



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 106659912 B

(45) 授权公告日 2021.11.30

(21) 申请号 201580036541.2

C12Q 1/6886 (2018.01)

(22) 申请日 2015.06.30

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 101400406 A, 2009.04.01

申请公布号 CN 106659912 A

CN 102112495 A, 2011.06.29

(43) 申请公布日 2017.05.10

US 2012023600 A1, 2012.01.26

(30) 优先权数据

CN 101432010 A, 2009.05.13

62/020,684 2014.07.03 US

US 2005261181 A1, 2005.11.24

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Kristina Hauer等.DKK2 Mediates

2017.01.03

Osteolysis, Invasiveness, and Metastatic Spread in Ewing Sarcoma.《Tumor and Stem Cell Biology》.2013,第73卷(第2期),第967-977页.

(86) PCT国际申请的申请数据

Kristina Hauer等.DKK2 Mediates

PCT/US2015/038581 2015.06.30

Osteolysis, Invasiveness, and Metastatic Spread in Ewing Sarcoma.《Tumor and Stem Cell Biology》.2013,第73卷(第2期),第967-977页.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/004055 EN 2016.01.07

(73) 专利权人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

Atsuko Yanagida等.Downregulation of the Wnt antagonist Dkk2 links the loss of Sept4 and myofibroblastic transformation of hepatic stellate cells.《Biochimica et Biophysica Acta》.2011,第1812卷(第11期),第1403-1411页.

(72) 发明人 D·吴 L·孙

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 张全信 赵蓉民

审查员 赵亚丽

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

权利要求书2页 说明书30页

序列表5页 附图20页

(54) 发明名称

Dickkopf2 (Dkk2) 抑制作用抑制肿瘤形成

发展癌症或转移的倾向的方法,以及确定免疫疗法治疗或癌症疫苗用于治疗癌症的使用的方法。此外,本发明包括用于治疗癌症的药物组合物以及用于实施上述方法的试剂盒。

(57) 摘要

本发明涉及Dickkopf2 (DKK2) 的抑制作用增加CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)活性、减弱肿瘤血管生成,并且从而抑制肿瘤形成的发现。因此,在本文所述的各种实施方式中,本发明的方法涉及通过给患者施用有效量的DKK2基因消耗剂来治疗癌症的方法,在对象中提供抗肿瘤免疫性和抗肿瘤血管生成的方法,刺激T细胞介导的对细胞群体或组织的免疫应答和抑制对象中的肿瘤血管生成的方法。另外,本发明包括诊断癌症或

1. 一种用于治疗对象的癌症的药物组合物,所述药物组合物包含DKK2消耗剂和药学上可接受的载体,其中所述DKK2消耗剂是DKK2抗体,其中所述DKK2抗体是包含选自以下的氨基酸序列中的至少一种的合成抗体:YAL008-5-1A10、YAL008-1-5F8以及YAL008-7-1A10,其中所述YAL008-5-1A10的重链肽序列由SEQ ID NO: 8表示,和所述YAL008-5-1A10的轻链肽序列由SEQ ID NO: 9表示;所述YAL008-1-5F8的重链肽序列由SEQ ID NO: 10表示,和所述YAL008-1-5F8的轻链肽序列由SEQ ID NO: 11表示;和所述YAL008-7-1A10的重链肽序列由SEQ ID NO: 13表示,和所述YAL008-7-1A10的轻链肽序列由SEQ ID NO: 12表示。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述DKK2抗体靶向包含选自SEQ ID NO: 1、5和7的氨基酸序列中的至少一种的DKK2 中和表位。

3. 用于测定来自对象的生物样品中DKK2基因的表达水平的试剂在制造用于诊断所述对象的癌症或发展癌症的倾向的试剂盒中的用途,其中与来自没有癌症的对象的对照生物样品的DKK2表达水平相比,来自所述对象的生物样品中DKK2表达水平的增加是所述对象具有癌症或发展癌症的倾向的指示,并且其中当在对象中检测到癌症或发展癌症的倾向时,为所述对象推荐进行治疗,其中所述试剂包括根据权利要求1或2所述的DKK2抗体。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述癌症选自结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、肠癌和食管癌。

5. 根据权利要求3所述的用途,其中来自所述对象的生物样品中DKK2的表达水平比正常对照水平高至少10%。

6. 根据权利要求3所述的用途,其中使用选自以下的方法测定来自所述对象或正常对照的生物样品中DKK2的表达水平:检测所述基因的mRNA、检测由所述基因编码的蛋白质、以及检测由所述基因编码的蛋白质的生物活性。

7. 根据权利要求3所述的用途,其中所述对象是哺乳动物。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述哺乳动物是人。

9. 一种包含靶向DKK2表位的中和性DKK2抗体的组合物,所述DKK2表位包含选自SEQ ID NO: 1、5和7的氨基酸序列中的至少一种,其中所述DKK2抗体是包含选自以下的氨基酸序列中的至少一种的合成抗体:YAL008-5-1A10、YAL008-1-5F8以及YAL008-7-1A10,其中所述YAL008-5-1A10的重链肽序列由SEQ ID NO: 8表示,和所述YAL008-5-1A10的轻链肽序列由SEQ ID NO: 9表示;所述YAL008-1-5F8的重链肽序列由SEQ ID NO: 10表示,和所述YAL008-1-5F8的轻链肽序列由SEQ ID NO: 11表示;和所述YAL008-7-1A10的重链肽序列由SEQ ID NO: 13表示,和所述YAL008-7-1A10的轻链肽序列由SEQ ID NO: 12表示。

10. 一种用于诊断对象中的癌症或发展癌症或转移的倾向的试剂盒,所述试剂盒包含选自以下的试剂:用于检测DKK2基因的mRNA的试剂、用于检测DKK2蛋白的试剂以及用于检测DKK2蛋白的生物活性的试剂,其中所述试剂包含靶向DKK2表位的中和性DKK2抗体,所述DKK2表位包含选自SEQ ID NO: 1、5和7的氨基酸序列中的至少一种,并且所述DKK2抗体是包含选自以下的氨基酸序列中的至少一种的合成抗体:YAL008-5-1A10、YAL008-1-5F8以及YAL008-7-1A10,其中所述YAL008-5-1A10的重链肽序列由SEQ ID NO: 8表示,和所述YAL008-5-1A10的轻链肽序列由SEQ ID NO: 9表示;所述YAL008-1-5F8的重链肽序列由SEQ ID NO: 10表示,和所述YAL008-1-5F8的轻链肽序列由SEQ ID NO: 11表示;和所述YAL008-7-1A10的重链肽序列由SEQ ID NO: 13表示,和所述YAL008-7-1A10的轻链肽序列由SEQ ID

NO: 12表示。

11.根据权利要求10所述的试剂盒,其中所述癌症选自结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、肠癌和食管癌。

Dickkopf2 (Dkk2) 抑制作用抑制肿瘤形成

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e) 要求于2014年7月3日提交的美国临时专利申请号62/020,684的优先权,该申请通过引用以其整体并入本文。

[0003] 关于联邦赞助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是通过政府支持在由国立卫生研究院授予的基金CA132317下进行的。美国政府享有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 癌症是全世界的主要健康问题。每年,世界各地有数千万人被诊断为癌症,并且超过一半的患者最终死于癌症。在美国大约一半的所有男性和所有女性的三分之一将在其一生中的某一时间被诊断为癌症,并且四分之一的死亡是由癌症引起的(Jemal等人,CA Cancer J.Clin.,2002,52:23-47;Howlader 等人,SEER Cancer Statistics Review,1975-2010,National Cancer Institute)。最常识别的人癌症包括由器官和实体组织产生的癌症,例如,结肠癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、前列腺癌和子宫内膜癌。结肠癌影响西半球二十分之一的人群(Henderson,Nature Cell Biology,2000,2(9):p.653-60)。在全球,每年有100 万新患者被诊断患有结肠癌,并且其中一半死于该疾病(Liu等人,Cell,2002,108(6):p.837-47)。

[0007] 在过去几十年中,癌症治疗和诊断方面取得了显著进步。癌症的治疗选择包括手术、化学疗法、放射疗法和免疫疗法。最近的免疫疗法治疗,旨在刺激免疫系统,特别引起了大量的研究。尽管免疫疗法可以是高度有效的,但是仅有小部分患者,而不管肿瘤起源器官,通常对治疗有反应。这一领域的新发现显然需要提高免疫疗法的疗效和特异性。

[0008] Wnt信号传导控制多种细胞过程,包括细胞命运决定、分化、极性、增殖和迁移。分泌蛋白的Wnt家族结合几类受体,例如低密度脂蛋白受体相关(LRP)蛋白5和6(LRP5/6),从而导致几种不同的细胞内信号传导级联的活化,包括Wnt/ β -联蛋白、Wnt/钙和Wnt/Jnk途径。Wnt与LRP5/6的结合通过阻断多蛋白复合物的功能特异性激活Wnt/ β -联蛋白途径,所述多蛋白复合物引发 β -联蛋白的降解,导致 β -联蛋白在细胞质和细胞核中的积累。核 β -联蛋白与Lef/TCF家族转录因子的成员复合并激活基因表达。

[0009] 可能由于干细胞功能改变引起的病理状态,例如退行性疾病和癌症,通常与Wnt/ β -联蛋白途径活性的变化相关。事实上,Wnt/ β -联蛋白途径的过度活化被认为诱导干细胞的过早衰老和年龄相关的干细胞功能丧失(Brack等人,Science,2007,第317卷,第5839期,第807-810页;Liu等人,Science,2007,第317卷,第5839期,第803-806页)。在癌症中,Wnt/ β -联蛋白途径的过度活化,其通常与其他细胞生长调节基因的突变结合,可导致异常细胞生长(Reya和Clevers,Nature,2005,434(7035):843-50)。因此,许多正在进行的研究集中在Wnt/ β -联蛋白途径作为癌症中的潜在治疗靶标(Breuhahn等人,Oncogene,2006,25:3787-3800;Greten等人,Br J Cancer,2009,100:19-23)。特别地,包括癌症基因组测序项目的几个研究揭示,超过80%的结肠癌具有突变或甚至丧失腺瘤性结肠息肉病(adenomatosis polyposis coli)(APC)基因,所述基因是Wnt/ β -联蛋白途径的主要抑制剂

(Kinzler和Vogelstein,Cell.1996, Oct 18;87(2):159-70.Review;Sjoblom等人,Science,2006,Oct 13; 314(5797):268-74;Mann等人,Proc Natl Acad Sci U S A, 1999.96(4):第1603-8 页)。APC和蛋白质如GSK3 β 和Axin形成标记 β -联蛋白降解的复合物。APC 中的突变破坏这种复合物,并导致细胞质 β -联蛋白水平增加及其核易位。由于 β -联蛋白是Wnt信号传导的最重要的衔接子,它促进致癌因子响应于Wnt 配体的表达。

[0010] Wnt信号传导也受许多分泌的多肽拮抗剂调节。这些包括四种分泌的 Dickkopf (Dkk) 蛋白 (Monaghan等人,Mech Dev,1999.87:45-56;Krupnik 等人,Gene,1999.238:301-13)。在这四种Dkk蛋白中,已经证明DKK1、2 和4是经典Wnt信号传导的有效拮抗剂 (Mao等人,Nature,2001.411:321-5; Semenov等人,Curr Biol,2001.11:951-61;Bafico等人,Nat Cell Biol,2001.3: 683-6;Niehrs,Nature,2006.25:7469-81),通过以高亲和力直接结合至Wnt共同受体LRP 5/6 (Mao等人,Nature,2001.411:321-5;Semenov等人,Curr Biol, 2001.11:951-61;Bafico等人,Nat Cell Biol,2001.3:683-6)。虽然DKK1据报道在脊椎动物发育中的头和心形成中起关键作用 (Niida等人,Oncogene,2004 年11月4日;23(52): 8520-6),但是Dkk2似乎不在脊椎动物发育中发挥皮层作用。缺乏Dkk2的小鼠具有较低的血糖 (Li等人,Proc Natl Acad Sci U S A, 2012.109:11402-7)、降低的骨骼质量 (Li等人, Nat Genet,2005.37:945-52) 和缺陷性眼表上皮 (Gage等人,Dev Biol,2008.317:310-24; Mukhopadhyay 等人,Development,2006.133:2149-54)。鉴于DKK蛋白是Wnt拮抗剂,常规的认识是DKK的失活将增加Wnt活性并因此加速癌症形成。然而,他们在癌症形成中的作用还没有直接研究。

[0011] Dkk分子含有两个保守的富含半胱氨酸的结构域 (Niehrs,Nature,2006.25: 7469-81)。以前,显示DKK1和DKK2的第二个富含Cys的结构域在抑制经典Wnt信号传导中起更重要的作用 (Li等人,J Biol Chem,J Biol Chem, 2002.277:5977-81;Brott和Sokol, Mol.Cell.Biol.,2002.22:6100-10)。最近,解构了DKK2的第二个富含Cys结构域的结构,并描绘了DKK与LRP5/6和 Kremen的相互作用所需的结构域上的氨基酸残基 (Chen等人,J Biol Chem, 2008.283:23364-70;Wang等人,J Biol Chem,2008.283:23371-5)。Dkk与 LRP5/6的相互作用是Dkk介导的Wnt抑制的主要机制的基础。尽管Dkk与 Kremen (也是跨膜蛋白) 的相互作用显示促进Wnt信号传导的Dkk拮抗作用,但是这种相互作用可能具有其他未解构的功能。Ala扫描诱变鉴定了LRP5的第三个YWTD重复结构域上的氨基酸残基对结合 DKK1和DKK2是重要的 (Zhang等人,Mol.Cell.Biol.,2004.24:4677-84)。这些结果已经通过 DKK1/LRP6的第三个和第四个YWTD重复结构域复合物的结构研究证实 (Cheng等人,Nat Struct Mol Biol,2011.18:1204-10;Chen等人,Dev Cell, 2011.21:848-61;Ahn等人,Dev Cell,2011.21:862-73.;Bourhis等人,Structure, 2011.19:1433-42)。结构研究之一还揭示了DKK的N末端与LRP的第一个 YWTD重复结构域之间的第二个DKK-LRP相互作用位点 (Bourhis等人, Structure,2011.19:1433-42)。

[0012] 虽然Wnt信号传导由于其在早期胚胎发育中的作用和其促进肿瘤发生最初被发现,但是最近的研究已经揭示其在广泛的生物过程中起重要作用。本发明源自Wnt拮抗剂与常规观点相反对肿瘤促进作用的意外发现。这种Wnt 抑制剂的中和,其将导致Wnt信号传导的改变,可能通过调节肿瘤免疫微环境抑制肿瘤形成。显然,需要新的方法来减少癌细胞增殖,触发癌细胞死亡并治疗癌症。本发明满足了这种需要。此外,本发明满足改善抗癌免疫

疗法和癌症诊断的需要。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及在有需要的对象中治疗癌症的组合物和方法。治疗癌症的方法包括给对象施用有效量的在药学上可接受的载体中的Dickkopf2 (DKK2) 基因消耗剂(depleting agent)。

[0015] 在另一方面,本发明包括在有需要的对象中治疗或减少血管生成的方法。方法包括给对象施用有效量的在药学上可接受的载体中的DKK2基因消耗剂。在一些实施方式中,血管生成是与癌症相关的肿瘤血管生成。在其他实施方式中,血管生成是与缺血性和炎症疾病相关的病理性血管生成。在还其他实施方式中,血管生成与心血管疾病相关。

[0016] 在另一方面,本发明包括用于治疗对象中的癌症的药物组合物。本发明的药物组合物包含DKK2消耗剂和药学上可接受的载体。

[0017] 在又另一方面,本发明提供了在对象中提供抗肿瘤免疫性的方法。方法包括给对象施用有效量的DKK2抗体或其片段与药学上可接受的载体。在另一方面,本发明提供了在对象中刺激对细胞群体或组织的T细胞介导的免疫应答的方法。方法包括给对象施用有效量的DKK2抗体或其片段与药学上可接受的载体。在一些实施方式中,T细胞介导的免疫应答是CD8⁺细胞毒性T 淋巴细胞(CTL) 应答。

[0018] 本发明还提供了诊断对象中癌症或发展癌症的倾向的方法。方法包括测定来自该对象的生物样品中DKK2基因的表达水平,其中与来自没有癌症的对象的对照生物样品的DKK2表达水平相比,来自该对象的生物样品中DKK2 表达水平的增加是对象具有癌症或发展癌症的倾向的指示,并且其中当在对象中检测到癌症或发展癌症的倾向时,为该对象推荐进行治疗。

[0019] 本发明还提供了一种用于确定对有需要的对象的癌症治疗的功效的方法。方法包括测定来自该对象的生物样品中DKK2基因的表达水平,其中与来自不具有癌症的对象的对照生物样品中DKK2表达水平相比,来自该对象的生物样品中DKK2表达水平的增加是治疗有效的指示,并且其中当治疗被确定为有效的时,为对象推荐进额外的治疗。在一些实施方式中,治疗包括选自化学疗法、放射疗法、免疫疗法和癌症疫苗疗法中的至少一种。

[0020] 在进一步方面,本发明包括包含靶向DKK2表位的中和性DKK2抗体的组合物,所述DKK2表位包含选自SEQ ID NO:1、5和7的氨基酸序列中的至少一种。

[0021] 在还进一步方面,本发明包括用于诊断对象中癌症或发展癌症或转移的倾向的试剂盒。试剂盒包括选自以下的试剂:用于检测DKK2基因的mRNA 的试剂、用于检测DKK2蛋白的试剂和用于检测DKK2蛋白的生物活性的试剂。

[0022] 在一些实施方式中,癌症包括包含表达腺瘤性结肠息肉病(APC) 突变的细胞的肿瘤。在一些实施方式中,DKK2消耗剂选自DKK2抗体、siRNA、核酶、反义分子、适配体、肽模拟物(peptidomimetic)、小分子及其组合。在一些实施方式中,DKK2消耗剂具有中和活性。在其他实施方式中,DKK2 抗体包括选自以下的抗体:多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人抗体、抗体的生物活性片段、抗体模拟物及其任何组合。在还其他实施方式中,DKK2抗体靶向DKK2 中和表位,所述中和表位包含选自SEQ ID NO:1、5和7的氨基酸序列中的至少一种。在进一步的实施方式中,DKK2抗体是包含选自以下的氨基酸序列中的至少一种的合成抗体: YAL008-5-1A10(SEQ ID NO 8和9)、YAL008-7-1A10(SEQ ID NO

12和13) 和YAL008-1-5F8 (SEQ ID NO 10和11)。

[0023] 在一些实施方式中,癌症选自结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、肠癌、胰腺癌和食管癌。在一些实施方式中,癌症是转移性的。

[0024] 在一些实施方式中,本发明的组合物和方法还包括给对象施用另外的药剂,所述另外的药剂选自化学治疗剂、抗细胞增殖剂、免疫治疗剂及其任何组合。在一些实施方式中,另外的药剂是程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体。在其他实施方式中,DKK2消耗剂和另外的药剂共同施用至对象。在又其他实施方式中,DKK2消耗剂和另外的药剂是共同配制的并且共同施用至对象。

[0025] 在一些实施方式中,给药途径选自吸入、口服、直肠、阴道、胃肠外、外部、经皮、肺部、鼻内、含服、眼部、鞘内施用及其任何组合。

[0026] 在一些实施方式中,来自对象的生物样品中DKK2基因的表达水平比正常对照水平高至少10%。在一些实施方式中,通过选自以下的方法测定表达水平:检测基因的mRNA、检测由基因编码的蛋白质、以及检测由基因编码的蛋白质的生物活性。

[0027] 在一些实施方式中,本发明的治疗包含至少DKK2消耗剂。

[0028] 在一些实施方式中,对象是哺乳动物。在其他实施方式中,哺乳动物是人。

[0029] 在进一步的实施方式中,本发明的试剂盒的试剂包含靶向DKK2表位的中和性DKK2抗体,所述DKK2表位包含选自SEQ ID NO:1、5和7的氨基酸序列中的至少一种。

附图说明

[0030] 为了说明本发明的目的,在附图中描绘了本发明的某些实施方式。然而,本发明并不限于图中描绘的实施方式的精确安排和机构。

[0031] 图1A-1C是说明APCKO (APC^{min}DKK2^{-/-}) 小鼠中减少的肿瘤负荷的一系列直方图和图像。将同窝仔小鼠 (雄性) 在常规食物饮食中饲养在SPF动物饲养箱中18周。图1A:肿瘤/息肉数目。图1B:肿瘤/息肉大小:APCKO 肿瘤倾向于小于APC小鼠的肿瘤。图1C:代表性的H和E染色显示APCKO 小鼠中较小并且较少频率的肿瘤。

[0032] 图2A-2B是直方图,其证明DKK2不调节MC38细胞中的增殖。图2A:平板接种50K细胞。在血清饥饿过夜后,将重组 (r) DKK2加入到培养基中。24小时后,使用ATPlite试剂盒测量增殖。图2B:在相似的设置中,收集细胞并使用血细胞计数器计数。两个实验n=3, P>0.05。

[0033] 图3A-3B是描绘来自18周龄APC或APCKO小鼠的息肉 (图3A) 和派伊尔淋巴集结 (PP) (图3B) 的CTL的流式细胞术分析的图。CD69和粒酶B (GZMB) 是CTL (细胞毒性T淋巴细胞) 活化标记物。此分析强调DKK2 失活导致息肉和PP中CD8+CTL的过度活化。PP是肠淋巴结。

[0034] 图4是一系列曲线图和直方图,其展示了在11周时来自APCKO小鼠的派伊尔淋巴集结的CD8细胞的增加的粒酶B (gzmb) 表达,其中息肉几乎不可见。APC和APCKO是同笼/窝仔。

[0035] 图5是证明DKK2缺失的肿瘤、细胞毒性T细胞 (CTL) 的超活化和凋亡增加之间的关系和一致性的一系列图像。肠上皮细胞通过脱氧核苷酸转移酶dUTP切口末端标记 (TUNEL) 染色。

[0036] 图6A和6B是展示由非造血细胞产生的DKK2主要有助于CD8细胞上 GZMB表达增加的图。同笼仔WT和KO (DKK2^{-/-}) (图6A) 以及APC和 APCKO (图6B) 小鼠被致死照射并用WT

CD45.1骨髓细胞移植。将小鼠用复方新诺明 (sulfatrim) 治疗4周。照射后8周,将它们安乐死并收获它们的PP,并使用流式细胞术分析GZMB表达。在DKK KO小鼠中观察到在移植的CD8细胞上增加的GZMB表达,而不管APC状态如何。

[0037] 图7是一系列曲线图,其证明上皮细胞中DKK2的缺失导致来自APC小鼠的派伊尔淋巴集结 (PP) 的CD8细胞的活化增加。在5周龄时用他莫昔芬 (tamoxifen) 治疗同笼和同窝仔。研究11周龄小鼠的CD8细胞。在来自在上皮细胞中缺乏DKK2的APC小鼠的样品的PP中检测到增加的gzm和CD69 表达。

[0038] 图8A-8B是一系列直方图,其展示了DKK2抗体YAL008-1-5F8 (5F8) 和YAL008-5-1A10 (1A10) 的两个克隆。图8A:示出了识别rDKK2 (3nM),但不识别rDKK1的5F8和1A10的ELISA。图8B:在293T细胞上的Wnt报道分子测定中,24小时,通过1A10和5F8逆转DKK2的Wnt抑制功能。

[0039] 图9A-9C展示了通过新型 α -DKK2Ab (5F8=YAL008-1-5F8和 1A10=YAL008-5-1A10) 的DKK2中和导致APCmin小鼠的肿瘤负荷的显著降低。8周龄APC小鼠用200 μ g 5F8、1A10和IgG每72小时治疗持续8周。通过福尔马林固定的肠的亚甲基蓝染色测量肿瘤负荷。 α -Dkk2ab (抗体,ab) 治疗的小鼠的肿瘤数目 (图9A) 和肿瘤体积 (图9B) 二者都较低。体重没有显著差异 (图9C)。 $n=5, *P<0.05$ 。

[0040] 图10是一系列曲线图和直方图,其证明抗DKK2抗体增加派伊尔淋巴集结 (PP) 中的CTL活化。 $n=5, *P<0.05$ 。

[0041] 图11是列出用于免疫小鼠的抗原及其序列的表。两种主要抗体是特别关注的 (由*或**标记):抗YAL008-1抗原 (SEQ ID NO 1) 的抗体YAL008-1-5F8 显示对全长DKK2蛋白的最高亲和力并且进一步针对中和活性进行表征。抗 YAL008-5抗原 (SEQ ID NO 5) 的抗体YAL008-5-1A10和抗YAL008-7抗原 (SEQ ID NO 7) 的抗体YAL008-7-1A10识别全长DKK2蛋白并具有中和活性。抗体由AbMax (京天成生物技术有限公司 (AbMax Biotechnology Co., Ltd.), 中国) 的合成肽产生。虽然YAL008-5-1A10和YAL008-7-1A10由在人和小鼠DKK2二者中相同的序列制成,YAL008-1-5F8由人序列制成,其具有与小鼠的序列不同的两个残基。YAL008-1-5F8仍然对小鼠DKK2蛋白具有交叉反应性。基于酶联免疫吸附测定 (ELISA), 两种抗体对小鼠DKK2蛋白的亲和力为0.1-1nM范围。符号“#”表示加入用于缀合的半胱氨酸残基。YAL008-1-5F8、YAL008-5-1A10和YAL008-7-1A10 (SEQ ID NO:8-13) 的 CDR的氨基酸序列也列在下表中。

[0042] 图12是说明DKK-LRP6胞外域相互作用而提出的机制的图像。在此图示中示出了LRP6胞外域的所有四种 β -螺旋。示出了DKK (包括N末端肽和 DKK1C)。YAL008-1-5F8 (5F8) 和YAL008-5-1A10 (1A10) Dkk2中和抗体的抗原由箭头表示。

[0043] 图13A-13B是一系曲线图和图像,其示出了在同种异体移植肿瘤模型中 DKK2中和降低肿瘤负荷,伴随着粒酶B阳性细胞增加和肿瘤细胞死亡。将小鼠结肠癌细胞 (MC38) 皮下移植到免疫活性的C57BL小鼠,并在移植后6 天开始用抗DKK2抗体 (5F8=YAL-008-1-5F8) 治疗。示出了肿瘤生长曲线 (图 13A) 以及凋亡细胞和粒酶B阳性细胞的肿瘤切片的免疫染色 (图13B)。 $n=5$ 。

[0044] 图14是一系列直方图,其描绘了中和抗DKK2抗体增加粒酶B阳性NK 和CD8细胞。来自图13的同种异体移植肿瘤中的细胞的流式细胞术分析揭示, DKK2中和不影响CD45造血

细胞、NK或CD8⁺细胞的数目,但增加肿瘤中粒酶B阳性造血细胞、NK和CD8⁺细胞的百分比。 $n=5$ 。

[0045] 图15是一系曲线图,其表明DKK2中和在较长期治疗方案中以剂量依赖性方式延缓肿瘤进展。5F8=YAL-008-1-5F8。

[0046] 图16是一系列直方图和图像,其描绘了来自图15的肿瘤的免疫染色分析证实DKK2中和增加GZMB阳性细胞和肿瘤细胞死亡。此图还揭示,更长的DKK2中和抗体的治疗诱导次级抗肿瘤效应,包括CD8细胞数目的增加以及肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖的减少。

[0047] 图17是一系列曲线图和直方图,其描绘了肿瘤细胞中DKK2表达的减少延缓肿瘤进展,伴随着GZMB阳性细胞的增加和肿瘤细胞死亡。MC38中的 DKK2表达被shRNA沉默并且表达较低水平的DKK2的MC38细胞在同种异体移植模型中形成较小的肿瘤。与先前实验中所揭示的作用机制一致,DKK2 的表达降低与肿瘤细胞死亡和粒酶B阳性细胞的增加相关。

[0048] 图18是一系列曲线图和直方图,其描绘了宿主DKK2的失活也延缓了肿瘤进展,伴随着GZMB阳性细胞的增加和肿瘤细胞死亡。此图和图19中的数据表明可能存在DKK2的两个来源,一个是宿主,而另一个是肿瘤细胞。二者对于促进肿瘤生长都是重要的。

[0049] 图19是一系列曲线图和直方图,其描绘了使用同种异体移植小鼠肿瘤模型,DKK2中和减少肺癌形成,伴随着增加GZMB阳性细胞和肿瘤细胞凋亡。5F8=YAL-008-1-5F8。

[0050] 图20A-20C是一系列曲线图,其展示了当单独施用或与其他抗体(σ IgG; PD-1抗体)组合施用, YAL-008-1-5F8对肿瘤形成的对比作用。图20A显示在Lewis肺癌(LLC)同种异体移植肺肿瘤模型中, YAL-008-1-5F8对肿瘤延缓具有与PD-1抗体类似的作用;并且YAL-008-1-5F8和PD-1抗体的组合显示比单独的PD-1抗体更高的肿瘤进展抑制。图20B显示使用LLC同种异体移植肿瘤模型,当单独施用或与其他抗体(σ IgG;PD-1抗体)组合施用, YAL-008-1-5F8对小鼠存活的对比作用。图20C说明当在MC38结肠癌模型中单独施用或与其他抗体组合施用, YAL-008-1-5F8对肿瘤形成的对比作用。在这种MC38模型中,PD-1抗体对肿瘤形成没有显著影响。

具体实施方式

[0051] 本发明涉及意想不到的发现,即抑制Dickkopf2 (DKK2) 导致抑制肿瘤形成,伴随着包括中性杀伤(NK)细胞和CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的免疫效应细胞的增加的细胞毒性活性,以及增加的肿瘤细胞凋亡和肿瘤血管生成的减少。因此,在本文所述的各种实施方式中,本发明的方法涉及通过给患者施用有效量的DKK2基因消耗剂来治疗癌症的方法,在对象中提供抗肿瘤免疫性的方法,在对象中刺激对细胞群体或组织的免疫效应细胞介导的免疫应答的方法。另外,本发明包括诊断癌症或发展癌症的倾向的方法,以及确定使用免疫疗法治疗来治疗癌症的方法。此外,本发明包括用于治疗癌症的药物组合物以及用于实施上述方法的试剂盒。

[0052] 定义

[0053] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述相似或等同的任何方法和材料可以用于本发明的测试的实践中,但是本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明时,将使用以下术语。

- [0054] 还应当理解,本文所使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,而不意在限制。
- [0055] 如本文所使用的,冠词“一种”和“一个”用于指该冠词的一个或多于一个(即,至少一个)语法对象。作为实例,“一个要素”是指一个要素或多于一个要素。
- [0056] 如本文所用,当提及可测量的值例如量、时间持续等时,术语“约”意在涵盖从规定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$,更优选地 $\pm 5\%$,甚至更优选地 $\pm 1\%$,并且还更优选地 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这样的变化适于执行所披露的方法。
- [0057] 如本文所用,“高10%”是指表达水平为比对照高至少10%或更多,例如高20%、30%、40%、或50%、60%、70%、80%、90%或更多,和/或1.1倍、1.2倍、1.4倍、1.6倍、1.8倍、2.0倍或更多,以及其间的任何和所有全部或部分增量。
- [0058] 如本文所用,术语“对照”或“参考”可互换使用,并且是指用作比较标准的值(例如,健康对象中DKK2表达水平)。
- [0059] 如本文中使用的“对象”或“患者”可以是人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括例如家畜和宠物,例如羊、牛、猪、犬、猫和鼠哺乳动物。优选地,对象是人。
- [0060] 如在本文使用的“突变”是DNA序列的变化,导致从其天然状态的改变。突变可以包括至少一个脱氧核糖核酸碱基例如嘌呤(腺嘌呤和/或胸腺嘧啶)和/或嘧啶(鸟嘌呤和/或胞嘧啶)的缺失和/或插入和/或重复和/置换。
- [0061] 突变可能或可能不产生在生物体(对象)的可观察特征(表型)中可辨别的变化。
- [0062] 本文所用的术语“免疫原性”是特定物质例如抗原或表位在哺乳动物体内引起免疫应答的能力。这种免疫应答可以是体液和/或细胞介导的。
- [0063] 本文所用的术语“活化”是指细胞在足够的细胞表面部分连接以诱导显著的生物化学或形态变化之后的状态。在T细胞的上下文中,这种活化是指已经被充分刺激以诱导细胞增殖的T细胞的状态。T细胞的活化还可以诱导细胞因子产生及调节性能或细胞溶解效应子功能。在其他细胞的上下文中,此术语推断特定物理化学过程的上调或下调。术语“活化的T细胞”表示目前正在进行细胞分裂、细胞因子产生、调节性能或细胞溶解效应子功能的,和/或最近经历了“活化”的过程的T细胞。
- [0064] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且没有限制可包含蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数目。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,该术语是指短链(其在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚体)以及较长链(其在本领域中通常称为蛋白质,其存在很多类型)。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。
- [0065] 在本发明的上下文中,使用通常出现的核酸碱基的以下缩写。“A”是指腺苷,“C”是指胞嘧啶,“G”是指鸟苷,“T”是指胸苷,并且“U”是指尿苷。
- [0066] 本文所用的术语“RNA”定义为核糖核酸。
- [0067] 本文所用的术语“免疫治疗剂”意在包括调节患者免疫系统的任何药剂。“免疫疗法”是指改变患者免疫系统的治疗。
- [0068] 本文所用的术语“治疗的”是指治疗和/或预防。通过抑制、缓解或根除疾病状态获得治疗效果。

[0069] 在本发明的上下文中使用的术语“治疗”意在包括用于疾病或病症的治疗性治疗以及预防性或抑制性措施。因此,例如,术语治疗包括在疾病或病症发作之前或之后施用药剂,从而预防或消除疾病或病症的所有征兆。作为另一个实例,在疾病的临床表现后施用药剂以对抗疾病的症状包括疾病的“治疗”。这包括预防癌症。

[0070] 术语“生物样品”是指从生物体或从生物体的组分(例如,细胞)获得的样品。样品可以是任何生物组织或流体。通常,样品将是“临床样品”,其是源自患者的样品。这样的样品包括但不限于骨髓、心脏组织、痰、血液、淋巴液、血细胞(例如,白细胞)、组织或细针活检样品、尿、腹膜液和胸膜液或来自它们的细胞。生物样品也可包括组织切片例如用于组织学目的的冷冻切片。

[0071] “Dkk蛋白”是指含有一个或多个富含半胱氨酸的结构域的Dkk蛋白家族的蛋白质。Dkk蛋白家族包括Dkk1、Dkk2、Dkk3和Dkk4,以及在序列水平、结构或功能上与这些蛋白质中的一种或多种充分相关的任何其他蛋白质。这种蛋白家族描述于例如Krupnik等人,(1999) Gene 238:301中。此定义也包括Dkk蛋白的等位基因变体和突变体,例如本文所述的那些。

[0072] 当用于提及核苷酸序列时,术语“等同的”应理解为是指编码在功能上等等的多肽的核苷酸序列。等同的核苷酸序列将包括通过一个或多个核苷酸置换、添加或缺失而不同的序列,例如等位基因变体;并且因此将包括由于遗传密码的简并性而与本文所述的核酸的核苷酸序列不同的序列。

[0073] “杂交”是指核酸链通过碱基配对与互补链结合的任何过程。两个单链核酸在形成双链双链体时“杂交”。双链性(double-strandedness)区域可以包括单链核酸中的一个或两个的全长,或者一个单链核酸的全部和另一个单链核酸的子序列,或双链性区域可以包括每个核酸的子序列。杂交还包括形成含有某些错配的双链体,条件是两条链仍然形成双链螺旋。“严格杂交条件”是指导致基本上特异性杂交的杂交条件。术语探针与模板核酸的靶位点的“特异性杂交”是指探针主要与靶标的杂交,使得可以清楚地解释杂交信号。如本文进一步描述的,导致特异性杂交的这些条件根据同源性区域的长度、区域的GC含量、杂化物的解链温度“ T_m ”而变化。因此杂交条件将在杂交溶液的盐含量、酸度和温度以及洗涤中变化。

[0074] 本文所用的关于核酸例如DNA或RNA的术语“分离的”是指分别与存在于天然来源的大分子中的其他DNA或RNA分离的分子。本文使用的术语“分离的”还指当通过重组DNA技术产生时基本上不含细胞材料、病毒材料或培养基,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品的核酸或肽。此外,“分离的核酸”意在包括不是作为片段天然存在的并且不会在天然状态中发现的核酸片段。术语“分离的”在本文中也用于指从其他细胞蛋白分离的多肽并且意在包括纯化的和重组的多肽二者。“分离的细胞”或“分离的细胞群体”是不存在于其天然环境中的细胞或细胞群体。

[0075] 如本文所用,术语“核酸”是指多核苷酸,例如脱氧核糖核酸(DNA),和在适当时,核糖核酸(RNA)。该术语还应当理解为包括作为等同物的由核苷酸类似物制备的RNA或DNA的类似物,和如适用于所述的实施方式的单链(有义或反义)和双链多核苷酸。EST、染色体、cDNA、mRNA和rRNA 是可以称为核酸的分子的代表性实例。

[0076] “干细胞”是指能够分化成所需细胞类型的细胞。干细胞包括胚胎干(ES)细胞;成人干细胞;和体干细胞,例如来自未定型中胚层的SP细胞。“全能”干细胞能够分化成所有组

织类型,包括中胚层、内胚层和外胚层的细胞。“多能(multipotent/pluripotent)”干细胞是能够分化成几种命运中的至少两种的细胞。

[0077] 当在多核苷酸序列的上下文中使用时,术语“变体”可以包括与基因或其编码序列的多核苷酸序列相关的多核苷酸序列。此定义还可以包括例如“等位基因”、“剪接”、“物种”或“多态”变体。多肽通常将相对于彼此具有显著的氨基酸同一性。多态性变体是给定物种的个体之间特定基因的多核苷酸序列的变异。多态性变体可包括其中多核苷酸序列变化一个碱基的“单核苷酸多态性”(SNP)。SNP的存在可以指示例如某种群体、疾病状态或疾病状态的倾向。

[0078] 术语“Wnt拮抗剂”或“Wnt抑制剂”是指下调(例如,遏制或抑制)通过Wnt途径的信号转导的分子或组合物。下调可以直接发生,例如通过抑制Wnt信号传导途径中的蛋白质的生物活性,或间接发生,例如通过抑制Wnt信号传导的下游介体(例如TCF3)或通过降低 β -联蛋白的稳定性等。Wnt拮抗剂的实例包括但不限于Dkk多肽(Glinka等人,Nature,1998,391:357-62; Niehrs,Trends Genet,1999,15(8):314-9)、crescent多肽(Marvin等人,Genes&Dev.,2001,15:316-327)、cerberus多肽(美国专利号6,133,232)、WISE/Sclerostin(Li等人,J Biol Chem,2005.280:19883-7)、轴蛋白多肽(Zeng 等人,Cell,1997,90(1):181-92; Itoh等人,Curr Biol,1998,8(10):591-4;Willert 等人,Development,1999,126(18):4165-73)、Frzb多肽(Cadigan等人,Cell,1998,93(5):767-77;美国专利号6,133,232;美国专利号6,485,972)、糖原合酶激酶(GSK)多肽(He等人,Nature,1995)374(6523):617-22)、T细胞因子(TCF)多肽(Molenaar等人,Cell,1996,86(3):391-9)、显性失活散乱蛋白(dishevelled)多肽(Wallingford等人,Nature,2000,405(6782):81-5)、显性失活N钙黏着蛋白多肽(美国专利号6,485,972)、显性失活 β -联蛋白多肽(美国专利号6,485,972)、下游转录因子(例如TCF等)的显性失活突变体(dominant negatives)、Wnt多肽的显性失活突变体、破坏LRP-卷曲蛋白(frizzled)-Wnt复合物的药剂和螯合Wnt的药剂(例如,crescent和Wnt的抗体)。Wnt拮抗剂多肽可以是哺乳动物来源的,例如人、小鼠、大鼠、犬、猫、牛或羊,或非哺乳动物来源,例如来自非洲蟾蜍、斑马鱼、果蝇、鸡或鹌鹑。Wnt拮抗剂还包括各种多肽的片段、同系物、衍生物、等位基因变体和肽模拟物,包括但不限于Dkk、crescent、cerberus、轴蛋白、Frzb、GSK、TCF、显性失活散乱蛋白、显性失活N-钙黏着蛋白、和显性失活 β -联蛋白多肽。在其他实施方式中,Wnt拮抗剂还包括抗体(例如,Wnt特异性抗体)、多核苷酸和小分子。

[0079] 本文所用的术语“癌症”包括任何恶性肿瘤,包括但不限于癌、肉瘤。癌症起因于细胞的不受控制和/或异常分裂,然后侵入并破坏周围组织。如本文所用,“增殖(proliferating和proliferation)”是指经历有丝分裂的细胞。如本文所用,“转移”是指恶性肿瘤从其原始见到位置的远处扩散。癌细胞可通过血流、通过淋巴系统、穿过体腔或其任何组合转移。

[0080] 术语“癌”是指由上皮细胞组成的趋向于浸润周围组织并产生转移的恶性新生长。

[0081] 术语“癌症疫苗”是指刺激免疫系统以抵抗癌症或抵抗有助于癌症发展的药剂的疫苗。存在两种广泛类型的癌症疫苗:预防性癌症疫苗,其旨在预防健康对象中的癌症发展;以及治疗性癌症疫苗,其旨在通过增强身体对抗癌症的天然防御来治疗现有癌症(Lollini等人,Nature Reviews Cancer,2006;6(3):204-216)。如本文所用,术语“癌症疫

苗”应解释为包括预防性和治疗性癌症疫苗二者。

[0082] 术语“转移”是指癌症从一个器官或部分到另一个不相邻的器官或部分的扩散。

[0083] 术语“血管生成”是指新血管的产生,通常围绕或进入组织或器官。在正常生理条件下,人或动物仅在非常特定的限制情况下经历血管生成。例如,血管生成通常在伤口愈合、胎儿和胚胎发育和黄体、子宫内膜和胎盘的形中观察到。不受控制的(持续的和/或非调节的)血管生成与多种疾病状态相关,并且在肿瘤生长和转移期间发生。

[0084] 术语“改善”或“治疗”意指与癌症或黑素瘤相关的临床征兆和/或症状由于所进行的动作而减轻。待监测的征兆或症状将是特定癌症或黑素瘤的特征,并且对于临床医师来说是熟知的,如监测征兆和病症的方法。例如,熟练的临床医生将知道可以使用通常用于特定肿瘤的诊断成像方法(例如,使用超声或磁共振图像(MRI)监测肿瘤)来监测肿瘤生长的大小或生长速率。

[0085] 如本文所用,术语“药物组合物”是指在本发明中有用的至少一种化合物与其他化学组分例如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂的混合物。药物组合物有助于将该化合物施用至生物体。本领域中存在施用化合物的多种技术,包括但不限于:静脉内、口服、气雾剂、肠胃外、眼部、肺部和外部施用。

[0086] 术语“药学上可接受的载体”包括药学上可接受的盐、药学上可接受的材料、组合物或载体,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料,其涉及在对象内携带或输送本发明的化合物(一种或多种)或携带或输送本发明的化合物(一种或多种)至对象,使得其可以执行其预期功能。通常,这种化合物从身体的一个器官或部分携带或输送至身体的另一器官或部分。每种盐或载体在与制剂的其他成分相容的意义上必须是“可接受的”,并且不对对象有害。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉末黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡类;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;稀释剂;造粒剂;润滑剂;粘合剂;崩解剂;润湿剂;乳化剂;着色剂;脱模剂;涂层剂;甜味剂;调味剂;加香剂;防腐剂;抗氧化剂;增塑剂;胶凝剂;增稠剂;硬化剂;固化剂;悬浮剂;表面活性剂;保湿剂;载体;稳定剂;和在药物制剂中使用的其他无毒的相容性物质,或其任何组合。如本文所用,“药学上可接受的载体”还包括与化合物的活性相容并且对于对象是生理上可接受的任何和所有的包衣、抗菌剂和抗真菌剂,以及吸收延迟剂等。补充性活性化合物也可以掺入组合物中。

[0087] 如本文所用的术语“抗体”或“Ab”是指衍生自特异性结合到抗原上的特异性表位的免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可以是源自天然来源或来自重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。用于本发明的抗体可以以多种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、细胞内抗体(“胞内抗体”)、Fv、Fab和F(ab)₂,以及单链抗体(scFv)和人源化抗体(Harlow等人,1998,使用抗体:实验室手册(Using Antibodies:A Laboratory Manual),纽约冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY);Harlow等人,1989,抗体:实验室手册(Antibodies:A

Laboratory Manual), 纽约冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor, New York); Houston等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird 等人, 1988, Science 242:423-426)。抗体可以源自天然来源或源自重组来源。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。

[0088] 本文所用的术语“合成抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体, 例如本文所述的由噬菌体表达的抗体。该术语还应解释为是指通过合成编码抗体的DNA分子产生的抗体, 并且该DNA分子表达抗体蛋白或规定抗体的氨基酸序列, 其中使用以下合成DNA或氨基酸序列技术获得DNA或氨基酸序列, 所述技术是本领域可获得的和熟知的。

[0089] 术语“抗体片段”是指完整抗体或其重组变体的至少一部分, 并且是指完整抗体的抗原结合结构域, 例如完整抗体的抗原决定可变区, 其足以赋予抗体片段对靶标例如抗原的识别和特异性结合。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、scFv抗体片段、线性抗体、单结构域抗体例如sdAb (VL或VH)、VHH结构域、和由抗体片段形成的多特异性抗体。术语“scFv”是指包含至少一个包含轻链可变区的抗体片段和至少一个包含重链可变区的抗体片段的融合蛋白, 其中轻链和重链可变区通过短的柔性多肽连接体连续连接, 并且能够表达为单链多肽, 并且其中scFv保留其来源的完整抗体的特异性。除非特别说明, 如本文所使用的scFv可以具有任何顺序的VL 和VH可变区, 例如相对于多肽的N末端和C末端, scFv可以包含VL-连接体-VH或可以包含VH-连接体-VL。

[0090] 本文所用的“抗体重链”是指存在于其天然存在的构象中的抗体分子中的两种类型多肽链中的较大者, 并且其通常决定抗体所属的类别。

[0091] 本文所用的“抗体轻链”是指存在于其天然存在的构象中的抗体分子中的两种类型的多肽链中的较小者。 κ 和 λ 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0092] 本文所用的术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体, 例如由噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。该术语也应解释为是指通过合成编码抗体的DNA分子产生的抗体, 所述DNA分子表达抗体蛋白或规定抗体的氨基酸序列, 其中DNA或氨基酸序列使用本领域可获得和熟知的重组DNA或氨基酸序列技术获得。

[0093] 本文使用的术语“抗原”或“Ag”定义为引发免疫应答的分子。这种免疫应答可涉及抗体产生, 或特异性免疫活性细胞的活化, 或二者。技术人员将理解, 任何大分子, 包括实际上所有的蛋白质或肽, 可以用作抗原。此外, 抗原可以衍生自重组或基因组DNA。技术人员将理解, 包含编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码如本文所使用的术语“抗原”。此外, 本领域技术人员将理解, 抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是, 本发明包括但不限于使用多于一个基因的部分核苷酸序列, 并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫应答。此外, 技术人员将理解, 抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见的是, 抗原可以是合成的或可以源自生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0094] 术语“施用器”, 如本文所用的术语, 是指用于施用本发明的化合物和组合物的任何装置, 包括但不限于皮下注射器、移液管等。

[0095] 如本文所用, “适配体”是指可以与另一个分子特异性结合的小分子。适配体通常是基于多核苷酸或肽的分子。多核苷酸适配体是通常包含几条核酸链的DNA或RNA分子, 其采用高度特异性的三维构象, 所述构象被设计为对特异性靶分子(例如肽、蛋白质、药物、维

生素,以及其他有机和无机分子)具有合适的结合亲和力和特异性。这样的多核苷酸适配体可以通过使用通过指数富集的配体的系统演化而从大量随机序列中选择。肽适配体通常是连接到结合特异性配体的蛋白质支架的约10至约20个氨基酸的环。可以使用例如酵母双杂交系统的方法从组合文库鉴定和分离肽适配体。

[0096] 本文所用的术语“抗肿瘤效应”是指可以通过多种手段表现的生物效应,包括但不限于,例如,肿瘤体积的减少、肿瘤细胞数目的减少、转移的数目减少,预期寿命的增加、肿瘤细胞增殖的减少、肿瘤细胞存活的减少、或与癌性病症相关的各种生理症状的改善。“抗肿瘤效应”也可以通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防肿瘤发生的能力来证明。

[0097] 本文所用的术语“异种移植”是指取自一个物种的供体并移植到另一个物种的受体中的组织的移植。

[0098] 本文所用的术语“同种异体移植”是指取自一个物种的供体并移植到同一物种的受体中的组织的移植。

[0099] 范围:贯穿本公开内容,本发明的各个方面可以以范围格式呈现。应当理解,在范围格式的描述仅为了方便和简明,并且不应当解释为是对本发明的范围的硬性限制。因此,一个范围的描述应当被认为是具有确切披露的所有可能的子范围以及该范围内的单独数值。例如,诸如从1至6的范围的描述应当被认为已经确切披露子范围,例如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3到6等,以及在所述范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的宽度,此均适用。

[0100] 描述

[0101] 免疫系统在激活和抑制之间平衡。逃避免疫监视是肿瘤形成的先决条件之一。肿瘤逃避免疫监视的方法之一是产生升高量的免疫抑制分子。多年来已经确定了越来越多的免疫抑制分子和机理。已经表明这些免疫抑制分子的中和在治疗各种恶性肿瘤中是有效的。

[0102] 本发明涉及抑制中性杀伤(NK)细胞和CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL)活性并刺激肿瘤血管生成的分泌型肿瘤形成增强剂DKK2的发现。DKK2是一种分泌蛋白,其可以抑制β-联蛋白介导的Wnt信号传导,改变非β-联蛋白介导的Wnt活性,并且还可以具有Wnt非依赖性功能。它还显示具有促血管生成活性(Park等人,Angiogenesis,2014.17:221-34;Min等人,J Clin Invest, 2011.121:1882-93)。DKK2在许多组织中表达,并在人结肠直肠癌、胃肠癌、肝癌、肾癌和胰腺癌中上调。下面描述的实验证据表明DKK2抑制剂和中和抗体是用于治疗其中表达DKK2的癌症的肿瘤血管生成的关键免疫调节剂和抑制剂。因此DKK2是治疗这些癌症的有希望的靶标。

[0103] 本发明的方法

[0104] 本发明涉及在有需要的对象中治疗癌症的方法,并且方法包括给对象施用有效量的在药学上可接受的载体中的DKK2基因消耗剂。术语“DKK2基因消耗剂”是指抑制或减少DKK2表达或抑制或降低细胞、组织或体液中 DKK2活性的任何药剂。

[0105] 小干扰RNA(siRNA):

[0106] 在一个实施方式中,消耗剂是小干扰RNA(siRNA)。siRNA是包含靶向感兴趣的基因或多核苷酸的一组核苷酸的RNA分子。如本文所用,术语“siRNA”包括所有形式的siRNA,包

括但不限于(i)双链RNA多核苷酸,(ii)单链多核苷酸,和(iii)(i)或(ii)的多核苷酸,其中这样的多核苷酸在其中具有一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸改变或置换。siRNA及其用于抑制基因表达的用途是本领域众所周知的(Elbashir等人,Nature,2001,411(6836):494-988)。在本发明中,siRNA能够干扰所关注的基因例如DKK2的表达和/或活性。

[0107] 核酶:

[0108] 在进一步的实施方式中,消耗剂是核酶。核酶及其用于抑制基因表达的用途也是本领域众所周知的(Cech等人,1992,J.Biol.Chem.267:17479-17482; Hampel等人,1989,Biochemistry 28:4929-4933;Eckstein等人,国际公开号 WO 92/07065;Altaian等人,美国专利号5,168,053)。核酶是具有以类似于 DNA限制性内切核酸酶的方式特异性切割其他单链RNA的能力的RNA分子。通过修饰编码这些RNA的核苷酸序列,可以设计分子以识别RNA分子中的特定核苷酸序列并切割它(Cech,1988,J.Amer.Med.Assn.260:3030)。此方法的主要优点是以下事实:核酶是序列特异性的。存在两种基本类型的核酶,即四膜虫型(Hasselhoff,1988,Nature 334:585)和锤头型。四膜虫型核酶识别长度为四个碱基的序列,而锤头型核酶识别长度为11-18个碱基的碱基序列。序列越长,序列将仅在靶mRNA种类中发生的可能性越大。因此,锤头型核酶优于用于灭活特定mRNA种类的四膜虫型核酶,并且18个碱基的识别序列优于在各种不相关的mRNA分子内随机出现的较短识别序列。用于抑制目标基因(即DKK2)表达的核酶可以通过将靶序列掺入与所需基因的mRNA 序列互补的碱性核酶结构中来设计。靶向感兴趣的基因的核酶可以使用市售的试剂(美国加利福尼亚州福斯特城应用生物系统公司(Applied Biosystems, Inc.,Foster City,CA))合成,或者它们可以从编码它们的DNA进行遗传表达。

[0109] 反义分子:

[0110] 在另一个实施方式中,消耗剂是反义核酸序列。反义分子及其用于抑制基因表达的用途是本领域众所周知的(Cohen,1989,寡脱氧核苷酸反义基因表达的抑制剂(Oligodeoxyribonucleotides,Antisense Inhibitors of Gene Expression),CRC出版社)。反义核酸是与特定mRNA分子的至少一部分互补的DNA或RNA分子,如该术语在本文别处定义的(Weintraub,1990,Scientific American 262:40)。在细胞中,反义核酸与相应的mRNA杂交,形成双链分子,从而抑制基因的翻译。可以使用编码反义分子的DNA通过遗传表达向细胞提供反义分子,如Inoue,1993,美国专利号5,190,931所教导的。可选地,可以合成制备反义分子,然后提供给细胞。约10至约30之间的反义寡聚体是优选的,因为它们容易合成并引入靶细胞中。本发明考虑的合成的反义分子包括本领域已知的与未修饰的寡核苷酸相比具有改善的生物活性的寡核苷酸衍生物(美国专利号5,023,243)。

[0111] 小分子抑制剂

[0112] 本领域众所周知,位于人LRP5的第三个YWTD重复结构域的 β -螺旋结构的顶部空腔处的一些氨基酸残基对于DKK结合和DKK介导的Wnt拮抗作用是重要的(Zhang等人,Mol Cell Biol.2004;24:4677-4684)(图12)。在本发明的一个实施方式中,可以结合至此空腔并破坏DKK和LRP5/6之间的相互作用的小分子作为DKK2抑制剂。在具体的实施方式中,DKK2抑制剂是类似于本领域已知的参与DKK结合的LRP5的任何氨基酸残基的任何小分子。那些残基的非限制性实例是Glu721、Trp863、Tyr719、Arg764、Asp887、Phe888、Gly781、Trp780和Met890(Zhang等人,Mol Cell Biol.2004;24:4677-4684)。在进一步的实施方式中,作为

DKK2抑制剂的小分子是槲花青化合物(例如 IIC8和IIIC3)(Li等人,Proc Natl Acad Sci U S A,2012.109:11402-7)。

[0113] 抗体

[0114] 本发明考虑使用包含抗DKK2抗体的组合物。在一个实施方式中,抗体包含选自多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人抗体和抗体的生物活性片段及其任何组合的抗体。在具体的实施方式中,合成抗体由京天成生物技术有限公司(AbMax Biotechnology Co.Ltd.)(中国)生产,例如抗体YAL008-1-5F8(抗原肽序列为5'-KLNSIKSSLGGETPG-3', SEQ ID NO 1,位于DKK2的N末端)、抗体YAL008-5-1A10(抗原肽序列为5'-CKVWKDATYSSKAR-3', SEQ ID NO 5,位于DKK2的第二个富含Cys的结构域)、和抗体YAL008-7-1A10(抗原肽序列为5'-CARHFWTKIC-3', SEQ ID NO 7,位于DKK2的第二个富含Cys的结构域)(图11和12)。在进一步的实施方式中,在抗原肽的3'末端添加半胱氨酸("C")用于缀合。

[0115] 产生抗体的方法是本领域已知的。本文描述了用于生产根据本发明使用的抗体的示例性技术。本领域技术人员应当理解,抗体包括能够特异性结合存在于靶分子上的表位的任何免疫球蛋白分子,无论是源自天然来源还是源自重组来源。在一个实施方式中,靶分子包括

[0116] 当用于本发明的组合物和方法中的靶分子的抗体是多克隆抗体(IgG)时,抗体通过用包含全长靶蛋白或其片段、上游调节子、或其片段的肽接种适当的动物而产生。这些多肽或其片段可以通过本领域已知的任何方法获得,包括化学合成和生物合成。

[0117] 然后从获得自动物的流体中分离在接种的动物中产生的特异性结合靶分子或其片段的抗体。可以以这种方式在几种非人哺乳动物例如但不限于山羊、绵羊、马、骆驼、兔和驴中产生抗体。用于产生多克隆抗体的方法是本领域熟知的,并且描述于例如Harlow等人,1998,In:Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,NY中。

[0118] 针对全长靶分子或其片段的单克隆抗体可以使用任何公知的单克隆抗体制备方法制备,例如在Harlow等人(1998,抗体:实验室手册(In:Antibodies, A Laboratory Manual),纽约冷泉港(Cold Spring Harbor,NY))和Tuszynski等人(1988,Blood,72:109-115)中描述的那些。人单克隆抗体可以通过美国专利公开号2003/0224490中描述的方法制备。针对抗原的单克隆抗体从使用本文提及的标准程序用抗原免疫的小鼠产生。可以使用本领域可获得的技术克隆和测序编码使用本文所述的程序获得的单克隆抗体的核酸,并且描述于例如Wright等人,1992,Critical Rev.Immunol.12(3,4):125-168,及其中引用的参考文献中。

[0119] 当用于本发明方法的抗体是对应于全长靶分子或其片段的抗体的生物活性抗体片段或合成抗体时,抗体如下制备:将编码所需抗体或片段的核酸克隆到合适的载体中。将载体转染到适于产生大量抗体或其片段的细胞中。然后在细胞中表达编码所需抗体的DNA,从而产生抗体。编码所需肽的核酸可以使用本领域可获得的技术克隆和测序,并描述于例如Wright等人,1992, Critical Rev.in Immunol.12(3,4):125-168及其中引用的参考文献中。可选地,所需抗体或其片段的量也可以使用化学合成技术合成。如果抗体的氨基酸序列是已知的,则可以使用本领域已知的方法化学合成所需的抗体。

[0120] 本发明还可以包括使用与存在于靶分子上的表位特异性反应的人源化抗体。这些

抗体能够结合靶分子。用于本发明的人源化抗体具有人架构并具有来自与靶细胞表面分子特异性反应的抗体(通常为小鼠抗体)的一个或多个互补决定区(CDR)。YAL008-1-5F8、YAL008-5 1A10和YAL008-7-1A10的 CDR序列的氨基酸序列列于图11中。

[0121] 当用于本发明的抗体是人源化的时,抗体可以如Queen等人(美国专利号6,180,370)、Wright等人,1992,Critical Rev.Immunol.12(3,4):125-168及其中引用的参考文献中、或在Gu等人,1997,Thrombosis&Hematocyst 77(4):755-759中描述,或使用本领域已知的产生人源化抗体的其他方法产生。Queen等人披露的方法部分地涉及设计通过表达编码来自能够结合所需抗原的供体免疫球蛋白的重链和轻链互补决定区(CDR)的重组DNA区段而产生的人源化免疫球蛋白,其连接到编码受体人构架区的DNA区段上。一般来说,Queen专利中的发明适用于基本上任何人源化免疫球蛋白的设计。Queen解释,DNA区段将通常包括与人源化免疫球蛋白编码序列可操作地连接的表达控制DNA序列,包括天然相关或异源启动子区。表达控制序列可以是能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统,或者表达控制序列可以是能够转化或转染原核宿主细胞的载体中的原核启动子系统。一旦载体被掺入合适的宿主中,将宿主保持在适合于高水平表达引入的核苷酸序列的条件下,并且根据需要收集和纯化人源化轻链、重链、轻链/重链二聚体或完整的抗体、结合片段或其他免疫球蛋白形式(Beychok,细胞免疫球蛋白的合成 (Cells of Immunoglobulin Synthesis),纽约学院出版社(Academic Press,New York),1979,将其通过引用并入本文)。

[0122] 可以根据本领域熟知的方法分离人抗体的DNA序列,特别是互补决定区(CDR)。优选地,如国际专利申请公开号WO 1987/02671中所述,从永生化的B细胞分离人CDR DNA序列。可用于产生本发明的抗体的CDR可以类似地源自编码能够结合靶分子的单克隆抗体的DNA。这样的人源化抗体可以使用熟知的方法在能够产生抗体的任何方便的哺乳动物来源中产生,包括但不限于小鼠、大鼠、骆驼、骆马、兔或其他脊椎动物。用于恒定区和框架DNA序列的合适细胞和其中表达和分泌抗体的宿主细胞可以从许多来源获得,例如维吉尼亚州马纳萨斯美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Manassas,VA)。

[0123] 产生对DKK2有反应性的特异性抗体或抗体片段的另一种方法包括筛选编码在具有DKK2蛋白或肽的细菌中表达的免疫球蛋白基因或其部分的表达文库。例如,可以使用噬菌体表达文库在细菌中表达完整的Fab片段、VH区和Fv区。参见例如Ward等人,Nature,1989,341:544-546;Huse等人,Science,1989,246:1275-1281;和McCafferty等人,Nature,1990,348:552-554。用例如DKK2肽筛选这样的文库可以鉴定与DKK2反应的免疫球蛋白片段。可选地,SCID-hu小鼠(可获自Genpharm)可用于产生抗体或其片段。

[0124] 在进一步的实施方式中,可以从使用在McCafferty等人,Nature,1990,348:552-554中描述的技术产生的抗体噬菌体文库分离抗体或抗体片段。Clackson 等人,Nature,1991,352:624-628和Marks等人,1991,222:581-597描述了使用噬菌体文库分别分离鼠和人抗体。随后的出版物描述了通过链改组(Marks 等人,BioTechnology,1992,10:779-783),以及组合感染和体内重组作为构建非常大噬菌体文库(Waterhouse等人,Nuc.Acids.Res.,1993,21:2265-2266)产生高亲和力(nM范围)的人抗体。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代物。

[0125] 还可以修饰DNA,例如,通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列代替同源鼠序

列(美国专利号4,816,567;Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1984,81:6851),或通过使免疫球蛋白编码序列共价连接非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分。通常,这种非免疫球蛋白多肽置换抗体的恒定结构域,或者它们置换抗体的一个抗原结合位点的可变结构域,以产生嵌合二价抗体,所述嵌合二价抗体具有对第一抗原具有特异性的一个抗原结合位点和对不同抗原具有特异性的另一抗原结合位点。

[0126] 已经开发了用于产生功能性抗体片段的各种技术。抗体片段可以包括抗体的可变区或抗原结合区。传统上,通过完整抗体的蛋白水解消化得到这些片段(参见例如Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1992,24:107-117以及Brennan等人,Science,1985,229:81)。然而,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,可以从上述抗体噬菌体文库中分离抗体片段。可选地,可以从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段并化学偶联以形成F(ab')₂片段(Carter等人,Bio/Technology,1992,10:163-167)。根据另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物中分离F(ab')₂片段。用于产生抗体片段的其他技术对于本领域技术人员是显而易见的。在其他实施方式中,选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185;美国专利号5,571,894;美国专利号5,587,458。抗体片段也可以是“线性抗体”,例如,例如,美国专利号5,641,870中描述的。这样的线性抗体片段可以是单特异性或双特异性的。

[0127] 抗体模拟物或“非抗体结合蛋白”通过使用非免疫球蛋白支架作为抗体可变区的替代蛋白框架,使用非免疫球蛋白支架,包括adnectins、高亲和性多聚体(avimers)、单链多肽结合分子和抗体样结合肽模拟物。(美国专利号 5,260,203;5,770,380;6,818,418和7,115,396)。已经开发了以类似于抗体的方式靶向和结合靶标的其他化合物。这些“抗体模拟物”中的某些使用非免疫球蛋白支架作为抗体可变区的替代蛋白框架。可以使用称为“抗体样结合肽模拟物”(ABiP)的用于将抗体减小为较小肽模拟物的方法,用于将抗体减小为较小肽模拟物的方法也可用作抗体的替代方案(Murali等人,Cell Mol Biol.,2003,49(2):209-216)。融合蛋白是单链多肽,包括称为“高亲和性多聚体”的多个结构域,通过体外外显子改组和噬菌体展示从人细胞外受体结构域开发,并且是一类在各种靶分子的亲和力和特异性方面与抗体有些相似的结合蛋白(Silverman等人,Nat Biotechnol,2005,23:1556-1561)。得到的多结构域蛋白可以包括多个独立的结合结构域,其与单表位结合蛋白相比可以表现出改善的亲和力(在一些情况下亚纳摩尔)和特异性。关于高亲和性多聚体的构建和使用的方法的其他细节公开于例如美国专利申请公开号 20040175756、20050048512、20050053973、20050089932和20050221384中。

[0128] 除了非免疫球蛋白框架外,还在包括但不限于RNA分子和非天然寡聚体(例如,蛋白酶抑制剂、苯并二氮杂类、嘌呤衍生物和 β -转角模拟物)的化合物中模拟抗体性质,所有这些都适用于本发明。这些的目的是通过开发用于设计定制特异性的抗体的完全体外技术来规避在动物中开发抗体的限制。

[0129] 如本领域已知的,适配体是由与特定分子靶标紧密结合的核酸组成的大分子。Tuerk和Gold(Science,1990,249:505-510)披露了用于选择适配体的 SELEX(指数富集的配体系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment))方法。在SELEX方法中,产生和/或用靶分子筛选核酸分子的大文库(例如,1015个不同分子)。然后可以进一步精制分离的适配体,以消除对靶标结合和/或适配体结构无贡献的任

何核苷酸(即,截短到其核心结合结构域的适配体)。参见,例如Jayasena,1999,Clin.Chem. 45:1628-1650对于适配体技术的综述。

[0130] 关于本发明的抗DKK2抗体的术语“中和”或短语“中和DKK2活性的抗体”意指与DKK2结合或与DKK2接触的抗体导致抑制细胞增殖活性、癌症转移、癌细胞侵入或癌细胞迁移,抑制Wnt信号传导、血管生成、促进DKK2 诱导的微环境的肿瘤形成的建立。因为DKK2分泌到细胞外并且作为癌细胞的增殖、迁移、侵入和转移的必要因子起作用,一些抗DKK2抗体可以中和这些活性。本发明中的中和抗体特别适用于治疗应用:以预防或治疗顽固性疾病癌症和癌症转移。本发明中的中和抗体可以施用至患者或与细胞接触以抑制特征在于DKK2过表达的癌症的转移。

[0131] 本发明的抗体可以通过本领域已知的任何方法评估免疫特异性结合。可使用的免疫测定包括但不限于使用以下的技术的竞争性和非竞争性测定系统:例如,蛋白质印迹、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、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、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、蛋白A免疫测定,仅举几个例子。这种测定是常规的并且是本领域熟知的(参见例如分子生物学现代方法(Current Protocols in Molecular Biology)(Ausubel等人编辑),格林出版协会(Greene Publishing Associates)和纽约约翰威立(Wiley-Interscience,New York),2002)。

[0132] 联合疗法

[0133] 当与用于治疗癌症的至少一种另外的化合物组合时,本文所述方法中鉴定的化合物也可用于本发明的方法中。另外的化合物可以包含本文鉴定的化合物或已知用于治疗、预防或减少癌症的症状和/或转移的化合物,例如市售化合物。

[0134] 在一个方面,本发明考虑本发明中有用的药剂可以与治疗剂组合使用,所述治疗剂例如抗肿瘤剂,包括但不限于化学治疗剂、免疫治疗剂、抗细胞增殖剂或其任何组合。例如,以下非限制性示例性类别的任何常规化学治疗剂包括在本发明中:烷化剂;亚硝基脲;抗代谢物;抗肿瘤抗生素;植物生物碱;紫杉烷;激素药;和混合式(miscellaneous)药剂。

[0135] 烷化剂是这样命名的,因为它们能够在细胞中存在的条件下向许多电负性基团添加烷基,从而干扰DNA复制以阻止癌细胞繁殖。大多数烷化剂是细胞周期非特异性的。在具体方面,它们通过交联DNA双螺旋链中的鸟嘌呤碱基来停止肿瘤生长。非限制性实例包括白消安、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、异环磷酰胺、盐酸氮芥、盐酸美沙拉秦、丙卡巴肼、塞替派和尿嘧啶芥。

[0136] 抗代谢物阻止在细胞周期的合成(S)期期间将碱基并入DNA,从而禁止正常发育和分裂。抗代谢物的非限制性实例包括例如5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、甲氨蝶呤和硫鸟嘌呤的药物。

[0137] 抗肿瘤抗生素通常通过干扰细胞分裂所需的酶或通过改变细胞周围的膜来阻止细胞分裂。此类中包括蒽环类,例如多柔比星,其通过破坏DNA的结构并终止其功能来阻止细胞分裂。这些药剂是细胞周期非特异性的。抗肿瘤抗生素的非限制性实例包括阿克拉霉素、放线菌素、安定霉素、重氮丝氨酸、博莱霉素、松节霉素、加利车霉素、卡霉素、卡莫西霉素、卡西林素、色霉素、更生霉素、柔红霉素、地柔红霉素、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、阿霉素、伊达比星、马赛洛霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、霉酚酸、诺加霉素、橄

榄霉素、培霉素、紫菜霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星。

[0138] 植物生物碱抑制或停止有丝分裂或抑制阻止细胞产生细胞生长所需的蛋白质的酶。常用的植物生物碱包括长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。然而，本发明不应被解释为仅限于这些植物生物碱。

[0139] 紫杉烷影响在细胞功能中是重要的称为微管的细胞结构。在正常的细胞生长中，当细胞开始分裂时形成微管，但是一旦细胞停止分裂，则微管被分解或破坏。紫杉烷禁止微管分解，使得癌细胞变得如此被微管堵塞，以致它们不能生长和分裂。非限制性的示例性紫杉烷包括紫杉醇和多西紫杉醇。

[0140] 激素剂和类激素药物用于某些类型的癌症，包括例如白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。它们常常与其他类型的化学疗法药物一起使用以增强其有效性。性激素用于改变雌性或雄性激素的作用或产生，并用于减缓乳腺癌、前列腺癌和子宫内膜癌的生长。抑制这些激素的产生（芳香酶抑制剂）或作用（他莫昔芬）通常可用作治疗的辅助。一些其他肿瘤也是激素依赖性的。他莫昔芬是激素剂的非限制性实例，其干扰促进乳腺癌细胞生长的雌激素的活性。

[0141] 混合式药剂包括化学治疗剂，例如博莱霉素、羟基脲、L-天冬酰胺酶和丙卡巴肼。

[0142] 化学治疗剂的其他实例包括但不限于以下及其药学上可接受的盐、酸和衍生物：氮芥例如苯丁酸氮芥、氯氮平、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氮芥氧化物、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲洛磷胺、尿嘧啶芥子；亚硝基脲例如卡莫司汀、氯卓卡星、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀；嘌呤类似物例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫柳宁、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物例如阿扎他滨、阿扎胞苷、6-氮尿嘧啶、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、脱氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU；雄激素例如卡鲁斯特、丙酸色丙酸托烷酯、表薄甾烷醇、美雄烷、睾内酯；抗肾上腺药例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦；叶酸补充剂例如亚叶酸；醋葡醛内酯；醛磷酰胺糖苷；氨基乙酰丙酸；安吖啶；贝伐单抗；比生群；依达曲沙；地磷酰胺（defofamine）；地美可辛；地吖醌；依洛尼塞；依利醋铵（elliptinium acetate）；依托格鲁；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖；氯尼达明；米托胍脲；米托蒽醌；莫匹达莫；硝唑兰；喷司他丁；苯来美特；吡柔比星；鬼臼酸；2-乙基肼；丙卡巴肼；PSK@雷佐生；西佐呋喃；锗螺胺；丝裂酸；三唑酮；2,2',2''-三氯三乙胺；氨基甲酸乙酯；长春地辛；达卡巴嗪；甘露醇氮芥；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；哌泊溴烷；gacytosine；阿糖胞苷（“Ara-C”）；环磷酰胺；塞替哌；紫杉烷，例如太平洋紫杉醇（TAXOLO, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）和多西他赛（TAXOTERE, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-巯鸟嘌呤；巯基嘌呤；甲氨蝶呤；铂类似物例如顺铂和卡铂；长春花碱；铂；依托泊苷（VP-16）；异环磷酰胺；丝裂霉素C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本；诺安托；替尼泊苷；道诺霉素；氨基蝶呤；塞罗达；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸（DMFO）；视黄酸；埃斯波霉素；和卡培他滨。

[0143] 抗细胞增殖剂可以进一步定义为凋亡诱导剂或细胞毒性剂。凋亡诱导剂可以是粒酶、Bcl-2家族成员、细胞色素C、半胱天冬酶或其组合。示例性粒酶包括粒酶A、粒酶B、粒酶C、粒酶D、粒酶E、粒酶F、粒酶G、粒酶H、粒酶I、粒酶J、粒酶K、粒酶L、粒酶M、粒酶N或其组合。在其他具体方面，Bcl-2家族成员是例如Bax、Bak、Bcl-Xs、Bad、Bid、Bik、Hrk、Bok或其组合。

[0144] 在另外的方面,半胱天冬酶为半胱天冬酶-1、半胱天冬酶-2、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-4、半胱天冬酶-5、半胱天冬酶-6、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-10、半胱天冬酶11、半胱天冬酶12、半胱天冬酶-13、半胱天冬酶-14或其组合。在具体方面,细胞毒性剂是TNF- α 、白树毒素、促红细胞生成素、核糖体抑制蛋白(RIP)、假单胞菌外毒素、艰难梭菌毒素B、幽门螺杆菌VacA、小肠结肠炎耶尔森氏菌YopT、维生素E、二亚乙基三胺五乙酸、伊洛福芬(Irofulven)、白喉毒素、米托洁林(mitogillin)、蓖麻毒素、肉毒杆菌毒素、霍乱毒素、皂草素6或其组合。

[0145] 免疫治疗剂可以是但不限于白细胞介素-2或其他细胞因子,程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)信号传导的抑制剂,例如结合PD-1的单克隆抗体,易普利姆玛。免疫治疗剂还可以阻断细胞毒性T淋巴细胞相关抗原A-4(CTLA-4)信号传导,并且其还可以涉及癌症疫苗和基于树突状细胞的治疗。

[0146] 免疫治疗剂还可以是通过细胞因子治疗或通过过继细胞疗法和/或通过造血干细胞移植转移外源细胞而被活化和扩增的NK细胞。适合于过继细胞疗法的NK细胞可以源自不同来源,包括自体NK细胞的离体扩增,来自外周血的未刺激或扩增的同种异体NK细胞,来自外周血和脐带血的CD34+造血祖细胞和NK细胞系。表达嵌合抗原受体或细胞因子的遗传修饰的NK细胞也包括在本发明中。用于本发明的另一种免疫治疗剂是基于过继T细胞疗法(ACT)的药剂,其中给患者施用肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。施用的T细胞可以被遗传工程化以表达肿瘤特异性抗原受体,例如以非主要组织相容性(MHC)限制的方式识别细胞表面抗原的嵌合抗原受体(CAR)或者它们可以是传统的 $\alpha\beta$ TCR,其识别由MHC分子呈递的细胞内抗原的表位。

[0147] 药物组合物和制剂

[0148] 本发明设想了包含DKK2消耗剂的药物组合物用于本发明方法的用途。

[0149] 这样的药物组合物是处于适于施用至对象的形式,或者药物组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受的载体、一种或多种另外的成分或这些的一些组合。药物组合物的各种组分可以以生理学上可接受的盐的形式存在,例如与生理上可接受的阳离子或阴离子组合,如本领域所熟知的。

[0150] 在一个实施方式中,可以施用可用于实施本发明的方法的药物组合物以递送1ng/kg/天和100mg/kg/天之间的剂量。在另一个实施方式中,可以施用可用于实施本发明的药物组合物以递送1ng/kg/天和500mg/kg/天之间的剂量。

[0151] 本发明的药物组合物中活性成分、药学上可接受的载体和任何另外的成分的相对量将根据所治疗的对象的身份、大小和状况而变化,并且还取决于施用组合物的途径而变化。举例来说,组合物可以包含在0.1%与100%(w/w)之间的活性成分。

[0152] 可用于本发明方法的药物组合物可适当地开发用于吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、外部、经皮、肺部、鼻内、含服、眼部、鞘内、静脉内或其他给药途径。其他考虑的制剂包括投射的纳米颗粒(projected nanoparticle)、脂质体制剂、含有活性成分的再密封的红细胞和基于免疫的制剂。给药途径(一种或多种)对于本领域技术人员是显而易见的,并且取决于许多因素,包括所治疗的疾病的类型和严重性、所治疗的兽医或人患者的类型和年龄等。

[0153] 本文所述的药物组合物的制剂可以通过药理学领域已知的或以后开发的任何方

法制备。通常,这种制备方法包括使活性成分与载体或一种或多种其他辅助成分缔合的步骤,然后如果必要或需要,将产品成形或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

[0154] 如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将施用至对象的活性成分的剂量或这种剂量的合宜分数,例如这样剂量的一半或三分之一。单位剂型可以是单日剂量或多日剂量之一(例如,每天约1至4次或更多次)。当使用多日剂量时,对于每个剂量,单位剂型可以相同或不同。

[0155] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要涉及适合于对人进行伦理给药的药物组合物,但是本领域技术人员应当理解,这样的组合物通常适于施用至各种动物。对适于施用至人的药物组合物修饰以使该组合物适于施用至各种动物是众所周知的,且普通技术的兽医药理学家可以仅使用普通(如果有的话)实验设计和进行这种修饰。考虑施用本发明的药物组合物的对象包括但不限于人和其他灵长类动物、哺乳动物,包括商业上相关的哺乳动物,例如牛、猪、马、绵羊、猫和狗。

[0156] 在一个实施方式中,使用一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体配制组合物。在一个实施方式中,药物组合物包含治疗有效量的DKK2消耗剂和药学上可接受的载体。可用的药学上可接受的载体包括但不限于甘油、水、盐水、乙醇和其他药学上可接受的盐溶液,例如磷酸盐和有机酸盐。这些和其他药学上可接受的载体的实例描述于雷明顿药学大全(Remington's Pharmaceutical Sciences),1991,新泽西马克出版有限公司(Mack Publication Co.,New Jersey)中。

[0157] 载体可以是溶剂或分散介质,包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们适当的混合物以及植物油。恰当的流动性可以被维持,例如通过应用包衣例如卵磷脂,通过在分散体的情况下维持所需的颗粒大小,以及通过应用表面活性剂。阻止微生物的作用可以通过不同的抗菌剂以及抗真菌剂,例如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等等来实现。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、氯化钠或多元醇例如甘露醇和山梨醇。可注射的组合物的延长吸收可以通过将延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝或明胶包括在组合物中而造成。

[0158] 制剂可以与常规赋形剂,即适合于口服、胃肠外、鼻部、静脉内、皮下、肠内或本领域已知的任何其他合适的给药方式的药学上可接受的有机或无机载体物质的混合物一起使用。可以将药物制剂灭菌,并且如果希望的话,与助剂混合,所述助剂例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等。它们也可以根据需要进行与其他活性剂例如其他止痛剂组合。

[0159] 本发明的组合物可包含占组合物总重量约0.005%至2.0%的防腐剂。防腐剂用于阻止在暴露于环境中的污染物的情况下的腐败。根据本发明有用的防腐剂的实例包括但不限于选自苯醇、山梨酸、对羟基苯甲酸酯、亚胺脲及其组合的那些。特别优选的防腐剂是约0.5%至2.0%的苯醇和0.05%至0.5%的山梨酸的组合。

[0160] 组合物优选包含抑制化合物降解的抗氧化剂和螯合剂。对于一些化合物,优选的抗氧化剂是BHT、BHA、 α -生育酚和抗坏血酸,其优选范围为组合物总重量的约0.01%至0.3%,更优选BHT范围为0.03%至0.1%。优选地,螯合剂以组合物总重量的0.01%至0.5%的量存在。特别优选的螯合剂包括按组合物总重量计约0.01-0.20%,更优选0.02-0.10%重量范围的依地酸盐(例如依地酸二钠)和柠檬酸。螯合剂可用于螯合组合物中可能对制剂

的保存期限有害的金属离子。虽然BHT和乙二胺四乙酸二钠是分别对于一些化合物特别优选的抗氧化剂和螯合剂,但是如本领域技术人员已知的,其他合适和等效的抗氧化剂和螯合剂因此可能被置换。

[0161] 施用/给药

[0162] 施用方案可影响有效量的组成。例如,治疗制剂可在与癌症相关的外科手术之前或之后,或在患者被诊断患有癌症之后不久施用至患者。此外,可以每天施用或者顺序地施用若干分次剂量以及交错剂量,或者剂量可以连续地输注、或者可以是单次快速静脉注射。此外,治疗制剂的剂量可按比例地增加或减少,如治疗或预防情况的紧急情况所指示的。

[0163] 给患者,优选哺乳动物,更优选人施用本发明的组合物可以使用已知的程序,以有效治疗患者癌症的剂量和时间进行。实现治疗效果所需的治疗化合物的有效量可以根据以下因素而变化:例如所使用的具体化合物的活性;给药时间;化合物的排泄速率;治疗的持续时间;其他药物,与化合物组合使用的化合物或材料;所治疗患者的疾病或病症的状态、年龄、性别、体重、状况、一般健康和在先病史,以及医学领域中熟知的类似因素。可对剂量方案加以调节,以提供最优治疗应答。例如,可每日施用数个分开的剂量或可按治疗情形紧迫程度所指示的成比例减少剂量。本发明的治疗化合物的有效剂量范围的非限制性实例为约0.01至50mg/kg体重/每天。本领域普通技术人员将能够研究相关因素并且在不进行过度实验的情况下确定治疗化合物的有效量。

[0164] 化合物可以以每天几次的频率施用至动物,或者可以更低频率地施用,例如每天一次,每周一次,每两周一次,每月一次或甚至更低频率,例如每几个月一次或甚至每年一次或更少。应当理解,在非限制性实例中,可以每天,每隔一天,每2天,每3天,每4天或每5天施用每天剂量化合物的量。例如,对于每隔一天的给药,可以在周一开始5mg/天的剂量,在周三施用第一后续的5mg/天剂量,在周五施用第二后续5mg/天剂量,等等。剂量的频率对于本领域技术人员是显而易见的,并且取决于许多因素,例如但不限于所治疗的疾病的类型和严重性,以及动物的类型和年龄。在本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变以此获得用于具体患者、组合物,以及施用模式的有效达到所希望的治疗应答的活性成分的量,不对患者具有毒性。具有本领域普通技术的医生,例如医师或兽医,可以容易地确定和开出所需的药物组合物的有效量。例如,医生或兽医可以以水平低于为了实现所需疗效需要的剂量开始在药物组合物中采用的本发明的化合物的剂量,且逐步增加剂量直至实现所需效果。

[0165] 在具体实施方式中,特别有利的是以容易施用和剂量均匀性的剂量单位形式配制化合物。如本文所用的剂量单位形式指适宜作为待治疗患者的单一剂量的物理上分离的单位;每个单位含有经计算产生与所需药用载体相关的所需治疗效应的药物化合物的预先确定的量。本发明的剂量单位形式由以下因素决定并直接取决于以下因素:(a) 治疗化合物的独特特征和要实现的特定治疗效果,以及(b) 混配/配制这样的用于治疗患者的癌症的治疗化合物领域固有的限制。

[0166] 给药途径

[0167] 本领域技术人员将认识到,尽管可以使用多于一种途径用于给药,但是特定途径可以提供比另一种途径更直接和更有效的反应。

[0168] 本发明的任何组合物的给药途径包括吸入、口服、鼻部、直肠、肠胃外、舌下、经皮、

经粘膜(例如,舌下、舌部、(经)颊部、(经)尿道、阴道(例如,经阴道和阴道内)、(经)鼻部和(经)直肠)、膀胱内、肺内、十二指肠内、胃内、鞘内、皮下、肌肉内、皮肤内、动脉内、静脉内、支气管内、吸入和外部给药。合适的组合物和剂型包括例如片剂、胶囊、囊剂、丸剂、软胶囊(gel cap)、含片、分散体、悬浮液、溶液、糖浆、颗粒、珠粒、经皮贴剂、凝胶、粉末、弹丸剂、浆剂、锭剂、乳霜、糊剂、膏剂、洗剂、盘剂、栓剂、用于鼻或口服给药的液体喷雾剂、用于吸入的干粉或气雾化制剂、用于膀胱内给药的组合物和制剂等。应当理解,可用于本发明的制剂和组合物不限于本文所述的具体制剂和组合物。

[0169] 控释制剂和药物递送系统

[0170] 本发明的药物组合物的控释或缓释制剂可以使用常规技术制备。在一些情况下,待使用的剂型可以作为一种或多种活性成分的缓释或控释而提供,其中使用例如羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、凝胶、可渗透膜、渗透系统、多层包衣、微粒、脂质体或微球体或其组合,以提供不同比例的所需释放曲线。本领域普通技术人员已知的合适的控释制剂,包括本文所述的那些,可以容易地选择用于本发明的药物组合物。因此,适合于口服给药的单一单位剂型,例如适于控释的片剂、胶囊、软胶囊和囊剂,包括在本发明中。

[0171] 大多数控释药品都具有相对其非控释相应物改进药物治疗的共同目标。理想的是,在医学治疗中所设计的最佳的控释制剂的用途其特征为采用最小量的药物物质在最少量的时间内治愈或控制病况。控释制剂的优点包括延长药物活性、减少给药频率和增加患者顺应性。此外,控释制剂可用于影响作用开始的时间或其他特征,例如药物的血液水平,因此可影响副作用的发生。

[0172] 免疫应答刺激

[0173] 在一个实施方式中,本发明包括通过给对象施用有效量的DKK2抗体或其片段与药学上可接受的载体来提供抗肿瘤免疫性和刺激T细胞介导的免疫应答的方法。

[0174] 活化T淋巴细胞(T细胞)及其在免疫疗法中用于治疗癌症和感染性疾病的用途是本领域众所周知的(Melief等人,Immunol.Rev.,1995,145:167-177; Riddell等,Annu.Rev.Immunol.,1995,13:545-586)。如本发明中所披露的,DKK2的消除导致CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的活化和肿瘤的抑制。

[0175] 用于CTL活化的标记物可以是但不限于细胞毒素例如穿孔素、粒酶和颗粒溶素、细胞因子、IL-2、IL-4、CD25、CD54、CD69、CD38、CD45RO、CD49d、CD40L、CD137、CD134。如本文实施例部分所述,样品中这些标记物中至少一种的水平的测量可用于评估CTL活化。T细胞或通常本发明的任何细胞的分选可以使用多种市售的细胞分选机中的任何一种进行,分选机包括但不限于MoFlo分选机(DakoCytomation,Fort Collins,Colo.)、FACS AriaTM、FACSArrayTM、FACSVantageTM、BDTM LSR II、和FACSCaliburTM(BD Biosciences, San Jose, Calif.)。

[0176] 血管生成

[0177] 血管生成是生长和发育中以及伤口愈合和肉芽组织形成中的正常且重要的过程。血管生成的正常调节由诱导血管形成的因素和停止或抑制该过程的因素之间的精细平衡决定。当这种平衡被破坏时,其通常导致病理性血管生成,这导致血管形成增加。病理性血管生成是癌症和各种缺血性和炎症疾病(例如心血管疾病)的标志。由于肿瘤不能生长超过一定大小或没有血液供应而扩散,阻断肿瘤血管生成是抗癌疗法中的有效方法。还使用

本领域已知为与治疗缺血性和炎性疾病相关的血管生成抑制剂,也称为抗血管生成剂。在本发明的一个实施方式中,DKK2消耗剂是阻止或减缓癌症生长的血管生成抑制剂。在另一个实施方式中,DKK2消耗剂是预防或治疗缺血性和炎性疾病的抗血管生成剂。炎性疾病的非限制性实例是心血管疾病、动脉粥样硬化和类风湿性关节炎。

[0178] 诊断和治疗

[0179] 在一个实施方式中,本发明涉及诊断对象中癌症或发展癌症或转移的倾向的方法。方法包括测定来自对象的生物样品中DKK2基因的表达水平,其中与正常对照DKK2表达水平相比,DKK2表达水平的增加表明对象患有癌症或具有发展癌症或转移的倾向。

[0180] 在另一个实施方式中,本发明涉及用于测定免疫疗法治疗在有需要的对象中治疗癌症的功效的方法。方法包括测定来自对象的生物样品中DKK2基因的表达水平,其中与正常对照中DKK2的表达水平相比,DKK2的表达水平的增加是免疫疗法有效的表示。在本发明的一些方面,癌症的治疗可以包括实体瘤的治疗或转移的治疗。转移是癌症的一种形式,其中转化的或恶性的细胞将癌症从一个位点传播并扩散到另一个位点。这些癌症包括皮肤、乳腺、脑、宫颈、睾丸等的癌症。更具体地,癌症可包括但不限于以下器官或系统:心脏、肺、胃肠、泌尿生殖道、肝、骨骼、神经系统、妇科、血液、皮肤和肾上腺。更具体地,本文的方法可用于治疗神经胶质瘤(神经鞘瘤、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤)、神经母细胞瘤、嗜铬细胞瘤、副神经节瘤、脑膜瘤、肾上腺皮质癌、肾癌、各种类型的血管癌、成骨细胞性骨癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫平滑肌瘤、唾液腺癌、脉络丛癌、乳腺癌、胰腺癌、结肠癌和巨核细胞白血病。皮肤癌包括恶性黑素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波氏肉瘤、发育异常性痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、瘢痕疙瘩和牛皮癣。

[0181] 所关注基因(DKK2)的表达的对照标准量

[0182] 本发明的方法包括将来自对象的生物样品中测量的DKK2表达量与 DKK2表达的对照量(即,参比)进行比较。

[0183] 在一个实施方式中,DKK2的标准对照表达水平可以通过测量健康对象中DKK2的表达水平来获得。优选地,健康对象是相似年龄、性别和种族的对象,并且从未被诊断有任何类型的严重疾病,特别是任何类型的癌症。

[0184] 在另一个实施方式中,DKK2的表达的对照量是本领域接受的DKK2的表达的值。此参比值可以是基于DKK2表达的平均值通过应用标准统计学方法对一组对象计算的基线值。

[0185] 在一个实施方式中,通过选自以下的方法测定表达水平:检测基因的 mRNA、检测由基因编码的蛋白质、以及检测由基因编码的蛋白质的生物活性。

[0186] 在本发明的某些方面,在来自对象的样品中测定DKK2的表达水平。样品优选包括肿瘤细胞、来自肿瘤细胞周围的任何流体(即,白血病血液、肿瘤组织等)或与肿瘤生理接触或接近的任何流体,或除了本文所述那些之外的任何其他体液也应被认为包括在本发明中。

[0187] 测量方法

[0188] 可以使用本领域技术人员已知的任何方法来测定DKK2表达的水平。例如,可以使用微阵列。微阵列在本领域中是已知的,并且由与基因产物(例如mRNA、多肽、其片段等)在序列上对应的探针可以特异性杂交或结合到已知位置的表面组成。为了检测至少一种关注基因,通过使测试样品与至少一种核酸探针接触来形成杂交样品。用于检测DKK2的优选探

针是能够与 DKK2mRNA 杂交的标记的核酸探针。核酸探针可以是例如全长核酸分子或其部分,例如长度为至少10、15或20个核苷酸的寡核苷酸,并且足以在严格条件下与合适的靶标特异性地杂交。将杂交样品保持在足以允许核酸探针与感兴趣的靶标特异性杂交的条件下。特异性杂交可以在高严格条件或中等严格条件下进行,视情况而定。在优选的实施方式中,用于特异性杂交的杂交条件是高严格性条件。然后使用标准方法检测特异性杂交(如果存在的话)。如果在核酸探针和测试样品中的基因之间发生特异性杂交,则存在于核酸探针中的序列也存在于对象的mRNA中。也可以使用多于一种核酸探针。由扫描仪检测的杂交强度数据由Affymetrix微阵列套件(Affymetrix Microarray Suite) (MASS) 软件自动获取和处理。使用150的目标强度将原始数据标准化为表达水平。测量少量不同基因的mRNA表达谱的替代方法是通过例如经典的**TaqMan®**基因表达分析或**TaqMan®**低密度阵列-微流体卡(应用生物系统公司(Applied Biosystems))。特别地,本发明优选利用qPCR系统。非限制性实例包括商业试剂盒,例如可从伯乐公司(Bio-rad)(加利福尼亚州伯克利(Berkley, California))商购的**PrimePCRPathways®**。

[0189] 样品——特别是mRNA——的转录状态也可以通过本领域已知的其他核酸表达技术测量。可以使用本领域技术人员已知的任何方法从样品中分离mRNA。非限制性实例包括商业试剂盒,例如可从Qiagen(荷兰)购得的**RNeasy®**或可从分子研究中心有限公司(Molecular Research Center, Inc.) (俄亥俄州辛辛那提(Cincinnati, Ohio))购得的Mini Kit the **TRI Reagent®**,其可用于分离RNA。通常,可以使用本领域已知的方法扩增所分离的mRNA。利用例如PCR或RT-PCR方法的扩增系统是本领域技术人员已知的。对于扩增技术的一般概述,参见例如Dieffenbach等人,PCR引物:实验室手册(PCR Primer: A Laboratory Manual),纽约冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)(1995)。

[0190] 另一种用于分析mRNA表达的精确方法可以使用下一代测序(NGS),包括第一、第二、第三以及后续的下一代测序技术。

[0191] 在本发明的其他方面,通过本领域中用于测定样品中肽或多肽的量的所有已知方法,可以实现测定肽、多肽的量或检测其生物活性。这些装置包括可以利用各种夹心、竞争或其他测定形式的标记分子的免疫测定装置和方法。这样的测定将产生指示肽或多肽的存在或不存在的信号。此外,信号强度可以优选地与样品中存在的多肽的量直接或间接(例如反比例)相关。进一步合适的方法包括测量肽或多肽特异性的物理或化学性质,例如其精确的分子质量或NMR谱。所述方法优选包括生物传感器、与免疫测定偶联的光学装置、生物芯片、分析装置例如质谱仪、NMR分析仪或色谱装置。此外,方法包括基于微板ELISA的方法、全自动或机器人免疫测定(例如可在ElecsysTM分析仪上获得)、CBA(酶促结合测定,例如可在Roche-HitachiTM分析仪上获得)和乳胶凝集测定(例如可在Roche-HitachiTM分析仪上获得)。

[0192] 试剂盒

[0193] 本发明包括一组优选的抗体,被标记(例如,荧光剂,淬灭剂等)或未标记的,其可用于检测至少DKK2。

[0194] 在某些实施方式中,提供了试剂盒。鉴于本说明书,用于这些方法的市售试剂盒是本领域技术人员已知的。通常,试剂盒将包含适合于检测所关注的多肽或核酸或mRNA的存

在的检测试剂。

[0195] 在另一个实施方式中,存在一组探针组或抗体。在一些实施方式中,该组抗体包含靶向DKK2表位的中和性DKK2抗体,所述DKK2表位包含选自KLNSIKSSLGGETPG (SEQ ID NO 1)、CKVWKDATYSSKAR (SEQ ID NO 5) 和CARHFWTKIC (SEQ ID NO 7) 的氨基酸序列中的至少一种。在一些实施方式中,探针组的组被设计为检测DKK2的水平并提供关于癌症诊断或发展癌症或转移的倾向的信息。探针组是特别有用的,因为它们比意欲在特定基因组中检测尽可能多的肽的探针组更小且更便宜。在本发明中,探针组靶向于检测对癌基因有信息的多肽。探针组还可以包含大量或少量探针,其检测对于癌症没有信息的肽。此类探针可用作对照和用于标准化(例如,掺入标记物)。探针组可以是干混合物或溶液中的混合物。在一些实施方式中,探针组可以固定在固体基底上以形成探针阵列。探针可以是抗体或核酸(例如, DNA、RNA、DNA和RNA的化学修饰形式)、LNA (锁定的核酸) 或PNA (肽核酸) 或能够与关注的肽或核酸序列特异性相互作用的任何其他聚合化合物。

[0196] 考虑试剂盒可以设计用于分离和/或检测基本上任何样品(例如,白血病血液、肿瘤细胞、肿瘤组织等)中的肽(例如DKK2、已知的癌症标记物、免疫激活剂或凋亡蛋白)或核酸序列,并且鉴于本说明书,多种试剂和方法是本领域已知的。

[0197] 实施例

[0198] 现在参考以下实施例描述本发明。提供这些实施例仅是出于说明的目的,并且本发明决不应该被解释为局限于这些实施例,而是应该被解释为涵盖由于在此所提供的教导而变得明显的任何以及所有变化。

[0199] 无需进一步描述,相信本领域普通技术人员可以使用前述说明和以下说明性实施例制备和利用本发明的化合物并实施要求保护的方法。因此以下工作实施例特别指出本发明的优选实施方式,且不应理解为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0200] 实施例1:遗传DKK2缺失导致APC^{Min/+}小鼠中肿瘤负荷降低。

[0201] 将APC^{Min/+}小鼠(称为APC)和APC^{Min/+}DKK2^{-/-}(APCKO)小鼠饲养在无特定病原体的动物房中。在不存在DKK2的情况下,肿瘤进展显著减少,如由较低的肿瘤数目和大小所指示的(图1A和1B)。相应地,肿瘤诱导的异常,例如脾肿大、胸腺萎缩和淋巴细胞减少(You, S., 等人, Int J Exp Pathol, 2006. 87 (3) :p.227-36) 在APCKO小鼠中显著较低。这种现象在高和低脂肪饮食的雄性和雌性小鼠组中观察到,具有一致的结果。总之,这些数据强烈地表明,在DKK2不存在的情况下,结肠癌进展显著更低。由于一些研究已将DKK2 与肿瘤细胞增殖的增加或减少相关联(Hirata, H., 等人, Clin Cancer Res, 2009.15 (18) :p.5678-87; Hauer, K., 等人, Cancer Res, 2013.73 (2) :p.967-77), 针对潜在参与促进增殖,测试DKK2。在该研究中,在24小时后用重组DKK2 (rDKK2) 治疗小鼠结肠癌MC38细胞(Mayo Clinic), 然后使用ATPlite试剂盒(PerkinElmer) 和血细胞计数器(图2) 测量对细胞增殖的影响。数据显示rDKK2不影响MC38细胞的增殖。用其中和抗体的DKK2中和也不改变 MC38增殖(未示出)。APC和APCKO小鼠对Ki67表达(与细胞增殖相关的蛋白质)的组织学分析也显示肿瘤或正常区域的增殖没有显著差异。

[0202] 实施例2:缺乏DKK2增加CD8⁺活化,而对其他白细胞亚群或标记物没有显著影响。

[0203] 为了测试DKK2表达是否可以改变肿瘤微环境以产生适当的抗肿瘤免疫应答,分析肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的水平和抗肿瘤活性。由于它们的肿瘤的性质,APC小鼠提供了研

究肿瘤区域并将其与邻近正常区域进行比较的独特机会。包括测量CD4 (IL-2、IFN γ 、TNF α 、CD25、CD69、FoxP3) 细胞的水平、活化标记物和细胞因子产生以及MDSC的一些抑制性质(精氨酸酶和 iNOS功能)的分析显示APC与APCKO小鼠没有差异。还分析了其他器官例如派伊尔淋巴集结(PP)、脾、肠系膜淋巴结(MLN)、固有膜、胸腺和骨髓,并且没有观察到显著差异。

[0204] 免疫系统的主要抗肿瘤活性之一包括肿瘤反应性CD8⁺T细胞的细胞毒性活性(Waldner等人,World J Gastroenterol,2006.12(45):第7233-8页)。CTL 通过在MHC I内识别它们的同源抗原,靶向肿瘤细胞并释放细胞毒性化合物例如gzmb(Naito,Y等人,Cancer Res,1998.58(16):第3491-4页)。作为丝氨酸蛋白酶的gzmb的摄取导致半胱天冬酶的蛋白水解活化、Bid的切割、DNA 的断裂和靶细胞中凋亡的诱导(Thomberry等人,J Biol Chem,1997.272(29):第 17907-11页;Heusel等人,Cell,1994.76(6):第977-87页)。APC和APCKO 小鼠中的TIL的分析揭示了gzmb⁺和CD69⁺(另一种CD8⁺活化标记物)CD8 细胞的百分比的显著增加(图3A)。几种亚型的CD8⁺T细胞浸润肠肿瘤;发现CD8⁺ab⁺细胞在gzmb表达中具有最显著的差异(数据未显示)。APCKO的 CD8 TIL中增加的gzmb表达与在TUNEL测定中检测到的其肿瘤中较高水平的凋亡细胞一致(图5)。对APC小鼠的淋巴系统的进一步分析显示在18周龄的PP的CD8⁺细胞中显著更高水平的gzmb表达(图3B)。还分析了其中几乎不可见息肉的11周龄小鼠的PP中的CD8⁺活化。观察到来自APCKO的PP 中的gzmb表达比来自APC的PP中的显著增加(图4)。还分析了几个其他淋巴器官的gzmb表达(即MLN、脾和腹股沟LN),但没有观察到差异。

[0205] 实施例3:肠、非造血DKK2主要负责KO小鼠中的表型。

[0206] 先前报道DKK2在肠上皮细胞中表达(Li等人,Proc Natl Acad Sci U S A. 2012.109(28):p.11402-7)。为了确定DKK2在肠上皮细胞中而不是在免疫/造血细胞中的表达是否可能是来自PP的CD8⁺活性降低的主要原因,进行了两个以下实验:

[0207] A) 肠特异性、条件性DKK2.KO小鼠的产生:产生在DKK2两侧加入loxP 位点的(DKK2-floxed)小鼠并将其与APC小鼠(指定为APC-V-KO和APC 的后代)育种的他莫昔芬诱导性绒毛-cre小鼠杂交。实际上,与PP CD8细胞中的APC小鼠相比,在他莫昔芬治疗的11周龄APC-V-KO上检测到增加的 gzmb和CD69表达(图7)。

[0208] B) BM过继转移:为了排除免疫细胞中DKK2表达调节CD8⁺T细胞活性的可能性,照射WT/KO小鼠并进行来自CD45.1⁺小鼠的BM过继转移。在 APCKO小鼠的PP的CD45.1⁺CD8⁺细胞中增加的gzmb表达水平(图6)与 DKK2来源是非造血的可能性一致。

[0209] 实施例4:靶向肠/结肠癌中的DKK2具有治疗益处。

[0210] DKK2是分泌的,并且是用抗体(Ab)靶向以减少肿瘤负荷的合适候选物。虽然DKK2对于眼睑发育是重要的(Gage等人,Dev Biol,2008.317(1):p. 310-24),但不知道在成年小鼠中具有生命攸关的功能。本发明披露了三种新的Ab的克隆(YAL008-1-5F8、YAL008-5-1A10和YAL008-7 1A10;图11),其对DKK2而非DKK1(图8A)具有高度特异性,其中和DKK2并抑制其 Wnt拮抗剂功能(图8B)。在初步测试中,APC小鼠(8周龄)腹膜内注射 YAL008-1-5F8、YAL008-5-1A10、YAL008-7 1A10或IgG。8周后,评价其肠肿瘤,观察到a-Dkk2ab治疗的小鼠的肿瘤数目和体积的显著减少,伴随较低的肿瘤诱导的免疫异常(图9A和9B)。治疗对体重几乎没有影响,表明其可能不引起显著的副作用(图9C)。结果表明在结肠癌小鼠模型中在所有DKK2 缺失时显著的肿瘤/息肉减少。这与这些小鼠中PP CD8⁺细胞中增加的gzmb 表达

一致(图10)。同时,这些结果表明开发了功能抗体(Ab),其可以靶向及中和DKK2并降低APC小鼠中的肿瘤负荷,为靶向DKK2的治疗应用提供主要证据的证明。gzmb表达的这种差异是APCKO小鼠中减少的肿瘤/息肉负荷的重要促成因素。因此,本文提供的数据突出了DKK2在肠/结肠癌进展中的关键作用。

[0211] 实施例5:在结肠癌细胞的移植小鼠模型中靶向DKK2显示DKK2是调节肿瘤性状和微环境的重要参与者。

[0212] 来源于C57BL小鼠中的小鼠结肠癌的MC38细胞在移植到具有免疫活性的WT C57BL小鼠时进展非常快。因此,此异种移植模型充当侵略性晚期肿瘤模型的良好替代物,其可用于测试a-Dkk2 Ab用于治疗晚期癌症的潜力。在一项研究中,用MC38细胞移植C57BL小鼠(每组n=5)。六天后,通过腹膜内(IP)途径用小鼠IgG或a-Dkk2 Ab(YAL008-1-5F8)以8mg/kg治疗小鼠。图13A显示YAL008-1-5F8显著抑制肿瘤生长。肿瘤切片的免疫染色揭示YAL008-1-5F8增加肿瘤细胞凋亡和粒酶B阳性细胞(图13B)。重要的是,浸润到这些移植的肿瘤中的白细胞的流式细胞分析显示CD45、NK、CD8⁺、骨髓细胞或CD4的数目没有差异,但是YAL008-1-5F8治疗导致粒酶B阳性CD45阳性白细胞——包括粒酶B阳性NK和CD8⁺细胞——的显著增加(图14)。这些结果与遗传模型研究一致,DKK2中和通过涉及效应子免疫细胞的调节的机制抑制肿瘤形成。

[0213] 图15显示,抗DKK2抗体的较长期治疗导致使用MC38细胞的同种异体移植模型中肿瘤形成的进一步减少。此外,所述抗体显示对抑制肿瘤形成的依赖于ose的效应。除了用抗体(YAL008-1-5F8)治疗的肿瘤中的粒酶B阳性细胞和肿瘤细胞凋亡的增加之外,较长的治疗还导致CD8⁺T细胞的增加以及肿瘤血管生成和增殖的减少(图16)。

[0214] 实施例6:在晚期结肠直肠癌模型中靶向DKK2。

[0215] 虽然APC小鼠是最成熟的小鼠模型之一,但是它们的息肉很少转化为癌。为了研究在具有产生肿瘤而不仅是息肉的更强致癌突变的结肠癌模型中靶向DKK2,培育了几种小鼠品系:C57BL/6APC^{tm1Tyj/J}小鼠、B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J}小鼠和villin-CreER2小鼠。他莫昔芬在5周龄时注射。3组小鼠(n=5)用200μg YAL008-1-5F8/YAL008-5-1A10/IgG从第9周开始每72小时治疗直到第18周。将它们的肠固定,分离PP用于FACS分析和肿瘤负荷评估。还收集脾脏、胸腺和血液,用于分析淋巴细胞减少(B/T细胞)。肿瘤评估后,处理肠以进行组织学评估。与IgG治疗的小鼠相比,结果应该显示在YAL008-1-5F8和YAL008-5-1A10治疗的小鼠中肿瘤数目和体积减少。此外,检测到PP的CD8⁺细胞中更高水平的gzmb。

[0216] 实施例7:在具有确立的息肉和肿瘤的APC小鼠中靶向DKK2。

[0217] 用200μg YAL008-1-5F8、YAL008-5-1A10或IgG,对16周龄的购买的APC小鼠(完全发育的息肉/肿瘤)进行治疗,每72小时,持续5周。在终点天,如先前在实施例7中所述收集数据。应观察到用a-DKK2 Ab治疗的小鼠的肿瘤负荷(数量和体积)的显著降低。也应检测到其PP CD8⁺细胞中更高水平的gzmb。

[0218] 实施例8:促进肿瘤生长的DKK2来源的研究。

[0219] 为了研究肿瘤产生的DKK2在肿瘤形成中的作用,对一组小鼠注射DKK2-shRNA-MC38细胞,而另一组注射对照-ShRNA-MC38细胞。DKK2 shRNA将DKK2表达降低超过一半(图17,左图)。DKK2-shRNA-MC38细胞在移植模型中比对照-ShRNA-MC38细胞显示显著较慢的肿瘤形成(图17,中间图)。重要的是,在用DKK2-shRNA-MC38细胞移植的肿瘤中,粒酶B阳性细

胞和凋亡细胞增加(图17,右图)。

[0220] 为了研究来自宿主的DKK2的作用,我们将MC38细胞移植到WT C57BL 或DKK2缺失的C57BL小鼠中。图18显示在DKK2缺失小鼠上肿瘤形成较慢。此外,在移植到DKK2缺失小鼠上的肿瘤中的粒酶B⁺细胞和凋亡细胞增加。

[0221] 总之,这些数据表明肿瘤细胞和宿主产生的DKK2在支持肿瘤生长中都是重要的。

[0222] 实施例9:YAL008-1-5F8治疗的APC小鼠中T细胞在减少的肿瘤负荷中的作用。

[0223] 本文先前描述的结果显示在APCKO和在YAL008-1-5F8治疗的APC小鼠中肿瘤负荷的显著降低伴随着APCKO的肿瘤和YAL008-1-5F8治疗的小鼠的PP中更高水平的gzmb表达。为了研究是否T细胞负责这样的现象或检测到更高的gzmb,因为使用更少的肿瘤诱导的抑制T细胞缺失的小鼠。将Rag2 缺陷小鼠饲养至APC小鼠。用YAL008-1-5F8或IgG治疗T/B细胞敲除APC 小鼠(n=5)8周。在终点天,对小鼠实施安乐死并研究其肿瘤负荷。应该检测不到这两组的肿瘤负荷的显著差异。因此,缺乏DKK2导致浸润肠肿瘤和杀死癌细胞的T细胞中更高的gzmb表达。

[0224] 实施例10:DKK2在调节T细胞活化中的作用。

[0225] 重要的是知道DKK2是否直接影响T细胞中的gzmb表达,或者它是否影响调节其表达的其他细胞/因子。为了研究此问题,从脾脏、MLN、上皮内淋巴细胞和PP中分离出幼稚CD8⁺T细胞。将这些细胞在涂布CD3/CD28的平板中培养,在其培养基中有或没有rDKK2和rWnt3a。在48和72小时后,分别对应于早期和中期活化,收集样品并通过FACS分析gzmb表达。在48 小时处将另外剂量的rDKK2施用于孔,这是因为rDKK2在长时间培养中失去其生物活性。一旦将rDKK2加入到培养基中,应当检测到gzmb表达的降低,这支持DKK2直接影响gzmb表达的观点。

[0226] 实施例11:上皮内淋巴细胞(iel)在调节肿瘤负荷中的作用:在存在和不存在rDKK2和YAL008-1-5F8的情况下上皮内淋巴细胞的杀伤能力。

[0227] CD8细胞中增加的gzmb表达与其细胞毒性能力和抗肿瘤特性密切相关。包括本发明的几个研究已经表明,上皮内淋巴细胞实际上可以杀死结肠癌细胞(Arjonen等人,Clin Exp Rheumatol,2010,28(1):第128-34页;Ebert Immunology,2009.127(2):第206-15;Di Sabatino等人,Gut,2006,55(4):第 469-77页;Lundqvist等人,J Immunol,1996.157(5):第1926-34页;Melgar 等人,Immunology,2002.106(4):第476-85页和Nussler等人,Langenbecks Arch Surg,2000.385(3):第218-24页)。到目前为止,本文披露的结果显示APCKO 的CD8⁺Til中的gzmb表达特别地升高,并且这些细胞的来源可能是肠的上皮内淋巴细胞。这些细胞的表型与上皮内淋巴细胞的表型一致,因为它们是高度gzmb⁺,>95%CD69⁺,并且观察到显著的CD4⁺CD8⁺群体(活化的CD4⁺上皮内淋巴细胞的标志)(Pahar等人,Eur J Immunol,2006.36(3):第583-92 页)。

[0228] 为了研究DKK2或其抑制是否可以直接调节上皮内淋巴细胞的杀伤能力,通过FACS分选来自11周龄APC小鼠的CD8⁺上皮内淋巴细胞,并用10:1 和5:1E:T比例的10K MC38细胞孵育。将rDKK2(15nM)和YAL008-1-5F8/IgG (3nM)加入培养基中以研究DKK2是否可以直接影响上皮内淋巴细胞的杀伤能力。24小时后,通过FACS分析MC38细胞的AnnexinV和PI染色。该实验重复3次(每次n=3)并且在YAL008-1-5F8治疗的细胞中应显示增加的杀伤并且在DKK2治疗的孔中显示减少的杀伤。该实验还在源自APC小鼠的 APC10.1细胞上进行(De

Giovanni等人, Int J Cancer, 2004, 109 (2) : p.200-6), 并且应该显示类似的结果。加入gzmb抑制剂(例如25-100 μ M的Z-AAD-CMK (Biovision公司, CA)) 以确保gzmb在上皮内淋巴细胞的细胞毒性功能中的作用。

[0229] 实施例12: 上皮内淋巴细胞在调节肿瘤负荷中的作用: 来自APC/APCKO和APC/APC-V-KO的上皮内淋巴细胞的杀伤能力。

[0230] 通过FACS分选来自11周龄APC/APCKO和APC/APC-V-KO小鼠的CD8⁺上皮内淋巴细胞以比较其CTL活性。小鼠是年龄/性别相匹配的同窝幼仔。如本文之前实施例11所述进行实验。应该检测到APCKO或APC-V-KO小鼠的更高的细胞毒性能力。还进行了对24周龄APC/APCKO和APC/APC-V-KO小鼠的Til CD8的类似实验。在该实验中, 小心收集肠肿瘤并在FACS分选CD8细胞之前消化。由于肿瘤非常小, 每组汇集两只小鼠。对于该实验, 使用5:1的E:T比。

[0231] 实施例13: Wnt信号传导在CD8细胞中调节gzmb的作用。

[0232] 许多研究已经将Wnt信号传导与T细胞功能相关联, 并且记忆细胞中的Wnt信号传导是特别值得注意的(Xue和Zhao Ann N Y Acad Sci, 2012.1247: 第16-33页; Jeannet等人, Proc Natl Acad Sci U S A, 2010.107 (21) : 第9777-82 页; Barker等人, Adv Cancer Res, 2000.77: 第1-24页和Zhou等人, Immunity, 2010.33 (2) : 第229-40页)。DKK2的Wnt拮抗性可能负责下调gzmb。为了研究Wnt在gzmb表达调节中的作用, 使用珠粒从LRP5/6KO小鼠中分选幼稚胸腺CD8⁺T细胞, 从而选择缺乏Wnt信号传导的细胞。然后将细胞用CFSE 标记并静脉内注射到11周龄的APC和APC-v-KO小鼠(同笼/同窝出生)中。由于先前的结果显示, 迁移至PP的注射的幼稚细胞在注射后24-96小时开始产生gzmb, 48小时后收集PP, 并且通过FACS测量CFSE+细胞中gzmb的水平。由于LRP5/6KO T细胞不能对Wnt配体应答, 因此它们在APC/APC-v-KO小鼠中不应显示gzmb表达的任何差异。因此, 本文提供的结果应该确定CD8⁺细胞中gzmb表达的DKK2减少可能是由于Wnt信号传导的抑制。

[0233] 实施例14: 用于癌症治疗的DKK2和抗DKK2用于改善癌症免疫疗法的用途。

[0234] 本发明披露了DKK2在结肠癌中的作用。本文提供的数据提供关于DKK2 在结肠癌促进中的显著和未被评价的作用的强烈和令人信服的论点。此外, 如本发明所示, DKK2在调节gzmb中的作用也是非常出乎意料的。因此调节结肠癌中的DKK2表达为患者的新的治疗选择打开了大门。包括将各种敲除T细胞过继转移到APC/APCKO小鼠中和使用老化APC/APC-V-KO小鼠研究它们的肿瘤负荷的几个实验正在进行。尽管DKK2中和似乎不阻止肿瘤发展, 但是其可以增加TIL上的gzmb表达的事实使其成为用于改善癌症疫苗或其他不是100%有效的免疫疗法的极好的工具。如本发明中提出的抗DKK2抗体的使用对于改善癌症免疫疗法例如改善结肠癌治疗中的MUC1疫苗和PD-1靶向是理想的。

[0235] 实施例15: DKK2抗体抑制同种异体移植模型中的肺肿瘤形成。

[0236] 将小鼠LLC肺癌细胞移植到C57BL小鼠中并用抗DKK2抗体 (YAL008-1-5F8) 治疗。抗体抑制肿瘤形成, 伴随着粒酶B阳性细胞和凋亡肿瘤细胞的增加(图19)。

[0237] 实施例16: DKK2和Wnt对NK细胞活化的影响。

[0238] 在DKK2、Wnt3a、Wnt5A和DKK1的重组蛋白存在或不存在并且存在或不存在Wnt抑制剂(包括LGK-974) 和GSK抑制剂(包括CHIR 99021) 下, 测试来自脾和MC38移植肿瘤的人NK细胞系NK-92和原代小鼠NK细胞的粒酶和细胞毒性活性的表达。以这种方式, 可以评估DKK2

和Wnt对NK 细胞活化的调节。

[0239] 实施例17:当与PD-1抗体缔合时,DKK2抗体最佳地抑制肿瘤形成。

[0240] 用LLC或MC38细胞移植C57BL小鼠(每组n=5)。六天后,通过腹膜内(IP)途径用小鼠IgG、 α -Dkk2抗体(YAL008-1-5F8)和/或PD-1抗体以16mg(8mg/抗体)/kg治疗小鼠。将YAL-008-1-5F8对肿瘤形成的作用与PD-1抗体的进行对比(Cancer Res.2005Feb 1;65(3):1089-96)。在LLC同种异体移植肺肿瘤模型中,YAL-008-1-5F8对肿瘤延缓的作用与PD-1抗体相似,YAL-008-1-5F8和PD-1抗体的组合显示出比单独的PD-1抗体更高的抑制肿瘤进展(图20A);YAL-008-1-5F8对小鼠存活具有与PD-1抗体相似的效果,并且YAL-008-1-5F8和PD-1抗体的组合显示出比单独使用PD-1抗体提高的存活率(图20B)。图20C说明当在MC38结肠癌模型中单独施用或与其他抗体组合施用时,YAL-008-1-5F8对肿瘤形成的对比作用。在这种MC38模型中,PD-1抗体不显示对肿瘤形成的显著影响。

[0241] 将本文引用的各个和每个专利、专利申请和出版物的公开内容通过引用全部并入本文中。

[0242] 虽然本发明参照具体实施方式披露,清楚的是在不偏离本发明的真实精神和范围下本发明的其他实施方式和变更可以由其他的本领域的普通技术人员来设计。所附权利要求书意欲解释为包括所有这类实施方式和等效变化方式。

序列表

<110> 耶鲁大学
D. 吴
L. 孙

<120> Dickkopf2 (Dkk2) 抑制作用抑制肿瘤形成

<130> 047162-7027W01(00325)

<150> US 62/020,684

<151> 2014-07-03

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Lys Leu Asn Ser Ile Lys Ser Ser Leu Gly Gly Glu Thr Pro Gly
1 5 10 15

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Arg Asp Arg Asn His Gly His Tyr Ser Asn His Asp Cys
1 5 10

[0001]

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Gly Arg Pro His Thr Lys Met Ser His Ile Lys Gly Cys
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Thr Lys Gln Arg Lys Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Cys
1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Cys Lys Val Trp Lys Asp Ala Thr Tyr Ser Ser Lys Ala Arg
1 5 10

<210> 6

<211> 88

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Met Pro His Ile Lys Gly His Glu Gly Asp Pro Cys Leu Arg Ser Ser
1 5 10 15

Asp Cys Ile Asp Gly Phe Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Thr Lys Ile
20 25 30

Cys Lys Pro Val Leu His Gln Gly Glu Val Cys Thr Lys Gln Arg Lys
35 40 45

Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Asp Cys Ala Lys
50 55 60

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

Arg Leu His Val Cys Gln Lys Ile
85

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Cys Ala Arg His Phe Trp Thr Lys Ile Cys
1 5 10

[0002]

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

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

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

Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile Gly Arg Ile
35 40 45

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

Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala His Met Glu Leu
65 70 75 80

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

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 9

<211> 105

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

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

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
20 25 30

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

Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
50 55 60

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

Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr Phe
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> 智人

[0003]

<400> 10

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

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln
20 25 30

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp
35 40 45

Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
50 55 60

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

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Arg Leu Gly
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 104

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
20 25 30

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

Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Val Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
100

<210> 12

<211> 102

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

[0004]

Ser Asn Pro Val Thr Ser Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser
1 5 10 15

Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe
20 25 30

Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser
35 40 45

Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
50 55 60

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

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Val Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
85 90 95

Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100

<210> 13

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

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

[0005]

Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys
			20					25					30		
Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Thr	Ile	Asp	Pro	Ser
		35					40					45			
Asp	Ser	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu
	50					55					60				
Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu
65					70					75					80
Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Asp
				85					90					95	
Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
			100					105						110	

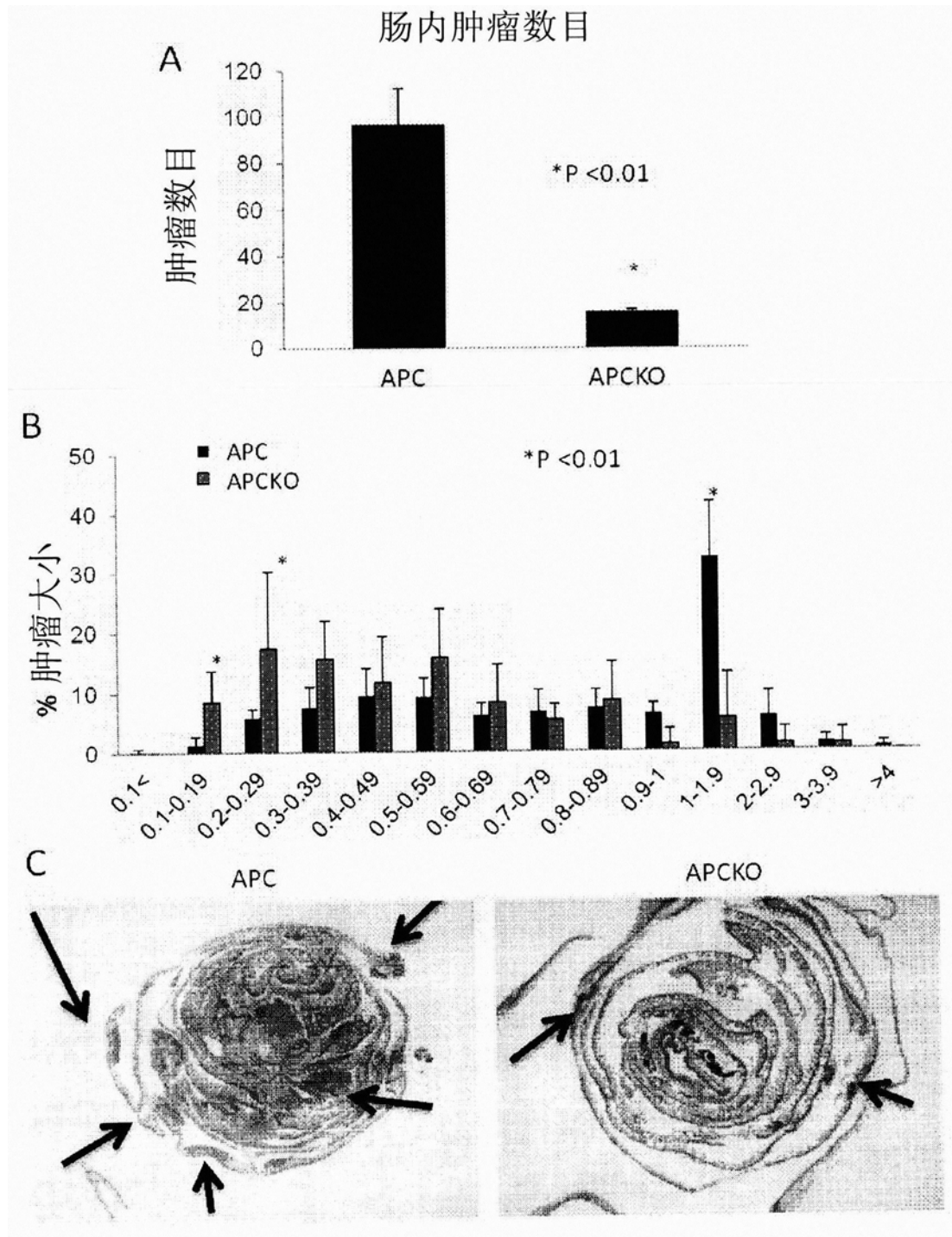


图1A-1C

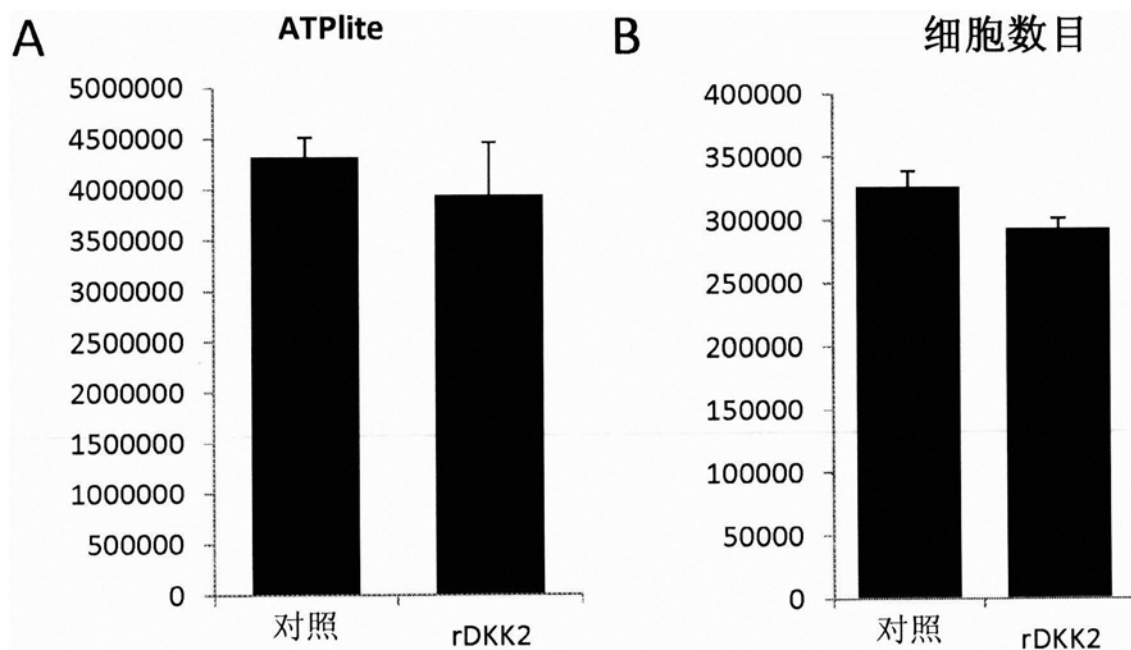


图2A-2B

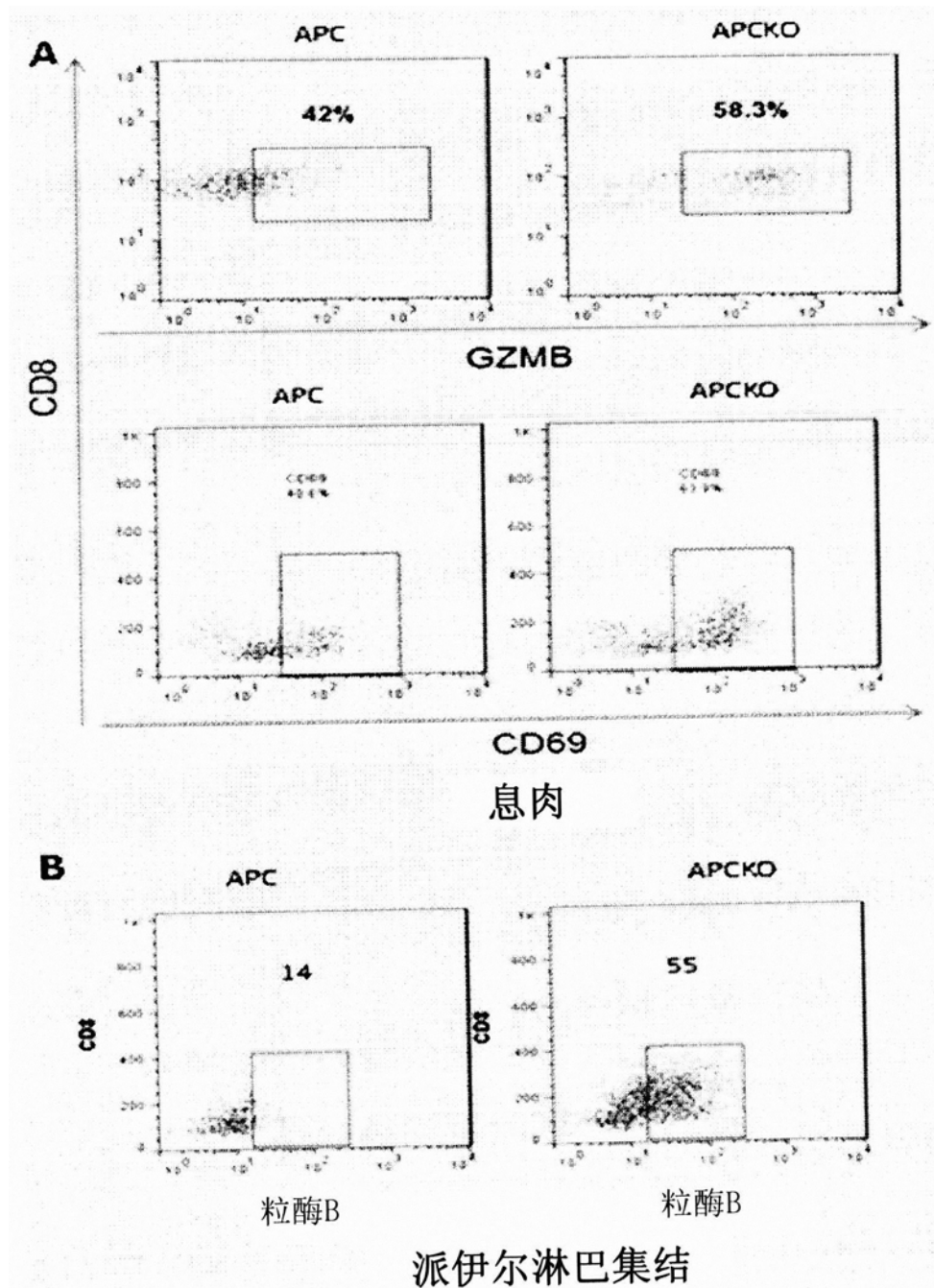


图3A-3B

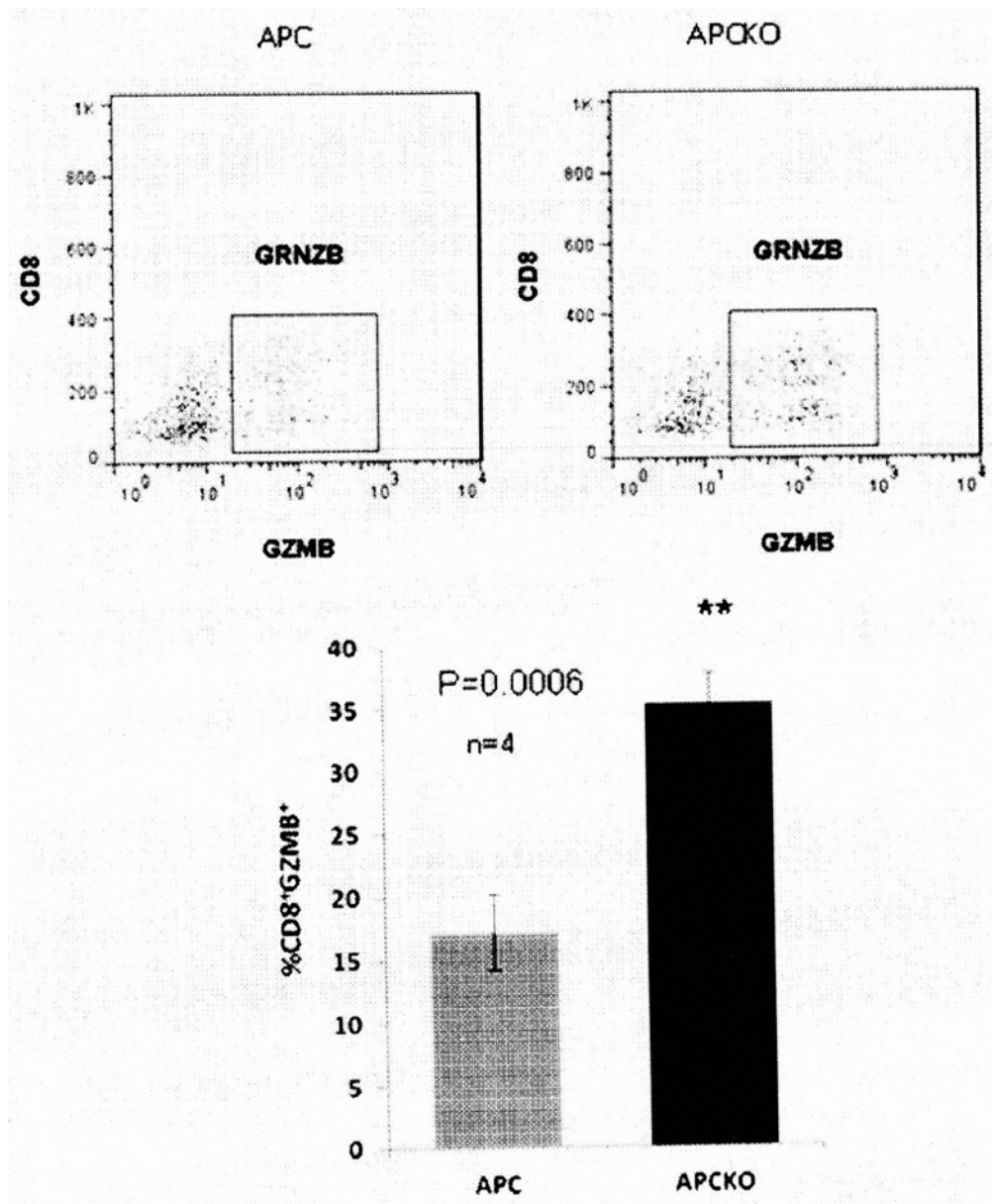


图4

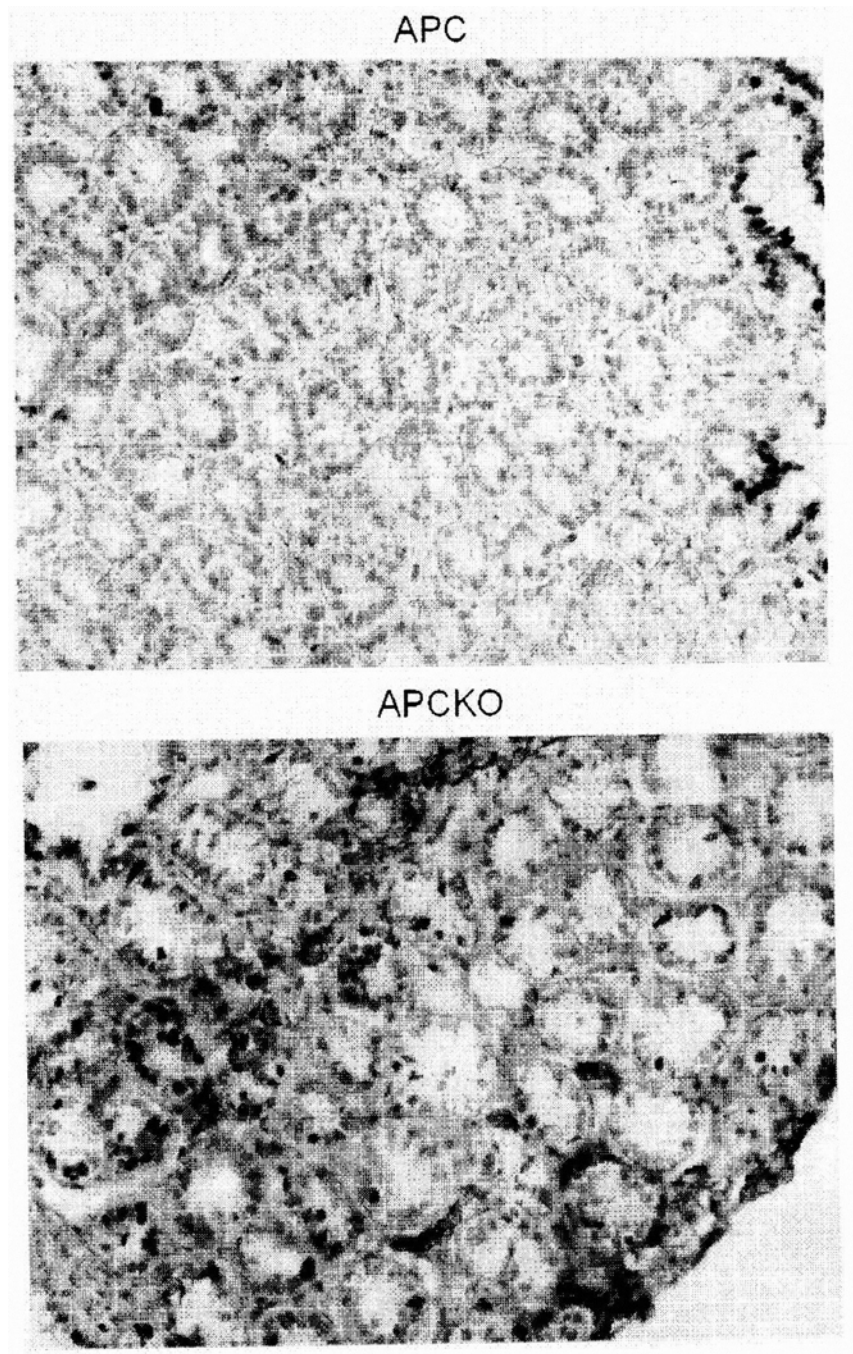


图5

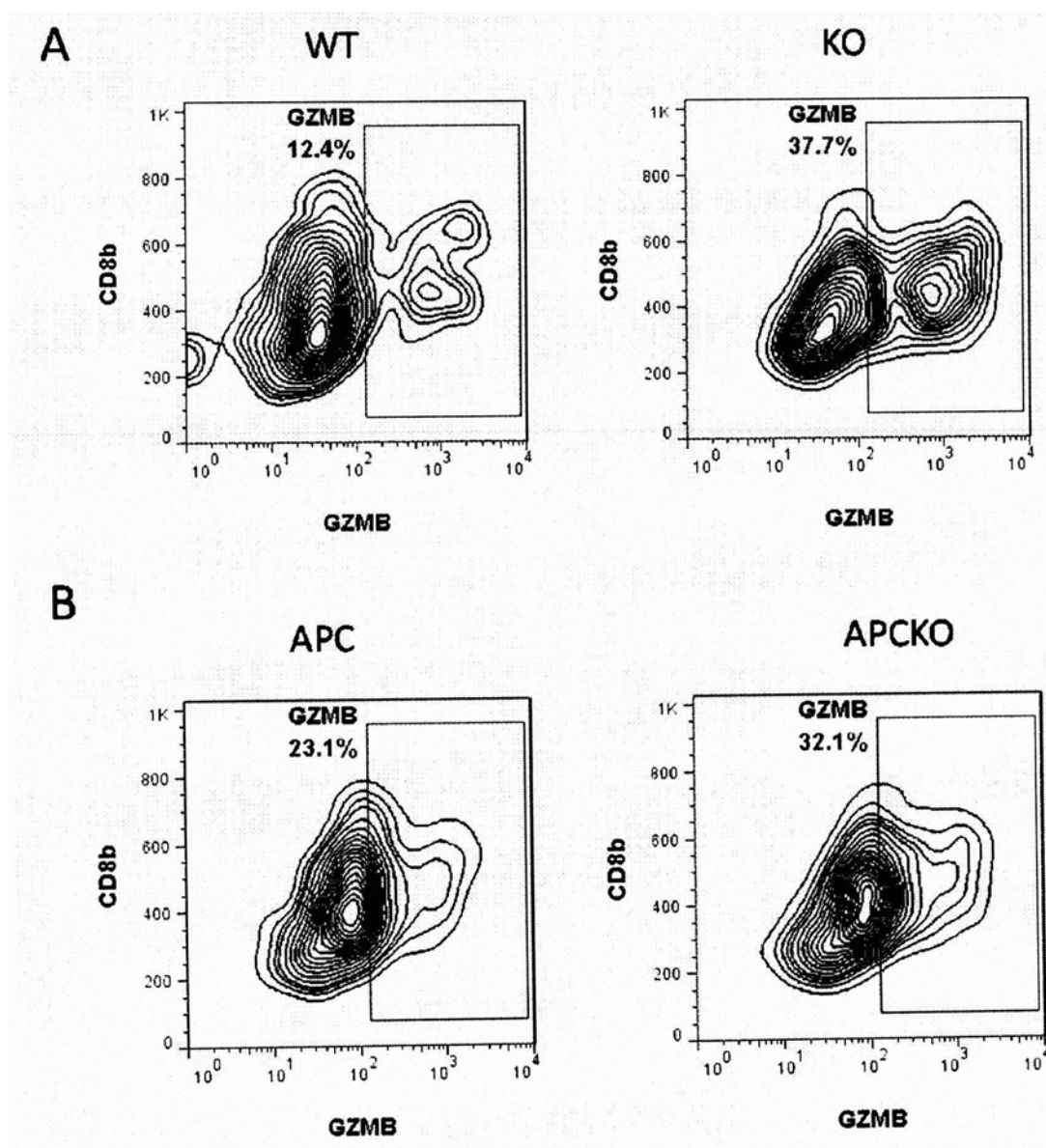


图6A-6B

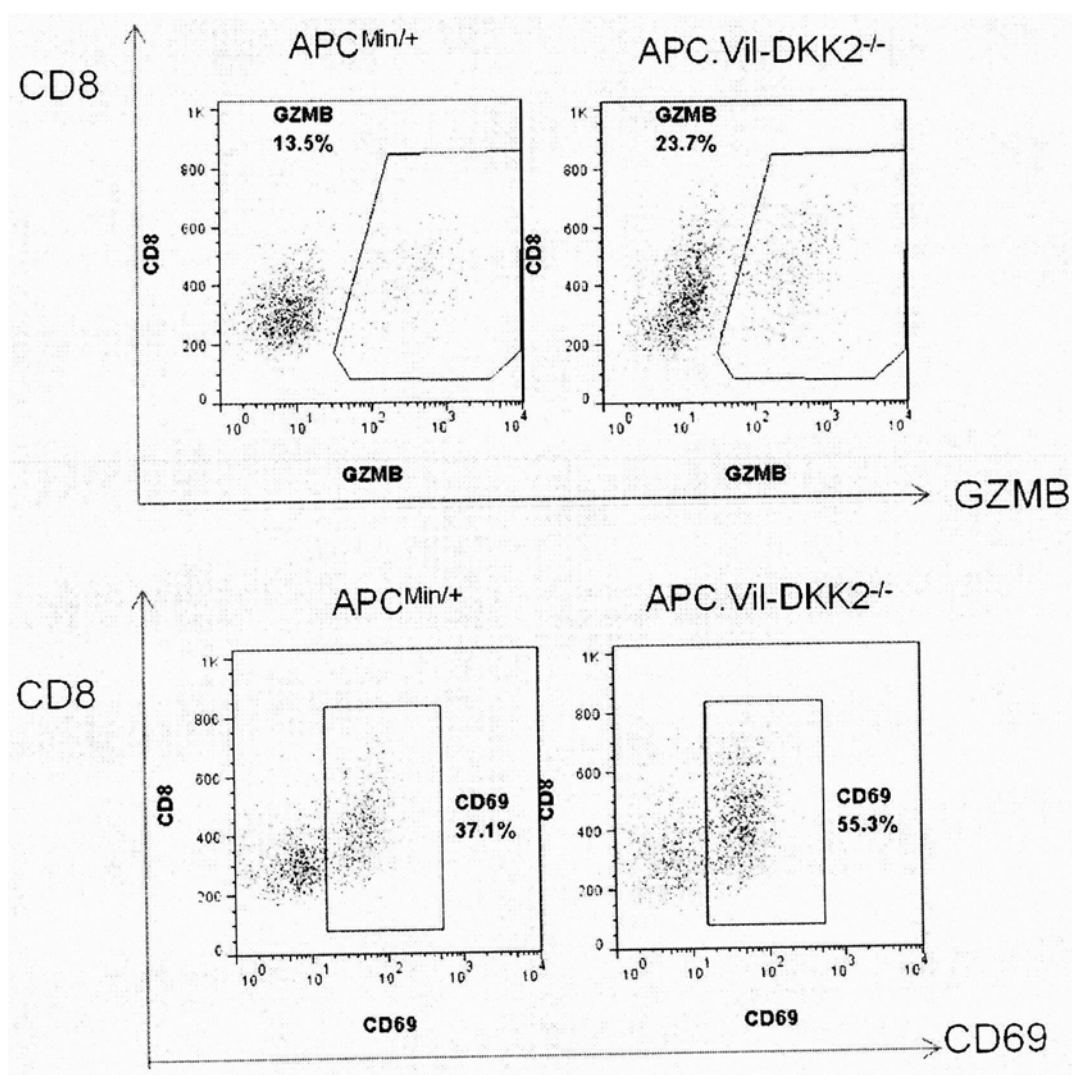


图7

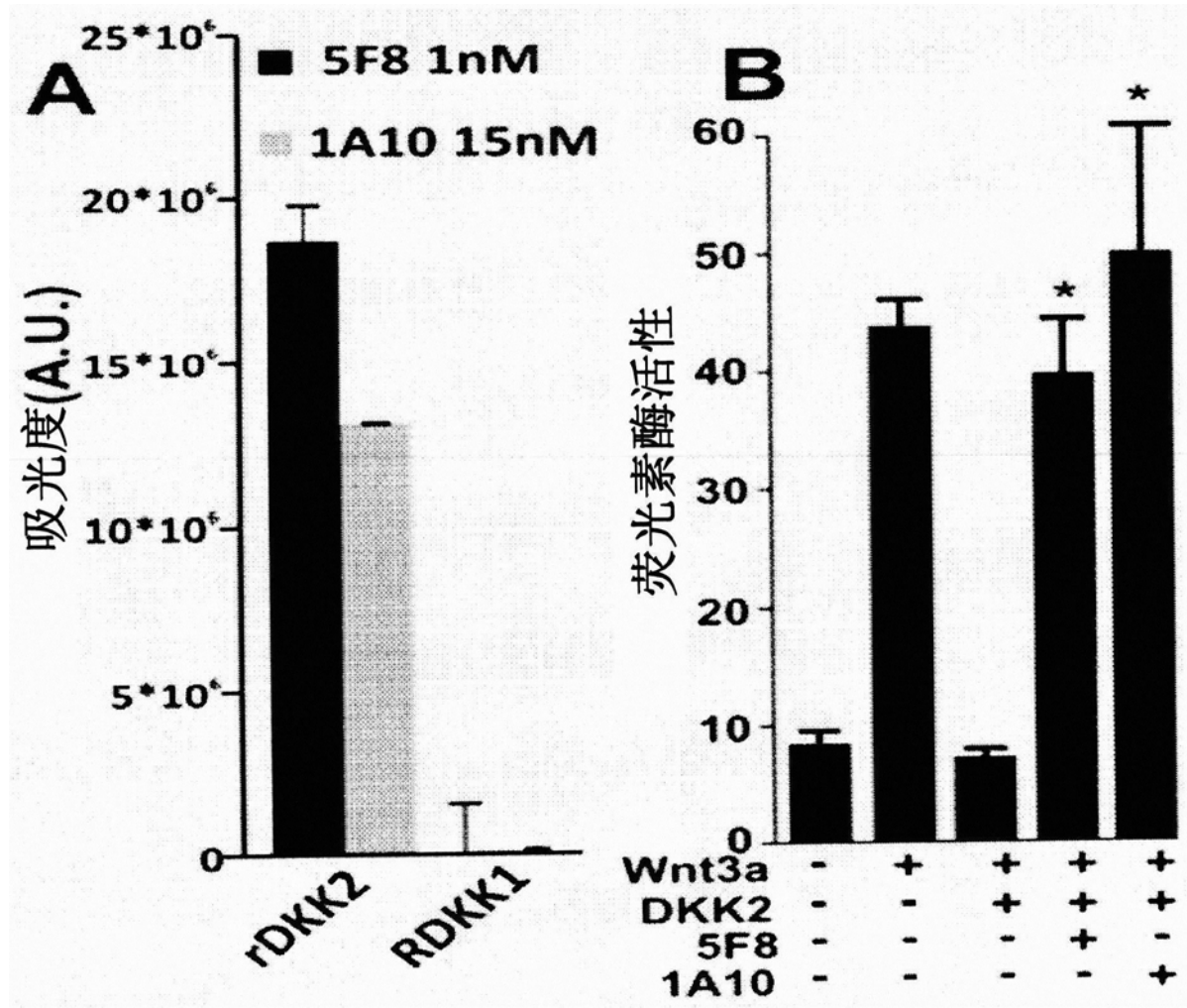


图8A-8B

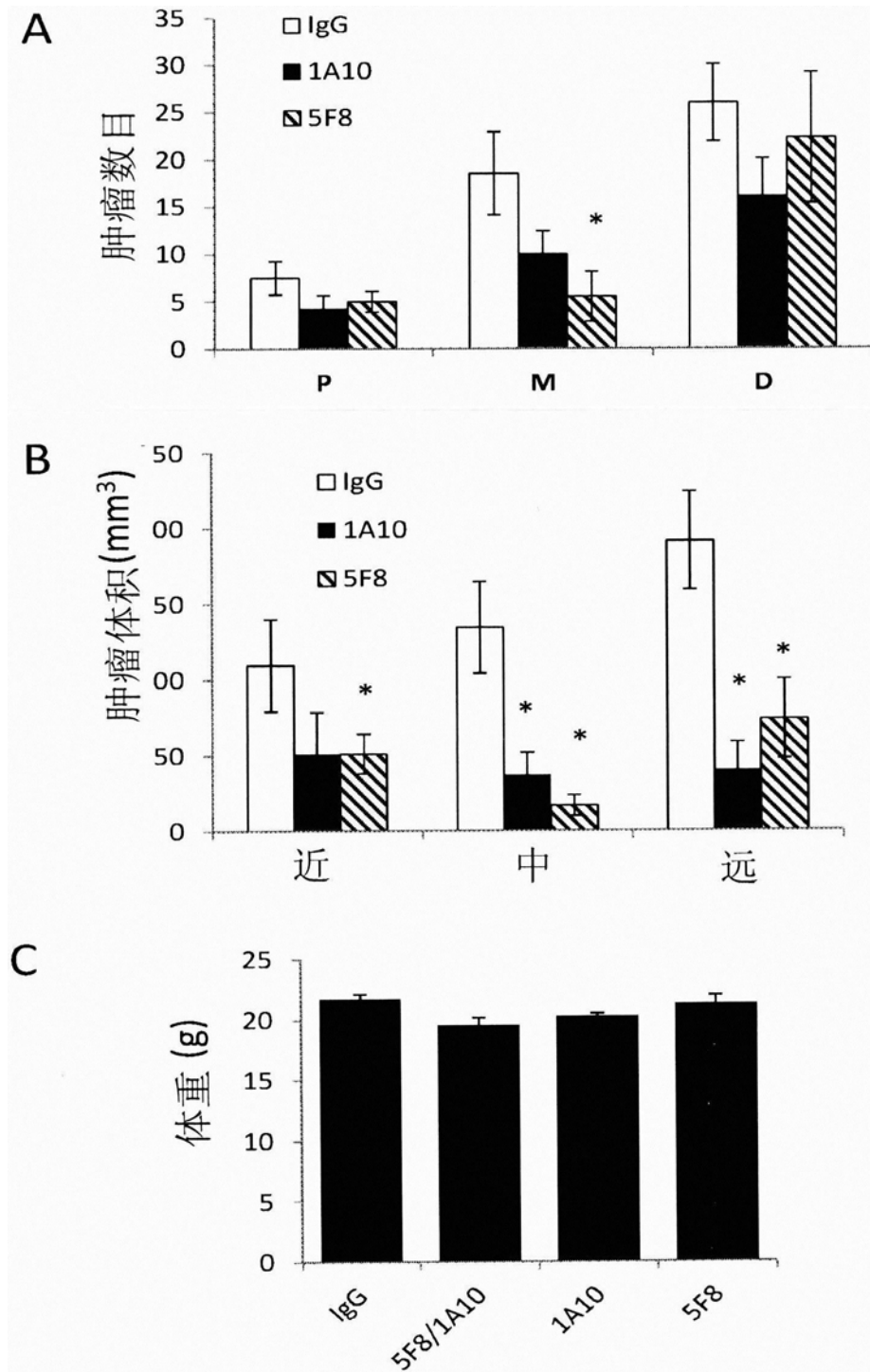


图9A-9C

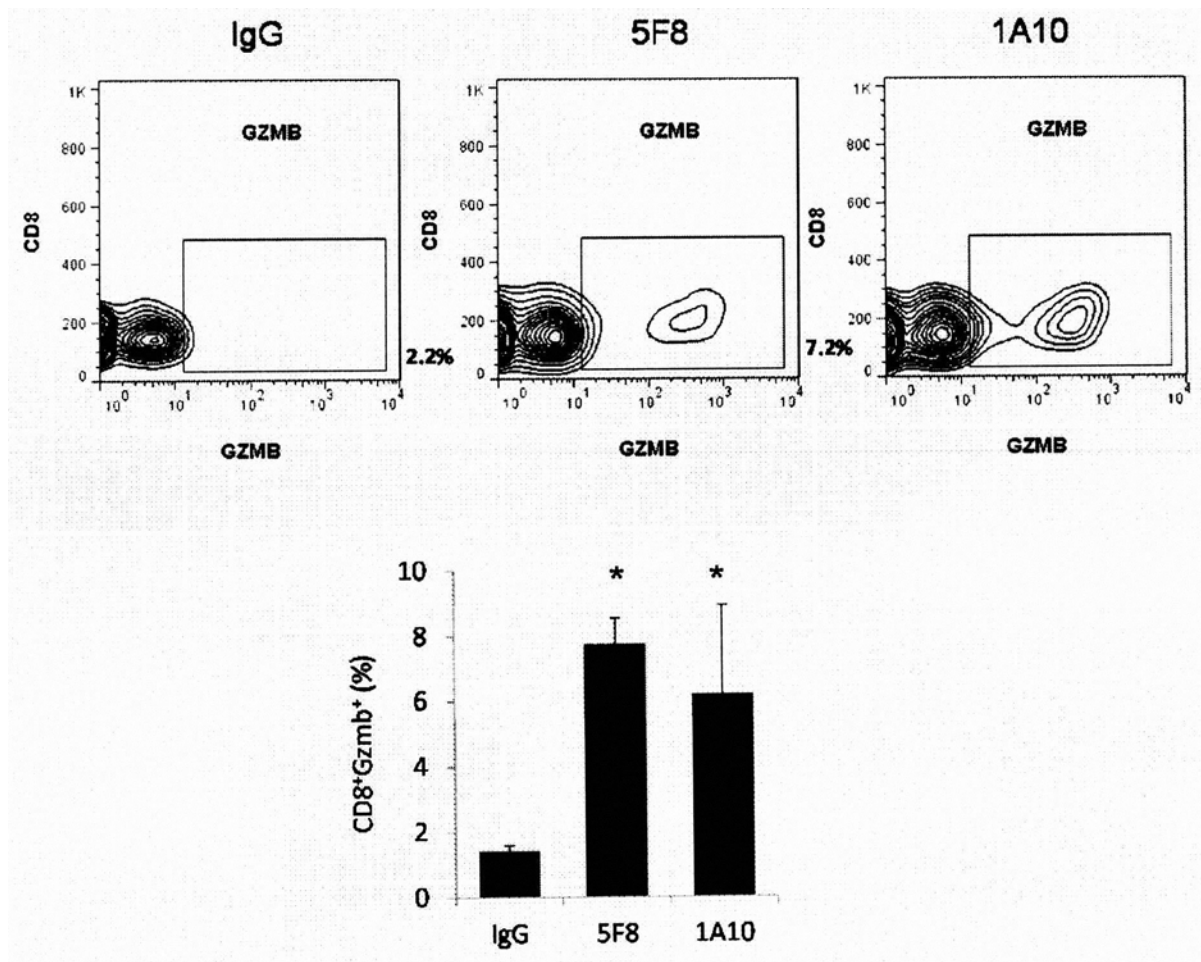


图10

SEQ ID NO	ID	氨基酸序列	免疫原性	
1	YAL008-1*	34-KLNSIKSSLGGETPGC [#] -48	8.2	DKK2-特异性
2	YAL008-2	148-RDRNHGHYSNHDC [#] -159	23.2	DKK2-特异性
3	YAL008-3	166-GRPHTKM SHIKGC [#] -177	12.2	DKK2-特异性
4	YAL008-4	215-TKQRKKGSHGLEC [#] -226	20	DKK2-非特异性
5	YAL008-5**	239-CKVWKDATYSSKAR-252	10.4	DKK2-特异性
6	YAL008-6	小鼠DKK2的Met172-Ile259		重组DKK2-C末端
7	YAL008-7	195-CARHFWTKIC-204		

特别关注的抗体:

* 5F8: KLNSIKSSLGGETPGC

** 1A10: CKVWKDATYSSKAR

“#”表示加入用于缀合的半胱氨酸残基

SEQ ID NO: 6的氨基酸序列

MPHIKGHEG DPCLRSSDCI DGFCARHFW TKICKPVLHQ GEVCTKQRKK GSHGLEIFQR
CDCAKGLSCK VWKDATYSSK ARLHVCQKI

YAL008-5 1A10 重链肽序列 (SEQ ID NO: 8):

LQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYFVNWWKQSHGKSLDWIGRIIPYNGDTFYNQKFKG
KATLTVDKSSTTAHMELLSLTSEDSAVYYCGRGDYWGQGTSTVTVSS

YAL008-5 1A10 轻链肽序列 (SEQ ID NO: 9):

PLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSG
SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKEIK

YAL008-1 5F8 重链肽序列 (SEQ ID NO: 10):

GAELVRPGASVKLSCKASGYSTNYWMNWWKQRPQGQGLEWGMHPDSETRLNQKFKDKA
TLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCAREGLRLRSYAMDYWGQGTSTVTVSS

YAL008-1-5F8 轻链肽序列 (SEQ ID NO: 11):

PSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRFV
GSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYITPLTFGAGTKLE

YAL008-7-1A10 轻链肽序列 (SEQ ID NO: 12):

SNPVTSGESVSISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQRPQGQSPQLLIYLMSTRASGVSDRFSGSGS
GTDFTLEISRVKAEDVGYYCQQLVEYPYTFGGGTKEI

YAL008-7-1A10 重链肽序列 (SEQ ID NO: 13):

SGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYWMHWWKQRPQGQGLEWGTIDPSDSYTSYNQKFKGK
ATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTYYDYDFAYWGQGTSTVTVSS

图11

提出的DKK-LRP6胞外域相互作用机制

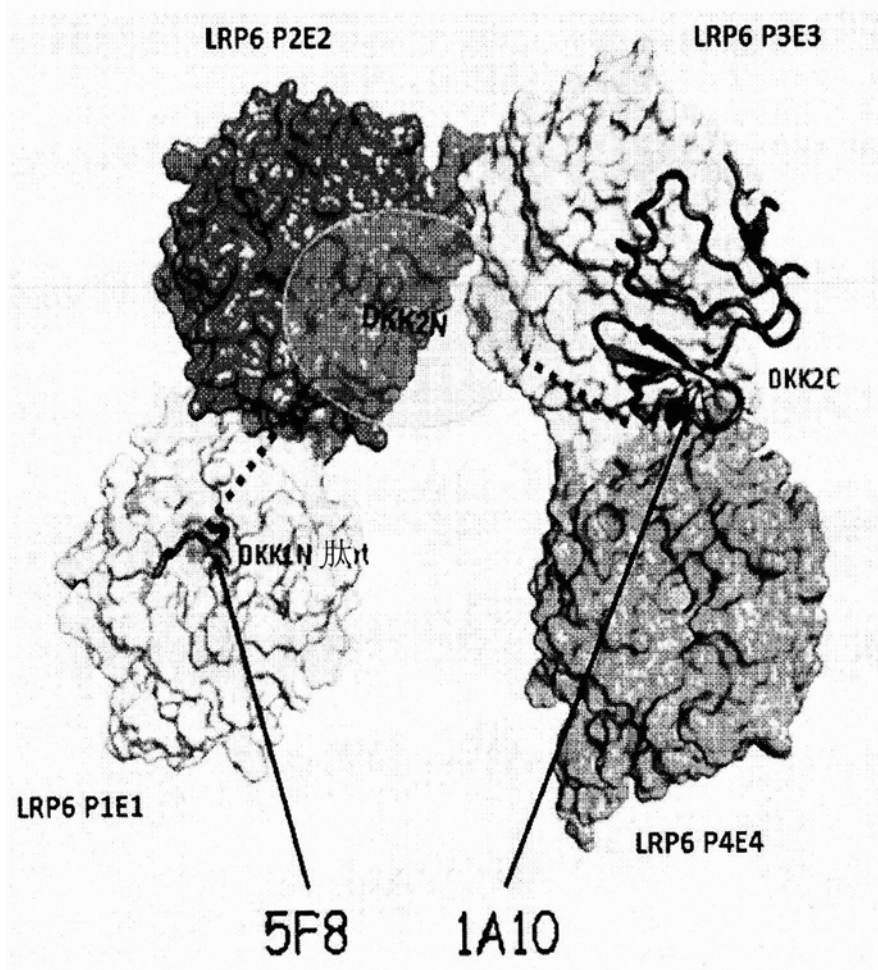


图12

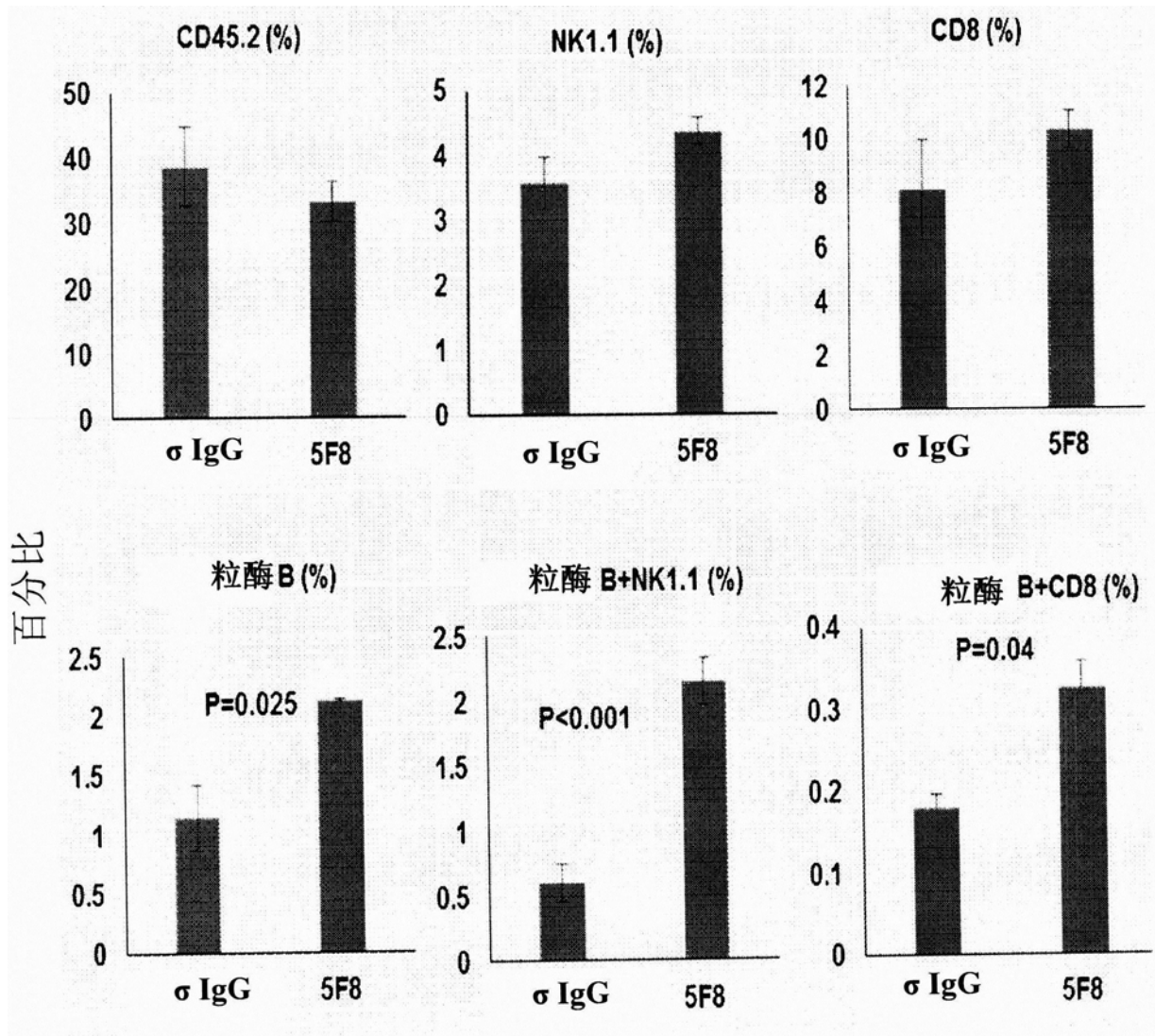


图14

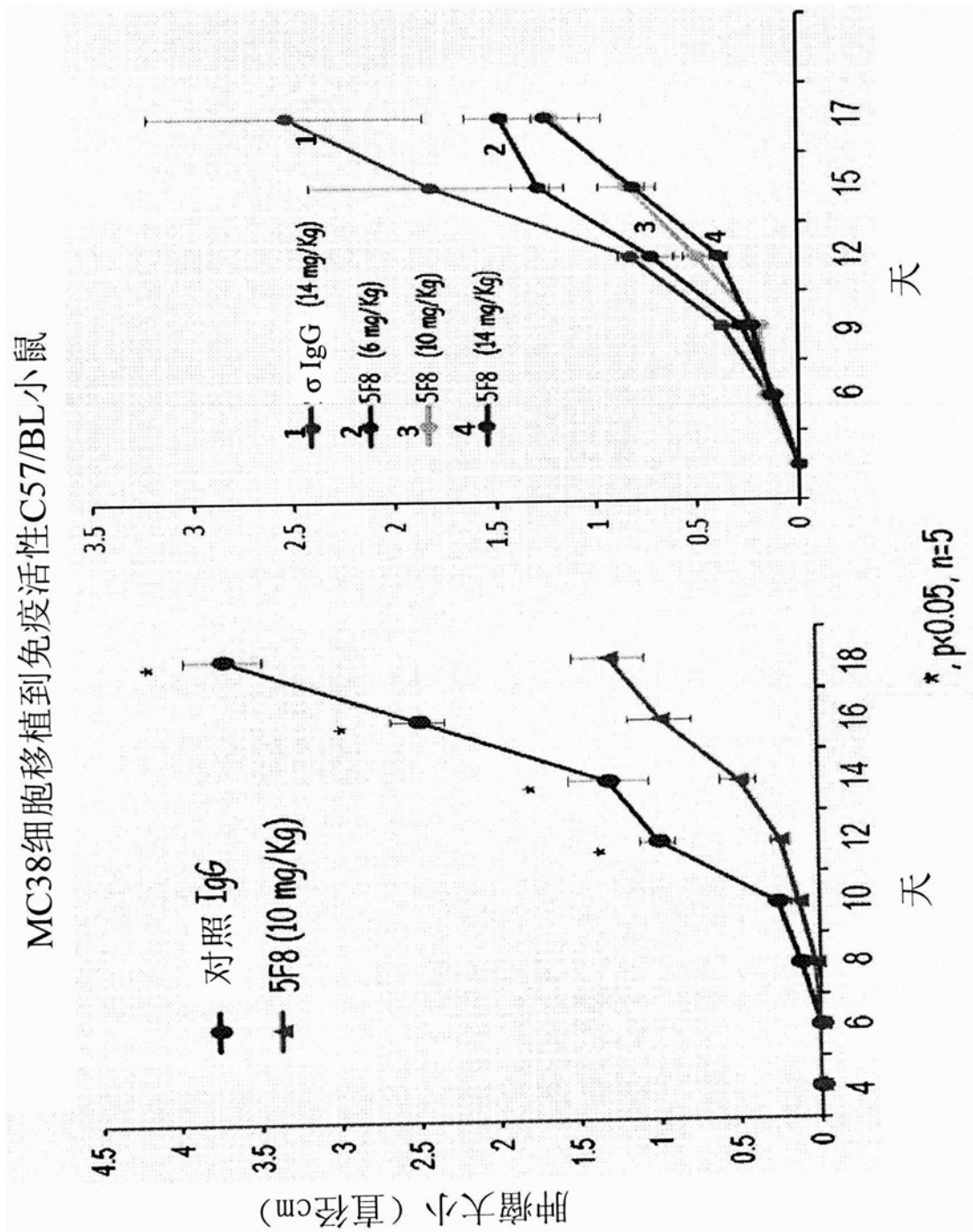


图15

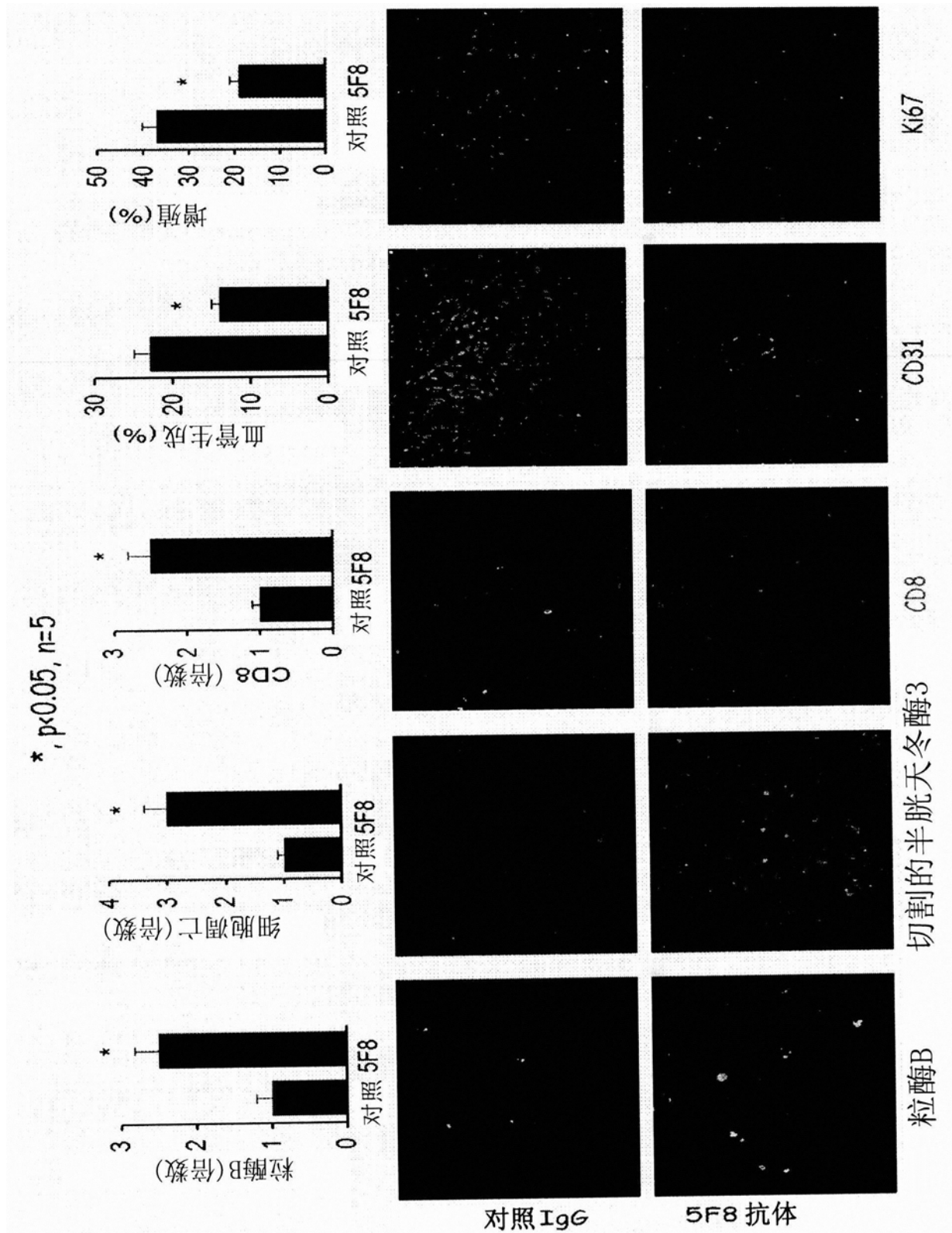


图16

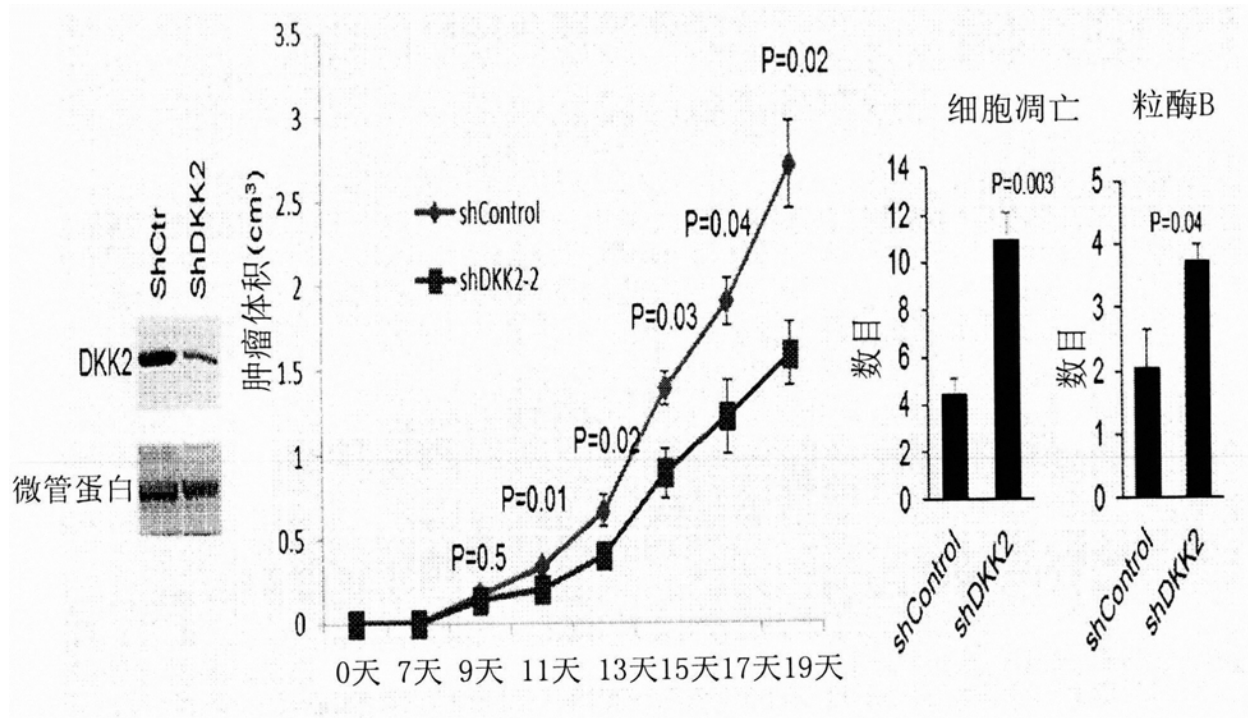


图17

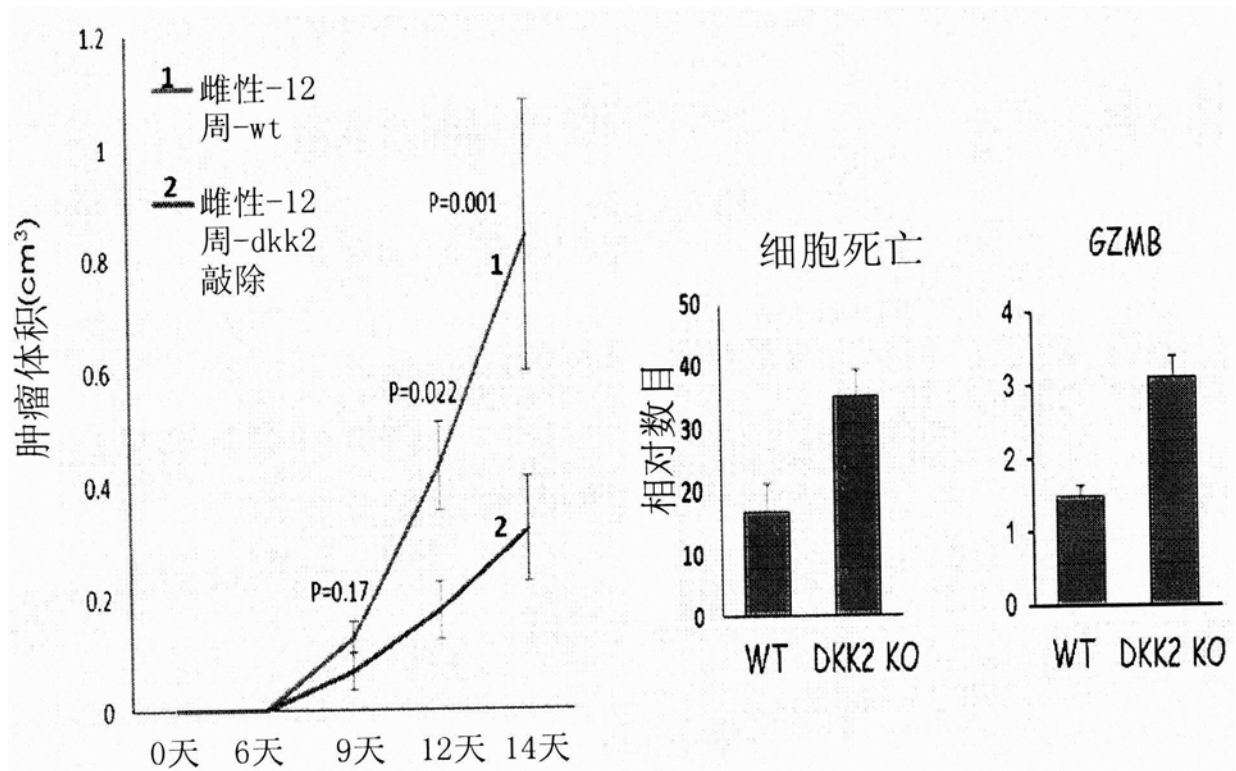


图18

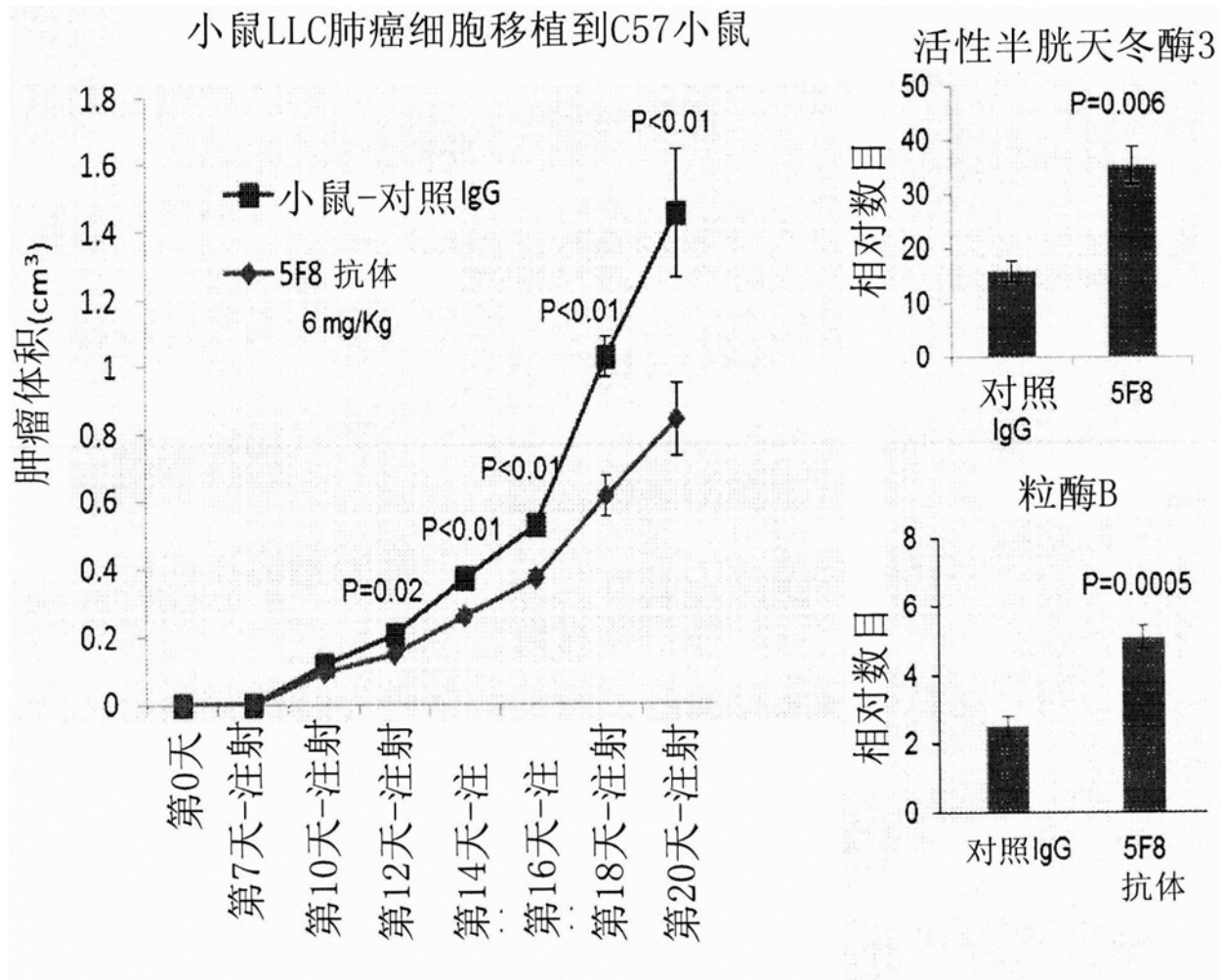


图19

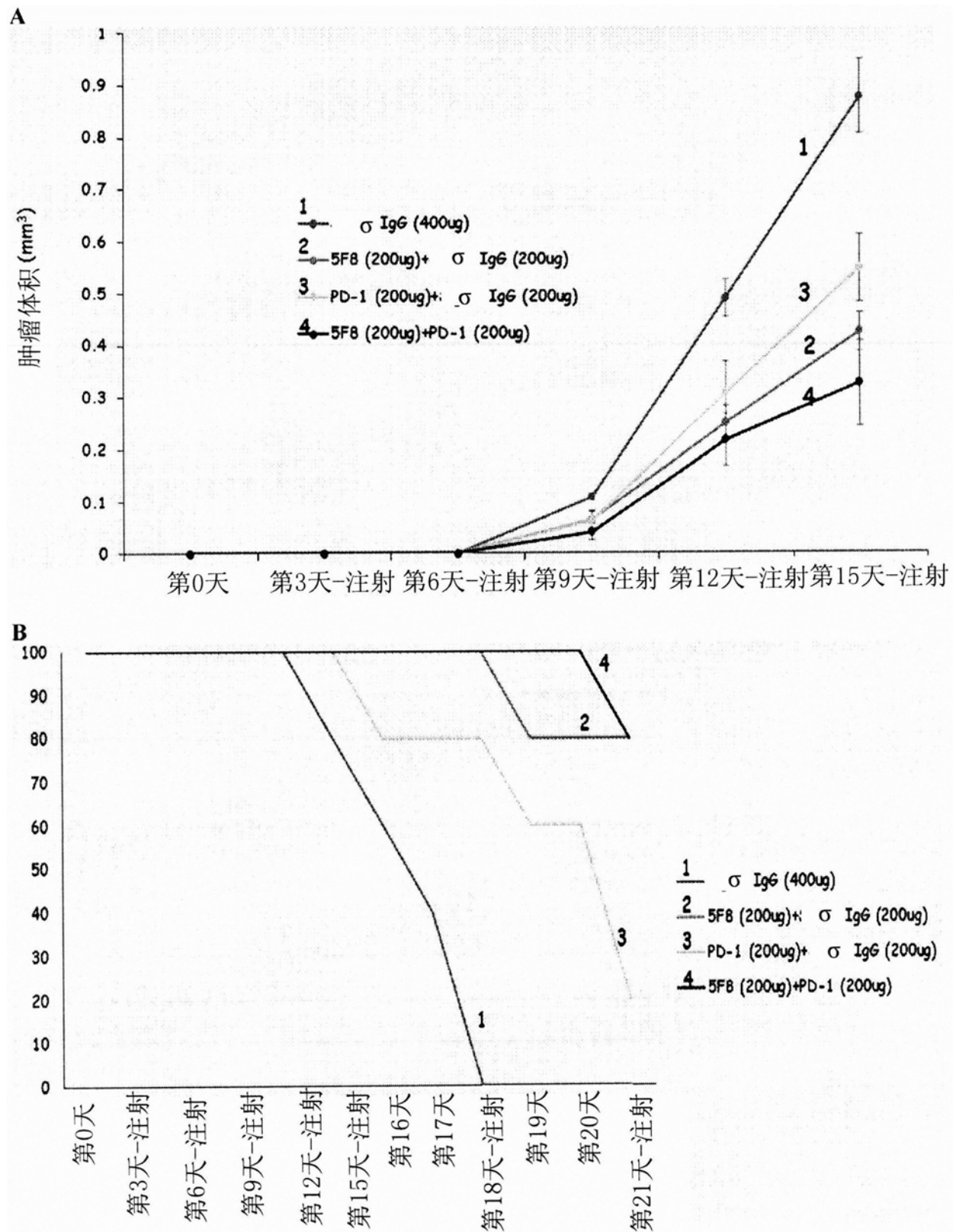


图20A-20B

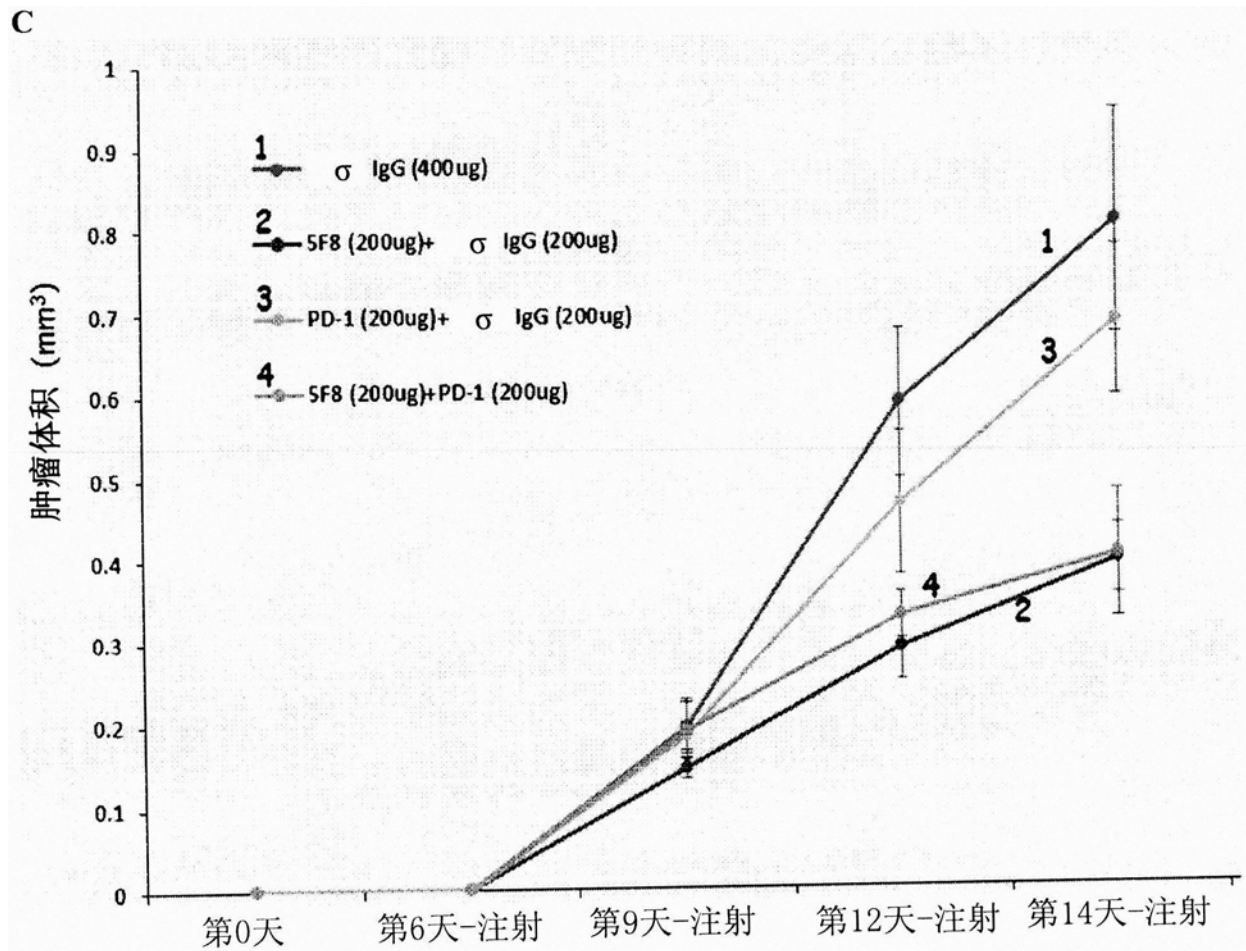


图20C