



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116271014 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202310196594.7
(22) 申请日 2017.08.04
(30) 优先权数据
2016-154174 2016.08.05 JP
(62) 分案原申请数据
201780046902.0 2017.08.04
(71) 申请人 中外制药株式会社
地址 日本国东京都
申请人 学校法人自治医科大学
国立研究开发法人医药基盘・健康・营养研究所
(72) 发明人 垣内绫子 加藤淳彦 林修次
柳泽和泉 今野良 根津幸穗
山海直

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 柴云峰

(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

权利要求书10页 说明书89页
序列表（电子公布） 附图44页

(54) 发明名称
用于预防或治疗IL-8相关疾病的组合物

(57) 摘要
例如,提供了使用IL-8信号抑制剂的新的IL-8相关疾病的治疗方法等。备选地,提供了使用新的抗IL-8抗体的已知的或新的IL-8相关疾病的治疗方法等。

1. 用于治疗或预防IL-8相关疾病的组合物,其包含作为活性成分的结合人IL-8的分离的抗IL-8抗体,其中所述IL-8相关疾病选自由以下各项组成的组:

子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛,

且其中所述抗IL-8抗体选自由以下各项组成的组:

(A) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链;

(B) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链;

(C) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链;

(D) 抗IL-8抗体,其包含重链和轻链,其分别具有与包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链至少80%的序列同一性;

(E) 抗IL-8抗体,其包含重链和轻链,其分别具有与包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链至少80%的序列同一性;和

(F) 抗IL-8抗体,其包含重链和轻链,其分别具有与包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链至少80%的序列同一性;

(G) 抗IL-8抗体,其包含:

(a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,

(b) SEQ ID NO:29的氨基酸序列作为HVR-H2,和

(c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3;

(H) 抗IL-8抗体,其包含:

(d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,

(e) SEQ ID NO:31的氨基酸序列作为HVR-L2,和

(f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;

(I) 抗IL-8抗体,其包含:

(a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,

(b) SEQ ID NO:24的氨基酸序列作为HVR-H2,和

(c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3;

(J) 抗IL-8抗体,其包含:

(d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,

(e) SEQ ID NO:107的氨基酸序列作为HVR-L2,和

(f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;

(K) 抗IL-8抗体,其包含:

(a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,

(b) SEQ ID NO:29的氨基酸序列作为HVR-H2,

(c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3,

(d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,

(e) SEQ ID NO:31的氨基酸序列作为HVR-L2,和

(f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;

(L) 抗IL-8抗体,其包含:

(a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,

(b) SEQ ID NO:24的氨基酸序列作为HVR-H2,

(c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3,

(d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,

(e) SEQ ID NO:107的氨基酸序列作为HVR-L2,和

(f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;

(M) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链可变区和含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链可变区;

(N) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的重链可变区和含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的轻链可变区;

(O) 抗IL-8抗体,其包含HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其分别具有与(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2,(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,(d)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,(e)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L2,和(f)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L3的至少80%序列同一性;

(P) 抗IL-8抗体,其包含HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其分别具有与(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,(b)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,(d)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,(e)包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HVR-L2,和(f)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L3的至少80%的序列同一性;

(Q) 抗IL-8抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,其分别具有与包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链可变区至少80%的序列同一性;以及

(R) 抗IL-8抗体,其包含有重链可变区和轻链可变区,其分别具有与包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的轻链可变区至少80%的序列同一性。

2. 用于治疗或预防IL-8相关疾病的组合物,其包含作为活性成分的结合人IL-8的分离的抗IL-8抗体,其中所述IL-8相关疾病选自由以下各项组成的组:

子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛;

其中所述抗IL-8抗体选自由以下各项组成的组:

(1) 抗IL-8抗体,其以pH依赖性方式结合至IL-8,并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:

(a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,

(b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,

(c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,

(d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,

(e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2,和

(f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3;

(2) 抗IL-8抗体,其以pH依赖性方式结合至IL-8,并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:

(a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,

(b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,

(c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,

(d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,

(e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2,和

(f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,

其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代:

在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸,

在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中位置1处的天冬酰胺和位置5处的亮氨酸,和

在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中位置1处的谷氨酰胺;

(3) 抗IL-8抗体,其以pH依赖性方式结合至IL-8,并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:

(a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,

(b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,

(c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,

(d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,

(e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2,和

(f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,

其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代:

在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中位置9处的酪氨酸和位置11处的精氨酸,和

在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸;

(4) 抗IL-8抗体,其以pH依赖性方式结合至IL-8,并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:

(a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,

(b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,

(c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,

(d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,

(e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2,和

(f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,

其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代:

在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中位置6处的丙氨酸、位置8处的甘氨酸、位置9处的酪氨酸和位置11处的精氨酸,和

在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸;

(5) 抗IL-8抗体,其以pH依赖性方式结合至IL-8,并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:

- (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,
- (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,
- (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,
- (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,
- (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2, 和
- (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,

其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代:

在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中位置1处的天冬酰胺和位置5处的亮氨酸, 和

在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中位置1处的谷氨酰胺;

(6) 抗IL-8抗体, 其以pH依赖性方式结合至IL-8, 并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:

- (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,
- (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,
- (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,
- (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,
- (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2, 和
- (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,

其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代:

在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中位置9处的酪氨酸和位置11处的精氨酸,

在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸,

在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中位置1处的天冬酰胺和位置5处的亮氨酸, 和

在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中位置1处的谷氨酰胺; 和

(7) 抗IL-8抗体, 其以pH依赖性方式结合至IL-8, 并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:

- (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,
- (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,
- (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,
- (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,
- (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2, 和
- (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,

其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代:

在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中位置6处的丙氨酸、位置8处的甘氨酸、位置9处的酪氨酸和位置11处的精氨酸,

在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸,

在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中位置1处的天冬酰胺和位置5处的亮氨酸, 和

在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中位置1处的谷氨酰胺。

3. 权利要求2的组合物, 其中所述抗IL-8抗体选自由以下各项组成的组:

(8) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体, 其包含:

- (a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,

- (b) SEQ ID NO:29的氨基酸序列作为HVR-H2,和
- (c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3;
- (9) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含:
 - (d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,
 - (e) SEQ ID NO:31的氨基酸序列作为HVR-L2,和
 - (f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;
- (10) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含:
 - (a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,
 - (b) SEQ ID NO:24的氨基酸序列作为HVR-H2,和
 - (c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3;
- (11) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含:
 - (d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,
 - (e) SEQ ID NO:107的氨基酸序列作为HVR-L2,和
 - (f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;
- (12) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含:
 - (a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,
 - (b) SEQ ID NO:29的氨基酸序列作为HVR-H2,
 - (c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3,
 - (d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,
 - (e) SEQ ID NO:31的氨基酸序列作为HVR-L2,和
 - (f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;
- (13) 权利要求1中(1)或(2)所述的抗IL-8抗体,其包含:
 - (a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,
 - (b) SEQ ID NO:24的氨基酸序列作为HVR-H2,
 - (c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3,
 - (d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,
 - (e) SEQ ID NO:107的氨基酸序列作为HVR-L2,和
 - (f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;
- (14) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链可变区和含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链可变区;
- (15) 权利要求1中的(1)或(2)所述的抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的重链可变区和含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的轻链可变区;
- (16) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其分别具有与(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2,(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,(d)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,(e)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L2,和(f)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L3的至少80%序列同一性;
- (17) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其分别具有与(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的

HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2, (c) 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3, (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1, (e) 包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HVR-L2, 和(f) 包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L3的至少80%的序列同一性;

(18) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体, 其包含重链可变区和轻链可变区, 其分别具有与包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链可变区至少80%的序列同一性; 以及

(19) 权利要求1中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体, 其包含有重链可变区和轻链可变区, 其分别具有与包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的轻链可变区至少80%的序列同一性。

4. 用于治疗或预防IL-8相关疾病的组合物, 其包含作为活性成分的结合人IL-8的分离的抗IL-8抗体, 其中所述IL-8相关疾病选自由以下各项组成的组:

子宫内膜异位症; 子宫腺肌病; 痛经; 粘连; 纤维化疾病; 子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛; 不孕; 以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛,

且其中所述抗IL-8抗体选自由以下各项组成的组:

(I) 抗IL-8抗体, 其包含Fc区, 所述Fc区包含在选自由以下各项组成的组中的一个或多个位置处的氨基酸取代: 235、236、239、327、330、331、428、434、436、438和440, 根据EU编号;

(II) 抗IL-8抗体, 其包含Fc区, 所述Fc区包含在选自由434、438和440组成的组中的所有位置处的氨基酸取代, 根据EU编号;

(III) 抗IL-8抗体, 其包含Fc区, 所述Fc区包含所有下述取代: 在位置434用Ala的氨基酸取代; 在位置438用Glu、Arg、Ser或Lys的氨基酸取代; 在位置440用Glu、Asp或Gln的氨基酸取代, 根据EU编号;

(IV) 抗IL-8抗体, 其包含Fc区, 所述Fc区包含所有下述取代: 在位置434用Ala的氨基酸取代; 在位置438用Glu、Arg、Ser或Lys的氨基酸取代; 在位置440用Glu、Asp或Gln的氨基酸取代, 且进一步包含在位置428的Ile或Leu, 和/或在位置436的Ile、Leu、Val、Thr或Phe, 根据EU编号;

(V) 抗IL-8抗体, 其包含Fc区, 所述Fc区包含选自由以下各项组成的组中的一种或更多种氨基酸取代: L235R、G236R、S239K、A327G、A330S、P331S、M428L、N434A、Y436T、Q438R和S440E, 根据EU编号;

(VI) 抗IL-8抗体, 其包含Fc区, 所述Fc区包含选自由以下各项组成的组的氨基酸取代的组合:

N434A/Q438R/S440E; N434A/Q438R/S440D;

N434A/Q438K/S440E; N434A/Q438K/S440D;

N434A/Y436T/Q438R/S440E; N434A/Y436T/Q438R/S440D;

N434A/Y436T/Q438K/S440E; N434A/Y436T/Q438K/S440D;

N434A/Y436V/Q438R/S440E; N434A/Y436V/Q438R/S440D;

N434A/Y436V/Q438K/S440E; N434A/Y436V/Q438K/S440D;

N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E; N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;

N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E;N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;
N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E;N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;
N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E;N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;
M428L/N434A/Q438R/S440E;M428L/N434A/Q438R/S440D;
M428L/N434A/Q438K/S440E;M428L/N434A/Q438K/S440D;
M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;
M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E;M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;
M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E;M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;
M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E;和M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;
根据EU编号;

(VII) 抗IL-8抗体,其包含含以下氨基酸取代的组中的Fc区:

L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;或
L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E
根据EU编号;和

(VIII) 抗IL-8抗体,其包含上述(I)至(VII)中任一项所述的Fc区,其中所述Fc区具有选自由以下(a)至(e)组成的组中的至少一种性质:

- (a) 相对于天然Fc区的FcRn结合亲和力,Fc区在酸性pH下的FcRn结合亲和力已经增加;
- (b) 相对于天然Fc区对预先存在的ADA的结合亲和力,Fc区对预先存在的ADA的结合亲和力已经降低;
- (c) 相对于天然Fc区的血浆半衰期,Fc区的血浆半衰期已经增加;
- (d) 相对于天然Fc区的血浆清除率,Fc区的血浆清除率已经降低;和
- (e) 相对于天然Fc区对效应受体的结合亲和力,Fc区对效应受体的结合亲和力已经降低。

5. 权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中所述纤维化疾病选自由以下各项组成的组:子宫内膜异位症或子宫腺肌病中的纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、牛皮癣、肝纤维化、肾纤维化和肺纤维化。

6. 用于治疗或预防IL-8相关疾病的组合物,其包含IL-8信号抑制剂作为活性成分,其中所述IL-8相关疾病选自由以下各项组成的组:人子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;人子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

7. 权利要求6所述的组合物,其用于抑制IL-8相关疾病中免疫细胞向病变或其周围环境的浸润。

8. 权利要求6或7所述的组合物,用于抑制芳香酶或纤维化因子的产生。

9. 权利要求6至8中任一项所述的组合物,其不影响性周期。

10. 权利要求6至9中任一项所述的组合物用于抑制子宫内膜异位症或子宫腺肌病中的粘连或纤维化。

11. 权利要求6至10中任一项所述的组合物用于(1)使子宫内膜异位症或子宫腺肌病患者中的子宫内膜上皮细胞或基质细胞萎缩,或(2)减少子宫内膜异位症中的子宫内膜间质。

12. 权利要求6至11中任一项所述的组合物,其中痛经是具有子宫内膜异位症或子宫腺

肌病的痛经,或是怀疑子宫内膜异位症或子宫腺肌病的痛经。

13. 权利要求6所述的组合物,其中粘连是在手术后形成的。

14. 权利要求6至13中任一项所述的组合物,其中所述IL-8信号抑制剂是IL-8抑制剂、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂。

15. 权利要求14所述的组合物,其中所述IL-8抑制剂、所述CXCR1抑制剂或所述CXCR2抑制剂分别是抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体。

16. 权利要求1至5中任一项所述的组合物,用于抑制免疫细胞向IL-8相关疾病的病变或其邻近环境的浸润。

17. 权利要求1至5所述的组合物,用于抑制芳香酶或纤维化因子的产生。

18. 权利要求1至5中任一项所述的组合物,其不影响性周期。

19. 权利要求1至5中任一项所述的组合物用于抑制子宫内膜异位症或子宫腺肌病中的粘连或纤维化。

20. 权利要求1至5中任一项所述的组合物,用于:

- (1) 使子宫内膜异位症或子宫腺肌病患者中的子宫内膜上皮细胞或基质细胞萎缩,或
- (2) 减少子宫内膜异位症中的子宫内膜间质。

21. 权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述痛经具有子宫内膜异位症或子宫腺肌病,或怀疑是子宫内膜异位症或子宫腺肌病。

22. 权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述粘连在手术后形成。

23. 权利要求1至22中任一项所述的组合物,其中所述IL-8相关疾病对IL-8信号有应答。

24. 权利要求1至23中任一项所述的组合物,其额外包含药学上可接受的载体。

25. 权利要求1至5和权利要求16至24中任一项所述的组合物,其中所述子宫内膜异位症是人子宫内膜异位症。

26. 权利要求1至5和权利要求16至25中任一项所述的抗IL-8抗体,用于治疗或预防选自以下各项组成的组的IL-8相关疾病:

子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

27. 权利要求6至15和权利要求23至25中任一项所述的IL-8信号抑制剂,用于治疗或预防选自以下各项组成的组的IL-8相关疾病的:

人子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;人子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

28. 权利要求1至5和权利要求16至25中任一项所定义的抗IL-8抗体,在制备用于治疗或预防IL-8相关疾病的药物中的用途,其中所述IL-8相关疾病选自以下各项组成的组:

子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

29. 权利要求6至15和权利要求23至25中任一项所定义的IL-8信号抑制剂,在制备用于治疗或预防IL-8相关疾病的药物中的用途,其中所述IL-8相关疾病选自以下各项组成的组:

人子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;人子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经的

疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

30. 抗IL-8抗体在制备治疗或预防IL-8相关疾病的药物中的用途,其中所述IL-8相关的疾病是粘连,并且其中所述抗IL-8抗体包含:

(A) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链;

(B) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链;

(C) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链;

(D) 抗IL-8抗体,其包含重链和轻链,其分别具有与包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链至少80%的序列同一性;

(E) 抗IL-8抗体,其包含重链和轻链,其分别具有与包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链至少80%的序列同一性;和

(F) 抗IL-8抗体,其包含重链和轻链,其分别具有与包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链至少80%的序列同一性;

(G) 抗IL-8抗体,其包含:

(a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,

(b) SEQ ID NO:29的氨基酸序列作为HVR-H2,和

(c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3;

(H) 抗IL-8抗体,其包含:

(d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,

(e) SEQ ID NO:31的氨基酸序列作为HVR-L2,和

(f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;

(I) 抗IL-8抗体,其包含:

(a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,

(b) SEQ ID NO:24的氨基酸序列作为HVR-H2,和

(c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3;

(J) 抗IL-8抗体,其包含:

(d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,

(e) SEQ ID NO:107的氨基酸序列作为HVR-L2,和

(f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;

(K) 抗IL-8抗体,其包含:

(a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,

(b) SEQ ID NO:29的氨基酸序列作为HVR-H2,

(c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3,

(d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,

(e) SEQ ID NO:31的氨基酸序列作为HVR-L2,和

(f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;

(L) 抗IL-8抗体,其包含:

- (a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,
- (b) SEQ ID NO:24的氨基酸序列作为HVR-H2,
- (c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3,
- (d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,
- (e) SEQ ID NO:107的氨基酸序列作为HVR-L2,和
- (f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;

(M) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链可变区和含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链可变区;

(N) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的重链可变区和含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的轻链可变区;

(O) 抗IL-8抗体,其包含HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其分别具有与(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2,(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,(d)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,(e)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L2,和(f)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L3的至少80%序列同一性;

(P) 抗IL-8抗体,其包含HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其分别具有与(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,(b)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,(d)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,(e)包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HVR-L2,和(f)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L3的至少80%的序列同一性;

(Q) 抗IL-8抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,其分别具有与包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链可变区至少80%的序列同一性;以及

(R) 抗IL-8抗体,其包含有重链可变区和轻链可变区,其分别具有与包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的轻链可变区至少80%的序列同一性。

31. 权利要求30所述的用途,其中粘连是在手术后形成的。

用于预防或治疗IL-8相关疾病的组合物

[0001] 本申请是申请日为2017年8月4日,中国申请号201780046902.0,发明名称为“用于预防或治疗IL-8相关疾病的组合物”的分案申请。

技术领域

[0002] 本公开涉及用于IL-8相关疾病等的治疗或预防组合物。

背景技术

[0003] 子宫内膜异位症不仅因其雌激素依赖性(非专利文献1和2)而且因其作为炎性疾病(非专利文献3)而闻名。

[0004] 在一个方面,并非意在受任何限制,子宫内膜异位症(endometriosis)是指子宫内膜组织在子宫腔外出现和异位生长的疾病(通常在骨盆内,偶尔在腹膜腔内,很少在胸腔内)。子宫内膜异位症不是恶性肿瘤,而是随着时间的推移而发展的疾病并且导致肿瘤形成和邻近组织的粘连、月经期和非月经期的严重腹部和骨盆疼痛以及不育(生育能力受损)。子宫内膜异位症主要发生在20岁或20岁以上的育龄妇女,导致与疼痛和其他症状相关的QOL降低,并且由于粘连的加重导致慢性疼痛和不育。在一个方面,并非意在受任何限制,子宫腺肌病(adenomyosis)是指与子宫内膜异位症相似但涉及在子宫肌层内发生子宫内膜的疾病。子宫腺肌病导致严重的月经痛、月经过多、贫血和慢性疼痛。(本文使用的术语“子宫内膜异位症”和“子宫腺肌病”通过以下“实施本发明的方式”中的描述来定义。)

[0005] 子宫内膜异位症或子宫腺肌病的常规治疗包括镇痛药、激素疗法和手术治疗。镇痛药仅具有有限的效果并且不能预防疾病状态的进展。激素疗法对缓解疼痛并延缓疾病进展有效;然而,它的问题在于,在治疗期间由于其停止月经而丧失受孕能力,在治疗中断后疾病状态可能再次发展,并且激素药物具有副作用。此外,之前没有报道改善激素药物施用后的受孕能力。即使在手术治疗的情况下,手术后三至五年复发的可能性也高达约50%(非专利文献4和5)。为了防止术后复发,患者需要继续服用激素类药物并忍受其副作用。

[0006] IL-8(白细胞介素8)是趋化因子,并且是已知具有72个和77个氨基酸形式的蛋白质。IL-8也称为CXCL8。当根据72个氨基酸形式编号时,IL-8的单体在半胱氨酸7和34之间以及半胱氨酸9和50之间具有两个二硫键。已知IL-8也可以在溶液中以同型二聚体的形式存在。该同二聚体没有分子间共价键,并且通过两个单体的 β 折叠之间的非共价相互作用来稳定。

[0007] IL-8由各种细胞诸如外周血单核细胞、组织巨噬细胞、NK细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞在用炎性细胞因子等刺激下产生(非专利文献6)。IL-8被认为具有主要活化中性粒细胞、提高它们的细胞粘连分子的表达、从而增强它们与血管内皮细胞的粘连的活性。IL-8还对中性粒细胞具有趋化活性。在受损组织中产生的IL-8促进粘连于血管内皮细胞的中性粒细胞向组织的迁移,从而诱导与中性粒细胞浸润相关的炎症。此外,IL-8是内皮细胞的主要血管生成因子,并且还已知参与肿瘤血管生成。

[0008] 已报道,当将人增殖期子宫内膜组织向腹膜内移植入具有雌二醇释放胶囊的卵巢

切除裸鼠中,然后向它们施用抗IL-8抗体时,观察到子宫内膜病变的消退(专利文献1)。

[0009] 然而,在非灵长类实验动物模型中不会发生类似于人类的月经。因此,为了阐明人子宫内膜异位症的原因,诸如大鼠和小鼠等动物不能作为人子宫内膜异位症的真正动物模型。首先大鼠和小鼠不具有IL-8。此外,因为直到最近还没有可以用来正确评估人子宫内膜异位症的体内非人灵长类动物模型,所以以前没有报道使用体内非人类灵长类动物模型确认IL-8信号对子宫内膜异位症的影响。

[0010] 而且,由外科手术等引起的粘连在各种疾病状况下都是悬而未决的。防粘连片是一种治疗或预防粘连的方法。尽管防粘连片在减少术后粘连方面是有效的,但由于仍以15%的频率形成致密粘合,因此效果仍然不足(非专利文献7)。

[0011] 引文列表

[0012] [专利文献]

[0013] 专利文献1:W02009/026117

[0014] [非专利文献]

[0015] 非专利文献1:Bulun等,Endometriosis.N Engl J Med 2009;360:268-279

[0016] 非专利文献2:Giudice等,Endometriosis.Lancet 2004;364:1789-1799

[0017] 非专利文献3:Donnez等,Gynecol Obstet Invest 2002;54Suppl.1:52-58; discussion 59-62

[0018] 非专利文献4:Vercellini等,Am J Obstet Gynecol.2008年5月;198(5):504.e1-5

[0019] 非专利文献5:Guo等,Hum Reprod Update.2009年7月-8月;15(4):441-461

[0020] 非专利文献6:Remo等,Expert Rev.Clin.Immunol.2014 10(5):593-619

[0021] 非专利文献7:Becker等,J Am Coll Surg.1996年10月;183(4):297-306发明概述

[0022] [本发明要解决的问题]

[0023] 鉴于包括上述那些在内的各种情况实现了本发明。在一个非限制性方面,本发明的目的是提供使用IL-8信号抑制剂治疗IL-8相关疾病的新方法等。

[0024] 更具体地,在一个非限制性实施方案中,本发明的目的是提供通过使用IL-8信号抑制剂用于新的IL-8相关疾病的新治疗方法等。备选地,在另一个非限制性实施方案中,本发明的目的是提供通过使用新的抗IL-8抗体用于新的或已知的IL-8相关疾病的新治疗方法等。

[0025] [解决问题的手段]

[0026] 不必然意在受理论约束,本发明人已经提出,子宫内膜异位症的真实病理学在概念上是如先前报道的慢性炎性增殖性疾病(Odagiri,Fertil Steril.2009;92(5):1525-31)。子宫内膜异位症的病理学是慢性炎症后的免疫应答,表现为纤维化、平滑肌化生、神经再生、血管生成等。基于IL-8参与慢性炎症机制的重要组成部分以及子宫内膜异位症是一种慢性炎性疾病的概念,本发明人进行了药物有效性的病理学和临床评价(使用腹腔镜或MR观察)。

[0027] 本发明,并非意在受任何限制,基于从基础研究到使用动物模型的临床研究的综合研究,其包括创建非人灵长类动物模型以阐明子宫内膜异位症等的病理学,以及高度功能性抗IL-8抗体的制备和改进及其药理作用的评估。因为使用大鼠、小鼠或其他小动物的

动物模型实验不能实现对人子宫相关疾病的真实评估,所以本发明人创建了具有手术诱导的子宫内膜异位症的食蟹猴模型,并且进行试错和专门研究,同时收集每个人的优秀技术、知识等,如来自包括食蟹猴在内的灵长类动物的基础繁殖研究,人子宫内膜异位症病理状况的概念等,及其评估和临床管理(腹腔镜手术和观察,MRI(磁共振成像)评估等),然后完成本发明。

[0028] 具体地,在一个非限制性实施方案中,本发明人采用以下方法:从抗炎方面关注IL-8(其是子宫内膜异位症中的主要炎性细胞因子),以寻求与现有的激素疗法不同的,改善其病理状况而不会影响性周期的子宫内膜异位症或子宫腺肌病的治疗剂。结果,本发明人出人意料地发现通过施用IL-8信号抑制剂改善了病理状况。

[0029] 此外,在另一个非限制性实施方案中,本发明人采用了从抗炎方面解决由外科手术等引起的粘连的方法,结果出人意料地发现通过施用IL-8信号抑制剂改善了粘连。

[0030] 而且,在另一个非限制性实施方案中,本发明人认为本公开中的高功能性抗IL-8抗体可用于治疗新的或已知的IL-8相关疾病等。这种高功能性抗IL-8抗体包括pH依赖性抗IL-8抗体(以pH依赖性方式与IL-8结合的抗IL-8抗体)。当施用于个体时,pH依赖性抗IL-8抗体是有利的,因为与参考抗体相比,它们可以具有至少一种或更多种以下性质:它们快速去除IL-8;它们稳定地保持它们的IL-8中和活性;它们的免疫原性低;且它们的表达水平高。备选地,这种高功能性抗IL-8抗体可以是具有至少一种或更多种以下性质的抗体:含有Fc结构域的抗IL-8抗体,其在酸性pH下的FcRn结合亲和力大于天然Fc结构域;含有Fc结构域的抗IL-8抗体,其对预先存在的ADA的结合亲和力低于天然Fc结构域的结合亲和力;含有Fc结构域的抗IL-8抗体,其血浆半衰期长于天然Fc结构域的血浆半衰期;和含有Fc结构域的pH依赖性抗IL-8抗体,其对效应受体的结合亲和力低于天然Fc结构域的结合亲和力。

[0031] 在一个非限制性的具体实施方案中,本发明涉及:

[0032] [1]用于治疗或预防IL-8相关疾病的组合物,其包含作为活性成分的结合人IL-8的分离的抗IL-8抗体,其中所述IL-8相关疾病选自由以下各项组成的组:

[0033] 子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛;

[0034] 其中所述抗IL-8抗体选自由以下各项组成的组:

[0035] (1)抗IL-8抗体,其以pH依赖性方式结合至IL-8,并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:

[0036] (a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,

[0037] (b)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,

[0038] (c)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,

[0039] (d)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,

[0040] (e)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2,和

[0041] (f)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3;

[0042] (2)抗IL-8抗体,其以pH依赖性方式结合至IL-8,并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:

[0043] (a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,

[0044] (b)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,

- [0045] (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,
- [0046] (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,
- [0047] (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2, 和
- [0048] (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,
- [0049] 其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代:
- [0050] 在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸,
- [0051] 在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中位置1处的天冬酰胺和位置5处的亮氨酸, 和
- [0052] 在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中位置1处的谷氨酰胺;
- [0053] (3) 抗IL-8抗体, 其以pH依赖性方式结合至IL-8, 并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:
- [0054] (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,
- [0055] (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,
- [0056] (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,
- [0057] (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,
- [0058] (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2, 和
- [0059] (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,
- [0060] 其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代:
- [0061] 在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中位置9处的酪氨酸和位置11处的精氨酸, 和
- [0062] 在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸;
- [0063] (4) 抗IL-8抗体, 其以pH依赖性方式结合至IL-8, 并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:
- [0064] (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,
- [0065] (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,
- [0066] (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,
- [0067] (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,
- [0068] (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2, 和
- [0069] (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,
- [0070] 其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代:
- [0071] 在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中位置6处的丙氨酸、位置8处的甘氨酸、位置9处的酪氨酸和位置11处的精氨酸, 和
- [0072] 在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸;
- [0073] (5) 抗IL-8抗体, 其以pH依赖性方式结合至IL-8, 并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代:
- [0074] (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,
- [0075] (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2,
- [0076] (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3,
- [0077] (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,
- [0078] (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2, 和
- [0079] (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,

- [0080] 其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代：
- [0081] 在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中位置1处的天冬酰胺和位置5处的亮氨酸，和
- [0082] 在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中位置1处的谷氨酰胺；
- [0083] (6) 抗IL-8抗体，其以pH依赖性方式结合至IL-8，并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代：
- [0084] (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1，
- [0085] (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2，
- [0086] (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3，
- [0087] (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1，
- [0088] (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2，和
- [0089] (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3，
- [0090] 其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代：
- [0091] 在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中位置9处的酪氨酸和位置11处的精氨酸，
- [0092] 在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸，
- [0093] 在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中位置1处的天冬酰胺和位置5处的亮氨酸，和
- [0094] 在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中位置1处的谷氨酰胺；和
- [0095] (7) 抗IL-8抗体，其以pH依赖性方式结合至IL-8，并且包含在以下至少一种中的至少一个氨基酸取代：
- [0096] (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1，
- [0097] (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2，
- [0098] (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3，
- [0099] (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1，
- [0100] (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2，和
- [0101] (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3，
- [0102] 其中所述抗IL-8抗体至少包含以下氨基酸取代：
- [0103] 在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中位置6处的丙氨酸、位置8处的甘氨酸、位置9处的酪氨酸和位置11处的精氨酸，
- [0104] 在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中位置3处的酪氨酸，
- [0105] 在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中位置1处的天冬酰胺和位置5处的亮氨酸，和
- [0106] 在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中位置1处的谷氨酰胺。
- [0107] [2] [1]的组合物，其中所述抗IL-8抗体选自由以下各项组成的组：
- [0108] (8) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体，其包含：
- [0109] (a) SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1，
- [0110] (b) SEQ ID NO:29的氨基酸序列作为HVR-H2，和
- [0111] (c) SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3；
- [0112] (9) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体，其包含：
- [0113] (d) SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1，
- [0114] (e) SEQ ID NO:31的氨基酸序列作为HVR-L2，和
- [0115] (f) SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3；

- [0116] (10) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含:
- [0117] (a)SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,
- [0118] (b)SEQ ID NO:24的氨基酸序列作为HVR-H2,和
- [0119] (c)SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3;
- [0120] (11) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含:
- [0121] (d)SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,
- [0122] (e)SEQ ID NO:107的氨基酸序列作为HVR-L2,和
- [0123] (f)SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;
- [0124] (12) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含:
- [0125] (a)SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,
- [0126] (b)SEQ ID NO:29的氨基酸序列作为HVR-H2,
- [0127] (c)SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3,
- [0128] (d)SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,
- [0129] (e)SEQ ID NO:31的氨基酸序列作为HVR-L2,和
- [0130] (f)SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;
- [0131] (13) [1]中(1)或(2)所述的抗IL-8抗体,其包含:
- [0132] (a)SEQ ID NO:23的氨基酸序列作为HVR-H1,
- [0133] (b)SEQ ID NO:24的氨基酸序列作为HVR-H2,
- [0134] (c)SEQ ID NO:30的氨基酸序列作为HVR-H3,
- [0135] (d)SEQ ID NO:26的氨基酸序列作为HVR-L1,
- [0136] (e)SEQ ID NO:107的氨基酸序列作为HVR-L2,和
- [0137] (f)SEQ ID NO:32的氨基酸序列作为HVR-L3;
- [0138] (14) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链可变区和含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0139] (15) [1]中的(1)或(2)所述的抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的重链可变区和含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0140] (16) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其分别具有与(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1, (b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2, (c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3, (d)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1, (e)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L2,和(f)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L3的至少80%序列同一性;
- [0141] (17) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其分别具有与(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1, (b)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2, (c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3, (d)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1, (e)包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HVR-L2,和(f)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L3的至少80%的序列同一性;
- [0142] (18) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,其分别具有与包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链可变区至少80%的序列同一性;以及

[0143] (19) [1]中的(1)至(7)中任一项所述的抗IL-8抗体,其包含有重链可变区和轻链可变区,其分别具有与包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的轻链可变区至少80%的序列同一性;

[0144] [3]用于治疗或预防IL-8相关疾病的组合物,其包含作为活性成分的结合人IL-8的分离的抗IL-8抗体,其中所述IL-8相关疾病选自由以下各项组成的组:

[0145] 子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛,

[0146] 且其中所述抗IL-8抗体选自由以下各项组成的组:

[0147] (I)抗IL-8抗体,其包含Fc区,所述Fc区包含在选自由以下各项组成的组中的一个或多个位置处的氨基酸取代:235、236、239、327、330、331、428、434、436、438和440,根据EU编号;

[0148] (II)抗IL-8抗体,其包含Fc区,所述Fc区包含在选自由434、438和440组成的组中的所有位置处的氨基酸取代,根据EU编号;

[0149] (III)抗IL-8抗体,其包含Fc区,所述Fc区包含所有下述取代:在位置434用Ala的氨基酸取代;在位置438用Glu、Arg、Ser或Lys的氨基酸取代;在位置440用Glu、Asp或Gln的氨基酸取代,根据EU编号;

[0150] (IV)抗IL-8抗体,其包含Fc区,所述Fc区包含所有下述取代:在位置434用Ala的氨基酸取代;在位置438用Glu、Arg、Ser或Lys的氨基酸取代;在位置440用Glu、Asp或Gln的氨基酸取代,且进一步包含在位置428的Ile或Leu,和/或在位置436的Ile、Leu、Val、Thr或Phe,根据EU编号;

[0151] (V)抗IL-8抗体,其包含Fc区,所述Fc区包含选自由以下各项组成的组中的一种或更多种氨基酸取代:L235R、G236R、S239K、A327G、A330S、P331S、M428L、N434A、Y436T、Q438R和S440E,根据EU编号;

[0152] (VI)抗IL-8抗体,其包含Fc区,所述Fc区包含选自由以下各项组成的组的氨基酸取代的组合:

[0153] N434A/Q438R/S440E;N434A/Q438R/S440D;

[0154] N434A/Q438K/S440E;N434A/Q438K/S440D;

[0155] N434A/Y436T/Q438R/S440E;N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0156] N434A/Y436T/Q438K/S440E;N434A/Y436T/Q438K/S440D;

[0157] N434A/Y436V/Q438R/S440E;N434A/Y436V/Q438R/S440D;

[0158] N434A/Y436V/Q438K/S440E;N434A/Y436V/Q438K/S440D;

[0159] N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E;N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;

[0160] N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E;N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;

[0161] N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E;N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;

[0162] N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E;N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;

[0163] M428L/N434A/Q438R/S440E;M428L/N434A/Q438R/S440D;

[0164] M428L/N434A/Q438K/S440E;M428L/N434A/Q438K/S440D;

[0165] M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0166] M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E;M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;

- [0167] M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E;M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;
- [0168] M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E;和M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;
- [0169] 根据EU编号;
- [0170] (VII) 抗IL-8抗体,其包含含以下氨基酸取代的組合的Fc区:
- [0171] L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;或
- [0172] L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E
- [0173] 根据EU编号;和
- [0174] (VIII) 抗IL-8抗体,其包含上述(I)至(VII)中任一项所述的Fc区,其中所述Fc区具有选自自由以下(a)至(e)组成的组中的至少一种性质:
- [0175] (a) 相对于天然Fc区的FcRn结合亲和力,Fc区在酸性pH下的FcRn结合亲和力已经增加;
- [0176] (b) 相对于天然Fc区对预先存在的ADA的结合亲和力,Fc区对预先存在的ADA的结合亲和力已经降低;
- [0177] (c) 相对于天然Fc区的血浆半衰期,Fc区的血浆半衰期已经增加;
- [0178] (d) 相对于天然Fc区的血浆清除率,Fc区的血浆清除率已经降低;和
- [0179] (e) 相对于天然Fc区对效应受体的结合亲和力,Fc区对效应受体的结合亲和力已经降低。
- [0180] [4] 用于治疗或预防IL-8相关疾病的组合物,其包含作为活性成分的结合人IL-8的分离的抗IL-8抗体,其中所述IL-8相关疾病选自自由以下各项组成的组:
- [0181] 子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛,
- [0182] 且其中所述抗IL-8抗体选自自由以下各项组成的组:
- [0183] (A) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链;
- [0184] (B) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链;
- [0185] (C) 抗IL-8抗体,其包含含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链;
- [0186] (D) 抗IL-8抗体,其包含重链和轻链,其分别具有与包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链至少80%的序列同一性;
- [0187] (E) 抗IL-8抗体,其包含重链和轻链,其分别具有与包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链至少80%的序列同一性;和
- [0188] (E) 抗IL-8抗体,其包含重链和轻链,其分别具有与包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链至少80%的序列同一性;
- [0189] [5] [1]-[4]中任一项所述的组合物,其中所述纤维化疾病选自自由以下各项组成的组:子宫内膜异位症或子宫腺肌病中的纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、牛皮癣、肝纤维化、肾纤维化和肺纤维化。
- [0190] [6] 用于治疗或预防IL-8相关疾病的组合物,其包含IL-8信号抑制剂作为活性成分,其中所述IL-8相关疾病选自自由以下各项组成的组:人子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛

经;粘连;人子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

[0191] [7][6]所述的组合物,其用于抑制IL-8相关疾病中免疫细胞向病变或其周围环境的浸润。

[0192] [8][6]或[7]所述的组合物,用于抑制芳香酶或纤维化因子的产生。

[0193] [9][6]至[8]中任一项所述的组合物,其不影响性周期。

[0194] [10][6]至[9]中任一项所述的组合物用于抑制子宫内膜异位症或子宫腺肌病中的粘连或纤维化。

[0195] [11][6]至[10]中任一项所述的组合物用于(1)使子宫内膜异位症或子宫腺肌病患者中的子宫内膜上皮细胞或基质细胞萎缩,或(2)减少子宫内膜异位症中的子宫内膜间质。

[0196] [12][6]至[11]中任一项所述的组合物,其中痛经是具有子宫内膜异位症或子宫腺肌病的痛经,或是怀疑子宫内膜异位症或子宫腺肌病的痛经。

[0197] [13][6]所述的组合物,其中粘连是在手术后形成的。

[0198] [14][6]至[13]中任一项所述的组合物,其中所述IL-8信号抑制剂是IL-8抑制剂、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂。

[0199] [15][14]所述的组合物,其中所述IL-8抑制剂、所述CXCR1抑制剂或所述CXCR2抑制剂分别是抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体。

[0200] [16][1]至[5]中任一项所述的组合物,用于抑制免疫细胞向IL-8相关疾病的病变或其邻近环境的浸润。

[0201] [17][1]至[5]所述的组合物,用于抑制芳香酶或纤维化因子的产生。

[0202] [18][1]至[5]中任一项所述的组合物,其不影响性周期。

[0203] [19][1]至[5]中任一项所述的组合物用于抑制子宫内膜异位症或子宫腺肌病中的粘连或纤维化。

[0204] [20][1]至[5]中任一项所述的组合物,用于:

[0205] (1)使子宫内膜异位症或子宫腺肌病患者中的子宫内膜上皮细胞或基质细胞萎缩,或

[0206] (2)减少子宫内膜异位症中的子宫内膜间质。

[0207] [21][1]至[5]中任一项所述的组合物,其中所述痛经具有子宫内膜异位症或子宫腺肌病,或怀疑是子宫内膜异位症或子宫腺肌病。

[0208] [22][1]至[5]中任一项所述的组合物,其中所述粘连在手术后形成。

[0209] [23][1]至[22]中任一项所述的组合物,其中所述IL-8相关疾病对IL-8信号有应答。

[0210] [24][1]至[23]中任一项所述的组合物,其额外包含药学上可接受的载体。

[0211] [25][1]至[5]和[16]至[24]中任一项所述的组合物,其中所述子宫内膜异位症是人子宫内膜异位症。

[0212] [A1][1]至[5]和[16]至[25]中任一项所述的抗IL-8抗体,用于治疗或预防选自以下各项组成的组的IL-8相关疾病:

[0213] 子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺

肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

[0214] [A2] [6]至[15]和[23]至[25]中任一项所述的IL-8信号抑制剂,用于治疗或预防选自以下各项组成的组的IL-8相关疾病的:

[0215] 人子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;人子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

[0216] [A3]一种治疗或预防IL-8相关疾病的方法,其中所述IL-8相关疾病选自以下各项组成的组:

[0217] 子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛,其中所述方法包括向有此需要的受试者施用[1]至[5]和[16]至[25]中任一项所定义的抗IL-8抗体,或[1]至[5]和[16]至[25]中任一项所述的组合物(其中所述有此需要的受试者可以是患有或怀疑患有所述IL-8相关疾病的受试者)。

[0218] [A4]一种治疗或预防IL-8相关疾病的方法,其中所述IL-8相关疾病选自以下各项组成的组:

[0219] 人子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;人子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛,其中所述方法包括向有此需要的受试者施用[6]至[15]和[23]至[25]中任一项所定义的IL-8信号抑制剂,或[6]至[15]和[23]至[25]中任一项所述的组合物(其中所述有此需要的受试者可以是患有或怀疑患有所述IL-8相关疾病的受试者)。

[0220] [A5] [1]至[5]和[16]至[25]中任一项所定义的抗IL-8抗体,在制备用于治疗或预防IL-8相关疾病的药物中的用途,其中所述IL-8相关疾病选自以下各项组成的组:

[0221] 子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;纤维化疾病;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

[0222] [A6] [6]至[15]和[23]至[25]中任一项所定义的IL-8信号抑制剂,在制备用于治疗或预防IL-8相关疾病的药物中的用途,其中所述IL-8相关疾病选自以下各项组成的组:

[0223] 人子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连;人子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经的疼痛;不孕;以及由粘连、纤维化或炎症引起的疼痛。

[0224] 本领域普通技术人员当然会理解,本发明意在包括上文任何一个中描述的一个或更多个元素的部分或全部的任何组合,除非它们基于本领域普通技术人员的共同技术知识在技术上是矛盾的。

[0225] 附图简述

[0226] 图1显示RA患者血清中具有天然人IgG1的Fc结构域的Fv4-IgG1与类风湿因子的结合程度。

[0227] 图2显示RA患者血清中Fv4-YTE与类风湿因子的结合程度。

[0228] 图3显示RA患者血清中Fv4-LS与类风湿因子的结合程度。

[0229] 图4显示RA患者血清中Fv4-N434H与类风湿因子的结合程度。

[0230] 图5显示RA患者血清中Fv4-F1847m与类风湿因子的结合程度。

[0231] 图6显示RA患者血清中Fv4-F1848m与类风湿因子的结合程度。

- [0232] 图7显示RA患者血清中Fv4-F1886m与类风湿因子的结合程度。
- [0233] 图8显示RA患者血清中Fv4-F1889m与类风湿因子的结合程度。
- [0234] 图9显示RA患者血清中Fv4-F1927m与类风湿因子的结合程度。
- [0235] 图10显示RA患者血清中Fv4-F1168m与类风湿因子的结合程度。
- [0236] 图11显示针对Fv4-IgG1和含有具有增加的FcRn结合的各种Fc区变体的抗体中的每一种,在RA患者的血液中与类风湿因子结合的平均值。
- [0237] 图12显示食蟹猴血浆中各种抗人IgE抗体浓度的时间过程,其中各自施用OHB-IgG1(其是具有天然人IgG1的Fc结构域的抗人IgE抗体)和含有具有增加的FcRn结合的各种Fc区变体的抗体(OHB-LS、OHB-N434A、OHB-F1847m、OHB-F1848m、OHB-F1886m、OHB-F1889m和OHB-F1927m)。
- [0238] 图13显示当施用Fv4-IgG1(其是抗人IL-6受体抗体)或Fv4-F1718(其由在酸性pH下增加Fv4-IgG1的FcRn结合活性造成)时,人FcRn转基因小鼠的血浆中抗体浓度的时间过程。
- [0239] 图14显示通过Biacore测量H998/L63和Hr9在pH 7.4和5.8下与IL-8结合获得的传感图。
- [0240] 图15显示当H998/L63和H89/L118各自以2mg/kg与人IL-8组合施用至小鼠时,小鼠血浆中人IL-8浓度的时间进程。
- [0241] 图16显示当H89/L118以2mg/kg或8mg/kg与人IL-8组合施用至小鼠时,小鼠血浆中人IL-8浓度的时间进程。
- [0242] 图17显示当H89/L118和H553/L118各自以2mg/kg或8mg/kg与人IL-8组合施用至小鼠时,小鼠血浆中人IL-8浓度的时间进程。
- [0243] 图18-1显示取决于Hr9、H89/L118和H553/L118在储存在血浆中之前的抗体浓度的化学发光的相对强度的变化。
- [0244] 图18-2显示取决于Hr9、H89/L118和H553/L118在储存在血浆中一周后的抗体浓度的化学发光的相对强度的变化。
- [0245] 图18-3显示取决于针对Hr9、H89/L118和H553/L118在储存在血浆中两周后的抗体浓度的化学发光的相对强度的变化。
- [0246] 图19显示针对每种抗IL-8抗体(hWS4、Hr9、H89/L118、H496/L118和H553/L118)和其他现有抗体药物,EpiMatrix预测的ADA发生频率。
- [0247] 图20显示EpiMatrix针对每种抗IL-8抗体(H496/L118、H496v1/L118、H496v2/L118、H496v3/L118、H1004/L118和H1004/L395)和其他现有抗体药物预测的ADA发生频率。
- [0248] 图21-1显示取决于Hr9、H89/L118和H1009/L395-F1886s在储存在血浆中之前的抗体浓度的化学发光的相对强度的变化。
- [0249] 图21-2显示取决于Hr9、H89/L118和H1009/L395-F1886s在储存在血浆中一周后的抗体浓度的化学发光的相对强度的变化。
- [0250] 图21-3显示取决于Hr9、H89/L118和H1009/L395-F1886s在储存在血浆中两周后的抗体浓度的化学发光的相对强度的变化。
- [0251] 图22显示当H1009/L395、H553/L118和H998/L63各自与人IL-8组合施用至小鼠时,小鼠血浆中人IL-8浓度的时间进程。

[0252] 图23显示当单独或与人IL-8组合添加至细胞外基质时,Hr9、H89/L118或H1009/L395与细胞外基质的结合量。

[0253] 图24显示当具有可变区H1009/L395的抗体和不结合FcRn的Fc结构域(F1942m)单独或与人IL-8组合施用,人FcRn转基因小鼠血浆中抗体浓度的时间进程。

[0254] 图25显示EpiMatrix对H1009/L395和H1004/L395以及其他现有抗体药物预测的ADA发生频率。

[0255] 图26显示当将H89/L118-IgG1(其包含H89/L118的可变区和天然人IgG1的Fc结构域),和包含具有增加的FcRn结合的各种Fc区变体的抗体(H89/L118-F1168m、H89/L118-F1847m、H89/L118-F1848m、H89/L118-F1886m、H89/L118-F1889m和H89/L118-F1927m)各自施用至食蟹猴时,食蟹猴血浆中每种抗人IL-8抗体浓度的时间进程。

[0256] 图27显示抗体对各种Fc γ R的结合活性,其中所述抗体包含H1009/L395的可变区,并且它们的Fc结构域是变体(F1886m、F1886s和F1974m)。

[0257] 图28显示当将抗IL-8抗体与人IL-8组合施用至小鼠时,人FcRn转基因小鼠血浆中人IL-8浓度的时间进程。所述抗IL-8抗体是:H1009/L395-IgG1(2mg/kg),其包含H1009/L395的可变区和天然人IgG1的Fc结构域;和H1009/L395-F1886s(2、5或10mg/kg),其包含H1009/L395的可变区和修饰的Fc结构域。

[0258] 图29显示当将Hr9-IgG1或H89/L118-IgG1(其包含天然人IgG1的Fc区)或包含修饰的Fc区的H1009/L395-F1886s或H1009/L395-F1974m施用至食蟹猴时,食蟹猴血浆中抗体浓度的时间进程。

[0259] 图30是显示子宫内膜异位症患者的囊液中IL-8浓度的图。

[0260] 图31显示了腹腔镜检查记录片,其中记录了通过播种切成小块的子宫内膜组织而形成的病变,以及通过粘连和缝合而形成的病变。

[0261] 图32是显示在诱导后4个月和诱导后12个月(施用后6个月)形成结节病变(nodular lesions)和粘连的照片。

[0262] 图33是显示在诱导后12个月(施用后6个月)形成子宫内膜异位症样增殖性子宫内膜上皮和基质的照片。

[0263] 图34-1是显示猴子宫内膜异位症模型中囊液中粘连r-AFS评分与IL-8浓度之间的高度相关性的图。

[0264] 图34-2是显示施用载体或抗体H1009/L395-F1974m后,子宫内膜异位症结节病变的相对体积的图。

[0265] 图35-1是显示施用载体或抗体H1009/L395-F1974m之前和之后的总r-AFS评分、粘连r-AFS评分和尺寸r-AFS评分的变化的一组图。

[0266] 图35-2是显示施用载体或抗体H1009/L395-F1974m前后总r-AFS评分变化的图。

[0267] 图36显示诱导后12个月(施用后6个月)载体组和抗体H1009/L395-F1974m施用组的移植部位的组织病理学图像。与载体组相比,在抗体H1009/L395-F1974m施用组中观察到增殖的上皮和基质细胞的萎缩以及间质的减少。

[0268] 图37是显示在具有并发的子宫腺肌病的猴子的载体组和抗体H1009/L395-F1974m施用组中的子宫内膜组织的一组照片。与载体组相比,在抗体H1009/L395-F1974m施用组中观察到子宫内膜上皮的萎缩以及基质细胞的萎缩和减少。

[0269] 图38是关于手术后粘连的一组照片,显示了猴子宫内膜异位症模型的载体组和抗体H1009/L395-F1974m施用组中的代表性腹腔。

[0270] 图39显示相对于不含IL-8的孔中中性粒细胞的迁移能力,补充有各种试剂的各孔中中性粒细胞的相对迁移能力的评估结果。

[0271] 图40显示当将中性粒细胞的培养上清液加入子宫内膜异位症细胞时分析芳香酶的表达水平的结果。

[0272] 图41显示当加入IL-8和抗IL-8抗体时分析中性粒细胞培养液中MCP-1浓度的结果。

[0273] 图42显示当加入IL-8和抗IL-8抗体时分析巨噬细胞中CTGF表达的结果。

[0274] 实施本发明的方式

[0275] 以下描述本公开的优选的非限制性实施方案。

[0276] 意在,后面所示的实施例中描述的所有元素自然将被当然地认为是等同于描述在此“实施本发明的方式”中,而不受任何专利实践、习惯、法律等的限制,由此可以试图在本专利申请要求专利保护的国家以有限的方式解释实施例中描述的内容。

[0277] 本领域普通技术人员当然会理解,本公开意在包括本公开任何位置描述的一个或更多个元素的一些或全部的任何组合,只要它们基于技术人员的普通技术知识在技术上是不矛盾的。

[0278] 本文中,术语“抗体”以最广义使用,并且包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示出期望的抗原结合活性即可。

[0279] 在本公开中,“结合至相同表位的抗体”作为期望的参照抗体(例如,参照抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)是指,在一个实施方案中,抗体,其例如,50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多地抑制与所期望的抗原(例如,IL-8,CXCR1或CXCR2)结合的参照抗体的抗原结合。相反,参照抗体例如,50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多地抑制抗体与抗原的结合。本文中,可以使用典型的竞争测定,但不限于此。

[0280] 本文中,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体。具体地,例如,构成群体的各个抗体是相同的和/或与相同的表位结合,除了可能的变体抗体,诸如通常以少量存在的含有天然存在的突变或在单克隆抗体制备的产生过程中出现的突变的变体。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,本发明的单克隆抗体可以通过各种技术产生,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和使用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法。在一个实施方案中,本公开中的抗体可以是单克隆抗体。

[0281] 本文中,术语“天然抗体”是指具有各种结构的天然存在的免疫球蛋白分子。在一个方面,天然IgG抗体是,例如但不限于,约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由通过二硫键连接在一起的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。在N至C末端方向上,每条重链具有可变区(VH),后面是三个恒定区(CH1,CH2和CH3)。同样,在N至C末端方向上,每条轻链具有可变区(VL),后面是恒定区(CL)。基于其恒定区的氨基酸序列,抗体轻链可以被分配为

两种类型(称为kappa(κ))和lambda(λ)))中的一种。这里使用的恒定区可以是任何报道的同种异型(等位基因)或任何亚类/同种型。例如,使用的重链恒定区可以是,但不限于,天然IgG抗体的恒定区(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。例如,已知的IgG1等位基因是IGHG1*01至05(见<http://www.imgt.org/>),并且这些中的任何一种都可以用作天然人IgG1序列。同时,恒定区序列可以来自单个等位基因或亚类/同种型,或来自多个等位基因或亚类/同种型。具体地,此类抗体包括但不限于具有衍生自IGHG1*01的CH1、衍生自IGHG1*02的CH2和衍生自IGHG1*01的CH3的抗体。天然人IgG抗体的重链恒定区包括例如人IgG1恒定区(SEQ ID NO:100)、人IgG2恒定区(SEQ ID NO:101)、人IgG3恒定区(SEQ ID NO:102)和人IgG4恒定区(SEQ ID NO:103)。同时,天然人IgG抗体的轻链恒定区包括例如人 κ 链恒定区(SEQ ID NO:104)和人 λ 链恒定区(SEQ ID NO:105)。

[0282] 本文中,术语“框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变区部分。可变区的FR一般由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常以下列顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0283] 本文中,术语“人共有框架”是代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常出现的氨基酸残基的框架。一般地,人免疫球蛋白VL或VH序列选自可变区序列的亚组。一般地,该序列的亚组是如Kabat等,Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,所述亚组可以是如Kabat等,同上中所述的亚组 κ I。在一个实施方案中,对于VH,所述亚组可以是如Kabat等,同上中所述的亚组III。

[0284] 本文中,“受体人框架”是包含衍生自人免疫球蛋白框架或人共有框架的VL或VH框架的氨基酸序列的框架。“衍生自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以含有预先存在的氨基酸序列取代。在一个实施方案中,预先存在的氨基酸取代的数量是10、9、8、7、6、5、4、3或2或更少。在一个实施方案中,VL受体人框架在序列上与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0285] 本文中,术语“可变区”是指参与抗体与所期望的抗原的结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链可变区(分别为VH和VL)一般具有类似的结构,其中每个结构域包含4个保守的框架区(FR)和3个高变区(HVR)(Kindt等Kuby Immunology,6th ed., W.H.Freeman and Co.,2007p.91)。在一个实施方案中,单个VH或VL结构域足以赋予抗原结合特异性,但不限于此。此外,可以分别使用来自结合抗原的抗体的VH或VL结构域筛选互补VL或VH结构域的文库来分离结合特定抗原的抗体(例如,Portolano等,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等,Nature1991 352:624-628)。

[0286] 在本文中,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中在序列上是高变的(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的每个区。通常,抗体包含六个HVR;VH中的三个(H1、H2和H3)和VL中的三个(L1、L2和L3)。示例性HVR包括:

[0287] (a) 存在于氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处的高变环(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0288] (b) 存在于氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)上的CDR(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,

5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991)) ;

[0289] (c) 存在于氨基酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2) 和93-101 (H3) 上的抗原接触(MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)) ;和

[0290] (d) (a)、(b) 和/或(c) 的组合,包括HVR氨基酸残基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3) 和94-102 (H3) 。

[0291] 除非另有说明,否则HVR残基和可变区内的其他残基(例如,FR残基) 在本文中根据Kabat等人,同上编号。

[0292] 本文中,“个体”是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物如猴)、兔和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。在一个实施方案中,“个体”优选是在其体内天然具有IL-8的哺乳动物,更优选具有与人类相似的月经的动物,例如非人灵长类动物,且更优选人。本文中,术语“个体”与“受试者”可互换使用,除非它与上下文不一致。

[0293] 本文中,“分离的”抗体是指已经与其天然环境的组分分开的抗体。在一个实施方案中,抗体可以纯化至例如95%或更高,或99%或更高的纯度,例如,以色谱方式(例如,离子交换或反相HPLC)或电泳方式(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)或毛细管电泳)。关于评估抗体纯度的方法,参见,例如,Flatman等,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。在一个方面,本公开中的“分离的”抗体可以指“纯化的”抗体。

[0294] 本文中,“分离的”核酸是指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子,但该核酸分子存在于染色体外或在与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0295] 本文中,术语“亲和力”通常可指分子的单个结合位点(例如,抗体或化学化合物)与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则本公开中的术语“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映结合对的成员(例如,抗体或化学化合物和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力一般可由解离常数(KD)表示。可以使用本领域技术人员已知的方法测量结合亲和力,包括本公开中描述的那些。

[0296] 在一个实施方案中,与诸如IL-8、CXCR1或CXCR2的抗原结合的抗体可具有例如 $\leq 1000\text{nM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ 的解离常数(KD)(例如, 10^{-8}M 或更低、 10^{-8}M 至 10^{-13}M 或 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。

[0297] 在本文中,术语“宿主细胞”和“宿主细胞系”可交替使用,并且指其中已经引入外源核酸的细胞(包括所述细胞的后代)。宿主细胞包括“转化子”和“转化的细胞”,其包括原代转化的细胞和源自其的后代,不考虑后代数量。后代与其母体细胞的核酸含量可以不完全相同,而是可以含有突变。用于在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变体后代也包括在本文中。

[0298] 在本文中,术语“载体”,是指能够传播与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制的核酸结构的载体以及整合于已将其引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够引导它们可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中也称为“表达载体”。

[0299] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)可以是抗体片段。抗体片段可包括例如Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、scFv片段、双

抗体和单结构域抗体。关于抗体片段的综述,参见,例如,Hudson等,Nat.Med.9:129-134 (2003)。关于scFv片段的综述,参见于,例如,Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg和Moore编,(Springer-Verlag,New York), pp.269-315(1994);W093/16185;美国专利No.5,571,894;和美国专利No.5,587,458。

[0300] 本文中,“双抗体”是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的(见,例如,EP404,097;W01993/01161;Hudson等,Nat.Med.9:129-134 (2003); Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448(1993))。三抗体和四抗体描述于例如Hudson等,Nat.Med.9:129-134(2003)。

[0301] 本文中,“单结构域抗体”是包含抗体的重链可变结构域的整个或一部分或轻链可变结构域的整个或一部分的抗体片段。在一个实施方案中,当本公开中的抗体是单结构域抗体时,其可以是人单结构域抗体(见,例如,Domantis,Inc.,Waltham,MA;美国专利No.6,248,516)。抗体片段可以通过多种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及使用重组宿主细胞产生。

[0302] 本文中,术语“嵌合抗体”是指其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同来源或物种的抗体。

[0303] 本文中,“人源化”抗体是指嵌合抗体,其包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在一个实施方案中,人源化抗体包含基本上至少一个、通常两个可变区,其中全部(或基本上全部)HVR对应于非人抗体的HVR(例如,CDR),且全部(或基本上全部)FR对应于人抗体的那些。人源化抗体可任选地包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。

[0304] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)可以是嵌合抗体。嵌合抗体描述于,例如,美国专利No.4,816,567;以及Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)。嵌合抗体可以包含非人可变区(例如,衍生自诸如猴、或小鼠、大鼠、仓鼠或兔的非人灵长类动物的可变区)和人恒定区。

[0305] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)可以是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以降低在人中的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或更多个可变区,其中HVR(例如CDR)(或其部分)衍生自非人抗体,并且FR(或其部分)衍生自人抗体序列。人源化抗体还可任选地包含人恒定区的至少一部分。在一个实施方案中,人源化抗体中的一些FR氨基酸残基可被来自非人抗体(例如,衍生HVR残基的抗体)的相应氨基酸残基取代,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0306] 人源化抗体及其制备方法在例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中进行了综述并进一步描述于,Riechmann等,Nature 332:323-329(1988); Queen等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);US专利No.5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri 等,Methods 36:25-34(2005)(描述特异性决定区(SDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述“表面再塑”);Dall'Acqua等,Methods 36:43-60(2005)(描述“FR改组”);和Osbourne等,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述FR改组的“导向选择”方法))。

[0307] 在一个实施方案中,可用于人源化的人框架可包括,例如,使用“最佳拟合”方法选

择的框架区(Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993);衍生自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(Carter等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992)和Presta等,J.Immunol.,151:2623(1993));和衍生自筛选FR文库的框架区(Baca等,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997);和Rosok等,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0308] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)可以是人抗体。人抗体可以通过各种技术产生。人抗体综述于,例如van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-374(2001)以及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)。可以通过对转基因动物施用抗原(例如IL-8、CXCR1或CXCR2)来制备人抗体,所述转基因动物已被修饰为应答抗原而生成完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这些动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,它们取代内源性免疫球蛋白基因座,或者在染色体外存在或随机整合到动物的染色体中。在这种转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座一般已被失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。还参见,例如,描述XENOMOUSETM技术的美国专利No.6,075,181和6,150,584;描述HUMAB[®]技术的美国专利No.5,770,429;描述K-M MOUSE[®]技术的美国专利No.7,041,870;和描述VELOCIMOUSE[®]技术的US2007/0061900。可以进一步修饰由这些动物产生的完整抗体的人可变区,例如通过将它们与不同的人恒定区组合。

[0309] 在另一个实施方案中,人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法制备。用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系描述如下(例如,Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);以及Boerner等,J.Immunol.,147:86(1991))。通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体描述于Li等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)。其它方法包括例如描述于美国专利No.7,189,826(描述自杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述人-人杂交瘤)的那些。人杂交瘤技术(Trioma技术)描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)以及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)。

[0310] 在一个备选实施方案中,人抗体还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变区序列生成。然后,可以将此类可变区序列与所期望的人恒定区组合。从抗体文库中选择人抗体的技术描述如下。

[0311] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)可以通过从组合文库筛选具有期望活性的抗体来分离。例如,本领域已知多种方法用于产生噬菌体展示文库并筛选这些文库以获得具有期望结合特征的抗体。此类方法在例如Hoogenboom等在Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等编,Human Press,Totowa,NJ,2001)进行了综述,并且在例如以下中进行了进一步描述:McCafferty等,Nature 348:552-554;Clackson等.,Nature 352:624-628(1991);Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,Molecular Biology248:161-175(Lo,

编, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu等, J. Mol. Biol. 338(2):299-310(2004); Lee等, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093(2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472(2004); 以及Lee等, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132(2004)。

[0312] 在一个实施方案中,在某些噬菌体展示方法中,VH和VL全集通过聚合酶链反应(PCR)分别克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以如Winter等,Ann. Rev. Immunol., 12:433-455(1994)中所述筛选抗原结合噬菌体。噬菌体展示抗体片段,例如scFv和Fab。来自经免疫的来源的文库可提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。在一个备选的实施方案中,也可以(例如,从人)克隆天然全集以提供针对广泛的非自身抗原和自身抗原的单一抗体来源,而无需任何免疫,如Griffiths等,EMBO J, 12:725-734(1993)所述。在又一个实施方案中,也可以通过克隆来自干细胞的非重排V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物来编码高度可变区CDR3并在体外完成重排,来合成地制备原始(naive)文库,如Hoogenboom, H. R. 和Winter, G., J. Mol. Biol. 227(1992)381-388中所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公布包括,例如:美国专利No. 5,750,373; US2005/0079574; US2005/0119455; US2005/0266000; US2007/0117126; US2007/0160598; US2007/0237764; US2007/0292936; US2009/0002360。

[0313] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文中被认为是人抗体或人抗体片段。

[0314] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)可以是多特异性抗体(例如双特异性抗体)。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的抗体(例如,单克隆抗体)。在一个实施方案中,结合特异性之一是针对抗原(例如,IL-8、CXCR1或CXCR2)而另一个是针对任何其他抗原。在另一个实施方案中,双特异性抗体可以结合抗原(例如,IL-8、CXCR1或CXCR2)的不同两个表位。双特异性抗体可用于将细胞毒性剂定位于表达抗原(例如,IL-8、CXCR1或CXCR2)的细胞。双特异性抗体可以制备成全长抗体或抗体片段。

[0315] 用于制备多特异性抗体的技术包括,但不限于,重组共表达具有不同特异性的两条免疫球蛋白重链-轻链对(例如Milstein和Cuellar, Nature 305:537(1983); WO 93/08829; 和Trautnecker等人, EMBO J. 10:3655(1991))和“栓臼结构(knob-in-hole)”设计(例如美国专利号5,731,168)。多特异性抗体还可以通过涉及静电控制效应制备Fc-异源二聚分子(例如WO2009/089004A1); 交联两种或更多种抗体或抗体片段(例如,美国专利号4,676,980; 和Brennan等人, Science 229:81(1985)); 使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(例如, Kostelny等人, J. Immunol. 148(5):1547-1553(1992)); 使用“双抗体”技术来制备双特异性抗体片段(例如Hollinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)); 使用scFv二聚体(例如, Gruber等人, J. Immunol., 152:5368(1994))来制备; 以及制备三特异性抗体(例如, Tutt等人, J. Immunol. 147:60(1991))。具有三个或更多个功能性抗原结合位点的改造的抗体,包括“章鱼抗体”,也包括在本文中(例如, US 2006/0025576)。

[0316] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)或其抗体片段可以包含结合至抗原(例如,IL-8、CXCR1或CXCR2)以及另一种不同抗原(例如, US2008/0069820)的抗原结合位点的“双重作用Fab”或“DAF”。

[0317] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)的氨基酸序列变体(突变体)可以通过在编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或

通过肽合成来制备。这些修饰可以通过将任意氨基酸(残基)的一个或更多个任意缺失、插入、取代或其组合引入氨基酸序列来实现。只要最终构建体具有期望的特征(例如抗原结合),可以进行缺失、插入和取代的任何组。

[0318] 在一个实施方案中,当提供具有一个或更多个氨基酸取代的抗体变体(突变体)时,用于取代诱变的目标位点可包括HVR和FR。

[0319] 在一个实施方案中的保守取代在表1中的“优选取代”的标题下显示,并且在表1中的“示例性取代”的标题下显示了更实质的变化,并且在下文中参考氨基酸侧链类别进一步描述。可以将氨基酸取代引入目标抗体中,并且针对期望的活性筛选产物,例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

[0320] [表1]

最初残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser
Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0322] 氨基酸可以根据共同的侧链特性进行分组:

[0323] (1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0324] (2) 中性、亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0325] (3) 酸性:Asp、Glu;

[0326] (4) 碱性:His、Lys、Arg;

[0327] (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;

[0328] (6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe

[0329] 非保守替代意味着将这些类别中的一个的成员交换为另一个类别。

[0330] 在一个实施方案中,氨基酸插入包括一个或两个残基或含有三至一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端的融合,以及将单个或更多个氨基酸残基插入氨基酸序列。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。插入变体(突变体)的其他实例包括抗体的N和/或C末端与酶(例如,针对ADEPT的酶)或增加抗体的血浆半衰期的多肽的融合。

[0331] 本文中,相对于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在候选序列中氨基酸残基的百分比,其与参考多肽序列中的氨基酸残基相同,在比对序列和引入缺口后,如果必要的话,实现最大百分比序列同一性,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR) 软件或GENETYX®。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0332] ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech股份有限公司编写,并且源代码已经与美国版权局的用户文件一起提交,其注册在美国版权登记号TXU510087下。ALIGN-2程序可从Genentech股份有限公司(南旧金山,加州)公开获得,或者可以从源代码编译。编译ALIGN-2程序以在UNIX® 操作系统(包括数字化UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置,且不变。

[0333] 在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A对、与或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(其可以备选地表示为具有或包含对、与或针对给定氨基酸序列B一定的%氨基酸序列同一性的给定的氨基酸序列A),如下计算:分数X/Y的100倍,其中X是通过序列比对程序ALIGN-2在A和B的程序的比对中得分为相同匹配的氨基酸残基数,其中Y是B中氨基酸残基的总数。会理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A对B的%氨基酸序列同一性将不等于B对A的%氨基酸序列同一性。除非另外具体陈述,否则本文中的所有%氨基酸序列同一性值均使用计算机程序ALIGN-2获得。

[0334] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)的氨基酸序列,其在CDR区、重链可变区、轻链可变区、重链恒定区、轻链恒定区、整个重链区、整个轻链区或其任何特定区的氨基酸序列中具有一个或更多个氨基酸的适当取代、缺失或插入,并具有针对抗原的结合活性(例如,IL-8、CXCR1或CXCR2),也可以从在严格条件下与包含编码那个区的氨基酸序列的核苷酸序列的核酸杂交的核酸中获得。用于在严格条件下分离杂交的核酸的示例性的严格杂交条件是6M尿素,0.4%SDS,0.5x SSC和37℃,或与其等同或相应的条件。通过使用更严格的条件,例如6M尿素,0.4%SDS,0.1x SSC和42℃,可以预期分离具有更高同源性的核酸。杂交后洗涤的条件包括,例如,0.5xSSC(其中1x SSC是,例如0.15M NaCl和0.015M柠檬酸钠,pH 7.0)和0.1%SDS在60℃,优选0.2x SSC和0.1%SDS在60℃,更优选0.2x SSC和0.1%SDS在62℃,甚至更优选0.2x SSC和0.1%SDS在65℃,还更优选0.1x SSC和0.1%SDS在65℃。洗涤时间和洗涤次数可以适当调整;例如,20分钟的洗涤可以进行三次。可以通过已知方法对分离的核酸进行测序。

[0335] 在一个备选的实施方案中,代替上述杂交技术,也可使用基于编码CDR区、重链可变区、轻链可变区、重链恒定区、轻链恒定区、整个重链区、整个轻链区或其任何特定区的氨基酸序列的核苷酸序列信息合成的引物的基因扩增方法,例如PCR,也可用于分离在严格条

件下与包含比那马那个区的氨基酸序列的核苷酸序列的核酸杂交的核酸。

[0336] 由此分离的核酸对于目标区的核苷酸序列具有至少50%或更高,优选70%或更高、75%或更高、80%或更高、85%或更高,更优选90%或更高(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高)的总体序列同一性。具有由这种分离的核酸编码的氨基酸序列的抗体如果在功能上(基本上)等同于(例如,任何一种或更多种指标或特征,例如血液中的抗原结合或保留(基本上)等同于)具有目标区的氨基酸序列的抗体,则是有利的;然而,其并不限于此。本文中,术语“基本上”意在表示当通过本领域技术人员所知的方法评估时,与具有目的区的氨基酸序列的抗体所拥有的功能相比,保留至少50%或更多,优选70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多,更优选90%或更多(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更多)的功能(例如,可能专注于任何一个或更多个指标特征诸如血液中的抗原结合和保留)。

[0337] 在一个实施方案中,本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)可以是糖基化的。可以通过改变氨基酸序列,使得创建或消除糖基化位点来容易地实现对抗体的糖基化位点的添加或删除。

[0338] 在一个实施方案中,当本发明的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)包含Fc区时,连接至Fc结构域的糖链可以变化。由动物细胞产生的天然抗体通常含有分枝的,分两支的寡糖,其经由N-连接连接于Fc区的CH2结构域的Asn297(Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997))。寡糖包括,例如,甘露糖,N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc),半乳糖,和唾液酸,以及岩藻糖,其在分两支的寡糖结构的“茎”中连接于GlcNAc。在一个实施方案中,可修饰抗体中的寡糖以产生具有某些改善的性质的抗体变体。在一个实施方案中,可以对本公开的抗体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改善的性质的抗体变体。

[0339] 本文中,“效应子功能”是指可归因于抗体Fc区(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)的生物学活性,并且可以随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括但不限于C1q结合或补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调;和B细胞激活。

[0340] 本文所用的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的含有恒定区的至少一部分的C末端区。该术语包括天然Fc区和变体Fc区。天然Fc区是指天然抗体的Fc区。天然人IgG的Fc区的实例包括,例如如上所述人IgG1恒定区(SEQ ID NO:100)、人IgG2恒定区(SEQ ID NO:101)、人IgG3恒定区(SEQ ID NO:102)或人IgG4恒定区(SEQ ID NO:103)中包含的Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链的Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的C末端。然而,Fc结构域的C末端赖氨酸(Lys447)或Fc结构域的C末端甘氨酸(Gly446)和赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。除非本文另有规定,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号依照EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)。

[0341] 与属于免疫球蛋白超家族的Fc γ R不同,本文的FcRn,尤其是人FcRn,在结构上类似于主要组蛋白相容性复合物(MHC)I类的多肽,与I类MHC分子分享22%至29%的序列同一性(Ghetie等,Immunol.Today(1997)18(12),592-598)。FcRn表达为由与跨膜 α 或重链复合的可溶性 β 或轻链(β 2微球蛋白)组成的异二聚体。与MHC一样,FcRn的 α 链由三个细胞外结构域(α 1、 α 2和 α 3)组成,并且其短的细胞质结构域将蛋白质锚定在细胞表面。 α 1和 α 2结构域与

抗体Fc区的FcRn结合结构域相互作用(Raghavan等, *Immunity*, (1994), 1:303-15)。FcRn在哺乳动物的母体胎盘或卵黄囊中表达,并参与母体至胎儿的IgG转移。此外,在新生啮齿类动物表达FcRn的小肠中,FcRn参与母体IgG从摄取的初乳或乳汁跨刷状缘上皮的转移。FcRn在各种物种的多种其他组织和内皮细胞系统中表达。FcRn还在成人内皮、肌肉血管系统、和肝窦状隙毛细管中表达。认为FcRn通过在与IgG结合后将介导IgG再循环到血清中而在保持血浆IgG浓度中发挥作用通常,FcRn对IgG分子的结合是严格pH依赖的。在低于7.0的酸性pH范围内观察到最佳结合。人FcRn的多核苷酸和氨基酸序列可以例如分别来自NM_004107.4和NP_004098.1中所示的前体(含有信号序列)(括号中显示RefSeq登录号)。该前体与与人 β 2-微球蛋白在体内形成复合物。因此,使用已知重组表达技术,可以制备能够与人 β 2-微球蛋白形成复合物的可溶性人FcRn,且适当用于各种实验系统。这种能够与人 β 2-微球蛋白形成复合物的可溶性人FcRn可以用于评估抗体或Fc区变体的FcRn结合活性FcRn不特别限制,只要其是能够结合FcRn结合结构域的形式即可,并且优选人FcRn。

[0342] 在一个实施方案中,当本公开中的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)或其Fc区变体具有FcRn结合活性时,该抗体或Fc区变体优选具有“FcRn结合结构域”,更优选具有人FcRn结合结构域。FcRn结合结构域不特别限制,只要抗体(例如,抗IL-8抗体,抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)在酸性pH和/或中性pH值下具有FcRn结合活性或亲和力即可。备选地,FcRn结合结构域可具有直接或间接结合至FcRn的活性。这些结构域包括但不限于例如IgG型免疫球蛋白的Fc区、白蛋白、白蛋白结构域3、抗FcRn抗体、抗FcRn肽和抗FcRn支架分子(具有直接结合至FcRn的活性)和结合至IgG或白蛋白结合的分子(其具有间接结合FcRn的活性)备选地,可能使用例如在酸性pH和/或中性pH下具有FcRn结合活性的结构域。如果该结构域最初在酸性pH和/或中性pH下具有FcRn结合活性,则其可以不经修饰地使用。当该结构域在酸性pH和/或中性pH下没有或具有弱的FcRn结合活性时,可以修饰抗体或Fc区变体的FcRn结合结构域中的氨基酸残基以在酸性pH和/或中性pH下产生FcRn结合活性。备选地,可以修饰在酸性pH和/或中性pH下最初具有FcRn结合活性的结构域的氨基酸以增加其FcRn结合活性。可以通过比较氨基酸修饰前后在酸性pH和/或中性pH下的FcRn结合活性来鉴定FcRn结合结构域所需的氨基酸修饰。

[0343] FcRn结合结构域优选是直接结合至FcRn的区域。FcRn结合结构域的优选实例包括抗体的恒定区和Fc区。然而,能够结合至具有FcRn结合活性的多肽的区域,诸如白蛋白或IgG,可以通过白蛋白或IgG间接结合至FcRn。因此,FcRn结合区可以是结合对白蛋白或IgG具有结合活性的多肽的区域。不受限制,FcRn结合结构域的FcRn结合活性优选在中性pH下较高以促进从血浆中去除抗原,而FcRn结合结构域的FcRn结合活性优选在酸性pH下较高以改善抗体在血浆中的保留。例如,可以选择和使用其FcRn结合活性最初在中性pH或酸性pH下较高的FcRn结合结构域。备选地,可以修饰抗体或Fc区的氨基酸以在中性pH或酸性pH下赋予FcRn结合活性。备选地,可以增加在中性pH或酸性pH下预先存在的FcRn结合活性。

[0344] 与其修饰之前相比,抗体(例如,抗IL-8抗体、CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)或Fc区(变体)的FcRn结合活性是否已增加,(基本上)保持或减少可以通过本领域技术人员已知的任何方法确定,而没有特别限制,并且还可能使用本实施例中描述的方法。例如,可以使用BIACORE、catchard曲线和流式细胞仪等(WO2013/046722)。在这些测定中,人FcRn的细胞外结构域可用作可溶性抗原。除了pH之外,本领域技术人员可以适当地确定测量抗体或Fc区

(变体)的FcRn结合活性的条件,不受特别限制。这些测定可以,例如,在MES缓冲液在37℃的条件下进行,如W02009/125825中所述的。可以例如,通过允许FcRn作为分析物流动到固定有抗体的芯片上,评估抗体或Fc区(变体)的FcRn结合活性。

[0345] 此外,抗体或Fc区(变体)的FcRn结合活性可以基于解离常数(KD)、表观解离常数(表观KD)、解离速率(kd)或表观解离速率(表观kd)评估。

[0346] 当测量抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)或Fc区(变体)中的FcRn结合结构域的FcRn结合活性时,可适当使用酸性或中性pH。用于评估FcRn结合结构域的FcRn结合活性(结合亲和力)的温度可以是10℃至50℃的任何温度。优选地,用于确定人FcRn结合结构域的FcRn结合活性(结合亲和力)的温度是15℃至40℃。更优选地,用于确定FcRn结合结构域的FcRn结合活性(结合亲和力)的温度是20℃至35℃的任何温度,诸如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35℃中的任何一个,但不限于此。25℃是非限制性实例。

[0347] 在一个实施方案中,可以对包含在本公开的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)的氨基酸序列中的氨基酸进行翻译后修饰(例如,通过焦谷氨酰化(pyroglutamylation)将N末端谷氨酰胺修饰成焦谷氨酸是本领域技术人员公知的)。要理解,这种具有翻译后修饰的氨基酸的氨基酸序列也包括在本公开中描述的氨基酸序列的等同物中。

[0348] 在一个实施方案中,本公开的抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)可以通过含有额外的非蛋白质部分衍生化。适于抗体衍生抗体的结合部分包括,例如,水可溶性聚合物。可溶性聚合物的实例包括,例如,聚乙二醇(PEG),乙二醇/丙二醇的共聚物,羧甲基纤维素,葡聚糖,聚乙烯醇,聚乙烯吡咯烷酮,聚-1,3-二氧杂环戊烷,聚-1,3,6-三氧杂环己烷,乙烯/马来酸酐共聚物,聚氨基酸(同源聚合物或无规共聚物),葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇,聚丙二醇均聚物,聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物,聚氧乙基化醇(例如,甘油),聚乙烯醇及其任意混合物。作为该部分的实例,聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而可能在制造中有利。所述聚合物可以是任意分子量,并且可以是分支的或不分支的。与抗体连接的聚合物的数量可以改变,并且如果连接一个或更多个聚合物,它们可以是相同或不同分子。通常,用于衍生的聚合物的数量和/或类型可以基于以下考虑因素确定,例如要改善的抗体的特定性质或功能、抗体衍生物是否用于在限定情况下的疗法等。

[0349] 在一个实施方案中,可以提供本公开抗体的缀合物,(例如抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)和可以通过暴露于照射选择性加热的非蛋白结构部分的缀合物。非蛋白结构部分可以是,例如,碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA102:11600-11605(2005))。照射可以是任意波长的,只要其达到期望的目的,且可以是不损害普通细胞但可以将非蛋白结构部分加热到杀死接近抗体-非蛋白结构部分的细胞的温度的波长。

[0350] 除非另有具体说明,否则本公开中的术语“IL-8”是指源自任何脊椎动物、灵长类动物(例如,人、食蟹猴和恒河猴)和其他哺乳动物(例如,兔和狗;然而,小鼠和大鼠不具有内源性IL-8)的天然IL-8。IL-8包括完整的IL-8、任何体内修饰形式的IL-8和诸如剪接变体和等位基因变体的天然存在的IL-8衍生物。人IL-8氨基酸序列的典型实例显示在SEQ ID NO:22。此外,对于人IL-8氨基酸序列的非限制性实例,人白细胞介素-8前体的序列在NCBI中记录为NP_000575.1。此外,食蟹猴IL-8的氨基酸序列的非限制性实例在NCBI中登记为

XP_005555144.1。

[0351] CXCR1也称为白细胞介素8受体 α 、IL8RA或CD181,且CXCR2也称为白细胞介素8受体 β 或IL8RB,两者都是趋化因子受体。已知IL-8通过结合至其受体CXCR1和CXCR2而发挥其生理作用(Science.1991;253:1278-80;Science.1991;253:1280-3)。已报道,CXCR1仅被IL-8和粒细胞趋化蛋白-2激活,CXCR2通过结合至IL-8和诸如GRO α 、 β 和 γ 的各种分子、中性粒细胞激活肽和粒细胞趋化蛋白质-2激活(Neuro-oncol.2005;7:122-33)。到目前为止,还没有报道过除CXCR1和CXCR2之外的其他IL-8受体。如本实施例中所述,本发明人已经证明中性粒细胞向IL-8迁移的能力被IL-8中和抗体以及CXCR2抑制剂阻断,因此很容易预测不仅抗IL-8抗体以及包括CXCR1抑制剂和CXCR2抑制剂的IL-8信号抑制剂可用于对抗本发明实施例中描述的子宫内膜异位症、粘连和子宫腺肌病。

[0352] 除非另有具体说明,否则本公开中的术语“CXCR1”是指存在于任何脊椎动物、灵长类动物(例如,人、食蟹猴和恒河猴)和其他哺乳动物(例如,兔和狗)中的天然CXCR1。CXCR1包括完整的CXCR1、任何体内修饰形式的CXCR1和诸如剪接变体和等位基因变体的天然存在的CXCR1衍生物。人CXCR1的氨基酸序列的非限制性实例在NCBI中记录为NP_000625.1。

[0353] 除非另有具体说明,否则本公开中的术语“CXCR2”是指存在于任何脊椎动物、灵长类动物(例如,人、食蟹猴和恒河猴)和其他哺乳动物(例如,兔和狗)中的天然CXCR2。CXCR2包括完整的CXCR2、任何体内修饰形式的CXCR2和诸如剪接变体和等位基因变体的天然存在的CXCR2衍生物。人CXCR2的氨基酸序列的非限制性实例在NCBI中记录为NP_001161770.1和NP_001548.1。

[0354] IL-8由免疫细胞诸如单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞、皮肤成纤维细胞、角质细胞、血管内皮细胞、黑素细胞、肝细胞和各种肿瘤细胞系产生。IL-8是对于中性粒细胞的有效趋化因子,并参与中性粒细胞向炎症部位的迁移。已报道,当IL-8结合至中性粒细胞表面的高亲和力受体(CXCR1和CXCR2)时,它通过促进脱粒和增加细胞质游离Ca²⁺的浓度来激活中性粒细胞,并诱导它们迁移,从而破坏渗透的组织(W02004/058797)。

[0355] 如本实施例中所述,本发明人揭示CXCR1和CXCR2在免疫细胞如中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞、子宫内膜异位症上皮细胞和血管内皮细胞中表达,但不在基质细胞和肌肉成纤维细胞中表达。此外,向已从人子宫内膜异位症患者收集并培养的子宫内膜异位症衍生的基质细胞和肌成纤维细胞中添加IL-8或抗IL-8抗体未显示诸如细胞增殖或萎缩的变化(数据未显示)。

[0356] 这些结果与Ulukus等的报告不一致,该报告称CXCR1在子宫内膜异位症组织的上皮、基质和纤维化区域中以高水平表达(Human Reproduction2005 20(3):794-80)。在Ulukus的报告中,整体染色强度高。CXCR2虽然呈弱阳性,但也在基质细胞和血管内皮细胞上染色。此外,上述结果与Iwabe等Fertility and Sterility 1998 69(5):924-930的报告不一致,该报告称体外实验表明源自子宫内膜异位症患者的基质细胞增殖由IL-8增强但通过添加抗IL-8抗体抑制。在Iwabe的报告中,来自人子宫内膜异位症患者的子宫内膜异位症病变被去除上皮细胞以获得基质细胞,然后加入IL-8以检查细胞增殖。该应答弱,约为20%。

[0357] 同时,如本实施例中所述,本发明人在非人灵长类动物子宫内膜异位症模型中证明,在施用诸如抗体H1009/L395-F1974m的IL-8信号抑制剂后,增殖性上皮细胞和基质细胞

显示出萎缩性变化。

[0358] 不意在受理论约束,一方面推测免疫细胞可能在Iwabe的报告中共存,因为它们的实验是在细胞通过后不久进行的。由于CXCR1和CXCR2不在基质细胞中表达,因此认为CXCR1或CXCR2介导的IL-8信号不直接作用于基质细胞作为其靶标,而是作用于子宫内膜上皮和免疫细胞作为直接靶标并间接作用通过来自子宫内膜上皮细胞和免疫细胞的信号作用于基质细胞。

[0359] 本公开中的“IL-8信号抑制剂”不受特别限制,只要其可以直接或间接且部分或完全抑制IL-8信号即可。例如,IL-8信号抑制剂可以是核酸(例如,诸如siRNA的双链核酸)、蛋白质(包括抗体和抗体片段)、肽或其他化合物(例如,低分子量化合物)。在一个方面,IL-8信号抑制剂可以是IL-8抑制剂、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂,并且在这种情况下,它们包括例如核酸(例如,诸如siRNA的双链核酸)、蛋白质(包括抗体和抗体片段,更具体地,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体、抗CXCR2抗体和完全或部分保留其功能的抗体片段)、肽或其他化合物(例如,低分子量化合物)。

[0360] 如果IL-8信号抑制剂部分或完全抑制IL-8与其受体CXCR1和/或CXCR2的结合,则IL-8的抑制优选降低或改变在IL-8与受体结合而没有抑制时应发生的活性的正常水平或类型。可以观察到这种降低或改变,例如,如抑制IL-8诱导的弹性蛋白酶释放或钙通量,抑制IL-8诱导的CD11b(Mac-1)表达的增加或抑制L-选择素表达的降低。与不存在IL-8信号抑制剂的情况相比,这种抑制包括上述活性水平或类型的减少或变化,例如,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。

[0361] 在一个实施方案中,本公开中的CXCR1抑制剂可结合(是特异性的)至CXCR1但不结合至CXCR2,或可结合(是特异性的)至CXCR1和CXCR2(也称为CXCR1/CXCR2抑制剂)。

[0362] 在一个实施方案中,本公开中的CXCR2抑制剂可结合(是特异性的)至CXCR2但不结合至CXCR1,或可结合(是特异性的)至CXCR1和CXCR2(也称为CXCR1/CXCR2抑制剂)。

[0363] 在一个实施方案中,本公开中CXCR1抑制剂和/或CXCR2抑制剂的具体实例包括,例如,W02010/056753中描述的抗CXCR1抗体、Repartin和Repartin衍生物;W02011/042466中描述的CXCR1和/或CXCR2抑制剂;W02005/113534和W02003/057676中描述的CXCR1和CXCR2趋化因子拮抗剂;W02012/062713和W02013/168108中描述的CXCR2结合多肽;W02008/061740、W02008/061741、W02008/062026、W02009/106539、W02010/015613和W02013/030803中描述的CXCR2抑制剂。

[0364] 在一个实施方案中,本公开中IL-8抑制剂的具体实例包括,例如,JP2006-117633A中描述的IL-8模拟物;JP2013-180992A(或JP5496232B)中公开的IL-8表达抑制剂;JPH9-2954A(或JP3008010B)中公开的IL-8产生抑制剂;W01998/037200中公开的抗体片段-聚合物复合物;抗IL-8抗体、结合抗原的多特异性抗体,包括IL-8,及其在W01995/023865、W02009/026117、W02013/166099、W02006/113643、W02004/058797、W02008/130969、W02011/100271、W098/58671、W02014/149733、US2003/0077283A1等中公开的变体。在另一个实施方案中,针对高功能性抗IL-8抗体,这些抗IL-8抗体变体可额外地具有下文所述的一种或更多种性质。

[0365] 在一个实施方案中,本公开中的术语“抗IL-8抗体”或“结合至IL-8的抗体”是指能够以足够的亲和力结合至IL-8的抗体,因此可用作通过靶向IL-8用于检测、诊断、治疗和/

或预防的化合物。

[0366] 在一个实施方案中,抗IL-8抗体非特异性结合至不相关的非IL-8蛋白的程度可以是,例如,低于抗体结合至IL-8的程度的10%。

[0367] 在一个实施方案中,本公开中的抗IL-8抗体具有IL-8中和活性。IL-8中和活性可以指抑制IL-8所示的生物活性的活性,或者可以指抑制IL-8结合至其受体(CXCR1或CXCR2)的活性。

[0368] 在一个实施方案中,本公开中的抗IL-8抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0369] 在一个实施方案中,本公开中的抗IL-8抗体优选与具有内源IL-8的动物(例如,兔)具有交叉反应性,或者在一些情况下优选为抗灵长类动物IL-8抗体(优选具有与人类月经相似的月经的非人灵长类动物的针对IL-8的抗体,诸如食蟹猴或狒狒,或抗人IL-8抗体(例如,抗人IL-8中和抗体))。

[0370] 如本实施例中所体现的,但不限于,本发明人发现了能够赋予抗体(例如,抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR2抗体)高功能性的氨基酸修饰技术,并基于该发现考虑了高功能性抗IL-8抗体。此类抗体的非限制性实例描述如下。

[0371] 在一个实施方案中,本公开中的抗IL-8抗体可以是抗IL-8抗体,其可以具有对IL-8的pH依赖性亲和力。这种抗IL-8抗体包括,例如,在以下氨基酸序列中包含至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或更多个氨基酸取代的序列:

[0372] (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1;

[0373] (b) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H2;

[0374] (c) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H3;

[0375] (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1;

[0376] (e) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2;和

[0377] (f) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3。

[0378] 除非另有具体说明,否则氨基酸可以由任何其他氨基酸取代。在另一个实施方案中,本公开中的抗IL-8抗体可额外地至少包含在选自下述位置组成的组的位置处用不同的氨基酸或用下文所示的氨基酸的取代:

[0379] (1) 在SEQ ID NO:26的序列中在位置8处的丝氨酸;在SEQ ID NO:27的序列中在位置1处天冬酰胺和位置5处亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的序列中在位置1处的谷氨酰胺;

[0380] (2) 在SEQ ID NO:24的序列中用天冬氨酸取代在位置6处的丙氨酸,且用脯氨酸取代在位置11处的精氨酸;以及在SEQ ID NO:25的序列中用组氨酸取代在位置3处的酪氨酸;

[0381] (3) 在SEQ ID NO:24的序列中用酪氨酸取代在位置8处的甘氨酸,且用组氨酸取代在位置9处的酪氨酸;

[0382] (4) 在SEQ ID NO:24的序列中用天冬氨酸取代在位置6处的丙氨酸,用酪氨酸取代在位置8处的甘氨酸,用组氨酸取代在位置9处的酪氨酸,且用脯氨酸取代在位置11处的精氨酸;以及在SEQ ID NO:25的序列中用组氨酸取代在位置3处的酪氨酸;

[0383] (5) 在SEQ ID NO:27的序列中用赖氨酸取代在位置1处的天冬酰胺,且用组氨酸取代在位置5处的亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的序列中用赖氨酸取代在位置1处的谷氨酰胺;

[0384] (6) 在SEQ ID NO:26的序列中用谷氨酰胺取代在位置8处的丝氨酸;在SEQ ID NO:27的序列中用赖氨酸取代在位置1处的天冬酰胺,且用组氨酸取代在位置5处的亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的序列中用赖氨酸取代在位置1处的谷氨酰胺;

[0385] (7) 在SEQ ID NO:24的序列中用组氨酸取代在位置9处酪氨酸,且用脯氨酸取代在位置11处精氨酸;在SEQ ID NO:25的序列中用组氨酸取代在位置3处酪氨酸;在SEQ ID NO:27的序列中用赖氨酸取代在位置1处的天冬酰胺,且用组氨酸取代在位置5处的亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的序列中用赖氨酸取代在位置1处的谷氨酰胺;以及

[0386] (8) 在SEQ ID NO:24的序列中用天冬氨酸取代在位置6处的丙氨酸,用酪氨酸取代在位置8处的甘氨酸,用组氨酸取代在位置9处酪氨酸,且用脯氨酸取代在位置11处精氨酸;在SEQ ID NO:25的序列中用组氨酸取代在位置3处酪氨酸;在SEQ ID NO:27的序列中用赖氨酸取代在位置1处的天冬酰胺,且用组氨酸取代在位置5处的亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的序列中用赖氨酸取代在位置1处的谷氨酰胺。

[0387] 在进一步或备选实施方案中,本公开中可具有对IL-8的pH依赖性亲和力的抗IL-8抗体包含选自以下各项组成的组中的任何一种或更多种氨基酸序列:

[0388] (a) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1,或具有与其至少65%、70%、75%或更高,优选80%、85%、90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的HVR-H1;

[0389] (b) 包含SEQ ID NO:24或29的氨基酸序列的HVR-H2,或具有与其至少65%、70%、75%或更高,优选80%、85%、90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的HVR-H2;

[0390] (c) 包含SEQ ID NO:25或30的氨基酸序列的HVR-H3,或具有与其至少65%、70%、75%或更高,优选80%、85%、90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的HVR-H3;

[0391] (d) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1,或具有与其至少65%、70%、75%或更高,优选80%、85%、90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的HVR-L1;

[0392] (e) 包含SEQ ID NO:27、31或107的氨基酸序列的HVR-L2,或具有与其至少65%、70%、75%或更高,优选80%、85%、90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的HVR-L2;以及

[0393] (f) 包含SEQ ID NO:28或32的氨基酸序列的HVR-L3,或具有与其至少65%、70%、75%或更高,优选80%、85%、90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的HVR-L3;

[0394] 本文中,与参考氨基酸序列具有特定%序列同一性的HVR可以在功能上等同于包含此参考氨基酸序列的HVR。此外,抗IL-8抗体可包含例如,包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,和/或包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L2和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L3。而且,抗IL-8抗体可额外地至少包含在选自下述位置组成的组的位置处用不同的氨基酸或用下文所示的氨基酸的取代:

[0395] (1) 在SEQ ID NO:26的氨基酸序列中在位置8处的丝氨酸;在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中在位置1处天冬酰胺和位置5处亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中在位置1处的谷氨酰胺;

[0396] (2) 在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中用天冬氨酸取代在位置6处的丙氨酸且用脯氨酸取代在位置11处的精氨酸;以及在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中用组氨酸取代在位置3处的酪氨酸;

[0397] (3) 在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中用酪氨酸取代在位置8处的甘氨酸,且用组氨酸取代在位置9处的酪氨酸;

[0398] (4) 在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中用天冬氨酸取代在位置6处的丙氨酸,用酪氨酸取代在位置8处的甘氨酸,用组氨酸取代在位置9处的酪氨酸,且用脯氨酸取代在位置11处的精氨酸;以及在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中用组氨酸取代在位置3处的酪氨酸;

[0399] (5) 在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中用赖氨酸取代在位置1处的天冬酰胺,且用组氨酸取代在位置5处的亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中用赖氨酸取代在位置1处的谷氨酰胺;

[0400] (6) 在SEQ ID NO:26的氨基酸序列中用谷氨酰胺取代在位置8处的丝氨酸;在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中用赖氨酸取代在位置1处的天冬酰胺,用组氨酸取代在位置5处的亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中用赖氨酸取代在位置1处的谷氨酰胺;

[0401] (7) 在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中用组氨酸取代在位置9处酪氨酸,且用脯氨酸取代在位置11处精氨酸;在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中用组氨酸取代在位置3处酪氨酸;在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中用赖氨酸取代在位置1处的天冬酰胺,且用组氨酸取代在位置5处的亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中用赖氨酸取代在位置1处的谷氨酰胺;以及

[0402] (8) 在SEQ ID NO:24的氨基酸序列中用天冬氨酸取代在位置6处的丙氨酸,用酪氨酸取代在位置8处的甘氨酸,用组氨酸取代在位置9处酪氨酸,且用脯氨酸取代在位置11处精氨酸;在SEQ ID NO:25的氨基酸序列中用组氨酸取代在位置3处酪氨酸;在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中用赖氨酸取代在位置1处的天冬酰胺,且用组氨酸取代在位置5处的亮氨酸;以及在SEQ ID NO:28的氨基酸序列中用赖氨酸取代在位置1处的谷氨酰胺。

[0403] 本领域技术人员自然会理解本文所述氨基酸序列的所有可能组合。

[0404] 在一个实施方案中,除非另有具体说明,否则本公开中的术语“功能等同物”意指当通过本领域技术人员已知的方法测量时保留至少50%或更多、优选70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多,更优选90%或更多(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更多)含有参考氨基酸序列的抗体所具有的功能,其表示为其理化性质和/或生物活性等(例如,可能关注任何一种或更多种诸如抗原结合和血液保留的指标或性质)。

[0405] 在进一步或备选实施方案中,本公开中可具有对IL-8的pH依赖性亲和力的抗IL-8抗体包含选自以下各项组成的组中的任何一种或更多种氨基酸序列:

[0406] (A) 包含SEQ ID NO:33、34或108的氨基酸序列的重链可变区,或具有与其至少65%、70%、75%或更高,优选80%、85%、90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的重链可变区;以及

[0407] (B) 包含SEQ ID NO:35或109的氨基酸序列的轻链可变区,或具有与其至少65%、70%、75%或更高,优选80%、85%、90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的轻链可变区。

[0408] 本文中,与参考氨基酸序列具有特定%序列同一性的可变区可以在功能上等同于包含此参考氨基酸序列的可变区。此外,例如,抗IL-8抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:35的氨

氨基酸序列。这种抗体可以是有利的,因为其IL-8中和活性在体内(例如,在血浆中)稳定保留或因为其免疫原性低。而且,当抗IL-8抗包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的变体时,其可额外地至少包含在选自下述位置组成的组的位置处用不同的氨基酸或下文所示的氨基酸的取代:

[0409] (i) 在SEQ ID NO:33的氨基酸序列中,用不同的氨基酸(例如天冬氨酸)取代在位置55处的丙氨酸;

[0410] (ii) 在SEQ ID NO:33的氨基酸序列中,用不同的氨基酸(例如酪氨酸)取代在位置57处的甘氨酸;

[0411] (iii) 在SEQ ID NO:33的氨基酸序列中,用不同的氨基酸(例如组氨酸)取代在位置58处的酪氨酸;

[0412] (iv) 在SEQ ID NO:33的氨基酸序列中,用不同的氨基酸(例如脯氨酸)取代在位置60处的精氨酸;

[0413] (v) 在SEQ ID NO:33的氨基酸序列中,用不同的氨基酸(例如苏氨酸)取代在位置84处的谷氨酰胺;

[0414] (vi) 在SEQ ID NO:33的氨基酸序列中,用不同的氨基酸(例如天冬氨酸)取代在位置87处的丝氨酸;

[0415] (vii) 在SEQ ID NO:33的氨基酸序列中,用不同的氨基酸(例如组氨酸)取代在位置103处的酪氨酸。

[0416] 本领域技术人员自然会理解上文所述的氨基酸序列的所有可能组合。

[0417] 在另一个实施方案中,本公开中的抗IL-8抗体可以是包含下文(1)至(7)中的每一个中列出的(a)至(f)的至少一至六个氨基酸序列的抗体,或在每一个中列出的(a)至(f)的至少任一个或更多个氨基酸序列中包含至少一个氨基酸取代的抗体。抗体可以是对IL-8具有pH依赖性亲和力的抗IL-8抗体。除非另有明确说明,否则氨基酸可以由任何其他氨基酸取代。

[0418] (1) (a) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H1,

[0419] (b) 包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-H2,

[0420] (c) 包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-H3,

[0421] (d) 包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L1,

[0422] (e) 包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HVR-L2,和

[0423] (f) 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的HVR-L3。

[0424] (2) (a) 包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的HVR-H1,

[0425] (b) 包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的HVR-H2,

[0426] (c) 包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-H3,

[0427] (d) 包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-L1,

[0428] (e) 包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的HVR-L2,和

[0429] (f) 包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HVR-L3。

[0430] (3) (a) 包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的HVR-H1,

[0431] (b) 包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的HVR-H2,

[0432] (c) 包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-H3,

- [0433] (d) 包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HVR-L1,
[0434] (e) 包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的HVR-L2,和
[0435] (f) 包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-L3。
[0436] (4) (a) 包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HVR-H1,
[0437] (b) 包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的HVR-H2,
[0438] (c) 包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HVR-H3,
[0439] (d) 包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的HVR-L1,
[0440] (e) 包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HVR-L2,和
[0441] (f) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HVR-L3。
[0442] (5) (a) 包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的HVR-H1,
[0443] (b) 包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的HVR-H2,
[0444] (c) 包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的HVR-H3,
[0445] (d) 包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的HVR-L1,
[0446] (e) 包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的HVR-L2,和
[0447] (f) 包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的HVR-L3。
[0448] (6) (a) 包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的HVR-H1,
[0449] (b) 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的HVR-H2,
[0450] (c) 包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的HVR-H3,
[0451] (d) 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的HVR-L1,
[0452] (e) 包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的HVR-L2,和
[0453] (f) 包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的HVR-L3。
[0454] (7) (a) 包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的HVR-H1,
[0455] (b) 包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的HVR-H2,
[0456] (c) 包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的HVR-H3,
[0457] (d) 包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的HVR-L1,
[0458] (e) 包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HVR-L2,和
[0459] (f) 包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的HVR-L3。

[0460] 在本文中,术语“酸性pH”是指选自例如pH 4.0和pH 6.5之间的pH。在一个实施方案中,酸性pH是指,但不限于pH 4.0、pH 4.1、pH 4.2、pH 4.3、pH 4.4、pH 4.5、pH 4.6、pH 4.7、pH 4.8、pH 4.9、pH 5.0、pH 5.1、pH 5.2、pH 5.3、pH 5.4、pH 5.5、pH 5.6、pH 5.7、pH 5.8、pH 5.9、pH 6.0、pH 6.1、pH 6.2、pH 6.3、pH 6.4或pH 6.5。

[0461] 在本文中,术语“中性pH”是指选自例如pH 6.7和pH 10.0之间的pH。在一个实施方案中,中性pH是指,但不限于,例如pH 6.7、pH 6.8、pH 6.9、pH 7.0、pH 7.1、pH 7.2、pH 7.3、pH 7.4、pH 7.5、pH 7.6、pH 7.7、pH 7.8、pH 7.9、pH 8.0、pH 8.1、pH 8.2、pH 8.3、pH 8.4、pH 8.5、pH 8.6、pH 8.7、pH 8.8、pH 8.9、pH 9.0、pH 9.5或pH 10.0。

[0462] 在一个实施方案中,本公开的抗IL-8抗体是以pH依赖性方式结合IL-8的抗IL-8抗体。在本公开的一个方面,以pH依赖性方式结合IL-8的抗IL-8抗体是指与在中性pH下相比,在酸性pH下的IL-8-结合亲和力降低的抗体。这种pH依赖性抗IL-8抗体包括,例如,在中性pH下比在酸性pH下对IL-8具有更高亲和力的抗体。在一个实施方案中,本公开的抗IL-8抗

体在中性pH下具有对IL-8的亲合力比在酸性pH下的亲合力高至少2倍、3倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、200倍、400倍、1000倍、10000倍或更多倍。不受限制地,该结合亲合力可以通过使用表面等离子共振测定(BIACORE等)来确定。通过同时拟合结合和解离传感图,可以使用简单的一对一Langmuir结合模型(Biacore T200评价软件(GE Healthcare))计算结合速率常数(kon)和解离速率常数(koff)。平衡解离常数(KD)计算为koff/kon的比率。筛选结合亲合力随pH变化的抗体可以使用例如但不限于ELISA,动力学排除测定(KinExATM)以及表面等离子体共振测定(BIACORE等)进行。pH依赖性IL-8结合能力是指以pH依赖性方式结合IL-8的性质。同时,可以通过W02009/125825中描述的方法评估抗体是否可以多次结合IL-8。

[0463] 在一个实施方案中,本公开的抗IL-8抗体优选在中性pH(例如,pH 7.4)下具有针对IL-8的小的解离常数(KD)。在中性pH(例如,pH 7.4)下抗体对IL-8的解离常数可以是,例如,0.3nM或更小、0.1nM或更小或0.03nM或更小。

[0464] 在一个实施方案中,本公开的抗IL-8抗体优选在酸性pH(例如,pH 5.8)下具有针对IL-8的大解离常数(KD)。在酸性pH(例如,pH 5.8)下抗体对IL-8的解离常数可以是,例如,3nM或更大、10nM或更大或30nM或更大。

[0465] 在一个实施方案中,本公开的抗IL-8抗体具有在酸性pH(例如,pH5.8)下的解离常数与在中性pH(例如,pH 7.4)下的解离常数的比,[KD(酸性pH)/KD(中性pH)](例如[KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)]),其为例如30或更大、50或更大,或者例如100或更大,例如200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000或9500或更大。

[0466] 在一个实施方案中,本公开的抗IL-8抗体优选在酸性pH(例如,pH 5.8)下具有大的解离速率常数(koff)。在酸性pH(例如,pH 5.8)下抗体的解离速率常数可以是例如0.003(1/s)或更大、0.005(1/s)或更大或0.01(1/s)或更大。

[0467] W02013/046704报道,引入有特定突变(与在酸性pH下增加FcRn结合的突变组合)(代表性的实例是根据EU编号的双残基突变Q438R/S440E)的Fc区变体在其类风湿因子的结合中呈现显著降低。然而,W02013/046704未显示,已经通过Q438R/S440E修饰降低其类风湿因子结合的Fc区变体与含有天然Fc区的抗体相比在血浆保留方面更优。因此,存在对安全和更有利的允许改善的血浆保留、但不结合预先存在的ADA的Fc区变体的需要。本发明人认为,包含氨基酸残基突变的组合(用Ala(A)取代在位置434(根据EU编号)处的氨基酸和特定的双残基突变(代表性的实例是Q438R/S440E))的Fc区变体,作为允许改善血浆保留但不结合抗药物抗体(预先存在的ADA等)的安全且更有利的Fc区变体是优选的。

[0468] 因此,在进一步或替代的实施方案中,本公开的抗IL-8抗体包含含有FcRn结合结构域的Fc区变体,并且所述FcRn结合结构域可包含与天然Fc区相比,例如根据EU编号在位置434处的Ala;在位置438处的Glu、Arg、Ser或Lys;在位置440处的Glu、Asp或Gln。对于抗IL-8抗体,FcRn结合结构域可以是FcRn结合结构域,其在酸性pH和中性pH下具有增加的FcRn结合活性,特别是在酸性pH下。备选地,在该抗体中,其FcRn结合结构域优选含有包含根据EU编号在位置434处的Ala;在位置438处的Glu、Arg、Ser或Lys;在位置440处的Glu、Asp或Gln,更优选包含在位置434处的Ala;在位置438处的Arg或Lys;以及在位置440处的Glu和

Asp的Fc区变体。备选地,该Fc区变体优选进一步含有根据EU编号在位置428处的Ile或Leu;和/或在位置436处的Ile、Leu、Val、Thr或Phe,更优选地,进一步含有在位置428处的Leu;和/或在位置436处的Val或Thr。

[0469] 在一个实施方案中,本公开的抗IL-8抗体的Fc区变体优选是天然Ig抗体的Fc区变体,更优选天然IgG (IgG1、IgG2、IgG3或IgG4型) 抗体的Fc区变体,更优选地,其衍生自天然人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。Fc区变体可以衍生自例如人IgG1。

[0470] 关于天然人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4型抗体的Fc区,根据EU编号,除了位置436,上述修饰位点位置428、434、438和440是所有天然人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4型抗体的Fc区所共有的。在另一方面,在Fc区中的位置436,天然人IgG1、IgG2和IgG4型抗体具有Tyr (Y),而天然人IgG3型抗体具有Phe (F)。然而,Stapleton等 (Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential, Nature Communications, 2011年12月, 599号) 报道含有R435H (根据EU编号) 的氨基酸取代的人IgG3同种异型显示与IgG1相当的在人中的血浆半衰期。因此,血浆保留可以藉由通过引入除在位置436处的氨基酸取代之外的R435H氨基酸取代增加在酸性条件下的FcRn结合来改善。

[0471] W02013/046704具体报道了Q438R/S440E、Q438R/S440D、Q438K/S440E和Q438K/S440D (根据EU编号),作为双氨基酸残基取代,当与可在酸性pH下增加FcRn结合的氨基酸取代组合时,可以导致类风湿因子结合的降低。

[0472] 因此,在一个实施方案中,与天然Fc区相比,本公开的抗IL-8抗体的Fc区变体的氨基酸序列在其FcRn结合结构域中可包含选自以下各项组成的组的取代的氨基酸的组合:

[0473] N434A/Q438R/S440E; N434A/Q438R/S440D;

[0474] N434A/Q438K/S440E; N434A/Q438K/S440D;

[0475] N434A/Y436T/Q438R/S440E; N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0476] N434A/Y436T/Q438K/S440E; N434A/Y436T/Q438K/S440D;

[0477] N434A/Y436V/Q438R/S440E; N434A/Y436V/Q438R/S440D;

[0478] N434A/Y436V/Q438K/S440E; N434A/Y436V/Q438K/S440D;

[0479] N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E; N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;

[0480] N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E; N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;

[0481] N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E; N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;

[0482] N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E; N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;

[0483] M428L/N434A/Q438R/S440E; M428L/N434A/Q438R/S440D;

[0484] M428L/N434A/Q438K/S440E; M428L/N434A/Q438K/S440D;

[0485] M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0486] M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E; M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;

[0487] M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E; M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;

[0488] M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E; 和M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;

[0489] L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; 和

[0490] L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;

[0491] 根据EU编号。

[0492] 备选地,在另一个实施方案中,与天然Fc区相比,本公开的抗IL-8抗体的Fc区变体可包含选自以下各项组成的组的一个或更多个位置(例如,六个、七个或所有位置)处的其他氨基酸的取代:根据EU编号,位置235、236、239、327、330、331、428、434、436、438和440,例如,选自以下各项组成的组:L235R、G236R、S239K、A327G、A330S、P331S、M428L、N434A、Y436T、Q438R和S440E的一个或更多个氨基酸取代(例如,六个、七个或所有取代)。

[0493] 在一个实施方案中,优选地,与天然IgG的Fc区相比,本公开的抗IL-8抗体的Fc区变体的FcRn结合活性在酸性pH下已经增加。

[0494] 在某个pH下FcRn结合结构域的FcRn结合亲和力的增加可以对应于所测量的FcRn结合亲和力相比于天然FcRn结合结构域的所测量的FcRn结合亲和力的增加。在这种情况下,表示结合亲和力差异的KD(天然Fc区)/KD(本公开的抗IL-8抗体的Fc区变体)可以是至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、70倍、80倍、100倍、500倍或1000倍。这种在FcRn结合结构域的FcRn结合亲和力中的增加可在酸性pH和/或中性pH下提供;然而,特别地,优选FcRn结合活性在酸性pH下增加。

[0495] 此外,本公开的抗IL-8抗体(其FcRn结合亲和力在酸性pH下已增加)的Fc区变体的FcRn结合亲和力,可以比天然IgG的Fc区的FcRn结合亲和力,例如在pH6.0和25℃下大1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、75倍、100倍、200倍、500倍、1000倍或更多。

[0496] 如本文所用,“抗药物抗体”或“ADA”是指内源性抗体,其对位于治疗性抗体上的表位具有结合活性,因此可以结合至治疗性抗体。如本文所用,“预先存在的抗药物抗体”或“预先存在的ADA”是指在向患者施用治疗性抗体之前在患者的血液中的和可检测的抗药物抗体。在一个实施方案中,预先存在的ADA是类风湿因子、针对人IgG抗体的Fc区的多克隆或单克隆自身抗体。类风湿因子表位位于CH2/CH3界面区中和CH3结构域中,并且可以根据克隆而变化。对于“对预先存在的ADA的结合亲和力低的Fc区变体”,与包含天然IgG Fc区的抗体的ADA结合亲和力相比,亲和力可能已经降低,例如,降低至1/10或更低,1/50或更低或1/100或更低。

[0497] 在一个实施方案中,抗体Fc区(变体)对预先存在的ADA的结合亲和力可以通过例如在酸性pH和/或中性pH下的电化学发光(ECL)反应来证明;然而,也可能使用本领域技术人员已知的其他合适方法来确定对预先存在的ADA的结合亲和力。ECL测定描述于,例如Moxness等(Clin Chem, 2005, 51:1983-85)以及本文的实施例。测定可在37℃的条件下用MES缓冲液进行测定。抗体的抗原结合活性可以通过例如BIACORE确定。在一个实施方案中,对预先存在的ADA的结合亲和力可以在10℃至50℃的任何温度下评估。人Fc区和预先存在的人ADA之间的结合活性优选在15℃至40℃的温度下确定。温度优选为20℃至25℃,更优选为25℃。活性可以在pH 7.4(或pH 7.0)和25℃下测量。

[0498] 在一个实施方案中,优选本公开的抗IL-8抗体的Fc区变体对预先存在的ADA,优选在中性pH下的类风湿因子(RF)没有显著增加的结合亲和力,和/或与天然IgG的Fc区相比,在酸性pH下具有增加的FcRn结合活性;结果,其优选表现出血浆中的清除率(CL)降低,血浆中的保留时间延长或血浆中的半衰期延长($t_{1/2}$)。血浆中的抗体清除率(CL)、血浆中的保留时间和血浆中的半衰期($t_{1/2}$)之间的相关性是本领域技术人员已知的。

[0499] 在一个实施方案中,与包含根据EU编号的氨基酸取代N434Y/Y436V/Q438R/S440E

的组合的参照Fc区变体相比,本公开的抗IL-8抗体的Fc区变体具有改善的血浆保留。

[0500] 本文的实施例1至3比较以下两种Fc区变体的血浆保留:W02013/046704中描述的称为F1718的Fc区变体(在四个位点:N434Y/Y436V/Q438R/S440E引入突变的Fc区);和Fc区变体F1848m(在四个位点:N434A/Y436V/Q438R/S440E引入突变的Fc区)。两个Fc区变体之间的氨基酸突变的差异仅在根据EU编号的位置434处,在这里引入的氨基酸突变对于F1718为Y(酪氨酸)和对于F1848m为A(丙氨酸)。然而,与天然IgG1相比,F1848m表现出改善的血浆保留,而F1718没有在血浆保留方面表现出改善(参见,特别是,本文实施例(3-2))。此外,本文实施例(1-2)和(3-3)的结果证明,各种Fc区变体的,F1847m、F1886m、F1889m和F1927m的血浆保留比F1848m更好。因此,本领域技术人员可以自然地预测,与含有根据EU编号的氨基酸取代N434Y/Y436V/Q438R/S440E的组合的参考Fc区变体相比,包括F1847m、F1886m、F1889m和F1927m以及F1848m的Fc区变体具有改善的血浆保留。

[0501] 在血液中半衰期已被延长并且在酸性pH下的FcRn结合得到改善的抗体也描述在US2005/0014934 (Hinton等)中。抗体可以含有Fc区变体,所述Fc区变体包含一个或更多个增加Fc区与FcRn结合的氨基酸取代,并且可以包含在选自如下各项组成的组的位置处的一个或更多个氨基酸取代:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424和434(EU编号),例如,在Fc区中的位置434处的氨基酸取代。关于Fc区变体的其他实例,参见Duncan&Winter, Nature 322:738-40(1988);美国专利No.5,648,260;美国专利No.5,624,821;和WO 94/29351。可以将这些氨基酸的适当修饰引入本公开的抗IL-8抗体的Fc区(变体)中。

[0502] 与Fc γ R或补体蛋白的结合也可引起不利影响(例如不适当的血小板激活)。不与效应受体如Fc γ RIIa受体结合的Fc区变体可以更安全和/或更有利。

[0503] 在一个实施方案中,包含本公开的Fc区变体的抗IL-8抗体仅具有弱补体蛋白结合活性或不与补体蛋白结合。优选的补体蛋白是C1q。对补体蛋白的低结合活性可以指,与天然IgG或包含天然IgG Fc区的抗体的补体蛋白结合活性相比,已经降低至例如1/10或更少、1/50或更少或1/100或更少的补体蛋白结合活性。Fc区(变体)的补体蛋白结合活性可以通过氨基酸序列修饰诸如氨基酸取代、插入和缺失来降低。

[0504] 在进一步或替代的实施方案中,包含本公开的Fc区变体的抗IL-8抗体仅具有弱效应受体结合活性或不与效应受体结合。效应受体包括,例如,激活Fc γ R,特别是Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Fc γ RI包括例如Fc γ RIa、Fc γ RIb和Fc γ RIc及其亚型。Fc γ RII包括,例如,Fc γ RIIa(两种同种异型:R131和H131)和Fc γ RIIb。Fc γ RIII包括,例如,Fc γ RIIIa(两种同种异型:V158和F158)和Fc γ RIIIb(两种同种异型:Fc γ IIIIb-NA1和Fc γ IIIIb-NA2)。仅具有弱效应受体结合亲和力或不结合该受体的抗体包括包含Fc结构变体的抗体,与包含天然IgG的Fc区的抗体的结合亲和力相比,其结合亲和力已降低至,例如1/10或更少、1/50或更少或1/100或更少。具体实例包括包含沉默Fc区的抗体和不具有Fc区的抗体(例如Fab、F(ab) $'_2$ 、scFv、sc(Fv) $_2$ 和双抗体)。

[0505] 仅具有弱或不具有效应受体结合亲和力的Fc区变体的实例描述在Strohl等(Current Opinion in Biotechnology (2009) 20(6), 685-691),其包括去糖基化Fc区(N297A和N297Q)和沉默Fc区,和由操作Fc区以沉默其效应子功能(或抑制免疫性)得到的沉默的Fc区(IgG1-L234A/L235A、IgG1-H268Q/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/

C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A和IgG4-L236E)。W02008/092117描述含有包含G236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R或N325L/L328R(根据EU编号)的取代的沉默Fc区的抗体。W02000/042072描述含有在位置EU233、EU234、EU235和EU237的一个或更多个处包含取代的沉默的Fc区的抗体。W02009/011941描述含有删除了EU231至EU238的残基的沉默的Fc区的抗体。Davis等(Journal of Rheumatology(2007) 34(11):2204-2210)描述具有含有取代C220S/C226S/C229S/P238S的沉默的Fc区的抗体。Shields等(Journal of Biological Chemistry(2001) 276(9), 6591-6604)描述含有包含取代D265A的沉默的Fc区的抗体。美国专利No. 6,737,056描述具有降低的效应子功能的抗体,其包含在EU238、EU265、EU269、EU270、EU297、EU327和EU329中处的一个或更多个氨基酸取代。美国专利No. 7,332,581描述在EU265、EU269、EU270、EU297和EU327处含有两个或更多个氨基酸取代的Fc区变体以及在EU265和EU297处具有用丙氨酸取代的所谓“DANA”Fc区变体。可以将这些氨基酸残基的修饰适当地引入本公开的抗IL-8抗体的Fc区变体中。

[0506] “与效应受体的弱结合”是指效应受体结合活性为天然IgG(或包含天然IgG Fc区的抗体)的效应受体结合活性的,例如95%或更少、优选90%或更少、85%或更少、80%或更少、或75%或更少、更优选70%或更少、65%或更少、60%或更少、55%或更少、50%或更少、45%或更少、40%或更少、35%或更少、30%或更少、25%或更少、20%或更少、15%或更少、10%或更少、9%或更少、8%或更少、7%或更少、6%或更少、5%或更少、4%或更少、3%或更少、2%或更少或1%或更少。与天然IgG(或包含天然IgG Fc区的抗体)的效应受体结合活性相比,Fc γ R结合活性可降低至1/10或更少、1/50或更少或1/100或更少。

[0507] 本文中,“沉默Fc区”是包含一个或更多个氨基酸取代,插入、缺失的Fc区变体,以便与天然Fc区相比降低效应受体结合。由于效应受体结合活性可以在很大程度上降低,因此Fc区变体(基本上)不再与效应受体结合。沉默的Fc区包括,例如,在选自以下各项组成的组的一个或更多个位置处包含氨基酸取代的Fc区(变体):EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331和EU332。在一个实施方案中,这些氨基酸残基的修饰也可以适当地引入本公开的抗IL-8抗体的Fc区(变体)中。

[0508] 在一个实施方案中,用于修饰抗体恒定区以产生本公开的抗IL-8抗体的Fc区变体的方法可以基于,例如,评估几种恒定区同种型(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4),然后在其序列中引入例如适当的氨基酸取代,以选择在酸性pH下具有降低的抗原结合活性和/或在酸性pH下具有增加的解离速率的同种型。

[0509] 在进一步的或替代的实施方案中,本公开的抗IL-8抗体可包含:

[0510] (A) 包含SEQ ID NO:36、37或106的氨基酸序列的重链,或与其具有至少65%、70%或75%或更高,优选80%、85%或90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的重链;和/或

[0511] (B) 包含SEQ ID NO:38或44的氨基酸序列的重链,或与其具有至少65%、70%或75%或更高,优选80%、85%或90%或更高,且更优选95%或更高的序列同一性的重链。

[0512] 本文中,与参考氨基酸序列具有一定百分比(%)的序列同一性的重链或轻链可以在功能上等同于包含参考氨基酸序列的重链或轻链。此外,抗IL-8抗体可含有具有以下五

种性质中的至少一种的Fc区变体:

[0513] (a) 相对于在酸性pH下的天然Fc区的FcRn结合亲和力,Fc区变体的FcRn结合亲和力已经增加;

[0514] (b) 相对于所述天然Fc区对预先存在的ADA的结合亲和力,Fc区变体对预先存在的ADA的结合亲和力已经降低;

[0515] (c) 相对于天然Fc区的血浆半衰期,Fc区变体的血浆半衰期已经延长;

[0516] (d) 相对于天然Fc区的在血浆中的清除率,Fc区变体的在血浆中清除率的已经降低;

[0517] (e) 相对于天然Fc区的效应受体结合亲和力,Fc区变体的效应受体结合亲和力已经降低;和

[0518] (F) 能够以pH依赖性方式与IL-8结合。

[0519] 本领域技术人员自然会理解本文所述氨基酸序列的所有可能组合。

[0520] 在一个实施方案中,本公开的抗IL-8抗体可以使用例如美国专利No.4,816,567中描述的方法产生。在一个实施方案中,提供编码本公开的抗IL-8抗体的分离的核酸。此类核酸可以编码包含抗体的VL的氨基酸序列和/或包含抗体的VH的氨基酸序列(例如,抗体轻和/或重链)。可以将编码抗IL-8抗体的分离的核酸插入一种或更多种载体中,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序将此类核酸容易地分离并测序(例如,通过使用寡核苷酸探针来进行,所述寡核苷酸探针特异性结合至编码抗体的重和/或轻链的基因)。

[0521] 在进一步的实施方案中,提供了含有这种核酸的一种或更多种载体(例如,表达载体)。在一个实施方案中,提供了含有这种核酸的宿主细胞。所述宿主细胞含有:(1) 包含核酸的载体,所述核酸编码包含抗体VL的氨基酸序列和包含抗体VH的氨基酸序列,或(2) 第一载体和第二载体,所述第一载体包含编码包含抗体VL的氨基酸序列的核酸,所述第二载体包含编码包含抗体VH的氨基酸序列的核酸(例如,已经用该载体转化的细胞)。

[0522] 在一个实施方案中,宿主是真核的(例如,CHO细胞或淋巴细胞(例如,Y0、NS0或SP20细胞))。

[0523] 在一个实施方案中,提供了用于产生本公开的抗IL-8抗体的方法。该方法包括,例如,在适于表达该抗体的条件下培养含有上述核酸的宿主细胞,并任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)收集该抗体。

[0524] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括,例如,原核和真核细胞。衍生自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)的细胞可用于表达糖基化抗体。无脊椎动物包括例如植物和昆虫细胞。

[0525] 在一个实施方案中,通过在适于抗体表达的条件下培养产生的抗IL-8抗体,可以从宿主细胞内部或细胞外分离含有编码抗体的核酸的宿主细胞(培养基、乳汁等))将其纯化为基本上纯的均质抗体。不受限制地,通常用于纯化多肽的分开/纯化方法可以适当用于分开和纯化所述抗体。抗体可以例如,通过适当选择和组合柱色谱,滤器,超滤,盐析,溶剂沉淀,溶剂萃取,蒸馏,免疫沉淀,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,等电聚焦,透析和重结晶适当分离和纯化。色谱包括,例如,亲和色谱,离子交换色谱,疏水色谱,凝胶过滤色谱,反相色谱,和吸附色谱。所述色谱可以使用液相色谱,例如,HPLC和FPLC进行。用于亲和色谱的柱包

括,例如,蛋白A柱和蛋白G柱。蛋白A柱包括,例如,Hyper D,POROS,和Sephacrose F.F. (Pharmacia)。

[0526] 在一个实施方案中,本公开关注于抗IL-8抗体的特性(在IL-8和抗IL-8之间的复合物的增加的胞外基质结合和增强的细胞摄取),因此本公开涉及提供用于选择具有增加的胞外基质结合的抗体和具有增强的细胞摄取的抗体的方法。在一个实施方案中,本公开提供用于生产包含其IL-8结合活性是pH-依赖性的可变区的抗IL-8抗体的方法,其包括以下的步骤:(i)评估抗IL-8抗体和胞外基质之间的结合;(ii)选择强烈结合胞外基质的抗IL-8抗体;(ii)培养包含编码抗体的核酸的载体的宿主;和(iv)从培养基分离抗体。与细胞外基质的结合可以例如通过ELISA系统评估,其中将抗体添加至用细胞外基质固定的板中,然后向其中加入针对该抗体的标记抗体以检测该抗体与细胞外基质之间的结合。备选地,该结合可以例如如下评估:将抗体和钉抗体的混合物添加至用细胞外基质固定的板中,并通过电化学发光(ECL)方法测量钉的电化学发光评估抗体和细胞外基质之间的结合。

[0527] 在一个实施方案中,优选本公开抗IL-8抗体的IL-8中和活性稳定地保留在溶液(例如,在PBS中)中。该活性是否稳定地保留在溶液中可以通过评估添加到该溶液中的本公开的抗IL-8抗体的IL-8中和活性是否在储存之前和在一定的温度下储存一定时期之后的变化来测试。在一个实施方案中,储存期例如一至四周,且储存温度例如25℃、30℃、35℃、40℃或50℃。

[0528] 在一个实施方案中,优选本公开抗IL-8抗体的IL-8中和活性稳定地保留在体内(例如,在血浆中)中。该活性是否稳定地保留在体内可以通过评估添加到非人动物或人的血浆的本公开的抗IL-8抗体的IL-8中和活性是否在储存之前和在一定的温度下储存一段时间之后的变化来测试。在一个实施方案中,储存期例如一至四周,且储存温度例如25℃、30℃、35℃或40℃。

[0529] 在一个实施方案中,本公开的抗IL-8抗体的细胞摄取速率在与IL-8的复合物中比单独的抗体更高。

[0530] 在一个实施方案中,优选本发明的抗IL-8抗体在人宿主中的预测免疫原性降低。“低免疫原性”可以意为,例如,施用的抗IL-8抗体在足够长的时间内在至少大多数施用足够量的抗体的个体中不诱导体内免疫应答以实现治疗效果。免疫应答的诱导可包括产生抗药物抗体。“低抗药物抗体产生”可以改述为“低免疫原性”。人的免疫原性水平可以使用T细胞表位预测程序预测。这种T细胞表位预测程序包括(Lonza)、iTope/TCED (Antitope) 和EpiMatrix (EpiVax)。具有降低的免疫原性的序列可以,例如通过使用T细胞表位预测程序的分析来设计。氨基酸修饰位点的非限制性实例包括在SEQ ID NO:34中所示的抗IL-8抗体的重链序列中的根据Kabat编号的位置81和/或位置82b。

[0531] 在一个实施方案中,用于与本文所述的抗IL-8抗体进行功能性比较的参照抗体可以是包含SEQ ID NO:39和40的氨基酸序列的抗体。在一个具体实施方案中,用于PK测试的参考抗体可以是包含SEQ ID NO:43和45的氨基酸序列的抗体。

[0532] 在一些实施方案中,本公开的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)通过使用物理化学性质和/或生物活性作为指标的各种已知方法鉴定、筛选或表征。

[0533] 结合测量和其他测量

[0534] 在一个方面,可以通过任何方法对本公开的抗体评估其抗原结合活性,所述方法

例如, ELISA, 蛋白质印迹, 动力学排除测定 (KinExATM), 和使用装置如Biacore (GE Healthcare) 的表面等离子共振。

[0535] 在一个实施方案中, 结合亲和力可以使用Biacore T200 (GE Healthcare) 以下列方式测量。通过胺偶联方法将适量的捕获蛋白 (例如, 蛋白A/G (PIERCE)) 固定在传感芯片CM4 (GE Healthcare) 上, 并且允许通过它捕获目标抗体。然后, 将稀释的抗原溶液和运行缓冲液 (作为参照溶液, 例如, 0.05% 吐温20, 20mM ACES, 150mM NaCl, pH 7.4) 注射以允许抗原分子与捕获在传感芯片上的抗体相互作用。使用10mM甘氨酸HCl溶液 (pH1.5) 再生传感芯片。在预定的温度 (例如, 37°C, 25°C, 或20°C) 进行测量。每种抗体对于抗原的KD (M) 基于结合速率常数kon (1/Ms) 和解离速率常数koff (1/s) 计算, 其为动力学参数, 从通过该测量获得的传感图计算。使用BIACORE T200评价软件 (GE Healthcare) 计算每个参数。

[0536] 在一个实施方案中, IL-8可以如下文所述定量。将含有小鼠IgG恒定区的抗人IL-8抗体固定在板上。含有结合于人源化抗IL-8抗体的IL-8的溶液 (其不与上述抗人IL-8抗体竞争), 等分到固定化平板上。搅拌后, 加入生物素化的抗人Igκ轻链抗体并使其反应一定时期。然后, 进一步加入SULFO-Tag-标记的链霉亲和素并使其反应一定时期。然后, 加入测定缓冲液并立即用SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery) 进行测量。

[0537] 活性评价测定

[0538] 在一个方面, 提供测定以鉴别具有生物活性的抗体。生物活性包括, 例如, 中和抗体 (例如IL-8) 的活性和阻断来自抗原 (例如IL-8) 的信号活性。

[0539] 在一个实施方案中, IL-8中和活性水平可以通过例如下文所述方法确定。PathHunterTMCHO-K1 CXCR2β-Arrestin细胞系 (DiscoverX, Cat.#93-0202C2) 是人工细胞系, 其被产生用于表达已知为人IL-8受体的人CXCR2并且在由人IL-8导致的信号被传导时发出化学发光。当将人IL-8加入细胞的培养基中时, 化学发光以取决于加入的人IL-8的浓度的方式从细胞发出。当将人IL-8与抗人IL-8抗体组合加入培养基时, 与不加入抗体时相比, 细胞的化学发光降低或不可检测, 因为抗人IL-8抗体可以经由人IL-8阻断信号传导。即抗体的人IL-8中和活性越强, 化学发光水平越弱; 并且抗体的人IL-8中和活性越弱, 化学发光水平越高。因此, 抗人IL-8抗体的人IL-8中和活性可以通过检查此差异来评估。

[0540] 如本文所用, 术语“诊断组合物”、“治疗组合物”和“预防性组合物”分别可与“诊断剂”、“治疗剂”和“预防剂”互换。在一个实施方案中, 当“治疗组合物”或“预防性组合物”意在治疗或预防期望受试者的疾病或症状时, 该组合物也称为“药物组合物”; 一般地, 药物组合物是指用于治疗或预防疾病或症状的药剂。

[0541] 如本文所用, “药学上可接受的载体”是指除药物组合物中包含的活性成分之外的组分。通常选择对受试者无毒的药学上可接受的载体, 但该选择将根据目的考虑利益/风险进行选择。药学上可接受的载体包括例如缓冲剂、赋形剂、稳定剂和防腐剂。

[0542] 在一个实施方案中, 本公开的治疗或预防性组合物包含药学上可接受的载体, 并且可以以冻干剂或水性制剂的形式制备。

[0543] 药学上可接受的载体通常在所用剂量和浓度下对接受者无毒, 并且包括例如: 缓冲剂, 诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和蛋氨酸; 防腐剂 (例如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化六烃季铵; 氯化苄甲烃铵; 苄索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烃基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-

戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶和免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖和糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖和山梨醇;成盐反离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或诸如TWEENTM、PLURONICSTM的非离子表面活性剂,或聚乙二醇(PEG)。备选地,药学上可接受的载体还可包括例如间质药物分散剂,诸如可溶性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP)(US2005/0260186;US2006/0104968)。将sHASEGP与一种或更多种糖胺聚糖酶如软骨素酶组合是可能的。

[0544] 如本文所用,药物组合物中活性成分(IL-8信号抑制剂,诸如IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂),的“有效量”是指在必要的剂量和时间段上有效实现期望治疗或预防结果的量。

[0545] 在一个方面,本公开基于IL-8信号抑制剂(例如,IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂和CXCR2抑制剂)作为药物组合物的适用性。本公开内容的IL-8信号抑制剂(例如,IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂和CXCR2抑制剂)可用于例如诊断、治疗或预防IL-8过量存在的疾病。

[0546] 在一个实施方案中,本公开的IL-8信号抑制剂(例如,IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂)通过任何合适的方式施用。包括肠胃外、肺内和鼻内,并且如果需要局部治疗,则病灶内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内和皮下施用。部分根据施用是短暂的还是长期的,给药可以通过任何合适的路径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射进行。各种给药时间表是可获得的。

[0547] 在一个实施方案中,本公开的IL-8信号抑制剂可以以符合医学实用性的方式配制、给药和施用。

[0548] 在一个实施方案中,本公开涉及含有IL-8信号抑制剂的产品,其可用于诊断、治疗和/或预防本文公开的疾病。这种产品包括容器和与容器相关的标签或附加文件。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、袋子和静脉内溶液袋。

[0549] 本公开内容的IL-8信号抑制剂(例如,IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂)用于预防或者治疗疾病的合适的剂量和施用间隔可以根据要治疗的疾病类型、抑制剂的类型、疾病的严重程度和病程、施用的目的、既往治疗、患者的临床病史和对抑制剂的应答以及主治医师的自由裁量权适当的确定。

[0550] 在一个实施方案中,治疗效果包括,例如,预防疾病发展或复发、缓解症状、降低疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速度、治愈、减轻和缓解病理状况和改善预后。

[0551] 在一个实施方案中,在本公开中,其中IL-8过量存在的疾病或症状和涉及IL-8信号的疾病或可涉及发作、进展、恶化、复发等的病理状况的疾病,统称为“IL-8相关疾病”。

[0552] 在一个方面的一个实施方案中,本公开涉及用于IL-8相关疾病的治疗或预防组合物,其包含IL-8信号抑制剂(例如,IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂)作为有效成分。在进一步的实施方案中,该组合物可额外包含药学上可接受的载体。

[0553] 在一个方面的一个实施方案中,本公开涉及用于治疗或预防IL-8相关疾病(例如子宫内膜异位症、子宫腺肌病、痛经、粘连和纤维化疾病)的IL-8信号抑制剂(例如,IL-8抑

制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂)。

[0554] 在一个方面的一个实施方案中,本公开涉及作为针对IL-8相关疾病(例如子宫内膜异位症、子宫腺肌病、痛经、粘连和纤维化疾病)的诊断、治疗或预防组合物的IL-8信号抑制剂(例如,IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂)的用途。

[0555] 在一个方面的一个实施方案中,本公开涉及用于治疗或预防IL-8相关疾病(例如,子宫内膜异位症、子宫腺肌病、痛经、粘连和纤维化疾病)的方法,其包括(以有效量)施用IL-8信号抑制剂(例如,IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂),或包含其的治疗或预防组合物至需要它的受试者。本文中,需要其的受试者可以是患有或怀疑患有IL-8相关疾病的受试者。在进一步的实施方案中,该组合物可额外包含药学上可接受的载体。

[0556] 在一个方面的一个实施方案中,本公开涉及本公开的IL-8信号抑制剂(例如,IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体)、CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂)或包含其的治疗或预防组合物在制备用于治疗或预防IL-8相关疾病(例如,子宫内膜异位症、子宫腺肌病、痛经、粘连和纤维化疾病)的药剂中的用途。在进一步的实施方案中,该组合物可额外包含药学上可接受的载体。

[0557] 在一个实施方案中,为本公开的IL-8信号抑制剂的治疗或预防靶标的IL-8相关疾病(例如,IL-8抑制剂(例如,抗IL-8抗体),CXCR1抑制剂或CXCR2抑制剂)包括,例如以下:子宫内膜异位症;子宫腺肌病;痛经;粘连,诸如Ashermans综合征;不孕;子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经中的疼痛;粘连、纤维化或炎症中的疼痛;炎性皮肤病,诸如炎性角化病、特应性皮炎、接触性皮炎、掌跖脓疱病和牛皮癣;慢性炎症性疾病,诸如为自身免疫性疾病的慢性类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)和贝赫切特病(Behcet's disease);炎症性肠病,诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎;炎症性肝病,诸如乙型肝炎和丙型肝炎、酒精性肝炎和药物引起的过敏性肝炎;炎症性肾病,诸如肾小球肾炎和ANCA相关的肾炎;炎症呼吸系统疾病,诸如支气管炎和哮喘;炎症性慢性血管疾病,诸如动脉粥样硬化;多发性硬化;口腔炎;声带炎;移植后缺血再灌注;使用人造器官和人造血管时出现的炎症;恶性肿瘤,诸如卵巢癌、肺癌、前列腺癌、胃癌、乳腺癌、黑素瘤(恶性黑素瘤)、头颈癌、肾癌、膀胱癌和胶质母细胞瘤;感染引起的败血症或此类(包括感染性休克);急性肺损伤;纤维化疾病,诸如子宫内膜异位症或子宫腺肌病中的纤维化、囊性纤维化、肝纤维化、肾纤维化,和诸如慢性阻塞性肺病(COPD)的肺纤维化;选自脑卒中、脑梗塞(例如,缺血性脑梗塞)、脑血栓形成、脑栓塞、出血性脑血管损伤、脑内出血和蛛网膜下腔出血的脑部疾病;心肌梗塞(包括急性心肌梗塞、不稳定性心绞痛和心脏缺血/再灌注损伤)(参见,例如,本文的实施例;本文所示的文献;Remo等,Expert Rev.Clin.Immunol.10(5),pp.593-619,2014;Mian等,Clin Cancer Res.2003年8月1日,9(8):3167-75;Huang et al.,Am JPathol.2002年7月;161(1):125-34;W097/49426;W097/39775;JP10-045622;JP10-182488;JP10-053536)。IL-8相关疾病可以是哺乳动物疾病,并且优选是灵长类动物疾病,并且更优选人类疾病(例如,针对子宫内膜异位症的人子宫内膜异位症,针对子宫腺肌病的人子宫腺肌病;以下同样适用)。

[0558] 在一个实施方案中,为使用本公开的IL-8信号抑制剂的治疗或预防靶标的患有IL-8相关疾病的患者(受试者)可以是患有或怀疑患有IL-8相关疾病的受试者。本文中,怀疑患有IL-8相关疾病的受试者包括但不限于曾经患有IL-8相关疾病且具有该疾病的复发

的可能性的受试者,以及在接受由医师或其他人基于指示IL-8相关疾病的病理发现,做出的确诊或此类之前,怀疑患有IL-8相关疾病的受试者。在一个实施方案中,IL-8相关疾病的预防和治疗在一些情况下可以被解释为同义词。备选地,IL-8相关疾病的预防可以基于本领域技术人员公知的一般概念来解释,如果合适。

[0559] 在本公开的一个实施方案中,IL-8相关疾病对IL-8信号有应答。

[0560] 本文中,子宫内膜异位症是指但不限于这样的疾病,在其中症状表现为具有与子宫内膜组织相同或相似的形态和功能的组织在子宫外(通常在骨盆内,偶尔在腹腔内,很少在胸腔内)异位形成和生长(日本妇产科学会,1993)。子宫内膜异位症不是恶性肿瘤;然而,这种疾病随着时间的推移而发展并导致肿瘤形成和周围组织的粘连、月经期间和周期之间的严重腹部和骨盆疼痛、性交疼痛、排便疼痛和不育(生育能力受损)。子宫内膜异位症主要在20岁或以上的育龄妇女中形成,这会导致疼痛和其他症状,导致QOL降低,并且可能由于严重粘连而导致慢性疼痛和不育。纤维化由子宫内膜异位症病变(受影响区域)中粘连部位的病理状况的进展引起。在纤维化区域中,胶原蛋白产生并导致纤维化。子宫内膜异位症中纤维化的进展一般被认为是不可逆的。因此,还没有关于阻止子宫内膜异位症中纤维化进展或减轻纤维化的方法的报道。如上所述,子宫内膜异位症是在具有多个阶段的过程中变得恶化的疾病,同时从疾病发作的进展过程中显示出各种病理特征;尽管如此,这种疾病统称为子宫内膜异位症。然而,最近,体内子宫内膜异位症模型使用具有类似于人类月经的月经的非人灵长类动物创造,这最终促进了疾病的病理状况的阐明。本发明人通过手术诱导子宫内膜异位症创造了一种具有类似于人类月经的月经的体内食蟹猴子宫内膜异位症模型。通过使用这种可靠的体内模型,本发明人成功地在世界上第一次证明子宫内膜异位症病变的增殖可以通过向生物体施用IL-8信号抑制剂抑制,从而允许子宫内膜异位症病变中的上皮细胞和基质细胞的萎缩性改变,或子宫内膜异位症中间质的减少导致平滑肌细胞减少。由于萎缩的子宫内膜异位症组织,特别是间质,异位神经元的减少也可以预期。此外,本发明人观察了在施用IL-8信号抑制剂的组中肌肉组织再生,其在载体组中是不可检测的。因此,本发明人认为侵入子宫肌层的病变被消退并被肌肉组织取代用于恢复。根据子宫内膜异位症腺管是否已经侵入腹壁肌层评估深部病变的存在,且提示IL-8信号抑制剂可以抑制深部病变的形成。此外,出人意料地,本发明人还首次证明IL-8信号抑制剂甚至能够抑制子宫内膜异位症中的粘连和纤维化。因此,在一个实施方案中,本公开的IL-8信号抑制剂可用于治疗或预防在子宫内膜异位症的特定阶段称为纤维化的症状,其可被视为纤维化疾病。而且,在体内食蟹猴模型中,一只动物可能是由于模型制备的影响具有不规则的性周期;然而,除了此动物,性周期是规律的,因此认为IL-8信号抑制剂对性周期没有影响(参见本文的实施例)。这些发现表明,与用于子宫内膜异位症的常规治疗剂相比,IL-8信号抑制剂是有希望的治疗或预防剂。此外,出人意料的是,可以通过使用IL-8信号抑制剂作为单一药物而不将其与激素药物组合来治疗或预防子宫内膜异位症。在一个实施方案中,本公开的子宫内膜异位症对IL-8信号有应答。

[0561] 本文中,子宫腺肌病是指但不限于子宫内膜组织,特别是子宫内膜腺及其周围子宫基质存在于子宫肌肉组织中的情况,其是具有周围平滑肌肥大和增生的疾病且引起严重的月经痛、月经过多、贫血和慢性疼痛。尽管6%至20%的子宫腺肌病患者也患有子宫内膜异位症(Taketani,等,Study report on mental and physical disorders sponsored by

the Ministry of Health and Welfare.1998:99-104), 子宫腺肌病是一种在疾病分类中不同于子宫内膜异位症的疾病。两者是分开的、不同的疾病是本领域技术人员最近的普通技术知识(Frankl等,1925,10:680-4;Brosens等,Lancet.1993年6月16日,341(8838):181-2;Benagiano等,Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.2006年8月,20(4):449-63)。虽然子宫腺肌病在以下方面类似于子宫内膜异位症:子宫内膜异位症异位形成和增殖,且以雌激素依赖性方式发生变化,并且月经疼痛是主要症状,但与子宫内膜异位症相比,子宫腺肌病通常在年龄相对大的经产妇女中形成,这在流行病学上与子宫内膜异位症不同。不可能详细说明导致子宫肌层和子宫内膜基底层之间边界破坏的原因;然而,针对所述形成已经提出了以下假设:子宫损伤(过度刮除或出生伤害)导致子宫内膜直接并入子宫肌层(Pappas等,Obstet Gynecol.1959,13:714;Benagiano等,Fertil Steril.2012年9月,98(3):572-9)。子宫内膜组织不存在高达90%的子宫肌层在其腔侧并且其仅在其浆膜侧分布在子宫肌层上的情况被称为盆腔腹膜子宫内膜异位症(Bergeron等,Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2006;20(4):511-521)。

[0562] 本发明人在上述体内食蟹猴模型中观察并证实了子宫腺肌病的自发发作,并且在世界上第一次成功证明通过施用IL-8信号抑制剂至该活体可以抑制子宫腺肌病病变的增殖。IL-8信号抑制剂不影响体内食蟹猴模型中的性周期(参见本文的实施例)。因此,与用于子宫腺肌病的常规治疗剂相比,IL-8信号抑制剂是有希望的治疗或预防剂。此外,出人意料的是,可以通过IL-8信号抑制剂作为单一药物而不将其与激素药物组合来治疗或预防子宫腺肌病。IL-8信号抑制剂的施用可导致子宫腺肌病中肥大的子宫壁变薄,因此预期它们对子宫腺肌病中的纤维化具有治疗或预防作用。在本公开的一个实施方案中,子宫腺肌病对IL-8信号有应答。

[0563] 痛经在此不受限制,但可以具体指扰乱日常生活的月经症状。已知子宫内膜异位症、子宫腺肌病、月经过多等与痛经有关,且典型症状包括例如腰痛、头痛、恶心、贫血和疲劳以及月经期间的腹痛,特别是下腹痛。根据其原因,痛经大致分为以下两种类型:功能性(原发性)痛经和器质性(继发性)痛经。功能性痛经的原因包括,例如,前列腺素的过度分泌,以及与诸如子宫肌瘤和子宫内膜异位症的疾病进展相关的原因。器质性痛经的原因包括,例如,与诸如子宫肌瘤和子宫内膜异位症的疾病进展相关的那些。此外,已知痛经是由子宫内外的炎症引起的。同时,IL-8被认为是抗炎细胞因子。因此,在一个实施方案中,本公开的IL-8信号抑制剂可以治疗或预防痛经。在优选的非限制性实施方案中,本公开的IL-8信号抑制剂可治疗或预防子宫内膜异位症或子宫腺肌病的痛经,具有怀疑的子宫内膜异位症或子宫腺肌病的痛经、具有炎症的痛经或具有由粘连引起的疼痛的痛经。备选地,在本公开的另一个实施方案中,痛经对IL-8信号有反应。

[0564] 本文中,“具有怀疑的子宫内膜异位症或子宫腺肌病的痛经”包括但不限于曾经患有子宫内膜异位症或子宫腺肌病且具有该疾病的复发的可能性的受试者中的痛经,以及在由医师或其他人基于例如指示子宫内膜异位症或子宫腺肌病的病理结果做出的确诊或此类之前,怀疑患有子宫内膜异位症或子宫腺肌病的受试者中的痛经。

[0565] 在一个实施方案中,如上所述,当本公开的IL-8信号抑制剂用于治疗或预防具有子宫内膜异位症或子宫腺肌病的痛经,或具有怀疑的子宫内膜异位症或子宫腺肌病的痛经时,该IL-8信号抑制剂是有利的,因为它不影响性周期且可作为单一药物而不将其与激素

药物组合用于治疗或预防子宫内膜异位症或子宫腺肌病。

[0566] 此外,本发明人认为并证明了IL-8信号抑制剂除治疗和预防子宫内膜异位症和子宫腺肌病外还可治疗或预防粘连,如本文实施例中所述。痛经的特征还在于诸如腹痛的疼痛。因此,自然地认为,不仅子宫内膜异位症的粘连而且其他症状或病症的粘连都由于组织或器官的粘连接触而引起患者的疼痛。例如,众所周知,在盆腔粘连中,疼痛与子宫直肠窝(Douglas' pouch)的粘连相关,而与生殖器官附属物之间的粘连无关(Porpora等, The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists 1999;6:429-434),且器官之间的粘连引起颤搐导致疼痛。此外,已知异位神经纤维和NGF产生在子宫内膜异位症中引起疼痛和疼痛恶化(Anaf等, Hum Reprod 2000,15:1744-1750; Berkley等, Proc Natl Acad Sci U S A 2004,101:11094-11098; Odagiri等, Fertil Steril 2009,92:1525-1531)。另外,还有一份先前的报道(Odagiri等, Fertil Steril 2009,92:1525-1531)表明具有在子宫内膜异位症病变周围的增加的平滑肌的间质加剧收缩期间的疼痛。证实了本文实施例中描述的抗IL-8抗体的施用降低子宫内膜异位症组织的间质,并且预期减少异位神经元,因此可以预期疼痛减轻。

[0567] 在一个实施方案中,本公开的IL-8信号抑制剂可以治疗或预防子宫内膜异位症或子宫腺肌病(慢性疼痛、月经期间疼痛等)、痛经中的疼痛,或藉由粘连、纤维化或炎症的疼痛。本文中,慢性疼痛包括但不限于慢性下腹部疼痛和慢性骨盆疼痛。

[0568] 在一个实施方案中,本文中“不影响性周期”可意为周期性月经周期和排卵在受试者(人类中的女性或非人类动物中的雌性)中基本上不受干扰。周期的周期性可以基于在本文实施例中观察到的月经期间出血的存在,或基于血液或尿液中雌激素或黄体酮水平的变化来评估。已知激素(例如,雌激素/黄体酮组合药物、黄体酮制剂、GnRH激动剂和达那唑)疗法干扰月经周期并抑制排卵。不受限制地,实质性干扰的存在可以评估,例如,通过测试月经周期的趋势,或通过统计学测试与经历已知影响性周期的激素疗法的参照组相比在施用IL-8信号抑制剂的组中月经周期是否受到干扰。在一个实施方案中,由于本公开的IL-8信号抑制剂不影响被施用的患有子宫内膜异位症、子宫腺肌病或痛经的受试者的性周期,因此认为其不像传统的激素疗法,其不抑制排卵并且允许怀孕的机会。此外,该抑制剂的优点在于避免了激素药物,因此受试者可以排除由低雌激素条件引起的诸如绝经的副作用情况。

[0569] 当细胞、组织、器官或内脏受损或受伤时,身体具有伤口愈合功能以治愈受伤部位或伤口。然而,在伤口愈合过程中,通常在细胞、组织、器官或内脏之间可发生不需要的附着。通常,不受限制地,这种附着的病况称为粘连。一些患者针对粘连是无症状的;然而,不可忽视的数量的患者由于具有诸如疼痛、不孕和腹部饱胀感的症状而需要治疗。粘连包括例如手术后被形成(形成)的粘连或(例如,在手术切口表面的粘连、缝合部位周围的区域、诸如由纱布的磨损部位直接或间接形成的粘连或粘连在上述位置直接或间接形成;在子宫刮除后被形成(形成)的子宫内粘连(Asherman综合征));药物引起的粘连(例如,药物局部施用至器官);由疾病引起的粘连(例如子宫内膜异位症、子宫腺肌病、浸润性癌细胞或组织,与感染相关的炎性疾病(输卵管炎、卵巢炎、盆腔腹膜炎等);具有粘连的肠闭锁;以及自发粘连。本发明人偶然发现IL-8信号抑制剂的体内施用降低了剖腹手术部位的粘连,该粘连与针对子宫内膜异位症的体内食蟹猴模型中的手术后子宫内膜异位症的不同。在本发明

的一个实施方案中,粘连对IL-8信号有应答。

[0570] 本文中,不受限制地,不育意味着尽管具有没有避孕的性交,但是希望怀孕的健康夫妇在一段时间内(通常在一年内)没有实现怀孕(日本产科妇人科学会,2016)。在一个方面,不育包括但不限于在粘连形成后(特别是由粘连引起)的不育和由腹膜内炎症引起的不育。在本公开的一个实施方案中,不育对IL-8信号有应答。

[0571] 本文中,掌跖脓疱病是指但不限于在手掌或足底上形成不可数皮疹(充满脓液的水疱)的疾病。上述充满脓液的水疱是无菌的且不含细菌或真菌,其中中性粒细胞已在皮肤角蛋白中累积,且IL-8以高浓度存在(Skov等,J Immunol 2008,181:669-679)。该症状是慢性的,并且长时间反复复发。在针对掌跖脓疱病的临床试验中,当施用作为抗IL-8抗体的HuMab10F8时,病理状态得到改善(Skov等,J Immunol 2008;181:669-679)。因此,在本公开的一个实施方案中,掌跖脓疱病对IL-8信号有应答。

[0572] 在本文中,ANCA相关肾炎是指其中ANCA(抗中性粒细胞胞质抗体)是阳性的肾炎。ANCA相关肾炎是其中在诸如肾小球的肾脏血管中发生炎症的疾病,且其典型的病理状况是坏死性新月体性肾小球肾炎。随着肾炎变为慢性的,纤维化进展并且肾小球硬化导致肾衰竭(“Evidence-based Clinical Guideline for rapidly progressive glomerulonephritis(RPGN)2014” in Japanese;Nature Review Rheumatology 10(2014) 463)。在ANCA相关肾炎中,IL-8在病变中以高水平表达,患者中性粒细胞的迁移能力通过ANCA治疗增强,并通过抗IL-8抗体治疗抑制(Cockwell等,Kidney Int.1999Mar,55(3): 852-63)。在本公开的一个实施方案中,ANCA相关的肾炎对IL-8信号有应答。

[0573] 本文中,囊性纤维化是指由囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)中的基因突变引起的全身性常染色体隐性遗传性疾病。分泌液和粘膜液诸如气道液、肠液和胰液在整个身体内变得极其粘稠,导致管腔闭塞,其易受感染且表现为诸如胎粪性肠梗阻、由于胰腺萎缩和外分泌失败的消化不良和吸收不良以及由于反复呼吸道感染的呼吸衰竭的症状。病变及其周围区域,例如气道液或支气管肺泡灌洗液,含有高浓度的IL-8(Marcos等,Nat Med.2010年9月,16(9):1018-23;Khan等,Am J Respir Crit Care Med.1995年4月,151(4):1075-82)并且存在大量通过IL-8迁移的中性粒细胞。认为过度和持续的炎症发生以及中性粒细胞产生诸如弹性蛋白酶的酶并且经历NETosis,因此体液的粘度增加导致症状的表现(Cheng等,Front Immunol.2013Jan 24,4:1)。在CXCR2抑制剂Elubrixin针对囊性纤维化的临床试验中观察到局部中性粒细胞迁移被抑制(J Cyst Fibros.2013年5月,12(3): 241-8)。预期当通过阻断IL-8途径抑制中性粒细胞迁移来抑制酶产生和NETosis时,局部粘度降低,并且症状得到改善。因此,在本公开的一个实施方案中,囊性纤维化对IL-8信号有应答。

[0574] 在此,不意在受限制,牛皮癣也被称为炎性疾病。典型的症状是用银色皮屑覆盖的边界清楚的红色丘疹或凸状突起。常见的触发因素包括外伤、感染和某些药物。通常,几乎没有症状,但偶尔会经历轻度瘙痒。一些主要的怨言可以来自美容的角度。有些人患有伴随疼痛作为并发症的关节炎,其增加了严重程度。US2003/0077283A1公开使用抗IL-8中和抗体对牛皮癣的局部治疗。此外,用于感染的抗IL-8中和抗体的治疗剂可在市场上以Abcream™的名称获得。因此,在本公开的一个实施方案中,牛皮癣对IL-8信号有应答。

[0575] 纤维化的机制如下:由出血或疾病引起的损伤后的炎症作为触发因素,且包括IL-

8的趋化因子和细胞因子从周围组织招募诸如中性粒细胞和单核细胞的免疫细胞;产生细胞因子和趋化因子,这诱导肌肉成纤维细胞(或纤维化细胞)的活化和增殖以及诸如胶原蛋白的细胞外基质的过度产生或低降解,其导致纤维化。这对于各种器官中的纤维化是常见的(N Engl J Med 2015,372:1138-1149 2015年3月19日)。

[0576] 在本文中,通过关注该纤维化病况,将具有这种纤维化的疾病和病况统称为“纤维化疾病”。

[0577] 在IL-8信号抑制剂在体内食蟹猴模型中抑制免疫细胞的浸润并减少富含胶原蛋白的间质(参见本文实施例)的事实之外,由于IL-8信号抑制剂在体外测定中对产生MCP-1的中性粒细胞(称为巨噬细胞迁移因子和纤维化增强因子)的迁移等表现出抑制活性,所以如上所述,IL-8信号抑制剂是针对纤维化的有希望的治疗或预防剂。

[0578] 另外,如本文实施例中所述,各种抗IL-8抗体在体外测定中抑制作为纤维化增强因子的连接组织生长因子(CTGF)的表达的增加。该结果支持诸如抗IL-8抗体的IL-8信号抑制剂是纤维化疾病的有希望的治疗或预防剂的事实。

[0579] 在本公开的一个实施方案中,子宫内膜异位症中的粘连和纤维化可以在子宫衍生的组织在子宫外部形成和增殖的过程中发生(例如,骨盆脏器、在腹膜腔中或在胸腔中)。

[0580] 本文中,肝纤维化是指但不限于如下疾病,其中由病毒感染、脂肪蓄积或此类引起的慢性炎症触发诸如细胞外基质(ECM)(例如肝脏中的胶原蛋白)的过度产生或低降解,其导致纤维化。肝纤维化包括由诸如病毒性肝炎、酒精性肝炎、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)或原发性胆汁性肝硬化(PBC)的慢性炎症引起的肝硬化。

[0581] 已经报道了以下内容:IL-8在诸如病毒性甲型肝炎和乙型肝炎、酒精性肝炎和原发性胆汁性肝硬化的慢性肝病中是增加的(Mediators Inflamm.2015,2015:276850);且IL-8水平在慢性肝病中的血液中高,且在晚期病理状况的患者中尤其高;CXCR1受体的表达水平在单核细胞中高;且IL-8强烈增强肝脏中的炎症;且这些结果表明IL-8对纤维化进展的贡献(PLoS One.2011;6(6):e21381)。

[0582] 此外,具有纤维化的NASH患者中的血浆IL-8浓度显著高(Gastroenterology,2015年9月,149(3):635-48.e14),这表明IL-8与纤维化之间存在相关性。在本公开的一个实施方案中,肝纤维化对IL-8信号有应答。

[0583] 本文中,肾纤维化是指但不限于如下疾病,其中炎症引发肾脏中细胞外基质(诸如胶原蛋白)的过度产生或低降解,其导致纤维化。肾纤维化包括例如由诸如慢性肾炎和糖尿病的慢性炎症引起的慢性肾病。随着慢性肾病进展,肾脏中发生纤维化,而不管致病性疾病。一旦开始,纤维化是不可逆的,并且对于肾脏,需要透析或肾移植。

[0584] 以下报道已发表:肾成纤维细胞通过IL-1增强IL-8产生(Kidney Int.1995年3月,47(3):845-54);通过抑制MCP-1信号降低肾纤维化(Kitagawa等,Am J Pathol.2004年7月,165(1):237-46);以及用人纤维细胞检测糖尿病病况中的纤维化的活化和机制,且结果表明人纤维细胞经由升高的血糖和MCP-1/CCR2的升高的血糖参与糖尿病肾病的进展(Clin Exp Nephrol.2013年12月,17(6):793-804)。由于IL-8信号抑制剂抑制产生MCP-1的中性粒细胞向病变的迁移(参见本文的实施例),预期抑制剂通过MCP-1抑制肾纤维化的进展或改善肾纤维化。在本公开的一个实施方案中,肾纤维化对IL-8信号有应答。

[0585] 本文中,肺纤维化是指但不限于如下疾病,其中纤维化由肺或支气管中细胞外基

质(诸如胶原蛋白)的过度产生或低降解(其由炎症引发)导致。肺纤维化包括例如慢性阻塞性肺病(COPD)、肺纤维化合并肺气肿(CPFE)、特发性间质性肺炎(IIP)和特发性肺纤维化(IPF)。

[0586] 慢性阻塞性肺病(COPD)是指但不限于,由对有害物质(主要是香烟烟雾)长期吸入暴露引起的肺部炎症性疾病(Guideline for diagnosis and therapy of chronic obstructive pulmonary disease(COPD),第4版)。在呼吸道和肺部中,慢性炎症降低肺泡弹性并缩小支气管腔,且因此,至肺部的气流变弱,气流阻塞导致呼吸困难、慢性咳嗽、痰液产生等。据报道在COPD患者的痰液中,IL-8是增加的并且存在大量中性粒细胞,并且患者的中性粒细胞的迁移测定中的趋化指数与肺功能FEV1/FVC相关(Yamamoto等,Chest.1997年8月,112(2):505-10;Wu等,PLoS One.2015年5月11日,10(5)。此外,据报道,在用于COPD患者的CXCR2抑制剂MK7123的临床试验中,在活性药物组中的肺功能(FEV1)得到改善,而安慰剂组中的该功能恶化(Am J Respir Crit Care Med.2015年5月1日,191(9):1001-11)。

[0587] 肺纤维化合并肺气肿(CPFE)是指但不限于预后不良的疾病,其中称为肺气肿(其破坏和扩大肺部)的病理变化因肺纤维化而复杂化(Cottin等,Eur Respir J.2005年10月,26(4):586-93)。有报道描述,在CPFE中,IL-8在患者的支气管肺泡灌洗液中增加,并且支气管肺泡灌洗液中IL-8的浓度与在胸部CT中表明肺气肿病变的低衰减面积(LAA)相关(Respirology.2012年7月,17(5):814-20);且在胸部CT中显示肺气肿病变的LAA与预后相关(Johannessen A,等,Am J Respir Crit Care Med 2013,187:602-8)。

[0588] IIP是各种间质性肺炎的通用名称,其原因尚不可识别,其为如下疾病,其中炎症和损伤发生在肺泡壁,这导致使壁增厚和变硬的纤维化,导致气体交换功能受损(Guideline for diagnosis and therapy of idiopathic interstitial pneumonias,修订第二版;Travis等,Am J Respir Crit Care Med.2013年9月15日,188(6):733-48)。在IIP中,IPF是常见且最难治疗的,并且是预后不良的肺病,其遵循慢性和进行性过程并且发展为严重的纤维化,导致不可逆的蜂巢肺形成(Guideline for diagnosis and therapy of idiopathic interstitial pneumonias,修订的第2版;Raghu等,Am J Respir Crit Care Med.2011Mar 15;183(6):788-824)。来自IPF患者的血清和支气管肺泡灌洗液中IL-8的水平高(Car等,Am J Respir Crit Care Med1994,149:655-659;Ziegenhagen等,Am J Respir Crit Care Med 1998,157:762-768);并且在支气管肺泡灌洗液中,在对IL-8应答中迁移的中性粒细胞数量增加,并且当数量高时预后更差(Haslam等,Thorax 1980,35:328-339;Turner-Warwick M等,Am Rev Respir Dis 1987,135:26-34)。这些表明IL-8和中性粒细胞深度参与了IPF的病理状况。从IPF患者具有IL-8的SNIP并且局部IL-8浓度升高的发现来看,IL-8也被假定是该疾病的原因(Ahn等,Respir Res.2011年6月8日;12:73)。在本公开的一个实施方案中,肺纤维化、COPD、CPFE、IIP和IPF对IL-8信号有应答。

[0589] 在进一步或替代的实施方案中,本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)用于抑制纤维化因子产生。备选地,本公开涉及抑制受试者中纤维化因子产生的方法,其包括施用有效量的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)至受试者,或涉及用于该方法的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)。备选地,本公开涉及用于抑制纤维化因子产生的药物组合物,其包含有效量的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)。备选地,本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)在制备用于抑制纤维化因子产生的药剂中的用途。备选地,本公开

涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)在抑制纤维化因子产生中的用途。备选地,本公开涉及制备用于抑制纤维化因子产生的药物组合物的方法,其包括将IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)与药学上可接受的载体混合的步骤。在一个实施方案中,纤维化因子包括例如MCP-1(单核细胞趋化蛋白-1)。这种纤维化因子的产生的抑制可以发生在例如,诸如中性粒细胞的免疫细胞中。

[0590] 在进一步或替代的实施方案中,本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)用于抑制血管生成。备选地,本公开涉及抑制受试者血管生成的方法,其包括施用有效量的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)至受试者,或涉及用于该方法的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)。备选地,本公开涉及用于抑制血管生成的药物组合物,其包含有效量的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)。备选地,本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)在制备用于抑制血管生成的药剂中的用途。备选地,本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)在抑制血管生成中的用途。备选地,本公开涉及制备用于抑制血管生成的药物组合物的方法,其包括将IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)与药学上可接受的载体混合的步骤。

[0591] 如本文实施例中所述,在体外测定中,证明中性粒细胞迁移不仅被商业上可获得的抗IL-8抗体抑制,而且被用于体内实验的IL-8受体抑制剂以及抗IL-8抗体抑制。这意味着本领域技术人员自然地理解,来自本文实施例中描述的体内模型的发现可以概括并扩展到IL-8信号抑制剂的一般应用。

[0592] 因此,在另一个或替代实施方案中,本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)用于在IL-8相关疾病中抑制免疫细胞对病变或其周围环境的浸润(在一个方面,其可重新表述为迁移)。备选地,本公开涉及用于在IL-8相关疾病中在受试者中抑制免疫细胞对病变或其周围环境的浸润的方法,其包括向受试者施用有效量的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体),或涉及用于该方法的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)。备选地,本公开涉及用于在IL-8相关疾病中抑制免疫细胞对病变或其周围环境的浸润的药物组合物,其包含有效量的IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)。备选地,本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)在制备用于在与IL-8有关的疾病中抑制免疫细胞对病变或其周围环境的浸润的药剂中的用途。备选地,本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)在IL-8相关疾病中抑制免疫细胞对病变或其周围环境浸润中的用途。备选地,本公开涉及制备用于在IL-8相关疾病中抑制免疫细胞对病变或其周围环境的浸润的药物组合物的方法,其包括将IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)与药学上可接受的载体混合的步骤。

[0593] 在一个实施方案中,免疫细胞优选包括例如中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、辅助性T细胞、杀伤性T细胞、树突细胞和NK细胞,并且优选包括但不限于中性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞。当提及“免疫细胞对IL-8相关疾病中的病变的浸润”时,IL-8相关疾病可以是上述任何疾病,例如子宫内膜异位症、子宫腺肌病、痛经、粘连或纤维化疾病。应当意在免疫细胞浸润或迁移到IL-8相关疾病的病变(疾病部位)或其周围。此外,当提及“免疫细胞对IL-8相关疾病中的周围环境的浸润”时,技术人员可以理解,例如,对于子宫内膜异位症,将意在浸润或迁移到腹膜腔或腹水中,或者例如,对于肺纤维化,将意在浸润或迁移到胸腔或胸腔积液液中。

[0594] 在另一个或替代的实施方案中,本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如,抗IL-8抗体)

用于抑制子宫内膜异位症或子宫腺肌病的病变中芳香酶的产生。备选地，本公开涉及抑制受试者中芳香酶产生的方法，其包括施用有效量的IL-8信号抑制剂(例如，抗IL-8抗体)至受试者，或涉及用于该方法的IL-8信号抑制剂(例如，抗IL-8抗体)。备选地，本公开涉及用于抑制芳香酶产生的药物组合物，其包含有效量的IL-8信号抑制剂(例如，抗IL-8抗体)。备选地，本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如，抗IL-8抗体)在制备用于抑制芳香酶产生的药剂中的用途。备选地，本公开涉及IL-8信号抑制剂(例如，抗IL-8抗体)在抑制子宫内膜异位症或子宫腺肌病的病变中芳香酶产生的用途。备选地，本公开涉及制备用于抑制子宫内膜异位症或子宫腺肌病病变中芳香酶产生的药物组合物的方法，其包括将IL-8信号抑制剂(例如，抗IL-8抗体)与药学上可接受的载体混合的步骤。

[0595] 本领域普通技术人员自然会理解，本公开基于本领域技术人员的普通技术知识包括本文所述的任何实施方案中的一个或更多个的全部或部分的任何组合，除非存在技术上的矛盾。

[0596] 此说明书中引用的所有现有技术文献均通过引用本领域技术人员的普通技术知识并入本文。

[0597] 在本文中，术语“和/或”的含义应理解为包括在短语“和/或”(其中“和”和“或”被适当地组合)之前和之后的术语的任何组合。

[0598] 当诸如第一、第二、第三、第四等术语用于指代各种元素时，应理解，这些元素不应受这些术语的限制。这些术语仅用于将元素与其他元素区分开，并且应当理解，例如，第一元素可称作第二元素，并且类似地，第二元素可称作第一元素，而不脱离本公开的范围。

[0599] 除非另有明确说明或除非与上下文矛盾，否则本文所用的词语“一”，“一个”和“所述”意味着“至少一个”。

[0600] 在本文中，术语用于描述特定实施方案的目的，但不意在限制本发明或本文的公开内容。除非另外定义，否则本文使用的所有术语(包括技术和科学术语)被解释为具有本文的公开内容涉及的并且理想的本领域普通技术人员通常理解的不同含义，于此，并且不应该以过于正式的意义解释。

[0601] 如本文所使用的，术语“包含”意指存在所描述的项目(成员、步骤、元素、数字等)，除非在上下文中清楚地做出不同的理解，并且该术语不排除存在其他项目(成员、步骤、元素、数字等)。

[0602] 参考示意图来描述本公开的实施例，为了解释的清楚起见，其可能被夸大。

[0603] 除非与上下文相反，否则本文描述的数值被理解为基于本领域普通技术人员的普通技术知识具有一定范围的值。例如，表述“1mg”理解为描述为具有一定变化的“约1mg”。此外，例如，除非与上下文相反，否则本文使用的表达“1至5项”理解为具体地和单独地描述每个值，诸如“1项、2项、3项、4项、5项”。

[实施例]

[0604] [实施例1]在酸性pH条件下具有增强的FcRn结合的新的Fc区变体的产生，用于改善血浆中的保留

[0605] 在内体中的酸性pH条件下，已知摄入细胞的IgG抗体通过结合FcRn返回血浆。因此，与不结合FcRn的蛋白相比，IgG抗体通常具有长的血浆半衰期。已知利用该性质通过增

加其在酸性pH条件下的FcRn结合能力(结合亲和力)(通过在抗体Fc区引入氨基酸修饰))来增强抗体的血浆保留的方法。具体而言,已知通过增加其在酸性pH条件下结合FcRn的能力(通过氨基酸修饰,如M252Y/S254T/T256E(YTE)修饰))来改善抗体的血浆保留的方法(J.Biol.Chem.281:23514-23524(2006)),M428L/N434S(LS)修饰(Nat.Biotechnol.28:157-159(2010)),和N434H修饰(Clinical Pharmacology&Therapeutics 89(2):283-290(2011))。

[0606] 另一方面,如上文所述的,还已知在酸性pH条件下具有增加的对FcRn的结合的Fc区变体显示结合至类风湿因子(RF)(W02013/046704)。因此,为了产生可以改善血浆保留而不显示结合至类风湿因子的Fc区变体而进行以下研究。

[0607] (1-1)新的含有Fc区变体的抗体的生产

[0608] 如下文所示,产生在酸性pH条件下具有增加的FcRn结合能力的Fc区变体包括已知修饰,YTE,LS,或N434H,以及多个新发现的Fc区变体(F1847m、F1848m、F1886m、F1889m、F1927m和F1168m)。

[0609] 通过参照实施例1的方法产生重链的基因(其中氨基酸修饰引入Fv4-IgG1(其是抗人IL-6受体抗体))的重链(VH3-IgG1m的Fc区))。这些重链用于通过参照实施例2的方法产生以下抗体:

[0610] Fv4-IgG1由作为重链的VH3-IgG1m(SEQ ID NO:2)和作为轻链的VL3-CK(SEQ ID NO:110)组成;

[0611] Fv4-YTE由作为重链的VH3-YTE(SEQ ID NO:3)和作为轻链的VL3-CK组成;

[0612] Fv4-LS由作为重链的VH3-LS(SEQ ID NO:4)和作为轻链的VL3-CK组成;

[0613] Fv4-N434H由作为重链的VH3-N434H(SEQ ID NO:5)和作为轻链的VL3-CK组成;

[0614] Fv4-F1847m由作为重链的VH3-F1847m(SEQ ID NO:6)和作为轻链的VL3-CK组成;

[0615] Fv4-F1848m由作为重链的VH3-F1848m(SEQ ID NO:7)和作为轻链的VL3-CK组成;

[0616] Fv4-F1886m由作为重链的VH3-F1886m(SEQ ID NO:8)和作为轻链的VL3-CK组成;

[0617] Fv4-F1889m由作为重链的VH3-F1889m(SEQ ID NO:9)和作为轻链的VL3-CK组成;

[0618] Fv4-F1927m由作为重链的VH3-F1927m(SEQ ID NO:10)和作为轻链的VL3-CK组成;
和

[0619] Fv4-F1168m由作为重链的VH3-F1168m(SEQ ID NO:11)和作为轻链的VL3-CK组成

[0620] (1-2)对人FcRn的结合动力学分析

[0621] 通过参照实施例2的方法产生含有VH3-IgG1m或上述变体作为重链和L(WT)(SEQ ID NO:1)作为轻链的抗体,并且如下评价对人FcRn的结合活性。

[0622] 使用BIAcore T100(GE Healthcare)进行人FcRn和每种所述抗体的动力学分析。通过胺偶联方法将适量的蛋白L(ACTIGEN)固定在传感芯片CM4(GE Healthcare)上以捕获目标抗体。接着,通过注射稀释的FcRn溶液和运行缓冲液(用作参照溶液)将人FcRn与捕获在传感芯片上的抗体进行相互作用。对于运行缓冲液,使用50mM磷酸钠,150mM NaCl,和0.05%(w/v)吐温20(pH 6.0)),并且各个缓冲液还用于稀释FcRn。为了再生传感芯片,使用10mM pH 1.5的甘氨酸-HCl。所有测量在25℃进行。基于结合速率常数 k_a (1/Ms)和解离速率常数 k_d (1/s)(其是从通过测量获得的传感图计算的动力学参数))对每个抗体计算对于人FcRn的 K_D (M)。BIAcore T100评价软件(GE Healthcare)用于计算每个参数。

[0623] 结果在表2中显示。

[0624] [表2]

变体名称	氨基酸突变	在 pH 6.0 对 hFcRn 的 KD 值 (nM)
IgG1		1382
LS	M428L/N434S	116
YTE	M252Y/S254T/T256E	148
[0625] F1847m	N434A/Y436T/Q438R/S440E	367
F1848m	N434A/Y436V/Q438R/S440E	295
F1886m	M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E	108
F1889m	M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E	103
F1927m	M428L/N434A/Q438R/S440E	125
F1168m	N434A/Q438R/S440E	410

[0626] [实施例2]具有增强的FcRn结合的含有新的Fc区变体的抗体在酸性pH条件下对类风湿因子的结合的评价

[0627] 抗药物抗体 (ADAs) 影响治疗性抗体的功效和药代动力学, 并且有时导致严重的副作用; 因此, 治疗性抗体的临床应用和功效可以受ADA的产生的限制。很多因素影响治疗性抗体的免疫原性, 并且效应T细胞表位的存在是一个因素。此外, 在施用治疗性抗体前在患者中存在ADA (也称为“预先存在的ADA”) 也可能具有类似的问题。具体而言, 在患有自身疾病如类风湿性关节炎 (RA) 的患者的治疗性抗体的情况下, 类风湿因子 (RF) (其是针对人IgG的自身抗体)) 可以成为“预先存在的ADA”问题。近来, 报道了, 具有N434H (Asn434His) 突变的人源化抗CD4 IgG1抗体引起显著的类风湿因子结合 (Clin Pharm Ther 2011年2月89 (2): 283-290)。详细研究确认, 与母体人IgG1相比, 人IgG1中的N434H突变增加类风湿因子对抗体的Fc区的结合。

[0628] 类风湿因子是针对人IgG的多克隆自身抗体, 并且其在人IgG中的表位根据克隆而不同, 并且似乎位于CH2/CH3交界区, 并且在可以与FcRn结合表位重叠的CH3结构域。因此, 增加对FcRn的结合活性 (结合亲和力) 的突变可以增加类风湿因子对特定克隆的结合活性 (结合亲和力)。

[0629] 实际上, 关于在酸性pH或中性pH对FcRn具有增加的结合的Fc, 还已知不仅N434H修饰而且很多其他氨基酸修饰类似地增加对类风湿因子的结合 (W02013/046704)。

[0630] 另一方面, 在W02013/046704还列举选择性抑制对类风湿因子的结合而不影响对FcRn的结合的多种氨基酸修饰, 并且, 已经指出这两个氨基酸突变的组合, 即Q438R/S440E、Q438R/S440D、Q438K/S440E和Q438K/S440D。因此, 研究了此次新产生的在酸性pH条件下具有增加的结合能力的Fc对类风湿因子的结合是否可以通过引入Q438R/S440E降低。

[0631] (2-1) 含有新的Fc区变体的抗体的类风湿因子结合测定

[0632] 通过利用电化学发光 (ECL) 在 pH 7.4 使用来自 30 个 RA 患者的个体血清 (Proteogenex) 进行对类风湿因子的结合测定。将 50 倍稀释的血清样品, 各个生物素化的测试抗体 (1 μg/mL), 和各个 SULFO-TAG NHS 酯 (Meso Scale Discovery) - 标记的测试抗体 (1 μg/mL) 混合并在室温孵育三小时。之后, 将混合物加入至链霉亲和素-包被的 MULTI-ARRAY 96-孔板 (Meso Scale Discovery) 中, 并且将板在室温孵育两小时并且随后洗涤。在向每孔加入读取缓冲液 T (x4) (Meso Scale Discovery) 之后, 立即将板放在 SECTOR 成像仪 2400 读

数器(Meso Scale Discovery)上,并且测量化学发光。

[0633] 该测定的结果在图1至10中显示。具有天然人IgG1的Fv4-IgG1(图1)仅显示弱的对类风湿因子的结合,而现有的具有增加的FcRn结合的Fc变体,Fv4-YTE(图2),Fv4-LS(图3),和Fv4-N434H(图4),在很多供体中全部显示显著增加的类风湿因子结合。另一方面,所有具有增加的FcRn结合的新的Fc区变体,Fv4-F1847m(图5),Fv4-F1848m(图6),Fv4-F1886m(图7),Fv4-F1889m(图8),Fv4-F1927m(图9),和Fv4-F1168m(图10),仅显示弱的类风湿因子结合,并且这表明,作为增加FcRn结合的修饰的结果,对类风湿因子的结合被显著抑制。

[0634] 此外,图11显示30个RA患者的血液中对于每种变体的类风湿因子结合的平均值。所有六种新的变体显示比三种预先存在的变体(YTE,LS和N434H)低的结合,并且与天然人IgG1相比,它们还显示较低的对类风湿因子的结合。由此,当考虑临床开发具有改善的对FcRn的结合能力的治疗性抗体用于自身免疫疾病等,如类风湿关节炎等时,与类风湿因子相关的风险(其是现有的Fc区变体的问题)此次新产生的Fc区变体中得到遏制,并且因此它们可以更安全地使用。

[0635] [实施例3]在酸性pH条件下具有增加的FcRn结合的新的Fc区变体在食蟹猴中的PK评价

[0636] 在实施例3中,通过以下方法,使用新的含有Fc区变体的抗体(其对类风湿因子的结合被确认为被抑制)评价改善食蟹猴中血浆保留的效果。

[0637] (3-1)新的含有Fc区变体的抗体的产生

[0638] 产生以下抗人IgE抗体:

[0639] OHB-IgG1由作为重链的OHBH-IgG1(SEQ ID NO:12)和作为轻链的OHBL-CK(SEQ ID NO:13)组成;

[0640] OHB-LS由作为重链的OHBH-LS(SEQ ID NO:14)和作为轻链的OHBL-CK组成;

[0641] OHB-N434A由作为重链的OHBH-N434A(SEQ ID NO:15)和作为轻链的OHBL-CK组成;

[0642] OHB-F1847m由作为重链的OHBH-F1847m(SEQ ID NO:16)和作为轻链的OHBL-CK组成;

[0643] OHB-F1848m由作为重链的OHBH-F1848m(SEQ ID NO:17)和作为轻链的OHBL-CK组成;

[0644] OHB-F1886m由作为重链的OHBH-F1886m(SEQ ID NO:18)和作为轻链的OHBL-CK组成;

[0645] OHB-F1889m由作为重链的OHBH-F1889m(SEQ ID NO:19)和作为轻链的OHBL-CK组成;和

[0646] OHB-F1927m由作为重链的OHBH-F1927m(SEQ ID NO:20)和作为轻链的OHBL-CK组成。

[0647] (3-2)对新的含有Fc区变体的抗体的猴PK测定

[0648] 评价向食蟹猴施用抗人IgE抗体后抗人IgE抗体在血浆中的体内动力学。将抗人IgE抗体溶液以2mg/kg静脉内施用一次。施用后五分钟、(两小时)、七小时、一天,两天、三天、(四天)、七天、14天、21天、28天、35天、42天、49天和56天进行血液收集。将收集的血液立即在4℃和15,000rpm进行离心5分钟,获得血浆。将分离的血浆储存在设置为-80℃或更低的冰箱中,直到进行测量。使用八种类型的抗人IgE抗体,即OHB-IgG1、OHB-LS、OHB-N434A、

OHB-F1847m、OHB-F1848m、OHB-F1886m、OHB-F1889m和OHB-F1927m。

[0649] (3-3)通过ELISA测量抗人IgE抗体在血浆中的浓度

[0650] 通过ELISA测量抗人IgE抗体在食蟹猴的血浆中的浓度。首先,将抗人IgG κ 链抗体(Antibody Solutions)分散在Nunc-Immuno平板,MaxiSorp(Nalge Nunc International)中并让其在4℃静置过夜,产生抗人IgG κ 链抗体-固定的板。制备血浆浓度为640,320,160,80,40,20或10ng/mL的校准曲线样品,和稀释100倍或更多的食蟹猴血浆测量样品。这些校准曲线样品和血浆测量样品这样产生,使得食蟹猴IgE(公司内制备的产物)以1 μ g/mL的浓度加入。随后,将样品分散在抗人IgG κ 链抗体-固定的板中,并让其在室温静置两小时。然后,分散HRP-抗人IgG γ 链抗体(Southern Biotech),并且让其在室温静置一小时。随后,使用TMB铬精(Chromogen))溶液(Life Technologies)作为底物进行生色反应,并且在通过加入1N硫酸(Wako)终止反应后,通过微孔板读数器测量450nm的吸光度。使用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices)从校准曲线的吸光度计算猴血浆中抗人IgE抗体的浓度。测量的猴血浆中抗人IgE抗体的浓度的改变在图12中显示。从测量的猴血浆中抗人IgE抗体的浓度的改变,使用Phoenix WinNonlin Ver.6.2(Pharsight Corporation)的瞬时分析计算去除清除。计算的药代动力学参数在表3中显示。将来自血浆中对于施用的样品抗体阳性的个体的样品从猴血浆中抗人IgE抗体浓度和清除的改变的计算中排除。

[0651] [表3]

[0652] 抗人IgE抗体施用后施用的样品的去除清除

[0653]

样品名称	去除清除 (mL/天/kg)
OHB-IgG1	9.33
OHB-F1847m	2.83
OHB-F1848m	4.02
OHB-F1886m	1.92
OHB-F1889m	2.39
OHB-F1927m	1.51
OHB-LS	1.80
OHB-N434A	4.36

[0654] (3-4)通过电化学发光方法测量血浆中针对施用的样品的抗体

[0655] 通过电化学发光方法测量猴血浆中针对施用的样品的抗体。使用SULFO-TAG NHS酯(Meso Scale Discovery)钆-标记的施用的样品,使用EZ-Link Micro Sulfo-NHS-生物素化试剂盒(Pierce)生物素化的施用的样品,和食蟹猴血浆测量样品等量混合,并且让其在4℃静置过夜。将样品加入至MULTI-ARRAY 96-孔链霉亲和素Gold Plate(Meso Scale Discovery),然后使其在室温反应两小时,并洗涤。然后,将读取缓冲液T(x4)(Meso Scale Discovery)分散入板中后,立即使用SECTOR成像仪2400(Meso Scale Discovery)进行测量。

[0656] 结果,确认与天然IgG1的实例相比,所有新的Fc区变体显示极大改善的血浆保留。

[0657] (3-5)对于Fc变体的小鼠PK测定

[0658] 进行以下实验以比较F1718(其是W02013/046704中所述的Fc区变体)),和F1848m(其是这次新发现的Fc区变体)),其为增加在酸性pH下FcRn结合的Fc变体。

[0659] 通过参照实施例1的方法产生在其中将氨基酸修饰引入Fv4-IgG1,抗人IL-6受体

抗体,的重链(VH3-IgG1)的Fc区的重链的基因。使用这些重链,参照实施例2的方法产生以下抗体:

[0660] 由VH3-IgG1作为重链和VL3-CK作为轻链组成的Fv4-IgG1;和

[0661] 由VH3-F1718(SEQ ID NO:21)作为重链和VL3-CK作为轻链组成的Fv4-F1718。

[0662] 将上述抗人IL-6受体抗体以1mg/kg施用到人FcRn转基因小鼠(B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg品系32+/+小鼠;Jackson Laboratories,Methods Mol.Biol.602:93-104(2010)的尾静脉一次。施用抗人IL-6受体抗体后15分钟、七小时、一天、两天、三天、七天、14天、21天和28天,收集血液。将收集的血液立即在15,000rpm和4℃离心15分钟,获得血浆。将分离的血浆储存在设置-20℃或以下的冰箱中,直到进行测量。

[0663] (3-6)通过ELISA测量血浆中抗人IL-6受体抗体的浓度

[0664] 小鼠血浆中抗人IL-6受体抗体的浓度通过ELISA测量。首先,将抗体的抗人IgG(γ -链特异性)F(ab')₂片段(SIGMA)分散在Nunc-Immuno平板,MaxiSorp(Nalge nunc International)中并使其在4℃静置过夜,产生固定有抗人IgG的平板。分别制备含有血浆浓度为0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025或0.0125 μ g/mL的抗人IL-6受体抗体的校准曲线样品和稀释100倍或更多的小鼠血浆测量样品。将200 μ L的20ng/mL可溶性人IL-6受体加入至100 μ L的校准曲线样品或血浆测量样品,并且随后让混合的溶液在室温静置一小时。随后,将混合的溶液分散在固定抗人IgG的板的每个孔中,并且将板在室温静置一小时。然后,加入生物素化的抗人IL-6R抗体(R&D),在室温反应一小时。随后,加入链霉亲和素-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies),在室温反应一小时,并且该反应溶液的显色反应使用TMB单成分HRP微孔底物(TMB One Component HRP Microwell Substrate)(BioFX Laboratories)作为底物进行。在通过加入1N硫酸(Showa Chemical)终止反应后,在微孔板读数器上测量每孔中反应溶液在450nm的吸光度。小鼠血浆中的抗体浓度使用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices)从校准曲线的吸光度计算。

[0665] 结果在图13中显示。F1718(其是W02013/046704中所述的在酸性pH增加FcRn结合的Fc区变体))不显示任何延长抗体PK的效果,但显示与天然IgG1相当的血浆保留。

[0666] 本文中,在W02013/046704中描述的F1718具有引入Fc区的四个突变,即N434Y/Y436V/Q438R/S440E。相反,此次新公开的F1848m引入有四个突变,即N434A/Y436V/Q438R/S440E。引入这两种类型的Fc的氨基酸突变的仅有的差异是在根据EU编号位置434引入的氨基酸突变在F1718中是Y(酪氨酸)并且在F1848m中是A(丙氨酸)。在实施例(3-2)中,与天然IgG1相比,F1848m显示改善的血浆保留,而F1718在血浆保留方面不显示任何改善。因此,不受特别限制,这提示A(丙氨酸)优选作为要在位置434引入的氨基酸突变,用于改善血浆保留。

[0667] [实施例4]人源化抗人IL-8抗体的产生

[0668] (4-1)人源化抗人IL-8抗体hWS-4的产生

[0669] 美国专利号6,245,894(W01996/002576)中公开的人源化抗IL-8抗体结合人IL-8(以下表示为hIL-8)并且阻断其生理功能。人源化抗IL-8抗体可以通过将美国专利号6,245,894中公开的重链和轻链可变区序列与任何已知人抗体恒定区序列中的任一种组合而产生。人抗体恒定区序列不受特别限制,但天然人IgG1序列或天然人IgG4序列可以用作重链恒定区,并且天然人 κ 序列可以用作轻链恒定区序列。

[0670] 本文中,从美国专利号6,245,894中公开的人源化IL-8抗体中,hWS4H-IgG1的基因(SEQ ID NO:39)(在其中重链可变区RVHg和用于重链恒定区的天然人抗IgG1序列组合)通过参照实施例1的方法产生。此外,hWS4L-kOMT的编码序列(SEQ ID NO:40)(在其中轻链可变区RVLa和用于轻链恒定区的天然人 κ 序列组合)通过参照实施例1的方法产生。产生在其中组合上述重链和轻链的抗体,并且将其命名为人源化WS-4抗体(下文,hWS-4)。

[0671] (4-2)人源化抗人IL-8抗体Hr9的生产

[0672] 使用不同于hWS-4中使用的FR的人共有框架区序列产生新的人源化抗体。

[0673] 具体而言,VH3-23和VH3-64的杂交序列用作重链FR1,VH3-15和VH3-49中看到的序列用作FR2,VH3-72中看到的序列用作FR3(条件是不包括根据Kabat编号的82a),并且在JH1等中看到的序列用作FR4。这些与hWS-4重链的CDR序列连接,产生Hr9-IgG1(SEQ ID NO:41),一种新的人源化抗体重链。

[0674] 接着,产生两种类型的抗体,即,具有hWS4H-IgG1作为重链和hWS4L-kOMT作为轻链的hWS-4,和具有Hr9-IgG1作为重链和hWS4L-kOMT作为轻链的Hr9。在本公开内,尤其是涉及轻链时,Hr9(其重链可变区示于SEQ ID NO:33)写为Hr9/hWS4L。根据附于产品的方案使用FreeStyle 293F细胞(Invitrogen)表达抗体。通过参照实施例2的方法从培养上清液纯化抗体。结果,以表4中所示的量获得抗体。出人意料地,Hr9的表达水平是hWS-4的表达水平的大约8倍。

[0675] [表4]

	抗体产率/1mL培养基(μ g)
hWS-4	6.4
Hr9	50

[0677] (4-3)hWS-4和Hr9的人IL-8-结合活性

[0678] 使用BIAcore T200(GE Healthcare)如下确定hWS-4和Hr9对人IL-8的结合亲和力。

[0679] 使用具有0.05%吐温20,20mM ACES,和150mM NaCl(pH 7.4)的组成的运行缓冲液。通过胺偶联方法将适量的蛋白A/G(PIERCE)固定在传感芯片CM4(GE Healthcare)上并且捕获目标抗体。接着,通过注射稀释的人IL-8溶液和运行缓冲液(用作参照溶液)使人IL-8与捕获在传感芯片上的抗体相互作用。对于运行缓冲液,使用具有上述组成的溶液,并且该缓冲液还用于稀释人IL-8。为了再生传感芯片,使用10mM pH1.5的甘氨酸-HCl。所有测量在37°C进行。基于结合速率常数 k_{on} (1/Ms)和解离速率常数 k_{off} (1/s)(其是从通过测量获得的传感图计算的动力学参数))计算每个抗体对于人IL-8的KD(M)。BIAcore T200评价软件(GE Healthcare)用于计算每个参数。

[0680] 结果显示在表5中。确认hWS-4和Hr9具有相当的对人IL-8的结合亲和力。

[0681] [表5]

抗体名称	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	KD(M)
hWS-4	9.74E+05	2.03E-04	2.09E-10
Hr9	1.11E+06	2.17E-04	1.95E-10

[0683] 对于开发抗体药物,抗体分子的生产水平是重要因素,并且通常,希望的是高生产水平。从上述检测特别值得注意的是,选择更适当的人共有框架区-衍生的序列用于与hWS-

4的HVR序列组合,并且得到Hr9,其具有改善的生产水平,同时保持对人IL-8的结合亲和力。

[0684] [实施例5]具有pH-依赖性IL-8结合能力的抗体的获得

[0685] (5-1)赋予pH依赖性的Hr9-修饰的抗体的生产

[0686] 为了向实施例4中获得Hr9赋予pH-依赖性IL-8结合能力,进行研究。

[0687] 在不受特定理论限制的同时,对IL-8具有pH-依赖性结合能力的抗体被认为可以显示以下体内行为。施用于活体生物的抗体可以在保持中性pH环境中(例如,在血浆中)强烈结合IL-8,并且阻断其功能。一部分所述IL-8/抗体复合物通过与细胞膜的非特异性相互作用(胞饮)(下文,称为非特异的摄取)摄入细胞中。在内体的酸性pH条件下,前述抗体对IL-8的结合亲和力变弱,并且因此抗体释放IL-8。然后,已经释放IL-8的抗体可以经由FcRn返回细胞外。以此方式返回细胞外(进入血浆中)的前述抗体可以再次结合另一个IL-8并阻断其功能。认为对IL-8具有pH-依赖性结合能力的抗体也能够通过上述机制多次结合IL-8。

[0688] 相反,在不具有像前述抗体的性质的抗体的情况下,抗体分子仅能够中和抗原一次,但不能多次中和抗原。通常,因为IgG抗体具有两个Fabs,单个抗体分子可以中和两分子的IL-8。另一方面,能够多次结合IL-8的抗体能够任意次数地结合IL-8,只要它们保持在活体内。例如,因为被施用直到被去除,摄入细胞十次的pH依赖性的IL-8结合抗体的单个分子,可以中和最多20个分子的IL-8。因此,可以多次结合IL-8的抗体具有能够甚至以小量的抗体中和多个IL-8分子的优势。从另外一个角度,可以多次结合IL-8的抗体具有能够在施用相同量的抗体时保持更长时期中和IL-8的状态的优势。从另一角度,可以多次结合IL-8的抗体具有能够比当施用相同量的不具有所拥有的性质的抗体时更强烈地阻断IL-8的生物活性的优势。

[0689] 为了实现这些优势,将氨基酸修饰(主要是组氨酸))引入Hr9-IgG1和WS4L-kOMT的可变区,目的是产生能够多次结合IL-8的抗体。具体而言,通过参照实施例1和2的方法产生表6中所示的变体。

[0690] 表6中所示的标记如“Y97H”显示引入突变的位置,由Kabat编号定义,引入突变前的氨基酸,和引入突变后的氨基酸。具体而言,当表示为“Y97H”时,其表示根据Kabat编号位置97的氨基酸残基从Y(酪氨酸)取代为H(组氨酸)。此外,当引入多个氨基酸取代的组合时,以如“N50H/L54H”的方式描述。

[0691] [表6]

抗体名称	引入重链的突变	引入轻链的突变
Hr9/WS4L	无	无
Hr9/L16	无	L54H
H89/WS4L	Y97H	无
H89/L12	Y97H	N50H
H89/L16	Y97H	L54H

[0693] (5-2)pH-依赖性IL-8结合能力

[0694] 如下文所述,使用BIAcore T200(GE Healthcare)确定实施例5-1中产生的抗体的人IL-8-结合亲和力。使用以下两种运行缓冲液:

[0695] 0.05%吐温20,20mMACES,150mM NaCl,pH7.4;

[0696] 0.05%吐温20,20mMACES,150mM NaCl,pH 5.8。

[0697] 通过胺偶联方法将适量的蛋白A/G(PIERCE)固定在传感芯片CM4(GE Healthcare)上并且捕获目标抗体。接着,通过注射稀释的人IL-8溶液和运行缓冲液(用作参照溶液)将人IL-8与传感芯片上捕获的抗体相互作用。对于运行缓冲液,使用上述溶液中的任一种,并且各个缓冲液还用于稀释人IL-8。为了再生传感芯片,使用10mM pH 1.5的甘氨酸-HCl。所有测量在37℃进行。基于结合速率常数 k_{on} (1/Ms)和解离速率常数 k_{off} (1/s) (其是从通过测量获得的传感图计算的动力学参数))计算每个抗体对人IL-8的 K_D (M)。BIAcore T200评价软件(GE Healthcare)用于计算每个参数。

[0698] 结果显示在表7中。首先,与Hr9比较,在轻链中含有L54H修饰的Hr9/L16在中性pH (pH7.4)具有稍微增强的人IL-8-结合亲和力,但在酸性pH (pH5.8)具有降低的人IL-8-结合亲和力。另一方面,通过将各种轻链与在重链中含有Y97H修饰的H89组合产生的抗IL-8抗体 (H89/WS4L, H89/L12, 和H89/L16)全部显示在酸性pH降低的人IL-8-结合亲和力以及在中性pH降低的人IL-8-结合亲和力。

[0699] [表7]

[0700]

抗体名称	pH	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	k_{on} 比率 (pH7.4/pH5.8)	k_{off} 比率 (pH5.8/pH7.4)	K_D 比率 (pH5.8/pH7.4)
Hr9	pH 7.4	8.59E+05	2.11E-04	2.46E-10			
(Hr9/WS4L)	pH 5.8	3.23E+05	4.69E-04	1.45E-09	2.7	2.2	5.9
Hr9/L16	pH 7.4	8.90E+05	9.57E-05	1.08E-10			
	pH 5.8	3.91E+04	1.97E-04	5.04E-09	22.8	2.1	46.8
H89/WS4L	pH 7.4	8.51E+05	7.65E-04	8.99E-10			
	pH 5.8	1.62E+05	7.27E-03	4.48E-08	5.2	9.5	49.8
H89/L12	pH 7.4	5.95E+05	2.48E-04	4.17E-10			
	pH 5.8	1.19E+05	3.52E-03	2.96E-08	5.0	14.2	71.0
H89/L16	pH 7.4	6.02E+05	4.21E-04	6.99E-10			
	pH 5.8	1.20E+05	4.22E-03	3.51E-08	5.0	10.0	50.3
H89/L63	pH 7.4	5.37E+05	1.13E-04	2.10E-10			
	pH 5.8	2.62E+05	2.10E-03	8.04E-09	2.1	18.7	38.3
H89/L118	pH 7.4	5.80E+05	2.13E-05	3.67E-11			
	pH 5.8	1.79E+05	3.84E-03	2.15E-08	3.2	180.3	585.0

[0701] (5-3) 用于赋予pH依赖性的进一步修饰的抗体的生产和评价

[0702] 接着,研究5-2中发现的有希望的修饰和新的氨基酸突变的组合,并且作为结果发现以下组合。

[0703] [表7-2]

[0704]

抗体名称	引入重链的一个或多个突变	引入轻链的一个或多个突变
H89/L63	Y97H	N50H/L54H
H89/L118	Y97H	N50H/L54H/Q89K

[0705] 通过参照实施例1和2的方法产生这些变体,并且通过与实施例5-2类似的方法评价对人IL-8的结合亲和力。

[0706] 结果也在表7中显示。具有H89-IgG1 (SEQ ID NO:42) 作为重链和L63-kOMT (SEQ ID NO:43) 作为轻链的H89/L63在中性pH (pH 7.4) 显示与Hr9相当的人IL-8-结合亲和力,并且在酸性pH (pH 5.8) 显示降低的人IL-8-结合亲和力。具体而言, H89/L63在pH 5.8的 k_{off} (解离速率常数) 和 K_D (解离常数) 都比Hr9的那些高。这意为在内体中的酸性pH条件下, H89/L63具有容易释放人IL-8的性质。

[0707] 此外,出人意料地, H89/L118 (其具有H89-IgG1作为重链和L118-kOMT (SEQ ID NO:

44) 作为轻链) 在中性pH条件下与Hr9相比具有增强的人IL-8-结合亲和力(KD), 但在酸性pH条件下与Hr9相比具有减弱的人IL-8-结合亲和力(KD)。不特别限制, 通常, 当可以多次结合抗原的抗体用作药物产品时, pH-依赖性抗原结合抗体优选具有强的结合亲和力(小的KD), 从而它们在中性pH条件下(如在血浆中)可以强烈地中和抗原。另一方面, 抗体优选具有大的解离速率常数(koff)和/或弱的结合亲和力(大的KD), 从而它们可以在酸性pH条件(如在内体中)快速释放抗原。与Hr9相比, H89/L118在这些中性pH和酸性pH两者下都具有可获得的可有利性质。

[0708] 因此, 对于Hr9鉴定了有用的氨基酸修饰, 如对于其重链的Y97H和对于其轻链的N50H/L54H/Q89K。不限于其中, 已经表明, 作为药物较好的pH依赖性的IL-8结合抗体能够通过选自这些修饰的单个或多个氨基酸修饰的组合产生。

[0709] 不受特定理论限制, 考虑的是, 当使用pH-依赖性抗原结合抗体作为药物时的重点是施用于身体的抗体是否可以在内体中释放抗原。在这一点上, 在酸性pH条件下足够弱的结合(大的解离常数(KD))或足够快的解离速率(大的解离速率常数(koff))被认为是重要的。因此, 在以下实验中研究通过BIAcore获得的H89/L118的KD或koff是否足以在体内内体中解离抗原。

[0710] [实施例6]产生用于小鼠PK测定的高-亲和力抗体

[0711] 用于确认抗体对在小鼠中去除人IL-8的速率的效果的方法不特别限制。例如, 存在一种方法, 其包括将抗体在与IL-8混合的条件下施用于小鼠, 并且随后比较从小鼠血浆去除人IL-8的速率。

[0712] 本文中, 希望的是, 要用于小鼠PK测定的参照抗体在中性pH和酸性pH条件都具有足够强的结合亲和力。然后, 对赋予Hr9高-亲和力的修饰进行检索, 并且由此, 产生具有H998-IgG1 (SEQ ID NO:45) 作为重链和L63-k0MT作为轻链的H998/L63。

[0713] 通过实施例5-2相似的方法将H998/L63用于评价人IL-8-结合亲和力。得到的传感图显示在图14中。

[0714] H998/L63在中性pH和酸性pH条件中都显示显著缓慢解离速率, 并且显示其具有比Hr9更强的IL-8-结合亲和力。然而, 已知, 由于BIAcore的机械限制, 分析值如解离速率常数(koff)和解离常数(KD)在蛋白-蛋白相互作用具有低解离速率的情况下不能准确计算。对于H998/L63不能获得准确的分析值, 其分析值在本文中显示。然而, 从实验结果确认, H998/L63在中性pH和酸性pH都具有非常强的结合亲和力, 并且适合作为要用于小鼠PK测定的比较的抗体。

[0715] [实施例7]使用pH依赖性的IL-8结合抗体H89/L118的小鼠PK测定 (7-1) 使用H89/L118的小鼠PK测定

[0716] 使用实施例5中产生的H89/L118和实施例6中产生的H998/L63评价人IL-8的体内去除速率。

[0717] 向小鼠 (C57BL/6J, Charles river) 中同时施用人IL-8和抗人IL-8抗体后, 评价人IL-8的药代动力学。将人IL-8和抗人IL-8抗体 (分别是10 μ g/mL和200 μ g/mL) 的混合溶液以10mL/kg的单个剂量施用于尾静脉。此时, 因为就人IL-8而言存在足够过量的抗人IL-8抗体, 所以认为几乎所有人IL-8结合于抗体。施用后五分钟、两小时、四小时、七小时、一天、两天、三天、七天、14天、21天和28天, 收集血液。将收集的血液立即在15,000rpm和4 $^{\circ}$ C离心15

分钟,获得血浆。将分离的血浆储存在设为-20℃或以下的冰箱中,直到进行测量。

[0718] (7-2) 血浆中人IL-8浓度的测量

[0719] 通过电化学发光方法确定小鼠血浆中的人IL-8浓度。首先,将具有小鼠IgG恒定区的抗人IL-8抗体(内部制备)分散到MULTI-ARRAY 96-孔板(Meso Scale Discovery)中,并且使其在室温静置一小时。然后将含有5%BSA(w/v)的PBS-Tween溶液用于在室温封闭两小时以制备固定有抗人IL-8抗体的平板。制备以275,91.7,30.6,10.2,3.40,1.13,或0.377ng/mL的血浆浓度含有人IL-8的校准曲线样品和稀释25倍或更多的小鼠血浆测量样品。将样品与hWS-4混合并让其在37℃反应过夜。随后,将50μL的混合溶液分散在固定有抗人IL-8抗体的平板的每个孔中,并且将溶液在室温搅拌一小时。将hWS-4的终浓度调节至25 μg/mL。然后,在与生物素小鼠抗人Igκ轻链(BD Pharmingen)在室温反应一小时,并且随后与SULFO-TAG标记的链霉亲和素(Meso Scale Discovery)在室温反应一小时后,分散读取缓冲液T(x1)(Meso Scale Discovery),立即利用SECTOR成像仪2400(Meso Scale Discovery)进行测量。使用分析软件,SOFT Max PRO(Molecular Devices),基于校准曲线的响应计算人IL-8浓度。

[0720] 得到的人IL-8在血浆中的浓度的数据显示在图15中,并且人IL-8从小鼠血浆的清除率(CL)的值在表8中显示。

[0721] [表8]

	人 IL-8 CL (mL/d/kg)	
	H998/L63	H89/L118
#1	21.4	472.2
#2	27.5	447.2
#3	24.7	476.0
平均值 (N=3)	24.5	465.1
标准差	3.0	15.6

[0723] 从图15看出,与和H998/L63同时施用人IL-8比较,与H89/L118同时施用的人IL-8显示明显快速地从小鼠血浆去除。此外,定量表示人IL-8从小鼠血浆的去除速率的CL值表明,与H998/L63相比,人IL-8的去除速率对于H89/L118增加约19倍。

[0724] 不受特定理论限制,从获得的数据可以猜测以下内容。大多数与抗体同时施用的人IL-8结合血浆中的抗体并且以复合形式存在。由于强亲和力,结合于H998/L63的人IL-8以抗体结合的状态存在,甚至在内体中的酸性pH条件下。之后,H998/L63经由FcRn返回血浆,同时仍然以人IL-8-复合的形式;因此,当这发生时,人IL-8同时也返回血浆中。因此,大多数摄入细胞的人IL-8再次返回血浆。即,当同时施用H998/L63时,人IL-8从血浆去除的速率显著降低。另一方面,如之前描述的,以与H89/L118(pH依赖性的IL-8结合抗体))复合的形式摄入细胞的人IL-8,在内体中的酸性pH条件下与抗体解离。从抗体解离的人IL-8在转移到溶酶体后会降解。因此,与在酸性pH和中性pH都具有强的结合亲和力的IL-8结合抗体如H998/L63相比,pH依赖性的IL-8结合抗体可以明显加速人IL-8的去除。

[0725] (7-3) 利用增加的剂量的H89/L118的小鼠PK测定

[0726] 接着,如下进行验证改变H89/L118的剂量的效果的实验。同时向小鼠(C57BL/6J, Charlesriver)施用人IL-8和H89/L118(2mg/kg或8mg/kg)后,评价人IL-8的药代动力学。以10mL/kg的单个剂量将人IL-8(2.5μg/mL)和抗人IL-8抗体(200μg/mL或800μg/mL)的混合溶液施用于尾静脉。此时,因为与人IL-8相比存在足够过量的抗人IL-8抗体,所以认为几乎所有人IL-8结合于抗体。施用后五分钟、七小时、一天、两天、三天、七天、14天、21天和28天,收集血液。将收集的血液立即在15,000rpm和4℃离心15分钟,获得血浆。将分离的血浆储存在设为-20℃或以下的冰箱中,直到进行测量。

[0727] 小鼠血浆中的人IL-8浓度的测量通过实施例7-2类似的方法进行。得到的关于血浆中IL-8浓度的数据显示在图16中,并且人IL-8从小鼠血浆的清除率(CL)的值显示在表9中。

[0728] [表9]

	人IL-8 CL (mL/d/kg)	
	H89/L118	H89/L118
抗体名称	H89/L118	H89/L118
抗体剂量	2 mg/kg	8 mg/kg
#1	181.2	93.0
#2	237	101.6
#3	247	114.5
平均值 (N = 3)	221.8	103.0
标准差	35.6	10.8

[0730] 由此,确认与施用以2mg/kg的H89/L118的组相比,施用以8mg/kg抗体的组具有大约2倍慢的人IL-8去除速率。

[0731] 下文,并非意在受理论约束,描述基于概述为带来前述结果的可能因素之一的内容。

[0732] 在经由FcRn从内体内部返回血浆中的抗体中,优选的是结合人IL-8的抗体的比例低。关于内体中存在的人IL-8,希望其具有高比例的不被抗体结合的游离形式。当人IL-8与不具有pH-依赖性IL-8-结合能力的抗体一起施用,认为内体中的大多数(接近100%)人IL-8以与抗体复合的形式存在,并且小量(接近0%)被认为是游离。另一方面,当与pH依赖性的IL-8结合抗体(例如H89/L118)一起施用,特定部分的人IL-8应该以游离形式存在于内体中。假想地,在此情况下游离形式的比例可以如下理解:[内体中游离人IL-8的比例(%)] = [内体中游离人IL-8浓度]/[内体中总人IL-8浓度] x 100。

[0733] 理想的是,通过上述等式理解的内体中游离人IL-8的比例更高,并且例如,20%比0%更优选,40%比20%更优选,60%比40%更优选,80%比60%更优选,和100%比80%更优选。

[0734] 因此,在上述内体中游离人IL-8的比例和在酸性pH对人IL-8的结合亲和力(KD)和/或解离速率常数(koff)之间有关联的考虑是合理的。即,在酸性pH对人IL-8的结合亲和力越弱和/或解离速率越强,则内体中游离人IL-8的比例应该越高。然而,在游离人IL-8的比例在内体中已经接近100%的pH依赖性的IL-8结合抗体的情况下,进一步在酸性pH弱化结合亲和力和/或增加解离速率不一定导致游离人IL-8的比例的有效增加。技术人员可以容易理解,例如,即使游离人IL-8的比例从99.9%改善到99.99%,这种改善程度可能是不显著的。

[0735] 此外,根据一般化学平衡理论,当抗IL-8抗体和人IL-8共存并且其结合反应和解离反应达到平衡时,游离人IL-8的比例明确通过三个参数确定:抗体浓度,抗原浓度,和解离常数(KD)。本文中,当抗体浓度高时,当抗原浓度高时,或当解离常数(KD)小时,复合物容易形成并且游离人IL-8的比例降低。另一方面,当抗体浓度低时,当抗原浓度低时,或当解离常数(KD)大时,复合物形成变得困难,并且游离人IL-8的比例增加。

[0736] 同时,在该实验中,当以8mg/kg施用H89/L118时去除人IL-8的速率低于当以2mg/kg施用抗体时的速率。这因此提示,在内体中,与当以2mg/kg施用抗体时相比,当以8mg/kg施用抗体时,游离人IL-8的比例减少。原因可能是增加抗体剂量四倍增加内体中的抗体浓度,并且由此促进内体中IL-8抗体复合物的形成。即,认为在施用以增加剂量的抗体的组中,游离人IL-8在内体中的比例降低,并且因此去除人IL-8的速率降低。这还提示,当以8mg/kg施用抗体时,H89/L118在酸性pH条件下的解离常数(KD)的程度不足以将游离人IL-8变为接近100%。更具体而言,如果其是在酸性pH条件下具有较大解离常数(KD)(较弱结合)的抗体,甚至当以8mg/kg施用抗体时,其可以实现接近100%游离IL-8的状态,并且人IL-8去除的速率等于当以2mg/kg施用抗体时的速率。

[0737] 基于上述内容,为了确认如上文提到的研究的pH依赖性的IL-8结合抗体是否可以在内体内接近100%游离人IL-8的比例,不特别限制,技术人员可以验证是否存在增加体内抗原-去除效果的程度的空间。例如,存在一种比较当使用新的pH依赖性的IL-8结合抗体时与当时用H89/L118时人IL-8去除的速率的方法,在此情况下,与H89/L118相比,新的抗体在酸性pH具有更弱的结合亲和力和/或在酸性pH具有增加的解离速率。在所述新的pH-依赖性IL-8抗体显示与H89/L118相当的人IL-8去除速率的情况下,这提示,H89/L118在酸性pH的结合亲和力和/或解离速率已经处于足以实现游离人IL-8在内体的比例接近100%的水平。另一方面,在所述新pH-依赖性IL-8抗体显示更高的人IL-8去除速率的情况下,这提示H89/L118在酸性pH的结合亲和力和/或解离速率具有改善空间。

[0738] [实施例8] pH依赖性的IL-8结合抗体H553/L118的产生和评价

[0739] (8-1) 具有pH-依赖性IL-8结合能力的新的H553/L118的生产

[0740] 本文中,本发明人旨在产生与H89/L118相比,在酸性pH条件下具有甚至更弱的人IL-8-结合亲和力和/或更高的解离速率的抗体。

[0741] 使用H89/L118作为基础引入氨基酸修饰(主要涉及组氨酸)),通过与实施例5类似的方法产生表10中所示的修饰的抗体。此外,通过与实施例5-2类似的方法确定这些抗体的人IL-8-结合亲和力。

[0742] 部分结果显示在表10中。显示具有H553-IgG1 (SEQ ID NO:46) 作为重链和L118-k0MT作为轻链的H553/L118,和具有H496-IgG1 (SEQ ID NO:57) 作为重链和L118-k0MT作为轻链的抗体h496/L118具有比H89/L118进一步增加的pH依赖性。

[0743] [表10]

[0744]

抗体名称	pH	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)	kon比率 (pH7.4/pH5.8)	koff比率 (pH5.8/pH7.4)	KD比率 (pH5.8/pH7.4)
H89/L118	pH 7.4	9.45E+05	1.14E-04	1.21E-10			
	pH 5.8	1.23E+05	3.90E-03	3.18E-08	7.7	34.2	263.0
H496/L118	pH 7.4	1.29E+06	5.03E-05	3.91E-11			
	pH 5.8	1.78E+05	5.47E-03	3.07E-08	7.2	108.6	785.0
H553/L118	pH 7.4	1.15E+06	1.13E-04	9.76E-11			
	pH 5.8	6.14E+05	3.05E-02	4.97E-08	1.9	270.7	509.3

[0745] 在获得的H553/L118中,将两种氨基酸修饰,Y55H和R57P,引入H89/L118的重链中。另一方面,H496/L118,其中仅将R57P引入H89/L118的重链中,与H89/L118相比,在中性pH具有增强的对人IL-8的结合亲和力,但在酸性pH具有几乎不改变的人IL-8-结合亲和力。更具体而言,引入H89/L118的R57P修饰是仅增强在中性pH的人IL-8-结合亲和力但不改变在酸性pH的结合亲和力的修饰。此外,与H89/L118相比,通过将Y55H修饰引入H496/L118的重链产生的H553/L118在中性pH具有保持的或稍微增强的结合亲和力,但另一方面,在酸性pH具有减小的结合亲和力。即,将两个氨基酸修饰(Y55H和R57P)的组合引入H89/L118使得进一步增强在酸性pH降低结合亲和力,同时在中性pH保持或稍微增强结合亲和力的性质。

[0746] (8-2) 使用H553/L118的小鼠PK测定

[0747] 使用H553/L118评价小鼠中人IL-8去除速率,通过与实施例7-2类似的方法进行。将得到的关于血浆中人IL-8浓度的数据在图17中显示,并且人IL-8从小鼠血浆的清除率(CL)的值在表11中显示。

[0748] [表11]

[0749]

抗体名称	人IL-8 (mL/d/kg)			
	H89/L118	H89/L118	H553/L118	H553/L118
抗体剂量	2 mg/kg	8 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg
#1	181.2	93.0	250	256.6
#2	237	101.6	245	248.4
#3	247	114.5	249	244.1
平均值(N=3)	221.8	103.0	248	249.7
标准差	35.6	10.8	3	6.4

[0750] 由此,当比较施用以2mg/kg抗体的组时,在H553/L118和H89/L118之间未观察到大的差异;然而,确认的是,当比较施用以8mg/kg抗体的组时,与H89/L118相比,H553/L118以2.5倍作用加速人IL-8的去除。从另外一个角度,在2mg/kg和8mg/kg之间,H553/L118不显示人IL-8去除速率的差异,并且关于H89/L118未观察到由于增加抗体剂量造成的抗原去除速率的降低。

[0751] 没有特别限制,获得该结果的一个原因可以如下讨论。当以2mg/kg和以8mg/kg施用抗体时,H533/L118显示相当的人IL-8去除速率。这表明,内体中游离IL-8的比例实现接近100%的水平,甚至在8mg/kg施用的条件下,因为H553/L118在酸性pH对IL-8的结合足够弱。换句话说,这提示,尽管H89/L118可以以约2mg/kg的剂量实现最大的人IL-8去除效果,但其效果在约8mg/kg的高剂量下可能弱化。另一方面,H553/L118可以甚至在约8mg/kg的高剂量下实现最大的去除人IL-8的效果。

[0752] (8-3) 使用H553/L118的稳定性评价

[0753] 显示H553/L118是可以比H89/L118更显著地加速在小鼠中人IL-8的去除的抗体。然而,为了该抗体在体内长期持续该对人IL-8的抑制性效果,同样重要的是,在施用的抗体存在于体内(例如,血浆中)的期间,稳定保持IL-8中和活性(该抗体的IL-8中和活性的稳定

性)。因此,通过以下方法评价这些抗体在小鼠血浆中的稳定性。

[0754] 通过本领域技术人员已知的方法从C57BL/6J (Charles River)的血液收集小鼠血浆。将200 μ L的200mM PBS (Sigma, P4417) 加入至800 μ L的小鼠血浆中,得到1mL。此外,将叠氮化钠以0.1%的终浓度作为防腐剂加入。然后,将每种抗体 (Hr9, H89/L118和H553/L118) 加入至上述小鼠血浆中得到0.2mg/mL的终浓度。此刻,收集一部分样品作为初始样品。剩余样品储存在40 $^{\circ}$ C。储存后一周和二周,收集每种样品的一部分,并且将它们用作储存一周的样品和储存两周的样品。所有样品在-80 $^{\circ}$ C冷冻并储存,直到进行每个分析。

[0755] 接着,如下对小鼠血浆中含有的抗IL-8抗体评价其人IL-8中和活性: CXCR1和CXCR2是人IL-8的已知受体。PathHunter (注册商标) CH0-K1CXCR2 β -阻抑蛋白细胞系 (DiscoverX Co., Cat.#93-0202C2) 表达人CXCR2,并且是人工产生的细胞系,从而当传递人IL-8介导的信号时发出化学发光。其不特别限制,抗人IL-8抗体具有的人IL-8中和活性可以使用该细胞评价。首先,当将人IL-8加入细胞的培养溶液时,特定量的化学发光以依赖于添加的人IL-8的浓度的方式呈现。当将人IL-8和抗人IL-8抗体一起加入培养溶液中时,在抗人IL-8抗体结合人IL-8之后,人IL-8信号转导可以被阻断。由此,通过添加人IL-8引起的化学发光将被抗人IL-8抗体抑制,并且化学发光将比不加抗体时弱,或根本不存在化学发光。因此,随着抗体具有的人IL-8中和活性变得更强,化学发光的程度变得更弱;并且随着抗体具有的人IL-8中和活性变得更弱,化学发光的程度变得更强。

[0756] 这对于已经加入小鼠血浆并储存一定时期的抗体也是一样。如果抗体的中和活性不由于在小鼠血浆中的储存改变,储存前和后上述化学发光的程度应该不改变。另一方面,在其中和活性由于在小鼠血浆中的储存而降低的抗体的情形中,与储存前相比,通过使用储存的抗体的化学发光程度将增加。

[0757] 随后,上述细胞系用于检查小鼠血浆中储存的抗体的中和活性是否得到保持。首先,将细胞系悬浮在AssayComplete (tm) Cell Plating 0试剂中,并且随后以5000个细胞/孔接种在384-孔板中。开始细胞培养后一天,进行以下实验以确定要加入的人IL-8的浓度。将系列稀释的人IL-8溶液 (其含有45nM (400ng/mL) 至0.098nM (0.1ng/mL) 的人IL-8终浓度) 加入到细胞培养溶液中。接着,根据产品的方案添加检测试剂,并且使用化学发光检测器检测相对化学发光水平。从该结果,确认细胞对人IL-8的反应性,并且确定适于确认抗人IL-8抗体的中和活性的人IL-8浓度。本文中,人IL-8浓度设为2nM。

[0758] 接着,前述添加抗人IL-8抗体的小鼠血浆用于评价其中含有的抗体的中和活性。将上文确定的浓度的人IL-8和前述含有抗人IL-8抗体的小鼠血浆加入细胞培养物中。确定要加入的小鼠血浆的量,从而含有范围从2 μ g/mL (13.3nM) 至0.016 μ g/mL (0.1nM) 的抗人IL-8抗体的阶梯浓度。接着,根据产品方案添加检测试剂,并且使用化学发光检测器检测相对化学发光水平。

[0759] 本文中,在每个抗体浓度的相对化学发光水平的相对值通过将不添加人IL-8和抗体的孔中的平均相对化学发光水平定义为0%,和将仅添加人IL-8但不添加抗体的孔中的平均相对化学发光水平定义为100%来计算。

[0760] 使用表达人CXCR2的细胞的人IL-8抑制测定的结果显示在图18-1 (其显示来自初始样品 (在小鼠血浆中没有防腐剂处理) 的结果), 图18-2 (其显示在40 $^{\circ}$ C储存一周的样品的结果), 和图18-3 (其显示在40 $^{\circ}$ C储存两周的样品的结果) 中。

[0761] 由此,对于Hr9和H89/L118未观察到储存在小鼠血浆中之前和之后人IL-8中和活性的差异。另一方面,H553/L118显示在两周的储存后人IL-8中和活性降低。因此,与Hr9和H89/L118相比,H553/L118的人IL-8中和活性在小鼠血浆中容易降低,并且显示H553/L118是关于IL-8中和活性具有不稳定性质的抗体。

[0762] [实施例9]使用计算机系统具有降低的预测的免疫原性得分的抗体的产生

[0763] (9-1)各种IL-8结合抗体的预测的免疫原性得分

[0764] 抗药物抗体(ADA)的产生影响治疗性抗体的功效和药代动力学,并且有些情况下带来多种副作用;因此,治疗性抗体的临床利用和药物功效可能受ADA产生限制。已知治疗性抗体的免疫原性受很多因素影响,并且特别是,存在很多描述效应T细胞具有的表位在治疗性抗体中的重要性的报道。

[0765] 已经开发了用于预测T细胞表位的计算机工具如Epibase(Lonza),iTope/TCED(Antitope),和EpiMatrix(EpiVax)。使用这些计算机工具,可以预测每个氨基酸序列中的T细胞表位(Expert Opin.Biol.Ther.2007年3月;7(3):405-418),并且可以评价治疗性抗体的可能的免疫原性。

[0766] 本文中,EpiMatrix用于计算每种抗IL-8抗体的免疫原性得分。EpiMatrix是用于通过将要预测其免疫原性的蛋白的氨基酸序列以九个氨基酸分段自动设计肽片段的序列,并且随后计算其结合八种II型主要MHC等位基因(DRB1*0101,DRB1*0301,DRB1*0401,DRB1*0701,DRB1*0801,DRB1*1101,DRB1*1301,和DRB1*1501)的能力,预测研究的蛋白的免疫原性的系统(Clin.Immunol.2009年5月;131(2):189-201)。

[0767] 每个IL-8抗体的重链和轻链的免疫原性得分(如上文所述计算)在表12的“EpiMatrix得分”栏中显示。此外,关于EpiMatrix得分,对于Tregitope含量校准的免疫原性得分在“tReg调节的Epx得分”栏显示。Tregitope是主要在天然的抗体序列中大量存在的肽片段序列,并且是认为通过激活调节性T细胞(Treg)抑制免疫原性的序列。

[0768] 此外,关于这些得分,对于重链和轻链的得分的总和在“总共”栏中显示。

[0769] [表12]

抗体名称	重链		轻链		总共	
	EpiMatrix得分	tReg 调节的得分	EpiMatrix得分	tReg 调节的Epx得分	EpiMatrix得分	tReg 调节的Epx得分
hWS-4	62.44	12.18	22.64	-23.89	85.08	-11.71
Hr9	56.52	6.27	22.64	-23.89	79.16	-17.62
H89/L118	57.99	7.74	7.16	-39.36	65.15	-31.62
H496/L118	54.13	3.87	7.16	-39.36	61.29	-35.49
H553/L118	47.88	-2.37	7.16	-39.36	55.04	-41.73

[0771] 根据这些结果,“EpiMatrix得分”和“tReg调节的Epx得分”都显示与hWS-4(其是已知人源化抗人IL-8抗体)相比,H89/L118,H496/L118和H553/L118的免疫原性得分降低。

[0772] 此外,利用EpiMatrix,可行的是比较通过考虑重链和轻链得分对于作为整体的抗体分子预测的ADA产生频率与由各种可商购抗体引起的实际ADA产生频率。进行所述分析的结果显示在图19中。由于系统限制,图19中使用的符号对于hWS-4是“WS4”,对于Hr9是“HR9”,对于H89/L118是“H89L118”,对于H496/L118是“H496L118”,并且对于H553/L118是“H553L118”。

[0773] 如图19中所示的,由各种可商购抗体引起的人中ADA产生的频率已知对于坎帕斯(Campath)(阿仑单抗(Alemtuzumab))是45%,对于美罗华(Rituxan)(利妥昔单抗(Rituximab))是27%,对于塞尼哌(Zenapax)(达克珠单抗(Daclizumab))是14%。另一方面,在从氨基酸序列预测的ADA产生频率对于hWS-4(其是已知人源化抗人IL-8抗体)是10.42%的同时,与hWS-4相比,此次新鉴定的H89/L118(5.52%),H496/L118(4.67%),或H553/L118(3.45%)的频率显著较低。

[0774] (9-2)具有降低的预测的免疫原性得分的修饰的抗体的生产

[0775] 如上文所述的,与hWS-4相比,H89/L118,H496/L118,和H553/L118的免疫原性得分较低;然而,如从表12显而易见的,对于重链的免疫原性得分高于对于轻链的免疫原性得分,这提示对于重链的氨基酸序列的改善仍存在空间(尤其是从免疫原性的角度)。然后,在H496的重链可变区中进行可以降低免疫原性得分的氨基酸修饰的搜索。作为仔细搜索的结果,发现三个变体,H496v1(其中根据Kabat编号位置52c处的丙氨酸用天冬氨酸取代),H496v2(其中位置81处的谷氨酰胺用苏氨酸取代),和H496v3(其中位置82b处的丝氨酸用天冬氨酸取代)。此外,产生在其中引入所有这三种修饰的H1004。

[0776] 通过与实施例9-1类似的方法计算的免疫原性得分的结果显示在表13中。

[0777] [表13]

抗体名称	重链		轻链		总共	
	EpiMatrix得分	tReg调节的Epx得分	EpiMatrix得分	tReg调节的Epx得分	EpiMatrix得分	tReg调节的Epx得分
H496/L118	54.13	3.87	7.16	-39.36	61.29	-35.49
H496v1/L118	32.17	-18.08	7.16	-39.36	39.33	-57.44
H496v2/L118	45.26	-5.00	7.16	-39.36	52.42	-44.36
H496v3/L118	38.27	-11.98	7.16	-39.36	45.43	-51.34
H1004/L118	10.79	-39.47	7.16	-39.36	17.95	-78.83
H1004/L395	10.79	-39.47	7.79	-38.74	18.58	-78.21

[0779] 与H496相比,三条重链,H496v1,H496v2,和H496v3(其全部含有单个修饰),显示减小的免疫原性得分。此外,H1004(在其中引入三个修饰的组合)实现显著的免疫原性得分改善。

[0780] 本文中,除了L118之外,鉴定L395作为适于与H1004组合的轻链。因此,在免疫原性得分的计算中,使用L118组合和L395组合。如表13中所示,H1004/L118和H1004/L395(其是重链和轻链的组合)也显示非常低的免疫原性得分。

[0781] 接着,以与实施例9-1类似的方式对这些预测ADA产生的频率。结果在图20中显示。图20中使用的符号对于H496v1/L118是“V1”,对于H496v2/L118是“V2”,对于H496v3/L118是“V3”,对于H1004/L118是“H1004L118”,并且对于H1004/L395是“H1004L395”。

[0782] 出人意料地,H1004/L118和H1004/L395(其具有显著降低的免疫原性得分)也显示对ADA产生频率预测的值的改善,并且显示预测的值为0%。

[0783] (9-3)H1004/L395的IL-8-结合亲和力的测量

[0784] 产生H1004/L395,其是具有H1004-IgG1m(SEQ ID NO:47)作为重链和L395-kOMT(SEQ ID NO:38)作为轻链的抗体。如下文描述使用BIACORE T200(GE Healthcare)测量H1004/L395对人IL-8的结合亲和力。

[0785] 使用以下两种运行缓冲液,并且在各个温度进行测量:

[0786] 0.05%吐温20,40mM ACES,150mM NaCl,pH 7.4,40℃

[0787] 0.05%吐温20,40mM ACES,150mM NaCl,pH 5.8,37℃。

[0788] 通过胺偶联方法将适量的蛋白A/G(PIERCE)固定在传感芯片CM4(GE Healthcare)上并且捕获目标抗体。接着,注射稀释的人IL-8溶液或运行缓冲液(用作参照溶液)以允许捕获在传感芯片上的抗体与人IL-8的相互作用。对于运行缓冲液,使用上述溶液中的任一种,并且各个缓冲液还用于稀释人IL-8。为了再生传感芯片,使用25mM NaOH和10mM甘氨酸-HCl(pH 1.5)。基于结合速率常数 k_{on} (1/Ms)和解离速率常数 k_{off} (1/s)(其是从通过测量获得的传感图计算的动力学参数)计算每个抗体对于人IL-8的 KD (M)。BIAcore T200评价软件(GE Healthcare)用于计算每个参数。

[0789] 测量结果显示在表14中。与H89/L118相比,H1004/L395(具有降低的免疫原性得分)在中性pH具有相当的对于人IL-8的 KD ,但在酸性pH具有增加的 KD 和 k_{off} ;并且显示其具有在内体中容易从IL-8解离的性质。

[0790] [表14]

抗体名称	pH	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	KD (M)	k_{on} 比率 (pH7.4/pH5.8)	k_{off} 比率 (pH5.8/pH7.4)	KD 比率 (pH5.8/pH7.4)
H89/L118	pH 7.4	7.51E+05	1.29E-04	1.72E-10	5.8	48.7	283.7
	pH 5.8	1.29E+05	6.28E-03	4.88E-08			
H1004/L395	pH 7.4	1.02E+06	1.55E-04	1.51E-10	3.3	218.1	728.5
	pH 5.8	3.06E+05	3.38E-02	1.10E-07			

[0792] [实施例10]pH依赖性的IL-8结合抗体H1009/L395的产生和评价

[0793] (10-1)各种pH依赖性的IL-8结合抗体的生产

[0794] 通过实施例9中的评价获得H1004/L395(其具有pH-依赖性IL-8结合能力和降低的免疫原性得分)。随后,进行深入研究,产生在小鼠血浆中具有这些有利性质以及稳定性的变体。

[0795] 基于H1004/L395通过引入各种修饰产生以下修饰的抗体。

[0796] [表14-2]

[0797] 重链

H1004	A52cD/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H0932	A52cD/G54H/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1000	D31E/A52cD/G54H/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1009	A52cD/G54Y/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1022	A52cD/G54H/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1023	A52cD/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1028	A52cD/G54Y/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1029	S30D/D31K/A52cD/G54H/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
Hi031	S30D/D31K/A52cD/G54H/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1032	S30D/D31K/A52cD/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1037	S30D/D31K/A52cD/G54Y/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1040	D31E/A52cD/G54H/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1041	D31E/A52cD/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1046	D31E/A52cD/G54Y/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H

H1047	S30D/D31K/A52cD/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1048	D31E/A52cD/R57P/Q81T/s82bD/Y97H
H1049	S30D/D31K/A52cD/G54Y/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1050	D31E/A52cD/G54Y/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H

[0799] [表14-3]

L395	N50K/L54H/089K
L442	S31E/N50K/L54H/Q89K

[0801] 进一步地,通过组合上述18种类型的重链和两种类型的轻链产生总共36种类型的抗体。如下文所述对这些抗体进行各种评价。

[0802] 以与实施例9-3的方法类似的方式测量在中性和酸性pH条件下的人IL-8-结合亲和力。在获得的结果中,在pH7.4的KD,以及在pH5.8的KD和koff显示在表15中。

[0803] 接着,通过下述方法评价在PBS中储存抗体后关于IL-8结合的稳定性。

[0804] 将各个抗体用DPBS (Sigma-Aldrich) 透析过夜,并且随后将每种抗体的浓度调节至0.1mg/mL。此刻,收集一些抗体样品作为初始样品。剩余样品在50℃储藏一周,并且随后收集作为用于热加速测试的样品。

[0805] 接着,使用初始样品和用于热加速测试的样品如下进行IL-8-结合亲和力的BIACORE测量。

[0806] 使用BIACORE T200 (GE Healthcare) 分析人IL-8对修饰的抗体的结合水平。通过使用0.05%吐温20,40mMACES,和150mMNaCl (pH7.4) 作为运行缓冲液在40℃进行测量。

[0807] 通过胺偶联方法将适量的蛋白A/G (PIERCE) 固定在传感芯片CM4 (GE Healthcare) 上并且捕获目标抗体。接着,注射稀释的人IL-8溶液或运行缓冲液 (用作参照溶液) 以允许捕获在传感芯片上的抗体与人IL-8的相互作用。运行缓冲液还用于稀释人IL-8。为了再生传感芯片,使用25mM NaOH和10mM甘氨酸-HCl (pH 1.5)。测量的人IL-8结合水平和在该结合水平捕获的抗体的量使用BIACORE T200评价软件 (GE Healthcare) 提取。

[0808] 对于初始样品和用于热加速测试的样品计算每1000RU量的捕获的抗体的人IL-8结合的量。此外,计算对于初始样品与用于热加速测试的样品的人IL-8-结合水平的比率。

[0809] 得到的初始样品与用于热加速测试的样品的IL-8-结合水平的比率也显示在表15中。

[0810] [表15]

[0811]

抗体	pH7.4 KD	pH5.8 KD	pH5.8 koff	IL-8 结合量的比率 (热加速/初始)
H0089/L0118	1.7E-10	4.9E-08	6.3E-03	0.61
H0932/L0395	1.6E-10	1.1E-07	5.7E-02	0.56
H0932/L0442	2.1E-10	7.9E-08	2.2E-02	0.56
H1000/L0395	1.4E-10	8.9E-08	2.0E-02	0.57
H1000/L0442	2.0E-10	7.1E-08	1.7E-02	0.57
H1004/L0395	1.5E-10	1.1E-07	3.4E-02	0.58
H1004/L0442	2.2E-10	7.7E-08	2.0E-02	0.59
H1009/L0395	7.1E-11	8.7E-08	1.0E-02	0.64
H1009/L0442	1.1E-10	6.3E-08	6.0E-03	0.64
H1022/L0395	2.7E-10	2.9E-07	1.2E+01	0.47
H1022/L0442	3.6E-10	1.8E-07	2.0E-02	0.46
H1023/L0395	7.6E-11	9.2E-08	1.8E-02	0.54
H1023/L0442	1.2E-10	7.1E-08	1.7E-02	0.55
H1028/L0395	1.8E-10	2.1E-07	1.0E+01	0.55
H1028/L0442	2.4E-10	1.4E-07	1.3E-01	0.56
H1029/L0395	8.6E-11	5.5E-08	8.0E-03	0.59
H1029/L0442	1.4E-10	4.8E-08	8.5E-03	0.58
H1031/L0395	1.5E-10	9.9E-08	4.6E-02	0.48
H1031/L0442	2.1E-10	8.9E-08	3.9E-02	0.47
H1032/L0395	4.2E-11	5.0E-08	4.1E-03	0.61
H1032/L0442	7.8E-11	4.3E-08	5.9E-03	0.61
H1037/L0395	9.4E-11	7.0E-08	1.5E-02	0.55
H1037/L0442	1.3E-10	6.1E-08	1.5E-02	0.57
H1040/L0395	2.6E-10	2.4E-07	4.6E-02	0.44
H1040/L0442	3.4E-10	1.4E-07	2.1E+01	0.49
H1041/L0395	8.0E-11	7.1E-08	1.3E-02	0.55
H1041/L0442	1.2E-10	6.1E-08	1.5E-02	0.56
H1046/L0395	1.8E-10	1.6E-07	1.2E-02	0.56
H1046/L0442	2.3E-10	1.1E-07	1.2E-02	0.55
H1047/L0395	9.5E-11	4.7E-08	6.0E-03	0.65
H1047/L0442	1.5E-10	4.7E-08	4.6E-03	0.64
H1048/L0395	1.5E-10	9.0E-08	6.4E-03	0.59
H1048/L0442	2.1E-10	6.7E-08	1.5E-02	0.59
H1049/L0395	2.5E-11	3.8E-08	4.0E-03	0.65
H1049/L0442	5.3E-11	3.3E-08	4.5E-03	0.65
H1050/L0395	6.6E-11	7.7E-08	5.0E-03	0.64
H1050/L0442	9.9E-11	5.4E-08	7.6E-03	0.64

[0812] 通过上述研究,获得H1009/L395,其是具有H1009-IgG1m(SEQ ID NO:48)作为重链和L395-k0MT作为轻链的抗体。

[0813] 如表15中所示,与H89/L118相比,H1009/L395在中性pH具有稍微增强的人IL-8-结合亲和力,但另一方面,在酸性pH具有减小的结合亲和力,即,pH-依赖性进一步加强。此外,当暴露于严格条件如在50℃在PBS中,与H89/L118相比,H1009/L395具有稍微改善的IL-8结合稳定性。

[0814] 因此,选择H1009/L395作为其在小鼠血浆中的中和活性可以稳定保持,同时保持其pH-依赖性IL-8结合能力的抗体。

[0815] (10-2)H1009/L395的稳定性评价

[0816] 接着,以与实施例8-3的方法类似的方式,评价H1009/L395的IL-8中和活性在小鼠血浆中是否稳定保持。本文中,使用H1009/L395-F1886s,其将在之后实施例15中详细描述。

该抗体具有与H1009/L395相同的可变区,和与天然人IgG1相比具有在酸性pH条件下增强Fc γ R结合的修饰和用于降低其对Fc γ R(s)的结合的修饰的恒定区。H1009/L395的可变区,尤其是HVR周围的区域,负责该抗体的人IL-8-结合和IL-8中和活性,并且引入恒定区的修饰被认为不影响这些性质。

[0817] 如下进行小鼠血浆的稳定性评价。将150 μ L的200mM磷酸盐缓冲液(pH 6.7)加入到585 μ L的小鼠血浆中。此外,叠氮化钠作为防腐剂以0.1%的终浓度加入。将每种抗体(Hr9, H89/L118,或H1009/L395-F1886s)以0.4mg/mL的终浓度加入上述小鼠血浆中。此刻,收集一部分样品作为初始样品。剩余样品储存在40 $^{\circ}$ C。开始储存后一周和二周,收集每种样品的一部分,并且将它们用作储存一周的样品和储存两周的样品。所有样品在-80 $^{\circ}$ C冷冻并储存,直到进行每个分析。

[0818] 人IL-8中和活性的测量使用表达人CXCR2的细胞,通过与实施例8-3相似的方法进行。然而,这次用于确认抗人IL-8抗体的中和活性的人IL-8的浓度是1.2nM。

[0819] 使用上述抗体与表达人CXCR2的细胞获得的人IL-8抑制测定的结果在图21-1(其显示对于初始样品(没有在小鼠血浆中的储存处理)的结果,图21-2(其显示对于在40 $^{\circ}$ C储存一周的样品的结果),和图21-3(其显示在40 $^{\circ}$ C储存两周的样品的结果)中显示。

[0820] 由此,出人意料地,甚至在将其在小鼠血浆中在40 $^{\circ}$ C储存两周后,人IL-8中和活性在H1009/L395-F1886s中保持,并且IL-8中和活性比在H553/L118的情形中更稳定保持。

[0821] (10-3)使用H1009/L395的小鼠PK测定

[0822] 通过以下方法评价由H1009/L395在小鼠中去除人IL-8的速率。H1009/L395、H553/L118和H998/L63用作抗体。通过实施例7中所示方法进行向小鼠的施用和血液收集,以及小鼠血浆中人IL-8浓度的测量。

[0823] 得到的人IL-8在血浆中的浓度的数据在图22中显示,并且人IL-8从小鼠血浆的清除率(CL)的值在表16中显示。

[0824] [表16]

抗体名称	人 IL-8 CL (mL/d/kg)		
	H998/L63	H553/L118	H1009/L395
#1	21.4	773.2	705.0
#2	27.5	497.6	777.3
#3	24.7	879.8	737.7
平均值 (N = 3)	24.5	716.9	740.0
标准差	3.0	197.2	36.2

[0826] 由此,当将H1009/L395以2mg/kg施用时,在小鼠中人IL-8去除的速率与H553/L118的相当,并且表明,H1009/L395实现体内中接近100%的游离IL-8。显示定量表示从小鼠血浆去除人IL-8的速率的清除率(CL)值是H998/L63的大约30倍高。

[0827] 没有特别限制,增加人IL-8去除速率的效果可以如下理解。通常,在以几乎恒定浓度保持抗原的活体中,抗原的产生速率和去除速率也将保持在几乎恒定值。当抗体在该条件施用时,甚至在抗原生产速率不受影响的情况下,抗原去除的速率可以由于抗原与抗体的复合物的形成而改变。通常,因为抗原-去除速率大于抗体-去除速率,在此种情况下,已经与抗体形成复合物的抗原的去除速率降低。当抗原去除速率降低时,血浆中的抗原浓度增加,但在此情况下增加程度也可以由当抗原单独存在时的去除速率与当抗原形成复合物

时的去除速率的比率定义。即,与抗原单独存在时的去除速率相比,如果形成复合物时的去除速率减少至十分之一,则施用抗体的生物的血浆中的抗原浓度可以比抗体施用前增加到大约十倍。本文中,清除率(CL)可以用作去除速率。更具体而言,向生物施用抗体后发生的抗原浓度的增加(抗原积累)可以由抗体施用前和抗体施用后每种条件下的抗原CL来定义。

[0828] 本文中,施用H998/L63和H1009/L395时人IL-8的CL大约30倍的差异的存在提示,将这些抗体施用给人时血浆中人IL-8浓度的提高水平之间可以存在大约30倍的差异。此外,血浆中人IL-8浓度的30倍的差异的产生表明,在各个条件下完全阻断人IL-8的生物活性所需的抗体的量将存在大约30倍的差异。即,与H998/L63相比,H1009/L395可以以大约1/30的量阻断血浆中IL-8的生物活性,这是非常小的抗体量。此外,当将H1009/L395和H998/L63以相同剂量单独地施用于人时,H1009/L395将能够长时期以较高强度阻断IL-8的生物活性。为了长时期阻断IL-8的生物活性,需要稳定保持IL-8中和活性。如实施例10中所示,使用小鼠血浆的实验阐明,H1009/L395可以长时期保持其人IL-8中和活性。还表明包括这些显著性质的H1009/L395,从体内中和IL-8的功效的角度是具有较好效果的抗体。

[0829] [实施例11]使用pH依赖性的IL-8结合抗体H1009/L395评价胞外基质结合

[0830] 如实施例10中所示的H1009/L395在消除人IL-8方面出色的30倍好的效果是出人意料的效果。已知,当施用pH-依赖性抗原结合抗体时的抗原去除速率取决于抗体-抗原复合物摄入细胞的速率。即,如果当具有抗原的复合物形成时(与不形成复合物时相比)pH-依赖性抗体摄入细胞的速率增加,则pH-依赖性抗体的抗原-去除效果可以增加。用于增加抗体摄入细胞的速率的已知方法包括赋予抗体在中性pH条件下结合FcRn的能力的方法(WO 2011/122011),用于增强抗体对Fc γ R(s)的结合能力的方法(WO 2013/047752),和使用促进含有多价抗体和多价抗原的复合物的形成的方法(WO 2013/081143)。

[0831] 然而,上述技术不用在H1009/L395的恒定区。此外,已知IL-8形成同源二聚体的同时,发现由H1009/L395结合的人IL-8以单体的形式存在,因为H1009/L395识别人IL-8的形成同源二聚体的表面。因此,这些抗体将不形成多价复合物。

[0832] 更具体而言,当上述技术不用于H1009/L395时,H1009/L395显示30倍高的人IL-8-去除效果。

[0833] 并非意在受理论约束,可以带来以H1009/L395为代表的pH依赖性的IL-8结合抗体的上述性质的可能因素如下所示。

[0834] 人IL-8是具有高等电点(pI)的蛋白,并且通过已知方法计算的理论等电点是大约10。即,在中性pH条件下,人IL-8是其电荷向正面转变的蛋白。由H1009/L395代表的pH依赖性的IL-8结合抗体也是电荷朝正面转变的蛋白,并且H1009/L395的理论等电点是大约9。即,通过H1009/L395(具有高等电点并且最初富含正电荷的蛋白)结合具有高等电点的人IL-8产生的复合物的等电点将比单独H1009/L395更高。

[0835] 增加抗体的等电点(其包括增加抗体上的正电荷数和/或减少抗体的负电荷数),可以被认为增加抗体-抗原复合物向细胞中的非特异的摄取。还有一种可能性,与单独抗IL-8抗体相比,抗IL-8抗体和具有高等电点的人IL-8之间形成的复合物的等电点更高,并且复合物可以更容易摄入细胞中。

[0836] 如之前描述的,对胞外基质的结合也是可能影响向细胞内摄取的因素。然后,检查单独抗体和具有人IL-8抗体的复合物之间在胞外基质结合方面是否存在差异。

[0837] (11-1)通过ECL(电化学发光)方法评价结合于胞外基质的抗体的量

[0838] 使用TBS(Takara,T903)将胞外基质(BD Matrigel基底膜基质/由BD制造)稀释至2mg/mL。将稀释的胞外基质以5μL每孔分散在MULTI-ARRAY 96孔板,高结合,Bare(由Meso Scale Discovery:MSD制造)中,并且在4℃固定过夜。然后,使用含有150mM NaCl,0.05%吐温20,0.5% BSA,和0.01% NaN₃的20mM ACES缓冲液(pH 7.4)进行封闭。

[0839] 要单独添加的抗体样品通过使用如下所示的缓冲液1将每种抗体稀释到9μg/mL,随后进一步用缓冲液2将它们稀释至3μg/mL的终浓度。

[0840] 缓冲液1:含有150mM NaCl,0.05%吐温20,和0.01% NaN₃的20mM ACES缓冲液,pH 7.4

[0841] 缓冲液2:含有150mM NaCl,0.05%吐温20,0.1% BSA,和0.01% NaN₃的20mM ACES缓冲液,pH 7.4

[0842] 另一方面,添加的抗体-人IL-8复合物样品如下制备:以十倍于抗体的摩尔浓度将人IL-8添加至抗体样品,然后使用缓冲液-1稀释每种抗体从而使抗体浓度分别变为9μg/mL,并且随后使用缓冲液-2将它们中的每个进一步稀释到3μg/mL的抗体终浓度。此时,人IL-8浓度是大约0.6μg/mL。将其在室温震荡一小时用于复合物形成。

[0843] 接着,从平板移除封闭溶液,将单独抗体或复合物的溶液加入所述平板,并且将此在室温震荡一小时。然后,在去除单独抗体溶液或复合物溶液后,加入含有0.25%戊二醛的缓冲液-1。然后,将平板静置10分钟后,将其用含有0.05%吐温20的DPBS(由Wako Pure Chemical Industries制造)洗涤。用于ECL检测的抗体通过使用Sulfo-标签NHS酯(由MSD制造)sulfo-标记山羊抗人IgG(γ)(由Zymed Laboratories制造)制备。将用于ECL检测的抗体用缓冲液-2稀释至1μg/mL,加入平板中,并且随后在暗处在室温震荡一小时。去除用于ECL检测的抗体,加入通过使用超纯水2倍稀释MSD读取缓冲液T(4x)(由MSD制造)产生的溶液,并且随后由SECTOR成像仪2400(由MSD制造)测量发光量。

[0844] 结果在图23中显示。有趣的是,发现所有抗IL-8抗体如H1009/L395几乎不显示像单独抗体一样的对胞外基质的任何结合(-IL8),但在与人IL-8形成复合物后与胞外基质结合(+hIL8)。

[0845] 如上文所述的,抗IL-8抗体通过结合人IL-8获得对胞外基质的结合能力的性质尚未从现有技术信息中阐述。此外,不受限制,将该性质与pH依赖性的IL-8结合抗体结合可以更有效地增加IL-8去除的速率。

[0846] [实施例12]使用非-FcRn结合抗体的小鼠PK测定

[0847] 使用以下方法确认人IL-8和pH依赖性的IL-8结合抗体之间的复合物是否形成以及在小鼠体内复合物摄入细胞是否增加。

[0848] 首先,产生包含H1009/L395的可变区和缺乏对各种Fc受体的结合亲和力的Fc区的突变体。具体而言,作为在酸性pH条件下用于缺失对人FcRn的结合能力的修饰,将重链H1009-IgG1在位置253用丙氨酸取代异亮氨酸和在位置254用天冬氨酸取代丝氨酸(根据EU编号)。此外,作为用于缺失对小鼠FcγR(s)的结合的修饰,将位置235处的亮氨酸用精氨酸取代,将在位置236处的甘氨酸用精氨酸取代,和将在位置239处的丝氨酸用赖氨酸取代。产生H1009-F1942m(SEQ ID NO:49)作为含有这些修饰中的四重的重链。此外,产生具有H1009-F1942m作为重链和L395-kOMT作为轻链的H1009/L395-F1942m。

[0849] 因为具有该Fc区的抗体在酸性pH条件下缺乏FcRn结合亲和力,所以其不从内体转移到血浆。因此,与具有天然Fc区的抗体相比,所述抗体在活体中从血浆快速去除。在该情况下,在将具有天然Fc区的抗体摄入细胞后,仅它们中不被FcRn营救的一部分在转移到溶酶体后被降解,但在具有不具有FcRn结合亲和力的Fc区的抗体的情况下,摄入细胞的所有抗体都在溶酶体中降解。更具体而言,在具有所述修饰的Fc区的抗体的情况下,施用的抗体从血浆去除的速率可以与结合入细胞的速率相当。即,细胞内摄取其FcRn结合亲和力被缺失的抗体的速率也可以通过测量这些抗体从血浆去除的速率来确认。

[0850] 然后,测试与H1009/L395-F1942m的摄取相比,H1009/L395-F1942m和人IL-8之间形成的复合物的细胞内摄取是否增加。具体而言,测试当单独施用抗体时和当与人IL-8形成复合物后施用抗体时抗体从血浆去除的速率是否将改变。

[0851] 评价在将抗人IL-8抗体单独施用给人FcRn转基因小鼠(B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg品系32+/+小鼠;Jackson Laboratories;Methods Mol.Biol.(2010)602:93-104)和将人IL-8和抗人IL-8抗体同时施用给人FcRn转基因小鼠时,抗人IL-8抗体各自的生物动力学。抗人IL-8抗体溶液(200 μ g/mL),和人IL-8(10 μ g/mL)和抗人IL-8抗体(200 μ g/mL)的混合溶液分别以10mL/kg施用于尾静脉一次。在该情况下,因为抗人IL-8抗体以足够超过人IL-8的量存在,所以认为几乎所有人IL-8结合于抗体。施用后五分钟、两小时、七小时、一天和两天收集血液。将收集的血液立即在4 $^{\circ}$ C和15,000rpm离心15分钟,获得血浆。将分离的血浆在设为-20 $^{\circ}$ C或以下的冰箱中储存,直到进行测量。

[0852] 通过电化学发光方法测量小鼠血浆中的抗人IL-8抗体浓度。首先,向使用含有5% BSA(w/v)的PBS-吐温溶液在室温封闭过夜的链霉亲和素Gold Multi-ARRAY板(Meso Scale Discovery),将抗人 κ 轻链山羊IgG Biotin(IBL)在室温反应一小时,产生固定有抗人抗体的平板。制备含有在血浆中浓度为3.20、1.60、0.800、0.400、0.200、0.100和0.0500 μ g/mL的抗人IL-8抗体的用于校准曲线的样品和稀释100倍或更高的用于小鼠血浆测量的样品。将每种样品与人IL-8混合,并且随后以50 μ L/孔分散在固定有抗人抗体的板中,并且随后在室温搅拌一小时。将人IL-8调节至333ng/mL的终浓度。

[0853] 然后,将具有小鼠IgG恒定区的抗人IL-8抗体(内部制备)加入板中,并让其在室温反应一小时。此外,将用SULFO-TAG NHS酯(Meso Scale Discovery)钆-标记的抗小鼠IgG(BECKMAN COULTER)加入板中,并且让其反应一小时。然后,在将读取缓冲液T(x1)(Meso Scale Discovery)分散到板中后,立即使用SECTOR成像仪2400(Meso Scale Discovery)进行测量。使用分析软件,SOFTmax PRO(Molecular Devices),基于校准曲线的响应计算抗人IL-8抗体浓度。

[0854] 由此获得的小鼠血浆中抗体浓度显示在图24中,并且在各个条件下的抗体清除率显示在表17中。

[0855] [表17]

[0856]

抗体名称	IL8	CL
	μ g/kg	mL/d/kg
H1009/L395-F1942m	-	134
H1009/L395-F1942m	100	291

[0857] 显示与H1009/L395-F1942m的摄取速率相比,细胞内摄取H1009/L395-F1942m和人

IL-8的复合物的速率增加至少2.2倍。本文中,因为作为可以是5倍、10倍或30倍的值的一种可能性包括在内的以下原因而标注为“至少2.2倍”。因为与去除H1009/L395-F1942m的速率相比,从小鼠血浆去除人IL-8的速率非常快,所以施用后血浆中人IL-8结合的H1009/L395-F1942m的比例快速降低。更具体而言,甚至当与人IL-8同时施用时,不是存在于血浆中的所有H1009/L395-F1942m都是人IL-8结合的形式,并且实际上,施用后大约七小时,它们中的大多数已经以游离形式抗体存在。因为在这种条件下评价摄取速率,所以即使与H1009/L395-F1942m的摄取速率相比,H1009/L395-F1942m和人IL-8的复合物的细胞内摄取速率实际增加五倍、十倍或30倍,也仅部分反映该实验系统的结果;因此,效果可以可能表示为大约2.2倍的增加。因此,从这些获得的结果,尽管与体内H1009/L395的实际细胞内摄取速率比较,显示H1009/L395和IL-8的复合物的细胞内摄取速率增加,但是该效果不限于获得的2.2倍增加的值。

[0858] 不特别限制,可以从目前获得的研究结果进行以下解释。当H1009/L395(其是pH依赖性的IL-8结合抗体)与人IL-8形成复合物时,该复合物具有更高的等电点并且比抗体单独存在时更多向正电荷转换。同时,与抗体单独的结合相比,复合物对胞外基质的结合增加。性质如等电点的升高和胞外基质结合的增强可以被认为是促进体内抗体摄入细胞的因素。此外,根据小鼠实验,与H1009/L395的摄取速率相比,H1009/L395和人IL-8的复合物的细胞内摄取速率也显示增加2.2倍或更高。由此,理论解释以及体外性质和体内现象一致地支持以下假说:H1009/L395和人IL-8形成复合物,促进复合物摄入细胞,并且导致人IL-8的去除的显著增加。

[0859] 迄今已经报道了多种针对IL-8的抗体,但迄今没有关于与IL-8形成复合物时对胞外基质的结合增加和复合物摄入细胞的增加的报道。

[0860] 此外,基于当抗体与IL-8形成复合物时观察到抗IL-8抗体的细胞内摄取的增加的研究结果,技术人员可以考虑,在血浆中与IL-8形成复合物的抗IL-8抗体快速摄入细胞,同时未与IL-8形成复合物的游离抗体倾向于保留在血浆中而不被摄入细胞。在该情况下,当抗IL-8抗体是pH-依赖性的时,摄入细胞的抗IL-8抗体在细胞中释放IL-8分子并且随后返回细胞外部,并且随后其能够结合另一IL-8分子;并且因此,复合物形成时细胞内摄取的增加可以具有更强烈去除IL-8的进一步效果。即,选择对胞外基质具有增加的结合的抗IL-8抗体或具有增加的细胞内摄入的抗IL-8抗体也是本公开的另一个方面。

[0861] [实施例13]使用计算机系统免疫原性预测pH依赖性的IL-8结合抗体h1009/L395

[0862] 接着,通过与实施例9-1相似的方法对于H1009/L395预测免疫原性得分和ADA产生频率。结果显示在表18和图25中。在图25中,H1009/L395称为“H1009L395”。

[0863] [表18]

抗体名称	重链		轻链		总共	
	EpiMatrix得分	tReg调节的Epx得分	EpiMatrix得分	tReg调节的Epx得分	EpiMatrix得分	tReg调节的Epx得分
hWS-4	62.44	12.18	22.64	-23.89	85.08	-11.71
H1004/L395	10.79	-39.47	7.79	-38.74	18.58	-78.21
H1009/L395	9.62	-40.64	7.79	-38.74	17.41	-79.38

[0865] 表18中的结果表明,H1009/L395具有与H1004/L395相同的低免疫原性得分水平。此外,根据图25中的结果,对于H1009/L395的预测的ADA产生频率为0%,并且这也与H1004/

L395的相似。

[0866] 因此,与已知抗人IL-8抗体hWS-4相比,对于H1009/L395预测的免疫原性大大减少。因此,认为H1009/L395在人中具有非常低的免疫原性,并且能够长期安全地保持抗IL-8中和活性。

[0867] [实施例14]在酸性pH条件下使用具有增强的FcRn结合能力的H89/L118变体的食蟹猴PK测定

[0868] 如上述实施例中所述,在抗体具有天然IgG1作为其恒定区的情况中,pH依赖性的IL-8结合抗体H1009/L395是具有较好性质的抗体。然而,所述抗体还可以用作在恒定区中含有氨基酸取代的抗体,例如,含有在酸性pH具有增强的FcRn结合的Fc区的那些,如实施例5中举例说明的。因此,H89/L118用于确认在酸性pH具有增强的FcRn结合的Fc区也可以在pH依赖性的IL-8结合抗体中行使功能。

[0869] (14-1)在酸性pH具有增强的FcRn结合的H89/L118Fc区-修饰的抗体的生产

[0870] 将实施例5-1中所述用于增强FcRn结合的各种修饰引入H89/L118的Fc区。具体而言,以下变体通过将用于F1847m、F1848m、F1886m、F1889m、F1927m和F1168m的修饰引入H89-IgG1的Fc区产生:

[0871] H89/L118-IgG1,其具有H89-IgG1m (SEQ ID NO:50) 作为重链和L118-KOMT作为轻链;

[0872] H89/L118-F1168m,其具有H89-F1168m (SEQ ID NO:51) 作为重链和L118-KOMT作为轻链;

[0873] H89/L118-F1847m,其具有H89-F1847m (SEQ ID NO:52) 作为重链和L118-KOMT作为轻链;

[0874] H89/L118-F1848m,其具有H89-F1848m (SEQ ID NO:53) 作为重链和L118-KOMT作为轻链;

[0875] H89/L118-F1886m,其具有H89-F1886m (SEQ ID NO:54) 作为重链和L118-KOMT作为轻链;

[0876] H89/L118-F1889m,其具有H89-F1889m (SEQ ID NO:55) 作为重链和L118-KOMT作为轻链;

[0877] H89/L118-F1927m,其具有H89-F1927m (SEQ ID NO:56) 作为重链和L118-KOMT作为轻链。

[0878] 使用这些抗体通过下述方法进行食蟹猴PK测定。

[0879] H89/L118-F22,其稍后描述在实施例中,也以相同的方式产生(具有H89-F22 (SEQ ID NO:106) 作为重链和L118-KOMT作为轻链)。

[0880] (14-2)含有新Fc区变体的抗体的食蟹猴PK测定

[0881] 将抗人IL-8抗体施用于食蟹猴后,评价抗人IL-8抗体的生物动力学。将抗人IL-8抗体溶液以2mg/kg静脉内施用一次。施用后五分钟、四小时、一天、两天、三天、七天、十天、14天、21天、28天、35天、42天、49天和56天收集血液。将收集的血液立即在4℃和15,000rpm离心十分钟,获得血浆。将分离的血浆在设为-60℃或以下的冰箱中储存,直到进行测量。

[0882] 食蟹猴血浆中的抗人IL-8抗体浓度通过电化学发光方法测量。首先,将抗hκ捕获Ab(Antibody Solutions)分散在MULTI-ARRAY 96-孔板(Meso Scale Discovery)中,并且

在室温搅拌一小时。然后,含有5% BSA (w/v)的PBS-吐温溶液用于在室温封闭两小时,制备固定有抗人抗体的平板。制备含有在血浆中浓度为40.0、13.3、4.44、1.48、0.494、0.165和0.0549 μ g/mL的抗人IL-8抗体的用于校准曲线的样品和稀释500倍或更高的用于食蟹猴血浆测量的样品,将50 μ L的溶液分散在固定抗人抗体的板的每个孔中,并将溶液在室温搅拌一小时。然后,向前述板中加入抗 κ 报告Ab,生物素缀合物(Antibody Solutions),并且使其在室温反应一小时。在进一步加入SULFO-TAG标记的链霉亲和素(Meso Scale Discovery)并使其在室温反应一小时后,将读取缓冲液T(x1) (Meso Scale Discovery)分散在板中,并且立即使用ECTOR成像仪2400(Meso Scale Discovery)进行测量。使用分析软件,SOFTmax PRO(Molecular Devices),基于校准曲线的响应计算抗人IL-8抗体浓度。

[0883] 对于每种抗体的半衰期($t_{1/2}$)和清除率(CL)获得的结果显示在表19中,并且食蟹猴血浆中抗体浓度的改变显示在图26中。

[0884] [表19]

[0885]	抗体名称	$t_{1/2}$ 天	CL mL/d/kg
	H89/L118-IgG1	11.9	2.95
	H89/L118-F1168m	24.1	3.21
	H89/L118-F1847m	27.9	2.09
	H89/L118-F1848m	25.3	1.74
	H89/L118-F1886m	45.1	1.34
	H89/L118-F1889m	39.5	1.75
	H89/L118-F1927m	30.3	2.13

[0886] 上述结果确认,与具有天然IgG1 Fc区的抗体相比,所有Fc区变体显示改善的血浆中保留。尤其是,H89/L118-F1886m显示最理想的血液动力学。

[0887] [实施例15]具有降低的对Fc γ R的结合能力的Fc区

[0888] 已知天然人IgG1的Fc区结合免疫系统的各种细胞的一种或更多种Fc γ 受体(下文,称为Fc γ R),并且呈现效应子功能如对靶细胞的ADCC和ADCP。

[0889] 另一方面,IL-8是可溶性细胞因子,并且主要预期用作药物的抗IL-8抗体通过在IL-8过量存在的位点处中和IL-8的功能而显示药学作用。所述IL-8过量存在的位点不特别限制,并且例如,可以是发炎的位点。通常已知在此种发炎的位点,各种免疫细胞聚集并被激活。经由Fc受体向这些免疫细胞传递不想要的激活信号和在不想要的细胞中诱导活性如ADCC和ADCP通常是不希望的。因此,不特别限制,从安全的角度,可以优选体内施用的抗IL-8抗体对Fc γ R具有低结合能力。

[0890] (15-1)具有降低的对Fc γ R的结合的修饰的抗体的生产

[0891] 将氨基酸修饰进一步引入H1009/L395-F1886m的Fc区,目的是降低对各种人和食蟹猴Fc γ R的结合能力。具体而言,H1009-F1886s(SEQ ID NO:37)通过将H1009-F1886m重链进行以下取代中的每一种产生:位置235处R替换L,位置236处R替换G,和位置239处K替换S(根据EU编号)。类似地,H1009-F1974m(SEQ ID NO:36)通过将H1009-F1886m在位置235处用R取代L和在位置236处用R取代G(根据EU编号),和将根据EU编号位置327至位置331的区域用天然人IgG4序列的该区域取代来产生。产生H1009/L395-F1886s和H1009/L395-F1974m,作为具有这些重链以及L395-kOMT作为轻链的抗体。

[0892] (15-2)对各种人Fc γ Rs的亲合力的确认

[0893] 接着,产生的H1009/L395-F1886s或H1009/L395-F1974m对人和食蟹猴中可溶形式的Fc γ RIa或Fc γ RIIIa的结合通过以下方法确认。

[0894] 对产生的H1009/L395-F1886s和H1009/L395-F1974m对人和食蟹猴中可溶性形式的Fc γ RIa和Fc γ RIIIa的结合,使用BIAcore T200(GE Healthcare)进行测定。人和食蟹猴中可溶性Fc γ RIa和Fc γ RIIIa由本领域技术人员已知的方法以His-标签标记的分子的形式产生。通过胺偶联方法将适量的rProtein L(BioVision)固定在传感芯片CM4(GE Healthcare)上并且捕获抗体。接着,将可溶性Fc γ RIa或Fc γ RIIIa与运行缓冲液(用作参照溶液)注射,并且使得与捕获在传感芯片上的抗体相互作用。HBS-EP+(GE Healthcare)用作运行缓冲液,并且HBS-EP+还用于稀释可溶性Fc γ RIa或Fc γ RIIIa。为了再生传感芯片,使用10mM pH 1.5的甘氨酸-HCl。所有测量在20℃进行。

[0895] 结果在图27中显示。本文中,用于人Fc γ RIa、人Fc γ RIIIa、食蟹猴Fc γ RIa和食蟹猴Fc γ RIIIa的符号分别具有相同的顺序:hFc γ RIa、hFc γ RIIIa、cynoFc γ RIa和cynoFc γ RIIIa。曾显示H1009/L395-F1886m与所有Fc γ R结合,但在另一方面,证实新产生的H1009/L395-F1886s和H1009/L395-F1974m不与任何Fc γ R结合。

[0896] (15-3)Fc变体的小鼠IL-8去除测定

[0897] 接着,对于产生的H1009/L395-F1886s和H1009/L395-F1974m,通过以下实验确认小鼠中抗体的人IL-8去除速率和血浆保留。本文中,H1009/L395-F1886s三个剂量,2mg/kg、5mg/kg和10mg/kg用于评价,因此也可以评估针对H1009/L395-F1886s的增加抗体剂量的效果。

[0898] 在同时施用人IL-8和抗人IL-8抗体至人FcRn转基因小鼠之后(B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg line 32+/+mouse;Jackson Laboratories;Methods Mol.Biol.(2010)602:93-104),评价人IL-8的生物动力学。人IL-8(10 μ g/mL)和抗人IL-8抗体(200 μ g/mL、500 μ g/mL或1000 μ g/mL)的混合溶液以10mL/kg通过尾静脉施用一次。在该情况下,因为抗人IL-8抗体以足够超过人IL-8的量存在,所以认为几乎所有人IL-8结合于抗体。施用后五分钟、两小时、四小时、七小时、一天、两天、三天、七天、14天、21天和28天,收集血液。将收集的血液立即在4℃和15,000rpm离心15分钟,获得血浆。将分离的血浆在设为-20℃或以下的冰箱中储存,直到进行测量。

[0899] 通过类似于实施例7的方法测量小鼠血浆中的人IL-8浓度。将得到的关于血浆中人IL-8浓度的数据在图28中显示,并且人IL-8从小鼠血浆的清除率(CL)的值在表20中显示。

[0900] 首先,当比较2mg/kg施用组时,显示具有天然IgG1的Fc区的H1009/L395和具有修饰的Fc区的H1009/L395-F1886s具有相当的人IL-8去除作用。

[0901] 接着,当H1009/L395-F1886s抗体的剂量改变时,在2mg/kg和10mg/kg之间未观察到人IL-8清除率值的显著差异,而在施用一天后,血浆IL-8中存在微小的差异。这有力地表明,即使当以高剂量施用该抗体时,包含H1009/L395可变区的抗体也显示出足够的IL-8去除作用。

[0902] [表20]

[0903]

抗体名称	剂量	人IL-8CL (mL/d/kg)
------	----	-------------------

H1009/L395	2mg/kg	740
H1009/L395-F1886s	2mg/kg	628
H1009/L395-F1886s	5mg/kg	458
H1009/L395-F1886s	10mg/kg	560

[0904] (15-4)Fc区变体的食蟹猴PK测定

[0905] 接着,食蟹猴中抗体的血浆保留通过使用H1009/L395-F1886s或H1009/L395-F1974m的以下方法验证。

[0906] 在单独施用抗人IL-8抗体或同时施用人IL-8和抗人IL-8抗体至食蟹猴后,评价抗人IL-8抗体的生物动力学。将抗人IL-8抗体溶液(2mg/mL)或人IL-8(100pg/kg)和抗人IL-8抗体(2mg/kg)的混合溶液以1mL/kg静脉内施用一次。施用后五分钟、四小时、一天、两天、三天、七天、十天、14天、21天、28天、35天、42天、49天和56天收集血液。将收集的血液立即在4℃和15,000rpm离心十分钟,获得血浆。将分离的血浆在设为-60℃或以下的冰箱中储存,直到进行测量。

[0907] 通过实施例14的方法测量食蟹猴血浆中的抗人IL-8抗体浓度。得到的血浆中抗人IL-8抗体浓度的数据示于图29中,且来自食蟹猴血浆的抗人IL-8抗体的半衰期($t_{1/2}$)和清除率(CL)的值示于表21。

[0908] 首先,与具有天然人IgG1的Fc区的Hr9和H89/L118相比,具有改善功能的Fc区的H1009/L395-F1886s显示具有显著延长的血浆保留。

[0909] 此外,当H1009/L395-F1886s与人IL-8同时施用,血浆浓度的变化等于单独施用抗体时的血浆浓度的变化。不受特别限制,以下讨论可能来自此发现。如上所述,与单独摄取H1009/L395相比,H1009/L395和人IL-8的复合物的细胞内摄取已显示增加。一般地,认为高分子量蛋白质非特异性地或以受体依赖性方式并入细胞中,然后被转移至溶酶体并通过存在于溶酶体中的各种降解酶降解。因此,如果蛋白质摄入细胞的速率增加,则该蛋白质的血浆保留也可能更差。然而,在抗体的情况下,它具有通过内体中的FcRn返回血浆的性质;因此,只要通过FcRn功能充分地营救,即使细胞内摄取速率加快,血浆保留也可不受影响。本文中,即使当H1009/L395-F1886s与人IL-8同时施用于食蟹猴时,血浆保留也不受影响。这表明,虽然对于H1009/L395-F1886s,抗体摄入细胞的速率增加,但该抗体被FcRn充分营救使得它可以返回血浆。

[0910] 此外,另一种Fc变体H1009/L395-F1974m也显示出与H1009/L395-F1886s相当的血浆保留。虽然这些Fc变体已经引入了具有降低结合至如上所述的各种Fc γ R的能力的不同修饰,但已显示它们不影响抗体本身的血浆保留。从上文来看,与具有天然IgG1 Fc区的抗体相比,H1009/L395-F1886s和H1009/L395-F1974m在食蟹猴中的血浆保留被显著延长并且非常令人满意。

[0911] [表21]

[0912]

	$t_{1/2}$	CL
	天	mL/d/kg
Hr9	20.26	3.72
H89/L118	11.88	2.95
H1009/L395-F1886s	35.75	1.64

H1009/L395-F1886s+hIL-8	72.24	1.11
H1009/L395-F1974m+hIL-8	43.78	1.60

[0913] 如上述实施例中所示,H1009/L395是一种抗体,其作为抗体首次实质化,所述抗体可通过具有pH依赖性IL-8结合能力以及当与IL-8复合时快速并入细胞中的特征显著增加人体IL-8在体内的去除速率。此外,由于与已知的hWS-4抗体相比,H1009/L395在中性pH条件下的IL-8-结合亲和力也增加,因此H1009/L395可在中性pH条件下(例如在血浆中)更强烈地中和人IL-8。另外,它是在血浆条件下具有优异稳定性的抗体,并且即使在体内施用后其IL-8中和活性也不降低。而且,基于Hr9(其生产量与hWS-4相比已显著提高)构建的H1009/L395是从生产量的观点来看适合于制造的抗体。此外,在计算机(in silico)免疫原性预测中,H1009/L395表现出非常低的免疫原性得分,与已知的hWS-4抗体和市场上可得的现有的一些现有抗体相比,其显著降低。具体地,因为ADA不太可能在人体内产生,所述预期H1009/L395是可以长期安全使用的抗体。因此,与已知的抗人IL-8抗体相比,H1009/L395是从各种观点来看已得到改善的抗体,并且作为药剂非常有用。

[0914] 如上所述,具有天然IgG的Fc区的H1009/L395是充分有用的;然而,包含功能上改善的Fc区的H1009/L395变体也可以适当地用作其有效性已得到改善的抗体。具体地,通过在酸性pH条件下增加FcRn结合以及改善血浆中的保留,其效果可以持续更长时间。此外,包含Fc区的变体(其中已经引入了修饰以降低Fc γ R结合能力)避免了在所施用的生物的体内免疫系统细胞的意外活化、细胞毒活性的发展等,并且可以作为高度安全的抗体药物使用。此类Fc特别优选包括但不限于本文所述的F1886s和F1974m。包含其他修饰的Fc区的抗体药物也可用作本发明的实施方案,只要它们具有相似的功能即可。

[0915] 因此,包括H1009/L395-F1886s和H1009/L395-F1974m的本公开的抗体可以保持允许安全且长时间地强烈抑制人IL-8的生物活性的状态。该抗体已经达到了现有抗IL-8抗体无法达到的水平,并且预期可用作极高质量的抗IL-8抗体药物。

[0916] [实施例16]测量子宫内膜异位症患者的囊液中IL-8的浓度

[0917] 测定子宫内膜异位症患者囊液中IL-8的浓度,以评估IL-8在子宫内膜异位症中的参与。作为样本,从在自治医科大学(Jichi Medical University)接受手术的子宫内膜异位症患者的手术后组织收集囊液,并且在第一次匿名化后,样本在中外制药株式会社(Chugai Pharmaceutical Co.,Ltd.)接受第二次匿名化。囊液中的IL-8的浓度通过电化学发光法测量。首先,在用生物素标记后,将抗人IL-8抗体(Hycult Biotech)等分到MSD GOLD 96-孔链霉亲和素SECTOR板(Meso Scale Discovery)中,该板已使用含有5%(w/v) BSA的PBS-吐温溶液封闭2小时,并且在黑暗中室温摇动1小时以制备固定抗人IL-8抗体的板。制备含有在囊液中的浓度为900、300、100、33.3、11.1、3.70或1.23pg/ml的人IL-8(参照NP_000575.1内部制备)的标准曲线样品和稀释了5倍或更多的人囊液测量样品,并以25 μ l体积等分到固定抗人IL-8抗体的板的每个孔中,然后在黑暗中室温搅拌1小时。然后,使SULFO-TAG标记的抗人IL-8抗体(内部制备)在黑暗中室温反应1小时后,将读取缓冲液T(x1)(Read Buffer T(x1))(Meso Scale Discovery)等分并使用SectorOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)立即进行测量。使用分析软件SOFT Max PRO(Molecular Devices),基于标准曲线响应计算人IL-8的浓度。

[0918] 如图30中所见,结果显示子宫内膜异位症患者的囊液中IL-8的浓度为10000pg/ml

或更高,因此是相当高的。这表明IL-8在子宫内膜异位症中的重要性。

[0919] [实施例17]手术诱导的子宫内膜异位症的猴模型的制备和病理状况的评估

[0920] 制备手术诱导的子宫内膜异位症模型,并进行评估以检查抗IL-8抗体针对子宫内膜异位症的药物功效。病理模型如下制备。

[0921] 具有规律性周期的8至14岁的雌性食蟹猴(由国立研究开发法人医疗基盘健康营养研究所Tsukuba灵长类动物研究中心的提供(Tsukuba Primate Research Center at the National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition))在对应于黄体期的期间在麻醉下进行剖腹手术。通过以V形解剖去除子宫体。然后,将子宫体切成5至10mm的立方体,同时留下子宫的平滑肌层,并将一片和两片分别移植到右腹壁和左腹壁(头侧和尾侧)上,以如下方式,子宫内膜部分通过用可吸收缝合线缝合与腹膜接触,并形成移植物。切除后,用可吸收的缝合线缝合子宫。然后,将剩余的子宫内膜组织细切并悬浮在5ml的2ng/ml肝细胞生长因子溶液(R&D系统)中,将其接种在腹膜腔中用于移植,然后关闭腹部。使用氯胺酮/甲苯噻嗪(以约2:1的适当比例混合)的平衡麻醉进行麻醉;然而,根据麻醉的维持期,用异氟烷维持麻醉。在手术期间使用加热垫维持和控制体温,并且通过心电图监测情况。在手术后苏醒时施用拮抗剂Antisedan(与甲苯噻嗪的量基本相同)和抗生素头孢拉定。手术后给予疼痛缓解剂Zalban持续两天,并且每天定期观察猴子以确认没有手术后异常。在腹腔镜观察中,麻醉和术后监测也以相同的方式进行。

[0922] 在上述手术诱导子宫内膜异位症后四个月、九个月(施用后3个月)和12个月(施用后6个月)进行腹腔镜观察,子宫内膜异位症的病理状况评估如下。

[0923] 在麻醉下在中线将腹部切开,并通过插入套管针然后引入腹腔镜进行腹腔镜观察。腹腔镜连接到视频系统(KARL STORZ)和监视器。监视器用于腹膜内观察,视频系统用于记录。然后,使用腹腔内充气单元(OLYMPUS)向腹膜腔充满二氧化碳气体以使腹部膨胀,并从腹侧部分插入刻度棒和钳。使用刻度棒或刻度钳测量病变的尺寸。

[0924] 测量通过缝合子宫内膜组织形成的结节性病变的尺寸(宽度、高度和深度),并基于宽度(mm)x高度(mm)x深度(mm)计算体积。基于修改的r-AFS评分(其针对来自用于临床用途的r-AFS评分的猴子修改)通过腹腔镜观察针对黏连位置、面积和深度以及病变的尺寸评估通过细切后接种子宫内膜组织形成的病变和粘连。如图31所示,修改的r-AFS评分针对猴子有以下两种修改:

[0925] 1.添加了与膀胱子宫陷凹粘连的项目,因为在猴子模型中,与膀胱粘连的频率高于人。用于评估对膀胱的粘连的方法与用于粘连到子宫直肠窝的评分相同。

[0926] 2.由于猴子的身体和器官尺寸比人类的小,因此将病变尺寸评分的标准改为:<3mm、3-10mm以及>10mm.。

[0927] 通过确认使用视频系统记录的腹腔镜观察的视频,在稍后的日期完成腹腔镜评估。

[0928] 基于诱导后4个月的腹腔镜观察结果,选择符合标准的个体并进行分组。选择标准如下:

[0929] 1.在诱导后4个月的腹腔镜观察中证实了子宫内膜移植物(endometrial transplant)的植入。

[0930] 2.在诱导后和施用前的期间,确认了月经出血三次或更多次。

[0931] 分组分两次进行。在基于每个个体中结节病变的平均体积和可测量的病变的数量的随机化之后,最终将6个个体分配至载体组,并且将7个个体分配至抗体H1009/L395-F1974m施用组。为了确认组之间没有偏差,使用针对所有最终分配的个体的数据进行Kruskal-Wallis检验。评估的项目是结节病变(针对每个病变)的体积、体重、尺寸r-AFS评分和粘连r-AFS评分。

[0932] [表22]

[0933]	组	剂量	施用方法	动物 ID
	载体组	—	s.c., q4w	#101, #102, #103, #110, #115, #120
	H1009/L395-F1974m 组	10 mg/kg	i.v., q4w	#105, #106, #112, #117, #119, #121, #123

[0934] 从诱导后6个月开始施用,每4周一次,持续6个月,进行6次。在抗体施用组中H1009/L395-F1974m以10mg/kg通过静脉内注射施用,而在载体组中His缓冲液(20mM His-Asp, 150mM Arg-Asp(pH6.0))皮下施用。为了评估子宫内膜异位症的病理状况,在开始施用后每三个月进行腹腔镜观察,即在初次施用后3个月和6个月。

[0935] 在开始施用后6个月后的最终的腹腔镜观察后,在补充麻醉后通过放血使猴子安乐死。进行尸检以收集盆腔内器官(右侧和左侧卵巢、右侧和左侧输卵管、右侧和左侧输卵管系膜、右侧和左侧输卵管伞、右侧和左侧子宫阔韧带、子宫、阴道、子宫直肠窝以及膀胱子宫陷凹),包括移植部位。将收集的组织用10%中性缓冲的福尔马林固定,并将石蜡包埋的组织样品的薄片用苏木精和伊红(HE)染色。组织和通过缝合诱导的病变也被切割以收集累积的囊液(如果有的话)。

[0936] 载体对照组的腹腔镜观察的结果显示结节性病变的形成(其在诱导后4个月通过缝合子宫内膜组织形成),以及在诱导后12个月(施用后6个月)结节性病变和邻近的黑色囊肿的进一步形成。而且,由于子宫内膜组织的细切和接种,在子宫直肠窝和膀胱中观察到粘连的形成(图32)。此外,如图33所示,在诱导后12个月尸检时收集的载体组的组织样品的HE染色显示在移植的子宫内膜组织(初始移植)直至肌肉腹壁层附近密集地形成增殖性子宫内膜上皮。子宫内膜上皮周围的区域由多层基质细胞和富含胶原纤维的间质构成,因此观察到类似于人子宫内膜异位症组织结构的结构形成。这些结果表明该模型用作有用的子宫内膜异位症模型(12th World Congress on Endometriosis, 2014, P-221)。类似地,还有关于使用狒狒作为外科手术诱导的子宫内膜异位症模型的方法的报道(Fertil Steril. 2013;99(3):783-789, Fertil Steril. 2013;100(4):1144-50)。

[0937] 此外,在诱导后12个月(施用后6个月)最终的腹腔镜观察后进行尸检。收集累积的囊液,并通过电化学发光法测量载体组囊液中IL-8的浓度。首先,将抗体H1009/L395-F1974m的溶液等分到MULTI-ARRAY 96-孔板(Meso Scale Discovery)中,并让该板在4℃下静置过夜以制备固定抗体H1009/L395-F1974m的板。制备在缓冲液中浓度为269、108、43.0、17.2、6.89、2.75或1.10pg/ml的猴IL-8(参照XM_005555087.1内部制备)的标准曲线样品和稀释了50倍或更多的猴囊液测量样品,并等分到固定抗体H1009/L395-F1974m的板的每个孔中,然后在黑暗中室温搅拌两小时。然后,将兔抗IL-8抗体(Hycult Biotech)在黑暗中室温反应一小时。然后,将SULFO-TAG标记的抗兔抗体(Meso Scale Discovery)在黑暗中室温

反应一小时后,将读取缓冲液T(x1) (Meso Scale Discovery) 等分并立即使用SectorOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)进行测量。使用分析软件SOFT Max PRO (Molecular Devices),基于标准曲线响应计算猴IL-8的浓度。如表23中所见,结果显示,与人子宫内膜异位症患者的囊液相似,手术诱导的子宫内膜异位症猴模型的囊液中IL-8的浓度显著高。该发现支持猴模型对人子宫内膜异位症是高度可外推的。此外,评估每个个体的囊液中IL-8的浓度与粘连r-AFS评分的相关性。有趣的是,如图34-1所示,囊液中IL-8的浓度倾向于与粘连r-AFS评分相关。当在个体中测量几种囊液IL-8浓度时,使用最高值用作代表值。该结果表明IL-8参与子宫内膜异位症的粘连。

[0938] [表23]

[0939]	在囊液中的IL-8的浓度(ng/mL)		
	#101	46.4	
	#102	0.726	
	#103	9.83	
	#110	58.3	
	#115	476	28.8 25.0
	#120	417	

[0940] 在抗体H1009/L395-F1974m施用组和载体组中在施用开始后6个月通过腹腔镜观察进行药物功效评估。经分析,在6个月的施用期间发现月经出血少于3次的个体被排除在分析之外。在该检查中的个体中,来自抗体H1009/L395-F1974m施用组#117 (10mg/kg组)的个体落在其下,因此被排除在分析之外。在抗体H1009/L395-F1974m施用组中,抗体检测通过本领域技术人员已知的方法进行。检测抗体,并发现六个中的两个个体中的API血液低谷浓度降低。通过包括抗抗体阳性个体来进行下述分析。

[0941] 首先,计算通过缝合子宫内膜组织形成的每个结节性病变的体积,并根据它们的尺寸和随时间的变化进行分类,如下表24所示。诸如由于粘连而无法随时间评估的病变未包括在分析中。

[0942] [表24]

[0943]	类型		
	A: 增殖性, ≥ 500 mm ³	在施用后6个月显著生长至500 mm ³ 或更大	
	B: 增殖性, <500 mm ³	在施用后6个月小于500 mm ³ , 且与施用前相比的施用后的生长趋势	
	C: 没有变化	在施用期间尽管提高/降低, 但没有显著的变化	
	D: 降低	与施用前相比, 施用后的降低趋势	

[0944] 如表25中所见,如下结果显示在载体组中:显示增殖的A型和B型的频率高达54% (7/13病变),并且显示减少的D型低至15% (2/13病变),而在抗体H1009/L395-F1974m施用组中,显示降低的D型的频率高达58% (7/12病变)。因此,显示抗体H1009/L395-F1974m的施用具有减少结节病变的效果。

[0945] [表25]

组	A: 增殖性, ≥500 mm ³	B: 增殖性, <500 mm ³	C: 没有变化	D: 降低
[0946] 载体	8%	46%	31%	15%
	(1/13)	(6/13)	(4/13)	(2/13)
H1009/L395-F1974m 10 mg/kg	0%	8%	33%	58%
	(0/12)	(1/12)	(4/12)	(7/12)

[0947] 而且,通过下面的计算程序计算针对每个个体的结节病变的相对体积,以评估抗体H1009/L395-F1974m对结节病变的药物功效(结节病变的相对体积(%) = 施用开始后6个月所选病变的体积总和/施用开始前2个月所选病变的体积总和) × 100)。结果如图34-2所示。结节病变的相对体积针对载体组为141% (67-331) (中值(最小值-最大值))且针对抗体H1009/L395-F1974m施用组为49% (15-156)。与载体组相比,通过施用抗体H1009/L395-F1974m显著降低结节病变(P=0.0492)。参数t检验(显著性水平:P<0.05)用于统计学分析。结果显示通过抗IL-8抗体抑制结节病变体积增加的效果。

[0948] 接下来,基于“修改的r-AFS评分”评估通过子宫内膜组织的细切和接种形成的病变(lesion)以及粘连,以检查抗体H1009/L395-F1974m施用组(N=6)和载体组(N=6)中的药物功效。通过下述程序计算“修改的r-AFS评分的变化”,以看到每个个体中抗体施用前后的变化。结果如图35-1所示。

[0949] 总r-AFS评分的变化 = 总r-AFS评分(施用后) - 总r-AFS评分(施用前)

[0950] 粘连r-AFS评分的变化 = 粘连r-AFS评分(施用后) - 粘连r-AFS评分(施用前)

[0951] 尺寸r-AFS评分的变化 = 尺寸r-AFS评分(施用后) - 尺寸r-AFS评分(施用前)

[0952] 与载体组相比,抗体H1009/L395-F1974m施用组的“总r-AFS评分的变化”和“粘连评分的变化”明显降低(p=0.0070, p=0.0096)。与载体组相比,抗体H1009/L395-F1974m组中“尺寸r-AFS评分的变化”也倾向于降低。统计分析使用统计分析软件(SAS Institute)通过非参数Steel检验(non-parametric Steel test) (显著性水平:针对双侧检验的5%)进行。通过抗体H1009/L395-F1974m的施用显著降低“粘连评分变化”的结果以及如上图34-1所示,在囊液中IL-8浓度与“粘连r-AFS评分”之间存在相关性趋势的结果,表明IL-8与子宫内膜异位症中的粘连密切相关,且抗IL-8抗体可用于改善子宫内膜异位症中的粘连。

[0953] 图35-1显示了基于腹腔镜手术期间记录的图像评估的“修改的r-AFS评分的变化”。图35-2显示了基于医师在腹腔镜手术期间记录的评分的“总修改的r-AFS评分”。初次施用之前两个月的评分用作施用前的评分。通过对相应进行的Wilcoxon符号秩和检验,对每组施用前后的“总修改的r-AFS评分”的变化进行统计学分析。结果(显著性水平:P<0.05)显示施用组中的评分在载体组中显著增加(P=0.0313),但在抗体H1009/L395-F1974m施用组中评分没有变化(P=0.875)。由于“总修改的r-AFS得分”代表子宫内膜异位症的病理性恶性肿瘤,此结果显示通过抗IL-8抗体抑制子宫内膜异位症病理恶化的效果。

[0954] 在最终的腹腔镜观察后,将在尸检时收集的移植物和被移植部位HE染色并在光学显微镜下观察组织病理学。结果,与载体组相比,在抗体H1009/L395-F1974m施用组中观察到增殖性上皮细胞和基质细胞的萎缩性变化以及主要成分为胶原纤维的间质减少,如图36中所见。并且,在保持API血液浓度的抗抗体阴性个体中效果特别强(表26)。尽管在载体组

中观察到D型病变(#102-L2和#115-R) (其显示出结节病变体积减小的趋势), 但该结节病变的病理结果未显示萎缩或间质减少, 因此病变得以维持。虽然用抗体H1009/L395-F1974m施用的组包括B型个体 (其表现出结节性病变的体积增加的趋势), 但结节性病变的病理结果显示基质的萎缩性改变和#106-L1中的间质减少, 证明病理状况的改善。此外, 在载体组的56% (9/16) 中观察到含铁血黄素, 但仅在24% (4/17) 的抗体施用组中观察到含铁血黄素, 表明通过抗体施用抑制了巨噬细胞或单核细胞的浸润。而且, 在抗体施用组中观察到在载体组中未见的肌肉组织再生, 并且此数据表明侵入肌肉层的病变已经退化并被肌肉组织取代。当根据已侵入腹壁肌层的子宫内膜异位症腺体管的存在评估深部病变的存在时, 载体组与包含抗抗体阳性个体的抗体H1009/L395-F1974m施用组之间没有太大差异; 然而, 当排除抗抗体阳性个体时, 与载体组中的5/18病变相比, 抗体H1009/L395-F1974m施用组的频率低至1/11病变。因此, 还提示该抗体具有抑制深部病变形成的效果。

[0955] [表26]

[0958] 这些结果表明,抗IL-8抗体具有减少子宫内膜异位症病变体积、改善粘连、诱导上皮细胞和基质细胞萎缩性改变、减少免疫细胞浸润和改善纤维化的药物功效,证明抗IL-8抗体可用作子宫内膜异位症的治疗剂。基于上述结果,本领域技术人员自然会理解IL-8信号抑制剂可用作子宫内膜异位症的治疗或预防剂。

[0959] [实施例18]抗IL-8抗体针对子宫腺肌病的药物功效

[0960] 在手术诱导的子宫内膜异位症猴模型中抗体施用开始后6个月的最终的腹腔镜观察后,在尸检期间收集的子宫用10%中性缓冲福尔马林固定并HE染色用于观察。在载体组的一个案例以及在抗体施用组的一个案例中,在子宫中强烈地观察到类似于子宫腺肌病的子宫内膜组织。在这两只食蟹猴中观察的子宫内膜组织显示出在人子宫中看到在子宫肌层中具有子宫内膜腺体和子宫内膜基质的子宫腺肌病的病理学特征。因此,将该猴子视为人子宫腺肌病并发症模型,并比较这些单个病例的子宫肌层(myometria)中的子宫内膜组织。如图37所示,与载体组相比,在抗体H1009/L395-F1974m施用组中,观察到子宫腺肌病病变中子宫内膜上皮的萎缩以及基质细胞的减少和萎缩。该发现显示抗IL-8抗体也对子宫腺肌病具有抑制效果。基于上述结果,本领域技术人员自然会理解IL-8信号抑制剂可用作子宫腺肌病的治疗或预防剂。

[0961] [实施例19]子宫内膜异位症组织中CXCR1和CXCR2表达的分析

[0962] CXCR1和CXCR2被称为人IL-8受体。为了检查IL-8在子宫内膜异位症病变中起作用的细胞,手术切除的人子宫内膜异位症组织的石蜡包埋块使用小鼠抗人CXCR1单克隆抗体(R&D Systems,目录号:42705)和小鼠抗人CXCR2单克隆抗体(Abcam,目录号:19)免疫组化染色。从这些石蜡块制备薄片组织,并与作为第一抗体的抗CXCR1和CXCR2的抗体一起孵育。然后,与聚合物-HRP缀合的山羊抗小鼠IgG抗体(Dako)作为第二抗体反应,并使用二氨基联苯胺(Wako Pure Chemical Industries)进行可视化。结果显示CXCR1和CXCR2在基质细胞中是阴性的,如表27中所见。同时,CXCR1和CXCR2均在浸润到组织中的中性粒细胞以及含有含铁血黄素沉积物的巨噬细胞和单核细胞中呈阳性,并且还发现它们在上皮细胞中的表达呈弱阳性。此外,观察到CXCR1和CXCR2在血管内皮细胞中都是弱阳性的。这些发现表明IL-8对子宫内膜异位症上皮细胞具有直接的药理效应的可能性以及经由浸润免疫细胞(诸如中性粒细胞和巨噬细胞)的药理效应的可能性。

[0963] [表27]

	CXCR1 (IL-8RA)			CXCR2 (IL-8RB)		
	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
[0964] 具有基质细胞的子宫内膜上皮细胞	±	±	-	-	±	-
不具有基质细胞的子宫内膜上皮细胞	+	+	+	+	+	+
基质细胞的	-	-	-	-	-	-
中性粒细胞(neutrophils)	+	+	+	+	+	+
充满含铁血黄素的巨噬细胞(Hemosiderin-laden macrophage)	+	+	+	+	+	+
单核细胞*	+	+	+	+	+	+
血管内皮细胞	±	±	±	±	±	±

[0965] *:巨噬细胞样细胞

[0966] NA:无应用

[0967] -:阴性,+阳性,±:部分阳性

[0968] [实施例20]抗IL-8抗体针对手术后粘连的药物功效

[0969] 在上述手术诱发的子宫内膜异位症食蟹猴模型中,在腹腔镜观察所有个体中观察到与腹壁切口部位周围区域的粘连,这与在剖腹手术后发生的子宫内膜异位症的粘连不

同。诱导后4个月(抗体施用之前2个月)。为了检查抗IL-8抗体在手术后针对粘连的药物功效,个体的数量被匿名化,并且腹壁上切口部位周围区域的粘连通过比较施用之前两个月腹腔镜观察的结果和在施用开始后6个月最终腹腔镜观察的照片来评估。具体地,在施用前后比较对腹壁上切口部位周围区域的粘连,并由五个评价者以三点量表评价:(1)改善的、(2)稳定的和(3)进展的。采用五个评价者中三个或更多个评价者达成共识的评级;否则(2)使用稳定的。对载体组中的6只猴子以及抗体H1009/L395-F1974m施用组中的7只猴子进行评价。图38显示了载体组和抗体H1009/L395-F1974m施用组中腹膜腔的代表性照片。如表28所示,在载体组中的六只猴子中,五只是“稳定”而一只只是“进展的”,而在抗体H1009/L395-F1974m施用组中,七只猴子中虽然一只只是“进展的”但有六只是“改善的”。具有“进展的”的猴子是在其中抗体H1009/L395-F1974m的血液浓度由于抗抗体产生而降低的个体。上述发现表明抗IL-8抗体可用作手术后粘连改善治疗剂或预防剂。基于上述结果,本领域技术人员自然会理解IL-8信号抑制剂可用作粘连的治疗或预防剂。

[0970] [表28]

组	改善的	稳定的	进展的
载体	0/6	5/6	1/6
H1009/L395-F1974m 10mg/kg	6/7	0/7	1/7

[0972] [实施例21]中性粒细胞的分离和IL-8引起的中性粒细胞迁移的评估

[0973] IL-8对中性粒细胞具有趋化活性。已经认为受损组织产生的IL-8促进粘连于血管内皮细胞的中性粒细胞向组织的迁移并诱导与中性粒细胞浸润相关的炎症。如表27所示,在子宫内膜异位症病变部位也观察到中性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞的浸润,并且在这些免疫细胞中CXCR1表达和CXCR2表达均为阳性。此外,表达在上皮细胞中也呈相对于阳性的弱阳性,表明IL-8对子宫内膜异位症上皮细胞具有直接的药理效应的可能性以及经由浸润免疫细胞(诸如中性粒细胞和巨噬细胞)的药理效应的可能性。在这种情况下,本发明人评估了,作为第一步,中性粒细胞对IL-8的迁移能力。从健康个体的外周血中收集中性粒细胞,并如下文所述进行分离和纯化。

[0974] 将肝素处理的全血与1/5体积的HetaSep(STEMCELL Technologies)组合。根据产物的方案收集含有有核细胞的上清液,然后向其中加入ACK溶液(GIBCO)以诱导溶血。溶血后,将细胞悬浮于0.1%BSA/PBS中以确定细胞计数。细胞计数测量后,根据产品方案,使用EasySep(注册商标)Human Neutrophil Enrichment Kit(STEMCELL technologies)和EasySep(注册商标)Magnet(STEMCELL technologies)调整细胞计数并分离中性粒细胞。分离后,使用抗CD66b抗体和抗CD45RA抗体通过FACS评估中性粒细胞以确认其纯度。

[0975] 使用Migration Plate for CytoSelect(注册商标)96-孔细胞迁移试验(Cell Biolabs,目录号:CBA-104)来评估分离的中性粒细胞的迁移能力。膜下方的底层是进料盘,向其加入1%FBS或1%FBS+IL-8(100ng/ml)和150μl补充有各种抗体、化合物或对照溶剂的RPMI-1640培养基(SIGMA)。评价对象如下:作为抗体,每种10μg/ml:H1009/L395-F1974m、抗IL-8中和抗体抗IL-8抗体[807](abcam,目录号:ab18672)和抗IL-8抗体[6217](abcam,目录号:ab10768)和IgG1(Sigma,目录号:I5154)作为阴性对照;作为化学化合物,10μM的CXCR2抑制剂SRT3109(上海皓元化学科技有限公司(Shanghai Haoyuan Chemexpress),目录号:HY-15462);和作为对照培养基,PBS和DMSO。膜上方的顶层是膜室,悬浮在无血清

RPMI-1640培养基中的中性粒细胞以50000个细胞/孔接种在该室中。在孵育2小时后,使用CellTiter-Glo(注册商标)发光细胞活力测定(Promega),基于相对化学发光的量检测已迁移到底层进料盘的活细胞(中性粒细胞)的数量。将没有添加IL-8的孔的平均相对化学发光量取为1,以计算添加各种试剂时相对化学发光量的相对值。结果如图39所示。

[0976] 结果显示通过IL-8的中性粒细胞迁移的促进,以及通过各种抗IL-8中和抗体和CXCR2抑制剂的中性粒细胞迁移的抑制。上述结果令人信服地支持这样的观点,即不仅IL-8抑制剂而且还有广泛的IL-8信号抑制剂如已知参与IL-8信号抑制的CXCR1抑制剂和CXCR2抑制剂抑制中性粒细胞迁移。因此,结果还令人信服地表明IL-8信号抑制剂抑制子宫内膜异位症中以及在其中IL-8浓度高的病变中的中性粒细胞的浸润。因此,通过概括和扩展这些结果,本领域技术人员将充分理解IL-8信号抑制剂能够预防子宫内膜异位症以及已知在其中IL-8浓度高的炎症性疾病。

[0977] [实施例22]中性粒细胞对子宫内膜异位症细胞的作用

[0978] 接下来,检查子宫内膜异位症细胞以评估浸润子宫内膜异位症病变的中性粒细胞如何起作用。子宫内膜异位症细胞通过以下步骤获得。通过手术切除的人子宫内膜异位症组织在含有0.5mg/ml胶原酶和0.1mg/ml DNase 1的DMEM/F-12,HEPES(GIBCO)培养基中细切,并在37℃温育后收集细胞。使细胞悬浮液通过100μm细胞过滤器,然后向其中加入裂解缓冲液(BD Biosciences)以诱导溶血。溶血后,接种细胞,将传代的细胞在液氮中冷冻并作为子宫内膜异位症细胞储存。使用补充有10%FBS,2.5μg/ml两性霉素B,100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的DMEM/F-12,HEPES进行培养。冷冻储存的细胞在用于实验之前引发(were initiated)。

[0979] 将中性粒细胞培养上清液加入到通过上述方法获得的子宫内膜异位症细胞中,并评估子宫内膜异位症细胞的反应性。为了制备中性粒细胞培养物上清液,将分离的中性粒细胞悬浮在含有1%FBS的RPMI-1640培养基中,并以 3.0×10^6 细胞/孔接种在6-孔板中。培养一天后收集培养上清液。将子宫内膜异位症细胞以10000个细胞/孔接种在96-孔板中,并使其占培养基体积的一半的方式向其中加入收集的中性粒细胞培养物上清液。同样地,对于对照组(在本公开的实施例中也称为“对照”),使其占培养基体积的一半的方式添加含有1%FBS的RPMI-1640培养基。8小时后,除去培养基并使用RNeasy 96试剂盒(QIAGEN)根据产物的方案纯化RNA。使用SuperScript(注册商标)VIL0(注册商标)MasterMix(Invitrogen)从纯化的RNA合成cDNA,并通过实时PCR比较芳香酶mRNA的表达水平。使用的探针是用于芳香酶的Taqman探针Hs00903411_m1(Thermo Fisher)和人GAPD(GAPDH)内源对照(Applied Biosystems,目录号:4326317E)用于GAPDH测定。

[0980] 在将芳香酶的表达水平与GAPDH的表达水平归一化后,当对照为1时,芳香酶的相对表达水平显示在图40中。证实了芳香酶的表达水平在添加了中性粒细胞培养上清液的子宫内膜异位症细胞中增加。

[0981] 芳香酶是一种雌激素合成酶,已知雌激素可促进子宫内膜异位症上皮细胞的增殖。通过添加中性粒细胞培养物上清液,子宫内膜异位症细胞中的芳香酶表达增强,并且该发现表明中性粒细胞浸润到子宫内膜异位症病变中增加子宫内膜异位症细胞中的芳香酶表达水平,这增强了子宫内膜异位症上皮细胞的增殖。因此,推测通过使用IL-8信号抑制剂抑制中性粒细胞浸润到子宫内膜异位症病变中,子宫内膜异位症上皮细胞的增殖受到抑

制。上述推测也由如下发现支持：在手术诱导的子宫内膜异位症猴模型的抗体H1009/L395-F1974m施用组中，增殖性上皮细胞萎缩。

[0982] [实施例23]分析由中性粒细胞产生的趋化因子和细胞因子

[0983] 接下来，在IL-8存在或不存在下或在抗IL-8抗体存在下分析在中性粒细胞中产生何种趋化因子、细胞因子和生长因子。将分离的中性粒细胞悬浮在含有1%FBS的RPMI-1640培养基中，并以 1.5×10^6 细胞/孔接种到6-孔板中。向其中添加或不添加IL-8，或向其中添加IL-8和各种抗体，并将中性粒细胞培养一天。分别加入终浓度为10 μ g/ml的抗体H1009/L395-F1974m、抗IL-8抗体[807] (ab18672) 和IgG1，并加入终浓度为100ng/ml的IL-8。一天后，收集细胞培养液，使用针对Luminex(注册商标)平台(Thermo Fisher)的细胞因子人磁性30-Plex平板，根据产品的方案测定细胞培养液中各种细胞因子、趋化因子和生长因子的浓度。

[0984] 如图41所示，结果显示细胞培养液中MCP-1(单核细胞趋化蛋白1)的浓度通过添加IL-8而强烈升高，并且该升高由抗IL-8中和抑制。

[0985] MCP-1也称为CCL2，对单核细胞具有趋化活性。认为MCP-1促进单核细胞迁移和浸润到局部炎症部位。如表26所示，在手术诱导的子宫内膜异位症猴模型的结节病变中，抗体H1009/L395-F1974m施用组中含铁血黄素减少，并且此发现表明了通过抗体施用抑制了巨噬细胞或单核细胞的浸润。由于对单核细胞具有趋化活性的MCP-1是通过IL-8刺激中性粒细胞产生的，上述结果表明，在应答IL-8时，中性粒细胞可能浸润到子宫内膜异位症病变中并产生MCP-1，其导致单核细胞和巨噬细胞迁移并浸润到病变部位中。

[0986] 此外，已知MCP-1作用于成纤维细胞并促进胶原蛋白的产生(J Biol Chem.1996年7月26日;271(30):17779-84)，并且有许多报道描述MCP-1在体内增强组织纤维化(J Immunol.1994年11月15日,153(10):4733-41;Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2004年5月,286(5):L1038-44;J Invest Dermatol.2003年9月;121(3):510-6)。这表明，在对IL-8的应答中，中性粒细胞浸润到子宫内膜异位症病变部位中并进一步产生MCP-1，从而除了增强单核细胞和巨噬细胞的迁移和浸润之外还增强子宫内膜异位症病变部位的纤维化。上述结果表明，通过使用IL-8信号抑制剂抑制中性粒细胞的浸润改善子宫内膜异位症病变部位的纤维化。实际上，如图36和表26所示，在抗体H1009/L395-F1974m施用组的手术诱导的子宫内膜异位症猴模型的结节病变部位中观察到主要成分为胶原纤维的间质的降低，从而证明药物治疗改善纤维化的药物功效。上述结果令人信服地支持IL-8信号抑制剂针对子宫内膜异位症中的纤维化是有用的。通过概括和扩展这些结果，本领域技术人员将充分理解IL-8信号抑制剂可以治疗或预防子宫内膜异位症以及各种纤维化疾病中的纤维化。

[0987] [实施例24]术后粘连诱导的猴子模型的制备和病理状况的评估

[0988] (24-1)手术后粘连诱导的猴子模型的制备

[0989] 为了制备手术后粘连诱导的模型，在如下麻醉下处理9至16岁的雌性食蟹猴(由生物医学创新、健康和营养国立研究所Tsukuba灵长类动物研究中心的提供)。使用氯胺酮/甲苯噻嗪(以约2:1的适当比例混合)和异氟烷的平衡麻醉进行麻醉。在腹壁的中线制作5至6cm的切口。打开腹部后，在子宫体上切开1厘米，用单根缝线缝合4针。然后，整个子宫用纱布拂拭(brush)五次。接下来，在距离腹壁切开的中线2cm处对右腹壁腹膜部分制作1cm的切

口,并使用可吸收缝线通过4针的连续缝合术缝合。缝合后,将缝合的部分用纱布拂拭五次。同样地,将左腹壁的腹膜切开,缝合并用纱布拂拭。最后,通过10至11针连续缝合术缝合腹壁的中线。整个步骤在一小时或更短时间内完成。在手术后苏醒时施用拮抗剂Antisedan (与甲苯噻嗪的量基本相同)和抗生素头孢拉定。然后,手术后给予疼痛缓解剂Zalban持续两天,并且每天定期观察猴子以确认没有手术后异常。在腹腔镜观察,麻醉和术后监测也以相同的方式进行。

[0990] (24-2) 术后粘连诱导模型中抗IL-8抗体的药物功效评估

[0991] 抗IL-8抗体施用组中的动物在手术后1小时或更短时间以10mg/kg静脉内施用抗IL-8抗体H1009/L395-F1974m以诱导上述手术后粘连。对照组未经治疗。施用抗IL-8抗体后24至35天,进行腹腔镜检查以观察由于切口、缝合和用纱布拂拭而形成的粘连。在麻醉下在中线将腹部切开,并通过插入套管针然后引入腹腔镜进行腹腔镜观察。腹腔镜连接到视频系统(KARL STORZ)和监视器。视频系统用于记录,监测器用于腹膜内观察。使用刻度棒或刻度钳测量粘连的尺寸。在腹腔镜观察期间评估粘连的存在、范围和位置。结果如表29所示。腹腔镜观察的结果显示,在未治疗组的两只猴子的整个切口部位都观察到粘连。尽管在抗IL-8抗体施用组中的个体206号个体中发现了粘连,但在201号个体的右腹壁腹膜和左腹壁或子宫切口部位未发现粘连。因此,证明了抗IL-8抗体的防粘连效果。该结果表明抗IL-8抗体可用作粘连预防剂。本领域技术人员自然会理解,抗IL-8抗体可通过适当改变施用时间等发挥更强的粘连形成预防效果。另外,基于上述结果,本领域技术人员自然会理解IL-8信号抑制剂可用作粘连预防剂。

[0992] [表29]

		切口部位			
		腹壁			子宫
		中线	腹膜(右侧)	腹膜(左侧)	
[0993] 未治疗的	#202	○	○	○	○
	#204	○	○	○	○
抗IL-8抗体	#201	○	×	×	×
	#206	○	○	○	○

[0994] ○=发现粘连

[0995] ×=无粘连

[0996] [实施例25] 从单核细胞分化的巨噬细胞中IL-8的功能分析和抗IL-8抗体对其药效的评估

[0997] 购买来自健康人的外周血中作为CD14阳性部分分离的单核细胞(A11 Cells,目录编号:PB011-P-F-2),并将其储存在-80℃。当在实验中使用,将细胞解冻并如下所述使用。将细胞在37℃水浴解冻,向其中加入含有DNase I(STEMCELL Technologies,目录号:07900)和10%FBS的培养基。在高速离心机中离心后,除去上清液。重复该步骤后,将细胞悬浮在充足体积的培养基中以确定细胞计数。培养单核细胞用于体外分化成巨噬细胞,并分析连接组织生长因子(CTGF)在IL-8存在和不存在之间的表达变化。CTGF是促进纤维化的因子。将单核细胞悬浮在含有10%FBS和25ng/ml GM-CSF(SIGMA)的RPMI-1640培养基(SIGMA)中,并接种在培养板中。将细胞培养7天,同时每隔两天或三天更换一半培养上清液。七天

后,除去培养上清液,将100ng/ml IL-8和各种抗体加入含有10%FBS,20ng/mL IFN- γ (SIGMA)和10pg/ml LPS(Wako Pure Chemical Industries)的RPMI-1640培养基中,在其中培养细胞3天。

[0998] 评估的抗体是:抗体H1009/L395-F1974m、抗IL-8抗体[807] (abcam,目录号:ab18672)、抗IL-8抗体[6217] (abcam,目录号:ab10768)、抗IL-8抗体(Becton Dickinson,目录号:BD554726)和抗IL-8抗体(Becton Dickinson,目录号:BD555717);它们以10 μ g/ml的浓度使用。作为阴性对照,IgG1 (SIGMA,目录号:I5154)以10 μ g/ml的浓度使用。

[0999] 培养三天后,收集细胞,并使用RNeasy Mini Kit (QIAGEN)根据产品方案纯化RNA。使用SuperScript VILO MasterMix (Thermo Fisher)从纯化的RNA合成cDNA,并通过实时PCR估计CTGF mRNA的表达水平。使用的探针是用于CTGF的Taqman探针Hs00170014_m1 (Thermo Fisher)和用于18SrRNA测定的真核生物18SrRNA内源对照(Thermo Fisher,目录号:E4319413E)。

[1000] 用18S rRNA标准化CTGF的表达水平。归一化值如图42所示。在没有添加IL-8的情况下,在从单核细胞分化的巨噬细胞中未观察到CTGF表达。同时,在添加IL-8的情况下,分化的巨噬细胞中CTGF表达增加。该结果表明IL-8具有诱导在从单核细胞分化的巨噬细胞中CTGF表达升高的功能。此外,当抗IL-8抗体与IL-8同时加入时,未观察到CTGF表达的升高。显示通过IL-8的CTGF表达的升高被各种抗IL-8抗体抑制。基于上文描述的结果,本领域技术人员自然会理解IL-8是参与纤维化进展的因素,并且IL-8信号抑制剂诸如抗IL-8抗体可用作的治疗剂或预防剂用于纤维化疾病。

[1001] [参考实施例1]构建用于具有氨基酸取代的IgG抗体的表达载体

[1002] 通过在动物细胞表达载体中插入含有使用QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)通过所附说明书中描述的方法制备的变体的质粒片段来构建感兴趣的H链表达载体和L链表达载体。通过本领域技术人员已知的方法测定制备的表达载体的核苷酸序列。

[1003] [参考实施例2] IgG抗体的表达和纯化

[1004] 通过下述方法进行抗体表达。将人胚胎肾癌来源的HEK293H细胞系(Invitrogen)悬浮于含有10%胎牛血清(Invitrogen)的DMEM培养基(Invitrogen)中,并以细胞密度为 5×10^5 至 6×10^5 个细胞/ml,以用于贴壁细胞的皿(直径10cm,CORNING),每皿10ml接种。在CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂)中孵育一天一夜后,通过抽吸除去培养基,并向其中加入6.9ml CHO-S-SFM-II (Invitrogen)培养基。通过脂质转染法将制备的质粒导入细胞。收集所得培养上清液,离心(约2000g,持续5分钟,室温)以除去细胞,并通过0.22 μ m过滤器MILLEX (R) -GV (Millipore)进行灭菌以获得培养上清液。使用rProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences),通过本领域技术人员已知的方法纯化获得的培养上清液。使用分光光度计测量280nm处的吸光度测定纯化抗体的浓度。使用通过Protein Science 1995, 4:2411-2423中描述的方法测定的消光系数,由测定的值计算抗体浓度。

[1005] 工业性应用

[1006] 本发明证明抗IL-8抗体等可用作子宫内膜异位症等的治疗和/或预防剂。本发明可用于减少子宫内膜异位症病变的体积、改善粘连,诱导上皮细胞和基质细胞中的萎缩性变化、减少免疫细胞的浸润、改善纤维化等。

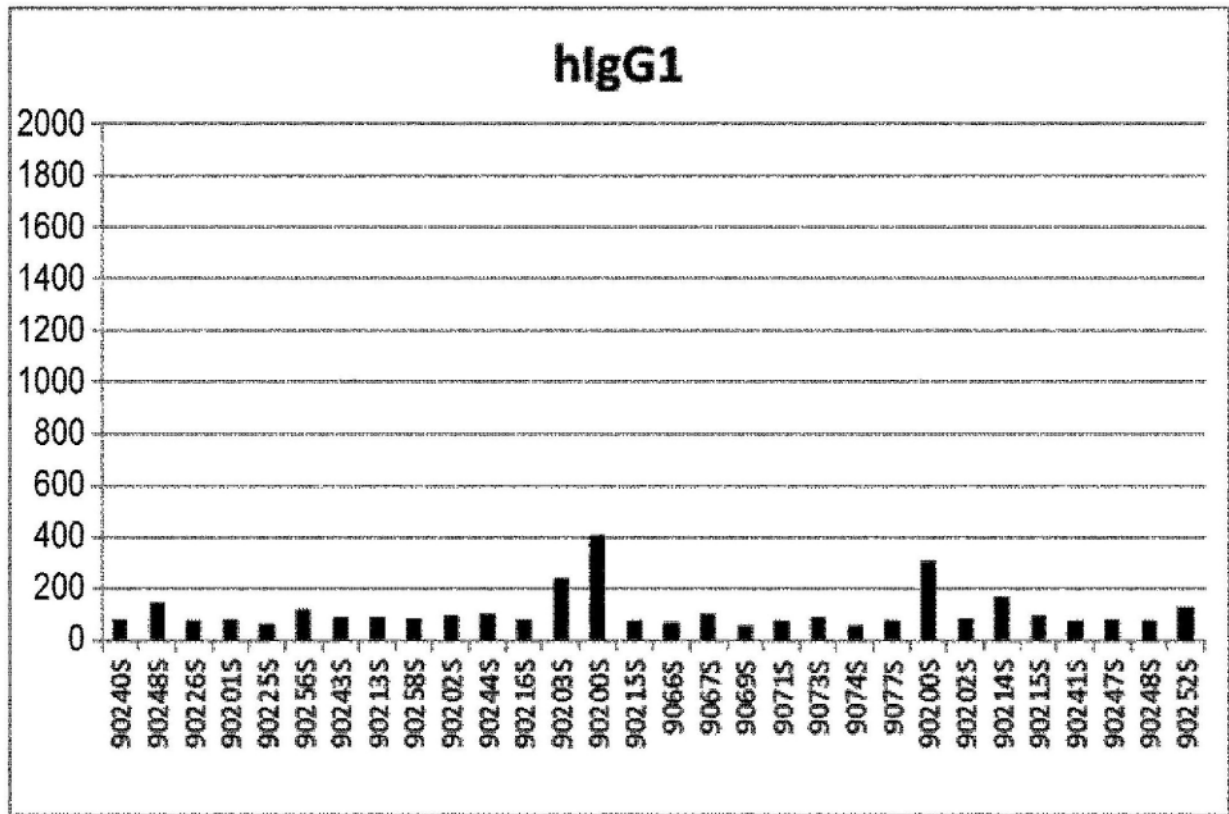


图1

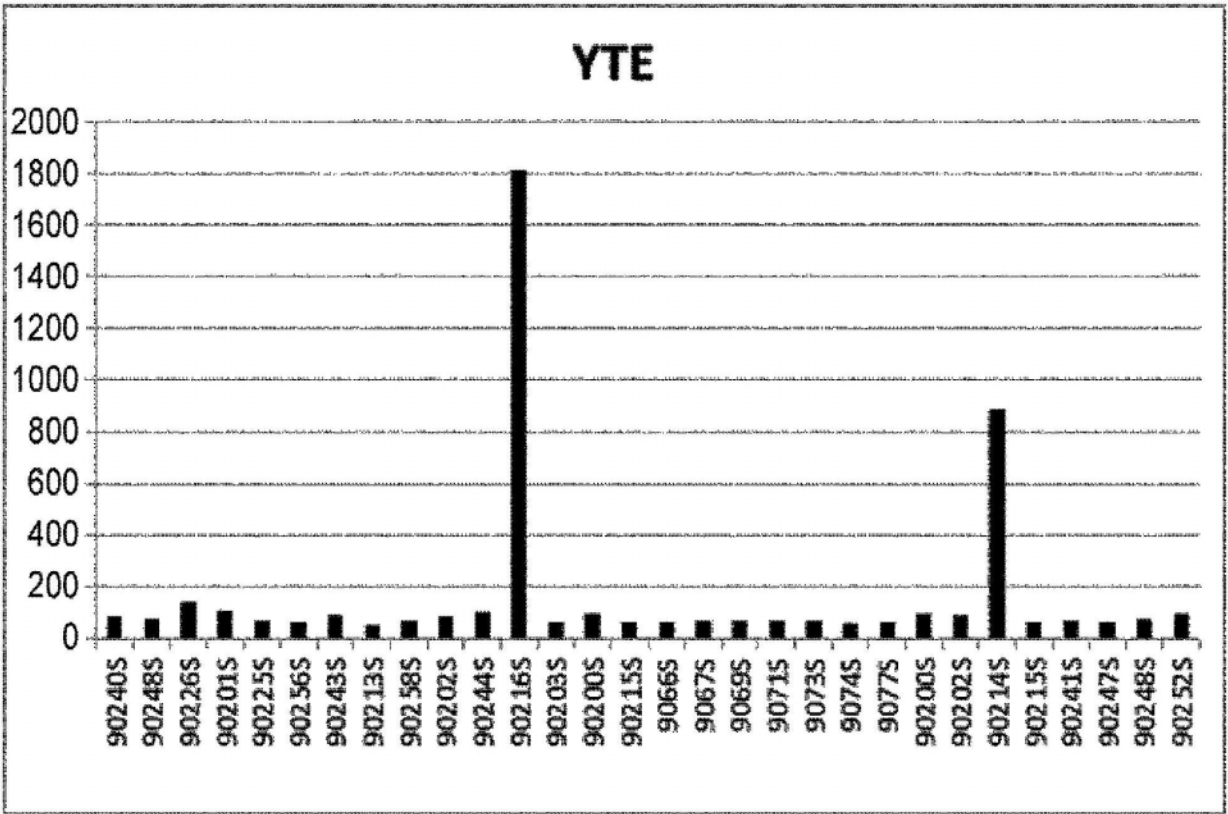


图2

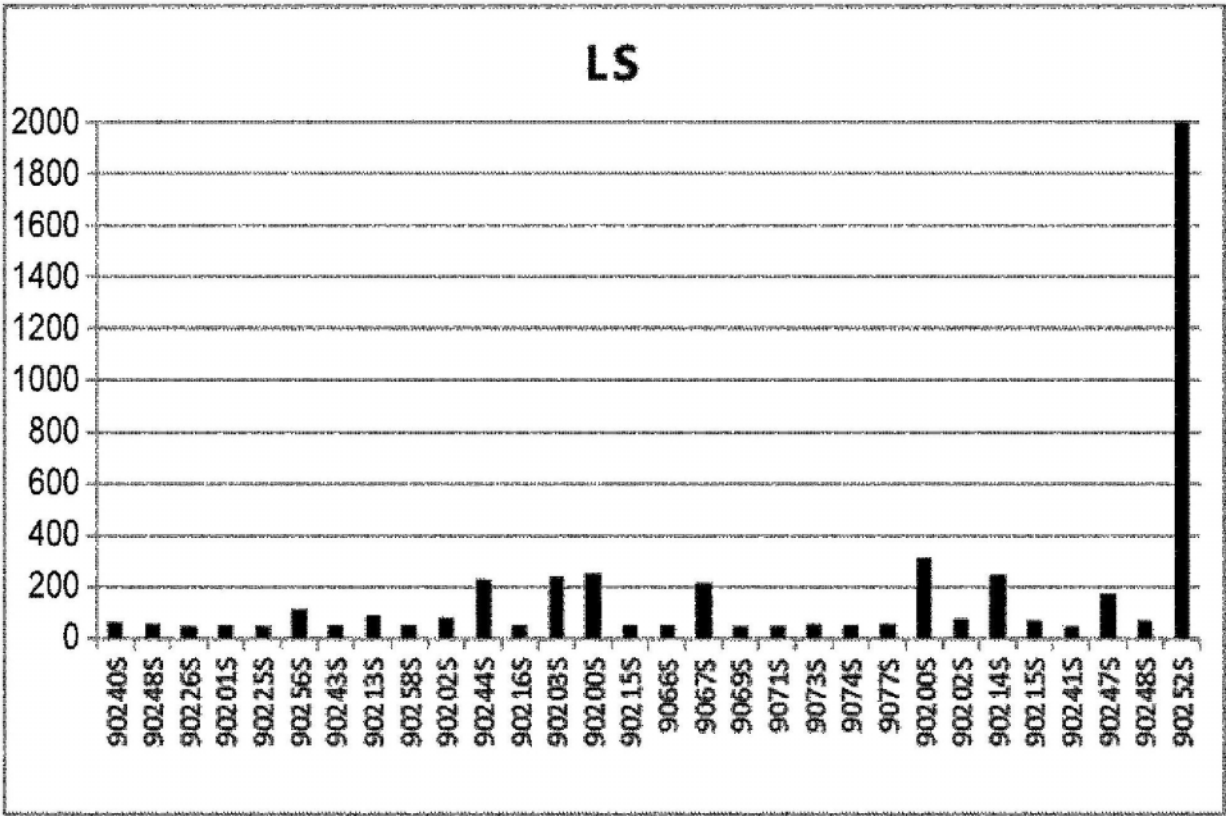


图3

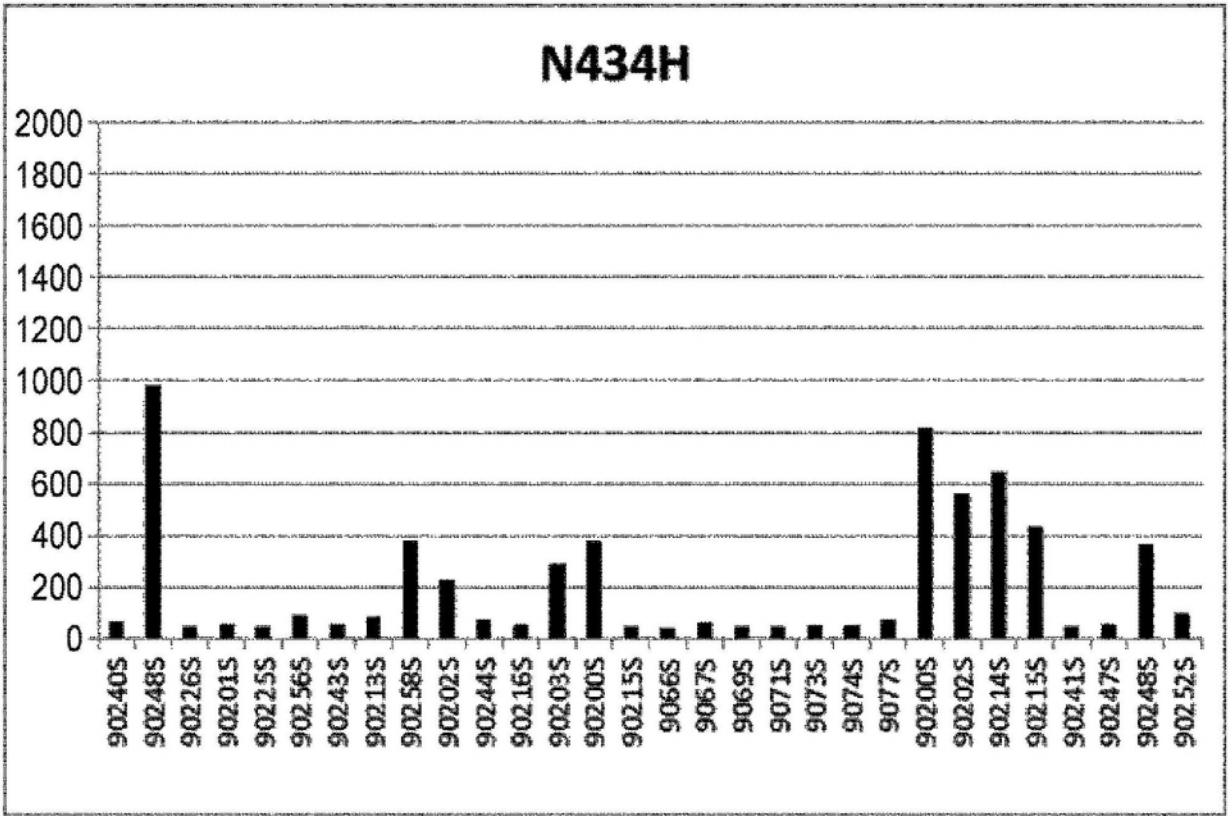


图4

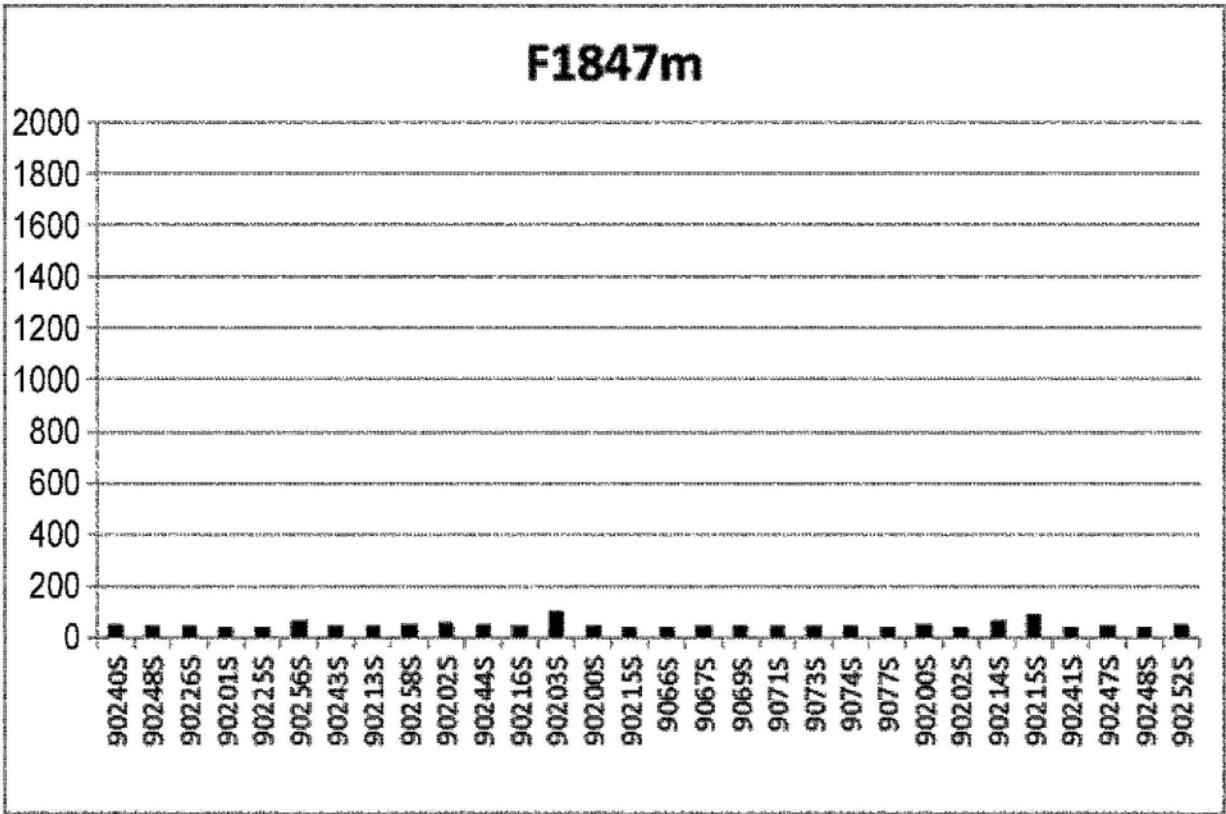


图5

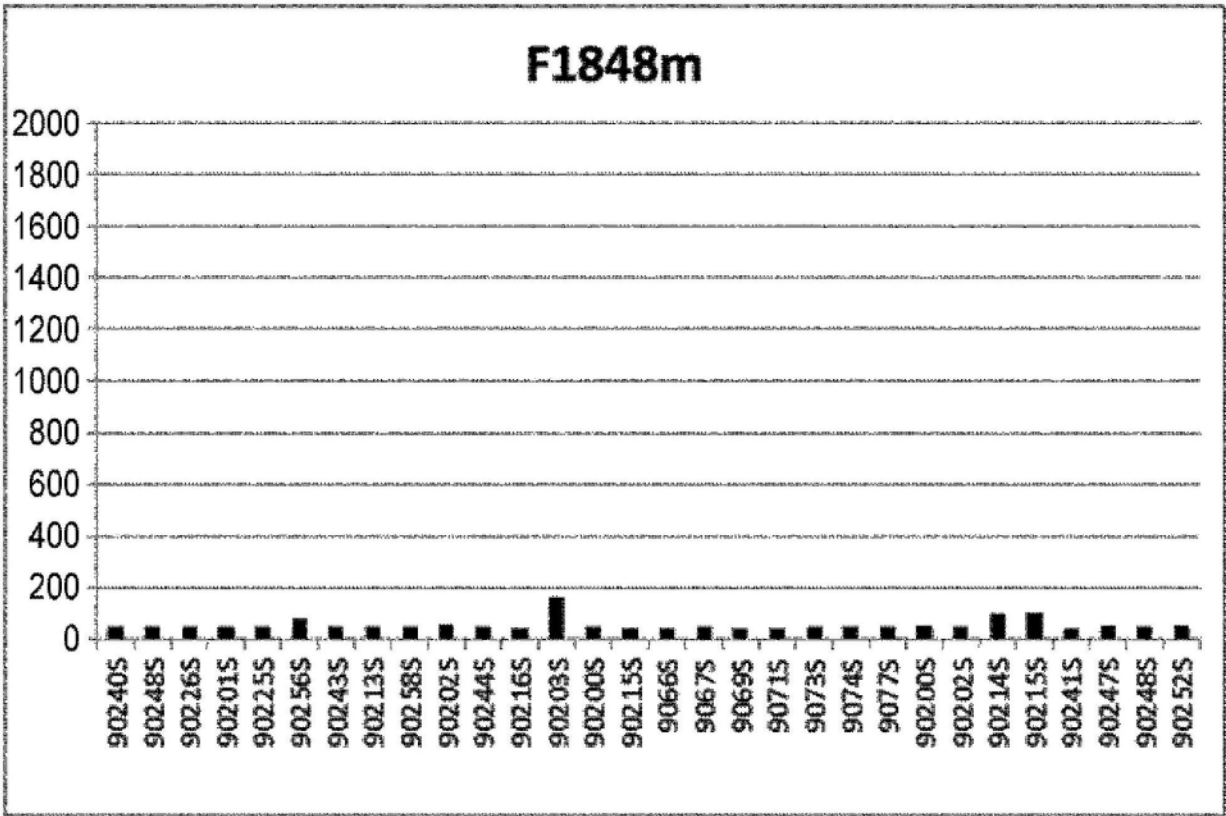


图6

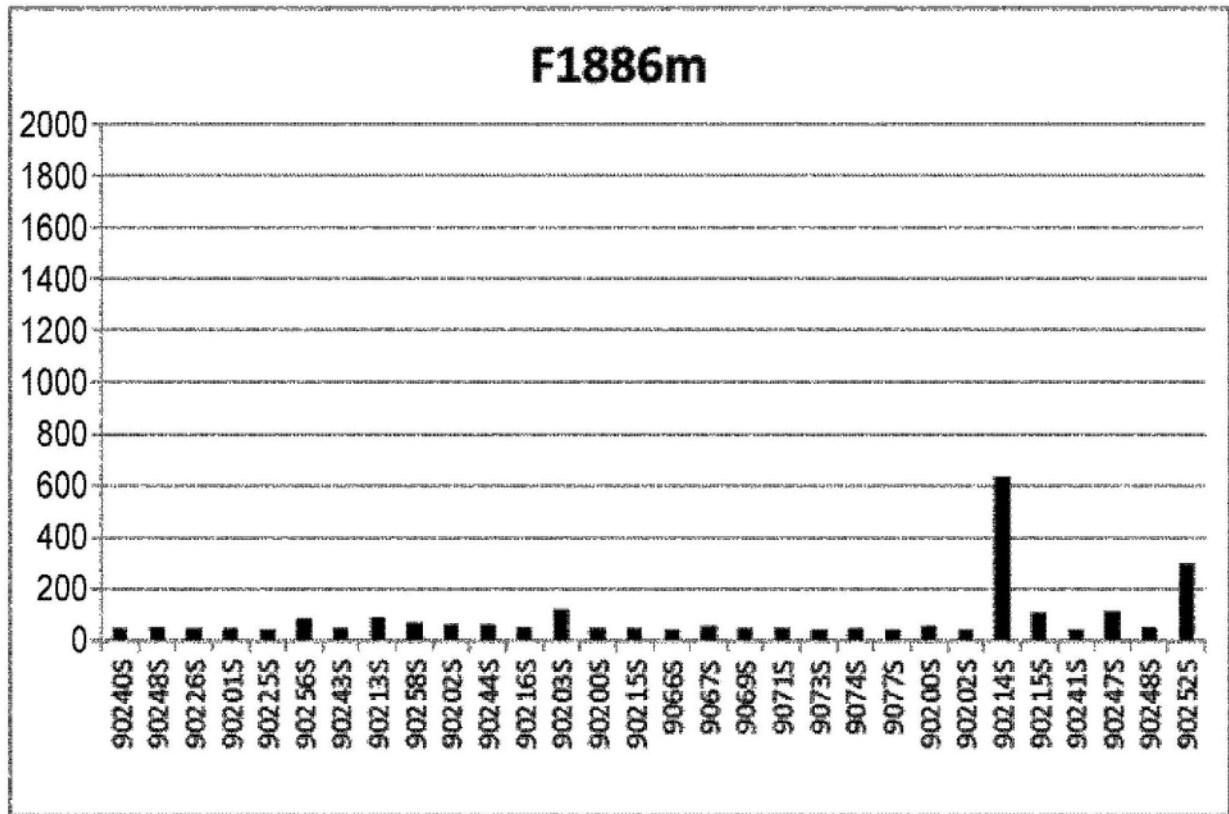


图7

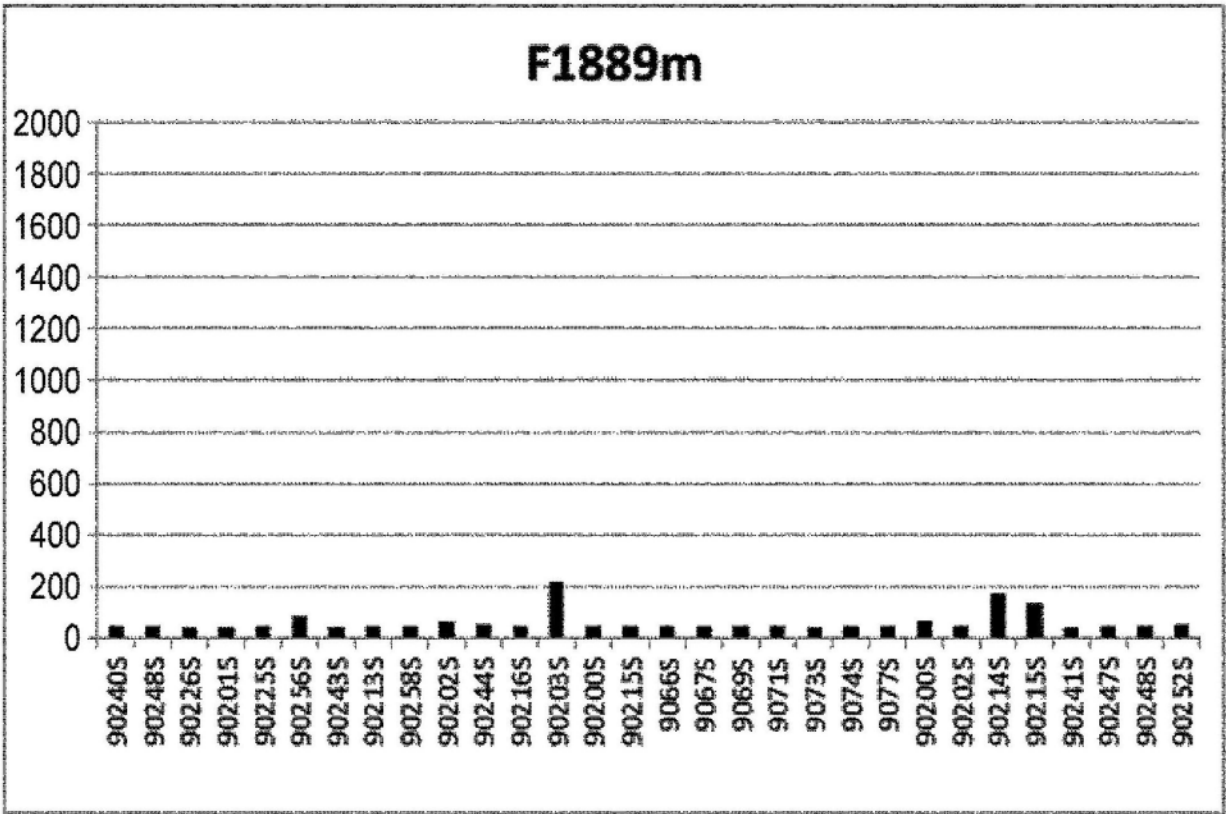


图8

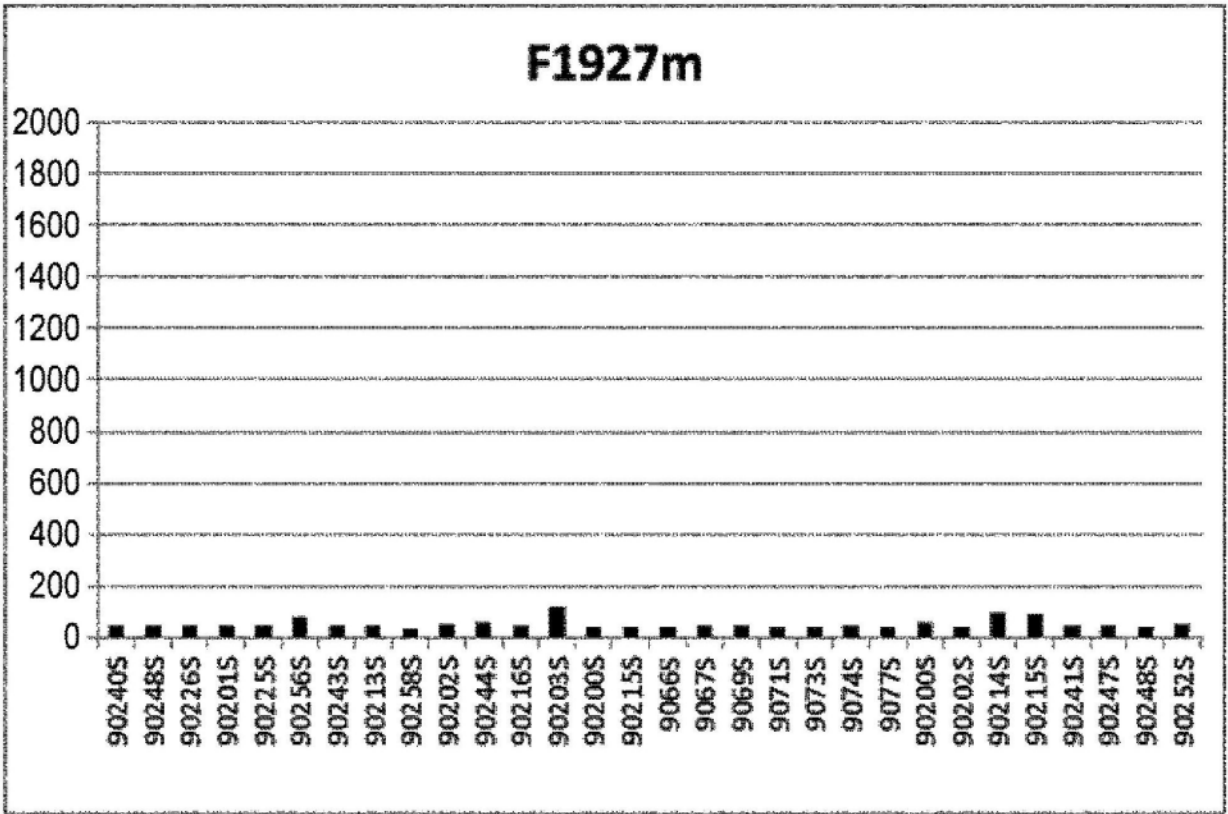


图9

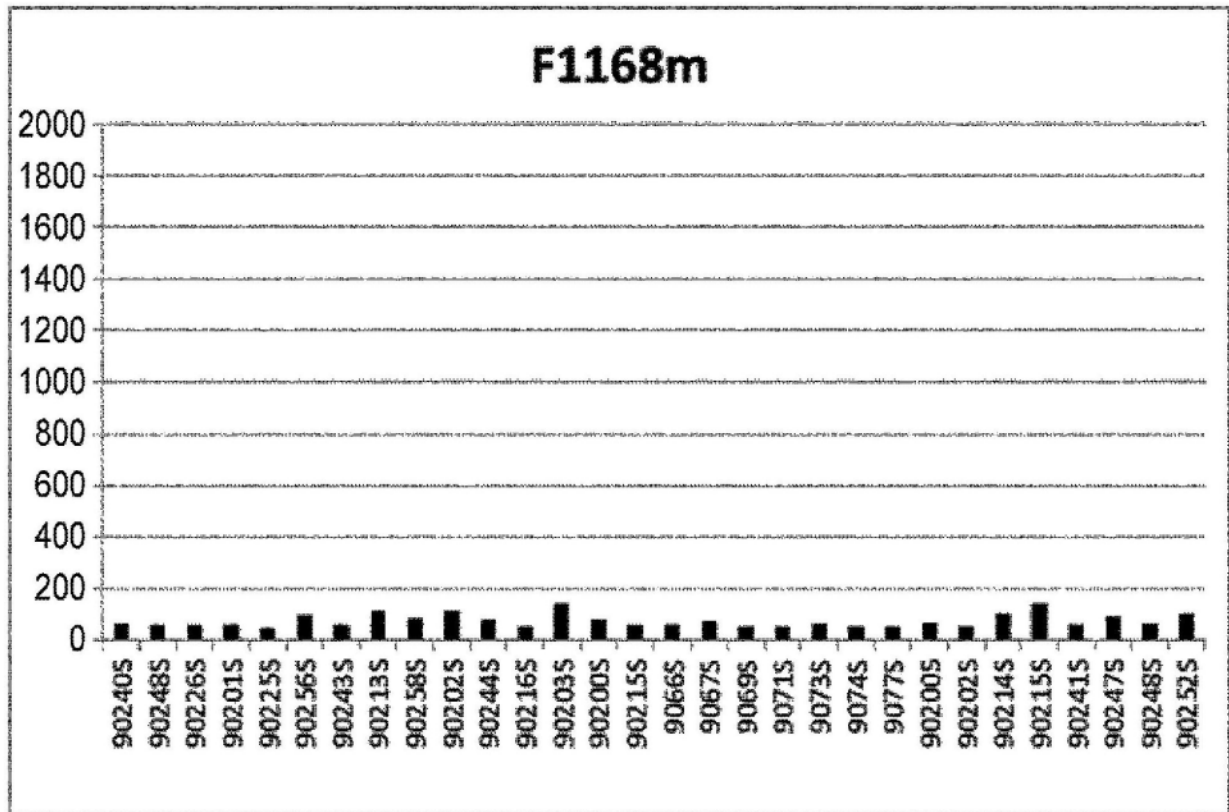


图10

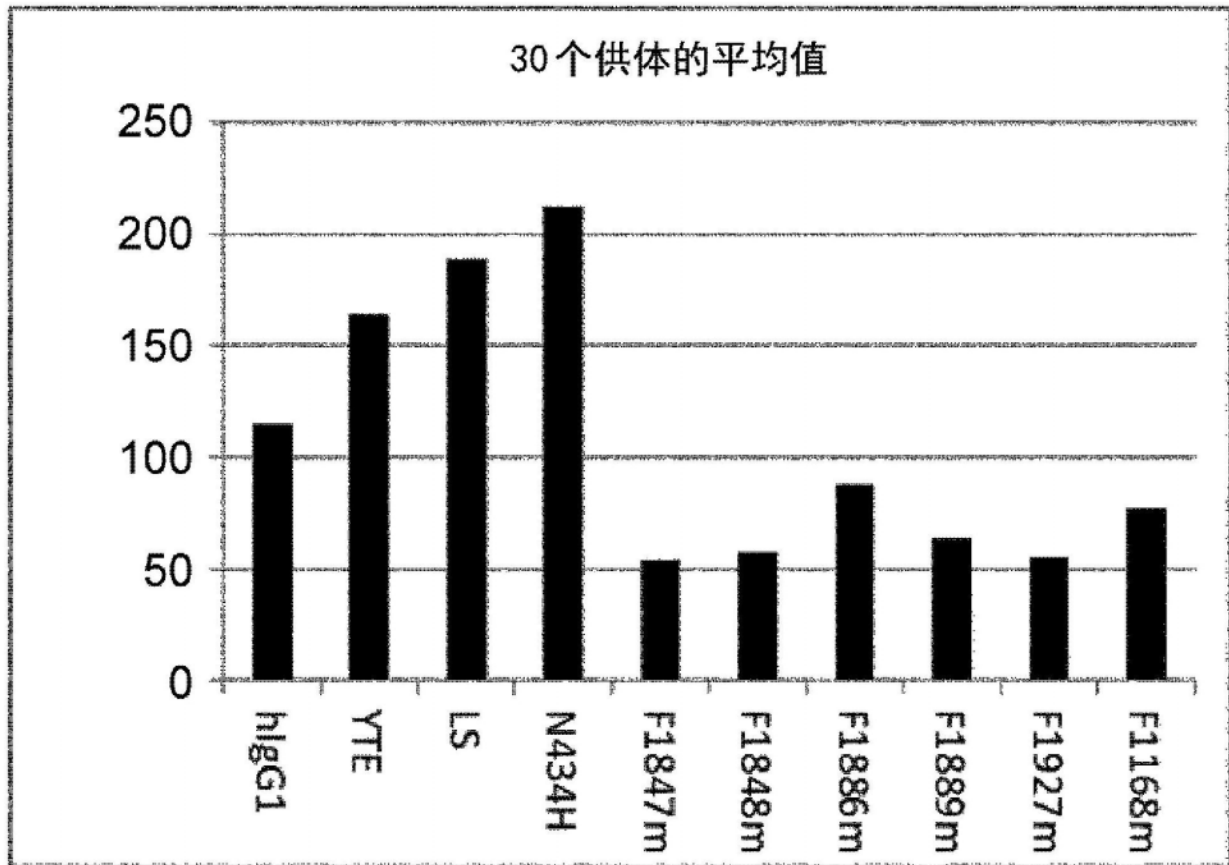


图11

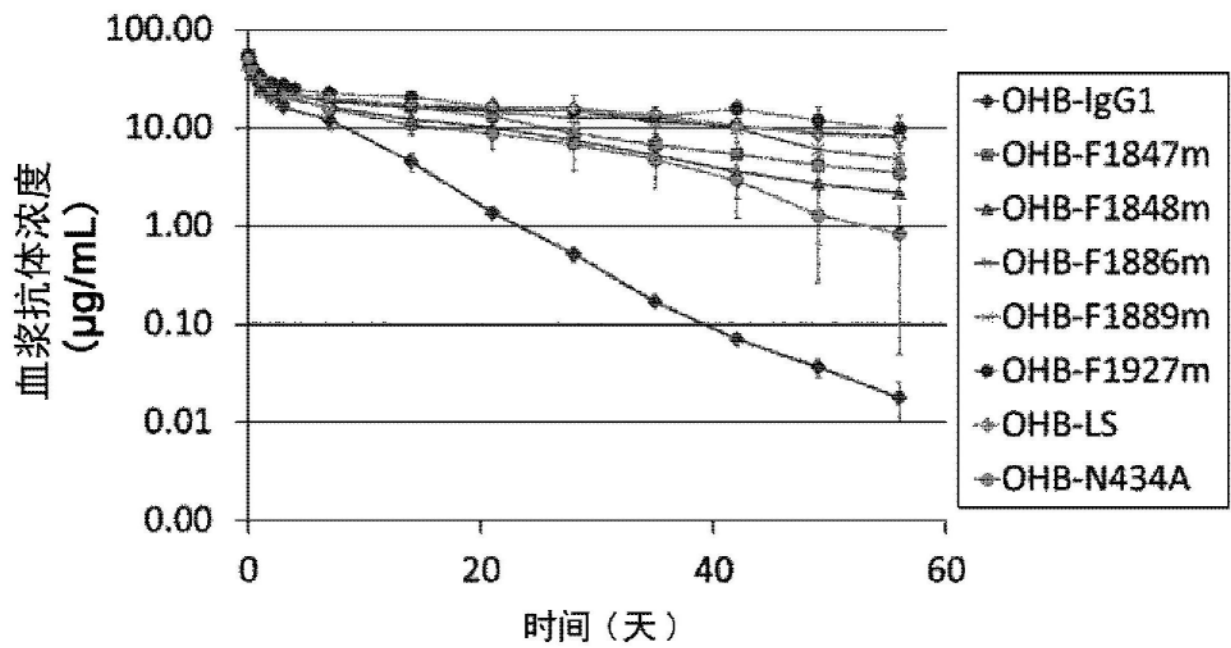


图12

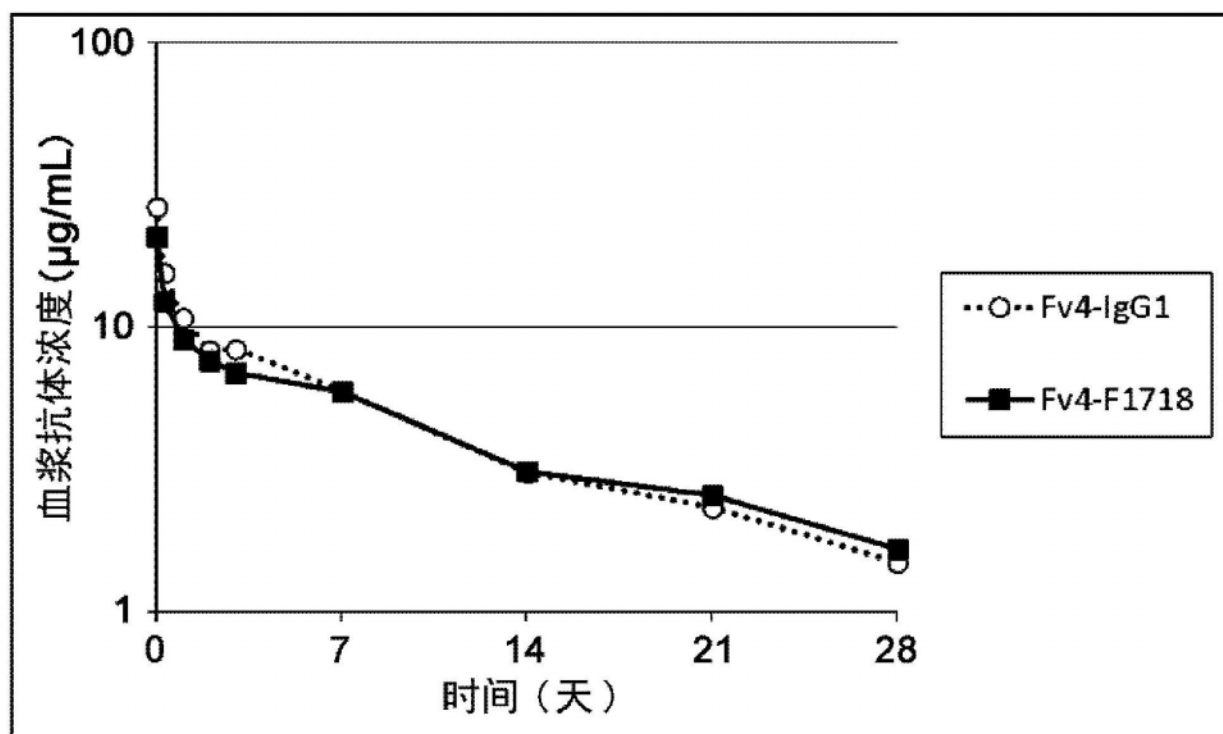


图13

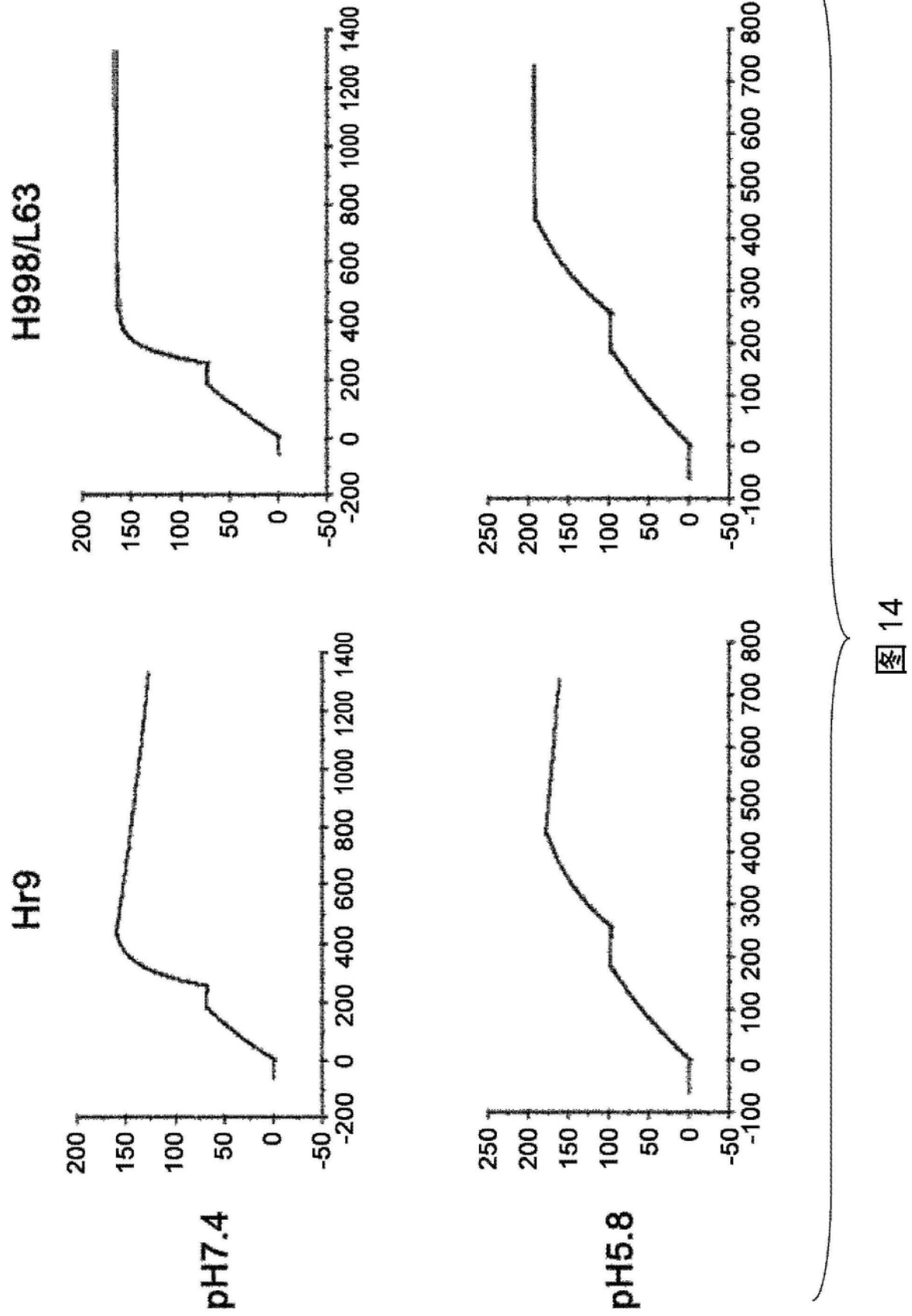


图 14

图14

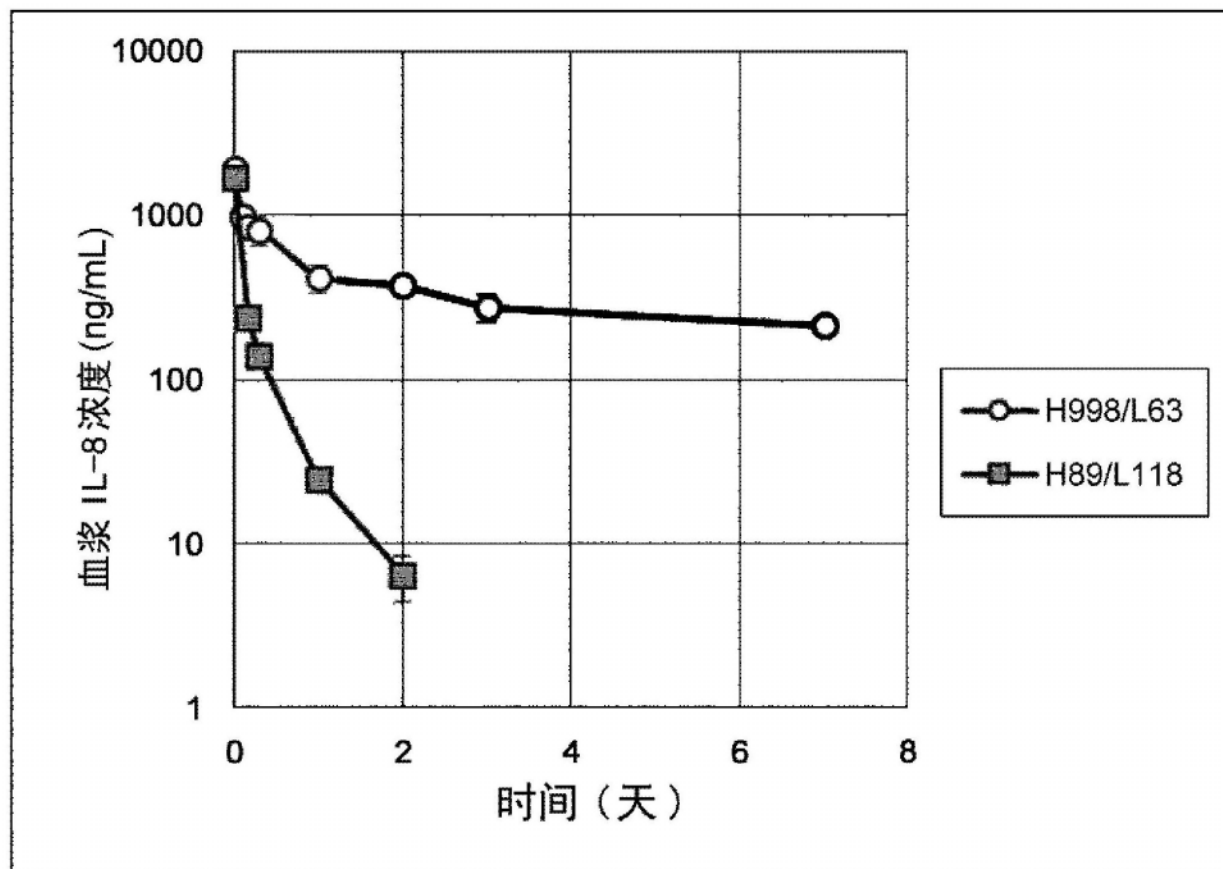


图15

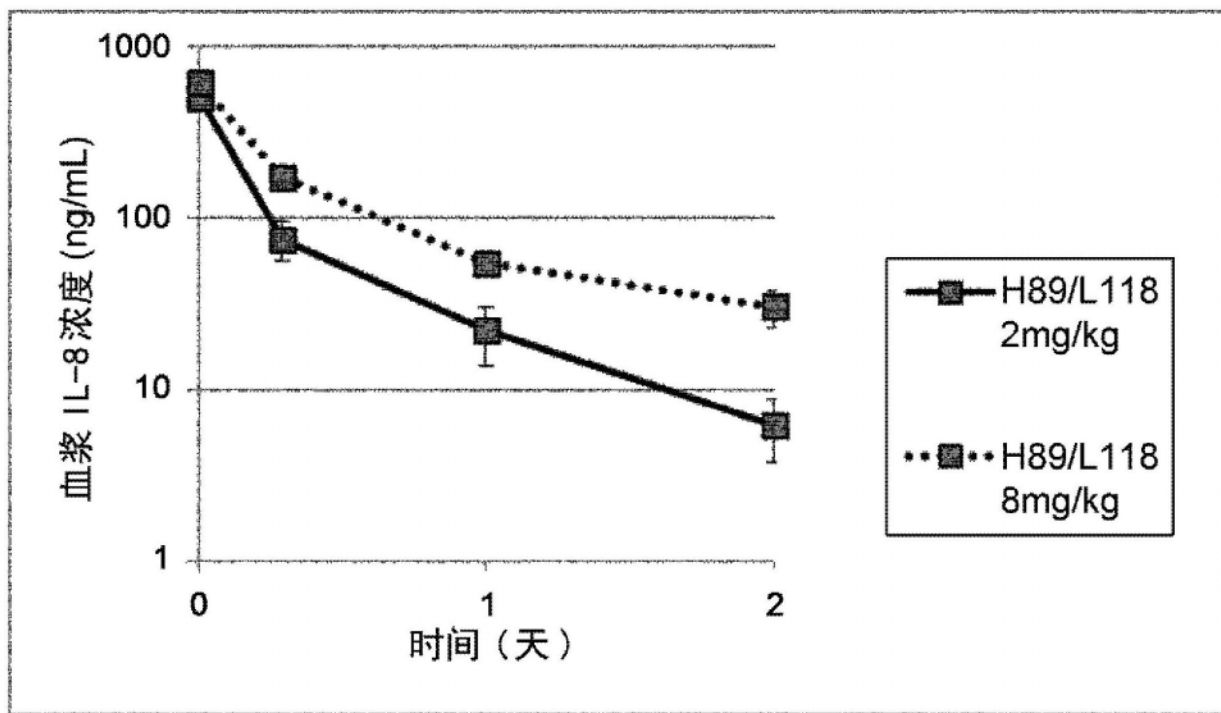


图16

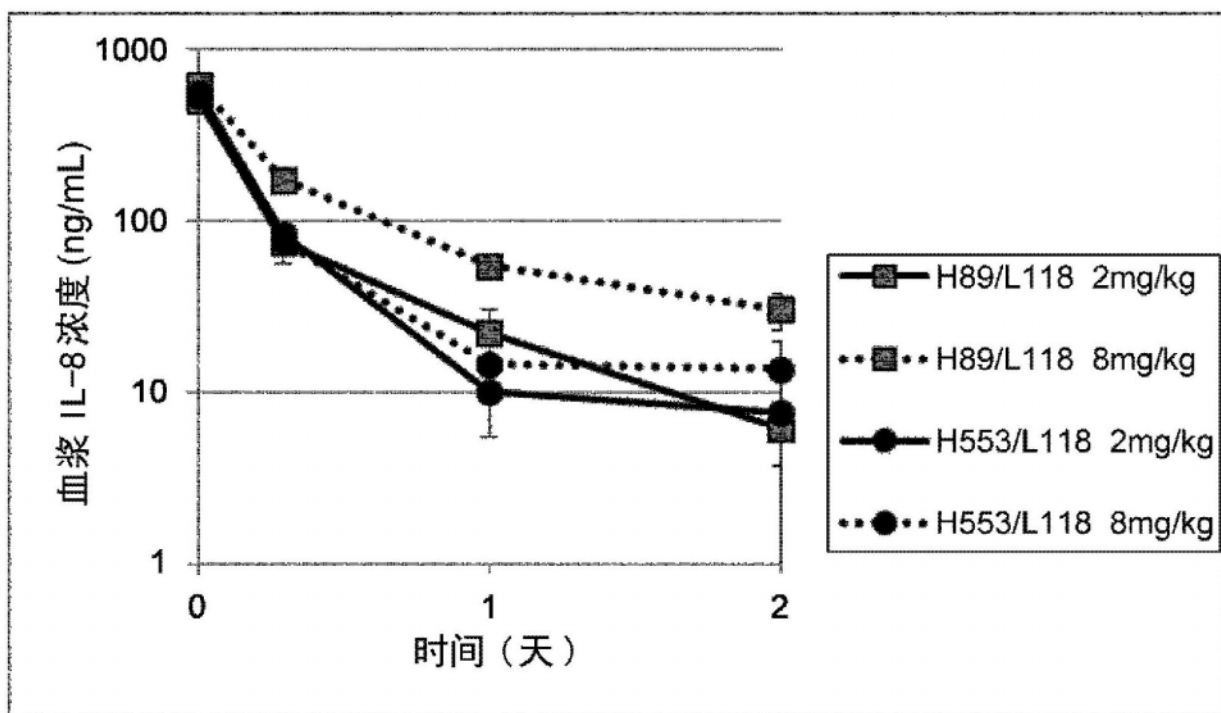


图17

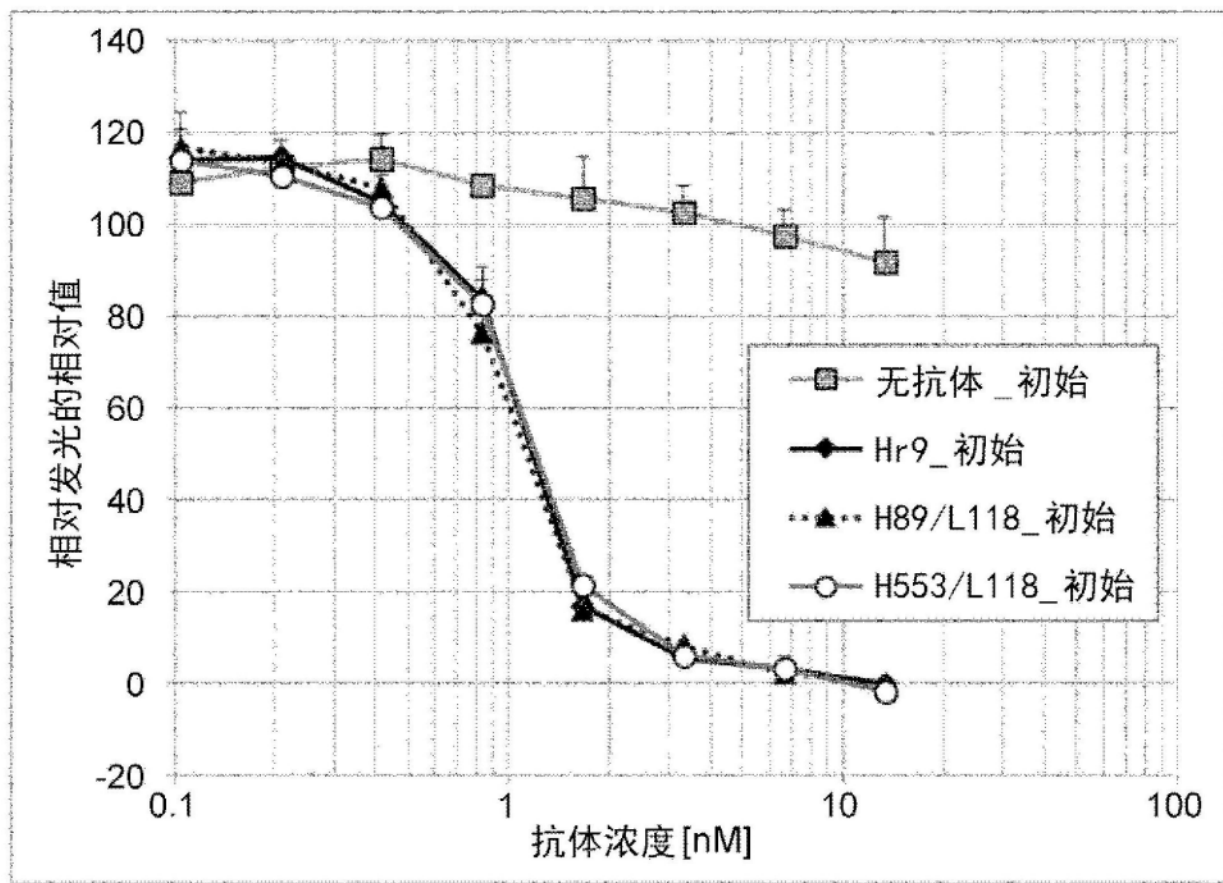


图18-1

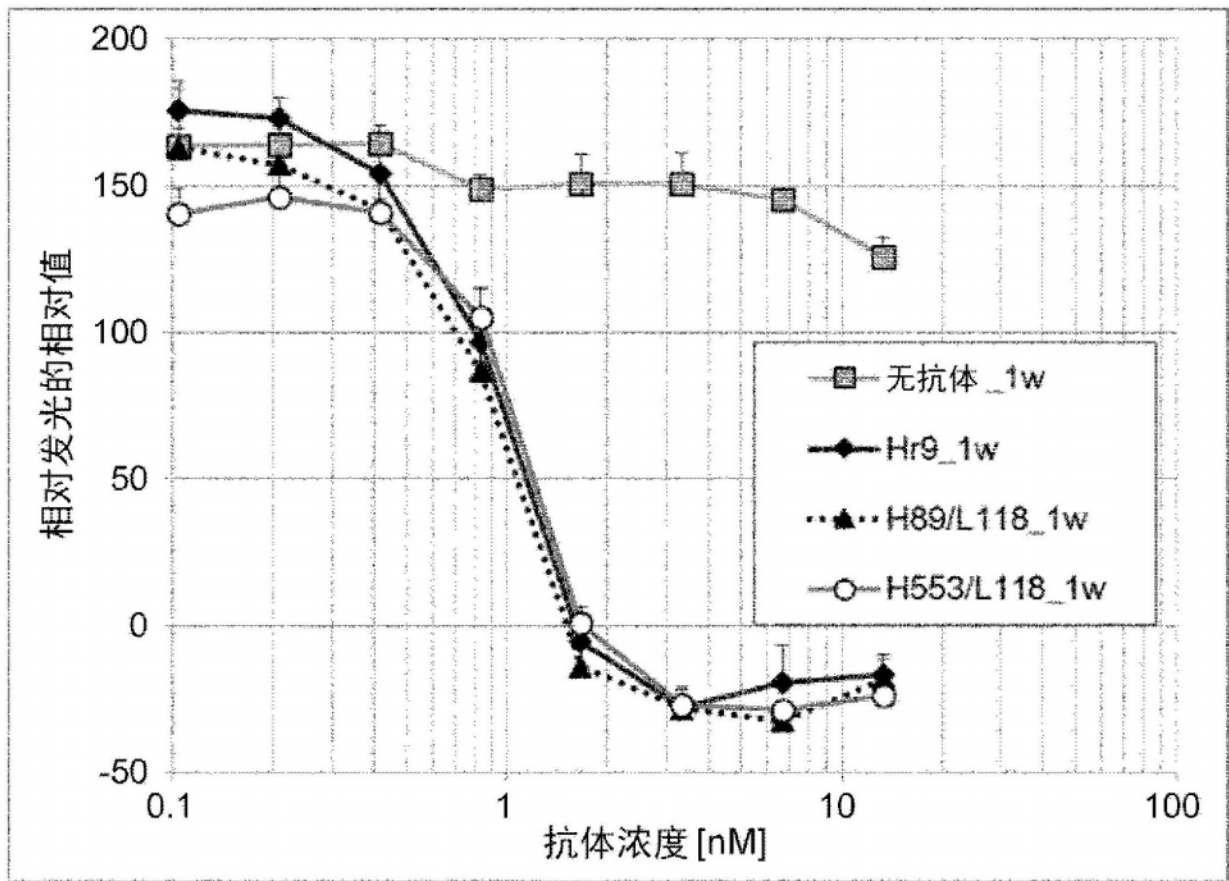


图18-2

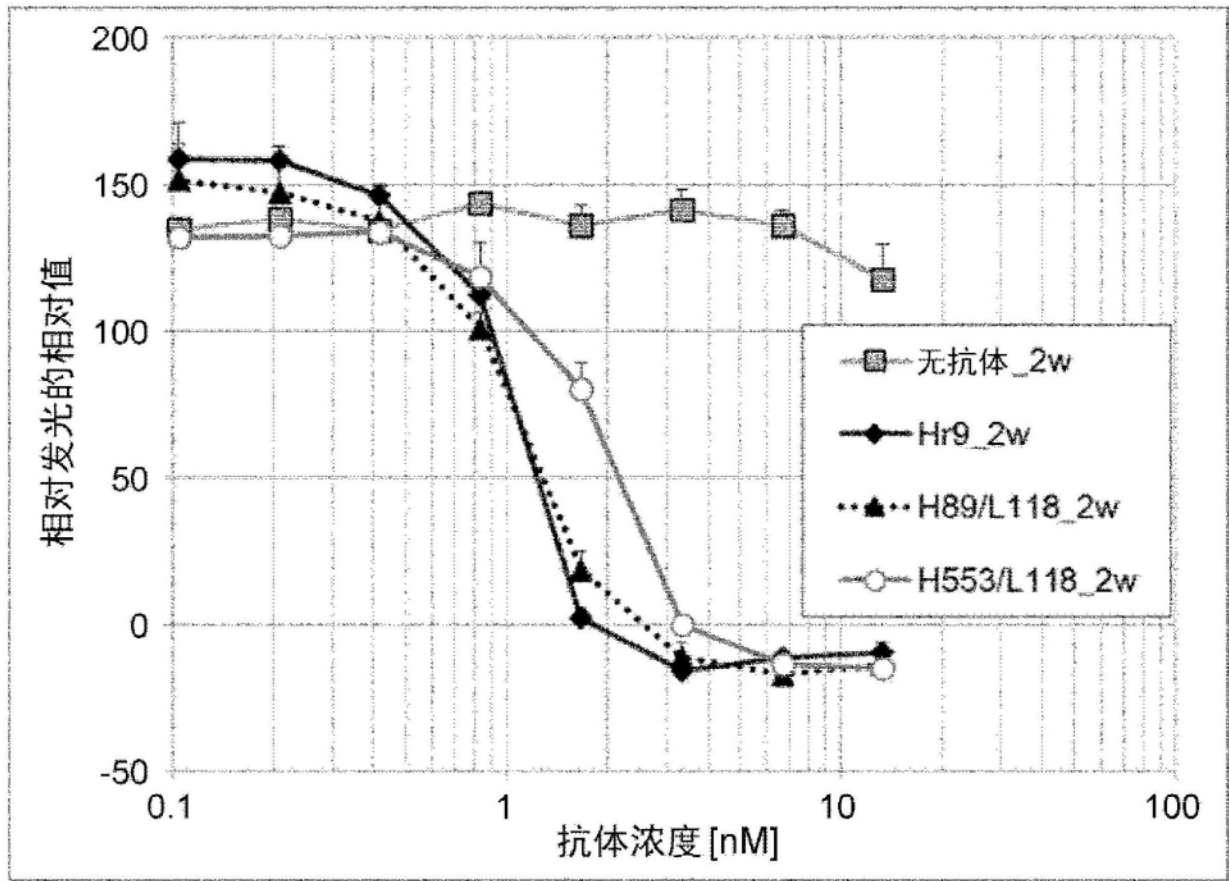


图18-3

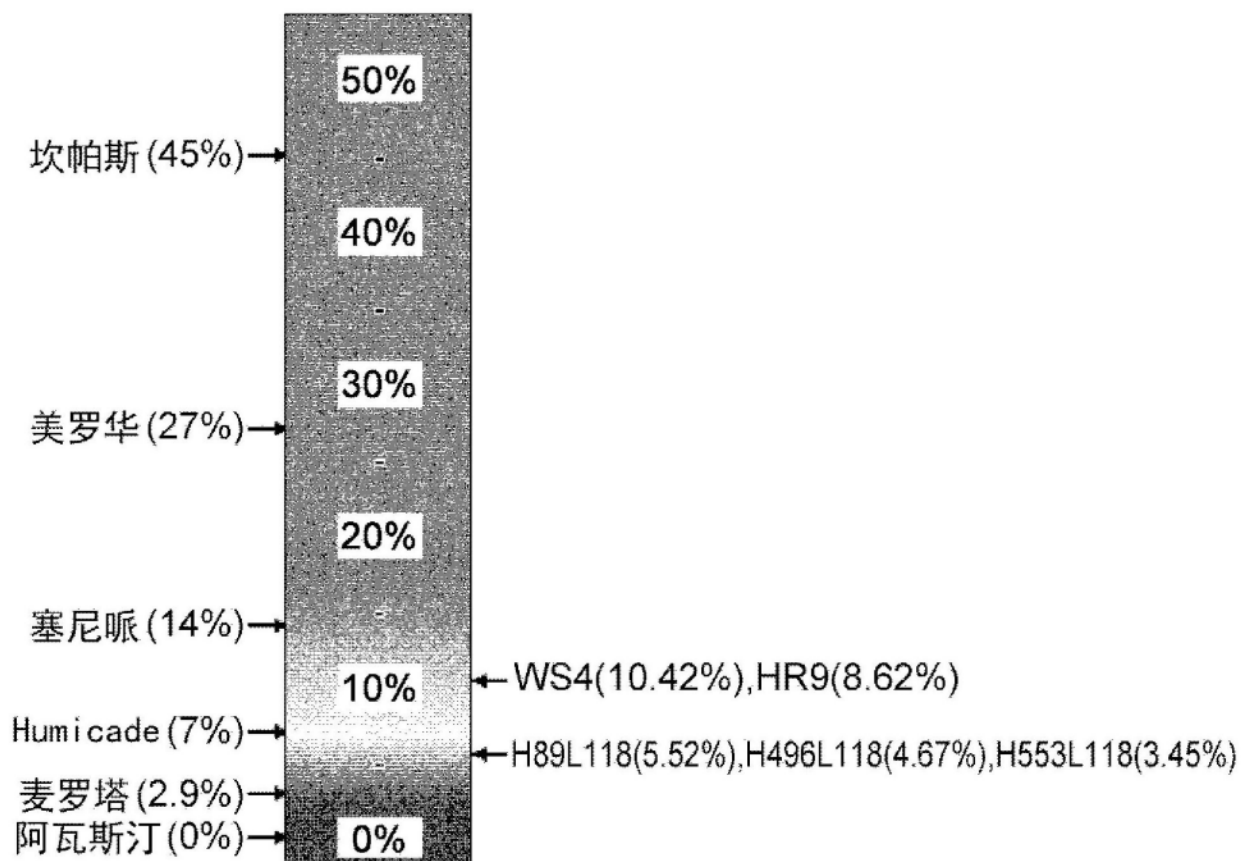


图19

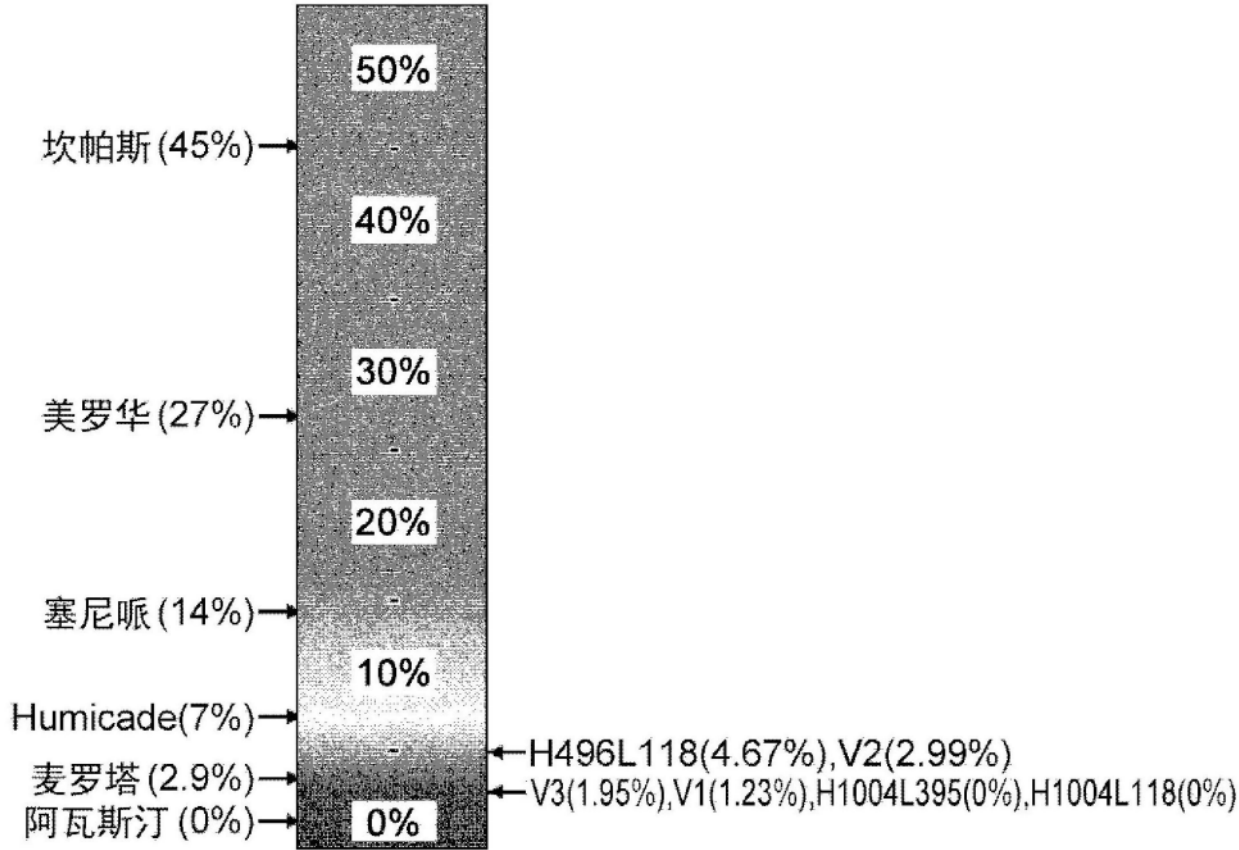


图20

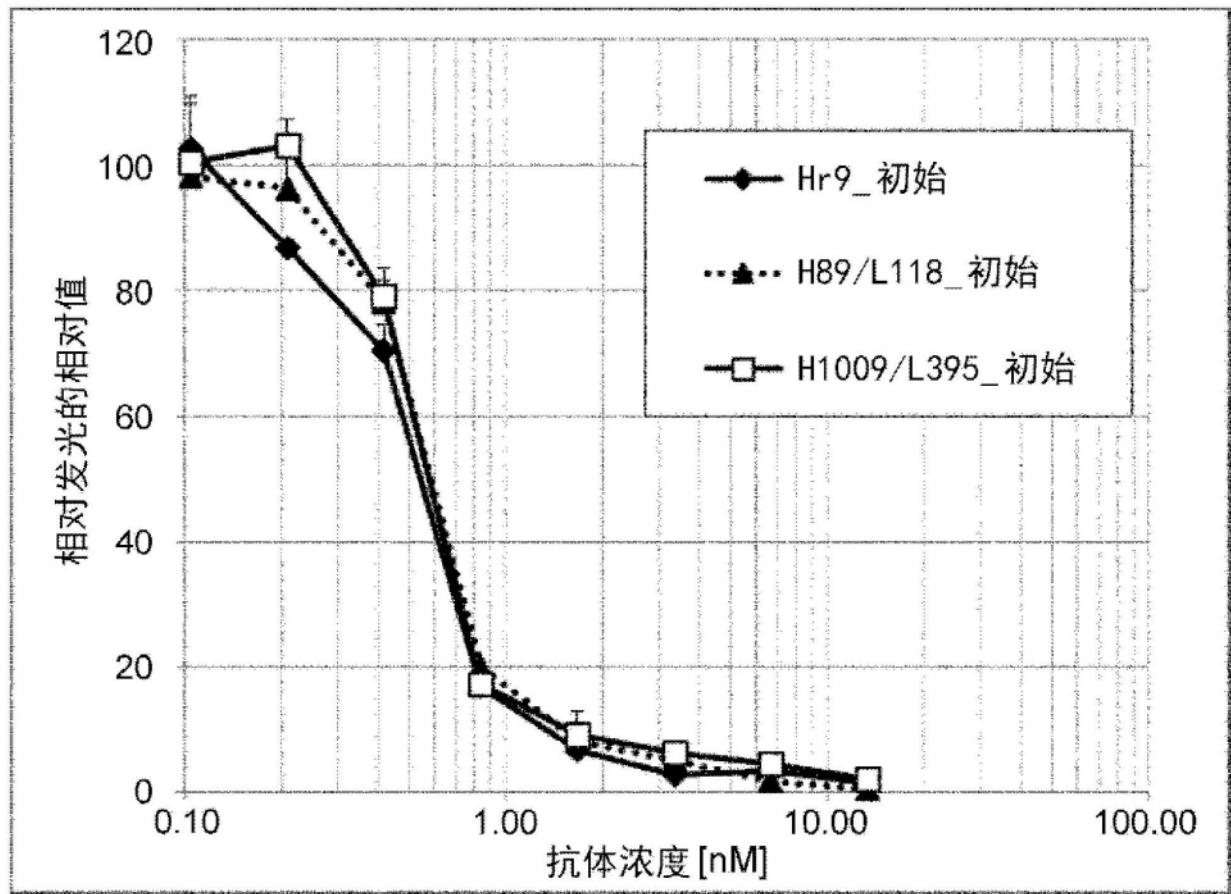


图21-1

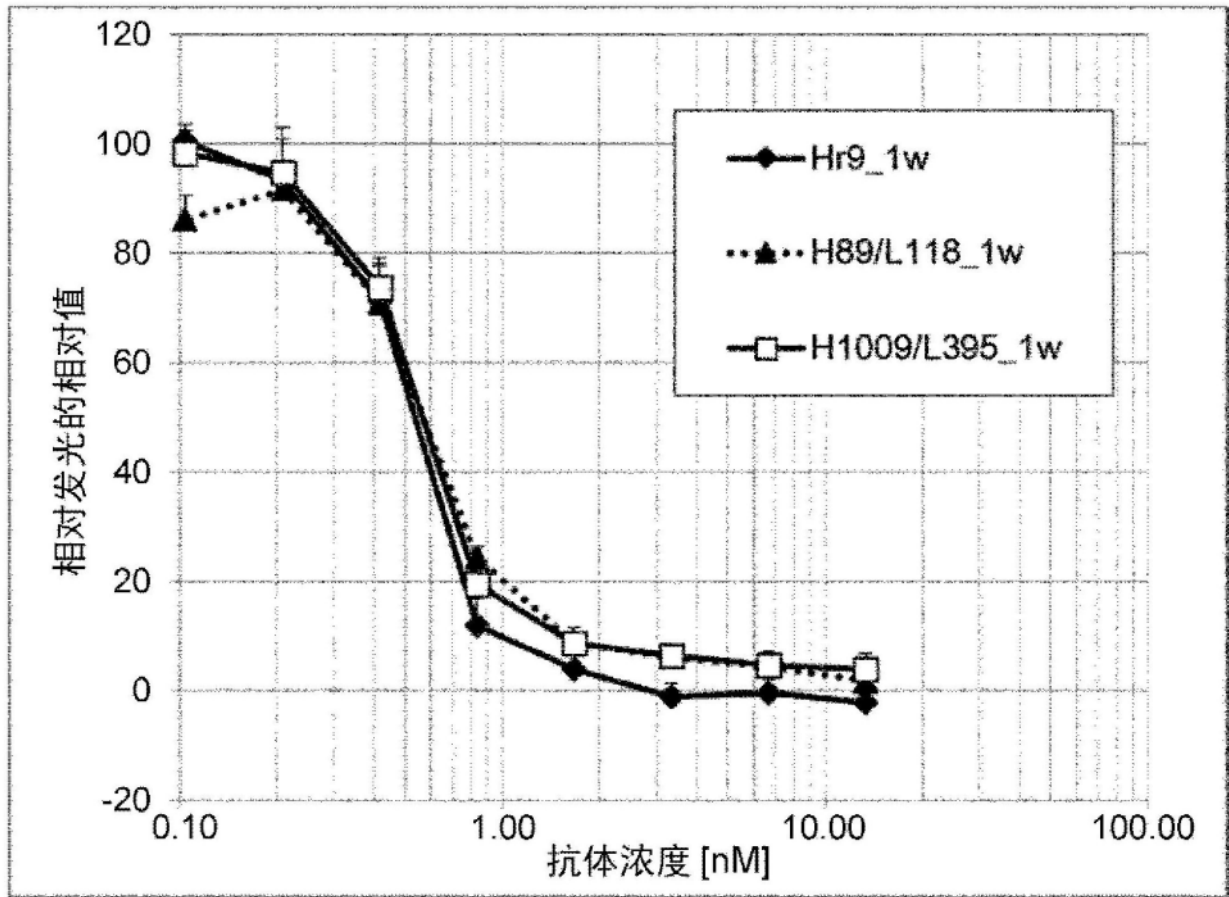


图21-2

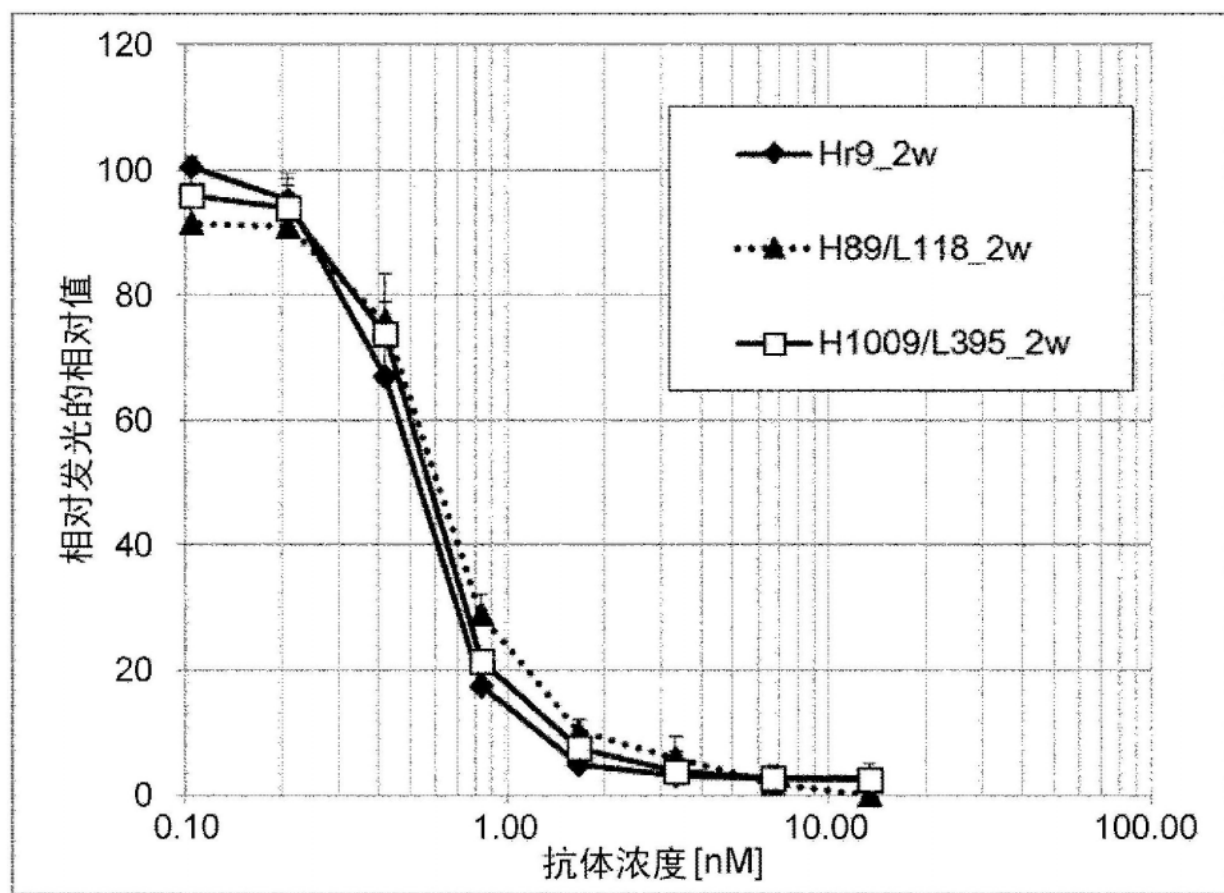


图21-3

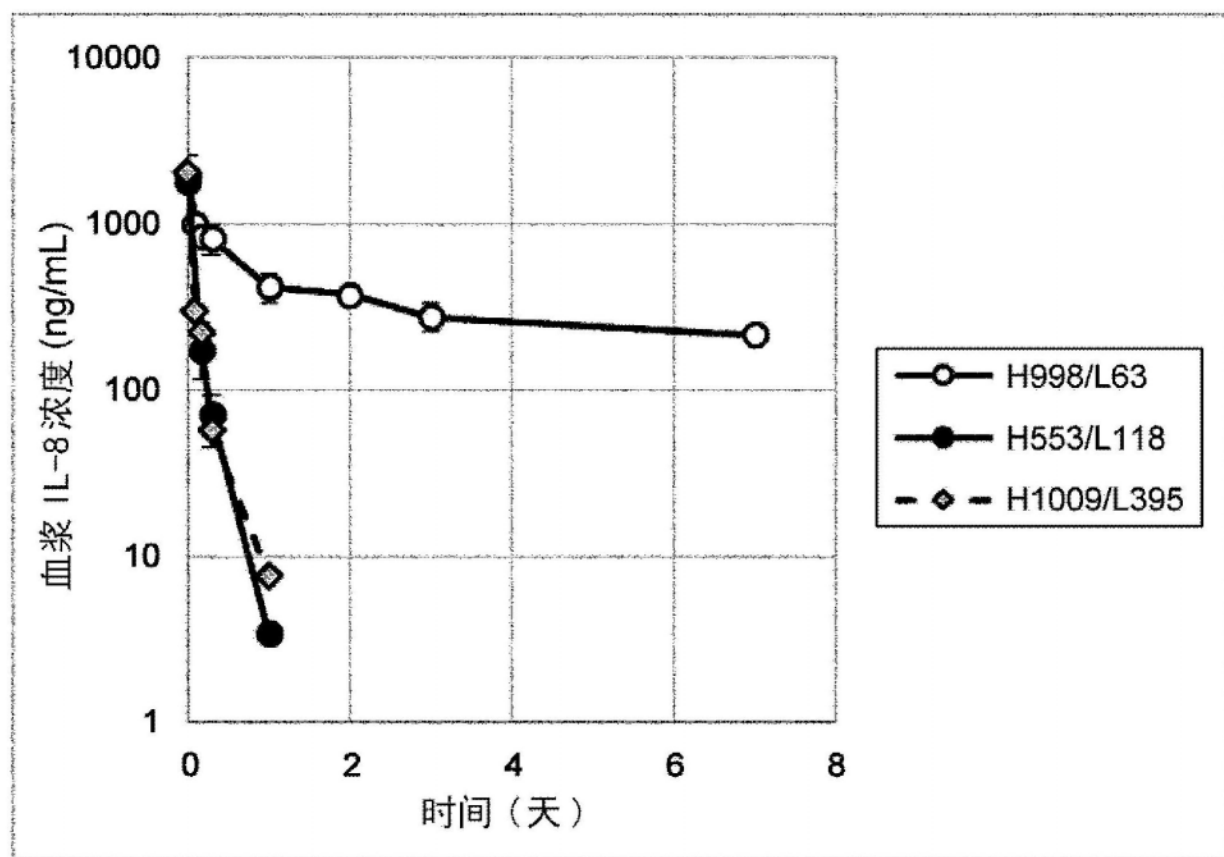


图22

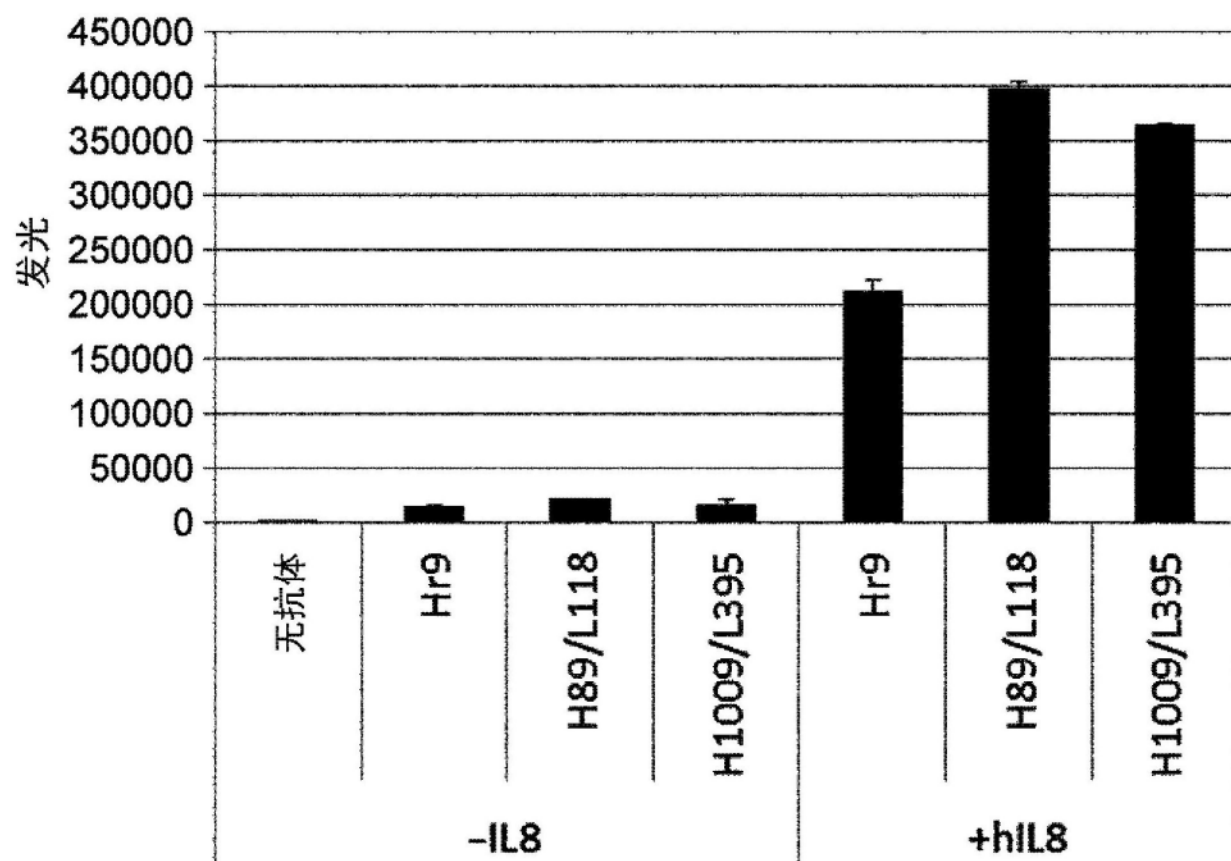


图23

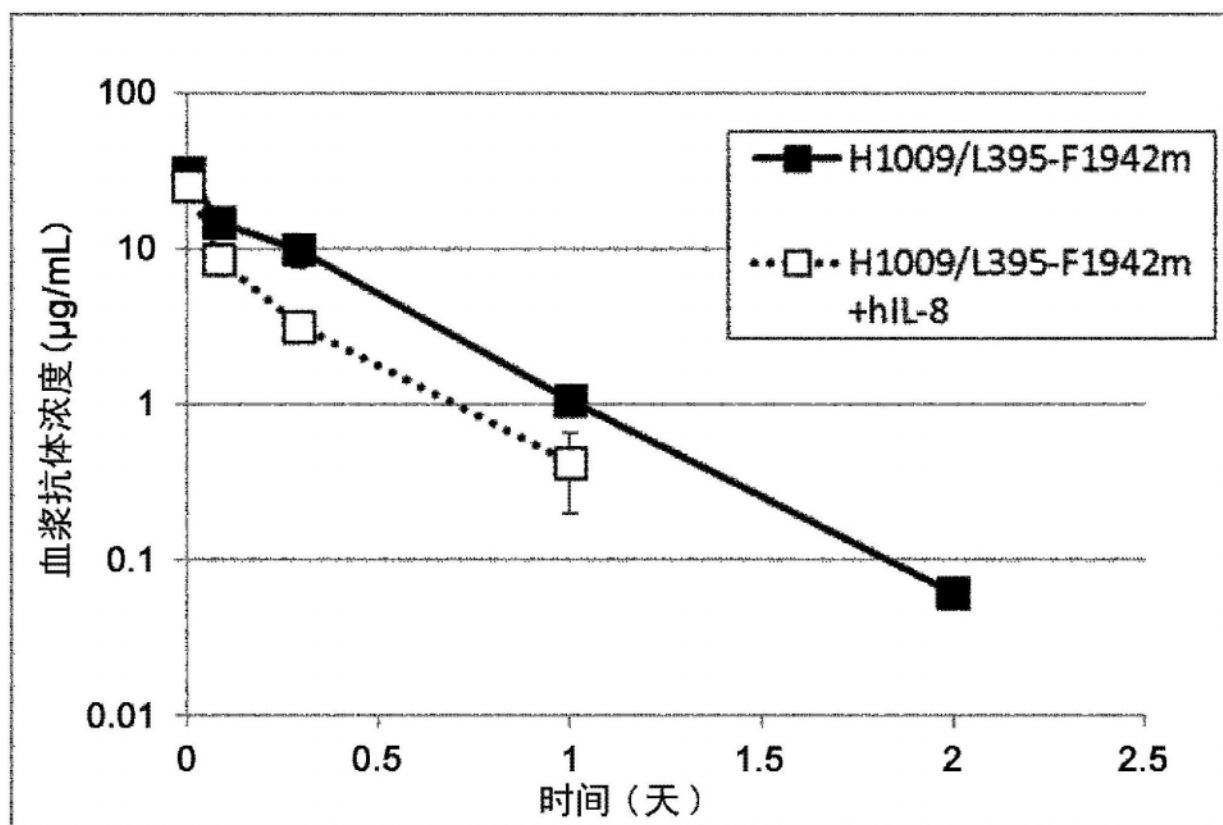


图24

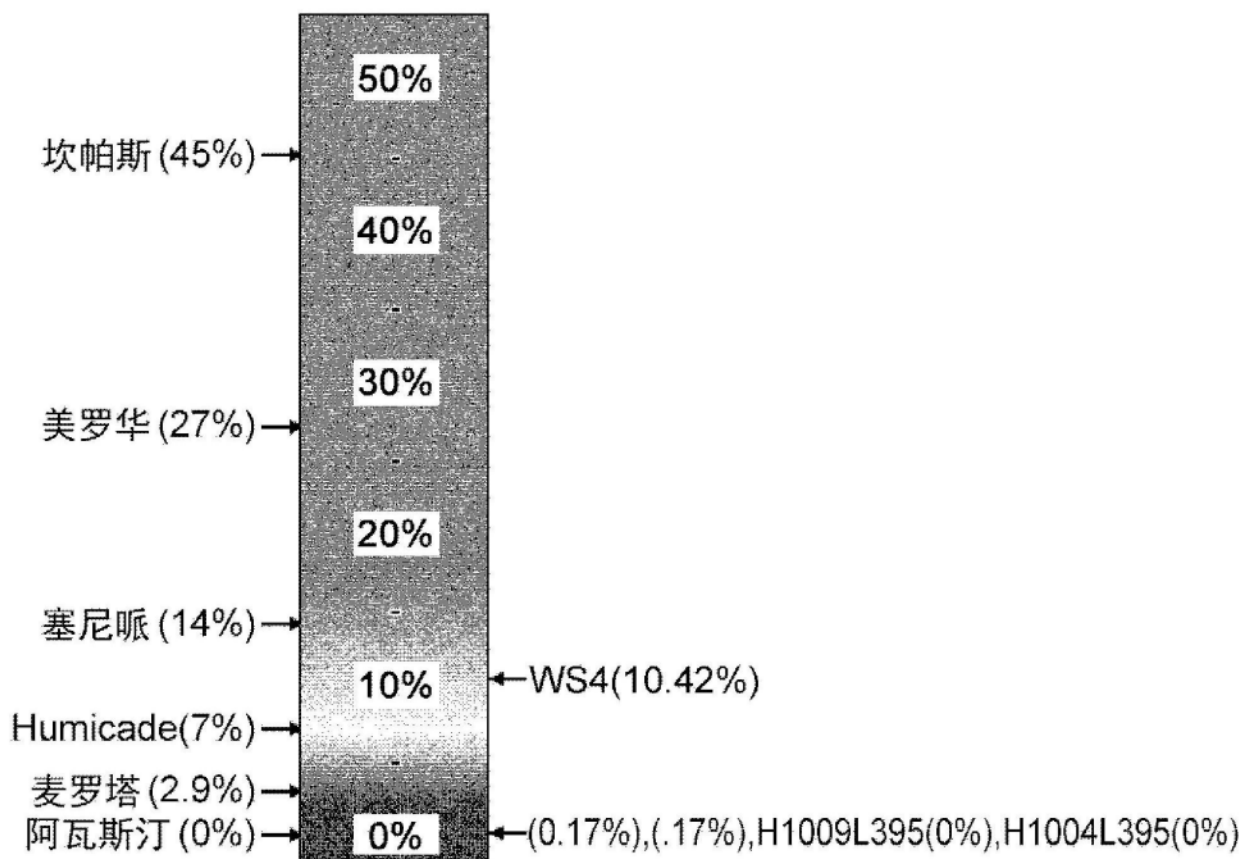


图25

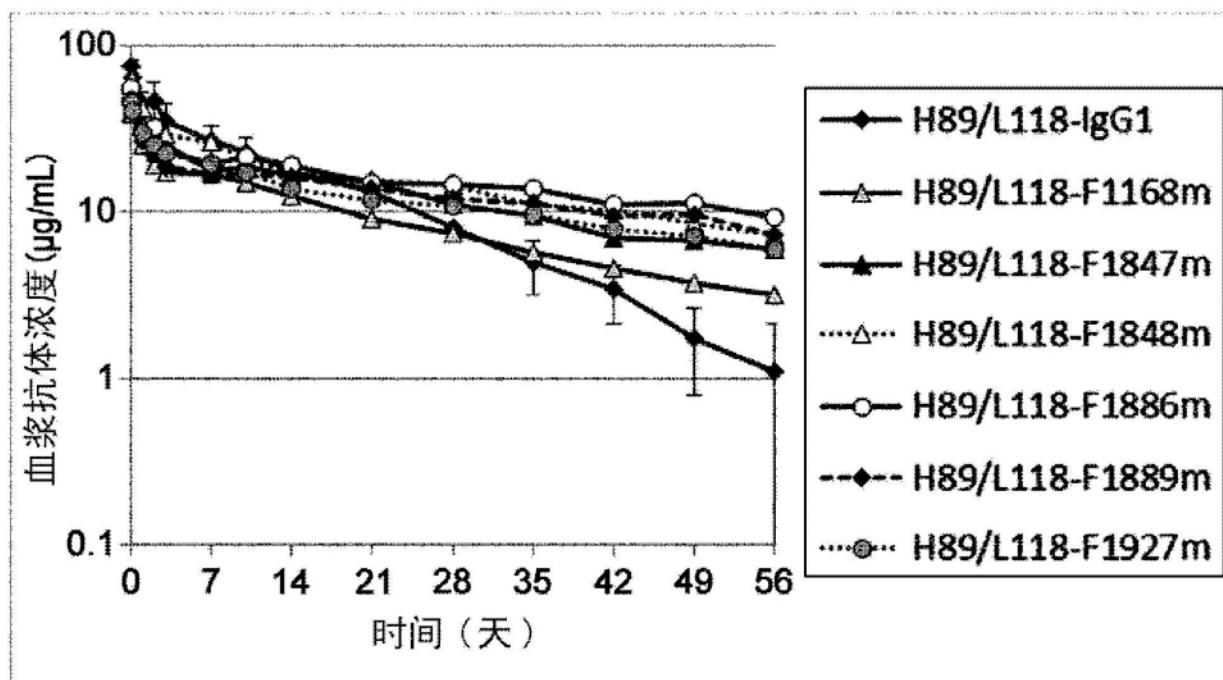


图26

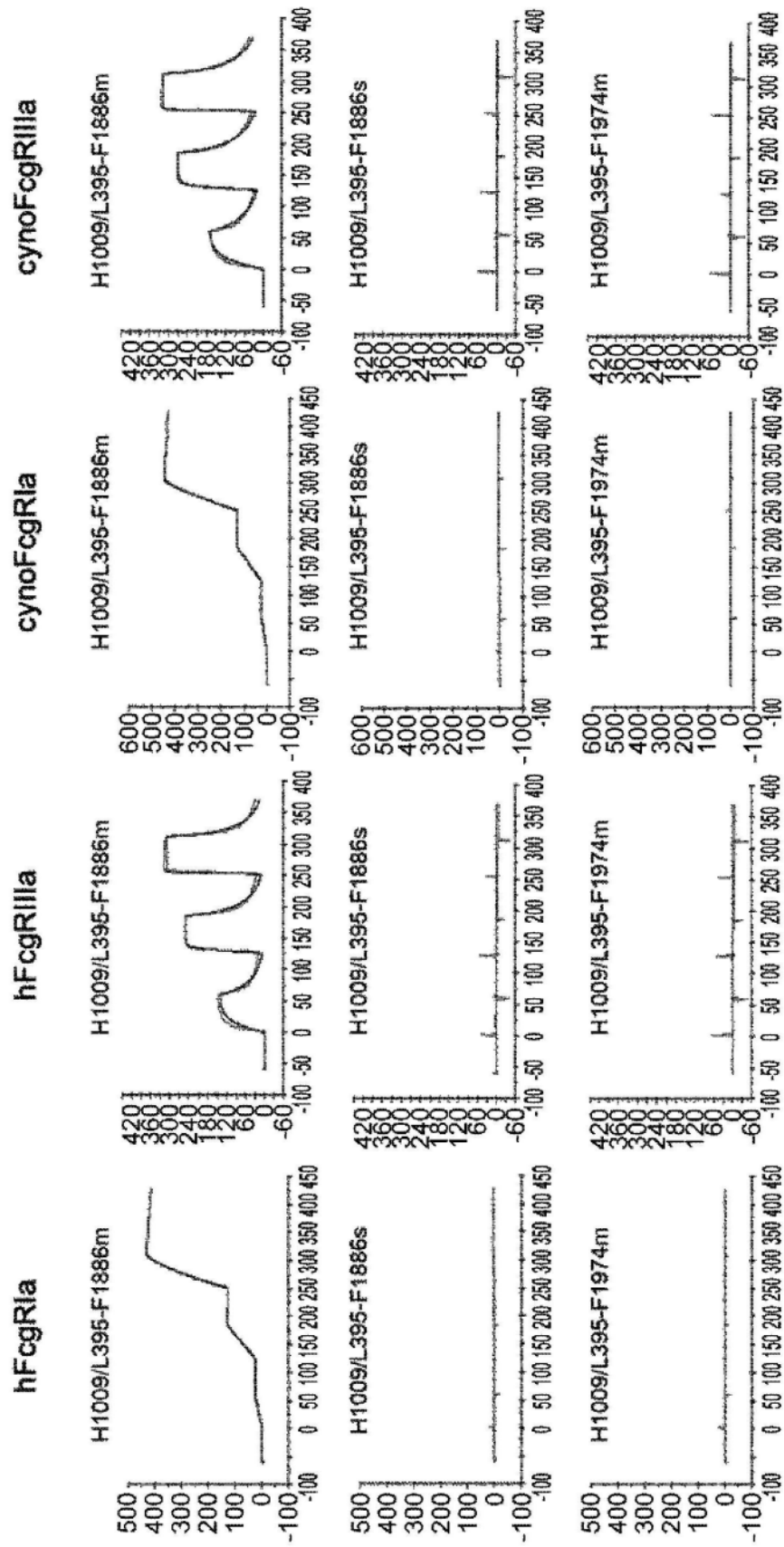


图 27

图27

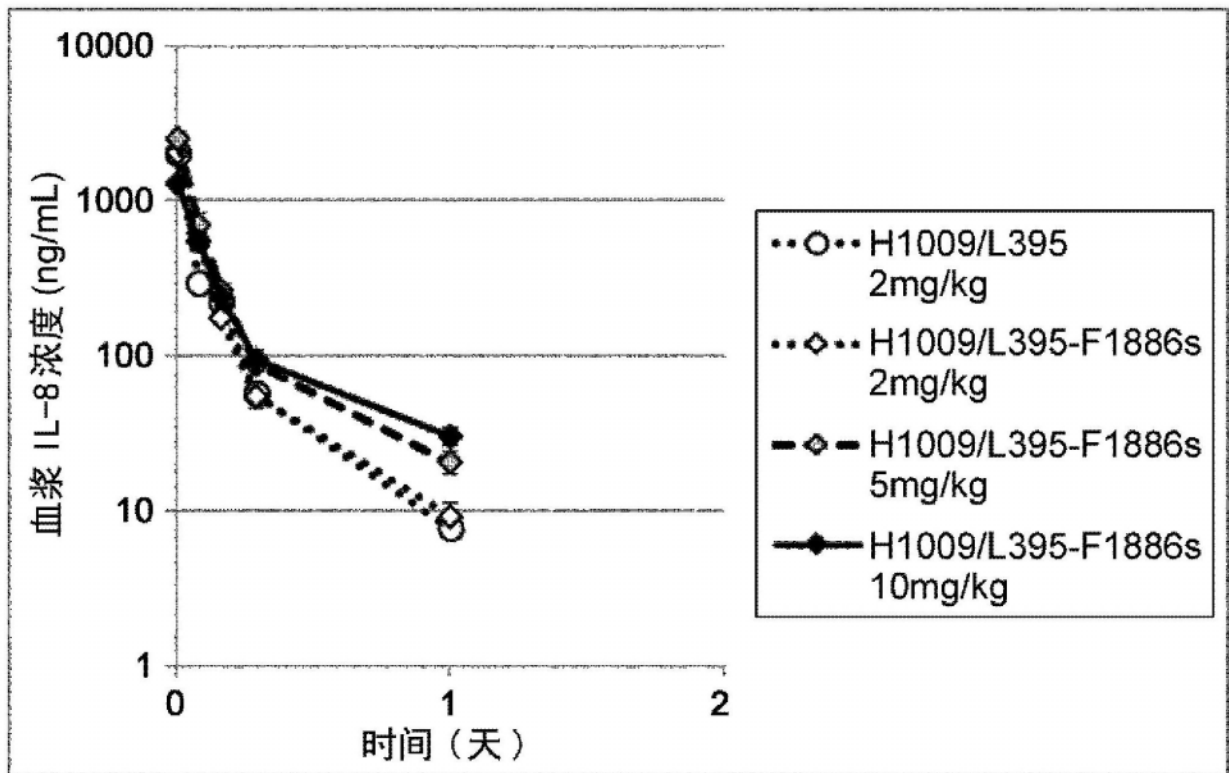


图28

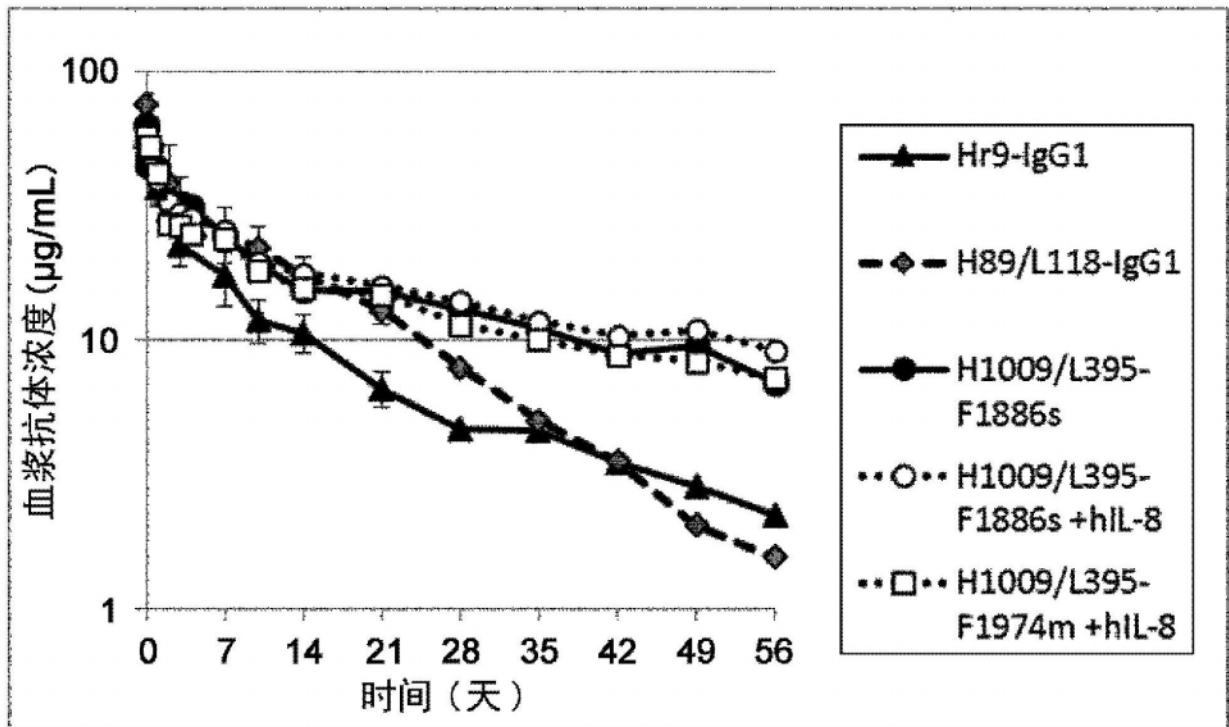


图29

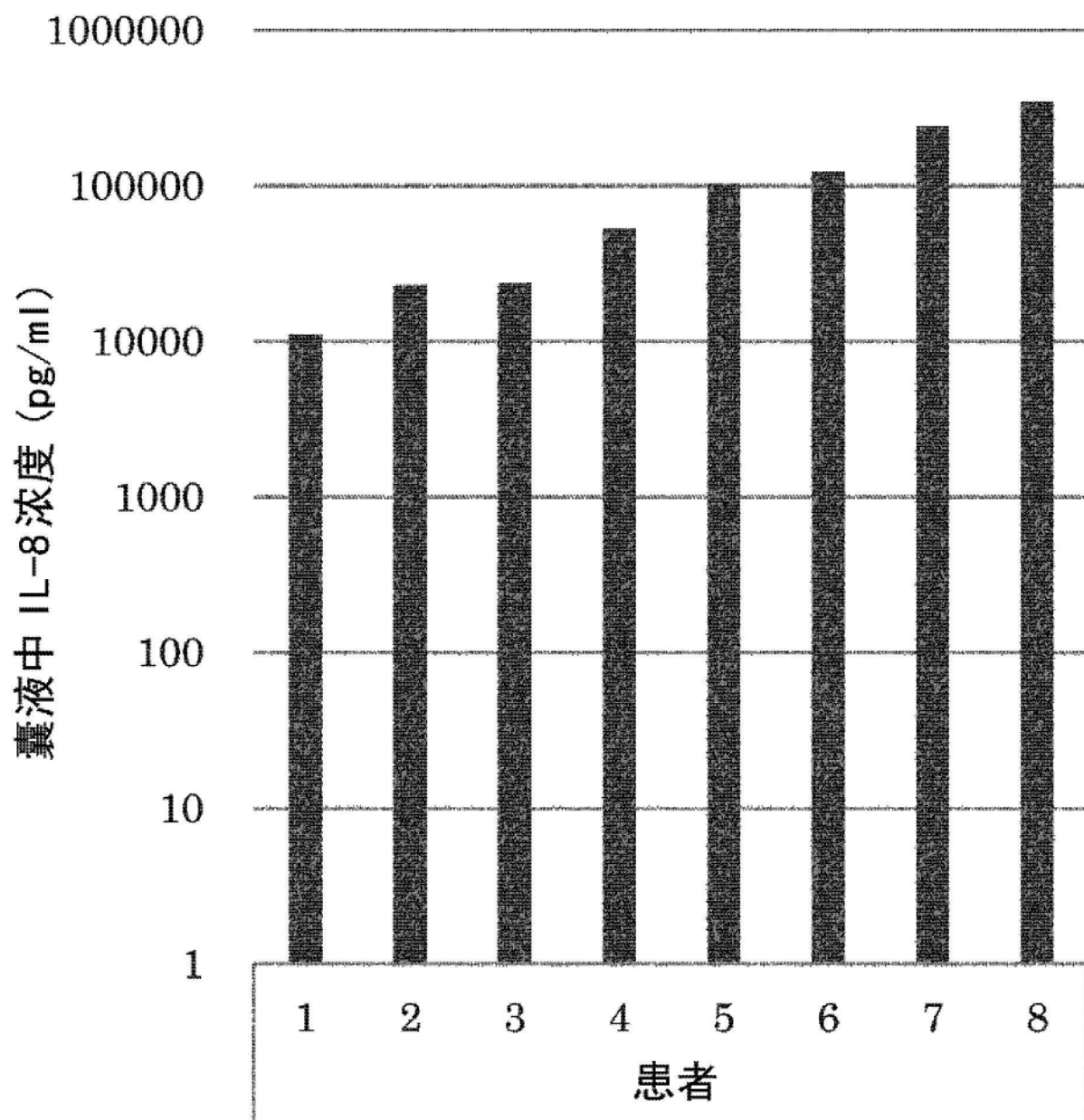


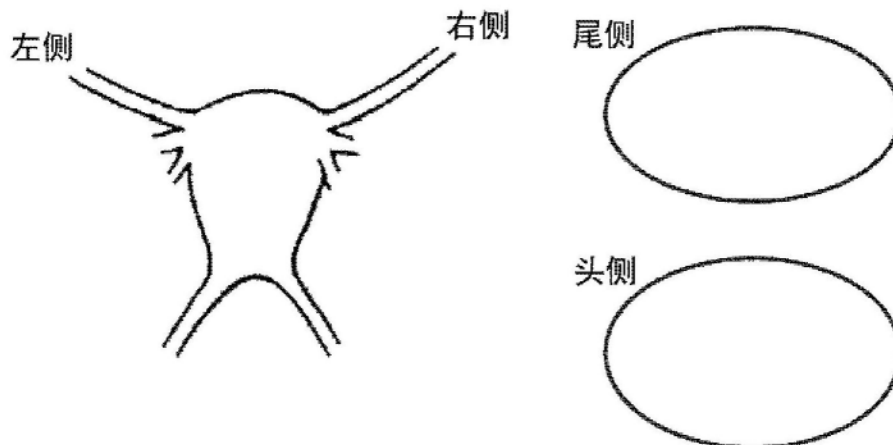
图30

尺寸

区域		深度	尺寸			总分
			<3mm	3-10mm	>10mm	
另外的腹膜壁		表面的	1	2	4	
		深部的	2	4	6	
卵巢	左侧	表面的	1	2	4	
		深部的	4	16	20	
	右侧	表面的	1	2	4	
		深部的	4	16	20	

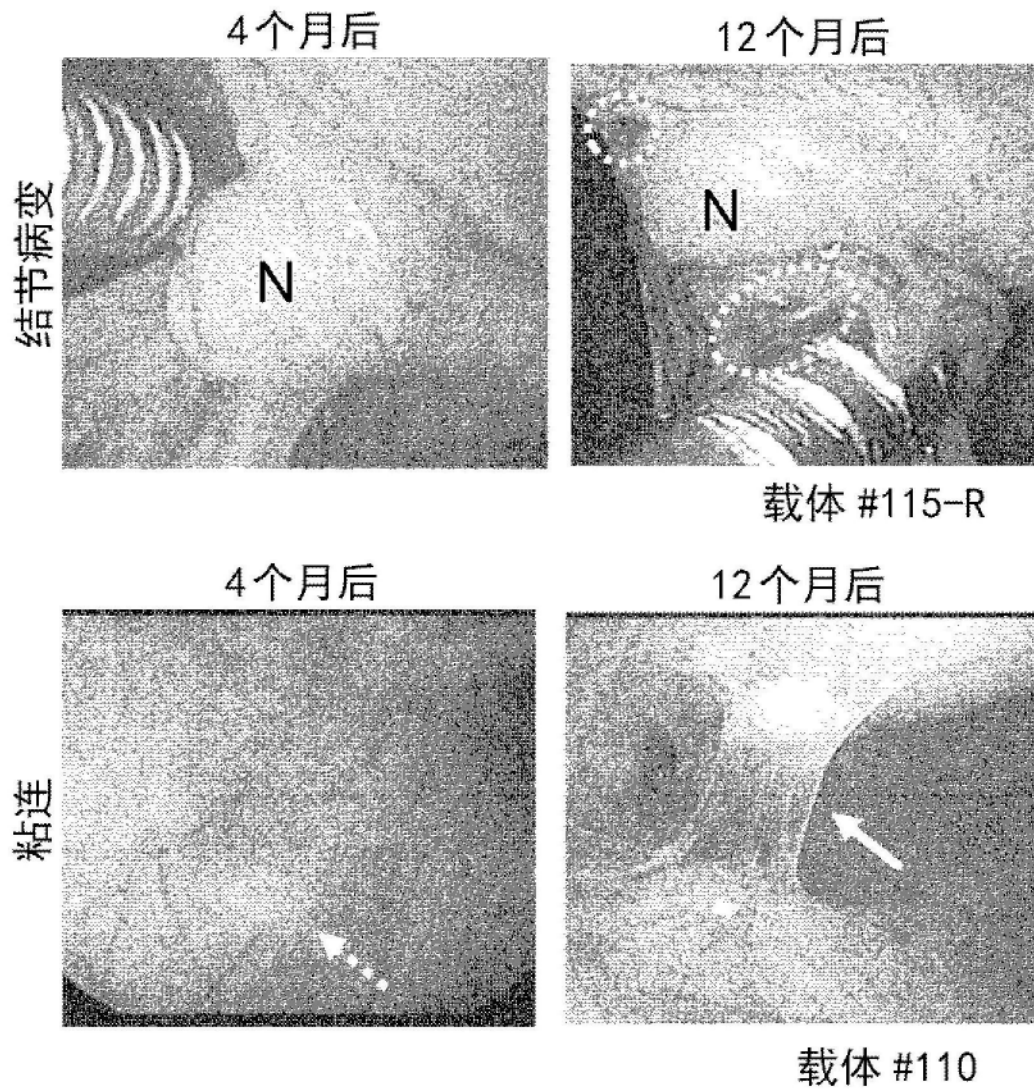
粘连

区域			非闭塞	部分闭塞	闭塞	总分
子宫直肠窝			0	4	40	
膀胱子宫陷凹			0	4	40	
区域	深度		<1/3	1/3-2/3	>2/3	
卵巢	左侧	膜状	1	2	4	
		致密	4	8	16	
	右侧	膜状	1	2	4	
		致密	4	8	16	
输卵管	左侧	膜状	1	2	4	
		致密	4	8	16	
	右侧	膜状	1	2	4	
		致密	4	8	16	



腹腔镜观察的数据单

图31



N: 结节病变

虚线: 囊性粘连

实线箭头: 粘连

虚线箭头: 表面病变

图32

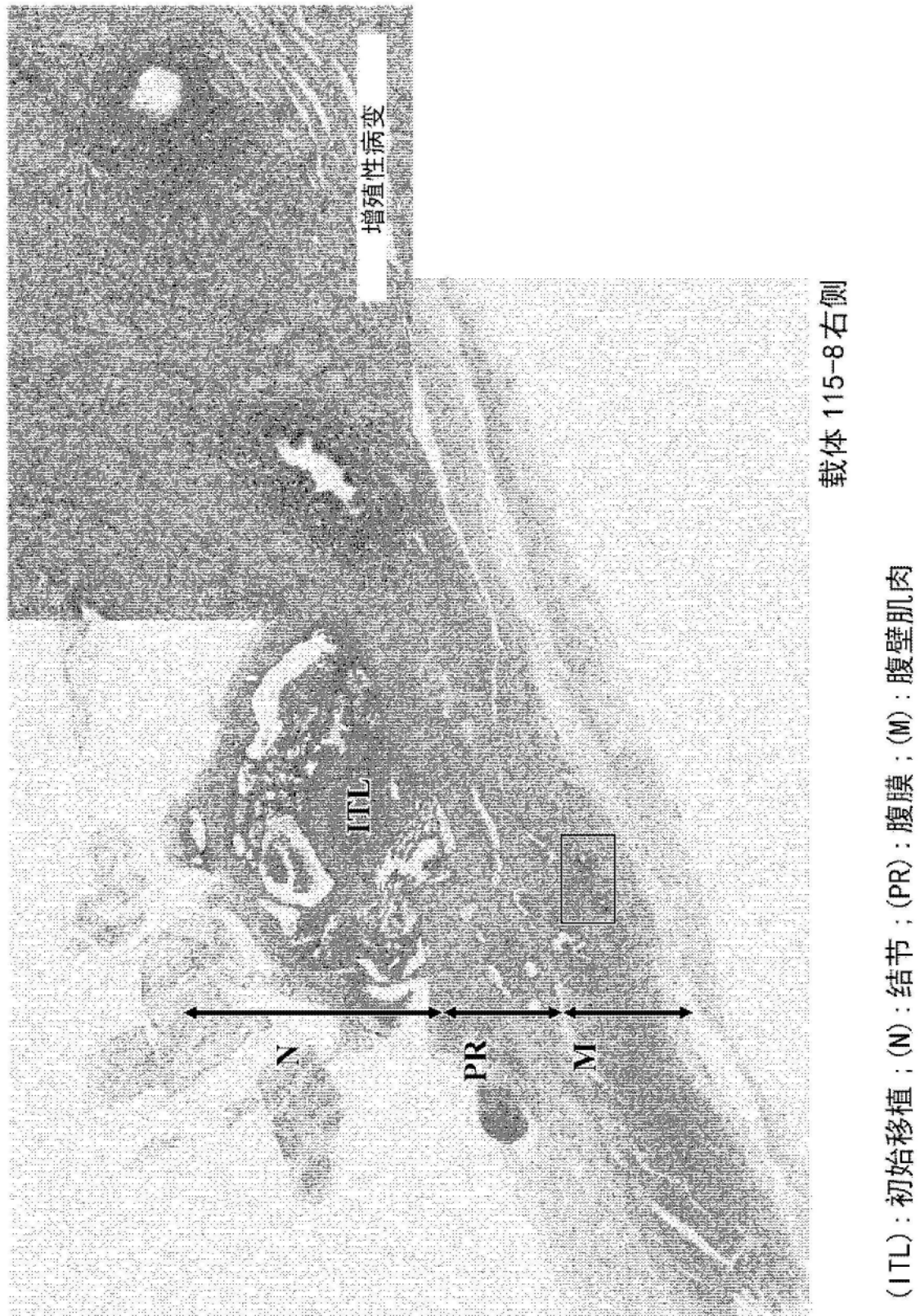


图33

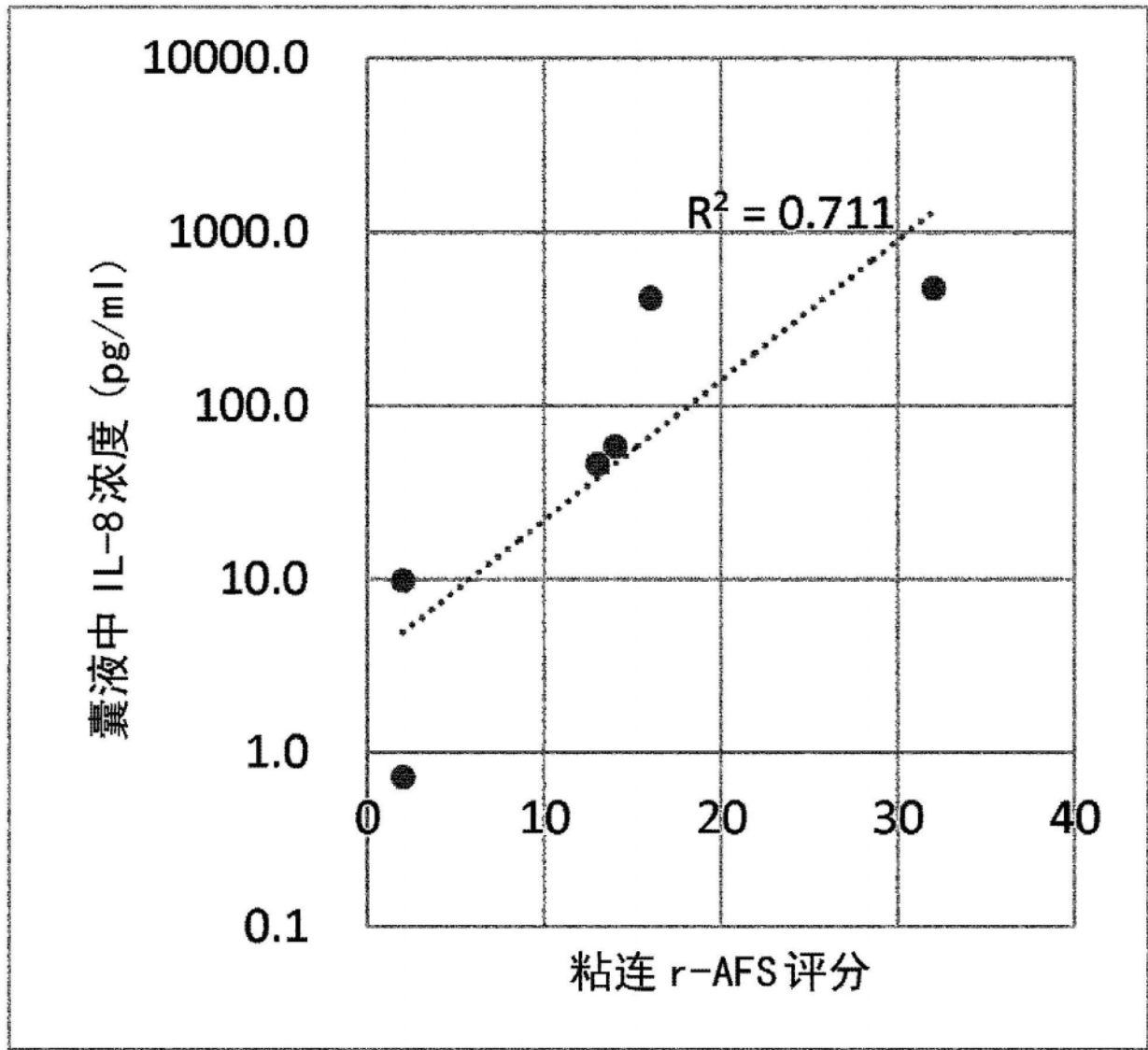


图34-1

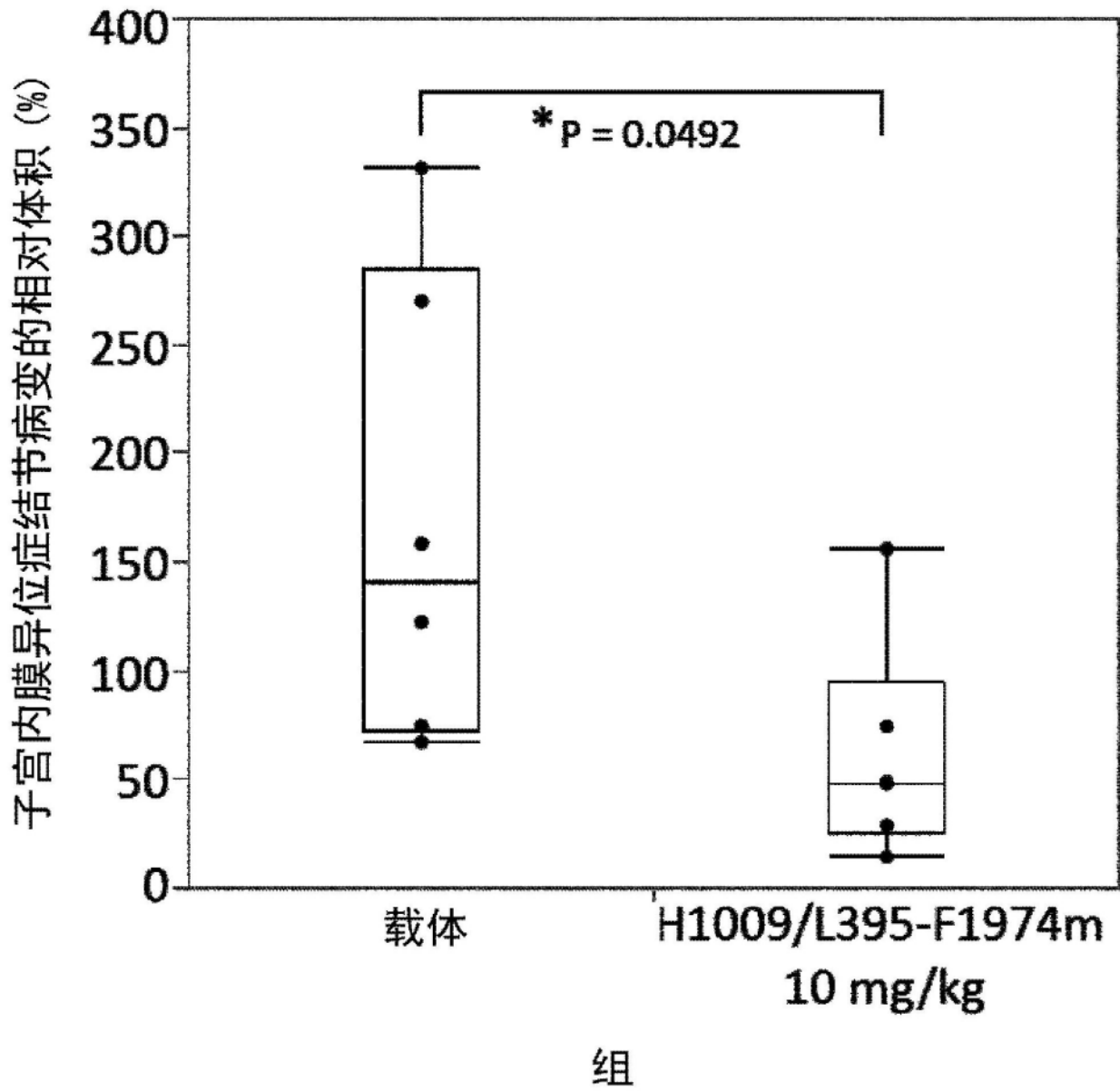


图34-2

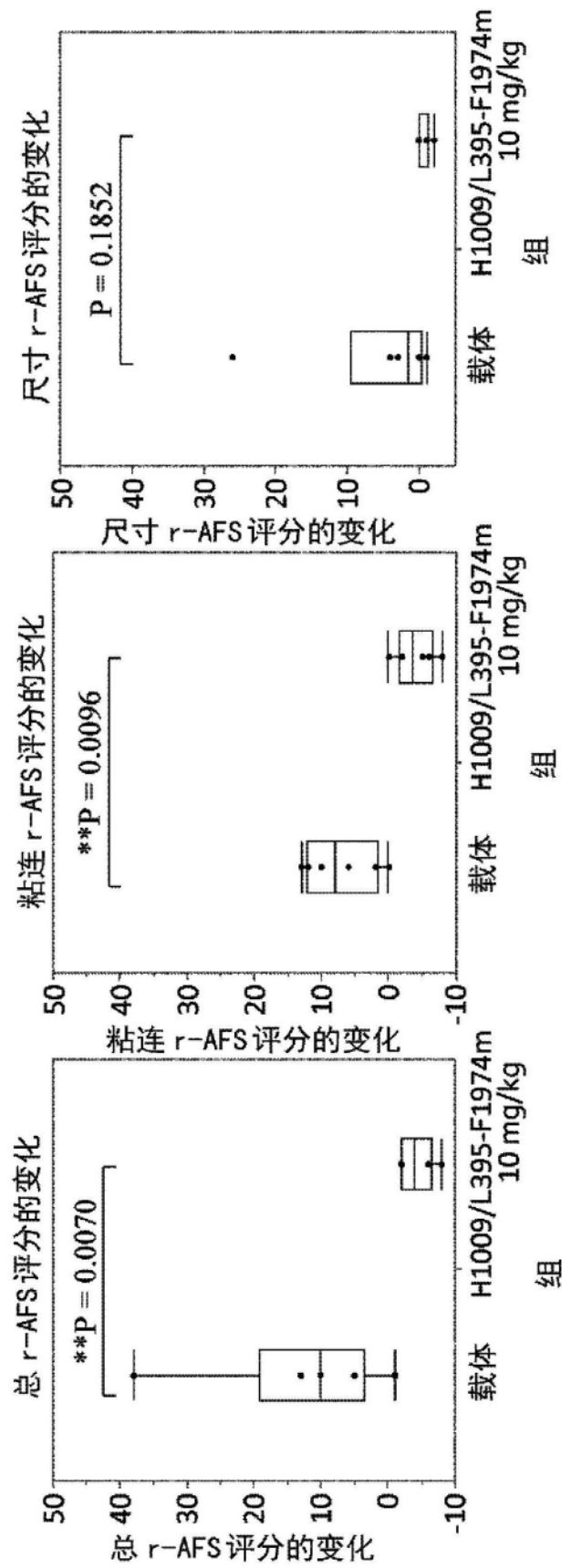


图 35-1

图35-1

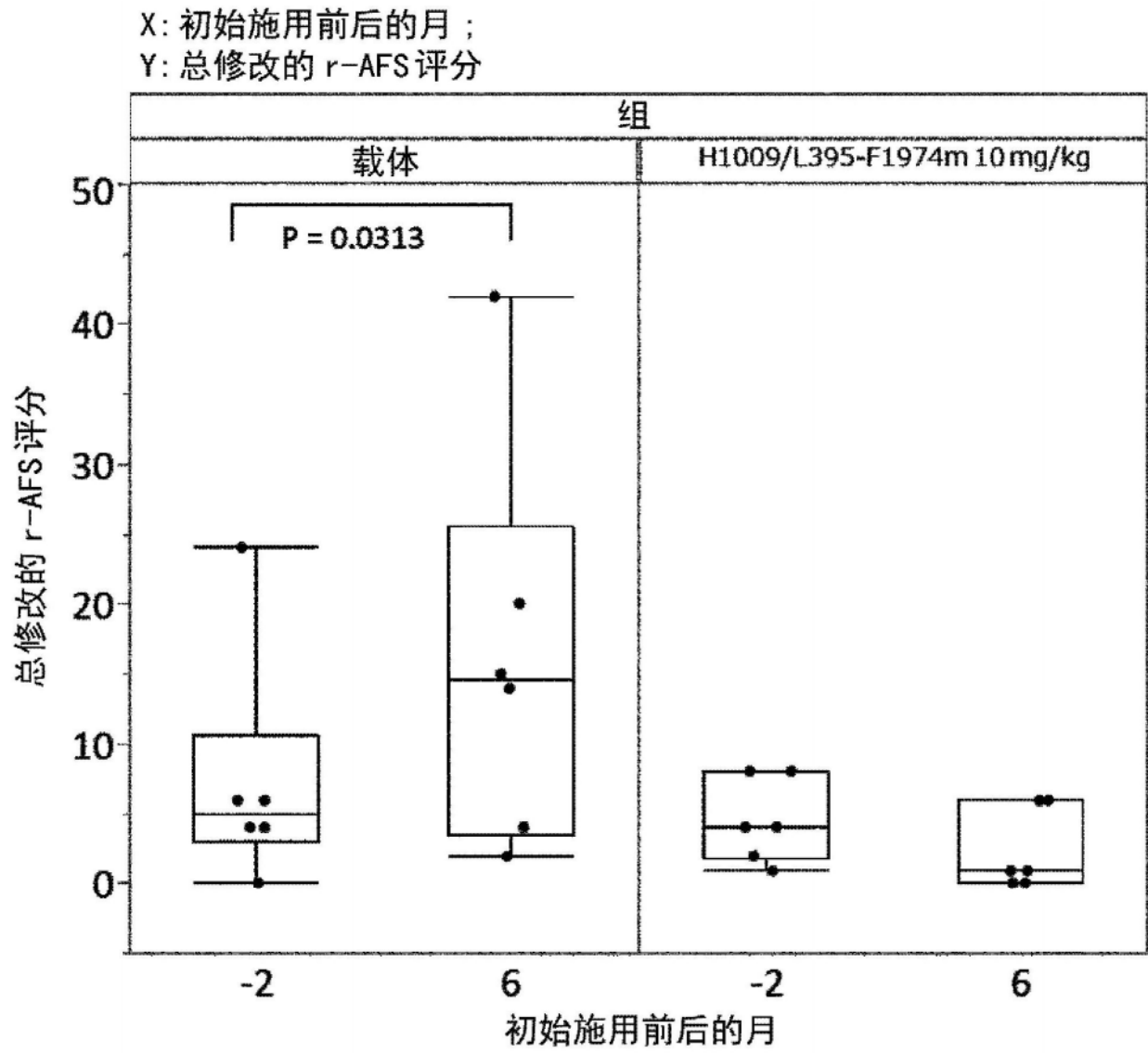


图35-2

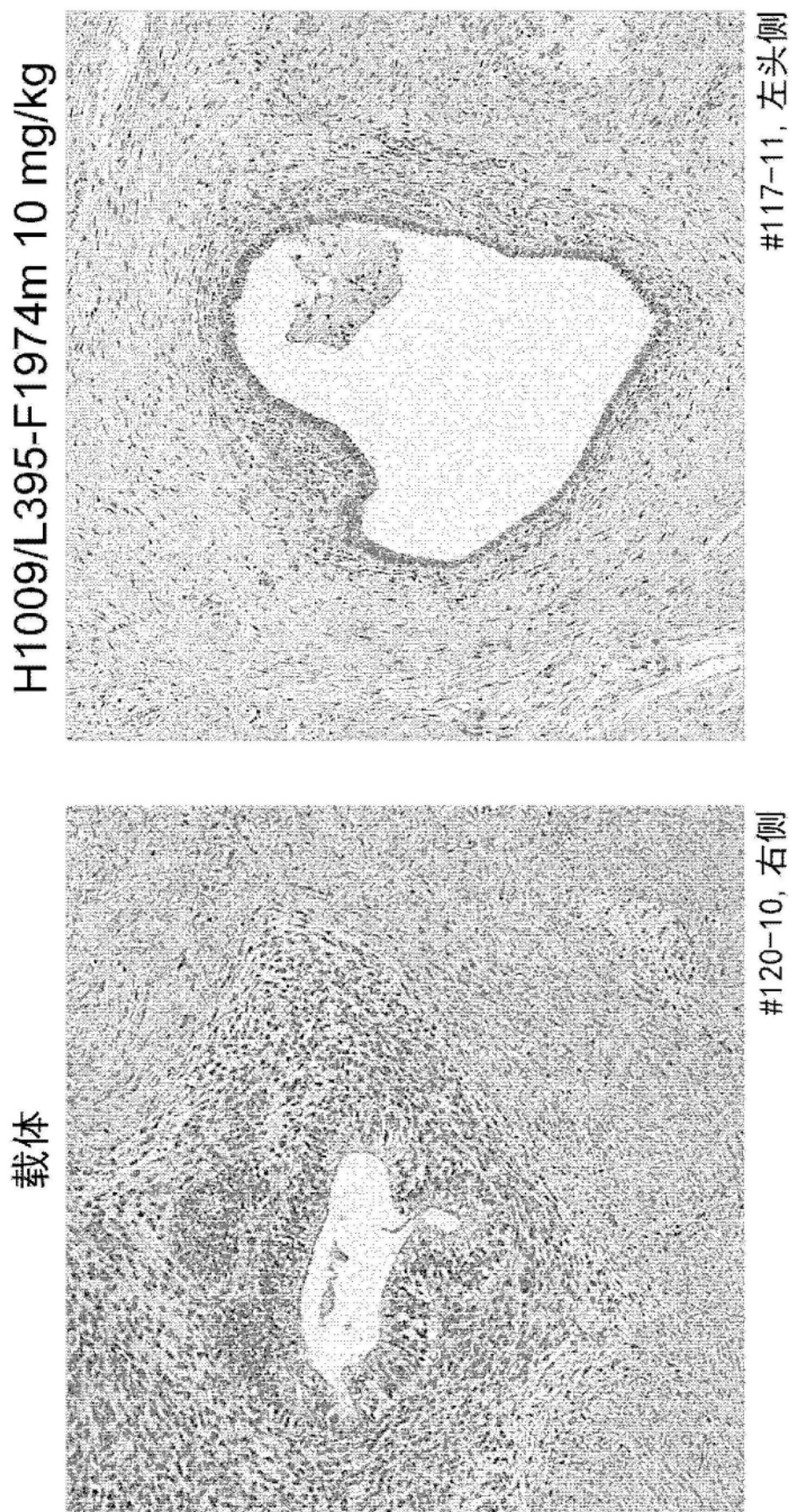
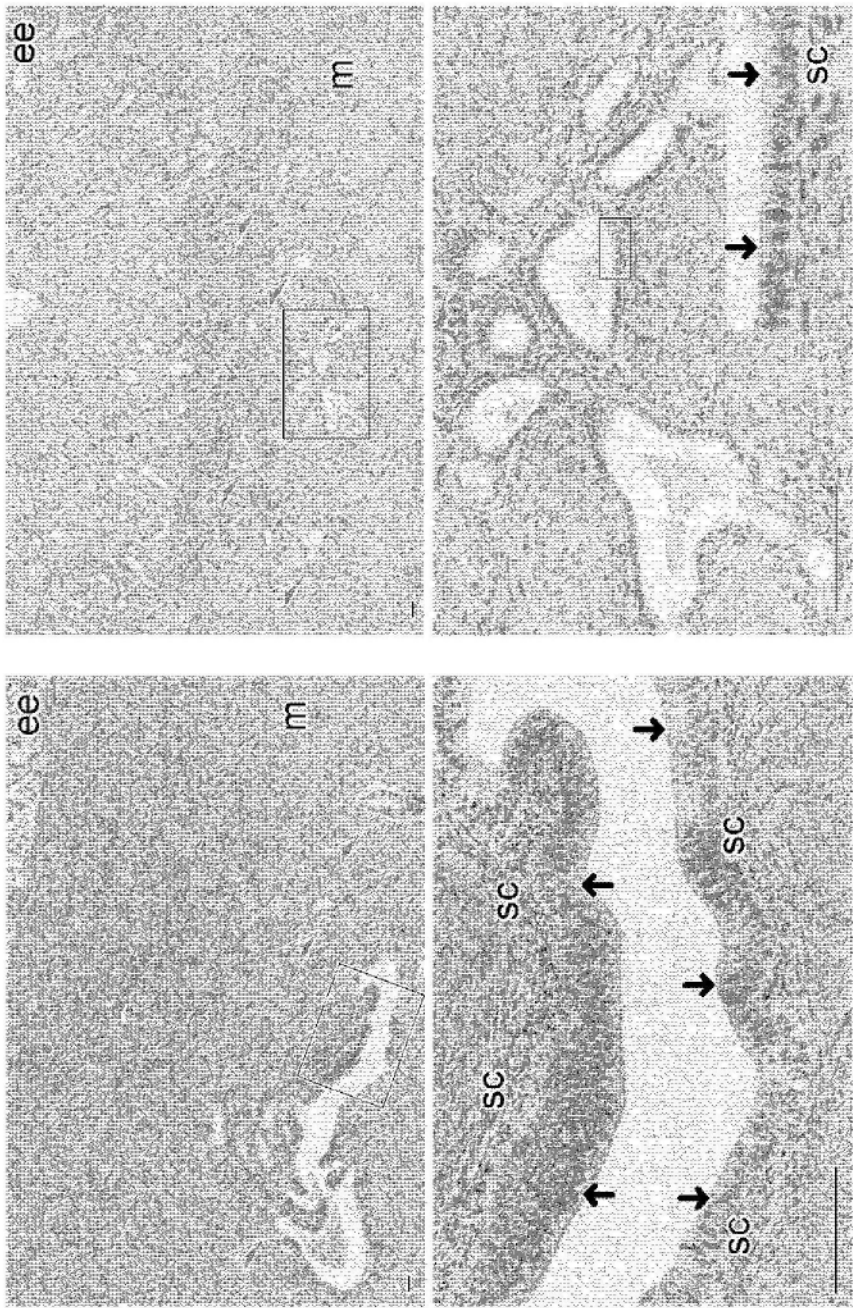


图36



H1009/L395-F1974m 10mg/kg

载体

➤: 异位的子宫内膜异位症病变, ee: 正常子宫内膜, m: 子宫基层
➡: 上皮组织, sc: 基质细胞区域
条 = 10 μ m

图37

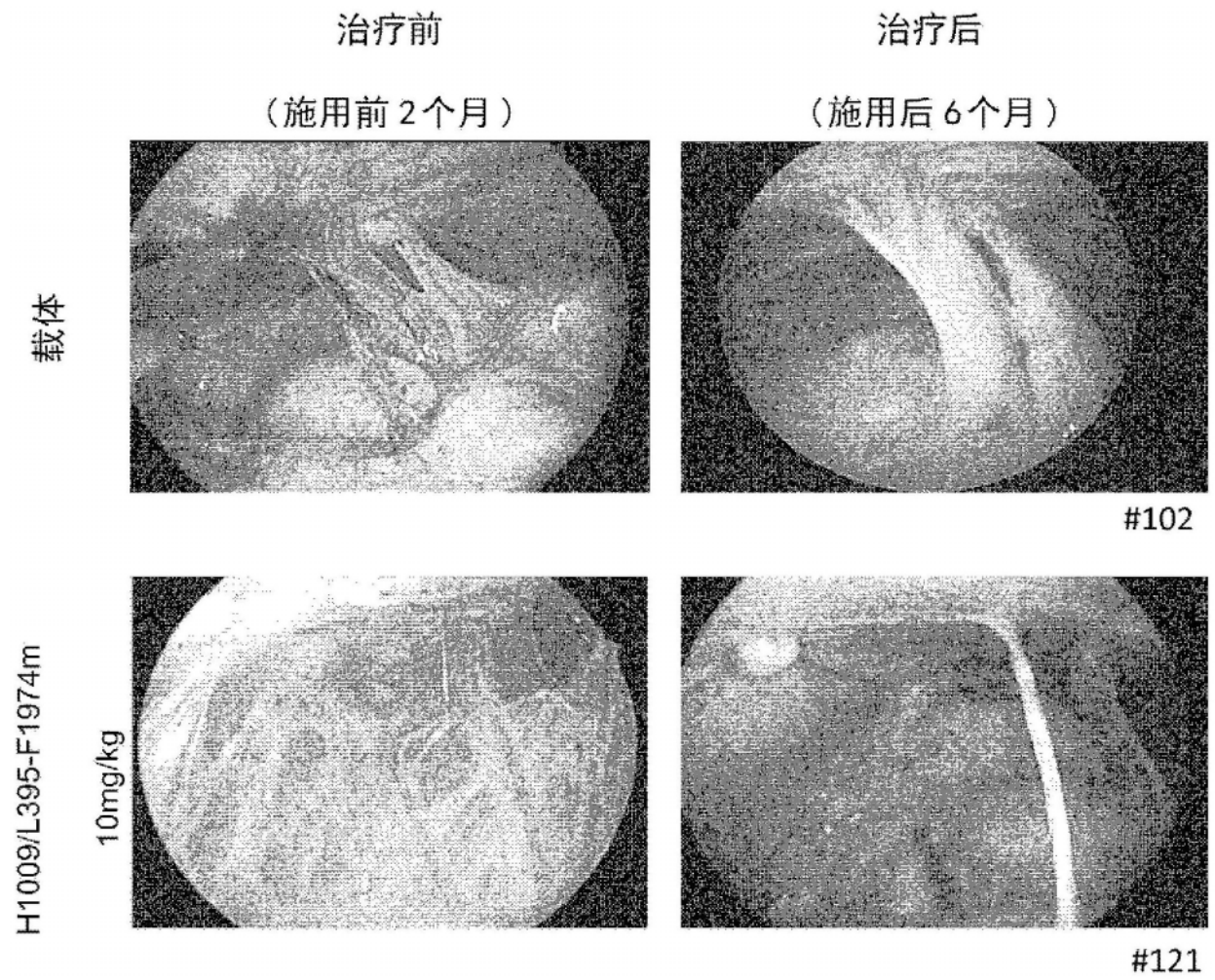


图38

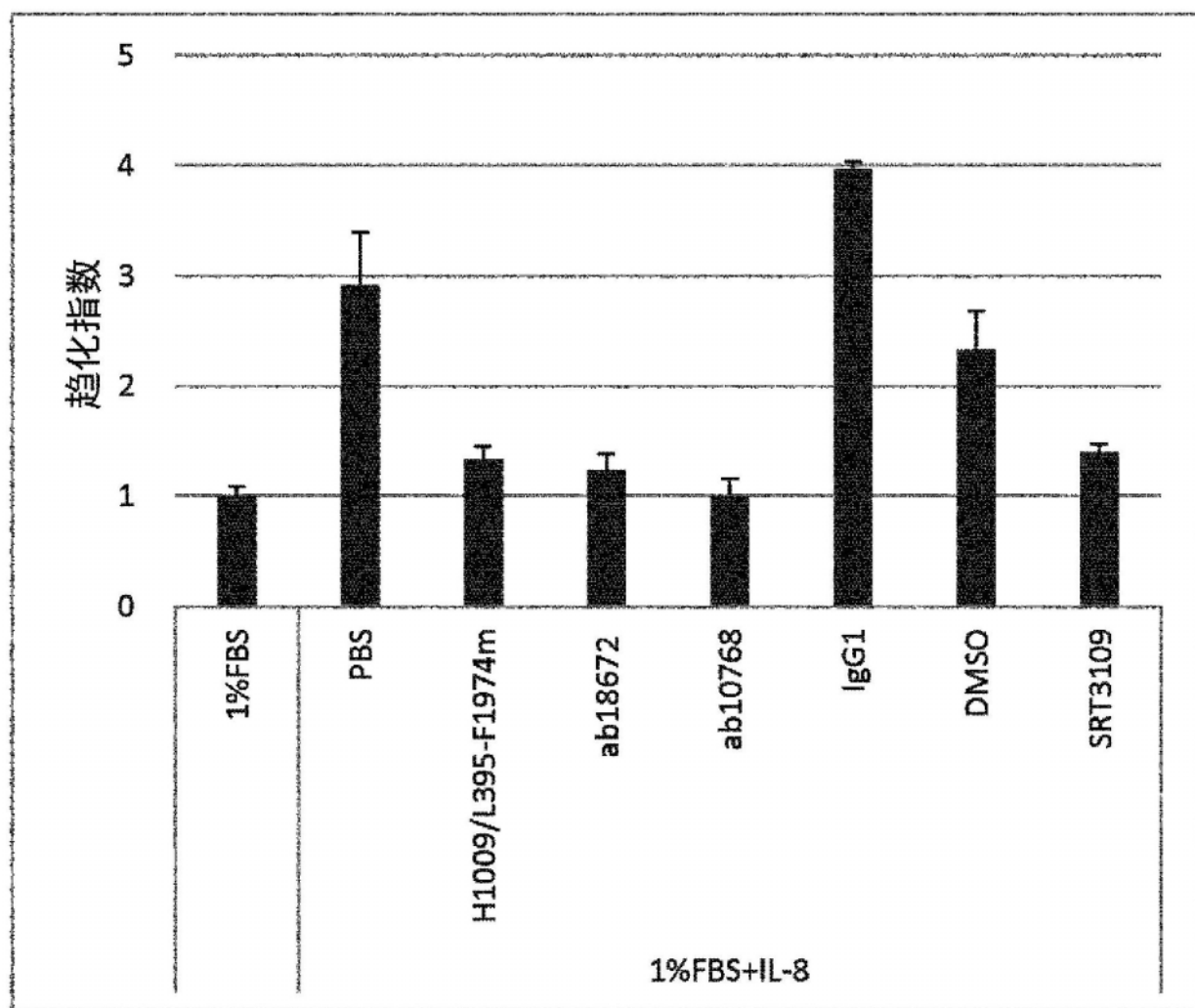


图39

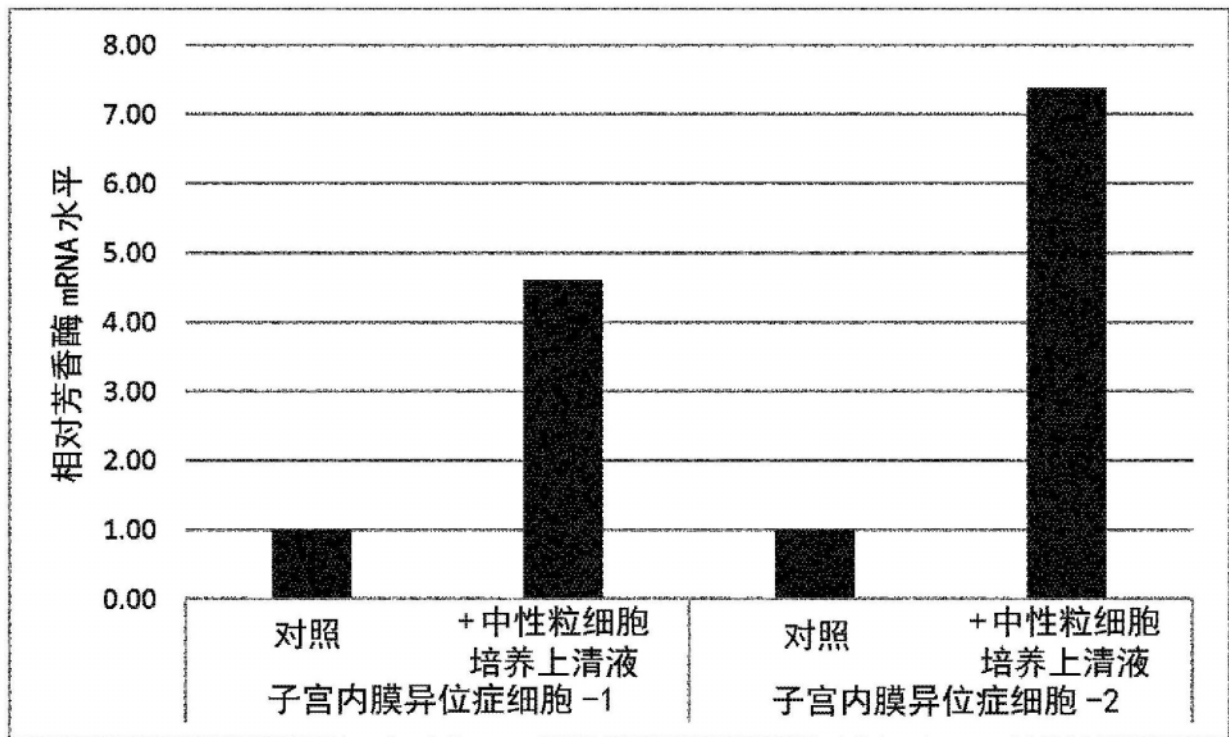
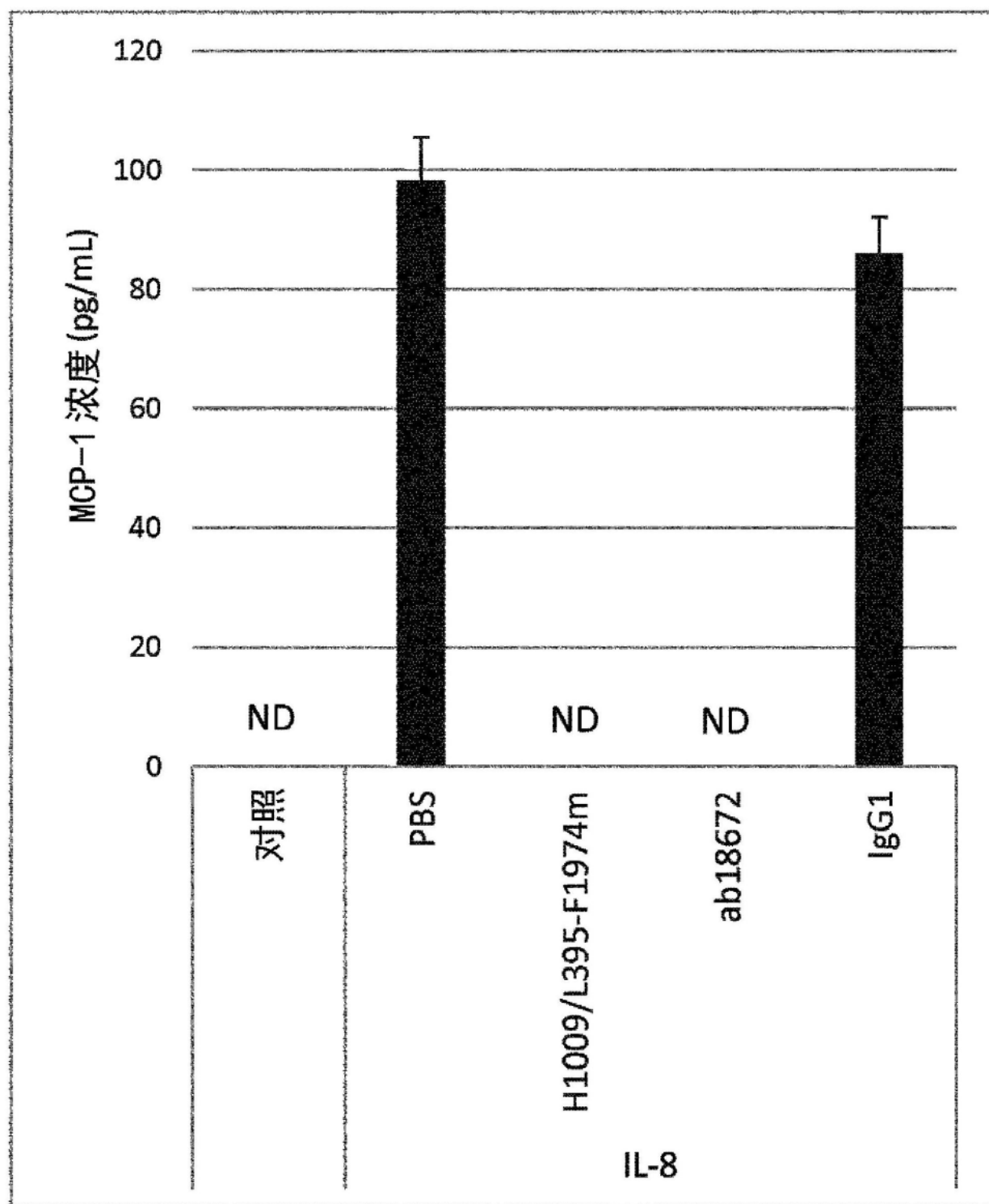
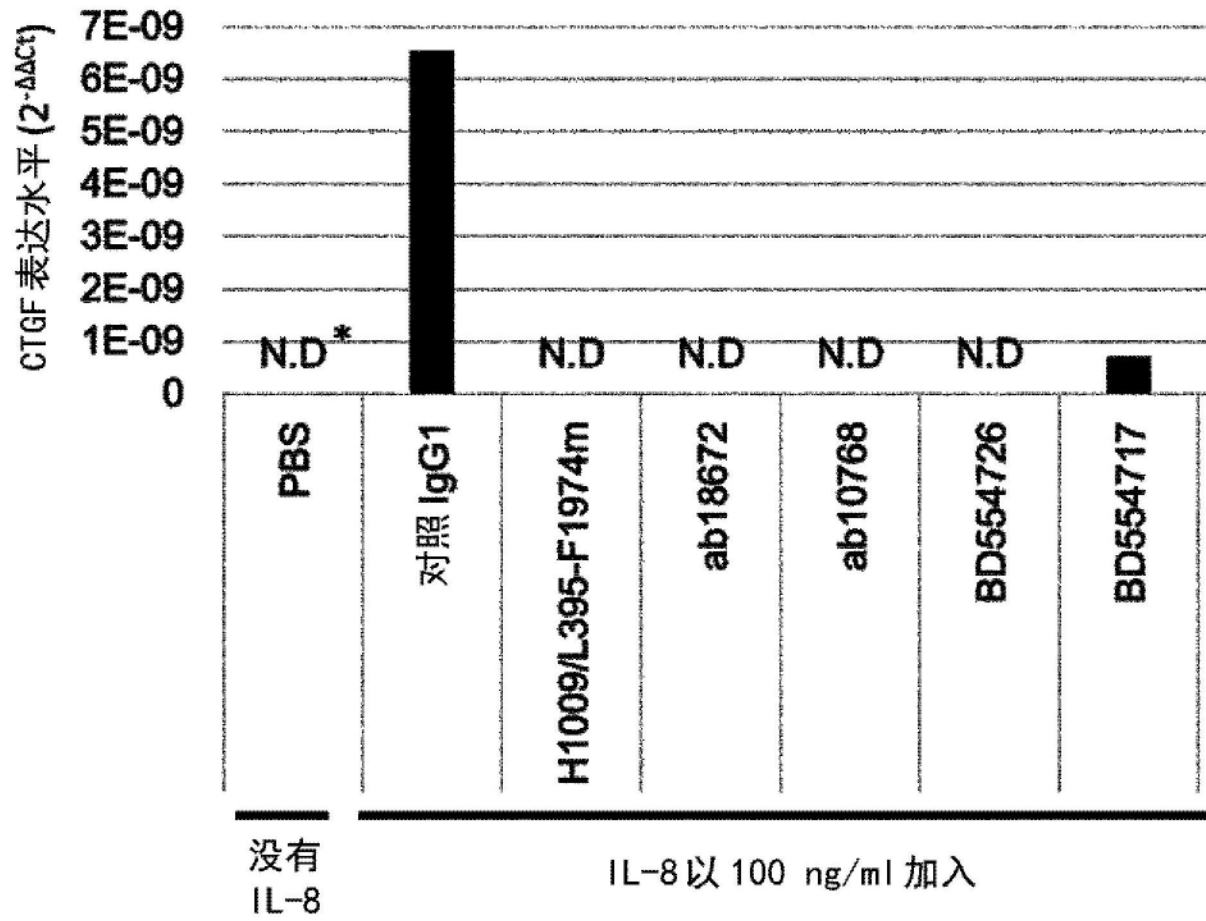


图40



ND: 未检测出

图41



*N. D: 根本未检测出 CTGF 表达

图42