



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104168916 B

(45)授权公告日 2017.07.04

(21)申请号 201380012187.0

(22)申请日 2013.03.01

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104168916 A

(43)申请公布日 2014.11.26

(30)优先权数据
61/606,220 2012.03.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.09.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/028667 2013.03.01

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/131001 EN 2013.09.06

(73)专利权人 中央研究院

地址 中国台湾台北市南港区研究院路2段
128号

(72)发明人 吴汉忠 廖美英 林政纬

(74)专利代理机构 北京连和连知识产权代理有限公司 11278

代理人 王淑丽

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件
CN 101970497 A,2011.02.09,
CN 1976951 A,2007.06.06,

审查员 马俊凯

权利要求书2页 说明书19页
序列表16页 附图23页

(54)发明名称

抗上皮细胞黏着分子(EpCAM)抗体及其使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种经分离单株抗体或其抗原结合片段。该抗体或抗原结合片段具有以下特征:(a)对包括氨基酸序列SEQ ID NO:1的上皮细胞黏着分子(Epithelial cell adhesion molecule;EpCAM)具有特异性结合亲和力;(b)对可以表现EpCAM的癌细胞具有特异性结合亲和力,该癌细胞是选自由口腔癌细胞、鼻咽癌细胞(nasopharyngeal cancer cell;NPC)、结肠直肠癌细胞及卵巢癌细胞所组成的群;(c)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell;HUVEC)及正常鼻黏膜上皮细胞(normal nasal mucosal epithelia;NNM)不具结合亲和力。本发明亦公开了一种经分离单株抗体或其抗原结合片段,其对于位处上皮细胞黏着分子(EpCAM)的EGF样区域II内的KPEGALQNNGLYDPDCDE(SEQ ID NO:63)序列内的

抗原决定部位具有特异性结合亲和力。本发明亦公开使用该等的方法。

1. 一种经分离单株抗体或其抗原结合片段,其对于位在如SEQ ID NO:1所示的上皮细胞黏着分子EpCAM的EGF样区域II内的KPEGALQNDGLYDPDCDE序列的抗原决定部位具有特异性结合亲和力,其特征在于:(i)所述抗体的重链可变域的互补决定域1的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;(ii)所述抗体的重链可变域的互补决定域2的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示;(iii)所述抗体的重链可变域的互补决定域3的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示;(iv)所述抗体的轻链可变域的互补决定域1的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;(v)所述抗体的轻链可变域的互补决定域2的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;以及(vi)所述抗体的轻链可变域的互补决定域3的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

2. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于:当EpCAM的EGF样区域II内的氨基酸95位置处的酪氨酸Y95或氨基酸96位置处的天门冬氨酸D96或氨基酸95位置处的酪氨酸Y95及氨基酸96位置处的天门冬氨酸D96两者发生突变时,则该结合亲和力会消失。

3. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该重链可变域的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,及该轻链可变域的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

4. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗原结合片段包括该抗体的Fv片段。

5. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗原结合片段为该抗体的Fab片段。

6. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段是经人源化的。

7. 如权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中该重链可变域的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,及该轻链可变域的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示。

8. 一种经分离单链可变片段,其特征在于:

所述单链可变片段的重链可变域的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,及所述单链可变片段的轻链可变域的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,或所述单链可变片段的重链可变域的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,及所述单链可变片段的轻链可变域的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示;其中该重链可变域及该轻链可变域由一链接肽所链接。

9. 一种如权利要求1至7任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备抑制癌细胞及/或肿瘤启动细胞生长的药物的用途。

10. 如权利要求9所述的用途,其中该癌细胞是选自由口腔癌细胞、鼻咽癌细胞、结肠直肠癌癌细胞及卵巢癌细胞所组成的群。

11. 如权利要求1至7任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其是经可侦测化合物或酶加以标记,或经囊封在脂质体内。

12. 一种组合物,其包括:

- (a) 如权利要求1至7任一项所述的经分离抗体或抗原结合片段;
- (b) 抗癌药剂;及
- (c) 医药学上可接受的载剂。

13. 一种如权利要求8所述的经分离单链可变片段在制备抑制癌细胞及/或肿瘤启动细胞生长的药物的用途。

14. 如权利要求13所述的用途,其中所述癌细胞是选自由口腔癌细胞、鼻咽癌细胞、结

肠直肠癌细胞及卵巢癌细胞所组成的群。

15. 如权利要求8所述的经分离单链可变片段, 其是经可检测化合物或酶加以标记, 或经囊封在脂质体内。

16. 一种组合物, 其包括:

- (a) 如权利要求8所述的经分离单链可变片段;
- (b) 抗癌药剂; 及
- (c) 医药学上可接受的载剂。

抗上皮细胞黏着分子 (EpCAM) 抗体及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明大体上是涉及抗癌剂,更特定而言是涉及用在癌症治疗、诊断及造影成像的抗体。

背景技术

[0002] 头及颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma;HNSCC)是全球已发展国家中第六位最常见的恶性肿瘤。口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma;OSCC)则是头及颈部位最常见的肿瘤。虽然头及颈部癌症在诊断、局部处理及化疗法上有明显的改进,但在过去30年间,长期存活率并没有明显的增加。即使具有现代的医疗服务,针对口腔内癌症方面的整体死亡率仍维持在约50%的高水平。因此,高风险性癌前病灶的预防及早期诊断与治疗在降低HNSCC相关死亡上是有相当帮助的。

发明内容

[0003] 在一方面,本发明是涉及一种经纯化或经分离的单株抗体或其抗原结合片段,其对于位处上皮细胞黏着分子(EpCAM)的EGF样区域II(SEQ ID NO:1)内的KPEGALQNNGLYDPDCDE(SEQ ID NO:63)序列内的抗原决定部位具有特异性结合亲和力。

[0004] 在本发明一具体实施例中,该抗体或抗原结合片段会展现出下列的特征:当EpCAM的EGF样区域II内的氨基酸95位置处的酪氨酸(Y)或氨基酸96位置处的天门冬氨酸(D)或该Y及D发生突变(或具有取代性突变作用),则前述的结合亲和力会消失。

[0005] 在本发明另一具体实施例中,该抗体或抗原结合片段包括:

[0006] (a) 一重链可变域,其包括(i)包含SEQ ID NO:4的互补决定域1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:5的互补决定域2(CDR2);及(iii)包含SEQ ID NO:6的互补决定域3(CDR3);及

[0007] (b) 一轻链可变域,其包括(i)包含SEQ ID NO:7的CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:8的CDR2;及(iii)包含SEQ ID NO:9的CDR3。

[0008] 在本发明另一具体实施例中,该结合片段包括该抗体的Fv片段。另一选择地,该结合片段包括该抗体的Fab片段。

[0009] 在本发明另一具体实施例中,该抗体是经拟人化单株抗体。

[0010] 在本发明另一具体实施例中,该重链可变域包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列,而该轻链可变域包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

[0011] 在另一方面,本发明涉及一种经纯化或经分离的单链可变片段,其包括:

[0012] (a) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变域及包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的轻链可变域,或包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变域及包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变域;及

[0013] (b) 链接该重链可变域及该轻链可变域的链接肽。

[0014] 除此之外,在另一方面,本发明涉及一种经分离的单株抗体或其抗原结合片段,其具有下列的特征:

[0015] (a) 对于包括SEQ ID NO:1氨基酸序列的上皮细胞黏着分子 (EpCAM) 具有特异性结合亲和力;

[0016] (b) 对于可表现EpCAM的癌细胞具有特异性结合亲和力,该癌细胞是选自由口腔癌细胞、鼻咽癌细胞、结肠直肠癌细胞及卵巢癌细胞所组成的群;及

[0017] (c) 对于人脐静脉内皮细胞及正常鼻黏膜上皮细胞则不具结合亲和力。

[0018] 在本发明一具体实施例中,该抗体或抗原结合片段在活体内可展现出诱导该癌细胞凋亡及/或抑制该癌细胞生长的特征。

[0019] 在本发明另一具体实施例中,该抗体或抗原结合片段对于位处EpCAM的EGF样区域II内的KPEGALQNNDGLYDPDCDE (SEQ ID NO:63) 序列内的抗原决定部位具有特异性结合亲和力。

[0020] 在本发明另一具体实施例中,该抗体或抗原结合片段是经一可侦测化合物或酵素加以标记,或是经囊封在脂质体内。

[0021] 在本发明另一具体实施例中,该抗体或抗原结合片段包括:

[0022] (a) 包含SEQ ID NO:2氨基酸序列的重链可变域及包含SEQ ID NO:3氨基酸序列的轻链可变域;或

[0023] (b) 包含SEQ ID NO:24氨基酸序列的重链可变域及包含SEQ ID NO:25氨基酸序列的轻链可变域。

[0024] 除此之外,在另一方面,本发明涉及一种组合物,其包括:(a) 如前所提的经分离的抗体或抗原结合片段;(b) 一抗癌药剂;及(c) 一医药上可接受的载剂。

[0025] 除此之外,在另一方面,本发明涉及一种抑制癌细胞及/或肿瘤起始细胞生长的方法,该方法包括向一有其需要的个体投予一组合物,该组合物包括:(a) 如前所提的经分离的抗体或抗原结合片段;及(b) 一医药上可接受的载剂,其中该癌细胞及/或肿瘤起始细胞具表现EpCAM。

[0026] 在本发明一具体实施例中,是将拟人化抗体或抗原结合片段投予至该个体。该癌细胞是选自由口腔癌细胞、鼻咽癌细胞、结肠直肠癌细胞及卵巢癌细胞所组成的群。

[0027] 又另一方面,本发明涉及侦测及/或诊断具表现EpCAM的癌细胞的方法,该方法包括:

[0028] (a) 自一病患取得细胞或组织样本;

[0029] (b) 将该细胞或组织样本与如前所提的抗体或结合片段接触;

[0030] (c) 分析该抗体或结合片段结合至该细胞或组织样本的情况;及

[0031] (d) 与正常对照组比较结合情况,以判定个体中具表现EpCAM的癌细胞存在。

[0032] 并与下文图式及下列较佳实施例的说明,本发明该等或其他态样会是显而易见的,虽然其中可以进行变化及修饰,但不会脱离本发明新颖概念上的精神及范畴。

[0033] 该等所附图式可说明清楚本发明一或多个实施例,且并与书面说明可用以解释本发明原理。只要有可能的情况下,通篇图式是使用与实施例同一或类似组件的相同参考编号。

附图说明

[0034] 图1显示OCAb9-1与各种不同癌细胞株的结合活性。(A) OCAb9-1在各种不同癌细胞

株的结合活性的ELISA分析。NM-IgG是作为对照组。(B) OCAb9-1单株抗体对抗口腔癌细胞(SAS)、鼻咽癌细胞(NPC)、肺癌细胞(H441及H520)、结肠直肠癌细胞(HCT116、SW620及COLO 205)及卵巢癌细胞(SKOV-3)、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)及正常鼻黏膜上皮细胞(NNM)的西方转渍分析。(C) 抗EpCAM单株抗体(OCAb9-1)在人类组织微数组中的免疫组织染色。将经包埋石蜡部分与OCAb9-1培养反应,以侦测不同人类癌组织(包括口腔、乳房、结肠、卵巢及子宫及该等对应的正常组织)中的EpCAM表现。EpCAM(染成棕色)、苏木精(染成蓝色)为背景染色之用。细胞照影成像是放大200倍取得。

[0035] 图2显示OCAb9-1标靶蛋白的鉴定。(A)通过免疫亲和力层析纯化的OCAb9-1标靶蛋白。第1行:分子量标志;第2行:自经共轭OCAb9-1亲和力管柱所纯化的蛋白质,及第3行:自经共轭OCAb9-1亲和力管柱所纯化蛋白质的西方转渍分析。将39kDa蛋白质(箭头指示处)经纯化,并进行LC/MS/MS分析。(B)以Swiss-Prot数据库确认OCAb9-1的标靶蛋白。全长的人类TACSTD1(EpCAM)为含有314个氨基酸的多肽。高度亮点序列是被LC/MS/MS点击的肽。(C) SAS细胞溶解物与OCAb9-1抗体进行免疫沉淀反应,之后与兔子抗EpCAM单株抗体(1144-1)及EpAb3-5、EpAb4-1抗体进行转渍分析。(D)两种EpCAM shRNA质体(shEpCAM1及shEpCAM2)分别转染至SAS细胞株之后,萃取出每一细胞株的总RNA,并以qRT-PCR分析检测。shEpCAM1及shEpCAM2两者质体在经转染SAS细胞株中对于EpCAM mRNA具有明显的抑制效应。测量经混合选殖体的样本,每一处代表平均值 $\pm$ SEM(n=3)。***表示 $P<0.001$ 。(E)进行西方转渍分析及(F)流式细胞分析,以评估抗OCAb9-1单株抗体与对照组细胞及剔除EpCAM基因SAS细胞的结合。

[0036] 图3显示该等抗EpCAM单株抗体的特征。OCAb9-1及EpAb单株抗体可辨识人类癌细胞株。将SAS、HCT116及NNM细胞与OCAb9-1及EpAb单株抗体培养。利用流式细胞分析技术、免疫荧光染色(A)及西方转渍(B)测量该等抗EpCAM单株抗体的结合活性。以EpAb2-6(0-20 μ g/ml)处理(C) SAS细胞及(D) HCT116细胞6小时,利用膜联蛋白V-FITC及PI双重染色通过流式细胞分析技术测量细胞死亡情况。膜联蛋白V-FITC可用以测量细胞族群内在早期(6小时)活跃性地进行细胞凋亡作用的细胞百分比。碘化丙啶(PI)是用以从不具生命力细胞中区分出具生命力的细胞。

[0037] 图4显示EpCAM shRNA及EpAb2-6在活体外及活体内对癌细胞生长的抑制作用。通过EpCAM shRNA(shEpCAM)剔除EpCAM基因在SAS细胞中的表现。单独使用LKO shRNA载体(对照组shRNA)是作为对照组。(A) EpCAM的降调节会抑制SAS细胞的细胞增殖。通过MTT检测法分析细胞存活率。**表示 $p<0.01$,***表示 $p<0.001$ 。(B-D)显示活体外抑制EpCAM的表现会抑制肿瘤细胞的(B)细胞群落形成、(C)迁移及(D)侵犯性。(E)抑制EpCAM的表现会降低活体内肿瘤生长。以EpAb2-6单株抗体(10mg/kg)或PBS处理带有SAS衍生性肿瘤异种移植的NOD/SCID小鼠,并测量肿瘤体积(n=6)(数据以平均值 $\pm$ SD表示,而p值是以t-检定法分析)。误差线为 $\pm$ SD。*表示 $P<0.05$ 。(F)所示Kaplan-Meier存活曲线为经以EpAb2-6及PBS处理的小鼠的长时间存活期(每一组n=6)。

[0038] 图5A-D显示EpAb2-6会减小瘤球形成。以碘化丙啶(PI)染色通过流式细胞技术分析,EpAb2-6会增加(A) HCT116及(B)瘤球(HCT116球体细胞)中的异二倍体DNA的含量。(C) EpAb2-6会减小瘤球形成。(D) HCT116球体细胞以EpAb2-6处理6天,计算所得瘤球数目。

[0039] 图6显示单独使用EpAb2-6或EpAb2-6并与IFL组合使用对抗带有HCT116肿瘤小鼠

的效果。(A) 带HCT116衍生性结肠癌小鼠投予EpAb2-6、IFL、EpAb2-6与IFL的组合,及PBS。测量每一组的肿瘤大小(每一组的 $n=6$)。每一点表示平均值;误差线为SD。(B) 每一组的体重。(C) 治疗结束时,测量肿瘤重量。(D) 在(C)中所述的分析结果代表性影像。*表示 $p<0.05$ 为显著差异。

[0040] 图7显示发展对抗EpCAM的拟人化抗体。(A) 将EpAb2-6的CDR嫁接至人类IgG1基本架构上,以产生拟人化抗体EpAb2-6(hEpAb2-6)。hEpAb2-6对人类癌细胞株的结合能力。以ELISA测量mEpAb2-6及hEpAb2-6与(B) SAS细胞及(C) CCD-1112Sk细胞的结合活性。正常小鼠IgG(NM-IgG)及正常人类IgG(人类IgG)是作为阴性对照组。(D) mEpAb2-6及hEpAb2-6对抗NNM、SAS及HCT116细胞的西方转渍分析。以hEpAb2-6($0-20\mu\text{g/ml}$)处理(E) SAS细胞及(F) HCT116细胞6小时,并以膜联蛋白V-FITC及碘化丙啶(PI)双重染色通过流式细胞技术分析测量细胞死亡。

[0041] 图8A-B显示EpAb2-6特异性B细胞抗原决定部位的鉴定。(A) 吾人通过改变野生型EGF-I区域(Q54A/N55A)或EGF-II区域(Q89A/N90A、D92A/G93A、L94A/Y95A、L94A、Y95A或D96A)氨基酸而构筑各种不同的EpCAM突变。(B) 各种不同的EpCAM突变体在HEK293细胞中表现。萃取出细胞蛋白质之后,使用西方转渍分析测定EpAb2-6及EpAb3-5等抗体对抗各种EpCAM突变体的反应性。Y95及D96氨基酸取代会导致EpAb2-6单株抗体结合活性明显的减损,其对应应在EGF-II上的序列如(A)所示。

[0042] 图9显示EpCAM的增加与肿瘤细胞的肿瘤起始及自我更新能力有关。在球体肿瘤细胞及抗失巢凋亡肿瘤细胞中测到EpCAM的表现量增加。(A) 视野影像下球体细胞、抗失巢凋亡细胞及附着性HCT116细胞中细胞形态明显改变。上述细胞中EpCAM的表现(B) 实时qPCR(左)及(C) 流式细胞技术分析。(D) 以三重复方式计算筛选具高表现EpCAM细胞及低表现EpCAM细胞比较两者细胞的球体细胞形成数目。所示图像是来自高表现EpCAM及低表现EpCAM细胞的瘤球的代表性影像。(E) 评估球体细胞及附着性HCT116细胞在小鼠中的肿瘤起始能力。肿瘤发生率及肿瘤体积计监测35天。(F) 经苏木精及曙红(H&E)染色肿瘤部分的组织学分析(图所显示上方:相邻鼠科骨骼肌间浸润前的侵犯性;下方:具有清楚界定的扩张性肿瘤界线,而不是组织浸润)。

[0043] 图10显示EpCAM会升调节癌细胞的改编基因(c-MYC、OCT4、NANOG及SOX2)表现及自我更新。(A) 球体肿瘤细胞中EpCAM表现及改编基因表现的增加情况。球体及附着性HCT116细胞中EpCAM、c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2表现的即时qPCR(左上图)、西方转渍(右上图),及免疫荧光染色(下图)分析。(B) 高表现EpCAM及低表现EpCAM的HCT116细胞中该等基因表现的即时qPCR分析。(C) 通过即时qPCR分析HEK293细胞中EpCAM的异位表现及改编基因表现。(D) 在剔除EpCAM基因的Hep3B细胞及HCT116细胞中EpCAM、c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2mRNA含量的即时qPCR分析。(E) 抑制EpCAM会减小Hep3B及HCT116细胞中瘤球形成,量线=50微米。(F) 剔除瘤球中EpCAM基因在活体外会影响自我更新能力。实验步骤示于上文。**为 $p<0.01$ 表示明显差异。(G) 通过打入不同细胞浓度进入活体内分析证明瘤球中剔除EpCAM基因会抑制肿瘤起始能力。*为 $p<0.01$ 是以对数等级检定分析。

[0044] 图11显示EpCAM的表现与EMT进展及肿瘤生成有关。(A) 在剔除EpCAM基因的Hep3B细胞及HCT116细胞中E-钙黏着素(E-cad)、细胞角蛋白18(CK18)及中间丝蛋白(Vim)的免疫荧光染色。(B) 在剔除EpCAM基因的Hep3B细胞及HCT116细胞中EMT基因表现的即时qPCR(左

图) 及西方转渍(右图) 分析。(C) 在高表现EpCAM及低表现EpCAM分筛细胞中EMT基因表现的即时qPCR分析。(D及E) 抑制EpCAM会抑制活体外肿瘤细胞的侵犯性(D) 及细胞群落形成(E)。(F) 抑制EpCAM会降低活体内肿瘤生长。以皮下方式将 2×10^6 的HCT/LKO及HCT/EpCAM shRNA细胞注射至NOD/SCID小鼠中, 每3天测量肿瘤体积(左图), 并在实验结束时测量肿瘤重量(右图)($n=6$)。(G) 利用即时qPCR分析萃取自肿瘤的RNA(数据是以平均值 $\pm$ SD表示, 而以t-检定分析p值)。

[0045] 图12显示细胞内结构域(EpICD) 参与调节自我更新及EMT基因。(A) 细胞经DAPT处理(50 μ M) 或未处理后, HCT116细胞中EpICD在细胞核转位的雷射共焦免疫荧光照影成像分析。量线=10 μ m。(B) 293T/EpCAM-v5细胞以DAPT处理后的EpICD裂解的西方转渍分析结果, 而蛋白质样本是与EpICD或v5抗体进行转渍(黑色箭头表示EpICD裂解)。(C-E) (C) DAPT会抑制EMT基因表现、(D) 肿瘤侵犯性及(E) 瘤球形成。(F) EpCAM过度表现会升调节c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2的转录活性。以荧光素酶分析法评估启动子活性。(G) DAPT会抑制EpCAM所诱发的c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2转录活性。(H) EpICD诱发改编基因的转录活化作用。(I-J) 染色质免疫沉淀法(ChIP) 分析EpICD与HCT116及NNM细胞中c-MYC、OCT4、NANOG及SOX2基因外显子结合后DNA活化情况。**为 $p<0.01$ 是表示显著差异。

[0046] 图13显示EpEX为活化EpCAM讯号的转换子。(A) 293T转染选殖体中EpEX291及全长EpCAM蛋白质表现的西方转渍分析结果。(B) EpEX会诱发c-Myc、Nanog、Oct4及Sox2的启动子活性。细胞以pEpEX291转染(左图), 或添加可溶性EpEX(sEpEX; 2 μ g/ml)(右图), 通过荧光素酶分析法评估c-Myc、Nanog、Oct4及Sox2的启动子活性, 对照组是使用BSA。(C) EpCAM表现细胞的细胞外结构域(EpEX) 释放。以免疫沉淀法及西方转渍分析HCT116细胞培养上清液中EpEX释放含量。(D) 鉴别来自HCT/LKO及HCT/EpCAM shRNA细胞培养上清液中的EpEX。(E) HCT116细胞经以DAPT(50 μ M)、TAPI(40 μ M) 或两者(D/T) 处理24小时, 该培养上清液与EpEX抗体进行免疫沉淀作用, 而整个细胞溶解液(whole cell lysate; WCL) 是与抗EpEX抗体(中间分格) 或抗EpICD抗体(下面分格) 进行西方转渍分析。黑色箭头: 可溶性EpICD; 灰色箭头: 中间型EpICD。(F) HCT116细胞以pEpEX291-v5(0.5 μ g、2 μ g) 转染72小时(左图) 或以sEpEX(2.5 μ g/ml、5 μ g/ml) 处理(右图), 该细胞培养上清液及细胞溶解物以上述西方转渍技术进行分析。

[0047] 图14显示EpCAM(EpICD) 与自我更新基因表现及肿瘤恶性的关联性。(A) 人类结肠直肠癌(HCRC)、邻近正常黏膜组织及正常结肠组织等不同组织上EpEX及EpICD在细胞定位的免疫荧光照影成像。所示代表性影像为EpEX(绿色) 及EpICD(红色) 的个别影像(上部分格), 合并影像(中间分格) 及从个别影像(虚框处) 的放大区域(下部分格)。箭头是指(HCRC) EpICD会进入细胞核内, 而在(邻近正常黏膜组织) 发现细胞膜上EpEX与EpICD会有共位现象。通过人类结肠癌组织微数组进行EpICD蛋白质表现的免疫组织分析。(B) 所示代表性影像为正常细胞及不同分化程度肿瘤细胞的随机放大局部图, 及(C) EpICD表现的箱线图, 以t-检定分析P值。图14D显示EpICD的细胞定位表现在细胞膜(M)、细胞质(C) 及细胞核(N) 中。右边影像是左边影像框线区域的局部放大图。(E) 通过qPCR分析测定42位人类结肠癌病患中EpCAM、c-Myc、Nanog、Oct4及Sox2的mRNA表现含量。EpCAM与改编基因间的相关性是以斯皮尔曼氏分析法(Spearman's analysis) 评估。

[0048] 图15为该等对抗癌细胞单株抗体的主要特征的综整。

- [0049] 图16为该等抗EpCAM单株抗体的主要特征的综整。
- [0050] 图17显示EpAb2-6VH及VL区域的氨基酸序列。
- [0051] 图18显示该等抗EpCAM单株抗体的动力学常数及结合亲和力。
- [0052] 图19显示以EpAb2-6筛选的噬菌体展现肽序列的排列比较。

具体实施方式

[0053] 除非另有定义,否则本文所使用的所有技术及科学术语为熟知本发明所涵盖技艺者惯常了解的意义。在有矛盾的情况下,本发明文件,包括定义将可以支配主控。

[0054] 如本文所使用,「左右」、「约」或「大约」通常是指给定数值或范围的20%内,较佳是10%内,且更佳是5%内。本文给定的数量是大约的,其意指如果未表述说明,该术语为「左右」、「约」或「大约」的意思。

[0055] 缩写:mAb意指单株抗体;NNM意指正常鼻黏膜;FACS意指流式细胞技术分析;ELISA意指酶联免疫吸附分析;EMT意指上皮间质转化;qRT-PCR意指定量即时反转录聚合酶链式反应;ChIP意指染色质沉淀作用;GAPDH意指甘油醛-3-磷酸脱氢酶;HUVEC意指人脐静脉内皮细胞;IHC意指免疫组织化学;CDR意指互补决定域。

[0056] 如本文所使用,「调剂」通常应指经制备、制造、特制物质的某物品。

[0057] 如本文所使用,「抗体」一词意指具有可特异性结合至特定抗原的能力的免疫球蛋白(Ig)分子或免疫球蛋白分子的片段。该Ig单体是由4条多肽链所组成的「Y」形分子,包括由双硫键链接的2条相同重链及2条相同轻链。该Y形分子的臂杆上含有可结合抗原的位点,且因此可辨识特异性外来物体。该抗体的此区域被称为Fab(fragment,antigen binding)区域。

[0058] 如本文所使用,「抗体」一词不只是指全长的抗体分子,也是指仍具有抗原结合能力的抗体分子片段。此等片段亦为技艺所熟知的,且经常性地活体外及活体内使用。「抗体」一词不只是指全长的免疫球蛋白分子,亦指抗原结合活性片段,诸如众所熟知的活性片段F(ab')₂、Fab、Fv及Fd。

[0059] 抗原结合片段(Fab片段)是指在抗体上可与抗原结合的区域。其是由每条重链及轻链的一个固定域及一个可变域组成。该两个可变域会与其特异性抗原上的抗原决定部位结合。Fc及Fab片段可以在实验室里制造产生。酵素木瓜蛋白酶可用以将免疫球蛋白的单体裂解成2个Fab片段及1个Fc片段。酵素胃蛋白酶会切在枢纽区域,因此会形成1个F(ab')₂片段及1个pFc'片段。酵素IdeS(源于化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的免疫球蛋白降解酵素,商品名为FabRICATOR™)在中性pH下会以序列特异性方式裂解IgG。该F(ab')₂片段通过温和还原作用可以切成2个Fab'片段。

[0060] 抗体的可变域是以Fv区域表示,且其是与抗原结合最重要的区域。

[0061] 「Fv片段」是具有活性的抗体片段(Fv),是由重链及轻链的可变部分组成。该「Fv片段」是由重链可变域(VH)及轻链可变域(VL)通过强力非共价方式相互影响结合在一起而组成。因此,每一Fv片段含有一个完整的抗原结合位点,且为衍生自抗体分子的最小活性片段。

[0062] 该重链及轻链的可变域可以融合在一起,而形成单链可变域(single-chain variable fragment;scFv),其只有Fab片段大小的一半,但仍保有亲本免疫球蛋白原有的

特异性。

[0063] 现已报导,「完全地」人类抗体可避免某些经拟人化抗体及嵌合抗体的副作用。有两种成功的方法是经确认的一产生抗体的噬菌体表现技术及用以产生更多似人类抗体的老鼠遗传工程技术。可使用噬菌体表现技术,如此可变的抗体区域便可以表现在丝状噬菌体抗体上。

[0064] 技艺中现已为大家接受的是哺乳类抗体的非CDR区域可经同质特异性或异质特异性抗体的类似区域置换,但仍保有原抗体的抗原决定部位特异性。此在「拟人化」抗体的发展及用途上最为明确地显露,其中为了产生具有功能的抗体,是将非人类CDR以共价方式结合至人类FR及/或Fc/pFc'区域。因此,(例如)PCT国际公开案W092/04381揭示经拟人化鼠科RSV抗体的产生及用途,其中至少一部分的鼠科FR区域业经人类来源的FR区域置换。此等抗体(包括具有抗原结合能力的全长抗体片段)常被称为「嵌合」抗体。所产生的此等嵌合抗体的其中抗体的某些或全部FR区域业经其他同构型人类FR区域置换。

[0065] 非人类(例如鼠科)抗体的经拟人化形式为含有衍生自非人类免疫球蛋白最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体其他抗原结合次序列)。经拟人化抗体包括人类免疫球蛋白(接受者抗体),其中该接受者的互补决定域(CDR)的残基是被诸如具有所需特异性、亲和力及容量的小鼠、大鼠或兔子的非人类物种者(供应者抗体)的CDR的残基置换。在某些例子中,人类免疫球蛋白的Fv架构残基是被对应的非人类残基所置换。经拟人化抗体亦包括既非发现在接受者抗体亦非发现在外来CDR或架构序列的残基。一般而言,经拟人化抗体会包括实质上至少一个及典型地两个所有的可变域,其中所有或实质所有的CDR区域是对应在非人类免疫球蛋白的CDR区域,且所有或实质所有的FR区域为人类免疫球蛋白一致性序列的FR区域。该拟人化抗体最佳亦包括至少一部分的免疫球蛋白固定域(Fc),典型地是人类免疫球蛋白的固定域[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); 及Presta, Curr.Op.Struct.Biol., 2:593-596 (1992)]。

[0066] 将非人类抗体进行拟人化的方法是技艺中所熟知的。通常地,经拟人化抗体具有一或多个并入其中的非人类来源的氨基酸残基。该等非人类氨基酸残基常被称为「输入」残基,该等典型地是取自「输入」可变域。拟人化作用基本上是根据Winter及共事者的方法[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); 及Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)],通过将噬齿类动物CDR或CDR序列取代人类抗体的对应序列加以进行的。因此,此等「拟人化」抗体是嵌合抗体(美国专利案4,816,567),其中实质上不超过一个完整人类可变域是经非人类物种的对应序列所取代。实务上,拟人化抗体通常地是人类抗体,其中某些CDR残基及可能某些FR残基是经噬齿类动物抗体中类似位置处的残基所取代。

[0067] 人类抗体亦可利用各种技艺中已知的技术产生,包括噬菌体表现库技术。Cole等人及Boerner等人的技术亦可用在制备人类单株抗体[Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p77 (1985) 及Boerner et al., J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991)]。类似地,人类抗体可通过将人类免疫球蛋白基因座引入至其中该内源性免疫球蛋白基因业经部分或全部失活的转殖基因动物(例如小鼠)中而加以制造。当激敏后,可以观察到人类抗体的产生,其在所有方面是与人类中所见者极为类

似,包括基因重新排列、组合及抗体的全部型态。此方法(例如)是描述在美国专利案5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016。此完全性人类单株抗体或拟人化单株抗体具有特别用途是在于该等抗体不会引发对抗抗体本身的免疫反应。参见美国专利案7,622,113,该案是以全文并入本文参考。

[0068] 该抗体可经标记化及固定在固体支撑物上。当本文所使用的「标记物」一词是指以直接方式或间接方式共轭至抗体上的可侦测性化合物或组合物,如此即可产生「经标记」抗体。该标记物本身可以具有侦测性的(例如,放射性同位素标记物或荧光标记物),或以酵素性质标记物的例子而言,该标记物可催化受质化合物或组合物发生具有侦测性的化学性变化。

[0069] 实施例

[0070] 根据本发明实施例的装置、方法及其相关结果如下所示,但非意欲限制本发明范畴。注意的是为方便读者,实施例中使用了标题或次标题,但绝非限制本发明范畴。再者,本文提出及揭示某些理论,然而不论该等理论是对或错,绝非限制本发明范畴,只要本发明是根据本发明据以实施,不考虑任何特别理论或作用流程为何。

[0071] 材料与方法

[0072] 细胞株与培养。使用下列人类细胞株:口腔癌症(FaDu及SAS)、鼻咽癌(NPC039)、卵巢癌(SKOV-3)、肺癌(CL1-5、H441及H520)、胰脏癌(MIA PaCa-2)、结肠直肠癌(COLO205、HCT116及SW620)、肝细胞癌(Hep3B及Mahlavu)、肾细胞癌(A498)、前列腺癌(PC3)、CCD-1112Sk(人类正常包皮细胞)及正常鼻黏膜上皮细胞(NNM)的原代培养。NPC细胞是在吾人的实验室建立的(Lin等人.(1993)「七种新建立鼻咽癌细胞株」Lab. Invest. 68, 716-727)。Mahlavu细胞是Michael Hsiao博士(基因体研究中心,中央研究院)赠与。正常鼻黏膜上皮细胞(NNM)的原代培养是采自罹患鼻息肉患者的手术(Lee等人., (2007)「爱波斯坦-巴尔病毒感染对于在鼻咽癌的整体基因的效应」Funct. Intergr. Genomics 7, 79-93)。人脐静脉内皮细胞(HUVEC)是购买于(龙沙公司(Lonza), Walkersville镇, 马里兰州),且在EBM-2培养基(龙沙公司(Lonza), Walkersville镇, 马里兰州)中生长。人类口腔癌细胞株SAS获自日本研究生物资源库(东京, 日本),该等细胞是在5%CO₂、37℃下培养在经补充含有10%FBS的杜尔贝克氏改良的伊格氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's medium; DMEM)中。杨泮池(Pan-Chyr Yan)博士所提供的肺腺癌细胞(CL1-5)(Chu等人., (1997)「从人类肺腺癌细胞株挑选具侵略性及转移性的次细胞群」Am J Respir Cell Mol Biol. 17, 353-60)是培养在补充含有10%FBS的RPMI培养基中。其他细胞株是购自ATCC并培养在经补充含有5%或10%胎牛血清(FBS)的杜尔贝克氏改良的伊格氏培养基(DMEM)中(置于37℃、5%的CO₂潮湿培养箱中)。该等细胞是根据ATCC的步骤培养,且在细胞复苏后经过少于6个月的继代培养。

[0073] 单株抗体的产生及IgG的纯化。依循下列仅稍作修改的标准程序产生对抗SAS细胞及EpCAM抗原的单株抗体(Wu等人.(2003).「登革热2型病毒(DEN-2)血清型特异性B细胞抗原决定部位的鉴定及利用以抗原决定部位为主的肽抗原的DEN-2经免疫动物血清样本的侦测」J. Gen. Virol. 84, 2771-2779; Liu等人.(2011)「通过抗登革热病毒非结构性蛋白1的自体抗体的人类内皮细胞抗原的分子拟态」J. Biol. Chem. 286, 9726-36)。简而言之,雌性BALB/cJ小鼠以腹膜内方式以3周间隔时间利用SAS进行免疫4次。在最后追加剂的第4天,从经免疫小鼠脾脏获取脾脏细胞,并通过50%聚乙二醇(GIBCO, CA, USA)与NSI/1-Ag4-1多发

性骨髓瘤细胞进行融合。将经融合细胞悬浮在补充含有次黄嘌呤-胺基蝶呤-胸腺嘧啶(hypoxanthine-aminopterin-thymidine;HAT) (SIGMA™,圣路易斯市,密苏里州)及杂交瘤选殖因子(ICN,奥罗拉市,俄亥俄州)的DMEM培养基中,而后培养在96孔培养盘中。而后通过有限稀释法对该等SAS为阳性但NNM为阴性的杂交瘤进行次选殖,并保存在液态氮中。经姥鲛烷(pristane)灌注的BALB/cJ小鼠会产生腹水,而以蛋白G琼脂糖4G凝胶(GE Healthcare Biosciences,匹兹堡市,宾夕法尼亚州)纯化出单株抗体。

[0074] ELISA。以SAS(口腔癌细胞)、NPC、HCT116(结肠癌细胞)、SKOV3(卵巢癌细胞株)、NNM及HUVEC细胞接种于96孔培养盘中(Corning Costar,圣路易斯市,密苏里州)。该等培养盘以2%多聚甲醛固定并以1%牛血清白蛋白阻断。将OCAb9-1加至该等培养盘中并培养1小时。而后用含有0.1%(重量体积比)TWEEN®20的PBS(PBST_{0.1})清洗该等培养盘,并与经共轭辣根过氧化酶的抗小鼠IgG(Jackson ImmunoResearch实验室)再培养1小时。清洗后,该等培养盘与受质溶液邻-苯二胺二盐酸盐(SIGMA™)培养。通过添加3N盐酸终止反应,并以微量盘计读仪读取490nm处的读值。

[0075] 流式细胞技术。使用0.25%胰蛋白酶-EDTA(1mM)(INVITROGEN®)1-3分钟将SAS、HCT116及NNM细胞解离分开。用经活化荧光细胞分筛缓冲液(含有1%胎牛血清的PBS)清洗细胞,而后在4℃下与稀释范围为0.00001至1μg/ml的OCAb9-1及EpAb培养在经活化荧光细胞分筛缓冲液中1小时。与作为第二抗体的经共轭藻红蛋白的山羊抗小鼠IgG(稀释1:250; Jackson ImmunoResearch Laboratories(West Grove,宾夕法尼亚州)在4℃下培养30分钟。最后清洗之后,该等细胞再以溶在PBS的1%FBS进行悬浮,并以流式细胞仪(BD,圣荷西市,加州)进行分析。

[0076] 免疫荧光染色。培养在盖玻片上的细胞是以多聚甲醛固定、清洗,而后以含有溶在PBS的1%牛血清白蛋白阻断10分钟。将细胞与溶在1%牛血清白蛋白的第一抗体培养在室温下。1小时培养后,细胞经清洗并与异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate; FITC)山羊抗小鼠抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)、Alexafluor488山羊抗小鼠抗体或Alexafluor568山羊抗兔子(INVITROGEN®)抗体培养。加入4',6-二甲脒基-2-苯基吡啶(DAPI)以便进行核复染染色。

[0077] 免疫组织化学分析。将老鼠肿瘤组织或人类组织微数组(Pantomics公司,旧金山,加州)与抗体培养,而后与经共轭辣根过氧化酶(HRP)的第二抗体培养。该等部分最后与二胺基联苯胺培养并以苏木精(hematoxylin)进行复染。人类结肠癌组织微阵列及15种癌症组织分析(TMA BC05011及TMA MTU391)主要类型是购自BIOMAX®。利用HistoQuest software(TissueGnostics,维也纳,奥地利)定量EpICD的表现。通过具有控制滤片、照相机及机动平台(Märzhäuser,韦兹拉尔,德国)的AQuest软件(TissueGnostics,维也纳,奥地利)进行标准化自动摄取。以影像细胞学而言,所有影像均是利用Tissue-Faxs图像分析软件(TissueGnostics,维也纳,奥地利)获得。

[0078] 靶蛋白的鉴定。SAS细胞以补充含有蛋白酶抑制剂鸡尾酒錠片(Roche,印第安纳波利斯市,印第安纳州)的裂解缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 7.4,150mM NaCl,1%NP-40)进行裂解。将上清液施加至与OCAb9-1偶合的蛋白质G琼脂糖凝胶(GE Healthcare Biosciences,匹兹堡市,宾夕法尼亚州)。清洗之后,用冲脱缓冲液(0.2M甘氨酸,pH 2.5,150mM NaCl及1%NP-40)冲脱与OCAb9-1结合的蛋白质,并以1M Tris-HCl,pH 9.1中和冲脱

液(Liu等人.,2011)。该冲脱液通过SDS-PAGE进行离析。从凝胶上切下感兴趣的条纹带,以溶在25mM碳酸氢铵(ammonium bicarbonate;ABC)的50mM二硫苏糖醇(dithioerythritol;DTE)在pH 8.5、37℃下进行还原作用1小时,并在室温下以溶在ABC的100mM碘乙酰胺(iodoacetamide;IAA)进行烷基化1小时。以溶在ABC的50%乙腈清洗后,将该凝胶浸泡在100%乙腈中,并与0.02μg胰蛋白酶在37℃下培养16小时。该经消化的肽以溶在5%TFA的50%乙腈萃取,并以浓缩器(Eppendorf,汉堡市,德国)浓缩。该样本以中央研究院蛋白质组学及结构生物学研究所核心设备中心的LC-MC/MS定序加以分析。

[0079] 免疫沉淀及西方转渍分析。用补充含有蛋白酶抑制剂混合锭(Roche,印第安纳波利斯市,印第安纳州)的RIPA缓冲液(0.01M磷酸钠(pH 7.2),150mM NaCl,2mM EDTA,50mM NaF,1%Nonidet P-40,1%脱氧胆酸钠,及0.1%SDS)萃取细胞,并在4℃下以20,000g的速度旋转离心30分钟。上清液利用抗EpCAM抗体进行免疫沉淀作用。使用经共轭HRP的第二抗体(Jackson Immuno Research Labs,West Grove,宾夕法尼亚州),且利用经强化化学发光药剂(enhanced chemiluminescence reagents;ECL)(Thermo Scientific,罗克福德市,伊利诺伊州)将讯号显影。

[0080] 细胞凋亡分析。细胞分别地接种,并以0-20μg/ml单株抗体处理6小时。通过膜联蛋白V-FITC及PI侦测细胞凋亡的细胞,并以流式细胞仪(BD免疫细胞分析系统,圣荷西市,加州)进行分析。早期细胞凋亡作用是以膜联蛋白V-FITC细胞凋亡侦测套组II(BD Pharmingen,拉霍亚市,加州)测量,细胞凋亡的细胞核是以碘化丙啶(PI)染色。

[0081] 用以分析抗肿瘤功效的动物模式。带有SAS衍生性口腔癌异种移植(~75mm³)的SCID小鼠在尾部静脉处以静脉注射方式注射EpAb2-6或等体积的PBS。经由尾部静脉注射方式施与治疗,每周2次10mg/kg,连续4周,总剂量80mg/kg。每周以测径尺(caliper)测量肿瘤2次,且常规性地观察小鼠重量减少情况,以作为药剂毒性的表征。肿瘤体积是以长度×(宽度)²×0.52计算得之。以组合式治疗肿瘤模式而言,根据不同治疗的方案(EpAb2-6、IFL、EpAb2-6加上IFL,及PBS对照组),将带有HCT116衍生性结肠癌异种移植(~50mm³)的SCID分成4组。以仅接受EpAb2-6的组别而言,小鼠经由尾部静脉以静脉注射方式(i.v.)注射20mg/kg剂量,每周2次施与EpAb2-6单品疗法达4周(每周×4)。以仅接受IFL的组别而言,IFL(25mg/kg的5-FU+10mg/kg的亚叶酸钙(leucovorin)+10mg/kg伊利替康(irinotecan))是通过静脉注射方式(i.v.)每周施与2次达4周(每周×4)。以组合式治疗组别而言,EpAb2-6是在IFL前24小时投予;EpAb2-6及IFL两者一如其他两组是以相同的剂量周期给药。EpAb2-6组合IFL的程序是改良自先前报导(Azrak RG等人.(2004)「伊利替康及5-氟尿嘧啶间的治疗合作对抗人类肿瘤异种移植」C1 in Cancer Res.10,1121-9;Kim等人.(2010)「除FOLFIRI方案外,树突细胞疫苗可经由鼠科结肠直肠癌模式抑制免疫抑制细胞增进抗肿瘤效应」Vaccine 28,7787-7796)。

[0082] 抗EpCAM抗体的选殖及CDR定序。利用TRIzol试剂(INVITROGEN®)从杂交瘤细胞中萃取出总RNA,并以NucleoTrap mRNA迷你套组(Macherey-Nagel GmbH&Co.KG.)分离出mRNA。经纯化mRNA以寡(dT)作引子在ThermoScript RT-PCR系统(INVITROGEN®)中进行反转录。通过PCR以各种引子组自cDNA产物扩增可变重链域及可变轻链域(VH及VL)。利用TA套组(Promega,麦迪逊市,威斯康星州)选殖该等PCR产物,并以DNA定序法测定该等VH及VL序列。Software Vector NTI(InforMax)是作为序列分析之用。从该等序列,将架构区域(FR)及互

补决定域(CDR)通过与见于Kabat数据库者加以比较及与见于ImMunoGeneTics数据库者校准而进行分析,(Lefranc等人.(2009)「IMGT,国际ImMunoGeneTics信息系统」Nucleic Acids Res.37,D1006-12)。

[0083] 拟人化EpAb2-6的构筑及表现。拟人化EpAb2-6VH分别是由编号DI164282基因的经修饰FR1至FR4及EpAb2-6VH的CDR1至CDR3所组成。拟人化EpAb2-6VL CDR则是由编号GM882764基因的经修饰FR及EpAb2-6VL的CDR所组成。将所得VH选殖至带有讯号肽及人类IgG1固定域的经修饰表现载体pcDNA3.1(INVITROGEN®)上。而VL是选殖至经修饰载体pSecTag(INVITROGEN®)上。该VH及VL质体共转染至CHO-K1细胞中并通过G418及嘌呤霉素筛选2-3周。其转型细胞在96孔培养盘中进行有限稀释。2周后,稳定性细胞选殖体会在麦考伊氏5A(McCoy's 5A)培养基(SIGMA-ALDRICH®)中产生拟人化抗体,并以ELISA加以鉴定。拟人化抗体是利用CELLine AD 1000(INTEGRA Biosciences,瑞士)根据制造商的建议所产生的。

[0084] 噬菌体表现生物淘洗法。噬菌体表现生物淘洗法步骤是根据先前报告进行的(Wu等人.,2003;Liu等人.,2011)。简而言之,ELISA盘以100μg/ml的单株抗体涂布。将100μg/ml单株抗体的样本加至培养盘孔中,并在4℃下培养6小时。清洗及阻断后,将噬菌体表现肽库(New England BioLabs公司)稀释成 4×10^{10} pfu的噬菌体并在室温下培养50分钟。清洗后,用100ml的0.2M甘氨酸/HCl(pH 2.2)冲脱经结合的噬菌体,并以15ml的1M Tris/HCl(pH 9.1)加以中和。经冲脱的噬菌体在ER2738(New England Biolabs公司,麻萨诸塞州,美国)中进行扩增以便随后重复循环的挑选工作。该噬菌体是在LB/IPTG/X-Gal培养皿上进行定量。第二轮及第三轮的生物淘洗步骤与第一轮是相同的,但用在生物淘洗时是添加 2×10^{11} pfu经扩增噬菌体。

[0085] 通过EpCAM突变株鉴定EpAb2-6抗原决定部位。吾人使用重组表现质体

[0086] pcDNATM3.1/V5-His以产生EpCAM突变株。通过衍生自pcDNATM3.1/V5-His作为模板的定点导向突变作用产生各式的EpCAM突变株。利用pfu ultra DNA聚合酶(MERCK)进行PCR,且所有突变构筑体均定序加以确认。生长在6孔培养盘中的80%-90%满的HEK293细胞以各式EpCAM质体进行转染。转染2天后,以PBS清洗该等细胞。用补充含有蛋白酶抑制剂混合锭的RIPA缓冲液萃取细胞,并在4℃下以20,000g速度离心旋转30分钟。该野生型及经突变重组蛋白质是通过与1μg/ml第一抗体(EpAb2-6或EpAb3-5)培养,接着与经共轭HRP的第二抗体(Jackson Immuno Research Labs,West Grove,宾夕法尼亚州)培养而进行染色,该等讯号是利用经强化化学发光药剂(ECL)(Thermo Scientific,罗克福德市,伊利诺伊州)进行显影。

[0087] 表面电浆共振技术。通过表面电浆共振(BIAcore T100,Biacore公司)进行鼠科及经人化抗体的亲和力分析。EpCAM抗原是固定在Series S Sensor Chip CM5(Biacore公司)上,并以10μl/min的流速注入。该等单株抗体是在HBS-EP⁺缓冲液(Biacore公司)中稀释,并以50μl/min的流速注入1.5分钟,并使其解离超过5分钟。在每一单株抗体注入前,先注入10mM甘氨酸HCl,0.2M NaCl(pH2.5)完成芯片表面的再生作用。该等数据是用整体拟合1:1结合模式通过BIAevaluation软件进行分析。

[0088] RNA萃取及定量实时RT-PCR。利用ULTRASPEC RNA分离试剂(Biotecx Laboratories,休斯敦市,德州)从细胞株中制备出总RNA。根据制造商的说明书,利用

Super-Script III RNaseH-反转录酶 (INVITROGEN®, 卡尔斯巴德市, 加州) 进行cDNA反转录。选殖、定量RT-PCR时所用的正向及反向引子列示在表1中。利用LightCycler480系统 (Roche Applied Science) 进行定量RT-PCR。每一样本的基因表现含量是以同一样本GAPDH的表现含量进行标准化。该等反应进行三重复, 并计算出标准误差值 (S.D.)。

[0089] 表1

[0090]

分析	基因	序列 (5'→3')
Q-RT-PCR 引子	<i>EpCAM</i>	F: CTCCACGTGCTGGTGTGT (SEQ ID NO: 26) R: TGTTTTAGTTCAATGATGATCCAGTA (SEQ ID NO: 27)
	<i>c-Myc</i>	F: AAACACAACTTGAACAGCTAC (SEQ ID NO: 28) R: ATTTGAGGCAGTTTACATTATGG (SEQ ID NO: 29)
	<i>Nanog</i>	F: ATGCCTCACACGGAGACTGT (SEQ ID NO: 30) R: AGGGCTGTCCTGAATAAGCA (SEQ ID NO: 31)
	<i>Sox2</i>	F: TATTTGAATCAGTCTGCCGAG (SEQ ID NO: 32) R: ATGTACCTGTTATAAGGATGATATTAGT (SEQ ID NO: 33)
	<i>Oct4</i>	F: AGCAAAACCCGGAGGAGT (SEQ ID NO: 34) R: CCACATCGGCCTGTGTATATC (SEQ ID NO: 35)
	<i>E-钙黏素</i>	F: GGAAGTATGAAAAGTGGGCTTG (SEQ ID NO: 36) R: AAATTGCCAGGCTCAATGAC (SEQ ID NO: 37)
	<i>中间丝蛋白</i>	F: GTTTCCCCTAAACCGCTAGG (SEQ ID NO: 38) R: AGCGAGAGTGGCAGAGGA (SEQ ID NO: 39)
	<i>Snail</i>	F: CTTTCGGCTCCAGGAGAGTC (SEQ ID NO: 40) R: TTCCCACTGTCCTCATCTGAC (SEQ ID NO: 41)
	<i>Slug</i>	F: TGGTTGCTTCAAGGACACAT (SEQ ID NO: 42) R: GTTGCAGTGAGGGCAAGAA (SEQ ID NO: 43)
	<i>GAPDH</i>	F: CTTCAACCATGGAGGAGGC (SEQ ID NO: 44) R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG (SEQ ID NO: 45)
	<i>18s rRNA</i>	F: GCAATTATCCCCATGAACG (SEQ ID NO: 46) R: GGGACTTAATCAACGCAAGC (SEQ ID NO: 47)
ChIP 引子	<i>c-Myc</i>	F: GCCTGCGATGATTTATACTCAC (SEQ ID NO: 48) R: AAACAGAGTAAGAGAGCCG (SEQ ID NO: 49)
	<i>Nanog</i>	F: TCTTCAGGTTCTGTTGCTCG (SEQ ID NO: 50) R: GTTAATCCCGTCTACCACTCTC (SEQ ID NO: 51)
	<i>Sox2</i>	F: GGATAACATTGTACTGGGAAGGGACA (SEQ ID NO: 52) R: CAAAGTTTCTTTTATTCGTATGTGTGAGCA (SEQ ID NO: 53)

[0091]

选 殖 引 子	<i>Oct4</i>	F: CGCCTCGAGTGGGGGAACCTGGAGGATGGCAAG (SEQ ID NO: 54) R: TATAAGCTTGGGGGAAGGAAGGCGCCCCAAG (SEQ ID NO: 55)
	<i>GAPDH</i>	F: TCCAAGCGTGTAAGGGT (SEQ ID NO: 56) R: GAAGGGACTGAGATTGGC (SEQ ID NO: 57)
	<i>EpEX</i>	F: TATAAGCTTACCATGGCGCCCCCGC (SEQ ID NO: 58) R: CGCCTCGAGAATAACCAGCACAA (SEQ ID NO: 59)
	<i>EpCAM</i>	F: GATAAGCTT ATGGCGCCCCCGCAGGTC (SEQ ID NO: 60) R: GATCTCGAGTGCATTGAGTTCCCTATGCATCTCACC (SEQ ID NO: 61)

[0092] 球体细胞分析。为了形成球体细胞,将培养的细胞分散成单一细胞。将 5×10^3 细胞接种在超低吸附力6孔培养盘(CORNING™)6天,并维持在补充含有B27(INVITROGEN®)、EGF (10ng/ml)及FGF (25ng/ml)的DMEM/F12中,每周2次。显微镜下计数球体细胞。为进行血清诱发分化分析,将瘤球培养在经基质胶涂布(matrigel-coated)内含有补充10%FBS的DMEM的培养盘中达7天,以诱发分化过程。

[0093] 质体构筑。将全长的人类EpCAM选殖至带标志v5及6xHis的pcDNA3.1载体中。从pcDNA3.1-EpCAM次选殖出pEpEX291(是由EpCAM的胞外域及穿膜域所组成)及pEpICD质体。通过将c-MYC(相对于转录起始位点处-1224/+47)、OCT4(-2616/+1)、及NANOG(-1590/+250)的PCR片段插入至pGL4.1质体(Promega)中而制造出荧光素酶启动子活性。编码EpCAM短夹型RNA的慢病毒(pLK0-shEpCAM)及对照组质体pLK0-AS1是获自RNAi核心设备中心(中央研究院)。

[0094] 慢病毒感染。通过PolyJET转染套组(SignaGen Laboratories)将包装质体(pCMV-ΔR8.91)、包膜载体(pMDG)及夹型pLK0-RNAi载体共转染HEK293T包装细胞。转染48小时后,收集含病毒的上清液,与含有聚凝胺(polybrene) (8μg/ml)的新鲜培养基混合,并与标的细胞培养进行另一48小时感染。以嘌呤霉素(4μg/ml)筛选经转导细胞4天。

[0095] 荧光素酶报导子分析。将该等细胞接种在培养盘中,并通过PolyJET套组共转染pcDNA3.1、EpCAM、EpICD、或EpEX-表现载体(400ng)及pGL4-Oct4-Luc、Nanog-Luc、Sox2-Luc、或c-Myc-Luc-表现质体(100ng)24小时。通过Dul-Glo荧光素酶套组(Promega)测量该等启动子活性,并通过与作为内控的pRL-TK(20ng)进行共转染以标准化经转染的效率。

[0096] 细胞群落形成及侵犯性分析。为了进行细胞群落形成分析,将密度为 5×10^3 的细胞接种在6孔培养盘中达10天,接着固定并以结晶紫染色。为了进行侵犯性分析,将细胞(1×10^5)在室温下接种在经涂布基质胶的透孔细胞培养插入物(transwell insert) (8-μm聚碳酸酯核孔过滤膜,Corning)中达30分钟,以便形成名副其实的经重建基础薄膜。培养24小时后,细胞以甲醇固定10分钟,而后用棉花棒移除非侵犯细胞。用DAPI通过染色,在倒立式荧光显微镜(Zeiss)下显像观察经侵犯的细胞,并通过ImageJ软件进行量化。

[0097] 统计分析。所有的数据均衍生自至少三组独立的实验。数值是以平均值±标准误差表示。除非特别说明,否则每一实验检定条件与各自对照组的显著差异是利用学生t-检定。*表示p值<0.05,**表示p值<0.01或***表示p值<0.001被视为具有显著差异。存活分析是以对数等级检定进行。相关系数是通过斯皮尔曼氏分析法(Spearman's analysis)分析。

[0098] 结果

[0099] 可辨识口腔癌细胞的单株抗体(等)的产生及特征

[0100] 为了产生可对抗口腔癌的单株抗体(等),吾人将SAS细胞注入至BALB/cJ小鼠中。共计筛选超过8,000个杂交瘤选殖体,并挑选出12个对SAS细胞具有较高反应性的选殖体(图15)。细胞性ELISA及西方转渍分析显示,OCAb9-1可特异性地辨识数种人类癌细胞,但却不会辨识诸如NNM或HUVEC细胞的正常细胞(图1)。另外利用各种人类癌症组织微数组的实验亦显示,OCAb9-1能够特异性辨识不同来源的人类癌症组织,但却无法辨识正常的组织(图1C)。

[0101] 为了标靶分子鉴定,制备该SAS细胞溶解物,并通过经共轭OCAb9-1的免疫亲和性层析进行纯化。银染色法及西方转渍分析证实,OCAb9-1可以辨识具有分子量为39kDa的标靶蛋白(图2A)。通过LC-MS/MS分析蛋白质的性质,吾人发现该OCAb9-1的标靶蛋白为人类EpCAM(图2B)。同时与市售的抗EpCAM抗体1144-1(分别为Santa Cruz Biotech;Epitomics)一起通过执行免疫沉淀分析及西方转渍分析确认了OCAb9-1对EpCAM的特异性(图2C)。经以shRNA剔除EpCAM后(图2D),用OCAb9-1的西方转渍分析(图2E)及FACS(图2F)显示出讯号会显著地减少,此证实OCAb9-1可以特异性地辨识EpCAM(图2)。

[0102] OCAb9-1不会诱发癌细胞凋亡作用。为了开发治疗性抗体,吾人从SAS细胞纯化出EpCAM蛋白质,并重新产生5种可辨识EpCAM的单株抗体(图16)。该等单株抗体对于癌细胞株(SAS、NPC039、HCT116及SKOV3)具有强烈的侦测讯号,但该等单株抗体显示对正常细胞株(HUVEC及NNM)并没有结合亲和力,如细胞性ELISA、西方转渍分析及FACS分析所示(图16)。这些单株抗体对SAS及HCT116细胞具有极高的细胞表现结合活性,对正常细胞如NNM细胞则不具反应,如FACS(数据未列)、免疫荧光分析分析(图3A)及西方转渍分析(图3B)所示。该等单株抗体的重链及轻链中的3个互补决定域(CDR)示于图17。所有的这些单株抗体对EpCAM具有极高的亲和力,且其等的动力学常数范围为 $10^{-9} \sim 10^{-13}$ (图18)。显著地,使用SAS及HCT116细胞株时,重新产生的5种单株抗体中的一种单株抗体(EpAb2-6)会诱发癌细胞的细胞凋亡(图3C-D)。

[0103] 活体外及活体内癌细胞生长的抑制作用

[0104] 为了评估EpCAM在肿瘤生成作用中扮演的功能性角色,通过EpCAM shRNA剔除在SAS细胞中该基因的表现。当EpCAM基因经剔除,生长率(图4A)、细胞群落形成(图4B)、移动(图4C)及侵犯能力(图4D)会显著地下降。由于EpCAM基因剔除会影响活体外癌细胞生长并诱发癌细胞的细胞凋亡作用,吾人遂研究探讨EpAb2-6是否可用以直接地抑制活体内肿瘤的生长。建立口腔癌异种移植,并以EpAb2-6或对照组PBS处理。经以EpAb2-6处理的肿瘤体积变得比该等两组的对照组肿瘤体积小。经发现对照组PBS的肿瘤比EpAb2-6组的肿瘤体积分别大1.5倍($n=6$; *表示 $p<0.05$;图4E)。为进一步定出抗体治疗功效的特征,吾人将带有肿瘤的小鼠经以EpAb2-6及PBS处理后的存活率做一比较。带有肿瘤小鼠经以EpAb2-6及PBS处理后的整体存活率的中位数分别为71天及48天(图4F)。EpAb2-6的处理可以有效地压制瘤球的形成(图5C),并诱发肿瘤及瘤球两者中的异二倍体DNA含量(图5A及5B)。这些实验证明,通过EpAb2-6靶向EpCAM可抑制瘤球形成及肿瘤生长,同时延长了带有肿瘤小鼠的生命期。

[0105] EpAb2-6与IFL组合对于人类结肠癌症异种移植

[0106] 为了评估EpAb2-6并与IFL组合的治疗性功效,吾人将HCT116 (3×10^6 细胞)注入至NOD/SCID小鼠中。将EpAb2-6 (20mg/kg) 及IFL (25mg/kg的5-FU+10mg/kg的亚叶酸钙+10mg/kg的依利替康(irinotecan))的组合以静脉注射方式注射至带有HCT116异种移植($\sim 50\text{mm}^3$)的NOD/SCID小鼠中,每周注射两次,共计注射八次。使用EpAb2-6及IFL组合治疗的小鼠中的肿瘤经发现会小于仅以IFL治疗小鼠中的肿瘤(*表示 $P < 0.05$) (图6A)。直至第25天时,IFL组的肿瘤大小会逐渐增加至以EpAb2-6+IFL治疗的肿瘤的1.6倍。治疗期间,该等EpAb2-6+IFL组及IFL组在体重上并没有明显的变化(图6B)。治疗结束时,相较于EpAb2-6+IFL治疗的最终平均肿瘤重量为0.146公克,经以IFL治疗者为0.23公克,注射PBS缓冲液的小鼠的肿瘤则为0.952公克(图6C及D)。

[0107] 拟人化EpAb2-6 (hEpAb2-6) 的开发

[0108] EpAb2-6对于诱发癌细胞的细胞凋亡具有高度亲和力及有效能的活性,因而联想到其作为治疗性抗体的潜在可能性。为了开发拟人化单株抗体,吾人定序出源自杂交瘤细胞株的EpAb2-6的VH及VL序列(图17)。将EpAb2-6的CDR移植至人类IgG1基础骨干上,以产生拟人化EpAb2-6 (hEpAb2-6) (图7A)。hEpAb2-6在CHO-K1细胞中表现,并从细胞培养上清液中纯化出来。保有鼠科特异性的EpAb2-6 (mEpAb2-6) 的hEpAb2-6会辨识SAS及HCT116癌细胞两者,但不会辨识CCD-1112Sk正常细胞。细胞性ELISA及西方转渍分析进一步证实hEpAb2-6的高度结合活性(图7B-D)。以表面电浆共振分析EpAb2-6及hEpAb2-6针对EpCAM的亲和力,并分别测得为0.3491nM及0.6773nM(图18)。除此之外,利用SAS及HCT116细胞株的活体外研究发现,hEpAb2-6会诱发癌细胞的细胞凋亡(图7E-F)。该等结果显示,拟人化EpAb2-6对EpCAM具有高度结合亲合力,此联想到利用治疗性抗体在癌症治疗、靶向肿瘤药物递送及医学影像上应用的可能性。

[0109] EpAb2-6-特异性B细胞抗原决定部位的鉴定

[0110] 扩增与EpAb2-6-特异性抗体具有高度反应性且与正常小鼠IgG中的抗体较低反应性的18个免疫阳性噬菌体选殖体(PC-26、PC-11、PC-29、PC-3、PC-4、PC-18、PC-12、PC-1、PC-19、PC-27、PC-35、PC-21、PC-37、PC-20、PC-2、PC-7、PC-8或PC-44),并分离出噬菌体DNA用以定序。将所挑选出的选殖体的插入核苷酸加以定序,而所有的选殖体经发现含有36个核苷酸(转译成12个氨基酸残基)(图19)。利用MacDNASIS软件排列比较肽序列,以分析出EpAb2-6抗体的抗原决定部位及结合的基本结构。通过PCR扩增编码涵盖人类EpCAM第一EGF样(EGF-I)的重复序列(氨基酸27-59)及涵盖人类EpCAM第二EGF样(EGF-II)的重复序列(氨基酸66-135)的cDNA。使用重迭延伸性PCR及以PCR为基础的定点突变作用,以便将图8A-B所示的突变引入至野生型EGF-I或EGF-II区域中。使用西方转渍分析测试EpAb2-6或EpAb3-5抗体对变体EpCAM突变体的反应性。研究每一EpAb2-6抗体对个别EpCAM突变体的结合(图8B),并与野生型EpCAM分子的结合作比较。EGF-II区域Y95或D96位置处的氨基酸突变作用会造成相对结合活性的消失或显著下降,因此Y95及D96被认为是用在抗体结合的"必须"残基。图8是显示EpCAM的EGF样区域I中的序列VGAQNTVIC (SEQ ID NO:62) 及EGF样区域II的序列KPEGALQNNDGLYDPDCDE (SEQ ID NO:63)。

[0111] EpCAM的提升与肿瘤起始特性的关联性

[0112] 肿瘤起始细胞天生具有无需附着的能力。因此吾人挑选HCT116结肠癌细胞进行两种非贴附性的培养、瘤球形成及抗失巢细胞凋亡筛选(图9A)。有趣地,相较于附着性细胞

(图9B左),EpCAM mRNA的表现在抗失巢凋亡细胞(4倍)及球体细胞(12倍)均会上升。经由流式细胞分析,发现当与附着细胞的细胞表面EpCAM比较,细胞表面EpCAM在球体形成细胞会增加4倍表达量(图9C),而在抗失巢凋亡细胞则会增加2倍表达量(数据未列)。同样地,与附着型细胞表面EpCAM比较(69%表达量),球体形成肝癌Hep3B细胞的EpCAM表现(98%表达量)增加45%。发现当球体细胞在分化条件下进行再附着后此升高的状况会下降。CD133(TIC细胞的标志)经进一步确认会在球体形成Hep3B细胞中增加4倍,但其在分化后会下降(数据未列)。又,HCT116细胞群内高量表达EpCAM时会显著性地影响球体细胞形成能力(图9D)。附着性细胞与球体形成细胞间的肿瘤生成潜力的比较显示,球体细胞衍生HCT116细胞呈现较强的肿瘤起始能力(图9E)。吾人亦发现球体衍生肿瘤异种移植展现出更具侵略性及自我更新能力的两者特性(图9F)。此推测提高EpCAM的表现可能与肿瘤起始能力有关。

[0113] EpCAM可调控改编基因表现及肿瘤起始能力

[0114] 定量PCR分析、西方转渍分析及免疫荧光分析一致性地显示,EpCAM基因及改编基因(c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2)两者会相伴性地在球体细胞中的表现皆是被升调节(图10A)。相似的结果也发现在高量表达EpCAM的HCT116细胞中(图10B)。为研究探讨EpCAM是否可调控改编基因的表现,吾人将EpCAM野生型表现载体转染至HEK293细胞。定量PCR分析显示,EpCAM过度表现会诱发增加c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2mRNA含量(图10C)。相反地,通过慢病毒介导shRNA剔除Hep3B及HCT116细胞的EpCAM基因会削减EpCAM、c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2mRNA表现(图10D)。此外,EpCAM剔除不表现时会抑制Hep3B及HCT116这两者球体细胞的数量及大小,此确定了EpCAM在瘤球形成能力上的影响(图10E)。为了进一步评估EpCAM在肿瘤细胞自我更新能力上的重要性,将HCT116球体细胞分散,将细胞再重新继代培养3次,接着进行EpCAM基因剔除不表现作用。结果显示,经过EpCAM shRNA处理激发后,球体细胞的再生能力会在之后的继代培养大大地降低(图10F)。此外,活体内HCT116球体细胞经连续稀释移植实验显示,剔除瘤球中EpCAM基因明显地会阻碍肿瘤起始潜在能力并有效地抑制肿瘤生长的潜力(图10G)。总体而言,该等数据显示EpCAM在调节改编基因表现及维持自我更新能力上是必须的。

[0115] EpCAM可调节EMT进展及肿瘤生成作用

[0116] 目前已证实上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition;EMT)会促使肿瘤细胞产生具有干细胞的特性(Mani等人.,2008),因此,吾人尝试研究探讨EpCAM是否可调控EMT进展。免疫荧光分析显示出剔除EpCAM基因表现后观察EMT标志(上皮细胞标志E-钙黏着素及细胞角蛋白18会升调节)及间质标志(中间丝蛋白会降调节)的变化(图11A)。实时PCR数据显示,与仅有载体的细胞比较,已剔除EpCAM基因表现的细胞发现E-钙黏着素的mRNA及蛋白质含量会增加而中间丝蛋白则会降低(图11B)。其它EMT调节转录因子(诸如Snail及Slug)会同时在剔除EpCAM基因表现的细胞及低EpCAM表现细胞中是降低(图11B及11C)。评估EpCAM在肿瘤生成潜力上的效应显示,抑制EpCAM会导致活体外侵犯性及细胞群落形成能力的降低(图11D及11E)。此外,抑制EpCAM亦会抑制活体内异种移植肿瘤的生长(图11F)。从原发性肿瘤萃取的RNA样本证明,相较于仅有载体的细胞而言(图11G),EpCAM、改编基因(c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2)及间质标志(中间丝蛋白及Snail)的表现在剔除EpCAM基因的肿瘤细胞中显著地会减少。该等数据显示EpCAM与调节EMT进展及肿瘤生成作用有关。

[0117] EpICD的蛋白裂解参与EpCAM的讯号调控

[0118] EpCAM结构含有一细胞外结构域(EpEX)、一穿膜域及细胞内结构域(EpICD)。EpEX是由两个表皮生长因子类似区域及一个半胱氨酸含量少的区域所组成,而EpICD则是由一短链26个氨基酸所组成。检测EpICD在改编基因调控及肿瘤生成作用的影响。以雷射共焦影像术侦测在HCT116细胞的细胞质及细胞核两者中可溶性EpICD的讯号(图12A),发现细胞若经DAPT(一种 γ -分泌酶抑制剂)处理后会阻断EpICD裂解,观察到EpICD会与细胞膜上的EpEX有共位现象(图12A)。除此之外,相较于附着性肿瘤细胞部分,可溶性EpICD在球体细胞衍生肿瘤部分表现会增加。西方转渍分析证实,293T/EpCAM-v5细胞具有一条分子量为40kDa的主要条纹带(EpCAM-v5)及一条分子量低于10kDa次要条纹带(EpICD-v5);然而,可溶性EpICD-v5(10kDa)经过DAPT处理后会减少(图12B)。以DAPT处理会抑制中间丝蛋白、Snail及Slug的表现(图12C),此会伴随发生减少肿瘤的侵犯性及球体细胞形成能力(图12D及12E)。进一步分析通过EpICD介导在改编基因的转录调控,将EpCAM或EpICD与c-MYC、OCT4、NANOG及SOX2的试验性调节区域共转染的分析显示,EpCAM及EpICD两者会升调控该等四种基因的转录活性(图12F及12H);然而,该等被EpCAM所诱发的活性在DAPT处理后会阻断(图12G)。除此之外,核染质免疫沉淀分析显示在HCT116细胞中侦测到EpICD与c-MYC(近端上游区域取代外显子1)、OCT4(远程上游区域)、NANOG(上游区域)及SOX2(下游区域)启动子结合后能活化其表现(图12I-J),然而,正常鼻黏膜细胞(NNM)并没有发现该等现象,该等细胞亦表现极少量的EpCAM(数据未列)。

[0119] EpCAM的细胞外结构域可作为EpCAM讯号的活化子

[0120] 吾人进一步构筑一种截断EpICD的载体(EpEX_{291-v5}),其含有EpCAM的细胞外结构域及穿膜域(图13A),以便分清楚EpICD在控制改编基因表现上的重要性。令人惊讶地,以EpEX_{291-v5}转染HCT116细胞亦会诱发c-MYC、OCT4、NANOG及SOX2的启动子活性。当以可溶性EpEX(sEpEX)处理时会发现类似的结果(图13B),进而推测EpCAM细胞外结构域的脱落或释放在协调EpCAM讯号上也扮演一部分的角色。为了试验此假设,将HCT116细胞的经培养上清液用对抗EpCAM细胞外结构域的抗体进行免疫沉淀反应。结果显示在血清存在下,确定EpEX会增加释放(图13C)。进一步确认在剔除EpCAM基因的细胞中EpEX会减少释放(图13D)。另外,经以DAPT(一种 γ -分泌酶抑制剂)、TAPI(一种TNF- α 转化酶抑制剂)单独处理或两者同时处理时,发现皆会阻断EpEX的释放及抑制EpICD裂解。然而膜上的EpCAM不会受到这些处理的影响(图13E)。HCT116细胞中转染EpEX_{291-v5}的表现会导致细胞培养上清液中EpEX释放的增加,且在EpEX_{291-v5}转染体及sEpEX-处理细胞两者中均可侦测到促进EpICD裂解及诱导中间丝蛋白表现(图13F)。再者,人类结肠癌样本的免疫荧光分析结果显示,部分在细胞核有表现可溶性EpICD的肿瘤细胞EpICD会丧失表现在细胞膜-EpEX讯号侦测处,然而,其他肿瘤细胞或其邻近的黏膜细胞则显示在其细胞膜上EpICD及EpEX表现有共位现象。正常结肠组织中EpEX或EpICD较少表现(图14A)。

[0121] 人类结肠癌症中的EpCAM/EpICD表现是与改编基因因子有关

[0122] 吾人进一步分析EpCAM及EpICD的表现与其改编基因因子及肿瘤恶性性质关联性。结果显示,与正常组织做比较,癌化结肠组织中EpICD的表现会增加。癌症中EpICD的表现含量似乎与肿瘤的分化程度有关,虽然此差异并未达到统计学上的意义(图14B-C)。吾人亦发现,在细胞核具有EpICD表现的某些肿瘤组织(49例中有24例)中,所存在的确实区域在整个

区域内少很多。大部分讯号是在细胞质或膜的部分侦测到(图14D),进而推论EpICD核转位作用可能是一动态暂时性调控作用。从42位结肠癌调查对象中进一步评估EpCAM的mRNA含量及其与改编基因因子的关连性显示EpCAM的表现与下列所示者成正相关:c-MYC(系数=0.501;中度相关)、NANOG(系数=0.513;中度相关)及OCT4(系数=0.244;较低相关)(图14E)。

[0123] 总而言之,现证明EpCAM及干细胞基因皆共同表现在TIC细胞中其表现量是上升的。EpCAM会升调控改编基因因子(c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2)及EMT表现。EpCAM蛋白裂解成EpEX及EpICD在媒介EpCAM讯号上扮演重要的角色。EpICD的核转位作用会调节改编基因的表现,同时EpEX的胞外释放会进一步触发EpICD的活化。抑制EpCAM或阻断EpICD裂解会减低活体外及活体内两者的侵犯性、生长及自我更新能力。该等结果显示EpCAM的过度表现会促进肿瘤启始能力及肿瘤恶化。此显示未来运用EpCAM单株抗体在临床癌症诊断、预后评估、预防、癌症标靶治疗及造影技术上有其重要性。

[0124] EpCAM,或上皮特异性抗原(epithelial specific antigen;ESA)是鉴定上皮转型瘤的癌细胞特异性抗原。EpCAM的过度表现与癌细胞转移、癌细胞抗药性及血液中循环肿瘤细胞具有关联性,该等均具TIC细胞所有的特征。数个研究已经成功地利用CD44+/CD24-结合EpCAM,经由免疫分析染色分析鉴定出在胰脏、卵巢、肝脏及结肠直肠癌中的TIC细胞。本文数据证明在瘤球细胞培养中确认EpCAM具有升调控的作用,其在肿瘤启始、生长及侵犯性上具有极高的影响;然而,当剔除EpCAM基因之后,自我更新及启始能力皆会受到抑制。另一种情形是,肿瘤细胞失去EpCAM功能会抑制细胞群落生长、侵犯性及肿瘤生成。同时亦发现,EpCAM表现量增加与肿瘤分化程度具有关联性,证明EpCAM在肿瘤恶化上亦扮演重要角色。

[0125] 虽然EpCAM与TIC细胞在形成肿瘤的关联性已有充分证据,但TIC细胞透过EpCAM所调控基因的机制仍未清楚。仍旧缺乏该等基因与TIC细胞相互作用的关联性的直接证据。吾人的数据显示,EpCAM增加且持续的表现被侦测到与瘤球及球体细胞衍生异种移植中的c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2的存在表现有一致性。具有或不具有EpCAM功能会直接冲击到该等基因的产生,且荧光素酶分析法确定该等基因是受到EpCAM调控。癌症组织mRNA微数组数据进一步确认,EpCAM的表现是与c-Myc、Oct4、Nanog及Sox2成正相关。总体而言,这些数据显示通过EpCAM与改编基因的启动子结合后的活化,在具肿瘤启始能力的肿瘤细胞里扮演诱发细胞癌化能力。

[0126] 除了干细胞基因外,上皮-间质转化作用的促进可能亦「参与」EpCAM媒介的肿瘤进展。吾人数据发现,在EpCAM过度表现细胞侦测到Snail、Slug及中间丝蛋白的升调控及E-钙黏着素的降调控两者。相反地,剔除EpCAM基因或添加DAPT(其会阻断EpICD的释放)则会抑制Snail、Slug及中间丝蛋白的mRNA含量,其会伴随着肿瘤侵犯性能力的降低。

[0127] EpCAM因受到TNF- α 转化酵素(TACE)及 γ -分泌酶(早衰蛋白2;PS2)的影响而引发EpICD自膜上断裂,进入细胞核与FHL2及Tcf/Lef1结合产生协同合作的调节。吾人发现在经培养肿瘤启始细胞、球体衍生肿瘤异种移植及人类结肠癌细胞中一致性地侦测到细胞质及细胞核中具有可溶性EpICD表现。核染质免疫沉淀分析及荧光素酶分析显示,EpICD会与改编基因启动子结合后并活化其表现。以 γ -分泌酶抑制剂处理会阻断EpICD裂解及核转位作用,此会伴随着抑制改编基因因子及EMT基因活化表现,通过抑制了肿瘤自我更新及侵犯

性。然而,细胞质或细胞核中可溶性EpICD的存在并非均质地表现在所有的肿瘤细胞,此推测EpICD裂解可能是动态性的过程。除了EpICD之外,吾人亦发现,EpEX的释放可触发EpCAM讯号事件,通过血清浓度可以增加细胞培养上清液中EpEX的释放,而添加DAPT或TAPI可阻断EpEX及EpICD的释放。再者,sEpEX的处理或以pEpEX转染可促进EpICD裂解并诱发改编基因活化,此推论EpEX的裂解可启动EpCAM讯号,且推论其释放可进一步触发EpCAM活化。

[0128] 本发明是关于对EpCAM具有相当结合亲和力的新颖性EpCAM单株抗体,其展现出有效的抑制肿瘤活性,且因此可提供具有潜力的治疗意义。总而言之,吾人所示完整性证据显示,EpCAM(特别是EpICD)的增加会通过升调节干细胞基因表现及EMT因子活化而促进TIC细胞的肿瘤生成。除此之外,EpEX的释放会经由自分泌效应(*autocrine effect*)或旁分泌效应(*paracrine effect*)触发EpCAM讯号。因此,发展及应用针对EpCAM及/或EpEX的抑制剂或治疗性单株抗体以此做为未来癌症治疗的新策略,而我们生产的EpCAM抗体在未来则有潜力应用在癌症与TIC诊断、预防、癌症标靶治疗和癌症造影技术上。

SEQUENCE LISTING

<110> 中央研究院
 <120> 抗上皮细胞黏着分子(EpCAM)抗体及其使用方法
 <130> 10011-00024
 <150> 61/606,220
 <151> 2012-03-02
 <160> 63
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1

Met Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Thr Ala Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr
 20 25 30

Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys
 35 40 45

Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala
 50 55 60

[0001]

Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg
 65 70 75 80

Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp
 85 90 95

Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly
 100 105 110

Thr Ser Met Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp
 115 120 125

Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile
 130 135 140

Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys
 145 150 155 160

Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu
 165 170 175

Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr
 180 185 190

Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp
195 200 205

Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser
210 215 220

Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu
225 230 235 240

Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala
245 250 255

Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val Ile
260 265 270

Val Val Val Val Ile Ala Val Val Ala Gly Ile Val Val Leu Val Ile
275 280 285

Ser Arg Lys Lys Arg Met Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Glu Ile Lys Glu
290 295 300

Met Gly Glu Met His Arg Glu Leu Asn Ala
305 310

[0002]

<210> 2
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Phe Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Arg Thr Thr Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Ser

<210> 3
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Val Ser
20 25 30

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

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

[0003]

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser
115

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met His
1 5 10

<210> 5
<211> 8

<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro
1 5

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Thr Ala Val Tyr
1

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Val Ser Leu Ser
1 5 10

[0004]

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp
1 5 10 15

<210> 12
<211> 40
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Thr Phe Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
1 5 10 15

Ser Ala Arg Thr Thr Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp
20 25 30

[0005]

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
35 40

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys
20

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 16
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

[0006]

<400> 17

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
1 5 10 15

Thr Val Ser

<210> 18
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人类化 VII 区域 FW1

<400> 18

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

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser
20

<210> 19
<211> 40
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类化 VH 区域 FW3

<400> 19

Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
1 5 10 15

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
35 40

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类化 VH 区域 FW4

<400> 20

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

[0007]

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类化 VL 区域 FW1

<400> 21

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys
20

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类化 VL 区域 FW2

<400> 22

Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类化 VL 区域 FW3

<400> 23

Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类化 VH 区域

<400> 24

[0008]

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

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

Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly
35 40 45

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

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

<210> 25

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类化 VI 区域

<400> 25

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Val Ser
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

[0009]

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser
115

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> EpCAM F 引子

<400> 26

ctccacgtgc tgggtgtgt 18

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> EpCAM R 引子

<400> 27

tgttttagtt caatgatgat ccagta 26

	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> c-Myc F 引子	
	<400> 28	
	naaccacaac ttgaacagct ac	22
	<210> 29	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> c-Myc R 引子	
	<400> 29	
	atttgaggca gtttacatta tgg	23
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0010]	<220>	
	<223> nanog F 引子	
	<400> 30	
	atgccacaca cggagactgt	20
	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Nanog R 引子	
	<400> 31	
	agggcgtgcc tgaataagca	20
	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Sox2 F 引子	
	<400> 32	
	tatttgaatc agtctgccga g	21
	<210> 33	

	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Sox2 R 引子	
	<400> 33	
	atgtacctgt tataaggatg atattagt	28
	<210> 34	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Oct4 F 引子	
	<400> 34	
	agcaaaaccc ggaggagt	18
	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Oct4 R 引子	
[0011]	<400> 35	
	ccacatcggc etgtgtatat-c	21
	<210> 36	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> E-钙黏着素 F 引子	
	<400> 36	
	ggaactatga aaagtgggct tg	22
	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> E-钙黏着素 R 引子	
	<400> 37	
	naattgccag gctcaatgac	20
	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 中间丝蛋白 F 引子	
	<400> 38	
	gtttcccta aaccgctagg	20
	<210> 39	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 中间丝蛋白 R 引子	
	<400> 39	
	agcgagagtgc gcagagga	18
	<210> 40	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Snail F 引子	
[0012]	<400> 40	
	cttcggctcc aggagagtc	19
	<210> 41	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Snail R 引子	
	<400> 41	
	ttcccactgt cctcatctga c	21
	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Slug F 引子	
	<400> 42	
	tggttgcttc aaggacacat	20
	<210> 43	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	Slug R 引子	
	<400>	43	
		gttgcaagtga gggcaagaa	19
	<210>	44	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	GAPDH F 引子	
	<400>	44	
		cttcaccacc atggaggagg c	21
	<210>	45	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	GAPDH R 引子	
	<400>	45	
		ggcatggact gtggcataga g	21
[0013]	<210>	46	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	18s rRNA F 引子	
	<400>	46	
		gcaattattc cccatgaacg	20
	<210>	47	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	18s rRNA R 引子	
	<400>	47	
		gggacttaat caacgcaagc	20
	<210>	48	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	ChIP 引子 c Myc F	

[0014]	<400> 48 gccctgcgatg atttatactc ac	22
	<210> 49	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ChIP 引子 c-Myc R	
	<400> 49 naacagagta agagagccg	19
	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ChIP 引子 Nanog F	
	<400> 50 tcttcaggtt ctgttgctcg	20
	<210> 51	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ChIP 引子 Nanog R	
	<400> 51 gttaatcccg tctaccagtc tc	22
	<210> 52	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ChIP 引子 Sox2 F	
	<400> 52 ggataacatt gtactgggaa gggaca	26
	<210> 53	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ChIP 引子 Sox2 R	
	<400> 53	

	caaagtttct tttattcgta tgtgtgagca	30
	<210> 54	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ChIP 引子 Oct F	
	<400> 54	
	cgctctgagt gggaacctg gaggatggca ag	32
	<210> 55	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ChIP 引子 Oct4 R	
	<400> 55	
	tataagcttg gggaagggaag gcgccccaaag	30
	<210> 56	
	<211> 17	
	<212> DNA	
[0015]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ChIP 引子 GAPDH F 引子	
	<400> 56	
	tccaagcgtg taagggt	17
	<210> 57	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ChIP 引子 GAPDH R 引子	
	<400> 57	
	gaagggaactg agatttgc	18
	<210> 58	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 选殖引子 EpEX F	
	<400> 58	
	tataagctta ccatggcgcc ccgc	25

	<210> 59	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 选殖引子 EpEX R	
	<400> 59	
	cgccctcgaga ataaccagca caa	23
	<210> 60	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 选殖引子 EpCAM F	
	<400> 60	
	gataagctta tggcgccccc gcaggtc	27
	<210> 61	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0016]	<220>	
	<223> 选殖引子 EpCAM R	
	<400> 61	
	gatctcgagt gcattgagtt ccctatgcat ctccac	36
	<210> 62	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 62	
	Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys	
	1 5	
	<210> 63	
	<211> 19	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 63	
	Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp	
	1 5 10 15	
	Cys Asp Glu	

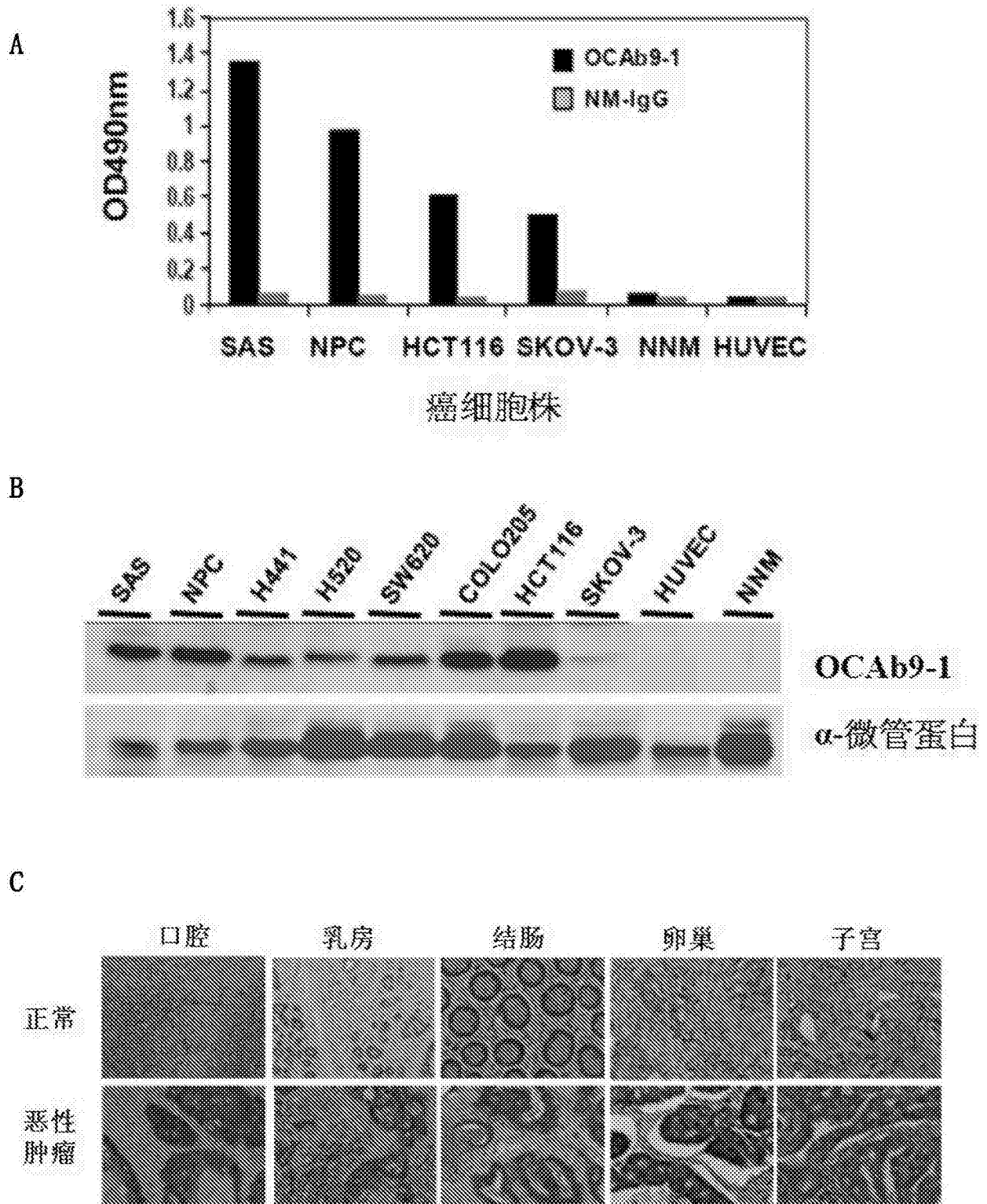
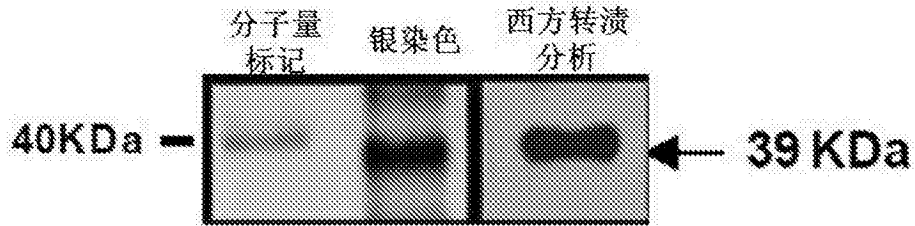


图1

A



B

```

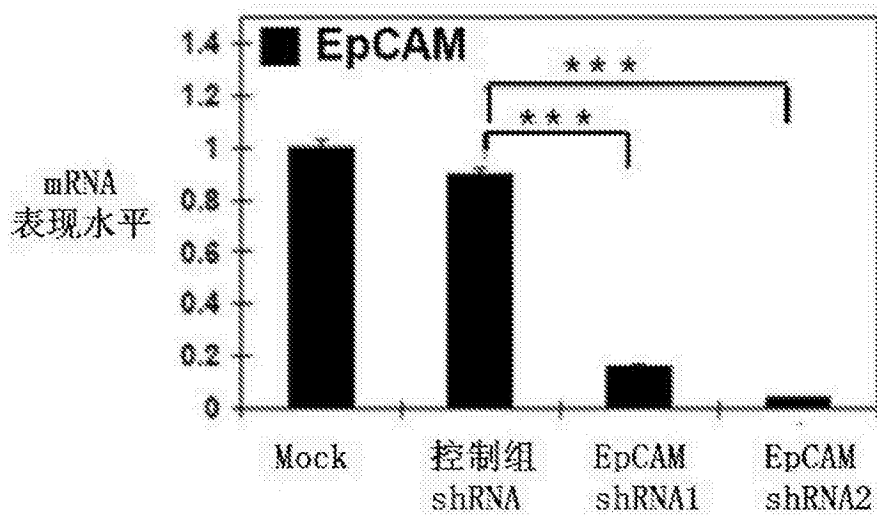
1  MAPPGVLAFG LLLAAATATF AAQEECVCE NYKLAVNCFV NNNRQCQCTS
51  VGAQNTVICS KLAACKLVKM AEMNGSKLGR RAKPEGALQN NDGLYDPDCD
101 ESGLFKAKQC NGTSMCWCVN TAGVRRTDKD TEITCSERVY TYWIIIEELKH
151 KAREKPYDSK SLRTALQKEI TTRYQLDPKF ITSILYENNV ITIDLVQNSS
201 QKTQNDVDIA DVAYYFEKDV KGESLFHSKK MDLTVNGEQL DLDPGOTLIY
251 YVDEKAPEFS MQGLKAGVIA VIVVVVIAV AGIVVLVISR KKRMAYEKA
301 EIKEMGEMHR ELNA

```

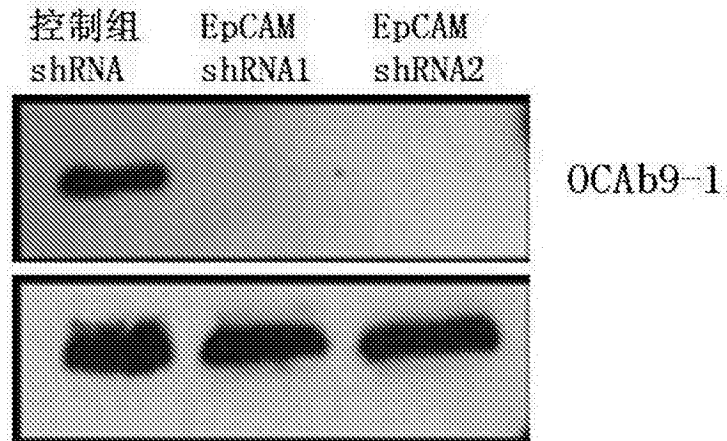
C



D



E



F

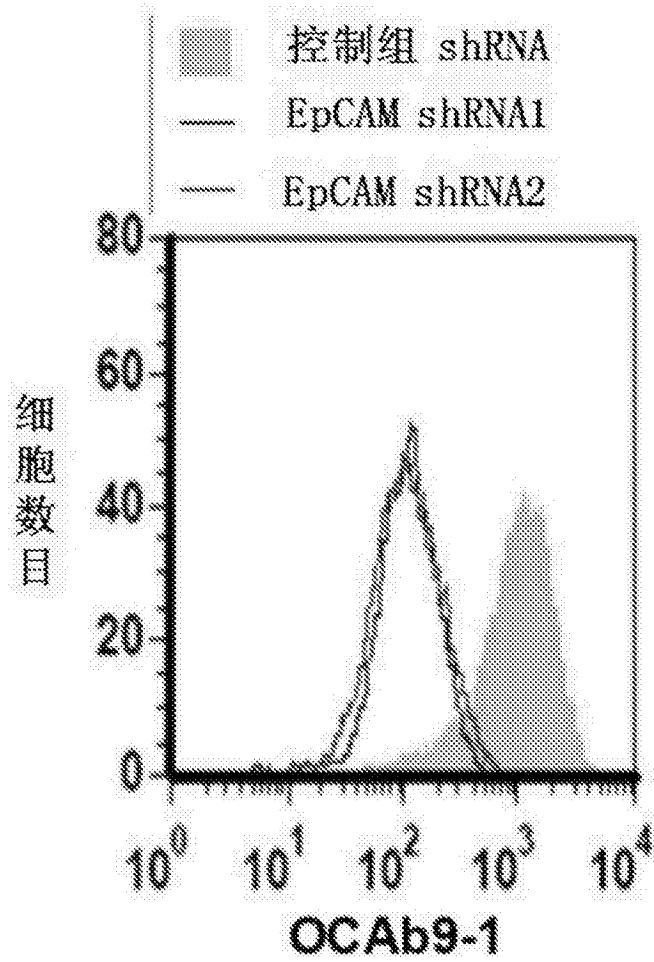
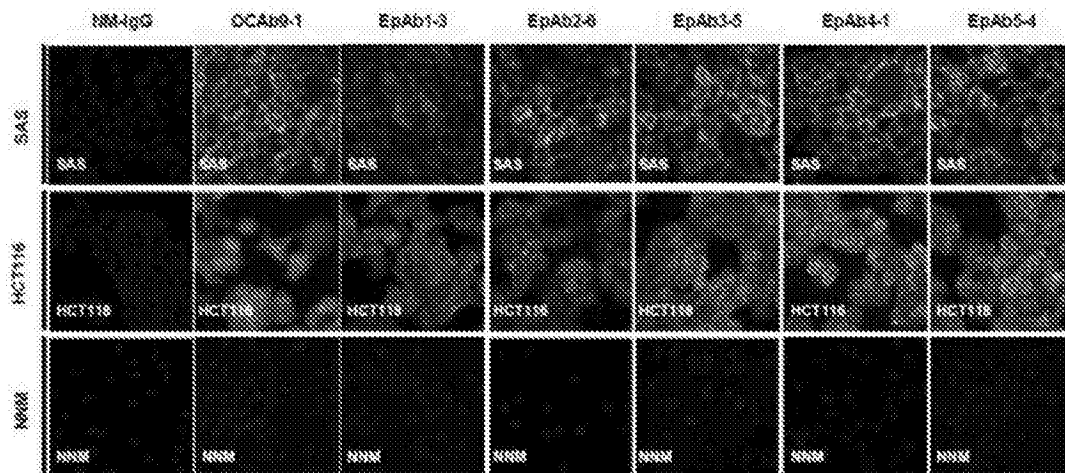
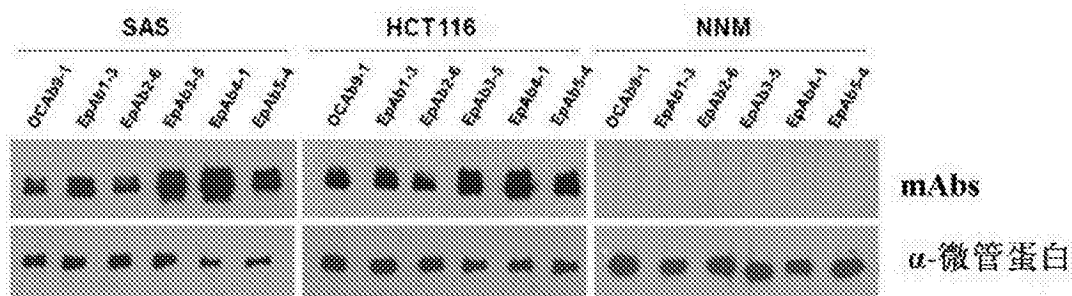


图2

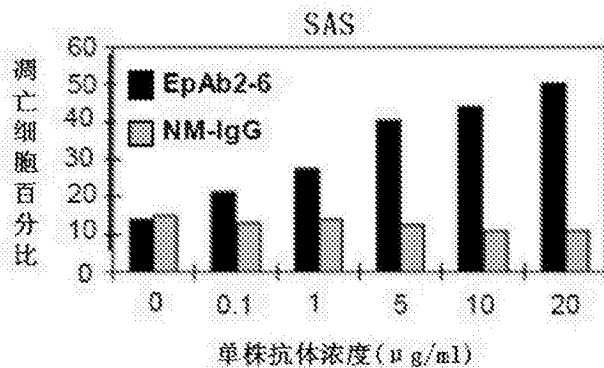
A



B



C



D

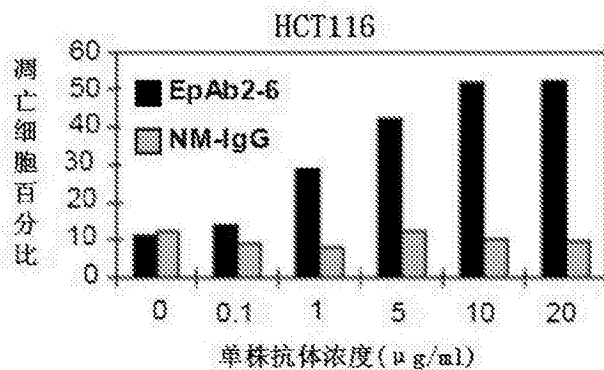
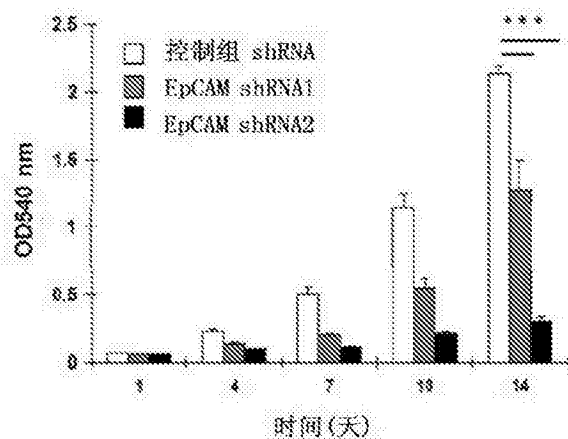
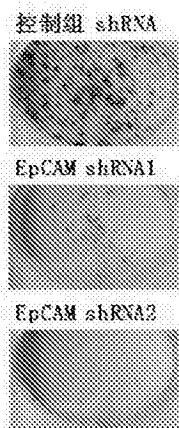


图3

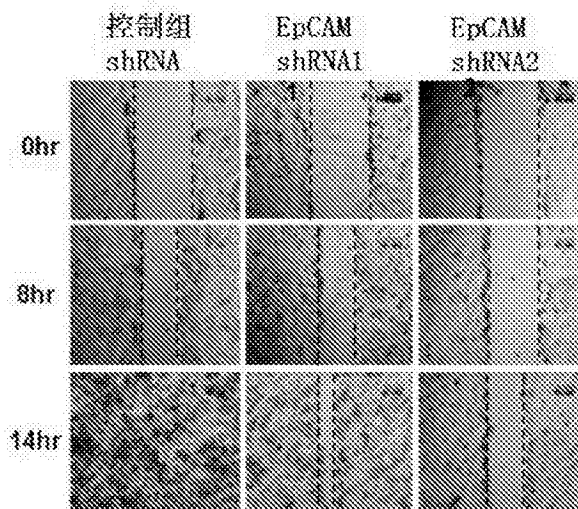
A



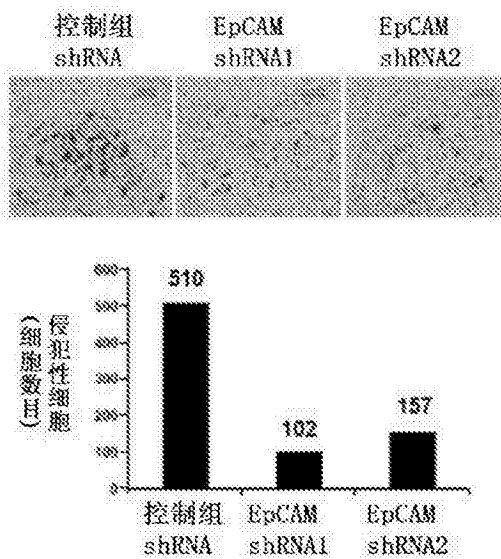
B



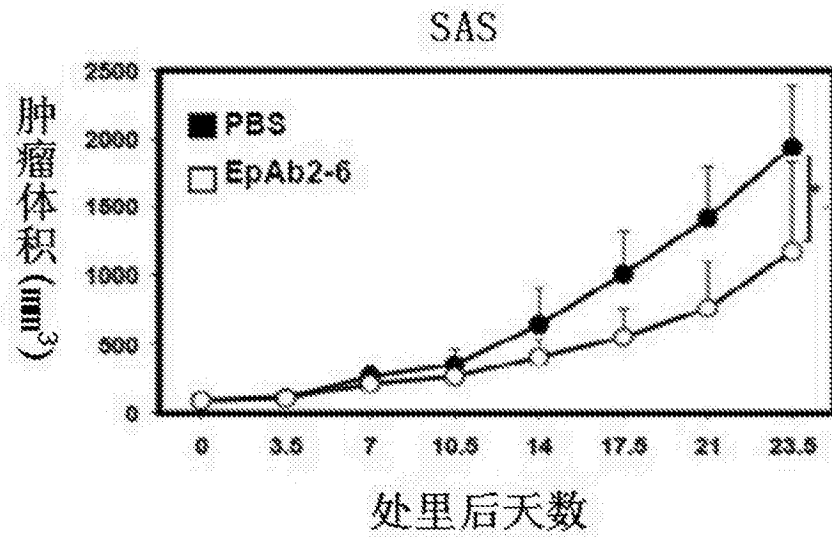
C



D



E



F

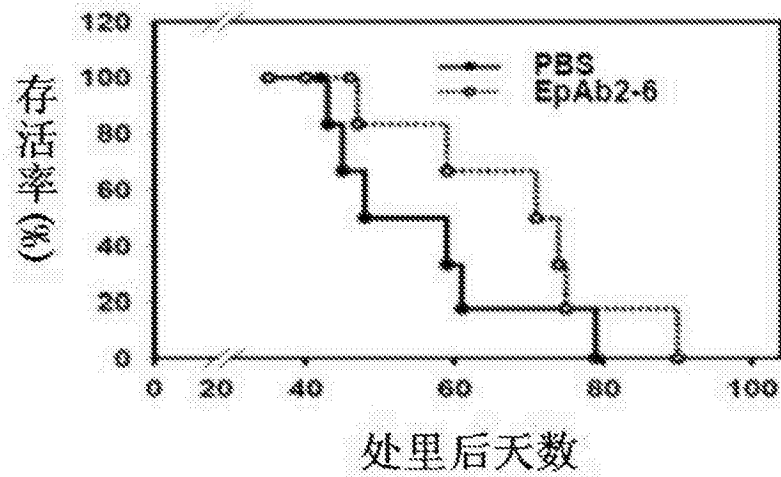


图4

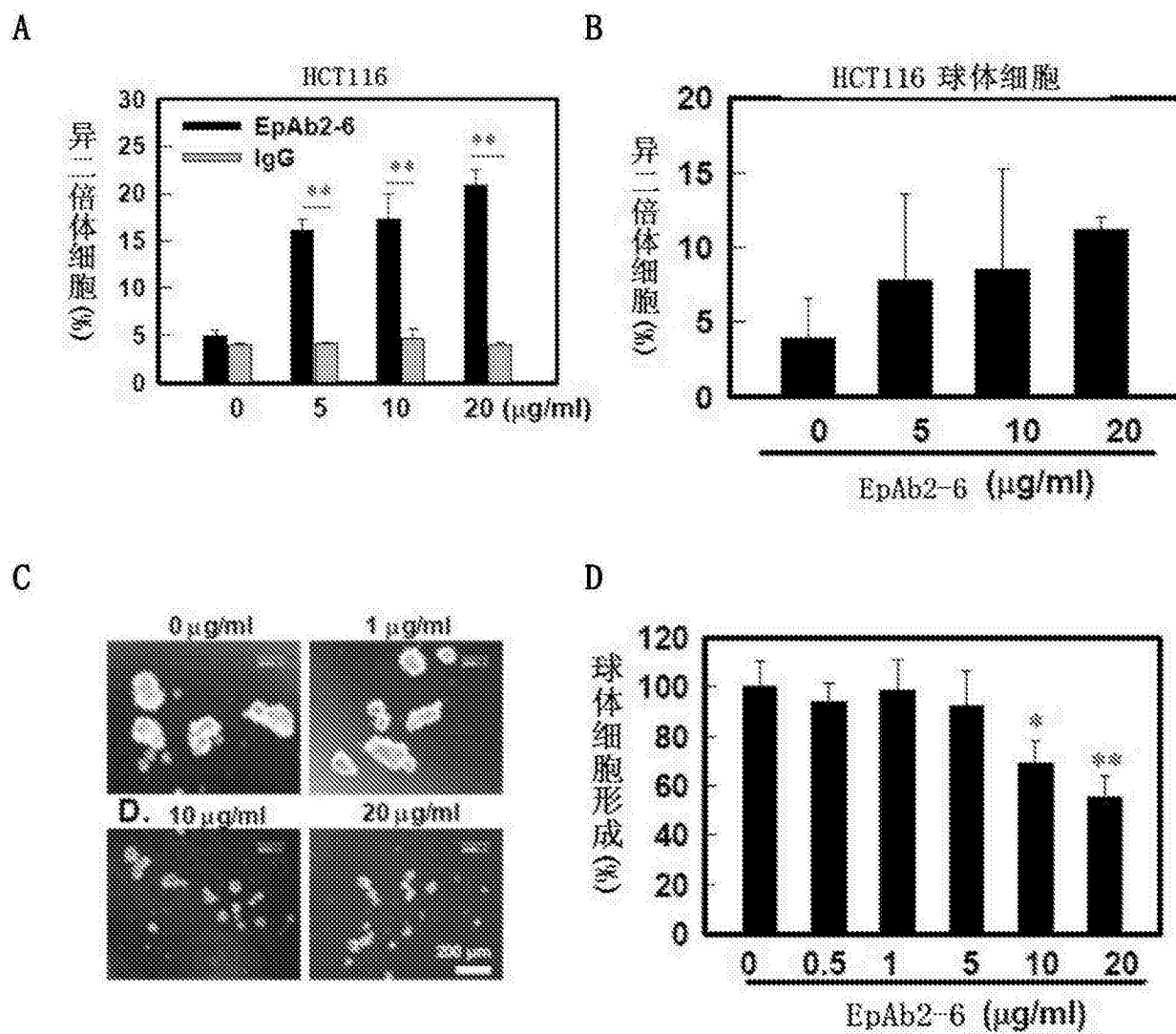


图5

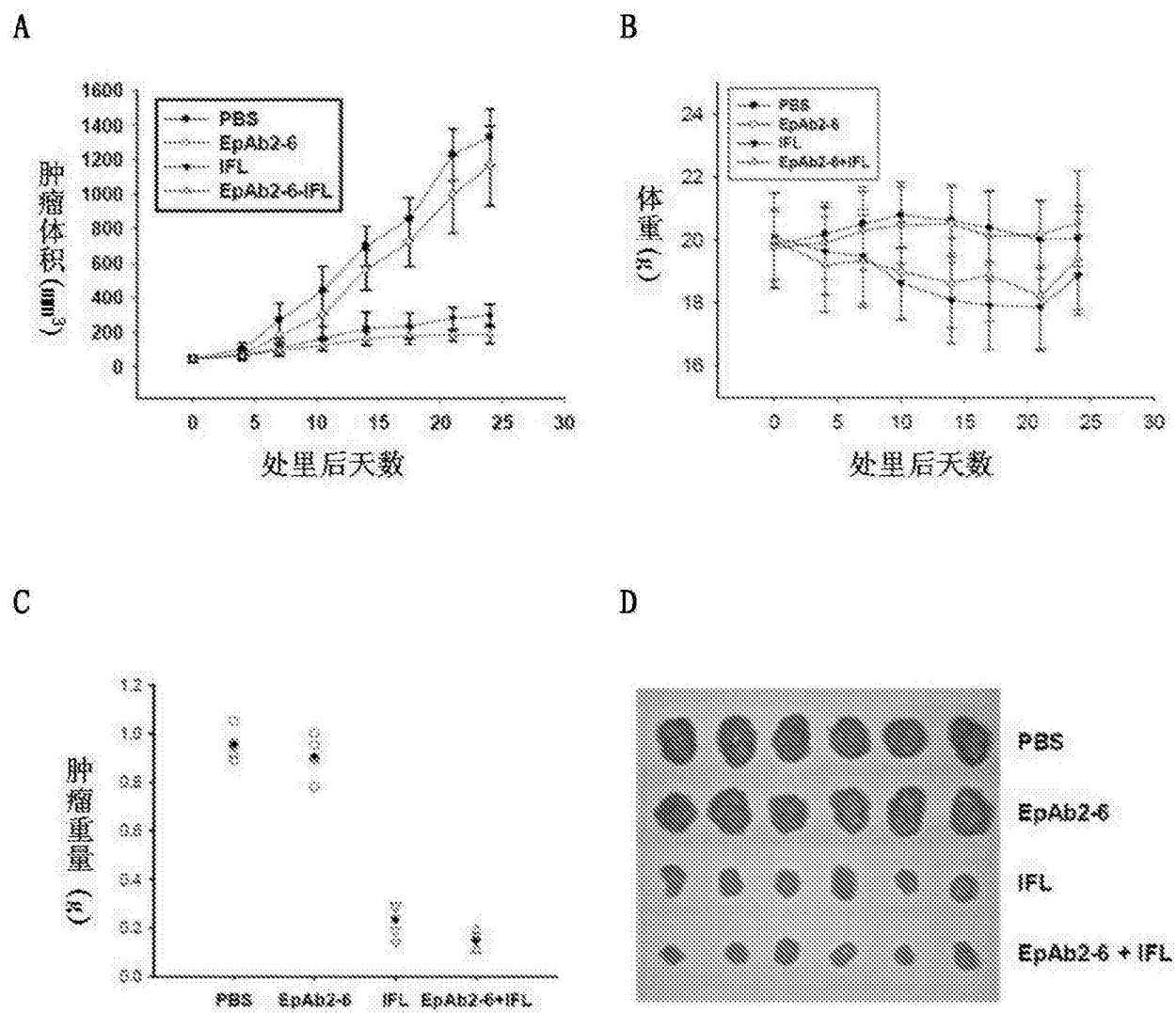
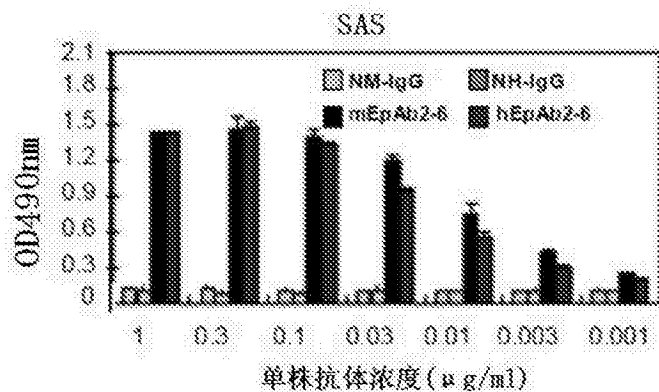


图6

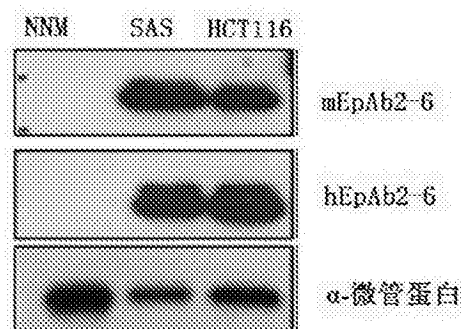
A

hEpAb2-6 V _H	FW1	CDR1	FW2	CDR2
	VRLQESGPELKRPGETVKNICKAS	GVTFTDYSMH	WYXQAPNGCEKWMAGW	INTETGEP
hEpAb2-6 V _L	FW3	CDR3	FW4	
	TYADDFKGRFAPSLTSAATAYLQNNLENEETATVFCAR	TAVY	WQXQTIVTVSS	
hEpAb2-6 V _H	FW1	CDR1	FW2	CDR2
	DRQMTQSPNLSAASLGERVSLTC	RANQHSVNLIS	WLQMEPIKTHRLIY	ATSTLLIS
hEpAb2-6 V _L	FW3	CDR3	FW4	
	GVPKRFSCGRSGSDYSLTISSLESEDFVDYYC	LQYASYPWT	PGGGTELEIKRAADAAPTYS	

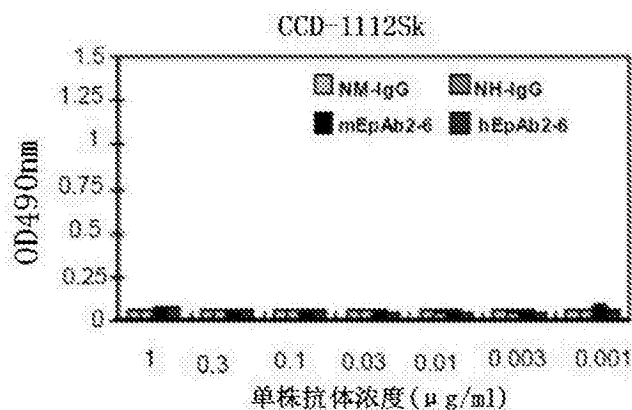
B



D



C



E

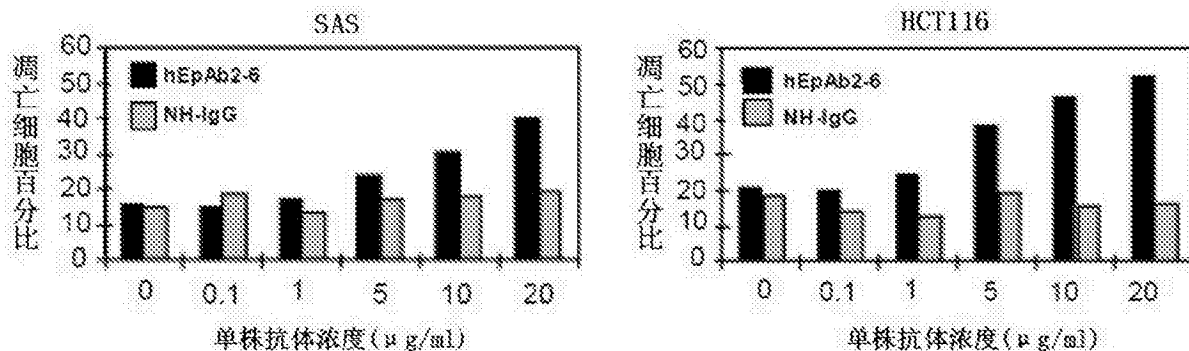
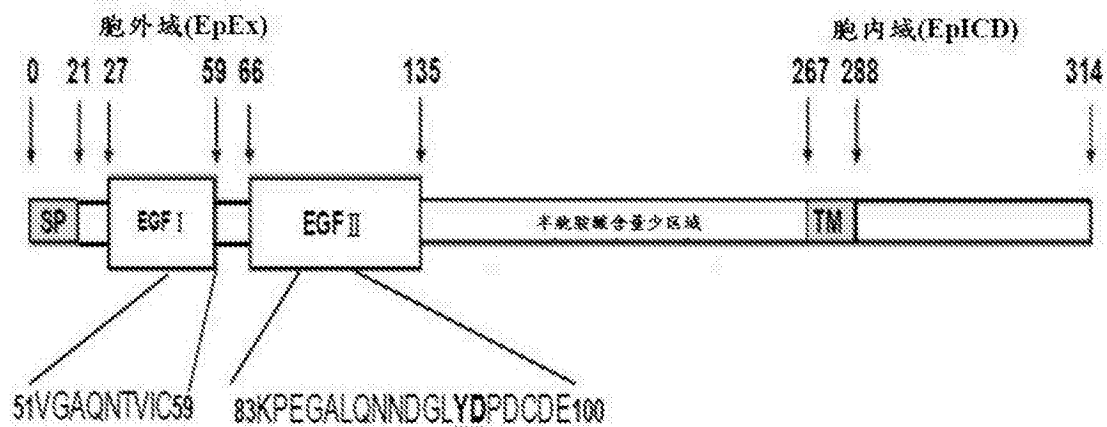


图7

A



B

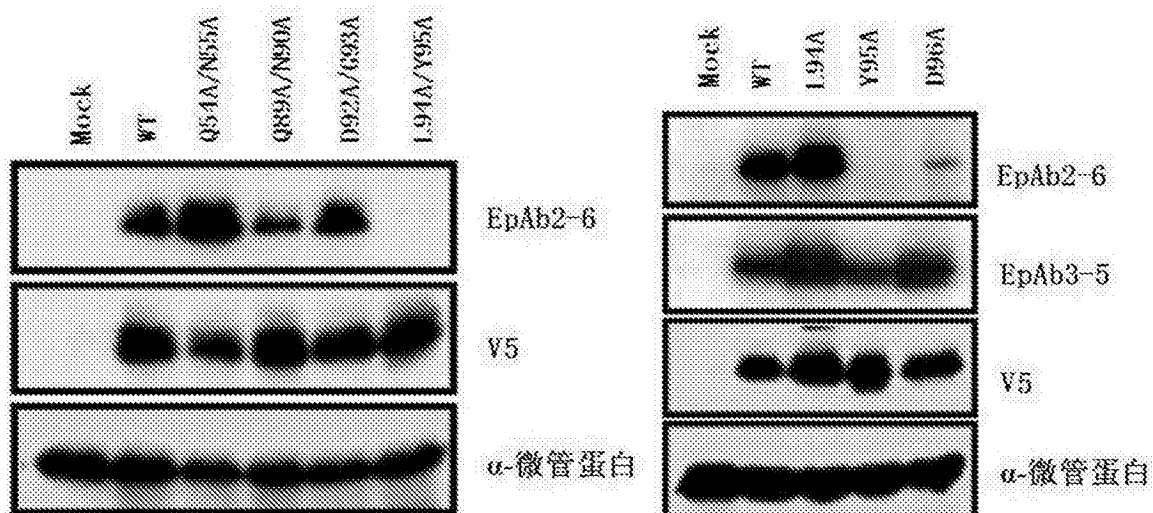


图8

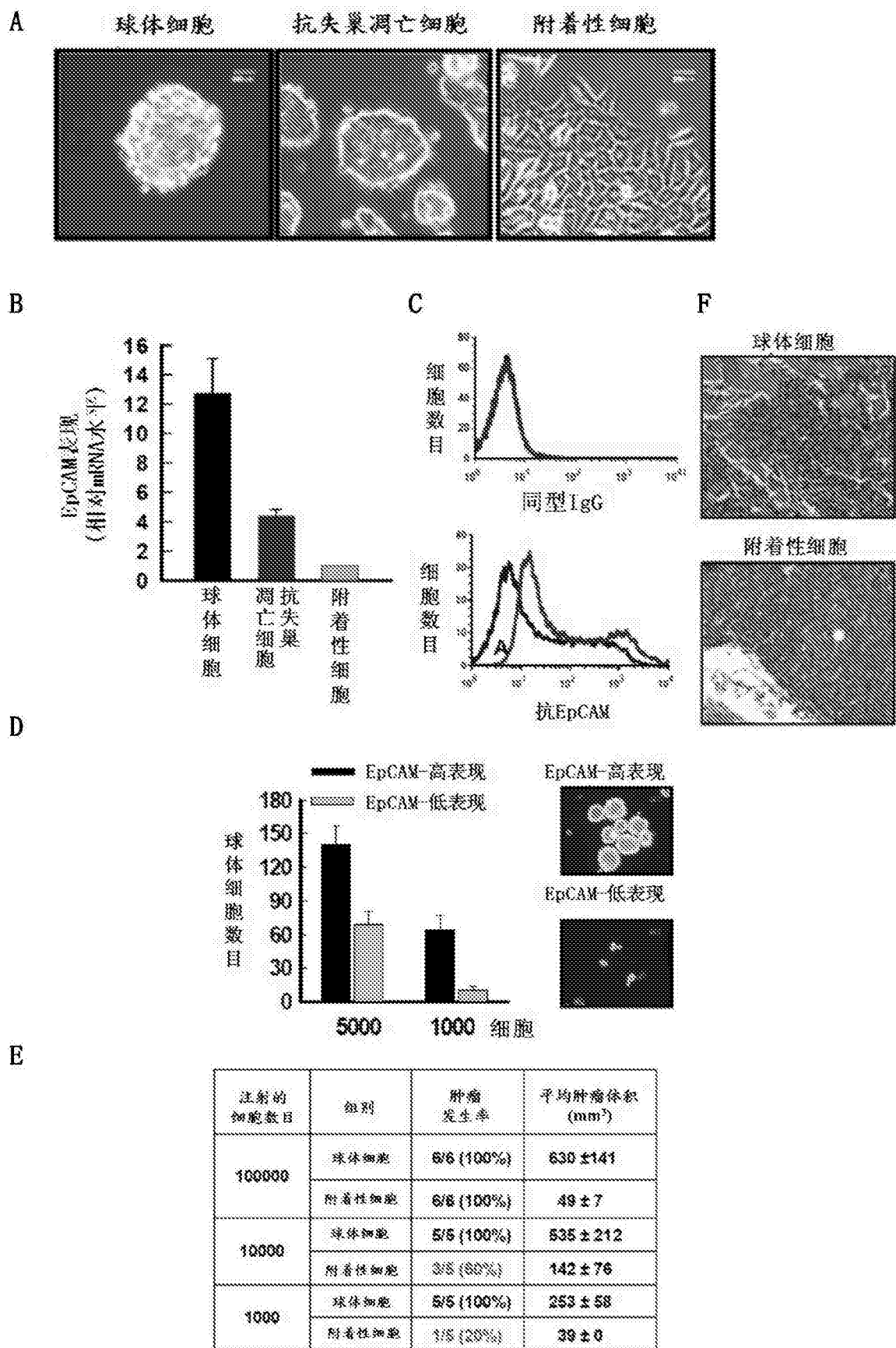
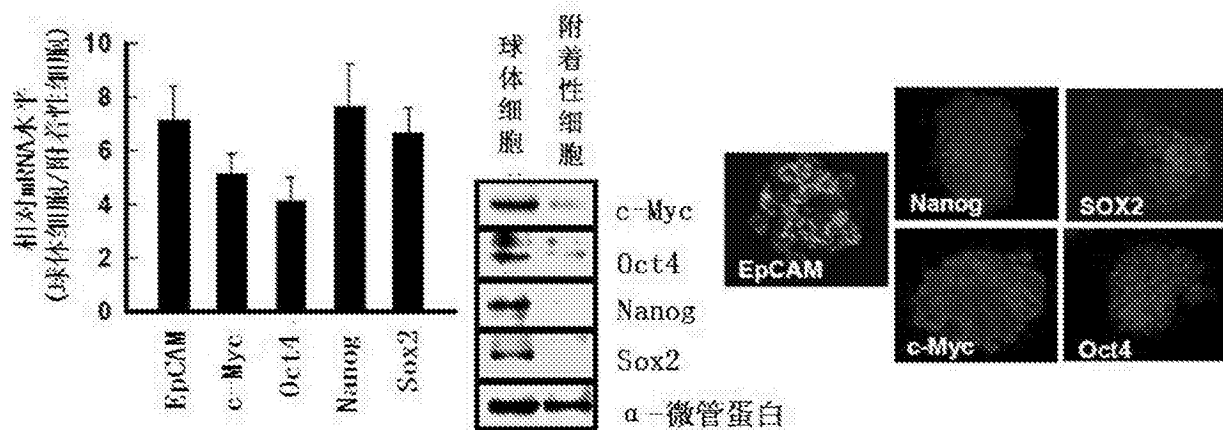
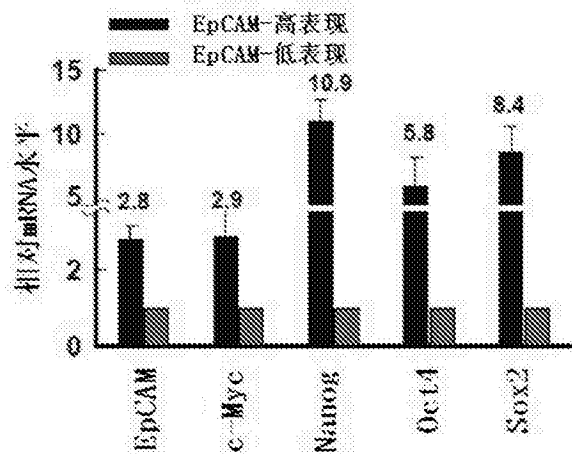


图9

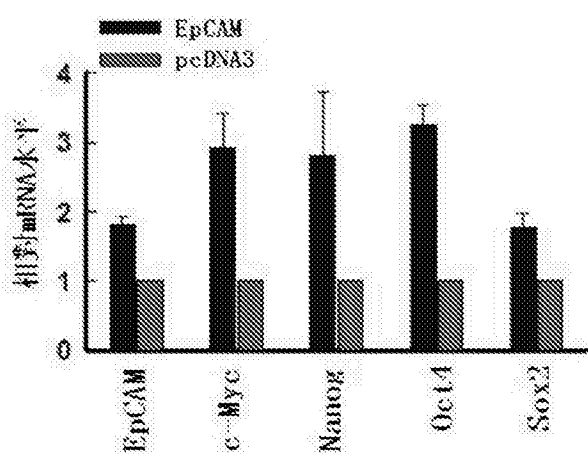
A



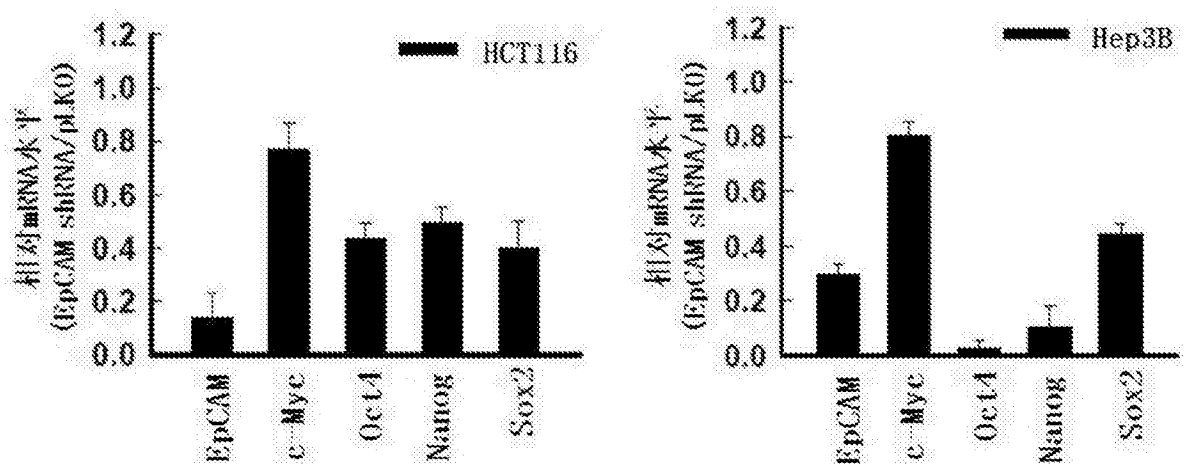
B



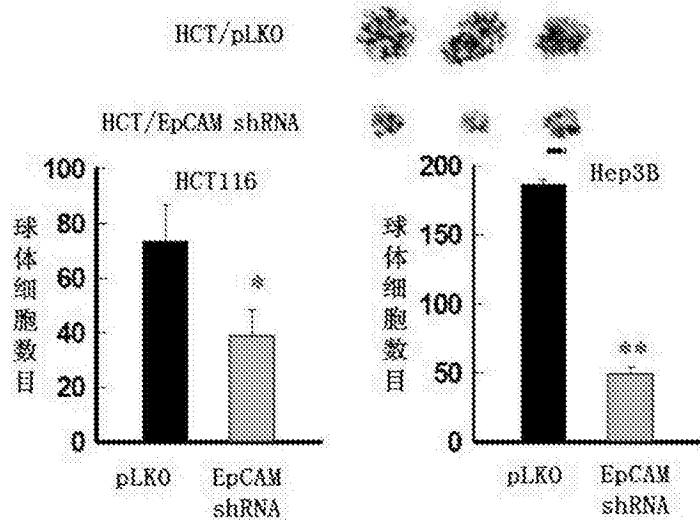
C



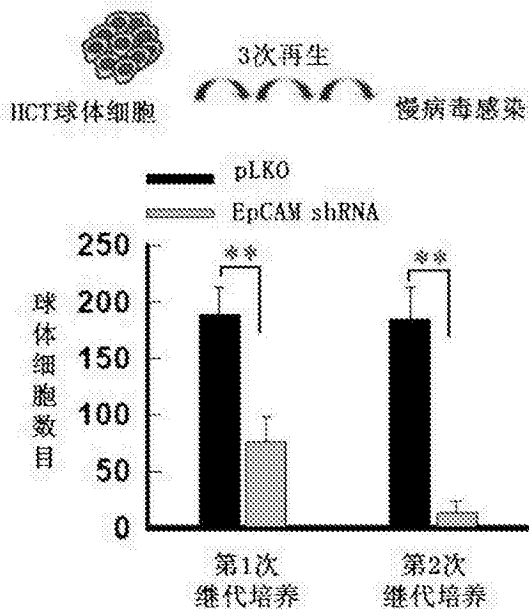
D



E



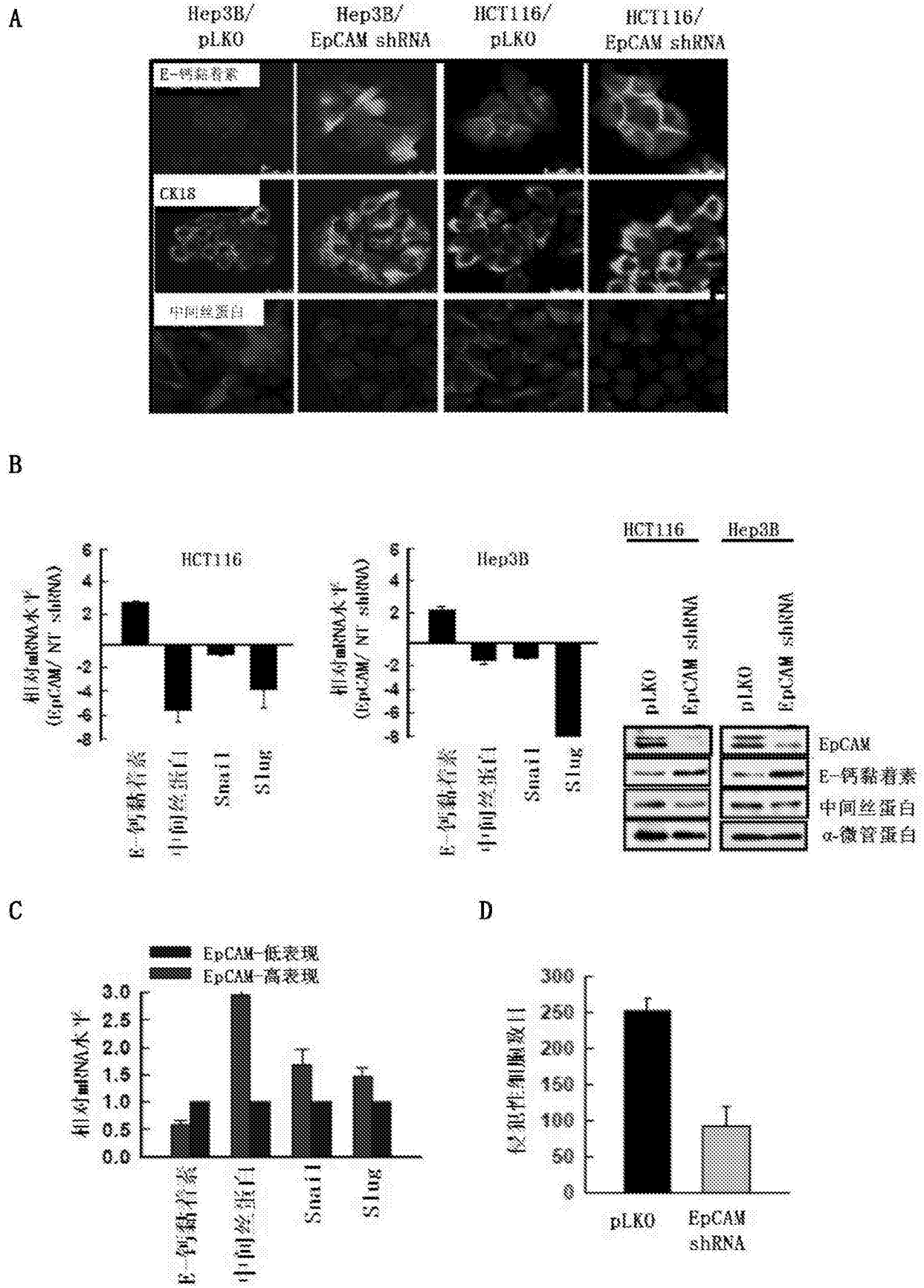
F



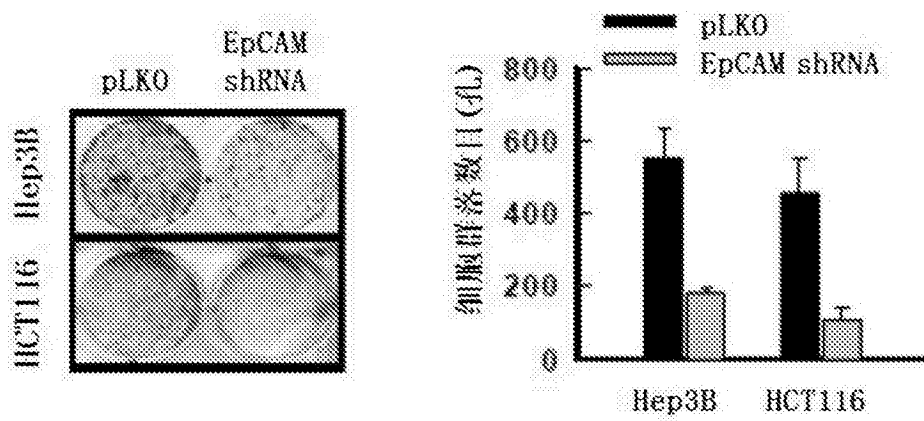
G

shRNA	细胞数目	100000	10000	1000	100
pLKO	潜伏发生率	5/5 21	4/4 24	3/4 29	2/4 35
EpCAM	潜伏发生率	5/5 32*	4/4 33*	2/4 40	1/4 48

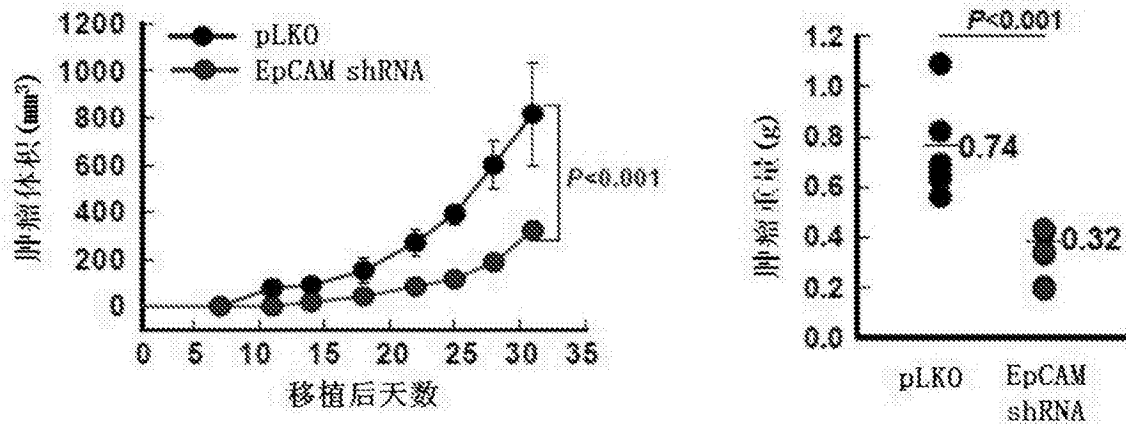
图10



E



F



G

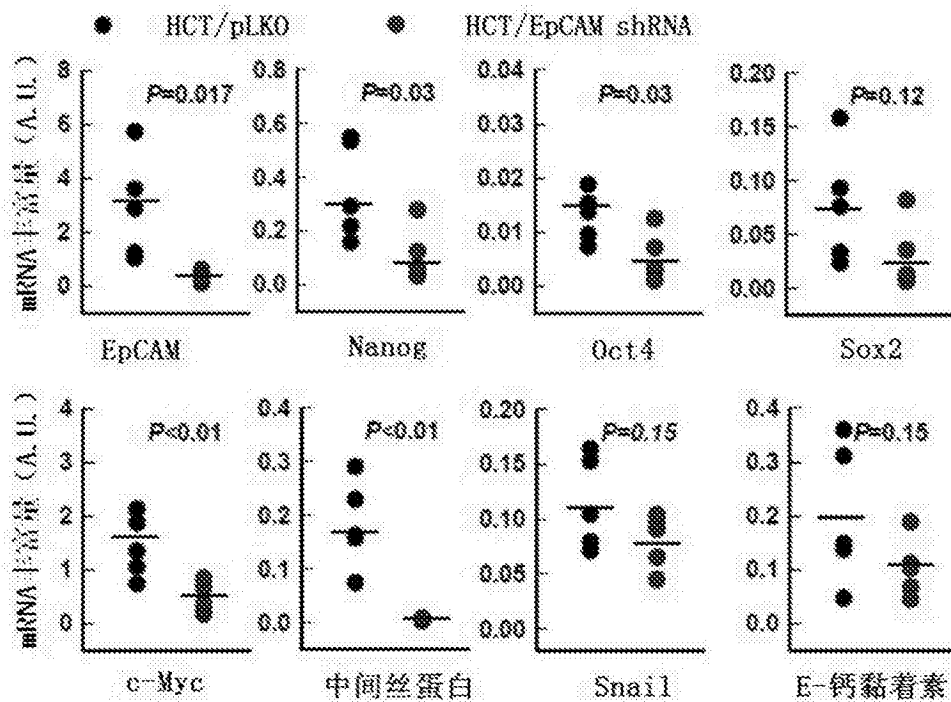
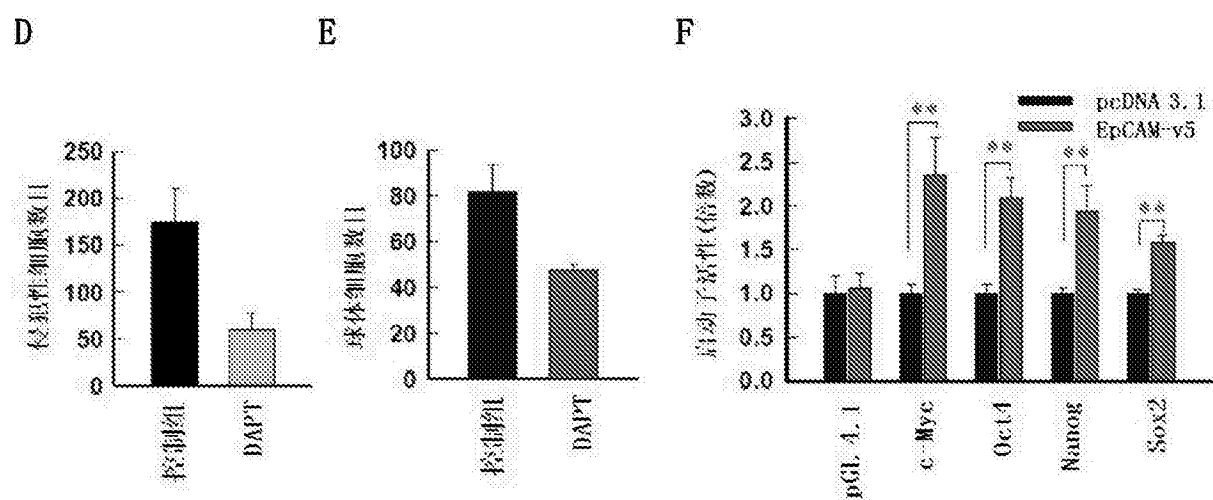
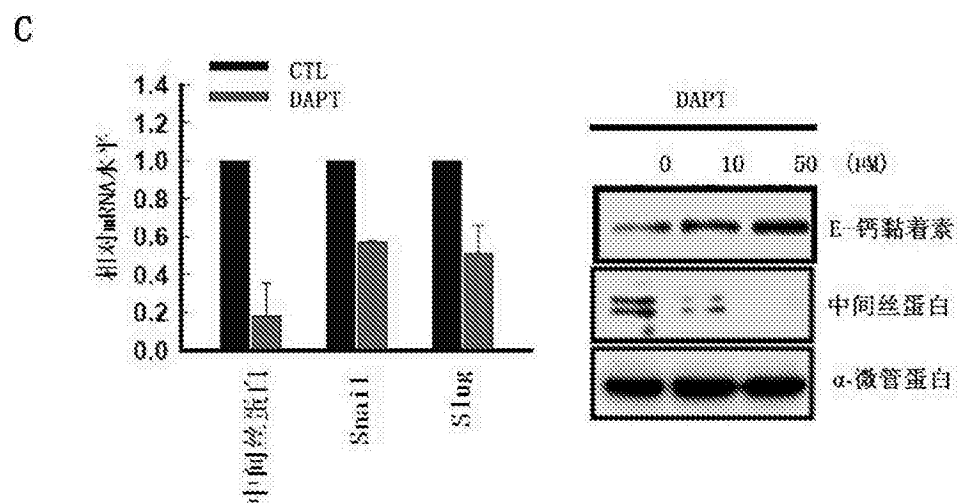
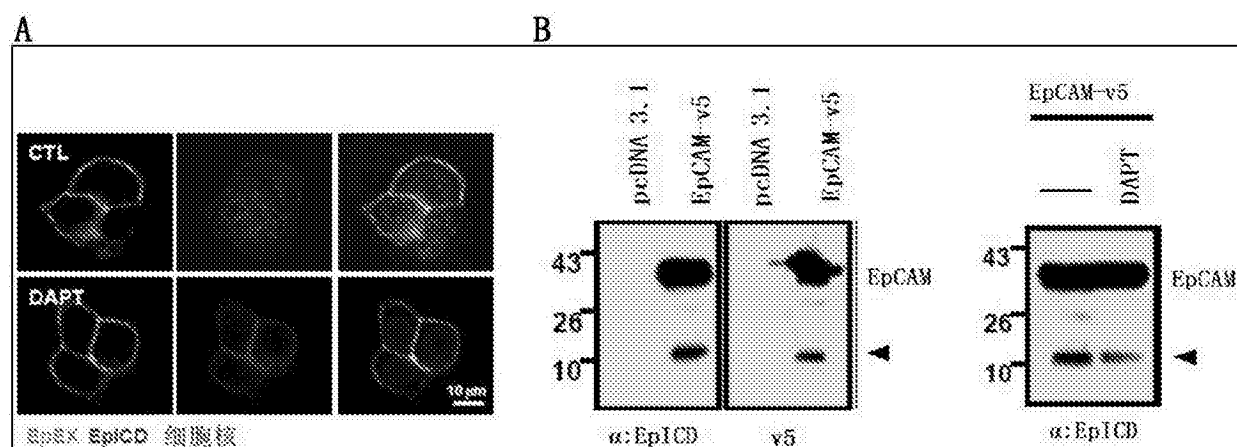
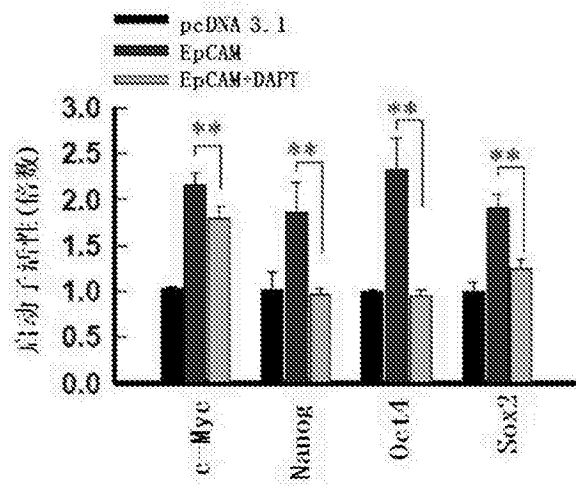


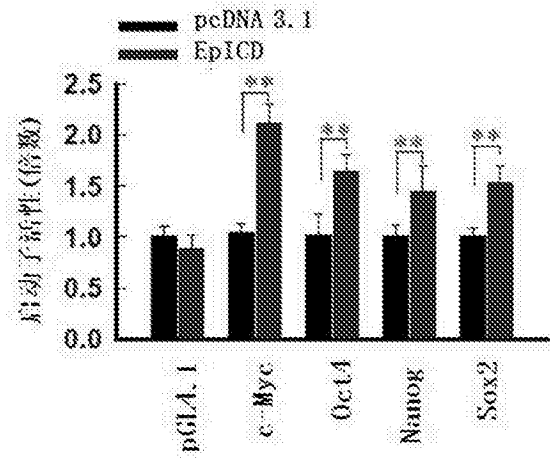
图11



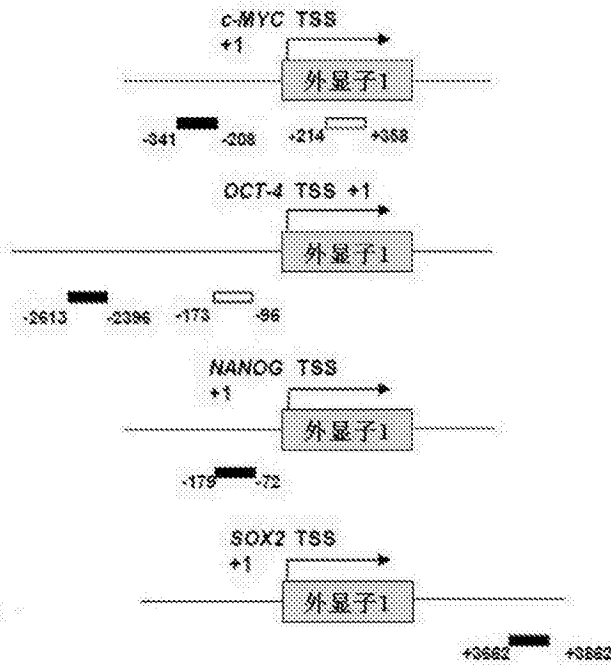
G



H



I



J

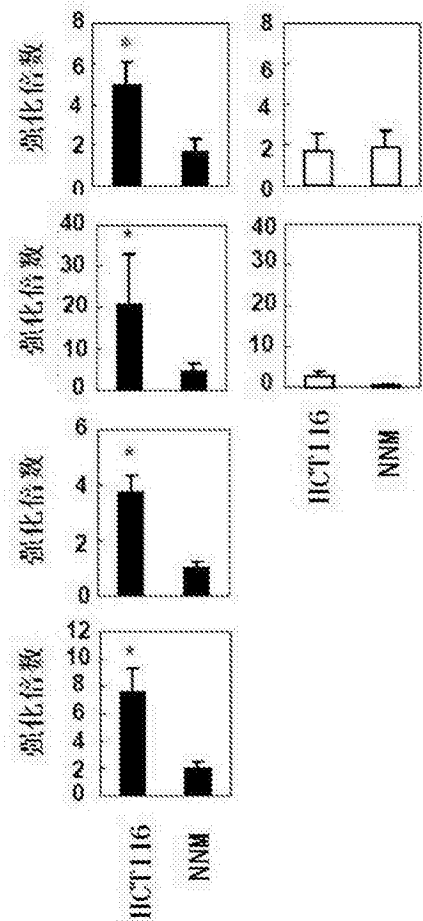


图12

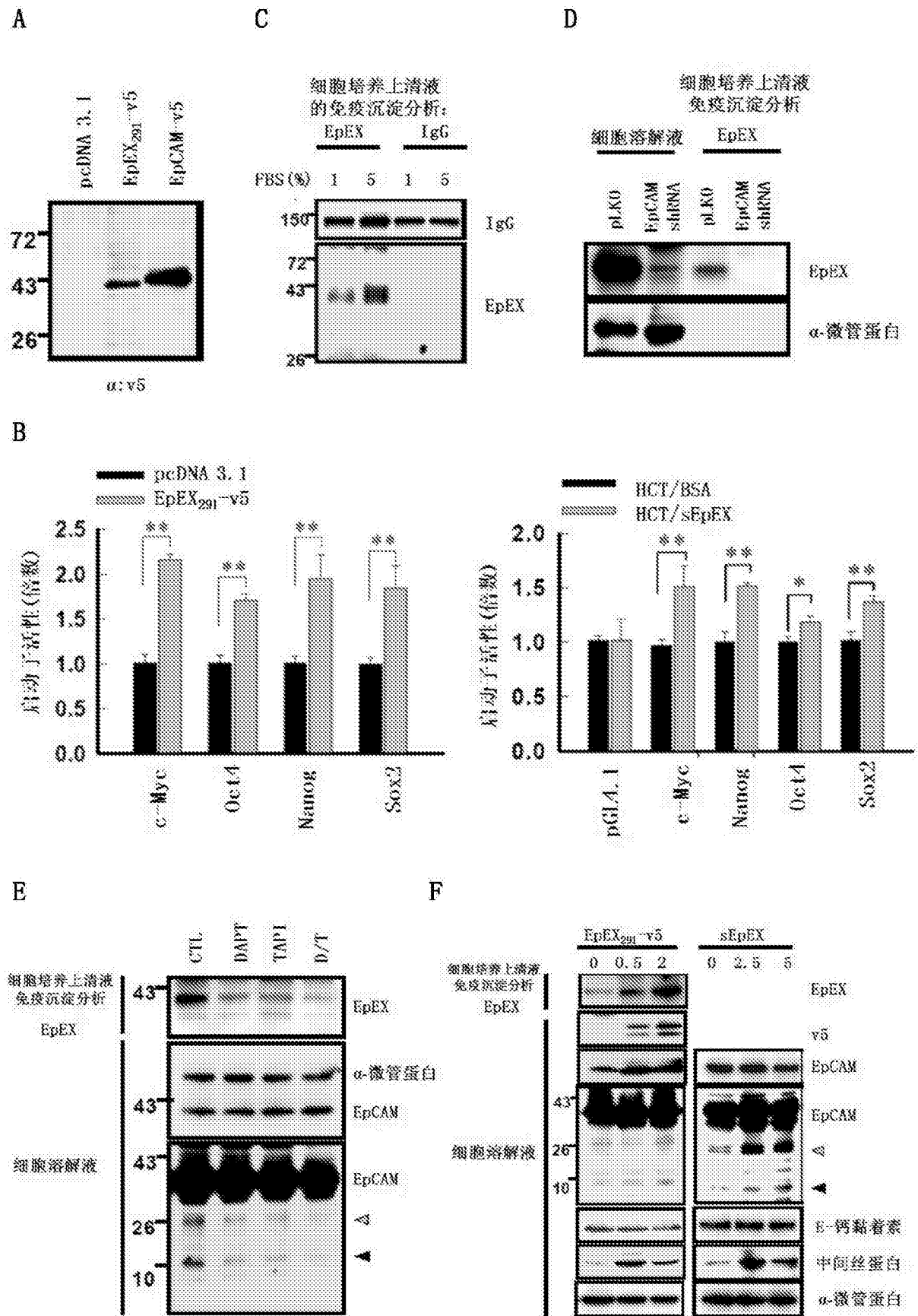


图13

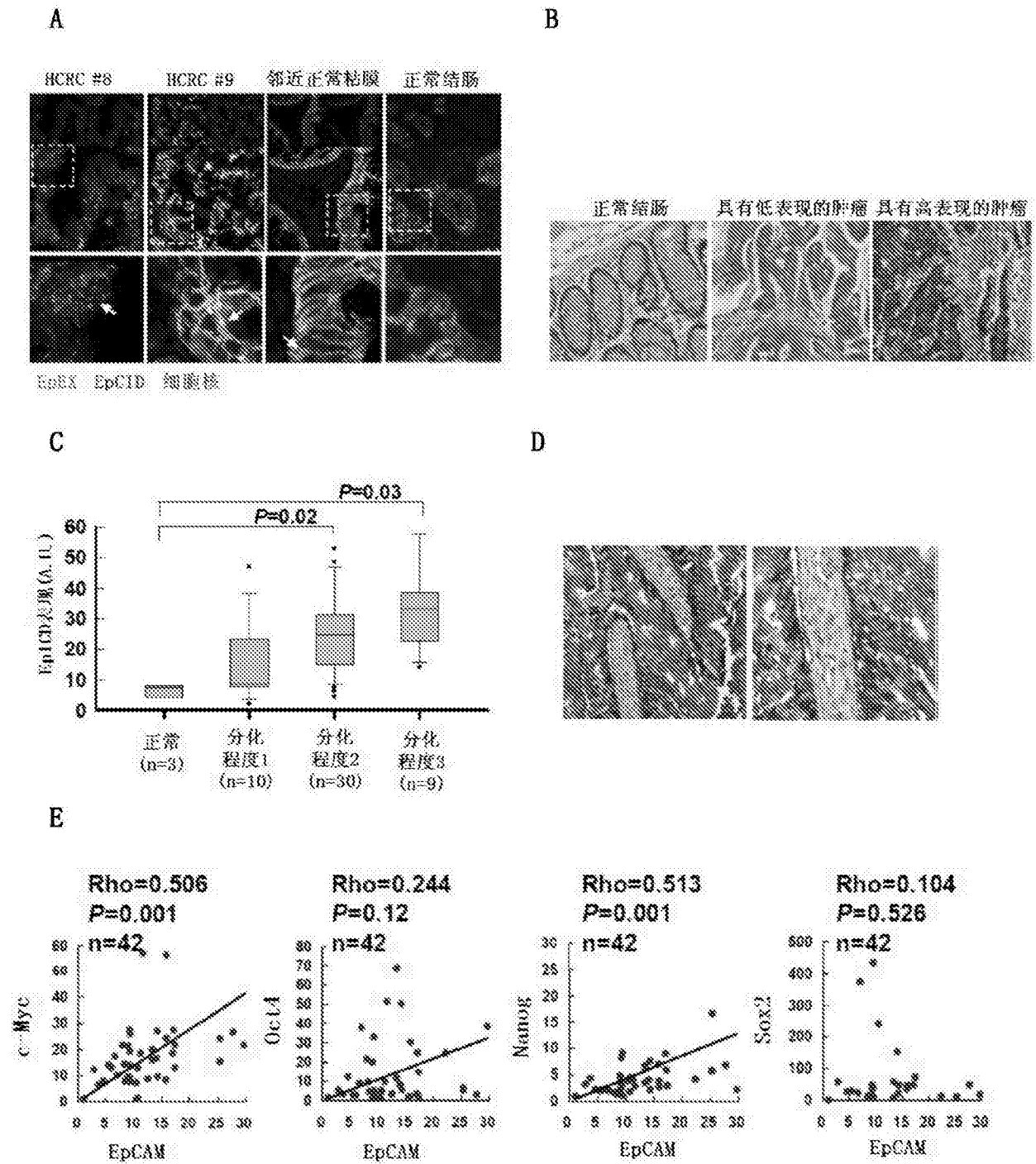


图14

单株抗体 来源体	ELISA	西方转 录分析	流式细 胞分析	同型物	SAS	NPC	HCT 116	Maha vii	PaCa	CL1.5	PC3	HIB10	A498	SKOV3	U2OS	HIV EC	NN M	细胞株	
OCAb1-1	+	+	+	IgM, κ	+++	+	-	-	-	-	+/	-	-	-	-	+	-	-	
OCAb2-6	+	+	+	IgG2a, κ	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OCAb3-3	+	+	+	IgG1, κ	+++	+	-	+	+	+	+	+	+/	+	+	-	-	-	
OCAb4-10	+	+	+	IgG1, κ	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OCAb5-5	+	+	+	IgG2a, κ	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OCAb6-1	+	-	+	IgG2a, κ	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OCAb7-1	+	+	+	IgG1, κ	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OCAb8-6	+	-	-	IgG1, κ	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OCAb9-1	+	+	+	IgG1, κ	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
OCAb10-1	+	+	+	IgG2a, κ	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
OCAb11-3	+	+	-	IgG1, κ	+++	+	-	-	-	+/	+	-	-	+	+	-	-	-	
OCAb12-1	+	+	-	IgG1.2a, κ	+++	+/	-	-	-	+	+/	-	-	+	+	-	-	-	

缩写：+代表结合（+++，OD 490nm>1.5；++，OD 490nm 1.1-1.5；+，OD 490nm 0.5-1；+/-，OD 490nm 0.2-0.5）-代表没有结合（OD 490nm<0.2）

图15

细胞株

单株抗体 克隆体	ELISA	西方转 录分析	流式细 胞分析	同型物	SAS	NPC	HCT116	SKOV3	HUVEC	NNM
OCAb9-1	+	+	+	IgG1, κ	++	+	+	+	-	-
EpAb1-3	+	+	+	IgG1, κ	++	+	+/-	+	-	-
EpAb2-6	+	+	+	IgG2a, κ	+++	++	+	+/-	-	-
EpAb3-5	+	+	+	IgG2b, κ	+++	++	+	++	-	-
EpAb4-1	+	+	+	IgG1, κ	++	++	+	+	-	-
EpAb5-4	+	+	+	IgG1, κ	++	+	+/-	+	-	-

缩写：+代表结合（+++，OD 490nm > 1.5；++，OD 490nm 1-1.5；+，OD 490nm 0.5-1；+/-，OD 490nm 0.2-0.5）
-代表没有结合（OD 490nm < 0.2）

图16

EpAb2-6 VH及VL区域的氨基酸序列

V _H 区域 (SEQ ID NO: 2)		FW1		CDR1	FW2	CDR2
EpAb2-6 (SEQ ID NO: 10)		EVQVTSQPELKKPGETVKISCKAS		GYTFIDYSMH (SEQ ID NO: 4)	WVKQAPGKGLKWNQW (SEQ ID NO: 11)	INTETGEP (SEQ ID NO: 5)
EpAb2-6 (SEQ ID NO: 12)		TEADDFKGRFAPSLETSAKITTYLQNNLNEDATATFCAR		CDR3 TAVY (SEQ ID NO: 6)	FW4 WQQGTSLSVSS (SEQ ID NO: 13)	家族 V _H 9
V _L 区域 (SEQ ID NO: 3)		FW1		CDR1	FW2	CDR2
EpAb2-6 (SEQ ID NO: 14)		DIQLTQSPSSLASLGERVSLIC		RASQEISVLS (SEQ ID NO: 7)	WLQQKPDGIERLIY (SEQ ID NO: 15)	ATSIILDS (SEQ ID NO: 8)
EpAb2-6 (SEQ ID NO: 16)		GVPKRFSGRSGSDYSLSLTSSEDEADYYC		CDR3 IQVASYPWT (SEQ ID NO: 9)	FW4 FGCGTKLEIKRADAAPTVS (SEQ ID NO: 17)	家族 V _L 9

图17

单株抗体选殖体	$K_d(M)$	$K_{on}(M^{-1}S^{-1})$	$K_{off}(S^{-1})$
OCAb9-1	7.168×10^{-11}	3.284×10^6	2.354×10^{-4}
EpAb1-3	1.833×10^{-9}	1.849×10^5	3.389×10^{-4}
EpAb2-6	3.491×10^{-10}	4.007×10^5	1.399×10^{-4}
EpAb3-5	$\leq 4.66 \times 10^{-13}$	2.961×10^6	1.38×10^{-6}
EpAb4-1	1.228×10^{-12}	2.865×10^5	3.519×10^{-7}
EpAb5-4	2.431×10^{-10}	6.221×10^5	1.513×10^{-4}
hEpAb2-6	6.773×10^{-10}	3.756×10^5	2.544×10^{-4}

图18

选殖体	噬菌体序列																		
PC-26	H	G	T	Q	M	T	W	W	D	P	D	L							
PC-11,-29				M	Q	G	K	D	W	M	D	L	S	P	T				
PC-3,-4,-18	S	T	Q	M	S	Y	R	D	Q	D	L	Y							
PC-12	V	P	M	S	R	P	E	W	N	D	L	Y							
PC-1,-19,-27,-35	V	P	V	G	R	L	D	F	I	D	L	Y							
PC-21,-37			T	Q	K	M	D	A	H	D	L	Y	P	V					
PC-20							F	Q	V	G	D	L	Y	D	H	M	W	N	
PC-2,-7,-8								W	Q	N	V	E	Y	D	M	R	E	W	I
PC-44	V	T	P	Q	A	K	D	W	Y	T	L	Y							
EpCAM ₈₃₋₁₀₀	K	P	E	G	A	L	Q	N	N	D	G	L	Y	D	P	D	C	D	E

图19