙黏着蛋白胞外结构域1-3(ECD1-3)和N-钙黏着蛋白第四结构域(ECD4)。设计了两个独立的筛选(方法)以期产生能影响该分子的粘附和迁移表型的特异性制剂以及产生靶向表达N-钙黏着蛋白的细胞的试剂。通过ELISA和流式细胞术表征第4轮淘选后的各噬菌体克隆。测定了特异性结合物的序列,取一些选择的克隆重新组成二价抗体小片段(双抗体)。这种双抗体显示与表达N-钙黏着蛋白的细胞特异性结合。

[0041] 本文所述的抗-N-钙黏着蛋白片段是一种基础构建模块,在此基础上可构成形状和大小各异的全人抗体或工程改造抗体,此抗体的基本属性是能特异性结合N-钙黏着蛋白。可用这些抗体治疗或诊断表达N-钙黏着蛋白的前列腺癌、膀胱癌或其它癌症。至关重要是注意到N-钙黏着蛋白可由肿瘤细胞本身或任何周围基质(肌肉、成纤维细胞、血管等)表达。我们以前曾证明N-钙黏着蛋白是前列腺癌、膀胱癌和其它癌症发生侵袭、生长、转移和发展的生物学重要决定因素,是诊断、预后和治疗的至关重要靶标。抗N-钙黏着蛋白的小鼠单克隆抗体在癌症动物模型中能阻断肿瘤生长、转移、侵袭和发展成雄激素不依赖性。已发现不难将人scFv重新组成全抗体或工程改造抗体,从而能够靶向癌症而不刺激针对这种抗体的免疫应答。

[0042] 据我们所知,我们描述了以诊断和治疗前列腺癌和其它癌症为目的而制备的抗N-钙黏着蛋白的第一种人抗体片段。本发明是基础是我们课题组开发的N-钙黏着蛋白涉及前列腺和膀胱及其它癌症进展的现有技术以及治疗性靶向其的概念。噬菌体展示描述了分离抗体片段的已良好建立的技术。本文所用的非免疫噬菌体文库由加利福尼亚州旧金山

分校的 JD Marks 博士所开发。

[0043] 本发明描述了能识别 N- 钙黏着蛋白的单链抗体片段的分离和表征。这些片段可用作单链片段或重新组成较大片段,例如全 IgG,用于诊断或治疗癌症。

[0044] 如本文所述,本发明描述了具有推定的诊断和治疗应用价值的许多候选片段,这些片段可重新组成较大构建物用于识别前列腺癌和其它癌症的 N- 钙黏着蛋白。可采用这些抗体本身(裸抗体)或可偶联于放射性同位素、纳米颗粒、脂质体、病毒或任何其它“有效负载”以便为治疗、成像或其它目的而递送至肿瘤。可利用这些片段来提高表达 N- 钙黏着蛋白的肿瘤的治疗或成像模式的特异性。

[0045] 据我们所知,我们首次证明抗 N- 钙黏着蛋白的抗体具有治疗活性,优于靶向此类肿瘤的任何其它已知方法。本发明的优点在于所述抗体片段无免疫原性,是人抗体,不作其它修饰即可用于患者。识别 N- 钙黏着蛋白的片段具有灵活优点,即,不难为任何目的而工程改造它们。

[0046] 定义

[0047] “N- 钙黏着蛋白和 E- 钙黏着蛋白”指具有以下特征的核酸,例如基因、前-mRNA、mRNA 和多肽、多态性变体、等位基因、突变体和种间同源物:(1) 所含的氨基酸序列优选在至少约 25、50、100、200、500、1000 个或更多个氨基酸的区域上,与各参比核酸编码的多肽,或本文所述的氨基酸序列(分别如图 7、8 和 9 所示)的氨基酸序列相同性,大于约 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%,优选 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 或更高;(2) 特异性结合用包含参比氨基酸序列(分别如图 7、8 和 9 所示)的免疫原、它们各自的免疫原性片段及其各自的保守性修饰变体所产生的抗体,例如多克隆抗体;(3) 在严格杂交条件下特异性杂交编码参比氨基酸序列(分别如图 7、8 和 9 所示)的核酸及其保守性修饰变体;(4) 所含的核酸序列优选在至少约 25、50、100、150、200、250、500、1000 个或更多个核苷酸的区域上,与图 7、8 和 9 分别显示的参比核酸序列的核苷酸序列相同性大于约 95%,优选大于约 96%、97%、98%、99% 或更高。多核苷酸或多肽序列通常来自哺乳动物,包括但不限于灵长类,例如人;啮齿类,例如大鼠、小鼠、仓鼠;奶牛、猪、马、绵羊或任何哺乳动物。本发明的核酸和蛋白质包括天然产生或重组的分子。

[0048] “癌症”指人癌症和癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病等,包括实体瘤和淋巴瘤、肾癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、食道癌和肝癌;淋巴瘤,包括非霍奇金和霍奇金淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤。“泌尿生殖道癌症”指尿道和生殖组织的人癌症,包括但不限于肾癌、膀胱癌、泌尿道癌、尿道癌、前列腺癌、阴茎癌、睾丸癌、阴门癌、宫颈癌和卵巢组织癌。

[0049] 本文要治疗的癌症的特征是 N- 钙黏着蛋白过度活化。或者,本文要治疗的癌症可以是 N- 钙黏着蛋白在正常或低水平表达,或 N- 钙黏着蛋白由细胞亚组表达,并且 N- 钙黏着蛋白未过表达的癌症。在本发明的一个实施方式中,进行诊断或预后试验以确定患者癌症的特征是否为 N- 钙黏着蛋白表达。考虑了测定此类扩增/表达的各种试验,包括免疫组化、FISH 和脱落抗原试验(shed antigen assay)、Southern 印迹或 PCR 技术。此外,可采用体内诊断试验评估 N- 钙黏着蛋白表达或扩增,例如通过给予能结合待检测分子并用可检测标记物(例如,放射性同位素)作标记的分子(例如,抗体),再外部扫描患者该标记物的定位。在一些实施方式中,待治疗的癌症尚无侵袭性,但表达 N- 钙黏着蛋白。

[0050] “治疗耐受的”癌症、肿瘤细胞和肿瘤,指对凋亡介导(例如,通过死亡受体细胞信号传导,例如 Fas 配体受体、TRAIL 受体、TNF-R1、化疗药物、放疗)和非凋亡介导的(例如,毒性药物、化学品)的癌症治疗,包括化疗、激素治疗、放疗和免疫治疗变得耐受或难治的癌症。

[0051] “过表达”指测试组织样品中 N- 钙黏着蛋白、LY6-E 和 E- 钙黏着蛋白的 RNA 或蛋白质表达分别明显高于对照组织样品中的 N- 钙黏着蛋白、LY6-E 和 E- 钙黏着蛋白的 RNA 或蛋白质表达。在一个实施方式中,所述组织样品是自体样品。与不大可能发展成转移的患者的癌症组织或与正常(即,非癌症)组织样品相比,与侵袭性、转移性、激素不依赖性(例如,雄激素不依赖)、或对治疗耐受或患癌可能性增加相关的测试癌组织样品(例如,膀胱、前列腺)的 N- 钙黏着蛋白或 LY6-E mRNA 或蛋白质的表达通常至少高 2 倍,常高最多 3、4、5、8、10 倍或更高。当观察用测试和对照样品作大致类似加载的凝胶条带时,不难看到此类差异。N- 钙黏着蛋白或 Ly6-E 表达量增加的前列腺癌更可能变得具有侵袭性、转移或发展成雄激素不依赖性或非难治癌症。各种截断值与 N- 钙黏着蛋白或 Ly6-E 阳性相关,因为原发性肿瘤中存在少量百分比的 N- 钙黏着蛋白或 Ly6-E 阳性细胞就可鉴定为复发和转移风险高的肿瘤。术语“过表达”或“过表达的”可互换使用,指与正常细胞相比,在高于可检测水平转录或翻译的基因,通常在癌细胞中。因此,过表达指蛋白质和 RNA 二者过表达(由于转录、转录后加工、翻译、翻译后加工、稳定性改变和蛋白质降解改变所致)以及蛋白质运送模式改变(核定位增加)和功能活性增强,例如由于底物的酶水解增加所致的局部过表达。与正常细胞或比较细胞(例如,BPH 细胞)相比,过表达也可以是增加 50%、60%、70%、80%、90%或更高。

[0052] 术语“表达 N- 钙黏着蛋白的癌症”和“N- 钙黏着蛋白表达相关癌症”可互换,指以上定义的表达 N- 钙黏着蛋白的癌细胞或组织。

[0053] 术语“癌症-相关抗原”或“肿瘤特异性标记物”或“肿瘤标记”可互换,指相比于正常细胞,优先在癌症细胞中表达的分子(通常是蛋白质、碳水化合物或脂质),可利用这种分子使药理学制剂优先靶向癌细胞。标记物或抗原可在细胞表面或胞内表达。癌症相关抗原是相比于正常细胞在癌症细胞中常表达稳定或极少降解的分子,例如相比于正常细胞表达高 2- 倍、表达高 3- 倍或更高。癌症相关抗原常是癌症细胞中不适当合成的分子,例如相比于正常细胞表达的分子含有缺失、添加或突变的分子。癌症相关抗原常仅在癌细胞中表达,而在正常细胞中不合成或表达。示范性的细胞表面肿瘤标记物包括乳腺癌的蛋白质 c-erbB-2 和人表皮生长因子受体(HER),前列腺癌的 PSMA,和包括乳腺癌、卵巢癌和结肠直肠癌在内的许多癌症中的碳水化合物粘蛋白。示范性的胞内肿瘤标记物包括,例如突变的肿瘤抑制蛋白或细胞周期蛋白,包括 p53。

[0054] 相反,E- 钙黏着蛋白通常在癌症患者的癌性组织样品中表达不足(underexpression),这些癌症可能变成侵袭性、转移或发展成雄激素不依赖性或非难治癌症。这种表达不足可以是低两倍、三倍、四倍或至少五倍。观察采用测试和对照样品作大致类似加载的凝胶条带时,不难看到此类差异。因此,在可能变成侵袭性、转移或发展成雄激素不依赖性或非难治癌症的癌症中,组合的 N- 钙黏着蛋白/E- 钙黏着蛋白值甚至更高,可以高至少两倍、三倍、四倍、五倍、十倍或二十倍。各种截断值与 N- 钙黏着蛋白阳性/E- 钙黏着蛋白阴性相关,因为原发性肿瘤中存在少量百分比的 N- 钙黏着蛋白阳性细胞就可鉴定

为复发和转移风险高的肿瘤。

[0055] “激动剂”指能结合本发明多肽或多核苷酸,刺激、提高、活化、促进、增强活化、致敏或上调本发明多肽或多核苷酸活性或表达的制剂。

[0056] “拮抗剂”指能抑制本发明多肽或多核苷酸表达,或能结合、部分或完全阻断刺激、降低、阻止、延迟活化、灭活、脱敏或下调本发明多肽或多核苷酸活性的制剂。

[0057] 表达或活化的“抑制剂”、“活化剂”和“调节剂”分别指采用体外和体内试验鉴定,对表达或活化具有抑制、激活或调节作用的分子,例如配体、激动剂、拮抗剂和它们的同源物及模拟物。术语“调节剂”包括抑制剂和活化剂。抑制剂是,例如,能抑制本发明多肽或多核苷酸表达,或者能结合、部分或完全阻断刺激或酶活性、降低、防止、延迟激活,灭活、脱敏或下调本发明多肽或多核苷酸活性的制剂,如拮抗剂。活化剂是,例如,能诱导或活化本发明多肽或多核苷酸的表达,或者能结合、刺激、提高、打开、激活、促进、增强活化或酶活性、致敏或上调本发明多肽或多核苷酸活性的制剂,如激动剂。调节剂包括天然产生的和合成的配体、拮抗剂、激动剂、小化学分子等。鉴定抑制剂和活化剂的试验包括例如,在存在或不存在本发明多肽或多核苷酸时将推定的调节化合物施加于细胞,然后测定对本发明多肽或多核苷酸活性的功能影响。将用潜在的活化剂、抑制剂或调节剂处理的包含本发明多肽或多核苷酸的样品或试验结果与没有该抑制剂、活化剂或调节剂的对照样品作比较,以检测影响程度。将对照样品(未用调节剂处理)的相对活性值指定为 100%。当本发明多肽或多核苷酸的活性值为对照的约 80%,任选 50%或 25-1%时,实现了抑制。当本发明多肽或多核苷酸的活性值为对照的 110%,任选 150%,任选 200-500%,或 1000-3000%或更高时,实现了激活。

[0058] 本文所用术语“测试化合物”或“候选药物”或“调节剂”或其语法等同形式描述了天然产生或合成的任何分子,如蛋白质、寡肽(如长约 5-25 个氨基酸,优选长约 10-20 个或 12-18 个氨基酸,优选长 12、15 或 18 个氨基酸),有机小分子、多糖、脂质、脂肪酸、多核苷酸、RNAi、siRNA、抗体、寡核苷酸等。所述测试化合物可以是测试化合物的文库形式,例如能提供足够多样性的组合文库或随机文库。任选将测试化合物连接于融合伴侣,如靶向化合物、拯救化合物、二聚化合物、稳定性化合物、可寻址化合物和其它功能分子。通常,通过鉴定具有某些所需特性或活性,如抑制活性的测试化合物(称为“先导化合物”),产生先导化合物的变体,并评估这些化合物变体的特性和活性,从而产生具有有用特性的新化学实体。这种分析中常常采用高通量筛选(HTS)方法。

[0059] “有机小分子”指分子量大于约 50 道尔顿小于约 2500 道尔顿,优选小于约 2000 道尔顿,优选约 100-1000 道尔顿之间,更优选约 200-500 道尔顿之间的天然产生或合成的有机分子。

[0060] 细胞毒性制剂包括“细胞周期特异性”或“抗有丝分裂”或“细胞骨架相互作用”药物。这些术语可互换,指能阻断细胞有丝分裂的任何药理学制剂。此类制剂可用于化疗。细胞周期特异性药物通常能结合细胞骨架微管蛋白而阻断微管蛋白聚合成微管的能力,导致细胞分裂停滞在中期。示范性的细胞周期特异性药物包括长春花生物碱、紫杉烷类、秋水仙素和鬼臼毒素。示范性长春花生物碱包括长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。示范性紫杉烷类包括紫杉醇和多西他赛。细胞骨架相互作用药物的另一实例包括 2-甲氧基雌二醇。

[0061] “siRNA”或“RNAi”指形成双链 RNA 的核酸,当 siRNA 在基因或靶基因相同的细胞中表达时,所述双链 RNA 能降低或抑制所述基因或靶基因的表达。因此,“siRNA”或“RNAi”指由互补链所形成的双链 RNA。杂交形成双链分子的 siRNA 的互补部分通常基本上或完全相同。在一个实施方式中,siRNA 指与靶基因基本上或完全相同而形成双链 siRNA 的核酸。所述 siRNA 通常长至少约 15-50 个核苷酸,例如双链 siRNA 的各互补序列长 15-50 个核苷酸,所述双链 siRNA 长约 15-50 个碱基对,优选约 20-30 个核苷酸碱基,优选约 20-25 或约 24-29 个核苷酸,例如长 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸。

[0062] 本领域普通技术人员熟知 siRNA 分子和载体的设计和制备。例如,设计合适 siRNA 的有效方法是始于 mRNA 转录的 AUG 起始密码子(例如,参见图 5)和扫描 AA 二核苷酸序列(参见 Elbashir 等.EMBO J 20 :6877-6888(2001)。每个 AA 和 3' 毗连核苷酸是潜在的 siRNA 靶位点。此毗连位点序列的长度将决定 siRNA 的长度。例如,19 个毗连位点可产生 21 核苷酸长的 siRNA。含 3' 突出 UU 二核苷酸的 siRNA 通常最有效。该方法与利用 RNA pol III 来转录发夹 siRNA 也相容。RNA pol III 在 4-6 个核苷酸的多聚(T)段处终止转录,产生含短的多聚(U)尾的 RNA 分子。然而,含有其它 3' 末端突出二核苷酸的 siRNA 也能有效诱导 RNAi,可凭经验选择这种序列。对于选择性,可进行 BLAST 检索以避免与其它编码序列同源的含 16-17 个以上毗连碱基对的靶序列(参见 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)。

[0063] 可直接给予这种 siRNA 或者利用不同设计标准的 siRNA 表达载体,诱导 RNAi。载体可插入短间隔臂序列分开的编码用于终止转录的 T 串的两个反向重复(序列)。预计表达的 RNA 转录物将折叠成短发夹 siRNA。siRNA 靶序列的选择,编码推定发夹的茎干的反向重复序列的长度,该反向重复序列的顺序,编码该发夹环的间隔臂序列的长度和组成,5' - 突出物的存在与否可有所不同。此 siRNA 表达盒的优选顺序是有义链、短间隔臂序列和反义链。含不同长度茎干(例如,15-30)的发夹 siRNA 可能是合适的。连接发夹 siRNA 的有义和反义链的环可具有不同长度(例如,3-9 个核苷酸或更长)。所述载体可包含操作性连接于编码 siRNA 的核苷酸序列的启动子和表达增强子或其它调控元件。表达“调控序列”指在特定宿主生物体中表达操作性连接的编码序列所需的 DNA 序列。适合原核生物的调控序列,例如包括启动子,任选的操纵序列和核糖体结合位点。已知道真核细胞能利用的启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。可设计这些调控元件使临床医师能通过加入或控制(调控元件对其起反应的)外部因素而关闭或打开所述基因的表达。

[0064] 构建含有所需治疗基因编码序列和控制序列的合适载体可采用本领域熟知的标准连接和限制性技术(参见 Maniatis 等.,刊于《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning :A Laboratory Manual),冷泉港实验室,纽约(1982))。切割、改进分离的质粒、DNA 序列或合成的寡核苷酸,并重新连接成所需形式。

[0065] 当将某核酸与另一核酸序列置于功能相关位置时,其是“操作性连接的”。例如,如果将前序列或分泌前导序列的 DNA 操作性连接于某多肽的 DNA,可表达成参与该多肽分泌的前蛋白;如果将启动子或增强子操作性连接于编码序列,可影响该编码序列的转录;或者如果将核糖体结合位点操作性连接于编码序列则能促进其翻译。“操作性连接于”通常表示连接的 DNA 序列彼此邻近,以分泌性前导序列为例,是毗连并在阅读框中。然而,增强子不必毗连,可在方便的限制性位点处进行连接。如果不存在此类位点,可根据常规操作采用合成的寡核苷酸适体或接头。

[0066] “测定功能效应”指检测直接或间接受本发明多核苷酸或多肽影响的化合物的参数提高或降低,例如检测对物理和化学或表型的影响。可用本领域技术人员已知的任何方法检测此类功能影响,例如蛋白质的光谱学(如荧光、吸光度、折射率)、流体动力学(如形状)、色谱或溶解度特性的变化;检测蛋白质的可诱导标记物或转录激活;检测结合活性或结合试验,例如能否结合抗体;检测配体结合亲和力的变化;检测钙流入;检测本发明多肽酶促产物的累积或底物的消耗;酶促活性,例如激酶活性的变化;检测本发明多肽的蛋白质水平变化;检测 RNA 稳定性;G-蛋白质结合;GPCR 磷酸化或脱磷酸;信号转导,例如受体-配体相互作用,第二信使(例如,cAMP、IP3 或胞内 Ca^{2+}) 的浓度;鉴定下游或报道基因(CAT、萤光素酶、 β -gal、GFP 等)的表达,例如通过化学发光、荧光、比色反应、抗体结合、可诱导标记和配体结合试验检测。

[0067] 将用潜在的活化剂、抑制剂或调节剂处理的包含本发明核酸或蛋白质的样品与没有这类抑制剂、活化剂或调节剂的对照样品作比较,或用试验检测影响程度。将对照样品(未用抑制剂处理)的相对蛋白质活性值指定为 100%。当与对照相比,该活性值为约 80%,优选 50%,更优选 25-0%时,实现了抑制。当与对照(未用活化剂处理)相比,该活性值为 110%,优选 150%,更优选 200-500%(即比对照高 2-5 倍),更优选 1000-3000%或更高时,实现了活化。

[0068] “生物学样品”包括组织切片,例如活检或尸检样品,以及为组织学目的获取的冰凍切片。此类样品包括血液和血液组分或产物(例如,血清、血浆、血小板、红细胞等),痰,组织,培养的细胞,例如原代培养物,外植体和转化的细胞,粪便、尿液等。生物学样品通常获自真核生物,最优选哺乳动物,例如灵长类,如黑猩猩或人;奶牛;犬;猫;啮齿类,如豚鼠、大鼠、小鼠;兔;或鸟类;爬行动物;或鱼类。

[0069] “活检”指为诊断或预后评估目的取出组织样品的过程,也指组织标本自身。可将本领域已知的任何活检技术应用于本发明的诊断和预后方法。应用的活检技术取决于待评估组织的类型(即,前列腺、淋巴结、肝脏、骨髓、血细胞)、肿瘤的大小和类型(即,实体或悬浮(即血液或腹水))等因素。代表性的活检技术包括切除活检、切开式活检、针吸活检、外科手术活检和骨髓活检。“切除活检”指取出整个肿瘤块及其周围的少量边缘正常组织。“切开式活检”指取出包括肿瘤截面直径的楔形组织。通过内窥镜检查或荧光法进行诊断或预后可能需要肿瘤块的“芯针活检”或“细针抽吸活检”,通常可获得肿瘤块内的细胞悬液。活检技术的讨论可参见,例如《哈里森内科学原理》(Harrison's Principles of Internal Medicine),Kasper 等编.,第 16 版.,2005,第 70 章和整个第 V 部分。

[0070] 对于两条或多条核酸或多肽序列,术语“相同”或“相同性百分数”指采用默认参数的 BLAST 或 BLAST 2.0 序列比较算法检测,或通过手工比对和目测,检查到两条或多条序列或子序列含有相同的或一定百分数相同的氨基酸残基或核苷酸(即,当在比较窗口或指定区域上比较和比对最大对应性时,在指定区域上约有 60%相同,优选 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同)(参见,例如 NCBI 网址 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 等)。然后称此类序列“基本相同”。该定义也指或适用于测试序列的互补序列。该定义还包括含有缺失和/或添加的序列以及含取代的那些序列。如下所述,该优选算法考虑了空位等。优选在长度至少约 25 个氨基酸或核苷酸的区域上存在相同性,或者更优选在长 50-100 个氨基酸或核苷酸的区域上存在

相同性。

[0071] 对于序列比较,一般将一条序列用作与测试序列相比的参比序列。采用序列比较算法时,将测试和参比序列均输入计算机,如果必要指定子序列坐标,指定序列算法程序的参数。优选采用默认的程序参数,或者可指定另选的参数。然后,该序列比较算法根据程序参数计算出测试序列相对于参比序列的序列相同性百分数。

[0072] 本文所用的“比较窗口”包括参比选自 20-600 个,通常约 50-200 个,更常约 100-150 个毗连位置任一数量的区段,其中对两个序列进行最优比对后,将序列与毗连位置数量相同的参比序列作比较。本领域熟知比对序列比较的方法。可用以下算法对所比较的序列进行最佳比对,例如 Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2 :482(1981) 的局部同源性算法, Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48 :443(1970) 的同源性比对算法, Pearson 和 Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85 :2444(1988) 的检索相似性的算法,用计算机执行这些算法 (GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA,威斯康星遗传学软件包 (Wisconsin Genetics Software Package),遗传学计算机小组 (Genetics Computer Group),575 Science Dr.,麦迪逊,威斯康星州) 或手工比对和目测观察 (参见,例如《最新分子生物学方案》(Current Protocols in Molecular Biology) (Ausubel 等编,1995 增补))。

[0073] 适合测定序列相同性和序列相似性百分比的优选算法的例子是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,它们的描述分别见 Altschul 等., *Nuc. Acids Res.* 25 :3389-3402(1977) 和 Altschul 等., *J. Mol. Biol.* 215 :403-410(1990)。采用 BLAST 和 BLAST 2.0 及本文所述参数可确定本发明核酸和蛋白质的序列相同性百分数。进行 BLAST 分析的软件可从公众渠道国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 获得 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)。该算法包括,首先通过鉴定查询序列中长度 W 的短字来鉴定高评分序列对 (HSP),该短字与数据库序列中相同长度的字排列比对时,能匹配或满足一些正阈值评分 T。T 称为相邻字评分阈值 (Altschul 等,同上)。将这些命中的初始相邻字用作启动搜索,以寻找含有它们的更长的 HSP 种子。沿各序列两个方向上延伸该字命中,直到累积的比对评分增加。对于核苷酸序列,采用参数 M (一对匹配残基的奖励分;总是 > 0) 和 N (错配残基的罚分;总是 < 0) 计算出累积评分。对于氨基酸序列,用评分矩阵计算累积评分。在以下情况出现时中止字命中在各个方向上的延伸:累积比对评分从其最大获得值跌落 X 时;由于一个或多个负评分残基比对的累积,累积评分变为零或零以下时;或者到达两序列的末端。BLAST 算法的参数 W、T 和 X 决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 采用的默认值如下:字长 (W) = 11,期望值 (E) = 10, M = 5, N = -4, 以及比较两条链。对于氨基酸序列, BLASTP 程序采用的默认值为:字长 = 3,期望值 (E) = 10, BLOSUM62 评分矩阵 (参见 Henikoff 和 Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 :10915(1989)) 比对 (B) = 50,期望值 (E) = 10, M = 5, N = -4, 以及比较两条链。

[0074] “核酸”指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物和互补体。该术语包括含有已知的核苷酸同类物或修饰的主链残基或连接键的核酸,它们是合成、天然产生的和非天然产生的,它们的结合特性与参比核酸类似,代谢方式与参比核苷酸类似。此种同类物的例子包括但不限于:硫代磷酸酯、氨基磷酸酯 (phosphoramidates)、磷酸甲酯、手性 - 磷酸甲酯、2-O- 甲基核糖核苷酸、肽 - 核酸 (PNA)。

[0075] 除非另有说明,具体核酸序列也包括其保守性修饰变体 (如,简并密码子取代) 和

互补序列以及明确指出的序列。具体说,可通过在一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置用混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代产生的序列,而实现简并密码子取代(Batzer等, *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991); Ohtsuka等, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985); Rossolini等, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。术语核酸与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸和多核苷酸可互换使用。

[0076] 具体核酸序列还隐含包括“剪接变体”。类似地,核酸编码的具体蛋白质隐含包括该核酸剪接变体编码的任何蛋白质。如其名称所提示的那样,“剪接变体”是基因另路剪接的产物。转录后,可剪接最初的核酸转录物,从而产生不同的(交替)剪接核酸产物编码的不同多肽。产生剪接变体的机制可有所不同,但包括外显子的交替剪接。该定义还包括通过通读转录从同一核酸产生的其它多肽,包括剪接反应的任何产物,包括剪接产物的重组形式。钾通道剪接变体的例子见 Leicher等, *J. Biol. Chem.* 273(52):35095-35101(1998)。

[0077] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于一个或多个氨基酸残基是相应天然产生氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然产生的氨基酸聚合物和非天然产生的氨基酸聚合物。

[0078] 术语“氨基酸”指天然产生的和合成的氨基酸,以及以类似于天然产生氨基酸的方式起作用的氨基酸同类物和氨基酸模拟物。天然产生的氨基酸是遗传密码编码的氨基酸,以及随后修饰的氨基酸,如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸同类物指与天然产生的氨基酸具有相同的基本化学结构,即 α 碳结合于氢、羧基、氨基和R基团的化合物,如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类同类物含有修饰的R基团(如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留了天然产生氨基酸的相同基本化学结构。氨基酸模拟物指结构不同于氨基酸的一般化学结构,但功能类似于天然产生氨基酸的化学化合物。

[0079] 在本文中,氨基酸用IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的通用三字母码或单字母码表示。同样,核苷酸用其普遍接受的单字母码表示。

[0080] “保守性修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。对于特定的核酸序列,保守性修饰变体指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸,或者当核酸不编码氨基酸序列时,指基本相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸可编码任何一种给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码丙氨酸。因此,在密码子确定为丙氨酸的每个位置上,可将密码子改变为所述的任何相应密码子而不会改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,是保守性修饰变异的一种。本文所述的编码多肽的每种核酸序列也描述了该核酸的每种可能的沉默变异。本领域技术人员知道,可修饰核酸中的各密码子(除了AUG和TGG外,AUG通常是甲硫氨酸的唯一密码子,TGG通常是色氨酸的唯一密码子),而产生功能相同的分子。因此,就表达产物而非实际探针序列而言,编码多肽的核酸的各沉默变异隐含在所述各序列中。

[0081] 对于氨基酸序列,本领域技术人员明白,可对核酸、肽、多肽或蛋白质序列进行单个取代、缺失或加入,而改变、加入或删除所编码序列中一个氨基酸或少量百分比的氨基酸,是“保守性修饰变体”,其中所述改变导致某氨基酸被化学性质相似的氨基酸所取代。本领域熟知可提供功能相似氨基酸的保守性取代表。此类保守性修饰的变体包括但不排除本发明的多态性变体、种间同源物和等位基因。

[0082] 以下八组各含有彼此可保守性取代的氨基酸：1) 丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)；2) 天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E)；3) 天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)；4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K)；5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V)；6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)；7) 丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)；和 8) 半胱氨酸 (C)、甲硫氨酸 (M) (参见, 例如 Creighton, 《蛋白质》(1984))。

[0083] “标记物”或“可检测部分”是可用光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理方法检测的组份。例如, 有用的标记物包括 ^{32}P 、荧光染料、电子致密试剂、酶 (例如, ELISA 中常用的)、生物素、地高辛或半抗原和可制成可检测试剂的蛋白质, 例如将放射性标记物掺入肽中, 或用于检测能与该肽特异性反应的抗体。

[0084] 用于 (例如) 细胞或核酸、蛋白质或载体时, 术语“重组”表示该细胞、核酸、蛋白质或载体已通过引入异源核酸或蛋白质而被修饰, 或天然核酸或蛋白质已被改变, 或者该细胞衍生自如此修饰的细胞。因此, 例如重组细胞可表达天然 (非重组) 形式细胞中未发现的基因, 或异常表达、表达不足或根本不表达天然基因。

[0085] 当用于核酸诸部分时, 术语“异源”指该核酸包含在天然状态下彼此没有关系的两个或多个子序列。例如, 重组产生的核酸一般含有两个或多个无关基因的序列, 例如一个来源的启动子和另一来源的编码区, 它们排列构成了新的功能性核酸。相似地, 异源蛋白表示该蛋白包含天然状态下彼此没有关系的两个或多个子序列 (如融合蛋白)。

[0086] 术语“严格杂交条件”指通常在核酸的复杂混合物中, 探针与其目标子序列杂交, 但不与其他序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的, 不同情况下不同。较长的序列能在较高温度下特异性杂交。核酸杂交的详细指南参见 Tijssen, 《生物化学和分子生物学技术——与核酸探针杂交》(Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes), “核酸测定的杂交原理和方案综述” (Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays) (1993)。严格条件通常选择比特定序列在指定离子强度、pH 下的解链温度 (T_m) 低约 5–10°C。 T_m 是 50% 靶标互补探针与靶序列杂交平衡时的温度 (在指定离子强度、pH 和核酸浓度下) (由于靶序列过量, 在 T_m 时 50% 探针平衡地占据)。也可加入去稳定剂, 如甲酰胺获得严格条件。对于选择性或特异性杂交, 阳性信号至少是背景信号的两倍, 优选 10 倍。示范性的严格杂交条件如下: 50% 甲酰胺、5x SSC 和 1% SDS, 42°C 培育, 或者 5x SSC、1% SDS、65°C 培育, 用 0.2xSSC 和 0.1% SDS 在 65°C 洗涤。

[0087] 如果编码的多肽基本相同, 那么在严格条件下彼此不杂交的核酸仍然基本相同。例如, 利用遗传密码子所允许的最大密码子简并性产生核酸拷贝时可能发生这种情况。在这种情况下, 所述核酸一般能在中等严格的杂交条件下杂交。示范性“中等严格杂交条件”包括 37°C, 在 40% 甲酰胺、1MNaCl、1% SDS 的缓冲液中杂交, 45°C, 1x SSC 洗涤。阳性杂交信号至少是背景的两倍。本领域普通技术人员不难认识到, 可利用其他杂交和洗涤条件提供类似严格性的条件。测定杂交参数的其它指南可参见许多参考文献, 例如《最新分子生物学方案》(Current Protocols in Molecular Biology), Ausubel 等编., 约翰韦利父子公司 (John Wiley&Sons)。

[0088] 对于 PCR, 低严格性扩增的典型温度约为 36°C, 但退火温度可根据引物长度在约 32°C–48°C 之间变动。对于高严格性 PCR 扩增, 典型温度约为 62°C, 但高严格性退火温度根

据引物长度和特异性范围可以是约 50℃ -65℃。高严格性和低严格性扩增的典型循环条件包括变性阶段 90℃ -95℃, 30 秒 -2 分钟, 退火阶段持续 30 秒 -2 分钟, 72℃ 延伸阶段约 1-2 分钟。低和高严格性扩增反应的方案和指南可参见, 例如 Innis 等. (1990) 《PCR 方案: 方法和应用指南》(PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications), 学术出版社 (Academic Press, Inc.) 纽约)。

[0089] “抗体”指能特异性结合并识别抗原, 包含来自免疫球蛋白基因框架区的多肽或其片段。公知的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因, 以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 κ 或 λ 。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ , 进而分别定义了免疫球蛋白类型 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。抗体的抗原结合区通常对结合的特异性和亲和力至关重要。

[0090] 示范性的免疫球蛋白 (抗体) 结构单元包含四聚体。每个四聚体由相同的两对多肽链组成, 各对有一条“轻链” (约 25kD) 和一条“重链” (约 50-70kD)。各链的 N 末端为约 100-110 或更多个氨基酸的可变区, 主要负责抗原识别。术语轻链可变区 (V_L) 和重链可变区 (V_H) 分别指这些轻链和重链。

[0091] 存在的抗体可以是完整的免疫球蛋白, 或它们的用不同肽酶消化产生的许多特征已知的片段。因此, 例如, 胃蛋白酶可在铰链区中二硫键下方消化抗体产生 $F(ab')_2$, Fab 的二聚体, 其本身是由二硫键连接于 V_H - C_H1 的轻链。可在温和条件下还原 $F(ab')_2$ 打断铰链区的二硫键, 将 $F(ab')_2$ 二聚体转变为 Fab' 单体。Fab' 单体主要是含部分铰链区的 Fab (参见《基础免疫学》(Fundamental Immunology) (Paul 编., 第 3 版 1993)。虽然根据完整抗体的消化定义了各种抗体片段, 但是本领域技术人员知道, 也可用化学方法或通过重组 DNA 方法从头合成此类片段。因此, 本文所用的术语抗体还包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段, 或采用重组 DNA 方法从头合成的那些片段 (例如, 单链 Fv) 或利用噬菌体展示文库鉴定的那些片段 (参见, 例如 McCafferty 等., Nature 348 :552-554(1990))。

[0092] 为制备本发明的适合抗体和本发明的应用, 可采用本领域已知的许多技术制备 (例如) 重组的单克隆或多克隆抗体 (参见, 例如 Kohler 和 Milstein, Nature 256 : 495-497(1975); Kozbor 等., Immunology Today 4 :72(1983); Cole 等., 第 77-96 页, 刊于《多克隆抗体和癌症治疗》(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy), Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, 《免疫学最新方法》(Current Protocols in Immunology) (1991); Harlow 和 Lane, 《抗体, 实验室手册》(Antibodies, A Laboratory Manual) (1988); 和 Goding, 《多克隆抗体: 原理和实践》(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice) (第 2 版. 1986))。可克隆细胞的编码感兴趣抗体的重链和轻链的基因, 例如可克隆杂交瘤的编码多克隆抗体的基因, 用于产生重组单克隆抗体。也可从杂交瘤或浆细胞制备编码单克隆抗体的重链和轻链的基因文库。重链和轻链基因产物的随机组合可产生具有不同抗原特异性的抗体集合 (参见, 例如 Kubly, 《免疫学》(Immunology) (第 3 版. 1997))。可采纳产生单链抗体或重组抗体的技术 (美国专利 4, 946, 778, 美国专利 4, 816, 567) 来产生本发明多肽的抗体。也可用转基因小鼠或其它生物, 例如其它哺乳动物来表达人源化抗体或人抗体 (参见, 例如美国专利号 5, 545, 807; 5, 545, 806; 5, 569, 825; 5, 625, 126; 5, 633, 425; 5, 661, 016; Marks 等., Bio/Technology 10 :779-783(1992); Lonberg 等., Nature 368 :856-859(1994); Morrison, Nature 368 :812-13(1994); Fishwild 等., Nature

Biotechnology 14:845-51(1996);Neuberger, Nature Biotechnology 14:826(1996); Lonberg 和 Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93(1995))。或者,可采用噬菌体展示技术鉴定能特异性结合所选抗原的抗体和异质 Fab 片段(参见,例如 McCafferty 等., Nature 348:552-554(1990);Marks 等., Biotechnology 10:779-783(1992))。还可将抗体制成双特异性抗体,即能识别两种不同抗原的抗体(参见,例如 WO 93/08829, Traunecker 等., EMBO J. 10:3655-3659(1991);和 Suresh 等., Methods in Enzymology 121:210(1986))。所述抗体也可以是异质偶联物,例如两个共价连接的抗体或免疫毒素(参见,例如美国专利号 4,676,980;WO 91/00360;WO 92/200373;和 EP 03089)。

[0093] 本领域熟知人源化或灵长类化非人抗体的方法。人源化抗体中通常含有引入的非人来源的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常称为输入残基,通常取自输入的可变区。基本上可按照 Winter 和同事的方法(参见,例如 Jones 等., Nature 321:522-525(1986);Riechmann 等., Nature 332:323-327(1988);Verhoeyen 等., Science 239:1534-1536(1988)和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)),用啮齿类的 CDR 或 CDR 序列取代人抗体的相应序列进行人源化。因此,此类人源化抗体是嵌合型抗体(美国专利号 4,816,567),其中明显小于完整的人可变区被非人物种的相应序列取代。实际上,人源化抗体通常是一些 CDR 残基和可能一些 FR 残基被啮齿类抗体中同类位点的残基取代的人抗体。

[0094] “嵌合型抗体”是一种抗体分子,其中:(a) 其恒定区或一部分经过改变、替换或交换,使其抗原结合位点(可变区)连接于类别、效应功能和/或物种不同或改变的恒定区,或连接于能赋予该嵌合型抗体新特性的完全不同的分子,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或(b) 其可变区或一部分经过改变、替换或交换,使其可变区具有不同的或改变的抗原特异性。本发明的优选抗体和应用包括人源化和/或嵌合型单克隆抗体。

[0095] 在一个实施方式中,将所述抗体偶联于“效应”部分。效应部分可以是任何数量的分子,包括标记部分,例如放射性标记物或荧光标记物,或者可以是治疗分子。一方面,所述抗体可调节蛋白质的活性。此类效应分子包括但不限于:抗肿瘤药物、毒素、放射性试剂、细胞因子、二抗或酶。此外,本发明提供一种实施方式,其中将本发明抗体连接于能将前药转化成细胞毒制剂的酶。

[0096] 可利用所述免疫偶联物使效应器靶向 N-钙黏着蛋白阳性细胞,特别是表达 N-钙黏着蛋白或 Ly6 的细胞。当观察大致类似加载量的测试和对照样品的凝胶条带时,不难看出此种差异。细胞毒制剂的例子包括但不限于:蓖麻毒蛋白、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟蒽蒽菌素二酮、放线菌素 D、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒蛋白和糖皮质激素及其它化疗剂和放射性同位素。合适的可检测标记包括但不限于:放射性同位素、荧光化合物、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合剂或酶。

[0097] 在一些实施方式中,本发明提供 N-钙黏着蛋白的抗体。可单独或与效应器偶联,全身性应用 N-钙黏着蛋白抗体以治疗癌症(例如前列腺癌或膀胱癌)。偶联毒性试剂,例如蓖麻毒蛋白的 N-钙黏着蛋白抗体,以及未偶联的抗体可以是天然靶向携带 N-钙黏着蛋白的前列腺癌细胞的有用治疗剂。可用此类抗体来阻断侵袭性。用于本发明的合适 N-钙黏着蛋白抗体包括但不限于:GC41H7、1F12、2B3。

[0098] 此外,可用包含本发明任何单克隆抗体的抗原结合区的本发明重组蛋白来治疗癌症。在此类情况中,该重组蛋白的抗原结合区连接于具有治疗活性的第二蛋白的至少一个功能活性部分。所述第二蛋白质可包括但不限于:酶、淋巴因子、抑瘤素或毒素。合适的毒素包括阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟炭疽菌素二酮、放线菌素 D、白喉毒素、假单胞菌外毒素 (PE)A、PE40、蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、糖皮质激素和放射性同位素。

[0099] 将治疗剂偶联于抗体的技术是熟知的(参见,例如 Arnon 等., " 癌症治疗中用于药物免疫靶向的单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy) ", 刊于《单克隆抗体和癌症治疗》(Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy), Reisfeld 等. (编), 第 243-56 页 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等., " 用于药物递送的抗体 (Antibodies For Drug Delivery) " 刊于《受控药物递送》(Controlled Drug Delivery) (第 2 版), Robinson 等. (编), 第 623-53 页 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, " 癌症治疗中细胞毒性剂的抗体运载体综述 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review) " 刊于《单克隆抗体' 84: 生物学和临床应用》(Monoclonal Antibodies ' 84: Biological And Clinical Applications), Pinchera 等. (编), 第 475-506 页 (1985); 和 Thorpe 等., " 抗体-毒素偶联物的制备和细胞毒特性 (The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates) ", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982))。

[0100] 短语“特异性(或选择性)结合”于抗体或与之“特异性(或选择性)免疫反应”指蛋白质或肽时,指测定蛋白质是否存在的结合反应,常是在蛋白质和其它生物物质的异质群体中的结合反应。因此,在指定的免疫试验条件下,指定抗体与特定蛋白质的结合(信号)至少是背景的两倍,更常超过背景 10 倍到 100 倍。在此类条件下特异性结合于抗体要求所选抗体对特定蛋白质具有特异性。例如,可选择多克隆抗体,从而仅获得能与所选抗原而非其他蛋白质特异性免疫反应的那些多克隆抗体。可通过扣除能与其他分子交叉反应的抗体而实现这种选择。可采用各种形式的免疫测定以选择能与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。例如,常规采用固相 ELISA 免疫测定来选择能与蛋白质特异性免疫反应的抗体(参见,例如可用于测定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述见 Harlow 和 Lane, “利用抗体, 实验室手册”(Using Antibodies, A Laboratory Manual) (1998))。

[0101] 本文的“治疗有效剂量或用量”表示给予的剂量产生了所需效应。精确剂量和制剂取决于治疗目的,本领域技术人员可用已知技术确定这种剂量(参见,例如 Lieberman, 《药物剂型》(Pharmaceutical Dosage Forms) (第 1-3 卷, 1992); Lloyd, 《药物配制的领域、科学和技术》(The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding) (1999); 《雷明顿: 药学的科学和实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy), 第 20 版, Gennaro 编, (2003), 和 Pickar, 《剂量计算》(Dosage Calculations) (1999))。

[0102] 术语“药学上可接受的盐”或“药学上可接受的运载体”表示包括根据本文所述化合物上发现的具体取代基,用相对无毒的酸或碱制备的活性化合物的盐。当本发明化合物含有相对酸性的官能团时,可使中性形式的此类化合物接触足量的所需碱来获得碱加成盐,所述碱可以是纯碱或溶于合适的惰性溶剂中。药学上可接受的碱加成盐的例子包括钠盐、钾盐、钙盐、铵盐、有机氨基酸盐或镁盐,或类似盐。本发明化合物含有相对碱性的官

能团时,可使中性形式的此类化合物接触足量的所需酸来获得酸加成盐,所述酸可以是纯酸或溶于合适的情性溶剂中。药学上可接受的酸加成盐的例子包括:衍生自无机酸的盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、硝酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐,磷酸盐、磷酸氢盐,磷酸二氢盐、硫酸盐、硫酸氢盐、氢碘酸盐或亚磷酸盐等,以及衍生自相对无毒的有机酸的盐,如乙酸盐、丙酸盐、异丁酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、延胡索酸盐、乳酸盐、扁桃酸盐、邻苯二甲酸盐、苯磺酸盐、对甲基苯磺酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐等。也包括氨基酸如精氨酸等的盐,和有机酸如葡糖醛酸或半乳糖醛酸等的盐(参见例如, Berge 等, *Journal of Pharmaceutical Science* 66:1-19(1977))。本发明的某些特定化合物含有能够使该化合物转变为碱或酸加成盐的碱性和酸性官能团。本领域技术人员知道适合用于本发明的其它药学上可接受的运载体。

[0103] 可使所述盐与碱或酸接触,以常规方法分离母体化合物,而再生中性形式的该化合物。该化合物母体形式的某些物理特性(例如在极性溶剂中的溶解度)与各种形式的盐有别,但对于本发明的目的,这种盐等同于该化合物的母体形式。

[0104] 除盐形式外,本发明还提供前药形式的化合物。本文所述化合物的前药是在生理学条件下不难通过化学改变而提供本发明化合物的那些化合物。此外,在离体环境下,可通过化学或生化方法将前药转变为本发明化合物。例如,放置在含有合适酶或化学试剂的透皮贴片储库中时,前药可缓慢转变为本发明化合物。

[0105] 本发明的某些化合物可存在非溶剂化形式以及溶剂化形式,包括水合形式。通常,溶剂化形式等同于非溶剂化形式,均包括在本发明范围内。本发明某些化合物可存在多晶型或无定形式。通常,在本发明所考虑的应用中所有物理形式等价,均包括在本发明范围内。

[0106] 本发明的某些化合物可含有不对称碳原子(光学中心)或双键;其外消旋物、非对映体、几何异构体和单个异构体均包括在本发明范围内。

[0107] 上皮向间充质转变(EMT)指上皮肿瘤细胞获得了基质特征。在癌症中,EMT与侵袭性和能动行为(motile behavior)相关,可能是癌转移的基础核心过程。EMT与预后不良相关,由多种转录因子,例如 SNAIL、SLUG 和 TWIST 介导。

[0108] E-钙黏着蛋白是参与上皮细胞间粘附的一种细胞表面蛋白,它在侵袭性和转移性实体瘤中常丢失。

[0109] 详细实施方式

[0110] 本发明提供治疗癌症患者的方法。所述方法通常包括以下步骤:(a)获得有患表达 N-钙黏着蛋白癌症风险个体的测试组织样品;(b)测定所述测试组织样品中 N-钙黏着蛋白存在与否或含量,与已知该癌症阴性的个体的对照组织样品作比较;藉此诊断表达 N-钙黏着蛋白的所述癌症,其中 N-钙黏着蛋白以正常或低水平表达,或由细胞亚组表达和未过表达;和(c)将有效量的 N-钙黏着蛋白抗体给予具有患表达 N-钙黏着蛋白的癌症风险的个体。所述组织样品通常是血清,但也可以是活检组织,特别是泌尿生殖道组织,包括前列腺组织或膀胱组织。所述抗体通常是单克隆抗体。诊断为表达 N-钙黏着蛋白或 mRNA 转录物的癌症阳性,表示与已知未患癌症个体的对照组织样品相比,测试组织样品中检测到较高水平的 N-钙黏着蛋白,例如高 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2-倍、3-倍、4-倍或更高。可采用本领域已知的标准 ELISA 技术实施这种检测(综

述见 Gosling,《免疫测定:实用方案》(Immunoassays:A Practical Approach),2000,牛津大学出版社)。通过采用,例如放射性同位素、荧光标记物、酶或本领域已知的任何其他可检测标记物标记一抗或二抗来实现这种检测。

[0111] 在另一实施方式中,通过以下方式实施这种检测方法:使表达 N- 钙黏着蛋白或 mRNA 转录物的患者测试组织样品接触各自与 N- 钙黏着蛋白核酸特异性杂交的第一寡核苷酸和第二寡核苷酸的引物组;扩增所述样品中的 N- 钙黏着蛋白核酸;和测定该测试组织样品中是否存在 N- 钙黏着蛋白核酸,与已知的表达 N- 钙黏着蛋白或 mRNA 转录物癌症为阴性个体的对照组织样品作比较。所述组织样品通常也是血清,但也可以是活检组织,特别是泌尿生殖道组织,包括前列腺或膀胱组织。诊断为表达 N- 钙黏着蛋白或 mRNA 转录物的癌症阳性,表示与已知未患癌症个体的对照组织样品相比,测试组织样品中检测到较高水平的 N- 钙黏着蛋白转录 RNA。

[0112] 这些方法尤其可应用于治疗前列腺癌和膀胱癌。在某些实施方式中,所述方法可应用于激素难治或治疗耐受的癌症。在某些实施方式中,所述方法可应用于转移性癌。例如,可利用 N- 钙黏着蛋白和 / 或 mRNA 差异性表达的比较来测定患有表达 N- 钙黏着蛋白或 mRNA 转录物癌症个体的癌症所处阶段。

[0113] 治疗通常包括通过可接受的给药途径,例如静脉内注射 (IV) 反复给予有效剂量的抗 N- 钙黏着蛋白抗体。剂量取决于本领域技术人员通常知道的各种因素,包括但不限于:癌症类型和严重程度,癌症的等级或阶段、所用制剂的结合亲和力和半衰期,患者的 N- 钙黏着蛋白表达程度,脱落的循环性 N- 钙黏着抗原的含量,所需的稳态抗体浓度水平,治疗频率和与本发明治疗方法联用的化疗剂的影响。每日剂量范围约 0.1-100mg/kg,每周剂量范围约为 10-500mg 的 mAb 可能有效和良好耐受,虽然甚至更高的每周剂量也可能适合和 / 或良好耐受。决定合适剂量的主要决定因素是具体情况中有效治疗所需的特定制剂的用量。可能需要反复给药以实现肿瘤的抑制或消退。初始负荷剂量可能较高。可输注给予初始负荷剂量。可类似地给予周期维持剂量,只要初始剂量良好耐受。

[0114] 也可直接给予所述制剂,在某些情况下可能有利。例如,对于治疗膀胱癌,可将所述制剂直接注射入膀胱。由于直接给予膀胱的制剂可被患者快速清除,采用非人抗体或嵌合型抗体可能有效,而没有抗原性导致的明显并发症。

[0115] 在一些实施方式中,本发明提供治疗癌症,特别是表达 N- 钙黏着蛋白的癌症,或抑制表达 N- 钙黏着蛋白的癌细胞生长的方法,所述方法通过用抑制癌细胞生长有效量的能识别 / 结合 N- 钙黏着蛋白的抗体或其片段治疗对象,或使癌细胞与抑制癌细胞生长有效量的能识别 / 结合 N- 钙黏着蛋白的抗体或其片段接触。在一些实施方式中,所述癌细胞是前列腺癌细胞或膀胱癌细胞。所述接触的抗体可以是单克隆抗体和 / 或嵌合型抗体。在一些实施方式中,所述嵌合型抗体包含人免疫球蛋白恒定区。在一些实施方式中,所述抗体是人抗体或包含人免疫球蛋白恒定区。在进一步的实施方式中,所述抗体片段包括 Fab、F(ab)₂ 或 Fv。在其它实施方式中,所述片段包括含有抗原结合区的重组蛋白。

[0116] 在任何一种上述实施方式中,也可给予化疗药物和 / 或放疗。在一些实施方式中,患者还接受激素拮抗剂治疗。可将所述抗体经静脉内、腹膜内、肌肉内、肿瘤内或真皮内给予患者,而使患者与所述抗体或抗体片段接触。在一些实施方式中,所述患者患有泌尿生殖道癌症(例如,膀胱癌、前列腺癌)。在上述一些实施方式中,所述患者患有前列腺癌,任选

患者接受激素消融治疗 (patient hormone ablation therapy)。在一些实施方式中,所述接触包括将所述抗体直接给予注射入癌症或癌转移灶。

[0117] 在一些实施方式中,本发明提供治疗癌症患者的方法。该方法通常包括:(a) 获得有患表达 N- 钙粘蛋白癌症风险个体的测试组织样品;(b) 测定所述测试组织样品中 N- 钙黏着蛋白存在与否或含量,与已知该癌症阴性个体的对照组织样品作比较;藉此诊断表达 N- 钙黏着蛋白的所述癌症,其中 N- 钙黏着蛋白以正常或低水平表达,或由细胞亚组表达和未过表达;(c) 测定癌症是否可能变为侵袭性、转移、激素不依赖性 or 难治;(d) 按照该癌症变为侵袭性、转移、激素不依赖性 or 难治的可能性确定是否增加给予化疗剂、免疫治疗剂、激素治疗或放疗。

[0118] 在一些实施方式中,所述化疗剂可选自:蓖麻毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A 链、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙 (tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟炭疽菌素二酮、放线菌素 D、白喉毒素、假单胞菌外毒素 (PE)A、PE40、相思豆毒蛋白、相思豆毒蛋白 A 链、莨菪根毒素 A 链、 α - 帚曲菌素、白树毒素、迈托毒素 (mitogellin)、局限曲霉素、酚霉素、依诺霉素、麻疯树逆境蛋白 (curicin,)、巴豆毒蛋白、刺孢霉素、肥皂草 (*saponaia officinalis*) 抑制剂、类美坦西醇和糖皮质激素。

[0119] 本发明还提供鉴定癌症干细胞的方法。所述方法通常包括以下步骤:(a) 获得具有患表达 N- 钙粘蛋白癌症风险个体的测试组织样品;(b) 测定该测试组织样品中癌症干细胞存在与否,与已知癌症阴性个体的对照组织样品作比较;其中 N- 钙黏着蛋白以正常或低水平表达,或者由所述干细胞的亚组表达和未过表达。

[0120] 在一些实施方式中,本发明包括能结合 N- 钙黏着蛋白胞外结构域 4 的单克隆抗体或其片段,其包含以下氨基酸序列:

[0121] SEQ ID NO :1:MAQVQLVQSGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRHAMIWVRQAPGKGLEWVSSISGSS DSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCAKATGYSYYGMDVWGPGTTTVTVSSGGGGSGGGGSG GGSIDIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYGATTLQHGVPSRFSGSGSGTDFSL TISSLPEDFAIYFCQQAHSPPTFGGGTKLEIKR。

[0122] 在一些实施方式中,本发明包括能结合 N- 钙黏着蛋白的胞外结构域 1-3 的单克隆抗体或其片段,其包含选自下组的氨基酸序列:

[0123] SEQ ID NO 2:MAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTSYIHWVRQAPGQGFQEWMIINPSG GSASYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELRSLR

[0124] SEQ ID NO 3:MAQVQLQESGWYFDLWGRGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLSQGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCLQDYN GWTFGGQTKVEIKR

[0125] SEQ ID NO 4:MAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG RVKSYADAVKGRFTISRDNSENILYVQIDSLRVEDTAVYYCARRGGDHAAGMDVWGQTTTVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGGRSDIGGYNYSWYQQHPGKAPKLMIDVGNRPSGVSNRFSGSKSGNT

[0126] SEQ ID NO 5:MAPGAAGGVGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTXVYYCARLEYSSSSRAFDVWGQTTTVTVSSGGGGSGGGGSG GGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTI TGAQAEDADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVLG

[0127] SEQ ID NO 6 :MAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF

[0128] SEQ ID NO 7 :MAQVQLVQSGAEVKRPGASVRISCKASGYPTTYPPIHWVRQAPGQGLEWMGINPNS
GATKNVQKFQGRVTMTADTSIRTAYMELSRLTSDDTAVYYCARGEGDTGSYLGGYWGLGLTVTVSSGGGSGGGGSG
GGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGRAPLLVIYGKNIRPSGIPDRFSGSSSGNSASLTI
TGAQAEDADYYCNSRDRSGNYLFGVGTKVTVLG

[0129] SEQ ID NO 8 :MAQVQLVQSGAEVKKPGESLEISCKGSGYSFANNWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGD
SDVRYRSRFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHRVAYSGYDAFDIWGQGTMTVTS SGGGSGGGG
SGGGSSVLTDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYPSWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASL
TITGAQAEDADYYCHSRDRSGNQVLFGGGTKVTVLG

[0130] SEQ ID NO 9 :MAQVQLVQSGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG
SNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGEGGVWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSD
IVMTQSPSTLSAS。

[0131] 在一些实施方式中,本发明提供能结合 N- 钙黏着蛋白的胞外结构域 1-3 或 N- 钙黏着蛋白的胞外结构域 4 的抗体片段,其中所述片段是 scFv。在一些实施方式中,本发明提供能结合 N- 钙黏着蛋白的胞外结构域 1-3 或 N- 钙黏着蛋白的胞外结构域 4 的抗体片段,其中所述片段是双抗体。为产生双抗体,用 SGGGS 替换接头 SGGGSGGGGSGGGGS。

[0132] 给药和配制方法

[0133] 按照已知方法,例如经静脉内给药(如推注)或输注一段时期,经肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径将抗-N-钙黏着蛋白抗体或免疫偶联物给予人患者。优选静脉内或皮下给予所述抗体。给药可以是局部或全身性给药。

[0134] 给予的组合物通常包含溶解于药学上可接受的运载体,优选水性运载体的本文所述制剂(例如,N-钙黏着蛋白抑制剂、N-钙黏着蛋白抗体和免疫偶联物,N-钙黏着蛋白 siRNA 和其载体)。可采用各种水性运载体,例如缓冲盐水等。这些溶液应无菌,通常不含有害物质。这些组合物可用常规的熟知灭菌技术灭菌。该组合物可含有模拟生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,如 pH 调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如,乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的活性剂浓度可有很大不同,主要根据液体体积、粘度、体重等因素,按照所选的具体给药方式和患者需要而选择。

[0135] 因此,静脉内给予的典型药物组合物根据药物而不同。本领域技术人员知道胃肠道外给予组合物的实际制备方法,这些方法在例如《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science),第15版.,马克出版公司(Mack Publishing Company),伊斯顿,宾夕法尼亚州。(1980)等出版物中有更详细描述。

[0136] 根据给药方法,可给予各种单位剂型的所述药物组合物。例如,适合口服给予的单位剂型包括但不限于:粉末、片剂、丸剂、胶囊和锭剂。口服给予时,应明白要保护抗体免遭消化。这通常可通过以下方式实现:用能赋予分子耐受酸水解和酶水解的组合物将所述分子配制成复合物,或将所述分子包装在适当耐受的运载体,例如脂质体或保护屏障中。本领域熟知保护制剂免遭消化的方法。

[0137] 具体地说,将具有所需纯度的抗体与任选的药学上可接受的运载体、赋形剂或稳定剂混合,制备包含本发明所用的抗体和免疫偶联物及抑制剂的药物制剂。此类制剂可以是冻干制剂或水性溶液。可接受的运载体、赋形剂或稳定剂所用的剂量和浓度应对受者无

毒。可接受的运载体、赋形剂或稳定剂可以是：乙酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸盐；抗氧化剂（例如，抗坏血酸）、防腐剂、低分子量多肽；蛋白质，例如血清白蛋白或明胶，或亲水性聚合物，例如聚乙烯基吡咯烷酮（polyvinylpyrrolidone）；和氨基酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂；离子和非离子表面活性剂（例如，聚山梨酯）；成盐抗衡离子，例如钠；金属复合物（例如，Zn-蛋白复合物）；和/或非离子型表面活性剂。可将所述抗体配制成 0.5-200mg/ml 或 10-50mg/ml 浓度。

[0138] 所述制剂也可提供其它活性化合物，包括化疗剂、细胞毒性剂、细胞因子、生长抑制剂和抗-激素剂。也可将所述活性成分制备成缓释制品（例如，固体疏水性聚合物（例如，聚酯，水凝胶（如聚（2-羟乙基-甲基丙烯酸酯）或聚（乙烯醇））、聚丙交酯的半通透基质）。还可将所述抗体和免疫偶联物包裹在用（例如）凝聚技术或界面聚合技术制备的微胶囊中，例如分别包裹在羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊中，包裹在胶体药物递送系统（例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊）中或包裹在大乳液（macroemulsion）中。

[0139] 可给予所述组合物作治疗性或预防性处理。在治疗应用中，将“治疗有效剂量”的组合物给予疾病（例如，癌症）患者。该应用的有效量取决于疾病的严重程度和患者的总体健康状况。可根据所需和患者的耐受剂量和频率一次或多次给予所述组合物。对于本发明的目的，“患者”或“对象”包括人和其它动物，特别是哺乳动物。因此，这些方法适用于人治疗和兽医应用。在优选的实施方式中，所述患者是哺乳动物，优选灵长类，在最优选的实施方式中，所述患者是人。其它已知的癌症治疗可与本发明方法联用。例如，也可用本发明所用的组合物靶向其它癌细胞或使之对治疗剂，例如 5FU、长春碱、放线菌素 D、顺铂、氨甲喋呤等敏感。

[0140] 在其它实施方式中，本发明方法可与其它癌症治疗（例如，根治性前列腺切除术）、放疗（外线束或近距离放疗）、激素治疗（例如，睾丸切除术，LHRH-类似物治疗以抑制睾酮产生，抗-雄激素治疗）或化疗联用。根治性前列腺切除术包括切除整个前列腺加上一些周围组织。当认为癌症不会扩散到该组织外时通常采用这种治疗。放疗常用于治疗局限于前列腺或已扩散到邻近组织的前列腺癌。如果该疾病已到晚期，可利用射线减少肿瘤的大小。激素治疗常用于前列腺癌扩散到前列腺以外或复发的患者。激素治疗的目的是降低雄性激素（雄激素）水平，藉此导致前列腺癌缩小或生长更慢。促黄体激素释放激素（LHRH）激动剂能减少睾酮的产生。可每月或更长的间隔注射这些制剂。两种此类类似物是亮丙瑞林和戈舍瑞林。还可采用抗-雄激素（例如，氟他米特、比卡鲁胺和尼鲁米特）药物。雄激素全阻断指联用抗-雄激素与睾丸切除术或 LHRH 类似物，称为 s 组合。对于前列腺癌扩散到前列腺以外和激素治疗失效的患者，化疗是一种选择。不指望破坏所有的癌细胞，但可能减缓肿瘤生长并减轻疼痛。可用于治疗激素治疗后复发或继续生长并扩散的前列腺癌的一些化疗药物包括：阿霉素（亚德里亚霉素）、雌莫司汀、依托泊甙、米托蒽醌、长春碱和紫杉醇。常一起给予两种或多种药物以降低癌细胞对化疗产生耐受的可能性。小细胞癌是更可能对化疗而非激素治疗起反应的罕见前列腺癌类型。

[0141] 在一些实施方式中，也可与本发明所用 N-钙黏着蛋白抗体、N-钙黏着蛋白结合抑制剂或 N-钙黏着蛋白 siRNA 分子联合给予“心脏保护剂”（参见，美国专利号 6,949,245）。心脏保护剂是能防止或降低（例如）蒽环类抗生素药物给予患者时发生相关心肌功能

失常（即，心肌病和 / 或充血性心力衰竭）的化合物或组合物。所述心脏保护剂可以，例如阻断或降低自由基介导的心脏毒作用和 / 或防止或降低氧化应激损伤。本定义包括的心脏保护剂的例子包括铁螯合剂右雷佐生 (ICRF-187) (Seifert 等. *The Annals of Pharmacotherapy* 28:1063-1072(1994))；降脂剂和 / 或抗氧化剂，例如普罗布考 (Singal 等. *J. Mol. Cell Cardiol.* 27:1055-1063(1995))；氨磷丁（氨基巯基 2-[(3-氨基丙基)氨基]乙硫醇-二氢磷酸酯，也称为 WR-2721，及其去磷酸细胞摄取形式，称为 WR-1065) 和 S-3-(3-甲基氨基丙基氨基)丙基磷-硫代酸 (WR-151327)，参见 Green 等. *Cancer Research* 54:738-741(1994)；地高辛 (Bristow, M. R. 刊于: Bristow M R 等, “药物诱导的心脏病” (Drug-Induced Heart Disease). 纽约: Elsevier 191-215(1980))； β -阻断剂，例如美托洛尔 (Hjalmarson 等. *Drugs* 47:增刊 4:31-9(1994)；和 Shaddy 等. *Am. Heart J.* 129:197-9(1995))；维生素 E；抗坏血酸（维生素 C）；自由基清除剂，例如齐墩果醇酸、熊果酸和 N-乙酰半胱氨酸 (NAC)；自旋捕获化合物，例如 α -苯基-叔丁基硝酮 (PBN)；(Paracchini 等., *Anticancer Res.* 13:1607-1612(1993))；硒代有机化合物，例如 P251 (Elbesen)；等。

[0142] 联合给药考虑采用不同制剂或单一药物制剂共同给药和任一顺序的连续给药，其中优选一段时期同时给予两种（或全部）活性剂而发挥它们的生物学活性。

[0143] 鉴定到的能间接或直接调节 N-钙黏着蛋白表达和 / 或功能的分子和化合物可用于治疗各自表达 N-钙黏着蛋白的癌症。可单独给予或与常规化疗、放疗或免疫治疗以及目前开发的治疗共同给予 N-钙黏着蛋白调节剂。

[0144] 适合口服给予的制剂可包括：(a) 液体溶液，例如悬浮在稀释剂，例如水、盐水或 PEG 400 中的有效量包装核酸；(b) 胶囊、小囊或片剂，各自含有预定量的活性成分，例如液体、固体、颗粒或明胶；(c) 合适液体配制的悬液；和 (d) 合适的乳液。药片剂型可包含以下一种或多种药学上相容的运载体：乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、磷酸钙、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、明胶、胶体二氧化硅、滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸、和其它赋形剂、着色剂、填充剂、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、调味剂、色素、崩解剂。锭剂剂型可包含调味剂，例如蔗糖配制的活性成分，以及含惰性基料，例如明胶和甘油或蔗糖及阿拉伯胶乳液、凝胶等配制的活性成分的软锭剂，除活性成分外，还含有本领域已知的运载体。

[0145] 可将所选的化合物单独或与其它合适的组分混合制成经吸入给药的气溶胶制剂（即它们可“雾化”）。可将气溶胶制剂装在可接受的加压推进剂，如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等中。

[0146] 直肠给药的合适制剂包括，例如栓剂，其由包装的核酸与栓剂基料组成。合适的栓剂基料包括天然或合成的甘油三酯或石蜡烃。此外，也可采用所选化合物与基料组成的明胶直肠胶囊，所述基料包括，例如液体甘油三酯、聚乙二醇和石蜡烃。

[0147] 适合胃肠道外给药，例如通过关节内（关节中）、静脉内、肌肉内、肿瘤内、真皮内、腹膜内和皮下途径给药的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射液，它们可含有抗氧化剂、缓冲剂、杀菌剂和使制剂与受者血液等渗的溶质；水性和非水性无菌悬液可包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。实施本发明时，可通过，例如静脉内输注、口服、局部、腹膜内、膀胱内或鞘内给予组合物。胃肠道外给药、口服给药和静脉内给药是优选给药方法。所述化合物制剂可放在单剂量或多剂量密封容器，例如安瓿和小瓶中。

[0148] 可从上述类型的无菌粉末、颗粒和片剂制备注射溶液和悬液。也可通过上述静脉内或胃肠道外给予经核酸转导作离体治疗的细胞。

[0149] 所述药物制品优选为单位剂型。在此剂型中,所述制品再分成含有合适量活性组分的单位剂量。此单位剂型可以是包装制品,该包装含有离散量的制品,例如包装在小瓶或安瓿中的片剂、胶囊和粉末。此单位剂型也可以是胶囊、片剂、小囊或锭剂本身,或者可以是适当数量的任何包装形式。如果需要,所述组合物还可含有其它相容的治疗剂。

[0150] 在缓释制剂中,优选的药物制品可递送一种或多种活性 N- 钙黏着蛋白调节剂,任选与一种或多种化疗剂或免疫治疗剂组合。通常治疗性给予 N- 钙黏着蛋白调节剂作为致敏剂,可提高肿瘤细胞对其它细胞毒性癌症治疗,包括化疗、放疗、免疫治疗和激素治疗的敏感性。

[0151] 在癌症治疗的治疗性应用中,本发明药学方法中所用的 N- 钙黏着蛋白调节剂或抑制剂的初始给予剂量范围是每日约 0.001mg/kg-1000mg/kg。可采用范围约 0.01mg/kg-500mg/kg、或约 0.1mg/kg-200mg/kg、或约 1mg/kg-100mg/kg、或约 10mg/kg-50mg/kg 的日剂量。然而,此剂量视患者的要求、所治疾病的严重程度和所用化合物而不同。例如,考虑具体患者所诊断的癌症类型和阶段可凭经验决定剂量。就本发明而言,给予患者的剂量应足以随时间推移在患者中产生有益的治疗反应。给予特定载体或转导的细胞类型在具体患者中伴随产生的任何不良副作用的性质和程度也决定了此剂量的大小。本领域技术人员有能力确定具体情况的合适剂量。一般开始时以低于所述化合物最佳剂量的较低剂量治疗。随后,小量递增剂量直至获得在该情况下的最佳效果。如果需要,为方便起见,可将每日总剂量分成多份在一天内给予。

[0152] 通常将本发明所用的药物制品(例如,N- 钙黏着蛋白 siRNA、N- 钙黏着蛋白抗体、N- 钙黏着蛋白疫苗、N- 钙黏着蛋白抑制剂和免疫偶联物)递送给哺乳动物,包括人和非人哺乳动物。采用本发明方法可治疗的非人哺乳动物包括家养动物(即,犬、猫、鼠、啮齿目和兔形目)和农业动物(牛、马、绵羊、猪)。

实施例

[0153] 提供以下实施例是为了说明而非限制本发明。

[0154] 实施例 1:人 N- 钙黏着蛋白的特异性人 scFv 的分离和表征

[0155] 材料与方法

[0156] N- 钙黏着蛋白重组蛋白的表达和细胞系

[0157] 制备了两个独立的 N- 钙黏着蛋白重组蛋白(Z Wainberg):N- 钙黏着蛋白胞外结构域 1-3(ECD1-3)和 N- 钙黏着蛋白第四结构域(ECD4)。采用 RT-PCR 从 mRNA 制品克隆其 cDNA 序列。将 ECD1-3 的核酸 160-497 和核酸 489-603 与 6 个组氨酸标签同框克隆入细菌表达系统中,并与 GST 标签同框克隆入载体中。诱导表达数小时后分离周质组分,用 Ni-NTA 层析纯化重组蛋白质。用 SDS-PAGE 分析蛋白质的大小和纯度。产生 LNCap N- 钙黏着蛋白转染细胞。将完整的 N- 钙黏着蛋白 cDNA 克隆入载体并通过感染转染入 LNCap 细胞。利用两种前列腺细胞系 PC3 细胞和 DU145 细胞表征分离的抗-N- 钙黏着蛋白抗体片段。

[0158] 噬菌体文库淘选

[0159] 我们淘选了展示人单链 Fv(scFv)的非免疫噬菌体文库,如以前所述(Sheets

M. D. PNAS 1998), 该文库含有 JD Marks 实验室制备的 8.2×10^8 个成员。选择对 N- 钙黏着蛋白重组蛋白有亲和力的噬菌体。将 ECD1-3 和 ECD4 分别吸附在两个免疫试管上 (Nunc)。然后用 PBS 洗涤免疫试管, 室温下用 PBS 配制的 4% 牛奶封闭 2 小时, 随后用 PBS 洗涤 3 次。取 1ml 噬菌体展示 scFv 文库试样 (8.10^{11} pfu) 与 1ml 8% MPBS 混合, 加入上述抗原包被的免疫试管中。室温下温育免疫试管 1 小时。然后用 PBS 配制的 0.05% 吐温 20 洗涤免疫试管 1 次, 用 PBS 洗涤 3 次。用 1ml 100mM 三乙胺洗脱噬菌体 5 分钟, 用 0.5ml 1M Tris-HCl pH 7.4 中和。冻存各轮次的一半洗脱噬菌体, 将另一半用于感染 TG1 细胞。如以前所述 (Sheets M. D. PNAS 1998) 进行噬菌体扩增和纯化。选择包括类似于第一轮的另一轮淘选。第一轮和第二轮用 2ml ($40 \mu\text{l}/\text{ml}$) 包被免疫试管, 而第三轮和第四轮用 $20 \mu\text{l}/\text{ml}$ 包被免疫试管。在第二、三和四轮中逐渐增加洗涤次数。如前所述 (参考 Marks JD J Mol Biol. 1991 Dec 5 ;222(3) :581-97), 用 ELISA 评估第一、二和三轮的多克隆噬菌体抗体和第四轮淘选得到的 95 个克隆。

[0160] ELISA 筛选各克隆

[0161] 用 ELISA 测定 95 个克隆与它们靶蛋白的结合 (Marks JD J Mol Biol. 1991 年 12 月 5 ;222(3) :581-97) (Poul M 等, JMB 第 301 卷, 第 5 版, 第 1149-1161 页)。采用选择用的靶蛋白包被 96 孔 ELISA 板。用限制性酶 BstNI 对 scFv 基因作酶解图谱 (fingerprinting) 来测定独特 scFv 的数量, 并经 DNA 测序证实。

[0162] 将 scFv 重新组成双抗体

[0163] 利用 NcoI 和 NotI 限制性酶切去 scFv 插入物的 pHEN1, 利用同一限制性酶切位点将其克隆入 pSyn 载体中。为将 scFv 重新组成双抗体, 采用了通过重叠延伸 PCR (SOE-PCR) 剪接得到 15-5 个氨基酸的接头 (Yazaki PJ 等, PEDS 2004 年 5 月 ;17(5) :481-9)。将 SOE-PCR 产物克隆入 TOPO 载体 (英杰公司 (invitrogen)) 中并测序证实 PCR 未产生突变。最终利用 NcoI 和 NotI 限制性位点将该双抗体构建物克隆入 pSyn1 载体中。

[0164] scFv 和双抗体的表达和纯化

[0165] 将克隆入 pSyn1 的 scFv 和双抗体转染入 TG1 细菌中以表达蛋白质。先培养细菌至密度 0.50. $D_{600\text{nm}}$, 然后用 1mM IPTG 诱导表达。诱导 4 小时后, 离心细菌, 制备周质组分。用 Ni-NTA 柱纯化 6HIS 标签蛋白。用 PBS 透析洗脱的蛋白质、浓缩并过滤。

[0166] 生物化学表征

[0167] 用非还原条件下的 SDS-PAGE 分析纯化的蛋白质。利用尺寸排阻柱 (Superdex 75) (法玛西亚公司 (Pharmacia)) 测定天然结构的大小。

[0168] 流式细胞术

[0169] 进行流式细胞术以评估噬菌体抗体克隆和双抗体与细胞 N- 钙黏着蛋白的结合。对于噬菌体抗体染色, 采用浓缩 20 倍的上清液。各噬菌体克隆在 20ml 2TY 中培养至密度 0.50. $D_{600\text{nm}}$, 此时用辅助噬菌体拯救该噬菌体。培养过夜后, 用 PEG/NaCl 沉淀收集上清液中的单克隆噬菌体, 重悬于 1ml PBS/1% BSA 中。对于流式细胞术染色, 在冰上温育 5×10^5 细胞与 $100 \mu\text{l}$ 20x PEG 浓缩的噬菌体抗体克隆 1 小时。用流动缓冲液 (PBS 1% FBS, 1mMEDTA, 0.02% 叠氮钠) 洗涤细胞, 用单克隆抗-M13 抗体 (AB 公司 (Amersham Biosciences)) 检测噬菌体抗体克隆。洗涤细胞, 用 R-PE 偶联的抗-小鼠抗体染色。对于双抗体染色, 在冰上温育 5×10^5 细胞与流动缓冲液配制的 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的双抗体 1 小时。用流动缓冲液洗涤细

胞,用 1/100 抗 -c-Myc- 生物素抗体检测双抗体。最后,用流动缓冲液洗涤细胞,用 1/40 链霉亲和素 -R-PE (西格玛公司 (SIGMA)) 染色。

[0170] 体内研究

[0171] 用 ^{124}I 标记 D4Db 蛋白后,注射入携带 LAPC9AI 肿瘤的 SCID 小鼠和携带 PC3 肿瘤的裸鼠尾静脉。注射后 4 和 20 小时进行 MicroPET 成像。注射后 20 小时进行生物分布 (试验)。

[0172] 淘选

[0173] 分别用 ECD1-3-6His 或 ECD4-6HIS 重组蛋白淘选展示人单链 Fv 抗体 (scFv) 的同一非免疫噬菌体文库,该文库含有 8.2×10^8 个成员。淘选结果包括输入、输出、回收和富集,见表 1。从第二轮开始,用 ECD1-3 淘选实现初步富集,然而仅在 ECD4 最后一轮淘选时富集度大于 1。这些结果与多克隆 ELISA 的结果相一致,在用 ECD1-3 的第二轮淘选出现了信号,但仅在用 ECD4 的第三轮淘选的样品显示信号。

[0174] 如图 1 所示,通过 ELISA 分析第 1、2 和 3 轮淘选获得的多克隆噬菌体抗体。采用淘选轮次所用靶蛋白包被 ELISA 平板。用 HRP 偶联的抗 -M13 抗体检测结合的噬菌体抗体。

[0175] 表 1

[0176] a) ECD1-3

	固定的蛋白质	输入 (pfu)	输出 (pfu)	回收	富集度
[0177] 第 1 轮	40 $\mu\text{l/ml}$	8×10^{11}	2×10^6	2.5×10^{-6}	
第 2 轮	40 $\mu\text{l/ml}$	5×10^{10}	2×10^5	4×10^{-6}	1.6
第 3 轮	20 $\mu\text{l/ml}$	5×10^{11}	4×10^6	10^{-5}	2.5
第 4 轮	20 $\mu\text{l/ml}$	2×10^{11}	5×10^8	2.5×10^{-3}	250

[0178] b) ECD4

[0179]

	固定的蛋白质	输入 (pfu)	输出 (pfu)	回收	富集度
第 1 轮	40 $\mu\text{l/ml}$	8×10^{11}	2×10^7	1.25×10^{-5}	
第 2 轮	40 $\mu\text{l/ml}$	5×10^{10}	10^5	2×10^{-6}	0.2
第 3 轮	20 $\mu\text{l/ml}$	5×10^{11}	5×10^4	10^{-7}	0.05
第 4 轮	20 $\mu\text{l/ml}$	3.5×10^{11}	5×10^5	1.4×10^{-6}	1.4

[0180]

[0181] 筛选

[0182] 从 ECD1-3 和 ECD4 的第四轮选择分离得到 95 个克隆,用 ELISA 检验。用 ECD1-3-6HIS 和 ECD1-3-GST 筛选从 ECD1-3-6HIS 的第四轮选择分离得到的 95 个克隆。用 ECD1-3 6HIS 检验时,95 个克隆中有 93 个呈阳性。22 个 ECD1-3 6HIS 阳性克隆也是

ECD1-3-GST 阳性。制作 ECD1-3 6HIS 和 ECD1-3-GST 二者均阳性的 22 个克隆的酶解图谱来分离独特的克隆。7 个克隆仅有 1 拷贝 :A7、C7、C12、D10、E4、E10 和 G2。B12 有另一拷贝。D4 有 3 个其它拷贝,A8 有 8 个其它拷贝。在琼脂糖凝胶上分析时,A8NcoI-NotI 插入物短于其它克隆。用 ECD4-6HIS 和 ECD1-3 6HIS 筛选从 ECD4-6HIS 第四轮选择分离得到的 95 个克隆。用 ECD1-3 6HIS 检验时,测试的所有 95 个克隆均呈阳性。我们选择产生较强 ELISA 信号的 8 个阳性克隆,对它们作酶解图谱分析。这 8 个克隆具有相同的酶解图谱。这些克隆之一的 A1 重新命名为 A14。

[0183] 小结,我们选择了结合 N- 钙黏着蛋白 ECD1-3 重组蛋白的 10 个不同的噬菌体克隆 (A7、A8、B12、C7、C12、D4、D10、E4、E10、G2),结合 N- 钙黏着蛋白 ECD4 重组蛋白的 1 个噬菌体克隆 (A14)。

[0184] 噬菌体克隆与细胞表面 N- 钙黏着蛋白的结合

[0185] 通过流式细胞术检验了 ELISA 选择的 7 个独立噬菌体克隆与 N- 钙黏着蛋白阳性细胞 (PC3 和 LNCaP N- 钙黏着蛋白转染细胞) 的结合情况。也检测了这些克隆与 N- 钙黏着蛋白阴性细胞 (DU-145 和 LNCap) 的交叉反应性。对于这些实验,制备了第二批噬菌体抗体,用 ELISA 再次检验。所选克隆的两次 ELISA 结果见表 2。除了一个克隆 D4 外,所有噬菌体克隆均为 N- 钙黏着蛋白阳性细胞而非 N- 钙粘蛋白阴性细胞染色。各克隆的平均荧光强度见表 2。我们选择 A14 作为唯一的抗 -ECD4,以及 C7 和 E4 以供重新组成双抗体,因为这些噬菌体抗体克隆显示最强细胞染色。制备的双抗体 :A14Db、C7Db 和 E4 Db 可用于染色 N- 钙黏着蛋白阳性和阴性细胞。用流式细胞术分析时,A14Db 和 E4Db 显示相当的弱染色,而 C7 Db 显示较强的 N- 钙黏着蛋白阳性细胞染色 (数据未显示)。然而,C7Db 也显示 N- 钙黏着蛋白阴性细胞染色。

[0186] 测序这些克隆的 scFv 蛋白。这些序列列于下文 :

[0187]

A14ScFv	SEQ ID NO: 1
A7 不完全 ScFv	SEQ ID NO: 2
A8 截短的 ScFv	SEQ ID NO: 3
B12 不完全 ScFv	SEQ ID NO: 4
C7 ScFc	SEQ ID NO: 5
C12 不完全 ScFc	SEQ ID NO: 6
D4 ScFv	SEQ ID NO: 7
E4 ScFv	SEQ ID NO: 8
E10 不完全 ScFv	SEQ ID NO: 9

[0188] 表 2

[0189]

克隆	融合蛋白	拷贝数	第 1 次 ELISA (O.D)	第 2 次 ELISA (O.D)	流式细胞 术 (MFI)
A14 (A1)	HIS 结构域 4	1	0.32	?	57
A7	GST HIS	1	0.1 0.26	0 0.38	48
A8 (截短的)	GST HIS	9	0.17 0.25	0.05 0.11	30
B12	GST HIS	2	0.2 0.18	0.26 0.4	91
C7	GST HIS	1	0.1 0.23	0.19 0.35	110
C12	GST HIS	1	0.34 0.2	0.16 0.31	38
D4	GST HIS	4	0.31 0.38	0.15 0.24	0
D10	GST HIS	1	0.22 0.24	0.13 0.28	25
E4	GST HIS	1	0.17 0.35	0.21 0.39	216
E10	GST HIS	1	0.13 0.21	0.14 0.35	12
G2	GST HIS	1	0.09 0.26	0.06 0.14	36

[0190] 表 3

[0191]		肿瘤	血液	肝脏	脾脏	肾脏	肺
[0192]	LAPC9 AI	0.6	0.9	0.3	0.2	0.6	0.3
[0193]	PC3	0.3	0.6	0.3	0.1	0.6	0.3

[0194] 肿瘤或小鼠注射后 22 小时获得的生物分布数据。

[0195] 肿瘤 / 血液 = 0.7 (LAPC9) 和 0.5 (PC3)

[0196] 选择最佳结合剂

[0197] 还试图在 10 种 ECD1-3 结合剂中选择最佳的, 制备这些噬菌体克隆, 用 LNCap 细胞消耗, 用 N- 钙黏着蛋白转染的 LNCaP 细胞淘选两次。测序各克隆。虽然用 D4 噬菌体克隆染色 N- 钙黏着蛋白转染的 LNCaP 细胞为阴性, 但含 X 拷贝的 D4 克隆为优势克隆。

[0198] 制备 D4 双抗体 (D4Db), 与 E4Db 比较对 PC3 和 DU145 (细胞的) 染色 (图 2)。E4Db 和 D4Db 二者均染色 PC3 细胞, 而 DU145 细胞为阴性。PC3 细胞的 D4Db 染色强于 E4Db (图 4)。

[0199] 如图 2 所示, 将 N- 钙黏着蛋白阳性细胞 (PC3) 与双抗体温育, 染色并作流式细胞术分析。第二抗体为: 抗 -C-Myc-FITC (以灰色填充)、A14 Db (虚线)、E4 Db (细线)、C7 Db (粗线)。

[0200] 如图 3 所示, 将 N- 钙黏着蛋白阴性细胞 (DU 145) 和 N- 钙黏着蛋白阳性细胞 (PC3)

与 C7 Db 温育,染色并作流式细胞术分析。第二抗体为:抗 -C-Myc-FITC(以灰色填充)、C7 Db(实线)。

[0201] 如图 4 所示,将 N-钙黏着蛋白阴性细胞 (DU 145) 和 N-钙黏着蛋白阳性细胞 (PC3) 与双抗体温育,染色并作流式细胞术分析。第二抗体为:抗 -C-Myc- 生物素,和链霉亲和素 R-PE(以灰色填充)、E4 Db(虚线)、D4 Db(实线)。

[0202] 图 5 显示 ^{124}I 标记的 D4 Db 在 LAPC9 AI 肿瘤中的肿瘤定位。注射后 4 小时登记冠状切片。

[0203] 应理解,本文所述的实施例和实施方式目的只是为了说明,本领域技术人员明白据此可作出的各种修饰或改变,它们包括在本申请的构思和范围以及所附权利要求书的范围内。本文引用的所有出版物、专利、专利申请出于所有目的通过引用全文纳入本文。

a.



b.

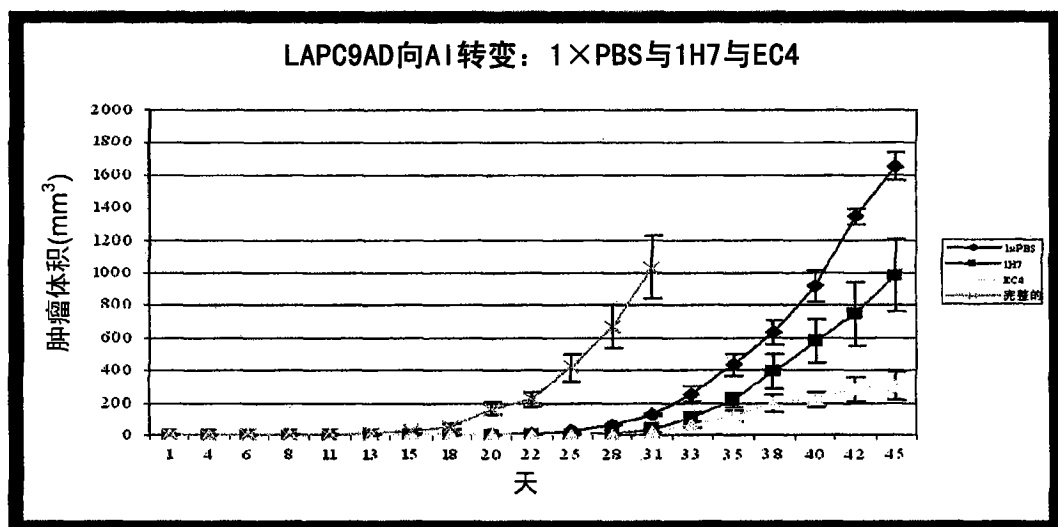


图 1a

LAPC9AI类的肿瘤生长曲线

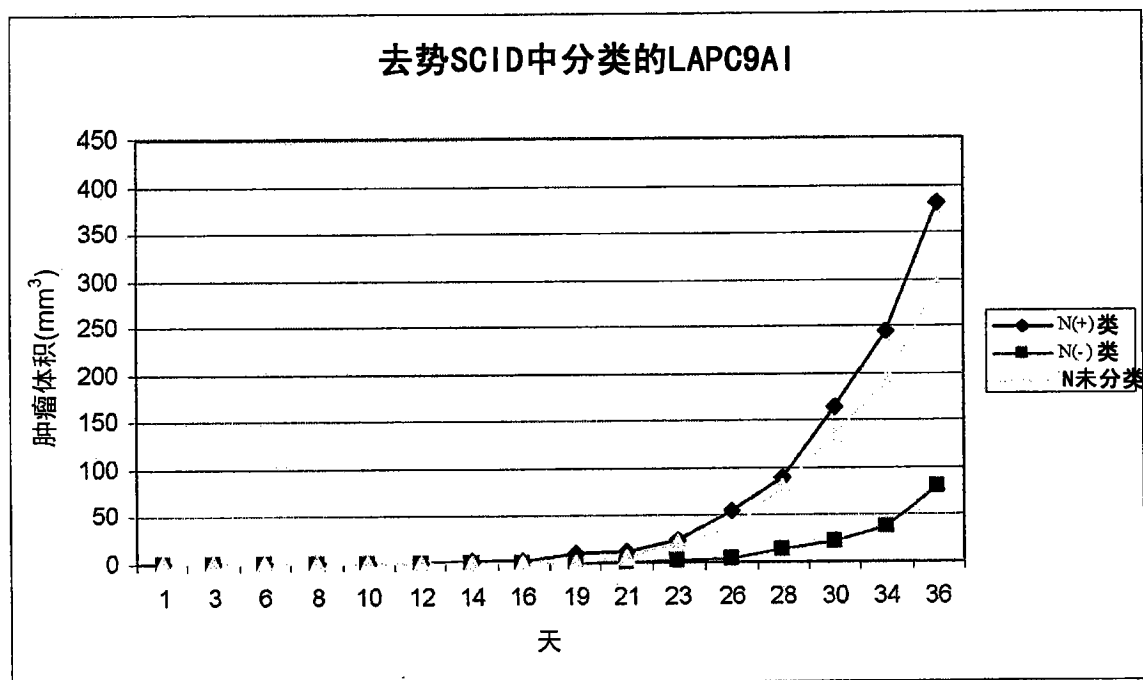
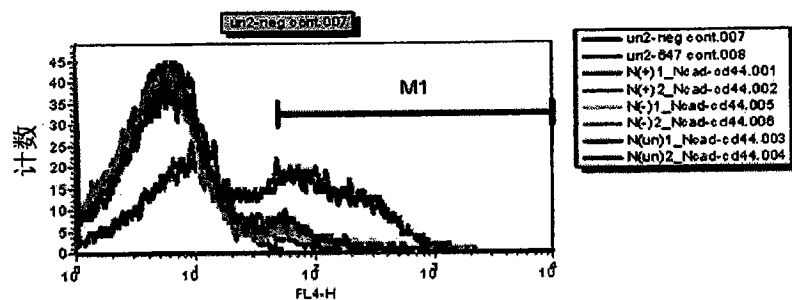


图 2

加工N-cad分类肿瘤的
FAC结果

FCS文件名称	参数	标记	门控 细胞%
un2 neg cont.007	FL4-H	无	100.0
un2-neg cont.007	FL4-H	1	0.19
un2-647 cont.008	FL4-H	无	100.0
un2-647 cont.008	FL4-H	1	3.32
N(+)-1_Ncad-cd44.001	FL4-H	无	100.0
N(+)-1_Ncad-cd44.001	FL4-H	1	41.72
N(+)-2_Ncad-cd44.002	FL4-H	无	100.0
N(+)-2_Ncad-cd44.002	FL4-H	1	40.78
N(-)-1_Ncad-cd44.005	FL4-H	无	100.0
N(-)-1_Ncad-cd44.005	FL4-H	1	8.7
N(-)-2_Ncad-cd44.006	FL4-H	无	100.0
N(-)-2_Ncad-cd44.006	FL4-H	1	8.48
N(un)-1_Ncad-cd44.003	FL4-H	无	100.0
N(un)-1_Ncad-cd44.003	FL4-H	1	10.77
N(un)-2_Ncad-cd44.004	FL4-H	无	100.0
N(un)-2_Ncad-cd44.004	FL4-H	1	9.82

	平均值%
Ncad(+) 类	41.25%
Ncad(-) 类	8.58%
Ncad未分类	9.95%

图 3

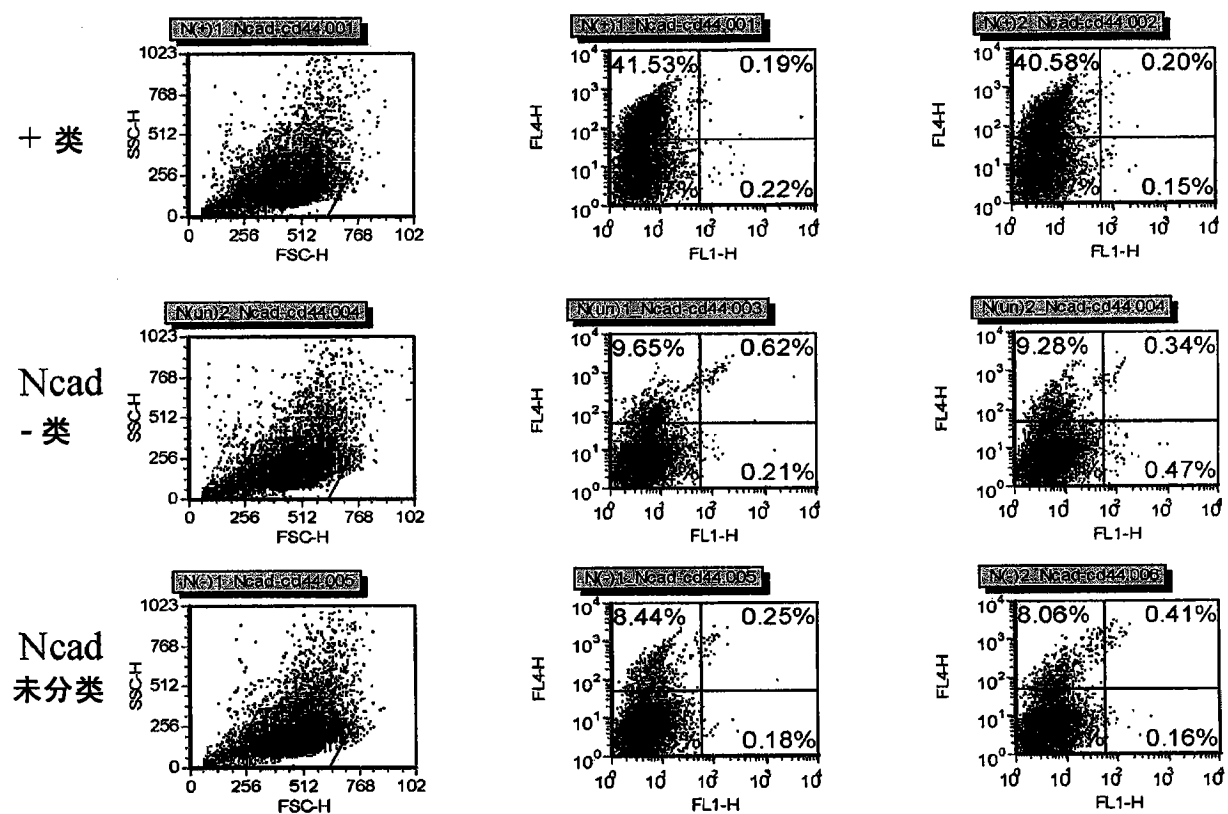


图 4

前列腺癌中N-钙黏着蛋白信号传导的模型

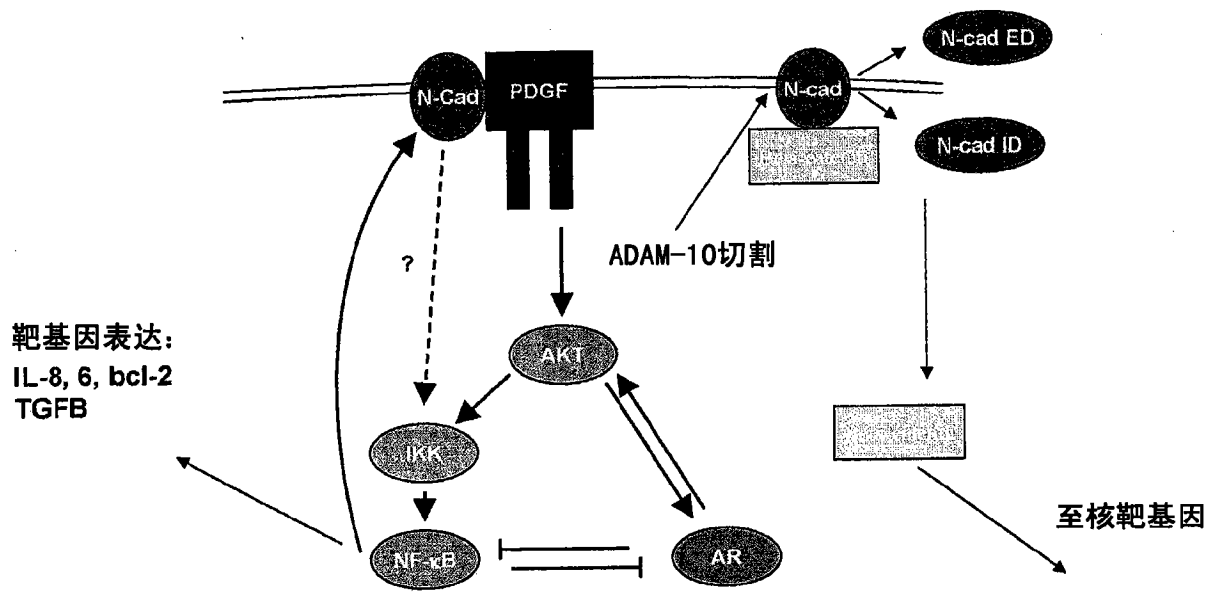
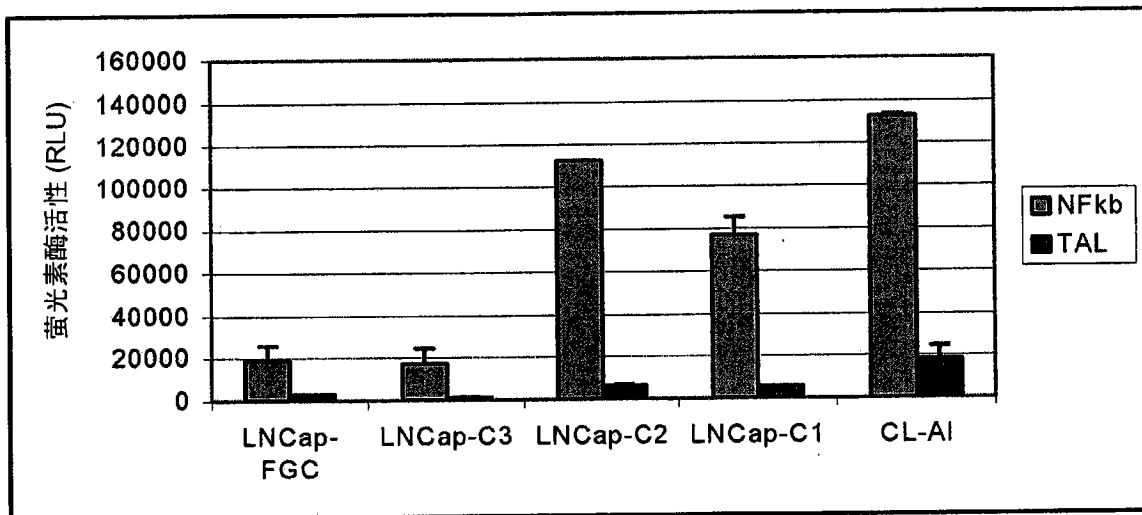


图 5

N-钙黏着蛋白激活NF-κB



正常血清

NF κ B受体试验: TAL是阴性对照。

图 6

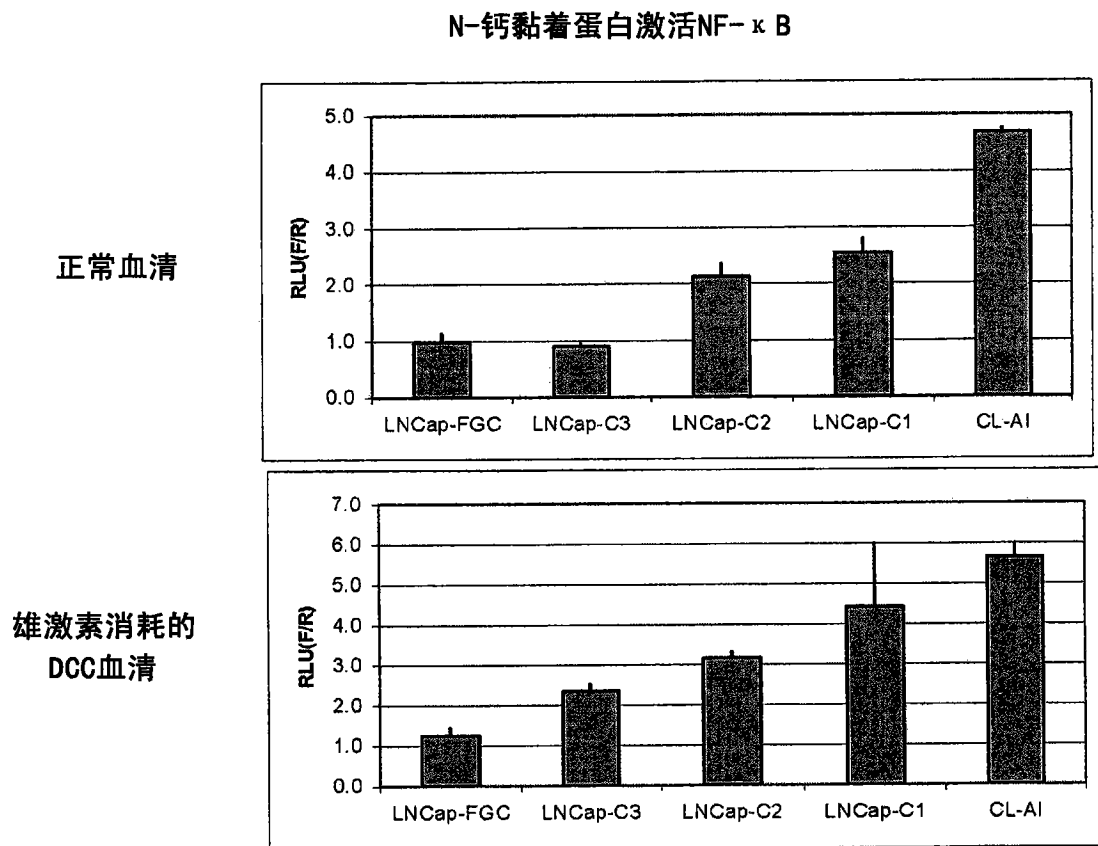


图 7

N-钙黏着蛋白在C1细胞表面表达

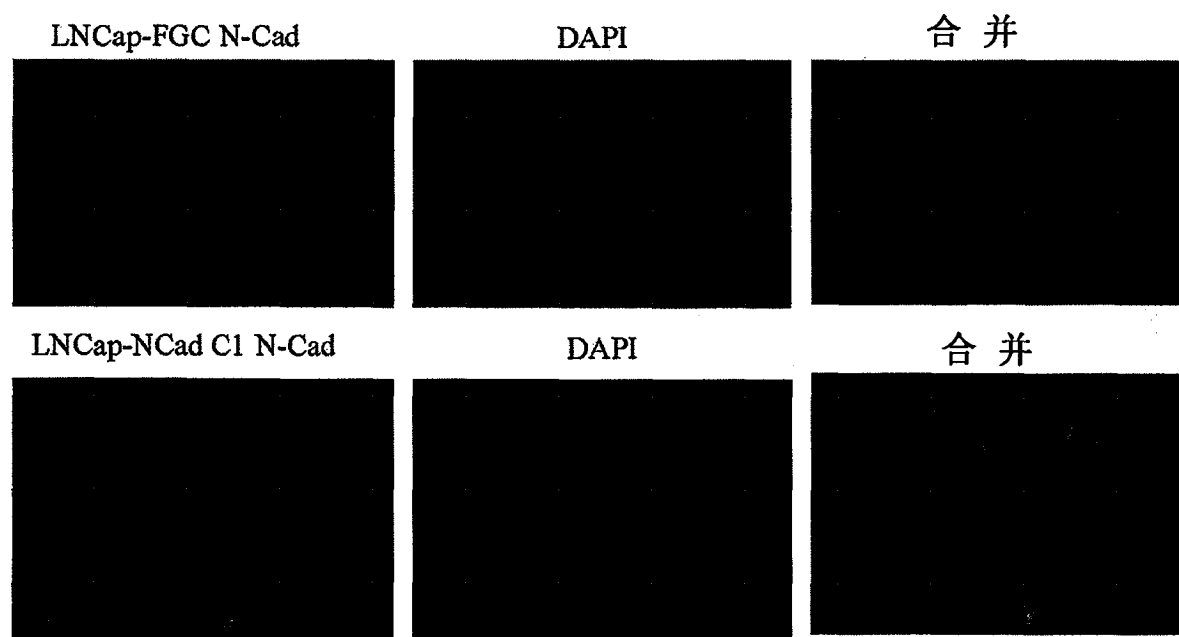


图 8

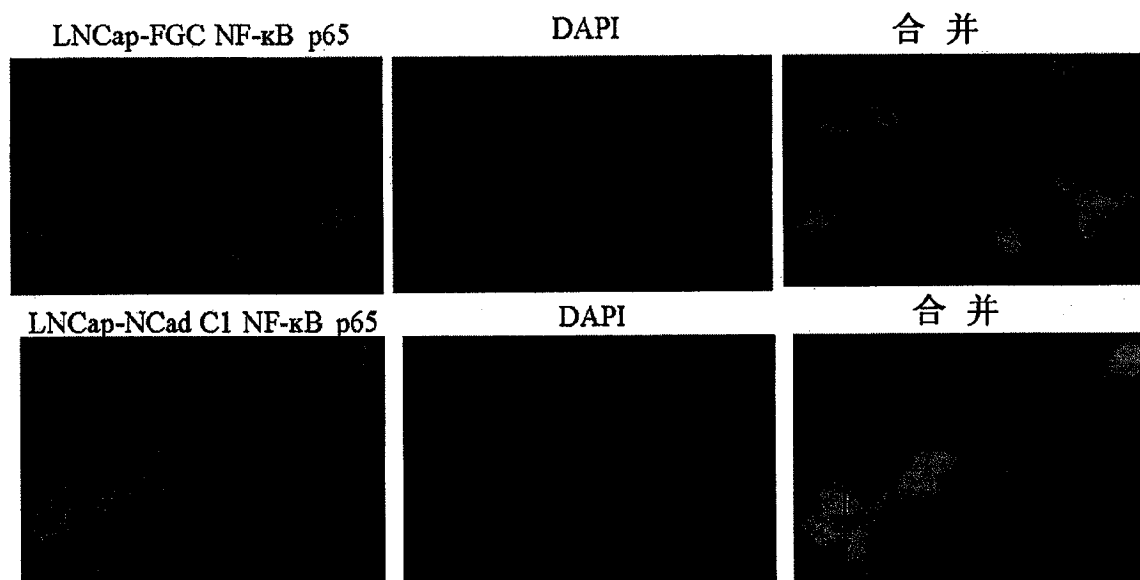
NF- κ B 定位于N-钙黏着蛋白阳性细胞(C1)中的核

图 9

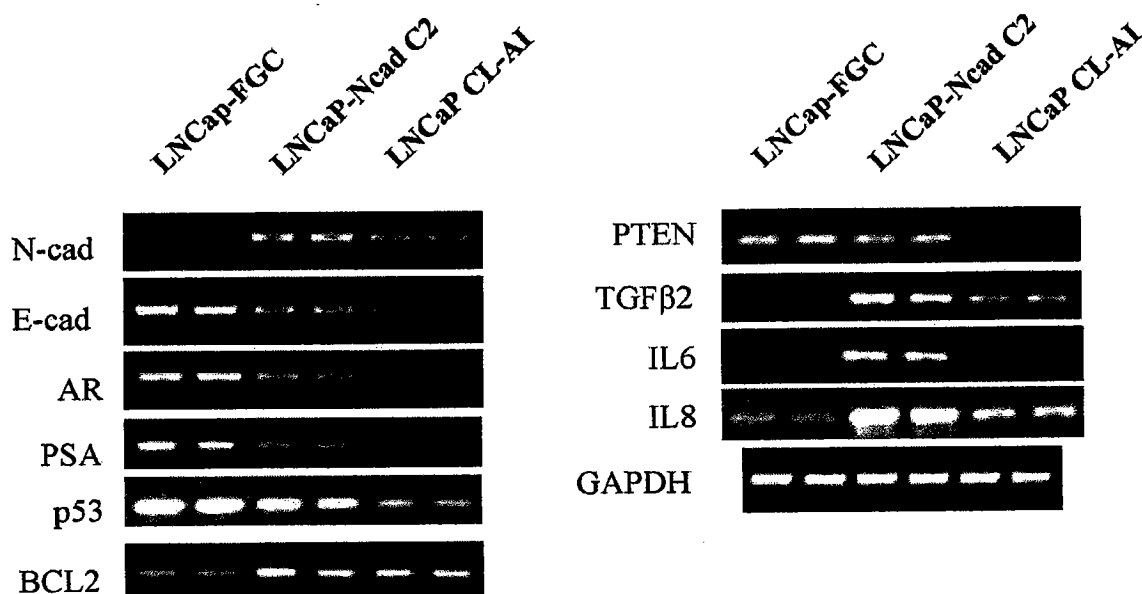
N-钙黏着蛋白表达导致IL-6、IL-8、TGF β 2和bcl-2的诱导

图 10

诱导的基因与N-钙黏着蛋白水平的相关性

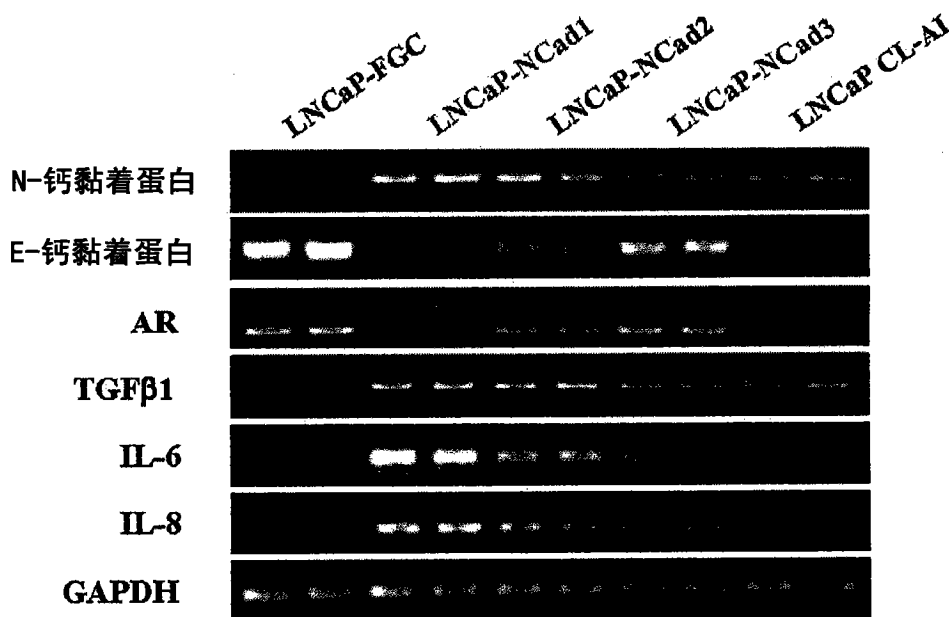


图 11

N-钙黏着蛋白敲减导致IL-6和IL-8下调

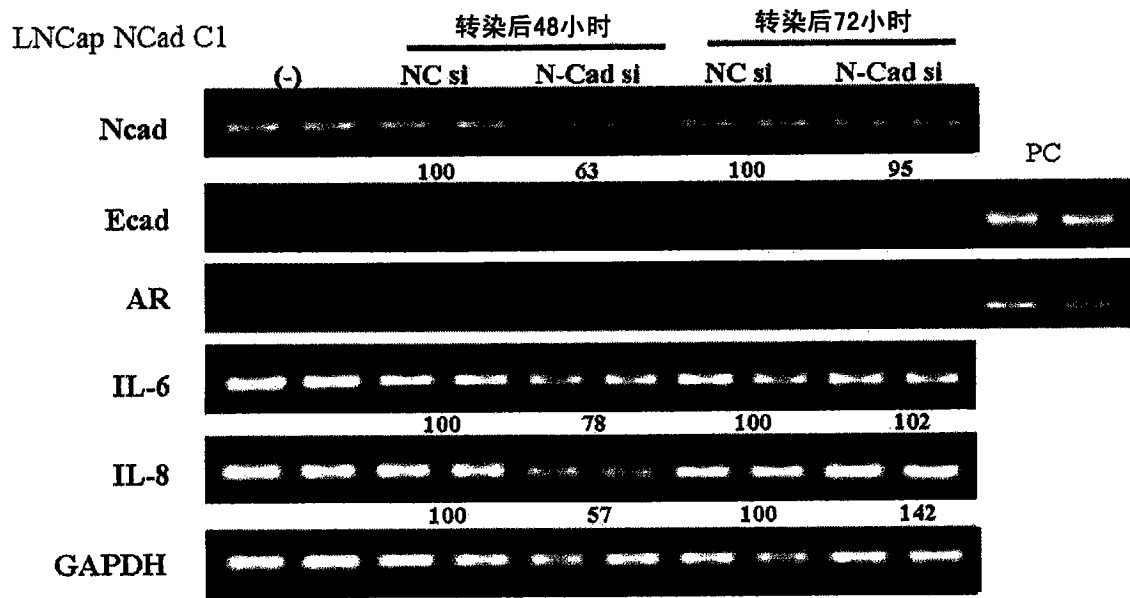
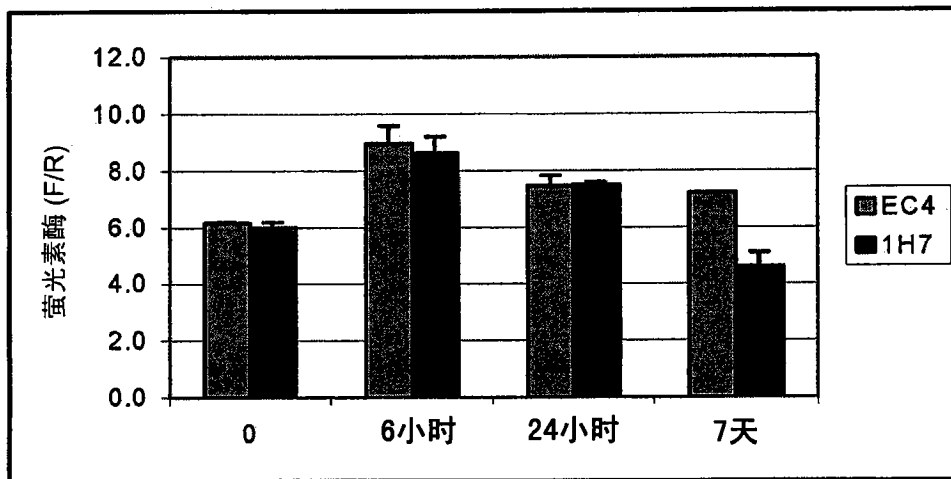


图 12

N-钙黏着蛋白抗体处理后的NF κ B活性

1H7处理7天后的NF κ B活性，略微降低
这与pAkt和Ncad表达降低的蛋白质印迹相符

图 13

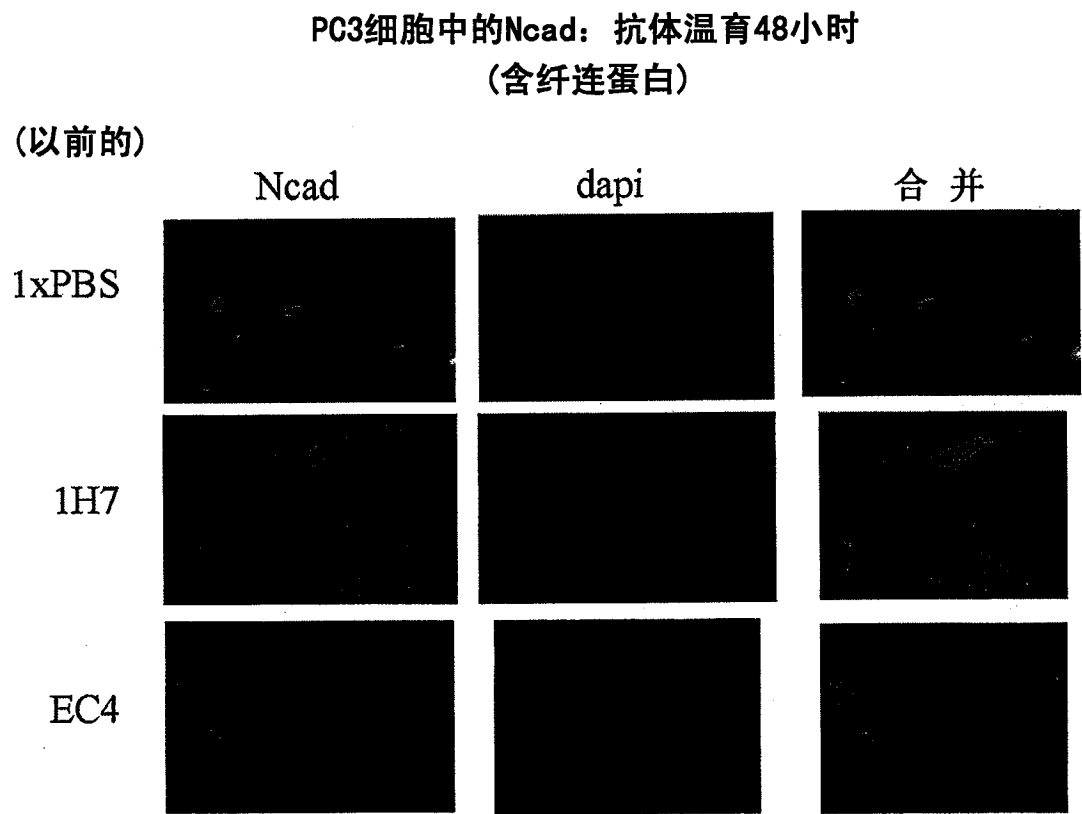


图 14

N-钙黏着蛋白敲减导致激活的Akt下调

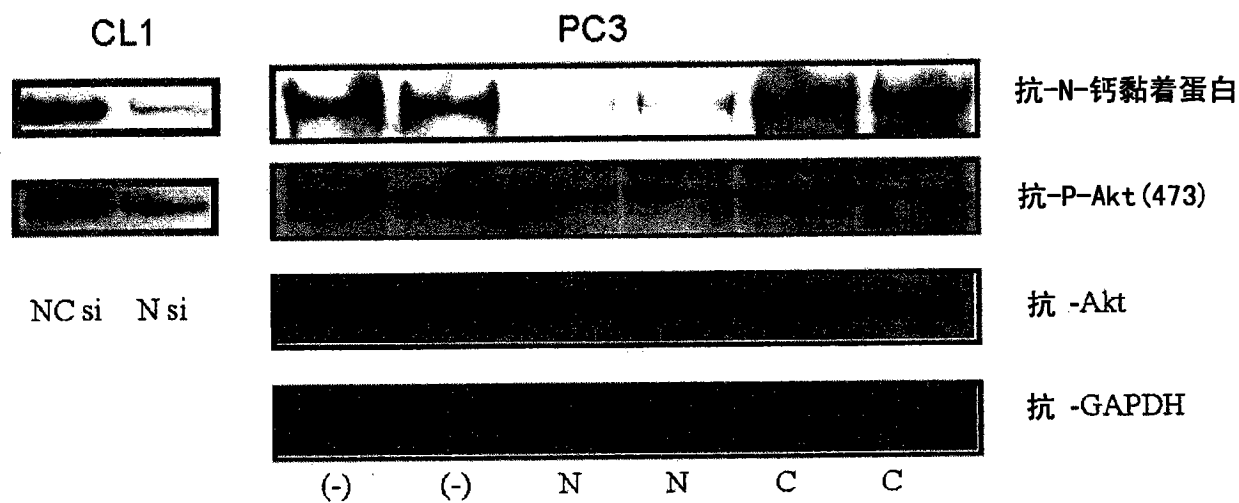


图 15

N-钙黏着蛋白特异性抗体激活，然后下调Akt活化。

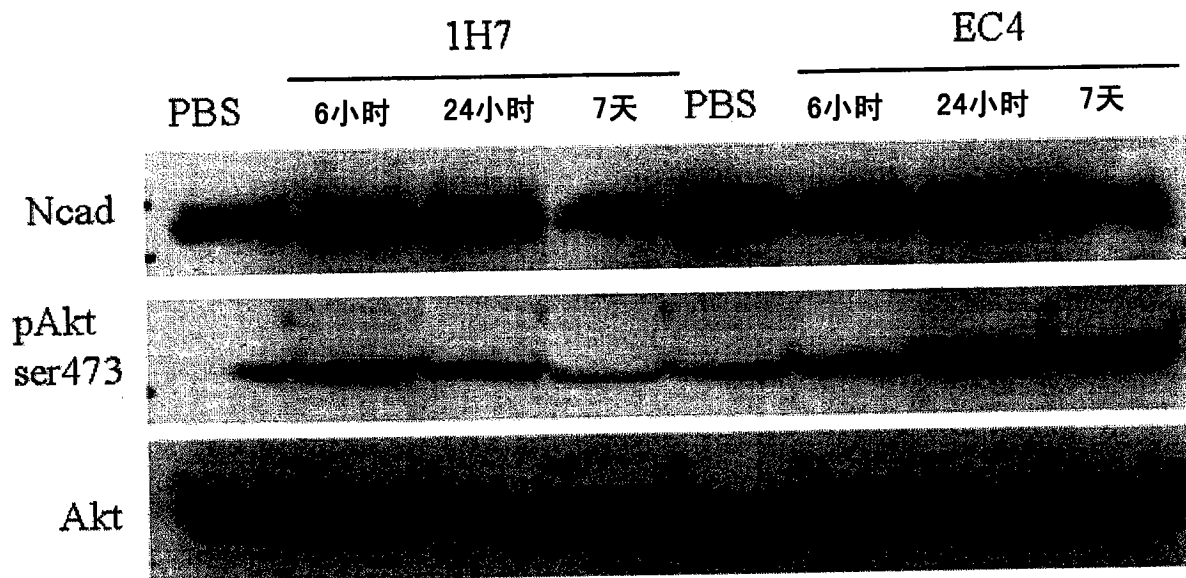


图 16