(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105431205 B
(45)授权公告日 2020.07.07

(21)申请号 201480033785.0

(22)申请日 2014.06.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105431205 A

(43)申请公布日 2016.03.23

(30)优先权数据
61/834,169 2013.06.12 US
13/939,781 2013.07.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.12.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/042065 2014.06.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/201212 EN 2014.12.18

(73)专利权人 斯坦福大学董事会
地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 约瑟夫·A·莫利克 张珀琳
保罗·J·乌茨

(74)专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有限责任公司 11138
代理人 闫小刚

(51)Int.Cl.
C07K 16/30(2006.01)

(56)对比文件

WO 2004065423 A2,2004.08.05,

Carla Danussi等.A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction.《Glycobiology》.2009,第19卷(第10期),第1056-1067页.

Pealine Zhaoying Teo等.Using the allergic immune system to target cancer: activity of IgE antibodies specific for human CD20 and MUC1.《Cancer Immunol Immunother》.2012,第61卷(第12期),第2295-2309页.

Pealine Zhaoying Teo等.Using the allergic immune system to target cancer: activity of IgE antibodies specific for human CD20 and MUC1.《Cancer Immunol Immunother》.2012,第61卷(第12期),第2295-2309页.

M.R.Price.Summary Report on the ISOBM TD-4 Workshop: Analysis of 56 Monoclonal Antibodies against the MUC1 Mucin.《Tumor Biology》.1997,第19卷第1-20页.

审查员 薛旸

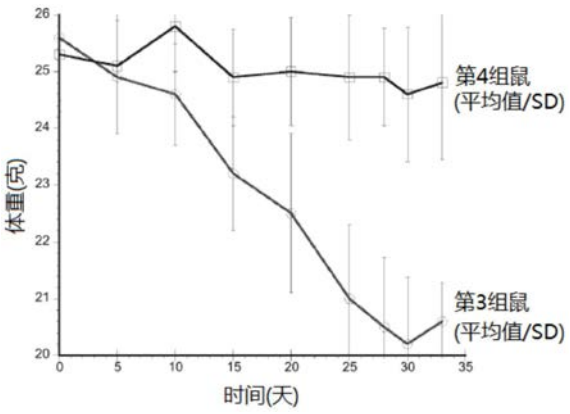
权利要求书1页 说明书22页
序列表3页 附图6页

(54)发明名称

抑制肿瘤转移的IgE抗体

(57)摘要

本发明提供可用于抑制或预防转移癌的新型IgE抗体。还提供了以下方法:通过调节至少一种非肿瘤细胞的活性而抑制肿瘤转移,治疗患者以抑制或预防源自原发性实体瘤的肿瘤转移的出现,治疗已确立的转移癌,减少癌细胞的转移,以及减缓原发性实体瘤或转移细胞或转移瘤的生长动力学。



CN 105431205 B

1.IgE单克隆抗体在制备用于在患者中抑制已确立和生长的表达MUC1的实体瘤之转移的药物中的用途,其中所述IgE单克隆抗体对MUC1具有特异性并且具有由SEQ ID NO:1组成的核酸编码的重链可变区和由SEQ ID NO:2组成的核酸编码的轻链可变区,所述IgE单克隆抗体通过与所述实体瘤上的MUC1和宿主源髓样抑制细胞上存在的抗体受体相结合而形成三元复合物,所述宿主源髓样抑制细胞在所述实体瘤的微环境中存在且被所述实体瘤产生的细胞因子吸引,所述抗体受体对所述IgE抗体的恒定区具有特异性,其中所述三元复合物的形成重编程所述髓样抑制细胞并且其介导转移的能力受到抑制。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述IgE单克隆抗体为嵌合单克隆抗体或人源化单克隆抗体。

3.根据权利要求1至2中任一项所述的用途,其中所述IgE单克隆抗体具有人源恒定区。

4.根据权利要求1至2中任一项所述的用途,其中所述实体瘤选自乳腺癌、结直肠癌、卵巢癌、肾癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠癌和肺癌。

5.根据权利要求3所述的用途,其中所述实体瘤选自乳腺癌、结直肠癌、卵巢癌、肾癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠癌和肺癌。

抑制肿瘤转移的IgE抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2013年6月12日提交的美国临时申请No.61/834,169的权益，以及2013年7月11日提交的美国专利申请No.13/939,781的权益。以上申请的全部教导内容整体以引用方式并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明的作出得到了政府支持，具体为由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)资助的第CA111639号合同。政府在本发明中享有某些权利。

背景技术

[0005] IgE抗体介导过敏和哮喘反应，这些反应的特征在于需要募集效应细胞的速发型超敏和炎症延迟型应答。IgE抗体从外周循环转运到组织中，在那里它们可经由以下三种类型的Fc受体而结合过敏效应细胞，诸如肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞、单核细胞和巨噬细胞：FcεRI(或高亲和力FcεR)($K_a=10^{11}M^{-1}$)、FcεRII(或低亲和力FcεR,CD23)($K_a<10^{8}M^{-1}$)和半乳凝素-3。不同于IgG类抗体，IgE以极高的亲和力结合到其FcR，该亲和力就FcεRI而言比IgG对FcR(FcγRI-III)的亲和力高大约三个数量级，且就FcεRII而言，与IgG对其高亲和力FcγRI的亲和力一样高(Gould,HJ,et al.,Annu.Rev.Immunol.,21:579-628.(2003);Gounni,AS,et al.,Nature,367:183-186(1994);Kinet,JP,Annu.Rev.Immunol.,17:931-72:931-972(1999)和Ravetch JV,and Kinet JP,Annu.Rev.Immunol.,9:457-492(1991))。

[0006] 过敏肿瘤学(AllergoOncology)新出现的领域基于表明IgE介导的过敏与癌症之间存在逆相关性的观察结果和研究(Turner MC,et al.,Int.J.Cancer,118:3124-3132(2006);Wang H&Diepgen TL,Allergy 60:1098-1111,(2005);Turner MC,et al.,Am.J.Epidemiol.,162:212-221(2005);Wang H,et al.,Int.J.Cancer,119:695-701(2006);Mills PK,et al.,Am.J.Epidemiol.,136:287-295(1992);Wiemels JL,et al.,Cancer Res.,64:8468-8473(2004);Dodig S.,et al.,Acta Pharm.,55:123-138(2005)和Wrensch M.,et al.,Cancer Res.,66:4531-4541(2006))。因此，该领域的研究人员正在探索IgE抗体类在以下前提下在预防和治疗某些癌症中的治疗潜力：最初作为对微生物/寄生虫感染的适应性反应而发生的免疫反应在抗恶性肿瘤时可能是有用的。

[0007] IgE在癌症治疗方面的应用由Nagy等人倡导(Nagy,E.,et al.,Cancer Immunol.Immunother.,34:63-69(1991))，他们开发了对小鼠乳瘤病毒(MMTV)的大囊膜糖蛋白(gp36)具有特异性的鼠IgE单克隆抗体并证实了在具有同基因MMTV分泌性乳腺腺癌(H2712)的C3H/HeJ小鼠中的显著抗肿瘤活性(Nagy,E.,et al.,Cancer Immunol.Immunother.,34:63-69(1991))。Kershaw等人(Kershaw,MH,et al.,Oncol.Res.,10:133-142(1998))开发了名为30.6的鼠单克隆IgE，其为在结直肠腺癌细胞表面上表达的抗原决定簇特异性的。小鼠IgE 30.6抑制了在严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠中的皮下生长的既定人结直肠癌COLO 205细胞的生长，但这种效应是短暂的。相比之下，小鼠IgG 30.6未

显示出抗肿瘤效应。小鼠IgE的特定效果归因于该抗体与具有FcεR的效应细胞之间的相互作用，因为该活性具体地通过事先施用非特异性小鼠IgE而丧失(Kershaw,MH,et al.,Oncol.Res.,10:133-142(1998))。Gould等人开发了卵巢癌肿瘤相关抗原叶酸盐结合蛋白(FBP)特异性的小鼠/人嵌合IgE(MOv18-IgE)和IgG MOv18(IgG1)。在人卵巢癌SCID小鼠异种移植模型(IGROV1)中对MOv18-IgE和MOv18-IgG1的保护活性进行了比较。MOv18-IgE的有益效果大于MOv18-IgG1且持续时间更长，从而证实了IgE抗体优异的抗肿瘤效果(Gould,HJ,et al.,Eur.J.Immunol.,29:3527-3537(1999))。

[0008] 近来，Karagiannis等人证实了单核细胞通过两种不同的途径介导IgE依赖性肿瘤细胞杀伤：ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)和ADCP(抗体依赖性细胞介导的吞噬作用)，这两种途径通过FcεRI和FcεRII介导(Karagiannis,SN,et al.,Cancer Immunol.Immunother.,57:247-263(2008)和Karagiannis,SN,et al.,J.Immunol.,179:2832-2843(2007))。该小组还使用这种测定系统证实了抗Her2IgE可激活单核细胞而经由ADCC在体外杀伤肿瘤细胞(Karragiannis P.,et al.,Cancer Immunol.Immunother.,58:915-930(2009)，2008年10月22日在线出版)。另外的实例包括Fu等人(Clin.Exp.Immunol.,153:401-409,2008)，他们证实了从胰腺癌患者分离的IgE类抗体介导对抗癌细胞的ADCC，以及Spillner等人(Cancer Immunol.Immunother.,61:1565-1573(2012)，他们展示了使用单核细胞，在体外与抗EGFR IgG相比，抗EGFR IgE将对抗人上皮癌细胞系A431的细胞毒性提高了高达95％。

[0009] 尽管在过敏肿瘤学的新兴领域中出现了鼓舞人心的发现，但是仍然迫切需要开发治疗转移癌的新型治疗剂。

发明内容

[0010] 本发明提供了可用于抑制肿瘤生长和转移的新型IgE抗体。提供了具有对肿瘤相关抗原(TAA)的结合特异性的包含人ε恒定区和可变区的治疗性单克隆IgE抗体。还提供了对位于原发性实体瘤微环境中的至少一种宿主源非肿瘤细胞的活性重编程的方法，从而逆转该非肿瘤细胞促进肿瘤生长和转移的能力。提供了治疗患者中的转移癌、抑制原发性肿瘤发生转移和减缓原发性或转移性肿瘤的生长动力学的方法。

[0011] 在一个实施方案中，本发明提供了对位于患者实体瘤的微环境中的至少一种宿主源非肿瘤细胞的活性重编程的方法，其中非肿瘤细胞介导肿瘤转移的能力受到抑制，该方法包括施用肿瘤相关抗原特异性的IgE抗体的步骤，其中抗体在肿瘤的微环境内形成三元复合物，所述三元复合物由IgE抗体、肿瘤相关抗原和肿瘤环境内源性的宿主源非肿瘤细胞构成，其中抗体特异性结合到肿瘤相关抗原和位于宿主源非肿瘤细胞的表面上的抗体受体，该抗体受体为IgE特异性的。

[0012] 在另一个实施方案中，本发明提供抑制患者中的实体瘤转移的方法，该方法包括向患者施用能够在肿瘤的微环境内形成三元复合物的IgE抗体，所述三元复合物由肿瘤相关抗原特异性的IgE抗体、肿瘤相关抗原和肿瘤微环境内源性的宿主源非肿瘤细胞构成，其中抗体特异性结合到肿瘤相关抗原和位于宿主源非肿瘤细胞的表面上的抗体受体，该抗体受体为IgE特异性的，并且其中在形成三元复合物后，非肿瘤细胞介导肿瘤转移的能力受到抑制。

附图说明

[0013] 前述的以及其他的目标、特征和优点会从以下的本发明的优选的实施方案的更具体的描述中更明显地表现出来，如附图所示，在不同的视图中，相似的字母对应相同的部件。附图并不一定是按照比例制作的，而是在强调表现本发明的原理。

[0014] 图1.嵌合IgE抗体的构造和抗原特异性。(A)载体构建体的图形表示。亲代载体为pcDNA 3.1/新霉素(pEpsilon I)、pEF6/灭瘟素(pEpsilon II)、pcDNA 3.1/博莱霉素(pKappa I)和pcDNA 3.1/潮霉素(pKappa II)。重链和轻链可变区基因从表1中的杂交瘤克隆，并插入人ε或人k恒定区基因的上游。(B)SDS-PAGE分析。从转染的CHO-K1克隆纯化的嵌合IgE以及得自骨髓瘤细胞系SKO-007的对照人IgE通过电泳在4-12％梯度丙烯酰胺凝胶上分离，并通过考马斯蓝染色。(C)抗体特异性分析。叠加柱状图示出了与未转染的细胞系相比，结合到用同族抗原转染的细胞系的IgE的FACS分析。1F5.hIgE(抗hCD20)结合了用人CD20cDNA转染的A20细胞，而3C6.hIgE(抗hMUC1，部分糖基化的形式)在用hMUC1cDNA转染的小鼠乳腺癌细胞系4T-1上检测到人MUC1。折线图显示了通过4H5.hIgE(抗hMUC1蛋白骨架)对合成的hMUC1串联重复肽(50mer)的ELISA检测。对照肽源自hCD20的第二个胞外环(43mer)。

[0015] 图2.肥大细胞和嗜酸性粒细胞介导的体外肿瘤细胞毒性。柱状图显示％$PI^{+}CFSE^{+}$肿瘤细胞。将OCI-Ly8人B细胞淋巴瘤细胞($hCD20^{+}$)用10^{-5}mM CFSE标记15分钟。将1×10^{5}个标记的细胞与未染色的CBMC和2.5μg/ml IgE(A和B)或脐带血源性嗜酸性粒细胞(CBEo)和5μg/ml IgE(C和D)混合，然后在37℃温育24h。将细胞混合物用碘化丙啶(PI)染色，然后进行流式细胞术分析。PI^{+}细胞在$CFSE^{hi}$组分中的百分比代表总肿瘤细胞毒性，并且结果以柱状图形式示出。(A)在不同的效应细胞:靶细胞比率下CBMC和hIgE介导的肿瘤细胞毒性。(B)添加2μg/ml的封闭抗体或同种型对照(E:T比率4:1)。(C)在不同的效应细胞:靶细胞比率下CBEo和hIgE介导的肿瘤细胞毒性。(D)添加2μg/ml封闭抗体或10U/ml肝素。(E:T比率2.5:1)。这里还显示了由单独的抗体诱导的肿瘤死亡的数据(即，在不存在效应细胞的情况下)。显示的结果为一个代表性实验的平均值±SD。学生t检验*，$p<0.05$；**，$p<0.01$；***，$p<0.005$。

[0016] 图3.肿瘤特异性IgE抑制体内肿瘤生长。在第0天将10^{5}个4T1.hMUC1肿瘤细胞皮下接种到hFcεRI小鼠的两侧。在第1、2、3、4和5天施用20μg对照或3C6.hIgE(抗hMUC1)。获取2维卡尺测量值，直到肿瘤面积超过300mm^{2}。(A)平均肿瘤大小对时间的曲线图。误差条表示每个组的平均值±SD。在最后的时间点每个组的存活小鼠/总小鼠数在括号中指出。抗hMUC1组明显不同于对照组(双向ANOVA，$p<0.001$)。(B和C)从(A)中所示的实验在第34天从存活的小鼠收获肿瘤、切片并针对肥大细胞染色。肥大细胞在肿瘤的中心区以及在瘤周区域中基本上不存在。存在的肥大细胞(红色箭头)未脱粒(B)。仅有来自3C6.hIgE处理组的小鼠的一个肿瘤含有被肥大细胞浸润的区域，其显示了脱粒的证据(C)。

[0017] 图4.hMUC1特异性的小鼠IgE介导FcεRI中的完全肿瘤排斥。将用人MUC1、抗hMUC1IgE(3C6.mIgE)和/或细胞因子(MCP-1、IL-5)转染的4T1肿瘤细胞的四种不同组合在第0天皮下接种到hFcεRI Tg^{+}小鼠的两侧。每只小鼠总共施用10^{5}个细胞(n＝4只/组)。(A)四个实验组的说明。(B)实验被设计为测试IgE抗体与同族抗原(MUC1)和被所研究的两种细胞因子吸引的髓样细胞的相互作用。将细胞混合，然后立即皮下注射到FcεRI KO/Tg小鼠的两

侧(100,000个细胞/小鼠)。通过二维卡尺生长来监控肿瘤生长。除了第4组外,在每个组中均观察到了渐进生长,在第4组中,肿瘤可暂时性触知,然后永久性消退。所示的数据代表两个单独的实验。误差条表示平均肿瘤大小±SD。

[0018] 图5.hMUC1特异性的小鼠IgE介导FcεRI KO/Tg小鼠中的完全肿瘤排斥。各个生长曲线以及得自图6所示实验的重复实验的肿瘤测量平均值。将表达3C6.mIgE或细胞因子的4T1肿瘤细胞如图6A中所示进行混合。数据得自各个肿瘤测量(A,C)或肿瘤体积的平均值(B,D)。注意,在重复实验中,存在一组共4个表现出生长的肿瘤,尽管生长动力学大大降低。

[0019] 图6.hMUC1特异性的小鼠IgE不能在野生型小鼠中介导完全的肿瘤排斥,但揭示出预防转移的能力。将表达3C6.hIgE或细胞因子的各组4T1肿瘤细胞如图6A中所示进行混合,并注入Balb/c小鼠中。显示了各个肿瘤生长曲线(A,B),和小组的平均值(C,D)。未在FcεRI KO/Tg小鼠中生长的第4组肿瘤在野生型小鼠中生长,尽管生长动力学大大降低。注意,第3组肿瘤(单独的4T1/hMUC1和细胞因子)表现出中等生长动力学。三只FcεRI KO/Tg转基因小鼠包括在该实验中作为阳性对照,并且所有三只在用第4组肿瘤注射时均未能展示出任何肿瘤生长(D图,□--□)。第3组肿瘤(仅MUC1和细胞因子)降低的生长动力学可能源于以下事实:这些小鼠在肿瘤发展过程的早期发生了转移,并且到第10天时开始体重减轻(图7)。具有第4组肿瘤(3C6-mIgE+MUC1+细胞因子)的小鼠未显示出体重减轻或其他明显的转移迹象,尽管在其两侧具有小的肿瘤。

[0020] 图7.第3和第4组小鼠中的体重减轻动力学。对用第3和第4组肿瘤注射的野生型小鼠每5天进行称重,并计算平均值和标准偏差。注意,到第10天可在两组之间检测到平均体重的明显差异。第3组中的小鼠体重快速减轻、产生腹水并且出现竖毛。这些全身转移迹象均未在具有第4组肿瘤的野生型小鼠中发生。

具体实施方式

[0021] 本发明提供可用于抑制或预防肿瘤生长和转移的新型IgE抗体。肿瘤转移部分地由存在于肿瘤微环境内的细胞因子和先天免疫系统的骨髓(髓样)源细胞的相互作用而驱动。肿瘤细胞对细胞因子的局部表达将例如髓样抑制细胞吸引到肿瘤微环境中,继而导致这些细胞释放另外的细胞因子。肿瘤微环境内的细胞因子环境因此通过几十甚至数百种细胞因子和趋化因子变成复合物,这些因子促成癌症相关炎症。

[0022] 在肿瘤微环境中蓄积的肿瘤相关髓源性细胞诸如巨噬细胞和肥大细胞似乎与肿瘤进展相关(DePalma et al.,Cancer Cell 23(3):277-286(2013);Dalton et al.,Cancer Immunol Immunother DOI10.1007/s00262-012-1246-0,2012年4月18日在线出版)。这种关联受肿瘤微环境内存在的复杂细胞因子环境调控。例如,乳腺癌转移在存在2型细胞因子的情况下通过巨噬细胞增强(Ruffell B et al.,Trends Immunol.33:119(2012))。另外,响应于细胞因子,其他细胞诸如单核细胞、粒细胞和肥大细胞分泌蛋白水解酶,这些酶对细胞外基质(ECM)进行修饰,从而导致释放促进转移的ECM结合生长因子(Hanahan D&Coussens LM,Cancer Cell 21:309(2012);Lu P,et al.,Cold Spring Harb.Perspect.Biol.,3:a005058(2011))。因此,看来"在肿瘤组织中的慢性激活的髓样细胞支持许多肿瘤特征"(Coussens LM et al.,Science 339:286-291(2013));(Hanahan D&Coussens LM,Cancer Cell 21:309(2012))。

[0023] 本发明人已出人意料地发现:本发明的抗体可抑制原发性实体瘤以及继发性肿瘤和更高层次的肿瘤的转移。不受理论的约束,根据本发明的IgE抗体可对原发性肿瘤的肿瘤微环境中的宿主源非肿瘤细胞重编程,以使得抑制肿瘤转移或预防肿瘤转移的发生。本发明是独特的且出人意料的,因为其通过中间宿主源细胞来调节肿瘤细胞的行为。最终结果是原发性肿瘤将不会转移。这与大量记录的且众所周知的基于抗体的癌症疗法的各方面大相径庭,在基于抗体的癌症疗法中,采用抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)来治疗癌症以直接杀死癌细胞(Fu,et al.Clin.Exp.Immunol.,153:401-409,2008;Karagiannis P.,et al.,Cancer Immunol.Immunother.,58:915-930(2009),2008年10月22日在线出版;Karagiannis,SN,et al.,Cancer Immunol.Immunother.,57:247-263(2008)和Karagiannis,SN,et al.,J.Immunol.,179:2832-2843(2007))。

[0024] 在本发明的一个实施方案中,对宿主源非肿瘤细胞诸如髓样抑制细胞重编程在原发性实体瘤的肿瘤微环境内进行。宿主源非肿瘤细胞的重编程例如在向受试者施用有效量的肿瘤特异性IgE抗体后通过所述肿瘤微环境内的细胞因子和肿瘤特异性IgE抗体介导。在一个实施方案中,重编程包括在肿瘤微环境内形成三元复合物。在一个实施方案中,肿瘤微环境内的该三元复合物由IgE抗体,在其表面上具有肿瘤相关抗原的细胞诸如肿瘤细胞或可溶性肿瘤相关抗原,以及宿主源非肿瘤细胞构成。在向受试者施用有效量的抗体后,抗体特异性结合到肿瘤相关抗原和位于宿主源非肿瘤细胞表面上的抗体受体。

[0025] 术语“肿瘤微环境”或“肿瘤间质”意指围绕肿瘤细胞并供养肿瘤细胞的组织、细胞、分子和血管。肿瘤的微环境是动态的,并且肿瘤可改变其微环境,且微环境可影响肿瘤生长和扩散的方式。

[0026] 在一个实施方案中,宿主源非肿瘤细胞是肿瘤微环境的内源性定居细胞。如本文所用,可与术语“肿瘤间质内源性的”互换使用的“肿瘤微环境内源性的”意指插入瘤巢(tumor nest)中或围绕瘤巢的细胞类型的动态隔室(dynamic compartment)的一个或多个细胞,并包括但不限于将随时间而变化的结缔组织、脉管和炎性细胞,而且也包括肿瘤细胞本身。肿瘤间质的其他宿主源非肿瘤细胞包括成纤维细胞和血管细胞,包括但不限于间充质源细胞(诸如成纤维细胞、血管祖细胞、内皮细胞、脂肪细胞及其前体和血管内皮细胞)和不同表型的髓源性细胞,包括但不限于肥大细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞、血小板及其祖细胞以及浸润性淋巴细胞,包括CD4和CD8T细胞和B细胞。过敏效应细胞和/或髓样抑制细胞在本文也统称为髓源性细胞或髓系细胞。

[0027] 在一个优选的实施方案中,抗体包含人Fcε恒定区。在一个优选的实施方案中,IgE抗体是CA125、叶酸盐结合蛋白(FBP)、HER2/neu、MUC1和PSA特异性抗体。

[0028] 如本文所用,“受试者”是人类患者或其他动物,诸如另一种哺乳动物,其具有功能性肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和朗格汉斯细胞。在人中,所有这些细胞均表达所施用的本发明的IgE抗体的高亲和力IgE受体(FcεRI)。

[0029] 在一些情况下,本发明的IgE抗体可用于抑制从原发性肿瘤向与原发性肿瘤的部位不同的部位的扩散(也称为转移)。这些另外的肿瘤部位在为从原发性肿瘤部位转移的结

果时有时被称为继发性、三发性、四发性或更高层次的肿瘤部位。原发性肿瘤释放循环癌细胞，这些癌细胞首先必定在各种组织和器官诸如肝、肺和骨骼内建立微环境。这些最终产生临床上和放射照片上明显的转移。不同于主要留在血管腔隙内作为其固有生物学一部分的IgG抗体，IgE抗体迁移出血管空间到达体内的每个组织。

[0030] 在一个实施方案中，对肿瘤微环境内源性的宿主源非肿瘤细胞重编程在由循环癌细胞所形成的继发性、三发性、四发性或更高层次的肿瘤部位的微环境内进行。在第二实施方案中，细胞重编程通过所述继发性、三发性、四发性或更高层次的肿瘤微环境内的肿瘤特异性抗体介导，其中向受试者施用有效量的肿瘤特异性抗体。

[0031] 在一个实施方案中，宿主源非肿瘤细胞是肿瘤微环境内源性的髓源性抑制细胞。在一个优选的实施方案中，髓源性抑制细胞独立地选自肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和朗格汉斯细胞。在一个实施方案中，宿主源非肿瘤细胞是间充质源细胞，并独立地选自成纤维细胞、血管祖细胞、内皮细胞、脂肪细胞及其前体。

[0032] 本发明人也已发现本发明的抗体可介导肿瘤排斥。据证实，该效应通过由IgE和肿瘤相关细胞表面抗原所激活的髓源性细胞介导。肿瘤的杀伤是以下方面的结果：IgE抗体的局部效应，环境中存在髓源性细胞，以及巨噬细胞、嗜酸性粒细胞趋化性细胞因子。在一个实施方案中，本发明的IgE抗体可用于在发生转移后在继发性、三发性、四发性或更高层次的微环境部位处诱导肿瘤细胞死亡。在第二实施方案中，在继发性、三发性、四发性或更高层次的微环境部位处的肿瘤细胞死亡通过改变其中存在的细胞因子的模式和改变非肿瘤细胞的激活状态而介导，所有这些均响应于所述微环境内的肿瘤特异性抗体。在一个优选的实施方案中，肿瘤细胞死亡需要在所述微环境内形成三元复合物，该三元复合物由IgE抗体、具有靶抗原的肿瘤细胞和非肿瘤细胞构成。具体地讲，IgE抗体特异性结合到位于肿瘤细胞表面上的抗原和位于非肿瘤细胞表面上的抗体受体，其中向受试者施用有效量的抗体。在另一个实施方案中，非肿瘤细胞为髓源性抑制细胞。在一个优选的实施方案中，髓源性抑制细胞独立地选自肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和朗格汉斯细胞。在一个优选的实施方案中，IgE抗体为抗MUC1IgE。

[0033] 本发明人进一步发现：本发明的抗体可用于减缓原发性实体瘤或转移细胞或转移瘤在患者体内的生长动力学。在一个实施方案中，对髓源性细胞重编程在原发性实体瘤或一组转移细胞的肿瘤微环境内进行。在第二实施方案中，重编程通过所述肿瘤微环境内的肿瘤特异性抗体介导，其中向受试者施用有效量的肿瘤特异性抗体。在一个优选的实施方案中，重编程需要在实体瘤或转移细胞或转移瘤内形成三元复合物，所述三元复合物由抗体、实体瘤或转移细胞或转移瘤的肿瘤细胞和非肿瘤细胞构成，其中抗体特异性结合到位于肿瘤细胞表面上的抗原和位于非肿瘤细胞表面上的抗体受体，并且其中向受试者施用有效量的抗体。在另一个实施方案中，非肿瘤细胞为髓源性细胞。在一个优选的实施方案中，髓源性细胞为独立地选自肥大细胞、成髓细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和朗格汉斯细胞的髓系细胞。在一个优选的实施方案中，抗体为IgE。在一个更优选的实施方案中，IgE抗体为抗MUC1IgE。如本文所用，“受试者”为人类受试者或具有功能性肥大细胞、成髓细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和朗格汉斯细胞的其他动物，这些细胞对所施用的本发明的

IgE抗体具有受体亲和力。

[0034] 如本文所用的原发性实体瘤或转移细胞或转移瘤的生长动力学减缓或完全消除被定义为意指本领域所理解的含义。例如，生长动力学的减缓意指：对于给定的肿瘤类型而言，原发性实体瘤、转移细胞或转移瘤的指数生长、比生长速率或倍增时间相对于在体内或体外通常观察到的指数生长、比生长速率或倍增时间降低。肿瘤的完全消除是在存在IgE抗体的情况下在症状上、通过体检或放射成像发现不存在肿瘤，其中通过这些检测方法在之前发现存在肿瘤。

[0035] 本发明的“治疗性IgE抗体”(在本文也称为“本发明的单克隆IgE抗体”)是包含人epsilon(ε)恒定区并且还包含可变区的单克隆抗体，所述可变区包含至少一个抗原结合区，所述抗原结合区为肿瘤相关抗原(TAA)特异性的，所述肿瘤相关抗原为位于肿瘤微环境中或者说是与进行治疗的肿瘤紧邻的细胞表面抗原或可溶性癌抗原。一般认为，本发明的IgE抗体的治疗剂量将远低于与抗癌抗体疗法的IgE类(例如，曲妥珠单抗(HERCEPTIN®)和利妥昔单抗(RITUXAN®))相关的剂量，这不仅是因为IgE对FcεRI的高亲和力，还因为本发明的方法包括对肿瘤微环境内源性的一种或多种宿主源非肿瘤细胞进行重编程。IgE抗体似乎在肿瘤环境内具有级联效应，这促进对实体瘤的转移的抑制。该级联效应意味着：根据本发明的IgE抗体不需要施用来介导对靶抗原的药理效应，并因此例如不需要使CD20或HER2/neu受体饱和，例如，这对于常规的基于IgG的单克隆癌症疗法则是必需的。IgE抗体主动转运出血管空间，结合到在髓样细胞前体细胞上展示的fcεR。这与IgG抗体形成鲜明对比，后者通常位于血管空间中，并且仅通过质量作用穿过发生了通透率变化的血管离开该空间。

[0036] 如本文所用的术语“肿瘤相关抗原”(TAA)可以是本领域已知的任何类型的可与肿瘤相关的癌抗原，并包括存在于细胞表面(包括肿瘤细胞)上的抗原以及可溶性癌抗原。肿瘤和正常细胞上的多种细胞表面抗原具有可溶性对应物。这样的抗原包括但不限于存在于癌相关成纤维细胞(CAF)、肿瘤内皮细胞(TEC)和肿瘤相关巨噬细胞(TAM)上的那些抗原。癌相关成纤维细胞(CAFs)靶抗原的实例包括但不限于：碳酸酐酶IX(CAIX)、成纤维细胞激活蛋白α(FAPα)和基质金属蛋白酶(MMP)，包括MMP-2和MMP-9。肿瘤内皮细胞(TEC)靶抗原的实例包括但不限于血管内皮生长因子(VEGF)，包括VEGFR-1、2和3；CD-105(内皮素)；肿瘤内皮标记物(TEM)，包括TEM1和TEM8；MMP-2；存活素；和前列腺特异性膜抗原(PMSA)。肿瘤相关巨噬细胞抗原的实例包括但不限于：CD105、MMP-9、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3和TEM8。

[0037] 在一个实施方案中，治疗性IgE抗体可以为位于非肿瘤细胞上的癌抗原例如VEGFR-2、MMP、存活素、TEM8和PMSA特异性的。肿瘤抗原可以为上皮癌抗原(例如乳腺、胃肠、肺)、前列腺特异性癌抗原(PSA)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)、膀胱癌抗原、肺(例如小细胞肺)癌抗原、结肠癌抗原、卵巢癌抗原、脑癌抗原、胃癌抗原、肾细胞癌抗原、胰腺癌抗原、肝癌抗原、食道癌抗原或头颈癌抗原。癌抗原还可以是淋巴瘤抗原(例如，非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤)、B细胞淋巴瘤癌抗原、白血病抗原、骨髓瘤(即，多发性骨髓瘤或浆细胞骨髓瘤)抗原、急性淋巴细胞性白血病抗原、慢性骨髓白血病抗原或急性骨髓性白血病抗原。

[0038] 其他癌抗原包括但不限于存在于大多数人类腺癌上的粘蛋白-1蛋白或肽(MUC-1)：胰腺、结肠、乳腺、卵巢、肺、前列腺、头颈，包括多发性骨髓瘤和一些B细胞淋巴瘤；人表皮生长因子受体-2(HER-2/neu)抗原；与肺癌、头颈癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、卵

巢癌、脑癌和膀胱癌相关的表皮生长因子受体(EGFR)抗原;普遍在雄激素非依赖性前列腺癌中表达的前列腺特异性抗原(PSA)和/或前列腺特异性膜抗原(PSMA);与黑素瘤癌胚(CEA)抗原相关的gp-100(糖蛋白100);与刘易斯(Lewis)A血型物质有关并与结直肠癌相关的糖链抗原19.9(CA 19.9);以及黑素瘤癌抗原,诸如MART-1。

[0039] 其他抗原包括间皮素、叶酸盐结合蛋白(FBP)、糖链抗原125(CA-125)和黑素瘤相关抗原,诸如NYESO1。

[0040] 在一个实施方案中,癌抗原为细胞表面癌抗原的释放、可溶形式。在一个优选的实施方案中,肿瘤相关靶抗原严格地为位于肿瘤细胞表面上的细胞表面抗原。在一个优选的实施方案中,肿瘤相关抗原选自CA125、叶酸盐结合蛋白(FBP)、HER2/neu、MUC1和PSA。

[0041] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指单一分子组成的抗体的制备物。单克隆抗体组合物对于特定的表位展示出单一结合特异性和亲和力。本发明的单克隆抗体优选地为嵌合的、人源化的或全人的,以便在受试者宿主为人时结合人Fcε受体。人源化和全人抗体还可用于在宿主受试者为人时降低对例如嵌合抗体的鼠组分的免疫原性。单克隆抗体可通过包括但不限于重组和合成的标准技术来制备。

[0042] 术语“嵌合单克隆抗体”是指展示出单一结合特异性的抗体,其具有一个或多个源自一个抗体的区和一个或多个源自另一个抗体的区。在本发明的一个实施方案中,恒定区源自人epsilon(ε)恒定区(重链)和人k或λ(轻链)恒定区。本发明的嵌合IgE单克隆抗体的可变区通常为非人源的,诸如源自啮齿类动物,例如小鼠(鼠)、兔、大鼠或仓鼠。

[0043] 如本文所用,“人源化”单克隆抗体包含源自人ε恒定区(重链)和人k或λ(轻链)恒定区的恒定区。抗体的可变区优选地包含人源骨架和非人源抗原结合区(CDR)。

[0044] 全人或人样抗体可通过对基因工程改造的动物进行疫苗接种而产生,所述动物诸如为在艾伯基因科斯(Abgenix)公司(Thousand Oaks,CA)和麦德里克斯(MedaRex)(Princeton,NJ)产生的小鼠品系,其含有人免疫球蛋白遗传库并响应于疫苗接种而产生全人抗体。另外,使用噬菌体展示文库,将可在抗原筛选测定法中鉴定和选择的人可变区的编码区并入,以产生结合靶抗原的人免疫球蛋白可变区。

[0045] 术语“抗原结合区”是指本发明的抗体含有与抗原相互作用的氨基酸残基并为抗体赋予其对抗原的特异性和亲和力的那部分。抗体区包含维持抗原结合残基的正确形式所必需的“骨架”氨基酸残基。

[0046] “抗原”是能够被抗体结合的分子或分子的部分,其还能够诱导动物产生能够结合该抗原的表位的抗体。抗原可具有一个或多个相同或不同的表位。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体为单一表位特异性的。在一个实施方案中,抗原能够被本发明的IgE抗体结合,以形成免疫复合物,该免疫复合物与髓样效应细胞相结合能够对肿瘤微环境重编程以抑制或预防肿瘤生长或转移。在一个实施方案中,抗原就其本身而言出于多种原因可能不能刺激免疫反应,这些原因例如为抗原是“自身”抗原,通常不被免疫系统识别为需要作出反应,或要不然免疫系统变为对该抗原耐受而不产生免疫反应。在另一个实施方案中,抗原为MUC1。

[0047] 术语“表位”意指抗原能够被抗体识别且在抗体结合区的一个或多个处被抗体结合的那部分。表位通常包含分子的化学活性表面基团,诸如氨基酸或糖侧链,并具有特定的三维结构特性以及特定的电荷特性。在一个实施方案中,抗原的表位为重复性表位。在一个

实施方案中，抗原的表位为非重复性表位。

[0048] “三元复合物”是在肿瘤微环境中形成的复合物，其由本发明的IgE抗体、细胞表面肿瘤相关靶抗原和宿主源非肿瘤细胞构成，其中抗体特异性结合到肿瘤相关抗原和位于非肿瘤细胞表面上的抗体受体。

[0049] 在一个优选的实施方案中，抗原为CA-125、叶酸盐结合蛋白(FBP)、HER2/neu、MUC1或PSA。在一个实施方案中，非肿瘤细胞为效应细胞。在一个实施方案中，效应细胞为髓系过敏和/或抗寄生虫效应细胞。在一个优选的实施方案中，IgE为抗MUC1IgE。在一个优选的实施方案中，抗体受体为FcεRI。

[0050] 在一个实施方案中，三元复合物包含结合到可溶性癌抗原和位于宿主源非肿瘤细胞表面上的抗体受体的IgE抗体。在一个优选的实施方案中，三元复合物包含结合到在肿瘤细胞表面上表达的肿瘤相关靶抗原和位于肿瘤微环境内源性的宿主源非肿瘤细胞上的FcεRI的IgE抗体。

[0051] 提升抗体(诸如对抗原的鼠抗体)和确定所选的抗体是否结合到唯一的抗原表位的方法是本领域熟知的。

[0052] 筛选所需的抗体可通过本领域已知的技术完成，这些技术例如为放射性免疫测定法、ELISA(酶联免疫吸附测定法)、“夹心”免疫测定法、免疫放射测定法、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定法、原位免疫测定法(采用例如胶体金、酶或放射性同位素标记)、西部(Western)印迹、沉淀反应、凝集测定法(例如凝胶凝集测定法、血凝测定法)、补体固定测定法、免疫荧光测定法、蛋白A测定法和免疫电泳测定法等。本领域已知许多方式用来在免疫测定法中检测结合，这些方式在本发明的范围内。

[0053] 对于单克隆抗体的制备，可以使用通过培养中的传代细胞系来产生抗体分子的任何技术(参见例如Antibodies--A Laboratory Manual,Harlow and Lane,eds.,Cold Spring Harbor Laboratory Press:Cold Spring Harbor,New York,1988)。这些包括但不限于最初由Kohler和Milstein(1975,Nature 256:495-497)开发的杂交瘤技术，以及三瘤(trioma)技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor et al.,1983,Immunology Today,4:72)和EBV-杂交瘤技术以产生人单克隆抗体(Cole et al.,1985,in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,pp.77-96)。在本发明的另外的实施方案中，可采用最新的技术(PCT/US90/02545)在无菌动物中产生单克隆抗体。根据本发明，可以使用人抗体，并且人抗体可通过使用人杂交瘤(Cote et al.,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,80:2026-2030)或通过在体外用EBV病毒转化人B细胞(Cole et al.,1985,in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,pp.77-96)而获得。事实上，根据本发明，可以使用通过将来自多肽特异性的小鼠抗体分子的基因与来自具有适当生物活性的人抗体分子的基因拼接在一起而产生“嵌合”抗体所开发的技术(Morrison et al.,1984,J.Bacteriol.159:870;Neuberger et al.,1984,Nature 312:604-608;Takeda et al.,1985,Nature 314:452-454)；这样的抗体在本发明的范围内。

[0054] 在一个实施方案中，本发明的抗体是IgE单克隆抗体，其含有选自以下的核酸序列：由包含SEQ ID NO:1的核酸序列编码的重链可变区、由包含SEQ ID NO:2的核酸序列编码的轻链可变区及其任意组合，并且其中重链和轻链分别接枝到人ε重链和k轻链基因上。

[0055] 在一个实施方案中，本发明的抗体是IgE单克隆抗体，其含有选自以下的核酸序

列:由SEQ ID NO:3的核酸编码的重链可变区、由SEQ ID NO:4的核酸编码的轻链可变区及其任意组合,并且其中重链和轻链分别接枝到人ε重链和k轻链基因上。

[0056] 在一个实施方案中,本发明提供单克隆抗体3C6.hIgE,其包含从VU-3C6杂交瘤克隆的并分别接枝到人Ig k轻链和ε重链基因上的IgG轻链和重链的可变区。VU-3C6靶向人粘蛋白1(hMUC1)—在由腺上皮所产生的肿瘤上过表达的粘蛋白的高度糖基化形式。在一个实施方案中,本发明包括IgE抗体4H5hIgE,其为与3C6.hIgE特异性的MUC1同种型不同的MUC1同种型特异性的。

[0057] 在一个实施方案中,本发明的抗体为单克隆抗体3C6.hIgE,其含有由包含SEQ ID NO:1的核酸序列编码的重链可变区、由包含SEQ ID NO:2的核酸序列编码的轻链可变区。

[0058] 在一个实施方案中,本发明的抗体为单克隆抗体4H5hIgE。抗体4H5.hIgE具有由SEQ ID NO:3的核酸编码的重链可变区和由SEQ ID NO:4的核酸编码的轻链可变区,并且这些区接枝到人Ig k轻链和ε重链基因上。

[0059] 在一个实施方案中,本发明的抗体为MUC1的表位特异性的IgE单克隆抗体。在一个实施方案中,本发明的抗体为MUC1的表位特异性的,所述表位包含MUC1的氨基酸STAPPAHGVTSAPDTRPAPG[SEQ ID NO:5]。确切的表位位于表征MUC1外部结构域的20个氨基酸重复中的一个。在一个实施方案中,本发明的抗体能够在STAPPAHGVTSAPDTRPAPG[SEQ ID NO:5]所限定的表位处结合MUC1。

[0060] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体由阳性转染瘤表达,所述转染瘤通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)和西部(Western)印迹鉴定。阳性转染瘤将针对最高产率通过有限稀释而克隆,并针对抗体产生而选择。如本文所用,"转染瘤"包括表达抗体的重组真核宿主细胞,诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和NS/0骨髓瘤细胞。这样的转染瘤方法是本领域熟知的(Morrison,S.(1985)Science,229:1202)。之前公布的用于生成小鼠/人嵌合或人源化抗体的方法已成功产生了各种人嵌合抗体或抗体融合蛋白(Helguera G,Penichet ML.,Methods Mol.Med.(2005)109:347-74)。

[0061] 一般来讲,嵌合小鼠-人单克隆抗体(即,嵌合抗体)可通过本领域已知的重组DNA技术产生。例如,将编码鼠(或其他物种)单克隆抗体的Fc恒定区的基因用限制性内切酶消化,以移除编码鼠Fc的区,并将编码人Fc恒定区的基因的等同部分代入。(参见Robinson et al.,国际专利公布PCT/US86/02269;Akira,et al.,欧洲专利申请184,187;Taniguchi,M.,欧洲专利申请171,496;Morrison et al.,欧洲专利申请173,494;Neuberger et al.,国际申请WO 86/01533;Cabilly et al.美国专利No.4,816,567;Cabilly et al.,欧洲专利申请125,023;Better et al.(1988Science,240:1041-1043);Liu et al.(1987)PNAS,84:3439-3443;Liu et al.,1987,J.Immunol.,139:3521-3526;Sun et al.(1987)PNAS,84:214-218;Nishimura et al.,1987,Canc.Res.,47:999-1005;Wood et al.(1985)Nature,314:446-449和Shaw et al.,1988,J.Natl Cancer Inst.,80:1553-1559)。

[0062] 嵌合抗体可通过以下方式进一步人源化:将不在抗原结合中直接涉及的Fv可变区的序列用来自人类Fv可变区的等价序列替换。Morrison,S.L.,1985,Science,229:1202-1207以及Oi et al.,1986,BioTechniques,4:214提供了人源化嵌合抗体的一般性综述。这些方法包括分离、操纵和表达编码重链或轻链至少一条中的免疫球蛋白Fv可变区的全部或一部分的核酸序列。这样的核酸的来源是本领域技术人员熟知的,并例如可得自7E3,这是

一种产生抗$GPII_bIII_a$抗体的杂交瘤。然后可将编码嵌合抗体或其片段的重组DNA克隆进适当的表达载体。合适的人源化抗体作为另外一种选择可通过CDR取代而产生(美国专利No.5,225,539;Jones et al.1986Nature,321:552-525;Verhoeyan et al.1988Science,239:1534和Beidler et al.1988J.Immunol.,141:4053-4060)。

[0063] 在一个实施方案中,使用各种策略,使本发明的IgE单克隆抗体的免疫原性与例如得出该抗体的亲代抗体相比得以降低。例如,可通过以下方式使本发明的包含人Fcε恒定区和鼠可变区的嵌合IgE单克隆抗体对人受试者的免疫原性更低:对包含恒定区和可变区的人源化抗体进行基因工程改造,所述恒定区源自人Fcε,所述可变区包含人源骨架和非人源抗原结合区,所述抗原结合区维持与亲代嵌合抗体相同的抗原特异性。作为另外一种选择,包含与亲代嵌合IgE单克隆抗体相同的抗原特异性的全人或人样抗体也可使用已知的程序进行基因工程改造。

[0064] 用于降低本发明的IgE单克隆抗体的免疫原性的其他方法包括但不限于诸如DE-IMMUNIZATION™(Biovation Ltd.,Aberdeen,United Kingdom和Merck KgaA,Darmstadt,Germany)的方法。该技术是这样一个过程,该过程鉴定可在人类中导致免疫原性的鼠或嵌合单克隆抗体诸如“人抗小鼠抗体”(HAMA)或“人抗嵌合抗体”(HACA)上存在的鼠表位。该过程还在遗传上改变这些表位以与未接受该过程的抗体相比避免或至少降低免疫原性。

[0065] 降低单克隆抗体的免疫原性的其他方法(Lazar et al.,Mol Immunol.,44,1986-1998(2007))鉴定可以激活辅助T细胞从而导致HAMA或HACA反应的骨架和抗原结合区肽或构象基序。使用该方法,将新的定量范式用于确定鼠可变区的“人源性”,并将低人源性的鼠区替换成较高人源性的区,从而降低抗体的免疫原性。

[0066] 如本文所用,诱导IgE介导的免疫反应包括以下一者或多者:

[0067] i)在肿瘤微环境内或在肿瘤细胞上形成三元复合物,其包括将IgE抗体结合到髓源细胞以及结合到肿瘤特异性抗原,以使得对髓源细胞的重编程抑制或预防肿瘤转移;

[0068] ii)超敏型反应,其由尤其是在肿瘤微环境中的抗原/IgE免疫复合物刺激,如通过经由IgE抗体受体FcεRI和/或FcεRII结合到这样的免疫复合物的肥大细胞和嗜碱性粒细胞的脱粒从而导致例如释放组氨酸所证实;

[0069] iii)经由对抗尤其是在肿瘤微环境中的抗原/IgE免疫复合物的ADCC免疫反应、ADCP免疫反应或ADCC和ADCP两种免疫反应而直接靶向肿瘤细胞,如在经由IgE抗体受体FcεRI和FcεRII结合到抗原/IgE免疫复合物时,通过嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和其他细胞的刺激而释放促炎性细胞因子、蛋白酶和血管活性脂质介质(例如,白三烯、前列腺素D2和血小板激活因子)所证实;

[0070] iv)适应性细胞反应,如部分地通过产生对抗原、抗原/IgE抗体免疫复合物或与MHC复合的抗原的肽呈特异性的T细胞所证实;

[0071] v)响应于用抗原/IgE抗体免疫复合物进行的挑战而产生的Th1/Tc1免疫反应,如例如通过产生对肿瘤抗原和肿瘤呈特异性的CD8IFNγ阳性T细胞所证实;

[0072] vi)体液反应,如通过产生对抗抗原或抗原/IgE免疫复合物的新型、内源性抗体所证实。

[0073] 如本文所用,本发明的IgE单克隆抗体的“有效量”是这样一种量,其根据本发明足以识别和结合为细胞表面抗原的TAA的表位,并诱导、引起或增强参比免疫反应。

[0074] 本发明还提供诱导IgE介导的免疫反应的方法，该免疫反应对抗能够产生这种反应的受试者体内的循环肿瘤细胞上的细胞表面抗原。该方法包括向受试者施用有效量的特异性结合循环肿瘤细胞表面的表位的IgE单克隆抗体，从而导致对抗肿瘤的IgE介导的免疫反应。

[0075] 如本文所用，通过循环肿瘤细胞或临床上不明显的转移上的细胞表面抗原而触发的IgE介导的免疫反应的诱导部分地通过以下任一者所证实：

[0076] i)完全或部分地因对肿瘤微环境中的髓源性细胞重编程而抑制肿瘤生长和/或促进肿瘤破坏；

[0077] ii)经由具有人Fcε受体的效应细胞在肿瘤环境中出现的急性炎症及后续肿瘤生长抑制和/或破坏，所述受体能够结合单克隆IgE抗体并引导对微环境中的抗原的ADCC免疫反应、ADCP免疫反应或ADCC和ADCP两种免疫反应；

[0078] iii)通过出现T细胞所证实的继发性T细胞反应，从而导致肿瘤生长抑制或裂解和破坏，所述T细胞展示出对靶肿瘤抗原或二级额外(secondarily additional)抗原的特异性，所述抗原源自肿瘤并在肿瘤细胞上在MHC的背景下表达；或

[0079] iv)通过产生抗其他抗原的T细胞所证实的抗肿瘤T细胞反应，所述其他抗原与如上文在(ii)中已发生了裂解的肿瘤细胞相关。

[0080] 本发明还提供诱导对受试者中原发性肿瘤表面上的TAA或对循环转移瘤细胞表面上的TAA的直接IgE介导的ADCC免疫反应、ADCP免疫反应或ADCC和ADCP两种免疫反应的方法，所述受试者能够产生这种免疫反应，所述方法包括：向受试者施用有效量的特异性结合循环抗原的单一表位的IgE单克隆抗体，其中引起针对该抗原的IgE介导的ADCC免疫反应以及可能或任选的ADCP免疫反应。在一个优选的实施方案中，ADCC免疫反应以及可能或任选的ADCP免疫反应在肿瘤或肿瘤细胞的微环境中引起。在另一个实施方案中，ADCC免疫反应以及可能或任选的ADCP免疫反应能够经由旁观者、附带效应(bystander,colateral effect)导致肿瘤微环境内的肿瘤细胞的裂解和杀伤或肿瘤细胞的裂解和杀伤。

[0081] 本发明还提供治疗与本发明的抗体特异性的抗原相关的癌症的方法，方式是施用包含本发明的特异性结合肿瘤相关抗原的至少单个表位的IgE单克隆抗体的组合物。这样的癌症包括但不限于胰腺癌、胃癌(胃部的癌症)、结直肠癌和肺癌。可通过本发明的方法治疗的其他类型的癌症包括但不限于：骨肉瘤、食道癌、肺癌、间皮瘤、肝癌、胃癌、胰腺癌、结直肠癌、直肠癌、结肠癌、输尿管肿瘤、脑瘤、胆囊癌、胆管瘤、胆管癌、肾癌、乳腺癌、膀胱癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、甲状腺癌、睾丸肿瘤、卡波氏肉瘤、上颌癌、舌癌、唇癌、口腔癌、喉癌、咽喉癌、肌肉瘤、皮肤癌等。

[0082] 在一个实施方案中，本发明提供通过向受试者施用本发明的特异性结合MUC1的表位的治疗性IgE单克隆抗体而治疗受试者中的上皮源癌症的方法。在一个优选的实施方案中，本发明的结合MUC1的单一表位的治疗性IgE单克隆抗体通过对原发性肿瘤中的肿瘤微环境重编程而抑制或预防肿瘤转移，或通过干扰促进肿瘤长到其起源组织之外的宿主源髓样细胞的网络的建立而预防临床上或放射照片上明显的转移的建立。

[0083] 在一个实施方案中，术语“对肿瘤微环境重编程”意指肿瘤中宿主源定居髓样细胞或随后卷入肿瘤中的过敏效应细胞上的抗原结合的IgE对肿瘤生长和转移的净效应。一旦结合到位于肿瘤微环境区域中的抗原和宿主源细胞上的高亲和力FcεRI，肿瘤行为即发生

变化，使得肿瘤将不会形成转移，如通过症状、体检或放射成像所证实。在一个实施方案中，对肿瘤微环境重编程通过形成三元复合物而促进。在一个实施方案中，三元复合物由IgE抗体、效应细胞和肿瘤相关抗原构成。

[0084] 本发明还提供药物组合物。这样的组合物包含治疗有效量的本发明的抗体和药学上可接受的载剂。在一个优选的实施方案中，药物组合物包含本发明的特异性结合MUC1的单一表位的治疗性IgE单克隆抗体。

[0085] 在一个实施方案中，术语“药学上可接受的”意指由联邦或州政府的监管机构批准或在美国药典或其他公认药典中所列的用于动物更具体地讲用于人类的。术语“载剂”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这样的药物载剂可以为无菌液体，诸如水和油，包括石油、动物、蔬菜或合成来源的那些油，诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物经静脉内施用时，水是优选的载剂。盐水溶液以及右旋糖和甘油水溶液也可用作液体载剂，尤其是用于注射用溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要，组合物还可以包含微量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可呈溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制剂等的形式。组合物可通过传统的粘结剂和载剂诸如甘油三酯而配制成栓剂。口服制剂可包含标准载剂，诸如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载剂的实例在E.W.Martin所著的"Remington's Pharmaceutical Sciences"中有所描述。这样的组合物将包含治疗有效量的抗体或其片段，优选地呈纯化的形式，以及适量的载剂以便提供正确施用给患者的形式。制剂应适合施用方式。

[0086] 根据本发明的方法，包含本发明的IgE单克隆抗体的组合物可通过任何免疫学上合适的途径施用。例如，可通过静脉内、皮下、腹膜内、鞘内、膀胱内、皮内、肌内或淋巴管内途径将抗体引入患者体内。组合物可呈溶液、片剂、气雾剂或多相制剂的形式。脂质体、长循环脂质体、免疫脂质体、生物降解性微球、胶束等也可用作载剂、媒介物或递送系统。此外，使用本领域熟知的离体程序，可从患者体内抽取血液或血清；任选地，可能可取的是对患者血液中的抗原进行纯化；然后可将血液或血清与包含根据本发明的结合剂的组合物混合；最后将经过处理的血液或血清重新注入患者体内。本发明不应限于任何特定的将结合剂引入患者体内的方法。

[0087] 在一个优选的实施方案中，根据常规程序将组合物配制成适于经静脉内施用给人类的药物组合物。通常，供静脉内施用的组合物是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。若组合物要通过输注而施用，则其可用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶进行分配。若组合物通过注射而施用，则可提供一安瓿无菌注射用水或盐水，以便可在施用前对成分进行混合。

[0088] 本发明的组合物可被配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与阴离子形成的那些和与阳离子形成的那些，所述阴离子诸如为衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些，所述阳离子诸如为衍生自钠、钾、铵、钙、铁的氢氧化物、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0089] 本发明的组合物将有效治疗、抑制和预防与本发明的抗体特异性的抗原相关的肿瘤发生转移的量可通过标准临床技术来确定。IgE抗体在血管外空间中的存在情况可通过响应于纯化抗原(例如MUC1)的皮内施用而产生的标准皮肤风团-潮红反应来测定。此外，可

任选地采用体外测定法以帮助确定最佳的剂量范围。待用于制剂中的精确剂量还将取决于施用途径以及疾病或障碍的严重性，并且应根据执业医生的判断和每个患者的情况来决定。有效剂量可从得自体外或动物模型试验系统的剂量反应曲线外推而得。

[0090] 对于本发明的抗体，施用给患者的剂量通常为0.001μg/kg至1mg/kg患者体重。优选地，施用给患者的剂量在0.01μg/kg与0.1mg/kg患者体重之间，更优选地0.02μg/kg至20μg/kg患者体重。一般来讲，本发明的IgE单克隆抗体比得自其他物种的抗体具有高得多的FcεR亲和力(例如与IgG抗体相比)和更长的人体内半衰期。因此，通常可以采用更低剂量的本发明的抗体和更低频率的施用。

[0091] 本发明的药物组合物也可以在联合疗法中施用，即与其他药剂联用。例如，联合疗法可包括本发明的组合物与至少一种其他抗肿瘤剂、功效增强剂和/或安全性增强剂。

[0092] 本发明的药物组合物具有体外和体内诊断及治疗功用。例如，这些分子可施用给培养中的细胞，例如体外或离体，或受试者体内的细胞，例如体内，以治疗癌症。如本文所用，术语“受试者”旨在包括人类和非人类动物。优选的受试者是患有癌症的人类患者。如本文所用，术语“治疗”癌症包括：预防患者中出现肿瘤转移；抑制患者中癌症的发生；消除或降低患有转移癌或局限于原始器官的癌症的患者中先前存在的肿瘤负荷；延长癌症患者在通过化疗和/或手术初步治疗后的缓解期；和/或延长患者中癌症缓解与癌症复发之间的任何周期。

[0093] 如本文所用，在本发明的上下文中的“抑制”意指减慢、阻碍、限制、减少或预防。例如，术语“抑制原发性肿瘤细胞的转移”在本文中使用时意指减慢、阻碍、限制、减少或预防原发性肿瘤细胞转移。

[0094] 如本文所用，“施用”是指导致将包含本发明的抗体的组合物暴露于预定的细胞或组织(通常为哺乳动物)或与之接触的任何动作。如本文所用，施用可在体内、体外或离体进行。例如，组合物可通过注射或通过内窥镜施用。施用还包括直接向细胞施加根据本发明的组合物。例如，在手术过程中，可暴露出肿瘤细胞。根据本发明的一个实施方案，这些暴露的细胞(或肿瘤)可直接暴露于本发明的组合物，例如，通过洗涤或灌注手术部位和/或细胞，或通过直接在肿瘤内注射IgE产品本身。

[0095] 当用于治疗癌症的疗法时，本发明的抗体以治疗有效量(即，治疗临床上明显的肿瘤，或在原始部位或远处预防在将来的某个时间点出现临床上明显的肿瘤所需的量)施用给患者。本发明的抗体及包含所述抗体的药物组合物通常将经肠胃外施用(当可能时)，或在靶细胞部位施用，或经静脉内施用。

[0096] 在另一个实施方案中，本发明的IgE抗体可与第二治疗剂(例如，化疗剂)共同施用。这样的治疗剂包括例如抗肿瘤剂，诸如多柔比星、顺铂、硫酸博来霉素、紫杉醇、卡莫司汀、苯丁酸氮芥和环磷酰胺。这些药剂本身仅在对患者具有毒性或亚毒性的水平上有效。此外，不认为这些药剂在扩散到其起源组织之外的常见实体瘤中有效。通过共同施用肿瘤特异性IgE抗体和常见的化疗剂，目标将在于通过预防化疗耐药性的出现而增强化疗剂的活性，化疗耐药性是微环境中的宿主源非肿瘤细胞的结果。

[0097] 本发明的药物组合物可包含一种或多种选自以下的另外的化疗剂：氮芥(例如环磷酰胺和异环磷酰胺)、氮丙啶(例如噻替派)、烷基磺酸盐(例如白消安)、亚硝基脲(例如卡莫司汀和链脲霉素)、铂络合物(例如卡铂和顺铂)、非典型烷化剂(例如达卡巴嗪和替莫唑

胺)、叶酸盐类似物(例如甲氨蝶呤)、嘌呤类似物(例如氟达拉滨和巯基嘌呤)、腺苷类似物(例如克拉屈滨和喷司他丁)、嘧啶类似物(例如氟尿嘧啶(单独地或与亚叶酸结合)和吉西他滨)、取代的脲(例如羟基脲)、抗肿瘤抗生素(例如博莱霉素和多柔比星)、表鬼臼毒素(例如依托泊苷和替尼泊苷)、微管剂(例如多西他赛和紫杉醇)、喜树碱类似物(例如伊立替康和托泊替康)、酶(例如天冬酰胺酶)、细胞因子(例如白介素-2和干扰素-α)、单克隆抗体(例如曲妥单抗和贝伐单抗)、重组毒素和免疫毒素(例如重组霍乱毒素-B和TP-38)、癌症基因疗法、物理疗法(例如热疗、放疗和手术)和癌症疫苗(例如抗端粒酶的疫苗)。

[0098] 通过以下非限制性实施例对本发明进一步举例说明。

[0099] 实施例

[0100] 实施例1:形成嵌合IgE基因载体

[0101] 针对人粘蛋白1(hMUC-1)(在源自腺上皮的肿瘤上过表达的粘蛋白)的两种不同的同种型而产生杂交瘤VU-3C6和VU-4H5。从每个杂交瘤克隆抗体可变基因片段并测序,然后使用标准程序接枝到人k轻链和ε重链基因片段上。对得自人外周淋巴细胞的k cDNA克隆然后将该序列与数据库序列(例如GenBank:J00241.1)进行比较。从表达IgE的杂交瘤(SKO-007,ATCC CRL 8033-1)克隆ε恒定区cDNA,然后与数据库中的基因组序列(例如GenBank:J00222.1)进行比较。将最终IgE小鼠-人嵌合抗体命名为3C6.hIgE和4H5.hIgE。最终的质粒在图1A中示出。

[0102] 1F5杂交瘤靶向人CD20(hCD20),这是一种pan-B细胞标志物和治疗B细胞淋巴瘤及多种自身免疫疾病的重要治疗靶标。从1F5杂交瘤克隆抗体可变基因片段,并如上所述使用标准程序接枝到人Ig k轻链和ε重链基因上。将最终的IgE嵌合抗体命名为1F5.hIgE。最终的质粒在图1A中示出。

[0103] 将最终的质粒转染进CHO-K1细胞(美国典型培养物保藏中心(ATCC),Manassas,VA)以制备和纯化抗体。使用抗hIgE亲和柱,将人IgE通过快速蛋白液相色谱法(FPLC)纯化。图1B显示了纯化的嵌合IgE与人IgE同种型对照(得自人骨髓瘤SKO-007的IgE,以类似的方式纯化)的SDS-PAGE比较。所有三个嵌合抗体样品均是纯的,与对照hIgE相比具有微弱的大小差异(可能是由于不同的糖基化模式)。在还原条件下,ε重链在75kDa迁移,不同于作为50kDa多肽而迁移的γ重链。

[0104] 测试了纯化的抗体结合其相应天然抗原(即,CD20和MUC1)的能力。如经由流式细胞术所分析,1F5.hIgE结合通过人CD20转染的A20小鼠B细胞淋巴瘤,但不结合野生型细胞系(图1C左图)。类似地,3C6.hIgE结合到通过人MUC1转染的4T1鼠乳腺癌细胞,但不结合到未转染的4T1细胞(图1C中图)。4H5.hIgE结合到源自人MUC-1的串联重复、胞外结构域的50-mer肽,如通过ELISA所检测,但不结合对照肽(图1C右图)。因此,使用所述人ε和k恒定区以及制备和纯化方案未影响原始小鼠抗体的可变区对抗原的识别。

[0105] 实施例2:1F5.hIgE(抗hCD20)产生的IgE介导肿瘤细胞毒性

[0106] 为了确定抗hCD20嵌合抗体1F5.hIgE是否具有功能性IgE Fc区,我们研究了其激活脐带血源性肥大细胞(CBMC)的能力。使用白介素-8(IL-8)的产生作为CBMC激活的量度,我们观察到:用1F5.hIgE预先包被的CBMC在存在hCD20转染的小鼠B细胞(A20.hCD20)而非未转染的细胞的情况下产生了IL-8。类似地,只有用抗hCD20IgE(1F5.hIgE)包被的CBMC才对$hCD20^{+}$人B细胞OCI-Ly8产生反应,而用对照IgE(SKO)包被的CBMC未在这些条件下产生

IL-8。这些数据表明1F5.hIgE以抗原依赖性和抗原特异性方式激活肥大细胞。

[0107] 肥大细胞和IgE介导的肿瘤细胞毒性

[0108] 为了测试肿瘤特异性IgE介导的潜在细胞毒性效应，我们关注于已知表达高亲和力IgE受体FcεRI并对该受体作出反应的效应细胞。之前的研究人员报导了由人单核细胞和肿瘤特异性IgE介导的肿瘤细胞毒性(Karagiannis et al.(2003).Eur J Immunol 33:1030-1040)。我们在自己的系统中使用U937单核细胞观察到了类似的结果。在该报告中，我们关注于使用人肥大细胞和嗜酸性粒细胞获得的数据；这两种细胞类型涉及在过敏和哮喘中观察到的发病和组织损伤(Rothenberg et al.,2006Nat Rev Immunol 8:205-217;Gould and Sutton.2008Nat Rev Immunol 8:205-217;Tsai et al.,2005Chem Immunol Allergy 87:179-197)。肥大细胞尤其受到关注，因为它们位于产生肿瘤的组织内、表达高水平的FcεRI并在激活时触发协调的炎性反应，该反应募集可能介导肿瘤消退的嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和其他效应细胞(Theoharides and Conti,2004Trends Immunol 25:235-241)。之前，已证实肥大细胞经由TNF和过氧化物酶体系发挥杀肿瘤作用(Henderson et al.,1981J Exp Med 153:520-533;Benyon et al.,1991J Immunol 147:2253-2258;Ozdemir,O.2007J Immunol Methods 319:98-103)。

[0109] 为了测试激活的肥大细胞是否能直接诱导肿瘤细胞死亡，我们制备了纯化的、经培养的肥大细胞并将它们与IgE和肿瘤温育。源自脐带血的经培养的肥大细胞(CBMC)在功能上类似于从组织现分离的人类肥大细胞(Saito et al.,1996J Immunol 157:343-350)。将CBMC与OCI-Ly8B细胞在存在抗CD20(1F5.hIgE)或对照(SKO-007)IgE的情况下混合。24h后，添加碘化丙啶(PI)以标记死亡细胞，并通过流式细胞术对混合物进行分析。也为PI^+的$CFSE^+$细胞的百分比表示存在的死亡/濒死肿瘤细胞的分率。当添加1F5.hIgE时，与对照抗体相比，观察到了肿瘤细胞毒性的增加(图2A)。将效应细胞:靶细胞比率增至2:1以上未增加该效应的幅度。

[0110] 为了研究机理，通过已公布的抗体依赖性细胞吞噬测定法(Karagiannis 2003supra)，将肥大细胞用c-kit抗体标记，并在存在特异性或对照IgE的情况下测量c-kit+/CFSE+细胞的百分比。我们未观察到肥大细胞的任何明显的IgE依赖性吞噬活性(CBMC通过这种活性可诱导肿瘤细胞死亡)，将细胞混合物与一系列封闭抗体或兔IgG1同种型对照进行温育。添加抗TNF将肿瘤细胞毒性从24.2±3.5％降至14.0±0.3％(图2B)。对于所测试的其他抗体，见到了轻微的降低，但这些差异无统计显著性。

[0111] 嗜酸性粒细胞和IgE介导的肿瘤细胞毒性

[0112] 肿瘤嗜酸性粒细胞增多已与预后良好相关联，尤其是在胃肠道肿瘤中(Fernandez-Acenero et al.,2000Cancer 88:1544-1548;Iwasaki et al.,1986Cancer 58:1321-1327;Pretlow et al.,1983Cancer Res43:2997-3000)。

[0113] 之前，Karagiannis等人已报导了从人外周血分离的嗜酸性粒细胞在用卵巢癌细胞系IGROV测试时以IgE依赖性方式介导细胞毒性(Karagiannis et al.,2007J Immunol 179:2832-2843)。为了获得足够数量的天然人类嗜酸性粒细胞，我们在存在IL-3和IL-5的情况下对脐带血单核细胞进行了分化。通过该方案获得的嗜酸性粒细胞表现出与外周血嗜酸性粒细胞的表型和功能相似性(Zardini et al.,1997J Immunol Methods205:1-9)。3周后，如通过流式细胞术所分析，培养物中>95％的活细胞在表型上类似于成熟嗜酸性粒细胞

($CD66b^+$,$CD16^-$)。我们将这些细胞命名为脐带血源性嗜酸性粒细胞(CBEo)。我们将CBEo与OCI-Ly8B细胞混合,并添加了5.0μg/ml的对照(SKO)或肿瘤特异性(1F5.hIgE)IgE抗体。在37℃下24h后,添加PI以标记死亡细胞,并通过流式细胞术对混合物进行分析(图2C)。与通过CBMC观察到的一样,CBEo在存在肿瘤特异性IgE的情况下与对照IgE相比触发了肿瘤细胞死亡的增加。令人感兴趣的是,该效应的抗体依赖性在较高的效应细胞-靶细胞比率下不太明显,从而表明更高的嗜酸性粒细胞与肿瘤比率可以按非抗体依赖性方式导致细胞死亡。

[0114] 为了研究CBEo介导的肿瘤细胞毒性的机理,我们将培养物与一组封闭抗体和抑制剂进行温育(图2D)。我们观察到采用TNF相关细胞凋亡诱导配体(TRAIL)的封闭抗体时肿瘤死亡的适度降低,并在添加低浓度的肝素(10U/ml)时观察到了更明显的效应。认为肝素(一种阴离子分子)通过中和嗜酸性粒细胞释放的阳离子蛋白(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)、主要碱性蛋白(MBP)、嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO)和嗜酸性粒细胞源神经毒素(EDN))而发挥这种效应(Swaminathan et al.,2005Biochemistry 44:14152-14158)。已证实,这些阳离子蛋白通过破坏带负电的细胞膜而导致真核细胞死亡(Carreras et al.,2003Biochemistry42:6636-6644)。

[0115] 激活的CBMC的细胞因子表达谱

[0116] 大量的基因在肥大细胞被IgE和抗原激活时由激活的肥大细胞上调(Sayama et al.,2002Immunol 3:5)。为了研究哪些细胞因子/趋化因子通过被肿瘤特异性IgE激活的肥大细胞产生,我们对细胞因子进行了无偏筛查(unbiased screen)。使用基于微珠的多重测定法,对得自通过与IgE和肿瘤细胞共培养而激活的肥大细胞的上清液分析了36种细胞因子。通过以下两种方法,将CBMC通过FcεRI在37℃下激活24小时:与IgE和抗IgE共培养,或通过将抗hCD20IgE与表达hCD20的肿瘤细胞共培养。评估了一组炎性、生长和趋化因子。为了鉴定在激活与静息肥大细胞中明显上调的细胞因子,我们应用了2类芯片显著性分析(SAM)算法($q<0.05$,倍数变化>5.0)。SAM鉴定了炎性细胞因子,诸如巨噬细胞炎症蛋白(MIP)-1α、MIP-1β、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、上皮中性粒细胞激活肽78(ENA78)和IL-8。正如预期,当肥大细胞被多价抗原(例如,细胞表面抗原)激活时的反应强度大于被简单的二价交联(IgE+抗IgE)激活时的反应强度。

[0117] 实施例3:抗MUC1IgE抗体抑制体内肿瘤生长

[0118] 为了测试抗hMUC1IgE(3C6.hIgE)的体内抗肿瘤活性,我们形成了表达hMUC1的跨膜型的鼠细胞系。我们将全长hMUC1cDNA转染进鼠乳腺癌4T1。4T1从Balb/c小鼠中自发产生的乳腺癌分离(Dexter et al.,1978Cancer Res 38:3174-3181),并且已被用作乳腺癌的移植模型(Pulaski et al.,2001Curr Protoc Immunol Chapter 20:Unit 2022)。4T1.hMUC1在其细胞表面上表达丰富的hMUC1,并在hFcεRI转基因小鼠中的皮下以类似于亲代4T1细胞系所观察到的动力学生长。

[0119] 人FcεRI小鼠模型

[0120] 为了研究用嵌合人IgE抗体靶向肿瘤的体内作用,我们使用了人FcεRIα转基因小鼠(hFcεRI Tg^+)。在这些小鼠中,编码高亲和力IgE受体FcεRIα的α-亚基的内源性基因已被破坏,并且小鼠在人FcεRIα启动子的控制下为人类同源物转基因的(Dombrowicz et al.,1996J Immunol 157:1645-1651)。与FcεRIα表达限于肥大细胞和嗜碱性粒细胞的野生型小鼠相比之下,FcεRIα在hFcεRI Tg^+小鼠中的表达范围类似于在人类中所见的范围。除了肥

大细胞和嗜碱性粒细胞之外，在hFcεRI Tg+小鼠(和人类)中，FcεRI还在嗜酸性粒细胞、单核细胞、朗格汉斯细胞、B细胞和嗜酸性粒细胞上表达(Kinet,J.P.1999Annu Rev Immunol 17:931-972;Kayaba et al.,2001J Immunol 167:995-1003)。hFcεRIα基因产物具有与小鼠β和γ亚基复合以形成功能性4链受体(αβγ2)的能力。hFcεRI Tg+小鼠对人类IgE抗体和过敏原产生过敏反应(Dombrowicz et al.,1996supra)。

[0121] 为了验证这些小鼠对人IgE作出反应的能力，我们将4T1.hMUC1肿瘤细胞施用到腹膜中，然后在第9天施用对照IgE(源自SKO-007)或抗hMUC1人IgE(3C6.hIgE)。24h后，执行腹腔灌洗，收集细胞，制备细胞离心涂片，再用苏木精、伊红和甲苯胺蓝染色。得自对照组的肥大细胞完整无损，而得自抗hMUC1组的那些细胞显示出明显的脱粒证据。这表明得自hFcεRI Tg+小鼠的肥大细胞能够以抗原特异性方式对人IgE作出反应。

[0122] 肿瘤特异性IgE抑制体内肿瘤生长

[0123] 在hFcεRI Tg+小鼠中测试了hMUC1特异性IgE在体内影响4T1.hMUC1肿瘤生长的能力。对于这些实验，我们考虑了IgE的静脉内和腹膜内递送。我们发现，IgE在体内被快速清除。该观察与皮下肿瘤未良好血管化的事实一起使得我们在癌周区域给药。

[0124] 将4T1.hMUC1肿瘤细胞(总共10^5个)皮下(s.c.)接种到小鼠的剃毛两侧，并用20μg SKO或3C6.hIgE在第1、2、3、4和5天进行处理(图3A)。我们在用3C6.hIgE处理的小鼠中观察到了适度的肿瘤生长抑制(肿瘤大小减小24％，双向ANOVA表明$p<0.001$)。另外，在对照组中8只小鼠仅有3只存活到第34天，而在抗hMUC1组中8只小鼠中有5只仍活着。

[0125] 在第34天从存活的小鼠获取肿瘤样本，并使用甲苯胺蓝针对肥大细胞的存在进行染色(图3C)。我们在得自用对照IgE处理的小鼠的肿瘤中检出了瘤周和瘤内肥大细胞的存在。除了一只小鼠外，在3C6.hIgE处理的小鼠中未观察到肥大细胞或炎性细胞数的显著增加，所述一只小鼠在一个肿瘤切片中具有肥大细胞浸润，伴有肥大细胞脱粒的证据。甚至在用抗hMUC1IgE(3C6.hIgE)处理后，肿瘤也保持了hMUC1表达，如通过免疫组织化学所分析。

[0126] 通过局部递送肿瘤特异性IgE和细胞因子而增强肿瘤反应

[0127] 在我们的体内模型中不存在明显的抗肿瘤反应可能是由于以下两个因素：第一，不能将足量的抗体递送到血管化不良且快速生长的皮下肿瘤；第二，在这些移植肿瘤的微环境中缺乏足够的效应细胞。为了测试这些变量，我们形成了产生抗hMUC1小鼠IgE(mIgE)或趋化性细胞因子MCP-1和IL5的4T1细胞系(表1)。

[0128] 表1:4T1衍生细胞系

[0129]

	4T1/3C6.mIgE	4T1.hMUC1/IL-5	4T1.hMUC1/MCP-1
细胞表面 hMUC1 表达	-	+	+
抗 hMUC1 小鼠 IgE 产生	1 μg/ml[a]	-	-
小鼠 IL-5 产生	-	10 ng/ml[b]	-
小鼠 MCP-1 产生	-	-	1 ng/ml[b]

[0130] [a]在小鼠IgE特异性ELISA测定法中测得

[0131] [b]在小鼠细胞因子特异性捕获ELISA测定法中测得

[0132] 由于以下报导,我们选择MCP-1/CCL2:该细胞因子由肿瘤细胞响应于癌基因激活而产生并可负责单核细胞和肥大细胞趋化进瘤周基质(Soucek et al.,2007Nat Med 13:1211-1218)。白介素5既是生长因子又是嗜酸性粒细胞的趋化因子(Sanderson,C.J.1988Dev Biol Stand 69:23-29)。我们将产抗原/细胞因子的4T1细胞的组合与产mIgE的4T1细胞混合,然后将它们皮下注入hFcεRI Tg^{+}小鼠(图4A)。产抗体且表达抗原的肿瘤的混合物以渐进方式生长,与表达MCP-1和IL-5两者但缺乏局部抗体产生的肿瘤一样。相比之下,表达抗hMUC1小鼠IgE、靶抗原和两种细胞因子的肿瘤未能在8只小鼠中的7只中生长(图4B)。在产生肿瘤的该单只小鼠中,肿瘤仅在第19天而不是第8天开始可见。在表达MCP-1和IL5的肿瘤中观察到了含嗜酸性粒细胞的免疫浸润物。然而,仅当也存在肿瘤特异性IgE时才观察到肿瘤消除。这些数据表明:当在存在过敏效应细胞的情况下将足量的肿瘤特异性IgE递送到具有抗原的肿瘤时,可观察到完全和持久的反应。

[0133] 令人感兴趣的是,当将野生型4T1肿瘤细胞(既不产hIgE也不产趋化因子)皮下注入已排斥其肿瘤的7只小鼠的相反侧时,野生型肿瘤未能在30天后产生(数据未示出)。这些数据表明IgE+趋化因子转染的肿瘤细胞可刺激适应性T细胞反应,并可预防性地和间接地用作刺激记忆反应的肿瘤疫苗。

[0134] 为了确认这一重要观察结果,重复了该实验,并且结果在图5中示出(C图,各个肿瘤,和D图,肿瘤体积的平均值)。在第4组小鼠中,观察到了一个肿瘤,其与其他肿瘤组相比以大大降低的动力学生长。在该重复实验中,我们观察到具有第3组肿瘤(仅抗原+细胞因子)的小鼠在肿瘤生长过程的早期产生了明显的转移迹象。我们推测:在第3组中植入的肿瘤的生长比第1或2组稍慢,因为生长肿瘤的小鼠患病,且在实验过程的早期体重减轻。

[0135] 实施例4:IgE抗体抑制肿瘤转移

[0136] 用野生型小鼠(Balb/c)代替在实施例3中所述的人FcεRIα转基因小鼠重复了实施例3的图4中所述的实验。进行该实验以评估在转基因小鼠中与野生型小鼠相比FcεRI表达谱在介导所观察到的肿瘤反应中的贡献。

[0137] 当在野生型小鼠中重复实施例3中所述的实验时,我们观察到了不同的结果。不是在转基因小鼠中所见的第4组肿瘤的完全肿瘤排斥(图4B和图5),相反,生长动力学大大降低的非常小的肿瘤在第4组野生型小鼠中出现(图6)。将三只FcεRIα转基因小鼠包括在该实验中作为阳性对照。植入了第4组肿瘤的三只Tg+小鼠中没有一只(0/3)显示出肿瘤生长(图6D,□--□)。

[0138] 即使野生型小鼠中的第4组肿瘤以大大降低的动力学生长,它们也仍以渐进的方式生长。如我们已在采用Tg+小鼠的之前实验中所观察到的,野生型小鼠中的第3组肿瘤在实验过程中很早的时间发生了转移。第3组野生型小鼠体重减轻、产生腹水并且出现竖毛,所有的都是在多种器官和部位中广泛分布的肿瘤的迹象。然而,在第4组野生型小鼠中,即便它们产生了与第1、2和3组在生长和出现上滞后的小肿瘤,但这些小鼠未产生如在具有第3组肿瘤的小鼠中所见的转移性疾病的迹象。也就是说,即使肿瘤在所有小鼠皮肤下存在,但细胞因子MCP-1/IL-5对肿瘤行为(转移)的作用在3C6-mIgE的影响下被完全逆转。跟进具有第4组肿瘤的小鼠一个月,小鼠均未产生明显的转移,但它们在其两侧上具有以渐进方式非常缓慢生长的肿瘤。该关键实验的结果在下表2中汇总。

[0139] 表2

[0140]

肿瘤组	肿瘤生长 Fc-ε 转基因	转移 Fc-ε 转基因	肿瘤生长 野生型	转移 野生型
第 1 组：MUC1	+++++	-----	+++++	------
第 2 组：MUC1 + MUC1 IgE	+++++	-----	+++++	-------
第 3 组：MUC1、IL-5 + MCP-1	+++	++	+++	+++++
第 4 组：MUC1、3C6-mIgE、IL5 和 MCP1	-----	----	+	------

[0141] MUC1＝4T-1/MUC1;MUC1IgE＝用hMUC1特异性的3C6小鼠重链和轻链转染的4T-1;IL5＝用mIL5的cDNA转染的4T1/hMUC1;MCP-1＝用MCP-1的cDNA转染的4T1/hMUC1。

[0142] 在具有第3组肿瘤的Tg+和野生型小鼠中完成的实验中均观察到了早期转移。这在具有第4组肿瘤的小鼠中被完全逆转。Tg+与野生型小鼠之间的差异在于:在Tg+小鼠中,注射了第4组肿瘤的小鼠从未产生可触知的肿瘤。在野生型小鼠中,第4组肿瘤出现生长,尽管很缓慢。因此,mIgE抗体的作用必定是对被细胞因子吸引到肿瘤的细胞进行重编程,而本身不严格限制肿瘤生长。对Tg+小鼠中具有第4组肿瘤的小鼠未产生转移的原因的合理解释是肿瘤在注射部位通过过敏免疫反应被消除。然而,在野生型小鼠中,转移性表型通过mIgE消除,与肿瘤的存在无关。换句话讲,仅当实验在野生型小鼠中进行时,我们才能观察到细胞因子对肿瘤的作用可逆(图6),并且3C6-mIgE抗体能够对肿瘤中和肿瘤周围的髓样细胞重编程,这可能是通过预防肿瘤移植(在Tg+小鼠中)或大大减缓其生长(野生型小鼠),但在两种情况下均预防肿瘤转移。

[0143] 此外,通过野生型小鼠开展的实验也表明抗体可控制已确立的肿瘤,因为它们在野生型小鼠中的生长动力学显著降低(图6)。

[0144] 因此,本发明的IgE抗体的一个特征是:其能够在从原发性肿瘤出现明显转移之前预防循环细胞在肝、肺和骨骼及皮肤中建立所必需的微环境。IgE抗体(不同于IgG抗体)迁移出血管空间到达体内的每个组织。因此,IgE抗体将独特地定位,以预防循环细胞形成支持转移所必需的微环境。用这样的IgE抗体进行治疗因此将预防明显的转移出现并因此预防癌症复发。

[0145] 本文提及的专利和科学文献确立了本领域技术人员可以获得的知识。本文引述的所有美国专利和已公开或未公开的美国专利申请以引用方式并入。本文引述的所有已公开的外国专利和专利申请据此以引用方式并入。本文引述的所有其他公开的参考文献、文件、手稿和科学文献据此以引用方式并入。

[0146] 虽然已参考本发明的优选实施方案对本发明进行了具体展示和描述,但是本领域的技术人员将理解的是,在不脱离所附权利要求书涵盖的本发明的范围的情况下,可在本发明中作出形式和细节的多种更改。还将理解的是,本文所述的实施方案都不是互相排斥

的，并且可在不脱离由所附权利要求书涵盖的本发明的范围的情况下以各种方式加以组合。

[0147] 序列表

[0148] SEQ ID NO:1

[0149] <120>3C6.hIgE重链可变：

[0150] <212>DNA

[0151] GCCGCCACCATGTACTTGGGACTGAACTGTGTATTCATAGTTTTTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCTTGTGCTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGAAGCAAAGCTAATAATCATGCAACATACTATGCTGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCACCATCTCAAGAGATGTTTCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACAACTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTTATTACTGTACCAGGGGGGGGTACGGCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGGTAAGTG

[0152] SEQ ID NO:2

[0153] <120>3C6.hIgE轻链可变：

[0154] <212>DNA

[0155] GCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTAAGT

[0156] SEQ ID NO:3

[0157] <120>4H5.hIgE单克隆抗体重链可变区

[0158] <212>DNA

[0159] GCCGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATGCTCTTTTTGGTAGCAACAGCAACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTATATGTACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTGACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCATACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGCGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGGGGGGGTGATTACCCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGGTAAGT

[0160] SEQ ID NO:4

[0161] <120>4H5.hIgE单克隆抗体重链可变区

[0162] <212>DNA

[0163] GCCGCCACCATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTATGTTACTGCTGCTATGGGTATCTGGTACCTGTGGGGACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCTCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTAAGT

[0164] SEQ ID NO:5

[0165] <120>MUC1表位的氨基酸序列

[0166] <212>氨基酸

[0167] STAPPAHGVTSAPDTRPAPG

<110> 斯坦福大学董事会
约瑟夫 A 莫利克
张珀琳
保罗 J 乌茨

<120> 抑制肿瘤转移的 IgE 抗体

<130> 4173.3003 WO

<150> 61/834,169
<151> 2013-06-12

<150> 13/939,781
<151> 2013-07-11

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

[0001]

<210> 1
<211> 428
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的多核苷酸

<220>
<223> 3C6.hIgE 重链可变

<400> 1

gccgccacca tgtacttggg actgaactgt gtattcatag tttttctctt aaatggtgtc 60

cagagtgaag tgaagcttga ggagtctgga ggaggcttgg tgcaacctgg aggatccatg 120

aaactctctt gtgctgcctc tggattcact tttagtgacg cctggatgga ctgggtccgc 180

cagtctccag agaaggggct tgagtgggtt gctgaaatta gaagcaaagc taataatcat 240

gcaacatact atgctgagtc tgtgaaaggg aggttcacca tctcaagaga tgtttccaaa 300

agtagtgtct acctgcaaat gaacaactta agagctgaag acactggcat ttattactgt 360

accaggggggg ggtacggctt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 420

ggtaagtg 428

<210> 2
<211> 409
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<220>
<223> 3C6.hIgE 轻链可变

<400> 2
gccgccacca tgaagttgcc tgttaggctg ttggtgctga tgttctggat tcctgcttcc 60

agcagtgatg ttttgatgac ccaaactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 120

gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc attgtacata gtaatggaaa cacctattta 180

gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccaaagctcc tgatctacaa agtttccaac 240

cgattttctg gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat cagggacaga tttcacactc 300

aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg ggagtttatt actgctttca aggttcacat 360

[0002] gttccgctca cgttcggtgc tgggaccaag ctggagctga aacgtaagt 409

<210> 3
<211> 427
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<220>
<223> 4H5.hIgE 单克隆抗体重链可变区

<400> 3
gccgccacca tgggatggag ctgtatcatg ctcttttgg tagcaacagc aacaggtgtc 60

cactcccagg tccaactgca gcagtctggg gctgaactgg tgaagcctgg ggcttcagtg 120

aagttgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcaccagct actatatgta ctgggtgaag 180

cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt ggagagatta atcctagcaa tggtggtact 240

gacttcaatg agaagttcaa gagcaaggcc acactgactg tagacaaatc ctccagcaca 300

gcatacatgc aactcagcag cctgacatct gcggactctg cggtctatta ctgtacaagg 360

ggggggtgatt acccctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 420

ggtaagt 427

<210> 4
<211> 415
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<220>
<223> 4H5.hIgE 单克隆抗体重链可变区

<400> 4
gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt cttatgttac tgctgctatg ggtatctggt 60

acctgtgggg acattgtgat gtcacagtct ccatcctccc tagctgtgtc agttggagag 120

aaggttacta tgagctgcaa gtccagtcag agccttttat atagtagcaa tcaaaagaac 180

[0003] tacttggcct ggtaccagca gaaaccaggg cagtctccta aactgctgat ttactgggca 240

tccactaggg aatctggggt ccctgatcgc ttcacaggca gtggatctgg gacagatttc 300

actctcacca tcagcagtgt gaaggctgaa gacctggcag tttattactg tcagcaatat 360

tatagctatc ctctcacgtt cggtgctggg accaagctgg agctgaaacg taagt 415

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> MUC1 表位的氨基酸序列

<400> 5
Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly
20

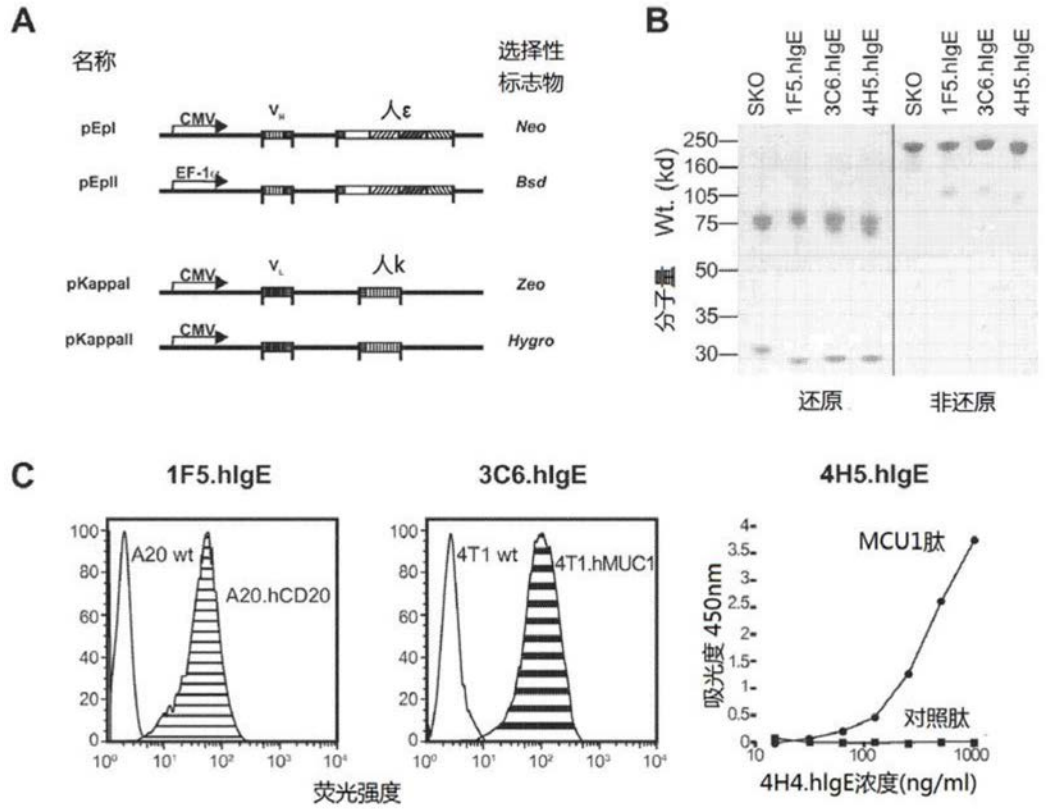

A
名称
选择性标志物
pEpI
CMV
人ε
Neo
pEpII
EF-1α
Bsd
pKappaI
人k
Zeo
pKappaII
Hygro
B
SKO
1F5.hIgE
3C6.hIgE
4H5.hIgE
Wt. (kd)
分子量
250
160
105
75
50
35
30
还原
非还原
C
1F5.hIgE
3C6.hIgE
4H5.hIgE
A20 wt
A20.hCD20
4T1 wt
4T1.hMUC1
荧光强度
MCU1肽
对照肽
吸光度 450nm
4H4.hIgE浓度(ng/ml)

图1

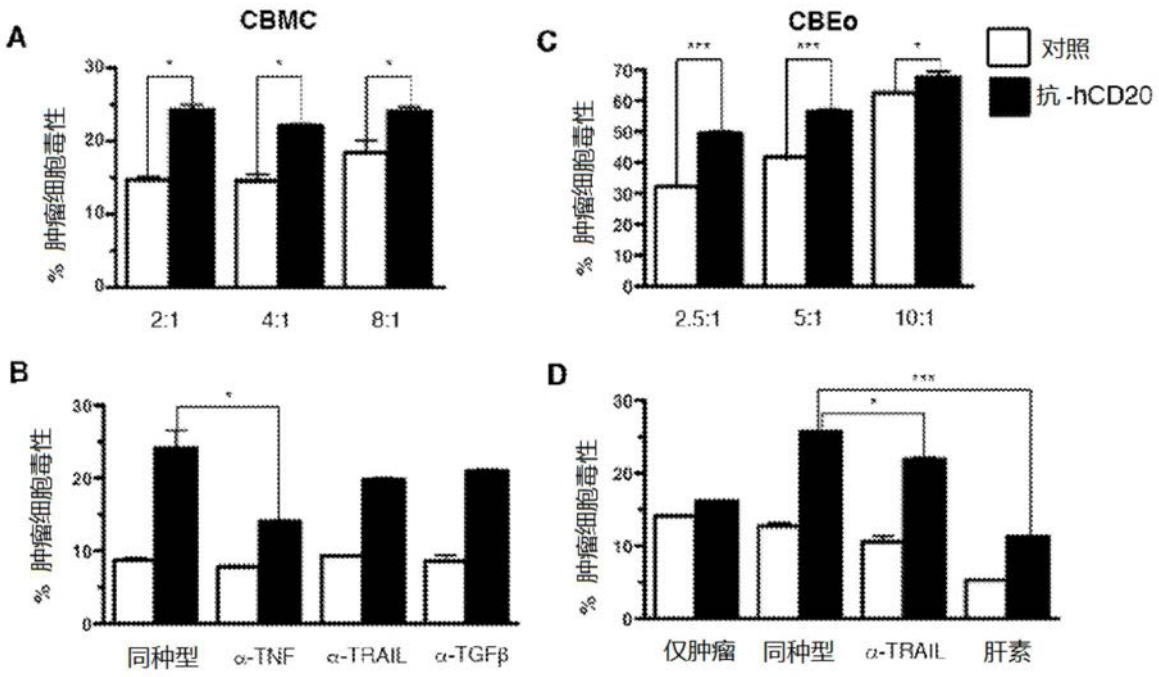

A
CBMC
% 肿瘤细胞毒性
2:1
4:1
8:1
C
CBEo
对照
抗-hCD20
2.5:1
5:1
10:1
B
同种型
α-TNF
α-TRAIL
α-TGFβ
D
仅肿瘤
同种型
α-TRAIL
肝素

图2

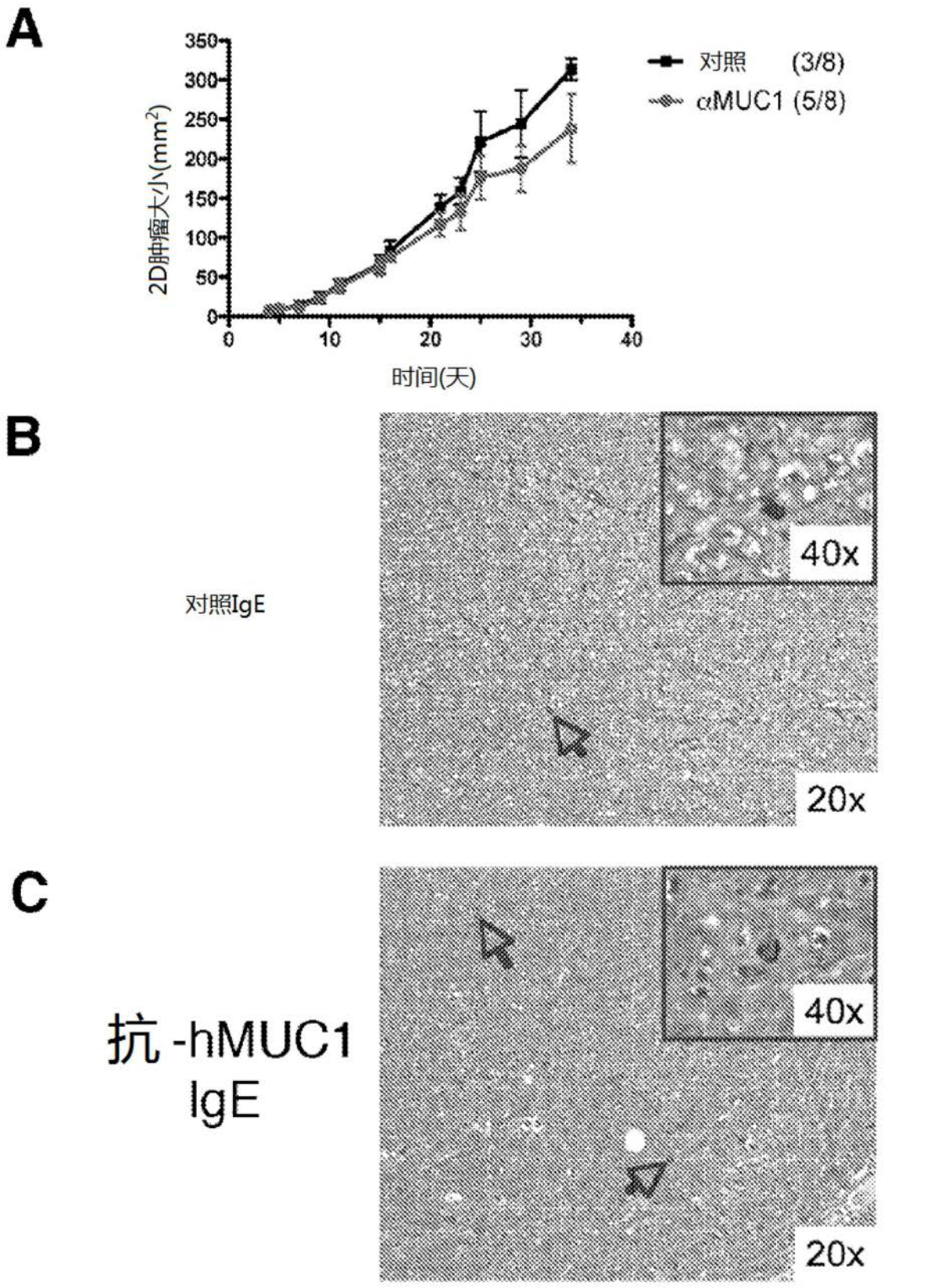

A
2D肿瘤大小(mm²)
350
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
时间(天)
对照 (3/8)
αMUC1 (5/8)
B
对照IgE
40x
20x
C
抗-hMUC1
IgE
40x
20x

图3

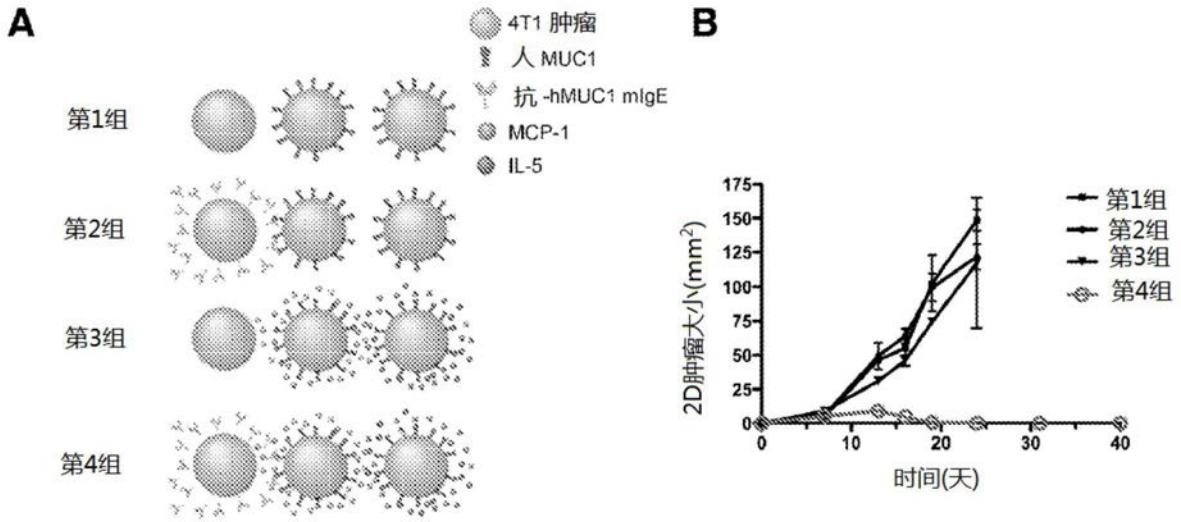

A
4T1 肿瘤
人 MUC1
抗 -hMUC1 mIgE
MCP-1
IL-5
第1组
第2组
第3组
第4组
B
2D肿瘤大小(mm²)
时间(天)
第1组
第2组
第3组
第4组

图4

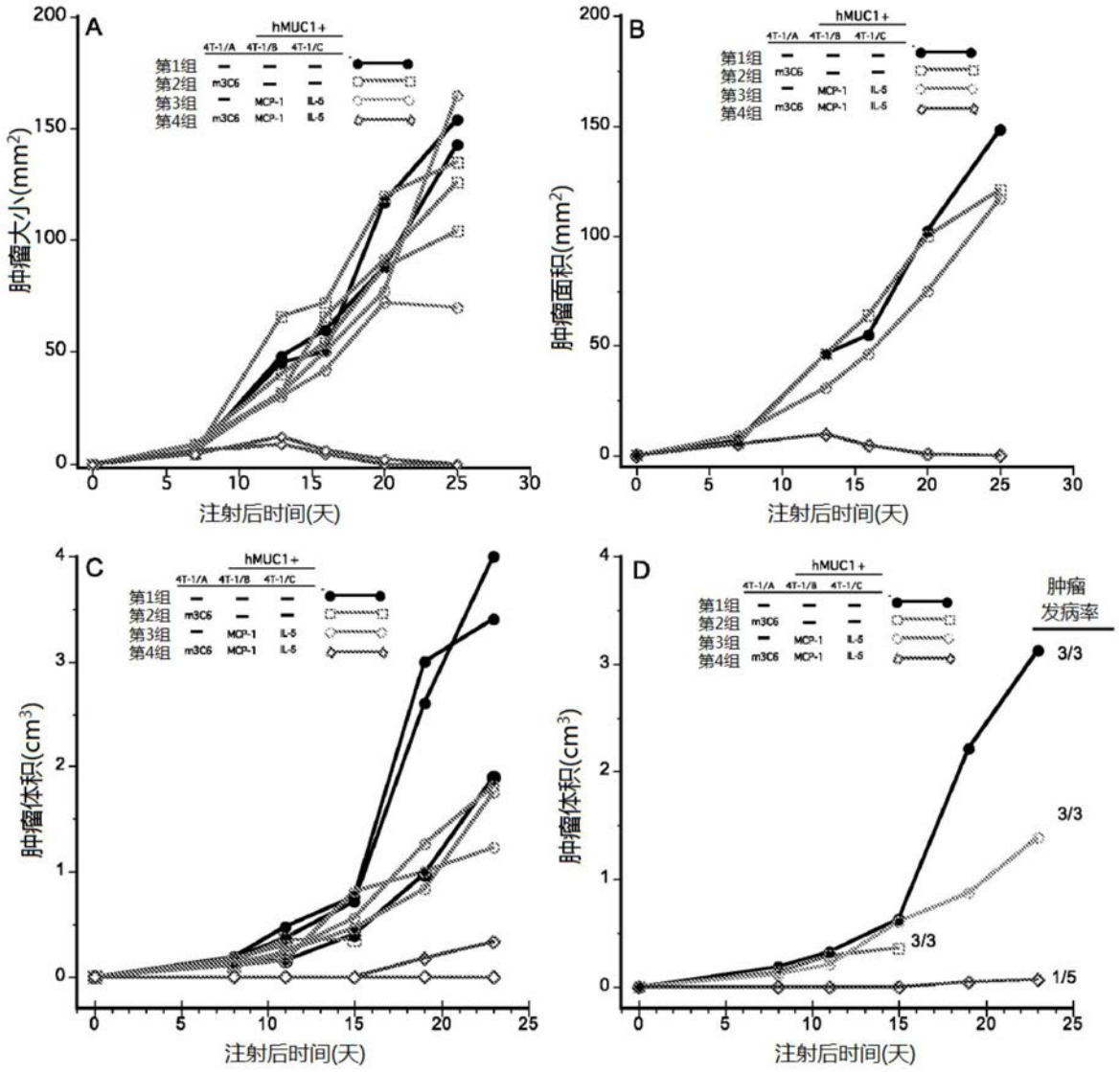

A
B
C
D
hMUC1+
4T-1/A 4T-1/B 4T-1/C
第1组
第2组 m3C6
第3组 MCP-1 IL-6
第4组 m3C6 MCP-1 IL-6
肿瘤大小(mm²)
肿瘤面积(mm²)
肿瘤体积(cm³)
注射后时间(天)
肿瘤
发病率
3/3
3/3
3/3
1/5

图5

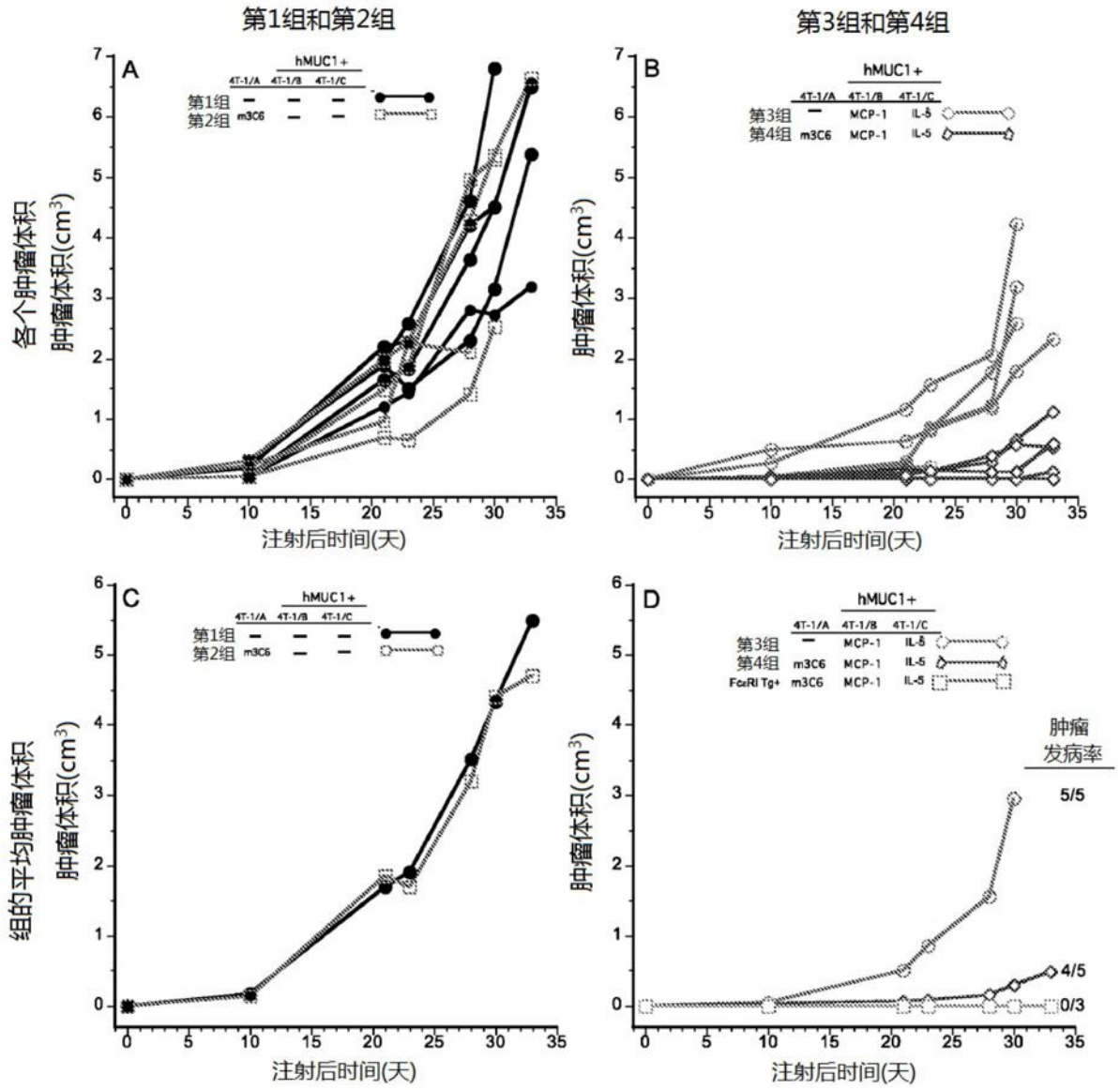

第1组和第2组
第3组和第4组
A
B
C
D
hMUC1+
4T-1/A 4T-1/B 4T-1/C
第1组
第2组 m3C6
第3组
第4组 m3C6
MCP-1
IL-5
FcεRI Tg+ m3C6 MCP-1 IL-5
各个肿瘤体积
肿瘤体积(cm3)
组的平均肿瘤体积
注射后时间(天)
肿瘤
发病率
5/5
4/5
0/3

图6

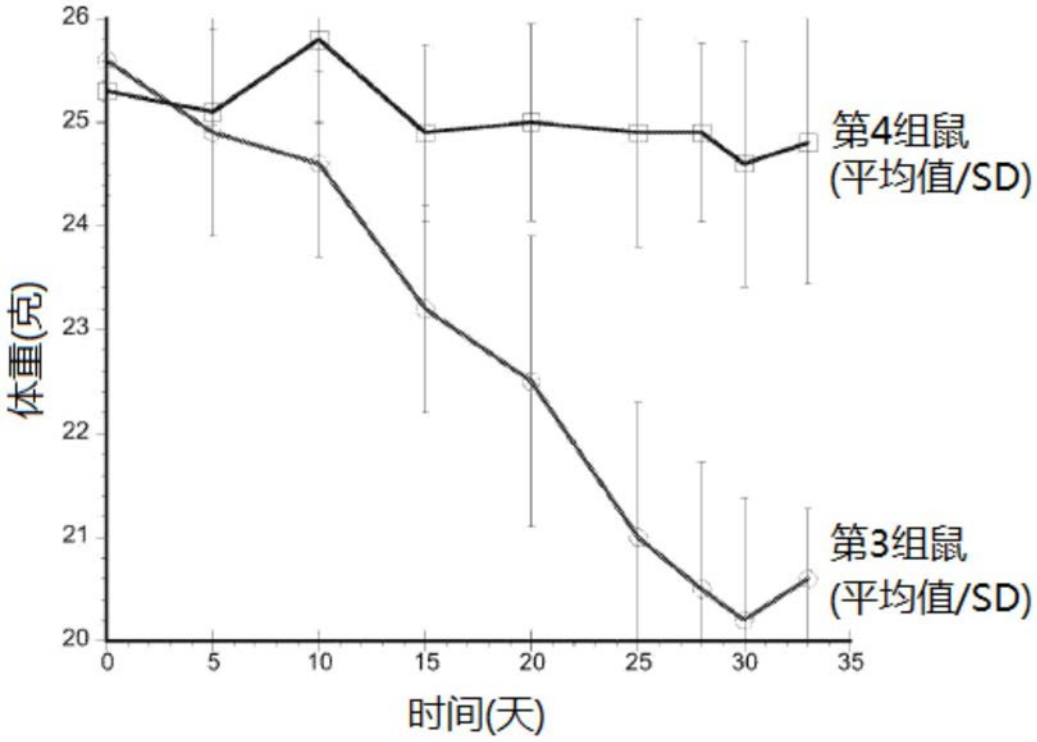

26
25
24
23
22
21
20
体重(克)
0
5
10
15
20
25
30
35
时间(天)
第4组鼠
(平均值/SD)
第3组鼠
(平均值/SD)

图7