



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107427574 B

(45) 授权公告日 2022.02.08

(21) 申请号 201680010938.9

(22) 申请日 2016.01.08

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107427574 A

(43) 申请公布日 2017.12.01

(30) 优先权数据  
2015900054 2015.01.09 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.08.18

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/AU2016/050005 2016.01.08

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/109872 EN 2016.07.14

(73) 专利权人 阿达尔塔有限公司

地址 澳大利亚维多利亚州

(72) 发明人 迈克尔·弗利 安德鲁·颇乌  
凯瑟琳·格里菲斯 萨曼莎·科博  
卡特丽娜·维杜卡

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

审查员 贾星航

权利要求书3页 说明书77页

序列表38页 附图43页

(54) 发明名称

CXCR4结合分子

(57) 摘要

本公开涉及针对也称为融合素或CD184的G偶联蛋白受体CXCR4的多肽(在本文中也称为CXCR4结合分子或多肽)。本发明也涉及编码所述多肽的核酸;用于制备所述多肽的方法;组合物,并且特别是包含所述多肽的药物组合物;以及所述多肽用于治疗或诊断目的用途。

1. 多肽,其相比对应于NCAM结构域1的SEQ ID NO:1氨基酸序列是修饰的,所述多肽包含分别与SEQ ID NO:1的氨基酸1至26、33至79和88至97限定的骨架区具有至少90%同一性的序列并且具有CDR1和CDR3区;其中修饰的多肽能结合人C-X-X趋化因子受体4型(CXCR4),并且其中所述CDR1和CDR3区选自:

- (i) 由SEQ ID NO:12组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:13组成的CDR3区序列;
- (ii) 由SEQ ID NO:15组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:16组成的CDR3区序列;
- (iii) 由SEQ ID NO:18组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:19组成的CDR3区序列;
- (iv) 由SEQ ID NO:21组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:22组成的CDR3区序列;
- (v) 由SEQ ID NO:24组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:25组成的CDR3区序列;
- (vi) 由SEQ ID NO:27组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:28组成的CDR3区序列; 或者
- (vii) 由SEQ ID NO:30组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:31组成的CDR3区序列。

2. 根据权利要求1所述的多肽,其是人CXCR4的拮抗剂。

3. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述CDR3区由SEQ ID NO: 13组成。

4. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 29中的任一项所示的序列组成。

5. 根据权利要求4所述的多肽,其由SEQ ID NO: 11组成。

6. 多肽,其相比对应于NCAM结构域1的SEQ ID NO:1氨基酸序列是修饰的,所述多肽包含分别与SEQ ID NO:1的氨基酸1至26、33至79和88至97限定的骨架区具有至少90%同一性的序列并且具有CDR1和CDR3区;其中修饰的多肽能结合CXCR4,并且其中所述CDR1和CDR3区选自:

- (i) 由SEQ ID NO:41组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:42组成的CDR3区序列;
- (ii) 由SEQ ID NO:45组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:46组成的CDR3区序列;
- (iii) 由SEQ ID NO:49组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:50组成的CDR3区序列;
- (iv) 由SEQ ID NO:53组成的CDR1区域序列和由SEQ ID NO:54组成的CDR3区域序列;
- (v) 由SEQ ID NO:57组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:58组成的CDR3区序列;
- (vi) 由SEQ ID NO:61组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:62组成的CDR3区序列;
- (vii) 由SEQ ID NO:65组成的CDR1区域序列和由SEQ ID NO:66组成的CDR3区域序列;
- (viii) 由SEQ ID NO:69组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:70组成的CDR3区序列;
- (ix) 由SEQ ID NO:73组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:74组成的CDR3区序列; 或者
- (x) 由SEQ ID NO:77组成的CDR1区序列和由SEQ ID NO:78组成的CDR3区序列。

7. 根据权利要求6所述的多肽,其由SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 72或SEQ ID NO: 76中的任一项所示的序列组成。

8. 根据权利要求7所述的多肽,其由SEQ ID NO: 40所示的序列组成。

9. 根据权利要求6所述的多肽,其以5 nM至30 nM的亲和力结合人CXCR4。

10. 根据权利要求6所述的多肽,其以5 nM或更小的亲和力结合人CXCR4。

11. 根据权利要求1或6所述的多肽,其结合CXCR4的一个或多个选自由SEQ ID NO:105所示的人CXCR4的C28、E32、V112、Y184、F189、P191、D193、W195、D262、L266、E268和E288组成

的组的残基。

12. 根据权利要求1或6所述的多肽,其抑制一种或多种以下活动:

- (i) 表达CXCR4的细胞中的cAMP;
- (ii) 表达CXCR4的细胞中的 $\beta$ -抑制蛋白信号传导;
- (iii) 表达CXCR4的细胞的细胞增殖;
- (iv) 表达CXCR4的细胞的转移;
- (v) CXCR4诱导的血管生成;和
- (vii) 表达CXCR4的细胞的迁移。

13. 根据权利要求1或6所述的多肽,其被聚乙二醇化。

14. 一种核酸分子,其编码根据任何前述权利要求所述的多肽。

15. 一种表达构建体,其包含根据权利要求14所述的核酸分子。

16. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求14所述的核酸分子或根据权利要求15所述的表达构建体。

17. 一种缀合物,其包含根据权利要求1至13中任一项所述的多肽和药剂。

18. 根据权利要求17所述的缀合物,其中所述药剂是治疗剂、毒素、可检测标记或延长所述多肽的半衰期的药剂。

19. 根据权利要求17或18所述的缀合物,其中所述药剂通过结合血清蛋白来延长所述多肽的半衰期,或是免疫球蛋白的Fc部分。

20. 一种多聚体,其包含两个或更多个根据权利要求1至13中任一项所述的多肽或根据权利要求17所述的缀合物。

21. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至13中任一项所述的多肽或根据权利要求17所述的缀合物或根据权利要求20所述的多聚体以及可接受的载体。

22. 根据权利要求1或6所述的多肽,或根据权利要求17所述的缀合物,或根据权利要求20所述的多聚体,其中所述多肽、所述缀合物或所述多聚体用于治疗或预防CXCR4相关疾病或病症,所述多肽包含选自由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76组成的组的序列。

23. 根据权利要求1至13中任一项所述的多肽或根据权利要求17所述的缀合物或根据权利要求20所述的多聚体或根据权利要求21所述的药物组合物在制备预防或治疗CXCR4相关疾病或病症的药物中的用途。

24. 根据权利要求1至13中任一项所述的多肽或根据权利要求17所述的缀合物或根据权利要求20所述的多聚体或根据权利要求21所述的药物组合物在制备预防或治疗与CXCR4信号传导相关疾病或病症的药物中的用途。

25. 根据权利要求1至13中任一项所述的多肽或根据权利要求17所述的缀合物或根据权利要求20所述的多聚体或根据权利要求21所述的药物组合物在制备预防或治疗CXCR4所涉及于其中的路径或机理相关的疾病或病症的药物中的用途。

26. 根据权利要求23所述的用途,其中所述CXCR4相关疾病或病症选自癌症、纤维化、炎症、多发性硬化症、动脉粥样硬化和病毒性感染。

27. 权利要求1至13中任一项所述的多肽在制备用于检测获自受试者的样品的CXCR4的试剂中的用途。

## CXCR4结合分子

[0001] 相关申请和以引用的方式并入

[0002] 本文引用或参照的所有文件以及本文引用的文件中引用或参照的所有文件连同本文或以引用的方式并入本文的任何文件中提及的任何产品的任何制造商说明书、描述、产品说明书和产品单一起据此以引用的方式整体并入本文。

[0003] 本文件要求AU 2015900054的优先权,所述专利的整个内容以引用的方式并入本文。

[0004] 电子提交的序列表的整个内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

### 发明领域

[0005] 本公开涉及针对也称为融合素(Fusin)或CD184的G偶联蛋白受体CXCR4的多肽(在本文中也称为CXCR4结合分子或多肽)。本发明也涉及编码所述多肽的核酸;用于制备所述多肽的方法;组合物,并且特别是包含所述多肽的药物组合物;以及所述多肽用于治疗或诊断目的的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 趋化因子(化学引诱细胞因子)是一个家族的结构和功能相关小蛋白质,除控制其它生物过程诸如血管生成、形态发生、自体免疫性、肿瘤生长和转移之外,其也引导细胞(例如白细胞和/或淋巴细胞和/或干细胞和/或神经元)的迁移。基于氨基末端半胱氨酸残基的存在和相对位置,趋化因子被分组成各个家族(例如CC、CXC、CX<sub>3</sub>C和C趋化因子)。通常,趋化因子的生物活性由细胞表面受体特别是7跨膜结构域G蛋白偶联受体(GPCR)介导。根据趋化因子受体所结合的趋化因子的家族来将它们分组和命名。

[0008] CXCR家族的一个成员是CXCR4,其主要在淋巴细胞上表达,并且使趋化性活化。CXCR4,也称为融合素,是一种对作为具有强力淋巴细胞趋化活性的分子的基质源性因子1(SDF-1,也称为CXCL12)具有特异性的 $\alpha$ 趋化因子受体。

[0009] CXCR4在胚胎发生、体内平衡、纤维化和炎症方面起作用。CXCR4/SDF-1路径已牵涉于器官血管化中以及免疫和造血系统中(Tachibana K等(1998) Nature 393:591-594)。阻断CXCR4受体的药物似乎能够“动员”造血干细胞作为外周血液干细胞进入血流中。也已显示CXCR4充当嗜T淋巴细胞性HIV-1分离株的共受体(Geng Y等(1996) Science 272:872-877)。也已显示CXCR4在广泛多种癌细胞类型上表达,并且在许多不同赘瘤中涉及于刺激转移过程(Murphy PM(2000) N.Eng. J. Med. 345:833-835)。

[0010] G蛋白偶联受体当前是最重要类别的治疗靶标,并且针对它们的抗体出于治疗、诊断和研究目的而被高度探寻。尽管大量关注这些靶标,但使用常规手段产生针对膜蛋白质的高品质抗体或结合剂已具有挑战性。

[0011] 先前已描述针对CXCR4的结合剂,包括完整抗体(例如Medarex)、抗体片段和单结构域抗体(Ablynx),然而,本发明结合剂提供缓和抗体的一些缺点的替代性构建体,所述缺点例如Fc介导的效应以及高生产成本、低稳定性和它们的大尺寸,此使它们用于肿瘤穿透的效用降低。本发明的结合剂提供小分子药剂的替代物,所述小分子药剂诸如普乐沙福

(Plerixafor) (莫唑比 (Mozobil) 或AMD3100), 其当前被指示在患有非霍奇金氏淋巴瘤 (non-Hodgkins' lymphoma, NHL) 和多发性骨髓瘤 (MM) 的患者中与粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 组合用于外周血液干细胞动员。

[0012] 发明概述

[0013] 本公开涉及CXCR4结合分子或多肽, 在本文所述的实例中被称为“i体”。这些i体结合在细胞表面上表达的天然人CXCR4。本公开的i体可用于调节, 并且特别是抑制或阻止CXCR4介导的信号传导, 和/或调节CXCR4所涉及于其中的生物路径, 和/或调节与所述信号传导相关的生物机理、应答和效应。因此, 本公开的i体可用于预防和治疗CXCR4相关疾病和病症。

[0014] 应了解本公开的CXCR4结合分子或i体提供与其它结合剂诸如传统抗体相比的优势。如同传统抗体一样, 本公开的i体能够以高亲和力和高特异性结合它们的靶标, 但当相较于传统治疗性抗体、多肽或肽时, 它们的较小尺寸和稳定性是有利的。相比于常规抗体, I体也是更稳定分子, 此导致替代性施用途径以及较低剂量形式、较小频率给药和较小副作用。I体在尺寸方面也较小, 并且因此可穿透其它大蛋白质可能不能够穿透的组织、器官和区域, 诸如骨基质和微肿瘤环境。不同于传统单克隆抗体, I体也具有能够穿透沟槽和裂缝的长CDR3结合环。本公开的i体能够深度结合至CXCR4G蛋白偶联受体 (GPCR) 的口袋中。

[0015] 由于它们的尺寸相对较小, 所以i体理想地适于调整半衰期, 当用作成像剂或用于持续设定时期来递送所需剂量时, 此将具有优势。作为小多肽, i体也通过缀合于所鉴定多肽来提供向靶标递送有效载荷。

[0016] 另外, 本发明者已发现本公开的CXCR4结合多肽/i体具有将它们与本领域中已知的其它抑制剂/拮抗剂CXCR4结合分子区分的特征。特定来说, 本公开的CXCR4结合多肽/i体不导致干细胞动员。另外, 本公开的CXCR4结合多肽/i体不抑制钙流动。

[0017] 本公开提供一种包含骨架区和其中含有的互补决定区 (CDR1和CDR3) 的多肽, 其中所述骨架区包含与由SEQ ID NO:1的氨基酸1至26、33至79以及88至97界定的骨架区具有至少75%同一性的序列, 并且其中分别由SEQ ID NO:1的氨基酸27至32和80-87界定的所述CDR1区和所述CDR3区通过在其中进行氨基酸添加或取代来修饰, 并且其中所述多肽结合人CXCR4。

[0018] 在一个实例中, 多肽包含SEQ ID NO:2所示的序列 (图1B) 或SEQ ID NO:2所示的序列或SEQ ID NO:2所示的在其中包含1至5个氨基酸添加或取代的序列。

[0019] 在一个实例中, CDR1区由6个连续氨基酸残基的随机序列 (在图1B中指定为XXXXXX) 组成, 并且CDR3区由Y' n (在图1B中) 表示, 其中Y是任何氨基酸残基, 并且n是10至20个氨基酸的任何数目 (包括端值)。SEQ ID NO:2的CDR1区和/或CDR3区通过相对于SEQ ID NO:1中的相应CDR1区和/或CDR3区进行氨基酸添加和/或取代来修饰。

[0020] 在一个实例中, 在SEQ ID NO:2的位置23处的氨基酸A' 是氨基酸谷氨酰胺 (Q) 或赖氨酸 (K)。

[0021] 在一个实例中, 在SEQ ID NO:2的位置24处的氨基酸B' 是氨基酸缬氨酸 (V) 或丙氨酸 (A)。

[0022] 在一个实例中, 在SEQ ID NO:2中, A' 是Q, 并且B' 是V。

[0023] 多肽可进一步包含1至4个的选自由M、EAEA、MA或MP组成的组的连续N末端氨基酸。

[0024] 在一个实例中,多肽结合人CXCR4。在另一实例中,多肽是人CXCR4的拮抗剂。

[0025] 在一个实例中,多肽以小于50uM、小于20uM、小于10uM、小于1μM、小于850nM、小于700nM、小于600nM、小于500nM、小于300nM、小于100nM、小于50nM、小于25nM、小于20nM、小于15nM、小于10nM或小于5nM的亲和力结合人CXCR4。在一特定实例中,多肽以约700nM的亲和力结合人CXCR4。在一特定实例中,多肽以小于700nM的亲和力结合人CXCR4。

[0026] 在一个实例中,骨架区包含与SEQ ID NO:1在位置1至26、33-79以及88-97处具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少97%、或至少98%、至少99%同一性或100%同一性的序列。

[0027] 在一个实例中,骨架区包含与SEQ ID NO:1在位置1至26、33-79以及88-97处具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少97%、或至少98%、至少99%同源性或100%同源性的序列。

[0028] 在一个实例中,根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的多肽通过一个或多个氨基酸取代来修饰。

[0029] 在一个实例中,CDR1区和CDR3区通过一个或多个氨基酸取代来修饰。在另一实施方案中,CDR1区和/或CDR3区通过用随机环序列替换来修饰。

[0030] 在一个实例中,CDR3区包含与SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:31具有至少70%同一性、或至少80%同一性、或至少90%同一性、或至少95%同一性、或至少97%同一性、或至少98%同一性、或至少99%同一性或100%同一性的序列或由所述序列组成。

[0031] 在一个实例中,CDR3区包含与SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:31具有至少70%同源性、或至少80%同源性、或至少90%同源性、或至少95%同源性、或至少97%同源性、或至少98%同源性、或至少99%同源性或100%同源性的序列或由所述序列组成。

[0032] 在另一实例中,CDR3区包含在选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:31的序列内具有至少1个、2个、3个、4个、5个或6个取代的序列或由所述序列组成。

[0033] 在另一实例中,CDR3区包含SEQ ID NO:13或由SEQ ID NO:13组成。

[0034] 在一个实例中,CDR1区包含与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:30具有至少50%同一性、或至少65%同一性、或至少80%同一性或100%同一性的序列或由所述序列组成。

[0035] 在一个实例中,CDR1区包含与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:30具有至少50%同源性、或至少65%同源性、或至少80%同源性或100%同源性的序列或由所述序列组成。

[0036] 在另一实例中,CDR1区包含在SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:30内具有至少1个、2个或3个取代的序列或由所述序列组成。

[0037] 在另一实例中,CDR1区包含SEQ ID NO:12或由SEQ ID NO:12组成。

[0038] 在另一实例中,多肽包含:

[0039] (i) 与SEQ ID NO:12具有至少50%同一性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:13具有至

少70%同一性的CDR3区序列；

[0040] (ii)与SEQ ID NO:12具有至少50%同源性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:13具有至少70%同源性的CDR3区序列；

[0041] (iii)与SEQ ID NO:15具有至少50%同一性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:16具有至少70%同一性的CDR3区序列；

[0042] (iv)与SEQ ID NO:15具有至少50%同源性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:16具有至少70%同源性的CDR3区序列；

[0043] (v)与SEQ ID NO:18具有至少50%同一性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:19具有至少70%同一性的CDR3区序列；

[0044] (vi)与SEQ ID NO:18具有至少50%同源性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:19具有至少70%同源性的CDR3区序列；

[0045] (vii)与SEQ ID NO:21具有至少50%同一性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:22具有至少70%同一性的CDR3区序列；

[0046] (viii)与SEQ ID NO:21具有至少50%同源性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:22具有至少70%同源性的CDR3区序列；

[0047] (ix)与SEQ ID NO:24具有至少50%同一性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:25具有至少70%同一性的CDR3区序列；

[0048] (x)与SEQ ID NO:24具有至少50%同源性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:25具有至少70%同源性的CDR3区序列；

[0049] (xi)与SEQ ID NO:27具有至少50%同一性的CDR1区和与SEQ ID NO:28具有至少70%同一性的CDR3区序列；

[0050] (xii)与SEQ ID NO:27具有至少50%同源性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:28具有至少70%同源性的CDR3区序列；

[0051] (xiii)与SEQ ID NO:30具有至少50%同一性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:31具有至少70%同一性的CDR3区序列；或

[0052] (xiv)与SEQ ID NO:30具有至少50%同源性的CDR1区序列和与SEQ ID NO:31具有至少70%同源性的CDR3区序列。

[0053] 在一个实例中，多肽包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29具有至少80%同一性、至少90%同一性、或至少95%同一性、或至少97%同一性、或至少98%同一性、或至少99%同一性的序列。

[0054] 在一个实例中，多肽包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29具有至少70%同源性、或至少80%同源性、或至少90%同源性、或至少95%同源性、或至少98%同源性、或至少99%同源性的序列。

[0055] 在一个实例中，多肽包含SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29中的任一者所示的序列。

[0056] 在一个实例中，多肽在选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ

ID NO:72或SEQ ID NO:76组成的组的序列内包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个取代。

[0057] 在一个实例中,多肽包含SEQ ID NO:11或由SEQ ID NO:11组成。

[0058] 在另一实例中,多肽包含CDR1区,所述CDR1区包含由式 $SX_1SX_2X_3R$ 表示的序列,其中

[0059]  $X_1$ 是G、K、L或Y;

[0060]  $X_2$ 是D、H、G或N;并且

[0061]  $X_3$ 是I、V、M、F、Q或Y;

[0062] 或其保守性氨基酸取代。

[0063] 在一个实例中,CDR1区包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:77中的任一者所示的序列或由所述序列组成。

[0064] 在一个实例中,多肽包含CDR3区,所述CDR3区包含由式 $Y'_1RY'_2GY'_3YRHR'_4LY'_5LG$ 表示的序列,其中

[0065]  $Y'_1$ 是Y或W;

[0066]  $Y'_2$ 是T、V或I;

[0067]  $Y'_3$ 是G或A;

[0068]  $Y'_4$ 是A或Y;并且

[0069]  $Y'_5$ 是V、R或K;

[0070] 或其保守性氨基酸取代。

[0071] 在一个实例中,CDR3区包含SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:78中的任一者所示的序列或由所述序列组成。

[0072] 在另一实例中,多肽包含与选自由SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76组成的组的序列至少70%同一的序列。

[0073] 在另一实例中,多肽包含与选自由SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76组成的组的序列至少75%、80%、85%、87%、90%、93%、95%、98%或99%同一的序列。

[0074] 在另一实例中,多肽包含由序列

[0075]  $ZLQVDIVPSQGEISVGESKFFLCA' B' AGSX_1SX_2X_3RISWFSPNGEKLTPNQQRISVVWVNDSSSTLT IYNANIDDAGIYKCVVY'_1RY'_2GY'_3YRHR'_4LY'_5LGEATVNVKIFQ$  (SEQ ID NO:39)

[0076] 表示的序列,其中

[0077]  $A'$  是Q或K;

[0078]  $B'$  是V或A;

[0079]  $X_1$ 是G、K、L或Y;

[0080]  $X_2$ 是D、H、G或N;

[0081]  $X_3$ 是I、V、M、F、Q或Y;

[0082]  $Y'_1$ 是Y或W;

[0083]  $Y'_2$ 是T、V或I;

[0084]  $Y'_3$ 是G或A;

[0085]  $Y'_4$ 是A或Y;并且

[0086]  $Y'_5$ 是V、R或K;

[0087] 或其保守性氨基酸取代;并且

[0088] Z是选自M、EAEA、MA或MP的氨基酸或不存在。

[0089] 在另一实例中,多肽包含SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76中的任一者所示的序列或由所述序列组成。

[0090] 在另一实例中,多肽包含SEQ ID NO:40所示的序列或由所述序列组成。

[0091] 在一个实例中,多肽对人CXCR4的 $K_D$ 在约0.01nM至约700nM之间,诸如在约0.05nM至约500nM之间,例如在约0.1nM至约100nM之间,例如在约1nM至约50nM之间,在约5nM至约30nM之间,在约10nM至约20nM之间,或在约3nM至约16nM之间。

[0092] 在另一实例中,多肽以3nM与10nM之间的亲和力结合人CXCR4。在另一实例中,多肽以3nM与5nM之间的亲和力结合人CXCR4。

[0093] 在一个实例中,通过固定人CXCR4以及使用表面等离子体共振评估多肽与经固定人CXCR4的结合来评估 $K_D$ 。在一个实例中,评估多肽与经固定CXCR4脂质粒子的结合。

[0094] 本公开的示例性多肽对于人CXCR4具有约5nM(例如 $\pm 1$ nM)的 $K_D$ 。

[0095] 在另一实例中,缔合速率( $K_a$ )在约 $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 之间,例如在约 $5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $8.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 之间,例如在约 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $6 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 之间,例如在 $6 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 至 $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 之间。在一个实例中,通过固定人CXCR4以及使用表面等离子体共振评估分子与经固定人CXCR4的结合来评估 $K_a$ 。

[0096] 在另一实例中,解离速率( $K_d$ )在约 $0.005 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $0.9 M^{-1} s^{-1}$ 之间,例如在约 $0.02 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $0.7 M^{-1} s^{-1}$ 之间,例如在约 $0.2 M^{-1} s^{-1}$ 与 $0.55 M^{-1} s^{-1}$ 之间。

[0097] 本公开的一示例性多肽具有约 $1.297 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 的 $K_a$ 。本公开的另一示例性结合多肽具有约 $0.00629 M^{-1} s^{-1}$ 的 $K_d$ 。在一个实例中,通过固定表达人CXCR4的脂质粒子以及使用表面等离子体共振评估多肽与表达人CXCR4的经固定脂质粒子的结合来评估 $K_a$ 和 $K_d$ 。

[0098] 本公开的多肽与CXCR4的结合中涉及的残基已被确定,并且公开于本文中。在一个实例中,本公开提供一种如本文所述的CXCR4结合多肽,其结合人CXCR4的一个或多个选自由E32、Y184、F189、W195、D262和L266或任何这些残基的组合组成的组的核心残基。在另一实例中,残基选自由E32K、Y184S、F189L、W195R、D262G和L266H或任何这些残基的组合组成的组。在另一实例中,本公开提供一种如本文所述的CXCR4结合多肽,其结合CXCR4的一个或多个选自由C28、V112、D193、P191、E268和E288或任何这些残基的组合组成的组的残基。在另一实例中,残基选自由C28W、V112A、D193G、P191T、E268K和E288G或任何这些残基的组合组成的组。所取代的氨基酸残基根据具有Uniprot序列标识符编号P61073-1的人CXCR4(SEQ ID NO:105)的典型序列来编号。

[0099] CXCR4结合多肽接触已显示负责结合诸如AMD3100的小分子的相同残基,从而指示CXCR4结合多肽可深度穿透至CXCR4结合口袋中。在一特定实例中,多肽结合至CXCR4的D262位置。

[0100] 本公开的多肽可通常用于调节CXCR4介导的信号传导,和/或调节CXCR4所涉及于其中的生物路径,和/或调节与上述信号传导或这些路径相关的生物机理、应答和效应。

[0101] 在一个实例中,多肽可用于调节(即抑制、阻止、刺激或加强)一种或多种以下活动:

[0102] (i) 表达CXCR4的细胞中的钙流动;

[0103] (ii) 表达CXCR4的细胞中的cAMP;

[0104] (iii) 表达CXCR4的细胞中的 $\beta$ -抑制蛋白(arrestin)信号传导;

[0105] (iv) 表达CXCR4的细胞的凋亡;

[0106] (v) 表达CXCR4的细胞的细胞增殖;

[0107] (vi) 表达CXCR4的细胞的转移;

[0108] (vii) CXCR4诱导的血管生成;和

[0109] (viii) 表达CXCR4的细胞的迁移。

[0110] 在一个实例中,相较于在不存在多肽的相同条件下肿瘤细胞的分化和/或增殖,肿瘤细胞增殖可增加或降低至少30%,优选至少50%或至少60%、或70%或75%、或80%或90%或更多。

[0111] 在一个实例中,在肿瘤细胞增殖测定中,多肽可以 $IC_{50}$ 小于600nM、小于500nM、小于200nM、小于100nM、小于50nM、小于25nM、小于10nM或小于5nM用于抑制肿瘤细胞增殖。在一个实例中,肿瘤细胞增殖测定是5-溴-2'-脱氧尿苷细胞增殖或CTG (CellTiter-Glo®)测定。在另一实例中,通过MTT测定的方式来测定对肿瘤细胞增殖的抑制。

[0112] 在一个实例中,可通过半胱天冬酶(caspase)测定、tunnel和DNA片段化测定、细胞渗透性测定、膜联蛋白(annexin)V测定、蛋白质裂解测定以及线粒体和ATP/ADP测定来测量由本公开的多肽对表达CXCR4的细胞的凋亡的诱导。所述测定将为本领域技术人员所熟悉。

[0113] 在一个实例中,例如在细胞表达CXCR4的转移性乳腺癌模型(例如MDA-MB-231或MDA-MB-468细胞)中,本公开的多肽可用于抑制CXCR4<sup>+</sup>肿瘤细胞的转移。

[0114] 因此,本公开也提供一种抑制表达CXCR4的癌细胞的转移的方法。

[0115] 在一个实例中,例如在CEM、MDA-MB-231、MDA-MB-468、PC3和Ramos细胞中,本公开的多肽可用于抑制表达CXCR4的细胞的由SDF-1诱导的迁移。

[0116] 在一个实例中,本公开的多肽可用于抑制血管生成,此可在毛细血管形成测定中例如用HUVEC细胞或MDA-MB-231细胞进行测量。

[0117] 在一个实例中,本公开的多肽用于治疗或预防受试者的CXCR4相关疾病或病症。

[0118] 多肽所结合的人CXCR4可呈单体、二聚或多聚形式。举例来说,人CXCR4可呈异二聚体形式。已描述的CXCR异二聚体的实例包括CXCR4/CXCR7(Levoye等Blood 2009 113;6085-6093)、CXCR4/CCR2(Sohy等J Biol Chem.2007 282;30062-30069)、CXCR4/ $\beta$ 2AR( $\beta$ 2肾上腺素能受体)(La Rocca等J Cardiovasc Pharmacol.2010 56;548-559)、CXCR4/CCR5(Sohy等J Biol Chem.2009 284;31270-31279)、CXCR4/DOR( $\delta$ 类鸦片受体)(Pello等Eur.J.Immunol.2008 38;537-549)。也已显示CXCR4与T细胞受体相互作用(Kremer等J.Immunol.2011 187;1440-1447)。这些二聚体可调节SDF-1诱导的信号传导结果,并且所述i体拮抗剂也可相较于呈单体形式的CXCR4改变信号传导后果。

[0119] 在一个实例中,本公开的多肽结合影响CXCR4的结构的跨膜结构域或其它结构域。

[0120] 在另一实例中,本公开的多肽特异性结合CXCR4的任何适合细胞外部分、区域、结构域、环或细胞外表位。在一个实例中,多肽特异性结合跨膜结构域的一个细胞外部分,或特异性结合一个连接跨膜结构域的细胞外环。

[0121] 在另一实例中,本公开的多肽被聚乙二醇化。

[0122] 本公开也提供一种编码本文所述的多肽的核酸分子。

[0123] 在一个实例中,核酸分子包含与SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:79中的任一者具有至少80%同一性、至少90%同一性、或至少95%同一性、或至少97%同一性、或至少98%同一性、或至少99%同一性或100%同一性的序列。

[0124] 在一个实例中,核酸分子包含与SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:79中的任一者具有至少80%同源性、至少90%同源性、或至少95%同源性、或至少97%同源性、或至少98%同源性、或至少99%同源性或100%同源性的序列。

[0125] 在一个实例中,核酸分子编码选自由SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76组成的组的多肽。

[0126] 本公开也提供一种包含本文所述的核酸分子的表达构建体。

[0127] 本公开也提供一种包含本文所述的核酸分子或表达构建体的宿主细胞。

[0128] 本公开也提供一种产生本公开的多肽的方法,其包括在使得能够表达所述多肽的条件下培养宿主细胞以及回收所述多肽。

[0129] 本公开也提供一种包含本文所述的多肽和药剂的缀合物(例如免疫缀合物)。

[0130] 药剂可为例如治疗剂、毒素、可检测标记或延长多肽的半衰期的药剂。在一个实例中,药剂是聚乙二醇(PEG)。在另一实例中,药剂是Pro-Ala-Ser(PAS)的连续序列。

[0131] 在一个实例中,延长多肽的半衰期的药剂结合血清蛋白(例如白蛋白)或免疫球蛋白的Fc部分。

[0132] 在另一实例中,可使本发明的多肽连接于用于向诸如肿瘤细胞的细胞递送的毒素或细胞毒性药物。

[0133] 在另一实例中,可使本发明的多肽连接于诸如放射性同位素的标记。

[0134] 本公开也提供一种包含两个或更多个本文所述的多肽的多聚体。所述多肽可包含相同或不同氨基酸序列。举例来说,在它的最简单形式中,至少两个多肽通过适合接头或序列或间隔体直接连接。举例来说,接头或间隔体可为1个与50个之间的氨基酸。举例来说,适合接头是GS9接头或GS15接头或GS20接头。

[0135] 本公开也提供多价或多特异性多肽(包括双特异性多肽)。在一个实例中,本公开提供本公开的多肽连接于针对除CXCR4以外的靶标的多肽,所述靶标包括但不限于人血清白蛋白(以增加半衰期)、CD3、CD64、CD16或CD89(以重定向和活化针对肿瘤的任何循环T细胞)。在一特定实例中,多特异性多肽是结合CXCR4和人血清白蛋白(HSA)的双特异性多肽,所述多肽包含序列SEQ ID NO:80。

[0136] 本公开也提供一种包含如本文所述的多肽或缀合物或多聚体以及可接受的载体的药物组合物。

[0137] 本公开也提供一种用于治疗或预防CXCR4相关疾病或病症的本公开的多肽、缀合物或多聚体,所述多肽包含选自由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76组成的组的序列。

[0138] 在一个实例中,本公开的多肽特异性结合人CXCR4。

[0139] 本公开也提供一种预防或治疗CXCR4相关疾病或病症或与CXCR4信号传导或CXCR4所涉及于其中的路径或机理相关的疾病或病症的方法,其包括向有此需要的受试者施用本公开的多肽或缀合物或多聚体。

[0140] 在一个实例中,多肽包含选自由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76组成的组的序列。

[0141] 可经受用本公开的多肽、核酸分子、缀合物或多聚体治疗的疾病或病症包括癌症(例如造血性癌症:CLL、AML、ALL、MM、NHL;实体肿瘤:乳腺癌、肺癌、脑肿瘤;肿瘤的基质化学抗性;白血病和其它癌症)、病毒性感染(例如HIV/AIDS、西尼罗病毒(West Nile Virus)脑炎)、炎症性疾病(例如类风湿性关节炎、哮喘、全身性红斑狼疮;神经炎症性疾病)、纤维化,例如肺病(肺纤维化)、全身性硬化症、肾病(作为实例的糖尿病性肾病变、FSGS)、肝病、眼病(葡萄膜炎、AMD、糖尿病性视网膜病变);免疫缺陷病症;多发性硬化症和中风。组织和创伤愈合,包括瘢痕形成、灼伤或辐射诱发的灼伤。

[0142] 在一个特定实例中,CXCR4相关疾病或病症是纤维化。在另一实例中,病症是特发性肺纤维化(IPF)。在另一特定实例中,CXCR4相关疾病或病症是肾病。

[0143] 在另一实例中,CXCR4相关疾病或病症是多发性硬化症。

[0144] 在另一实例中,CXCR4相关疾病或病症是动脉粥样硬化。

[0145] 在另一实例中,CXCR4相关疾病或病症是HIV。

[0146] 本公开的多肽可或可不导致干细胞动员。在一个实例中,本公开也提供一种用于动员外周血液干细胞的方法,其包括向有此需要的受试者施用本公开的多肽、核酸分子、缀合物或多聚体。在一个实例中,外周血液干细胞用于自体干细胞移植。在一个实例中,有此需要的受试者患有多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病或非霍奇金氏淋巴瘤。在另一实例中,干细胞是CD34+细胞。

[0147] 一般来说,已显示针对CXCR4的抗体动员干细胞,此在一些适应症中不合乎治疗方法的需要。本公开的多肽不实质上导致干细胞动员。在一个实例中,相较于对照AMD3100,本公开的多肽使干细胞动员降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0148] 在另一实例中,多肽不实质上抑制钙流动。

[0149] 本公开也提供本文所述的CXCR4结合多肽的功能性片段。在一个实例中,功能性片段包含本文所述的CXCR4结合分子的CDR3序列。就“功能性片段”来说,我们意指当相较于它所源于的全长多肽时以大致上类似或改进的亲和力结合人CXCR4,以及抑制或阻止CXCR4介

导的信号传导的片段。优选地,片段结合人CXCR4的一个或多个选自由E32、Y184、F189、W195、D262和L266或任何这些残基的组合组成的组的核心残基。

[0150] 在另一实例中,功能性片段包含选自由SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:78组成的组的序列。

[0151] 本公开进一步提供一种基于本文所述的CXCR4结合多肽或其一部分(诸如本文所述的CXCR4结合多肽的CDR3序列)的肽模拟物。肽模拟物可基于或源于选自由SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:78组成的组的序列。本公开也涵盖用于治疗CXCR4相关疾病或病症,特别是本文所述的CXCR4相关疾病或病症的包含一种或多种模拟肽的组合物。

[0152] 本公开另外提供用于治疗或防治CXCR4相关疾病或病症的本公开的多肽或核酸或表达构建体或细胞或组合物。

[0153] 本公开另外提供本公开的多肽或核酸或表达构建体或细胞或组合物在医学中的用途。

[0154] 本公开也提供本公开的多肽或核酸或表达构建体或细胞或组合物用于治疗或防治CXCR4相关疾病或病症的用途。

[0155] 在一个特定实例中,CXCR4相关疾病或病症是纤维化。在另一特定实例中,CXCR4相关疾病或病症是肺纤维化。在另一实例中,它是肝纤维化。在另一实例中,它是眼部的纤维化相关病状。在另一实例中,它是皮肤纤维化。在另一实例中,它是肾纤维化。

[0156] 本公开另外提供本公开的多肽或核酸或表达构建体或细胞制造用于治疗或防治CXCR4相关疾病或病状的药剂的用途。

[0157] 本公开的多肽也可用于诊断形式中。

[0158] 因此,本公开另外提供一种用于检测从受试者获得的样品中CXCR4的方法,所述方法包括使样品与本公开的多肽接触以使CXCR4-多肽复合物形成,以及检测所述复合物,其中检测到所述复合物指示所述样品中存在CXCR4。在一个实例中,样品来自罹患CXCR4相关疾病或病状的受试者。在另一实例中,样品是生物样品。

[0159] 本公开也提供一种用于检测受试者中或从受试者获得的样品中CXCR4结合多肽结合于人CXCR4的复合物的方法,所述方法包括使所述复合物形成,以及检测所形成复合物。在一个实例中,人CXCR4可为二聚体、三聚体或多聚体。检测形成复合物的方法将为本领域技术人员所熟悉。实例包括蛋白质印迹(western blot)分析或表面等离子体共振(biacore)。或者,可使用基于荧光的方法,其中复合物的形成导致产生可或不进行定量的可荧光检测信号。

[0160] 本公开也提供本公开的CXCR4结合多肽结合于人CXCR4的复合物。复合物的人CXCR4部分可呈二聚体、三聚体或多聚体形式。

[0161] 本公开另外提供一种用于诊断受试者的CXCR4相关疾病或病症的方法,所述方法包括进行本文所述的用于检测来自所述受试者的样品中CXCR4的方法,其中在所述样品中

检测到CXCR4指示所述疾病或病症。

[0162] 在一个实例中,方法包括测定样品中CXCR4的水平,其中相较于对照样品,样品中CXCR4的水平增加或降低指示疾病或病症。

[0163] 本公开另外提供一种用于定位和/或检测和/或诊断和/或预测CXCR4相关疾病或病症的方法,所述方法包括在体内检测结合于CXCR4的本公开的多肽(如果存在),其中所述多肽缀合于可检测标签。

[0164] 在一个实例中,方法另外包括向受试者施用多肽。

[0165] 在本文所述的任何治疗/防治/诊断/预测方法的一个实例中,CXCR4相关疾病或病症是癌症、病毒性感染(例如HIV)、炎症性疾病、神经炎症性疾病;纤维化、免疫缺陷病症;多发性硬化症、潮热或中风。在另一实例中,CXCR4相关疾病或病症是纤维化、癌症或炎症。

[0166] 本公开的术语“受试者”意图包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、母牛、马、鸡、两栖动物和爬行动物。

[0167] 附图简述

[0168] 图1是显示人NCAM结构域1的序列(A);i体骨架以及CDR1(由XXXXXX表示)和CDR3(由Yn表示)(B);特异性CXCR4结合剂ADCX-99的序列(C)和ADCX-99的亲合力成熟结合剂的共有序列(D)的图示。X和Y是任何氨基酸,n是在10与20之间(包括端值)的数目。A'、B'是任何氨基酸。Z不存在,或是氨基酸M、EAEA、MA或MP。

[0169] 图2-1和2-2显示(A)ADCX-306(22.5uM)、(B)ADCX-272(1.6uM)和(C)ADCX-668(42uM)的表面等离子体共振(SPR;Biacore)亲和力。

[0170] 图3-1至3-3显示ADCX-99(具有Flag、组氨酸(FH)以及具有IM7-FH蛋白质标签)、ADCX-6、ADCX-306、ADCX-668和ADCX-272在如所指示的各种浓度下的 $\beta$ -抑制蛋白活性。所有i体都显示一定程度的对 $\beta$ -抑制蛋白的抑制。

[0171] 图4显示从周质部分纯化的(缀合于IM7-FH(IM7flag组氨酸标记的免疫性蛋白质)的i体ADCX-99蛋白的尺寸排阻色谱法(SEC)结果。使用Superdex 75柱进行SEC。

[0172] 图5显示i体ADCX-99结合经固定CXCR4阳性脂质粒子的表面等离子体共振(SPR;BIAcore)(A)。ADCX-99不结合无效脂质粒子(B)或CCR5阳性脂质粒子(C)。

[0173] 图6显示来自源于i体ADCX-99的亲合力成熟突变体文库的90个个别i体。相较于阴性对照ADCX-272和ADR-3以及野生型i体ADCX-99(在相同条件下生长以及以最后2个柱提供),通过抗FLAG抗体的结合来测试亲和力成熟i体的表达。

[0174] 图7-1和7-2显示来自i体ADCX-99的亲合力成熟突变体文库的90个个别i体。测试亲和力成熟i体与CXCR4阳性脂质粒子(A)和CCR5阳性脂质粒子(B)的结合。将亲和力成熟i体与CXCR4阳性脂质粒子和CCR5阳性脂质粒子的结合与野生型i体ADCX-99(最后2个柱)以及与阳性对照i体ADCX-272和阴性对照i体ADR-3的结合进行比较。

[0175] 图8显示亲和力成熟i体相对于起始序列ADCX-99的序列比对。

[0176] 图9显示i体(表4)充当针对在细胞上表达的许多趋化因子受体的拮抗剂以及通过 $\beta$ -抑制蛋白测定测量的特异性。

[0177] 图10显示i体AM4-661(A)、AM4-272(B)以及AM3-114、AM3-523和AM5-245相对于ADCX-99(C)的个别序列比对。

[0178] 图11显示双特异性AM3-114-Im7-S21结合CXCR4与人血清白蛋白(HSA)两者的表面等离子体共振(SPR;BIAcore)。(A)双特异性i体AM3-114-Im7-S21在各种浓度即60nM、200nM、600nM和1.00 $\mu$ M下通过SA21肽与HSA的结合( $K_D$  518(+/-2)nM), (B)缺乏由i体AM3-114在各种浓度即60nM、200nM、600nM和1.00 $\mu$ M下与HSA的结合, (C) i体AM3-114与CXCR4的结合( $K_D$  9nM)以及(D)双特异性AM3-114-Im7-S21与CXCR4的结合( $K_D$  9nM)。

[0179] 图12显示在静脉内注射小鼠之后i体浓度的概况,如通过定量质谱测定法所测定。使I体(AM3-114、AM4-746)缀合于IM7-FH、IM7-FH-SA21或PEG(30K或2x20K),并且与未缀合对照ADCX99-9xHis进行比较。

[0180] 图13显示在i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746和AM4-1121、阳性对照AMD3100和阴性对照i体的情况下,如通过cAMP测定所测量,CXCR4的化学发光信号检测。

[0181] 图14显示在i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746和AM4-1121、对照Ag(SDF-1)、21H5阴性对照i体和AMD3100阳性对照(有效浓度 $EC_{80}$ )的情况下,通过Quest<sup>TM</sup> Fluo-8试剂盒测量的钙流动的抑制百分比。

[0182] 图15显示(A)抗CXCR4i体AM3-114相较于两种阳性对照(小分子AMD3100和MAb12G5)和阴性对照i体;以及(B)抗CXCR4i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746和AM4-1121、阳性对照(AMD3100)和ADCX-99的BRET $\beta$ -抑制蛋白测定的结果。

[0183] 图16-1至16-3显示i体AM3-114对各种细胞系的如通过流式细胞计量术测定的结合亲和力,所述细胞系不表达CXCR4T47D(A),以及在各种水平下表达CXCR4,包括:Namalwa(B)、MOLP8(C)、MOLT4(D)、Jurkat(E)、CCRF-CEM(F)、A498(G)、Ramos(H)、NCI-H69(I)和HL-60(J)。所有细胞系都用10、1和0.001 $\mu$ M的i体浓度测试,并且此外,用i体在4.7、2.1、0.47、0.21、0.1和0.01 $\mu$ M下测试Namalwa细胞(B)。

[0184] 图17显示CXCR4i体与SDF-1竞争结合CXCR4阳性脂质粒子,通过表面等离子体共振(SPR;BIAcore)所测量。显示i体AM3-114(A)和AM4-272(B)的数据。

[0185] 图18显示CXCR4i体与各种分子竞争结合Ramos细胞。AM3-114(顶部图)、AM4-272(中部图)、AM3-523(底部图)i体结合Ramos细胞,并且在添加AMD3100、MAb12G5和天然配体SDF-1后,这个结合在不同程度上降低。

[0186] 图19-1和19-2显示CXCR4i体诱导Ramos细胞的凋亡。AM3-114(AD-114)、AM4-272(AD-272)、AM3-523(AD-523)i体结合Ramos细胞,并且诱导凋亡,如通过膜联蛋白V和碘化丙啶双重染色所评估(各流式细胞计量术迹线中的左上象限)。未处理细胞充当阴性对照,并且毒胡萝卜素(thapsigargin)是一种充分描述的凋亡诱导剂(19-1)。对流式细胞计量术迹线的定量以图形形式显示(19-2)。

[0187] 图20显示i体AM3-272、AM3-114和AM1-320相对于阴性对照i体和阳性对照小分子AMD3100的HIV抑制测定的结果。

[0188] 图21显示使用FLUOStar微板读取器测量的i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746和AM4-1121以及对照21H5的NP2-CD4/CXCR4细胞活力。

[0189] 图22显示相对于阴性对照i体21H5,用各种i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746和AM4-1121对HIV病毒株(NL4.3和1109-F-30)的抑制。CXCR4i体以剂量依赖性方式阻断HIV的感染。VSVG是来自水泡性口膜炎病毒的在结合无关受体之后经受胞吞作用的包膜。

[0190] 图23-1和23-2显示用聚乙二醇化(30KDa和2x20KDa PEG)和非聚乙二醇化CXCR4i

体AM3-114和AM4-746对HIV的抑制。CXCR4i体以剂量依赖性方式阻断三种HIV病毒株的感染。CXCR4i体不能阻断CCR5依赖性HIV病毒株的感染(B)。

[0191] 图24显示用i体AM4-272、AM4-746、AM4-1121、AM3-114、AM3-523或阴性对照盐水、同种型对照i体(21H5)或阳性对照AMD3100注射的小鼠的外周血液(PB)的白血细胞计数(A);缺乏由i体对LSK细胞的动员显示于(B)中,并且缺乏由i体对LSKSLAM细胞的动员显示于(C)中。

[0192] 图25显示在人源化NODSIL2R $\gamma$ (NSG)小鼠模型中,相较于阳性对照AMD3100,i体AM3-114和AM4-523和阴性对照i体21H5不动员干细胞。ns=统计学上不显著。

[0193] 图26显示CXCR4i体不动员人干细胞和祖细胞。关于经分选CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>HSC的体外结合实验(A)人CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>HSC的代表性点图。(B)在如由箭号指示的AM3-114、AM4-272和AM3-523的情况下,i体结合人脐带血(CB)CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>HSC的代表性流式细胞计量频率曲线(C)相对于对照i体(21H5),AM3-114结合人BM CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>HSC和来自huNSG BM的muCD45<sup>-</sup>huCD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>HSC的代表性频率曲线。

[0194] 图27显示i体AM3-114(A)和AM4-272(B)对激光经治疗小鼠中的促纤维化基因表达的影响。测试i体治疗小鼠中的一组85种促纤维化基因的mRNA水平。

[0195] 图28显示AM3-114i体与人纤维细胞的结合。通过用针对CD45的抗体染色来鉴定人纤维细胞。通过针对C末端标签的抗FLAG抗体来鉴定i体AM3-114的结合。DAPI用于将细胞核染色。末个图是所有三种染色的合并图像。

[0196] 图29显示相较于阴性对照i体(其不结合CXCR4)、阳性对照AMD3100和MSX-122以及仅媒介物对照,i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746和AM4-1121抑制白细胞浸润至荷载SDF-1的鼠气囊中。

[0197] 图30显示相较于阳性对照AMD3100和吡非尼酮以及阴性对照i体(21H5),i体(AM3-114、AM4-272、AM3-523)在不同剂量下对在博莱霉素损伤之后肺内纤维细胞募集的影响。通过染色来自博莱霉素处理小鼠的肺组织中的CD45<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>Col1<sup>+</sup>细胞来测量纤维细胞。在Y轴上指示是纤维细胞的细胞的百分比。

[0198] 图31-1至31-3显示i体(AM3-114、AM4-272、AM3-523)、CXCR4小分子拮抗剂AMD3100和阴性对照i体21H5在抑制人IPF肺纤维母细胞侵袭方面的作用。IPF肺纤维母细胞株系在i体存在下的相对创伤密度(%)。纤维母细胞来自正常肺(A),来自缓慢IPF进展者(B),以及来自快速IPF进展者(C)。箭号指示特异性抑制IPF肺纤维母细胞的迁移的i体AM3-114(B和C),抑制快速进展者纤维母细胞的i体AM4-272(C),但两种i体都不对正常肺纤维母细胞具有任何作用(A)。AMD3100和阴性对照i体21H5对任何这些细胞系都不具有作用。

[0199] 图32显示AM3-114-6H i体显著降低缓慢IPF肺纤维母细胞中的ACTA2、COL1A1、COL3A1和FN1转录物表达。将缓慢肺纤维母细胞涂铺在BME上,并且用2mg/ml的单独(空心棒条)以及含有i体AM3-114-6H(灰色棒条)或AMD3100(黑色棒条)的BME处理。提取RNA,并且对促纤维化转录物进行qPCR分析。描绘的是缓慢肺纤维母细胞中 $\alpha$ SMA、COL1A1、COL3A1和FN1的平均转录物表达(n=3/组)。

[0200] 图33显示i体阻断血小板聚集的能力。关于阻断SDF-1 $\alpha$ 诱导的血小板聚集来测试AM4-272、AM4-746、AM4-1121、AM3-114、AM3-523和MAB12G5以及阴性对照i体(21H5)和阴性对照MAB(mIgG2a)。在这些条件下,i体AM3-114和AM4-1121最有效阻断这个聚集。

[0201] 图34显示i体AM4-272对患有诱发性EAE的小鼠的临床评分和体重的影响。各线代表在MOG诱发的实验性自体免疫脑脊髓炎 (EAE) 和各种治疗的情况下, 各组中小鼠的体重。棒条代表各组中小鼠的临床评分。I体AM4-272降低临床评分, 并且预防在MOG诱发的EAE动物中所见的体重损失。

[0202] 序列索引

- [0203] SEQ ID NO 1: 编码智人 (*Homo sapiens*) NCAM结构域1的氨基酸序列
- [0204] SEQ ID NO:2 编码i体骨架的氨基酸序列。
- [0205] SEQ ID NO:3 编码欧洲牛 (*Bos taurus*) NCAM结构域1的氨基酸序列
- [0206] SEQ ID NO:4 编码小家鼠 (*Mus musculus*) NCAM结构域1的氨基酸序列
- [0207] SEQ ID NO:5 编码黑鼠 (*Rat rattus*) NCAM结构域1的氨基酸序列
- [0208] SEQ ID NO:6 编码原鸡 (*Gallus gallus*) NCAM结构域1的氨基酸序列
- [0209] SEQ ID NO:7 编码非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) NCAM2结构域1的氨基酸序列
- [0210] SEQ ID NO:8 编码非洲爪蟾 NCAM1结构域1的氨基酸序列
- [0211] SEQ ID NO:9 编码智人 NCAM2结构域1的氨基酸序列
- [0212] SEQ ID NO:10 编码小家鼠 NCAM2结构域1的氨基酸序列
- [0213] SEQ ID NO:11 编码ADCX-99的氨基酸序列
- [0214] SEQ ID NO:12 编码ADCX-99 CDR1的氨基酸序列
- [0215] SEQ ID NO:13 编码ADCX-99 CDR3的氨基酸序列
- [0216] SEQ ID NO:14 编码ADCX-272的氨基酸序列
- [0217] SEQ ID NO:15 编码ADCX-272 CDR1的氨基酸序列
- [0218] SEQ ID NO:16 编码ADCX-272 CDR3的氨基酸序列
- [0219] SEQ ID NO:17 编码ADCX-6的氨基酸序列
- [0220] SEQ ID NO:18 编码ADCX-6 CDR1的氨基酸序列
- [0221] SEQ ID NO:19 编码ADCX-6 CDR3的氨基酸序列
- [0222] SEQ ID NO:20 编码ADCX-54的氨基酸序列
- [0223] SEQ ID NO:21 编码ADCX-54 CDR1的氨基酸序列
- [0224] SEQ ID NO:22 编码ADCX-54 CDR3的氨基酸序列
- [0225] SEQ ID NO:23 编码ADCX-LS的氨基酸序列
- [0226] SEQ ID NO:24 编码ADCX-LS CDR1的氨基酸序列
- [0227] SEQ ID NO:25 编码ADCX-LS CDR3的氨基酸序列
- [0228] SEQ ID NO:26 编码ADCX-668的氨基酸序列
- [0229] SEQ ID NO:27 编码ADCX-668 CDR1的氨基酸序列
- [0230] SEQ ID NO:28 编码ADCX-668 CDR3的氨基酸序列
- [0231] SEQ ID NO:29 编码ADCX-306的氨基酸序列
- [0232] SEQ ID NO:30 编码ADCX-306 CDR1的氨基酸序列
- [0233] SEQ ID NO:31 编码ADCX-306 CDR3的氨基酸序列
- [0234] SEQ ID NO:32 编码ADCX-99的核苷酸序列
- [0235] SEQ ID NO:33 编码ADCX-272的核苷酸序列
- [0236] SEQ ID NO:34 编码ADCX-6的核苷酸序列

- [0237] SEQ ID NO:35编码ADCX-54的核苷酸序列
- [0238] SEQ ID NO:36编码ADCX-LS的核苷酸序列
- [0239] SEQ ID NO:37编码ADCX-668的核苷酸序列
- [0240] SEQ ID NO:38编码ADCX-306的核苷酸序列
- [0241] SEQ ID NO:39亲和力成熟i体的共有氨基酸序列。
- [0242] SEQ ID NO:40编码AM3-114的氨基酸序列
- [0243] SEQ ID NO:41编码AM3-114 CDR1的氨基酸序列
- [0244] SEQ ID NO:42编码AM3-114 CDR3的氨基酸序列
- [0245] SEQ ID NO:43编码AM3-114的核苷酸序列
- [0246] SEQ ID NO:44编码AM3-920的氨基酸序列
- [0247] SEQ ID NO:45编码AM3-920 CDR1的氨基酸序列
- [0248] SEQ ID NO:46编码AM3-920 CDR3的氨基酸序列
- [0249] SEQ ID NO:47编码AM3-920的核苷酸序列
- [0250] SEQ ID NO:48编码AM4-1121的氨基酸序列
- [0251] SEQ ID NO:49编码AM4-1121 CDR1的氨基酸序列
- [0252] SEQ ID NO:50编码AM4-1121 CDR3的氨基酸序列
- [0253] SEQ ID NO:51编码AM4-1121的核苷酸序列
- [0254] SEQ ID NO:52编码AM4-613的氨基酸序列
- [0255] SEQ ID NO:53编码AM4-613 CDR1的氨基酸序列
- [0256] SEQ ID NO:54编码AM4-613 CDR3的氨基酸序列
- [0257] SEQ ID NO:55编码AM4-613的核苷酸序列
- [0258] SEQ ID NO:56编码AM3-523的氨基酸序列
- [0259] SEQ ID NO:57编码AM3-523 CDR1的氨基酸序列
- [0260] SEQ ID NO:58编码AM3-523 CDR3的氨基酸序列
- [0261] SEQ ID NO:59编码AM3-523的核苷酸序列
- [0262] SEQ ID NO:60编码AM4-661的氨基酸序列
- [0263] SEQ ID NO:61编码AM4-661 CDR1的氨基酸序列
- [0264] SEQ ID NO:62编码AM4-661 CDR3的氨基酸序列
- [0265] SEQ ID NO:63编码AM4-661的核苷酸序列
- [0266] SEQ ID NO:64编码AM3-466的氨基酸序列
- [0267] SEQ ID NO:65编码AM3-466 CDR1的氨基酸序列
- [0268] SEQ ID NO:66编码AM3-466 CDR3的氨基酸序列
- [0269] SEQ ID NO:67编码AM3-466的核苷酸序列
- [0270] SEQ ID NO:68编码AM5-245的氨基酸序列
- [0271] SEQ ID NO:69编码AM5-245 CDR1的氨基酸序列
- [0272] SEQ ID NO:70编码AM5-245 CDR3的氨基酸序列
- [0273] SEQ ID NO:71编码AM5-245的核苷酸序列
- [0274] SEQ ID NO:72编码AM4-272的氨基酸序列
- [0275] SEQ ID NO:73编码AM4-272 CDR1的氨基酸序列

- [0276] SEQ ID NO:74编码AM4-272 CDR3的氨基酸序列
- [0277] SEQ ID NO:75编码AM4-272的核苷酸序列
- [0278] SEQ ID NO:76编码AM4-746的氨基酸序列
- [0279] SEQ ID NO:77编码AM4-746 CDR1的氨基酸序列
- [0280] SEQ ID NO:78编码AM4-746 CDR3的氨基酸序列
- [0281] SEQ ID NO:79编码AM4-746的核苷酸序列
- [0282] SEQ ID NO:80编码AM3-114-Im7-FH-SA21双重特异性i体的氨基酸序列
- [0283] SEQ ID NO:81编码AM3-114-Im7-FH-SA21双重特异性i体的核苷酸序列
- [0284] SEQ ID NO:82编码21H5i体的氨基酸序列
- [0285] SEQ ID NO:83编码AM4-774 CDR1的氨基酸序列
- [0286] SEQ ID NO:84编码AM4-774 CDR3的氨基酸序列
- [0287] SEQ ID NO:85编码AM4-208 CDR1的氨基酸序列
- [0288] SEQ ID NO:86编码AM4-208 CDR3的氨基酸序列
- [0289] SEQ ID NO:87编码AM4-1088 CDR1的氨基酸序列
- [0290] SEQ ID NO:88编码AM4-1088 CDR3的氨基酸序列
- [0291] SEQ ID NO:89编码AM4-239 CDR1的氨基酸序列
- [0292] SEQ ID NO:90编码AM4-239 CDR3的氨基酸序列
- [0293] SEQ ID NO:91编码AM3-32 CDR1的氨基酸序列
- [0294] SEQ ID NO:92编码AM3-32 CDR3的氨基酸序列
- [0295] SEQ ID NO:93编码AM4-757 CDR1的氨基酸序列
- [0296] SEQ ID NO:94编码AM4-757 CDR3的氨基酸序列
- [0297] SEQ ID NO:95编码AM4-386 CDR1的氨基酸序列
- [0298] SEQ ID NO:96编码AM4-386 CDR3的氨基酸序列
- [0299] SEQ ID NO:97编码AM4-352 CDR1的氨基酸序列
- [0300] SEQ ID NO:98编码AM4-352 CDR3的氨基酸序列
- [0301] SEQ ID NO:99编码AM3-182 CDR1的氨基酸序列
- [0302] SEQ ID NO:100编码AM3-182 CDR3的氨基酸序列
- [0303] SEQ ID NO:101编码AM4-203 CDR1的氨基酸序列
- [0304] SEQ ID NO:102编码AM4-203 CDR3的氨基酸序列
- [0305] SEQ ID NO:103编码AM5-95 CDR1的氨基酸序列
- [0306] SEQ ID NO:104编码AM5-95 CDR3的氨基酸序列
- [0307] SEQ ID NO:105编码人CXCR4的氨基酸序列
- [0308] 详述
- [0309] 概要
- [0310] 术语“和/或”，例如“X和/或Y”，应被理解为意指“X和Y”或“X或Y”，并且应被视为提供对两种含义或对任一含义的明确支持。
- [0311] 在整篇本说明书中，除非另外明确陈述或上下文另外要求，否则提及单一步骤、物质组合物、成组步骤或成组物质组合物应被视为涵盖那些步骤、物质组合物、成组步骤或成组物质组合物中的一者和多者（即一者或多者）。

[0312] 本领域技术人员将了解本文所述的本发明易经受除明确描述的变化和修改以外的变化和修改。应了解本发明包括所有所述变化和修改。本发明也包括本说明书中个别或共同提及或指示的所有步骤、特征、组合物和化合物以及所述步骤或特征的任何和所有组合或所述步骤或特征中的任何两者或更多者。

[0313] 本公开在范围方面不受限于本文所述的实施方案,所述实施方案仅意图出于例示目的。功能等效产品、组合物和方法明确在如本文所述的本公开的范围。

[0314] 除非另外明确陈述,否则本文任何实例都应被视为在进行必要的变更下适用于任何其它实例。

[0315] 所选定义

[0316] 术语“包含(comprise)”或变化形式(诸如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”)应理解为暗示包括所述要素、整数或步骤、或成组要素、整数或步骤,而非排除任何其它要素、整数或步骤、或成组要素、整数或步骤。

[0317] 如本文所用,术语“亲和力”是指单一分子与它的配体结合的强度,并且对于两种药剂的可逆结合,通常表示为平衡解离常数( $K_D$ )。它通过本公开的i体或CXCR4结合多肽与CXCR4之间的 $K_{解离}/K_{结合}$ 的比率来确定。 $K_D$ 和亲和力逆向相关。 $K_D$ 值涉及i体或CXCR4结合多肽的浓度,并且因此KD值越低(浓度越低),抗体的亲和力越高。本公开的i体或CXCR4结合多肽对CXCR4的亲和力可为例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM,约100nM至约1皮摩尔(pM),或约100nM至约1飞摩尔(fM)或更大。

[0318] 如本文所用,关于CXCR4结合分子或多肽与靶标的相互作用的术语“结合”意指相互作用取决于在所述靶标上存在特定结构(例如抗原决定簇或表位)。举例来说,CXCR4结合分子或多肽识别和结合特定蛋白质结构而非普遍识别和结合蛋白质。

[0319] 如本文所用,术语“保守性氨基酸取代”是指基于某些共同性质的氨基酸的分组。一种用以定义个别氨基酸之间的共同性质的实用方式在于分析同源性生物体的相应蛋白质之间的正常氨基酸变化频率。根据所述分析,可定义各组氨基酸,其中组内的氨基酸优先彼此交换,并且因此在它们对总体蛋白质结构的影响方面彼此最为类似(Schulz GE和RH Schirmer,Principles of Protein Structure,Springer-Verlag)。以这个方式定义的各氨基酸组的实例包括:

[0320] (i) 带电荷组,由Glu、Asp、Lys、Arg和His组成,

[0321] (ii) 芳族组,由Phe、Tyr和Trp组成,

[0322] (iii) 氮环组,由His和Trp组成,

[0323] (iv) 略微极性组,由Met和Cys组成,等。

[0324] 如本文所用,术语“CXCR4相关疾病或病状”应被视为意指可通过适合地向有此需要的受试者(即患有疾病或病症或至少一种其症状和/或处于引起或发展疾病或病症的风险下)施用本公开的CXCR4结合分子或多肽或组合物和/或针对CXCR4或CXCR4所涉及于其中的生物路径或机理具有活性的已知活性成分来分别预防和/或治疗的疾病和病症。术语CXCR4相关疾病或病状也包括CXCR4介导的疾病或病症。

[0325] 如本文所用,术语“同源性”描述用于鉴定具有类似功能或基序的基因或蛋白质的基于数学的序列类似性比较。本公开的多肽序列可作为“查询序列”用于相对于公共数据库进行搜索以例如鉴定其它家族成员、相关序列或同源物。可使用BLAST程序进行所述搜索

(Altschul等(1990) *J. Mo. Biol.* 215:403-10)。为出于比较目的获得空位化比对, 可如 Altschul等(1997) *Nuc Acids Res.* 25 (17) :3389-3402中所述利用空位化BLAST。

[0326] 如本文所用, 术语“同一性”意指当比对序列以使序列匹配最大, 即考虑空位和插入时, 在两个或更多个序列中的相应部分处的同一的核苷酸或氨基酸残基的百分比。使用已知方法, 可易于计算同一性, 所述方法包括但不限于 *Computational Molecular Biology*, Lesk AM编 Oxford University Press New York, 1988; *Computer Analysis of Sequence data*, 第I部分 Griffin AM和Griffin HG编, Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence analysis in molecular biology*, von Heinje G, Academic Press, New Jersey, 1994中所述的那些。用以确定同一性的方法被设计来给予测试的序列之间的最大匹配。此外, 用以确定同一性的方法被编纂在可公开获得的计算机程序中。用以确定两个序列之间的同一性的计算机程序方法包括但不限于 GCG程序包、BLASTP、BLASTN和FASTA。熟知 Smith Waterman算法也可用于确定同一性。

[0327] 如本文所用, 术语“治疗 (treating/treat/treatment)”包括施用足以减轻或消除指定病症的至少一种症状的治疗有效量的本公开的多肽、核酸分子、缀合物或多聚体。在一个实例中, 治疗涉及施用治疗有效量的多肽、核酸分子、缀合物或多聚体以治疗或预防 CXCR4相关疾病或病症。在一个实例中, 治疗也指防治性治疗。

[0328] 如本文所用, 术语“预防 (preventing/prevent/prevention)”包括施用足以阻止或阻碍指定病症的至少一种症状的发展的治疗有效量的本公开的多肽、核酸分子、缀合物或多聚体。

[0329] 如本文所用, 术语“特异性结合 (specifically binds/binds specifically)”应被视为意指相比于本公开的 CXCR4结合分子或多肽与替代性靶标或细胞反应或缔合, 本公开的 CXCR4结合分子或多肽更频繁, 更快速, 以更久持续时间和/或以更大亲和力与表达 CXCR4的特定靶标或细胞反应或缔合。更特定来说, 相比于 CXCR4结合分子或多肽与其它趋化因子受体例如 CCR5、CXCR7或CCR7结合, CXCR4结合分子或多肽以更大亲和力结合表达 CXCR4的靶标或细胞。举例来说, 相比于特异性结合靶标的 CXCR4结合分子或多肽结合其它 GPCR, 例如结合在结构或序列方面类似的其它 GPCR, CXCR4结合分子或多肽以更大亲和力 (例如2倍、10倍、20倍或40倍或60倍或80倍至100倍或150倍或200倍更大亲和力)、亲合力, 更易于, 和/或以更久持续时间结合那个靶标。特异性结合 CXCR4的多肽可显示与其它趋化因子受体或亲和力相关分子的一定交叉反应性, 但程度仅为所述交叉反应性不实质上调节 CXCR4结合的生物机理应答或效应。

[0330] 如本文所用, 提及“类似”结合水平应理解为意指 CXCR4结合分子或多肽在它结合另一靶标所处的水平的约30%或25%或20%内的水平下结合靶标。这个术语也可意指一种结合分子或多肽在另一结合分子或多肽结合相同靶标所处的水平的约30%或25%或20%内的水平下结合靶标。

[0331] 如本文在结合的情形下所用的术语“大致上”是指多肽在它结合另一靶标所处的水平的约15%或10%或5%内的水平下结合 CXCR4。这个术语也可意指一种结合分子或多肽在另一结合分子或多肽结合相同靶标所处的水平的约5%或4%或3%内的水平下结合靶标。

[0332] 如本文所用的术语“随机环序列”是指肽序列的从中间 (I组) 结构域的一个或多个

$\beta$ 链构象延伸或在所述一个或多个 $\beta$ 链构象之间延伸的部分。环区域通常不含延伸的 $\beta$ 链构象。环区域4类似于常规CDR1环。环区域8类似于常规CDR3环。

[0333] 如本文所用,术语“互补决定区”(同义词CDR;即CDR1、CDR2和CDR3)是指免疫球蛋白超家族结构域内的氨基酸残基,其存在是特异性抗原结合的主要促进因素。

[0334] 如本文所用的术语“骨架”或“i体骨架”意指由i组人NCAM1免疫球蛋白(Ig)结构域1(SEQ ID NO:1)的由氨基酸1至26、33至79以及88至97界定的骨架区表示的序列。

[0335] 如本文在经分离多肽或经分离结合多肽的情形下所用的术语“经分离”是指重组或合成起源的蛋白质或其一些组合,就它的起源或获得来源而言,所述蛋白质不与在自然界中所见的蛋白质相伴,不含来自相同来源的其它蛋白质,由来自不同物种的细胞表达,或不存在于自然界中。

[0336] 术语“治疗有效量”是指治疗剂的在单独或与另一治疗剂组合向细胞、组织或受试者施用,有效预防或改善疾病状况或疾病的进展的量。

[0337] 术语“肽模拟物(peptide mimetic/peptidomimetic)”意指能够充当它在结构上所基于的肽底物的模型的肽样分子。所述肽模拟物包括化学修饰的肽、含有非天然存在的氨基酸的肽样分子、以及类肽,其是由寡聚装配的N取代的甘氨酸产生的肽样分子(参见例如Goodman和Ro, Peptidomimetics for Drug Design, 于BURGER'S MEDICINAL CHEMISTRY AND DRUG DISCOVERY第1卷(M.E.Wolff编;John Wiley&Sons 1995),第803-861页)。

[0338] 多种肽模拟物在本领域中是已知的,包括例如含有受约束氨基酸、模拟肽二级结构的非肽组分、或酰胺键电子等排体的肽样分子。含有受约束非天然存在的氨基酸的肽模拟物可包括例如 $\alpha$ -甲基化氨基酸; $\alpha, \alpha$ -二烷基-甘氨酸或 $\alpha$ -氨基环烷羧酸;Na-Ca环化氨基酸;Na-甲基化氨基酸; $\beta$ -氨基环烷羧酸或 $\gamma$ -氨基环烷羧酸; $\alpha, \beta$ -不饱和氨基酸; $\beta, \beta$ -二甲基氨基酸或 $\beta$ -甲基氨基酸; $\beta$ 取代的2,3-桥亚甲基氨基酸;NC $\delta$ 或Ca-C $\delta$ 环化氨基酸;或取代的脯氨酸或另一氨基酸模拟物。

[0339] 此外,模拟肽二级结构的肽模拟物可含有例如非肽 $\beta$ 转角模拟物; $\gamma$ 转角模拟物; $\beta$ 折叠结构的模拟物;或螺旋结构的模拟物,其各自在本领域中是熟知的。肽模拟物也可为含有例如酰胺键电子等排体,诸如逆反转修饰;经还原酰胺键;亚甲基硫醚或亚甲基亚砷键;亚甲基醚键;亚乙基键;硫代酰胺键;反式烯烃或氟烯烃键;1,5-二取代的四唑环;酮基亚甲基或氟代酮基亚甲基键或另一酰胺电子等排体的肽样分子。本领域技术人员了解这些和其它肽模拟组分涵盖在如本文所用的术语“肽模拟物”的含义内。除非另外明确指示,否则术语“多肽”或“肽”将包括肽模拟物。

[0340] I体骨架和CXCR4结合分子

[0341] 本公开提供一种包含具有经修饰CDR1区和CDR3区的骨架的结合多肽(或“i体”)。在一个实例中,骨架区包含人NCAM1的如SEQ ID NO:1所示的结构域1或与其具有至少45%同一性或至少75%同源性的相关结构域序列,排除如所突出显示的CDR1区和CDR3区。

[0342] NCAM(或神经细胞粘附分子)是一种来自免疫球蛋白(Ig)超家族的具有I组结构域或中间组结构域的糖蛋白。NCAM的细胞外结构域由5个免疫球蛋白样(Ig)结构域继之以2个III型纤维结合蛋白(FNIII)结构域组成。

[0343] 相关结构域序列包括分别显示母牛、小鼠、大鼠、鸡和蛙NCAM1结构域序列的SEQ ID NO 3、4、5、6和8,以及分别显示蛙、人和小鼠NCAM 2结构域序列的SEQ ID NO 7、9和10。

[0344] 这些相关结构域之间的序列同一性如下：

NCBI REF		得分	E 值		
P13591.3 NCAM1_人	RecName: NCAM	200	5e-60	同一性(100%)	SEQ ID NO: 1
P31836.1 NCAM1_牛	RecName: NCAM	197	6e-59	同一性(98%)	SEQ ID NO: 3
P13595.3 NCAM1_小鼠	RecName: NCAM	195	2e-57	同一性(95%)	SEQ ID NO: 4
P13596.1 NCAM1_大鼠	RecName: NCAM	192	3e-57	同一性(95%)	SEQ ID NO: 5
P13590.3 NCAM1_鸡	RecName: NCAM	175	2e-50	同一性(89%)	SEQ ID NO: 6
P36335.1 NCA12_非洲爪蟾	RecName: NCAM	130	1e-34	同一性(68%)	SEQ ID NO: 7
P16170.1 NCA11_非洲爪蟾	RecName: NCAM	130	1e-34	同一性(68%)	SEQ ID NO: 8
O15394.2 NCAM2_人	RecName: NCAM	87.8	8e-20	同一性(51%)	SEQ ID NO: 9
O35136.1 NCAM2_小鼠	RecName: NCAM	86.3	3e-19	同一性(47%)	SEQ ID NO: 10

[0346] 这些相关结构域之间的序列同源性如下：

sp P13591.3 NCAM1_人	RecName: NCAM	序列同源性(100%)	SEQ ID NO: 1
sp P31836.1 NCAM1_牛	RecName: NCAM	序列同源性(100%)	SEQ ID NO: 3
sp P13595.3 NCAM1_小鼠	RecName: NCAM	序列同源性(99%)	SEQ ID NO: 4
sp P13596.1 NCAM1_大鼠	RecName: NCAM	序列同源性(99%)	SEQ ID NO: 5
sp P13590.3 NCAM1_鸡	RecName: NCAM	序列同源性(98%)	SEQ ID NO: 6
sp P36335.1 NCA12_非洲爪蟾	RecName: NCAM	序列同源性(89%)	SEQ ID NO: 7
sp P16170.1 NCA11_非洲爪蟾	RecName: NCAM	序列同源性(89%)	SEQ ID NO: 8
sp O15394.2 NCAM2_人	RecName: NCAM	序列同源性(74%)	SEQ ID NO: 9
sp O35136.1 NCAM2_小鼠	RecName: NCAM	序列同源性(74%)	SEQ ID NO: 10

[0348] 人NCAM的结构域1已在细菌表达系统中以重组多肽形式产生(Frei等(1992) J.Cell Biol.118:177-194)。

[0349] 本公开描述在CDR1区和/或CDR3区中引入i体骨架中的修饰,其已显示会改变结构域(或“i体”)的结合性质。特定来说,本发明者已开发经修饰i体氨基酸和多肽,其惊人地能够以高亲和力和特异性结合CXCR4,并且抑制或降低CXCR4诱导的细胞迁移。特定来说,本公开的CXCR4结合多肽或i体用于抑制癌症转移、抗炎症性疾病和纤维化相关疾病。

[0350] 因此,本公开提供结合CXCR4,包含i体骨架酸序列的许多多肽,其中i体骨架的CDR1区或CDR3区已被修饰,并且其中分子以小于50uM、小于40μM、小于20μM、小于10uM、小于1uM、小于700nM、小于600nM、小于500nM、小于400nM、小于300nM、小于200nM、小于100nM、小于50nM、小于10nM、或小于5nM或小于1nM的亲和力结合人CXCR4。

[0351] 在一个实施方案中,用随机环序列替换多肽的整个CDR1区和/或CDR3区。

[0352] 举例来说,可用具有如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:69、SEQ ID

NO:73或SEQ ID NO:77所示的序列或与其具有至少50%同一性的序列的环区域替换多肽的CDR1环区域。

[0353] 举例来说,可用具有如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:77所示的序列或与其具有至少50%同源性的序列的环区域替换多肽的CDR1环区域。

[0354] 在另一实例中,可用具有如SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:78所示的序列、与其具有至少70%同一性的序列的环区域替换多肽的CDR3环区域。

[0355] 在另一实例中,可用具有如SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:78所示的序列、与其具有至少70%同源性的序列的环区域替换多肽的CDR3环区域。

[0356] 在一个实例中,多肽包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76具有至少80%同一性、至少90%同一性、或至少95%同一性、或至少97%同一性、或至少98%同一性、或至少99%同一性的序列。

[0357] 在一个实例中,多肽包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76具有至少80%同源性、至少90%同源性、或至少95%同源性、或至少97%同源性、或至少98%同源性、或至少99%同源性的序列。

[0358] 在一个实例中,多肽包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76。

[0359] 在一个实例中,多肽包含以下或由以下组成:包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸取代的SEQ ID NO:11。

[0360] 在一个实例中,多肽包含SEQ ID NO:11或由SEQ ID NO:11组成。

[0361] 本公开也提供一种编码本文所述的多肽的核酸分子。

[0362] 在一个实例中,核酸分子包含与SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:79中的任一者具有至少80%同一性、至少90%同一性、或至少95%

同一性、或至少97%同一性、或至少98%同一性、或至少99%同一性或100%同一性的序列。

[0363] 在一个实例中,核酸分子包含与SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:79中的任一者具有至少80%同源性、至少90%同源性、或至少95%同源性、或至少97%同源性、或至少98%同源性、或至少99%同源性或100%同源性的序列。

[0364] 通过GAP (Needleman和Wunsch, 1970) 分析 (GCG程序), 采用空位产生罚分=5和空位延伸罚分=0.3来确定多肽或多核苷酸的同源性%。查询序列的长度是至少50个残基, 并且GAP分析历经至少50个残基的区域来比对两个序列。举例来说, 查询序列的长度是至少100个残基, 并且GAP分析历经至少100个残基的区域来比对两个序列。在一个实例中, 历经两个序列的整个长度来将它们比对。

[0365] 出于本公开的目的, 使用适用于蛋白质比对与DNA比对两者的Needleman-Wunsch比对 (即整体比对) 来进行序列比对和同源性得分计算。缺省评分矩阵BLOSUM50和单位矩阵分别用于蛋白质比对和DNA比对。空位中第一残基的罚分对于蛋白质是-12, 并且对于DNA是-16, 而空位中额外残基的罚分对于蛋白质是-2, 并且对于DNA是-4。比对由v20u6版FASTA程序包获得 (W.R.Pearson和D.J.Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, 以及W.R.Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology, 183:63-98)。

[0366] 本公开涵盖本公开的结合蛋白的变异形式。举例来说, 相较于本文所示的序列, 这种变异结合蛋白包含一个或多个保守性氨基酸取代。在一些实例中, 结合蛋白包含10个或更少个, 例如9或8或7或6或5或4或3或2或1个保守性氨基酸取代。“保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链和/或亲疏水性和/或亲水性的氨基酸残基替换的氨基酸取代。

[0367] 具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中定义, 包括碱性侧链 (例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链 (例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链 (例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链 (例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 $\beta$ -分支侧链 (例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和芳族侧链 (例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。亲疏水性指数例如于Kyte和Doolittle (1982) 中描述, 并且亲水性指数于例如US4554101中描述。

[0368] 本公开也涵盖非保守性氨基酸变化。举例来说, 受到特别关注的是用另一带电荷氨基酸以及用中性或带正电荷氨基酸取代带电荷氨基酸。在一些实例中, 结合蛋白包含10个或更少个, 例如9或8或7或6或5或4或3或2或1个非保守性氨基酸取代。

[0369] 本文所述的CXCR4结合蛋白的变异形式保留结合CXCR4的能力。本文描述用于测定与CXCR4的特异性结合的方法。

[0370] 亲和力成熟

[0371] 在另一实例中, 使本公开的多肽进行亲和力成熟以产生能够以增加的亲和力、特异性或活性结合CXCR4的i体或以产生具有增加的表达或溶解性的i体。举例来说, 使编码本公开的多肽的序列突变以致引入一个或多个氨基酸取代。所得变异多肽接着例如在竞争性

测定中针对与CXCR4的结合进行筛选,针对对其它趋化因子受体(例如CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CX3CR1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CCR1、XCR1;参见图9)的特异性增加进行筛选,或针对表达增加或溶解性增加进行筛选(参见图7),或通过如下所述的亲和测定,针对对CXCR4的亲和力增加进行筛选。

[0372] 存在用于使多肽和蛋白质进行亲和力成熟的若干方案。这些方案包括DNA改组(Stemmer Proc Natl Acad Sci U S A. (1994);91(22):10747-10751)、易错PCR(Hawkins等(1992) J.Mol.Biol.,226:889-896以及Henderson等(2007) Structure 15:1452-66)和使整个骨架随机化的细菌增变细胞(Irving等(1996) Immunotechnology 2:127-43.3),以及更具靶向性的方法诸如掺杂寡核苷酸诱变(Hermes等(1989) Gene,84:143-1514)。核糖体展示与来自Q $\beta$ 噬菌体的易错RNA依赖性RNA聚合酶偶联也已用于使单结构域、结合蛋白和多肽进行亲和力成熟(Kopsidas等,(2006) Immunology Letters 107 163-168)。

[0373] 本公开的多肽可为可溶性分泌蛋白质,或可以融合蛋白形式呈现在细胞或粒子(例如噬菌体或其它病毒、核糖体或芽孢)的表面上。示例性噬菌体展示方法例如于US5821047;US6248516和US6190908中描述。接着筛选使用这些方法产生的噬菌体展示粒子以鉴定具有足以结合CXCR4的构象的所展示结合蛋白或针对CXCR4的改进结合剂。

[0374] 可通过诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)或为本领域技术人员所熟悉的任何其它技术的方法来测定表观亲和力。可通过诸如斯卡查德(Scatchard)分析或为本领域技术人员所熟悉的任何其它技术的方法来测定亲和力。为本领域技术人员所熟悉的用于测量表观结合亲和力的另一技术是表面等离子体共振技术(在BIACORE 2000系统上分析)(Liljeblad等,Glyco.J.2000,17:323-329)。标准测量和传统结合测定由Heeley,R.P,Endocr.Res.2002,28:217-229所描述。

[0375] 在一个实例中,相比于非亲和力成熟i体的结合亲和力,本公开的亲和力成熟i体以更大结合亲和力(例如大至少约5倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍或至少约1000倍)特异性结合人CXCR4。

#### [0376] 蛋白质产生

[0377] 在一个实例中,本公开的多肽通过在例如如本文所述和/或如本领域中所知的足以产生蛋白质的条件下培养细胞系例如大肠杆菌(E.Coli)细胞系来产生。

#### [0378] 重组表达

[0379] 在重组蛋白的情况下,将编码其的核酸放置至一个或多个表达构建体例如表达载体中,接着将所述表达构建体转染至宿主细胞中,所述宿主细胞诸如可产生二硫桥或二硫键的细胞,诸如包括大肠杆菌细胞的细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。示例性哺乳动物细胞包括猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞。示例性细菌细胞包括BL21(DE3)、BL21(DE3)-pLysS、Tuner、Tuner pLysS、Origami、Origami B、Origami B pLysS、Rosetta、AD494、HMS174,其全都可从Novagen获得。

[0380] 用以实现这些目标的分子克隆技术在本领域中是已知的,并且例如于Ausubel F M(1987) Current Protocols in Molecular Biology.New York.NY,John Wiley&Sons或 Sambrook,Fritsch和Maniatis Molecular Cloning:a laboratory manual Cold Spring Harbor NY.Cold Spring Harbor Laboratory Press中描述。广泛多种克隆和体外扩增方法适于构建重组核酸。

[0381] 在分离之后,将编码本公开的蛋白质的核酸插入表达构建体或可复制载体中以进行进一步克隆(扩增DNA)或在无细胞系统中或在细胞中表达。举例来说,使核酸可操作地连接于启动子。

[0382] 如本文所用,术语“启动子”应在它的最广泛情形下采用,并且包括基因组基因的转录调控序列,包括为达成准确转录起始所需的TATA框或起始子元件,伴有或不伴有例如应答于发育和/或外部刺激或以组织特异性方式来改变核酸的表达的额外调控元件(例如上游活化性序列、转录因子结合位点、增强子和沉默子)。在本发明情形下,术语“启动子”也用于描述重组核酸、合成核酸或融合核酸或衍生物,其赋予、活化或增强它所可操作地连接的核酸的表达。示例性启动子可含有一种或多种特定调控元件的额外拷贝以进一步增强表达和/或改变所述核酸的空间表达和/或时间表达。

[0383] 如本文所用,术语“可操作地连接于”意指相对于核酸来定位启动子以使所述核酸的表达由所述启动子控制。

[0384] 无细胞表达系统也由本公开涵盖。举例来说,使编码CXCR4结合多肽的核酸可操作地连接于适合启动子例如T7、T5或SP6启动子,并且使所得表达构建体暴露于足以达成转录和翻译的条件。用于体外表达或无细胞表达的典型表达载体已被描述,并且包括但不限于TNT T7和TNT T3系统(Promega)、pEXP1-DEST和pEXP2-DEST载体(Invitrogen)。

[0385] 用于在细胞中表达的许多载体是可用的。载体组分通常包括但不限于以下中的一者或多者:信号序列、编码本公开的多肽的序列(例如由本文提供的信息获得)、增强子元件、启动子和转录终止序列。熟练技术人员将了解适于表达蛋白质的序列。载体可为质粒,适当时可为病毒性载体,例如噬菌体或噬菌粒。例如在制备核酸构建体、诱变、将DNA引入细胞中以及基因表达和蛋白质分析时用于操作核酸的许多已知技术和方案于例如Ausubel F M(1987)Current Protocols in Molecular Biology.New York.NY,John Wiley&Sons中描述。广泛多种宿主/表达载体组合可用于表达本公开的i体DNA序列。适用表达载体例如可由染色体、非染色体和合成DNA序列的区段组成。适合载体包括SV40的衍生物和已知细菌质粒,例如大肠杆菌质粒col E1、Per1、Pbr322、Pmb9和它们的衍生物、诸如RP4的质粒;噬菌体DNA,例如噬菌体的众多衍生物\例如NM989和其它噬菌体DNA,例如M13和丝状单链噬菌体DNA;酵母质粒,诸如2u质粒或其衍生物;适用于真核细胞中的载体,诸如适用于昆虫或哺乳动物细胞中的载体;源于质粒和噬菌体DNA的组的载体,诸如已被修饰以采用噬菌体DNA或其它表达控制序列的质粒;等。

[0386] 示例性信号序列包括原核分泌信号(例如DsbA、pelB、碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II)、酵母分泌信号(例如转化酶前导物、 $\alpha$ 因子前导物或酸性磷酸酶前导物)或哺乳动物分泌信号(例如单纯性疱疹gD信号)。

[0387] 示例性前导肽包括在原核生物中具有活性的那些(诸如PelB、OmpA、PIII、DsbA、TorT、TolB、phoA启动子、 $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统和杂合启动子诸如tac启动子)。

[0388] 适合细菌启动子包括大肠杆菌lacI和lacZ启动子、T3和T7、T5启动子、gpt启动子、 $\lambda$ PR和PL启动子以及trp启动子。真核启动子包括CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、逆转录病毒LTR的启动子诸如劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus,RSV)的启动子、以及金属硫蛋白启动子诸如小鼠金属硫蛋白-I启动子。

[0389] 在哺乳动物细胞中具有活性的示例性启动子包括巨细胞病毒立即早期启动子(CMV-IE)、人延伸因子1- $\alpha$ 启动子(EF1)、小核RNA启动子(U1a和U1b)、 $\alpha$ -肌球蛋白重链启动子、猿猴病毒40启动子(SV40)、劳斯肉瘤病毒启动子(RSV)、腺病毒主要晚期启动子、 $\beta$ -肌动蛋白启动子;包含CMV增强子/ $\beta$ -肌动蛋白启动子的杂合调控元件或免疫球蛋白启动子或其活性片段。适用哺乳动物宿主细胞系的实例是用SV40转化的猴肾CV1株系(COS-7,澳大利亚细胞库(AUSTRALIAN CELL BANK)CRL 1651);人胚肾株系(293或被亚克隆以达成悬浮培养生长的293细胞);幼小仓鼠肾细胞(BHK,澳大利亚细胞库CCL 10);或中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。

[0390] 适于在诸如像选自包含巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和裂殖酵母(*S.pombe*)的组的酵母细胞的酵母细胞中的表达的典型启动子包括但不限于ADH1启动子、GAL1启动子、GAL4启动子、CUP1启动子、PHO5启动子、nmt启动子、RPR1启动子或TEF1启动子。

[0391] 用于将经分离核酸分子或包含其的基因构建体引入细胞中以达成表达的手段为本领域技术人员所知。用于给定细胞的技术取决于已知成功技术。用于将重组DNA引入细胞中的手段包括显微注射、由DEAE-右旋糖苷介导的转染、由脂质体介导的转染(诸如通过使用转脂胺(lipofectamine)(Gibco,MD,USA)和/或细胞转染剂(cellfectin)(Gibco,MD,USA))、PEG介导的DNA摄取、电穿孔、病毒转导(例如使用慢病毒)和微粒轰击(诸如通过使用DNA涂布的钨或金粒子(Agracetus Inc.,WI,USA))以及其它手段。

[0392] 在一些情况下,适用的是以不可溶形式表达蛋白质、多肽或肽,特别是当目标多肽相当短,通常可溶,和/或在宿主细胞内经受蛋白水解降解时。以不可溶形式产生蛋白质有助于简单回收,并且保护多肽免遭不合需要的蛋白水解降解。一种用于以不可溶形式产生多肽的手段在于通过在融合构建体中包括至少一个诱导包涵体形成的肽标签(即包涵体标签)来重组产生多肽作为不可溶融合蛋白的一部分。通常,融合蛋白被设计以包括至少一个可裂解肽接头以使目标多肽可随后从融合蛋白进行回收。融合蛋白可被设计以包括多个包涵体标签、可裂解肽接头和编码目标多肽的区域。

[0393] 包含有助于表达不溶性蛋白质的肽标签的融合蛋白在本领域中是熟知的。通常,嵌合或融合蛋白的标签部分较大,从而增加融合蛋白将不可溶的可能性。通常使用的大的肽标签的实例包括但不限于氯霉素乙酰基转移酶(Dykes等,Eur.J.Biochem.,174:411(1988))、 $\beta$ -半乳糖苷酶(Schellenberger等,Int.J.Peptide Protein Res.,41:326(1993);Shen等,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 281:4627(1984);以及Kempe等,Gene,39:239(1985))、谷胱甘肽-S-转移酶(Ray等,Bio/Technology,11:64(1993)以及Hancock等(W094/04688))、L-核酮糖激酶的N末端(美国专利号5,206,154以及Lai等,Antimicrob.Agents&Chemo.,37:1614(1993))、噬菌体T4gp55蛋白(Gramm等,Bio/Technology,12:1017(1994))、细菌酮类固醇异构酶蛋白(Kuliopulos等,J.Am.Chem.Soc.116:4599(1994))、泛素(Pilon等,Biotechnol.Prog.,13:374-79(1997))、牛凝乳酶原(Naught等,Biotechnol.Bioengineer.57:55-61(1998))和杀细菌性/可渗透性增加性蛋白质("BPI";Better,M.D.和Gavit,P.D.,美国专利号6,242,219)。本领域充满这个技术的特定实例,参见例如美国专利号6,613,548,其描述蛋白质标签和可溶性蛋白质的融合蛋白以及随后从细胞溶解产物进行纯化;美国专利号6,037,145,其教导保护所表达嵌合蛋白免遭特定蛋白

酶的标签;美国专利号5,648,244,其教导对具有标签和可裂解接头以达成易于纯化所需蛋白质的融合蛋白的合成;以及美国专利号5,215,896;美国专利号5,302,526;美国专利号5,330,902;和US 2005221444,其描述含有被特定设计以增加嵌合蛋白或肽的不溶性的氨基酸组成的融合标签。

[0394] 较短包涵体标签近来已从玉米 (*Zea mays*) 玉米蛋白 (美国专利申请序列号11/641,936)、胡萝卜 (*Daucus carota*) 胱抑素 (cystatin) (美国专利申请序列号11/641,273) 和来自秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的淀粉状蛋白样 (amyloid-like) 假定蛋白质 (美国专利申请序列号11/516,362;各自据此以引用的方式整体并入本文) 得以开发。使用短包涵体标签使在重组宿主细胞内产生的靶标肽的产率增加。

[0395] 本文也提供一种包含一个或多个多核苷酸构建体的重组宿主细胞。本文涵盖编码本公开的i体的多核苷酸,也涵盖产生i体的方法,所述方法包括从多核苷酸进行表达。可例如通过在适当条件下培养含有多核苷酸的重组宿主细胞来实现表达。

[0396] 视所用细胞类型而定,可在多种培养基中培养用于产生本公开的结合分子或多肽的宿主细胞。可商购获得的培养基诸如汉姆氏F10 (Ham's F10) (Sigma)、最低必需培养基 (MEM), (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和杜贝卡氏改良依格氏培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma) 适于培养哺乳动物细胞。用于培养本文讨论的其它细胞类型的培养基在本领域中是已知的。

[0397] 应了解并非所有载体、表达控制序列和宿主都将完全同等地起表达DNA序列的作用。在相同表达系统的情况下,也并非所有宿主都将完全同等地起作用。然而,在不脱离本申请的范围的情况下,本领域技术人员将能够在不进行过度实验下选择适当载体、表达控制序列和宿主以实现所需表达。举例来说,在选择载体时,必须考虑宿主,因为所述载体必须在所述宿主中起作用。也将考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及由载体编码的任何其它蛋白质 (诸如抗生素标记) 的表达。

[0398] 本公开也提供一种含有一个或多个如本文公开的多核苷酸的宿主细胞。本公开也提供一种通过如上所述的任何适合技术来将所述一个或多个多核苷酸引入宿主细胞中的方法。

[0399] 一旦多核苷酸已被引入宿主细胞中,即可发生多核苷酸的表达,例如通过在各种条件下培养宿主细胞以从一个或多个多核苷酸表达一种或多种多肽。

[0400] 除克隆之外或并非克隆,编码本公开的i体的多核苷酸可被重组/合成制备。多核苷酸可被设计成具有CXCR4结合多肽的适当密码子。一般来说,如果序列将用于表达,那么将选择优选用于预定宿主的密码子。完全多核苷酸可从通过标准方法制备的重叠寡核苷酸装配并且装配成完全编码序列。参见例如Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair等, Science, 223:1299 (1984); Jay等, J. Biol. Chem., 259:6311 (1984)。

[0401] 蛋白质的分离

[0402] 可分离或纯化本公开的CXCR4结合分子或多肽或i体。

[0403] 用于纯化本公开的多肽的方法在本领域中是已知的和/或在本文中进行描述。

[0404] 当使用重组技术时,本公开的多肽可在细胞内,在周质间隙中产生,或直接分泌至培养基中。如果蛋白质在细胞内产生,那么作为第一步骤,例如通过离心或超滤来移除颗粒碎片,即宿主细胞或经溶解片段。当蛋白质被分泌至培养基中时,可首先使用可商购获得的

蛋白质浓缩过滤器例如Amicon或Millipore Pellicon超滤装置来浓缩由所述表达系统获得的上清液。可将蛋白酶抑制剂诸如PMSF包括在任何前述步骤中以抑制蛋白水解,并且可包括抗生素以防止不定污染物的生长。

[0405] 可使用例如离子交换、羟磷灰石色谱法、疏水性相互作用色谱法、凝胶电泳、透析、亲和色谱法(例如蛋白A亲和色谱法或蛋白G色谱法)、加热或前述事项的任何组合来纯化由细胞制备的蛋白质。这些方法在本领域中是已知的,并且例如于W099/57134中描述。

[0406] 熟练技术人员也将了解本公开的多肽可被修饰以包括用以有助于纯化或检测的标签,例如多聚组氨酸标签例如六组氨酸标签、或流感病毒血凝素(HA)标签、或猴病毒5(V5)标签、或FLAG标签、或谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签。举例来说,标签是六his标签。接着使用本领域中已知的方法诸如亲和纯化来纯化所得蛋白质。举例来说,通过以下方式来纯化包含六his标签的蛋白质:使包含所述蛋白质的样品与固定在固体或半固体载体上的特异性结合六his标签的镍-次氨基三乙酸(Ni-NTA)接触,洗涤所述样品以移除未结合蛋白质,以及随后洗脱结合的蛋白质。或者,或此外,在亲和纯化方法中使用结合标签的多肽、配体或抗体。

#### [0407] 缀合物

[0408] 本公开也提供本文所述的CXCR4结合分子或多肽的缀合物。本公开的多肽可与其缀合的化合物的实例选自由以下组成的组:放射性同位素、可检测标记、治疗性化合物、胶体、毒素、核酸、肽、蛋白质、使蛋白质在受试者中的半衰期增加的化合物及其混合物。

[0409] 示例性治疗剂包括但不限于抗血管生成剂、抗新血管化药剂和/或抗其它血管化药剂、抗增生剂、促凋亡剂、化学治疗剂、抗有丝分裂剂(例如抗有丝分裂剂澳瑞他汀(Auristatin)、(MMAF/MMAE,根据Angew.Chem.Int.Ed.2014,53,1-6)或治疗性核酸。

[0410] 毒素包括对细胞有害(例如杀灭细胞)的任何药剂。关于对本领域中已知的这些类别的药物以及它们的作用机理的描述,参见Goodman等,(1990)。与制备抗体免疫毒素缀合物相关的额外技术于例如US5194594中提供,并且可用于本公开中。示例性毒素包括白喉(diphtheria)A链、白喉毒素的非结合性活性片段、外毒素(exotoxin)A链(来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素(ricin)A链、相思子毒素(abrin)A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、 $\alpha$ -帚曲菌素(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白质、石竹素(dianthin)蛋白质、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白质(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、泻果素(curcun)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素(gelonin)、有丝分裂素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯族毒素(tricothecene)。参见例如W093/21232。

[0411] 在一些实例中,可使CXCR4结合分子或多肽或i体共价或非共价偶联于细胞毒素或其它细胞增殖抑制性化合物,以使那个药剂的递送定位于肿瘤细胞。举例来说,药剂可选自由以下组成的组:药剂、酶抑制剂、增殖抑制剂、溶解剂、DNA或RNA合成抑制剂、膜可渗透性调节剂、DNA代谢物、二氯乙基硫醚衍生物、蛋白质产生抑制剂、核糖体抑制剂、凋亡诱导剂和神经毒素。

[0412] 适于形成本公开的免疫缀合物的化学治疗剂包括紫杉醇(taxol)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙锭(ethidium bromide)、吐根碱

(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽醌二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、米拉霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1脱氢睾酮(1de-hydrotestosterone)、糖皮质激素(glucocorticoid)、普鲁卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素(puromycin)、抗代谢剂(诸如甲氨蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤(6-mercaptapurine)、6硫鸟嘌呤(6thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟达拉滨(fludarabine)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、达卡巴嗪(decarbazine)、羟基脲(hydroxyurea)、天冬酰胺酶(asparaginase)、吉西他滨(gemcitabine)、克拉屈滨(cladribine)、烷化剂(诸如二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、塞替派(thioepa)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、链脲佐菌素(streptozotocin)、达卡巴嗪(dacarbazine)(DTIC)、丙卡巴肼(procarbazine)、丝裂霉素C(mitomycin C)、顺铂和其它铂衍生物诸如卡铂(carboplatin))、抗生素(诸如更生霉素(dactinomycin)(先前称为放线菌素(actinomycin))、博莱霉素(bleomycin)、柔红霉素(先前称为道诺霉素(daunomycin))、多柔比星(doxorubicin)、伊达比星(idarubicin)、米拉霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、光神霉素(plicamycin)、安曲霉素(anthracycline)(AMC))。

[0413] 在一个实例中,使如本文所述的CXCR4结合分子或多肽缀合或连接于另一蛋白质(例如人血清白蛋白或HSA),包括本公开的另一CXCR4结合分子或多肽或包含如本文所述的CDR1区和/或CDR3区的蛋白质。也可使如本文所述的CXCR4结合分子或多肽缀合于靶向例如肿瘤抗原、或具有重定向和活化针对肿瘤的任何循环T细胞的潜力的靶标(例如CD3)、或在单核细胞和巨噬细胞上显著表达以及在嗜中性白细胞活化后被上调的靶标(例如CD64)、或在天然杀伤细胞、嗜中性多形核白细胞、单核细胞和巨噬细胞的表面上表达的靶标的另一结合分子或多肽。在一个实例中,结合分子或多肽是IgG的低亲和力结合剂(例如CD16),或主要在嗜中性白细胞、单核细胞、巨噬细胞和嗜酸性粒细胞上组成性表达的靶标(例如CD89)。不排除其它蛋白质或缀合配偶体。额外蛋白质将为熟练技术人员显而易见,并且包括例如免疫调节剂或半衰期延长蛋白质或肽或多肽或结合血清白蛋白的其它蛋白质以及其它额外蛋白质。

[0414] 示例性血清白蛋白结合肽或蛋白质描述于US20060228364或US20080260757中。

[0415] 在一个实例中,使本公开的CXCR4结合分子或多肽缀合于如Schellenberger等(2009)Nature Biotechnology 27(12):1186-1192中所述的XTEN多肽。

[0416] 在一个实例中,使本公开的CXCR4结合分子或多肽缀合于如Schlappschy等(2013)Protein Engineering, Design&Selection第26卷第8期第489-501页中所述的多肽。

[0417] 在一个实例中,使本公开的多肽缀合于如例如于Peters等(2010),Blood第115卷第10期2057-2064, Kim等,(2009)BMB Rep. 42:212-216以及Nagashima等(2011)J Biochem. 149:337-346中所述的免疫球蛋白的Fc区。

[0418] 可使用本领域中已知的方法制备CXCR4结合多肽缀合物(双特异性分子)。举例来说,可分别产生双特异性分子的各结合特异性,接着彼此缀合。当结合特异性是蛋白质、多

肽或肽时,多种偶联剂或交联剂可用于共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、N-丁二酰亚胺-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫基双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基二顺丁烯二酰亚胺(oPDM)、N-丁二酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)和4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基丁二酰亚胺酯(磺基-SMCC)(参见例如Karpovsky等(1984)J.Exp.Med 160 1686,Liu,MA等(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82 8648)。其它方法包括Paulus(1985)Behring Ins Mitt第78期,1 18-132,Brennan等(1985)Science 229 81-83以及Glennie等(1987).J Immunol 39 2367-2375中所述的那些。

[0419] 多种放射性核素可用于产生放射性缀合蛋白质。实例包括但不限于低能量放射性核(例如适于诊断目的),诸如 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^2\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{43}\text{K}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ 等。举例来说,放射性核素是 $\gamma$ 射线、光子或正电子发射性放射性核素,具有适于容许在施用与定位于成像部位之间流逝的时间之后具有放射性或进行检测的半衰期。本公开也涵盖高能量放射性核(例如出于治疗目的),诸如 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 和 $^{188}\text{Re}$ 。这些同位素通常产生具有短路径长度的高能量 $\alpha$ 或 $\beta$ 粒子。所述放射性核素杀灭它们紧密邻近的细胞,例如缀合物已附着或已进入的赘生性细胞。它们对非定位细胞具有少许作用或不具有作用,并且基本上是非免疫原性的。或者,高能量同位素可通过热辐照另外稳定同位素来产生,例如如在硼中子捕获疗法中(Guan等,1998)。可为适合的其它同位素描述于Carter.(2001)Nature Reviews Cancer 1,118-129,Goldmacher等(2011)Therapeutic Delivery 2;397-416,Payne(2003)Cancer Cell 3,207-212,Schrama等,(2006)Nature Rev.Drug Discov.5,147-159,Reichert等(2007)Nature Reviews Drug Discovery 6;349-356中。

[0420] 在另一实例中,使蛋白质缀合于用于细胞预靶向的“受体”(诸如链霉亲和素(streptavidin)),其中向患者施用缀合物,随后使用清除剂从循环移除未结合缀合物,接着施用缀合于治疗剂(例如放射性核苷酸)的“配体”(例如抗生蛋白(avidin))。

[0421] 本公开的CXCR4结合分子或多肽可被修饰以含有本领域中已知以及可易于获得的额外非蛋白质部分。举例来说,适于使蛋白质衍生的部分是生理上可接受的聚合物,例如水溶性聚合物。所述聚合物适用于增加本公开的CXCR4结合多肽的稳定性和/或降低清除(例如由肾进行的清除)和/或降低免疫原性。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)或丙二醇(PPG)。

[0422] 在一个实例中,如本文所述的CXCR4结合分子或多肽包含一种或多种可检测标记以有助于检测和/或分离。举例来说,化合物包含荧光标记,诸如像荧光素(fluorescein)(FITC)、5,6-羧甲基荧光素、德克萨斯红(Texas red)、硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基(NBD)、香豆素(coumarin)、丹磺酰氯、若丹明(rhodamine)、4'-6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)以及花青染料Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5和Cy7、荧光素(5-羧基荧光素-N-羟基丁二酰亚胺酯)、若丹明(5,6-四甲基若丹明)。这些荧光剂的最大吸收和最大发射分别处于:FITC(490nm;520nm)、Cy3(554nm;568nm)、Cy3.5(581nm;588nm)、Cy5(652nm;672nm)、Cy5.5(682nm;703nm)和Cy7(755nm;778nm)。

[0423] 在某些实例中,可使本公开的i体与用于使肿瘤成像的药剂偶联。所述药剂包括:金属;金属螯合剂;镧系元素;镧系元素螯合剂;放射性金属;放射性金属螯合剂;正电子发射核;微泡(用于超声);脂质体;微囊封在脂质体或纳米球体中的分子;单晶氧化铁纳米化

合物;磁共振成像造影剂;光吸收剂、反射剂和/或散射剂;胶体粒子;荧光团,诸如近红外荧光团。在许多实例中,所述次级官能基/部分将相对较大,例如大小是至少25amu,并且在许多情况下,大小可为至少50、100或250amu。在某些实例中,次级官能基是用于螯合金属的螯合部分,例如放射性金属或顺磁性离子的螯合剂。在额外实例中,它是用于放射疗法或成像程序的放射性核素的螯合剂。

[0424] 或者,或此外,用例如荧光半导体纳米晶体(如例如于US6306610中所述)标记如本文所述的CXCR4结合分子或多肽。

[0425] 或者,或此外,用例如磁性或顺磁性化合物标记CXCR4结合分子或多肽,所述化合物诸如铁、钢、镍、钴、稀土物质、钹-铁-硼、亚铁-铬-钴、镍-亚铁、钴-铂或锇铁氧体。

#### [0426] 经固定蛋白质

[0427] 在一个实例中,将本公开的CXCR4结合分子或多肽固定在固体或半固体基质上。术语“固定”应理解为涉及用以将蛋白质固定于特定基质上的各种方法和技术,例如如W099/56126或W002/26292中所述。举例来说,固定可用于使蛋白质稳定以致它的活性不由于尤其在储存期间或在单批使用时的生物、化学或物理暴露而降低或不利改变。

[0428] 用于将蛋白质固定在基质上的各种方法在本领域中是已知的,并且包括交联、结合于载体和留置在半渗透性基质内。

[0429] 示例性基质包括多孔凝胶、氧化铝、膨润土、琼脂糖、淀粉、尼龙或聚丙烯酰胺。

#### [0430] 测定本公开的CXCR4结合分子或多肽的活性

##### [0431] 结合测定

[0432] 针对G蛋白偶联受体的最具特异性和最强力的抗体通常靶向由蛋白质的三级结构形成的构象复杂表位。关于可溶性蛋白质靶标使用的方法对于天然结构取决于完整脂质双层的跨膜蛋白质不具有有效性。

[0433] 可通过例如标准流式细胞计量方法来测试本公开的CXCR4结合分子或多肽与CXCR4的结合。因为本公开的CXCR4结合分子或多肽优选识别呈它的天然构象的人CXCR4,所以优选使用利用表达天然构象的CXCR4的试剂的测定来测定与CXCR4的结合。可用于结合测定中的表达天然构象CXCR4的试剂的非限制性实例包括天然表达CXCR4的细胞、已被转染来表达CXCR4的细胞(例如用CXCR4表达载体转染的R1610细胞)。表达CXCR4的适合细胞的实例包括MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-361、MDA-MB-549、Ramos、Namalwa、MOLT-4、DU-4475、DU-145、PC3、LNcaP、SW480、HT29、NCI-H69、SJSA-1-met-luc和HL-60细胞。简要来说,对于流式细胞计量术测定,使表达CXCR4的细胞与测试CXCR4结合分子或多肽一起孵育,洗涤,与能够结合测试抗体的经标记二级试剂一起孵育,再次洗涤,并且经受分析以检测二级试剂与细胞的结合(例如使用FACS机器)。如通过流式细胞计量术所评估,使细胞明亮染色的CXCR4分子或多肽用于进一步探究。适于根据本公开使用的结合测定的实例包括放射性配体结合测定,诸如过滤测定(PerkinElmer)或SPA测定(PerkinElmer或GE Healthcare);或标记的配体结合测定,诸如DELFIATM TRF(PerkinElmer)、LanthaScreenTM系统(Invitrogen)或Tag-liteTM系统(Cisbio)。

[0434] 或者,可用编码跨膜形式的CXCR4的表达载体转染诸如CHO细胞系的细胞系。所转染蛋白质可优选在N末端包含诸如myc标签的标签以使用针对所述标签的抗体进行检测。可通过使经转染细胞与CXCR4结合多肽一起孵育,以及检测结合的多肽来测定本公开的CXCR4

结合分子或多肽与CXCR4的结合。抗体与所转染蛋白质上的标签的结合可用作阳性对照。

[0435] 用于评估结合的另一方法要求使用能够并有高浓度的呈它们的天然构象的靶标膜蛋白质的脂质粒子(例如并有CXCR4的磁性蛋白脂质体或并有CXCR4的脂质体粒子)。所述脂蛋白粒子于例如WO 2005/042695、WO 2011/083141、Banik等(2009) *Drug Discovery & Development* 12(9):14-17; Willis S等(2008) *Biochemistry* 47:6988-90中描述。通过共表达逆转录病毒结构核心多聚蛋白Gag以及所需膜蛋白质(例如CXCR4),由哺乳动物细胞产生脂质粒子。Gag核心蛋白在质膜处自我装配,在所述质膜中,它们萌发,并且捕获靶标膜蛋白质。脂蛋白的直径是约150nm,因此易于混悬于可用于接种的水溶液中。因为脂质粒子内的膜蛋白质直接源于细胞表面而未经受机械破坏或清洁剂,所以膜蛋白质的天然结构和取向得以保留。脂蛋白不含有可导致不集中免疫应答的细胞质蛋白质或倒置膜蛋白质。可使用标准技术来将脂蛋白固定于固体载体上,并且通过表面等离子体共振来分析根据本公开的CXCR4分子或多肽达成的结合(参见例如Maynard JA等(2009) *Biotechnol J* 4(11):1542-1558, Stenlund P等(2003) *Anal Biochem* 316(2):243-50, Hoffman等(2000) *Proc Natl Acad Sci* 97:11215-11220, WO 2005/042695)。

[0436] 此外,可使脂质粒子经受逐个残基突变以确定本公开的CXCR4结合多肽结合CXCR4的哪些残基。这证实代表侧链对结合性CXCR4结合多肽与CXCR4表位之间的相互作用作出最高能量贡献的氨基酸的关键残基(Bogan和Thorn, (1998) *J. Mol. Biol.* 280, 1-9; Lo Conte等, (1999) *J. Mol. Biol.* 285, 2177-2198。在CXCR4二聚体结构(由PDB标识符编号30DU获得; Wu等, (2010) *Science* 330:1066-1071的情况下显现对于i体AM3-114、i体AM4-272和i体AM3-523结合所鉴定的关键残基。

[0437] 另一测定是抗原结合测定,例如如Scopes在*Protein purification: principles and practice*,第3版, Springer Verlag, 1994中所述。这种方法通常涉及标记CXCR4结合分子或多肽,以及使它与经固定靶标或其片段例如人CXCR4或CXCR4阳性脂质粒子接触。在洗涤以移除非特异性结合蛋白质之后,检测标记的量,以及因此,检测结合蛋白质的量。当然,可固定CXCR4结合分子或多肽,并且对靶标进行标记。也可使用淘选型测定。

[0438] 用于测定CXCR4抑制剂活性的示例性方法是竞争性结合测定。举例来说,与CXCR4结合分子或多肽一起或在添加CXCR4结合分子或多肽之后,添加经标记SDF-1至表达CXCR4的细胞或经固定CXCR4阳性脂质粒子中。在洗涤以移除未结合SDF-1和/或CXCR4结合分子或多肽之后,检测结合于CXCR4的标记的量。将这个量与在不存在CXCR4结合分子或多肽下孵育之后结合的量进行比较,并且使SDF-1结合(即结合的标记)的量降低的CXCR4结合分子或多肽被视为CXCR4抑制剂。

[0439] 结合测定也可用于检测受体介导的G蛋白活化(例如*Regulation of G Protein-Coupled Receptor Function and Expression* Benovic JL编第119-132页(2000) Wiley-Liss NY)。所述测定包括受体刺激的GTP与G $\alpha$ 亚单位结合。GPCR的活化导致在G $\alpha$ 亚单位中进行GDP-GTP交换,并且这个交换可被定量并用作受体-G蛋白相互作用的直接测量结果。这通常涉及与处于无细胞的膜制剂或人工脂质膜中的受体一起使用放射性标记的鸟嘌呤核苷酸。并入的放射性标记的量用作G蛋白活化程度的量度。

[0440] 用于测定抗原结合亲和力的方法在本领域中是熟知的,并且也包括半数最大结合测定、竞争测定和斯卡查德分析。

[0441] 亲和测定

[0442] 任选地,确定CXCR4结合多肽的解离速率常数(K<sub>d</sub>)、缔合速率常数(K<sub>a</sub>)或结合常数/平衡解离常数(K<sub>D</sub>,即K<sub>d</sub>解离/K<sub>a</sub>缔合)。CXCR4结合多肽的这些常数可通过放射性标记或荧光标记的CXCR4结合测定来测量。这个测定使CXCR4结合多肽与一定浓度的CXCR4阳性脂质粒子平衡。在洗涤以移除未结合CXCR4之后,测定CXCR4结合多肽的量。根据另一实例,通过使用表面等离子体共振测定,例如使用BIAcore表面等离子体共振(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ),用经固定CXCR4阳性脂质粒子来测量常数(WO 2005/042695)。

[0443] 解离速率常数(K<sub>d</sub>)用于计算解离速率(k<sub>解离</sub>),即用于计算结合分子从它的靶标解离的快速程度的常数。BIAcore SPR分析中所见的较平缓斜率指示解离速率较缓慢,并且因此结合较强烈。较陡峭下降趋势意味着解离速率较快/抗体结合较弱。

[0444] 缔合速率常数(K<sub>a</sub>)是用于计算缔合速率的反应的一部分,所述缔合速率即用于表征结合分子结合它的靶标的快速程度的常数。

[0445] 实验测量的解离速率和缔合速率(K<sub>d</sub>解离/K<sub>a</sub>缔合)的比率用于计算K<sub>D</sub>值。大多数结合分子具有在低微摩尔(10<sup>-6</sup>)至纳摩尔(10<sup>-7</sup>至10<sup>-9</sup>)范围内的K<sub>D</sub>值。高亲和力抗体通常被视为在低纳摩尔范围(10<sup>-9</sup>)内,其中极高亲和力抗体在皮摩尔(10<sup>-12</sup>)范围内。

[0446] 功能性测定

[0447] 配体诸如激动剂或SDF-1与CXCR4结合可导致由这个G蛋白偶联受体和G蛋白的活性达成的信号传导,以及刺激其它细胞内信号传导分子。可在适合测定中在有或无配体下测定本公开的CXCR4结合分子或多肽的抑制活性或刺激活性,以及在存在或不存在配体下评估CXCR4结合分子或多肽使活性抑制或刺激的能力。

[0448] 可以许多方式来度量在本公开的CXCR4结合分子或多肽的情况下的CXCR4受体活性,所述方式例如β-抑制蛋白调节的改变、细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的改变、磷脂酶C的活化、细胞内三磷酸肌醇QP3浓度的改变、细胞内二酰基甘油(DAG)浓度的改变以及细胞内环化3',5'-单磷酸腺苷(cAMP)浓度的改变。

[0449] 可通过本领域中已知的方法或其它适合方法(例如Neote等(1993) Cell 72:415-425; Van Riper等(1993) J. Exp. Med 177:851-856)来测定G蛋白活性,诸如使GTP水解成GDP,或由受体结合触发的稍后信号传导事件,诸如诱导细胞内(胞质)游离钙的浓度快速和短暂增加。

[0450] cAMP测定

[0451] 可通过用荧光染料测量细胞内cAMP的增加或降低来监测在本发明的多肽的情况下GPCR的活化。测量细胞内cAMP的方法在本领域中是已知的。测量细胞cAMP水平的测定依赖于由偶联于Gα<sub>s</sub>或Gα<sub>i/o</sub>蛋白的GPCR调控的腺苷酸环化酶的活性。腺苷酸环化酶需要用毛喉素(forskolin)预先刺激。此外,为抵抗通过磷酸二酯酶(PDE)使cAMP天然降解成AMP,在测定优化期间在系统中可能需要PDE的抑制剂(例如IBMX)。适用膜渗透性染料的实例包括乙酰氧基甲酯形式的染料,其可由细胞内酯酶裂解以形成不再具有膜渗透性并且保持圈闭在细胞内部的游离酸。也可使用被设计以直接测量在由GPCR调节腺苷酸环化酶活性后产生的cAMP的水平测定。所述测定基于内源性cAMP与外源添加的生物素化cAMP之间的竞争。通过使用缀合于固体物质诸如捕获珠粒的特异性抗体来实现对cAMP的捕获。

[0452] 广泛使用放射性测量测定,诸如SPA cAMP测定(GE Healthcare)和来自

PerkinElmer的使用<sup>125</sup>I标记的cAMP的FlashPlate™ cAMP测定。更新近地,这些测定已被基于发光或荧光的均相测定替换以避免使用放射性。另一测定是DiscovRx的酶片段互补测定(HitHunter™)。细胞cAMP与用β-半乳糖苷酶的小肽片段标记的cAMP竞争结合抗cAMP抗体。所得游离经标记cAMP与酶片段互补,从而产生活性β-半乳糖苷酶,用荧光或发光底物对其进行检测。AlphaScreen™(PerkinElmer)是一种基于珠粒的灵敏性邻近化学发光测定。细胞cAMP与由链霉亲和素供体珠粒和抗cAMP抗体缀合的受体珠粒识别的生物素化cAMP探针竞争。生物素化cAMP从抗体释放导致链霉亲和素供体从它的受体解离,此可测量为化学发光信号降低。

[0453] 此外,基于荧光偏振(FP)的cAMP试剂盒可从Perkin-Elmer、Molecular Devices和GE Healthcare获得。此外,基于HTRF的cAMP检测可从Cisbio获得。用这个方法,新型供体(用销穴状化合物标记的cAMP抗体)和受体(用改性别藻蓝蛋白染料标记的cAMP)对被设计以增加信号的稳定性,并且使得这个测定对于cAMP测量高度敏感和可再现。

[0454] 更新近商业测定诸如cAMP-Glo™测定(Promega)可用于调节偶联于Gα蛋白的GPCR,此转而调节腺苷酸环化酶。测定基于cAMP作为四聚非活性cAMP依赖性蛋白质激酶(PKA)的强力活化剂,从而导致它的经cAMP结合的调控亚单位的解离以及游离活性催化亚单位的释放。可通过用基于荧光素酶/虫荧光素的反应测量APT在激酶反应中的使用来监测PKA的活化。消耗的ATP的量反映由cAMP对PKA的活化。

[0455] β-抑制蛋白募集测定

[0456] β-抑制蛋白是在GPCR的活化之后被募集至细胞表面的细胞内蛋白质。它们调控G蛋白偶联受体(GPCR)的活性(Luttrell等(2002)Journal of Cell Science,115:455-465)。在这个情况下,通过本发明的多肽,导致受体脱敏以及靶向用于内化的受体。除它在受体脱敏、终止G蛋白偶联信号传导和内化方面的作用之外,β-抑制蛋白也充当骨架蛋白质来使活化的GPCR关联于额外细胞内信号传导路径,诸如以G蛋白非依赖性方式进行的c-Src、ERK 1/2和Akt活化。若干方法可用于测量β-抑制蛋白募集,包括TransFluor®测定(Molecular Devices),其中使β-抑制蛋白偶联于GFP,并且在受体活化后,GFP的弥漫性细胞质分布变为形成含有GFP的凹陷或囊泡,其用高容量成像系统进行显现。

[0457] 若干非基于成像的β-抑制蛋白募集测定诸如如Xu Y等(1999)Proc Natl Acad Sci 96:151-6中所述的生物发光共振能量转移(BRET)、PathHunter™技术(DiscoveRx)和Tango™测定(Invitrogen)是可用的。在BRET测定中,在C末端用荧光蛋白质标签(诸如eGFP2、GFP10或YFP)使目标受体标记,并且用海肾(Renilla)荧光素酶(RLuc)使β-抑制蛋白标记,或反之亦然。在β-抑制蛋白募集后,两种标签变得紧密邻近,并且从RLuc反应发射的光激发GFP,其接着发射处于较高波长下的可检测信号。BRET被计算为两种发射的比率(GFP/RLuc)。

[0458] Invitrogen的Tango™ GPCR测定系统是一种基于蛋白酶活化的报道基因的平台。使β-抑制蛋白融合于TEV蛋白酶,同时将GPCR在它的C末端用蛋白酶裂解位点延伸,继之以转录因子Gal-VP16。在GPCR活化后,蛋白酶标记的抑制蛋白被募集至受体,并且融合于受体的Gal-VP16被裂解并进入核中以调控β-内酰胺酶报道基因的转录。β-内酰胺酶催化用两种荧光团进行标记的经修饰底物的裂解,并且可监测这两种荧光团之间的FRET信号变化。

[0459] PathHunter™测定(DiscoveRx)利用β-半乳糖苷酶的酶片段互补和随后酶活性来

测量受体- $\beta$ -抑制蛋白相互作用。在这个测定中,使 $\beta$ -抑制蛋白融合于 $\beta$ -半乳糖苷酶的非催化活性N末端缺失突变体,并且在C末端用源于 $\beta$ -半乳糖苷酶的所缺失N末端序列的小(4kDa)片段(ProLink<sup>TM</sup>)使GPCR标记。在GPCR- $\beta$ -抑制蛋白相互作用后, $\beta$ -半乳糖苷酶的两个部分被致使邻近,此导致酶活化,裂解底物,以及产生化学发光信号。

#### [0460] 钙测定

[0461] 可通过用荧光染料测量细胞内钙的增加或降低来监测在本发明的多肽的情况下GPCR的活化。由于可利用细胞渗透性Ca<sup>2+</sup>灵敏性荧光染料(诸如Fluo-3和Fluo-4)和自动实时荧光板读取器诸如FLIPR<sup>TM</sup>(Molecular Device),所以Ca<sup>2+</sup>测定在GPCR筛选方面极其普及。Molecular Device也提供荧光染料试剂盒,其含有允许染料荷载于细胞而无需随后进行细胞洗涤以移除过量染料的专有淬灭分子。FLIPR<sup>TM</sup>的集成吸移能力允许以384或1536孔形式进行超高通量筛选,能够全都在一个测定中检测激动剂、拮抗剂和调节剂。荧光染料的使用也可用Ca<sup>2+</sup>灵敏性生物传感器的使用替换。也已开发水母发光蛋白水母素(aequorin)的重组表达来对GPCR进行功能性筛选(EglenRM等(2008) Assay Drug Dev Technol 6:659-71),在腔肠素(coelenterazine)衍生物存在下,所述水母素应答于细胞内Ca<sup>2+</sup>升高而提供强烈发光信号。

[0462] 额外商业测定包括Fluo-4/Fluor-8钙动员测定(Invitrogen)和Tango<sup>TM</sup> GPCR测定(Life Technologies)。

#### [0463] 趋化性测定

[0464] 趋化性测定也可用于评估本发明的CXCR4结合多肽阻断配体结合CXCR4和/或抑制与配体结合受体相关的功能的能力(Fernandis等(2004) Oncogene 23:157-167)。这些测定基于由化合物(化学引诱剂)诱导的体外或体内功能性细胞迁移。可通过任何适合手段来评估趋化性,例如以利用96孔趋化性板的测定,或本领域认可的其它趋化性评估方法。在一个实例中,可利用趋化性测定来评估Jurkat细胞、MDA-MB-231、MDA-MB-468、PC3或NCI-H69细胞的迁移。举例来说,使Jurkat细胞( $5 \times 10^5$ 个细胞于200ml RPMI-1640中)与以及不与本发明的多肽和SDF-1一起预孵育,并且添加至具有0.25% BSA的6.5mm直径、5mm孔聚碳酸酯Transwell培养插件(Costar, Cambridge, MA)的顶部孔中。将SDF-1(固定浓度)添加于下部孔中,并且在37°C下孵育细胞4小时以达成迁移。用ZM Coulter计数器(Coulter Diagnostics, Hialeah, FL)对下部腔室中的迁移细胞计数。

#### [0465] 增殖测定

[0466] 可评估本公开的CXCR4结合多肽抑制肿瘤细胞(例如表达表面CXCR4的肿瘤细胞诸如MDA-MB-231、MDA-MB-361、MDA-MB-549、Ramos、Namalwa、MOLT-4、DU-4475、DU-145、PC3、LNcaP、SW480、HT29、NCI-H69和HL60)的细胞增殖或在已被工程改造来表达CXCR4的细胞系中的细胞增殖的能力。也可评估本公开的CXCR4结合多肽抑制CD34<sup>+</sup>祖细胞的细胞增殖的能力(例如Kahn等Overexpression of CXCR4 on human CD34<sup>+</sup> progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation ((2004) Blood. 103:2942-2949)。细胞增殖测定将为本领域技术人员所知。细胞增殖测定的实例包括MTT细胞增殖测定(ATCC)、CellTiter水性细胞增殖测定(Promega)、AlamarBlue测定(Invitrogen)、CyQUANT直接细胞增殖测定(Life Technologies),描述于例如W001/081614和US5972639中。

#### [0467] 凋亡测定

[0468] 可评估本公开的CXCR4结合分子或多肽诱导凋亡的能力。可以将为本领域技术人员所知的多种形式获得凋亡测定。这些形式包括：

[0469] (i) 半胱天冬酶测定,例如**PhiPhiLux**<sup>®</sup> (OncoImmunin, Inc)、半胱天冬酶3活性测定 (Roche Applied Science)、半胱天冬酶-Glo<sup>™</sup>测定 (Promega)、CaspACE<sup>™</sup>测定系统 (Promega)、**EnzChek**<sup>®</sup>半胱天冬酶-3测定试剂盒 (Invitrogen)、活性半胱天冬酶-3检测试剂盒 (Stratagene)、半胱天冬酶介导的凋亡产品 (BioVision)、CasPASE<sup>™</sup>凋亡测定试剂盒 (Genentech)；

[0470] (ii) Tunnel和DNA片段化测定,例如凋亡DNA梯型试剂盒 (Roche Applied Science)、细胞DNA片段化ELISA (Roche Applied Science)、DeadEnd<sup>™</sup> TUNEL系统 (Promega)、APO-BrdU<sup>™</sup> TUNEL测定试剂盒 (Invitrogen)、TUNEL凋亡检测试剂盒 (Upstate)、凋亡Mebstain试剂盒 (Bechman Coulter)、核介导的凋亡试剂盒 (BioVision)、凋亡DNA阶梯试剂盒 (Genentech)；

[0471] (iii) 细胞渗透性测定,例如APOPercentage<sup>™</sup>测定 (Biocolor Assays)；

[0472] (iv) 膜联蛋白V测定,例如膜联蛋白V, Alexa **Fluor**<sup>®</sup> (Invitrogen)；若丹明110, 双-(L-天冬氨酸酰胺), 三氟乙酸盐 (Invitrogen)；膜联蛋白V凋亡试剂盒 (BioVision)；

[0473] (v) 蛋白质裂解测定,例如抗聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (Roche Applied Science)、M30CytoDEATH (Roche Applied Science)；

[0474] (vi) 线粒体和ATP/ADP测定,例如**ApoGlow**<sup>®</sup>快速凋亡筛选试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒 (Stratagene) 和线粒体介导的凋亡产品 (BioVision)；和

[0475] (vii) 如本文公开的实例中所述的膜联蛋白V和碘化丙啶的组合。

[0476] 血管生成测定

[0477] 血管生成的特征在于具有许多细胞事件,包括内皮细胞迁移、侵袭和分化成毛细血管。体外内皮管形成测定用作一种用于研究内皮分化和由抗血管生成剂对内皮管形成的调节的模型 (参见例如Sharon McGonigle和Victor Shifrin *Current Protocols in Pharmacology* DOI:10.1002/0471141755.ph1212s43或Liang等, (2007) *Biochem Biophys Res Commun.* August 3;359 (3):716-722.)。通常,使用人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)、HMVEC和HMEC-1细胞进行内皮管形成测定。将细胞以每毫升M199培养基 (具有1%FBS和200ng/ml CXCL12)  $1 \times 10^5$ 个细胞的密度涂铺于基质胶层上。在18小时之后,在4倍放大倍数下将各孔拍照,并且对它们的管状网络结构的数目计数。

[0478] 受体二聚化测定

[0479] CXCR4与CXCR7、CCR5、 $\beta_2$ AR ( $\beta_2$ 肾上腺素能受体)、CCR2、DOR ( $\delta$ 类鸦片受体) 和CCR7在质膜处相互作用以形成异二聚体、寡聚体或甚至包括CXCR4同二聚体的更高级复合物。特异性靶向GPCR异二聚体或影响受体二聚化的化合物可具有实现特定治疗作用的潜力 (Rozenfeld R等 (2011) *Biochem J* 433:11-8)。已建立各种技术来监测受体二聚化,包括共振能量转移方法 (FRET或BRET)。

[0480] 在通常使用的基于FRET或BRET的方法中,使供体分子和接受体分子遗传融合于在细胞中过表达的GPCR的C末端。当供体分子和接受体分子由于GPCR二聚化而被致使紧密邻近时,发生共振能量转移 (综述于Achour L等 (2011) *Methods Mol Biol* 756:183-200中)。

然而,所述传统FRET和BRET测定的一个限制是在过表达系统中,共振能量转移也可发生在细胞内区室内以致难以证明特定信号仅由在细胞表面处蛋白质的直接相互作用产生。

[0481] 如题为‘检测系统及其用途 (Detection System and Uses Therefor)’的美国专利8,283,127中所述的GPCR二聚化测定涵盖Dimerix的异聚体鉴定技术 (HIT) 测定配置,其用于配体依赖性鉴定、监测和筛选任何两种蛋白质的异聚体。它也涵盖在所有基于邻近性的报道子系统应用Dimerix的测定。

[0482] 用Tag-lite™进行的GPCR二聚化测定是一种使TR-FRET与SNAP-tag™技术 (Cisbio) 组合,从而使得能够以96或384孔形式定量分析在活细胞的表面处的蛋白质-蛋白质相互作用的方法。在这个测定中,在N末端用SNAP标签或CLIP标签使GPCR标记,其可随后用所述标签的携带适当TR-FRET可相容荧光团的相应细胞不渗透性底物标记,通常使用钷穴状化合物作为供体,以及绿色或红色荧光分子作为受体。在这个测定中存在若干可能二聚体组合:1/4的二聚体含有被供体标记的两个受体,1/4的二聚体含有被受体标记的两个受体,并且1/2的二聚体含有被供体标记的一个受体和被受体标记的一个受体。仅最后那部分将发射FRET信号。

[0483] PathHunter™系统 (DiscoverX) 是可用于GPCR异二聚化分析的另一平台。用于先前描述的PathHunter™β-抑制蛋白募集测定中的细胞系可用作起始物质。在这些细胞系中,使β-抑制蛋白融合于β-半乳糖苷酶受体的较大部分,并且使较小42氨基酸ProLink™标签连接于一种GPCR靶标。可将第二未标记的GPCR引入细胞中,并且可使用PathHunter检测试剂,通过β-抑制蛋白向标记的GPCR的募集来测量未标记的GPCR对ProLink™标记的GPCR的转活化作用。可将转活化强度估计为对未标记的GPCR的激动剂的细胞应答与对ProLink™-GPCR的激动剂的应答之间的比率。测定可用于探究各对GPCR之间的相互作用,以及以384孔形式筛选通过增强或破坏GPCR异二聚化来调节GPCP活性的化合物,所述各对GPCR例如CXCR4和CXCR7、CXCR4和CCR5、或CXCR4和β<sub>2</sub>AR、或CXCR4和DOR、或CXCR4和CCR2、或CXCR4和CCR7。

[0484] 竞争性测定

[0485] 竞争研究可用于测定包括配体SDF-1或多肽 (i体) 的CXCR4结合分子竞争结合CXCR4的能力。通常,在恒定浓度的SDF-1或经FITC标记的人抗CXCR4抗体 (例如12G5) 存在下,将CXCR4i体滴定成一系列1:3连续稀释液,从而产生一定浓度范围,例如从100nm至5pM。接着添加混合物至CXCR4表达性细胞中,并且使其结合。可通过荧光细胞计量术以及检测FITC来评估各i体与12G5竞争结合CXCR4表达性细胞的能力。

[0486] 也可如W0 2005/042695中所述,利用含有CXCR4的脂蛋白 (IntegraMolecular) 进行竞争研究。

[0487] 也可通过进行FACS滴定,用流式细胞计量术来考查本公开的i体结合多种不同细胞系的能力。可使递增量的i体与100,000个细胞一起孵育,并且通过流式细胞计量术来评估结合。也可确定B<sub>max</sub>值,其指示大约多少个CXCR4分子存在于各细胞上。基于结合曲线,可确定i体结合的EC<sub>50</sub>。适合细胞系的实例包括Ramos、Raji、Namalwa、L540、DMS79、MDA-MB-231、MDA-MB-361、MDA-MB-549、MOLT-4、DU-4475、DU-145、PC3、LNcaP、SW480、HT29、NCI-H69和HL60。

[0488] 也可考查本公开的i体结合人外周血液单核细胞 (PBMC) 的不同子组的能力。可通

过标准方法来分离人PBMC,并且通过FACS来进一步分离细胞子组。细胞子组的实例包括以下中的一者或多者:CD3<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>和CD14<sup>+</sup>。如本文实例中所示,可通过流式细胞计量术,相较于适合对照来评估结合。

[0489] 可使用碘-125标记的SDF-1和天然表达CXCR4的细胞系或CXCR4脂质粒子进行竞争测定。可通过标准放射性标记配体结合测定来关于阻断SDF-1结合CXCR4表达性细胞系对i体进行比较。可按1:3连续稀释i体以产生一定浓度范围,接着在比放射性是2000Ci/mmol的<sup>125</sup>I-SDF-1 (Amersham,目录号EM314-25UCI)存在下添加至CXCR4表达性细胞中。可通过在不存在i体下在40℃下使<sup>125</sup>I-SDF-1结合CXCR4表达性细胞2小时来测定可能结合的总放射性标记配体。可通过在1μM未标记SDF-1 (Peprotech,目录号300-28A)存在下使<sup>125</sup>I-SDF-1进行结合来测定放射性标记配体的非特异性结合。接着通过标准方法来测定细胞结合的<sup>125</sup>I-SDF-1的量。

[0490] 或者,未标记的SDF-1可用于与i体竞争结合过表达CXCR4的脂质粒子。可使用针对His标签或FLAG标签的抗体来检测i体与这些脂质粒子的结合。将添加递增浓度的SDF-1,并且将测量保持结合的i体的量。这可以ELISA形式进行,其中将CXCR4脂质粒子固定在塑料上。这个信息将确定i体在CXCR4上的结合位点是否与配体SDF-1相同或接近或不同。

#### [0491] 蛋白质检测测定

[0492] 本公开的一个实例检测CXCR4或表达其的细胞或在膜内含有CXCR4的脂质粒子的存在。使用为熟练技术人员所知的多种技术中的任一种来测定蛋白质或细胞的量、水平或存在,诸如像选自以下组成的组的技术:流式细胞计量术、免疫组织化学分析、免疫荧光、免疫印迹、蛋白质印迹、斑点印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定、荧光共振能量转移(FRET)、基质辅助激光解吸/离子化飞行时间(MALDI-TOF)、电喷雾离子化(ESI)、质谱测定法(包括串联质谱测定法,例如LC MS/MS)、生物传感器技术、消逝光纤技术或蛋白质芯片技术。

[0493] 在一个实例中,用于测定蛋白质的量或水平的测定是半定量测定。

[0494] 在另一实例中,用于测定蛋白质的量或水平的测定是定量测定。

[0495] 举例来说,用免疫测定检测蛋白质,例如使用选自以下组成的组的测定:免疫组织化学、免疫荧光、酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光联免疫吸附测定(FLISA)、蛋白质印迹、放射免疫测定(RIA)、生物传感器测定、蛋白质芯片测定和免疫染色测定(例如免疫荧光)。

[0496] 标准固相ELISA或FLISA形式特别适用于测定来自多种样品的蛋白质的浓度。

[0497] 在一种形式中,ELISA或FLISA包括将CXCR4脂质粒子固定在固体基质诸如像膜、聚苯乙烯或聚碳酸酯微孔、聚苯乙烯或聚碳酸酯量杆或玻璃载体上。接着致使包括本公开的CXCR4结合分子或多肽的样品与经固定CXCR4蛋白产生实体关系,接着结合或‘捕获’。接着使用结合位于CXCR4结合分子或多肽的末端的标签序列的第二经标记化合物检测结合的CXCR4结合分子或多肽。

[0498] 将为熟练人士显而易见的是本文所述的测定形式可顺从高通量形式,诸如像自动化筛选过程或微阵列形式。此外,上述测定的变化形式将为本领域技术人员显而易见,诸如像竞争性ELISA。

[0499] 在一替代性实例中,使用本领域中已知的方法诸如像免疫组织化学分析或免疫荧光来检测细胞内或细胞上的多肽。使用免疫荧光的方法具有示范性,因为它们是定量的或

至少半定量的。定量经染色细胞的荧光程度的方法在本领域中是已知的。

[0500] 含有CXCR4的脂质粒子可用于评估本公开的CXCR4结合分子或多肽与CXCR4的结合。包埋在脂质粒子中的CXCR4蛋白可用于其中不能使用可溶性蛋白质或全细胞的测定中，诸如其中目标蛋白质(例如CXCR4)必须结合于载体或基底的测定，例如使用微流体装置的测定例如生物传感器测定。在一些实例中，使脂蛋白连接于表面并接着与本公开的CXCR4结合分子或多肽接触，并且生物传感器检测本发明的CXCR4多肽与脂质粒子的结合。检测可通过表面等离子体共振、比色衍射光栅、微悬臂的偏转(Weeks BL等(2003) Scanning 25(6): 297-9)或声波响应(Coper MA等(2001) Nature Biotechnology 19,833-837)来达成。在一些实例中，使CXCR4结合分子或多肽连接于传感器的一部分的表面，并且接着使这个表面与脂质粒子接触并检测结合。检测可通过表面等离子体共振、比色衍射光栅、微悬臂的偏转或声波响应来达成。在一些实例中，使CXCR4结合分子或多肽和脂质粒子在溶液中接触。

[0501] 生物传感器装置被设计以测量生物分子之间的相互作用。生物传感器装置通常采用电极表面与电流或阻抗测量元件组合，所述元件将与测定基底(诸如US5567301中所述的测定基底)组合集成至装置中。通常，生物传感器测量目标蛋白质与可能结合它的潜在配体之间的直接相互作用。生物传感器通常具有高度灵敏性，并且可应对和检测甚至极其微弱或极少量相互作用。已构建由光学芯片、光纤、波谱仪检测器、微通道芯片、纳米孔和微悬臂、以及声波装置组成的生物传感器装置。本领域中已知的一些形式的生物传感器也依赖于表面等离子体共振来检测蛋白质相互作用，借此表面等离子体共振反射表面的变化指示蛋白质结合配体或抗体(US5485277和US5492840)。

[0502] 在一个实例中，使脂质粒子连接于传感器表面，其中“传感器表面”是以下任何基底：其中检测所述基底的由使所述表面与分子或多肽接触介导的性质变化，并且可与在不存在所述接触下的表面进行比较。然而，在其它实例中，脂质粒子已连接于传感器表面。尽管传感器表面可为生物传感器芯片，但传感器表面也包括本领域中已知的任何生物传感器芯片，例如Biacore C1芯片、F1芯片、包含例如金的涂层的玻璃基底。

[0503] 由于易于使所述系统适合于微米或纳米规模，所以生物传感器特别用于高通量分析中。此外，所述系统方便地适合于并入若干检测试剂，从而允许在单一生物传感器装置中达成诊断试剂的多路化。这容许同时检测少量体液中的若干蛋白质或肽。

[0504] 本公开也涵盖以下任何测定：其中目标蛋白质是膜组分(例如CXCR4)，以及其中对蛋白质与结合分子或多肽的结合的研究要求呈现处于脂质双层的情形下的蛋白质和/或使蛋白质连接于载体或固体基底，或所述研究由此而得以促进。所述测定包括使用以下各物的测定：微流体装置、光学生物传感器、PATIR-FTIR光谱法(这是一种使用全内反射傅里叶(Fourier)转换红外光谱法的生物传感器类型)(19998, Chem. Phys. Lipids 96:69-80)、CPRW生物传感器(耦合等离子体-波长共振(CPWR)光谱法，如Salamon等(1997) Biophys J 73:2791-2197中所述)、如Signature biosceinces所述的多极耦合波谱法(MCS)、如Walt等(200) Science 287:451-52以及Dickinson等(1996) Nature 382:697-700中所述的光纤生物传感器(Illumina)、如Sundberg等Current Opin in Biotech 11:47-53中所述的芯片实验室(lab-on-a-chip)微流体技术、微通道(蚀刻至基于压缩光盘的装置中的Gyros微通道)、如Tamayo等(2001) Ultramicroscopy 86:167-173中所述的微悬臂、如WO 01/02551中所述的共焦显微术和纳米孔检测、以及微孔结合测定。在一个实例中，传感器表面包括96

孔、384孔、1536孔、纳米孔、光纤或载片形式。

#### [0505] 成像方法

[0506] 如将为熟练技术人员根据前述事项显而易见,本公开也涵盖使用本公开的CXCR4结合分子或多肽进行的成像方法。对于成像,通常使CXCR4结合分子或多肽缀合于可检测标记,其可为可发射可通过成像来检测的信号的任何分子或药剂。然而,也可使用特异性结合本公开的CXCR4结合分子或多肽的二级经标记化合物。示例性可检测标记包括蛋白质、放射性同位素、荧光团、可见光发射荧光团、红外光发射荧光团、金属、铁磁性物质、电磁发射物质、具有特定磁共振(MR)波谱特征的物质、X射线吸收或反射物质或改变声响的物质。

[0507] 可在成像程序之前,全身性施用或向待成像的器官或组织(或在癌症的情况下,向肿瘤)局部施用本公开的CXCR4结合分子或多肽(以及如果使用经标记二级化合物,那么也是如此)。通常,以有效获得肿瘤、组织或器官的所需光学图像的剂量施用CXCR4结合分子或多肽。视所用特定CXCR4结合分子或多肽、待成像的状况、经受成像程序的组织或器官、所用成像设备等而定,所述剂量可广泛变化。

[0508] 在本公开的一些实例中,CXCR4结合分子或多肽在各种生物医学应用中用作组织和器官的体内光学成像剂,所述应用包括但不限于肿瘤成像、器官断层摄影成像、器官功能监测、冠脉血管造影术、荧光内窥镜检查、激光引导的手术、光声方法和声致荧光方法等。

[0509] 成像方法的实例包括磁共振成像(MRI)、MR波谱法、放射线摄影术、计算机断层摄影术(CT)、超声、平面 $\gamma$ 照相机成像、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、正电子发射断层摄影术(PET)、其它基于核医学的成像、使用可见光的光学成像、使用荧光素酶的光学成像、使用荧光团的光学成像、其它光学成像、使用近红外光的成像或使用红外光的成像。

[0510] 在一些实例中,在用于人中之前,使用体外或体内测定,例如使用本文所述的模型来测试成像剂。

#### [0511] 样品

[0512] 就本公开的方法在体外对经分离组织样品进行,并非作为基于体内的筛选进行而言,提及“样品”应被理解为提及源于受试者的生物物质的任何样品,诸如但不限于体液(例如血液或滑液或脑脊髓液)、细胞物质(例如组织抽吸物)、组织活检样本或手术样本。

[0513] 根据本公开的方法使用的样品可直接使用,或可需要在使用之前进行某一形式的处理。举例来说,活检或手术样品可需要在使用之前进行均质化或其它形式的细胞分散。此外,就生物样品不呈液体形式(如果所述形式被需要或合乎需要)而言,可需要添加诸如缓冲液的试剂以赋予样品可动性。

[0514] 如将根据先前描述而显而易见,这种测定可需要使用适于例如定量的对照,例如正常或健康个体或典型群体。

[0515] “健康受试者”是尚未被诊断为罹患例如CXCR4相关疾病或病症的病状和/或不处于发展疾病或病症的风险下的受试者。

[0516] 或者,或此外,适合对照样品是包含对于已知未罹患病状的典型受试者群体测定的标志物的测量结果的对照数据集。

[0517] 在一个实例中,在测定中不包括参照样品。作为替代,由先前从典型群体产生的创建数据集获得适合参照样品。接着将由处理、分析和/或测定测试样品获得的数据与对于抽样群体获得的数据进行比较。

[0518] 药物组合物

[0519] 本公开的CXCR4结合分子或多肽(同义词活性成分)适用于配制成药物组合物以用于胃肠外、局部、口服或局部施用、气雾剂施用、或经皮施用,用于防治性治疗,或用于治疗性治疗。视施用方法而定,药物组合物可以多种单位剂型施用。举例来说,适于口服施用的单位剂型包括粉剂、片剂、丸剂、胶囊和锭剂。

[0520] 本公开的药物组合物适用于胃肠外施用,诸如静脉内施用或皮下施用,或向体腔或器官或关节的管腔中施用。用于施用的组合物将通常包括溶解于药学上可接受的载体诸如水性载体中的本公开CXCR4结合分子或多肽的溶液。可使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。组合物可含有如为接近生理条件所需的药学上可接受的载体,诸如pH调整剂和缓冲剂、毒性调整剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。本公开的结合分子或多肽在这些制剂中的浓度可广泛变化,并且将根据所选特定施用模式和患者的需要,基于流体体积、粘度、体重等来选择。示例性载体包括水、盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可使用非水性媒介物,诸如混合油和油酸乙酯。脂质体也可用作载体。媒介物可含有少量的增强等张性和化学稳定性的添加剂,诸如缓冲剂和防腐剂。

[0521] 本公开的CXCR4结合分子或多肽可被配制以用于胃肠外施用,例如被配制以用于通过静脉内、肌肉内、皮下、经皮途径或其它所述途径来注射,包括蠕动施用和向肿瘤或疾病部位中直接滴注(腔内施用)。含有本公开化合物作为活性成分的水性组合物的制备将为本领域技术人员所知。

[0522] 本公开的适合药物组合物将通常包括一定量的本公开的CXCR4结合分子或多肽与可接受的药物载体诸如无菌水溶液混合以产生视预定用途而定的一定范围的最终浓度。制备技术通常在本领域中是已知的,如由Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版Mack Publishing Company,1980所例示。

[0523] 在配制后,本公开化合物将以可与剂量配制相容的方式,并且以诸如治疗/防治有效的量施用。本公开化合物的适合剂量将视特定化合物、待治疗的病状和/或所治疗的受试者而变化。在熟练医师的能力范围内的是确定适合剂量,例如通过以次优剂量开始,以及以递增方式改进剂量以确定最优或适用剂量。

[0524] 示例性施用剂量和时机将为熟练技术人员基于本文公开内容而显而易见。

[0525] 本公开的组合物可与其它治疗部分或成像部分/诊断部分组合。举例来说,本公开的药物组合物可包含选自由以下组成的组的额外活性剂:双膦酸盐、活性维生素D3、降血钙素(calcitonin)及其衍生物、激素制剂诸如雌二醇、SERM(选择性雌激素受体调节剂)、依普黄酮(ipriflavone)、维生素K2(四烯甲萘醌(menatetrenone))、钙制剂、PTH(甲状旁腺激素)制剂、非类固醇消炎剂、可溶性TNF受体制剂、抗TNF- $\alpha$ 结合分子、抗体或抗体的功能性片段、抗PTHrP(甲状旁腺激素相关蛋白)结合分子、抗体或抗体的功能性片段、IL-1受体拮抗剂、抗IL-6受体结合分子、抗体或抗体的功能性片段、抗VEGF-A结合分子或抗体、抗CD20结合分子或抗体、抗PDL-1或抗PD1结合分子或抗体、抗CCL2结合分子或抗体、抗CCR2结合分子或抗体、抗RANK-L结合分子或抗体或抗体的功能性片段。

[0526] 本公开的药物组合物也可包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、

亚硫酸钠等；(2) 油溶性抗氧化剂，诸如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚 (BHA)、丁基化羟基甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等；和 (3) 金属螯合剂，诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0527] 本公开的药物组合物也可以组合疗法施用，即与其它药剂组合。举例来说，组合疗法可包括本公开的CXCR4结合分子或多肽与至少一种其它抗癌剂、消炎剂或免疫抑制剂组合。

[0528] 抗癌剂或化学治疗剂的实例可包括米托蒽醌 (Mitoxantrone)、依托泊苷 (etoposide)、阿扎胞苷 (Azacitidine)、来那度胺 (Lenalidomide)、替莫唑胺 (Temozolomide)、地西他滨 (Decitabine)、Ganetespib、氯法拉滨 (Clofarabine)、阿糖胞苷 (Cytarabine)、柔红霉素 (Daunorubicin)、长春瑞滨 (vinorelbine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、索拉非尼 (sorafenib)、利妥昔单抗 (rituximab)、贝伐单抗 (bevacizumab) 或硼替佐米 (bortezomib)。

[0529] 这些组合物也可含有佐剂，诸如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。防止存在微生物可通过以下两种方式来确保：灭菌程序以及包括各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等。也可合乎需要的是将等张剂诸如糖、氯化钠等包括至组合物中。此外，延长可注射药物形式的吸收可通过包括延迟吸收的药剂诸如单硬脂酸铝和明胶来达成。

[0530] 可与药学上可接受的载体组合以产生单一剂型的活性成分的量将视所治疗受试者和特定施用模式而变化。可与载体物质组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是组合物的产生治疗作用的那个量。通常，出自100%，这个量将在约0.01%至约99%的活性成分 (即CXCR4结合多肽)，在一个实例中约0.1%至约70%，在一个实例中约1%至约30%的活性成分的范围，所述活性成分与药学上可接受的载体组合。调整剂量方案以提供最优所需响应 (例如治疗响应)。举例来说，可施用单次推注，可随时间施用若干分次剂量，或可如由治疗情况的紧急性所指示，按比例降低或增加剂量。尤其有利的是以剂量单位形式配制胃肠外组合物以易于施用和达成剂量均一性。如本文所用的“剂量单位形式”是指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理离散单元。各单元含有被计算来产生所需治疗作用的预定量的活性化合物以及所需药物载体。本公开的剂量单位形式的规格由以下支配并且直接取决于以下：(a) 活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗作用，和 (b) 混配这种活性化合物以治疗个体敏感性的领域中固有的限制。对于施用CXCR4结合分子或多肽，剂量在每kg宿主体重约0.0001至100mg，并且更通常是0.01至5mg的范围内。举例来说，剂量可为每kg体重0.3mg，每kg体重1mg，每kg体重3mg，每kg体重5mg，或每kg体重10mg，或在1-10mg/kg的范围内。示例性治疗方案需要每天一次，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3个月一次或每3至6个月一次进行施用。用于本公开的CXCR4结合分子或多肽的优选剂量方案包括通过静脉内施用，每kg体重1mg或每kg体重3mg，其中使用一种以下给药时程给予抗体：(i) 每4周，持续6次剂量，接着每3个月；(ii) 每3周；(iii) 每kg体重3mg，1次，继之以每3周，每kg体重1mg。

[0531] 可改变本公开的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平以便获得活性成分的有效实现就特定患者、组合物和施用模式来说的所需治疗响应而对受试者无毒的量。所选剂量水平将取决于多种药物动力学因素，包括所用本公开的特定组合物或其酯、盐或酰胺

的活性;施用途径;施用时间;所用特定化合物的排泄速率;治疗的持续时间;与所用特定组合物组合使用的其它药物、化合物和/或物质;所治疗患者的年龄、性别、重量、状况、总体健康状况和先前医学史;以及医学领域中熟知的类似因素。本公开的CXCR4结合分子或多肽的“治疗有效剂量”优选导致疾病症状的严重性减轻,无疾病症状时期的频率和持续时间增加,或归因于疾病折磨的损害或失能得以预防。举例来说,对于治疗CXCR4<sup>+</sup>肿瘤,相对于未治疗受试者,“治疗有效剂量”优选使细胞生长或肿瘤生长抑制至少约20%、至少约40%、至少约60%或至少约80%。可在预测在人肿瘤的功绩的动物模型系统中评估化合物抑制肿瘤生长的能力。或者,可通过考查化合物抑制细胞生长的能力来评估组合物的这个性质,所述抑制作用可通过为熟练从业者所知的测定来在体外测量。治疗有效量的治疗性化合物可降低肿瘤尺寸,或另外改善受试者的症状。本领域普通技术人员将能够基于诸如受试者的身材、受试者的症状的严重性、以及所选特定组合物或施用途径的因素来确定所述量。

[0532] 可用本领域中已知的医学装置施用治疗性组合物。举例来说,可用无针皮下注射装置施用本公开的治疗性组合物,所述装置诸如美国专利号5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556中公开的装置。适用于本公开中的熟知植入物和模块的实例包括:美国专利号4,487,603,其公开一种用于在控制速率下分配药物的可植入微输注泵;美国专利号4,486,194,其公开一种用于穿过皮肤来施用药剂的治疗装置;美国专利号4,447,233,其公开一种用于在精确输注速率下递送药物的药物输注泵;美国专利号4,447,224,其公开一种用于连续药物递送的变流可植入输注装置;美国专利号4,439,196,其公开一种具有多室隔间的渗透药物递送系统;以及美国专利号4,475,196,其公开一种渗透药物递送系统。许多其它所述植入物、递送系统和模块为本领域技术人员所知。

[0533] 在一个实例中,将组合物配制成不含热原以使它们能够向人患者施用。

[0534] 本公开也涵盖本公开的任何CXCR4结合多肽/i体组合物制备用于治疗本公开的病症的药剂的用途。可将药剂包装在具有适当标签的适合药物包装中可以根据标签上的指示向医院和诊所销售。

#### [0535] CXCR4结合多肽的用途

[0536] 本公开的CXCR4结合分子或多肽具有涉及诊断和治疗CXCR4相关疾病和病症的众多体外和体内诊断和治疗效用。举例来说,这些分子可在体外或离体向培养的细胞施用,或例如在体内向人受试者施用以治疗、预防和诊断多种病症。优选受试者包括患有由CXCR4活性介导或调节或涉及CXCR4/SDF-1路径的病症的人受试者。当连同另一药剂一起施用CXCR4结合多肽时,两者可以任一顺序或同时施用。鉴于本公开的CXCR4结合分子或多肽对CXCR4具有特异性结合性,它们可用于特异性检测细胞的表面上的CXCR4表达,并且此外,可用于通过免疫亲和纯化来纯化CXCR4阳性细胞。

[0537] 靶标特异性效应细胞例如连接于本公开的组合物的效应细胞也可用作治疗剂。用于靶向的效应细胞可为人白细胞诸如巨噬细胞、嗜中性白细胞或单核细胞。其它细胞包括嗜酸性粒细胞、天然杀伤细胞以及其它IgG或IgA受体携带细胞。必要时,可从待治疗的受试者获得效应细胞。可以细胞于生理上可接受的溶液中的混悬液形式施用靶标特异性效应细胞。施用的细胞的数目将视治疗目的而变化。一般来说,数量将足以获得在靶标细胞例如表达CXCR4的肿瘤细胞处定位,以及通过例如吞噬作用来实现细胞杀灭。

[0538] 可与用于移除所靶向细胞的其它技术联合用靶标特异性效应细胞进行疗法。举例

来说,使用本公开的组合物和/或装备有这些组合物的效应细胞的抗肿瘤疗法可与化学疗法联合使用。另外,组合免疫疗法可用于将两个不同细胞毒性效应群体引向肿瘤细胞排斥。举例来说,连接于Fc- $\gamma$ 受体抗体或CD3抗体的CXCR4结合多肽可与IgG或IgA受体特异性结合剂联合使用。本公开的双特异性和多特异性分子也可用于调节效应细胞上的Fc $\gamma$ R或Fc $\gamma$ R水平,诸如通过对细胞表面上的受体加帽和消除。

[0539] 作为HIV进入T细胞中的共受体,已知CXCR4涉及于HIV感染中。另外,已显示CXCR4/SDF-1路径涉及于炎症性病状中。更进一步,已显示CXCR4/SDF-1路径涉及于血管生成或新血管化中。因此,本公开的CXCR4结合多肽可用于在如下详述的许多临床情况下调节CXCR4活性。

[0540] 本公开也提供用于诊断或检测如本文所述的CXCR4相关疾病或病症的方法。可采用任何适于检测和分析CXCR4的方法。如本文所用,术语“样品”是指来自人、动物的样品,或研究样品,例如细胞、组织、器官、流体、气体、气溶胶、浆液、胶体或凝聚物质。样品也包括但不限于细胞的蛋白质或膜提取物;生物流体,诸如痰、血液、血清、血浆或尿;或采用本文所述的抗体的生物样品,诸如福尔马林固定组织切片或冷冻组织切片。术语“样品”也可指从人或动物新鲜获取的细胞、组织、器官或流体,或经处理或储存的细胞、组织、器官或流体。可在体内,例如在不从人或动物进行移除的情况下测试样品,或它可在体外进行测试。可在例如通过组织学方法来处理之后测试样品。

[0541] 可使用本领域中已知的各种诊断测定技术,诸如竞争性结合测定、直接或间接夹心式测定和免疫沉淀测定,在非均相或均相中进行(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) 第147-158页)。可用可检测部分标记诊断测定中使用的抗体。可检测部分直接或间接产生可检测信号。举例来说,可检测部分可为本文所述的那些可检测部分中的任一者,所述可检测部分诸如像放射性同位素,诸如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S或<sup>125</sup>I;荧光或化学发光化合物,诸如异硫氰酸荧光素(FITC)、德克萨斯红、花青昔(cyanin)、photocyan、若丹明或虫荧光素;或酶,诸如碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。可采用本领域中已知的用于使抗体缀合于可检测部分的任何方法,包括由Hunter等, Nature, 144:945 (1962); David等, Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain等, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); 以及Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982) 所述的那些方法。

[0542] 本文提供一种诊断与CXCR4相关的病状的方法,其包括评估受试者的样品中CXCR4和/或SDF-1的水平,其中相较于参照样品,所述样品中CXCR4和/或SDF-1的水平有变化指示肿瘤或转移或纤维化的存在或增加。在一个方面,与CXCR4或SDF-1相关的病状是肿瘤、转移、血管生成或纤维化。相较于参照样品,样品中CXCR4和/或SDF-1水平增加可指示存在肿瘤或转移,或肿瘤或转移性生长或纤维化增加。参照样品可为在较早时间点取自受试者的样品或来自另一个体的样品。样品中的CXCR4水平和/或SDF-1水平可通过使样品与本文所述的CXCR4结合分子、多肽或其i体接触来检测。在一个实施方案中,对CXCR4结合分子、多肽或其i体进行可检测标记。

[0543] 在另一实例中,提供一种用于诊断患有肿瘤的受试者的癌转移的方法,其包括:评估所述肿瘤中的CXCR4水平或活性,借此相较于参照样品,所述肿瘤中的CXCR4水平或活性有变化指示存在转移性肿瘤生长。在一些情况下,肿瘤中的CXCR4水平或活性可高于在较早

测量时的那些,此可指示受试者处于癌转移的较大风险下;癌已转移;或癌转移已增加。参照样品可源于同一受试者,在不同时间点取自同一肿瘤,或取自身体的其它部位,或取自另一个体。

[0544] 在另一实例中,提供一种用于诊断患有纤维化的受试者的纤维化的水平或进展速率的方法,其包括:评估组织、血液、血浆或生物流体中的CXCR4水平或活性,借此相较于参照样品,CXCR4水平有变化指示存在纤维化。在一些情况下,CXCR4水平或活性可高于在较早测量时的那些,此可指示受试者是疾病的较快进展者。参照样品可源于同一受试者,在不同时间点取自同一组织、血液、血浆或生物流体,或取自身体的其它部位,或取自另一个体。

#### [0545] 治疗方法

[0546] 本文提供用于治疗或预防CXCR4相关疾病或病症的方法。方法包括施用治疗有效量的CXCR4结合分子或多肽和另一治疗剂。

[0547] 已显示CXCR4由多种癌类型表达,并且在某些情况下,已确定CXCR4表达与受试者预后或存活之间存在反向关联。与CXCR4表达相关的癌类型的非限制性实例包括乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、鼻咽癌、黑色素瘤、肾细胞癌、淋巴瘤(例如非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma))、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、横纹肌肉瘤、结肠直肠癌、肾癌、骨肉瘤、急性淋巴母细胞性白血病和急性骨髓性白血病。

[0548] 因此,在本公开的一个实例中,本公开的CXCR4结合分子或多肽可用于治疗CXCR4相关疾病或病症,其中所述疾病是癌症,并且其中所述癌症包括但不限于选自以下组成的组的癌症:膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、头颈部癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、子宫癌、子宫颈癌、甲状腺癌、胃癌、脑干神经胶质瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤、室管膜瘤(ependymoma)、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)家族的肿瘤、生殖细胞肿瘤、颅外癌、霍奇金氏病、白血病、急性淋巴母细胞性白血病、急性骨髓性白血病、肝癌、神经管母细胞瘤、神经母细胞瘤、一般说的脑肿瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、骨肉瘤、骨恶性纤维组织细胞瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、一般说的软组织肉瘤、幕上原始神经外胚层和松果体肿瘤、视路和下丘脑神经胶质瘤、韦尔姆斯氏肿瘤(Wilms' tumor)、急性淋巴细胞性白血病、成人急性骨髓性白血病、成人非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、食道癌、毛细胞白血病、肾癌、多发性骨髓瘤、口腔癌、胰腺癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、皮肤癌、骨髓发育不良综合征和小细胞肺癌。

[0549] 在根据本公开的一个实例中,本公开的CXCR4结合分子或多肽可用于抑制转移性肿瘤细胞生长。

[0550] 在根据本公开的一个实例中,本公开的CXCR4结合分子或多肽可用于治疗纤维化。

[0551] 本公开的CXCR4结合分子或多肽可单独使用,或与其它癌症治疗诸如手术和/或放射,和/或与其它抗赘生剂诸如以上讨论和所示的抗赘生剂组合使用,所述抗赘生剂包括化学治疗药物和其它抗肿瘤抗原抗体,诸如结合CD20、Her2、PD-1、PDL-1、IL-2、PSMA、Campath-1、EGFR等的那些。

[0552] 本公开的CXCR4结合分子或多肽可单独使用,或与其它炎症和纤维化治疗组合使用。

[0553] 已显示CXCR4是HIV进入T细胞中的共受体,并且另外,已证明某些鼠抗CXCR4抗体能够抑制HIV分离株进入T细胞中(参见Hou,T等(1998) J Immunol 160 180-188, Carnec,X

等(2005) *J Virol* 79:1930-1938)。因此, CXCR4可作为受体由病毒用于进入细胞中, 并且抗体或其它阻断剂可用于抑制使用CXCR4作为受体的所述病毒进入细胞中。因此, 在一个实例中, 本公开的CXCR4结合分子或多肽可用于抑制病毒进入细胞中, 其中所述病毒使用CXCR4作为进入细胞中的受体, 以致病毒性感染被抑制。在一个实例中, CXCR4结合分子或多肽例如在治疗或预防HIV/AIDS时用于抑制HIV进入T细胞中。CXCR4结合分子或多肽可单独使用, 或与其它抗病毒剂诸如抗逆转录病毒药物诸如AZT或蛋白酶抑制剂组合使用。

[0554] 已发现CXCR4与CXCR7形成异二聚体, 并且调控CXCL12介导的G蛋白信号传导(Levoye A等(2009) *Blood* 113(24):6085-6093)。也已显示CXCR4/CXCR7异二聚体募集 $\beta$ -抑制蛋白以增强细胞迁移(Decaillot FM等(2011) *J Biol Chem* 286(37):32188-97)。因此, 本公开的CXCR4结合分子或多肽可单独施用, 或连同如于例如WO 2007/115231、WO 2007/115232、WO 2008/048519、WO 2008/109154、WO 2010/054006中所述的靶向CXCR7受体的药剂一起施用。也已发现CXCR4与CCR5(Sohy等 *J Biol Chem*. 2009 284:31270-31279)、 $\beta_2$ AR(La Rocca等 *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010 56:548-559)、CCR2(Sohy等 *J Biol Chem*. 2007 282:30062-30069)、DOR( $\delta$ 类鸦片受体)(Pello等 *Eur. J. Immunol*. 2008 38:537-549)或CCR7形成异二聚体。因此, 本公开的CXCR4结合分子或多肽可单独施用, 或连同靶向这些受体的药剂一起施用。

[0555] 已显示CXCR4/SDF-1路径在多种炎症性病状中起作用, 包括但不限于炎症性肝病(Terada, R等(2003) *Lab. Invest* 83:665-672)、自体免疫关节炎(Matthys, P等(2001) *J. Immunol* 167 4686-4692)、过敏性气道疾病(Gonzalo, J A等(2000) *J. Immunol* 165-499-508)和牙周疾病(Hosokawa, Y等(2005) *Clin. Exp. Immunol* 4:467-474)。

[0556] 因此, 抑制SDF-I结合CXCR4的本公开的CXCR4结合分子或多肽可用于抑制炎症、炎症性病症, 包括选自由以下组成的组的病症: 炎症性肝病、自体免疫关节炎、过敏性气道疾病、牙周疾病(由牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)诱发)(Hajishengallis等 *PNAS* 2008 105:13532-13537)、类风湿性关节炎、炎症性肠病、全身性红斑狼疮、I型糖尿病、炎症性皮肤病症(例如牛皮癣、扁平苔癣)、皮肤修复和再生(灼伤、瘢痕形成)、眼病(AMD、葡萄膜炎)、全身性硬化症、辐射诱发的纤维化、自体免疫甲状腺疾病、休格连氏综合征(Sjogren's syndrome)、肺炎症(例如慢性阻塞性肺病、肺类肉瘤病、淋巴细胞性肺炎、特发性肺纤维化)、多发性硬化症(Kohler等 *Brain Pathology* 2008, 18:504-516)、败血症(Ding等 *Crit Care Med* 2006 34:3011-3017)和炎症性肾病(例如IgA肾病变、肾小球性肾炎)。CXCR4结合多肽可单独使用, 或与其它消炎剂组合使用, 所述消炎剂诸如非类固醇消炎药物(NSAID)、皮质类固醇(例如泼尼松、氢化可的松)、甲氨蝶呤、COX-2抑制剂、TNF拮抗剂(例如依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗)和免疫抑制剂(诸如6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤和环孢灵A(cyclosporine A))。

[0557] 因此, 抑制SDF-I结合CXCR4的本公开的CXCR4结合分子或多肽可用于抑制纤维化病症中的纤维化, 所述病症包括选自由以下组成的组的病症: 肺纤维化(特发性肺纤维化、真菌囊性纤维化(Carevic等 *Eur Respir J* 2015 46:395-404)、肺动脉高血压(Farkas等 *PLoS ONE* 2014 9:e89810)、辐射诱发的纤维化(Shu等 *PLoS ONE* 2013; 8:e79768.)和全身性硬化症、哮喘(Lukacs等 *AJP* 2012 160:1353-1360以及Nagase等 *J Immunol* 2000; 164:5935-5943)、肝纤维化(非酒精性脂肪性肝炎(NASH)(Boujedidi等 *Clinical Science*

2015 128;257-267))、肾纤维化(高血压和慢性肾病(Yuan等Am J Physiol Renal Physiol.2014 308;459-472))、眼纤维化(增生性玻璃体视网膜病变、糖尿病性视网膜病变(Butler等The Journal of Clin Invest 2005 115;86-93)、早产儿视网膜病变(Villalvilla等Life Sciences 2012 91;264-270)、非感染性葡萄膜炎(Zhang等Experimental Eye Research 2009 89;522-531)和湿性AMD(US\_7964191))、心脏纤维化(高血压、缺血性心肌病、心内膜心肌纤维化、动脉纤维化(Chu等Circ Heart Fail.2011 4;651-658))、皮肤纤维化(肥厚性瘢痕形成(Ding等Wound Rep and Reg 2014 22;622-630)、灼伤相关的瘢痕形成(Avniel等Journal of Investigative Dermatology 2006 126;468-476)、糖尿病性创伤、硬皮病或全身性硬化症(Tourkina等Fibrogenesis&Tissue Repair 2011,4;10.1186/1755-1536-4-15))。本发明的CXCR4结合分子或多肽可单独使用,或与其它抗纤维化剂例如吡非尼酮(Pirfenidone)或尼达尼布(Nintedanib)组合使用。

[0558] 已证明SDF-1通过募集CXCR4表达性血管生成细胞来诱导新血管化(Jin,D.K.等(2006)Nat Med.12:557-567)。也已发现CXCR4为胃肠道的血管化所必需(Tachibana等(1998)Nature 393(6685):591-4)。此外,阻断SDF-1/CXCR4路径可通过以VEGF非依赖性方式抑制血管生成来减弱体内肿瘤生长(Guleng,B.等(2005)Cancer Res.65:5864-58-71)。因此,抑制SDF-1结合CXCR4的本公开的CXCR4结合分子或多肽可用于通过干扰SDF-1/CXCR4路径来抑制血管生成。抑制血管生成可例如用于抑制肿瘤生长或肿瘤转移(无论肿瘤是否为CXCR4<sup>+</sup>)。CXCR4结合分子或多肽可单独使用,或与其它抗血管生成剂诸如抗VEGF(Grunewald M等(2006)Cell 124(1):175-89)或PD GF-D抗体或抗体的片段组合使用。

[0559] 缺乏由本公开的i体对于干细胞的动员-潜在应用

[0560] 各种细胞因子、趋化因子和粘附分子已牵涉于调控CD34<sup>+</sup>干细胞动员中(综述于Gazitt,Y.(2001).J Hematother.Stem Cell Res.10:229-236中),包括CXCR4和SDF-1的相互作用。此外,已证明小分子CXCR4拮抗剂会刺激CD34<sup>+</sup>干细胞从骨髓向外周快速动员(参见例如Devine,S M等(2004)J.Clin.Oncol 22 1095-1 102;Broxmeyer,H E等(2005)J.Exp.Med 201:1307-1318,Flomenberg,N等(2005)Blood 106:1867-1874)。

[0561] 相比之下,发现一些本公开的i体缺乏干细胞动员能力。有若干研究指示不动员干细胞的CXCR4抑制剂/拮抗剂诸如本文所述的i体将适用于长期研究中以及治疗慢性疾病。

[0562] i) 纤维化治疗

[0563] 对损伤的应答涉及旨在不仅维持体内平衡,而且也诱导组织修复的适应性机制的活化。这个再生修复潜力在人中在某些情况下,诸如在肝切除或急性肾小管坏死之后,是明显的。然而,在慢性或重复损伤存在下,应答主要涉及无序实质细胞再生与产生大量ECM的组合,最终导致形成结缔组织瘢痕。尽管通过结缔组织进行的这个修复明确有助于在例如皮肤创伤之后维持器官完整性,但它在其它器官诸如心脏、肾和肺中的存在常常是有害的(Wynn等Nat Med(2012)18:1028-1040)。

[0564] 对治疗纤维化存在未满足的临床需要(Luppi等Curr Respir Care Rep(2012)1:216-223,Friedman等Sci Transl Med.(2013)5:167s r1)。重要的是,当前不存在靶向促纤维化炎症性过程的治疗策略,并且因此指示对开发新型治疗剂存在明确的未满足临床需要。因此,抑制促炎性细胞因子活化和病理性ECM积累的策略提供用于预防病理性器官纤维化的潜在治疗靶标。

[0565] (a) 肺纤维化:特发性肺纤维化 (IPF)

[0566] 特发性肺纤维化 (IPF) 是一种间质性炎症性疾病,特征在于肺瘢痕形成和纤维化,最终导致终末呼吸功能不全。新近研究呈现证据表明表达CXCR4的循环纤维细胞促进肺纤维化的发病机理(Phillips等J Clin Invest (2004) 114:438-446.)。这个和其它新近研究表明阻断这些纤维细胞上CXCR4的活性可能是适用于患有各种类型的纤维化的患者中的治疗方法,所述纤维化包括与肺病、糖尿病和心血管疾病相关的纤维化。

[0567] b) 眼纤维化

[0568] 新血管在眼后部中的病理性生长是许多疾病的毁灭性后果,所述疾病包括年龄相关的黄斑变性、增生性糖尿病性视网膜病变和早产儿视网膜病变。危及视力的晚期年龄相关的黄斑变性(被称为湿性AMD)影响超过85岁的所有人中的5.7%。糖尿病性视网膜病变是糖尿病的最恐怖并发症,影响约40%的患有II型糖尿病患者和86%的患有I型糖尿病患者(Cheung等Lancet 2010;376:124-36)。另一视网膜血管疾病称为早产儿视网膜病变,是早产的毁灭性后果,并且仍然是西方世界中儿童期失明的主要原因。这些病状的共同特征是血管生长异常和随后形成瘢痕,其是导致失明的关键事件。为预防由这些疾病所致的失明,靶向视网膜血管生长异常以及随后瘢痕形成两者的治疗是必要的。

[0569] 湿性AMD当前以每月或每两月向眼中注射阻断血管生成生长因子血管内皮生长因子(VEGF)的作用的人源化抗体或抗体片段来治疗。这些新型治疗已转变对患有湿性AMD者的临床护理,并且预防大多数患者的突然视力损失(Rosenfeld等N Engl J Med 2006;355:1419-31;Brown等N Engl J Med 2006;355:1432-44)。本发明的CXCR4结合分子或多肽可用于治疗眼部的瘢痕形成和纤维化相关病症,包括玻璃体视网膜病变、糖尿病性视网膜病变和早产儿视网膜病变。

[0570] ii) 动脉粥样硬化治疗

[0571] Zernecke和同事(Zernecke等(2008)Circulation Research 102:09-217)提供证据表明CXCL12/CXCR4轴在动脉粥样硬化中具有保护性,并且这个保护作用归因于对骨髓细胞体内平衡的控制。这些研究显示在两种不同小鼠品系(Apoe<sup>-/-</sup>小鼠和Ldlr<sup>-/-</sup>)中,由小分子拮抗剂AMD3465长期抑制CXCR4使膳食诱发的动脉粥样硬化性病变发展加剧。已显示相比于AMD3100,用AMD3465达成的CXCR4拮抗作用在使嗜中性白细胞从骨髓释放方面更有效10倍(Hatse等Biochem Pharmacol.2005;70:752-761)。Zernecke等人也证明用AMD3465长期治疗导致骨髓嗜中性白细胞扩增以及单核细胞略微增加,此似乎与骨髓中淋巴细胞的降低相关联。他们推断“当尝试用CXCR4拮抗剂进行的治疗时,似乎有理由保持谨慎,所述拮抗剂可动员造血细胞,但可抑制斑块稳定性祖细胞子组的募集,并且可因此促进动脉粥样硬化”。因此,缺乏动员造血细胞的能力的药剂可适用于治疗动脉粥样硬化。本发明的CXCR4结合分子或多肽能够具有抗动脉粥样硬化作用,同时不使干细胞动员增加。

[0572] iii) 肾病

[0573] 根据Zuk等(2014)Am J Physiol Renal Physiol 10月1日;307(7):F783-97的研究提供强力证据表明CXCR4抑制通过抑制白细胞浸润和促炎性细胞因子表达并非通过对造血干细胞或它们的动员的任何作用来改善急性肾损伤。因此,本公开的CXCR4结合分子或多肽可适用于治疗肾病。

[0574] iv) 血管生成

[0575] SDF-1和它的受体CXCR4已牵涉于血管生成和瘢痕形成(纤维化)中(Ferrara等Nature 2005;438:967-74)。实际上,在患有湿性AMD、增生性糖尿病性视网膜病变和早产儿视网膜病变者的玻璃体中,SDF-1增加(Scotti等Retina 2014;34:1802-10,Butler等J Clin Invest 2005;115:86-93,Sonmez等Ophthalmology 2008;115:1065-1070)。它的受体CXCR4定位于病理生长血管的生长尖端。此外,已显示在啮齿动物脉络膜新血管化和早产儿视网膜病变模型中,抑制CXCR4会预防血管的异常生长(Lima e Silva等FASEB J 2007;21:3219-30)。另一研究已显示循环纤维细胞可充当增生性玻璃体视网膜病变(PVR)膜中肌纤维母细胞的前体。在PVR视网膜前膜中,存在较高数目的表达CXCL12和CXCR4的细胞,并且表明CXCL12/CXCR4趋化因子轴似乎对于在PVR患者中纤维细胞向眼中募集具有支配作用(Abu El-Asar等Br J Ophthalmol 2008;92:699-704)。

[0576] 为改进对这些血管疾病的临床管理,需要靶向血管生成与随后纤维化两者的治疗。本公开的新型多肽或i体适用于所述治疗。

[0577] 因此,在处于AMD、增生性糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变、增生性玻璃体视网膜病变、葡萄膜炎、角膜血管生成中的眼后部血管疾病的模型中,本公开的CXCR4结合分子、多肽或i体可有效降低血管生成和随后瘢痕形成。

#### [0578] 炎症性模型

[0579] 可在炎症性小鼠模型中考查本公开的CXCR4结合分子或多肽抑制炎症的能力。这些模型包括鼠实验性结肠炎模型、角叉菜胶(carrageenan)诱发的爪水肿模型和博莱霉素诱发的肺纤维化模型,如Liang Zhongxing等(2012)PLoS ONE 7(4):e34038.doi:10.1371中所述。

#### [0580] 纤维化模型

[0581] 可在博莱霉素啮齿动物模型中考查本公开的CXCR4结合分子或多肽抑制纤维化的能力。在常常用于模拟特发性肺纤维化(IPF)的啮齿动物博莱霉素模型中,血清和支气管肺泡灌洗液中的SDF-1水平增加。此外,发现针对CXCR4的中和抗体和小分子CXCR4拮抗剂AMD3100会减轻肺嗜酸粒细胞增多,从而指示在小鼠过敏性气道疾病模型中,CXCR4介导的信号促进肺炎症(Gonzalo等J Immunol.2000;165:499-508,Lukacs等Am J Pathol.2002;160:1353-60)。这些数据强烈指示相比于再上皮化,CXCR4在促进纤维化方面具有突出作用。本发明的CXCR4结合分子或多肽可用作抗纤维化剂。

[0582] 迄今为止,已开发若干CXCR4拮抗剂(Tsutsumi等Biopolymers.2007;88:279-289)。已显示使用诸如TN14003、MSX-122或AMD3100的拮抗剂阻断CXCR4会有效缓和博莱霉素诱发的肺纤维化(Xu等Cell Mol Biol.2007;37:291-299)。AMD3100(普乐沙福)作为一种FDA核准的小分子CXCR4拮抗剂也已关于博莱霉素处理的小鼠进行测试。尽管AMD3100有效阻断干细胞归巢,但它也增加干细胞动员,此已导致它用于增加干细胞产率来为自体移植做准备。TN14003作为一种14聚体肽在博莱霉素处理的小鼠中阻断肺纤维化的发展,而MSX-122作为一种小分子也已在完全预防博莱霉素诱发的肺纤维化方面显示超过TN14003和AMD3100的优越性(Xu等Cell Mol Biol.2007;37:291-299),并且接受MSX-122的经照射小鼠在肺纤维化的发展方面显著降低,而AMD3100不显著抑制这个纤维化过程(Shu等PLoS ONE 2013;8(11):e79768.)。本发明的CXCR4结合分子或多肽能够阻断干细胞归巢,同时不使干细胞动员增加。

[0583] 一种用以阐明新型靶标在IPF的发病机理中的作用的替代性技术涉及从患有疾病的患者分离纤维母细胞,以及与来自健康受试者的纤维母细胞比较介体释放。在这个方法中,使细胞暴露于药理学激动剂和拮抗剂。纤维母细胞可被包埋并培养于三维基质中,并且与其它细胞类型共培养。可用人患者纤维母细胞考查本公开的CXCR4结合分子或多肽抑制纤维化的能力。

[0584] 另一转化模型是将来自IPF患者的纤维母细胞植入免疫缺陷小鼠中。可在这个动物纤维化模型中考查本公开的CXCR4结合分子或多肽抑制纤维化的能力(Murray等, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology第50卷第5期,2014年5月)。

[0585] 癌症/转移模型

[0586] 可在小鼠模型中考查本公开的CXCR4结合分子或多肽抑制转移的能力。这些模型包括乳腺癌模型(通过施用MDA-MB-231细胞)、头颈部癌动物模型(通过施用686LN-Ms细胞)和葡萄膜黑素瘤微转移模型,如Liang Zhongxing等(2012) PLoS ONE 7(4):e34038.doi:10.1371中所述。

[0587] 体内血管生成测定

[0588] 可在小鼠模型中考查CXCR4结合分子抑制血管生成的能力。这些模型描述于Liang等,(2007) Biochem Biophys Res Commun.8月3日;359(3):716-722中,借此将MDA-MB-231细胞皮下植入裸小鼠的侧腹中。

[0589] 试剂盒

[0590] 在一些实例中,可将CXCR4结合分子或多肽提供于试剂盒或药物包装中。

[0591] 在一个实例中,本公开涉及用于进行本文所述的CXCR4结合分子的施用的试剂盒。

[0592] 药物包装和试剂盒可另外在药物制剂中包括赋形剂、载体、缓冲剂、防腐剂或稳定剂。试剂盒的各组分可被封闭在个别容器内,并且所有各种容器都可在单一包装内。本发明试剂盒可被设计用于室温储存或冷储存。另外,制剂可含有稳定剂以增加试剂盒的储存期限,并且包括例如牛血清白蛋白(BSA)或其它已知常规稳定剂。当组合物是冻干组合物时,试剂盒可含有其它溶液制剂以复原制剂。可接受的溶液在本领域中是熟知的,并且包括例如药学上可接受的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0593] 另外,本文提供的药物包装或试剂盒可进一步包括任何本文提供的其它部分,诸如像如其它地方更详细描述的化学治疗剂。

[0594] 本发明的药物包装和试剂盒可进一步包括用于本文提供的测定诸如像ELISA测定的组分。或者,试剂盒的制剂在免疫测定诸如免疫组织化学分析中用于测试患者组织活检切片。

[0595] 本发明的药物包装和试剂盒可进一步包括详细说明例如产品描述、施用模式和治疗指示的标签。本文提供的药物包装可包括任何如本文所述的组合物。药物包装可进一步包括用于预防任何本文所述的疾病适应症,降低所述适应症的风险,或治疗所述适应症的标签。

[0596] 本公开的试剂盒可另外包括在任何本发明方法中使用试剂盒组分的标签或说明书。试剂盒可在包装或分配器中包括本公开的i体化合物以及在本公开方法中施用化合物的说明书。说明书可包括实施任何本文所述的本公开方法的说明书,所述方法包括治疗、检

测、监测或诊断方法。说明书可另外包括对令人满意的临床终点或可能发生的任何不利症状的指示,或由管理机构诸如食品与药物管理局所需的关于在人受试者的情况下进行使用的额外信息。

[0597] 本领域技术人员应了解可在不脱离本公开的广泛一般性范围的情况下对上述实施方案进行众多变化和/或修改。因此,本发明实施方案应在所有方面都被视为具有说明性而非限制性。本公开包括以下非限制性实例。

[0598] 一般性方法

[0599] Biacore测定

[0600] (图2、5、11、17)使用Biacore T200仪器(GE Healthcare,Uppsala,Sweden),在25℃下用经固定CXCR4脂质粒子对所选i体进行动力学结合分析。在1×HBS-P+运行缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% [v/v]吐温-20(Tween-20))中进行链霉亲和素固定。胺偶联试剂盒(GE Healthcare)和其中的说明书用于在所有四个通道中在传感器芯片表面上同时连接链霉亲和素(Sigma;在10mM乙酸钠缓冲液(pH 4.5)中稀释至100μg/mL),从而导致偶联>6,000RU的链霉亲和素(1RU=1pg蛋白质/mm<sup>2</sup>)。涉及脂质粒子的所有结合实验都用1×HBS/BSA(10mM HEPES、150mM NaCl、1mg/mL BSA)作为仪器运行缓冲液来进行。通常在运行缓冲液中以1/20稀释生物素化CXCR4脂质粒子(Integral Molecular,目录号LEV-101B;3.6U/mL,如WO 2005/042695中所述),并且通过在2μL/mL下注射1,800秒来固定于含有链霉亲和素的通道上,从而导致大于2,500RU的捕获响应水平。以类似方式固定生物素化CCR5和无效脂质粒子,用作脱靶对照。为测定结合动力学,历经经固定脂质粒子注射i体于1×HBS/BSA中稀释的连续稀释液(三倍),其中分别监测缔合时期和解离时期60秒和600秒。也出于双重参照目的包括仪器运行缓冲液(“调零缓冲液”空白)溶液的对照测量结果。使用Scrubber软件(www.biologic.com.au)处理收集的实验数据。通过相对于朗缪尔(Langmuir)1:1结合模型拟合各组实验数据来获得动力学参数( $k_a$ =缔合速率常数和 $k_d$ =解离速率常数)和平衡解离常数( $KD=k_d/k_a$ )。所有相互作用测量都一式三份进行,并且将获得的结合参数报告为平均值±标准偏差。

[0601] β-抑制蛋白(BRET)测定

[0602] (图3和14)基于先前利用BRET证实的对GPCR/β-抑制蛋白相互作用的监测,BRET在这个研究中用于评估由任何随之发生的邻近性增加所致的实时动力学概况。BRET发生在作为供体的互补海肾荧光素酶(Rluc)变体与作为接受体的绿色荧光蛋白变体之间。在Rluc催化氧化腔肠素底物(诸如用于第一代BRET(BRET)的腔肠素h或用于扩展BRET(eBRET)的EnduRen)后,如果在10nm内,那么能量被转移至接受体中,从而导致在特征波长下达到峰值的接受体发光。如先前所述进行BRETβ-抑制蛋白测定(See,H.B.,Seeber,R.M.,Kocan,M.,Eidne,K.A.和Pfleger,K.D.(2011)'Application of G protein-coupled receptor-heteromer identification technology to monitor beta-arrestin recruitment to G protein-coupled receptor heteromers',Assay Drug Dev Technol,9(1),21-30,10.1089/adt.2010.0336)。从由Aron Chakera(Oxford University,United Kingdom)友情提供的含有用Rluc标记的相应受体cDNA的质粒产生CXCR4/Rluc8cDNA构建体。先前从由Atsushi Miyawaki(RIKEN Brain Science Institute,Wako-city,Japan)友情提供的pCS2-Venus制备β-抑制蛋白2/Venus cDNA构建体。在CXCR4激动剂SDF-1/CXCL12和i体存在

下评估在短暂表达CXCR4/Rluc8和 $\beta$ -抑制蛋白2/Venus的细胞中,在100nM SDF-1激动剂存在下的BRET技术。在37°C、5%CO<sub>2</sub>下,在补充以10%胎牛血清(FCS)和400mg/mL遗传霉素(Gibco)的完全培养基(含有0.3mg/mL谷氨酰胺、100IU/mL青霉素和100mg/mL链霉素的杜贝卡氏改良依格氏培养基;Gibco)中维持HEK293FT细胞。在接种之后24小时,根据制造商说明书使用Gene juice (Novagen)进行转染。用0.05%胰蛋白酶-EDTA (Gibco)收集细胞。使用FuGene6 (Promega)转染HEK293FT细胞。含5 $\mu$ M腔肠素h (Promega)的HBSS用作荧光素酶底物溶液。在转染后24小时,将细胞收集于HEPES缓冲的含有5%FCS的无酚红完全培养基中,并且添加至聚L-赖氨酸涂布的白色96孔板(Nunc)中。使用BRET产生剂量-响应曲线,其中用含有5mM腔肠素h (Molecular Probes)的PBS替换板中的培养基,并且立刻进行测定。对于这些测定,在转染后48小时,在37°C、5%CO<sub>2</sub>下,使板与30mM EnduRen (Promega)一起孵育2小时以确保达到底物平衡。所有BRET测量结果都是使用VICTOR Light板读取器,用Wallac 1420软件(PerkinElmer)在37°C下获取。依序在400-475和520-540nm下测量滤光发射。通过以下方式来计算BRET信号:将媒介物处理的细胞样品的520-540nm发射关于400-475nm发射的比率从用激动剂(在这个情况下是在SDF-1或CXCL12存在下)和i体(ADCX-99、ADCX-272、ACDX-6、ACDX-306、ADCX-668)在各种浓度下处理的相同细胞的第二等分试样的相同比率中减去。数据是一式两份进行的四个独立实验的平均值 $\pm$ S.E.M.。

[0603] (图9)根据制造商方案进行PathHunter® $\beta$ -抑制蛋白测定(DiscoveRx)。将细胞接种至白壁384孔组织培养经处理微板(Corning)中,并且以在总体积20 $\mu$ L中具有5,000个细胞(或对于CXCR4是10,000个细胞)进行标准化。细胞生长处于37°C下(5%CO<sub>2</sub>、95%相对湿度)。添加I体或AMD3100(Tocris Bioscience)(5 $\mu$ L,在0.5-3.8 $\mu$ M下)至单份孔中,并且将板在37°C下孵育30分钟。接着在EC80浓度下添加激动剂,并且在37°C下继续孵育90分钟(或对于CCR1是180分钟)。通过单次添加15 $\mu$ L(50%v/v)PathHunter检测试剂混合物,随后在室温下孵育1小时来产生测定信号。在信号产生之后,用PerkinElmer Envision仪器读取微板来以相对光单位(RLU)检测化学发光信号。使用CBIS数据分析套件(ChemInnovation)分析化合物活性。抑制% = 100%  $\times$  [1 - (测试样品的平均RLU - 媒介物对照的平均RLU) / (EC80对照的平均RLU - 媒介物对照的平均RLU)]。

[0604] Im7-FH对应于N末端溶解性和纯化标签,其中Im7是大肠杆菌蛋白质(Hosse RJ等(2009) Anal Biochem 15;385(2):346-57),并且FH是flag+6个组氨酸残基。

[0605] 实施例1-鉴定CXCR4阻断i体

[0606] 从鲨鱼IgNAR抗体结构获悉的原理可成功应用于产生来自免疫球蛋白超家族的人I组结构域的结合谱系,此进一步描述于WO 2005/118629中。鲨鱼IgNAR抗体在结构上接近于免疫球蛋白超家族的I组结构域,诸如NCAM的结构域1。NCAM的经修饰结构域1被称为i体骨架。使用这个骨架,产生多肽的文库,并且展示在噬菌体上以相对于特定靶标来筛选那个靶标的特异性结合剂。预期所述文库主要在CDR1和CDR3类似区域中含有可变性。

[0607] 产生在CDR1区(由图1B中的XXXXXX表示)中以及在CDR3区(由图1B中的Y' n表示)中具有随机氨基酸序列的i体文库,其中n(随机CDR3序列中的氨基酸的数目)的长度在10至20个氨基酸之间随机变化,并且序列根据SEQ ID NO:2。本公开的i体包含骨架区,所述骨架区对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至26、33至79以及88至97或与其至少60%同一的序列,或另外可包含1至5个氨基酸添加或取代。在一个实例中,骨架区包含SEQ ID NO:2所示的序

列或SEQ ID NO:2所示的包含1至5个氨基酸添加或取代的序列。

[0608] 通过相对于SEQ ID NO:1中分别由SEQ ID NO:1中的氨基酸位置27至32和80至86表示的相应CDR1区和/或CDR3区进行氨基酸添加和/或取代来修饰SEQ ID NO:2的互补决定区(CDR1和CDR3)。所得i体多肽能够以小于50 $\mu$ M的亲合力结合人CXCR4。

[0609] 在一个实例中,SEQ ID NO:2中的A'和B'是任何氨基酸残基。

[0610] 在一个实例中,SEQ ID NO:2中的A'是氨基酸Q或K,并且SEQ ID NO:2中的B'是氨基酸残基V或A。在另一实例中,在SEQ ID NO:2中,A'是Q,并且B'是V或A。

[0611] 序列ID NO:2可进一步包含1至4个的选自由M、EAEA、MA或MP组成的组的连续N末端氨基酸残基。

[0612] 在使i体文库和捕获在板或珠粒上的hCXCR4脂质粒子或与CXCR4阳性细胞一起在溶液中孵育之后,针对展示在脂质粒子中或在HEK细胞系中表达的人CXCR4(hCXCR4)来选择展示在噬菌体上的I体。在任一形式中都完成广泛洗涤以移除非特异性结合剂。观察到向hCXCR4阳性脂质粒子或细胞富集,并且挑选单一集落并使其生长。除CDR1区和CDR3区的特定区域之外,i体骨架的序列保持相同。特异性结合hCXCR4的单一集落的CDR1序列和CDR3序列详述于表1中。i体对CXCR4的亲合力描述于表1以及图5(对于ADCX-99)和图2(对于i体ADCX-306、ADCX-272和ADCX-668)中。

[0613] i体结合剂ADCX-99、ADCX-272、ADCX-6、ADCX-306和ADCX-668调节 $\beta$ -抑制蛋白的能力也显示于图3中。

[0614] 表1:针对hCXCR4鉴定的i体的小组

名称	CDR1 序列	CDR3 序列	i体的SEQ ID NO.	K <sub>D</sub> ( $\mu$ M)
ADCX-99	SGSDIR (SEQ ID NO:12)	YRTGGYRHRA LVLG (SEQ ID NO:13)	11	0.7
ADCX-272	HLEVRS (SEQ ID NO:15)	EQRGRSQSYFS (SEQ ID NO:16)	14	1.6
ADCX-6	LTSLEG (SEQ ID NO:18)	EDHPQYSKME (SEQ ID NO:19)	17	ND
[0615] ADCX-54	RTIIVE (SEQ ID NO:21)	VLSIRGWEL (SEQ ID NO:22)	20	ND
ADCX-LS	IAEFST (SEQ ID NO:24)	QVSDHPEAGIL WRG (SEQ ID NO:25)	23	ND
ADCX-668	TIWYEQ (SEQ ID NO:27)	WTRPVTSSMH (SEQ ID NO:28)	26	42
ADCX-306	FQEWVN (SEQ ID NO:30)	TMPHTLNNLD VRT (SEQ ID NO:31)	29	22

[0616] ND=未测出。

[0617] 此外,产生指定为21H5的对照i体,其不结合CXCR4。这用作同种型对照。以下显示这个i体的序列:

[0618] LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGDAKDKDISWFSPNGEKLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNAN

IDDAGIYKCVVTGSDAMSNYSYPISESEATVNVKIFQ (SEQ ID NO:82)

[0619] 实施例2-表征CXCR4阻断i体

[0620] 2.1在大肠杆菌中进行的I体表达和纯化

[0621] 使用大肠杆菌表达系统表达和纯化I体。表达具有各种亲和和标签的I体,所述标签包括大肠杆菌免疫性蛋白质(Im7) FLAG和6xHIS(在图4中指定为Im7-FH)。使用各种标签,分别利用抗FLAG树脂或Ni-NTA树脂来从周质部分和细胞质纯化I体。尺寸排阻色谱法的结果显示于图4中。

[0622] 2.2在毕赤酵母中进行的I体表达和纯化

[0623] 将i体的基因克隆至毕赤酵母表达载体中。在对克隆选择进行一定优化之后,在小(2ml)规模上,蛋白质效价在3-9mg/L的范围内。在发酵规模上,产量在26-150mg/L之间。可在发酵水平上优化诸如(温度、pH、饲料速率和饲料策略)的其它参数以改进产量。在大规模表达和纯化之后,通过SDS-PAGE来表征i体,并且已显示当它们以适当尺寸迁移时,它们基本上完整(图未显示)。

[0624] 2.3i体结合CXCR4的亲合力和特异性

[0625] i体ADCX-99被显示在BIAcore测定中结合经固定CXCR4阳性脂质粒子(A),但显示与无效脂质粒子(B)或与对GPCR CCR5呈阳性的脂质粒子(C)极小结合,从而证明i体ADCX-99对CXCR4具有特异性(图5)。

[0626] 一种鉴定的CXCR4i体ADCX-99对CXCR4阳性脂质粒子的亲合力为约 $K_D$  600nM(622.877nM),由图5中的Biacore测定所测定。

[0627] i体ADCX-272被显示在BIAcore测定中结合经固定CXCR4阳性脂质粒子(图2),但显示与无效脂质粒子或与对GPCR CCR5呈阳性的脂质粒子(通过ELISA)极小结合(图7B),从而证明i体ADCX-272对CXCR4具有特异性。

[0628] CXCR4i体ADCX-272对CXCR4阳性脂质粒子的亲合力被测定为约 $K_D$  1.6 $\mu$ M,由Biacore所测定(图2B)。

[0629] 实施例3-i体的亲合力成熟

[0630] 使用易错PCR使i体ADCX-99进行亲合力成熟。这以两种方式进行;通过产生涉及CDR1和CDR3的随机突变的文库,或使用在序列中任何地方的平均2-3个核苷酸突变。根据Henderson等(2007) Structure 15:1452-66来淘选文库。使用这个策略,在CDR1区和/或CDR3区中对i体ADCX-99进行修饰以改进亲合力或表达来产生突变体的文库。

[0631] 3.1对i体的表达水平、亲合力和特异性的改进

[0632] 在96孔板中培养亲合力成熟ADCX-99的90个随机突变i体。对周质部分的分析显示在突变克隆之间蛋白质表达和亲合力水平显著变化。通过与ADCX-99比较,若干突变克隆是比野生型ADCX-99i体更好的表达物(图6)。

[0633] 当接着考查相同90个克隆与CXCR4阳性脂质粒子的结合时,观察到尽管大多数克隆对CXCR4阳性脂质粒子具有较低亲合力,但若干克隆显示较高亲合力(图7-1)。相较于野生型ADCX-99i体,突变i体克隆36和39似乎在这个测定中与CXCR4阳性脂质粒子具有较高结合。也考查突变i体克隆与CCR5阳性脂质粒子的结合(图7-2)。如同野生型ADCX-99一样,I体突变克隆36和39对CCR5具有同样低结合(图7-2),从而证明对CXCR4具有特异性。

[0634] 使ADCX-99的突变克隆经受另一轮亲合力成熟,并且关于改进的亲合力和表达来

考查超过1000个突变克隆。

[0635] 亲和力成熟i体的共有序列显示于图1D中 (SEQ ID NO:39)。CD1区和CDR3区分别由 $SX_1SX_2X_3R$ 和 $Y'_1RY'_2GY'_3YRHR Y'_4LY'_5LG$ 表示。

[0636] 本公开的亲和力成熟i体包含骨架区,所述骨架区对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至26、33至79以及88至97或与其至少60%同一的序列,或另外可包含1至5个氨基酸添加或取代。在一个实例中,多肽包含SEQ ID NO:2所示的序列或SEQ ID NO:2所示的包含1至5个氨基酸添加或取代的序列。

[0637] 在一个实例中,SEQ ID NO:39中的A'和B'是任何氨基酸残基。

[0638] 在一个实例中,SEQ ID NO:39中的A'是氨基酸Q或K,并且SEQ ID NO:39中的B'是氨基酸残基V或A。在另一实例中,在SEQ ID NO:39中,A'是Q,并且B'是V或A。

[0639] 在一个实例中,Z不存在,或是选自M、EAEA、MA或MP的氨基酸。具有改进的亲和力成熟序列的概要描述于表2中。

[0640] 表2:通过两轮亲和力成熟产生的源于ADCX-99的序列的概要

	原始CXCR i体结合剂
ADCX-99	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGSGSDIRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGYKCVVYR <u>TGGYRHRALVLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:11)
	第2轮亲和力成熟序列
AM3-114	LQVDIVPYQGEISVGESKFFLCQVAGSLSGIRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVVWR <u>TGGYRHRYLVLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:40)
AM3-920	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGSGSGIRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVVWR <u>TGGYRHRYLVLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:44)
AM4-1121	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGSKSGIRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVV <u>YRTGGYRHRYLRLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:48)
AM4-613	LQVDIVPS QGEISVGESK FFLCQVAGSKSDVRISWFSP NGEKLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNAN IDDAGIYKCVVWRTGGYRHRYLVLGEATVNVKIFQ (SEQ ID NO:52)
AM3-523	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGSGSHMRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVV <u>WRVGGYRHRALVLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:56)
AM4-661	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGSKSDFRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVVYR <u>TGGYRHRYLVLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:60)
AM3-466	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGSGSHQRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVVWR

[0641]

	<u>TGAYRHRALVLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:64)
AM5-245	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQAAGSGSHIRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVV <u>WRTGGYRHRALVLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:68)
[0642] AM4-272	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGSYSDYRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVVYR <u>IGGYRHRYLVLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:72)
AM4-746	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGSKSNIRISWFSPNGE KLTPNQQRISVWVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVVYR <u>TGGYRHRYLKLGEATVNVKIFQ</u> (SEQ ID NO:76)

[0643] 相对于ADCX-99的共有序列 (SEQ ID NO:2和39) 进行修饰的氨基酸位置的概要显示于图1中。图8指示对应于各亲和力成熟i体的特定氨基酸残基取代。加下划线对应于各序列中的CDR1区和CDR3区。

[0644] 表3概述关于前20名亲和力成熟i体针对在脂质粒子上表达的CXCR4的解离速率的改进。

[0645] 表3 20个亲和力成熟i体的Kd值

	相较于ADCX99 的氨基酸变化		Kd
	CDR1	CDR3	
AM3-114 (SEQ ID 40)	SLSGIR (SEQ ID NO:41)	WRTGGYRHRYLVLG (SEQ ID NO:42)	0.0066
AM3-466 (SEQ ID 64)	SGSHQR (SEQ ID NO:65)	WRTGAYRHRALVLG (SEQ ID NO:66)	0.00784
AM3-920 (SEQ ID 44)	SGSGIR (SEQ ID NO:45)	WRTGGYRHRYLVLG (SEQ ID NO:46)	0.00817
AM4-661 (SEQ ID 60)	SKSDFR (SEQ ID NO:61)	YRTGGYRHRYLVLG (SEQ ID NO:62)	0.00955
AM3-523 (SEQ ID 56)	SGSHMR (SEQ ID NO:57)	WRVGGYRHRALVLG (SEQ ID NO:58)	0.00998
AM4-774	SKSVIR (SEQ ID NO:83)	YRTGGYRHRYLVLG (SEQ ID NO:84)	0.0105
AM4-1121 (SEQ ID 48)	SKSGIR (SEQ ID NO:49)	YRTGGYRHRYLRLG (SEQ ID NO:50)	0.1153
AM4-613 (SEQ ID 52)	SKSDVR (SEQ ID NO:53)	WRTGGYRHRYLVLG (SEQ ID NO:54)	0.01236
AM4-208	SKSEIR (SEQ ID NO:85)	YRTGGYRHRYLVLG (SEQ ID NO:86)	0.01283
[0646] AM4-1088	SKSDFR (SEQ ID NO:87)	RTGGYRHRYLKLG (SEQ ID NO:88)	0.01349
AM4-239	AYSDIR (SEQ ID NO:89)	YRTGGYRHRYLVLG (SEQ ID NO:90)	0.01356
AM3-32	SGSGIT (SEQ ID NO:91)	WRTGVYRHRALVLG (SEQ ID NO:92)	0.0136
AM5-245 (SEQ ID 68)	SGSHIR (SEQ ID NO:69)	WRTGGYRHRALVLG (SEQ ID NO:70)	0.01445
AM4-757	SKSAIR (SEQ ID NO:93)	YRTGSYRHRYLVLG (SEQ ID NO:94)	0.01488
AM4-386	ITSEGH (SEQ ID NO:95)	ETTVFNEVMRLGNGA HVY (SEQ ID NO:96)	0.015
AM4-352	SKDDIR (SEQ ID NO:97)	YRTGGYRHRYLVLG (SEQ ID NO:98)	0.0152
AM3-182	VGNHIR (SEQ ID NO:99)	WRAGGYRHRALVLG (SEQ ID NO:100)	0.01562
AM4-203	SYGDIR (SEQ ID NO:101)	YRTGGWRHRYLVLG (SEQ ID NO:102)	0.01621
AM4-272 (SEQ ID 72)	SYSDYR (SEQ ID NO:73)	YRIGGYRHRYLVLG (SEQ ID NO:74)	0.01631
AM5-95	SGSHIR	WRTGGYRHRALVLG	0.01663
[0647]	(SEQ ID NO:103)	(SEQ ID NO:104)	

[0648] 表4概述前20名亲和力成熟i体对在脂质粒子上表达的CXCR4的亲和力 (Ka、Kd和K<sub>D</sub>)。

[0649] 表4CXCR4结合多肽对在脂质粒子上表达的CXCR4的亲和力

结合多肽	对在脂质粒子上表达的CXCR4的亲合力		
	Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Kd (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	KD (nM)
AM3-114	1.297 x10 <sup>6</sup>	6.29 x10 <sup>3</sup>	4.85
	1.9 x10 <sup>6</sup>	6.34 x10 <sup>3</sup>	3.33
AM3-523	1.003 x10 <sup>6</sup>	8.61 x10 <sup>3</sup>	8.53
	9.65 x10 <sup>5</sup>	9.15 x10 <sup>3</sup>	9.47
AM3-466	4.65 x10 <sup>5</sup>	6.43 x10 <sup>3</sup>	13.83
	4.26 x10 <sup>5</sup>	6.67 x10 <sup>3</sup>	15.7
AM3-920	1.117 x10 <sup>6</sup>	8.02 x10 <sup>3</sup>	7.18
	1.26 x10 <sup>6</sup>	7.41 x10 <sup>3</sup>	5.87
AM4-613	1.334 x10 <sup>6</sup>	10.44 x10 <sup>3</sup>	7.83
AM4-1121	1.289 x10 <sup>6</sup>	9.29 x10 <sup>3</sup>	7.21
	1.42 x10 <sup>6</sup>	9.54 x10 <sup>3</sup>	6.7
AM4-661	9.66 x10 <sup>5</sup>	9.21 x10 <sup>3</sup>	9.53
	9.83 x10 <sup>5</sup>	9.5 x10 <sup>3</sup>	9.66
AM5-245	8.13 x10 <sup>5</sup>	12.1 x10 <sup>3</sup>	14.88
	7.71 x10 <sup>5</sup>	12.3 x10 <sup>3</sup>	15.9
AM4-272	8.06 x10 <sup>6</sup>	13.08 x10 <sup>3</sup>	1.6
AM4-746	2.5 x10 <sup>6</sup>	13.39 x10 <sup>3</sup>	5.36

[0651] 针对许多趋化因子来测定表4中的亲合力成熟结合剂的特异性,并且显示于图9中,从而证明对靶标CXCR4具有高特异性,而与其它趋化因子G蛋白偶联受体(GPCR)的结合有限。

[0652] 3.2对亲合力成熟i体的表达水平、亲和力和特异性的改进

[0653] 当在ADCX-99的CDR1内进行在位置28处的G>K氨基酸取代和在位置31处的I>F氨基酸取代(在图1D中分别指定为X<sub>1</sub>和X<sub>3</sub>),以及在ADCX-99序列的CDR3内在位置89处进行A>Y氨基酸取代(在图1D中指定为Y<sub>4</sub>)时,观察到表达从10mg/L改进至14mg/L。这由对应于AM4-661的序列表示。AM4-661相对于ADXC-99的比对显示于图10A中。

[0654] 当在ADCX-99的CDR1中进行在位置28处的G>Y取代(在图1D中指定为X<sub>1</sub>)和在位置31处的I>Y取代(在图1D中指定为X<sub>3</sub>),以及在ADCX-99的CDR3中进行在位置82中的T>I(在图1D中指定为Y<sub>2</sub>)和在位置89处的A>Y取代(在图1D中指定为Y<sub>4</sub>)时,观察到对CXCR4的亲合力从>700nM改进至1nM,如由对应于AM4-272的序列所证实。比对显示于图10B中。

[0655] 观察到多肽AM3-114、AM5-245和AM3-523对CXCR4的特异性的改进。ADCX-99对CCR4的活性(由DiscoverXB-抑制蛋白测定所测定)34%被降低至在AM3-114、AM5-245和AM3-523的情况下分别-3%、-5%和-2%。所有三种多肽都具有在ADCX-99的CDR3中在位置80处的Y>W取代(在图1D中指定为Y<sub>1</sub>)和在ADCX-99的CDR1中在位置30处的D>G或H取代(在图1D中指定为X<sub>2</sub>)。比对显示于图10C中。

[0656] 实施例4-i体的半衰期改进

[0657] 4.1对CXCR4和人血清白蛋白的双重特异性

[0658] 通过以下方式来产生双重特异性i体:使18个残基的人血清白蛋白(HAS)结合肽(N末端)-RLIEDICLPRWGCLWEDD-(C末端)(描述于US 20100104588;Dennis MS等(2002) J.Biol.Chem.277,35035-35043中)缀合于AM3-114的C末端以产生AM3-114-Im7-SA21(SEQ ID NO:80)。Im7蛋白用于促进对缀合物的检测。

[0659] 通过表面等离子体共振来测量对CXCR4和HSA的亲和力,如图11中所示。双特异性CXCR4和HSA结合剂AM3-114-Im7-SA21显示对CXCR4的约5-10nM亲和力以及对人血清白蛋白(HSA)的约500nM亲和力(图11A)。在具有和不具有额外18个残基的HSA肽SA21的情况下,对CXCR4的亲和力不变(分别是图11C和D)。在未添加18个残基的HSA肽SA21的情况下,i体AM3-114不结合HSA(图11B)。因此,缀合物显示特异性结合CXCR4与HSA两者。

[0660] 4.2i体的聚乙二醇化

[0661] 使用位点特异性缀合方法(HiPEG™技术,PolyTherics,UK),使AM3-114-Im7-FH和AM4-746-Im7-FH[Im7-FH对应于N末端溶解性和纯化标签,其中Im7是大肠杆菌蛋白质(Hosse RJ等(2009) Anal Biochem 15;385(2):346-57),并且FH是flag+6His]缀合于30K线性或2x20K分支PEG以增加i体分子的流体动力学半径,并且因此降低肾和肝消除(Konterman等2011Curr Opin Biotech 22:868-8760)。

[0662] 4.3评估半衰期延长的i体

[0663] 在临床前药物动力学研究中,在小鼠中,与对照i体ADCX99-9H(9组氨酸标签)和AM3-114-Im7-FH(含有Im7蛋白与FLAG+6His标签两者)一起评估聚乙二醇化物质(AM3-114-30K PEG、AM3-114-2x20K PEG、AM4-746-2x20K PEG)和一种HSA肽缀合物(AM3-114-Im7-FH-SA21)。通过静脉内注射施用来向各组小鼠施用一次测试物品,如下表4中所述:

[0664] 表4向小鼠施用的测试物品

组号	治疗剂	剂量水平 (mg/kg)	剂量浓度 (mg/mL)	剂量体积 (mL/kg)	动物的 数目(雄 性)
[0665] 1	ADCX99-9H	3	1	3.0	9
2	AM3-114-IM 7-FH	3	1	3.0	9
3	AM3-114-Im 7-FH-SA21	2	1	2.0	9
4	AM4-746-2x 20K PEG	1.25	1	1.25	12
[0666] 5	AM3-114-30 K PEG	3	1	3.0	9
6	AM3-114-2x 20K PEG	1.25	1	1.25	12

[0667] 向组1、2和5中的动物施用的剂量体积是3mL/kg。

[0668] 向组3中的动物施用的剂量体积是2mL/kg。

[0669] 向组4和6中的动物施用的剂量体积是1.25mL/kg。

[0670] 在给药之后如下收集来自所有小鼠的一系列血液样品 (0.3mL, 2个时间点/小鼠, 3只小鼠/组/时间点):

[0671] 表5从小鼠采血的时机

组号	时间点
1	5、15、45、60和90分钟
2	5、15、45、60和90分钟
3	5分钟以及2、6、12小时以及1和3天
4	5分钟以及2、6、12小时以及1和3、5和6天
5	5分钟以及2、6、12小时、1和3天
6	5分钟以及2、6、12小时以及1、3、5和6天

[0673] 出于这个目的,各小鼠 (CD-1小鼠) 通过隐静脉或在异氟烷麻醉下通过心脏穿刺来取血,并且将样品收集至含有抗凝剂K<sub>2</sub>-EDTA的管中。将管放置在湿冰上直至处理时。在各动物的末次采血之后,通过颈部脱位来使它安乐死,并且丢弃而不进一步检查。

[0674] 在收集之后,离心 (约4°C) 样品,并且以两个单独等分试样回收所得血浆并冷冻 (≤60°C) 储存在经标注Protein LoBind 1.5mL管 (Eppendorf, 目录号022431081) 中。通过LC-MS/MS测定方法来测定ADCX99-9H、AM3-114-IM7-FH、AM3-114-Im7-FH-SA21、AM4-746-2x20K PEG、AM3-114-30K PEG和AM3-114-2x20K PEG浓度。样品预处理涉及将ADCX99-9H、AM3-114-IM7-FH、AM3-114-Im7-FH-SA21、AM4-746-2x20K PEG、AM3-114-30K PEG和AM3-114-2x20K PEG从CD-1小鼠血浆直接胰蛋白酶消化成特征肽 (sPeptide); GEKLTPNQQRIG用作内部标准物。鉴定化合物,并且历经0.500μg/mL至100.000μg/mL (对于ADCX99-9H、AM3-114-IM7-FH、AM3-114-Im7-FH-SA21、AM3-114-30K PEG和AM3-114-2x20K PEG) 和0.083μg/mL至16.667μg/mL (对于AM4-746-2x20K PEG) 的理论浓度范围进行定量。在标称-80°C下储存ADCX99-9H、AM3-114-IM7-FH、AM3-114-Im7-FH-SA21、AM4-746-2x20K PEG、AM3-114-30K PEG和AM3-114-2x20K PEG的储备溶液,并且在4°C下储存GEKLTPNQQRIG内部标准物。

[0675] 使用涡轮离子喷雾的AB Sciex API 5000或QTRAP 5500四极杆质谱仪用于检测ADCX99-9H、AM3-114-IM7-FH、AM3-114-Im7-FH-SA21、AM4-746-2x20K PEG、AM3-114-30K PEG和AM3-114-2x20K PEG。

[0676] AM3-114i体的半衰期由于添加SA21HSA结合肽以及由于添加PEG 30K和PEG 2x20K而延长,如图12以及表6A和6B中所证明。

[0677] 表6A在CD-1小鼠中静脉内注射之后的药物动力学参数,AAT-M4-438 (1/2)

制剂	性别	C <sub>0</sub> (ug/ mL)	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ug/ mL)	C <sub>max</sub> (SE) (ug/mL)	AUC <sub>0-t</sub> (ug*h/m L)	AUC <sub>0-t</sub> (SE) (ug*h/ mL)
ADCX99-9H/3 mg/kg	雄性	20.871	0.08	13.611	3.083	5.318	0.403
AM3-114-IM7-FH/3mg/kg	雄性	40.820	0.08	16.275	2.107	4.750	0.297
AM3-114-Im7-FH-SA21/2mg/kg	雄性	23.284	0.08	20.531	1.024	25.266	1.114
AM4-746-2x20K PEG/1.25 mg/kg	雄性	26.168	0.08	25.559	2.023	175.057	8.650
AM3-114-30K PEG/3 mg/kg	雄性	78.799	0.08	76.652	1.508	495.670	16.804
AM3-114-2x20K PEG/1.25 mg/kg	雄性	25.652	0.08	25.442	2.267	380.960	23.559

[0679] 表6B在CD-1小鼠中静脉内注射之后的药物动力学参数,AAT-M4-438 (2/2)

制剂	性别	AUC <sub>0-∞</sub> (ug*h/mL)	T <sub>1/2</sub> (h)	λ <sub>Z</sub> (1/h)	T <sub>1/2</sub> <sup>*</sup> (h)	V <sub>D</sub> (mL/ kg)	Cl <sub>CR</sub> (mL/h /kg)
ADCX99-9H (6H)/3 mg/kg	雄性	5.417	1.50	2.6660	0.26	207.73 9	553.838
AM3-114-IM7-FH/3 mg/kg	雄性	4.767	1.50	3.8809	0.18	162.15 5	629.303
AM3-114-Im7-FH-SA21/2 mg/kg	雄性	25.544	6.00	0.7279	0.95	107.57 1	78.296
AM4-746-2x20K PEG/1.25 mg/kg	雄性	175.834	72.00	0.0674	10.29	105.53 5	7.109
AM3-114-30K PEG/3 mg/kg	雄性	499.831	72.00	0.0585	11.85	102.61 8	6.002
AM3-114-2x20K PEG/1.25 mg/kg	雄性	381.849	144.00	0.0360	19.24	90.854	3.274

[0681] 4.4XTEN蛋白质序列与i体的融合

[0682] 作为聚乙二醇化的一种替代方案,本发明者考查XTEN方法的效用,所述方法利用向i体中添加约400个残基的准重复序列来增加i体在体内的半衰期,继之以用于纯化/检测的C末端His标签。XTEN序列被工程改造成固有无结构化并因此具有非免疫原性,并且也具有高度亲水性,此应在表达/纯化/下游应用期间有助于i体的溶解性和稳定性(Schellenberger等,(2009)Nature Biotech;27(12):1186-1190)。

[0683] 将AM3-114克隆至细菌表达载体(pET26)中,并且进行初始表达试验。蛋白质印迹显示与抗His抗体具有反应性的条带,其不存在于非诱导对照的情况下,从而强烈表明AM3-114-XTEN构建体实际上被表达。AM3-114-XTEN构建体的预测MW是约50kDa,而目标条带处于刚好超过100kDa的表观MW下(数据未显示)。这与归因于高度无结构化和酸性XTEN基团导致i体的电泳迁移性显著降低的预期迁移性变动一致,这是一种先前已对于其它无结构化蛋白质观察到的现象。

[0684] 通过流式细胞计量术来测试这个物质与RAMOS细胞上的CXCR4的结合,并且显示其以剂量依赖性方式进行结合。结合仅略微小于AM3-114i体,从而指示114-XTEN具有活性。在SPR中测试AM3-114-XTEN,并且发现它仍然保留与脂质粒子上的CXCR4的结合,即使亲和力略微降低。引起关注的是,亲和力较低似乎主要归因于缔合速率,因为解离速率类似于无XTEN的i体(数据未显示)。

[0685] 4.5i体的PAS化

[0686] 使i体的半衰期延长的另一方法在于使用PAS化技术。将使i体与由数百个小氨基酸脯氨酸、丙氨酸和/或丝氨酸(“PAS”)残基组成的多肽序列遗传融合。这些PAS序列,特别是PAS(400)和PAS(600)在水溶液中采用无规卷曲结构,因此产生允许延长蛋白质在血液中的半衰期的较大流体动力学体积,也已报道与这些序列融合的蛋白质具有极低免疫原性和毒性(Schlapschy等Protein Eng Des Sel(2013)26:489)。已显示这些序列在融合于靶标蛋白质时使在小鼠中的半衰期延长,以及改进所述靶标蛋白质的药物品质。

[0687] 将使i体在C末端融合于PAS序列,并且在大肠杆菌中表达蛋白质。

[0688] 实施例5-i体的功能特征

[0689] 5.1对CXCR4转染细胞的cAMP的调节

[0690] DiscoverX已开发一组稳定表达通过cAMP来进行信号传导的非标记的GPCR的细胞

系。Hit Hunter® cAMP测定使用由DiscoverX开发,用β-半乳糖苷酶(β-Gal)作为功能性报道子,称为酶片段互补(EFC)的技术,以均质非成像测定形式通过抑制性调控G蛋白(Gi)和刺激性调控G蛋白(Gs)第二信使信号传导来监测GPCR的活化。所述酶被分成两个互补部分:用于酶接受体的EA和用于酶供体的ED。使ED融合于cAMP,并且在测定中,与由细胞产生的cAMP竞争结合cAMP特异性抗体。活性β-Gal通过外源性EA互补于任何未结合ED-cAMP来形成。活性酶可接着转化化学发光底物,从而产生可在标准微板读取器上可检测的输出信号。

#### [0691] 方法

##### [0692] 细胞处理

[0693] 根据标准程序从冷冻储备物扩增cAMP Hunter细胞系。接着以20μL的总体积将细胞接种至白壁384孔微板中,并且在37°C下孵育适当时间,随后进行测试。根据制造商说明书,使用DiscoverX HitHunter cAMP XS+测定来测定cAMP调节。

##### [0694] 拮抗剂形式

[0695] 对于拮抗剂测定,使表达CXCR4的Hunter细胞与样品一起预孵育,随后在EC80浓度下进行激动剂攻击。(对于Gi cAMP测定,使用15μM的毛喉素浓度)。从细胞抽吸培养基,并且用10μL 1:1HBSS/Hepes:cAMP XS+Ab试剂替换。添加AMD3100或针对CXCR4的i体的5μL 4X储备物至细胞中,并且在37°C或室温下孵育30分钟。添加5μL 4X EC80激动剂SDF-1至细胞中,并且在37°C或室温下孵育30或60分钟。对于Gi偶联的GPCR,包括EC80毛喉素(使用15μM的毛喉素浓度)。

##### [0696] 信号检测

[0697] 在适当化合物孵育之后,通过与20μL cAMP XS+ED/CL溶解混合物一起孵育1小时,随后与20μL cAMP XS+EA试剂一起在室温下孵育3小时来产生测定信号。在信号产生之后,用PerkinElmer Envision™仪器读取微板来检测化学发光信号。

#### [0698] 结果

[0699] 接着测定通过对照i体(21H5)、AMD3100和i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746、AM4-1121抑制cAMP(IC<sub>50</sub>)。数据显示于表7和图13中。诸如CXCR4的趋化因子受体主要为Gai偶联的,并且因此通过第2信使cAMP进行信号传导。调控环化AMP(cAMP)对于SDF-1与各种细胞信号传导之间的相互作用可能是重要的。考查这组CXCR4i体在体外调节cAMP水平的能力。先前描述的拮抗剂AMD3100显示对cAMP的剂量依赖性效应抑制,具有615nM的预期IC<sub>50</sub>。i体极其有效阻断这些细胞中由SDF-1诱导的cAMP降低。实际上,所有i体都具有低于AMD3100的IC<sub>50</sub>值。基于IC<sub>50</sub>结果,CXCR4结合性i体AM3-114是强力cAMP抑制剂。

[0700] 这些数据表明i体可结合CXCR4,并且抑制关键功能性信号传导诸如控制cAMP调节的Gai信号传导路径,而不阻断影响钙流动的Gq路径。这可为为何i体可阻断炎症和纤维化,但不动员干细胞(此在以长期疗法使用时将为优势)的原因。

[0701] 表7通过cAMP测定以拮抗剂模式测定的针对CXCR4的化合物的IC<sub>50</sub>

	样品	cAMP抑制 IC50 (nM)
[0702]	21H5 (对照i体)	>10uM
	AMD3100	615
	AM3-114	99
	AM4-1121	125
	AM3-523	225
	AM4-746	115
	AM4-272	300

[0703] 5.2对CXCR4转染细胞的钙的调节

[0704] 用i体或AMD3100处理CXCR4转染细胞30分钟,接着用100ng/ml的SDF-1刺激30分钟。接着测定通过对照或i体抑制Ca<sup>2+</sup>流入(IC<sub>50</sub>)。

[0705] 材料

[0706] 细胞

[0707] 稳定表达人CXCR4受体的哺乳动物细胞由Multispan, Inc内部产生(目录号C1004-1)。使用的对照激动剂是SDF-1 (Peprotech, 目录号300-28A)。

[0708] 化合物

[0709] 以液体形式在40uM或10mM下测试7种化合物/i体(21H5、AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746、AM4-1121和AMD3100)。AMD3100(也称为普乐沙福(plerixafor)或普乐沙福(Mozobil))是CX CR4的小分子拮抗剂,并且可商购获得。它用作阳性对照。

[0710] 钙测定试剂盒

[0711] Screen Quest™ Fluo-8免洗涤试剂盒(AAT Bioquest, 目录号36315)

[0712] 仪器

[0713] FLIPR 384 (Molecular Devices)

[0714] 方法

[0715] 钙测定

[0716] 将细胞以适当密度接种于384孔板中,并且培养过夜。根据制造商方案进行钙测定。添加钙染料上样缓冲液至细胞中,并且在37℃下孵育1小时。监测钙流动120秒,其中在第19秒将化合物注射至孔中。在拮抗剂模式中,使载体或化合物与细胞一起预孵育30分钟,随后用对照激动剂在从剂量-响应曲线获得的EC80浓度下进行钙流动测量。数据显示于表8和图14中。因为钙流动由Gq路径引导,所以这个结果表明所有测试i体都不显著调节Gq路径。因此,i体不调节钙流动。

[0717] 表8钙抑制测定

	钙抑制 EC50 (nM)
[0718]	21H5
	>10uM

[0719]	AMD3100	500nM
	AM3-114	uM
	AM4-1121	uM
	AM3-523	uM
	AM4-746	uM
	AM4-272	uM

[0720] 5.3对CXCR4转染细胞的 $\beta$ -抑制蛋白的调节

[0721] 在如See, Heng B等(2011) Assay and Drug Development Technologies 9(1): 21-30中所述的 $\beta$ -抑制蛋白BRET测定中考查i体与CXCR4的结合。在10种浓度下在具有和不具有100nM SDF-1的情况下,在添加‘媒介物’和‘SDF-1+媒介物’对照下考查i体以表征i体是否是CXCR4活性的激动剂或拮抗剂。

[0722] 各结合剂的 $\beta$ -抑制蛋白BRET测定的结果提供于表9中以及图15中。AMD3100具有18nM的IC<sub>50</sub>,而亲本CXCR4i体ADCX-99对 $\beta$ -抑制蛋白募集具有极其微弱作用,可能归因于对CXCR4的亲和力较低(643nM),如由SPR所示。i体组IC<sub>50</sub>值在164nM(对于AM3-114)与127, 13nM(对于AM3-523)之间的范围内。这些 $\beta$ -抑制蛋白募集变化是由于改变结合区中的1-10个氨基酸。

[0723] 表9通过 $\beta$ -抑制蛋白测定所测定的i体的亲和力

蛋白质	在 $\beta$ -抑制蛋白BRET测定中的IC <sub>50</sub> (nM) (拮抗剂模式, 在 100 nM SDF-1 存在下)
23B2	无活性
AMD3100	18
mAb-12G5	64
SDF-1	NA
ADCX-99	无活性
AM1-126	610
AM1-320	1419
AM3-114	164
AM3-920	~uM
AM4-1121	796
AM4-613	1826

[0725]	AM3-523	12713
	AM4-661	1544
	Am3-466	6322
	AM5-245	~uM
	AM4-272	861
	AM4-746	741

[0726] 实施例6-i体的结合特征

[0727] 在表面上表达人CXCR4的任何细胞都可用于考查本文所述的CXCR4结合分子或多

肽(i体)结合天然细胞表面CXCR4的能力。所述细胞系的实例包括人T细胞系、CEM以及其它细胞系诸如Ramos、Raji、Namalwa、L540、DMS79、MDA-MB-231、MDA-MB-361、MDA-MB-549、MOLT-4、DU-4475、DU-145、PC3、LNcaP、SW480、HT29、NCI-H69和HL60。

[0728] 6.2通过流式细胞计量术分析来获得i体的体外结合亲和力

[0729] 用i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746和AM4-1121 (10 $\mu$ M、1 $\mu$ M和0.001 $\mu$ M) 处理细胞,并且通过流式细胞计量术分析来评估染色强度。测试的细胞系是T47D (CXCR4阴性)、MDA-MB-231 (低CXCR4表达) 以及Namalwa、NCI-H69、Jurkat、CCRF-CEM、A498、Ramos (高CXCR4表达)。

[0730] 方法

[0731] 收集细胞系,并且将细胞转移至96孔组织培养板中(2x10<sup>5</sup>个细胞/孔)。接着在1000rpm、4 $^{\circ}$ C下将培养板离心5分钟。用100uL含有测试抗体的PBS缓冲液再混悬细胞,并且在4 $^{\circ}$ C下孵育60分钟。用300uL冰冷FACS缓冲液洗涤细胞两次,1000rpm、5分钟,并且用100uL含有抗His-PE抗体(针对i体)的PBS缓冲液再混悬并在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中孵育40分钟。接着用300uL冰冷FACS缓冲液洗涤细胞2次,1000rpm、5分钟,并且细胞用300uL混悬缓冲液再混悬并根据标准方法经受FACS分析。

[0732] 通过流式细胞计量术证明的代表性i体AM3-114对T47D细胞(A)、Namalwa细胞(B)、MOLP8(C)、MOLT4(D)、Jurkat细胞(E)、CCRF-CEM(F)、A498(G)、Ramos(H)、NCI-H69(I)和HL-60(J)上的CXCR4的结合亲和力显示于图16-1至16-3中。用三种i体浓度(10 $\mu$ M、1 $\mu$ M和0.001 $\mu$ M)测试细胞系,例外之处是Namalwa细胞,其也用i体在4.7、2.1、0.47、0.21、0.1和0.01 $\mu$ M下测试。

[0733] 实施例7-由i体与SDF-1竞争结合CXCR4

[0734] 7.1i体竞争结合CXCR4的SPR测定

[0735] 如WO 2005/042695中所述,利用含有CXCR4的脂蛋白(Integra Molecular)进行竞争研究以测定i体抑制SDF-1结合CXCR4的能力。

[0736] 通过表面等离子体共振(SPR)来测试一组CXCR4i体与配体SDF-1竞争的能力。图17显示两种i体的实例,一种i体以剂量依赖性方式与SDF-1竞争(AM3-114,图17A),并且一种i体不充分竞争(AM4-272,图17B)。将CXCR4脂质粒子与i体和SDF-1一起在2nM、50nM和200nM下共注射。

[0737] 表12显示各i体与SDF-1竞争结合CXCR4阳性脂质粒子的程度(由+指示)。

[0738] 表12与SDF-1竞争结合CXCR4阳性脂质粒子的程度

[0739]

i体	与SDF-1的竞争
AM4-661	+
AM3-466	++
AM3-114	+++
AM4-272	+/-
AM3-523	++
AM4-746	++
AM4-1121	++
AM3-920	++

AM3-126	-
---------	---

[0740] 7.2就各种CXCR4结合分子来说的i体竞争结合CXCR4的流式细胞计量术测定

[0741] 使用流式细胞计量术来评估含有N末端序列EAEA的CXCR4i体 (AM3-114-6H、AM4-272-6H和AM3-523-6H) 与在细胞的表面上表达的CXCR4的结合以及SDF-1竞争结合的能力。使i体与Ramos细胞一起在100 $\mu$ l FACS缓冲液 (1xPBS和2%FCS) 中在4 $^{\circ}$ C下孵育60分钟。在用2ml冰冷FACS缓冲液洗涤两次之后,在1,500rpm下离心细胞5分钟,将细胞再混悬于100 $\mu$ l含有抗His PE抗体 (MACS Molecular, 定购号:130-092-691) 的FACS缓冲液中,并且在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中孵育40分钟。这个测定是稳健的,并且可用于考查i体与SDF-1和其它拮抗剂之间的竞争。在这个情况下,使各i体 (0.5 $\mu$ M) 与细胞一起单独或在过量SDF-1 (2 $\mu$ M)、MAb12G5 (2 $\mu$ M) 和AMD3100 (2 $\mu$ M) 存在下孵育。在添加2 $\mu$ M AMD3100后,所有三种i体的结合都降低 (图18)。SDF-1能够与AM4-272充分竞争,但仅与AM3-114和AM3-523部分竞争。所有三种i体都与AMD3100竞争,从而指示在i体的结合位点与这个小分子的结合位点之间存在类似性。抗CXCR4MAb 12G5能够几乎完全降低523的结合,并且部分阻断AM3-114和AM4-272的结合。

[0742] 实施例8-由i体对CXCR4表达性细胞的迁移的抑制

[0743] 可使用乳腺癌细胞系MDA-MB-468和前列腺癌细胞系PC3考查本文公开的CXCR4结合分子或多肽 (i体) 抑制由SDF-1诱导的迁移的能力,所述细胞系在它们的转移潜力以及体外和体内性质方面得以充分表征 (Kaighn等1979 *Invest Urol*. 17 (1) :16-23. Yoneda等2000 *Cancer* 88:2979-88)。MDA-MB-468细胞具有侵袭性,并且从裸小鼠的原发性乳腺脂肪垫肿瘤向肺转移。方法描述于Byeong-Chel Lee等 (2004) *Mol Cancer Res* 2;327中。简而言之,添加细胞至纤维结合蛋白 (50 $\mu$ g/ml) 涂布的transwell插件 (Costar Corp., Cambridge, MA) 中。接着使MDA-MB-468细胞和PC3细胞在无血清培养基中饥饿过夜,并且将接着与抗CXCR4i体一起孵育,随后将它们施加于8 $\mu$ m孔径transwell插件中。将细胞于500 $\mu$ L RPMI 1640中在 $7 \times 10^4$ /ml的最终浓度下混悬至上部腔室中。添加连续稀释的重组SDF-1至下部腔室中。在孵育3至9小时之后,通过用棉拭擦拭来移除过滤器的上表面上的细胞,并且根据制造商说明书,使用Hema3试剂盒 (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ) 来固定和染色下部腔室上的迁移细胞。接着以四个单独显微视野对每个视野的细胞迁移进行计数 (Kashima等 *Cancer Sci* 105 (2014) 1343-1350; Zhu等 *Molecular Cancer Research* (2013) 11 (1) 86-94)。

[0744] 实施例9-由i体对血管生成的抑制

[0745] 使HUVEC中的表面SDF-1或CXCR4失活会损害HUVEC在基质胶涂布表面上排列成管状结构的能力。可根据Liang等, *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 August 3; 359 (3) : 716-722测试本公开的i体对HUVEC形成基质胶依赖性管状结构的能力的影响。为进行毛细血管形成测定,使CXCR4i体拮抗剂与人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 一起分别在100nM、5 $\mu$ M和1 $\mu$ g/ml浓度下在室温下预孵育10分钟,随后进行接种。接着将细胞以每毫升M199培养基 (具有1%FBS和200ng/ml SDF-1)  $1 \times 10^5$ 个细胞的密度涂铺于基质胶层上。在18小时之后,在4倍放大倍数下在五个随机视野中将各孔拍照,并且对它们的管状网络结构的数目计数。

[0746] 实施例10-由i体在体外对肿瘤细胞增殖的抑制

[0747] 在如 (Lapteva (2005) *Cancer Gene Therapy* 12, 84-89) 中所述的MTT细胞增殖测定中考查本文公开的CXCR4分子或多肽 (i体) 在体外抑制以上提及的Ramos肿瘤细胞的增殖

的能力,所述Ramos肿瘤细胞是表达CXCR4的人伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)细胞系。使细胞在96孔组织培养板中生长,并且用媒介物或抗CXCR4i体处理。接着使细胞与MTT溶液一起孵育约4小时。在这个孵育时期之后,形成水不溶性甲臞染料。在溶解之后,使用扫描多孔分光光度计(ELISA读取器)对甲臞染料定量。揭示的吸光度与细胞数目直接相关。

[0748] 发现i体AM3-114在10 $\mu$ M下能够大致上抑制RAMOS细胞的生长。这个作用在添加i体之后24小时与48小时之间特别明显,但在添加i体之后72小时仍然存在对细胞的实质性抑制。如所预期,AMD3100也能够在这个时间范围内抑制细胞生长。两种对照i体(21H5和AM8-7)对细胞生长具有少许作用。i体AM4-272存在较小抑制作用,但AM3-523在这个测定中不具有可观察作用。i体对正常HEK细胞不具有作用。

#### [0749] 实施例11-由i体对凋亡的诱导

[0750] 根据如Mishra M等(2011) J Cell Mol Med 15(11):2462-77中所述的方法,在凋亡测定中考查本发明的i体在Ramos肿瘤细胞(人伯基特氏淋巴瘤细胞系)中诱导凋亡的能力。使I体与Ramos细胞一起孵育,并且在24或72小时之后通过流式细胞计量术来考查。用作经典凋亡标记的膜联蛋白V和碘化丙啶对细胞染色。将双重阳性细胞评估为已变得凋亡。三种CXCR4i体(AM3-114-6H、AM4-272-6H和AM3-523-6H)能够强烈诱导凋亡(图19)。未处理细胞充当阴性对照以显示细胞否则是健康的。毒胡萝卜素是一种充分描述的凋亡诱导剂,并且显示预期凋亡水平。AMD3100不诱导Ramos细胞的显著凋亡。这与显示人抗CXCR4mAb MDX-1338能够诱导Ramos细胞的凋亡,但AMD3100不能(Kuhne等Clin Cancer Res (2013) 19(2):357-66)的先前报道一致。

#### [0751] 实施例12-i体在体内与肿瘤的结合

[0752] 12.1-i体对已用CCRF-CEM细胞静脉内注射的SCID/bg小鼠的脾和肝中的肿瘤的染色

[0753] 对已用CCRF-CEM细胞静脉内注射,并且在27天之后处死的SCID/bg小鼠的脾和肝进行使用抗CXCR4i体(AM3-114-6H、AM4-272-6H和AM3-523-6H)在130 $\mu$ g/ml下的免疫组织化学染色。使组织在10%中性缓冲福尔马林中固定过夜,并且随后转移至组织盒中并放置在70%乙醇中。接着对组织进行石蜡包埋。通过使含有4 $\mu$ m切片的载片依次在以下各物中孵育来使它们脱石蜡和水化:二甲苯,更换两次,各次5分钟;接着100%乙醇,更换两次,各次3分钟;70%乙醇,2分钟;50%乙醇,2分钟;以及蒸馏水,5分钟。通过在80 $^{\circ}$ C烘箱中在10mM柠檬酸溶液(pH 6.0)中将载片孵育过夜来进行抗原修复。随后在PBS中洗涤载片,并且在含有0.4% $H_2O_2$ 的10%甲醇中进行可渗透化处理30分钟。在可渗透化之后,将载片用CXCR4特异性i体(AM3-114-6H、AM4-272-6H或AM3-523-6H)和对照i体(21H5-6H)在4 $^{\circ}$ C下染色过夜。所有载片都随后用生物素化抗His标签抗体(Miltenyi Biotech)染色,并且使用HRP-DAB细胞和组织染色试剂盒,根据制造商说明书(R&D systems)进行显色。

[0754] 130 $\mu$ g/ml的AM3-114-6H和AM4272-6H使得用这些细胞攻击的免疫损害小鼠的脾和肝中的CCRF-CEM细胞染色(图未显示)。

#### [0755] 12.2-实体肿瘤

[0756] 可使用Ramos皮下肿瘤细胞模型(或Namawala细胞或MDA-MB-231或MDA-MB-468或PC3细胞)来考查CXCR4结合分子或多肽(i体)在体内抑制确立实体肿瘤的增殖的能力。在这个测定中,将10x10<sup>6</sup>个细胞/小鼠植入各小鼠的侧腹区域中,并且使其生长至40mm<sup>3</sup>的平均尺

寸,由肿瘤的长度x宽度x高度/2所计算。小鼠接着接受腹膜内(ip)注射第一剂i体(指定为治疗的第0天)和在第7天腹膜内第二剂抗体。各组小鼠用(i)媒介物、(ii)i体或(iii)抗CD20阳性对照治疗。在给药后第0天与第30天之间,在定期间隔(约2-3次/周)下测量肿瘤体积和小鼠体重。

[0757] 这个测定模型也可用于评估i体增加小鼠的存活时间的能力。

[0758] 12.3-转移

[0759] 可在动物模型中测试本公开的i体的抗转移功效。对于乳腺癌转移,静脉内注射MDA-MB-231细胞以产生实验性转移模型。通过尾部静脉来给予6至8周龄雌性裸小鼠 $1.5 \times 10^6$ 个MDA-MB-231乳腺癌细胞与i体(1mM,小于5分钟预孵育)混合的注射液(10/组)。从次日开始,通过腹膜内注射来给予治疗组中小鼠每日4mg/kg的i体。在注射肿瘤细胞之后35天将动物处死。收集整个肺组织并切片以进行人CXCR4的实时RT-PCR以及H&E组织染色来用显微镜评估每个切片五个视野中的转移性肿瘤面积。

[0760] 对于头颈部癌动物模型,如所描述(Yoon Y等,(2007)Cancer Res 67:7518-7524)以与MDA-MB-231细胞相同的方式来注射686LN-Ms细胞的转移性亚克隆。

[0761] 对于葡萄膜黑素瘤微转移小鼠模型,在第0天,各小鼠用 $1 \times 10^6$ 个表达HGF/TGF- $\beta$ /CXCR4/MMP2的野生型OMM2.3细胞接种至右眼的后房中。在第3天,通过腹膜内注射来用本发明的i体每日治疗小鼠,而用0.1mL 45%(2-羟丙基)- $\beta$ 环糊精注射对照小鼠。在第7天,摘除具有肿瘤的眼。通过组织学方法来检查肿瘤的生长。在第28天,收集肝组织并固定在10%福尔马林中,处理,H&E染色,并且在显微镜下对肝微转移的数目计数。用显微镜检查六个穿过肝的中心的切片中微转移(100mm直径)的存在,并且测定每个切片的平均微转移数目(Liang等PLoS One.2012;7(4):e34038)。

[0762] 实施例13-由i体对HIV侵袭的抑制

[0763] 体外HIV抑制测定用于证明i体能够抑制HIV进入CXCR4表达性T细胞中。AM3-114能够以与AMD3100类似的功效阻断HIV进入CXCR4表达性T细胞中,如图20中所示。AM3-114和AMD-3100具有50nM的 $IC_{50}$ ,而阴性对照i体(21H5)如所预期在抑制测定中不具有作用。

[0764] 细胞活力

[0765] 在第二实验中,证明i体不导致用于HIV感染的细胞的活力损失。

[0766] 方法

[0767] 对于HIV抑制测定,在添加i体(阴性对照i体21H5以及抗CXCR4i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746或AM4-1121)之前24小时,将NP2-CD4/CXCR4细胞( $1 \times 10^4$ 于100 $\mu$ l中)接种于平底96孔板中。接着从细胞移除培养基,并且用100 $\mu$ l具有5倍稀释的i体的新鲜培养基替换,在37 $^{\circ}$ C下持续16小时。CXCR4i体的浓度范围是25 $\mu$ g/ml至0.008ug/ml。在未处理孔中维持PBS的浓度(5.8%,vol/vol)。在此之后,移除培养基并用新鲜培养基替换。在整个随后培养时期中维持i体浓度。在37 $^{\circ}$ C下孵育NP2-CD4/CXCR4细胞总计72小时。根据制造商方案,使用CellTitre-Glo发光细胞活力测定(Promega)来评估各孔中的细胞活力。使用FLUOStar微板读取器(BMG)测量发光。为测定在抗体存在下的细胞活力百分比,将用抗体处理的细胞中的荧光素酶的量表示为相对于未处理细胞中的荧光素酶的量百分比。结果呈现于图21中。

[0768] 对病毒进入的抑制

[0769] 所有CXCR4i体都似乎导致显著水平的对两种使用CXCR4的HIV-1包膜病毒株NL4.3和1109-F-30的抑制。NL4.3是一种实验室改适包膜,而1109-F-30是一种来自慢性感染个体的C亚型临床包膜。i体不抑制无关病毒VSVG的进入,所述VSVG是来自水泡性口膜炎病毒的包膜,其在结合无关受体之后经受胞吞作用。结果呈现于图22中。

[0770] 阴性对照i体21H5对病毒株1109-F-30具有少许作用,但对病毒株NL4.3具有一定侵袭作用。比较而言,i体AM3-114、AM4-746和AM4-1121全都极其充分抑制两种HIV病毒株,具有约80nM的 $IC_{50}$ 。此外,当使i体AM3-114和AM4-746缀合于大小是30K(线性)和2x20K(分支)的PEG时, $IC_{50}$ 始终保持约80nM。也与较早实验一致,AM4-272在阻断HIV感染方面的有效性最小。

[0771] 测定聚乙二醇化i体阻断HIV感染进入宿主细胞中的能力。测定缀合有20K PEG的AM3-114、缀合有30K PEG的AM3-114和缀合有30K PEG的AM4-746阻断三种不同病毒株的HIV侵袭的能力。将这些与非聚乙二醇化形式的i体进行比较。AM3-114与AM4-746两者均能够以与非聚乙二醇化形式类似的方式阻断HIV侵袭,其中相较于非聚乙二醇化i体,聚乙二醇化i体的效能仅略微降低(图23-1)。

[0772] 聚乙二醇化i体和非聚乙二醇化i体不能阻断由依赖于CCR5达成进入的HIV病毒株(YU-2)向宿主细胞中的HIV进入(图23-2)。这证明i体的抗CXCR4活性对阻断HIV进入至关重要。

#### [0773] 方法

[0774] 在感染之前24小时,将NP2-CD4/CXCR4细胞( $1 \times 10^4$ 于100 $\mu$ l中)接种于平底96孔板中。将抗CXCR4抗体再混悬于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。在感染之前,从细胞移除培养基,并且用100 $\mu$ l具有5倍稀释的i体(在x2浓度下)的新鲜培养基替换,在37 $^{\circ}$ C下持续30分钟。CXCR4抗体的浓度范围是25 $\mu$ g/ml至0.008 $\mu$ g/ml。在未处理孔中维持PBS的浓度(5.8%, vol/vol)。在37 $^{\circ}$ C下用于100 $\mu$ l中的200TCID<sub>50</sub>的Env假型荧光素酶报道子病毒感染NP2-CD4/CXCR4细胞12小时。在此之后,移除接种物并用新鲜培养基替换。在整个随后培养时期中维持i体浓度。在37 $^{\circ}$ C下孵育NP2-CD4/CXCR4总计72小时。根据制造商方案,通过细胞溶解产物中的荧光素酶活性(Promega)来度量HIV-1进入水平。使用FLUOStar微板读取器(BMG)测量发光。通过模拟感染细胞来评估背景活性,并且从所有孔中减去。为计算在i体存在下的HIV-1进入百分比,将用i体处理的细胞中的荧光素酶的量表示为相对于未处理细胞中的荧光素酶的量百分比。

#### [0775] 实施例14-缺乏由i体达成的干细胞动员

[0776] 普乐沙福或AMD3100是小分子双环拉胺(bicyclam) CXCR4抑制剂,其已被核准与G-CSF组合用于HSC动员。已知先前技术的CXCR4抑制剂会导致干细胞动员。如这个实施例中所示的实验中所示,本公开的i体缺乏导致干细胞动员的能力。

[0777] 14.1评估CXCR4抗体对各种造血细胞的特异性。

[0778] 为确认CXCR4抗体(FLAG标记的)与各种造血细胞群体的直接结合,用5种CXCR4i体(AM4-272、AM4-746、AM4-1121、AM3-114或AM3-523)的混合物染色从C57/BL6小鼠收集的骨髓细胞,接着用荧光抗FLAG抗体进行二级标记。针对谱系、祖细胞和HSC标志物对这些细胞染色,并且对各种造血细胞群体评估CXCR4表达。这个实验的结果证实CXCR4i体对原代小鼠造血细胞的活性。对从人源化NSG小鼠收集的骨髓细胞进行相同实验以证实CXCR4i体对原

代人造血细胞群体的活性(数据未显示)。

[0779] i体全都能够结合呈CD34<sup>+</sup>和CD38<sup>-</sup>的骨髓细胞和人脐带血。

[0780] 14.2小鼠LSK和LSKSLAM细胞的动员

[0781] 为获得在使用CXCR4i体造血干细胞动员的证据,通过静脉内注射来用CXCR4i体(AM4-272、AM4-746、AM4-1121、AM3-114或AM3-523)注射小鼠(5只小鼠/组)。在1和3小时之后,使小鼠安乐死并收集外周血液(PB)。将脾收集并称重以评估脾肿大(脾的肿大)。对PB计数以评估如图24A中所示的白血细胞含量。使样品溶解以移除红血细胞,并且涂铺4000个细胞以获得LPP(低增殖潜力)和CFU-HPP(集落形成单位-高增殖潜力)集落(在涂铺后7天进行集落计数)。其余细胞用抗体混合物染色以评估谱系定型的干细胞和祖细胞含量。流式细胞计量分析用于计算每体积PB的谱系定型细胞、造血干细胞和祖细胞以及富集的HSC的数目。相较于阳性对照AMD3100,用任何i体(AM4-272、AM4-746、AM4-1121、AM3-114或AM3-523,图24A)都未检测到白血细胞的动员。在图24B中显示相对于阳性对照AMD3100,缺乏鼠Lin<sup>-</sup>、Sca-1<sup>+</sup>、c-Kit<sup>+</sup>(LSK细胞)的动员。当相较于阳性对照AMD3100时,i体未实现对LSK细胞的动员。

[0782] 图24C显示缺乏由i体对Lin<sup>-</sup>、Sca-1<sup>+</sup>、c-Kit<sup>+</sup>、CD150<sup>+</sup>、CD48<sup>-</sup>、(CD34<sup>-</sup>)LSKSLAM细胞的动员。再次,对于所有i体都未观察到动员。

[0783] 14.3人CD34<sup>+</sup>细胞的动员

[0784] 为获得在使用CXCR4i体人CD34<sup>+</sup>干细胞和祖细胞动员的证据,在人源化NODSIL2R $\gamma$ (NSG)小鼠中进行以上动员实验。NSG小鼠具有严重免疫缺陷性并缺乏成熟T细胞、B细胞和NK细胞,并且具有严重缺陷性先天免疫性,此允许移入人细胞而无随后排斥。用新鲜分选的CD34<sup>+</sup>脐带血细胞移植NSG小鼠,并且在确认阳性人CD45/CD34移入(约4-5周)后用作为干细胞动员的小鼠模型。

[0785] 用21H5i体、CXCR4i体(AM3-114和AM3-523)和阳性对照AMD3100处理人源化NSG小鼠,所述AMD3100先前已证明在这个模型中产生显著CD34<sup>+</sup>细胞动员。

[0786] 收集经动员外周血液并评估CD34<sup>+</sup>(人干细胞和祖细胞)。

[0787] 如图25中所示用i体AM3-114和AM4-523进行的初步实验证明在人源化NODSIL2R $\gamma$ (NSG)小鼠模型中,相较于阳性对照AMD3100,这些i体不动员干细胞。这个研究结果是重要的,并且代表与先前技术的已知会导致干细胞动员的CXCR4抑制剂的偏离。

[0788] 14.4确认i体与干细胞的结合

[0789] 为确定CXCR4i体是否结合HSC,评估针对人CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞的体外结合分析。如先前所述(Nilsson SK等,2005 15;106(4):1232-9;Grassinger,2009 2;114(1):49-59)收集脐带血(CB)和人骨髓(BM)。如先前所述(Grassinger,2009)分离富集的人BM CD34<sup>+</sup>细胞和纯化的CB CD34<sup>+</sup>细胞。依序用CXCR4i体(10 $\mu$ g/ml)、His抗体-PE和含有CD34-FITC(BD Biosciences#348053)和CD38-BV421(BD Horizon#562444)的抗体混合物染色人CB和BM CD34<sup>+</sup>细胞和huNSG BM,用PBS(0.5%BSA)洗涤,并且如先前所述(Grassinger,2009)在Cytopeia Influx(BD)上通过流式细胞计量术来分析。对于分析人和鼠BM和PB,在10-20,000个细胞/秒下分析多达5 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞。使用FlowJo 10软件(FlowJo,LLC)分析数据。对于分析huNSG BM,也将huCD45-PECy7(BD Biosciences#557748)和muCD45-BUV395(BD Biosciences#564279)包括在抗体混合物中。来自人CB和BM的HSC定义为CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>,并且

来自huNSG小鼠的HSC定义为 $\mu\text{CD45}^{-}\text{huCD45}^{+}\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}$ 。评估来自3个个别供体的CB和BM样品以及来自3个个别huNSG小鼠的BM。

[0790] I体AM3-114、AM4-272和AM3-523以递减亲和力有效结合人脐带血HSC(图26)。AM3-114也有效结合人骨髓HSC和从人源化NODSCIDIL2R $\gamma^{-/-}$ (huNSG)小鼠收集的骨髓(图26)。

[0791] 实施例15-由i体预防纤维化

[0792] 15.1角膜碱灼伤模型

[0793] 可使用如Cai X等(2014) PLoS ONE 9(2):e88176中所述的角膜碱灼伤模型来考查通过i体的纤维化诱导(角膜新血管化(NV))。方法涉及用腹腔内注射60mg/kg的戊巴比妥(Nembutal)和局部施用一滴四卡因(tetracaine)来使大鼠(例如Sprague Dawley)麻醉。通过以下方式来产生角膜碱创伤:将一张于1N NaOH中浸渍的1.5mm直径圆形滤纸置于与右眼的中心角膜接触40秒。在碱暴露之后立刻,用PBS冲洗眼表面60秒。将大鼠随机分成2组(n=15):组1包含进行标准盐水治疗的经受碱灼伤的大鼠(10 $\mu$ l,每天4次),并且组2包含进行TMP治疗的经受碱灼伤的大鼠(1.5mg/ml于10ml体积中,每天4次)。接着在第28天使用裂隙灯显微镜检查法来观察所有眼以评估角膜NV。

[0794] 15.2评估角膜中的NV

[0795] 可如Zhang Z等(2005) Invest Ophthalmol Vis Sci 46:4062-4071doi:10.1167/iovs.04-1330中所述来定量角膜NV(NV)。简要说,对研究条件不知情的眼科医师在碱灼伤之后第1、2、5和8天在裂隙灯显微镜下检查所有眼。将角膜图像分成4个象限。使用游标卡尺测量各象限的血管长度(L<sub>i</sub>, i=1-4)。使用以下等式计算角膜NV面积(A): $A = \sum_{i=1-4} 3.1416 \times \{R^2 - (R - L_i)^2\}$  (R是大鼠角膜的半径。R=3.5mm,如由测量15个大鼠角膜所计算)。

[0796] 15.3脉络膜新血管化

[0797] 激光诱导的脉络膜新血管化(CNV)是一种充分表征和接受的脉络膜新血管化模型(Fletcher EL等(2011) Prog Mol Biol Transl Sci 100:211-286)。它也是一种用于测定靶向血管生成和纤维化的潜在治疗的功效的快速方法。简要说,使用连续波光凝激光(532nm二极管)向眼后部施加多达四个激光光点。激光能量足够高以在布鲁赫氏膜(Bruch's membrane)中产生破坏。在随后7-14天期间,发生血管从脉络膜向视网膜中生长,并且以免疫细胞化学方式或使用荧光素血管造影术进行定量。

[0798] 简要说,使在使用之前以循环光照环境(12小时光照开启,12小时光照关闭,在笼中光度<350lux下)在生物学动物设施中舍饲10天或更久的总计二十(20)只Dark agouti大鼠或C57BL/6小鼠麻醉,并且用在视神经周围施加为4个光点的532nm连续波热激光处理。在激光处理之后立刻,用最高剂量的i体(在视网膜处的浓度是20mg/ml)治疗动物。

[0799] 用专用啮齿动物眼底照相机/OCT(Micron III, Phoenix Instruments)检查所有大鼠的视网膜的结构,并且使用荧光素血管造影术定量血管的完整性。接着定量所有荧光病变的尺寸(直径和面积)以提供血管生成程度的量度。

[0800] 在成像之后,通过麻醉剂过量用药来杀死动物,并且将后部眼杯在4%多聚甲醛中固定30分钟。接着处理视网膜全标本包埋物以进行IB4标记来评估脉络膜血管向视网膜下间隙中的生长的程度。病变的直径和面积提供对新血管化程度的评估。

[0801] 此外,通过对胶质细胞增生标志物GFAP进行免疫标记来定量由于脉络膜血管的侵袭而显现的瘢痕形成的水平。

[0802] 此外,也考查在激光处理之后治疗的视网膜中的视网膜收缩、病变尺寸、小神经胶质和神经胶质应答的改变以及促纤维化基因表达以评估纤维化。

[0803] 在小鼠脉络膜新血管化模型中,抗CXCR4i体AM3-114-6H(加对照i体)减轻病理性血管生成或病变特征。已考查在激光处理之后眼中CXCR4的水平(PCR纤维化阵列;SABiosciences),并且显示调控异常。在这个环境中的CXCR4上调表明用CXCR4拮抗剂i体治疗可具有有益作用。

[0804] 如下处理小鼠:

[0805] ●组1(n=10):激光处理两只眼-一只眼中用媒介物;另一只眼中用i体

[0806] ●组2(n=10):激光处理一只眼(无i体);另一只眼未用激光处理。

[0807] 以1 $\mu$ l体积在多达20mg/ml的浓度下在玻璃体内注射i体药物。

[0808] 获得i体对在激光处理之后治疗的视网膜中的视网膜收缩、病变尺寸和基因表达的影响的数据。相较于同一眼中未用激光处理的区域,在激光处理之后,存在显著视网膜收缩。用AM3-114与AM4-272两者治疗均导致激光处理区域的收缩显著降低。一个混乱因素是媒介物对照也似乎在收缩比率方面具有极其显著降低。因为媒介物仅由单次注射的TBS组成,所以不可能这将具有这种作用。更可能的解释是i体实际上已从所治疗的眼逃逸,并且进入循环中,也许从而阻断炎症性细胞浸润媒介物治疗的眼。在施用i体AM3-114后,病变尺寸也存在降低。

[0809] 考查与血管生成和纤维化相关的基因的表达。使用商业旋转柱(RNeasy,Qiagen,Valencia CA)从视网膜和RPE/脉络膜样品分离总RNA。PCR基因阵列用于评估涉及血管生成或纤维化的84种基因的表达(Qiagen)。简而言之,将来自未治疗眼、激光经治疗眼和未治疗对侧眼的总RNA样品(各组n=9,各自25ng)在它们的相应治疗组内汇集(3个含有3个汇集样品的独立实验),逆转录(RT2第一链,Qiagen),接着经受cDNA靶标模板的预扩增(RT2pre-AMP,Qiagen)。添加样品至商业主混合物(RT2SYBR绿色主混合物,Qiagen)中,并且扩增40个循环(ABI 7900HT,Life Technologies,Grand Island NY)。对于各治疗组,进行三个独立阵列。使用 $\Delta\Delta Ct$ ( $\Delta\Delta Ct$ )分析数据,表示为倍数变化,并且使用未配对t检验来评估调控。来自AM3-114治疗眼与AM4-272治疗眼两者的这个基因表达数据均指示诸如以下的促纤维化基因存在广泛下调:Col1A2、TGF- $\beta$ 1、结缔组织生长因子(CTGF)和组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP3)、血栓反应素2(Thbs2)、丝氨酸蛋白酶抑制剂(SerpinH1)、整合素 $\beta$ 8亚单位(ITGB8)、赖氨酰基氧化酶(LOX)、嗜酸性粒细胞趋化因子(CCL11)、 $\beta$ 3整合素(ITGB3)、丝氨酸-苏氨酸蛋白质激酶(Akt1)、SMAD家族成员6(SMAD6)、血小板源性生长因子 $\alpha$ 多肽(PDFGA)、转化生长因子、 $\beta$ 受体II(Tgfbr2)、骨形态发生蛋白7(Bmp7)(图27)。

[0810] 实施例16-i体与纤维细胞的结合

[0811] 循环骨源性间质细胞具有发育成纤维细胞的潜力并可在纤维化的发病机理中起关键作用(Strieter RM,Keeley EC,Burdick MD和Mehrad B.The Role of Circulating Mesenchymal Progenitor Cells,Fibrocytes,in Promoting Pulmonary Fibrosis.Trans Am Clin Climatol Assoc 2009;120;49-59),并且表达CD45和CXCR4的细胞是在鼠博莱霉素诱发的肺纤维化模型中,可应答于SDF-1而迁移并移行至肺中的循环纤维细胞(Phillips RJ,Burdick MD,Hong K,Lutz MA,Murray LA等Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12and mediate fibrosis.J Clin Invest(2004)114:438-

44)。

[0812] 如下进行i体(AM3-114)和CD-45的双重标记。使I体AM3-114与经分离人PBMC一起在室温下孵育4小时。在显微镜载片上涂抹PBMC,并且用丙酮在4℃下固定10分钟。在三次洗涤和用PBS再水化之后,使载片与1:100稀释的小鼠FLAG抗体一起在4℃下孵育过夜。在洗涤之后,使载片与山羊抗小鼠Alex Fluor 568(用以通过结合FLAG抗体来检测i体)一起在室温下孵育1小时。接着洗涤载片,并且与小鼠抗CD-45FITC标记的抗体一起在4℃下孵育过夜。在再洗涤之后,载片用含有DAPI的ProLong Gold抗淬灭封固剂封固。通过使用Nikon A1共焦显微镜来捕获图像。

[0813] 通过用针对CD45的抗体染色来鉴定人纤维细胞。通过针对C末端标签的抗FLAG抗体来鉴定i体AM3-114的结合。DAPI用于将细胞核染色。结果呈现于图28中。结果显示i体AM3-114能够结合人纤维细胞。

[0814] 实施例17-体内鼠气囊模型-

[0815] 在体内鼠气囊模型中评估i体阻断炎症的能力。皮下(s.c.)气囊是一种用于研究急性和慢性炎症的体内模型(Durate等,Models of Inflammation:Carrageenan Air Pouch,Current Protocols in Pharmacology 5.6.1-5.6.8,2012年3月)。将刺激物注射至大鼠或小鼠中的气囊中诱导炎症性应答,其可通过产生的渗出物的体积、细胞的浸润和炎症性介体的释放来定量。通过将无菌空气注射在小鼠的背部的皮肤下方来产生气囊。用消炎性化合物或测试物品(i体或AMD3100)预处理小鼠,并且其次用炎症诱发剂SDF-1处理。接着关于细胞移行和细胞因子释放来分析气囊灌洗液。

[0816] 对7周龄BALB/c小鼠进行气囊测定。在第1和3天,将每g初始体重(IBW)0.2ml的无菌空气注射在背部皮肤下方以产生囊。在第6天,将小鼠分成各组,并且接受腹膜内注射0.5ml含有或不含有i体(AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746或AM4-1121)或AMD3100(10mg/kg)的PBS。30分钟后,将SDF-1(6μg)注射至囊中。4小时后,在CO<sub>2</sub>腔室中杀死小鼠,并且洗涤气囊。收集细胞,计数,并且通过流式细胞计量术来表征。

[0817] 气囊中的总细胞证明测试物品抑制细胞向气囊/炎症部位迁移。i体AM3-114、AM4-272、AM3-523、AM4-746和AM4-1121抑制细胞向气囊迁移(类似于AMD3100),然而,阴性对照i体(21H5)不抑制细胞迁移。在无炎症性刺激剂的情况下将I体注射至小鼠中对细胞向气囊迁移不具有影响(图29)。

[0818] 实施例18-在博莱霉素小鼠模型中预防特发性肺纤维化(IPF)

[0819] 在小鼠疾病模型中考查CXCR4结合分子(i体)抑制肺纤维化的能力。博莱霉素作为一种抗生素和抗肿瘤剂广泛用于类似于IPF的人疾病的实验性模型中。博莱霉素能够通过诱导脂质过氧化来导致与它对DNA的作用无关的细胞损害。导致胶原蛋白沉积的博莱霉素和肺之间的相互作用的确切性质是未确定的。然而,细胞因子和生长因子诸如IL-1、IL-6、TNF-α、PDGF和TGF-β的过度活化已始终牵涉于疾病进展中。新近证据表明在博莱霉素小鼠模型中拮抗CXCR4有效预防肺纤维化。

[0820] 小鼠IPF模型是经验证的炎症和纤维化模型,其中初始(在48小时内)肺损伤的组织学特征在于血管周水肿,毛细血管充血和肺泡壁增厚,伴有肺泡内出血和炎症性细胞在肺泡壁中以及在间隙中浸润。在这个模型中,局灶性支气管周和胸膜下胶原蛋白沉积通常在博莱霉素施用之后一周内跟着到来。

[0821] 博莱霉素的最优剂量是2U/小鼠,并且评估纤维细胞募集的最优时间被确认在第4天。在第4天,收集支气管肺泡灌洗(BAL)液以分析SDF-1浓度。一半肺组织用于制备肺的单细胞混悬液,并且细胞用于流式细胞计量术以及测定CD45<sup>+</sup>、CXCR4<sup>+</sup>和胶原蛋白1<sup>+</sup>(纤维细胞)。另一半肺组织进行Sircol染色以了解胶原蛋白1的存在,并且将测试Col-1、Col-3和SDF-1的RNA。

[0822] 使用2U博莱霉素/小鼠(每组10只),用i体,即阴性对照i体21H5在30mg/kg下以及抗CXCR4i体AM3-114、AM4-272、AM3-523在1、10和30mg/kg下对小鼠给药。在第4天监测SDF-1、纤维细胞和胶原蛋白沉积。就在用博莱霉素施用之前,用i体对各组给药。切碎一半肺组织,并且于PBS中洗涤并用于以胶原蛋白酶A和分散酶处理来制备肺的单细胞混悬液。细胞接着用于流式细胞计量术,并且测定CD45<sup>+</sup>、CXCR4<sup>+</sup>和胶原蛋白1<sup>+</sup>纤维细胞。

[0823] 在30mg/kg下施用i体AM3-114能够显著减弱纤维细胞向患有博莱霉素诱发的纤维化的小鼠的肺中募集。也明显的是i体AM4-272和AM3-523能够显著减弱纤维细胞向这些小鼠的肺中募集。I体AM4-272和AM3-523甚至在1mg/Kg下也能够阻断纤维细胞的募集。如所预期,AMD3100和吡非尼酮也能够阻断纤维细胞的募集。单独媒介物和阴性对照i体都不影响纤维细胞向患有博莱霉素诱发的纤维化的小鼠的肺中募集(图30)。

[0824] 根据制造商方案,使用Sircol染色测定(Biocolour Ltd., Carrickfergus, Northern Ireland)来检查肺组织以确定细胞外基质蛋白胶原蛋白的存在。相较于单独媒介物或阴性对照i体(21H5),i体AM3-114在30mg/kg下,i体AM4-272在10mg/kg下,以及i体AM-3523在30mg/kg下全都降低肺的胶原蛋白含量。也观察到AMD3100和吡非尼酮使胶原蛋白降低。

[0825] 在小鼠中进行博莱霉素肺纤维化实验超过21天以评估聚乙二醇化i体的作用。在10mg/Kg下施用聚乙二醇化i体AM4-272能够在第7天减弱纤维细胞向患有博莱霉素诱发的纤维化的小鼠的肺中募集。AM4-272-PEG在第7天在与AMD3100和吡非尼酮大约相同的程度上降低纤维细胞。

[0826] 随后,其余肺组织用于根据Phillips等(2004) J Clin Invest 114,438来分析来自各样品的RNA以了解CXCL12、Colla1和Col3a1基因表达。

[0827] 实施例19表位定位

[0828] 基因枪诱变(Integral Molecular)用于评估抗CXCR4i体AM3-114、AM4-272和AM3-523与野生型和突变人CXCR4的结合。针对表达CXCR4的HEK-293T细胞来测试i体。确定用于i体AM3-114(1 $\mu$ g/ml)、AM4-272(2 $\mu$ g/ml)和AM3-523(1 $\mu$ g/ml)的免疫检测和表位定位的最优筛选条件,其产生高信号/背景值。表13中显示在筛选中鉴定的所有关键残基的平均i体反应性(和范围)。对照抗体是可商购获得的flag抗体和12G5。

[0829] 表13对于i体AM3-114、AM4-272和AM3-523结合CXCR4关键的残基

CXCR4 中 的突变	结合反应性(WT%)				
	i体AM3- 114	i体AM4- 272	i体AM3- 523	Flag 抗体	12G5
[0830] E32K	58.8	38.1	6.6	71.1	58.3
Y184S	96.1	61.7	12.6	147.7	106.8
F189L	26.1	21.8	45.5	115.7	153.2
W195R	28.8	84.8	57.6	87.6	101.1
D262G	30.2	26.7	12.5	74.4	97.4
L266H	23	60.6	60.4	105.1	127.3
C28W	15.9	28	75	121.7	46.6
[0831] V112A	63.6	109	7.6	61.7	95
P191T	66	55	42.3	116	154
D193G	38	80	78.6	116	108.5
E268	104.4	56.6	44.4	138	149
E288	54.6	80.6	91.5	78.8	163

[0832] CXCR4蛋白的对于i体结合关键的残基(灰色)被鉴定为是对于i体结合呈阴性(对于AM3-114和AM4-272,<30%WT;对于AM3-523,<15%),但对于抗Flag mAb呈阳性(>70%WT),以及对于额外对照mAb 12G5也呈阳性(>50%WT)的残基。

[0833] 所有三种i体都共有AMD3100也结合的残基D262(Haste等,(2001)Molecular Pharmacology 60:164-173)。除F189之外,通过表位定位来鉴定的所有关键氨基酸在人CXCR4与小鼠CXCR4之间是保守的。先前未已鉴定结合CXCR4的残基E32或L266的结合剂。

[0834] 另一组残基也对一些i体的结合具有影响,它们是C28、V112、D193、P191、E268和E288。

[0835] 实施例20-i体与具有特发性肺纤维化(IPF)的人患者组织中的CXCR4的结合

[0836] 为进一步确认CXCR4在正常肺和IPF肺中的表达,在免疫组织化学(IHC)分析中利用阴性对照i体21H5、CXCR4特异性i体(AM3-114、AM4-272和AM3-523)(数据未显示)。在正常肺活检体和缓慢IPF肺活检体中检测到少许CXCR4表达性细胞。易于在快速IPF肺活检体中检测到CXCR4表达性细胞。最后,用i体检测存在于快速IPF肺活检体的纤维化区域中的间质细胞中的CXCR4。本公开的i体能够结合来自IPF患者肺活检体(快速进展者与缓慢进展者两者)的纤维母细胞,但不结合来自正常肺组织的肺活检体。

[0837] 实施例21-降低来自特发性肺患者组织的人肺纤维母细胞侵袭

[0838] 若干报道已显示CXCL12和CXCR4在肺侵袭中具有作用的证据(Li等Cancer Lett 2012 322;169-176以及Krook等Mol Cancer Res 2014 12;953-964)。Lovgren,A等人已显示β-抑制蛋白在肺纤维母细胞侵袭中起重要作用(Lovgren等Sci Transl Med 2011 3;74ra23)。此外,若干报道已显示CXCR4将CXCL12递送至CXCR7,从而导致β-抑制蛋白路径的活化,从而表明CXCR4可促进肺纤维母细胞的侵袭(Coggins等2014PLoS One 9,e98328,Decaillet等J Biol Chem 2011 286;32188-32197,以及Rajagopal等PNAS 2010 107;628-632)。

[0839] 为确定CXCR4和CXCL12在纤维母细胞侵袭中的作用,在创伤愈合侵袭测定中利用正常肺纤维母细胞和IPF肺纤维母细胞。在室温下用50 $\mu$ g/ml基底膜提取物(BME;Trevigen)涂布ImageLock 96孔板(Essen Bioscience)1小时。将正常纤维母细胞和由显示疾病的缓慢进展或快速进展的特发性肺纤维化(IPF)患者的肺活检体产生的纤维母细胞涂铺(每孔36,000个细胞)在BME涂布的板上,并且孵育过夜。次日,使用Woundmaker<sup>TM</sup>(Essen Bioscience)刮擦细胞,用DPBS洗涤,用含阴性对照i体21h5、CXCR4特异性i体(AM3-114、AM4-272;130 $\mu$ g/ml)或AMD3100(12 $\mu$ M)的2mg/ml BME溶液处理。通过在37 $^{\circ}$ C下将板孵育15分钟来使BME聚合。接着将板插入IncuCyte Zoom成像系统中,并且每2小时采集图像,持续约50小时。使用IncuCyte软件(Essen Bioscience)定量侵袭。

[0840] BIBF-1120作为一种当前被核准用于治疗IPF的多重受体酪氨酸激酶抑制剂有效抑制正常纤维母细胞运动性与IPF纤维母细胞运动性两者。在缓慢IPF肺纤维母细胞和三分之二的快速IPF肺纤维母细胞而非正常肺纤维母细胞中,CXCR4特异性i体AM3-114-6H和AM4-272-6H抑制侵袭(图31-1至31-3显示来自正常情况、缓慢和快速IPF患者的纤维母细胞的代表性实例)。

[0841] 实施例22-i体在体外展现抗纤维化性质

[0842] 为确定CXCR4在肺纤维母细胞活化和细胞外基质产生中的潜在作用,用CXCR4特异性i体(AM3-114-6H、AM4-272-6H、AM3-523-6H)、阴性对照i体(21H5)或AMD3100处理纤维母细胞48小时,此后提取RNA并针对ACTA2、COL1A1、COL3A1和FN1转录物进行qPCR分析。qPCR方法如下:将纤维母细胞涂铺在50 $\mu$ g/ml的BME上,并且用130 $\mu$ g/ml的i体或12 $\mu$ M的AMD3100处理。在48小时之后,使用Trizol试剂提取RNA,并且使用superscript II逆转录酶(Life technology)逆转录成cDNA,如先前所述(Trujillo等Sci Transl Med 2010 2;57ra82)。随后将互补DNA(cDNA)荷载至Taqman板中,并且使用COL1A1、COL3A1、FN1和 $\alpha$ SMA的预先设计引物进行基因表达分析。所有Taqman分析都使用Applied Bio system的Viia 7仪器(Life technology)进行。接着输出结果,相对于18s RNA表达进行标准化,并且使用Data Assist软件(Life technologies)计算倍数变化分析。在缓慢IPF肺纤维母细胞而非正常肺纤维母细胞中,CXCR4特异性AM3-114-6H显著降低ACTA2、COL1A1、COL3A1和FN1的促纤维化基因转录物表达(图32)。

[0843] 为考查i体是否可调节IPF肺纤维母细胞中的可溶性胶原蛋白,使用ELISA。使用直接ELISA检测胶原蛋白1。简要说,将纯化的胶原蛋白1蛋白质和经调节的上清液在4 $^{\circ}$ C下涂布在maxi-sorb ELISA板上过夜。次日早晨,将板洗涤,用1%BSA阻断1小时,接着与生物素化抗胶原蛋白1抗体(Abcam)一起在室温下在旋转振荡器上孵育2小时。接着将板洗涤,并且添加HRP缀合的链霉亲和素至各孔中持续20分钟。在20分钟之后,将板洗涤,并且用TMB底物显色20分钟,此后,添加终止溶液,并且使用Synergy H1微板读取器(Biotek)在450nm下获取吸光度。

[0844] 在用i体处理后48小时,CXCR4特异性i体AM4-272-6H显著降低纤维母细胞的经调节上清液中的可溶性胶原蛋白。

[0845] 实施例23-i体调节各种信号传导配偶体

[0846] 各种报道指示CXCR4与包括CCR2的其它趋化因子受体联合进行信号传导。为确定CXCR4特异性i体是否可调节潜在CXCR4信号传导配偶体,在i体(AM3-114-6H或AM4-272-

6H)、AMD3100或BIBF-1120处理后48小时,从正常肺纤维母细胞培养物、缓慢IPF肺纤维母细胞培养物和快速IPF肺纤维母细胞培养物收集经调节上清液,并且使用商业ELISA试剂盒,如由制造商(R&D Systems)所推荐来检测纤维母细胞经调节上清液中的CCL2、CCL5和CXCL12。靶向CXCR4的i体AM3-114-6H和AM4-272-6H、AMD3100和BIBF-1120显著增加IPF纤维母细胞经调节上清液而非正常纤维母细胞经调节上清液中的CCL2蛋白,此在快速IPF肺纤维母细胞经调节上清液中是明显的。靶向CXCR4的i体AM4-272-6H使一些IPF肺纤维母细胞中的CCL5水平增加;然而,这个作用不是一致的,并且在用一个用对照i体21H5-6H处理的缓慢IPF肺纤维母细胞株系中被观察到。

[0847] 实施例24-i体阻断血小板聚集

[0848] 进行实验以考查i体是否可阻断由SDF-1 $\alpha$ 诱导的血小板聚集。使富含血小板的人血浆混悬液与i体AM3-114、AM3-523、AM4-746或AM4-1121(或12G5阳性对照抗CXCR4Mab)一起在10或20ug/mL下预孵育10分钟,随后用100nM SDF-1 $\alpha$ 刺激。在阴性对照i体21H5(或12G5的同种型对照:小鼠IgG2a)存在下,SDF-1诱导稳健和可再现聚集(下降黑色曲线,其指示光透射增加),此与先前已发表的情况匹配。所有i体以及12G5都具有抑制作用,其中AM3-114和AM4-1121是最高效的(图33)。这些i体显示对聚集的强烈和持续阻断。AM3-523和AM4-746与Mab12G5在相同程度上阻断聚集,而AM4-272仅微弱阻断聚集。阴性对照i体和对照Mab都不对血小板聚集具有任何影响。

[0849] 实施例25-抗CXCR4i体在小鼠多发性硬化症模型中具有活性(实验性自体免疫脑脊髓炎)

[0850] Holman等(Biochimica et Biophysica Acta 2011)已有一些出版物暗示证明了在实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)即小鼠多发性硬化症模型中,CXCL12导致在约第8-12天时间点跨越血脑屏障募集CXCR4阳性细胞。此外,新近研究证明CXCR4拮抗剂在EAE中显示功效(Hanes等JBC第290卷(37):22385-22397(2015),Kohler等Brain Pathology 2008,18;504-516)。本发明者通过在第0天注射髓磷脂寡树突细胞蛋白质(MOG)来在少数动物(n=每组3)中诱发EAE,并且在第7-10天之间用i体AM4-272以静脉内方式在4mg/Kg下治疗它们(1次注射/天,持续4天)。这是已被报道对炎症性细胞跨越血脑屏障进行浸润至关重要的时间。注意到在用AM4-272i体注射的3只小鼠之中,1只进展成疾病,而另外2只几乎无疾病。在第15天,用i体治疗的动物的体重显著不同于患病动物或用阴性对照i体21H5注射的动物。此外,在第14天与第15天,相较于患病动物或用对照i体注射的动物,临床评分均由于用i体注射而得以显著改进(图34)。这些数据表明本发明的i体可结合炎症性细胞上的CXCR4,并且抑制它们从外周血液系统迁移至脑中。似乎阻断这个迁移可缓和EAE的症状。

[0851] 对实验性小鼠的脑进行免疫组织化学分析。在患病动物(仅MOG)的脑的白质中以及在给予AM4-272i体的症状性小鼠中观察到大量炎症性细胞染色。而在媒介物对照中或在给予AM4-272i体的无症状小鼠中,存在极少炎症性T细胞染色。

[0852] 已对进行以及不进行i体(AM4-272)治疗的EAE小鼠的脑组织进行初始苏木精和伊红染色以突出显示T细胞向白质中的浸润。在用对照i体21H5治疗的MOG小鼠中,而非在用AM4-272i体治疗的小鼠中,观察到显著T细胞浸润。



[0039] <220>  
 [0040] <221> Xaa  
 [0041] <222> (27) .. (32)  
 [0042] <223> 任何氨基酸  
 [0043] <220>  
 [0044] <221> Xaa  
 [0045] <222> (80) .. (80)  
 [0046] <223> 任何氨基酸以及在10与20之间(包括端值)的任何数目的氨基酸  
 [0047] <400> 2  
 [0048] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0049] 1 5 10 15  
 [0050] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Xaa Xaa Ala Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [0051] 20 25 30  
 [0052] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [0053] 35 40 45  
 [0054] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0055] 50 55 60  
 [0056] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Xaa  
 [0057] 65 70 75 80  
 [0058] Glu Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe Gln  
 [0059] 85 90  
 [0060] <210> 3  
 [0061] <211> 97  
 [0062] <212> PRT  
 [0063] <213> 欧洲牛  
 [0064] <400> 3  
 [0065] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0066] 1 5 10 15  
 [0067] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Asp Ala Lys Asp Lys Asp  
 [0068] 20 25 30  
 [0069] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [0070] 35 40 45  
 [0071] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0072] 50 55 60  
 [0073] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Thr  
 [0074] 65 70 75 80  
 [0075] Ala Glu Asp Gly Thr Glu Ser Glu Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe  
 [0076] 85 90 95  
 [0077] Gln

[0078] <210> 4  
 [0079] <211> 97  
 [0080] <212> PRT  
 [0081] <213> 小家鼠  
 [0082] <400> 4  
 [0083] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0084] 1 5 10 15  
 [0085] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Asp Ala Lys Asp Lys Asp  
 [0086] 20 25 30  
 [0087] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Ser Pro Asn Gln Gln  
 [0088] 35 40 45  
 [0089] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0090] 50 55 60  
 [0091] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Thr  
 [0092] 65 70 75 80  
 [0093] Ala Glu Asp Gly Thr Gln Ser Glu Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe  
 [0094] 85 90 95  
 [0095] Gln  
 [0096] <210> 5  
 [0097] <211> 97  
 [0098] <212> PRT  
 [0099] <213> 黑鼠  
 [0100] <400> 5  
 [0101] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0102] 1 5 10 15  
 [0103] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Asp Ala Lys Asp Lys Asp  
 [0104] 20 25 30  
 [0105] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Ser Pro Asn Gln Gln  
 [0106] 35 40 45  
 [0107] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0108] 50 55 60  
 [0109] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Thr  
 [0110] 65 70 75 80  
 [0111] Ala Glu Asp Gly Thr Gln Ser Glu Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe  
 [0112] 85 90 95  
 [0113] Gln  
 [0114] <210> 6  
 [0115] <211> 97  
 [0116] <212> PRT

[0117] <213> 原鸡  
 [0118] <400> 6  
 [0119] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0120] 1 5 10 15  
 [0121] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Glu Ala Lys Tyr Lys Asp  
 [0122] 20 25 30  
 [0123] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [0124] 35 40 45  
 [0125] Arg Ile Ser Val Val Arg Asn Asp Asp Phe Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0126] 50 55 60  
 [0127] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Ser  
 [0128] 65 70 75 80  
 [0129] Ser Val Glu Glu Gly Asp Ser Glu Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe  
 [0130] 85 90 95  
 [0131] Gln  
 [0132] <210> 7  
 [0133] <211> 94  
 [0134] <212> PRT  
 [0135] <213> 非洲爪蟾  
 [0136] <400> 7  
 [0137] Leu Glu Val Asn Ile Val Pro Asp Gln Gly Glu Ile Ser Leu Gly Glu  
 [0138] 1 5 10 15  
 [0139] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ser Gly Glu Ala Thr Asp Ile Ser  
 [0140] 20 25 30  
 [0141] Trp Tyr Ser Pro Thr Gly Glu Lys Leu Leu Asn Gln Gln Gln Ile Ser  
 [0142] 35 40 45  
 [0143] Val Val Lys Asn Asp Glu Tyr Thr Ser Thr Leu Thr Ile Tyr Asn Val  
 [0144] 50 55 60  
 [0145] Ser Ser Gln Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Ala Ser Ser Glu Thr  
 [0146] 65 70 75 80  
 [0147] Glu Gly Glu Ser Glu Gly Thr Val Asn Leu Lys Ile Tyr Gln  
 [0148] 85 90  
 [0149] <210> 8  
 [0150] <211> 94  
 [0151] <212> PRT  
 [0152] <213> 非洲爪蟾  
 [0153] <400> 8  
 [0154] Leu Glu Val Asn Ile Val Pro Asp Gln Gly Glu Ile Ser Leu Gly Glu  
 [0155] 1 5 10 15

[0156] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ser Gly Glu Ala Thr Asp Ile Ser  
 [0157]                   20                   25                   30  
 [0158] Trp Tyr Ser Pro Thr Gly Glu Lys Leu Val Thr Gln Gln Gln Ile Ser  
 [0159]                   35                   40                   45  
 [0160] Val Val Arg Ser Asp Asp Tyr Thr Ser Thr Leu Thr Ile Tyr Asn Ala  
 [0161]           50                   55                   60  
 [0162] Ser Ser Gln Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Ala Ser Asn Glu Ala  
 [0163] 65                   70                   75                   80  
 [0164] Glu Gly Glu Ser Glu Gly Thr Val Asn Leu Lys Ile Tyr Gln  
 [0165]                   85                   90  
 [0166] <210> 9  
 [0167] <211> 93  
 [0168] <212> PRT  
 [0169] <213> 智人  
 [0170] <400> 9  
 [0171] Leu Gln Val Thr Ile Ser Leu Ser Lys Val Glu Leu Ser Val Gly Glu  
 [0172] 1                   5                   10                   15  
 [0173] Ser Lys Phe Phe Thr Cys Thr Ala Ile Gly Glu Pro Glu Ser Ile Asp  
 [0174]                   20                   25                   30  
 [0175] Trp Tyr Asn Pro Gln Gly Glu Lys Ile Ile Ser Thr Gln Arg Val Val  
 [0176]                   35                   40                   45  
 [0177] Val Gln Lys Glu Gly Val Arg Ser Arg Leu Thr Ile Tyr Asn Ala Asn  
 [0178]           50                   55                   60  
 [0179] Ile Glu Asp Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Gln Ala Thr Asp Ala Lys Gly  
 [0180] 65                   70                   75                   80  
 [0181] Gln Thr Gln Glu Ala Thr Val Val Leu Glu Ile Tyr Gln  
 [0182]                   85                   90  
 [0183] <210> 10  
 [0184] <211> 93  
 [0185] <212> PRT  
 [0186] <213> 小家鼠  
 [0187] <400> 10  
 [0188] Leu Gln Val Thr Ile Ser Leu Ser Lys Val Glu Leu Ser Val Gly Glu  
 [0189] 1                   5                   10                   15  
 [0190] Ser Lys Phe Phe Thr Cys Thr Ala Ile Gly Glu Pro Glu Ser Ile Asp  
 [0191]                   20                   25                   30  
 [0192] Trp Tyr Asn Pro Gln Gly Glu Lys Ile Ile Ser Thr Gln Arg Val Met  
 [0193]                   35                   40                   45  
 [0194] Leu Gln Lys Glu Gly Val Arg Ser Arg Leu Thr Ile Tyr Asn Ala Asn

[0195]           50                               55                               60  
 [0196] Ile Glu Asp Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Gln Ala Thr Asp Ala Lys Gly  
 [0197] 65                               70                               75                               80  
 [0198] Gln Thr Gln Glu Ala Thr Val Val Leu Glu Ile Tyr Gln  
 [0199]                               85                               90  
 [0200] <210> 11  
 [0201] <211> 103  
 [0202] <212> PRT  
 [0203] <213> 人工序列  
 [0204] <220>  
 [0205] <223> ADCX-99蛋白质序列  
 [0206] <400> 11  
 [0207] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0208] 1                               5                               10                               15  
 [0209] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Ser Gly Ser Asp Ile Arg  
 [0210]                               20                               25                               30  
 [0211] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [0212]                               35                               40                               45  
 [0213] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0214] 50                               55                               60  
 [0215] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Tyr  
 [0216] 65                               70                               75                               80  
 [0217] Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Ala Leu Val Leu Gly Glu Ala Thr  
 [0218]                               85                               90                               95  
 [0219] Val Asn Val Lys Ile Phe Gln  
 [0220]                               100  
 [0221] <210> 12  
 [0222] <211> 6  
 [0223] <212> PRT  
 [0224] <213> 人工序列  
 [0225] <220>  
 [0226] <223> ADCX\_99 CDR1蛋白质序列  
 [0227] <400> 12  
 [0228] Ser Gly Ser Asp Ile Arg  
 [0229] 1                               5  
 [0230] <210> 13  
 [0231] <211> 14  
 [0232] <212> PRT  
 [0233] <213> 人工序列

[0234] <220>  
 [0235] <223> ADCX-99 CDR3蛋白质序列  
 [0236] <400> 13  
 [0237] Tyr Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Ala Leu Val Leu Gly  
 [0238] 1 5 10  
 [0239] <210> 14  
 [0240] <211> 100  
 [0241] <212> PRT  
 [0242] <213> 人工序列  
 [0243] <220>  
 [0244] <223> 编码ADCX-272的蛋白质序列  
 [0245] <400> 14  
 [0246] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0247] 1 5 10 15  
 [0248] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly His Leu Glu Val Arg Ser  
 [0249] 20 25 30  
 [0250] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [0251] 35 40 45  
 [0252] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0253] 50 55 60  
 [0254] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Glu  
 [0255] 65 70 75 80  
 [0256] Gln Arg Gly Arg Ser Gln Ser Tyr Phe Ser Glu Ala Thr Val Asn Val  
 [0257] 85 90 95  
 [0258] Lys Ile Phe Gln  
 [0259] 100  
 [0260] <210> 15  
 [0261] <211> 6  
 [0262] <212> PRT  
 [0263] <213> 人工序列  
 [0264] <220>  
 [0265] <223> 编码ADCX-272 CDR1的蛋白质序列  
 [0266] <400> 15  
 [0267] His Leu Glu Val Arg Ser  
 [0268] 1 5  
 [0269] <210> 16  
 [0270] <211> 11  
 [0271] <212> PRT  
 [0272] <213> 人工序列

[0273] <220>  
 [0274] <223> 编码ADCX-272 CDR3的蛋白质序列  
 [0275] <400> 16  
 [0276] Glu Gln Arg Gly Arg Ser Gln Ser Tyr Phe Ser  
 [0277] 1 5 10  
 [0278] <210> 17  
 [0279] <211> 99  
 [0280] <212> PRT  
 [0281] <213> 人工序列  
 [0282] <220>  
 [0283] <223> 编码ADCX-6的蛋白质序列  
 [0284] <400> 17  
 [0285] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0286] 1 5 10 15  
 [0287] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Leu Thr Ser Leu Glu Gly  
 [0288] 20 25 30  
 [0289] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [0290] 35 40 45  
 [0291] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0292] 50 55 60  
 [0293] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Glu  
 [0294] 65 70 75 80  
 [0295] Asp His Pro Gln Tyr Ser Lys Met Glu Glu Ala Thr Val Asn Val Lys  
 [0296] 85 90 95  
 [0297] Ile Phe Gln  
 [0298] <210> 18  
 [0299] <211> 6  
 [0300] <212> PRT  
 [0301] <213> 人工序列  
 [0302] <220>  
 [0303] <223> 编码ADCX-6 CDR1的蛋白质序列  
 [0304] <400> 18  
 [0305] Leu Thr Ser Leu Glu Gly  
 [0306] 1 5  
 [0307] <210> 19  
 [0308] <211> 10  
 [0309] <212> PRT  
 [0310] <213> 人工序列  
 [0311] <220>



[0351] <400> 22  
 [0352] Val Leu Ser Ile Arg Gly Lys Trp Glu Leu  
 [0353] 1 5 10  
 [0354] <210> 23  
 [0355] <211> 103  
 [0356] <212> PRT  
 [0357] <213> 人工序列  
 [0358] <220>  
 [0359] <223> 编码ADCX-LS的蛋白质序列  
 [0360] <400> 23  
 [0361] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0362] 1 5 10 15  
 [0363] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Thr  
 [0364] 20 25 30  
 [0365] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [0366] 35 40 45  
 [0367] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0368] 50 55 60  
 [0369] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Gln  
 [0370] 65 70 75 80  
 [0371] Val Ser Asp His Pro Glu Ala Gly Ile Leu Trp Arg Gly Glu Ala Thr  
 [0372] 85 90 95  
 [0373] Val Asn Val Lys Ile Phe Gln  
 [0374] 100  
 [0375] <210> 24  
 [0376] <211> 6  
 [0377] <212> PRT  
 [0378] <213> 人工序列  
 [0379] <220>  
 [0380] <223> 编码ADCX-LS CDR1的蛋白质序列  
 [0381] <400> 24  
 [0382] Ile Ala Glu Phe Ser Thr  
 [0383] 1 5  
 [0384] <210> 25  
 [0385] <211> 14  
 [0386] <212> PRT  
 [0387] <213> 人工序列  
 [0388] <220>  
 [0389] <223> 编码ADCX-LS CDR3的蛋白质序列

[0390] <400> 25  
 [0391] Gln Val Ser Asp His Pro Glu Ala Gly Ile Leu Trp Arg Gly  
 [0392] 1 5 10  
 [0393] <210> 26  
 [0394] <211> 99  
 [0395] <212> PRT  
 [0396] <213> 人工序列  
 [0397] <220>  
 [0398] <223> 编码ADCX-668的蛋白质序列  
 [0399] <400> 26  
 [0400] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0401] 1 5 10 15  
 [0402] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Thr Ile Trp Tyr Glu Gln  
 [0403] 20 25 30  
 [0404] Ile Ser Trp Phe Thr Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [0405] 35 40 45  
 [0406] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0407] 50 55 60  
 [0408] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Trp  
 [0409] 65 70 75 80  
 [0410] Thr Arg Pro Val Thr Ser Ser Met His Glu Ala Thr Val Asn Val Lys  
 [0411] 85 90 95  
 [0412] Ile Phe Gln  
 [0413] <210> 27  
 [0414] <211> 6  
 [0415] <212> PRT  
 [0416] <213> 人工序列  
 [0417] <220>  
 [0418] <223> 编码ADCX-668 CDR1的蛋白质序列  
 [0419] <400> 27  
 [0420] Thr Ile Trp Tyr Glu Gln  
 [0421] 1 5  
 [0422] <210> 28  
 [0423] <211> 10  
 [0424] <212> PRT  
 [0425] <213> 人工序列  
 [0426] <220>  
 [0427] <223> 编码ADCX-668 CDR3的蛋白质序列  
 [0428] <400> 28

[0429] Trp Thr Arg Pro Val Thr Ser Ser Met His  
 [0430] 1 5 10  
 [0431] <210> 29  
 [0432] <211> 100  
 [0433] <212> PRT  
 [0434] <213> 人工序列  
 [0435] <220>  
 [0436] <223> 编码ADCX306的蛋白质序列  
 [0437] <400> 29  
 [0438] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0439] 1 5 10 15  
 [0440] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Phe Gln Glu Trp Val Asn  
 [0441] 20 25 30  
 [0442] Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln Arg Ile  
 [0443] 35 40 45  
 [0444] Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile Tyr Asn  
 [0445] 50 55 60  
 [0446] Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Thr Met Pro  
 [0447] 65 70 75 80  
 [0448] His Thr Leu Asn Asn Leu Asp Val Arg Thr Glu Ala Thr Val Asn Val  
 [0449] 85 90 95  
 [0450] Lys Ile Phe Gln  
 [0451] 100  
 [0452] <210> 30  
 [0453] <211> 6  
 [0454] <212> PRT  
 [0455] <213> 人工序列  
 [0456] <220>  
 [0457] <223> 编码ADCX306 CDR1的蛋白质序列  
 [0458] <400> 30  
 [0459] Phe Gln Glu Trp Val Asn  
 [0460] 1 5  
 [0461] <210> 31  
 [0462] <211> 13  
 [0463] <212> PRT  
 [0464] <213> 人工序列  
 [0465] <220>  
 [0466] <223> 编码ADCX306 CDR3的蛋白质序列  
 [0467] <400> 31

[0468] Thr Met Pro His Thr Leu Asn Asn Leu Asp Val Arg Thr  
 [0469] 1 5 10  
 [0470] <210> 32  
 [0471] <211> 309  
 [0472] <212> DNA  
 [0473] <213> 人工序列  
 [0474] <220>  
 [0475] <223> 编码ADCX-99的核苷酸序列  
 [0476] <400> 32  
 [0477] ctgcaagtag atattgtgcc gagccagggc gaaattagcg tgggcgaaag caaatTTTTc 60  
 [0478] ttatgccagg tggcgggctc tgggagtgat attcggatca gctggTTtag CCCgaacggt 120  
 [0479] gaaaaactga ccccgaatca gcaacgtatc agcgttTgtt ggaacgatga tagctctagt 180  
 [0480] accctgacga tttacaatgc gaacattgat gacgcgggca tttataaatg cgtggTatat 240  
 [0481] aggacggggg ggtatcgtca tcgtgctcTt gtgctggggg aagccaccgt taatgtgaaa 300  
 [0482] atctttcag 309  
 [0483] <210> 33  
 [0484] <211> 300  
 [0485] <212> DNA  
 [0486] <213> 人工序列  
 [0487] <220>  
 [0488] <223> 编码ADCX-272的核苷酸序列  
 [0489] <400> 33  
 [0490] ctgcaagtag atattgtgcc gagccagggc gaaattagcg tgggcgaaag caaatTTTTc 60  
 [0491] ttatgccagg tggcgggcca tttgtaggTg aggtcgatca gctggTTtag CCCgaacggt 120  
 [0492] gaaaaactga ccccgaatca gcaacgtatc agcgttTgtt ggaacgatga tagctctagt 180  
 [0493] accctgacga tttacaatgc gaacattgat gacgcgggca tttataaatg cgtggTtagag 240  
 [0494] cagcgggggc ggtcgcagtc ttatTTTTcg gaagccaccg ttaatgtgaa aatctttcag 300  
 [0495] <210> 34  
 [0496] <211> 297  
 [0497] <212> DNA  
 [0498] <213> 人工序列  
 [0499] <220>  
 [0500] <223> 编码ADCX-6的核苷酸序列  
 [0501] <400> 34  
 [0502] ctgcaagtgg acattgtccc gagccagggT gagatttcgg tgggcgagtc caagttcttt 60  
 [0503] ctgtgtcaag ttgccggtct gaccagcctg gaaggtatta gctggTTcag CCCgaacggc 120  
 [0504] gaaaaactga cgccaaatca gcagcgtatt agcgtcgttt ggaatgacga ctctagcagc 180  
 [0505] acctgacga tctacaacgc gaacatcgat gatgcgggta tctataagtg cgttTgtcag 240  
 [0506] gatcaccgc aatacagcaa aatggaagag gcaaccgtta atgtgaaaat ctttcag 297

- [0507] <210> 35  
[0508] <211> 297  
[0509] <212> DNA  
[0510] <213> 人工序列  
[0511] <220>  
[0512] <223> 编码ADCX-54的核苷酸序列  
[0513] <400> 35  
[0514] ctgcaagtag atattgtgcc gagccagggc gaaattagcg tgggcgaaag caaatTTTTc 60  
[0515] ttatgccagg tggcgggccc gacgattatt gtgtagatca gctggTTtag CCCgaacggt 120  
[0516] gaaaaactga ccccgaatca gcaacgtatc agcgttTgtt ggaacgatga tagctctagt 180  
[0517] accctgacga tttacaatgc gaacattgat gacgcgggca tttataaatg cgtggtagtg 240  
[0518] ctgtctattc ggggtaagtg gtagctggaa gccaccgtta atgtgaaaat ctttcag 297  
[0519] <210> 36  
[0520] <211> 309  
[0521] <212> DNA  
[0522] <213> 人工序列  
[0523] <220>  
[0524] <223> 编码ADCX-LS的核苷酸序列  
[0525] <400> 36  
[0526] ctgcaagtag atattgtgcc gagccagggc gaaattagcg tgggcgaaag caaatTTTTc 60  
[0527] ttatgccagg tggcgggcat tgcttatttt agtactatca gctggTTtag CCCgaacggt 120  
[0528] gaaaaactga ccccgaatca gcaacgtatc agcgttTgtt ggaacgatga tagctctagt 180  
[0529] accctgacga tttacaatgc gaacattgat gacgcgggca tttataaatg cgtggtagcag 240  
[0530] gtttcggatc atccgtaggc gggatTTTTg tggcgggggtg aagccaccgt taatgtgaaa 300  
[0531] atctttcag 309  
[0532] <210> 37  
[0533] <211> 297  
[0534] <212> DNA  
[0535] <213> 人工序列  
[0536] <220>  
[0537] <223> 编码ADCX-668的核苷酸序列  
[0538] <400> 37  
[0539] ctgcaagttg acattgtgcc gagccagggc gaaattagcg tgggcgaaag caaatTTTTc 60  
[0540] ttatgccagg tggcgggcac tatttggtat tagcagatca gctggTTtac CCCgaacggt 120  
[0541] gaaaaactga ccccgaatca gcaacgtatc agcgttTgtt ggaacgatga tagctctagt 180  
[0542] accctgacga tttacaatgc gaacattgat gacgcgggca tttataaatg cgtggtagtg 240  
[0543] acgcgtcctg ttacttcttc gatgcatgaa gccaccgtta atgtgaaaat ctttcag 297  
[0544] <210> 38  
[0545] <211> 300

- [0546] <212> DNA  
[0547] <213> 人工序列  
[0548] <220>  
[0549] <223> 编码ADCX306的核苷酸序列  
[0550] <400> 38  
[0551] ctgcaagtgg acattgtgcc gagccaaggc gagatttccg tcggcgagag caaattcttt 60  
[0552] ctgtgtcagg ttgctgggttt tcaagaatgg gtcaattggt tctctccgaa tggtgaaaag 120  
[0553] ctgacgccga accagcagcg cattagcggt gtatggaatg atgacagcag cagcaccctg 180  
[0554] acgatctaca acgcaaacat cgacgatgcc ggtatctata agtgcgttgt caccatgcc 240  
[0555] cacaccttga acaatctgga tgttcgtacc gaggcgactg tgaacgtgaa aatcttccag 300  
[0556] <210> 39  
[0557] <211> 105  
[0558] <212> PRT  
[0559] <213> 人工序列  
[0560] <220>  
[0561] <223> 共有氨基酸序列  
[0562] <220>  
[0563] <221> Xaa  
[0564] <222> (1) .. (1)  
[0565] <223> 选自M、EAEA、MA或MP的任何氨基酸或不存在  
[0566] <220>  
[0567] <221> Xaa  
[0568] <222> (25) .. (25)  
[0569] <223> Q或K  
[0570] <220>  
[0571] <221> Xaa  
[0572] <222> (26) .. (26)  
[0573] <223> V或A  
[0574] <220>  
[0575] <221> Xaa  
[0576] <222> (30) .. (30)  
[0577] <223> G、K、L或Y  
[0578] <220>  
[0579] <221> Xaa  
[0580] <222> (32) .. (32)  
[0581] <223> D、H、G或N  
[0582] <220>  
[0583] <221> Xaa  
[0584] <222> (33) .. (33)

[0585] <223> I、V、M、F、Q或Y  
 [0586] <220>  
 [0587] <221> Yaa  
 [0588] <222> (82) .. (82)  
 [0589] <223> Y或W  
 [0590] <220>  
 [0591] <221> Xaa  
 [0592] <222> (84) .. (84)  
 [0593] <223> T、V或I  
 [0594] <220>  
 [0595] <221> Xaa  
 [0596] <222> (86) .. (86)  
 [0597] <223> G或A  
 [0598] <220>  
 [0599] <221> Xaa  
 [0600] <222> (91) .. (91)  
 [0601] <223> A或Y  
 [0602] <220>  
 [0603] <221> Xaa  
 [0604] <222> (93) .. (93)  
 [0605] <223> V、R或K  
 [0606] <400> 39  
 [0607] Xaa Met Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val  
 [0608] 1 5 10 15  
 [0609] Gly Glu Ser Lys Phe Phe Leu Cys Xaa Xaa Ala Gly Ser Xaa Ser Xaa  
 [0610] 20 25 30  
 [0611] Xaa Arg Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn  
 [0612] 35 40 45  
 [0613] Gln Gln Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu  
 [0614] 50 55 60  
 [0615] Thr Ile Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val  
 [0616] 65 70 75 80  
 [0617] Val Xaa Arg Xaa Gly Xaa Tyr Arg His Arg Xaa Leu Xaa Leu Gly Glu  
 [0618] 85 90 95  
 [0619] Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe Gln  
 [0620] 100 105  
 [0621] <210> 40  
 [0622] <211> 103  
 [0623] <212> PRT



- [0663] <213> 人工序列
- [0664] <220>
- [0665] <223> 编码AM3-114的核苷酸序列
- [0666] <400> 43
- [0667] atggcgctgc aggtggatat tgtgccgagc cagggcgaaa ttagcgtggg cgaaagcaaa 60
- [0668] ttttttctgt gccaggtggc gggcagcctg agcggcattc gtattagctg gtttagcccg 120
- [0669] aacggcgaaa aactgacccc gaaccagcag cgtattagcg tgggtggaa cgatgatagc 180
- [0670] agcagcacc c tgaccattta taacgcgaac attgatgatg cgggcattta taaatgcgtg 240
- [0671] gtgtggcgta ccggcggcta tcgtcatcgt tatctgggtg tgggcgaagc gaccgtgaac 300
- [0672] gtgaaaattt ttca 314
- [0673] <210> 44
- [0674] <211> 103
- [0675] <212> PRT
- [0676] <213> 人工序列
- [0677] <220>
- [0678] <223> 编码AM3-920的蛋白质序列
- [0679] <400> 44
- [0680] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu
- [0681] 1                    5                    10                    15
- [0682] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ile Arg
- [0683]                    20                    25                    30
- [0684] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln
- [0685]                    35                    40                    45
- [0686] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile
- [0687]                    50                    55                    60
- [0688] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Trp
- [0689] 65                    70                    75                    80
- [0690] Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly Glu Ala Thr
- [0691]                    85                    90                    95
- [0692] Val Asn Val Lys Ile Phe Gln
- [0693]                    100
- [0694] <210> 45
- [0695] <211> 6
- [0696] <212> PRT
- [0697] <213> 人工序列
- [0698] <220>
- [0699] <223> 编码AM3-920 CDR1的蛋白质序列
- [0700] <400> 45
- [0701] Ser Gly Ser Gly Ile Arg

[0702] 1 5

[0703] <210> 46

[0704] <211> 14

[0705] <212> PRT

[0706] <213> 人工序列

[0707] <220>

[0708] <223> 编码AM3-920 CDR3的蛋白质序列

[0709] <400> 46

[0710] Trp Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly

[0711] 1 5 10

[0712] <210> 47

[0713] <211> 313

[0714] <212> DNA

[0715] <213> 人工序列

[0716] <220>

[0717] <223> 编码AM3-920的核苷酸序列

[0718] <400> 47

[0719] atggcgctgc aggtggatat tgtgccgagc cagggcgaaa ttagcgtggg cgaaagcaaa 60

[0720] ttttttctgt gccaggtggc gggcagcggc agcggcattc gtattagctg gtttagcccg 120

[0721] aacggcgaaa aactgacccc gaaccagcag cgtattagcg tgggtgtggaa cgatgataca 180

[0722] gcagcacctt gaccatttat aacgcgaaca ttgatgatgc gggcatttat aaatgcgtgg 240

[0723] tgtggcgtac cggcggctat cgtcatcggtt atctggtgct gggcgaagcg accgtgaacg 300

[0724] tgaaaatttt tca 313

[0725] <210> 48

[0726] <211> 103

[0727] <212> PRT

[0728] <213> 人工序列

[0729] <220>

[0730] <223> 编码AM4-1121的蛋白质序列

[0731] <400> 48

[0732] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu

[0733] 1 5 10 15

[0734] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Ser Lys Ser Gly Ile Arg

[0735] 20 25 30

[0736] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln

[0737] 35 40 45

[0738] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile

[0739] 50 55 60

[0740] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Tyr

[0741]	65	70	75	80
[0742]	Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Arg Leu Gly Glu Ala Thr			
[0743]		85	90	95
[0744]	Val Asn Val Lys Ile Phe Gln			
[0745]		100		
[0746]	<210>	49		
[0747]	<211>	6		
[0748]	<212>	PRT		
[0749]	<213>	人工序列		
[0750]	<220>			
[0751]	<223>	编码AM4-1121 CDR1的蛋白质序列		
[0752]	<400>	49		
[0753]	Ser Lys Ser Gly Ile Arg			
[0754]	1	5		
[0755]	<210>	50		
[0756]	<211>	14		
[0757]	<212>	PRT		
[0758]	<213>	人工序列		
[0759]	<220>			
[0760]	<223>	编码AM4-1121 CDR3的蛋白质序列		
[0761]	<400>	50		
[0762]	Tyr Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Arg Leu Gly			
[0763]	1	5	10	
[0764]	<210>	51		
[0765]	<211>	313		
[0766]	<212>	DNA		
[0767]	<213>	人工序列		
[0768]	<220>			
[0769]	<223>	编码AM4-1121的核苷酸序列		
[0770]	<400>	51		
[0771]	atggcgctgc aggtggatat tgtgccgagc cagggcgaaa ttagcgtggg cgaaagcaaa	60		
[0772]	ttttttctgt gccaggtggc gggcagcaaa agcggcattc gtattagctg gtttagcccg	120		
[0773]	aacggcgaaa aactgacccc gaaccagcag cgtattagcg tgggtggaa cgatgataca	180		
[0774]	gcagcaccct gaccatttat aacgcgaaca ttgatgatgc gggcatttat aaatgcgtgg	240		
[0775]	tgtatcgtac cggcggctat cgtcatcggt atctgcgtct gggcgaagcg accgtgaacg	300		
[0776]	tgaaaatttt tca	313		
[0777]	<210>	52		
[0778]	<211>	103		
[0779]	<212>	PRT		



[0819] <213> 人工序列  
 [0820] <220>  
 [0821] <223> 编码AM4-613的核苷酸序列  
 [0822] <400> 55  
 [0823] atggcgctgc aggtggatat tgtgccgagc cagggcgaaa ttagcgtggg cgaaagcaaa 60  
 [0824] ttttttctgt gccaggtggc gggcagcaaa agcgatgtgc gtattagctg gtttagcccg 120  
 [0825] aacggcgaaa aactgacccc gaaccagcag cgtattagcg tgggtggaa cgatgataca 180  
 [0826] gcagcacctt gaccatttat aacgcgaaca ttgatgatgc gggcatttat aaatgcgtgg 240  
 [0827] tgtggcgtac cggcggctat cgtcatcggt atctggtgct gggcgaagcg accgtgaacg 300  
 [0828] tgaaaatttt tca 313  
 [0829] <210> 56  
 [0830] <211> 103  
 [0831] <212> PRT  
 [0832] <213> 人工序列  
 [0833] <220>  
 [0834] <223> 编码AM3-523的蛋白质序列  
 [0835] <400> 56  
 [0836] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [0837] 1 5 10 15  
 [0838] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Ser Gly Ser His Met Arg  
 [0839] 20 25 30  
 [0840] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [0841] 35 40 45  
 [0842] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [0843] 50 55 60  
 [0844] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Trp  
 [0845] 65 70 75 80  
 [0846] Arg Val Gly Gly Tyr Arg His Arg Ala Leu Val Leu Gly Glu Ala Thr  
 [0847] 85 90 95  
 [0848] Val Asn Val Lys Ile Phe Gln  
 [0849] 100  
 [0850] <210> 57  
 [0851] <211> 6  
 [0852] <212> PRT  
 [0853] <213> 人工序列  
 [0854] <220>  
 [0855] <223> 编码AM3-523 CDR1的蛋白质序列  
 [0856] <400> 57  
 [0857] Ser Gly Ser His Met Arg

[0858] 1 5

[0859] <210> 58

[0860] <211> 14

[0861] <212> PRT

[0862] <213> 人工序列

[0863] <220>

[0864] <223> 编码AM3-523 CDR3的蛋白质序列

[0865] <400> 58

[0866] Trp Arg Val Gly Gly Tyr Arg His Arg Ala Leu Val Leu Gly

[0867] 1 5 10

[0868] <210> 59

[0869] <211> 314

[0870] <212> DNA

[0871] <213> 人工序列

[0872] <220>

[0873] <223> 编码AM3-523的核苷酸序列

[0874] <400> 59

[0875] atggcgctgc aggtggatat tgtgccgagc cagggcgaaa ttagcgtggg cgaaagcaaa 60

[0876] ttttttctgt gccaggtggc gggcagcggc agccatatgc gtattagctg gtttagcccg 120

[0877] aacggcgaaa aactgacccc gaaccagcag cgtattagcg tgggtgtggaa cgatgatagc 180

[0878] agcagcaccc tgaccattta taacgcgaac attgatgatg cgggcattta taaatgcgtg 240

[0879] gtgtggcgtg tgggcggcta tcgtcatcgt gcgctgggtc tgggcgaagc gaccgtgaac 300

[0880] gtgaaaattt ttca 314

[0881] <210> 60

[0882] <211> 103

[0883] <212> PRT

[0884] <213> 人工序列

[0885] <220>

[0886] <223> 编码AM4-661的蛋白质序列

[0887] <400> 60

[0888] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu

[0889] 1 5 10 15

[0890] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Ser Lys Ser Asp Phe Arg

[0891] 20 25 30

[0892] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln

[0893] 35 40 45

[0894] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile

[0895] 50 55 60

[0896] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Tyr

[0897]	65	70	75	80
[0898]	Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly Glu Ala Thr			
[0899]		85	90	95
[0900]	Val Asn Val Lys Ile Phe Gln			
[0901]		100		
[0902]	<210> 61			
[0903]	<211> 6			
[0904]	<212> PRT			
[0905]	<213> 人工序列			
[0906]	<220>			
[0907]	<223> 编码AM4-661 CDR1的蛋白质序列			
[0908]	<400> 61			
[0909]	Ser Lys Ser Asp Phe Arg			
[0910]	1	5		
[0911]	<210> 62			
[0912]	<211> 14			
[0913]	<212> PRT			
[0914]	<213> 人工序列			
[0915]	<220>			
[0916]	<223> 编码AM4-661 CDR3的蛋白质序列			
[0917]	<400> 62			
[0918]	Tyr Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly			
[0919]	1	5	10	
[0920]	<210> 63			
[0921]	<211> 314			
[0922]	<212> DNA			
[0923]	<213> 人工序列			
[0924]	<220>			
[0925]	<223> 编码AM4-661的核苷酸序列			
[0926]	<400> 63			
[0927]	atggcgctgc aggtggatat tgtgccgagc cagggcgaaa ttagcgtggg cgaaagcaaa 60			
[0928]	ttttttctgt gccaggtggc gggcagcaaa agcaacattc gtattagctg gtttagcccg 120			
[0929]	aacggcgaaa aactgacccc gaaccagcag cgtattagcg tgggtggaa cgatgatagc 180			
[0930]	agcagcacc c tgaccattta taacgcgaac attgatgatg cgggcattta taaatgcgtg 240			
[0931]	gtgtatcgta cggcgggcta tcgtcatcgt tatctgaaac tgggcgaagc gaccgtgaac 300			
[0932]	gtgaaaattt ttca 314			
[0933]	<210> 64			
[0934]	<211> 103			
[0935]	<212> PRT			



- [0975] <213> 人工序列
- [0976] <220>
- [0977] <223> 编码AM3-466的核苷酸序列
- [0978] <400> 67
- [0979] atggcgctgc aggtggatat tgtgccgagc cagggcgaaa ttagcgtggg cgaaagcaaa 60
- [0980] ttttttctgt gccaggtggc gggcagcggc agccatcagc gtattagctg gtttagcccg 120
- [0981] aacggcgaaa aactgacccc gaaccagcag cgtattagcg tgggtgtggaa cgatgatagc 180
- [0982] agcagcaccc tgaccattta taacgcgaac attgatgatg cgggcattta taaatgcgtg 240
- [0983] gtgtggcgta ccggcgcgta tcgtcatcgt gcgctgggtc tgggcgaagc gaccgtgaac 300
- [0984] gtgaaaattt ttca 314
- [0985] <210> 68
- [0986] <211> 103
- [0987] <212> PRT
- [0988] <213> 人工序列
- [0989] <220>
- [0990] <223> 编码AM5-245的蛋白质序列
- [0991] <400> 68
- [0992] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu
- [0993] 1 5 10 15
- [0994] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Ala Ala Gly Ser Gly Ser His Ile Arg
- [0995] 20 25 30
- [0996] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln
- [0997] 35 40 45
- [0998] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile
- [0999] 50 55 60
- [1000] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Trp
- [1001] 65 70 75 80
- [1002] Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Ala Leu Val Leu Gly Glu Ala Thr
- [1003] 85 90 95
- [1004] Val Asn Val Lys Ile Phe Gln
- [1005] 100
- [1006] <210> 69
- [1007] <211> 6
- [1008] <212> PRT
- [1009] <213> 人工序列
- [1010] <220>
- [1011] <223> 编码AM5-245 CDR1的蛋白质序列
- [1012] <400> 69
- [1013] Ser Gly Ser His Ile Arg

[1014] 1 5  
 [1015] <210> 70  
 [1016] <211> 14  
 [1017] <212> PRT  
 [1018] <213> 人工序列  
 [1019] <220>  
 [1020] <223> 编码AM5-245 CDR3的蛋白质序列  
 [1021] <400> 70  
 [1022] Trp Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Ala Leu Val Leu Gly  
 [1023] 1 5 10  
 [1024] <210> 71  
 [1025] <211> 314  
 [1026] <212> DNA  
 [1027] <213> 人工序列  
 [1028] <220>  
 [1029] <223> 编码AM5-245的核苷酸序列  
 [1030] <400> 71  
 [1031] atggcgctgc aggtggatat tgtgccgagc cagggcgaaa ttagcgtggg cgaaagcaaa 60  
 [1032] ttttttctgt gccaggcggc gggcagcggc agccatattc gtattagctg gtttagcccg 120  
 [1033] aacggcgaaa aactgacccc gaaccagcag cgtattagcg tgggtgtggaa cgatgatagc 180  
 [1034] agcagcaccc tgaccattta taacgcgaac attgatgatg cgggcattta taaatgcgtg 240  
 [1035] gtgtggcgta ccggcggcta tcgtcatcgt gcgctgggtc tgggcgaagc gaccgtgaac 300  
 [1036] gtgaaaattt ttca 314  
 [1037] <210> 72  
 [1038] <211> 103  
 [1039] <212> PRT  
 [1040] <213> 人工序列  
 [1041] <220>  
 [1042] <223> 编码AM4-272的蛋白质序列  
 [1043] <400> 72  
 [1044] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [1045] 1 5 10 15  
 [1046] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Ser Tyr Ser Asp Tyr Arg  
 [1047] 20 25 30  
 [1048] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [1049] 35 40 45  
 [1050] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [1051] 50 55 60  
 [1052] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Tyr

[1053]	65	70	75	80
[1054]	Arg Ile Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly Glu Ala Thr			
[1055]		85	90	95
[1056]	Val Asn Val Lys Ile Phe Gln			
[1057]		100		
[1058]	<210>	73		
[1059]	<211>	6		
[1060]	<212>	PRT		
[1061]	<213>	人工序列		
[1062]	<220>			
[1063]	<223>	编码AM4-272 CDR1的蛋白质序列		
[1064]	<400>	73		
[1065]	Ser Tyr Ser Asp Tyr Arg			
[1066]	1	5		
[1067]	<210>	74		
[1068]	<211>	14		
[1069]	<212>	PRT		
[1070]	<213>	人工序列		
[1071]	<220>			
[1072]	<223>	编码AM4-272 CDR3的蛋白质序列		
[1073]	<400>	74		
[1074]	Tyr Arg Ile Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly			
[1075]	1	5	10	
[1076]	<210>	75		
[1077]	<211>	300		
[1078]	<212>	DNA		
[1079]	<213>	人工序列		
[1080]	<220>			
[1081]	<223>	编码AM4-272的核苷酸序列		
[1082]	<400>	75		
[1083]	ctgcaagtag atattgtgcc gagccagggc gaaattagcg tgggcgaaag caaatTTTTc	60		
[1084]	ttatgccagg tggcgggcca tttgtagggtg aggtcgatca gctggtttag cccgaacggt	120		
[1085]	gaaaaactga ccccgaaatca gcaacgtatc agcgttgtgt ggaacgatga tagctctagt	180		
[1086]	accctgacga tttacaatgc gaacattgat gacgcgggca tttataaatg cgtggtagag	240		
[1087]	cagcgggggc ggtcgcagtc ttatTTTTcg gaagccaccg ttaatgtgaa aatctttcag	300		
[1088]	<210>	76		
[1089]	<211>	103		
[1090]	<212>	PRT		
[1091]	<213>	人工序列		

- [1092] <220>  
 [1093] <223> 编码AM4-746的蛋白质序列  
 [1094] <400> 76  
 [1095] Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu  
 [1096] 1 5 10 15  
 [1097] Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Ser Lys Ser Asn Ile Arg  
 [1098] 20 25 30  
 [1099] Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln  
 [1100] 35 40 45  
 [1101] Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile  
 [1102] 50 55 60  
 [1103] Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Tyr  
 [1104] 65 70 75 80  
 [1105] Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Lys Leu Gly Glu Ala Thr  
 [1106] 85 90 95  
 [1107] Val Asn Val Lys Ile Phe Gln  
 [1108] 100  
 [1109] <210> 77  
 [1110] <211> 6  
 [1111] <212> PRT  
 [1112] <213> 人工序列  
 [1113] <220>  
 [1114] <223> 编码AM4-746 CDR1的蛋白质序列  
 [1115] <400> 77  
 [1116] Ser Lys Ser Asn Ile Arg  
 [1117] 1 5  
 [1118] <210> 78  
 [1119] <211> 14  
 [1120] <212> PRT  
 [1121] <213> 人工序列  
 [1122] <220>  
 [1123] <223> 编码AM4-746 CDR3的蛋白质序列  
 [1124] <400> 78  
 [1125] Tyr Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Lys Leu Gly  
 [1126] 1 5 10  
 [1127] <210> 79  
 [1128] <211> 314  
 [1129] <212> DNA  
 [1130] <213> 人工序列

[1131] <220>  
 [1132] <223> 编码AM4-746的核苷酸序列  
 [1133] <400> 79  
 [1134] atggcgctgc aggtggatat tgtgccgagc cagggcgaaa ttagcgtggg cgaaagcaaa 60  
 [1135] ttttttctgt gccaggtggc gggcagcaaa agcaacattc gtattagctg gtttagccccg 120  
 [1136] aacggcgaaa aactgacccc gaaccagcag cgtattagcg tgggtggaa cgatgatagc 180  
 [1137] agcagcacc caccattta taacgcgaac attgatgatg cgggcattta taaatgcgtg 240  
 [1138] gtgtatcgta ccggcggcta tcgtcatcgt tatctgaaac tgggcgaagc gaccgtgaac 300  
 [1139] gtgaaaattt ttca 314  
 [1140] <210> 80  
 [1141] <211> 243  
 [1142] <212> PRT  
 [1143] <213> 人工序列  
 [1144] <220>  
 [1145] <223> 编码AM3-114-Im7-FH-SA21双重特异性i体的蛋白质序列  
 [1146] <400> 80  
 [1147] Met Ala Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val  
 [1148] 1 5 10 15  
 [1149] Gly Glu Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Ser Leu Ser Gly  
 [1150] 20 25 30  
 [1151] Ile Arg Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn  
 [1152] 35 40 45  
 [1153] Gln Gln Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu  
 [1154] 50 55 60  
 [1155] Thr Ile Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val  
 [1156] 65 70 75 80  
 [1157] Val Trp Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly Glu  
 [1158] 85 90 95  
 [1159] Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe Gln Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu  
 [1160] 100 105 110  
 [1161] Lys Asn Ser Ile Ser Asp Tyr Thr Glu Ala Glu Phe Val Gln Leu Leu  
 [1162] 115 120 125  
 [1163] Lys Glu Ile Glu Lys Glu Asn Val Ala Ala Thr Asp Asp Val Leu Asp  
 [1164] 130 135 140  
 [1165] Val Leu Leu Glu His Phe Val Lys Ile Thr Glu His Pro Asp Gly Thr  
 [1166] 145 150 155 160  
 [1167] Asp Leu Ile Tyr Tyr Pro Ser Asp Asn Arg Asp Asp Ser Pro Glu Gly  
 [1168] 165 170 175  
 [1169] Ile Val Lys Glu Ile Lys Glu Trp Arg Ala Ala Asn Gly Lys Pro Gly

[1170]	180	185	190
[1171]	Phe Lys Gln Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp		
[1172]	195	200	205
[1173]	Lys Gly Ser Gly His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly		
[1174]	210	215	220
[1175]	Ser Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp		
[1176]	225	230	235 240
[1177]	Glu Asp Asp		
[1178]	<210> 81		
[1179]	<211> 732		
[1180]	<212> DNA		
[1181]	<213> 人工序列		
[1182]	<220>		
[1183]	<223> 编码AM3-114-Im7-FH-SA21双重特异性i体的核苷酸序列		
[1184]	<400> 81		
[1185]	atggccctgc aagtcgacat cgttccgtca caaggtgaaa tcagcgtggg tgagtccaaa	60	
[1186]	ttctttctgt gccaggtegc aggcagcctg agcggtatcc gtattagctg gttcagccc	120	
[1187]	aatggcgaaa agctgacgcc gaaccagcag cgtatctctg tggtttgaa cgacgacagc	180	
[1188]	agcagcacc tgaccatcta taacgccaat attgatgatg caggcattta caaatgtgtg	240	
[1189]	gtgtggcgca ccggtggtta ccgccaccgt tacctggttt tgggcgaggc gacggccaat	300	
[1190]	gttaagattt tccaaggtgg cggtagtagc gagctgaaga actccatcag cgactatacc	360	
[1191]	gaagcggaat ttgttcagtt gctgaaagaa attgagaaag aaaatgtcgc ggccactgat	420	
[1192]	gacgtcttag acgtgctgct ggagcatttt gttaagatca ccgagcacc ggacggtagc	480	
[1193]	gatctcatct actatcctag cgataaccgc gacgattctc cagagggcat tgtcaaagaa	540	
[1194]	attaaggaat ggcgtgctgc aaatggtaaa ccgggtttca aacagggtagc tggtagcggc	600	
[1195]	agcgactaca aagatgatga cgacaagggt agcggccacc atcaccacca tcatcaccac	660	
[1196]	ggcggcggcg gctcgcgttt gattgaagat atctgcctgc cgcgttgggg ttgtctgtgg	720	
[1197]	gaggacgatt aa	732	
[1198]	<210> 82		
[1199]	<211> 105		
[1200]	<212> PRT		
[1201]	<213> 人工序列		
[1202]	<220>		
[1203]	<223> 编码21H5 i体的氨基酸序列		
[1204]	<400> 82		
[1205]	Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu		
[1206]	1 5 10 15		
[1207]	Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Asp Ala Lys Asp Lys Asp		
[1208]	20 25 30		

[1209]	Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln
[1210]	35 40 45
[1211]	Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile
[1212]	50 55 60
[1213]	Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Thr
[1214]	65 70 75 80
[1215]	Gly Ser Asp Ala Met Ser Asn Tyr Ser Tyr Pro Ile Ser Glu Ser Glu
[1216]	85 90 95
[1217]	Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe Gln
[1218]	100 105
[1219]	<210> 83
[1220]	<211> 6
[1221]	<212> PRT
[1222]	<213> 人工序列
[1223]	<220>
[1224]	<223> 编码AM4-774 CDR1的氨基酸序列
[1225]	<400> 83
[1226]	Ser Lys Ser Val Ile Arg
[1227]	1 5
[1228]	<210> 84
[1229]	<211> 14
[1230]	<212> PRT
[1231]	<213> 人工序列
[1232]	<220>
[1233]	<223> 编码AM4-774 CDR3的氨基酸序列
[1234]	<400> 84
[1235]	Tyr Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly
[1236]	1 5 10
[1237]	<210> 85
[1238]	<211> 6
[1239]	<212> PRT
[1240]	<213> 人工序列
[1241]	<220>
[1242]	<223> 编码AM4-208 CDR1的氨基酸序列
[1243]	<400> 85
[1244]	Ser Lys Ser Glu Ile Arg
[1245]	1 5
[1246]	<210> 86
[1247]	<211> 14

- [1248] <212> PRT  
[1249] <213> 人工序列  
[1250] <220>  
[1251] <223> 编码AM4-208 CDR3的氨基酸序列  
[1252] <400> 86  
[1253] Tyr Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly  
[1254] 1 5 10  
[1255] <210> 87  
[1256] <211> 6  
[1257] <212> PRT  
[1258] <213> 人工序列  
[1259] <220>  
[1260] <223> 编码AM4-1088 CDR1的氨基酸序列  
[1261] <400> 87  
[1262] Ser Lys Ser Asp Phe Arg  
[1263] 1 5  
[1264] <210> 88  
[1265] <211> 13  
[1266] <212> PRT  
[1267] <213> 人工序列  
[1268] <220>  
[1269] <223> 编码AM4-1088 CDR3的氨基酸序列  
[1270] <400> 88  
[1271] Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Lys Leu Gly  
[1272] 1 5 10  
[1273] <210> 89  
[1274] <211> 6  
[1275] <212> PRT  
[1276] <213> 人工序列  
[1277] <220>  
[1278] <223> 编码AM4-239 CDR1的氨基酸序列  
[1279] <400> 89  
[1280] Ala Tyr Ser Asp Ile Arg  
[1281] 1 5  
[1282] <210> 90  
[1283] <211> 14  
[1284] <212> PRT  
[1285] <213> 人工序列  
[1286] <220>



[1326]	1	5	10
[1327]	<210> 95		
[1328]	<211> 6		
[1329]	<212> PRT		
[1330]	<213> 人工序列		
[1331]	<220>		
[1332]	<223> 编码AM4-386 CDR1的氨基酸序列		
[1333]	<400> 95		
[1334]	Ile Thr Ser Glu Gly His		
[1335]	1	5	
[1336]	<210> 96		
[1337]	<211> 18		
[1338]	<212> PRT		
[1339]	<213> 人工序列		
[1340]	<220>		
[1341]	<223> 编码AM4-386 CDR3的氨基酸序列		
[1342]	<400> 96		
[1343]	Glu Thr Thr Val Phe Asn Glu Val Met Arg Leu Gly Asn Gly Ala His		
[1344]	1	5	10 15
[1345]	Val Tyr		
[1346]	<210> 97		
[1347]	<211> 6		
[1348]	<212> PRT		
[1349]	<213> 人工序列		
[1350]	<220>		
[1351]	<223> 编码AM4-352 CDR1的氨基酸序列		
[1352]	<400> 97		
[1353]	Ser Lys Asp Asp Ile Arg		
[1354]	1	5	
[1355]	<210> 98		
[1356]	<211> 14		
[1357]	<212> PRT		
[1358]	<213> 人工序列		
[1359]	<220>		
[1360]	<223> 编码AM4-352 CDR3的氨基酸序列		
[1361]	<400> 98		
[1362]	Tyr Arg Thr Gly Gly Tyr Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly		
[1363]	1	5	10
[1364]	<210> 99		

- [1365] <211> 6  
[1366] <212> PRT  
[1367] <213> 人工序列  
[1368] <220>  
[1369] <223> 编码AM3-182 CDR1的氨基酸序列  
[1370] <400> 99  
[1371] Val Gly Asn His Ile Arg  
[1372] 1 5  
[1373] <210> 100  
[1374] <211> 14  
[1375] <212> PRT  
[1376] <213> 人工序列  
[1377] <220>  
[1378] <223> 编码AM3-182 CDR3的氨基酸序列  
[1379] <400> 100  
[1380] Trp Arg Ala Gly Gly Tyr Arg His Arg Ala Leu Val Leu Gly  
[1381] 1 5 10  
[1382] <210> 101  
[1383] <211> 6  
[1384] <212> PRT  
[1385] <213> 人工序列  
[1386] <220>  
[1387] <223> 编码AM4-203 CDR1的氨基酸序列  
[1388] <400> 101  
[1389] Ser Tyr Gly Asp Ile Arg  
[1390] 1 5  
[1391] <210> 102  
[1392] <211> 14  
[1393] <212> PRT  
[1394] <213> 人工序列  
[1395] <220>  
[1396] <223> 编码AM4-203 CDR3的氨基酸序列  
[1397] <400> 102  
[1398] Tyr Arg Thr Gly Gly Trp Arg His Arg Tyr Leu Val Leu Gly  
[1399] 1 5 10  
[1400] <210> 103  
[1401] <211> 6  
[1402] <212> PRT  
[1403] <213> 人工序列

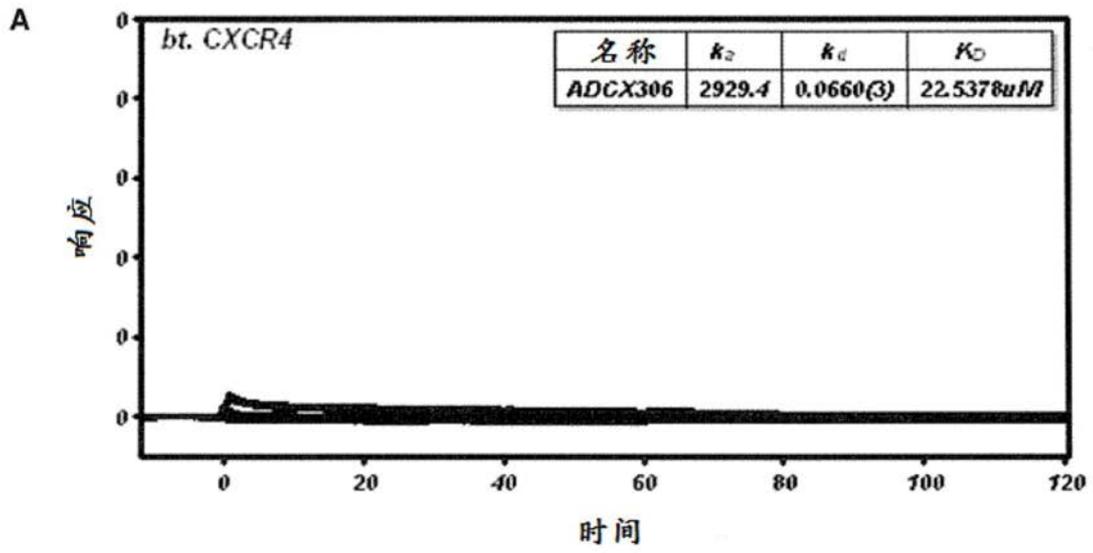


[1443]	Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
[1444]	165 170 175
[1445]	Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn
[1446]	180 185 190
[1447]	Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu
[1448]	195 200 205
[1449]	Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser
[1450]	210 215 220
[1451]	Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr
[1452]	225 230 235 240
[1453]	Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr
[1454]	245 250 255
[1455]	Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln
[1456]	260 265 270
[1457]	Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
[1458]	275 280 285
[1459]	Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe
[1460]	290 295 300
[1461]	Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val
[1462]	305 310 315 320
[1463]	Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly
[1464]	325 330 335
[1465]	His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
[1466]	340 345 350

1	26	33	79	88	97
<b>A</b>	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAG	<b>DAKDKD</b>	ISWFSPNGEKLTPNQQRISVWVWDDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCV	<b>TGEDGSES</b>	EATVNVKIFQ (SEQ ID NO:1)
<b>B</b>	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCA'B'AG	<b>XXXXXX</b>	ISWFSPNGEKLTPNQQRISVWVWDDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCV	<b>Y'n</b>	EATVNVKIFQ (SEQ ID NO:2)
<b>C</b>	LQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAG	<b>SGSDIR</b>	ISWFSPNGEKLTPNQQRISVWVWDDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCV	<b>VRTGGYRHRALVLG</b>	EATVNVKIFQ (SEQ ID NO:11)
<b>D</b>	ZMLQVDIVPSQGEISVGESKFFLCA'B'AG	<b>SX<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>R</b>	ISWFSPNGEKLTPNQQRISVWVWDDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCV	<b>Y<sub>1</sub>R<sub>Y</sub><sub>2</sub>GY<sub>3</sub>YRHRV<sub>4</sub>LY<sub>5</sub>LG</b>	EATVNVKIFQ (SEQ ID NO:39)

图1

### ADCX-306



### ADCX-272

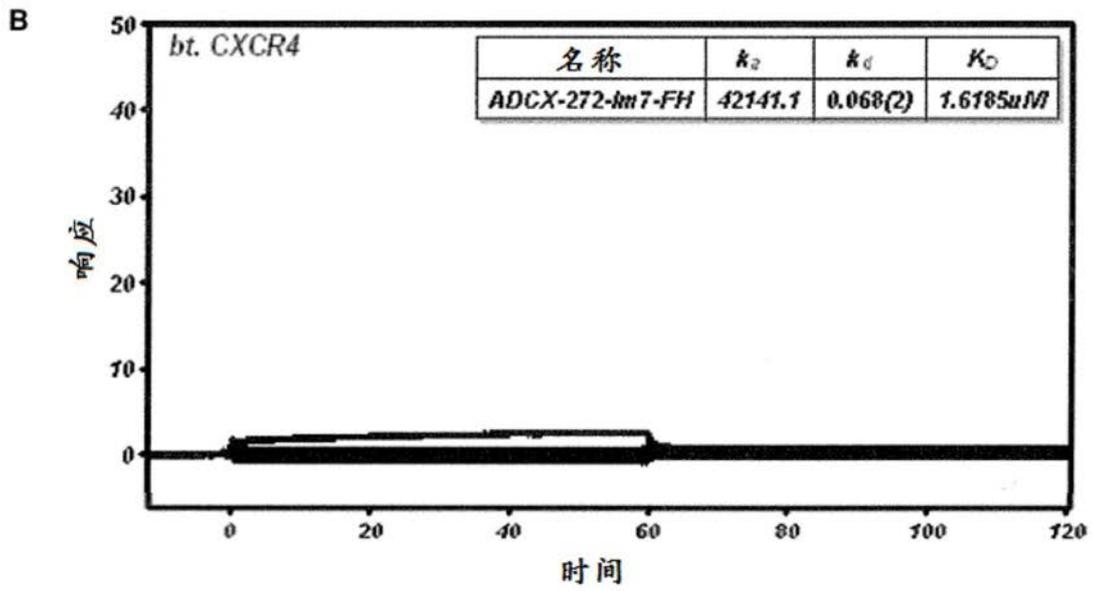


图2-1

ADCX-668

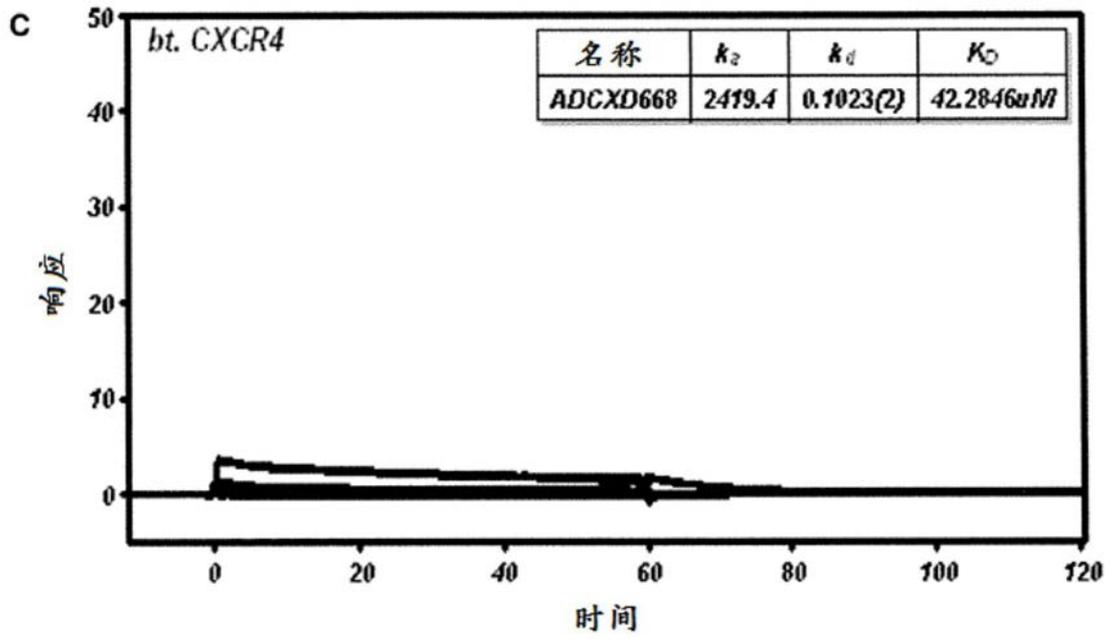
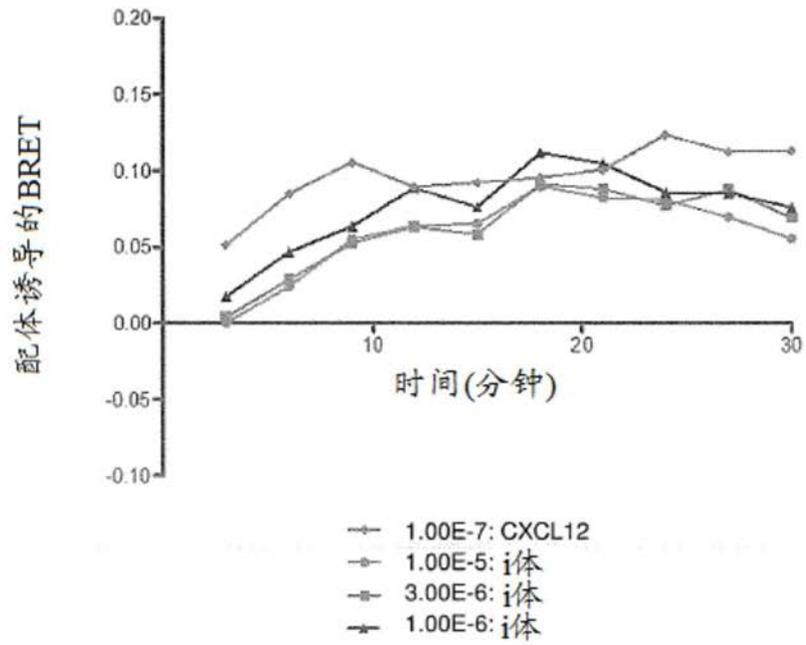


图2-2

**A**

ADCX99-Im7-FH



**B**

ADCX272-Im7-FH

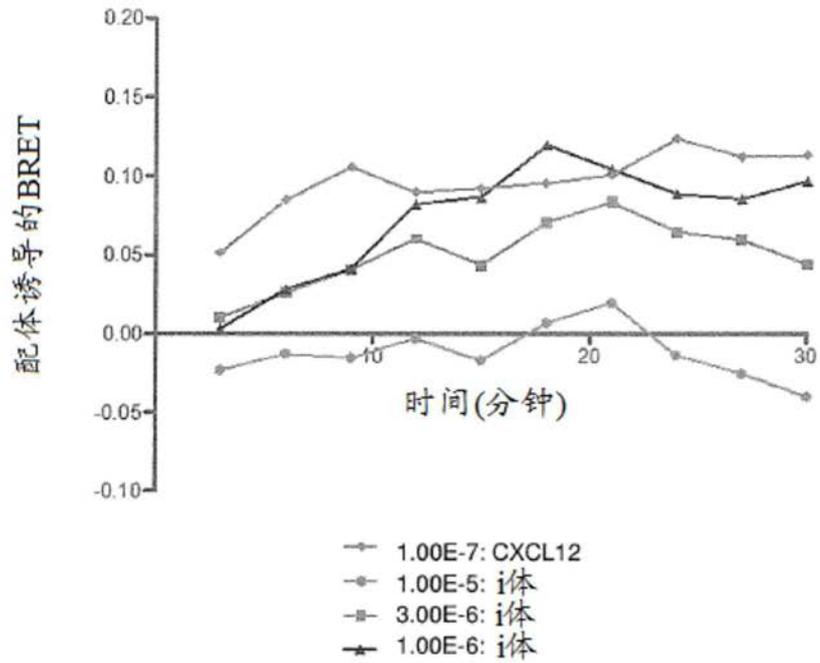
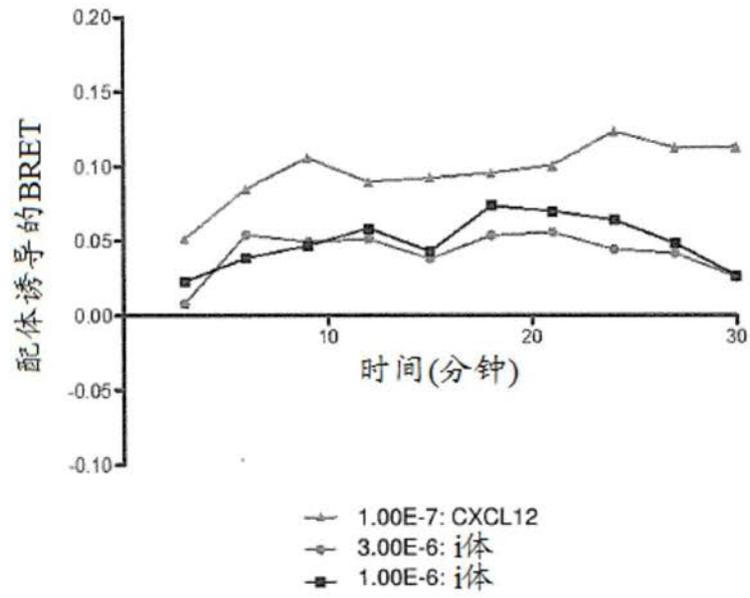


图3-1

C

ADCX99-FH



D

ADCX6

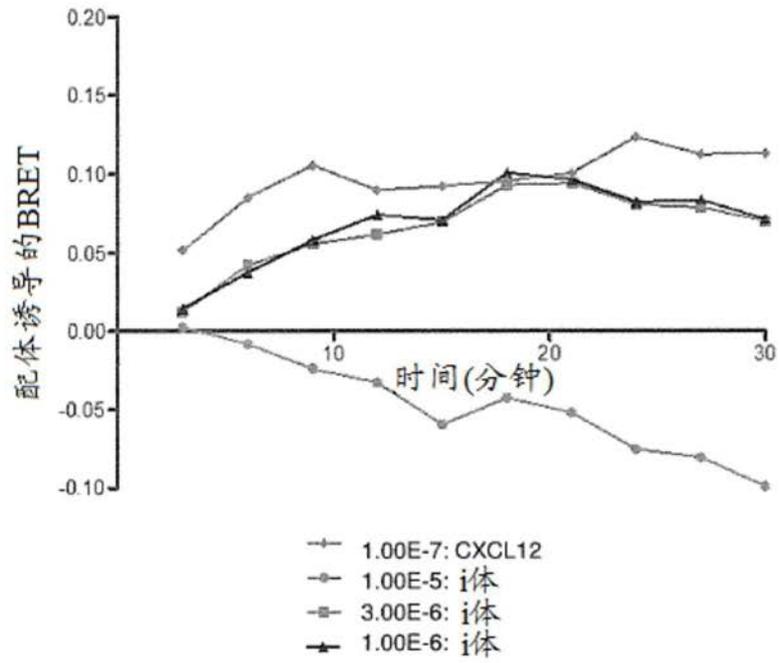
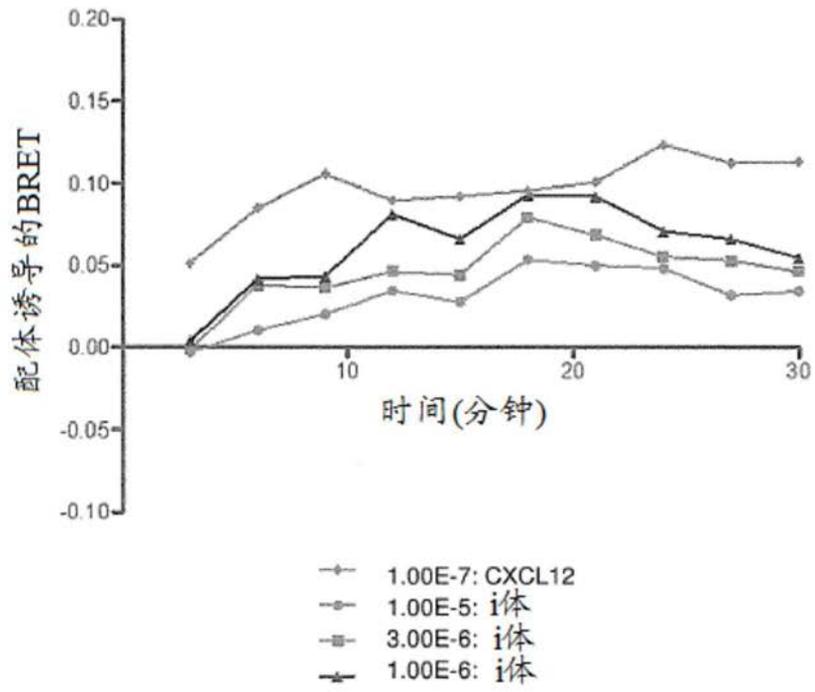


图3-2

E

ADCX306



F

ADCX668

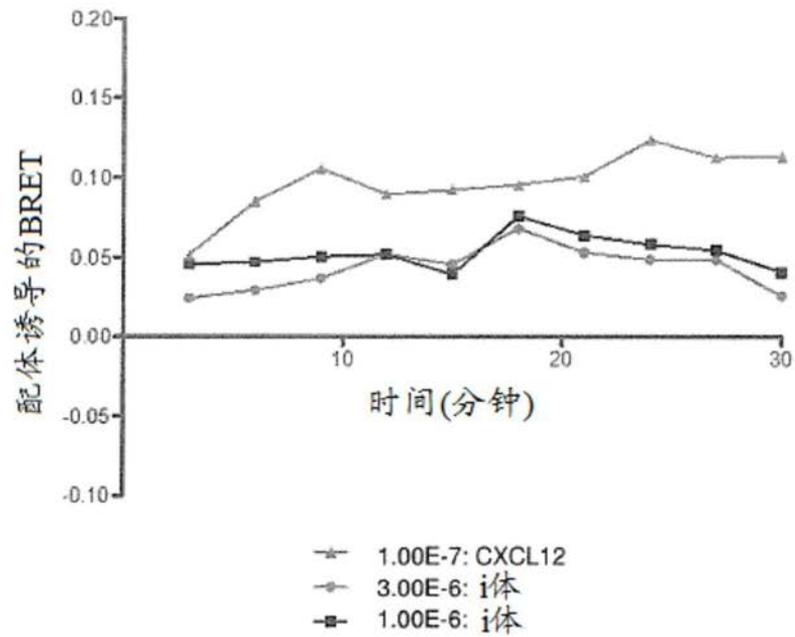


图3-3

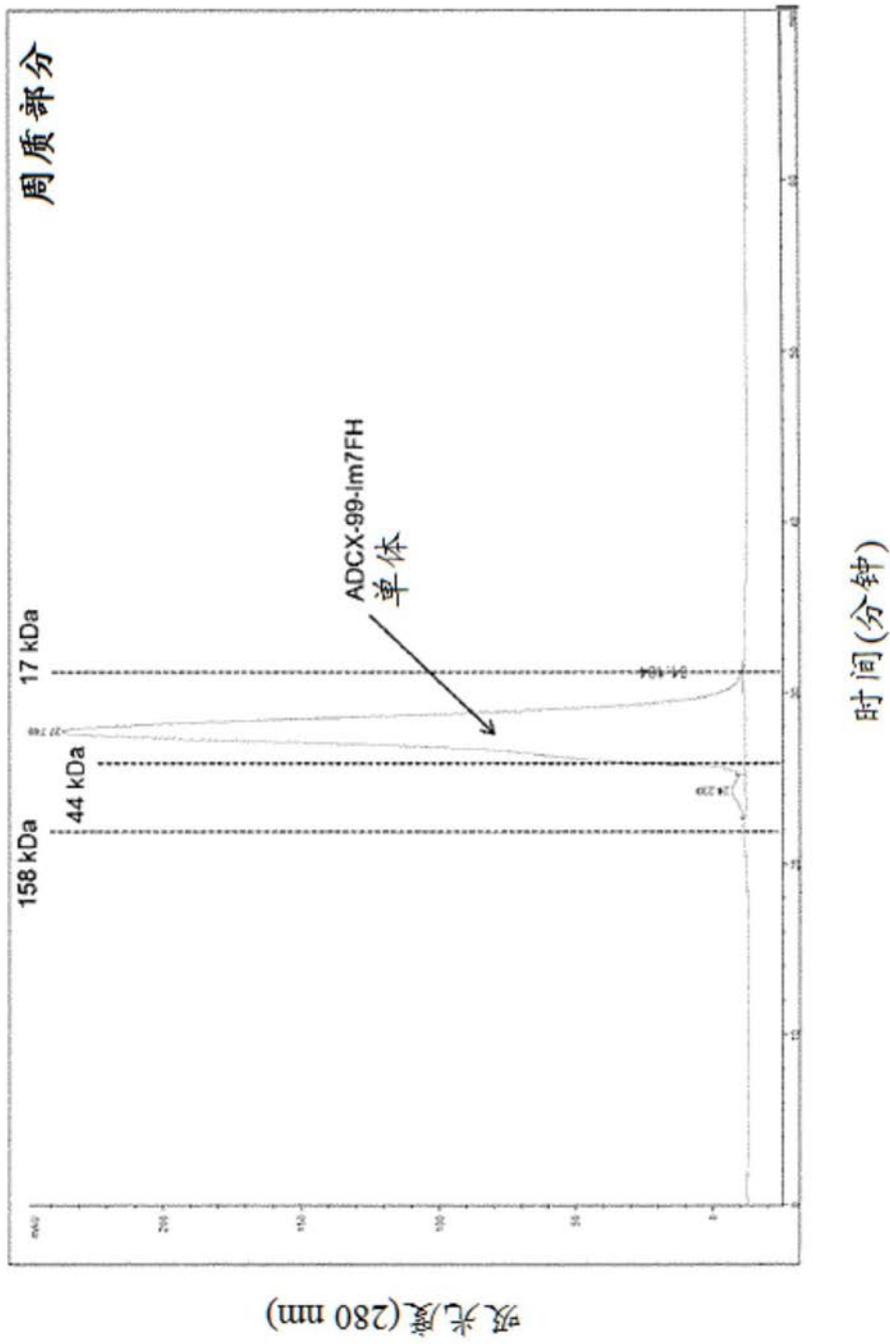


图4

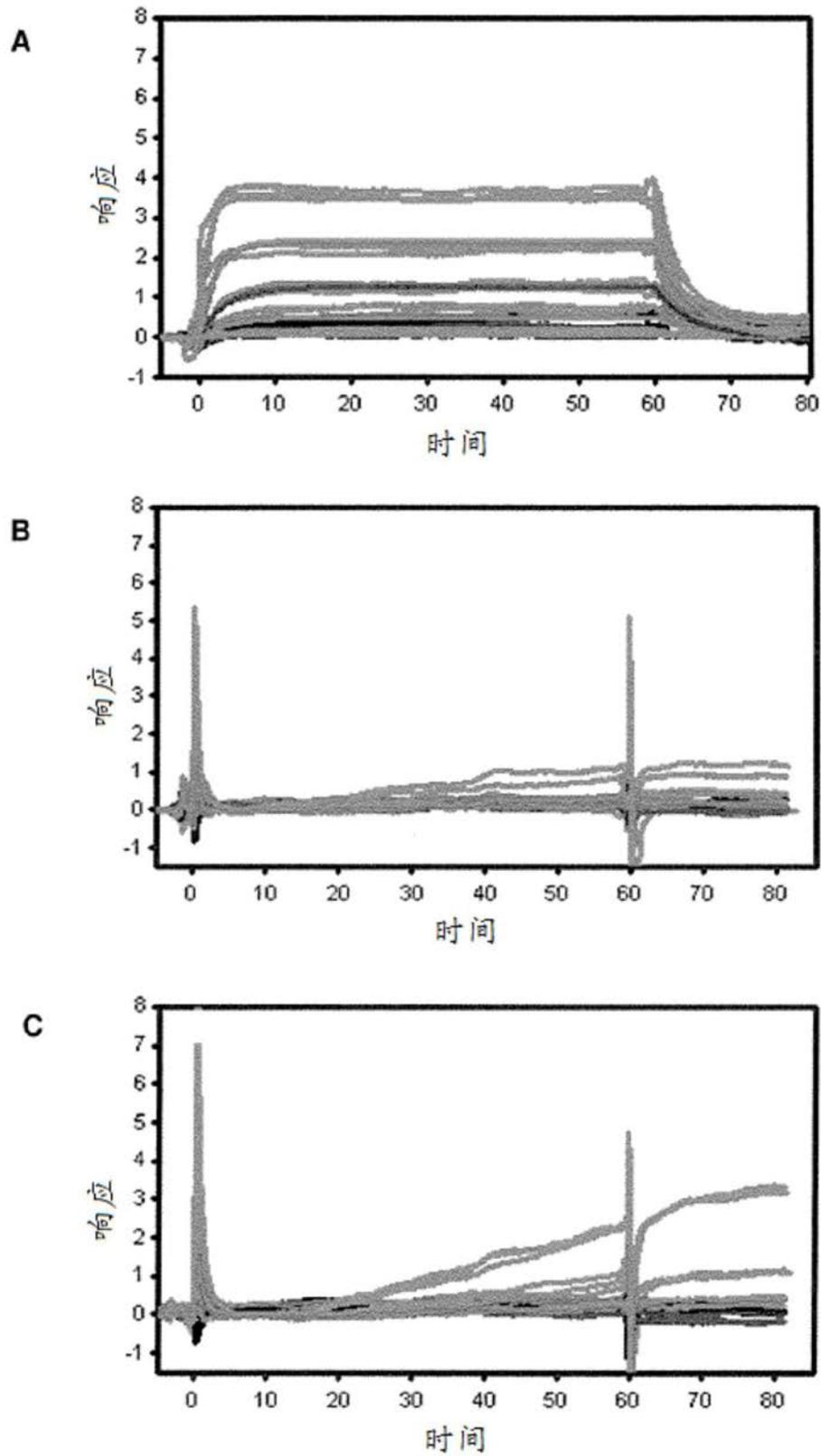


图5

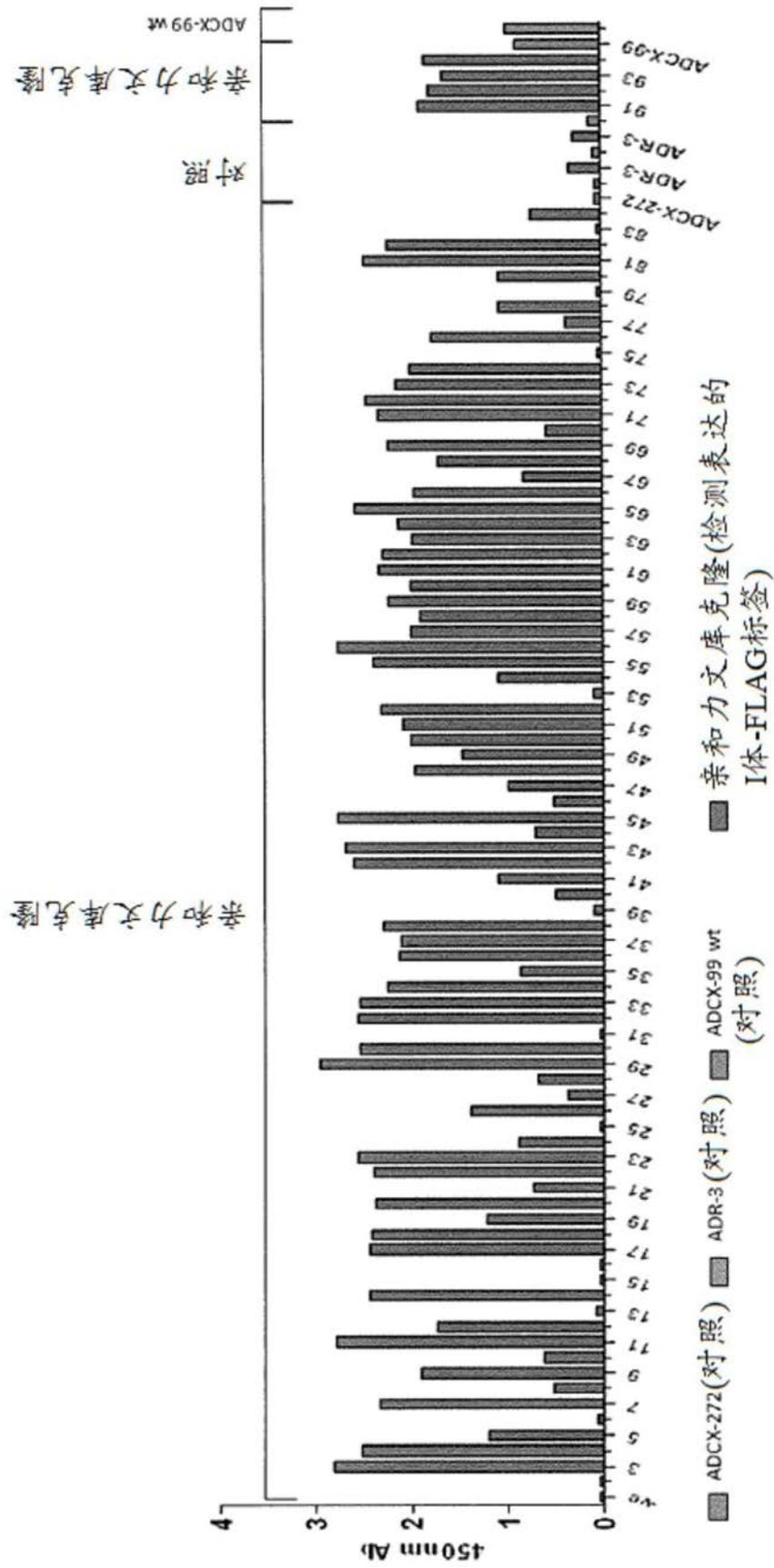
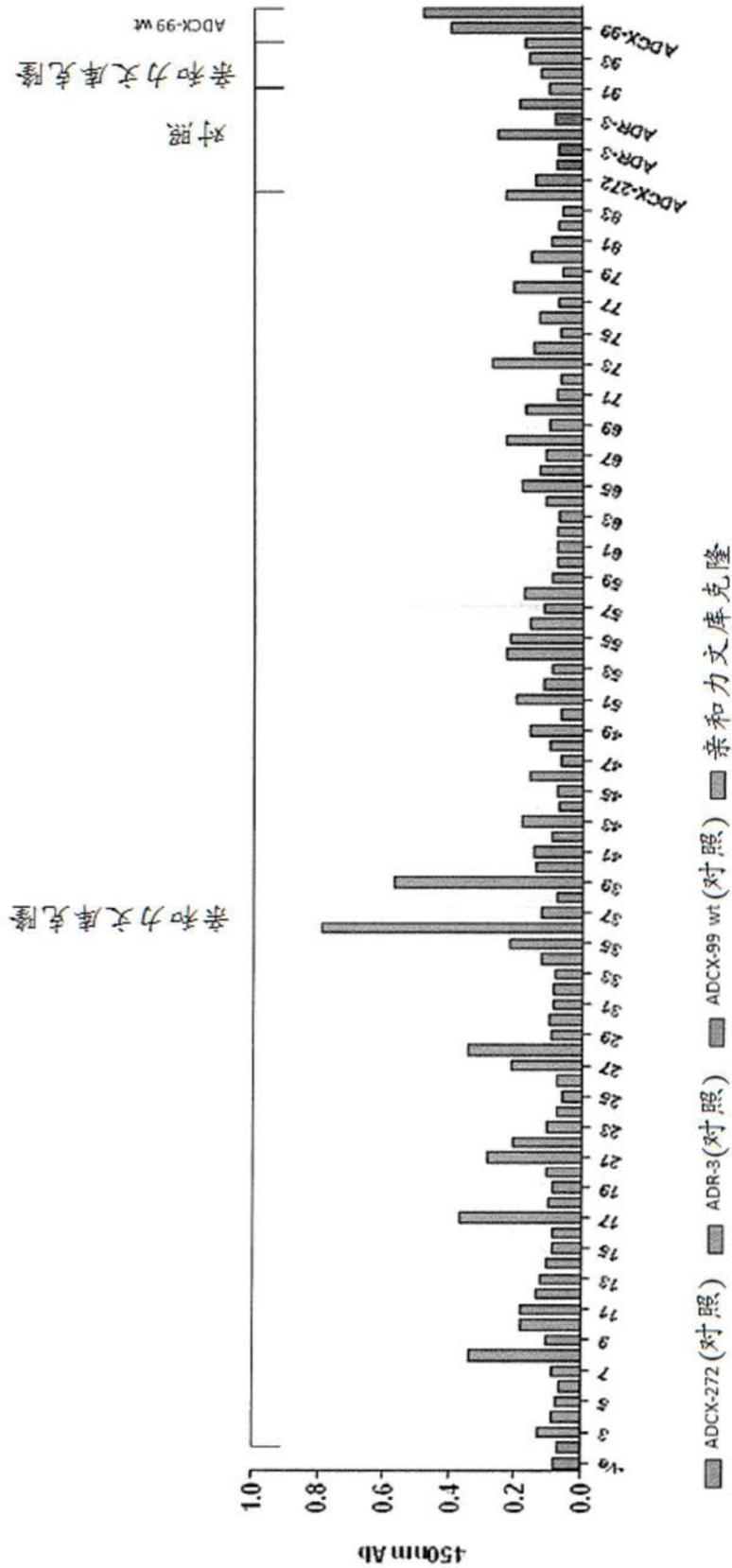
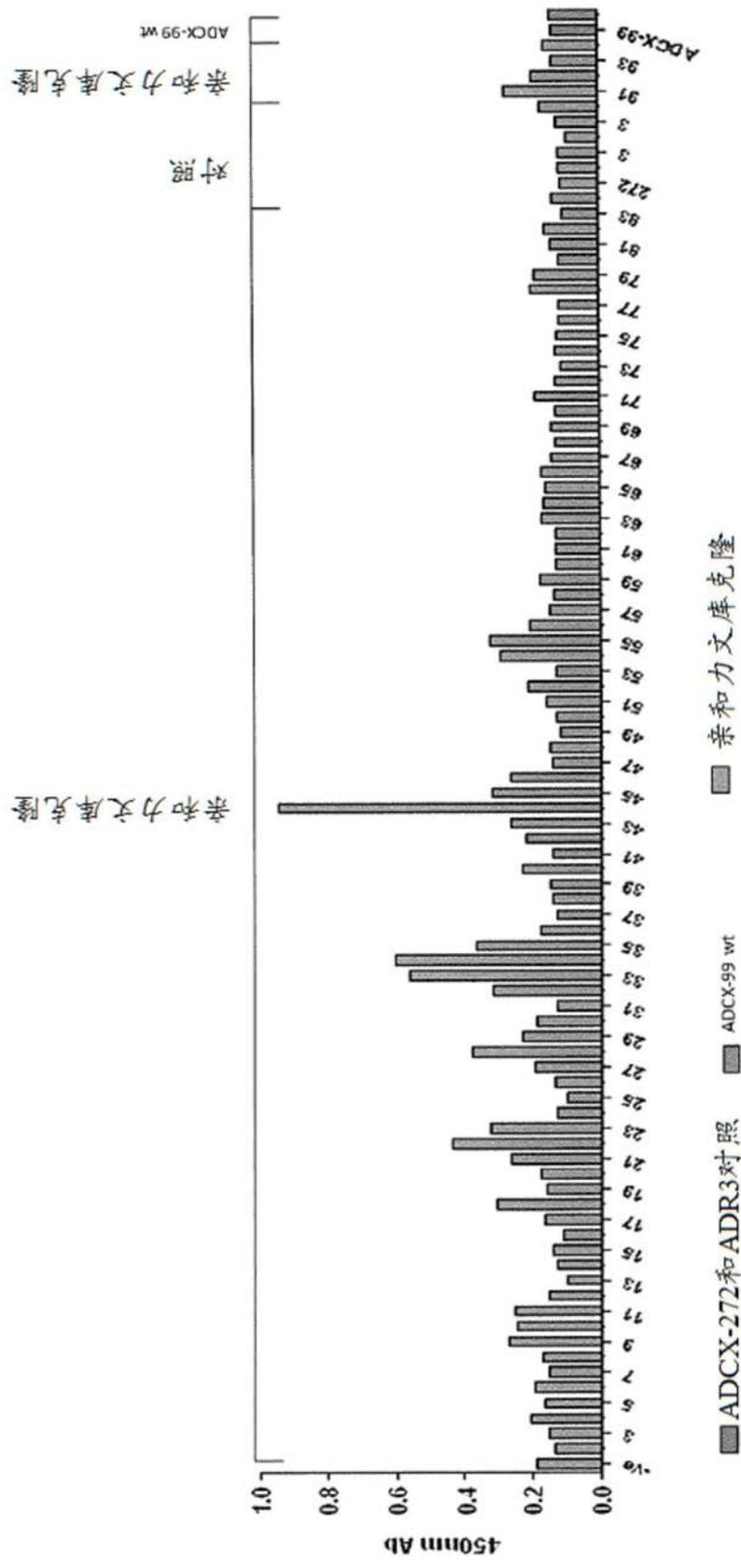


图6



A

图7-1



B

图7-2



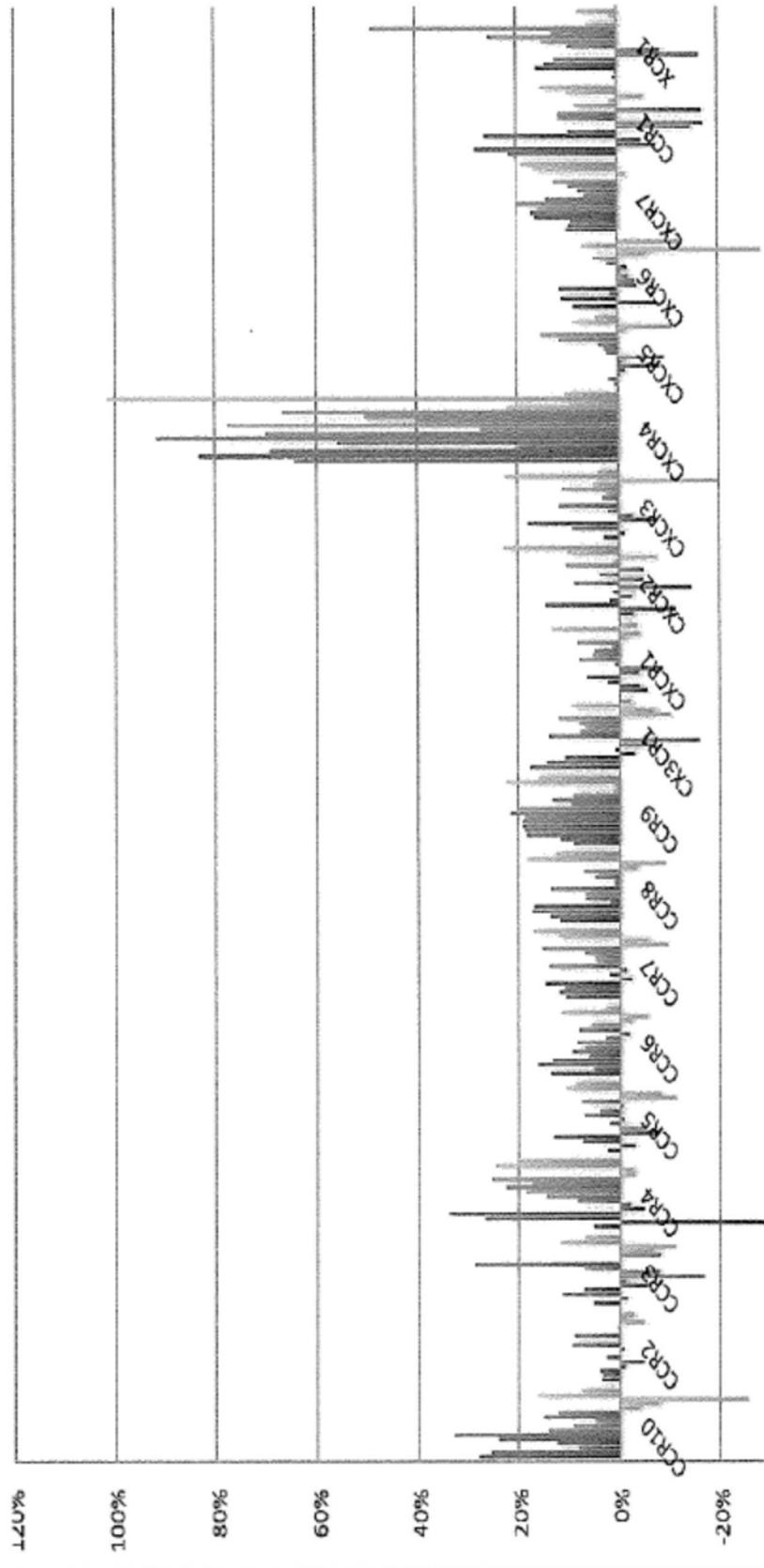


图9



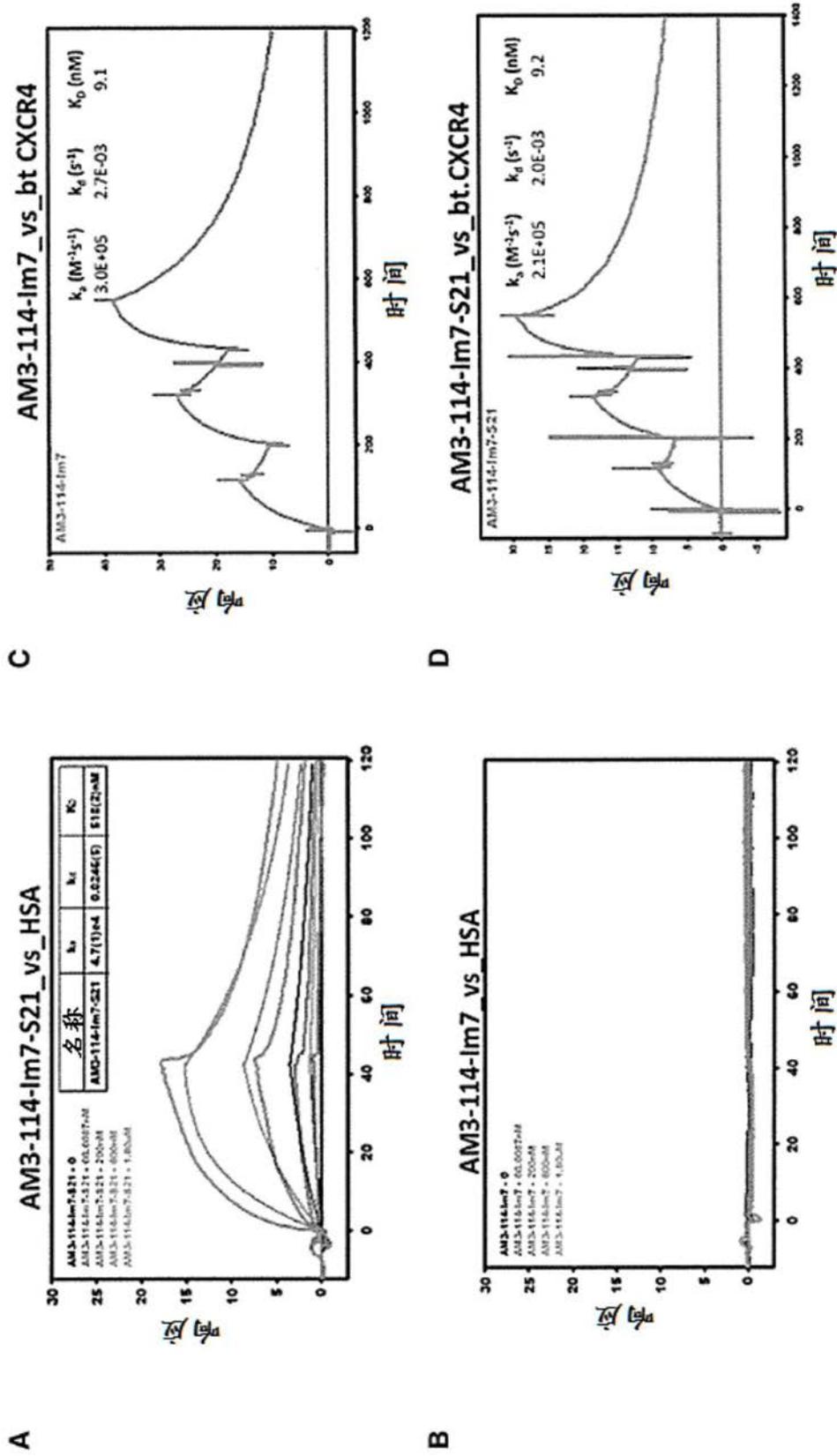


图11

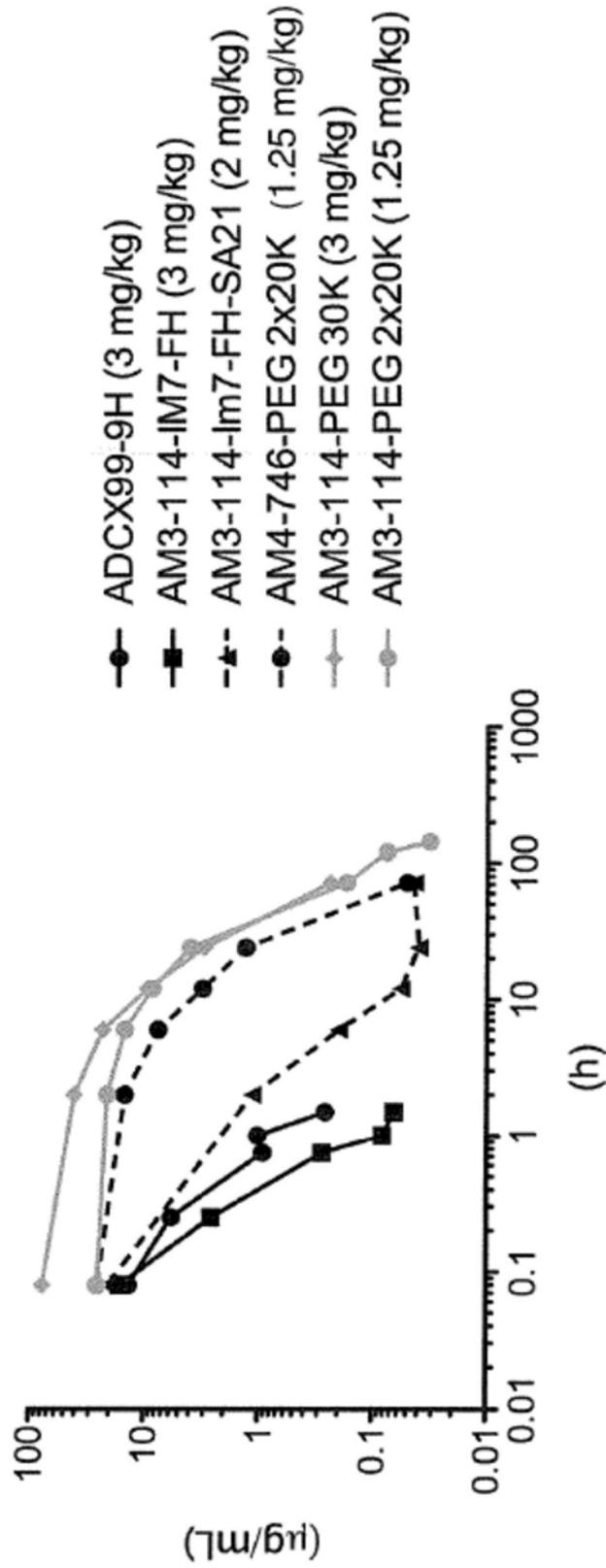


图12

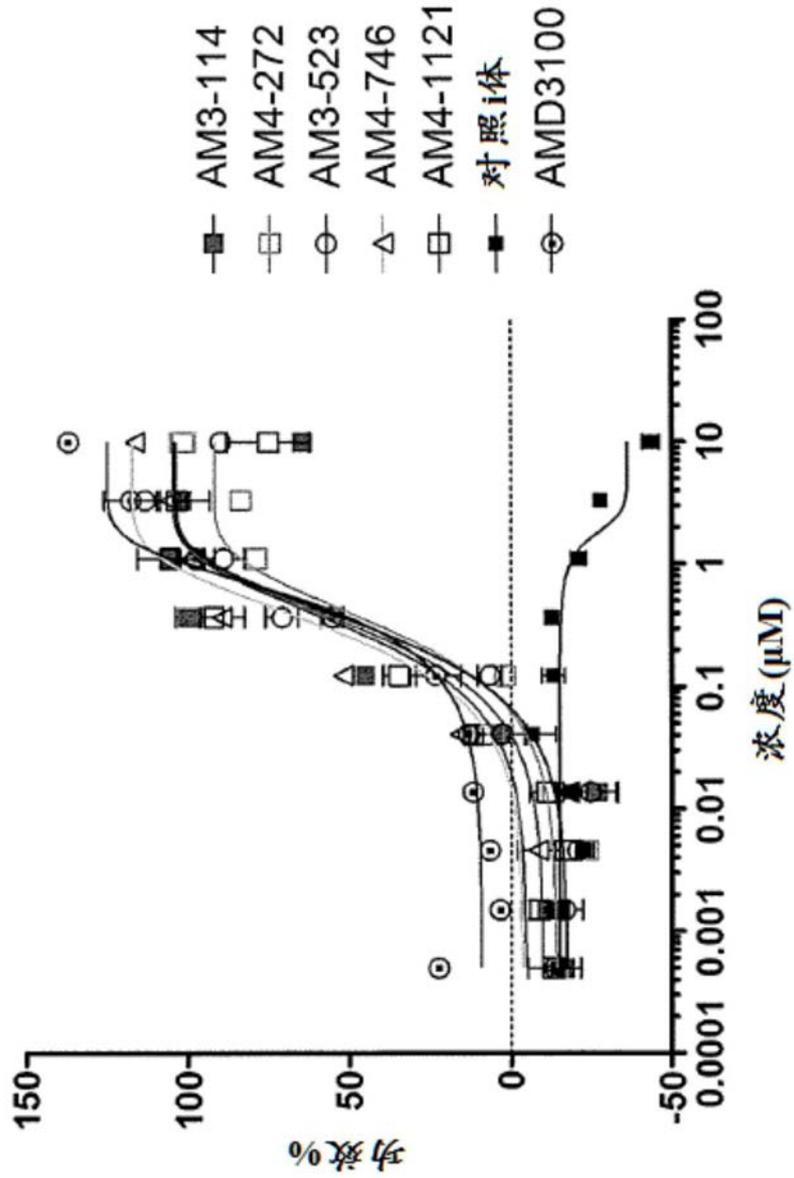


图13

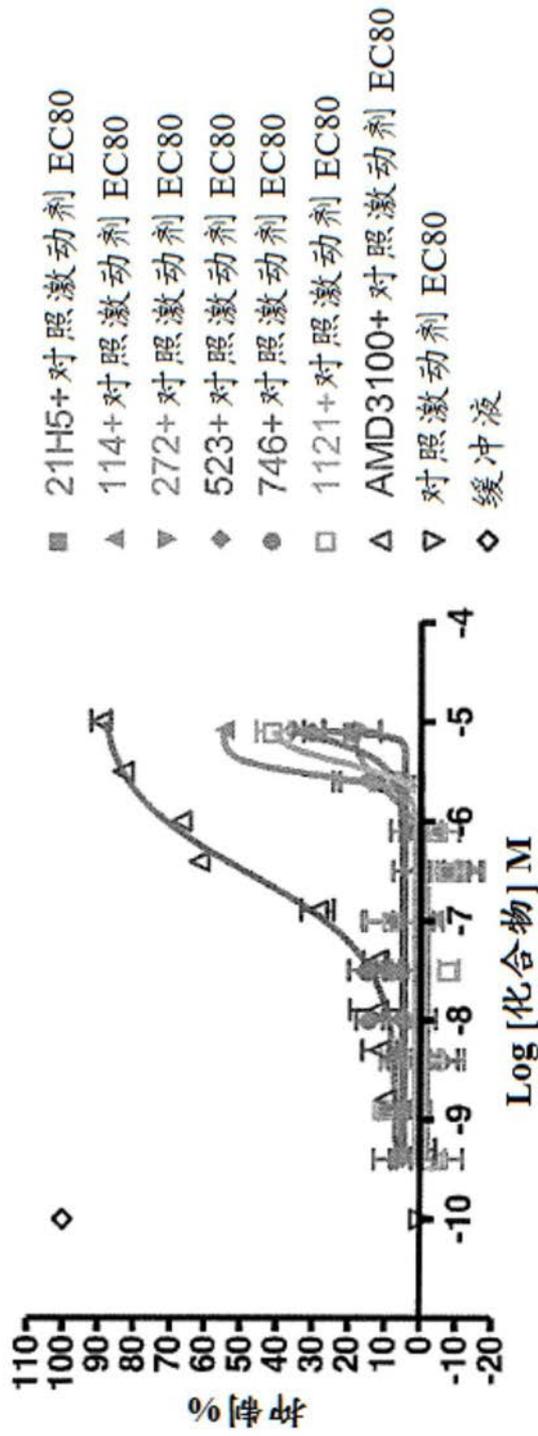
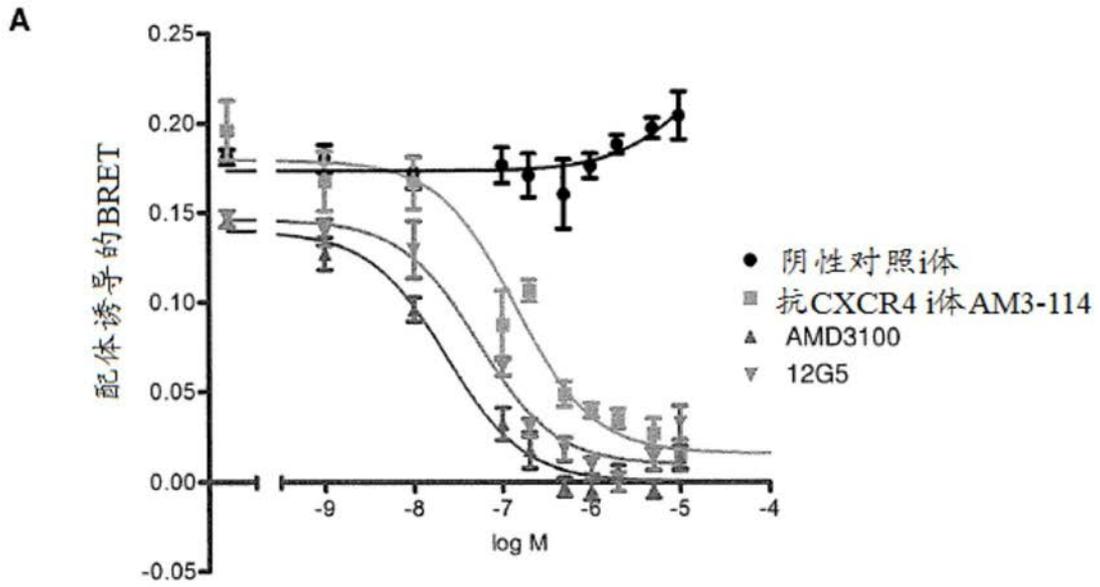


图14



5

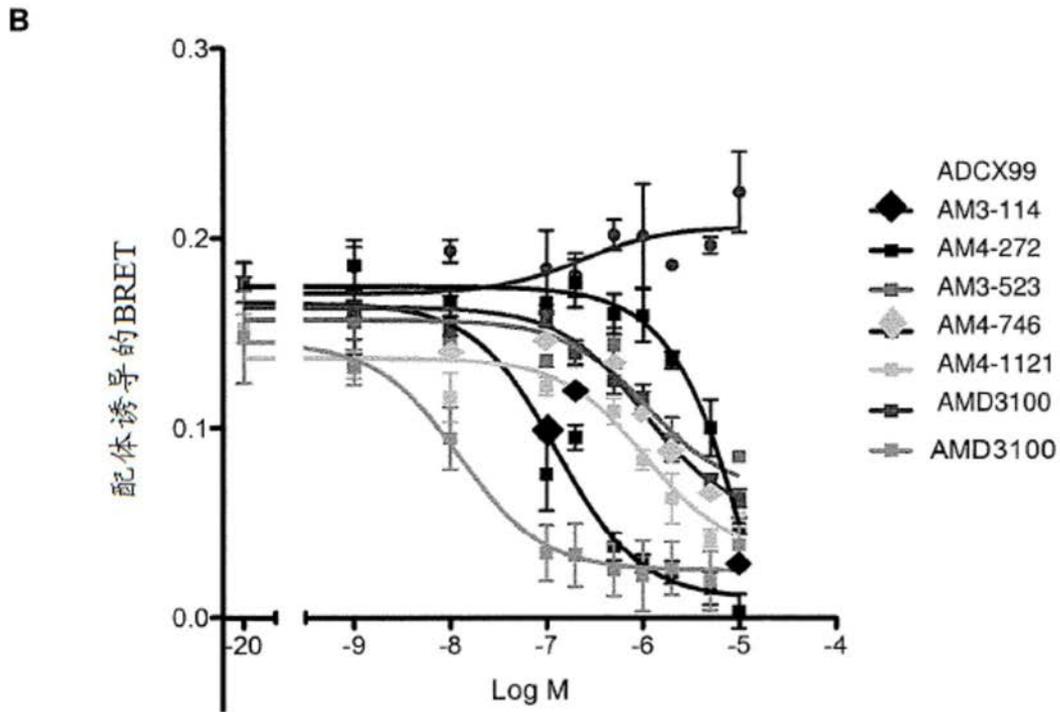


图15

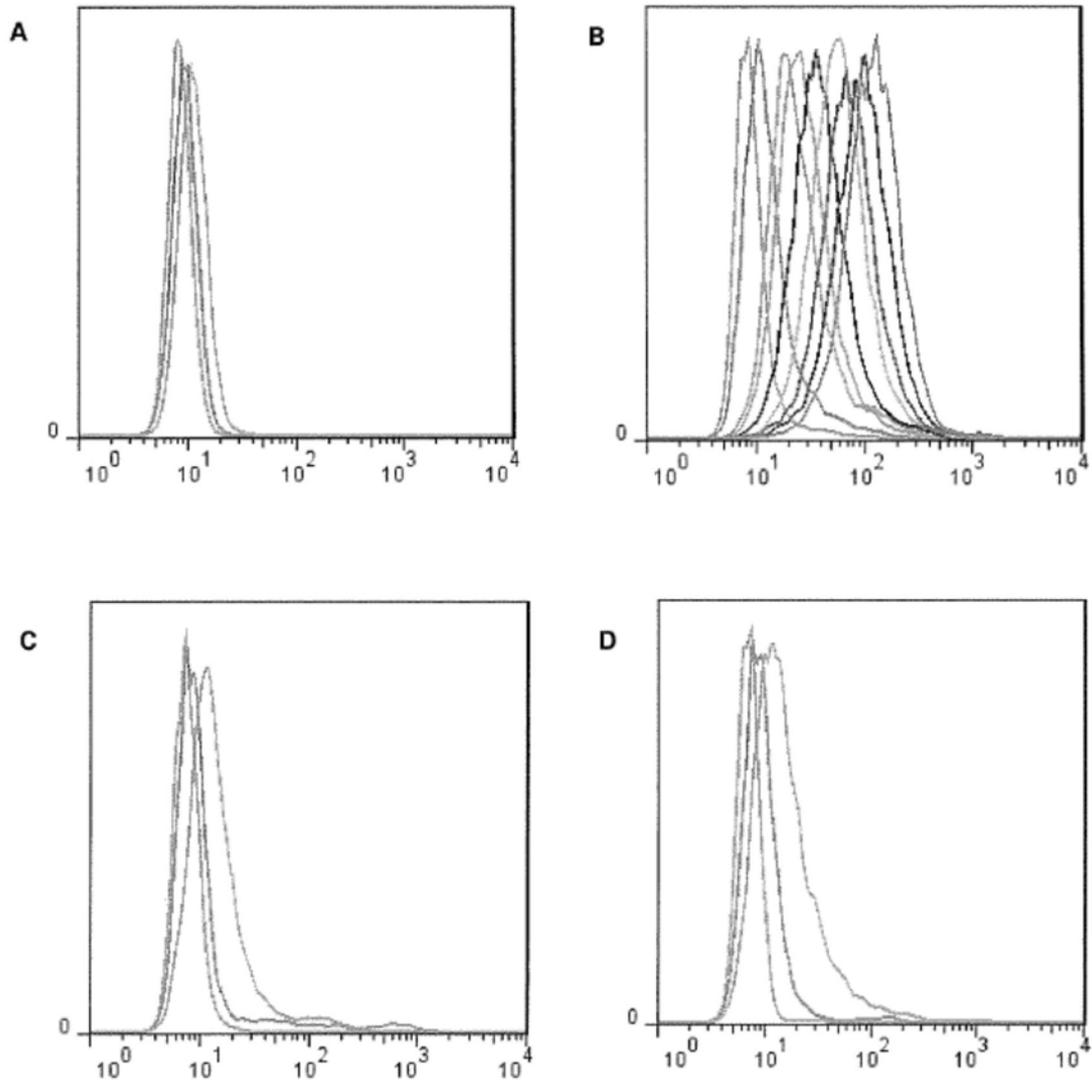


图16-1

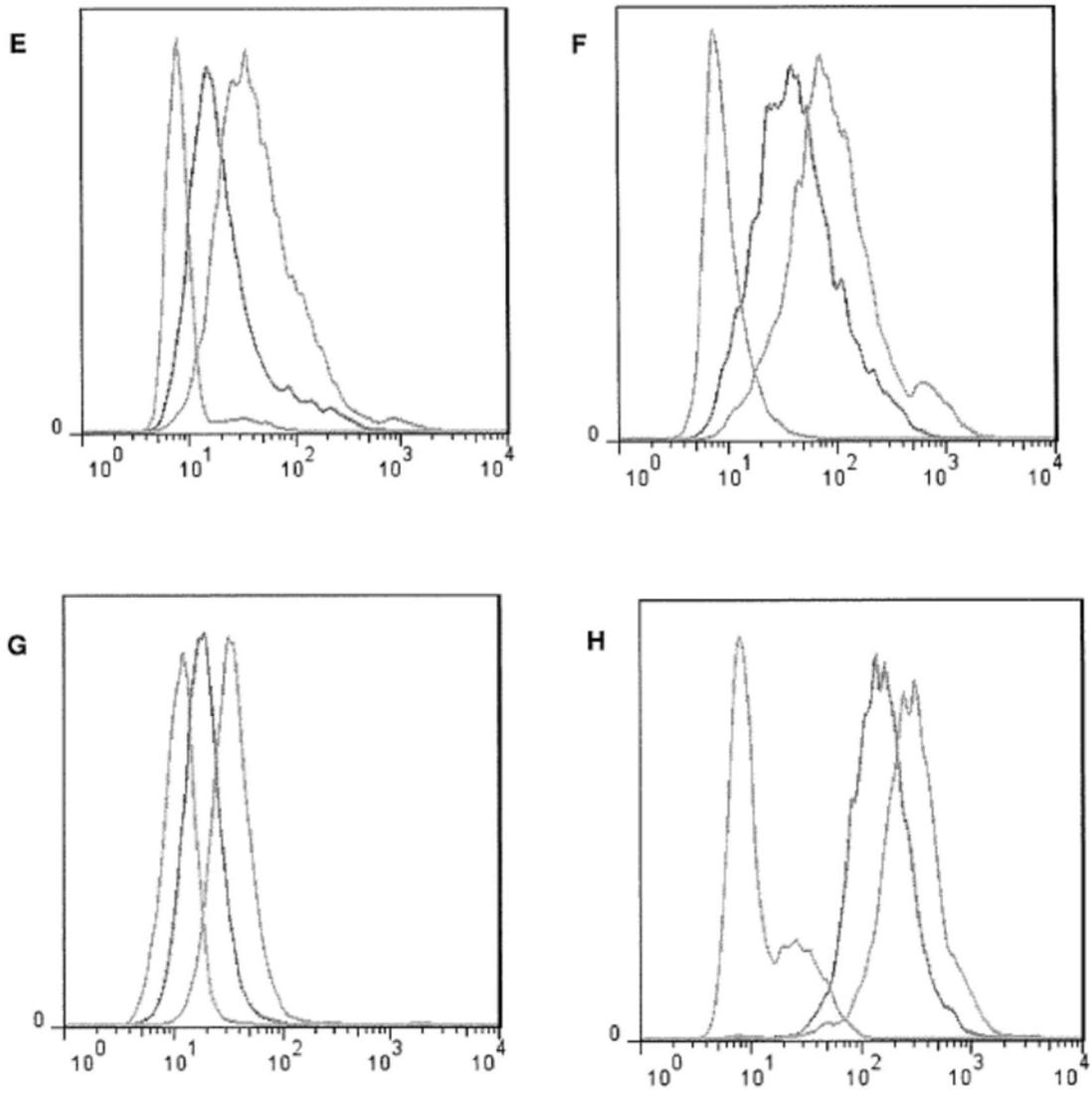


图16-2

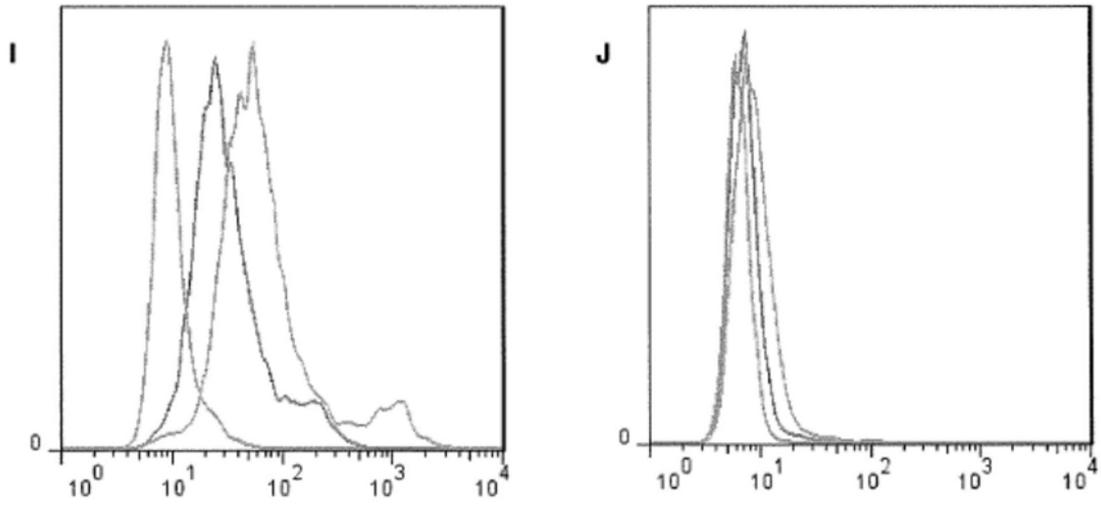


图16-3

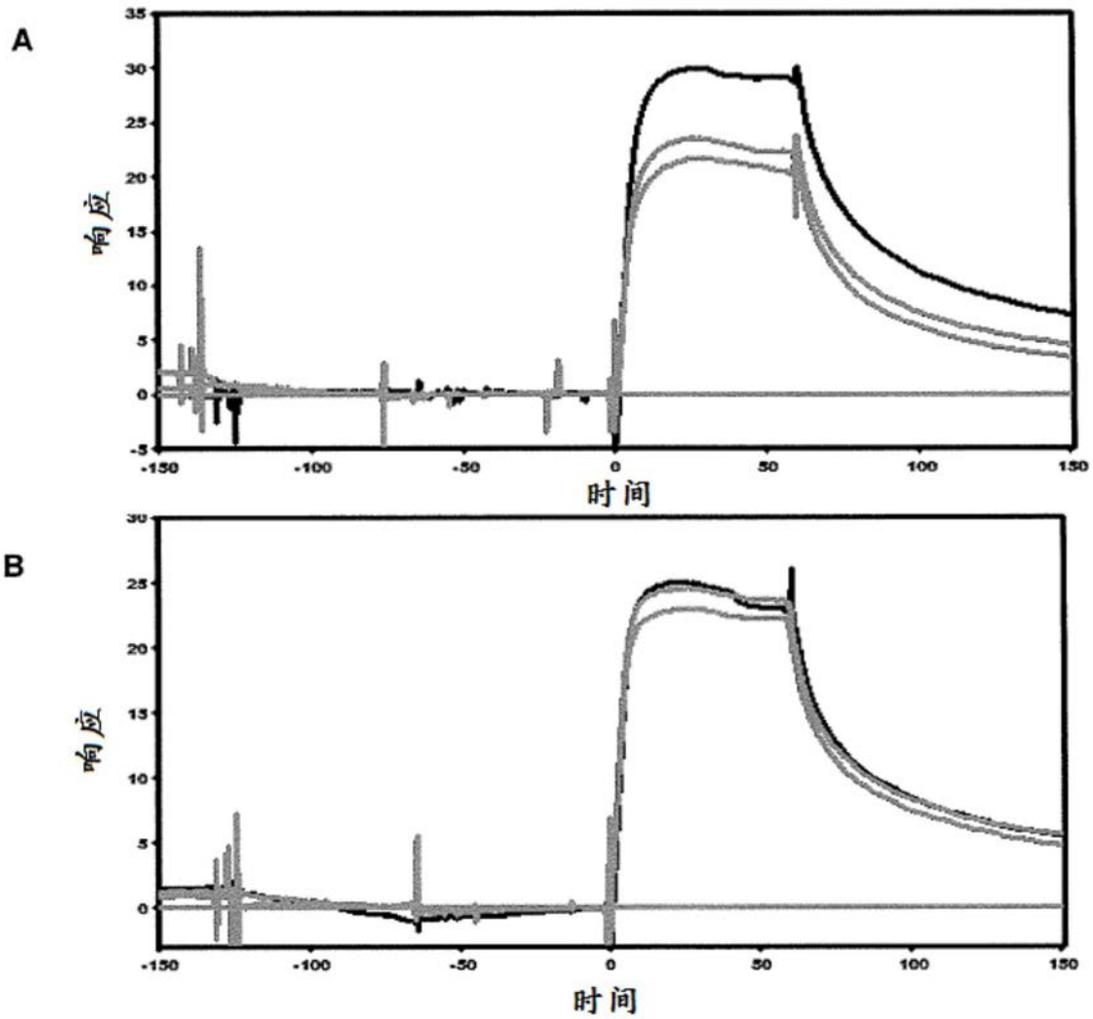


图17

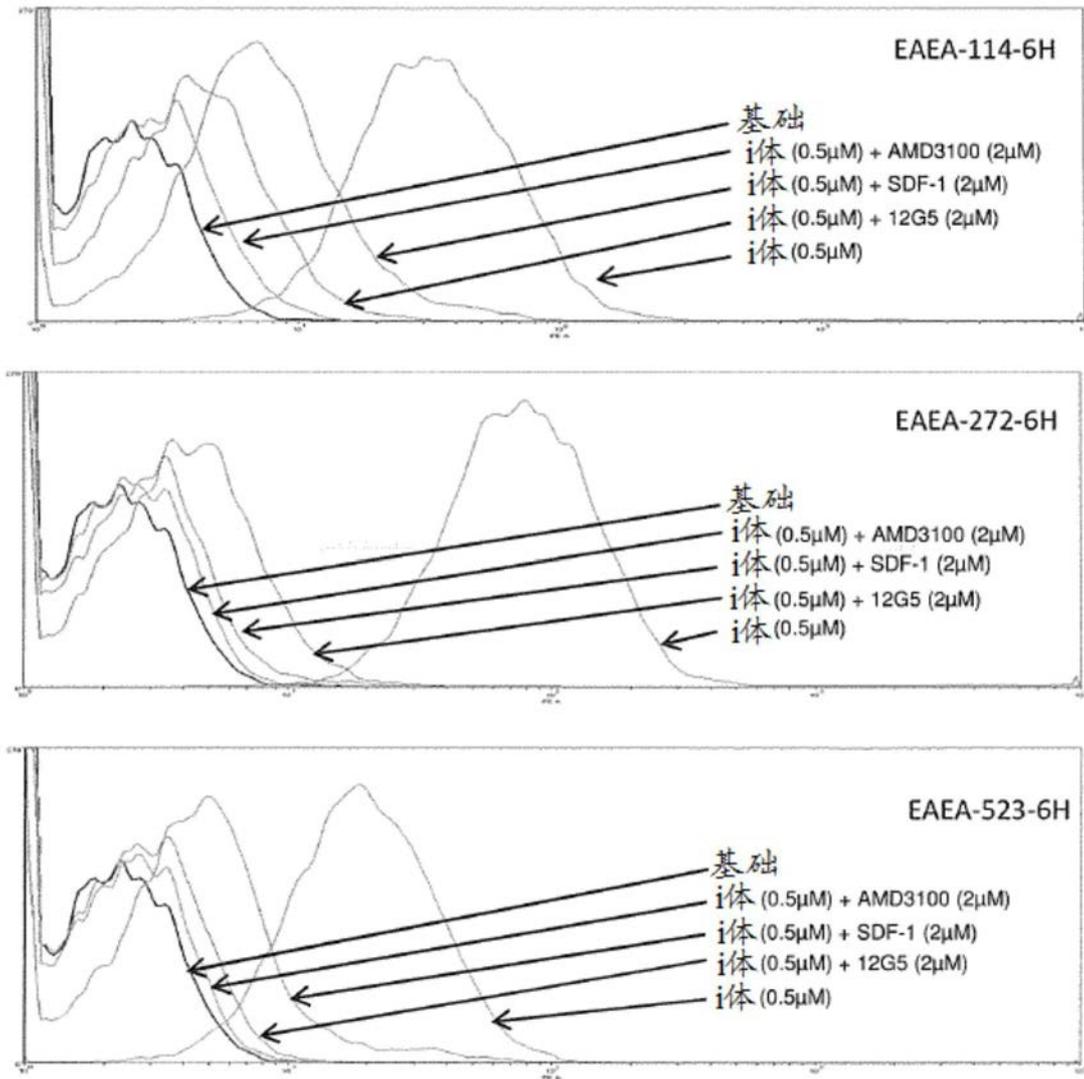


图18

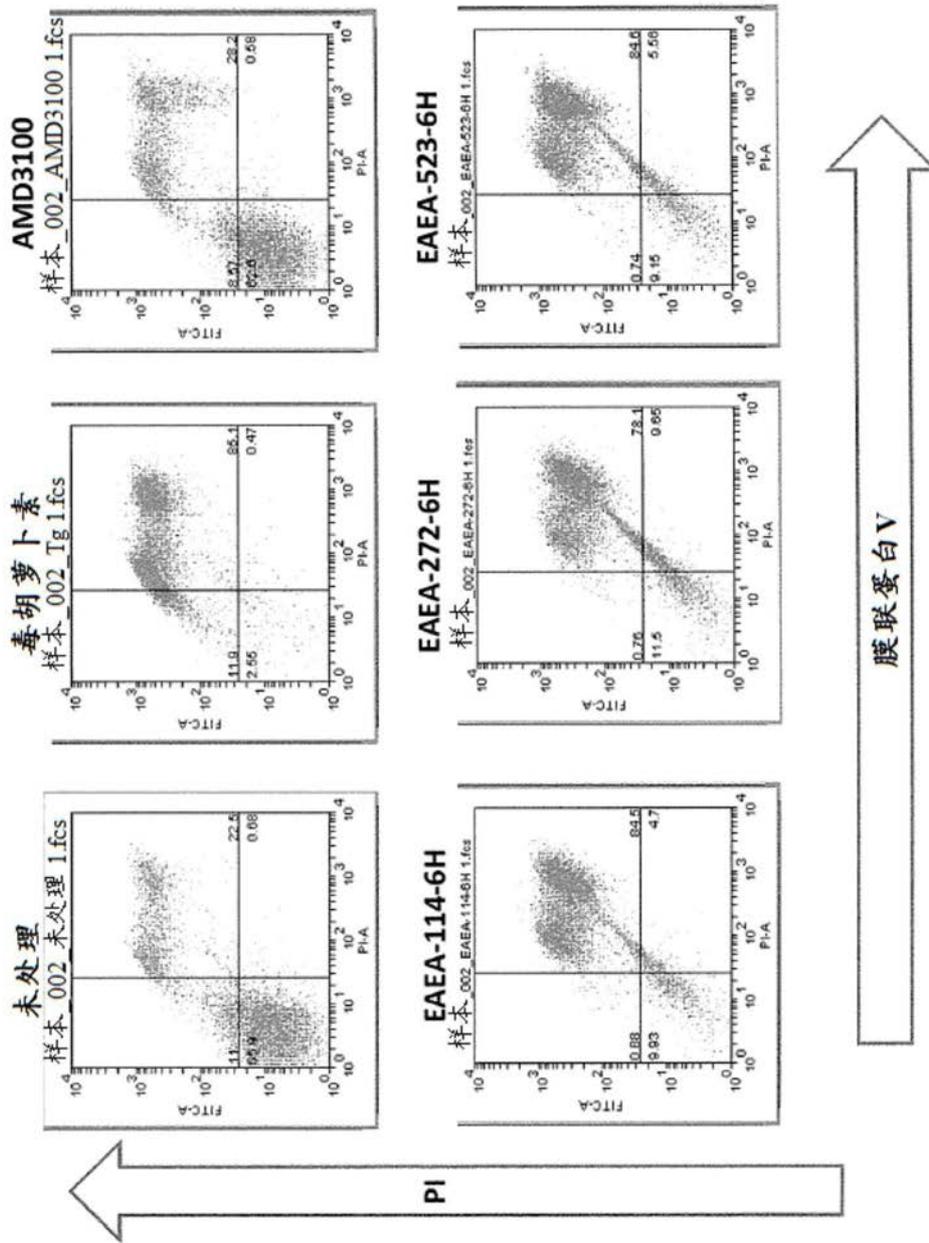


图19-1

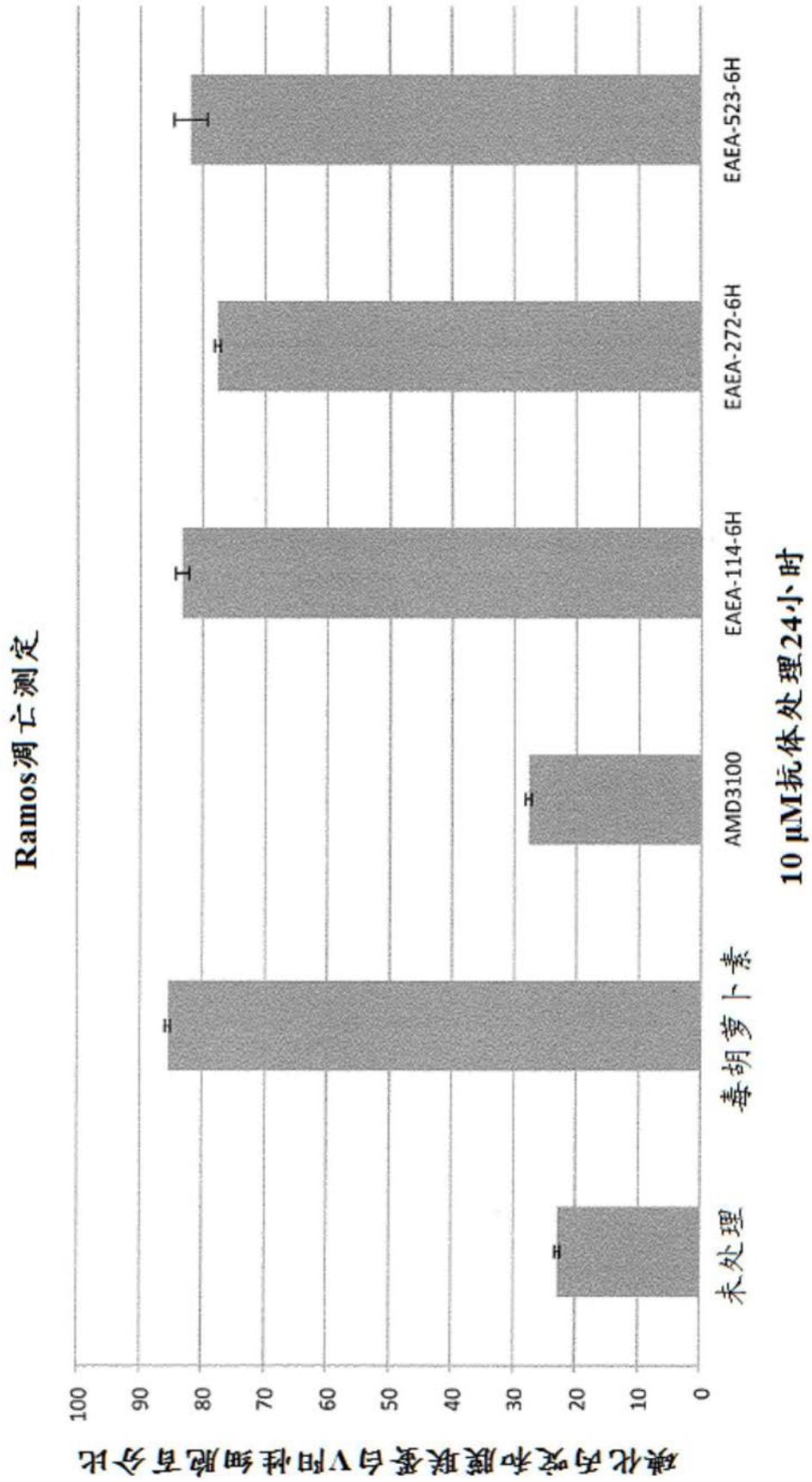


图19-2

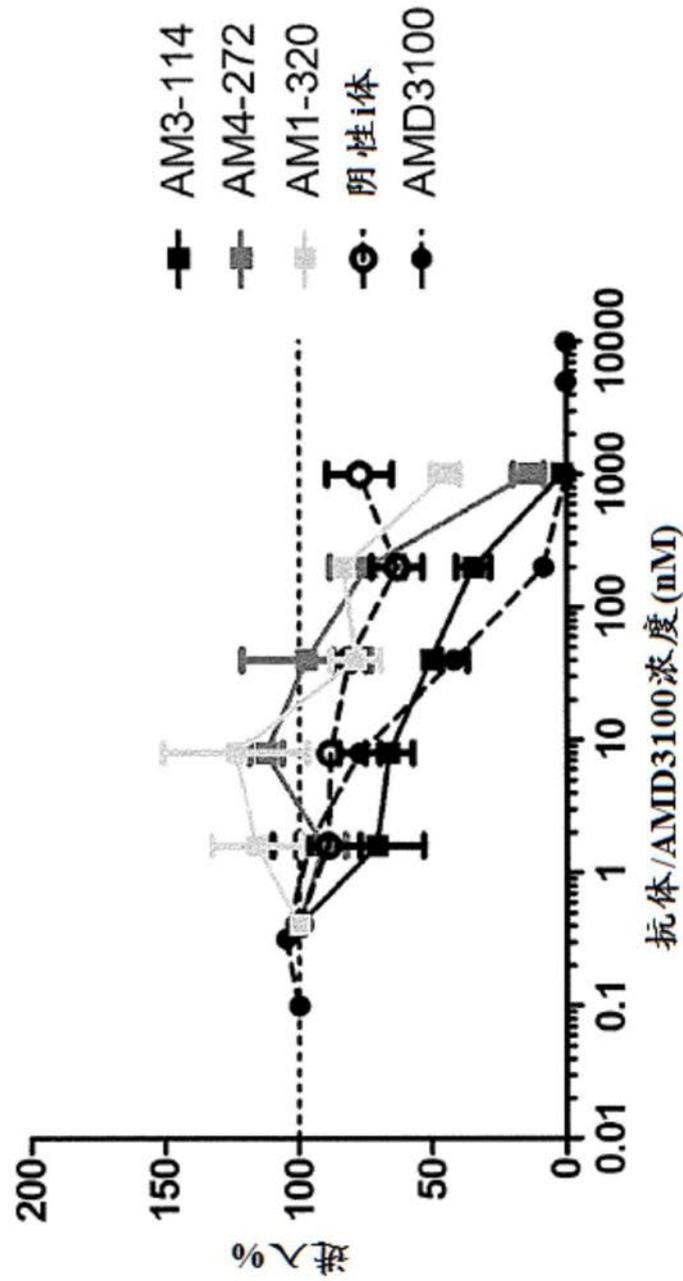


图20

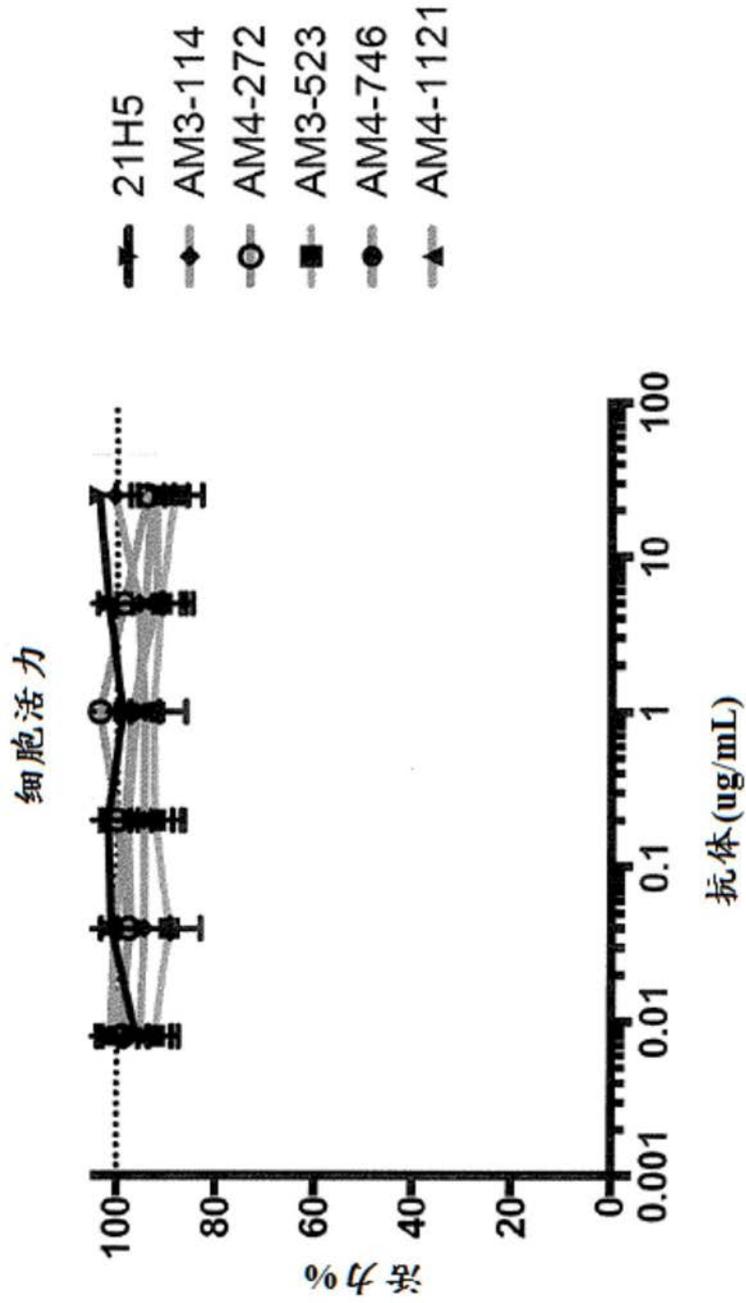


图21

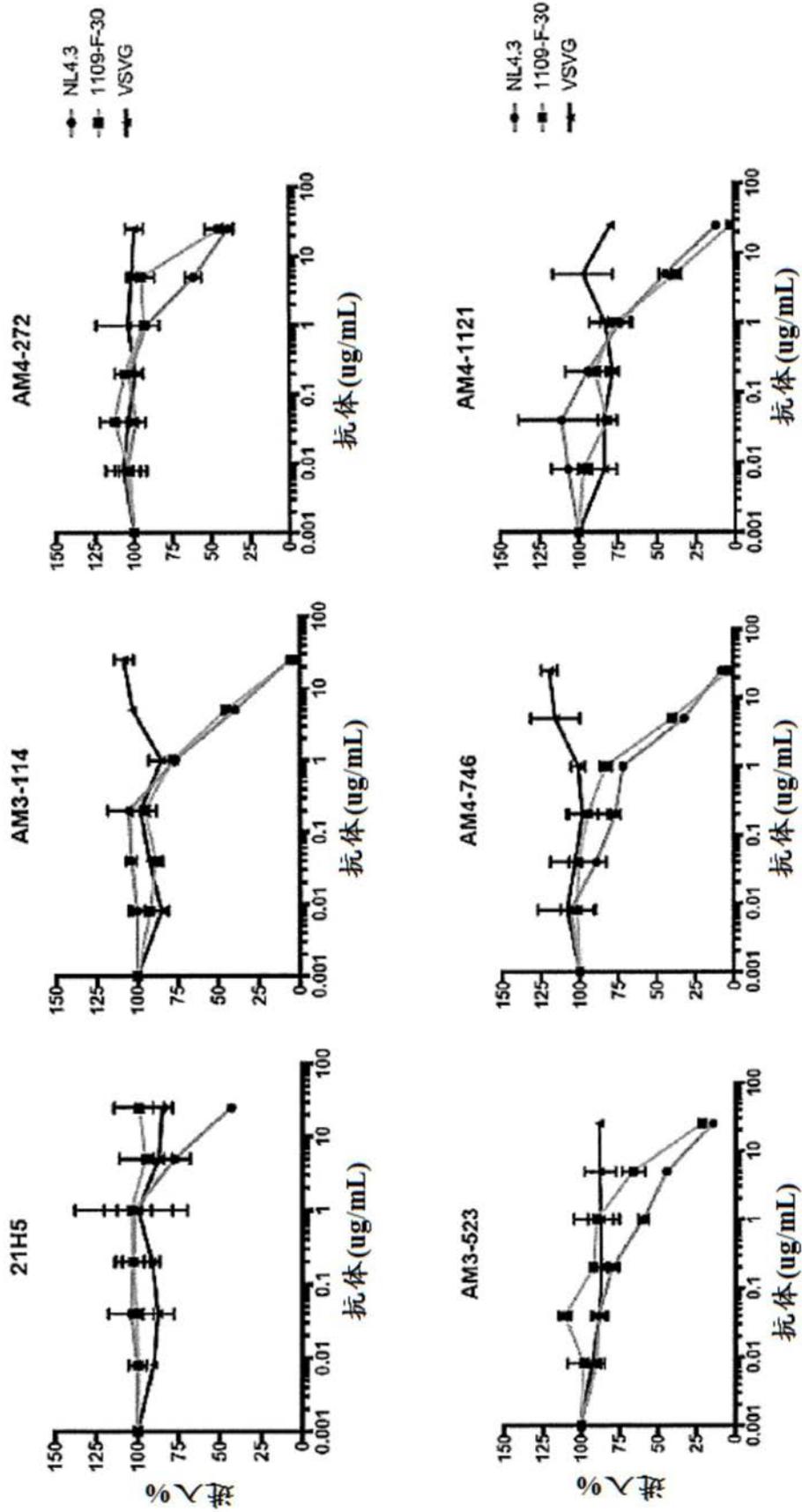


图22

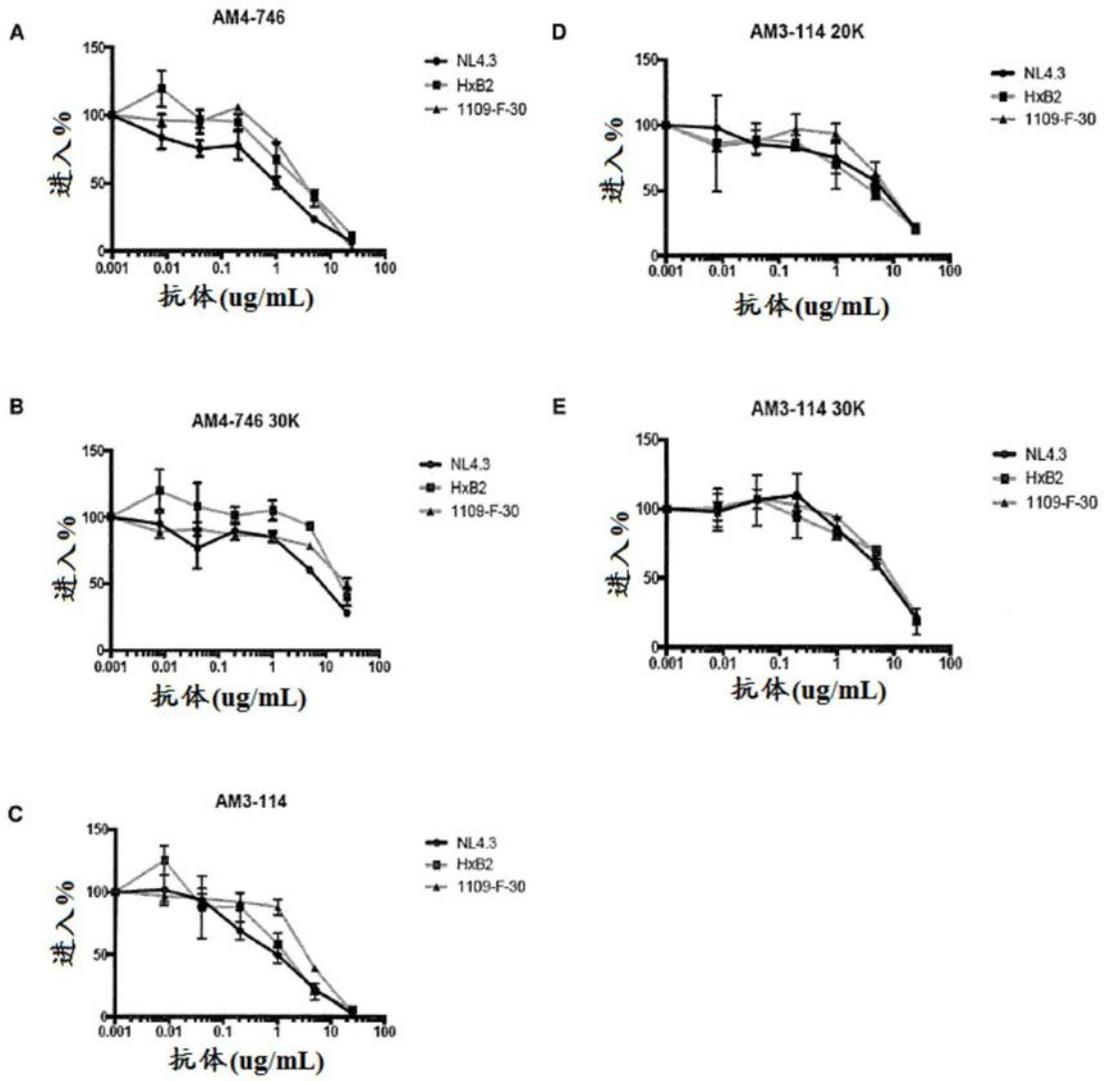


图23-1

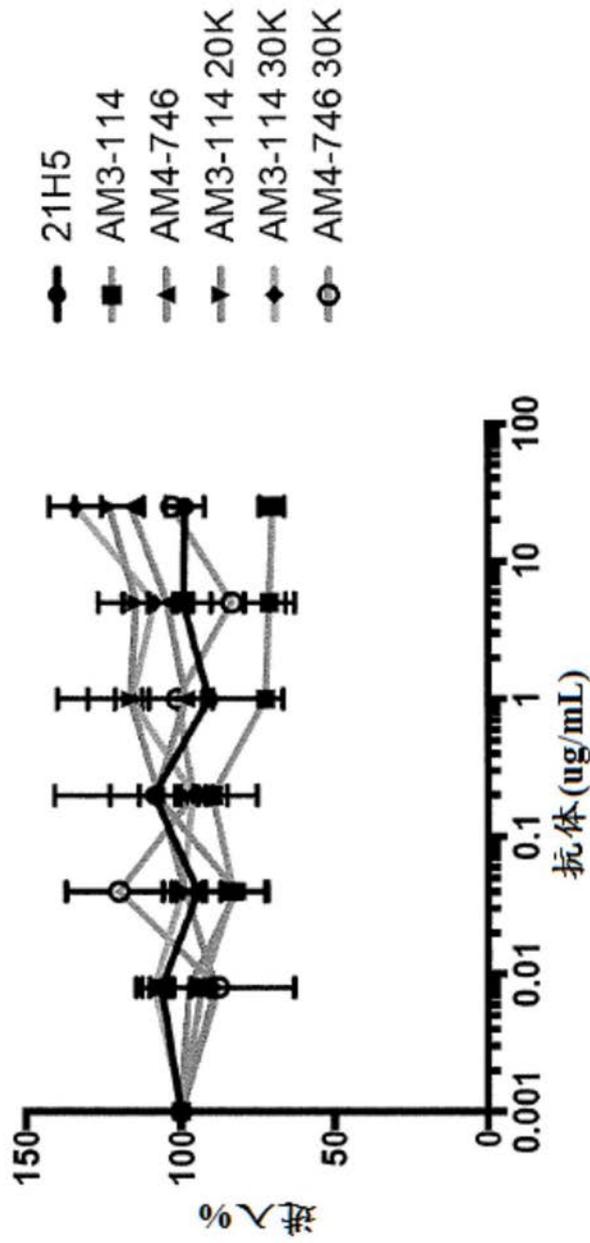


图23-2

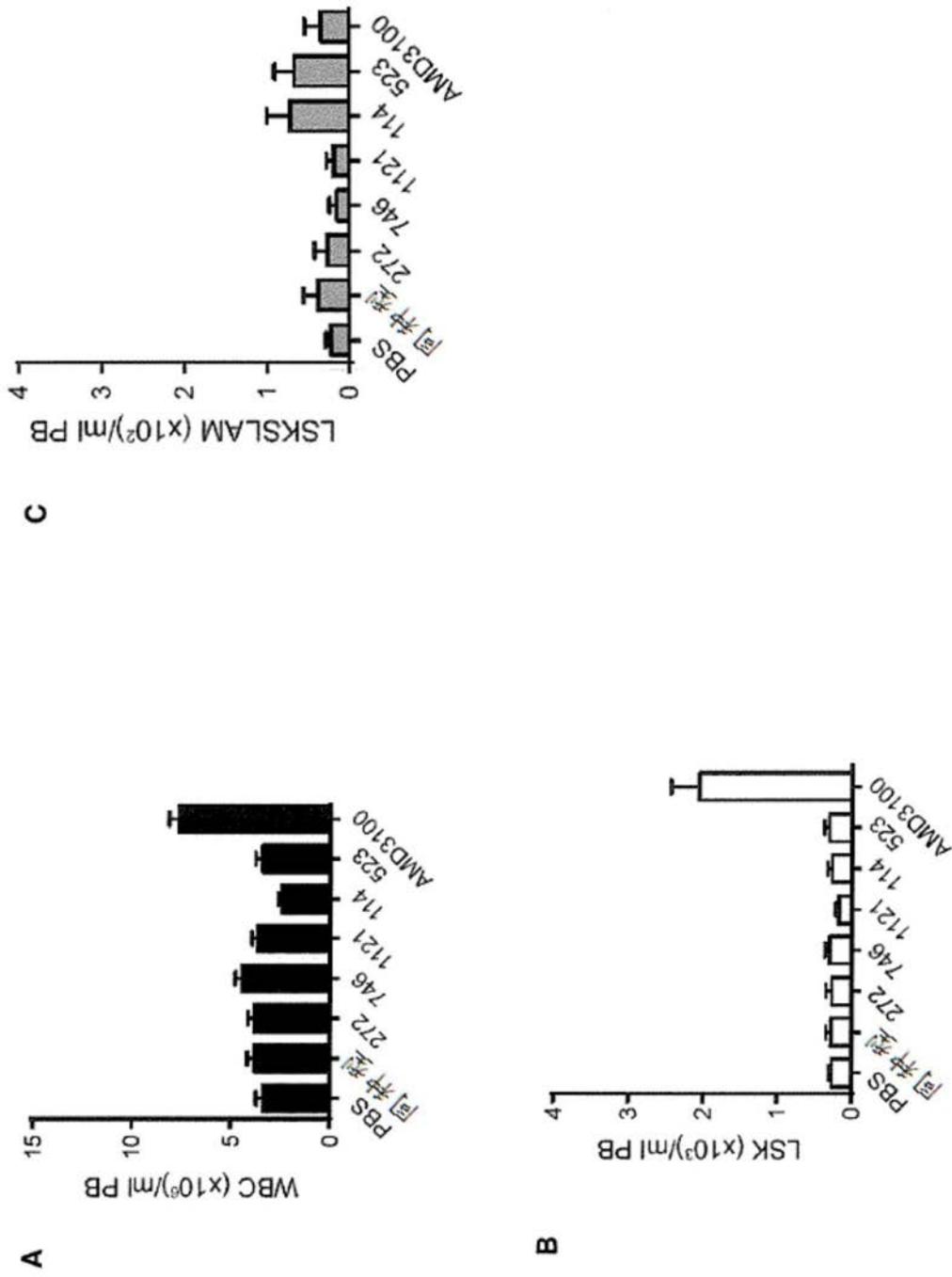


图24

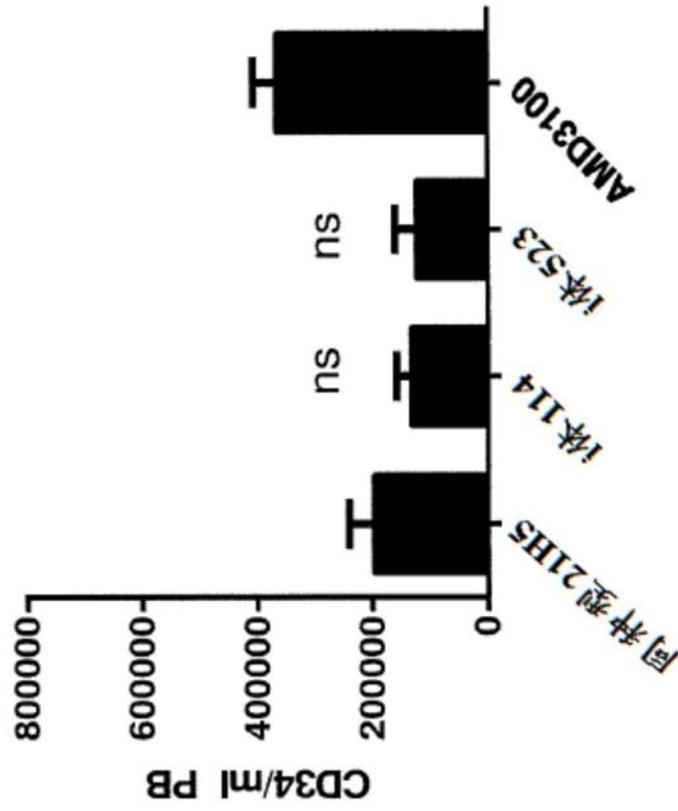


图25

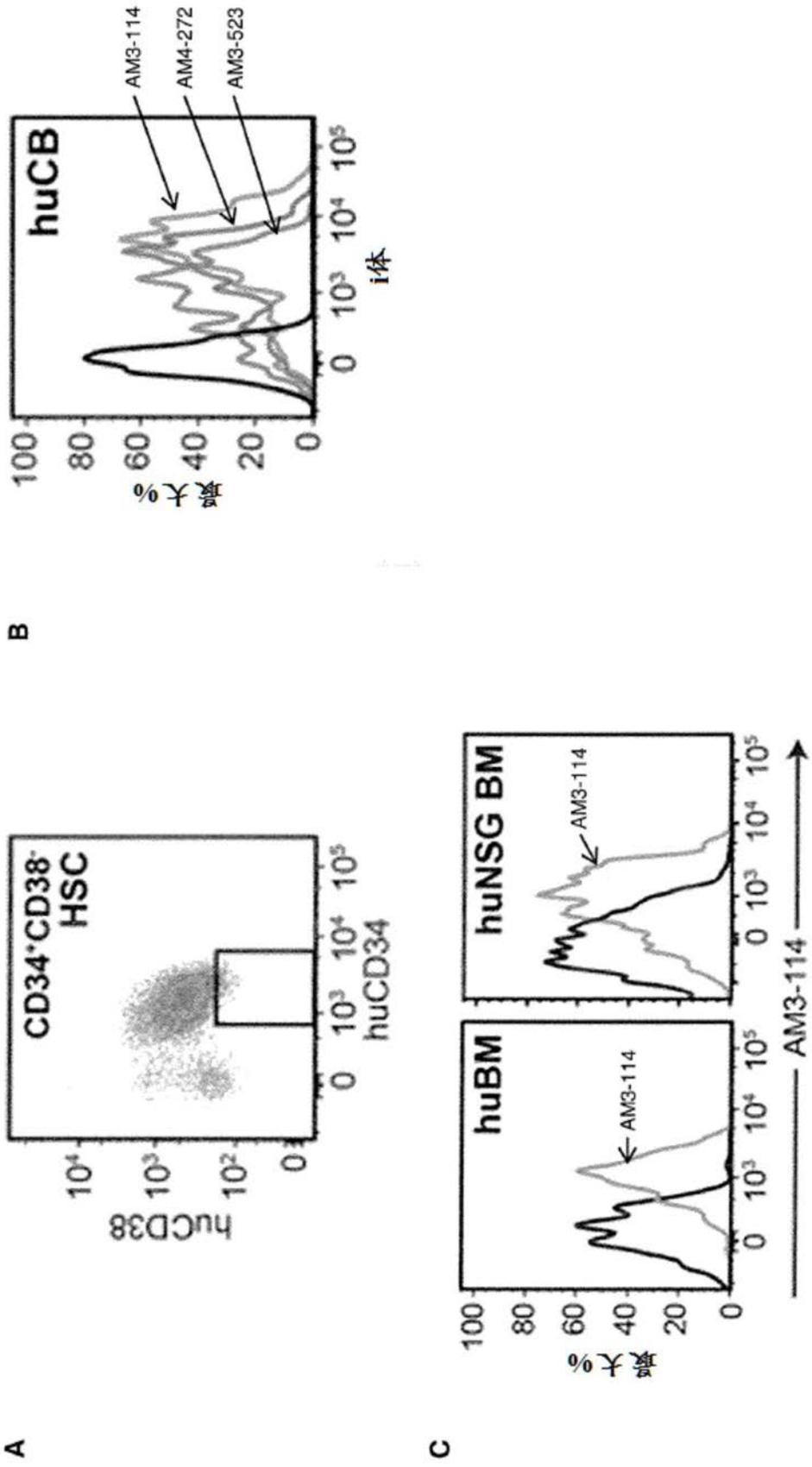


图26

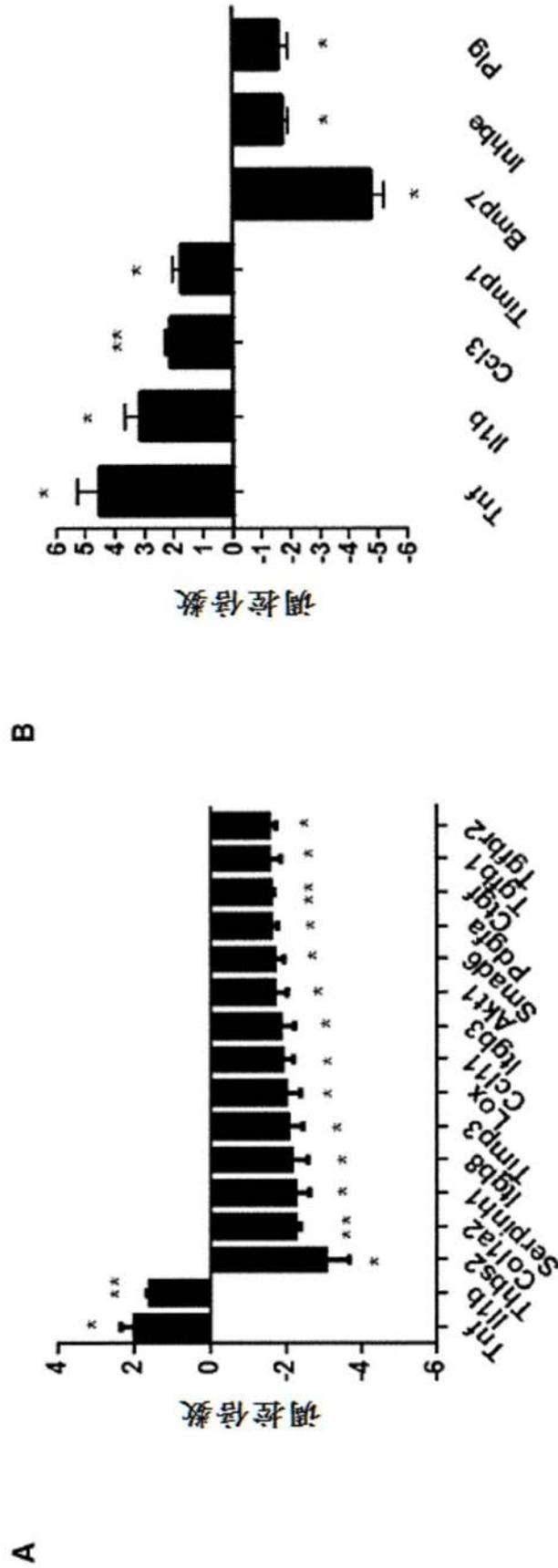


图27

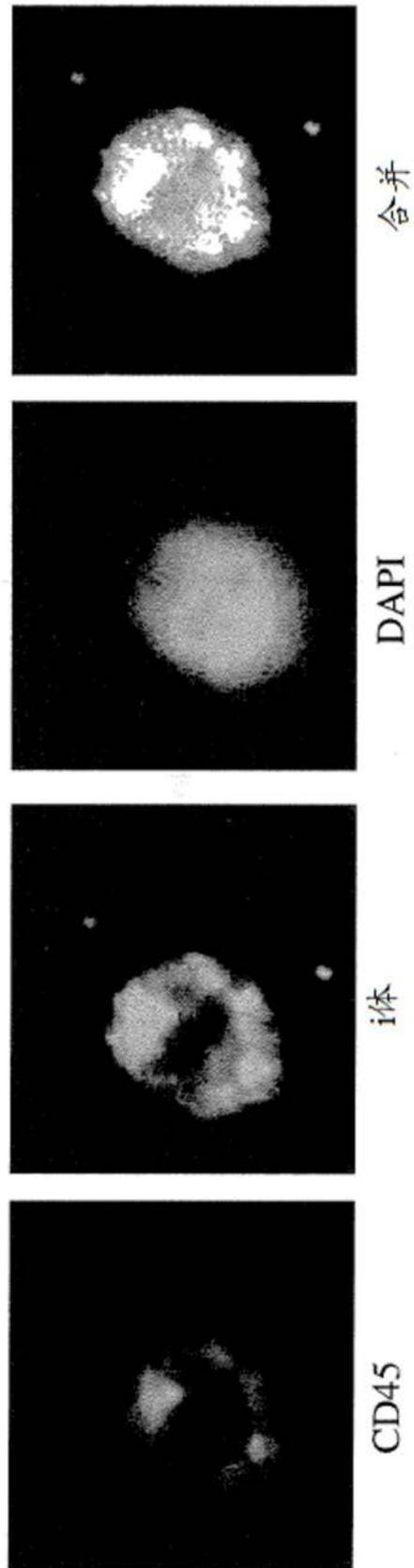


图28

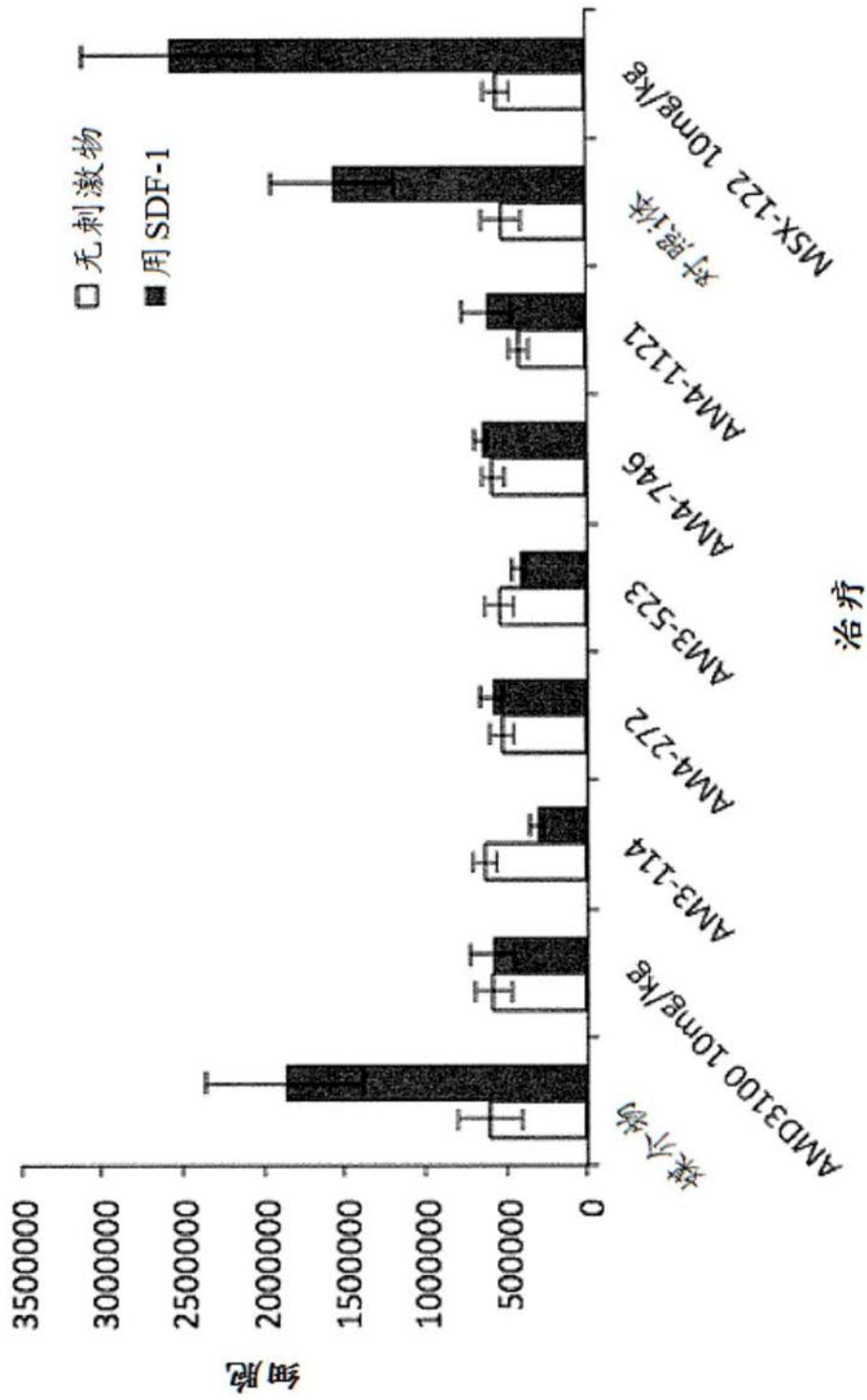


图29

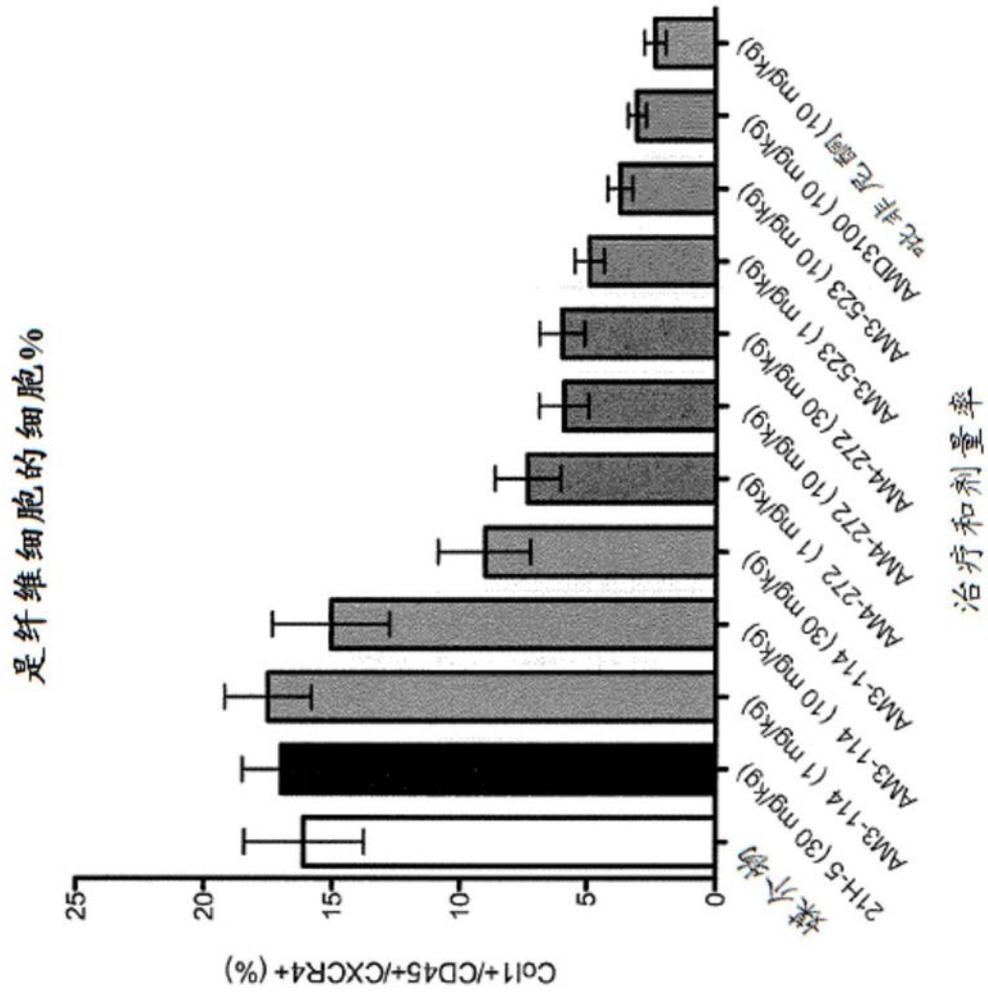


图30

正常

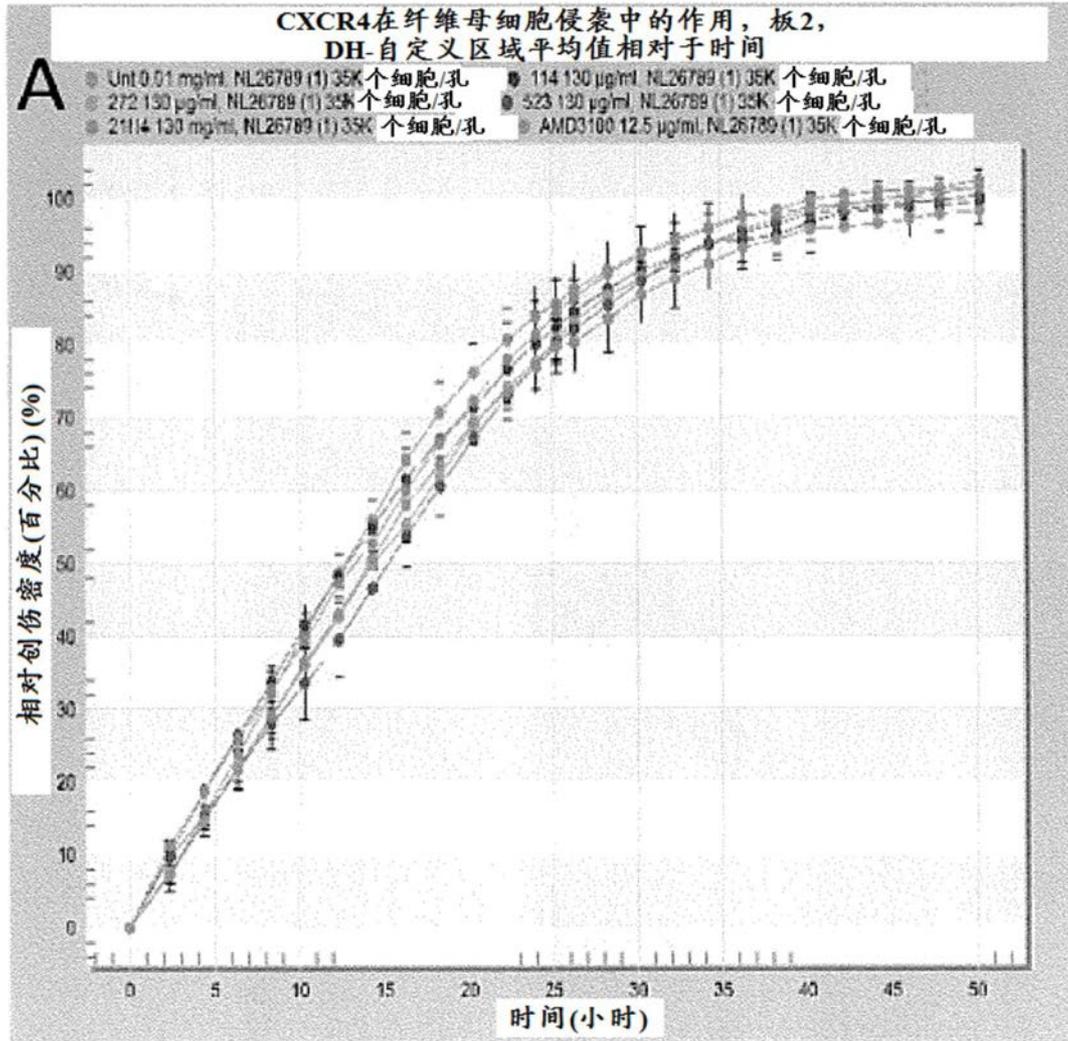


图31-1

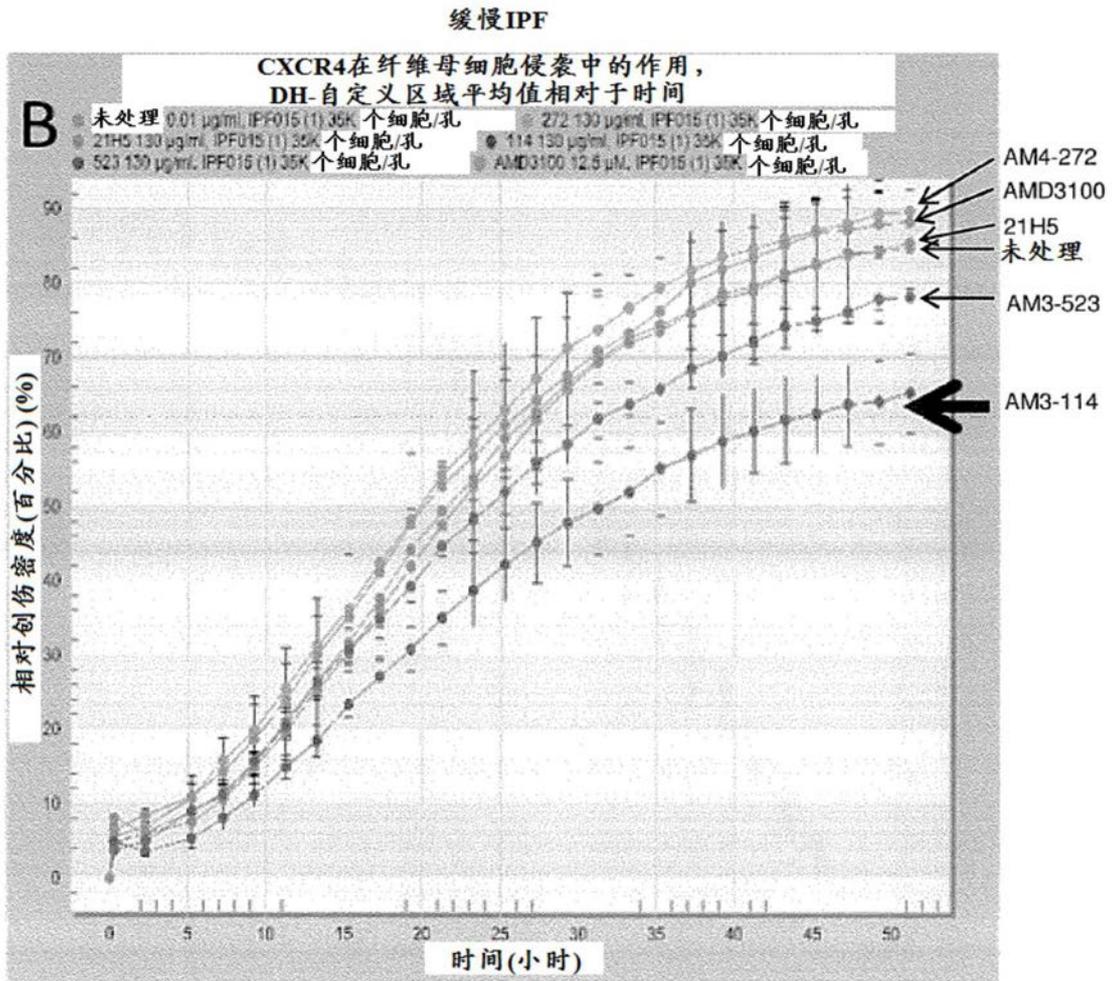


图31-2

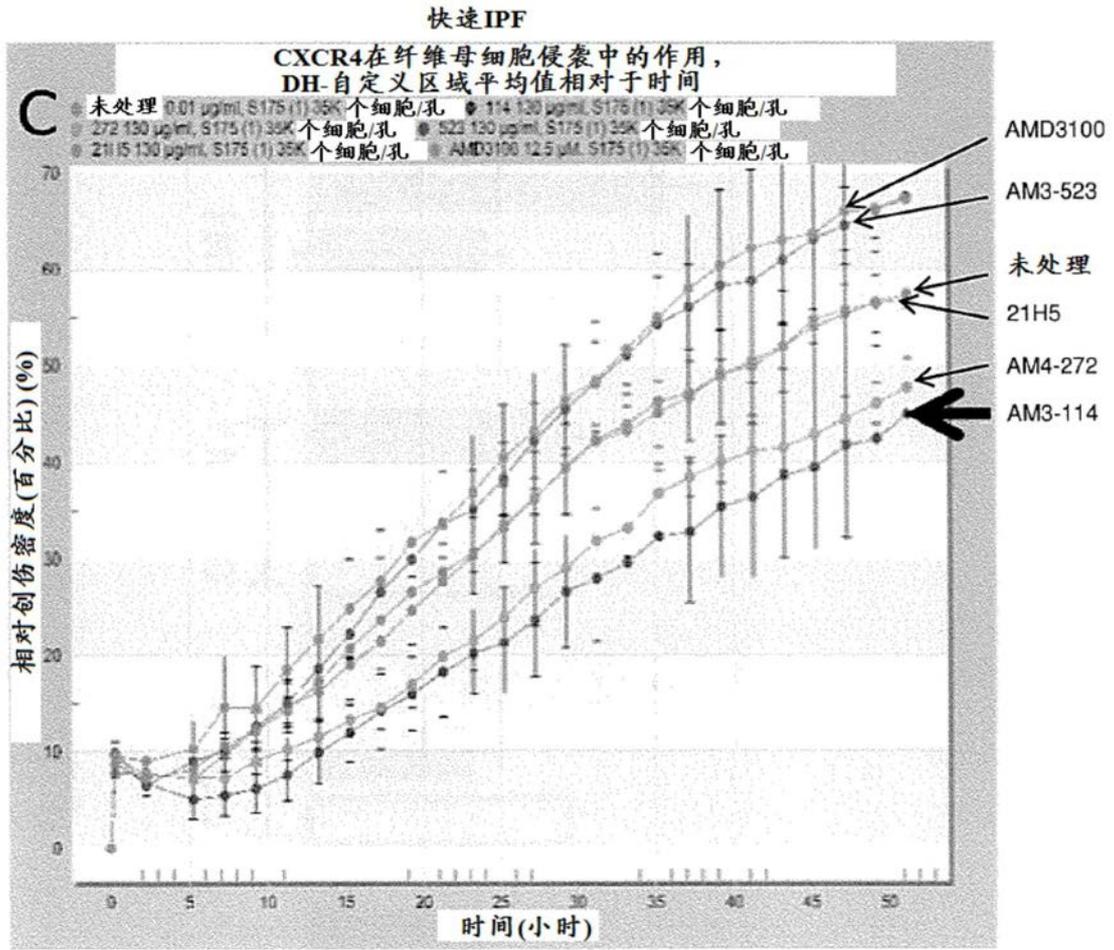


图31-3

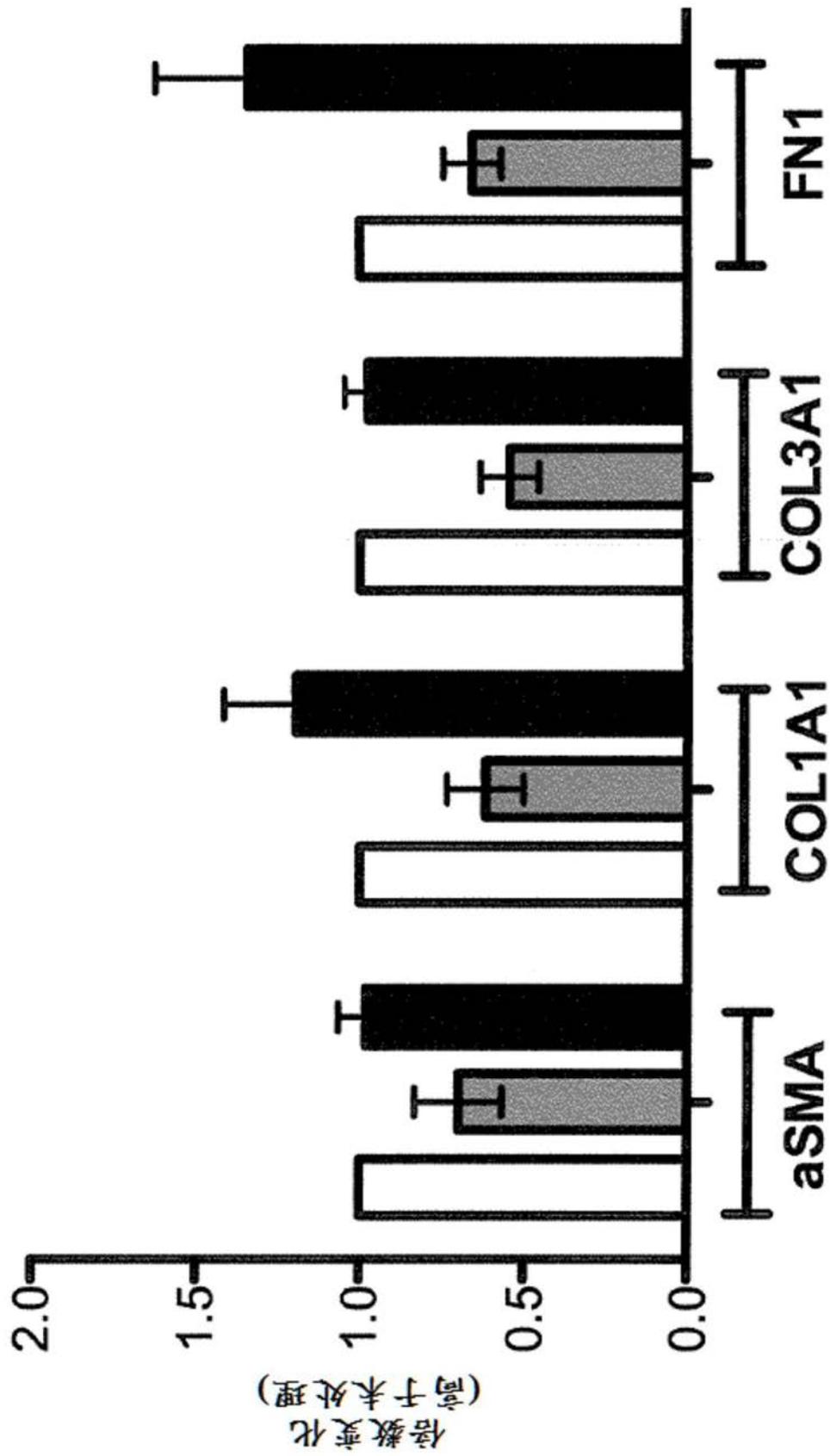


图32

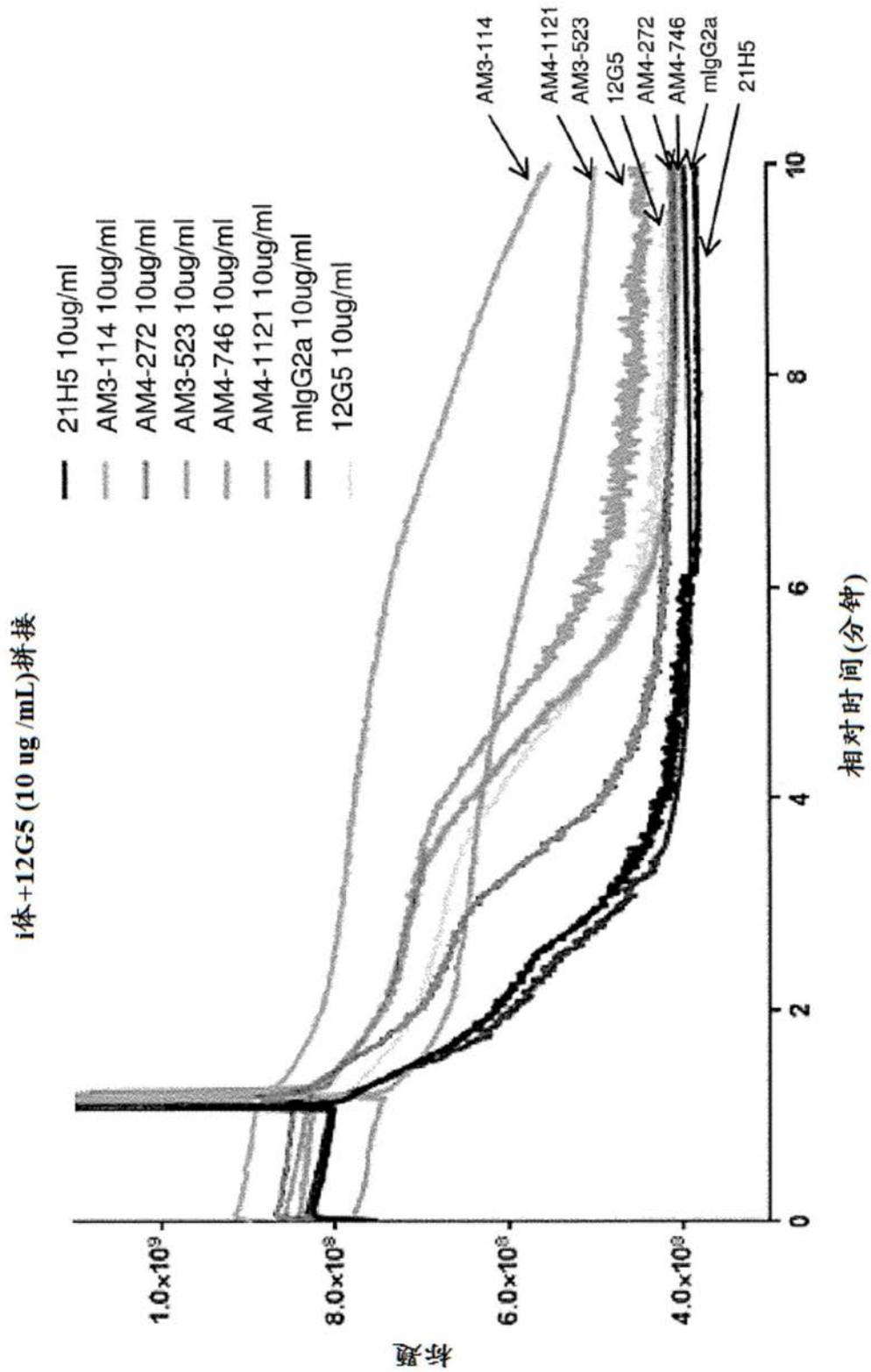


图33

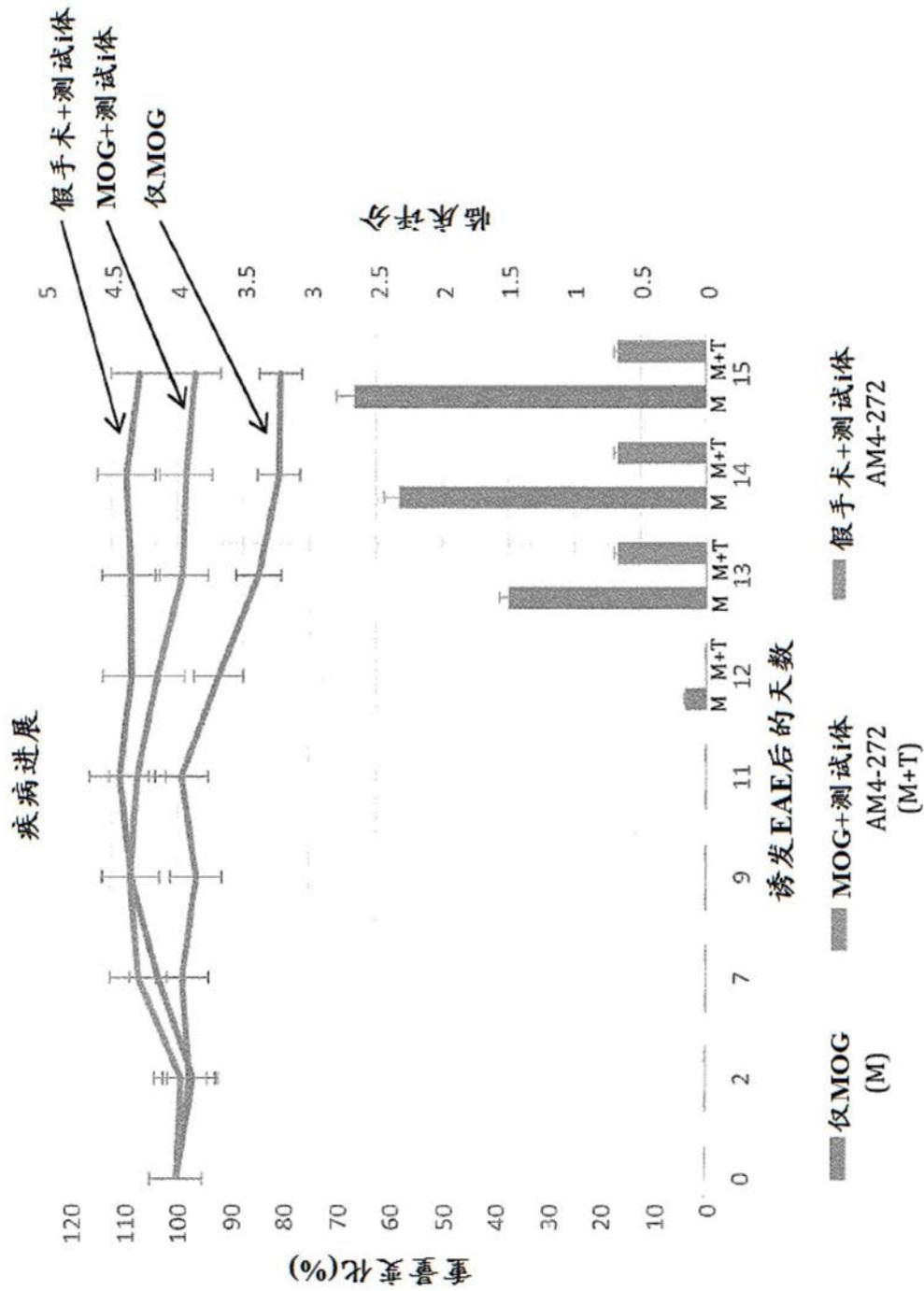


图34