



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115867355 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202180045596.5

(22) 申请日 2021.06.30

(30) 优先权数据

20183251.6 2020.06.30 EP

63/147,485 2021.02.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/068038 2021.06.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/003042 EN 2022.01.06

(71) 申请人 艾瑞克斯疗法有限公司

地址 挪威奥斯陆

(72) 发明人 J·克林格霍夫 J·海伦

R·I·侯赛因

J·H·W·迪斯特勒 M·托马西克

T·巴斯 D·麦卡尼

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61P 37/00 (2006.01)

(54) 发明名称

用于治疗系统性硬化病的抗S100A4抗体

(57) 摘要

本文公开了可用于治疗疾病系统性硬化病的抗S100A4中和抗体。本公开文本还提供了用于治疗系统性硬化病的分离的多核苷酸、载体、分离的宿主细胞、组合物和药物组合物。

权利要求书3页 说明书23页

序列表17页 附图26页

1. 一种用于治疗系统性硬化病的抗人S100A4抗体,其中所述抗体能够中和S100A4的生物活性。

2. 根据权利要求1所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体特异性地结合SEQ ID NO:11的人S100A4多肽,优选结合包含在SEQ ID NO:11的氨基酸66与89之间的表位。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够结合由SEQ ID NO:12定义的表位。

4. 根据权利要求1或2所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够结合由SEQ ID NO:13定义的表位。

5. 根据权利要求1或2所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够结合由SEQ ID NO:14定义的表位。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体包含:

a) 重链可变 (VH) 区,所述重链可变区包含:

i. 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由其组成的CDR-H1;

ii. 含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的CDR-H2;和

iii. 含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的CDR-H3;

以及

b) 轻链可变 (VL) 区,所述轻链可变区包含:

i. 含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由其组成的CDR-L1;

ii. 含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或由其组成的CDR-L2;和

iii. 含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列或由其组成的CDR-L3;

或SEQ ID NO:1至6中任一个的CDR变体,其中任一个氨基酸已经被改变为另一个氨基酸,条件是不超过3个氨基酸已经被如此改变,例如其中每个CDR中2或1个氨基酸已经被如此改变。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述重链可变 (VH) 区包含SEQ ID NO:7或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少85%、如至少90%、如至少95%同一性;并且所述轻链可变 (VL) 区包含SEQ ID NO:9或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少85%、如至少90%、如至少95%同一性,优选地其中所述抗体具有由SEQ ID NO:7定义的VH区和由SEQ ID NO:9定义的VL区。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体包含:

a) 重链可变 (VH) 区,所述重链可变区包含:

i. 含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由其组成的CDR-H1;

ii. 含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由其组成的CDR-H2;和

iii. 含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由其组成的CDR-H3;

以及

b) 轻链可变 (VL) 区,所述轻链可变区包含:

i. 含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列或由其组成的CDR-L1;

ii. 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或由其组成的CDR-L2;和

iii. 含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR-L3;

或SEQ ID NO:15至20中任一个的CDR变体,其中任一个氨基酸已经被改变为另一个氨基酸。

基酸,条件是不超过3个氨基酸已经被如此改变,例如其中每个CDR中2或1个氨基酸已经被如此改变。

9.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述重链可变(VH)区包含SEQ ID NO:21或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少85%、如至少90%、如至少95%同一性;并且所述轻链可变(VL)区包含SEQ ID NO:23或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少85%、如至少90%、如至少95%同一性,优选地其中所述抗体具有由SEQ ID NO:21定义的VH区和由SEQ ID NO:23定义的VL区。

10.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述重链包含SEQ ID NO:25或由其组成并且所述轻链包含SEQ ID NO:26或由其组成。

11.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。

12.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体选自完整抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab样片段、scFv、单结构域抗体、双抗体和三抗体。

13.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的免疫球蛋白亚类抗体。

14.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体是人IgG4亚类抗体。

15.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体包含人重链恒定(CH)区,所述人重链恒定区包含SEQ ID NO:27中所示的序列或变体序列或者由SEQ ID NO:27中所示的序列或变体序列组成,所述变体序列与SEQ ID NO:27中所示的序列具有至少80%,如至少85%、如至少90%、如至少95%序列同一性。

16.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体包含具有突变的IgG恒定区的Fc结构域。

17.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体是聚乙二醇化的。

18.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体分子是人源化抗体、嵌合抗体或人工程化抗体。

19.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够结合天然构象S100A4蛋白。

20.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够结合S100A4蛋白的二聚体、寡聚体和/或多聚体形式。

21.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够抑制由S100A4介导的T细胞和/或巨噬细胞募集和/或浸润。

22.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够抑制S100A4蛋白在刺激细胞侵袭中的生物活性。

23.根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中用所述抗S100A4抗体治疗减少纤维化。

24.根据权利要求23所述的用于所述用途的抗体分子,其中纤维化通过测量真皮厚度、真皮羟脯氨酸含量、真皮CD3⁺细胞计数和/或真皮成肌纤维细胞计数来评估。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体, 其中用所述抗S100A4抗体治疗减少真皮厚度、真皮胶原蛋白或羟脯氨酸含量、真皮成肌细胞计数和/或T细胞计数。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体, 其中将所述抗体经由肠胃外施用如皮下、肌内或静脉内施用。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体, 其中将所述抗体每周, 如每2周、如每3周、如每4周施用。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体, 其中将所述抗体每周施用, 且每周剂量为25mg, 如50mg、如75mg、如100mg、如125mg、如150mg、如175mg、如200mg、如225mg、如250mg、如275mg、如300mg或更多。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的抗体, 其中将所述抗体与选自以下的化合物共同施用: 血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、硫唑嘌呤、钙通道阻断剂、环磷酰胺、羟氯喹、霉酚酸酯、甲氨蝶呤、糖皮质激素、磷酸二酯酶-5抑制剂、内皮素受体拮抗剂、 α 阻断剂、类前列腺素、利妥昔单抗、酪氨酸激酶抑制剂如尼达尼布、和托珠单抗。

30. 一种用于治疗系统性硬化病的药物组合物, 其包含根据权利要求1至27中任一项所述的抗体分子和药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂。

31. 一种用于治疗系统性硬化病的分离的多核苷酸, 其编码根据权利要求1至25中任一项所述的抗体。

32. 一种包含根据权利要求31所述的用于所述用途的分离的多核苷酸的载体。

33. 一种分离的宿主细胞, 其包含根据权利要求31所述的用于所述用途的分离的多核苷酸或根据权利要求32所述的用于所述用途的载体。

34. 一种组合物, 其包含根据权利要求1至27中任一项所述的用于所述用途的抗体、根据权利要求31所述的用于所述用途的多核苷酸、根据权利要求32所述的用于所述用途的载体和/或根据权利要求33所述的用于所述用途的细胞。

35. 根据权利要求34所述的用于所述用途的组合物, 其中所述组合物是药物组合物, 其进一步包含药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂。

用于治疗系统性硬化病的抗S100A4抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及抗S100A4中和抗体分子及其在治疗疾病系统性硬化病中的医学用途，且更特别地涉及能够抑制S100A4的生物活性(例如诱导促炎性信号传导和刺激TGF- β 诱导的成纤维细胞激活和/或胶原蛋白合成)的抗S100A4抗体分子，其用于治疗系统性硬化病。

背景技术

[0002] 系统性硬化病(SSc)是一种罕见的结缔组织疾病，具有高发病率和死亡率[1,2]。所述疾病的标志是自身免疫、血管病变、持续炎症和病理学激活的成纤维细胞实现的细胞外基质蛋白积累[2]。选择性抑制SSc中细胞外基质的异常释放的治疗方法迄今为止尚不可用[1]。

[0003] 通过损伤相关分子模式(DAMP)分子激活先天免疫系统在刺激SSc特征性的促炎性和促纤维化反应中起主要作用[3]。S100A4是熟知的DAMP，其在损伤后上调，并且是通过激活模式识别受体(包括RAGE和TLR-4)的促炎性和促纤维化途径的强诱导剂[4]。促炎性作用与多种促炎性细胞因子和趋化因子如IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、血清淀粉样蛋白A和CCL5；先天免疫的关键炎性分子的上调有关[5,6,7]。此外，细胞外S100A4还对适应性免疫系统的不同元件具有充分证明的作用[8,9,10,11]，增加了持续炎症，这对于纤维化障碍的发病机理是重要的[12,13,14]。

[0004] S100A4还通过与TLR4相互作用直接激活促纤维化途径，这种相互作用放大转化生长因子 β (TGF- β)驱动的成纤维细胞激活[22]。TGF- β 是SSc和IPF发病机理中的关键分子，并且TGF- β 信号传导在SSc和IPF中持续激活，其中它上调成纤维细胞中胶原蛋白的合成并诱导体内纤维化[23]。已经显示TGF- β 刺激S100A4的表达，并且继而，S100A4放大TGF- β 诱导的成纤维细胞激活和胶原蛋白合成[22]。

[0005] 总之，S100A4通过激活促炎性和促纤维化途径在诱导、放大和维持纤维化中起重要作用。直接地通过TGF- β 途径的激活以及更多是间接地通过不同免疫细胞的激活和促纤维化细胞因子的分泌[15]。许多临床研究专注于靶向纤维化途径或免疫途径中的单一分子，收效甚微。

[0006] 因此，需要一种治疗方法，其可起到影响纤维化轴和炎症轴二者的双重作用，所述纤维化轴和炎症轴二者在SSc的病理生理学中起重要作用。

发明内容

[0007] 本发明如权利要求中所限定。

[0008] 本文提供了用于治疗系统性硬化病的抗S100A4中和抗体。

[0009] 本发明人已经在两种不同的系统性硬化病小鼠模型中测试了抗S100A4抗体，并且已经显示抗体治疗具有良好的耐受性，并且在这些疾病模型中有效抑制S100A4的促纤维化和促炎性作用。据我们所知，本发明还提供了选择性抑制系统性硬化病中通过病理学激活的成纤维细胞实现的细胞外基质蛋白的积累的第一种治疗方法。

[0010] 在一方面,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的抗S100A4抗体,其中所述抗体能够中和S100A4的生物活性。

[0011] 在一方面,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的分离的多核苷酸,其编码如本文所述的抗体。

[0012] 在一方面,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的包含如本文所述的分离的多核苷酸的载体。

[0013] 在一方面,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的分离的宿主细胞,其包含如本文所述的分离的多核苷酸或载体。

[0014] 在一方面,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的药物组合物,其包含如本文所述的抗体以及药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂。

[0015] 在一方面,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的组合物,其包含如本文公开的抗体和多核苷酸、载体和/或细胞。

[0016] 在另一方面,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的药物组合物,其包含如本文公开的抗体、多核苷酸、载体和/或细胞,还包含药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂。

附图说明

[0017] 图1显示了来自实施例1的5个不同样品组的用H&E染色进行染色的组织样品的代表性图像的相对真皮厚度(和皮下脂肪层厚度)。比例尺:100 μ m。结果进一步描述于实施例1中。

[0018] 图2显示了来自实施例1的5个不同样品组的样品的真皮厚度。图中显示了来自8只小鼠/组的每个高倍视野的4次测定的平均倍数变化 $\pm$ SEM。NaCl第1-6周组的值设定为1。使用Mann-Whitney U检验进行选择的比较。结果进一步描述于实施例1中。

[0019] 图3显示了来自实施例1的5个不同样品组的样品的成肌纤维细胞计数。图中显示了平均倍数变化 $\pm$ SEM。NaCl第1-6周组的值设定为1。使用Mann-Whitney U检验进行选择的比较。结果进一步描述于实施例1中。

[0020] 图4显示了来自实施例1的5个不同样品组的样品的皮肤胶原蛋白含量。图中显示了平均倍数变化 $\pm$ SEM。NaCl第1-6周组的值设定为1。使用Mann-Whitney U检验进行选择的比较。结果进一步描述于实施例1中。

[0021] 图5显示了来自实施例1的5个不同样品组的样品的CD-3阳性细胞计数。图中显示了平均倍数变化 $\pm$ SEM。NaCl第1-6周组的值设定为1。使用Mann-Whitney U检验进行选择的比较。结果进一步描述于实施例1中。

[0022] 图6显示了来自实施例2的4个不同样品组的样品的皮下厚度。图中显示了平均倍数变化 $\pm$ SEM。P值表示如下:0.05>p>0.01为*;0.01>p>0.001为**,与媒介物处理的Tsk1小鼠相比;0.05>p>0.01为#;0.01>p>0.001为##,与IgG1处理的Tsk1小鼠相比。pa:具有相同遗传背景但不表达Tsk1等位基因的对照小鼠。所有组N=10。结果进一步描述于实施例2中。

[0023] 图7显示了来自实施例2的4个不同样品组的样品的成肌纤维细胞计数。图中显示了平均倍数变化 $\pm$ SEM。P值表示如下:0.05>p>0.01为*;0.01>p>0.001为**,与媒介物处理的Tsk1小鼠相比;0.05>p>0.01为#;0.01>p>0.001为##,与IgG1处理的Tsk1小鼠相比。pa:具有相同遗传背景但不表达Tsk1等位基因的对照小鼠。所有组N=10。结果进一步描述于实施

例2中。

[0024] 图8显示了来自实施例2的4个不同样品组的样品的羟脯氨酸含量。图中显示了平均倍数变化 $\pm$ SEM。P值表示如下:0.05>p>0.01为*;0.01>p>0.001为**,与媒介物处理的Tsk1小鼠相比;0.05>p>0.01为#;0.01>p>0.001为##,与IgG1处理的Tsk1小鼠相比。pa:具有相同遗传背景但不表达Tsk1等位基因的对照小鼠。所有组N=10。结果进一步描述于实施例2中。

[0025] 图9显示了来自实施例2的4个不同样品组的样品的CD3阳性T细胞的数量。图中显示了平均倍数变化 $\pm$ SEM。P值表示如下:0.05>p>0.01为*;0.01>p>0.001为**,与媒介物处理的Tsk1小鼠相比;0.05>p>0.01为#;0.01>p>0.001为##,与IgG1处理的Tsk1小鼠相比。pa:具有相同遗传背景但不表达Tsk1等位基因的对照小鼠。所有组N=10。结果进一步描述于实施例2中。

[0026] 图10显示了单克隆人源化抗S100A4抗体对博来霉素激发的小鼠的纤维化读数的影响。抗S100A4抗体对真皮厚度(A)、成肌纤维细胞计数(B)和羟脯氨酸含量(C)的影响。HE染色的皮肤切片的代表性图像显示在D-E中。p值表示如下:0.05>p>0.01为*;0.01>p>0.001为**,与NaCl相比;0.05>p>0.01为#;0.01>p>0.001为##,与注射博来霉素三周接着再注射NaCl 3周的小鼠相比。结果进一步描述于实施例3中。

[0027] 图11显示通过Luminex分析进行分析的单核细胞的IL-6分泌。所示数据是5个供体的平均值。在不存在或存在小鼠IgG1(A)、人IgG4(B)、AX-202(C)或6B12(D)的情况下,将从PBMC纯化的单核细胞与培养基、媒介物、LPS、S100A4一起培养6小时。数据显示通过Luminex测定量化的上清液中IL-6的水平。数据表示为来自五个单独供体的平均值+SEM。“+”表示至少一个供体超过IL-6检测限(19,200pg/mL)。“-”表示至少一个供体低于IL-6检测限(8.8pg/mL)。结果进一步描述于实施例4中。

[0028] 图12显示通过Luminex分析进行分析的单核细胞的IL-10分泌。所示数据是5个供体的平均值。在不存在或存在小鼠IgG1(A)、人IgG4(B)、AX-202(C)或6B12(D)的情况下,将从PBMC纯化的单核细胞与培养基、媒介物、LPS、S100A4一起培养6小时。数据显示通过Luminex测定量化的上清液中的细胞因子IL-10。数据表示为来自五个单独供体的平均值+SEM。“-”表示至少一个供体低于IL-10检测限(8.6pg/mL)。结果进一步描述于实施例4中。

[0029] 图13显示通过Luminex分析进行分析的单核细胞的TNF- α 分泌。所示数据是5个供体的平均值。在不存在或存在小鼠IgG1(A)、人IgG4(B)、AX-202(C)或6B12(D)的情况下,将从PBMC纯化的单核细胞与培养基、媒介物、LPS、S100A4一起培养6小时。数据显示通过Luminex测定量化的上清液中TNF- α 的水平。数据表示为来自五个单独供体的平均值+SEM。“-”表示至少一个供体低于TNF- α 检测限(15.20pg/ml)。结果进一步描述于实施例4中。

具体实施方式

[0030] 定义

[0031] 本文所用的术语“抗S100A4抗体”包括任何基本上完整的抗体,以及特异性识别S100A4抗原的嵌合抗体、人源化抗体、分离的人抗体、单链抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、双特异性抗体、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和/或轻链的同二聚体和异二聚体、及其抗原结合片段和衍生物。合适的抗原结合片段和衍生物包括但不限于Fv片段(例如单链Fv和

二硫键键合的Fv)、Fab样片段(例如Fab片段、Fab'片段和F(ab')₂片段)、单一可变结构域(例如VH和VL结构域)和结构域抗体(dAb,包括单一和双重形式[即dAb-接头-dAb])。使用抗体片段而不是完整抗体的潜在优点是多方面的。片段的较小尺寸可导致改善的药理学特性,例如更好地穿透实体组织。此外,抗原结合片段如Fab、Fv、ScFv和dAb抗体片段可在大肠杆菌(E.coli)和细胞系中表达和由其分泌,因此允许容易地产生大量所述片段。

[0032] 蛋白质S100A4也称为18A2、42A、CAPL、FSP1、MTS1、P9KA、PEL98和S100钙结合蛋白A4。

[0033] 如本文所用,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述(the)”包括复数指示物,除非上下文另外明确说明。因此,例如,提及“一种抗体”包括多种此类抗体。

[0034] 如本文所用,术语“变体”定义DNA序列或其编码的RNA或蛋白质产物的天然存在的遗传突变体,或DNA序列或其编码的RNA或蛋白质产物的重组制备的变体。术语“变体”还可以指给定肽的天然存在的变体或给定肽或蛋白质的重组制备的变体,其中一个或多个氨基酸残基已经通过氨基酸取代、添加或缺失而被修饰。

[0035] 如本文所用的“抑制”意指本发明的抗体的存在全部或部分地抑制配体与它们的受体的结合和/或受体在配体结合后所引发的信号的失能。这包括例如对细胞行为和过程有影响的下游信号传导。还包括抑制靶分子下游效应的其他机制,例如通过阻断靶分子的二聚化、寡聚化和/或多聚化。“抑制”、“阻断”和“中和”在本文中用作等同术语。

[0036] 用于治疗系统性硬化病的抗S100A4抗体

[0037] 本发明涉及用于治疗系统性硬化病的抗S100A4中和抗体。

[0038] 因此,本发明的一个方面是提供用于治疗系统性硬化病的抗S100A4抗体,其中所述抗体能够中和S100A4的生物活性。

[0039] 抗体靶标

[0040] 在一些实施方案中,所述抗体特异性结合SEQ ID NO:11中所示的人S100A4多肽,优选结合包含在SEQ ID NO:11的氨基酸66与89之间的表位。

[0041] 在一些实施方案中,所述抗体能够结合由SEQ ID NO:12定义的表位。在一些实施方案中,所述抗体能够结合由SEQ ID NO:13定义的表位。在一些实施方案中,所述抗体能够结合由SEQ ID NO:14定义的表位。

[0042] 在一些实施方案中,所述抗体能够结合其天然构象的S100A4蛋白。

[0043] 在一些实施方案中,所述抗体能够结合S100A4蛋白的二聚体、寡聚体和/或多聚体形式。

[0044] 抗体组成和序列

[0045] 在一些实施方案中,所述抗S100A4抗体的组成如US 9,683,032中所述。

[0046] 在一些实施方案中,所述抗体包含:

[0047] a) 重链可变(VH)区,所述重链可变区包含:

[0048] i. 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由其组成的CDR-H1;

[0049] ii. 含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的CDR-H2;和

[0050] iii. 含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的CDR-H3;

[0051] 和/或

[0052] b) 轻链可变(VL)区,所述轻链可变区包含:

[0053] i. 含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由其组成的CDR-L1;

[0054] ii. 含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或由其组成的CDR-L2;和

[0055] iii. 含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列或由其组成的CDR-L3;

[0056] 或SEQ ID NO:1至6中任一个的CDR变体,其中任一个氨基酸已经被改变为另一个氨基酸,条件是不超过3个氨基酸已经被如此改变,例如其中每个CDR中2或1个氨基酸已经被如此改变。

[0057] 在一些实施方案中,所述抗体的重链可变(VH)区包含SEQ ID NO:7或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%同一性;并且所述抗体的轻链可变(VL)区包含SEQ ID NO:9或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%同一性。在一些优选的实施方案中,所述抗体具有由SEQ ID NO:7定义的VH区和由SEQ ID NO:9定义的VL区。

[0058] 在一些实施方案中,所述抗S100A4抗体的组成可以如US 9,657,092中所述。

[0059] 在一些实施方案中,所述抗体包含:

[0060] a) 重链可变(VH)区,所述重链可变区包含:

[0061] i. 含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由其组成的CDR-H1;

[0062] ii. 含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由其组成的CDR-H2;和

[0063] iii. 含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由其组成的CDR-H3;

[0064] 和/或

[0065] b) 轻链可变(VL)区,所述轻链可变区包含:

[0066] i. 含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列或由其组成的CDR-L1;

[0067] ii. 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或由其组成的CDR-L2;和

[0068] iii. 含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR-L3;

[0069] 或SEQ ID NO:15至20中任一个的CDR变体,其中任一个氨基酸已经被改变为另一个氨基酸,条件是不超过3个氨基酸已经被如此改变,例如其中每个CDR中2或1个氨基酸已经被如此改变。

[0070] 在一些实施方案中,所述抗体的重链可变(VH)区包含SEQ ID NO:21或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%同一性;并且所述抗体的轻链可变(VL)区包含SEQ ID NO:23或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%同一性。在一些优选的实施方案中,所述抗体具有由SEQ ID NO:21定义的VH区和由SEQ ID

N0:23定义的VL区。

[0071] 在一些实施方案中,所述抗体由ECACC 10022401杂交瘤产生。在一些实施方案中,所述抗体由ECACC 11051801杂交瘤产生。在一些实施方案中,所述抗体由ECACC 11051802杂交瘤产生。在一些实施方案中,所述抗体由ECACC 11051803杂交瘤产生。在一些实施方案中,所述抗体由ECACC 11051804杂交瘤产生。

[0072] 这些存放物描述于US 9,657,092中并可通过US 9,657,092获得。

[0073] 使用单克隆抗体可能是有用的,因为它们与特异性结合位点结合,从而抑制其他分子接近该特异性位点。

[0074] 在一些实施方案中,所述抗体是双特异性抗体。

[0075] 在一些实施方案中,所述抗体是完整抗体。在一些实施方案中,所述抗体是Fab片段。在一些实施方案中,所述抗体是F(ab')₂片段。在一些实施方案中,所述抗体是Fab样片段。在一些实施方案中,所述抗体是scFv。在一些实施方案中,所述抗体是纳米抗体,也称为单结构域抗体。在一些实施方案中,所述抗体是双抗体。在一些实施方案中,所述抗体是三抗体。

[0076] 在一些实施方案中,所述抗体是IgG1亚类抗体。在一些实施方案中,所述抗体是IgG2亚类抗体。在一些实施方案中,所述抗体是IgG3亚类抗体。在一些实施方案中,所述抗体是IgG4亚类抗体。优选地,所述亚类是人IgG亚类。在一些实施方案中,所述抗体包含具有突变的IgG恒定区的Fc结构域。

[0077] 对于本发明,使用具有免疫球蛋白亚类的抗体可能是有用的,所述免疫球蛋白亚类在宿主中引发弱促炎性应答或无促炎性应答。如图所示,当需要降低抗体的效应物或交联功能时,IgG4亚类特别有用。因此,在一些实施方案中,所述抗体是人IgG4亚类抗体。

[0078] 在一些实施方案中,所述抗体包含人重链恒定(CH)区,所述人重链恒定区包含SEQ ID N0:27中所示的序列或由其组成。在一些实施方案中,所述抗体包含CH区,所述CH区包含SEQ ID N0:27的变体或由SEQ ID N0:27的变体组成,所述变体与SEQ ID N0:27具有至少80%,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%序列同一性。

[0079] 在一些实施方案中,所述抗体包含人轻链恒定(CL)区,所述人轻链恒定区包含SEQ ID N0:28中所示的序列或由其组成。在一些实施方案中,所述抗体包含CL区,所述CL区包含SEQ ID N0:28的变体或由SEQ ID N0:28的变体组成,所述变体与SEQ ID N0:28具有至少80%,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%序列同一性。

[0080] 在一些实施方案中,所述抗体包含具有突变的人IgG恒定区的Fc结构域。在一些实施方案中,所述抗体包含突变体人IgG4重链恒定区。在一些实施方案中,所述突变体IgG4重链恒定区包含根据EU编号进行编号的S228P取代。所述S228P取代可以防止体内和体外IgG4 Fab臂交换,这可能导致具有未知特异性的功能性单价双特异性抗体(bsAb),并因此潜在地降低治疗效果。在一些实施方案中,已去除人IgG4重链恒定区的末端赖氨酸。

[0081] 在一些实施方案中,所述抗体是聚乙二醇化的。

[0082] 在一些实施方案中,所述抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,所述抗体是人工程化抗体。

[0083] 抗体功能和治疗效果

[0084] 在一些实施方案中,所述抗体能够中和S100A4的生物活性。不受理论束缚,S100A4被认为刺激TGF- β 诱导的成纤维细胞激活和胶原蛋白合成,并介导促炎性作用,如T细胞和/或巨噬细胞募集和/或浸润。

[0085] 在一些实施方案中,所述抗体能够抑制由S100A4介导的T细胞和/或巨噬细胞募集和/或浸润。

[0086] 在一些实施方案中,所述抗体能够抑制S100A4蛋白在刺激细胞侵袭中的生物活性。

[0087] 在一些实施方案中,用抗S100A4抗体治疗减少纤维化。纤维化可以通过本领域已知的方法测量真皮厚度、真皮羟脯氨酸含量、真皮CD3⁺细胞计数和/或真皮成肌纤维细胞计数来评估。因此,在一些实施方案中,用抗S100A4抗体治疗减少真皮厚度、真皮胶原蛋白或羟脯氨酸含量、真皮成肌细胞计数和/或T细胞计数。

[0088] 抗体治疗

[0089] 在一些实施方案中,经由肠胃外施用如皮下、肌内或静脉内施用所述抗体以治疗系统性硬化病。

[0090] 在一些实施方案中,将所述抗体每周,例如每2周、例如每3周、例如每4周施用。

[0091] 在一些实施方案中,将所述抗体每周施用一次或两次,且每周剂量为5mg、如10mg、如15mg、如20mg、如25mg、如30mg、如40mg、如50mg、如60mg、如75mg、如100mg、如125mg、如150mg、如175mg、如200mg、如225mg、如250mg、如275mg、如300mg、如325mg、如350mg、如375mg、如400mg、如450mg、如500mg或更多。

[0092] 将使用抗S100A4抗体的治疗与使用可用于治疗系统性硬化病的其他化合物的治疗组合可能是有益的。因此,在一些实施方案中,将所述抗体与用于治疗系统性硬化病的另一种化合物共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与血管紧张素转换酶抑制剂共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与血管紧张素受体阻断剂共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与硫唑嘌呤共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与钙通道阻断剂共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与环磷酰胺共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与羟氯喹共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与霉酚酸酯共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与甲氨蝶呤共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与糖皮质激素共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与磷酸二酯酶-5抑制剂共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与内皮素受体拮抗剂共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与 α 阻断剂共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与类前列腺素共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与利妥昔单抗共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与酪氨酸激酶抑制剂如尼达尼布共同施用。在一些实施方案中,将所述抗体与托珠单抗共同施用。

[0093] 编码或表达所述抗体的多核苷酸、载体和细胞

[0094] 在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的分离的多核苷酸,其编码如本文所述的抗体。

[0095] 在一些实施方案中,编码所述抗体的重链可变(VH)区的多核苷酸包含SEQ ID NO:

8或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%同一性。在一些实施方案中,编码所述抗体的轻链可变(VL)区的多核苷酸包含SEQ ID NO:10或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%同一性。在一些优选的实施方案中,编码所述抗体的多核苷酸编码由SEQ ID NO:8定义的VH区和由SEQ ID NO:10定义的VL区。

[0096] 在一些实施方案中,编码所述抗体的重链可变(VH)区的多核苷酸包含SEQ ID NO:22或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%同一性。在一些实施方案中,编码所述抗体的轻链可变(VL)区的多核苷酸包含SEQ ID NO:24或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少81%、如至少82%、如至少83%、如至少84%、如至少85%、如至少86%、如至少87%、如至少88%、如至少89%、如至少90%、如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%同一性。在一些优选的实施方案中,编码所述抗体的多核苷酸编码由SEQ ID NO:22定义的VH区和由SEQ ID NO:24定义的VL区。

[0097] 在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的包含如本文所述的分离的多核苷酸的载体。

[0098] 在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的分离的宿主细胞,其包含如本文所述的分离的多核苷酸或载体。

[0099] 包含所述抗体的组合物

[0100] 在一些实施方案中,如本文所述的抗体可以与药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂一起包含在用于治疗系统性硬化病的药物组合物中。因此,在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的药物组合物,其包含如本文所述的抗体以及药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂。

[0101] 在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的组合物,其包含如本文公开的抗体和如上文在“编码或表达所述抗体的多核苷酸、载体和细胞”部分中公开的多核苷酸、载体和/或细胞。

[0102] 在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗系统性硬化病的药物组合物,其包含如本文公开的抗体和如上文在“编码或表达所述抗体的多核苷酸、载体和细胞”部分中公开的多核苷酸、载体和/或细胞,以及进一步包含药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂。

[0103] 实施例

[0104] 实施例1-抗S100A4抗体在博来霉素诱导的真皮纤维化中的功效

[0105] 材料和方法

[0106] 博来霉素诱导的皮肤纤维化的小鼠模型

[0107] 该模型中的潜在分子机制与在具有T细胞和巨噬细胞浸润的SSc中观察到的相似,

其激活驻留的成纤维细胞并经由促纤维化细胞因子的释放诱导上皮向间充质转化。该模型可用于评价所述疾病的早期炎症阶段。简言之,在剃除上背部区域中的1cm²皮肤后,通过每隔一天皮下(s.c.)注射0.5mg/mL博来霉素(BLM)持续6周在6周龄C57BL/6J雄性小鼠中诱导皮肤纤维化。向BLM激发的三组小鼠腹膜内(i.p.)各注射100至200μL以下浓度的S100A4中和抗体(SNA):2.5或7.5mg/kg/d,在第22天开始,每第三天继续注射,持续3周。对于对照,每隔一天皮下注射100μL NaCl,持续6周。对于媒介物对照,向BLM激发的小鼠腹膜内注射100μL PBS,在第22天开始,每第三天继续注射,持续3周。还包括另一个对照以测定撤除BLM激发后的皮肤纤维化。为此,用以下两种方式对3周BLM激发的小鼠进行注射:(i)皮下100μL NaCl,在第22天开始,每隔一天持续3周以及(ii)腹膜内媒介物对照PBS。在第42天处死小鼠,收集皮肤、血液和肺用于分析。评估真皮厚度、胶原蛋白含量以及皮肤组织中成肌纤维细胞和CD3⁺细胞的数量。

[0108] 分析每组N=8只小鼠的以下组:

[0109] 第1组:皮下NaCl(w 1-6)

[0110] 第2组:皮下BLM(w 1-6)+腹膜内PBS(w 4-6)

[0111] 第3组:皮下BLM(w 1-3)+皮下NaCl(w 4-6)+腹膜内PBS(w 4-6)

[0112] 第4组:皮下BLM(w 1-6)+腹膜内SNA(w 4-6)2.5mg/kg

[0113] 第5组:皮下BLM(w 1-6)+腹膜内SNA(w 4-6)7.5mg/kg

[0114] 将BLM以0.5mg/mL的浓度溶解于0.9% NaCl中。将抗体在无菌PBS中稀释,并且分别地,对于第4组和第5组以100μL的体积腹膜内注射,并且第6组以200μL的体积腹膜内注射。运送至研究地点的抗S100A4抗体的浓度为2mg/mL,批次号为批号003P10T120116JKL且日期为2016年1月。

[0115] 定期观察动物的生命体征、活动、皮毛的质量和质地(在每次动物房访视时)。此外,在BLM施用开始前的同一天和同一时间,在校准量表上每周给小鼠称重,直到处死之前。在对小鼠进行尸检时,对所有内脏器官进行肉眼可见的病理学(例如肿瘤、出血等)的筛查。在实验开始之前,所有48只小鼠由动物房的人员随机分配到6个笼中,他们对该项目的目的不知情。

[0116] 真皮增厚的量化

[0117] 切离注射的皮肤区域,随后将其在4%福尔马林中固定6小时,然后在70%乙醇中固定,并包埋在石蜡中。将皮肤切片并用苏木精/伊红染色。用具有DP80数字显微镜照相机和CellSens标准软件(Olympus, Philadelphia, 美国宾夕法尼亚州)的BX53显微镜以100倍放大率分析注射部位的真皮厚度。如所述[16],通过测量表皮-真皮连接处与真皮-皮下脂肪连接处之间的最大距离来确定真皮厚度。在来自不同部位的4个不同切片中量化真皮厚度,且每个切片测量4次。以盲法进行分析。

[0118] 纤维化的量化-Masson三色染色

[0119] 将石蜡包埋的皮肤切片用蓝色Masson三色染色以更好地显现真皮中的染成蓝色的胶原蛋白束。用具有DP80数字显微镜照相机和CellSens标准软件(Olympus, Philadelphia, 美国宾夕法尼亚州)的BX53显微镜以100倍放大率观察染色的皮肤切片。

[0120] 通过羟脯氨酸测定评估胶原蛋白

[0121] 经由羟脯氨酸测定来测定皮肤样品中胶原蛋白的量。在120℃下在6M HCl中消化

来自上背部的全皮厚度穿孔活检物($\varnothing$ 4 mm,两个样品/动物)三小时后,用6M NaOH将样品的pH调节至6。然后,向每个样品中添加0.06M氯胺T,并在室温下孵育20min。接下来,添加3.15M高氯酸和20%对二甲氨基苯甲醛,并将样品在60℃下再孵育20min。用Spectra MAX 190微板分光光度计(Molecular Devices)测定两个全皮厚度穿孔活检物中每一个在557nm处的吸光度。

[0122] 成肌纤维细胞的检测

[0123] 成肌纤维细胞的特征在于 α -平滑肌肌动蛋白(α SMA)的表达。通过与单克隆小鼠抗 α SMA抗体(Merck, A5228)一起孵育,在来自上背部的石蜡包埋皮肤切片中检测到 α SMA阳性的成纤维细胞。通过稀释系列(row)实验确定用于抗体染色的抗体的合适浓度,并进行1:1000的稀释,浓度为2 μ g/mL。用辣根过氧化物酶标记的二抗(多克隆山羊抗小鼠IgG/HRP, Dako, P0447, 1:200, 浓度为5 μ g/mL)和3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB) (Sigma-Aldrich)将表达可视化。小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgM即用型(Dako, IS750)的阴性对照小鼠混合物用作对照。然后用Mayer苏木精溶液复染切片,并用具有DP80数字显微镜照相机和CellSens标准软件(Olympus, Philadelphia, 美国宾夕法尼亚州)的BX53显微镜以100和200倍放大率观察。由不知情的评审员计数每个样品的四个切片中的真皮全厚度中的成肌纤维细胞(即,纺锤形成纤维细胞,其具有苏木精染色的细胞核和细胞质中 α SMA的强阳性染色)的数量进行分析。

[0124] T细胞检测

[0125] CD3是充当T细胞共受体的多聚体蛋白质复合物。作为T细胞谱系的限定特征,CD3可用作T细胞的标记物。通过与多克隆兔抗CD3抗体(Abcam, Ab5690)一起孵育,在来自上背部的石蜡包埋皮肤切片中检测到CD3阳性的细胞。通过稀释系列实验确定用于抗体染色的抗体的合适浓度,并进行1:50的稀释,浓度为4 μ g/mL。用辣根过氧化物酶标记的二抗(多克隆山羊抗兔IgG/HRP, Dako, P0448, 1:200, 浓度为1.25 μ g/mL)和3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB) (Sigma-Aldrich)将表达可视化。来自非免疫兔的血清的阴性对照兔Ig级分固相吸附即用型(Dako, IS600)用于对照。然后用Mayer苏木精溶液复染切片,并用具有DP80数字显微镜照相机和CellSens标准软件(Olympus, Philadelphia, 美国宾夕法尼亚州)的BX53显微镜以100和200倍放大率观察。由不知情的评审员计数每个样品的四个切片中皮下组织的血管周围浸润物中CD3染色阳性的单核(具有苏木精染色的核)圆形细胞的数量进行分析。

[0126] 统计数据

[0127] 所有数据表示为平均值 $\pm$ SEM。通过Kolmogorov-Smirnov检验来测试数据的正态分布,此后,通过参数非配对t检验或非参数Mann-Whitney U检验来测试非相关样品的各组之间差异的统计学显著性。使用GraphPad Prism 5(5.02版;GraphPad Software, 美国加利福尼亚州拉荷亚)创建统计分析和图表。P值小于0.05被认为是显著的。P值表示如下:0.05>p>0.01为*;0.01>p>0.001为**; $p<0.001$ 为***。

[0128] 伦理声明

[0129] 根据第246/1992Co11.号法案(捷克共和国)第419/2012Co11.号法令(捷克共和国)实验室动物护理和使用指南进行动物研究,并由布拉格风湿病学研究所伦理委员会批准,参考批准项目编号5689/2015。

[0130] 结果

[0131] 两种浓度的抗S100A4抗体是良好耐受的,且在临床检查或肉眼尸检时没有明显的毒性迹象。

[0132] BLM在暴露的皮肤区域诱导显著的皮肤纤维化,伴随真皮增厚、成肌纤维细胞分化和增殖以及处理期间进展的增加的羟脯氨酸含量。在实验的最后三周(用PBS对照)中撤除BLM显示纤维化参数降低:当与用BLM激发6周的组相比时,真皮增厚、成肌纤维细胞分化和羟脯氨酸含量分别降低18%、33%和11%(如图2至图4中所示)。

[0133] 与用博来霉素激发6周的媒介物处理的小鼠组相比,仅7.5mg/kg浓度的抗S100A4抗体显著降低真皮增厚、成肌纤维细胞计数、羟脯氨酸含量和CD3阳性细胞数量(如图1至图5中所示)。

[0134] 用7.5mg/kg抗S100A4抗体处理使真皮厚度(如图1和图2所示)、成肌纤维细胞的数量(如图3所示)、羟脯氨酸含量(如图4所示)以及CD3阳性细胞的数量降低至低于BLM撤除(即小鼠前三周用BLM激发,然后注射NaCl)的水平(如图5所示),因此表明降低至纤维化的处理前水平。因此,在该组中观察到的这些效果表明7.5mg/kg抗S100A4抗体在小鼠中预防皮肤纤维化进展和治疗由博来霉素的重复皮下注射诱导的预先建立的皮肤纤维化中的治疗功效。

[0135] 在用最低浓度的抗S100A4抗体(即2.5mg/kg)处理的小鼠组中,仅在将真皮厚度和成肌纤维细胞计数降低至低于用BL激发6周并用媒介物处理的小鼠的水平方面表现出中等效果(如图2和图3中所示)。

[0136] 总之,结果表明S100A4的抑制改善BLM诱导的硬皮病模型中的皮肤纤维化。

[0137] 实施例2-S100A4在系统性硬化病的紧皮-1模型中的靶向

[0138] 材料和方法

[0139] 紧皮-1(Tsk-1)模型

[0140] Tsk-1小鼠携带原纤维蛋白-1基因的杂合突变。携带两个野生型等位基因的同窝仔用作对照。在5周龄时开始处理Tsk-1小鼠,并持续至第10周。在10周龄时处死小鼠并如下所述分析结果。分析以下组,每组n=10只小鼠(每组中5只雄性和5只雌性):

[0141] • 用媒介物(PBS)处理的未携带Tsk-1等位基因的非纤维化pa小鼠

[0142] • 用媒介物处理的Tsk-1小鼠

[0143] • 用抗S100A4抗体(7.5mg/kg、2mg/ml;每周一、周三和周五注射)处理的Tsk-1小鼠

[0144] • 用同种型mIgG1(2mg/ml;批号:722919A2;每周一、周三和周五注射)处理的Tsk-1小鼠

[0145] 皮下增厚的量化

[0146] 切离上背部皮肤的限定区域,随后将其在4%福尔马林中固定6小时并包埋在石蜡中。将皮肤切片并用苏木精/伊红染色。如所述[2,17-21],在来自不同部位的四个不同切片中量化皮下厚度(以任意单位测量为围绕皮下组织的肌肉层之间的距离),且每个切片进行两次测量。以盲法进行分析。

[0147] 成肌纤维细胞的检测

[0148] 成肌纤维细胞的特征在于 α -平滑肌肌动蛋白(α SMA)的表达。通过与单克隆抗 α SMA抗体(克隆1A4,Sigma-Aldrich,德国施泰因海姆)一起孵育,在来自上背部的石蜡包埋载玻

片中检测到 α SMA阳性的成纤维细胞。用辣根过氧化物酶标记的二抗和3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)(Sigma-Aldrich)将表达可视化。单克隆小鼠IgG抗体(Calbiochem,美国加利福尼亚州圣地亚哥)用于对照。由不知情的评审员(JD)评估每个样品四个切片中的成肌纤维细胞来进行分析。

[0149] 羟脯氨酸测定

[0150] 经由羟脯氨酸测定来测定皮肤样品中胶原蛋白的量。在120℃下在6M HCl中消化来自上背部的全皮厚度穿孔活检物($\varnothing$ 3 mm)三小时后,用6M NaOH将样品的pH调节至6。然后,向每个样品中添加0.06M氯胺T,并在室温下孵育20min。接下来,添加3.15M高氯酸和20%对二甲氨基苯甲醛,并将样品在60℃下再孵育20min。用Spectra MAX 190微板分光光度计测定在557nm处的吸光度。

[0151] CD3/T细胞染色

[0152] 将福尔马林固定、石蜡包埋的皮肤切片用大鼠抗CD3抗体(ab11089,Abcam,英国剑桥)染色。Alexa Fluor缀合的驴抗大鼠抗体(Life Technologies,德国达姆施塔特,A21208)。同种型兔对照抗体用作对照。用DAPI复染切片以将细胞核可视化。由经验丰富的评审员对阳性细胞进行计数。

[0153] 统计数据

[0154] 所有数据均表示为平均值 $\pm$ SEM,并且对于非相关样品,通过Mann-Whitney U非参数检验测试各组之间的差异的统计学显著性。P值小于0.05被认为是显著的。P值表示如下:0.05>p>0.01为*;0.01>p>0.001为**; $p<0.001$ 为***,与媒介物处理的10周龄Tsk1小鼠相比。

[0155] 结果

[0156] 用抗S100A4抗体处理是良好耐受的,且在临床检查、肉眼尸检或组织学上没有明显的毒性迹象。

[0157] Tsk-1小鼠出现显著的皮肤纤维化、皮下增厚、成肌纤维细胞分化和羟脯氨酸含量增加(如图6至图9所示)。

[0158] 与媒介物处理的10周龄Tsk1小鼠相比或与用IgG1处理的Tsk-1小鼠相比,用抗S100A4抗体处理显著降低了皮下增厚(如图6所示)、成肌纤维细胞计数(如图7所示)和羟脯氨酸含量(如图8所示)。在抗S100A4处理的小鼠中还观察到T细胞计数减少的趋势(如图9所示),然而,其未能达到统计学显著性。这可能是由于Tsk小鼠与对照小鼠之间T细胞计数的差异相当小。

[0159] 总之,结果表明用抗S100A4抗体处理改善了Tsk-1小鼠的皮肤纤维化。

[0160] 实施例3-人源化抗S100A4抗体在体内治疗博来霉素诱导的真皮纤维化中的功效

[0161] 系统性硬化病(SSc)是具有高发病率和死亡率的系统性纤维化罕见病。SSc是所有自身免疫性风湿病中病例特异性死亡率最高的病症,其中超过一半的诊断所述病症的病例最终死亡作为直接后果。所述疾病的标志是通过病理学激活的成纤维细胞实现的细胞外基质蛋白的积累。选择性抑制SSc中细胞外基质的异常释放的治疗方法迄今为止尚不可用。博来霉素诱导的真皮纤维化是最常用的SSc小鼠模型。它特别类似于SSc的早期炎症阶段。这里,我们的目的是评价人源化S100A4抗体在博来霉素诱导的皮肤纤维化中的作用。

[0162] 材料和方法

[0163] 抗体原液

[0164] AX-202作为人源化IgG4单克隆抗S100A4抗体用于本研究。所述抗体包含由SEQ ID NO:25定义的重链序列和由SEQ ID NO:26定义的轻链序列。将抗体溶解在PBS中并在-20℃下储存。

[0165] 研究动物

[0166] 对C57B1/6小鼠进行实验。

[0167] 动物数量:64

[0168] 早期死亡:无

[0169] 每只动物的总研究持续时间:6周

[0170] 处理方案

[0171] 将2mg/mL抗体原液在无菌PBS中稀释并以100μL体积腹膜内注射。

[0172] 通过每天皮下注射博来霉素 (2.5mg/kg, Sigma-Aldrich) 在上背部的限定和标记区域 (1cm²) 诱导皮肤纤维化,持续长达六周。在用博来霉素预激发三周后开始处理,每周两次腹膜内 (i.p.) 注射或每周一次在尾静脉中静脉内 (IV) 注射。在第一次注射博来霉素后三周 (第一次注射博来霉素后六周) 分析结果。

[0173] 研究设计和研究组

[0174] 对照组中N=8只小鼠,人源化抗体处理组中N=10只小鼠

[0175] 使用以下实验组:

[0176] 第1组:对照/NaCl

[0177] 第2组:博来霉素3周,NaCl 3周

[0178] 第3组:博来霉素6周+NaCl最后3周 (每第3天腹膜内)

[0179] 第4组:博来霉素6周+AX-202 16mg/kg最后3周 (每周两次腹膜内)

[0180] 第5组:博来霉素6周+AX-202 24mg/kg最后3周 (每周静脉内尾静脉注射)

[0181] 第6组:博来霉素6周+AX-202 8mg/kg最后3周 (每周两次腹膜内)

[0182] 研究实施

[0183] 每天临床监测小鼠的行为、活动、毛皮质地和粪便稠度。处死后,对肺和皮肤进行肉眼宏观评价。

[0184] 皮下增厚的量化

[0185] 在通过颈椎脱位处死后,从肩胛骨之间的上背部的限定区域获得1cm²的皮肤样品。切离损伤皮肤区域,将其在4%福尔马林中固定6小时并包埋在石蜡中。切割5μm切片并将其用苏木精和伊红染色。通过以100倍放大率测量每只小鼠的损伤皮肤的在三个部位的表皮-真皮连接处与真皮-皮下脂肪连接处之间的距离来确定真皮厚度。

[0186] 成肌纤维细胞的检测

[0187] 成肌纤维细胞的特征在于α-平滑肌肌动蛋白 (αSMA) 的表达。通过与单克隆抗αSMA抗体 (克隆1A4, Sigma-Aldrich, 德国施泰因海姆) 一起孵育,在来自上背部的石蜡包埋载玻片中检测到αSMA阳性的成纤维细胞。用辣根过氧化物酶标记的第二抗体和3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) (Sigma-Aldrich) 将表达可视化。单克隆小鼠IgG抗体 (Calbiochem, 美国加利福尼亚州圣地亚哥) 用于对照。由不知情的评审员评估每个样品四个切片中的成肌纤维细胞来进行分析。

[0188] 羟脯氨酸测定

[0189] 经由羟脯氨酸测定来测定皮肤样品中胶原蛋白的量。在120℃下在6M HCl中消化来自上背部的全皮厚度穿孔活检物($\varnothing = 3\text{ mm}$)三小时后,用6M NaOH将样品的pH调节至6。然后,向每个样品中添加0.06M氯胺T,并在室温下孵育20min。接下来,添加3.15M高氯酸和20%对二甲氨基苯甲醛,并将样品在60℃下再孵育20min。用Spectra MAX 190微板分光光度计测定在557nm处的吸光度。

[0190] 统计数据

[0191] 所有数据表示为平均值 $\pm$ SEM,并使用graph pad 8通过单因素方差分析检验来测试各组之间的差异的统计学显著性。P值小于0.05被认为是显著的。P值表示如下:0.05>p>0.01为*;0.01>p>0.001为**; $p<0.001$ 为***,与用NaCl注射6周的对照小鼠相比。0.05>p>0.01为#;0.01>p>0.001为##; $p<0.001$ 为###,与注射博来霉素3周后再注射NaCl 3周的小鼠相比。

[0192] 结果

[0193] 真皮纤维化小鼠模型

[0194] 在用博来霉素激发后,小鼠出现显著的真皮纤维化,其中与用博来霉素激发3周,然后再注射博来霉素溶剂NaCl 3周的小鼠相比,用博来霉素激发6周的小鼠的纤维化变化更显著。用NaCl注射6周的小鼠作为对照。

[0195] 一般耐受性

[0196] 用抗S100A4抗体AX-202处理是良好耐受的,且在临床检查、肉眼尸检或组织学上没有明显的毒性迹象。

[0197] 功效结果

[0198] 与用博来霉素注射6周的对照小鼠相比,用AX-202处理显著减少真皮增厚、成肌纤维细胞计数和羟脯氨酸含量(参见图10)。效应是剂量依赖性的,且在腹膜内16mg/kg和每周一次静脉内24mg/kg的剂量中观察到最显著的效应(参见图10A-图10C)。然而,每三天腹膜内8mg/kg也观察到AX-202的统计学显著效应。在腹膜内16mg/kg和静脉内24mg/kg的剂量下,与仅注射博来霉素3周的小鼠相比,AX-202还诱导纤维化消退以及真皮厚度和成肌纤维细胞计数的统计学上显著的变化。

[0199] 结论

[0200] AX-202处理在耐受良好的剂量下显著改善了博来霉素诱导的皮肤纤维化、真皮增厚、成肌纤维细胞计数和羟脯氨酸。

[0201] 实施例4-对体外S100A4诱导的细胞因子释放的影响

[0202] 材料和方法

[0203] 通过FicollPaque PLUS (GE Healthcare;11778538) 密度离心从健康供体分离外周血单个核细胞(PBMC),并且使用单核细胞分离试剂盒(StemCell Technologies;19359)分离单核细胞。

[0204] 将单核细胞铺板(100,000个细胞/孔)到96孔板中并在以下物质的存在下培养6小时:

[0205] • 培养基,

[0206] • 媒介物1 (0.074% TBS),

- [0207] • LPS (1.0ng/ml; Invivogen; tlr1-b5lps),
- [0208] • S100A4 (2.0μg/ml),
- [0209] • S100A4 (2.0μg/ml) + 媒介物2 (3.2% PBS),
- [0210] • 媒介物1 + 小鼠 IgG1 (Biolegend; 401407),
- [0211] • 媒介物1 + 人 IgG4 (Biolegend; 403701),
- [0212] • 媒介物1 + AX-202 或 6B12 (各为 32μg/ml),
- [0213] • S100A4 (2.0μg/ml) + 小鼠 IgG1 (8.0、16 或 32μg/ml),
- [0214] • S100A4 (2.0μg/ml) + 人 IgG4 (8.0、16 或 32μg/ml),
- [0215] • S100A4 (2.0μg/ml) + AX-202 (8.0、16 或 32μg/ml), 或
- [0216] • S100A4 (2.0μg/ml) + 6B12 (8.0、16 或 32μg/ml)。

[0217] 6B12: 小鼠单克隆 IgG1 抗 S100A4 抗体 (VH 区和 VL 区分别如 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:9 定义)

[0218] AX-202: 如实施例 3 所述的人源化单克隆 IgG4 抗 S100A4 抗体

[0219] 培养 6 小时后, 收集细胞培养上清液并在 -20℃ 下储存以用于随后的细胞因子分析。根据制造商的说明书 (R&D systems; LXSAM-03) 通过 Luminex 测定来量化上清液中细胞因子 (IL-6、TNF-α 和 IL-10) 的水平。

[0220] 结果

[0221] 与媒介物对照相比, 用 LPS (1.0ng/ml; 阳性对照) 或 S100A4 (2.0μg/ml) 刺激单核细胞导致细胞培养上清液中测量的 IL-6、TNFα 和 IL-10 水平增加 (参见图 11 和图 12)。与同种型对照相比, 在所有测试浓度下, AX-202 或 6B12 降低了 S100A4 引起的 IL-6 和 IL-10 的增加 (参见图 11C-图 11D 和 12C-图 12D)。与媒介物对照相比, 小鼠 IgG1 或人 IgG4 同种型对照未增加 S100A4 诱导的 TNFα 水平 (参见图 13A-图 13B), 然而 6B12 而不是 AX-202 显著增加 S100A4 诱导的 TNFα 水平, 并且由 6B12 诱导的增加显示剂量依赖性趋势 (参见图 13C-图 13D)。

[0222] 结论

[0223] 如所预期的, S100A4 引起 IL-6、TNFα 和 IL-10 水平增加 (参见图 2-图 4)。AX-202 和 6B12 均降低了 S100A4 引起的 IL-6 和 IL-10 释放 (参见图 11C-图 11D 和 12C-图 12D)。

[0224] 重要的是, 与单独 S100A4 相比, 小鼠 IgG1 对照、人 IgG4 对照或 AX-202 与 S100A4 的组合没有导致 TNFα 水平的显著增加 (参见图 13A-图 13B)。相比之下, 通过用 6B12 抗体处理以剂量依赖性方式增加 S100A4 诱导的促炎性细胞因子 TNFα 的水平而增加 (参见图 13C-图 13D)。

[0225] 这表明, 令人惊讶地, 与小鼠抗 S100A4 抗体 6B12 相比, 人源化抗 S100A4 抗体不增加 S100A4 诱导的促炎性 TNFα 水平。

[0226] 尽管出于清楚理解的目的, 已经通过说明和实施例的方式详细地描述了前述发明, 但是描述和实施例不应被解释为限制本发明的范围。

[0227] 上述书面说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本公开文本。然而应理解的是, 不管文本中显现以上所述如何详细, 仍可以以许多方式来实现本公开文本, 并且应该根据所附权利要求及其任何等同物来解释本公开文本。

[0228] 参考文献

[0229] 1. Elhai, M. et al. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort

studies. (2012). *Rheumatology* 51,1017-1026.

[0230] 2.Varga J,Abraham D.Systemic sclerosis:a prototypic multisystem fibrotic disorder. (2007). *J Clin Invest*.117 (3) :557-67.

[0231] 3.Brown M,O'Reilly S.Innate immunity and Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of scleroderma:advances and opportunities for therapy (2018.) *Curr Opin Rheumatol*.30 (6) :600-605.

[0232] 4.Eisenbacher JL,Schrezenmeier H,Jahrsdörfer B,Kaltenmeier C,Rojewski MT,Yildiz T,Beyer T,Erle A,Wiegmann DS,Grassl S,Hang R,Körper S,Wiesneth M, Lotze MT,Lotfi R.S100A4 and uric acid promote mesenchymal stromal cell induction of IL-10⁺/IDO⁺lymphocytes. (2014). *J Immunol*.192 (12) :6102-10.

[0233] 5.Cerezo LA,Remáková M,Tomčík M,Gay S,Neidhart M,Lukanidin E,Pavelka K, Grigorian M,Vencovsky J,Šenolt L.The metastasis-associated protein S100A4 promotes the inflammatory response of mononuclear cells via the TLR4 signalling pathway in rheumatoid arthritis. (2014). *Rheumatology (Oxford)* 53: 1520-6.

[0234] 6.Hansen MT,Forst B,Cremers N,Quagliata L,Ambartsumian N,Grum-Schwensen B, Klingelhöfer J,Abdul-Al A,Herrmann P,Osterland M,Stein U,Nielsen GH,Scherer PE,Lukanidin E,Sleeman JP,Grigorian M.A link between inflammation and metastasis:serum amyloid A1 and A3 induce metastasis,and are targets of metastasis-inducing S100A4. (2015). *Oncogene*.34 (4) :424-35.

[0235] 7.Neidhart M,Pajak A,Laskari K,Riksen NP.,Joosten LAB.,Netea G., Lutgens E,Stroes ESG.,Ciurea A,Distler O,Grigorian M,Karouzakis E.Oligomeric S100A4 Is Associated With Monocyte Innate Immune Memory and Bypass of Tolerance to Subsequent Stimulation With Lipopolysaccharides (2019). *Frontiers in Immunology* 10:791pp.

[0236] 8.Ambartsumian N, Klingelhöfer J,Grigorian M.The Multifaceted S100A4 Protein in Cancer and Inflammation. (2019). *Methods Mol Biol*.1929:339-365.

[0237] 9. Klingelhöfer J,Grum-Schwensen B,Beck MK,Knudsen RS,Grigorian M, Lukanidin E,Ambartsumian N.Anti-S100A4 antibody suppresses metastasis formation by blocking stroma cell invasion. (2012). *Neoplasia* 12:1260-8.

[0238] 10.Grum-Schwensen B, Klingelhöfer J,Beck M,Bonefeld CM,Hamerlik P, Guldborg P,Grigorian M,Lukanidin E,Ambartsumian N.S100A4-neutralizing antibody suppresses spontaneous tumor progression,pre-metastatic niche formation and alters T-cell polarization balance. (2015). *BMC Cancer* 15:44pp.

[0239] 11.Bruhn S,Fang Y,Barrenäs F,Gustafsson M,Zhang H,Konstantinell A, Krönke A,Sönnichsen B,Bresnick A,Dulyaninova N,Wang H,Zhao Y, Klingelhöfer J, Ambartsumian N,Beck MK,Nestor C,Bona E,Xiang Z,Benson M.A generally applicable translational strategy identifies S100A4 as a candidate gene in

allergy. (2014). *Sci Transl Med*.218:218pp.

[0240] 12.Wynn,T.A.Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2paradigm. (2004.) *Nat.Rev.Immunol*.4:583-594.

[0241] 13.Tan,F.K.,et al.Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. (2006).*Rheumatology (Oxford)* 45:694-702.

[0242] 14.Mavalala,C.,et al.Type 2helper T-cell pre-dominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. (1997) *Am.J.Pathol*.151:1751-1758.

[0243] 15.Zhang W,Ohno S,Steer B,Klee S,Staab-Weijnitz CA,Wagner D,Lehmann M,Stoeger T,KönigshoffM,Adler H.S100a4 Is Secreted by Alternatively Activated Alveolar Macrophages and Promotes Activation of Lung Fibroblasts in Pulmonary Fibrosis. (2018). *Front Immunol*.9:1216.

[0244] 16.Distler JH,Jungel A,Huber LC,Schulze-Horsel U,Zwerina J,Gay RE,et al.Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. (2007) *Arthritis Rheum*.56(1):311-322.

[0245] 17.Gabrielli A,Avvedimento EV,Krieg T.Scleroderma.The New England journal of medicine.2009May 7;360(19):1989-2003.

[0246] 18.Akhmetshina A,Palumbo K,Dees C,Bergmann C,Venalis P,Zerr P,et al.Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis.Nature communications.2012Mar 13;3:735.

[0247] 19.Avouac J,Furnrohr BG,Tomcik M,Palumbo K,Zerr P,Horn A,et al.Inactivation of the transcription factor STAT-4prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis.*Arthritis and rheumatism*.2011Mar;63(3):800-809.

[0248] 20.Avouac J,Palumbo K,Tomcik M,Zerr P,Dees C,Horn A,et al.Inhibition of activator protein 1signaling abrogates transforming growth factor beta-mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis.*Arthritis and rheumatism*.2012May;64(5):1642-1652.

[0249] 21.Weingartner S,Zerr P,Tomcik M,Palumbo-Zerr K,Distler A,Dees C,et al.Pomalidomide is effective for prevention and treatment of experimental skin fibrosis.*Annals of the rheumatic diseases*.2012Nov;71(11):1895-1899.

[0250] 22.Tomcik M,Palumbo-Zerr K,Zerr P,Avouac J,Dees C,Sumova B,Distler A,Beyer C,Cerezo LA,Becvar R,Distler O,Grigorian M,Schett G,Senolt L,Distler JH.S100A4amplifies TGF-β-induced fibroblast activation in systemic sclerosis. (2014). *Ann Rheum Dis*.74:1748-55.

[0251] 23.Allanore Y,Simms R,Distler O,Trojanowska M,Pope J,Denton CP,Varga J.Systemic Sclerosis. (2015). *Nat Rev Dis Primers*.23;1:15002.

[0252] 序列

[0253]

SEQ ID NO:	描述	生物体和任选登录号	序列
1	CDR-H1 6B12单克隆抗体(氨基酸序列)	人工序列	NDYYWN
2	CDR-H2 6B12单克隆抗体(氨基酸序列)	人工序列	HIGYGGNINYNPSLKN
3	CDR-H3 6B12单克隆抗体(氨基酸序列)	人工序列	ESFYDGYPFDY
4	CDR-L1 6B12单克隆抗体(氨基酸序列)	人工序列	RASQDIRNYLN
5	CDR-L2 6B12单克隆抗体(氨基酸序列)	人工序列	YTSRLHS
6	CDR-L3 6B12单克隆抗体(氨基酸序列)	人工序列	QQGNSLPRT
7	VH区6B12单克隆抗体(氨基酸序列) 前导序列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (CDR加下划线, 前导序列为斜体, 根据Kabat编号方案进行编号)	人工序列	<i>MKVLSLLYLLTAIPGILSDVQL</i> QESGPGLVKPSQSLTCSV TGDSFTNDYYWNWIRQFPG SKLEWMGHIGYGGNINYNP SLKNRISITRDTSKNQFFLRL TSVTTEDTATYYCTRESFYD GYPFDYWGQGLTVTSA
8	VH区6B12单克隆抗体(DNA) 前导序列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (CDR加下划线, 前导序列为斜体, 根据Kabat编号方案进行编号)	人工序列	<i>ATGAAAGTGTGAGTCTGTTG</i> <i>TACCTGTTGACAGCCATTCTT</i> <i>GGTATCCTGTCTGATGTACA</i> GCTTCAGGAGTCAGGACCT GGCCTCGTGAAACCTTCTC AGTCTCTGTCTCTCACCTGC TCTGTCACTGGCGACTCCT TCACCAATGATTATTACTG GAACTGGATCCGCGAGTTT CCAGGAAGCAAACCTGGAA TGGATGGGCCACATAGGCT ACGGCGGTAACATTAATA CAACCCATCTCTCAAAAAT CGAATCTCCATCACTCGTG

[0254]

			ACACATCTAAGAACCAATT TTTCCTGAGGTTGACTTCTG TGACTACTGAGGACACAGC TACATATTACTGTACAAGA <u>GAGAGTTTCTATGATGGTT</u> <u>ACCCCTTTGATTACTGGGG</u> CCAAGGGACTCTGGTCACT GTCTCTGCA
9	VL区6B12单克隆抗体（氨基酸序列） 前导序列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 （CDR加下划线，前导序列为斜体， 根据Kabat编号方案进行编号）	人工序列	<i>MMSSAQFLGLLLLCFQGTRC</i> DIQMTQTSSLSASLGDRVTI SCRASQDIRNYLNWYQQR GGTLKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNSLPRTFGGG TKLEIK
10	VL区6B12单克隆抗体（DNA） 前导序列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 （CDR加下划线，前导序列为斜体， 根据Kabat编号方案进行编号）	人工序列	<i>ATGATGTCCTCTGCTCAGTTC</i> <i>CTTGGTCTCCTGTTGCTCTGT</i> <i>TTTCAAGGTACCAGATGTGA</i> TATCCAGATGACACAGACT ACATCCTCCCTGTCTGCCTC TCTGGGAGACAGAGTCACC ATCAGTTGCAGGGCAAGTC <u>AGGACATTAGGAATTATTT</u> <u>AAACTGGTATCAGCAGAGA</u> CCAGGTGGAACCTTAAAC TCCTGATCTACTACACATC <u>AAGATTACACTCAGGAGTC</u> CCATCAAGGTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGAACAGATTA TTCTCTCACCATTAGTAAC CTGGAACAAGAAGATATTG CCACTTACTTTTGCCAACA <u>GGGTAATTCGCTTCCTCGG</u> <u>ACGTTCGGTGGAGGCACCA</u> AGCTGGAAATCAAA
11	人S100A4 （蛋白质） 氨基酸1至101	智人（Homo sapiens） （登录号： NP_062427.1）	MACPLEKALDVMVSTFHKY SGKEGDKFKLNKSELKELLT RELPSFLGKRTDEAAAFQKLM SNLDSNRDNEVDFQEYCVFL SCIAMMCNEFFEGFPDKQPR KK
12	6B12单克隆抗体结合的表位（蛋白质）	智人	RDNEVDFQEYCVFLSCIAM MCNEF
13	5C3单克隆抗体结合的表位（蛋白质）	智人	ELPSFLGKRT
14	5C3单克隆抗体结合的表位（蛋白质）	智人	EGFPDKQPRKK
15	CDR-H1 5C3单克隆抗体（氨基酸序列）	人工序列	ETVMH
16	CDR-H2 5C3单克隆抗体（氨基酸序列）	人工序列	RIDPANGNTKDDPKFQG
17	CDR-H3 5C3单克隆抗体（氨基酸序列）	人工序列	SYAMDY
18	CDR-L1 5C3单克隆抗体（氨基酸序列）	人工序列	RSSQSIVHSNGNTYLE
19	CDR-L2 5C3单克隆抗体（氨基酸序列）	人工序列	KVSNRLS
20	CDR-L3 5C3单克隆抗体（氨基酸序列）	人工序列	FQGSHVPFT
21	VH区5C3单克隆抗体（氨基酸序列） FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 （CDR加下划线，根据Kabat编号方案进 行编号）	人工序列	EAQLQQSGAELVKPGASVK LSCTASGFNIQETVMHWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNT <u>KDDPKFQKGASITVDTSSNT</u> AYLQLSSLTSEDTAIVYVCAS <u>SYAMDYWGQGTSTVTVSS</u>

[0255]

22	VH区5C3单克隆抗体 (DNA)	人工序列	GAGGCTCAGCTGCAGCAGT CTGGGGCAGAGCTTGTGAA GCCAGGGGCTCTGTCAAG TTGTCCTGCACAGCCTCTG GCTTCAACATTCAAGAGAC CTATATGCACTGGGTGAAG CAGAGGCCTGAACAGGGC CTGGAGTGGATTGGAAGGA TTGATCCTGCGAATGGTAA TACCAAAGATGACCCGAAG TTCCAGGGCAAGGCCTCTA TAACAGTAGACACATCCTC CAACACAGCCTACCTGCAG CTCAGCAGCCTGACATCTG AGGACACTGCCGTCTATTA CTGTGCTTCAAGTTATGCT ATGGACTACTGGGGTCAAG GAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA
23	VL区5C3单克隆抗体 (氨基酸序列) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (CDR加下划线, 根据Kabat编号方案进行编号)	人工序列	DVLMTQTPLSLPVSLGDQAS ISCRSSQIVHSNGNTYLEW YLQKGTGQSPELLIYKVSNRL SGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGYYCFQGSHPV FTFGSGTKLEIK
24	VL区5C3单克隆抗体 (DNA)	人工序列	GATGTTTGTATGACCCAAA CTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGGAGATCAAGCCT CCATCTCTTGCAGATCTAG TCAGAGTATTGTACATAGT AATGGAAACACCTATTTAG AATGGTACCTGCAGAAAAC AGGCCAGTCTCCAGAGCTC CTGATCTACAAAGTTTCCA ACCGACTCTCTGGGGTCCC AGACAGGTTCAAGTGGCAGT GGATCAGGGACAGATTTCA CACTCAAGATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATCTGGG AGTTTATTACTGCTTTCAA GGTTCACATGTTCCATTCA CGTTCGGCTCGGGACAAA GTTGAAATAAAA
25	AX-202完整重链	人工序列	QVQLQESGPGLVKPSQTLST TCTVSGDSFTNDYYWNWIR QHPGKGLEWIGHIGYGGNIN YNPSLKNRLSMSRDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCTRE SFYDGYPFDYWGQGLVT SSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRV SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE

[0256]

			YKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLG
26	AX-202完整轻链	人工序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCRASQDIRNYLNWYQQKP GKALKLLYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQGNSLPRTFGG GTKVEIKRTVAAPS VFIFPPS DEQLKSGTASVCLLN NFYP REAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
27	IgG4 CH	智人	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGKT YTCNV D HKPSNTKVDK RVE SKYGPPCPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLG
28	κ轻链恒定区 (CL)	智人	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYLSSTLTLSKADY ECHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

[0257] 项

[0258] 1. 一种用于治疗系统性硬化病的抗人S100A4抗体。

[0259] 2. 根据项1所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体特异性地结合SEQ ID NO: 11的人S100A4多肽,优选结合包含在SEQ ID NO: 11的氨基酸66与89之间的表位。

[0260] 3. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体包含:

[0261] a) 重链可变(VH)区,所述重链可变区包含:

[0262] i. 含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列或由其组成的CDR-H1;

[0263] ii. 含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列或由其组成的CDR-H2;和

[0264] iii. 含有SEQ ID NO: 3的氨基酸序列或由其组成的CDR-H3;

[0265] 以及

[0266] b) 轻链可变(VL)区,所述轻链可变区包含:

[0267] i. 含有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列或由其组成的CDR-L1;

[0268] ii. 含有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列或由其组成的CDR-L2;和

- [0269] iii. 含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列或由其组成的CDR-L3;
- [0270] 或SEQ ID NO:1至6中任一个的CDR变体,其中任一个氨基酸已经被改变为另一个氨基酸,条件是不超过3个氨基酸已经被如此改变,例如其中每个CDR中2或1个氨基酸已经被如此改变。
- [0271] 4. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述重链可变(VH)区包含SEQ ID NO:7或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少85%、如至少90%、如至少95%同一性;并且所述轻链可变(VL)区包含SEQ ID NO:9或其变体,所述变体与其具有至少80%同一性,如至少85%、如至少90%、如至少95%同一性,优选地其中所述抗体具有由SEQ ID NO:7定义的VH区和由SEQ ID NO:9定义的VL区。
- [0272] 5. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体包含:
- [0273] a) 重链可变(VH)区,所述重链可变区包含:
- [0274] i. 含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由其组成的CDR-H1;
- [0275] ii. 含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由其组成的CDR-H2;和
- [0276] iii. 含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由其组成的CDR-H3;
- [0277] 以及
- [0278] b) 轻链可变(VL)区,所述轻链可变区包含:
- [0279] i. 含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列或由其组成的CDR-L1;
- [0280] ii. 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或由其组成的CDR-L2;和
- [0281] iii. 含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR-L3;
- [0282] 或SEQ ID NO:15至20中任一个的CDR变体,其中任一个氨基酸已经被改变为另一个氨基酸,条件是不超过3个氨基酸已经被如此改变,例如其中每个CDR中2或1个氨基酸已经被如此改变。
- [0283] 6. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。
- [0284] 7. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体选自完整抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab样片段、scFv、单结构域抗体、双抗体和三抗体。
- [0285] 8. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体分子是人源化抗体、嵌合抗体或人工程化抗体。
- [0286] 9. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够中和S100A4的生物活性。
- [0287] 10. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够结合S100A4蛋白的二聚体、寡聚体和/或多聚体形式。
- [0288] 11. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中所述抗体能够抑制由S100A4介导的T细胞和/或巨噬细胞募集和/或浸润。
- [0289] 12. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中用所述抗S100A4抗体治疗减少纤维化。
- [0290] 13. 根据项12所述的用于所述用途的抗体,其中用所述抗S100A4抗体治疗减少真皮厚度、真皮胶原蛋白或羟脯氨酸含量、真皮成肌细胞计数和/或T细胞计数。
- [0291] 14. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体,其中将所述抗体经由肠胃

外施用如皮下、肌内或静脉内施用。

[0292] 15. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的抗体, 其中将所述抗体与选自以下的化合物共同施用: 血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、硫唑嘌呤、钙通道阻断剂、环磷酰胺、羟氯喹、霉酚酸酯、甲氨蝶呤、糖皮质激素、磷酸二酯酶-5抑制剂、内皮素受体拮抗剂、 α 阻断剂、类前列腺素、利妥昔单抗、酪氨酸激酶抑制剂如尼达尼布、和托珠单抗。

序列表

<110> 艾瑞克斯疗法有限公司

<120> 用于治疗系统性硬化病的抗S100A4抗体

<130> P5648PC00

<160> 28

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (6)

<223> CDR-H1 6B12

<400> 1

Asn Asp Tyr Tyr Trp Asn

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (16)

<223> CDR-H2 6B12

<400> 2

His Ile Gly Tyr Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (11)

<223> CDR-H3 6B12

<400> 3

Glu Ser Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (11)

<223> CDR-L1 6B12

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (7)

<223> CDR-L2 6B12

<400> 5

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (9)

<223> CDR-L3 6B12

<400> 6

Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Arg Thr

1 5

<210> 7

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (138)

<223> VH区6B12

<400> 7

Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile

1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro

20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Phe Thr

35 40 45

Asn Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Ser Lys Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly His Ile Gly Tyr Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Pro

65 70 75 80

Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln

85 90 95

Phe Phe Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr

100 105 110

Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

130 135

<210> 8

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (414)

<223> VH区6B12

<400> 8

```
atgaaagtgt tgagtctgtt gtacctgttg acagccattc ctggtatcct gtctgatgta 60
cagcttcagg agtcaggacc tggcctcgtg aaaccttctc agtctctgtc tctcacctgc 120
tctgtcactg gcgactcett caccaatgat tattactgga actggatccg gcagtttcca 180
ggaagcaaac tggaatggat gggccacata ggctacggcg gtaacattaa ctacaacca 240
tctctcaaaa atcgaatctc catcactcgt gacacatcta agaaccaatt tttcctgagg 300
ttgacttctg tgactactga ggacacagct acatattact gtacaagaga gagtttctat 360
gatggttacc cctttgatta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 414
```

<210> 9

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (127)

<223> VL区6B12

<400> 9

```
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
1          5          10          15
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
          20          25          30
Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
          35          40          45
Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gly Thr Leu
          50          55          60
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65          70          75          80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
          85          90          95
Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
```

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

100

<210> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

Arg Asp Asn Glu Val Asp Phe Gln Glu Tyr Cys Val Phe Leu Ser Cys

1

5

10

15

Ile Ala Met Met Cys Asn Glu Phe

20

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

Glu Leu Pro Ser Phe Leu Gly Lys Arg Thr

1

5

10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14

Glu Gly Phe Pro Asp Lys Gln Pro Arg Lys Lys

1

5

10

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (5)

<223> CDR-H1 5C3

<400> 15

Glu Thr Tyr Met His

1

5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (17)

<223> CDR-H2 5C3

<400> 16

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Asp Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (6)

<223> CDR-H3 5C3

<400> 17

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (16)

<223> CDR-L1 5C3

<400> 18

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (7)

<223> CDR-L2 5C3

<400> 19

Lys Val Ser Asn Arg Leu Ser

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (9)

<223> CDR-L3 5C3

<400> 20

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 21

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (115)

<223> VH区5C3

<400> 21

Glu Ala Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Gln Glu Thr

115	120	125
Gly Gly Gly Cys Cys Thr	Gly Gly Ala Gly Thr	Gly Gly Ala Thr Thr
130	135	140
Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr	Gly Ala Thr Cys Cys Thr Gly	
145	150	155
Cys Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Ala Ala Thr	Ala Cys Cys Ala Ala	
165	170	175
Ala Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly Ala Ala Gly	Thr Thr Cys	
180	185	190
Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr	Cys Thr Ala	
195	200	205
Thr Ala Ala Cys Ala Gly Thr Ala Gly Ala Cys Ala Cys	Ala Thr Cys	
210	215	220
Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr	Ala Cys	
225	230	235
Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly	Cys Cys	
245	250	255
Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys	Ala Cys	
260	265	270
Thr Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr	Gly Thr	
275	280	285
Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Thr Thr Ala Thr Gly Cys Thr	Ala	
290	295	300
Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Ala		
305	310	315
Ala Gly Gly Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys	Cys	
325	330	335
Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala		
340	345	

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (112)

<223> VL区5C3

<400> 23

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

<210> 24

<211> 336

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体区

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (336)

<223> VL区5C3

<400> 24

Gly	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	Cys	Cys	Cys
1				5					10					15	
Ala	Ala	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Cys	Thr	Cys	Thr	Cys	Cys	Cys	Thr
			20					25					30		
Gly	Cys	Cys	Thr	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Thr	Cys	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala
		35					40					45			
Gly	Ala	Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Thr	Cys	Thr
	50					55					60				
Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Ala	Gly	Thr	Cys	Ala
65				70					75					80	
Gly	Ala	Gly	Thr	Ala	Thr	Thr	Gly	Thr	Ala	Cys	Ala	Thr	Ala	Gly	Thr
			85					90					95		
Ala	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Cys	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr

100	105	110
Thr Ala Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala		
115	120	125
Gly Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr		
130	135	140
Cys Cys Ala Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr		
145	150	155
Ala Cys Ala Ala Ala Gly Thr Thr Thr Cys Cys Ala Ala Cys Cys Gly		
165	170	175
Ala Cys Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Ala		
180	185	190
Gly Ala Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Gly Cys Ala		
195	200	205
Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala		
210	215	220
Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly Ala Thr Cys		
225	230	235
Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly		
245	250	255
Ala Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Gly Thr Thr Thr Ala		
260	265	270
Thr Thr Ala Cys Thr Gly Cys Thr Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr		
275	280	285
Thr Cys Ala Cys Ala Thr Gly Thr Thr Cys Cys Ala Thr Thr Cys Ala		
290	295	300
Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Cys Thr Cys Gly Gly Gly Ala Cys		
305	310	315
Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala		
325	330	335

<210> 25

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (446)

<223> AX-202完整重链

<400> 25

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	Asn	Asp
			20					25					30		
Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Ile	Gly	His	Ile	Gly	Tyr	Gly	Gly	Asn	Ile	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50					55				60					
Lys	Asn	Arg	Leu	Ser	Met	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65					70				75					80	
Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Thr	Arg	Glu	Ser	Phe	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
		100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
	115					120					125				
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
	130				135				140						
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145					150				155					160	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
		165						170				175			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
		180					185				190				
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
	195					200					205				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
	210				215				220						
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225				230					235					240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
		245						250				255			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
	260						265				270				
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
	275					280					285				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
	290					295					300				

Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330						335
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			340					345						350	
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
			355				360							365	
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
			370				375					380			
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
385					390					395					400
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405					410						415
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			420					425						430	
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly		
			435				440						445		

<210> 26

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (214)

<223> AX-202完整轻链

<400> 26

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Leu
			35				40					45			
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50			55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70						75				80	

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Arg		
	85	90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
	100	105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115	120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
	130	135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 27		
<211> 326		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 27		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
1	5	10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	20	25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	35	40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr		
65	70	75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85	90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
	100	105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
	115	120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
145	150	155
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
	165	170
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
	180	185
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
	195	200
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
	210	215
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
225	230	235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
	245	250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
	260	265
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
	275	280
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
	290	295
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
305	310	315
Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
	325	

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 28

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
1	5	10
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
	20	25
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
	35	40
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
50	55	60

Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
65					70					75					80
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
				85						90				95	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
				100						105					

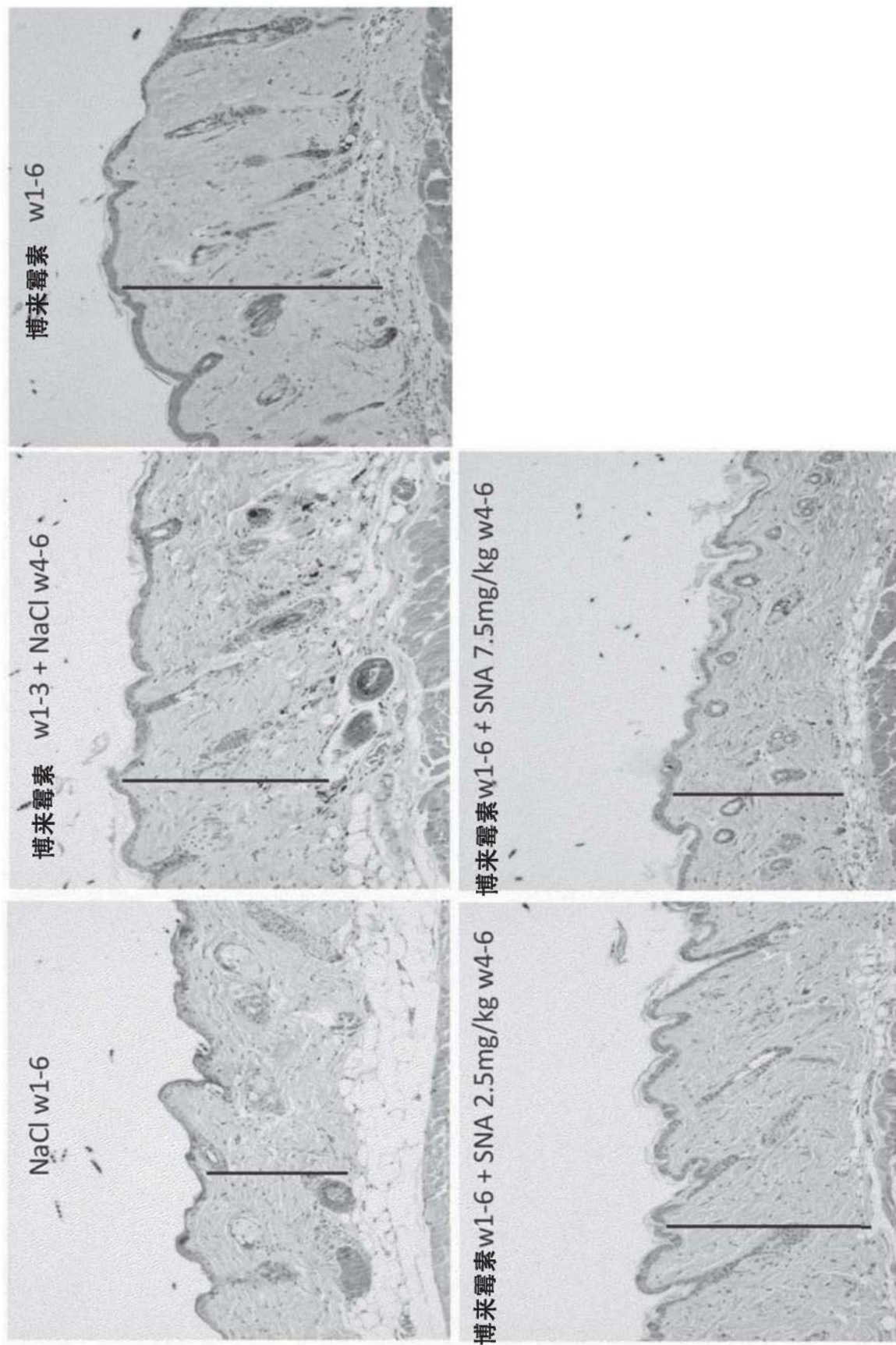


图1

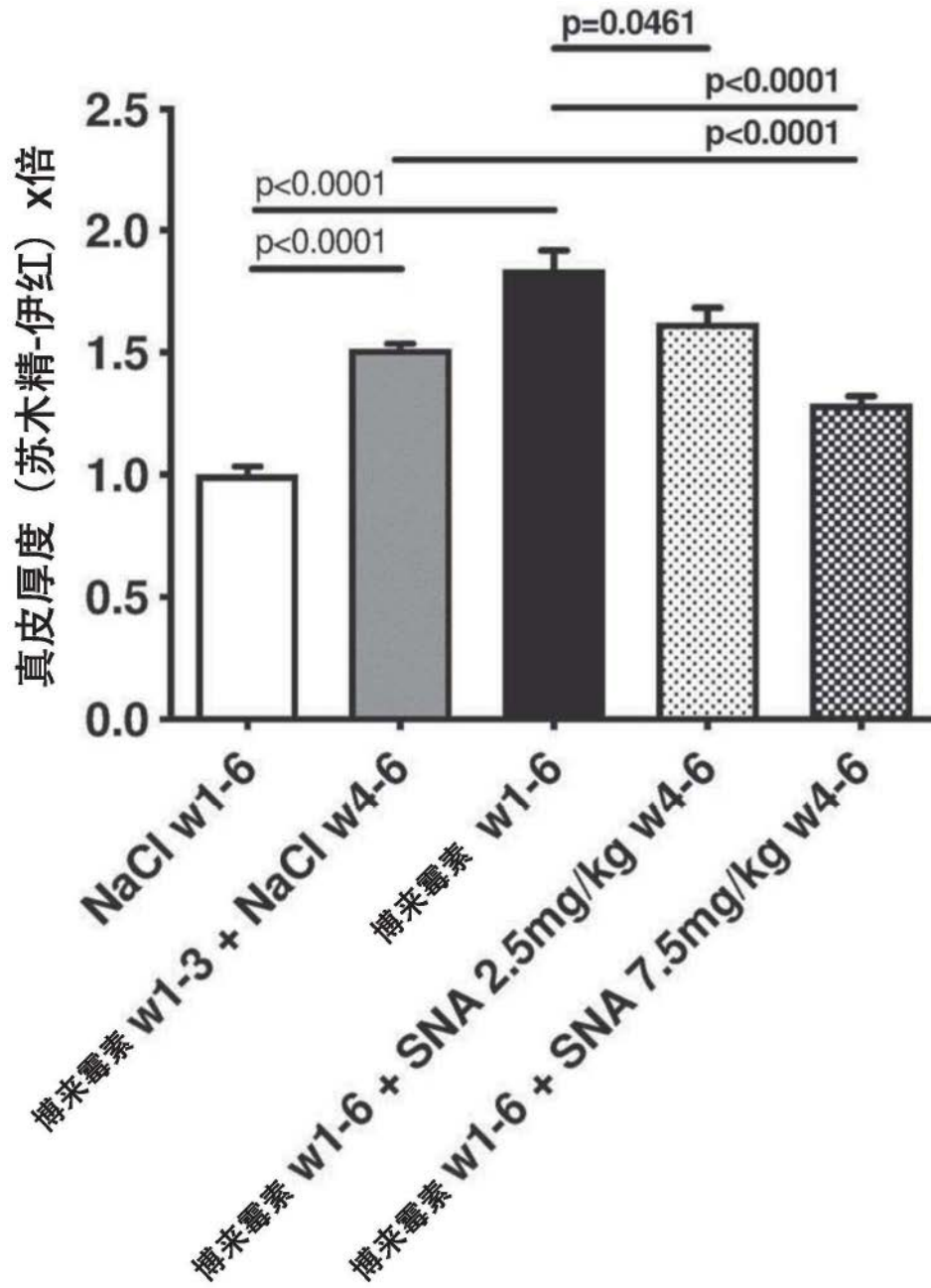


图2

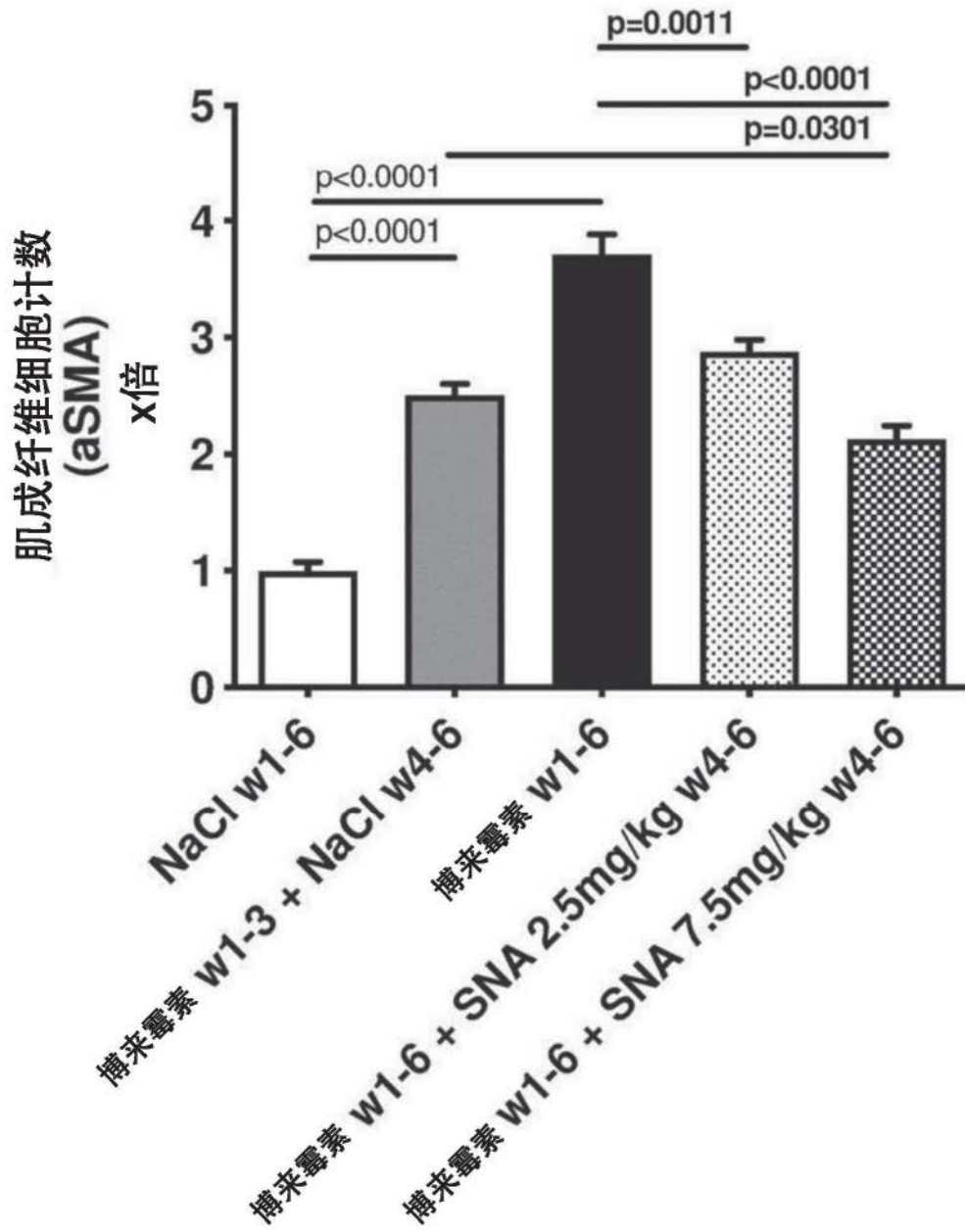


图3

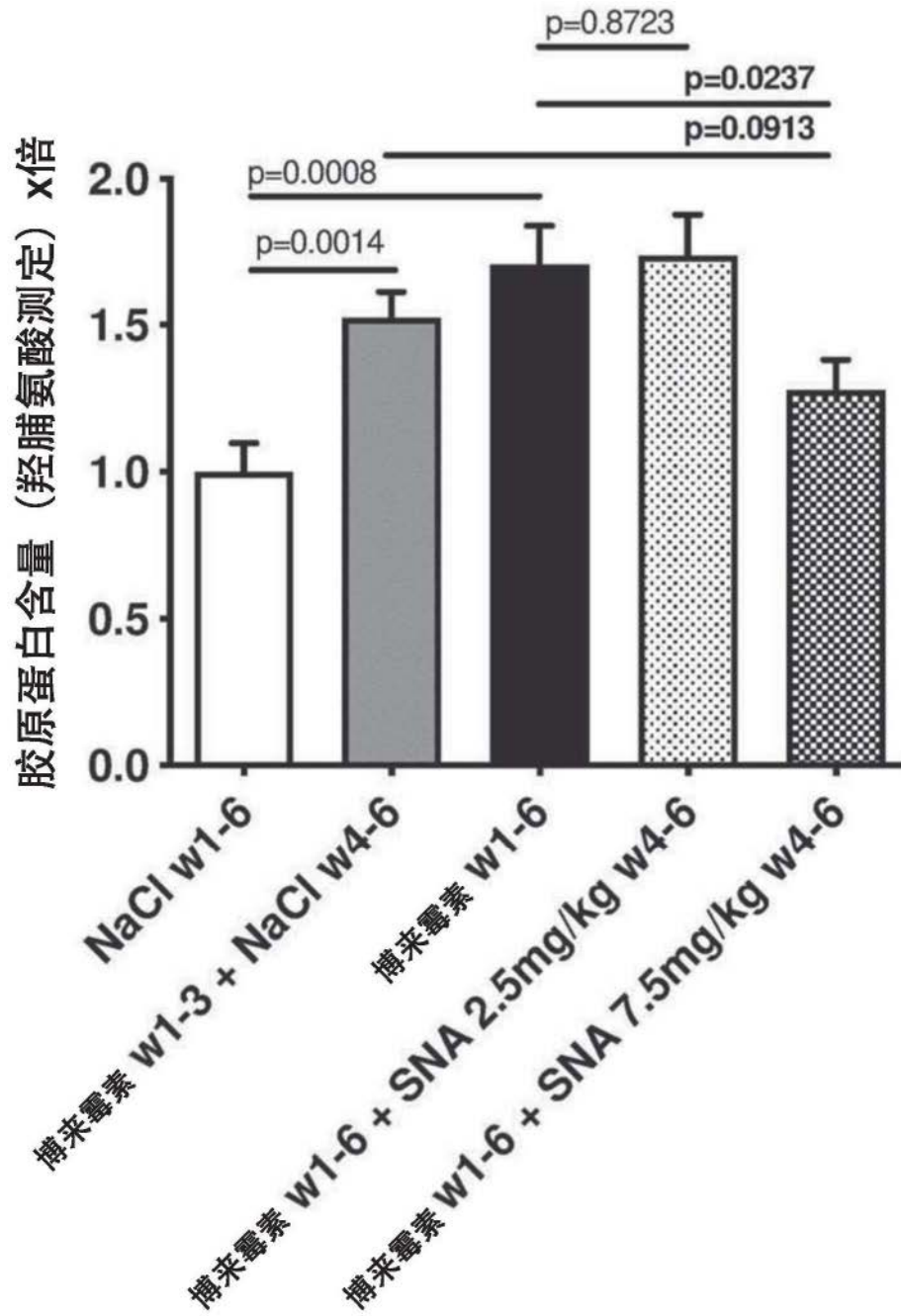


图4

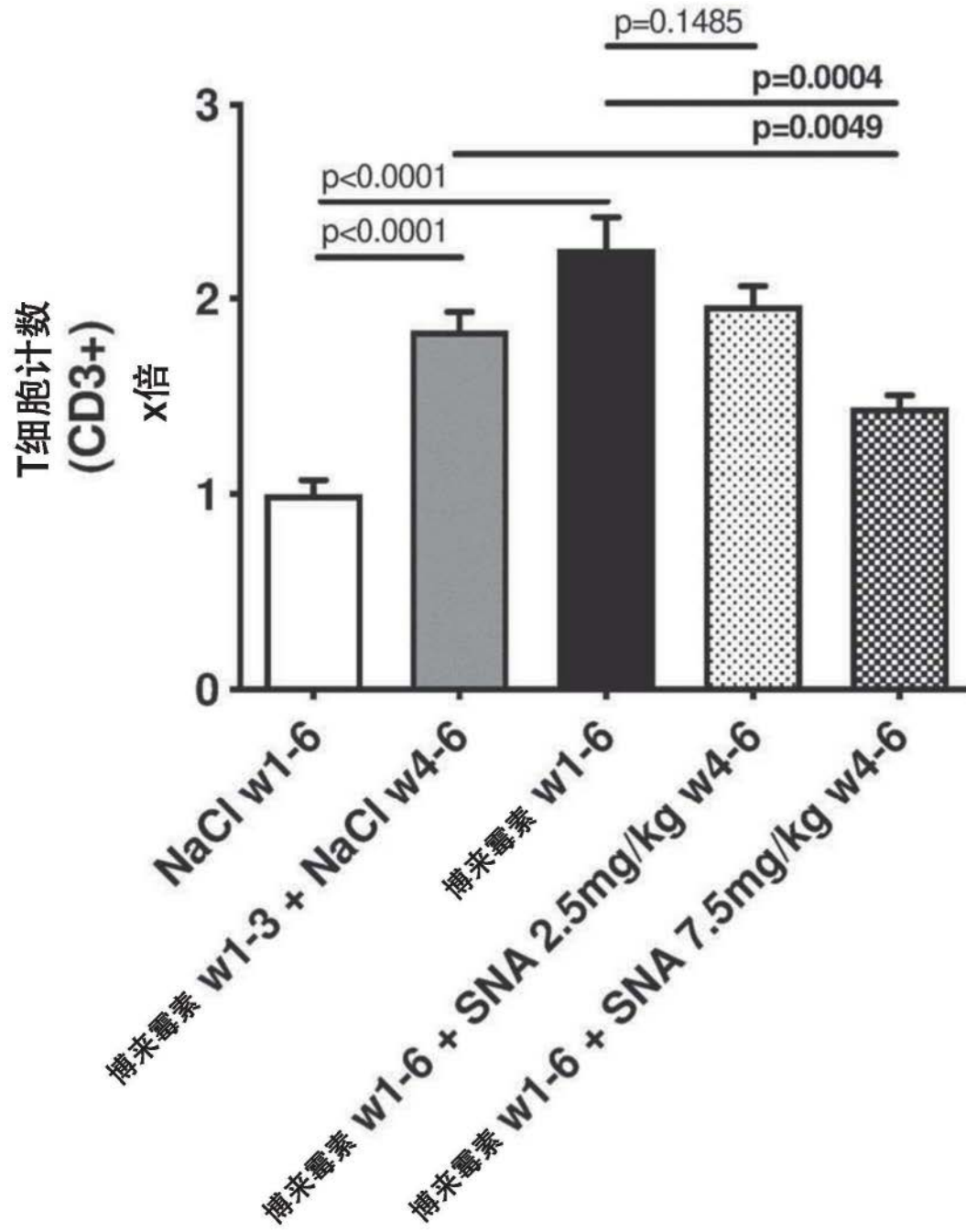


图5

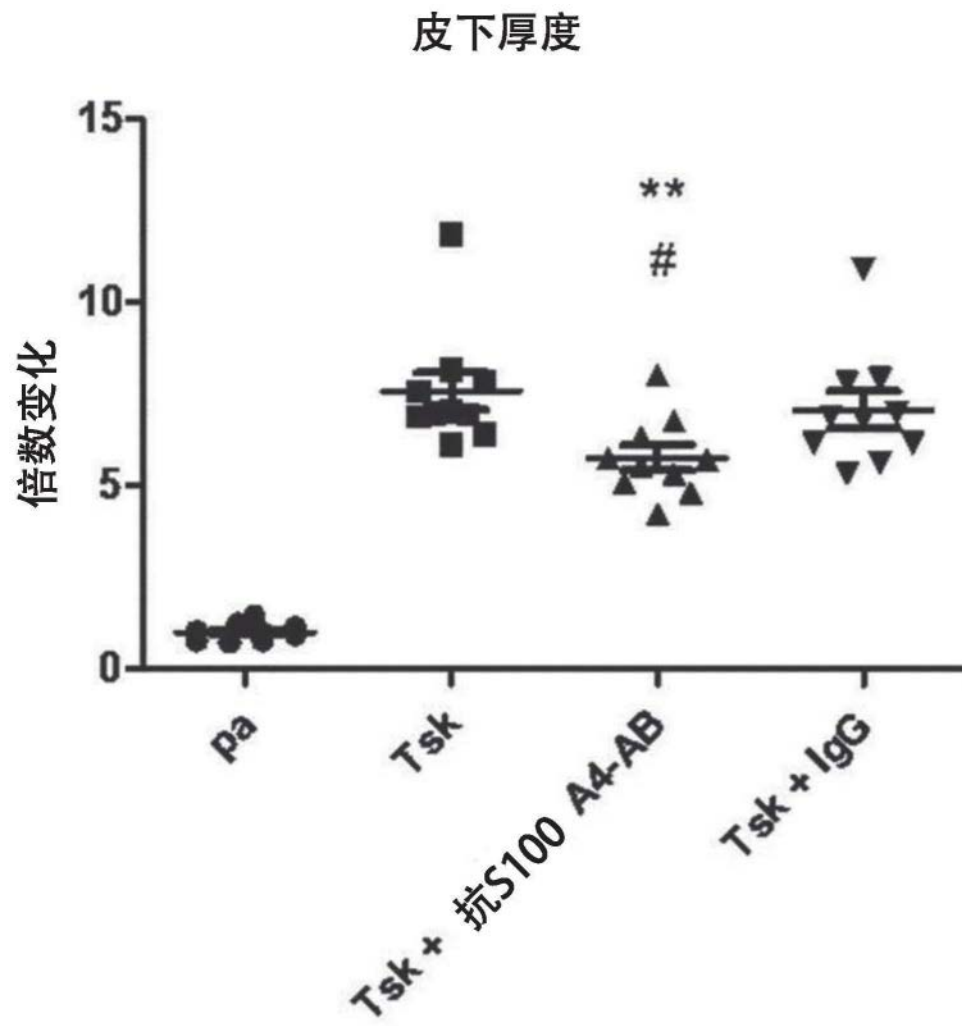


图6

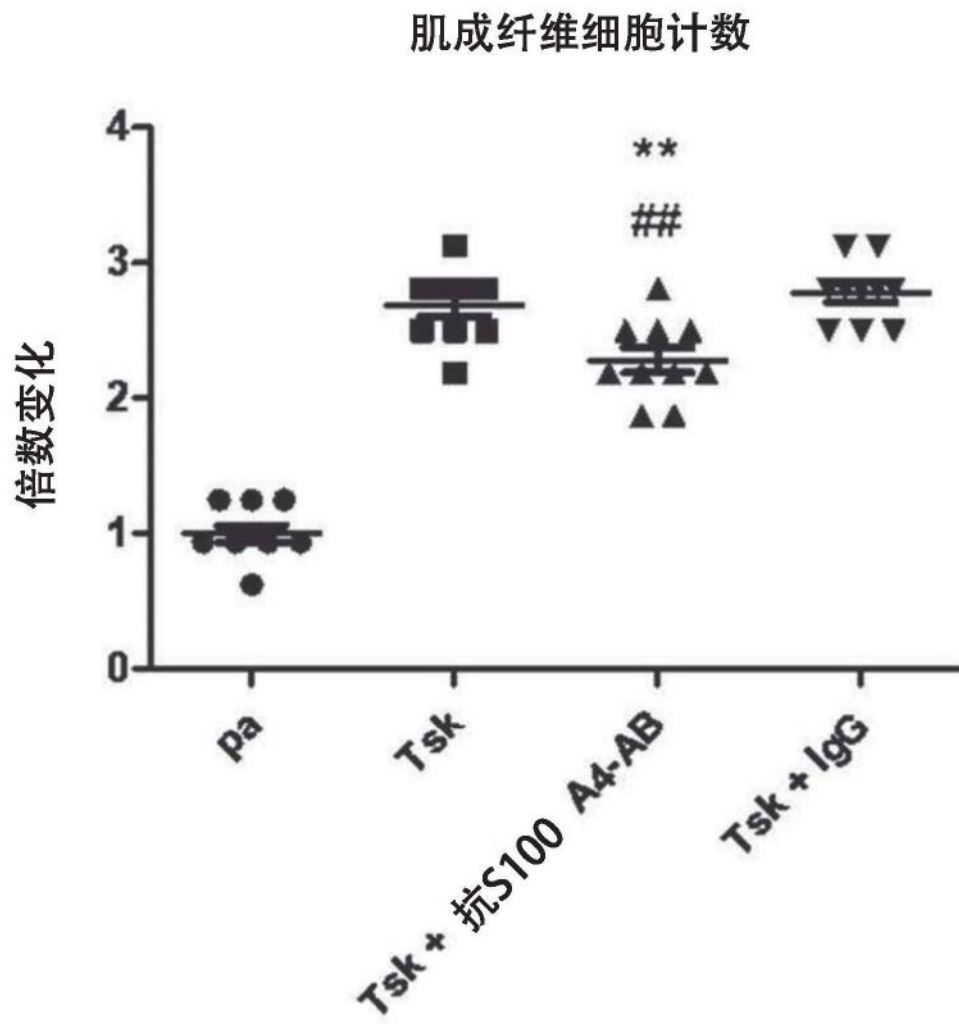


图7

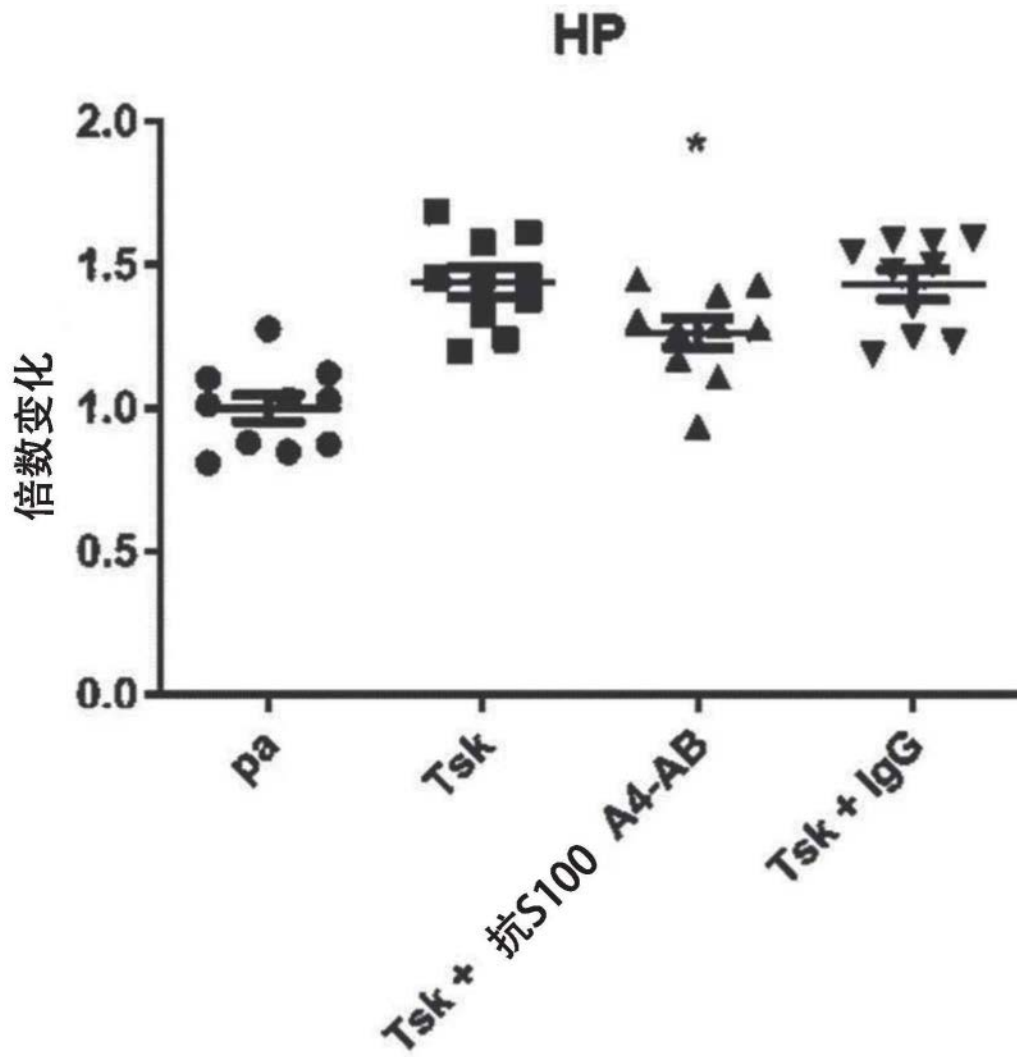


图8

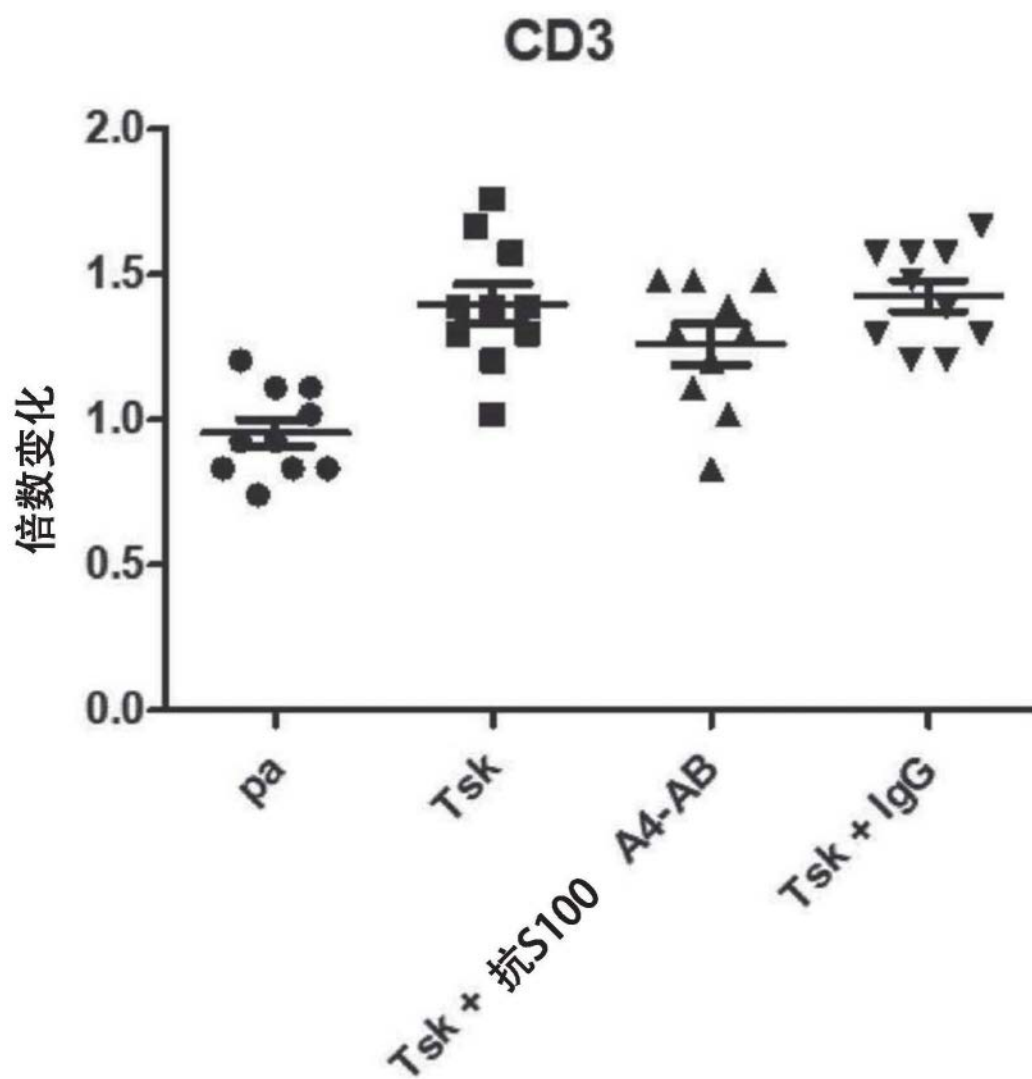


图9

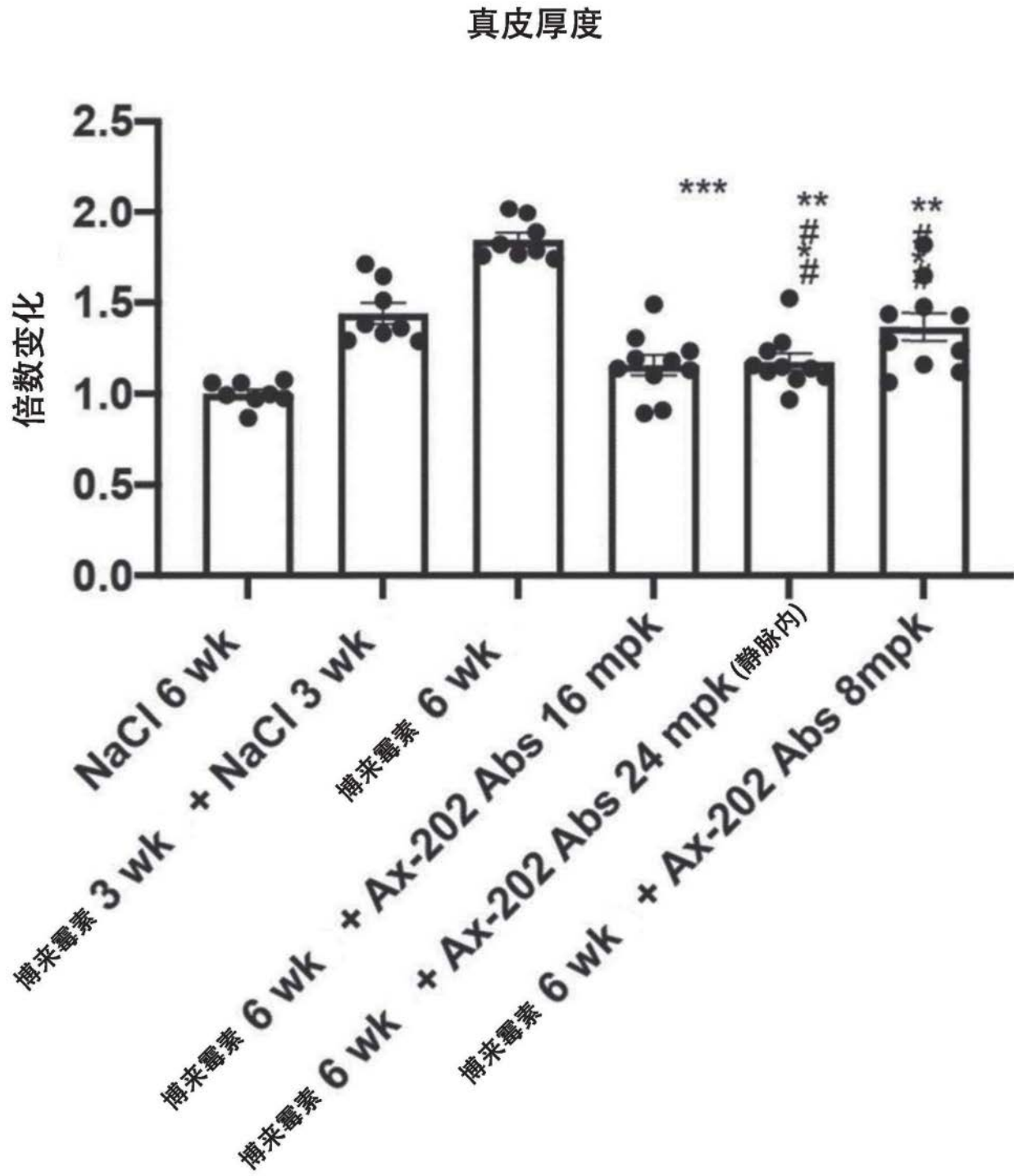


图10A

肌纤维细胞数量

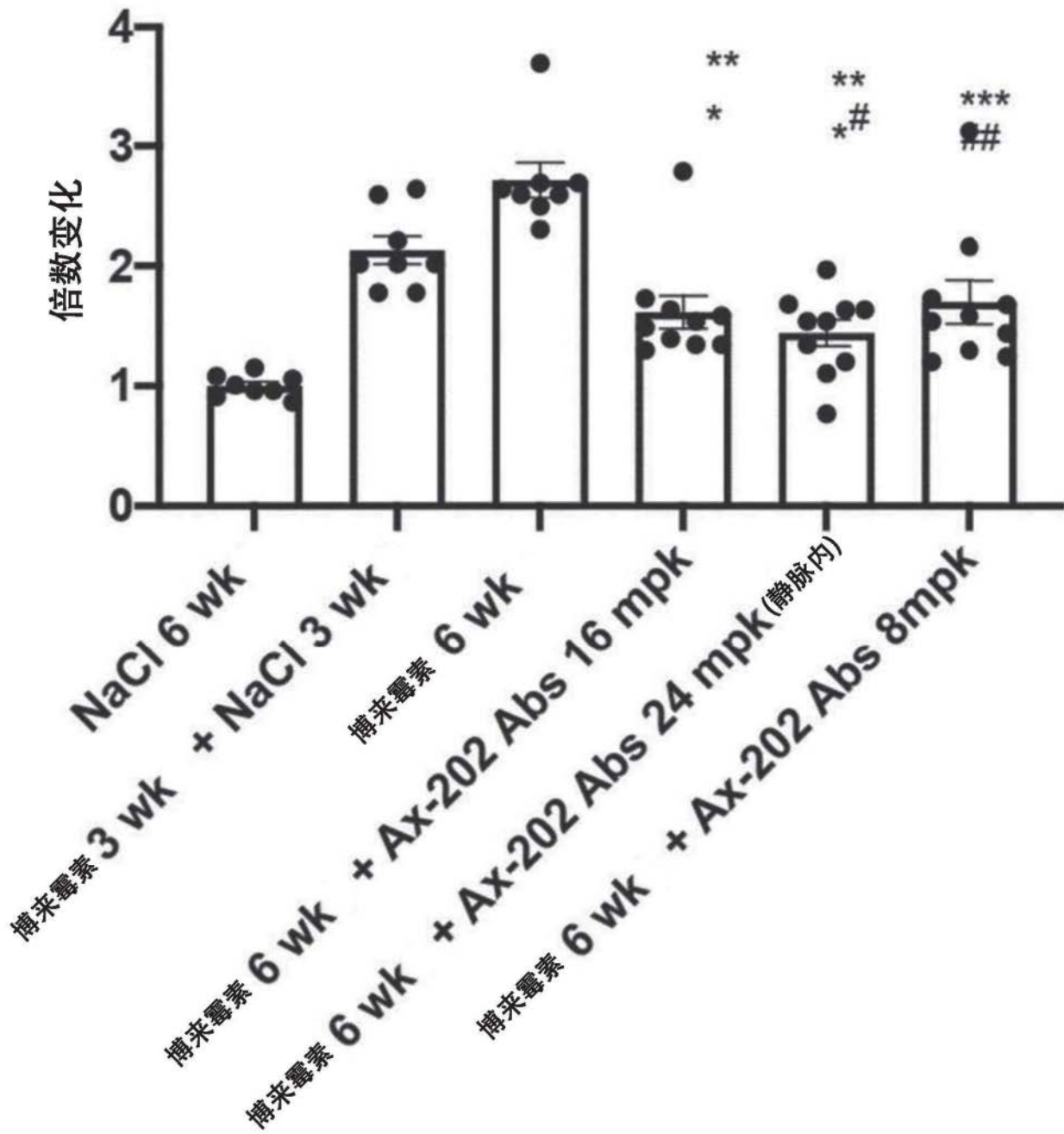


图10B

羟脯氨酸

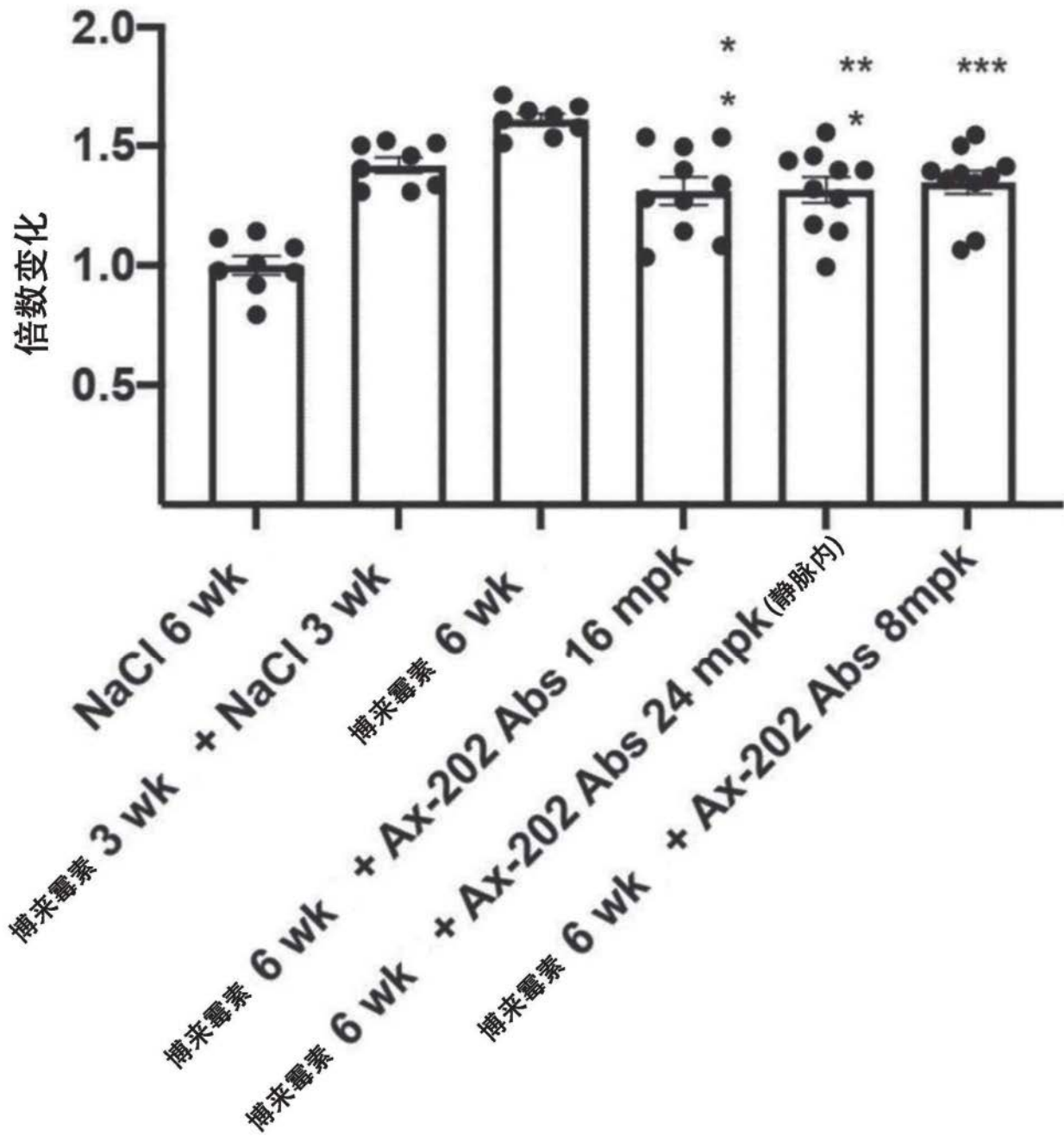


图10C

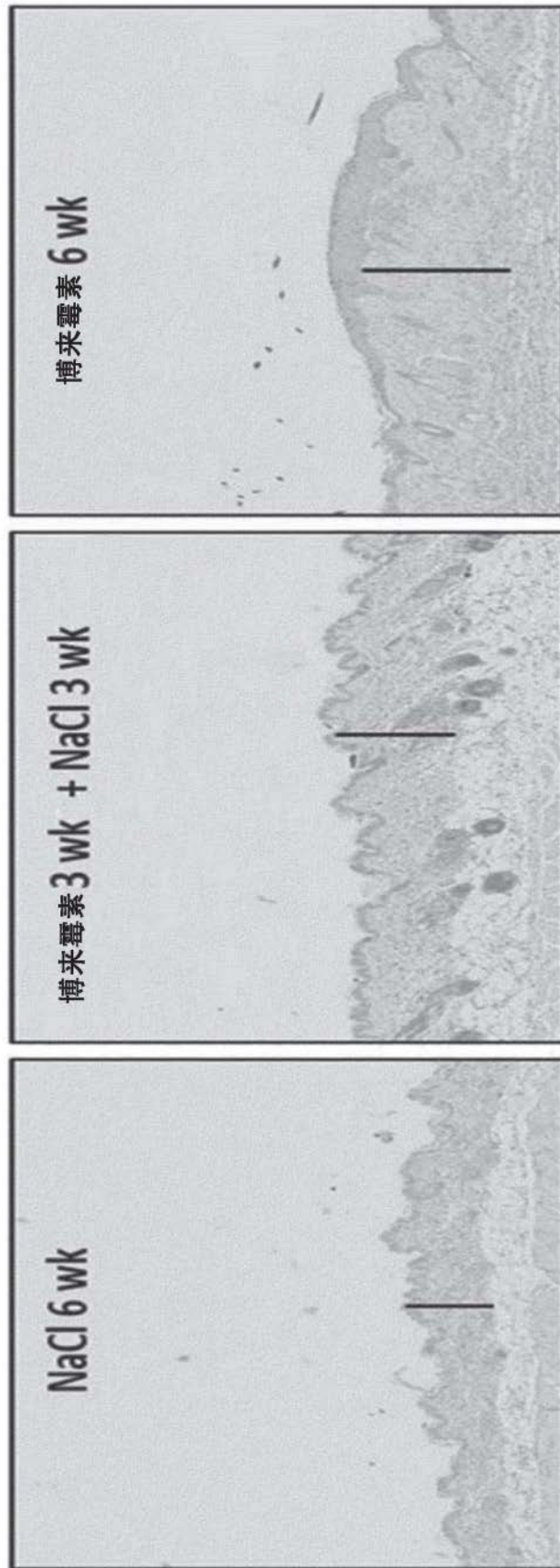


图10D

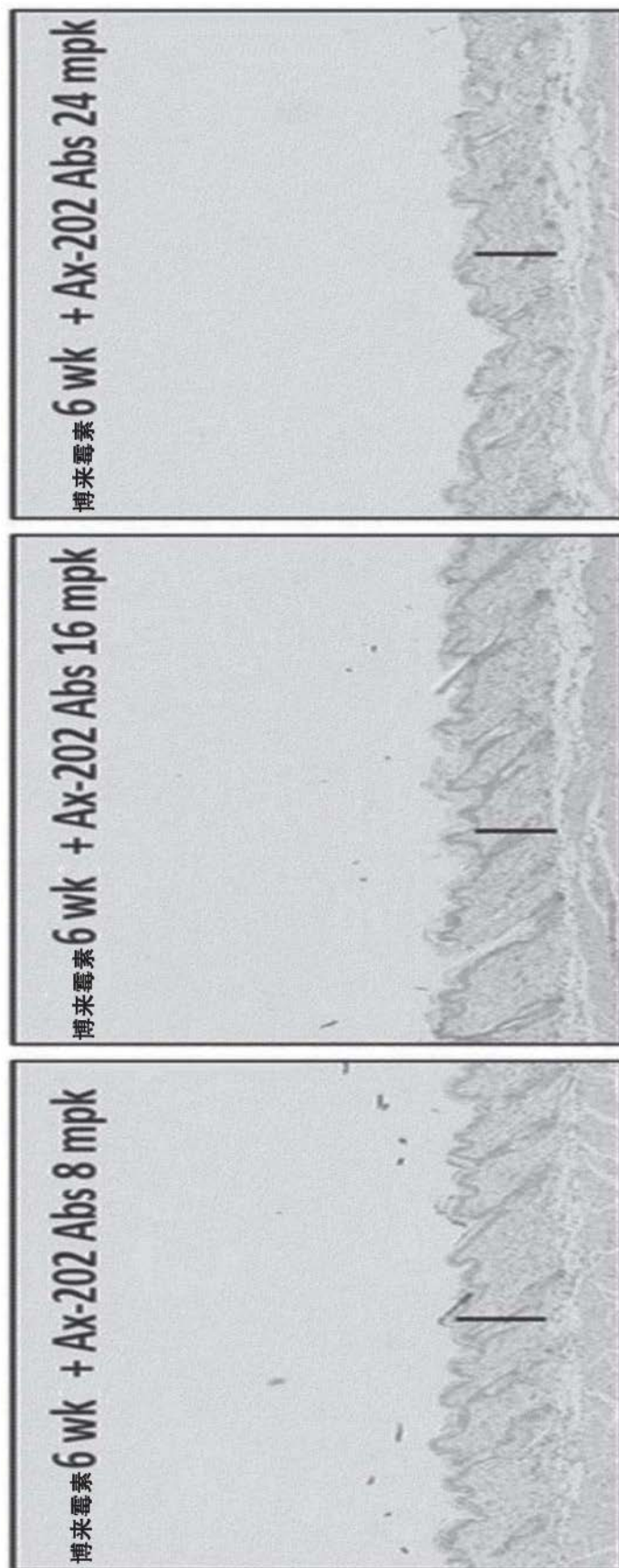


图10E

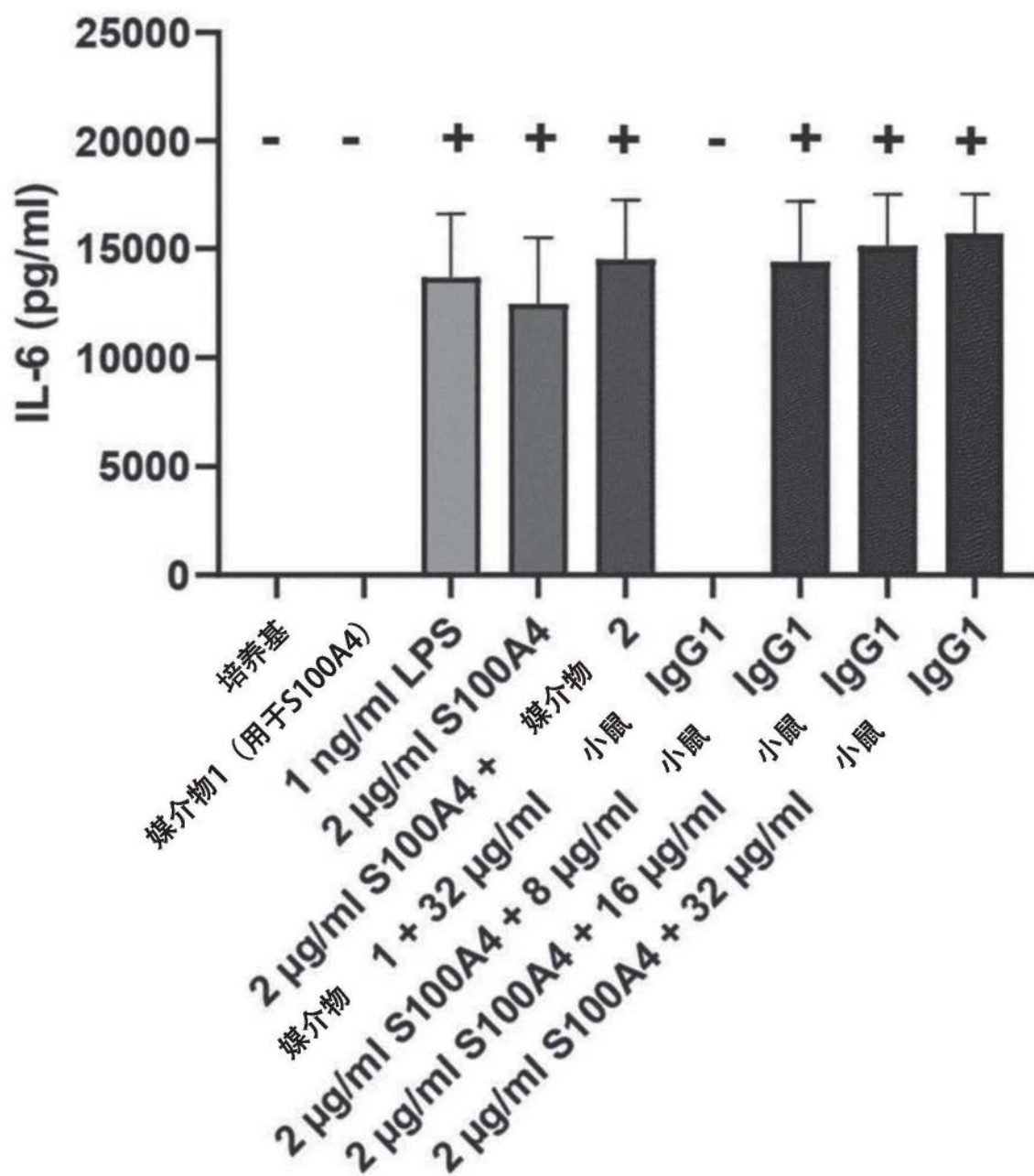


图11A

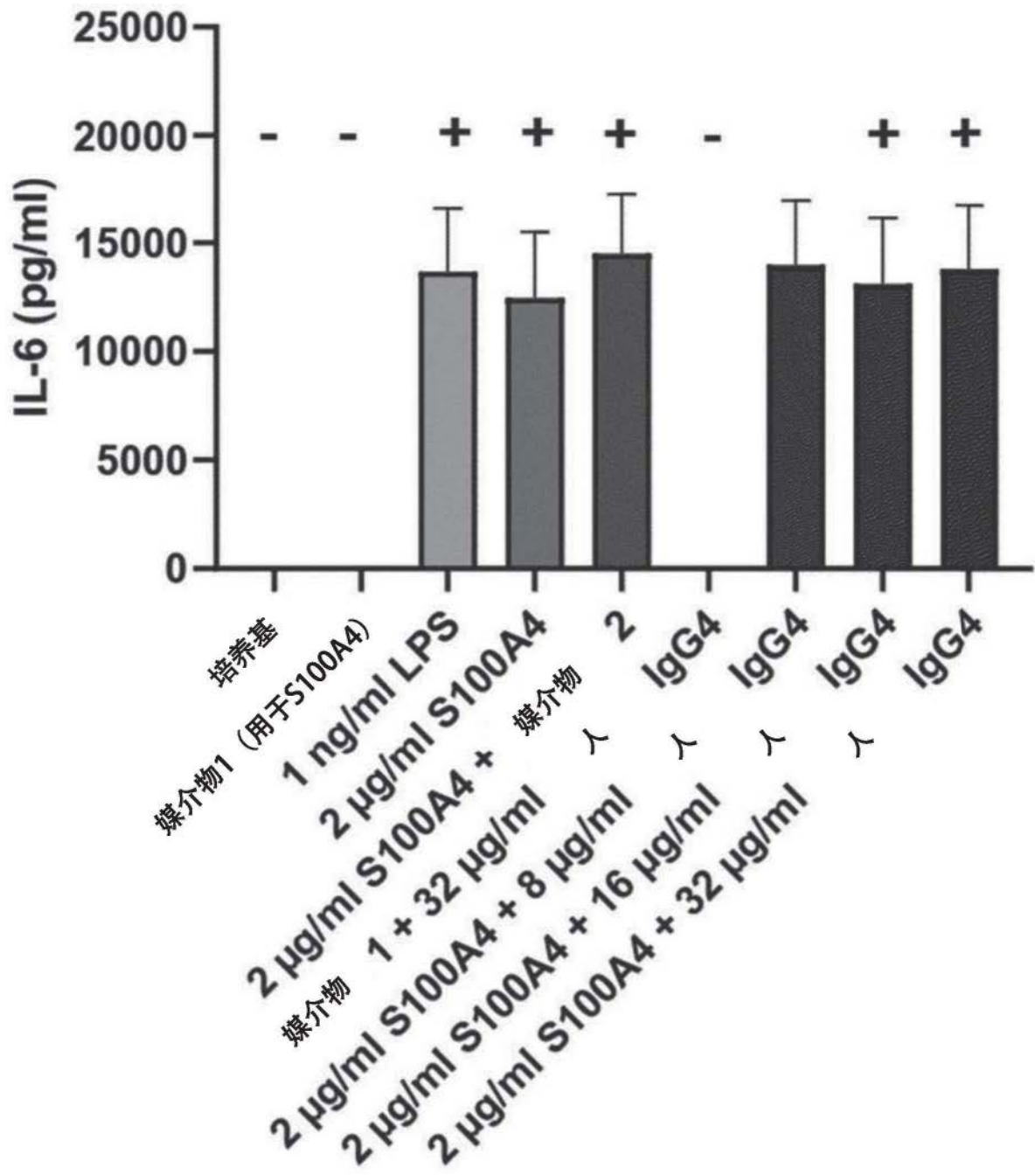


图11B

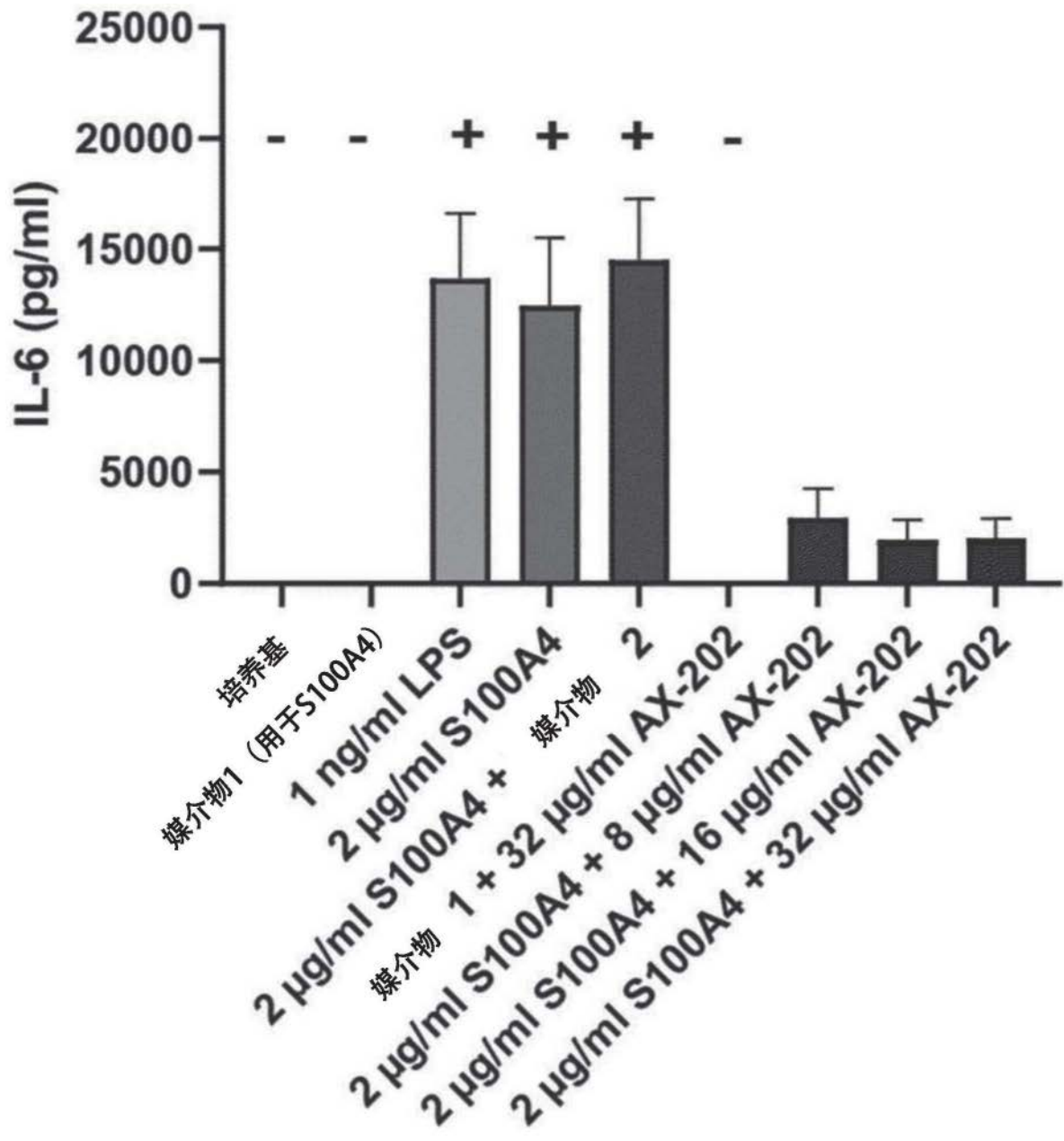


图11C

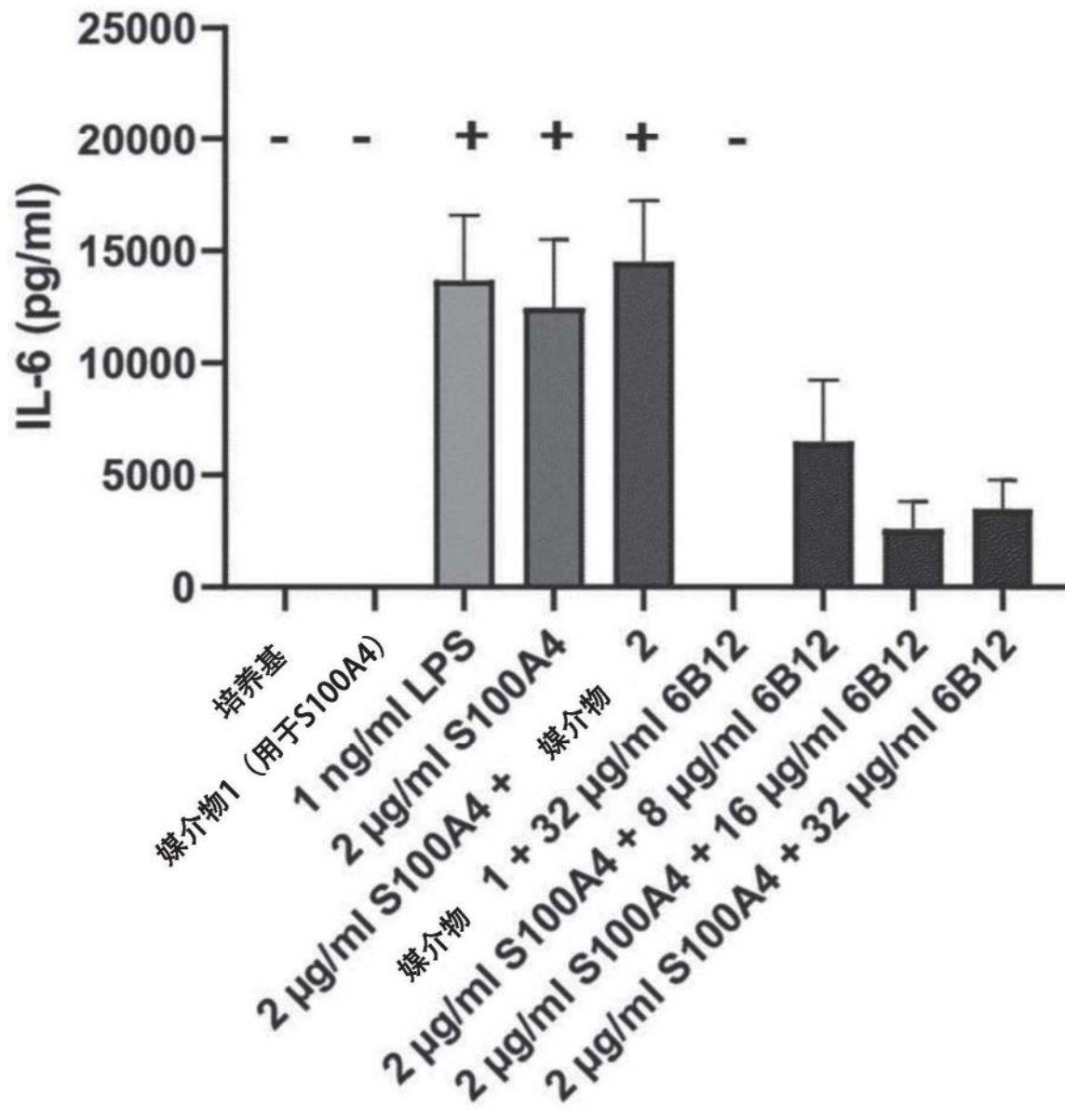


图11D

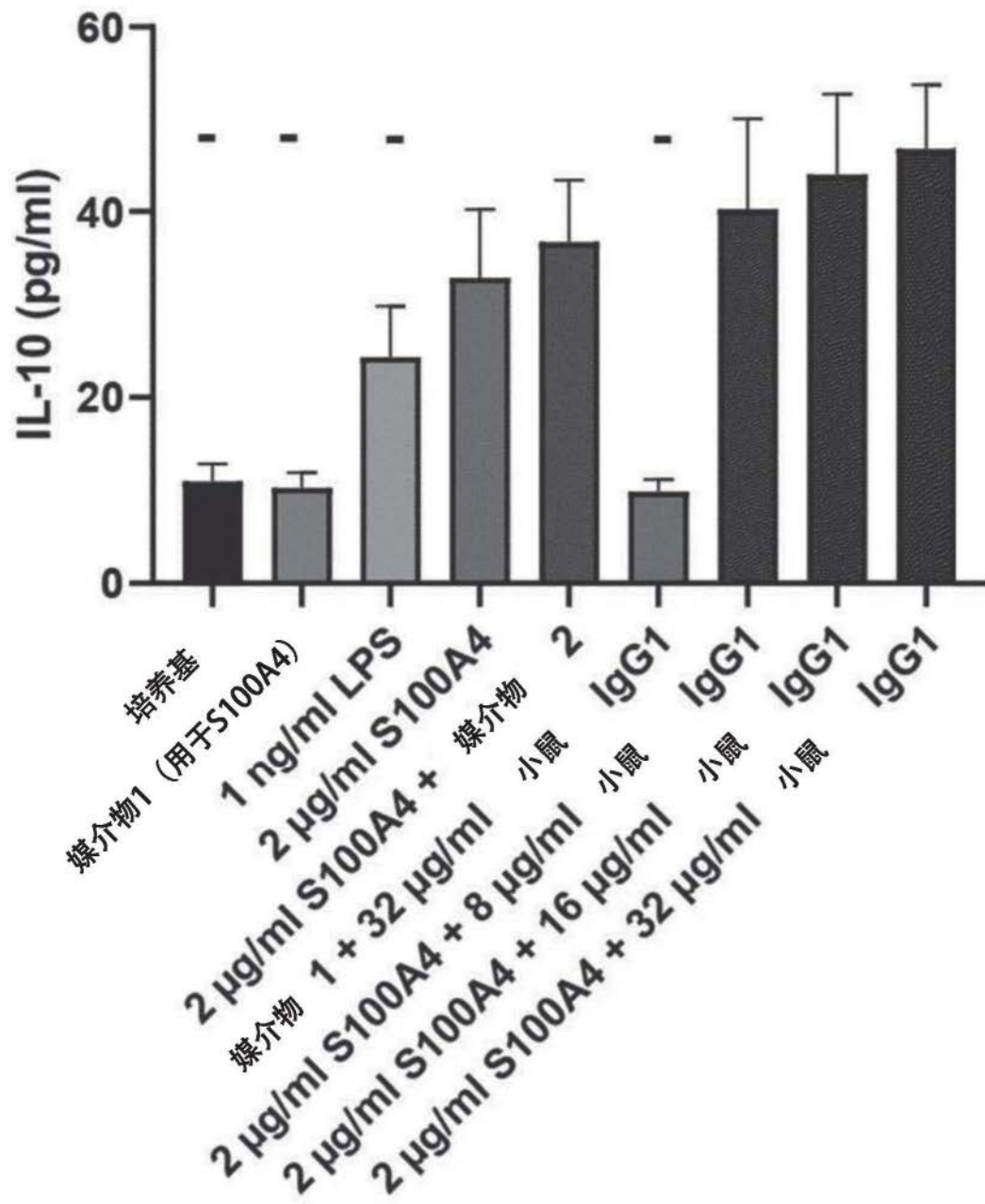


图12A

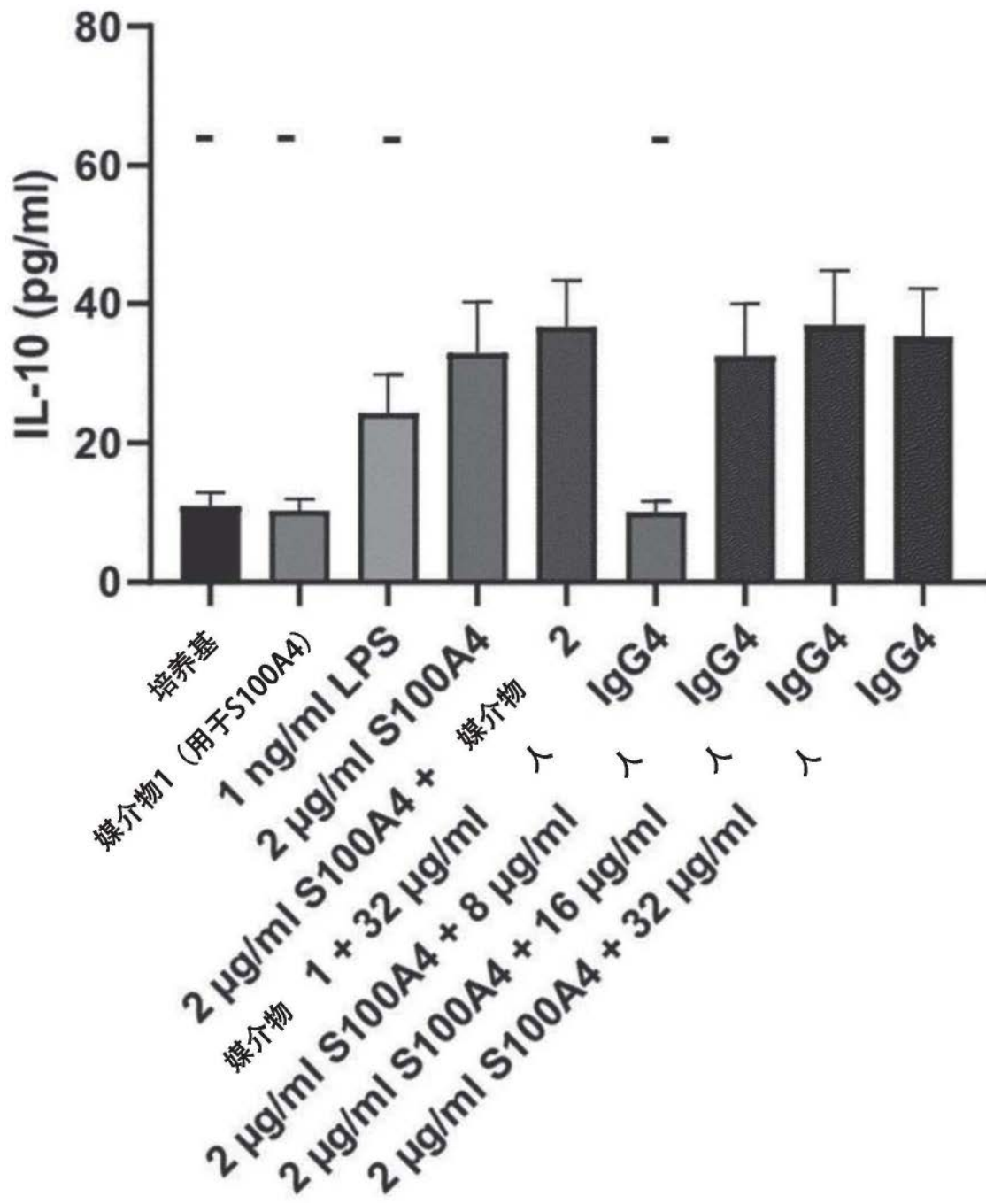


图12B

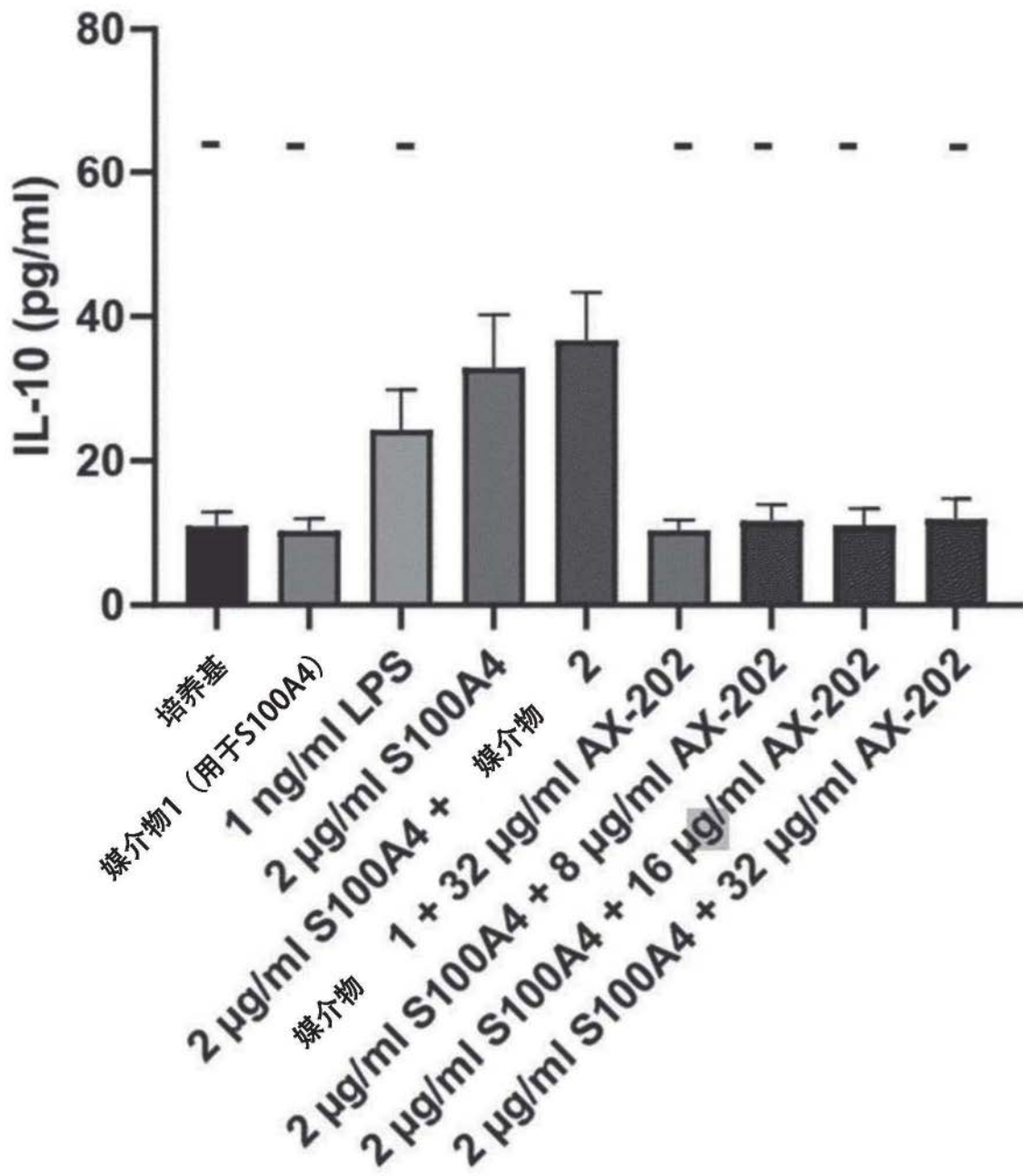


图12C

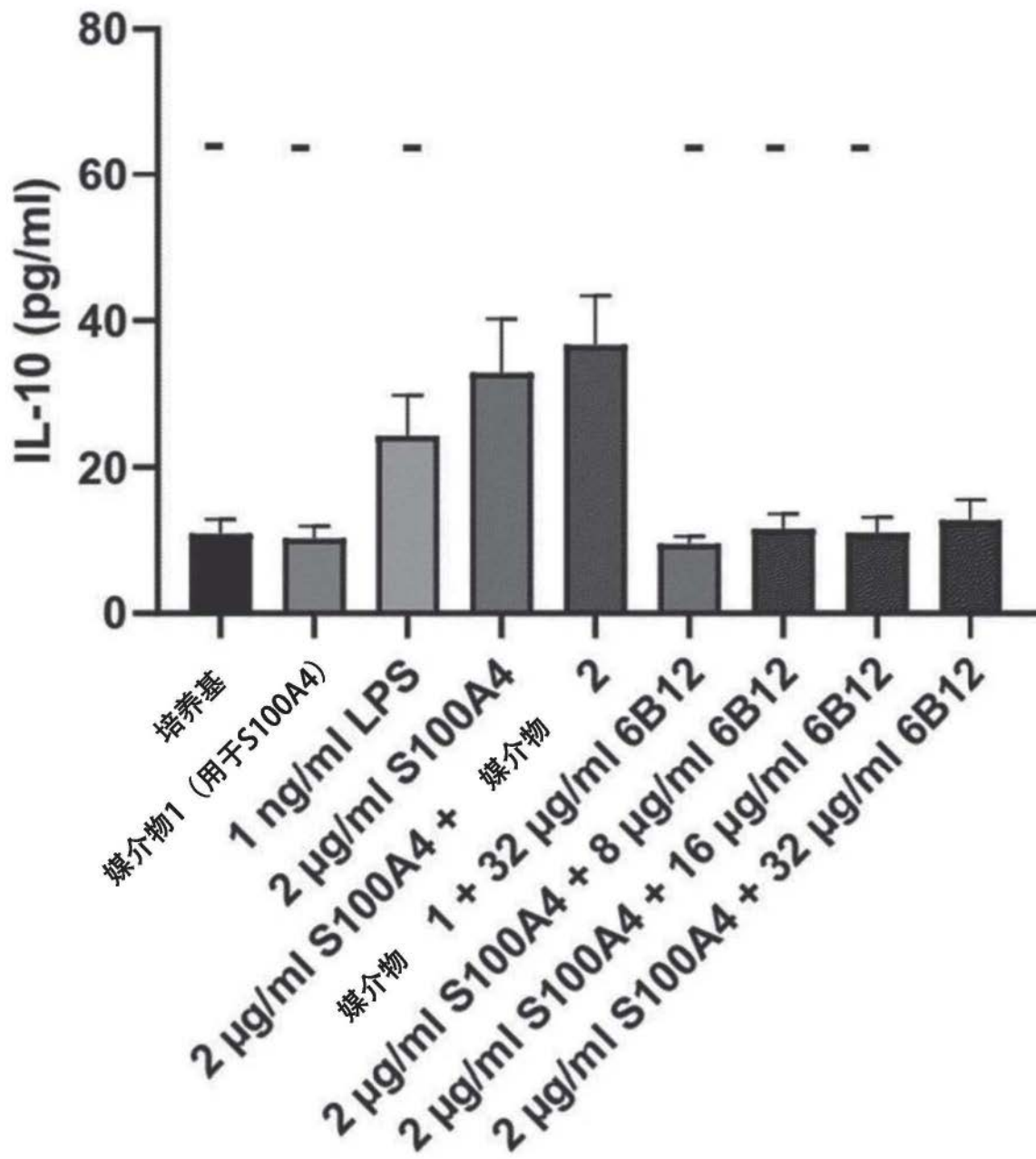


图12D

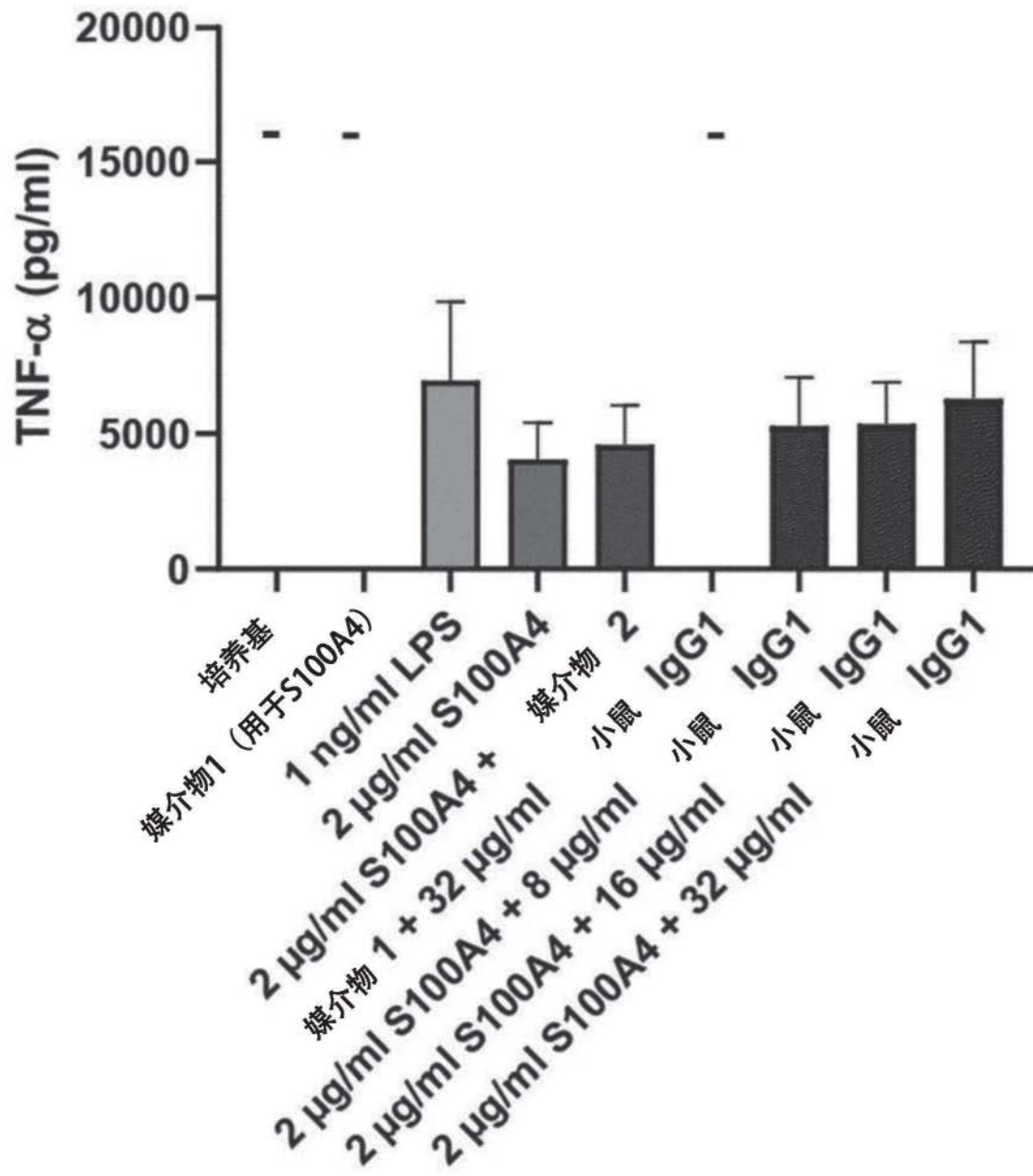


图13A

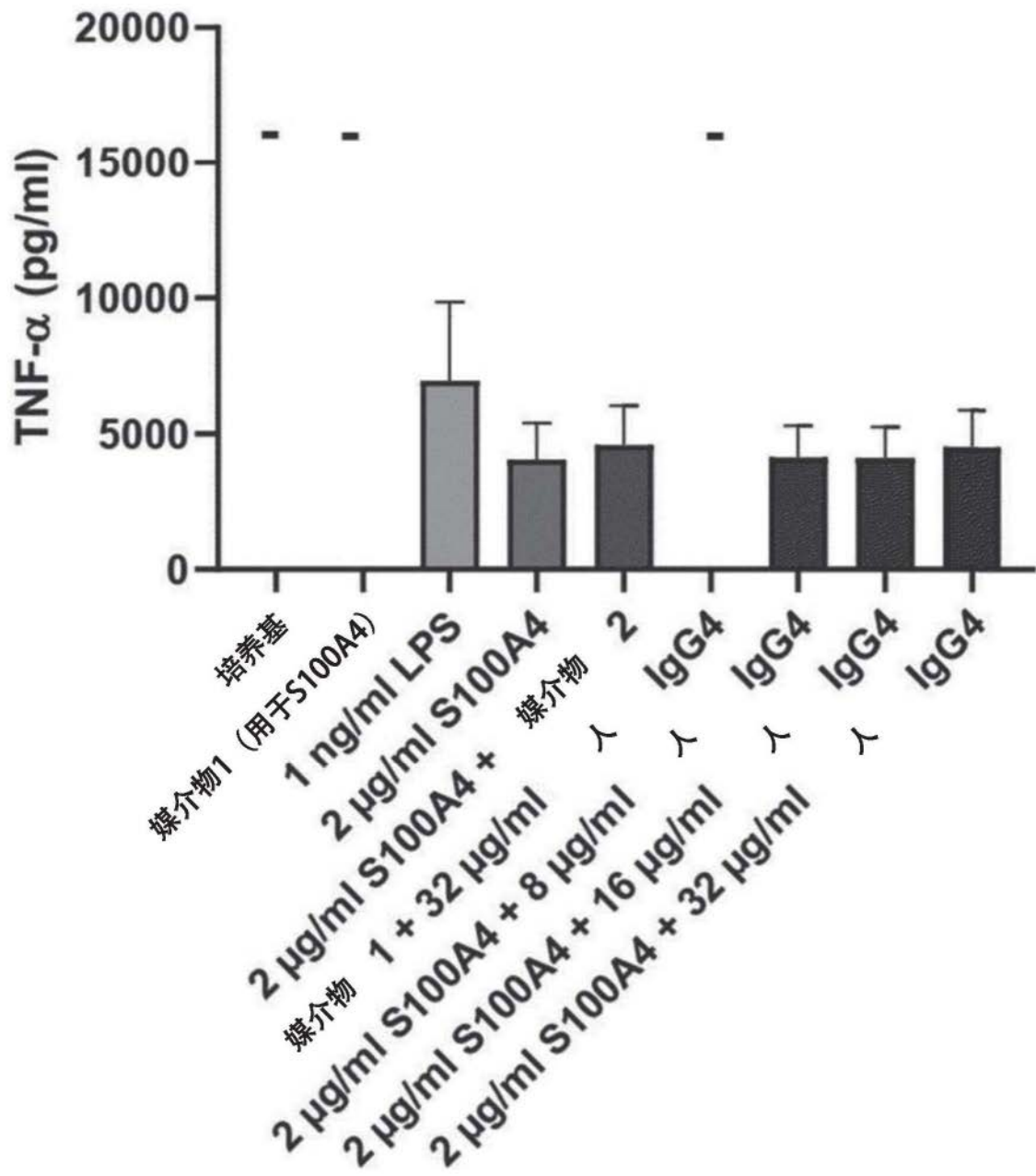


图13B

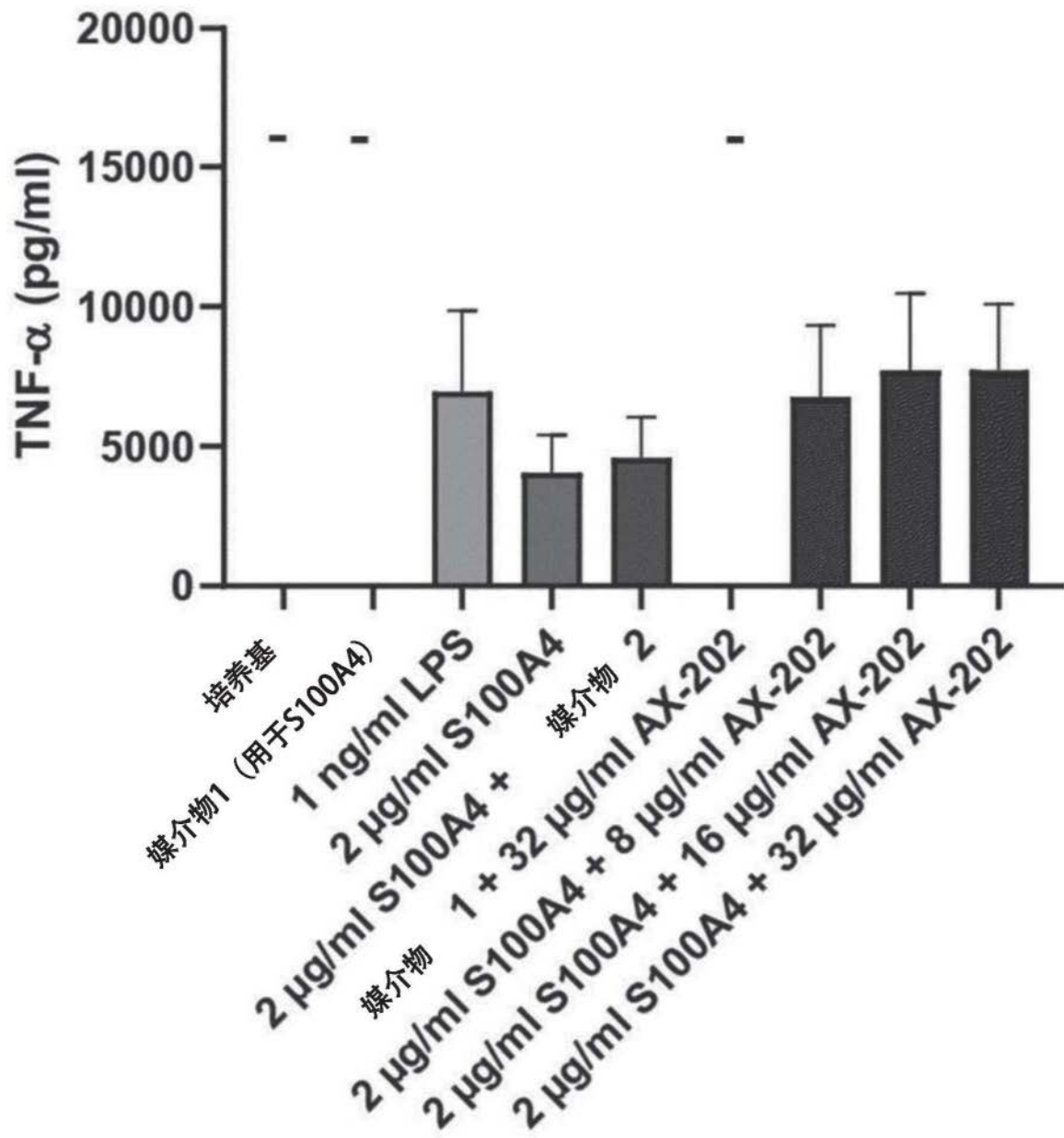


图13C

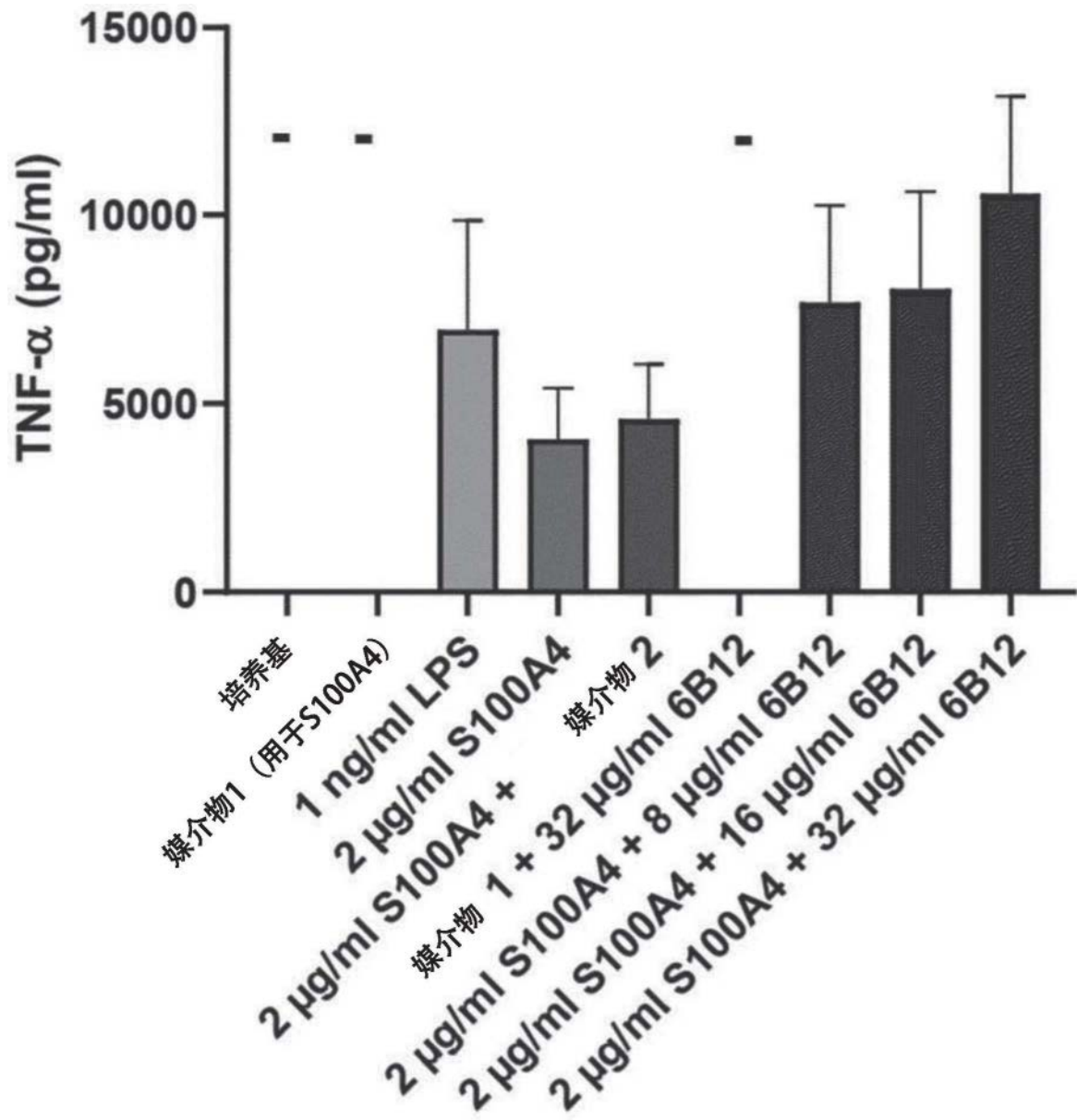


图13D