



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105407922 B

(45) 授权公告日 2021.06.25

(21) 申请号 201480042769.8

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

(22) 申请日 2014.07.30

公司 11227

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 郑斌 彭鲲鹏

申请公布号 CN 105407922 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2016.03.16

G01N 33/569 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/574 (2006.01)

PCT/EP2013/002272 2013.07.31 EP

A61K 39/395 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 45/06 (2006.01)

2016.01.28

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/EP2014/066330 2014.07.30

CN 102741289 A, 2012.10.17

(87) PCT国际申请的公布数据

Wilma Dormeyer等.plasma membrane

W02015/014870 EN 2015.02.05

proteomics of human embryonic stem cells
and human embryonal carcinoma cells.

(73) 专利权人 生物技术公司

《journal of proteome research》.2008,表1.

地址 德国美因兹

Uri Ben-David等.immunologic and
chemical targeting of the tight-junction
protein claudin-6 eliminates tumorigenic
human pluripotent stem cells.《Nature
Communications》.2013,摘要、图3、第4页右栏第
1段、第6-7页讨论.

专利权人 加尼梅德药物公司

审查员 罗洋

约翰·古腾堡大学美因兹医学大
学转化肿瘤学公司

权利要求书1页 说明书63页

(72) 发明人 乌尔·沙欣 厄兹莱姆·图雷奇

序列表11页 附图34页

科登·沃尔特 迈克·瓦格纳

玛丽亚·克罗伊茨贝格

扎内比·黑克尔

斯特凡·雅各布斯

(54) 发明名称

涉及癌症干细胞的癌症的诊断与治疗

(57) 摘要

B
CN 105407922

本发明提供了用于诊断或治疗涉及癌症干
细胞之癌症疾病的方法,其包括靶向CLDN6。特别
地,本发明提供了确定癌症干细胞的方法,其包
括检测表达CLDN6的细胞。此外,本发明提供了治
疗或预防癌症的方法,其包括通过向癌症患者施
用能够与CLDN6结合的抗体来抑制和/或消除癌
症干细胞。

1. 与化学治疗组合的结合CLDN6的抗体在制造用于在患者中治疗或预防癌症之药物中的用途,其中所述抗体包含含有由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的轻链可变区(VL)的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中所述抗体和所述化学治疗以协同有效量施用,并且其中所述化学治疗包括选自卡铂、吉西他滨、紫杉醇、多柔比星、拓扑替康、PEB和顺铂,并且其中所述癌症的特征在于表达CLDN6的癌细胞。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述癌症涉及表达CLDN6的癌症干细胞。
3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述癌症干细胞位于所述癌症患者的肿瘤部位。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述抗体介导:补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解和/或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解。
5. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述抗体与治疗部分相偶联。
6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述治疗部分是化学治疗剂、毒素药物部分或放射性核素。
 7. 根据权利要求5所述的用途,其中所述治疗部分是细胞毒剂。
 8. 根据权利要求6所述的用途,其中所述毒素药物部分通过接头与所述抗体共价连接。
 9. 根据权利要求6或8所述的用途,其中所述毒素药物部分可透过细胞膜。
 10. 根据权利要求8所述的用途,其中所述毒素药物部分是美登木素生物碱或奥瑞他汀。
11. 根据权利要求 10所述的用途,其中所述美登木素生物碱选自DM1和DM4。
12. 根据权利要求10所述的用途,其中所述奥瑞他汀选自单甲基奥瑞他汀E(MMAE)和单甲基奥瑞他汀F(MMAF)。
13. 根据权利要求8和10至12中任一项所述的用途,其中所述接头是可切割的接头。
14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述接头是组织蛋白酶可切割的接头。
15. 根据权利要求8和10至12中任一项所述的用途,其中所述抗体通过所述抗体的半胱氨酸巯基与所述接头连接。

涉及癌症干细胞的癌症的诊断与治疗

[0001] 常规的癌症治疗主要是试图选择性地检测和根除大部分快速生长的癌细胞(即,形成肿瘤块的细胞)以及主要通过干扰细胞生长和DNA复制中涉及的细胞机制来发挥其对癌细胞的毒性作用。此外,标准的肿瘤学方案主要被设计为无过度毒性地施用最高剂量的辐照或化学治疗剂,即,通常称为“最大耐受剂量”(maximum tolerated dose, MTD)。

[0002] 化学治疗方案还常常涉及施用化学治疗剂的组合以试图提高治疗的效力。尽管可使用许多种化学治疗剂,但是这些治疗有许多缺点。例如,化学治疗剂引起显著的且往往危险的副作用,原因是对快速生长的细胞(不论正常还是恶性)的非特异性副作用。

[0003] 其他类型的癌症治疗包括手术、激素治疗、免疫治疗、表观遗传治疗、抗血管生成治疗、靶向治疗和放射治疗来根除患者中的赘生性细胞(neoplastic cells)。

[0004] 然而,所有用于癌症治疗的常规方法对患者而言都具有明显的缺点,包括缺乏效力(特别是在长期结果方面)和具有毒性。因此,需要用于治疗癌症患者的新疗法。

[0005] 越来越多的证据表明,在肿瘤内存在癌细胞亚群,其保留干细胞样特性。这个亚群被称为癌症干细胞(cancer stem cell,CSC)。癌症干细胞与正常干细胞相比具有类似特性,它们具有自我更新的能力并形成肿瘤的所有异质细胞(heterogeneous cell)类型。分析肿瘤细胞CSC样特性的有效测定是集落形成测定。使用该测定,可容易地检查单一肿瘤细胞的自我更新能力和肿瘤形成潜力。

[0006] 认为癌症干细胞能够引发肿瘤形成、维持肿瘤生长以及可能导致肿瘤散布至体内的远处器官部位。癌症干细胞包括独特的肿瘤亚群,其相对于肿瘤(即,肿瘤块)的其余细胞而言,更易致瘤,生长相对更缓慢或静止,且往往比肿瘤块相对更具化学抗性。因为常规的癌症治疗靶向快速增殖的细胞(即,形成肿瘤块的细胞),所以认为这些治疗在靶向和损害癌症干细胞方面相对无效。癌症干细胞可显示使其相对更具化学抗性的其他特征,例如多重抗药性和抗凋亡途径。无法充分地靶向并根除癌症干细胞将构成无法进行标准肿瘤学治疗方案以确保许多癌症患者长期受益的关键原因。因此,癌症干细胞可能不仅仅是治疗后癌症复发和药物无效的主要原因,也是恶性癌转移的主要原因。因此,治愈癌症的一种机会是消除癌症干细胞。

[0007] 密蛋白(claudin)是位于上皮和内皮的紧密连接内的整合膜蛋白。预测密蛋白具有四个跨膜区段,具有两个胞外环,且N末端和C末端位于细胞质中。跨膜蛋白质的密蛋白(CLDN)家族在上皮和内皮紧密连接的维持中发挥关键的作用,并且还可能在细胞骨架的维持中以及细胞信号转导中发挥作用。CLDN6在一系列不同的人癌细胞中表达,而在正常组织中的表达限于胎盘。

[0008] 此处我们给出的数据证明,在产生多能细胞的过程中CLDN6的表达被上调。此外,CLDN6与癌症干细胞的已知标志物密切相关并且CLDN6阳性肿瘤细胞示出增加的集落形成。这也证明,使用CLDN6特异性抗体的治疗可以克服肿瘤(例如卵巢癌)的化学治疗抗性并且化学治疗与CLDN6抗体治疗的组合具有明显的协同效应。

[0009] 本文中所给出的结果表明,CLDN6是癌症干细胞的新标志物,且出于诊断和治疗目的,可通过靶向CLDN6来靶向癌症干细胞。

发明内容

[0010] 在一个方面,本发明涉及确定癌症干细胞的方法,其包括检测表达CLDN6的细胞。

[0011] 在一个实施方案中,表达CLDN6的细胞的存在表明癌症干细胞的存在和/或表达CLDN6的细胞的量与癌症干细胞的量相关。在一个实施方案中,例如在癌症治疗之前、期间和/或之后,在从癌症患者获得的样品中检测表达CLDN6的细胞。在一个实施方案中,所述方法包括定量和/或定性测定表达CLDN6的细胞。在一个实施方案中,所述方法包括将表达CLDN6的细胞的量与参照样品中表达CLDN6的细胞的量或者与预定参照范围进行比较。所述参照样品可以是来自经诊断未患有癌症之患者的样品。所述预定参照范围可以基于经诊断未患有癌症的患者群体。在一个实施方案中,所述方法包括监测癌症患者中癌症干细胞的量,其中监测癌症患者中癌症干细胞的量优选包括将从癌症患者获得的样品中癌症干细胞的量与较早从所述癌症患者获得的样品中癌症干细胞的量进行比较。在一个实施方案中,从所述癌症患者获得的样品是在施用癌症治疗期间或之后取自所述癌症患者的样品。

[0012] 在另一个方面,本发明涉及监测癌症患者中癌症治疗之效力的方法,其包括:(i)在施用癌症治疗期间或之后,确定从所述癌症患者获得的样品中癌症干细胞的量;以及(ii)将从所述癌症患者获得的所述样品中癌症干细胞的量与较早从所述癌症患者获得的样品中癌症干细胞的量进行比较,其中确定从所述癌症患者获得的所述样品中癌症干细胞的量和/或确定较早从所述癌症患者获得的所述样品中癌症干细胞的量包括确定表达CLDN6的细胞的量。

[0013] 在一个实施方案中,较早从癌所述症患者获得的所述样品是在施用癌症治疗之前、期间或之后取自所述癌症患者的样品。

[0014] 在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,癌症干细胞的量稳定或减少表明癌症治疗有效。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,癌症干细胞的量增加表明癌症治疗无效。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,癌症治疗是针对癌症干细胞的癌症治疗。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,从癌症患者获得的样品是生物流体或肿瘤组织活检物(biopsy)。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,样品已经经历一个或更多个预处理步骤。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,通过检测或确定CLDN6蛋白/或CLDN6 mRNA的量来检测表达CLDN6的细胞或确定其量。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,通过使用免疫测定来检测表达CLDN6的细胞或确定其量,其中所述免疫测定优选选自:western印迹、免疫组织化学、放射免疫测定(radioimmunoassay)、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定(“sandwich” immunoassay)、免疫沉淀测定、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、凝集测定(agglutination assay)、补体固定测定(complement-fixation assay)、免疫放射测定(immunoradiometric assay)、荧光免疫测定、免疫荧光、蛋白A免疫测定、流式细胞术和FACS分析。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,通过使用能够结合CLDN6的抗体来检测表达CLDN6的细胞或确定其量。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,表达CLDN6的细胞是表达CLDN6的癌细胞和/或存在于肿瘤部位的细胞。

[0015] 在另一个方面,本发明涉及治疗或预防癌症的方法,其包括通过向癌症患者施用能够结合CLDN6的抗体来抑制和/或消除癌症干细胞。

[0016] 在一个实施方案中,所述癌症干细胞表达CLDN6。在一个实施方案中,所述方法还

包括施用化学治疗和/或放射治疗。在一个实施方案中，抑制和/或消除癌症干细胞增强化学治疗和/或放射治疗的抗癌效果，其中所述化学治疗和/或放射治疗的抗癌效果的增强包括经受化学治疗和/或放射治疗之癌症患者寿命的延长。

[0017] 在另一个方面，本发明涉及治疗或预防癌症的方法，其包括向癌症患者施用(i)能够结合CLDN6的抗体和(ii)化学治疗。

[0018] 在一个实施方案中，所述癌症涉及表达CLDN6的癌症干细胞。在一个实施方案中，施用能够结合CLDN6的抗体导致抑制或消除表达CLDN6的癌症干细胞。在一个实施方案中，施用能够结合CLDN6的抗体增强化学治疗的抗癌效果，其中所述化学治疗的抗癌效果的增强优选包括经受化学治疗之癌症患者寿命的延长。

[0019] 在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，癌症干细胞的消除导致癌症治愈。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，以协同有效量施用能够结合CLDN6的抗体和化学治疗。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，以低于最大耐受剂量的剂量施用化学治疗。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，化学治疗包括施用选自以下的药剂：紫杉烷类、铂化合物、核昔类似物、喜树碱类似物、蒽环类(anthracyclines)，其前药、其盐、及其组合。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，化学治疗包括施用选自以下的药剂：紫杉醇、顺铂、卡铂，其前药、其盐、以及其组合。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，癌症干细胞位于癌症患者的肿瘤部位。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，癌症对化学治疗具有抗性，特别是如果所述化学治疗作为单一治疗施用。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，能够结合CLDN6的抗体对癌症干细胞具有抑制和/或细胞毒性作用(cytotoxic effect)，其中能够结合CLDN6的抗体通过介导以下的一种或更多种来发挥其对癌症干细胞的抑制和/或细胞毒性作用：补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、诱导凋亡和抑制增殖。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，能够结合CLDN6的抗体与治疗部分相偶联，并且可以是如本文所述的抗体药物缀合物。在一个实施方案中，所述治疗部分是细胞毒剂、化学治疗剂或放射性核素。在一个实施方案中，所述治疗部分作用于缓慢生长(slow-growing)的细胞。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，能够结合CLDN6的抗体与CLDN6的第一胞外环结合。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中，能够结合CLDN6的抗体包含：含有由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段的重链可变区(VH)以及含有由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列或其片段的轻链可变区(VL)。

[0020] 在另一个方面，本发明涉及治疗或预防癌症的方法，其包括向癌症患者施用抗体药物缀合物，所述抗体药物缀合物包含通过接头与至少一种毒素药物部分共价连接的能够结合CLDN6的抗体。

[0021] 在一个实施方案中，所述毒素药物部分可透过细胞膜。在一个实施方案中，所述毒素药物部分中的至少一种作用于缓慢生长的细胞。在一个实施方案中，所述毒素药物部分是美登木素生物碱(maytansinoid)或奥瑞他汀(auristatin)。在一个实施方案中，所述美登木素生物碱选自DM1和DM4。在一个实施方案中，所述奥瑞他汀选自单甲基奥瑞他汀E(MMAE)和单甲基奥瑞他汀F(MMAF)。在一个实施方案中，所述接头是可切割的接头，优选组织蛋白酶可切割的接头。在一个实施方案中，所述抗体通过所述抗体的半胱氨酸巯基与所述接头连接。

[0022] 在一个实施方案中,所述癌症涉及表达CLDN6的癌症干细胞。在一个实施方案中,施用所述抗体药物缀合物导致抑制或消除表达CLDN6的癌症干细胞。在一个实施方案中,所述癌症干细胞的消除导致癌症治愈。在一个实施方案中,所述癌症干细胞位于所述癌症患者的肿瘤部位。在一个实施方案中,所述抗体药物缀合物对癌症干细胞具有抑制和/或细胞毒性作用,其中所述抗体药物缀合物优选通过诱导凋亡和/或抑制增殖来发挥其对癌症干细胞的抑制和/或细胞毒性作用。

[0023] 在一个实施方案中,所述方法还包括施用化学治疗和/或放射治疗。在一个实施方案中,施用所述抗体药物缀合物增强化学治疗和/或放射治疗的抗癌效果,其中所述化学治疗和/或放射治疗的抗癌效果的增强优选包括经受化学治疗和/或放射治疗之癌症患者寿命的延长。

[0024] 在一个实施方案中,以协同有效量施用所述抗体药物缀合物和所述化学治疗。在一个实施方案中,以低于最大耐受剂量的剂量施用所述化学治疗。在一个实施方案中,所述化学治疗包括施用选自以下的药剂:紫杉烷类、铂化合物、核苷类似物、喜树碱类似物、蒽环类,其前药、其盐、及其组合。在一个实施方案中,所述化学治疗包括施用选自以下的药剂:紫杉醇、顺铂、卡铂,其前药、其盐、及其组合。在一个实施方案中,所述癌症对化学治疗具有抗性,特别是如果所述化学治疗作为单一治疗施用。

[0025] 在一个实施方案中,所述能够结合CLDN6的抗体(特别是当存在于所述抗体药物缀合物中时)对CLDN6具有亲和力和/或特异性,以适当地使得胞吞(endocytosis)所述抗体和/或所述抗体药物缀合物。在一个实施方案中,所述抗体药物缀合物中之能够结合CLDN6的抗体与所述CLDN6的第一胞外环结合。在一个实施方案中,所述抗体药物缀合物中之能够结合CLDN6的抗体包含:含有由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段的重链可变区(VH)以及含有由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列或其片段的轻链可变区(VL)。

[0026] 在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,CLDN6具有根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在本发明所有方面之方法的一个实施方案中,癌症包括原发性癌、晚期癌、转移癌、复发癌、或其组合。

[0027] 在另一个方面,本发明涉及治疗或预防癌症的方法,其包括:(i)通过本发明的方法确定癌症患者中的癌症干细胞以及(ii)向所述癌症患者施用针对癌症干细胞的癌症治疗。在一个实施方案中,所述针对癌症干细胞的癌症治疗包括实施本发明的治疗或预防癌症的方法。

[0028] 在另一个方面,本发明涉及预防癌症化学抗性、癌症复发或癌症转移(特别是在癌症治疗期间或之后)的方法,所述方法包括通过本发明的方法治疗癌症。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗或预防癌症的医药制品(medical preparation),其包含(i)能够结合CLDN6的抗体和(ii)化学治疗剂。能够结合CLDN6的抗体和化学治疗剂可以以混合物或彼此分开的形式存在于所述医药制品中。所述医药制品可以以药盒的形式存在,所述药盒包括包含所述能够结合CLDN6的抗体的第一容器和包含所述化学治疗剂的第二容器。所述医药制品还可包括使用制品(特别是使用本发明方法中的制品)治疗或预防癌症的打印说明书。本文描述了医药制品(特别是能够结合CLDN6的抗体和化学治疗剂)的不同实施方案。

[0030] 在一个具体的方面,本发明提供了医药制品,其包含(i)能够结合CLDN6的抗体和

(ii) 紫杉醇。能够结合CLDN6的抗体和紫杉醇可以以混合物或彼此分开的形式存在于所述医药制品中。所述医药制品可用于治疗或预防癌症，例如卵巢癌。所述医药制品可以以药盒的形式存在，所述药盒包括包含所述能够结合CLDN6的抗体的第一容器和包含紫杉醇的第二容器。所述医药制品还可包括使用制品(特别是使用用于本发明方法中的制品)治疗或预防癌症(例如卵巢癌)的打印说明书。本文描述了医药制品(特别是能够结合CLDN6的抗体)的不同实施方案。

[0031] 在另一个方面，本发明提供了抗体药物缀合物，其包含通过接头与至少一种毒素药物部分共价连接的能够结合CLDN6的抗体。

[0032] 在一个实施方案中，所述毒素药物部分可透过细胞膜。在一个实施方案中，所述毒素药物部分中的至少一种作用于缓慢生长的细胞。在一个实施方案中，所述毒素药物部分是美登木素生物碱或奥瑞他汀。在一个实施方案中，所述美登木素生物碱选自DM1和DM4。在一个实施方案中，所述奥瑞他汀选自单甲基奥瑞他汀E(MMAE)和单甲基奥瑞他汀F(MMAF)。在一个实施方案中，所述接头是可切割的接头，优选组织蛋白酶可切割的接头。在一个实施方案中，所述抗体通过所述抗体的半胱氨酸巯基与所述接头连接。

[0033] 在一个实施方案中，所述能够结合CLDN6的抗体(特别是当存在于所述抗体药物缀合物中时)对CLDN6具有亲和力和/或特异性，以适当地使得胞吞所述抗体和/或所述抗体药物缀合物。在一个实施方案中，所述抗体药物缀合物中之能够结合CLDN6的抗体与所述CLDN6的第一胞外环结合。在一个实施方案中，所述抗体药物缀合物中之能够结合CLDN6的抗体包含：含有由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段的重链可变区(VH)以及含有由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列或其片段的轻链可变区(VL)。

[0034] 在另一个方面，本发明提供了药物制剂(pharmaceutical formulation)，其包含本发明的抗体药物缀合物，和可药用稀释剂、载体或赋形剂。

[0035] 在另一个方面，本发明提供了医药制品，其包含本发明的抗体药物缀合物，和化学治疗剂。优选地，所述医药制品用于治疗或预防癌症。所述抗体药物缀合物和所述化学治疗剂可以以混合物或彼此分开的形式存在于医药制品中。所述医药制品可以以药盒的形式存在，所述药盒包括包含所述抗体药物缀合物的第一容器和包含所述化学治疗剂的第二容器。所述医药制品还可包括使用制品(特别是使用用于本发明方法的制品)治疗或预防癌症的打印说明书。本文描述了医药制品(特别是抗体药物缀合物和化学治疗剂)的不同实施方案。

[0036] 在一个具体的方面，本发明提供了医药制品，其包含本发明的抗体药物缀合物和紫杉醇。所述抗体药物缀合物和紫杉醇可以以混合物或彼此分开的形式存在于所述医药制品中。所述医药制品可用于治疗或预防癌症，例如卵巢癌。所述医药制品可以以药盒的形式存在，所述药盒包括包含所述抗体药物缀合物的第一容器和包含紫杉醇的第二容器。所述医药制品还可包括使用制品(特别是使用用于本发明方法的制品)治疗或预防癌症(例如卵巢癌)的打印说明书。本文描述了医药制品(特别是抗体药物缀合物)的不同实施方案。

[0037] 本发明还提供了本文描述的药剂和组合物，例如抗体药物缀合物、能够结合CLDN6的抗体和/或化学治疗剂以用于本文所述的方法。例如，本发明还提供了抗体药物缀合物或能够结合CLDN6的抗体以用于与化学治疗剂(例如紫杉醇)一起施用。

[0038] 在一个实施方案中，所述能够结合CLDN6的抗体是单克隆抗体、嵌合抗体或人源化

抗体或者抗体的片段。在一个实施方案中,当与细胞的CLDN6(特别是通过细胞在其细胞表面上表达的CLDN6)结合时,则抗体介导细胞杀伤,其中所述细胞优选癌症干细胞,例如本文所述癌症的癌症干细胞。

[0039] 根据本发明,癌症优选选自:卵巢癌(特别是卵巢腺癌和卵巢畸胎癌)、肺癌包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)(特别是鳞状细胞肺癌和腺癌)、大细胞癌(LCC)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(特别是基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑素瘤、头颈癌(特别是恶性多形性腺瘤)、肉瘤(特别是滑膜肉瘤及癌肉瘤)、胆管癌、膀胱癌(特别是移行细胞癌和乳头状癌)、肾癌(特别是肾细胞癌)包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌、结肠癌、小肠癌包括回肠癌(特别是小肠腺癌和回肠腺癌)、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌、睾丸癌(特别是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和睾丸胚胎性癌)、子宫癌、生殖细胞肿瘤例如畸胎癌或胚胎性癌(特别是睾丸和卵巢的生殖细胞肿瘤),及其转移形式。

[0040] 根据本发明,表达CLDN6的癌细胞和/或癌症干细胞优选本文所述之癌症的细胞。

[0041] 在一个实施方案中,本文所述的癌症为CLDN6阳性。在一个实施方案中,本文所述之癌症的癌细胞为CLDN6阳性。在一个实施方案中,本文所述之癌症的癌细胞在其细胞表面上表达CLDN6。

[0042] 在一个实施方案中,本文所述的癌症包括原发性癌、晚期癌、转移癌、复发癌、或其组合,例如原发性癌和转移癌的组合。在一个实施方案中,癌症对化学治疗(例如紫杉醇单一治疗)部分或完全顽固(refractory)。在一个实施方案中,癌症是卵巢癌,特别是对化学治疗(例如紫杉醇单一治疗)部分或完全顽固的卵巢癌。

[0043] 根据下文的详细描述和权利要求书,本发明的其他特征和优点将明显。

附图说明

[0044] 图1:CLDN6mRNA在人iPS细胞中表达。

[0045] 使用不含RNA(无RNA的对照)或具有重编程混合物(reprogramming cocktail)(未修饰的OSKMNL+EBK+miR-mix)的Lipofectamine RNAiMAX(Life Technologies)转染人包皮成纤维细胞(HFF),并在处理后第5、12和19天收集细胞。提取RNA,转录成cDNA,然后使用ABI PRISM 7300序列检测系统和软件(具有QuantiTect SYBR green Kit的Applied Biosystems(Qiagen))通过定量实时RT-PCR进行分析。示出了是用重编程混合物处理的细胞(黑色柱)相对于来自处理第1天的HFF细胞(灰色柱)之CLDN6表达的诱导倍数。将CLDN6 mRNA表达以管家基因HPRT1的mRNA表达归一化。OSKMNL=转录因子OCT4、SOX2、KLF4、cMYC、NANOG和(und)LIN28,EBK=IFN-逃逸蛋白(escape protein)E3、K3和B18R,miR-mix=miRNA-302a/b/c/d和367。

[0046] 图2:CLDN6在人iPS细胞的表面上表达。

[0047] 用不含RNA(无RNA的对照)或用重编程混合物(未修饰的OSKMNL+EBK+miR-mix)转染HFF细胞并在处理后第5(A)、12(B)和19(C)天收集细胞。在4°C下,用1μg/ml的CLDN6特异性IMAB027-AF647和SSEA-4-V450抗体(每个测试2.5μl,购自BD)将细胞染色30分钟并通过流式细胞术分析表面表达。实验进行两次重复并示出了代表性的点图。OSKMNL=转录因子OCT4、SOX2、KLF4、cMYC、NANOG和LIN28,EBK=IFN-逃逸蛋白E3、K3和B18R,miR-mix=miRNA-302a/b/c/d和367。

[0048] 图3:在卵巢癌细胞系中CLDN6的表面表达。

[0049] 为了分析CLDN6表达,在4℃下用1 μ g/ml的IMAB027-AF647将1E6细胞染色30分钟并通过流式细胞术分析表面表达。在(A)中示出了COV318细胞。实验进行三次重复并示出了一个代表性的点图。在(B)中,示出了稳定转染有对照载体的PA-1细胞(PA-1 76)或转染有表达针对CLDN6的shRNA之载体的PA-1细胞(克隆PA-1 50和PA-1 54)。实验进行三次重复并给出了一个代表性的点图。shRNA=小发夹RNA。

[0050] 图4:CLDN6对于卵巢癌细胞的集落形成重要。

[0051] 为了分析克隆形成行为(clonogenic behavior),在4℃下用1 μ g/ml的IMAB027-AF647将COV318、PA-1 50和PA-1 54细胞染色30分钟,然后将700个(COV318)或500个(PA-1 50/54)CLDN6阳性或CLDN6-阴性细胞分选到6孔板中。使细胞形成集落,持续14天,然后用0.5%结晶紫染色20分钟。(A)示出了各个细胞系的代表性图片。(B)通过人工计数进行集落的定量。示出了三个独立实验的平均值和标准差。

[0052] 图5:在卵巢癌细胞系COV318中CLDN6与CSC标志物CD24、CD90和CD44共表达。

[0053] 在4℃下,用根据表1示出的FACS组(panel)中针对不同表面标志物的抗体将1E6 COV318细胞染色30分钟,并通过流式细胞术分析CSC标志物表达。实验进行三次重复。在(A)中示出了CLDN6与不同已建立的CSC标志物共定位的代表性点图。在(B)中使用在该图的x轴上显示的不同设门(gate)策略计算出的CD44、CD24、CD90与CLDN6阳性细胞共定位的百分比。示出了三次重复的平均值和标准差。

[0054] 图6:表达CLDN6的细胞的富集导致已建立的CSC标志物的累积。

[0055] 用0.5 μ g/ml IMAB027和APC缀合的山羊抗人IgG二抗(1:300)将COV318细胞染色,然后通过FACS分选来分离CLDN6阳性和CLDN6阴性级分。使这两种级分的细胞扩增10天。在4℃下,用根据表1示出的FACS组中针对不同表面标志物的抗体将每种级分的1E6细胞染色30分钟。实验进行三次重复。在(A)中示出了在CLDN6阳性和CLDN6阴性级分中不同CSC标志物表达水平的代表性点图以及其与CLDN6的共定位。在(B)中,如图示出了CSC标志物表达水平的百分比,以及通过比较在CLDN6阳性和CLDN6阴性级分中阳性细胞的百分比来计算相关标志物CD44、CD90和CD24的富集因子(enrichment factor)(表达倍数)。

[0056] 图7:与CLDN6低表达细胞相比,CLDN6高表达细胞系示出CSC标志物的富集。

[0057] 在4℃下,用根据表1示出的FACS组中针对不同表面标志物的抗体将CLDN6高表达的卵巢癌细胞系OV90(A)和PA-1(B)或睾丸癌细胞系NEC-8(C)和NEC-14(D)的1E6细胞染色30分钟,并通过流式细胞术分析CSC标志物表达。实验进行三次重复并示出了代表性点图。

[0058] 图8:在早期异种移植肿瘤模型中IMAB027与紫杉醇组合的抗肿瘤效果。

[0059] 在移植后第3、10和17天,通过腹膜内(i.p.)注射用15mg/kg的紫杉醇治疗异位表达人CLDN6的皮下人ES-2异种移植肿瘤。在第4天开始抗体维持治疗,每周注射三次35mg/kg的IMAB027(以静脉内(i.v.)/i.p./i.p.交替进行)。(A)在用IMAB027(白色正方形)、紫杉醇(灰色圆)、IMAB027与紫杉醇的组合(黑色正方形)或载剂对照(白色圆)治疗后的平均肿瘤生长动力学(\pm SEM)。箭头标记治疗开始的时间点。(B)经治疗小鼠的存活曲线。组大小:n=12。

[0060] 图9:在晚期异种移植肿瘤模型中IMAB027与顺铂组合的抗肿瘤效果。

[0061] 在治疗开始之前,使皮下人NEC14异种移植肿瘤生长至~100mm³的中值大小。从移

植后第6至10天,每天通过腹膜内注射1mg/kg的顺铂来治疗小鼠,且从第6天开始用每周注射三次35mg/kg的IMAB027(以i.v./i.p./i.p.交替进行)作为维持治疗。(A)在用IMAB027(实心圆)、顺铂(空心正方形)、IMAB027与顺铂的组合(实心正方形)或载剂对照(空心圆)治疗后的平均肿瘤生长动力学(±SEM)。箭头标记治疗开始的时间点。(B)在移植后第24天小鼠中单个肿瘤的大小(平均值±标准差)。(C)经治疗的小鼠的存活曲线。组大小:n=19。P值:*,P<0.05;**,P<0.01和***,P<0.001。

[0062] 图10:在晚期异种移植肿瘤模型中IMAB027与卡铂组合的抗肿瘤效果。

[0063] 如图9中所描述的,用IMAB027单独或与细胞生长抑制药物组合来治疗晚期人NEC14异种移植肿瘤。在第6、13和20天通过腹膜内快速推注(bolus injection)30mg/kg的卡铂(而不是顺铂)来治疗小鼠。(A)在用IMAB027(实心圆)、卡铂(空心正方形)、IMAB027与卡铂的组合(实心正方形)或载剂对照(空心圆)治疗后的平均肿瘤生长动力学(±SEM)。箭头标记治疗开始的时间点。(B)在移植后第24天小鼠中单个肿瘤的大小(平均值±标准差)。(C)经治疗的小鼠的存活曲线。组大小:n=19。P值:*,P<0.05;**,P<0.01和***,P<0.001。

[0064] 图11:CLDN6对于卵巢癌细胞的球体形成行为重要。

[0065] 为了分析CLDN6对球体形成的影响,在用0.5μg/ml的IMAB027染色后,通过荧光激活细胞分选来分离CLDN6阳性和CLDN6阴性COV318细胞。在球体形成的条件(含0.4%牛血清白蛋白、20ng/ml碱性成纤维细胞生长因子、10ng/ml表皮生长因子和5μg/ml胰岛素的无血清DMEM/F12培养基)下,使CLDN6阳性和CLDN6阴性COV318细胞在超低附着板(ultra low attachment plate)中生长。(A)分选后第3、8和19天CLDN6阳性(CLDN6+)和CLDN6阴性(CLDN6-)COV318细胞的第一代球体的代表性图片。(B)分选后第22天从(A)的CLDN6+第一代球体的单细胞获得的第二代球体的代表图片。

[0066] 图12:用铂衍生物处理后CLDN6阳性细胞的富集。

[0067] 将COV318细胞用500ng/ml的顺铂或2000ng/ml的卡铂处理4天。处理后,在没有细胞生长抑制药物的情况下,使细胞分别再生长3天(白色柱)和6天(黑色柱)。使用CLDN6特异性抗体IMAB027和同种型对照抗体通过流式细胞术分析CLDN6的表达。示出了经处理的COV318细胞相对于未处理的细胞的表达。为了进行评估,从CLDN6染色中减去同种型对照的值。

[0068] 图13:腹膜内移植后CLDN6阳性细胞的富集。

[0069] 在无胸腺裸鼠中经腹膜内注射COV318细胞。使产生了腹水的小鼠安乐死,并收集腹水和实体瘤两者以用于进一步表征。在制备后立即以及将其在培养物中维持几代后分析经分离的细胞的CLDN6的表达。(A)使用CLDN6特异性抗体IMAB027和同种型对照对亲本COV318细胞的CLDN6表达进行流式细胞术分析。(B)在分离后不同的时间点,在来自腹水和来自卵巢、肝脏、胃、胰腺和膈之实体瘤的细胞上的CLDN6表达(*:在第5天和35天的腹水;**:在第12天和29天的实体瘤)。在X轴上显示了荧光强度。将显示在Y轴上的事件数缩放(scale)为事件最大数的百分比。

[0070] 图14:在原发性肿瘤样品中CLDN6与卵巢癌症干细胞标志物相关。

[0071] 使用Fluidigm检测系统和软件通过qRT-PCR对42个卵巢癌样品之CLDN6的mRNA表达水平和多种所描述的卵巢癌症干细胞标志物进行了分析。进行Spearman相关分析以分析

CLDN6与癌症干细胞特异性标志物的相关性。在(A)中示出了显著相关性的散点图(P值≤0.05)。在(B)中示出了所有相关性的总结。

[0072] 图15:在用卡铂和紫杉醇治疗后,IMAB027介导的ADCC。

[0073] 使用COV362(Luc)靶细胞分析IMAB027与化学治疗的组合的ADCC活性。因此,将细胞用指定浓度的卡铂、吉西他滨、紫杉醇、多柔比星或拓扑替康处理4天。处理后,在没有细胞生长抑制药物的情况下,使细胞分别生长3天(A-D)和10天(E-J)。不用细胞生长抑制剂培养对照细胞。使用来自健康供体的PBMC,用IMAB027(黑色线)或同种型对照抗体(灰色线)以~40:1的效应物(PBMC)与靶细胞的比进行ADCC实验(A,C,E,G,I)。将数据点(n=4次重复)描绘为平均值±SD。使用IMAB027通过流式细胞术分析CLDN6的表达(B,D,F,H,J)。黑色虚线证明在未处理的细胞中CLDN6的表达,灰色实心直方图表示处理后的CLDN6表达。

[0074] 图16:在非常晚期的异种移植肿瘤模型中IMAB027与PEB治疗的组合的抗肿瘤效果。

[0075] 使皮下人NEC14异种移植肿瘤在裸鼠中生长至非常晚期的阶段。在第13天开始用PEB(顺铂、依托泊苷和博来霉素)和IMAB027进行肿瘤治疗。在第13、14、15、16和17天用1mg/kg的顺铂和5mg/kg的依托泊苷,在第13、17和21天用10mg/kg的博来霉素通过腹膜内注射治疗接受PEB方案的小鼠。在移植后第13天至101天,通过每周三次以i.v./i.p./i.p.交替注射35mg/kg来施用抗体IMAB027。载剂对照组接受0.9%NaCl溶液和药物物质缓冲液来代替。对小鼠监测共计220天。(A)、(B)未治疗的小鼠和用IMAB027、PEB或PEB与IMAB027的组合治疗的小鼠的平均肿瘤生长动力学(±SEM)。箭头标记治疗开始的时间点(Dunn多重比较检验:***,P<0.001)。(C)未治疗的小鼠和用IMAB027、PEB或PEB与IMAB027的组合治疗的小鼠的存活曲线(Mantel-Cox检验:*,P<0.05;**,P<0.01)。组大小:n=14。

[0076] 图17:IMAB027、IMAB027-DM1和IMAB027-vcMMAE的相对结合亲和力和细胞毒性。

[0077] (A)通过流式细胞术分析测量IMAB027、IMAB027-DM1和IMAB027-vcMMAE对内源性表达CLDN6的OV90细胞的结合。(B)IMAB027-DM1和IMAB027-vcMMAE介导的OV90细胞生存力降低的剂量-响应曲线。将肿瘤细胞与IMAB027-DM1或IMAB027-vcMMAE孵育72小时。使用基于XTT的生存力测定来测量细胞生存力的降低。将数据点(n=3次重复)描绘为平均值±SD。MFI:平均荧光强度。

[0078] 图18:IMAB027-DM1缀合物对晚期异种移植肿瘤的抗肿瘤效果。

[0079] 在移植后10天,用1.78mg/kg、5.33mg/kg或16mg/kg的IMAB027-DM1或载剂对照的静脉内单剂量注射剂来治疗具有已建立皮下人OV90异种移植肿瘤的裸鼠。每周两次测量皮下肿瘤的大小(平均值+SEM)。组大小:n=5,*:P<0.05,**:P<0.01。

[0080] 图19:IMAB027-DM1和IMAB027-vcMMAE缀合物对晚期OV90异种移植肿瘤的剂量范围确定。

[0081] 在移植后10天,用IMAB027-DM1、IMAB027-vcMMAE、载剂的单剂量静脉注射剂或IMAB027的多剂量注射剂治疗已建立皮下人OV90异种移植肿瘤的裸鼠。(A)与载剂对照和IMAB027(35mg/kg,每周i.v./i.p./i.p.)相比,用1.33、2.67和5.33mg/kg的IMAB027-DM1 i.v.(顶部)或者用4、8或16mg/kg的IMAB027-vcMMAE i.v.(底部)治疗的小鼠的肿瘤生长。每周两次测量皮下肿瘤的大小(平均值+SEM)。(B)用载剂或4、8或16mg/kg的IMAB027-vcMMAE治疗的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线。当肿瘤的体积达到1400mm³时,或者如果肿瘤

变成溃疡性,将小鼠处死。组大小:n=10, * :P<0.05, ** :P<0.01, *** :P<0.001。

[0082] 图20:IMAB027-vcMMAE缀合物对晚期PA-1异种移植肿瘤的剂量范围确定。

[0083] 在移植后15天,用IMAB027-vcMMAE、载剂对照的单剂量静脉注射剂或IMAB027的多剂量注射剂治疗已建立皮下人PA-1异种移植肿瘤的裸鼠。(A)平均肿瘤生长(±SEM)和(B)用载剂对照、IMAB027(35mg/kg,每周i.v./i.p./i.p.)或者4、8或16mg/kg的IMAB027-vcMMAE治疗的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线。当肿瘤的体积达到1400mm³时,或者如果肿瘤变成溃疡性,将小鼠处死。组大小:n=8, * :P<0.05, ** :P<0.01。(C)在移植后不同的时间点在PA-1异种移植肿瘤切片中对CLDN6的代表性免疫组织化学染色。

[0084] 图21:IMAB027-vcMMAE对晚期MKN74异种移植肿瘤的抗肿瘤效果。

[0085] 在移植后7天,用16mg/kg的IMAB027-vcMMAE或载剂对照的静脉内注射剂治疗已建立皮下人MKN74异种移植肿瘤的裸鼠。(A)平均肿瘤生长(±SEM)和(B)用载剂对照或IMAB027-vcMMAE治疗的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线。当肿瘤的体积达到1400mm³时,或者如果肿瘤变成溃疡性,将小鼠处死。组大小:n=10。(C)移植前,MKN74肿瘤细胞上CLDN6表达的流式细胞术分析和移植后第31天未治疗的MKN74异种移植肿瘤的代表性免疫组织化学染色。** :P<0.01, *** :P<0.001。

[0086] 图22:IMAB027-DM1和IMAB027-vcMMAE对晚期腹膜内转移性人卵巢肿瘤的抗肿瘤效果。

[0087] 将裸鼠经腹膜内植入异位表达萤光素酶的人卵巢癌细胞系PA-1(Luc)。在形成腹膜内转移性异种移植肿瘤后,在移植后第14天,用16mg/kg IMAB027-DM1、IMAB027-vcMMAE或载剂对照通过腹膜内注射来治疗动物。在使用IVIS Lumina成像系统通过发光活性施用荧光素后,确定转移瘤的生长。(A)用IMAB027-DM1、IMAB027-vcMMAE或载剂治疗的小鼠之转移负荷(metastasis load)的定量。(B)在移植后第28天裸鼠的体内全身发光图像。组大小:n=8(载剂)或n=9(IMAB027-DM1、IMAB027-vcMMAE), ** :P<0.01, *** :P<0.0001。

[0088] 图23:人癌细胞对结合CLDN6抗体的胞吞作用。

[0089] 使用基于细胞毒性的测定来确定CLDN6结合性IMAB027、chimAB5F2D2或同种型对照抗体的胞吞作用,所述基于细胞毒性的测定依赖于结合靶标抗体与皂草素(saporin)缀合的抗人IgG Fab片段(FabZap)的共同内在化(co-internalization)。将PA-1、OV90或NEC14人癌细胞与IMAB027、chimAB5F2D2或同种型对照抗体和抗人FabZap孵育72小时。(A)IMAB027/FabZap和chimAB5F2D2/FabZap分别介导PA-1、OV90和NEC14细胞生存力降低的剂量-响应曲线。将数据点(n=3次重复)描绘为平均值±SD。(B)流式细胞结合和胞吞作用之IMAB027归一化的EC 50(相对EC50)和最大值(相对最大值)的比较。

[0090] 发明详述

[0091] 虽然在下文中对本发明进行了详细描述,但是应理解,本发明不局限于本文所述的具体方法、方案和试剂,因为这些方法、方案和试剂可以改变。还应理解,本文使用的术语只出于描述具体实施方案的目的,而无旨在限制本发明的范围,本发明的范围将由所附权利要求限定。除非另有指明,否则本文使用的全部技术和科学术语的含义与本领域普通技术人员通常所理解的含义相同。

[0092] 在下文中,将对本发明的要素进行描述。这些要素伴随具体实施方案列举,但是,应理解,它们可以以任何方式及任何数目组合从而形成另外的实施方案。多方面描述的实

施例及优选实施方案不应被解释为将本发明仅局限于明确描述的实施方案。该描述应理解为支持和涵盖组合明确描述的实施方案与任何数目的所公开的和/或优选的要素的实施方案。此外，应认为本申请所述全部要素的任何排列和组合均由本申请说明书所公开，除非上下文中另有指明。

[0093] 优选地，本文使用的术语如“*A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)*”，H.G.W.Leuenberger, B.Nagel, and H. **Kölbl** 编，Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland (1995) 所描述的进行定义。

[0094] 除非另有指明，否则本发明的实施将采用本领域文献(参见例如*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, J.Sambrook等编, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989) 中所解释的化学、生物化学、细胞生物学、免疫学和重组DNA技术的常规方法。

[0095] 在整个说明书和随后的权利要求书中，除非上下文中另外要求，否则词语“包括/包含”及其变化形式将理解为意指包括所陈述的成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组，但不排除任何其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组，尽管在一些实施方案中，这样的其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组可以被排除，即，主题在于包括所陈述的成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。除非本文中另外指明或者与上下文明显矛盾，否则描述本发明的上下文中(尤其是在权利要求书的上下文中)使用的无数量词修饰的名词及类似的引用要解释为涵盖单数和复数两者。本文中数值范围的叙述仅旨在作为单独地指代落入该范围内之各独立值的速记方法。除非本文中另外指明，否则各单独的值均并入说明书中，如同其在本文中单独引用。除非本文中另外指明或者与上下文明显相矛盾，否则可以以任何合适的顺序进行本文中所描述的所有方法。除非另外要求，否则本文中提供的任意和全部实施例或示例性语言(例如，“例如”)的使用仅旨在更好地举例说明本发明，而并不对本发明的范围进行限制。本说明书中的任何语言都不应当被解释为表示对实施本发明而言必要之任何非要求保护的要素。

[0096] 本说明书通篇中引用了若干篇文献。本文所引用的每篇文献(包括全部专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指南等)，无论是在上文中的还是在下文中的，均通过引用以其整体并入本文。本文中的任何内容都不应当被解释为承认本发明无权作为在先发明而先于这些公开内容。

[0097] 密蛋白 (claudin) 是紧密连接中最重要组分的一个蛋白质家族，在紧密连接中，密蛋白构成了控制上皮细胞之间的细胞间空隙中分子流动的细胞旁屏障。密蛋白是四次跨膜的跨膜蛋白，N端和C端均位于细胞质中。第一胞外环，称为EC1或ECL1，平均由53个氨基酸组成，而第二胞外环，称为EC2或ECL2，由约24个氨基酸组成。密蛋白家族的细胞表面蛋白质(例如CLDN6) 在多种来源的肿瘤中表达，并且由于其选择性表达(在毒性相关的正常组织中不表达) 和定位于质膜而特别适合作为与抗体介导的癌症免疫疗法有关的靶标结构。

[0098] 已鉴定CLDN6在肿瘤组织中差异性地表达，表达CLDN6的唯一的正常组织为胎盘，在胎盘中在RNA水平上检测到少量的CLDN6。已发现CLDN6在例如，卵巢癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、黑素瘤、头颈癌、肉瘤、胆管癌、肾细胞癌和膀胱癌中表达。

[0099] 在本发明的多个实施方案中，与CLDN6表达相关的癌症疾病包括卵巢癌(特别是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤)、肺癌包括小细胞肺癌(SCLC) 和非小细胞肺癌(NSCLC) (特别是鳞状

细胞肺癌和腺癌)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(特别是基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑素瘤、头颈癌(特别是恶性多形性腺瘤)、肉瘤(特别是滑膜肉瘤和癌肉瘤)、胆管癌、膀胱癌(特别是移行细胞癌和乳头状癌)、肾癌(特别是肾细胞癌)包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌、结肠癌、小肠癌包括回肠癌(特别是小肠腺癌和回肠腺癌)、睾丸胚胎癌、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌、睾丸癌(特别是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎睾丸癌)、子宫癌、生殖细胞肿瘤例如畸胎瘤或胚胎性癌(特别是睾丸的生殖细胞肿瘤),及其转移形式。在一个实施方案中,与CLDN6表达相关的癌症疾病选自卵巢癌、肺癌、转移性卵巢癌和转移性肺癌。优选地,卵巢癌是癌或腺癌。优选地,肺癌是癌或腺癌,且优选细支气管癌,例如细支气管癌或细支气管腺癌。

[0100] 如本文所使用的术语“CLDN”意指密蛋白并且包括CLDN6。优选地,密蛋白是人密蛋白。

[0101] 术语“CLDN6”优选指人CLDN6,并且特别指包含序列表的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列或者所述氨基酸序列之变体的蛋白质,优选由序列表的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列或者所述氨基酸序列之变体组成的蛋白质。CLDN6的第一胞外环优选包含SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列或SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的第28至80位氨基酸,更优选第28至76位的氨基酸。CLDN6的第二胞外环优选包含SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列或SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的第138至160位氨基酸,优选第141至159位氨基酸,更优选第145至157位氨基酸。所述第一和第二胞外环优选形成CLDN6的胞外部分。

[0102] 根据本发明,术语“变体”特别指突变体、剪接变体、构象、同种型、等位基因变体、种变体(species variant)和种同源物(species homolog),特别是天然存在的那些。等位基因变体指基因的正常序列中发生了改变,其显著性通常不明显。对于给定的基因,全基因测序通常鉴定出多种等位基因变体。种同源物是与给定的核酸或氨基酸序列具有不同物种来源的核酸或氨基酸序列。术语“变体”应涵盖任何经翻译后修饰的变体和构象变体。

[0103] 根据本发明,术语“密蛋白阳性癌症”或类似术语意指涉及表达密蛋白之癌细胞的癌症,优选在所述癌细胞的表面上表达密蛋白。如果CLDN6位于细胞的表面上时,CLDN6在所述细胞的表面上表达并易于被添加至细胞的CLDN6特异性抗体结合。

[0104] “细胞表面”根据其在本领域中的通常含义使用,并因此包括易于被蛋白质和其他分子结合的细胞外部。例如,具有一个或更多个胞外部分的跨膜蛋白被认为是在细胞表面上表达。

[0105] 在本发明的上下文中,术语“胞外部分”指面对着细胞的胞外空间的分子(例如蛋白质)的一部分,且优选例如,通过位于细胞外的抗原结合分子(例如抗体)而接近所述细胞的外部。优选地,该术语指一个或更多个胞外环或结构域或其片段。

[0106] 术语“部分”或“片段”在本文中可互换使用,是指连续的元件。例如,结构(如氨基酸序列或蛋白质)的一部分是指所述结构的连续元件。结构的份、部分或片段优选包含一个或更多个所述结构的功能特性。例如,表位或肽的份、部分或片段优选与衍生其的表位、肽免疫学等同。蛋白质序列的一部分或片段优选包含所述蛋白质序列的至少6个,特别是至少8个、至少10个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个或至少100个连续的氨基酸。

[0107] 根据本发明,如果表达水平与胎盘细胞或胎盘组织中的表达相比更低,则CLDN6在

细胞中基本不表达。优选地，表达水平低于胎盘细胞或胎盘组织中表达的10%，优选地，低于5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%，或甚至更低。优选地，如果表达水平不超过非癌组织(除胎盘外)中表达水平的2倍，优选1.5倍，并且优选地不超过所述非癌组织中的表达水平，则CLDN6在细胞中基本不表达。优选地，如果表达水平低于检测限和/或如果表达水平太低以致于不能被添加至细胞的CLDN6特异性抗体结合，则CLDN6在所述细胞中基本上不表达。

[0108] 根据本发明，如果表达水平超过非癌组织(除胎盘外)中表达水平的优选2倍以上，优选10倍、100倍、1000倍或10000倍以上，则CLDN6在细胞中表达。优选地，如果表达水平高于检测限和/或如果表达水平足够高以使得能够被添加至细胞的CLDN6特异性抗体结合，则CLDN6在所述细胞中表达。优选地，在细胞中表达的CLDN6在所述细胞表面上表达或暴露。

[0109] 已经发现在胎盘中仅作为mRNA可检测到CLDN6表达，而完全无法检测到蛋白质。因此，本文所作出的关于CLDN6在胎盘中表达的陈述优选指mRNA的表达。

[0110] 根据本发明，术语“疾病”指任何病理状态，包括癌症，特别是本文中所描述的那些形式的癌症。任何本文中提及的癌症或癌症的特别形式还包括其癌症转移。在一个优选实施方案中，根据本申请，待治疗的疾病涉及表达CLDN6的细胞，特别是表达CLDN6的癌症干细胞。

[0111] 根据本发明，“与表达CLDN6的细胞相关的疾病”或类似的表述意指CLDN6在患病组织或器官的细胞中表达。在一个实施方案中，与健康组织或器官中的状态相比，患病的组织或器官之细胞中的CLDN6表达增加。增加指增加至少10%，特别是至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%，或甚至更多。在一个实施方案中，表达仅见于患病的组织中，而相应健康组织中的表达被抑制。根据本发明，与表达CLDN6之细胞相关的疾病包括癌症疾病。此外，根据本发明，癌症疾病优选地为其中癌细胞表达CLDN6的那些。

[0112] 如本文所使用的“癌症疾病”或“癌症”包括具有如下特征的疾病：异常调节性细胞生长、增殖、分化、粘附和/或迁移。“癌细胞”意指通过迅速、不受控制的细胞增殖而生长并且在起始新生长的刺激停止后继续生长的异常细胞。优选地，“癌症疾病”以表达CLDN6的细胞为特征，特别是表达CLDN6的癌症干细胞。

[0113] 根据本发明，术语“癌症”包括白血病、精原细胞瘤、黑素瘤、畸胎瘤、淋巴瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾上腺癌、甲状腺癌、血癌、皮肤癌、脑的癌症、宫颈癌、肠癌、肝癌、结肠癌、胃癌、肠癌、头颈癌、胃肠癌、淋巴结癌、食管癌、结肠直肠癌、胰腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、乳腺癌癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌和肺癌及其转移。其实例为肺癌、乳房癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、宫颈癌或上述癌症类型或肿瘤的转移。根据本发明，术语癌症还包括癌转移。

[0114] 根据本发明，“癌”是衍生自上皮细胞的恶性肿瘤。该组代表最常见的癌症，包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌和结肠癌的常见形式。

[0115] “腺癌”为源自腺组织的癌症。该组织也是称为上皮组织的一大类组织的一部分。上皮组织包括皮肤、腺体以及内衬于身体的腔和器官的多种其他组织。在胚胎学上，上皮来自外胚层、内胚层和中胚层。被归类为腺癌的细胞并不一定必须是腺体的一部分，只要它们具有分泌特性即可。该形式的癌可发生在一些包括人在内的高等哺乳动物中。良好分化的

腺癌趋向于与其所来源的腺组织类似,而不良分化的腺癌则可能不是这样。通过对来自组织活检物的细胞进行染色,病理学家将确定肿瘤是腺癌还是一些其他类型的癌症。由于腺体在体内普遍存在的性质,腺癌可在身体的许多组织中产生。尽管每种腺体可以不分泌相同的物质,但只要细胞具有外分泌功能,它就可被认为是腺性的,并且因而它的恶性形式被命名为腺癌。只要有充足的时间,恶性腺癌就侵袭其他组织并且常常转移。卵巢腺癌是最常见的卵巢癌类型。其包括浆液和粘液腺癌、透明细胞腺癌和子宫内膜样腺癌。

[0116] “转移”意指癌细胞从其初始部位扩散至身体的另一部位。转移的形成是非常复杂的过程,并依赖于恶性细胞从原发肿瘤脱离,侵袭胞外基质,穿透内皮基底膜进入体腔和血管,并随后在通过血液运输后,浸润靶器官。最后,新肿瘤在靶部位的生长依赖于血管生成。由于肿瘤细胞或组分可残留并发展出转移潜力,因此即使在去除原发肿瘤后仍经常发生肿瘤转移。在一个实施方案中,根据本发明的术语“转移”指“远处转移”,其指远离原发肿瘤和局部淋巴结系统的转移。在一个实施方案中,根据本发明的术语“转移”指淋巴结转移。

[0117] 难治性癌症是特定治疗对其无效的恶性肿瘤,它最初就对治疗无响应,或随着时间的推移而变得无响应。术语“难治的”,“无响应的”或“抗性的(resistant)”在本文可互换使用。

[0118] 如本文所用的术语“癌症干细胞”指可以是高度增殖性癌细胞的祖先的细胞。癌症干细胞具有使肿瘤重新生长的能力,如通过其在免疫缺陷的小鼠中形成肿瘤的能力所证明。相对于肿瘤块,癌症干细胞通常还是生长缓慢的,即癌症干细胞通常是静止的。在某些(但不是全部的)实施方案中,癌症干细胞仅可表示肿瘤的一部分,例如约0.1%至10%。癌症干细胞可具有全部以下特征或性质的一个或更多个:(i)可具有引发肿瘤和/或保持肿瘤生长的能力,(ii)通常可具有比肿瘤块较少的突变(例如,由于缓慢生长以及因此较少的DNA复制相关的误差、改善的DNA修复和/或促使其恶性的表观遗传/非诱变变化),(iii)可具有(a)正常干细胞(例如,相似的细胞表面抗原和/或细胞内表达谱、自我更新程序、多药抗性、未成熟表型等、正常干细胞的特征)的许多特征以及可衍生自(a)正常干细胞;(iv)可以是转移瘤的来源,(v)可以缓慢生长或静止,(vi)可以是致瘤性的(例如,如由NOD/SCID植入实验所确定的),(vii)可以比常规治疗相对具有抗性(即化学抗性)和(viii)可包括肿瘤的亚群(例如相对于肿瘤块)。

[0119] “治疗”意指向对象施用治疗(例如化合物或组合物或者化合物或组合物的组合)以预防或消除疾病,包括减少对象中肿瘤的大小或肿瘤数目,阻止或减缓对象中的疾病,抑制或减缓对象中新疾病的发展,降低目前患有或先前患有疾病的对象中症状和/或复发的频率或严重程度和/或延长,即增加或延伸对象的寿命。特别地,术语“疾病的治疗”包括治愈、缩短持续时间、改善、预防、减缓或抑制进展或恶化,或者预防或延缓疾病或其症状的发作。

[0120] 在本发明的上下文中,术语例如“保护”或“预防”指对象中疾病发生和/或传播两者的预防或治疗,特别地,指最小化使对象产生疾病的机会或延迟疾病的发展。例如,处于癌症危险中的对象将是进行治疗以预防癌症的候选者。

[0121] “处于危险中”意指与普通群体相比,被鉴定为比正常机会具有更高可能性发展疾病(特别是癌症)的对象。此外,曾患有或目前患有疾病(特别是癌症)的对象具有发生疾病之增加的危险,因为这样的对象可继续发生疾病。目前患有或曾经患有癌症的对象也有癌

症转移之增加的危险。

[0122] 根据本发明，术语“患者”意指治疗对象，特别是患病的对象，包括人类、非人灵长类或其他动物，特别是哺乳动物，例如，牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)。在一个特别优选的实施方案中，患者为人类。

[0123] 在施用治疗的上下文中，如本文所用的术语“组合”指使用一种以上的治疗或治疗剂。术语“组合”的使用并不限制向对象施用的治疗或治疗剂的顺序。可以在向患者施用第二治疗或治疗剂之前、同时或之后施用治疗或治疗剂。优选地，以一定的顺序、量和/或在一定的时间间隔内向对象施用治疗或治疗剂以使得所述治疗或治疗剂可以一起发挥作用。在一个具体的实施方案中，以一定的顺序、量和/或在一定的时间间隔内向对象施用治疗或治疗剂以使得它们比如如果以其他方式(特别是彼此独立地)施用提供增加的益处。优选的是，增加的益处是协同效应。

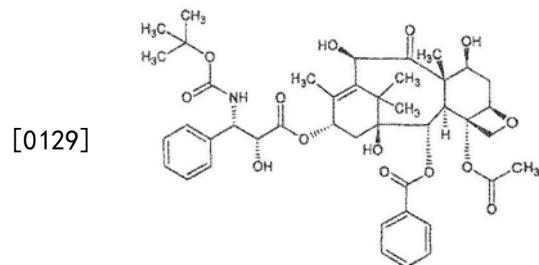
[0124] “靶细胞”应意指任何不需要的细胞，例如癌细胞，特别是癌症干细胞。在一些优选的实施方案中，靶细胞表达CLDN6。

[0125] 根据本发明，术语“化学治疗”指用一种或更多种化学治疗剂或化学治疗剂(例如细胞生长抑制剂或细胞毒剂)之组合的治疗。根据本发明的化学治疗剂包括细胞生长抑制化合物和细胞毒性化合物。

[0126] 根据本发明，术语“化学治疗剂”包括紫杉烷类(例如紫杉醇和多西他赛)和铂化合物(例如顺铂和卡铂)及其组合。优选的组合(特别是用于治疗卵巢癌)可包括紫杉烷和铂化合物的组合，例如紫杉醇和卡铂的组合。更优选的组合(特别是用于治疗卵巢癌，特别是卵巢生殖细胞肿瘤和/或用于治疗生殖细胞肿瘤，特别是卵巢癌和睾丸生殖细胞肿瘤)可包括铂化合物(例如顺铂)与依托泊苷和/或博来霉素的组合。根据本发明，提及化学治疗剂包括任何前药例如酯、盐或衍生物(例如所述药剂的缀合物)。实例是所述药剂与载体物质的缀合物，例如，蛋白质结合的紫杉醇(例如白蛋白结合的紫杉醇)。优选地，所述药剂的盐是可药用的盐。

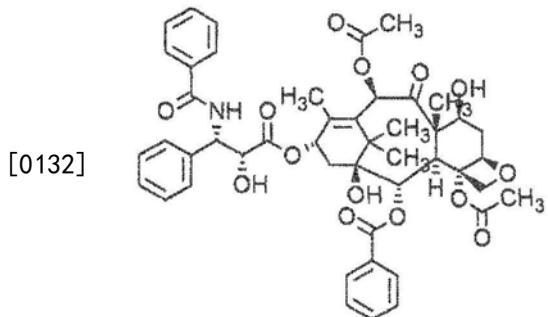
[0127] 紫杉烷是一类首先来自天然来源(例如紫杉(Taxus)属的植物)的二萜化合物，但一些已被人工合成。紫杉烷类药物的主要作用机制是破坏微管功能，从而抑制细胞分裂的过程。紫杉烷类包括多西他赛(Taxotere)和紫杉醇(Taxol)。

[0128] 根据本发明，术语“多西他赛”指具有下式的化合物：



[0130] 具体地，术语“多西他赛”指化合物 $1,7\beta,10\beta$ -三羟基-9-氧代- $5\beta,20$ -epoxytax-11-烯- $2\alpha,4,13\alpha$ -三基-4-乙酯-2-苯甲酸酯-13-{(2R,3S)-3-[$(\text{叔丁基})_2\text{O}-$ 氨基]-2-羟基-3-苯基丙酯}。

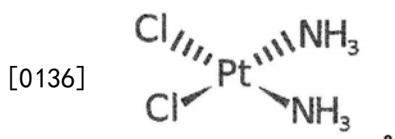
[0131] 根据本发明，术语“紫杉醇”指具有下式的化合物：



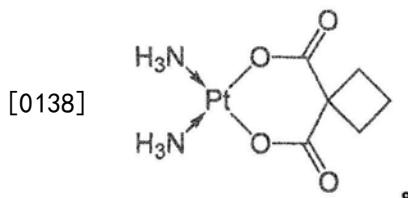
[0133] 具体地,术语“紫杉醇”指化合物 $(2\alpha,4\alpha,5\beta,7\beta,10\beta,13\alpha)-4,10\text{-双-}(\text{乙酰氧基})-13\text{-}\{(2R,3S)\text{-}3\text{-}(\text{苯甲酰氨基})\text{-}2\text{-羟基}-3\text{-苯基丙酰基}\}\text{氧基}\}-1,7\text{-二羟基-}9\text{-氧代-}5,20\text{-epoxytax-11-烯-2-基苯甲酸酯}$ 。

[0134] 根据本发明,术语“铂化合物”指其结构中包含铂的化合物,例如铂络合物,并且包括例如顺铂、卡铂和奥沙利铂的化合物。

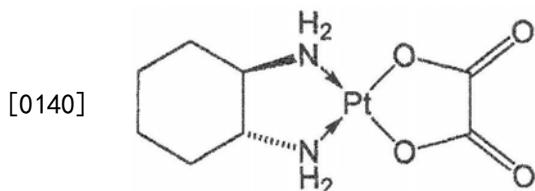
[0135] 术语“顺铂”指下式的化合物顺式-二氨二氯合铂(II) (CDDP) :



[0137] 术语“卡铂”指下式的化合物顺式-二氨(1,1-环丁烷二羧酸)合铂(II) :



[0139] 术语“奥沙利铂”指这样的化合物,其为与下式的二氨基环己烷载体配体络合的铂化合物:

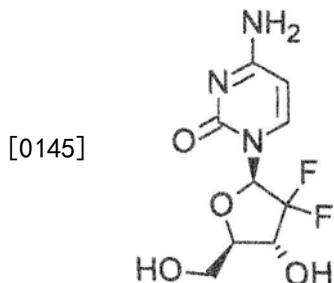


[0141] 具体地,术语“奥沙利铂”指化合物 $[(1R,2R)\text{-环己烷-}1,2\text{-二胺}](\text{乙二酸络(ethanedioato)-}0,0')\text{铂(II)}$ 。注射用奥沙利铂还以商品名Eloxatine市售。

[0142] 构想用于本发明的另外的化学治疗剂(无论是单独还是与其他化学治疗剂(例如紫杉烷类或铂化合物)组合使用)包括但不限于:核昔类似物、喜树碱类似物和蒽环类。

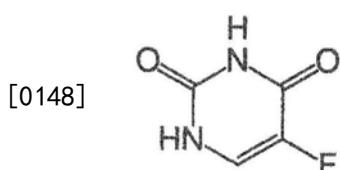
[0143] 术语“核昔类似物”指核昔的结构类似物,包括嘌呤类似物和嘧啶类似物二者的类别。

[0144] 术语“吉西他滨”是下式的核昔类似物的化合物:



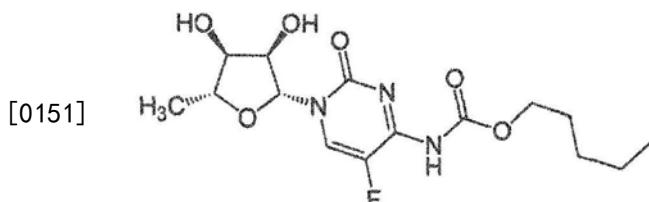
[0146] 具体地,该术语指化合物4-氨基-1-(2-脱氧-2,2-二氟- β -D-赤-呋喃戊糖基)嘧啶-2(1H)-酮或4-氨基-1-[(2R,4R,5R)-3,3-二氟-4-羟基-5-(羟基甲基)氧杂戊环(oxolan)-2-基]-1,2-二氢嘧啶-2-酮。

[0147] 术语“核苷类似物”包括氟嘧啶衍生物,例如氟尿嘧啶及其前药。术语“氟尿嘧啶”或“5-氟尿嘧啶”(5-FU或f5U)(以商品名Adrucil、Carac、Efudix、Efludex和Fluoroplex出售)为下式之嘧啶类似物的化合物:



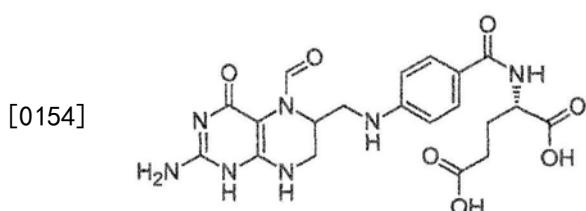
[0149] 具体地,该术语指化合物5-氟-1H-嘧啶-2,4-二酮。

[0150] 术语“卡培他滨”(Xeloda, Roche)指化学治疗剂,其在组织中转化为5-FU的前药。可经口施用的卡培他滨具有下式:



[0152] 具体地,该术语指化合物[1-(3,4-二羟基-5-甲基四氢呋喃-2-基)-5-氟-2氧化-1H-嘧啶-4-基]氨基甲酸戊酯。

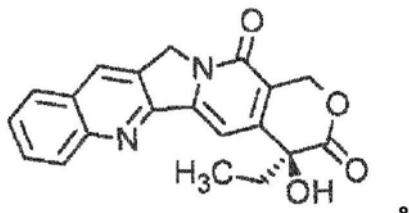
[0153] 术语“亚叶酸”或“甲酰四氢叶酸”指用于与化学治疗剂5-氟尿嘧啶协同组合的化合物。因此,如果本文中提及施用5-氟尿嘧啶或其前药的施用,则在一个实施方案中的所述施用可包括与亚叶酸一起施用。亚叶酸具有下式:



[0155] 具体地,该术语指化合物(2S)-2-{[4-[(2-氨基-5-甲酰基-4-氧化-5,6,7,8-四氢-1H-蝶啶-6-基)甲基氨基]苯甲酰基]氨基}戊二酸。

[0156] 根据本发明,术语“喜树碱类似物”指化合物喜树碱(CPT; (S)-4-乙基-4-羟基-1H-吡喃并[3',4':6,7]中氮茚并[1,2-b]喹啉-3,14-(4H,12H)-二酮)的衍生物。优选地,术语“喜树碱类似物”指包含下面结构的化合物:

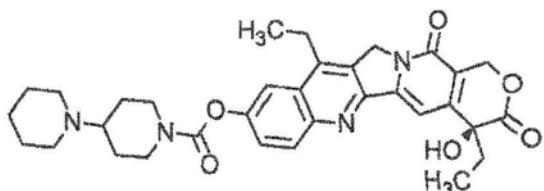
[0157]



[0158] 根据本发明，优选的喜树碱类似物为DNA酶拓扑异构酶I (topo I) 的抑制剂。根据本发明，优选的喜树碱类似物为伊立替康和拓扑替康。

[0159] 伊立替康为通过抑制拓扑异构酶I来防止DNA解旋 (unwind) 的药物。从化学角度，其为具有下式的天然生物碱喜树碱的半合成类似物：

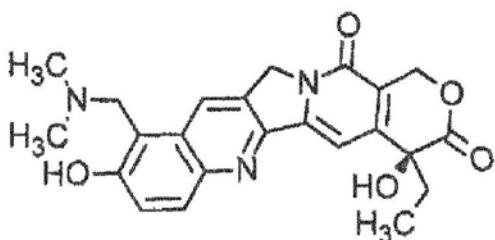
[0160]



[0161] 具体地，术语“伊立替康”指化合物 (S)-4,11-二乙基-3,4,12,14-四氢-4-羟基-3,14-二氧代1H-吡喃并[3',4':6,7]-中氮茚并[1,2-b]喹啉-9-基-[1,4'-二哌啶]-1'-羧酸酯。

[0162] 拓扑替康是下式的拓扑异构酶抑制剂：

[0163]



[0164] 具体地，术语“拓扑替康”指化合物 (S)-10-[(二甲基氨基)甲基]-4-乙基-4,9-二羟基-1H-吡喃并[3',4':6,7]中氮茚并[1,2-b]喹啉-3,14(4H,12H)-二酮单盐酸盐。

[0165] 葸环类是一类通常用于癌症化学治疗的药物，其也为抗生素。在结构上，所有的葸环类具有共同的四环7,8,9,10-四氢并四苯-5,12-醌 (four-ringed 7,8,9,10-tetrahydrotetracene-5,12-quinone) 结构并且通常需要在特异位点进行糖基化。

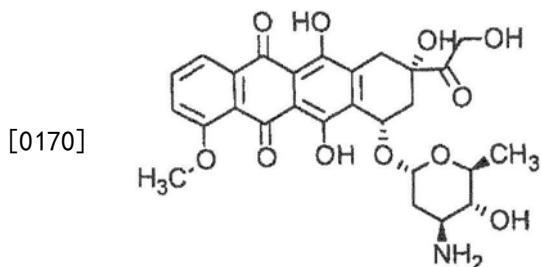
[0166] 葸环类优选进行下列作用机制中的一种或更多种：1. 通过插入DNA/RNA链的碱基对之间来抑制DNA和RNA的合成，从而防止迅速生长的癌细胞的复制；2. 抑制拓扑异构酶II，防止超螺旋DNA松弛并由此阻断DNA转录和复制；3. 产生铁介导之损伤DNA和细胞膜的游离氧自由基。

[0167] 根据本发明，术语“葸环类”优选指这样的药剂，其优选通过抑制DNA与拓扑异构酶II再结合来诱导凋亡，优选抗癌药剂。

[0168] 葸环类和葸环类类似物的实例包括，但并不限于，柔红霉素 (道诺霉素)、多柔比星 (亚德里亚霉素)、表柔比星、伊达比星、紫红霉素、吡拉柔比星 (pyraruvinic)、戊柔比星、N-三氟-乙酰基多柔比星-14-戊酸酯、阿克拉霉素、吗啉代多柔比星 (吗啉代-DOX)、氰基吗啉代-多柔比星 (氰基-吗啉代-DOX)、2-吡咯并-多柔比星 (2-PDOX)、5-亚氨基道诺霉素、米托葸醌和阿克拉霉素A (阿克拉比星)。米托葸醌是anthracendione类化合物中的一员，其为缺

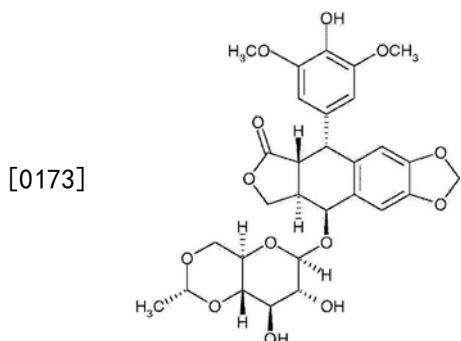
乏蒽环类的糖部分但保留允许插入DNA中的平面多环芳香环结构的蒽环类类似物。

[0169] 在本发明的上下文中,特别预期的蒽环类为表柔比星。表柔比星为具有下式的蒽环类药物:



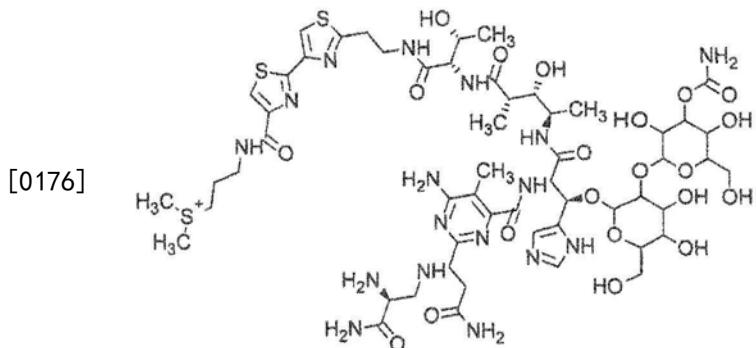
[0171] 并且以商品名Ellence (美国)、Pharmorubicin或Epirubicin Ebewe (在其他地方)市售。具体地,术语“表柔比星”指化合物(8R,10S)-10-[(2S,4S,5R,6S)-4-氨基-5-羟基-6-甲基-𫫇烷-2-基] 氧基-6,11-二羟基-8-(2-羟基乙酰基)-1-甲氧基-8-甲基-9,10-二氢-7H-并四苯-5,12-二酮。在一些化学治疗方案中,表柔比星比最普遍的蒽环类多柔比星有利,原因是表柔比星似乎导致更少的副作用。

[0172] 术语“依托泊昔”指的鬼臼毒素的半合成衍生物,其显示出抗肿瘤活性。依托泊昔通过形成与拓扑异构酶II和DNA的复合物来抑制DNA合成。这种复合物诱导双链DNA断裂并防止由拓扑异构酶II结合进行的修复。在DNA中的累计断裂阻止进入细胞分裂的有丝分裂期,并导致细胞死亡。依托泊昔具有下式:



[0174] 具体地,该术语是指化合物4'-去甲基-表鬼臼毒素9-[4,6-O-(R)-亚乙基-β-D-吡喃葡萄糖苷],4'--(二氢磷酸盐)。

[0175] 术语“博来霉素”是指由轮枝链霉菌(*Streptomyces verticillus*)细菌产生的糖肽抗生素。当用作抗癌剂时,它的作用原理是在DNA中产生断裂。博来霉素优选地包括具有下式的化合物:



[0177] 如果根据本发明的化学治疗与能够结合CLDN6的抗体(其可与至少一种毒素药物部分存在于缀合物中,即作为抗体药物缀合物)组合施用,优选在施用所述抗体之前和/或同时施用所述化学治疗(作为混合物或作为单独的组分)。优选地,在施用抗体之前开始施用化学治疗。优选地,化学治疗提高了癌细胞(例如癌症干细胞)中CLDN6的表达,并在施用抗体之前开始或施用以使得增强所述抗体的抗肿瘤活性。优选地,在首次施用抗体之前至少2天、至少4天、至少6天、至少8天、至少10天、至少12天或至少14天开始施用化学治疗。可在施用抗体的过程中继续施用化学治疗或者在施用抗体之前或过程中停止,例如在抗体施用之前1至3天、1至7天、1至10天或1至14天停止。优选地,化学治疗剂包括紫杉烷(例如紫杉醇或多西他赛)和/或铂化合物(例如顺铂或卡铂)。

[0178] 术语“抗原”指包含针对其引起和/或将引起免疫应答之表位的物质,例如,蛋白质或肽。在一个优选的实施方案中,抗原为肿瘤相关抗原(例如,CLDN6),即可来源于细胞质、细胞表面和细胞核的癌细胞组成,特别是优选细胞内大量产生的那些抗原或作为癌细胞上的表面抗原。

[0179] 在本发明的上下文中,术语“肿瘤相关抗原”或“肿瘤抗原”优选指在正常条件下在有限数目的组织和/或器官中或在特定发育阶段中特异性表达的蛋白质,以及在一个或更多个肿瘤或癌症组织中表达或异常表达的蛋白质。在本发明的上下文中,肿瘤相关抗原优选与癌细胞的细胞表面结合,并且优选不在或仅很少在正常组织中表达。

[0180] 术语“表位”指分子中的抗原决定簇,即,指分子中被免疫系统识别(例如,被抗体识别)的部分。例如,表位是被免疫系统识别的抗原上之离散的三维位点。表位通常由分子的化学活性表面基团(例如,氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位与非构象表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,与前者的结合丧失,而与后者的结合则不丧失。蛋白质(例如,CLDN6)的表位优选包含所述蛋白质的连续或不连续部分,并且长度优选为5至100,优选5至50,更优选8至30,最优选10至25个氨基酸,例如,表位的长度可优选为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。

[0181] 术语“抗体”包括包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白以及包含所述糖蛋白之抗原结合部分的任何分子。术语“抗体”包括单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、抗体的片段或衍生物,其包括但不限于单链抗体(例如,scFv's)和抗原结合抗体片段(例如,Fab和Fab'片段),且还包括抗体的所有重组形式,例如,在原核生物中表达的抗体、非糖基化抗体以及如本文所述的任何抗原结合抗体片段和衍生物。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区构成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区构成。VH和VL区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),互补决定区间散布着更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR构成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0182] 如本文所使用的术语“单克隆抗体”指单分子组分的抗体分子的制备物(preparation)。单克隆抗体显示单一的结合特异性和亲和力。在一个实施方案中,单克隆

抗体由杂交瘤产生,其包括从与无限增殖细胞融合的非人类动物(例如,小鼠)获得的B细胞。

[0183] 如本文所使用的术语“重组抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有抗体,例如(a)从免疫球蛋白基因是转基因的或转染色体的动物(例如,小鼠)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体,(b)从转化以表达抗体的宿主细胞(例如,从转染瘤)分离的抗体,(c)从重组的、组合的抗体文库分离的抗体,以及(d)通过涉及剪接免疫球蛋白基因序列与其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。

[0184] 如本文所使用的术语“人抗体”旨在包括具有来自人种系免疫球蛋白序列之的可变区和恒定区的抗体。人抗体可包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0185] 术语“人源化抗体”指具有基本来自非人物种免疫球蛋白的抗原结合位点的分子,其中所述分子其余的免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。所述抗原结合位点可包含融合到恒定结构域上的完整可变结构域,或者仅包含移植(graft)到可变结构域中适当构架区上的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型的,或者通过一个或更多个氨基酸替换进行修饰,例如进行修饰以使其与人免疫球蛋白更类似。一些形式的人源化抗体保留了全部CDR序列(例如含有来自小鼠抗体的全部六个CDR的人源化小鼠抗体)。其他形式具有一个或更多个相对于原始抗体而言发生了改变的CDR。

[0186] 术语“嵌合抗体”指这样的抗体,其中每个重链和轻链氨基酸序列的一部分与来自特定物种或者属于特定类别的抗体中的相应序列同源,而该链的其余区段则与另一物种或属于另一类别的相应序列同源。通常,轻链和重链的可变区均模拟来自一个哺乳动物物种之抗体的可变区,而恒定部分则与来自另一物种的抗体序列同源。这种嵌合形式的一个明显优点是可使用易于获得的B细胞或来自非人宿主生物体的杂交瘤从目前已知的来源方便地产生可变区,而与其组合的恒定区来自例如人细胞制备物。所述可变区具有易于制备的优点,并且特异性不受来源的影响,而由于恒定区为人类的,因此该抗体在注射时引发人类对象免疫应答的可能性将比恒定区来自非人来源时更低。然而,定义不限于此具体实例。

[0187] 抗体可来自不同物种,包括但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠和人。

[0188] 本文所述的抗体包括IgA,例如IgA1或IgA2、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgM和IgD抗体。在多个实施方案中,所述抗体是IgG1抗体,更特别是IgG1、κ或IgG1、λ同种型(即IgG1、κ、λ)、IgG2a抗体(例如IgG2a、κ、λ)、IgG2b抗体(例如IgG2b、κ、λ)、IgG3抗体(例如IgG3、κ、λ)或IgG4抗体(例如IgG4、κ、λ)。

[0189] 本文所使用的“异源抗体”以产生这种抗体的转基因生物体进行定义。该术语指这样的抗体,其具有对应于不由所述转基因生物体组成的生物体中可见的氨基酸序列或编码核酸序列的氨基酸序列或编码核酸序列,并且通常来自与所述转基因生物体不同的物种。

[0190] 本文所使用的术语“异源杂合抗体(heterohybrid antibody)”指具有不同生物来源的轻链和重链的抗体。例如,具有与鼠类轻链结合的人重链的抗体是异源杂合抗体。

[0191] 本文所述抗体优选是分离的。本文所使用的“分离的抗体”旨在指基本不含具有不同抗原特异性之其他抗体的抗体(例如,特异性结合CLDN6的分离的抗体基本上不含特异性结合除CLDN6之外抗原的抗体)。分离的抗体特异性结合人CLDN6的表位、同工型或变体,然而,其可能具有对其他相关抗原(例如,来自其他物种(例如,CLDN6物种同源物))的交叉反

应性。此外，分离的抗体可基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。在本发明的一个实施方案中，“分离的”单克隆抗体的组合指具有不同的特异性并与明确定义的组合物或混合物组合的抗体。

[0192] 术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“结合部分”)或者抗体的“抗原结合片段”(或简称为“结合片段”)或者类似的术语指抗体中保留特异性结合抗原之能力的一个或更多个片段。已表明，抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来实现。术语抗体的“抗原结合部分”中涵盖的结合片段的实例包括(i) Fab片段，由VL、HL、CL和CH结构域组成的一价片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，包含通过铰链区处二硫键连接的两个Fab片段的二价片段；(iii) 由VH和CH结构域组成的Fd片段；(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段；(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等，(1989) Nature 341:544-546)；(vi) 分离的互补决定区(CDR)以及(vii) 两个或更多个分离的CDR的组合，其可任选地通过合成接头连接。此外，尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码，但是可使用重组方法通过合成接头将它们连接，使之成为单个蛋白质链，其中VL和VH区配对以形成一价分子(称为单链Fv(scFv)；参见例如，Bird等(1988) Science 242:423-426；和Huston等(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这种单链抗体还旨在涵盖于术语抗体的“抗原结合片段”内。另一个实例是结合结构域免疫球蛋白融合蛋白，其包含(i)与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合结构域多肽，(ii)与所述铰链区融合的免疫球蛋白重链CH2恒定区，和(iii)与所述CH2恒定区融合的免疫球蛋白重链CH3恒定区。所述结合结构域多肽可为重链可变区或轻链可变区。结合结构域免疫球蛋白融合蛋白在US 2003/0118592和US 2003/0133939中进一步公开。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段，并以与完整抗体相同的方式根据用途对片段进行筛选。

[0193] 术语“结合结构域”表征与本发明(例如，抗体)有关的结构，其与给定的靶结构/抗原/表位结合/相互作用。因此，根据本发明，结合结构域表示“抗原相互作用位点”。

[0194] 出于本发明的目的，术语“抗体”涵盖如本文所述的所有抗体和抗体衍生物(例如抗体片段)。术语“抗体衍生物”指抗体的任何经修饰形式(例如，抗体与另一种药剂或抗体的缀合物)或抗体片段。

[0195] 天然存在的抗体通常是单特异性的，即它们与单一抗原结合。本发明包括与靶细胞结合(通过接合CLDN6)和与第二实体例如细胞毒性细胞(例如，通过接合CD3受体)结合的抗体。本发明的抗体可以是双特异或多特异性的，例如三特异性、四特异性等。

[0196] 术语“双特异性分子”旨在包括具有两种不同结合特异性的物质。例如，所述分子可以与(a)细胞表面抗原，和(b)受体(例如效应细胞表面上的Fc受体)结合或相互作用。术语“多特异性分子”旨在包括具有两种以上不同结合特异性的物质。例如，所述分子可与(a)细胞表面抗原、(b)受体(例如，效应细胞表面上的Fc受体)和(c)至少一种其他组分结合或相互作用。因此，术语“能够结合CLDN6的抗体”包括，但不限于，针对CLDN6和其他靶标(例如，效应细胞上的Fc受体)的双特异性、三特异性、四特异性以及其他多特异性分子。术语“双特异性抗体”还包括双抗体。双抗体为二价的双特异性抗体，其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达，但由于使用的接头太短以致于不能使同一链上的两个结构域配对，从而促使结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见例如，Holliger,P.,等(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448；Poljak,R.J.,等(1994) Structure 2:

1121-1123)。

[0197] 在本发明的上下文中，“能够结合CLDN6的抗体”优选能够如本文所述引发免疫效应物功能。优选地，所述免疫效应物功能针对在其表面上携带肿瘤相关抗原CLDN6的细胞(例如癌症干细胞)。

[0198] 在本发明的上下文中，术语“免疫效应物功能”包括由免疫系统的组分介导的任何功能，其导致例如抑制肿瘤的生长和/或抑制肿瘤的发展，包括抑制肿瘤传播和转移。优选地，免疫效应物功能导致杀伤癌细胞，特别是癌症干细胞。这样的功能包括补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)、诱导携带肿瘤相关抗原之细胞的凋亡、携带肿瘤相关抗原之细胞的细胞溶解，和/或抑制携带肿瘤相关抗原之细胞的增殖。结合的物质还仅通过与癌细胞表面上的肿瘤相关抗原结合来发挥作用。例如，抗体仅通过与癌细胞表面上的肿瘤相关抗原结合来阻断肿瘤相关抗原的功能或诱导凋亡。

[0199] 根据本发明，抗体可与治疗性部分或药剂(例如毒素药物部分，特别是细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性同位素)缀合。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害且特别杀伤细胞的任何药剂。实例包括：紫杉醇(taxol)、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙啶、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱(colchicine)、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素(anthracin)二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、鹅膏蕈碱、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素，及其类似物或同系物。适于形成抗体缀合物的治疗剂包括，但不限于：抗代谢物(例如，甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪(decarbazine))、烷基化剂(例如，氮芥(mechlorethamine)、硫喷妥苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(BSNU)和罗莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺式-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(例如，柔红霉素(原来的道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如，更生霉素(原来的放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和氨茴霉素(AMC))以及抗有丝分裂剂(例如，长春新碱和长春花碱)。在一个优选实施方案中，治疗剂为细胞毒剂或放射性毒剂。在另一个实施方案中，治疗剂为免疫抑制剂。在又一个实施方案中，治疗剂为GM-CSF。在一个优选实施方案中，治疗剂为多柔比星、顺铂、博来霉素、硫酸盐、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺或蓖麻毒蛋白A。根据本发明，特别优选的毒素药物部分是抑制微管组装和具有抗增殖和/或细胞毒性作用的化合物。

[0200] 根据本发明，特别优选与治疗性部分或药剂(例如细胞毒素)缀合并作用于缓慢生长或静止细胞(例如癌症干细胞)的抗体。这样的治疗部分包括作用于mRNA和/或蛋白质合成的治疗部分。已知若干个转录的抑制剂。例如，放线菌素D，其既是转录抑制剂又是DNA损伤剂，其插在DNA内，从而抑制转录的起始阶段。Flavopiridol靶向转录的延伸阶段。 α 鹅膏蕈碱直接与RNA聚合酶II结合，从而导致抑制起始和延伸两个阶段。

[0201] 抗体还可与放射性同位素(例如，碘-131、钇-90或铟-111)缀合以产生细胞毒性放射性药物。

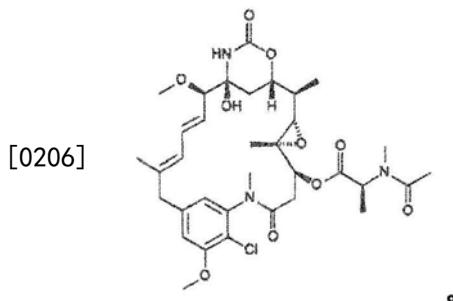
[0202] 本发明的抗体缀合物可用于修饰给定的生物应答，并且药物部分不应被解释为限制于经典的化学治疗剂。例如，药物部分可为具有所期望生物活性的肽、蛋白质或多肽。这样的蛋白质可包括，例如，酶促活性毒素或其活性片段，例如，相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、

假单胞菌外毒素或白喉毒素；蛋白质，例如，肿瘤坏死因子或干扰素- γ ；或者生物应答调节物，例如，淋巴因子、白细胞介素-1（“IL-1”）、白细胞介素-2（“IL-2”）、白细胞介素-6（“IL-6”）、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（“GM-CSF”）、粒细胞集落刺激因子（“G-CSF”）或其他生长因子。根据本发明进一步优选的药物部分是姜黄色素、盐霉素和萝卜硫素。

[0203] 用于将这些治疗部分缀合至抗体的技术是公知的，参见，例如，Arnon等，“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”，Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy中，Reisfeld等（编辑），第243-56页（Alan R.Liss, Inc. 1985）；Hellstrom等，“Antibodies For Drug Delivery”，Controlled DrugDelivery（第2版）中，Robinson等（编辑），第623-53页（Marcel Dekker, Inc. 1987）；Thorpe，“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”，Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications中，Pincheraet等（编辑），第475-506页（1985）；“Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”，Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy中，Baldwin等（编辑），第303-16页（Academic Press 1985），和Thorpe等，“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”，Immunol.Rev., 62:119-58(1982)。

[0204] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的抗体与一个或更多个美登木素生物碱分子缀合。

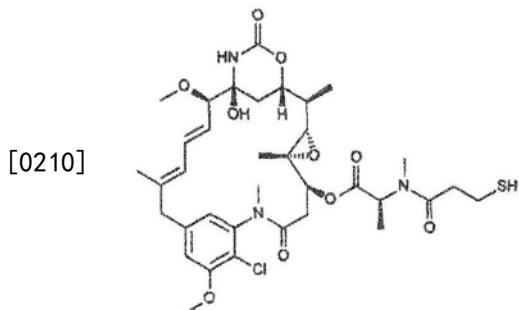
[0205] 美登木素生物碱是有效的微管靶向化合物，其抑制有丝分裂时细胞的增殖。美登木素生物碱是美登素（maytansine）的衍生物，美登素为与氯化苯环连接的19元柄型大环内酯（ansa macrolide）结构。美登素具有下式：



[0207] 发现某些微生物也产生美登木素生物碱，例如美登木醇（maytansinol）和C-3美登木醇酯（美国专利No.4,151,042）。例如，在美国专利号4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,362,663; 和4,371,533以及Kawai等（1984）Chem.Pharm.Bull.3441-3451（其通过引用并入本文）中已经报道了合成的美登木醇和美登木醇类似物。

[0208] 美登木素生物碱是本领域中公知的，并且可通过已知的技术合成或从天然来源分离。根据本发明，特别优选的美登木素生物碱是美登素的含巯基衍生物，例如DM1和DM4。这种美登素的含巯基衍生物包括其中结合至羰基的甲基被包含游离巯基的基团（例如基团-R-SH，其中R表示亚烷基或其他含碳基团的原子）取代的化合物。

[0209] DM1，也称为mertansine，其是具有下式的美登木素生物碱：



[0211] 具体地,术语“mertansine”或“DM1”指的是化合物N^{2'}-脱乙酰N^{2'}- (3-巯基-1-氧代丙基) -美登素。

[0212] “DM4”指的是化合物N^{2'}-脱乙酰-N^{2'}- (4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基) -美登素。

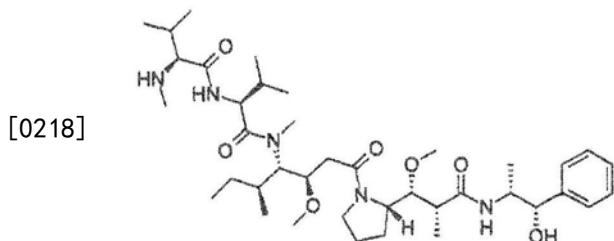
[0213] 抗CLDN6抗体-美登木素生物碱缀合物是通过将抗CLDN6抗体与美登木素生物碱分子化学连接来制备的,而不明显削弱抗体或美登木素生物碱分子的生物学活性。每个抗体分子平均缀合3至4个美登木素生物碱的分子,尽管预期相对于使用裸抗体,即使一个毒素/抗体分子就能增强细胞毒性。

[0214] 在这方面,术语“与至少一种毒素药物部分共价连接的抗体”包括这样的情况,其中相同药物的一个或更多个分子与抗体分子共价连接以及其中不同药物与抗体分子共价连接。在后一种情况下,每种不同药物的一个或更多个分子可与抗体分子或其组合(例如,一种药物的一个分子被连接,同时另一种药物的几个分子被连接)连接。

[0215] 在本发明的一些实施方案中,使抗体与多拉司他汀(dolastatin)或多拉司他汀肽类似物及衍生物-奥瑞他汀类(美国专利号5,635,483;5,780,588,其通过引用并入本文)缀合。奥瑞他汀类是多拉司他汀10(一种来自海洋软体动物海兔(Dolabella auricularia)的天然产物)的合成类似物。像美登木素生物碱一样,奥瑞他汀类是微管破坏物。多拉司他汀或奥瑞他汀药物部分可通过肽药物部分的N(氨基)末端或C(羧基)末端与抗体连接。

[0216] 示例性的奥瑞他汀实施方案包括单甲基奥瑞他汀药物部分,例如MMAE和MMAF,其优选是N-末端连接的。

[0217] MMAE,也称为单甲基奥瑞他汀E,其具有下式:



[0219] 具体地,术语“MMAE”指的是化合物(S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲氨基)丁酰胺基)丁酰胺。MMAE实际上是去甲基奥瑞他汀E,即,N-末端氨基仅具有一个甲基取代基,而不是如奥瑞他汀E本身的两个取代基。

[0220] 根据本发明,特别优选的是抗体-vc奥瑞他汀缀合物,例如抗体-vcMMAE缀合物。根据本发明,术语“抗体-vc奥瑞他汀”或“vcMMAE”指这样的抗体-药物缀合物(ADC),其包含通

过溶酶体可切割二肽缬氨酸-瓜氨酸(vc)与抗体连接的奥瑞他汀(例如MMAE)。

[0221] MMAF,也称为单甲基奥瑞他汀M,指的是化合物(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲氨基)丁酰胺基)丁酰胺基)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸。

[0222] 有许多本领域中已知的连接基团用于制备抗体-药物缀合物。

[0223] 在本发明的一个实施方案中,通过双功能交联试剂将抗体与药物相连。如本文所使用的“双官能交联试剂”是指这样的试剂,其具有两个反应性基团,其中一个能与抗体反应,而另一个能与药物反应以使抗体与药物连接,由此形成缀合物。任何合适的双官能交联试剂都可与本发明一起使用,只要该连接试剂提供了用于保持药物的例如细胞毒性和抗体的靶向特性即可。优选地,所述接头分子通过化学键使药物和抗体连接,以使得药物与抗体彼此化学偶联(例如,共价结合)。

[0224] 在一个实施方案中,双官能交联试剂包括不可切割的接头。不可切割接头是能够将药物(例如美登木素生物碱)与抗体以稳定的、共价的方式连接的任何化学部分。优选地,不可切割的接头是在生理条件下(特别是在细胞内)不可切割的。因此,不可切割的接头对酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割和二硫键切割基本上都具有抗性,在这些条件下药物或抗体保持活性。在药物和抗体之间形成不可切割的接头之合适的交联试剂是本领域中公知的。在一个实施方案中,药物通过硫醚键与抗体连接。不可切割的接头的实例包括具有用于与药物(例如与美登木素生物碱的巯基基团)反应的基于马来酰亚胺基或卤代乙酰基部分的接头。这样的双官能交联剂是本领域中公知的,包括但不限于:N-琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸酯(SMCC)和N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺基己酸酯),其是SMCC的“长链”类似物(LC-SMCC)。优选地,双官能交联试剂是SMCC。使用这样的接头,药物(例如mertansine)可通过4-(3-巯基-2,5-二氧化-1-吡咯烷基甲基)-环己烷羧酸与抗体的氨基基团(例如赖氨酸残基的游离NH₂基团)连接。每种抗体药物缀合物分子可包含与mertansine的几个分子结合的单个抗体分子。

[0225] 在一个特别优选的实施方案中,连接试剂是可切割的接头。优选地,可切割的接头是在生理条件下(特别是在细胞内)可切割的。合适的可切割接头的实例包括二硫化物接头、酸不稳定接头、光不稳定接头、肽酶不稳定接头和酯酶不稳定接头。含二硫化物的接头是通过二硫化物交换而产生的可切割的接头,其可在生理条件下发生。酸不稳定接头是在酸性pH下可切割的接头。例如,某些细胞内区室(例如内体和溶酶体),具有酸性pH值(pH 4-5)并提供适于切割酸不稳定接头的条件。光不稳定的接头在身体表面以及许多可获得光的体腔中有用。此外,红外光可以穿透组织。肽酶不稳定的接头可用于切割细胞内部或外部的某些肽。在一个实施方案中,可切割的接头在温和条件下切割,即在其中细胞毒剂的活性不受影响的细胞内条件下。

[0226] 在一个特别优选的实施方案中,接头是包含或由二肽缬氨酸(Val)-瓜氨酸(Cit)(vc)组成的接头,其在肿瘤细胞内由组织蛋白酶切割。

[0227] 根据本发明,术语“针对癌症干细胞的癌症治疗”指可用于靶向并优选杀伤和/或损害癌症干细胞之增殖或生存力的任何治疗。这类治疗包括:i)靶向靶定在癌症干细胞(例如,CLDN6)的某些细胞表面之裸露的或与治疗部分缀合的抗体、抗体片段和蛋白质(例如,

如上所述能够结合CLDN6的抗体或抗体缀合物)或ii)损害癌症干细胞之增殖或生存力的小分子。在一个具体实施方案中,与抗原结合的物质在癌症干细胞上的表达水平高于在正常干细胞上的表达水平。在一个具体实施方案中,所述物质与癌症干细胞抗原特异性地结合。

[0228] 根据本发明,术语“结合”优选地指特异性结合。

[0229] 根据本发明,在标准测定中如果抗体对预定靶标具有显著的亲和力并且与所述预定靶标结合,则所述抗体能够与所述预定靶标结合。“亲和力”或“结合亲和力”一般通过平衡解离常数(K_D)来测量。优选地,术语“显著亲和力”指以 $10^{-5}M$ 或更低、 $10^{-6}M$ 或更低、 $10^{-7}M$ 或更低、 $10^{-8}M$ 或更低、 $10^{-9}M$ 或更低、 $10^{-10}M$ 或更低、 $10^{-11}M$ 或更低或者 $10^{-12}M$ 或更低的解离常数(K_D)与预定靶标结合。

[0230] 在标准测定中,如果抗体对靶标不具有显著的亲和力并且不与所述靶标显著地结合,特别是不与之可检测地结合,则所述抗体(基本上)不能与所述靶标结合。优选地,如果以高至 $2\mu g/ml$,优选 $10\mu g/ml$,更优选 $20\mu g/ml$,特别是 50 或 $100\mu g/ml$ 或更高的浓度存在,则所述抗体不能与所述靶标可检测地结合。优选地,如果抗体与靶标以与预定靶标(所述抗体能够与其结合)结合之 K_D 相比至少 10 倍、 100 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍或 10^6 倍的 K_D 结合,则所述抗体对所述靶标不具有显著的亲和力。例如,如果抗体与所述抗体能够结合的靶标结合的 K_D 为 $10^{-7}M$,则所述抗体与对其无显著亲和力的靶标结合的 K_D 为至少 $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-2}M$ 或 $10^{-1}M$ 。

[0231] 在标准测定中,如果抗体能够与预定靶标结合同时不能够与其他靶标结合,即对其他靶标不具有显著亲和力也不与其他靶标显著结合,则所述抗体对所述预定靶标具有特异性。根据本发明,如果抗体能够与CLDN6结合,同时(基本上)不能够与其他靶标结合,则所述抗体对CLDN6具有特异性。优选地,如果抗体与这样的其他靶标的亲和力和结合没有显著超过与CLDN6不相关的蛋白质(例如牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、人血清白蛋白(HSA)或非密蛋白跨膜蛋白例如MHC分子或转铁蛋白受体或任何其他指定的多肽)的亲和力或结合,则所述抗体对CLDN6具有特异性。优选地,如果抗体与靶标以与非特异性靶标结合之 K_D 相比低至少 10 倍、 100 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍或 10^6 倍的 K_D 结合,则所述抗体对所述预定靶标具有特异性。例如,如果抗体与其特异性靶标结合的 K_D 为 $10^{-7}M$,则抗体与其无特异性的靶标结合的 K_D 为至少 $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-2}M$ 或 $10^{-1}M$ 。

[0232] 可使用任何合适的方法实验性测定抗体与靶标的结合;参见例如Berzofsky等,“Antibody-Antigen Interactions”Fundamental Immunology中,Paul,W.E.编,Raven Press New York,N Y(1984),Kuby,Janis Immunology,W.H.Freeman and Company New York,N Y(1992)和本文中描述的方法。可使用常规技术容易地测定亲和力,例如,通过平衡透析;通过使用BIAcore 2000仪器,使用制造商所描述的通用方法;通过使用放射标记的靶抗原的放射免疫测定;或通过技术人员已知的其他方法。例如,可通过Scatchard等,Ann N.Y.Acad.ScL,51:660(1949)的方法分析亲和力数据。如果在不同条件(例如,盐浓度、pH)下测量,则所测量的具体抗体-抗原相互作用的亲和力可以不同。因此,亲和力和其他抗原-结合参数(例如, K_D 、 IC_{50})的测量优选地用抗体与抗原的标准化溶液以及标准化缓冲液进行。

[0233] 本文所使用的“同种型”指由重链恒定区基因所编码的抗体类别(例如,IgM或IgG1)。

[0234] 本文所使用的“同种型转换 (isotype switching)”指抗体的类别或同种型由一个 Ig类别变成另一Ig类别的现象。

[0235] 本文所用的术语“天然存在的”当应用于物体时是指该物体可见于自然界这一事实。例如,存在于可从自然界来源分离的生物体(包括病毒)中并且未经人在实验室中有意修饰的多肽或多核苷酸序列即是天然存在的。

[0236] 本文使用的术语“重排”指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型,其中V区段在编码基本完整VH或VL结构域的构象中分别位于紧邻D-J或J区段的位置。重排的免疫球蛋白(抗体)基因座可通过与种系DNA的比较来鉴定;重排的基因座将具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源性元件。

[0237] 涉及V区段时,本文使用的术语“未重排的”或“种系构型”指其中V区段未重组从而未与D或J区段紧邻的构型。

[0238] 优选地,将能够结合CLDN6的抗体与表达CLDN6的细胞结合诱导或介导了表达CLDN6的细胞的杀伤。表达CLDN6的细胞优选癌症干细胞,并且,特别是本文所述的癌症疾病的细胞,例如卵巢癌的癌症干细胞。优选地,抗体通过诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、凋亡和抑制表达CLDN6之细胞增殖中的一种或更多种来诱导或介导细胞杀伤。优选地,在效应细胞存在的情况下,发生ADCC介导的细胞裂解,在特定实施方案中,所述效应细胞选自单核细胞、单核的细胞、NK细胞和PMN。可使用溴脱氧尿苷(5-溴-2-脱氧鸟苷,BrdU)通过确定细胞在测定中的增殖来体外测量对细胞增殖的抑制。BrdU为合成的核苷,其为胸苷的类似物,并且在DNA复制期间,可被掺入复制中之细胞(在细胞周期的S期)的新合成的DNA中,从而取代胸苷。使用例如对BrdU具有特异性的抗体检测到掺入的化学物质,表明细胞正活跃地复制其DNA。

[0239] 在一些优选的实施方案中,本文所述的抗体可以下面特性中的一种或更多种为特征:

[0240] a) 对CLDN6具有特异性;

[0241] b) 对CLDN6的结合亲和力为约100nM或更低,优选,约5至10nM或更低,更优选,约1至10nM或更低;

[0242] c) 诱导或介导CLDN6阳性细胞上CDC的能力;

[0243] d) 诱导或介导CLDN6阳性细胞上ADCC的能力;

[0244] e) 抑制CLDN6阳性细胞生长的能力;

[0245] f) 诱导CLDN6阳性细胞凋亡的能力。

[0246] 在一个实施方案中,能够结合CLDN6的抗体具有能够与存在于CLDN6中的表位结合的能力,优选位于CLDN6胞外结构域内的表位,特别是第一胞外环内,优选CLDN6的第28至76位氨基酸或第二胞外环,优选CLDN6的第141至159位氨基酸。在一些具体的实施方案中,能够结合CLDN6的抗体与不存在于CLDN9上而存在于CLDN6上的表位结合。优选地,能够结合CLDN6的抗体与不存在于CLDN4和/或CLDN3上而存在于CLDN6上的表位结合。最优选地,能够结合CLDN6的抗体与不存在于除CLDN6之外的CLDN蛋白质上而存在于CLDN6上的表位结合。

[0247] 能够结合CLDN6的抗体优选与CLDN6结合但不与CLDN9结合,且优选不与CLDN4和/或CLDN3结合。优选地,能够结合CLDN6的抗体对CLDN6具有特异性。优选地,能够结合CLDN6的抗体与在细胞表面上表达的CLDN6结合。在一些特别优选的实施方案中,能够结合CLDN6

的抗体与存在于活细胞表面上的CLDN6天然表位结合。

[0248] 在一个优选的实施方案中,能够结合CLDN6的抗体包含含有选自SEQ ID NO:3、5、7、9的氨基酸序列及其片段的重链可变区(VH)。

[0249] 在一个优选的实施方案中,能够结合CLDN6的抗体包含含有选自SEQ ID NO:4、6、8、10、11、12的氨基酸序列及其片段的轻链可变区(VL)。

[0250] 在某些优选的实施方案中,能够结合CLDN6的抗体包含选自以下可能情况(i)至(vii)的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0251] (i) VH包含由SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或其片段并且VL包含由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列或其片段,

[0252] (ii) VH包含由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段并且VL包含由SEQ ID NO:6所示氨基酸序列或其片段,

[0253] (iii) VH包含由SEQ ID NO:7所示氨基酸序列或其片段并且VL包含由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列或其片段,

[0254] (iv) VH包含由SEQ ID NO:9所示氨基酸序列或其片段并且VL包含由SEQ ID NO:10所示氨基酸序列或其片段,

[0255] (v) VH包含由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段并且VL包含由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列或其片段,

[0256] (vi) VH包含由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段并且VL包含由SEQ ID NO:11所示氨基酸序列或其片段,

[0257] (vii) VH包含由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段并且VL包含由SEQ ID NO:12所示氨基酸序列或其片段。

[0258] 在一个特别优选的实施方案中,能够结合CLDN6的抗体包含以下的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0259] VH包含由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段并且VL包含由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列或其片段。

[0260] 术语“片段”特别指一个或更多个互补决定区(CDR),优选至少重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的CDR3可变区。在一个实施方案中,所述一个或更多个互补决定区(CDR)选自一组互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。在一个特别优选的实施方案中,术语“片段”指重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。

[0261] 在一个实施方案中,如本文所述包含一个或更多个CDR、一组CDR或CDR组之组合的抗体包含所述CDR及其间插框架区(intervening framework region)。优选地,该部分还将包含至少约50%的第一和第四框架区之一或两者,所述50%为第一框架区的C端50%和第四框架区的N端50%。通过重组DNA技术进行的抗体构建可导致在可变区的N端或C端引入接头编码的残基,所述接头的引入是为了便于克隆或其他操作步骤,包括引入接头来连接本发明的可变区与其他蛋白质序列,所述其他蛋白质序列包括免疫球蛋白重链、其他可变结构域(例如,在双抗体的产生中)或蛋白质标签。

[0262] 在一个实施方案中,如本文所述包含一个或更多个CDR、一组CDR或CDR组之组合的抗体包含在人抗体框架中的所述CDR。

[0263] 本文中提到的在其重链包含特定链或特定区域或序列的抗体优选指这样的情况,

其中所述抗体的所有重链均包含所述特定链、区域或序列。这相应地也适用于抗体的轻链。

[0264] 应当理解的是，本文所述的抗体可以通过施用编码抗体的核酸(例如RNA)和/或通过施用包含编码抗体的核酸(例如RNA)的宿主细胞而递送给患者。因此，当向患者施用时，编码抗体的核酸可以以裸露的形式或以合适的递送载体(例如以脂质体或病毒颗粒的形式)存在，或在宿主细胞内。经过更长的时间，提供的核酸可以以持续的方式产生抗体从而减轻对于治疗性抗体至少部分观察到的不稳定性。可通过重组的方式产生递送给患者的核酸。如果将宿主细胞内不存在的核酸向患者施用，则优选被表达由所述核酸编码之抗体的患者的细胞摄取。如果在宿主细胞内存在核酸时细胞向患者施用核酸，优选由患者中的宿主细胞进行表达以产生由所述核酸编码的抗体。

[0265] 如本文所使用的术语“核酸”旨在包括DNA和RNA，例如基因组DNA、cDNA、mRNA、重组产生的和化学合成的分子。核酸可以为单链或双链。RNA包括体外转录的RNA(IVT RNA)或合成的RNA。

[0266] 核酸可包含在载体中。如本文所用的术语“载体”包括技术人员已知的任何载体，其包括质粒载体、黏粒载体、噬菌体载体例如λ噬菌体、病毒载体例如腺病毒或杆状病毒载体，或人工染色体载体例如细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)或P1人工染色体(PAC)。所述载体包括表达载体以及克隆载体。表达载体包括质粒和病毒载体且一般含有用于在特定宿主生物体(例如，细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物)或者在体外表达系统中有效连接的编码序列之表达所需的期望编码序列和合适的DNA序列。克隆载体一般用于设计和放大某期望的DNA片段，并可能缺乏表达所期望DNA片段所需要的功能性序列。

[0267] 在本发明的上下文中，术语“RNA”指包含核糖核苷酸残基，优选完全或基本上由核糖核苷酸残基构成的分子。“核糖核苷酸”指在β-D-呋喃核糖基的2'-位上具有羟基的核苷酸。该术语包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA例如部分纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组产生的RNA以及通过添加、缺失、替换和/或改变一个或更多个核苷酸而不同于天然存在的RNA之经修饰的RNA。这样的改变可包括例如向RNA的末端或内部(例如在RNA的一个或更多个核苷酸处)添加非核苷酸材料。在RNA分子中的核苷酸还可包含非标准核苷酸，例如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可称为类似物或天然存在的RNA的类似物。

[0268] 根据本发明，术语“RNA”包括并优选指“mRNA”，其意指“信使RNA”以及指可使用DNA作为模板而产生且编码肽或蛋白质的“转录本”。mRNA通常包含5'非翻译区(5'-UTR)、蛋白质或肽编码区和3'非翻译区(3'-UTR)。mRNA在细胞中和体外具有有限的半衰期。优选地，使用DNA模板通过体外转录来产生mRNA。在本发明的一个实施方案中，通过在体外转录或化学合成来获得RNA。体外转录方法是技术人员已知的。例如，有多种市售的体外转录试剂盒。

[0269] 在本发明的一个实施方案中，RNA是自我复制的RNA，例如单链自我复制的RNA。在一个实施方案中，自我复制的RNA是正义单链RNA。在一个实施方案中，自我复制的RNA是病毒RNA或来自病毒RNA的RNA。在一个实施方案中，自我复制的RNA是甲病毒属(alphaviral)基因组RNA或来自甲病毒属基因组RNA。在一个实施方案中，自我复制的RNA是病毒基因表达载体。在一个实施方案中，病毒是塞姆利基森林(Semliki forest)病毒。在一个实施方案中，自我复制的RNA包含一个或更多个转基因，所述转基因中至少一个编码本文所述的抗体。在一个实施方案中，如果RNA是病毒RNA或来自病毒RNA，则转基因可部分或完全取代病

毒序列,例如编码结构蛋白的病毒序列。在一个实施方案中,自我复制的RNA是体外转录的RNA。

[0270] 甲病毒属的基因组是正义单链RNA(ssRNA(+)),其编码大型多蛋白的两个开放阅读框(ORF)。在基因组5'端的ORF编码非结构蛋白nSP1至nSP4(nsP1-4),其被翻译并加工为RNA依赖性RNA聚合酶(复制酶);在3'端的ORF编码结构蛋白-衣壳和糖蛋白。这两个ORF均通过所谓的亚基因组启动子(subgenomic promoter,SGP)分离,所述亚基因组启动子控制结构ORF的转录。当作为基因载体利用时,SGP后面的结构蛋白通常被转基因所取代。为了将这些载体包装进病毒颗粒中,通常由辅助构建体反式表达所述结构蛋白。在经感染细胞的细胞质中,甲病毒属专门在RNA水平上复制。感染后,ssRNA(+)基因组充当用于nsP1234聚蛋白前体翻译的mRNA,nsP1234聚蛋白前体在病毒生命周期的早期阶段自我蛋白水解加工为片段nsP123和nsP4。片段nsP123和nsP4形成从基因组RNA模板转录(-)链RNA的(-)链复制酶复合物。在稍后的阶段中,nsP1234聚蛋白被彻底切割成组装为合成新(+)链基因组之(+)链复制酶复合物的单蛋白以及编码结构蛋白或转基因的亚基因组转录本。亚基因组RNA以及新基因组RNA被加帽并聚腺苷酸化,因而在靶细胞感染后被识别为mRNA。只有新基因组RNA含有确保专门将基因组RNA包装进出芽病毒体的包装信号。甲病毒属复制子对于载体学的吸引力为基于加帽的和聚腺苷酸化之RNA基因组的正定向。可转移的复制子RNA易于在体外合成,由此将帽类似物(cap-analoga)添加至体外转录反应可实现加帽且在质粒模板上poly-A尾可被编码为poly-T轨道(poly-T track)。通过常规的转染技术转染体外转录的(IVT)复制子,且即使少量的起始IVT RNA也被迅速增殖。在转移后的几个小时内,位于SGP下游的转基因被转录为每个细胞约40.000至200.000份非常高拷贝数的亚基因组RNA,因此,重组蛋白被强烈表达并不出人意料。根据具体的目的,可将IVT复制子直接转染进靶细胞中,或用反式提供结构基因的辅助载体包装进甲病毒属颗粒中。转移到皮肤或肌肉中导致了高且持续的局部表达,同时强烈诱导体液免疫应答和细胞免疫应答。

[0271] 为了提高根据本发明使用的RNA的表达和/或稳定性,可将其修饰,优选不改变表达的肽或蛋白质的序列。

[0272] 在RNA的情况下,根据本发明所使用的术语“修饰”包括不在所述RNA中天然存在的RNA的任何修饰。

[0273] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明使用的RNA不含有未加帽的5'-三磷酸。可通过用磷酸酶处理RNA来实现除去这类未加帽的5'三磷酸。

[0274] 根据本发明的RNA可具有经修饰的天然存在的或合成的核糖核苷酸以提高其稳定性和/或降低细胞毒性。例如,在一个实施方案中,在根据本发明使用的RNA中5-甲基胞昔被部分或完全(优选完全)取代为胞昔。可替换地或额外地,在一个实施方案中,在根据本发明使用的RNA中假尿昔被部分或完全(优选完全)取代为尿昔。

[0275] 在一个实施方案中,术语“修饰”指提供具有5' -帽或5' -帽类似物的RNA。术语“5' -帽”指在mRNA分子的5' -端发现的帽结构且一般由通过不寻常的5' -至5' -三磷酸键连接至mRNA的鸟昔核苷酸组成。在一个实施方案中,该鸟昔在7位上被甲基化。术语“常规的5' -帽”指天然存在的RNA 5' -帽,优选指7-甲基鸟昔帽(m7G)。在本发明的上下文中,术语“5' -帽”包括类似于RNA帽结构的5' -帽类似物且被修饰以如果附着至那里(优选在体内和/或在细胞中)则具有稳定RNA的能力,。

[0276] 在所述5' -帽或5' -帽类似物存在的情况下,可通过DNA模板的体外转录来提供具有5' -帽或5' -帽类似物的RNA,其中所述5' -帽共转录地并入到产生的RNA链中,或者例如,可通过体外转录产生RNA且使用加帽酶(例如,痘苗病毒的加帽酶)将5' -帽转录后附着至RNA。

[0277] RNA可包括进一步的修饰。例如,在本发明中使用的RNA的进一步修饰可以是天然存在的poly(A)尾的延长或截短或者5' -或3' -非翻译区(UTR)的改变,例如引入与所述RNA的编码区不相关的UTR,例如,插入一个或更多个,优选来自珠蛋白基因(例如 α 2-珠蛋白、 α 1-珠蛋白、 β -珠蛋白,优选 β -珠蛋白,更优选人 β -珠蛋白)的两个拷贝的3' -UTR。

[0278] 因此,为了提高根据本发明所使用的RNA的稳定性和/或表达,可对其进行修饰以与polyA序列结合出现,优选长度为10至500,更优选30至300,甚至更优选65至200,特别是100至150个腺苷残基。在一个特别优选的实施方案中,poly-A序列的长度为约120个腺苷残基。此外,两种或更多种3' -非翻译区(UTR)并入RNA分子的3' -非翻译区可导致翻译效率的增强。在一个具体的实施方案中,3' -UTR来自人 β -珠蛋白基因。

[0279] 优选地,如果RNA递送给(即转染进)细胞,特别是存在于体内的细胞,则RNA表达其编码的蛋白质或肽。

[0280] 术语“转染”指的是向细胞中引入核酸(特别是RNA)。对于本发明的目的而言,术语“转染”还包括向细胞中引入核酸或由这样的细胞摄取核酸,其中所述细胞可存在于对象(例如患者)中。因此,根据本发明,用于转染本文所述核酸的细胞可存在于体外或体内,例如,所述细胞可形成患者的器官、组织和/或生物体的一部分。根据本发明,转染可以是瞬时的或稳定的。对于转染的一些应用,即使所述转染的遗传材料仅瞬时表达也是足够的。由于在转染过程中引入的核酸通常不整合到核基因组中,因此外来核酸将通过有丝分裂而被稀释或降解。允许核酸附加型(episomal)扩增的细胞大幅降低了稀释的速率。如果希望经转染的核酸实际上保留在细胞及其子代细胞的基因组中,则必须发生稳定的转染。RNA可被转染进细胞中以瞬时表达其编码的蛋白质。

[0281] 术语RNA的“稳定性”指RNA的“半衰期”。“半衰期”指消除分子活性、量或数目之一半而所需的时间段。在本发明的上下文中,RNA的半衰期指示所述RNA的稳定性。RNA的半衰期可能影响RNA的“表达持续时间”。可以预期具有长半衰期的RNA将长期表达。

[0282] 在本发明的上下文中,术语“转录”指的是其中DNA序列中的遗传密码被转录为RNA的过程。随后,RNA可被翻译为蛋白质。根据本发明中,术语“转录”包括“体外转录”,其中术语“体外转录”指其中RNA(特别是mRNA)是优选使用合适的细胞提取物在体外于无细胞系统中合成的RNA。优选地,克隆载体应用于生产转录本。这些克隆载体一般被指定为转录载体,并且由根据本发明的术语“载体”所涵盖。

[0283] 根据本发明,术语“翻译”指在细胞的核糖体中的过程,信使RNA的链通过其指导氨基酸序列的组装以形成肽或蛋白质。

[0284] 根据本发明,术语“表达”以其最通用的含义使用,并且包括例如通过转录和/或翻译生产RNA和/或肽或蛋白质。关于RNA,术语“表达”或“翻译”特别指肽或蛋白质的生产。它还包括核酸的部分表达。此外,表达可以是瞬时的或稳定的。根据本发明,术语表达也包括“异常表达”或“反常表达”。

[0285] 根据本发明,“异常表达”或“反常表达”意指与参照(例如,不具有与某种蛋白质

(例如肿瘤抗原)的异常或反常表达相关之疾病的对象中的状态)相比,表达被改变,优选提高。表达的提高指提高至少10%,特别是至少20%,至少50%或至少100%,或更多。在一个实施方案中,表达仅见于患病组织中,而在健康组织中表达被抑制。

[0286] 术语“特异性表达”意指蛋白质基本上仅在特定的组织或器官中表达。例如,肿瘤抗原在胎盘中特异性表达意指所述蛋白质主要在胎盘中表达且在其他组织中不表达或在其他组织或器官类型中的表达没有达到显著程度。因此,即专门在胎盘的细胞中表达且在任何其他组织中表达显著程度较小的蛋白质在胎盘的细胞中特异地表达。在一些实施方案中,肿瘤抗原也可在正常条件下在一种以上的组织类型或器官中(例如在2或3种组织类型或器官,但优选是在不超过3种不同的组织或器官类型中)特异地表达。在这种情况下,那么肿瘤抗原在这些器官中特异地表达。

[0287] 根据本发明,术语“RNA编码”意指如果存在于合适的环境中,优选在细胞内, RNA可被表达以产生其编码的蛋白质或肽。

[0288] 本发明的一些方面依赖宿主细胞的过继转移,宿主细胞在体外转染有核酸(例如本文所述的编码抗体的RNA),并被转移到接受者(例如患者),优选在从低的前体频率向临床相关细胞数目离体扩增后进行。根据本发明,用于治疗的宿主细胞可以与待治疗接受者是自体的(*autologous*)、同种异体的(*allogeneic*)或同系基因的(*syngeneic*)。

[0289] 术语“自体的”用于描述来自相同对象的任何事物。例如,“自体移植物”指来自相同对象的组织或器官的移植。这样的过程是有利的,原因它们克服了免疫学屏障,否则会导致排斥。

[0290] 术语“同种异体的”用于描述来自相同物种之不同个体的任何事物。当在一个或更多个基因座上的基因不相同时,将两个或更多个个体称为彼此是同种异体的。

[0291] 术语“同系基因的”用于描述来自具有相同基因型的个体或组织的任何事物,即,同一近交品系的同卵双胞胎或动物,或其组织。

[0292] 术语“异源的”用于描述由多个不同元件组成的事物。作为一个实例,将一个个体的骨髓转移到不同的个体中构成了异源移植。异源基因是来自不同于该对象的基因。

[0293] 根据本发明,术语“肽”包括寡肽和多肽并且指包含两个或更多个通过肽键共价连接的氨基酸,优选3个或更多,优选4个或更多,优选6个或更多,优选8个或更多,优选9个或更多,优选10个或更多,优选13个或更多,优选16个或更多,优选21个或更多和至多优选8、10、20、30、40或50个,特别是100个。术语“蛋白质”指大的肽,优选指具有超过100个氨基酸残的肽,但一般而言,术语“肽”和“蛋白质”是同义词并且在本文中可互换使用。

[0294] 本文关于特定的氨基酸序列(例如,在序列表中所示的那些)给出的教导将被解释为也指产生与所述特定的序列功能上等同之序列的所述特异性序列的变体,例如与特定氨基酸序列的性质显示出相同或相似性质的氨基酸序列。一个重要的性质是保留抗体与其靶标的结合或维持抗体的效应物功能。优选地,相对于特定序列为变体的序列,当它取代了抗体中的特定序列时保留了所述抗体与CLDN6的结合且优选保留如本文所述抗体的功能,例如CDC介导的裂解或ADCC介导的裂解。

[0295] 例如,序列表中示出的序列可被修饰以除去一个或更多个,优选全部游离的半胱氨酸残基,特别是通过除半胱氨酸以外的氨基酸来替换半胱氨酸残基,优选丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸、甘氨酸、酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸,最优选丙氨酸或丝氨酸。

[0296] 本领域技术人员应当理解,特别是可对CDR、高变区和可变区的序列进行修饰而不丧失结合CLDN6的能力。例如,CDR区与本文指定的抗体的区域相同或高度同源。“高度同源”可以预期在CDR中进行1至5,优选1至4,例如,1至3或1或2个替换。此外,可对高变区和可变区进行修饰,以使得它们与本文具体公开的抗体区域显示基本的同源性。

[0297] 对于本发明的目的而言,氨基酸序列的“变体”包括氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、氨基酸缺失变体和/或氨基酸替换变体。在蛋白质的N末端和/或C末端包含缺失的氨基酸缺失变体也被称为N末端和/或C末端截短变体。

[0298] 氨基酸插入变体包括在特定氨基酸序列中插入单个或两个或更多个氨基酸。在具有插入的氨基酸序列变体的情况下,向氨基酸序列的特定位点中插入一个或更多个氨基酸残基,但是随机插入并对所产生的产物进行合适的筛选也是可能的。

[0299] 氨基酸添加变体包括一个或更多个氨基酸(例如,1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸)的氨基端和/或羧基端融合。

[0300] 氨基酸缺失变体的特征在于从序列中除去一个或更多个氨基酸,例如,除去1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。所述缺失可在蛋白质的任何位置中。

[0301] 氨基酸替换变体的特征在于除去序列中的至少一个残基,并且在该位置插入另一个残基。优选在氨基酸序列中同源蛋白质或肽之间非保守的位置处进行修饰和/或用具有类似特性的其他氨基酸替换氨基酸。优选地,蛋白质变体中的氨基酸改变为保守氨基酸改变,即,替换带有类似电荷的或不带电荷的氨基酸。保守氨基酸改变涉及替换与其侧链相关的氨基酸家族之一。天然存在的氨基酸一般分为四个家族:酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和不带电荷的极性氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时一起被归类为芳香族氨基酸。

[0302] 优选地,给定的氨基酸序列和所述给定的氨基酸序列之变体氨基酸序列之间的相似性程度优选同一性为至少约60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。优选地针对氨基酸区域给出相似性程度或同一性,所述区域为参照氨基酸序列整个长度的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。例如,如果参照氨基酸序列由200个氨基酸组成,优选地针对至少约20、至少约40、至少约60、至少约80、至少约100、至少约120、至少约140、至少约160、至少约180或约200个氨基酸给出相似性程度或同一性,优选连续的氨基酸。在一些优选的实施方案中,针对参照氨基酸序列的整个长度给出相似性程度或同一性。可用本领域已知的工具进行用于确定序列相似性(优选序列同一性)的比对,优选使用最佳序列比对,例如,使用Align,采用标准设定,优选EMBOSS::needle,Matrix: Blosum62,空位打开(Gap Open)10.0,空位延伸(Gap Extend)0.5来进行。

[0303] “序列相似性”指相同的或显示保守氨基酸替换的氨基酸的百分比。两条氨基酸序列之间的“序列同一性”表示所述序列之间相同的氨基酸的百分比。

[0304] 术语“百分比同一性”旨在表示在最佳比对之后获得的待比较的两条序列之间相同的氨基酸残基的百分比,该百分比完全是统计学意义上的,并且两条序列之间的差异随

机分布在其整个长度上。通过在对其进行最佳比对后比较其序列来常规地进行两条氨基酸序列之间的序列比较,所述比较通过区段或通过“比较窗”来进行以鉴定和比较局部区域的序列相似性。除手工产生以外,用于比较的序列的最佳比对还可通过以下手段产生:Smith 和Waterman,1981,Ad. App.Math.2,482的局部同源性算法,Neddleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48,443的局部同源性算法,Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl Acad.Sci.USA 85,2444的相似性搜索法,或者使用这些算法的计算机程序(在Wisconsin Genetics软件包中的GAP,BESTFIT,FASTA,BLAST P,BLAST N和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.)。

[0305] 通过以下方法计算百分比同一性:测定进行比较的两条序列之间相同的位置数,用该数除以进行比较的位置数,并用所得结果乘以100,从而获得这两条序列之间的百分比同一性。

[0306] 术语“细胞”或“宿主细胞”优选指完整的细胞,即具有完整的膜,尚未释放其正常的细胞内组分(例如酶、细胞器或遗传物质)的细胞。完整的细胞优选活细胞,即能够执行其正常代谢功能的活细胞。优选地,根据本发明,所述术语指可转染有外源核酸的任何细胞。优选地,当细胞转染有外源核酸,并转移至接受者时可在接受者中表达所述核酸。术语“细胞”包括细菌细胞;其他有用的细胞是酵母细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。合适的细菌细胞包括来自革兰氏阴性细菌菌株的细胞,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、变形杆菌属(*Proteus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*),以及革兰氏阳性细菌菌株,例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和乳球菌属(*Lactococcus*)的菌株。合适的真菌细胞包括来自木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)和曲霉属(*Aspergillus*)物种的细胞。合适的酵母细胞包括来自酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如栗酒裂殖酵母(*Schizo saccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolicd*))和汉逊酵母属(*Hansenula*)物种的细胞。合适的哺乳动物细胞包括例如CHO细胞、BHK细胞、HeLa细胞、COS细胞、293HEK等。然而,也可使用两栖动物细胞、昆虫细胞、植物细胞和任何在本领域种用于表达异源蛋白质的其他细胞。特别优选哺乳动物细胞用于过继转移,例如来自人、小鼠、仓鼠、猪、山羊和灵长类的细胞。细胞可衍生自大量的组织类型,且包括原代细胞和细胞系,例如免疫系统的细胞,特别是抗原呈递细胞(例如树突细胞和T细胞)、干细胞(例如造血干细胞和间充质干细胞)以及其他类型的细胞。抗原呈递细胞是在主要组织相容性复合物的情况下在其表面上展示抗原的细胞。T细胞可使用其T细胞受体(TCR)识别这一复合物。

[0307] 术语“转基因动物”指具有包含一个或更多个转基因(优选重链和/或轻链转基因)或转染色体(整合或不整合到动物的天然基因组DNA中)之基因组的动物,并且其优选能够表达所述转基因。例如,转基因小鼠可具有人轻链转基因和人重链转基因或人重链转染色体,以使得当用CLDN6抗原和/或表达CLDN6的细胞免疫时,所述小鼠产生人抗CLDN6抗体。可将人重链转基因整合到小鼠的染色体DNA中(如转基因小鼠(例如,HuMAb小鼠(例如,HCo7或HCo12小鼠))的情况那样),或者可以染色体外维持人重链转基因,如WO 02/43478中所述的转染色体(例如,KM)小鼠的情况那样。这样的转基因和转染色体小鼠可通过进行V-D-J重组

和同种型转换而能够产生针对CLDN6的多种同种型的人单克隆抗体的多种同种型(例如,IgG、IgA和/或IgE)。

[0308] 本文所用的“减少”、“降低”或“抑制”意指水平(例如,表达水平或细胞增殖水平)的总体降低或引起总体降低的能力,优选5%或更高,10%或更高,20%或更高,更优选50%或更高,最优选75%或更高。

[0309] 术语,例如“增加”、“提高”或“增强”优选指增加或增强约至少10%,优选至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,更优选至少50%,甚至更优选至少80%,最优选至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%或甚至更多。

[0310] 尽管下文提供了关于抗体治效力背后的机制方面的一些考虑,但不应认为以任何方式限制了本发明。

[0311] 本文所述的抗体优选地与免疫系统的组分相互作用,优选通过ADCC或CDC。本文所述抗体还可用于靶向有效负载(payload)(例如,放射性同位素、药物或毒素)来直接杀伤肿瘤细胞或者可与传统化学治疗剂协同使用,通过互补性作用机制攻击肿瘤,所述作用机制可包括由于化学治疗剂对T淋巴细胞的细胞毒性副作用而受损的抗肿瘤免疫应答。然而,本文所述抗体还可简单地通过在细胞表面上结合CLDN6来发挥作用,从而例如阻断细胞增殖。

[0312] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

[0313] ADCC描述了如本文所述的效应细胞(特别是淋巴细胞)的细胞杀伤能力,其优选需要被抗体标记的靶细胞。

[0314] ADCC优选在抗体与肿瘤细胞上的抗原结合以及抗体Fc结构域与免疫效应细胞表面上的Fc受体(FcR)接合(engage)时发生。已鉴定出几个Fc受体家族,且特定的细胞群特征性地表达确定的Fc受体。可将ADCC视为直接诱导不同程度的直接肿瘤破坏的机制,所述破坏导致抗原呈递并诱导肿瘤指向性T细胞应答。优选地,ADCC的体内诱导将引起肿瘤指向性T细胞应答和宿主来源的抗体应答。

[0315] 补体依赖性细胞毒性

[0316] CDC是可通过抗体指引的另一种细胞杀伤方法。IgM是用于补体活化的最有效同种型。IgG1和IgG3在通过经典补体活化途径指引CDC方面也都很有效。优选地,在该级联中,抗原-抗体复合物的形成导致紧邻参与抗体分子(例如,IgG分子)的CH2结构域的多个C1q结合位点暴露出来(C1q是补体C1的三种亚组分之一)。优选地,这些暴露的C1q结合位点将先前的低亲和力C1q-IgG相互作用转变为一种高亲和力相互作用,这触发了涉及一系列其他补体蛋白质的级联事件并且导致效应细胞趋化剂/活化剂C3a和C5a的蛋白水解释放。优选地,该补体级联最终形成膜攻击复合物,其在细胞膜中产生孔,这有利于水和溶质自由穿行于细胞内外。

[0317] 本文所述的抗体可通过多种技术产生,包括常规的单克隆抗体法,例如,Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975)的标准体细胞杂交技术。尽管原则上优选体细胞杂交方案,但是也可采用其他技术来产生单克隆抗体,例如,B淋巴细胞的病毒或致癌转化或使用抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0318] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的优选动物系统为鼠系统。在小鼠中产生杂交瘤是已经非常成熟的方案。分离用于融合的免疫脾细胞的免疫方案和技术在本领域中是已知的。融合伴侣(fusion partner)(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合方案也是已知的。

[0319] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的另一些优选动物系统为大鼠系统和兔系统(例如,Spieker-Polet等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92:9348(1995)中所描述的,还参见,Rossi等,Am.J.Clin.Pathol.124:295(2005))。

[0320] 在又一个优选实施方案中,可使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生人单克隆抗体。这些转基因和转染色小鼠包括分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在本文中统称为“转基因小鼠”。可按照W02004 035607中对CD20详细描述的那样在这样的转基因小鼠中进行人抗体的产生。

[0321] 用于产生单克隆抗体的又一策略为直接从产生具有确定特异性之抗体的淋巴细胞中分离编码抗体的基因,例如,参见Babcock等,1996;A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single,isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities。重组抗体工程的细节还可参见Welschof和Kraus,Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8和Benny K.C.Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1。

[0322] 为了产生抗体,可以如所述的,利用来自抗原序列(即,抗体待指向的序列)的载体缀合肽、重组表达的抗原或其片段的富集制备物和/或表达抗原的细胞来免疫小鼠。或者,可利用编码抗原或其片段的DNA免疫小鼠。如果使用抗原的纯化制备物或富集制备物的免疫不产生抗体,还可用表达抗原的细胞(例如,细胞系)免疫小鼠来促进免疫应答。

[0323] 可以用通过尾静脉或眶后取血获得的血浆和血清样品在免疫方案的全程中监测免疫应答。可使用具有足够效价的免疫球蛋白的小鼠进行融合。可以在处死并移出脾前3天,利用抗原表达细胞经腹膜内或经静脉内对小鼠进行加强免疫以提高分泌特异性抗体的杂交瘤的比率。

[0324] 为了产生生产单克隆抗体的杂交瘤,可从经免疫的小鼠中分离脾细胞和淋巴结细胞,并将其与合适的无限增殖细胞系(例如,小鼠骨髓瘤细胞系)融合。然后,可针对抗原特异性抗体的产生来筛选获得的杂交瘤。然后可以通过ELISA对单个孔筛选分泌抗体的杂交瘤。使用抗原表达细胞通过免疫荧光和FACS分析,可对抗原有特异性的抗体进行鉴定。可将分泌抗体的杂交瘤重新铺板(replate),再次筛选,并且如果单克隆抗体仍为阳性的,则可通过有限稀释进行亚克隆。然后,可在组织培养基中体外培养稳定的亚克隆以产生抗体用于表征。

[0325] 还可使用例如本领域公知的重组DNA技术与基因转染方法的组合在宿主细胞转染瘤中产生本发明的抗体(Morrison,S.(1985)Science 229:1202)。

[0326] 例如,在一个实施方案中,可将目的基因(例如,抗体基因)连接至表达载体(例如,真核表达质粒)中,例如通过使用W0 87/04462、W0 89/01036和EP 338 841中公开的GS基因表达系统或本领域公知的其他表达系统来进行。可将具有所克隆抗体基因的纯化质粒引入真核宿主细胞中,例如,CHO细胞、NS/0细胞、HEK293T细胞或HEK293细胞或者其他真核细胞(例如,来自植物的细胞、真菌或酵母细胞)中。用于引入这些基因的方法可为本领域中所述的方法,例如,电穿孔、lipofectine、lipofectamine或其他。在将这些抗体基因引入宿主细胞后,可对表达抗体的细胞进行鉴定和选择。这些细胞代表此后可扩增其表达水平并扩大规模以生产抗体的转染瘤。可从这些培养上清液和/或细胞中分离并纯化出重组抗体。

[0327] 或者,克隆的抗体基因可在其他表达系统中表达,包括原核细胞,例如,微生物,如

大肠杆菌 (E.coli)。此外,抗体可在非人转基因动物中产生,例如,在羊和兔的乳汁中或在鸡蛋中产生,或者在转基因植物中产生;参见例如,Verma,R.,等(1998)J.Immunol.Meth.216:165-181;Pollock,等(1999)J.Immunol.Meth.231:147-157;和Fischer,R,等(1999)Biol.Chem.380:825-839。

[0328] 嵌合

[0329] 鼠抗体在人中具有高免疫原性,当重复应用时导致治疗效力降低。通过重链恒定区介导主要的免疫原性。如果对各个抗体进行嵌合或人源化,则鼠抗体在人中的免疫原性可被降低或完全避免。嵌合抗体为不同部分来自不同动物物种的抗体,例如,具有来自鼠抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些抗体。将鼠抗体重链和轻链的可变区与人重链和轻链的恒定区连接在一起从而获得抗体的嵌合(例如,如Kraus等,in Methods in Molecular Biology series,Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8所述)。在一个优选实施方案中,通过连接人κ轻链恒定区至鼠轻链可变区产生嵌合抗体。在另一优选实施方案中,可通过连接人λ轻链恒定区至鼠轻链可变区产生嵌合抗体。用于产生嵌合抗体的优选重链恒定区为IgG1、IgG3和IgG4。用于产生嵌合抗体的另一些优选重链恒定区为IgG2、IgA、IgD和IgM。

[0330] 人源化

[0331] 抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因,在各抗体之间,CDR内的氨基酸序列比CDR外的序列更多样。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此有可能通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体之特性的重组抗体,所述表达载体包含来自所述特定天然存在抗体的CDR序列,其移植到来自具有不同特性之不同抗体的框架序列上(参见,例如,Riechmann,L.等(1998)Nature 332:323-327;Jones,P.等(1986)Nature 321:522-525;和Queen,C.等(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:10029-10033)。这样的框架序列可获自包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库。这些种系系序列不同于成熟的抗体基因序列,因为它们不包含完整组装的可变基因,其是在B细胞成熟期间通过V(D)J连接而形成的。种系基因序列还将在均匀穿过可变区的个别处不同于高亲和力第二抗体库(secondary repertoire antibody)的序列。

[0332] 可使用标准结合测定(例如,ELISA、Western印迹、免疫荧光和流式细胞术分析)来确定抗体结合抗原的能力。

[0333] 为了纯化抗体,可将选择的杂交瘤培养在两升转瓶中以纯化单克隆抗体。或者,可以在基于透析的生物反应器中产生抗体。在用蛋白G-琼脂糖或蛋白A-琼脂糖进行亲和色谱法之前,可将上清液过滤并浓缩(如有需要)。可通过凝胶电泳和高效液相色谱法检查经洗涤的IgG,以确保纯度。可将缓冲液更换成PBS,并可以使用1.43消光系数通过OD280来测定浓度。可将单克隆抗体分成等分试样并储存于-80°C。

[0334] 可使用位点定向诱变或多位点定向诱变来确定选定的单克隆抗体是否与独特的表位结合。

[0335] 可利用多种市售试剂盒(例如,Zymed,Roche Diagnostics)进行同种型ELISA来确定抗体的同种型。可用抗小鼠Ig包被微量滴定板的孔。封闭后,使所述板与单克隆抗体或纯化的同种型对照于环境温度下反应两小时。然后,可使孔与小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG3、

IgA或小鼠IgM特异性过氧化物酶缀合探针反应。在洗涤之后,将所述板用ABTS底物(1mg/ml)显影,并于OD 405至650下进行分析。或者,可按照制造商所述使用IsoStrip小鼠单克隆抗体同种型试剂盒(Roche,Cat.No.1493027)。

[0336] 可使用流式细胞术来证明经免疫小鼠的血清中存在抗体或存在单克隆抗体与活细胞表达抗原的结合。可将天然或转染后表达抗原的细胞系和缺乏抗原表达的阴性对照(在标准生长条件下培养)与杂交瘤上清液中或含有1%FBS的PBS中之不同浓度的单克隆抗体混合,并可于4℃下孵育30分钟。在洗涤之后,可使APC-或Alexa647-标记的抗IgG抗体在一抗染色相同的条件下与抗原结合的单克隆抗体结合。通过流式细胞术,用FACS仪器利用光散射和侧向散射特性对单个活细胞设门来分析样品。可采用共转染方法以在单次测量中区分抗原特异性单克隆抗体和非特异性结合物。可如上所述对用编码抗原和荧光标志物的质粒瞬时转染的细胞进行染色。可在与抗体染色细胞不同的荧光通道中检测到经转染的细胞。由于大多数经转染的细胞同时表达这两种转基因,因此抗原特异性单克隆抗体优选与表达荧光标志物的细胞结合,而非特异性抗体以相当的比与未转染的细胞结合。可利用使用荧光显微术的替代测定补充或替代流式细胞术测定。可完全如上所述染色细胞并通过荧光显微术来检查细胞。

[0337] 可使用免疫荧光显微术分析来证明经免疫小鼠的血清中存在抗体或存在单克隆抗体与表达抗原的活细胞结合。例如,将自发或在转染后表达抗原的细胞系和缺乏抗原表达的阴性对照于标准生长条件下培养于腔室载玻片(chamber slide)中补充有10%胎牛血清(FCS)、2mM L-谷氨酰胺、100IU/ml青霉素和100μg/ml链霉素的DMEM/F12培养基中。然后用甲醇或多聚甲醛固定细胞或者不做处理。然后,可将细胞与针对抗原的单克隆抗体于25℃下反应30分钟。在洗涤之后,使细胞与Alexa555标记的抗小鼠IgG二抗(Molecular Probes)于相同条件下反应。然后,通过荧光显微术检查细胞。

[0338] 可制备来自适当的阴性对照和表达抗原的细胞的细胞提取物,并进行十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳之后,将分开的抗原转移至硝酸纤维素膜,封闭,并用待测试的单克隆抗体进行探测。可使用抗小鼠IgG过氧化物酶检测IgG结合并用ECL底物显影。

[0339] 还可以按照技术人员公知的方式,通过免疫组织化学来测试抗体与抗原的反应性,例如,使用多聚甲醛或丙酮固定的冷冻切片或用多聚甲醛固定的石蜡包埋组织切片,其来自获得于常规手术过程期间的患者或获得于携带接种有自发表达抗原或在转染后表达抗原之细胞系的异种移植肿瘤的小鼠的非癌组织或癌组织样品。对于免疫染色,可孵育与抗原反应的抗体,然后根据供应商的说明加入辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠或山羊抗兔抗体(DAKO)。

[0340] 可对抗体介导吞噬和杀伤表达CLDN6之细胞的能力进行测试。单克隆抗体活性的体外测试将在体内模型检测前提供初步筛选。

[0341] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0342] 简言之,来自健康供体的多形核细胞(PMN)、NK细胞、单核细胞、单核的细胞或其他效应细胞可通过Ficoll Hypaque密度离心然后裂解污染的红细胞来纯化。可将经洗涤的效应细胞悬浮于补充了10%热灭活的胎牛血清,或者5%热灭活的人血清的RPMI中,并以不同的效应细胞:靶细胞的比与⁵¹Cr标记之表达CLDN6的靶细胞混合。或者,可用荧光增强配体

(BATDA) 标记靶细胞。可用荧光计测量从死亡细胞中释放的增强配体与铕形成的高毒荧光螯合物。另一替代技术可利用具有荧光素酶的靶细胞的转染。然后, 可仅通过活细胞将添加的萤光黄氧化。然后, 以不同浓度添加经纯化的抗CLDN6 IgG。可使用不相关的人IgG作为阴性对照。根据使用的效应细胞类型, 于37°C下, 可进行测定4至20小时。可通过测量培养上清液中⁵¹Cr的释放或EuTDA螯合物的存在来测定样品的细胞溶解。或者, 由萤光黄氧化产生的发光可作为活细胞的量度。

[0343] 还可用多种组合来测试抗CLDN6单克隆抗体以确定使用多个单克隆抗体是否增强细胞溶解。

[0344] 补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0345] 可使用多种已知的技术来测试单克隆抗CLDN6抗体介导CDC的能力。例如, 可以以技术人员已知的方式从血液中获得补体血清。可使用不同的方法来确定mAb的CDC活性。例如, 可测量⁵¹Cr的释放或可使用碘化丙啶(PI)排除测定来评价提高的膜渗透性。简言之, 可洗涤靶细胞, 并将 5×10^5 /ml与不同浓度的mAb于室温或37°C下孵育10至30分钟。然后, 添加血清或血浆至终浓度为20% (v/v), 并使细胞于37°C下孵育20至30分钟。可向FACS管中的PI溶液添加来自每个样品的全部细胞。然后, 可立即使用FACSArray通过流式细胞术分析来分析该混合物。

[0346] 在一种替代测定中, 可根据贴壁细胞确定CDC的诱导。在该测定的一个实施方案中, 在进行测定前24小时, 以 3×10^4 /孔的密度将细胞接种于组织培养平底微量滴定板中。第二天, 移除生长培养基并将细胞与抗体一式三份地孵育。将对照细胞分别与生长培养基或包含0.2%皂昔(saponin)的生长培养基孵育以确定背景裂解和最大裂解。室温孵育20分钟后, 移除上清液, 并向细胞添加20% (v/v) DMEM中的人血浆或血清(预热至37°C), 并于37°C下再孵育20分钟。向碘化丙啶溶液(10μg/ml)添加来自每个样品的全部细胞。然后, 用含有2.5μg/ml溴化乙啶的PBS替换上清液, 并在使用Tecan Safire在600nm下测量520nm处激发后的荧光发射。如下计算百分比特异性裂解: %特异性裂解 = (样品荧光 - 背景荧光) / (最大裂解荧光 - 背景荧光) × 100。

[0347] 通过单克隆抗体来诱导凋亡和抑制细胞增殖

[0348] 可将单克隆抗CLDN6抗体与例如CLDN6阳性肿瘤细胞或转染了CLDN6的肿瘤细胞于37°C下孵育约20小时以测试引发凋亡的能力。可以收获细胞, 用膜联蛋白-V结合缓冲液(BD biosciences)洗涤, 并与和FITC或APC缀合的膜联蛋白-V(BD biosciences)在黑暗中孵育15分钟。可向FACS管中的PI溶液(10μg/ml于PBS中)添加来自每个样品的全部细胞, 并立即通过流式细胞术进行评价(如上)。或者, 可利用市售的试剂盒来检测单克隆抗体对细胞增殖的一般抑制。DELFIA细胞增殖试剂盒(Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200)为基于在微板中的增殖细胞DNA合成期间5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU)的掺入之测量的非同位素免疫测定。使用铕标记的单克隆抗体来检测掺入的BrdU。使用固定溶液固定细胞并使DNA变性以能够检测抗体。洗去未结合的抗体, 并添加DELFIA诱导物以从标记的抗体中解离铕离子至溶液中, 其中它们与DELFIA诱导物的组分形成高度荧光螯合物。在检测中, 利用时间分辨荧光术测定的荧光与每个孔的细胞中DNA的合成成比例。

[0349] 临床前研究

[0350] 还可在体内模型(例如, 在携带有用表达CLDN6细胞系接种的异种移植肿瘤的免疫

缺陷性小鼠中)中对本文所述的结合物质进行检测以确定它们控制表达CLDN之肿瘤细胞生长的效力。

[0351] 可以在将表达CLDN6的肿瘤细胞异种移植至免疫受损的小鼠或其他动物中后,利用本文所述抗体进行体内研究。可向无肿瘤小鼠施用抗体,然后注射肿瘤细胞以测量所述抗体防止肿瘤或肿瘤相关症状形成的效果。可向具有肿瘤的小鼠施用抗体以确定各抗体降低肿瘤生长、转移或肿瘤相关症状的治疗效果。抗体施加可与其他物质(如细胞生长抑制药物、生长因子抑制剂、细胞周期阻断剂、血管生成抑制剂或其他抗体)的施加组合以测定组合的协同效力和潜在毒性。可用抗体或对照试剂接种动物,并针对与CLDN6抗体治疗可能相关的症状进行彻底研究以分析抗体介导的毒副作用。体内施加CLDN6抗体可能的副作用特别包括在表达CLDN6的组织(包括胎盘)的毒性。在人和其他物种(例如,小鼠)中识别CLDN6的抗体对预测由在人中施加单克隆CLDN6抗体介导的潜在副作用特别有用。

[0352] 可按照“Glenn E.Morris的Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) ISBN-089603-375-9”和Olwyn M.R.Westwood, Frank C.Hay的“Epitope Mapping: A Practical Approach”Practical Approach Series, 248中详细描述的,对抗体识别的表位进行作图。

[0353] 可以以任意合适的药物组合物的形式施用本文所述的化合物和药剂。

[0354] 本发明的药物组合物优选是无菌的,并含有有效量之本文所述的抗体和本文所讨论之任选的其他药剂以产生期望的反应或期望的效果。

[0355] 药物组合物通常以均匀的剂型提供,并且可以以本身已知的方式制备。药物组合物可例如是溶液或混悬剂形式。

[0356] 药物组合物可包含盐、缓冲物质、防腐剂、载体、稀释剂和/或赋形剂,所有这些均优选为可药用的。术语“可药用的”指不与药物组合物的活性成分的作用相互作用之材料的无毒性。

[0357] 不可药用盐可用于制备可药用盐,并且也包括在本发明中。这类可药用盐以非限制性方式包括由以下酸制备的那些:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。可药用盐还可制备成碱金属盐或碱土金属盐,例如,钠盐、钾盐或钙盐。

[0358] 适用于药物组合物中的缓冲物质包括盐中的乙酸、盐中的柠檬酸、盐中的硼酸和盐中的磷酸。

[0359] 适用于药物组合物中的防腐剂包括苯扎氯铵、氯丁醇、对羟基苯甲酸酯和硫汞撒。

[0360] 可注射制剂可包含可药用赋形剂,例如,Ringer乳酸盐。

[0361] 术语“载体”指天然或合成性质的有机或无机组分,其中将活性组分组合以促进、增强或实现应用。根据本发明,术语“载体”还包括适于向患者施用的一种或更多种相容的固体或液体填料、稀释剂或包封物质。

[0362] 可用于肠胃外施用的载体物质为,例如,无菌水、Ringer、Ringer乳酸盐、无菌氯化钠溶液、聚亚烷基二醇、氢化萘以及特别是,生物相容的丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯/多氧-丙烯共聚物(polyoxyethylene/polyoxy-propylene copolymer)。

[0363] 术语“赋形剂”在本文中使用时旨在表示可存在于药物组合物中但不是活性成分的所有物质,例如,载体、结合剂、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、乳化剂、缓冲剂、调

味剂或着色剂。

[0364] 本文所述的药剂和组合物可通过任意常规途径施用,例如,通过肠胃外施用,包括通过注射或输注。施用优选肠胃外施用,例如,静脉内施用、动脉内施用、皮下施用、皮内施用或肌内施用。

[0365] 适于肠胃外施用的组合物一般包括活性化合物的无菌水或非水制备物,其优选与接受者的血液等渗。相容的载体和溶剂的实例为Ringer溶液和等渗氯化钠溶液。此外,通常使用无菌固定油类作为溶液或混悬介质。

[0366] 本文所述的药剂和组合物以有效量施用。“有效量”指单独或与其他剂量一起获得期望反应或期望效果的量。在治疗特定疾病或特定病症的情况下,期望的反应优选涉及抑制疾病的进程。这包括减缓疾病的进展和特别是,中断或逆转疾病的进展。治疗疾病或病症中的期望反应还可是延迟或预防所述疾病或所述病症的发作。特别地,术语“有效量”指这样的治疗量,其足以导致预防癌症及其一种或更多种症状的发展、复发或发作,降低癌症的严重程度、持续时间,改善癌症的一种或更多种症状,预防癌症的发展,引起癌症的消退和/或预防癌症转移。在本发明的一个实施方案中,治疗的量有效实现稳定、降低或消除癌症干细胞群和/或根除、除去或控制原发性癌、转移癌和/或复发癌。

[0367] 本文所述药剂或组合物的有效量将取决于待治疗的病症、疾病的严重程度、患者的个体参数(包括年龄、生理状况、尺寸和体重)、治疗的持续时间、伴随治疗的类型(如果存在的话)、具体施用途径以及类似因素。因此,本文所述药剂的施用剂量可取决于多个这样的参数。在患者对初始剂量反应不够的情况下,可使用更高剂量(或通过不同的更局部化的施用途径获得的有效的更高剂量)。

[0368] 可向患者施用本文所述的药剂和组合物以治疗或预防癌症疾病,例如,如本文所述的以存在表达CLDN6的癌症干细胞为特征的癌症疾病。

[0369] 本文所提供的药剂和组合物可单独使用或与常规的治疗方案组合使用,所述常规的治疗方案例如手术、辐照、化学治疗和/或骨髓移植(自体的、同系基因的、同种异体的或不相关的)。

[0370] 癌症的治疗代表其中组合策略是特别理想的领域,原因是两种、三种、四种或甚至更多种癌症药物/治疗的共同作用经常产生比单一治疗方法的影响明显更强的协同效应。因此,在本发明的另一个实施方案中,癌症治疗可有效地与多种其他药物组合其中有例如与常规肿瘤治疗、多表位策略、另外的免疫治疗和靶向血管生成或凋亡之治疗方法的组合(综述参见例如Andersen等,2008:Cancer treatment:the combination of vaccination with other therapies.Cancer Immunology Immunotherapy,57 (11) :1735-1743)。不同药剂的依次施用可在不同的检查点(check point)抑制癌细胞的生长,而其他药剂可例如抑制新血管生成、恶性细胞的存活或转移,其有可能将癌症转化为慢性疾病。以下列表提供了可与本发明组合使用的一些抗癌药物和治疗的非限制性实例:

[0371] 1. 化学治疗

[0372] 化学治疗是用于多种类型癌症之护理的标准。最常见的化学治疗剂通过杀伤快速分裂的细胞(癌症细胞的主要特性之一)而起作用。因此,与常规化学治疗药物(例如烷基化剂、抗代谢物、蒽环类、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂和影响细胞分裂或DNA合成的其他抗肿瘤剂)的组合通过清除抑制细胞、重新启动免疫系统,通过使肿瘤细胞更易受到免疫介导

的杀伤,或通过额外活化免疫系统的细胞可显著改善本发明的治疗效果。在多个研究中已证明化学治疗和以接种疫苗为基础的免疫治疗药物的协同抗癌作用(参见例如Quoix等.2011:Therapeutic vaccination with TG4010and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer:a controlled phase 2B trial.Lancet Oncol.12 (12) :1125-33;还可参见Liseth等.2010:Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies:the hematological experience.J Biomed Biotechnol.2010:6920979;还可参见Hirooka等2009:A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer.Pancreas 38 (3) :e69-74)。有数以百计可获得的化学治疗药物,其基本上都适合用于组合治疗。可与本发明相组合的化学治疗药物的一些(非限制性)实施例是:卡铂(Paraplatin)、顺铂(Platinol、Platinol-AQ)、克唑替尼(Xalkori)、环磷酰胺(Cytoxan,Neosar)、多西他赛(Taxotere)、多柔比星(Adriamycin)、埃罗替尼(Tarceva)、依托泊苷(VePesid)、氟尿嘧啶(5-FU)、吉西他滨(Gemzar)、甲磺酸伊马替尼(Gleevec)、伊立替康(Camptosar)、脂质体包封的多柔比星(DOXIL)、甲氨蝶呤(Folex,Mexate,Amethopterin)、紫杉醇(Taxol,Abraxane)、索拉非尼(Nexavar)、舒尼替尼(Sutent)、拓扑替康(Hycamtin)、曲贝替定(trabectidin)(Yondelis)、长春新碱(Oncovin,Vincasar PFS)和长春花碱(Velban)。

[0373] 2. 手术

[0374] 癌症手术-移出肿瘤的操作-仍然是癌症治疗的基础。可将手术与其他癌症治疗组合以去除任何剩余的肿瘤细胞。已经数次证明将手术方法与后续的免疫治疗组合是一种有前景的方法。

[0375] 3. 辐射

[0376] 放射治疗仍然是癌症治疗的重要组成部分,所有癌症患者中约50%在他们疾病的进程中接受放射治疗。放射治疗的主要目的是使癌症细胞丧失其增殖(细胞分裂)潜力。用于治疗癌症的辐射类型是光子辐射(X射线和 γ 射线)和粒子辐射(电子、质子和中子束)。有两种方式将辐射递送至癌症的部位。外部波束辐射是通过瞄准高能射线(光子、质子或粒子辐射)从体外递送至肿瘤部位。内部辐射或近程放射治疗是通过密封在导管或籽(seed)中的放射源从身体内部直接递送至肿瘤部位中。适用于与本发明组合的放射治疗技术是,例如分馏法(fractionation)(以分馏的方案递送的放射治疗,例如,在几周内每日给予1.5至3Gy的级分)、3D适形放射疗法(3DCRT;递送辐射至总肿瘤体积)、强度调制放射疗法(IMRT;电脑控制的多个辐射束的强度调制)、图像引导放射疗法(IGRT;包括允许校正的放疗前成像的技术)和立体定向体部放射疗法(SRBT,在很少的治疗部分内递送极高的个体剂量的辐射)。关于放射治疗综述,参见Baskar等2012:Cancer and radiation therapy:current advances and future directions.Int.J Med Sci.9 (3) :193-199。

[0377] 4. 抗体

[0378] 抗体(优选单克隆抗体)通过多种机制实现其对癌细胞的治疗效果。它们可在产生凋亡或程序性细胞死亡中具有直接的作用。它们可以阻断信号转导途径的组分(例如,生长因子受体),有效地阻止肿瘤细胞的增殖。在表达单克隆抗体的细胞中,它们可引起抗独特型抗体形成。间接作用包括募集具有细胞毒性的细胞,例如单核细胞和巨噬细胞。将这种类

型的抗体介导的细胞杀伤称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。抗体还结合补体，导致直接的细胞毒性，称为补体依赖性细胞毒性(CDC)。如例如在Gadri等2009: Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma.J Immunother.32(4):333-40中所证明的，将手术方法与免疫治疗药物或方法组合是一种成功的途径。以下的列表提供了可与本发明组合的抗癌抗体和潜在的抗体靶标(括号内)的一些非限制性实例：阿巴伏单抗(CA-125)、阿昔单抗(CD41)、阿达木单抗(EpCAM)、阿夫土珠单抗(Afutuzumab)(CD20)、培化阿珠单抗(Alacizumab pegol)(VEGFR2)、喷替酸阿妥莫单抗(CEA)、Amatuximab(MORAb-009)、马安那莫单抗(TAG-72)、阿泊珠单抗(HLA-DR)、阿昔莫单抗(CEA)、巴维昔单抗(磷脂酰丝氨酸)、贝妥莫单抗(CD22)、贝利木单抗(BAFF)、贝伐珠单抗(VEGF-A)、Bivatuzumab mertansine(CD44 v6)、Blinatumomab(CD19)、布妥昔单抗(CD30 TNFRSF8)、莫坎妥珠单抗(黏蛋白CanAg)、雷坎妥珠单抗(MUC1)、卡罗单抗喷地肽(前列腺癌细胞)、Carlumab(CNT0888)、卡妥索单抗(EpCAM、CD3)、西妥昔单抗(EGFR)、Citatuzumab bogatox(EpCAM)、西妥木单抗(IGF-1受体)、Claudiximab(密蛋白)、Clivatuzumab tetraxetan(MUC1)、西他土珠单抗(TRAIL-R2)、达西珠单抗(CD40)、Dalotuzumab(胰岛素样生长因子I受体)、地诺单抗(RANKL)、地莫单抗(B-淋巴瘤细胞)、Drozitumab(DR5)、依美昔单抗(GD3神经节苷脂)、依决洛单抗(EpCAM)、埃罗妥珠单抗(SLAMF7)、依那妥珠单抗(PDL192)、Ensituximab(NPC-1C)、依帕珠单抗(CD22)、厄妥索单抗(HER2/neu、CD3)、伊瑞西珠单抗(整联蛋白 α v β 3)、Farletuzumab(叶酸受体1)、FBTA05(CD20)、Ficlatuzumab(SCH 900105)、Figitumumab(IGF-1受体)、Flanvotumab(糖蛋白75)、Fresolimumab(TGF- β)、Galiximab(CD80)、盖尼塔单抗(IGF-I)、吉妥单抗奥唑米星(CD33)、Gevokizumab(IL-1 β)、Girentuximab(碳酸酐酶9(CA-IX))、Glembatumumab vedotin(GPNMB)、替伊莫单抗(CD20)、Icrumumab(VEGFR-1)、伊戈伏单抗(CA-125)、Indatuximab ravidansine(SDC1)、Intetumumab(CD51)、奥英妥珠单抗(CD22)、伊匹单抗(CD152)、Iratumumab(CD30)、拉贝珠单抗(CEA)、来沙木单抗(TRAIL-R2)、利韦单抗(乙型肝炎表面抗原)、林妥珠单抗(CD33)、Lorvotuzumab mertansine(CD56)、鲁卡木单抗(CD40)、鲁昔单抗(CD23)、马帕木单抗(TRAIL-R1)、马妥珠单抗(EGFR)、美泊利单抗(IL-5)、Milatuzumab(CD74)、米妥莫单抗(GD3神经节苷脂)、Mogamulizumab(CCR4)、Moxetumomab pasudotox(CD22)、他那可单抗(C242抗原)、他那莫单抗(5T4)、Narnatumab(RON)、Necitumumab(EGFR)、尼妥珠单抗(EGFR)、纳武单抗(IgG4)、奥法木单抗(CD20)、Olaratumab(PDGF-Ra)、Onartuzumab(人分散因子受体激酶)、Oportuzumab monatox(EpCAM)、奥戈伏单抗(CA-125)、Oxelumab(OX-40)、帕尼单抗(EGFR)、Patritumab(HER3)、Pemtumomab(MUC1)、帕妥珠单抗(HER2/neu)、平妥单抗(腺癌抗原)、普托木单抗(波形蛋白)、Racotumomab(N-羟乙酰神经氨酸)、Radretumab(纤连蛋白额外结构域-B)、雷韦单抗(狂犬病病毒糖蛋白)、雷莫芦单抗(VEGFR2)、Rilotumumab(HGF)、利妥昔单抗(CD20)、Robatumumab(IGF-1受体)、Samalizumab(CD200)、西罗珠单抗(FAP)、西妥昔单抗(IL-6)、Tabalumab(BAFF)、他珠单抗(甲胎蛋白)、帕他普莫单抗(CD19)、Tenatumomab(生键蛋白C)、Teprotumumab(CD221)、西木单抗(CTLA-4)、加珠单抗(TRAIL-R2)、TNX-650(IL-13)、托西莫单抗(CD20)、曲妥珠单抗(HER2/neu)、TRBS07(GD2)、替西木单抗(CTLA-4)、西莫白介素单抗(EpCAM)、Ublituximab(MS4A1)、Urelumab(4-1BB)、伏洛昔单抗(整联蛋白 α 5 β 1)、伏妥莫单

抗(肿瘤抗原CTAA16.88)、扎妥木单抗(EGFR)、扎木单抗(CD4)。

[0379] 5. 细胞因子、趋化因子、共刺激分子、融合蛋白

[0380] 本发明的另一个实施方案是组合使用本发明的抗原编码的药物组合物与细胞因子、趋化因子、共刺激分子和/或其融合蛋白以引起有益的免疫调节或肿瘤抑制效果。为了增加免疫细胞向肿瘤中的浸润并促进抗原递呈细胞向肿瘤引流淋巴结的运动,可使用具有C、CC、CXC和CX3C结构的多种趋化因子。一些最有前景的趋化因子是,例如CCR7及其配体CCL19和CCL21,此外,CCL2、CCL3、CCL5和CCL16。另一些实例为CXCR4、CXCR7和CXCL12。此外,共刺激或调节分子,例如B7配体(B7.1和B7.2)是有用的。其他细胞因子也是有用的,例如白细胞介素特别是(例如,IL-1至IL17)、干扰素(例如IFN α 1至IFN α 8、IFN α 10、IFN α 13、IFN α 14、IFN α 16、IFN α 17、IFN α 21、IFN β 1、IFNW、IFNE1和IFNK)、造血因子、TGF(例如,TGF- α 、TGF- β 和TGF家族的其他成员),最后,受体的肿瘤坏死因子家族的成员及其配体以及其他刺激分子,包括但不限于:4-1BB、4-1BB-L、CD137、CD137L、CTLA-4GITR、GITRL、Fas、Fas-L、TNFR1、TRAIL-R1、TRAIL-R2、p75NGF-R、DR6、LT. β .R、RANK、EDAR1、XEDAR、Fn114、Troy/Trade、TAJ、TNFRII、HVEM、CD27、CD30、CD40、4-1BB、OX40、GITR、GITRL、TACI、BAFF-R、BCMA、RELT和CD95(Fas/APO-1)、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白、TNF受体相关的凋亡介导蛋白(TRAMP)和死亡受体6(DR6)。CD40/CD40L和OX40/OX40L是用于联合免疫治疗重要的靶标,因为它们直接作用于T细胞存活和增殖。综述参见Lechner等2011:Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. Immunotherapy 3 (11), 1317-1340。

[0381] 6. 细菌处理

[0382] 研究人员一直使用厌氧细菌,例如诺维氏梭状芽孢杆菌(*Clostridium novyi*)来消耗贫氧(oxygen-poor)肿瘤的内部。当厌氧细菌与肿瘤的氧化侧接触时,它们就死亡,这意味着它们对身体其余部分是无害的。另一个策略是利用已转化有可以将无毒前药转换为有毒药物之酶的厌氧细菌。随着细菌在肿瘤的坏死区和低氧区的增殖,所述酶仅在肿瘤中表达。因此,全身性应用的前药仅在肿瘤中代谢为有毒药物。已用非致病性厌氧菌生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)证明这是有效的。

[0383] 7. 激酶抑制剂

[0384] 用于补充性癌症治疗的另一大组潜在靶标包括激酶抑制剂,原因是癌细胞的生长和存活与激酶活性的失调密切相关。为了恢复正常激酶活性,从而减少肿瘤生长,正在使用广泛的抑制剂。靶向的激酶的组包括受体酪氨酸激酶,例如BCR-ABL、B-Raf、EGFR、HER-2/ErbB2、IGF-IR、PDGFR- α 、PDGFR- β 、c-Kit、Flt-4、Flt3、FGFR1、FGFR3、FGFR4、CSF1R、c-Met、RON、c-Ret、ALK;细胞质酪氨酸激酶,例如c-SRC、c-YES、Ab1、JAK-2;丝氨酸/苏氨酸激酶,例如ATM、Aurora A&B、CDK、mTOR、PKC ι 、PLK、b-Raf、S6K、STK11/LKB1和脂质激酶,例如PI3K、SK1。小分子激酶抑制剂,例如PHA-739358、尼罗替尼、达沙替尼和PD166326、NSC 743411、拉帕替尼(GW-572016)、卡奈替尼(CI-1033)、司马沙尼(semaxinib)(SU5416)、瓦他拉尼(PTK787/ZK222584)、Sutent(SU11248)、索拉非尼(BAY 43-9006)和来氟米特(SU101)。更多的信息参见例如Zhang等2009:Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer 9,28-39。

[0385] 8. Toll样受体

[0386] Toll样受体(TLR)家族的成员是先天免疫和适应性免疫的重要纽带且许多佐剂的作用依赖TLR的活化。大量针对癌症已建立的疫苗并入TLR的配体以加强疫苗应答。除TLR2之外,已经检验了TLR3、TLR4特别是TLR7和TLR8在被动免疫治疗方法中用于癌症治疗。密切相关的TLR7和TLR8通过影响免疫细胞、肿瘤细胞和肿瘤微环境而有助于抗肿瘤应答,并且可被核苷类似物结构活化。全部TLR都已用作独立的免疫治疗或癌症疫苗佐剂,并且可与本发明的制剂和方法协同组合。更多的信息参见van Duin等2005:Triggering TLR signaling in vaccination.Trends in Immunology,27 (1) :49-55。

[0387] 9. 血管生成抑制剂

[0388] 除了靶向受肿瘤介导的逃逸机制(escape mechanism)和免疫抑制影响之免疫调节受体的治疗,还有靶向肿瘤环境的治疗。血管生成抑制剂阻止了肿瘤生存所需要之血管的广泛生长(血管生成)。例如,可通过靶向不同的分子来阻断为满足肿瘤细胞增加的养分和氧气需求而促进的血管生成。可与本发明组合的血管生成介导的分子或血管生成抑制剂的非限制性实例是可溶性VEGF(VEGF同工型VEGF121和VEGF165、受体VEGFR1、VEGFR2和共受体神经毡蛋白-1和神经毡蛋白2)1和NRP-1、血管生成素2、TSP-1和TSP-2,制管张素(angiostatin)和相关分子、内皮抑制素、血管形成抑制素、钙网蛋白、血小板因子4、TIMP和CDAI、Meth-1和Meth-2、IFN- α 、IFN- β 和IFN- γ 、CXCL10、IL-4、IL-12和IL-18、凝血酶原(三环结构域-2)、抗凝血酶III片段、催乳素、VEGI、SPARC、骨桥蛋白、乳腺丝抑蛋白、血管能抑素(canstatin)、增殖蛋白相关蛋白、静息蛋白(restin)和药物例如贝伐珠单抗、伊曲康唑、羧胺三唑、TNP-470、CM101、IFN- α 、血小板因子-4、苏拉明、SU5416、血小板反应蛋白、VEGFR拮抗剂、血管生成抑制类固醇+肝素、软骨衍生的血管生成抑制因子、基质金属蛋白酶抑制剂、2-甲氧基雌二醇、tecogalan、四硫钼酸盐、沙利度胺、血小板反应蛋白、催乳素 α V β 3抑制剂、利诺胺、塔喹莫德(tasquinimod),综述参见Schoenfeld和Dranoff 2011:Anti-angiogenesis immunotherapy.Hum Vaccin. (9) :976-81。

[0389] 10. 小分子靶向治疗药物

[0390] 小分子靶向治疗药物通常是癌细胞内之在突变的、过表达的或其他关键蛋白质上酶促结构域的抑制剂。突出的和非限制性的实例是酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼(Gleevec/Glivec)和吉非替尼(Iressa)。在先前的专利申请US2009004213中也描述了使用靶向某些激酶的小分子(例如苹果酸舒尼替尼和/或甲苯磺酸索拉非尼)与疫苗组合用于癌症治疗。

[0391] 11. 基于病毒的疫苗

[0392] 有许多可用的或正在开发的基于病毒的癌症疫苗可与本发明的制剂一起用于组合的治疗方法。使用这类病毒载体的一个优点在于其引发免疫应答的固有能力,作为产生免疫活化所需的危险信号之病毒感染的结果出现炎性反应。理想的病毒载体应该是安全的,并且不应该引入抗载体免疫应答以使得加强抗肿瘤特异性应答。重组的病毒例如痘苗病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和禽痘病毒已用于动物肿瘤模型中且基于其令人鼓舞的结果,已经开始了人体临床试验。特别重要的基于病毒的疫苗是病毒样颗粒(VLP),其是包含来自病毒外层外壳之某些蛋白质的小颗粒。病毒样颗粒不含有来自病毒的任何遗传物质并且不会引起感染,但是它们可被构建以呈递在其外壳上的肿瘤抗原。VLP可衍生自多种病毒,例如乙肝病毒或其他病毒科,包括细小病毒科(Parvoviridae)(例如腺相关病毒)、逆转录病毒科(Retroviridae)(例如,HIV)和黄病毒科(Flaviviridae)

(例如,丙型肝炎病毒)。一般性综述参见Sorensen和Thompson 2007:Virus-based immunotherapy of cancer:what do we know and where are we going?APMIS 115(11):1177-93;针对癌症的病毒样颗粒在Buonaguro等2011:Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer.Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83;和Guillén等2010:Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants:application to chronic disease,cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies.Procedia in Vaccinology 2(2),128-133中进行了综述。

[0393] 12.多表位策略

[0394] 多表位的使用显示了接种疫苗的有前景成果。结合智能算法系统的快速测序技术使得能够利用肿瘤突变组 (mutanome) ,并且可为与本发明组合的个性化疫苗提供多表位。更多的信息参见2007:Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides.J Immunother 30:762-772;此外,Castle等2012:Exploiting the mutanome for tumor vaccination.Cancer Res 72(5):1081-91。

[0395] 13.过继T细胞转移

[0396] 例如,在Rapoport等2011:Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma.Blood 117(3):788-97中描述了肿瘤抗原接种疫苗和T细胞转移的组合。

[0397] 14.基于肽的靶向治疗

[0398] 肽可与细胞表面受体或在肿瘤周围受影响的胞外基质结合。如果核素在细胞附近衰变,则与这些肽(例如,RGD)连接的放射性核素最终杀伤癌细胞。这些结合基序的寡聚体或多聚体特别受到极大的关注,原因是其可导致增强的肿瘤特异性和亲合力。对于非限制性实例,参见Yamada2011:Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer,bladder cancer, and malignant glioma.Nihon Rinsho 69(9):1657-61。

[0399] 15.其他治疗

[0400] 还有许多其他的癌症治疗可与本发明组合以产生协同效应。非限制性的实例是靶向凋亡的治疗、高热(hyperthermia)、激素治疗、端粒酶治疗、胰岛素增强治疗、基因治疗和光动力治疗。

[0401] 本领域中已知的多种方法可用于检测和/或确定表达CLDN6的细胞的量。

[0402] 例如,免疫测定可用于检测细胞中或在细胞表面上之CLDN6蛋白的表达。根据本发明,免疫测定包括但不限于:western印迹、免疫组织化学、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、免疫荧光、蛋白A免疫测定、流式细胞术或FACS分析。

[0403] 在一个实施方案中,在检测和/或测定量之前使细胞与能够结合CLDN6的一个或更多个标记的抗体结合。

[0404] 或者,可检测CLDN6 mRNA的表达或可确定CLDN6 mRNA的量以检测和/或测定表达

CLDN6的细胞的量。

[0405] 在本发明的某些实施方案中,用于检测和/或测定表达CLDN6的细胞的量之从患者获得的样品是生物流体,其包括但不限于:血液、骨髓、血清、尿或组织间液(interstitial fluid)。在另一些实施方案中,来自患者的样品是组织样品(例如,来自具有或怀疑具有癌性组织之对象的组织活检物)。最优先地,所述样品是肿瘤的组织活检物。

[0406] 根据本发明的方法,样品可以是在检测和/或测定表达CLDN6的细胞的量之前已经经过一个或更多个预处理步骤的生物样品。在某些实施方案中,生物流体是通过离心、过滤、沉淀、透析或层析,或通过这些预处理步骤的组合进行预处理。在另一些实施方案中,组织样品通过冷冻、化学固定、石蜡包埋、脱水、透化(permeabilization)或均质化,之后通过离心、过滤、沉淀、透析或层析或通过这些预处理步骤的组合进行预处理。

[0407] 样品中癌症干细胞的量可表示为,例如样品中全部细胞或全部癌细胞的百分比或相对于面积(例如,每个视野中的细胞)、体积(例如,每ml的细胞)或重量(例如,每ml的细胞)进行定量。

[0408] 可将测试样品中癌症干细胞的量与(a)参照样品中癌症干细胞的量进行比较。在一个实施方案中,参照样品是从更早的时间点(例如,在接受作为基线参照样品的治疗之前,或者在接受治疗时的较早的时间点)进行治疗的对象获得的样品。在该实施方案中,治疗的期望结果是与参照样品相比,导致测试样品中癌症干细胞的量降低。在另一个实施方案中,参照样品从没有可检测到的癌症的健康对象获得,或从对相同类型的癌症处于缓解期的患者获得。在该实施方案中,治疗的期望结果是测试样品具有与参照样品中检测到的癌症干细胞相同量的癌症干细胞或者少于参照样品中检测到的癌症干细胞的量。在一个具体的实施方案,相对于较早对于对象确定的(先前检测的)癌症干细胞量,癌症干细胞的量的稳定或降低表明对象预后的改善或对治疗的积极响应,然而相对于较早的癌症干细胞量的增加则表明相同或更差的预后,和/或对治疗响应的失败。

[0409] 在一些实施方案中,使用细胞表面标志物(例如CLDN6)与癌症干细胞典型的其他标志物的组合以确定样品中癌症干细胞的量。

[0410] 本发明还提供了包含一个或更多个容器的药盒,所述容器填充有用于检测、测定量或监测表达CLDN6的细胞的试剂。在一个实施方案中,所述药盒任选地包含使用试剂(特别是使用本发明方法中的试剂)通过检测和/或测定表达CLDN6的细胞的量来测定癌症干细胞或监测癌症治疗效力的说明书。在一个实施方案中,所述药盒包含与CLDN6蛋白质或CLDN6 mRNA特异性结合的药剂。在一些实施方案中,所述药剂是抗体或抗体片段。在另一些实施方案中,所述药剂是核酸。对于核酸检测,所述药盒一般包含(但不限于)对CLDN6 mRNA特异的探针。对于定量PCR,所述药盒一般包含对CLDN6核酸序列特异的预选引物。定量PCR药盒还可包含适用于扩增核酸的酶(例如,聚合酶,如Taq)以及用于扩增反应混合物所需的脱氧核苷酸和缓冲液。定量PCR药盒还可包含对CLDN6核酸序列特异的探针。在一些实施方案中,定量PCR药盒还包含适用于逆转录RNA的组分,所述组分包含用于逆转录反应的酶(例如,逆转录酶)和引物以及逆转录反应所需的脱氧核苷酸和缓冲液。

[0411] 在某些实施方案中,所述药剂被可检测地标记。此外,所述药盒可包含用于进行测定和用于解释和分析测定性能所产生之数据的说明书。

[0412] 基于所获得的结果(即,无论癌症干细胞是否存在或癌症干细胞的量是否稳定或

降低),医务人员可以选择特别的癌症治疗,例如,针对癌症干细胞的癌症治疗,或者可以选择继续所述治疗。或者,基于该结果,不存在癌症干细胞或癌症干细胞的量没有增加,则医务人员可以选择施用不针对癌症干细胞的癌症治疗或者继续、改变或停止所述治疗。

[0413] 在本发明的某些实施方案中,如果确定癌症干细胞群的降低不足以使对从经受癌症治疗的患者中获得的样品中的癌症干细胞群与先前从所述患者中获取的样品进行比较,那么医务人员有多种选择来调整治疗。例如,那么医务人员可提高癌症治疗的剂量、施用的频率、施用的持续时间,或其任意组合。在一个具体的实施方案中,在确定后,可向患者施用另外的癌症治疗来替代第一治疗或者与第一治疗进行组合。

[0414] 在另一些实施方案中,如果确定癌症干细胞群的降低可用于对从经受癌症治疗的患者中获得的样品中的癌症干细胞群与先前从所述患者中获取的样品进行比较,那么医务人员可选择不调整癌症治疗。例如,医务人员可以选择不提高癌症治疗的剂量、施用的频率、施用的持续时间,或其任意组合。另外,医务人员可选择增加另外的治疗或组合治疗。

[0415] 通过以下实施例进一步举例说明本发明,所述实施例不被解释为限制本发明的范围。

实施例

[0416] 实施例1:CLDN6在诱导性人多能干细胞的表面上表达

[0417] 为了分析CLDN6在人诱导性多能干细胞(iPSC)中是否表达,根据在PCT/EP2012/04673中所述的方案,使用重编程混合物(未修饰的OSKMNL+EBK+miR-mix;由OSKMNL的体外转录(IVT)的RNA=转录因子OCT4、SOX2、KLF4、cMYC、NANOG和LIN28,EBK的IVT-RNA=IFN-逃逸蛋白E3、K3和B18R以及由miR-302a/b/c/d和367组成的miRNA mix组成;)或模拟转染的HFF(无RNA的对照),在处理的多个时间点使用ABI PRISM 7300序列检测系统和软件(带有QuantiTect SYBR green Kit(Qiagen)的Applied Biosystems)通过定量实时RT-PCR(qRT-PCR)分析了在新生HFF(人包皮成纤维细胞,System Bioscience)中CLDN6的转录本表达。将细胞在补充有10ng/ml bFGF和0.5μM Thiazovivin的Nutristem无血清培养基(Stemgent, Cambridge(MA))中进行培养。在实验的第一、2、3、4、8、9、10和11天使用Lipofectamine RNAiMAX(Life Technologies)转染重编程混合物。作为对照,将细胞仅用Lipofectamine RNAiMAX进行处理(无RNA的对照)。在处理的第19天,与未经处理的HFF相比,我们检测到CLDN6几乎6000倍的明显上调,而在处理的第12天,我们观察到CLDN6约2000倍的上调(图1)。因此,CLDN6在人诱导性多能干细胞(iPSC)中表达。

[0418] 使用流式细胞术来检查CLDN6是否也在iPSC的表面上表达。由于iPSC在HFF饲养细胞上生长,我们结合对SSEA-4(一种广泛接受的干细胞标志物)的染色分析以确保能特异性地检测到iPSCs。为此目的,在处理的第5、12和19天收集用重编程混合物或模拟对照(无RNA)处理的HFF细胞,并用1μg/ml CLDN6特异的IMAB027-AF647和2μl SSEA-4抗体于4℃下染色30分钟并通过流式细胞术分析表面表达。在我们的染色方案中还包括生存力染料(Viability Dye)7-AAD以使得从我们的分析中排除死细胞。实验重复两次并使用BD Canto II流式细胞仪从每个样品记录50.000个事件。利用FlowJo软件分析记录的细胞且示出代表性点图(图2)。

[0419] 在第5天,在用重编程混合物或未用其处理的HFF的表面上均检测不到CLDN6。出乎

意料的是,我们发现不论用重编程混合物处理与否,15%的HFF表达SSEA-4。这可通过以下事实来解释,使用的HFF是新生成纤维细胞且可能这些细胞保留对SSEA-4的某些阳性。在处理的第12天,约63%经处理的HFF对SSEA-4呈阳性并且我们观察到约15%的CLDN6-SSEA-4双阳性级分。在处理的第19天,15%经处理的HFF对CLDN6和SSEA-4呈阳性,代表不同的亚群。推测CLDN6-SSEA-4阳性亚群仅仅标记iPSC,而CLDN6-SSEA-4阴性亚群则被看作是HFF饲养细胞或不是重编程的细胞,而SSEA-4单阳性细胞表示在重编程开始时的细胞。

[0420] 由于我们发现15%的HFF细胞对SSEA-4为阳性,但对CLDN6不是,因此推测相比于SSEA-4,CLDN6代表了对人iPSC更特异的标志物。SSEA-4也在新生HFF中表达,而CLDN6似乎仅在代表iPSC级分的全部重编程HFF细胞中特异地表达。

[0421] 因此,CLDN6在人iPSC的表面上特异性地表达。

[0422] 实施例2:CLDN6对卵巢癌细胞的集落形成重要

[0423] 分析肿瘤细胞的CSC样特性的有效测定是集落形成测定。使用该测定,可容易地检查单肿瘤细胞的自我更新能力和肿瘤形成效力。为了分析CLDN6在肿瘤形成中是否发挥作用,我们一方面选择COV318,一种仅显示CLDN6阳性细胞亚群的卵巢肿瘤细胞系,而另一方面选择PA-1,一种均匀地CLDN6表达细胞系,其携带稳定的慢病毒小发夹RNA(shRNA),所述小发夹RNA介导CLDN6的敲减(knockdown)(克隆PA-1 50,PA-1 54);参照图3。

[0424] 将细胞用1 μ g/ml IMAB027-AF647针对CLDN6于4°C下染色30分钟,之后使用BD FACSAria细胞分选仪通过FACS(荧光激活的细胞分选)进行关于其CLDN6表达的分选。CLDN6阳性或阴性亚群的500(PA-1 50、PA-1 54)或700(COV318)个细胞直接分选进6孔板的孔中并使其生长至14天,直到形成足够的集落。每周两次更换培养基。将集落用含0.5%结晶紫的10%乙醇染色并固定20分钟,用蒸馏水洗涤三次并使其空气干燥。拍摄照片并对集落进行手工计数。认为至少50个细胞是一个集落。在图4中,示出了COV318和CLDN6-敲减细胞系PA-1 50和54细胞的代表性集落形成测定。

[0425] 有趣的是,在这两种细胞系中,与CLDN6阳性细胞相比,CLDN6阴性细胞显示出显著更低的集落形成。从这些结果,我们得出结论,CLDN6在集落形成能力中发挥重要的作用,集落形成能力是癌症干细胞的重要特征。

[0426] 实施例3:在卵巢癌细胞系中CLDN6与CSC标志物CD24、CD90和CD44共表达

[0427] 特定的表面标志物表达谱的使用是用于从实体肿瘤和细胞系中鉴定和分离CSC的常见策略。在文献中用于从卵巢癌分离CSC的表面标志物包括CD44、CD24、CD90、CD34、CD117和CD133。为了分析我们是否可以在其中含有小CLDN6阳性细胞亚群的卵巢癌细胞系中鉴定出CSC亚群,我们建立了包含针对这些表面标志物之抗体的FACS组(表1)。此外,我们还涵盖了检测所述组中的CLDN6抗体以研究CLDN6与已建立的CSC标志物共定位的百分比,从而判断CLDN6充当CSC标志物的潜力。为此目的,将细胞系COV318的1E6细胞用指定的抗体量(见表1)于4°C下染色30分钟,之后通过流式细胞术分析其表面标志物的表达谱。在我们的染色方案中我们还涵盖了生存力染料eFluor® 506以使得从我们的分析中排除死细胞。实验进行三次重复并使用BD Canto II流式细胞仪从每个样品中记录50.000个事件。使用FlowJo软件分析记录的细胞。

表面标志物	抗体的量/测试物	抗体的荧光染料
CD44	5 μ l/100 μ l测试物	FITC
CD133/1	2 μ l/100 μ l测试物	PE
CD90	2.5 μ l/100 μ l测试物	PerCP-Cy™ 5.5
[0428]	CD117 1 μ g/100 μ l测试生物素 0.05 μ g/100 μ l测试SA	APC-Cy7
	CD34 5 μ l/100 μ l测试物	Brilliant Violet™ 421
	CD24 2 μ l/100 μ l测试物	PE-Cy7
	CLDN6 0.25 μ l/100 μ l测试物	Alexa Fluor® 647
	活细胞/死细胞 0.2 μ l/200 μ l PBS	可固定的生存力染料 eFluor®506

[0429] 表1:CSC FACS组。示出了用于分析卵巢癌细胞系中之CSC标志物和CLDN6表达的FACS组。列出了用于相应标志物之抗体的量和偶联的荧光染料。

[0430] FACS分析显示COV318细胞表达CSC标志物CD44、CD90和CD24亚群以及CLDN6与所有三个标志物至少部分共定位(图5A)。然后,我们使用不同的设门策略来计算所有四个标志物共定位的百分比。首先,我们计算了整个活细胞群中CD44、CD24、CD90与CLDN6阳性细胞的百分比。我们发现0.18%的活细胞对所有四个标志物是阳性的。然后,我们计算了活细胞群中CD44、CD24和CD90阳性细胞的百分比,这可代表CSC级分。我们发现,当使其相对于整个活细胞群时,0.23%的细胞对所有三个标志物是阳性的,然而,当设定成相对于CLDN6阳性亚群时,我们发现20.1%的细胞级分是三重阳性的,表明在CLDN6阳性亚级分中有87倍浓度的3种标志物。在最后一步中,我们一方面计算了CLDN6阳性细胞在整个活细胞群中的百分比,在另一方面计算了其在CD44/CD24/CD90阳性亚群中的百分比。我们发现表达CLDN6的细胞的浓度从整个细胞群中的0.91%变为CSC级分中的66.87%,表明增加了74倍(图5B)。

[0431] 总之,这些数据表明CLDN6在CSC级分中累积,反之CSC标志物在CLDN6阳性亚群中富集。这些发现表明CLDN6是CSC的标志物。

[0432] 实施例4:表达CLDN6的细胞的富集导致已建立的CSC标志物CD44、CD24和CD90的累积

[0433] 已示出细胞系和肿瘤中分离的CSC级分常富含CSC标志物,例如CD44和CD24。为了分析CLDN6充当新CSC标志物的潜力,我们研究了大批细胞中的CLDN6阳性级分细胞分离物是否导致已建立的卵巢CSC标志物的累积。

[0434] 为此目的,用0.5 μ g/ml IMAB027将COV318细胞于4°C下染色30分钟,然后在4°C下,与山羊抗人IgG二抗(1:300)孵育10分钟,之后使用BD FACSaria细胞分选仪通过FACS分选从COV318细胞中分离CLDN6阳性和CLDN6阴性细胞级分。然后使选择的细胞在标准生长条件下扩增10天。将这两个亚群的1E6细胞于4°C下针对CSC标志物CD44、CD24、CD90、CD34、CD117和CD133染色30分钟(具体参见表1)并通过流式细胞术分析其表面标志物的表达谱。使用BD Canto II流式细胞仪从每个样品中记录50.000个事件,并使用FlowJo软件分析记录的细

胞。

[0435] FACS分析显示,在标准条件下培养10天后,CLDN6-阳性分选的级分中约50%的细胞仍然对CLDN6呈阳性,而CLDN6阴性分选的细胞对CLDN6是完全阴性的。重要的是,我们发现,与COV318细胞的CLDN6阴性细胞级分相比,CLDN6阳性级分示出CSC标志物CD44、CD24和CD90的累积。不同样品的代表性点图示于图6A中。对这些标志物表达水平的进一步量化揭示当将CLDN6阳性和CLDN6阴性亚群进行比较时,CD44有99倍富集、CD90有8倍富集而CD24有33倍富集(图6B)。

[0436] 这些结果证明,CLDN6可用作从大量细胞系中分离CSC级分的选择标志物,表明CLDN6是新CSC标志物。

[0437] 实施例5:与CLDN6低表达细胞相比,CLDN6高表达细胞系示出CSC标志物的富集

[0438] 已显示CLDN6在生殖细胞肿瘤、卵巢腺癌和一些具有原始表型(primitive phenotype)的癌症中高度表达。在CLDN6是CSC标志物的情况下,我们会期望在这样的细胞系或肿瘤中累积具有CSC样特征的细胞,因此累积CSC标志物阳性细胞。

[0439] 我们研究了4个CLDN6高表达细胞系:卵巢癌细胞系OV90和PA-1以及睾丸癌细胞系NEC-8和NEC-14之已建立的CSC标志物的表达水平。为此目的,每个细胞系的1E6细胞针对表面标志物CD44、CD24、CD90、CD34、CD117和CD133以及CLDN6于4°C下染色30分钟(具体参见表1)并且然后通过流式细胞术分析细胞的表达谱。实验进行三次重复,使用BD Canto II流式细胞仪从每个样品中记录50.000个事件并使用FlowJo软件分析记录的细胞。通过用生存力染料eFluor®506进行复染色从分析中排除死细胞。各个样品的代表性点图示于图7中。

[0440] FACS分析显示,所有经研究的细胞系约95%对CLDN6为阳性。如所预期的,除了CLDN6外,这些CLDN6高表达细胞系也示出已建立的CSC标志物的累积,其中OV90细胞示出CD44、CD133、CD24和CD117的高表达,PA-1细胞示出CD44、CD133、CD90和CD117的高表达,而NEC-8和NEC-14细胞示出标志物CD133、CD90、CD24和CD117升高的表达水平。

[0441] 这些结果表明,CLDN6高表达细胞系富含CSC样细胞,并进一步支持了CLDN6是CSC标志物。

[0442] 实施例6:用CLDN6抗体与化学治疗药物的组合对晚期人异种移植肿瘤的治疗以协同的方式抑制了肿瘤细胞生长并延长了存活

[0443] 将人癌细胞系移植到Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠。肿瘤建立后,将荷瘤小鼠分组,并使其接受CLDN6特异性单克隆抗体(IMAB027)、化学治疗药物或两者的组合。对照组接受抗体缓冲液(载剂对照)。

[0444] 具体而言,对于人ES-2(CLDN6)异种移植肿瘤的治疗,在37°C下于具有5%CO₂的湿润培养箱中,将稳定转染有人CLDN6的人卵巢癌细胞系ES-2在含有1×非必需氨基酸溶液(Life Technologies)、700μg/ml G418(Life Technologies)和10%FCS(Life Technologies)的最小必需培养基(Life Technologies)中进行培养。对于移植,向6周大的雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠的肋中皮下接种在200μl PBS中的5×10⁶ES-2(CLDN6)细胞。在皮下肿瘤接种后第3天,用盐水对照组、抗体组或药物单一治疗组和抗体/细胞生长抑制药物组合治疗组治疗小鼠(n=12每组)。在移植后第3、10和17天施用15mg/kg的紫杉醇或盐水对照。在第4天开始抗体维持治疗,以每周三次快速推注35mg/kg IMAB027或载剂对照(IMAB027缓冲液)(以i.v./i.p./i.p.交替进行)。每周两次监测肿瘤负荷和动物健康。当肿

瘤体积达到最大 1400mm^3 或当肿瘤变成溃疡性时,处死小鼠。使用Kruskal-Wallis检验和事后Dunn多重比较检验来分析肿瘤生长的抑制。

[0445] 对于晚期人NEC14异种移植肿瘤的治疗,根据供应商的说明书,在 37°C 下具有5% CO_2 的湿润培养箱中,在含有10%FCS(Life Technologies)的RPMI 1640培养基GlutaMAX™(Life Technologies)中培养人睾丸生殖细胞肿瘤细胞系NEC14。对于移植,向6-8周大的雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠的胁中皮下接种在 $200\mu\text{l}$ PBS中的 2×10^7 NEC14细胞。在晚期治疗研究中,肿瘤生长至体积为 50mm^3 至 150mm^3 并在治疗前将小鼠分为对照组、抗体组或细胞生长抑制药物单一治疗组和抗体/细胞生长抑制药物组合治疗组($n=19$ 每组)。移植后6天,按照以下施用单独的药物或组合或载剂对照(盐水):在第6、7、8、9和10天i.p.快速推注 $1\text{mg}/\text{kg}$ 的顺铂注射剂;在第6、13和20天i.p.快速推注 $30\text{mg}/\text{kg}$ 的卡铂以及抗体维持治疗,每周三次抗体快速推注 $35\text{mg}/\text{kg}$ IMAB027或载剂对照(IMAB027缓冲液)(以i.v./i.p./i.p.交替进行)。每周两次监测肿瘤负荷。当肿瘤体积达到最大 1400mm^3 时或当肿瘤变成溃疡性时,处死小鼠。使用Kruskal-Wallis检验和事后Dunn多重比较检验来分析肿瘤生长的抑制。

[0446] 与对照组相比,用紫杉醇治疗异位表达人CLDN6的人ES-2(CLDN6)异种移植肿瘤没有效果且没有示出抗肿瘤活性。与此相反,IMAB027抑制小鼠中的肿瘤生长并延长存活。用IMAB027与紫杉醇的组合治疗协同地抑制肿瘤生长(图8)。

[0447] 此外,顺铂和IMAB027两者作为单一药剂能够明显降低具有NEC14肿瘤动物中肿瘤的生长。然而,在最初的肿瘤生长抑制后,我们在大多数动物中观察到复发的肿瘤生长。在组合治疗的方法中,顺铂和IMAB027协同作用,不仅抑制肿瘤的生长,而且引起完全的NEC14肿瘤消退(remission)。最令人印象深刻地,存活数据示出了IMAB027与顺铂组合的治疗效力。与单药剂方法相比,几乎所有用IMAB027与顺铂一起治疗的小鼠在肿瘤移植后仍存活90天(图9)。

[0448] 在具有NEC14异种移植肿瘤的小鼠的晚期治疗中,其他铂衍生物(例如卡铂)仅示出非常有限的抗肿瘤功效。然而,卡铂与IMAB027的组合导致协同的肿瘤抑制效应,以及高效的肿瘤生长抑制和存活的延长(图10)。

[0449] 因此,CLDN6特异性抗体与化学治疗药物的组合增加了对肿瘤生长的抑制,并延长了移植有人肿瘤细胞之小鼠的存活。抗体与化学治疗药物的组合产生了对于抑制肿瘤细胞生长和延长存活的协同效应。

[0450] 实施例7:CLDN6是CSC标志物

[0451] 实施例7.1:CLDN6对于卵巢癌细胞的球体形成行为(spheres forming behavior)重要

[0452] 分析肿瘤细胞的CSC样特性的另一个有效测定是球体形成测定。使用该测定,可容易地检查细胞锚定非依赖性生长(CSC的典型特征)的能力。为了分析CLDN6在肿瘤细胞的锚定非依赖性生长中是否发挥作用,我们选择COV318细胞(仅包含CLDN6阳性细胞亚群的卵巢肿瘤细胞系)。针对其CLDN6表达来分选COV318细胞并使得CLDN6阳性和阴性细胞群在干细胞特定的条件下历时21天来形成球体。球体形成测定显示,当在干细胞特定的条件下培养时,CLDN6阳性COV318细胞显示出形成球体的能力,而CLDN6阴性细胞几乎完全死亡(图11A)。这些结果表明,CLDN6阳性级分代表了干细胞富集群体,其表现出锚定非依赖性生长的能力。

[0453] 为了确定CLDN6阳性COV318细胞经过很多细胞分裂的周期,同时保持其未分化状态的能力,我们分析了球体产生第二代球体的能力。为此目的,将CLDN6阳性COV318细胞的第一代球体(接种后第22天)解离成单个细胞,然后重新铺板。重新铺板后23天,我们可清楚地观察到已经形成了第二代球体,并且这些新形成的球体比初始的第一代球体在形态上更规则(图11B)。这些观察进一步证实COV318细胞的CLDN6阳性级分代表该细胞系的干细胞级分。

[0454] 总之,这些结果清楚地表明CLDN6在卵巢癌细胞的锚定非依赖性生长(其是癌症干细胞的重要特征)中发挥显著的作用。

[0455] 实施例7.2:在用化学治疗药物体外处理后,CLDN6阳性COV318细胞的富集

[0456] 卵巢癌细胞系COV318显示了CLDN6的异源表达且非常小的细胞亚群($\sim 0.3\text{-}0.5\%$)表达CLDN6。在各种情况下,用铂衍生物体外处理COV318细胞产生具有较高CLDN6阳性细胞百分比($>2\%$)的残余细胞群(图12)。CLDN6阳性细胞在处理后特异性累积表明这些细胞在化学治疗期间可能具有选择性存活或生长优势。对常规化学治疗的抗性是CSC的一个特征。

[0457] 实施例7.3:CLDN6阳性COV318细胞在体内的富集

[0458] 在先前的研究中,我们发现经皮下注射到无胸腺裸鼠肠中的COV318细胞是弱致瘤性的。与此相反,通过腹膜内注射而接受COV318细胞的小鼠在100多天内产生恶性腹水和腹膜肿瘤。与亲本COV318细胞(图13A)相比,从腹水和肿瘤中分离的大部分细胞呈CLDN6阳性(图13B,上图)。在标准条件下培养后,COV318细胞再次丧失体外的CLDN6表达(图13B,下图)。这意味着CLDN6阳性COV318细胞表现出更高的肿瘤形成能力,表明小CLDN6阳性亚群包含CSC。

[0459] 实施例7.4:CLDN6与在原发性肿瘤样品中的卵巢癌症干细胞标志物相关

[0460] 因为我们先前的结果示出CLDN6与卵巢癌细胞系的一些CSC标志物共定位,因此我们下一步提出了这样的问题:CLDN6表达是否也与来自卵巢癌患者之原发性肿瘤样品中的CSC标志物相关。

[0461] 为此目的,通过qRT-PCR在42个人卵巢癌样品中分析了CLDN6和在文献中描述的在卵巢癌中为癌症干细胞特异性的选定标志物(CTCFL、LIN28B、CD24、GNL3、EpCAM、CD44、ABCG2、ALDH1A1、AMACR、ATXN1、BMI1、BMP4、CD34、CD117、Myd88、Nanog、Notch1、Pou5F1、CD133、Snail1、Sox2)的mRNA表达。使用Spearman的r.散点图(Spearman's r.Scatter plots)进行CLDN6与这些标志物的后续相关性分析。来自显著相关性的散点图以及所有相关性的总结示于图14中。

[0462] 在经分析的卵巢癌样品中,发现CLDN6与CTCFL、LIN28B、CD24、GNL3和EPCAM正相关,而发现CD44与CLDN6负相关(图14A)。对于所有其他经研究的标志物,没有观察到显著的相关性(图14B)。

[0463] 这些结果进一步支持了CLDN6是CSC标志物。

[0464] 实施例8:通过与化学治疗药物的组合增强了抗CLDN6抗体的抗肿瘤活性

[0465] 实施例8.1:化学治疗剂对IMAB027介导的ADCC的影响

[0466] 用COV362(Luc)细胞分析了化学治疗剂对IMAB027介导的ADCC的影响,分别用卡铂、吉西他滨、紫杉醇、多柔比星和拓扑替康对其进行了预处理。如通过流式细胞术所示,靶

细胞的预处理导致细胞表面上CLDN6蛋白水平的提高(图15B、D、F、H和J)。与未经处理的靶细胞相比,用化学治疗剂处理之细胞的最大细胞裂解增加至3倍(图15A、C、F、G和I)。总之,与化学治疗药物的组合可增强IMAB027的抗肿瘤活性。

[0467] 实施例8.2:多化学治疗PEB(顺铂、依托泊苷和博来霉素)与IMAB027的组合高效地增加了对肿瘤生长的抑制并延长了移植有人肿瘤细胞系NEC14之小鼠的存活

[0468] Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠经皮下移植人睾丸生殖细胞肿瘤细胞系NEC14。将具有非常晚期肿瘤的小鼠随机分组并用抗体IMAB027、多化学治疗PEB(顺铂、依托泊苷和博来霉素)或IMAB027与PEB的组合进行治疗。

[0469] 与未治疗以及IMAB027治疗的小鼠相比,多化学治疗非常明显地降低了肿瘤生长(图16A)。然而,在肿瘤最初对PEB治疗响应后,在第30天,在大多数动物中肿瘤开始生长。只有在其中PEB与IMAB027一起协同作用的组合方法中实现了对肿瘤生长的持续抑制(图16B)。未治疗的小鼠显示出30天的中值存活,而在IMAB027和PEB分别治疗的小鼠中观察到34和97天的中值存活。在用PEB治疗的组中,在研究结束时,3/14(21%)的小鼠显示出完全的肿瘤消退,1/14(7%)的小鼠呈现出~30mm³的残留肿瘤块。出人意料地是,在12/14(86%)用PEB与IMAB027组合治疗的小鼠中观察到肿瘤完全消退。治愈了11只小鼠,在6个月内无任何复发,对一只无瘤小鼠在第93天进行了安乐死,原因是不良的整体健康状况(图16C)。该研究表明,与单独用多化学治疗治疗的动物相比,接受了PEB与IMAB027组合的具有非常晚期人NEC14睾丸肿瘤的动物具有显著更长的存活和显著更高的响应率。

[0470] 实施例9:抗CLDN6抗体-药物缀合物在治症表达CLDN6的肿瘤中非常有效

[0471] 实施例9.1:毒素缀合的IMAB027的体外结合和抗肿瘤活性

[0472] 使用流式细胞术在卵巢癌细胞系OV90上测试了IMAB027-药物缀合物IMAB027-DM1和IMAB027-vcMMAE的相对结合亲和力。在饱和结合实验中,将抗体的浓度对中值荧光强度(MFI)和EC50(在平衡时与一半结合位点结合的抗体浓度)作图,并且通过非线性回归计算最大结合。与非缀合的IMAB027相比,IMAB027-药物缀合物显示出类似的低EC50值并且在低浓度下实现了结合的饱和(图17A)。使用XTT增殖测定用OV90细胞测定了IMAB027-药物缀合物的细胞毒活性。剂量-响应曲线显示了IMAB027-DM1和IMAB027-vcMMAE在体外对肿瘤细胞生长的类似抑制(图17B)。总之,与DM1或vcMMAE缀合的IMAB027以类似的相对亲和力与CLDN6阳性靶细胞结合高效诱导了肿瘤细胞的杀伤。

[0473] 实施例9.2:用毒素缀合的IMAB027抗CLDN6抗体对晚期人异种移植肿瘤的治疗抑制了肿瘤细胞生长、延长了存活并介导了完全的肿瘤消退

[0474] 在移植有CLDN6阳性人癌细胞系的小鼠中测试了缀合至细胞毒性药物的CLDN6特异性抗体IMAB027的抗肿瘤活性。在这种靶向方法中,将IMAB027与美登木素生物碱DM1或奥瑞他汀E(MMAE)连接并在具有晚期异种移植肿瘤的无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠中监测肿瘤生长。

[0475] 晚期人OV90卵巢皮下异种移植肿瘤模型的治疗:

[0476] 在具有同源CLDN6表达的晚期人异种移植肿瘤的小鼠中检测毒素缀合的IMAB027的抗肿瘤效果。在肿瘤细胞移植后第10天开始治疗。在i.v.单次快速推注后,IMAB027-DM1和IMAB027-vcMMAE非常明显地抑制了同源表达CLDN6之OV90卵巢癌细胞异种移植物的肿瘤生长(图18和19A)。更重要的是,单次应用16mg/kg IMAB027-vcMMAE导致60%的经治疗小鼠中的肿瘤完全消退(图19B)。

[0477] 晚期人PA-1卵巢皮下异种移植肿瘤模型的治疗:

[0478] 还在具有异源CLDN6表达的晚期异种移植肿瘤模型中测试了毒素缀合的IMAB027的抗肿瘤效果。在皮下移植后,在一定的时间段后,PA-1异种移植肿瘤丧失CLDN6表达(图20C)。在第15天开始治疗。在那时,PA-1异种移植肿瘤开始丧失CLDN6表达。动物通过通过i.v.单次快速推注接受4、8或16mg/kg IMAB027-vcMMAE。对照动物替代地接受未缀合的IMAB027或载剂对照缓冲液。

[0479] 用IMAB027-vcMMAE的治疗非常明显地抑制了PA-1异种移植植物的肿瘤生长并延长了荷瘤小鼠的存活,同时IMAB027或IMAB027-DM1(数据未示出)没有影响PA-1肿瘤生长(图20A和B)。

[0480] 肿瘤块中CLDN6阳性肿瘤细胞水平的降低可能是在该体内肿瘤模型中IMAB027和IMAB027-DM1的弱抗肿瘤活性的原因。IMAB027-DM1通过不可切割的接头与不可透过膜的毒素DM1缀合。与此相反,IMAB027-vcMMAE通过组织蛋白酶可切割的接头与可透过细胞膜的毒素MMAE缀合。细胞处理后,可透过膜形式的MMAE的释放有利于杀伤缺乏特定表位的肿瘤细胞(旁观者效应(bystander effect))。因此,用IMAB027-vcMMAE的治疗在根除含CLDN6阳性
和CLDN6阴性两种细胞的PA-1肿瘤方面非常有效。

[0481] 总之,IMAB027-vcMMAE通过旁观者细胞的靶细胞活化杀伤来非常有效地杀伤了具有异源CLDN6表达的人异种移植肿瘤。

[0482] 晚期人MKN74胃皮下异种移植肿瘤模型的治疗:

[0483] 与在晚期肿瘤中丧失CLDN6表达的PA-1异种移植肿瘤相反,MKN74异种移植肿瘤获得CLDN6表达。如通过使用CLDN6特异性抗体IMAB027的流式细胞术所示,<0.3%的胃癌细胞系MKN74的细胞在体外呈CLDN6阳性。有趣的是,在无胸腺裸鼠中,大量的肿瘤细胞在皮下移植后表现出CLDN6表达(图21C)。用16mg/kg IMAB027-vcMMAE对已建立的MKN74异种移植肿瘤的治疗导致非常显著地抑制了肿瘤生长并延长了存活(图21A和B)。

[0484] 用IMAB027-vcMMAE观察到的肿瘤生长抑制可能由旁观者细胞的靶细胞活化杀伤而引起。

[0485] 晚期人PA-1卵巢腹膜内异种移植肿瘤模型的治疗:

[0486] 除了经皮下注射(s.c.)异种移植肿瘤的治疗之外,还在经腹膜内注射(i.p.)的异种移植肿瘤模型中使用异位表达荧光素酶的PA-1细胞以体内监测来测试毒素缀合的IMAB027抗体的抗肿瘤活性(图22)。在肿瘤细胞移植后第14天,小鼠经i.v.单次快速推注接受16mg/kg IMAB027-DM1或16mg/kg IMAB027-vcMMAE。

[0487] 体内生物发光强度的测量表明在用IMAB027-DM1治疗后,腹膜PA-1转移瘤的肿瘤生长受到抑制。此外,IMAB027-vcMMAE比IMAB027-DM1或载剂显示出显著更高的抗肿瘤效果,在100%的动物中腹膜肿瘤完全消退(图22)。

[0488] 总之,在体内测试的浓度范围中IMAB027-vcMMAE和IMAB027-DM1是非常有效的且没有显示出毒副作用。IMAB027-DM1显著抑制皮下异种移植肿瘤的肿瘤生长并降低腹膜异种移植肿瘤的肿瘤生长。IMAB027-vcMMAE非常显著地抑制了具有同源或甚至异源CLDN6表达的皮下或腹膜人异种移植肿瘤之动物的肿瘤生长并延长其存活。最令人印象深刻的是,在用MMAE缀合的抗体进行治疗后,很大一部分荷瘤动物得到治愈。IMAB027-vcMMAE的优异抗肿瘤活性(特别是在肿瘤表现出异源CLDN6表达的动物体内所观察到的)证明IMAB027-

vcMMAE缀合物适合用于治疗具有低百分比CLDN6阳性的肿瘤。

[0489] 实施例9.3:CLDN6特异性抗体的胞吞作用依赖于其亲和力以及CLDN6结合表位

[0490] 毒素缀合的抗体的细胞毒性效力严格依赖于其对内在化的靶向介导潜力。因此，具有高胞吞速率之抗体的产生是毒素缀合的抗体开发中重要的关键因素。

[0491] 在体外通过将内源表达CLDN6的人癌细胞与CLDN6反应性单克隆嵌合抗体和与毒素皂草素缀合的抗人Fab片段一起孵育来测试胞吞作用的效率。CLDN6结合的抗体/Fab-皂草素复合物的内在化导致特异性杀伤细胞，并且可以使用细胞生存力测定进行测量。对不同CLDN6反应性抗体的筛选证明，胞吞作用不仅依赖于抗体的结合亲和力，而且依赖于抗原表位。我们观察到，CLDN6特异性抗体与CLDN6的第一胞外环中表位的结合支持了OV-90和PA-1人癌细胞中的胞吞作用。值得注意的是，在该测定中，具有类似或较高亲和力但与另一表位结合的CLDN6反应性抗体5F2D2示出较低的细胞毒潜力(图23)。

[0492] 实施例10:在以上实施例7至9中所使用的材料和方法

[0493] 细胞培养:

[0494] 通过用萤火虫荧光素酶稳定地转染细胞系COV362 (ECACC, 07071910) 和PA-1 (ATCC,CRL-1572) 而分别产生稳定表达荧光报道基因的COV362 (Luc) 和PA-1 (Luc) 细胞。

[0495] 在补充有10%热灭活的FCS (Gibco, 10270-106) 的RPMI 1640培养基 (Gibco, 61870-010) 中培养NEC14 (JCRB, 0162) 和MKN74 (JCRB, 0255) 细胞。在含有2mM GlutaMAX (Gibco, 35050-038) 和10%热灭活的FCS的DMEM (Gibco, 41965-039) 中培养COV318 (ECACC, 07071903) 和COV362 (Luc) 细胞。在补充有1.5g/1碳酸氢钠 (Invitrogen, 25080) 、1mM丙酮酸钠 (Invitrogen, 11360) 、1%非必需氨基酸 (Gibco, 11140-035) 和10%热灭活的FCS的MEM (Gibco, 31095-029) 中培养PA-1和PA-1 (Luc) 细胞。在补充有1.5g/1碳酸氢钠和15%热灭活的FCS之MCB105 (Sigma, M6395) 和199培养基 (Sigma, M4530) 的1:1的混合物中培养OV90 (ATCC, CRE-11732) 细胞。在37°C和5%CO₂下培养细胞。

[0496] 通过流式细胞术测定CLDN6的表达:

[0497] 用0.05%胰蛋白酶/EDTA (Gibco, 25300-054) 收获细胞，用FACS缓冲液 (含2%FCS (Gibco, 10270-106) 和0.1%叠氮化钠 (AppliChem, A1430) 的PBS) 洗涤细胞，并以 2×10^6 个细胞/ml的浓度重悬于FACS缓冲液中。将100μl细胞混悬液与2.5μg/ml浓度的抗CLDN6抗体 IMAB027或同种型对照人IgG1抗体 (Sigma, I5154) 在4°C下孵育30分钟。用FACS缓冲液将细胞洗涤三次并与在FACS缓冲液中以1:200稀释之APC缀合的F(ab')₂片段山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch, 109-136-170) 在4°C下孵育30分钟。将细胞洗涤两次并重悬于FACS缓冲液中。使用BD FACS Array (BD Biosciences) 和FlowJo软件 (Tree Star Inc.) 通过流式细胞术分析其结合。使用活细胞/死细胞 (live/dead) 染料碘化丙啶 (Sigma, P4864) 从分析中排除死细胞。

[0498] 用铂衍生物处理COV318细胞:

[0499] 使COV318细胞 (每100mm细胞培养皿 1.2×10^6 个细胞) 在标准条件下生长。24小时后，用0.5μg/ml顺铂或2μg/ml卡铂处理细胞并孵育96小时。更换培养基并使经处理的细胞在标准生长条件下生长。3天至6天后，通过流式细胞术分析细胞的CLDN6表达。

[0500] 在用细胞生长抑制剂处理后的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) :

[0501] 使用稳定转染有作为报道分子的荧光素酶的人卵巢癌细胞系COV362来确定卡铂

和紫杉醇对IMAB027介导的ADCC的影响。使COV362 (Luc) 细胞(每150mm细胞培养皿 3×10^6 个细胞) 在标准条件下生长。24小时后,用5ng/ml紫杉醇、20 μ g/ml卡铂、25ng/mL吉西他滨、20ng/ml多柔比星或7.5ng/ml拓扑替康处理细胞并孵育4天。更换培养基并使经处理的细胞在标准条件下再生长3天(对于卡铂和吉西他滨)或10天(对于紫杉醇、多柔比星或拓扑替康)。

[0502] 用0.05%胰蛋白酶/EDTA (Gibco, 25300-054) 收获细胞,并在含有2mM谷氨酰胺 (Gibco, 25030-081) 和20mM HEPES (Gibco, 15630-056) 的DMEM中调节浓度至 2×10^5 个细胞/ml。将每孔 1×10^4 个细胞接种到白色96孔PP板中,并在37°C和5%CO₂下孵育~5小时。

[0503] 使用Ficoll Hypaque (GE Healthcare, 17144003) 通过密度梯度离心从人供体血液样品中分离PBMC(外周血单核细胞)。分离含间期(interphase)的PBMC并用含有2mM EDTA的PBS将细胞洗涤3次。将PBMC以 1.6×10^7 细胞/mL的浓度重悬于X-Vivo 15培养基(Lonza, BE04-418Q) 中并储存在37°C和5%CO₂下,直到进行测定。

[0504] 以指定的浓度向细胞添加25 μ l IMAB027和同种型对照抗体。此后,添加25 μ l的PBMC混悬液,并在37°C和5%CO₂下将所述细胞孵育24小时。

[0505] 在向全裂解对照添加在PBS中的10 μ l 8% Triton X-100 (Sigma, T8787) 以及向最大活细胞对照添加10 μ l PBS后,向样品添加50 μ l的荧光素混合物(在ddH₂O中3.84mg/ml D-荧光素(Sigma Aldrich, 50227) 和160mM的HEPES),并将细胞在室温下于黑暗中孵育90分钟。用发光计(Infinite M200, TECAN) 测量生物发光。结果表示为集成数字相对光单位(integrated digital relative light unit)。

[0506] 如下计算特异性裂解:

$$[0507] \text{特异性裂解} [\%] = 100 - \left[\frac{\text{样品-总裂解}}{\text{最大活细胞-总裂解}} \times 100 \right]$$

[0508] 最大活细胞:10 μ l PBS,无抗体

[0509] 总裂解:在PBS中10 μ L 8% Triton X-100,无抗体。

[0510] 在无胸腺裸鼠中COV318细胞的腹膜内移植:

[0511] 在小鼠中测试了人卵巢癌细胞系COV318的体内致瘤性以及CLDN6阳性细胞的累积。因此,将重悬于PBS中的 2×10^7 个COV318细胞经腹膜内注射到6-8周大的雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠中。每天监测小鼠。一旦明显出现危及生命的症状,就使动物安乐死。分离并培养肿瘤和腹水细胞以用于进一步分析。机械解离肿瘤、过筛,并用DMEM培养基(Gibco, 41965-039) 洗涤。为了获得单细胞混悬液,在37°C下用accutase (Life Technologies, A11105-01) 将肿瘤细胞处理30分钟,通过40 μ m的细胞渗滤器,并用DMEM培养基洗涤。收集腹水,并通过使用ACK(铵-氯化物-钾) 裂解缓冲液(Invitrogen, A10492-01) 除去污染的红细胞。在标准条件下,使用补充有青霉素/链霉素(Gibco, 15140) 的标准COV318培养基使肿瘤和腹水细胞生长。通过流式细胞术针对CLDN6表达筛选细胞。

[0512] 非常晚期人NEC14异种移植肿瘤的治疗:

[0513] 对于移植,向6-8周大的雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠的肋中皮下接种在200 μ l PBS中的 2×10^7 个NEC14细胞。在非常晚期的治疗研究中,使肿瘤生长13天达到体积为最大170mm³且在治疗之前将小鼠分为对照组、IMAB027组、PEB(顺铂、依托泊苷、博来霉素)组和

IMAB027/PEB组(n=14每组)。

[0514] 移植后13天,如下所述施用药物:在第13、14、15、16和17天i.p.快速推注1mg/kg的顺铂;在第13、14、15、16和17天i.p.快速推注5mg/kg的依托泊苷;在第13、17和21天i.p.快速推注10mg/kg的博来霉素。从第13天至第101天每周三次通过i.v./i.p./i.p.交替快速推注35mg/kg的IMAB027来施加IMAB027。作为载体对照,小鼠分别接受代替抗体的药物缓冲液或代替PEB的0.9%NaCl溶液。

[0515] 每周两次监测肿瘤负荷和动物健康。当肿瘤达到体积为1400mm³时或当肿瘤变成溃疡性时,处死小鼠。使用Kruskal-Wallis检验和事后Dunn多重比较检验来分析肿瘤生长的抑制。

[0516] 球体形成测定:

[0517] 对于球体形成测定,用0.5μg/ml IMAB027针对CLDN6将COV318细胞于4℃下染色30分钟,然后用山羊抗人IgG二抗(1:300)于4℃下孵育10分钟,随后使用BD FACS Aria细胞分选仪针对CLDN6表达对细胞进行分选。然后将1×10⁶个CLDN6阳性或阴性分选的细胞接种到含有0.4%牛血清白蛋白、20ng/ml碱性成纤维细胞生长因子、10ng/ml表皮生长因子和5μg/ml胰岛素的无血清DMEM/F12培养基之6孔超低附着板(Corning)的孔中,并在这些干细胞特定的条件下使细胞历时21天来形成球体。每隔一天更换一次培养基但不破坏球体,并定期拍摄代表性图片。

[0518] 为了生产第二代球体,将CLDN6阳性COV318细胞的第一代球体(接种后第22天)解离为单细胞,然后重新铺板于6孔超低附着板的孔中。此外,每隔一天更换一次培养基但不破坏形成的球体,并定期拍摄代表性图片。

[0519] 使用Bio Mark™ HD系统(Fluidigm)进行定量实时RT-PCR分析:

[0520] 使用Bio Mark™ HD系统(Fluidigm)通过qRT-PCR用对于选定的卵巢癌症干细胞特异性因子(CTCFL、LIN28B、CD24、GNL3、EpCAM、CD44、ABCG2、ALDH1A1、AMACR、ATXN1、BMI1、BMP4、CD34、CD117、Myd88、Nanog、Notch1、Pou5F1、CD133、Snail1、Sox2)的**TaqMan®**基因表达测定(Life technologies)对42个人卵巢癌样品进行了分析。根据各自制造商的说明书使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)从卵巢癌样品中分离RNA,并使用PrimeScript RT Reagent试剂盒(Takara Bio Inc.)合成cDNA。根据**Fluidigm®** Advanced Development Protocol 28-快速基因表达分析使用**TaqMan®GE Assays rev A2**-制备并分析样品。通过IFC Controller HX完成上样到96.96Gene Expression Dynamic Array IFC上。通过Fluidigm BioMark™ HD系统分析芯片阵列。TaqMan PreAmp MasterMix购自Applied Biosystems。根据ΔΔCt法评估数据集。使用Spearman's r进行CLDN6与选定的卵巢癌症干细胞标志物的相关性分析。通过对相关系数的测试来评估相关性值的显著性。使用Benjamini和Hochberg法调节用于多个测试的P值,并且认为经调节的p值≤0.05具有显著性。

[0521] 毒素缀合的CLDN6抗体

[0522] 在Piramal Healthcare(Grangemouth,UK)进行单克隆抗体的毒素缀合。

[0523] 对于DM1缀合,通过在室温下于PBS(pH 7.2)中孵育1小时用与赖氨酸基团的自由NH2残基反应的SMCC(6×体积摩尔浓度(molarity))来修饰裸抗体。随后将经修饰的抗体透析到35mM柠檬酸盐缓冲液(pH5.0)中并使用反相埃尔曼测定(reversed Ellman's assay)来确定接头与抗体的比。通过在室温下孵育17小时,DM1(6×体积摩尔浓度)通过其巯基基

团缀合至SMCC接头的马来酰亚胺部分。将缀合的抗体透析至制剂缓冲液(20mM His、85mg/ml蔗糖,pH 5.8)中,并储存于-80℃。通过UV光谱测定法分析药物抗体比,通过SEC-HPLC分析单体含量并通过RP-HPLC分析游离药物含量。

[0524] 对于MMAE缀合物,将裸抗体透析到PBS(pH7.2)中,并在室温下使用特劳特试剂(Traut's reagent)(2-亚氨基四氢噻吩(2-Iminothiolane))(20×体积摩尔浓度)通过赖氨酸残基之游离NH₂基团的硫醇化修饰2小时。随后,将硫醇化的抗体透析到35mM柠檬酸盐缓冲液(pH 5.5)中并使用反相埃尔曼测定来确定接头与抗体的比。通过在室温下孵育15小时,vcMMAE(6×体积摩尔浓度)通过组织蛋白酶可切割接头的缬氨酸缀合至硫醇化抗体的巯基基团。将缀合的抗体透析到制剂缓冲液(20mM His,85mg/ml蔗糖,pH 5.8)中,并储存于-80℃。通过UV光谱测定法分析药物抗体比,通过SEC-HPLC分析单体含量并通过RP-HPLC分析游离药物含量。

[0525] 通过流式细胞术测定相对结合亲和力:

[0526] 用0.05%胰蛋白酶/EDTA(Gibco,25300-054)收获细胞,用FACS缓冲液(含2%FCS(Gibco,10270-106)和0.1%叠氮化钠(Applichem,A1430)的PBS)洗涤细胞,并以 2×10^6 个细胞/ml的浓度重悬于FACS缓冲液中。将IMAB027、IMAB027-DM1或IMAB027-vcMMAE(滴定系列为0.1ng/ml至20μg/ml)与100μl细胞混悬液于4℃下孵育30分钟。然后将细胞用FACS缓冲液洗涤三次并与在FACS缓冲液中1:200稀释的抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,109-136-170)于4℃下孵育30分钟。随后,将所述细胞洗涤两次,并重悬于100μl的FACS缓冲液中。使用BD FACSArray(BD Biosciences)和FlowJo软件(Tree Star Inc.)通过流式细胞术对结合进行分析。

[0527] 用毒素缀合的IMAB027进行生存力测定:

[0528] 在体外使用检测细胞代谢活动的比色测定(来自Applichem的Cell Proliferation Kit XTT)测定了IMAB027-DM1和IMAB027-vcMMAE对人肿瘤细胞系之生存力的作用。

[0529] 用0.05%胰蛋白酶/EDTA(Gibco,25300-054)收获OV90细胞并将2500个细胞接种在96孔培养板的50μl生长培养基中。24小时后,添加在50μl培养基中稀释之浓度系列的DM1缀合的IMAB027和MMAE缀合的IMAB027或同种型对照抗体。将细胞培养3至7天,直到未处理的细胞达到约80%的汇合度。根据制造商的说明书使用Applichem Cell Proliferation Kit II(Applichem,A8088-1000)进行细胞生存力分析。在用XTT试剂孵育3至5小时后,将100μl细胞上清液转移到新96孔测定板中,并使用分光光度计(Tecan)在480nm(参照630nm)处测定吸光度。使用下面的等式计算生存力:

$$[0530] \text{生存力的降低} [\%] = 100 - \left[\frac{\text{样品-空白}}{\text{最大活细胞-空白}} \times 100 \right]$$

[0531] 空白:无细胞的培养基和XTT

[0532] 最大活细胞:细胞、培养基和XTT

[0533] 使用GraphPad Prism 6软件通过非线性回归来确定EC50值。

[0534] 晚期皮下OV90异种移植肿瘤的治疗:

[0535] 在标准条件下培养人卵巢癌细胞系OV90。对于移植,向6-8周大的雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠的胁中皮下接种在200μl PBS中的 1×10^7 个OV90细胞。在晚期的治疗研究

中,治疗前,使肿瘤生长10天并将具有已建立 50mm^3 至 150mm^3 体积肿瘤的小鼠随机分为载剂组和抗体组($n=10$)。每两周监测肿瘤体积($\text{TV}=(\text{长}\times\text{宽}^2)/2$)。 TV 表示为 mm^3 ,使得随着时间构建肿瘤的生长曲线。

[0536] 在初始剂量范围确定研究中,使动物i.v.单次注射载剂、IMAB027-DM1(1.78mg/kg、5.33mg/kg或16mg/kg)并在移植后第35天进行解剖。在第二剂量范围确定研究中,使动物i.v.单次注射载剂、IMAB027-vcMMAE(4mg/kg、8mg/kg或16mg/kg)或IMAB027-DM1(1.33mg/kg、2.67mg/kg或5.33mg/kg)。每周三次通过i.v./i.p./i.p.交替快速推注35mg/kg的IMAB027来施加IMAB027。当肿瘤达到大于 1400mm^3 的体积或形成溃疡时,处死小鼠。使用Kruskal-Wallis检验和事后Dunn多重比较检验来分析肿瘤生长的抑制。使用Mantel Cox检验来分析存活。

[0537] 晚期皮下PA-1异种移植肿瘤的治疗和肿瘤切片的免疫组织化学:

[0538] 在标准条件下培养人卵巢癌细胞系PA-1。对于移植,向6-8周大的雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠的肋中皮下接种在 $200\mu\text{l}$ PBS中的 1×10^7 个PA-1细胞。在晚期治疗研究中,治疗前,使肿瘤生长15天,并将具有已建立 40mm^3 至 120mm^3 体积肿瘤的小鼠随机分为载剂组和抗体组($n=10$)。每两周监测肿瘤体积($\text{TV}=(\text{长}\times\text{宽}^2)/2$)。 TV 表示为 mm^3 ,使得随着时间构建肿瘤的生长曲线。

[0539] 向动物i.v.单次注射载剂、IMAB027-vcMMAE(4mg/kg、8mg/kg或16mg/kg)或IMAB027-DM1(4mg/kg、8mg/kg或16mg/kg)。每周三次通过i.v./i.p./i.p.交替快速推注35mg/kg的IMAB027来施加IMAB027。当肿瘤达到大于 1400mm^3 的体积或形成溃疡时,处死小鼠。使用Kruskal-Wallis检验和事后Dunn多重比较检验来分析肿瘤生长的抑制。使用Mantel Cox检验来分析存活。

[0540] 为了分析肿瘤建立和进展过程中CLDN6的表达,分别在第7、14和56天解剖未治疗小鼠的PA-1肿瘤,用福尔马林固定并在石蜡中包埋。从每个样品FFPE(福尔马林固定石蜡包埋)块制备 $4\mu\text{m}$ 的组织切片,其封片在黏性载玻片(SuperFrost Ultra Plus, Thermo Fisher Scientific)上,并在 60°C 下烘烤60分钟。染色前,使FFPE组织切片脱石蜡。在 120°C 下将切片在补充有0.05%Tween-20的10M柠檬酸(pH 6.0)中煮沸10分钟。通过在PBS中0.3%的 H_2O_2 中孵育15分钟来淬灭内源过氧化物酶。在用PBS洗涤后,在室温下用封闭缓冲液(10%山羊血清于PBS中)将非特异性抗体结合位点封闭30分钟,接着用 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 在封闭缓冲液中稀释的第一兔抗密蛋白-6抗体(IBL-America, 18865)孵育过夜。然后将样品用PBS洗涤3次并用各自的第二即用型抗体(Power Vision HRP山羊抗-兔; Immunologic)在室温下孵育30分钟。使用显色底物溶液(VectorRed; Vector Laboratories)显现4:30分钟。在用苏木精复染、脱水和封片后,使用Leica DM2000显微镜对切片进行分析。

[0541] 晚期皮下MKN74异种移植肿瘤的治疗和肿瘤切片的免疫组织化学:

[0542] 在标准条件下培养人胃癌细胞系MKN74。对于移植,向6-8周大的雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}小鼠的肋中皮下接种在 $200\mu\text{l}$ PBS中的 1×10^7 个MKN74细胞。在晚期治疗研究中,在治疗前,使肿瘤生长7天并将已建立 $200\pm 30\text{mm}^3$ 体积肿瘤的小鼠随机分为载剂组和抗体组($n=10$)。每两周监测肿瘤体积($\text{TV}=(\text{长}\times\text{宽}^2)/2$)。 TV 表示为 mm^3 ,使得随着时间构建肿瘤的生长曲线。

[0543] 动物在第8天通过单次i.v.快速推注来接受载剂对照缓冲液或16mg/kg IMAB027-

vcMMAE。当肿瘤达到大于 1400mm^3 的体积或形成溃疡时,处死小鼠。使用Kruskal-Wallis检验和事后Dunn多重比较检验来分析肿瘤生长的抑制。使用Mann-Whitney检验和事后Dunn多重比较检验来分析肿瘤生长的抑制。使用Mantel Cox检验来分析存活。

[0544] 移植前通过流式细胞术以及在第31天通过在解剖的未治疗MKN74异种移植植物上的组织化学来分析在MKN74细胞上的CLDN6靶向表达。

[0545] 对于免疫组织化学,制备厚度为 $3\mu\text{m}$ 的组织切片、封片在载玻片上,并在室温下空气干燥90分钟。在 -20°C 下将所有的组织切片在丙酮中固定10分钟,并在PBS中洗涤5分钟。通过用0.03%的过氧化氢(Dakocytomation EnVision System,K4011)孵育15分钟来淬灭内源过氧化物酶。在用PBS洗涤后,在室温下用封闭缓冲液(10%山羊血清于PBS中)将非特异性抗体结合位点封闭30分钟,接着在室温下用 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ IMAB027-FITC孵育60分钟。然后将样品用PBS洗涤3次并用各自第二即用型抗体(Bright Vision聚HRP抗-兔IgG, Immunologic,DPVR-110HRP)在室温下孵育30分钟。使用显色底物溶液(VectorRed;Vector Laboratories)显现2:30分钟。在用苏木精复染、脱水和封片后,使用Leica DM2000显微镜对切片进行分析。

[0546] 晚期腹膜内PA-1(Luc)异种移植肿瘤的治疗:

[0547] 使用稳定表达作为发光报道基因的萤火虫荧光素酶的人卵巢畸胎癌细胞系PA-1(Luc)作为腹膜内异种移植肿瘤模型来体内研究毒素缀合的IMAB027抗体的抗肿瘤活性。先前的移植实验表明,腹膜内接种PA-1(Luc)细胞产生腹膜内肿瘤结节。

[0548] 将重悬于PBS中的 1×10^7 个PA-1(Luc)细胞经腹膜内注射到雌性Hsd:无胸腺裸-Foxn1^{nu}中。在肿瘤细胞接种后第14天开始生物发光成像,此后每周都进行成像,直到研究结束。将D-荧光素(PerkinElmer,122796)溶解在无菌水中,并在用IVIS Lumina成像系统(Advanced Molecular Vision)成像之前5分钟经腹膜内进行注射($150\text{mg}/\text{kg}$,注射体积 $200\mu\text{l}$)。用异氟烷麻醉小鼠,并将其置于IVIS Lumina的暗室中且对1分钟的积累时间(integration time)发射的光子进行量化。将源自动物内表达荧光素酶的PA-1细胞之透射光的强度表示为伪彩色图像(pseudocolor image),其中蓝色是最低强度的生物发光信号,而红色是最高强度的生物发光信号。在LED低照度下获得了小鼠的灰度照片图像。使用Living Image软件(Xenogen)叠加所述图像。对于所有的图像,使用了相当的照明设置。为了量化生物发光,测定了感兴趣区域(ROI),并使用光子/秒(p/s)单位测量了各自ROI的总通量(total flux)。从各动物各自的生物发光值减去从动物上非信号发射区获得的背景生物发光值。

[0549] 在第14天,将小鼠随机分组并通过腹膜内施用 $16\text{mg}/\text{kg}$ 的IMAB027-DM1或IMAB027-vcMMAE分别进行治疗。对照动物接受载体缓冲液。每周通过来自腹面视角的生物发光成像和覆盖小鼠腹部的感兴趣区域中总通量(光子/秒)的后续分析来监测肿瘤生长。

[0550] 胞吞作用:

[0551] 使用基于细胞毒性的胞吞作用测定来确定结合CLDN6抗体的胞吞作用,所述胞吞作用测定依赖于靶向结合抗体和皂草素缀合的抗人IgG Fab片段(Fab-ZAP人,Advanced Targeting Systems,IT-51)的共同内在化。皂草素是核糖体失活蛋白质,一经内在化其即抑制蛋白质的生物合成,因此导致细胞死亡。

[0552] 用0.05%胰蛋白酶/EDTA(Gibco,25300-054)收获PA-1细胞并以 2.5×10^3 个细胞/

孔接种于96孔培养板的50 μ l生长培养基中。24小时后,各添加25 μ l体积的Fab-ZAP,随后是IMAB027或同种型对照抗体。在6或8步稀释系列中施用CLDN6抗体,同时施加恒定浓度的Fab-ZAP(FAB-ZAP:抗体比为3:1至6561:1)。在37℃湿润的CO₂培养箱中将细胞再培养72小时。然后,根据生产商的说明书使用来自AppliChem的细胞增殖试剂盒II(AppliChem,A8088-1000)分析细胞生存力。使用分光光度计(Tecan)在480nm(参照630nm)处测量吸光度。

序列表

<110> BioNTech AG et al.

<120> 涉及癌症干细胞的癌症的诊断与治疗

<130> 342-79 PCT

<150> PCT/EP2013/002272

<151> 2013-07-31

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 220

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
1 5 10 15
[0001]

Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65 70 75 80

Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu
85 90 95

Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
100 105 110

Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
 115 120 125

Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile
 130 135 140

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
 145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
 165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
 180 185 190

Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
 195 200 205

[0002] Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
 210 215 220

<210> 2
<211> 220
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
 20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
 35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys

50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65 70 75 80

Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu
85 90 95

Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
100 105 110

Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
115 120 125

Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Val Ile
130 135 140

[0003] Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
180 185 190

Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
195 200 205

Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
210 215 220

<210> 3
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0004]

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 4

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu His
 20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Val Tyr Ser
 35 40 45

Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ile Tyr Pro Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

[0005]

<210> 5
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

[0006]
 <400> 6

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr Ser
 35 40 45

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
 50 55 60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr

85	90	95
----	----	----

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 7
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

[0007]

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Phe Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 8

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
35 40 45

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
50 55 60

[0008]

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 9

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0009] Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 10

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
 20 25 30

Trp Phe Gln Leu Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
 35 40 45

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
 50 55 60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

[0010] <213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 11

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Gly Ile Tyr Ser
 35 40 45

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
 50 55 60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 12

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

[0011] Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr Ser
 35 40 45

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
 50 55 60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

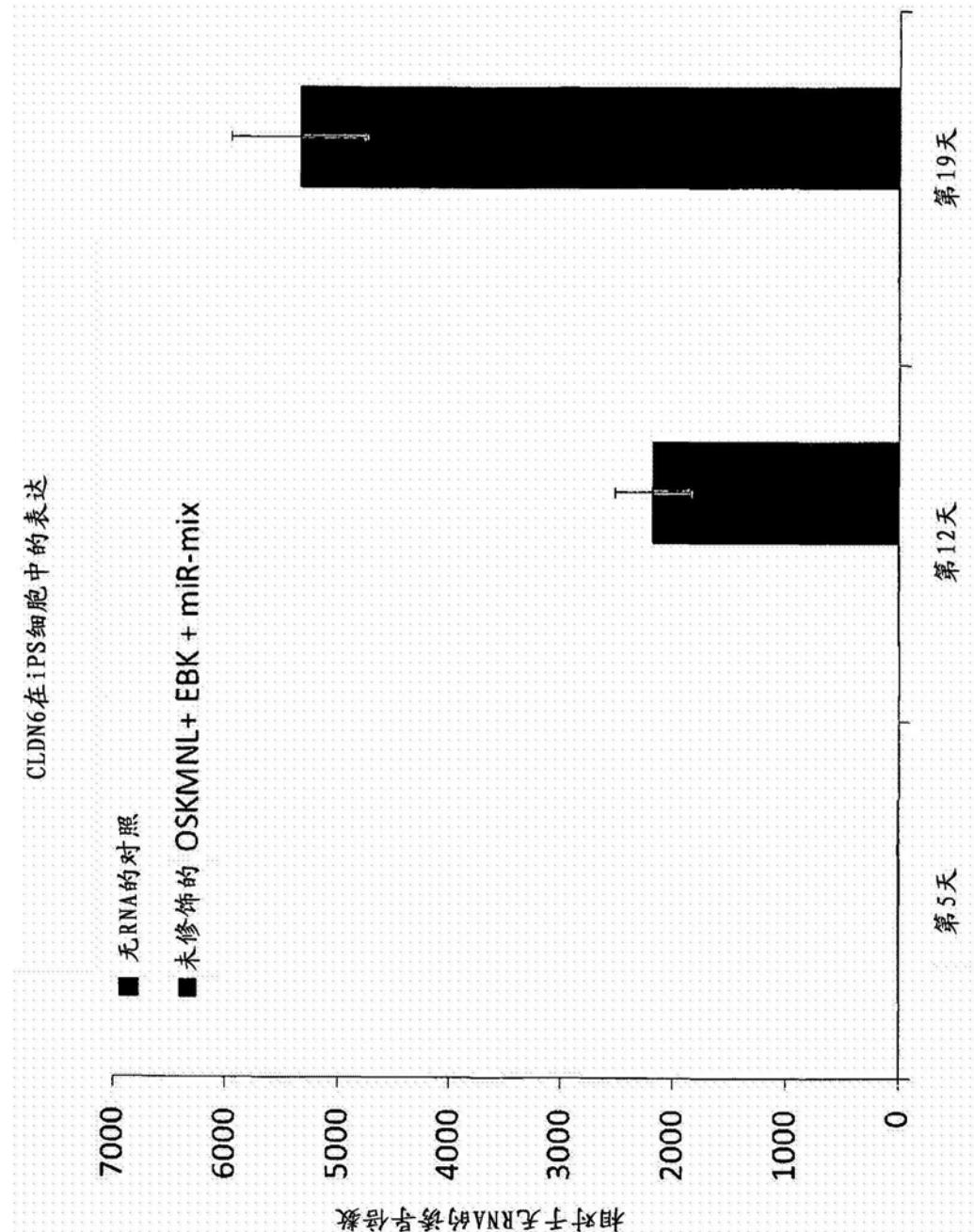


图1

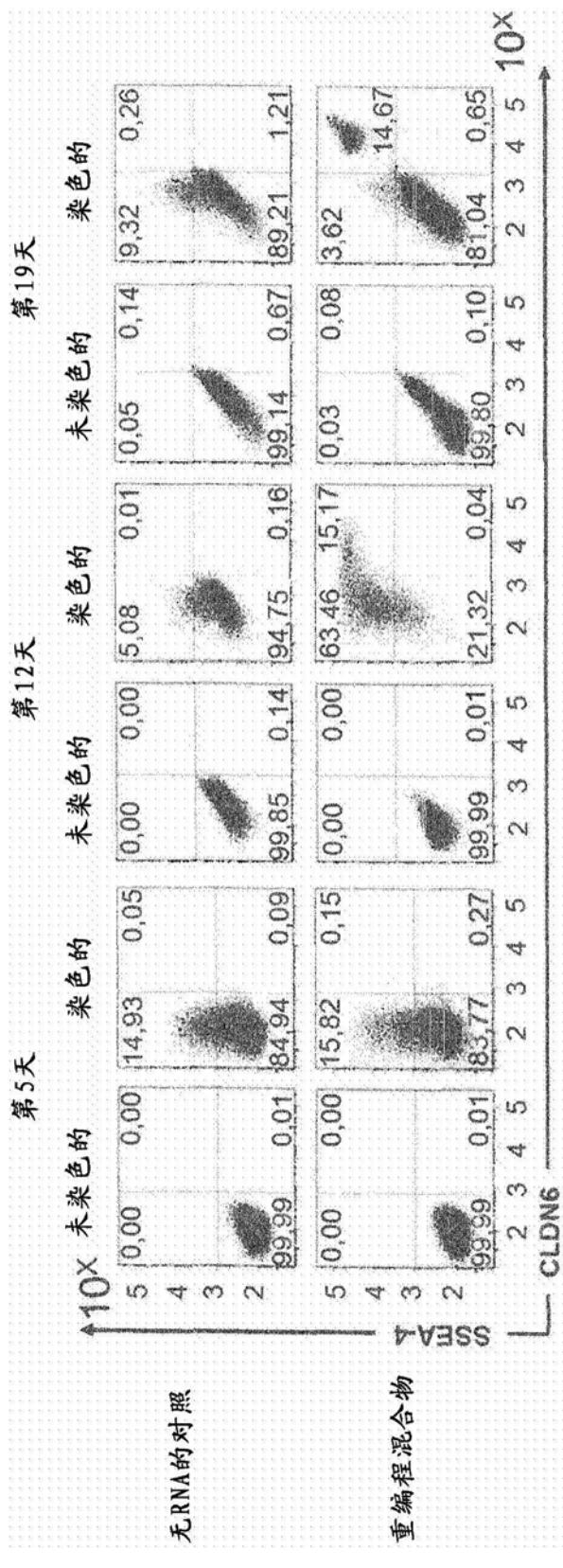


图2

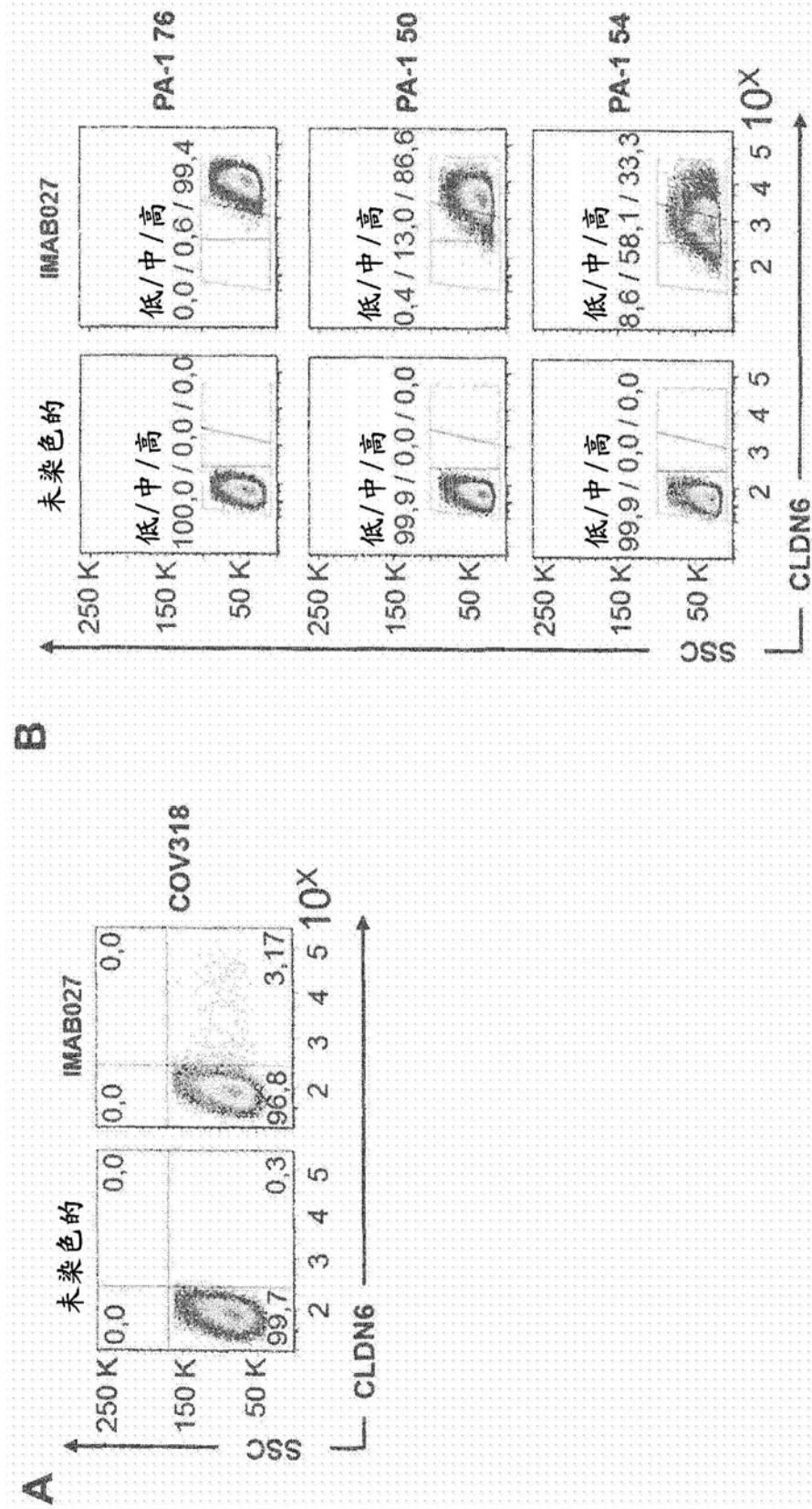


图3

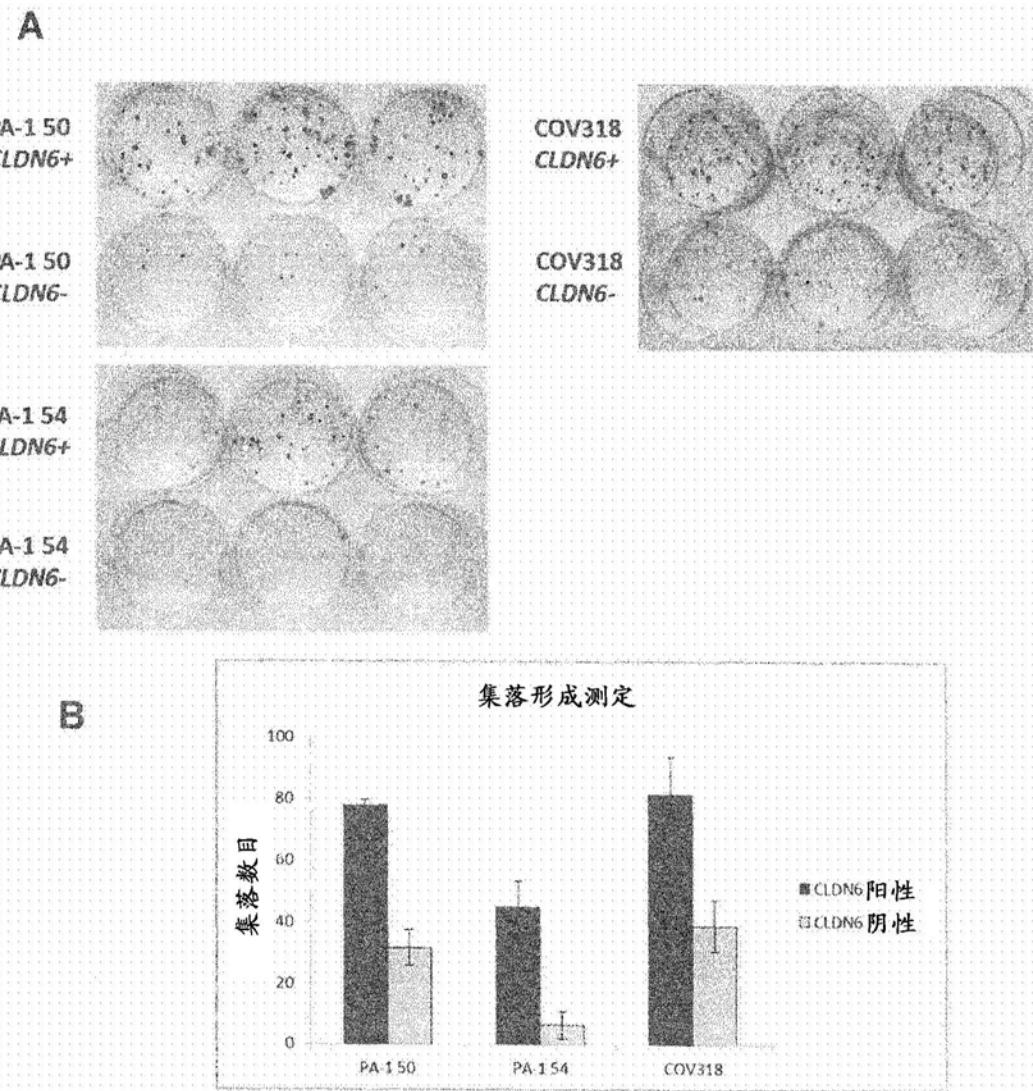


图4

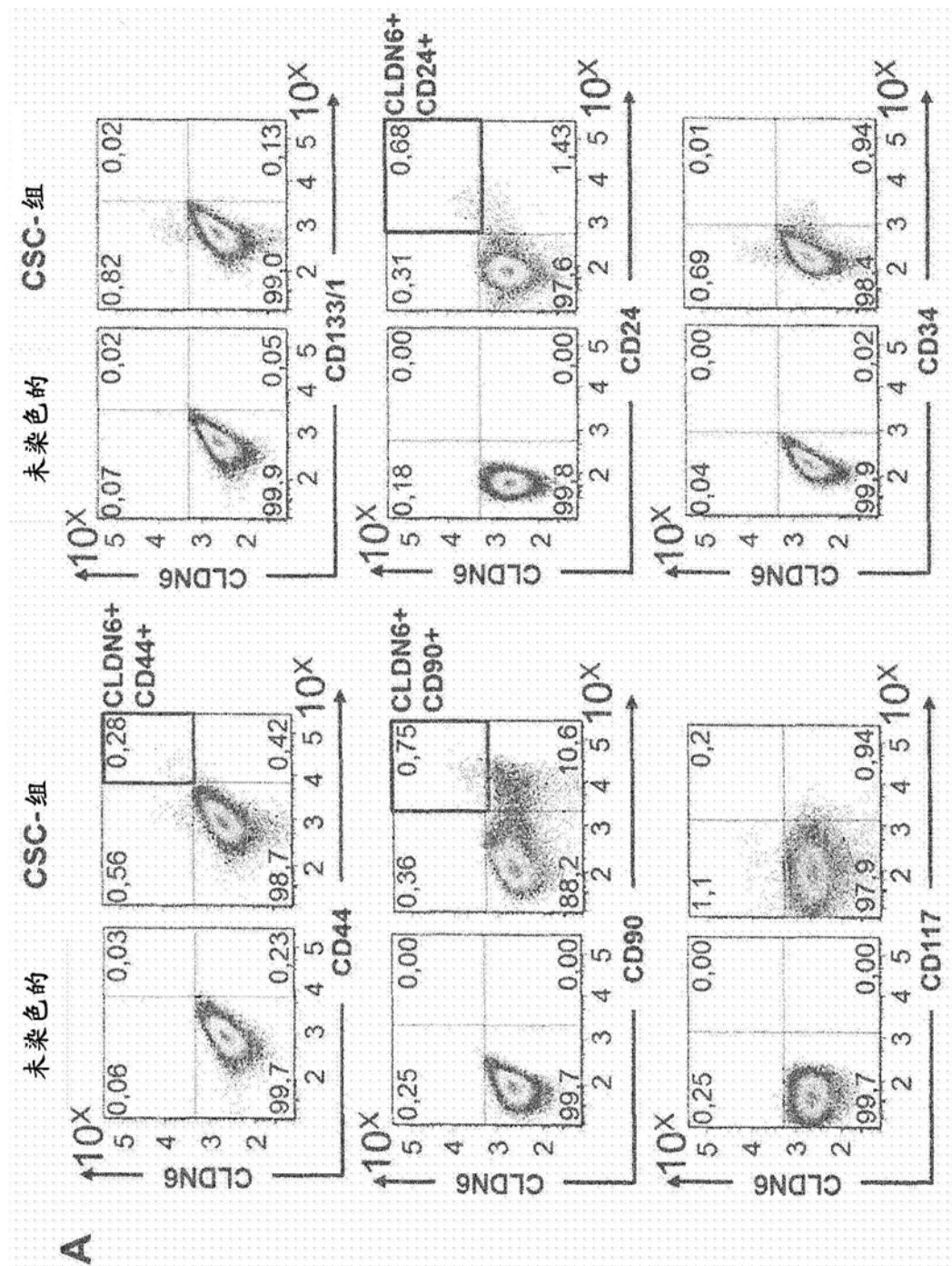
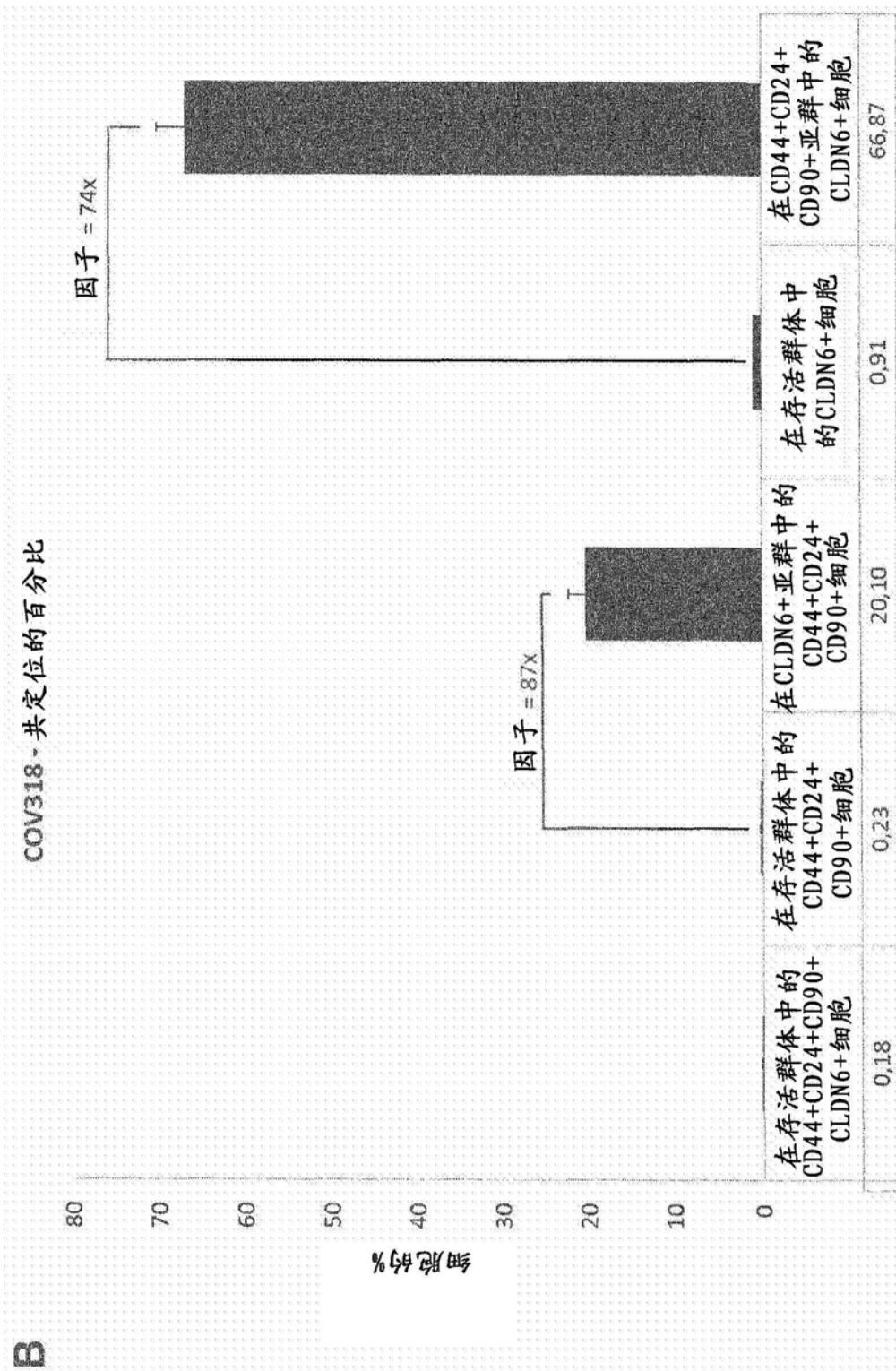


图5



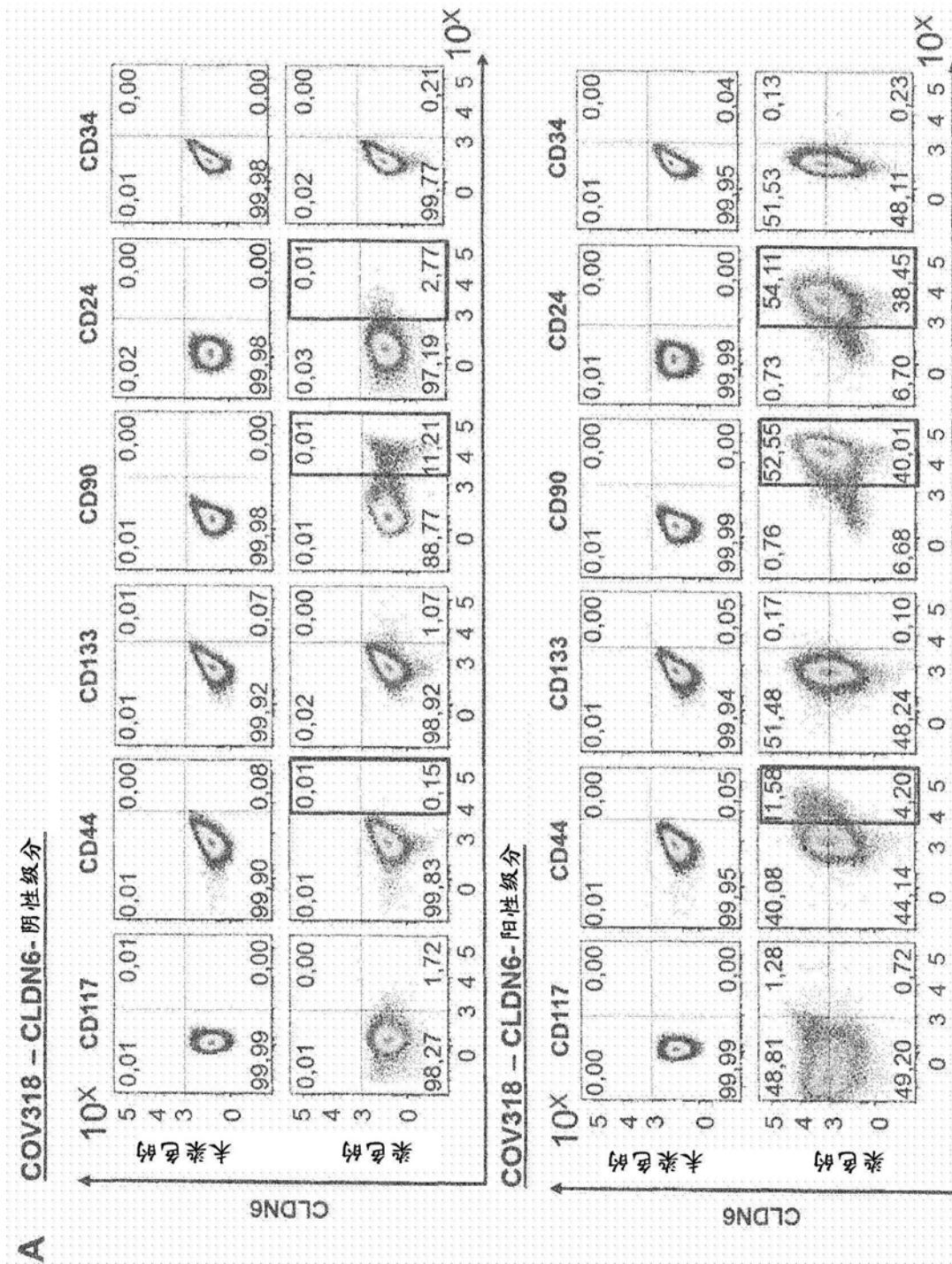


图6

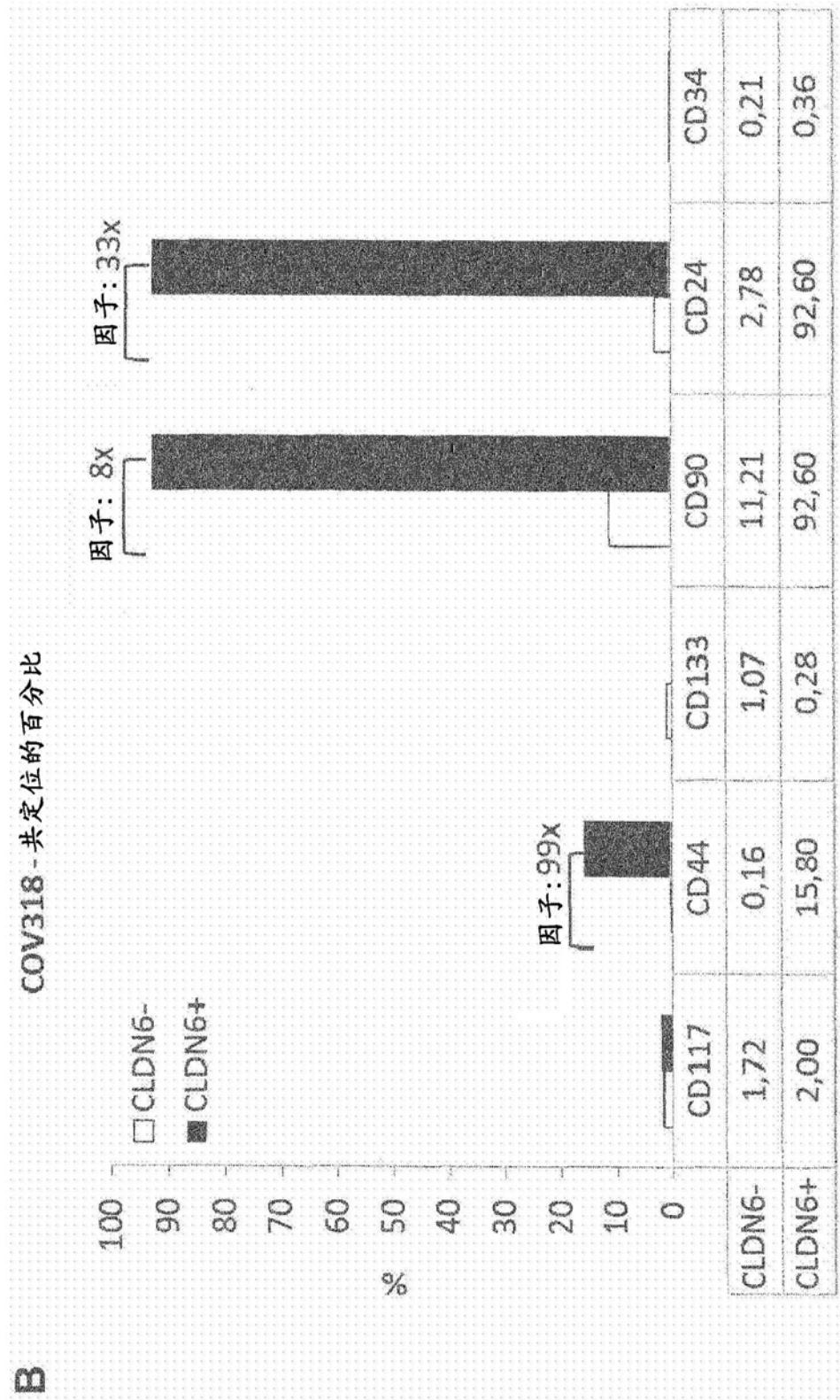


图6(续)

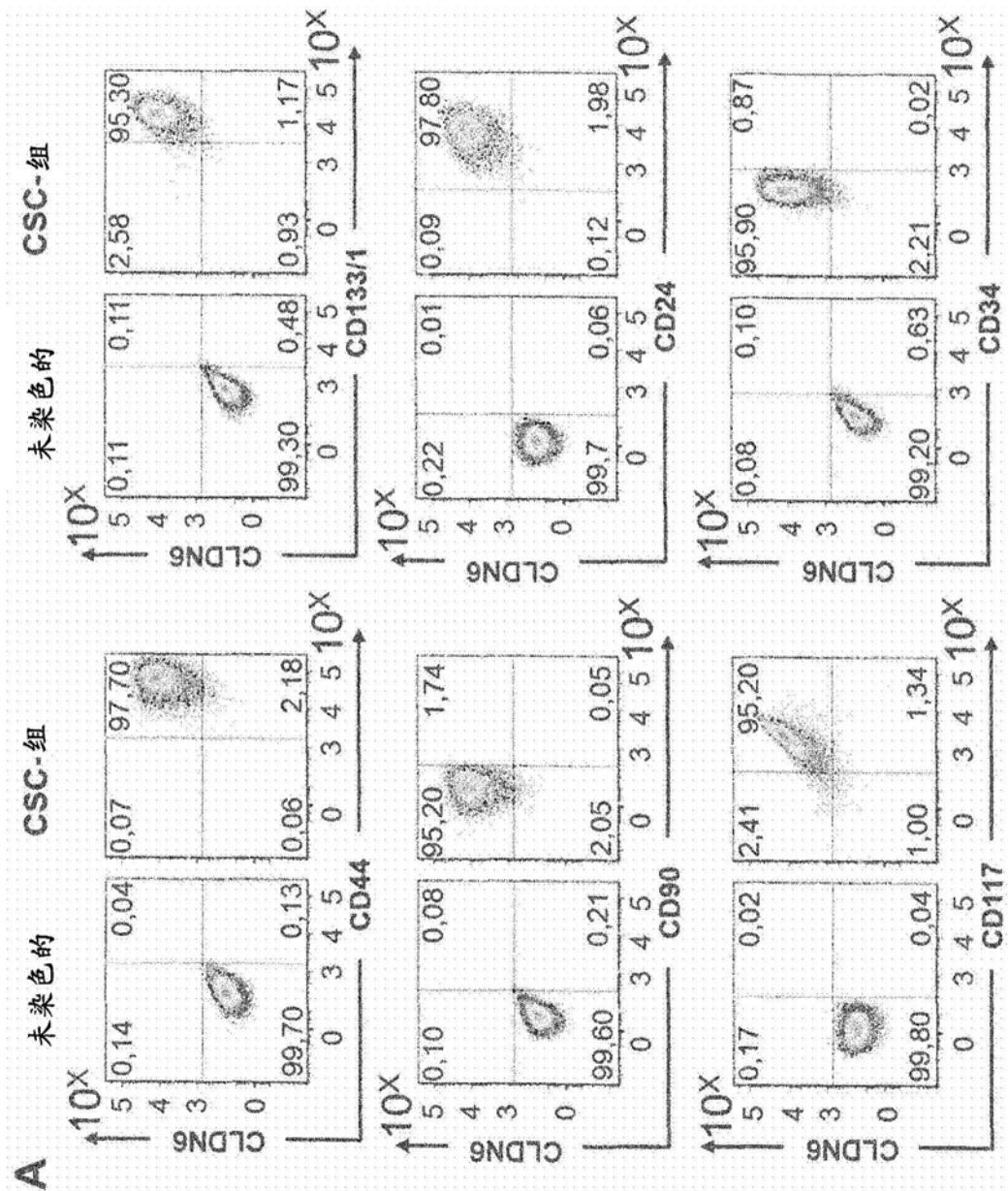


图7

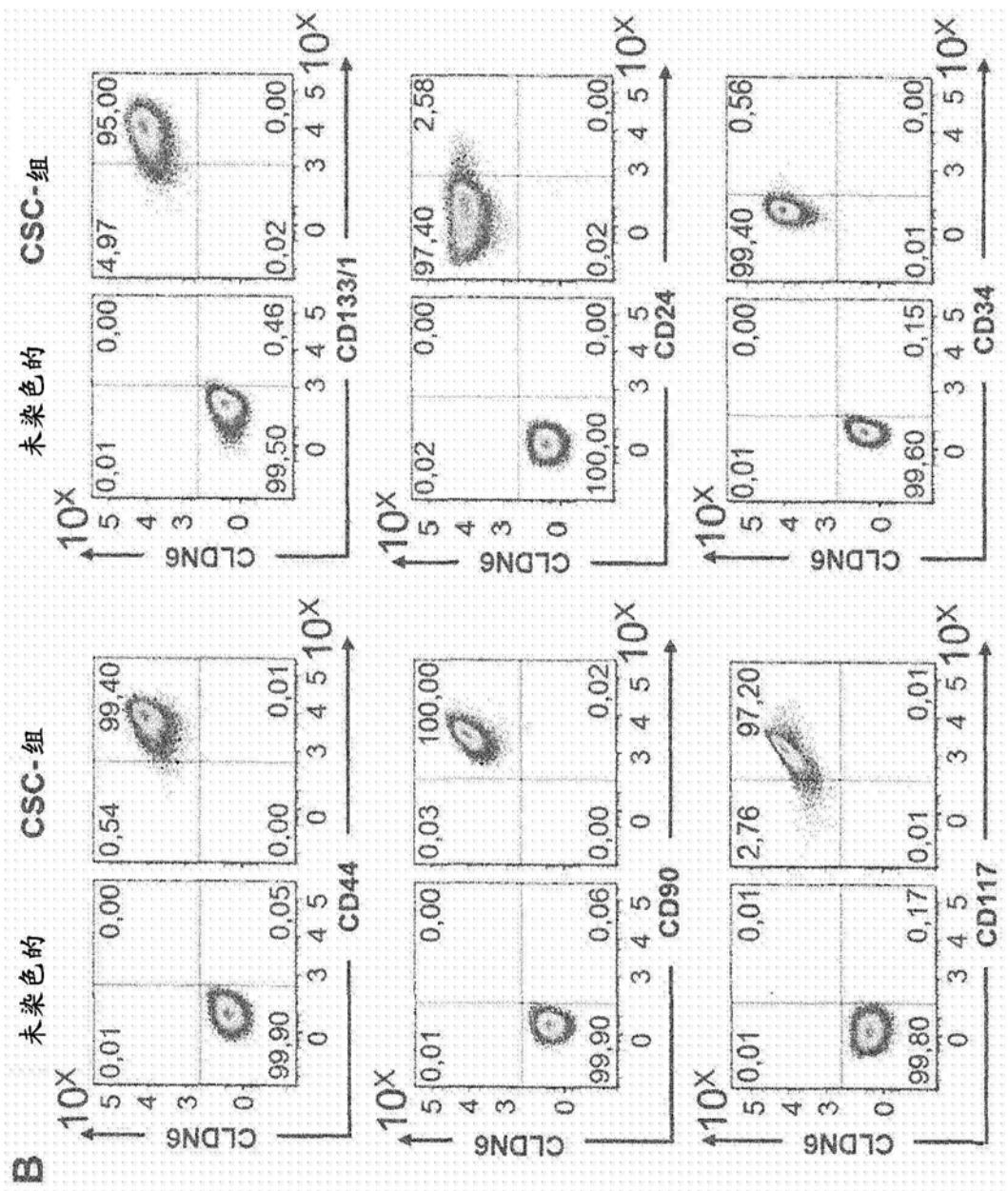


图7(续)

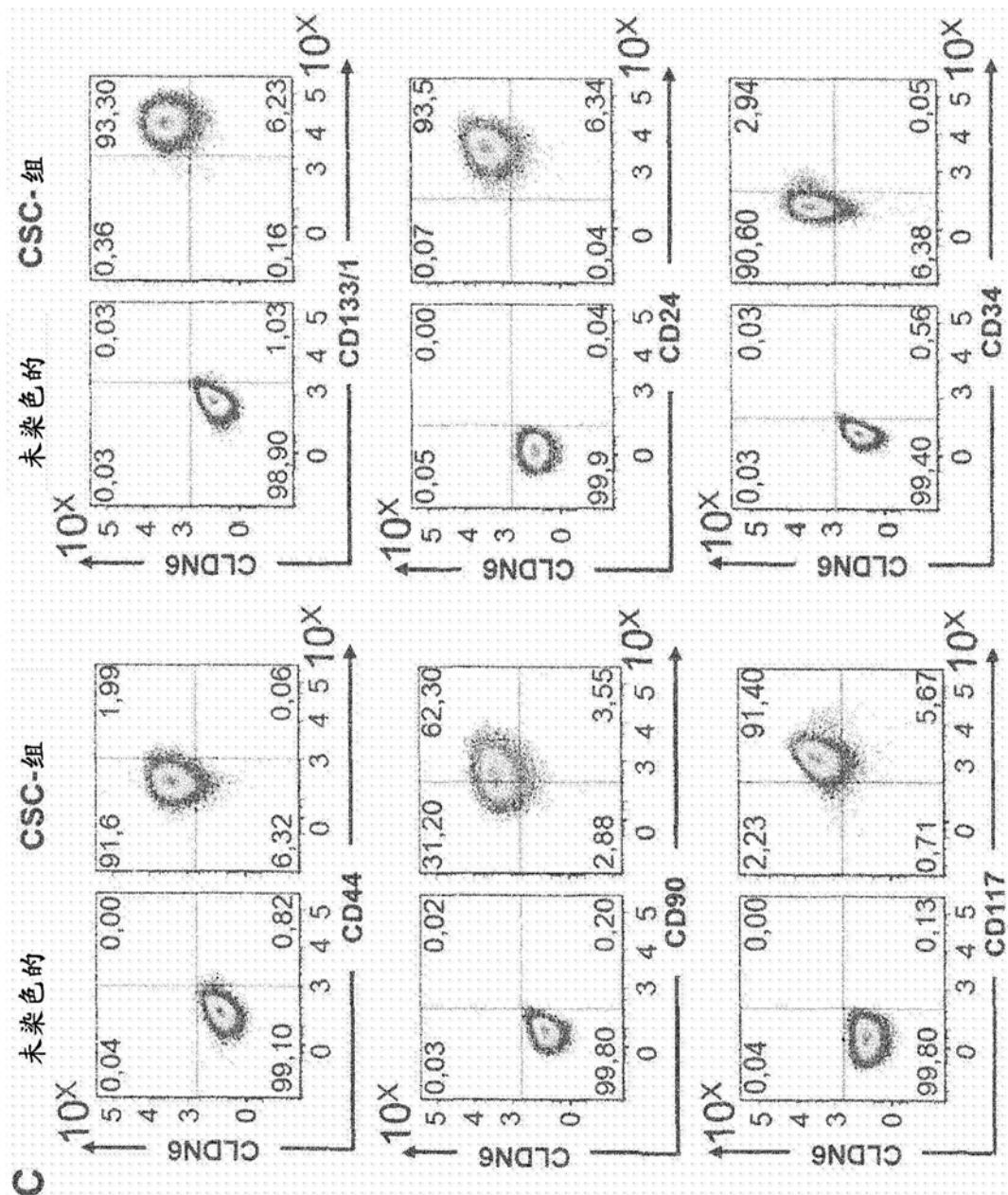


图7(续)

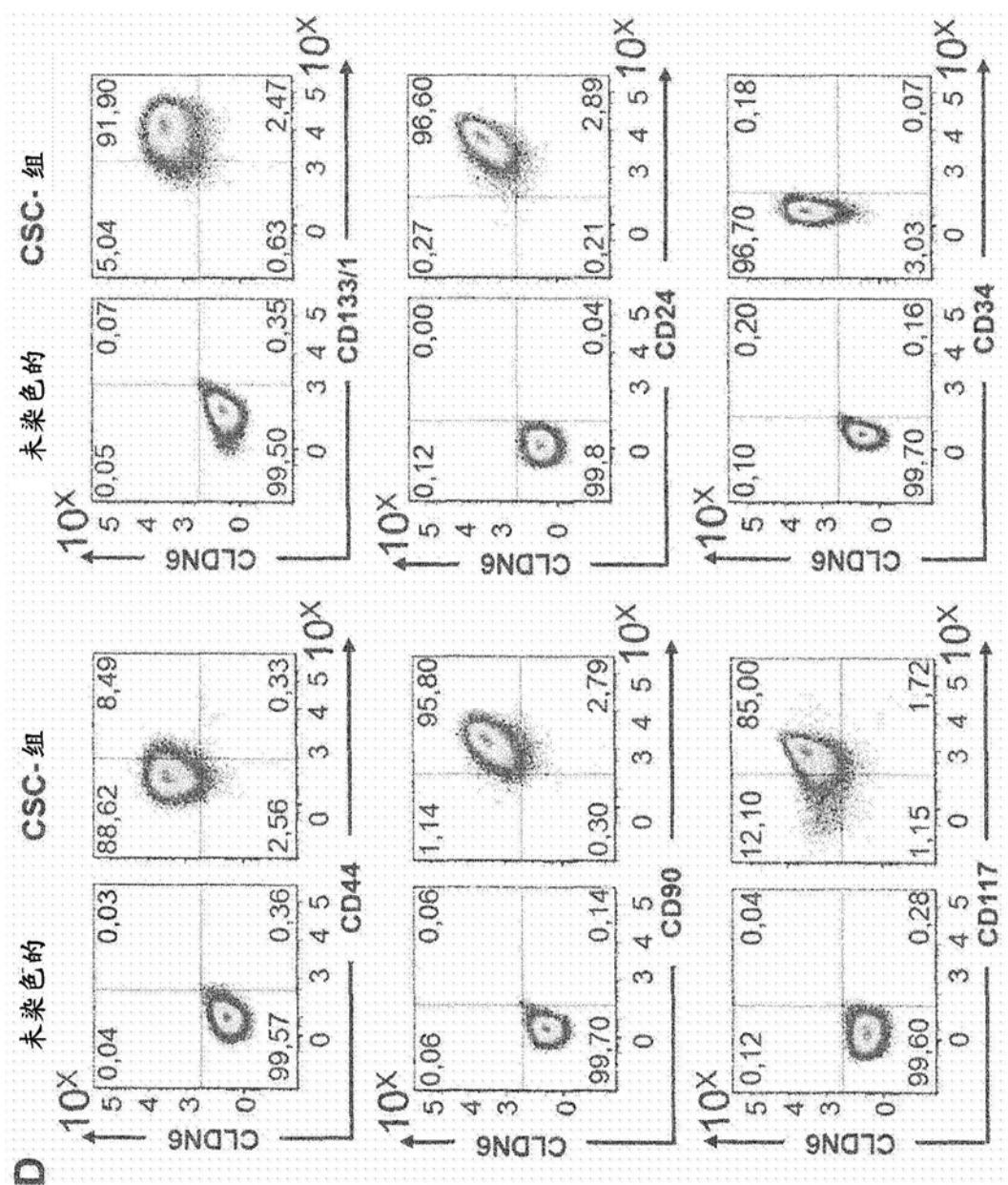


图7 (续)

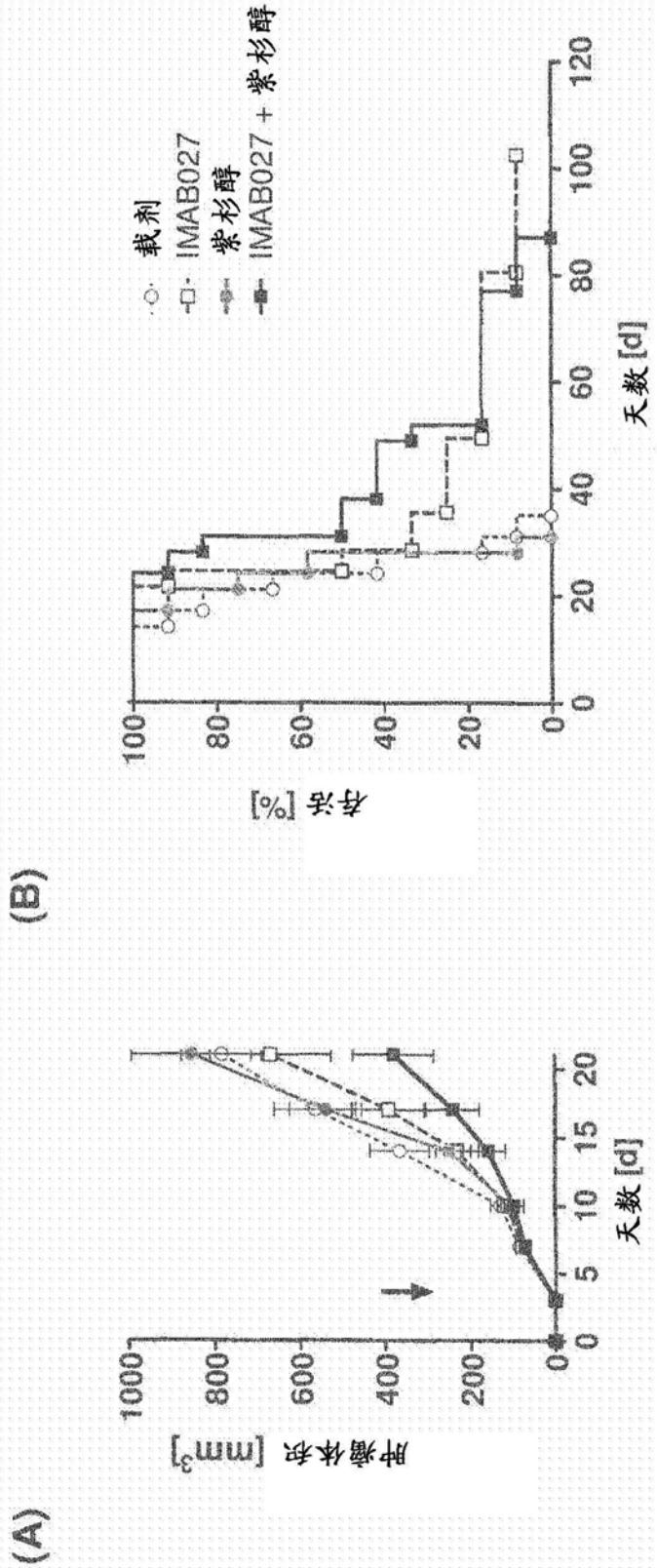


图8

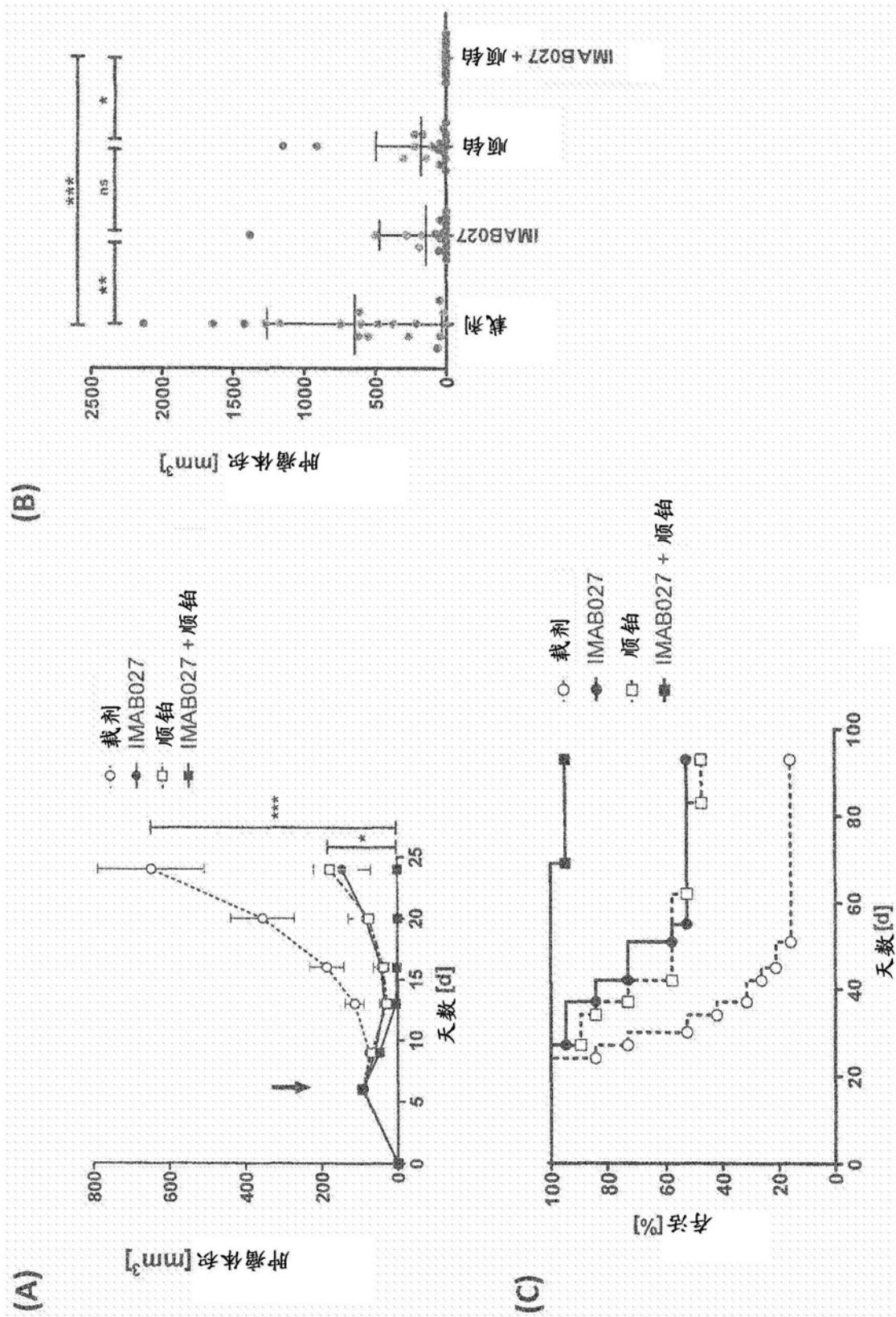


图9

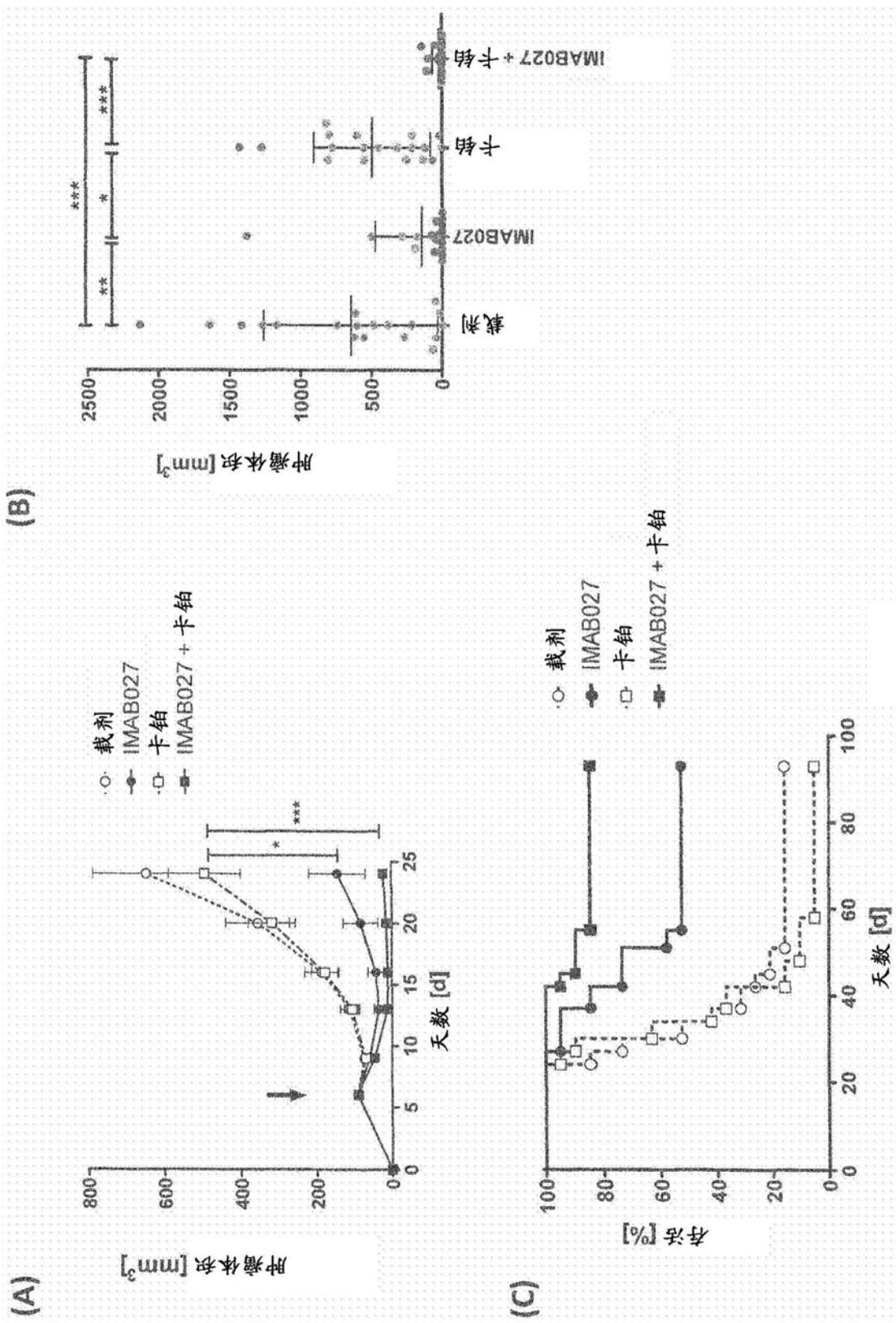


图10

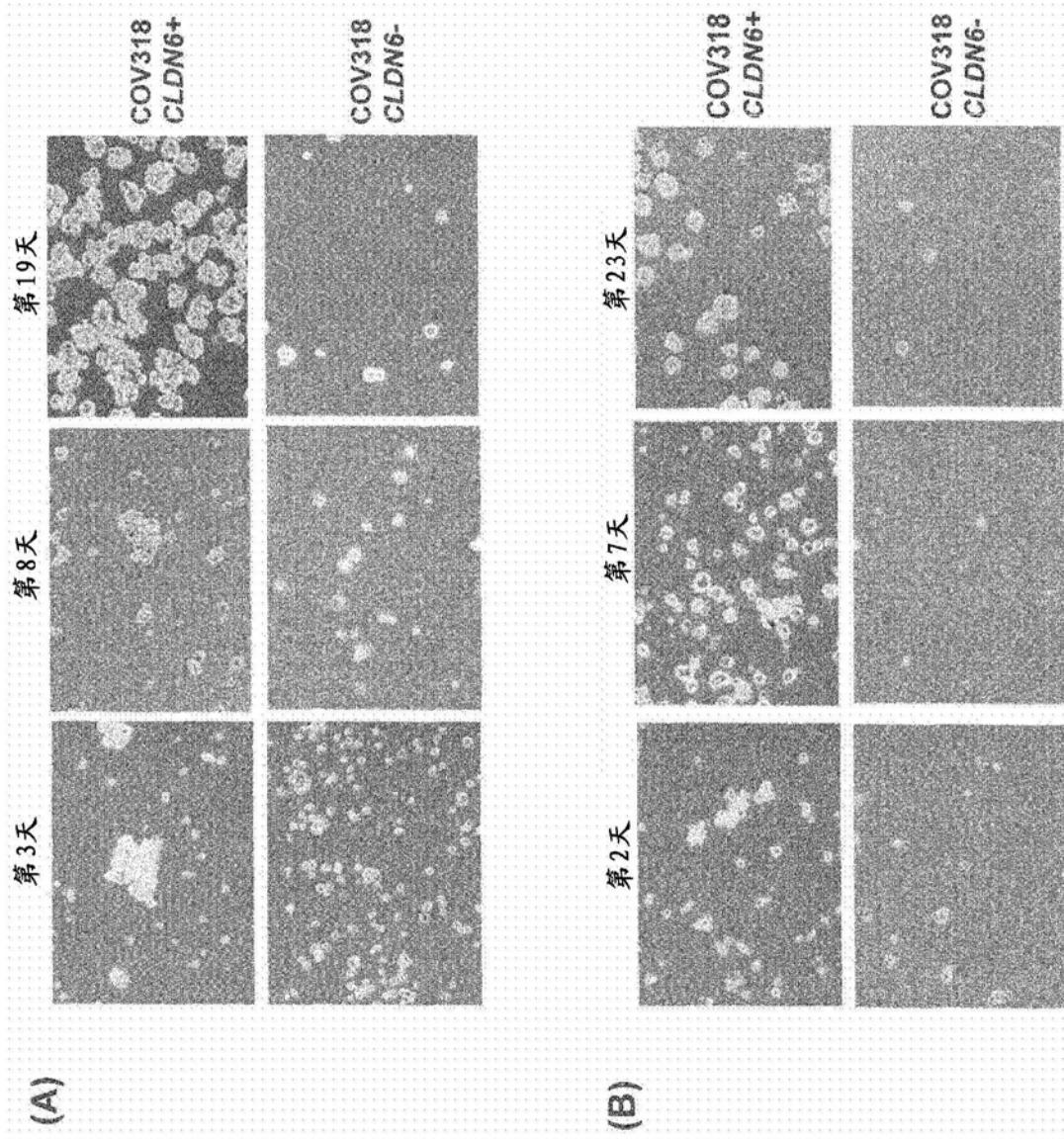


图11

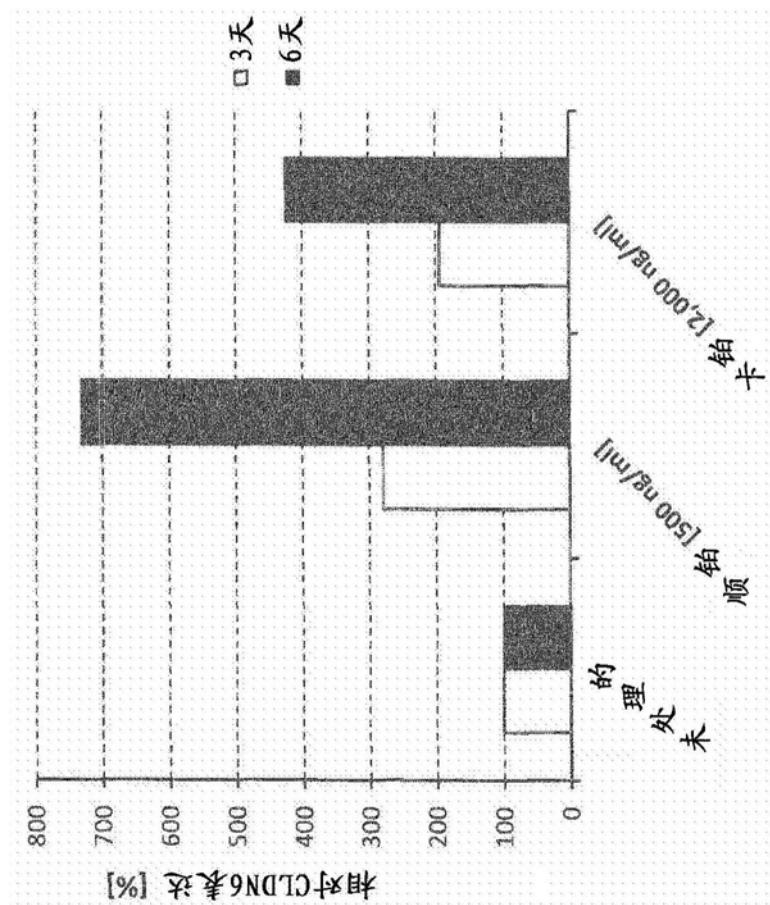


图12

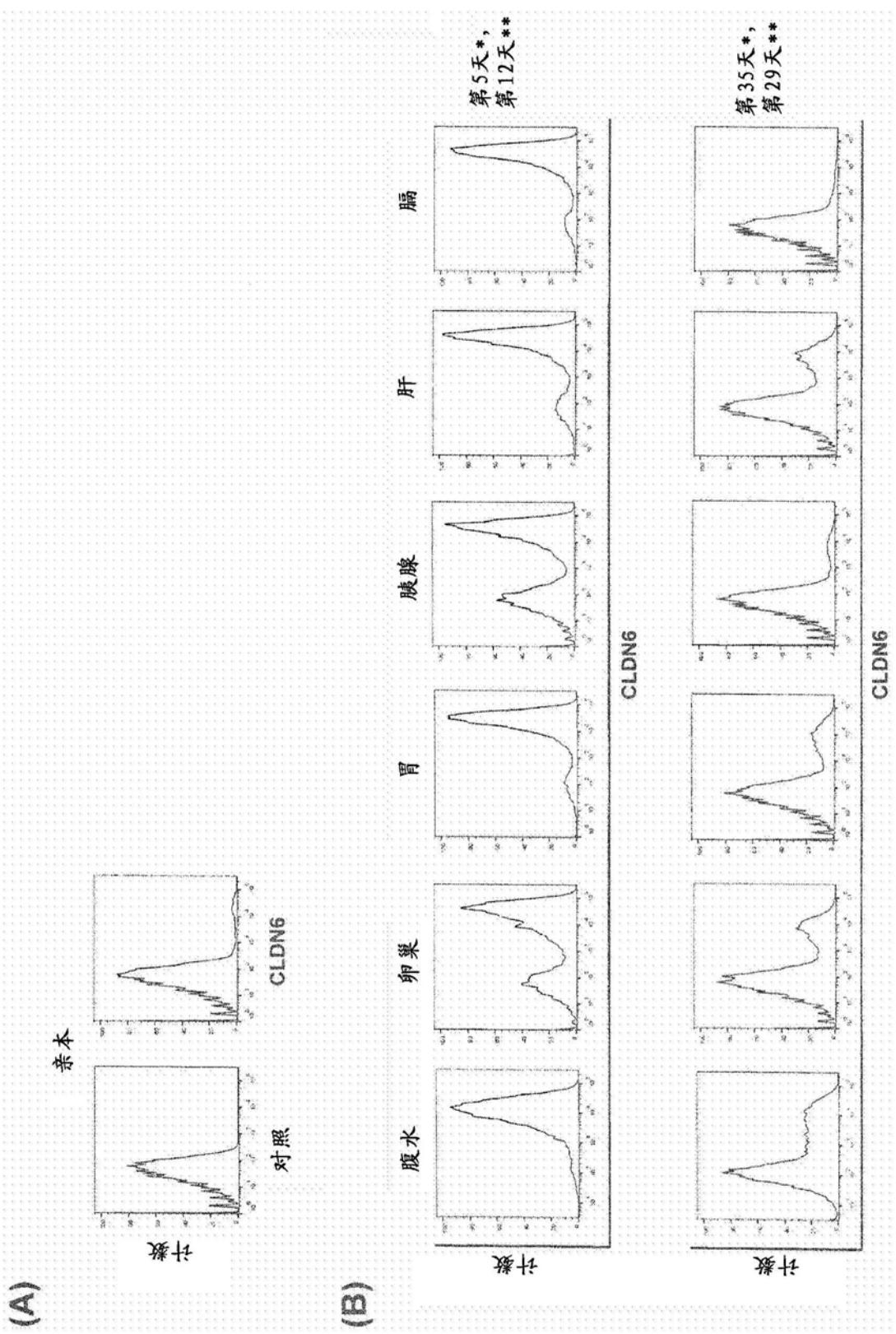


图13

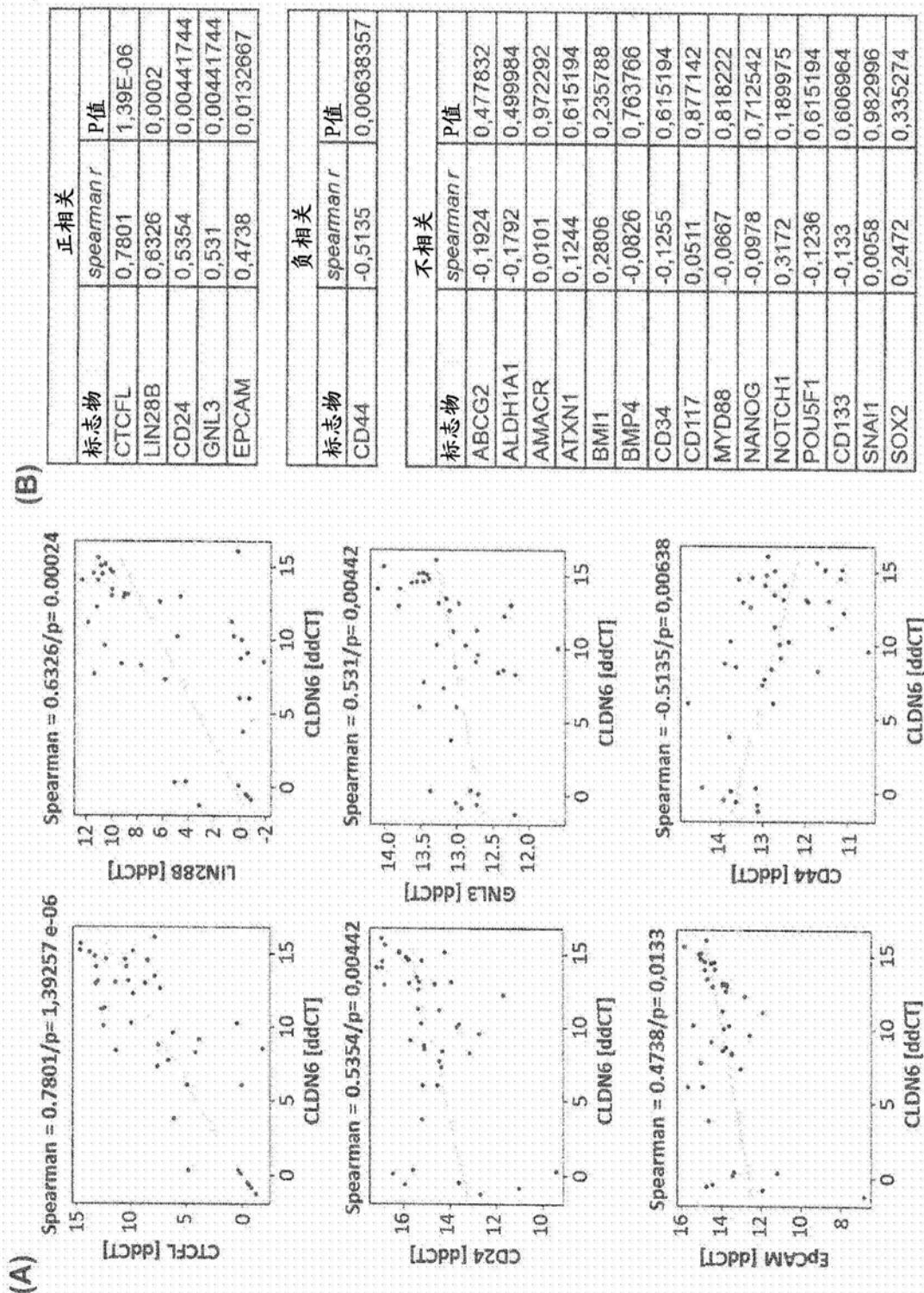


图14

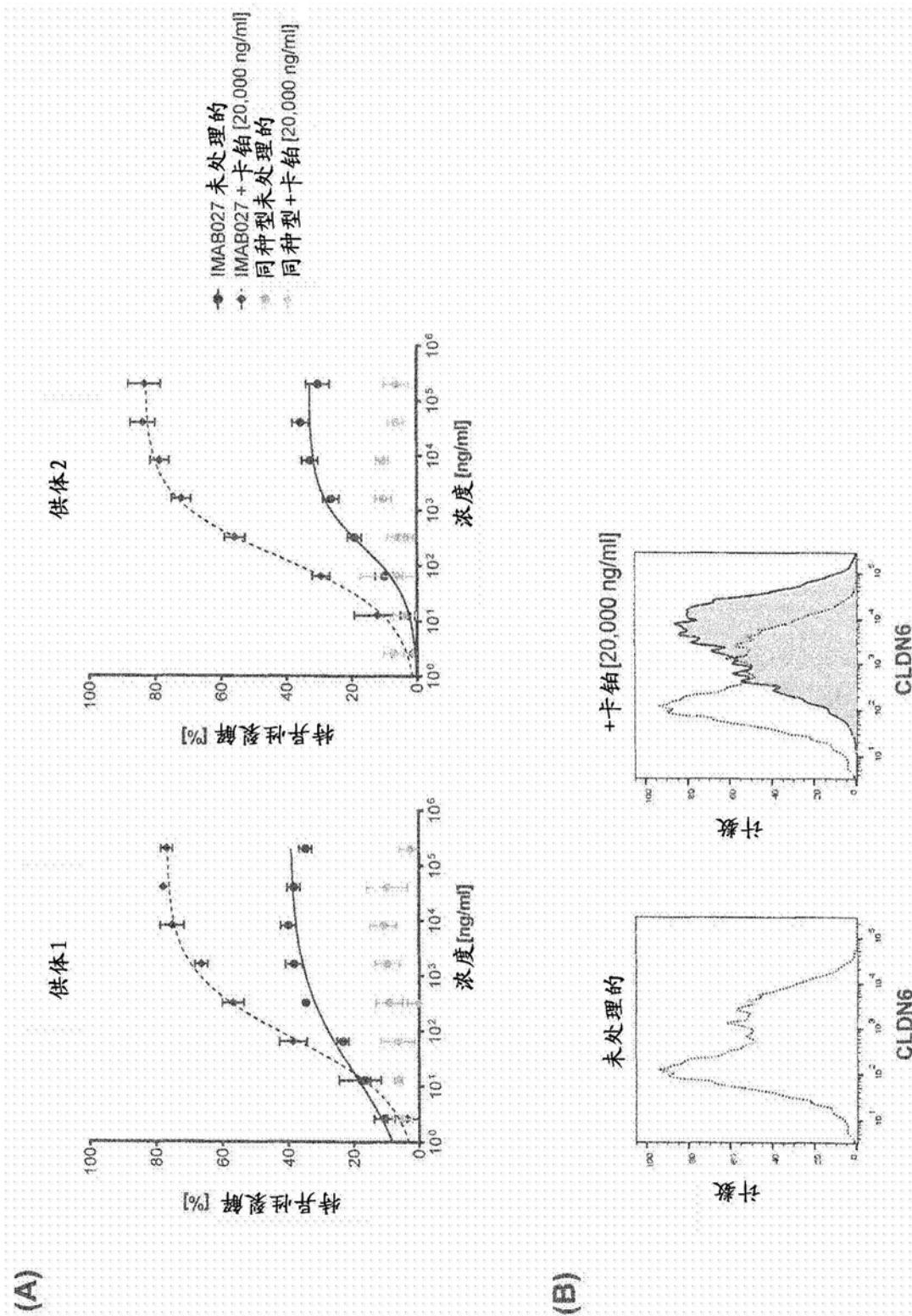


图15

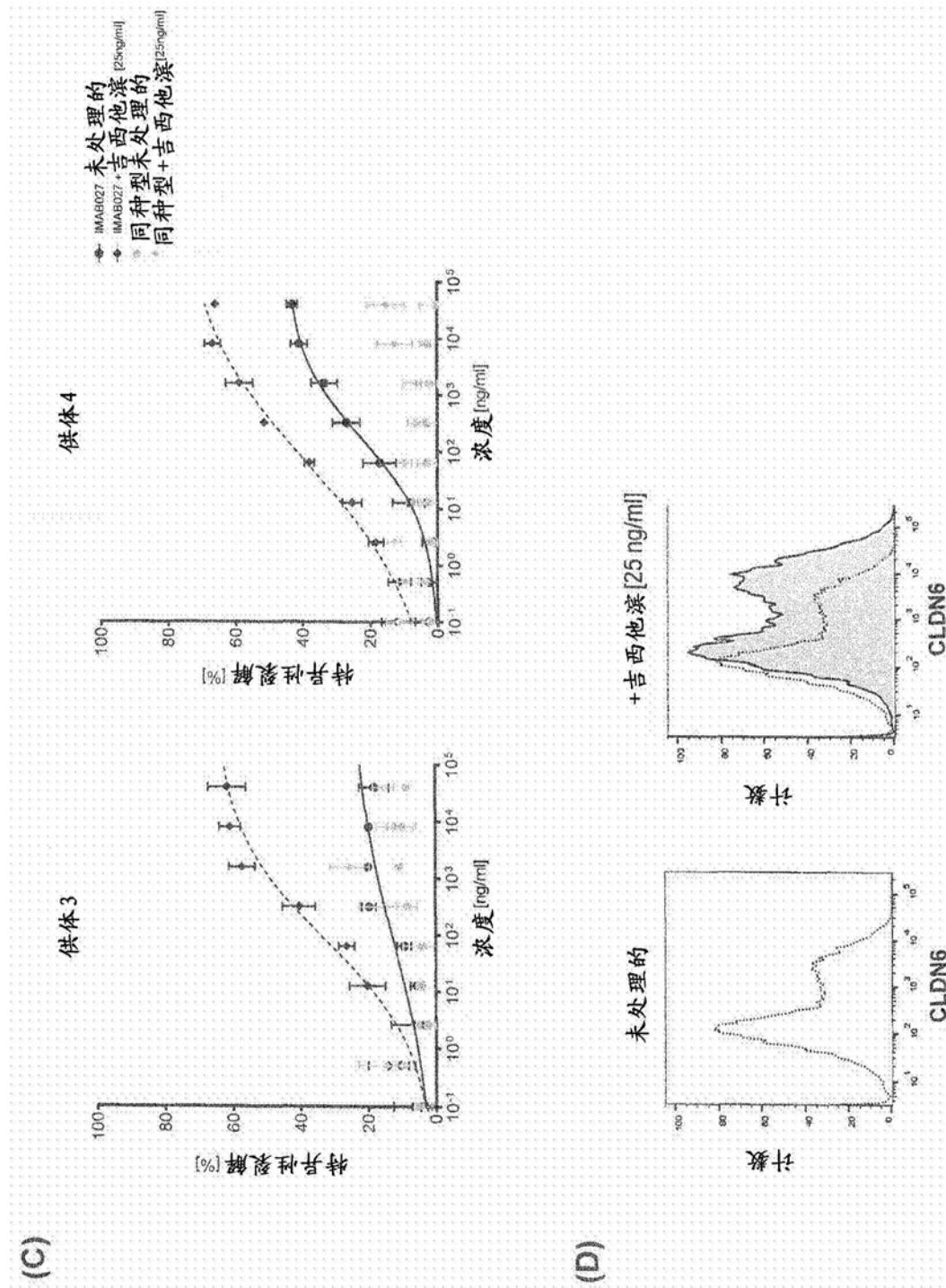


图15(续)

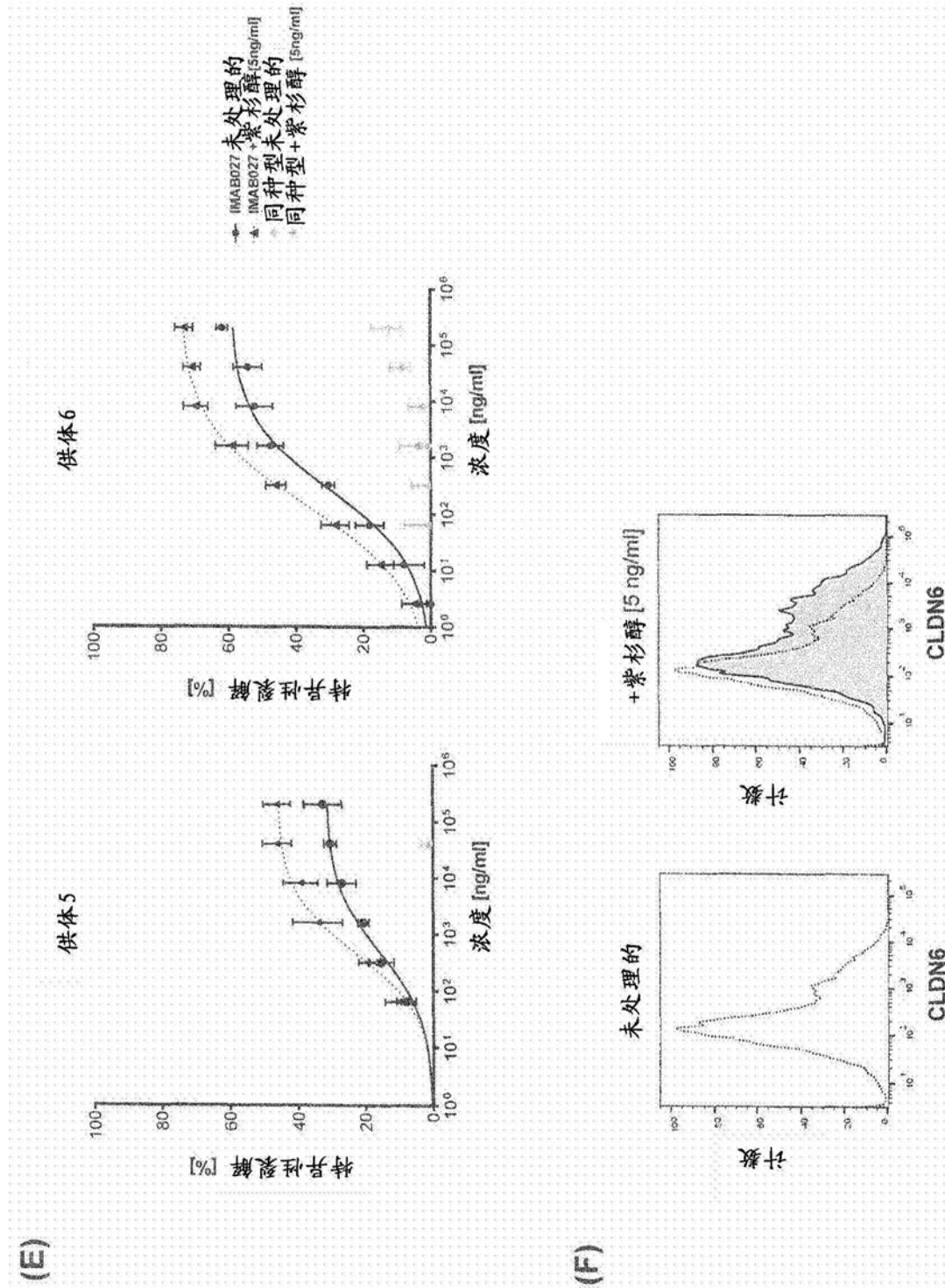


图15(续)

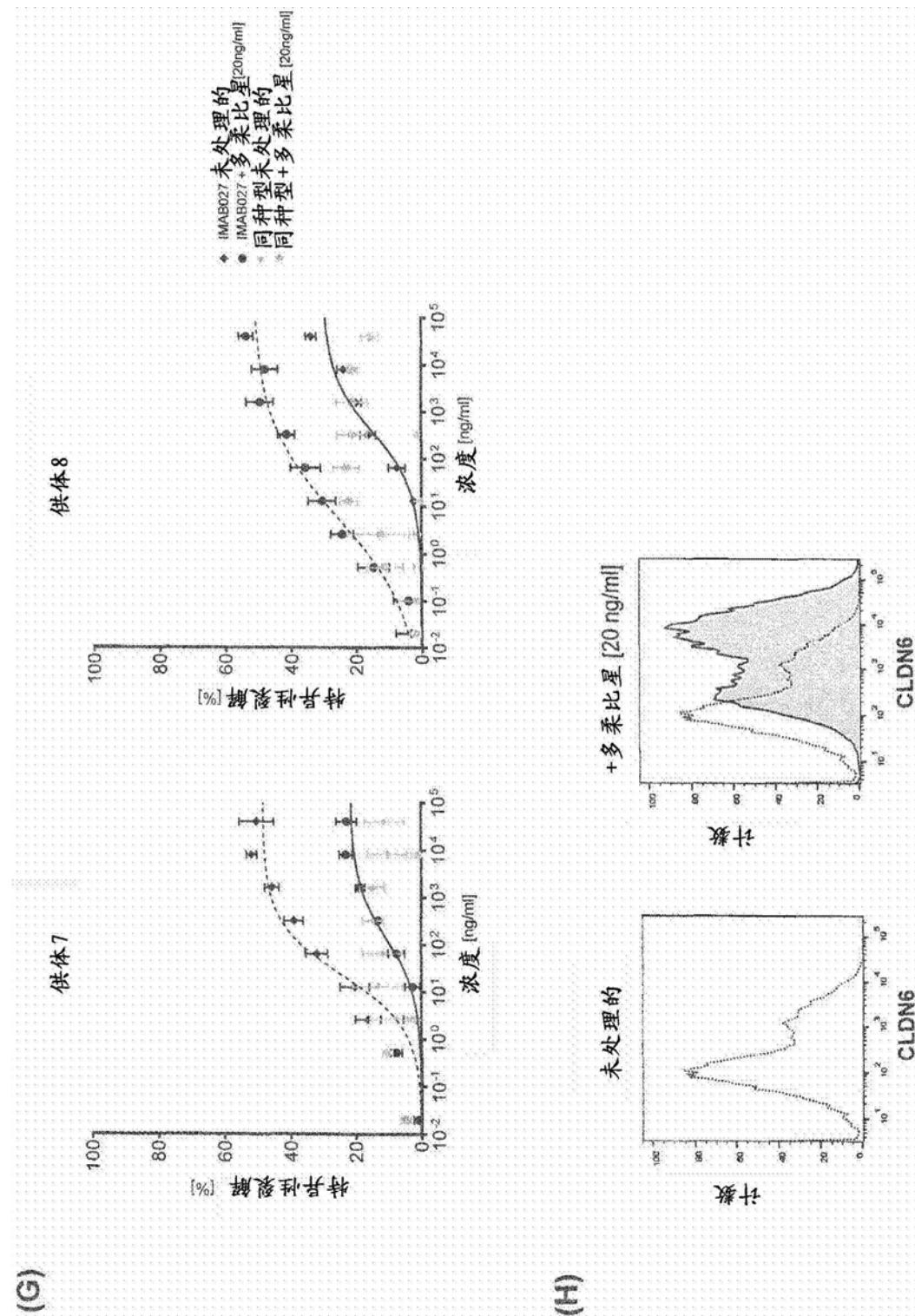


图15(续)

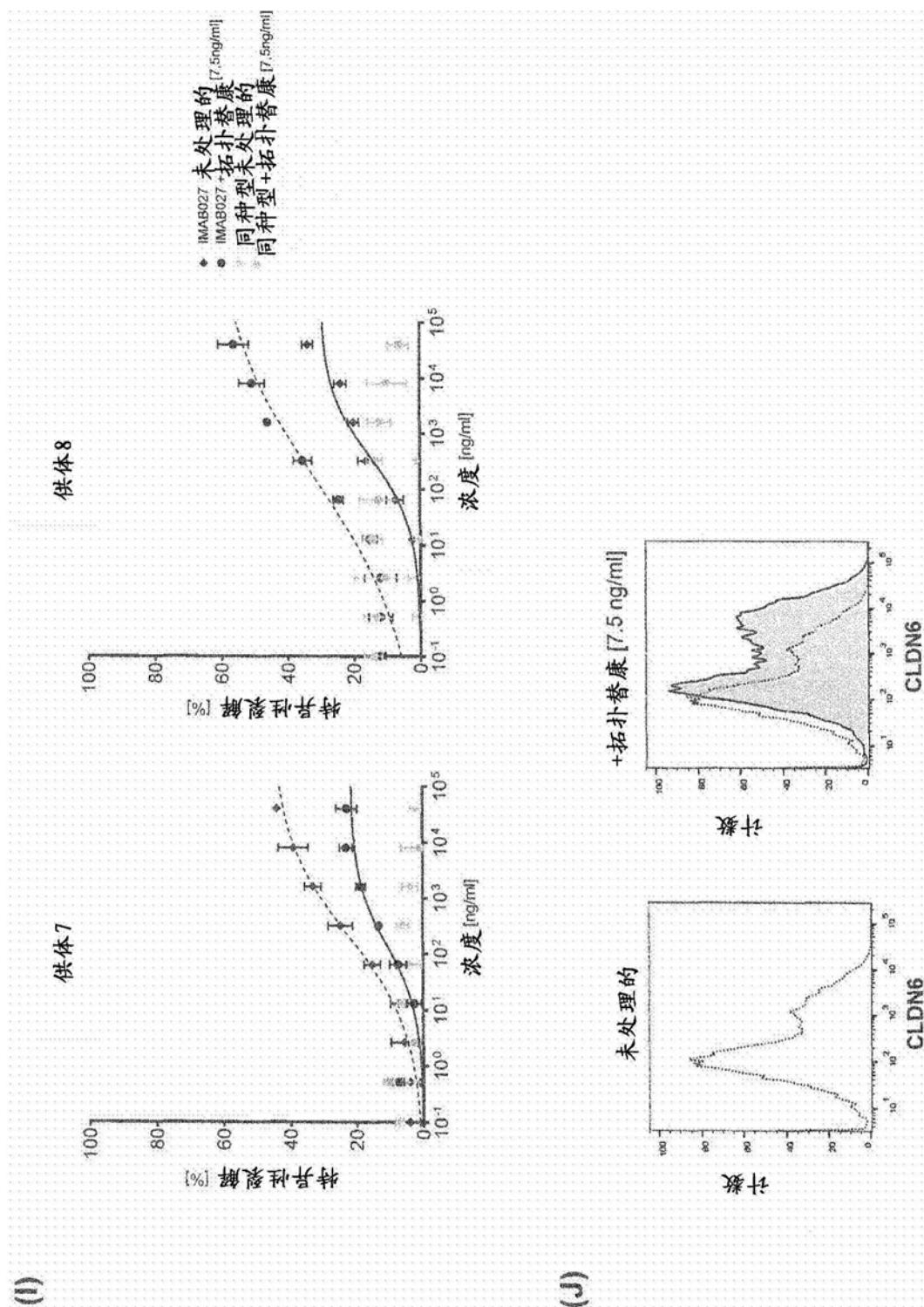


图15(续)

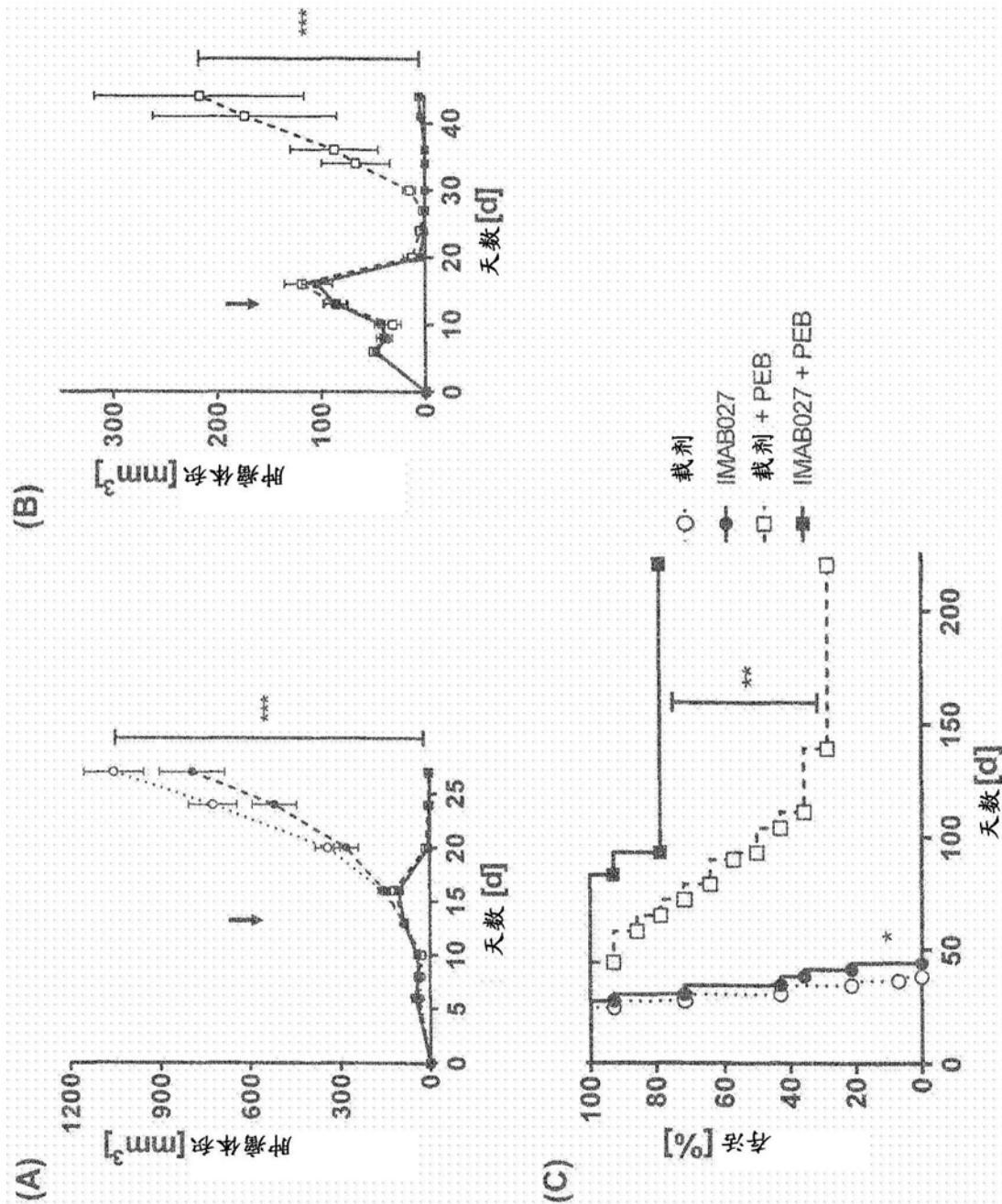


图16

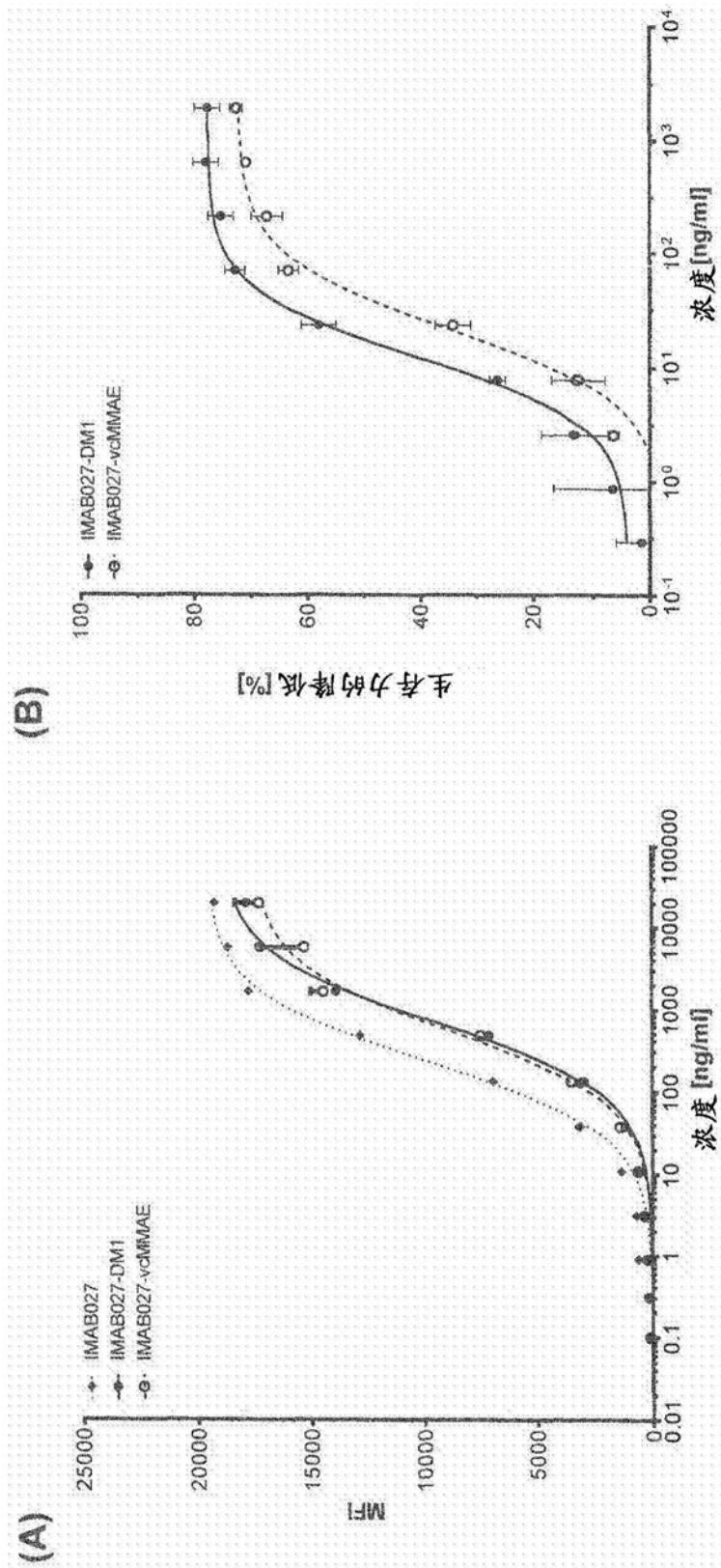


图17

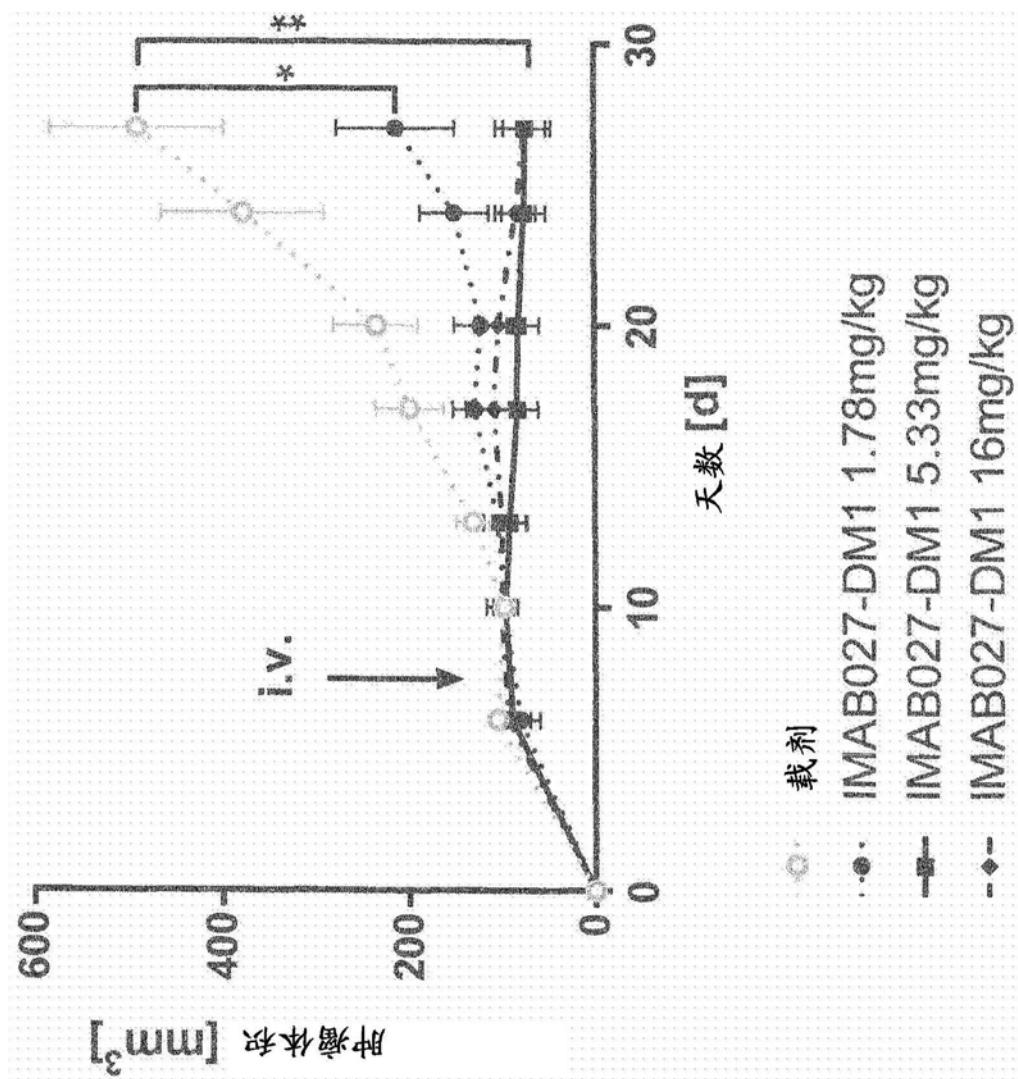


图18

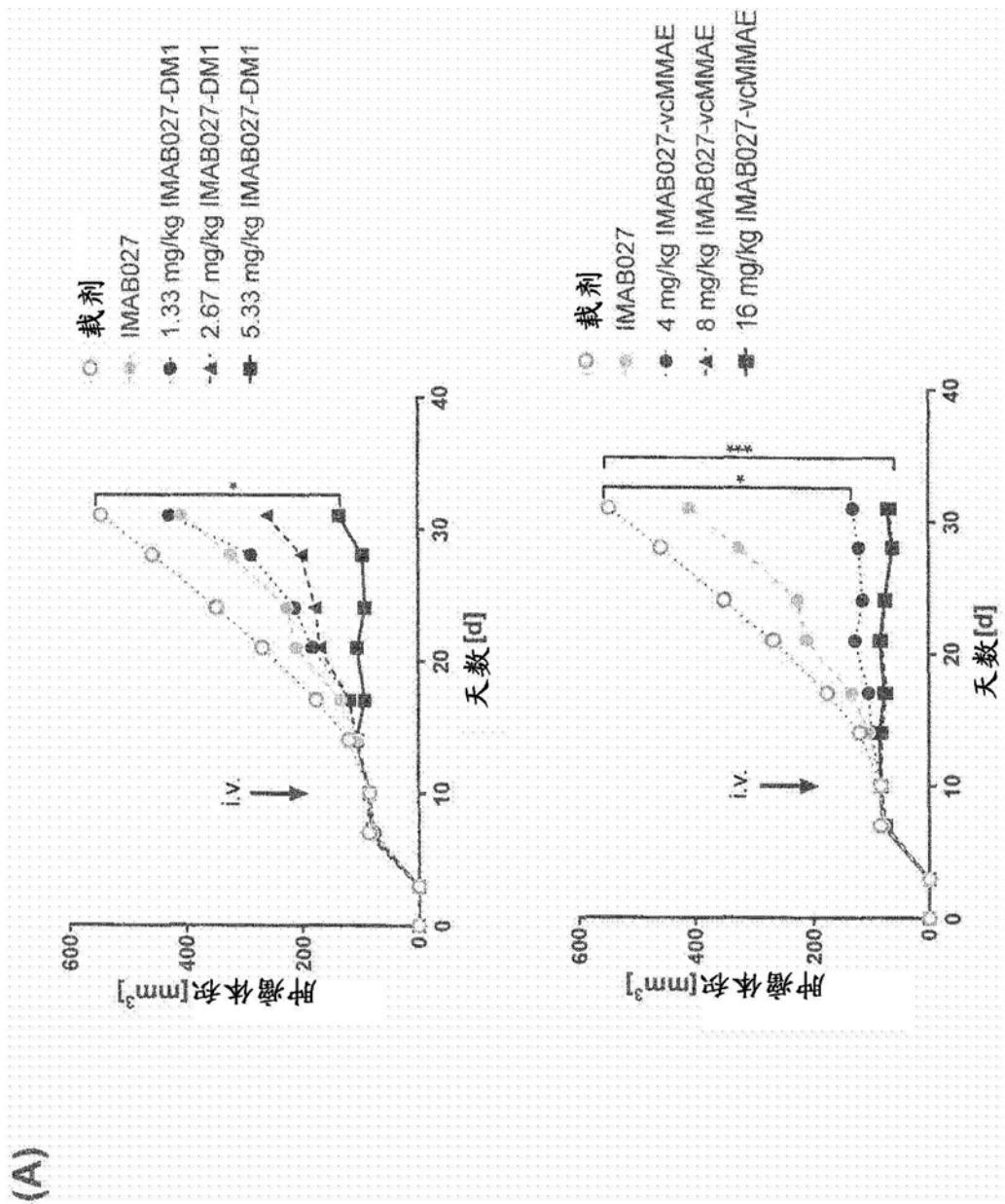


图19

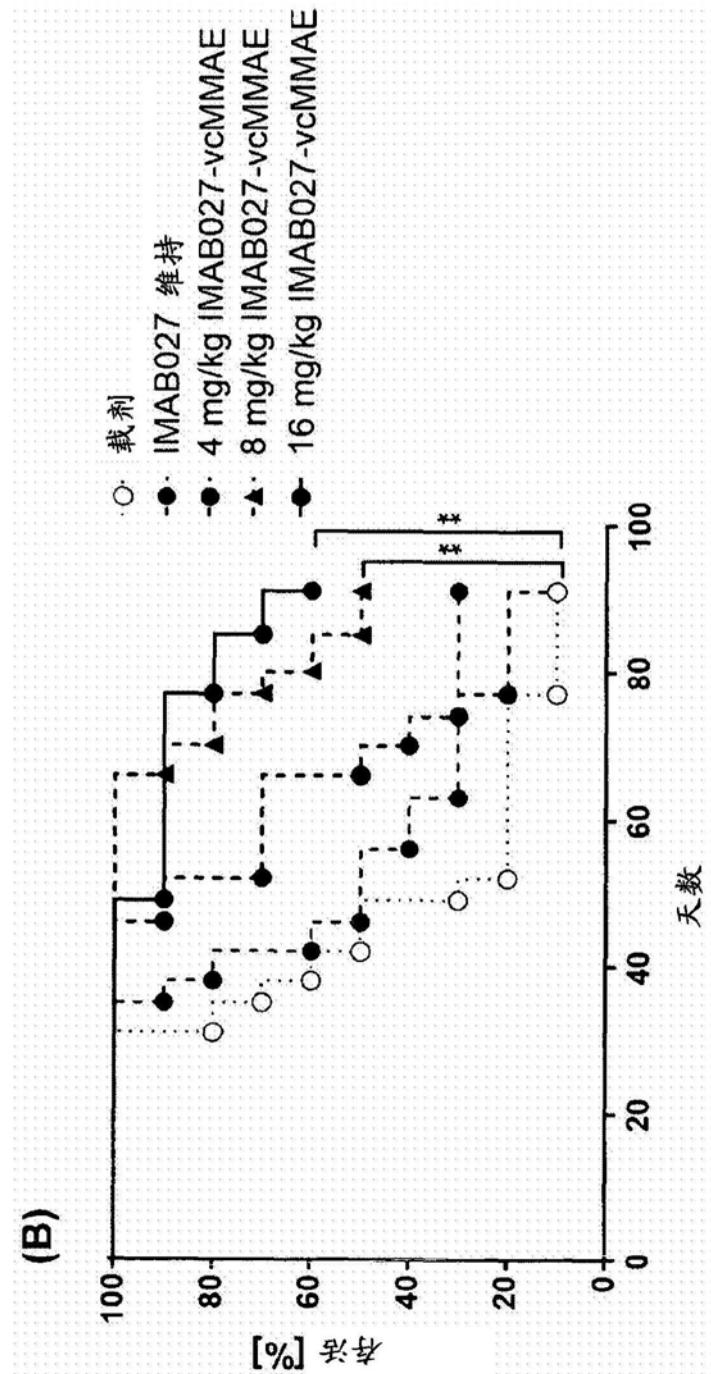


图19 (续)

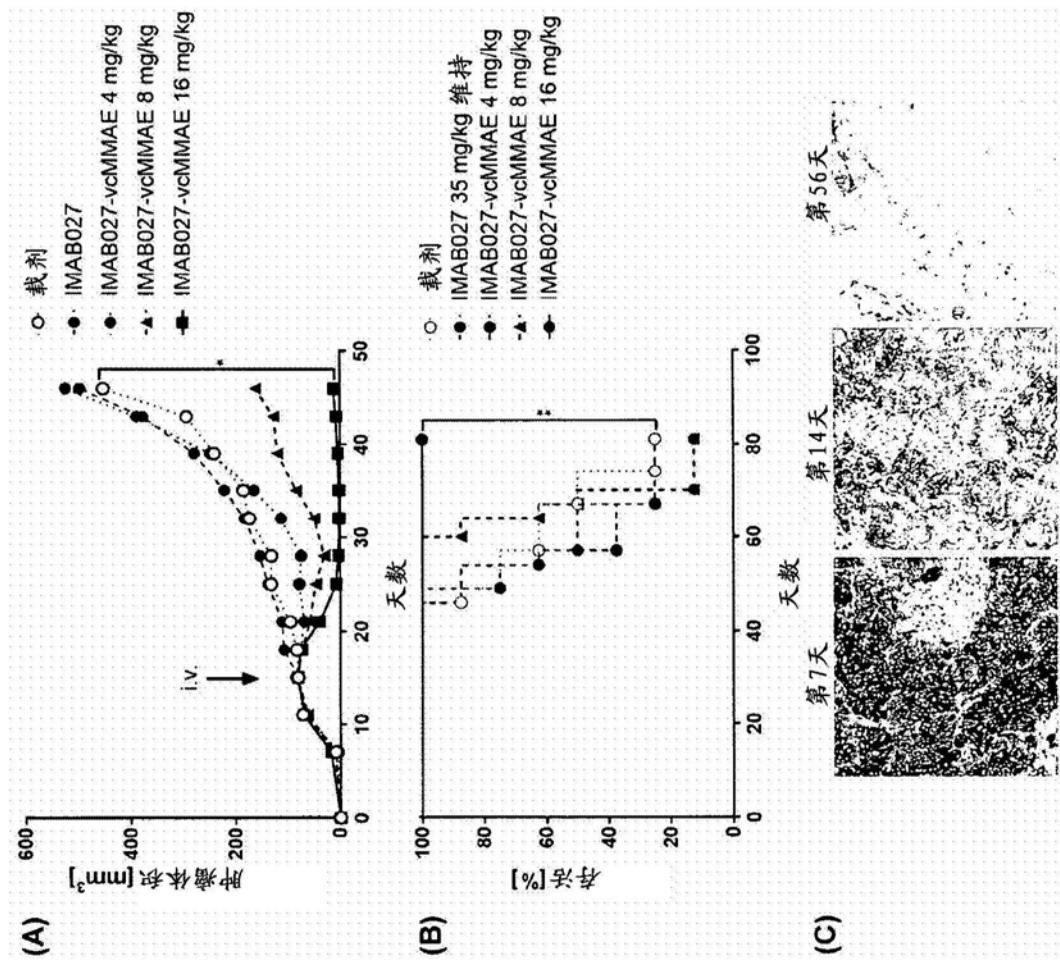


图20

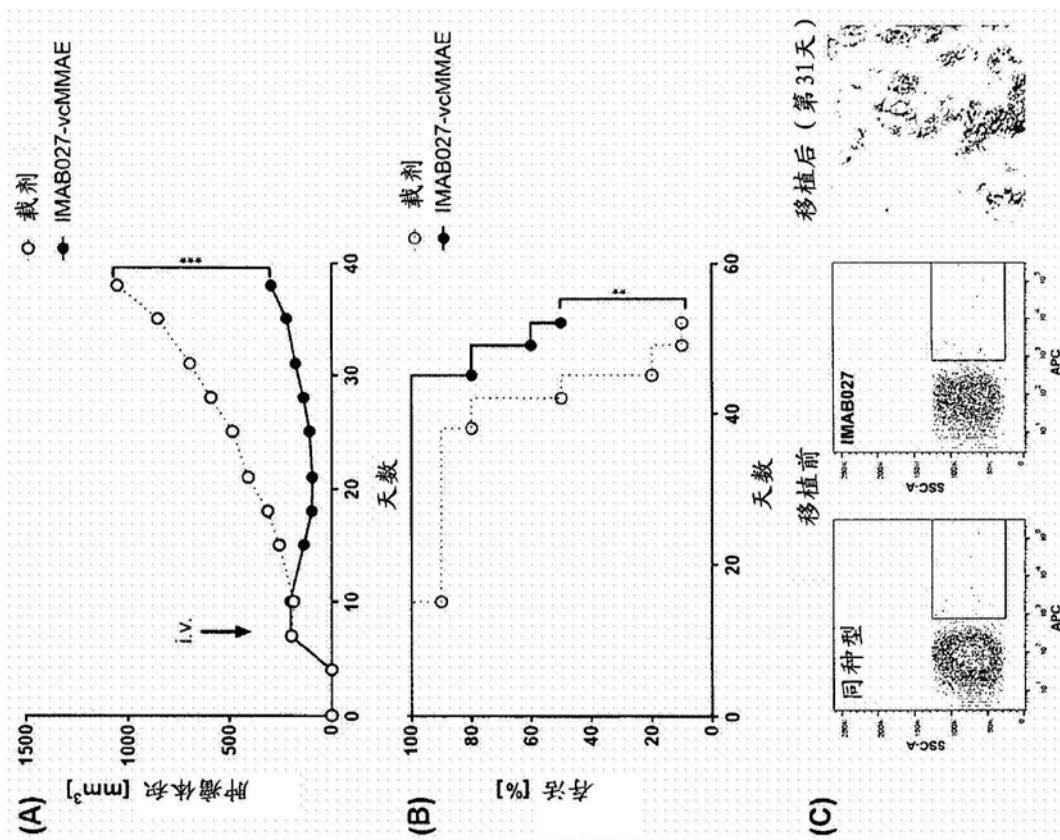


图21

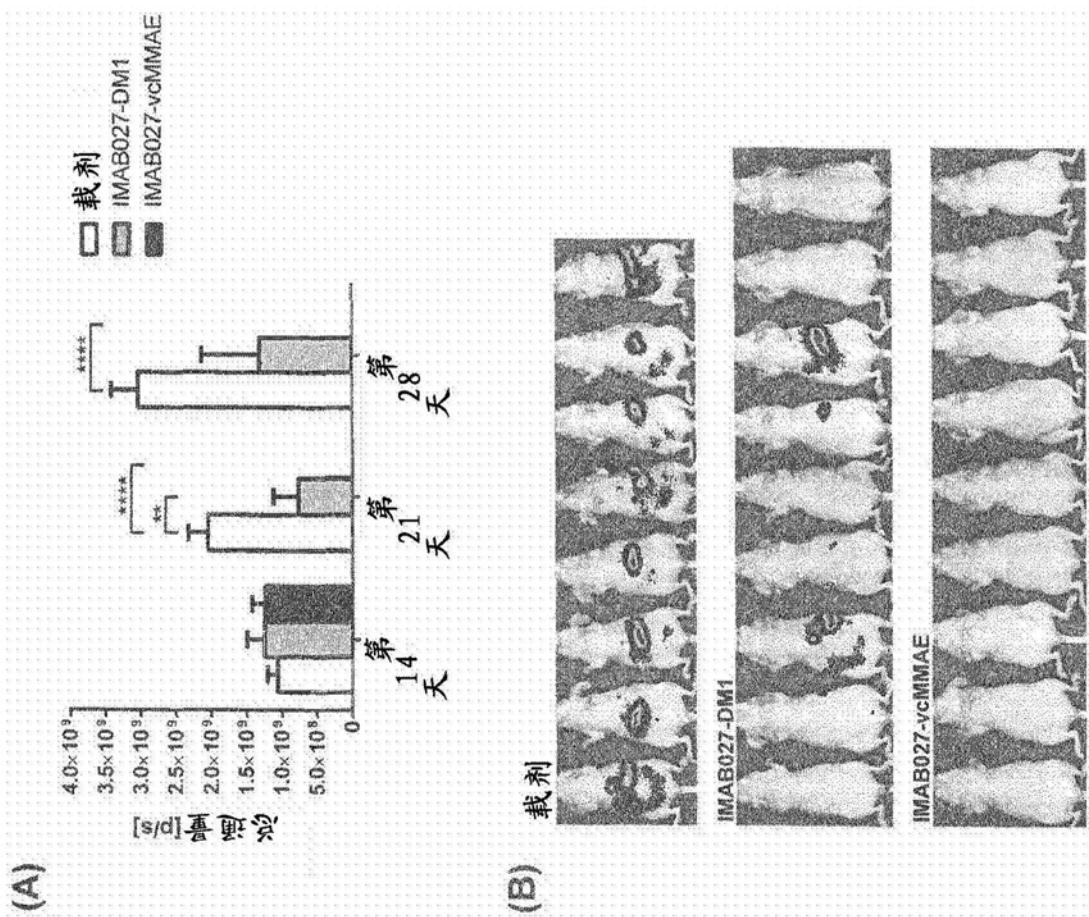


图22

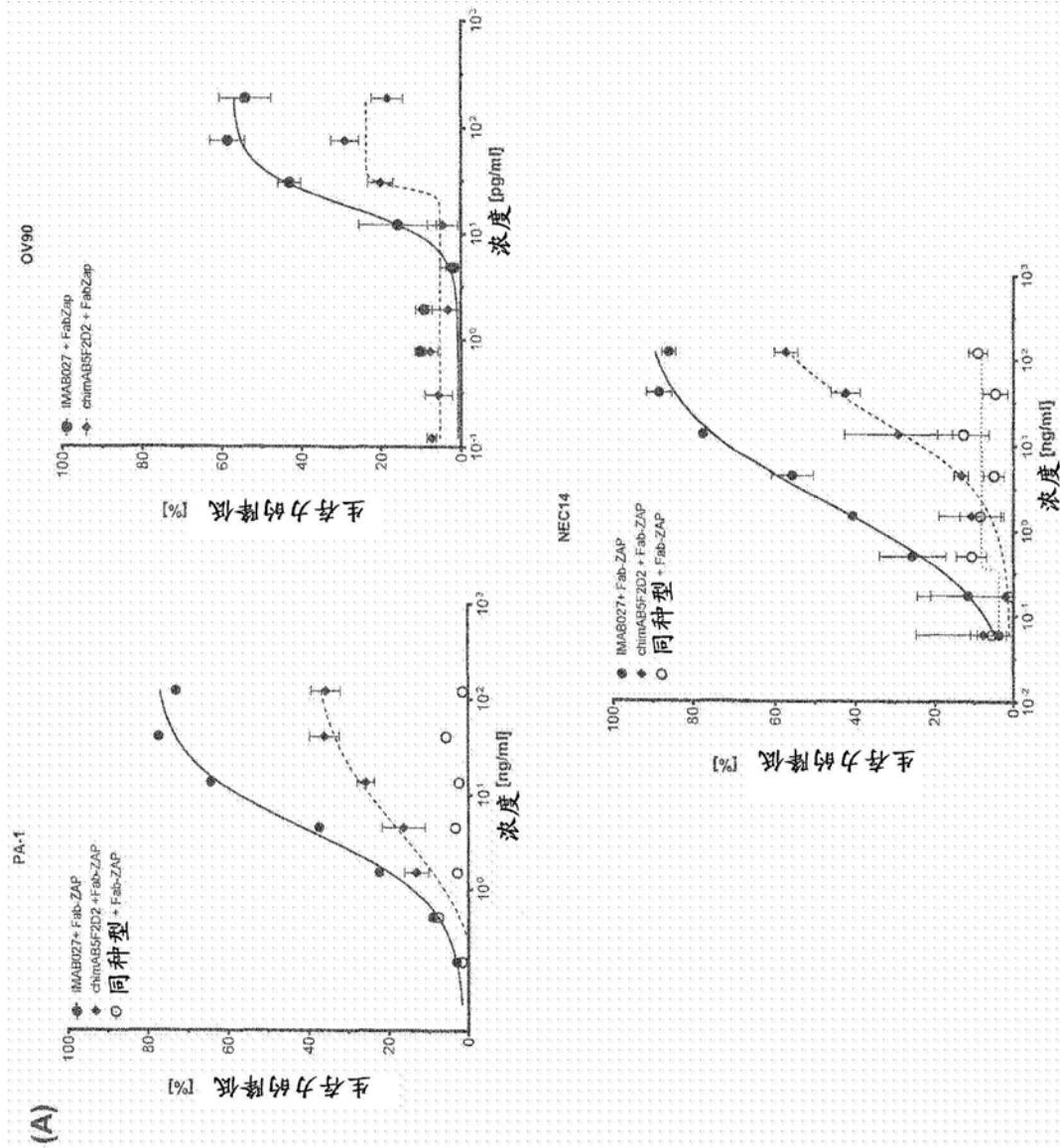


图23

(B)

名称	PA-1		OV90		NEC14	
	相对 EC50	相对最大值	相对 EC50	相对最大值	相对 EC50	相对最大值
IMAB027 结合	100%	100%	100%	100%	100%	100%
IMAB027 胞吞作用	100%	100%	100%	100%	100%	100%
chimAB5F2D2 结合	92%	143%	69%	97%	80%	93%
chimAB5F2D2 胞吞作用	102%	50%	237%	39%	980%	71%

图23 (续)