(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116854816 A
(43)申请公布日 2023.10.10

(21)申请号 202310053523.1

(22)申请日 2019.04.02

(30)优先权数据
62/651668 2018.04.02 US

(62)分案原申请数据
201980024875.6 2019.04.02

(71)申请人 阿拉玛布治疗学股份有限公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 张彦丰

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李波 彭昶

(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
C07K 7/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 19/10(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)
A61P 19/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

权利要求书1页 说明书32页
序列表（电子公布） 附图2页

(54)发明名称

连接蛋白43抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及连接蛋白43抗体及其用途。具体地，本公开涉及治疗与骨细胞中Cx43半通道不充分开放相关联的疾病或病况的组合物和方法，优选治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松、或骨质减少。



CN 116854816 A

1.一种抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包含:

分别具有SEQ ID NO:1、2和3的第一、第二和第三重链互补决定区(CDR)序列;和

分别具有SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列的第一、第二和第三轻链CDR序列。

2.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

3.一种抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

4.一种抗Cx43抗体或其抗原结合片段,其中当与Cx43结合时,结合至位于FLSRPTEKTI(SEQ ID NO:19)的氨基酸序列内的表位。

5.如权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中表位可包含一个或多个氨基酸序列,选自:SEQ ID NO:19的F1,S3,R4,P5,T6,E7,K8,T9和I10。

6.如权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中表位由SEQ ID NO:19的F1,S3,R4,P5,T6,E7,K8,T9和110组成。

7.权利要求4的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含SEQ ID NO:19的所有十个氨基酸。

8.一种分离的抗Cx43抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与权利要求1-7中任一项的抗体或其抗原结合片段交叉竞争与Cx43的结合。

9.一种药物组合物,包括权利要求1-8任一所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

10.权利要求1-8中任一项的抗体或其抗原结合片段、权利要求9的药物组合物在制备用于促进骨细胞中Cx43半通道开放的药物中的用途,所述药物优选用于治疗癌症,癌症转移,骨质疏松或骨质减少。

连接蛋白43抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日为2019年4月2日的中国专利申请201980024875.6“连接蛋白43抗体及其用途”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2018年4月2日提交的美国临时申请第62/651,668号的优先权权益,通过引用将该申请的公开内容全文纳入本文。

[0004] 序列表

[0005] 通过EFS-Web在2019年4月1日创建的名为“172628_010900_sequence.txt”的具有43,787字节大小的ASCII文本文件通过引用其全部内容纳入本文。

技术领域

[0006] 本公开一般涉及抗连接蛋白(Cx)43抗体及其在治疗例如与骨细胞中Cx43半通道开放相关联的疾病或病况的用途。

背景技术

[0007] 尽管存在许多预防和治疗措施,癌症仍然是世界范围内死亡的一大主要原因。在2010和2020年之间,美国新癌症病例预期将在男性中增加约24%,每年超过一百万,在女性中增加21%,每年超过900,000例。在男性和女性中预期都将增加最多的癌症类型是黑色素瘤;男性中将是前列腺、肾脏、肝脏和膀胱癌;女性中则是肺、乳腺、子宫和胸腺癌。癌症在美国是第二大常见死因,每4例中占接近1例。许多癌症难于或接近不可能用目前的方法治疗。许多癌症逃匿目前治疗方案,对于治疗产生抗性,或在治疗后复发。

[0008] 当癌症从其起初发生的身体部分(例如乳腺或前列腺)散布到其它身体部分(例如肝脏或骨骼)并建立继发肿瘤时,发生癌症转移。骨骼是癌症转移的最常见位点。转移到骨骼的癌症包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、肺癌和皮肤癌(例如黑色素瘤)。在达75%的患有晚期乳腺和前列腺癌的患者中,可鉴定出骨转移。骨转移(met)与许多显著临床和生命质量的结果有关,例如但不限于棘手的疼痛、病理性骨折、脊索和神经压缩、骨髓浸润和运动受损。在许多情况下,癌症的系统性存在也可使得癌症难以治愈。

[0009] 正常骨骼由三种主要细胞类型组成:骨形成成骨细胞,骨再吸收成骨细胞和骨细胞。骨细胞占骨骼细胞的约95%,通过协调溶骨和成骨活性维持骨重塑过程。当癌细胞侵袭骨骼时,影响许多正常骨骼功能。癌细胞与局部微环境相互作用,通过骨骼破坏和血管化促进癌细胞存活。

[0010] 骨细胞表达称作连接蛋白(Cx)43半通道的半通道。这些骨细胞半通道通常是关闭的,可以在接触机械刺激时打开,导致在骨骼微环境中释放各种因子。半通道开放释放的因子可介导其它减少癌细胞迁移和骨转移的过程。阿仑膦酸(AD)是一种有效和常用的双磷酸药物,已显示能够打开骨细胞中的Cx43半通道。双磷酸盐是一类已知用于治疗许多骨骼疾病,包括骨转移的药物。已显示施用双磷酸盐与骨转移发生减少以及具有乳腺癌的患者中死亡率的降低有关。AD与肿瘤生长减少以及骨骼破坏和疼痛减少相关。AD抑制破骨活性,诱

导骨细胞中Cx43半通道开放。然而，施用AD常伴有多种严重的副作用。

[0011] 因此，存在治疗癌症转移，例如通过开放Cx43半通道的有效方法的需要。

发明内容

[0012] 本文提供了治疗与骨细胞中Cx43半通道开放(例如不充分或缺陷性开放)相关联的疾病或病况的组合物和方法，优选治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松、或骨质减少。

[0013] 在一个方面，本文提供了抗Cx43抗体，或其抗原结合片段，包括：

[0014] 分别具有SEQ ID NO:1、2和3的第一、第二和第三重链互补决定区(CDR)序列；和

[0015] 分别具有SEQ ID NO:4、5和6的第一、第二和第三轻链互补决定区(CDR)序列。

[0016] 在一些实施方式中，抗体或其片段可具有重链可变区，其具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列，和轻链可变区，其具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0017] 在另一个方面，本文提供了抗-Cx43抗体或其抗原结合片段，包括重链，其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列，和轻链，其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0018] 在另一个方面，本文提供了与位于氨基酸序列FLSRPTEKTI(SEQ ID NO:19)内的表位结合的抗体。在一些实施方式中，表位可包含一个或多个氨基酸，选自:SEQ ID NO:19的F1,S3,R4,P5,T6,E7,K8,T9和I10。在一个实施方式中，表位由SEQ ID NO:19的F1,S3,R4,P5,T6,E7,K8,T9和I10组成。在一些实施方式中，表位可包括SEQ ID NO:19的全部10个氨基酸。在一些实施方式中，表位可由SEQ ID NO:19的全部10个氨基酸组成。

[0019] 在另一个方面，本文提供了分离的抗-Cx43抗体或其抗原结合片段，其中抗体或其片段与任何本文公开的抗体或其片段交叉竞争与Cx43的结合。在一些实施方式中，抗体或其片段促进骨细胞中的Cx43半通道开放。

[0020] 在另一个方面，本文提供了一种药物组合物，用于促进骨细胞中的半通道开放，优选用于治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松、或骨质减少，包括本文公开的抗体或其片段和药学上可接受的载体。

[0021] 本文还提供了本文公开的抗体或其片段的用途，用于制备药物，以促进骨细胞中的Cx43半通道开放，优选用于治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松、或骨质减少。

[0022] 本文还提供了一种促进骨细胞中的Cx43半通道开放的方法，优选用于治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松、或骨质减少，包括使骨细胞接触有效量的本文公开的抗体或其片段。

[0023] 本文还提供了一种治疗与骨细胞中Cx43半通道不充分开放相关联的疾病或病况的方法，优选用于治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松、或骨质减少，包括对有需要的患者施用治疗有效量的本文公开的抗体或其片段。

附图说明

[0024] 图1:抗体筛选原始数据的箱形图。

[0025] 图2:在高严格条件下用抗体探测肽FLSRPTEKTI的全替换分析的字母图。基础序列列于图下方，基线序列的有义信号在红线处。给定位置的取代绘于对该置换记录的信号强度处。

[0026] 图3:在高严格条件下用抗体探测肽FLSRPTEKTI的全替换分析的字母图。基础序列

列于图下方，基线序列的有义信号在红线处。给定位置的取代绘于对该置换记录的信号强度处。

具体实施方式

[0027] 应理解，前面的一般性描述和下面的详细描述都只是示例性和解释性的，不对本公开的组合物和方法构成限制。

[0028] 本文公开了与抗Cx43抗体或其抗原结合片段有关的组合物和方法。在一些实施方式中，本文公开的组合物显示了相对于PCT出版公开号WO2015/027120和WO2017/147561(在此完整引入以供参考)中公开的那些更卓越的活性、可药用性(例如减少的毒性)、稳定性和/或可开发性(例如减少的生产成本)。在一些实施方式中，优点是出乎意料的。

[0029] 定义

[0030] 方便起见，将说明书、实施例和所附权利要求中使用的特定术语汇集在此。除非另外定义，否则，本文中所使用的所有技术和科学术语都具有本文所属领域普通技术人员通常所理解的含义。

[0031] 本文所用的下列术语和词语将具有下列意义：

[0032] 本文使用冠词“一个”和“一种”表示一个或一个以上的(即至少一个)该冠词语法上的宾语。举例而言，“一种元件”表示一个元件或者一个以上的元件。

[0033] 本文所用术语“约”表示在所示值20％以内，更优选10％以内并且最优选5％以内的可接受误差。

[0034] “抗Cx43抗体”是与Cx43(例如其胞外结构域)免疫特异性结合的抗体。抗体可以是分离的抗体。与Cx的这种结合显示值例如不大于1μM，不大于100nM或不大于50nM的K_D值。可用本领域技术人员已知的任何方法测定K_D，例如表面质子共振实验或细胞结合实验。抗Cx43抗体可以是单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0035] 本文所用的“抗体”是包含与目标表位结合的结合域的蛋白质。术语抗体包括单克隆抗体，所述单克隆抗体包含免疫球蛋白重链和轻链分子，单重链可变域抗体，和其变体和衍生物，包括单克隆和单重链可变结构域抗体的嵌合变体。结合域基本由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码，其中蛋白质与抗原免疫特异性结合。已被认识的免疫球蛋白基因包括kappa，lambda，alpha，gamma，delta，epsilon和mu恒定区基因，以及大量免疫球蛋白可变区基因。轻链被归类为κ或λ。重链被归类为γ、μ、α、δ或ε，这进而确定了免疫球蛋白类别，分别为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。对于大多数脊椎生物，包括人和小鼠，典型的免疫球蛋白结构单元包括四聚体，其包含两对相同的多肽链，每对具有一条“轻”(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。“VL”和“VH”分别指这些轻链和重链。“C_L”和“C_H”指轻链和重链的恒定区。每条V_L和V_H上的三个β-链环负责与抗原结合，称作“互补决定区”或“CDR”。“Fab”(抗原结合片段)区包括来自抗体的每条重链和轻链的一个恒定区和一个可变区即V_L，C_L，V_H和C_H1。

[0036] 抗体包括完整的免疫球蛋白和其抗原结合片段。术语″抗原结合片段″指与抗原结合或与完整抗体(即其衍生来源的完整抗体)竞争抗原结合(即特异性结合)的抗体多肽片段。可用本领域熟知的重组或生物化学方法产生抗原结合片段。示范性抗原结合片段包括Fv，Fab，Fab′，$(Fab')_2$，CDR，互补位和单链Fv抗体(scFv)，其中V_H和V_L链结合在一起(直接或通过肽接头)形成连续的多肽。

[0037] 抗体还包括变体、嵌合抗体和人源化抗体。本文所用的术语“抗体变体”指在重链和/或轻链中具有单个或多个突变的抗体。在一些实施方式中，突变存在于可变区中。在一些实施方式中，突变存在于恒定区中。“嵌合抗体”指这样的抗体，其中重链和轻链氨基酸序列中每一条的一部分与衍生自特定物种或属于特定家族的抗体对应序列同源，但链的剩余区段与另一物种或家族的对应序列同源。通常在这些嵌合抗体中，轻链和重链可变区模拟衍生自哺乳动物物种的抗体可变区，而恒定区与衍生自另一种物种的抗体的序列同源。这些嵌合形式的一种显著优点是例如能使用来自非人宿主生物的轻易可得的杂交瘤或B细胞便利地从目前已知的序列衍生可变区，而从例如人细胞制备物衍生恒定区。虽然可变区具有容易制备的优点，且其特异性不受其来源影响，来自人的恒定区将较难在抗体注射入人个体时引发免疫应答，相较其恒定区来自非人来源的对应抗体而言。然而，定义并不限于该具体例子。“人源化”抗体指一种分子，其具有基本衍生自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点，分子的剩余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可包括融合在恒定区上的完整可变区或仅移植到可变区中的合适框架结构区的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型或以一个或多个氨基酸取代修饰，例如修饰成更像人免疫球蛋白。人源化抗体的一些形式保留了所有的CDR序列(例如人源化小鼠抗体，其包含来自小鼠抗体的全部六个CDR)。人源化抗体的其它形式具有一个或多个CDR(一、二、三、四、五或六个)，它们相对于原始抗体有所改变，也称作“衍生自”一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0038] 如本文所述，抗体氨基酸残基可根据Kabat的通用编号系统编号(Kabat等(1991)《免疫学热门蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》，第五版.NIH，公共卫生局(Public Health Service)，马里兰州贝塞斯达)。

[0039] 如本文抗体和作为靶标的Cx43的表位之间的结合的上下文中所用术语“结合”指分子间的非共价相互作用的过程。优选地，所述结合具有特异性。抗体的特异性可以基于亲和力确定。特异性抗体对其表位的结合亲和力或解离常数K_D小于10^{-7}M，优选小于10^{-8}M。

[0040] 术语“亲和力”指抗体的结合结构域与表位之间结合反应的强度。其是在结合结构域和表位之间作用的吸引力和排斥力的总和。本文所用的术语亲和力指解离常数K_D。

[0041] 术语“抗原”指一种分子或分子部分，其能与选择性结合分子例如抗体结合，还能用于动物产生与该抗原的表位结合的抗体。抗原可具有一个或多个表位。

[0042] 术语“癌症”泛指宿主自身细胞不受控的异常生长，导致侵袭周围组织和可能的与宿主中异常细胞生长的最初位点远端的组织。主要类别包括肿瘤，其为表皮组织癌(例如皮肤、鳞状细胞)；肉瘤，其为结缔组织癌(例如骨骼、软骨、脂肪、肌肉、血液组织等)；白血病，其为造血组织癌(例如骨髓组织)；淋巴瘤和骨髓瘤，其为免疫细胞癌；和中枢神经系统癌，其包括大脑和脊髓组织的癌症。“癌症”、“新生物”和“肿瘤”在本文中互换使用。本文所用的“癌症”指所有类型的癌或新生物或恶性肿瘤，包括白血病、肿瘤和肉瘤，不论是新生还是复发的。癌症的特定例子包括：肿瘤、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤和混合类型的肿瘤。癌症的非限制性例子是大脑、骨髓瘤、膀胱、乳腺、宫颈、头颈、肾、非小细胞肺、间皮瘤、卵巢、前列腺、肉瘤、胃、子宫和髓母细胞瘤的新发或复发癌。

[0043] 术语“表位”包括任意能够特异性结合免疫球蛋白或T细胞受体的决定区，优选多肽决定区。在某些实施方式中，表位决定簇包括有化学活性的成组表面分子(例如氨基酸、

糖侧链、磷酰基或磺酰基基团)，而在某些实施方式中，表位决定簇可具有特定的三维结构特点和/或特定的荷电特点。在一个实施方式中，表位是由抗体结合的抗原的区域。在一些实施方式中，当抗体在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其目标抗原时，称为与抗原特异性结合。表位作图的方法是本领域熟知的，例如X光共结晶学鉴定、基于阵列的寡肽扫描、定点诱变、高通量诱变作图和氢-氘交换。可从连续氨基酸或由于蛋白质三级结构折叠并置的不连续氨基酸形成表位。连续氨基酸形成的表位通常在与变性溶剂接触后仍然维持，而三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理后丧失。表位通常包含呈现独特空间构象的至少3个、更通常至少5个或约8-10个氨基酸。

[0044] 与表位结合的抗体上的位点称作“互补位”，其通常包括与表位一旦结合后紧邻的氨基酸残基。见Sela-Culang等，Front Immunol.2013;4:302。

[0045] “免疫组织化学”或“IHC”指在细胞或组织切片中检测的过程，其能够实现在生物组织中免疫特异性识别感兴趣抗原的抗体的结合及其随后的检测。IHC技术的综述可见例如Ramos-Vara等，Veterinary Pathology January 2014卷51号(1)，42-87，在此完整引入以供参考。为了评估IHC结果，开发了不同的定型和半定量评分系统。参见例如Fedchenko等，Diagnostic Pathology，2014;9:221，在此完整引入以供参考。一个例子是H分数，它是通过将具有染色强度序数值(从“无信号”的0到“强信号”的3得分)的细胞百分数与300个可能的值相乘的结果相加而得出的。

[0046] “免疫特异性的”or“免疫特异性地”(有时与“特异地”可互换使用)指通过免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的域与感兴趣代表的一个或多个表位结合，但基本不识别和结合包含抗原分子的混合群体的样品中的其它分子的抗体。通常，用例如实时无标签生物层干涉技术，例如Octet®HTX生物传感器，或用表面等离子体共振例如BIACORE™，或用溶液亲和力ELISA测定的抗体与同源抗原免疫特异性结合的K_D值不大于50nM。这些技术的使用是本领域熟知的。

[0047] 术语“表面等离子体共振”是指一种光学现象，可通过检测生物传感器基质中蛋白质浓度的变化来分析实时生物分子相互作用，例如使用BIACORE™系统(Pharmacia Biosensor AB，Uppsala，Sweden and Piscataway，N.J.)。

[0048] 生物层干涉术是无标签的技术，用于测定生物分子相互作用。它是一种光学分析技术，其分析两种表面反射白光的干涉模式：在生物传感器尖端的一层固定化蛋白质和一层内部参比。与生物传感器尖端结合的分子数量中的任何改变导致可实时测量的干涉模式变化(Abdiche，Y.N.，等，Analytical Biochemistry，(2008)，377(2)，209-217)。在一些实施方式中，用“基于实时生物层干涉仪的生物传感器(Octet HTX技术)”评估本文公开的一些抗Cx43抗体的结合特征。

[0049] 术语″交叉竞争″，″交叉竞争性″，″交叉阻断″，″交叉阻断的″和″交叉阻断性″在本文中可互换使用，指抗体或其片段通过本文抗Cx43抗体的变构调节直接或间接干涉目标Cx43的结合。抗体或其片段能干涉另一种抗体或其片段与目标结合的程度以及因此是否可根据本公开称作交叉封闭或交叉竞争可用竞争性结合实验确定。一种特别适合的定量交叉竞争实验使用FACS或基于AlphaScreen的方法，以测定标记的(例如His标志、生物素化或放射性标记)抗体或其片段与另一种抗体或其片段之间竞争与其目标结合的能力。一般说，交叉竞争性抗体或其片段因此是例如能在交叉竞争实验中与目标结合的抗体，因此在实验过

程中或在第二种抗体或其片段存在下根据公开内容免疫球蛋白单可变区或多肽被记录的置换(displacement)达到最大理论置换(例如被需要被交叉封闭的冷(未标记)抗体或其片段置换)的最高100％(例如在基于FACS的竞争实验中)被给定量的要测试的潜在交叉阻断性抗体或其片段置换。优选因此交叉竞争性抗体或其片段具有10％-100％之间,更优选50％-100％之间的记录的置换。

[0050] 抗体之间的交叉竞争性还可用实时无标记生物层干涉术实验测定。两种抗体之间的交叉竞争可表示成由于自身结合(第一种和第二种抗体是相同抗体)第二种抗体的结合低于北京信号。两种抗体之间的交叉竞争可表示成例如小于基线自身背景结合(第一种和第二种抗体是相同抗体)的第二种抗体结合％。

[0051] 术语“促进”、“增强”和“诱导”可在本文中互换使用,指生物活性中任何统计学显著的提高(例如半通道开放)。例如,“促进”可以指生物活性增加约10％,20％,30％,40％,50％,60％,70％,80％,90％或100％。

[0052] 术语“患者”包括人或其他哺乳动物,其接受预防性或治疗性处理。

[0053] 本文所用的术语“治疗”是指诸如本文所述的治疗或预防措施。“治疗”方法采用向患者(例如患有癌症的患者)施用本文提供的Cx43配体,以预防,治愈,延迟,降低癌症或复发癌症的严重性或减轻其一种或多种症状,或者为了将患者的生存期延长至超出在没有此类治疗的情况下预期的生存期。“治疗”的方法还采用向患者施用本文提供的Cx43配体(例如抗体)以在患者中提供超出在不存在这种治疗的情况下预期的癌症治疗。

[0054] 如本文所用,术语“有效量”是指当施用给患者时足以实现癌症的治疗、预后或诊断的试剂(例如Cx43配体,如抗Cx43抗体)的量。治疗有效量可以根据患者和所治疗的疾病或病症,对象的体重和年龄,疾病或病症的严重程度以及给药方式等而变化,这些都可由本领域普通技术人员容易地确定。给药剂量范围可以是例如约1ng至约10,000mg,约5ng至约9,500mg,约10ng至约9,000mg,约20ng至约8,500mg,约30ng至约7,500mg,约40ng至约7,000mg,约50ng至约6,500mg,约100ng至约6,000mg,约200ng至约5,500mg,约300ng至约5,000mg,约400ng至约4,500mg,约500ng至约4,000mg,约1μg至约3,500mg,约5μg至约3,000mg,约10μg至约2,600mg,约20μg至约2,575mg,约30μg至约2,550mg,约40μg至约2,500mg,约50μg至约2,475mg,约100μg至约2,450mg,约200μg至约2,425mg,约300μg至约2,000,约400μg至约1,175mg,约500μg至约1,150mg,约0.5mg至约1,125mg,约1mg至约1,100mg,约1.25mg至约1,075mg,约1.5mg至约1,050mg,约2.0mg至约1,025mg,约2.5mg至约1,000mg,约3.0mg至约975mg,约3.5mg至约950mg,约4.0mg至约925mg,约4.5mg至约900mg,约5mg至约875mg,约10mg至约850mg,约20mg至约825mg,约30mg至约800mg,约40mg至约775mg,约50mg至约750mg,约100mg至约725mg,约200mg至约700mg,约300mg至约675mg,约400mg至约650mg,约500mg,或约525mg至约625mg本文提供的抗体或其抗原结合片段。给药可以是例如每周、每两周、每三周、每4周、每5周或每6周。可调节剂量方案以提供最佳治疗响应。有效量还是试剂的任何毒性或有害效果(副作用)最小化和/或被有益效果抵消的量。给药可以是静脉内精确或约6mg/kg或12mg/kg每周静脉内给药,或者以12mg/kg或24mg/kg每两周静脉内给药。其它给药方案如下所述。

[0055] 合适领域的普通技术人员能够一般理解本文所使用的重组核酸技术、微生物学、免疫学、抗体工程和分子和细胞生物学领域内的其它术语。例如,制备重组DNA,进行寡核苷

酸合成和实施组织培养与转化可采用常规技术(如电穿孔、转染或脂质转染)。酶促反应和纯化技术可按照生产商的说明书或按照本领域常规操作或按照本文所述来进行。以上所述技术和方法可以一般性地按照如本领域所知、亦如本说明书所引用和论述的众多综合性和专论性文献中所述来进行。参见,例如Sambrook等,2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)(第3版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港),该书通过援引纳入本文通用于所有目的。除非特别说明,本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药学化学中使用的命名以及实验室方法和技术是本领域公知且普遍使用的。对于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及治疗患者,可使用标准技术。

[0056] 如本文所用,术语包含摄或包括摄是指存在于给定实施方式中,但未包含未指定要素的组合物,方法及其各自的组分。

[0057] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方式所需的那些要素。该术语允许存在实质上不影响本公开的该实施方式的基本和新颖的或功能的特征的附加要素。

[0058] 术语“由……组成”是指本文所述的组合物,方法及其各自的组分,其排除了在该实施方式的描述中未列举的任何要素。

[0059] 本说明书和所附权利要求书中,单数形式“一”和“所述”包括复数含意,除非另有明确说明。因此,例如,一种方法摄包括一种或多种方法,和/或本文所述类型步骤,这些方法对于本领域技术人员在阅读本公开等后将变得显而易见。

[0060] 在以下小节中进一步详细描述本公开的各个方面和实施方式。

[0061] Cx43

[0062] 各种细胞能够通过半通道和连接蛋白形成的间隙连接彼此通信,并与胞外环境通信。连接蛋白在人体中普遍表达。六个连接蛋白组成一个半通道,两个半通道组成一个间隙连接通道。间隙连接是位于相邻细胞之间质膜内的一组通道,它们介导胞间通讯。半通道是与间隙连接通道分开的实体。半通道允许胞内区室与胞外环境之间的分子交换。

[0063] 骨细胞表达称作连接蛋白(Cx)43半通道的半通道。这些骨细胞半通道通常是关闭的,可以在接触机械刺激时打开,导致在骨骼微环境中释放各种因子。半通道开放释放的因子可介导其它减少癌细胞迁移和骨转移的过程。

[0064] 连接蛋白-43也称为间隙连接α-1蛋白(GJA1),它是一种4382kDa的蛋白,由382个氨基酸组成(NCBI参考序列:NP_000156.1)。GJA1包含一个长C末端尾,一个N末端结构域和多个跨膜结构域。蛋白质四次通过磷脂双层,保留其C和N端与胞质接触。C末端尾由50个氨基酸组成,包括翻译后修饰位点以及转录因子、细胞骨架元件和其他蛋白质的结合位点。结果,C末端尾对于调节pH门控和通道装配等功能至关重要。值得注意的是,编码该尾的GJA1基因(NCBI基因ID:2697)的DNA区高度保守,这表明它要么对突变具有抗性,要么在突变后变得致命。同时,N末端域参与通道门控和寡聚,因此可控制通道开放和关闭状态之间的切换。跨膜结构域形成间隙连接通道,而胞外环促进正确通道对接。此外,两个胞外环形成与两个六聚体相互作用的二硫键,形成一个完整的间隙连接通道。

[0065] 抗-Cx43抗体

[0066] 促进或增强Cx43半通道的开放可以诱导或促进骨细胞中Cx43半通道的开放,从而治疗例如癌症,癌症转移,骨肉瘤,骨质疏松或骨质减少。如此,抗Cx43抗体可用作癌症治疗

中的有效试剂。

[0067] 在某些实施方案中，抗Cx43抗体可以是单克隆抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中，抗Cx43抗体可以是修饰的，例如嵌合或衍生自小鼠抗Cx43抗体的人源化抗体。在一些实施方案中，抗Cx43抗体是与人Cx43蛋白(例如，胞外环或其部分)上存在的表位结合的抗体或其抗原结合片段。

[0068] 示范性抗 抗体可具有一个或多个以下：

[0069] 重链：

[0070] CDR1(SEQ ID NO.:1):GYTFTSYY

[0071] CDR2(SEQ ID NO.:2):INPSNAGT

[0072] CDR3(SEQ ID NO.:3):TREGNPYYTMNY

[0073] 轻链：

[0074] CDR1(SEQ ID NO.:4):QSLLESDGKTY

[0075] CDR2(SEQ ID NO.:5):LVS

[0076] CDR3(SEQ ID NO.:6):WQGTHFPWT

[0077] 在一些实施方案中，已经令人惊讶地发现，与在PCT公开号WO 2015/027120和WO 2017/147561中公开的抗体相比，具有上述CDR序列的抗体显示出优异的结合亲和力和/或抗体稳定性。不希望受理论的束缚，据信重链CDR2中的“NG”至“NA”突变可减少脱酰胺作用。抗体特别是在CDR区的脱酰胺作用可能导致结合亲和力变化，抗体降解，和电荷变体变化，从而影响抗体功能并增加抗体生产成本。这样，本文公开的CDR提供了改进的结合亲和力和抗体稳定性，从而产生了优于PCT公开号WO 2015/027120和WO 2017/147561中公开的那些有利技术效果。

[0078] 可以使用例如CDR移植，种系建模和3-D结构分析来人源化和优化单克隆抗体，以增加抗体的可药用性和/或可开发性。在一些实施方案中，人源化后抗Cx43抗体可以具有以下可变域中的一个或两个：

[0079] 重链可变区(SEQ ID NO.:7)：

[0080] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNAGTNFNEKF KNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNPYYTMNYWGQGTLVTVSS

[0081] 轻链可变区(SEQ ID NO.:8)：

[0082] DVVMTQSPLSLPVTIGQPASISCKSSQSLLESDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGGGTKVEIK

[0083] 在选择的实施方案中，抗Cx43抗体可以具有融合至例如人IgG1或IgG4的恒定区的可变域，其可以任选地包含一个或多个突变。在一些实施方案中，可以将突变设计为减少或最小化抗体的细胞毒性效应子功能，同时保持结合亲和力和抗体稳定性。例如，抗Cx43抗体可具有一个或多个以下重链序列(其中黑体部分对应于可变区，非粗体部分对应于恒定区)：

[0084] >Ab#D重链(SEQ ID NO.:9)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIG
GINPSNgGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGN
PYYTMNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
[0085] NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0086] >Ab#F重链(SEQ ID NO.:10)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIG
GINPSNgGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGN
PYYTMNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP
[0087] SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0088] >Ab#H重链(SEQ ID NO.:11)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIG
GINPSNaGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGN
PYYTMNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP
[0089] SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0090] >Ab#J重链(SEQ ID NO.:12)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIG
GINPSNgGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGN
PYYTMNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
[0091] NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0092] >Ab#L重链(SEQ ID NO.:13)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIG
GINPSNaGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGN
PYYTMNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
[0093] NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0094] >Ab#N重链(SEQ ID NO.:14)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNgGTNFNEK FKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNPYYTMNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK

[0095] TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0096] >Ab#P重链(SEQ ID NO.:15)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNaGTNFNEK FKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNPYYTMNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK

[0097] TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0098] >Ab#R重链(SEQ ID NO.:16)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNgGTNFNEK

[0099] **FKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNPYYTMNYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS

[0100] SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0101] >Ab#T重链(SEQ ID NO.:17)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNaGTNFNEK FKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNPYYTMNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK

[0102] TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0103] 在一些实施方式中,抗Cx43抗体可具有一个或多个以下轻链序列(其中黑体部分对应于可变区,非粗体部分对应于恒定区):

[0104] >Ab#F,Ab#H,Ab#J,Ab#L,Ab#N,Ab#P,Ab#R,Ab#T的轻链(SEQ ID NO.:18)

DVVMTQSPLSLPVTIGQPASISCKSSQSLLESDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS

[0105] GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0106] 在又一个实施方案中,抗Cx43抗体可包含两种或更多种抗Cx43抗体的混合物或掺混物(cocktail),每种抗Cx43抗体结合Cx43上的相同或不同表位。

[0107] 在一些实施方案中,可以制备双特异性抗体,其中至少一种特异性是本文公开的抗Cx43抗体或其抗原结合片段。另一特异性可以针对与所治疗疾病有关的另一靶标。

[0108] 一方面,提供了Cx43配体在制备药物中的用途。在另一方面,提供了一种抑制患者

体内肿瘤生长和/或转移的方法,该方法包括向患者施用有效量的Cx43配体。

[0109] 抗Cx43抗体的制备

[0110] 可以使用本领域通常已知的各种方法来制备抗Cx43抗体。例如,噬菌体展示技术可以用于筛选人抗体文库,以产生用于治疗的完全人单克隆抗体。高亲和力的粘合剂可被视为中和研究的候选对象。另外,可使用常规的单克隆方法,其中可以用人蛋白质,经鉴定和测试的候选结合物,以及通过将重链和轻链的结合位点移植到人抗体编码序列中而最终产生的人源化抗体免疫小鼠或家兔。

[0111] 抗体通常包含两对相同的多肽链,每对均具有一条全长的"轻"链(通常具有约25kDa的分子量)和一条全长的"重"链(通常具有约50-70kDa的分子量)。各链的氨基末端部分包含约100-110或更多个氨基酸的可变区,通常负责抗原识别。各链的羧基末端部分定义为通常负责效应物功能的恒定区。重链和轻链中每一条的可变区通常表现出相同的总体结构,包括由三个超变区(也称为互补决定区或CDR)连接的四个相对保守的框架区(FR)。每对两根链的CDR通常通过框架区对齐,能够与特定表位结合。从N端到C端,轻链和重链都包含结构域FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3和FR4。各结构域氨基酸的分配通常与Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest(《免疫学热门蛋白的序列》)(马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究院(National Institutes of Health)(1987和1991))或Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Chothia等,Nature 342:878-883(1989)的定义一致。

[0112] 随着单克隆抗体的发展,抗体作为药物成为有用和令人感兴趣的药物。单克隆抗体可以使用通过培养中的连续细胞系产生抗体分子的任何方法来产生。制备单克隆抗体的合适方法的例子包括Kohler等的杂交瘤方法(1975,Nature 256:495-497)和人B细胞杂交瘤方法(Kozbor,1984,J.Immunol.133:3001;和Brodeur等,1987,单克隆抗体生产技术和应用,Marcel Dekker,Inc,纽约,第51-63页)。

[0113] 可以修饰单克隆抗体以用作治疗剂。一个例子是"嵌合"抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源。其他例子是此类抗体的片段,只要它们表现出所需的生物活性即可。参见美国专利号4,816,567和Morrison等(1985),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855。一个相关的发展是"CDR嫁接"抗体,其中抗体包含一个或多个来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的互补决定区(CDR),而抗体链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源。

[0114] 另一个发展是"人源化"抗体。非人源化抗体的人源化方法是本领域众所周知的(参见美国专利号5,585,089和5,693,762;另见CécileVincke等人,J.Biol.Chem.2009;284:3273-3284以人源化λ抗体)。通常,人源化抗体由非人动物产生,然后通常来自抗体非抗原识别部分的某些氨基酸残基被修饰为与对应同种型人抗体中的所述残基同源。可以例如使用本领域中描述的方法进行人源化(Jones等人,1986,Nature 321:522-525;Riechmann等人,1988,Nature 332:323-327;Verhoeyen等人,1988;(Science 239:1534-1536),通过用啮齿动物可变区的至少一部分替代人抗体的相应区域来实现。

[0115] 最近的发展是不接触人类抗原的人抗体("完全人抗体")。使用在不产生内源性小

鼠免疫球蛋白的情况下能够产生人类抗体库的转基因动物(例如小鼠),通过用抗原(通常具有至少6个连续氨基酸)免疫来产生此类抗体,其可任选缀合于载体。见例如Jakobovits等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551-2555;Jakobovits等人,1993,Nature 362:255-258;和Bruggermann等人,1993,Year in Immunol.7:33。在这些方法的一个实例中,通过使其中编码小鼠重链和轻链免疫球蛋白链的内源性小鼠免疫球蛋白基因座丧失能力,并将编码人重链和轻链蛋白的基因座插入其基因组中来生产转基因动物。然后将具有少于全部修饰的部分修饰的动物杂交,以获得具有所有所需免疫系统修饰的动物。施用免疫原后,这些转基因动物产生的抗体对具有人(而非鼠)氨基酸序列(包括可变区)的这些抗原具有免疫特异性。见PCT公开号WO96/33735和WO94/02602,引入以供参考。其它方法如美国专利号5,545,807,PCT公开号WO91/10741,WO90/04036,和EP 546073B1及EP 546073A1所述,引入以供参考。如本文所述,人抗体还可通过在宿主细胞中表达重组DNA或在杂交瘤细胞中表达而产生。

[0116] 在一些实施方案中,噬菌体展示技术可以用于筛选治疗性抗体。在噬菌体展示中,可以在丝状噬菌体表面展示抗体库,并且可以针对与免疫原结合的噬菌体筛选构建的文库。抗体噬菌体是基于噬菌体的基因工程以及抗原指导的选择和噬菌体繁殖的反复实验。该技术允许体外选择Cx43单克隆抗体。噬菌体展示过程始于抗体文库的制备,然后将可变重(VH)和可变轻(VL)PCR产物连接到噬菌体展示载体中,最终分析单克隆抗体的克隆。将代表抗体库的VH和VL PCR产物连接到噬菌体展示载体(例如噬菌粒pComb3X)中,该载体经工程改造可将VH和VL表达为融合到最初源自M13噬菌体的大肠杆菌丝状噬菌体的pIII次要衣壳蛋白上的scFv。然而,噬菌体展示载体pComb3X不具有编码大肠杆菌中完整噬菌体所必需的所有其他基因。对于那些基因,将辅助噬菌体添加到用噬菌体展示载体文库转化的大肠杆菌中。结果得到噬菌体文库,每个噬菌体在其表面表达Cx43单克隆抗体,并携带有各自核苷酸序列的载体。噬菌体展示还可以用于在某些大肠杆菌菌株中产生Cx43单克隆抗体本身(不与噬菌体衣壳蛋白连接)。在VL和VH序列后,在噬菌体展示载体中工程化了其他cDNA,以表征和纯化产生的mAb。具体而言,重组抗体可具有血凝素(HA)表位标签和聚组氨酸,以易于从溶液中纯化。

[0117] 多种抗体噬菌体文库由感染辅助噬菌体的约10^8个独立大肠杆菌转化体产生。使用生物淘选,可以通过单克隆抗体表达的表面筛选与上述免疫原序列或其片段噬菌体结合的文库。循环淘选可以抽出可能非常稀有的抗原结合克隆,并由多轮噬菌体与抗原结合(固定在ELISA板上或固定在细胞表面的溶液中),洗涤,洗脱和在大肠杆菌中再扩增噬菌体结合子组成。在每一轮中,通过洗去非结合子并选择性洗脱结合的噬菌体克隆,从池中选择特异性结合子。三轮或四轮后,噬菌体克隆通过其表面Cx43单克隆抗体的高度特异性结合是固定免疫原上定向选择的特征。

[0118] 另一种方法是将适于通过亲和色谱法纯化的C末端His标签添加到上面列出的免疫原序列中。可以将纯化的蛋白质与合适的佐剂一起接种到小鼠中。可以测试在杂交瘤中产生的单克隆抗体与免疫原的结合,并且可以如本文的测定中所述筛选阳性结合子。

[0119] 完全人抗体也可以从噬菌体展示文库中产生(如在Hoogenboom等人,1991,J.Mol.Biol.227:381和Marks等人,1991,J.Mol.Biol.222:581中公开的)。这些过程通过在丝状噬菌体表面展示抗体库以及随后通过与所选抗原的结合来选择,以模仿免疫选择。PCT

公开号WO99/10494中描述了一种这样的技术，其通过引用并入本文，其描述了使用这种方法分离用于MPL-和msk-受体抗体的高亲和力和功能激动性抗体。

[0120] 可以确定编码上述抗体的核苷酸序列。此后，也可以通过重组方法生产嵌合，CDR移植，人源化和完全人抗体。可以使用本领域通常已知的材料和方法将编码抗体的核酸引入宿主细胞并表达。

[0121] 本文提供了针对Cx43的抗体。优选抗体结合Cx43。在优选的实施方案中，本发明提供了编码重链和轻链免疫球蛋白分子的核苷酸序列和包含它们的氨基酸序列，特别是对应于其可变区的序列。在优选实施方案中，提供了对应于CDR，特别是从CDR1至CDR3的序列。在另外的实施方案中，本公开内容提供了表达此类免疫球蛋白分子的杂交瘤细胞系和由其产生的单克隆抗体，优选纯化的针对人Cx43的人单克隆抗体。

[0122] 本公开内容的抗Cx43抗体的轻链和重链可变区的CDR可以移接到来自相同或另一物种的框架区(FR)。在某些实施方案中，抗Cx43抗体的轻链和重链可变区的CDR可被移接到共有人FR。为了产生共有人FR，将来自几个人重链或轻链氨基酸序列的FR进行比对以鉴定共有的氨基酸序列。抗Cx43抗体重链或轻链的FR可被来自不同重链或轻链的FR替换。抗Cx43抗体重链和轻链FR中的稀有氨基酸通常不被替换，而其余FR氨基酸可以被替换。稀有氨基酸是特定氨基酸，它们位于FR中通常不存在的位置。来自本公开内容的抗Cx43抗体的移接的可变区可以与不同于抗Cx43抗体的恒定区的恒定区一起使用。或者，移植的可变区是单链Fv抗体的一部分。CDR嫁接描述于例如美国专利号6,180,370、5,693,762、5,693,761、5,585,089和5,530,101，出于任何目的通过引用并入本文。

[0123] 在一些实施方案中，本发明的抗体可以由杂交瘤细胞系产生。在这些实施方案中，本发明的抗体以约4pM至1μM之间的解离常数(KD)结合Cx43。在本公开的某些实施方案中，抗体以小于约100nM，小于约50nM或小于约10nM的KD结合Cx43。

[0124] 在实施方案中，本公开的抗体是IgG1，IgG2，IgG3或IgG4同种型，例如IgG1同种型。在某些实施方案中，抗体包含人κ或λ轻链和人IgG1，IgG2或IgG4重链。在实施方案中，将抗体的可变区连接至IgG1、IgG2或IgG4同种型的恒定区。在实施方案中，将抗体的可变区连接至除了IgG1、IgG2或IgG4同种型的恒定区以外的恒定区。在某些实施方案中，已经克隆了本公开的抗体以在哺乳动物细胞中表达。

[0125] 在替代实施方案中，本发明的抗体可以在杂交瘤细胞系以外的细胞系中表达。在这些实施方式中，编码特定抗体的序列可以用于转化合适的哺乳动物宿主细胞。根据这些实施方案，可以使用将多核苷酸引入宿主细胞的任何已知方法来实现转化，包括例如将多核苷酸包装在病毒(或病毒载体)中并用病毒(或载体)或通过本领域已知的转染方法转导宿主细胞。此类方法例如美国专利号4,399,216、4,912,040、4,740,461和4,959,455(出于任何目的，通过引用将其全部结合在此)。通常，使用的转化方法可能取决于待转化的宿主。将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域众所周知的，包括但不限于葡聚糖介导的转染，磷酸钙沉淀，多烯介导的转染，原生质体融合，电穿孔，将多核苷酸包封在脂质体中，以及DNA直接显微注射到细胞核中。

[0126] 根据本公开的方法的某些实施方案，使用标准连接技术将本公开的编码Cx43抗体的重链恒定区、重链可变区、轻链恒定区或轻链可变区的氨基酸序列的核酸分子插入合适的表达载体中。在一个优选的实施方案中，将Cx43抗体重链或轻链恒定区附加到合适的可

变区C-末端,并连接到表达载体中。通常选择载体以在所用的特定宿主细胞中起作用(即,载体与宿主细胞机制相容,从而可以发生基因的扩增和/或基因的表达)。有关表达载体的综述,参见Goeddel编),1990,Meth.Enzymol.Vol.185,Academic Press.N.Y。

[0127] 通常,在任何宿主细胞中使用的表达载体可以包含用于质粒维持以及用于克隆和表达外源核苷酸序列的序列。此类序列通常包括一条或多条以下核苷酸序列:启动子,一个或多个增强子序列,复制起点,转录终止序列,包含供体和受体剪接位点的完整内含子序列,编码多肽分泌前导序列的序列,核糖体结合位点,聚腺苷酸化序列,用于插入编码要表达的多肽的核酸的多接头区域,和选择标记元件。这些序列是本领域熟知的。

[0128] 本公开的表达载体可以从起始载体例如可商购的载体构建。这样的载体可以包含或可以不包含所有期望的侧翼序列。当上述一种或多种侧翼序列尚未存在于载体中时,可以将它们单独获得并连接到载体中。用于获得每条侧翼序列的方法是本领域技术人员众所周知的。

[0129] 在构建载体并且将包含抗Cx43抗体的编码轻链或重链或轻链和重链的核酸分子插入载体的适当位点后,可以将完整的载体插入合适的宿主中用于扩增和/或多肽表达的细胞。抗Cx43抗体的表达载体转化入所选宿主细胞可以通过众所周知的方法实现,包括转染,感染,磷酸钙共沉淀,电穿孔,显微注射,脂质转染,DEAE-葡聚糖介导的转染或其他已知技术。选择的方法将部分取决于所用宿主细胞的类型。这些方法和其他合适的方法是技术人员众所周知的,并且例如在上文的Sambrook等人中提出。

[0130] 宿主细胞在适当条件下培养时,会合成抗Cx43抗体,随后可从培养基(如果宿主细胞将其分泌到培养基中)或直接从产生它的宿主细胞(如果未分泌)中收集。合适的宿主细胞的选择将取决于多种因素,例如所需的表达水平,对于活性(例如糖基化或磷酸化)而言理想或必需的多肽修饰以及折叠成生物活性分子的难易程度。

[0131] 可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域众所周知的,包括但不限于可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的许多永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,人类胚胎肾细胞(HEK),HeLa细胞,仓鼠肾(BHK)细胞,猴肾细胞(COS),人类肝细胞癌细胞(例如Hep G2)和许多其他细胞系。在某些实施方案中,可以通过确定哪些细胞系具有高表达水平并产生具有组成型Cx43结合特性的抗体来选择细胞系。在另一个实施方案中,可以从B细胞谱系中选择不产生其自身抗体但是具有产生和分泌异源抗体的能力的细胞系(例如,小鼠骨髓瘤细胞系NS0和SP2/0)。

[0132] 表位作图和相关技术

[0133] 本公开提供了抗Cx43抗体,其与在Cx43分子的一个或多个结构域例如胞外环内发现的一个或多个氨基酸相互作用。抗体结合的表位可以包括一个或多个位于一个或多个胞外环内的2个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9或更多个)氨基酸的连续序列。替代地或另外地,表位可以包括位于一个或多个胞外环(例如构象表位)内的1个或多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)。

[0134] 可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术来确定抗体是否“与在多肽或蛋白质内一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例如常规的交叉阻断实验,例如在Antibodies,Harlow and Lane(冷泉港出版社,冷泉港,纽约)中描述的那些。其他方法包括丙氨酸扫描突变分析,肽印迹分析(Reineke(2004)Methods Mol.Biol.248:443-63),肽裂

解分析晶体学研究和NMR分析。另外，可以采用诸如表位切除，表位提取和抗原化学修饰的方法(Tomer(2000)Prot.Sci.9:487-496)。

[0135] 可以用于鉴定抗体相互作用的多肽内氨基酸的另一种方法是通过质谱检测氢/氘交换。一般而言，氢/氘交换方法涉及氘标记目标蛋白质，然后将抗体与氘标记的蛋白质结合。接下来，蛋白质/抗体复合物被转移到水中，被抗体复合物保护的氨基酸内的可交换质子比不属于界面的氨基酸内的可交换质子以较慢的速率经历由氘到氢的反向交换。结果，形成蛋白质/抗体界面一部分的氨基酸可能保留氘，因此与未包含在界面中的氨基酸相比，其质量相对较高。抗体解离后，对目标蛋白进行蛋白酶裂解和质谱分析，从而揭示氘标记的残基，这些残基对应于与抗体相互作用的特定氨基酸。见例如Ehring(1999)Analytical Biochemistry 267:252-259;Engen和Smith(2001)Anal.Chem.73:256A-265A。

[0136] 修饰辅助分析(MAP)，也称为基于抗原结构的抗体分析(ASAP)，是一种根据每种抗体与化学或酶修饰抗原表面的结合图谱的相似性将针对同一抗原的大量单克隆抗体(mAb)分类的方法(参见US 2004/0101920，通过引用整体并入本文)。每个类别可以反映独特的表位，该独特的表位与另一类别所代表的表位明显不同或部分重叠。该技术可以快速过滤遗传上相同的抗体，从而使表征可以集中在遗传上不同的抗体上。当用于杂交瘤筛选时，MAP可能有助于鉴定产生具有所需特性的mAb的罕见杂交瘤克隆。MAP可用于将本发明的抗体分类为结合不同表位的抗体组。

[0137] 本公开提供结合相同表位或表位一部分的抗Cx43抗体。同样地，本公开还包括抗Cx43抗体，其与本文所述的任何特定示例性抗体竞争结合Cx43或其片段。例如，本公开包括抗Cx43抗体，其与一种或多种获自本文描述的那些抗体的抗体交叉竞争结合Cx43。

[0138] 通过使用本领域已知的常规方法，可以容易地确定抗体是否与参照抗Cx43抗体结合相同的表位或竞争与之结合。例如，为了确定测试抗体是否与本发明的参照抗Cx43抗体结合相同的表位，可以使参照抗体在饱和条件下结合Cx43或肽。接下来，评估测试抗体结合Cx43分子的能力。如果测试抗体在参照抗Cx43抗体饱和结合后能够结合Cx43，则可以得出结论，测试抗体与参照抗Cx43抗体结合的表位不同。另一方面，如果在与参照抗Cx43抗体饱和结合后测试抗体不能与Cx43结合，则测试抗体可与本公开的参照抗Cx43抗体结合相同的表位。

[0139] 为了确定抗体是否与参照抗Cx43抗体竞争结合，可以在两个方向上执行上述结合方法:在第一方向上，可以使参照抗体在饱和条件下结合至Cx43，然后评估测试抗体与Cx43分子的结合。在第二方向上，可以使测试抗体在饱和条件下结合至Cx43，然后评估参照抗体与Cx43分子的结合。如果在两个方向上只有第一(饱和)抗体能够结合Cx43分子，那么可以得出结论，测试抗体和参照抗体竞争结合Cx43。如本领域普通技术人员将理解的，与参照抗体竞争结合的抗体可能未必与参照抗体结合相同的表位，而是可能通过结合重叠或相邻表位在空间上阻断参照抗体的结合。

[0140] 如果两种抗体各自竞争性地抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合，则两种抗体会结合到相同或重叠的表位上。即，如竞争结合实验中测量的，一种抗体的1、5、10、20或100倍过量抑制另一种抗体的结合至少50％，但优选为75％，90％或甚至99％(参见，例如，Junghans等人，Cancer Res.1990 50:1495-1502)。或者，如果抗原中基本上所有减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变都减少或消除了另一种抗体的结合，则两种抗体具有相同的

表位。如果某些减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变减少或消除了另一种抗体的结合，则两种抗体的表位重叠。

[0141] 然后可以进行其他常规实验(例如，肽突变和结合分析)，以确认观察到的测试抗体结合的缺乏实际上是由于与参考抗体结合到相同的表位还是空间阻滞(或其他现象)是造成缺乏观察到的结合的原因。可以使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或本领域可用的任何其他定量或定性抗体结合测定法进行此类实验。

[0142] 在另一个方面，本文提供了与位于氨基酸序列FLSRPTEKTI(SEQ ID NO:19)内的表位部分或完全结合的抗体。在一些实施方式中，表位可包含一个或多个氨基酸，选自:SEQ ID NO:19的F1，S3，R4，P5，T6，E7，K8，T9和I10。在一个实施方式中，表位由SEQ ID NO:19的F1，S3，R4，P5，T6，E7，K8，T9和I10组成。在一些实施方式中，表位可包括SEQ ID NO:19的全部10个氨基酸。在一些实施方式中，表位可由SEQ ID NO:19的全部10个氨基酸组成。

[0143] 药物组合物及其用途

[0144] 在另一方面，提供了可用于本文公开的方法中的药物组合物，即，用于促进骨细胞中Cx43半通道的开放，优选用于治疗癌症，癌症转移，骨肉瘤，骨质疏松或骨质减少的药物组合物。

[0145] 在一些实施方案中，药物组合物包含Cx43配体和药学上可接受的载体。可以将Cx43配体与药学上可接受的载体一起配制为药物组合物。另外，药物组合物可包括例如使用该组合物治疗患者以促进骨细胞中Cx43半通道开放的说明，优选用于治疗癌症，癌症转移，骨肉瘤，骨质疏松或骨质减少。

[0146] 在一个实施方案中，Cx43配体可以是抗Cx43抗体或其抗原结合片段。

[0147] 本文中，“药学上可接受的运载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂和其它赋形剂。优选地，运载体适用于肠胃外、口腔或局部给药。取决于给予途径，该活性化合物(例如小分子或生物剂)可被包被在某材料中，以保护该化合物免受酸和可能使该化合物失活的其它自然条件的作用。

[0148] 药学上可接受的运载体包括用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌水溶液或分散液和无菌粉剂，以及用于制备片剂、丸剂、胶囊等的常规赋形剂。这种介质和试剂在配制药物活性物质中的用途是本领域已知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容，否则考虑将其用于本文提供的药物组合物中。补充性活性化合物也可掺入所述组合物。

[0149] 药学上可接受的运载体可以包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的例子包括:(1)水溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸，盐酸半胱氨酸，硫酸氢钠，偏亚硫酸氢钠，亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂，例如棕榈酸抗坏血酸酯，丁基羟基茴香醚(BHA)，丁基羟基甲苯(BHT)，卵磷脂，没食子酸丙酯，α-生育酚等;以及(3)金属螯合剂，例如柠檬酸，乙二胺四乙酸(EDTA)，山梨糖醇，酒石酸，磷酸等。

[0150] 可以在本文提供的药物组合物中使用的合适的水性和非水性载体的实例包括水，乙醇，多元醇(例如甘油，丙二醇，聚乙二醇等)及其合适的混合物，和可注射的有机酯，例如油酸乙酯。当需要时，例如通过使用包衣材料，例如卵磷脂，在分散液的情况下，通过保持所需的粒径，以及通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。在许多情况下，组合物中有用地包含等张剂，例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。组合物中包含延迟吸收的试

剂如单硬脂酸盐和明胶可延长可注射组合物的吸收。

[0151] 这些组合物还可包含功能性赋形剂,例如防腐剂,湿润剂,乳化剂和分散剂。

[0152] 在制备和储存条件下,治疗性组合物通常应无菌、无热源和稳定。可将组合物配制成溶液、微乳剂、脂质体或适合高抗体浓度的其他有序结构。

[0153] 可将所需量的活性化合物和一种上述组分或其组合根据需要掺入合适溶剂后通过例如过滤灭菌,从而制备无菌注射液。通常,将活性活化物掺入含有碱性分散介质和上述其它所需成分的无菌载剂中制备分散剂。在用于制备无菌注射液的无菌粉末情况中,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥(冻干),得到由其之前无菌过滤的溶液得到活性组分和任何其它所需组分的粉末。可在无菌条件下将活性剂与其它药学上可接受的运载体以及可能需要的任何防腐剂,缓冲剂或推进剂混合。

[0154] 可通过灭菌步骤(见上)和加入各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等确保防止微生物的出现。组合物中也可能需要包含等张剂,如糖、氯化钠等。此外,可通过加入能延迟吸收的物质,例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射药物形式的长期吸收。

[0155] 包含Cx43配体的药物组合物可以单独或联合治疗给药。例如,组合疗法可包括本文提供的组合物,其包含Cx43配体和至少一种或多种其他治疗剂,例如本领域已知的一种或多种化学治疗剂,将在下面进一步详细讨论。药物组合物也可以与放射疗法和/或手术联合施用。

[0156] 给药方案经调节能提供最优的所需效果(例如治疗效果)。例如,可以是一次推注,按时间分次给药或根据治疗情况的紧急性成比例地降低或增加剂量。

[0157] 用于施用抗体的示例性剂量范围包括:10-1000mg(抗体)/kg(患者体重),10-800mg/kg,10-600mg/kg,10-400mg/kg,10-200mg/kg,30-1000mg/kg,30-800mg/kg,30-600mg/kg,30-400mg/kg,30-200mg/kg,50-1000mg/kg,50-800mg/kg,50-600mg/kg,50-400mg/kg,50-200mg/kg,100-1000mg/kg,100-900mg/kg,100-800mg/kg,100-700mg/kg,100-600mg/kg,100-500mg/kg,100-400mg/kg,100-300mg/kg and 100-200mg/kg。示例性的剂量时间表包括每三天一次,每五天一次,每七大一次(即每周一次),每十天一次,每十四天一次(即每两周一次),每二十一天一次(即,每三周一次),每28天一次(即每四周一次)和每月一次。

[0158] 有利的是配制成单位剂量的胃肠道外组合物以便于给药和剂量均一性。本文中所用的单位剂量指作为单个剂量用于待治疗患者的物理上离散的单位,每个单位包含预定量的活性剂与所需药物运载体,该预定量经测算能够产生任何所需的治疗效果。本发明中单位剂量形式的规格取决于或直接依赖于(a)活性化合物的独特特性和待实现的具体治疗效果,以及(b)复合这种活性化合物用于个体中治疗灵敏度的领域中的固有限制。

[0159] 可改变本文公开的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,从而获得就具体患者、组合物与给药方式有效实现所需治疗应答且对患者无毒性的活性成分量。对于给药,本文所用术语“胃肠外给药”表示除肠道和局部给药外的给药形式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下(subcapsular)、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注给药。

[0160] 本文所用的术语“肠胃外给药”和“胃肠外给予”是指除肠内(即,通过消化道)和局

部给药以外的给药方式，通常通过注射或输注给药，包括但不限于静脉内，肌肉内，动脉内，鞘内，囊内，眶内，心内，皮内，腹膜内，经气管，皮下，表皮下，关节内，包膜下，蛛网膜下，脊柱内，硬膜外和胸骨内注射和输注。静脉内注射和输注通常(但不限于)用于抗体给药。

[0161] 当本文提供的药剂作为药物施用给人或动物时，它们可以单独给予或作为含有例如0.001至90％(例如0.005至70％，例如0.01至30％)活性成分与药物学上可接受运载体的组合的药物组合物给予。

[0162] 在某些实施方案中，本文提供的用于促进骨细胞中Cx43半通道的开放，优选用于治疗癌症，癌症转移，骨肉瘤，骨质疏松或骨质减少的方法和用途可包括施用Cx43配体和至少一种不是Cx43配体的其他抗癌剂。

[0163] 在一个实施方案中，至少一种另外的抗癌剂包括至少一种化学治疗药物。此类化疗药物的非限制性示例包括铂基化疗药物(例如顺铂、卡铂)，紫杉烷类(例如紫杉醇(Taxol®)、多西紫杉醇(Taxotere®)、EndoTAG-1™(紫杉醇包裹在基于带正电的脂质复合物的配方；MediGene)，Abraxane®(与白蛋白结合的紫杉醇制剂))，酪氨酸激酶抑制剂(例如伊马替尼/Gleevec®，舒尼替尼/Sutent®，达沙替尼/Sprycel®)及其组合。

[0164] 在另一个实施方案中，至少一种另外的抗癌剂包含EGFR抑制剂，例如抗EGFR抗体或EGFR信号传导的小分子抑制剂。一种示例性的抗EGFR抗体是西妥昔单抗(Erbitux®)。西妥昔单抗可购自ImClone Systems Incorporated。抗EGFR抗体的其他实例包括马妥珠单抗(EMD72000)，帕尼单抗(Vectibix®；Amgen)；尼妥珠单抗(TheraCIM™)和mAb 806。EGFR信号传导途径的示例性小分子抑制剂是吉非替尼(易瑞沙®)，其可从阿斯利康和Teva商购。EGFR信号传导途径的小分子抑制剂的其他实例包括厄洛替尼盐酸盐(OSI-774；Tarceva®，OSI Pharma)；拉帕替尼(Tykerb®，GlaxoSmithKline)；卡尼替尼(二盐酸卡尼替尼，Pfizer)；培利替尼(Pfizer)；PKI-166(诺华公司)；PD158780；和AG 1478(4-(3-氯罗尼力诺)-6,7-二甲氧喹唑啉)。

[0165] 在又一个实施方案中，至少一种另外的抗癌剂包含VEGF抑制剂。示例性的VEGF抑制剂包含抗VEGF抗体，例如贝伐单抗(Avastatin®；Genentech)。

[0166] 在又一个实施方案中，至少一种另外的抗癌剂包含抗ErbB2抑制剂。合适的抗ErbB2抗体包括曲妥珠单抗和帕妥珠单抗。

[0167] 一方面，可以通过实现治疗协同作用来证明根据本公开的组合改善的效力。

[0168] 当给定剂量下两种产品的组合比相同剂量下两种产品各自的最佳效果更好时，使用术语“治疗协同作用”。在一个实例中，可以通过对参数肿瘤体积的重复测量(例如，时间因子)使用从方差的双向分析获得的估值将组合与最佳单一药剂进行比较来评估治疗协同作用。

[0169] 术语“添加剂”是指两种或多种产品在给定剂量下的组合等效于两种或多种产品各自获得的功效总和，而术语“超添加剂”是指组合使用时比两种或两种以上产品获得的功效总和更有效。

[0170] 可以量化效力(包括组合效力)的另一种方法是通过计算$\log_{10}$细胞杀伤率，该杀伤率根据以下公式确定：$\log_{10}$细胞杀伤＝T-C(天)/3.32×T_d，其中T-C代表细胞生长的延迟，

这是治疗组(T)肿瘤和对照组肿瘤(C)达到预定值(例如1g或10ml)的平均时间(天),而T_d代表在对照动物中肿瘤体积翻倍所需的时间,以天为单位。当应用此措施时,如果$\log_{10}$细胞杀伤力大于或等于0.7,则认为该产品是有活性的;如果$\log_{10}$细胞杀伤力大于2.8,则认为该产品非常有活性。

[0171] 使用该测量,以其自身最大耐受剂量使用的组合(其中每种成分的存在剂量通常小于或等于其最大耐受剂量)在$\log_{10}$细胞杀伤力大于单独施用最佳组分时$\log_{10}$细胞杀伤值时,显示治疗协同作用。在示例性情况下,组合的$\log_{10}$细胞杀伤值超过组合的最佳组分的$\log_{10}$细胞杀伤值至少一个对数级的细胞杀伤值。

[0172] 本文公开了用于提供癌症治疗的组合物和方法。该方法可包括在有此需要的对象中促进骨细胞中Cx43半通道的开放。Cx43调节(例如抗Cx43抗体)可用作独立的癌症治疗方法,或与其他癌症治疗方法结合使用。

[0173] 本文还提供了一种用于促进骨细胞中Cx43半通道的开放,优选用于治疗癌症,癌症转移,骨肉瘤,骨质疏松或骨质减少的方法,包括在有此需要的对象中施用本文公开的任何一种或多种抗Cx43抗体。

[0174] 在各种实施方案中,本文公开的方法可以包括向对象施用有效量的抗Cx43抗体或其抗原结合片段。通常,可以治疗和/或预防地施用有效量。

[0175] 可以将治疗适当地施用于患有,易患这种癌症或处于其风险中的受试者,特别是人类。可以通过受试者或保健提供者的诊断测试或意见(例如,基因测试,酶或蛋白质标记,家族史等)来任意客观或主观确定“有风险”的那些受试者。识别需要这种治疗的对象可依赖于对象或卫生保健专业人员的判断中,并且可以是主观的(例如意见)或客观的(例如可以通过测试或诊断方法测量)。

[0176] 制剂给药

[0177] 本公开内容的制剂,包括但不限于重建和液体制剂,可根据已知方法,施给需要用抗Cx43抗体治疗的哺乳动物,优选人,例如作为丸剂静脉内推注,或在一段时间内连续输注,或通过肌肉内,腹膜内,脊髓内,皮下,关节内,滑膜内,鞘内,口服,局部或吸入途径施用。

[0178] 在实施方案中,通过静脉内或皮下(即,在皮肤下)给药将制剂施用给哺乳动物。为此可使用注射器注射制剂。但是,还可以使用其他给药制剂的装置,例如注射装置(例如INJECT-EASE TM和GENJECT™装置);进样笔(例如,GENPEN ™);自动注射器设备,无针设备(例如MEDIJECTOR™和BIOJECTOR™);和皮下贴片输送系统。

[0179] 在一个具体的实施方案中,本公开涉及用于单剂给药单元的试剂盒。这样的试剂盒包括治疗性蛋白质或抗体的水性制剂的容器,包括单腔或多腔预装注射器。示例性的预填充注射器可从德国Ravensburg的Vetter GmbH获得。

[0180] 蛋白质的合适剂量(“治疗有效量”)将取决于,例如,要治疗的病状,病状的严重程度和病程,是否出于预防或治疗目的而给予该蛋白质,先前的治疗方法,患者的临床病史和对抗Cx43抗体的应答,所用制剂的形式以及主治医师的判断力。抗Cx43抗体可以一次或经过一系列治疗适当地施用于患者,并且可以从诊断开始的任何时间施用于患者。抗Cx43抗体可以单独治疗或与其他可用于治疗所述疾病的药物或疗法联用。

[0181] 对于抗Cx43抗体,用于向患者给药的初始候选剂量可以在约0.1-100或1-20mg/kg

的范围内，其可以采取一次或多次分开给药的形式。然而，其他剂量方案可能是有用的。通过常规技术可以容易地监测这种治疗的进展。

[0182] 根据本公开的某些实施方案，可以在一段确定的时间内向受试者施用多剂量的抗Cx43抗体(或包含抗Cx43抗体和本文提及的任何其他治疗活性剂的组合的药物组合物)。根据本公开内容的该方面的方法包括向受试者依次施用多剂量的本公开内容的抗Cx43抗体。如本文所用，“顺序施用”是指每剂量的抗Cx43抗体在不同的时间点(例如，在以预定间隔(例如，小时，天，周或月)分开的不同天)上施用于受试者。本公开内容包括以下方法，该方法包括：依次向患者施用单剂初始剂量的抗Cx43抗体，然后依次施用一剂或多剂抗Cx43抗体，并任选地随后施用一剂或多剂第三剂的抗Cx43抗体。抗Cx43抗体可以以0.1mg/kg至约100mg/kg之间的剂量施用。

[0183] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指本发明的抗Cx43抗体的时间给药顺序。因此，“初始剂量”是在治疗方案开始时给予的剂量(也称为“基线剂量”)；“第二剂量”是在初始剂量之后给予的剂量；“第三剂量”是在第二剂量之后给予的剂量。初始，第二和第三剂量都可以包含相同量的抗Cx43抗体，但通常在给药频率上可能彼此不同。然而，在某些实施方案中，在治疗过程中，初始，第二和/或第三剂量中所含的抗Cx43抗体的量彼此不同(例如，适当地向上或向下调整)。在某些实施方案中，在治疗方案开始时以“负荷剂量”施用两次或更多(例如2、3、4或5)剂量，随后以较低频率施用后续剂量(例如“维持剂量”)。

[0184] 在本公开的某些示例性实施方式中，每个第二和/或第三剂量在紧接前一剂给药后的第1至26(例如1、$1^1/_2$、2、$2^1/_2$、3、$3^1/_2$、4、$4^1/_2$、5、$5^1/_2$、6、$6^1/_2$、7、$7^1/_2$、8、$8^1/_2$、9、$9^1/_2$、10、$10^1/_2$、11、$11^1/_2$、12、$12^1/_2$、13、$13^1/_2$、14、$14^1/_2$、15、$15^1/_2$、16、$16^1/_2$、17、$17^1/_2$、18、$18^1/_2$、19、$19^1/_2$、20、$20^1/_2$、21、$21^1/_2$、22、$22^1/_2$、23、$23^1/_2$、24、$24^1/_2$、25、$25^1/_2$、26、$26^1/_2$等)周施用。如本文所用，短语“紧接在前的剂量”是指在多次给药的顺序中，抗Cx43抗体的剂量，在该顺序中的下一个剂量的给药之前，在没有中间干预的情况下向患者给药。

[0185] 根据本公开内容的该方面的方法可包括向患者施用任何数量的第二剂量和/或第三剂量的抗Cx43抗体。例如，在某些实施方案中，仅向患者施用单次第二剂量。在其他实施方案中，向患者施用两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多)第二剂量。例如，在某些实施方案中，仅向患者施用单次第三剂量。在其他实施方案中，向患者施用两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多)第三剂量。

[0186] 在涉及多个第二剂量的实施方案中，每个第二剂量可以与其他第二剂量相同的频率施用。例如，每个第二剂量可以在紧接前一剂量后1-2周或1-2个月施给患者。类似地，在涉及多个第三剂量的实施方案中，每个第三剂量可以与其他第三剂量相同的频率施用。例如，每个第三剂量可以在紧接前一剂量后2-12周施给患者。在本公开的某些实施方案中，向患者施用第二和/或第三剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。给药频率也可以在医生的治疗过程中根据临床检查后各个患者的需要进行调整。

[0187] 本公开包括其中以第一频率(例如，每周一次，每两周一次，每三周一次，每月一次，每两个月一次)向患者施用-10或2-6负荷剂量的施用方案，然后以较低的频率对患者给予两次或多次维持剂量。例如，根据本公开的该方面，如果以例如每月一次的频率(例如，每月一次两次，三个，四个或更多次的负荷剂量)的频率来施用负荷剂量，则维持剂量可以每五周一次，每六周一次，每七周一次，每八周一次，每十周一次，每十二周一次等方式给予患

者。

[0188] 实施例

[0189] 下列实施例,包括进行的实验和获得的结果仅用于说明目的,而不应解释为限制本公开。

[0190] 实施例1:结合亲和力

[0191] 根据以下方案测试优化的序列与Cx43的结合亲和力。

[0192] 1.解吸Biacore T200

[0193] 2.插入新的CM5芯片

[0194] 3.Prime 3X和HBS-EP+缓冲液(10mM肝素,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05%表面活性剂P20[吐温20])

[0195] 4.前提条件:以100ul/分钟的速度开始新的传感图。用REGEN COMMAND分别注射具有高粘度溶液的(超净)的10ul 2X 100mM HCl,2X 50mM NaOH,2X 0.5%SDS。这将清洗并准备芯片以进行偶联。仅在空白芯片上执行此操作,不能在连接蛋白质后。

[0196] 5.将胺偶联抗人IgG Fc(GE:BR-1008-39)与您将要使用的每个表面(包括参比表面)分别按照GE人抗体捕获试剂盒随附说明进行使用。简而言之,将单克隆抗体在10mM醋酸钠(pH 5)中稀释至25ug/ml。以5ul/分钟的速度开始新的传感图。快速用NHS/EDC激活7′,注入Mab 7′,并用乙醇胺7′封闭。通常获得10,000-12,000RU/表面。然后以20ul/min的速度用3M $MgCl_2$进行10次再生,每次30秒钟。(注意,使用小鼠IgG进行的实验类似,但我们使用的是GE小鼠抗体捕获试剂盒(GE:BR-1008-38)。唯一的区别是抗小鼠IgG抗体以30ug/ml的浓度偶联,并在20###l/分钟下用10mM甘氨酸-HCl(pH 1.7)再生3分钟。

[0197] 6.归一化,然后在HBS-EP+缓冲区中进行1X Prime。

[0198] 7.然后在胺偶联后立即进行实验。在两次实验之间有大量时间时,将芯片取出并保存在4摄氏度下。将芯片放回仪器之后,再进行3X引发(使用HBS-EP+),定标,用HBS-EP+1X引发。

[0199] 用以下参数编写程序:

[0200] 概述

[0201] 缓冲液=HBS-EP+

[0202] 流速=100ul/min

[0203] 数据采集率=1Hz

[0204] 样品区室温度=15℃(这是样品在注射前维持的温度)。

[0205] 实验运行温度=25℃

[0206] 双重检测,Fc2-Fc1

[0207] 对于每轮实验循环:

[0208] a.通过在FC2上以5ul/min的速度注射5ug/ml Mab 180秒将Mab Ab#K捕获在FC2上,仅在注射1%Tween20后额外洗涤。

[0209] b.在两个FC上以30ul/min经30秒注入1M NaCl,然后进行额外的缓冲液洗涤并稳定180秒。

[0210] c.以100ul/分钟的速度通过高效注射进样(肽)210秒,在两个FC上解离300秒,然后进行额外的缓冲液洗涤和60秒稳定化。

[0211] e.用3M $MgCl_2$以20ul/min的速度再生两个表面30秒,选择高粘度溶液,然后进行缓冲液洗涤和60秒稳定化。

[0212] 循环编程如下:

[0213] 1.初始注射10次缓冲液以稳定仪器。

[0214] 2.每条肽(PEP1,PEP2,PEP3)的浓度系列:0,4nM,12nM,37nM,111nM,333nM,1000nM

[0215] 循环1-10初始

[0216] 循环11-17 PEP1(914)

[0217] 循环18-24 PEP1(915)

[0218] 循环25-31 PEP1(916)

[0219] 循环32-38 PEP1(914)

[0220] 循环39-45 PEP1(915)

[0221] 循环46-52 PEP1(916)

[0222] 循环53-59 PEP1(914)

[0223] 循环60-66 PEP1(915)

[0224] 循环67-73 PEP1(916)

[0225] 数据分析

[0226] 使用T200评估软件2.0分析数据。由于在最佳动力学条件下达到平衡,因此每组三份重复的(Fc2-Fc1)数据总体上符合1:1结合动力学模型或稳态亲和力模型。两种方法获得的结果相似。

[0227] 对于其中将单克隆抗体捕获在CM5芯片表面的所有实验,都遵循上述方案。

[0228] 还根据以下方案使用CAP芯片:

[0229] 1.根据制造商的说明,制备GE Healthcare(28920234)的Biotin CAPture套件中的CAP芯片。简短地说,将其接在仪器(T200)中,用流动的缓冲液(HBS-EP+)进行三次灌注,并在待机模式下用流动的缓冲液水化过夜。然后用再生溶液(6M GuHCl,250mM NaOH)以30ul/分钟的速度以3x60秒注射调节。然后定标1次,预运行1次。然后其准备好进行实验。用以下参数编写程序:

[0230] 概述

[0231] 缓冲液=HBS-EP+

[0232] 流速=100ul/min

[0233] 数据采集率=1Hz

[0234] 样品区室温度=15℃(这是样品在注射前维持的温度)。

[0235] 实验运行温度=25℃

[0236] 双重检测,Fc4-Fc3

[0237] 对于每轮实验循环:

[0238] a.通过以2ul/分钟的速度注射来自套件的生物素捕获试剂300秒,从而在Fc3和Fc4上捕获生物素捕获试剂。

[0239] b.通过以5ul/分钟的速度注射3ug/ml肽2120秒在Fc4上捕获生物素化肽,然后进行额外的缓冲液洗涤和120秒稳定化。

[0240] c.进样(单克隆抗体),以100ul/分钟进样210秒,在两个Fc上解离300秒。

[0241] d.用6M GuHCl,250mM NaOH以30ul/分钟的速度再生两个表面120秒钟(选择高粘度溶液),然后进行缓冲液洗涤和120秒钟稳定化。

[0242] 循环编程如下:

[0243] 1.初始注射5次缓冲液以稳定仪器。

[0244] 2.运行每种Mab(I或H)的系列浓度:0,6.2nM,18.5nM,55.6nM,166.7nM,500nM。

[0245] 循环1-5起始

[0246] 循环6-11单抗I

[0247] 循环12-17单抗H

[0248] 循环18-23单抗I

[0249] 循环24-29单抗H

[0250] 结合亲和力结果(表1)表明,通常至少保持了结合亲和力,并且在许多情况下,令人惊讶地提高了结合亲和力。

[0251] 表1:各种抗体的结合亲和力

[0252]

分子ID	Kd(M)
对照	1.474E-7
Ab#D	1.985E-7
Ab#F	3.347E-11
Ab#H	4.650E-8
Ab#J	1.260E-8
Ab#L	1.012E-8
Ab#N	3.412E-10
Ab#P	8.582E-9
Ab#R	4.920E-8
Ab#T	5.821E-10

[0253] 实施例2.Fc受体结合分析

[0254] Fc效应子功能是通过Fc与受体的结合来介导的。受体包括FCRI,FCRIIa,FCRIIb,FCRIIIa,FCRIIIb,Clq和FcRn。通常期望降低与大多数Fc受体的结合亲和力,预期使FcRn的潜在体内毒性最小化,同时保持抗体半衰期。以下表面等离子体共振(SPR)和酶联免疫吸附测定(ELISA)方案用于测试各种抗体对不同Fc受体的结合。

[0255] A.FCRI结合

[0256] 实验:Biacore 8K

[0257] 芯片:CM5

[0258] (1)固定化

[0259] 通过在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS来制备活化剂。混合物活化CM5传感器芯片420秒。然后将30μg/mL的10mM NaAc(pH 4.5)中的THE™His标签抗体以30μL/分钟注入通道1-8,持续400秒。用1M乙醇胺-HCl(GE)使芯片失活。

[0260] (2)捕获配体并运行分析物

[0261] 将运行缓冲液(1xHBS-EP+)中的2μg/mL CD64以10μL/分钟注入通道1-4的Fc2中,持续30秒。6种浓度(40、20、10、5、2.5和1.25nM)分析物20170905-Ab#C-02、20170905-Ab#D-

02、20170908-Ab#G-02、20170920-Ab#H-02和跑样缓冲液以30μL/分钟依次注入到通道1-4的Fc1至Fc2中，结合阶段为180，然后解离为400。根据分析物浓度按升序重复6个捕获配体和运行分析物的循环。在每个解离阶段后注入作为再生缓冲液的10mM甘氨酸，pH 1.5。

[0262] 将运行缓冲液(1xHBS-EP+)中的2μg/mL CD64以10μL/分钟注入通道1-6的Fc2中，持续30秒。8种浓度(10240，5120，2560，1280，640，320，160和80nM)分析物20170907-Ab#K-02，20170908-Ab#L-02，20170915-Ab#O-02，20170919-Ab#P-02，20170919-Ab#S-02和20170920-Ab#T-02以及跑样缓冲液以30μL/分钟依次注入到通道1-6的Fc1至Fc2中，结合阶段为60，然后解离为90。根据分析物浓度按升序重复8个捕获配体和运行分析物的循环。在每个解离阶段后注入作为再生缓冲液的10mM甘氨酸，pH 1.5。

[0263] (3)再生

[0264] 用10mM甘氨酸pH 1.5再生芯片。

[0265] (4)数据分析

[0266] 没有捕获配体的表面通道Fc1用作参比减法(reference subtraction)的对照表面。每个相互作用的最终数据均从参照通道和缓冲通道数据中扣除。通过1:1结合模式拟合20170905-Ab#C-02、20170905-Ab#D-02、20170908-Ab#G-02、20170920-Ab#H-02与CD64结合的实验数据。分析物20170907-Ab#K-02、20170908-Ab#L-02、20170915-Ab#O-02、20170919-Ab#P-02、20170919-Ab#S-02和20170920-Ab#T-02的10240nM曲线被移除，以获得更好的拟合。用稳态亲和力拟合相对实验数据，并在下表2中示出。

[0267] 表2:FCRI结合

[0268]

分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	评价
Ab#D	4.82E+05	9.25E-04	1.92E-09	1:1 结合
Ab#H	5.54E+05	3.18E-03	5.73E-09	
Ab#L	无		1.62E-06	稳态亲和力
Ab#P			2.79E-06	
Ab#T			3.05E-06	

[0269] 所有抗体均显示出低或无FCRI结合，这是有利的。

[0270] A.与FcγRIIa，FcγRIIb，FcγRIIIa，FcγRIIIb的结合

[0271] 实验:Biacore 8K

[0272] 芯片:CM5

[0273] (1)固定化

[0274] 通过在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS来制备活化剂。混合物活化CM5传感器芯片420秒。然后将30μg/mL的10mM NaAc(pH 4.5)中的THE™His标签抗体以30μL/分钟注入通道1-8，持续400秒。用1M乙醇胺-HCl(GE)使芯片失活。

[0275] (2)捕获配体并运行分析物

[0276] 将运行缓冲液(1×HBS-EP+)中的1μg/mLFcγRIIa，FcγRIIb，FcγRIIIa或Fcγ

RIIIb以10μL/分钟的流速注入通道1-8的Fc2中，持续15秒。将分析物分别注入通道1-8。在60秒的缔合阶段，接着90秒的解离过程中，以30μL/分钟的流速监测一系列分析物浓度(参见下表3)。在每个解离阶段后注入作为再生缓冲液的10mM甘氨酸，pH 1.5。

[0277] 表3:分析物浓度

[0278]

分析物	测试的浓度(nM)
Ab#D	0,160,320,640,1280,2560,5120,10240
其它	0,320,640,1280,2560,5120,10240,20480,40960

[0279] (3)再生

[0280] 用10mM甘氨酸pH 1.5再生芯片。

[0281] (4)数据分析

[0282] 没有捕获配体的表面通道Fc1用作参比减法(reference subtraction)的对照表面。每个相互作用的最终数据均从参照通道和缓冲通道数据中扣除。通过稳态亲和模式拟合与FcγRIIa,FcγRIIb,FcγRIIIa和FcγRIIIb结合的抗体的实验数据，并在下表4中显示。

[0283] 表4:FcγRIIa,FcγRIIb,FcγRIIIa,和FcγRIIIb结合

[0284]

样品编号	与 FcγRIIa 结合	与 FcγRIIb 结合	与 FcγRIIIa 结合	与 FcγRIIIb 结合
Ab#D	3.39E-06	1.08E-05	2.25E-06	5.28E-06
Ab#H	2.12E-05	1.89E-05	无/结合非常弱	无/结合非常弱
Ab#L	无/结合非常弱	无/结合非常弱	3.40E-05	无/结合非常弱
Ab#P	无/结合非常弱	2.83E-05	无/结合非常弱	无/结合非常弱
Ab#T	无/结合非常弱	无/结合非常弱	无/结合非常弱	无/结合非常弱

[0285] 所有抗体均显示出低或无FcγRIIa,FcγRIIb,FcγRIIIa,和FcγRIIIb结合，这是有利的。

[0286] C.与FcRn的结合

[0287] 实验:Biacore 8K

[0288] 芯片:CM5

[0289] (1)缓冲液交换

[0290] 根据说明手册，使用脱盐柱将人FcRn的缓冲液更换为跑样缓冲液(50mM Na_2HPO_4、50mM NaH_2PO_4、150mM NaCl,0.05%Tween20,pH 6.0)。用Nanodrop测定浓度。

[0291] (2)固定化

[0292] 通过在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS(GE)来制备活化剂。用混合物以10μL/分钟的流速活化CM5传感器芯片420秒。然后将10mM NaAc(pH5.5)中的5μg/mL抗体分别以10μL/分钟的流速注入通道1-8的Fc2中60秒。相对Fc1被阻断。用1M乙醇胺-HCl(GE)以10μ

L/分钟的流速灭活芯片420秒。

[0293] (2)运行分析物

[0294] 将分析物FcRn分别注入通道1-8。在60秒的缔合阶段,接着90秒的解离过程中,以30μL/分钟的流速监测8个浓度的FcRn(0,93.75,187.5,375,750,1500,3000和6000nM)。每轮相互作用分析循环后,用1×PBS(pH 7.4)以10μL/分钟的流速再生传感器芯片表面30秒。

[0295] (3)再生

[0296] 用1xPBS(pH7.4)再生芯片。

[0297] (4)数据分析

[0298] 没有固定化抗体的表面通道Fc1用作参比减法(reference subtraction)的对照表面。每个相互作用的最终数据均从参照通道和缓冲通道数据中扣除。用稳态亲和力模式拟合相对实验数据,并在下表5中示出。

[0299] 表5:FcRn结合

[0300]

配体	KD (M)
Ab#D	2.25E-06

[0301]

Ab#H	2.61E-06
Ab#L	2.60E-06
Ab#P	2.55E-06
Ab#T	2.56E-06

[0302] 所有抗体显示理想的相似FcRn结合。

[0303] D.通过ELISA对C1q的结合

[0304] 平板(Nunc)在4℃以3μg/mL的抗体包被过夜。封闭并洗涤后,将C1q在封闭缓冲液(600、189.75、60.01、18.98、6.00、1.90、0.60、0.19、0.06和0.02μg/mL)中进行半对数滴定,并在室温下孵育2小时。然后洗涤板,随后与第二抗体绵羊抗人C1q Ab-HRP一起孵育1小时。洗涤后,加入TMB底物,并用2M HCl终止相互作用。使用酶标仪(Molecular Device)读取450nm处的吸光度,并在下表6中示出。

[0305] 表6:C1q结合

[0306]

抗体	KD
Ab#D	75nM
Ab#H	无结合
Ab#L	弱结合
Ab#P	无结合
Ab#T	无结合

[0307] 所有抗体均显示出低或无C1q结合,这是有利的。

[0308] 实施例3.表位作图

[0309] 为了重建目标分子表位,使用固相Fmoc合成法合成了基于肽的表位模拟物文库。通过接枝专利亲水性聚合物配方,然后使用二环己基碳二亚胺(DCC)与N-羟基苯并三唑

(HOBt)与叔丁氧基羰基-六亚甲基二胺(BocHMDA)反应,随后使用三氟乙酸(TFA)裂解Boc-基团,获得氨基官能化的聚丙烯载体。通过定制的改良JANUS液体处理站(Perkin Elmer),使用标准的Fmoc-肽合成方法在氨基官能化固相载体上合成肽。

[0310] 使用支架上的化学连接肽(CLIPS)技术完成结构模拟物的合成。CLIPS技术允许将肽结构化为单环,双环,三环,片状折叠,螺旋状折叠及其组合。CLIPS模板与半胱氨酸残基偶联。肽中的多个半胱氨酸的侧链与一个或两个CLIPS模板偶联。例如,将0.5mM的P2 CLIPS(2,6-双(溴甲基)吡啶)溶液溶解在碳酸氢铵(20mM,pH 7.8)/乙腈(1:3(v/v))中。将该溶液添加到肽阵列上。CLIPS模板将结合肽阵列(455孔板,带3μl孔)固相结合肽中存在的两个半胱氨酸的侧链。将肽阵列在溶液中轻轻摇动30至60分钟,同时将其完全覆盖在溶液中。最后,将肽阵列用过量的H_20充分洗涤,并在70℃的PBS(pH 7.2)中,在含有1%SDS/0.1%2,2'-(乙二氧基)二乙硫醇的破坏缓冲液中超声处理30分钟,然后再在水中超声处理45分钟。携带T3CLIPS的肽以类似的方式制备,但现在使用三个半胱氨酸。

[0311] 根据以下设计合成了不同组的肽。请注意,某些微型卡上肽的实际顺序是随机的。

[0312]

	组 1	组 2
标签	RN.FLSRPTEKTI	WN
说明	衍生自前导序列 FLSRPTEKTI 的单残基取代变体。在该系列中,肽中的每个残基都被所有其他蛋白质残基取代,且有一个残基的偏移。	来自前导肽序列FLSRPTEKTI的长度为 5、6、7、8 和 9 的肽,具有一个残基的偏移量。
序列 (前10)	FWSRPTEKTI(SEQ ID NO. 20) FLSRPTEKTC(SEQ ID NO. 21) FLGRPTEKTI(SEQ ID NO. 22) FLSRPTEKDI(SEQ ID NO. 23) FLSRPTEKYI(SEQ ID NO. 24) FLSRWTEKTI(SEQ ID NO. 25) FLSRPSEKTI(SEQ ID NO. 26) FLNRPTEKTI(SEQ ID NO. 27) FLSRPFEKTI(SEQ ID NO. 28) FLSRPTEKTG(SEQ ID NO. 29)	FLSRP(SEQ ID NO. 30) LSRPT(SEQ ID NO. 31) SRPTE(SEQ ID NO. 32) RPTEK(SEQ ID NO. 33) PTEKT(SEQ ID NO. 34) TEKTI(SEQ ID NO. 35) FLSRPT(SEQ ID NO. 36) LSRPTE(SEQ ID NO. 37) SRPTEK(SEQ ID NO. 38) RPTEKT(SEQ ID NO. 39)

[0313] 在ELISA中测试抗体与每种合成肽的结合。将肽阵列与一抗溶液一起孵育(在4℃过夜)。洗涤后,将肽阵列与1/1000稀释的适当抗体过氧化物酶偶联物(SBA;山羊抗人HRP偶联物,Southern Biotech)在25℃孵育1小时。洗涤后,加入过氧化物酶底物2,2′-叠氮基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐(ABTS)和20μl/ml的3%H_2O_2。一小时后,测量显色。用电荷耦合器件(CCD)-照相机和图像处理系统对显色进行定量。

[0314] 从CCD相机获得的值范围是0到3000mAU,类似于标准的96孔板ELISA读数器。结果被量化并存储到实验室数据库中。偶尔,一个孔会含有气泡,从而产生假阳性值,需要对卡进行人工检查,并将由气泡引起的任何值都记为0。

[0315] 为了验证合成肽的质量,平行合成了一组独立的阳性和阴性对照肽。用市售抗体3C9和57-9进行筛选(参见Posthumus等(1990)病毒学杂志64:3304-3309)。

[0316] 图1给出了完整数据组的图形概述。此处的箱形图描绘了每个数据集，并指示了每个数据集中的平均ELISA信号，分布和离群值。根据实验条件(抗体量，封闭强度等)，可获得不同的ELISA数据分布。具体来说，框的底部和顶部是数据的第25和第75个百分位。靠近箱中间的条是第50个百分点(中位数)。晶须在分位数间范围的1.5处，表明数据集中的统计异常(Mcgill等人，(1978)美国统计学家，32:12-16)。

[0317] 在高严格条件下以高浓度测试抗体。记录的结果如图2和图3所示。分别分析了两个肽组各自的数据。

[0318] 对用前导序列FLSRPTEKTI的取代变体分析记录的数据表明，序列中任一残基的许多置换均产生负面影响，尽管程度不同，但会影响抗体的结合(图2)。仅见到一个例外-残基L2，它不耐受L2P和L2Y替代，但对所有其他替代都不敏感。

[0319] 分析前导序列FLSRPTEKTI的截短变体记录的数据，表明该序列的N端被抗体偏爱(图3)。来自FLSRPTEKTI中心部分的许多构建体也是熟知的。

[0320] 总而言之，在包含两种类型的衍生自前导序列FLSRPTEKTI的肽变体的肽阵列上测试了抗体-单残基突变体和截短变体。该抗体在高严格条件下产生可检测的结合。整个FLSRPTEKTI中的许多取代都不适合该抗体。抗体是来自序列N末端部分的较强结合截短构建体。

[0321] 实施例4.抗体稳定性

[0322] 抗体稳定性是影响开发，功效，生产成本等的重要因素。序列优化后，评估了关键稳定性参数。测试了在酸性和高温条件下各种抗体的种类分布概貌。所有抗体显示改进的稳定性。

[0323] A.SE-UPLC(尺寸排阻超高效液相色谱仪)

[0324] 制剂:PBS，pH 6.5或7.2

[0325] 浓度(mg/mL):5.28，5.13，5.00，5.17，5.01，5.26，4.92，5.04，4.99，5.12(全部在约5mg/mL)

[0326] 条件:室温，酸性处理，然后在4℃存放1周或在40℃存放1周

[0327] 将2μL样品以0.3mL/分钟的流速经10分钟注入ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200，1.7μm，4.6x150mm色谱柱中。使用50mM磷酸钠，500mM NaCl，pH 6.2的流动相。所有抗体在各种pH，加热和储存条件下均显示出所需的稳定性。

[0328] B.rCE-SDS(还原毛细管电泳-十二烷基硫酸钠)

[0329] 制剂:PBS，pH 6.5，7.2，6.2

[0330] 浓度(mg/mL):0.5

[0331] 条件:室温，酸性处理，然后在4℃存放1周或在40℃存放1周

[0332] 样品在还原标记缓冲液中制备，然后提交给LabChip GXII系统(PerkinElmer)。所有抗体在各种pH，加热和储存条件下均显示出所需的稳定性。

[0333] 实施例5.半通道开放实验

[0334] 体外实验

[0335] 可以使用染料吸收测定法在体外测试本文公开的抗体对半通道开放的作用。该染料可以是荧光示踪染料(例如，溴乙锭或荧光黄)。

[0336] 在一个示例中，可以使用流体流动回路设备(FFLA)(平行板流动室)或其变体。

FFLA模拟骨骼中的动态流体微环境,以产生流体流动剪切应力(FFSS)。细胞在平行板流动室中培养,使细胞暴露于稳定的层流中。

[0337] 骨细胞感受FFSS在骨细胞腔/小管网络中产生的机械应力。已经提出骨液流动是由血管外压力以及骨细胞施加的周期性机械负荷驱动的,并且最大生理负荷为8至30dyn/cm^2。在某些方面,FFSS水平在先前研究中测量骨内流体流动的研究报告的生理值范围内。流体剪切应力的大小可以通过调节流动回路的柱高来改变。

[0338] 用于评估半通道功能的实验可使用足够小以穿过半通道孔的荧光示踪分子。如果半通道关闭,分子将无法通过。如果半通道是开放的,染料可以穿过并导致细胞发荧光,从而可以定量荧光。当溴乙锭与DNA结合时,它会发出荧光。一旦荧光黄位于细胞内部,它就会发出荧光。

[0339] 染料转移方法可以包括将细胞暴露于胞外荧光通透性示踪剂。胞外通透性示踪剂是保留在细胞外的分子,除非在某些条件下细胞膜通透性增加。在某些方面,示踪剂的质量小于1、2或3kDa。在其它方面,示踪剂将具有净电荷。此类通透性示踪剂包括但不限于阴离子染料荧光黄(LY;净电荷=-1)和阳离子探针溴乙锭(Etd;净电荷=+1),碘丙啶(PI;净电荷=+2)。与DNA结合后,EtBr的荧光会增强,从而增加对比度并使其更易于识别。在某些方面,在不同时间段或在施加刺激以打开半通道后去除胞外染料,并量化每个细胞中保留的荧光强度。在某些方面,在快照图像中定量荧光强度。

[0340] 体外测定中用于测试半通道开放的物质包括:

[0341] 表达半通道的细胞或细胞系。可使用本领域已知的方法和/或表达载体获得,分离或工程化表达各种连接蛋白半通道的细胞或细胞系。

[0342] 骨细胞:从动物(包括小鼠,大鼠,兔,鸡)等分离的原代骨细胞或包括但不限于MLO-Y4细胞等的骨细胞系。

[0343] 癌细胞:乳腺癌细胞系:包括ER,PR,HER和TP53阳性/阴性细胞(例如MD-MBA-231,MCF7,T47D或ZR751)。MDA-MB-231是乳腺导管癌。从在C57B1/6MMTV-PyMT雌性小鼠(小鼠乳腺肿瘤病毒启动子驱动的多瘤中期T转基因)小鼠中产生的自发乳腺肿瘤建立Py8119乳腺肿瘤细胞系。癌基因(多瘤中期T转基因)的表达由小鼠乳腺肿瘤病毒启动子驱动。

[0344] 前列腺癌细胞系:包括雄激素受体和5α-还原酶阳性/阴性和对雄激素敏感/不敏感的细胞系(例如LNCaP-Rf,BM18,pRNA-1-1/ras,RC58T/hTERT,PPC-1等)。

[0345] 成骨细胞:MLO-A5成骨细胞被用作对照,因为它们表达连接蛋白43,但是在阿仑膦酸盐刺激下它们似乎不开放。

[0346] 示踪分子包括但不限于荧光黄,溴乙锭,伊文思蓝,Alexa350,Alexa488和Alexa594。

[0347] Cx43(E2):Cx43(E2)抗体对Cx43半通道具有特异性。Cx43E2结合Cx43半通道的第二个细胞外环,并阻止半通道打开。

[0348] 确定抗体是否打开半通道的方法包括以下一个或多个步骤:

[0349] (a)分离,获得或产生表达连接蛋白的细胞或细胞系。例如,原代骨细胞可以从骨灰质分离。可以使用本领域已知的其他方法分离其他细胞类型。在某些方面,颅骨骨细胞分离自动物(例如16天胚胎鸡颅骨或新生小鼠)。将动物断头,切下颅骨并迅速浸入70%酒精中。然后将颅骨放入aMEM中,并用PBS洗涤多次。将清洁的骨骼置于新鲜的αMEM中。将骨头切

碎，切成1.5毫米面积大小。可用胶原酶处理骨块，以去除软组织和类骨质，然后使用EDTA脱钙。最后，通过用胶原酶和剧烈搅拌处理，从骨块中释放出骨细胞。

[0350] (b)从长骨中分离原代骨细胞。可以从2-3周龄的小鼠或大鼠中分离出长骨骨细胞。例如，给小鼠服用过量麻醉剂，然后将其颈脱臼，断头并浸入70％的乙醇中。分离关节末端仍然完整的股骨和胫骨。将腿迅速浸入70％酒精中，然后置于αMEM中。αMEM中的腿用PBS洗涤。去除大部分肌肉，并从肌腱/韧带分离。将清洁的骨骼置于新鲜的αMEM中。清洁完所有骨头后，在用PBS冲洗骨髓之前，用手术刀切开每个骨头的两端。将骨切成1.5至2mm的长度，并用胶原酶处理。在一实例中，用胶原酶依次处理骨块9次以去除所有其他组织和类骨质，然后使用EDTA脱钙。

[0351] (c)培养细胞或细胞系。例如，原代和/或溶骨细胞系在胶原蛋白包被的平板上培养，并浸入含有通透性示踪剂的记录培养基(不含HECO3的HCO3-α-MEM培养基，用HEPES缓冲)中。

[0352] (d)施用测试抗体。使培养的细胞与测试抗体接触所需的时间。

[0353] (e)确定通透性示踪剂的吸收。通透性示踪剂的摄取是通过检测细胞内示踪剂的量来确定的。在某些方面，使用延时记录。可基于示踪剂或使用的其他探针的荧光波长在配有日蚀滤光片的显微镜记录不同细胞感兴趣区域的荧光。在某些方面，快速冷却的数码相机每2分钟捕获一次图像，并使用ImageJ软件执行图像处理。所收集的数据可以绘制成初始荧光和感兴趣时间的荧光相对于基础荧光的倍数差异。

[0354] 对于快照图像，可以将细胞暴露于通透性示踪剂5-10分钟，用PBS冲洗多次，并用甲醛固定。在某些方面，用显微镜拍摄荧光视野的至少三张显微照片。图像分析是通过ImageJ软件完成的。测量随机细胞的像素密度均值。

[0355] 连接蛋白半通道的开放可以通过例如将骨细胞与Cx43(E2)抗体(一种特异性抑制Cx43半通道的多克隆抗体)以及受试抗体一起孵育来确认。如果测试抗体打开Cx43半通道，则此通道的开放将被Cx43(E2)抗体阻断。为了控制Cx43半通道的开放，对骨细胞进行流体剪切应力和/或AD处理，这两种方法都已知会在骨细胞中打开半通道。

[0356] 在特定实例中，在不存在或存在1μg/ml Cx43(E2)抗体的情况下，用20μM AD或测试抗体处理MLO-Y4骨细胞。与未处理的基础摄取水平相比，进行溴乙锭染料摄取并进行定量。该测定在钙的存在下进行。低钙条件可以用作对照(开放半通道)。Cx43(E2)抗体可阻断AD或测试抗体诱导的骨细胞半通道的开放。

[0357] 体内试验

[0358] 在某些方面，通过将候选试剂注射入长骨中并使用荧光示踪染料(例如钙黄绿素或伊文思蓝)来检测骨细胞中半通道的开放来确定骨细胞中Cx43的调节。

[0359] 用于分析骨细胞中半通道的体内分析的一个例子使用3-4个月大的小鼠或大鼠。动物称重。通过腹膜内(IP)注射将测试抗体引入动物。2-4小时后，将荧光示踪染料(即，伊文思蓝，Alexa 594)注射到动物的侧尾静脉中或通过IP注射。注意：最多可以注射动物体重的1％(以体积计)。在某些方面，在注射尾静脉之前将动物加热以扩张尾静脉。2-4小时后，杀死动物，切下无肌肉组织的胫骨和股骨，并用PBS清洗多次。将骨骼固定在低聚甲醛中，并在4℃下于14％EDTA溶液中脱钙两周，或在恒定搅拌下于室温下脱钙3-5天。骨骼在PBS中洗涤，并在PBS中的30％蔗糖中浸泡过夜，然后包埋在OCT化合物中。通常根据需要在模具中调

节骨骼的位置。使用低温恒温器切5μm厚的冷冻切片，将切片用PBS冲洗，然后使用PBS中的50％甘油固定。可以在荧光显微镜下检查骨切片，并使用Image J定量吸收示踪染料的骨中骨细胞的程度。

[0360] 骨细胞中Cx43半通道的开放可通过打开骨细胞中Cx43半通道的胫骨上的机械负荷来确认。这可以作为体内骨细胞中半通道开放的阳性对照。对于阴性对照，使用骨细胞中缺乏Cx43的小鼠。该小鼠通过10-kb DMP-1 Cre和Cx43 flox小鼠杂交而产生。

[0361] 实施例6.癌细胞迁移，生存力和转移的测定

[0362] 体外实验

[0363] 癌细胞迁移实验通过施用AD或FFSS打开骨细胞中的Cx43半通道。打开的半通道允许各种因子释放到培养基中，产生调理培养基(CM)。通过软琼脂和伤口愈合试验确定AD或FFSS处理的CM中释放的因子可降低癌细胞迁移。用对照CM处理的癌细胞表现出正常迁移。与锚定依赖性生长相反，软琼脂测定法是不依赖于锚定性生长的测定。只有癌细胞可以在软琼脂上生长，并且它们在该基质上的生长表明癌细胞的增殖程度。

[0364] 在某些实施方案中，将癌细胞(例如，乳腺癌或前列腺癌)细胞与CM一起温育，并确定癌细胞的增殖，迁移和侵袭。

[0365] 癌细胞的生长和生存力可以使用WST-1(水溶性四唑盐)，使用台盼蓝法的活细胞计数，BrdU DNA掺入和细胞增殖测定来确定。对于WST-1分析，使用Synergy HT多模式微量滴定板阅读仪(Biotek)在450nm的发射波长下测量细胞增殖。

[0366] 细胞迁移分析通常在24孔组织培养板(BD Biosciences)中的跨孔膜滤器插入物中进行。跨孔膜滤器插入物直径可以为6.5mm，孔径为8μm，聚碳酸酯膜的厚度为10nm。

[0367] 侵袭测定在BD Biocoat生长因子减少的Matrigel侵袭室(BD Biosciences)中进行。收集癌细胞系并将其与或不与测试抗体一起重悬于来自骨细胞的CM中。将癌细胞悬液添加到插入物的上侧。细胞在37℃下孵育不同的时间。去除未迁移通过滤器的细胞，固定迁移通过插入物的细胞并用Hema 3 Stat Pack(Fisher Scientific)染色。在光学显微镜下计数每个插入物在5个视野中迁移的细胞数量。

[0368] 当在来自用AD或FFSS或本文公开的抗体处理以刺激Cx43半通道开放的骨细胞的CM中温育时，可减少乳腺癌细胞迁移。当骨细胞Cx43半通道被E2抗体阻断时，这种对癌细胞迁移的抑制作用就会减弱。与成骨细胞中收集的CM孵育或直接用AD治疗时，未见癌细胞迁移的这种减少。本文公开的抗体对Cx43半通道的开放对乳腺癌细胞的生长和迁移具有保护作用。

[0369] A.体内试验

[0370] 使用胫骨内注射骨转移模型和/或心内注射癌转移测定法确定测试抗体对体内骨转移的作用。

[0371] 胫骨内骨转移模型：该方法包括使用异氟烷对1个月大的正常或免疫功能低下的小鼠进行麻醉。还给予小鼠盐酸丁丙诺平(0.3mg/ml)作为镇痛药。使用表达荧光或化学发光标记的癌细胞(例如，对正常小鼠表达Luc-GFP的Py8119细胞或对免疫功能低下的小鼠表达Luc-GFP的MD-MBA-231进行胫骨内注射。通过一个装有30号针头的汉密尔顿注射器造成的预穿孔，将癌细胞接种到右胫骨的骨髓区域。在左胫骨内注射PBS作为对照。每周两次IP给予测试抗体或盐水，持续5周。从接种肿瘤细胞后3天开始，每周通过生物发光成像或荧光

监测胫骨内肿瘤的生长。在足够的生物发光成像后研究结束时，拍摄X射线图像以测试骨质量，并观察标记的转移性癌细胞集落并用荧光显微镜计数。

[0372] 心内骨转移模型：用异氟烷麻醉两三个月大的正常或免疫功能低下的小鼠，并给予盐酸丁丙诺平(0.3mg/ml)作为镇痛药。将表达荧光或化学发光标记的癌细胞(例如，向正常小鼠表达Luc-GFP的Py8119细胞或向免疫受损小鼠表达Luc-GFP-MD-MBA-231的Py8119细胞)注入小鼠的左心室。该过程包括：保持针头朝向操作者并向右倾斜，将其插入第二肋间隙，距胸骨左侧约3mm。前进约5毫米，然后轻轻转动针头，直到观察到鲜红色动脉血的脉动流进入针座。经30秒注射细胞悬液。拔出针头，然后用酒精拭子按压注射部位30秒钟。将小鼠放在温暖的表面上，直到完全从麻醉中恢复。心内注射后，从肿瘤细胞接种后3天起每周一次进行生物发光或荧光成像以验证肿瘤细胞分布。在足够的生物发光成像后研究结束时，拍摄X射线图像以评估骨质量，并观察标记的转移性癌细胞集落并用荧光显微镜计数。

[0373] Cx43条件性敲除(cKO)小鼠。由于纯合的Cx43整体敲除具有致死性，并且由于发明人希望检查在骨细胞中表达的Cx43的作用，因此生成了骨细胞特异性Cx43敲除小鼠。将floxed Cx43基因的纯合小鼠与Cx43整体杂合的小鼠杂交，以促进骨细胞中Cx43的完全缺失。然后将Cx43fl/-小鼠(子代的50％)与表达由人DMP-1启动子驱动的Cre重组酶的小鼠杂交。这样产生的小鼠为Cx43 fl/-，DMP1 Cre+或Cx43 fl/-，DMP1 Cre-(小比例为Cx43fl/fl或Cx43-/-)。通过免疫组织化学证实了Cx43缺陷的骨细胞。

[0374] 研究可包括8组小鼠：用阿仑膦酸盐(AD)处理的WT，无AD的WT，用AD处理的cKO，无AD的cKO，用测试抗体(TA)处理的WT，无TA的WT，经TA处理的cKO和无TA的cKO。以150μg/kg体重对小鼠施用AD或TA。与WT小鼠相比，使用AD或TA治疗可以预期KO中的骨转移会增加。在没有AD或TA处理的情况下，WT和基因敲除小鼠之间的骨转移应该相似。

[0375] 本公开的各个方面可以单独使用、组合使用、或者以前面描述的实施例中未具体讨论的各种配置使用，因此在其应用上不限于在前面的描述中阐述的或者在附图中示出的部件的细节和布置。例如，一个实施方式中描述的方面可以以任何方式与其它实施方式中描述的方面组合。

[0376] 虽然已经讨论了本主题公开的特定实施方式，但是以上说明书是说明性的而非限制性的。在阅读本说明书后，本公开的许多变化对于本领域技术人员而言将变得显而易见。本公开的全部范围应该通过参考权利要求及其等同物的全部范围和说明书以及这些变化来确定。

[0377] 通过引用纳入

[0378] 说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请均出于所有目的通过引用整体并入本文，其程度如同每个单独的出版物或专利或专利申请被具体指出通过引用并入。

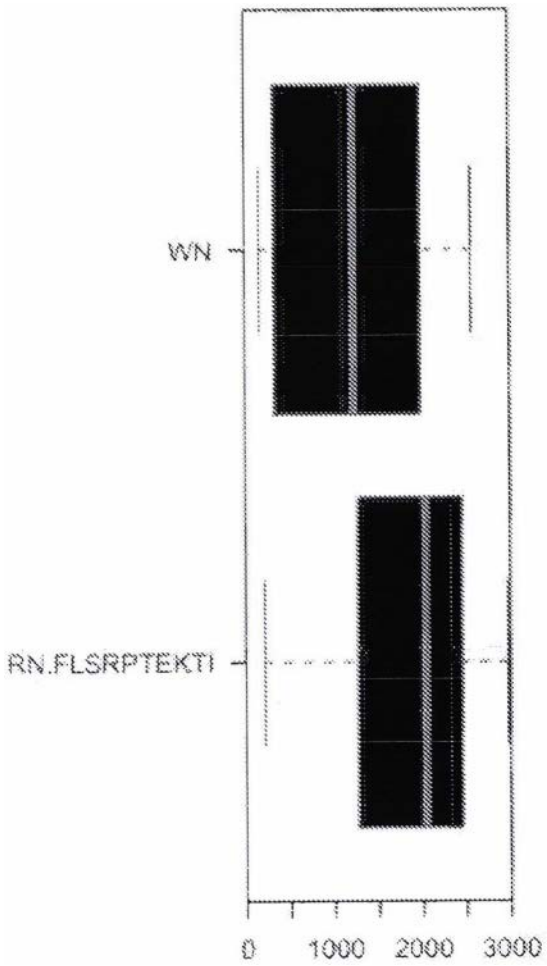
WN
RN.FLSRPTEKTI
0
1000
2000
3000

图1

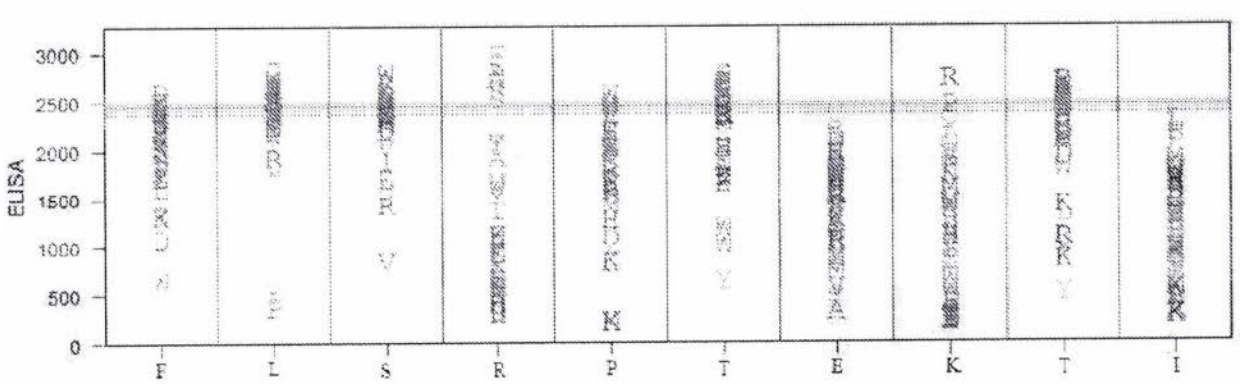
ELISA
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
F
L
S
R
P
T
E
K
T
I

图2

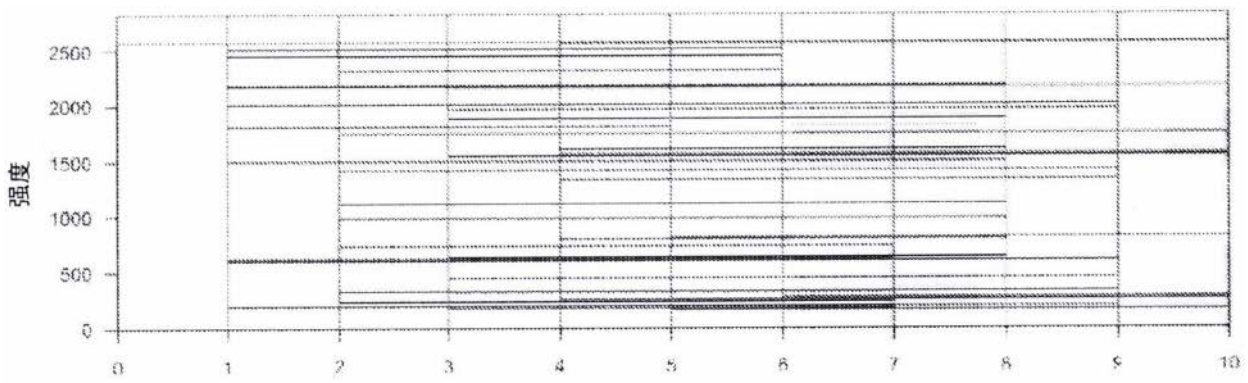

图3