



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103582494 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 12

(21) 申请号 201180063111. 1

(22) 申请日 2011. 10. 27

(30) 优先权数据

61/407, 367 2010. 10. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 06. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/058076 2011. 10. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/058418 EN 2012. 05. 03

(71) 申请人 纽约州立大学研究基金会

地址 美国纽约

(72) 发明人 萨比恩·布洛克松

M·凯利·欧巴尼昂

斯特法诺斯·吉尔卡尼德斯

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 张颖 谢丽娜

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 49/14 (2006. 01)

A61K 49/00 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书24页 附图2页

(54) 发明名称

靶向 E- 钙粘着蛋白的可溶性细胞外结构域的
组合物和用于癌症治疗的有关方法

(57) 摘要

本发明部分地基于我们的下述发现：靶向在 E- 钙粘着蛋白的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个内的表位，会导致上皮衍生的肿瘤细胞的死亡，但是不会导致正常的、健康的上皮细胞或非上皮细胞（包括内皮细胞和成纤维细胞）的死亡。因此，本发明的组合物包括：具有 E- 钙粘着蛋白的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列的多肽及其生物活性变体；用于表达这样的多肽的表达载体和细胞；和靶向 EC2-EC5 子结构域的试剂（例如，抗体）。本发明的方法包括：鉴别和生产具有 E- 钙粘着蛋白的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列的多肽或其生物活性变体的方法；制备靶向这些多肽的试剂（诸如抗体）的方法；以及施用这类试剂或引起它们的体内产生以治疗上皮癌或减少它们的发生或复发风险的方法。

1. 一种治疗癌症患者的方法,所述方法包括:给所述患者施用治疗有效量的试剂,所述试剂特异性地靶向可溶性 E- 钙粘着蛋白(sEcad)的第二、第三、第四或第五子结构域(分别是 EC2、EC3、EC4 和 EC5)中的一个或多个,但是不靶向 sEcad 的第一子结构域(EC1)。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述试剂特异性地靶向 EC4 和 / 或 EC5。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述试剂特异性地靶向 EC4。

4. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述试剂特异性地靶向 EC5。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述试剂是蛋白骨架。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述蛋白骨架是抗体或其片段,其特异性地结合这样的表位:所述表位包含在 sEcad 的 EC2、EC3、EC4 或 EC5 子结构域中的一个或多个中,但是不在 sEcad 的 EC1 子结构域中的氨基酸残基。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述抗体是人源化抗体、嵌合抗体或人抗体。

8. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述抗体是单链抗体。

9. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述抗体是单克隆或多克隆抗体。

10. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述抗体属于免疫球蛋白 G(IgG) 类或免疫球蛋白 M(IgM) 类。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述试剂被可检测地标记。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述试剂杀死恶性的 E- 钙粘着蛋白表达细胞,但是不会杀死非恶性细胞。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述试剂通过程序化细胞死亡、生长停止、失巢凋亡、坏死或自噬,杀死恶性的 E- 钙粘着蛋白表达细胞。

14. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述试剂在不含细胞毒性量的任何赋形剂的药物制剂中施用。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述试剂在药物制剂中递送,所述药物制剂:

(a) 在施用给患者以后,产生约 1-10mg/kg 的所述试剂血清水平,或

(b) 在加给细胞培养物以后,产生约 1-500 μ g/mL 细胞培养基的所述试剂浓度。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述药剂在所述患者中产生约 1-5mg/kg 的血清水平,或者在所述细胞培养基中产生约 1-400 μ g/mL 的浓度。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述试剂在药物制剂中如下递送:通过口服给药、静脉内给药、鼻或吸入给药、肌肉内给药、腹膜内给药、透粘膜给药或透皮给药。

18. 根据权利要求 1 所述的方法,所述方法另外包括下述步骤:提供得自所述患者的生物样品,并确定所述样品是否包括升高的 sEcad 水平或另一癌症预测生物标志物。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述生物样品是尿、唾液、脑脊液、血液或活组织检查样品。

20. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述步骤是在施用所述试剂之前进行,升高的 sEcad 水平指示,所述患者是治疗的良好候选人。

21. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述步骤是在施用所述试剂之后的 1 个或多个时间进行,降低的 sEcad 水平指示,所述患者对治疗较好地应答。

22. 根据权利要求 1 所述的方法,所述方法另外包括施用第二癌症治疗的步骤。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述第二癌症治疗包括:施用化学治疗剂、辐射

治疗、使用抗体的治疗或外科手术干预。

24. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述癌症是在上皮形成组织内。

25. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述癌症是消化道、中枢神经系统、乳房、皮肤、生殖系统、肺或泌尿道的癌症。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述消化道的癌症是口腔、喉、食管、胃、肠、直肠或肛门的癌症。

27. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述皮肤的癌症是鳞状细胞癌或黑素瘤。

28. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述生殖系统的癌症是宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、外阴或唇癌、前列腺癌、睾丸癌或男性生殖道的癌症。

29. 一种降低受试者将产生癌症的可能性的方法,所述方法包括,给所述受试者施用治疗有效量的:(a) 抗原多肽或者其抗原活性片段或其它变体,所述抗原多肽包含得自 sEcad 的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列、但是不包括 EC1 子结构域,或 (b) 表达载体,所述表达载体包含编码所述抗原多肽或者其抗原活性片段或其它变体的核酸序列。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述抗原多肽包含得自 EC4 和 / 或 EC5 的氨基酸序列。

31. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述抗原多肽包含得自 EC4 的氨基酸序列。

32. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述抗原多肽包含得自 EC5 的氨基酸序列。

33. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述抗原多肽引起这样的抗体的产生:所述抗体特异性地结合 sEcad,但是不会结合由所述受试者的非恶性细胞表达的 E- 钙粘着蛋白。

34. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述抗原多肽或所述表达载体如下在药物制剂中递送:口服给药、静脉内给药、鼻或吸入给药、肌肉内给药、腹膜内给药、透粘膜给药或透皮给药。

35. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述癌症是在上皮形成组织内。

36. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述癌症是消化道、中枢神经系统、乳房、皮肤、生殖系统、肺或泌尿道的癌症。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述消化道的癌症是口腔、喉、食管、胃、肠、直肠或肛门的癌症。

38. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述皮肤的癌症是鳞状细胞癌或黑素瘤。

39. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述生殖系统的癌症是宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、外阴或唇癌、前列腺癌、睾丸癌或男性生殖道的癌症。

40. 一种药学上可接受的组合物,其包含治疗有效量的:(a) 抗体,所述抗体特异性地结合包含氨基酸残基的表位,所述氨基酸残基在 sEcad 的 EC2、EC3、EC4 或 EC5 子结构域中的一个或多个中,但是不在 sEcad 的 EC1 子结构域中;(b) 抗原多肽或者其抗原活性片段或其它变体,所述抗原多肽包含得自 sEcad 的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列、但是不包括 EC1 子结构域;或 (c) 表达载体,所述表达载体包含编码所述抗原多肽或者其抗原活性片段或其它变体的核酸序列。

41. 一种用于鉴别 sEcad 中的表位的方法,所述方法包括:

(a) 提供包含 sEcad 的多肽或者其片段或其它变体;

(b) 将所述多肽施用给动物;

(c) 分离所述动物响应于所述多肽而产生的抗体 ;和

(d) 将癌细胞暴露于所述抗体或由其产生的单克隆抗体,其中所述癌细胞的死亡指示,所述多肽包含可以被靶向或被用作癌症治疗、预防或成像试剂的 sEcad 表位。

42. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述多肽包含得自 sEcad 的 EC2、EC3、EC4 或 EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列,但是不包括得自 sEcad 的 EC1 子结构域的氨基酸序列。

43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述多肽包含得自 EC4 或 EC5 中的一个或多个的氨基酸序列。

44. 根据权利要求 43 所述的方法,其中所述多肽包含被限制在 EC4 内的氨基酸序列。

45. 根据权利要求 43 所述的方法,其中所述多肽包含被限制在 EC5 内的氨基酸序列。

靶向 E- 钙粘着蛋白的可溶性细胞外结构域的组合物和用于癌症治疗的有关方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 10 月 27 日提交的美国临时申请号 61/407,367 的优先权日期的权益。该先前提交的临时申请的内容特此通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明在国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号 CA133910 和 ES015832 的政府支持下完成。美国政府具有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明的组合物和方法涉及靶向细胞-细胞粘着蛋白 E- 钙粘着蛋白的细胞外结构域。所述组合物包括结合剂、诸如抗体、以及 E- 钙粘着蛋白细胞外结构域的抗原片段,其可以用于治疗癌症的治疗性和预防性方法中。

背景技术

[0006] E- 钙粘着蛋白是一种帮助维持上皮细胞-细胞粘着的镶嵌式跨膜糖蛋白。已经证实,E- 钙粘着蛋白(全长)功能的缺失会在皮肤、肺、胃、肠和乳房的癌症中导致细胞的去分化、增殖和侵袭力增加(Brouxhon 等人,Cancer Res. 67(16):7654-7664(2007);Hirohashi, Am. J. Pathol. 153(2):333-339(1998);Chen 等人,Cancer Lett. 201:97-106(2003))。此外,在得自乳腺癌患者的活组织检查样本中 E- 钙粘着蛋白染色的缺失,已经与预后不良和较短的无转移期相关联(Pederson 等人,Brit. J. Cancer 87:1281-1286(2002))。

[0007] 全长蛋白由 1 个细胞外结构域、1 个单独的跨膜区和 1 个细胞质结构域组成,所述细胞外结构域由 5 个命名为 EC1-EC5 的子结构域组成(参见 Shiraishi 等人,J. Immunol. 175(2):1014-1021(2005))。EC1 子结构域(其距离细胞膜表面最远)含有在钙粘着蛋白表达细胞(包括 E-、N-、P-、和 R- 钙粘着蛋白表达细胞)中发现的组氨酸-丙氨酸-缬氨酸(HAV)三联体,并且认为该子结构域是促进由 E- 钙粘着蛋白介导的细胞-细胞接触所必需的(Beavon, European J. Cancer 36:1607-1620(2000))。

[0008] 全长 E- 钙粘着蛋白在跨膜结构域附近含有不同蛋白酶的切割位点,并且在该位点的切割会产生约 80-84kDa 的可溶性 N- 端肽,后者被称作可溶性 E- 钙粘着蛋白(sEcad)。sEcad 的脱落在正常的、未受刺激的上皮细胞中以低水平组成性地发生,并且在具有上皮衍生的肿瘤(诸如乳腺癌、皮肤癌、肺癌、前列腺癌、胃癌和结直肠癌)的患者中以高水平发生(Banks 等人,J. Clin. Pathol. 48:179-180(1995);Baranwal 等人,Biochem. Biophys. Res. Com. 384(1):6-11(2009);Chan 等人,Gut 48:808-811(2001);Charalabopoulos 等人,Exp. Oncol. 28(1):83-85(2006);Kuefer 等人,Clin. Cancer Res. 9:6447-6452(2003);Shirahama 等人,J. Dermatol. Sci. 13:30-36(1996);Velikova 等人,Br. J. Cancer 77:1857-1863(1998))。还已经报道,sEcad 的脱落会在诱导细胞凋亡以后的正常的非癌性犬肾细胞中增加(Steinhusen 等人,J. Biol.

Chem. 276:4972-4980 (2001)。

[0009] 尽管 sEcad 水平在癌症患者的尿或血清中增加,并且当正常细胞发生细胞凋亡时升高,该脱落蛋白的生物学活性尚未得到充分理解。许多研究已经证实,sEcad 会破坏正常上皮细胞的细胞粘着、诱导上皮细胞散布、和增强肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭 (Gil 等人, *Gynecol. Oncol.* 108(2):361-369 (2008); Maretzky 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(26):9182-9187 (2005); Marambaud 等人, *EMBO J.* 21(8):1948-1956 (2002); Najy 等人, *J. Biol. Chem.* 283(26):18393-18401 (2008); Noe 等人, *J. Cell Sci.* 114:111-118 (2001); Ryniers 等人, *Biol. Chem.* 383:159-165 (2002); 和 Symowicz 等人, *Cancer Res.* 67(5):2030-2039 (2007))。调控这些生物学功能的信号传递途径仍然不清楚。使用 SKBr3 乳腺癌细胞系的研究证实,纯化的细胞外融合蛋白 (Fc-sEcad) 的外源性添加会诱导 sEcad-HER2 复合物,从而导致细胞外信号调节的激酶 (ERK) 活化 (Najy 等人, *J. Biol. Chem.* 283(26):18393-18401 (2008))。人 EGF 受体属于 ErbB 或 HER 家族的受体酪氨酸激酶,它们在许多上皮肿瘤中过表达或失调 (Mendelsohn 和 Baselga, *Oncogene* 19:6550-6565 (2000); Burgess, *Growth Factors* 26:263-274 (2008))。该家族的受体会活化下游 - 信号传递分子诸如 ERK,后者又活化多种癌细胞行为,包括细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成 (Hanahan 和 Weinberg, *Cell* 100:57-70 (2000); Shields 等人, *Trends Cell Biol.* 10:147-154 (2000))。因此,已经开发了许多抗 -EGF 疗法。这些包括小分子酪氨酸激酶抑制剂、单克隆抗体和癌症疫苗 (Fukuoka 等人, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21:292a Abs1188 (2002); Lage 等人, *Ann. Med.* 35:327-336 (2003); Mateo 等人, *Immunotechnology* 3:71-81 (1997); Slamon 等人, *N. Engl. J. Med.* 344:783-792 (2001); 和 Yu 等人, *J. Clin. Invest.* 110:289-294 (2002))。这些治疗策略受限于,仅某些处于成熟的肿瘤会表达特定受体 / 抗原,并非具有特定组织学和阶段的所有肿瘤都过表达靶受体 / 抗原 (仅 20% 至 50% 的乳腺癌过表达 EGF 受体)。因而,这些类型的药物的应答率保持较低 (Mendelson 和 Baselga, *Oncogene* 19:6550-6565 (2000); Ortega 等人, *Cancer Control* 17(1):7-15 (2010))。另外,最初对这些药物有应答的肿瘤最终会形成获得性抗性 (Jackman 等人, *Clin. Cancer Res.* 12:3908-3914 (2006); Ortega 等人, *Cancer Control* 17(1):7-15 (2010); 和 Riely 等人, *Clin. Cancer Res.* 12:839-844 (2006))。

发明内容

[0010] 本发明部分地基于我们的下述发现:靶向在 E-钙粘着蛋白的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个内的表位,会导致上皮衍生的肿瘤细胞的死亡,但是不会以任何可察觉的程度(例如,以任何临床上有害的程度)杀死正常的、健康的上皮细胞或非上皮细胞,包括内皮细胞和成纤维细胞。因此,本发明的组合物包括:具有 E-钙粘着蛋白的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列的多肽及其生物活性变体;用于表达这样的多肽的表达载体和细胞;和靶向 EC2-EC5 子结构域的试剂(例如,抗体)。本发明的方法包括:鉴别和生产具有 E-钙粘着蛋白的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列的多肽或其生物活性变体的方法;制备靶向这些多肽的试剂(诸如抗体)的方法;以及施用这类试剂或引起它们的体内产生以治疗上皮癌或减少它们的发生或复发风险的方法。为了容易阅读,我们将不会在每次时都提及生物活性变体;应当理解,在可以如本文所述制备和使用具有在天

然存在的 E- 钙粘着蛋白的 EC2、EC3、EC4 和 EC5 子结构域中的一个或多个中发现的氨基酸序列的多肽的情况下,还可以制备和使用该多肽的生物活性变体。

[0011] 在其中施用抗 E- 钙粘着蛋白抗体的方法包括剂量特异性的疗法,且所述疗法可以选择性地针对下述癌症且对其具有细胞毒性:乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌和皮肤癌以及其它上皮癌,和从外胚层衍生出的组织(例如,中枢神经系统、眼晶状体、脑和感觉神经节和神经以及在头中的结缔组织)的癌症。本文所述的治疗性的和预防性的方法可以与其它细胞毒性疗法(例如,化学疗法、激素疗法、放射疗法和基于抗体的疗法(例如,单克隆抗 EGF 抗体疗法))联合进行。

[0012] 因此,在一个方面,本发明表征了治疗癌症患者的方法,所述方法包括:除了别的以外,给所述患者施用治疗有效量的试剂,所述试剂特异性地靶向可溶性 E- 钙粘着蛋白(sEcad)的第二、第三、第四或第五子结构域(分别是 EC2、EC3、EC4 和 EC5)中的一个或多个,但是不靶向 sEcad 的第一子结构域(EC1)。所述试剂可以特异性地靶向 EC4 和/或 EC5。在靶向单个子结构域(例如,EC4 或 EC5)的情况下,所述试剂可以结合被限制在该结构域内的氨基酸残基。所述试剂可以是蛋白骨架,诸如抗体或其片段或其它变体,其特异性地结合这样的表位:所述表位包含在 sEcad 的 EC2、EC3、EC4 或 EC5 子结构域中的一个或多个中、但是不在 sEcad 的 EC1 子结构域中的氨基酸残基。

[0013] 在所述试剂是抗体的情况下,所述抗体可以是人源化抗体、嵌合抗体、鼠抗体或人抗体。所述试剂或抗体还可以是单链抗体;所述试剂或抗体还可以是单克隆或多克隆抗体(例如,IgG 或 IgM 类免疫球蛋白)。不论所述试剂的确切性质如何,可以将它可检测地标记(例如,用荧光标记或化学发光标记)。

[0014] 就对生物细胞的影响而言,可以将所述试剂表征为这样的试剂:其杀死恶性的 E- 钙粘着蛋白表达细胞,但是不会以任何显著的或可察觉的程度杀死非恶性细胞。通过诱导程序化细胞死亡、生长停止、失巢凋亡、坏死、自噬或导致细胞死亡的其它状态,可以实现所述杀死。

[0015] 本发明的试剂可以配制为药物制剂或制品,其不含细胞毒性量的赋形剂或其它“惰性”成分。更具体地,所述药物或药学上可接受的组合物可以配制成为如下递送给患者:通过口服给药、静脉内给药、鼻或吸入给药(例如,吸入法)、肌肉内给药、腹膜内给药、透粘膜给药(例如,配制成为用于施用至粘膜组织,诸如作为直肠或阴道衬里的粘膜组织)或透皮给药。当我们在下面进一步讨论剂量时,我们在这里指出,可以在含有约 1 μ g/mL 至约 400 μ g/mL 所述试剂(例如,约 4 μ g/mL 至约 20 μ g/mL 所述试剂)的药物制剂中递送所述试剂。所述剂量还可以使得,在施用给患者以后,所述患者的活性药剂血清水平是约 1-10mg/kg(例如,约 1-5mg/kg)。当用于细胞培养时,所述剂量可以使得,在加入培养基中以后,所述活性药剂以约 1-500 μ g/mL 细胞培养基(例如,约 1-400 μ g/mL)存在。本领域公知,不同制剂中的剂量可以变化,且在本发明的药物制剂或制品中的剂量可以随下述因素而变化:添加剂在制剂中的存在、不存在或相对量(例如,由生产商提供)。因而,本发明的方法包括,其中在这样的药物制剂中递送所述试剂的那些方法:所述药物制剂(a)在施用给患者以后,产生约 1-10mg/kg(例如,约 1-5mg/kg)的试剂血清水平,或(b)在加给细胞培养物以后,产生约 1-500 μ g/mL(例如,约 1-400 μ g/mL)细胞培养基的试剂浓度。

[0016] 在本发明的施用 sEcad- 靶向剂的任意方法中,所述方法可以包括下述步骤:提供

得自患者的生物样品（例如，在施用所述靶向剂之前，和 / 或在施用所述靶向剂以后的某个时间点），并确定所述样品是否包括升高水平的 sEcad 或其它癌症预测生物标志物。所述生物样品可以是，例如，尿、唾液、脑脊液、血液或活组织检查样品。当这样的步骤是在施用所述试剂之前进行时，升高的 sEcad 水平可以指示，所述患者是治疗的良好候选人。当这样的步骤是在施用所述试剂之后的 1 个或多个时间进行时，降低的 sEcad 水平可以指示，所述患者对治疗较好地应答。

[0017] 在本发明的任意方法中，还可以施用第二癌症治疗。例如，可以施用化学治疗剂、辐射治疗、使用抗体（即，可用于治疗癌症且特异性地结合除了 sEcad 以外的靶标的抗体）的治疗或外科手术干预。

[0018] 顺从治疗的患者包括，具有在上皮形成组织内的癌症的那些患者。所述癌症可以是消化道（例如，口腔、喉、食管、胃、肠、直肠或肛门）、中枢神经系统、乳房、皮肤（例如，鳞状细胞癌或黑素瘤）、生殖系统（例如，宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、外阴或唇癌、前列腺癌、睾丸癌或男性生殖道的癌症）、肺或泌尿道的癌症。

[0019] 所述方法可以是治疗性的或预防性的。因此，在另一个方面，本发明表征了降低受试者将产生癌症的可能性的方法。这些方法可以如下实现：给所述受试者施用治疗有效量的：(a) 抗原多肽或者其抗原活性片段或其它变体，所述抗原多肽包含得自 sEcad 的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列、但是不包括 EC1 子结构域，或 (b) 表达载体，其包含编码所述抗原多肽或者其抗原活性片段或其它变体的核酸序列。所述抗原多肽可以包括被限制在 EC4 内、被限制在 EC5 内的氨基酸序列，或者其包括来自 EC4 和 EC5 二者的序列。所述抗原多肽可以引起这样的抗体的产生：所述抗体特异性地结合 sEcad，但是不会结合由受试者的非恶性细胞表达的 E- 钙粘着蛋白。在这些方法中采用的抗原多肽和表达载体可以以与上述制剂相同或类似的方式配制。例如，它们可以通过下述途径递送：口服给药、静脉内给药（其可以比口服给药优选）、鼻或吸入给药（例如，吸入法）、肌肉内给药、腹膜内给药、透粘膜给药或透皮给药。受试者面临的风险可以是产生本文描述的任意癌症类型的风险。所述风险可以是基于群体中的一般发生率的平均风险，或者它可以是由于遗传素质或先前的癌症发生而增加的风险。例如，可以将抗原多肽或其编码载体施用给受试者，以减少下述癌症的发生或复发的风险：在上皮形成组织内的癌症；消化道（例如，口腔、喉、食管、胃、肠、直肠或肛门）、中枢神经系统、乳房、皮肤（例如，鳞状细胞癌或黑素瘤）、生殖系统（例如，宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、外阴或唇癌、前列腺癌、睾丸癌或男性生殖道的癌症）、肺或泌尿道的癌症。

[0020] 本发明的方法可以以药物制备的方式来表示。因此，本发明包括本文所述的试剂和组合物在药物制备中的用途。在某些实施方案中，所述试剂和组合物的用途延伸至用于治疗癌症（包括本文所述的癌症类型）的药物的制备。

[0021] 本发明的组合物包括，包含治疗有效量的下述物质的药学上可接受的组合物：(a) 抗体，其特异性地结合包含氨基酸残基的表位，所述氨基酸残基在 sEcad 的 EC2、EC3、EC4 或 EC5 子结构域中的一个或多个中，但是不在 sEcad 的 EC1 子结构域中；(b) 抗原多肽或者其抗原活性片段或其它变体，所述抗原多肽包含得自 sEcad 的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列、但是不包括 EC1 子结构域；或 (c) 表达载体，其包含编码所述抗原多肽或者其抗原活性片段或其它变体的核酸序列。

[0022] 在另一个方面,本发明表征了鉴别 sEcad 中的表位的方法。这些方法可以如下实现,除了别的以外:(a) 提供包含 sEcad 的多肽或其片段或其它变体;(b) 将所述多肽施用给动物;(c) 分离所述动物响应于所述多肽而产生的抗体;和(d) 将癌细胞暴露于所述抗体或由其产生的单克隆抗体。所述癌细胞的死亡指示,所述多肽包含可以被靶向或被用作癌症治疗、预防或成像试剂的 sEcad 表位。在本发明的其它方面,所述多肽可以包括得自 sEcad 的 EC2、EC3、EC4 或 EC5 子结构域中的一个或多个的氨基酸序列,但是不包括得自 sEcad 的 EC1 子结构域的氨基酸序列。例如,所述多肽可以包括得自 EC4 和 / 或 EC5 中的一个或多个的氨基酸序列(例如,被限制在 EC4 内的氨基酸序列或被限制在 EC5 内的氨基酸序列)。

[0023] 在开发癌症治疗中的最大挑战之一是,发现可以区分癌细胞和正常的健康组织的治疗剂。许多目前可得到的化疗剂具有非选择性的细胞毒性,且具有狭窄的治疗指数,从而导致全身性药物毒性,后者使患者虚弱并提高患者总死亡率。因而,新的癌症治疗剂的一种非常合乎需要的性质是,选择性地靶向癌细胞且不会有害地影响正常的健康细胞和组织的能力。尽管本发明的组合物不限于在信号传递途径中的任何特定点处影响细胞的那些组合物,我们预期,本发明的治疗组合物在 HER2 受体的上游起作用,并且将捕获比 HER2 靶向治疗更多样的下游靶标。

[0024] 在附图和下面的描述中阐述了本发明的一个或多个实施方案的细节。从所述描述和附图以及权利要求书将会明白本发明的其它特征、目的和优点。

附图说明

[0025] 图 1A 显示了人 E-钙粘着蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1),其中用交替的下划线指示细胞外子结构域 EC2-EC5(用双下划线指示 EC2 和 EC4,用单下划线指示 EC3 和 EC5)。

[0026] 图 1B 是野生型人 E-钙粘着蛋白的示意图,其中指示了 sEcad。所述可溶性片段的长度可以变化,且可以终止于第 4 个或第 5 个细胞外结构域,或者在其它情况下,终止于跨膜结构域(参见,例如, Noe 等人, J. Cell Sci. 114(1):111-118, 2000 的研究)。

[0027] 图 2A 的线图描绘了在如实施例 5 所述用盐水或 α -sEcad 治疗以后,小鼠中可触知的肿瘤的数目随时间的变化。

[0028] 图 2B 中的一组照片显示了:在左侧,在盐水治疗的小鼠中观察到的肿瘤与在 α -sEcad 治疗的小鼠中的肿瘤的对比(如在实施例 5 中所述)。还显示了通过外科手术切除的肿瘤,以及得自未治疗的(盐水)和治疗的(α -sEcad)小鼠的组织学制品。

[0029] 图 2C 的一对条形图图解了未治疗的(盐水)和治疗的(α -sEcad)小鼠之间的肿瘤重量(g)和体积(cm^3)的差异。

具体实施方式

[0030] 如下面进一步所述,我们在一组上皮癌细胞和非癌细胞中试验了多种商购可得的单克隆和多克隆抗体的有效性,所述抗体靶向 E-钙粘着蛋白的细胞外结构域,包括 Espada 等人(J. Cell Physiol. 219:84-93(2009))、Fouquet 等人(J. Biol. Chem. 279(41):43061-43069(2004))和 Galaz 等人(J. Cell Physiol. 205(1):86-96(2005))采用的 DECMA-1 抗体。当我们重复这些实验时,我们发

现,在低至 40 μ g/mL 的浓度施用该抗体,会令人惊讶地诱导癌细胞(即 MCF-7、SCC12b、SCC13、CRL-1555、PAM212、SP308 和 KLN205 细胞)以及用作对照的非癌细胞(即,人乳房上皮细胞和 PHK 和 PMK 细胞)的细胞死亡。此外,用相同浓度(40 μ g/mL)的对照 IgG 同种型抗体处理这些癌细胞和非癌细胞也会在两类细胞中诱导相同水平的细胞死亡。这些数据提示,在所述抗体施用以后的细胞死亡的非特异性诱导。在我们的实验室中,施用靶向 E-钙粘着蛋白的细胞外结构域 EC2-EC5 的抗体的更稀溶液(10-20 μ g/mL 的低剂量)会仅诱导癌细胞的细胞死亡(似乎是通过细胞凋亡)。我们没有观察到对非癌细胞的不利作用。此外,将对照 IgG 同种型以 10-20 μ g/mL 的浓度施用于非癌细胞,一般而言对细胞生存力没有可检测的影响。这些在 10-20 μ g/mL 之间的浓度是比 Espada 等人(J. Cell Physiol. 219:84-93(2009))、Fouquet 等人(J. Biol. Chem. 279(41):43061-43069(2004))和 Galaz 等人(J. Cell Physiol. 205(1):86-96(2005))使用的浓度低约 20-50 倍。因此,我们预期,可以制备本发明的药物制剂和制品,并用作低剂量制剂(例如,在比 Espada 和其他人在先前的研究中提出的那些更低的剂量)。

[0031] 如上所述,外源施用的 10-20 μ g/mL 的针对 E-钙粘着蛋白的 EC2-EC5 子结构域的抗体(单克隆或多克隆)会选择性地杀死人和小鼠肿瘤细胞系的代表集合。我们还有数据表明,这样的抗体对 HT29 人结肠细胞系、NCI-H292 人肺细胞系和 KLN205 鼠肺癌细胞系具有细胞毒性。此外,我们证实,在我们的使用低浓度的靶向所述子结构域的抗体的分析中,非癌细胞(包括正常的人乳房上皮细胞、正常的人和小鼠角质形成细胞、小鼠 3T3 成纤维细胞和人内皮细胞)保持不受影响。靶向上皮衍生的肿瘤细胞中的 E-钙粘着蛋白的 EC2-EC5 细胞外结构域的不同组合来诱导细胞死亡的分子途径仍然有待阐明。但是,我们证实,使癌细胞死亡会增量调节促细胞凋亡的标志物 p53;在用针对 EC2-EC5E-钙粘着蛋白结构域的抗体处理以后,我们在 MCF-7 乳腺癌、小鼠 SCC 和小鼠 KLN205 肺癌细胞系中观察到该增量调节。

[0032] 如上面所指出的,本发明的组合物包括特异性地靶向 sEcad 的 EC2、EC3、EC4 和 EC5 中的一种或多种(但是不包括 EC1)的试剂。这些试剂随后可以抑制 sEcad,或者它们可以结合、抑制或隔离肿瘤细胞微环境中的其它靶标,诸如细胞存活受体。尽管本发明的组合物不限于通过任何特定机理发挥它们的作用的那些,我们的工作假设是,本发明的试剂会干扰 sEcad 的提供对癌细胞有益的信号的能力。例如,我们假定,癌细胞会将 sEcad 分泌进微环境中,所述 sEcad 在所述微环境中会提供模仿正常的细胞-与-细胞接触的功能骨架。因而,从肿瘤微环境中实际地或有效地除去 sEcad 会扰乱肿瘤细胞的保持粘着和存活的能力。在其它情况下,本发明的试剂可以如下抑制 sEcad 活性:通过结合在与其它细胞靶标(例如,HER-2)相互作用的 sEcad 上的表位,由此改变在细胞存活、细胞增殖、细胞迁移和/或侵袭中涉及的下流信号传递事件。可替换地,或者额外地,试剂可以不结合 sEcad 信号传递所需的特定表位,但是可以替代性地以隔离、标记或靶向 sEcad 进行破坏的方式结合 sEcad,由此降低所述 sEcad 在肿瘤微环境中的浓度,并使其不可用于模仿细胞-细胞相互作用或结合细胞受体。例如,所述试剂和组合物可以如下减少 sEcad 脱落:例如,结合 E-钙粘着蛋白和阻断切割位点,或者以其它方式阻断或抑制 sEcad 的释放。因而,本文所述的组合物或试剂可以特异性地靶向 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个,通过干扰特定表位或实际地降低 sEcad 水平而有效地阻止 sEcad 提供一种或多种它否则会提供的信号。

[0033] 为了容易阅读,我们可以将下述试剂更简单地称作靶向剂:所述试剂特异性地靶向在 sEcad 的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个中、但是不在 sEcad 的第一子结构域 (EC1) 中的氨基酸残基。本发明的靶向剂可以是蛋白骨架,诸如修饰的纤连蛋白结构域或免疫球蛋白或其片段或其它变体,其特异性地结合在 sEcad 的 EC2-EC5 子结构域中的一个或多个中的氨基酸残基(但是不结合 sEcad 的 EC1)。在所述试剂是或包括蛋白(例如,蛋白骨架或抗原多肽)的情况下,我们可以将所述试剂称作基于蛋白的治疗剂。我们倾向于使用术语“蛋白”来表示较长的氨基酸聚合物,并且我们倾向于使用术语“多肽”来表示较短的序列或在较大分子或复合物内的氨基酸残基链。但是,两个术语意图描述具有 2 个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或其它肽拟似物的实体,不论翻译后修饰(例如,酰胺化、磷酸化或糖基化)。所述亚基氨基酸残基可以通过肽键或其它键(例如,酯或醚键)相连。术语“氨基酸”和“氨基酸残基”表示天然的和/或非天然的或合成的氨基酸,其可以是 D- 或 L- 型光学异构体。

[0034] 抗-sEcad 抗体可以呈各种构型,且包括由一种或多种多肽组成的蛋白,所述多肽主要由免疫球蛋白基因编码。可以使用多种抗体结构中的任一种,包括完整抗体、抗体多聚体或抗体片段或它们的其它变体,所述变体包括所述抗体的功能性的抗原结合区。我们可以与“抗体”同义地使用术语“免疫球蛋白”。所述抗体可以具有单克隆或多克隆起源。不论抗体的来源,合适的抗体包括:完整抗体,例如具有 2 个重 (H) 链和 2 个轻 (L) 链的 IgG 四聚体,单链抗体,嵌合抗体,人源化抗体,互补决定区 (CDR)- 嫁接的抗体,以及抗体片段,例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv 和从这样的片段衍生出的重组抗体,例如骆驼抗体 (camelbodies)、微抗体 (microantibodies)、双体 (diabodies) 和双特异性抗体。

[0035] 完整抗体是包含结合抗原的可变区 (V_H 和 V_L) 以及轻链恒定结构域 (C_L) 和重链恒定结构域 C_{H1}、C_{H2} 和 C_{H3} 的抗体。所述恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。如本领域众所周知的,V_H 和 V_L 区域进一步细分成被称作“互补性决定区”(CDR) 的高变区,其中散布着更保守的框架区 (FR)。已经定义了 FR 和 CDR 的范围(参见,Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版,美国卫生和人类服务部(U.S. Department of Health and Human Services),NIH 公开号 91-3242,1991,和 Chothia, 等人,J.Mol.Biol. 196:901-917(1987)。抗体的 CDR 通常包括这样的氨基酸序列:它们一起限定天然免疫球蛋白结合位点的天然 Fv 区的结合亲和力和特异性。

[0036] 抗-sEcad 抗体可以得自任意类型的免疫球蛋白,例如,IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(以及它们的亚型(例如,IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)),并且免疫球蛋白的轻链可以是 κ 或 λ 类型。公知的人免疫球蛋白基因包括 κ、λ、α (IgA1 和 IgA2)、γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、δ、ε 和 μ 恒定区基因、以及众多免疫球蛋白可变区基因。

[0037] 术语免疫球蛋白或抗体的“抗原结合部分”通常是指,免疫球蛋白的特异性地结合靶标的部分,在本发明的情况下,所述靶标是这样的表位:其包含在 sEcad 的第二至第五子结构域中的一个或多个的内部或之间(例如,在第四和第五子结构域的内部或之间)的氨基酸残基。因此,免疫球蛋白的抗原结合部分是这样的分子:其中一个或多个免疫球蛋白链不是全长的,但是其特异性地结合细胞靶标。抗原结合部分或片段的例子包括:(i) Fab 片段,即由 VLC、VHC、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂ 片段,即由通过

铰链区的二硫键相连的 2 个 Fab 片段构成的二价片段；(iii) Fv 片段，其由抗体的单个臂的 VLC 和 VHC 结构域组成；和 (v) 分离的 CDR，其具有足以特异性地结合例如可变区的抗原结合部分的框架。使用重组方法，通过合成的接头，可以连接轻链可变区的抗原结合部分和重链可变区的抗原结合部分，例如，Fv 片段的 2 个结构域 VLC 和 VHC，所述接头使得它们成为单个蛋白链，其中所述 VLC 和 VHC 区配对以形成单价分子（称作单链 Fv(scFv)；参见例如，Bird 等人，*Science* 242:423-426 (1988)；和 Huston 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)）。这样的 scFv 可以是本发明的靶试剂，且被术语抗体的“抗原结合部分”包括在内。

[0038] “Fv”片段是含有完全抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密地相互共价结合的 1 个重链和 1 个轻链可变结构域的二聚体组成。在该构型中，每个可变结构域的 3 个高变区相互作用，以在 V_H - V_L 二聚体的表面上限定抗原结合位点。虽然 6 个高变区赋予抗原结合特异性，甚至单个可变结构域（或仅包含 3 个对抗原特异性的高变区的一半 Fv）具有识别和结合抗原的能力，尽管其亲和力低于整个结合位点。为了提高稳定性，可以通过柔性肽接头诸如 $(Gly_4Ser)_3$ 来连接 VH - VL 结构域以形成单链 Fv 或 scFv 抗体片段，或者可以通过在框架区中引入 2 个半胱氨酸残基而将其工程改造以形成二硫键，从而形成二硫键稳定化的 Fv(dsFv)。

[0039] 如指出的，其它有用抗体形式包括双体、微体和双特异性抗体。双体是通过短肽接头（约 5 个氨基酸或更少）共价连接的 scFv 的同源二聚体。通过使用因为太短而不允许在相同链上的 2 个结构域之间配对的接头，可以迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对，并产生 2 个抗原结合位点（关于双体的其它信息，参见，例如，EP404,097 和 W093/11161）。在本发明的组合物和方法中有用的双体变体 $(dsFv)_2$ 或线性抗体包括一对串联的 Fd 区段 $(V_H-C_H1-V_H-C_H1)$ ，它们形成一对抗原结合区（参见，例如，Zapata 等人，*Prot. Eng.* 8:1057 (1995)）。有用的微体是 SCFV- CH_3 融合蛋白的同源二聚体。在微体变体 Flex 微体中，scFv 与 IgG1 的铰链区融合，后者又通过 10-氨基酸接头连接至 CH_3 区。

[0040] 还可以使用双特异性抗体（其识别 2 种不同的表位），只要一个臂特异性地结合本文所述的 sEcad。已经开发了多种不同的双特异性抗体形式。例如，有用的双特异性抗体可以是四源杂交瘤（quadroma），即其中每个 H-L 对源自不同抗体的完整抗体。通常，如下生产四源杂交瘤：融合 2 种不同的 B 细胞杂交瘤，随后筛选融合的细胞，以选择已经维持两组克隆型免疫球蛋白基因的表达式的那些。可替换地，双特异性抗体可以是重组抗体。双特异性抗体的示例形式包括、但不限于：串联的 scFv，其中具有不同特异性的 2 条单链通过肽接头相连；双体和单链双体。

[0041] 抗体的片段适合用于提供的方法中，只要它们保留全长抗体的期望的特异性和/或足以抑制癌细胞存活、增殖或转移的特异性。因而，本文所述的抗-sEcad 抗体的片段可以保留完整抗体的结合列举的子结构域的能力。

[0042] 使用本领域普通技术人员已知的常规技术，可以得到这些抗体部分，并且以与筛选作为抗癌剂的完整抗体相同的方式，筛选所述部分的实用性。

[0043] 用于制备抗体片段的方法是本领域众所周知的，且包括生化方法（例如对完整抗体进行蛋白水解消化，然后可以进行化学交联）和基于重组 DNA 的方法，在后一种方法中，对免疫球蛋白序列进行遗传工程改造以指导期望的片段的合成。示例性的生化方法描述

在美国专利号 5,855,866、5,877,289、5,965,132、6,093,399、6,261,535 和 6,004,555 中。可以表达编码嵌合链或人源化链的核酸,以产生连续多肽。参见,例如,Cabilly 等人,美国专利号 4,816,567;Cabilly 等人,欧洲专利号 0,125,023B1;Boss 等人,美国专利号 4,816,397;Boss 等人,欧洲专利号 0,120,694B1;Neuberger 等人,W086/01533;Neuberger 等人,欧洲专利号 0,194,276B1;Winter,美国专利号 5,225,539;和 Winter,欧洲专利号 0,239,400B1。也参见,Newman 等人,BioTechnology10:1455-1460(1992)(关于 CDR 嫁接的抗体)和 Ladner 等人(美国专利号 4,946,778)和 Bird 等人,Science242:423-426(1988)(关于单链抗体)。

[0044] 通过用非特异性的硫醇蛋白酶木瓜蛋白酶对整个免疫球蛋白进行蛋白酶解,可以获得抗体片段。木瓜蛋白酶消化会产生两个各自具有单个抗原结合位点的相同抗原结合片段(称为“Fab 片段”)和一个残余“Fc 片段”。通过蛋白 A-琼脂糖或离子交换色谱法来分离各个洗脱级分。从兔和人类来源的 IgG 制备 F(ab')₂ 片段的常见操作为酶胃蛋白酶的有限蛋白酶解。完整抗体的胃蛋白酶处理会产生具有两个抗原结合位点且仍能够使抗原交联的 F(ab')₂ 片段。Fab 片段含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab' 片段因在重链 CH1 结构域的羧基末端添加几个残基(包括一或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸)而与 Fab 片段不同。F(ab')₂ 抗体片段最初以 Fab' 片段对形式产生,所述 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。已知抗体片段的其它化学偶联。

[0045] 在本发明的范围内还包括,制备靶向剂(例如,抗体或其抗原结合片段或其它变体)的方法,所述靶向剂靶向 sEcad,例如,通过特异性地结合 sEcad 的第二、第三、第四或第五子结构域(或包括在这些子结构域中的 2 个或更多个中的氨基酸残基的表位)。例如,使用 PCR 诱变方法改变编码免疫球蛋白链的 DNA 序列(例如,使用用于制备人源化的免疫球蛋白的方法;参见例如,Kanunan 等人,Nucl.Acids Res.17:5404(1989);Sato 等人,Cancer Research53:851-856(1993);Daugherty 等人,Nucleic Acids Res.19(9):2471-2476(1991);和 Lewis 和 Crowe,Gene101:297-302(1991)),可以构建可变区。使用这些或其它合适的方法,还可以容易地生产变体。例如,在一个实施方案中,可以诱变处理克隆的可变区,并可以选择编码具有期望的特异性的变体的序列(例如,从噬菌体文库中;参见例如,Krebber 等人,美国专利号 5,514,548;和 Hoogenboom 等人,W093/06213)。

[0046] 其它合适的生产或分离免疫球蛋白(其特异性地识别本文所述的细胞靶标)的方法包括,例如,依赖于转基因动物(例如,小鼠)的免疫接种的方法,所述转基因动物能够生产人抗体的完全所有组成成分(参见例如,Jakobovits 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:2551-2555(1993);Jakobovits 等人,Nature362:255-258(1993);Lonberg 等人,美国专利号 5,545,806;和 Surani 等人,美国专利号 5,545,807)。

[0047] 本领域众所周知,单克隆抗体是由单个克隆的抗体生产细胞产生的具有相同抗原特异性的同种抗体,多克隆抗体通常识别相同抗原上的不同表位,且由超过一个克隆的抗体生产细胞产生。每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”是指,抗体的得自基本同种的抗体群的特征,不能被解释为需要通过任何特殊方法制备抗体。例如,通过 Kohler 等人,(Nature256:495(1975)) 首先描述的杂交瘤方法,或通过重组 DNA 方法(参见,例如,美国专利号 4,816,567),可以制备单克隆抗体。例如,也可以利用 Clackson 等人

(Nature 352:624-628(1991)) 和 Marks 等人 (J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)) 描述的技术,从噬菌体抗体文库中分离单克隆抗体。

[0048] 本文的单克隆抗体可以包括嵌合抗体,即这样的抗体:其通常具有重链和/或轻链的一部分,所述部分与从特定物种衍生出的抗体或者属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列一致或同源,而链的其余部分与从另一物种衍生出的抗体或者属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列一致或同源,以及这种抗体的片段,只要他们表现出期望的生物活性(美国专利号 4,816,567;和 Morrison 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。目标嵌合抗体包括灵长类动物化的抗体,其包含从非人灵长类动物(例如类人猿、旧大陆猴、新大陆猴、原猴)衍生出的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0049] 用于制备单克隆抗体(mAb)的不同方法是本领域众所周知的。参见,例如,在美国专利号 4,196,265(通过引用并入本文)中描述的方法。最标准的单克隆抗体制备技术通常从与用于制备多克隆抗体的那些相同的系开始(Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988))。通常,可以用选定的免疫原免疫合适的动物,以刺激抗体生产细胞。啮齿类动物(诸如小鼠和大鼠)是示例性的动物,尽管还可以使用兔、绵羊、蛙和鸡。小鼠可以是特别有用的(例如,常规地使用 BALB/c 小鼠,且通常产生更高的稳定融合体百分比)。

[0050] 免疫接种后,可以选择具有产生期望的抗体的潜能的体细胞,尤其是 B 淋巴细胞(B 细胞),用于制备 MAbs 和与永生骨髓瘤细胞(通常为与免疫的动物相同的物种的细胞)的细胞融合。适合用于杂交瘤产生融合操作的骨髓瘤细胞系通常为不产生抗体的,具有高融合效率和酶缺乏,后者又使得它们不能在某些仅支持期望的融合细胞(杂交瘤)生长的选择性培养基中生长。如本领域技术人员已知的,可使用多种骨髓瘤细胞中的任一种。例如,当免疫动物为小鼠时,可使用 P3-X63/Ag8、X63-Ag8. 653、NS1/1. Ag41、Sp210-Ag14、F0、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、4B210 或以上所列的小鼠细胞系中的任一种。U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2 和 UC729-6 都可与人类细胞融合体结合使用。

[0051] 该培养可以提供杂交瘤群体,从其中可以选出特定杂交瘤,接着系列稀释,并将其克隆进单个抗体生成系中,所述抗体生成系可无限繁殖以产生抗体。

[0052] 用于生产单克隆抗体的方法可以包括纯化步骤。通常可以进一步纯化抗体,例如,使用过滤、离心和各种色谱法诸如 HPLC 或亲和色谱法,所有这些都是本领域普通技术人员熟知的技术。这些纯化技术各自包括分级分离,以从混合物的其它组分中分离出期望的抗体。尤其适于制备抗体的分析方法包括例如蛋白 A-琼脂糖和/或蛋白 G-琼脂糖色谱法。

[0053] 本发明的抗-sEcad 抗体可以包括得自人或非人来源的 CDR。“人源化的”抗体通常是来自小鼠、大鼠、仓鼠、兔子或其它物种的携带人类恒定区和/或可变区结构域或特定变化的嵌合或突变单克隆抗体。制备所谓的“人源化”抗体的技术是本领域技术人员众所周知的。

[0054] 免疫球蛋白的框架可以是人框架、人源化的框架或非人框架(例如,经过修饰以降低在人类中的抗原性的鼠框架)或合成的框架(例如,共有序列)。人源化的免疫球蛋白是这样的:其中框架残基与人种系序列相对应,且 CDR 源自 V(D)J 重组和体细胞突变。但

是,人源化的免疫球蛋白也可以包含并非在人种系免疫球蛋白核酸序列中编码的氨基酸残基(例如,通过随机诱变或位点特异性的离体诱变引入的突变)。已经证实,人可变基因的体内体细胞突变会导致框架残基的突变(参见 Nature Immunol. 2:537(2001))。这样的抗体由于它的来源而被称作“人的”抗体,尽管存在框架突变。小鼠抗体可变结构域也含有在框架残基中的体细胞突变(参见 Sem. Immunol. 8:159(1996))。结果,含有人 Ig 基因座的转基因小鼠产生被统称为“全人”的免疫球蛋白,尽管它们具有 4.5 个框架突变的平均值(Nature Genet. 15:146-56(1997))。因此,被接受的用法指示,基于种系序列、但是具有框架突变(例如,通过体内体细胞突变过程引入)的抗体可变结构域基因被称作“人的”。

[0055] 通过本领域已知的多种方法,可以工程改造人源化抗体,所述方法包括、例如:(1)将非人互补性决定区(CDR)嫁接到人框架和恒定区上(在本领域被称作人源化的方法),或者可替换地,(2)移植整个非人可变结构域,但是通过替换表面残基而给它们提供人一样表面(在本领域被称作表面修饰的方法)。人源化抗体可以包括人源化的和表面修饰的抗体。类似地,可以如下制备人抗体:将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物中,例如,其中已经部分地或完全地灭活内源免疫球蛋白基因的小鼠。在攻击以后,观察到人抗体产生,其在所有方面(包括基因重排、装配和抗体所有组成成分、)非常类似于在人类中看到的抗体产生。该方案描述在,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,和下述科学出版物:Marks 等人,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg 等人,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-13(1994);Fishwild 等人,Nature Biotechnology 14:845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology 14:826(1996);Lonberg 和 Huszar,Intern. Rev. Immunol. 13:65-93(1995);Jones 等人,Nature 321:522-525(1986);Morrison 等人,Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 81:6851-6855(1984);Morrison 和 Oi,Adv. Immunol., 44:65-92(1988);Verhoeyer 等人,Science 239:1534-1536(1988);Padlan, Molec. Immun. 28:489-498(1991);Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217(1994);和 Kettleborough, C. A. 等人,Protein Eng. 4(7):773-83(1991))。

[0056] 除了嵌合的和人源化的抗体以外,从具有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠(参见,例如,美国专利号 6,075,181、6,091,001 和 6,114,598),或者从人免疫球蛋白基因的噬菌体展示文库(参见,例如 McCafferty 等人,Nature 348:552-554(1990);Clackson 等人,Nature 352:624-628(1991),和 Marks 等人,J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)),可以衍生出全人抗体。在某些实施方案中,使用本领域已知的标准方法,可以通过 scFv-噬菌体展示文库生产和鉴别抗体。

[0057] 可以修饰抗-sEcad 抗体以调节它们的抗原结合亲和力、它们的效应子功能或它们的药代动力学。具体地,可以在 CDR 中产生随机突变,并筛选产物以鉴别具有较高亲和力和/或较高特异性的抗体。这样的诱变和选择在抗体领域中常规地实践。产生所述置换变体的简便方法是使用噬菌体展示的亲和力成熟。

[0058] 例如,CDR 改组和植入技术可与本文提供的抗体一起使用。CDR 改组将 GDR 序列插入特定框架区中(Jirholt 等人,Gene 215:471(1988))。CDR 植入技术准许将 CDR 序列随机组合到单一母框架中(Soderlind 等人,Immunotechnol. 4:279(1999);和 Soderlind 等人,Nature Biotechnol. 18:852(2000))。使用这样的技术,可以例如诱变处理抗-sEcad 抗体的 CDR 序列以产生多个不同序列,可以将所述序列掺入骨架序列中,并筛选所得到的抗

体变体的期望的特性（例如，较高亲和力）。在某些实施方案中，可以如本领域已知地检查抗-sEcad抗体的序列中T细胞表位的存在。然后可以改变基础序列以除去T细胞表位，即，“去免疫化”所述抗体。

[0059] 重组技术（使用例如噬粒技术）允许从编码大量抗体的重组基因制备具有期望的特异性的抗体。某些重组技术包括，通过免疫筛选从组合免疫球蛋白噬菌体表达文库中分离抗体基因，所述文库从分离自免疫动物的脾的RNA制备（Morrison等人，Mt. Sinai J. Med. 53:175(1986)；Winter和Milstein，Nature349:293(1991)；Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:4457(1992)）。就这样的方法而言，可以从分离自免疫动物的脾的RNA制备组合免疫球蛋白噬粒文库，并可以通过使用表达抗原的细胞和对照细胞进行淘选，选择表达适当抗体的噬粒。该方案优于常规杂交瘤技术的优点包括：在单轮中可产生且筛选多达约 10^4 倍的抗体，且通过H链和L链组合可以产生新特异性，这可以进一步增加所产生的适当抗体的百分比。

[0060] 一种在细菌中产生多样性抗体分子的大谱系的方法利用噬菌体 λ 作为载体（Huse等人，Science246:1275(1989)）。使用 λ 载体产生抗体包括：将DNA序列的重链和轻链群体克隆到独立的起始载体中。随后，可以随机组合载体以形成单一载体，其指导重链和轻链的共表达以形成抗体片段。已描述丝状噬菌体展示的一般技术（美国专利号5,658,727）。最一般地而言，所述方法提供了一种系统，其使用单一载体系统从抗体基因所有组成成分同时克隆和筛选预选择的配体结合特异性。筛选文库的分离成员的预选择的配体结合能力，允许将所表达的抗体分子的结合能力与分离编码来自这一文库的成员的基因的简便方法相关联。已描述筛选噬粒文库的其它方法（美国专利号5,580,717、5,427,908、5,403,484和5,223,409）。

[0061] 一种产生和筛选完全或部分合成的抗体结合位点或互补位的大文库的方法利用从丝状噬菌体（诸如M13、f1或fd）衍生出的展示载体（美国专利号5,698,426，通过引用并入本文）。被称为“噬粒”的丝状噬菌体展示载体会产生具有多样的且新颖的免疫特异性的单克隆抗体的大文库。所述技术在丝状噬菌体复制的装配阶段中使用丝状噬菌体外壳蛋白膜锚定域作为连接基因产物和基因的构件，且已用于从组合文库克隆和表达抗体（Kang等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA88:4363(1991)；和Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA88:7978(1991)）。通过标准亲和力分离操作，筛选表面表达文库的结合神经氨酸酶分子的特异性Fab片段。通过在扩增噬菌体群体后对编码多肽的核酸测序，可以表征所选择的Fab片段。

[0062] 已描述一种产生抗体的多样文库和筛选期望的结合特异性的方法（美国专利号5,667,988和5,759,817）。所述方法包括：使用简并寡核苷酸和引物延长反应，将简并度掺入免疫球蛋白可变重链和轻链可变结构域的CDR区中，且将诱变处理的多肽展示于噬粒表面上，从而制备呈噬粒文库形式的异源二聚体免疫球蛋白分子的文库。此后，关于结合预选的抗原的能力来筛选展示蛋白。已描述这种产生抗体的多样文库和筛选期望的结合特异性的方法的另一变体（美国专利号5,702,892，通过引用并入本文）。在这种方法中，仅采用重链序列，将重链序列随机分布在编码CDRI或CDRIII高变区的所有核苷酸位置，且可以独立于任何生物过程产生CDR中的遗传变异性。

[0063] 除了以上所公开的组合免疫球蛋白噬菌体表达文库以外，一种分子克隆方法是，

从含有人抗体文库的转基因小鼠制备抗体。已描述这样的技术（美国专利号 5,545,807, 通过引用并入本文）。这样的转基因动物可以用于产生具有单一同种型的人抗体,更具体来说为 B 细胞成熟所必需的同种型,诸如 IgM 和可能的 IgD。产生人抗体的另一方法描述于美国专利号 5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016 和 5,770,429 中,其中描述了能够从 B 细胞发育所需的同种型转变为其它同种型的转基因动物。

[0064] 可以修饰抗-sEcad 免疫球蛋白以减少或消除糖基化。缺少糖基化的免疫球蛋白可以是根本没有糖基化的免疫球蛋白;也就是说,未完全糖基化;或者被非典型地糖基化(即,突变体的糖基化模式不同于对应的野生型免疫球蛋白的糖基化模式)。IgG 多肽包括一个或多个(例如,1、2 或 3 或更多个)减弱糖基化的突变,即这样的突变:其导致 IgG CH2 结构域缺少糖基化、或未完全糖基化、或被非典型地糖基化。在人 IgG1 的氨基酸 297 处的天冬酰胺残基的突变是这样的突变的一个例子。还可以修饰寡糖结构,例如,通过从 N-连接的聚糖消除岩藻糖(fucose)部分。

[0065] 通过与非蛋白聚合物(例如聚乙二醇)缀合,还可以修饰抗体以增加它们的体内稳定性和/或溶解度。可以使用任何聚乙二醇化方法,只要所述抗-sEcad 抗体保留选择性地结合 sEcad 的第二、第三、第四或第五子结构域的能力。

[0066] 可以采用多种抗体/免疫球蛋白框架或骨架,只要得到的多肽包括至少一个对靶标(即,sEcad 的第二、第三、第四或第五子结构域)特异性的结合区。这样的框架或骨架包括人免疫球蛋白的 5 种主要独特型或其片段(诸如本文别处公开的那些),且包括其它动物物种的免疫球蛋白,其优选地具有人源化的方面。在这点上特别感兴趣的是单重链抗体(诸如在骆驼科中鉴别出的那些)。

[0067] 使用可在其上面嫁接 sEcad 抗体的 CDR 的非免疫球蛋白骨架,可以制备基于非免疫球蛋白的抗体。可以使用本领域技术人员已知的任意非免疫球蛋白框架和骨架,只要所述框架或骨架包括对靶标特异性的结合区。免疫球蛋白-样分子包括这样的蛋白:其与免疫球蛋白共有某种结构特征,例如, β -折叠二级结构。非免疫球蛋白框架或骨架的例子包括,但不限于:adnectins(纤连蛋白)、锚蛋白、结构域抗体和 Ablynx nv、脂质运载蛋白、小模块免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、maxybodies(Avidia, Inc., Mountain View, CA)、蛋白 A 和 affilin(γ -晶体蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH, Halle, 德国)。

[0068] 本发明的抗-sEcad 抗体特异性地结合在 sEcad 的第二、第三、第四或第五子结构域上的表位(但是不结合 EC1 的表位)。表位表示在靶标上的被互补位(即,抗体的结合位点)特异性地结合的抗原决定簇。表位决定簇通常由分子(诸如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面分型组成,且通常具有特定的三维结构特征、以及特定的电荷特征。表位通常具有约 4 个至约 10 个邻接氨基酸(连续表位),或可替换地可以是一组限定特定结构(例如,构象表位)的非邻接氨基酸。因而,表位可以由至少 4 个、至少 6 个、至少 8 个、至少 10 个和至少 12 个这样的氨基酸组成。确定氨基酸的空间构象的方法是本领域已知的,且包括例如 x-射线晶体学和二维核磁共振。

[0069] 预测抗体可以与其结合的其它潜在表位的方法是本领域技术人员众所周知的,且包括、但不限于:Kyte-Doolittle 分析(Kyte 和 Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105-132(1982)), Hopp 和 Woods 分析(Hopp 和 Woods, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA78:3824-3828(1981);Hopp 和 Woods, Mol. Immunol. 20:483-489(1983);Hopp, J. Immunol. Methods88:1-18(1986)), Jameson-Wolf 分析 (Jameson 和 Wolf, Comput. Appl. Biosci. 4:181-186(1988)), 和 Emini 分析 (Emini 等人, Virology140:13-20(1985))。在某些实施方案中,通过确定理论细胞外结构域,鉴定潜在表位。可以使用分析算法诸如 TMpred(参见 Hofmann 和 Stoffel, Biol. Chem. 374:166(1993))或 TMHMM(Krogh 等人, J. Mol. Biol., 305(3):567-580(2001))来进行这样的预测。可以使用其它算法诸如 SignalP3.0(Bednsten 等人, J. Mol. Biol. 340(4):783-795(2004))来预测信号肽的存在,并预测将从全长蛋白切掉那些肽的位置。蛋白的在细胞外面的部分可以充当抗体相互作用的靶标。

[0070] 本发明的组合物包括这样的抗体:其(1)表现出阈值水平的结合活性;和/或(2)不与已知的相关多肽分子显著地交叉反应。本领域普通技术人员可以容易地确定抗体的结合亲和力,例如,通过 Scatchard 分析 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672(1949))。

[0071] 在某些实施方案中,所述抗-sEcad 抗体可以结合它们的目标表位或模仿诱饵,对 sEcad 的目标第二、第三、第四或第五子结构域的亲和力是对其它蛋白的至少 1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍或更大,所述其它蛋白经预测与 sEcad 的第二、第三、第四或第五子结构域具有某种同源性。

[0072] 在某些实施方案中,所述抗-sEcad 抗体以 10^{-4} M 或更小、 10^{-7} M 或更小、 10^{-9} M 或更小的高亲和力或以低于纳摩尔的亲和力 (0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1nM 或甚至更小) 结合。在某些实施方案中,所述抗体对 sEcad 的第二、第三、第四或第五子结构域的结合亲和力是至少 1×10^6 Ka。在某些实施方案中,所述抗体对 sEcad 的第二、第三、第四或第五子结构域的结合亲和力是至少 5×10^6 Ka、至少 1×10^7 Ka、至少 2×10^7 Ka、至少 1×10^8 Ka、或更大。还可以以它们与 sEcad 的第二、第三、第四或第五子结构域的结合亲和力的方式,描述或详细说明抗体。在某些实施方案中,结合亲和力包括具有下述 Kd 的亲和力:小于 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-3} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M 或 10^{-15} M 或更小。

[0073] 在某些实施方案中,所述抗体不结合已知的相关的多肽分子;例如,它们结合 sEcad 多肽的第二、第三、第四或第五子结构域,但是不结合已知的相关的多肽。可以相对于已知的相关的多肽来筛选抗体,以分离特异性地结合 sEcad 多肽的第二、第三、第四或第五子结构域的抗体群体。例如,对 sEcad 多肽的第二、第三、第四或第五子结构域特异性的抗体将在适当的缓冲液条件下流过这样的柱:所述柱包含附着于不溶性基质上的 sEcad 多肽的第二、第三、第四或第五子结构域相关的蛋白 (sEcad 多肽的第二、第三、第四或第五子结构域除外)。这样的筛选允许分离与密切相关的多肽没有交叉反应性的多克隆和单克隆抗体 (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane(编), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current so Protocols in Immunology, Cooligan 等人(编), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995)。特异性抗体的筛选和分离是本领域众所周知的 (参见, Fundamental Immunology, Paul(编), Raven Press, 1993; Getzoff 等人, Adv. in Immunol. 43:1-98(1988); Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J. W. (编), Academic

Press Ltd., 1996; Benjamin 等人, Ann. Rev. Immunol. 2:67-101, 1984)。这样的测定的代表性例子包括：并行免疫电泳、放射免疫测定法 (RIA)、放射免疫沉淀、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、斑点印迹或蛋白质印迹测定、抑制或竞争测定和夹心测定。

[0074] 使用例如在本文实施例中公开的方法，可以评价特定抗体的选择性地杀死恶性的表达 e- 钙粘着蛋白的细胞的能力。

[0075] 所述抗-sEcad 抗体可以包括标签，后者也可以被称作报告物或标志物（例如，可检测的标志物）。可检测的标志物可以是与抗-sEcad 抗体或其生物活性片段共价连接的任意分子，其允许定性地和 / 或定量地评估被标记的肽的表达或活性。所述活性可以包括生物活性、物理化学活性或它们的组合。可检测的标志物的形式和位置可以变化，只要标记的抗体保留生物活性。可以使用许多不同的标志物，具体标志物的选择将取决于预期用途。可以使用标记的抗-sEcad 抗体，例如，用于评估生物样品（例如，尿，唾液 (salive)、脑脊液、血液或活组织检查样品）中的 sEcad 的水平，或用于评价对 sEcad 肽治疗剂的临床应答。

[0076] 合适的标志物包括，例如，酶、光亲和配体、放射性同位素和荧光的或化学发光的化合物。将可检测的标志物引入肽中的方法是本领域众所周知的。可以在合成过程中或在合成后添加标志物。还可以通过将标记的前体（例如，放射性标记的氨基酸）加入转化的细胞在其中生长的培养基中，标记重组的抗-sEcad 抗体或其生物活性变体。在某些实施方案中，可以使用肽的类似物或变体，以便促进可检测的标志物的掺入。例如，可以用密切相关的芳族氨基酸（诸如酪氨酸）替换任何 N- 端苯丙氨酸残基，所述芳族氨基酸可以用 ¹²⁵I 容易地标记。在某些实施方案中，可以将支持有效标记的额外官能团添加到抗-sEcad 抗体或其生物活性变体的片段上。例如，可以将 3- 三丁基锡苯甲酰基添加到天然结构的 N- 端；随后用 ¹²⁵I 置换三丁基锡基团，将产生放射性标记的碘代苯甲酰基。

[0077] 作为施用抗体或抗体-样治疗剂本身的替代方案，还可以通过施用在体内引起抗-sEcad 抗体产生的蛋白来实现本发明的方法。因此，本发明的组合物包括在 EC2-EC5 子结构域中的 E- 钙粘着蛋白细胞外结构域的抗原片段（参见图 1A 和图 1B）。这些多肽可以与异源多肽融合以产生免疫原性的融合蛋白。例如，sEcad 多肽可以与在美国专利号 7, 262, 270 中描述的流感病毒 HA2 血凝素蛋白的片段融合。

[0078] 在本发明的范围内还包括，可以用于抑制 E- 钙粘着蛋白的表达的核酸（例如，反义寡核苷酸或介导 RNA 干扰的寡核苷酸）。核酸构建体还可以用于在体内或离体（例如，在细胞或组织培养物中）表达 sEcad 的抗原片段。

[0079] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文可互换使用，并且指 RNA 和 DNA 两者，包括 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 以及含有 DNA（或 RNA）的核酸类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构。核酸可以是双链的或单链的（即，有义链或反义链）。多核苷酸的非限制性例子包括基因、基因片段、外显子、内含子、信使 RNA (mRNA) 和它们的部分、转移 RNA、核糖体 RNA、siRNA、微小 RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任意序列的分离的 DNA、任意序列的分离的 RNA、核酸探针和引物、以及核酸类似物。在本发明范围内，核酸可以编码，例如，抗体、突变体抗体或其片段或 sEcad 或其片段。

[0080] “分离的”核酸可以是，例如，天然存在的 DNA 分子或其片段，前提条件是，在天然存在的基因组中通常发现地紧邻地侧接该 DNA 分子的至少一个核酸序列被除去或不存在。因而，分离的核酸包括，但不限于，独立于其它序列作为单独分子存在的 DNA 分子（例如，化学

合成的核酸,或通过聚合酶链式反应 (PCR) 或限制性内切核酸酶处理产生的 cDNA 或基因组 DNA 片段)。分离的核酸也表示这样的 DNA 分子:其掺入载体、自主复制的质粒、病毒中,或者掺入原核生物或真核生物的基因组 DNA 中。另外,分离的核酸可以包括工程改造的核酸,诸如作为杂种或融合核酸的一部分的 DNA 分子。下述核酸不是分离的核酸:其存在于在例如 cDNA 文库或基因组文库内的许多(例如,几十,或数百至数百万)其它核酸中,或存在于含有基因组 DNA 限制酶切消化物的凝胶切片中。

[0081] 分离的核酸分子可以通过标准技术产生。例如,聚合酶链式反应 (PCR) 技术可以用于获得含有本文所述核苷酸序列(包括编码本文所述多肽(即工程改造的蛋白)的核苷酸序列)的分离的核酸。PCR 可用于从 DNA 以及 RNA(包括来自总基因组 DNA 或总细胞 RNA 的序列)扩增特定序列。各种 PCR 方法描述于,例如,PCR Primer:A Laboratory Manual, Dieffenbach 和 Dveksler, 编, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995。一般而言,来自或超出目标区域末端的序列信息用于设计寡核苷酸引物,所述引物的序列与待扩增的模板的相反链相同或相似。各种 PCR 策略也是可用的,通过这些策略可以将位点特异性的核苷酸序列修饰引入模板核酸中(可能希望这样做,例如,当制备工程改造的蛋白时,例如抗体、突变体抗体或其片段、或融合蛋白或其片段)。也可以化学合成分离的核酸,作为单核苷酸分子(例如,使用亚磷酸胺技术,使用 3' 到 5' 方向的自动 DNA 合成),或者作为一系列寡核苷酸。例如,可以合成一对或多对含有所需序列的长寡核苷酸(例如, >50-100 个核苷酸),每对含有互补的短区段(例如,约 15 个核苷酸),以便寡核苷酸对退火时形成双链体。使用 DNA 聚合酶延伸寡核苷酸,每个寡核苷酸对产生单个双链核酸分子,然后可以将其连接入载体。还可以通过例如诱变编码工程改造的蛋白的 DNA 的天然存在的部分,获得本发明的分离的核酸。

[0082] 本文所述的核酸和多肽(例如, sEcad 的抗原片段)可以称作“外源的”。术语“外源”表示所述核酸或多肽是重组核酸构建体的一部分或由其编码,或者不存在于其天然环境中。例如,外源核酸可以是来自一个物种的、被引入另一物种的序列,即异源核酸。通常,这样的外源核酸通过重组核酸构建体被引入其它物种。外源核酸还可以是生物体天然的、并且已经被引入该生物体的细胞中的序列。包括天然序列的外源核酸通常可如下与天然存在的序列区分开:其存在与所述外源核酸连接的非天然序列,例如在重组核酸构建体中侧接天然序列的非天然调节序列。此外,稳定转化的外源核酸通常整合的位置不同于天然序列存在的位置。

[0083] 本文也提供了重组构建体,且可以用于转化细胞以便表达多肽,例如,抗体、突变体抗体或其片段、或 sEcad 或其片段。重组核酸构建体包含这样的核酸:其编码例如本文所述的抗体、突变体抗体或其片段、或 sEcad 或其片段,且其可操作地连接至适用于表达工程改造的蛋白(例如,抗体、突变体抗体或其片段、或 sEcad 或其片段)的调节区。在某些情况下,重组核酸构建体可以包括这样的核酸:其包含反义取向的编码序列、基因、或者编码序列或基因的片段,使得 RNA 的反义链被转录。应当理解,许多核酸可以编码具有特定氨基酸序列的多肽。遗传密码的简并性是本领域众所周知的。就许多氨基酸而言,存在超过一种充当氨基酸的密码子的核苷酸三联体。例如,使用特定生物的适当的密码子偏爱表,可以修饰在抗体、突变体抗体或其片段、或融合蛋白或其片段的给定片段的编码序列中的密码子,从而得到在所述生物中的最佳表达。

[0084] 还提供了载体,其含有核酸,诸如本文描述的那些。“载体”是复制子(诸如质粒、噬菌体或粘粒),其中可以插入其它 DNA 区段,从而实现插入的区段的复制。表达载体包括质粒载体、病毒载体和在美国申请公开号 2006/0239970 中描述的 HSV 扩增子颗粒(它特此通过引用并入本文)。

[0085] 通常,载体在与适当的控制元件结合时能够复制。合适的载体主链包括,例如,本领域常规地使用的那些,诸如质粒、病毒、人工染色体、BAC、YAC 或 PAC。术语“载体”包括克隆和表达载体、以及病毒载体和整合载体。“表达载体”是包括调节区的载体。合适的表达载体包括,但不限于,质粒和从例如噬菌体、杆状病毒和逆转录病毒衍生出的病毒载体。众多载体和表达系统可从诸如 Novagen (Madison, WI)、Clontech (Palo Alto, CA)、Stratagene (La Jolla, CA) 和 Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA) 等公司商购得到。

[0086] 本文提供的载体还可以包括例如复制起点、骨架附着区 (SAR) 和 / 或标志物。标志物基因可以赋予宿主细胞可选择的表型。例如,标志物可以赋予杀生物剂抗性,例如对抗生素(例如,卡那霉素、G418、博来霉素或潮霉素)的抗性。如上面所指出的,表达载体可以包括标签序列,后者用于便利被表达的多肽的操控或检测(例如,纯化或定位)。标签序列,诸如绿色荧光蛋白 (GFP)、谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)、多组氨酸、c-myc、血凝素或 Flag™ 标签 (Kodak, New Haven, CT) 序列,通常表达为与编码的多肽的融合体。此类标签可以插入多肽中任何位置,包括在羧基或氨基末端处。

[0087] 所述载体还可以包括调节区。术语“调节区”表示这样的核苷酸序列:其影响转录或翻译起始和速率、以及转录或翻译产物的稳定性和 / 或迁移率。调节区包括、但不限于:启动子序列、增强子序列、应答元件、蛋白识别位点、可诱导元件、蛋白结合序列、5' 和 3' 非翻译区 (UTR)、转录起始位点、终止序列、聚腺苷酸化序列和内含子。

[0088] 本文使用的术语“可操作地连接”表示,在核酸中安置调节区和待转录序列,从而影响所述序列的转录或翻译。例如,为了将编码序列置于启动子的控制下,所述多肽的翻译读码框的翻译起始位点通常位于所述启动子下游 1 至约 50 个核苷酸之间。然而,启动子可以位于翻译起始位点上游多达约 5,000 个核苷酸,或者位于转录起始位点上游约 2,000 个核苷酸。启动子通常包含至少 1 个核心(基础)启动子。启动子还可以包括至少一个控制元件,诸如增强子序列、上游元件或上游活化区 (UAR)。要包括的启动子的选择取决于几种因素,包括、但不限于:效率、选择性、诱导性、所需的表达水平以及细胞或组织优先表达。对于本领域技术人员而言,通过适当地选择启动子和其它调节区并相对于编码序列进行定位来调节编码序列的表达,是常规操作。

[0089] 本文还提供了宿主细胞。宿主细胞可以是例如,原核生物,例如,细菌诸如大肠杆菌,或真核生物,例如,酵母、昆虫或哺乳动物细胞,其表达本发明的多肽。

[0090] 本文所述的抑制 sEcad 的试剂可以被包括在生理上可接受的(即,充分无毒的,以用于本文所述的治疗性和预防性方法中)的药物组合物中。因此,本发明表征了多种制剂,包括局部乳膏剂(整合在防晒霜中)和用于透皮递送 sEcad 抑制剂的持续释放贴剂。在其它实施方案中,所述药物组合物可以配制为含漱液、凝胶或乳剂,或者为直肠溶液、混悬液或乳剂。本领域普通技术人员会明白,基于要治疗的癌症的类型,可以选择特定制剂。例如,含漱液、凝胶或乳剂可以用于治疗在嘴、喉、食管或胃中的癌症,直肠溶液、混悬液或乳剂可

以用于治疗在直肠或结肠中的癌症。

[0091] 本发明的治疗剂（例如，抗-sEcad 抗体和其它基于蛋白或核酸的 sEcad 抑制剂）可以配制成，与提高它们的稳定性和 / 或提供在体内的受控或持续释放的材料一起施用给患者。因此，本发明包括这样的递送系统，其中与微粒（例如，聚合微粒诸如聚丙交酯-共聚-乙交酯微粒）或纳米颗粒（例如，脂质体、聚合的碳水化合物纳米颗粒、树枝状聚合物和基于碳的纳米颗粒）一起配制 sEcad-特异性的试剂。

[0092] 其它制剂包括用于皮下给药、腹膜内给药、静脉内给药、动脉内给药或肺给药的那些。如指出的，还可以制备和使用持续释放植入物。

[0093] 本发明的任一种治疗或预防方法可以包括下述步骤：在治疗之前，或随着治疗进展，评估患者。如上面所指出的，非常确定的是，在具有乳腺癌、皮肤癌、肺癌、前列腺癌、胃癌和结直肠癌以及其它上皮恶性肿瘤的患者的尿和 / 或血清中，sEcad 升高。与先前对 sEcad 水平的研究相一致，我们的数据证实，sEcad 以低水平从正常上皮细胞的表面脱落，且以远远更高的水平从人皮肤癌细胞、人乳腺癌细胞和小鼠肺癌细胞脱落。因而，本发明的方法可以包括下述步骤：从得自受试者的样品（例如，尿或血液样品）确定 sEcad 水平。升高的水平指示，受试者是本文所述治疗的良好候选人，并且，随着治疗进展而监测 sEcad 可以帮助优化定量给药和时间安排以及预测结果。例如，可以使用监测来检测抗性的发生，并快速地将应答患者与无应答患者区分开。在存在抗性或无应答性的征象时，医师可以在肿瘤形成其它逃逸机理之前选择替代试剂或辅助试剂。

[0094] 可以将包含 2 种或更多种试剂（其特异性地靶向 sEcad 的第二、第三、第四或第五子结构域中的一个或多个）的组合物施用给正在罹患会易于罹患癌症的人或哺乳动物。所述抗-sEcad 抗体还可以与其它治疗剂（诸如细胞毒性剂）或癌症化疗一起施用。2 种或更多种治疗剂的并行施用不要求所述试剂在同时或通过相同的途径施用，只要存在时间段的重叠即可，在所述重叠期内，所述试剂发挥它们的治疗效果。预见到同时或先后施用，正如在不同的天或周施用。

[0095] 本发明的药物组合物除了包括 sEcad 靶向剂以外，还可以包括一种或多种其它的治疗性抗体（例如，识别一种或多种除了 sEcad 以外的细胞靶标的抗体）。下面列出了示例性的免疫球蛋白。每种免疫球蛋白通过它的适当名称和它的商品名来鉴别。在括号中的以“DB”开始的数字表示，每种抗体在从艾伯塔大学(University of Alberta)可得到的 DrugBank 数据库中的标识符 T. Wishart 等人 (Nucl. Acids Res. 36:D901-906 (2008)) 在环球网 www.drugbank.ca 上描述了 DrugBank 数据库。有用的免疫球蛋白包括：阿昔单抗 (ReoPro™) (DB00054)，即嵌合的人-鼠单克隆抗体 7E3 的 Fab 片段，其合成参见 EP0418316 (A1) 和 W089/11538 (A1)；阿达木单抗 (Humira™) (DB00051)，即结合肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 并阻断 TNF- α 与它的同源受体的结合的全人单克隆抗体；阿仑珠单抗 (Campath™) (DB00087)，即靶向 CD52（一种存在于成熟的淋巴细胞的表面上的蛋白）的人源化的单克隆抗体，其被用于治疗慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL) 和 T- 细胞淋巴瘤；巴利昔单抗（舒莱™）(DB00074)，即针对 IL-2 受体的 α 链 (CD25) 的嵌合的小鼠-人单克隆抗体；贝伐单抗（阿瓦斯丁™）(DB00112)，即识别和阻断血管内皮生长因子 (VEGF)（刺激血管生成的化学信号）的人源化的单克隆抗体，其合成参见 Presta 等人, Cancer Res., 57:4593-4599 (1997)；西妥昔单抗 (certuximab)（爱必妥™）(DB00002)，

即结合和抑制表皮生长因子受体 (EGFR) 的嵌合的 (小鼠 / 人) 单克隆抗体, 其合成参见美国专利号 6, 217, 866 ; 培化舍珠单抗 (Cimzia™), 即人源化的 TNF 抑制剂单克隆抗体的聚乙二醇化的 Fab' 片段 ; 达珠单抗 (赛尼哌™) (DB00111), 即针对 IL-2 受体的 α 亚基的人源化的单克隆抗体 ; 依库珠单抗 (Soliris™), 即结合人 C5 补体蛋白的人源化的单克隆抗体 ; 依法珠单抗 (Raptiva™) (DB00095), 即结合 CD11a 的人源化的单克隆抗体 ; 吉姆单抗 (麦罗塔™) (DB00056), 即与细胞毒性剂相连的针对 CD33 的单克隆抗体, 其氨基酸序列参见 J. Immunol. 148:1149 (1991), 和 Caron 等人, Cancer. 73(3Suppl):1049-1056 (1994) ; 替伊莫单抗 (泽娃灵™) (DB00078), 即螯合剂 tiuxetan 和放射性同位素 (钪⁹⁰ 或 镱¹¹¹) 结合的单克隆小鼠 IgG1 抗体替伊莫单抗 ; 英夫利昔单抗 (类克™) (DB00065), 即结合肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的嵌合的小鼠 - 人单克隆抗体, 其合成参见美国专利号 6, 015, 557 ; 莫罗单抗 -CD3 (Orthoclone OKT3™), 即结合 T 细胞受体 -CD3- 复合物的小鼠单克隆 IgG2a 抗体 ; 那他珠单抗 (Tysabri™) (DB00108), 即针对细胞粘附分子 α 4- 整联蛋白的人源化的单克隆抗体, 其序列参见 Leger 等人, Hum. Antibodies 8(1):3-16 (1997) ; 奥马珠单抗 (Xolair™) (DB00043), 即选择性地结合人免疫球蛋白 E (IgE) 的人源化的 IgG1k 单克隆抗体 ; 帕利珠单抗 (Synagis™) (DB00110), 即针对呼吸道合胞体病毒 (RSV) 的 F 蛋白的 A 抗原位点中的表位的人源化的单克隆抗体 (IgG), 其氨基酸序列参见 Johnson 等人, J. Infect. Dis. 176(5):1215-1224 (1997) ; 帕尼单抗 (Vectibix™), 即对表皮生长因子受体 (也被称作 EGF 受体、EGFR、ErbB-1 和 HER1 (在人类中)) 特异性的全人单克隆抗体 ; 雷珠单抗 (Lucentis™), 即从与贝伐单抗 (阿瓦斯丁™) 相同的亲本鼠抗体衍生出的亲和力和成熟的抗 -VEGF-A 单克隆抗体片段 ; 利妥昔单抗 (Rituxan™, 美罗华™) (DB00073), 即针对蛋白 CD20 (其主要存在于 B 细胞的表面上) 的嵌合的单克隆抗体 ; 托西莫单抗 (Bexxar™) (DB00081), 即与 ¹³¹I 共价结合的抗 -CD20 小鼠单克隆抗体 ; 或曲妥单抗 (赫赛汀™) (DB00072), 即选择性地结合 HER2 蛋白的人源化的单克隆抗体。

[0096] 所述抗体可以包括被批准的或面市的抗体的生物等效物 (生物类似物)。生物类似物可以是例如这样的目前已知的抗体 : 其具有与面市的抗体相同的一级氨基酸序列, 但是与面市的抗体相比, 其可以在不同的细胞类型中或通过不同的生产、纯化或配制方法制备。通常, 可以使用任何保藏的材料。

[0097] 所述药物组合物还可以包括细胞毒性剂或者与细胞毒性剂一起施用, 所述细胞毒性剂例如, 抑制或阻止细胞的功能和 / 或造成细胞的破坏的物质。示例性的细胞毒性剂包括放射性同位素 (例如, ¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y 和 ¹⁸⁶Re)、化学治疗剂和毒素, 诸如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或合成毒素或其片段。非细胞毒性剂表示这样的物质 : 其不会抑制或阻止细胞的功能, 和 / 或不会造成细胞的破坏。非细胞毒性剂可以包括可活化为细胞毒性的试剂。非细胞毒性剂可以包括珠子、脂质体、基质或颗粒 (参见, 例如, 美国专利公开 2003/0028071 和 2003/0032995, 它们通过引用并入本文)。可以用本文公开的抗体或其它靶向剂缀合、偶联、连接或结合这样的试剂。

[0098] 常规癌症药物可以与本文公开的组合物一起施用。有用的药物包括抗血管生成剂, 即, 阻断肿瘤的刺激新血管生长 (这为肿瘤的存活所必需) 的能力的试剂。可以使用本领域技术人员已知的任何抗血管生成剂, 包括诸如阻断血管内皮生长因子 (VEGF) 的功能的贝伐单抗 (阿瓦斯丁®, Genentech, Inc.) 等试剂。其它例子包括, 但不限于, 达肝素

(法安明®)、舒拉明 ABT-510、磷酸考布他汀 A4、来那度胺、LY317615 (恩扎妥林)、大豆异黄酮(染料木黄酮;大豆蛋白分离物)AMG-706、抗-VEGF 抗体、AZD2171、Bay43-9006 (甲苯磺酸索拉非尼)、PI-88、PTK787/ZK222584 (伐拉尼布)、SU11248 (苹果酸舒尼替尼)、VEGF-Trap、XL184、ZD6474、沙利度胺、ATN-161、EMD121974 (西仑吉肽(Cilenigtide)) 和塞来考昔(西乐葆®)。

[0099] 其它有用的治疗剂包括这样的试剂:其促进癌细胞中的 DNA- 损伤,例如,细胞 DNA 的双链断裂。可以使用本领域技术人员已知的任意形式的 DNA- 损伤剂。DNA 损伤通常通过辐射疗法和 / 或化学疗法产生。辐射疗法的例子包括,但不限于,外部辐射疗法和内部辐射疗法(也被称作近距离放射疗法)。用于外部辐射疗法的能源包括 x- 射线、 γ 射线和粒子束;在内部辐射中使用的能源包括放射性的碘(碘¹²⁵或碘¹³¹)和铯⁸⁹或磷、钋、铍、铀、磷酸盐或钴的放射性同位素。施用辐射疗法的方法是本领域普通技术人员众所周知的。

[0100] 损伤 DNA 的化学治疗剂的例子包括,但不限于,白消安(马利兰)、卡铂(伯尔定)、卡莫司汀(BCNU)、苯丁酸氮芥(留可然)、顺铂(Platinol)、环磷酰胺(Cytosan、Neosar)、达卡巴嗪(DTIC-Dome)、异环磷酰胺(Ifex)、洛莫司汀(CCNU)、氮芥(氮芥、Mustargen)、美法仑(爱克兰)和丙卡巴肼(Matulane)。

[0101] 其它标准的癌症化学治疗剂包括,但不限于,烷化剂,诸如卡铂和顺铂;氮芥烷化剂;亚硝基脲烷化剂,诸如卡莫司汀(BCNU);抗代谢药,诸如甲氨蝶呤;亚叶酸;嘌呤类似物抗代谢药、巯基嘌呤;嘧啶类似物抗代谢药,诸如氟尿嘧啶(5-FU)和吉西他滨(健择®);激素抗肿瘤剂,诸如戈舍瑞林、亮丙瑞林和他莫昔芬;天然的抗肿瘤剂,诸如阿地白介素、白介素-2、多西他赛、依托泊苷(VP-16)、干扰素 α 、紫杉醇(泰素®)和维 A 酸(ATRA);天然的抗生素抗肿瘤剂,诸如博来霉素、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、道诺霉素和丝裂霉素(包括丝裂霉素 C);和天然的长春花生物碱抗肿瘤剂,诸如长春碱、长春新碱、长春地辛;羟基脲;醋葡醛内酯、阿霉素、异环磷酰胺、依诺他滨、环磷腺苷、阿柔比星、安西他滨、尼莫司汀、盐酸丙卡巴肼、卡波醌、卡铂、卡莫氟、色霉素 A3、抗肿瘤多糖、抗肿瘤血小板因子、环磷酰胺(Cytosin®)、施佐菲兰、阿糖胞苷(胞嘧啶阿糖胞苷)、达卡巴嗪、硫代肌苷、塞替派、替加氟、多拉司他汀、多拉司他汀类似物诸如 auristatin、CPT-11(伊立替康)、米托蒽醌、长春瑞滨、替尼泊苷、氨基蝶呤、洋红霉素、埃斯波霉素(参见,例如,美国专利号 4,675,187)、新制癌菌素、OK-432、博来霉素、氟铁龙、溴尿苷、白消安、二磷酸己烯雌酚四钠(honvan)、培洛霉素、苯丁抑制素(乌苯美司®)、干扰素- β 、美雄烷、二溴甘露醇、美法仑、层粘连蛋白肽、香菇多糖、采绒革盖菌提取物、替加氟 / 尿嘧啶、雌莫司汀(雌激素 / 氮芥)。

[0102] 可以用作癌症患者的治疗剂的其它试剂包括:EPO、G-CSF、更昔洛韦;抗生素、亮丙瑞林;哌替啶;齐多夫定(AZT);白介素 1-18,包括突变体和类似物;干扰素或细胞因子,诸如干扰素 α 、 β 和 γ 激素,诸如促黄体激素释放激素(LHRH)和类似物,和促性腺素释放激素(GnRH);生长因子,诸如转化生长因子- β (TGF- β)、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经生长因子(NGF)、生长激素释放因子(GHRF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子同源因子(FGFHF)、肝细胞生长因子(HGF)和胰岛素生长因子(IGF);肿瘤坏死因子- α 和 β (TNF- α 和 β);侵袭抑制因子-2(IIF-2);骨形态发生蛋白 1-7(BMP1-7);生长激素抑制

素 ; 胸腺素 - α - 1 ; γ - 球蛋白 ; 超氧化物歧化酶 (SOD) ; 补体因子 ; 和抗 - 血管生成因子。

[0103] 有用的治疗剂包括, 前药, 例如, 这样的前体或衍生物形式的药学活性物质 : 与母体药物相比, 其对肿瘤细胞具有更少的细胞毒性或无细胞毒性, 且能够酶促地活化或转化成有活性的或更高活性的母体形式。参见, 例如, Wilman, *Biochemical Society Transactions*, 14:375-382(1986) 和 Stella 等人, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt 等人, (编), 第 247-267 页, Humana Press(1985)。前药包括, 但不限于 : 含有磷酸酯的前药、含有硫代磷酸酯的前药、含有硫酸酯的前药、含有肽的前药、D- 氨基酸修饰的前药、糖基化的前药、含有 b- 内酰胺的前药、含有任选地被取代的苯氧基乙酰胺的前药或含有任选地被取代的苯基乙酰胺的前药、5- 氟胞嘧啶和其它 5- 氟尿苷前药, 其可以转化成更有活性的无细胞毒性的药物。可以衍生化成用于本文中的前药形式的细胞毒性药物的例子包括、但不限于上述的那些化学治疗剂。

[0104] 本领域技术人员已知的任意方法可以用于确定是否诱发了特定应答。可以使用评估特定疾病状态的程度的临床方法来确定是否诱发了应答。用于评价应答的特定方法将取决于 : 患者的病症的性质、患者的年龄和性别、施用的其它药物和主治临床医师的判断。

[0105] 实施例

[0106] 实施例 1 : sEcad 的隔离会在体外恶性乳房上皮细胞中诱导细胞凋亡, 但是在正常的人乳房上皮细胞中却不会诱导

[0107] Wheelock 等人 (*J. Cell Biochem.* 34:187-202(1987)) 首先描述了 E- 钙粘着蛋白胞外结构域脱落, 他们在 MCF-7 乳腺癌细胞的培养基中检测到可溶性的 80kDa 片段。此后, 已经在体外在几种不同的恶性细胞类型中描述了该 sEcad 片段的切割, 所述恶性细胞类型包括恶性的乳房、皮肤、卵巢、前列腺、食管、结肠、肺和脑细胞 (Davies 等人, *Clin. Cancer Res.* 7(10):3289-3297(2001); Gil 等人, *Gynecol. Oncol.* 108(2):361-369(2008); Ito 等人, *Oncogene* 18(50):7080-7090(1999); Kantak and Kramer, 1998; Noe 等人, *J. Cell Sci.* 114:111-118(2001); Ryniers 等人, *Biol. Chem.* 383:159-165(2002); Symowicz 等人, *Cancer Res.* 67(5):2030-2039(2007))。

[0108] 为了确定在良性和恶性细胞之间是否存在 E- 钙粘着蛋白的局部化和组成性脱落的差异, 我们将正常的 MCF-10A 乳房上皮细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞染色, 用于通过免疫荧光显微术进行 E- 钙粘着蛋白显影。在 4- 孔室载玻片 (Nunc) 上, 在补充了 10%FBS 的 DMEM 中, 培养两种细胞类型至汇合。在 100% 甲醇中固定细胞, 针对 E- 钙粘着蛋白进行免疫染色, 并通过免疫荧光显微术 (x20 放大率) 进行检查。使用组蛋白 H1 (红色) (Santa Cruz) 标记细胞核。我们还通过 ELISA 分析了上清液中的脱落的 E- 钙粘着蛋白胞外结构域。收集得自汇合的 MCF-10A 和 MCF-7 细胞的条件培养基, 并按照生产商的说明书通过 ELISA (R&D Systems) 分析 sEcad 水平。

[0109] 在暴露于对人 E- 钙粘着蛋白结构域 EC1 特异性的单克隆抗体 (SHE78-7, Zymed) 以后, 我们观察到在细胞 - 细胞接触位点处的 E- 钙粘着蛋白免疫染色, 最显著地沿着在两个细胞系的细胞簇内的细胞间边界。相比而言, 尽管在正常的 MCF-10A 细胞和 MCF-7 癌细胞的条件培养基中检测到脱落的可溶性的 E- 钙粘着蛋白胞外结构域, 其在 MCF-7 癌细胞系中显著增加。MCF-10A 相对于 MCF-7 细胞的 sEcad 水平显著不同。

[0110] 接着,在有或没有针对 E-钙粘着蛋白的胞外结构域的抗体 (DECMA; 20 μ g/mL) 或免疫前血清 (IgG; 20 μ g/mL) 存在下,培养汇合的 MCF-10A 和 MCF-7 细胞 48 小时,并使用末端脱氧核苷酸基转移酶生物素-dUTP 切口末端标记 (TUNEL) 试剂盒 (Promega),根据生产商的说明书,分析细胞凋亡。在暴露于抗-sEcad 抗体的正常 MCF-10A 细胞和未处理的或同种型对照细胞之间,没有可察觉的细胞凋亡差异。相比而言,抗-sEcad 处理过的 MCF-7 癌细胞表现出细胞的细胞凋亡的显著增加,这在未处理的细胞中没有发现。为了进一步证实这些发现,我们使用细胞凋亡特异性的 ELISA 测定,其测量细胞质的组蛋白相关的 DNA 片段 (单核小体和寡核小体)。使用针对细胞质的组蛋白相关的 DNA 片段的细胞凋亡特异性的 ELISA (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Boehringer Mannheim, Mannheim, 德国),根据生产商的说明书,分析得自 MCF-10A 和 MCF-7 细胞的细胞裂解物的细胞凋亡,所述细胞在有或没有 20 μ g/mL 抗-sEcad Ab 或 IgG 存在下培养了 48 小时。结果揭示,抗-sEcad 处理会显著地诱导 MCF-7 细胞的细胞凋亡,但是在 MCF-10A 细胞中没有可察觉的作用。任一个细胞系的坏死水平不受抗-sEcad 处理的影响。总之,这些结果表明,从细胞环境中抑制或隔离脱落的 E-钙粘着蛋白胞外结构域,会选择性地诱导乳腺癌细胞的细胞凋亡,而不影响正常的健康的乳房上皮细胞。

[0111] 由于 p53 的活化会导致对于抑制肿瘤发生而言重要的基因的转录调节,并且它的特异性作用主要通过触发细胞凋亡而产生 (Fuster 等人, Trends Mol. Med. 13 (5): 192-199 (2007)), 我们接下来希望确定 p53 是否在该抗-sEcad 诱导的细胞凋亡中起作用。使用蛋白质印迹法和针对 p53 的抗体,我们检查了抗-sEcad 对该促细胞凋亡蛋白在 MCF-7 细胞中的表达的影响。简而言之,在 4-15% 梯度凝胶 (BioRad) 上电泳 50 μ g 裂解物,将其转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜,并用抗-p53 (Santa Cruz; 1:400)、随后用过氧化物酶-缀合的第二抗体 (1:3,000) 进行免疫印迹,并进行增强的化学发光 (ECL) 检测。通过 G3PDH 染色,验证相同的蛋白装载。在 20 μ g/mL 抗-sEcad 处理以后, p53 从 24 小时开始增加,并在 48 小时之前达到最大水平。相比而言,未处理的细胞或用同种型对照处理的细胞没有 p53 表达。由于 p53 在肿瘤中的存在与对化学疗法的有利应答相关联,并且低水平的 p53 会在癌细胞中赋予抗药性,我们认为,抑制肿瘤环境中的 sEcad 可以增强细胞毒性,并降低随着当前的化疗策略而形成的抗性。

[0112] 实施例 2: 在抗-sEcad 抗体治疗以后,人皮肤鳞状细胞癌细胞发生细胞凋亡,而正常的成年人角质形成细胞却没有

[0113] 为了直接确定在正常的上皮角质形成细胞培养物中的 sEcad 的组成性脱落相对于人鳞状细胞癌 (SCC) 的差异,我们在正常的原代人皮肤角质形成细胞 (PHK) 中和在 2 个不同的人 SCC 细胞系 (SCC12b 和 SCC13) 中评价了 sEcad 水平。将 PHK、SCC12b 和 SCC13 细胞培养至约 80% 汇合,并通过蛋白免疫印迹法检查在培养物上清液中的 sEcad 水平。简而言之,在 4-15% 梯度凝胶 (BioRad) 上电泳 60 μ L 得自每个细胞系的条件培养基,将其转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜,并用抗-E-钙粘着蛋白 (Santa Cruz; 1:600)、随后用过氧化物酶-缀合的第二抗体 (1:3,000) 进行免疫印迹,并进行增强的化学发光 (ECL) 检测。还收集得自 PHK、SCC12b 和 SCC13 细胞的条件培养基,并根据生产商的说明书,通过 ELISA 分析 sEcad 的水平。我们通过蛋白质印迹法在两个 SCC 细胞系中观察到增加的 sEcad 表达。通过 ELISA,这相当于,在 SCC12b 和 SCC13 细胞系中的 sEcad 水平比非癌性的 PHK 细胞增加了

大于 3 倍。

[0114] 为了确定抗-sEcad 抗体是否诱导除了上述的 MCF-7 乳腺癌细胞以外的上皮癌细胞的细胞凋亡,我们在有或没有抗-sEcad(20 μ g/mL;DECMA;Sigma)或免疫前血清(IgG;“同种型对照”)存在下培养 PHK(D033)、SCC12b 和 SCC13 细胞至汇合 48 小时,并根据生产商的说明书使用 TUNEL 测定来分析细胞的细胞凋亡。

[0115] 当暴露于抗-sEcad 时,SCC12b 和 SCC13 细胞表现出显著增加的细胞凋亡,而用该阻断抗体处理的正常 PHK 没有表现出可检测的促细胞凋亡效应。使用细胞凋亡特异性的 ELISA 测定,我们进一步验证,用该剂量的抗-sEcad 处理 PHK 对细胞凋亡没有影响。总之,该数据表明,抗-sEcad 处理会在 2 个不同的人皮肤癌细胞系中选择性地诱导细胞凋亡,但是在正常的原代人角质形成细胞皮肤培养物中却不会。

[0116] 实施例 3:小鼠 SCC 易感抗-sEcad 诱导的细胞凋亡

[0117] 为了有效地研究诸如鳞状细胞癌等疾病过程,谨慎地使用人和动物模型方案。因此,我们希望确定抗-sEcad 治疗是否会选择性地诱导 SCC 小鼠细胞系的细胞凋亡。如果是这样的话,这将能够使用鼠模型系统在体内进一步试验抗-sEcad 剂的效力和毒性。

[0118] 我们首先通过 ELISA 确定了汇合的原代小鼠角质形成细胞(PMK)和小鼠 SCC 细胞系(PAM212)的条件培养基中的 sEcad 水平。如预期的,在 PAM212 细胞系中的 sEcad 水平是对照 PMK 培养物的几乎 2 倍。

[0119] 通过蛋白质印迹法确认了这些水平;在 PAM212 细胞系中的 sEcad 的相对水平是 2-3 倍。因而,显然,与乳房和人皮肤癌细胞一样,在小鼠 SCC 中的 E-钙粘着蛋白的胞外结构域的组成性脱落在统计上高于非癌性的健康的上皮细胞。

[0120] 为了验证抗-sEcad 治疗对小鼠 SCC 具有选择性的细胞毒性,在有或没有针对 E-钙粘着蛋白的胞外结构域的抗体(20 μ g/mL DECMA;Sigma)或免疫前血清(IgG)存在下,将 PMK 和 PAM212 细胞培养至汇合 48 小时,并使用 TUNEL 测定分析细胞凋亡。我们观察到,在用阻断抗体温育以后,SCC 细胞系中的 TUNEL-阳性细胞显著增加,但是在 PMK 培养物中没有可察觉的差异。

[0121] 通过细胞凋亡特异性的 ELISA 测定(Cell Death Detection ELISA^{PLUS}(Boehringer Mannheim))证实了这些结果,该测定表明抗-sEcad 处理的 PAM212 细胞系的细胞凋亡增加了超过 2 倍,但是在 PMK 培养物中没有可察觉的细胞死亡。相比而言,不论细胞类型如何,在所有试验条件下的坏死水平没有变化。

[0122] 由于我们以前证实了暴露于 20 μ g/mL 抗-sEcad 抗体的 MCF-7 细胞中的 p53 水平的增加,我们接下来确定在有或没有该阻断抗体或免疫前血清(IgG)存在下培养 24 和 48 小时的 PAM212 细胞中是否存在类似的 p53 增加。简而言之,在 4-15% 梯度凝胶(BioRad)上电泳 50 μ g 裂解物,将其转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,并用抗-p53(Santa Cruz;1:400)、随后用过氧化物酶-缀合的第二抗体(1:3,000)进行免疫印迹,并进行增强的化学发光(ECL)检测。通过 G3PDH 染色,验证相同的蛋白装载。蛋白质印迹法证实,在抗-sEcad 治疗以后 24 和 48 小时,p53 水平显著增加,但是在未处理的或同种型 IgG 对照中没有泳带。抗-sEcad 诱导的 p53 表达的这种定时与在以前描述的 MCF-7 细胞系中发现的相同。因此,这种抗-sEcad 诱导的癌细胞死亡可能是通过 p53 依赖性的途径,尽管确切的下游参与者仍然有待阐明。

[0123] 实施例 4 :阻断 sEcad 不会诱导其它非癌细胞的细胞凋亡

[0124] 将 3T3 小鼠成纤维细胞和人内皮细胞 (HUVEC) 在有或没有抗 -sEcad Ab 或免疫前血清 (IgG) 存在下培养 24-48 小时,并通过 TUNEL 和通过上述的细胞凋亡特异性的 ELISA 测定,分析细胞凋亡。在有阻断抗体存在下,3T3 细胞在使用 TUNEL 测定时几乎没有或根本没有表现出细胞凋亡性细胞核,并且在细胞凋亡特异性的 ELISA 测定中没有表现出细胞凋亡的变化。类似地,用抗 -sEcad 处理的 HUVEC 细胞在使用两种策略时没有表现出可察觉的细胞凋亡差异。此外,在 E- 钙粘着蛋白阻断抗体中培养 3T3 和 HUVEC 细胞以后,这些细胞没有表现出坏死的变化。

[0125] 实施例 5 :抗 -sEcad mAb 疗法在体内会延迟肿瘤发生、阻止肿瘤负荷和减轻肿瘤等级

[0126] 在该研究中使用雌性纯洁的 MMTV-PyMT 转基因小鼠,其特征在于,可触知的乳腺癌肿瘤的快速发展,所述肿瘤进展至侵袭性腺癌,并转移至肺 (Guy 等人,1992;Bugge 等人,1998)。从 48 天龄开始,每周 2 次通过腹膜内注射用靶向 sEcad 的 EC-5 结构域的单克隆抗体 (α -sEcad;DECMA-1, Sigma Aldrich, 每只小鼠 20 μ g/200 μ l 盐水)或生理盐水处理小鼠。在 90 天龄时处死小鼠。所有盐水处理的(对照)MMTV-PyMT 小鼠在 56-60 天时形成可触知的肿瘤,而在治疗的小鼠中观察到肿瘤发生的统计上显著的延迟(81-85 天;参见图 2A)。90- 天龄 EC5mAb- 治疗的小鼠表现出更少的总肿瘤,所述肿瘤在组织病理学上被确定为中等分化的(结构等级为 II,细胞核等级为 I;参见图 2B)。相比而言,在 90 天盐水处理的小鼠中的所有肿瘤都是低分化的(结构等级为 III,细胞核等级为 III;参见图 2C)。mAb- 治疗的小鼠也表现出减少的总肿瘤重量和体积负荷。

[0127] 综上所述,我们的结果清楚地证实,抗 -sEcad 抗体治疗会诱导多种上皮癌细胞系(乳房、皮肤和肺)的细胞死亡,而不影响邻近的正常的健康的上皮细胞、成纤维细胞和内皮细胞。我们提议,癌细胞会向微环境中分泌 sEcad,以人工地模拟正常的细胞-细胞接触,并提供与附近的邻近细胞的功能骨架。因而,通过从肿瘤微环境中清除 sEcad,我们会扰乱肿瘤细胞环境的这种滋养能力,并活化在程序化细胞死亡中涉及的 p53 依赖性的分子途径。

[0128] 已经描述了本发明的许多实施方案。尽管如此,应该理解,可以做出各种修改,而不脱离本发明的精神和范围。因此,其它实施方案是在下述权利要求的范围内。

```

MGPWSRSLSA LLLLLQVSSW LCQEPEPCHP GFDAESYTFT VPRRHLEGR 50
VLGRVNFEDC TGRQRTAYFS LDTRFKVGTG GVITVKRPLR FHN PQIHFLV 100
YAWDSTYRKF STKVTLNTVG HHHRRPPPHQA SVSGIQAELL TFPNSSPGLR 150
RQKRWDVIPP ISCPENEKGP FPKNLVQIKS NKDKGKVFY SITGQGADTP 200
PVGVFIIERE TGWLKVTEPL DRERIATYTL FSHAVSSNGN AVEDPMEILI 250
TVTDQNDNKP EFTQEVFKGS VMEGALPGTS VMEVTATDAD DDVNTYNAAI 300
AYTILSODPE LPDKNMFTIN RNTGVISVVT TGLDRESEPT YTLVVQAADL 350
QGEGLSTTAT AVITVTDND NPPIFNPTTY KGQVPENEAN VVITTLKVTD 400
ADAPNTPAWE AVYTILNDDG GQFVVTNPNV NNDGILKTAK GLDFEAKQQY 450
ILHAVAVNVV PFEVSLTTST ATVTVDVLDV NEAPIFVPPE KRVEVSEDFG 500
VGQEITSYTA QEPDTFMEQK ITYRIWRDTA NWLEINPDTG AISTRAELDR 550
EDFEHVKNST YTALIIATDN GSPVATGTGT LLLILSDVND NAPIPEPRTI 600
FFCERNPKPO VINIIDADLP PNTSPFTAEL THGASANWTI QYNDPTQESI 650
ILKPKMALEV GDYKINLKL M DNQNKDQVTT LEVSVCDCEG AAGVCRKAQP 700
VEAGLOIPAI LGILGGILAL LILLLLLLLF LRRRAVVKEP LLPPEDDTRD 750
NVYYYDEEGG GEEDQDFDLS QLHRGLDARP EVTRNDVAPT LMSVPRYLPR 800
PANPDEIGNF IDENLKAADT DPTAPPYDSL LVFDYEGSGS EAASLSSLNS 850
SESDKDQDYD YLNEWGNRFK KLADMYGGGE DD 882

```

图 1A

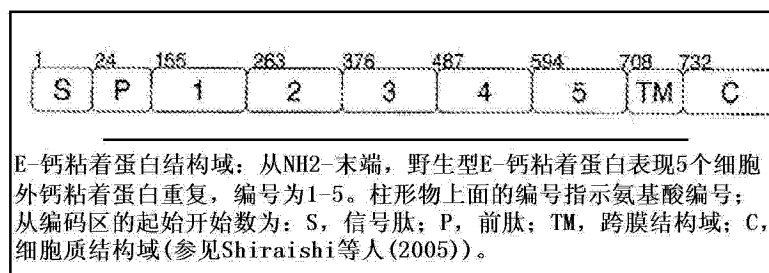


图 1B

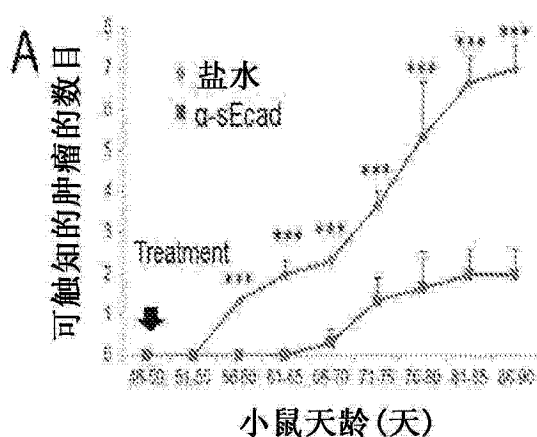


图 2A

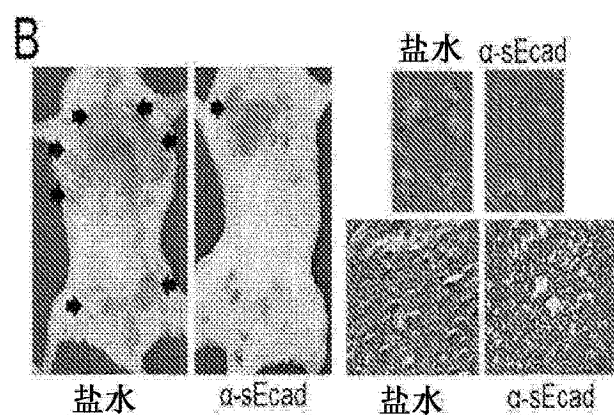


图 2B

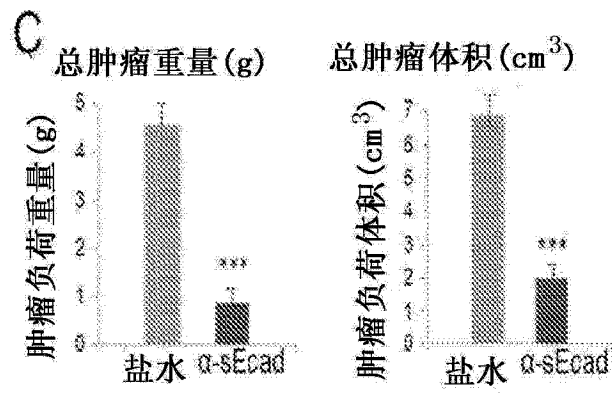


图 2C