(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113574070 B
(45)授权公告日 2025.02.25

(21)申请号 202080017438.4
(22)申请日 2020.02.28
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113574070 A
(43)申请公布日 2021.10.29
(30)优先权数据
62/811,938 2019.02.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/020343 2020.02.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/176844 EN 2020.09.03
(73)专利权人 德克萨斯大学体系董事会
地址 美国德克萨斯
(72)发明人 姜欣 M·里克尔梅 顾肃敏
(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
专利代理师 张拥 孙占华
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61P 19/10(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017147561 A1,2017.08.31
审查员 张英朔
权利要求书1页 说明书34页
序列表15页 附图7页

(54)发明名称

用于治疗骨肉瘤的组合物和使用方法

(57)摘要

本文公开了结合至连接蛋白43半通道以活化通道开放的抗体。本文还公开了利用活化Cx43半通道开放的抗体来检测和治疗骨肉瘤的方法。

CN 113574070 B

1.抗连接蛋白43抗体或其片段在制备抑制受试者的骨肉瘤细胞中的成骨细胞生长的药物中的用途,其中所述抗体或其片段包含可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:58中示出的序列具有至少90%同一性的序列;和可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:63中示出的序列具有至少90%同一性的序列;

其中所述抗体或其片段包含重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含:

a)如SEQ ID NO:19的序列所示的互补决定区1(CDR1);

b)如SEQ ID NO:20的序列所示的互补决定区2(CDR2);和

c)如SEQ ID NO:21的序列所示的互补决定区(CDR3);以及

其中所述抗体或其片段包含轻链免疫球蛋白可变区,所述轻链免疫球蛋白可变区包含:

a)如SEQ ID NO:49的序列所示的互补决定区1(CDR1);

b)如SEQ ID NO:50的序列所示的互补决定区2(CDR2);和

c)如SEQ ID NO:51的序列所示的互补决定区3(CDR3)。

2.如权利要求1所述的用途,其包括向所述受试者施用有效量的编码所述抗连接蛋白43抗体的表达载体。

3.如权利要求1所述的用途,其中所述抗连接蛋白43抗体以药学上可接受的组合物施用。

4.如权利要求1所述的用途,其中所述抗连接蛋白43抗体被全身施用。

5.如权利要求3所述的用途,其中所述抗连接蛋白43抗体在静脉内、皮内、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下或局部施用。

6.如权利要求1所述的用途,其中所述抗连接蛋白43抗体是人源化抗体。

7.如权利要求1所述的用途,其还包括向所述受试者施用至少第二抗癌疗法。

8.如权利要求7所述的用途,其中所述第二抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

9.如权利要求1所述的用途,其中所述抗连接蛋白43抗体或其片段还包含标签序列。

10.如权利要求1所述的用途,其中所述其片段是Fab片段、Fab'片段或F(ab')2片段。

11.如权利要求3所述的用途,其中所述药学上可接受的组合物被冻干。

12.如权利要求1所述的用途,其包括向所述受试者施用有效量的抗连接蛋白43抗体。

用于治疗骨肉瘤的组合物和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年2月28日提交的美国临时专利申请号62/811,938的权益。所述在先提交的申请的内容在此通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表的并入

[0004] 本申请包含在本申请提交的同时通过EFS-Web提交的序列表,含有在2020年2月25日创建的名称为“21105_0070P1_SL.txt”、大小为24,576字节的文件,并且所述文件通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0005] 连接蛋白(Connexin)半通道在细胞和组织功能中起重要作用,连接蛋白半通道的功能异常可能涉及各种病理病状,诸如本文所描述的那些病理病状。因此,仍然需要用于治疗与半通道活性相关的病理病状的其他疗法,以及用于鉴定这类疗法的方法。

[0006] 骨肉瘤发生在包括年轻成人在内的患者中,并且通常会转移到肺部,这使得疾病无法治愈。目前可用的疗法与症状的减轻有关,但这些疗法都不能治愈疾病。需要治疗有需要的患有骨肉瘤的患者的骨肉瘤或肺、骨、脑转移或其他器官转移。

发明内容

[0007] 本文公开了治疗或预防受试者的骨肉瘤的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的抗连接蛋白43抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:58中示出的序列具有至少90%同一性的序列。

[0008] 本文公开了治疗或预防受试者的骨肉瘤的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的抗连接蛋白43抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:63中示出的序列具有至少90%同一性的序列。

[0009] 本文公开了治疗或预防受试者的骨肉瘤的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的抗连接蛋白43抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:58中示出的序列具有至少90%同一性的序列;和可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:63中示出的序列具有至少90%同一性的序列。

[0010] 本文描述了治疗或预防患有骨肉瘤的受试者的骨肉瘤或肺、骨、脑转移或其他器官转移的方法,其包括向受试者施用有效量的结合至连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道开放的抗体或编码所述抗体的表达载体。在一些方面中,所述方法可以包括向受试者施用有效量的抗体。在一些方面中,所述方法可以包括向受试者施用有效量的编码抗体的表达载体。在一些方面中,结合至连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道开放的抗体对间隙通道偶联没有影响。

[0011] 本文描述了治疗或预防受试者的骨肉瘤的方法,其包括向受试者施用有效量的结合至连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道开放的抗体或编码所述抗体的表达载体。在一些方面中,所述方法包括向受试者施用有效量的抗体。在一些方面中,所述方法包括向受试者

施用有效量的编码抗体的表达载体。在一些方面中,骨肉瘤已经转移到受试者的肺部。在一些方面中,结合至连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道开放的抗体对间隙通道偶联没有影响。

[0012] 本文描述了可以药学上可接受的组合物施用的编码抗体的表达载体。在一些方面中,抗体可以被全身施用。在一些方面中,抗体可以静脉内、皮内、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下或局部施用。

[0013] 本文公开了包含以下的抗体:对应于SEQ ID NO:19的第一VH CDR、对应于SEQ ID NO:20的第二VH CDR、对应于SEQ ID NO:21的第三VH CDR、对应于SEQ ID NO:49的第一VL CDR、对应于SEQ ID NO:50的第二VL CDR和对应于SEQ ID NO:51的第三VL CDR。在一些方面中,抗体可以是人源化抗体。在一些方面中,抗体可以是IgG、IgM、IgA、IgD、IgE或基因修饰的IgG类抗体,其包含对应于SEQ ID NO:19的第一VH CDR、对应于SEQ ID NO:20的第二VH CDR、对应于SEQ ID NO:21的第三VH CDR、对应于SEQ ID NO:49的第一VL CDR、对应于SEQ ID NO:50的第二VL CDR和对应于SEQ ID NO:51的第三VL CDR。在一些方面中,抗体可以是IgG类抗体,其中IgG类抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4类抗体。在一些方面中,抗体可以包含与SEQ ID NO:58至少90%相同的VH氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:63至少90%相同的VL氨基酸序列。在一些方面中,抗体包含根据SEQ ID NO:58的VH氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:63的VL氨基酸序列。

[0014] 在一些方面中,所公开的方法还可以包括向受试者施用至少第二抗癌疗法。在一些方面中,第二抗癌疗法可以是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

[0015] 本文公开了重组连接蛋白43(Cx43)半通道结合抗体或其片段。在一些方面中,抗体包含对应于SEQ ID NO:19的第一VH CDR或其片段、对应于SEQ ID NO:20的第二VH CDR或其片段、对应于SEQ ID NO:21的第三VH CDR或其片段、对应于SEQ ID NO:49的第一VL CDR或其片段、对应于SEQ ID NO:50的第二VL CDR或其片段和对应于SEQ ID NO:51的第三VL CDR或其片段。在一些方面中,抗体或其片段可以是人源化抗体。在一些方面中,抗体可以是IgG、IgM、IgA、IgD、IgE或基因修饰的IgG类抗体,其包含对应于SEQ ID NO:19的第一VH CDR、对应于SEQ ID NO:20的第二VH CDR、对应于SEQ ID NO:21的第三VH CDR、对应于SEQ ID NO:49的第一VL CDR、对应于SEQ ID NO:50的第二VL CDR和对应于SEQ ID NO:51的第三VL CDR。在一些方面中,抗体可以是IgG类抗体,其中IgG类抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4类抗体。在一些方面中,抗体包含与SEQ ID NO:58至少90%相同的VH氨基酸序列或其片段和/或与SEQ ID NO:63至少90%相同的VL氨基酸序列或其片段。在一些方面中,抗体可以包含根据SEQ ID NO:58的VH氨基酸序列或其片段和/或根据SEQ ID NO:63的VL氨基酸序列或其片段。

[0016] 本文公开了治疗受试者的骨肉瘤的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含根据本文所描述的组合物的抗体或编码根据本文所描述的方面的抗体的表达载体。在一些方面中,所述药物组合物包含针对受试者的编码根据本文所描述的方面的抗体的表达载体。在其他方面中,所述药物组合物包含针对受试者的根据本文所描述的方面的抗体。在一些方面中,所述方法可以被进一步定义为抑制或预防受试者中的癌肺转移的方法。在一些方面中,所述受试者患有骨肉瘤和/或肺、骨、脑转移或其他

器官转移。在一些方面中,所述药物组合物可以被全身施用。在一些方面中,所述药物组合物在静脉内、皮内、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下或局部施用。

[0017] 在一些方面中,所述药物组合物可以包含与SEQ ID NO:19相同的第一VH CDR、与SEQ ID NO:20相同的第二VH CDR、与SEQ ID NO:21相同的第三VH CDR、与SEQ ID NO:31相同的第一VL CDR、与SEQ ID NO:32相同的第二VL CDR和与SEQ ID NO:65相同的第三VL CDR。在几个方面中,所述方法还可以包括向受试者施用至少第二抗癌疗法。在另外的方面中,第二抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

[0018] 本文公开了针对半通道多肽的抗体和编码所述抗体的核酸分子。在一些方面中,抗体可以结合具有FLSRPTEKTI(SEQ ID NO:13)、KRDPCPHQVD(SEQ ID NO:14)或LSAVYTCKR(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列的表位。在一些方面中,抗体可以结合具有FLSRPTEKTI(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列的表位。

[0019] 在另外的实施方案中,根据实施方案使用的抗体可以是国际(PCT)专利公布号WO 2015-027120或WO 2017-147561中描述的那些抗体中的任一种,所述专利公开出于其用于制造或表达抗体的抗体、载体和细胞的教导通过引用并入本文。

[0020] 在一些方面中,第一重链区可以包含具有SEQ ID NO:2的残基13至37的氨基酸序列的氨基酸序列;具有对应于SEQ ID NO:2的残基46至66的氨基酸序列的第二重链区;以及包含具有SEQ ID NO:2的残基97至116的氨基酸序列的氨基酸序列的第三重链区。

[0021] 在一些方面中,本文公开的抗体可包括全长抗体、抗体片段、单链抗体、双特异性抗体、微型抗体、结构域抗体、合成抗体和抗体融合物和其片段。

[0022] 本文公开了包含本文所描述的任何抗体或其片段与药学上可接受的载体的药物组合物。本文还公开了用作药物或在用于治疗骨肉瘤或抑制或预防肺癌转移的疗法中使用的抗体或药物组合物。

[0023] 本文公开了治疗或预防癌症转移的方法。在一些方面中,癌症可以是患有骨肉瘤的患者的肺癌骨、脑转移或其他器官转移。治疗方法可包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所描述的分离的抗体。此外,本文公开了在制备用于治疗或预防癌症转移(例如,肺癌)的药物中使用本文所描述的任何抗体的方法。

[0024] 本文公开了使用本文所描述的任何抗体、化合物或试剂来活化或增强Cx43半通道的体外方法。在一些方面中,本文所描述的方法可用于通过以下来确定对骨细胞中Cx43半通道开放活化的影响:(i)使用荧光黄(Lucifer yellow)或Alexa染料,通过染料摄入测定确定半通道开放,(ii)通过测量ATP水平来评估对半通道开放的刺激作用(例如,通过Cx43半通道从骨细胞中释放的ATP增加可表明所测试的化合物或抗体可抑制肿瘤或取消细胞生长和/或定殖,(iii)测试试剂对通过以流体流动剪切应力形式进行机械负荷的半通道开放的刺激作用。在一些方面中,结合至连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道开放的抗体对间隙通道偶联没有影响。

[0025] 如本文所用,术语“抗原”是能够由抗体或T细胞受体结合的分子。在一些方面中,除抗体之外的结合部分可以被工程化以特异性结合抗原,例如适体、高亲和性多聚体(avimer)等。

[0026] 术语“抗体”或“免疫球蛋白”用于包括完整抗体和其结合片段/节段。如本文所用,

术语“抗体”旨在泛指任何免疫结合剂,诸如IgG、IgM、IgA、IgD、IgE和基因修饰的IgG以及包含保留抗原结合活性的抗体CDR结构域的多肽。抗体可选自由以下组成的组:嵌合抗体、亲和力成熟抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、人类抗体或抗原结合抗体片段或天然或合成配体。通常,片段与其来源的完整抗体竞争特异性结合抗原。片段包括单独的重链、轻链、Fab、Fab’F(ab’)2、Fabc和Fv。片段/节段通过重组DNA技术产生,或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学分离产生。术语“抗体”还包括化学缀合至或表达为与其他蛋白质的融合蛋白的一个或多个免疫球蛋白链。术语“抗体”还包括双特异性抗体。双特异性或双功能抗体是具有两个不同重/轻链对和两个不同结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可以通过多种方法产生,包括杂交瘤的融合或Fab’片段的连接。参见例如,Songsivilai和Lachmann,Clin Exp Immunol 79:315-21,1990;Kostelny等人,J.Immunol.148:1547-53,1992。

[0027] 术语“抗体”可包括五种不同类别的人类免疫球蛋白,即IgG、IgA、IgM、IgD和IgE。在一些方面中,所公开的抗体可以是IgG类抗体,其可以分类为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的4个亚类。在一些方面中,所公开的抗体可以是IgA类抗体,其可以分类为IgA1和IgA2的2个亚类。免疫球蛋白的基本结构由2条同源L链(轻链)和2条同源H链(重链)组成。免疫球蛋白类别和亚类由H链决定。在一些方面中,一种或多种抗体或其变体或片段可以是IgG4。

[0028] 在保持抗原结合特异性时,可以提高IgG4的抗体稳定性。在一些方面中,可以通过例如用谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、异亮氨酸(I)、天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、缬氨酸(V)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、苏氨酸(T)、甲硫氨酸(M)或亮氨酸(L)取代IgG4的精氨酸(R)来改善抗体。

[0029] 术语“分离的”可以指基本上不含其来源的细胞材料、细菌材料、病毒材料或培养基(当通过重组DNA技术产生时)或化学前体或其他化学物质(化学合成时)的核酸或多肽。此外,分离的化合物是指可以作为分离的化合物施用于受试者的化合物;换句话说,如果化合物粘附在柱上或包埋在琼脂糖凝胶中,那么不能简单地将其视为“分离的”。此外,“分离的核酸片段”或“分离的肽”是不是作为片段天然存在和/或通常不处于功能状态的核酸或蛋白质片段。

[0030] 本发明的部分(诸如多肽、肽、抗原或免疫原)可以共价或非共价地缀合或连接至其他部分,诸如佐剂、蛋白质、肽、支持物、荧光部分或标记。术语“缀合物”或“免疫缀合物”广泛用于定义一个部分与另一种药剂的有效结合,并且并不旨在仅指任何类型的有效结合,并且尤其不限于化学“缀合”。

[0031] 术语“提供”是根据其通常的含义“供应或提供以供使用”而使用的。在一些实施方案中,通过施用蛋白质直接提供蛋白质,而在其他实施方案中,通过施用编码蛋白质的核酸有效地提供蛋白质。在某些方面中,本发明考虑包含核酸、抗原、肽和/或表位的各种组合的组合物。

[0032] 短语与靶标的“特异性结合”或对靶标的“特异性免疫反应性”是指在存在其他生物制剂的异质群体的情况下决定分子存在的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,特定分子优先结合特定靶标并且不会大量结合样品中存在的其他生物制剂。在这种条件下抗体与靶标的特异性结合需要根据其对靶标的特异性来选择抗体。多种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定常规地用于选择与蛋

白质特异性免疫反应的单克隆抗体。参见,例如,Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,1988,关于可用于确定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述。

[0033] 本申请通篇讨论了本发明的其他方面。关于本发明的一个方面所讨论的任何方面也适用于本发明的其他方面,反之亦然。在此描述的每个方面被理解为适用于本发明的其他方面的本发明的方面。考虑本文讨论的任何方面可以关于本发明的任何方法或组合物实施,反之亦然。此外,本发明的组合物和试剂盒可用于实现本发明的方法。

[0034] 如本文所用,当在权利要求书和/或说明书中与术语“包含/包括(comprising)”结合使用时,词语“一(a)”或“一(an)”可意指“一个(种)”,但其也符合“一个(种)或多个(种)”、“至少一个(种)”及“一个(种)或一个(种)以上”的含义。

[0035] 在本申请通篇中,术语“约”用于指示一个值包括用于确定所述值的装置或方法的误差标准偏差。

[0036] 权利要求书中术语“或”的使用用于指“和/或”,除非明确指出仅指替代物或替代物相互排斥,尽管本公开支持仅指替代物和“和/或”的定义。

[0037] 如本申请和权利要求书中所用,词语“包含”(以及包含的任何形式,例如“包括”和“含有”)、“具有”(以及具有的任何形式,例如“有”和“具备”)、“包括”(以及包括的任何形式,例如“涵盖”和“包含”)或“含有”(以及含有的任何形式,例如“包含”和“涵盖”)是包括性的或开放式的且不排除额外的、未提及的要素或方法步骤。

[0038] 如本文所用,术语“氨基酸”和“氨基酸同一性”是指20种天然存在的氨基酸中的一种或可在所公开的任何抗体、变体或片段中的任何非天然类似物。因此,如本文所用的“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸。例如,出于本发明的目的,高苯丙氨酸、瓜氨酸和正亮氨酸被认为是氨基酸。“氨基酸”还包括氨基酸残基,诸如脯氨酸和羟脯氨酸。侧链可以是(R)或(S)构型。在一些方面中,氨基酸呈(S)或L-构型。如果使用非天然存在的侧链,那么可以使用非氨基酸取代基,例如以防止或延迟体内降解。

[0039] 本发明的其他目的、特征和优点将从以下详述中变得显而易见。然而,应该理解,虽然指示本公开的具体实施方案,但是详细描述和具体实施例仅通过说明的方式给出,因为从此详细描述中,本公开的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员来说将变得显而易见。

[0040] 附图描述

[0041] 以下附图形成本说明书的一部分,并且被包括来进一步说明本发明的某些方面。可通过参考一个或多个这些附图结合本文提出的说明书实施方案的详细描述更好地理解本发明。

[0042] 图1A-C显示通过人类-小鼠嵌合抗Cx43抗体HMAb2(这种抗体包含与“M2”抗体相同的鼠可变结构域和CDR)来抑制骨中的乳腺癌生长。将Py81 19-Luc细胞注射至对照和cKO雌性小鼠的右胫骨中。左胫骨注射有PBS作为对照。图1A显示通过生物发光成像每周记录持续4周并进行定量的肿瘤生长。数据表示为平均值±SEM。**,P0.01。n=7只/组。图1B显示用白色箭头显示的肿瘤扩散至肺部和大脑的Cx43 cKO小鼠的代表性图像。图1C显示胫骨注射有Py8119细胞的代表性X射线照片,指示肿瘤细胞注射的位置和溶骨性病变发生的位置(箭头)。注射有PBS的左胫骨未显示溶骨性病变。

[0043] 图2A-B显示MLO-Y4骨细胞(A)或原代小鼠骨细胞(B)中的Cx43半通道被HMAb2活化,但被HMAb1阻断。将细胞与E2(多克隆)、HMAb1和HMAb2抗体或生胃酮(carbenoxolone)(CBX)(一种连接蛋白通道阻断剂)一起孵育。执行溴化乙锭(EtBr)染料摄入测定。数据表示为SEM。与基底对照相比,***,P0.001。

[0044] 图3A-B显示体内骨细胞中MHAb2对半通道的活化。将伊文思(Evans)蓝染料注射至WT小鼠的尾静脉中,并且IP注射25μg/ml MHAb2。注射后两小时处死小鼠并用PBS灌注。分离胫骨并制备固定的胫骨组织切片。图3A显示用罗丹明(rhodamine)缀合的抗人类IgG检测到抗体的存在。条形,50μm。图3B显示在皮质和小梁骨中通过伊文思蓝(EB)荧光测量并进行定量的染料摄入。*,P<0.05;***,P0.001。

[0045] 图4A-C显示HMAb2抑制乳腺癌细胞的溶骨性生长并保护骨骼免于骨折。图4A显示将Py8119-Luc乳腺癌细胞注射至雌性小鼠的胫骨中。图4B显示每周一次或两次腹膜内注射25mg/kg的HMAb2,持续四周。在对照小鼠中每周两次注射生理盐水。肿瘤生长通过生物发光成像每周记录持续4周并进行定量(下图)。数据表示为平均值±SEM。对于HMAb2和生理盐水,n=6。图4C显示通过X射线对注射MHAb2或生理盐水的小鼠进行成像。*,P0.05。

[0046] 图5A-B显示HMAb2和HAb2抗体均识别Cx43并结合骨细胞表面上的Cx43。图5A显示用HMAb2(MHC2)或HAb2(HC2)抗体免疫标记表达Cx43的亲本HeLa或HeLa细胞。图5B显示用抗HMAb2(MHC2)或HAb2(HC2)抗体免疫荧光标记非渗透性骨细胞MLO-Y4细胞。

[0047] 图6显示MHAb2对溶骨性乳腺癌生长的剂量依赖性抑制。将Py8119-Luc乳腺癌细胞注射至雌性小鼠的胫骨中。每周一次腹膜内注射5、15和25mg/kg的HMAb2,持续四周。在对照小鼠中每周一次注射生理盐水。肿瘤生长通过生物发光成像每周记录持续4周并进行定量。数据表示为平均值±SEM。对于HMAb2和生理盐水,n=6。*,P0.05。

[0048] 图7A-D显示HMAb2增加小梁骨质量、体积和厚度。4个月大的小鼠一周一次腹膜内注射有25mg/kg HMAb2抗体或生理盐水,持续两周。骨骼参数(A)骨骼体积;(B)小梁厚度;(C)小梁数量;(D)骨矿密度(BMD)通过显微CT成像确定并进行定量。数据表示为平均值±SEM。n=6;*,P0.05;**,P0.01。

[0049] 图8A-B显示MHAb2对溶骨性人类乳腺癌生长的抑制。图8A显示将MDA-MB231人类乳腺癌细胞注射至雌性免疫受损裸鼠的胫骨中。每周一次腹膜内注射25mg/kg的HMAb2,持续7周。在对照小鼠中每周一次注射生理盐水或人类IgG。肿瘤生长通过生物发光成像每周记录持续7周并进行定量。数据表示为平均值±SEM。n=6。*,P0.05。图8B显示7周后处死小鼠并分离肿瘤。

[0050] 图9显示通过嵌合MHC2抗体(对应于小鼠-人类嵌合M2抗体)对鼠骨肉瘤癌细胞的成骨细胞生长的抑制。将DML8-Luc鼠骨肉瘤细胞植入至C3H小鼠品系的胫骨中。每周一次腹膜内注射25mg/kg的MHC2。在对照小鼠中每周一次注射生理盐水。肿瘤生长通过生物发光成像每周记录持续6周并进行定量。n=6只/组。数据表示为平均值±SEM。*,P0.05。

[0051] 图10A-B显示优化的(重链CDR中的单一氨基酸变化)人源化M2抗体抑制人类骨肉瘤癌细胞中的成骨细胞生长。图10A显示通过优化的人源化HC2抗体(对应于优化的人源化M2抗体)对人类骨肉瘤癌细胞的成骨细胞生长的剂量依赖性抑制。将OS17-Luc骨肉瘤细胞植入至免疫受损的小鼠的胫骨中。每周一次腹膜内注射5、15和25mg/kg的HC2。在对照小鼠中每周一次注射生理盐水。肿瘤生长通过生物发光成像每周记录持续7周并进行定量。图

10B显示通过HC2抗体(对应于优化的人源化的M1抗体)在肿瘤植入后42天的剂量依赖性抑制。n＝5只/组。数据表示为平均值±SEM。*,P<0.05;**,P0.01。

具体实施方式

[0052] 通过参考特定的实施方案的以下详细描述和其中所包括的实施例,以及参考附图和其先前和以下描述可以更容易理解所公开的方法和组合物。

[0053] 应理解,除非另有说明,否则所公开的方法和组合物不限于具体的合成方法、具体的合成技术或特定的试剂,并且因此这些可以变化。还应理解本文使用的术语仅出于描述特定的实施方案的目的并且不意图具有限制性。

[0054] 本发明公开了可用于、可结合用于、可用于制备的材料、组合物和组分,或是所公开方法的产品和组合物。本文公开了这些和其他材料,并且应当理解当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,尽管可能不能明确地公开每个不同的个体和这些化合物的各种组合和排列的具体参考,但是每个都应特别考虑并在本文描述。因此,如果公开一类分子A、B和C以及一类分子D、E和F以及公开组合分子A-D的实例,那么即使没有单独列举每一个,也可以单独和共同地考虑每一个。因此,在此实例中,特别考虑组合A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F中的每一个,并且应认为将其从公开A、B和C;D、E和F中公开;以及示例性组合A-D。同样,还特别考虑并公开了这些的任何子集或组合。因此,例如,特别考虑子组A-E、B-F和C-E,并且应认为将其从公开A、B和C;D、E和F中公开;以及示例性组合A-D。此概念适用于本申请的所有方面,包括但不限于制备和使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此,如果存在多个可执行的额外步骤,应当理解,这些额外步骤中的每一个可以所公开的方法的任何具体的实施方案或实施方案的组合来执行,并且特别考虑且应认为公开每个这样的组合。

[0055] 本文所提到的所有公布通过引用并入本文以公开和描述与公布所引用相关的方法和/或材料。本文所讨论的公布仅为其在本申请的申请日之前的公开而提供。本文中的任何内容均不得解释为承认本公开无权凭借在先公开早于这个公布。此外,本文提供的公布日期可能与实际公布日期不同,这可能需要单独确认。

[0056] 定义

[0057] 应当理解,所公开的方法和组合物不限于所描述的特定方法、方案和试剂,因为这些可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅为了描述特定实施方案的目的,并非旨在限定本发明的范围,本发明的范围只受所附权利要求书限定。

[0058] 必须注意的是,除非上下文另外清楚指出,否则如本文和随附权利要求书中所用,单数形式“一(a/an)”和“所述”包括复数个指代对象。“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件、情况或材料可发生或可不发生或存在,并且描述包括其中事件、情况或材料发生或存在的情况和其中不发生或不存在的情况。

[0059] 如本文所用的词“或”表示特定列表的任何一个成员,并且还包括所述列表的成员的任何组合。

[0060] 范围可在本文中表达为自“约”一个特定值起和/或至“约”另一个特定值止。除非上下文另外明确指出,否则当表达、还特别考虑并认为公开的范围是自一个特定值起和/或至另一个特定值止的范围。类似地,在通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,应理解,

除非上下文另外明确指出,否则具体值形成另一个应认为公开的特别考虑的实施方案。应进一步理解,除非上下文另外明确指出,否则每个范围的端点相对于另一个端点并独立于另一个端点均为重要的。最后,应理解,除非上下文另外明确指出,否则明确公开的范围内包含的所有单个值和值的子范围也被特别考虑,并且应认为公开。无论是否在特定情况下明确公开这些实施方案中的一些或所有,前述内容均适用。

[0061] 贯穿本说明书的描述和权利要求书,词"包括"和所述词的变型诸如"包含/包括(comprising/comprises)"意指"包括但不限于"并且不旨在排除例如其他添加剂、组分、整数或步骤。具体地,在被叙述为包括一个或多个步骤或操作的方法中,特别考虑每个步骤包括所列出的事物(除非步骤包括限制性术语,诸如"由.....组成"),这意指每个步骤并非旨在排除例如步骤中未列出的其他添加剂、组分、整数或步骤。

[0062] "抑制"、"抑制"和"抑制"意指减少或降低活性、水平、反应、病状、疾病或其他生物参数。这可以包括但不限于活性、反应、病状或疾病的完全消融。这还可以包括,例如,与天然或对照水平相比,活性、反应、病状或疾病的10%抑制或降低。因此,在一些方面中,与天然或对照水平相比,抑制或降低可以是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或介于两者之间的任何降低量。在一些方面中,与天然或对照水平相比,抑制或降低是10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%、80%-90%或90%-100%。在一些方面中,与天然或对照水平相比,抑制或降低是0%-25%、25%-50%、50%-75%或75%-100%。

[0063] 如本文所用,"调节"是指活性或功能或数量的变化。变化可以是活性、功能或数量的增加或减少、增强或抑制。

[0064] "提升"和"促进"是指活性、反应、病状、疾病或其他生物参数的增加。这可以包括但不限于活性、反应、病状或疾病的开始。这还可以包括,例如,与天然或对照水平相比,活性、反应、病状或疾病增加10%。因此,在一些方面中,与天然或对照水平相比,增加或提升可以是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更多,或介于两者之间的任何提升量。在一些方面中,与天然或对照水平相比,增加或提升是10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%、80%-90%或90%-100%。在一些方面中,与天然或对照水平相比,增加或提升是0%-25%、25%-50%、50%-75%或75%-100%或更多,诸如200%、300%、500%或1000%。在一些方面中,与天然或对照水平相比,增加或提升可以是大于100%,诸如与天然或对照水平相比,增加或提升100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或更多。

[0065] "治疗(Treatment/treating)"是指向受试者施用或施加治疗剂(例如,本文所描述的抗Cx43抗体)或对受试者实施程序或方式,目的是获得疾病或健康相关病状的治疗益处。例如,治疗可以包括施用药学上有效量的增强或刺激Cx43半通道开放的抗体。在一些方面中,结合至连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道开放的抗体对间隙通道偶联没有影响。

[0066] 如本文所用,术语"治疗"是指部分或完全缓解、改善、缓和特定疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征,延迟其发作,抑制或减缓其进展,降低其严重程度和/或降低其发病率。可向未表现出疾病、病症和/或病状的迹象的受试者和/或仅表现出疾病、病症和/或病状的早期迹象的受试者施用治疗,目的是降低发展出与所述疾病、病症和/或病状相关的病理的风险。例如,疾病、病症和/或病状可以是骨肉瘤或癌症。

[0067] 如本文所用,术语“受试者”是指所施用的靶标,例如人类。因此,所公开方法的受试者可以是脊椎动物,诸如哺乳动物、鱼、鸟、爬行动物或两栖动物。术语“受试者”还包括家养动物(例如,猫、犬等)、家畜(例如,牛、马、猪、绵羊、山羊等)和实验室动物(例如,小鼠、兔、大鼠、豚鼠、果蝇等)。在一个方面中,所述受试者为哺乳动物。在另一个方面中,所述受试者为人类。所述术语不表示特定的年龄或性别。因此,旨在涵盖成人、儿童、青少年和新生儿受试者,以及胎儿,无论是雄性还是雌性。

[0068] 如本文所用,术语“患者”是指患有疾病或病状的受试者。术语“患者”包括人类和兽医受试者。在所公开方法的一些方面中,诸如(例如)在施用步骤之前,“患者”已经被诊断为需要治疗。

[0069] 术语“片段”可以指与参考蛋白质或核酸基本相同并保留参考的生物活性的蛋白质或核酸分子的一部分(例如,至少5、10、25、50、100、125、150、200、250、300、350、400或500(等等)个氨基酸或核酸)。在一些方面中,片段或部分保留了本文描述的参考蛋白质或核酸的至少50%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的生物活性。此外,参考肽的片段可以是参考多肽的连续或邻近部分(例如,十个氨基酸长的参考肽的片段可以是所述肽内的任何2至9个邻近残基)。

[0070] 术语“变体”可以意指与参考序列在某些方面的差异,而不仅仅是简单地缺失一个或多个N端和/或C端氨基酸残基。当变体包括氨基酸残基的取代时,取代可被认为是保守的或非保守的。保守取代是以下组内的那些取代:Ser、Thr和Cys;Leu、Iie和Val;Glu和Asp;Lys和Arg;Phe、Tyr和Trp;和Gin、Asn、Glu、Asp和His。变体可以包含至少一种取代和/或至少一种添加,还可以存在至少一种缺失。变体还可包括一个或多个非天然存在的残基。例如,其可以在任何位置处(包括半胱氨酸的位置处)包括硒代半胱氨酸(例如,硒代-L-半胱氨酸)。许多其他“非天然”氨基酸取代基是本领域已知的,并且可以从商业来源获得。非天然存在的氨基酸的实例包括D-氨基酸、具有连接至半胱氨酸的硫原子的乙酰氨基甲基的氨基酸残基、聚乙二醇化的氨基酸和式NH2(CH2)nCOOH的ω氨基酸(其中n为2-6)、中性氨基酸、非极性氨基酸,诸如肌氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸和正亮氨酸。苯甘氨酸可以取代Trp、Tyr或Phe;瓜氨酸和蛋氨酸亚砜是中性、非极性的,半胱氨酸是酸性的,并且鸟氨酸是碱性的。脯氨酸可以被羟基脯氨酸取代,并且保留赋予脯氨酸的特性的构象。

[0071] “单链可变片段(scFv)”意指包含抗体重链和轻链可变区的蛋白质。scFv可以是包含可变重链、接头和可变轻链的融合蛋白。在一些方面中,接头可以是长度可以为约8至20个氨基酸的短而灵活的片段。例如,可以使用$(G4S)_n$(n=1、2、3或4)。

[0072] “片段抗原结合片段(Fab)”是结合至抗原的抗体的区域。Fab包含来自重链和轻链的恒定区和可变区。

[0073] “CDR”或互补决定区是散布在更保守的区域内的高变区,称为“框架区”(FR)。

[0074] 术语“单克隆抗体”(单克隆抗体)是指从基本同质的抗体群体中获得的抗体或类似抗体群体,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体,包括但不限于,单克隆抗体可以通过Kohler和Milstein首先描述的杂交瘤方法(Nature,256:495-497,1975)或通过重组DNA方法制得。

[0075] 术语“嵌合抗体”(或“嵌合免疫球蛋白”)是指包含与源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的重链和/或轻链的分子,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以及此类抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要其表现出所需的生物活性(Cabilly等人(1984),见下文;Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.81:6851)。

[0076] 术语“人源化抗体”是指含有来自非人类(例如,鼠)抗体以及人类抗体的序列的抗体形式。人源化抗体可包括来自相同或不同物种的保守氨基酸取代或非天然残基,这些不会显着改变其结合和/或生物活性。这类抗体是含有源自非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在大多数情况下,人源化抗体是人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自非人类物种(供体抗体)的CDR的残基置换,所述非人类物种诸如具有所需特性的小鼠、大鼠、骆驼、牛、山羊或兔。此外,人源化抗体可以包含既不在受体抗体中也不在导入的CDR或框架序列中发现的残基。进行这些修饰是以进一步改进和最大化抗体性能。因此,一般而言,人源化抗体可以包含全部或基本上全部的至少一个可变结构域(并且在一个方面中,两个可变结构域),其中全部或基本全部的高变环对应于非人类免疫球蛋白的高变环并且全部或基本上全部的FR区都是人类免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体任选地还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,或人类免疫球蛋白的恒定区的至少一部分(参见,例如,Cabilly等人,美国专利号4,816,567;Cabilly等人,欧洲专利号0,125,023B1;Boss等人,美国专利号4,816,397;Boss等人,欧洲专利号0,120,694B1;Neuberger,M.S.等人,WO 86/01533;Neuberger,M.S.等人,欧洲专利号0,194,276B1;Winter,美国专利号5,225,539;Winter,欧洲专利号0,239,400B1;Padlan,E.A.等人,欧洲专利申请号0,519,596A1;Queen等人(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第86卷:10029-10033)。

[0077] 如本文所用,术语“MIH”是指从杂交瘤克隆中克隆的抗体。“M1”是指杂交瘤单克隆1,并且“FT”是指可变重链。

[0078] 如本文所用,术语“MIM7K”是指从杂交瘤克隆M1和M7鉴定的可变轻链。

[0079] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术性和科学性术语具有与本公开方法和组合物所属领域中的技术人员通常所理解相同的含义。尽管在本发明方法和组合物的实践或测试中可使用与本文中所描述的那些方法和材料相似或相等的任何方法和材料,但特别有用的方法、装置和材料如所描述。本文中引述的公布及其中引述的材料在此特别地通过引用并入。本文中的任何内容均不得解释为承认本发明无权凭借在先发明而先于这个公开。不承认任何参考文献构成先前技术。参考文献的论述内容陈述了作者所主张的观点,并且申请人保留对所引用文件的准确性和相关性提出质疑的权利。应明确理解的是,虽然本文提到了许多公布,但这种引用并不构成承认这些文献中的任何一个构成本领域公知常识的一部分。

[0080] 各种细胞能够通过蛋白质连接蛋白形成的半通道和间隙连接相互通讯并与细胞外环境通讯。连接蛋白在全身普遍表达。六个连接蛋白组成一个半通道,并且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的质膜中的一组通道,其介导细胞间通讯。半通道是独立于间隙连接通道的实体。半通道允许细胞内隔室和细胞外环境之间的分子交换。

[0081] 骨细胞表达称为连接蛋白(Cx)43半通道的半通道。这些骨细胞半通道通常是关闭

的,并且当受到机械刺激时可以开放,这会导致各种因子释放到骨微环境中。通过半通道开放释放的因子可以介导可以减少肿瘤细胞迁移和骨转移的其他过程。

[0082] 本文公开了鉴定调节连接蛋白半通道的开放的试剂的方法。在一些方面中,调节可以意指刺激或增强一种或多种连接蛋白半通道的开放。在一些方面中,连接蛋白半通道可以是Cx 43半通道。在一些方面中,所述方法可以鉴定正调节(即,刺激或增强)连接蛋白半通道的开放的化合物或药物。其他实施方案涉及通过向诊断患有或具有骨肉瘤的患者施用开放连接蛋白43半通道或刺激或增强连接蛋白43半通道的开放的化合物来治疗骨肉瘤的方法。在一些方面中,患者患有原发性肿瘤。在一些方面中,开放Cx43半通道或刺激或增强Cx43半通道的开放的化合物可用于预防、抑制或减少向肺的转移。在一些方面中,开放Cx43通道或刺激或增强Cx43半通道的开放的化合物可用于治疗骨肉瘤。在一些方面中,结合至连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道开放的抗体对间隙通道偶联没有影响。

[0083] 当癌症从其起源的身体部位(例如,骨骼)扩散到身体的其他部位(例如,肺)并形成继发性肿瘤时,就会发生癌症转移。肺是患有骨肉瘤的患者中最常见的癌症转移部位之一。转移到肺部的癌症包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、骨癌和皮肤癌(例如,黑色素瘤)。可以在患有骨肉瘤的患者中鉴定出肺转移。肺转移(mets)与许多重要的临床和生活质量后果相关,诸如但不限于顽固性疼痛、恶心、头痛、呼吸急促、咯血、胸腔积液和运动能力受损。在许多情况下,癌症的全身存在也会使癌症无法治愈。

[0084] 正常骨骼由三种主要细胞类型组成:成骨成骨细胞、骨吸收破骨细胞和骨细胞。骨细胞占骨骼细胞的约95%,并且通过协调溶骨性和成骨性活性来维持骨重塑过程。当癌细胞侵入骨骼时,许多正常的骨骼功能都会受到影响。癌细胞与局部微环境相互作用,以通过骨破坏和血管化促进癌细胞存活。

[0085] 骨细胞连接蛋白(Cx)43半通道的开放及其释放的因子在癌症生长、迁移和转移中具有抑制作用,而半通道的失活则具有相反的作用。Cx43半通道介导细胞内和细胞外微环境之间的通讯。Cx43半通道大量存在于骨骼骨细胞中,并且骨细胞通过Cx43半通道释放的ATP对癌症骨转移发挥肿瘤抑制作用。因此,增强骨细胞中Cx43半通道的活化可能是保护骨骼组织免受癌细胞生长和定殖的重要策略。在一些方面中,本文所描述的抗体可减少或抑制骨肿瘤细胞生长,例如胫骨内肿瘤生长。

[0086] 骨细胞中的Cx43半通道已显示通过用阿仑膦酸盐(alendronate)(AD)治疗而开放,所述阿仑膦酸盐(AD)是一种有效且常用的双膦酸盐药物。双膦酸盐是一类已知用于治疗包括骨转移在内的许多骨病症的药物。Powles等人已经表明,双膦酸盐的施用与患有乳腺癌的患者的骨转移发生率的降低和死亡率的降低有关。AD与减少的肿瘤生长以及骨破坏和疼痛的减少有关。AD抑制破骨细胞活性并诱导骨细胞中Cx43半通道的开放(Plotkin等人,2002)。然而,AD施用伴随着多种严重的副作用。

[0087] 抗体

[0088] 本文公开了可以刺激或增强开放半通道,并且特别是Cx43半通道的抗体。在一些方面中,结合至连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道开放的抗体对间隙通道偶联没有影响。下面描述了鉴定和分离单克隆抗体的实例。

[0089] 如本文所用的术语“CDR”是指抗体可变结构域的互补决定区。Rabat等人(1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,United States Public

Health Service,National Institutes ofHealth,Bethesda)已经开发了对包括在CDR中的残基的系统鉴定。可变轻链(VL)CDR在本文中定义为包括位置27-32(CDR1)、50-56(CDR2)和91-97(CDR3)处的残基。可变重链(VH)CDR在本文中被定义为包括位置27-33(CDR1)、52-56(CDR2)和95-102(CDR3)处的残基。

[0090] 本文公开的CDR还可包括变体。通常,个别变体CDR之间的氨基酸同一性为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。因此,“变体CDR”是与本发明的亲本或参考CDR具有特定同一性并且共享生物学功能,包括但不限于亲本CDR的特异性和/或活性的至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。例如,“变体CDR”可以是与本发明的亲本或参考CDR相比含有1、2、3或4个氨基酸变化并且共享或改善了亲本CDR的生物学功能、特异性和/或活性的序列。

[0091] 在一些方面中,与亲本或参考CDR相比,本文公开的任何CDR序列可包括单一氨基酸变化。在一些方面中,与亲本或参考CDR相比,本文公开的任何CDR序列可包括至少两个氨基酸变化。在一些方面中,氨基酸变化可以是从半胱氨酸残基变为另一种氨基酸。在一些方面中,氨基酸变化可以是从甘氨酸残基变为另一种氨基酸。个别变体CDR之间的氨基酸同一性可以是至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。因此,“变体CDR”可以是与本发明的亲本CDR具有特定同一性并且共享生物学功能,包括但不限于亲本CDR的特异性和/或活性的至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。例如,亲本CDR序列可以是SEQ ID NO:19、20、21、49、50和/或51中的一个或多个。变体CDR序列可以与SEQ ID NO:19、20、21、49、50和/或51中的任一个至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。变体CDR序列也可以共享亲本CDR的特异性和/或活性的至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0092] 如本文所讨论,本文公开的任何抗体的氨基酸序列的微小变化被考虑为涵盖在本公开中,条件是氨基酸序列的变化与亲本序列保持至少75%,更优选至少80%、90%、95%,最优选99%序列同一性。在一些方面中,考虑了保守氨基酸置换。保守置换是发生在侧链相关的氨基酸家族中的那些置换。基因编码的氨基酸一般分为家族:(1)酸性=天冬氨酸、谷氨酸;(2)碱性=赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸;和(4)不带电荷的极性=甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。更优选的家族是:丝氨酸和苏氨酸是脂肪族羟基家族;天冬酰胺和谷氨酰胺是含酰胺的家族;丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸是脂肪族家族;以及苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸是芳香族家族。例如,可以合理地预期,亮氨酸被异亮氨酸或缬氨酸、天冬氨酸被谷氨酸、苏氨酸被丝氨酸单独置换或类似的氨基酸被结构相关的氨基酸置换不会对所得分子的结合或特性具有重大影响,特别是在置换不涉及框架位点内的氨基酸的情况下。通过测定多肽衍生物的比活性,可以很容易地确定氨基酸变化是否会产生功能性肽。测定是本领域普通技术人员已知的。

[0093] 在一些方面中,氨基酸取代可以是以下的那些氨基酸:(1)降低对蛋白水解的敏感性,(2)降低对氧化的敏感性,(3)改变形成蛋白质络合物的结合亲和力,(4)改变结合亲和

力,和(4)赋予或修改这类类似物的其他物理化学或功能性特性。在一些方面中,可以在重链、轻链或两者的非CDR序列中进行单个或多个氨基酸取代(优选为保守氨基酸取代)。在一些方面中,可以在重链、轻链或两者的一个或多个CDR序列中进行一个或多个氨基酸取代。

[0094] 已经开发了许多用于化学标记和增强抗体及其常见片段(包括Fab和F(ab')2片段)的特性的方法。先前已经实现了某些抗体二硫键的某种选择性还原,产生了可以在特定位点标记的抗体和抗体片段,从而增强了其的效用和特性。使用温和还原选择性还原F(ab')2片段中存在的两个铰链二硫键是有用的。在一些方面中,半胱氨酸和甲硫氨酸容易受快速氧化的影响,这可能负面地影响保护基团在合成和随后的肽纯化期间的裂解。在某些情况下,用于抗体生产的肽中的半胱氨酸残基可能影响抗体的亲和力,因为游离半胱氨酸在体内并不常见,并且因此可能无法被天然肽结构识别。在一些方面中,所公开的抗体及其片段包含这样的序列,其中位于CDR外部的半胱氨酸(例如,在重链、轻链或两者的非CDR序列中)被取代。在一些方面中,半胱氨酸可以被丝氨酸置换并且甲硫氨酸可以被正亮氨酸(Nle)置换。肽上或所公开抗体或其片段之一中的多个半胱氨酸可能易于形成二硫键,除非将还原剂(诸如二硫苏糖醇(DTT))添加至缓冲液中或半胱氨酸可被丝氨酸残基置换。

[0095] 虽然用于引入氨基酸序列变异的位点或区域是预先确定的,但突变本身不需要预先确定。例如,为了优化给定位点处突变的性能,可以在靶密码子或区域进行随机诱变,并且针对所需活性的最佳组合筛选表达的抗原结合蛋白CDR变体。在具有已知序列的DNA中的预定位点处进行取代突变的技术是众所周知的,例如M13引物诱变和PCR诱变。使用如本文所描述的抗原结合蛋白活性的测定来进行突变体的筛选。

[0096] 氨基酸取代通常是单个残基;插入通常将为大约从约一(1)至约二十(20)个氨基酸残基的数量级,尽管可以容许相当大的插入。缺失范围为从约一(1)至约二十(20)个氨基酸残基,但在某些情况下缺失可能更大。

[0097] 取代、缺失、插入或其任何组合可用于获得最终的衍生物或变体。这些变化是在少数氨基酸上进行的,以最小化分子的改变,特别是抗原结合蛋白的免疫原性和特异性。但是,在某些情况下可以容忍更大的变化。

[0098] 如本文所用的“Fab”或“Fab区”意指包含VH、CHI、VL和CL免疫球蛋白结构域的多肽。Fab可以单独指这个区域,或者在全长抗体、抗体片段或Fab融合蛋白或本文概述的任何其他抗体实施方案的上下文中指这个区域。

[0099] 如本文所用的“Fv”或“Fv片段”或“Fv区”意指包含单个抗体的VL和VH结构域的多肽。

[0100] 如本文所用,“框架”是指不包括定义为CDR的那些区域的抗体可变结构域的区域。每个抗体可变结构域框架可以进一步细分为由CDR分隔的连续区域(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0101] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保留与抗原(例如,半通道)特异性结合的能力的一个或多个抗体片段。已经表明,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来执行。包含在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括:(i)Fab片段,由VL/VK、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')2片段,包含在铰链区处通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)Fab'片段,其可以是具有部分铰链区的Fab(参见FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY(Paul编,第3版1993);(iv)Fd片段,其由VH和CH1结构域组成;(v)Fv片段,其由抗体的单臂的VL和VH结构域组成;(vi)dAb片段(Ward等人,

(1989)Nature341:544-546),其由VH结构域组成;(vii)分离的互补决定区(CDR);和(viii)纳米抗体,含有单个可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。

[0102] 术语“特异性结合”(或“免疫特异性结合”)并非旨在指示抗体与其预期靶标排他性地结合。相反,如果抗体对其预期靶标的亲和力比其对非靶分子的亲和力高约5倍,那么抗体“特异性结合”。适当地,不存在与非所需物质的显着交叉反应或交叉结合。例如,抗体对靶分子的亲和力将是其对非靶分子的亲和力的至少约5倍,诸如10倍,诸如25倍,尤其是50倍,且特别是100倍或更多倍。在一些实施方案中,抗体或其他结合剂与抗原之间的特异性结合意指至少$10^{6}M^{-1}$的结合亲和力。抗体可以例如以至少约$10^{7}M^{-1}$,诸如$10^{8}M^{-1}$至约$10^{9}M^{-1}$、约$10^{9}M^{-1}$至约$10^{10}M^{-1}$或约10-ˆM^{-1}至约$10^{11}M^{-1}$的亲和力结合。抗体可以例如以50nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、100pM或更小或更优选10pM或更小的EC50结合。在一些方面中,抗体可以约60μg/ml、59μg/ml、58μg/ml、57μg/ml、56μg/ml、55μg/ml、54μg/ml、53μg/ml、52μg/ml、51μg/ml、50μg/ml或更小的EC50结合。在一些方面中,抗体可以约50μg/ml、49μg/ml、48μg/ml、47μg/ml、46μg/ml、45μg/ml、44μg/ml、43μg/ml、42μg/ml、41μg/ml、40μg/ml或更小的EC50结合。在一些方面中,抗体可以约40μg/ml、39μg/ml、38μg/ml、37μg/ml、36μg/ml、35μg/ml、34μg/ml、33μg/ml、32μg/ml、31μg/ml、30μg/ml或更小的EC50结合。

[0103] 在一些方面中,本文所描述的抗体可以与其预期靶标特异性结合。在一些方面中,本文所描述的抗体没有异位结合(off site binding)。例如,本文所描述的抗体不结合或不分布至心脏、肝脏或脊髓。

[0104] 本文所描述的抗体可以是变体,包括但不限于片段(例如,四聚抗体的Fab片段或F(ab')2片段)、scFv或双抗体的片段,或凭借一个或多个氨基酸残基的添加和/或取代而不同的四聚抗体、scFv、双抗体或其片段的变体。抗体部分可以进一步工程化为例如双-双抗体(di-diabody)。

[0105] 如本领域公知的,某些类型的抗体片段可以通过“全长”抗体的酶促处理产生。用木瓜蛋白酶消化产生两个相同的Fab片段(各自具有单个抗原结合位点),和残留的Fc片段。Fab片段也含有轻链的恒定结构域和重链的Chi结构域。相比之下,胃蛋白酶消化产生具有两个抗原结合位点的F(ab')2片段并且仍然能够交联抗原。

[0106] Fab'片段与Fab片段的不同之处在于其在Chi结构域的C端处包括额外的残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸残基。恒定结构域的半胱氨酸残基带有一个游离的硫醇基团。F(ab')2抗体片段是由铰链区中的半胱氨酸残基连接的成对Fab'片段。抗体片段的其他化学偶联也是本领域已知的。

[0107] Fv区是含有由一个重链和一个轻链可变结构域组成的完整抗原识别和结合位点的最小片段。每个可变结构域的三个CDR相互作用以定义VH-VL二聚体表面上的抗原结合位点。总的来说,六个CDR赋予抗体抗原结合特异性。如本领域已知的,“单链”抗体或“scFv”片段是当抗体的VH和VL结构域包括在识别并结合抗原的单一多肽链中时形成的单链Fv变体。通常,单链抗体包括VH和VL结构域之间的多肽接头,其允许scFv形成用于抗原结合的所需三维结构(参见,例如,Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,113:269-315.1994)。

[0108] 在一些方面中,抗体可以是双抗体。双抗体是具有两个抗原结合位点的小抗体片段。每个片段包含连接至VL结构域的VH结构域。然而,由于结构域之间的接头太短而不允许

其在同一条链上配对,因此连接的Vh-Vl结构域被迫与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。双抗体更全面地描述于例如EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448,1993中。

[0109] 在一些方面中,考虑了结合至Cx43蛋白的至少一部分并刺激、促进或增强Cx43半通道的开放并刺激或增强信号传导并减少癌细胞生长、增殖和/或定殖的抗体或其片段。在一些方面中,考虑了结合至Cx43蛋白的至少一部分并刺激、促进或增强Cx43半通道的开放并刺激或增强信号传导并减少癌细胞生长、增殖和/或定殖并且对间隙连接偶联没有影响的抗体或其片段。在一些方面中,抗Cx43抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体或人源化抗体。因此,通过已知方式并且如本文所描述,可以产生对Cx43蛋白、一个或多个其相应表位或任何前述的缀合物具有特异性的多克隆或单克隆抗体、抗体片段和结合结构域和CDR(包括任何前述的工程化形式),无论此类抗原或表位是从天然来源分离的还是天然化合物的合成衍生物或变体。

[0110] 合适的抗体片段的实例包括但不限于:(i)Fab片段,其由VL、VH、CL和CH1结构域组成;(ii)“Fd”片段,其由VII和Cm结构域组成;(iii)“Fv”片段,其由单一抗体的VL和VH结构域组成;(iv)“dAb”片段,其由VH结构域组成;(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')2片段,一种包含两个连接的Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(“scFv”),其中VII结构域和VL结构域通过肽接头连接,所述肽接头允许两个结构域缔和以形成结合结构域;(viii)双特异性单链Fv二聚体(参见美国专利号5,091,513);(ix)通过基因融合构建的双抗体、多价体或多特异性片段(美国专利申请公开20050214860)。Fv、scFv或双抗体分子可以通过并入连接VH和VL结构域的二硫键来稳定。还可以制备包含接合至CH3结构域的scFv的微型抗体(Hu等人,1996)。

[0111] 还考虑了抗体样结合肽模拟物。Liu等人(2003)描述了“抗体样结合肽模拟物”(ABiP),其是作为精简抗体的肽,并且具有血清半衰期更长以及合成方法更简单的某些优点。

[0112] 动物可以接种抗原,诸如Cx43胞外结构域蛋白,以产生对Cx43蛋白具有特异性的抗体。通常,抗原与另一个分子结合或缀合以增强免疫反应。如本文所用,缀合物是与用于在动物中引发免疫反应的抗原结合的任何肽、多肽、蛋白质或非蛋白质的物质。在动物体内响应抗原接种而产生的抗体包含由产生B淋巴细胞的各种个别抗体制成的各种不同的分子(多克隆抗体)。多克隆抗体是抗体物种的混合群体,每个物种都可以识别同一抗原上的不同表位。鉴于动物体内多克隆抗体产生的正确条件,动物血清中的大多数抗体将识别动物已经免疫的抗原化合物上的集体表位。这种特异性通过亲和纯化进一步增强,以仅选择识别所关注的抗原或表位的那些抗体。

[0113] 单克隆抗体是抗体的单一物种,其中每个抗体分子识别相同的表位,因为产生抗体的细胞源自单个B淋巴细胞细胞系。产生单克隆抗体(MAb)的方法通常与用于制备多克隆抗体的方法相同。在一些方面中,啮齿动物(诸如小鼠和大鼠)用于产生单克隆抗体。在一些方面中,兔、绵羊或蛙细胞用于产生单克隆抗体。大鼠的使用是众所周知的并且可以提供某些优点。小鼠(例如,BALB/c小鼠)是常规使用的并且通常提供高百分比的稳定融合。

[0114] 杂交瘤技术涉及将来自先前用Cx43抗原免疫的小鼠的单个B淋巴细胞与永生性骨髓瘤细胞(通常是小鼠骨髓瘤)融合。这种技术提供了一种无限期繁殖单个产生抗体的细胞

的方法,使得可以产生无限量的具有相同抗原或表位特异性的结构上相同的抗体(单克隆抗体)。

[0115] 血浆B细胞可以从免疫兔的新鲜制备的兔外周血单核细胞中分离,并进一步选择用于Cx43结合细胞。在富集产生抗体的B细胞后,可以分离总RNA并合成cDNA。来自重链和轻链的抗体可变区的DNA序列可以被扩增,构建到噬菌体展示Fab表达载体中,并且转化到大肠杆菌中。Cx43特异性结合Fab可通过多轮富集淘选选出并进行测序。选定的Cx43结合命中可以在人类胚胎肾(HEK293)细胞(Invitrogen)中使用哺乳动物表达载体系统以兔和兔/人类嵌合形式表达为全长IgG,并且使用具有快速蛋白质液相色谱(FPLC)分离单元的蛋白质G树脂纯化。

[0116] 在一些方面中,抗体可以是嵌合抗体,例如包含来自移植到异源非人类、人类或人源化序列(例如框架和/或恒定结构域序列)的非人类供体的抗原结合序列的抗体。已经开发出用人源的类似结构域置换单克隆抗体的轻链和重链恒定结构域的方法,从而使外源抗体的可变区保持完整。或者,可以在针对人类免疫球蛋白基因转基因的小鼠中产生“完全人类”单克隆抗体。还开发了通过重组构建具有啮齿类动物(例如小鼠)和人类氨基酸序列的抗体可变结构域将单克隆抗体的可变结构域转化为更多人类形式的方法。在“人源化”单克隆抗体中,只有高变CDR源自小鼠单克隆抗体,并且框架和恒定区源自人类氨基酸序列(参见美国专利号5,091,513和6,881,557)。据认为,用在人类抗体的相应位置中发现的氨基酸序列置换啮齿动物特有的抗体中的氨基酸序列将降低治疗使用期间不良免疫反应的可能性。产生抗体的杂交瘤或其他细胞也可能发生基因突变或其他变化,这可能会或可能不会改变由杂交瘤产生的抗体的结合特异性。

[0117] 在各种动物物种中产生多克隆抗体以及产生各种类型的单克隆抗体的方法(包括人源化的、嵌合的和完全人类的)是本领域众所周知的并且是高度可预测的。例如,以下美国专利和专利申请提供了对这些方法的描述:美国专利申请号2004/0126828和2002/0172677;和美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,196,265;4,275,149;4,277,437;4,366,241;4,469,797;4,472,509;4,606,855;4,703,003;4,742,159;4,767,720;4,816,567;4,867,973;4,938,948;4,946,778;5,021,236;5,164,296;5,196,066;5,223,409;5,403,484;5,420,253 5,565,332;5,571,698;5,627,052;5,656,434;5,770,376;5,789,208;5,821,337;5,844,091;5,858,657;5,861,155;5,871,907;5,969,108;6,054,297;6,165,464;6,365,157;6,406,867;6,709,659;6,709,873;6,753,407;6,814,965;6,849,259;6,861,572;6,875,434;和6,891,024。本文和其中引用的所有专利、专利申请公布和其他公布在此通过引用并入本申请中。

[0118] 抗体可以从任何动物来源产生,包括鸟类和哺乳动物。优选地,抗体是绵羊、鼠类(例如,小鼠和大鼠)、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡。此外,更新的技术允许从人类组合抗体库中开发和筛选人类抗体。例如,噬菌体抗体表达技术允许在没有动物免疫的情况下产生特异性抗体,如美国专利号6,946,546中所描述,其通过引用并入本文。这些技术进一步描述于:Marks(1992);Stemmer(1994);Gram等人(1992);Barbas等人(1994);和Schier等人(1996)。

[0119] 完全可以预期,Cx43抗体将具有中和或抵消Cx43效应的能力,而不管动物物种、单克隆细胞系或其他抗体来源如何。某些动物物种可能不太适合产生治疗抗体,因为其更可

能由于补体系统通过抗体的“Fc”部分活化而引起过敏反应。然而,完整抗体可以被酶促消化成“Fc”(补体结合)片段,以及具有结合结构域或CDR的抗体片段。Fc部分的去除降低了抗原抗体片段引发不良免疫反应的可能性,并且因此,不具有Fc的抗体可能优先用于预防性或治疗性治疗。如本文所描述,抗体也可以构建为嵌合的或部分或完全人源的,以便减少或消除由于向动物施用已经在其他物种中产生的或具有来自其他物种的序列的抗体而导致的不利的免疫学后果。

[0120] 取代变体通常含有在蛋白质内的一个或多个位点处一种氨基酸与另一种氨基酸的交换,并且可以被设计成调节多肽的一种或多种特性,而具有或不具有其他功能或特性的损失。取代可以是保守的,即一种氨基酸被形状和电荷相似的一种氨基酸取代。保守取代是本领域众所周知的,包括例如:丙氨酸变为丝氨酸;精氨酸变为赖氨酸;天冬酰胺变为谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸变为谷氨酸;半胱氨酸变为丝氨酸;谷氨酰胺变为天冬酰胺;谷氨酸盐变为天冬氨酸盐;甘氨酸变为脯氨酸;组氨酸变为天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸变为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸变为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸变为精氨酸;甲硫氨酸变为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸变为酪氨酸、亮氨酸或蛋氨酸;丝氨酸变为苏氨酸;苏氨酸变为丝氨酸;色氨酸变为酪氨酸;酪氨酸变为色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸变为异亮氨酸或亮氨酸。或者,取代可以是非保守的,使得多肽的功能或活性受到影响。非保守变化通常涉及用化学性质不同的残基取代一个残基,例如用极性或带电荷的氨基酸取代非极性或不带电荷的氨基酸,反之亦然。

[0121] 蛋白质可以是重组的,也可以是体外合成的。或者,可以从细菌中分离出非重组或重组蛋白质。还考虑可以在组合物和方法中实施含有这种变体的细菌。因此,不需要分离蛋白质。

[0122] 考虑在组合物中每毫升含有约0.001mg与约10mg之间的总多肽、肽和/或蛋白质。因此,组合物中蛋白质的浓度可为约以下、至少约以下或至多约以下:0.001mg/ml、0.010mg/ml、0.050mg/ml、0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1.0mg/ml、1.5mg/ml、2.0mg/ml、2.5mg/ml、3.0mg/ml、3.5mg/ml、4.0mg/ml、4.5mg/ml、5.0mg/ml、5.5mg/ml、6.0mg/ml、6.5mg/ml、7.0mg/ml、7.5mg/ml、8.0mg/ml、8.5mg/ml、9.0mg/ml、9.5mg/ml、10.0mg/ml或更多(或其中可推导出的任何范围)。其中,约以下、至少约以下或至多约以下可以是结合Cx43的抗体:1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0123] 抗体或优选抗体的免疫学部分可以化学缀合至或表达为与其他蛋白质的融合蛋白。出于本说明书和所附权利要求书的目的,所有这些融合蛋白均包括在抗体或抗体的免疫学部分的定义中。

[0124] 本文描述了针对Cx43的抗体和抗体样分子、多肽和肽,其与至少一种药剂连接以

形成抗体缀合物或有效负荷。为了增加抗体分子作为诊断或治疗剂的功效,可以将抗体连接或共价结合或络合到至少一种所需分子或部分。这种分子或部分可以是但不限于至少一种效应分子或报道分子。效应分子包含具有所需活性,例如细胞毒活性的分子。已与抗体连接的效应分子的非限制性实例包括毒素、治疗酶、抗生素、放射性标记的核苷酸等。相比之下,将报道分子定义为可以使用测定检测到的任何部分。与抗体缀合的报道分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、发光分子、光亲和分子、有色粒子或配体,诸如生物素。

[0125] 本领域已知几种将抗体连接或缀合到其缀合物部分的方法。一些连接方法涉及使用金属螯合络合物,例如采用有机螯合剂,例如二乙烯三胺五乙酸酐(DTPA);乙烯三胺四乙酸;N-氯-对甲苯磺酰胺;和/或连接到抗体的四氯-3-6-二苯基甘脲-3。单克隆抗体也可以在偶联剂(诸如戊二醛或高碘酸盐)的存在下与酶反应。在这些偶联剂的存在下或通过与异硫氰酸酯反应来制备具有荧光素标记物的缀合物。

[0126] 在一些方面中,本文所描述的抗Cx43抗体可以包含重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:19的序列的互补决定区1(CDR1);包含SEQ ID NO:20的序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:21的序列的CDR3。表2显示了重链CDR的实例。

[0127] 在一些方面中,本文所描述的抗Cx43抗体可以包含轻链免疫球蛋白可变区,所述轻链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:49的序列的互补决定区1(CDR1);包含SEQ ID NO:50的序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:51的序列的CDR3。表2显示了轻链中的CDR的实例。

[0128] 在一些方面中,本文所描述的抗Cx43抗体可以包含重链免疫球蛋白可变区和轻链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:19的序列的互补决定区1(CDR1);包含SEQ ID NO:20的序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:21的序列的CDR3,所述轻链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:49的序列的互补决定区1(CDR1);包含SEQ ID NO:50的序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:51的序列的CDR3。

[0129] 在一些方面中,本文所描述的抗Cx43抗体可以包含可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:19、20或21中示出的序列具有至少90%同一性的序列(参见,表2)。在一些方面中,本文所描述的抗Cx43抗体包含可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:19、20或21中示出的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的序列。

[0130] 在一些方面中,本文所描述的抗Cx43抗体可以包含可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:49、50或51中示出的序列具有至少90%同一性的序列(参见,表2)。在一些方面中,本文所描述的抗Cx43抗体包含可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:49、50或51中示出的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的序列。

[0131] 本文公开了编码包含SEQ ID NO:52的序列的M1H的核酸序列。本文公开了编码包含SEQ ID NO:57的序列的M1M7K的核酸序列

[0132] 本文公开了编码包含可变重链的M1H的核酸序列,所述可变重链包含与SEQ ID NO:52中示出的序列具有至少90%同一性的序列(参见,表3)。在一些方面中,M1H包含可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:52中示出的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的序列。

[0133] 本文公开了编码包含可变轻链的M1M7K的核酸序列,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:57中示出的序列具有至少90%同一性的序列(参见,表3)。在一些方面中,M1M7K包含可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:57中示出的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的序列。

[0134] 本文公开了编码包含重链免疫球蛋白可变区的M1H区的核酸序列,所述重链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:16的序列的CDR1;包含SEQ ID NO:17的序列的CDR2;包含SEQ ID NO:18的序列的CDR3。

[0135] 本文公开了编码包含轻链免疫球蛋白可变区的M1M7K区的核酸序列,所述可变区轻链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:46的序列的CDR1;包含SEQ ID NO:47的序列的CDR2;包含SEQ ID NO:48的序列的CDR3。

[0136] 本文公开了编码包含重链免疫球蛋白可变区和轻链免疫球蛋白可变区的抗Cx43半通道抗体的核酸序列,所述重链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:16的序列的CDR1;包含SEQ ID NO:17的序列的CDR2;包含SEQ ID NO:18的序列的CDR3,所述轻链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:46的序列的CDR1;包含SEQ ID NO:47的序列的CDR2;包含SEQ ID NO:48的序列的CDR3。

[0137] 本文公开了结合人类Cx43的抗体或其片段。在一些方面中,抗体或其片段包含可变重链,所述可变重链包含与表2或4中提供的可变重链氨基酸序列中的一个具有至少90%同一性的序列。在一些方面中,抗体或其片段包含可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:58中示出的序列具有至少90%同一性的序列。在一些方面中,抗体或其片段包含可变重链,所述可变重链包含SEQ ID NO:58中示出的序列。

[0138] 本文公开了结合人类Cx43的抗体或其片段。在一些方面中,抗体或其片段包含可变轻链,所述可变轻链包含与表2或4中提供的可变轻链氨基酸序列中的一个具有至少90%同一性的序列。在一些方面中,抗体或其片段包含可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:63中示出的序列具有至少90%同一性的序列。在一些方面中,抗体或其片段包含可变轻链,所述可变轻链包含SEQ ID NO:63中示出的序列。

[0139] 本文公开了结合人类Cx-43半通道的抗体或其片段。在一些方面中,抗体或其片段包含:可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:58中示出的序列具有至少90%同一性的序列;和可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:63中示出的序列具有至少90%同一性的序列。在一些方面中,抗体包含:可变重链,所述可变重链包含SEQ IDNO:58中示出的序列;和可变轻链,所述可变轻链包含SEQ ID NO:63中示出的序列。

[0140] 在一些方面中,抗体或其片段包含M1H区。在一些方面中,M1H区包含重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:19的序列的CDR1;包含SEQ ID NO:20的序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:21的序列的CDR3。

[0141] 在一些方面中,抗体或其片段包含M1M7K区。在一些方面中,M1M7K区包含轻链免疫球蛋白可变区,所述轻链免疫球蛋白可变区包含:包含SEQ ID NO:49的序列的CDR1;包含50的序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:51的序列的CDR3。

[0142] 在一些情况下,所公开的抗体或其片段还包含标签序列。

[0143] 本文公开了编码所公开的抗体或其片段的核酸序列。例如,公开了包含可变重链的核酸序列,所述可变重链包含与SEQ ID NO:52中示出的序列具有至少90%同一性的序

列。本文公开了编码所公开的抗体或其片段的核酸序列。例如,本文公开了包含可变重链的核酸序列,所述可变重链包含SEQ ID NO:52中示出的序列。本文还公开了包含可变轻链的核酸序列,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:57中示出的序列具有至少90%同一性的序列。还公开了包含可变轻链的核酸序列,所述可变轻链包含SEQ ID NO:57中示出的序列。

[0144] 本文公开了包含以下的核酸序列:可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:52中示出的序列具有至少90%同一性的序列;和可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:57中示出的序列具有至少90%同一性的序列。公开了包含以下的核酸序列:可变重链,所述可变重链包含SEQ ID NO:52中示出的序列;和可变轻链,所述可变轻链包含SEQ ID NO:57中示出的序列。

[0145] 本文公开了能够编码包含可变重链的单链可变片段的核酸序列,所述可变重链包含与SEQ ID NO:52中示出的序列具有至少90%同一性的序列。

[0146] 公开了能够编码包含可变轻链的单链可变片段的核酸序列,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:57中示出的序列具有至少90%同一性的序列。

[0147] 公开了能够编码包含以下的单链可变片段的核酸序列:可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:58中示出的序列具有至少90%同一性的序列;和可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:63中示出的序列具有至少90%同一性的序列。

[0148] 在一些情况下,所公开的抗体或其片段可以是双特异性的。例如,抗体或其片段可以包含:包含SEQ ID NO:58的重链和轻链的第一Fab区和包含SEQ ID NO:63的重链和轻链的第二Fab区,其中第一和第二Fab区可以不同。

[0149] 在一些情况下,双特异性抗体可以是三功能的。

[0150] 在一些情况下,所公开的抗体或其片段可以是小鼠的、人类的、人源化的、嵌合的或其组合。

[0151] 在一些情况下,所公开的抗体或其片段是单克隆的。

[0152] 方法

[0153] 本文公开了治疗或预防受试者的骨肉瘤的方法。方法可以包括向受试者施用治疗有效量的抗连接蛋白43抗体或其片段。在一些方面中,抗体或其片段可以包含可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:58中示出的序列具有至少90%同一性的序列。在一些方面中,抗体或其片段可以包含可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:63中示出的序列具有至少90%同一性的序列。在一些方面中,抗体或其片段可以包含:可变重链,所述可变重链包含与SEQ ID NO:58中列出的序列具有至少90%同一性的序列;和可变轻链,所述可变轻链包含与SEQ ID NO:63中示出的序列具有至少90%同一性的序列。在一些方面中,所述方法可以延长患有骨肉瘤的受试者的寿命。在一些方面中,所述方法可以减少或抑制或防止骨肿瘤细胞生长,例如胫骨内肿瘤生长。在一些方面中,所述方法可以减少或抑制或防止胫骨内肿瘤生长。在一些方面中,所述方法可以增加、增强或促进或更多细胞中或恶性肿瘤中的ATP释放。在一些方面中,所述方法可以减少、抑制或防止骨肉瘤细胞迁移。

[0154] 在一些方面中,抗体或其片段可以包含:重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含:第一互补决定区1,其包含与SEQ ID NO:19具有至少60%同一性的序列;第二互补决定区2,其包含与SEQ ID NO:20具有至少60%同一性的序列;和第三互补决定区3,其包含与SEQ ID NO:21具有至少60%同一性的序列。在一些方面中,抗体或其片段可以

包含:轻链免疫球蛋白可变区,所述轻链免疫球蛋白可变区包含:第一互补决定区1,其包含与SEQ ID NO:49具有至少60%同一性的序列;第二互补决定区2,其包含与SEQ ID NO:50具有至少60%同一性的序列;和第三互补决定区3,其包含与SEQ ID NO:51具有至少60%同一性的序列。

[0155] 在一些方面中,抗体或其片段可以包含:重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含:第一互补决定区1,其包含与SEQ ID NO:19相比具有单一氨基酸变化的序列;第二互补决定区2,其包含与SEQ ID NO:20相比具有单一氨基酸变化的序列;和第三互补决定区3,其包含与SEQ ID NO:21相比具有单一氨基酸变化的序列。在一些方面中,抗体或其片段可以包含:轻链免疫球蛋白可变决定区,所述轻链免疫球蛋白可变决定区包含:第一互补决定区1,其包含与SEQ ID NO:49相比具有单一氨基酸变化的序列;第二互补决定区2,其包含与SEQ ID NO:50相比具有单一氨基酸变化的序列;和第三互补决定区3,其包含与SEQ ID NO:51相比具有单一氨基酸变化的序列。

[0156] 在一些方面中,抗体或其片段可以包含重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含:a)包含SEQ ID NO:19的序列的互补决定区1(CDR1)或其变体;b)包含SEQ ID NO:20的序列的互补决定区2(CDR2)或其变体;和/或c)包含SEQ ID NO:21的序列的互补决定区(CDR3)或其变体。在一些方面中,与亲本CDR相比,重链CDR1、CDR2或CDR3中的任一个可以包含至少一个氨基酸取代。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是半胱氨酸残基变为另一种氨基酸。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是甘氨酸残基变为另一种氨基酸。

[0157] 在一些方面中,抗体或其片段可以包含轻链免疫球蛋白可变区,所述轻链免疫球蛋白可变区包含:a)包含SEQ ID NO:49的序列的互补决定区1(CDR1)或其变体;b)包含SEQ ID NO:50的序列的互补决定区2(CDR2)或其变体;和/或c)包含SEQ ID NO:51的序列的互补决定区3(CDR3)或其变体。在一些方面中,与亲本CDR相比,轻链CDR1、CDR2或CDR3中的任一个可以包含至少一个氨基酸取代。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是半胱氨酸残基变为另一种氨基酸。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是甘氨酸残基变为另一种氨基酸。

[0158] 在一些方面中,抗体或其片段可以包含重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含:互补决定区1(CDR1),其包含与SEQ ID NO:19中示出的序列具有至少60%同一性的序列;互补决定区2(CDR2),其包含与SEQ ID NO:20中示出的序列具有至少60%同一性的序列;和/或互补决定区3(CDR3),其包含与SEQ ID NO:21中示出的序列具有至少60%同一性的序列。在一些方面中,与亲本CDR相比,轻链CDR1、CDR2或CDR3中的任一个可以包含至少一个氨基酸取代。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是半胱氨酸残基变为另一种氨基酸。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是甘氨酸残基变为另一种氨基酸。

[0159] 在一些方面中,抗体或其片段可以包含轻链免疫球蛋白可变区,所述轻链免疫球蛋白可变区包含:互补决定区1(CDR1),其包含与SEQ ID NO:49中示出的序列具有至少60%同一性的序列;互补决定区2 (CDR2),其包含与 SEQ ID NO: 50中示出的序列具有至少60%同一性的序列;和/或互补决定区3(CDR3),其包含与SEQ ID NO:51中示出的序列具有至少60%同一性的序列。在一些方面中,与亲本CDR相比,轻链CDR1、CDR2或CDR3中的任一个可以包含至少一个氨基酸取代。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是半胱氨酸残基

变为另一种氨基酸。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是甘氨酸残基变为另一种氨基酸。

[0160] 在一些方面中,抗体或其片段可以包含重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含:互补决定区1(CDR1),其包含与SEQ ID NO:19中示出的序列相比具有单一氨基酸变化的序列;互补决定区2(CDR2),其包含与SEQ ID NO:20中示出的序列相比具有单一氨基酸变化的序列;和/或互补决定区3(CDR3),其包含与SEQ ID NO:21中示出的序列相比具有单一氨基酸变化的序列。在一些方面中,与亲本CDR相比,轻链CDR1、CDR2或CDR3中的任一个可以包含至少一个氨基酸取代。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是半胱氨酸残基变为另一种氨基酸。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是甘氨酸残基变为另一种氨基酸。

[0161] 在一些方面中,抗体或其片段可以包含轻链免疫球蛋白可变区,所述轻链免疫球蛋白可变区包含:互补决定区1(CDR1),其包含与SEQ ID NO:49中示出的序列相比具有单一氨基酸变化的序列;互补决定区2(CDR2),其包含与SEQ ID NO:50中示出的序列相比具有单一氨基酸变化的序列;和/或互补决定区3(CDR3),其包含与SEQ ID NO:51中示出的序列相比具有单一氨基酸变化的序列。在一些方面中,与亲本CDR相比,轻链CDR1、CDR2或CDR3中的任一个可以包含至少一个氨基酸取代。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是半胱氨酸残基变为另一种氨基酸。在一些方面中,至少一个氨基酸取代可以是甘氨酸残基变为另一种氨基酸。

[0162] 在一些方面中,本文公开的任何方法可以进一步定义为用于治疗或预防患有骨肉瘤的受试者的肺或脑转移的方法。在一些方面中,转移可以在受试者的乳腺、其他骨骼和/或其他器官中。

[0163] 在一些方面中,本文公开的任何方法可以包括向受试者施用有效量的编码抗体或其片段的表达载体。在一些方面中,抗体或其片段可以药学上可接受的组合物施用。在一些方面中,所述药物组合物可以被冻干。在一些方面中,抗体或其片段可以全身施用。在一些方面中,抗体或其片段可以静脉内、皮内、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下或局部施用。在一些方面中,抗体或其片段可以是人源化抗体或其人源化片段。在一些方面中,抗体可以是IgG、IgM、IgA、IgD、IgE或基因修饰的IgG类抗体,其包含对应于SEQ ID NO:19的第一VH CDR、对应于SEQ ID NO:20的第二VH CDR、对应于SEQ ID NO:21的第三VH CDR、对应于SEQ ID NO:49的第一VL CDR、对应于SEQ ID NO:50的第二VL CDR和对应于SEQ ID NO:51的第三VL CDR。在一些方面中,抗体可以是IgG类抗体,其中IgG类抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4类抗体。

[0164] 在一些方面中,本文公开的任何方法还可以包括向受试者施用至少第二抗癌疗法。在一些方面中,第二抗癌疗法可以是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

[0165] 在一些方面中,在本文公开的任何方法中,抗体或其片段可以结合至Cx43半通道。在一些方面中,在本文公开的任何方法中,抗体或其片段可以刺激Cx43半通道的开放。在一些方面中,在本文公开的任何方法中,抗体或其片段可以刺激Cx43半通道的开放并且对间隙连接偶联没有影响。

[0166] 在一些方面中,抗体或其片段还可以包含标签序列。

[0167] 在一些方面中,抗体或其片段可以是Fab片段、Fab'片段或F(ab')2片段。

[0168] 疾病治疗

[0169] 本文公开了可用于治疗骨肉瘤或预防或减少患有骨肉瘤的受试者的肺转移和/或肝、脑或乳腺转移的抗体和其生物片段。可以通过任何合适的药物或治疗剂来增强Cx43半通道的信号传导,以防止癌细胞增殖、生长和/或定殖。在一些方面中,药物或治疗剂可以是抗Cx43抗体。

[0170] 本文所描述的药物组合物可以足以延迟、减少或优选地防止临床疾病发作的量施用于受试者(例如,人类患者)。因此,在一些方面中,患者可以是人类患者。在治疗应用中,组合物可以足以至少部分地改善迹象或症状或抑制(优选地阻止)病状的症状、其并发症和后果的进展的量施用于已经患有或被诊断患有骨肉瘤的受试者(例如,人类患者)。将足够实现此的量定义为"治疗有效量"。组合物(例如,药物组合物)的治疗有效量可以是实现治愈的量,但是所述结果只是可以实现的几个结果中的一个。如所指出,治疗有效量包括提供治疗的量,其中癌症的发作或进展被延迟、阻碍或预防,或癌症或癌症的症状得到改善或其频率可以降低。症状中的一种或多种可能不太严重。可以加快被治疗的个体中的恢复。例如,癌症的治疗可涉及例如肿瘤大小的减小、肿瘤侵袭性的降低、癌症生长速率的降低或转移的预防。癌症的治疗还可以指延长患有癌症的受试者的生存期。在一些方面中,本文所描述的抗体可以延长患有癌症的受试者的寿命。在一些方面中,本文所描述的抗体可减少或抑制骨肿瘤细胞生长,例如胫骨内肿瘤生长。

[0171] 在一些方面中,癌症可以是原发性或继发性肿瘤。在一些方面中,癌症可以是转移性肿瘤。在其他方面中,原发性或继发性肿瘤在患者的骨骼内。在其他方面中,癌症已经转移。在一些方面中,癌症可能起源于骨骼并转移到一个或多个以下部位:乳腺、肺、脑、肝或其他骨骼。

[0172] 本文公开了治疗患有癌症的患者的方法。癌症可以是骨肉瘤。在一些方面中,癌症可以是从骨癌转移的乳腺癌、肺癌、脑癌或肝癌。在一些方面中,所述受试者在施用步骤之前已被诊断患有癌症。在一些方面中,癌症可以是骨肉瘤。

[0173] 可配制本文所描述的组合物以包括治疗有效量的本文公开的抗体。在一些方面中,本文公开的抗体可以包含在药物制剂中。在一些方面中,药物制剂可以是单位剂量制剂。

[0174] 施加至哺乳动物(例如,人类)的本文公开的方法中使用的任何抗体的治疗有效量或剂量可由本领域普通技术人员在考虑年龄、体重、性别、受试者症状的严重程度和选择的特定组合物或施用途径、施用的其他药物以及主治医师的判断中的个体差异来确定。可以预期所需剂量中的变化。剂量水平的变化可以使用标准经验路线进行优化来进行调整。施用于患者的药物组合物的特定剂量将取决于多种考虑因素(例如,癌症症状的严重程度)、受试者的年龄和身体特征以及本领域中的普通技术人员已知的其他考虑因素。可以使用本领域中的普通技术人员已知的临床方法确定剂量。抗半通道抗体的治疗有效剂量可引起一种或多种疾病症状的严重程度降低、无疾病症状期的频率和持续时间增加,或预防由于疾病折磨所致的损伤或残疾。治疗有效量的治疗化合物或抗体可以减少肿瘤转移,或以其他方式改善受试者的症状。

[0175] 用本文提供的任何组合物治疗的持续时间可以是从短至一天到长至宿主寿命(例

如,许多年)的任何时间长度。例如,组合物可以一周一次(例如,持续4周至许多个月或数年);一月一次(例如,持续三个月至十二个月或持续许多年);或一年一次(持续5年、10年或更长时间)施用。还应注意,治疗频率可以是可变的。例如,本发明的组合物可以每天、每周、每月或每年一次(或两次、三次等)施用。

[0176] 可以将如本文公开的总有效量的抗体或组合物作为单剂量,或作为推注或通过在相对较短的时段内输注施用于受试者,或可以使用其中多个剂量在更长的时段内施用的分级治疗方案施用。或者,足以维持血液中治疗有效浓度的连续静脉内输注也在本公开的范围内。

[0177] 本文所描述的抗体或组合物可以与其他治疗方式联合施用于需要治疗的受试者。本发明化合物可以在用其他药剂或方案治疗之前、同时或之后给予。例如,本文公开的抗体可以单独施用或与用于治疗癌症的标准疗法联合施用。在一些方面中,本文所描述的任何抗体或组合物可以与化学疗法一起施用或使用。

[0178] 药物组合物

[0179] 本文公开了组合物,例如药物组合物,其包含与药学上可接受的载体一起配制的单克隆抗体或其抗原结合部分的一种或组合。这些组合物可包括(例如,两种或更多种不同的)本文所描述的抗体或免疫缀合物的一种或组合。例如,本发明的药物组合物可以包含结合靶抗原上的不同表位或具有互补活性的抗体的组合。

[0180] 本发明的药物组合物也可以作为联合疗法,即与其他药剂联合施用。例如,联合疗法可以包括与至少一种其他抗癌剂联合的抗半通道抗体。

[0181] 如本文所用,短语“药学上可接受的载体”包括生理学上兼容的任何溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,载体可以适用于静脉内、肌肉内、皮下或肠胃外施用(例如,通过注射或输注)。取决于施用途径,活性化合物(即抗体或免疫缀合物)可以包被在一种材料中,以保护化合物免受酸和其他可能使化合物失活的自然条件的作用。

[0182] 本发明的药物组合物中可以采用的适合水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和其适合混合物、植物油(诸如橄榄油),以及可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。可以例如通过使用包衣材料(诸如卵磷脂)、通过维持所需的粒度(在分散液的情况下)以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0183] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。用于药学活性物质的这种介质和药剂的用途是本领域中熟知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不兼容,考虑将其用于本发明的药物组合物中。补充性有效化合物也可并入组合物中。

[0184] 治疗组合物在制造和储存的条件下通常必须是无菌的和稳定的。组合物可被配制为适于高药物浓度的溶液、微乳液、脂质体或其他有序结构。载体可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其适合的混合物。可以例如通过使用包衣(诸如卵磷脂)、通过维持所需的粒度(在分散液的情况下)以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在很多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,诸如糖类、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸盐和明胶)引起可注射组合物的延长吸收。

[0185] 可通过将活性化合物以要求的量与本文列举的一种成分或成分组合一起并入适合的溶剂中,根据需要,随后进行灭菌微滤来制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性化合物并入含有基础分散介质和来自本文列举的那些成分的所需其他成分来制备分散液。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是产生活性成分外加来自其先前无菌过滤溶液的任何额外所需成分的粉末的真空干燥和冷冻干燥(冻干)。

[0186] 可与载体材料组合以产生单剂型的活性成分的量将根据所治疗的受试者和特定施用模式而变化。可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将通常是产生治疗效果的组合物的量。通常,按照100%计,这个量将范围介于约0.01%至约99%的活性成分,优选地约0.1%至约70%,最优选地约1%至约30%的活性成分以及药学上可接受的载体。

[0187] 调整剂量方案以提供所需的反应(例如,治疗反应)。例如,可以施用单次推注,几个分次剂量可以随时间施用或剂量可以按比例减少或增加,如由治疗情况的紧急程度所指示。为便于施用和剂量均匀,配制剂量单位形式的肠胃外组合物是特别有利的。本文使用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位;每个单位含有经计算可产生所需治疗效果的与所需药物载体结合的预定量的活性化合物。本发明剂量单位形式的规格由以下决定且直接取决于以下:(a)活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果,和(b)用于治疗个体敏感性的这种活性化合物的配制技术中固有的局限性。

[0188] 对于抗体的施用,剂量范围介于为0.0001至100mg/kg,更通常为0.01至5mg/kg、5mg/kg至10mg/kg、10mg/kg至15mg/kg、15mg/kg至20mg/kg或20mg/kg至25mg/kg宿主体重。在一些方面中,剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。在一些方面中,剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重、10mg/kg体重、15mg/kg体重、20mg/kg体重、25mg/kg体重或30mg/kg体重或在1-30mg/kg的范围内。在一些方面中,剂量可以是约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25mg/kg体重。在一些方面中,剂量可以是5mg/kg体重。在一些方面中,剂量可以是15mg/kg体重。在一些方面中,剂量可以是20mg/kg体重。在一些方面中,剂量可以是25mg/kg体重。示例性的治疗方案需要每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、一个月一次、每三个月一次或每三至六个月一次施用。本发明的抗半通道抗体的优选施用方案包括通过静脉内施用1mg/kg体重或3mg/kg体重,其中使用以下施用方案中的一种给予抗体:(i)每四周,持续六个剂量,随后是每三个月;(ii)每三周;(iii)3mg/kg体重一次,随后是每三周1mg/kg体重。

[0189] 在一些方法中,同时施用两种或多种具有不同结合特异性的单克隆抗体,在这种情况下,施用的每种抗体的剂量在所指示的范围内。抗体通常在多种情况下施用。单次剂量之间的间隔可以是例如每周、每月、每三个月或每年。间隔也可以是不规律的,如测量患者内针对靶抗原的抗体的血液水平所指示。在一些方法中,调整剂量以实现约1-1000μg/ml的血浆抗体浓度,在一些方法中约25-300pg/ml。

[0190] 本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以变化,以便获得有效实现特定患者、组合物和施用模式的所需治疗反应的活性成分的量,而对患者没有毒性。所选剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所采用的本发明特定组合物的活性;施用途径;施用时间;所采用的特定化合物的排泄速率;治疗的持续时间;与所采用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料;所治疗的患者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状况和

既往病史;以及医学领域中众所周知的类似因素。

[0191] 本发明的组合物可以使用本领域已知的多种方法中的一种或多种通过一种或多种施用途径来施用。如本领域技术人员将理解,施用途径和/或模式将根据所需结果而变化。本发明抗体的优选施用途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所用的短语"肠胃外施用"意指肠内和局部施用以外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内注射和输注。

[0192] 联合治疗。本文所描述的组合物和方法可涉及针对Cx43的抗体或其抗体片段,以刺激Cx43半通道的开放,以例如保护骨骼组织免受癌细胞生长和定殖,以及第二种或额外的疗法。这种疗法可用于治疗与Cx43介导的细胞增殖相关的任何疾病。例如,疾病可以是骨肉瘤、肺转移、肝转移、脑转移和/或乳腺转移。

[0193] 包括联合疗法的方法和组合物增强了另一种抗癌或抗过度增殖疗法的治疗或保护效果,和/或增加了其治疗效果。治疗和预防方法和组合物可以有效实现所需效果(例如杀死癌细胞和/或抑制细胞过度增殖)的组合量提供。这个过程可能涉及使细胞与抗体或抗体片段以及第二疗法接触。组织、肿瘤或细胞可以与包含一种或多种药剂(即,抗体或抗体片段或抗癌剂)的一种或多种组合物或药理学制剂接触,或通过使组织、肿瘤、和/或细胞与两种或更多种不同组合物或制剂接触,其中一种组合物提供1)抗体或抗体片段,2)抗癌剂,或3)抗体或抗体片段和抗癌剂两者。此外,考虑这种联合疗法可以与化学疗法、放射疗法、手术疗法或免疫疗法结合使用。

[0194] 当应用于细胞时,术语"接触"和"暴露"在本文中用于描述将治疗构建体和化学治疗剂或放射治疗剂递送至靶细胞或与靶细胞直接并置的过程。例如,为了实现细胞杀伤,将两种药剂以有效杀死细胞或防止其分裂的组合量递送至细胞。

[0195] 抗体和其生物片段可以在抗癌治疗之前、期间、之后或以各种组合施用。施用间隔可以范围介于同时到几分钟到几天到几周。在抗体或抗体片段与抗癌剂分开提供给患者的方面中,通常将确保每次递送时间之间有相当长的时段没有过期,使得这两种化合物将仍然能够对患者产生有利的联合作用。在这种情况下,考虑可以在彼此相隔约12至24或72小时内,更具体地,彼此相隔约6-12小时内向患者提供抗体疗法和抗癌疗法。在某些情况下,可能需要显著延长治疗时段,其中在各自施用之间间隔几天(2、3、4、5、6或7天)至几周(1、2、3、4、5、6、7或8周)。

[0196] 在一些方面,一个疗程可以持续1-90天或更长时间(这个范围包括中间天数)。考虑可以在第1天至第90天(这个范围包括中间天数)的任何一天或其任何组合给予一种药剂,并且在第1天至第90天(这个范围包括中间天数)的任何一天或其任何组合给予另一种药剂。在一天(24小时时期)内,可以给予患者一次或多次药剂施用。此外,在一个疗程后,考虑可以存在不施用抗癌治疗的时段。这个时段可能持续1-7天,和/或1-5周,和/或1-12个月或更长时间(这个范围包括中间天数),这取决于患者的病状,诸如其的预后、强度、健康等。预期将根据需要重复治疗周期。

[0197] 可以采用各种组合。对于下文的实例,抗体疗法是"A",并且抗癌疗法是"B":

[0198] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/BB/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/AB/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A。

[0199] 考虑到药剂的毒性(如果有的话),向患者施用本文公开的任何化合物或疗法将遵循施用这些化合物的一般方案。因此,在一些方面中,可以存在监测可归因于联合疗法的毒性的步骤。

[0200] 化学疗法。可以使用多种化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物来治疗癌症。“化学治疗剂”用于表示可以在癌症治疗中施用的化合物或组合物。这些药剂或药物根据其在细胞内的活动模式进行分类,例如,其是否以及在哪个阶段影响细胞周期。或者,可基于其直接交联DNA、嵌入DNA或通过影响核酸合成诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来表征试剂。

[0201] 化学治疗剂的实例包括烷化剂,诸如噻替哌(thiotepa)和环磷酰胺(cyclosphosphamide);磺酸烷基酯(alkyl sulfonate),诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,诸如佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙撑亚胺(ethylenimine)和甲基蜜胺(methylamelamine),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(trietylenephosphoramide)、三乙撑硫代磷酰胺(triethiylenethiophosphoramide)和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);番荔枝内酯(acetogenin)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物拓扑替康(topotecan));苔藓抑素(bryostatin);卡利司他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);隐藻素(cryptophycins)(特别是隐藻素1和隐藻素8);多拉司他汀(dolastatin);多卡霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);沙考地汀(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥,诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlomaphazine)、氯磷酰胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)和尿嘧啶氮芥(uracil mustard);硝基脲类,诸如诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimnustine);抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如,加利车霉素(calicheamicin),尤其是加利车霉素γ1I和加利车霉素ωI1);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;双磷酸盐类,诸如氯膦酸盐(clodronate);埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团(neocarzinostatin chromophore)和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团(chromoprotein enediyne antiobiotic chromophore)、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉比星(carabicin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(doxorubicin)(包括吗啉代-阿霉素、氰基吗啉代-阿霉素、2-吡咯啉-阿霉素和脱氧阿霉素)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)(诸如丝裂霉素C)、霉

酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、波非罗霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链霉黑素(streptonigrin)、链脲菌素(streptozocin)、杀结核菌(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他汀(zinostatin)和佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,诸如甲氨蝶呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸(denopterin)、蝶罗呤(pteropterin)和三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)和硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)和氟尿苷(floxuridine);雄激素,诸如卡普睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)和睾内酯(estolactone);抗肾上腺物质,诸如米托坦(mitotane)和曲洛司坦;叶酸补充物,诸如亚乙酸;醋葡醛内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吖啶(amsacrine);阿莫司汀(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺(demecolcine);亚丝醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃坡霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);美登素类化合物,诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍腙(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidanmol);尼曲吖啶(nitraerine);喷司他汀(pentostatin);蛋氨氮芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼;甲基苄肼;PSK多糖复合物;雷佐生(razoxane);利索新(rhizoxin);西佐喃(sizofiran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯毒素(trichothecene)(尤其是T-2毒素、疣孢霉素A(verracurin A)、漆斑菌素A(roridin A)和蛇形菌毒素(anguidine));氨基甲酸乙酯(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);甲托辛(gacytosine);阿拉伯糖(arabinoside)("Ara-C");环磷酰胺;紫杉烷(taxoid),例如,紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛吉西他滨(docetaxel gemcitabine);6-硫代鸟嘌呤;巯嘌呤;铂配位络合物,诸如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin);长春花碱(vinblastine);铂;依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱(vincristine);长春瑞滨(vinorelbine);诺消灵(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素(daunomycin);氨喋呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);伊立替康(irinotecan)(例如,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄醇,诸如视黄酸(retinoic acid);卡培他滨(capecitabine);卡铂、甲基苄肼、普卡霉素(plicomycin)、吉西他滨(gemcitabien)、诺维本(navelbine)、法呢基蛋白质转移酶抑制剂、反铂(transplatinum)和本文中任一种

的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0202] 放射疗法。导致DNA损伤并已被广泛使用的其他因素包括通常称为γ射线、X射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的定向递送。还考虑了其他形式的DNA损伤因素,诸如微波、质子束照射(美国专利5,760,395和4,870,287)和UV照射。很可能所有这些因素都会影响对DNA、DNA前体、DNA的复制和修复以及染色体的组装和维护的广泛损伤。X射线的剂量范围从长期(每周3至4次)每天50至200伦琴的剂量到2000至6000伦琴的单次剂量不等。放射性同位素的剂量范围变化很大,取决于同位素的半衰期、辐射的强度和类型以及赘生性细胞的摄入。

[0203] 免疫疗法。本领域技术人员将理解,额外的免疫疗法可以与本文公开的方法联合使用。在癌症治疗的背景下,免疫疗法通常依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。利妥昔单抗(Rituximab)(RITUXAN®)就是这样一个实例。免疫效应物可以是例如对肿瘤细胞表面上的某些标记具有特异性的抗体。单独的抗体可以作为治疗的效应物,或者其可以招募其他细胞来实际影响细胞杀伤。抗体还可以与药物或毒素(化学治疗剂、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合并用作靶向剂。或者,效应物可以是携带直接或间接与肿瘤细胞靶标相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0204] 在免疫疗法的一个方面中,肿瘤细胞必须带有一些适合靶向的标记,即在大多数其他细胞上不存在。存在许多肿瘤标记物并且这些标记物中的任何一个都可能适合在本实施方案的上下文中进行靶向。常见的肿瘤标记物包括CD20、癌胚抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸路易斯抗原(Sialyl Lewis Antigen)、MucA、MucB、PLAP、层粘连蛋白受体、erb B和p155。免疫疗法的另一个方面是将抗癌作用与免疫刺激作用相结合。还存在免疫刺激分子,包括细胞因子,诸如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、γ-IFN;趋化因子,诸如MIP-1、MCP-1、IL-8;和生长因子,诸如FLT3配体。

[0205] 目前正在研究或使用的免疫疗法的实例是免疫佐剂,例如,牛结核分枝杆菌(Mycobacterium bovis)、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、二硝基氯苯和芳香族化合物(美国专利5,801,005和5,739,169;Hui和Hashimoto,1998;Christodoulides等人,1998);细胞因子疗法,例如,干扰素a(3、和y、IL-1,GM-CSF和TNF(Bukowski等人,1998;Davidson等人,1998;Hellstrand等人,1998);基因疗法例如,TNF、IL-1、IL-2和p53(Qin等人,1998;Austin-Ward和Villaseca,1998;美国专利5,830,880和5,846,945);和单克隆抗体,例如,抗CD20、抗神经节苷脂GM2和抗p185(Hollander,2012;Hanibuchi等人,1998;美国专利5,824,311)。考虑一种或多种抗癌疗法可与本文所描述的抗体疗法一起采用。

[0206] 手术。大约60%的癌症患者将进行某种类型的手术,包括预防性、诊断性或分期性、治愈性和姑息性手术。治愈性手术包括切除术,其中所有或部分癌组织被物理去除、切除和/或破坏,并且可以与其他疗法结合使用,诸如本实施方案的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法。肿瘤切除术是指物理去除至少部分肿瘤。除肿瘤切除术外,手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制的手术(莫氏手术(Mohs' surgery))。

[0207] 在切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤后,可在体内形成空腔。治疗可以通过灌注、直接注射或局部应用所述区域额外抗癌疗法来完成。这种治疗可重复,例如每1、2、3、4、

5、6或7天,或每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月。这些治疗也可以具有不同的剂量。

[0208] 其他药剂。考虑其他药剂可与本文公开的任何方法或组合物组合使用以改善治疗的疗效。这些额外的药剂包括但不限于影响细胞表面受体和GAP连接的上调的药剂、细胞生长抑制剂和分化剂、细胞粘附抑制剂、增加过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂,或其他生物药剂。通过增加GAP连接的数量来增加细胞间信号传导会增加对邻近过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。细胞生长抑制剂或分化剂可与本文公开的组合物和方法组合使用以改善治疗的抗过度增殖功效。考虑细胞粘附抑制剂用于改善本文公开的组合物和方法的功效。细胞粘附抑制剂的实例包括但不限于粘着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀(Lovastatin)。还考虑,可以将增加过度增殖细胞对凋亡的敏感性的其他药剂(诸如抗体c225)与本文公开的组合物和方法组合使用,以改善治疗功效。

[0209] 试剂盒和诊断

[0210] 本文公开了包含一种或多种治疗剂和/或其他治疗剂和递送剂的试剂盒。在一些方面中,试剂盒可用于制备和/或施用本文公开的疗法。试剂盒可以包括一个或多个密封小瓶,所述小瓶含有本文公开的任何药物组合物。试剂盒可包括例如至少一种Cx43抗体或其片段以及用于制备、配制和/或施用一种或多种本文公开的组合物的组分或执行本发明方法的一个或多个步骤的试剂。在一些方面中中,试剂盒还可以包括合适的容器,其可以是不会与试剂盒的组分发生反应的容器,诸如埃普多夫管(eppendorf tube)、测定板、注射器、瓶子或管。容器可由可灭菌材料制成,诸如塑料或玻璃。

[0211] 试剂盒还可包括概述本文所阐述的方法的程序步骤的指令单,并且将遵循与本文所描述或本领域普通技术人员已知的基本相同的程序。指令信息可以在含有机器可读指令的计算机可读媒体中,当使用计算机执行所述指令时,使得显示递送药物有效量的治疗剂的真实或虚拟程序。

[0212] 实施例

[0213] 本领域技术人员应该理解,以下实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,因此可以认为构成了其实践的优选模式。然而,鉴于本公开,本领域的技术人员应理解可在不背离本发明的精神和范围的情况下在公开的具体实施方案中进行许多改变,并且仍获得类似或相似的结果。

[0214] 实施例1-抗Cx43单克隆抗体

[0215] 产生了抗Cx43单克隆抗体,并鉴定产生Cx43结合单克隆抗体的克隆。抗体序列的DNA和氨基酸的CDR序列与每个表征抗体的正确配对一起显示在下表中。M1抗体抑制Cx43半通道的开放。M2抗体活化、刺激和/或增强Cx43半通道的开放。

[0216] 表1:两种功能性抗体的重链和轻链配对。

[0217]

抗体名称	重链	轻链
M1 (HmAb1)	M1H	M1K1

[0218]

M2 (HmAb2)	M1H	M1M7K

[0219] 表2:来自杂交瘤的抗体链序列。

[0220]

mAb	CDR-1	CDR-2	CDR-3
M1H	ggctacaccttcaccag ctactat (SEQ ID NO: 16)	attaatcctagcaatggt ggtact (SEQ ID NO: 17	acaagagagggtaaccc ctactatactatgaactac (SEQ ID NO: 18)
	GYTFTSYY (SEQ ID NO: 19)	INPSNGGT (SEQ ID NO: 20)	TREGNPYYTMN Y (SEQ ID NO: 21)
M7H	ggctacatcttcaccac ctactgg (SEQ ID NO: 22)	attagtcctagcaacgg tcgttct (SEQ ID NO: 23)	gcacgattcgacgaggg ggacttc (SEQ ID NO: 24)
	GYIFITYW (SEQ ID NO: 25)	ISPSNGRS (SEQ ID NO: 26)	ARFDEGDF (SEQ ID NO: 27)
M7Ha	GYIFITTW (SEQ ID NO: 64)	ISPSNGRS (SEQ ID NO: 26)	ARFDEGDF (SEQ ID NO: 27)
M1K1	cagagtctgttaaacag tggaaatcaaaagacct ac (SEQ ID NO: 28)	ggggcatcc (SEQ ID NO: 29)	cagaatgatcatagttatc cattcacg (SEQ ID NO: 30)
	QSLLNSGNQK TY (SEQ ID NO: 31)	GAS (SEQ ID NO: 32)	QNDYSYPFT (SEQ ID NO: 33)
M1K1 a	QSLLNSGNQK TY (SEQ ID NO: 31)	GAS (SEQ ID NO: 32)	QNDHSYPFT (SEQ ID NO: 65)
M1K2	aaaagtgtcagtacatc tggctatagttat (SEQ ID NO: 34)	cttgtatcc (SEQ ID NO: 35)	cagcacattagggagctt acacg (SEQ ID NO: 36)
	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO: 37)	LVS (SEQ ID NO: 38)	QHIRELT (SEQ ID NO: 39)
M2K	aaaagtgtcagtacatc tggctatagttat (SEQ ID NO: 40)	cttgtatcc (SEQ ID NO: 41)	cagcacattagggagctt acacgt (SEQ ID NO: 42)
	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO: 43)	LVS (SEQ ID NO: 44)	QHIRELTR (SEQ ID NO: 45)
M1M7 K	gagcctcttagaaagc gatggaaagacatat	ctggtgtct (SEQ ID NO: 47)	tggcaaggtacacattttc cgtggacg

[0221]

	(SEQ ID NO: 46)		(SEQ ID NO: 48)
	QSLLESDGKTY (SEQ ID NO: 49)	LVS (SEQ ID NO: 50)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO: 51)

[0222] 克隆的可变结构域如下图所示。

[0223] 表3.DNA序列。可变重链(粗体)和可变轻链(下划线)。

[0224] >M1H

GAGGTCCAACTCCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGC
CTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCT**GGCTACAC**
CTTCACCAGCTACTATATGTACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG
ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGGGG**AATTAATCCTAGCAATGG**

[0225] **TGGTA**CTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAACAAGGCCACACT
GACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGC
AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT**ACAAGAG**
AGGGTAACCCCTACTATACTATGAACTACTGGGGTCAAG
GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 52)

[0226] >M7H

GAGGTCCAACTCCAGCAACCTGGGGCTGAACTGGTGAGGC
CTGGGGCTTCAGTAATGCTGTCCTGCAAGGCTTCT**GGCTACAT**
CTTCACCACCTACTGGATGCACTGGCTGAAGCAGAGGCCTGG
ACAAGGCCTTGACTGGATTGGAGAGA**TTAGTCCTAGCAACGG**

[0227] **TCGTTCT**AATTACAATAAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACT
GACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGC
AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT**GCACGAT**
TCGACGAGGGGGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCATAG
TCTCCTCA (SEQ ID NO: 53)

[0228] >M1K1

[0229] GACATTGTGATGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTG
CAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAGACCTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAG
CCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTG
GAACCGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAG
TTATCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA(SEQ ID NO:54)

[0230] >M1K2

[0231] GACATTGTGTTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATA
CAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCC
AGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
ACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTAC
ACGTTCGGAGGGGG GACCAAGCTGGAAATCAAAC(SEQ ID NO:55)

[0232] >M2K

[0233] GATATTGTGATGACCCAGTCTCCCGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATACAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTCGGAGGGGG GGACCAAGCTGGAAATCAAA(SEQ ID NO:56)

[0234] >M1M7K

[0235] GACGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGAAAGCGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA(SEQ ID NO:57)

[0236] 表4.氨基酸序列。可变重链(粗体)和可变轻链(下划线)。

[0237] >M1H

[0238] EVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS**GYTFTSYY**MYWVKQRPGQGLEWIGG**INPSNGGT**NFNEKFKNKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC**TREGNPYYTMNY**WGQ GTSVTVSS (SEQ ID NO: 58)

[0239] >M7H

[0240] EVQLQQPGAELVRPGASVMLSCKAS**GYIFTTYW**MHWLKQRPGQGLDWIGE**ISPSNGRS**NYNKKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC**ARFDEGDF**WGQGTTLIVS (SEQ ID NO: 59)

[0241] >M1K1

[0242] DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKTYLAW YQQKPGQPPKLLIYGASTRSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAED LAVYYCQNDHSYPFTFGSGTKLEIK(SEQ ID NO:60)

[0243] >M1K2

[0244] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQ

[0245] KPGQPPRLLIYLVSNLESGVP

[0246] ARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWKSN(SEQ ID NO:61)

[0247] >M2-K

[0248] DIVMTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQ

[0249] QKPGQPPRLLIYLVSN

[0250] LESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGTKLEIK(SEQ ID NO:62)

[0251] >M1M7-K

[0252] DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLESDGKTYLNWLLQ

[0253] RPGQSPKRLIYLVSK

[0254] LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPWTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO:63)

[0255] 实施例2-诊断和癌症治疗用途

[0256] 发现溶骨性肿瘤生长在骨细胞特异性Cx43基因敲除小鼠中增加。将Py8119-Luc细胞注射至对照和cKO雌性小鼠的右胫骨中。左胫骨注射有PBS作为对照。肿瘤生长通过生物发光成像每周记录持续4周并进行定量(图1A-1C)。

[0257] 将MLO-Y4骨细胞和原代小鼠骨细胞与E2(多克隆)、HMAb1和HMAb2抗体或生胃酮(CBX)(一种连接蛋白通道阻断剂)一起孵育。执行溴化乙锭(EtBr)染料摄入测定(图2A-2B)。发现Cx43 HMAb2抗体活化半通道。

[0258] 此外,将Cx43(M1)抗体递送至体内的骨细胞,并且发现阻断胫骨负荷诱导的伊文思蓝摄入。将伊文思蓝染料注射至WT、骨细胞特异性Cx43 KO的尾静脉中。在染料注射前2小时腹膜内注射小鼠IgG或Cx43(M1)mAb(25mg/kg)。染料注射后30min,左胫骨被机械负荷一次,持续10分钟。处死小鼠并用PBS灌注。分离胫骨并制备固定的胫骨组织切片。

[0259] 还观察到HMAb2对溶骨性肿瘤生长的抑制。将Py8119-Luc细胞注射至雌性小鼠的右胫骨中(图4A)。左胫骨注射有PBS作为对照。每周一次或两次腹膜内注射25mg/kg的HMAb2,持续四周。在对照小鼠中每周两次注射生理盐水。肿瘤生长通过生物发光成像每周记录持续4周并进行定量(图4B)。

[0260] 实施例3-抑制骨肉瘤细胞中的成骨细胞生长

[0261] 为确定M2抗体对抑制骨中骨肉瘤的功效,使用两种体内小鼠模型。第一个模型是小鼠骨肉瘤细胞系DLM8,其与C3H小鼠品系是同基因的(Sottnik,J.L.等人,Clin Exp Metastasis,2010.27(3):第151-60页)。第二个模型是免疫受损的(裸)小鼠中的OS17人类骨肉瘤细胞系(Kolb,E.A.等人Pediatr Blood Cancer,2010.55(1):第67-75页)。两种骨肉瘤细胞均通过胫骨内注射植入骨中。

[0262] 实验描述于图9和图10A-B的图例中。

[0263] 结果表明,M2抗体分别显着抑制了WT和裸鼠中的鼠类和人类骨肉瘤肿瘤生长。这种M2抗体(例如,鼠-鼠嵌合M2抗体和优化的人源化M2抗体)以剂量依赖性方式抑制骨肉瘤生长。

[0264] 鉴于本公开,本文公开和要求保护的所有方法都可以在没有过度实验的情况下进行和执行。虽然本发明的组合物和方法已经根据优选实施方案进行描述,但对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下,可以对本文描述的方法以及方法的步骤或步骤次序进行变化。更具体地说,显而易见的是,某些化学和生理相关的药剂可以取代本文所描述的药剂,同时将获得相同或相似的结果。对本领域技术人员显而易见的所有这些相似取代和修改被认为处在如由随附权利要求书限定的本发明的精神、范围以及理念内。

[0001] 序列表

[0002] <110> 姜欣(Jiang, Jean)

[0003] M·里克尔梅(Riquelme, Manuel)

[0004] 顾肃敏(Gu, Sumin)

[0005] <120> 用于治疗骨肉瘤的组合物和使用方法

[0006] <130> 21105.0070P1

[0007] <150> US 62/811,938

[0008] <151> 2019-08-28

[0009] <160> 63

[0010] <170> PatentIn 3.5版

[0011] <210> 1

[0012] <211> 10

[0013] <212> PRT

[0014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0015] <220>

[0016] <223> 合成构建体

[0017] <400> 1

[0018] Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile

[0019] 1 5 10

[0020] <210> 2

[0021] <211> 10

[0022] <212> PRT

[0023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0024] <220>

[0025] <223> 合成构建体

[0026] <400> 2

[0027] Lys Arg Asp Pro Cys Pro His Gln Val Asp

[0028] 1 5 10

[0029] <210> 3

[0030] <211> 9

[0031] <212> PRT

[0032] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0033] <220>

[0034] <223> 合成构建体

[0035] <400> 3

[0036] Leu Ser Ala Val Tyr Thr Cys Lys Arg

[0037] 1 5

[0038] <210> 4

[0039] <211> 24

[0040] <212> DNA

[0041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0042] <220>

[0043] <223> 合成构建体

[0044] <400> 4

[0045] ggctacacct tcaccagcta ctat 24

[0046] <210> 5

[0047] <211> 24

[0048] <212> DNA

[0049] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0050] <220>

[0051] <223> 合成构建体

[0052] <400> 5

[0053] attaatccta gcaatggtgg tact 24

[0054] <210> 6

[0055] <211> 36

[0056] <212> DNA

[0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0058] <220>

[0059] <223> 合成构建体

[0060] <400> 6

[0061] acaagagagg gtaaccccta ctatactatg aactac 36

[0062] <210> 7

[0063] <211> 8

[0064] <212> PRT

[0065] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0066] <220>

[0067] <223> 合成构建体

[0068] <400> 7

[0069] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr

[0070] 1 5

[0071] <210> 8

[0072] <211> 8

[0073] <212> PRT

[0074] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0075] <220>

[0076] <223> 合成构建体

[0077] <400> 8

[0078] Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr

[0079] 1 5

[0080] <210> 9

[0081] <211> 12

[0082] <212> PRT

[0083] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0084] <220>

[0085] <223> 合成构建体

[0086] <400> 9

[0087] Thr Arg Glu Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Met Asn Tyr

[0088] 1 5 10

[0089] <210> 10

[0090] <211> 24

[0091] <212> DNA

[0092] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0093] <220>

[0094] <223> 合成构建体

[0095] <400> 10

[0096] ggctacatct tcaccaccta ctgg 24

[0097] <210> 11

[0098] <211> 24

[0099] <212> DNA

[0100] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0101] <220>

[0102] <223> 合成构建体

[0103] <400> 11

[0104] attagtccta gcaacggtcg ttct 24

[0105] <210> 12

[0106] <211> 24

[0107] <212> DNA

[0108] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0109] <220>

[0110] <223> 合成构建体

[0111] <400> 12

[0112] gcacgattcg acgaggggga cttc 24

[0113] <210> 13

[0114] <211> 8

[0115] <212> PRT

[0116] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0117] <220>

[0118] <223> 合成构建体

[0119] <400> 13

[0120] Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr Trp

[0121] 1 5

[0122] <210> 14

[0123] <211> 8

[0124] <212> PRT

[0125] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0126] <220>

[0127] <223> 合成构建体

[0128] <400> 14

[0129] Ile Ser Pro Ser Asn Gly Arg Ser

[0130] 1 5

[0131] <210> 15

[0132] <211> 8

[0133] <212> PRT

[0134] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0135] <220>

[0136] <223> 合成构建体

[0137] <400> 15

[0138] Ala Arg Phe Asp Glu Gly Asp Phe

[0139] 1 5

[0140] <210> 16

[0141] <211> 24

[0142] <212> DNA

[0143] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0144] <220>

[0145] <223> 合成构建体

[0146] <400> 16

[0147] ggctacacct tcaccagcta ctat 24

[0148] <210> 17

[0149] <211> 24

[0150] <212> DNA

[0151] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0152] <220>

[0153] <223> 合成构建体

[0154] <400> 17

[0155] attaatccta gcaatggtgg tact 24

[0156] <210> 18

[0157] <211> 36

[0158] <212> DNA

[0159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0160] <220>

[0161] <223> 合成构建体

[0162] <400> 18

[0163] acaagagagg gtaaccccta ctatactatg aactac 36

[0164] <210> 19

[0165] <211> 8

[0166] <212> PRT

[0167] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0168] <220>

[0169] <223> 合成构建体

[0170] <400> 19

[0171] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr

[0172] 1 5

[0173] <210> 20

[0174] <211> 8

[0175] <212> PRT

[0176] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0177] <220>

[0178] <223> 合成构建体

[0179] <400> 20

[0180] Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr

[0181] 1 5

[0182] <210> 21

[0183] <211> 12

[0184] <212> PRT

[0185] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0186] <220>

[0187] <223> 合成构建体

[0188] <400> 21

[0189] Thr Arg Glu Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Met Asn Tyr

[0190] 1 5 10

[0191] <210> 22

[0192] <211> 24

[0193] <212> DNA

[0194] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0195] <220>

[0196] <223> 合成构建体

[0197] <400> 22

[0198] ggctacatct tcaccaccta ctgg 24

[0199] <210> 23

[0200] <211> 24

[0201] <212> DNA

[0202] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0203] <220>

[0204] <223> 合成构建体

[0205] <400> 23

[0206] attagtccta gcaacggtcg ttct 24

[0207] <210> 24

[0208] <211> 24

[0209] <212> DNA

[0210] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0211] <220>

[0212] <223> 合成构建体

[0213] <400> 24

[0214] gcacgattcg acgaggggga cttc 24

[0215] <210> 25

[0216] <211> 8

[0217] <212> PRT

[0218] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0219] <220>

[0220] <223> 合成构建体

[0221] <400> 25

[0222] Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr Trp

[0223] 1 5

[0224] <210> 26

[0225] <211> 8

[0226] <212> PRT

[0227] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0228] <220>

[0229] <223> 合成构建体

[0230] <400> 26

[0231] Ile Ser Pro Ser Asn Gly Arg Ser

[0232] 1 5

[0233] <210> 27

[0234] <211> 8

[0235] <212> PRT

[0236] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0237] <220>

[0238] <223> 合成构建体

[0239] <400> 27

[0240] Ala Arg Phe Asp Glu Gly Asp Phe

[0241] 1 5

[0242] <210> 28

[0243] <211> 36

[0244] <212> DNA

[0245] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0246] <220>

[0247] <223> 合成构建体

[0248] <400> 28

[0249] cagagtctgt taaacagtgg aaatcaaaag acctac 36

[0250] <210> 29

[0251] <211> 9

[0252] <212> DNA

[0253] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0254] <220>

[0255] <223> 合成构建体

[0256] <400> 29

[0257] ggggcatcc 9

[0258] <210> 30

[0259] <211> 27

[0260] <212> DNA

[0261] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0262] <220>

[0263] <223> 合成构建体

[0264] <400> 30

[0265] cagaatgatc atagttatcc attcacg 27

[0266] <210> 31

[0267] <211> 12

[0268] <212> PRT

[0269] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0270] <220>

[0271] <223> 合成构建体

[0272] <400> 31

[0273] Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Thr Tyr

[0274] 1 5 10

[0275] <210> 32

[0276] <211> 3

[0277] <212> PRT

[0278] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0279] <220>

[0280] <223> 合成构建体

[0281] <400> 32

[0282] Gly Ala Ser

[0283] 1

[0284] <210> 33

[0285] <211> 9

[0286] <212> PRT

[0287] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0288] <220>

[0289] <223> 合成构建体

[0290] <400> 33

[0291] Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr

[0292] 1 5

[0293] <210> 34

[0294] <211> 30

[0295] <212> DNA

[0296] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0297] <220>

[0298] <223> 合成构建体

[0299] <400> 34

[0300] aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat 30

[0301] <210> 35
[0302] <211> 9
[0303] <212> DNA
[0304] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0305] <220>
[0306] <223> 合成构建体
[0307] <400> 35
[0308] cttgtatcc
[0309] <210> 36
[0310] <211> 23
[0311] <212> DNA
[0312] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0313] <220>
[0314] <223> 合成构建体
[0315] <400> 36
[0316] cagcacatta gggagcttac acg 23
[0317] <210> 37
[0318] <211> 10
[0319] <212> PRY
[0320] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0321] <220>
[0322] <223> 合成构建体
[0323] <400> 37
[0324] Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr
[0325] 1 5 10
[0326] <210> 38
[0327] <211> 3
[0328] <212> PRT
[0329] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0330] <220>
[0331] <223> 合成构建体
[0332] <400> 38
[0333] Leu Val Ser
[0334] 1
[0335] <210> 39
[0336] <211> 7
[0337] <212> PRT
[0338] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0339] <220>
[0340] <223> 合成构建体
[0341] <400> 39
[0342] Gln His Ile Arg Glu Leu Thr
[0343] 1 5

[0344] <210> 40

[0345] <211> 30

[0346] <212> DNA

[0347] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0348] <220>

[0349] <223> 合成构建体

[0350] <400> 40

[0351] aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat 30

[0352] <210> 41

[0353] <211> 9

[0354] <212> DNA

[0355] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0356] <220>

[0357] <223> 合成构建体

[0358] <400> 41

[0359] cttgtatcc 9

[0360] <210> 42

[0361] <211> 24

[0362] <212> DNA

[0363] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0364] <220>

[0365] <223> 合成构建体

[0366] <400> 42

[0367] cagcacatta gggagcttac acgt 24

[0368] <210> 43

[0369] <211> 10

[0370] <212> PRT

[0371] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0372] <220>

[0373] <223> 合成构建体

[0374] <400> 43

[0375] Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr

[0376] 1 5 10

[0377] <210> 44

[0378] <211> 3

[0379] <212> PRT

[0380] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0381] <220>

[0382] <223> 合成构建体

[0383] <400> 44

[0384] Leu Val Ser

[0385] 1

[0386] <210> 45

[0387] <211> 8

[0388] <212> PRT

[0389] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0390] <220>

[0391] <223> 合成构建体

[0392] <400> 45

[0393] Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg

[0394] 1 5 8

[0395] <210> 46

[0396] <211> 31

[0397] <212> DNA

[0398] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0399] <220>

[0400] <223> 合成构建体

[0401] <400> 46

[0402] gagcctctta gaaagcgatg gaaagacata t 31

[0403] <210> 47

[0404] <211> 9

[0405] <212> DNA

[0406] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0407] <220>

[0408] <223> 合成构建体

[0409] <400> 47

[0410] ctggtgtct 9

[0411] <210> 48

[0412] <211> 27

[0413] <212> DNA

[0414] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0415] <220>

[0416] <223> 合成构建体

[0417] <400> 48

[0418] tggcaaggta cacattttcc gtggacg 27

[0419] <210> 49

[0420] <211> 11

[0421] <212> PRT

[0422] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0423] <220>

[0424] <223> 合成构建体

[0425] <400> 49

[0426] Gln Ser Leu Leu Glu Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

[0427] 1 5 10

[0428] <210> 50

[0429] <211> 3

[0430] <212> PRT
[0431] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0432] <220>
[0433] <223> 合成构建体
[0434] <400> 50
[0435] Leu Val Ser
[0436] 1
[0437] <210> 51
[0438] <211> 9
[0439] <212> PRT
[0440] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0441] <220>
[0442] <223> 合成构建体
[0443] <400> 51
[0444] Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Trp Thr
[0445] 1 5
[0446] <210> 52
[0447] <211> 357
[0448] <212> DNA
[0449] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0450] <220>
[0451] <223> 合成构建体
[0452] <400> 52
[0453] gaggtccaac tccagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
[0454] tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactata tgtactgggt gaagcagagg 120
[0455] cctggacaag gccttgagtg gattggggga attaatccta gcaatggtgg tactaacttc 180
[0456] aatgagaagt tcaagaacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
[0457] atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagagagggt 300
[0458] aacccctact atactatgaa ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 357
[0459] <210> 53
[0460] <211> 345
[0461] <212> DNA
[0462] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0463] <220>
[0464] <223> 合成构建体
[0465] <400> 53
[0466] gaggtccaac tccagcaacc tggggctgaa ctggtgaggc ctggggcttc agtaatgctg 60
[0467] tcctgcaagg cttctggcta catcttcacc acctactgga tgcactggct gaagcagagg 120
[0468] cctggacaag gccttgactg gattggagag attagtccta gcaacggtcg ttctaattac 180
[0469] aataagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
[0470] atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc acgattcgac 300
[0471] gaggggact tctggggcca aggcaccact ctcatagtct cctca 345
[0472] <210> 54

[0473] <211> 339

[0474] <212> DNA

[0475] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0476] <220>

[0477] <223> 合成构建体

[0478] <400> 54

[0479] gacattgtga tgacgcagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

[0480] atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagac ctacttggcc 120

[0481] tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctacggggc atccactagg 180

[0482] gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaaccgattt cactcttacc 240

[0483] atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatagttat 300

[0484] ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaaa 339

[0485] <210> 55

[0486] <211> 330

[0487] <212> DNA

[0488] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0489] <220>

[0490] <223> 合成构建体

[0491] <400> 55

[0492] gacattgtgt tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60

[0493] atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggaac 120

[0494] caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 180

[0495] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

[0496] cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacacgt 300

[0497] tcggaggggg gaccaagctg gaaatcaaac 330

[0498] <210> 56

[0499] <211> 330

[0500] <212> DNA

[0501] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0502] <220>

[0503] <223> 合成构建体

[0504] <400> 56

[0505] gatattgtga tgacccagtc tcccgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60

[0506] atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggaac 120

[0507] caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 180

[0508] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

[0509] cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacacgt 300

[0510] tcggaggggg ggaccaagct ggaaatcaaa 330

[0511] <210> 57

[0512] <211> 336

[0513] <212> DNA

[0514] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0515] <220>

[0516] <223> 合成构建体

[0517] <400> 57

[0518] gacgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc 60

[0519] atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gaaagcgatg gaaagacata tttgaattgg 120

[0520] ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

[0521] tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

[0522] agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

[0523] tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

[0524] <210> 58

[0525] <211> 119

[0526] <212> PRT

[0527] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0528] <220>

[0529] <223> 合成构建体

[0530] <400> 58

[0531] Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu

[0532] 1 5 10 15 20

[0533] Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg

[0534] 25 30 35 40

[0535] Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe

[0536] 45 50 55 60

[0537] Asn Glu Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0538] 65 70 75 80

[0539] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Gly

[0540] 85 90 95 100

[0541] Asn Pro Tyr Tyr Thr Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[0542] 105 110 115

[0543] <210> 59

[0544] <211> 114

[0545] <212> PRT

[0546] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0547] <220>

[0548] <223> 合成构建体

[0549] <400> 59

[0550] Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Met Leu

[0551] 1 5 10 15 20

[0552] Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr Trp Met His Trp Leu Lys Gln Arg

[0553] 25 30 35 40

[0554] Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile Gly Glu Ile Ser Pro Ser Asn Gly Arg Ser Asn Tyr

[0555] 45 50 55 60

[0556] Asn Lys Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0557] 65 70 75 80

[0558] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp

[0559] 85 90 95 100

[0560] Glu Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Ile Val Ser

[0561] 105 110

[0562] <210> 60

[0563] <211> 112

[0564] <212> PRT

[0565] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0566] <220>

[0567] <223> 合成构建体

[0568] <400> 60

[0569] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr

[0570] 1 5 10 15 20

[0571] Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Thr Tyr Leu Ala

[0572] 25 30 35 40

[0573] Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg

[0574] 45 50 55 60

[0575] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

[0576] 65 70 75 80

[0577] Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro

[0578] 85 90 95 100

[0579] Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0580] 105 110

[0581] <210> 61

[0582] <211> 110

[0583] <212> PRT

[0584] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0585] <220>

[0586] <223> 合成构建体

[0587] <400> 61

[0588] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr

[0589] 1 5 10 15 20

[0590] Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn

[0591] 25 30 35 40

[0592] Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser

[0593] 45 50 55 60

[0594] Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

[0595] 65 70 75 80

[0596] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg

[0597] 85 90 95 100

[0598] Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys Ser Asn

[0599] 105 110

[0600] <210> 62

[0601] <211> 110

[0602] <212> PRT

[0603] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0604] <220>

[0605] <223> 合成构建体

[0606] <400> 62

[0607] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr

[0608] 1 5 10 15 20

[0609] Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn

[0610] 25 30 35 40

[0611] Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser

[0612] 45 50 55 60

[0613] Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

[0614] 65 70 75 80

[0615] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg

[0616] 85 90 95 100

[0617] Ser Glu Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0618] 105 110

[0619] <210> 63

[0620] <211> 112

[0621] <212> PRT

[0622] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0623] <220>

[0624] <223> 合成构建体

[0625] <400> 63

[0626] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser

[0627] 1 5 10 15 20

[0628] Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp

[0629] 25 30 35 40

[0630] Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp

[0631] 45 50 55 60

[0632] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

[0633] 65 70 75 80

[0634] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro

[0635] 85 90 95 100

[0636] Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0637] 105 110

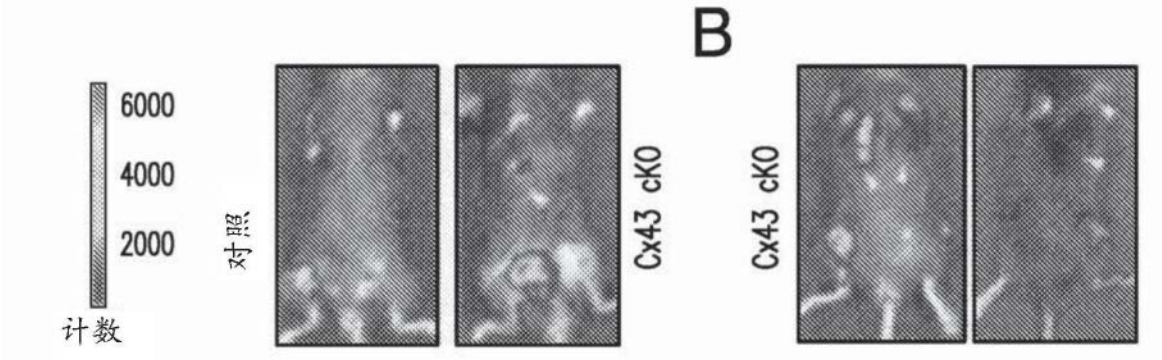


图 1B

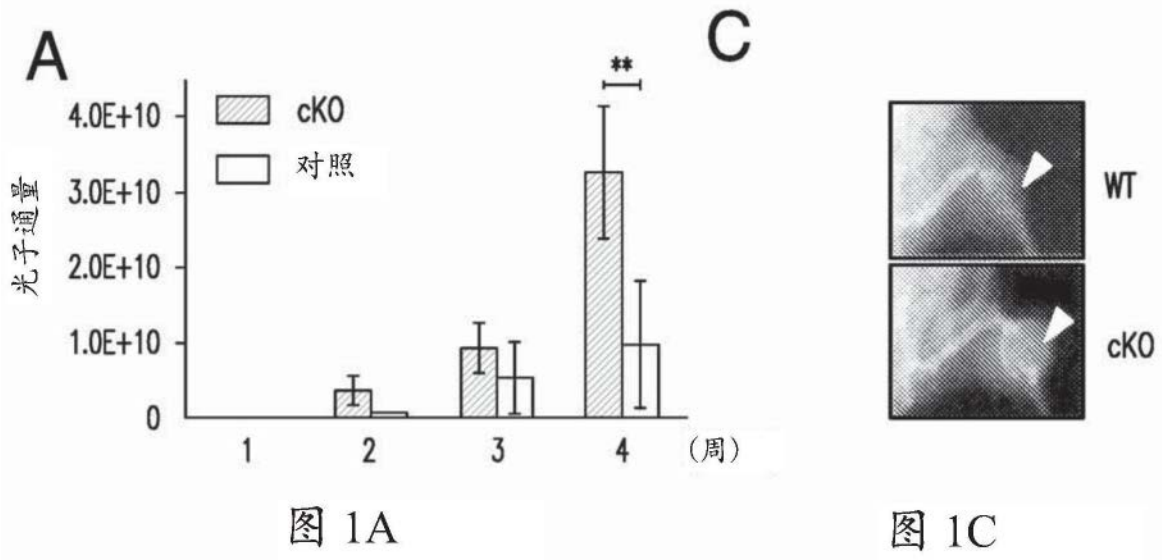


图 1A

图 1C

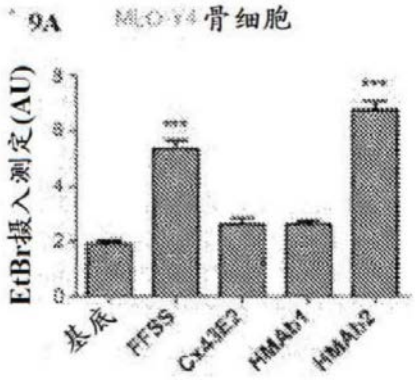


图2A

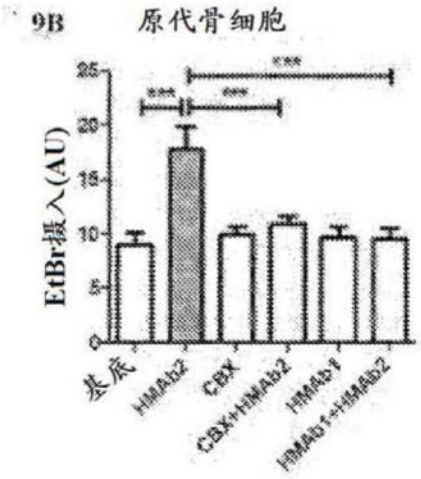

9B
原代骨细胞
EtBr摄入(AU)
25
20
15
10
5
0
***
***
***
基底
HMAb2
CBX
CBX+HMAb2
HMAb1
HMAb1+HMAb2

图2B

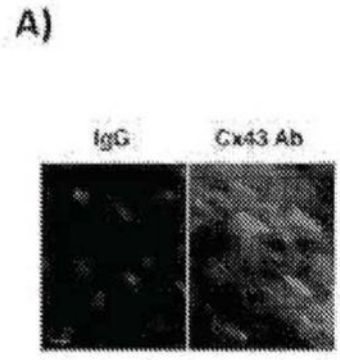

A)
IgG
Cx43 Ab

图3A

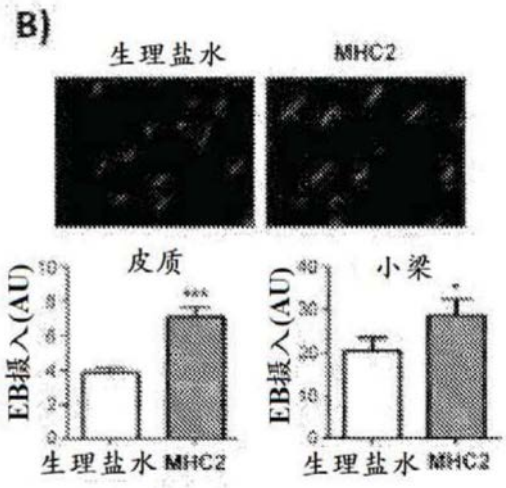

B)
生理盐水
MHC2
皮质
小梁
EB摄入(AU)
EB摄入(AU)
***
*
生理盐水
MHC2
生理盐水
MHC2

图3B

FIG. 4A

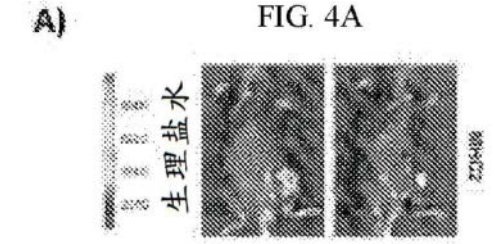


图4A

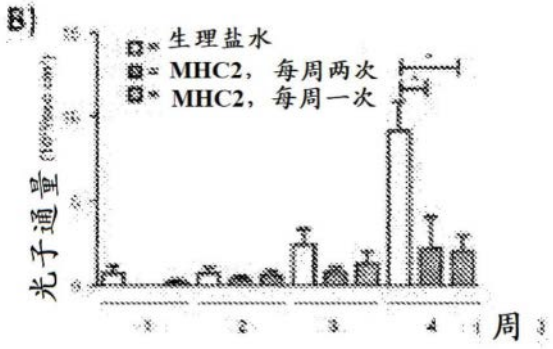


图4B

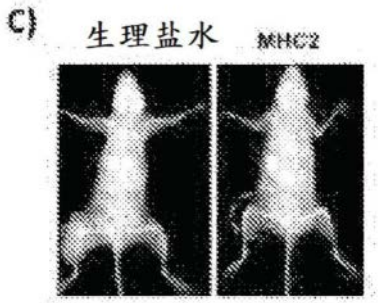


图4C

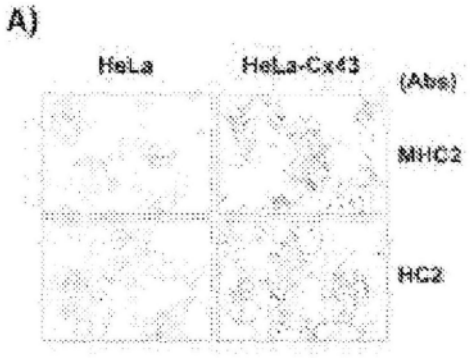

A)
HeLa
HeLa-Cx43
(Abs)
MHC2
HC2

图5A

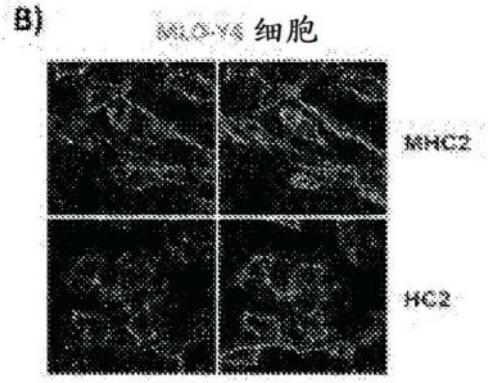

B)
MLO-Y4 细胞
MHC2
HC2

图5B

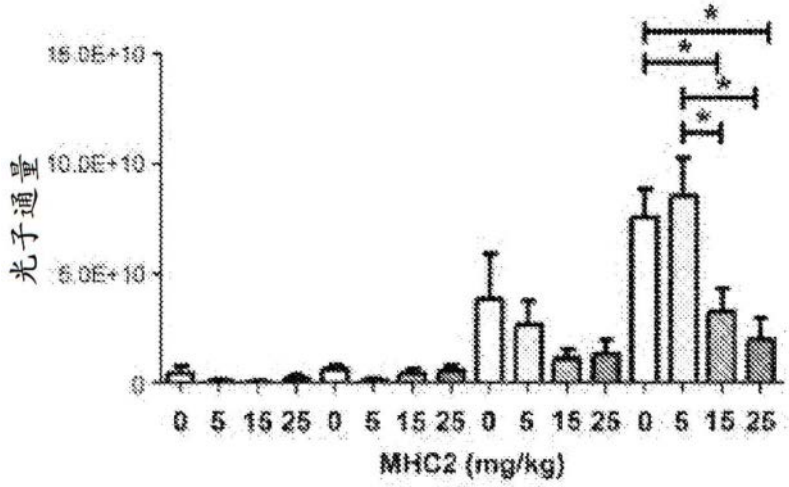

光子通量
15.0E+10
10.0E+10
5.0E+10
0
0 5 15 25 0 5 15 25 0 5 15 25 0 5 15 25
MHC2 (mg/kg)

图6

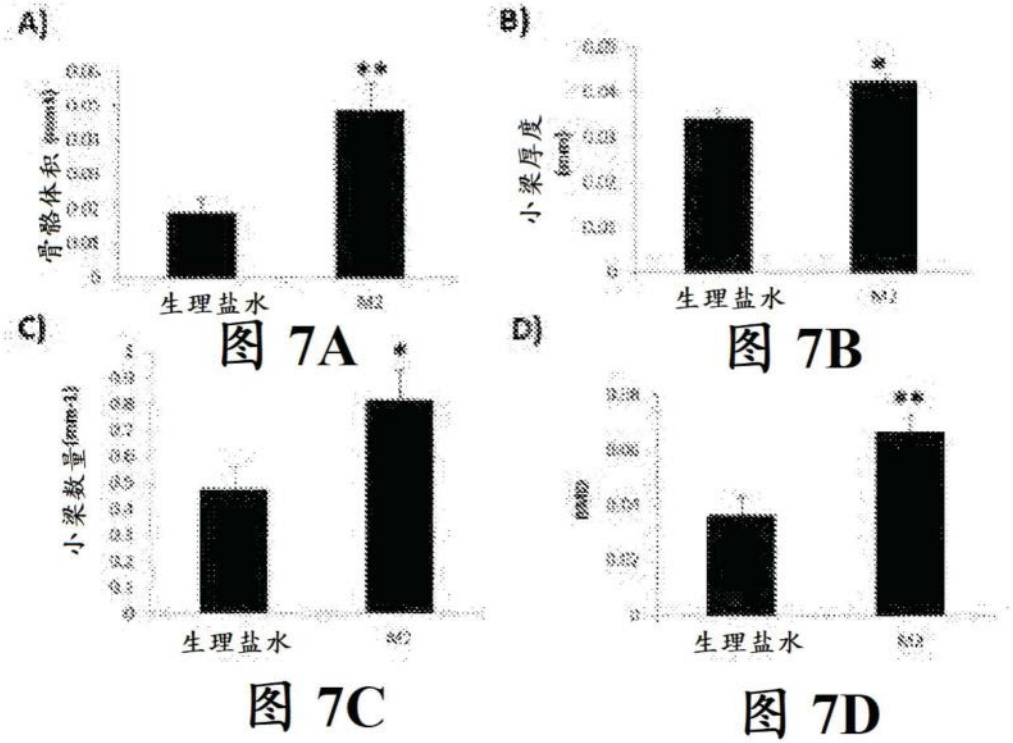


图 7A 图 7B

图 7C 图 7D

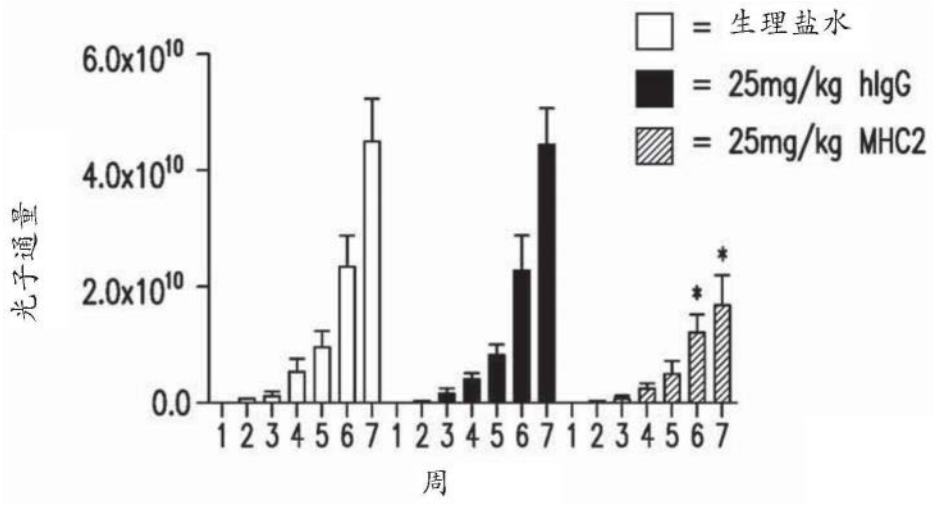


图8A

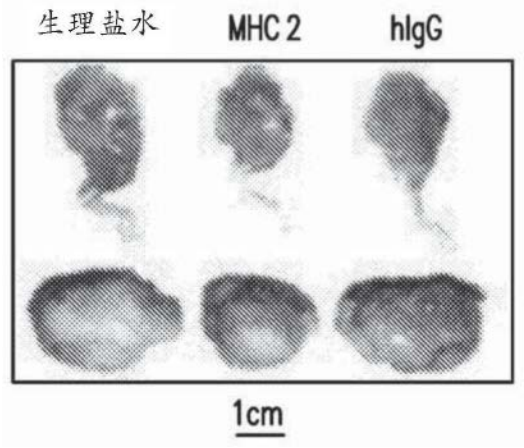


图8B

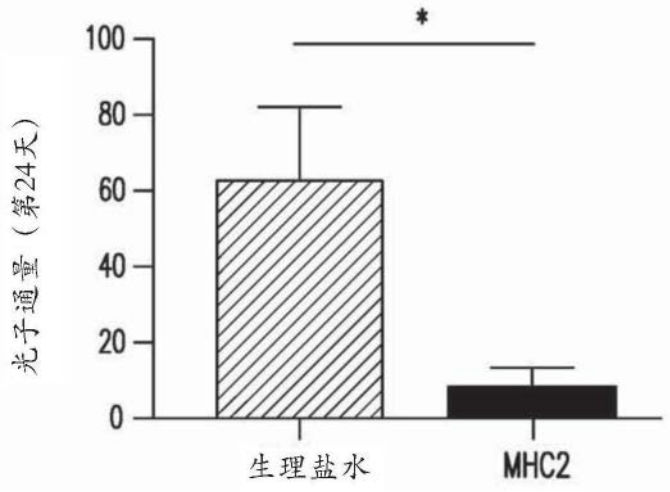


图9

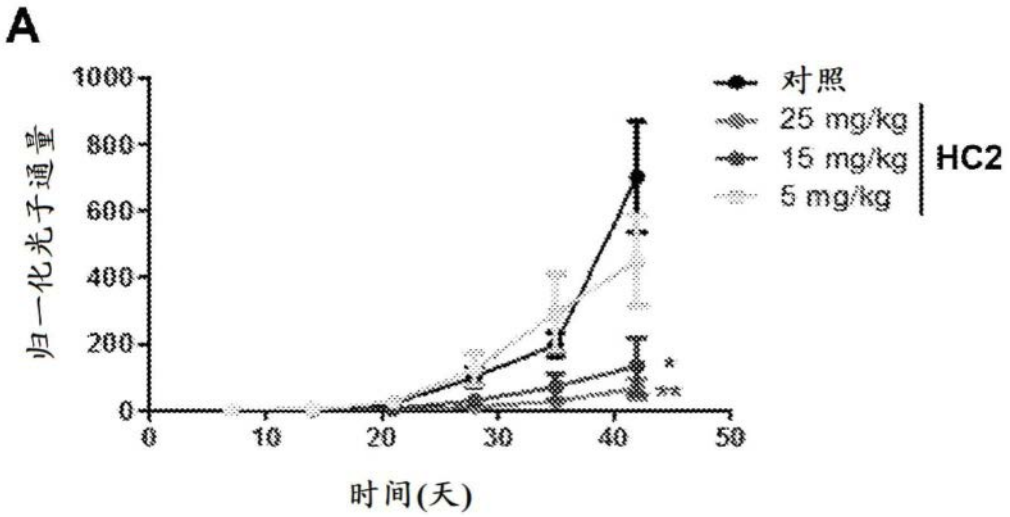

A
1000
800
600
400
200
0
归一化光子通量
0
10
20
30
40
50
时间(天)
对照
25 mg/kg
15 mg/kg
5 mg/kg
HC2
*
**

图10A

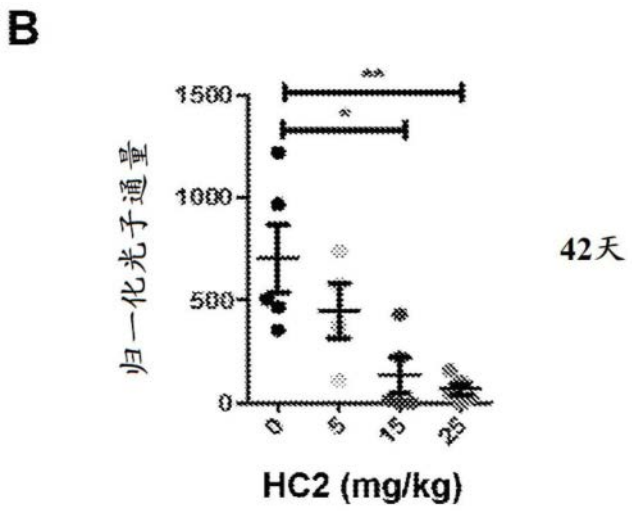

B
1500
1000
500
0
归一化光子通量
**
*
0
5
15
25
HC2 (mg/kg)
42天

图10B