



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104059150 B

(45)授权公告日 2018.10.02

(21)申请号 201410213409.1

(22)申请日 2006.02.06

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104059150 A

(43)申请公布日 2014.09.24

(30)优先权数据

60/650,047 2005.02.04 US

(62)分案原申请数据

200680011089.5 2006.02.06

(73)专利权人 宏观基因有限公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 J·P·马瑟 P·E·罗伯茨

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

代理人 孟锐

(51)Int.Cl.

G07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

C12P 21/02(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

(56)对比文件

WO 03094859 A2,2003.11.20,

审查员 郭婷婷

权利要求书1页 说明书46页 附图1页

(54)发明名称

结合EPHA2的抗体及其使用方法

(57)摘要

本文提供的是公开了结合到抗原EphA2的抗体的开发和特征描述,所述抗原EphA2存在于多种来自乳房、肺、前列腺和结肠的人癌症。也公开了通过使用直接抗此抗原的此类抗体来诊断和治疗多种癌症的方法。

1. 一种由美国典型培养物保藏中心保藏的、保藏号为PTA-6056或PTA-6059的细胞系产生的抗体或其抗原结合片段,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv和Fv,其中所述抗原结合片段保留所述抗体的结合特异性,并且所述抗体或其抗原结合片段特异性结合EphA2表位,并且具有阻碍肿瘤细胞增殖的能力,而不增加EphA2的磷酸酪氨酸含量。

2. 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体选自人源化抗体或嵌合抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含来自权利要求1所述的抗体的重链的三个互补决定区和来自权利要求1所述的抗体的轻链的三个互补决定区,并且保留权利要求1所述的抗体的结合特异性。

3. 分离的核酸,其编码权利要求1的抗体或其抗原结合片段。

4. 权利要求3的核酸,其中所述核酸与启动子有效连接。

5. 权利要求4的核酸,其中所述启动子和所述核酸包含在表达载体中。

6. 权利要求3的核酸,其中所述核酸编码所述抗体的所述抗原结合片段。

7. 一种细胞系,其用包含权利要求3的核酸的载体转染、转化或感染。

8. 一种产生抗体或其抗原结合片段的方法,其包括以下步骤:

a. 在表达所述抗体或抗原结合片段的条件下培养用权利要求3的核酸转化的细胞系;
以及

b. 收获表达的抗体或其抗原结合片段。

9. 权利要求8的方法,其中所述细胞系是杂交瘤。

10. 权利要求9的方法,其中所述杂交瘤具有ATCC保藏号PTA-6056或PTA-6059。

11. 一种药物组合物,其包含治疗有效剂量的权利要求1-2中任一项的抗体或其抗原结合片段,以及可药用的载体。

12. 一种杂交瘤,其保藏在美国典型培养物保藏中心,保藏号为PTA-6056或PTA-6059,其中所述杂交瘤用于产生权利要求1的抗体。

13. 权利要求1-2中任一项的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

结合EPHA2的抗体及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2006年2月6日,申请号为200680011089.5,发明名称为“结合EPHA2的抗体及其使用方法”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于生物学和免疫疗法的领域。更具体的,它与结合EphA2的抗体家族的发现有关。本发明另外提供了使用抗EphA2家族的抗体,对与EphA2相关的多种人类疾病和癌症的诊断和/或治疗。

背景技术

[0003] 抗体除了已知的在诊断学中的应用,已经表现出可以用作治疗剂。例如,近年来免疫疗法,或者出于治疗目的使用抗体已经用来治疗癌症。被动免疫疗法涉及在癌症治疗中单克隆抗体的使用。见例如:Cancer:Principles and Practice of Oncology,第六版(2001)第20章第495-508页。通过直接抑制肿瘤细胞生长或存活,以及通过它们恢复机体的免疫系统中天然细胞杀伤活性的能力,这些抗体可以具有内在的治疗生物学活性。这些试剂可以被单独施用,或与放射治疗或化疗剂联合施用。被批准分别用于治疗非霍奇金淋巴瘤和乳腺癌的利妥昔单抗(Rituximab)和曲妥单抗(Trastuzumab)是此类疗法的两个实例。备选的,抗体可以被用于制备抗体偶联物,其中抗体连接着毒剂并通过特异性结合肿瘤将试剂介导到肿瘤。吉妥单抗(Gemtuzumab ozogamicin)是被批准用于白血病治疗的抗体偶联物的实例。能够结合癌细胞,并具有潜在的诊断和治疗用途的单克隆抗体已经在文献中被公开。见,例如,下列专利申请公开了一些靶蛋白的分子量等:美国专利号6,054,561(200KD c-erbB-2(Her2),及其他未知的大小为40-200KD的抗原)以及美国专利号5,656,444(50KD和55KD,癌胚蛋白质)。在临床试验中和/或被批准用于治疗实体瘤的抗体实例包括:曲妥单抗(抗原:180kD,HER2/neu)、依决洛单抗(Edrecolomab)(抗原:40-50kD,Ep-CAM)、抗人乳脂肪球(HMFG1)(抗原>200KD,HMW黏蛋白)、西妥昔单抗(Cetuximab)(抗原:150KD和170KD,EGF受体)、阿仑单抗(Alemtuzumab)(抗原:21-28KD,CD52)、以及利妥昔单抗(抗原:35KD,CD20)。

[0004] 用于治疗乳腺癌的曲妥单抗的抗原靶标(Her-2受体),以及在临床试验中用于治疗一些癌症的西妥昔单抗的抗原靶标(EGF受体),在多种正常人类成体组织,包含皮肤、结肠、肺、卵巢、肝脏、及胰腺中都存在可检测的水平。使用上述治疗的安全差异可能是由表达水平或进入途径或抗体在这些部位的活性之间的差异提供的。

[0005] 免疫疗法的另一种类型是用抗原的主动免疫疗法或接种,所述抗原存在于特定癌症或者指导该抗原表达的DNA构建体中,随后引起个体的免疫应答,即,诱导个体主动产生抗其自身癌症的抗体。主动免疫还不及被动免疫疗法或免疫毒素那样常用。

[0006] 已经建议了一些疾病(包含癌症)进展的模型。理论范围是从单一感染/转化事件的起因,到由“疾病类似”或“癌症类似”组织类型逐步进化导致为最终具有完全病理性或恶性能力的组织。一些学说认为对于癌症,例如,单突变事件足以引起恶性肿瘤,而另一些学

说则认为后继的改变也是必需的。另一些学说则提出不断增加的突变负荷和肿瘤级别,通过细胞水平的突变选择事件连续体,对于瘤形成的起始和进展都是必须的。一些癌症靶标被发现仅存在肿瘤组织中,而其它则是存在于正常组织中,而在肿瘤组织中是表达上调和/或过量表达的。在上述情况下,一些研究员主张过量表达与获得恶性肿瘤有关,同时另一些研究员则主张过量表达仅仅是作为病状加重趋势的标志物。

[0007] 理想的诊断和/或治疗抗体所需要的一个方面在于开发和特征描述与多种癌症相关的抗原。只有极少数的抗原在多种类型的癌症中都表达(例如,“泛癌”抗原),而在非癌性细胞中只有有限的表达。此类抗原的分离和纯化将可用于制备靶向该抗原的抗体(例如,诊断的或治疗的)。与抗唯一一种特定类型癌症的相关抗原的抗体相比,结合“泛癌”抗原的抗体可以靶向在不同组织中发现的多种癌症。抗原也将用于药物发现(例如,小分子)和进一步对细胞调控、生长和分化的鉴定。

[0008] 位于病态细胞和/或癌细胞表面的新型靶是需要的,所述新型靶与可以特异性识别细胞表面靶标的抗体和其他药剂结合,可以用于治疗此类疾病和/或癌症。基于本文公开的发现,存在对特异性识别位于细胞表面的靶标的新型抗体和其他试剂的进一步的需要,所述抗体和试剂,可以调控(通过降低或增强)EphA2的疾病促进活性。

[0009] EphA2,以前已知为ECK,是在成人上皮细胞中表达的130KD的跨膜受体酪氨酸激酶。见Lindberg等人(1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:6316-6324。EphA2是受体酪氨酸激酶Eph家族的一名成员,该家族的独特之处在于它们识别锚定在相邻细胞细胞膜上的配体,已知为肝配蛋白。见Bartley等人(1994) *Nature* 368:558-560。人的EphA2受体的序列在文献中所知。它含有534个氨基酸的胞外结构域,24个氨基酸的跨膜结构域,以及418个氨基酸的含有酪氨酸激酶结构域的胞质结构域。

[0010] EphA2在多种癌细胞中过量表达,例如,在乳腺癌、前列腺癌、肺癌、以及结肠癌和浸润性黑色素瘤(aggressive melanomas)中,但是在这些相同组织的非癌性损伤中没有过量表达的报道。见,例如,Rosenberg等人(1997) *Am. J. Physiol.* 273:G824-G832;Easty等人(1995) *Int. J. Cancer* 60:129-136;Walker-Daniels等人(1999) *Prostate* 41:275-280;Zantek等人(1999) *Cell Growth&Differ.* 10:629-638;Zantek等人(2001) *Clin. Cancer Res.* 7:3640-3648;Zelniski等人(2001) *Cancer Res.* 61:2301-2306;W001/121172;和W001/12840。但是,被转化而过量表达EphA2的细胞表现出恶性增长和配体结合,导致EphA2被内化和降解,逆转了EphA2过量表达的原癌基因效应。见Zelniski等人(2001) *Cancer Res.* 61:2301-2306;和Walker-Daniels等人(2002) *Mol. Cancer Res.* 1:79-87。

[0011] 本领域的其他人已经提议使用EphA2作为治疗靶标。一名作者建议使用EphA2的配体例如肝配蛋白A1与人类免疫球蛋白G融合。将表达EphA2的细胞接触肝配蛋白A1-Fc融合蛋白质会导致EphA2表达的下调。见Duxbury等人(2004) *BBRC* 320:1096-1102。

[0012] 抗eck/EphA2的抗体是已知的,见例如Lindberg等人(1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:6316-6324。其他人已经描述过使用抗EphA2抗体进行基于抗体的靶向作用,见例如Charles-Kinch等人(2002) *Cancer Res.* 62:2840-2847,描述了使用EphA2的胞外结构域与人类免疫球蛋白融合,产生抗EphA2的单克隆抗体。用这些抗EphA2的单克隆抗体治疗癌细胞导致在软琼脂上生长的细胞的形态学改变和抑制。

[0013] 抗EphA2的抗体已经被制备并计划用于癌症的治疗(见例如,美国专利6,927,203;

国际专利公布号W001/12840和W001/12172;美国临时专利申请号60/379,322和60/379,368;美国专利5,824,303)。W02003US15044描述的方法包含施用有效量的结合EphA2并激活EphA2的抗体,从而增加EphA2的磷酸化并降低EphA2的水平。在其它实施方案中,本申请描述了施用有效量的抗体,所述抗体结合EphA2并抑制癌细胞在软琼脂中的集落形成、抑制在三维基膜或胞外基质制品中管状网络的形成,优选的结合暴露在癌细胞上而非非癌细胞表面的EphA2表位,和/或具有低K_{off},因此抑制肿瘤细胞生长和/或转移。美国专利6,927,203描述了使用增加EphA2磷酸酪氨酸含量的抗体,阻止肿瘤细胞增殖。

[0014] PCT专利申请W0 200391383描述了从EphA2衍生的肽及其在抗肿瘤免疫疗法中的应用。它描述了可以被用于诱导或模拟细胞毒性T淋巴细胞对过量表达EphA2的肿瘤细胞的应答的,基于EphA2表位的肽疫苗接种或免疫疗法。

[0015] 虽然EphA2抗体是已知的,但是仍然需要特殊的抗EphA2抗体,所述抗体特别有效的抑制肿瘤细胞生长,高于现有技术显示的EphA2抗体所表现出的效率水平。

[0016] 本文公开的所有文献、出版物,和专利申请都在本文中以其全文引用作为参考。

发明内容

[0017] 本文公开的发明涉及结合抗原EphA2的抗体,该抗原表达在多种人类癌症中。因此,一方面,本发明是优选的结合抗原EphA2的抗体家族,或抗体或多肽(其可以是或不是抗体)。本发明中所述的抗体,在抑制肿瘤细胞生长方面是惊人的和非常有效的,超过了现有技术显示的EphA2抗体所表现的效率水平。其中一些抗体在本文中称作LUCA19、SPL1、LUCA40或SG5。在本发明的一些方面中,某些抗体已被发现具有阻碍肿瘤细胞增殖的能力,同时并不增加EphA2的磷酸酪氨酸含量。

[0018] 另一方面,本发明是用任意下列宿主细胞系生产的抗EphA2的单克隆抗体:2003年3月20日储存于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的PTA-5070,2004年6月8日储存于美国典型培养物保藏中心的PTA-6056,2004年6月8日储存于美国典型培养物保藏中心的PTA-6059,以及2006年2月2日储存于美国典型培养物保藏中心的SG5生产宿主细胞系(SG.3.15.B4.1F9)。

[0019] 另一方面,本发明是竞争性抑制抗EphA2抗体与EphA2之间特异性结合的抗体或多肽(可以是或不是抗体)。另一方面,本发明是优选的结合与EphA2上被LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40优选的结合的表位相同的表位的抗体或多肽(可以是或不是抗体)。

[0020] 另一方面,本发明是含有抗EphA2抗体的片段或区域的抗体。在一个实施方案中,片段是抗EphA2抗体的轻链。在另一个实施方案中,片段是抗EphA2抗体的重链。在另一个实施方案中,片段包含来自抗EphA2抗体的轻链和/或重链的一个或多个可变区。在另一个实施方案中,片段包含来自抗EphA2抗体的轻链和/或重链的一个或多个互补决定区(CDR)。

[0021] 另一方面,本发明提供包含任意下列的多肽(可以是或不是抗体):抗EphA2抗体的a) 一个或多个CDR;b) 来自轻链的三个CDR;c) 来自重链的三个CDR;d) 来自轻链的三个CDR和来自重链的三个CDR;e) 轻链的可变区;f) 重链的可变区。

[0022] 另一方面,本发明是从LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40衍生的人源化抗体。在一些实施方案中,人源化抗体包含抗EphA2抗体的一个或多个CDR。另一方面,本发明提供结合与抗EphA2抗体所结合表位相同的人源化抗体。通常,本发明的人源化抗体包含一个或多个(一

个、二个、三个、四个、五个、六个) CDR, 其与抗EphA2抗体的CDR相同和/或衍生自抗EphA2抗体的CDR。另一方面, 本发明提供结合与抗EphA2抗体所结合表位相同的人抗体。

[0023] 另一方面, 本发明是包含从抗EphA2抗体的重链和轻链的可变区衍生的可变区, 以及从人抗体的重链和轻链的恒定区衍生的恒定区的嵌合抗体。

[0024] 另一方面, 本发明是生产单克隆抗EphA2抗体的宿主细胞(ATCC编号PTA-5070、PTA-6056、PTA-6059或SG.3.15.B4.1F9(ATCC编号PTA-XXXX))或其后代。

[0025] 另一方面, 本发明是编码抗EphA2抗体的分离的多核苷酸, 所述抗体是由ATCC保藏编号为PTA-5070、PTA-6056或PTA-6059的宿主细胞或者由宿主细胞SG.3.15.B4.1F9(ATCC编号PTA-XXXX)及其后代生产的。另一方面, 本发明提供了编码本文中描述的任意抗体(包含抗体片段)以及任意其它肽的多核苷酸。

[0026] 另一方面, 本发明是由本文中描述的任意抗体或多肽与EphA2结合的复合体。在一些实施方案中, EphA2出现在黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌或前列腺癌的细胞中。在一些实施方案中, 本发明是由抗EphA2抗体或优选的结合抗EphA2抗体所优选结合表位的抗体与EphA2结合的复合体。在一个实施方案中, 抗EphA2抗体或任意优选结合抗EphA2抗体所优选结合表位的抗体上连接了治疗剂(例如毒素)。

[0027] 另一方面, 本发明是由任意本文中描述的抗体或多肽与表达EphA2的癌细胞结合的复合体。在一些实施方案中, 癌细胞为黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌或前列腺癌的细胞。在一些实施方案中, 抗体为SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40或优选的结合任意这些抗EphA2抗体所优选结合表位的任意抗体。在一些实施方案中, SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40抗体或优选的结合任意这些抗EphA2抗体所优选结合表位的任意抗体连接了治疗剂(例如毒素)。

[0028] 另一方面, 本发明是EphA2上被SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40所优选结合的表位的复合体, 其反过来被任意本文中描述的抗体或多肽结合。在一些实施方案中, 表位是位于黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌或前列腺癌的细胞上。在一些实施方案中, 抗体为SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40或优选的结合任意这些抗EphA2抗体所优选结合表位的任意抗体。在一些实施方案中, SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40抗体或任意优选的结合任意这些抗EphA2抗体所优选结合表位的抗体上连接了治疗剂(例如毒素)。

[0029] 另一方面, 本发明是包含本文中描述的任意多肽(包含任意抗体例如抗EphA2抗体)或多核苷酸的药物组合物, 例如药物组合物包含抗EphA2抗体、连接治疗剂的抗EphA2抗体、含有抗EphA2抗体片段的抗体、抗EphA2抗体的人源化抗体、含有从抗EphA2抗体可变区衍生的可变区和从人抗体的恒定区衍生的恒定区的嵌合抗体, 或具有一个或多个抗EphA2抗体性质的人抗体, 以及可药用赋形剂。

[0030] 另一方面, 本发明是产生与病态的和/或癌变细胞反应的抗EphA2单克隆抗体的方法, 包括下列步骤: (a) 用免疫原免疫哺乳动物宿主; (b) 从该哺乳动物获得淋巴细胞; (c) 将(b)中的淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合产生杂交瘤; (d) 培养(c)中的杂交瘤以生产单克隆抗体; 以及(e) 筛选抗体只挑选那些只结合病态的和/或癌变细胞或细胞系却不结合非癌变或正常细胞或细胞系的抗体, 或与正常细胞的结合水平更低或结合方式不同的抗体。

[0031] 另一方面, 本发明是产生抗EphA2家族抗体的方法, 包含在允许生产抗体的条件下培养编码此类抗体的宿主细胞及其后代, 以及纯化抗EphA2抗体。

[0032] 另一方面, 本发明是产生抗EphA2家族抗体的方法, 包括在允许生产抗体的条件下

培养宿主细胞及其后代,以及纯化抗EphA2抗体。

[0033] 另一方面,本发明还提供通过在合适的细胞中表达编码抗体(可以分别表达单个轻链或重链,或从一个载体同时表达轻链和重链)的一个或多个多核苷酸,通常随后是回收和/或分离目标抗体或多肽,来产生本文中描述的任意抗体(或肽)的方法,。

[0034] 另一方面,本发明是竞争性抑制抗EphA2抗体优选结合EphA2的抗EphA2抗体或肽(可以是或不是抗体)。在一些实施方案中,本发明是优选的结合与其它抗EphA2抗体在EphA2上的相同或不同的表位的抗体或多肽(可以是或不是抗体)。

[0035] 另一方面,本发明是包含被特异性针对EphA2表位的抗体结合的EphA2的组合物。在一个实施方案中,抗体是抗EphA2。在另一些实施方案中,施用了两种或多种抗EphA2抗体,此类抗体定位在EphA2的两个或多个不同的表位上。在一些实施方案中,抗EphA2抗体连接了治疗剂或可检测的标签。

[0036] 另一方面,本发明是包含抗EphA2抗体的片段或区域的抗体。在一个实施方案中,片段是抗体的轻链。在另一个实施方案中,片段是抗体的重链。在另一个实施方案中,片段包含来自抗体的轻链和/或重链的一个或多个可变区。在另一个实施方案中,片段包含来自抗体轻链和/或重链的一个或多个互补决定区(CDR)。

[0037] 另一方面,本发明还提供包含任意下列各项选项的多肽(可以是或不是抗体):来自抗EphA2抗体的a)轻链或重链的一个或多个CDR(或其片段);b)轻链的三个CDR;c)重链的三个CDR;d)轻链的三个CDR以及重链的三个CDR;e)轻链的可变区;f)重链的可变区。

[0038] 另一方面,本发明是人源化的抗体。在一些实施方案中,人源化的抗体包含非人的抗EphA2抗体的一个或多个CDR。在一些实施方案中,人源化的抗体结合在与其它抗EphA2抗体相同或不同的表位上。通常,本发明的人源化抗体包含与最初的非人抗EphA2抗体的CDR相同和/或来自其的一个或多个(一个、二个、三个、四个、五个、六个,或其片段)CDR。在一些实施方案中,人抗体结合在与其它抗EphA2抗体相同或不同的表位上。另一方面,本发明是包含从非人的抗EphA2抗体的重链和轻链可变区衍生的可变区,以及从人抗体的重链和轻链恒定区衍生的恒定区的嵌合抗体。

[0039] 另一方面,本发明是编码由保藏编号分别为ATCC PTA-5070、PTA-6056或PTA-6059的宿主细胞,以及宿主细胞SG.3.15.B4.1F9(ATCC编号PTA-XXXX)及其后代生产的抗体SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40中任意一个的分离的多核苷酸。本发明包含具有任意上述特异性抗体的内在结合活性或生物学活性的抗体多肽。另一方面,本发明还提供编码本文中描述的任意抗体(包括抗体片段)以及任意其他多肽的多核苷酸。

[0040] 另一方面,本发明是包含本文中描述的任意多肽(包含本文中描述的任意抗体)或多核苷酸的药物组合物,例如药物组合物包含连接化疗剂的抗EphA2抗体、含有抗EphA2抗体片段的抗体、非人抗EphA2抗体的人源化抗体、含有从非人的抗EphA2抗体可变区衍生的可变区和从人抗体的恒定区衍生的恒定区的嵌合抗体,或具有非人的抗EphA2抗体的一个或多个性质的人抗体,或连接了化疗剂(例如放射性部分)的本文中描述的任意抗EphA2抗体,以及可药用赋形剂。

[0041] 一方面,本发明是包含抗EphA2抗体结合在呈现在病态或癌变细胞表面的EphA2上的组合物。在优选的实施方案中,癌细胞选自卵巢癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌和乳腺癌的癌细胞。在一些实施方案中,癌细胞是分离的。在一些实施方案中,癌细胞是位于生

物学样品中。通常,该生物学样品来自个体,例如人类。

[0042] 另一方面,本发明是通过在来自个体的细胞上检测EphA2诊断个体疾病的方法,特别是与个体中的炎症反应或自身免疫应答相关的疾病或病症。在本发明的另一些方面中,提供的方法被用于调控个体中的炎症反应或自身免疫应答。可使用本发明的组合物和方法治疗的、由于炎症或自身免疫失调导致的疾病和症状包括(作为说明而非限制)多发性硬化、脑膜炎、脑炎、中风、其它脑外伤、包括溃疡性结肠炎和局限性回肠炎的炎性肠病、重症肌无力、狼疮、类风湿性关节炎、哮喘、急性幼年型糖尿病、艾滋病痴呆、动脉粥样硬化、肾炎、视网膜炎、特应性皮炎、牛皮癣、心肌缺血和急性白细胞介导肺损伤。

[0043] 本发明的抗体和其他治疗剂的治疗性用途的其它启示还包括对有器官或移植排斥风险的个体进行施用。在近年,在移植例如皮肤、肾脏、肝脏、心脏、肺、胰腺和骨髓的组织 and 器官的外科技术效率上已有巨大的改善。最关键的问题可能是缺乏用于诱导接受者对被移植的同种异体移植物或器官产生免疫耐受的满意的试剂。当同种异基因的细胞或器官被移植进入宿主(即,供者和受者是同一物种的不同个体)后,宿主的免疫系统很可能增加对移植物中外源抗原的免疫应答(宿主抗移植物病)从而导致被移植组织的破坏。

[0044] 另一方面,本发明是用于诊断个体是否患有癌症的方法,包括确定从个体中选择的细胞上是否存在EphA2的表达,其中在所述细胞中EphA2的表达是否预示所述癌症。在一些实施方案中,用抗EphA2抗体确定EphA2的表达。在一些实施方案中,方法包括从细胞检测EphA2表达的水平。本文使用的术语“检测”包含在参考或不参考对照的条件下,定性的和/或定量的检测(测量水平)。

[0045] 另一方面,本发明是通过检测个体的细胞上或从细胞中释放的EphA2诊断个体中的癌症的方法,其中癌症选自,包括但不限于:副肾肿瘤、艾滋病相关癌症、软组织腺泡状肉瘤、星状细胞肿瘤、膀胱癌(鳞状细胞癌和移行细胞癌)、骨癌(釉质瘤、动脉瘤性骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌、转移性脑肿瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤因瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全、骨纤维性结构不良、胆囊和胆管癌、妊娠滋养层成瘤性疾病、胚细胞瘤、头颈癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌(肾母细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肉瘤/恶性脂肪瘤、肝癌(肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌(小细胞癌、腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌等)、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑(脊)膜瘤、多发性内分泌腺瘤形成、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、神经母细胞瘤、神经内分泌瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺肿瘤、小儿癌症、周围神经鞘肿瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后代眼色素层黑素瘤(posterious unveal melanoma)、罕见血液性疾病、转移性肾癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑囊肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌,和子宫癌(子宫颈癌((carcinoma of the cervix)、子宫内膜癌和平滑肌瘤)。

[0046] 另一方面,本发明是辅助在个体中诊断癌症(例如但不限于卵巢癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌或乳腺癌)的方法,包括确定在来自个体的生物学样品中EphA2的表达。在一些实施方案中,用抗EphA2抗体确定EphA2的表达。在一些实施方案中,抗EphA2抗体是本文中特别提到的家族成员。在一些实施方案中,方法是从细胞检测EphA2表达的水平。

[0047] 另一方面,本发明是通过施用能有效降低癌变细胞生长的、结合EphA2的抗体的有

效量治疗癌症的方法。在一些实施方案中,抗体是抗EphA2抗体。在一些实施方案中,癌变细胞选自,包括但不限于:副肾肿瘤、艾滋病相关癌症、软组织腺泡状肉瘤、星状细胞肿瘤、膀胱癌(鳞状细胞癌和移行细胞癌)、骨癌(釉质瘤、动脉瘤性骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌、转移性脑肿瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤因瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全、骨纤维性结构不良、胆囊和胆管癌、妊娠滋养层成瘤性疾病、胚细胞瘤、头颈癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌(肾母细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肉瘤/恶性脂肪瘤、肝癌(肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌(小细胞癌、腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌等)、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑(脊)膜瘤、多发性内分泌腺瘤形成、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、神经母细胞瘤、神经内分泌瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺肿瘤、小儿癌症、神经鞘膜肿瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后代眼色素层黑素瘤、罕见性血液性疾病、转移性肾癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状上皮细胞癌、胃癌、滑囊肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌,和子宫癌(子宫颈癌、子宫内膜癌和平滑肌瘤)。在某些优选的实施方案中,癌变细胞选自实体瘤,包括但不限于乳癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、肉瘤、转移性肾癌、甲状腺转移性癌和透明细胞癌。

[0048] 另一方面,本发明是包括施用有效量的特异性结合EphA2的抗体家族中的至少一个成员来延长患有癌症的个体转移过程的方法。在一个实施方案中,抗体是抗EphA2抗体。另一方面,本发明是在体外或个体内抑制癌细胞生长和/或增殖的方法,其包括向细胞培养物或样品,或者向个体施用有效量的包含结合了(包含连接了)化疗剂的抗EphA2抗体的组合物。

[0049] 在另一方面,本发明是通过向个体施用有效量的特异性结合EphA2的抗体家族的至少一种成员,向个体中的癌变细胞递送治疗剂的方法。在另一些实施方案中,抗EphA2抗体是结合了(包含连接了)其它治疗剂被递送到个体中的。

[0050] 在一些实施方案中,抗EphA2抗体是从本文中提到的抗体家族成员衍生的人源化抗体(通常,但并非必需,含有一个或多个部分或完整的抗体CDR)。在一些实施方案中,抗EphA2抗体是具有提到的抗体家族成员的一个或多个性质的人抗体。在一些实施方案中,化疗剂(例如毒素或放射性分子)被递送到癌细胞内(被内化)。在一些实施方案中,试剂为肥皂草毒蛋白(saporin)。

[0051] 另一方面,本发明是在个体中治疗癌症的方法,其包括向个体施用有效量的包含结合了(包含连接了)化疗剂的抗EphA2抗体的组合物。

[0052] 本发明另外提供了用于调控(增强或者减弱)EphA2与胞质信号伴侣的缔合作用的方法。通过使调节信号伴侣与EphA2结合的试剂,接触呈现在细胞表面的EphA2分子,可以影响EphA2与胞质信号伴侣间的缔合作用。能阻断或减少EphA2与其结合伴侣和/或信号伴侣的缔合作用的试剂可以被用于调控在EphA2介导的炎症或免疫应答中涉及到的生物学和病理学过程。涉及到这一作用的病理学过程包含与肿瘤相关的细胞生长。

[0053] 可以检测试剂,例如抗EphA2抗体,在阻断、减弱、增强或其它调控EphA2与其结合伴侣间的缔合作用方面的能力。具体来说,检测试剂调控此类相互作用的能力可以通过将含有EphA2相互作用位点(一般是在完整的活细胞时存在的天然构型)的肽与结合伴侣和检

测剂共同孵育,并且确定检测剂是否能减弱或增强结合伴侣与EphA2肽的结合。激动剂、拮抗剂,及其他调节剂是特别值得考虑的。

[0054] 在一些方面,本发明是用于在个体中辅助诊断疾病的方法,包括步骤(i)测定从个体获得的血液或组织样品中EphA2的存在情况;(ii)与正常的(非病态的)血液或组织样品相比,检测上述样品是否具有升高的EphA2标记量;以及(iii)揭示上述标记升高的量与疾病的阳性诊断间的相关性,或揭示上述标记未升高的量与疾病的阴性诊断间的相关性。在一些实施方案中,使用抗EphA2抗体检测标记。在一些实施方案中,方法受到选自放射性核素显像、流式细胞术及免疫组织化学的技术的影响。

[0055] 另一方面,本发明是通过使用本文中描述的抗EphA2抗体或任意EphA2结合部分(多肽,包括但不限于多种抗体和抗体衍生物),检测来自个体的细胞上的EphA2,而在个体中诊断癌症或转移性癌症的方法。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌和前列腺癌。在一些实施方案中,方法是从细胞检测EphA2的水平。EphA2的存在是通过检测在EphA2与EphA2结合部分间形成的复合体而检测出来的。本文使用的术语“检测”包含在参考或不参考对照的条件下,定性的和/或定量的检测(测量水平)。

[0056] 另一方面,本发明是通过施用能有效降低癌变细胞生长的有效量的组合物来治疗癌症的方法,所述组合物包含抗EphA2抗体,或本文中描述的任意抗体(包括多肽)或多核苷酸的实施方案,包括但不限于结合了治疗剂的抗EphA2抗体、含有抗EphA2抗体的片段或区域的抗体、人源化抗体(通常,但非必需,含有抗EphA2抗体的一个或多个CDR)、含有从抗EphA2抗体可变区衍生的可变区和从人抗体的恒定区衍生的恒定区的嵌合抗体,或具有抗EphA2抗体一个或多个性质的人抗体。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌或前列腺癌。

[0057] 在一些实施方案中,本发明是治疗患者的癌症的方法,该方法包括对所述患者施用治疗有效量的特异性结合EphA2的EphA2抗体,该抗体具有SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40的至少一个,优选的两个或多个下列特征:

[0058] a.结合癌细胞上的EphA2的能力;

[0059] b.在体外或体内结合EphA2暴露在活的癌细胞表面的一部分的能力;

[0060] c.阻碍肿瘤细胞增殖,但不增加EphA2磷酸酪氨酸含量的能力;

[0061] d.将治疗剂或可检测的标记递送表达EphA2的癌细胞的能力;以及

[0062] e.将治疗剂或可检测的标记递送表达EphA2的癌细胞内部的能力。

[0063] 另一方面,本发明是通过向个体施用能有效降低癌变细胞生长的有效量的组合物,抑制个体中的癌变细胞生长和/或增殖的方法,所述组合物包含抗EphA2抗体,或本文中描述的任意抗体(包括多肽)或多核苷酸的实施方案,其包括但不限于结合了治疗剂的抗EphA2抗体、含有抗EphA2抗体的片段或区域的抗体、人源化抗体(通常,但非必需,含有抗EphA2抗体的一个或多个CDR)、含有从抗EphA2抗体可变区衍生的可变区和从人抗体的恒定区衍生的恒定区的嵌合抗体,或者具有抗EphA2抗体一个或多个性质的人抗体。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌或前列腺癌。

[0064] 另一方面,本发明是通过施用能有效降低癌变细胞生长的有效量的组合物,在患有癌症的个体中阻止或延缓转移过程、治疗转移性癌症、或抑制转移性癌细胞增殖的方法,所述组合物包含抗EphA2抗体,本文中描述的任意抗体(包括多肽)或多核苷酸的实施方案,

其包括但不限于结合了治疗剂的抗EphA2抗体、含有抗EphA2抗体的片段或区域的抗体、人源化抗体(通常,但非必需,含有抗EphA2抗体的一个或多个CDR)、含有从抗EphA2抗体可变区衍生的可变区和从人抗体的恒定区衍生的恒定区的嵌合抗体,或具有抗EphA2抗体一个或多个性质的人抗体。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌或前列腺癌。

[0065] 另一方面,本发明是通过向个体施用有效量的连接了治疗剂(例如毒素或放射性分子)的、本文中描述的结合EphA2的抗体或任意结合EphA2的部分(多肽,包括但不限于抗体或抗体衍生物),向个体中的癌变细胞递送治疗剂(例如毒素或放射性分子)的方法。EphA2结合基包括,但不限于抗EphA2抗体、含有抗EphA2抗体的片段或区域的抗体、人源化抗体(通常,但非必需,含有抗EphA2抗体的一个或多个CDR)、含有从抗EphA2抗体可变区衍生的可变区和从人抗体的恒定区衍生的恒定区的嵌合抗体,或具有抗EphA2抗体一个或多个性质的人抗体。在一些实施方案中,癌变细胞来自黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌或前列腺癌。在另一个实施方案中,治疗剂(例如毒素或放射性分子)被递送到癌变细胞内部(被内化)。因此,本发明提供了将治疗剂递送到上述癌细胞内部,抑制癌细胞生长和/或增殖的方法。

[0066] 另一方面,本发明提供了基本纯化的免疫球蛋白或其抗原结合片段,其为SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40。

[0067] 在一些实施方案中,所述免疫球蛋白或其抗原结合片段可以为人抗体。

[0068] 在一些实施方案中,所述免疫球蛋白或其抗原结合片段可以为衍生物。

[0069] 另一方面,本发明提供了包含治疗有效剂量的本发明的纯化的免疫球蛋白或抗原结合片段与可药用载体的药物组合物。

[0070] 在一些实施方案中,其中所述纯化的免疫球蛋白或抗原结合片段可以是LUCA19、LUCA40、SG5或SPL1。

[0071] 在一些实施方案中,其中纯化的免疫球蛋白或抗原结合片段可与LUCA19、LUCA40、SG5或SPL1竞争结合EphA2。

[0072] 在一些实施方案中,其中纯化的免疫球蛋白或抗原结合片段可被人源化。

[0073] 在一些实施方案中,其中纯化的免疫球蛋白或抗原结合片段可以是嵌合的。

[0074] 另一方面,本发明提供了编码本发明的免疫球蛋白或其抗原结合片段的分离的核酸序列。

[0075] 在一些实施方案中,其中核酸可有效连接到启动子上。

[0076] 在一些实施方案中,其中启动子和核酸可包含在表达载体中。

[0077] 在一些实施方案中,其中免疫球蛋白可以是单克隆抗体。

[0078] 另一方面,本发明提供了用包含本发明的核酸的载体转染、转化或感染的细胞系。

[0079] 另一方面,本发明提供了人源化的本发明的免疫球蛋白或其抗原结合片段。

[0080] 另一方面,本发明提供了嵌合的本发明的免疫球蛋白或其抗原结合片段。

[0081] 另一方面,本发明提供了基本纯化的免疫球蛋白或其抗原结合片段,其特异性结合EphA2,并具有SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40的至少一个下列特征:

[0082] a. 结合癌细胞上的EphA2的能力;

[0083] b. 在体外或体内结合EphA2暴露在活的癌细胞表面的一部分的能力;

- [0084] c.阻碍肿瘤细胞增殖,但不增加EphA2的磷酸酪氨酸含量的能力;
- [0085] d.将治疗剂或可检测的标记递送到表达EphA2的癌细胞的能力;以及
- [0086] e.将治疗剂或可检测的标记递送到表达EphA2的癌细胞内部的能力。
- [0087] 另一方面,本发明提供了用于生产基本纯化的免疫球蛋白,或其抗原结合片段的方法,其包括以下步骤:
- [0088] a.在表达免疫球蛋白或抗原结合片段的条件下生长用本发明的核酸转化的细胞系;以及
- [0089] b.收获表达的免疫球蛋白或片段。
- [0090] 在一些实施方案中,其中细胞系可以是杂交瘤。
- [0091] 在一些实施方案中,其中杂交瘤可以是ATCC编号PTA-5070,PTA-6056,或PTA-6059,或杂交瘤SG3.15B4.1F9。
- [0092] 在一些实施方案中,其中免疫球蛋白可以是单克隆抗体。
- [0093] 另一方面,本发明提供了杂交瘤,其储存在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),登录号为PTA-5070,PTA-6056,或PTA-6059,或杂交瘤SG3.15B4.1F9 (PTA-XXXX)。
- [0094] 另一方面,本发明提供了杂交瘤产生的抗体,所述杂交瘤储存在美国典型培养物保藏中心,具有登录号为PTA-5070,PTA-6056,或PTA-6059,或杂交瘤SG3.15B4.1F9 (PTA-XXXX)。
- [0095] 另一方面,本发明提供了治疗需要它的患者中的癌症的方法,该方法包括对所述患者施用治疗有效量的EphA2抗体,所述EphA2抗体特异性结合EphA2,并具有SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40的至少一个下列特征:
- [0096] a.结合癌细胞上的EphA2的能力;
- [0097] b.在体外或体内结合EphA2暴露在活的癌细胞表面的一部分的能力;
- [0098] c.阻碍肿瘤细胞增殖,但不增加EphA2的磷酸酪氨酸含量的能力;
- [0099] d.将治疗剂或可检测的标记递送到表达EphA2的癌细胞的能力;以及
- [0100] e.将治疗剂或可检测的标记递送到表达EphA2的癌细胞内部的能力。

附图说明

- [0101] 图1显示了A549肿瘤异种移植物接受SPL1皮下治疗,以及在中止投药后它们缓慢的再生长的结果。

具体实施方式

- [0102] 本文公开的发明提供了与抗原EphA2结合的抗体和多肽,以及制备和使用这些抗体和多肽诊断和治疗多种与EphA2的表达和/或过量表达相关的疾病、人类癌症的方法。在多种人类癌症中已经出现EphA2的存在及其表达的升高。抗EphA2抗体,例如那些通过任意一个在下文中鉴定的宿主细胞生产的,已经产生并表现出与EphA2的特异性结合。
- [0103] 根据布达佩斯条约,生产mLUCA19的杂交瘤已经于1993年3月20日储存在美国典型培养物保藏中心(ATCC) 10801 University Blvd., Manassas VA 20110-2209,专利保藏编号为PTA-5070,生产SPL1的杂交瘤于2004年6月8日储存于美国典型培养物保藏中心(ATCC) 专

利保藏编号为PTA-6059,生产LUCA40的杂交瘤于2004年6月8日储存于美国典型培养物保藏中心(ATCC),专利保藏编号为PTA-6056,生产SG5的杂交瘤于2006年2月2日储存于美国典型培养物保藏中心(ATCC),专利保藏编号为PTA-XXXX。

[0104] I. 常规技术

[0105] 除非另外指出,本发明的实践将运用本领域技术之内的分子生物学(包含重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的传统技术。这些技术在文献中有详细说明,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等人,1989) Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编著,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编著,1998) Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编著,1987); Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998) Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths,和D.G.Newell编著,1993-8) J.Wiley和Sons;Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编著);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编著,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编著,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编著,1994);Current Protocols in immunology(J.E.Coligan等人编著,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons, 1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997); Antibodies:a practical approach(D.Catty.编著,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean编著,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编著,Harwood Academic Publishers,1995);以及Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等人编著,J.B.Lippincott Company,1993)。

[0106] II. 定义

[0107] EphA2是分子量约为130KD的多肽抗原,能与本发明所使用的抗体反应。作为本文更详细的描述,该抗原具有一个以上不同的表位。本发明的一些优选的抗体实施方案是直接针对EphA2抗原上的两个或多个特殊表位的其中之一。目前认为,与它们的正常组织对应物相比,EphA2在某些癌细胞中是过量表达的。

[0108] “抗体”是通过位于免疫球蛋白分子可变区的至少一个的抗原识别位点,能够特异性结合靶标,例如糖类、多核苷酸、脂类、多肽等的免疫球蛋白分子。如本文用到的,该术语不仅包含完整的多克隆或单克隆抗体,而且还包含它们的片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其突变体、天然存在的变体、含有具有必需特异性抗原识别位点的抗体部分的融合蛋白质、人源化抗体、嵌合抗体,以及具有必需特异性抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任意其他被修饰的构型。

[0109] 术语“单克隆抗体”不仅包含完整的单克隆抗体和全长的单克隆抗体,而且还包含它们的片段例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其突变体、含有抗体部分的融合蛋白质、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体,以及具有必需特异性抗原识别位点并且能够结合

抗原的免疫球蛋白分子的任意其他被修饰的构型。对于抗体的来源或它的制备方法(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)的说明并非出于限制的意图。

[0110] “人源化的”抗体指具有本质上从非人类物种的免疫球蛋白衍生的抗原结合位点,并且保留着基于人类免疫球蛋白的结构和/或序列的免疫球蛋白分子结构的分子。抗原结合位点可以含有融合在恒定结构域上的完整可变结构域,或者仅有被移植到可变结构域中的正确读码框区域的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型或者经过例如一个或多个氨基酸取代的修饰,例如修饰使其更类似人类免疫球蛋白。一些形式的人源化抗体保留了全部的CDR序列(例如,含有全部六个来自小鼠抗体的CDR的人源化的小鼠抗体)。另一些形式的人源化抗体有一个或多个在原始抗体上进行了改变的CDR(一个、二个、三个、四个、五个、六个),它们也被定义为是从LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的一个或多个CDR“衍生来的”一个或多个CDR。

[0111] “嵌合抗体”指这样一类抗体,它们的每一条重链和轻链的氨基酸序列中都有一部分与它衍生来源的特定物种或所属的特定物种抗体的相应序列同源,同时链的剩余部分则与另一物种的相应序列同源。通常,在这些嵌合抗体中,轻链和重链的可变区模拟从一个哺乳动物物种来源的抗体的可变区,而恒定区则与从另一个物种来源的抗体序列同源。上述嵌合形式的一个明显优势在于,例如,可以从目前已知的来源,使用来自非人类的宿主生物的现成的杂交瘤或B细胞方便的衍生出可变区,再结合来自(例如)人类细胞制品的恒定区。尽管可变区具有易于制备的优点,并且特异性又不会受到其来源的影响,来源于人类的恒定区比从非人类来源的恒定区在抗体被注射时,更不易对人类对象引发免疫应答。但是,该定义并不限于这一特定的实例。

[0112] “特异性的结合”或“优选的结合”(本文中互换使用)抗体或多肽的表位是本领域普遍理解的术语,而且用于确定此类特异性或优选结合的方法也是本领域已知的。如果分子与特定的细胞或物质间,比它与其它细胞或底物能更频繁、更迅速的缔合且具有更持久和/或更大的亲和力(affinity),就可以认为上述分子表现出了“特异性的结合”或“优选的结合”。如果抗体与靶标的结合比它与其他物质的结合具有更大的亲和力、亲合力(avidity)、更稳定,和/或更长的持续时间,该抗体就是与靶标“特异性的结合”或“优选的结合”。例如,特异性的或优选的结合一种EphA2表位的抗体是这样的抗体,其在结合这一EphA2表位时,比它结合其它EphA2表位或非EphA2表位时,具有更大的亲和力、亲合力、更稳定,和/或更长的持续时间。通过阅读该定义后也可以了解,例如,特异性的或优选的结合第一个靶标的抗体(或部分或表位),可以或不可以再特异性的或优选的结合第二个靶标。同样的,“特异性的结合”或“优选的结合”不必需要(虽然它可以包含)排它性的结合。通常,但并非必须,提到的结合表示优选的结合。

[0113] 关于表位的术语“免疫学活性”存在或“维持免疫学的活性”指抗体(例如抗EphA2抗体)在不同条件下结合表位的能力,例如,在表位经历过还原性和变性的条件后。

[0114] 如本文用到的,术语“LUCA19、SPL1、LUCA40或SG5”、“抗EphA2抗体”和“单克隆抗EphA2抗体”可以互换使用,指由任意的保藏编号为ATCC编号PTA-5070、PTA-6056或PTA-6059的宿主细胞,或者宿主细胞SG.3.15B4.1F9(ATCC编号PTA-XXXX)及其后代生产的免疫球蛋白。LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40与不同的生物学功能相关,包括但不限于,结合EphA2的能力;结合EphA2胞外结构域的能力;在体外或体内在癌细胞上结合暴露在活细胞表面的

EphA2的能力;将化疗剂递送到表达EphA2的癌变细胞(例如卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、结肠癌或乳腺癌细胞)的能力;将治疗剂或可检测的标记递送到表达EphA2的癌细胞内部的能力。在本文的讨论中,本发明中的多肽(包含抗体)可以具有任意一个或多个这些特征。

[0115] “抗EphA2等价抗体”或“抗EphA2等价多肽”指具有与抗EphA2抗体相关的一个或多个生物学功能的抗体或多肽,例如,结合的特异性。

[0116] 在本文中,“试剂”指生物学的、药物的或化学的化合物。非限制性实例包括简单或复杂的有机或无机分子、肽、蛋白质、寡核苷酸、抗体、抗体衍生物、抗体片段、维生素衍生物、糖类、毒素,或化疗用化合物。可以合成多种化合物,例如,小分子和寡聚物(例如寡肽和寡核苷酸),以及基于多种核心结构的合成有机化合物。此外,多种天然来源可以提供用于筛选的化合物,例如植物或动物的提取物等。技术人员可以容易认识到对本发明的试剂的结构性质是没有限制的。

[0117] 本发明的方法中使用的试剂可以是随机挑选的或理性选择的或设计的。如本文用到的,当试剂是在没有考虑EphA2与其天然结合伴侣或未知抗体缔合时所涉及的特异性序列的情况下被选择的,可以认为该试剂是被随机选择的。随机选择试剂的实例是使用化学文库或肽结合文库。

[0118] 如本文用到的,当试剂的选择是在非随机的基础上、将靶标位点和/或它的构型与试剂的作用联系起来考虑的时候,可以认为该试剂是被理性的选择或设计的。对于抗EphA2的试剂,目前认为在EphA2上至少存在三个表位能够激发针对其的抗体,因此对于试剂存在阻断EphA2/抗EphA2间的相互作用的至少三个作用位点。该发明也包含了作用在EphA2及其天然结合伴侣间的相互作用位点上的试剂,而且其它的配体和它们的活性EphA2-相互作用位点也包含在该发明的范围内,不论是目前已知的或还有待以后鉴定的。通过利用组成受体/配体和/或EphA2/抗EphA2抗体复合物的接触位点的肽序列可以合理选择或合理设计试剂。例如,合理选择的肽试剂可以是那些氨基酸序列与天然环境下暴露在活细胞表面的EphA2上出现的表位相同的肽。根据需要,通过与抗EphA2抗体或天然配体结合,此类试剂将减弱或阻断抗EphA2抗体与EphA2间,或EphA2与其天然配体间的缔合作用。

[0119] 如本文用到的,对于抗体,术语“标记的”意在包含通过偶联(即,物理性的连接)可检测的物质,例如在抗体上连接放射性剂或荧光团(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红蛋白(PE)),来直接标记抗体,也包含通过与可检测的物质的反应间接的标记探针或抗体。

[0120] 如本文用到的,对于抗体,术语“缔合作用”包含与试剂(例如,化疗剂)共价和非共价的附着或结合。抗体可以通过连接常用平台,以直接结合或间接结合来缔合试剂(例如,化疗剂),从而抗体指导了该试剂定位到癌变细胞,所述的癌变细胞是抗体结合的并且其中抗体和试剂不会在生理条件下显著解离,因此试剂不会靶向该抗体结合的相同的癌变细胞,或者因此该试剂的效力不会降低。

[0121] “生物样品”包含从个体获得的多种样品类型,并且可以被用于诊断或监控的分析。定义包含生物来源的血液和其它液体样品、实体组织样品例如活组织检查标本或组织培养物或来自其的细胞,以及其后代,例如,从怀疑患有癌症的个体收集的样品中获得的细胞,在优选的实施方案中细胞来自卵巢、肺、前列腺、胰腺、结肠和乳房组织。定义还包含在获得后以任意方式处理过的样品,例如使用试剂治疗、增溶,或富集某些组分(例如蛋

白质或多肽),或出于切片目的被包埋在半固体或固体基质中。术语“生物学样品”包括临床样品,还包括培养中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体,以及组织样品。

[0122] 术语“多肽”、“寡肽”,“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指任意长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以是线性的或分支的,它可以包含修饰过的氨基酸,并且可以被非氨基酸中断。术语还包含被天然或被干涉修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键的形成、糖基化、酰基化、乙酰化、磷酸化,或任意其它的操作或修饰,例如接合标记的成分。该定义中还包含例如含有一个或多个氨基酸的类似物(包括例如非天然氨基酸等)以及其它本领域已知的修饰。要理解因为本发明的多肽是基于抗体的,其中的肽可以以单链或结合的链存在。

[0123] 抗体的“可变区”指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区,其独立存在或者组合存在。

[0124] 抗体的“恒定区”指抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区,其独立存在或者组合存在。

[0125] 如本文用到的,“基本纯”指物质至少达到50%纯度(即,没有污染物),更优选的达到至少90%纯度,更优选的达到至少95%纯度,更优选的达到至少98%纯度,更优选的达到至少99%纯度。

[0126] “宿主细胞”包括单个的细胞或细胞培养物,其可以是或已经是载体的受体,用于整合多核苷酸插入片段。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,并且因为天然的、偶然的或计划的突变,其后代可以不必与原始亲本细胞完全一致(在形态学或基因组DNA互补链上)。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸在体内转染的细胞。

[0127] 如本文用到的,“延迟转移过程”意味着推迟、阻碍、放缓、延缓、稳定,和/或延期转移过程。上述延迟可以依据癌症病史和/或待治疗的个体而在时间长度上不同。本领域技术人员很清楚,有效或显著的延迟可以有效的包含预防,即个体不出现转移。

[0128] 药物、化合物或药物组合物的“有效量”是足以产生有益或理想结果的量,所述结果包括但不限于,临床结果中例如肿瘤的尺寸缩小(在癌症的范围内,例如,乳腺癌或前列腺癌)、阻滞癌变细胞生长、延缓转移过程、减弱疾病导致的一个或多个症状、增加患病患者的生活质量,降低治疗疾病时所需的其它药物剂量、增强其它药物的效力例如通过靶向作用和/或内化作用、延缓疾病的发展,和/或延长个体的存活。可以在一次或多次给药中施用有效量。出于本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接或间接的、降低(或摧毁)赘生性细胞的增殖,和/或降低和/或延迟赘生性细胞的转移过程或转移生长的量。

[0129] 根据癌症临床背景内的理解,药物、化合物或药物组合物的有效量可以是在联合或不联合使用另一种药物、化合物或药物组合物的情况下实现。因此,在施用一种或多种治疗剂的情况下都可以考虑“有效量”,并且如果可以或已经取得理想的结果,单独一种试剂在与一种或多种其它试剂联合使用时也可以认为以有效量给药。

[0130] 如本文用到的,“治疗”是获得有益的或理想的结果(包括优选的临床结果)的方法。出于本发明的目的,有益的或理想的临床结果包括但不限于一种或多种下列情况:降低(或摧毁)赘生性细胞的增殖、减少癌症中发现的赘生性细胞的转移、缩小肿瘤的尺寸、减少疾病导致的症状、增加患病患者的生活质量、减少用于治疗疾病所需的其它药物剂量、延缓

疾病的发展,和/或延长患者的存活。

[0131] 如本文用到的,“延迟转移过程”意味着推迟、阻碍、放缓、延缓、稳定,和/或延期转移过程。这一延迟可以依据癌症病史和/或待治疗的个体,在时间长度上有所差异。本领域技术人员很清楚,有效或显著的延迟可以有效的包含预防,即个体不出现转移。

[0132] “生物样品”包含从个体获得的多种样品类型,并且可以被用于诊断或监控的分析。该定义包含生物学来源的血液及其它液体样品、实体组织样品例如活组织检查标本或组织培养物或来自其的细胞及其后代。该定义还包含在获得后以任意方式处理过的样品,例如使用试剂治疗、增溶,或富集某些成分、例如蛋白质或多核苷酸,或出于切片目的包埋在半固体或固体基质中。术语“生物学样品”包含临床样品,还包含培养中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体、以及组织样品。

[0133] “个体”是脊椎动物,优选是哺乳动物,更优选是人。哺乳动物包括但不限于,家畜、运动动物(sport animals)、宠物(例如猫、狗、马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。

[0134] “毒素”或“细胞毒素”指任意引起细胞内不良反应的物质。例如,导向癌变细胞的毒素可以对癌变细胞产生不良的、有时是有害的影响。

[0135] 如本文用到的,“试剂”指生物学的、药物的或化学的化合物。非限制性实例包括简单或复杂的有机或无机分子、肽、蛋白质、寡核苷酸、抗体、抗体衍生物或抗体片段。可以合成多种化合物,例如,小分子和寡聚物(例如寡肽和寡核苷酸),和基于多种核心结构的合成有机化合物。此外,多种天然来源也可以提供用于筛选的化合物,例如植物或动物的提取物等。

[0136] 如本文用到的,“治疗剂”意味着任意对治疗(本文中,通常在癌症的范围)有用的试剂,包括抗肿瘤药、毒素或细胞毒素、细胞毒素剂,以及放射性试剂。

[0137] “主动免疫应答”指产生,并持续产生在体内直接针对抗原的抗体,以应答向宿主施用该抗原或编码该抗原的DNA载体,所述施用可以通过静脉内的、肌内的、皮下的或者其它使用或未使用佐剂的施用方式。主动免疫应答也可以包含其它方面的免疫应答,例如细胞免疫应答。

[0138] 制备组合物的成分和方法

[0139] 本发明包含包括药物组合物的组合物,其含有可结合EphA2的抗体、多肽和蛋白质,以及含有编码结合EphA2的抗体、多肽和蛋白质的序列的多核苷酸。如本文用到的,组合物包含结合EphA2的一种或多种抗体、多肽和/或蛋白质,和/或含有编码结合EphA2的一种或多种抗体、多肽和蛋白质的序列的一种或多种多核苷酸。这些组合物可以进一步包含合适的赋形剂,例如包括本领域熟知的缓冲液在内的可药用赋形剂。

[0140] 本发明还包含LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40,以及等价抗体或多肽片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc等)、嵌合抗体、单链(ScFv)、它们的突变体、含有抗体部分的融合蛋白质、人源化抗体,以及含有具有必需特异性的抗原(EphA2)识别位点的LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的任意其它修饰过的构型。本发明还提供表现出LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的一种或多种生物学特征的人源化抗体。LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的等价抗体(包括人源化抗体和人抗体),LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的肽片段,以及含有任意这些片段的多肽通过LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的一种或多种特征鉴定和描述。

[0141] 在一些实施方案中,本发明的结合EphA2的抗体、多肽和蛋白质是竞争性抑制

LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40与EphA2优选的结合的抗体、多肽和蛋白质,或者是优选的结合在EphA2上与抗EphA2抗体优选的结合的相同表位的抗体、多肽和蛋白质。

[0142] 因此,本发明提供任意下列选项(或组合物,包括药物组合物),以及下列选项的任意组合:(a)由保藏编号为ATCC编号PTA-5070、PTA-6056或PTA-6059,或者宿主细胞SG3.15B4.1F9 (PTA-XXXX)或其后代生产的抗EphA2抗体;(b)抗EphA2抗体的人源化形式;(c)含有抗EphA2抗体的一个或多个轻链和/或重链可变区的抗体;(d)包含与抗EphA2抗体的重链和轻链的可变区同源或衍生自其的可变区,以及与人抗体的重链和轻链的恒定区同源或衍生自其的恒定区的嵌合抗体;(e)含有LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的轻链和/或重链的一个或多个CDR(至少一个、二个、三个、四个、五个或六个)的抗体;(f)含有LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的重链和/或轻链的抗体;(g)等价于LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的人抗体。抗体的人源化形式可以具有或没有与LUCA19、SPL1、LUCA40或SG5,或者由保藏编号为ATCC编号PTA-5070、PTA-6056或PTA-6059或宿主细胞SG3.15B4.1F9 (ATCC编号PTA-XXXX)生产的抗体相同的CDR。对CDR区域的确定是本领域技术范围内的。在一些实施方案中,发明提供了含有至少一个CDR的抗体,所述CDR与LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40,或者与由保藏编号为ATCC编号PTA-5070、PTA-6056、PTA-6059的宿主细胞或宿主细胞SG3.15B4.1F9 (ATCC编号PTA-XXXX)生产的抗体的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个CDR基本同源(或者,在一些实施方案中,与LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的全部6个CDR基本同源,或者衍生自LUCA19、SPL1、LUCA40或SG5)。其它实施方案包括具有至少两个、三个、四个、五个或六个CDR的抗体,所述CDR与LUCA19、SPL1、LUCA40或SG5,或者与LUCA19、SPL1、LUCA40或SG5衍生的,或者与由保藏编号为ATCC编号PTA-5070,PTA-6056或PTA-6059的宿主细胞或宿主细胞SG3.15B4.1F9生产的抗体的至少两个、三个、四个、五个或六个CDR基本同源。要理解出于本发明的目的,结合的特异性和/或整体活性(可以指降低癌变细胞的生长和/或增殖、诱导癌细胞的凋亡性细胞死亡、推迟转移过程和/或姑息治疗)通常是被保留的,尽管与LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40相比其活性程度可以变化(可以更大或更小)。本发明还提供了制备任意这些抗体的方法。制备抗体的方法是本领域已知的并在本文中进行了描述。

[0143] 本发明还提供了含有本发明的抗体(例如LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40)的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,多肽含有抗EphA2抗体的轻链和/或重链的一个或多个可变区。在一些实施方案中,多肽含有LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的轻链和/或重链的一个或多个CDR。在一些实施方案中,多肽含有LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的轻链和/或重链的三个CDR。在一些实施方案中,多肽含有具有任意下列选项的LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的氨基酸序列:LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的序列中的至少5个连续的氨基酸、至少8个连续的氨基酸、至少10个左右连续的氨基酸、至少15个左右连续的氨基酸、至少20个左右连续的氨基酸、至少25个左右连续的氨基酸、至少30个左右连续的氨基酸,其中至少3个氨基酸来自LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的可变区。在一个实施方案中,可变区来自LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的轻链。在另一个实施方案中,可变区来自LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的重链。在另一个实施方案中,5个(或更多)连续的氨基酸来自LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的互补决定区(CDR)。

[0144] 抗体可以是多克隆(例如,非同源的)或单克隆。制备单克隆抗体的方法是本领域已知的。可以使用的一种方法是在Kohler和Milstein, Nature 256:495-497 (1975)中的方法

及其修正。通常,用于免疫接种的是小鼠或大鼠但是也可以使用其它动物。免疫原可以是,但不限于,原代细胞、培养的细胞系、癌变细胞、核酸、组织或肽。全长的EphA2或EphA2的任意片段(例如,胞外结构域),或表达EphA2的癌细胞被用作免疫原。用作免疫原的细胞,例如,表达EphA2的癌细胞在作为免疫原使用以前可以被培养一段时间(至少24小时)。细胞可以被单独作为免疫原使用,或者与非变性的佐剂,例如Ribi,组合使用。通常,在作为免疫原使用时细胞应该保持完整及优选的活力。使用完整细胞作为免疫原生成抗体的方法在W000/37503中描述。与破损的细胞相比,完整的细胞可以使抗原被更好的检测。此外,使用完整细胞作免疫原生成的单克隆抗体最有可能抗细胞表面的抗原决定簇或抗跨膜受体的胞外结构域。使用变性的或苛性佐剂,例如弗氏佐剂(Freud's),会破坏细胞,因此不提倡使用。免疫原可以周期性间隔多次施用,例如双周或单周,或者可以用维持其在动物体内活力的方式施用(例如以组织重组的方式)。

[0145] 为了监控抗体反应,可以从动物体内获取少量生物学样品(例如,血液),并检测抗该抗原的抗体滴度。可以摘除脾脏和/或一些大的淋巴结并将其分离成单个细胞。如果需要,脾脏细胞可以通过将细胞悬液加入被抗原包被的平板或孔中进行筛选(在去掉非特异的贴壁细胞后)。表达对抗原特异性的膜结合免疫球蛋白的B细胞,将结合在平板上,不会随其余的悬液被漂洗掉。之后,获得的B细胞或所有被分离的脾脏细胞都可以与骨髓瘤细胞融合(例如,X63-Ag8.653以及来自Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, CA的细胞)。聚乙二醇(PEG)可以用于将脾细胞或淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤。然后,杂交瘤在选择性培养基中培养(例如,次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶培养基,即已知的“HAT培养基”)。之后将得到的杂交瘤经过有限稀释后铺平板,并使用FACS、免疫组织化学(IHC筛选)和Western印迹,测定特异性结合免疫原(例如,癌细胞系表面EphA2等)的抗体产生。所选分泌单克隆抗体的杂交瘤再进行体外(例如,组织培养瓶或中空纤维反应器)或体内(例如,小鼠的腹水)培养。在生成抗EphA2抗体的条件下培养杂交瘤,并纯化抗体的方法是本领域已知的。

[0146] 可以选择上述分泌单克隆抗体的杂交瘤生产优选结合EphA2上抗EphA2抗体所优选结合的表位的抗体。挑选此类抗体的方法是本领域已知的。例如,结合竞争测定可以被用于确定抗体是否结合与LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40相同的表位。抗体与LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40竞争结合EphA2表示该抗体优选结合LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40结合的表位。结合竞争测定是本领域熟知的。可以配置选择多种不同形式的结合竞争测定是使用被标记的抗原或被标记的抗体的。通常,抗原被固定在96孔板上,用放射性或酶标记测量未标记抗体阻断标记抗体结合的能力。优选结合EphA2上的抗EphA2抗体所优选结合表位的多肽也可以使用类似的方法测试和鉴定。

[0147] 作为细胞融合技术的另一个备选,EBV无限增殖化B细胞可以被用于生产目标发明的单克隆抗体。杂交瘤被扩大和亚克隆,根据需要,可以通过常规测定方法(例如,FACS、IHC、放射免疫测定、酶免疫测定、荧光免疫测定等)测定上清液中的抗免疫原活性。

[0148] 在另一种备选方法中,抗体可以被重组制备。制备重组抗体的方法是本领域熟知的。单克隆抗体LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40及任意其它等价抗体可以被测序并在体外重组生产。在一个实施方案中,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40被测序,然后多核苷酸序列被克隆到载体中用于表达或增殖。编码目标抗体的序列可以被维持在宿主细胞内的载体中,并且之

后宿主细胞可以被扩增和冷冻作为将来使用。在另一个备选中,抗体可以通过噬菌体展示技术重组制备。见例如,美国专利号5,565,332;5,580,717;5,733,743;6,265,150;和Winter等人Annu.Rev.Immunol.(1994) 12:433-455。

[0149] 在另一个备选中,抗EphA2抗体或任意其他目标抗体或蛋白质可以进行Edman降解法测序,这是本领域技术人员熟知的。从质谱或Edman降解法产生的肽信息可以用来设计探针或引物,用于克隆目标蛋白质。

[0150] 另一个克隆目标蛋白质的备选方法是通过用EphA2“淘选”表达目标抗体或蛋白质的细胞。“淘选”方法的实施是通过从表达目标抗体或蛋白质的组织或细胞中获得cDNA文库,在另一种细胞类型中过量表达cDNA,并筛选与EphA2特异性结合的另一种细胞类型的被转染的细胞。在“淘选”克隆编码细胞表面蛋白质的哺乳动物基因中使用的方法的细节性描述可见于本领域。见例如,Aruffo,A.和Seed,B.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,8573-8577 (1987)以及Stephan,J.等人Endocrinology 140:5841-5854 (1999)。

[0151] 根据本领域的标准方法,cDNA可以通过逆转录特定细胞类型的mRNA获得。具体的,可以按照如上所述的Sambrook等人提出的方法,使用多种水解酶或化学溶液分离mRNA,或用可商购的核酸结合树脂,按照生产商(例如,Qiagen、Invitrogen、Promega)提供的相应说明书提取mRNA。然后,合成的cDNA被引入表达载体以在另一种类型的细胞中生产目标抗体或蛋白质。认为表达载体必须能够在宿主细胞内以游离基因或染色体DNA整合部分的方式复制。合适的表达载体包括但不限于质粒、病毒载体(包括腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒)和黏粒。

[0152] 含有目标多核苷酸的载体可以用任意多种合适的方法引入宿主细胞,包括电穿孔;使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖(dextran)或其他物质转染;微粒轰击;脂质体转染;和感染(例如,载体是感染性剂例如痘苗病毒)。引入载体或肽的选择通常取决于宿主细胞的特征。

[0153] 任意能够过量表达异源DNA的宿主细胞都可以用于分离编码目标抗体、多肽或蛋白质基因的目的。哺乳动物宿主细胞的非限制性实例包括但不限于COS、HeLa和CHO细胞。优选的,如果宿主细胞存在对应的内源目标抗体或蛋白质的表达,宿主细胞以高于该表达5倍左右的水平表达cDNA,更优选的高于10倍,甚至更优选的高于20倍。筛选特异性结合EphA2的宿主细胞会受到免疫测定或FACS的影响。过量表达目标抗体或蛋白质的细胞是可以鉴定的。

[0154] 本发明包括含有本发明抗体,例如LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的氨基酸序列的多肽。本发明的多肽可以通过本领域已知的方法制备。肽可以通过抗体的蛋白酶水解或其他降解方法,上述重组方法(即,单一或融合的多肽)或化学合成来制备。抗体的多肽,特别是约50个氨基酸的较短多肽,可以用化学合成方便的制备。化学合成方法是本领域已知的并可以商购。例如,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的多肽可以通过使用固相方法的自动多肽合成仪生产。

[0155] 发明还包括本发明抗体,例如LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的单链可变区片段(“scFv”)。单链可变区片段是用短的连接肽将轻链和/或重链的可变区连接制备的。Bird等人(1988) Science 242:423-426。例如连接肽可以桥接间隔大约3.5nm的一个可变区的羧基端和另一个可变区的氨基端。随后,连接体可以被修饰用于额外的功能,例如药物贴附或固

体支持体的贴附。单链变体可以重组或合成生产。为了合成生产scFv,可以使用自动合成仪。为了重组生产scFv,可以将含有编码scFv的多核苷酸的适当质粒引入合适的宿主细胞,所述宿主细胞可以是真核的宿主细胞,例如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞,或者是原核的宿主细胞,例如大肠杆菌(E.coli)。编码目标scFv的多核苷酸可以用常规操作方法制备,例如多核苷酸的连接。得到的scFv可以用本领域已知的标准蛋白质纯化技术分离。

[0156] 发明包括对抗体(例如抗EphA2抗体)的修饰,所述抗体包括性质没有受到显著影响的LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的肽及其功能性等价的抗体,以及活性增强或减弱的变体。多肽的修饰是本领域的常规实践,并且不需要在本文中详细描述。修饰的多肽实例包括具有氨基酸残基保守取代的多肽;不显著不良的改变功能活性的氨基酸的一个或多个缺失或增加;或者使用化学类似物。可以被另一个氨基酸残基保守取代的氨基酸残基包括但不限于:甘氨酸/丙氨酸;缬氨酸/异亮氨酸/亮氨酸;天冬酰胺/谷氨酰胺;天冬氨酸/谷氨酸;丝氨酸/苏氨酸;赖氨酸/精氨酸;和苯丙氨酸/酪氨酸。这些多肽也包括糖基化和非糖基化的多肽,以及具有其他翻译后修饰的多肽,例如,不同糖的糖基化,乙酰化和磷酸化。优选的,氨基酸取代是保守的,即取代的氨基酸具有和原始氨基酸相似的化学性质。此类保守取代是本领域已知的,并且上文已经提供了实例。氨基酸修饰的范围可以从一个或多个氨基酸的改变或修饰到区域,例如可变区的完全重新设计。在可变区的变化可以改变结合的亲和力和/或特异性。其他的修饰方法还包括使用本领域已知的偶联技术,包括但不限于,酶促方法、氧化取代和螯合作用。可以使用修饰,例如,用于免疫测定的标签附着,如用于放射性免疫测定的放射性部分的附着。制备被修饰的LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的多肽使用本领域已建立的方法,并可以使用本领域已知的标准测定进行筛选,其中一些描述在下文和实施例中。

[0157] 发明还包括包含来自本发明的抗体,例如LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40,的一个或多个片段或区域的融合蛋白质。在一个实施方案中,提供的融合多肽含有可变轻链区域的至少10个连续的氨基酸,以及可变重链区域的至少10个氨基酸。在另一个实施方案中,融合多肽含有异源的免疫球蛋白恒定区。在另一个实施方案中,融合多肽含有LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的轻链可变区和重链可变区。出于本发明的目的,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的融合蛋白质含有一个或多个LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40多肽,以及不吸附天然分子的另一段氨基酸序列,例如,异源的序列或来自另一区域的同源序列。LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的肽可以用本领域已知的方法制备,例如合成的或重组的。

[0158] 在另一个实施方案中,提供了LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的嵌合体,其中重链和/或轻链是融合蛋白质。在一些实施方案中,链的恒定结构域来自一个特定的种和/或纲,并且可变结构域来自不同的种和/或纲。例如,嵌合抗体(在一些实施方案中)中的恒定区来自人起源,并且可变区则与LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40(即,小鼠的)同源或从中衍生。本发明中还体现了具有人源化可变区的抗体,在所述可变区中(在一些实施方案中)CDR区域含有LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的氨基酸序列,而构架区却衍生自人的序列。人源化抗体的其他形式是本领域已知的并描述在本文中。还体现了嵌合体的功能片段。一个实例是人源化的Fab片段,其含有人的铰链区、人的第一恒定区、人的Kappa轻链或重链恒定区,以及来自LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的轻链和/或重链的可变区。人源化的LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的Fab片段可以随后制成Fab二聚体。通常,制备本发明中的LUCA19、SPL1、SG5或

LUCA40的融合蛋白质以及LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的嵌合体是通过使用本文中描述的重组方法制备表达编码它们的多核苷酸来进行的,但是它们也可以通过本领域已知的其他方法制备,包括例如化学合成。见,例如,美国专利号5,807,715;4,816,567;和6,331,415。

[0159] 本发明还包括人源化的抗体。抗体例如LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40或者其它的等价抗体的多核苷酸序列可以用于遗传操作以产生“人源化”抗体,或改善抗体的亲和力或其他特征。人源化抗体的一般原则包括维持抗体的抗原结合部分的基本序列,同时用人抗体序列替换抗体中非人的剩余部分。人源化单克隆抗体有四个基本步骤。它们是:(1) 确定核苷酸并预测起始抗体轻链和重链可变结构域的氨基酸序列;(2) 设计人源化抗体,即,决定在人源化过程中使用哪一段抗体构架区;(3) 实际的人源化方法/技术和(4) 转染和表达人源化抗体。例如,如果抗体是用于临床试验和人体治疗,为了避免免疫应答,恒定区就可以被改造得更类似人的恒定区。见,例如,美国专利号5,997,867和5,866,692。

[0160] 已经描述了多种含有从非人免疫球蛋白衍生的抗原结合位点的“人源化”抗体分子,包括由啮齿类的V区及其相关的人恒定区融合的互补决定区(CDR)的嵌合抗体。见,例如,Winter等人Nature 349:293-299 (1991);Lobuglio等人Proc.Nat.Acad.Sci.USA 86:4220-4224 (1989);Shaw等人J Immunol.138:4534-4538 (1987) 和Brown等人Cancer Res.47:3577-3583 (1987)。其他文献描述了在与合适的人抗体恒定区融合之前,移植到人支持构架区(FR)的啮齿类CDR。见,例如Riechmann等人Nature 332:323-327 (1988);Verhoeyen等人Science 239:1534-1536 (1988) 和Jones等人Nature 321:522-525 (1986)。另一份文献描述了用重组的镶边(veneered)啮齿类构架区支持的啮齿类CDR。见,例如,欧洲专利公开号519,596。这些“人源化的”分子被设计为使对啮齿类抗人抗体分子的有害免疫应答最小化,所述免疫应答限制了在人受者中那些部分治疗应用的持续时间和效力。其他可以被运用的人源化抗体的方法公开在Daugherty等人,Nucl.Acids Res.,19:2471-2476 (1991) 和美国专利号6,180,377;6,054,297;5,997,867;5,866,692;6,210,671;6,350,861;和PCT WO 01/27160中。

[0161] 在另一个备选,完整的人抗体可以通过可商购的、被改造表达特异性人免疫球蛋白的小鼠获得。设计用来生产更理想的(例如完整的人抗体)或更强效的免疫应答的转基因动物也可以用于生产人源化的或人的抗体。此类技术的实例是Abgenix,Inc. (Fremont, CA)的XenomouseTM和Medarex,Inc. (Princeton,NJ)的HuMAb-Mouse[®]和TC MouseTM。

[0162] 本发明还提供含有接合(例如,连接)了治疗剂或化疗分子,或者脂质体或其他含有化疗化合物的小泡的LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40或者LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的等价抗体或多肽的组合物,所述治疗剂例如放射性分子、毒素(例如,加利车霉素)。当施用到个体时,这些组合物,可以将这些试剂定向到表达被抗体或多肽识别的EphA2的癌细胞并且因此可以例如消除癌变细胞和/或抑制癌变细胞的增殖和/或生长。出于简明性,通常为LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40或者抗体制备参比,要理解这些方法可应用于本文描述的任意结合EphA2的实施方案。对于这些方法,接合作用通常指按本文描述的连接这些化合物。连接(通常至少在施用是以紧密连接固定这些成分)可以用下文描述的任意方式实现。

[0163] 本发明的放射性分子包括任意有效摧毁癌变细胞的放射性同位素。实例包括但不限于,钴-60和X射线。此外,天然存在的放射性元素例如通常表现为放射性同位素混合物的铀、镭、和钍是放射性分子的合适实例。

[0164] 本发明的毒素包括,但不限于,紫杉醇、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷、替尼泊苷、长春花新碱、长春花碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、二羟蒽酮、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、心得安和嘌呤霉素及它们的类似物或同系物。本发明的抗体可以被内化到它们结合的癌变细胞内,并且因此对治疗应用特别有用,例如,把由于其不利活性而需要内化的毒素递送到细胞内。此类毒素的实例包括但不限于,肥皂草毒蛋白、加利车霉素、阿娃斯汀(auristatin),和美登素类(maytansinoid)。

[0165] 本发明的抗体或多肽可以直接或间接的、共价的或非共价的接合(连接)放射性分子、毒素,或其它治疗剂,或接合脂质体或其它含有治疗剂的小泡。放射性分子、毒素或治疗分子可以连接到抗体的任意位置,只要抗体能够与其靶标EphA2结合。

[0166] 毒素或治疗剂可以直接的或间接的(例如,通过连接基团,或备选的,通过具有合适附着位点的连接分子,例如在美国专利5,552,391中描述的平台分子)偶联(例如,共价结合)到合适的单克隆抗体上。本发明的毒素和治疗剂可以用本领域已知的方法直接偶联到特定的靶蛋白上。例如,当试剂和抗体都具有能够与对方反应的取代基时,试剂和抗体之间就可以直接反应。例如,一个上的亲核基团,如氨基和巯基,能够与另一个上含有羰基的基团,如酞或酰基卤反应,或与含有良好离去基团(例如,卤化物)的烷基反应。

[0167] 抗体或多肽也可以通过微载体连接治疗剂。微载体指生物可降解或不可降解的、不溶于水的颗粒,其尺寸小于约150、120或100 μm ,更常见的小于约50–60 μm ,优选的小于约10、5、2.5、2或1.5 μm 。微载体包含“纳米载体”,其是尺寸小于约1 μm 的微载体,优选的小于约500nm。此类颗粒是本领域已知的。固相的微载体可以用生物相容性的、天然存在的聚合物,合成聚合物或合成共聚物构成的颗粒,其包括或排除了由琼脂糖或交联的琼脂糖,以及其它本领域已知的生物可降解的材料构成的微载体。生物可降解的固相微载体可以由聚合物构成,该聚合物是在哺乳动物的生理条件下可降解的(例如,聚(乳酸)、聚(乙醇酸)及其共聚物)或易腐蚀的(例如,聚(原酸酯如3,9-二亚乙基-2,4,8,10-四氧杂螺[5,5]十一烷(DETOSU))或聚(酞),例如聚癸二酸(酞))。微载体也可以是液相的(例如,基于油或脂类的),如脂质体、不带抗原的ISCOMS(免疫刺激复合体,是胆固醇、磷脂和辅助活化的皂苷的稳定复合体),或者存在于水包油或油包水乳剂中的液滴或微团,提供的液相微载体是生物可降解的。生物可降解的液相微载体通常包括了生物可降解的油类,其中多种都是本领域已知的,包括角鲨烯和植物油。微载体的形状通常是球形的,但是偏离球形的微载体也是可以接受的(例如,椭球形、杆状,等)。由于它们(对于水)不溶性,微载体可以从水和基于水(含水)溶液中过滤出。

[0168] 本发明的抗体或多肽的接合物可以包含双功能的连接体,其既含有能够偶联有毒试剂或治疗剂的基团,又含有能够偶联抗体的基团。连接体可以行使间隔区的功能,以拉开抗体和试剂的距离从而避免干扰结合能力。连接体可以是可分割的或不可分割的。连接体也可以作用来增加试剂或抗体上的取代基的化学反应活性,从而增加偶联效率。化学反应活性的增加也可以有利于试剂或试剂上的官能团的使用,否则则是不可能的。双功能的连接体可以通过本领域已知的方法偶联到抗体上。例如,含有活性酯部分的连接体,如N-羧基琥珀酰亚胺酯,可以通过酰胺键偶联到抗体的赖氨酸残基上。在另一个实施例中,含有亲核

的胺或肼残基的连接体可以偶联到由抗体糖类残基的糖醇解氧化所产生的醛基上。除了这些直接的偶联方法,连接体可以通过中间载体例如氨基葡聚糖间接的偶联到抗体上。这些实施方案中修饰的键是经过赖氨酸、糖类或中间载体。在一个实施方案中,连接体位点选择性的偶联蛋白质中的游离硫醇残基。适合与蛋白质中的硫醇基选择性偶联的部分是本领域已知的。实例包含二硫化合物、 α -卤化羰基和 α -卤化羧基化合物,和顺丁烯二酰亚胺。当亲核胺的官能团与 α -卤化羰基和 α -卤化羧基出现在同一个分子内时,存在通过胺的分子内烷基化而发生环化的可能。预防这一问题的方法是本领域普通技术人员熟知的,例如通过制备用不能活动的基团(如芳香基或反式链烯基)分隔胺和 α -卤化物官能团的分子,使有害的环化作用在立体化学上难以发生。见,例如,美国专利号6,441,163,用于通过二硫化物部分制备美登素类和抗体的接合物。

[0169] 可以用于制备抗体-药物接合物的可分割的连接体之一是基于顺式乌头酸的酸不稳定的连接体,可以利用不同细胞内区室的酸性环境,所述区室例如在受体介导的内吞作用中遇到的内体和溶酶体。见,例如,Shen等人Biochem.Biophys.Res.Commun.102:1048-1054(1981)中制备柔红霉素和大分子载体的接合物;Yang等人J.Natl.Canc.Inst.80:1154-1159(1988)中制备柔红霉素和抗黑素瘤抗体的接合物;Dillman等人Cancer Res.48:6097-6102(1988)中用酸不稳定的连接体以类似的方式制备柔红霉素和抗T细胞抗体的接合物;Trouet等人Proc.Nati.Acad.Sci.79:626-629(1982)中通过肽间隔臂连接柔红霉素和抗体。

[0170] 本发明的抗体(或多肽)可以用本领域已知的任意方法接合(连接)放射性分子。对放射性标记抗体方法的讨论见“Cancer Therapy with Monoclonal Antibodies”D.M.Goldenberg编著(CRC Press,Boca Raton,1995)。

[0171] 本发明的抗体(或多肽)可以连接标签试剂(或者称为“标签”),例如荧光分子、放射性分子或任意其他本领域已知的标签。本领域已知的标签通常(直接或间接的)提供信号。

[0172] 本发明的抗体、多肽和蛋白质的能力,例如抑制表达EphA2的癌变细胞生长的能力、延迟患有表达EphA2癌症的个体的转移过程的能力、递送治疗剂例如毒素或放射性化合物到表达EphA2的癌变细胞的能力(包括将治疗剂递送到表达EphA2的癌变细胞内部的能力),可以用本领域已知的方法来检测,其中一些描述在实施例中。

[0173] 本发明还提供了含有抗EphA2抗体或LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的等价抗体(如本公开中更清楚的,其包括本文描述的全部抗体)或多肽和治疗剂的组合物(包括药物组合物)。

[0174] 筛选单克隆抗体的方法

[0175] 一些方法可以被用于另外筛选与癌变细胞上的EphA2结合的单克隆抗体。可行的方法之一是免疫组织化学(IHC)。标准的免疫组织化学技术是本领域技术人员已知的技术。见例如,Animal Cell Culture Methods(J.P.Mather和D.Barnes编著,Academic Press,第57卷,第18和19章,第314-350页,1998)。生物学样品(例如,组织)可以取自活组织切片、尸体解剖或尸检。为了确定EphA2是否只出现在癌变细胞上,可以使用LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40检测患有癌症的个体组织中EphA2的存在,同时使用取自患有癌症的个体中其它非癌变组织以及取自没有癌症的个体中的组织作为对照。组织可以包埋在固体或半固体的物

质(例如,琼脂糖凝胶或OCT)中,防止其在冷冻及其后的染色切片过程中受到损坏。可以使用取自不同器官和不同阶段的癌症筛选单克隆抗体。可以用于筛选目的的组织实例包括但不限于卵巢、乳房、肺前列腺、结肠、肾、皮肤、甲状腺、脑、心、肝、胃、神经、血管、骨、上消化道以及胰腺。可以用于筛选目的的不同癌症类型的实例包括但不限于癌、腺癌、肉瘤、腺肉瘤、淋巴瘤、和白血病。

[0176] 在另一种备选中,癌变细胞系例如SK-Ov-3(ATCC#HTB 77)、LnCap(ATCC#CRL-1740)、COLO 205(ATCC#CCL 222)、A549(ATCC#CCL 185)、PANC-1(ATCC#CRL 1469)、SK-BR-3(ATCC#HTB 30)、SK-MES-1(ATCC#HTB 58)、HT-29(HTB-38)、SW 480(ATCC#CCL 228)、AsPC-1(ATCC#CRL 1682)、Capan-1(ATCC#HTB 79)、CFPAC-1(ATCC#CRL 1918)、HPAF-II(ATCC#CRL-1997)、HS-700T(ATCC#HTB-147)、Du-145(ATCC#HTB81)、CaLu-1(ATCC#HTB-54)、786-O(ATCC#CRL-1932)、CaKi-2(ATCC#HTB-47)、A498(ATCC#HTB-44)、BT474(ATCC#HTB-20)、和PC-3(ATCC#CRL 1435)和分别来自它们相应组织的正常细胞可以被用于筛选特异性针对癌变组织的单克隆抗体。来自不同器官的正常组织(包括但不限于卵巢、乳房、肺、前列腺、结肠、肾脏、皮肤、甲状腺、主动脉平滑肌以及内皮细胞)的原代细胞,较早的传代细胞、细胞培养物可以作为阴性对照。癌变的或非癌变的细胞可以生长在载玻片或盖玻片上或在塑料表面,或制备在CellArray™(见WO 01/43869中的描述)上,并用上文描述过的IHC筛选组织中抗体的结合。备选的,细胞可以用非蛋白水解的方式从生长表面上移除并且离心成沉淀再进行包埋,并且作为组织按上文描述的进行IHC分析。在另一种备选中,用与初级抗体、连接了荧光分子的次级“报告”抗体与单细胞一起孵育,并且之后使用荧光活化细胞分选(FACS)仪器分析来筛选所述单个细胞。

[0177] 一些不同的检测系统可以用来检测抗体与组织切片的结合。通常,免疫组织化学包括初级抗体与组织的结合,以及之后针对初级抗体来源物种的次级抗体生成并且与可检测的标记(例如,辣根过氧化物酶(HRP)或二氨基联苯胺(DAB))接合。可以采用的一种备选方法是多克隆镜像互补抗体或聚MICA。在D.C.Mangham和P.G.Isaacson(Histopathology (1999) 35 (2):129-33)中所描述的聚MICA(多克隆镜像互补抗体)技术,可以用来检测初级抗体(例如,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40)与正常的和癌变组织的结合。在The Binding Site Limited(P.O.Box 4073Birmingham B29 6AT England)可商购一些类型的聚MICATM检测试剂盒。商品编号HK004.D是使用DAB发色团的聚MICATM检测试剂盒。商品编号HK004.A是使用AEC发色团的聚MICATM检测试剂盒。备选的,初级抗体可以用可检测的标记直接进行标记。

[0178] IHC筛选以选择合适的抗体的第一步是从小鼠中培养的初级抗体(例如,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40)与一个或多个免疫原(例如,细胞或组织样品)结合。在一个实施方案中,组织样品是来自不同器官的冰冻组织切片。细胞或组织样品可以是癌变或非癌变的。

[0179] 制备、切片冰冻组织(固定或不固定),以及IHC可以使用本领域熟知的多种方法中的任意一种进行。见,例如,Stephan等人Dev.Biol.212:264-277(1999)和Stephan等人Endocrinology 140:5841-54(1999)。

[0180] 选择了这样的单克隆抗体,其与人细胞交叉反应并且结合癌变的细胞或组织,但是不以相同的程度结合正常细胞或组织。与一种或多种癌症类型中表达的抗原相结合,但是不结合正常细胞的单克隆抗体也被挑选出来。LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40就是结合出现在多种不同癌症中的抗原EphA2,但与正常组织结合有限的抗体实例。表位作图可以被用于

另外描述抗体特征。可商购的服务器(例如,Pepscan Systems,P.O.Box 2098,8203AB Lelystad,The Netherlands)可以用来确定抗原EphA2上被抗体,例如LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40结合的表位。

[0181] 使用LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40,结合EphA2的等价抗体或多肽诊断癌症的方法

[0182] 出于诊断的目的,根据本文公开的方法制备的单克隆抗EphA2抗体和从LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40衍生的与EphA2结合的等价抗体或多肽,可以用来鉴别或检测多种组织中癌变细胞的存在与否,所述组织包括但不限于,卵巢、乳房、肺、前列腺、结肠、肾脏、皮肤、甲状腺、脑、心、肝、胃、神经、血管、骨、上消化道和胰腺。出于简明性,在理解了这些方法应用于本文描述的任意结合EphA2的实施方案下,通常对LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40或者抗体制备参比。检测通常包括用本文描述的结合EphA2的抗体或多肽接触细胞,以及在EphA2和特异性结合EphA2的抗体(例如LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的人源化抗体,人类抗体或任意其它结合EphA2的部分)之间形成复合物。此类复合物的形成可以在体外或体内。不受到理论局限的,单克隆抗EphA2抗体可以通过EphA2的胞外结构域结合EphA2。如本文用到的,检测可以包含定性的和/或定量的检测,并且可以包括将测量的水平与正常细胞比较,确定癌变细胞中EphA2表达水平的升高。

[0183] 使用抗体进行诊断的一种方法是在体内进行肿瘤成像,通过将抗体连接标记部分(例如,荧光剂、放射性的或不透射线的剂),向患者施用该抗体并使用X射线或其他成像仪器显现标记的抗体在表达抗原的癌细胞表面的定位。标记部分是本领域已知的。

[0184] 在另一种方法中,通过本领域熟知的方法(例如,包埋在冰冻的化合物中、冰冻并切片(固定或不固定);固定并石蜡包埋,使用或不使用抗原修复和对比染色的多种方法)移除癌变细胞并制备用于免疫组织化学的组织。单克隆抗体也可以用来鉴定处于不同发展阶段的赘生物。抗体也可以用来确定患者的肿瘤在其表面是否以预先确定的水平表达抗原,从而确定可以用直接抗所述抗原的抗体进行免疫疗法的候选。

[0185] 识别抗原的抗体(或多肽)也可以产生诊断免疫测定,其用于检测从活或死的癌细胞中释放或分泌到体液中的抗原,所述体液包括但不限于,血液、唾液、尿、肺部积液或腹水。根据实施例中深入详细的讨论,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40可以结合组织中处于不同阶段的多种癌症,包括但不限于黑素瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌和结肠癌。使用LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40用于诊断目的的方法在任意形式的抗癌治疗(例如化疗或放射性疗法)前后,都可以用来确定哪种肿瘤对特定治疗最有反应、患者预后、转移性疾病的肿瘤亚型或起源以及疾病的发展或对治疗的反应。

[0186] 为了治疗目的使用LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40,或者等价抗体或多肽的方法

[0187] 使用本文公开的方法制备的单克隆抗EphA2抗体及等价抗体(以及本发明其他多肽实施方案)可以用于患有癌症个体治疗的疗目的,所述癌症包括但不限于黑素瘤、乳腺癌、肺癌、结肠癌或前列腺癌。这些治疗方法也用于上述相关的实施方案。出于简明性,在理解了这些方法应用于本文描述的任意结合EphA2的实施方案下,通常对LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40或者抗体制备参比,包括但不限于本文描述的包括相关实施方案的人源化抗体和人抗体。使用LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的疗法可以包括上述在体外和/或体内EphA2和此类抗体间复合物的形成。在一个实施方案中,单克隆抗EphA2抗体可以结合癌变细胞并降低其生长和/或增殖。在一个实施方案中,单克隆抗EphA2抗体可以结合癌变细胞并诱导癌细胞

中的凋亡细胞死亡。在另一个实施方案中,单克隆抗EphA2抗体可以结合癌变细胞并延迟转移过程。在另一个实施方案中,单克隆抗EphA2抗体可以结合癌变细胞并向癌变细胞递送连接在LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40上的治疗剂(例如毒素或放射性化合物)。对于一些实施方案,治疗剂(例如毒素)被引入了细胞内部(即,被内化)。特别适合这些方法的试剂包括在细胞内部具有活性的试剂。这些试剂的实例包括但不限于肥皂草毒蛋白、加利车霉素、阿娃斯汀,和美登素类。通常,在这些实施方案中对个体施用有效量(将治疗剂有效递送到靶标癌变细胞和/或其内部的量)。在另一个实施方案中,患有癌症个体用LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40进行姑息治疗。癌症患者的姑息治疗包括治疗或减轻疾病的不良症状,或者治疗或减轻对疾病的其它治疗产生的医源性症状,但是不直接影响癌症进程。这包括用于减轻疼痛、营养支持、性问题、精神性痛苦、抑郁、疲劳、精神性疾病、恶心、呕吐等的治疗。

[0188] 本发明还提供了使用LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40抗体或者能优选结合与任意LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40所优选结合表位相同的表位的抗体来抑制癌细胞生长和/或增殖的方法。

[0189] 在另一个实施方案中,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40或者本文描述的任意EphA2实施方案可以结合表达EphA2的癌变细胞,并诱导抗表达EphA2的癌变细胞的主动免疫应答。在一些情形中,主动免疫应答可以引起癌变细胞的死亡(例如,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40结合癌细胞诱导凋亡的或肿胀的细胞死亡),或抑制其生长(例如,阻断细胞周期进程)。在另一些情形中,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40或本文描述的任意EphA2抗体可以与癌变细胞结合,并且抗体依赖性细胞毒性(ADCC)可以消灭LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40所结合的癌变细胞。因此,本发明提供了包括施用本文描述的任意组合物的刺激免疫应答的方法。

[0190] 抗EphA2抗体可以与能增强或指导个体自身免疫应答的试剂(例如能强化ADCC的试剂)一起施用。在一个实施方案中,从抗EphA2抗体寡糖上移除了出现在该抗体中的至少一个岩藻糖残基,该修饰可以增强ADCC。在类似的实施方案中,出现在抗EphA2抗体中的岩藻糖残基被修饰以将其组成改变到比原始的、未修饰的抗体增强了ADCC的程度。

[0191] 在一些情形中,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的结合也可以激活细胞和体液免疫应答,并可以补充更多的天然杀伤细胞或增加细胞因子(例如,IL-2、IFN- γ 、IL-12、TNF- α 、TNF- β 等)产生,从而进一步激活个体的免疫系统去摧毁癌变细胞。在另一个实施方案中,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40可以结合癌变细胞,并且巨噬细胞或其他的吞噬细胞可以调理癌变细胞。

[0192] 在一些实施方案中,本发明提供产生被动免疫的方法,包括施用任意本文描述的组合物。

[0193] 本发明提供向表达EphA2的细胞,例如表达EphA2的癌细胞,递送任意本文描述的组合物(包含接合物)的方法。这些方法需要向个体施用本文中描述的组合物(包含接合物)。例如,在一些实施方案中,方法被用于向靶细胞中引入接合物。在另一个实施方案中,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40可以接合到治疗剂(例如放射性分子、毒素,如肥皂草毒蛋白、加利车霉素、阿娃斯汀或美登素类,或其它化疗分子)或脂质体或其它含有化疗化合物的小泡,并施用到个体以将这些化合物定向到含有抗体所识别的抗原的癌细胞,从而消灭癌变细胞。在另一个实施方案中,为了延迟转移过程,抗体可以在手术移除表达抗原的癌后作为辅助疗法使用。抗体也可以在患有表达抗原的肿瘤的患者术前进行施用(新辅助疗法),从

而缩小肿瘤尺寸并因此使得手术能够进行或简化手术,在手术中节省组织,和/或减少导致的损形。

[0194] LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40和等价的抗体或片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc等)的多种制剂都可以被用于施用,所述抗体或片段例如嵌合抗体、单链(ScFv)、其突变体、含有抗体部分的融合蛋白质、人源化抗体,以及LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的任意被修饰过的但仍含有必需特异性的抗原EphA2识别位点的构型。在一些实施方案中,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40抗体或LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的多种制剂可以被单独使用。在另一些实施方案中,施用了LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40或LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40的其多种制剂(包括本文描述的任意组合物实施方案)和可药用的赋形剂,并可以以多种制剂形式施用。可药用赋形剂是本领域已知的,是有利于药物有效物质施用的相对惰性的物质。例如,赋形剂可以赋予形态或稠度,或作为稀释剂。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、润湿剂和乳化剂、改变渗透性的盐、包囊剂、缓冲液、和皮肤渗透增强剂。Remington, The Science and Practice of Pharmacy第20版, Mack Publishing (2000) 中阐述了在肠胃外的和非肠胃外药物递送中使用的赋形剂和制剂。

[0195] 通常,这些试剂都被配制用于注射给药(例如,腹膜内、静脉内、皮下、肌内等),尽管也可以使用其他形式的给药(例如,口服、粘膜等)。因此,LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40抗体及其等价物优选结合可药用的载体,例如盐水、林格溶液、葡萄糖溶液等等。特定的剂量方案(即剂量、时间选择和重复)将取决于特定个体及该个体的病史。通常,可以使用任意下列选项的剂量:施用至少约50mg/kg体重的剂量;至少约10mg/kg体重的剂量;至少约3mg/kg体重的剂量;至少约1mg/kg体重的剂量;至少约750μg/kg体重的剂量;至少约500μg/kg体重的剂量;至少约250μg/kg体重的剂量;至少约100μg/kg体重的剂量;至少约50μg/kg体重的剂量;至少约10μg/kg体重的剂量;至少约1μg/kg体重的剂量;或更多。出于经验考虑,例如半衰期,通常将帮助确定剂量。与人免疫系统相容的抗体,例如人源化抗体或完全人抗体,可以用来延长抗体的半衰期,并且预防抗体被宿主的免疫系统攻击。

[0196] 一些个体需要一种以上的剂量。给药的频率可以在整个治疗过程中确定和调整,这基于降低癌变细胞数目、维持癌变细胞减少、降低癌变细胞的生长和/或增殖,或延迟转移过程。癌变细胞的存在可以用任意本文中讨论的或本领域技术人员已知的方法(例如,通过免疫组织化学或流式细胞术或活组织检查或生物学样品检测)鉴定。在一些情形中,维持持续释放LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40抗体的制剂方案是适当的。用于完成持续释放的多种制剂方案和仪器是本领域已知的。

[0197] 在一个实施方案中,在进行过一次或多次给药的个体中可以经验性的确定LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40抗体的剂量。个体被给与增加剂量的LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40。为了评估LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40或者其它等价抗体的效率,可以监控特定癌症疾病状态的标记。这些标记包括:通过触诊或视觉观察直接测量肿瘤尺寸;通过X射线或其他成像技术间接测量肿瘤尺寸;通过直接肿瘤活组织检查和肿瘤样品显微镜检评估的改善;测量间接的肿瘤标记(例如,前列腺癌的PSA),疼痛或麻痹的减少;语言、视力、呼吸或其他与肿瘤有关的失能的改善;食欲增加;或用可接受的测试测试生活质量的改善或生存期延长。本领域技术人员很清楚剂量将根据个体、癌症类型、癌症阶段、癌症是否已经开始向个体的其他部位转移以及过去和同期的治疗进行变动。

[0198] 其他制剂方案包含本领域已知的合适的递送方式,包括但不限于,载体例如脂质体。见例如,Mahato等人(1997) Pharm. Res. 14:853-859。脂质体制品包含但不限于,细胞转染剂、多层小泡和单层小泡。

[0199] 在一些实施方案中,出现了一种以上的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆。这样的组合物可以包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个与癌、腺癌、肉瘤或腺肉瘤反应的不同的抗体。LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40抗体可以混合一个或多个能与器官中的癌、腺癌、肉瘤或腺肉瘤反应的抗体,所述器官包括但不限于卵巢、乳房、肺、前列腺、结肠、肾、皮肤、甲状腺、骨、上消化道和胰腺。抗体的混合物,如它们在本领域中通常所示的,对治疗广泛个体的群体特别有效。

[0200] 使用本领域的标准方法进行疾病评估,例如成像方法和监控合适的标记。

[0201] 含有本发明的结合EphA2的抗体和多肽的试剂盒

[0202] 本发明还提供含有本文描述的抗体或结合EphA2的任意组合物的试剂盒,用于诊断和/或治疗。因此,试剂盒含有优选结合EphA2和/或与EphA2形成复合物的抗体(可用于例如检测乳房、结肠、肺或前列腺的癌变细胞)。在一些实施方案中,试剂盒包含抗EphA2抗体或优选结合与LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40所优选结合表位相同的表位的抗体。在一些实施方案中,试剂盒包含连接了治疗剂或标记试剂的抗EphA2抗体,或优选结合与LUCA19、SPL1、SG5或LUCA40所优选结合表位相同的表位的抗体。这些试剂盒可以另外包括说明书和/或试剂,用于将抗体或本文描述的任意抗体或多肽实施方案连接治疗剂或标记剂。在一些方面,抗体(例如,单克隆、多克隆、人的、人源化的等)与EphA2的结合被用于诊断个体中的癌症,例如检测癌变细胞存在与否的试剂盒,和检测乳房、结肠、肺或前列腺的癌变细胞存在与否的试剂盒。在另一些方面,例如,试剂盒可以用来治疗患有癌症或拥有癌症家族病史的个体。用于治疗癌症个体的试剂盒包括但不限于抑制癌细胞生长和/或增殖的、用于递送治疗剂到癌变细胞的、用于递送治疗剂到癌变细胞内部的试剂盒。本发明的试剂盒是包装合适的,可以任选的提供附加成分,例如用于确定与EphA2结合的缓冲液和说明书,例如俘获试剂、显色试剂、标签、反应表面、检测方法、对照样品和解释信息。说明书可以用于任意对抗原结合的测量方法,包括但不限于,本文描述的那些测定。在另一些实施方案中,说明书可以用于任意本文描述的方法,包含抑制癌变细胞,例如乳腺癌、肺癌、结肠癌或前列腺癌的生长和/或增殖的说明,用于向癌变细胞递送治疗剂的说明、用于向癌变细胞内部施用治疗剂的说明。在一些实施方案中,使用上述试剂来进行多种测量,例如可以允许在同一个体随着时间或多个个体中测量。可以使用任意检测抗体结合的(试剂盒提供的)合适方法,例如带标签的抗人类抗体,其中标签可以是酶、荧光基团、化学发光物质、放射性同位素或辅酶。通常,使用酶作为标签。

[0203] 下列实施例仅出于解释性目的提供,但不限制本发明。

[0204] 实施例

[0205] 实施例1. 制备癌细胞系作为免疫原。

[0206] 使用从组织或细胞培养物中分离的完整细胞作为免疫原,生产特异性对特定细胞类型代表性的表面抗原特异性的单克隆抗体。美国专利#6,541,225描述了适合本发明实践的此类方法。通常,为了生产抗特定细胞类型细胞表面抗原的单克隆抗体,希望用活的和完整的该类型细胞免疫未转化的B细胞,优选使用那些表面没有血清的细胞。适合用于生产抗

EphA2抗原的单克隆抗体(例如但不限于LUCA19、LUCA 40或SPL1)的细胞系,包括:BT-474(ATCC#HTB-20)、MDA-MB-175VII(ATCC#HB-25)、MDA-MB-361(ATCC#HB-27)、SKBR3(ATCC#HTB-30)、SKMES-1(ATCC#HTB-58)、ES-2(ATCC#CRL-1978)、SKOV3(ATCC#HTB-77)、HPAFII(ATCC#CRL-1997)、Hs700T(ATCC#HTB-147)、Co1o205(ATCC#CCL-222)、HT-29(ATCC#HTB-38)、SW480(ATCC#CCL-228)、SW948(ATCC#CCL-237)、A498(ATCC#HTB-44)和Caki-2(ATCC#HTB-47)。

[0207] 细胞生长在合适的补充了生长因子的无血清营养培养基中。使用在补充血清的培养基中增殖的细胞进行免疫具有严重的缺陷。血清含有未定义活性的大小生物分子的复杂混合物。这些生物分子可以附着在细胞表面,并且因此导致产生抗体交叉反应不代表特定细胞类型的分子。此外,血清生物分子与细胞表面的结合会导致遮蔽所需的细胞表面抗原靶标。多种无血清培养基制品是商业化已知并可以公开购买,例如,具有下列补充物的F12/DME(1:1)营养培养基:胰岛素(10 μ g/ml终浓度)、表皮生长因子(EGF)(5ng/ml终浓度)、亚硒酸(2.5x 10⁸M终浓度)、和猪垂体提取物(PPE)(5 μ l/ml终浓度)。

[0208] 为了收获细胞,用不含钙和镁的Hanks盐溶液漂洗单细胞层一次,在含10mM EDTA的Hanks盐溶液中37℃孵育15分钟。轻柔吹打使细胞从培养表面脱落。细胞悬液用1000xg离心5分钟沉淀。去掉上清液并根据需要用含有非变性佐剂的无血清培养基重悬。

[0209] 实施例2.产生单克隆抗体

[0210] 非变性佐剂(Ribi,R730,Corixa,Hamilton MT)在磷酸缓冲的盐溶液中再水化到2ml。然后将100 μ l此再水化的佐剂与实施例1中的一些细胞沉淀轻柔混合,用于免疫。按每只鼠约10⁶个细胞从足垫注射Balb/c小鼠,每周注射约一到两次。精确的免疫时间表如下:第0天,加Ribi免疫。第3天,加Ribi免疫。第7天,加Ribi免疫。第24天,去Ribi免疫。第29天,去Ribi免疫。第32天,去Ribi免疫。第36天,去Ribi免疫。第44天,去Ribi免疫。第51天,去Ribi免疫。第69天,取血作滴度测试。第71天,加Ribi免疫。第74天,加Ribi免疫。第81天,加Ribi免疫。第91天,融合前加强(无Ribi)。第104天,收获淋巴结用于融合。

[0211] 在第69天,从每只被免疫动物的尾部取一滴血,用FACS分析检测针对用于免疫的细胞系的抗体滴度。当滴度达到至少1:2000时,该小鼠用CO₂麻醉并颈椎脱位处死。收获用于制备杂交瘤的淋巴结。

[0212] 来自小鼠的淋巴细胞与小鼠骨髓瘤系X63-Ag8.653用35%聚乙二醇4000融合。在融合后的第10天,用有荧光活性的细胞分选(FACS)筛选杂交瘤上清液中的免疫细胞特异性单克隆抗体。取自每株杂交瘤的条件培养基与整分试样的人胚肾细胞一起孵育30分钟。孵育后,洗涤细胞样品,重悬于0.1ml稀释剂中并与1 μ g/ml接合山羊抗小鼠IgG的F(ab')₂片段的FITC在4℃孵育30分钟。洗涤细胞,重悬于0.2ml FACS稀释剂中并用FACScan细胞分析仪(Becton Dickinson;San Jose,CA)分析。通过FACS,基于杂交瘤克隆对人胚肾细胞表面的结合,选择人胚肾细胞用于另外的扩增、克隆和特征描述。选择了制备结合抗原(名为Ag-SPL1)和在该抗原上的表位(名为Ag-SPL1.1)的单克隆抗体(名为mu-SPL1)的杂交瘤。选择了制备结合抗原(名为Ag-LUCA19)和在该抗原上的表位(名为Ag-LUCA19.1)的单克隆抗体(mu-LUCA19)的杂交瘤。选择了制备结合抗原(名为Ag-LUCA40)和在该抗原上的表位(名为Ag-LUCA40.1)的单克隆抗体(mu-LUCA40)的杂交瘤。选择了制备结合抗原(名为Ag-Ag-SG5)和在该抗原上的表位(名为Ag-SG5.1)的单克隆抗体(mu-SG5)的杂交瘤。为了在足以支持单

克隆抗体生长和抗体纯化的培养基中纯化单克隆抗体,培养扩大生产mu-SPL-1、mu-LUCA19、mu-LUCA40和mu-SG5单克隆抗体的杂交瘤。

[0213] 实施例3.纯化抗EphA2抗体

[0214] 在10mM EDTA的存在下,从组织培养瓶上分离人类癌细胞(例如但不限于SKMES-1、786-0和Colo205细胞系),1400rpm离心5分钟并重悬于含有1%BSA和2mM EDTA的PBS(FACS稀释剂)中。将细胞计数并调整为 10^7 细胞/ml。约0.1ml细胞与100 μ l FACS稀释剂在37℃孵育30分钟。用蛋白G亲和层析从组织培养上清液中纯化出与人癌细胞系结合的单克隆抗体。如果需要,可以在抗体纯化前将组织培养上清液通过牛IgG柱,去掉过量的牛IgG。下列物质被用于抗体纯化过程:杂交瘤组织培养上清液、Immunopure (G) IgG结合缓冲液(Pierce#21011Rockford,IL)、Immunopure IgG洗脱缓冲液(Pierce#21009)、浓缩的HCl(用于调整pH值)、Corning的1升PES(聚醚砜)、0.22 μ m滤器(Corning#431098,Corning,NY)、Amersham Pharmacia AKTA Explorer System(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ)、Protein-G Sepharose 4Fast Flow(Amersham Biosciences#17-0618-03)、由3M硫氰酸钾/50mM Tris pH7.8和PBS(磷酸缓冲的盐液)、3M Tris pH9.0组成的抽提缓冲液。

[0215] 为了纯化小鼠抗人SPL1、小鼠抗人LUCA19和小鼠抗人LUCA40抗体(即本文分别谈到的mu-SPL1、mu-LUCA19和mu-LUCA40),测量上清液的体积并向其中添加等体积的结合缓冲液。让该混合物在室温下平衡。上清液经过0.22 μ m滤器澄清。上清液使用AKTA Explorer系统(Amersham Biosciences)上样到蛋白G琼脂糖柱,然后用5-10倍柱体积的结合缓冲液清洗。用洗脱缓冲液洗脱单克隆抗体,并收集相应的组分。向空管中添加3M Tris,pH9.0(1/60体积的组分)中和洗脱的组分。合并含有单克隆抗体的峰值组分。合并的样品被注入预湿润的slidealyzer盒(截留分子量10,000MW;Pierce#66810)中,在4℃1×PBS中透析(换3次缓冲液,每次更换后透析时间为4小时)。纯化的单克隆抗体经过无菌过滤(0.2 μ m Acrodisc)储存在2-8℃。

[0216] 被纯化的抗体样品用UV吸光度(A₂₈₀)和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确定浓度。在非还原和还原条件都运行SDS-PAGE,用于分析分子量、鉴定单克隆抗体的典型条带模式并且评估纯度。

[0217] 从杂交瘤上清液中纯化了mu-SPL1、muLUCA19和mu-LUCA40的单克隆抗体以后,重新测试它们分别与致免疫的或目标靶细胞的结合。细胞样品按上述方法制备,并与多种浓度的纯化抗体孵育。孵育细胞在清洗后,重悬在0.1ml稀释剂中并与1 μ g接合了山羊抗小鼠IgG的F(ab')₂片段的FITC在4℃孵育30分钟。清洗细胞,重悬于0.5ml FACS稀释剂中,并用FACScan细胞分选仪(Becton Dickinson;San Jose,CA)分析。在FACScan直方图中的右移表示纯化的抗体仍然结合细胞。

[0218] 在另一些实验中,用活细胞ELISA检测并证实了mu-SPL1、mu-LUCA19和mu-LUCA40抗体分别与SPL1、LUCA19和LUCA40结合。尽管也可以使用本领域已知的其它方法,但(本发明)使用下列方法。细胞(HT-29、SKOV3、SKMES-1、SW480、SKBR-3和HPAFII)在含有10%胎牛血清(FBS)的培养基中生长,直到在经过组织培养处理的96孔板(Falcon)上汇合。用PBS清洗细胞,然后与用50 μ l按所需浓度溶解在含有1%BSA和0.1%叠氮化钠的Hank's平衡盐溶液(HBSS)中的所需抗体一起在室温孵育1小时。用每孔100 μ l HBSS清洗细胞三次,之后与辣根过氧化物酶(HRP)次级抗体(每孔50 μ l稀释在HBSS中)一起室温孵育30分钟。最后用HBSS

清洗细胞三次,每孔加入每孔100 μ l变色底物(TMB底物,KPL)。用每孔100 μ l 1M磷酸终止变色反应。在0.D.450nm读取平板。

[0219] 实施例4.Western印迹分析SPL1、LUCA19和LUCA40在癌细胞系SW480中的表达

[0220] 肾癌细胞系SW480(ATCC#CCL-228)在175cm²培养皿生长到汇合。汇合的单层细胞用Hank's平衡盐溶液(HBSS+不含碳酸氢钠或酚红;用10mM HEPES,pH7.4缓冲;Sigma Chemicals)清洗三次,在室温下用200 μ g硫代-NHS-LC-生物素(Pierce Endogen)生物素酰化30分钟。然后用含有0.1M Tris,pH7.4(Sigma Chemicals)的HBSS+清洗细胞,并用含有0.1M Tris,pH7.4的HBSS+在室温下孵育15分钟。最后,用HBSS+清洗细胞三次,并在裂解缓冲液(含有2%Triton X-100、2mM PMSF、0.1%叠氮化钠的HBSS+和每5ml裂解缓冲液加1片无EDTA的全小蛋白酶混合物片剂(Roche Molecular Biochemicals))中在冰上孵育5分钟裂解细胞。

[0221] 将细胞刮入裂解缓冲液中并收集裂解液。裂解液在14,000 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C离心一小时。澄清的裂解液用5 μ l接合了(1mg/ml)CNBr 4MB琼脂糖微珠(Amersham Pharmacia)的人IgG在4 $^{\circ}$ C预清除2小时。离心并移去人类IgG微珠,然后,预清除的裂解液与接合了CNBr 4MB琼脂糖微珠(以1mg/ml接合)的单克隆抗体mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40在4 $^{\circ}$ C孵育2小时。孵育2小时后离心并移出mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40的微珠。人IgG的微珠和mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40的微珠都用1ml裂解缓冲液单独清洗三次,并且再用1ml HBSS+清洗三次。清洗后的微珠通过加入30 μ l SDS-PAGE样品缓冲液洗脱,并在99 $^{\circ}$ C沸腾加热5分钟。

[0222] 然后,样品用4-20%的Novex梯度凝胶(Invitrogen)解离,并转移到0.2 μ m的硝化纤维膜(Invitrogen)上,用接合了的链霉抗生物素(Pierce Endogen)的马辣根过氧化物酶(HRP)显色或用5 μ g/印迹的mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40Western印迹。

[0223] 为了检测接合了链霉抗生物素的HRP,先用封闭缓冲液(在含有0.05%Tween-20的Tris缓冲盐溶液(TBST)中有5%脱脂奶粉)封闭硝化纤维膜1小时。接合了链霉抗生物素的HRP按1 μ g/ml稀释在TBST中,并在室温下暴露于硝化纤维膜30分钟。硝化纤维膜用TBST清洗三次再用ECL+(Amersham)显色。

[0224] 为了用mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40进行Western印迹,硝化纤维膜在封闭缓冲液中类似的封闭1小时。然后,硝化纤维膜在热封的塑料袋中孵育,其中含有1ml在封闭缓冲液中按5 μ g/ml稀释的mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40。硝化纤维用TBST清洗三次,再与10ml 1 μ g/ml的接合驴抗小鼠IgG(特异性、针对牛、鸡、山羊、豚鼠、金黄仓鼠、马、人、大鼠、绵羊的血清蛋白质交叉吸附的重链和轻链;Jackson Immunoresearch货号#709-035-149)的HRP在室温孵育1小时。最后,用TBST清洗硝化纤维三次,并用ECL+(Amersham)显色。

[0225] 实施例5.免疫组织化学方法

[0226] 癌症患者的冰冻组织样品被包埋在OCT化合物中,并在异戊烷中用干冰速冻。用Leica 3050CM切片低温切片,厚度为8-10 μ m,解冻封固在SuperFrost Plus载玻片(VWR#48311-703)上。切片用75%丙酮/25%乙醇在10 $^{\circ}$ C固定,并且在室温空气干燥2-4小时。固定好的切片在使用前储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0227] 对于免疫组织化学,组织切片用Tris缓冲的0.05%Tween(TB-T)清洗复苏,并用封

闭缓冲液(TB-T, 5%普通山羊血清和100 μ g/ml抗生物素蛋白)在室温封闭30分钟。然后,载玻片与在封闭缓冲液中稀释的mu-LUCA19、mu-LUCA40、mu-SG5或mu-SPL1以及对照单克隆抗体(1 μ g/ml)在室温孵育60-90分钟。再用封闭缓冲液清洗切片三次。用含有山羊抗小鼠IgG+IgM(H+L)F(ab')₂-过氧化物酶接合物和过氧化物酶底物二氨基联苯(1mg/ml, Sigma货号D5637)的0.1M醋酸钠缓冲液pH5.05和0.003%过氧化氢(Sigma货号H1009)检测结合的单克隆抗体。染过色的载玻片用苏木精对比染色并用Nikon显微镜检查。

[0228] 在一些情况下,石蜡包埋甲醛固定的组织可以在用适当的抗原复苏方法后用于免疫组织化学。一种上述抗原复活方法描述在Mangham和Isaacson, Histopathology 35:129-33 (1999)中。本领域的技术人员可以使用其他的抗原复苏方法和/或检测的方法。从使用了冰冻组织或(根据需要,固定的组织)经过抗原复活和polyMICA检测的类似实验中获得结果。评估了抗LUCA19、抗LUCA40和抗SPL1抗体与多种正常组织和癌组织的结合情况。在所有情形中,抗体在对照的固定组织中的结合情况与在冰冻组织中的结合情况具有相关性。仅当对照中的两种情况不匹配时才使用来自冰冻组织的结果。

[0229] 出于便利,对使用不同来源的冰冻外科组织的一些实验所获得的综合结果总结在下表1-7中。表1-4总结了LUCA19、LUCA40、SPL1和SG5抗原在正常人体组织中的分布。表5-7总结了LUCA19、LUCA40和SPL1在多种人体肿瘤组织中的分布。

表 1. LUCA19 抗原在正常人体组织中的分布

组织类型	结果
皮肤	阴性
肺	阴性
肾	阴性
胰腺	阴性, 除少数导管上 1+染色
肝	阴性
结肠	阴性
十二指肠	基底上皮中 1+染色

[0230]

表 2. LUCA40 抗原在正常人体组织中的分布

组织类型	结果
皮肤	阴性, 除少数小的皮下血管上+/-
肺	阴性
肾	阴性, 除肾小球上+/-
胰腺	阴性
肝	阴性, 除实质上+/-
结肠	阴性, 除粘膜和肌层上+/-
十二指肠	阴性
前列腺	阴性
卵巢	阴性
乳房	阴性, 除腺体结构上+/-

[0231]

[0232]

表 3. SPL1 抗原在正常人体组织中的分布	
组织类型	结果
皮肤	阴性
肺	阴性
肾	阴性
胰腺	阴性
肝	阴性
结肠	粘膜上(50%)1+集中染色
十二指肠	1+粘膜染色
前列腺	阴性
卵巢	阴性
乳房	阴性

[0233]

表 4. SG5 抗原在正常人体组织中的分布	
组织类型	结果
皮肤	表皮和外泌汗腺上+/-染色
肺	阴性
肾	阴性
胰腺	阴性
肝脏	+/-染色(实质色)
结	阴性
胃	阴性
前列腺	阴性
卵巢	阴性
乳房	阴性

[0234]

表 5. LUCA19 抗原在人体肿瘤组织中的分布	
组织类型	结果
前列腺	4/4 筛选的肿瘤上阴性
结肠	5/5 筛选的肿瘤上 1-3+染色
肾	5/5 筛选的肿瘤上阴性
肺	4/7 筛选的肿瘤上 1-2+染色, 3/7 筛选的肿瘤上阴性
卵巢	4/4 筛选的肿瘤上阴性
胰腺	5/5 筛选的肿瘤上 2-3+
乳房	可变; 1/3 筛选的肿瘤上 1-2+

表 6. LUCA40 抗原在人体肿瘤组织中的分布

组织类型	结果
前列腺	可变；从阴性到 1+染色；筛选 8 个肿瘤
结肠	8/8 筛选的肿瘤上 1-3+染色
[0235] 肾	5/5 筛选的肿瘤上+/-基质染色
肺	可变；从阴性到 1+染色；筛选 8 个肿瘤
卵巢	5/5 筛选的肿瘤上+/-基质染色
胰腺	7/7 筛选的肿瘤上 1-2+染色
乳房	3/4 筛选的肿瘤上阴性；1/4 筛选的肿瘤上+/-

表 7. SPL1 抗原在人体肿瘤组织中的分布

组织类型	结果
[0236] 前列腺	6/6 筛选的肿瘤上阴性
结肠	7/9 的肿瘤上 1-3+顶端染色；2/9 筛选的肿瘤上阴性
肾	5/5 筛选的肿瘤上阴性
肺	3/8 筛选的肿瘤上可变的从+/-到 1+染色；5/8 肿瘤上阴性
[0237] 卵巢	5/5 筛选的肿瘤上阴性
胰腺	6/6 筛选的肿瘤上 1-2+
乳房	4/4 筛选的肿瘤上阴性

[0238] 实施例6. 免疫细胞化学的结果

[0239] 用单克隆抗体muLUCA19、mu-LUCA40和mu-SPL1检测了与不同组织类型来源的多种细胞系的反应性。结果的评分为‘+’表示弱阳性染色，‘++’表示中等阳性染色，‘+++’表示强阳性染色和‘-’表示阴性染色。

[0240] 免疫组织化学结果的获得使用了WO 01/43869中描述的CellArray™技术。不用蛋白酶消化，将来自不同建立的细胞系的细胞从生长表面移出、聚集并包埋在OCT化合物中。细胞经过冷冻和切片，然后使用标准的IHC方法染色。

[0241] 出于便利，在表8-10中汇集了mu-LUCA19、mu-LUCA40和mu-SPL1抗体与多种建立的人正常细胞系和肿瘤细胞系结合的结果。表8中出现的实验包括用本文描述的方法使用mu-LUCA19进行的活细胞ELISA、肉瘤测定 (Sarcoma Array) 和CellArray™结合实验。表9中出现的实验包括用本文描述的方法使用mu-LUCA40进行的活细胞ELISA、肉瘤测定和CellArray™结合实验。表10中出现的实验包含用本文描述的方法使用mu-SPL1进行的活细胞ELISA、肉瘤测定和CellArray™结合实验。

[0242]

表 8. Mu-LUCA19 的结合						
细胞系	ATCC#	器官	细胞类型	反应性 细胞阵 列	反应性 肉瘤阵 列	反应性 活 细 胞 ELISA
MDA361	HB-27	乳房	腺癌	-		
MDA175	HB-29	乳房	导管癌	-		
MCF7	HTB-22	乳房	腺癌	-		
SKBR3	HTB-30	乳房	转移性；腺癌伴 胸腔积液	-		-
BT474	HTB-20	乳房	导管癌	-		
HUVEC	原代	上皮细胞	正常成人	++		
HMEC	CC-2251*	乳房	正常哺乳动物上 皮	-		
SKOV3	HTB-77	卵巢	腺癌	++		+++

[0243]

ES-2	CRL-1978	卵巢	癌	+		
SKMES1	HTB-58	肺	鳞癌	-		+
CA130	RAVEN	肺	小细胞癌	+/-		
A549	CCL-185	肺	癌	+		
9979	RAVEN	肺	肺癌细胞系	-		
SW948	CCL-237	结肠	结肠直肠癌	-		
SW480	CCL-228	结肠	结肠直肠癌	-		+++
HT-29	HTB-38	结肠	结肠直肠癌	-		+
Colo205	CCL-222	结肠	结肠直肠癌伴腹水	+/-		
Hs700T	HTB-147	胰腺	腺癌	-		
HPAFII	CRL-1997	胰腺	腺癌	++		-
AsPC-1	CRL-1682	胰腺	腺癌	+		
9926	RAVEN	胰腺	腺癌	++		
SVT2	CCL-163.1	胚胎(小鼠)	成纤维细胞；SV40 转化	-		
Cos7	CRL-1651	肾(非洲绿猴)	SV40 转化	+/-		
RL65	CRL-10354	肺(大鼠)	上皮细胞	-		
Calu3	HTB-55	肺	腺癌	+++		
Caki2	HTB-47	肾	透明细胞癌	+		
A498	HTB-44	肾	癌	+/-		
786-O	CRL-1932	肾	肾细胞癌	+/-		
293	CRL-1573	肾	用腺病毒 5DNA 转化	-		
TDH	RAVEN	前列腺	前列腺癌细胞系	-		
PC3	CRL-1435	前列腺	腺癌	-		
LNCaP	CRL-1740	前列腺	癌	-		
DU145	HTB-81	前列腺	腺癌	+++		
22RV1	CRL-2505	前列腺	癌	-		
Hs746T	HTB-135	胃	癌	++		
N87	CRL-5822	胃	转移性；肝胃癌	++		
SW872	HTB-92	结缔组织	脂肪瘤		++	
SW684	HTB-91	结缔组织	纤维肉瘤		++	
SK-UT-1	HTB-114	子宫	平滑肌肉瘤		++	
SK-LMS-1	HTB-88	外阴	平滑肌肉瘤		++	
SK-ES-1	HTB-86	骨	尤因肉瘤		-	
RD-ES	HTB-166	骨	尤因肉瘤		+/-	
RD	CCL-136	肌肉	横纹肌肉瘤		-	
MG-63	CRL-1427	骨	骨肉瘤		-	
HT-1080	CCL-121	结缔组织	纤维肉瘤		++	
G-292	CRL-1423	骨	骨肉瘤		-	
A-204	HTB-82	肌肉	横纹肌肉瘤		+	

[0244] *CC-2251BioWhitaker

[0245] 表9.Mu-LUCA40的结合

[0246]

细胞系	ATCC#	器官	细胞类型	反应性 细胞阵列	反应性 肉瘤阵列	反应性 活细胞 ELISA
HMEC	CC-2251*	乳房	正常哺乳动物上皮	-		
HUVEC	原代	上皮细胞	正常成人	++		
BT474	HTB-20	乳房	导管癌	-		
MCF7	HTB-22	乳房	腺癌	-		
MDA175	HB-29	乳房	导管癌	-		
MDA361	HB-27	乳房	腺癌	-		
SKBR3	HTB-30	乳房	转移性；腺癌伴胸腔积液	-		-
9979	RAVEN	肺	肺癌细胞系	+		
A549	CCL-185	肺	癌	+		
CA130	RAVEN	肺	小细胞癌	+		
Calu3	HTB-55	肺	腺癌	+		
SKMES1	HTB-58	肺	鳞癌	-		+
ES-2	CRL-1978	卵巢	癌	+++		
SKOV3	HTB-77	卵巢	腺癌	+		+++
9926	RAVEN	胰腺	腺癌	++		
AsPC-1	CRL-1682	胰腺	腺癌	+		
HPAFII	CRL-1997	胰腺	腺癌	++		-
Hs700T	HTB-147	胰腺	腺癌	+		
Colo205	CCL-222	结肠	结肠直肠癌伴腹水	+		
HT-29	HTB-38	结肠	结肠直肠腺癌	-		+
SW480	CCL-228	结肠	结肠直肠腺癌	++		+++
SW948	CCL-237	结肠	结肠直肠腺癌	-		
293	CRL-1573	肾	腺病毒 5DNA 转化	+/-		
786-O	CRL-1932	肾	肾细胞癌	+		
A498	HTB-44	肾	癌	+		
Caki2	HTB-47	肾	透明细胞癌	+		
Cos7	CRL-1651	肾(非洲绿猴)	SV40 转化	++		
RL65	CRL-10354	肺 (大鼠)	上皮细胞	-		
SVT2	CRL-163.1	胚胎(小鼠)	成纤维细胞；SV40 转化	-		

[0247]

22RV1	CRL-2505	前列腺	癌	-		
DU145	HTB-81	前列腺	腺癌	-		
LNCaP	CRL-1740	前列腺	癌	-		
PC3	CRL-1435	前列腺	腺癌	-		
TDH	RAVEN	前列腺	前列腺癌细胞系	++		
Hs746T	HTB-135	胃	癌	+		
N87	CRL-5822	胃	转移性；肝胃癌	++		
SW872	HTB-92	结 缔 组 织	脂肪肉瘤		++	
SW684	HTB-91	结 缔 组 织	纤维肉瘤		++	
SK-UT-1	HTB-114	子宫	平滑肌肉瘤		+	
SK-LMS-1	HTB-88	外阴	平滑肌肉瘤		++	
SK-ES-1	HTB-86	骨	尤因肉瘤		-	
RD-ES	HTB-166	骨	尤因肉瘤		+/-	
RD	CCL-136	肌肉	横纹肌肉瘤		-	
MG-63	CRL-1427	骨	骨肉瘤		-	
HT-1080	CCL-121	结 缔 组 织	纤维肉瘤		++	
G-292	CRL-1423	骨	骨肉瘤		-	
A-204	HTB-82	肌肉	横纹肌肉瘤		+	

[0248] *CC-2251BioWhittaker

[0249] 表10.Mu-SPL1接合

[0250]

细胞系	ATCC#	器官	细胞类型	反应性 细胞阵列	反 应 性 肉 瘤 阵 列	反应性 活 细 胞 ELISA
HMEC	CC-2251*	乳房	正常哺乳动物 上皮	-		
HUVEC	原代	上皮细 胞	正常成人	++		
BT474	HTB-20	乳房	导管癌	-		
MCF7	HTB-22	乳房	腺癌	-		
MDA175	HB-29	乳房	导管癌	-		
MDA361	HB-27	乳房	腺癌	-		
SKBR3	HTB-30	乳房	转移性; 腺癌伴 胸腔积液	-		-
9979	RAVEN	肺	肺癌细胞系	+		
A549	CCL-185	肺	癌	+		
CA130	RAVEN	肺	小细胞癌	+		
Calu3	HTB-55	肺	腺癌	+		
SKMES1	HTB-58	肺	鳞癌	-		+
ES-2	CRL-1978	卵巢	癌	+++		

[0251]

SKOV3	HTB-77	卵巢	腺癌	++		+++
9926	RAVEN	胰腺	腺癌	++		
AsPC-1	CRL-1682	胰腺	腺癌	++		
HPAFII	CRL-1997	胰腺	腺癌	++(75%)		-
Hs700T	HTB-147	胰腺	腺癌	+/-		
Colo205	CCL-222	结肠	结肠直肠癌伴腹水	+/-		
HT-29	HTB-38	结肠	结肠直肠癌	+/-		+
SW480	CCL-228	结肠	结肠直肠癌	++		+++
SW948	CCL-237	结肠	结肠直肠癌	+		
293	CRL-1573	肾	腺病毒 5DNA 转化	+/-		
786-O	CRL-1932	肾	肾细胞癌	+		
A498	HTB-44	肾	癌	+		
Caki2	HTB-47	肾	透明细胞癌	++		
Cos7	CRL-1651	肾(非洲绿猴)	SV40 转化	++		
RL65	CRL-10354	肺 (大鼠)	上皮细胞	-		
SVT2	CRL-163.1	胚胎(小鼠)	成纤维细胞; SV40 转化	-		
22RV1	CRL-2505	前列腺	癌	-		
DU145	HTB-81	前列腺	腺癌	+/-		
LNCaP	CRL-1740	前列腺	癌	-		
PC3	CRL-1435	前列腺	腺癌	-		
TDH	RAVEN	前列腺	前列腺癌细胞系	++		
Hs746T	HTB-135	胃	癌	+		
N87	CRL-5822	胃	转移性; 肝胃癌	++		
SW872	HTB-92	结缔组织	脂肪瘤		+	
SW684	HTB-91	结缔组织	纤维肉瘤		++	
SK-UT-1	HTB-114	子宫	平滑肌肉瘤		+	
SK-LMS-1	HTB-88	外阴	平滑肌肉瘤		++	
SK-ES-1	HTB-86	骨	尤因肉瘤		-	
RD-ES	HTB-166	骨	尤因肉瘤		-	
RD	CCL-136	肌肉	横纹肌肉瘤		-	
MG-63	CRL-1427	骨	骨肉瘤		-	
HT-1080	CCL-121	结缔组织	纤维肉瘤		++	
G-292	CRL-1423	骨	骨肉瘤		-	
A-204	HTB-82	肌肉	横纹肌肉瘤		+	

[0252] *CC-2251BioWhitaker

[0253] 出于便利,表11中汇总了使用本文描述的方法,mu-LUCA19、mu-LUCA40和mu-SPL1抗体与多种来自国立癌症研究中心(National Cancer Institute,NCI)的建立的肿瘤细胞系结合的结果。

[0254]

表 11. NCI 细胞系阵列			LUCA19	LUCA40	SPL1
细胞系	肿瘤起源	组织类型	反应性	反应性	反应性
CRF-CEM	外周血	急性淋巴细胞白血病	-	-	-
HL-60(TB)		Procyelocytic 白血病	-	-	-
K-562	胸腔积液	慢性粒细胞白血病	-	-	-
MOLT-4	外周血	急性淋巴细胞白血病	-	-	-
RPMI-8226	外周血	多发性骨髓瘤	-	-	-
SR		免疫母细胞性大细胞淋巴瘤	-	-	-
A549	肺	癌	+	+	+
EKVX	肺	腺癌	-	-	-
HOP-62	肺	腺癌	+++	+++	+++
HOP-92	肺	大细胞, 未分化	+	+	++
NCI-H226	肺	鳞癌	+	++	++
NCI-H23	肺	腺癌	+/-	-	+
NCI-H322M	肺	细支气管肺泡细胞癌	-	-	-
NCI-H460	肺	非小细胞	-	-	-
NCI-H522	肺	腺癌	++	++	++
Colo205	结肠	结肠直肠癌腺癌伴腹水	+/-	+/-	+(50%)
HCC-2998	结肠	癌	++	++	+++
HCT-116	结肠	癌	++	++	++
HCT-15	结肠	腺癌	+	+/-	+
HT29	结肠	结肠直肠癌	-	-	+
KM12	结肠	腺癌	+	++	++
SW-620	结肠直肠癌	转移性; 淋巴结	++	++	+++
SF-268	CNS	间变型星形细胞瘤	++	++	++
SF-295	CNS	多形性胶质母细胞瘤	+	+	+
SF-539	CNS	胶质肉瘤	++	++	++
SNB-19	CNS	恶性胶质瘤	++	++	++
SNB-75	CNS	星形细胞瘤	+/-	+/-	+/-
U251	CNS	恶性胶质瘤	+++	++	++
LOX IMVI	淋巴结转移	恶性无黑色素性黑色素瘤	+	+	++
MALME-3M	肺转移	恶性黑色素瘤	-	-	+

[0255]

M14		无黑色素性黑色素瘤	-	-	-
SK-MEL-2	大腿皮肤转移	恶性黑色素瘤	-	-	-
SK-MEL-28		恶性黑色素瘤	-	-	-
SK-MEL-5	腋下淋巴结转移	恶性黑色素瘤	-	-	-
UACC-257		恶性黑色素瘤	+	+	+
UACC-62		恶性黑色素瘤	-	-	-
IGR-OV1	卵巢	囊腺癌	-	-	-
OVCAR-3	卵巢	腺癌	++	++(75%)	++
OVCAR-4	卵巢	腺癌	+	+	+
OVCAR-5	卵巢	腺癌	+++	++	+++
OVCAR-8	卵巢	腺癌	+++	+	++
SKOV3	卵巢	腺癌	++	+	+
PC3	前列腺	腺癌	-	-	-
DU145	前列腺	腺癌	-	-	-
786-O	肾	肾细胞癌	+/-	+	+
A498	肾	癌	+/-	+	+
ACHN	肾	癌	+++	++	++
CAKI-1	肾	腺癌	++	++	++
SN12C	肾	癌	++	++	+++
TK-10	肾	癌	+	+	+
UO-31	肾	癌	++	++	++
MCF-7	乳房	腺癌	-	-	-
NCI-ADR-RES	乳房	转移性；腺癌伴胸腔积液	+	+	++
MDA-MB-231	乳房	转移性；腺癌伴胸腔积液	++	++	+++
HS 578T	乳房	导管癌	+	+/-	+
MDA-MB-435	乳房	转移性；腺癌伴胸腔积液	-	-	-
BT-549	乳房	转移性；淋巴结；浸润性导管癌	+++	+++	+++
T-47D	乳房	转移性；胸腔积液；导管癌	-	-	-

[0256] 单克隆抗体mu-LUCA19、mu-LUCA40和mu-SPL1被用于检测与神经胶质瘤起源的细胞系的反应性。免疫细胞化学的结果获得自使用与上述CellArray™技术类似的方法。不用蛋白酶，使神经胶质瘤起源的细胞系从生长表面移出、聚集并包埋在OCT化合物中。细胞经过冷冻和切片，然后用标准IHC方法染色。在25个被筛选的神经胶质瘤起源的细胞系中，17个显示mu-LUCA19阳性。染色强度范围从+/-到3+染色。在25个被筛选的神经胶质瘤起源的细胞系中，18个显示mu-LUCA40阳性。染色强度范围从+/-到3+染色。在25个被筛选的神经胶质瘤起源的细胞系中，14个显示mu-SPL1阳性。染色强度范围从+/-到3+染色。

[0257] 实施例7. 分离和鉴定抗原Ag-SPL1、Ag-LUCA19、Ag-SG5和Ag-LUCA40

[0258] 为了鉴定SPL1、LUCA19、SG5和LUCA40反应的抗原，进行了免疫沉淀(Ippt)。对于免

疫沉淀,30个175cm²培养瓶的SW480细胞用30ml裂解缓冲液裂解。裂解缓冲液由增加了2% Triton X-100的Hanks平衡盐溶液(HBSS+)、蛋白酶抑制剂混合物(每5ml裂解液加1片Roche Molecular Biochemicals的无EDTA全蛋白酶混合物小片剂)、0.1%叠氮化钠和2mM PMSF组成。细胞裂解液在通过由1ml蛋白G(Amersham Pharmacia)组成的柱之前,先在4℃24,000×g澄清30分钟。经过预清除的SW480裂解液再与吸附了mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40的蛋白G(5μl蛋白G与10μg mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40在室温预孵育了30分钟)在4℃孵育2小时。微珠(经过预清除的蛋白G微珠和吸附了mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40的蛋白G微珠)之后用裂解缓冲液清洗三次后,再用30μl SDS样品缓冲液(3%SDS、20%甘油、10mM DTT、2%溴酚兰、0.1M Tris,pH8.0)洗脱。25μl洗脱物用SDS-PAGE解析并且用考马斯染色显色。5μl洗脱物用SDS-PAGE解析,并另外转移到硝化纤维素上进行Western印迹。

[0259] 印迹使用mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40探针检测并用Western印迹试剂盒(Invitrogen货号WB7103)显色,验证抗原识别。通过mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40和抗mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40的小鼠IgG洗脱物的Western印迹,观察到对于mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40洗脱物独特的蛋白质。用清洁的手术刀片将染色的蛋白质条带从NuPAGE凝胶上切下并放置在干净的Eppendorf管中。切下来的条带直到用于质谱鉴定蛋白质以前都储存在-20℃。

[0260] 实施例8.用串联质谱(MS/MS)鉴定mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40结合的抗原

[0261] mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40结合的抗原按照实施例7种描述的分离,并按照Kane等人J Bio Chem.2002June21;277(25):22115-8,Epub May 06中描述的方法进行串联质谱。蛋白质用SDS-PAGE分离,并用胶态考马斯蓝染色(Invitrogen)。目标蛋白质用胰酶在胶内消化。胰酶消化后的肽通过在离子阱质谱(Thermo-Finnigan LCDQ DECA XP)的微细管液相层析MS/MS测序,见Wu等人Nature 405:477-482(2000)中的描述。

[0262] 备选的,其他常规已知的质谱方法,例如MALDI质谱,也可以在本发明的实践中使用。质谱分析的结果显示mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5和mu-LUCA40结合的抗原是EphA2。

[0263] 实施例9.夹层ELISA用于mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5和mu-LUCA40的表位作图

[0264] 使用竞争性夹层ELISA评估EphA2上被mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5和mu-LUCA40结合的特异表位。mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5或mu-LUCA40按10μg/ml的浓度50μl/孔稀释在HBSS(不含碳酸氢钠和酚红的Hank平衡盐溶液)中,并与96孔Maxisorb微量滴定板在室温下结合2小时。随后被包被的平板用含有1%BSA(W/V)的HBSS封闭30分钟。HT-29细胞用实施例7中描述的裂解。裂解液按每孔150μl的体积加在封闭过的微量滴定孔中。裂解液在室温下孵育1小时。在孵育后,平板用封闭缓冲液彻底清洗。生物素酰化的mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5和mu-LUCA40,按50μl/孔、1μg/ml的浓度,加入微量滴定孔并在室温下孵育1小时。生物素酰化的mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5和mu-LUCA40是用每1mg纯化的抗体与1μl稀释在DMSO中的200mg/ml的硫代-NHS-LC-生物素在室温下孵育2小时制备的。然后,用终浓度0.1M的Tris,pH7.4在室温下骤冷生物素酰化的抗体30分钟。然后通过30kDa分子量截留滤器的浓缩,将生物素酰化的抗体与生物素分离。与生物素酰化抗体孵育1小时后,平板用HBSS彻底清洗。按1:10,000的浓度将接合了链霉抗生物素的辣根过氧化物酶(SA-HRP)稀释到HBSS

中。稀释后的SA-HRP按50 μ l/孔加入到清洗过的微量滴定孔中,并在室温孵育30分钟。在孵育了SA-HRP后,平板最后用HBSS彻底清洗并用添加100 μ l/孔的一步TMB底物进行变色反应来显色。用100 μ l/孔稀释在Milli-Q水中的1M磷酸终止显色。然后用ThermoMax微量滴定板读数器在450nm分析显色的平板。

[0265] 根据竞争性夹层ELISA的结果,我们可以得出结论,mu-SPL1、mu-LUCA19、mu-SG5和mu-LUCA40代表三种通过两个不同的表位结合EphA2的抗体,mu-LUCA40代表了一种,mu-SPL1代表了另一种。Mu-LUCA19似乎共享了mu-SPL1代表的表位,但两者没有完全重叠。重叠的部分没有伸展到mu-LUCA40代表的表位中。

[0266] 实施例10.对mu-LUCA19和mu-SG5的进一步鉴定

[0267] 用mu-LUCA19和mu-SG5研究了在表达内源性EphA2的神经胶质瘤细胞系,G55细胞中,EphA2的刺激作用。细胞用浓度递增到30 μ g/ml的mu-LUCA19或mu-SG5处理,并用磷酸酪氨酸特异性抗体(4G10,Upstate Cell Signaling Solutions,New York)通过Western印迹分析测量了免疫沉淀的EphA2中的磷酸酪氨酸含量。在用mu-LUCA19或mu-SPL1处理过的G55细胞免疫沉淀下来的EphA2中,没有发现磷酸酪氨酸含量上的差异。进行了总EphA2含量的对照Western印迹,保证了对于每种处理条件,免疫沉淀的总EphA2蛋白质是相等。使用A549细胞和mu-LUCA19和mu-SG5抗体也观察到类似的结果。这些结果表明,用mu-LUCA19或mu-SG5处理表达内源性EphA2的细胞不会增加或降低EphA2的磷酸酪氨酸的含量。

[0268] 实施例11.mu-SPL1、mu-LUCA19和mu-LUCA40在癌细胞系中的效果

[0269] 抗体在体外减少呈单层细胞生长时的细胞数量的能力,可以使用不同总量的测试或对照纯化的抗体的存在或缺失时生长的细胞单层来评估,并用MTT评估细胞数量的变化。MTT是用于测量线粒体酶活性的染料并且与相对活细胞数量相关。将目标细胞在96孔平板中种植并且生长在补充了10%胎牛血清的F12/DMEM(1:1)生长培养基中。细胞系按1500-2500细胞/孔的密度范围每三孔一组种植在96孔板培养皿中。种完后立即加入mu-SPL1、mu-LUCA19或mu-LUCA40。细胞在5%CO₂/空气的潮湿培养箱中37℃孵育5天。在评估最后,将MTT溶解在PBS(5mg/ml)中并且按1:10的稀释直接加入各孔。平板重新放回培养箱中4小时。孵育后,去掉培养基,加入100 μ l DMSO溶解MTT沉淀。在O.D.540nm下读取平板。在这些实验中,mu-LUCA40抑制786-O、A549、Caki-2、ES-2、SKMES-1和SKOV3细胞系的生长,而SPL1和LUCA19则没有。

[0270] 实施例12.mu-LUCA19、mu-SG5和mu-LUCA40以及接合毒素的抗小鼠IgG的内化作用

[0271] Mab-ZAP(Advanced Targeting Systems,San Diego,CA)是接合了肥皂草毒蛋白的抗小鼠IgG,所述肥皂草毒蛋白是抑制蛋白合成的毒素。该毒素不能通过细胞膜。如果单克隆抗体结合可内化的细胞表面抗原,毒素接合物可以结合所结合的单克隆抗体,并且因此被内化而最终杀死细胞。由于依赖内化作用证明毒性,Mab-ZAP可以用于评估特定的表面抗原是否可以用作依赖内化作用表达细胞毒性效应的任何毒素合适的靶标。因此,Mab-ZAP可以作为此类依赖内化作用的毒素例如美登素类和加利车毒素的模型。

[0272] 为了测试mu-LUCA19和mu-LUCA40和接合肥皂草毒蛋白的抗小鼠IgG在肿瘤细胞的内化作用,以及肥皂草毒蛋白内化后杀伤肿瘤细胞的效果,人神经胶质瘤细胞G130用10mM EDTA从储存瓶上移出并离心。细胞以50,000/ml浓度重悬在合适的培养基中,并按每孔100 μ l种植在96孔板中。Mu-SPL1、mu-LUCA19或mu-LUCA40抗体以10 $\times$ 浓度立即添加到合

适的孔中,使得终浓度为10 μ g/ml。室温15分钟后,Mab-ZAP(货号IT-04,Advanced Targeting Systems, San Diego CA)按10 $\times$ 浓度添加到合适的孔中,使得终浓度从0.001nM到10nM。经过4天生长,加入MTT(5mg/ml储存PBS中,每孔1:10稀释)37 $^{\circ}$ C 4小时。然后去掉所有孔的培养基,并且加入100 μ l/孔DMSO。轻柔旋转平板使蓝色的MTT沉淀溶解,并在0.D.540nm下读取平板。

[0273] 当mu-LUCA19和mu-LUCA40存在时,G130细胞中MTT染色比这些抗体不存在时的染色减少。这表明G130细胞的生长在mu-LUCA19和mu-LUCA40和Mab-ZAP存在时受到抑制,这些结果还表明mu-LUCA19和mu-LUCA40和接合了毒素的抗小鼠IgG在G130细胞中被内化。使用一种卵巢癌细胞系ES-2细胞和mu-SG5抗体也观察到类似的结果。当mu-SG5存在时,ES-2细胞中MTT染色比不存在此抗体时的染色减少。这表明mu-SG5和Mab-ZAP的存在抑制了ES-2细胞的生长。这一结果表明mu-SG5和接合了毒素的抗小鼠IgG被ES-2细胞内化。

[0274] 实施例13. 抗EphA2抗体SPL1和LUCA40与人细胞在裸鼠中的效力

[0275] 人肿瘤细胞被移植到裸鼠(nu/nu)的肾囊下。使用了三种肿瘤细胞系。从ATCC获得ES-2和SKOV3-3(卵巢肿瘤来源的细胞系)以及Caki-2(肾肿瘤来源的细胞系)。在一些研究中,双侧肾都接受了异种移植物。在接受处理的动物中,在肾纤囊中制备移植物(胶原凝胶中500k细胞)。腹膜内注射浓度为50mg/kg以及体积为0.01mL/g体重的抗EphA2单克隆抗体SPL1或LUCA40。在植入后第二天开始给药,SPL1、LUCA40或PBS的剂量以每周三次的快速单次注射施用。对照小鼠只注射PBS。末次注射三天后,动物被安乐死,检查肾和移植物。

[0276] 肿瘤中的人DNA总量在Applied Biosystems(Foster City,CA)SDS7000系统上的实时PCR定量,使用的引物和探针是根据公开的方法特异性针对人类核糖体基因RPL19。每个肿瘤样品用三个PCR反应分析并确定平均DNA浓度。对于每组肿瘤样品都确定了平均DNA浓度和均值的标准误差。统计学显著性用斯氏T检验(双尾,类型1)确定。肿瘤生长抑制通过[(治疗组平均肿瘤体积/PBS对照组平均肿瘤体积) $\times$ 100]的绝对值-100来计算。

[0277] 在未显示的数据中,使用细胞系Caki-2和ES-2,视测和手工检测中都显示SPL1都相对于对照减少了肿瘤尺寸。在用LUCA40处理的、移植Caki-2肿瘤的小鼠中也观察到类似的结果。LUCA40抗体处理小鼠的Caki-2肿瘤的DNA定量证实了LUCA40处理小鼠比对照的肿瘤更小。表12显示了用SPL1抗体的其他亚肾囊异种移植物研究设计,以及这些研究的DNA定量结果。

[0278] 表12. SPL1亚肾囊异种移植物模型研究设计和结果

[0279]

研究的细胞系	Mab剂量 (mg/kg)	动物数/组	%TGI*
ES-2	50	5	78.3, P=0.006
ES-2	50	6	61, P=0.026
SKOV3-3	50	6	70, P=0.005

[0280] *TGI=肿瘤生长抑制vs.PBS对照组;p值由非成对斯氏T检验确定。

[0281] 实施例14. SPL1在人卵巢肿瘤皮下模型中的抗肿瘤效应

[0282] 本研究被设计用于测试SPL1抗体在卵巢癌和肺癌的皮下模型中的剂量应答性抗肿瘤数据。

[0283] 卵巢肿瘤来源的ES-2细胞系是从中间皮下肿瘤模型研究中鉴定的快速生长肿瘤

中重新得到的。A549肺肿瘤来源的细胞是从ATCC获得的。培养的细胞用胰酶消化、在培养基中清洗、离心并按每毫升培养基1亿个细胞的密度(每0.05ml体积5百万个细胞)重悬在培养基中,然后,与等体积的Matrigel®混合成0.1mL最终注射体积。使用雌性CRL.nu/nu纯合小鼠。细胞被皮下注射接种在小鼠颈部背侧。给药从移植当天开始,或者从肿瘤已经成型并可测量的时候开始。对于第0天给药,在上午接种肿瘤,当天下午开始向动物给药。对于肿瘤成型后给药,按照下述将动物在群组中随机化:确定肿瘤体积,根据肿瘤体积分选动物,确定均值并选择合适数量的、高于和低于均值的动物(根据模型每组12-15只),从研究中去掉那些肿瘤太大或太小的。剩下的动物根据耳签号码随机化到治疗组和对照组中。用T检验证实最终分组的随机分布($P>0.1$ 可以认为是随机化)。

[0284] 对于每一个治疗投药组,SPL1用PBS稀释到合适的浓度剂量(ES-2细胞研究为50mg/kg,A549细胞研究中浓度范围为10mg/kg、30mg/kg和100mg/kg),以及PBS对照,并且以0.01mL/g体重的体积给药。SPL1或PBS的剂量为每周两次单次快速注射到腹膜内腔中来施用。对照小鼠只注射PBS。在12-15只小鼠的组中,给药开始于肿瘤成长到合适的尺寸,这根据研究而定。

[0285] 在开始肿瘤测量前允许肿瘤生长约6天。之后将肿瘤每周用数字测径器三维测量两次,肿瘤的体积是作为三种测量产物的二分之一来计算的。随时间变化的肿瘤体积是所有上述研究的主要目的。临床观察每天都进行。每只动物每周测量两次体重。

[0286] 每次测量都确定每组的平均肿瘤体积和均值的标准误差。用斯氏T检验(双尾,类型1)确定其统计学显著性。肿瘤生长抑制通过[(治疗组平均肿瘤体积/PBS对照组平均肿瘤体积) $\times 100$]的绝对值-100来计算。表13显示了皮下异种移植物的研究设计和结果。

[0287] 表13. SPL1 SC移植物模型研究设计和结果

[0288]

研究的细胞系	Mab 剂量 (mg/kg)	剂量方案	动物数/组	%TGI*
ES-2	50	第 0 天开始给药	12	44.9% P=0.045 第 18 天
	PBS	第 0 天开始给药	12	NA
	50	当肿瘤达到 100-150 mm ³ 时开始给药	12-15	47.6% P=0.012 第 21 天
	PBS	当肿瘤达到 100-200 mm ³ 时开始给药	12-15	NA
A549	10	当肿瘤达到 100 mm ³ 时开始给药	15	67.5% P=<0.001 第 34 天
	30	当肿瘤达到 100 mm ³ 时开始给药	15	82.2% P=<0.001 第 34 天
	100	当肿瘤达到 100 mm ³ 时开始给药	15	80.4% P=<0.001 第 34 天
	PBS	当肿瘤达到 100 mm ³ 时开始给药	15	NA

[0289] *TGI=肿瘤生长抑制vs.PBS对照组。

[0290] 如图1中显示,用SPL1治疗A549肿瘤异种移植物的子集在中止给药后出现了缓慢的再生长,其中肿瘤再生长被定义为在中止给药后体积增大两倍及两倍以上。在100mg/kg治疗组中的16只小鼠中有7只出现了肿瘤再生长,同时100mg/kg治疗组的16只小鼠中有9只在中止给药后维持无瘤。类似的,在30mg/kg治疗组的15只小鼠中有3只出现了肿瘤再生长,同时30mg/kg治疗组的12/15小鼠在中止给药后维持无瘤。图1在“中止给药”点后的图形结果只显示了出现肿瘤再生长的小鼠中的肿瘤尺寸。

[0291] 要理解本文中描述的实施例和实施方案都是仅出于说明的目的,并且多种根据其的修改或变化将被建议给本领域的技术人员,并且将包含在本申请的精神和法律范围以内。本文引用所有的出版物、专利和专利申请都以其相同程度的全文引用作为参考来用于所有目的,所述程度类似每一个独立的出版物、专利或专利申请都是具体和独立的这样引用作为参考。

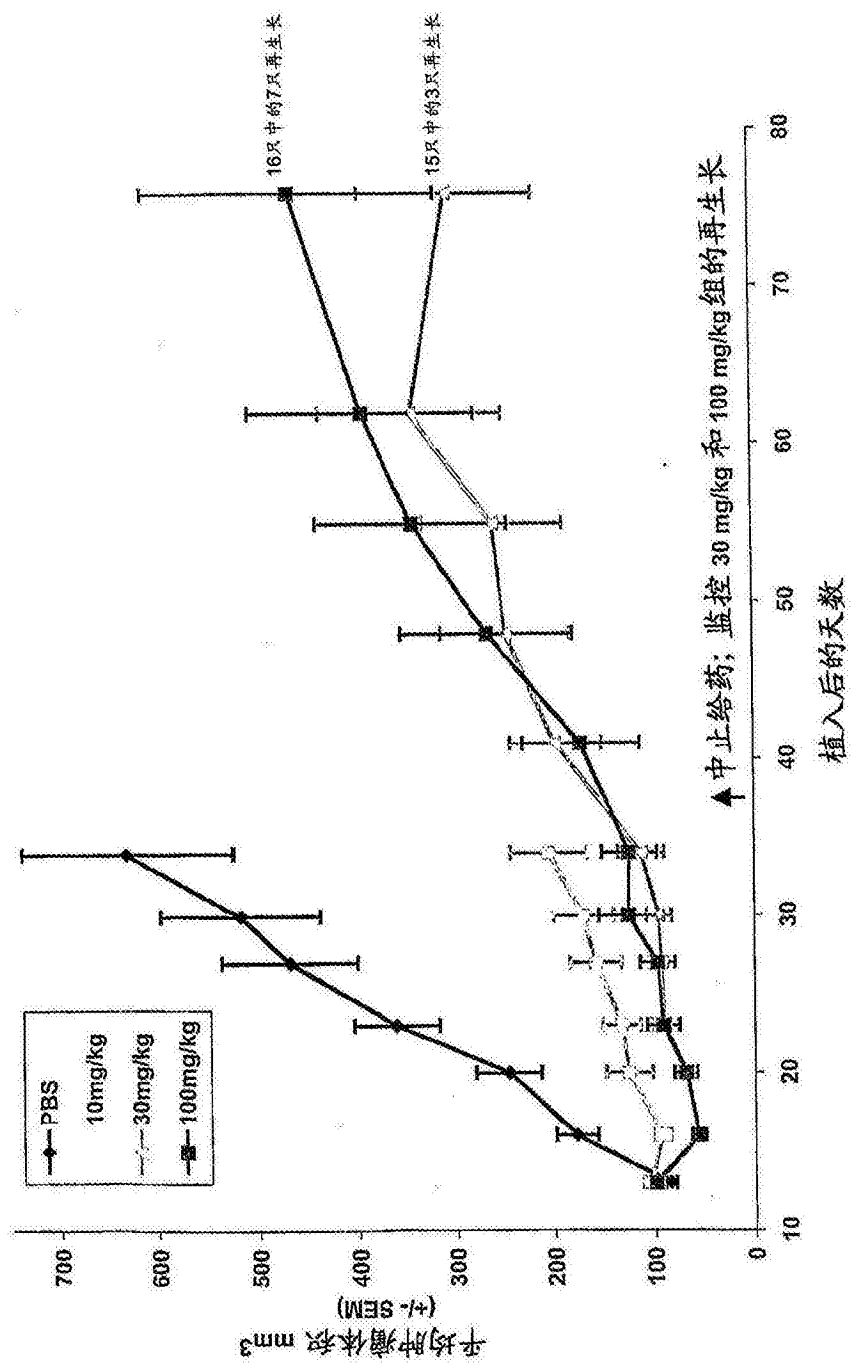


图1