

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480021986.5

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月23日

[11] 公开号 CN 101227921A

[22] 申请日 2004.6.7

[21] 申请号 200480021986.5

[30] 优先权

[32] 2003.6.6 [33] US [31] 60/476,909

[32] 2003.9.16 [33] US [31] 60/503,356

[86] 国际申请 PCT/US2004/018279 2004.6.7

[87] 国际公布 WO2005/048917 英 2005.6.2

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.27

[71] 申请人 医学免疫公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 凯利·卡尔斯-金奇

迈克尔·S·金奇

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 卢素华 郑霞

权利要求书 12 页 说明书 109 页 序列表 13 页
附图 8 页

[54] 发明名称

EphA4 和 EphA4 调节剂用于诊断、治疗和预防癌症的用途

[57] 摘要

本发明涉及用于治疗、控制或预防癌症，尤其是转移性癌症的方法和组合物。在一个实施方案中，本发明的方法包括给予有效量的一种或多种结合 EphA4 和激发 EphA4 的抗体。在另一个实施方案中，本发明的方法包括给予有效量的一种或多种结合 EphA4 和抑制软琼脂中的癌细胞克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中管状网络形成的抗体。在另一个实施方案中，本发明的方法包括给予有效量的一种或多种优选结合在癌细胞上而不是在非癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位的抗体。在另一个实施方案中，本发明的方法包括给予有效量的一种或多种结合极低 k_{off} 的 EphA4 的抗体，以降低 EphA4 表达，由此抑制肿瘤细胞生长和/或转移。本发明也提供药物组合物，其包括一种或多种本

发明的 EphA4 抗体或还包括一种或多种用于癌症治疗的其他试剂。

1. 一种治疗需要此种治疗的患者癌症的方法,所述方法包括向所述患者以治疗有效量的 EphA4 抗体给药,该 EphA4 抗体是 EphA4 激发性抗体、EphA4 癌细胞表型抑制性抗体、或暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体。
2. 如权利要求1所述的方法,其中相对于未经治疗的癌细胞中的 EphA4 的磷酸化水平,所述给药提高了癌细胞中 EphA4 的磷酸化。
3. 如权利要求1所述的方法,其中相对于未经治疗的癌细胞中的 75 kDa EphA4 关联蛋白的磷酸化水平,所述给药提高了癌细胞中 75 kDa EphA4 关联蛋白的磷酸化。
4. 如权利要求1所述的方法,其中相对于未经治疗的癌细胞中的 EphA4 的表达水平,所述给药降低了癌细胞中 EphA4 的表达。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述 EphA4 抗体抑制软琼脂中的克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述 EphA4 抗体降低软琼脂中存在的克隆形成或基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述降低通过细胞凋亡或坏死发生。
8. 如权利要求1所述的方法,其中当在细胞上表达而不在细胞间的接触

中表达时, 所述 EphA4 抗体结合 EphA4。

9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述 EphA4 抗体结合不能与其配体发生稳定相互作用的 EphA4。

10. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述 EphA4 抗体结合不与其配体结合的 EphA4。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述癌症是上皮细胞起源的。

12. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述癌症是内皮细胞起源的。

13. 如权利要求 1 所述的方法, 其中相对于具有所述癌细胞组织类型的非癌细胞, 所述癌含有过量表达 EphA4 的细胞。

14. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述癌是皮肤、肺、结肠、乳腺、前列腺、膀胱或胰腺癌, 或是肾脏细胞癌或黑素瘤。

15. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述癌是转移癌。

16. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述 EphA4 抗体是单克隆抗体。

17. 如权利要求 1 所述的方法, 所述 EphA4 抗体是人源化的。

18. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述 EphA4 抗体是人抗体。

19. 如权利要求1所述的方法,其中可变重链和/或可变轻链的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 4 和 8 中所含的 EA44 的可变重链或轻链氨基酸序列分别有至少 90%的氨基酸序列相同。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述重链和/或轻链序列的至少 3 个 CDR 与 EA44 中的相应 CDR 相同。

21. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述 EphA4 CDR 的至少 4 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

22. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述 EphA4 CDR 的至少 5 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

23. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述 EphA4 CDR 的全部 6 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

24. 如权利要求 1 所述的方法,该方法包括给予不是 EphA4 抗体的抗癌治疗。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中所述额外的癌治疗包括用 EphA2 抗体给药。

26. 如权利要求 24 所述的方法,其中所述额外的癌治疗选自化学治疗、生物治疗、免疫治疗、放射治疗、激素治疗、及外科治疗。

27. 一种药物组合物, 该组合物包括治疗有效量的 EphA4 抗体及药物学上可接受的载体, 该 EphA4 抗体是激发性抗体, EphA4 癌细胞表型抑制性抗体, 或暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体。

28. 如权利要求 27 所述的药物组合物, 其中所述 EphA4 抗体是单克隆抗体。

29. 如权利要求 27 所述的药物组合物, 其中所述 EphA4 抗体是人源化的。

30. 如权利要求 27 所述的药物组合物, 其中所述 EphA4 抗体是人的。

31. 如权利要求 27 所述的药物组合物, 其中所述可变重链和/或可变轻链的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 4 和 8 中所含的 EA44 的可变重链或轻链氨基酸序列分别有至少 90% 的氨基酸序列相同。

32. 如权利要求 31 所述的药物组合物, 其中所述可变重链和/或可变轻链序列的 CDR 至少 3 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

33. 如权利要求 31 所述的药物组合物, 其中所述 EphA4 抗体 CDR 的至少 4 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

34. 如权利要求 31 所述的药物组合物, 其中所述 EphA4 抗体 CDR 的至少 5 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

35. 如权利要求 31 所述的药物组合物, 其中所述 EphA4 抗体 CDR 的全部 6 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

36. 如权利要求 27 所述的药物组合物, 该组合物包括不是 EphA4 抗体的抗癌试剂。

37. 如权利要求 36 所述的药物组合物, 其中所述抗癌试剂是 EphA2 抗体。

38. 如权利要求 37 所述的药物组合物, 其中所述 EphA2 抗体是单克隆的。

39. 如权利要求 36 所述的药物组合物, 其中所述抗癌试剂是化学治疗性试剂、放射治疗性试剂、激素治疗性试剂、生物治疗、或免疫治疗性试剂。

40. 一种特异性结合 EphA4 的抗体, 该结合激发至少一种 EphA4 活性。

41. 如权利要求 40 所述的抗体, 其中所述 EphA4 活性是 EphA4 的磷酸化。

42. 如权利要求 40 所述的抗体, 其中所述 EphA4 活性是 75 kDa 的 EphA4 关联蛋白的磷酸化。

43. 一种特异性结合 EphA4 的抗体, 该结合抑制癌细胞表型。

44. 如权利要求 43 所述的抗体,其中所述结合抑制软琼脂中的癌细胞克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成。

45. 如权利要求 43 所述的抗体,其中所述结合降低软琼脂中的癌细胞克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成。

46. 如权利要求 45 所述的抗体,其中所述降低通过癌细胞的坏死或细胞凋亡发生。

47. 一种特异性结合 EphA4 的抗体,该结合仅当 EphA4 不是在细胞间接触中或不与 EphrinA4 配体结合时才发生。

48. 如权利要求 40-42 或 47 中任一项所述的抗体,该抗体是单克隆抗体。

49. 如权利要求 40-42 或 47 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化的。

50. 如权利要求 40-42 或 47 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人的。

51. 如权利要求 40-42 或 47 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是衍生物。

52. 如权利要求 51 所述的抗体,与不是衍生物的抗体相比,该抗体的体内半衰期增大。

53. 一种细胞系,该细胞系产生如权利要求40-42或47中任一项所述的抗体。

54. 一种识别抑制癌细胞表型的 EphA4 抗体的方法,所述方法包括:

a. 在适于抗体-抗原决定部位结合的条件下,用特异性结合 EphA4 的抗体与表达 EphA4 的细胞接触,这种细胞培养在软琼脂或三维基膜或细胞外基质制剂中;和

b. 检测所述细胞在软琼脂中形成克隆或在所述三维基膜或细胞外基质制剂中形成管状网络的能力,

其中如果相对于未接触所述抗体的表达 EphA4 的细胞,检测到所述细胞形成克隆或管状网络的能力降低时,就表明所述抗体是抑制癌细胞表型的 EphA4 抗体。

55. 一种识别杀死具有癌细胞表型的癌细胞的 EphA4 抗体的方法,所述方法包括:

a. 在适于抗体-抗原决定部位结合的条件下,用特异性结合 EphA4 的抗体与表达 EphA4 的癌细胞接触,这种癌细胞培养在软琼脂或三维基膜或细胞外基质制剂中;和

b. 检测所述克隆或管状网络的降低,

其中如果相对于未接触所述抗体的表达 EphA4 的细胞的克隆或管状网络,检测到所述克隆或管状网络降低时,就表明所述抗体是杀死具有癌细胞表型的癌细胞的 EphA4 抗体。

56. 一种识别优选结合在癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位的 EphA4 抗体的方法, 所述方法包括:

a. 接触两组表达 EphA4 的细胞, 其中第一组细胞是非癌细胞, 第二组细胞是癌细胞; 和

b. 检测所述抗体结合 EphA4 的能力,

其中如果在所述第二组细胞中而不是在所述第一组细胞中检测到抗体结合, 就表明所述抗体是优选结合在癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位的 EphA4 抗体。

57. 如权利要求 56 所述的方法, 其中所述的检测使用免疫荧光显微镜或流式细胞仪。

58. 一种治疗需要此种治疗的患者癌症的方法, 该方法包括以治疗有效量的 EphA4 反义核酸分子向所述患者给药。

59. 一种治疗需要此种治疗的患者癌症的方法, 该癌全部或部分地用第一种治疗难于治疗, 所述方法包括给予所述患者第二种治疗, 所述第二种治疗包括给予治疗有效量的 EphA4 抗体, 该抗体是 EphA4 激发性抗体、EphA4 癌细胞表型抑制性抗体、或暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体。

60. 如权利要求 59 所述的方法, 其中所述第一种治疗是化学治疗、激素治疗、生物治疗、或放射治疗。

61. 如权利要求 60 所述的方法, 其中所述激素治疗包括它莫西芬给药。

62. 如权利要求 59 所述的方法, 其中所述第二种治疗包括给予化学治疗、激素治疗、生物治疗、或放射治疗。

63. 如权利要求 59 所述的方法, 其中所述第一种治疗与所述第二种治疗同时进行。

64. 一种治疗需要此种治疗的患者非癌性高增生细胞疾病或紊乱的方法, 所述方法包括向所述患者用治疗有效量的 EphA4 抗体给药, 该 EphA4 抗体是 EphA4 激发性抗体、EphA4 癌细胞表型抑制性抗体、或暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体。

65. 如权利要求 64 所述的方法, 其中所述 EphA4 抗体优选结合在癌细胞上而不是在非癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位。

66. 如权利要求 64 所述的方法, 其中相对于未经治疗的非癌性高增生细胞中的 EphA4 磷酸化水平, 所述给药提高非癌性高增生细胞中的 EphA4 磷酸化。

67. 如权利要求 64 所述的方法, 其中相对于未经治疗的非癌性高增生细胞中的 EphA4 表达水平, 所述给药降低非癌性高增生细胞中的 EphA4 表达。

68. 如权利要求 64 所述的方法, 其中所述非癌性高增生细胞是上皮细胞。

69. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述患者具有非癌性高增生细胞，该非癌性高增生细胞相对于具有相同组织类型的非癌性非高增生细胞过表达 EphA4。

70. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述非癌性高增生细胞疾病或紊乱是哮喘、牛皮癣、炎性肠疾病、平滑肌再狭窄、内皮再狭窄、克隆氏病(crohn's disease)、或慢性阻塞性肺疾病。

71. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述 EphA4 抗体是单克隆抗体。

72. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述 EphA4 抗体是人源化的。

73. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述 EphA4 抗体是人抗体。

74. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述的可变重链和/或可变轻链的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 4 和 8 中所含的 EA44 的可变重链或轻链氨基酸序列分别有至少 90%的氨基酸序列相同。

75. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述可变重链和可变轻链的至少 3 个 CDR 与 EA44 中的相应 CDR 相同。

76. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述 EphA4 抗体 CDR 的至少 4 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

77. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述 EphA4 抗体 CDR 的至少 5 个

与 EA44 中的相应 CDR 相同。

78. 如权利要求 64 所述的方法, 其中所述 EphA4 抗体 CDR 的全部 6 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

79. 一种诊断、预测或监测已知患有或怀疑患有癌症的患者中癌症治疗功效的方法, 所述方法包括:

a. 在适于抗体-EphA4 结合的条件下, 用 EphA4 抗体与所述患者的细胞接触, 该 EphA4 抗体是 EphA4 激发性抗体, EphA4 癌细胞表型抑制性抗体, 暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体; 和

b. 检测与所述细胞结合的 EphA4 抗体,

其中如果检测到 EphA4 抗体结合水平比对照中的高, 就表明该患者患有癌症。

80. 如权利要求 79 所述的方法, 其中所述细胞是全血、唾液、尿、血清或肿瘤细胞组织的细针吸出物。

81. 如权利要求 79 所述的方法, 其中所述细胞来自从所述患者中得到的冷冻或固化组织或细胞。

82. 如权利要求 79 所述的方法, 其中所述检测包括对所述患者中的所述 EphA4 抗体结合进行成像。

83. 如权利要求 79 所述的方法, 其中所述患者患有转移癌。

84. 如权利要求 79 所述的方法, 其中所述 EphA4 抗体是暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体。

85. 一种 EphA4 抗体或抗体片段, 其是 EphA4 激发性抗体, EphA4 癌细胞表型抑制性抗体, 或暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体, 其中可变重链和/或可变轻链的氨基酸序列其与 SEQ ID NO: 4 和 8 中所含的 EA44 的可变重链或轻链氨基酸序列分别有至少 90% 的氨基酸序列相同。

86. 如权利要求 85 所述的 EphA4 抗体, 其中所述可变重链和可变轻链的至少 3 个 CDR 与 EA44 中的相应 CDR 相同。

87. 如权利要求 85 所述的 EphA4 抗体, 其中其 CDR 的至少 4 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

88. 如权利要求 85 所述的 EphA4 抗体, 其中其 CDR 的至少 5 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

89. 如权利要求 85 所述的 EphA4 抗体, 其中其 CDR 的全部 6 个与 EA44 中的相应 CDR 相同。

90. 一种细胞系, 其可产生如权利要求 85-89 中任一项所述的抗体。

EphA4 和 EphA4 调节剂用于诊断、治疗和预防癌症的用途

本申请要求于 2003 年 6 月 6 日提交的 U.S.临时专利申请 60/476,909 和 2003 年 9 月 16 日提交的 U.S.临时专利申请 60/503,356 的优先权，在此引入每一申请的全部内容引为参考。

1. 发明领域

本发明涉及用于治疗、控制或预防高增生性细胞疾病，尤其是癌症的方法和组合物。本发明的方法包括给予有效量的一种或多种对 EphA4 具有特异性的抗体，优选是单克隆抗体，该抗体是 EphA4 激动剂，可以抑制癌细胞表型(如软琼脂中的克隆形成或三维基膜或细胞外膜制剂如 MATRIGEL™ 中的管状网络形成)，优选地结合 EphA4 抗原决定部位，该抗原决定部位在癌细胞上而不是非癌细胞上选择性地暴露或增加，和/或结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} S^{-1}$ 的 EphA4。本发明也提供药物组合物，其包括一种或多种本发明的单克隆抗体或还包括一种或多种用于癌症治疗的其他试剂。也提供诊断方法和筛选治疗用 EphA4 特异性抗体的方法。

2. 发明背景

癌

瘤或肿瘤是因异常的不可控制的细胞生长而形成的肿瘤块，其可以是良性的或恶性的。良性肿瘤通常保持在一个地方。恶性肿瘤一般称为癌。术语"恶性"通常是指，肿瘤可以侵犯并破坏附近的身体结构，并可扩散到较远位

置而致死(请参见 Robbins 和 Angell, 1976, *Basic Pathology*, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122)。癌可以在身体多个位置发生, 其表现因器官不同而不同。癌细胞破坏它们起源的身体部分, 并扩散到身体其他部分, 在其他部分它们重新生长, 再次引起破坏。

每年有超过 120 万的美国人得癌症。在美国, 癌症是第二致死病症, 并且如果按这种趋势发展, 到 2010 年癌症会成为第一致死病症。对于美国男性而言, 肺和前列腺癌症是主要的癌症杀手。对于美国女性而言, 肺和乳腺癌是主要的癌症杀手。在美国两个男性之中就有一个在其一生中被诊断为患有癌症。在美国三个女性之中就有一个在其一生中被诊断为患有癌症。

癌症治疗法仍未被发现。现有的治疗选择如外科治疗, 化学治疗和放射治疗通常没有效果或存在严重副作用。

转移

当肿瘤细胞群落获得在体内转移至远距离和外部位点的能力时, 就产生了大多数威胁生命的癌。这些转移性细胞通过克服通常限制细胞转移到不同组织的限制条件而存活。例如, 如果将一般的乳腺上皮细胞移植到肺部, 那么它一般不能生长或存活, 然而肺转移瘤是乳腺癌发病率和死亡率的主要原因。近来有证据表明, 在原发性肿瘤在临床上有表现之前的很长时间, 转移性细胞就可扩散到了全身。在检测到并除去原发性肿瘤之后, 这些微转移性细胞可以保持休眠几个月或几年。因此, 更好地了解转移性细胞在外部微环境中的生长和存活机理对于改进治疗非常重要, 这样可以对抗转移性癌症, 并可较早地诊断和定位转移。

癌细胞信号

癌症是一种异常信号转导疾病。异常细胞信号克服对细胞生长和存活的

锚定依赖性限制(Rhim 等人, *Critical Reviews in Oncogenesis* 8: 305, 1997; Patarca, *Critical Reviews in Oncogenesis* 7: 343, 1996; Malik 等人, *Biochimica et Biophysica Acta* 1287: 73, 1996; Cance 等人, *Breast Cancer Res Treat* 35: 105, 1995)。酪氨酸激酶活性是由 ECM 锚定诱导的, 而且确实地, 酪氨酸激酶的表达或功能通常在恶性细胞中增大(Rhim 等人, *Critical Reviews in Oncogenesis* 8: 305, 1997; Cance 等人, *Breast Cancer Res Treat* 35: 105, 1995; Hunter, *Cell* 88: 333, 1997)。基于恶性细胞生长需要酪氨酸激酶活性的事实, 酪氨酸激酶成为新治疗方法的标靶(Levitzki 等人, *Science* 267: 1782, 1995; Kondapaka 等人, *Molecular & Cell Endocrinology* 117: 53, 1996; Fry 等人, *Current Opinion in BioTechnology* 6: 662, 1995)。不幸地是, 与肿瘤细胞特异性有关的障碍经常限制这些药物的应用。具体而言, 酪氨酸激酶活性通常对于良性组织的功能和存活是至关重要的(Levitzki 等人, *Science* 267: 1782, 1995)。为了使间接毒性最小化, 识别在肿瘤细胞中选择性过表达的酪氨酸激酶, 然后以其为标靶非常重要。

EphA4

EphA4 是在大脑、心脏、肺、肌肉、肾、胎盘、胰腺 (Fox 等人, *Oncogene* 10: 897, 1995) 和黑素细胞(Easty 等人, *Int. J. Cancer* 71: 1061, 1997) 中表达的受体酪氨酸激酶。EphA4 结合细胞膜锚定的配体(Ephrins A1、A2、A3、A4、A5、B2 及 B3; Pasquale, *Curr. Opin. In Cell Biology*, 1997, 9: 608; 及配体 B61、AL1/RAGS、LERK4、Htk-L 和 Elk-L3; Martone 等人, *Brain Research* 771: 238, 1997), 结合配体使 EphA4 在酪氨酸残基上自动磷酸化(Ellis 等人, *Oncogene* 12: 1727, 1996)。EphA4 酪氨酸磷酸化与 Src Homology 2/3 (SH2/SH3) 区生成蛋白结合区, 如细胞质酪氨酸激酶 p59fyn (Ellis 等人,

见上文; Cheng 等人, *Cytokine and Growth Factor Reviews* 13: 75, 2002)。
在 *Xenopus* 胚胎中活化 EphA4 会导致钙粘连蛋白依赖性的细胞粘连的丧失 (Winning 等人, *Differentiation* 70: 46, 2002; Cheng 等人, 见上文), 这表明 EphA4 在肿瘤血管生成中具有作用; 然而, EphA4 在癌症发展中的作用还不清楚。EphA4 在乳腺癌、食道癌症及胰腺癌症中表现出上调(Kuang 等人, *Nucleic Acids Res.* 26: 1116, 1998; Meric 等人, *Clinical Cancer Res.* 8: 361, 2002; Nemoto 等人, *Pathobiology* 65: 195, 1997; Logsdon 等人, *Cancer Res.* 63: 2649, 2003), 而在黑素瘤组织中表现出下调(Easty 等人, 见上文)。

癌症治疗

发展抗转移试剂的一个障碍是用于设计和评估这些药物的分析系统。大多数常规癌症治疗是以快速生长的细胞为靶。然而, 癌细胞并不一定必需地快速生长, 而是可以在不允许正常细胞存活的环境下存活或生长(Lawrence 和 Steeg, 1996, *World J. Urol.* 14: 124-130)。正常细胞与恶性细胞行为上的这些基本差异为治疗靶提供了机会。扩散到全身的微转移肿瘤的实例强调了在外部和三维微环境中需要评估可能的化学治疗药物。在常用细胞培养条件下可用多种标准癌药物分析法来测量肿瘤细胞的生长或存活(即单层生长)。然而, 细胞行为在二维分析中通常不能可靠地预测体内的肿瘤细胞行为。

如今, 癌症治疗可以包括外科治疗、化学治疗、激素治疗和/或放射治疗, 以根除患者的肿瘤细胞(参见, 例如, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", *Scientific American Medicine*, 卷 3, Rubenstein 和 Federman, 第 12 章, 第 IV 部分)。近来, 癌症治疗也可以包括生物治疗或免疫治疗。所有这些方法对患者而言都有明显的缺点。例如, 外科治疗可能由于患者的健康情况而不适宜, 或者患者不能接受。此外, 外科治疗不可能

完全除去肿瘤组织。放射治疗只有在新生组织比正常组织表现出更高的放射敏感性时才有效，同时放射治疗还会产生严重的副作用。激素治疗虽然是有效的，但是其很少以单一试剂给予，其经常在使用其他治疗除去大部分癌细胞后，用于预防或延缓癌症复发。生物治疗/免疫治疗受到次数限制，并且每种治疗通常只对极特定类型的癌症有效。

关于化学治疗，有多种化学治疗性试剂可用于治疗癌症。大部分癌症化学治疗是直接抑制 DNA 合成或间接抑制脱氧(核糖)核苷三磷酸前体的生物合成以预防 DNA 复制和伴随的细胞分裂(参见,例如, Gilman 等人, Goodman 和 Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第八版(Pergamom Press, New York, 1990))。这些试剂包括烷基化试剂, 如亚硝基脲, 抗代谢物, 如甲氧蝶呤和羟基脲, 及其他试剂, 如依托泊苷(etoposide), camptothecins, 博来霉素, 多柔比星, 柔红霉素等, 尽管它们具有必需的细胞周期特异性, 但是由于它们对 DNA 复制起作用, 因此可以在 S 期杀死细胞。其他试剂, 具体而言是秋水仙碱和长春花生物碱, 如长春碱和长春新碱, 可以干扰微管组装, 从而使有丝分裂停滞。化学治疗方法通常包括给予化学治疗性试剂的组合来提高治疗效果。

尽管可以使用多种化学治疗性试剂, 但是化学治疗具有很多缺点(参见, 例如, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", Scientific American Medicine, 卷 3, Rubenstein 和 Federman, 第 12 章, 第 10 部分)。几乎所有的化学治疗性试剂都有毒性, 而且化学治疗会引发明显的并经常是很危险的副作用, 包括严重恶心, 骨髓抑制, 免疫抑制等。此外, 即使给予化学治疗性试剂的组合, 很多肿瘤细胞仍对化学治疗性试剂具有抵抗性或会发展成具有抵抗性。事实上, 对治疗方法中使用的特定化学治疗性试剂有抵

抗性的那些细胞经常被证实对其他药物也有抵抗性,即使那些试剂的作用机理不同于特异性治疗中所用药物的作用机理;这种现象称为多向耐药性或多种耐药性。因此,由于耐药性,多种癌症难于进行标准化学治疗。

这样就明显需要可选择癌症治疗方法,尤其是用于治疗难于用标准癌症治疗法(如外科治疗,放射治疗,化学治疗,及激素治疗)治疗的癌症的治疗方法。此外,仅通过一种方法来治疗癌症非常少见。因此,需要研发治疗癌症的新治疗性试剂和治疗癌症的新的更有效的治疗组合。

3. 发明概述

EphA4 在许多癌症中过表达。本发明人发现,与 EphA4 结合的 EphA4 抗体可以降低细胞的增生和/或转移行为,并使 EphA4 和 75 千道尔顿(kDa)的 EphA4 关联蛋白磷酸化。本发明人认为,EphA4 与 EphA2 相似,可以在肿瘤发生和转移中起作用。激发 EphA2 而产生 EphA2 信号的抗体实际上可降低 EphA2 表达并抑制肿瘤细胞生长和/或转移,正如在未决的标题为“EphA2 Monoclonal Antibodies and Methods of Use Thereof”、2003 年 5 月 12 日申请、代理机构卷号 10271-097-999 的美国专利申请 10/436,782 中描述的那样。本发明人也发现,EphA4 结合抗体足以降低细胞-ECM 粘附和诱导细胞圆形化。细胞-ECM 粘附通常被认为提供了物理粘附和控制多方面细胞行为,包括决定细胞生长、迁移、侵入和分化的细胞内信号。因此,EphA4 抗体与 EphA4 的结合与 EphA4 磷酸化的升高和细胞-ECM 粘附的降低有关。尽管不希望限于任何作用机理,但是通过诱导 EphA4 自磷酸化,激发 EphA4 的抗体或其他分子能够抑制高增生或恶性细胞行为,从而使以后的 EphA4 降低到下调表达。因此,在一个实施方案中,本发明的 EphA4 抗体激发 EphA4

信号, 并提高 EphA4 和 EphA4 相关 75 kDa 蛋白的磷酸化("EphA4 激发性抗体")。

此外, 癌细胞表现出不同于非癌细胞的表型特征, 例如, 癌细胞在三维基板如软琼脂中形成克隆或在三维基膜或细胞外基质制剂如 MATRIGEL™ 中形成管状网络或网状基质。非癌细胞在软琼脂中不形成克隆, 而在三维基膜或细胞外基质制剂中形成明显的球状结构。本发明人还发现, 抗 EphA4 抗体能够降低表达 EphA4 的癌细胞在软琼脂中的生长。因此, 本发明也提供如下抗体: 其可特异性结合 EphA4, 并抑制一种或多种癌细胞表型, 如在软琼脂中的克隆形成或在三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成("癌细胞表型抑制性 EphA4 抗体")。使癌细胞暴露于这种癌细胞表型抑制性 EphA4 抗体可以防止或降低细胞形成克隆或在这些基板中形成管状网络的能力。此外, 在某些实施方案中, 将这种癌细胞表型抑制性 EphA4 抗体加到已经形成的癌细胞克隆中, 会例如通过坏死或细胞凋亡降低或除去存在的癌细胞克隆, 即可以杀死高增生和/或转移细胞。

根据亚细胞位置, 配体结合属性或蛋白组织(例如, 结构, 在细胞膜中的方向)的差异可以进一步区分癌细胞上的 EphA4 和非癌细胞上的 EphA4。在非癌细胞中, EphA4 以低水平表达。然而, 癌细胞通常表现出较低的细胞间接触, 这可以降低 EphA4-配体的结合。此外, EphA4 的过表达可能使 EphA4 相对于配体过量, 这会提高非配体结合的 EphA4 的量。因此, 改变 EphA4 的亚细胞分布或膜定向可以使 EphA4 定位到癌细胞中配体不能接近的位置。此外, 在癌细胞中 EphA4 可以具有变化的配体结合属性(例如, 由于变化构形的原因), 这使得其不能与其配体稳定地相互作用, 而不论其是否被定位到细胞间的连接处。在每种情况下, 这些变化都能在癌细胞的 EphA4 上露

出在非癌细胞中不会露出的某些抗原决定部位。因此,本发明也提供如下抗体:其可特异性结合 EphA4,但优选结合是在癌细胞上而不是在非癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位("暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体")。使癌细胞暴露于这种 EphA4 抗体(其优选结合在癌细胞上而不是非癌细胞上选择性暴露或增加的 EphA4 抗原决定部位)可以使治疗/预防抗体以癌细胞为靶,并具有防止或降低细胞增生的能力,同时不伤害非癌细胞。

结合具有极低 K_{off} 速率的 EphA4 的抗体对于降低 EphA4 表达和/或诱导 EphA4 分解特别有效,从而可以抑制肿瘤细胞生长和/或转移和/或高增生细胞的增生。因此,本发明还提供结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 的 EphA4 的抗体,并优选是 EphA4 激动剂。

本发明提供筛选和识别抗体的方法,该抗体结合 EphA4 并激发 EphA4,抑制癌细胞表型,优选结合在癌细胞上而不是在非癌细胞上选择性暴露或增加和/或其 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 的 EphA4 抗原决定部位,优选是单克隆抗体。具体而言,本发明的抗体与 EphA4 的细胞外区域结合,并优选产生 EphA4 信号和使 EphA4 自磷酸化,抑制癌细胞表型,优选结合在癌细胞上而不是在非癌细胞上暴露和/或其 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 的 EphA4 抗原决定部位。本发明的抗体还可用于调节 EphA4 信号和 EphA4 关联蛋白的磷酸化,如 75kDa 蛋白(该蛋白在酪氨酸残基上磷酸化)的磷酸化,然后使 EphA4 与 EphA4 抗体交联。调节这种 75 kDa EphA4 关联蛋白磷酸化的抗体可以用作治疗性试剂。在特定实施方案中,本发明提供了 EphA4 scFv 抗体 EphA4-44/EA44(在本说明书中,EA44 和 EphA4-44 指相同抗体,即结合 EphA4 的 EphA4-44 scFv 克隆,于 2004 年 6 月 10 日在 ATCC 保藏为"EA44")。在优选实施方案中,本发明提供一种 EphA4 抗体,其中其可变重链和/或可变轻链的氨基酸序列

分别与 SEQ ID NO: 4 和 8 中所含的 EA44 的可变重链或轻链氨基酸序列相同或至少 90% 序列相同。在其他优选实施方案中, 本发明提供一种 EphA4 抗体, 其中其至少 3 个, 至少 4 个, 至少 5 个, 或全部 6 个 CDR 与 EA44 中的相应 CDR 相同。在其他特定实施方案中, 本发明提供抗 EphA4 scFv 克隆 8、18、20、36 及 41。

具体而言, 本发明提供了一种抗体, 包括(或可选择地, 由其组成) EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22)和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26); EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22); EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH1 CDR1, VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28), EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID

NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32);EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32);EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28);EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32);EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30);EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR2 (SEQ ID NO. 30)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32);EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30);

EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32);
EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28), VL CDR2 (SEQ ID NO. 30)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32);
EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28), VL CDR2 (SEQ ID NO. 30)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32);
EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28), VL CDR2 (SEQ ID NO. 30)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32);
或图 7 所列的 EA44 VH CDR 和 VL CDR 的任意组合。

在另一个实施方案中,一种 EphA4 激发性抗体包括用具有核苷酸序列 SEQ ID NO. 21、23 或 25 的核酸序列编码的 VH CDR。在另一个实施方案中, EphA4 激发性抗体包括用具有核苷酸序列 SEQ ID NO. 27、29 或 30 的核酸序列编码的 VL CDR。在另一个实施方案中, EphA4 激发性抗体包括分别用具有核苷酸序列 SEQ ID NO. 21、23 或 25 的核酸序列及 SEQ ID NO. 27、29 或 30 的核酸序列编码的 VH CDR 和 VL CDR。

因此,本发明涉及药物组合物及预防和治疗方案,用于预防、治疗或控制受试者中与 EphA4 过量表达相关的疾病,尤其是癌,尤其是转移癌,该方法包括给予一种或多种抗体,该抗体特异性结合 EphA4 并激活 EphA4,抑制癌细胞表型(如在软琼脂中的克隆形成或在三维基膜或细胞外基质制剂如 MATRIGEL™ 中管状网络形成),优选结合在癌细胞上而不是在非癌细胞上选择性暴露或增加和/或其 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} S^{-1}$ 的 EphA4 抗原决定部位。在优选实施方案中,该 EphA4 抗体降低了软琼脂中已形成克隆的尺寸和/或降低了三维基膜或细胞外基质制剂中管状网络形成的程度。在一个实施方案

中,该癌是上皮细胞起源的癌。在另一个实施方案中,该癌是皮肤、肺、结肠、前列腺、乳腺或膀胱癌,或是肾细胞癌或黑素瘤。在优选实施方案中,该癌是胰腺癌。在另一个优选实施方案中,待预防、治疗或控制的癌中的癌细胞过表达 EphA4。在优选实施方案中,由于细胞间接触降低,或亚细胞位置变化的原因,或相对于配体而言 EphA4 量增大的原因,一些 EphA4 不与配体结合。在另一个优选实施方案中,EphA4 激动剂是 EphA4 抗体,其中其可变重链和/或可变轻链序列与 SEQ ID NO: 22、24、26、28、30 及 32 中所含的 EA44 的可变重链或轻链序列分别有至少 90% 的序列相同。在其他优选实施方案中,本发明提供一种 EphA4 抗体,其中它的至少 3 个,至少 4 个,至少 5 个,或全部 6 个 CDR 与 EA44 中的相应 CDR 相同。在其他特定实施方案中,本发明提供了抗 EphA4 scFv 克隆 8、18、20、36 及 41。

在优选实施方案中,本发明的方法用于预防、治疗或控制肿瘤转移。本发明的抗体可以与一种或多种其他癌症治疗组合给予。具体而言,本发明提供了预防、治疗或控制受试者癌症的方法,该方法包括给予所述受试者治疗或预防有效量的一种或多种本发明的 EphA4 抗体,除了给予本发明的 EphA4 抗体外,还组合给予治疗或预防有效量的一种或多种化学治疗,激素治疗,生物治疗/免疫治疗和/或放射治疗,或同时给予外科治疗。在优选实施方案中,将一种或多种 EphA4 抗体与一种或多种 EphA2 抗体组合给予。

在其他实施方案中,本发明的 EphA4 抗体用于治疗、预防和/或控制与细胞高增生相关的疾病或紊乱,例如但不限于癌症,哮喘,慢性阻塞性肺病,大肠、小肠、胃部及其他重要器官炎性疾病,再狭窄(平滑肌和/或内皮),Crohn 病(克隆氏病),牛皮癣,及其他非转移性疾病。在优选实施方案中,高增生细胞是上皮细胞。在优选实施方案中,高增生细胞过表达 EphA4。在优选实

施方案中，由于细胞间接触降低、亚细胞位置变化、或者相对于 EphA4-配体而言 EphA4 量增大的原因，一些 EphA4 不与配体结合。

本发明的方法和组合物不仅可用于未治疗的患者，还可以用于治疗部分或完全难以用现有的标准和实验癌症疗法治疗的患者并提高治疗功效，现有的治疗方法包括但不限于化学治疗、激素治疗、生物治疗、放射治疗和/或外科治疗。因此，在优选实施方案中，本发明提供了用于治疗或预防癌症的治疗和预防性激动剂，该癌症表现出是或可能是用除了包括给予本发明的 EphA4 抗体的治疗方法外的其他治疗方法难于治疗或不反应。在特定实施方案中，将一种或多种本发明的 EphA4 抗体给予难于用基于非 EphA4 的治疗方法治疗，尤其是它莫西芬(tamoxifen)治疗或耐药性与 IL-6 水平增加有关的治疗，或对该治疗不反应的患者，以使患者可以治疗或有反应。因此，该治疗对于以前难于治疗或不反应的患者可以产生治疗效果。

此外，本发明提供了筛选本发明的 EphA4 抗体的方法。具体而言，使用常规免疫技术可以筛选用于结合 EphA4 的抗体，尤其是结合 EphA4 的细胞外区域的抗体。在一个实施方案中，为识别激发性 EphA4 抗体，可以筛选具有激发 EphA4 信号能力，例如提高 EphA4 磷酸化和/或 75 kDa EphA4 关联蛋白的磷酸化和/或分解 EphA4 的 EphA4 抗体。

在另一个实施方案中，为识别癌细胞表型抑制性抗体，可以筛选具有防止或降低软琼脂中癌细胞的克隆形成或降低或抑制三维基膜或细胞外基质制剂中管状网络形成能力的抗 EphA4 抗体，或用于检测癌表型降低的任何其他方法，例如检测细胞增生接触抑制增加的任何分析法(例如，单层细胞培养中的克隆形成降低)的抗 EphA4 抗体。在优选实施方案中，筛选具有降低软琼脂中存在的克隆的尺寸或降低三维基膜或细胞外基质制剂中的管状

基质形成程度能力的抗体，尤其是诱导细胞(尤其是癌细胞，更尤其是转移癌细胞，也包括其他高增生细胞)坏死或细胞凋亡的抗体。此外，可以筛选在其他抗癌试剂存在下(例如，激素，化学治疗性试剂，生物或其他抗癌试剂)具有抑制或降低软琼脂中的克隆形成和/或三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成能力的抗体。

在另一个实施方案中，为识别优选结合在癌细胞上而不是在非癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位的抗体，可以筛选具有优选结合 EphA4 的能力的抗体，该 EphA4 不与配体(例如，Ephrin A4)结合且不是定位在细胞间接触中。本领域中用于测定细胞上抗体结合/定位的任何公知方法都可用于筛选具有所需结合属性的候选抗体。在特定实施方案中，免疫荧光显微镜或流式细胞仪被用于测定抗体的结合属性。在此实施方案中，当 EphA4 与配体结合并定位至细胞间接触时与 EphA4 的结合较差而与细胞上的自由 EphA4 很好结合的抗体也包括在本发明中。在另一个特定实施方案中，使用基于细胞的分析或 ELISA 分析，来选择具有与配体(例如，细胞锚定的或纯化的配体)竞争结合 EphA4 能力的 EphA4 抗体。

在另一个实施方案中，使用本领域公知的抗体结合动力学分析(例如基于表面电浆共振的分析，如 BIACORE™ 分析)，来识别 K_{off} 速率小于 $3 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 的抗体，以筛选抗体。

在其他实施方案中，本发明提供治疗、预防或控制癌症的方法，包括给予除本发明的 EphA4 抗体之外的能够在蛋白水平降低 EphA4 的治疗性试剂，例如但不限于，对 EphA4 具有特异性的反义核酸，介导 EphA4 表达的 RNA 干扰的双链 EphA4 RNA，抗 EphA4 核酶等，及其他 EphA4 抑制剂，例如，小分子 EphA4 抑制剂。

本发明还提供了使用本发明的 EphA4 抗体来评估癌症治疗功效的基于 EphA4 或基于非 EphA4 的诊断方法。通常, EphA4 表达的增加与侵入性和转移性癌的增加有关。因此, 用特定治疗使 EphA4 表达降低表明, 该治疗降低了癌侵入和/或转移的可能性。本发明的诊断方法也可用于预测癌症进程或癌症治疗的结果。在特定的实施方案中, 本发明的诊断方法提供了使用远离原发性肿瘤位点的组织和流体, 例如全血、唾液、尿、血清、细针吸出物(即活组织检查)的转移成像和定位方法, 以及诊断和预后的方法(及使用原发肿瘤的组织 and 流体的方法)。在其他实施方案中, 本发明的诊断方法提供了体内转移成像和定位方法及诊断和预后的方法。在这些实施方案中, 使用本发明的抗体, 优选是暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体检测原发性转移肿瘤。本发明的抗体也可用于冷冻或固定细胞的免疫组织化学分析或组织分析。此外, 本发明的抗体和诊断方法可用于诊断、预测或监测非癌症高增生疾病(尤其是与 EphA4 过表达相关的疾病)的治疗(不论是基于 EphA4 或基于非 EphA4 的治疗), 该疾病例如但不限于: 哮喘、牛皮癣、肠炎性疾病, 再狭窄、克隆氏病、前列腺上皮内肿瘤(PIN)、慢性阻塞性肺病等。

在另一个实施方案中, 提供了包含本发明的药物组合物或诊断试剂的试剂盒。

3.1 定义

本文中, 术语"激动剂"是指包括蛋白、多肽、肽、抗体、抗体片段、大分子或小分子(小于 10 kD)在内的任何化合物, 该化合物可以提高另一分子的活性、活动或功能。EphA4 激动剂可提高 EphA4 和/或 75 kDa EphA4 关联蛋白的磷酸化, 和 EphA4 蛋白的分解。激发 EphA4 的 EphA4 抗体可以抑制

或可以不抑制癌细胞表型(例如, 软琼脂中的克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成), 可以优选结合或可以不结合在癌细胞而不是在非癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位, 可以具有或可以不具有低 K_{off} 速率。

本文中, 术语"免疫特异性结合 EphA4 的抗体或其片段"指特异性结合 EphA4 多肽或 EphA4 多肽片段而不特异性结合其他多肽的抗体或其片段。优选地, 免疫特异性结合 EphA4 多肽或其片段的抗体或片段不与其他抗原发生非特异性的交叉反应(例如, 不与非 EphA4 蛋白(例如, BSA)竞争结合)。例如, 可以通过本领域所属技术人员公知的免疫测定或其他技术来识别免疫特异性结合 EphA4 多肽的抗体或片段。本发明的抗体包括但不限于合成抗体、单克隆抗体、重组生成的抗体、内抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、合成抗体、单链 Fv (scFv)、Fab 片段、F(ab')片段、二硫化物连接的 Fv (sdFv)(包括双特异性 sdFvs)、及抗独特型(抗 Id)抗体, 及上述任何一种的抗原决定部位结合的片段。具体而言, 本发明的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分, 即, 包括免疫特异性结合 EphA4 抗原的抗原结合位置(例如, 抗 EphA4 抗体的一个或多个互补决定区(CDR))的分子。优选地, 免疫特异性结合 EphA4 多肽或其片段的激发性抗体或片段优选激发 EphA4 而不明显激发其他活动。

本文中, 术语"癌"指涉及到具有转移至远端位置并表现出不同于非癌细胞的表型特性的细胞疾病, 该表型特性例如, 在三维基板如软琼脂中的克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂如 MATRIGEL™ 中的管状网络或网状基质形成。非癌细胞在软琼脂中不形成克隆, 而在三维基膜或细胞外基质制剂中形成明显的球状结构。虽然有各种机理, 但是癌细胞在发展中获得独特的

功能能力。这种能力包括回避细胞凋亡、生长信号自足、对抗生长信号不敏感、组织侵入/转移、无限的复制能力及持续的血管生成。术语"癌细胞"包括恶化前的癌细胞和恶性癌细胞。

本文中，术语"癌细胞表型抑制"指化合物具有预防或降低软琼脂中癌细胞克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中管状网络形成的能力，或检测癌细胞表型降低的任何其他方法，例如，例如检测细胞增生接触抑制增加的分析法(例如，单层细胞培养中的克隆形成降低)。当将癌细胞表型抑制化合物加到软琼脂中的癌细胞克隆时，其还可以降低或除去克隆，或降低或除去三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成的程度。抑制癌细胞表型的 EphA4 抗体可以激发或可以不激发 EphA4，可以具有或可以不具有低 K_{off} 速率。

本文中，术语"衍生物"指包括 EphA4 多肽、EphA4 多肽片段、免疫特异性结合 EphA4 多肽的抗体或免疫特异性结合 EphA4 多肽的抗体片段的氨基酸序列的多肽，它们通过氨基酸残基的取代、缺失或添加而改变。本文中，术语"衍生物"也指 EphA4 多肽、EphA4 多肽片段、免疫特异性结合 EphA4 多肽的抗体或免疫特异性结合 EphA4 多肽的抗体片段，它们经过修饰，如通过使其与任何类型的分子共价结合来修饰。例如，但不限于，可以通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、用公知的保护/阻挡基团衍生、蛋白断裂、细胞配体或其他蛋白融合等来修饰 EphA4 多肽、EphA4 多肽片段、抗体或抗体片段。可以使用本领域所属技术人员公知的技术通过化学修饰来修饰 EphA4 多肽、EphA4 多肽片段、抗体或抗体片段的衍生物，包括但不限于，特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，EphA4 多肽、EphA4 多肽片段、抗体或抗体片段的衍生物可以包括一种或多

种非典型氨基酸。在一个实施方案中，多肽衍生物具有与所述的 EphA4 多肽、EphA4 多肽片段、抗体或抗体片段相似或相同的功能。在另一个实施方案中，与未修饰的多肽相比，EphA4 多肽、EphA4 多肽片段、抗体或抗体片段的衍生物其活性发生改变。例如，衍生物抗体或其片段可以更紧地结合抗原决定部位或更耐蛋白水解。

本文中，术语"抗原决定部位"指在动物(优选是哺乳动物，最优选是小鼠或人)中的 EphA4 多肽具有抗原或免疫原活性的一部分。具有免疫原活性的抗原决定部位是在动物中产生抗体反应的 EphA4 多肽的一部分。具有抗原活性的抗原决定部位是可通过本领域公知的方法(例如，通过免疫测定)测定的抗体免疫特异性结合的 EphA4 多肽的一部分。抗原决定部位不必须是免疫原的。

本文中，术语"片段"包括含有 EphA4 多肽或免疫特异性结合 EphA4 多肽的抗体的氨基酸序列的至少 5 个连续氨基酸残基，至少 10 个连续氨基酸残基，至少 15 个连续氨基酸残基，至少 20 个连续氨基酸残基，至少 25 个连续氨基酸残基，至少 40 个连续氨基酸残基，至少 50 个连续氨基酸残基，至少 60 个连续氨基酸残基，至少 70 个连续氨基酸残基，至少连续 80 个氨基酸残基，至少连续 90 个氨基酸残基，至少连续 100 个氨基酸残基，至少连续 125 个氨基酸残基，至少 150 个连续氨基酸残基，至少连续 175 个氨基酸残基，至少连续 200 个氨基酸残基，或至少连续 250 个氨基酸残基的肽或多肽。优选地，抗体片段是抗原决定部位结合片段。

本文中，术语"人源化抗体"指非人(例如，鼠类)抗体形式，它们包括来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。对于大部分，人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体)，其中该受体的高度可变区域残基被非人物种(供者抗

体)的高度可变区域残基代替,该非人物种如小鼠、大鼠、野兔或具有所需特异性、亲合性和能力的非人灵长类。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基代替。此外,人源化抗体可以包括在受者抗体或供者抗体未被发现的残基。进行的这些修饰进一步改变抗体的性能。通常,人源化抗体包括基本上所有的至少一个、通常至少两个可变区域,其中所有或基本上所有的高度可变区域与非人免疫球蛋白的那些相应,且所有或基本上所有的FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体可选择地还包括至少一部分免疫球蛋白不变区(Fc),通常是人免疫球蛋白的不变区。在一些实施方案中,人源化抗体是衍生物。这种人源化抗体包括在一个或多个非人CDR中取代、缺失或添加的氨基酸残基。与非衍生物人源化抗体相比,人源化抗体衍生物具有基本上相同的结合,更好的结合,或更差的结合。在特定实施方案中,CDR的1个、2个、3个、4个、或5个氨基酸残基被取代、缺失或添加(即,突变)。关于人源化抗体的进一步的细节,请参考欧洲专利EP 239,400、EP 592,106及EP 519,596;国际公布WO 91/09967和WO 93/17105;美国专利5,225,539、5,530,101、5,565,332、5,585,089、5,766,886及6,407,213;和Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498; Studnicka等人, 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805-814; Roguska等人, 1994, PNAS 91: 969-973; Tan等人, 2002, *J. Immunol.* 169: 1119-25; Caldas等人, 2000, *Protein Eng.* 13: 353-60; Morea等人, 2000, *Methods* 20: 267-79; Baca等人, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 10678-84; Roguska等人, 1996, *Protein Eng.* 9: 895-904; Couto等人, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto等人, 1995, *Cancer Res.* 55: 1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409-10; Pedersen等人, 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959-73; Jones等人, 1986, *Nature* 321:

522-525; Reichmann 等人, 1988, *Nature* 332: 323-329; 和 Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol* 2: 593-596。

本文中, 术语"高增生性细胞紊乱"指由细胞高增生引起的非肿瘤性紊乱或由于该疾病的病理状态或症状所引起的紊乱。在一些实施方案中, 高增生性细胞紊乱的特征是上皮细胞高增生。高增生性上皮细胞紊乱包括但不限于哮喘、COPD、肺纤维化、支气管高反应、牛皮癣、脂溢性皮炎及囊肿性纤维化。在其他实施方案中, 该高增生性细胞紊乱的特征是内皮细胞高增生。高增生性内皮细胞紊乱包括但不限于再狭窄、高增生性血管病、Behcet 综合症、动脉硬化症及黄斑病变。

本文中, 术语"高度可变区域"指抗体中负责结合抗原的氨基酸残基。高度可变区域包括源于"互补决定区"或"CDR"的氨基酸残基(即轻链可变区域中的残基 24-34 (L1), 50-56 (L2)和 89-97 (L3)和重链可变区域中的 31-35 (H1), 50-65 (H2)和 95-102 (H3); Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))和/或源于"高度可变环"的那些氨基酸残基(即轻链可变区域中的残基 26-32 (L1), 50-52 (L2)和 91-96 (L3)和重链可变区域中的 26-32 (H1), 53-55 (H2)和 96-101 (H3); Chothia 和 Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917)。
"框架区"或"FR"残基是除了所定义的高度可变区域残基之外的那些可变区域残基。

本文中, 术语"组合"指使用多于一种的预防和/或治疗性试剂。使用术语"组合"并不限制将预防和/或治疗性试剂给予患有高增生性细胞紊乱(尤其是癌症)的受试者的顺序。在将第二种预防或治疗性试剂给予患有或易患高增生性细胞紊乱(尤其是癌症)的受试者之前(例如, 1 分钟、5 分钟、15 分钟、

30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周前)、同时、或在此之后(例如、1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周后),可以给予第一种预防或治疗性试剂。预防或治疗性试剂以一定顺序和时间间隔给予至受试者,使得本发明的试剂可以与其他试剂一起发挥作用,从而比以其他方式给予提供更大的益处。任何额外的预防或治疗性试剂可以与其他额外的预防或治疗性试剂以任何顺序给予。

本文中,术语"低耐受性"指一种状态,在该状态下患者出现治疗副作用,从而使患者不适于治疗和/或不能继续治疗,因为副作用的不利影响和/或危害超过治疗效果。

本文中,术语"控制"指受试者从预防或治疗性试剂的给药中得到有益效果,但该有益效果不会使疾病治愈。在某些实施方案中,受试者被给予一种或多种预防或治疗性试剂以"控制"疾病,从而预防疾病的进展或恶化。

本文中,术语"肿瘤"指具有转移至远端位置并表现出不同于非肿瘤细胞的表型特性潜能的细胞疾病,该表型特性例如,三维基板如软琼脂中的克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂如 MATRIGEL™ 中的管状网络或网状基质形成。非肿瘤细胞在软琼脂中不形成克隆,而在三维基膜或细胞外基质制剂中形成明显的球状结构。虽然有各种机理,但是肿瘤细胞在发展中具有独特的功能性能力。这些能力包括回避细胞凋亡、生长信号自足、对抗生长信号不敏感、组织侵入/转移、无限的复制能力、及持续的血管生成。因此,术语"非肿瘤病"意思是指病症、疾病或紊乱不涉及癌细胞。

本文中,术语“不反应/难于治疗”用于描述用一种或多种现有的治疗方法(例如癌症治疗方法),如化学治疗、放射治疗、外科治疗、激素治疗和/或生物治疗/免疫治疗,尤其是对特定癌症的标准治疗方案治疗的患者,所述治疗方法在临床上不足以治愈患者,例如,保持对治疗不敏感,因而这些患者需要额外的有效治疗。此术语也可用于描述对治疗有反应,但产生副作用、复发、产生抵抗性等的患者。在各种实施方案中,“不反应/难于治疗”意思是指至少有一些明显部分的癌细胞未被杀死,或它们的细胞分裂未得到抑制。通常本领域公知的用于分析癌细胞治疗有效性的任何方法,可以用来在体内或体外对癌细胞是否是“不反应/难于治疗”进行测定,在本文中使用本领域已接受的“难于治疗”的含义。在各种实施方案中,如果癌细胞数量没有明显降低,或都在治疗中有所增加,那么癌症为“不反应/难于治疗”的。

本文中,术语“增强”指提高治疗性试剂在通用或核准剂量下的效力。

本文中,术语“预防”指通过给予受试者预防或治疗性试剂而防止疾病发作、复发或扩散。

本文中,术语“预防性试剂”指能够用来防止与 EphA4 过表达相关的疾病或紊乱和/或细胞高增生(尤其是癌症)发作、复发或扩散的任何试剂。在某些实施方案中,术语“预防性试剂”指 EphA4 激发性抗体、EphA4 癌细胞表型抑制性抗体、暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体、或结合具有低 K_{off} 的 EphA4 的抗体。在某些其他实施方案中,术语“预防性试剂”指癌症化学治疗、放射治疗、激素治疗、生物治疗(例如,免疫治疗)和/或本发明的 EphA4 抗体。在其他实施方案中,可以组合给予多种的预防性试剂。

本文中,“预防有效量”指预防性试剂的量足以防止细胞高增生(优选癌症)的发作、复发或扩散。预防有效量可以指预防性试剂的量足以防止高增

生病的发作、复发或扩散，尤其是癌症，包括但不限于易患高增生病的那些癌症，例如，遗传上易患癌症或以前接触过致癌物质的那些癌症。预防有效量也可以指可以在预防高增生病中提供预防效果的预防性试剂的量。此外，本发明预防性试剂的预防有效量是指预防性试剂单独的量，或与其他试剂组合的量，它们能够在预防高增生病中提供预防效果。关于本发明的 EphA4 抗体的量，该术语包括可以提高整个预防作用或增强预防效果或与另一种预防性试剂的协同作用的量。

本文中，"方案"包括给药时间和给药方法。

本文中，术语"副作用"包括预防或治疗性试剂的不需要和不利的的作用。不利作用总是不想要的，但是不想要的的作用不必然是不利的。预防或治疗性试剂的不利作用可能是有害的或令人不舒适的或有危险的。化学治疗的副作用包括但不限于胃肠毒性，如但不限于，早期或晚期痢疾和肠胃气胀、恶心、呕吐、厌食、白血球减少症、贫血症、嗜中性白血球减少症、虚弱、腹痉挛、发烧、疼痛、体重下降、脱水、秃头症、呼吸困难、失眠症、头昏眼花、粘膜病、口腔干燥、及肾衰竭、及便秘、神经和肌肉影响、对肾和膀胱的临时或永久性损害、流感类症状、体液滞留、及临时或永久性不孕。放射治疗的副作用包括但不限于疲劳、口干、及食欲下降。生物治疗/免疫治疗的副作用包括但不限于在给予位置皮疹或肿胀，流感类症状，如发烧，发冷和疲劳，消化道问题和过敏反应。激素治疗的副作用包括但不限于恶心、受精力问题、消沉、食欲下降、眼睛问题、头痛、及体重波动。患者出现的其他不需要作用还有多种并且在本领域中是公知的。许多作用公开于 *Physicians' Desk Reference* (56th ed., 2002)中。

本文中，术语"单链 Fv"和"scFv"指包括抗体的 VH 和 VL 区域的抗体片

段，其中这些区域存在于单个多肽链中。通常，Fv 多肽还含有在 VH 和 VL 区域间的多肽连接，其可以使 scFv 形成抗原结合所需的结构。对于 scFv，请参见 Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg 和 Moore 编. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)。在特定实施方案中，scFv 包括双特异性 scFv 和人源化 scFv。

本文中，术语"受试者"和"患者"可交换使用。本文中，受试者优先是哺乳动物，如非灵长类(例如，牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)和灵长类(例如，猴子和人)，最优选是人。

本文中，术语"治疗"指根除、减少或缓解疾病或紊乱的症状，尤其是通过给予一种或多种治疗性试剂根除、减少或缓解或控制原发性、区域性或转移性癌组织。在某些实施方案中，这些术语指通过将一种或多种治疗性试剂给予患有这种疾病的受试者来最小化或延缓癌症扩散。

本文中，术语"治疗性试剂"指能够预防、治疗或控制与 EphA4 过表达相关的疾病或紊乱和/或细胞高增生疾病或紊乱(尤其是癌症)的任何试剂。在某些实施方案中，术语"治疗性试剂"指 EphA4 激发性抗体，EphA4 癌细胞表型抑制性抗体，暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体，或结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 的 EphA4 的抗体，激发 EphA4 的非抗体试剂，如 EphA4 配体或 EphA4-结合片段或其衍生物，或降低 EphA4 表达的试剂，如 EphA4 RNAi，反义药物等。在某些其他实施方案中，术语"治疗性试剂"指癌症化学治疗、放射治疗、激素治疗、生物治疗/免疫治疗、和/或本发明的 EphA4 抗体。在其他实施方案中，可以组合给予多种的预防性试剂。

本文中，"治疗有效量"指治疗性试剂的量足以治疗或控制与 EphA4 过表达相关的疾病或紊乱和/或细胞高增生疾病，并且优选其量足以破坏、改变、

控制或除去原发性、区域性或转移性癌组织。治疗有效量可以指足以延缓或最小化高增生病发作的治疗性试剂量，例如，延缓或最小化癌症扩散。治疗有效量可以指在治疗或控制癌症中提供治疗效果的治疗性试剂的量。此外，本发明治疗性试剂的治疗有效量指治疗性试剂单独的量，或与其他治疗组合的量，它们能够在治疗或控制高增生病或癌症中提供治疗效果。关于本发明中 EphA4 抗体的量，该术语包括可以提高整个治疗作用、或降低或避免不想要的效果、或增强治疗效果或与另一种治疗性试剂的协同作用的量。

4. 附图说明

图 1: EphA4 抗体诱导细胞圆形化。相对于在 0°C 下孵育的细胞而言，在 37°C 下孵育时，用结合 EphA4 的单链 Fv 抗体(scFv)孵育的 Aspc1 细胞表现出细胞圆形化。

图 2: EphA4 的交联引起相关 75 kDa 蛋白酪氨酸磷酸化。用 LX13 scFv 孵育细胞，然后用抗 Flag 抗体交联，用 Ephrin A4-Fc 免疫沉淀，用抗磷酸酪氨酸印迹。交联的 EphA4 ("X-交联的 EphA4")表明 EphA4 相关的 75 kDa 蛋白相对于未交联的对照细胞("对照")酪氨酸磷酸化提高。

图 3: EphA4 聚集抑制 ASPC1 细胞的软琼脂生长。用 EphA4 抗体(scFv)处理细胞，然后用二级单克隆抗体(mab; "LX13 Bival")交联，相对于单独用 scFv ("LX13")或单独二级 mab("对照")处理的细胞而言，软琼脂中的克隆形成明显降低。

图 4: EphA4 上调使乳腺癌细胞系中的细胞生长对雌激素的依赖性下降。MCF-7 细胞通常表达极低水平的 EphA4，用空载体("载体")或含有 EphA4 序列的载体的转染。分离 EphA4 的稳定表达体(克隆 2 和 3, "EphA4-2"和

"EphA4-3")。在其中用雌激素孵育细胞的软琼脂分析中，MCF-7-EphA4 细胞相对于载体-转染对照("+雌激素")，表现出锚定非依赖性生长提高 2.4 倍。然而，在没有雌激素时("-雌激素")，与载体-转染对照相比，EphA4 表达细胞的生长提高了 8.5 倍。

图 5：胰腺肿瘤组织中的 EphA4 RNA 水平提高。竖条 A：来自 52 岁男性的病理学正常胰腺组织中的 EphA4 RNA。竖条 B：胰腺组织中的 EphA4 RNA，显示了竖条 A 的 52 岁男性的阶段 4A 胰管腺癌。竖条 C：胰腺组织中的 EphA4 RNA，显示了 72 岁男性的阶段 2A 胰管腺癌。竖条 D：71 岁女性患者的淋巴结组织中的 EphA4 RNA，显示了阶段 2B 转移性胰腺癌。竖条 E：57 岁女性网膜组织中的 EphA4 RNA，显示了阶段 4 转移性胰腺癌。竖条 F：45 岁女性患者肝组织中的 EphA4 RNA，显示可转移性胰腺癌。

图 6：抗 EphA4 scFv 克隆 44 强烈诱导 EphA4 的酪氨酸磷酸化。相对于介质中的对照细胞或仅用抗 Flag 抗体孵育的细胞而言，抗 EphA4 scFv 克隆 8、18 及 20 也弱诱导 EphA4 的酪氨酸磷酸化，这表明了低水平的 EphA4 磷酸化。

图 7：scFV 克隆 EphA4-44 的序列。表明了 CDR、VH 及 VL 区域。

5. 发明的详细说明

本发明部分地是基于发明者发现在某些癌细胞中 EphA4 会上调且抗 EphA4 抗体会减少某些癌细胞行为，如在软琼脂中的细胞粘附和生长。抗 EphA4 抗体会激发 EphA4 和 EphA4 关联蛋白的磷酸化。本发明人还相信 EphA4 在癌症和细胞增生过程中发挥与 EphA2 相似的作用。通过降低在这些癌细胞中的 EphA2 表达水平，激发 EphA2 的 EphA2 单克隆抗体能抑制癌

细胞增生和侵入(参考未决的美国专利申请 10/436,782, 标题为“EphA2 Monoclonal Antibodies and methods of Use thereof”, 2003年5月12日提交)。EphA4活性的降低或EphA4信号的其他结果可以选择性地抑制恶性癌细胞生长。具体而言, EphA4水平的降低及EphA4和/或75 kDa EphA4关联蛋白的磷酸化可通过EphA4激动性单克隆抗体而得到。虽然不想被任何作用机理所限制, 但是细胞生长和/或转移的这种抑制可通过刺激(即激发)EphA4信号, 从而引起EphA4的磷酸化, 进而引起EphA4的分解来实现。癌细胞生长可因EphA4水平降低从而使配体非依赖性EphA4信号降低来降低。EphA4活性的降低还可通过EphA4癌细胞表型抑制性抗体或优选结合在癌细胞上而不是在非癌细胞上暴露的EphA4抗原决定部位的抗体来实现。此外, 结合低 K_{off} (例如, 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)的EphA4的抗体也可降低EphA4水平。

此外, 本发明人发现结合EphA4的抗体足以引发细胞行为发生改变。具体而言, 结合细胞表达的EphA4的EphA4抗体会降低细胞-ECM粘附并诱导细胞圆形化。通常认为细胞-ECM粘附提供物理粘附和细胞内信号, 该信号控制细胞行为的诸多方面, 包括决定有关细胞生长、迁移、侵入和分化。与这种理解一致的是, 细胞与其微环境的相互作用的改变与多种不同疾病状态的引起或进展有关。例如, 提高ECM粘附能促进迁移和增生, 从而引发高增生疾病, 其包括但不限于: 癌症; 大肠(IBD)、小肠(克隆氏病)、胃部及其他重要器官炎性疾病; 哮喘; COPD和其他肺的高增生病变; 以及再狭窄, 这是由平滑肌或内皮细胞生长和迁移增强引起的临床表现。因此, EphA4抗体通常可用于治疗非癌疾病, 尤其可用于治疗与细胞-ECM粘附相关的疾病。

因此, 本发明涉及到用于治疗、抑制及控制与EphA4过表达相关的疾病和紊乱和/或细胞高增生疾病和紊乱的方法和组合物。本发明的特定方面涉

及方法和包括抑制癌细胞增生和侵入的(特别是过表达EphA4的癌细胞)的化合物的组合物。本发明还涉及用于治疗、抑制或控制上皮细胞起源的癌转移(特别是人类的乳腺、肺、皮肤、前列腺、膀胱、胰腺癌症及肾脏细胞癌和黑素瘤)的方法和组合物。本发明的组合物和方法还包括与本发明的EphA4抗体组合使用的其他类型的活性成分。在其他实施方案中,本发明的方法被用于治疗、预防或控制与细胞高增生相关的其他疾病或紊乱,例如但不限于哮喘、牛皮癣、再狭窄、COPD等。

本发明还涉及治疗、抑制及控制癌症或其他高增生性细胞紊乱或疾病的方法,这种癌症、紊乱或疾病用现有的或标准的癌症治疗方法部分或完全地无法治疗,如化学治疗、放射治疗、激素治疗及生物治疗。

本发明还提供使用本发明的EphA4抗体(特别是暴露的EphA4抗原决定部位抗体)来评估癌症治疗功效的基于EphA4的或非基于EphA4的诊断方法。本发明的诊断方法也可用于预测癌症进程。在特定的实施方案中,本发明的诊断方法提供了使用远离原发性肿瘤位点的组织和流体的转移成像和转移定位的方法及诊断和预后的方法(及使用原发性肿瘤的组织 and 流体的方法)。在其他实施方案中,本发明的诊断方法提供了转移成像和转移定位的方法及体内诊断和预后的方法。

在其他实施方案中,本发明提供了筛选抗癌症试剂(尤其是抗转移癌试剂)的方法,包括筛选具有降低软琼脂中的细胞克隆形成和/或三维基膜和细胞外基质制剂如MATRIGEL™中的管状网络形成的能力的试剂。在优选实施方案中,本发明提供筛选用于治疗 and 预防高增生性疾病和紊乱的试剂的方法,包括分析具有降低软琼脂中已有细胞克隆形成和/或三维基膜中的管状网络形成的程度的能力。本发明人发现抑制软琼脂中细胞克隆和/或

MATRIGEL™ 中管状网络形成可以更好地显示抗转移活性,且可以识别潜在的抗转移试剂,该试剂通过标准细胞培养分析无法识别。

5.1 抗体

如上所述,本发明包括给予抗体(优选是单克隆抗体)或其片段,该抗体可免疫特异性结合并激发 EphA4 信号("EphA4 激发性抗体");抑制癌细胞表型,例如抑制软琼脂中的克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂如 MATRIGEL™ 中的管状网络形成("癌细胞表型抑制性抗体");优选结合在癌细胞而不是非癌细胞上选择性暴露或增加的 EphA4 抗原决定部位("暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体");和/或结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的 EphA4。在一个实施方案中,抗体结合 EphA4 的细胞外区域,并优选地激发 EphA4,例如,增强 EphA4 磷酸化和/或 75 kDa EphA4 关联蛋白的磷酸化,并优选地使 EphA4 分解。在另一个实施方案中,抗体结合 EphA4 的细胞外区域,并优选地抑制或更优选地降低软琼脂中的克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成的程度(如,通过细胞杀死机理,如坏死和细胞凋亡)。在其他实施方案中,在另一种抗癌剂存在下,如激素、生物、化学治疗或其他试剂存在下,该抗体抑制或降低癌细胞表型。在另一个实施方案中,该抗体在抗原决定部位结合 EphA4 的细胞外区域,该抗原决定部位在癌细胞中暴露而在非癌细胞中封闭。在另一个实施方案中,该抗体结合 EphA4 的细胞外区域,优选 K_{off} 小于 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 更优选小于 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 。在其他实施方案中,该抗体结合 EphA4, 其 K_{off} 小于 10^{-3} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-4} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-5} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-6} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-7} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-8} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-9} s^{-1} , 小于

$5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, 或小于 10^{-10} s^{-1} 。

在更优选实施方案中, 经 ELISA 或任何其他合适的免疫测定分析, 该抗体结合 EphA4 抗原决定部位和/或竞争结合 EphA4。表达抗 EphA4 scFv EA44 的细胞根据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约在 2004 年 6 月 1 日保藏在美国类型培养物中心(P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108), 并取得保藏号, 在此引为参考。在特定实施方案中, 本发明提供 EphA4 scFv 抗体 EphA4-44/EA44(在本说明书中, EA44 和 EphA4-44 指相同抗体, 即结合 EphA4 的 EphA4-44 scFv 克隆, 在 2004 年 6 月 10 日在 ATCC 保藏为 "EA44")。在优选实施方案中, 本发明提供一种 EphA4 抗体, 其中的可变重链和/或可变轻链的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 4 和 8 中所含的 EA44 的可变重链或轻链氨基酸序列分别有至少 90% 的序列相同。在其他优选实施方案中, 本发明提供一种 EphA4 抗体, 其中它的至少 3 个, 至少 4 个, 至少 5 个, 或全部 6 个 CDR 与 EA44 中的相应 CDR 相同。在其他特定实施方案中, 本发明提供抗 EphA4 scFv 克隆 8、18、20、36 及 41。在最优选实施方案中, 该抗体是人抗体或被人源化。

在其他实施方案中, 该 EphA4 抗体包括 EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22) 和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22) 和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22) 和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24) 和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24) 和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24) 和 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26); EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26) 和 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22); EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26) 和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26) 和 VL CDR3 (SEQ

ID NO. 32); EA44 VH1 CDR1, VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28), EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR1 (SEQ ID NO. 28); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO.

22), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR2 (SEQ ID NO. 30); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28), VL CDR2 (SEQ ID NO. 30)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR1 (SEQ ID NO. 22), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28), VL CDR2 (SEQ ID NO. 30)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); EA44 VH CDR2 (SEQ ID NO. 24), VH CDR3 (SEQ ID NO. 26), VL CDR1 (SEQ ID NO. 28), VL CDR2 (SEQ ID NO. 30)和 VL CDR3 (SEQ ID NO. 32); 或图 7 所列的 EA44 VH CDR 和 VL CDR 的任意组合。

本发明的抗体包括但不限于单克隆抗体, 合成抗体, 重组生成的抗体, 内抗体, 多特异性抗体(包括双特异性抗体), 人抗体, 人源化抗体, 嵌合抗体, 单链 Fv (scFv) (包括双特异性 scFv), 如 scFv 克隆 8、18、20、36、41 及 EA44, Fab 片段, F(ab')片段, 二硫化物连接的 Fv (sdFv), 及上述任何一

种的抗原决定部位结合片段。具体而言，本发明的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即，含有免疫特异性结合 EphA4 的抗原结合位点并是 EphA4 激动剂的分子，该分子抑制或降低癌细胞表型，优选结合在癌细胞上而不是在非癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位，和/或结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 的 EphA4。本发明的免疫球蛋白分子可为任何类型的免疫球蛋白分子(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)，任何种类(例如，IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂)或小类。

本发明方法所用的抗体可源于任何动物，包括鸟和哺乳类动物(例如，人类、鼠科、驴、羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡)。优选地，该抗体为人或人源化单克隆抗体。本文中，“人”抗体包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体，还包括从人免疫球蛋白库或表达人基因抗体的小鼠或其他动物分离出的抗体。

本发明方法所用的抗体可具有单特异性、双特异性、三特异性或多特异性。多特异性抗体可免疫特异性结合 EphA4 多肽的不同抗原决定部位，或免疫特异性结合 EphA4 多肽及异种抗原决定部位，如异种多肽或固体载体材料。参见，例如，国际公开 WO 93/17715、WO 92/08802、WO 91/00360 及 WO 92/05793；Tutt 等人，1991，*J. Immunol* 1. 147: 60-69；美国专利 4,474,893，4,714,681，4,925,648，5,573,920 及 5,601,819；和 Kostelny 等人，1992，*J. Immunol* 1. 148: 1547-1553。

在优选实施方案中，本发明的抗体是 BiTE (bispecific T cell engager)。BiTE 是双特异性抗体，其可重定向 T 细胞以抗原特异性地去除靶。BiTE 分子具有在分子的一端结合 T 细胞抗原(例如 CD3)的抗原结合区，及结合靶细胞上的抗原的抗原结合区。BiTE 分子最近在 WO 99/54440 中有所描述，这

里将其引入作为参考。该文献描述了一种新单链多功能多肽，其包括 CD19 和 CD3 抗原的结合位点(CD19×CD3)。该分子源自两种抗体，一种抗体结合 B 细胞上的 CD19，另一种抗体结合 T 细胞上的 CD3。这些不同抗体的变化区域与多肽序列融合，从而形成单独分子。其中还描述了特异性结合区的可变重链(VH)和轻链(VL)通过柔性连接子连接而形成单链双特异性抗体。

在本发明的实施方案中，免疫特异性结合 EphA4 的抗体或配体包括 BiTE 分子的一部分。例如，结合 EphA4 的抗体的 VH 和/或 VL(优选是 scFv)可以融合到抗 CD3 结合部分，如前述分子那样，从而形成以 EphA4 为靶的 BiTE 分子。除了 EphA4 抗体的可变重链和/或轻链外，结合 EphA4 的其他分子包括 BiTE 分子，例如 Ephrins A1、A2、A3、A4、A5、B2 及 B3；B61、AL1/RAGS、LERK4、Htk-L 及 Elk-L3。在另一个实施方案中，BiTE 分子包括结合其他 T 细胞抗原(除 CD3 外)的分子。例如，免疫特异性结合 T 细胞抗原(如 CD2，CD4，CD8，CD11a，TCR 及 CD28)的配体和/或抗体，是本方发明所预期的一部分。上述内容并不是排他的，而是阐明免疫特异性结合 T 细胞抗原的其他分子可用作 BiTE 分子的一部分。这些分子包括抗体或天然配体的 VH 和/或 VL 部分(例如 LFA3，其天然配体为 CD3)。在本发明的一个实施方案中，BiTE 分子是 EphA4 激动剂。在另一个实施方案中，BiTE 分子是 EphA4 拮抗剂。

本发明所用的"结合区"是指含有能够特异性结合抗原决定部位的三维结构的区域，如天然抗体、自由 scFv 片段或其相应的一个免疫球蛋白链，优选是 VH 链。因而，所述区域包括抗体或免疫球蛋白链的 VH 和/或 VL 区域，优选至少是 VH 区域，或更优选是用柔性多肽连接子连接的 VH 和 VL 区域(scFv)。另一方面，本发明的多肽中所含的所述结合区可包括抗体或免

疫球蛋白链的至少一个互补决定区(CDR), 用于识别 T 细胞上的抗原或细胞抗原。就这一点而言, 需注意的是, 本发明多肽中的结合区不仅可源自抗体, 而且可源自其他 T 细胞或细胞抗原结合蛋白, 如天然表面受体或配体。在本发明的实施方案中还可预期到, 在上述多肽的所述第一和或第二区域模拟或相应于天然抗体的 VH 和 VL 区域。为本发明的多肽提供结合位点的抗体可以是例如单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体、合成抗体、抗体片段(如 Fab、Fv 或 scFv 片段等)或其任一化学修饰衍生物。

本发明方法所用的抗体包括经修饰的衍生物, 即通过使任何类型的分子与抗体共价连接来修饰的衍生物。例如, 但不限于, 所述的抗体衍生物包括修饰的抗体, 例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、用公知的保护/阻挡基团衍生、蛋白断裂、细胞配体或其他蛋白融合等来修饰抗体。众多化学修饰可用已知的技术进行, 包括但不限于, 特定化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外, 该衍生物可含有一种或多种非典型氨基酸。

本发明包括单区域抗体, 包括骆驼化的单区域抗体(参考例如, Muyltermans 等人, 2001 年, *Trends Biochem. Sci.* 26: 230; Nuttall 等人, 2000 年, *Cur. Pharm. Biotech.* 1: 253; Reichmann 和 Muyltermans, 1999 年, *J. Immunol. Meth.* 231: 25; 国际公布 WO 94/04678 和 WO 94/25591; 美国专利 6,005,079; 这里引入它们的全部内容作为参考)。在一个实施方案中, 本发明提供单区域抗体, 其包括两个 VH 区域, 该区域具有 EphA4 激发性抗体、EphA4 癌细胞表型抑制性抗体、暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体或结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} S^{-1}$ 的 EphA4 的 EphA4 抗体的任一 VH 区域的经过修饰的氨基酸序列, 因而形成单区域抗体。在另一个实施方案中, 本发明还提供单区域抗

体,其包括两个 VH 区域,该区域含有 EphA4 激发性抗体、EphA4 癌细胞表型抑制性抗体、暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体或结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 的 EphA4 的 EphA4 抗体的一个或多个 VH CDR。

本发明的方法还包括使用抗体或其片段,其在哺乳动物(优选人)中的半衰期(例如,血清半衰期)为 15 天以上,优选是 20 天以上、25 天以上、30 天以上、35 天以上、40 天以上、45 天以上、2 个月以上、3 个月以上、4 个月以上或 5 个月以上。本发明的抗体或片段在哺乳动物(优选人)中半衰期增大,使得所述抗体或抗体片段在哺乳动物中的血清滴度升高,从而降低了给予所述抗体或抗体片段的频率和/或降低了给予的所述抗体或抗体片段的浓度。可通过本领域所属技术人员所公知的技术提高抗体或其片段的体内半衰期。例如,通过修饰(例如,取代,缺失或添加)参与 Fc 区域与 FcRn 受体间的相互反应的氨基酸残基,可以提高抗体或其片段的体内半衰期(参见,例如,国际公开 WO 97/34631 和 WO 02/060919,这里引用其全部内容作为参考)。通过使所述抗体或抗体片段与聚合物分子,如高分子量的聚乙二醇(PEG)连接,可以提高抗体或其片段的体内半衰期。PEG 可与所述抗体或抗体片段连接,使用或不使用多功能连接子,或者通过 PEG 与所述抗体或抗体片段的 N-或 C-端的位点特异性结合,或通过赖氨酸残基上的 ϵ -氨基。可以使用使生物活性损失最小的线性或带分支的聚合体衍生物。通过 SDS-PAGE 和质谱密切监测结合的程度,来确保 PEG 分子与抗体的适当结合。未反应的 PEG 可通过例如尺寸排除法或离子交换色谱而与抗体-PEG 共轭物分离。

本领域所属技术人员所知的标准技术可用于诱导编码抗体或其片段的核苷酸序列发生突变,包括例如,定点突变和 PCR 介导的突变,从而使氨基酸取代。优选地,相对于原抗体或其片段而言,该衍生物包括小于 15 个

氨基酸的取代、小于 10 个氨基酸的取代、小于 5 个氨基酸的取代、小于 4 个氨基酸的取代、小于 3 个氨基酸的取代、或小于 2 个氨基酸的取代。在优选实施方案中，该衍生物含有保守氨基酸取代，该取代发生在一个或多个预计的非必须氨基酸残基处。

本发明还包括抗体或其片段，它们免疫特异性结合 EphA4 并激发 EphA4 和/或抑制癌细胞表型，优选结合在癌细胞中暴露的 EphA4 抗原决定部位，和/或结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的 EphA4，所述抗体或抗体片段包括一个或多个 CDR 的氨基酸序列，该序列至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 与 EphA4 抗体的一个或多个 CDR 的氨基酸序列相同。可通过本领域所属技术人员已知的任何办法来决定两个氨基酸序列的相同百分比，包括 BLAST 蛋白检索。

在特定实施方案中，本发明包括抗体或抗体片段，它们包括一个或多个 CDR 的氨基酸序列，该序列至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 与 scFv 克隆 EA44 的一个或多个 CDR 的氨基酸序列相同。在另一个实施方案中，本发明包括重组的 EphA4 抗体或抗体片段，其为 EphA4 激发性抗体、EphA4 癌细胞表型抑制性抗体或暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体，其中该抗体包括至少一个 EA44 抗体可变轻链或可变重链的互补决定区(CDR)，其中可变重链和轻链的氨基酸序列是 EA44 序列。

在另一个特定实施方案中，本发明包括 EphA4 抗体或抗体片段，其为 EphA4 激发性抗体，EphA4 癌细胞表型抑制性抗体或暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体，其中所述抗体包括 EA44 抗体可变轻链和/或可变重链的 1 个、

2个、3个、4个、5个或全部6个互补决定区(CDR)。

5.1.1 抗体共轭物

本发明包括与异种试剂重组融合或化学结合(包括共价和非共价结合)的抗体或其片段(或其他治疗剂,如 EphA4 配体和其 EphA4 结合片段)的用途。异种试剂可以是多肽(或其一部分,优选至少 10、至少 20、至少 30、至少 40、至少 50、至少 60、至少 70、至少 80、至少 90 或至少 100 个氨基酸的多肽),核酸,小分子(小于 1000 道尔顿),或无机或有机化合物。融合不必是直接的,可通过连接子序列来融合。使用本领域所知的方法,与异种试剂融合或结合的抗体可用于体内检测、治疗、控制或监测紊乱的进展。参考,例如,国际公开 WO 93/21232; EP 439,095; Naramura 等人,1994 年, *Immunol. Lett.* 39: 91-99; 美国专利 5,474,981; Gillies 等人,1992 年, *PNAS* 89: 1428-1432; 和 Fell 等人,1991 年, *J. Immunol.* 146: 2446-2452, 这里引用其全部内容作为参考。在一些实施方案中,待检测、治疗、控制或监控的紊乱是过表达 EphA4 的恶性癌。在其他实施方案中,待检测、治疗、控制或监控的紊乱是过表达 EphA4 的恶化前的癌。在特定实施方案中,恶化前的癌是进行性前列腺上皮内肿瘤(PIN)、乳腺的导管癌、或复合癌。

本发明还包括组合物,该组合物包括与抗体片段融合或结合的异种试剂。例如,所述异种多肽可以与 Fab 片段、Fd 片段、Fv 片段、F(ab)₂ 片段或它们的一部分融合或结合。使多肽与抗体部分融合或结合的方法在本领域是已知的。参见,例如,美国专利 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851 及 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; 国际公开 WO 96/04388 和 WO 91/06570; Ashkenazi 等人,1991 年, *PNAS* 88: 10535-10539; Zheng

等人, 1995年, *J. Immunol.* 154: 5590-5600; 和 Vil 等人, 1992年, *PNAS* 89: 11337-11341 (这里引用上述全部内容作为参考)。

通过基因改组、基序改组(motif-shuffling)、外显子改组和/或密码子改组技术(总体称作"DNA 改组")可以产生其他融合蛋白。DNA 改组可用于改变本发明抗体或其片段的活性(例如, 抗体或其片段具有较高亲和力及较低解离速率)。通常参考, 美国专利 5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252、和 5,837,458; 及 Patten 等人, 1997, *Curr. Opinion Biotechnol.* 8: 724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16: 76; Hansson 等人, 1999, *J. Mol. Biol.* 287: 265; Lorenzo 和 Blasco, 1998, *BioTechniques* 24: 308 (在此引入这里每个专利和出版物的全部内容作为参考)。抗体或其片段, 或其编码的抗体或其片段可以在重组之前, 通过易错 PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机突变来进行改变。编码抗体或抗体片段的, 免疫特异性结合 EphA4 的多核苷酸的一个或多个部分可以与一种或多种异种试剂的一种或多种成分、基序、段、部分、区域、片段等重组。

在一个实施方案中, 为了便于纯化, 将本发明的抗体或其片段或其变体与标记序列(如肽)结合。在优选实施方案中, 标记的氨基酸序列是六组氨酸肽, 如 pQE 载体中的标签(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), 其中许多是商业上可提供的。例如, 如 Gentz 等人, 1989, *PNAS* 86: 821 中所描述的, 六组氨酸可以为纯化融合蛋白提供便利。用于纯化的其他肽标签包括但不限于, 红血球凝聚素"HA"标签, 其相应于源自流感红血球凝聚素蛋白的抗原决定部位(Wilson 等人, 1984, *Cell* 37: 767)和"Flag"标签。

在其他实施方案中, 本发明的抗体或其片段或其变体与诊断或检测性试

剂结合。作为临床试验的一部分，这种抗体可用于监控或预测癌症的发展和进程，如测定特定治疗的功效。此外，这种抗体可用于监控或预测恶化前的癌症的发展和进程(例如，高级前列腺上皮内肿瘤(PIN)，乳腺的导管癌，或复合癌)。在一个实施方案中，暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体与诊断或检测性试剂结合。

这种诊断和检测可通过使抗体与可检测物质配合来实现，该可检测物质包括，但不限于各种酶，如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶；辅基，如但不限于链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素；荧光材料，如但不限于，伞形酮，荧光素，荧光素异硫代氰酸酯，若丹明，二氯三嗪基胺荧光素，丹磺酰氯或藻红蛋白；发光材料，如但不限于，发光氨；生物发光材料，如但不限于，荧光素酶，昆虫萤光素，及发光蛋白质；放射性材料，如但不限于，铋(^{213}Bi)，碳(^{14}C)，铬(^{51}Cr)，钴(^{57}Co)，氟(^{18}F)，钆(^{153}Gd , ^{159}Gd)，镓(^{68}Ga , ^{67}Ga)，锗(^{68}Ge)，铥(^{166}Ho)，铟(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In)，碘(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I)，镧(^{140}La)，镥(^{177}Lu)，锰(^{54}Mn)，钼(^{99}Mo)，钯(^{103}Pd)，磷(^{32}P)，镨(^{142}Pr)，钷(^{149}Pm)，铼(^{186}Re , ^{188}Re)，铑(^{105}Rh)，钌(^{97}Ru)，钐(^{153}Sm)，钪(^{47}Sc)，硒(^{75}Se)，锶(^{85}Sr)，硫(^{35}S)，锝(^{99}Tc)，钛(^{201}Ti)，锡(^{113}Sn , ^{117}Sn)，氚(^3H)，氙(^{133}Xe)，镱(^{169}Yb , ^{175}Yb)，钇(^{90}Y)，锌(^{65}Zn)；使用各种正电子断层造影的正电子发射金属，以及非放射性的顺磁金属离子。

在其他实施方案中，本发明的抗体或其片段或其变体与治疗性试剂结合，如细胞毒素，例如，抑制细胞生长或杀死细胞的试剂，治疗性试剂或放射性金属离子，例如， α -发射体。细胞毒素或毒性试剂包括任何有害于细胞的任何试剂。例子包括紫杉醇(paclitaxel)，细胞松弛素 B，短杆菌肽 D，溴乙非啶，依米丁，丝裂霉素，依托泊苷，鬼臼噻吩甙，长春新碱，长春碱，

秋水仙碱,多柔比星,柔红霉素,二羟基炭疽菌素二酮,米托蒽醌,光神霉素,放射菌素 D, 1-去氢睾酮,糖皮质激素,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,心得安,嘌呤霉素,表柔比星,及环磷酰胺和其类似物或同系物。治疗性试剂包括但不限于,抗代谢物(例如,甲氨蝶呤,6-巯嘌呤,6-巯鸟嘌呤,阿糖胞苷,5-氟尿嘧啶脱焦炭),烷化试剂(例如,氮芥,thioepa,苯丁酸氮芥,苯丙酸氮芥,双氯乙基亚硝脒(BCNU)和洛莫司汀(CCNU),环硫代磷酰胺,白消安,二溴甘露醇,链脲霉素,丝裂霉素 C,及顺式二氯二氨铂(II) (DDP) 顺铂),蒽环霉素(例如,柔红霉素(前柔红霉素)和多柔比星),抗生素(例如,放线菌素 D(前放射菌素),博来霉素,光神霉素及安曲霉素(AMC)),及抗有丝分裂试剂(例如,长春新碱和长春碱)。

在其他实施方案中,本发明的抗体或其片段或其变体与治疗性试剂或改变预定生物反应的药物部分结合。该治疗性试剂或试剂部分应理解为不限于传统的化学治疗性试剂。例如,该试剂部分可以是具有所需的生物活性的蛋白或多肽。这种蛋白可包括例如毒素,如红豆因,蓖麻毒素 A,假单胞菌外毒素,霍乱毒素或白喉毒素;蛋白,如肿瘤坏死因子, α -干扰素, β -干扰素,神经生长因子,血小板生长素,组织血浆酶原催化剂,细胞凋亡试剂,例如, TNF- α , TNF- β , AIM I (参考,国际公开 WO 97/33899), AIM II (参考,国际公开 WO 97/34911), Fas 配体(Takahashi 等人,1994, *J. Immunol.*, 6: 1567), 及 VEGI (参考,国际公开 WO 99/23105), 血栓形成试剂或抗血管增生试剂,例如,血管抑素或血管内皮抑制素;或生物反应改性剂,例如,淋巴因子(例如,白细胞介素-1 ("IL-1"), 白细胞介素-2 ("IL-2"), 白细胞介素-6 ("IL-6"), 粒-巨噬细胞克隆刺激因子("GM-CSF"), 及粒细胞克隆刺激因子("G-CSF")), 或生长因子(例如,生长激素("GH"))。

在其他实施方案中，本发明的抗体或其片段或其变体与治疗性试剂结合，如与放射性材料或与射电金属离子结合的大环螯合剂(参考前述放射性材料的例子)结合。在某些实施方案中，该大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)，可通过连接分子与抗体连接。这种连接分子在本领域中是公知的，公开于 Denardo 等人，1998，*Clin Cancer Res.* 4: 2483-90； Peterson 等人，1999，*Bioconjug. Chem.* 10: 553；和 Zimmerman 等人，1999，*Nucl. Med. Biol.* 26: 943-50，在此引入每个文献的全部内容作为参考。

在特定实施方案中，结合的抗体是 EphA4 抗体，其优选结合在癌细胞上而不是非癌细胞上的 EphA4 抗原决定部位(即暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体)。在另一个特定实施方案中，该结合的抗体不是 EA2。在另一实施方案中，该结合的抗体包括 EA44 抗体的可变轻链或可变重链。

使治疗部分与抗体结合的技术是公知的，参见，例如，Arnon 等人，"Monoclonal For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*，Reisfeld 等人(编)，pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)； Hellstrom 等人，"Antibodies For Drug Delivery"，*Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.)，Robinson 等人(eds.)，pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)； Thorpe，"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review"，*Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*，Pinchera 等人(eds.)，pp. 475-506 (1985)； "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy"，*Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*，Baldwin 等人(eds.)，pp. 303-16 (Academic Press 1985)，及 Thorpe 等人，1982，*Immunol.*

Rev. 62: 119-58。使抗体与多肽融合或结合的方法在本领域中是已知的。参见, 例如, 美国专利 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, 及 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; 国际公开 WO 96/04388 和 WO 91/06570; Ashkenazi 等人, 1991, *PNAS* 88: 10535-10539; Zheng 等人, 1995, *J. Immunol.* 154: 5590-5600; 和 Vil 等人, 1992, *PNAS* 89: 11337-11341。使抗体与基序融合不必须直接进行, 而是可以通过连接序列进行。这种连接分子在本领域中是公知的, 并公开于 Denardo 等人, 1998, *Clin Cancer Res.* 4: 2483-90; Peterson 等人, 1999, *Bioconjug. Chem.* 10: 553; Zimmerman 等人, 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26: 943-50; Garnett, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 171-216, 在此引入每一文献的全部内容作为参考。

可选择地, 抗体可以与第二种抗体结合以形成抗体复共轭对配合物, 如 Segal 在美国专利 4,676,980 中所述的, 在此引入其全部作为参考。

抗体也可与固体载体连接, 这尤其适用于免疫测定或目标抗原的纯化。这种固体载体包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

5.1.2 制备抗体的方法

抗体或其片段可通过本领域中合成抗体的任何已知方法来制备, 具体而言, 通过化学合成或优选通过重组表达技术来制备。

可通过使用本领域所知的各种技术(包括使用杂交瘤、重组、及噬菌体展示技术, 或它们的组合)来制备单克隆抗体。例如, 单克隆抗体可通过使用杂交瘤技术来制备, 这些技术包括本领域已知的那些或如下的教导, 例如, Harlow 等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory

Press, 2nd ed.1988); Hammerling 等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (在此引入所述文献的全部内容作为参考)。在本文中, 术语"单克隆抗体"不限于通过杂交瘤技术制备的抗体。术语"单克隆抗体"是指源自单一克隆的抗体, 包括任何真核, 原核或噬菌体克隆, 不是指其制备的方法。

使用杂交瘤技术制备和筛选特定抗体的方法是本领域常规和公知的。简言之, 可以用 EphA4 (全长蛋白或其区域, 例如, 细胞外区域) 免疫小鼠, 并且一旦检测到免疫反应, 例如, 在小鼠血清中检测到对 EphA4 有特异性的抗体, 那么就割取小鼠的脾, 并进行脾细胞分离。然后将脾细胞通过已知技术与任何适合的骨髓瘤细胞融合, 例如从 ATCC 的细胞系 SP20 得到的细胞。通过有限的稀释, 选择杂交瘤并克隆。然后用本领域熟知的方法分析杂交瘤克隆, 分析分泌能够结合本发明多肽的抗体的细胞。通常, 含有高水平抗体的腹液可通过用阳性杂交瘤克隆免疫小鼠来得到。

因此, 单克隆抗体可通过培养可分泌本发明抗体的杂交瘤来制备, 其中优选地, 通过使从用 EphA4 或其片段免疫的小鼠中分离出的脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 然后从该融合体中筛选杂交瘤以筛选出分泌能够结合 EphA4 的抗体的杂交瘤克隆, 从而制备出杂交瘤。

识别特定 EphA4 抗原决定部位的抗体片段可通过本领域所属技术人员公知的任何技术得到。例如, 本发明的 Fab 和 F(ab')₂ 片段可通过使用酶(如木瓜蛋白酶(以产生 Fab 片段)或胃蛋白酶(以产生 F(ab')₂ 片段))来剪切免疫球蛋白分子制得。F(ab')₂ 片段包括可变区域, 轻链不变区和重链的 CH1 区域。此外, 本发明的抗体还可通过使用本领域所知的各种噬菌体展示方法制得。

在噬菌体展示方法中, 功能抗体区域展示在运载其多核苷酸编码序列的

噬菌体粒子的表面。具体而言,编码 VH 和 VL 区域的 DNA 序列从动物 cDNA 库(例如,人或鼠类淋巴组织的 cDNA 库)扩增。将该编码 VH 和 VL 区域的 DNA 通过 PCR 与 scFv 连接序列一起重组,并克隆到噬粒载体(例如, pCANTAB 6 或 pComb 3 HSS)中。将该载体电穿孔到 *E.coli* 中,并和辅助噬菌体一起感染 *E.coli*。这些方法中所用的噬菌体通常为包括 fd 和 M13 的细丝状噬菌体,且 VH 和 VL 区域通常与噬菌体基因 III 或基因 VIII 重组融合。可以用抗原来筛选或识别表达结合 EphA4 抗原决定部位的抗原结合区的噬菌体,例如,使用标记抗原或被结合或捕获到固体表面上的抗原来筛选或识别。可用于制备本发明抗体的噬菌体展示方法的例子包括如下所公开的那些: Brinkman 等人, 1995, *J. Immunol. Methods* 182: 41-50; Ames 等人, 1995, *J. Immunol. Methods* 184: 177; Kettleborough 等人, 1994, *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958; Persic 等人, 1997, *Gene* 187: 9; Burton 等人, 1994, *Advances in Immunology* 57: 191-280; 国际申请 PCT/GB91/01134; 国际公开 WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401, 及 WO 97/13844; 和美国专利 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743 和 5,969,108; 在此引入每一文献的全部内容作为参考。

可以筛选结合 EphA4, 尤其结合 EphA4 的细胞外区域的噬菌体。也可以筛选激动性 EphA4 活性(例如, EphA4 磷酸化提高, EphA4 水平降低), 或癌细胞表型抑制活性(例如, 在软琼脂中的克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂如 MATRIGELTM 中的管状网络形成降低), 或优选与在癌细胞上而不是在非癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位的结合(例如, 与在细胞间接触

中与配体结合的 EphA4 结合较差,与在细胞间接触中不与配体结合的 EphA4 结合较好)。

如上述参考文献中描述的,在选择噬菌体后,噬菌体的抗体编码区域可被分离并用于生产整个抗体,包括人抗体,或任何其他所需的抗原结合片段,并且在任何所需的宿主中表达,包括例如下文所述的哺乳动物细胞,昆虫细胞,植物细胞,酵母及细菌。可以使用本领域所公知的方法来重组产生 Fab, Fab'和 F(ab')₂ 片段,如在下述文献中公开的那些,国际公开 WO 92/22324; Mullinax 等人, 1992, *BioTechniques* 12: 864; Sawai 等人, 1995, *AJRI* 34: 26; 和 Better 等人, 1988, *Science* 240: 1041 (在此引入所述文献的全部内容作为参考)。

为了产生整个抗体,可用 PCR 引物(包括 VH 或 VL 核苷酸序列,限制位点,及保护限制位点的侧翼序列)来扩增 scFv 克隆中的 VH 或 VL 序列。利用本领域所属技术人员公知的克隆技术,可以将 PCR 扩增的 VH 区域克隆到表达 VH 不变区,例如人 γ 4 不变区的载体中,和可以将 PCR 扩增的 VL 区域克隆到表达 VL 不变区,例如人 κ 或 λ 不变区的载体中。优选地,表达 VH 或 VL 区域的载体包括 EF-1 α 启动子、分泌信号、可变区域的克隆位点、不变区、及选择标记如新霉素。VH 和 VL 区域还可克隆到表达必需不变区的载体中。然后,使用本领域所属技术人员公知的技术,将重链转化载体和轻链转化载体一起转染到细胞系中,以产生稳定或短暂的细胞系,表达全长抗体,例如, IgG。

在一些用途中,包括抗体在人体内的应用和体外检测分析,优选地使用人或嵌合抗体。完全人抗体在治疗人受试者方面是尤其理想的。人抗体可通过本领域公知的各种方法制备,包括如上所述的使用源自人免疫球蛋白序列

的抗体库的噬菌体展示方法制备。还可参考美国专利 4,444,887 和 4,716,111, 和国际公开 WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、及 WO 91/10741, 在此引入每一文献的全部内容作为参考。

还可通过使用不能表达功能性内生免疫球蛋白但可表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备人抗体。例如, 可以将人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物随机地或通过同源重组导入到小鼠胚胎干细胞中。可选择地, 除了人重链和轻链基因外, 可以将人可变区域、不变区、及差异性区域导入到小鼠胚胎干细胞中。小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可以非功能性地单独导入或在通过同源重组导入人免疫球蛋白克隆的同时导入。具体而言, J_H 区域的同合子缺失使内生抗体不能产生。扩增经修饰的胚胎干细胞并将其微注射到胚泡中从而产生嵌合小鼠。然后培育该嵌合小鼠, 以产生表达人抗体的同型后代。以常规方式用所选的抗原免疫该转基因小鼠, 例如, 用本发明的全部多肽或其一部分免疫。用常规的杂交瘤技术从该免疫的转基因小鼠中可以获得所述抗原的单克隆抗体。在该转基因小鼠中的人免疫球蛋白转基因在 B 细胞分化过程中重新排列, 然后发生类型转换和体细胞突变。因而, 使用这种技术, 可产生治疗用 IgG、IgA、IgM 和 IgE 抗体。关于制备人抗体的技术的总体描述, 参考 Lonberg 和 Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93)。关于制备人抗体和人单克隆抗体的技术和制备这种抗体的方法的详细说明, 参见, 例如, 国际公开 WO 98/24893、WO 96/34096 及 WO 96/33735; 和美国专利 5,413,923、5,625,126、5,633,425、5,569,825、5,661,016、5,545,806、5,814,318 及 5,939,598, 在此引入每一文献的全部内容作为参考。此外, 一些公司, 如 Abgenix, Inc. (Freemont, CA) 和 Medarex (Princeton, NJ) 使用与上述描述相

似的技术可提供所选抗原的人抗体。

嵌合抗体是其中抗体不同的部分源自于不同的免疫球蛋白分子的分子，如具有源自于非人抗体的可变区域和人免疫球蛋白不变区的抗体。制备嵌合抗体的方法在本领域是公知的。参见，例如，Morrison, 1985, *Science* 229: 1202; Oi 等人, 1986, *BioTechniques* 4: 214; Gillies 等人, 1989, *J. Immunol. Methods* 125: 191-202; 和美国专利 5,807,715、4,816,567 及 4,816,397, 在此引入每一文献的全部内容作为参考。嵌合抗体包括源于非人物种的一个或多个 CDR 和源于人免疫球蛋白分子的框架区，并可使用本领域所公知的各种技术来制备，这些技术包括例如，CDR 移植(EP 239,400; 国际公开 WO 91/09967; 和美国专利 5,225,539、5,530,101 及 5,585,089), 镶嵌或重建(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28 (4/5): 489-49S, Studnicka 等人, 1994, *Protein Engineering* 7: 805; 和 Roguska 等人, 1994, *PNAS* 91: 969), 及链改组(美国专利 5,565,332)。

通常，框架区里的框架残基会被 CDR 供体抗体相应的残基取代，从而改变了，优选是改进了抗原结合。这些框架取代可用本领域公知的方法来识别，例如，通过模拟 CDR 与框架残基间的相互作用来鉴别框架残基对抗原结合的重要性来识别，和进行序列比较来识别在特定位置上的不寻常框架残基来识别。(参见，例如，美国专利 5,585,089; 和 Riechmann 等人, 1988, *Nature* 332: 323, 在此引入其全部内容作为参考)。

人源化抗体是抗体或其变体或其片段，其能结合预定抗原，且含有框架区和 CDR，该框架区基本上具有人免疫球蛋白的氨基酸序列，CDR 基本上具有非人免疫球蛋白的氨基酸序列。人源化抗体基本上包括至少一个、通常是两个可变区域，其中所有或基本上所有的 CDR 区域与非人免疫球蛋白(即

供体抗体)的 CDR 区域相应,且所有或基本上所有框架区是人免疫球蛋白共有序列的框架区。优选地,人源化抗体还包括至少一部分免疫球蛋白不变区(Fc),通常是人免疫球蛋白的不变区。通常,该抗体包括轻链及至少重链的可变区域。该抗体还包括重链的 CH1、铰链区、CH2、CH3 及 CH4 区域。人源化抗体可选自任何种类的免疫球蛋白,包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE,及任何异型,包括 IgG、IgG2、IgG3 和 IgG4。通常地,如果需要人源化抗体表现出细胞毒性,那么该不变区是互补结合的不变区,且是典型的 IgG 种类。如果不需要这种细胞毒性,那么该不变区可以是 IgG2 种类。该人源化抗体可包括来源于多种种类或异型的序列,选择特定的不变区以优化所需的效果是本领域技术公知的。人源化抗体的框架区域和 CDR 区域不需要与双亲序列精确一致,例如,可通过取代、添加或缺失至少一个残基而使供体 CDR 或共有框架发生突变,从而使在该位点的 CDR 或构架残基不与共有或产生的抗体相应。然而,这种突变不会很多。通常,至少 75%的人源化抗体残基与双亲的框架区(FR)和 CDR 序列一致,更通常为 90%,且最优选的是大于 95%。人源化抗体可通过使用本领域所知的各种技术而制得,包括但不限于,CDR 接枝(欧洲专利 EP 239,400、国际公开 WO 91/09967 和美国专利 5,225,539、5,530,101 及 5,585,089),镶嵌或重建(欧洲专利 EP 592,106 和 EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28 (4/5): 489-498; Studnicka 等人, 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805-814; 和 Roguska 等人, 1994, *PNAS* 91: 969-973),链改组(美国专利 5,565,332),及下列文献中公开的技术,例如,美国专利 6,407,213, 5,766,886, 5,585,089, 国际公开 WO 9317105, Tan 等人, 2002, *J. Immunol.* 169: 1119-25, Caldas 等人, 2000, *Protein Eng.* 13: 353-60, Morea 等人, 2000, *Methods* 20: 267-79, Baca 等人, 1997,

J. Biol. Chem. 272: 10678-84, Roguska 等人, 1996, *Protein Eng.* 9: 895-904, Couto 等人, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s, Couto 等人, 1995, *Cancer Res.* 55: 1717-22, Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409-10, Pedersen 等人, 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959-73, Jones 等人, 1986, *Nature* 321: 522-525, Riechmann 等人, 1988, *Nature* 332: 323, 及 Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596。通常, 框架区里的框架残基会被 CDR 供体抗体的相应残基取代, 以改变并优选是改进抗原结合。这些框架取代可用本领域公知的方法来识别, 例如, 通过模拟 CDR 与框架残基间的相互作用来鉴别框架残基对抗原结合的重要性来识别, 和进行序列比较来识别在特定位置上的不寻常框架残基来识别。(参见, 例如, 美国专利 5,585,089; 和 Riechmann 等人, 1988, *Nature* 332: 323, 在此引入其全部内容作为参考)。

此外, 本领域所属技术人员使用公知的技术可用本发明的抗体来制备特异基因型抗体。(参见, 例如, Greenspan & Bona, 1989, *FASEB J.* 7: 437-444; 和 Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147: 2429-2438)。本发明提供了使用多核苷酸的方法, 该多核苷酸含有编码本发明的抗体或其片段的核苷酸序列。

5.1.3 编码抗体多核苷酸

本发明的方法还包括能在如上文所定义的高度严格、中度严格或低严格杂交条件下与编码本发明的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。

上述多核苷酸可以用本领域所公知的任何方法来获得, 且该多核苷酸的核苷酸序列可使用本领域所公知的任何方法来测定。因为抗体的氨基酸序列是已知的, 所以编码这些抗体的核苷酸序列可使用本领域所公知的方法测定, 即, 将已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子组装起来从而得到编码本发

明抗体或其片段的核酸。这种编码该抗体的多核苷酸可用化学合成的寡核苷酸来组装(例如, Kutmeier 等人, 1994, *BioTechniques* 17: 242), 该组装简而言之, 包括合成交叠的寡核苷酸, 该寡核苷酸含有该抗体的一部分编码序列; 退火并连接这些寡核苷酸; 然后用 PCR 扩增该连接的寡核苷酸。

可选择地, 编码抗体的多核苷酸可由适当来源的核酸产生。 如果含有编码特定抗体的核酸的克隆不能从商业上得到, 但抗体分子的序列是已知的, 那么编码该免疫球蛋白的核酸可以通过化学合成得到或从适合来源(例如, 从任何表达抗体的组织或细胞产生的抗体 cDNA 库或 cDNA 库, 或从任何表达抗体的组织或细胞分离的核酸, 优选是聚 A + RNA, 该组织或细胞如选择来表达本发明抗体的杂交瘤) 得到, 其方法是通过使用可与序列的 3'端和 5'端杂交的合成引物进行 PCR 扩增, 或通过使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针进行克隆, 以例如从编码该抗体的 cDNA 库中识别 cDNA 克隆。然后, 使用本领域公知的任何方法将通过 PCR 产生的扩增核酸克隆成到可复制的克隆载体中。

一旦上述抗体的核苷酸序列得到测定, 那么就使用核苷酸序列操作领域公知的方法, 来操作该抗体的核苷酸序列, 该方法如, 重组 DNA 技术, 定点变异, PCR 等。(参见, 例如, 下面文献中所述的技术, Sambrook 等人, 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 和 Ausubel 等人, 编, 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 在此引入其全部内容作为参考), 以产生具有不同氨基酸序列的抗体, 例如产生氨基酸取代, 缺失和/或添加。

在特定实施方案中, 使用常规的重组 DNA 技术, 将一个或多个 CDR 插

入到框架区中。该框架区可以是天然的或共有的框架区,优选是人框架区(关于人框架区列表,参见,例如,Chothia 等人,1998,*J. Mol. Biol.* 278:457-479)。优选地,通过组合框架区和 CDR 产生的多核苷酸编码特异性结合 EphA4 的抗体。优选地,如上文所述,在框架区内可以有一个或多个氨基酸取代,并且优选地,氨基酸取代提高了抗体与其抗原的结合。此外,这种方法可用于产生一个或多个参与链内二硫键的可变区半胱氨酸残基的氨基酸取代或缺失,从而产生缺少一个或多个链内二硫键的抗体分子。本发明也包括多核苷酸的其他变体,这些变体是本领域公知的。

5.1.4 抗体的重组表达

本发明的抗体、衍生物、类似物或其片段(例如,本发明抗体的重链或轻链,或其一部分,或本发明的单链抗体)的重组表达,需要构建含有编码该抗体的多核苷酸的表达载体。一旦得到编码本发明的抗体分子或抗体的重链或轻链或其一部分(优选但不必须包括重链或轻链可变区域)的多核苷酸,使用本领域公知的技术通过重组 DNA 技术就可制得用于制备该抗体分子的载体。因此,本文中描述了通过表达含有编码抗体的核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白的方法。可以使用本领域所属技术人员公知的方法来构建含有抗体编码序列和合适的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括,例如,体外重组 DNA 技术、合成技术及体内基因重组。因此,本发明提供了可复制的载体,其含有编码本发明抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变区域或其一部分或重链或轻链 CDR,且与启动子操作性连接的核苷酸序列。这种载体可以包括编码抗体分子不变区的核苷酸序列(参见,例如,国际公开 WO 86/05807 和 WO 89/01036 和美国专利 5,122,464),且该抗

体的可变区域可以克隆进这种载体中，以表达全部重链、全部轻链或全部重链和轻链。

可以通过常规技术将表达载体转化到宿主细胞中，然后通过常规技术培养该转化的细胞，以制备本发明的抗体。因此，本发明包括宿主细胞，其含有编码本发明的抗体或其片段，或其重链或轻链，或其一部分，或本发明的单链抗体，并与异源启动子可操作性连接的多核苷酸。在表达双链抗体的优选实施方案中，如下所述，编码重链和轻链的载体可以在宿主细胞中共表达以表达整个免疫球蛋白分子。

可以使用各种宿主表达载体系统来表达本发明的抗体分子(参见，例如，美国专利 5,807,715)。代表性的这种宿主表达系统是载体，通过该载体，可制备目的编码序列并随后纯化；和细胞，当用适合的核苷酸编码序列转录或转染时，该细胞原位表达本发明的抗体分子。这些包括但不限于用含有抗体编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的微生物，如细菌(例如，*E. coli* 和 *B. subtilis*)；用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如，*Saccharomyces pichia*)；用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如，杆状病毒)感染的昆虫细胞系统；用重组病毒表达载体(例如，花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV)感染的或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如，Ti 质粒)转化的植物细胞系统；或含有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如，COS、CHO、BHK、293、NSO 及 3T3 细胞)，它们含有源于哺乳动物细胞基因组的启动子(例如，金属硫蛋白启动子)或源于哺乳动物病毒的启动子(例如，腺病毒晚期启动子；牛痘病毒 7.5K 启动子)。优选地，用细菌细胞如 *Escherichia coli*，更优选真核细胞，特别是表达整个重组抗体分子的细菌细胞或优选的真核细胞来表达重

组抗体分子。例如, 结合有载体(如从人细胞巨化病毒中得到的主要中早其基因启动子元件)的哺乳动物细胞(如中国卵巢细胞(CHO))是抗体的有效表达系统(Foecking 等人, 1986, *Gene* 45: 101; 和 Cockett 等人, 1990, *BioTechnology* 8: 2)。在特定实施方案中, 通过组成型启动子, 诱导型启动子或组织特异性启动子来调节编码抗体或其片段的核苷酸序列的表达, 其中该抗体免疫特异性结合 EphA4 并激发 EphA4, 抑制癌细胞表型, 优选结合在癌细胞而不是非癌细胞上选择性暴露和/或 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} S^{-1}$ 的 EphA4 抗原决定部位。

在细菌系统中, 可以根据待表达的抗体分子的用途来有利地选择表达载体的数量。例如, 当制备大量这种蛋白时为, 为了生产抗体分子的药物组合物, 指导高水平表达融合蛋白产物且使该蛋白产物容易纯化的载体是理想的。这种载体包括但不限于 *E. coli* 表达载体 pUR278 (Ruther 等人, 1983, *EMBO* 12: 1791), 其中该抗体编码序列可以分别连接到该载体的带有 lac Z 编码区域的框架中, 从而制得融合蛋白; pIN 载体(Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509)等。pGEX 载体也可用于表达外源多肽, 如含有谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合蛋白。通常, 这种融合蛋白是可溶解的, 并易于从溶解的细胞中通过吸附、结合基质谷胱甘肽-琼脂糖珠, 然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱来纯化。该 pGEX 载体设计成含有凝血酶或因子 Xa 蛋白酶剪切位点, 从而可以从 GST 部分释放出克隆的目标基因产物。

在昆虫系统中, 将 *Autographa californica* 核型多角体病毒(AcNPV)用作载体来表达外源基因。病毒在 *Spodoptera frugiperda* 细胞中生长。上述抗体的编码序列可以分别克隆到病毒的非必需区域(例如多角体蛋白基因)并置于 AcNPV 启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

在哺乳动物宿主细胞中，可以使用多个基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下，目标抗体编码序列可以连接到腺病毒转录/翻译控制复合物中，例如，连接到晚期启动子和三联体引导序列中。然后通过体外或体内重组，将这种嵌合基因插入到腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区域(例如，区域 E1 或 E3)中插入会产生可繁殖的且能够在感染的宿主中表达抗体分子的重组病毒(例如，参见 Logan & Shenk, 1984, *PNAS* 81: 355-359)。对于插入的抗体编码序列的有效翻译，可能还需要特定的起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子和相邻序列。此外，该起始密码子必须与所需编码序列的阅读框协调一致，以确保整个插入物得到翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是各种来源的，包括天然和合成来源的。通过加入适合的转录增强子元件，转录终结子等，可以增强表达效率(参见，例如，Bittner 等人，1987, *Methods in Enzymol.* 153: 516-544)。

此外，选择宿主细胞株，该细胞株调节嵌入序列的表达，或以特定的理想方式修饰和处理基因产物。蛋白产物的这种修饰(例如，糖基化)和处理(例如，断裂)对于蛋白的功能是重要的。对于蛋白或基因产物的翻译后处理和修饰，不同的宿主细胞具有特征性和特定机制。选择适合的细胞系或宿主系统以确保正确修饰和处理表达的外源蛋白。因此，可以使用具有所述基因产物的初级转录、糖基化及磷酸化合适处理细胞机制的真核宿主细胞。这种哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、NS1 和 T47D、NSO (鼠类骨髓瘤细胞系，不会内源产生任何免疫球蛋白链)，CRL7030 和 HsS78Bst 细胞。

为了长期高产率地生产重组蛋白，稳定表达是优选的。例如，可以建立

稳定地表达抗体分子的细胞系。如果不使用含有病毒复制起点的表达载体，可以使用受合适表达控制元件(例如，启动子、增强子、序列、转录终结子、多聚腺苷酸位点等)控制的 DNA 和可选择性标记转录宿主细胞。在引入外源 DNA 后，可以将构建的细胞在富集培养基中生长 1-2 天，然后转移至选择培养基中。重组质粒中的可选择性标记对选择具有抗性，从而使细胞稳定地与质粒染色体结合，并生长形成集落，该集落随后克隆并扩展成细胞系。这种方法可用于构建表达抗体分子的细胞系。这种构建的细胞系尤其适用于筛选和分析直接或间接与抗体分子相互作用的组合物。

可以使用多种选择系统，包括但不限于，可分别用于 tk-、hgp^rt- 或 ap^rt- 细胞的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler 等人, 1977, *Cell* 11: 223), 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska & Szybalski, 1992, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 48: 202), 腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy 等人, 1980, *Cell* 22: 8-17) 基因。此外，抗代谢物抗性可用作选择下列基因的基础: *dhfr*, 对甲氨蝶呤具有抗性(Wigler 等人, 1980, *PNAS* 77: 357; O'Hare 等人, 1981, *PNAS* 78: 1527); *gpt*, 对麦考酚酸具有抗性(Mulligan & Berg, 1981, *PNAS* 78: 2072); *neo*, 对氨基糖苷 G-418 具有抗性(Wu 和 Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926; 和 Morgan 和 Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191; May, 1993, *TIB TECH* 11: 155-)和 *hygro*, 对潮霉素具有抗性(Santerre 等人, 1984, *Gene* 30: 147)。重组 DNA 技术领域中公知的方法通常可用于选择所需的重组克隆，并且这种方法公开于下述文献中，例如，Ausubel 等人(eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press,

NY (1990); 第 12 和 13 章, Dracopoli 等人(eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin 等人, 1981, *J. Mol. Biol.* 150: 1, 在此引入这些文献的全部内容作为参考。

可通过载体扩增来提高抗体分子的表达水平(参见, Bebbington 和 Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987))。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时, 提高宿主细胞培养基中存在的抑制剂水平会增大标记基因复制的数量。由于扩增区域与抗体基因相关, 因此抗体的产量也增大(Crouse 等人, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 257)。

宿主细胞可以用本发明的两个表达载体共转染, 第一载体编码重链衍生的多肽, 第二载体编码轻链衍生的多肽。这两种载体可以包括相同的可选择性标记, 该标记能使重链和轻链多肽同等表达。可选择地, 可以使用编码并能够同时表达重链和轻链多肽的单个载体。在这种情况下, 轻链应置于重链之前, 以避免有毒的自由重链过量(Proudfoot, 1986, *Nature* 322: 52; 和 Kohler, 1980, *PNAS* 77: 2197)。重链和轻链的编码序列可以包括 cDNA 或基因组 DNA。

一旦通过重组表达制得本发明的抗体分子, 那么就可以通过纯化免疫球蛋白分子领域内公知的任何方法进行纯化, 例如, 通过色谱法(例如, 离子交换、亲和色谱, 尤其是蛋白 A 之后的特异性抗原亲和色谱、及大小筛份(sizing)柱色谱), 离心, 不同的溶解度纯化或通过纯化蛋白的任何其他标准技术进行纯化。此外, 本发明的抗体或其片段可以与本文所述或本领域中公知的其他异种多肽序列融合, 以利于纯化。

5.2 EphA4 配体融合蛋白

本发明包括含有 EphA4 配体的融合蛋白的用途, 该配体例如, Ephrins A1、A2、A3、A4、A5、B2、及 B3、B61、AL1/RAGS、LERK4、Htk-L、及 Elk-L3, 或其配体片段, 该片断优选结合 EphA4 并引起 EphA4 信号的产生, 与异种试剂, 尤其是抗体的 Fc 区域重组融合或化学结合(包括共价和非共价结合)而产生融合蛋白(参见, 美国专利 5,116,964, Capan 和 Lasky)。异种试剂可以是多肽(或其一部分, 优选至少 10、至少 20、至少 30、至少 40、至少 50、至少 60、至少 70、至少 80、至少 90 或至少 100 个氨基酸的多肽), 核酸, 小分子(小于 1000 道尔顿), 或其他有机化合物。融合不必是直接的, 可通过连接序列来融合。使用本领域所知的方法, 这种融合蛋白可用于体内检测、治疗、控制或监测紊乱的进展。在优选实施方案中, 将 EphA4 配体融合蛋白用作 EphA4 激动剂。

5.3 预防/治疗方法

本发明包括用于治疗、预防或控制受试者中与 EphA4 过表达相关的疾病或紊乱和/或细胞高增生紊乱的方法, 优选是癌症, 包括给予一种或多种 EphA4 激发性抗体、或 EphA4 癌细胞表型抑制性抗体、或暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体、或结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 的 EphA4 的 EphA4 抗体, 优选是一种或多种单克隆(从其他单一抗体物种来源得到的抗体)EphA4 激发性抗体、或 EphA4 癌细胞表型抑制性抗体或暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体、或结合 K_{off} 小于 $3 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 的 EphA4 的 EphA4 抗体。在特定实施方案中, 待治疗、预防或控制的紊乱是恶性肿瘤。在另一个特定实施方案中, 待治疗、预防或控制的紊乱是恶化前的癌症。

在一个实施方案中，本发明的抗体可以与一种或多种用于治疗、预防或控制与 EphA4 过表达相关的疾病或紊乱，高增生紊乱和/或癌症的其他治疗性试剂组合给药。在某些实施方案中，一种或多种本发明的 EphA4 抗体与一种或多种用于治疗癌症的其他治疗性试剂同时给予至哺乳动物，优选是人。术语“同时”不限于将预防或治疗性试剂在准确的相同时间给予，还指，将本发明的 EphA4 抗体和其他试剂按顺序在一定时间间隔内给予至受试者，使得本发明的抗体能够与其他试剂一起起作用，从而比以其他方式给药产生更大的优点。例如，每种预防或治疗性试剂可以同时给予，或以任何顺序在不同时间点相继给予；然而，如果没有同时给予，它们应该及时充分地给予，从而提供所需的治疗或预防效果。每种治疗性试剂可以以任何适合的形式并通过任何适合的方案分别给予。在其他实施方案中，本发明的 EphA4 抗体在外科治疗之前、过程中或之后给予。优选地，外科治疗完全除去局部肿瘤或降低了大肿瘤的尺寸。外科治疗也可以作为预防性措施或用于减轻疼痛。

在另一个特定实施方案中，本发明的治疗和预防方法包括给予 EphA4 表达抑制剂，如但不限于，对 EphA4 具特异性的反义核酸，介导 RNAi 的双链 EphA4 RNA，抗 EphA4 核酶等(参见部分 5.5 *infra*)，或除了 EphA4 抗体之外的 EphA4 活性激动剂，如小分子 EphA4 活性抑制剂或激动剂。

在另一个实施方案中，一种或多种本发明的 EphA4 激动性试剂与一种或多种 EphA2 激动性试剂(参见，美国申请 10/436,783, Kinch 等人，2004 年 5 月 12 日申请)组合给予。

在各种实施方案中，预防或治疗性试剂给药的间隔时间小于 1 小时，为约 1 小时，为约 1 小时~约 2 小时，为约 2 小时~约 3 小时，为约 3 小时~约 4 小时，为约 4 小时~约 5 小时，为约 5 小时~约 6 小时，为约 6 小时~约 7

小时，为约7小时~约8小时，为约8小时~约9小时，为约9小时~约10小时，为约10小时~约11小时，为约11小时~约12小时，不超过24小时或不超过48小时。在优选实施方案中，两种或多种成分给药到同一受试患者。

术语治疗有效的和预防有效的表示了给药的剂量和频率。该剂量和频率通常还根据每个患者的特定因素而变化，这取决于用于给药的特异性治疗性或预防性试剂，癌症的严重程度和类型，给药方案，及患者的年龄、体重、反应和过往病史。本领域所属技术人员可以考虑上述因素并根据例如文献报道和 *Physician's Desk Reference* (56th ed., 2002) 中推荐的剂量选择适合的方案。

5.3.1 患者群

本发明提供了用于治疗、预防和控制与 EphA4 过表达相关的疾病或紊乱和/或细胞高增生细胞疾病的方法，优选是癌症，包括给予需要的受试者治疗或预防有效量的一种或多种本发明的 EphA4 抗体。在另一个实施方案中，本发明的 EphA4 抗体可以与一种或多种其他治疗性试剂组合给予。受试者优选是哺乳动物，如非灵长类(例如，牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)和灵长类(例如，猴子，如猕猴和人)。在优选实施方案中，受试者是人。

本发明方法治疗的特定癌症包括但不限于过表达 EphA4 的癌症。在另一个实施方案中，该癌是上皮起源的。这种癌的例子是肺、结肠、前列腺、乳腺及皮肤癌。其他癌包括膀胱和胰腺癌及肾脏细胞癌和黑素瘤。其他癌举例列出，并不限于部分 5.2.1.1。在特定实施方案中，本发明的方法可用于治疗和/或预防原发肿瘤的转移。

本发明的方法和组合物包括将一种或多种本发明的 EphA4 抗体给予患

有或将患有癌症的受试者/患者,例如,对特定型癌症具有基因易患病的体质,接触过致癌物质或从特定癌症康复的受试者/患者。本文中,"癌"指原发性或转移性癌。这种患者在之前可能进行过或未进行过癌治疗。本发明的方法和组合物可以用作第一次或第二次癌症治疗性试剂。本发明也包括治疗进行过其他癌治疗的患者,本发明的方法和组合物可在任何不利作用出现之前使用,或在忍受这些其他癌症治疗的过程中使用。本发明也包括给予一种或多种本发明的 EphA4 抗体以治疗或改善难于治疗患者症状的方法。在某些实施方案中,难于治疗的癌指,至少癌细胞的一些明显部分未被杀死或它们的细胞分裂未受抑制。对癌细胞是否难于治疗的测定可通过分析癌细胞治疗效果领域的任何公知方法在体内或体外进行,在本文中对"难于治疗"使用本领域可接受的含义。在各种实施方案中,如果癌细胞的数量没有显著降低或有所增加,那么癌症是难于治疗的。本发明也包括给予一种或多种 EphA4 激发性抗体以预防癌症在易患癌症的患者中开始和复发的方法。

在特定实施方案中,将本发明的 EphA4 抗体或降低 EphA4 表达的其他治疗给予对某些激素、放射和化学治疗性试剂具有不利耐药性或敏感性降低的癌细胞中,从而使癌细胞对这些试剂中的一种或多种再敏感,然后给予(或继续给予)以治疗或控制癌症,包括预防转移。在特定实施方案中,本发明的 EphA4 抗体被给予至细胞因子 IL-6 水平提高的患者,这种提高与对不同治疗方案(如化学治疗和激素治疗)的癌细胞耐药性发展有关。在另一个特定实施方案中,本发明的 EphA4 抗体被给予至患有乳腺癌的患者,而乳腺癌对它莫西芬治疗反应很低或用其难于治疗。在另一个特定实施方案中,本发明的 EphA4 抗体被给予至细胞因子 IL-6 水平提高的患者,这种提高与对不同治疗方案(如化学治疗和激素治疗)的癌细胞耐药性发展有关。

在可选的实施方案中，本发明提供了治疗患者癌症的方法，包括给予一种或多种本发明的 EphA4 抗体与任何其他治疗试剂至该患者，而该患者已被证实难于用其他治疗方法治疗且不再使用这些治疗方法。在某些实施方案中，用本发明方法治疗的患者是已经用化学治疗、放射治疗、激素治疗或生物治疗/免疫治疗来处理过的患者。其中，这些患者是难以治疗的患者和难以用现有癌症治疗方法治疗的患者。在其他实施方案中，该患者已经过治疗且不再有疾病活性，给予一种或多种本发明的激发性抗体来预防癌症复发。

在优选实施方案中，现有治疗是化学治疗。在特定实施方案中，现有治疗包括给予化学治疗试剂，包括但不限于，甲氨蝶呤，泰素，巯嘌呤，硫鸟嘌呤，羟基脲，阿糖胞苷，环磷酰胺，异环磷酰胺，亚硝基脲，顺铂，卡铂，丝裂霉素，达卡巴嗪(dacarbazine)，procarbazine，依托泊苷，campathecins，博来霉素，多柔比星，伊达比星(idarubicin)，柔红霉素，放线菌素 D，普卡霉素，米托蒽醌，天冬酰胺酶，长春碱，长春新碱，长春瑞宾(vinorelbine)，紫杉醇，多西他赛(docetaxel)等。这些患者是经过放射治疗、激素治疗和/或生物治疗/免疫治疗过的患者。这些患者是经过外科手术治疗过的患者。

可选择地，本发明也包括治疗正在进行或进行过放射治疗的患者的方法。这些患者正在用化学治疗，激素治疗和/或生物治疗/免疫治疗治疗，或已前用过它们来治疗。另外，这些患者是经过外科手术治疗过的患者。

在其他实施方案中，本发明包括治疗正在进行或进行过激素治疗和/或生物治疗/免疫治疗的患者的方法。这些患者正在用化学治疗和/或放射治疗进行治疗，或已前用过它们来治疗。这些患者是经过外科手术治疗过的患者。

此外，本发明也提供了作为代替化学治疗、放射治疗、激素治疗和/或生物治疗/免疫治疗来治疗癌症的方法，其中上述各种治疗已被证实或可能被证

实毒性过高，即对正在治疗的受试者产生不可接受或无法忍受的副作用。用本发明方法治疗的受试者可选择地同时用其他癌症治疗一起治疗，如外科手术治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗或生物治疗，这取决于哪种治疗被认为是不可接受或无法忍受的。

在其他实施方案中，本发明提供了给予一种或多种本发明的激动性单克隆抗体，而不需要其他任何癌症治疗方法来治疗癌症，该癌症证实难以用该治疗方法治疗。在特定实施方案中，难于用其他癌症治疗方法治疗的患者在没有进行癌症治疗的情况下给予一种或多种激动性单克隆抗体，。

在其他实施方案中，患有与过表达 EphA4 的细胞相关的恶化前癌症的患者可给予本发明的抗体，以治疗紊乱和降低发展成恶性肿瘤的可能性。在特定实施方案中，恶化前的癌症是进行性前列腺上皮内肿瘤(PIN)，乳腺的导管癌，或复合癌。

在其他实施方案中，本发明提供了治疗、预防和控制非癌高增生性细胞紊乱的方法，尤其是与 EphA4 过表达相关的紊乱，包括但不限于，哮喘，慢性阻塞性肺紊乱(COPD)，再狭窄(平滑肌和/或内皮)，牛皮癣等。这些方法包括与对上述治疗、预防和控制癌症的方法相似的方法，例如，给予本发明的 EphA4 抗体及抑制 EphA4 表达的试剂，组合治疗，给予难于用特定治疗方法治疗的患者等。

5.3.1.1. 癌

可以用本发明的方法和组合物治疗、预防或控制的癌症和相关紊乱包括但不限于上皮细胞起源的癌症。在优选实施方案中，癌是胰腺癌。这种癌的例子包括：白血病，如但不限于急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓

性白血病，如骨髓细胞、早幼粒细胞、骨髓单核细胞、单核细胞性及红细胞白血病和骨髓增生异常综合症；慢性白血病，如但不限于，慢性骨髓性(粒细胞)白血病，慢性淋巴细胞白血病，发状细胞性白血病；真性红血球增多症；淋巴瘤如但不限于何杰金氏病，非何杰金氏病；多发性骨髓瘤，如但不限于郁积多发性骨髓瘤，非分泌型骨髓瘤，骨硬化性骨髓瘤，浆细胞白血病，单一质浆细胞瘤和髓外质浆细胞瘤；Waldenstrom 巨球蛋白血症；意义未明的单克隆丙种球蛋白血症；良性单克隆丙种球蛋白血症；重链疾病；骨和结缔组织肉瘤，如但不限于骨质肉瘤，骨肉瘤，软骨肉瘤，尤文氏肉瘤，恶性巨细胞肿瘤，骨纤维肉瘤，脊索瘤，骨膜肉瘤，软组织肉瘤，血管肉瘤，纤维肉瘤，卡波氏肉瘤，平滑肌纤维肉瘤，脂肪肉瘤，淋巴管内皮细胞肉瘤，经鞘瘤，横纹肌肉瘤，滑液肉瘤；大脑肿瘤，如但不限于，神经胶质瘤，星细胞瘤，大脑干神经胶质瘤，室鼓膜瘤，寡树突胶质瘤，脑瘤，听神经瘤，颅咽管瘤，成神经管细胞瘤，脑膜瘤，松果瘤，松果母细胞瘤，原发性大脑淋巴瘤；乳腺癌包括但不限于腺癌，小叶性(小细胞)肺癌，导管内癌，髓质乳腺癌，粘液性乳腺癌，管状乳腺癌，乳头状乳腺癌，帕杰病，及炎症乳腺癌；肾上腺癌，如但不限于嗜铬细胞和肾上腺皮质癌；甲状腺癌，如但不限于乳头状或滤泡性甲状腺癌，髓质甲状腺癌和未分化甲状腺癌；胰腺癌，如但不限于，胰岛瘤，促胃液素瘤，胰升糖素瘤，舒血管肠肽瘤，生长激素抑制素分泌肿瘤，及良性肿瘤或胰岛细胞瘤；垂体癌，如但不限于库欣氏病(Cushing's disease)，泌乳刺激素分泌肿瘤，肢端肥大症，及尿崩症；眼癌，如但不限于眼黑素瘤，如虹膜黑素瘤，脉络膜骨黑素瘤，及睫状体黑素瘤，及成视网膜细胞瘤；阴道癌，如鳞状上皮细胞癌，腺癌，及黑素瘤；阴门癌，如鳞状上皮细胞癌，黑素瘤，腺癌，基细胞癌，肉瘤，及帕杰病；子宫颈

癌,如但不限于,鳞状上皮细胞癌,及腺癌;子宫癌,如但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤;卵巢癌,如但不限于,卵巢上皮癌,边界瘤,生殖细胞肿瘤,及胃肠道间质肿瘤;食道癌,如但不限于,鳞状上皮细胞癌,腺癌,淋巴组织癌,粘液表皮样癌,腺鳞状癌,肉瘤,黑素瘤,质浆细胞瘤,疣状癌,及燕麦细胞(小细胞)癌;胃癌,如但不限于,腺癌,蕈伞型(息肉型)的、溃疡性的、表面扩散的、分布扩散的,恶性淋巴瘤,脂肪肉瘤,纤维肉瘤,及癌肉瘤;结肠癌;直肠癌;肝癌,如但不限于肝细胞癌和肝母细胞瘤;胆囊癌,如腺癌;胆管癌,如但不限于乳头状,结节状,及扩散状;肺癌,如非小细胞肺癌,鳞状上皮细胞癌(表皮癌),空肠腺癌,大细胞癌和小细胞肺癌;睾丸癌,如但不限于生殖细胞瘤,精原细胞瘤,间变型,一般型(普通型),精母细胞型,非精原细胞瘤,胚胎癌,畸胎瘤,绒毛膜癌(卵黄囊肿瘤),前列腺癌,如但不限于,腺癌,平滑肌肉瘤,及横纹肌肉瘤;penal癌;口腔癌,如但不限于鳞状上皮细胞癌;基底癌;唾液腺癌,如但不限于腺癌,粘膜表皮癌,及增殖腺癌;咽癌,如但不限于鳞状上皮细胞癌,及疣状癌;皮肤癌,如但不限于,基底细胞癌,鳞状上皮细胞癌和黑素瘤,表面扩散黑素瘤,结节状黑素瘤,斑点恶性黑素瘤,肢端雀斑样黑素瘤;肾癌,如但不限于肾脏细胞癌,腺癌,肾上腺样瘤,纤维肉瘤,移行细胞癌(肾脏骨盆和/或子宫);魏氏肿瘤;膀胱癌,如但不限于移行细胞癌,鳞状上皮细胞癌,腺癌,癌肉瘤。此外,癌包括粘液肉瘤,骨源性肉瘤,内皮瘤,淋巴管内皮瘤,间皮瘤,滑膜瘤,成血管细胞瘤,上皮癌,乳头状囊腺癌,支气管肺癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌和乳头状腺癌(对于这种紊乱,请参见, Fishman 等人, 1985, *Medicine*, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia 和 Murphy 等人, 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis*,

Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., 美国)。

因此,本发明的方法和组合物也适用于治疗或预防各种癌症或其他异常性增生疾病,包括(但不限于)下述疾病:癌,包括膀胱、乳腺、结肠、肾、肝、肺、卵巢、胰腺、胃、子宫颈、甲状腺和皮肤;包括鳞状上皮细胞癌;淋巴系统的造血细胞肿瘤,包括白血病,急性淋巴细胞白血病,急性成淋巴细胞白血病,B细胞淋巴瘤,T细胞淋巴瘤,伯基特淋巴瘤;骨髓系统的造血细胞肿瘤,包括急性和慢性髓性白血病和前髓细胞白血病;间叶细胞样起源的肿瘤,包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤;其他肿瘤,包括黑素瘤,精原细胞瘤,teratocarcinoma,神经母细胞瘤和神经胶质瘤;中枢和外周神经系统的肿瘤,包括星细胞瘤,神经母细胞瘤,神经胶质瘤,及神经鞘膜瘤;间叶细胞样起源的肿瘤,包括纤维肉瘤,横纹肌肉瘤,及骨肉瘤;和其他肿瘤,包括黑素瘤,着色性干皮病,keratoactanthoma,精原细胞瘤,甲状腺卵泡癌和 teratocarcinoma。可以预期到,因细胞凋亡异常引起的癌症也可用本发明的方法和组合物治疗。这种癌症包括但不限于卵泡淋巴瘤,具有 p53 突变的癌,乳腺、前列腺和卵巢的激素相关的肿瘤,及癌症前期损害,如家族性大肠息肉症,及骨髓增生异常综合症。在特定实施方案中,治疗或预防皮肤、肺、结肠、乳腺、前列腺、膀胱、肾、胰腺、卵巢或子宫中的恶性或病态增生变化(如组织转化和发育异常),或高增生紊乱。在其他特定实施方案中,治疗或预防肉瘤、黑素瘤、或白血病。

在一些实施方案中,癌症是恶性的并过表达 EphA4。在其他实施方案中,癌症是恶化前的癌细胞并过表达 EphA4。在优选实施方案中,本发明的方法和组合物用于治疗 and/或预防乳腺、结肠、卵巢、肺、及前列腺癌和黑素瘤,并在下文中以举例的方式进行说明,但不起限制作用。

5.3.1.2. 乳腺癌的治疗

在特定实施方案中，患乳腺癌的患者被给予有效量的一种或多种本发明的单克隆抗体。在另一个实施方案中，本发明的抗体与有效量的一种或多种用于乳腺癌治疗的其他试剂组合给予，这些试剂包括但不限于：多柔比星，表柔比星，多柔比星和环磷酰胺(AC)的组合，环磷酰胺、多柔比星和5-氟尿嘧啶(CAF)的组合，环磷酰胺、表柔比星和5-氟尿嘧啶(CEF)、赫赛汀(herceptin)、它莫西芬的组合，它莫西芬和细胞毒性化学治疗、紫杉烷类(如多西他赛和紫杉醇)的组合。在另一个实施方案中，本发明的抗体可与紫杉烷类及标准多柔比星和环磷酰胺组合给予，来辅助治疗淋巴结阳性局部乳腺癌。

在特定实施方案中，患有恶化前导管癌的患者被给予本发明的 EphA4 抗体，来治疗紊乱并减少其发展成为恶性乳腺癌的可能性。

5.3.1.3. 结肠癌的治疗

在特定实施方案中，患有结肠癌的患者被给予有效量的一种或多种本发明的单克隆抗体。在另一个实施方案中，本发明的抗体可与有效量的一种或多种用于结肠癌治疗的其他试剂组合给予，这些试剂包括但不限于：5-FU 和亚叶酸的组合，5-FU 和左咪唑的组合，依立替康(CPT-11)或依立替康(irinotecan)、5-FU 和亚叶酸(IFL)的组合。

5.3.1.4. 前列腺癌的治疗

在特定实施方案中，患有前列腺癌的患者被给予有效量的一种或多种本发明的单克隆抗体。在另一个实施方案中，本发明的抗体可与有效量的一种

或多种用于前列腺癌治疗的其他试剂组合给予, 这些试剂包括但不限于: 体外放射治疗, 放射性同位元素(即, I^{125} 、钷、铀) 间质移植, 亮丙瑞林或其他 LHRH 激动剂, 非类固醇抗雄激素(氟他胺, 里奴内酰胺, 必卡他胺), 类固醇抗雄激素(醋酸环丙氯地酮酯), 亮丙瑞林和氟他胺的组合, 雌激素如 DES, 三对甲氧苯氯乙烯, 乙炔基雌二醇, 共轭雌激素 U.S.P., DES 二磷酸, 放射性同位元素如镭-89, 体外放射治疗和镭-89 的组合, 二线激素治疗剂如氨鲁米特, 氢化可的松, 氟他胺戒断药, 孕酮及酮康唑, 低剂量强的松, 或可使受试者在症状上有所改善且降低 PSA 水平的其他化学治疗方案, 包括多西他赛, 紫杉醇, 雌莫司汀/多西他赛, 雌莫司汀/依托泊苷(etoposide), 雌莫司汀/长春碱, 及雌莫司汀/紫杉醇。

在特定实施方案中, 对患有恶化前进行性前列腺上皮内肿瘤(PIN)的患者给药本发明的 EphA4 抗体来治疗紊乱并降低发展成恶性前列腺癌症的可能性。

5.3.1.5. 黑素瘤的治疗

在特定实施方案中, 患有黑素瘤的患者被给予有效量的一种或多种本发明的单克隆抗体。在另一个实施方案中, 本发明的抗体可与有效量的一种或多种用于黑素瘤癌症治疗的其他试剂组合给予, 这些试剂包括但不限于: 达卡巴嗪(DTIC), 亚硝基脲如双氯乙基亚硝脲(BCNU)和洛莫司汀(CCNU), 中度单试剂活性的试剂, 包括长春花生物碱, 铂化合物, 及紫杉烷类, Dartmouth 方案(顺铂, BCNU 及 DTIC), 干扰素 α (IFN-A)及白细胞介素-2 (IL-2)。在特定实施方案中, 有效量的一种或多种本发明的激动性单克隆抗体在有或没有肿瘤坏死因素- α (TNF- α)存在下, 可与高温隔离肢体灌注化疗(ILP)及苯丙酸

氮芥(L-PAM)组合给予至患有多重大脑转移瘤、骨转移瘤及脊髓压迫症的患者，以减轻症状和使放射治疗引起的肿瘤缩小。

在特定实施方案中，对患有恶化前复合痣的患者给予本发明的 EphA4 抗体来治疗紊乱并降低发展成恶性黑色素瘤的可能性。

5.3.1.6. 卵巢癌的治疗

在特定实施方案中，患有卵巢癌的患者被给予有效量的一种或多种本发明的单克隆抗体。在另一个实施方案中，本发明的抗体可与有效量的一种或多种用于卵巢癌症治疗的其他试剂组合给予，这些试剂包括但不限于：腹膜内的放射治疗，如 p^{32} 治疗，整个腹部和骨盆的放射治疗，顺铂，紫杉醇或多西他赛(Taxotere)和顺铂或卡铂的组合，环磷酰胺和顺铂的组合，环磷酰胺和卡铂组合，5-FU 和亚叶酸的组合，依托泊苷，脂质体多柔比星，吉西他滨(gemcitabine)或拓扑替康(topotecan)。可预期的是，有效量的一种或多种本发明的激动性单克隆抗体与紫杉醇组合给予至患有难于用铂治疗疾病的患者。治疗患有难治卵巢癌的患者包括：向患有难于用铂治疗的疾病的患者给予异环磷酰胺，在基于顺铂组合的治疗方案失败后用六甲基三聚氰胺(HMM)作为抢救性化学治疗，及向其肿瘤上含有可检测水平的细胞质雌激素受体的患者给它莫西芬予。

5.3.1.7. 肺癌的治疗

在特定实施方案中，患有小肺细胞癌症的患者被给予有效量的一种或多种本发明的单克隆抗体。在另一个实施方案中，本发明的抗体可与有效量的一种或多种用于肺癌治疗的其他试剂组合给予，该试剂包括但不限于：胸部放射治疗，顺铂，长春新碱，多柔比星，及依托泊苷，单独或组合的；环

磷酸胺，多柔比星，长春新碱/依托泊苷及顺铂(CAV/EP)的组合，用支气管内激光治疗、支气管内支架和/或近接治疗的局部缓解。

在其他特定实施方案中，患有非小肺细胞癌症的患者被给予有效量的一种或多种本发明的单克隆抗体及有效量的一种或多种用于肺癌治疗的其他试剂，其包括但不限于：减轻放射治疗，顺铂、长春碱和丝裂霉素的组合，顺铂和长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛或吉西他滨的组合，卡铂和紫杉醇的组合，支气管内病变的间质放射治疗或立体定向外科治疗。

5.3.2 其他预防/治疗性试剂

在一些实施方案中，通过给予一种或多种单克隆抗体的治疗与一种或多种治疗，如但不限于，化学治疗、放射治疗、激素治疗、和/或生物治疗/免疫治疗组合使用。预防/治疗性试剂包括但不限于蛋白性分子，包括但不限于肽、多肽、蛋白，包括翻译后经修饰的蛋白，抗体等；或小分子(小于 1000 道尔顿)，无机或有机化合物；或核酸分子，包括但不限于，双链或单链 DNA，或双链或单链 RNA，及三螺旋核酸分子。预防/治疗性试剂可源自于合成分子库的任何已知有机体(包括但不限于，动物、植物、细菌、真菌及原生生物，或病毒)。

在特定实施方案中，本发明的方法包括组合给予本发明的治疗性抗体与一种或多种预防/治疗性试剂，这些试剂是血管生成抑制剂，如但不限于：血管抑素(血浆酶原片段)；抗血管增生抗凝血酶 III；Angiozyme；ABT-627；Bay 12-9566；替尼芬；Bevacizumab；BMS-275291；源自软骨的抑制剂(CDI)；CAI；CD59 补充片段；CEP-7055；Col 3；康布瑞塔卡汀 A-4；血管内皮抑制素(胶原质 XVIII 片段)；纤维连结蛋白片段；Gro- β ；卤夫酮；肝脓肿；肝

磷脂六糖片段; HMV833; 人绒毛促性腺激素(hCG); IM-862; 干扰素 $\alpha/\beta/\gamma$; 干扰素诱导蛋白(IP-10); 白细胞介素-12; Kringle 5 (血浆酶原片段); 马立马司他; 金属蛋白酶抑制剂(TIMPs); 2-甲氧基雌二醇; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; 胎盘核糖核酸酶抑制剂; 血浆酶原催化剂抑制剂; 血小板因子-4 (PF4); Prinomastat; 泌乳刺激素 16kD 片段; 多育曲菌素-关联蛋白(PRP); PTK 787/ZK 222594; 类维生素 A; Solimastat; 角鲨胺; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; 四氢可的索-S; 四巯基钼酸盐; 萨利多胺; Thrombospondin-1 (TSP-1); TNP-470; 转换生长因子- β (TGF- β); 血管抑制素; 血管抑制因子(钙网蛋白片段); ZD6126; ZD6474; 法尼基转移酶抑制剂(FTI); 和二磷酸盐。

可用于本发明各种实施方案, 包括本发明的药物组合物、剂型和试剂盒的其他抗癌剂例子, 包括但不限于: 阿西维辛, 阿克拉霉素, 盐酸阿考达唑, 阿克罗宁, 阿多来新, 阿地白介素, 六甲蜜胺, 二霉素, 阿美萘醌醋酸盐, 氨基导眠能, 安吡啶, 阿那曲唑, 安曲霉素, 天冬酰胺酶, 曲林菌素, 阿扎胞苷, 阿扎替派, 含氮霉素, 巴马司他, 苯佐替派, 必卡他胺, 盐酸比生群, 二甲磺酸双奈法德, 比折来新, 硫酸博来霉素, 布喹那钠, 溴匹立明, 白消安, 放线菌素 C, 卡普萘酮, 卡醋胺, 卡贝替母, 卡铂, 卡氯芥, 盐酸卡柔比星, 卡折来新, 西地芬戈, 苯丁酸氮芥, 西罗霉素, 顺铂, 克拉屈滨, crisnatol mesylate, 环磷酰胺, 阿糖胞苷, 达卡巴嗪, 放线菌素 D, 盐酸柔红霉素, decarbazine, 地西他滨, 右奥马铂, 地扎胍宁, 甲磺酸地扎胍宁, 地吡醌, 多西他赛, 多柔比星, 盐酸多柔比星, 屈洛昔芬, 柠檬酸屈洛昔芬, 丙酸屈他雄酮, 偶氮霉素, 依达曲沙, 盐酸依氟鸟氨酸, 依沙芦星, 恩洛铂, 恩普氨酯, 依匹哌啶, 盐酸表柔比星, 厄布洛唑, 盐酸依索比星, 雌莫司汀,

磷酸盐雌莫司汀, 依他硝唑, 依托泊苷, 磷酸依托泊苷, etoprine, 盐酸法倔唑, 法扎拉滨, 芬维 A 胺, 氟尿苷, 磷酸氟达拉滨, 氟尿嘧啶, 氟西他滨, 磷喹酮, 福司曲星钠, 吉西他滨, 盐酸吉西他滨, 羟基脲, 盐酸伊达比星, 异环磷酰胺, 伊莫福新, 白细胞介素 2(包括重组白细胞介素 2, 或 rIL2), 干扰素 α -2a, 干扰素 α -2b, 干扰素 α -n1, 干扰素 α -n3, 干扰素 α -I a, 干扰素 γ -I b, 异丙铂, 盐酸依立替康, 醋酸兰瑞肽, 来曲唑, 醋酸亮丙瑞林, 盐酸利阿唑, 洛美曲索钠, 洛莫司汀, 盐酸洛索萘醌, 马索罗酚, 美登素, 盐酸氮芥, 醋酸甲地孕酮, 醋酸甲烯雌醇, 苯丙酸氮芥, 美诺立尔, 巯嘌呤, 甲氨蝶呤, 甲氨蝶呤钠, metoprine, 美妥替哌, 米丁度胺, mitocarcin, mitocromin, 米托洁林, 丝裂马菌素, 丝裂霉素, 米托司培, 米托坦, 盐酸米托萘醌, 麦考酚酸, 亚硝基脲, 诺考达唑, 诺加霉素, 奥沙利铂, 奥昔舒仑, 紫杉醇, 培门冬酶, 佩里霉素, 奈莫司汀, 硫酸派来霉素, 培磷酰胺, 哌泊溴烷, 哌泊舒凡, 盐酸吡罗萘醌, 普卡霉素, 普洛美坦, 吡非姆钠, 紫菜霉素, 泼尼莫司汀, 盐酸丙卡巴肼, 嘌呤霉素, 盐酸嘌呤霉素, 吡唑呋喃菌素, 利波腺苷, 罗谷亚胺, 沙芬戈, 盐酸沙芬戈, 司莫司汀, 辛曲秦, sparfosate sodium, 稀疏霉素, 盐酸锗螺胺, 螺莫司汀, 螺铂, 链黑菌素, 链佐星, 磺氯苯脲, 他利霉素, tecogalan sodium, 替加氟, 盐酸替洛萘醌, 替莫泊芬, 替尼泊苷, 替罗昔隆, 鞣内酪, thiamiprine, 硫鸟嘌呤, 塞替派, 噻唑呋啉, 替拉扎明, 柠檬酸托瑞米芬, 醋酸曲托龙, 磷酸曲西立滨, 三甲曲沙, 葡糖醛酸三甲曲沙, 曲普瑞林, 盐酸妥布氯唑, 乌拉莫司汀, 乌瑞替派, 伐普肽, 维替泊芬, 硫酸长春碱, 硫酸长春新碱, 长春地辛, 硫酸长春地辛, 硫酸长春匹定, 硫酸长春甘酯, 硫酸长春罗新, 酒石酸长春瑞宾, 硫酸长春罗定, 硫酸长春利定, 伏氯唑, 折尼铂, 净司他丁, 盐酸佐柔比星氢氯化物。其他抗癌症药物

包括但不限于: 20-epi-1,25 二羟基维生素 D₃,5-乙炔基尿嘧啶, 阿比特龙, 阿克拉霉素, 酰基富烯, adecyphenol, 阿多来新, 阿地白介素, ALL-TK 拮抗剂, 六甲蜜胺, 阿雌莫司汀, amidox, 阿米福汀, 氨基乙酰丙酸, 氨柔比星, 安吡啶, 阿那格雷, 阿那曲唑, 穿心莲内酯, 血管生成抑制剂, 拮抗剂 D, 拮抗剂 G, antarelix, 抗背部化形态发生蛋白-1, 抗雄激素, 抗雌激素, 肿瘤, aphidicolin glycinate, 细胞凋亡基因调节剂, 细胞凋亡调整器, 无嘌呤核酸, ara-CDP-DL-PTBA, 精氨酸脱氨基酶, asulacrine, 阿他美坦, 阿莫司汀, axinastatin 1, axinastatin 2, axinastatin 3, 阿扎司琼, azatoxin, 氮胸腺嘧啶, 浆果赤霉素 III 衍生物, balanol, 巴马司他, BCR/ABL 拮抗剂, benzochlorins, 苯甲酰基 staurosporine, β 内酰胺衍生物, β -alethine, β -clamycin B, 桦木酸, bFGF 抑制剂, 必卡他胺, 比生群, bisaziridinylspermine, 双奈法德, bistratene A, 比折来新, breflate, 溴匹立明, 布度钛, 丁基硫堇亚胺, 钙泊三醇, 钙磷酸蛋白 C, 喜树碱衍生物, 金丝雀疹 IL-2, 卡培他滨, 甲酰胺-氨基-三氮杂茂, 羧酰胺三唑, CaRest M3, CARN 700, 源自软骨的抑制剂, 卡折来新, 干酪素激酶抑制剂(ICOS), 栗树精胺, cecropin B, 西曲瑞克, 氯喹啉磺胺药物, 西卡前列素, 顺式卟啉, 克拉屈滨, 克罗米芬类似物, 克霉唑, collismycin A, collismycin B, 康布瑞塔卡汀 A4, 康布瑞塔卡汀类似物, conagenin, crambescidin 816, crisnatol, cryptophycin 8, cryptophycin A 衍生物, curacin A, 环戊噻酮, cycloplata, cypemycin, 阿糖胞苷 ocfosphate, 细胞因子, cytostatin, 达昔单抗, 地西他滨, 脱氢膜海鞘素 B, 地洛瑞林, 地塞米松, 右异环磷酰胺, 右雷佐生, 右维拉帕米, 地吡酮, didemnin B, didox, 二乙基 norspermine, 二氢-5-氮杂胞啶, 二氢紫杉醇, dioxamycin, 苯基苯螺莫司汀, 多西他赛, 二十二烷醇, 多拉司琼, 去氧氟尿苷, 屈洛昔

芬, 屈大麻酚, duocarmycin SA, 依布硒啉, 依考莫司汀, 依地福新, 依决洛单抗, 依氟鸟氨酸, 榄香烯, 乙嘧替氟, 表柔比星, 爱普列特, 雌莫司汀类似物, 雌激素激动剂, 雌激素拮抗剂, 依他硝唑, 依托泊苷磷酸盐, 依西美坦, 法倔唑, 法扎拉滨, 芬维 A 胺, 非格司亭, 非那雄胺, flavopiridol, 氟卓斯汀, fluasterone, 氟达拉滨, 盐酸 fluorodaunorunicin, 福酚美克, 福美斯坦, 福司曲星, 福莫司汀, 德叶啉钆, 硝酸镓, 加洛他滨, 加尼瑞克, 白明胶酶抑制剂, 吉西他滨, 谷胱甘肽抑制剂, hepsulfam, heregulin, 环己双乙酰胺, 金丝桃素, 伊班膦酸, 伊达比星, 艾多昔芬, 伊决孟酮, 伊莫福新, 伊洛马司他, 咪唑并吡啶酮, 咪喹莫特, 免疫刺激肽, 类胰岛素生长因子-1 受体抑制剂, 干扰素激动剂, 干扰素, 白细胞介素, 碘苄胍, 碘代多柔比星, 蕃薯宁, 伊罗普拉, 伊索拉定, isobengazole, isohomohalicondrin B, 伊他司琼, jasplakinolide, kahalalide F, 层状素-N 三醋酸基的, 兰瑞肽, leinamycin, 来格司亭, 硫酸蘑菇多糖, leptolstatin, 来曲唑, 白血病抑制因素, 白细胞 α 干扰素, 亮丙瑞林+雌激素+黄体酮, 亮丙瑞林, 左咪唑, 利阿唑, 线性聚胺类似物, 亲脂性二糖肽, 亲脂性铂化合物, lissoclinamide 7, 洛铂, 蚯蚓磷脂, 洛美曲索, 氯尼达明, 洛索萘醌, 洛伐他汀, 洛索立宾, 勒托替康, 德叶啉钆, lysofylline, 溶解肽, 美坦辛, mannostatin A, 马立马司他, 马索罗酚, maspin, matrilysin 抑制剂, 基质金属蛋白酶抑制剂, 美诺立尔, 麦尔巴隆, meterelin, methioninase, 灭吐灵, MIF 抑制剂, 米非司酮, 米替福新, 米立司亭, 不匹配双链 RNA, 米托胍脘, 二溴卫矛醇, 丝裂霉素类似物, 米托蒽胺, mitotoxin 纤维原细胞生长因子-saporin, 米托萘醌, 莫法罗汀, 莫拉司亭, 单克隆抗体, 人绒毛促性腺激素, 单磷酸基油脂 A+乳酸分支杆菌细胞壁 sk, 莫哌达醇, 多耐药性基因抑制剂, 多肿瘤抑制剂 1

基治疗, 芥子气抗癌试剂, 印度洋海绵 B, 分枝杆菌细胞壁提取物, myriaporone, N-乙酰基地那林, N-替代苯甲脒, 那法瑞林, nagrestip, 纳洛酮+戊唑辛, napavin, naphterpin, 那托司亭, 奈达铂, 奈莫柔比星, 奈立膦酸, 中性肽链内切酶, 里奴内酰胺, nisamycin, 氮氧化物调节剂, 硝基氧抗氧化物, nitrullyn, O6-苄基鸟嘌呤, 奥曲肽, okicenone, 寡核苷酸, 奥纳司酮, 恩丹西酮, 恩丹西酮, oracin, 口服细胞因子诱导剂, 奥沙利铂, 奥沙特隆, 奥沙利铂, oxaunomycin, 紫杉醇, 紫杉醇类似物, 紫杉醇衍生物, palauamine, palmitoyl 利索新, 帕米膦酸, 人参三醇, 帕诺米芬, parabactin, 帕折普汀, 培门冬酶, peldesine, 戊聚糖聚硫酸钠, 喷司他丁, pentrozone, 全氟溴烷, 培磷酰胺, 芥子醇, phenazinomycin, 乙酸苯酯, 磷酸酶抑制剂, picibanil, 盐酸匹鲁卡品, 吡柔比星, 吡曲克辛, placetin A, placetin B, 血浆酶原活化抑制剂, 合成铂, 铂化合物, 合成铂-三胺, 叶非姆钠, 甲基丝裂霉素, 强的松, 丙烷基二度-吡啶酮, 前列腺素 J2, 蛋白解体抑制剂, 蛋白 A 基免疫调节剂, 蛋白激酶 C 抑制剂, 蛋白激酶 C 抑制剂, 微藻, 蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂, 嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂, 红紫素, 吡唑并吡啶, pyridoxylated 血色素聚氧化乙烯结合物, raf 拮抗剂, 雷替曲塞, 雷莫司琼, ras 法尼基蛋白转移酶抑制剂, ras 抑制剂, ras-GAP 抑制剂, 脱甲基的 retelliptine, 依替膦酸钠 Re 186, 利索新, 核酶, RII 视黄酰胺, 罗谷亚胺, rohitukine, 罗莫肽, 罗喹美克, rubiginone B1, ruboxyl, 沙芬戈, saintopin, SarCNU, sarcophytol A, sargramostim, Sdi 1 模拟药, 司莫司汀, 衰老源自抑制剂 1, 正义寡核苷酸, 信号转导抑制剂, 信号转导调节剂, 单链抗原结合蛋白, 西佐喃, 索布佐生, 硼卡钠, 苯基乙酸钠, solverol, 生长调节素结合蛋白, 索纳明, 斯帕福斯酸, spicamycin D, 螺莫司汀, splenopentin, 天

然物质海绵素 1, 角鲨胺, 干细胞抑制剂, 干细胞分离抑制剂, stipiamide, 基质溶解酶抑制剂, sulf 次黄苷, 超活性血管活性的肠肽拮抗剂, suradista, 苏拉明, 苦马豆素, 合成粘多糖, 他莫司汀, 它莫西芬甲碘化物, 牛磺莫司汀, 紫杉醇, tazarotene, tecogalan 钠, 替加氟, tellurapyrylium, 端粒酶抑制剂, 替莫泊芬, 替莫唑胺, 替尼泊昔, 四氯癸烷氧化物, tetrazomine, thaliblastine, 撒利多胺, thiocoraline, 硫鸟嘌呤, 血小板生成素, 血小板生成素模拟物, 胸腺法新, 促胸腺生成素受体激动剂, 胸腺曲南, 甲状腺刺激性激素, 初乙基卟啉锡, 替拉扎明, 二茂钛二氧化物, topsentin, 托瑞米芬, 全能干细胞因素, 转换抑制剂, 维 A 酸, 三乙酰基尿苷, 曲西立滨, 三甲曲沙, 曲普瑞林, 托烷司琼, 妥罗雄豚, 酪氨酸激酶抑制剂, tyrphostins, UBC 抑制剂, 乌苯美司, 尿生殖窦性的生长抑制性因子, 尿激酶受体拮抗剂, 伐普肽, variolin B, 载体系统, 红血球基因治疗, 维拉雷琐, veramine, verdins, 维替泊芬, 长春瑞宾, vinxaltine, vitaxin, 伏氯唑, 扎诺特隆, 折尼铂, 亚苡维 C, 及净司他丁斯酯。优选的抗癌症药物为 5-氟尿嘧啶和亚叶酸。

在更特定实施方案中, 本发明还包括给予一种或多种本发明的单克隆抗体及给予一种或多种治疗剂, 如但不限于如表 1 中所述的抗癌试剂, 优选是治疗如前所述的乳腺、卵巢、黑素瘤、前列腺、结肠和肺癌。

表 1

治疗性试剂	给予	剂量	用药时间间隔
盐酸多柔比星(阿霉素 RDF [®] 和阿霉素 PFS [®])	静脉内	第 1 天 60-75 mg/m ²	21 天间隔
盐酸表柔比星 (Ellence [™])	静脉内	每个周期的第 1 天 100-120 mg/m ² 或在每个周期的第 1-8 天分次同量给予	3-4 周循环
氟尿嘧啶	静脉内	怎样供应: 5 ml 和 10 ml 小瓶(分别含有 250 和 500 mg 氟尿嘧啶)	
多西他赛	静脉内	1 小时内 60-100 mg/m ²	每 3 周一次

(Taxotere [®])			
紫杉醇 (Taxol [®])	静脉内	3 小时内 175 mg/m ²	每 3 周 4 次(相继给予含有阿霉素的化学治疗组合)
它莫西芬柠檬酸盐 (Nolvadex [®])	口服 (片剂)	20-40 mg 大于 20 mg 的剂量应分次给予(早上或晚上)	每日
亚叶酸钙, 注射	静脉内或肌肉内 注射	怎样供应: 350 mg 小瓶	剂量不清楚 PDR 3610
luprolide 醋酸盐 (Lupron [®])	单次皮下注射	1 mg (0.2 ml 或 20 单位)	一天一次
氟他胺 (Eulexin [®])	口服(胶囊)	250 mg(每个胶囊包括 125 mg 氟他胺)	一天 3 次, 间隔 8 小时(总日剂量 750 mg)
里奴内酰胺 (Nilandron [®])	口服 (片剂)	300 mg 或 150 mg(每一片包括 50 或 150 mg 里奴内酰胺)	一天一次 300 mg 达 30 天, 然后一天一次 150 mg
必卡他胺 (Casodex [®])	口服 (片剂)	50 mg(每一片包括 50 mg 必卡他胺)	一天一次
黄体酮	注射	USP 在麻油中, 50 mg/ml	
酮康唑 (Nizoral [®])	霜剂	根据不同症状日敷 2% 霜剂一次或二次	
强的松	口服 (片剂)	根据被治疗的特定疾病实体, 每天开始剂量为 5 mg-60 mg	
雌莫司汀磷酸钠 (Emcyt [®])	口服 (胶囊)	14 mg/kg 体重(对 10 kg 或 22 lb 体重给予一个 140 mg 胶囊)	每天给予 3 或 4 次分剂量
依托泊苷或 VP-16	静脉内	5 ml 溶液(20 mg/ml) (100 mg)	
达卡巴嗪 (DTIC-Dome [®])	静脉内	2-4.5 mg/kg	一天一次达 10 天。 以 4 周的间隔进行重复
带有卡氯芥移植物的聚苯丙生 20(Gliadel [®])	晶片置于切除腔中	如果切除腔的大小和形状允许, 那么可以有 8 个晶片, 每个含有 7.7mg 卡氯芥, 总共 61.6 mg	
顺铂	注射	怎样供应: 1 mg/ml 溶液, 在 50mL 和 100mL 的多剂量小瓶中	
丝裂霉素	注射	在 5 mg 和 20 mg 小瓶中供应(含有 5 mg 和 20 mg 丝裂霉素)	
吉西他滨 HCl (Gemzar [®])	静脉内	对于 NSCLC-研究了 2 个方案, 没有找到最佳方案 4 周方案-静脉内给予 1000 mg/m ² , 30 分钟内 3 周方案-静脉内给予 Gemzar, 1250 mg/m ² , 30 分钟内	4 周方案-每 28 天周期的第 1、8 和 15 天。在灌输 Gemzar 后的第 1 天, 静脉内给予顺铂 100 mg/m ² 。 3 周方案-每 21 天周期的第 1 和 8 天。在给予 Gemzar 后的第 1 天, 静脉内给予顺

			铂 100 mg/m ² 。
卡铂 (Paraplatin [®])	静脉内	单试剂治疗: 在第1天, 360 mg/m ² I.V. (灌 输持续 15 分钟或更久) 其他剂量计算: 与环磷酰胺的组合治疗, 剂 量调整建议, 制剂剂量, 等	每 4 周
异环磷酰胺 (Ilex [®])	静脉内	每天 12 g/m ²	连续 5 天, 每 3 周重复, 或 从血液毒性恢复后
盐酸拓扑替康 (Hycamtin [®])	静脉内	每天静脉内灌输 30 分钟, 1.5 mg/m ²	连续 5 天, 在 21 天周期的 第 1 天开始

本发明还包括给予本发明的 EphA4 抗体及放射治疗, 包括使用 x-射线, γ 射线和其他破坏癌细胞的放射源。在优选实施方案中, 该放射治疗作为外部放射或远距放射治疗, 其中该放射直接从远程源导入。在其他优选实施方案中, 该放射治疗作为内部治疗或近接治疗, 其中放射源被置于体内部, 接近癌细胞或肿瘤部分。

癌症治疗和其剂量, 给予方法和推荐的使用方法在本领域是公知的, 且在 Physician's Desk Reference 中有所描述(第 56 版, 2002)。

5.4 本发明抗体的识别

5.4.1 激发性抗体

本发明的抗体优选激动(即, 引发 EphA4 磷酸化)并免疫特异性结合 EphA4 受体。当被激动时, EphA4 磷酸化 75 kDa EphA4 关联蛋白, 且其本身可被磷酸化, 然后分解。本领域公知的分析 EphA4 或 75 kDa EphA4 关联蛋白的磷酸化、活性、或表达的任何方法都可用于分析候选的 EphA4 抗体, 来测定其激动活性(参见, 例如, 下文的 6.2 部分)。

5.4.2 优选结合在癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位的抗体

本发明的抗体优选结合 EphA4 抗原决定部位, 该抗原结合部位暴露在癌细胞(例如, 过表达 EphA4 的细胞和/或带有不与配体结合的 EphA4 的细胞)而不是非癌细胞或其中的 EphA4 与配体结合的细胞上。在该实施方案中, 本发明的抗体是不在非癌细胞上而在癌细胞上暴露的 EphA4 抗原决定部位的抗体。

本领域公知的用于检测候选 EphA4 抗体在细胞上的结合/定位的任何方法都可用来筛选候选的具有理想结合属性的抗体。在一个实施方案中, 用免疫荧光显微镜来检测抗体的结合属性。可以用标准技术来比较抗体与体外生长的细胞的结合。在特定实施方案中, 将与癌细胞结合的抗体与结合于非癌细胞的抗体进行比较。暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体与非癌细胞结合较差, 但与癌细胞结合较好。在另一个特定实施方案中, 将与解离的非癌细胞(例如, 用钙螯合剂(如 EGTA)处理)结合的抗体与结合于未解离的非癌细胞的抗体进行比较。暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体与未解离的非癌细胞结合较差, 但与解离的非癌细胞结合较好。

在另一个实施方案中, 用流式细胞仪检测抗体的结合特性。在该实施方案, EphA4 可与其配体交联或不交联。暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体与交联的 EphA4 结合较差, 但与未交联的 EphA4 结合较好。

在另一个实施方案中, 用 cell-based 或免疫测定法来检测抗体的结合特征。在该实施方案中, 可用与 EphA4 配体(例如, Ephrins A1、A2、A3、A4、A5、B2 及 B3、B61、AL1/RAGS、LERK4、Htk-L 及 Elk-L3)竞争结合 EphA4 的抗体来代替 EphA4 配体。在这种分析中用到的 EphA4 配体可以是可溶解的蛋白(例如, 重组表达的)或在细胞上表达, 从而锚定到该细胞上。

5.4.3 癌细胞表型抑制性抗体

本发明的抗体可优选抑制(且优选是降低)例如软琼脂中的癌细胞克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成并免疫特异性结合 EphA4 受体。本领域所属技术人员可以分析候选 EphA4 抗体抑制这种行为的能力(参见,例如,见下文 6.3 部分)。悬浮于软琼脂的转移性肿瘤细胞形成克隆,而良性肿瘤细胞则不形成克隆。可以分析软琼脂中的克隆形成,如 Zelinski 等人描述的(2001, *Cancer Res.* 61: 2301-6, 在此引其全部内容作为参考)。需要分析其激动活性的抗体可以包含在底部和顶部琼脂溶液中。转移性肿瘤细胞可以在软琼脂中悬浮,并可以生长。EphA4 癌细胞表型抑制性抗体将抑制克隆形成。

转移性细胞的另一种特异性行为可用来识别癌细胞表型抑制性抗体,这种形为是在三维微环境中如 MATRIGEL™ 中的管状网络形成。通常,癌细胞迅速组装到管状网络中,然后快速占据全部 MATRIGEL™。在存在 EphA4 癌细胞表型抑制性抗体的情况下,癌细胞组装成球状结构,这与分化的非癌细胞的行为相似。因此, EphA4 癌细胞表型抑制性抗体可通过其抑制癌细胞管状网络形成的能力而得到识别。

用于检测细胞增生接触抑制增大的任何其他方法(例如,在单层细胞培养中克隆形成的降低)也可用来识别癌细胞表型抑制性抗体。

除了抑制癌细胞克隆形成外,当将癌细胞表型抑制性抗体加到已经形成的癌细胞克隆中时,通过杀死细胞,例如,通过坏死或细胞凋亡,还可降低克隆或除去克隆。分析坏死和细胞凋亡的方法在本领域是公知的。

5.4.4 低 K_{off} 速率的抗体

本发明的单克隆抗体对 EphA4 或其片段的结合亲和力及单克隆抗体-EphA4 相互作用的解离速率可通过竞争性结合分析来确定。竞争性结合分析的一个例子是放射免疫测定法，包括用目标单克隆抗体孵育标记的 EphA4(例如， ^3H 或 ^{125}I)，同时提高未标记的 EphA4 的量，并检测与标记的 EphA4 结合的单克隆抗体。单克隆抗体对 EphA4 的亲和力及结合解离速率可通过斯卡查德点分析得到的数据来确定。与第二种单克隆抗体的竞争也可以用放射免疫测定法来测定。在这种情况下中，用与标记的 EphA4(例如， ^3H 或 ^{125}I)结合的单克隆抗体孵育 EphA4，同时提高第二种未标记的单克隆抗体的量。

在优选实施方案中，可以使用本领域公知的任何基于表面电浆共振的分析方法来分析候选的 EphA4 抗体，表征 EphA4-EphA4 抗体相互作用的动力学参数。在本发明中可以使用任何可从商业上得到的 SPR 仪器，包括但不限于，BIACORE 仪器，从 Biacore AB (Uppsala, Sweden)得到；IASys 仪器，从 Affinity Sensors (Franklin, MA.)得到；IBIS 系统，从 Windsor Scientific Limited (Berks, UK)得到，SPR-CELLIA 系统，从 Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japan)得到，及 SPR Detector Spreeta，从 Texas Instruments (Dallas, TX)得到。对于基于 SPR 的技术，请参考 Mullet 等人，2000, *Methods* 22: 77-91；Dong 等人，2002, *Review in Mol. Biotech.*, 82: 303-23；Fivash 等人，1998, *Current Opinion in Biotechnology* 9: 97-101；Rich 等人，2000, *Current Opinion in Biotechnology* 11: 54-61；在此引入这些文献的全部内容作为参考。此外，美国专利 6,373,577、6,289,286、5,322,798、5,341,215、6,268,125 中所述的用于测量蛋白-蛋白相互作用的任何 SPR 仪器和基于 SPR 的方法都可用在本发明方法中，在此引用这些专利的全部内容作为参考。

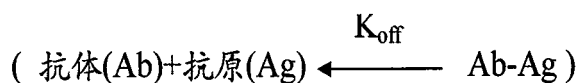
简而言之,基于 SPR 的分析包括将结合对的一个组分固定在表面上,并监控其在溶液中与该结合对的另一组分的相互作用。SPR 基于测量在配合物形成或解离时表面附近发生的溶剂的折射率改变。进行固定的表面是传感器芯片,其是 SPR 技术的核心所在;其由包被一薄层金的玻璃表面组成,并形成多种特异性表面的基底,该特异性表面设计用来优化分子与表面的结合。各种传感器芯片可从商业上得到,具体地是从上文所列出的公司处得到,它们都可用于本发明的方法。传感器芯片的例子包括 BIAcore AB, Inc.所提供的传感器芯片,例如,传感器芯片 CM5、SA、NTA 及 HPA。本发明的分子可使用本领域公知的任何固定方法和化学方法固定到传感器芯片表面,包括但不限于通过胺基团直接共价结合,通过巯基直接共价连接,与抗生物素蛋白涂覆表面的生物素粘附,与碳水化合物的乙醛连接及用 NTA 芯片通过组氨酸标签粘附。

在另一优选的实施方案中, BIACORE™ 动力学分析被用于测定单克隆抗体对 EphA4 的结合或解离速率(参见,例如,下文的 6.5 部分)。BIACORE™ 动力学分析包括用固定在芯片表面上的 EphA4 或其片段分析单克隆抗体与芯片的结合和解离。

一旦收集了一组完整的数据,就可以使用供应商 BIAcore, Inc.(Piscataway, NJ)提供的计算机算法生成结合曲线。这些算法用于计算 K_{on} 和 K_{off} , 表观平衡结合常数 K_D 推导为两个速率常数的比(即 K_{off}/K_{on})。对各速率常数的更多详细处理公开于 BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)中。可以使用本领域公知的任何方法对产生的数据进行分析。对生成的动力学数据的各种解释方法可以参考 Myszka, 1997, *Current Opinion in Biotechnology* 8: 50-7; Fisher 等人, 1994, *Current Opinion*

in *Biotechnology* 5: 389-95; O'Shannessy, 1994, *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 65-71; Chaiken 等人, 1992, *Analytical Biochemistry*, 201: 197-210; Morton 等人, 1995, *Analytical Biochemistry* 227: 176-85; O'Shannessy 等人, 1996, *Analytical Biochemistry* 236: 275-83; 在此引用其全部内容作为参考。

免疫特异性结合 EphA4 的抗体优选其 K_{off} 速率



小于 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-3} s^{-1} , 小于 10^{-4} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-5} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-6} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-7} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-8} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, 小于 10^{-9} s^{-1} , 小于 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, 或小于 10^{-10} s^{-1} 。

因此, 本发明提供分析和筛选本发明的 EphA4 抗体的方法, 包括用表达 EphA4 的细胞, 尤其是癌细胞, 优选是过表达 EphA4 的转移癌细胞(相对于同种细胞型的非癌细胞而言)孵育特异性结合 EphA4 的抗体, 尤其是结合 EphA4 的细胞外区域的抗体, 然后通过例如免疫荧光(对于暴露的 EphA4 抗原决定部位抗体)分析与非癌细胞相比, EphA4 磷酸化的增长和/或 EphA4 的分解(对于激发性抗体), 或软琼脂中克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中管状网络形成的降低(对于癌细胞表型抑制性抗体), 或与癌细胞结合的抗体增加, 从而识别本发明的 EphA4 抗体。

5.5 核酸分子

除了本发明的 EphA4 抗体外, 对 EphA4 有特异性的核酸分子也可用于降低 EphA4 表达, 从而用于本发明方法中。

5.5.1 反义

本发明包括反义核酸分子，即与编码 EphA4 的有义核酸的全部或部分互补的分子，例如，与双链 cDNA 分子的编码链互补或与 mRNA 序列互补。因此，反义核酸可与有义核酸通过氢键结合。反义核酸可互补于整个编码链，或仅与其一部分互补，例如，与蛋白编码区域(或开放阅读框)的全部或部分互补。反义核酸分子可以反义于编码本发明多肽的核苷酸序列的编码链的全部或部分非编码区。非编码区("5'和 3'非翻译区")是 5'和 3'序列，其与编码区侧翼连接但不翻译成氨基酸。

反义寡核苷酸的长度可以是例如约 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个核苷酸。本发明的反义核酸可以通过使用本领域公知的工艺通过化学合成和酶连反应制备。例如，反义核酸(例如，反义寡核苷酸)可使用天然核苷酸或经各种修饰的核苷酸来化学合成，该修饰的核苷酸设计来增强分子的生物稳定性或提高反义和有义核酸之间形成的双链的物理稳定性，例如，可使用硫代磷酸衍生物和吡啶取代的核苷酸。可用于产生反义核酸的修饰的核苷酸的例子包括 5-氟尿嘧啶，5-溴尿嘧啶，5-氯尿嘧啶，5-碘尿嘧啶，次黄嘌呤，黄嘌呤，4-乙酰基胞核嘧啶，5-(羧羟基甲基)尿嘧啶，5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷，5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶，二氟尿嘧啶， β -D-半乳糖基 Q 核苷，次黄苷，N6-异戊烯基腺嘌呤，1-甲基鸟嘌呤，1-甲基次黄苷，2,2-二甲基鸟嘌呤，2-甲基腺嘌呤，2-甲基鸟嘌呤，3-甲基胞核嘧啶，5-甲基胞核嘧啶，N6-腺嘌呤，7-甲基鸟嘌呤，5-甲基氨基甲基尿嘧啶，5-甲氧基氨基甲基-2-硫脲嘧啶， β -D-甘露糖基 Q 核苷，5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶，5-甲氧基尿嘧啶，2-甲基硫代-N6-异戊烯基腺嘌呤，尿嘧啶-5-氧化乙酸(v)，

wybutoxosine, 假尿嘧啶, Q 核苷, 2-硫代胞核嘧啶, 5-甲基-2-硫脲嘧啶, 2-硫脲嘧啶, 4-硫脲嘧啶, 5-甲基尿嘧啶, 尿嘧啶-5-氧化乙酸甲基酯, 尿嘧啶-5-氧化乙酸(v), 5-甲基-2-硫脲嘧啶, 3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶, (acp3)w, 及 2,6-二氨基嘌呤。可选择地, 可以使用在反义方向上(即, 从插入的核酸转录的RNA相对于目标核酸即EphA4是反义方向的)亚克隆有核酸的表达载体来生物制备反义核酸。

本发明的反义核酸分子通常被给予至受试者或在原位产生, 从而使它们与编码本发明所选多肽的细胞 mRNA 和/或基因组 DNA 杂交或结合, 从而抑制表达, 例如通过抑制转录和/或翻译而抑制表达。通过常规核苷酸互补杂交可以形成稳定的双链, 或例如反义核酸分子通过在双螺旋主沟中的特异性相互作用与 DNA 双链结合。给予本发明反义核酸分子的方案的例子包括在组织位点直接注射。可选择地, 反义核酸分子可修饰成以所选细胞为靶, 然后系统性给药。例如, 为了系统性给药, 可以对反义分子进行修饰, 从而使它们特异性结合所选细胞表面上的受体或表达的抗原, 例如, 将反义核酸分子与与细胞表面受体或抗原结合的肽或抗体连接。也可以使用本文所述的载体将反义核酸分子运输至细胞。为了使反义分子具有足够的细胞内浓度, 其中的反义核酸分子受控于强 pol II 或 pol III 启动子的载体构建体是优选的。

本发明的反义核酸分子可以是 α -端异构性核酸分子。 α -端异构性核酸分子与互补的 RNA 形成特异性双链杂交, 其中, 与常规 β -单元相反, 各链彼此平行(Gaultier 等人, 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 6625)。反义核酸分子还包括 2'-o-甲基核糖核苷酸(Inoue 等人, 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 6131)或嵌合的 RNA-DNA 类似物(Inoue 等人, 1987, *FEBS Lett.* 215: 327)。

5.5.2 核酶

本发明还包括核酶。核酶是具有核糖核酸酶活性的催化性 RNA 分子，其能够裂解具有互补区域的单链核酸，如 mRNA。因此，核酶(例如，锤头状的核酶；在 Haselhoff 和 Gerlach, 1988, *Nature* 334: 585-591 中有描述)可用于催化性裂解 mRNA 转录物，从而抑制该 mRNA 编码蛋白的翻译。基于 EphA4 的核苷酸序列，可以设计对编码 EphA4 的核酸分子具有特异性的核酶。例如，可以构造 *Tetrahymena* L-19 IVS RNA 的衍生物，其中的活性位点的核苷酸序列与裂解的核苷酸序列互补，这公开于美国专利 4,987,071 和 5,116,742 中。可选择地，编码本发明多肽的 mRNA 可用于从 RNA 分子库中选择具有特异性核糖核酸酶活性的催化性 RNA。参见，例如，Bartel 和 Szostak, 1993, *Science* 261: 1411。

5.5.3 RNA 干扰

在某些实施方案中，RNA 干扰(RNAi)分子用于降低 EphA4 表达。RNA 干扰(RNAi)定义为双链 RNA(dsRNA)抑制与其自身序列相应的基因表达的能力。RNAi 也称为转录后基因沉默机制或 PTGS。因为只有通常在细胞的细胞质中发现的 RNA 分子是单链 mRNA 的分子，所以细胞含有识别并将 dsRNA 切成含有 21-25 个碱基对的片段的酶(约两圈双螺旋，并称作小干扰 RNA 或 siRNA)。片段的反义链与有义链分离的足够开，从而使反义链可以与内生细胞 mRNA 分子上的互补有义序列杂交。该杂交引发双链区域中的 mRNA 切割，从而破坏其翻译成多肽的能力。通过引入与特定基因相应的 dsRNA，从而可以破坏特定组织和/或选定时间的细胞本身的基因表达。

双链(ds)RNA 可用于干扰哺乳动物中的基因表达(Wianny &

Zernicka-Goetz, 2000, *Nature Cell Biology* 2: 70-75; 在这里引入其全部内容作为参考)。dsRNA 用作抑制剂性 RNA 或 EphA4 功能性 RNAi, 以得到与零突变的 EphA4 相同的表型(Wianny & Zernicka-Goetz, 2000, *Nature Cell Biology* 2: 70-75)。

5.6 治疗或预防作用的表征和证实

本发明的预防和/或治疗方案的毒性和效果可以通过标准药理学方法在细胞培养物或实验室动物中测定, 例如, 测定 LD₅₀ (50%的致死剂量)和 ED₅₀ (50%的有效治疗剂量)。毒性和治疗效果的剂量比是治疗指数, 可以表达成 LD₅₀/ED₅₀。表现出较大治疗指数的预防和/或治疗性试剂是优选的。尽管可以使用具有毒性副作用的预防和/或治疗性试剂, 但是应该小心设计输送系统, 以将这种试剂输送至受影响的组织位点, 从而使未受感染的细胞的可能损害达到最小化, 因而降低副作用。

细胞培养分析和动物研究中得到的数据可用于配制各种剂量的人用预防和/或治疗性试剂。这种试剂的剂量优选是在循环浓度范围内, 具有 ED₅₀ 和较小的或没有毒性。根据所用的剂型和使用的给药方案, 剂量可在此范围内变化。对于本发明方法中使用的任何试剂, 其治疗有效量可以根据细胞培养分析进行初步估计。配制剂量以在动物模型中达到循环血浆浓度, 包括细胞培养检测的 IC₅₀ (即, 达到最大症状抑制的一半时的测试化合物浓度)。这些信息可用于更精确地测定人的有用剂量。例如使用高效液相色谱可以测量血浆中的水平。

本发明所用治疗的抗癌活性可以使用本领域公知的用于研究癌症的各种实验动物模型来测定, 如其中的小鼠 EphA4 用人 EphA4 替换的 SCID 小

鼠模型或转基因小鼠，带有人异种移植物的裸鼠，动物模型，如仓鼠，野兔等，这些公开在 *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, eds. Fiebig 和 Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology Research* (1991, eds. Boven 和 Winograd); 和 *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teicher), 在此引入全部内容作为参考。

5.6.1 治疗或预防实用性的证明

本发明的方案和组合物在使用前优选在人体外、然后在人体内对所需的治疗或预防活性进行测试。例如，体外分析可用于检测是否给予了特定的治疗方案。该分析包括体外细胞培养分析，其中的患者组织样品在培养基中生长，暴露或给予其他方案，并观察这种方案对组织样品的作用，例如，EphA4 的磷酸化或分解升高，在软琼脂中的生长和/或克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中管状网络形成受到抑制或降低。接触细胞的低水平增生或存活表明，治疗性试剂对于治疗患者是有效的。可选择地，不培养患者细胞，可以使用肿瘤或恶性细胞系的细胞来筛选治疗性试剂和方法。本领域中有多种分析标准可用于分析这种存活和/或生长；例如，可以通过测量 ^3H -胸苷的插入、直接细胞计数、检测已知基因(如原癌基因(例如，*fos*, *myc*))的转录活性或细胞循环标记的变化来分析细胞增生；可以通过台盼蓝染色分析细胞生存能力，基于形态变化、EphA4 磷酸化或分解的提高、软琼脂中的生长和/或克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中的管状网络形成降低等来可见地分析分化。

在人中进行测试之前，治疗用的化合物可在适合的动物模型系统中进行

测试,包括但不限于在大鼠、小鼠、小鸡、牛、猴子、野兔、仓鼠等,例如,上文所述的动物模型。然后在适合的临床试验中使用化合物。

此外,本领域所属技术人员公知的任何分析都可用来评估本文所述的用于治疗或预防癌症的组合治疗的预防和/或治疗实用性。

5.7 药物组合物

本发明的组合物包括药物组合物制造中用的原料药组合物(例如,不纯的或未消毒的组合物)和可用于制备单位剂型的药物组合物(即,适于给予受试者或患者的组合物)。这些组合物含有预防或治疗有效量的本文所述的预防和/或治疗性试剂或这些试剂与药物可接受的载体的混合物。优选地,本发明的组合物含有预防或治疗有效量的一种或多种本发明的 EphA4 抗体和药物学上可接受的载体,或可降低 EphA4 表达(例如,反义寡核苷酸)的试剂及药物学上可接受的载体。在另一个实施方案中,本发明的组合物还还有其他的治疗性抗癌试剂。

在特定实施方案中,术语"药物可接受的"是指联邦或政府管理机构核准的或美国药典或其他通常认可的药典中所列的适于动物,更具体地是人的载体。术语"载体"是指稀释剂、佐剂(例如, Freund 佐剂(完全和不完全),更优选地,从 Chiron, Emeryville, CA 得到的 MF59C.1 佐剂),赋形剂,或通过其给予治疗剂的载体。这种药物学载体可以是消毒的液体,如水和油,包括石油,动物,植物或合成的,如花生油,大豆油,矿物油,麻油等。当该药物组合物通过静脉内给予时,水是优选的载体。生理盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,尤其是用于注射用溶液。适合的药物学赋形剂包括淀粉,葡萄糖,乳糖,蔗糖,凝胶,麦芽,水稻,面粉,白垩,硅

胶，硬脂酸钠，甘油单硬脂酸酯，滑石，氯化钠，干脱脂奶，甘油，丙烯，乙二醇，水，乙醇等。如果需要，该组合物还可以含有少量润湿剂或乳化剂，或pH缓冲剂。这些组合物可以是溶液，悬浮液，乳状液，片剂，丸药，胶囊，粉末，缓释制剂等形式。

通常，本发明组合物的成分可以分别供应或混合成单位剂型，例如作为在密封容器中(如表明活性试剂量的安瓿或小袋)的冻干粉末或无水浓缩物。如果通过灌输给与予该组合物，那么可以用装有消毒药物级水或生理盐水的灌输液瓶分散。如果通过注射给予该组合物，那么可以提供注射用消毒水或生理盐水安瓿，以在给予之前混合成分。

本发明组合物可配制成中性或盐形式。药理学上可接受的盐包括用阴离子形成的盐，如衍生于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些盐，还包括用阳离子形成的盐，如衍生于钠、钾、铵、铯、氢氧化铁、异丙基胺、三乙基胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

各种运输系统是公知的，并可用于给予本发明的激动性单克隆抗体或本发明的激动性单克隆抗体与用于预防或治疗癌症的预防性或治疗性试剂的组合，例如脂质体胶囊，微粒，微胶囊，能够表达抗体或抗体片段的重组细胞，受体介导的内吞作用(参见，例如，Wu和Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432)，作为逆转录病毒或其他载体等一部分的核酸结构。给予本发明预防或治疗性试剂的方法包括但不限于，肠胃外给予(例如，皮层内，肌肉内，腹膜内，静脉内和皮下)，脑膜外，及粘膜(例如，鼻内，吸入，及口服路线)。在特定实施方案中，本发明的预防或治疗性试剂通过肌肉内，静脉内，或皮下给予。预防或治疗性试剂可以通过任何常规路线给予，例如通过灌输液或丸药注射，通过上皮或粘膜皮肤衬层吸附(例如，口服粘膜，直肠和

肠内粘膜等),也可以与其他生物活性试剂组合给予。给予可以是系统性的或局部的。

在特定实施方案中,可能需要将本发明的预防或治疗性试剂局部给予至需要治疗的区域;这可以通过例如但不限于局部灌输、注射、或通过移植物来进行,所述移植物可以是带孔的、非孔的或凝胶状材料,包括膜,如硅橡胶膜,或过滤料。

在另一个实施方案中,预防或治疗性试剂可通过控制释放或缓释系统输送。在一个实施方案中,可使用泵进行控制释放或缓释(参见, Langer, 见上文; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14: 20; Buchwald 等人, 1980, *Surgery* 88: 507; Saudek 等人, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574)。在另一个实施方案中,聚合物材料可用于对本发明的抗体或其片段进行控制释放或缓释(参见例如, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer 和 Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen 和 Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger 和 Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; 也参见 Levy 等人, 1985, *Science* 228: 190; During 等人, 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351; Howard 等人, 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105); 美国专利 5,679,377; 5,916,597; 5,912,015; 5,989,463; 5,128,326; 国际公开 WO 99/15154 和 WO 99/20253。缓释制剂中所用的聚合物例子包括但不限于聚(甲基丙烯酸 2-羟基乙基酯), 聚(甲基丙烯酸甲基酯), 聚(丙烯酸), 聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯), 聚(甲基丙烯酸), 聚乙醇酸(PLG), 聚酸酐, 聚(N-乙烯吡咯烷酮), 聚(乙烯醇), 聚丙烯酰胺, 聚(乙烯乙二醇), 聚交酯(PLA), 聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA), 及聚原酸酯。在优选实施方案中,缓释制剂中所用的聚合物是惰性

的，不含可滤去杂质，贮存稳定，消毒，及可生物分解的。在另一个实施方案中，控制释放或缓释系统置于接近预防或治疗目标处，因此仅需要系统性剂量的一部分(参见，例如，Goodson, *Medical Applications of Controlled Release*, 见上文, vol. 2, pp. 115-138 (1984))。

控制释放系统公开在 Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533)的综述中。本领域所属技术人员公知的任何技术可用于制备包含一种或多种本发明治疗性试剂的缓释制剂。参见，例如，美国专利 4,526,938；国际公开 WO 91/05548 和 WO 96/20698；Ning 等人，1996, *Radiotherapy & Oncology* 39: 179-189；Song 等人，1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397；Cleek 等人，1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854；和 Lam 等人，1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760，在此引入每一文献的全部内容作为参考。

5.7.1 基因治疗

在特定实施方案中，给予降低 EphA4 表达(例如，EphA4 反义核酸或 EphA4 dsRNA)的核酸通过基因治疗的方式来治疗、预防或控制癌症。基因治疗指通过给予受试者表达的或可表达的核酸来进行的治疗。在本发明的这种实施方案中，制备反义核酸并用来介导预防或治疗效果。

本领域中基因治疗用的任何方法都可用于本发明中。下面给出示例性方法。

对于基因治疗的常用方法，参见 Goldspiel 等人，1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488；Wu 和 Wu，1991, *Biotherapy* 3: 87；Tolstoshev，1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573；Mulligan，1993, *Science* 260: 926-932；和

Morgan 和 Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191; May, 1993, *TIBTECH* 11: 155。可以使用的重组 DNA 技术领域公知的方法公开在 Ausubel 等人 (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); 和 Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)。

在优选方面中, 本发明的组合物包括降低 EphA4 表达的 EphA4 核酸, 所述核酸是在合适宿主中表达该核酸的表达载体的一部分。具体而言, 这种核酸具有启动子, 优选是异源启动子, 所述启动子是诱导型的或组成型的, 且可选择地具有组织特异性。在另一个特定实施方案中, 使用核酸分子, 其中降低 EphA4 表达的核酸和任何其他所需序列与一区域侧翼连接, 该区域启动基因组目标位点的同源重组, 从而使降低 EphA4 表达的核酸内表达 (Koller 和 Smithies, 1989, *PNAS* 86: 8932; Zijlstra 等人, 1989, *Nature* 342: 435)。

运输核酸至受试者可以是直接的(其中受试者直接与核酸或承载核酸的载体接触)或是间接的(其中首先在体外用核酸转录细胞, 然后移植到受试者中)。这两种技术分别称作体内或体外基因治疗。在特定实施方案中, 在体内直接给予核酸序列。这可以通过本领域公知的多种方法实现, 例如, 通过使它们成为合适核酸表达载体的一部分, 并用其给药, 从而将它们置于细胞内, 例如, 通过使用缺失性或衰减逆转录病毒或其他病毒载体感染(参见美国专利 4,980,286), 或直接注射裸 DNA, 或通过使用微粒轰击(例如, 基因枪; Biolistic, Dupont), 或用脂质或细胞表面受体或转染试剂包被, 通过脂质体囊, 微粒, 或微胶囊, 或通过将它们与已知可进入核的肽连接来给药, 将它们与产生受体介导的内吞作用的配体连接来给药(参见, 例如, Wu 和

Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429) (这可用于使特异性表达受体的细胞型成为靶)等。在另一个实施方案中, 可以形成核酸-配体配合物, 其中配体包括融合病毒肽, 以破坏核内体, 这样使核酸避免溶酶体分解。在另一个实施方案中, 通过以特异性受体为靶, 核酸成为体内细胞特异性吸收和表达的目标(参见, 例如, 国际公开 WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/203 16; WO 93/14188, WO 93/20221)。可选择地, 通过同源重组, 核酸可以导入到细胞内, 并整合到宿主细胞 DNA 内而表达(Koller 和 Smithies, 1989, *PNAS* 86: 8932; 和 Zijlstra 等人, 1989, *Nature* 342: 435)。

在特定实施方案中, 使用含有降低 EphA4 表达的核酸序列的病毒载体。例如, 可以使用逆转录病毒载体(Miller 等人, 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 581)。这些逆转录病毒载体含有正确包装病毒基因组并整合到宿主细胞 DNA 中所必需的成分。将基因治疗中所用的核酸序列克隆到一种或多种载体中, 这有利于将该核酸运输到受试者中。关于逆转录病毒载体的更详细说明公开于 Boesen 等人, 1994, *Biotherapy* 6: 291-302, 其中公开了使用逆转录病毒载体运输 *mdr 1* 基因至造血干细胞, 从而该干细胞对化学治疗更有抗性。其他阐明逆转录病毒载体在基因治疗中的用途的文献是: Clowes 等人, 1994, *J. Clin. Invest.* 93: 644-651; Klein 等人, 1994, *Blood* 83: 1467-1473; Salmons 和 Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4: 129-141; 和 Grossman 和 Wilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics Devel.* 3: 110-114。

腺病毒是可在基因治疗中使用的其他病毒载体。对于将基因运输到呼吸上皮细胞而言, 腺病毒是特别有吸引力的载体。腺病毒会自然地感染上皮细胞, 从而引起轻度疾病。腺病毒的优点是能够感染非分裂细胞。Kozarsky 和 Wilson, 1993, *Current Opinion in Genetics Development* 3: 499, 给出了腺病

毒基因治疗论述。Bout 等人, 1994, *Human Gene Therapy* 5: 3-10, 证实了使用腺病毒载体可以将基因转化到猕猴的呼吸上皮细胞。在基因治疗中使用腺病毒的其他例子公开于 Rosenfeld 等人, 1991, *Science* 252:431; Rosenfeld 等人, 1992, *Cell* 68: 143; Mastrangeli 等人, 1993, *J. Clin. Invest.* 91: 225; 国际公开 WO 94/12649; 和 Wang 等人, 1995, *Gene Therapy* 2: 775。在优选实施方案中, 使用腺病毒载体。

腺相关病毒(AAV)已被建议用于基因治疗中(Walsh 等人, 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204: 289-300; 和美国专利 5,436,146)。

另一种基因治疗技术包括将基因转化到组织培养中的细胞中, 例如通过电穿孔, 脂质感染, 磷酸钙介导的转染, 或病毒传染转化。通常, 转化方法包括将可选择性标记转化到细胞中。然后将这些细胞置于筛选条件下, 以分离吸收并正在表达转化基因的那些细胞。然后, 将那些细胞运输到受试者中。

在此实施方案中, 在用得到的重组细胞体内给药之前, 将核酸导入到细胞中。这种导入可通过本领域公知的任何方法进行, 包括但不限于转染, 电穿孔, 微注射, 用含有核酸序列的病毒或抗菌素载体传染, 细胞融合, 染色体介导的基因转移, 微细胞介导的基因转移, 原生质球融合等。在本领域中, 将外源基因导入到细胞中的许多技术是公知的(参见, 例如, Loeffler 和 Behr, 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 599; Cohen 等人, 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 618), 并可用于本发明中, 只要受体细胞必需的发展和生理功能未被破坏。这种技术应该将核酸稳定转化到所述细胞中, 从而使该核酸在细胞中表达, 并优选在其细胞后代中可遗传和可表达。

得到的重组细胞通过本领域公知的各种方法运输到受试者。预期的细胞用量取决于所需的效果, 患者状态等, 并可由本领域所属技术人员测定。

5.7.2 制剂

本发明所用的药物组合物可以使用一种或多种生理学上可接受的载体或赋形剂以常规方式配制。

因此,本发明的 EphA4 激发性抗体或其他抗 EphA4 试剂(例如,反义和其他核酸)及其生理学上可接受的盐和溶剂化物可配制成通过吸入或吹入(通过口腔或鼻子)、或口服、肠胃外或粘膜(如口腔,阴道,直肠,舌下)给药。在优选实施方案中,使用局部或系统性肠胃外给药。

对于口服给药而言,上述药物组合物例如可以通过用常规方式与药物学上可接受的赋形剂一起制成片剂或胶囊,该赋形剂如结合剂(例如,预凝固的玉米淀粉,聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如,乳糖,微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁,滑石或氧化硅);崩解剂(例如,土豆淀粉或淀粉乙醇酸钠);或润湿剂(例如,月桂基硫酸钠)。可以用本领域公知的方法包被片剂。口服给药用的液体制剂可以是例如溶液,糖浆或悬浮液,或它们以干产物的形式存在以在使用之前与水或其他适合载体组合。这种液体制剂可以通过用常规方法用药物学上可接受的添加剂制备,该添加剂如悬浮剂(例如,山梨醇糖浆,纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯树胶);非水性载体(例如,杏仁油,油状酯,乙醇或分馏的植物油);和防腐剂(例如,甲基或丙基-p-羟基苯甲酸酯或山梨酸)。在需时,该制剂也可以含有缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。

口服给药用的上述制剂可以配制成使活性化合物可控制地释放。

对于口腔给药,上述组合物可以以常规方式配制成片剂或止咳糖的形式。

对于吸入给药,本发明所用的预防或治疗性试剂方便地从压缩包或喷雾器中以气雾剂形式输送,该输送需要使用适合的推进剂,例如,二氯二氟甲烷,三氯氟甲烷,二氯四氟乙烷,二氧化碳或其他适合气体。对于压缩的气雾剂,可以使用阀来测定剂量单位以实现定量输送。吸入器或吹入器中所用的凝胶胶囊和药管可配制成含有化合物和合适粉末基质(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

可以将预防或治疗性试剂配制成通过注射进行肠胃外给药,例如,通过丸药注射或连续灌输给药。注射用制剂可以是单位剂型,例如,在安瓿中或在多次剂量容器中的单位剂型,其中加入了防腐剂。该组合物在油性或水性载体中可以呈现出悬浮液、溶液或乳状液形式,并可以含有配方试剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可选择地,所述的活性成分可以在使用前与适合载体例如消毒的无热原水配制成粉末形式。

预防或治疗性试剂也可以配制成直肠组合物,如栓剂或灌肠剂,例如,含有常规栓剂基质,如可可油或其他甘油酯的栓剂或灌肠剂。

除了上述制剂外,上述预防或治疗性试剂也可以配制成贮存制剂。这种长时间作用制剂可通过植入(例如皮下或肌肉内)来给予或通过肌肉内注射给予。因此,例如,该预防或治疗性试剂可用合适的聚合或疏水材料配制(例如在可接受油中作为乳状液)或用离子交换树脂配制,或配制成少量溶解的衍生物,例如,微溶的盐。

本发明也提供包装在密封容器中(如表明活性试剂量的安瓿或小袋)的预防或治疗性试剂。在一个实施方案中,该预防或治疗性试剂可作为密封容器中的干消毒冻干粉末或无水浓缩物提供,并可例如用水或生理盐水重建成适合浓度,以给予受试者。

在本发明优选的实施方案中,各种化学治疗、生物治疗/免疫治疗和激素治疗性试剂的配制和给予是本领域公知的,通常公开在 *Physician's Desk Reference*, 第 56 版 (2002) 中。例如,在本发明的某些特定实施方案中,配制本发明的治疗性试剂,并以表 1 形式供应。

在本发明其他实施方案中,可以以胶囊中的液体或饮品形式口服给予放射治疗性试剂,如放射性同位素。放射性同位素也可配置成静脉内注射。肿瘤学家可以测定优选的制剂和给药路径。

在某些实施方案中,本发明的激动性单克隆抗体以 1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml 及 25 mg/ml 配制,以进行静脉内注射,和以 5 mg/ml、10 mg/ml 及 80 mg/ml 配制,以进行重复皮下给予和肌肉内注射。

如果需要,可以将上述组合物置于包装或分配装置中,其可包括一种或多种含有活性成分的单元剂型。这种包装例如包括金属或塑料箔,如泡罩包装。该包装或分配装置可以附有给药说明书。

5.7.3 剂量

可有效治疗、预防或控制癌症的本发明的组合物的量可以通过标准研究技术来确定。例如,可有效治疗、预防或控制癌症的组合物的剂量可通过将该组合物给予动物模型来确定,例如,用本文所述或本领域所属技术人员公知的动物模型。此外,任选地可以使用体外分析方法来帮助确定最佳的剂量范围。

本领域技术人员可以基于几种因素的考虑,来确定优选有效剂量(例如通过临床试验)。这些因素包括待治疗或预防的疾病、症状、患者体重、患者免疫状态和本领域所属技术人员公知的影响给予的药物组合物的精确度

的其他因素。

使用的精确剂量也取决于给药途径及癌症的严重度，并根据每个医生的判断和患者情况来决定。可以根据体外或动物模型测试系统的剂量反应曲线外推出有效剂量。

对于抗体，给予患者的剂量通常为 0.1 mg/kg~100 mg/kg 患者体重。优选地，给予患者的剂量为 0.1 mg/kg~20 mg/kg 患者体重，更优选为 1 mg/kg~10 mg/kg 患者体重。通常，人和人源化抗体在人体中比从其他物种得到的抗体有更长的半衰期，这是由于对外源多肽有免疫反应。因此，通常可以给予较少剂量的人抗体和给予次数减少。

对于给予患者的其他癌症治疗性试剂而言，本领域公知的各种癌症治疗的通常剂量列于表 1 中。在本发明中，某些优选实施方案包括在组合治疗中给予的剂量比单一试剂给予的剂量低。

本发明提供了用已知预防或治疗性试剂给药的任何方法，其给予剂量比以前认为的预防、治疗、控制或改善癌症有效剂量要低。优选地，将较低剂量的公知抗癌症治疗剂与较低剂量的本发明的激动性单克隆抗体组合给药。

5.8 试剂盒

本发明提供药物包或试剂盒，其包括填充有本发明的单克隆抗体的一个或多个容器。此外，一种或多种用于治疗癌症的其他预防或治疗性试剂也可以包含在这种药物包或试剂盒中。本发明还提供一种药物包或试剂盒，其包括填充有一种或多种本发明药物组合物中的一个或多个容器。任选地，这种容器含有一个通知，其以政府机构规定的形式规定药物或生物产品的制造、使用或销售，这种通知反应了允许制造、使用或销售以用于人给药。

本发明提供可在上述方法中使用的试剂盒。在一个实施方案中，该试剂盒含有一种或多种本发明的单克隆抗体。在另一个实施方案中，该试剂盒还含有在一个或多个容器中的一种或多种用于治疗癌症的其他预防或治疗性试剂。在某些实施方案中，其他预防或治疗性试剂是化学治疗的。在其他实施方案中，预防或治疗性试剂是生物治疗或激素治疗的。

6. 实施例

6.1 EphA4 抗体引起细胞行为的变化

细胞粘附和细胞圆形化分析

为了检测细胞圆形化，将胰腺癌细胞系 Aspcl 细胞置于已用细胞外膜 (ECM) 蛋白包被的 6-孔板上，或置于 ECM 蛋白包被的 24-孔板盖片上。进行细胞粘附 48 小时，用含有 EphA4 scFv 抗体的培养基在 37°C 下孵育。作为对照，将上述置于板上并粘附的细胞用 EphA4 scFv 抗体在 0°C 而不是在 37°C 下孵育。孵育后，洗涤 EphA4-scFv 孵育的细胞，并用抗 Flag 抗体处理，以交联 EphA4 结合的 scFv。洗涤板子或盖片，固定，染色，用显微镜观察。相对于用 EphA4 抗体在 0°C 下(即细胞形状不改变的温度)孵育的细胞而言，用 EphA4 抗体在 37°C 下孵育的细胞表现出细胞圆形化(图 1A, B)。这进一步表明，抗 EphA4 抗体使对 ECM 基质的粘附下降。ECM-细胞粘附出现明显的下降，因为这些类型的粘附使细胞内信号的位点，该信号促进细胞生长、存活、迁移和侵入 (Burridge 和 Chrzanowska-Wodnicka, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12: 463, 1996; Parsons, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8: 146, 1996)。

细胞粘附和细胞圆形化分析也可以按 Miao 等人(*Nature Cell Biol.* 2: 62, 2000)的方法进行，在此引入其全部内容作为参考。为研究细胞粘附，简单

来讲, 将三等份细胞置于已用各种 ECM 蛋白或聚-L-赖氨酸包被的 96-孔板上。在存在或不存在 EphA4 抗体(或其他 EphA4 激动剂)的情况下, 以每孔 1×10^5 个细胞的密度放置细胞, 并在 37°C 下粘附 30 分钟。从孔中洗掉非粘附细胞, 固定粘附细胞, 染色, 并通过酶联免疫吸附分析(ELISA)读数器来定量测量吸附。相对于在没有 EphA4 抗体的情况下发生粘附的对照细胞而言, 用 EphA4 抗体对细胞进行处理表现出对 ECM 蛋白-处理孔的粘附下降。

为了进行细胞圆形化分析, 简单来讲, 将细胞置于 ECM 蛋白包被的 6-孔板上, 或 ECM 蛋白包被的 24-孔板盖片中。粘附细胞 48 小时, 用含有或不含有 EphA4 抗体(或其他 EphA4 激动剂)的培养基孵育 10 分钟。洗涤板子或盖片, 固定, 染色, 用显微镜观察。相对于用不含 EphA4 抗体的培养基处理的细胞而言, 用 EphA4 抗体处理的细胞表现出细胞圆形化, 这表明对 ECM 基质的粘附下降。

6.2 制备单克隆抗体

免疫和融合

使用融合蛋白 EphA4-Fc 制备 EphA4 细胞外区域的单克隆抗。这种融合蛋白由与人免疫球蛋白连接的人 EphA4 的细胞外区域组成, 从而促进融合蛋白的分泌。

在左跖骨区域, 在第 0 天和第 7 天, 用溶于 TiterMax 辅剂的 $5 \mu\text{g}$ EphA4 融合蛋白(总体积 $100 \mu\text{l}$)注射小鼠(Balb/c 小鼠或 SJL 小鼠)。在左跖骨区域, 在第 12 天和第 14 天, 用溶于 PBS 的 $10 \mu\text{g}$ EphA4 融合蛋白(总体积 $100 \mu\text{l}$)注射小鼠。在第 15 天, 从腿和腹股沟取下腿弯部和腹股沟淋巴结细胞, 并

与 P3XBcl-2-13 细胞进行融合(使用 PEG)。

从免疫的 SJL 小鼠的融合淋巴结分离杂交瘤产生的 EphA4 抗体。

筛选抗体

使用标准分子生物学技术(例如, ELISA 免疫测定), 筛选母培养杂交瘤上清液的 EphA4 免疫反应性。进一步筛选上清液抑制 EphA4 单克隆抗体与 EphA4 结合的能力。简言之, 在未标记的 EphA4 抗体或其他未标记的 EphA4 结合蛋白存在的条件下, 通过竞争性 ELISA 分析标记的 EphA4 抗体结合 EphA4 融合蛋白的能力。随着加入的未标记抗体或结合蛋白的浓度提高, 结合 EphA4-Fc 的标记 EA4 的量降低。

6.3 EphA4 抗体的用途

6.3.1 EphA4 磷酸化

EphA4 抗体促进 ASPC1 细胞中的酪氨酸磷酸化。对照和在抗 EphA4 单克隆抗体(NED 154-567)存在条件下的细胞在 37°C 下孵育细胞 15 分钟。然后用 EphrinA4-Fc (R&D Systems; Minneapolis, MN)免疫沉淀细胞裂解物, 用 SDS-PAGE 溶解, 用抗磷酸化酪氨酸抗体 4G10 (Upstate Biotechnology; Lake Placid NY)和 PY20 (BD Transduction Laboratories; Franklin Lakes, NJ)的混合液进行 Western 印迹分析。用 EphA4 抗体处理后, 发现 EphA4 磷酸化增大, 这表明 EphA4 抗体激发 EphA4, 并可能促进 EphA4 自磷酸化。

EphA4 scFv 抗体克隆 EA44 强烈促进 EphA4 的酪氨酸磷酸化(图 6)。表达抗 EphA4 scFv EA44 的细胞根据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约在 2004 年 6 月 1 日保藏在美国类型培养物中心(P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108), 并取得保藏号。EA44 的 VH 和 VL CDR 氨基酸序列

分别包含在 SEQ ID NO: 22、24、26、28、30 及 32 中(图 7)。用所述的抗 EphA4 scFv (5 $\mu\text{g/ml}$) 在冰上孵育 Asp1 胰腺癌细胞。30 分钟后, 除去培养基, 用冰冷的 PBS 洗涤细胞, 将含有 10 $\mu\text{g/ml}$ 对 flag 抗原决定部位 M2 有特异性的抗体的培养基置于细胞上。此时, 用 10 $\mu\text{g/ml}$ mAb9(一种诱导 EphA4 酪氨酸磷酸化的已知抗体) 处理对照样品。用 scFv 克隆 8、18、20、36、41 或 44, 或 mAb9 在 37°C 下孵育细胞 15 分钟, 用冰冷的 PBS 洗涤, 然后在含有 1% Triton X-100 的 Tris-缓冲生理盐水中裂解。用 EphrinA4-Fc (4 μg ; R&D 系统) 从细胞裂解物中免疫沉淀出 EphA4, 用 SDS-PAGE 溶解, 再转移至硝基纤维素中。用抗 pTyr 抗体、4G10 和 PY20 进行 Western 印迹分析, 来分析 EphA4 酪氨酸磷酸化的状态。如图 6 所示, scFv 克隆 44 强烈促进 EphA4 磷酸化。

EphA4 抗体也促进 EphA4 关联蛋白的酪氨酸磷酸化。用 LX13 scFv 抗体孵育细胞, 洗涤, 然后用抗 Flag 抗体孵育以在细胞表面上交联 scFv。用 EphrinA4-Fc 免疫沉淀出 EphA4, 用抗磷酸酪氨酸抗体进行 Western 印迹分析。如图 2 所示, 相对于细胞中约 75 kDa 的 EphA4 关联蛋白的磷酸化而言(其中 EphA4 未交联("对照"泳道)), 交联 EphA4 ("X-连接的 EphA4"泳道)使约 75 kDa 的 EphA4 关联蛋白的酪氨酸磷酸化提高。

6.3.2. EphA4 分解

还可以分析抗体介导的 EphA4 分解。在 EphA4 抗体(10 $\mu\text{g/ml}$) 存在下, 在 37°C 下孵育单层 EphA4 阳性细胞(如胰腺癌细胞系 ASPC1 或 MiaPaca2)。在加入抗体后, 在下面的时间点在含有 1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) 的 Tris-缓冲生理盐水中裂解细胞: 0、0.5、1、2、4、8 及 24 小时。在

测量蛋白浓度(BioRad, Hercules, CA)后,用 SDS-PAGE 溶解等量总蛋白,并转移至硝基纤维素(Protran, Schleicher 和 Schuell, Keene, NH)。使用商业上可得到的 EphA4/Sek 单克隆抗体(BD Biosciences, San Jose, CA)通过 Western 印迹分析观察 EphA4 水平。然后剥离膜,用 paxillin 特异性抗体检测(clone SH11; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY),以确保两个样品含有等量的总蛋白。

6.3.3. 在软琼脂中生长

分析本发明的抗体抑制软琼脂中癌细胞形成的能力(这种分析可按下述进行,例如, Zelinski 等人, 2001, Cancer Res. 61: 2301, I 在此引入其全部内容作为参考)。简言之,在抗 EphA4 LX13 scFv 抗体(LX13)或对照溶液(PBS)存在下,使细胞在 37°C 下在软琼脂中悬浮 7 天。用 LX13 或 PBS 孵育后,洗涤细胞,用抗 LX13 二级单克隆抗体(二级 mab)或 PBS 孵育。用显微镜将克隆形成成分等级。含有至少三个细胞的簇定为阳性。如图 3 所示,用 LX13 和二级 mab ("LX13 bival")孵育的细胞含有聚集的 EphA4,这表明,相对于用 PBS 然后用二级 mab 孵育的细胞("对照")或用 LX13 然后 PBS ("LX13")处理的细胞而言,软琼脂中的生长明显得到抑制。

分析本发明抗体除去软琼脂中形成的癌细胞克隆的能力。分析方法与上述相似,除了在软琼脂生长的第 3 天之后,才将抗体加到癌细胞中。

6.3.4. 在乳腺癌细胞中的雌激素依赖性

转化雌激素敏感性乳腺癌细胞,即 MCF-7 细胞,并稳定地过表达人 EphA4 (MCF-7^{EPhA4})。Western 印迹分析证实,相对于相应的对照(数据未列出),转染细胞中的 EphA4 异常过表达。挑选两种 EphA4 过表达克隆,即

EphA4-2 和 EphA4-3, 用于进一步研究。

EphA4 过表达会提高恶性生长, 并降低雌激素的作用。在有或没有雌激素存在下, 分析 EphA4-2 和 EphA4-3 克隆和单独的载体对照在软琼脂中的克隆形成。

在雌激素存在下, EphA4-2 和 EphA4-3 细胞证实了相对于对应的对照而言, 在软琼脂中的克隆形成提高了两倍(图 4, "+雌激素")。EphA4-2 和 EphA4-3 细胞形成平均 4.6 个克隆/区域(图 4, "+雌激素", "EphA4-2"和"EphA4-3"竖条), 而用空载体转染的对照细胞形成小于 2 个克隆/区域(图 4, "+雌激素", "载体"竖条)。

在没有外源雌激素下进行平行研究(图 4, "-雌激素"竖条)。雌激素的实验偏差放大了对照和 EphA4-2、EphA4-3 细胞之间的细胞行为差异。尽管 MCF-7 对照细胞很大程度上不能在软琼脂上形成克隆(图 4, "-雌激素"区域中的"载体"竖条, <1 克隆/区域), 但是 EphA4-2 和 EphA4-3 细胞形成了更多个克隆(3.4 个克隆/区域; 图 4, "-雌激素"竖条)。尽管 EphA4-2 和 EphA4-3 细胞在软琼脂上比对应的对照能更有效地形成克隆, 但是这些细胞在没有外源雌激素下生长的更好(图 4, "-雌激素"竖条)。因此, EphA4 过表达降低了对外源雌激素的需求。

6.3.5. MATRIGEL™ 中的管状网络形成

三维微环境如 MATRIGEL™ 中的肿瘤细胞行为, 可用于可靠地预测乳腺上皮细胞的分化状态和侵略性。在 EphA4 抗体(10 µg/ml)或对照溶液(PBS)的存在下, 在 MATRIGEL™ 上孵育良性(MCF-10A)或恶性(MDA-MB-231)乳腺上皮细胞的单层培养物。按 Zelinski 等人(2001, *Cancer Res.* 61: 2301-6)

所述分析 MATRIGEL™ 上的细胞行为。简言之，在加入已在冰上用 EphA4 抗体或对照溶液(PBS)孵育 1 小时的 1×10^5 MDA-MB-231 或 MCF-10A 细胞之前，在 37°C 下用 MATRIGEL™ (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)包被组织培养皿。在 37°C 下在 MATRIGEL™ 上孵育细胞 24 小时，使用 Olympus IX-70 倒立显微镜分析细胞行为。所有图像记录在 35 mm 胶卷上(T-Max-400. Kodak, Rochester, NY)。

6.3.6. 体内生长

分析本发明的抗体抑制体内肿瘤生长的能力。简言之，将 MDA-MB-231 乳腺癌细胞皮下移植进无胸腺小鼠中。在肿瘤已生长到平均体积为 100 mm^3 后，向小鼠腹膜内给予 6 mg/ml EphA4 抗体或 PBS 对照，一周两次持续 3 周。检测肿瘤生长，并表达为肿瘤体积除以原始肿瘤体积(100 mm^3)的比值。使肿瘤继续生长，直到肿瘤体积到达 1000 mm^3 。通过计算每天处理后存活小鼠的百分比测定小鼠的存活率。

由于受体酪氨酸激酶通常调节肿瘤中的异常细胞行为，因此 EphA4 可以为胰腺癌基于抗体的治疗提供可能的治疗靶。另一个 Eph 受体家族成员(EphA2)的抗体介导的聚集降低了癌细胞的恶性潜能(Kinch 和 Carles-Kinch, *Clinical and Experimental Metastasis*, 20: 59, 2003)。为测试是否 EphA4 靶也会有相似的结果，测试几个结合人 EphA4 的 scFv 片段。使用二级抗体交联 EphA4 特异性 scFv 来介导 EphA4 的聚集。胰腺癌细胞系(ASPC1)的 EphA4 抗体处理产生多种生物和生物化学结果。首先，细胞对细胞外基质的粘附降低(图 1)，这有意义的，因为这些粘附是细胞内信号的位点，该信号促进细胞生长、存活、迁移和侵入 (Burrige 和 Chrzanowska-Wodnicka, *Annu. Rev.*

Cell Dev. Biol., 12: 463, 1996; Parsons, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8: 146,1996)。

其次,如同使用软琼脂克隆分析的测定结果,EphA4 抗体介导的聚集抑制锚定依赖性 ASPC1 细胞的生长(图 3)。第三,EphA4 活化使 EphA4 和 EphA4 相关 75 kDa 蛋白酪氨酸磷酸化。综上所述,这些数据表明,EphA4 抗体介导的活化诱导信号通道,使胰腺癌细胞的恶性发展降低。

在另一个实验中,EphA4 上调促进 MCF-7 乳腺癌细胞系的锚定非依赖性生长,从而降低省长对雌激素的依赖性。MCF-7 细胞通常表达极低水平的 EphA4,将其转化,并分离出 EphA4 的稳定表达体(EphA4-2 和 EphA4-3)。在使用雌激素的软琼脂分析中,MCF-7-EphA4 细胞证实与载体转化的对照相比,起锚定非依赖性生长提高 2.4 倍(图 4)。然而,在没有雌激素时,与相同对照相比,EphA4 表达细胞生长提高了 8.5 倍。这些数据表明,与没有 EphA4 的细胞相比,EphA4 过表达细胞对生长刺激(如基质粘附和生长因子)的依赖性更低。这些实验结果也表明,抗体介导的 MCF-7-EphA4 细胞聚集可以逆转恶性发展的增加。

6.4. 在胰腺肿瘤组织中 EphA4 RNA 水平提高

检测患者样品的 EphA4 RNA 水平,以测定癌组织中的 EphA4 表达。如图 5 所示,EphA4 RNA 水平在胰腺肿瘤组织中比正常组织高。竖条标记的"正常"(A)表示 52 岁男性患者的病理学正常胰腺组织的 EphA4 RNA 水平。"阶段 4 原发的"(B)表示胰腺组织中的 EphA4 RNA 水平,显示了取得竖条 A 的组织样品的同一 52 岁男性患者的阶段 4A 胰管腺癌。"阶段 2 原发的"(C)表示胰腺组织中的 EphA4 RNA 水平,显示了 72 岁男性患者的阶段 2A 胰管腺癌。"Met" (D)表示 71 岁女性患者的淋巴结组织中的 EphA4 RNA 水平,显

示了阶段 2B 转移性胰腺癌。"Met" (E)表示 57 岁女性患者网膜组织中的 EphA4 RNA 水平, 显示了阶段 4 转移性胰腺癌。"Met" (F)表示 45 岁女性患者肝组织中的 EphA4 RNA 水平, 显示了转移性胰腺癌。从这些样品可以证实, 癌和转移组织中的 EphA4 表达比对照组织更高。

6.5. 对转移癌患者的治疗

设计研究来分析本发明的单克隆抗体在转移性乳腺癌患者中的药物动力学和安全性。正接受治疗的患者可以继续接受这些药物治疗。

对患者用单一 IV 剂量的本发明单克隆抗体给药, 开始 4 周后, 进行分析, 然后每周重复给予相同剂量的 IV 剂量, 持续 12 周。分析用本发明的单克隆抗体治疗的安全性及 IV 剂量 26 周内疾病活性的可能发展。治疗并相似地分析不同组患者, 但接受剂量为 1 mg/kg、2 mg/kg、4 mg/kg 或 8 mg/kg。

将本发明的单克隆抗体配制成 5 mg/ml 和 10 mg/ml IV 注射。重复皮下给药需要 80 mg/ml 的制剂。本发明的单克隆抗体还配制成 100 mg/ml 给药, 以进行研究。

根据肿瘤生长的进展来检测或测定变化。

6.6. EphA4 抗体的动力学分析

用基于表面电浆共振的 BIACORE™ 分析法测量本发明的单克隆抗体的 K_{off} 速率。测量杂交瘤上清液中的 IgG。

EphA4 的固定

使用标准胺(NHS/EDC 的 70 μ l 1: 1 混合物)连合化学, 将 EphA4 融合蛋白固定到 CM5 传感芯片表面上。简言之, 将溶解在 10mM NaOAc 中, pH4 的 400nM EphA4 融合蛋白溶液注射到活化的表面上, 达到密度 1000-1100

RU。然后用 1M Et-NH₂ 的 70μl 注射液“封住”未使用的活性酯。相似地，在不含蛋白的同一种传感芯片上制备活化的和“封住”的对照表面，作为参考表面。

结合实验

将 250 μl 每种 EphA4 杂交瘤上清液的注射液注射到 EphA4 融合蛋白和对照表面上，记录结合反应。这些上清液未经稀释。每次注射后，收集至少 10 min 的分离相数据。制备纯化的 EphA4 单克隆抗体，以作为阳性对照(每 250μl 生长培养基 1μg、5μg 和 25μg)。还制备出不结合 EphA4 的阴性对照单克隆抗体，制备成 5μg/250μl 生长培养基。还制备出覆盖这些表面的生长培养基的对照注射液。每次结合循环后，EphA4 融合蛋白表面用单次 1 min 的 1M NaCl-50mM NaOH 脉冲(注射)再生。

数据分析

通过称为“双参照”的技术，减去人为噪声(空培养基注射液)和非特异性结合(对照表面)来校正结合数据。因此，传感器覆盖图代表了“净”结合曲线。EphA4 抗体具有低 K_{off} 速率。

7. 等价物

本领域所属技术人员可以认识到或能够确定不超过正常实验的方案，这些都是本发明特定实施方案的等价物。这种等价物也包括在下面的权利要求内。

本说明书中所述的所有出版物、专利和专利申请都在本说明书中引入作为参考，其结合程度就象是每种出版物、专利或专利申请都是具体的并且每一个都结合参考。

<110> 医学免疫公司

<120> EphA4 和 EphA4 调节剂用于诊断、治疗和预防癌症的用途

<130> 209073-146116

<140>

<141>

<150> 60/476,909

<151> 2003-06-06

<150> 60/503,356

<151> 2003-09-16

<160> 32

<170> Patentin Software 3.2

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 抗体 EA44 的蛋白 III 引导序列

<400> 1

atgaaaaaat tattatgcgca aattccttta gttgttcctt tctatgcggc ccagccggcc 60

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 抗体 EA44 的蛋白 III 引导序列

<400> 2

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala

20

<210> 3
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> 抗体 EA44 的 VH 序列

<400> 3
 atggcacagg tgcagctgtt gcagtctgga gctgaggtga agaagcctgg ggcctcagtg 60
 aaggttcctt gcaaggcttc tggatacacc ttcactagct atgctatgag ttgggtgcga 120
 caggcccctg gacaagggtt tgagtggatg ggatggatca acaccaacac tgggaacca 180
 acgtatgcc agggcttcac aggacggtt gtctctcct tggacacctc tgtcagcacg 240
 gcatatctgc agatcagcag cctaaaggct gaggacactg ccgtgtatta ctgtgcgaga 300
 gtccggacta cgggtgatgg ggacggtatg gacgtctggg gccaaaggcac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 4
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> 抗体 EA44 的 VH 序列

<400> 4
 Met Ala Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Val Lys Val Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln
 50 55 60
 Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Val Arg Thr Thr Val Tyr Gly Asp Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 抗体的 EA44 VH 和 VL 间的连接子

<400> 5

ggcggcggcg gcggtggcgg atcc

24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 抗体 EA44 的 VH 和 VL 间的连接子

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 抗体 EA44 的 VL 序列

<400> 7

gaaattgtgc tgactcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcaccacca gggccactgg tatccagac	180
aggttcagcg ccagtgggtc tgggacggat tcaacttca ccatcagcag agtggaaact	240
gaagattttg cagttatta ctgtcagcaa tatggtagt catggacatt cggccaaggg	300
accaaggtgg aaatcaaacg t	321

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 抗体 EA44 的 VL 序列

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1

5

10

15

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

<210> 9

<211> 15

<212> DNA

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> Sfi I 位点

<400> 9

ggcctcgggg gcctg

15

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> Sfi I site

<400> 10

Gly Leu Gly Gly Leu

1

5

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> FLAG 标签

<400> 11

gactacaaag atgacgatga caaa

24

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> FLAG 标签

<400> 12
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> HIS 标签

<400> 13
 caccatcacc atcaccat

18

<210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> HIS 标签

<400> 14
 His His His His His His
 1 5

<210> 15
 <211> 837
 <212> DNA
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> 前导 scFv (EA44)序列

<400> 15

```

atgaaaaaat tattatgc aattcctta gttgttcctt tctatgcggc ccagccggcc      60
atggcacagg tgcagctgtt gcagcttga gctgaggtga agaagcctgg ggcctcagtg 120
aaggttcctt gcaaggctt  tggatacacc ttactagct atgctatgag ttgggtgcga   180
caggccccctg gacaagggtt tgagtggatg ggatggatca acaccaacac tgggaacca 240
acgtatgcc  agggctcac aggacggttt gtcttctct tggacacctc tgtcagcag   300
gcatactgc agatcagcag cctaaaggct gaggacactg ccgtgtatta ctgtgcgaga   360
gtccggacta cgggtatgg ggacgggatg gacgtctggg gccaaaggcac cctggtcacc  420
gtctcctcag gcggcggcgg cgggtggcgg tccgaaattg tctgactca gtctccagcc  480
accctgtctg tctctccagg ggaagagacc accctctct gcagggccag tcagagtgtt  540
agcagcaact tagcctggtt ccagcagaaa cctggccagg ctcccaggct cctcatctat  600
ggtgcateca ccagggccac tggatccca gacaggttca gcgccagtgg gtctgggacg   660
gattcactc tcaccatcag cagagtggaa cctgaagatt tgcagtta ttactgtcag   720
caatatggtg gticatggac atcggccaa gggaccaagg tggaaatcaa acgtggcctc  780
gggggcctgg actacaaaga tgacatgac aaaggcgcac accatcacca tcacat   837

```

<210> 16

<211> 279

<212> PRT

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 前导 scFv (EA44)序列

<400> 16

```

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala
 1           5           10          15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu
 20          25          30
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Pro Cys Lys Ala Ser Gly
 35          40          45
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50          55          60
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro
 65          70          75          80
Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr
 85          90          95
Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp
100         105         110
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Arg Thr Thr Val Tyr Gly Asp
115         120         125
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
130         135         140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
145         150         155         160
Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
165         170         175
Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
180         185         190

```

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly
 195 200 205
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 210 215 220
 Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 225 230 235 240
 Gln Tyr Gly Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 245 250 255
 Lys Arg Gly Leu Gly Gly Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly
 260 265 270
 Ala His His His His His His
 275

<210> 17

<211> 777

<212> DNA

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 带有 FLAG & HIS 标签的成熟 scFv (EA44)序列

<400> 17

atggcacagg tgcagctgtt gcagtctgga gctgaggtga agaagcctgg ggcctcagtg 60
 aaggttcct gcaaggcttc tggatacacc ttcactagct atgctatgag ttgggtgcca 120
 caggccctg gacaaggct tgagtggatg ggatggatca acaccaacac tgggaacca 180
 acgtatgcc agggcttcac aggacggtt gtctctcct tggacacctc tgcagcacg 240
 gcatactgc agatcagcag cctaaaggct gaggacactg ccgtgtatta ctgtcgcaga 300
 gtcggacta cgggtgatgg ggacggtatg gacgtctggg gccaaaggcac cctggtcacc 360
 gtctctcag gcggcggcgg cggtggcggg tccgaaatt tgetgactca gtctccagcc 420
 accctgtctg tgetccagg ggaaagagcc accctctct gcagggccag tcagagtgtt 480
 agcagcaact tagcctggta ccagcagaaa cctggccagg ctcccaggct cctcatctat 540
 ggtgatcca ccagggccac tggatcca gacaggttca gcgccagtgg gtctgggacg 600
 gattcactc tcaccatcag cagagtggaa cctgaagatt ttgcagtta ttactgtcag 660
 caatatgta gtctatggac atcggccaa gggaccaagg tggaaatcaa acgtggcctc 720
 gggggcctgg actacaaga tgacgatgac aaaggcgcac accatcacca tcacat 777

<210> 18

<211> 259

<212> PRT

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 带有 FLAG & HIS 标签的成熟 scFv (EA44) 序列

<400> 18

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

Gly Ala Ser Val Lys Val Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln
 50 55 60
 Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Val Arg Thr Thr Val Tyr Gly Asp Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val
 130 135 140
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
 145 150 155 160
 Ser Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 165 170 175
 Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
 180 185 190
 Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 195 200 205
 Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
 210 215 220
 Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ala His His His
 245 250 255
 His His His

<210> 19

<211> 714

<212> DNA

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 不含 FLAG & HIS 标签的成熟 scFv (EA44)序列

<400> 19

atggcacagg tgcagctggt gcagctctgga gctgaggtga agaagcctgg ggcctcagtg 60
 aaggttccct gcaaggtctc tggatacacc tcactagct atgctatgag ttgggtgcca 120
 caggcccctg gacaagggtc tgagtggatg ggatggatca acaccaacac tgggaacca 180
 acgtatgcc agggcttcac aggacggttt gtctctcct tggacacctc tgcagcacg 240
 gcatactgc agatcagcag cctaaaggct gaggacactg ccgtgtatta ctgtcgaga 300
 gtccggacta cgggtgatgg ggacggtatg gacgtctggg gccaaagcac cctggtcacc 360
 gtctcctcag gcgcgcgcg gctgtggcga tccgaaattg tgctgactca gtctccagcc 420
 accctgtctg tgtctccagg ggaagagacc accctctcct gcagggccag tcagagtgtt 480

```

agcagcaact tagcctgta ccagcagaaa cctggccagg ctcccaggct cctcatctat 540
ggtgcatcca ccagggccac tggtatccca gacaggttca gegccagtgg gtctgggacg 600
gatttcactc tcaccatcag cagagtggaa cctgaagatt ttgcagtta ttactgtcag 660
caatatgta gttcatggac attcggccaa gggaccaagg tggaatcaa acgt 714

```

<210> 20

<211> 238

<212> PRT

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> 不含 FLAG & HIS 标签的成熟 scFv (EA44)序列

<400> 20

```

Met Ala Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 1           5           10          15
Gly Ala Ser Val Lys Val Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20          25          30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35          40          45
Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln
 50          55          60
Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr
 65          70          75          80
Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85          90          95
Tyr Cys Ala Arg Val Arg Thr Thr Val Tyr Gly Asp Gly Met Asp Val
100         105         110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly
115         120         125
Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val
130         135         140
Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
145         150         155         160
Ser Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
165         170         175
Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
180         185         190
Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
195         200         205
Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
210         215         220
Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
225         230         235

```

<210> 21

<211> 15

<212> DNA

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> EA44 VH 区域的 CDR1

<400> 21

agctatgcta tgagt

15

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> EA44 VH 区域的 CDR1

<400> 22

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 23

<211> 51

<212> DNA

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> EA44 VH 区域的 CDR2

<400> 23

tggatcaaca ccaacactgg gaacccaacg tatgccacagg gcttcacagg a

51

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>

<223> EA44 VH 区域的 CDR2

<400> 24

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 25
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

 <220>
 <223> EA44 VH 区域的 CDR3

 <400> 25
 gtccggacta cgggtgatgg ggacggtatg gacgtc 36

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

 <220>
 <223> EA44 VH 区域的 CDR3

 <400> 26
 Val Arg Thr Thr Val Tyr Gly Asp Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

 <220>
 <223> EA44 VL 区域的 CDR1

 <400> 27
 agggccagtc agagtgttag cagcaactta gcc 33

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

 <220>
 <223> EA44 VL 区域的 CDR1

 <400> 28
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> EA44 VL 区域的 CDR2

<400> 29
 ggtgcatcca ccagggccac t

21

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> EA44 VL 区域的 CDR2

<400> 30
 Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> EA44 VL 区域的 CDR3

<400> 31
 cagcaatatg gtagttcatg gaca

24

<210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 现代智人(Homo Sapiens)

<220>
 <223> EA44 VL 区域的 CDR3

<400> 32

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Trp Thr
1 5



图1

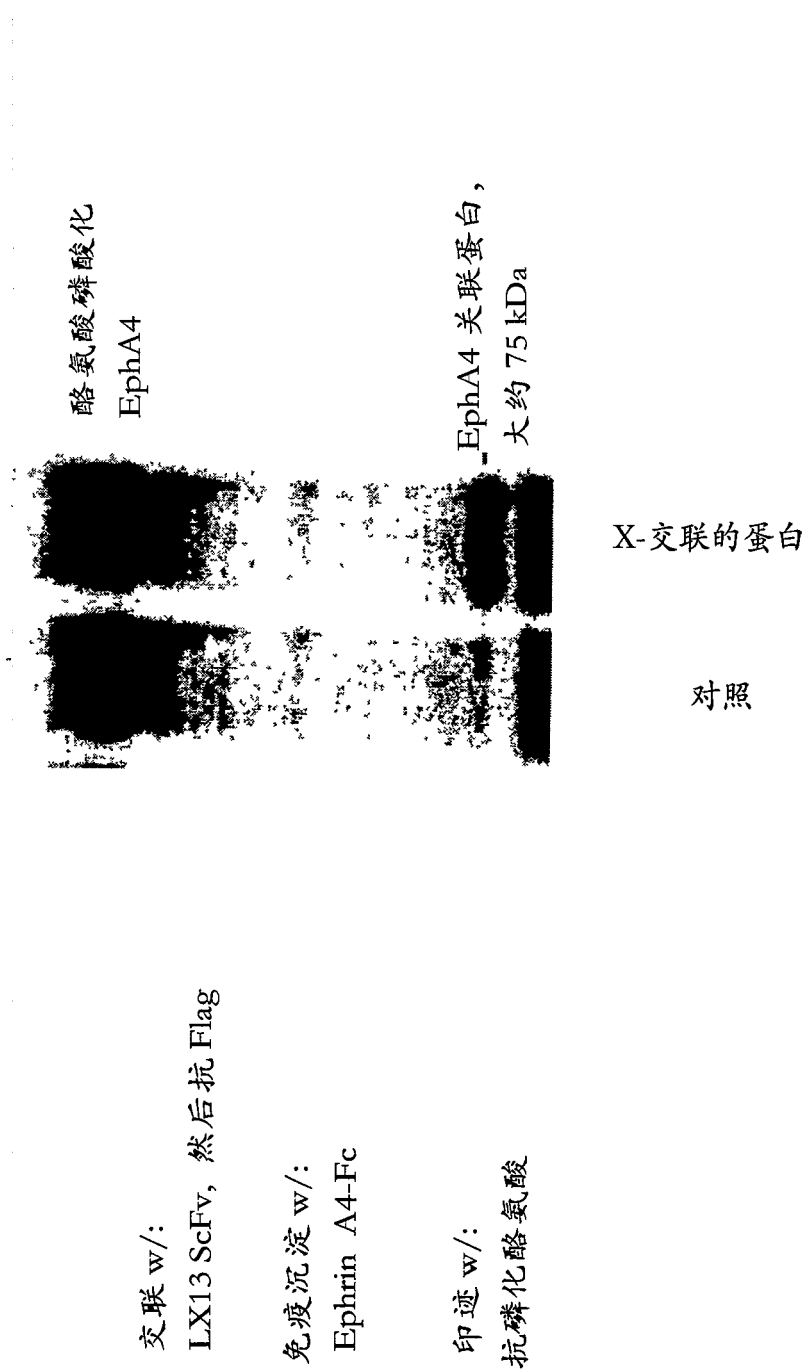
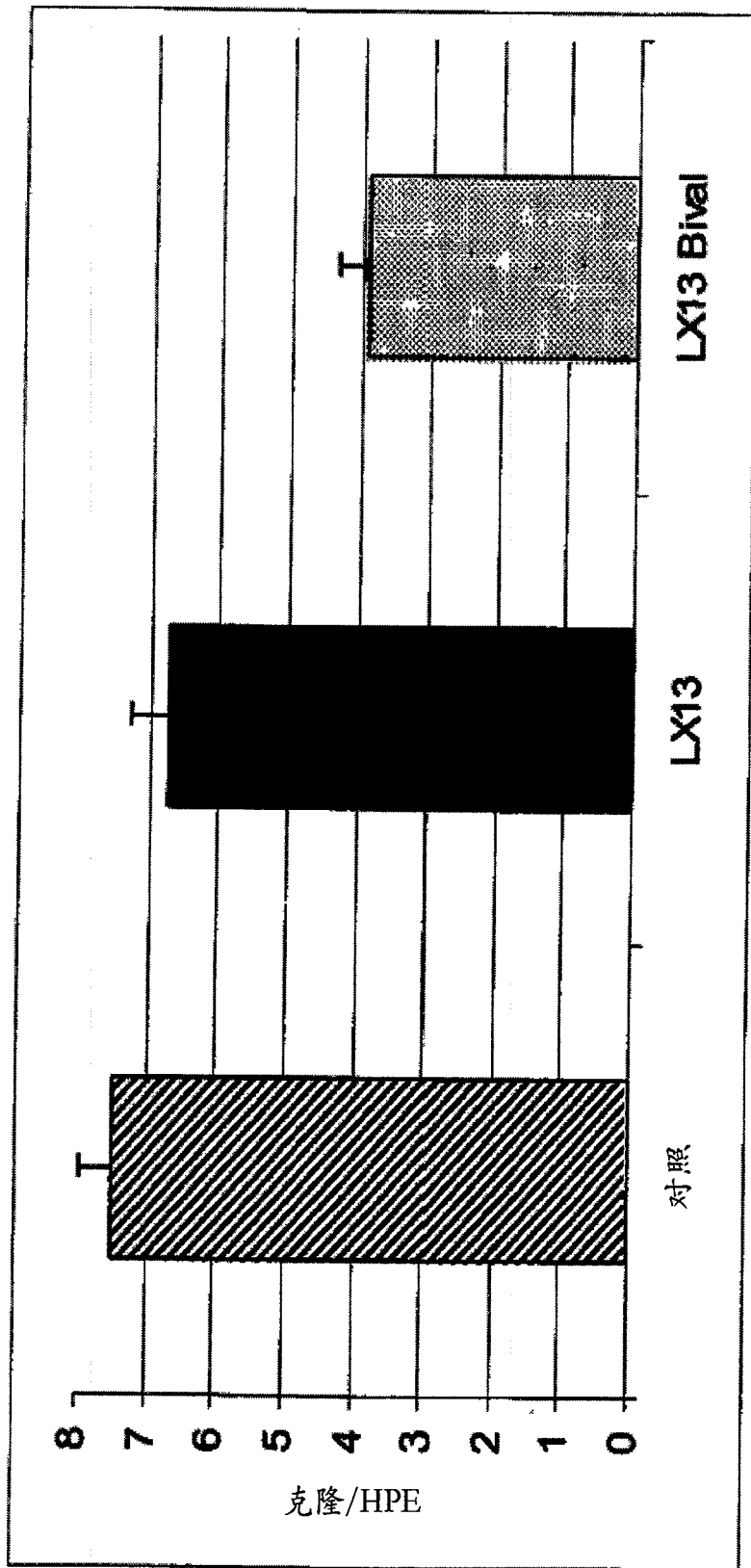


图 2



(聚集的 EphA4)

(scFv 单独)

(二级单抗单独)

图 3

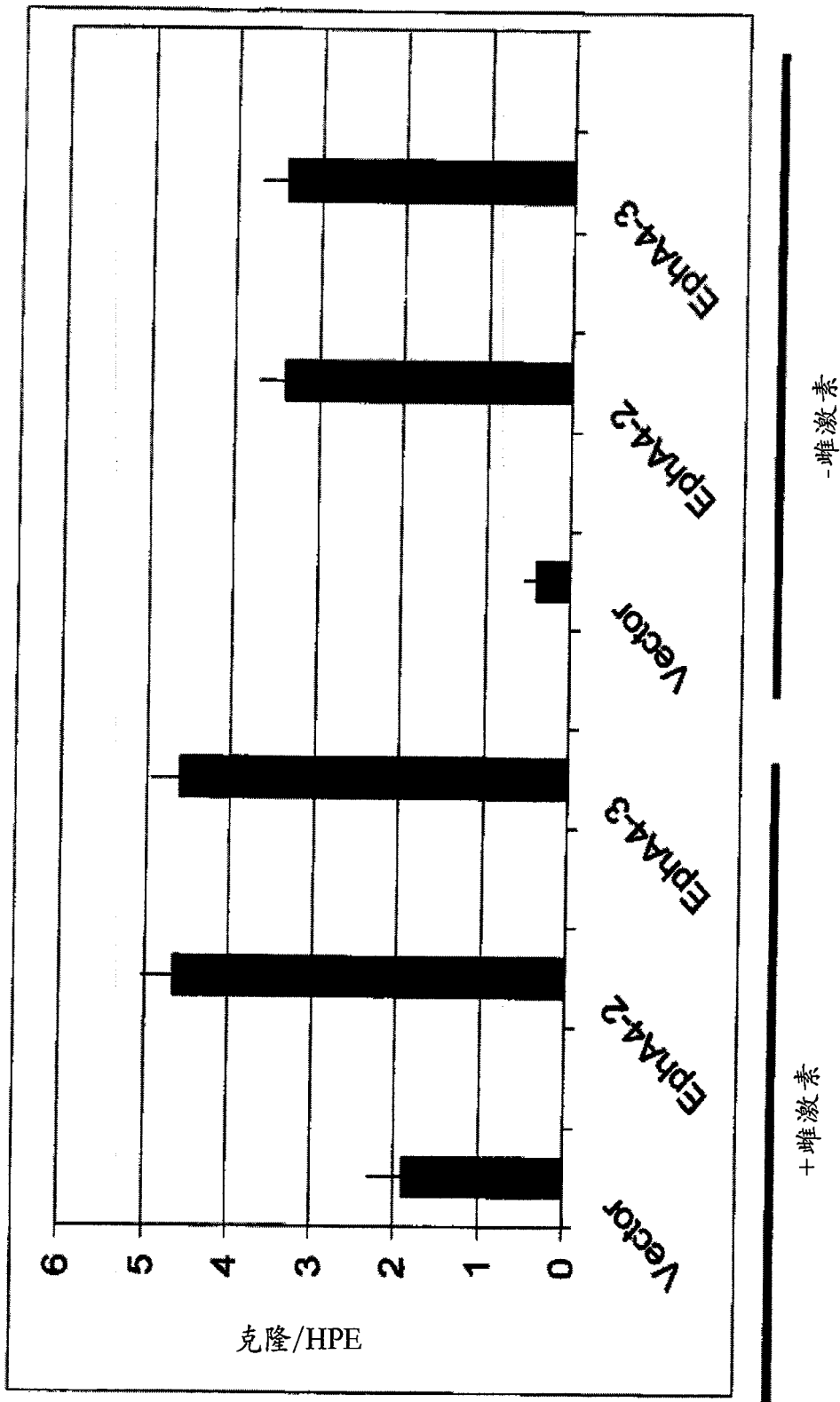
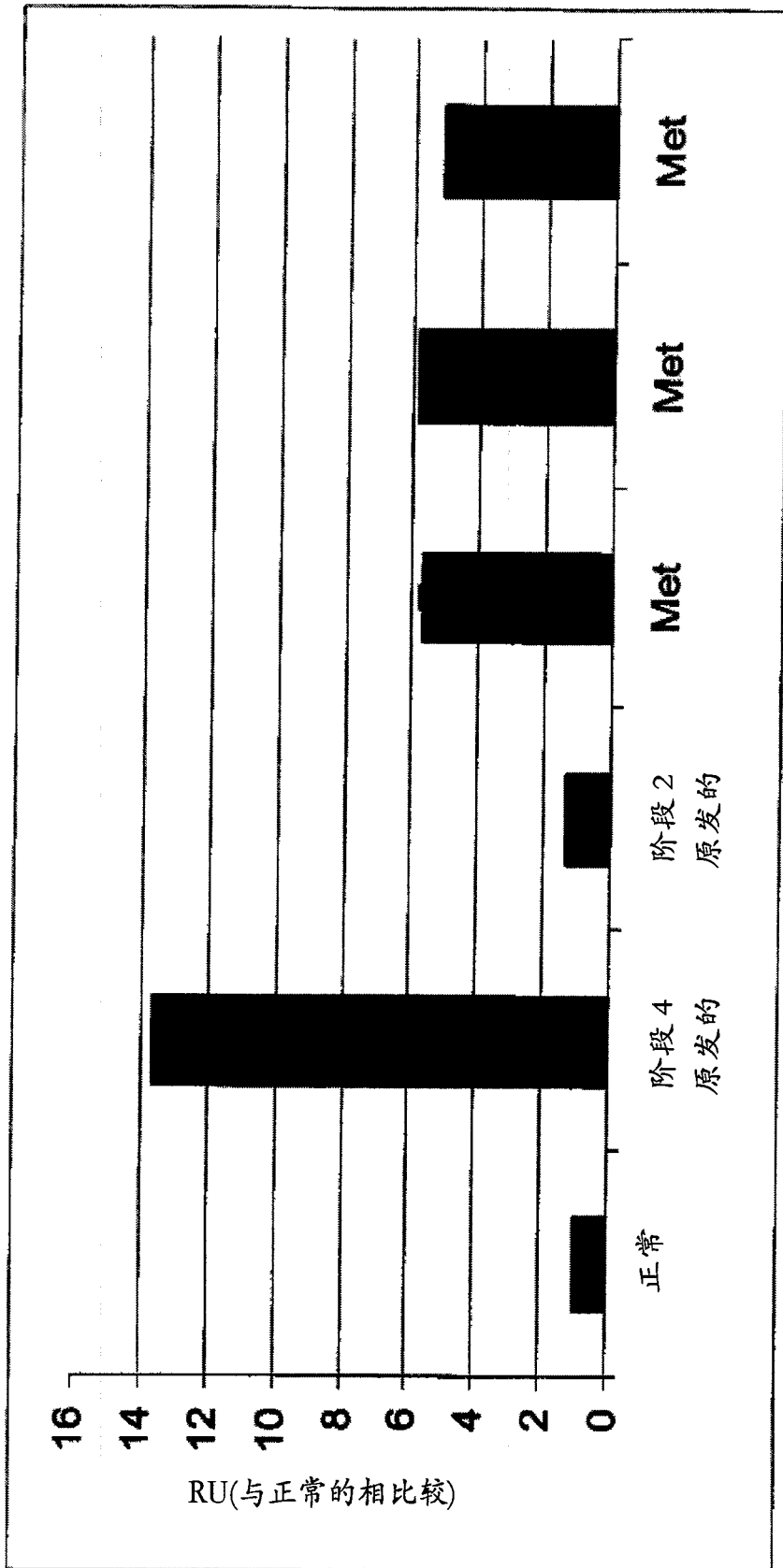


图 4



A. B. C. D. E. F.

图 5

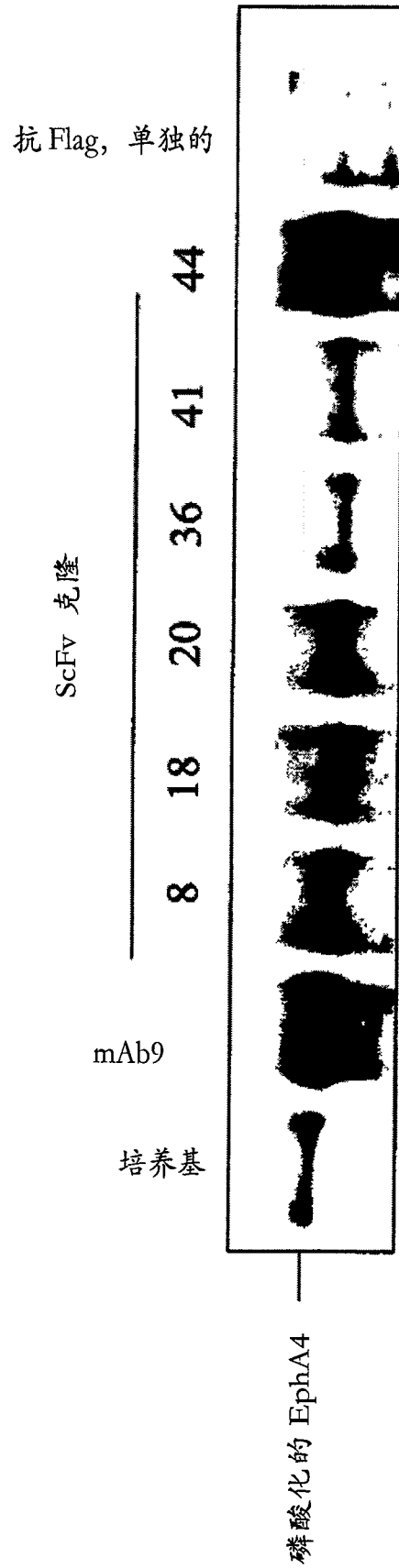


图6

专利名称(译)	EphA4和EphA4调节剂用于诊断、治疗和预防癌症的用途		
公开(公告)号	CN101227921A	公开(公告)日	2008-07-23
申请号	CN200480021986.5	申请日	2004-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	医学免疫有限公司		
[标]发明人	凯利卡尔斯金奇 迈克尔S金奇		
发明人	凯利·卡尔斯 - 金奇 迈克尔·S·金奇		
IPC分类号	A61K39/395 A61K49/00 G01N33/53		
代理人(译)	卢素华 郑霞		
优先权	60/476909 2003-06-06 US 60/503356 2003-09-16 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于治疗、控制或预防癌症，尤其是转移性癌症的方法和组合物。在一个实施方案中，本发明的方法包括给予有效量的一种或多种结合EphA4和激发EphA4的抗体。在另一个实施方案中，本发明的方法包括给予有效量的一种或多种结合EphA4和抑制软琼脂中的癌细胞克隆形成或三维基膜或细胞外基质制剂中管状网络形成的抗体。在另一个实施方案中，本发明的方法包括给予有效量的一种或多种优选结合在癌细胞上而不是在非癌细胞上暴露的EphA4抗原决定部位的抗体。在另一个实施方案中，本发明的方法包括给予有效量的一种或多种结合极低koff的EphA4的抗体，以降低EphA4表达，由此抑制肿瘤细胞生长和/或转移。本发明也提供药物组合物，其包括一种或多种本发明的EphA4抗体或还包括一种或多种用于癌症治疗的其他试剂。

治疗性试剂	给予	剂量	用药时间间隔
盐酸多柔比星(阿霉素 RDP [®] 和阿霉素 PFS [®])	静脉内	第1天 60-75 mg/m ²	21 天间隔
盐酸表柔比星 (Ellence [™])	静脉内	每个周期的第1天 100-120 mg/m ² 或在每个周期的第1-8天分次同量给予	3-4 周循环
氟尿嘧啶	静脉内	怎样供应: 5 ml 和 10 ml 小瓶(分别含有 250 和 500 mg 氟尿嘧啶)	
多西他赛	静脉内	1 小时内 60-100 mg/m ²	每3 周一次