

1. 抗 GM-CSF 抗体, 包含:

V_H区, 其包含 (i) CDR3 序列 R(Q/D)RFPYYFDY、CDR1 序列 NYIYH 和 CDR2 序列 WINAGNGNTKYSQKFQG; 或者 (ii) CDR3 序列 RDRFPYYFDY、CDR1 序列 GYYMH 和 CDR2 序列 WINPNSGGTNYAQKFQG, 以及

V_L区, 其包含 CDR3 序列 QQFN(K/R)SPLT、CDR1 序列 RASQSVGTNVA 或 RASQSIGSNLA 和 CDR2 序列 STSSRAT,

其中当 V_H区 CDR3 的序列为 RDRFPYYFDY 时, V_L区 CDR1 的序列为 RASQSIGSNLA。

2. 如权利要求 1 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述 V_H区包含 CDR3 序列 RQRFPYYFDY。

3. 如权利要求 1 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述 V_L区包含 CDR3 序列 QQFNKSPLT。

4. 如权利要求 1 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述 V_H区包含 CDR3 序列 RQRFPYYFDY, 并且所述 V_L区包含 CDR3 序列 QQFNKSPLT。

5. 如权利要求 4 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述 V_H区包含 CDR3 序列 RQRFPYYFDY、CDR1 序列 NYIYH 和 CDR2 序列 WINAGNGNTKYSQKFQG; 并且所述 V_L区包含 CDR3 序列 QQFNKSPLT、CDR1 序列 RASQSVGTNVA 和 CDR2 序列 STSSRAT。

6. 如权利要求 1 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述抗体包含 V_H区 FR4 序列 WGQGTTLVTVSS 和 V_L区 FR4 序列 FGGGTKVEIK。

7. 如权利要求 1 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述 V_H包含具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 序列的 V_H区 V 节段序列。

8. 如权利要求 7 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述 V_H具有序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5。

9. 如权利要求 1 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述 V_L包含具有 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:9 序列的 V_L区 V 节段序列。

10. 如权利要求 9 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述 V_L具有序列 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:9。

11. 如权利要求 1 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述 V_H具有序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5; 以及所述 V_L具有序列 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:9。

12. 如权利要求 11 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述抗体包含选自以下的重链和轻链可变区组合:

a) SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:8;

b) SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:6;

c) SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;

d) SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:7;

e) SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6; 或

f) SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:7。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述抗体是 IgG。

14. 如权利要求 13 所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述抗体包含具有 SEQ ID NO:11 中所示的氨基酸序列的重链恒定区。

15. 如权利要求 1 至 12 中任一项所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述抗体包含具有 SEQ ID

NO:10 中所示的氨基酸序列的 κ 轻链恒定区。

16. 如权利要求 1 至 12 中任一项所述的抗 GM-CSF 抗体, 其中所述抗体包含具有 SEQ ID NO:11 中所示的氨基酸序列的重链恒定区和具有 SEQ ID NO:10 中所示的氨基酸序列的 κ 轻链恒定区。

17. 如权利要求 1 至 12 中任一项所述的抗体, 其中所述 V_H 区或 V_L 区, 或者 V_H 和 V_L 区两者的氨基酸序列在 N- 末端包含甲硫氨酸。

18. 抗 GM-CSF 抗体, 其中所述抗体包含:

SEQ ID NO:5 的重链可变区,

SEQ ID NO:7 的轻链可变区,

SEQ ID NO:11 的重链恒定区, 和

SEQ ID NO:10 的 κ 轻链恒定区。

19. 权利要求 1 至 12 中任一项所述的抗体在制备用于治疗患有其中 GM-CSF 是治疗靶标的疾病的药物中的用途。

20. 如权利要求 19 所述的用途, 其中所述疾病是骨质减少症、类风湿性关节炎、哮喘、多发性硬化、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、特发性血小板减少性紫癜、心衰、缺血事件导致的心肌损害、癌症或者糖尿病。

21. 权利要求 13 所述的抗体在制备用于治疗患有其中 GM-CSF 是治疗靶标的疾病的药物中的用途。

22. 如权利要求 21 所述的用途, 其中所述疾病是骨质减少症、类风湿性关节炎、哮喘、多发性硬化、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、特发性血小板减少性紫癜、心衰、缺血事件导致的心肌损害、癌症或者糖尿病。

23. 权利要求 18 所述的抗体在制备用于治疗患有其中 GM-CSF 是治疗靶标的疾病的药物中的用途。

24. 如权利要求 23 所述的用途, 其中所述疾病是骨质减少症、类风湿性关节炎、哮喘、多发性硬化、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、特发性血小板减少性紫癜、心衰、缺血事件导致的心肌损害、癌症或者糖尿病。

针对粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2008 年 4 月 28 日提交的美国第 61/048,522 号临时申请的权益,该申请通过引用的方式并入本文中。

[0003] 发明背景

[0004] “粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)”是在响应多种炎症介质时由存在于造血环境和炎症外周部位的细胞产生的小糖蛋白。GM-CSF 能够刺激来自骨髓细胞的嗜中性粒细胞、巨噬细胞以及混合的粒细胞-巨噬细胞集落的产生,并且能够刺激来自胎儿肝脏祖细胞的嗜酸性集落的形成。GM-CSF 还能够刺激成熟粒细胞和巨噬细胞的功能性活动,以及抑制粒细胞和巨噬细胞的凋亡。

[0005] 已提出 GM-CSF 在多种疾病的发病机理中起作用。因此需要靶向 GM-CSF 的额外治疗。本发明提供了改良的抗 -GM-CSF 抗体,例如,用于治疗 GM-CSF 为致病机制的一部分的疾病。

[0006] 发明概述

[0007] 一方面,本发明提供了抗 -GM-CSF 抗体,例如,人工程化的 (humaneered) 抗体,以及利用所述抗体治疗疾病的方法,对这些疾病而言,抑制 GM-CSF 受体信号传导是理想的。因此,在一些实施方案中,本发明提供了抗 -GM-CSF 抗体,其包括含 CDR3 结合特异性决定簇 RQRFPY 或 RDRFPY、J 节段和 V- 节段的重链可变区,其中 J- 节段包含与人 JH4 (YFDYWQGTLTVSS) 至少 95% 的一致性,以及 V- 节段包含与人种系 VH1 1-02 或 VH1 1-03 序列至少 90% 的一致性;或者含 CDR3 结合特异性决定簇的重链可变区,该特异性决定簇包括 RQRFPY。在一些实施方案中,J 节段包含 YFDYWQGTLTVSS。在一些实施方案中,CDR3 包含 RQRFPYYFDY 或 RDRFPYYFDY。在一些实施方案中,重链可变区 CDR1 或 CDR2 能够是人种系 VH1 序列;或者 CDR1 和 CDR2 能够是人种系 VH1。在一些实施方案中,抗体包含人重链可变区 CDR1 或 CDR2,或者 CDR1 和 CDR2 两者,如在图 1 中列出的 V_H 区所示。在一些实施方案中,本发明的抗体的 V- 节段具有图 1 所示的 V_H V 节段序列。在一些实施方案中,本发明的抗体包含的 V_H 具有图 1 列出的 VH#1, VH#2, VH#3, VH#4 或 VH#5 序列。

[0008] 本发明还提供了例如,具有上段中描述的重链可变区的抗 -GM-CSF 抗体,其中该抗体包括含 CDR3 结合特异性决定簇 FNK 或 FNR 的轻链可变区。在一些实施方案中,这种抗体包含人种系 JK4 区。在一些实施方案中,抗体 V_L 区 CDR3 包含 QQFN(K/R)SPLT., 例如 QQFNKSPLT。在一些实施方案中,轻链可变区包含图 1 所示的 V_L 区的 CDR1 或 CDR2,或者 CDR1 和 CDR2 两者。在一些实施方案中,V_L 区包含与图 1 所示的 VKIIIA27V 节段序列具有至少 95% 一致性的 V 节段。在一些实施方案中,V_L 区具有图 1 所示的 VH#1, VH#2, VH#3 或 VH#4 序列。

[0009] 在一些实施方案中,本发明的抗体的单价亲和力优于约 10nM,经常优于(低于)约 500pM 或优于约 50pM,这通过在 37°C 进行的表面等离子共振分析来测定,所述抗体例如具有选自图 1 中的 V_H 区序列的 V_H 区序列以及选自图 1 中的 V_L 区序列的 V_L 区。因此,在一些实施方案中,本发明的抗体的亲和力(如利用表面等离子共振测量的)低于 50pM,通常

低于约 25pM,或甚至低于约 10pM。在一些实施方案中,本发明的抗-GM-CSF 具有慢解离速率,对于与 GM-CSF 的单价相互作用,通过在 37°C 的表面等离子共振分析测定的解离速率常数 (kd) 低于约 10^{-4}s^{-1} ,优选低于 $5\times 10^{-5}\text{s}^{-1}$,以及最优选低于 10^{-5}s^{-1} 。在一些实施方案中,本发明的抗体的解离速率比在相同条件下测定的参考嵌合 c19/2 单克隆抗体慢 2 至 3 倍,但在测量 GM-CSF 活性的基于细胞测定中,中和 GM-CSF 活性的效能比参考抗体的效能大至少 6-10 倍。

[0010] 在一些实施方案中,具有本文所述的重链可变区和 / 或轻链可变区的本发明的抗体是 IgG。在一些实施方案中,重链具有恒定区,该恒定区具有 SEQ ID NO:11 的序列。在一些实施方案中,轻链恒定区是具有 SEQ ID NO:10 所示序列的 κ 轻链。在一些实施方案中,本发明的抗体具有 SEQ ID NO:11 所示的重链恒定区、具有 SEQ ID NO:10 所示序列的轻链 κ 恒定区以及选自图 1 所示的重和轻链可变区的重链和轻链可变区,例如,抗体重链和轻链可变区包含来自图 1 所列序列的下述组合的一个:a) VH#2, VK#3;b) VH#1, VK#3;c) VH#3, VK#1;d) VH#4, VK#3;e) VH#4, VK#4;f) VH#4, VK#2;g) VH#5, VK#1;h) VH#5, VK#2;i) VH#3, VK#4;或 j) VH#3, VL#3)。结合本文的教导,本领域技术人员会意识到本发明的抗体能够选自图 1 所列的 V_H 区和 V_L 区的任一组合。

[0011] 在一些实施方案中, V_H 区或 V_L 区序列,或者 V_H 区和 V_L 区两者氨基酸序列都在 N 末端包含甲硫氨酸。

[0012] 在另外方面,本发明提供了治疗患者的方法,所述患者患有其中抑制 GM-CSF 是理想的疾病,该方法包括给予患者治疗有效量的前述权利要求中任一项的抗体。在一些实施方案中,所述患者患有骨质减少症、类风湿性关节炎、哮喘、多发性硬化、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、特发性血小板减少性紫癜、阿耳茨海默氏病、心衰、缺血事件导致的心肌缺损或糖尿病。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1 提供了抗 GM-CSF 抗体的示例性的 V_H 区或 V_L 区序列。

[0015] 图 2. 通过在 37°C 的表面等离子共振分析 (Biacore 3000) 测定的 GM-CSF 与 Ab1 (A) 或 Ab2 (B) 的结合。Ab1 和 Ab2 被捕获在 Biacore 芯片上固定的抗 Fab 多克隆抗体上。如所显示的,不同浓度的 GM-CSF 注射在表面上方。假定 1 : 1 相互作用,使用 Scrubber2 软件进行整体拟合分析 (Global fit analysis)。

[0016] 图 3. Ab1 和 Ab2 与糖基化的和非糖基化的 GM-CSF 结合。通过 ELISA 测定与人 293 细胞表达的糖基化的 GM-CSF 或大肠杆菌 (E. coli) 中表达的非糖基化的 GM-CSF 的结合。显示了来自单次试验的代表性的结果 (试验 1)。将从 1500ng/ml 开始的 Ab1 和 Ab2 的两倍稀释液应用到 GM-CSF 包被的孔中。每一点代表一式三份测定的平均值 $\pm$ 标准误。利用 Prism 5.0 软件 (Graphpad) 进行 Sigmoidal 曲线拟合。

[0017] 图 4. 证实 Ab1 和 Ab2 与共享表位结合的竞争性 ELISA。用 50ng/孔重组 GM-CSF 包被的 ELISA 板用不同浓度的抗体 (Ab2、Ab1 或同种型对照抗体) 以及 50nM 生物素化 Ab2 孵育。利用中性亲和素 (neutravidin)-HRP 偶联来测定生物素化的抗体结合。对与 GM-CSF 的结合的竞争进行 1 小时 (A) 或进行 18 小时 (B)。每一点代表一式三份测定的平均值 $\pm$ 标准误。利用 Prism 5.0 软件 (Graphpad) 进行 Sigmoidal 曲线拟合。

[0018] 图 5. GM-CSF 诱导的 IL-8 表达的抑制。不同量的每种抗体与 0.5ng/ml GM-CSF 孵

育,以及与 U937 细胞孵育 16 小时。通过 ELISA 测定分泌到培养物上清的 IL-8。

[0019] 发明详述

[0020] 如本文所用的,“抗体”指蛋白,该蛋白在功能上被定义为结合蛋白,在结构上被定义为包含氨基酸序列,该序列被本领域技术人员公认为来自产生抗体的动物的免疫球蛋白编码基因的框架区。抗体能够由一个或多个基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的多肽组成。已知的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及多种免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其依次分别定义免疫球蛋白类型 IgG, IgM, IgA, IgD 和 IgE。

[0021] 已知典型的免疫球蛋白(抗体)结构单位包含四聚体。每个四聚体由两对完全相同的多肽链组成,每对具有一条“轻”(约 25kD)和一条“重”链(约 50-70kD)。每条链的 N 末端确定了约 100-110 或更多的氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别指这些轻链和重链。

[0022] 此处使用的术语“抗体”还包括保留结合特异性的抗体片段。例如,有许多表征清楚的抗体片段。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区的二硫键近 C-端消化抗体,以产生 $F(ab)'_2$, Fab 的二聚体,该二聚体自身是通过二硫键连接到 $VH-CH1$ 的轻链。该 $F(ab)'_2$ 能够在温和条件下被还原,以破坏在铰链区的二硫键,从而将 $(Fab')_2$ 二聚体转化为 Fab' 单体。该 Fab' 单体本质上是带有部分铰链区的 Fab(对于其他抗体片段的更具体的描述,参见 Fundamental Immunology(基础免疫学),W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993))。尽管根据完整抗体的消化定义了多种抗体片段,本领域技术人员会认识到能够以化学方式或通过利用重组 DNA 方法学从头合成片段。因此,此处使用的术语“抗体”包括通过完整抗体的修饰产生的或利用重组 DNA 方法学合成的抗体片段。

[0023] 本发明的抗体还包括多种 V_H-V_L 对形式,包括单链抗体(以单多肽链存在的抗体),诸如单链 Fv 抗体(sFv 或 scFv),其中可变重链区和可变轻链区连接在一起(直接地或通过肽连接子)以形成连续的多肽。单链 Fv 抗体是共价连接的 V_H-V_L ,其可以由 V_H -和 V_L -编码序列的核酸表达,所述 V_H -和 V_L -编码序列直接连接的或通过肽编码连接子连接(例如, Huston, et al. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 85 :5879-5883, 1988)。虽然 V_H 和 V_L 作为单多肽链相互连接,但 V_H 和 V_L 结构域的结合是非共价的。抗体还可以是另一片段形式,诸如二硫化物稳定的 Fv(dsFv)。还可以例如利用重组技术产生其他片段作为可溶蛋白或作为从展示方法获得的片段。抗体还可以包括双抗体和微型抗体。

[0024] 本发明的抗体还包括诸如来自骆驼科动物抗体的重链二聚体。由于骆驼科动物体内的重链二聚体 IgG 的 V_H 区不必与轻链之间形成疏水作用,因此,通常接触轻链的重链中的该区在骆驼科动物体内被改变为亲水性氨基酸残基。重链二聚体 IgG 的 V_H 结构域被称为 VHH 结构域。另外,用于本发明的抗体包括单域抗体(dAbs)和纳米抗体(参见例如 Cortez-Retamozo, et al, Cancer Res. 64 :2853-2857, 2004)。

[0025] 如本文所用的,“V-区”指抗体可变区结构域,该结构域包含框架 1、CDR1、框架 2、CDR2 和框架 3 节段,包括 CDR3 和框架 4,这些节段作为 B 细胞分化期间重链和轻链 V 区基因重排的结果被加到 V-节段上。本文使用的“V-节段”指由 V 基因编码的 V-区(重或轻链)的区。重链可变区的 V-节段编码 FR1-CDR1-FR2-CDR2 和 FR3。出于本发明的目的,轻链可变区的 V-节段被定义为通过 FR3 延伸至到 CDR3。

[0026] 如本文所用的,术语“J- 节段”指编码的可变区的亚序列,其包含 CDR3 的 C 末端部分和 FR4。内源性 J- 节段由免疫球蛋白 J 基因编码。

[0027] 如本文所用的,术语“互补性决定区 (CDR)”指每条链上的三个高变区,其中断由轻和重链可变区确立的四个“框架”区。这些 CDR 主要负责结合到抗原表位。从 N 末端开始顺序编号,每条链的几个 CDR (CDRs) 通常称为 CDR1、CDR2 和 CDR3,以及通常被其中有特定 CDR 的链所确定。因此,例如, V_H CDR3 位于它被发现的抗体重链可变结构域;而 V_L CDR1 是来自它被发现的抗体轻链可变结构域的 CDR1。

[0028] 不同轻或重链的框架区的序列在同一物种内是相对保守的。抗体的框架区是组成型轻和重链的组合框架区,用于在三维空间定位和排列 CDRs。

[0029] CDRs 和框架区的氨基酸序列可以利用为本领域技术人员所熟知的不同的定义来确定,例如 Kabat、Chothia、国际免疫遗传学数据库 (IMGT) 和 AbM (参见例如 Johnson et al, supra; Chothia & Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (用于免疫球蛋白高变区的极限结构式). J. Mol. Biol. 196, 901-917; Chothia C. et al., 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions (免疫球蛋白高变区的构象). Nature 342, 877-883; Chothia C. et al., 1992, structural repertoire of the human VH segments (人 VH 节段的结构集合). J. Mol. Biol. 227, 799-817; Al-Lazikani et al, J. Mol. Biol. 1997, 273(4))。抗原结合位点的定义还在下列文章中被描述: Ruiz et al., IMGT, 国际免疫遗传学数据库. Nucleic Acids Res. 28, 219-221 (2000); 以及 Lefranc, M.-P. IMGT, 国际免疫遗传学数据库. Nucleic Acids Res. Jan 1; 29(1): 207-9 (2001); MacCallum et al, Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography (抗体-抗原相互作用: 接触分析及结合位点布局), J. Mol. Biol., 262(5), 732-745 (1996); 以及 Martin et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86, 9268-9272 (1989); Martin, et al, Methods Enzymol, 203, 121-153, (1991); Pedersen et al, Immunomethods, 1, 126, (1992); 以及 Rees et al, In Sternberg M. J. E. (ed.), Protein Structure Prediction (蛋白质结构预测). Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

[0030] “表位”或“抗原决定簇”指抗原上与抗体结合的位点。表位可以通过连续的氨基酸或经由蛋白三级折叠紧靠的非连续的氨基酸形成。暴露于变性剂时,通过连续的氨基酸形成的表位通常被保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性剂处理时消失。表位在独特的空间构象中通常包括至少 3 个,以及更通常地至少 5 个或 8-10 个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括例如 X 射线晶体学和二维核磁共振。参见例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (分子生物学方法中的表位分析操作), Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)。

[0031] 本发明上下文中使用的术语“结合特异性决定簇”或“BSD”指在 CDR 区内用于确定抗体结合特异性所必需的最小的连续或非连续氨基酸序列。在本发明中,该最小结合特异性决定簇位于抗体重链和轻链的 CDR3 序列的部分或全长内。

[0032] 如本文所用的,“抗 GM-CSF 抗体”或“GM-CSF 抗体”可互相替换使用,指结合到 GM-CSF 并抑制 GM-CSF 受体活性的抗体。可以利用评价 GM-CSF 结合和 / 或功能的多种本领域公认的测定方法来鉴定这类抗体。例如,可以利用诸如 ELISA 测定的结合测定,其测量

GM-CSF 与 α 受体亚单位结合的抑制。也方便地应用关于 GM-CSF 受体信号传导的基于细胞的测定,诸如确定 GM-CSF 依赖的细胞系响应有限量的 GM-CSF 时的增殖率的测定,如同测量细胞因子产生的量的测定,例如响应 GM-CSF 接触时的 IL-18 产生。

[0033] 如本文使用的,“中和抗体”指与 GM-CSF 结合并抑制通过 GM-CSF 受体的信号传导或抑制 GM-CSF 与其受体结合的抗体。

[0034] 如本文所使用的,“粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF)”指小的天然存在的具有内部二硫键的糖蛋白,分子量为约 23kDa。在人类,它是由位于人类第 5 号染色体上的细胞因子簇内的基因编码。人类基因和蛋白的序列是已知的。该蛋白具有 N- 末端信号序列和 C- 末端受体结合结构域 (Rasko and Gough In: The Cytokine Handbook (细胞因子手册), A. Thomson, et al, Academic Press, New York (1994), 第 349-369 页)。其三维结构与白介素的结构相似,尽管氨基酸序列并不相似。GM-CSF 在响应由存在于造血环境中炎症周围部位的许多炎症介质时产生。GM-CSF 能够刺激来自骨髓细胞的嗜中性粒细胞、巨噬细胞和混合的粒细胞-巨噬细胞集落的生成,并能够刺激嗜酸性粒细胞集落从胎儿肝脏祖细胞形成。GM-CSF 也能够刺激成熟的粒细胞和巨噬细胞的一些功能性活动并抑制粒细胞和巨噬细胞的凋亡。

[0035] 术语“平衡解离常数”或“亲和力”缩写为 (K_D), 指除以结合速率常数 (k_a , 时间⁻¹, M⁻¹) 的解离速率常数 (k_d , 时间⁻¹)。平衡解离常数可以利用本领域已知的任一方法测量。本发明的抗体是高亲和力抗体。这种抗体具有优于 (低于) 约 10nM, 通常优于约 500pM 或优于约 50pM 的单价亲和力, 这通过在 37°C 进行的表面等离子共振分析来测定。因此, 在某些实施方案中, 本发明的抗体具有低于 50pM, 通常低于约 25pM、或甚至低于 10pM 的亲和力 (如利用表面等离子共振所测量的)。

[0036] 在一些实施方案中, 本发明的 GM-CSF 具有慢解离速率, 对于与 GM-CSF 的单价相互作用, 通过在 37°C 的表面等离子共振分析测定的解离速率常数 (k_d) 低于约 $10^{-4}s^{-1}$, 优选低于 $5 \times 10^{-5}s^{-1}$, 以及最优选低于 $10^{-5}s^{-1}$ 。

[0037] 如本文所用的, “人源化抗体 (humanized antibody)” 指将来自供体抗体的 CDRs 移植到人框架序列的免疫球蛋白分子。人源化抗体还可以在框架序列中包含供体来源的残基。人源化抗体还可以包含人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。人源化抗体还可以包含既不是在受体抗体也不是在输入的 CDR 或框架序列中发现的残基。人源化能够利用本领域所熟知的方法来实现 (例如, Jones et al, Nature 321:522-525; 1986; Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al, Science 239:1534-1536, 1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol 2:593-596, 1992; U. S. Patent No. 4, 816, 567), 包括诸如 “超人化 (superhumanizing)” 抗体 (Tan et al, J. Immunol 169:1119, 2002) 和 “表面重塑 (resurfacing)” (例如, Staelens et al, Mol Immunol 43:1243, 2006; and Roguska et al, Proc. Natl Acad. Sci USA 91:969, 1994) 的技术。

[0038] 本发明上下文中的 “人工程化” 抗体 (“humaneered” antibody) 指具有参照抗体结合特异性的工程化人抗体。用于本发明的 “人工程化” 抗体具有包含从供体免疫球蛋白衍生的最小序列的免疫球蛋白分子。通常地, 抗体通过将编码来自参照抗体重链 CDR3 区的结合特异性决定簇 (BSD) 的 DNA 序列连接到人 V_H 节段序列, 以及将来自参照抗体轻链 CDR3 BSD 连接到人 V_L 节段序列被 “人工程化”。“BSD” 指介导结合特异性的 CDR3-FR4 区, 或该区

的一部分。因此,结合特异性决定簇可以是 CDR3-FR4、CDR3、CDR3 的最小必需结合特异性决定簇(其指当存在于抗体 V 区时赋予结合特异性的任一小于 CDR3 的区)、D 节段(关于重链区),或赋予参照抗体结合特异性的 CDR3-FR4 的其他区。人工程化的方法在公开号为 20050255552 的美国专利申请和公开号为 20060134098 的美国专利申请中被提供。

[0039] 本文使用的“人”抗体包括人源化和人工程化抗体,以及利用已知技术获得的人单克隆抗体。

[0040] 当术语“杂种”被用于提及核酸或蛋白的部分时,表示该核酸或蛋白包含两个或多个序列,这些序列通常不是在自然界发现的彼此有相同亲缘关系的序列。例如,该核酸通常以重组方式产生,其具有两个或多个序列,例如来自被排列以产生新的功能性核酸的无关联的基因。类似地,杂种蛋白指通常不是在自然界发现的彼此有相同亲缘关系的序列的两个或多个序列。

[0041] 当用术语“重组的”提及例如细胞、核酸、蛋白或载体时,指所述细胞、核酸、蛋白或载体已经通过引入异源核酸或蛋白或改变天然核酸或蛋白被修饰,或者指所述细胞来自进行过如此修饰的细胞。因此,例如,重组的细胞表达不在细胞的天然形式(非重组的)内存在的基因或表达否则会异常表达、低表达或根本不表达的天然基因。本文所用术语“重组的核酸”指正常不在自然界存在的形式的核酸,其最初一般通过例如利用聚合酶和核酸内切酶操纵核酸在体外形成。以这种方式,实现不同序列的可操作连接。因此出于本发明的目的,线性形式的分离的核酸,或者通过连接正常不相连的 DNA 分子在体外形成的表达载体都被认为是重组的。可以理解,一旦重组的核酸被制备并重新导入宿主细胞或有机体,它会以非重组形式复制,即,利用宿主细胞的体内细胞机制而不是体外操纵;然而,出于本发明的目的,这类核酸,一旦被重组制备,尽管随后非重组复制,仍然被认为是重组的。类似地,“重组蛋白”是利用重组技术制备的蛋白,即,通过上文所述的重组核酸的表达。

[0042] 当提及蛋白或肽时,短语“特异性(或选择性)结合”到抗体或“特异性(或选择性)与...免疫反应”指抗体结合感兴趣蛋白的结合反应。在本发明中,抗体结合感兴趣抗原如 GM-CSF 的亲和力优于它对其它抗原的亲和力至少 100 倍。

[0043] 用于两个或更多个多肽(或核酸)序列时,术语“一致的”或“一致性”百分比指两个或多个序列或子序列相同或者具有特定百分比的相同氨基酸残基或(核苷酸)(即,当在比较窗(comparison window)或指定区域比较并对齐以进行最大的对应时,在特定的区域有约 60%的一致性,优选 70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更高的一致性),如使用下述的带缺省参数的 BLAST 或 BLAST 2.0 序列比较算法或通过手工比对和目测(参见,例如 NCBI 万维网站)所测量的。这样的序列被称为“基本上一致的”。基本上一致的序列也包括具有删除和/或添加的序列,和具有取代的那些,以及例如多态或等位变体的天然存在的变体,以及人工变体。如下文所述的,优选的算法可以解释空位及类似情况。优选地,蛋白序列一致性存在于至少约 25 个氨基酸长度的区域,或更优选地存在于 50-100 个氨基酸长度的区域,或者整个蛋白长度。

[0044] 如本文使用的,“比较窗”包括选自一般为 20-600,通常为约 50-约 200,更通常约 100-约 150 的连续位的数目中的一个的片段的参照,其中可以将序列与具有相同数目连续位的参照序列最佳比对后进行比较。用于比较的序列比对方法在本领域是公知的。例如,可以通过 Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981) 的局部同源性算法、

通过 Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48 :443(1970) 的同源比对算法、通过 Pearson & Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85 :2444(1988) 的相似性检索方法、通过这些算法的计算机实施 (Wisconsin Genetics Software Package (威斯康星遗传学软件包) 中的 GAP, BESTFIT, FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group (遗传学计算机组), 575 Science Dr., Madison, WI) 或通过手工比对和目测 (参见, 例如 Current Protocols in Molecular Biology (通用分子生物学技术) (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)) 进行用于比较的序列的最优化比对。

[0045] 适于确定序列一致性百分比和序列相似性的优选的算法实例包括 BLAST 和 BLAST 2.0 算法, 这些算法在 Altschul et al, Nuc. Acids Res. 25 :3389-3402(1977) 和 Altschul et al, J. Mol. Biol. 215 :403-410(1990) 中有记载。具有本文所描述的参数的 BLAST 和 BLAST 2.0 用于确定本发明的核酸和蛋白的序列一致性百分比。BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 使用的缺省值是字长 (W) 为 11、期望值 (E) 为 10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 以及进行双链的比较。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用的缺省值是字长为 3 和期望值 (E) 为 10, 以及 BLOSUM62 得分矩阵 (参见 Henikoff & Henikoff, Proc. Natl Acad. Sci. USA 89 :10915(1989)) 比对 (B) 为 50、期望值 (E) 为 10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 以及进行双链的比较。

[0046] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学纯的”指物质基本上或实质上没有通常如在其天然状态中发现的伴随的组分。纯度和同质性通常利用诸如聚丙烯凝胶电泳和高效液相色谱法的分析化学技术来确定。存在于制剂中的主要种类的蛋白是基本上纯化的。术语“纯化的”在某些实施方案中表示在电泳凝胶中基本上产生一条带的蛋白。优选地, 它表示蛋白是至少 85% 纯的, 更优选地至少 95% 纯的, 以及最优选地至少 99% 纯的。

[0047] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文可以互相替换使用, 用于指氨基酸残基的多聚体。该术语适用于氨基酸多聚体, 该氨基酸多聚体中的一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物, 以及还适用于天然存在的氨基酸多聚体、包含修饰的残基的那些, 以及非天然存在的氨基酸多聚体。

[0048] 术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸, 此外还指在功能上与天然存在的氨基酸类似的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些, 以及后来被修饰的那些氨基酸, 例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构例如与氢结合的 α 碳、羧基、氨基、R 基的化合物, 例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这种类似物可以具有修饰的 R 基 (例如正亮氨酸) 或修饰的肽主链, 但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与氨基酸一般化学结构不同的结构的化合物, 但其功能与天然存在的氨基酸类似。

[0049] 本文的氨基酸可以通过它们公知的三字母符号或由 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的单字母符号被提及。同样地, 核苷酸可以通过它们公认的单字母代码被提及。

[0050] “保守性修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定的核酸序列, 保守性修饰变体指那些编码相同或本质上相同的氨基酸序列的核酸, 或者如果所述核酸不编码氨基酸序列, 其指本质上相同或相关的序列, 例如, 天然的连续的序列。由于遗传密码的兼并性, 大量功能相同的核酸编码大多数蛋白。例如, 密码子 GCA, GCC, GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此, 在由密码子指定的丙氨酸的每一位置处, 该密码子都可以改变为描述的相应密码

子中的另一个,而不改变编码的多肽。这种核酸变体是“沉默变体”,其是保守性修饰的变体的一种。本文编码多肽的每一核酸序列也描述了所述核酸的沉默变体。本领域的技术人员会认识到,在某些情形下,可以修饰核酸中的每一密码子(AUG除外,其通常是甲硫氨酸的唯一密码子;TGG也除外,其通常是色氨酸的唯一密码子)以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的沉默变体经常内含在描述的序列中,所述序列与表达产物有关,而与实际的探针序列无关。

[0051] 对于氨基酸序列,本领域的技术人员会认识到,改变、添加或删除在编码的序列中的单个氨基酸或小部分氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白序列的个别的取代、删除或添加是“保守性修饰的变体”,其中所述改变导致氨基酸被化学上类似的氨基酸取代。提供了功能类似的氨基酸的保守性取代表和诸如 BLOSUM 的取代矩阵在本领域中是公知的。这种保守性修饰变体为本发明的多态性变体,种间同源体和等位体的附加,并不排除本发明的多态性变体,种间同源体和等位体。典型的相互的保守性取代包括 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G); 2) 冬氨酸(D),谷氨酸(E); 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q); 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K); 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V); 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W); 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T); 和 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M) (参见,例如,Creighton, Proteins(1984))。

[0052] I. 引言

[0053] 本发明涉及以高亲和力与 GM-CSF 结合的抗体,并且是 GM-CSF 的拮抗剂。该抗体包含与人种系 V_H 和 V_L 序列具有高度一致性的可变区。在优选的实施方案中,本发明抗体的 CDRH3 中的 BSD 序列包含氨基酸序列 RQRFPY 或 RDRFPY。CDRL3 中的 BSD 包含 FNK 或 FNR。

[0054] 完整的 V 区通过如下方式产生:其中,BSD 形成部分 CDR3,另外的序列用于完成 CDR3 和添加 FR4 序列。通常,CDR3 除 BSD 之外的部分和完整的 FR4 由人种系序列组成。在一些实施方案中,除 BSD 之外的 CDR3-FR4 序列与人种系序列的差异在每条链上不超过 2 个氨基酸。在一些实施方案中,J 节段包含人种系 J 节段。例如,可以通过公众可用的国际免疫遗传学数据库 (IMGT) 和基于 V 的数据库 (V-base) (万维网 vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk) 确定人种系序列。

[0055] 人种系 V 节段的集合由 51 个重链 V 区、40 个 κ 轻链 V 节段和 31 个 λ 轻链 V 节段组成,产生共计 3,621 个种系 V 区对。另外还有针对这些 V 节段的大多数的稳定等位变体,但这些变体对种系集合的结构多样性的贡献是有限的。所有人种系 V 节段基因的序列都是已知的,并可以在由英国剑桥蛋白质工程 MRC 中心 (MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, United Kingdom) 提供的基于 V 的数据库中获取 (还参见 Chothia et al, 1992, J Mol Biol 227:776-798; Tomlinson et al, 1995, EMBO J 14:4628-4638; Cook et al (1995) Immunol. Today 16:237-242 and Williams et al, 1996, J Mol Biol 264:220-232)。

[0056] 本文所描述的抗体或抗体片段能够在原核或真核微生物系统中、或者在诸如哺乳动物细胞的更高级的真核生物细胞中表达。

[0057] 本发明中所用的抗体可以是任何形式。例如,在一些实施方案中,该抗体可以是包含恒定区,例如人的恒定区的完整抗体,或者可以是完整抗体的片段或衍生物,例如 Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv, Fv, 或者是单域抗体,例如纳米抗体或骆驼科动物抗体。

[0058] II. 重链

[0059] 本发明的抗 -GM-CSF 抗体的重链包含具有下列元件的重链 V 区：

[0060] 1) 包含 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3 的人重链 V 节段序列

[0061] 2) 包含氨基酸序列 R(Q/D)RFPY 的 CDRH3 区

[0062] 3) 由人种系 J 基因节段提供的 FR4。

[0063] 图 1 中显示了支持结合到 GM-CSF 的 V 节段序列及前面所述的 CDR3-FR4 节段及互补的 V_L区的实例。例如，该 V 节段可以来自人的 VH1 亚类。在一些实施方案中，该 V 节段是人 V_H1 亚类节段，其与种系节段 VH11-02 或 VH11-03 具有高度氨基酸序列一致性，例如至少 80%、85%或 90%或更高的一致性。在一些实施方案中，该 V 节段与 VH11-02 或 VH11-03 的区别不超过 15 个残基，以及优选地不超过 7 个残基。

[0064] 本发明的抗体的 FR4 序列由人的 JH1、JH3、JH4、JH5 或 JH6 基因种系节段提供，或者由与人种系 JH 节段具有高度氨基酸序列一致性的序列提供。在一些实施方案中，J 节段是人种系 JH4 序列。

[0065] CDRH3 还包含来自人的 J 节段的序列。通常地，除去 BSD 的 CDRH3-FR4 序列与人种系 J 节段的区别不超过 2 个氨基酸。在典型的实施方案中，CDRH3 中的 J 节段序列来自用于 FR4 序列的同样的 J 节段。由此，在一些实施方案中，该 CDRH3-FR4 区包含 BSD 和完整的人 JH4 种系基因片段。CDRH3 和 FR4 序列的示例性组合如下所示，其中 BSD 用粗体表示，人种系 J 片段 JH4 残基用下划线表示。

[0066] CDR3

[0067] **R (Q/D) RFPY** YFDYWGGTTLVTSS

[0068] 在一些实施方案中，本发明的抗体包含的 V 节段与种系节段 VH1-02 或 VH1-03、或与图 1 所示的 V_H区的一个 V 节段如 VH#1，VH#2，VH#3，VH#4 或 VH#5 的 V 节段部分具有至少 90%一致性，或至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%或 100%的一致性。

[0069] 在一些实施方案中，V_H区的 V 节段具有如图 1 所示的 CDR1 和 / 或 CDR2。例如，本发明的抗体可以具有包含序列 GYYMH 或 NYIHH 的 CDR1；或包含序列 WINPNSGGTNYAQKFQG 或 WINAGNGNTKYSQKFQG 的 CDR2。

[0070] 在特定的实施方案中，抗体具有来自图 1 所示的 V_H区 V 节段的一个的 CDR1 和 CDR2，以及包含 R(Q/D)RFPY 如 RDRFPYYFDY 或 RQRFPPYYFDY 的 CDR3。因此，在一些实施方案中，本发明的抗 GM-SCF 抗体可以例如，具有包含序列 R(Q/D)RFPYYFDYWGGTTLVTSS 的 CDR3-FR4 以及如图 1 所示的 CDR1 和 / 或 CDR2。

[0071] 在一些实施方案中，本发明的抗体的 V_H区具有含结合特异性决定簇 R(Q/D)RFPY 的 CDR3、来自人种系 VH1 节段的 CDR2 或来自人种系 VH1 的 CDR1。在一些实施方案中，CDR1 和 CDR2 都来自人种系 VH1 节段。

[0072] III. 轻链

[0073] 本发明的抗 -GM-SCF 抗体的轻链包含具有下列元件的轻链 V 区：

[0074] 1) 包含 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3 的人轻链 V 节段序列

[0075] 2) CDRL3 区，其包含序列 FNK 或 FNR，例如 QQFNRSPLT 或 QQFNKSPLT

[0076] 3) 由人种系 J 基因节段提供的 FR4。

[0077] V_L 区包含 V_λ 或 V_κ V 节段。图 1 中提供了支持结合的 V_κ 序列及互补的 V_H 区的实例。

[0078] V_L 区 CDR3 序列包含 J 节段衍生的序列。在典型的实施方案中,CDRL3 中的 J 节段序列来自用于 FR4 的同样的 J 节段。由此,在一些实施方案中,该序列与人 κ 种系 V 节段和 J 节段序列的差异可以不超过 2 个氨基酸。在一些实施方案中,该 CDRL3-FR4 区包含 BSD 和完整的人 JK4 种系基因节段。用于 κ 链的示例性 CDRL3-FR4 组合如下所示,其中最小的必需结合特异性决定簇用粗体显示,JK4 序列用下划线表示。

[0079] CDR3

[0080] QQ **FNR** SPLTFGGGTKVEIK

[0081] QQ **FNK** SPLTFGGGTKVEIK

[0082] V_κ 节段通常属于 VKIII 亚类。在一些实施方案中,该节段具有与人种系 VKIII 亚类至少 80% 的序列一致性,例如与人种系 VKIIIA27 序列至少 80% 的一致性。在一些实施方案中, V_κ 节段与 VKIIIA27 的差异可以不超过 18 个残基。在其他实施方案中,本发明的抗体的 V_L 区 V 节段与图 1 中所示的 V_L 区的人 κ V 节段序列,例如 VK#1, VK#2, VK#3 或 VK#4 的 V 节段序列具有至少 85% 的一致性,或至少 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 或 100% 的一致性。

[0083] 在一些实施方案中, V_L 区的 V 节段具有如图 1 所示的 CDR1 和 / 或 CDR2。例如,本发明的抗体可以具有 CDR1 序列 RASQSVGTNVA 或 RASQSIGSNLA ;或 CDR2 序列 STSSRAT。

[0084] 在特定的实施方案中,本发明的抗 -GM-CSF 抗体可以具有显示在图 1 中所示的 V_L 区的一个 V 节段中的 CDR1 和 CDR2 组合,以及包含 FNK 或 FNR 的 CDR3 序列,例如 CDR3 可以是 QQFNKSPLT 或 QQFNRSPLT。在一些实施方案中,这种抗 -GM-CSF 抗体可以包含 FR4 区,该 FR4 区是 FGGGTKVEIK。因此本发明的抗 -GM-CSF 抗体可以包含例如,来自图 1 所示的一个 V_L 区的 CDR1 和 CDR2,以及为 FGGGTKVEIK 的 CDR3-FR4 区。

[0085] IV. GM-CSF 抗体的制备

[0086] 本发明的抗体可以包含图 1 所示的 V_H 区 VH#1, VH#2, VH#3, VH#4 或 VH#5 的任一个。在一些实施方案中,本发明的抗体可以包含图 1 所示的 V_L 区 VK#1, VK#2, VK#3 或 VK#4 的任一个。在一些实施方案中,抗体具有图 1 所示的 V_H 区 VH#1, VH#2, VH#3, VH#4 或 VH#5 ; 以及如图 1 所示的 V_L 区 VK#1, VK#2, VK#3 或 VK#4。

[0087] 可以测试抗体以确定该抗体保留拮抗 GM-CSF 活性的活性。拮抗剂活性能够利用多种指标来确定,包括增殖测定。利用评价 GM-CSF 功能的多种测定来评价抗 GM-CSF 抗体。例如,对于 GM-CSF 受体信号传导,方便地利用基于细胞的测定,诸如确定 GM-CSF 依赖的细胞系响应有限量的 GM-CSF 的增殖率的测定。人 TF-1 细胞系适合用于这种测定。参见, Krinner et al, (2007) Mol. Immunol。给予治疗疾病 (对疾病而言,抑制 GM-CSF 是理想的) 的抗体优选保留嵌合 c19/2 抗体拮抗活性的至少约 50%, 或至少约 75%, 80%, 90%, 95% 或 100%, 例如 W003/068920, 其具有鼠单克隆抗体 LMM102 的可变区和 CDRs, 如由 Kabat 所定义的:

[0088] CDRH1 DYNIH

[0089] CDRH2 YIAPYSGGTGYNQEFKN

[0090] CDRH3 RDRFPYYFDY

[0091] CDRL1 KASQNVGSNVA

[0092] CDRL2 SASYRSG

[0093] CDRL3 QQFNRSPLT.

[0094] 可以利用熟知的测定来鉴定高亲和力抗体,以确定结合活性和亲和力。这种技术包括 ELISA 测定,以及利用表面等离子共振或干涉测量技术测定的结合测定。例如,亲和力可以通过利用 ForteBio (Mountain View, CA) Octet 生物传感器的生物膜层干涉测量技术来确定。本发明的抗体通常以相似的亲和力与糖基化和非糖基化形式的 GM-CSF 结合。

[0095] 本发明的抗体与 c19/2 竞争对 GM-CSF 的结合。本文所描述的抗体阻断 c19/2 或与 c19/2 竞争对 GM-CSF 的结合的能力表明,该抗体与 c19/2 结合相同的表位,或结合到与 c19/2 结合的表位接近的表位,例如与 c19/2 结合的表位交叠的表位。在其他的实施方案中,本文所述的抗体,例如图 1 提供的表中所示的包含 V_H 和 V_L 区组合的抗体,可以被用作参照抗体,以评价是否有另一抗体竞争对 GM-CSF 的结合。在测试抗体存在的情况下,如果参照抗体对抗原的结合减少至少 30%,通常至少大约 40%、50%、60% 或 75%,以及经常至少约 90%,则测试抗体被视为竞争性地抑制参照抗体的结合。许多测定可以应用于评价结合,包括 ELISA,以及其他测定,诸如免疫印迹。

[0096] 先前已经描述了带有与人种系序列接近的 V 区序列的抗体的分离方法(公开号为 20050255552 和 20060134098 的美国专利申请)。抗体库可以在适合的宿主细胞中表达,包括哺乳动物细胞、酵母细胞或原核细胞。为了在某些细胞体系中表达,可以在 N-末端引入信号肽,以将分泌导向细胞外介质。有或无信号肽的抗体可以从诸如大肠杆菌 (*E. coli*) 的细菌细胞分泌。在美国专利申请 20070020685 中描述了抗体片段从大肠杆菌的无信号分泌的方法。

[0097] 为了生成 GM-CSF-结合抗体,本发明的一个例如图 1 所示的 V_H 区与本发明的一个例如图 1 所示的 V_L 区结合,并在合适的表达系统中以许多形式中的任一种表达。由此,该抗体可以表达为 scFv、Fab、Fab' (包含免疫球蛋白铰链序列)、 $F(ab')_2$ (通过两个 Fab' 分子铰链序列间形成二硫键而形成)、完整的免疫球蛋白或截短的免疫球蛋白,或在原核或真核宿主细胞中,无论是在宿主细胞内还是通过分泌方式,表达为融合蛋白。甲硫氨酸残基可以任选地存在于例如在无信号表达系统中产生的多肽的 N 末端。本文描述的每一个 V_H 区都可以与每一个 V_L 区成对,以生成抗-GM-CSF 抗体。图 1 中显示了示例性的重链和轻链的组合。

[0098] 本发明的抗体抑制 GM-CSF 受体活化,例如通过抑制 GM-CSF 与受体结合,并且展示了对 GM-CSF 的高亲和力结合,例如 500pM。在一些实施方案中,抗体具有每秒约 10^{-4} 或更小的解离常数。不被理论约束,具有较小解离常数的抗体提供改良的治疗益处。例如,本发明的抗体具有比 c19/2 低三倍的解离速率,产生了超过 10 倍的有效 GM-CSF 中和活性,例如在基于细胞的测定中,诸如 IL-8 产生(参见,例如,实施例 2)。

[0099] 可以利用多种表达系统,包括原核的和真核的表达系统来生产抗体。在一些实施方案中,表达系统是哺乳动物细胞表达,诸如 CHO 细胞表达系统。许多这种系统可以从供应商处广泛获取。在抗体包含 V_H 和 V_L 区两者的实施方案中,该 V_H 和 V_L 区可以利用单一载体来表达,例如在双顺反子表达单元中或不同启动子控制下。在其他的实施方案中,该 V_H 和 V_L 区可以利用分别的载体来表达。本文所描述的 V_H 或 V_L 区可以在 N 末端任选地包含甲硫

氨酸。

[0100] 本发明的抗体可以通过多种形式来生产,包括作为 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv 或 dAB。本发明的抗体还能够包括人的恒定区。轻链的恒定区可以是人的 κ 或 λ 恒定区。重链恒定区通常是 γ 链恒定区,例如 γ -1、 γ -2、 γ -3 或 γ -4 恒定区。在其他的实施方案中,该抗体可以是 IgA。

[0101] 在本发明的一些实施方案中,抗体 V_L区,例如图 1 的 VK#1, VK#2, VK#3 或 VK#4, 与人 κ 恒定区(例如,SEQ ID NO:10)结合以形成完整的轻链。

[0102] 在本发明的一些实施方案中,V_H区与人 γ -1 恒定区结合。可以选择任何适合的 γ -1f 同种异型,诸如 f- 同种异型。因此,在一些实施方案中,抗体是具有 f- 同种异型恒定区例如 SEQ ID NO:11 的 IgG,其具有选自 VH#1, VH#2, VH#3, VH#4 或 VH#5(图 1) 的 V_H。在一些实施方案中,抗体具有选自 VK#1, VK#2, VK#3 或 VK#4(图 1) 的 V_L。在特定的实施方案中,抗体具有 SEQ ID NO:10 所列的 κ 恒定区,以及 SEQ ID NO:11 所列的重链恒定区,其中重链和轻链可变区包含下述来自图 1 所列的序列的组合中的一个:a) VH#2, VK#3 ;b) VH#1, VK#3 ;c) VH#3, VK#1 ;d) VH#3, VL#3 ;e) VH#4, VK#4 ;f) VH#4, VK#2 ;g) VH#5, VK#1 ;h) VH#5, VK#2 ;i) VH#3, VK#4 ;或 j) VH#3, VL#3)。

[0103] 在一些实施方案中,例如,如果抗体是片段,该抗体能够与另一分子偶联,例如聚乙二醇(聚乙二醇化)或血清蛋白,以在体内提供延长的半衰期。抗体片段聚乙二醇化的实例在 Knight et al. Platelets 15:409, 2004(关于阿昔单抗);Pedley et al., Br. J. Cancer 70:1126, 1994(关于抗-CEA 抗体);Chapman et al, Nature Biotech. 17:780, 1999;以及 Humphreys, et al., Protein Eng. Des. 20:227, 2007) 中被提供。

[0104] 在一些实施方案中,本发明的抗体以 Fab' 片段的形式存在。全长轻链通过将 V_L 区融合到人 κ 或 λ 恒定区产生。任一恒定区可以用于任何轻链。然而,在典型的实施方案中, κ 恒定区与 V κ 可变区联用,以及 λ 恒定区与 V λ 可变区一起使用。

[0105] Fab' 的重链是 Fd' 片段,其是通过将本发明的 V_H区融合到人重链恒定区序列,第一恒定结构域(CH1)和铰链区产生的。该重链恒定区序列可以来自任何的免疫球蛋白种类,但通常来自 IgG,以及可以来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。本发明的 Fab' 抗体还可以是杂种序列,例如铰链序列可以来自一个免疫球蛋白亚类,CH1 结构域可以来自另一亚类。

[0106] V. 用于治疗其中 GM-CSF 是靶标的疾病的抗 GM-CSF 抗体的给药。

[0107] 本发明还提供了治疗患有与 GM-CSF 有关的疾病的患者的方法,在该疾病中,抑制 GM-CSF 活性是理想的,即,该疾病中 GM-CSF 是治疗靶标。在一些实施方案中,这种患者患有慢性炎症疾病,例如关节炎,例如类风湿性关节炎、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、青少年特发性关节炎以及关节的其他炎症疾病;炎性肠疾病如溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、巴雷特综合征(Barrett's syndrome),回肠炎、肠炎和谷蛋白敏感性肠病;呼吸系统的炎症病症,诸如哮喘、成人呼吸窘迫综合征、变态反应性鼻炎、矽肺、慢性呼吸道阻塞性疾病、超敏反应肺疾病、支气管扩张症;皮肤的炎症疾病,包括银屑病、硬皮病和诸如湿疹、特应性皮炎、荨麻疹和瘙痒症的炎症皮肤病;涉及中枢和外周围神经系统炎症的病症包括多发性硬化、特发性脱髓鞘性多神经病、格-巴二氏综合征(Guillain-Barre syndrome)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病和诸如阿尔茨海默氏病的神经变性疾病。各种其它炎症疾病可以使用本发明的方法治疗。这些包括系统性红斑性狼疮,免疫介导性肾脏病,例如肾小球肾炎和脊

椎关节病；带有不良慢性炎症成分的疾病，诸如系统性硬化病，特发性炎症性肌病，肖格伦氏综合征 (Sjogren' s syndrome)，脉管炎，肉瘤样病，甲状腺炎，痛风，耳炎，结膜炎，鼻窦炎，肉瘤样病，贝赫切特综合征 (Behcet' s syndrome)，肝胆管疾病诸如肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎和硬化性胆管炎。在一些实施方案中，患者患有心血管系统损伤后的炎症。多种其他的炎症性疾病包括肺结核和慢性胆囊炎。例如在 Harrison' s Principles of Internal Medicine (哈里森内科学)，第 12 版，Wilson, et al., eds., McGraw-Hill, Inc.) 中也描述了其它慢性炎症疾病。在一些实施方案中，用抗体治疗的患者患有癌症，其中 GM-CSF 促进肿瘤或癌症细胞生长，例如急性髓样白血病。在一些实施方案中，用本发明抗体治疗的患者患有心衰，或具有患心衰的风险，例如由于心血管细胞的缺血损伤，诸如缺血性心脏病、中风和动脉粥样硬化导致。在一些实施方案中，用本发明的抗体治疗的患者患有哮喘。在一些实施方案中，用本发明的抗体治疗的患者患有阿尔茨海默氏病。在一些实施方案中，用本发明的抗体治疗的患者患有骨质减少症，例如骨质疏松症。在一些实施方案中，用本发明的抗体治疗的患者患有血小板减少性紫癜。在一些实施方案中，患者患有 I 型或 II 型糖尿病。在一些实施方案中，患者可以患有多于一种的以 GM-CSF 为治疗靶标的疾病，例如患者可以患有类风湿性关节炎和心衰，或者骨质疏松症和类风湿性关节炎等。

[0108] 本发明的方法包括以治疗有效量给予患者作为药物组合物的抗 GM-CSF 抗体，所述方法使用适用于治疗所述疾病的给药方案。可以配制用于多种药物递送系统的组合物。一种或多种生理学上可接受的赋性剂或载体也可以包括在用于合适制剂的组合物中。用于本发明的合适的制剂见于 Remington' s Pharmaceutical Sciences (雷明顿氏药物科学)，第 21 版，Philadelphia, PA. Lippincott Williams&Wilkins, 2005。

[0109] 抗 GM-CSF 抗体以适合注射入患者体内的溶液形式提供，例如用于注射的无菌等渗水溶液。将抗体以合适的浓度溶解或悬浮在可接受的载体中。在一些实施方案中，所述载体是水性的，例如，水、盐水、磷酸缓冲盐等。组合物可以包含接近生理条件所需的辅助性药用物质，诸如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂等。

[0110] 本发明的药物组合物以足以治愈或至少部分阻止疾病或疾病的症状及其并发症的量给予患者，例如患有骨质减少、哮喘、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、青少年特发性关节炎、多肌炎、系统性红斑狼疮、心衰、心肌损害如心脏病发作后的心肌损害、血小板减少性紫癜或糖尿病的患者。足以实现这一目的的量定义为“治疗有效剂量”。通过监测患者对治疗的反应确定治疗有效剂量。指示治疗有销量的典型的参考标准 (benchmark) 包括患者疾病症状的减轻。用于这一用途的有效量取决于疾病的严重程度以及患者总体健康状况，包括诸如年龄、体重、性别、给药途径等其他因素。抗体的单次或多次给药可以按照患者所需和耐受的剂量及频率给予。在任一情形下，该方法提供了有效地治疗患者的足够量的抗 GM-CSF 抗体。

[0111] 抗体可以单独给予，或与其他治疗联合给予，以治疗目的疾病。

[0112] 抗体可以通过经由包括但不限于静脉内、皮下、肌肉内或腹腔内途径的任何适合途径的注射或输注给药。在一些实施方案中，该抗体可以通过吹入法给药。在示例性的实施方案中，抗体可以在 4℃ 以 10mg/ml 储存在无菌等渗注射用盐水溶液中，并且在给予患者前，在 100ml 或 200ml 0.9% 的注射用氯化钠中稀释。在 1 小时的时程以 0.2-10mg/kg 的剂量通过静脉内输注的方式给予抗体。在其他的实施方案中，在 15 分钟 -2 小时的时间段，通

过静脉内输注的方式给予抗体。在其他的实施方案中,给药操作通过皮下弹丸注射。

[0113] 选择抗体的剂量以便为患者提供有效的治疗,所述剂量为小于 0.1mg/kg 体重至约 25mg/kg 体重的范围,或为 1mg-2g/ 患者的范围。优选地,该剂量为 1-10mg/kg 或大约 50mg-1000mg/ 患者的范围。该剂量可以以适当的频率重复,根据抗体的药代动力学(例如,抗体在循环中的半衰期)和药效反应(例如,抗体疗效的持续时间),该频率可以为每天一次至每三个月一次。在一些实施方案中,在体内的半衰期为约 7- 约 25 天,以及在每周一次至每三个月一次重复抗体给药。在其他的实施方案中,大约每月一次给药抗体。

[0114] 本发明的 V_H 区和 / 或 V_L 区还可以用于诊断目的。例如, V_H 区和 / 或 V_L 区可以用于临床分析,例如检测患者中的 GM-CSF 水平。本发明的 V_H 区或 V_L 区还可以用于例如生产抗 -Id 抗体。

实施例

[0115] 实施例 1. 工程化的人抗 -GM-CSF V 区的鉴定。

[0116] 如公开号为 20050255552 的美国专利申请中所描述的,进行人工程化。从人 V 节段文库序列以及人种系 J 节段序列构建表位 - 聚集的文库,该人 V 节段库序列连接到包含 CDRH3 和 CDRL3 中的 BSD 序列 的 CDR3-FR4 区。对于重链,使用人种系 JH4 序列,以及对于轻链,使用人种系 JK4 序列。

[0117] 选择支持与重组人 GM-CSF 结合的、来自 V_{H1} - 限制性文库的全长人工程化的 V 区。“全长” V - κ 文库用作构建如公开号为 20060134098 的美国专利申请所描述的“盒式”文库 (“cassette”libraries) 的基础,其中只有部分鼠科 c19/2V 节段最初由人序列文库取代。构建了两种类型的盒 (cassette)。通过框架 2 区内的交叠共有序列的桥式 PCR (bridge PCR) 制备 V - κ 链的盒。以这种方式,构建人 V - κ III 同种型的“前端”和“中间”人盒式文库。支持与 GM-CSF 结合的人 V - κ III 盒通过集落转移结合测定 (colony-lift binding assay) 来鉴定并按照 ELISA 中的亲和力来排序。将 V - κ 人“前端”和“中间”盒通过桥式 PCR 融合在一起,从而重构支持 GM-CSF 结合活性的全长人 V - κ 区。因此人工程化 Fabs 由支持与人 GM-CSF 结合的人工程化 V 重链和 V - κ 区组成。

[0118] 通过表面等离子共振技术 (spr) 分析确定结合活性。生物素化的 GM-CSF 被捕获在链霉抗生物素包被的 CM5 生物传感器芯片上。从大肠杆菌表达的人工程化的 Fab 片段在 10mM HEPES、150mM NaCl、0.1mg/mL BSA 和 0.005% p20 中在 pH 7.4 时稀释到 30nM 的起始浓度。利用 3 倍稀释系列,将每一 Fab 稀释 4 次,每一浓度在 37°C 下测试两次以确定与不同密度抗原表面的结合动力学。整体拟合来自所有三个表面的数据以提取解离常数。

[0119] 图 1 中显示了示例性的人工程化的抗 GM-CSF V 区。

[0120] 实施例 2. 人工程化的 GM-CSF 抗体的评价

[0121] 本实施例评价了人工程化抗 GM-CSF 抗体在基于细胞的测定中与嵌合的 IgG1k 抗体 (Ab2) 相比的结合活性和生物学效能,所述嵌合的 IgG1k 抗体具有来自小鼠抗体 LMM102 的可变区 (Nice et al, Growth Factors (生长因子), 3:159, 1990)。Ab1 是抗 GM-CSF 的人工程化 IgG1k 抗体,与 Ab2 具有相同的恒定区。

[0122] 人 GM-CSF 与 Ab1 和 Ab2 结合的表面等离子共振分析

[0123] 利用 Biacore 3000 仪器,表面等离子共振分析用于比较 Ab1 和 Ab2 与糖基化的人

GM-CSF 相互作用的结合动力学和单价亲和力。利用多克隆抗人 F(ab')₂, 将 Ab1 或 Ab2 捕获到 Biacore 芯片表面。人 293 细胞表达的糖基化重组人 GM-CSF 用作分析物。在 2 次独立实验中确定动力学常数 (参见, 图 2 和表 1)。结果表明, 在该实验中, GM-CSF 以可比较的单价亲和力与 Ab2 和 Ab1 结合。然而, Ab1 具有比 Ab2 低 2 倍的“结合速率 (on-rate)”, 但“解离速率 (off-rate)”比 Ab2 低约 3 倍。

[0124] 表 1: 图 2 中由表面等离子共振分析确定的 37°C 的动力学常数, 显示了结合常数 (k_a)、解离常数 (k_d) 和计算的亲和力 (KD)。

[0125]

	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	KD (pM)
Ab2	7.20×10^5	2.2×10^{-5}	30.5
Ab1	2.86×10^5	7.20×10^{-6}	25.1

[0126] GM-CSF 在 N-连接和 O-连接糖基化位点都是天然糖基化的, 尽管糖基化不是生物活性必需的。为了确定是否 GM-CSF 糖基化影响 Ab1 或 Ab2 的结合, 使用两种不同来源的重组 GM-CSF, 即大肠杆菌中表达的 GM-CSF (非糖基化的) 和人 293 细胞中表达的 GM-CSF (糖基化的), 在 ELISA 中比较抗体。图 3 和表 2 中的结果表明, 两种抗体都以等效的活性结合糖基化和非糖基化 GM-CSF。这两种抗体在该测定中还显示了可比较的 EC₅₀ 值。

[0127] 表 2. 由 ELISA 确定的 Ab2 和 Ab1 与两种不同来源的人 GM-CSF 结合的 EC₅₀ 的总结。从两次独立的实验确定对来自人 293 细胞 (糖基化的) 或来自大肠杆菌 (非糖基化的) 的重组 GM-CSF 的结合。实验 1 显示在图 5 中。

[0128]

	非糖基化的 (实验 1)	非糖基化的 (实验 2)	糖基化的(实验 1)
Ab2	400 pM	433 pM	387 pM
Ab1	373 pM	440 pM	413 pM

[0129] Ab1 是人工程化的抗体, 其衍生自存在于 Ab2 的小鼠可变区。通过竞争 ELISA 检测 Ab1 的交叠表位特异性 (Ab2)。

[0130] 利用已知的技术, 制备生物素化的 Ab2。生物素化不影响 Ab2 与 GM-CSF 的结合, 如由 ELISA 确定的。在该测定中, 以不同浓度添加 Ab2 或 Ab1, 生物素化的 Ab2 为固定量。在未标记的 Ab 或 Ab1 竞争剂存在下, 测定生物素化的 Ab2 的检测 (图 4)。Ab1 和 Ab2 两者都与生物素化的 Ab2 竞争与 GM-CSF 的结合, 由此表明与同一表位结合。Ab1 竞争与 GM-CSF 的结合比 Ab2 更有效, 这与通过表面等离子共振分析时 Ab1 与 Ab2 相比解离动力学较低是一致的。

[0131] GM-CSF 活性通过 Ab1 和 Ab2 的中和

[0132] 应用基于细胞的测定方法测定 GM-CSF 活性的中和来评价生物学效能。该测定方法测量 IL-8 从用 GM-CSF 诱导的 U937 细胞中的分泌。用 0.5ng/ml 大肠杆菌来源的 GM-CSF 诱导 16 小时后, 分泌入培养物上清的 IL-8 通过 ELISA 确定。

[0133] Ab1 和 Ab2 在该测定方法中的中和活性的比较显示在图 5 中的代表性测定中。在三次独立实验中, 当比较 IC₅₀ 时, Ab1 抑制 GM-CSF 活性比 Ab2 更有效 (表 3)。

[0134] 表 3. 抑制 GM-CSF 诱导的 IL-8 表达的 IC₅₀ 的比较。图 5 中显示了来自三次独立实验的数据,以 ng/ml 和 nM 表达平均 IC₅₀。

[0135]

实验	Ab2 (ng/ml)	Ab2 (nM)	Ab1 (ng/ml)	Ab1 (nM)
A	363	2.4	31.3	0.21
B	514	3.4	92.5	0.62
C	343	2.2	20.7	0.14
平均值	407	2.7	48.2	0.32

[0136] 小结

[0137] 人工程化 Ab1 结合 GM-CSF, 计算的平衡结合常数 (KD) 为 25pM。Ab2 结合 GM-CSF, KD 为 30.5pM。Ab2 显示了比 Ab1 高 2 倍的对 GM-CSF 的结合常数 (k_a), 而 Ab1 显示了比 Ab2 低 3 倍的解离动力学 (k_d)。在抗原结合 ELISA 中, Ab2 和 Ab1 对糖基化的和非糖基化的 GM-CSF 显示了相似的结合活性。竞争 ELISA 证实了两种抗体竞争相同的表位; Ab1 显示了比 Ab2 更高的竞争结合活性。此外, 在 GM-CSF 诱导的 IL-8 诱导测定中, Ab1 显示了比 Ab2 更高的 GM-CSF 中和活性。

[0138] 出于清楚理解的目的, 尽管已经通过说明和举例在一些细节上描述了前述发明, 但结合本发明的教导, 对本领域技术人员显而易见的是, 可以对本发明作出某些变化和修饰而不偏离所附权利要求书的精神或范围。

[0139] 本说明书引用的所有出版物、目录号、专利和专利申请都通过引用的方式并入本文, 如同各自被特别和单独地指明通过引用的方式并入一样。

[0140] 本发明的抗 -GM-CSF 抗体的示例性的 V_H 区序列:

[0141] SEQ ID NO :1 (VH#1, 图 1)

[0142] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPN

[0143] SGGTNYAQKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCVRRDRFPYYFDYW

[0144] QGTLVTVSS

[0145] SEQ ID NO :2 (VH#2, 图 1)

[0146] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFTNYYIHWVRQAPGQRLEWMGWINAG

[0147] NGNTKYSQKFQGRVAITRSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRDRFPYYFDYWG

[0148] QGTLVTVSS

[0149] SEQ ID NO :3 (VH#3, 图 1)

[0150] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFTNYYIHWVRQAPGQRLEWMGWINAG

[0151] NGNTKYSQKFQGRVAITRSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRQRFPPYYFDYWG

[0152] QGTLVTVSS

[0153] SEQ ID NO :4 (VH#4, 图 1)

[0154] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFTNYYIHWVRQAPGQRLEWMGWINAG

[0155] NGNTKYSQKFQGRVAITRSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCVRRQRFPPYYFDYWG

[0156] QGTLVTVSS

[0157] SEQ ID NO :5 (VH#5, 图 1)

[0158] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFTNYYIHWVRQAPGQRLEWMGWINAG

[0159] NGNTKYSQKFQGRVTITRSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCVRRQRFPPYYFDYWG

- [0160] QGTLVTVSS
- [0161] 本发明的抗 -GM-CSF 抗体的示例性的 V_L 区序列：
- [0162] SEQ ID NO :6 (VK#1, 图 1)
- [0163] EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGTNVAWYQQKPGQAPRVL γ YSTSSRATGI
- [0164] TDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFNRSPLTFGGGTKVEIK
- [0165] SEQ ID NO :7 (VK#2, 图 1)
- [0166] EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGTNVAWYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGI
- [0167] TDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFNKSPLTFGGGTKVEIK
- [0168] SEQ ID NO :8 (VK#3, 图 1)
- [0169] EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGSNLAWYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGIT
- [0170] DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFNRSPLTFGGGTKVEIK
- [0171] SEQ ID NO :9 (VK#4, 图 1)
- [0172] EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGSNLAWYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGIT
- [0173] DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFNKSPLTFGGGTKVEIK
- [0174] SEQ ID NO :10 示例性 κ 恒定区
- [0175] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
- [0176] EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0177] SEQ ID NO :11 示例性重链恒定区, f- 同种异型：
- [0178] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
- [0179] QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAP
- [0180] ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
- [0181] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
- [0182] QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDLAWEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
- [0183] FFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

VH1 1-02

VH#1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTINYAQKFGQGRVITWTRDTISISTAYMELSLRLSDDTAVYYCAR-----
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTINYAQKFGQGRVITWTRDTISISTAYMELSLRLSDDTAVYYCVRDRRPFYYFDYWGGTLLVTVSS

VH1 1-03

VH#2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSVMHVVVRQAPGQGLEWMGWINAGNGNTKYSQKFGQGRVITTRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR-----
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYIYHVVVRQAPGQGLEWMGWINAGNGNTKYSQKFGQGRVAITTRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRDRPFYYFDYWGGTLLVTVSS

VH#3

VH#4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFTNYIYHVVVRQAPGQGLEWMGWINAGNGNTKYSQKFGQGRVAITTRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRQRFYYFDYWGGTLLVTVSS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFTNYIYHVVVRQAPGQGLEWMGWINAGNGNTKYSQKFGQGRVAITTRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCVRQRPFYYFDYWGGTLLVTVSS

VH#5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFTNYIYHVVVRQAPGQGLEWMGWINAGNGNTKYSQKFGQGRVITTRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCVRQRPFYYFDYWGGTLLVTVSS

VKIII A27

VK#1

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQVGGSP-----
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGTN-VAMVYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGIIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQPNRSPILTFGGGTVKEIK

VK#2

VK#3

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGTN-VAMVYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGIIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQENKSPILTFGGGTVKEIK
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGSN-LAWYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGIIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQPNRSPILTFGGGTVKEIK

VK#4

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGSN-LAWYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGIIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQENKSPILTFGGGTVKEIK

图 1

Fab	Vh	Vk	通过表面等离子共振分析测定的与GM-CSF结合 的解离速率(S ⁻¹)
FB42-8	#2	#3	1.36 x 10 ⁻⁴
FB44-5	#1	#3	8.0 x 10 ⁻⁵
FB77-2	#3	#1	5.57 x 10 ⁻⁵
FB92-1	#4	#4	3.84 x 10 ⁻⁵
FB94-1	#4	#2	3.12 x 10 ⁻⁵
FB104-1	#5	#1	3.57 x 10 ⁻⁵
FB106-1	#5	#2	5.4 x 10 ⁻⁵

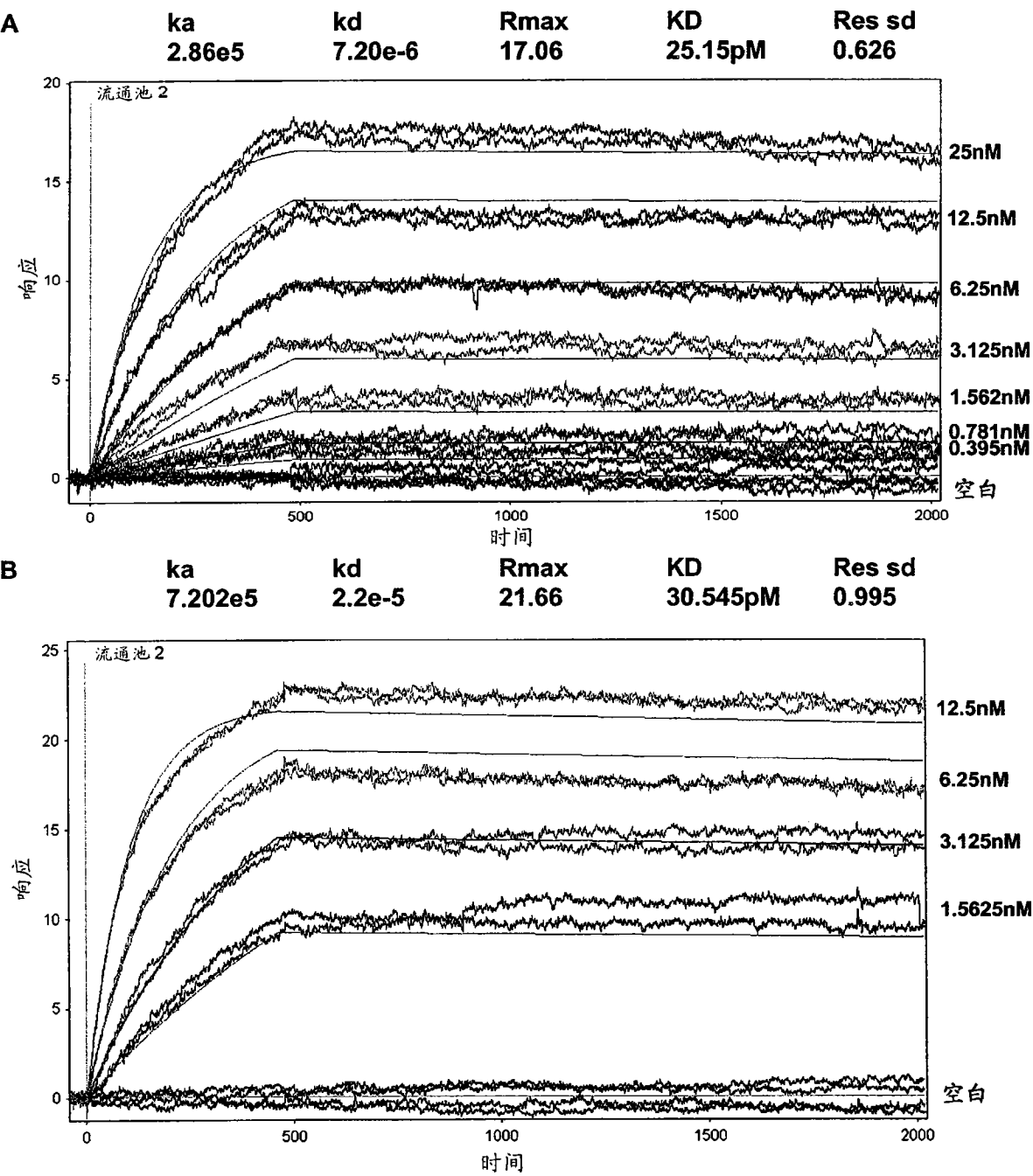


图 2

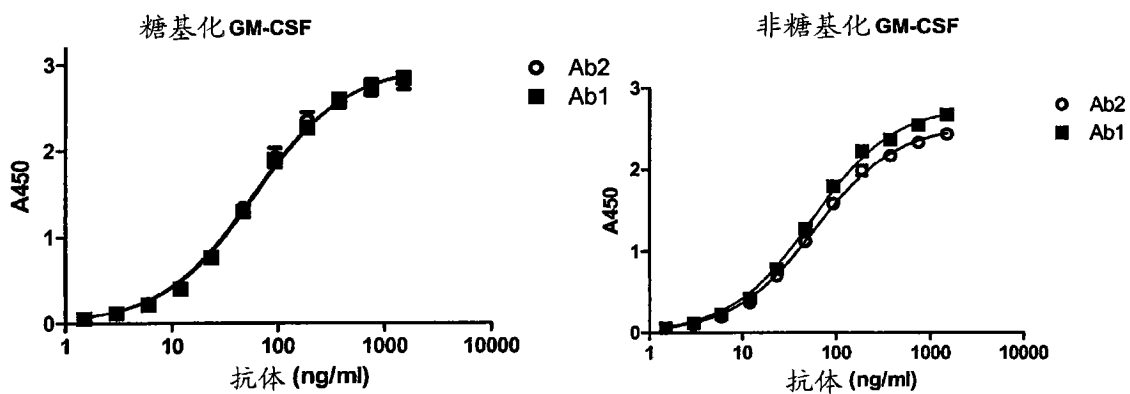


图 3

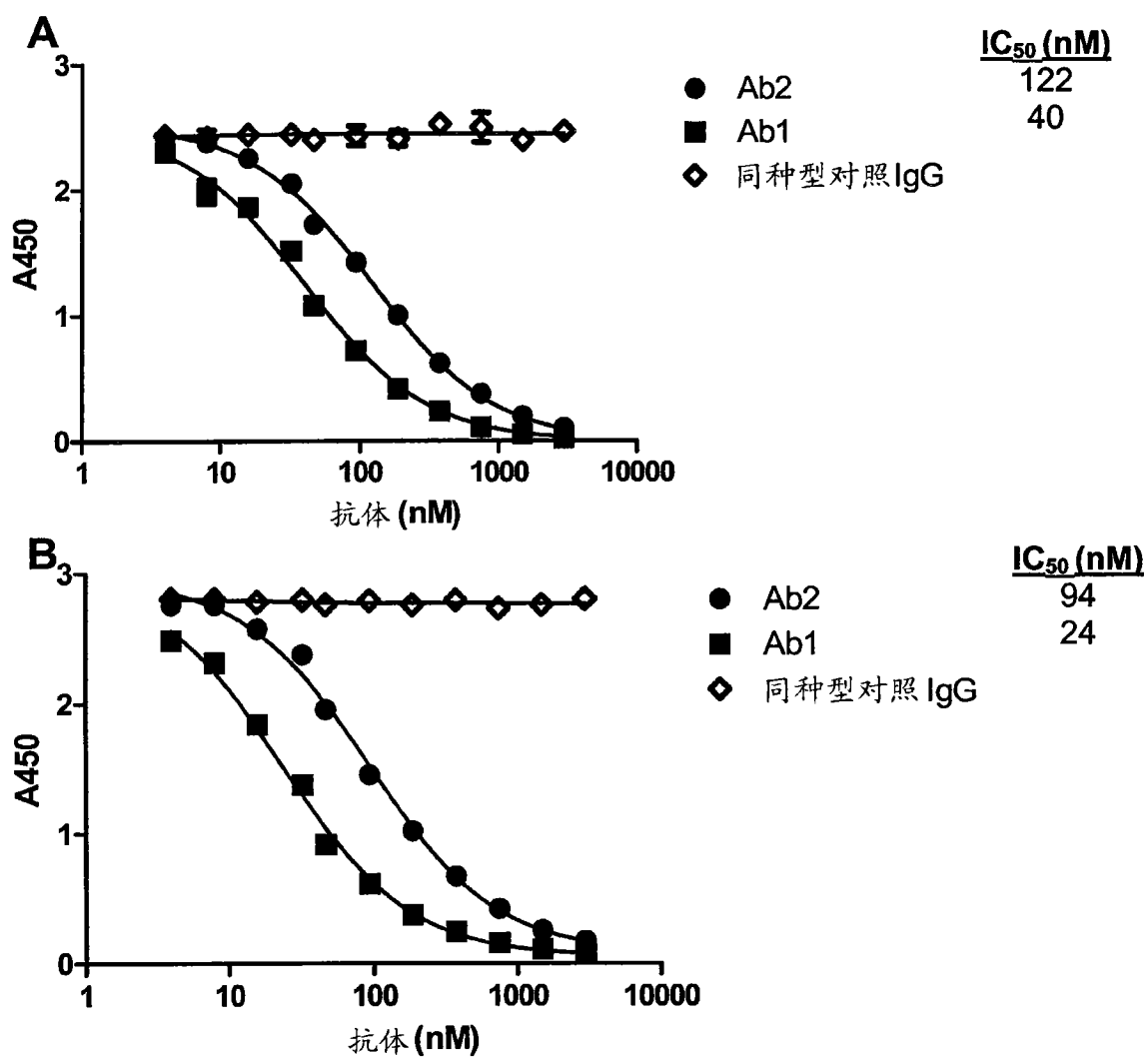


图 4

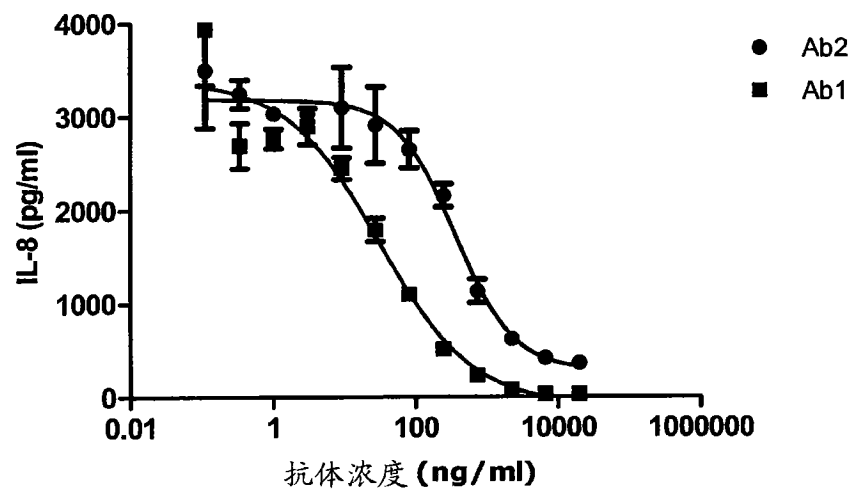


图 5