



(10) 授权公告号 CN 108424451 B

(45) 授权公告日 2022.09.09

(21) 申请号 201710825973.2

A61P 1/00 (2006.01)

(22) 申请日 2012.06.01

A61P 9/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 9/04 (2006.01)

申请公布号 CN 108424451 A

A61P 9/12 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.08.21

A61P 9/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 9/14 (2006.01)

61/493,230 2011.06.03 US

A61P 37/02 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 19/02 (2006.01)

201280037239.5 2012.06.01

A61P 29/00 (2006.01)

(73) 专利权人 佐马技术有限公司

A61P 25/00 (2006.01)

地址 美国加利福尼亚

A61P 19/08 (2006.01)

(72) 发明人 丹尼尔·贝丁格 希琳·S·卡恩

A61P 19/10 (2006.01)

阿默·米尔扎

A61P 17/02 (2006.01)

阿贾伊·J·纳拉辛哈 竹内俊彦

A61P 15/00 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司 11018

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 15/10 (2006.01)

专利代理师 潘怀仁 王珍仙

(56) 对比文件

(51) Int.Cl.

CN 1961003 A, 2007.05.09

C07K 16/22 (2006.01)

CN 101346394 A, 2009.01.14

C12N 15/13 (2006.01)

CN 101163502 A, 2008.04.16

C12N 15/85 (2006.01)

US 5262319 A, 1993.11.16

C12N 5/10 (2006.01)

Swati Biswas et al..Inhibition of

A61K 39/395 (2006.01)

TGF- β with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression.《J Clin Invest. 》.2007,第117卷(第5期),1305-1313.

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

审查员 徐乐

权利要求书3页 说明书85页

序列表11页 附图15页

(54) 发明名称

对TGF- β 具有特异性的抗体

(57) 摘要

本发明公开了对TGF- β 具有特异性的抗体。

本公开总体上涉及用于对包括TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3在内的转化生长因子 β (TGF β)具有特

异性的抗体的物质和方法,以及这些抗体用于治疗患有癌症、眼睛疾病、病状或病症、包括眼科纤维化或眼睛纤维化在内的纤维化以及与TGF β 表达相关的其他病状或病症的受试者的用途。

1. 结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3的抗体在制备用于治疗选自结肠直肠癌、肝细胞癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、肺癌、纤维变性癌症或纤维增生性疾病的疾病的药物中的用途,其中所述抗体包含:

- (a) SEQ ID NO:19中所示出的重链CDR1氨基酸序列;
 - (b) SEQ ID NO:20中所示出的重链CDR2氨基酸序列;
 - (c) SEQ ID NO:21中所示出的重链CDR3氨基酸序列;
 - (d) SEQ ID NO:22中所示出的轻链CDR1氨基酸序列;
 - (e) SEQ ID NO:23中所示出的轻链CDR2氨基酸序列;以及
 - (f) SEQ ID NO:24中所示出的轻链CDR3氨基酸序列;
- 其中所述药物与一种或多种第二药剂一起施用。

2. 结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3的抗体在制备用于治疗选自结肠直肠癌、肝细胞癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、肺癌、纤维变性癌症或纤维增生性疾病的疾病的药物中的用途,其中所述抗体包含:

- (a) SEQ ID NO:19中所示出的重链CDR1氨基酸序列;
- (b) SEQ ID NO:20中所示出的重链CDR2氨基酸序列;
- (c) SEQ ID NO:21中所示出的重链CDR3氨基酸序列;
- (d) SEQ ID NO:22中所示出的轻链CDR1氨基酸序列;
- (e) SEQ ID NO:23中所示出的轻链CDR2氨基酸序列;以及
- (f) SEQ ID NO:24中所示出的轻链CDR3氨基酸序列;

其中所述抗体包含与SEQ ID NO:6中所示出的重链可变区氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列以及与SEQ ID NO:8中所示出的轻链可变区氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

3. 结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3的抗体在制备用于治疗选自结肠直肠癌、肝细胞癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、肺癌、纤维变性癌症或纤维增生性疾病的疾病的药物中的用途,其中所述抗体包含:

- (a) SEQ ID NO:19中所示出的重链CDR1氨基酸序列;
- (b) SEQ ID NO:20中所示出的重链CDR2氨基酸序列;
- (c) SEQ ID NO:21中所示出的重链CDR3氨基酸序列;
- (d) SEQ ID NO:22中所示出的轻链CDR1氨基酸序列;
- (e) SEQ ID NO:23中所示出的轻链CDR2氨基酸序列;以及
- (f) SEQ ID NO:24中所示出的轻链CDR3氨基酸序列;

其中所述抗体以1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg的剂量施用。

4. 结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3的抗体在制备用于治疗选自结肠直肠癌、肝细胞癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、肺癌、纤维变性癌症或纤维增生性疾病的疾病的药物中的用途,其中所述抗体包含:

- (a) SEQ ID NO:19中所示出的重链CDR1氨基酸序列;
- (b) SEQ ID NO:20中所示出的重链CDR2氨基酸序列;
- (c) SEQ ID NO:21中所示出的重链CDR3氨基酸序列;
- (d) SEQ ID NO:22中所示出的轻链CDR1氨基酸序列;

- (e) SEQ ID NO:23中所示出的轻链CDR2氨基酸序列;以及
 - (f) SEQ ID NO:24中所示出的轻链CDR3氨基酸序列;
- 其中所述抗体以100mg/天或150mg/天的剂量施用。

5. 结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3的抗体在制备用于治疗选自结肠直肠癌、肝细胞癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、肺癌、纤维变性癌症或纤维增生性疾病的疾病的药物中的用途,其中所述抗体包含:

- (a) SEQ ID NO:19中所示出的重链CDR1氨基酸序列;
 - (b) SEQ ID NO:20中所示出的重链CDR2氨基酸序列;
 - (c) SEQ ID NO:21中所示出的重链CDR3氨基酸序列;
 - (d) SEQ ID NO:22中所示出的轻链CDR1氨基酸序列;
 - (e) SEQ ID NO:23中所示出的轻链CDR2氨基酸序列;以及
 - (f) SEQ ID NO:24中所示出的轻链CDR3氨基酸序列,
- 其中所述抗体每周、每2周、每3周或每月施用一次。

6. 结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3的抗体在制备用于治疗选自结肠直肠癌、肝细胞癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、肺癌、纤维变性癌症或纤维增生性疾病的疾病的药物中的用途,其中所述抗体包含:

- (a) SEQ ID NO:19中所示出的重链CDR1氨基酸序列;
 - (b) SEQ ID NO:20中所示出的重链CDR2氨基酸序列;
 - (c) SEQ ID NO:21中所示出的重链CDR3氨基酸序列;
 - (d) SEQ ID NO:22中所示出的轻链CDR1氨基酸序列;
 - (e) SEQ ID NO:23中所示出的轻链CDR2氨基酸序列;以及
 - (f) SEQ ID NO:24中所示出的轻链CDR3氨基酸序列,
- 其中所述抗体静脉内或皮下施用。

7. 根据权利要求1或3至6中任一项所述的用途,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:6中所示出的重链可变区氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列以及与SEQ ID NO:8中所示出的轻链可变区氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途,其中所述抗体包含SEQ ID NO:6中所示出的重链可变区氨基酸序列以及SEQ ID NO:8中所示出的轻链可变区氨基酸序列。

9. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途,其中所述抗体进一步包含重链恒定区,其中所述重链恒定区是经过修饰或未经过修饰的IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段或其组合。

10. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途,其中所述抗体进一步包含轻链恒定区,其中所述轻链恒定区是经过修饰或未经过修饰的 λ 轻链恒定区、 κ 轻链恒定区、其片段或其组合。

11. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途,其中所述抗体的一个或多个轻链框架氨基酸已经被另一个人类抗体氨基酸序列中的一个或多个相应氨基酸置换。

12. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途,其中所述抗体进一步包含与所述抗体的轻链可变区连接的人类轻链恒定区。

13. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途,其中所述抗体以比TGF β 3更大的亲和力结合TGF β 1和TGF β 2。

14. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途, 其中所述抗体中和TGFβ1和TGFβ2活性的程度大于中和TGFβ3活性的程度。

15. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途, 其中所述抗体在包含所述抗体以及药学上可接受的载体的无菌的药物组合物中。

16. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途, 其中所述抗体i) 增加肿瘤中自然杀伤(NK)细胞的数目和/或提高NK细胞的细胞溶解活性; ii) 减少肿瘤中调节性T细胞的数目和/或抑制调节性T细胞的功能; iii) 增加肿瘤中细胞毒性T细胞(CTL)的数目和/或增强CTL的功能; iv) 减少肿瘤中骨髓衍生抑制性细胞(MDSC)的数目和/或抑制MDSC的功能; 和/或v) 减少肿瘤中树突状细胞(DC)的数目和/或抑制树突状细胞的致耐受性功能。

17. 根据权利要求15所述的用途, 其中所述无菌的药物组合物i) 增加肿瘤中自然杀伤(NK)细胞的数目和/或提高NK细胞的细胞溶解活性; ii) 减少肿瘤中调节性T细胞的数目和/或抑制调节性T细胞的功能; iii) 增加肿瘤中细胞毒性T细胞(CTL)的数目和/或增强CTL的功能; iv) 减少肿瘤中骨髓衍生抑制性细胞(MDSC)的数目和/或抑制MDSC的功能; 和/或v) 减少肿瘤中树突状细胞(DC)的数目和/或抑制树突状细胞的致耐受性功能。

18. 根据权利要求2至6中任一项所述的用途, 其中所述药物进一步包含一种或多种第二药剂。

19. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述第二药剂是从由以下各项组成的群组中选出: 化学治疗剂和细胞毒性剂。

20. 根据权利要求18所述的用途, 其中所述第二药剂是从由以下各项组成的群组中选出: 化学治疗剂和细胞毒性剂。

21. 根据权利要求19或20所述的用途, 其中所述化学治疗剂是从由以下各项组成的群组中选出: 5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、伊立替康、5-氮杂胞嘧啶核苷和其组合。

22. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途, 其中所述抗体为冻干形式或水溶液形式。

23. 根据权利要求1、2、5或6中任一项所述的用途, 其中所述抗体以1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg的剂量施用。

24. 根据权利要求1、2、5或6中任一项所述的用途, 其中所述抗体以100mg/天或150mg/天的剂量施用。

25. 根据权利要求1至4中任一项所述的用途, 其中所述抗体每周、每2周、每3周或每月施用一次。

26. 根据权利要求1至5中任一项所述的用途, 其中所述抗体静脉内或皮下施用。

27. 根据权利要求18或19所述的用途, 其中所述一种或多种第二药剂与所述抗体同时或依序施用。

28. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途, 其中所述纤维增生性疾病为特发性肺纤维化(IPF)。

29. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途, 其中所述疾病为结肠直肠癌。

30. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途, 其中所述疾病为胰腺癌。

对TGF- β 具有特异性的抗体

[0001] 分案说明

[0002] 本申请是申请日为2012年6月1日、国家申请号为201280037239.5、发明名称为“对TGF- β 具有特异性的抗体”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0003] 本公开总体上涉及用于对包括TGF β 1、TGF β 2和/或TGF β 3在内的转化生长因子 β (TGF β) 具有特异性的抗体的物质和方法以及这些抗体用于治疗患有癌症、眼睛疾病、病状或病症、包括眼睛纤维化或眼科纤维组织形成在内的纤维化以及与TGF β 表达相关的其他病状或病症的受试者的用途。

背景技术

[0004] 转化生长因子 β (TGF β) 蛋白质家族由哺乳动物中存在的三种独特的亚型 (TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3) 组成。TGF β 蛋白活化并且调节影响包括细胞增殖性病状、炎症病状以及心血管病状在内的疾病病况的多种基因反应。TGF β 是一种多功能的细胞因子,最初因它能够使正常的成纤维细胞转化成能够进行非贴壁依赖性生长的细胞而得名。TGF β 分子主要由造血细胞和肿瘤细胞产生并且可以调节,即刺激或抑制来自多种正常和赘生性组织起源的细胞生长和分化 (Sporn等, Science, 233:532 (1986)), 并且刺激不同的基质细胞形成和扩充。

[0005] 已知TGF β 牵涉到许多增殖性和非增殖性细胞过程,如细胞增殖和分化、胚胎发育、细胞外基质形成、骨骼发育、伤口愈合、造血作用以及免疫和炎症反应。参见例如Pircher等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 136:30-37 (1986); Wakefield等, Growth Factors, 1:203-218 (1989); Roberts和Sporn, 第419-472页, Handbook of Experimental Pharmacology, M.B. Sporn和A.B. Roberts编著 (Springer, Heidelberg, 1990); Massague等, Annual Rev. Cell Biol., 6:597-646 (1990); Singer和Clark, New Eng. J. Med., 341:738-745 (1999)。并且, TGF β 被用于治疗 and 预防肠粘膜疾病 (W02001/24813)。还已知TGF β 对不同的免疫细胞类型具有强烈的免疫抑制作用, 包括抑制细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) (Ranges等, J. Exp. Med., 166:991, 1987; Espevik等, J. Immunol., 140:2312, 1988); B细胞淋巴细胞增殖和 κ 轻链表达减少 (Lee等, J. Exp. Med., 166:1290, 1987); 负向调节造血作用 (Sing等, Blood, 72:1504, 1988); 下调肿瘤细胞上的HLA-DR表达 (Czarniecki等, J. Immunol., 140:4217, 1988); 以及抑制抗原活化的B淋巴细胞响应于B细胞生长因子的增殖 (Petit-Koskas等, Eur. J. Immunol., 18:111, 1988)。还参见美国专利7,527,791。

[0006] 针对TGF β 的抗体已经在美国专利号7,527,791; 7,927,593; 7,494,651; 7,369,111; 7,151,169; 6,492,497; 6,419,928; 6,090,383; 5,783,185; 5,772,998; 5,571,714; 以及7,723,486中有所描述。

发明内容

[0007] 本公开提供了用于治疗与TGF β 表达相关的疾病或病症的方法和组合物。本公开提

供了结合TGFβ1、TGFβ2以及TGFβ3的抗体。条件是本文所描述的抗体可以对任何或所有TGFβ亚型具有差别亲和力。此外,本文发现所公开的TGFβ特异性抗体出人意料地调节肿瘤中的免疫细胞(例如渗透到肿瘤中)并且预期能够治疗与TGFβ表达相关的肿瘤以及与TGFβ表达相关的其他病状或病症。

[0008] 在一个方面,本公开提供了一种结合转化生长因子β (TGFβ) 1、TGFβ2以及TGFβ3的抗体,所述抗体包含:(a) 表1或SEQ ID NO:13、19以及25中所示出的重链互补决定重复区(CDR) 1氨基酸序列,或其一个或两个氨基酸已发生变化的变体;(b) 表1或SEQ ID NO:14、20以及26中所示出的来自于与(a) 相同的重链可变区的重链CDR2氨基酸序列,或其一个或两个氨基酸已发生变化的变体;以及(c) 表1或SEQ ID NO:15、21以及27中所示出的来自于与(a) 相同的重链可变区的重链CDR3氨基酸序列,或其一个或两个氨基酸已发生变化的变体。

[0009] 表1

[0010]

SEQ ID NO	克隆	序列
1	XPA.42.068 重链 DNA 序列	caggttcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60 tcctgcaagc cttctggata caccctcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120 cctggcaagc ggcttgagtg gatgggagtg atcaacccta acactgggtg cacaactatc 180 gcacagaaag ttccaggcag ggtcaccatg accaggagca cgtccatcag cacagcctac 240 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagatcattc 300 ctgtggctgg ttccctctga tgcttttgat atctggggcc aaggagacaat ggtcaccgtc 360 tcttca 366
2	XPA.42.068 重链 氨基酸序列	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHNVROA PGQGLEWMGW INPNTGGTNY 60 AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSLRSD TAVYYCARSF LNLVPSDAFD IWGQGTMTV 120 SS 122
3	XPA.42.068 轻链 DNA 序列	tcctctgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc caggagagaa ggccaggatt 60 acctgtgggg ggaataacat tggacgtaaa agtgtacatt ggtaccagca gaggccaggc 120 caggccctcg ttgttggtcct ctactatgat agagtacagc cctcagggat ccctgagcga 180 ttttctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaccagggt cgaagccggg 240 gatgagcccg actatttttg tcaagtggtg gataacacta gtgagcatgt ggtcttcggc 300 ggaggcacc cagctgaccgt cctaggc 327
4	XPA.42.068 轻链 氨基酸序列	SSELTQPPSV SVAPGEKARI TCGGNINIGRK SVHWYQQRPG QAPVVLVYD RVRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLITIRVEAG DEADYFCQVW DNTSEHVFG GGTQLTVLG 109
5	XPA.42.089 重链 DNA 序列	caggttcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60 tcctgcaagc cttctggata caccctcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120 cctggcaagc ggcttgagtg gatgggagtg atcatcccta tctttggtag agcaactatc 180 gcacagaaag ttccaggcag agtcacgatt accgaggacg aatccacgag cacagcctac 240 atggagctga gcaggctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagggagcta 300 tgggaggttc gggcccttcc gtcggtctac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360 tca 363
6	XPA.42.089 重链 氨基酸序列	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYAISWYRQA PGQGLEWMGW IIPFGTANY 60 AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSLRSD TAVYYCARGL WEVRALPSVY WGQGTILTVS 120 S 121
7	XPA.42.089 轻链 DNA 序列	tcctatgagc tgacacagcc accctcagtg tccgtggccc cgggacagac ggccagaatt 60 acctgtgggg caaatgacat tgggaagtaa agtgtccact ggtaccagca gaaggcaggc 120 caggccctcg tactgtgctg ctctgaagat atcatccggc cctcagggat ccctgagcga 180 atctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240 gatgagcccg actattactg tcaagtttgg gatagggata gtgatcaata tgtctttgga 300 actgggacca aggtcaccgt cctaggc 327
8	XPA.42.089 轻链 氨基酸序列	SYELTQPPSV SVAPGQTARI TCGANDIGSK SVHWYQQRAG QAPVVLVSED IIRPSGIPER 60 ISGSNSGNTA TLITIRVEAG DEADYFCQVW DRDSDQTVFG TGKVTVLG 109
9	XPA.42.081 重链 DNA 序列	caggttcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60 tcctgcaagc cttctggata caccctcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120 cctggcaagc ggcttgagtg gatgggagtg atcaacccta acactgggtg cacaactatc 180 gcacagaaag ttccaggcag ggtcaccatg accaggagca cgtccatcag cacagcctac 240 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagatcattc 300 ctgtggctgg ttccctctga tgcttttgat atctggggcc aaggagacaat ggtcaccgtc 360 tcttca 366
10	XPA.42.681 重链 氨基酸序列	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHNVROA PGQGLEWMGW INPNTGGTNY 60 AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSLRSD TAVYYCARSF LNLVPSDAFD IWGQGTMTV 120 SS 122
11	XPA.42.681 轻链 DNA 序列	tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc caggaaagac ggccaggatt 60 acctgtgggg gaaacaacat tggatttaga agtgtgcaat ggtaccaaca gaagttaggc 120 caggccctcg tccttggtcat ctattttgat cggcccccgc cctcagggat ccctgagcga 180 ttctctgctt ccaactctga gaacacggcc accctgacca tcaggagggg cgaagccggg 240 gatgagcccg actattactg tcaagtggtg gatagtgaca gtgatgatct agtcttcggc 300 ggaggcacc cagctgaccgt cctaggc 327
12	XPA.42.681 轻链 氨基酸序列	SYVLTOPPSV SVAPGKTARI TCGGNINIGRK SVHWYQQRSG QAPVLVIYD RARPSGIPER 60 FSAASSENTA TLIRRVVAG DEADYFCQVW DSDSDDLVFG GGTQLIVLG 109
13	XPA.42.068 - H-CDR1	GYFTGTY
14	XPA.42.068 - H-CDR2	INPNTGGT
15	XPA.42.068 - H-CDR3	ARSLNLVPS DAFDI
16	XPA.42.068 - L-CDR1	NIGRKS
17	XPA.42.068 - L-CDR2	YDR
18	XPA.42.068 - L-CDR3	QVWDNTSEHV
19	XPA.42.089 - H-CDR1	GGTFSSYA
20	XPA.42.089 - H-CDR2	IIPFGTA
21	XPA.42.089 - H-CDR3	ARGLWEVRAL PSVY
22	XPA.42.089 - L-CDR1	DIGSKS
23	XPA.42.089 - L-CDR2	EDI
24	XPA.42.089 - L-CDR3	QVWDRDSDQY
25	XPA.42.681 - H-CDR1	GYFTGTY
26	XPA.42.681 - H-CDR2	INPNTGGT
27	XPA.42.681 - H-CDR3	ARSLNLVPS LAFLI
28	XPA.42.681 - L-CDR1	NIGRKS
29	XPA.42.681 - L-CDR2	FDF
30	XPA.42.681 - L-CDR3	QVWDSDEDL V

[0011] 在一个相关方面,本公开提供了一种结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3的抗体,所述抗体包含:(a)表1或SEQ ID NO:13、19以及25中所示出的重链CDR1氨基酸序列,或其与其具有至少70%同一性的变体;(b)表1或SEQ ID NO:14、20以及26中所示出的来自于与(a)相同的重链可变区的重链CDR2氨基酸序列,或其与其具有至少70%同一性的变体;以及(c)表1或SEQ ID NO:15、21以及27中所示出的来自于与(a)相同的重链可变区的重链CDR3氨基酸序列,或其与其具有至少70%同一性的变体。

[0012] 在另一个方面,本公开涵盖了一种结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3

的抗体,所述抗体包含:(a)表1或SEQ ID NO:13、19以及25中所示出的重链CDR1氨基酸序列,或其与其具有至少70%同一性的变体;(b)表1或SEQ ID NO:14、20以及26中所示出的经过独立选择的重链CDR2氨基酸序列,或其与其具有至少70%同一性的变体;以及(c)表1或SEQ ID NO:15、21以及27中所示出的经过独立选择的重链CDR3氨基酸序列,或其与其具有至少70%同一性的变体。

[0013] 在某些实施方案中,重链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个示出于表1或SEQ ID NO:13-15、19-21以及25-27中。在一个相关实施方案中,重链CDR1、CDR2以及CDR3氨基酸序列中的三个示出于表1或SEQ ID NO:13-15、19-21以及25-27中。

[0014] 在一些实施方案中,预期所述抗体包含与表1或SEQ ID NO:2、6以及10中所示出的重链可变区氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列。在一个相关实施方案中,所述抗体包含与表1或SEQ ID NO:2、6以及10中所示出的重链可变区氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0015] 在另外的其他实施方案中,所述抗体包含氨基酸序列与重链可变区中的所有三个HCDR具有至少70%同一性的多肽序列,HCDR1、HCDR2以及HCDR3的氨基酸序列示出于SEQ ID NO:13-15、19-21以及25-27中。

[0016] 在某些实施方案中,一个或多个重链框架氨基酸已被另一个人类抗体氨基酸序列中的一个或多个相应氨基酸置换。

[0017] 预期本文所述的抗体进一步包含表1或SEQ ID NO:16-18、22-24以及28-30中所示出的轻链CDR氨基酸序列中的任一个。在一些实施方案中,抗体包含表1或SEQ ID NO:16-18、22-24以及28-30中所示出的轻链CDR氨基酸序列中的至少两个。在其他实施方案中,抗体包含表1或SEQ ID NO:16-18、22-24以及28-30中所示出的轻链CDR氨基酸序列中的至少三个。

[0018] 在另一个方面,本文所描述的抗体包含(a)表1或SEQ ID NO:16、22以及28中所示出的轻链CDR1氨基酸序列,或其一个或两个氨基酸已发生变化的变体;(b)表1或SEQ ID NO:17、23以及29中所示出的来自于与(a)相同的轻链可变区的轻链CDR2氨基酸序列,或其一个或两个氨基酸已发生变化的变体;以及(c)表1或SEQ ID NO:18、24以及30中所示出的来自于与(a)相同的轻链可变区的轻链CDR3氨基酸序列,或其一个或两个氨基酸已发生变化的变体。

[0019] 在替代性实施方案中,本文所涵盖的抗体包含:(a)表1或SEQ ID NO:16、22以及28中所示出的轻链CDR1氨基酸序列,或其一个或两个氨基酸已发生变化的变体;(b)表1或SEQ ID NO:17、23以及29中所示出的经过独立选择的轻链CDR2氨基酸序列,或其一个或两个氨基酸已发生变化的变体;以及(c)表1或SEQ ID NO:18、24以及30中所示出的经过独立选择的轻链CDR3氨基酸序列,或其一个或两个氨基酸已发生变化的变体。

[0020] 在某些实施方案中,轻链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个示出于表1或SEQ ID NO:16-18、22-24以及28-30中。

[0021] 进一步预期本文所述的抗体包含氨基酸序列与轻链可变区的所有三个LCDR具有至少70%同一性的多肽序列,LCDR1、LCDR2以及LCDR3的氨基酸序列示出于SEQ ID NO:16-18、22-24以及28-30中。

[0022] 在一个实施方案中,本文所涵盖的抗体包含与表1或SEQ ID NO:4、8以及12中所示

出的轻链可变区氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。在一个相关实施方案中,所述抗体包含与表1或SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的轻链可变区氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗体包含与表1或SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的轻链可变区氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。在再另一个实施方案中,所述抗体包含表1或SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的轻链可变区氨基酸序列。

[0023] 在另一个实施方案中,本文所述的抗体包含(i)与轻链可变区的所有三个LCDR具有至少70%同一性的氨基酸序列,LCDR1、LCDR2以及LCDR3的氨基酸序列示出于SEQ ID NO:16-18、22-24以及28-30中;以及(ii)与重链可变区的所有三个HCDR具有至少70%同一性的氨基酸序列,HCDR1、HCDR2以及HCDR3的氨基酸序列示出于SEQ ID NO:13-15、19-21以及25-27中。

[0024] 在另一个方面,本公开提供了一种结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3的抗体,所述抗体包含轻链可变区和/或重链可变区,其中(a)所述轻链可变区至少包含从SEQ ID NO:16、22以及28或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:17、23以及29或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR2,和/或从SEQ ID NO:18、24以及30或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR3;和/或其中(b)所述重链可变区至少包含从SEQ ID NO:13、19以及25或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:14、20以及26或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR2,和/或从SEQ ID NO:15、21以及27或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR3。在一个实施方案中,所述轻链可变区至少包含从SEQ ID NO:16或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:17或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:18或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3;和/或所述重链可变区至少包含从SEQ ID NO:13或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:14或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:15或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3。

[0025] 在一个相关实施方案中,所述轻链可变区至少包含从SEQ ID NO:22或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:23或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:24或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3;和/或所述重链可变区至少包含从SEQ ID NO:19或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:20或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:21或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3。

[0026] 在某些实施方案中,所述轻链可变区至少包含从SEQ ID NO:28或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:29或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:30或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3;和/或所述重链可变区至少包含从SEQ ID NO:25或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:26或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:27或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3。

[0027] 预期上述抗体序列中的任一个与本文所公开的重链或轻链可变区或HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3中的任一个的同一性百分比可以是至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性。

[0028] 在一些实施方案中,本公开的抗体进一步包含重链恒定区,其中所述重链恒定区是经过修饰或未经过修饰的IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段或其组合。

[0029] 在某些实施方案中,提供了一种抗体,在所述抗体中,一个或多个轻链框架氨基酸已被另一个人类抗体氨基酸序列中的一个或多个相应的氨基酸置换。

[0030] 在一个方面,本公开的抗体是从由XPA.42.089、XPA.42.068以及XPA.42.681组成的群组中选出。XPA.42.089的重链和轻链氨基酸序列分别示出于SEQ ID NO:6和8中。XPA.42.068的重链和轻链氨基酸序列分别示出于SEQ ID NO:2和4中,并且XPA.42.681的重链和轻链氨基酸序列分别示出于SEQ ID NO:10和12中。

[0031] 在一个实施方案中,本文所述的抗体进一步包含与所述轻链可变区连接的人类轻链恒定区。在一些实施方案中,所述轻链恒定区是经过修饰或未经过修饰的 λ 轻链恒定区、 κ 轻链恒定区、其片段或其组合。

[0032] 在一个优选实施方案中,本公开提供了一种以 10^{-6} M或更小的亲和力Kd对TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3具有特异性的抗体。在示例性实施方案中,本文所述的抗TGF β 抗体以 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或更小的亲和力结合TGF β 的至少一种亚型,或任选地结合两种TGF β 亚型或所有TGF β 1、TGF β 2或TGF β 3,对所述亚型中的一种或多种具有 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M或更小的亲和力。在其他实施方案中,本文所述的抗体与TGF β 1和TGF β 2结合的亲和力是与TGF β 3结合的亲和力的至少2至50倍、10至100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍,或比与TGF β 3结合的亲和力高20%至50%、50%至100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%(例如优先与TGF β 1和TGF β 2结合)。或者,本文所述的抗体与TGF β 亚型TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3中的每一种结合的亲和力是彼此的3倍、5倍或10倍以内。在某些实施方案中,所述抗体与TGF β 1和TGF β 2结合的亲和力大于与TGF β 3结合的亲和力。在某些实施方案中,亲和力是通过表面等离子体共振或KINEXA测定法来测量的。

[0033] 在一些实施方案中,所述抗体中和TGF β 1和TGF β 2活性的程度大于中和TGF β 3活性的程度。在一些实施方案中,抗体中和TGF β 1和TGF β 2的效力是中和TGF β 3的效力的至少2至50倍、10至100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍,或比中和TGF β 3的效力大20%至50%、50%至100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。本文所涵盖的示例性中和测定法包括但不限于白细胞介素-11释放测定法和HT-2细胞增殖测定法。另外,可以进行TGF β 活性测定法以确定本文所公开的抗体是否优先抑制一种TGF β 亚型,包括pSMAD磷酸化测定法或rhLAP结合测定法。在另一个实施方案中,相较于对TGF β 3的IC₅₀,所述抗体对TGF β 1和TGF β 2的IC₅₀更低(即结合更佳、效力更大)。

[0034] 在另一个方面,本公开提供了一种分离的核酸分子,所述核酸分子包含编码如本文所述的重链和/或轻链的核苷酸序列。

[0035] 在另一个方面,本公开提供了一种表达载体,所述表达载体包含与表达控制序列可操作地连接的本文所涵盖的核酸分子。还涵盖了一种宿主细胞,所述宿主细胞包含本公开的表达载体或核酸分子。在某些实施方案中,本公开提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞包含编码重链可变区和轻链可变区的核酸分子,其中重链核酸和轻链核酸由不同的核酸或在相同的核酸上表达。

[0036] 在一个相关方面,本公开提供了一种使用如本文所述的宿主细胞产生抗体的方

法,所述方法包括在适合条件下培养宿主细胞以及回收所述抗体。还提供了一种由本文所公开的方法产生的抗体。

[0037] 本公开进一步涵盖了一种无菌药物组合物,所述药物组合物包含本文所公开的抗体以及药学上可接受的载体。

[0038] 在另一个方面,本公开提供了一种用于治疗与TGF β 表达相关的疾病、病状或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所涵盖的抗体或药物组合物的步骤。在某些实施方案中,所述疾病、病状或病症是从由以下各项组成的群组中选出:癌症、眼睛(例如眼部、视力、眼科或眼科学)疾病、病状或病症、与纤维化相关的疾病、病状或病症,例如纤维增生性疾病、病状或病症,或伴有相关纤维化的疾病、病状或病症。

[0039] 纤维增生性疾病、病状或病症或者伴有相关纤维化的疾病包括累及体内任何器官或组织的疾病,所述任何器官或组织包括但不限于皮肤、肺、肾脏、心脏、脑以及眼睛。纤维增生性疾病、病状或病症或者伴有相关纤维化的疾病包括但不限于肺纤维化、特发性肺纤维化、细支气管周围纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病(COPD)、小气管疾病(例如阻塞性细支气管炎)、肺气肿、成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ALI)、因感染剂或毒性剂所致的肺纤维化、肾纤维化、由所有病因所致的肾小球肾炎(GN)、肾小球膜增生性GN、免疫性GN、新月体性GN、肾小球硬化症、肾小管间质损伤、肾间质性纤维化、肾纤维化以及肾间质性纤维化的所有成因、由药物暴露(包括对移植接受者进行的环孢菌素(cyclosporin)治疗)的并发症引起的肾纤维化、HIV相关肾病、移植肾病、糖尿病性肾脏疾病、糖尿病性肾病、肾源性全身性纤维化、糖尿病、特发性腹膜后纤维化、硬皮病、肝纤维化、与过度瘢痕形成和进行性硬化相关的肝脏疾病、因所有病因所致的肝硬化、胆道系统病症、可归因于感染的肝功能失调、纤维囊性疾病、心血管疾病、充血性心力衰竭、扩张性心肌病、心肌炎、血管狭窄、心脏纤维化、梗塞后心脏纤维化、后壁心肌梗塞、左心室肥大、静脉闭塞性疾病、再狭窄、血管成形术后再狭窄、动静脉移植失败、动脉粥样硬化、高血压、高血压性心脏病、心脏肥大、肥厚型心肌病、心力衰竭、主动脉疾病、进行性全身性硬化;多发性肌炎;全身性红斑狼疮;皮炎、筋膜炎、雷诺氏综合征(Raynaud's syndrome)、类风湿性关节炎、增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与眼部手术、对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、碱烧伤(例如角膜碱烧伤)、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化、与角膜浑浊相关的纤维化、小梁网纤维化、与青光眼相关的纤维化、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成、眼睛视网膜或脉络膜血管结构纤维化、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化、与年龄相关性黄斑变性相关的纤维化、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离、佩罗尼氏病(Peyronie's disease)、全身性硬化、脊髓损伤后、骨质疏松症、卡-恩二氏病(Camurati-Engelmann disease)、克罗恩氏病(Crohn's disease)、瘢痕形成、马凡氏综合征(Marfan syndrome)、卵巢早衰、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease)、帕金森氏病(Parkinson's Disease)、因手术切口或机械性创伤所致的纤维化、与眼部手术相关的纤维化,以及由创伤或手术伤口引起的在伤口愈合期间皮肤中出现的过度或肥厚性瘢痕或瘢痕瘤形成。

[0040] 示例性眼睛疾病(例如眼部、视力、眼科或眼科学疾病)、病状或病症包括但不限于纤维增生性病症、眼睛纤维化、眼科纤维组织形成、视网膜功能失调、与视网膜功能失调相关的纤维化、湿性或干性黄斑变性、增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、碱烧伤(例如角膜碱烧伤)、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离。

[0041] 示例性的眼睛纤维增生性疾病、病状或病症、眼睛纤维化、眼部纤维化或眼科纤维组织形成包括但不限于增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与视网膜功能失调相关的纤维化、与湿性或干性黄斑变性相关的纤维化、与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、与碱烧伤相关的纤维化、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离。

[0042] 在不同的实施方案中,眼睛纤维增生性疾病、病状或病症是从由以下各项组成的群组中选出:增生性玻璃体视网膜病、与眼部手术相关的纤维化、白内障手术后晶状体纤维化、角膜基质纤维化以及碱烧伤。

[0043] 在一个相关方面,本公开提供了一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所涵盖的抗体或药物组合物。在某些实施方案中,所述癌症是从由以下各项组成的群组中选出:肺癌、前列腺癌、乳腺癌、肝细胞癌、食道癌、结肠直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、纤维变性癌症、神经胶质瘤以及黑色素瘤。

[0044] 在一些实施方案中,所述抗体或组合物使肿瘤中的自然杀伤(NK)细胞的数量增加。在不同的实施方案中,所述抗体或组合物能够提高NK细胞的细胞溶解活性。举例来说,在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物能够增加NK细胞的穿孔素和颗粒酶的产生。在一个实施方案中,所述抗体是XPA.42.089或XPA.42.681。

[0045] 在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物使肿瘤中的调节性T细胞的数量减少和/或抑制调节性T细胞的功能。举例来说,在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物抑制调节性T细胞下调免疫应答或迁移至免疫应答部位的能力。

[0046] 在不同的实施方案中,所述抗体或组合物使肿瘤中的细胞毒性T细胞的数量增加和/或增强CTL活性,例如加强、提高或促进CTL活性。举例来说,在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物使CTL的穿孔素和颗粒酶的产生增加并且提高CTL的细胞溶解活性。在

一个实施方案中,所述抗体是XPA.42.068、XPA.42.089或XPA.42.681。

[0047] 在另一个实施方案中,所述抗体或组合物使肿瘤中单核细胞衍生的干细胞(MDSC)的数目减少和/或抑制MDSC的功能。举例来说,在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物抑制MDSC抑制免疫应答的能力,抑制MDSC的免疫抑制活性和/或抑制MDSC以促进调节性T细胞的扩充和/或功能的能力。在不同的实施方案中,所述抗体是从由XPA.42.089、XPA.42.068以及XPA.42.681组成的群组中选出。

[0048] 在不同的实施方案中,所述抗体使肿瘤中树突状细胞(DC)的数目减少和/或抑制树突状细胞的致耐受性功能(例如致耐受性作用)。举例来说,在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物降低CD8+树突状细胞的致耐受性作用。在一个实施方案中,所述抗体是XPA.42.089或XPA.42.681。

[0049] 在另一个方面,本公开提供了一种用于治疗纤维化的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所涵盖的抗体或药物组合物。

[0050] 在不同的实施方案中,将所述抗体与第二药剂一起施用。在一个实施方案中,所述第二药剂是从由以下各项组成的群组中选出:细胞外基质降解蛋白、抗纤维化剂、手术疗法、化学疗法、细胞毒性剂或放射疗法。示例性的第二药剂更详细地公开于发明详述中。

[0051] 在不同的实施方案中,定期施用疗法,例如每小时、每天、每周、每2周、每3周、每月或以更长的时间间隔施用一次。在一个相关实施方案中,在示例性治疗中,可以施用以下剂量的本文所公开的抗体:约1毫克/天、5毫克/天、10毫克/天、20毫克/天、50毫克/天、75毫克/天、100毫克/天、150毫克/天、200毫克/天、250毫克/天、500毫克/天或1000毫克/天。这些浓度可以作为单次剂型或作为多次剂量施用。

[0052] 还涵盖了一种包含本公开的结合TGFβ的任何上述抗体或组合物的组合物或其用于制备治疗本文所述的与TGFβ表达相关的任何病症的药剂的用途。还涵盖了包含任何上述抗体或组合物并且任选地附有适合的使用说明书的注射器,例如一次性或预填充的注射器;无菌密封容器,例如小瓶、瓶子、器皿;和/或试剂盒或包装。

[0053] 应了解的是,本文所述的每个特征或实施方案或组合是本发明的任何方面的一个非限制性说明性实例,并且因而,意图可与本文所述的任何其他特征或实施方案或组合相组合。举例来说,在用如“一个实施方案”、“一些实施方案”、“某些实施方案”、“另外的实施方案”、“具体的示例性实施方案”和/或“另一个实施方案”的措辞描述特征的情况下,这些类型的实施方案中的每一个均是一种特征的一个非限制性实例,旨在与本文所述的任何其他特征或特征的组合相组合而无需列出每一种可能的组合。这些特征或特征组合适用于本发明的任何方面。在公开了属于范围内的值的实例时,这些实例中的任一个被涵盖作为范围可能的终点,涵盖了这些终点之间的任何和所有数值,并且设想了上限终点和下限终点的任何和所有组合。

附图说明

[0054] 图1是示出了TGFβ抗体与TGFβ1竞争结合rhLAP的图表。

[0055] 图2示出了TGFβ抗体对细胞中的pSMAD信号转导的中和作用。(A) TGFβ1; (B) TGFβ2; (C) TGFβ3。

[0056] 图3是示出了TGFβ抗体对调节性T细胞(Treg)的抑制作用的图表。

- [0057] 图4是示出了TGF β 抗体在异种移植小鼠模型中的肿瘤抑制作用的图表。
- [0058] 图5是示出了TGF β 抗体在异种移植小鼠模型中的肿瘤抑制作用的图表。
- [0059] 图6是示出了TGF β 抗体在同基因小鼠模型中的肿瘤抑制作用的图表。
- [0060] 图7是示出了TGF β 抗体在同基因小鼠模型中的肿瘤抑制作用的图表。
- [0061] 图8是示出了TGF β 抗体在同基因小鼠模型中的肿瘤抑制作用的图表。
- [0062] 图9是示出了TGF β 抗体在同基因小鼠模型中的肿瘤抑制作用的图表。
- [0063] 图10是示出了TGF β 抗体在同基因小鼠肿瘤模型中对肿瘤中的自然杀伤细胞的体内作用的图表。
- [0064] 图11是示出了TGF β 抗体在同基因小鼠模型中对肿瘤中的骨髓衍生抑制性细胞的体内作用的图表。
- [0065] 图12是示出了TGF β 抗体在同基因小鼠肿瘤模型中对肿瘤中的树突状细胞的体内作用的图表。
- [0066] 图13是示出了TGF β 抗体在同基因小鼠肿瘤模型中对肿瘤中的调节性T细胞的体内作用的图表。
- [0067] 图14是示出了TGF β 抗体在同基因小鼠肿瘤模型中对肿瘤中的细胞毒性T细胞的体内作用的图表。
- [0068] 图15是示出了TGF β 抗体对NK细胞的细胞溶解活性的体外作用的图表。
- [0069] 图16是示出了TGF β 抗体对T细胞增殖的作用的图表。
- [0070] 图17是示出了通过颗粒酶B (GzmB) (图17A) 和穿孔素 (图17B) 的表达所评价的TGF β 抗体对CTL活化的作用的图表。
- [0071] 图18是示出了TGF β 抗体在接受TGF β 抗体施用的经过CsA处理的动物或对照动物中对血清血尿素氮 (BUN) 水平的作用的图表。
- [0072] 图19是示出了TGF β 抗体对接受TGF β 抗体施用的经过CsA处理的动物或对照动物的尿中白蛋白积聚的作用的图表,所述白蛋白积聚是病肾中的肾小球功能失调的特征。
- [0073] 图20是示出了TGF β 抗体对接受TGF β 抗体施用的经过CsA处理的动物或对照动物的尿中尿IV型胶原蛋白水平的作用的图表,所述尿IV型胶原蛋白的水平反映了肾中ECM沉积和纤维化的程度。
- [0074] 图21是示出了如通过对肾脏组织进行定量RT-PCR所评估的TGF β 抗体对牵涉到纤维化的基因表达的作用的图表。在接受TGF β 抗体施用的经过CsA处理的动物或对照动物中评估对TGF- β 1表达 (图21A) 和III型胶原蛋白 (图21B) 的作用。
- [0075] 图22是示出了在施用TGF β 1后TGF β 抗体对视网膜色素上皮 (RPE) 细胞中pSMAD2增加的作用的图表。

具体实施方式

[0076] 本公开提供了治疗与TGF β 表达相关的病状或病症 (例如癌症和纤维化) 的治疗剂。本公开提供了与TGF β 相互作用并且抑制它的一种或多种功能作用 (例如像经由结合TGF β 的配偶体进行信号转导) 的分子或药剂。本文所公开的组合物有利地能够调节肿瘤中的免疫细胞活性,从而在一个方面,提供了一种通过影响直接或间接影响肿瘤生长的细胞群体来治疗癌症的方法。

[0077] 为了能够更完全地了解本公开,对若干定义进行阐明。

[0078] 如本文所用的“靶标”或“靶标抗原”指的是任何或所有TGF- β 分子,包括TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3在内。

[0079] 如本文所用的“TGF β ”指的是TGF β 的任意一种或多种亚型,包括TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3或其变体。同样,除非另外指明,否则术语“TGF β 受体”是指结合至少一种TGF β 亚型的任何受体。

[0080] 如本文所用的抗靶标抗体的“所需生物活性”是与TGF β 结合并且抑制它的一种或多种功能作用的能力。

[0081] 如本文所用的“与靶标表达相关的病状”或“病症”是靶标活性有害的病状或病症,并且包括如下的疾病和其他病症,在所述疾病和其他病症中,高水平的靶标已经显示或被怀疑是导致病症的病理生理学的原因或促使病症恶化的因素;以及如下的疾病和其他病症,在所述疾病和其他病症中,高水平的靶标表达与不希望有的临床体征或症状有关。这些病症的证据可能是例如患有该病症的受试者所分泌的和/或细胞表面上的靶标水平增加和/或受影响的细胞或组织中信号转导增加。可以例如使用如本文所述的靶标特异性抗体来检测靶标水平的增加。

[0082] 可以用结合TGF β 的抗体物质(例如本公开的抗体)治疗的示例性的与TGF β 表达相关的疾病、病状或病症包括癌症,如肺癌、前列腺癌、乳腺癌、肝细胞癌、食道癌、结肠直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、纤维变性癌症、神经胶质瘤以及黑色素瘤、眼睛(例如眼部、视力、眼科或眼科学)疾病、病状或病症、与纤维化相关的疾病、病状或病症,例如纤维增生性疾病、病状或病症,或伴有相关纤维化的疾病、病状或病症。

[0083] 纤维增生性疾病、病状或病症或者伴有相关纤维化的疾病、病状或病症包括累及体内任何器官或组织的疾病,所述任何器官或组织包括但不限于皮肤、肺、肾脏、心脏、脑以及眼睛。纤维增生性疾病、病状或病症或者伴有相关纤维化的疾病包括但不限于肺纤维化、特发性肺纤维化、细支气管周围纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病(COPD)、小气管疾病(例如阻塞性细支气管炎)、肺气肿、成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ALI)、因感染剂或毒性剂所致的肺纤维化、肾纤维化、由所有病因所致的肾小球肾炎(GN),例如肾小球膜增生性GN、免疫性GN以及新月体性GN;肾小球硬化症、肾小管间质损伤、肾间质性纤维化、肾纤维化以及肾间质性纤维化的所有成因、由药物暴露(包括对移植接受者进行的环孢菌素治疗,例如环孢菌素治疗)的并发症引起的肾纤维化、HIV相关肾病、移植肾病、糖尿病性肾脏疾病(例如糖尿病性肾病)、肾原性全身性纤维化、糖尿病、特发性腹膜后纤维化、硬皮病、肝纤维化、与过度瘢痕形成和进行性硬化相关的肝脏疾病,包括因所有病因所致的肝硬化;胆道系统的病症、可归因于感染的肝功能失调、纤维囊性疾病、心血管疾病,如充血性心力衰竭;扩张性心肌病、心肌炎、血管狭窄、心脏纤维化(例如梗塞后心脏纤维化)、后壁心肌梗塞、左心室肥大、静脉闭塞性疾病、再狭窄(例如血管成形术后再狭窄)、动静脉移植失败、动脉粥样硬化、高血压、高血压性心脏病、心脏肥大、肥厚型心肌病、心力衰竭、主动脉疾病、进行性全身性硬化、多发性肌炎、全身性红斑狼疮、皮炎、筋膜炎、雷诺氏综合征、类风湿性关节炎、增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病或与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、碱烧伤(例如角膜碱烧伤)、白内障手术后晶状

体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离、佩罗尼氏病、全身性硬化、脊髓损伤后、骨质疏松症、卡-恩二氏病、克罗恩氏病、瘢痕形成、马凡氏综合征、卵巢早衰、阿尔茨海默氏病和帕金森氏病、因手术切口或机械性创伤所致的纤维化、与眼部手术相关的纤维化;以及由创伤或手术伤口引起的在伤口愈合期间皮肤中出现的过度或肥厚性瘢痕或瘢痕瘤形成。

[0084] 示例性眼睛疾病(例如眼部、视力、眼科或眼科学疾病)、病状或病症包括但不限于纤维增生性病症、眼睛纤维化、眼科纤维组织形成、视网膜功能失调、与视网膜功能失调相关的纤维化、湿性或干性黄斑变性、增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、碱烧伤(例如角膜碱烧伤)、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离。

[0085] 示例性的眼睛纤维增生性疾病、病状或病症、眼睛纤维化、眼部纤维化或眼科纤维组织形成包括但不限于增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与视网膜功能失调相关的纤维化、与湿性或干性黄斑变性相关的纤维化、与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、与碱烧伤相关的纤维化、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离。

[0086] 在不同的实施方案中,眼睛纤维增生性疾病、病状或病症是从由以下各项组成的群组中选出:增生性玻璃体视网膜病、与眼部手术相关的纤维化、白内障手术后晶状体纤维化、角膜基质纤维化以及碱烧伤。

[0087] “免疫球蛋白”或“天然抗体”是四聚糖蛋白。在天然存在的免疫球蛋白中,每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括主要负责抗原识别的具有约100至110个或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基端部分界定了主要负责效应功能的恒定区。人类轻链被分类为 κ 和 λ 轻链。重链被分类为 μ 、 Δ 、 γ 、 α 以及 ϵ ,并且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA

以及IgE。在轻链和重链内,可变区与恒定区由具有约12个或更多个氨基酸的“J”区接合,其中重链还包括具有约10个或更多个氨基酸的“D”区。大体上参见Fundamental Immunology的第7章(Paul,W.编著.第2版,Raven Press,N.Y.(1989))(出于所有目的以引用的方式整体并入本文)。每对轻链/重链的可变区形成抗体结合位点,因此完整的免疫球蛋白具有两个结合位点。

[0088] 每条重链在一端上具有可变域(VH),后面是多个恒定域。每条轻链在一端上具有可变域(VL)并且在它的另一端上具有恒定域;轻链的恒定域与重链的第一恒定域对准,并且轻链可变域与重链的可变域对准。特定的氨基酸残基被认为形成了轻链可变域与重链可变域之间的界面(Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917,1987)。

[0089] 免疫球蛋白可变域展现出相同的由三个高变区或CDR所接合的相对保守的框架区(FR)的通用结构。从N端到C端,轻链和重链均包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3以及FR4。氨基酸于每个结构域中的归属是根据以下文献中的定义:Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987和1991));或Chothia和Lesk(J.Mol.Biol.196:901-917,1987);Chothia等(Nature 342:878-883,1989)。

[0090] 抗体的高变区是指抗体中负责抗原结合的CDR氨基酸残基。高变区包含CDR中的氨基酸残基[例如轻链可变域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变域中的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3),如由Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)所述]和/或高变环中的那些残基(例如轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变域中的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3),如由Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)所述]。CDR还已经根据ImMunoGenTics(IMGt)编号来加以鉴定和编号(Lefranc,M.-P.,The Immunologist,7,132-136(1999);Lefranc,M.-P.等,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003),其将轻链和重链可变域中的CDR位置描述如下:CDR1,大致残基27至38;CDR2,大致残基56至65;以及CDR3,大致残基105至116(生殖系)或残基105至117(经过重排)。在一个实施方案中,预期在长度与本文所公开的抗体重链或轻链大致相似的抗体重链或轻链中,CDR在轻链可变域中位于大致残基26-31(L1)、49-51(L2)以及88-98(L3)处并且在重链可变域中位于大致残基26-33(H1)、50-58(H2)以及97-111(H3)处。然而,本领域技术人员应了解,在对具体抗体的序列进行鉴定时,CDR残基的实际位置可能不同于上述所预计的残基。

[0091] 框架或FR残基是除高变区残基以外的那些可变域残基。

[0092] 如本文所用的“重链可变区”是指抗体分子中包含所述抗体重链可变域的至少一个互补决定区(CDR)的区域。重链可变区可以含有所述抗体重链的一个、两个或三个CDR。

[0093] 如本文所用的“轻链可变区”是指抗体分子中包含所述抗体轻链可变域的至少一个互补决定区(CDR)的区域。轻链可变区可以含有所述抗体轻链的一个、两个或三个CDR,所述抗体轻链取决于所述抗体可以是 κ 或 λ 轻链。

[0094] 术语“抗体”在最广泛的意义上使用并且包括完全组装的抗体、四聚抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、可以结合抗原的抗体片段(例如Fab'、F'(ab)2、Fv、单链抗体、双链抗体),以及包含以上各项的重组肽,只要它们展现出所

需的生物活性即可。“免疫球蛋白”或“四聚抗体”是由两条重链和两条轻链组成的四聚糖蛋白,所述重链和轻链各自包含可变区和恒定区。可以通过重组DNA技术或通过完整抗体进行酶促或化学切割而产生抗原结合部分。抗体片段或抗原结合部分尤其包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、结构域抗体(dAb)、互补决定区(CDR)片段、CDR移植抗体、单链抗体(scFv)、单链抗体片段、嵌合抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、微型抗体(minibody)、线性抗体;螯合重组抗体、三体(tribody)或双体(bibody)、胞内抗体、纳米抗体、小模块免疫药物(SMIP)、抗原结合域免疫球蛋白融合蛋白、骆驼源化抗体、含VHH抗体或其变体或衍生物,以及含有至少一部分免疫球蛋白的多肽,所述至少一部分免疫球蛋白足以赋予所述多肽以特异性抗原结合性,如一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR序列,只要所述抗体保持所需的生物活性即可。

[0095] “单克隆抗体”是指从一群大致上均质的抗体中获得的抗体,即除了可能少量存在的可能的天然存在的突变以外,构成该群体的单独的抗体是相同的。

[0096] 如本文所用的“抗体变体”是指在参考抗体可变区结构域的可变区中含有至少一处氨基酸取代、缺失或插入的抗体多肽序列。变体可能与未经过修饰的抗体大致上具有同源性或大致上具有同一性。

[0097] 如本文所用的“嵌合抗体”指的是含有源自于两个不同抗体的序列的抗体(参见例如美国专利号4,816,567),所述两个不同的抗体典型地来源于不同的物种。最典型地,嵌合抗体包含人类和啮齿动物抗体片段,一般是人类恒定区和小鼠可变区。

[0098] “中和抗体”是能够消除或显著降低它所结合的靶标抗原的生物功能的抗体分子。因此,“中和”抗靶标抗体能够消除或显著降低如酶活性、配体结合或细胞内信号转导的生物功能。

[0099] “分离”的抗体是已经过鉴定并且与它的天然环境中的组分分离并回收的抗体。它的天然环境中的污染性组分是会干扰抗体的诊断性或治疗性使用的物质,并且可能包括酶、激素以及其他蛋白质或非蛋白质溶解物。在优选实施方案中,抗体经过纯化以达到如下的程度:(1)如通过劳里法(Lowry method)所测定,抗体多于95重量%,并且最优选地多于99重量%;(2)足以通过使用转杯式测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)通过在还原或非还原条件下使用考马斯蓝(Coomassie blue)或优选地使用银染色剂进行SDS-PAGE测定具有均一性。分离的抗体包括原位处于重组细胞内的抗体,这是因为抗体的天然环境中的至少一种组分将不会存在。然而,通常,将通过至少一个纯化步骤来制备分离的抗体。

[0100] 如本文所用的“特异性结合”靶标抗原、“具有靶标特异性”、“对靶标具有特异性”或对靶标抗原“具有免疫反应性”的抗体指的是与靶标抗原结合的亲和力大于与类似抗原结合的亲和力的抗体或抗体物质。在本公开的一个方面,靶标结合多肽或其片段、变体或衍生物与人类靶标结合的亲和力将大于它与其他(即非人类)物种的靶标的结合亲和力,但识别并且结合所述靶标的直系同源物的结合多肽在所提供的范围以内。

[0101] 举例来说,多肽为对它的同源抗原“具有特异性”的抗体或其片段指示所述抗体的可变区以可检测到的优先度识别并且结合所关注的多肽(即虽然在家族成员之间可能存在局部序列同一性、同源性或相似性,但是能够借助于结合亲和力方面的可测量的差异将所关注的多肽与同一家族的其他已知多肽相区别)。应了解,特异性抗体还可以经由与抗体可

变区以外并且特别是分子恒定区中的序列相互作用来与其他蛋白质(例如金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)蛋白质A或ELISA技术中的其他抗体)相互作用。用于本公开方法中的测定抗体的结合特异性的筛选测定法是本领域熟知的并且按常规执行的。关于这些测定法的综合性论述,参见Harlow等(编著),*Antibodies A Laboratory Manual*;Cold Spring Harbor Laboratory;Cold Spring Harbor,NY(1988),第6章。用于所述方法中的抗体可以使用本领域已知的任何方法来产生。

[0102] 术语“表位”指的是任何分子中能够由选择性结合剂在一个或多个抗原结合区中识别并且结合的部分。表位通常由分子中具有化学活性的表面基团(如氨基酸或碳水化合物侧链)组成,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。如本文所用的表位可能是连续的或不连续的。此外,表位可能是模拟物(模拟表位),因为它们包含与用于产生抗体的表位相同的三维结构,但不包含被用于刺激抗体免疫应答的靶标中存在的氨基酸残基或仅包含所述氨基酸残基中的一些。如本文所用的模拟表位并非被认为是与由选择性结合剂结合的表位不同的抗原;选择性结合剂能够识别表位和模拟表位的相同三维结构。

[0103] 术语“衍生物”在结合本公开的抗体物质和多肽使用时指的是通过如下的技术化学修饰的多肽:泛素化、与治疗剂或诊断剂缀合、标记(例如用放射性核素或不同的酶标记)、共价聚合物连接(如聚乙二醇化(用聚乙二醇衍生化))以及通过对通常不存在于人类蛋白质中的氨基酸(如鸟氨酸)进行化学合成来进行插入或取代。衍生物保持本公开的未衍生化分子的结合特性。

[0104] “可检测部分”或“标记”指的是可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段检测的组合物。举例来说,有用的标记包括 ^{32}P 、 ^{35}S 、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如,如ELISA中所常用)、生物素-抗生物素蛋白链菌素、毛地黄毒苷、抗血清或单克隆抗体可获得的半抗原和蛋白质,或序列与靶标互补的核酸分子。可检测部分经常产生可测量信号,如放射、发色或荧光信号,该信号可以被用于对样本中所结合的可检测部分的量进行定量。

[0105] 术语“治疗有效量”在本文用于指示本公开的靶标特异性组合物有效改善或减轻与靶标蛋白表达相关疾病的症状或体征的量。

[0106] 如本文关于方法所用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”以及“治疗(treatment)”指的是暂时或永久地、部分或完全地消除、减少、抑制或改善与TGF β 表达相关的事件、疾病或病状的临床症状、表现或进展。这种治疗无需是绝对有用的。

[0107] 本公开提供了一种可以包含表1中所示出的那些示例性序列的靶标特异性抗体、其片段、变体以及衍生物;包括上文所述的靶标特异性抗体的药物制剂;制备所述药物制剂的方法;以及用所述药物制剂和化合物治疗患者的方法。

[0108] 根据免疫球蛋白重链恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以归属于不同的类别,即IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM,所述类别可以进一步被分成亚类或同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1以及IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是熟知的。不同的同种型具有不同的效应功能;例如,IgG1和IgG3同种型具有ADCC活性。本文所公开的抗体如果包含恒定域,那么它可以属于这些亚类或同种型中的任一种。

[0109] 本公开的抗体对一种或多种TGF β 抗原所展现出的结合亲和力的K $_d$ 可以小于或等于约 10^{-5}M 、小于或等于约 10^{-6}M ,或小于或等于约 10^{-7}M ,或小于或等于约 10^{-8}M ,或小于或等于约 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 或 10^{-12}M 或更小。这些亲和力可以容易地使用常规技术测定,如通过平

衡透析;通过使用表面等离子体共振 (SPR) 技术 (例如BIAcore 2000仪器,使用由制造商所概述的一般程序);通过使用¹²⁵I标记的靶标抗原进行放射性免疫测定;或通过以下实施例中阐明或熟练技术人员所知的另一种方法来测定。亲和力数据可以例如通过Scatchard等 (Ann N.Y.Acad.Sci.,51:660,1949) 的方法来分析。

[0110] KinExA动力学排除测定法也可用于测量抗体对它的抗原的亲和力。KinExA技术测量了溶液相中的结合事件,而非溶液相与固相之间的结合事件。另外,虽然多种用于测量结合事件的方法需要至少一种反应物经由固定化或标记加以修饰,但是KinExA法不需要对所研究的分子进行修饰。据信与当前可供使用的其他方法相比,KinExA法允许对更广范围的结合常数进行测量。关于用于抗体表征的KinExA装置和操作的另外的描述可获自制造商 (Sapidyne Instruments公司,Boise,ID) 并且可以见于公布的文献中,例如美国专利号6,664,114和Darling等,“Kinetic Exclusion Assay Technology:Characterization of Molecular Interactions.”Assay and Drug Development Technologies,2004,2:647-657。

[0111] 转化生长因子 β

[0112] TGF β 是一种二硫键连接的二聚体,以具有约400个氨基酸(aa)的前原蛋白形式合成,在分泌之前该前原蛋白经过切割而产生成熟的TGF β 。N端切割片段被称为“潜在相关肽(latency-associated peptide,LAP)”可以与二聚体保持非共价结合,从而使TGF β 失活。体内分离的TGF β 主要以非活性的“潜在”形式,即与LAP缔合的形式存在。潜在的TGF β 复合体可以通过多种方式活化,例如通过与被称为非阳离子依赖性甘露糖-6-磷酸/胰岛素样生长因子II受体的细胞表面受体结合来活化。经由LAP内的糖基化位点上所连接的甘露糖-6-磷酸残基进行结合。在与受体结合后,TGF β 以它的成熟形式释放。成熟的活性TGF β 然后可以自由地与它的受体结合并且发挥它的生物功能。II型TGF β 受体中的主要TGF β 结合域已经被定位于一个具有19个氨基酸的序列 (Demetriou等,J.Biol.Chem.,271:12755,1996)。还参见美国专利7,867,496。

[0113] 目前,存在五种已知的TGF β 亚型(TGF β 1至TGF β 5;TGF β 1-3存在于哺乳动物中,TGF β 4存在于鸡中;而TGF β 5存在于蛙中),所有这些亚型彼此是同源的(60%-80%同一性),形成约25kDa的同二聚体,并且对常见的TGF β 受体(TGF β -RI、TGF β -RII、TGF β -RIIB以及TGF β -RIII)起作用。TGF β 以及TGF β 受体的结构和功能方面是本领域熟知的(参见例如Cytokine Reference,Oppenheim等编著,Academic Press,San Diego,Calif.,2001)。TGF β 在物种间是相当保守的。举例来说,大鼠与人类的成熟TGF β 1的氨基酸序列几乎相同。还参见美国专利7,867,496。

[0114] TGF β 1在生物组织的伤口愈合过程中起重要作用(New Engl.J.Med.,第331卷,第1286页,1994;以及J.Cell.Biol.,第119卷,第1017页,1992)。在受伤组织的部位处,存在如炎症细胞和成纤维细胞浸润、细胞外基质(ECM)产生和血管形成,以及细胞生长以继而使组织再生的生物反应以修复受损的组织。还参见美国专利7,579,186。

[0115] TGF β 2缺陷型小鼠表现出显著的发育缺陷,包括心脏、肺、颅面、四肢、脊椎、眼睛、耳朵以及泌尿生殖器缺陷(Dunker等.Eur J Biol 267:6982-8.2001)。TGF β 3缺陷型小鼠到出生后第24小时表现出几乎100%的致死率。这些小鼠显示出显著的上腭缺损和迟缓的肺部发育(Dunker等(同上))。TGF β 2还已牵涉到青光眼的产生(Luthen-Driscoll,

Experimental Eye Res 81:1-4,2005)、与克罗恩氏病相关的纤维化 (Van Assche等, Inflamm Bowel Dis.10:55-60,2004)、伤口愈合以及糖尿病性肾病 (Pohlers等, Biochim Biophys Acta 1792:746-56,2009)。

[0116] 已观测到,许多人类肿瘤 (deMartin等,EMBO J.,6:3673 (1987);Kuppner等, Int.J.Cancer,42:562 (1988)) 和许多肿瘤细胞系 (Derynck等,Cancer Res.,47:707 (1987);Roberts等,Br.J.Cancer,57:594 (1988)) 产生TGF β ,并且表明了那些肿瘤可以逃避正常的免疫监视的可能性机制。

[0117] TGF β 亚型在癌症中的表达是复杂的并且可变的,其中TGF β 亚型的不同组合在具体癌症中具有不同的作用。参见例如美国专利7,927,593。举例来说,TGF β 1和TGF β 3在卵巢癌以及它的进展中所起的作用可能大于TGF β 2;而TGF β 1和TGF β 2在分级较高的软骨肉瘤肿瘤中的表达高于TGF β 3。在人类乳腺癌中,TGF β 1和TGF β 3高表达,其中TGF β 3表达看似与总体存活率有关,有淋巴结转移和阳性TGF β 3表达的患者具有较差的预后结果。然而,在结肠癌中,TGF β 1和TGF β 2的表达高于TGF β 3,并且所存在的循环水平大于在无癌症个体中的循环水平。在神经胶质瘤中,TGF β 2对于细胞迁移是重要的。

[0118] TGF β 表达还已牵涉到如肾硬化、肺纤维化以及肝硬化的不同组织的纤维组织形成的发病;以及如慢性肝炎、类风湿性关节炎、血管再狭窄以及皮肤瘢痕瘤的不同病况的发病。所涵盖的包括与疾病或病症 (例如纤维增生性疾病或病症) 或对疾病或病症的治疗相关的纤维组织形成在内的纤维组织形成包括但不限于肺纤维化、特发性肺纤维化、细支气管周围纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、小气管疾病 (例如阻塞性细支气管炎)、肺气肿、成人或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、急性肺损伤 (ALI);因感染剂或毒性剂所致的肺纤维化、肾纤维化、由所有病因所致的肾小球肾炎 (GN),例如肾小球膜增生性GN、免疫性GN以及新月体性GN;肾小球硬化症、肾小管间质损伤、肾间质性纤维化、肾纤维化以及肾间质性纤维化的所有成因、由药物暴露 (包括对移植接受者进行的环孢菌素治疗,例如环孢菌素治疗) 的并发症引起的肾纤维化、HIV相关肾病;移植肾病、糖尿病性肾脏疾病 (例如糖尿病性肾病)、肾原性全身性纤维化、糖尿病、特发性腹膜后纤维化、硬皮病、肝纤维化、与过度瘢痕形成和进行性硬化相关的肝脏疾病,包括因所有病因所致的肝硬化;胆道系统的病症、可归因于感染的肝功能失调、纤维囊性疾病、心血管疾病,如充血性心力衰竭;扩张性心肌病、心肌炎、血管狭窄、心脏纤维化 (例如梗塞后心脏纤维化)、后壁心肌梗塞、左心室肥大、静脉闭塞性疾病、再狭窄 (例如血管成形术后再狭窄)、动静脉移植失败、动脉粥样硬化、高血压、高血压性心脏病、心脏肥大、肥厚型心肌病、心力衰竭、主动脉疾病、进行性全身性硬化;多发性肌炎、全身性红斑狼疮、皮炎、筋膜炎、雷诺氏综合征、类风湿性关节炎、增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与眼部手术 (如对青光眼的治疗) 相关的纤维化、与视网膜功能失调、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、与碱烧伤相关的纤维化、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化 (例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化 (例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成 (例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化 (例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性

视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离、佩罗尼氏病、全身性硬化、脊髓损伤后、骨质疏松症、卡-恩二氏病、克罗恩氏病、瘢痕形成、马凡氏综合征、卵巢早衰、阿尔茨海默氏病和帕金森氏病、因手术切口或机械性创伤所致的纤维化、与眼部手术相关的纤维化；以及由创伤或手术伤口引起的在伤口愈合期间皮肤中出现的过度或肥厚性瘢痕或瘢痕瘤形成。

[0119] 在肺纤维化和肾硬化中，TGF β 的浓度高并且会导致如纤维化的病态进展(Yamamoto等，Kidney Int.45:916-27,1994；以及Westergren-Thorsson等，J.Clin.Invest.92:632-7,1993)。已经假定，在肺纤维化和肾硬化中，持续性的组织损伤会持续地进行信号转导以表达TGF β ，抑制对ECM的TGF β 表达的负向调节信号，或协同地引起这两个事件。在诊断和治疗纤维化疾病中使用TGF β 抑制剂来抑制TGF β 的活性和细胞外基质积聚公开于W0 1991/04748、W0 1993/10808以及W0 2000/40227中。中和抗TGF β 抗体已被用于治疗实验性糖尿病性肾脏疾病(Han和Ziyadeh,Peritoneal dialysis international,19增刊2:S234-237(1999))。还参见美国专利7,527,791,所述美国专利进一步描述了TGF β 抑制剂在不同适应症中的用途，所述美国专利特此以引用的方式并入。

[0120] 示例性眼睛疾病(例如眼部、视力、眼科或眼科学疾病)、病状或病症包括但不限于纤维增生性病症、眼睛纤维化、眼科纤维组织形成、视网膜功能失调、与视网膜功能失调相关的纤维化、湿性或干性黄斑变性、增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、碱烧伤(例如角膜碱烧伤)、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离。

[0121] 示例性的眼睛纤维增生性疾病、病状或病症、眼睛纤维化、眼部纤维化或眼科纤维组织形成包括但不限于增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与视网膜功能失调相关的纤维化、与湿性或干性黄斑变性相关的纤维化、与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、与碱烧伤相关的纤维化、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离。

[0122] 在不同的实施方案中，眼睛纤维增生性疾病、病状或病症是从由以下各项组成的群组中选出：增生性玻璃体视网膜病、与眼部手术相关的纤维化、白内障手术后晶状体纤维化、角膜基质纤维化以及碱烧伤。

[0123] 抗体多肽

[0124] 本公开涵盖了编码靶标特异性抗体的氨基酸分子。在示例性实施方案中,本公开的靶标特异性抗体可以包含人类 κ 轻链或人类 λ 轻链或由其衍生的氨基酸序列,或者人类重链或由其衍生的序列,或者在一起呈单链、二聚、四聚或其他形式的重链和轻链。在一些实施方案中,靶标特异性免疫球蛋白的重链和轻链是不同的氨基酸分子。在其他实施方案中,同一个氨基酸分子含有靶标特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。

[0125] 在一些实施方案中,人类抗靶标抗体的氨基酸序列包含表1或SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681的成熟(即缺少信号序列)轻链可变区(VL)的氨基酸序列的一个或多个CDR或其变体,包括CDR移植抗体、经过修饰的抗体、人源化抗体、嵌合抗体或人类工程化抗体或本文所述的任何其他变体在内。在一些实施方案中,VL包含从上述抗体中的任一种的轻链的CDR1的起点到CDR3的终点的氨基酸序列。

[0126] 在一个实施方案中,靶标特异性抗体包含各自独立地从具有如下的轻链可变区的抗体的CDR1、CDR2以及CDR3区中选出的轻链CDR1、CDR2或CDR3(LCDR1、LCDR2、LCDR3),所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的VL区的氨基酸序列、编码SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的VH区的核酸,或由SEQ ID NO:3、7以及11中所示出的编码VL区的核酸分子编码。在一个实施方案中,根据Chothia编号,轻链CDR1是从大致残基24至34,CDR2是从大致残基50至56,并且CDR3从大致残基89延伸至97。在一个替代性实施方案中,预期根据ImMunoGenTics (IMGT) 编号,重链CDR位于大致残基27至38处(CDR1);大致残基56至65处(CDR2);以及大致残基105至116(生殖系)或残基105至117处(CDR3)。在一个实施方案中,预期在长度与本文所公开的那些抗体轻链大致相似的抗体轻链的轻链可变域中,轻链CDR位于大致残基26-31(L1)、49-51(L2)以及88-97(L3)处。靶标特异性抗体的多肽可以包含如下抗体的CDR1、CDR2以及CDR3区,所述抗体包含从由XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681组成的群组中选出的VL区的氨基酸序列。

[0127] 在一些实施方案中,人类靶标特异性抗体包含表1或SEQ ID NO:2、6以及10中所示出的抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681的成熟(即缺少信号序列)重链可变区(VH)的氨基酸序列的一个或多个CDR或其变体。在一些实施方案中,VH包含从上述抗体的重链中的任一者的CDR1的起点到CDR3的终点的氨基酸序列。

[0128] 在一个实施方案中,靶标特异性抗体包含各自独立地从具有如下重链可变区的抗体的CDR1、CDR2以及CDR3区中选出的重链CDR1、CDR2或CDR3(HCDR1、HCDR2、HCDR3),所述重链可变区包含SEQ ID NO:2、6以及10中所示出的VH区的氨基酸序列、编码SEQ ID NO:2、6以及10中所示出的VH区的核酸,或由SEQ ID NO:1、5以及9中所示出的编码VH区的核酸分子编码。进一步预期靶标特异性抗体包含各自独立地从具有如下重链可变区的抗体的CDR1、CDR2以及CDR3区中选出的重链CDR1、CDR2或CDR3,所述重链可变区包含SEQ ID NO:2、6以及10中所示出的VH区的氨基酸序列。在一个实施方案中,根据Chothia编号,重链CDR位于以下位置:CDR1是从大致残基26至35,CDR2是从大致残基50至58并且CDR3从大致残基95延伸至102(或95至111或95至118)。在一个替代性实施方案中,预期根据ImMunoGenTics (IMGT) 编号,重链CDR位于以下位置:CDR1,大致残基27至38(CDR1);大致残基56至65(CDR2);以及CDR3,大致残基105至116(生殖系)或残基105至117(CDR3)。在一个实施方案中,预期在长度与本文所公开的那些抗体重链大致相似的抗体重链的重链可变域中,重链CDR位于大致残基26-33(H1)、50-58(H2)以及97-111(H3)处。靶标特异性抗体的多肽可以包含如下抗体的

CDR1、CDR2以及CDR3区,所述抗体包含从由XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681组成的群组中选出的VH区的氨基酸序列。

[0129] 在另一个实施方案中,所述抗体包含任选地如表1中所示进行配对的如上文所公开的成熟轻链可变区和如上文所公开的成熟重链可变区。

[0130] 在示例性实施方案中,本公开涵盖:

[0131] 如下的单克隆抗体,所述单克隆抗体保留分别具有以下序列中的任一个的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3中的任何一个、两个、三个、四个、五个或六个:SEQ ID NO:13、19以及25;SEQ ID NO:14、20以及26;SEQ ID NO:15、21以及27;以及SEQ ID NO:16、22以及28;SEQ ID NO:17、23以及29;以及SEQ ID NO:18、24以及30,在这一个或多个CDR中的任一个中任选地包括一处或两处突变(例如保守性或非保守性取代),并且任选地如表1中所示进行配对;

[0132] 如下的单克隆抗体,所述单克隆抗体保留分别具有以下序列中的任一个的所有HCDR1、HCDR2、HCDR3,或重链可变区:SEQ ID NO:13、19以及25;SEQ ID NO:14、20以及26;以及SEQ ID NO:15、21以及27,在这一个或多个CDR中的任一个中任选地包括一处或两处突变,所述单克隆抗体任选地进一步包含任何适合的重链恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2或IgE,其人类序列,或其杂交体;

[0133] 如下的单克隆抗体,所述单克隆抗体保留分别具有以下序列中的任一个的所有LCDR1、LCDR2、LCDR3,或轻链可变区:SEQ ID NO:16、22以及28;SEQ ID NO:17、23以及29;以及SEQ ID NO:18、24以及30,在这一个或多个CDR中的任一个中任选地包括一处或两处突变,所述单克隆抗体任选地进一步包含任何适合的轻链恒定区,例如 κ 或 λ 轻链恒定区,其人类序列,或其杂交体。

[0134] 在一些实施方案中,所述抗体包含如表1中所示进行配对的所有三个轻链CDR、所有三个重链CDR,或轻链和重链的所有六个CDR。在一些示例性实施方案中,来自一种抗体的两个轻链CDR可以与来自不同抗体的第三个轻链CDR组合。或者,来自一种抗体的LCDR1可以与来自不同抗体的LCDR2和来自又另一种抗体的LCDR3组合,特别是在这些CDR具有高度同源性的情况下。类似地,来自一种抗体的两个重链CDR可以与来自不同抗体的第三个重链CDR组合;或来自一种抗体的HCDR1可以与来自不同抗体的HCDR2和来自又另一种抗体的HCDR3组合,特别是在这些CDR具有高度同源性的情况下。

[0135] 在一些实施方案中,提供了一种抗体,所述抗体包含如下的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:2、6以及10中所示出的重链可变区具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性的氨基酸序列;和/或与SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的轻链可变区具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性的氨基酸序列,所述抗体进一步包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3中的至少一个、两个、三个、四个、五个或全部。在一些实施方案中,与所述轻链可变区具有同一性百分比的氨基酸序列可以包含所述轻链CDR中的一个、两个或三个。在其他实施方案中,与所述重链可变区具有同一性百分比的氨基酸序列可以包含所述重链CDR中的一个、两个或三个。

[0136] 在另一个实施方案中,提供了一种抗体,所述抗体包含如下的多肽,所述多肽具有

与表1中的抗体序列的重链可变区中的所有三个HCDR具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性的氨基酸序列,所述CDR示出于SEQ ID NO:13、19以及25;SEQ ID NO:14、20以及26;以及SEQ ID NO:15、21以及27中。

[0137] 在一个相关实施方案中,提供了一种抗体,所述抗体包含如下的多肽,所述多肽具有与表1中的抗体序列的轻链可变区中的所有三个LCDR具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性的氨基酸序列,所述CDR示出于SEQ ID NO:16、22以及28;SEQ ID NO:17、23以及29;以及SEQ ID NO:18、24以及30中。

[0138] 在另一个实施方案中,提供了一种抗体,所述抗体包含如下的多肽,所述多肽具有与表1中的抗体序列的重链可变区和轻链可变区中的所有六个CDR具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性的氨基酸序列,所述CDR示出于SEQ ID NO:13、19以及25;SEQ ID NO:14、20以及26;以及SEQ ID NO:15、21、27;SEQ ID NO:16、22以及28;SEQ ID NO:17、23以及29;以及SEQ ID NO:18、24以及30中。

[0139] 预期本公开的抗体在抗体的CDR区中可能具有一处或两处或更多处氨基酸取代,例如非保守性或保守性取代。

[0140] 在一个相关实施方案中,框架的残基发生改变。可能发生改变的重链框架区位于被命名为H-FR1、H-FR2、H-FR3以及H-FR4的围绕重链CDR残基的区域内,并且可能发生改变的重链框架区的残基位于被命名为L-FR1、L-FR2、L-FR3以及L-FR4的围绕轻链CDR残基的区域内。框架区内的氨基酸可以例如被人类框架或人类共有框架中所鉴定的任何适合氨基酸置换。

[0141] 在示例性实施方案中,本文所述的抗TGF β 抗体特异性结合TGF β 的由TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3组成的群组中选出的至少一种亚型。在其他实施方案中,抗TGF β 抗体特异性结合:(a) TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3(“泛反应性抗体”或“泛结合抗体”);(b) TGF β 1和TGF β 2;(c) TGF β 1和TGF β 3;以及(d) TGF β 2和TGF β 3。在示例性实施方案中,本文所述的抗TGF β 抗体以 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M或更小的亲和力结合TGF β 的至少一种亚型(越低意味着结合亲和力越高),或任选地结合两种TGF β 亚型或所有TGF β 1、TGF β 2或TGF β 3,对所述亚型中的一种或多种具有 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M或更小的亲和力。在其他实施方案中,本文所述的抗体与TGF β 1和TGF β 2结合的亲和力是与TGF β 3结合的亲和力的至少2至50倍、10至100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍,或比与TGF β 3结合的亲和力高20%至50%、50%至100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%(例如优先与TGF β 1和TGF β 2结合)。或者,本文所述的抗体与TGF β 亚型TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3中的每一种结合的亲和力是彼此的3倍、5倍或10倍以内。

[0142] 在一些实施方案中,抗体中和TGF β 1和TGF β 2的效力是中和TGF β 3的效力的至少2至50倍、10至100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍,或比中和TGF β 3的效力大20%至50%、50%至100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0143] XPA.42.089的重链和轻链氨基酸序列分别示出于SEQ ID NO:6和8中。XPA.42.068的重链和轻链氨基酸序列分别示出于SEQ ID NO:2和4中,并且XPA.42.681的重链和轻链氨

基酸序列分别示出于SEQ ID NO:10和12中。

[0144] 抗体核酸

[0145] 本公开还涵盖了编码靶标特异性抗体的核酸分子。在一些实施方案中,不同的核酸分子编码靶标特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。在其他实施方案中,同一个核酸分子编码靶标特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。在一个实施方案中,核酸编码本公开的靶标特异性抗体以及由本文所述的核酸编码的任何多肽。

[0146] 在一个方面,本公开的核酸分子包含编码SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681的VL氨基酸序列或其部分的核苷酸序列。在一个相关方面,VL氨基酸序列是共有序列。在一些实施方案中,所述核酸编码所述抗体的轻链CDR的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述部分是包含CDR1-CDR3的连续部分。在一个实施方案中,所述部分包含轻链CDR1、CDR2或CDR3区中的至少一个、两个或三个,任选地具有不同的人类或人类共有框架,并且在总共3个CDR中任选地具有1处或最多2处或最多3处突变。

[0147] 在一个实施方案中,本公开提供了抗原结合化合物,所述抗原结合化合物包括功能片段,具有SEQ ID NO:2、6和10以及4、8和12中的任一个中所示出的可变区氨基酸序列。在一个相关实施方案中,上述抗原结合化合物是从由以下各项组成的群组中选出:包含本公开的一个或多个CDR序列并且展现出所需生物活性的完全组装的四聚抗体、单克隆抗体、人源化抗体;人类抗体;嵌合抗体;多特异性抗体、抗体片段、Fab、F(ab')₂;Fv;scFv或单链抗体片段;双链抗体;三链抗体、四链抗体、微型抗体、线性抗体;螯合重组抗体、三体或双体、胞内抗体、纳米抗体、小模块免疫药物(SMIP)、结合域免疫球蛋白融合蛋白、骆驼源化抗体、含VHH抗体,或这些抗体中的任一种的变体或衍生物,或两种或更多种抗体的混合物。如通过表面等离子体共振所测量,本公开的抗原结合化合物优选地对TGFβ1、TGFβ2以及TGFβ3中的一种或多种保持 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或更小的结合亲和力。

[0148] 在一个方面,本公开的抗体包含如表1中所配对的分别如氨基酸序列SEQ ID NO:2、6和10以及SEQ ID NO:4、8和12中所示出的重链可变区或轻链可变区。进一步预期所述抗体可以包含上述氨基酸序列中所示出的抗体的全部或一部分。在一个实施方案中,所述抗体包含如表1中所配对的SEQ ID NO:2、6以及10的重链的CDR1、CDR2或CDR3中的至少一个,或SEQ ID NO:4、8以及12的轻链的CDR1、CDR2或CDR3中的至少一个。

[0149] 在一个实施方案中,重链包含被鉴定为重链CDR3序列的氨基酸序列。这种“重链CDR3序列”(HCDR3)包括被鉴定为表1和SEQ ID NO:15、21以及27中所示出的重链CDR3序列的氨基酸序列。或者,HCDR3序列包含与表1中所鉴定的任何HCDR3氨基酸序列相比含有一处或多处氨基酸变化(例如取代、插入或缺失)的氨基酸序列。优选的取代包括被表1中另一个HCDR3内相应位置上的氨基酸取代。或者,HCDR3序列可以包含本文所述的HCDR3的共有氨基酸序列。

[0150] 包含上述HCDR3序列的重链可以进一步包含“重链CDR1序列”(HCDR1),所述重链CDR1序列包括以下各项中的任一个:被鉴定为SEQ ID NO:13、19和25以及表1中的HCDR1的氨基酸序列;与SEQ ID NO:13、19和25以及表1中所鉴定的任何HCDR1相比含有一处或多处氨基酸变化的氨基酸序列,所述氨基酸变化优选地是被表1中另一个HCDR1内相应位置上的氨基酸取代;或本文所述的HCDR1的共有序列。

[0151] 或者,包含上述HCDR3序列的重链可以进一步包含“重链CDR2序列”(HCDR2),所述

重链CDR2序列包括以下各项中的任一个：被鉴定为SEQ ID NO:14、20和26以及表1中的HCDR2的氨基酸序列；与SEQ ID NO:14、20和26以及表1中所鉴定的任何HCDR2相比含有一处或多处氨基酸变化的氨基酸序列，所述氨基酸变化优选地是被表1中另一个HCDR2内相应位置上的氨基酸取代；或本文所述的HCDR2的共有序列。

[0152] 包含上述重链CDR3序列的重链还可以包含(a)上述重链CDR1序列和(b)上述本发明重链CDR2序列。

[0153] 本公开的一个方面提供了一种结合靶标抗原的抗体，所述抗体包含含有下文所述的重链CDR序列中的任何一个、两个和/或三个的重链。

[0154] 上述重链CDR序列中的任一个还可以包括被添加至CDR的任一端上的氨基酸。本发明抗体和抗原结合化合物的变体和衍生物的制备(包括亲和力成熟或含有氨基酸类似物的变体或衍生物的制备)进一步详细地描述于本文中。示例性变体包括含有氨基酸序列内相应氨基酸的保守性或非保守性取代或者氨基酸被不同人类抗体序列的相应氨基酸置换的那些变体。

[0155] 包含上述重链中的任一个的抗体可以进一步包含轻链，优选地是结合靶标抗原的轻链，并且最优选地是包含下文所述的轻链CDR序列的轻链。

[0156] 本公开的另一个方面提供了一种结合靶标抗原的抗体，所述抗体包含含有下文所述的轻链CDR序列中的任何一个、两个和/或三个的轻链。

[0157] 优选地，轻链包含被鉴定为轻链CDR3序列的氨基酸序列。这种“轻链CDR3序列”(LCDR3)包括被鉴定为表1中以及SEQ ID NO:18、24和30内的轻链CDR3序列的氨基酸序列。或者，轻链CDR3序列包含与表1中所鉴定的任何轻链CDR3氨基酸序列相比含有一处或多处氨基酸变化(例如取代、插入或缺失)的氨基酸序列。优选的取代包括被表1中另一个轻链CDR3内相应位置上的氨基酸取代。

[0158] 包含上述轻链CDR3序列的轻链可以进一步包含“轻链CDR1序列”，所述轻链CDR1序列包括以下各项中的任一个：被鉴定为SEQ ID NO:16、22和28或表1中的轻链CDR1的氨基酸序列；与SEQ ID NO:16、22和28或表1中所鉴定的任何轻链CDR1相比含有一处或多处氨基酸变化的氨基酸序列，所述氨基酸变化优选地是被表1中另一个轻链CDR1内相应位置上的氨基酸取代。

[0159] 或者，包含上述轻链CDR3序列的轻链可以进一步包含“轻链CDR2序列”，所述轻链CDR2序列包括以下各项中的任一个：被鉴定为SEQ ID NO:17、23和29或表1中的轻链CDR2的氨基酸序列；与表1中所鉴定的任何轻链CDR2相比含有一处或多处氨基酸变化的氨基酸序列，所述氨基酸变化优选地是被SEQ ID NO:17、23和29或表1中另一个轻链CDR2内相应位置上的氨基酸取代。

[0160] 在一个相关方面，本公开涵盖了一种纯化的多肽，所述多肽包含SEQ ID NO:13-15、19-21以及25-27中的至少一个HCDR或SEQ ID NO:16-18、22-24以及28-30中的至少一个LCDR，其中重链可变区的框架区和轻链可变区的框架区包含来自人类抗体的框架区。在另一个实施方案中，通过氨基酸取代使重链可变区的框架区和轻链可变区的框架区发生化学改变而与不同的人类抗体序列具有更大的同源性。举例来说，在每个重链框架区(H-FR1-4)内，预期重链可变区的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个天然框架区残基已通过氨基酸取代而发生改变，并且其中在每个轻链框架区(L-FR1-4)内，轻链

可变区的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个天然框架残基已通过氨基酸取代而发生改变。

[0161] 包含上述轻链CDR3序列的轻链还可以包含(a)上述轻链CDR1序列和(b)上述轻链CDR2序列。

[0162] 包含上述轻链可变区中的任一个的抗体可以进一步包含任选地如表1中所述进行配对的重链可变区,优选地是结合靶标抗原的重链可变区,并且最优选地是包含上述重链CDR序列的重链可变区。

[0163] 在又一个实施方案中,抗体包含从由SEQ ID NO:2、6以及10组成的群组中选出的重链可变区和从由SEQ ID NO:4、8以及12组成的群组中选出的轻链可变区。

[0164] 在一个相关方面,核酸分子包含编码轻链氨基酸序列SEQ ID NO:4、8以及12中的一个或其部分的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含轻链核苷酸序列SEQ ID NO:3、7以及11中的任一个或其部分。本公开的核酸分子进一步包括所有的核酸序列,包括SEQ ID NO:1、3、5、7、9以及11中的序列;以及核酸序列基于遗传密码的多样性包含简并密码子并且编码如下氨基酸序列,所述氨基酸序列是本文所述抗体的重链可变区和轻链可变区或本文所述的任何HCDR或LCDR的氨基酸序列并且如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12以及13-30中所示出;以及在高严格性条件(如本文所述的那些条件)下与编码如下氨基酸序列的核酸序列杂交的核酸,所述氨基酸序列是本文所述抗体的重链可变区和轻链可变区或本文所述的任何HCDR或LCDR的氨基酸序列并且如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12以及13-30中所示出。

[0165] 在一些实施方案中,核酸分子编码与SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的VL氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL氨基酸序列。本公开的核酸分子包括在高严格性条件(如本文所述的那些条件)下与编码SEQ ID NO:4、8以及12的轻链可变区氨基酸序列或者具有SEQ ID NO:3、7以及11的轻链可变区核酸序列的核酸序列杂交的核酸。

[0166] 进一步预期,本公开的核酸分子包含编码抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681中的任一种的VH氨基酸序列或其部分的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述核酸编码所述抗体的重链CDR的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述部分是包含重链CDR1-CDR3的连续部分。在一个实施方案中,所述部分包含重链CDR1、CDR2或CDR3区中的至少一个、两个或三个,任选地具有不同的人类或人类共有框架,并且在总共3个CDR中任选地具有1处或最多2处或最多3处突变。

[0167] 在一个相关方面,核酸分子包含编码SEQ ID NO:2、6以及10的重链中的一者的重链氨基酸序列或其部分的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含SEQ ID NO:1、5以及9的重链核苷酸序列或其部分。

[0168] 在一些实施方案中,核酸分子编码与SEQ ID NO:2、6以及10中所示出的VH氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH氨基酸序列。在一个相关方面,VH氨基酸序列是共有序列。本公开的核酸分子进一步包括在高严格性条件(如本文所述的那些条件)下与编码SEQ ID NO:2、6以及10的重链可变区氨基酸序列或者具有SEQ ID NO:1、5以及9的重链可变区核酸序列中的任一个的核酸序列杂交的核酸。

[0169] 进一步预期,本公开的核酸可以编码从XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681

中选出的抗体的全长轻链或重链,其中全长轻链或全长重链分别包含轻链恒定区或重链恒定区,轻链恒定区任选地包括未经过修饰的或经过修饰的 κ 或 λ 区,并且重链恒定区包括任何类别的未经过修饰的或经过修饰的恒定区,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE。

[0170] 在一个方面,全长轻链抗体包含SEQ ID NO:4、8以及12中所示出的序列。进一步预期编码全长轻链的核苷酸编码序列SEQ ID NO:4、8以及12,并且包含SEQ ID NO:3、7以及11中所示出的核苷酸序列。

[0171] 在一个方面,全长重链抗体包含SEQ ID NO:2、6以及10中的任一个中的序列。进一步预期编码全长重链的核苷酸编码重链序列SEQ ID NO:2、6以及10,并且包含SEQ ID NO:1、5以及9中的任一个中所示出的核苷酸序列。

[0172] 在另外的实施方案中,本公开提供了一种结合转化生长因子 β (TGF β) 1、TGF β 2以及TGF β 3的抗体,所述抗体包含轻链可变区和/或重链可变区,其中 (a) 所述轻链可变区至少包含从SEQ ID NO:16、22以及28或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:17、23以及29或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR2,和/或从SEQ ID NO:18、24以及30或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR3;和/或其中 (b) 所述重链可变区至少包含从SEQ ID NO:13、19以及25或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:14、20以及26或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR2,和/或从SEQ ID NO:15、21以及27或与其具有至少80%同一性的序列中选出的CDR3。

[0173] 在一个相关实施方案中,所述轻链可变区至少包含从SEQ ID NO:16或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:17或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:18或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3;和/或所述重链可变区至少包含从SEQ ID NO:13或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:14或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:15或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3。

[0174] 在另一个实施方案中,所述轻链可变区至少包含从SEQ ID NO:22或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:23或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:24或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3;和/或所述重链可变区至少包含从SEQ ID NO:19或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:20或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:21或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3。

[0175] 在又一个实施方案中,所述轻链可变区至少包含从SEQ ID NO:28或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:29或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:30或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3;和/或所述重链可变区至少包含从SEQ ID NO:25或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR1、从SEQ ID NO:26或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR2,以及从SEQ ID NO:27或与其具有至少90%同一性的序列中选出的CDR3。

[0176] 在示例性实施方案中,本公开的抗体包含人类 κ 轻链或人类 λ 轻链或由其衍生的氨基酸序列,或者人类重链或由其衍生的序列,或者在一起呈单链、二聚、四聚或其他形式的重链和轻链。

[0177] 单克隆抗体

[0178] 单克隆抗体指的是从一群大致上均质的抗体中获得的抗体。单克隆抗体一般具有高度特异性,并且可能针对单个抗原位点,相对而言,常规(多克隆)抗体制备物典型地包括针对相同或不同决定簇(表位)的不同抗体。单克隆抗体除了它们的特异性之外也是有利的,因为它们可以通过均质培养物合成,不会被具有不同特异性和特征的其他免疫球蛋白污染。

[0179] 单克隆抗体可以通过最初由Kohler等(Nature,256:495-7,1975)描述的杂交瘤方法制备(Harlow和Lane;Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press:Cold Spring Harbor,New York(1988);Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,第59-103页(Academic Press,1986)),或可以通过重组DNA方法制备(参见例如美国专利号4,816,567)。还可以使用例如以下文献中所述的技术从噬菌体抗体文库中分离单克隆抗体:Clackson等(Nature 352:624-628,1991)以及Marks等(J.Mol.Biol.222:581-597,1991)。用于产生单克隆抗体的另外的方法是本领域技术人员熟知的。

[0180] 适当地通过常规的免疫球蛋白纯化程序将单克隆抗体(如通过上述方法产生的那些单克隆抗体)从培养基、腹水或血清中分离,所述常规免疫球蛋白纯化程序例如像蛋白质A-琼脂糖凝胶、疏水性相互作用色谱法(HIC)、离子交换色谱法、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析和/或亲和色谱法。

[0181] 进一步预期,本公开的抗体可以本领域熟知并且在本文所述的抗体的较小抗原结合片段的形式使用。

[0182] 抗体片段

[0183] 抗体片段包含完整全长抗体的一部分,优选地包含完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂以及Fv片段;双链抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);多特异性抗体片段,如双特异性、三特异性等抗体(例如双链抗体、三链抗体、四链抗体);微型抗体;螯合重组抗体;三体或双体;胞内抗体;纳米抗体;小模块免疫药物(SMIP)、结合域免疫球蛋白融合蛋白;骆驼源化抗体;含VHH抗体;以及由抗体片段形成的其他多肽。参见例如Holliger和Hudson(Nat.Biotech.23:1126-36(2005))。

[0184] 用木瓜蛋白酶对抗体进行消化会产生两个相同的抗原结合片段,所述抗原结合片段被称作“Fab”片段,是由VL、VH、CL以及CH结构域组成的单价片段,各自具有单个抗原结合位点;以及剩余的“Fc”片段,其名称反映了它能够容易地发生结晶。用胃蛋白酶进行处理会产生F(ab')₂片段,所述F(ab')₂片段是包含由铰链区中的二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段,具有包含抗体VH结构域和VL结构域的两个“单链Fv”或“scFv”抗体片段,其中这些结构域存在于单条多肽链中。优选地,Fv多肽进一步在VH结构域与VL结构域之间包含使得Fv能够形成抗原结合所需的结构,从而产生单链抗体(scFv)的多肽接头,其中VL区与VH区配对以经由使得它们能够成为单条蛋白质链的合成接头形成单价分子(Bird等,Science 242:423-426,1988;以及Huston等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883,1988)。关于scFv的综述,参见Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编著,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。Fd片段由VH结构域和CH1结构域组成。

[0185] 另外的抗体片段包括由VH结构域组成的结构域抗体(dAb)片段(Ward等, Nature 341:544-546, 1989)。双链抗体是二价抗体, 其中VH结构域和VL结构域表达于单条多肽链上, 但是使用过短而不允许同一条链上的两个结构域之间进行配对的接头, 从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对而形成两个抗原结合位点(参见例如EP404,097; WO 93/11161; Holliger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993; 以及Poljak等, Structure 2:1121-1123, 1994)。双链抗体可以具有双特异性或单特异性。

[0186] 缺少轻链的功能性重链抗体天然地存在于铰口鲨(Greenberg等, Nature 374:168-73, 1995)、地毯鲨(wobbegong shark) (Nuttall等, Mol Immunol. 38:313-26, 2001) 以及骆驼科(Camelidae) 动物(Hamers-Casterman等, Nature 363:446-8, 1993; Nguyen等, J. Mol. Biol. 275:413, 1998) (如骆驼、单峰骆驼、羊驼以及美洲驼) 中。抗原结合位点在这些动物中被缩减至单个结构域, 即VHH结构域。这些抗体仅使用重链可变区形成抗原结合区, 即这些功能性抗体是仅具有结构H2L2的重链的同二聚体(被称为“重链抗体”或“HCAb”)。据报道, 骆驼科动物VHH与含有铰链、CH2以及CH3结构域而缺少CH1结构域的IgG2和IgG3恒定区重组(Hamers-Casterman等(同上))。举例来说, 美洲驼IgG1是一种常规的(H2L2) 抗体同种型, 其中VH与含有铰链、CH 1、CH2以及CH3结构域的恒定区重组, 而美洲驼IgG2和IgG3是缺少CH1结构域并且不含轻链的仅具有重链的同种型。已发现骆驼科动物的VHH结构域以高亲和力结合抗原(Desmyter等, J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001) 并且在溶液中具有高稳定性(Ewert等, Biochemistry 41:3628-36, 2002)。经典的仅具有VH的片段很难以可溶性形式产生, 但可以在使框架残基发生改变而更类似于VHH时获得溶解性和特异性结合方面的改良。(参见例如Reichman等, J Immunol Methods 1999, 231:25-38。)用于产生具有骆驼科动物重链的抗体的方法描述于例如美国专利公布号20050136049和20050037421中。

[0187] 抗体重链可变域是仅具有15kDa分子质量的最小的完全功能性抗原结合片段, 这一实体被称为纳米抗体(Cortez-Retamozo等, Cancer Research 64:2853-57, 2004)。纳米抗体文库可以如Conrath等(Antimicrob Agents Chemother 45:2807-12, 2001) 中所述由接受免疫接种的单峰骆驼产生或使用如Revets等, Expert Opin. Biol. Ther. 5(1):111-24 (2005) 中所述的重组方法产生。

[0188] 双特异性Fab-scFv (“双体”) 和三特异性Fab- (scFv) (2) (“三体”) 的制备描述于Schoonjans等(J Immunol. 165:7050-57, 2000) 以及Willems等(J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003) 中。对于双体或三体, 使scFv分子与VL-CL (L) 和VH-CH1 (Fd) 链中的一者或两者融合, 例如为了产生三体, 使两个scFv与Fab的C端融合, 而在双体中, 使一个scFv与Fab的C端融合。

[0189] 由scFv通过肽接头(无铰链) 或通过IgG铰链与CH3融合所组成的“微型抗体”已描述于Olafsen等, Protein Eng Des Sel. 17(4):315-23, 2004中。

[0190] 胞内抗体是显示出细胞内表达并且可以操控细胞内蛋白质功能的单链抗体(Biocca等, EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby等, Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17616-21, 2004)。胞内抗体包含了保持抗体构建体处于细胞内区域内的细胞信号序列, 可以如以下文献中所述而产生:Mhashilkar等(EMBO J 14:1542-51, 1995) 以及Wheeler等(FASEB J. 17:1733-5, 2003)。穿膜抗体(transbody) 是可穿透细胞的抗体, 其中蛋白转导域(PTD) 与单链可变区片段(scFv) 抗体融合(Heng等, Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005)。

[0191] 进一步涵盖了如下的抗体,所述抗体是对靶标蛋白具有特异性的SMIP或结合域免疫球蛋白融合蛋白。这些构建体是单链多肽,这些单链多肽包含与实现抗体效应功能所需的免疫球蛋白结构域融合的抗原结合域。参见例如W003/041600、美国专利公布20030133939以及美国专利公布20030118592。

[0192] 可以将一个或多个CDR以共价键或非共价键方式并入分子中以使它成为免疫粘附素。免疫粘附素可以并有一个或多个CDR作为较大多肽链的一部分,可以使一个或多个CDR共价连接至另一条多肽链,或可以非共价键方式并有一个或多个CDR。CDR使得免疫粘附素能够特异性结合所关注的特定抗原。

[0193] 因此,可以通过本领域已知的技术产生包含抗体重链可变区或轻链可变区的一个、两个和/或三个CDR(例如单独的单个CDR,或串联的2个、3个或其他多个CDR重复区;或2个或3个单独CDR或串联重复区的组合;任选地在CDR或重复区之间存在间隔氨基酸序列)的多种组合物。

[0194] 多特异性抗体

[0195] 在一些实施方案中,可能希望产生对相同或不同分子的至少两个不同的表位具有结合特异性的多特异性(例如双特异性)抗靶标抗体。示例性双特异性抗体可以结合靶标分子的两个不同的表位。或者,可以将靶标特异性抗体臂与结合细胞表面分子以便使细胞防御机制集中于靶标的抗体臂组合,所述细胞表面分子如T细胞受体分子(例如CD2或CD3)或IgG的Fc受体(Fc γ R),如Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)以及Fc γ RIII(CD16)。双特异性抗体还可以用于使细胞毒性剂定位于表达或吸收靶标的细胞。这些抗体具有靶标结合臂以及结合细胞毒性剂(例如皂草素、抗干扰素-60、长春花生物碱、蓖麻毒素A链、甲氨蝶呤(methotrexate)或放射性同位素半抗原)的抗体臂。可以将双特异性抗体制备成长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)。

[0196] 根据用于制备双特异性抗体的另一种途径,可以对一对抗体分子之间的界面进行工程化以使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比达到最大。优选的界面包含抗体恒定域的CH3结构域的至少一部分。在这种方法中,将第一抗体分子的界面中的一个或多个小氨基酸侧链用较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)置换。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链而在第二抗体分子的界面上形成与一个或多个大侧链具有相同或相似大小的补偿性“空腔结构”。这提供了提高异二聚体相对于其他不需要的最终产物(如同二聚体)的产率的机制。参见W096/27011。

[0197] 双特异性抗体包括交联抗体或“异源缀合”抗体。举例来说,可以使异源缀合物中的抗体之一与生物素蛋白偶合,使另一抗体与生物素偶合。可以使用任何适当的交联方法制备异源缀合抗体。适合的交联剂以及许多交联技术是本领域熟知的,并且公开于美国专利号4,676,980中。

[0198] 用于由抗体片段产生双特异性抗体的技术也已描述于文献中。举例来说,可以利用化学键制备双特异性抗体。Brennan等(Science 229:81-83,1985)描述了使完整抗体发生蛋白水解切割以产生F(ab')₂片段的程序。在二硫醇络合剂亚砷酸钠存在下使这些片段还原以使邻近的二硫醇稳定并且防止分子间二硫键形成。然后使所产生的Fab'片段转化成硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过使用巯基乙胺还原以使Fab'-TNB衍生物之一重新转化成Fab'-硫醇并且与等摩尔量的另一Fab'-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。所

产生的双特异性抗体可以被用于对酶进行选择性的固定化的试剂。在又一个实施方案中,可以使直接从大肠埃希氏菌(*E. coli*)中回收的Fab'-SH片段在体外化学偶合以形成双特异性抗体。(Shalaby等,*J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992))。

[0199] Shalaby等,*J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) 描述了完全人源化的双特异性抗体F(ab')₂分子的制备。每个Fab'片段单独地由大肠埃希氏菌分泌并且在体外进行直接化学偶合以形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够结合过表达HER2受体的细胞和正常人类T细胞,并且能够触发人类细胞毒性淋巴细胞针对人类乳腺肿瘤靶标的溶解活性。

[0200] 也已经描述了用于直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的不同技术。举例来说,已利用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。(Kostelny等,*J. Immunol.* 148:1547-1553, 1992)。通过基因融合使来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的Fab'部分连接。使抗体同二聚体在铰链区还原以形成单体,然后重新氧化以形成抗体异二聚体。也可以利用这种方法产生抗体同二聚体。由Hollinger等(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48, 1993)描述的“双链抗体”技术已提供了制备双特异性抗体片段的替代性机制。

[0201] 所述片段包含通过接头与轻链可变区(VL)连接的重链可变区(VH),所述接头过短而不允许同一条链上的两个结构域之间发生配对。因此,迫使一个片段的VH和VL结构域与另一个片段的互补VL和VH结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。也已经报道了通过使用单链Fv(scFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等,*J. Immunol.* 152:5368 (1994)。

[0202] 或者,双特异性抗体可以是如Zapata等,*Protein Eng.* 8:1057-62 (1995)中所述而制备的“线性抗体”。线性抗体包含形成一对抗原结合区的一对串联的Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)。线性抗体可以具有双特异性或单特异性。

[0203] 在另一个实施方案中,双特异性抗体可以是螯合重组抗体(CRAb)。螯合重组抗体识别靶标抗原中相邻并且不重叠的表位,并且具有足够的柔性以能够同时结合两个表位(Neri等,*J. Mol. Biol.* 246:367-73, 1995)。

[0204] 还涵盖了效价大于2的抗体。举例来说,可以制备三特异性抗体。(Tutt等,*J. Immunol.* 147:60, 1991)。

[0205] 嵌合抗体和人源化抗体

[0206] 由于嵌合或人源化抗体在人类中的免疫原性小于亲本非人类(例如小鼠)单克隆抗体,所以它们可以被用于治疗人类而具有小得多的过敏反应风险。

[0207] 可以使用本领域已知的标准程序(参见Morrison等,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81,6841-6855 (1984);以及Boulianne等,*Nature* 312,643-646, (1984))产生嵌合单克隆抗体,其中使非人类(例如小鼠)单克隆抗体的Ig可变域与人类Ig恒定域融合。

[0208] 可以通过多种方法实现人源化抗体,所述方法包括例如:(1)将非人类互补决定区(CDR)移植到人类框架和恒定区上(这一过程在本领域中被称为经由“CDR移植”进行人源化), (2)移植整个非人类可变域,但通过置换表面残基将它们用类似于人类的表面“遮盖”(这一过程在本领域中被称为“镶饰”),或者可选地, (3)在被测定为不可能不利地影响抗原结合或蛋白质折叠,但有可能会降低在人类环境中的免疫原性的位置上用人类氨基酸取代(例如HUMAN ENGINEERING™)。在本公开中,人源化抗体将包括“人源化”抗体、“镶饰”抗体以及“HUMAN ENGINEERED™”抗体。这些方法公开于例如Jones等,*Nature* 321:522525

(1986);Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.,81:6851-6855(1984);Morrison和Oi,Adv.Immunol.,44:65-92(1988);Verhoeyer等,Science 239:1534-1536(1988);Padlan,Molec.Immun.28:489-498(1991);Padlan,Molec.Immunol.31:169-217(1994);Studnicka等,美国专利号5,766,886;Studnicka等,Protein Engineering 7:805-814,1994;Co等,J.Immunol.152,2968-2976(1994);Riechmann等,Nature 332:323-27(1988);以及Kettleborough等,Protein Eng.4:773-783(1991)中,这些参考文献各自以引用的方式并入本文。

[0209] CDR移植包括将来自小鼠重链和轻链Ig可变域的一个或多个引入到人类Ig可变域的适当的四个框架区中。这种技术(Riechmann等,Nature 332:323-27(1988))利用了保守框架区(FR1-FR4)作为支撑CDR环(与抗原的主要接触点)的骨架。然而,CDR移植的缺点在于它可能会产生结合亲和力大致上低于原始小鼠抗体的人源化抗体,这是因为框架区的氨基酸可以促成抗原结合并且因为CDR环的氨基酸可能影响两个Ig可变域的缔合。为了维持人源化单克隆抗体的亲和力,可以通过以下手段来改良CDR移植技术:选择与原始小鼠抗体的框架区最相似的人类框架区,以及在对抗原结合位点进行计算机模拟的辅助下对框架或CDR内的单个氨基酸进行定点诱变(例如Co等,J.Immunol.152,2968-2976(1994))。

[0210] 来自转基因动物的人类抗体

[0211] 针对靶标蛋白的人类抗体还可以使用转基因动物产生,所述转基因动物不会产生内源性免疫球蛋白并且经过工程化而含有人类免疫球蛋白基因座。举例来说,W0 98/24893公开了具有人类Ig基因座的转基因动物,其中所述动物因内源性重链和轻链基因座失活而不会产生功能性内源性免疫球蛋白。W0 91/00906也公开了能够对免疫原发动免疫应答的转基因非灵长类哺乳动物宿主,其中所述抗体具有灵长类动物恒定区和/或可变区,并且其中编码内源性免疫球蛋白的基因座被取代或失活。W0 96/30498和美国专利号6,091,001公开了使用Cre/Lox系统对哺乳动物的免疫球蛋白基因座进行修饰,如置换全部或部分恒定区或可变区以形成经过修饰的抗体分子。W0 94/02602公开了内源性Ig基因座已经失活并且具有功能性人类Ig基因座的非人类哺乳动物宿主。美国专利号5,939,598公开了产生转基因小鼠的方法,其中所述小鼠缺乏内源性重链,并且表达包含一个或多个异种恒定区的外源性免疫球蛋白基因座。还参见美国专利号6,114,598、6,657,103以及6,833,268。

[0212] 使用上述转基因动物,可以针对所选择的抗原分子产生免疫应答,并且可以从所述动物体内取出抗体产生细胞并用于产生分泌人类单克隆抗体的杂交瘤。免疫接种方案、佐剂等是本领域已知的,并且被用于如W0 96/33735中所述对例如转基因小鼠进行免疫接种。这一公布公开了针对包括IL-6、IL-8、TNF α 、人类CD4、L选择素、gp39以及破伤风毒素在内的多种抗原分子的单克隆抗体。可以测试所述单克隆抗体抑制或中和相应蛋白质的生物活性或生理效应的能力。W0 96/33735公开了针对IL-8的单克隆抗体,这些单克隆抗体源自于接受IL-8免疫接种的转基因小鼠的免疫细胞,阻断IL-8所诱导的中性粒细胞的功能。对被用于对转基因动物进行免疫接种的抗原具有特异性的人类单克隆抗体还公开于W0 96/34096和美国专利申请号20030194404;以及美国专利申请号20030031667中。

[0213] 另外的可用于制备单克隆抗体的转基因动物包括美国专利号5,770,429和Fishwild等(Nat.Biotechnol.14:845-851(1996))中所述的Medarex **HuMAb-MOUSE®**,其

含有编码人类抗体重链和轻链的未重排人类抗体基因中的基因序列。对**HuMAb-MOUSE®**进行免疫接种能够产生针对靶标蛋白的完全人类单克隆抗体。

[0214] 此外,Ishida等(Cloning Stem Cells.4:91-102(2002))描述了TransChromo小鼠(TCMOUSE™),所述小鼠包含人类DNA的具有兆碱基级大小的区段并且并有整个人类免疫球蛋白(hIg)基因座。TCMOUSE™具有完全不同的hIg谱,包括所有IgG亚类(IgG1-IgG4)在内。用不同的人类抗原对TCMOUSE™进行免疫接种会产生包含人类抗体的抗体反应。

[0215] 还参见Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等,Nature,362:255-258(1993);Bruggermann等,Year in Immunol.,7:33(1993);以及美国专利号5,591,669、美国专利号5,589,369、美国专利号5,545,807;以及美国专利公布号20020199213。美国专利公布号20030092125描述了使动物的免疫应答偏向于所需表位的方法。还可以通过体外活化B细胞产生人类抗体(参见美国专利号5,567,610和5,229,275)。

[0216] 来自展示技术的人类抗体

[0217] 用于产生重组人类抗体基因谱的技术不断发展以及使编码的抗体片段展示于丝状噬菌体表面上提供了一种直接制备人类抗体的手段。由噬菌体技术产生的抗体在细菌中以抗原结合片段(通常是Fv或Fab片段)的形式产生并且因此缺乏效应功能。可以通过以下两种策略中的一种引入效应功能:可以将片段工程化成例如在哺乳动物细胞中表达的完全抗体,或工程化成具有能够触发效应功能的第二结合位点的双特异性抗体片段。

[0218] 本公开涵盖了一种用于产生靶标特异性抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括以下步骤:在噬菌体上合成人类抗体文库,使用靶标蛋白或其部分对所述文库进行筛选,分离结合靶标的噬菌体,以及从噬菌体中获得抗体。举例而言,一种用于制备用于噬菌体展示技术中的抗体文库的方法包括以下步骤:使用靶标抗原或其抗原部分对包含人类免疫球蛋白基因座的非人类动物进行免疫接种以引起免疫应答,从接受免疫接种的动物体内提取抗体产生细胞;从所提取的细胞中分离RNA,对所述RNA进行反转录以产生cDNA,使用引物扩增cDNA,以及将所述cDNA插入到噬菌体展示载体中使得抗体在噬菌体上表达。可以用这种方式获得本公开的重组靶标特异性抗体。

[0219] 在另一个实例中,可以从未接受免疫接种的动物体内提取抗体产生细胞,从所提取的细胞中分离RNA并且进行反转录以产生cDNA,使用引物扩增所述cDNA,并且插入到噬菌体展示载体中使得抗体在噬菌体上表达。噬菌体展示法经由使抗体谱展示于丝状噬菌体表面上,并且继而通过噬菌体与所选择的抗原的结合对它们进行选择来模拟免疫选择。一种这样的技术描述于W0 99/10494中,W0 99/10494描述了利用这种途径分离针对MPL和msk受体的具有高亲和力并且具有功能性激动性的抗体。可以通过对重组组合抗体文库,优选地scFv噬菌体展示文库进行筛选来分离本公开的抗体,所述抗体文库是使用由源自于人类淋巴细胞的mRNA制备的人类VL和VH cDNA制备的。用于制备和筛选这些文库的方法是本领域已知的。参见例如美国专利号5,969,108。用于产生噬菌体展示文库的试剂盒是可商购获得的(例如Pharmacia重组噬菌体抗体系统,目录号27-9400-01;以及Stratagene SurfZAP.TM.噬菌体展示试剂盒,目录号240612)。还存在其他可以用于产生和筛选抗体展示文库的方法和试剂(参见例如Ladner等的美国专利号5,223,409;Kang等的PCT公布号W0 92/18619;Dower等的PCT公布号W0 91/17271;Winter等的PCT公布号W0 92/20791;Markland等的PCT公布号W0 92/15679;Breitling等的PCT公布号W0 93/01288;McCafferty

等的PCT公布号W0 92/01047;Garrard等的PCT公布号W0 92/09690;Fuchs等,(1991) Bio/Technology 9:1370-1372;Hay等,(1992) Hum.Antibod.Hybridomas 3:81-85;Huse等,(1989) Science 246:1275-1281;McCafferty等,Nature (1990) 348:552-554;Griffiths等,(1993) EMBO J 12:725-734;Hawkins等,(1992) J.Mol.Biol.226:889-896;Clackson等,(1991) Nature 352:624-628;Gram等,(1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:3576-3580;Garrad等,(1991) Bio/Technology 9:1373-1377;Hoogenboom等,(1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137;以及Barbas等,(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7978-7982)。

[0220] 在一个实施方案中,为了分离针对靶标抗原具有特异性并且具有所需特征的人类抗体,对人类VH和VL文库进行筛选以选择具有所需特异性的抗体片段。用于这种方法中的抗体文库优选地是如本文以及本领域中所述加以制备和筛选的scFv文库(McCafferty等的PCT公布号W0 92/01047;McCafferty等(Nature 348:552-554(1990)));以及Griffiths等(EMBO J 12:725-734(1993)))。优选地使用靶标蛋白作为抗原对scFv抗体文库进行筛选。

[0221] 或者,将抗体的Fd片段(VH-CH1)和轻链(VL-CL)单独地通过PCR克隆并且随机重组成组合噬菌体展示文库,然后可以针对与特定抗原的结合对所述文库进行选择。使Fab片段表达于噬菌体表面上,即以物理方式连接至编码它们的基因。因此,通过抗原结合对Fab进行选择同时选择了Fab编码序列,随后可以对所述Fab编码序列进行扩增。经由若干轮抗原结合和重新扩增(这个程序被称作淘选),使对抗原具有特异性的Fab富集并且最终分离。

[0222] 在1994年,描述了一种用于使抗体人源化的途径(被称作“导向选择”)。导向选择利用了噬菌体展示技术能够使小鼠单克隆抗体人源化的能力(参见Jespers,L.S.等,Bio/Technology 12,899-903(1994))。为此,可以使小鼠单克隆抗体的Fd片段与人类轻链文库组合展示,并且然后可以使用抗原对所得到的杂合Fab文库进行选择。小鼠Fd片段从而提供了引导选择的模板。随后,将所选择的人类轻链与人类Fd片段文库组合。对所得到的文库进行选择会产生完全人类Fab。

[0223] 已经描述了多种用于从噬菌体展示文库中获得人类抗体的程序(参见例如Hoogenboom等,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等,J.Mol.Biol,222:581-597(1991);美国专利号5,565,332和5,573,905;Clackson.T.和Wells,J.A.,TIBTECH 12.173-184(1994))。具体来说,对源自于噬菌体展示文库的抗体进行体外选择和演变已成为一种有效的手段(参见Burton,D.R.和Barbas III,C.F.,Adv.Immunol.57,191-280(1994);Winter,G.等,Annu.Rev.Immunol.12,433-455(1994);美国专利公布号20020004215和W0 92/01047;美国专利公布号20030190317;以及美国专利号6,054,287和5,877,293)。

[0224] Watkins,“Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift,”Methods in Molecular Biology,Antibody Phage Display:Methods and Protocols 178:187-193(2002)以及2003年3月6日公布的美国专利公布号20030044772描述了通过捕捉提升物(capture lift)对噬菌体表达的抗体文库或其他结合分子进行筛选的方法,这种方法包括将候选结合分子固定于固体支撑物上。

[0225] 通过使表达为噬菌体蛋白质融合物(例如,使用M13基因III)的一条链与表达为可溶性片段的互补链相缔合使Fv片段展示于噬菌体表面上。预期所述噬菌体可以是丝状噬菌体,如I类噬菌体:fd、M13、f1、If1、lke、ZJ/Z、Ff中的一种和II类噬菌体:Xf、Pf1以及Pf3中的一种。噬菌体可以是M13或fd或其衍生物。

[0226] 在选择了初始人类VL和VH区段后,进行“混合与匹配”实验,其中针对靶标结合对不同对的初始所选择的VL和VH区段进行筛选,以便选择优选的VL/VH对组合。另外,为了进一步提高抗体的质量,可以在与在天然免疫应答期间负责抗体亲和力成熟的体内体细胞突变过程相似的过程中,优选地在VH和/或VL的CDR1、CDR2或CDR3区中的任一个内,使一对或多对优选的VL/VH的VL和VH区段发生随机突变。这种体外亲和力成熟可以通过使用分别与VH CDR1、CDR2以及CDR3或VL CDR1、CDR2以及CDR3互补的PCR引物对VL和VH区进行扩增来实现,所述引物已经在某些位置上“掺入”了四个核苷酸碱基的随机混合物以使得所得的PCR产物编码VH和/或VL CDR3区中已引入了随机突变的VL和VH区段。可以针对与靶标抗原的结合对这些经过随机突变的VL和VH区段进行重新筛选。

[0227] 在从重组免疫球蛋白展示文库中筛选和分离靶标特异性抗体后,可以从展示包装中(例如从噬菌体基因组中)回收编码所选抗体的核酸,并且通过标准重组DNA技术将所述核酸亚克隆到其他表达载体中。必要时,可以如下文所述进一步操控所述核酸以产生本公开的其他抗体形式。为了表达通过筛选组合文库而分离的重组人类抗体,如本文所述,将编码所述抗体的DNA克隆到重组表达载体中,并且引入到哺乳动物宿主细胞中。

[0228] 预期可以在细菌或宿主细胞的增变株中进行噬菌体展示法。增变株是具有遗传缺陷的宿主细胞,所述遗传缺陷会引起在所述宿主细胞内复制的DNA相对于它的亲本DNA发生突变。示例性增变株是NR9046mutD5和NR9046mut T1。

[0229] 还预期可以使用辅助噬菌体进行噬菌体展示法。这是一种用于感染含有缺陷性噬菌体基因组的细胞并且用于补足所述缺陷的噬菌体。缺陷性噬菌体基因组可以是去除了某些功能编码基因序列的噬菌粒或噬菌体。辅助噬菌体的实例是M13K07、M13K07基因III 3号;以及展示或编码与衣壳蛋白融合的结合分子的噬菌体。

[0230] 还使用WO 92/01047中所公开的分层二元组合法(hierarchical dual combinatorial approach)经由噬菌体展示筛选法来产生抗体,在所述分层二元组合法中使用含有H链或L链克隆的单独的菌落感染编码另一条链(L或H)的克隆的整个文库,并且根据噬菌体展示技术(如其中所述的那些噬菌体展示技术)对所得的双链特异性结合成员进行选择。这种技术也公开于Marks等(Bio/Technology,10:779-783(1992))中。

[0231] 用于在酵母、微生物以及哺乳动物细胞的表面上展示肽的方法还已经被用于鉴定抗原特异性抗体。参见例如美国专利号5,348,867;5,723,287;6,699,658;Wittrup,Curr Op.Biotech.12:395-99(2001);Lee等,Trends in Biotech.21(1)45-52(2003);Surgeeva等,Adv Drug Deliv.Rev.58:1622-54(2006)。可以使抗体文库与酵母蛋白(如凝集素)连接,从而有效地模拟免疫系统中的B细胞在细胞表面上对抗体的展示。

[0232] 除了噬菌体展示法之外,还可以使用体外展示法和微生物细胞展示(包括核糖体展示和mRNA展示)来分离抗体(Amstutz等,Curr.Op.Biotech.12:400-05(2001))。使用核糖体展示对多肽进行选择描述于Hanes等(Proc.Natl Acad Sci USA,94:4937-4942(1997))以及颁予Kawasaki的美国专利号5,643,768和5,658,754中。核糖体展示也可用于对抗体进行快速大规模突变分析。选择性诱变途径也提供了一种制备活性得到提高的抗体的方法,可以使用核糖体展示技术对所述抗体进行选择。

[0233] 氨基酸序列变体

[0234] 预期产生包含抗体的一个、两个、三个、四个、五个和/或六个CDR的经过修饰的多

肽组合物,其中CDR发生改变以使得对靶标分子的特异性或亲和力有所增强。典型地例如通过以下手段连续地对抗体CDR内的位点进行修饰:首先用保守性选择物进行取代(例如,用疏水性氨基酸取代疏水性氨基酸),然后用更不相似的选择物进行取代(例如,用疏水性氨基酸取代带电荷的氨基酸),然后可以在靶标位点上产生缺失或插入。举例来说,使用围绕CDR的保守框架序列,产生与这些共有序列互补的PCR引物来扩增位于引物区域之间的抗原特异性CDR序列。用于克隆和表达核苷酸和多肽序列的技术是本领域公认的[参见例如 Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor, New York (1989)]。将所扩增的CDR序列连接到适当的质粒中。包含一个、两个、三个、四个、五个和/或六个克隆的CDR的质粒任选地含有编码与CDR连接的区域的多肽。

[0235] 针对对于原始抗原的结合亲和力来筛选包含经过修饰的CDR的抗体物质。另外,进一步测试抗体或多肽中和靶标抗原活性的能力。举例来说,可以如实施例所示对本公开的抗体进行分析以测定它们干扰靶标抗原的生物活性的能力。

[0236] 可以通过在下文中更详细描述保守性或非保守性氨基酸取代进行修饰。“插入”或“缺失”优选地在约1至20个氨基酸,更优选地1至10个氨基酸的范围内。可以通过使用重组DNA技术在抗体多肽分子中系统性地氨基酸取代并且测定所得的重组变体的活性而引入变异。可以于在来自不同物种的核酸中有所不同的位点(可变区位置)或高度保守的区域(恒定区)中的位点上核酸改变。在下文中更详细地描述了用于改变抗体序列和表达可用于本公开中的抗体多肽组合物的方法。

[0237] 氨基酸序列插入物包括长度在1个残基至含有100个或更多个残基的多肽范围内的氨基端和/或羧基端融合物,以及具有单个或多个氨基酸残基的序列内插入物。末端插入物的实例包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体或与表位标签或补救受体(salvage receptor)表位融合的抗体(包括抗体片段)。抗体分子的其他插入型变体包括在例如N端或C端上与延长所述抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0238] 术语“经过表位标记的”是指与表位标签融合的抗体。表位标签多肽具有足够的残基以提供表位从而可以产生针对所述表位的抗体,但又足够短以使它不会干扰抗体的活性。表位标签优选地是足够独特的以使得针对其的抗体大致上不会与其他表位交叉反应。适合的标签多肽一般具有至少6个氨基酸残基并且通常具有约8个-50个之间的氨基酸残基(优选地约9个-30个之间的残基)。实例包括flu血凝素(HA)标签多肽和它的抗体12CA5(Field等, *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165 (1988)); c-myc标签和针对其的8F9、3C7、6E10、G4、B7以及9E10抗体(Evan等, *Mol. Cell. Biol.* 5:3610-16 (1985)); 以及单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签和它的抗体(Paborsky等, *Protein Engineering* 3:547-53 (1990))。其他示例性标签是多聚组氨酸序列,一般具有约六个组氨酸残基,允许使用镍螯合来分离所标记的化合物。本领域熟知并且常规使用的其他标记和标签(如FLAG®标签(Eastman Kodak, Rochester, NY))由本公开所涵盖。

[0239] 如本文所用的术语“补救受体结合表位”是指IgG分子(例如, IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区中负责延长IgG分子的体内血清半衰期的表位。

[0240] 另一种类型的变体是氨基酸取代型变体。这些变体的抗体分子中的至少一个氨基酸残基已被去除,并且在它的位置上插入有不同的残基。涵盖了高变区或CDR区或框架区中的任一个内的取代型诱变。保守性取代包括氨基酸被属于它的类别的另一个成员所置换。

非保守性取代包括属于这些类别之一的成员被属于另一类别的成员所置换。

[0241] 基于所牵涉的残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质方面的相似性,进行保守性氨基酸取代。举例来说,非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸(Ala,A)、亮氨酸(Leu,L)、异亮氨酸(Ile,I)、缬氨酸(Val,V)、脯氨酸(Pro,P)、苯丙氨酸(Phe,F)、色氨酸(Trp,W)以及甲硫氨酸(Met,M);极性中性氨基酸包括甘氨酸(Gly,G)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、半胱氨酸(Cys,C)、酪氨酸(Tyr,Y)、天冬酰胺(Asn,N)以及谷氨酰胺(Gln,Q);带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸(Arg,R)、赖氨酸(Lys,K)以及组氨酸(His,H);以及带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E)。

[0242] 不牵涉到维持抗体的正确构象的任何半胱氨酸残基也可以一般被丝氨酸取代,以提高分子的氧化稳定性并且防止异常交联。相反地,可以向抗体中添加一个或多个半胱氨酸键以提高它的稳定性(特别是在抗体是如Fv片段的抗体片段的情况下)。

[0243] 亲和力成熟

[0244] 亲和力成熟一般包括制备和筛选在亲本抗体的CDR内具有取代的抗体变体,以及选择相对于亲本抗体一种或多种生物特性(如结合亲和力)有所改良的变体。用于产生这些取代型变体的适宜方式是使用噬菌体展示进行的亲和力成熟。简而言之,可以使若干个高变区位点(例如6-7个位点)突变以在每个位点上产生所有可能的氨基酸取代。由此产生的抗体变体以单价形式由丝状噬菌体粒子展示为与被包装在每个粒子内的M13的基因III产物的融合物。然后针对噬菌体展示的变体的生物活性(例如结合亲和力)对它们进行筛选。参见例如WO 92/01047、WO 93/112366、WO 95/15388以及WO 93/19172。

[0245] 目前的抗体亲和力成熟法属于两个诱变类别:随机性和非随机性。易错PCR、增变细菌菌株(Low等,J.Mol.Biol.260,359-68(1996);Irving等,Immunotechnology 2,127-143(1996))以及饱和诱变(Nishimiya等,J.Biol.Chem.275:12813-20(2000);Chowdhury,P.S.Methods Mol.Biol.178,269-85(2002))是随机性诱变法的典型实例(Rajpal等,Proc Natl Acad Sci U S A.102:8466-71(2005))。非随机性技术经常使用丙氨酸扫描或定点诱变来产生特定变体的有限集合。下文进一步详细地描述了一些方法。

[0246] 经由淘选法进行的亲和力成熟-通常经由在递减量的抗原存在的情况下对候选抗体进行若干轮淘选来对重组抗体进行亲和力成熟。使抗原量每轮发生递减能够选择对所述抗原具有最高亲和力的抗体,从而从一大组起始物质中得到具有高亲和力的抗体。经由淘选进行的亲和力成熟是本领域熟知的并且描述于例如Huls等(Cancer Immunol Immunother.50:163-71(2001))中。使用噬菌体展示技术进行亲和力成熟的方法描述于本文其他地方并且是本领域已知的(参见例如Daugherty等,Proc Natl Acad Sci U S A.97:2029-34(2000))。

[0247] 精确(look-through)诱变-精确诱变(LTM)(Rajpal等,Proc Natl Acad Sci U S A.102:8466-71(2005))提供了一种用于对抗体结合位点进行快速定位的方法。对于LTM,选择代表了由20种天然氨基酸提供的主要侧链化学性质的九个氨基酸来剖析功能性侧链在抗体的所有六个CDR中的每一个位置上对结合的影响。LTM在CDR内产生了一系列位置上的单个突变,其中每个“野生型”残基均被9个所选氨基酸中的一个系统性地取代。将突变的CDR组合以产生复杂性和大小递增而不会阻止定量展示所有变体的组合单链可变片段(scFv)文库。在阳性选择后,对具有改良的结合性的克隆进行测序,并且对有利的突变进行

定位。

[0248] 易错PCR-易错PCR包括在不同轮选择之间使核酸随机化。随机化可能因所使用的聚合酶的固有错误率而以低比率出现,但是可以通过在转录期间使用具有高固有错误率的聚合酶(Hawkins等,J Mol Biol.226:889-96(1992))进行易错PCR(Zaccolo等,J.Mol.Biol.285:775-783(1999))来增强。在突变循环后,使用本领域的常规方法选择对抗原的亲合力得到改良的克隆。

[0249] DNA改组-核酸改组是一种用于将较短或较小的多核苷酸组在体外或体内同源重组以产生变体多核苷酸的方法。DNA改组已描述于美国专利号6,605,449、美国专利6,489,145、WO 02/092780以及Stemmer,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:10747-51(1994)中。总体上,DNA改组包括以下3个步骤:使用脱氧核糖核酸酶I使有待改组的基因片段化,使片段随机杂交并且在DNA聚合酶存在的情况下通过PCR(有性PCR)重新组装或填补片段化的基因,以及通过常规PCR扩增重新组装的产物。

[0250] DNA改组与易错PCR的不同之处在于它是反向链式反应。在易错PCR中,聚合酶起始位点的数目和分子的数目呈指数增长。相反,在随机多核苷酸的核酸重新组装或改组中,起始位点的数目和随机多核苷酸的数目(而非大小)随时间推移不断减少。

[0251] 在抗体的情况下,DNA改组允许例如所有CDR1与所有CDR2和所有CDR3自由地组合缔合。预期可以在同一个反应中对多个家族的序列进行改组。此外,改组一般保留相对顺序,以使得例如CDR1不会出现在CDR2的位置上。稀有改组体(shufflant)将含有大量最佳(例如最高亲和力)的CDR并且可以基于它们的优良亲和力对这些稀有改组体进行选择。

[0252] 可以被用于DNA改组的模板多核苷酸可以是DNA或RNA。它可能具有不同的长度,这取决于有待重组或重新组装的基因或更短或更小的多核苷酸的大小。优选地,模板多核苷酸具有50bp至50kb。模板多核苷酸通常应当是双链。

[0253] 预期可以在基因选择的初始步骤期间,将具有与模板多核苷酸具有同一性的区域和与模板多核苷酸异源的区域的双链核酸多核苷酸添加至模板多核苷酸中。还预期可以在初始步骤期间将两个不同但相关的多核苷酸模板混合。

[0254] 丙氨酸扫描-可以进行丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合具有重大贡献的高变区残基。Cunningham和Wells(Science 244:1081-1085(1989))。鉴定一个残基或一组目标残基(例如带电荷的残基,如arg、asp、his、lys以及glu)并且将其用中性或带负电荷的氨基酸(最优选地是丙氨酸或多聚丙氨酸)置换以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过取代位点上或对于取代位点引入另外或其他变体来推敲对所述取代显示出功能敏感性的那些氨基酸位置。

[0255] 计算机辅助设计-可选地或另外地,可能有利的是,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体与抗原之间的接触点,或使用计算机软件建立这些接触点的模型。这些接触残基和相邻的残基是用于根据本文所详细阐述的技术进行取代的候选残基。在产生这些变体后,如本文所述对该组变体进行筛选,并且可以选择在一个或多个相关测定中具有优良特性的抗体以进一步研发。

[0256] 可选地或另外地,可以使用本领域已知的多种其他亲和力成熟技术,包括例如以下文献中所述的技术:公布的专利申请W02009/088933;W02009/088928;W02009/088924;以及Clackson等,Nature 352:624-628,1991;Marks等,Biotechnology 10:779-783,1992;

Virnekas等,Nucleic Acids Res.22:5600-5607,1994;Glaser等,J.Immunol.149:3903-3913,1992;Jackson等,J.Immunol.154:3310-3319,1995;Schier等,J.Mol.Biol.255:28-43,1996;以及Yang等,J.Mol.Biol.254:392-403,1995,这些参考文献以引用的方式整体并入本文。

[0257] 改变的糖基化

[0258] 还可以产生抗体变体,所述抗体变体相对于亲本抗体具有经过修饰的糖基化形态,例如所述抗体中存在的一个或多个碳水化合物部分缺失和/或增添了所述抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0259] 抗体的糖基化典型地是N-连接型或O-连接型。N-连接型是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除了脯氨酸以外的任何氨基酸)是用于使碳水化合物部分与天冬酰胺侧链进行酶促连接的识别序列。这些三肽序列中的任一个在多肽中的存在形成潜在的糖基化位点。因此,可以通过改变氨基酸序列以使它含有这些三肽序列中的一个或多个来将N-连接型糖基化位点添加至抗体中。O-连接型糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种连接至羟氨基酸,所述羟氨基酸最常见地是丝氨酸或苏氨酸,但是也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。可以通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基插入或取代于原始抗体的序列中来将O-连接型糖基化位点添加至抗体中。

[0260] Fc聚糖影响IgG与Fc受体和C1q的结合,并且因此对于IgG的效应功能是重要的。可以产生具有经过修饰的Fc聚糖和改变了的效应功能的抗体变体。举例来说,具有经过修饰的末端糖(如唾液酸、核心岩藻糖、二等分N-乙酰葡萄糖胺以及甘露糖残基)的抗体可能具有改变了的对Fc γ RIIIa受体的结合性和改变了的ADCC活性。在另一个实例中,具有经过修饰的末端半乳糖残基的抗体可能具有改变了的对C1q的结合性和改变了的CDC活性(Raju, Curr.Opin.Immunol.20:471-78(2008))。

[0261] 还涵盖了不存在岩藻糖基化或岩藻糖基化有所减少的抗体分子,所述抗体分子展现出改良的ADCC活性。实现这一目的的多种方式是本领域已知的。举例来说,通过使抗体分子与Fc γ RIII受体结合来介导ADCC效应活性,已显示这取决于CH2结构域的Asn-297上的N-连接型糖基化的碳水化合物结构。相较于天然的岩藻糖基化的抗体,非岩藻糖基化的抗体以增加的亲和力结合这种受体并且更高效地触发Fc γ RIII介导的效应功能。举例来说, α -1,6-岩藻糖基转移酶已被敲除的CHO细胞中非岩藻糖基化抗体的重组产生使得抗体的ADCC活性增加至100倍(Yamane-Ohnuki等,Biotechnol Bioeng.87:614-22(2004))。可以经由例如通过siRNA或反义RNA处理以降低岩藻糖基化通路中这种酶或其他酶的活性;将细胞系工程化以敲除所述一种或多种酶;或与选择性糖基化抑制剂一起培养来实现类似的作用(Rothman等,Mol Immunol.26:1113-23(1989))。一些宿主细胞株(例如Lec13或大鼠杂交瘤YB2/0细胞系)天然地产生岩藻糖基化水平较低的抗体。(Shields等,J Biol Chem.277:26733-40(2002);Shinkawa等,J Biol Chem.278:3466-73(2003))。还已经测定例如经由在过表达GnTIII酶的细胞中重组产生抗体以使二等分碳水化合物的水平增加会提高ADCC活性(Umana等,Nat Biotechnol.17:176-80(1999))。已预测两个岩藻糖残基中只要一个不存在就可以足以提高ADCC活性(Ferrara等,Biotechnol Bioeng.93:851-61(2006))。

[0262] 效应功能发生改变的变体

[0263] 涵盖了抗体的其他修饰。在一个方面,可能希望在效应功能方面对本公开的抗体进行修饰,例如以增强抗体治疗癌症的有效性。用于修饰效应功能的一种方法教导可以将一个或多个半胱氨酸残基引入Fc区中,从而允许在这个区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚抗体可能具有改良的内化能力和式增强的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。参见Caron等(J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992))以及Shopes, B. (J. Immunol. 148:2918-2922 (1992))。也可以使用如Wolff等(Cancer Research 53:2560-2565 (1993))中所述的异双功能交联剂来制备抗肿瘤活性有所增强的同二聚抗体。或者,可以将抗体工程化,所述抗体具有双重Fc区,并且从而可以具有增强的补体溶解和ADCC能力。参见Stevenson等(Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989))。另外,已显示CDR内的序列可能使得抗体与MHC II类结合并且触发不希望有的辅助T细胞反应。保守性取代可以允许抗体保持结合活性但丧失其触发不希望有的T细胞反应的能力。还参见Steplewski等(Proc Natl Acad Sci U S A. 85:4852-56 (1998)),所述文献描述了鼠类可变区与人类 γ 1、 γ 2、 γ 3以及 γ 4恒定区接合的嵌合抗体。

[0264] 在本公开的某些实施方案中,可能希望使用抗体片段而非完整抗体来例如增加肿瘤穿透作用。在这种情况下,可能希望修饰抗体片段以便延长它的血清半衰期,例如将如PEG或其他水溶性聚合物(包括多糖聚合物)的分子添加至抗体片段中以延长半衰期。这也可以例如通过将补救受体结合表位并入到抗体片段中(例如通过使抗体片段中的适当区域发生突变或通过所述表位并入到肽标签中,然后例如通过DNA或肽合成使所述肽标签在任一端或在中间与抗体片段融合)来实现(参见例如W096/32478)。

[0265] 补救受体结合表位优选地构成如下的区域,在所述区域中来自Fc结构域的一个或两个环的任一个或多个氨基酸残基被转移至抗体片段的类似位置上。甚至更优选地,来自Fc结构域的一个或两个环的三个或更多个残基被转移。更优选的是,表位获自Fc区(例如IgG的Fc区)的CH2结构域,并且被转移至抗体的CH1、CH3或VH区或多于一个所述区域中。或者,表位获自Fc区的CH2结构域并且被转移至抗体片段的CL区或VL区或这两者中。还参见国际申请W0 97/34631和W0 96/32478,所述国际申请描述了Fc变体以及它们与补救受体的相互作用。

[0266] 因此,本公开的抗体可以包含人类Fc部分、人类共有Fc部分或其保留与Fc补救受体相互作用的能力的变体,包括如下的变体在内,在所述变体中,牵涉到二硫键键合的半胱氨酸已经过修饰或被去除,和/或在N端上添加了met,和/或N端的20个氨基酸中的一个或多个被去除,和/或与补体相互作用的区域(如C1q结合位点)被去除,和/或ADCC位点被去除[参见例如Sarmay等,Molec. Immunol. 29:633-9 (1992)]。

[0267] 先前的研究将人类和鼠类IgG上针对FcR的结合位点主要定位于由IgG残基233-239构成的下铰链区。其他研究提出了另外的广泛区段,例如Gly316-Lys338(针对人类Fc受体1)、Lys274-Arg301和Tyr407-Arg416(针对人类Fc受体III),或在下铰链外部发现几个特异性残基,例如Asn297和Glu318(对于与鼠类Fc受体II相互作用的鼠类IgG2b)。关于人类IgG1 Fc片段与人类Fc受体IIIA的3.2 Å晶体结构的报道将IgG1残基Leu234-Ser239、Asp265-Glu269、Asn297-Thr299以及Ala327-Ile332描绘为涉及与Fc受体IIIA的结合。已经基于晶体结构表明,除了下铰链(Leu234-Gly237)之外,IgG CH2结构域环FG(残基326-330)和BC(残基265-271)中的残基也可能在与Fc受体IIA的结合中起作用。参见Shields等

(J.Biol.Chem.,276:6591-604 (2001)),所述文献以引用的方式整体并入本文。Fc受体结合位点内的残基的突变可能会引起效应功能发生改变,如ADCC或CDC活性发生改变,或半衰期发生改变。如上文所述,潜在的突变包括一个或多个残基的插入、缺失或取代,包括用丙氨酸取代、保守性取代、非保守性取代或用不同IgG亚类中相同位置上的相应氨基酸残基置换(例如将IgG1残基用该位置上的相应IgG2残基置换)。

[0268] Shields等报道牵涉到与所有人类Fc受体结合的IgG1残基位于靠近铰链的CH2结构域内并且分为如下两个类别:1)可以直接与所有FcR相互作用的位置包括Leu234-Pro238、Ala327以及Pro329(以及可能地Asp265);2)影响碳水化合物性质或位置的位置包括Asp265和Asn297。影响与Fc受体II的结合的另外的IgG1残基如下:(影响最大)Arg255、Thr256、Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298以及(影响较小)His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378以及Lys414。A327Q、A327S、P329A、D265A以及D270A减少结合。除了上文针对所有FcR所鉴定的残基之外,使得与Fc受体IIIA的结合减少40%或更多的另外的IgG1残基如下:Ser239、Ser267(仅Gly)、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338以及Asp376。提高与FcRIIA的结合的变体包括T256A、K290A、S298A、E333A、K334A以及A339T。Lys414显示会使得与FcRIIA和FcRIIB的结合减少40%,Arg416使得与FcRIIA和FcRIIA的结合减少30%,Gln419使得与FcRIIA的结合减少30%并且使得与FcRIIB的结合减少40%,并且Lys360使得与FcRIIA的结合提高23%。还参见Presta等(Biochem.Soc.Trans.30:487-490,2001),所述文献以引用的方式整体并入本文,描述了在IgG1的Fc区中存在若干个如下的位置,所述位置仅提高与特定Fc γ 受体(R)的结合,或者同时提高与一种类型的Fc γ R的结合并减少与另一种类型的结合。然后在体外抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定中测试所选择的具有提高的与Fc γ RIIIa的结合的IgG1变体,并且当使用外周血单核细胞或自然杀伤细胞时,所述变体显示出ADCC的增强。

[0269] 举例来说,美国专利号6,194,551(以引用的方式整体并入本文)描述了效应功能发生改变的变体,所述变体在人类IgG Fc区中在氨基酸位置329、331或322(使用Kabat编号)上含有突变,所述变体中的一些展示出减少的C1q结合或降低的CDC活性。作为另一个实例,美国专利号6,737,056(以引用的方式整体并入本文)描述了效应物或Fc γ 受体结合有所改变的变体,所述变体在人类IgG Fc区中在如下氨基酸位置上含有突变:氨基酸位置238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439(使用Kabat编号),所述变体中的一些展示出与ADCC或CDC活性降低相关的受体结合谱。在这些突变中,氨基酸位置238、265、269、270、327或329上的突变被认为会减少与FcRI的结合,氨基酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438或439上的突变被认为会减少与FcRII的结合,并且氨基酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435或437上的突变被认为会减少与FcRIII的结合。

[0270] 美国专利号5,624,821(以引用的方式整体并入本文)报道了鼠类抗体的C1q结合

活性可以通过使重链的氨基酸残基318、320或322突变来改变,并且置换残基297 (Asn) 会去除溶解活性。

[0271] 美国专利公布号20040132101 (以引用的方式整体并入本文) 描述了在以下氨基酸位置上具有突变的变体:氨基酸位置240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328或332 (使用Kabat编号) 或位置234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330或332 (使用Kabat编号), 其中位置234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330或332上的突变可以降低ADCC活性或减少与Fc γ 受体的结合。

[0272] Chappel等 (Proc Natl Acad Sci U S A. 88:9036-40 (1991)) (以引用的方式整体并入本文) 报道了IgG1的嗜细胞活性是它的重链CH2结构域的固有特性。IgG1的氨基酸残基234-237中的任一个上的单个点突变会显著降低或消除它的活性。需要将所有IgG1残基234-237 (LLGG) 均取代于IgG2和IgG4中来恢复完全结合活性。已观测到含有整个ELLGGP序列 (残基233-238) 的IgG2抗体比野生型IgG1更具活性。

[0273] Isaacs等 (J Immunol. 161:3862-9 (1998)) (以引用的方式整体并入本文) 报道了对于Fc γ R结合至关重要的基序内的突变 (谷氨酸233突变成脯氨酸、亮氨酸/苯丙氨酸234突变成缬氨酸, 以及亮氨酸235突变成丙氨酸) 会完全阻止靶细胞的消除。谷氨酸318突变成丙氨酸会消除小鼠IgG2b的效应功能并且还会降低人类IgG4的效力。

[0274] Armour等 (Mol Immunol. 40:585-93 (2003)) (以引用的方式整体并入本文) 鉴定出如下的IgG1变体, 所述变体与活化性受体Fc γ RIIa反应的效率为野生型IgG1的至多1/10, 但其与抑制性受体Fc γ RIIb的结合仅减少至1/4。在氨基酸233-236的区域中和/或氨基酸位置327、330以及331上产生突变。还参见W0 99/58572, 其以引用的方式整体并入本文。

[0275] Xu等 (J Biol Chem. 269:3469-74 (1994)) (以引用的方式整体并入本文) 报道了使IgG1 Pro331突变成Ser会显著减少C1q结合并且几乎消除溶解活性。相反, 在IgG4中用Pro取代Ser331会赋予IgG4 Pro331变体以部分溶解活性 (40%)。

[0276] Schuurman等 (Mol Immunol. 38:1-8 (2001)) (以引用的方式整体并入本文) 报道了使牵涉到重链间键形成的铰链半胱氨酸之一Cys226突变成丝氨酸会使得重链间键联更稳定。使IgG4铰链序列Cys-Pro-Ser-Cys突变成IgG1铰链序列Cys-Pro-Pro-Cys也显著地使重链之间的共价相互作用稳定。

[0277] Angal等 (Mol Immunol. 30:105-8 (1993)) (以引用的方式整体并入本文) 报道了使IgG4中氨基酸位置241上的丝氨酸突变成脯氨酸 (存在于IgG1和IgG2中的那个位置上) 会产生均质性抗体, 并且与原始嵌合IgG4相比, 使血清半衰期延长并且使组织分布改良。

[0278] 共价修饰

[0279] 抗体的共价修饰也包括在本公开的范围。适当时, 它们可以通过化学合成或通过酶促或化学切割抗体来制备。通过使抗体的靶向氨基酸残基与有机衍生化剂 (能够与所选侧链或者N端或C端残基反应) 反应来将抗体的其他类型的共价修饰引入分子中。

[0280] 最常使半胱氨酰基残基与 α -卤代乙酸酯 (和相应的胺), 如氯乙酸或氯乙酰胺反应, 从而产生羧甲基或羧酰胺基甲基衍生物。还通过与溴代三氟丙酮、 α -溴代- β -(5-咪唑基) 丙酸、氯乙酰基磷酸酯、N-烷基顺丁烯二酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡

啖基二硫化物、对-氯汞苯甲酸酯、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑反应来使半胱氨酰基残基衍生化。

[0281] 通过在pH 5.5-7.0下与焦碳酸二乙酯反应来使组氨酰基残基衍生化,这是因为这种试剂对组氨酰基侧链具有相对特异性。对溴苯甲酰甲基溴也是有用的;优选地在pH 6.0下于0.1M二甲胂酸钠中进行反应。

[0282] 使赖氨酰基残基和氨基端残基与琥珀酸酐或其他羧酸酐反应。使用这些试剂进行衍生化具有反转赖氨酰基残基的电荷的作用。用于衍生化含 α -氨基的残基的其他适合的试剂包括酰亚胺酯,如甲基吡啶亚胺甲酯、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯硼氢化物、三硝基苯磺酸、0-甲基异脲、2,4-戊二酮以及转氨酶催化的与乙醛酸的反应。

[0283] 通过与一种或若干种常规试剂(其中有苯基乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮以及茚三酮)反应来修饰精氨酰基残基。精氨酸残基的衍生化因胍官能团的pKa较高而需要在碱性条件下进行反应。此外,可以使这些试剂与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ -氨基反应。

[0284] 可以对酪氨酰基残基进行特定修饰,其中特别关注的是,通过与芳族重氮化合物或四硝基甲烷反应将光谱标记引入酪氨酰基残基中。最通常,分别使用N-乙酰咪唑和四硝基甲烷形成O-乙酰基酪氨酰基物质和3-硝基衍生物。使用 ^{125}I 或 ^{131}I 碘化酪氨酰基残基以制备用于放射性免疫测定中的标记蛋白。

[0285] 通过与碳化二亚胺(R-N.dbd.C.dbd.N-R')反应来选择性修饰羧基侧基(天冬氨酰基或谷氨酰基),其中R和R'是不同的烷基,如1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳化二亚胺或1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基戊基)碳化二亚胺。此外,通过与铵离子反应将天冬氨酰基残基和谷氨酰基残基转化成天冬酰胺酰基残基和谷氨酰胺酰基残基。

[0286] 时常分别使谷氨酰胺酰基残基和天冬酰胺酰基残基脱去酰胺基而形成相应的谷氨酰基残基和天冬氨酰基残基。在中性或碱性条件下使这些残基脱去酰胺基。这些残基脱去酰胺基的形式属于本公开的范围。

[0287] 其他修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸以及组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E.Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86页(1983))、N端胺的乙酰化以及任何C端羧基的酰胺化。

[0288] 另一种类型的共价修饰包括使糖苷与抗体进行化学或酶促偶合。这些程序是有利的,因为它们不需要在如下的宿主细胞中产生抗体,所述宿主细胞具有进行N-连接型或O-连接型糖基化的糖基化能力。根据所使用的偶合方式,可以使一个或多个糖连接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧基;(c)游离硫氢基,如半胱氨酸的硫氢基;(d)游离羟基,如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基;(e)芳族残基,如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基;或(f)谷氨酰胺的酰胺基。这些方法描述于W087/05330以及Aplin和Wriston(CRC Crit.Rev.Biochem.,第259-306页(1981))中。

[0289] 可以通过化学方式或酶促方式去除抗体上存在的任何碳水化合物部分。以化学方式去糖基化需要将抗体暴露于化合物三氟甲烷磺酸或等效的化合物。这种处理会使得大多数或所有糖(除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)之外)被切割,同时保持抗体完整。化学去糖基化由Hakimuddin等(Arch.Biochem.Biophys.259:52(1987))以及Edge等(Anal.Biochem.118:131(1981))描述。可以通过使用如Thotakura等(Meth.Enzymol.138:

350 (1987)) 所述的多种内切糖苷酶和外切糖苷酶来对抗体上的碳水化合物部分进行酶促切割。

[0290] 抗体的另一种类型的共价修饰包括使抗体连接至多种非蛋白质聚合物中的一种, 例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙基化多元醇、聚氧乙基化山梨糖醇、聚氧乙基化葡萄糖、聚氧乙基化甘油、聚氧化烯烃或多糖聚合物(如葡聚糖)。这些方法是本领域已知的, 参见例如美国专利号4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192;4,179,337;4,766,106;4,179,337;4,495,285;4,609,546或EP 315 456。

[0291] 衍生物

[0292] 如上所述的衍生物是指通过如下的技术化学修饰的多肽: 泛素化; 标记(例如使用放射性核素或不同的酶); 共价聚合物连接, 如聚乙二醇化(使用聚乙二醇衍生化); 以及通过化学合成氨基酸(如鸟氨酸)进行插入或取代。本发明的抗体物质的衍生物(如双特异性抗体)也可用作治疗剂并且可以通过本文的方法产生。

[0293] 可以通过共价键方式或通过离子键、范德华力(van der Waals)或氢键将缀合的部分并入抗体物质中或连接于抗体物质, 例如放射性核苷酸或由抗生物素蛋白链菌素识别的生物素化核苷酸的并入。

[0294] 可以使聚乙二醇(PEG)与抗体物质连接以提供更长的体内半衰期。PEG基团可以具有任何适宜的分子量并且可以是线性或分枝的。PEG的平均分子量优选地在约2千道尔顿(“kD”)至约100kDa范围内, 更优选地在约5kDa至约50kDa范围内, 最优选地在约5kDa至约10kDa范围内。一般通过PEG部分上的天然或工程化的反应性基团(例如醛基、氨基、硫醇基或酯基)对抗体物质上的反应性基因(例如醛基、氨基或酯基)进行酰化或还原性烷基化来使PEG基团与本公开的抗体物质连接。可以使用本领域熟知的技术将PEG部分添加至抗体物质中。参见例如国际公布号W0 96/11953和美国专利号4,179,337。

[0295] 通常在水相中使抗体物质与PEG进行连接并且可以容易地通过反相分析型HPLC监测。通过制备型HPLC纯化聚乙二醇化的物质, 并且通过分析型HPLC、氨基酸分析以及激光解吸质谱法进行表征。

[0296] 抗体缀合物

[0297] 抗体可以它的“裸露”或未缀合的形式施用, 或可以与其他治疗剂或诊断剂直接缀合, 或可以与包含这些其他治疗剂或诊断剂的载体聚合物间接缀合。在一些实施方案中, 使抗体与以下各项缀合, 细胞毒性剂如化学治疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射性缀合物)。适合的化学治疗剂包括: 道诺霉素(daunomycin)、亚德里亚霉素(doxorubicin)、甲氨蝶呤以及长春地辛(vindesine)(Rowland等, (1986)(同上))。适合的毒素包括: 细菌毒素, 如白喉毒素; 植物毒素, 如蓖麻毒素; 小分子毒素, 如格尔德霉素(geldanamycin)(Mandler等, J.Natl.Cancer Inst.92(19):1573-81(2000);Mandler等, Bioorg.Med.Chem.Letters 10:1025-1028(2000);Mandler等, Bioconjugate Chem.13.786-91(2002))、类美登素(maytansinoid)(EP 1391213;Liu等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-23(1996))、奥莉丝汀(auristatin)(Doronina等, Nat.Biotech.21:778-84(2003))以及卡奇霉素(calicheamicin)(Lode等, Cancer Res.58:2928(1998);Hinman等, Cancer Res.53:3336-3342(1993))。

[0298] 可以经由使用放射性同位素、亲和力标记(如生物素、抗生物素蛋白等)、酶促标记(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、荧光或发光或生物发光标记(如FITC或若丹明(rhodamine)等)、顺磁性原子等对抗体进行可检测标记。用于实现这种标记的程序是本领域熟知的;例如参见Stemberger, L.A.等, *J.Histochem.Cytochem.*18:315(1970); Bayer, E.A.等, *Meth.Enzym.*62:308(1979); Engval, E.等, *Immunol.*109:129(1972); Goding, J.W.J. *Immunol.Meth.*13:215(1976)。

[0299] 抗体部分的缀合描述于美国专利号6,306,393中。一般技术还描述于Shih等, *Int.J.Cancer* 41:832-839(1988); Shih等, *Int.J.Cancer* 46:1101-1106(1990); 以及Shih等的美国专利号5,057,313中。这种一般方法包括使具有经过氧化的碳水化合物部分的抗体组分与载体聚合物反应,所述载体聚合物具有至少一个游离胺官能团并且加载有多种药物、毒素、螯合剂、硼附加物或其他治疗剂。这一反应产生初始的希夫碱(Schiff base)(亚胺)键联,所述键联可以通过还原成仲胺以形成最终缀合物来稳定。

[0300] 载体聚合物可以是例如氨基葡聚糖或具有至少50个氨基酸残基的多肽。用于使药物或其他药剂与载体聚合物缀合的不同的技术是本领域已知的。可以使用多肽载体而非氨基葡聚糖,但多肽载体应当在链中具有至少50个氨基酸残基,优选地100-5000个氨基酸残基。至少一些氨基酸应当是赖氨酸残基或谷氨酸或天冬氨酸残基。赖氨酸残基的侧位胺以及谷氨酰胺和天冬氨酸的侧位羧酸酯基宜用于连接药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼附加物或其他治疗剂。适合的多肽载体的实例包括多聚赖氨酸、多聚谷氨酸、多聚天冬氨酸、其共聚物,以及这些氨基酸与其他氨基酸(例如丝氨酸)的混合聚合物,以赋予所得的已加载的载体和缀合物以所希望的溶解度特性。可以与抗体缀合的药剂的实例包括本文所述的细胞毒性剂或化学治疗剂中的任一种。

[0301] 或者,可以通过将抗体组分与治疗剂直接缀合来制备缀合的抗体。一般程序与间接缀合法类似,不同之处在于将治疗剂直接连接于经过氧化的抗体组分上。举例来说,可以使抗体的碳水化合物部分与聚乙二醇连接以延长半衰期。

[0302] 或者,可以通过形成二硫键或使用异双功能交联剂(如N-丁二酰基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP))将治疗剂连接在经过还原的抗体组分的铰链区中。Yu等, *Int.J.Cancer*56:244(1994)。用于这种缀合的一般技术是本领域熟知的。参见例如Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking*(CRC Press 1991); Upeslakis等, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch等(编著), 第187-230页(Wiley-Liss, Inc.1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter等(编著), 第60-84页(Cambridge University Press 1995)。多种双功能蛋白质偶合剂是本领域已知的,如N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、酰亚胺酯的双功能衍生物(如己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(如辛二酸二丁二酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双-叠氮基化合物(如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双-重氮基衍生物(如双-(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如2,6-二异氰酸甲代亚苯酯)以及双-活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0303] 抗体融合蛋白

[0304] 制备抗体融合蛋白的方法是本领域熟知的。参见例如美国专利号6,306,393。包含白细胞介素-2部分的抗体融合蛋白由以下文献描述:Boleti等,Ann.Oncol.6:945(1995); Nicolet等,Cancer Gene Ther.2:161(1995);Becker等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 93:7826(1996);Hank等,Clin.Cancer Res.2:1951(1996);以及Hu等,Cancer Res.56:4998(1996)。另外,Yang等(Hum.Antibodies Hybridomas 6:129(1995))描述了包括F(ab')₂片段和肿瘤坏死因子 α 部分的融合蛋白。抗体融合蛋白的另外的实例由Pastan等,Nat.Reviews Cancer 6:559-65(2006)描述。

[0305] 制备抗体-毒素融合蛋白的方法也是本领域技术人员已知的,在所述抗体-毒素融合蛋白中,重组分子包含一种或多种抗体组分和毒素或化学治疗剂。举例来说,抗体-假单胞菌(Pseudomonas)外毒素A融合蛋白已由以下文献描述:Chaudhary等,Nature 339:394(1989);Brinkmann等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 88:8616(1991);Batra等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 89:5867(1992);Friedman等,J.Immunol.150:3054(1993);Wels等,Int.J.Can.60:137(1995);Fominaya等,J.Biol.Chem.271:10560(1996);Kuan等,Biochemistry 35:2872(1996);以及Schmidt等,Int.J.Can.65:538(1996)。含有白喉毒素部分的抗体-毒素融合蛋白已由以下文献描述:Kreitman等,Leukemia 7:553(1993);Nicholls等,J.Biol.Chem.268:5302(1993);Thompson等,J.Biol.Chem.270:28037(1995);以及Vallera等,Blood 88:2342(1996)。Deonarain等,Tumor Targeting 1:177(1995)已描述了具有核糖核酸酶部分的抗体-毒素融合蛋白,而Linardou等,Cell Biophys.24-25:243(1994)产生了包含脱氧核糖核酸酶I组分的抗体-毒素融合蛋白。白树毒素(gelonin)被用作Wang等,Abstracts of the 209th ACS National Meeting,Anaheim,Calif.,1995年4月2日-6日,第1部分,BIOT005的抗体-毒素融合蛋白中的毒素部分。作为另一个实例,Dohlsten等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 91:8945(1994)报道了包含葡萄球菌肠毒素-A的抗体-毒素融合蛋白。

[0306] 适用于制备这些融合蛋白的毒素的实例是蓖麻毒素、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素以及假单胞菌内毒素。参见例如Pastan等,Cell 47:641(1986);以及Goldenberg,CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43(1994)。其他适合的毒素是本领域技术人员已知的。

[0307] 还可以通过将抗体与前药活化酶缀合以将本公开的抗体用于ADEPT中,所述前药活化酶可以将前药(例如肽基化学治疗剂,参见W081/01145)转化成活性抗癌药物。参见例如W088/07378和美国专利号4,975,278。

[0308] 可用于ADEPT中的免疫缀合物的酶组分包括任何酶,所述酶能够以某种方式作用于前药以将它转化成它的更具活性的细胞毒性形式。

[0309] 可用于本公开中的酶包括但不限于:可用于将含磷酸酯前药转化成游离药物的碱性磷酸酶;可用于将含硫酸酯前药转化成游离药物的芳基硫酸酯酶;可用于将无毒5-氟胞嘧啶转化成抗癌药物5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;可用于将含肽前药转化成游离药物的蛋白酶,如沙雷氏菌属(serratia)蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草芽孢杆菌蛋白酶、羧肽酶以及组织蛋白酶(如组织蛋白酶B和L);可用于转化含有D-氨基酸取代基的前药的D-丙氨酰羧肽酶;可用于将糖基化前药转化成游离药物的碳水化合物切割酶,如 α -半乳糖苷酶和神经氨

酸酶;可用于将经过 β -内酰胺衍生化的药物转化成游离药物的 β -内酰胺酶;以及可用于将在胺氮上分别经过苯氧基乙酰基或苯乙酰基衍生化的药物转化成游离药物的青霉素(penicillin)酰胺酶,如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶。或者,具有酶活性的抗体在本领域也被称为抗体酶,可以用于将本公开的前药转化成游离活性药物(参见例如Massey, Nature 328:457-458(1987))。可以如本文所述制备抗体-抗体酶缀合物以向肿瘤细胞群体递送抗体酶。

[0310] 可以通过本领域熟知的技术,如使用上述异双功能交联试剂使上述酶与抗体共价结合。或者,可以使用本领域熟知的重组DNA技术(参见例如Neuberger等, Nature 312:604-608(1984))建构融合蛋白,所述融合蛋白至少包含本公开抗体的抗原结合区,所述抗原结合区至少连接至本公开的酶的具功能活性的部分。

[0311] 重组产生抗体

[0312] 可以使用常规程序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)分离编码本公开抗体的DNA并且进行测序。这通常需要对编码抗体的DNA或优选地mRNA(即cDNA)进行克隆。使用标准技术进行克隆和测序,所述标准技术例如像聚合酶链式反应(PCR)(参见例如Sambrook等(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Guide,第1-3卷,Cold Spring Harbor Press;Ausubel等,(编著),Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons(1994),以引用的方式并入本文)。

[0313] 在使得能够鉴定在特定条件下可以彼此杂交的多核苷酸的条件下进行核苷酸探针反应和其他核苷酸杂交反应。一组示例性条件如下:在42℃下于50%甲酰胺,5×SSC,20mM Na•P04,pH 6.8中进行严格性杂交;以及在55℃下于1×SSC中洗涤30分钟。用于计算等效杂交条件和/或选择其他条件以实现所希望的严格性水平的公式是熟知的。在本领域中应了解,如Ausubel等(编著),Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons(1994),第6.0.3至6.4.10页所述,具有等效严格性的条件可以通过使温度和缓冲液或盐浓度发生变化来实现。杂交条件的变更可以凭经验来确定或基于探针的长度和鸟嘌呤核苷/胞嘧啶(GC)碱基配对的百分比来精确地计算。可以如Sambrook等(编著),Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press:Cold Spring Harbor,New York(1989),第9.47至9.51页中所述来计算杂交条件。

[0314] 如本文所用的“分离的”核酸分子或“分离的”核酸序列是这样的核酸分子,所述核酸分子(1)已经过鉴定并且与在所述核酸的天然来源中通常与它缔合的至少一种污染性核酸分子分离,或(2)经过克隆、扩增、标记或以其他方式与背景核酸相区分,以使得所关注的核酸的序列可以被测定,则被认为是分离的。分离的核酸分子与它在自然界中所存在的形式或环境不同。因此分离的核酸分子与在它存在于天然细胞中时的核酸分子是有区别的。然而,分离的核酸分子包括在通常表达抗体的细胞中所含的核酸分子,在所述细胞中,例如所述核酸分子所处的染色体位置不同于在天然细胞中所处的染色体位置。

[0315] 一种用于克隆和测序的RNA的来源是通过从转基因小鼠获得B细胞并且使所述B细胞与永生细胞融合而产生的杂交瘤。使用杂交瘤的优势在于可以容易地对它们进行筛选,并且选择能够产生所关注的人类单克隆抗体的杂交瘤。或者,可以从接受免疫接种的动物的B细胞(或整个脾)中分离RNA。当使用除杂交瘤以外的来源时,可能希望筛选编码具有特异性结合特征的免疫球蛋白或免疫球蛋白多肽的序列。一种用于这种筛选的方法是使用噬

菌体展示技术。噬菌体展示进一步描述于本文中并且也是本领域熟知的。参见例如Dower等的W0 91/17271;McCafferty等的W0 92/01047;以及Caton和Koprowski (Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:6450-54 (1990)),这些文献各自以引用的方式并入本文。在使用噬菌体展示技术的一个实施方案中,从接受免疫接种的转基因小鼠分离cDNA (例如总脾cDNA),使用聚合酶链式反应扩增编码一部分免疫球蛋白多肽 (例如CDR区)的cDNA序列,并且将所扩增的序列插入噬菌体载体中。通过标准技术 (如淘选) 鉴定编码所关注的肽 (例如具有所需结合特征的可变区肽)的cDNA。

[0316] 典型地测定编码免疫球蛋白多肽的整个可变区的序列,然而,有时仅对一部分可变区 (例如CDR编码部分) 进行测序就足够了。典型地,被测序的部分的长度是至少30个碱基,更经常将对编码至少约1/3或至少约1/2长度的可变区的碱基进行测序。

[0317] 使用标准技术 (参见例如Sambrook等 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, 第1-3卷, Cold Spring Harbor Press; 以及Sanger, F. 等 (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467, 所述文献以引用的方式并入本文) 进行测序。通过将所克隆的核酸的序列与所公布的人类免疫球蛋白基因和cDNA序列相比较,本领域技术人员将能够容易地根据所测序的区域确定: (i) 免疫球蛋白多肽 (包括重链的同种型在内) 的生殖系区段使用, 以及 (ii) 重链和轻链可变区的序列, 包括因N端区域添加和体细胞突变过程而产生的序列。免疫球蛋白基因序列信息的一个来源是马里兰州贝塞斯达市 (Bethesda, Md) 的美国国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 国家医学图书馆 (National Library of Medicine) 的国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information)。

[0318] 在分离后,可以将DNA放入表达载体中,然后将所述载体转染到不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞中,所述宿主细胞如大肠埃希氏菌细胞、猿猴COS细胞、人类胚肾293细胞 (例如293E细胞)、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞,以便在重组宿主细胞中实现单克隆抗体的合成。抗体的重组产生是本领域熟知的。

[0319] 表达控制序列是指在特定的宿主生物体中表达可操作地连接的编码序列所必需的DNA序列。适合于原核生物的控制序列例如包括启动子,任选地操纵子序列,以及核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多聚腺苷酸化信号以及增强子。

[0320] 在使核酸与另一个核酸序列存在功能关系时,它是可操作地连接的。举例来说,前序列或分泌前导序列的DNA在它被表达为参与多肽分泌的前蛋白的情况下是与多肽的DNA可操作地连接的;启动子或增强子在它会影响序列转录的情况下是与编码序列可操作地连接的;或核糖体结合位点在它经过定位而能够促成翻译的情况下是与编码序列可操作地连接的。一般来说,可操作地连接的意思是所连接的DNA序列是连续的,并且在分泌前导序列的情况下,是连续的并且处于阅读相中。然而,增强子未必是连续的。通过在适宜的限制性位点上连接来实现连接。如果这些位点不存在,那么根据常规惯例使用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0321] 细胞、细胞系以及细胞培养物经常可互换使用并且所有这些名称在本文中均包括子代。转化体和转化的细胞包括原代主体细胞和由其衍生的培养物而与传代的次数无关。还应了解的是,所有子代可能因有意或无意的突变而在DNA内含物方面并非完全相同。包括筛选出的具有与原始转化细胞相同的功能或生物活性的突变型子代在内。当意图采用不同

的名称时,可以从上下文中明显看出。

[0322] 在一个替代性实施方案中,可以通过直接蛋白质测序来测定所关注的免疫球蛋白的氨基酸序列。可以根据通用密码子表设计适合的编码核苷酸序列。

[0323] 可以通过将适当的核苷酸变化引入到编码DNA中或通过肽合成来制备氨基酸序列变体。这些变体包括例如抗体的氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。产生缺失、插入以及取代的任何组合以获得最终构建体,条件是最终构建体具有所需的特征。氨基酸的变化也可能会改变分子的翻译后加工,如使糖基化位点的数目或位置发生变化。

[0324] 通过本领域已知的多种方法制备编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于:从天然来源中分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下)或通过对抗体的早期制备的变体或非变体形式进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变以及盒式诱变来制备。

[0325] 本公开还提供了编码本公开抗体的分离的核酸,所述核酸任选地与由宿主细胞识别的控制序列可操作地连接;包含所述核酸的载体和宿主细胞;以及用于产生所述抗体的重组技术,所述技术可以包括培养宿主细胞以使得核酸表达以及任选地,从宿主细胞培养物或培养基中回收所述抗体。用于产生抗体的不同系统和方法由Birch和Racher (Adv. Drug Deliv. Rev. 671-685 (2006)) 进行综述。

[0326] 为了重组产生抗体,分离编码其的核酸,并且将所述核酸插入可复制载体中以进一步克隆(DNA扩增)或以进行表达。能够容易地使用常规程序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)分离编码单克隆抗体的DNA并且进行测序。许多载体是可供使用的。载体组分一般包括但不限于以下一个或多个:信号序列、复制起点、一个或多个选择标记基因、增强子元件、启动子以及转录终止序列。

[0327] (1) 信号序列组分

[0328] 本公开的抗体不仅可以直接重组产生,还可以与异源多肽的融合多肽形式重组产生,所述异源多肽优选地是信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N端上具有特异性切割位点的其他多肽。所选的信号序列优选地是可以由宿主细胞识别和加工(即通过信号肽酶切割)的信号序列。如果原核宿主细胞不识别和加工天然抗体信号序列,那么可以将所述信号序列用从由例如以下各项组成的群组中选出的信号序列取代:果胶酸裂解酶(例如pelB)、碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定性肠毒素II前导序列。对于酵母分泌,可以将天然信号序列用以下各项取代:例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列(包括酵母菌属(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)的 α -因子前导序列)或酸性磷酸酶前导序列、白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖淀粉酶前导序列,或W090/13646中所述的信号。在哺乳动物细胞表达中,哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列(例如单纯疱疹gD信号)是可供使用的。

[0329] 这种前体区的DNA与编码抗体的DNA在阅读框内连接。

[0330] (2) 复制起点组分

[0331] 表达载体和克隆载体均含有使载体能够在一种或多种所选宿主细胞内复制的核酸序列。一般来说,在克隆载体中,这种序列是使载体能够独立于宿主染色体DNA而进行复制的序列,并且包括复制起点或自主复制序列。对于多种细菌、酵母以及病毒而言,这些序列是熟知的。来自质粒pBR322的复制起点适用于大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适用

于酵母,并且不同的病毒起点可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。一般来说,哺乳动物表达载体不需要复制起点组分(典型地可以使用SV40起点,这只是因为它含有早期启动子)。

[0332] (3) 选择标记组分

[0333] 表达载体和克隆载体可以含有选择基因,也被称为选择标记。典型的选择基因编码如下的蛋白质,所述蛋白质(a)赋予对抗生素或其他毒素的抗性,所述抗生素或其他毒素例如氨苄西林(ampicillin)、新霉素(neomycin)、甲氨蝶呤、四环素(tetracycline)、G418、遗传霉素(geneticin)、组氨醇或霉酚酸(mycophenolic acid);(b)补充营养缺陷型缺乏;或(c)提供不可获自复合培养基的关键营养素,例如编码用于芽孢杆菌属(Bacilli)的D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0334] 选择方案的一个实例利用药物来使宿主细胞的生长停滞。那些经过异源基因成功转化的细胞会产生赋予抗药性的蛋白质并且因此能够在所述选择方案下存活。这种显性选择的实例使用如下药物:甲氨蝶呤、新霉素、组氨醇、嘌呤霉素(puromycin)、霉酚酸以及潮霉素(hygromycin)。

[0335] 适用于哺乳动物细胞的选择标记的另外的实例是能够鉴定对于吸收抗体编码核酸呈感受态的细胞的那些标记,如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和金属硫蛋白-II,优选地灵长类动物金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0336] 举例来说,首先通过将所有转化体在含有甲氨蝶呤(Mtx)(DHFR的一种竞争性拮抗剂)的培养基中培养以对经过DHFR选择基因转化的细胞进行鉴定。在使用野生型DHFR时,适当的宿主细胞是DHFR活性缺陷型中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0337] 或者,经过编码本公开抗体、野生型DHFR蛋白以及另一种选择标记(如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH))的DNA序列转化或共同转化的宿主细胞(特别是含有内源性DHFR的野生型宿主)可以通过在含有针对选择标记的选择剂(如氨基糖苷抗生素,例如卡那霉素(kanamycin)、新霉素或G418)的培养基中培养细胞来选择。参见美国专利号4,965,199。

[0338] 适用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒YRp7中的trp1基因(Stinchcomb等, Nature, 282:39 (1979))。所述trp1基因提供了用于不能够在色氨酸中生长的酵母突变株(例如ATCC号44076或PEP4-1)的选择标记。Jones (Genetics 85:12 (1977))。酵母宿主细胞基因组中trp1损害的存在则提供了通过在不存在色氨酸的情况下进行培养来检测转化的有效环境。类似地,Leu2缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)由带有Leu2基因的已知质粒补充。Ura3缺陷型酵母菌株由带有ura3基因的质粒补充。

[0339] 另外,源自于1.6 μ m环状质粒pKD1的载体可以用于对克鲁维酵母属酵母进行转化。或者, Van den Berg (Bio/Technology, 8:135 (1990)) 报道了一种用于在乳酸克鲁维酵母(K.lactis)中大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。还已经公开了用于使克鲁维酵母属的工业菌株分泌成熟重组人血清白蛋白的稳定多拷贝表达载体(Fleer等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991))。

[0340] (4) 启动子组分

[0341] 表达载体和克隆载体通常含有由宿主生物体识别并且与抗体编码核酸可操作地连接的启动子。适于与原核宿主一起使用的启动子包括阿拉伯糖(例如araB)启动子phoA启动子、 β -内酰胺酶以及乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统以及杂合启动子(如tac启动子)。然而,其他已知的细菌启动子也是适合的。用于细菌系统中的启动子

还将含有与编码本公开抗体的DNA可操作地连接的Shine-Dalgarno (S.D.) 序列。

[0342] 用于真核生物的启动子序列是已知的。几乎所有的真核生物基因皆具有富含AT的区域,所述区域位于转录起始位点上游约25至30个碱基处。存在于许多基因的转录起点上游70至80个碱基处的另一个序列是CNCAAT区,其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核生物基因的3'端处是AATAAA序列,所述序列可能是向编码序列的3'端添加多聚腺苷酸尾的信号。所有这些序列皆适于插入到真核表达载体中。

[0343] 适于与酵母宿主一起使用的启动序列的实例包括3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶(如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶以及葡糖激酶)的启动子。

[0344] 作为另外的优势在于转录受到生长条件控制的诱导型启动子的其他酵母启动子是以下各项的启动子区域:醇脱氢酶2、异细胞色素C(isocytochrome C)、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。适用于酵母表达的载体和启动子进一步描述于EP 73,657中。酵母增强子也可以有利地与酵母启动子一起使用。

[0345] 在哺乳动物宿主细胞中从载体对抗体进行转录例如受到以下各项的控制:从病毒基因组中获得的启动子,所述病毒如艾贝尔森白血病病毒(Abelson leukemia virus)、多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头状瘤病毒、鸟类肉瘤病毒,最优选地,巨细胞病毒、反转录病毒、乙型肝炎病毒、猿猴病毒40(SV40);从异源哺乳动物启动子获得的启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子;从热激启动子获得的启动子,条件是这些启动子与宿主细胞系统相容。

[0346] SV40病毒的早期和晚期启动子可以方便地以还含有SV40病毒复制起点的SV40限制性片段的形式获得。人类巨细胞病毒的立即早期启动子可以方便地以HindIII E限制性片段的形式获得。在美国专利号4,419,446中公开了一种在哺乳动物宿主中使用牛乳头状瘤病毒作为载体来表达DNA的系统。这种系统的一种改进形式描述于美国专利号4,601,978中。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人类 β -干扰素cDNA,还参见Reyes等,Nature 297:598-601(1982)。或者,可以使用劳斯氏肉瘤病毒(rous sarcoma virus)的长末端重复序列作为启动子。

[0347] (5) 增强子元件组分

[0348] 经常通过将增强子序列插入到载体中来增强高等真核生物对编码本公开抗体的DNA的转录。已知来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白以及胰岛素)的许多增强子序列。然而,典型地将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括位于复制起点下游(late side)的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点下游的多瘤增强子以及腺病毒增强子。关于活化真核启动子的增强元件,还参见Yaniv, Nature 297:17-18(1982)。增强子可以在抗体编码序列的5'端或3'端的位置上剪接至载体中,但优选地位于启动子的5'端位点上。

[0349] (6) 转录终止组分

[0350] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人类细胞或来自其他多细胞生物体的有核细胞)中的表达载体还将含有终止转录和使mRNA稳定所需的序列。这些序列通

常可获自真核生物或病毒DNA或cDNA的5'端和有时3'端非翻译区。这些区域含有被转录成编码抗体的mRNA的非翻译部分中的多聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止组分是牛生长激素多聚腺苷酸化区域。参见W094/11026和其中所公开的表达载体。另一种是小鼠免疫球蛋白轻链转录终止子。

[0351] (7) 对宿主细胞进行选择 and 转化

[0352] 适用于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞是上述原核生物、酵母或高等真核生物细胞。适用于这一目的的原核生物包括真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如埃希氏菌属(*Escherichia*),例如大肠埃希氏菌;肠杆菌属(*Enterobacter*);欧文氏菌属(*Erwinia*);克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*);变形杆菌属(*Proteus*);沙门氏菌属(*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*);沙雷氏菌属(*Serratia*),例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*);和志贺菌属(*Shigella*);以及芽孢杆菌属,如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) (例如公开于1989年4月12日公布的DD 266,710中的地衣芽孢杆菌41P);假单胞菌属(*Pseudomonas*),如绿脓假单胞菌(*P. aeruginosa*);和链霉菌属(*Streptomyces*)。一种优选的大肠埃希氏菌克隆宿主是大肠埃希氏菌294(ATCC 31,446),但是其他菌株,如大肠埃希氏菌B、大肠埃希氏菌X1776(ATCC 31,537)以及大肠埃希氏菌W3110(ATCC 27,325)也是适合的。这些实例是说明性的而非限制性的。

[0353] 除了原核生物外,真核微生物(如丝状真菌或酵母)也是适用于抗体编码载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通面包酵母(baker's yeast)是在低等真核宿主微生物中最常使用的。然而,许多其他属、种以及株系也是通常可供使用的并且可用于本文中,如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属宿主,例如像乳酸克鲁维酵母、脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、魏氏克鲁维酵母(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、克鲁维酵母(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K. drosophilae*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K. thermotolerans*)以及马克斯克鲁维酵母(*K. marxianus*);耶氏酵母(*Yarrowia*) (EP 402,226);毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070);念珠菌属(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma reesei*) (EP 244,234);粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*),如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);以及丝状真菌,例如像链孢霉属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)和曲霉属(*Aspergillus*)宿主,如构巢曲霉(*A. nidulans*)和黑曲霉(*A. niger*)。

[0354] 适用于表达糖基化抗体的宿主细胞源自于多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。来自宿主(如草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(毛虫)、埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)(果蝇)以及家蚕(*Bombyx mori*))的许多杆状病毒株和变体以及相应的允许的昆虫宿主细胞已经被鉴定。用于转染的多种病毒株是公共可获得的,例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)的L-1变体NPV和家蚕的Bm-5株NPV,并且这些病毒可以在本文中用作根据本公开的病毒,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0355] 棉花、玉米、马铃薯、大豆、牵牛花、番茄、烟草、浮萍以及其他植物细胞的植物细胞

培养物还可以用作宿主。

[0356] 有用的哺乳动物宿主细胞系的实例为中国仓鼠卵巢细胞,包括CHO K1细胞(ATCC CCL 61)、DXB-11、DG-44以及中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));经过SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651);人类胚肾细胞系(经过亚克隆而以悬浮培养方式培养的293或293细胞(Graham等, J.Gen Virol.36:59,1977);幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);小鼠塞尔托利细胞(TM4, Mather(Biol.Reprod.23:243-251,1980));猴肾细胞(CV1ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(buffalo rat liver cell)(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等, Annals N.Y Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝细胞瘤细胞系(Hep G2)。

[0357] 使用上述用于抗体产生的表达或克隆载体转化或转染宿主细胞,并且将所述宿主细胞培养于在适当时经过改良的常规营养培养基中以诱导启动子,选择转化体,或扩增编码所需序列的基因。另外,通过选择标记分离的具有转录单位的多个拷贝的新型载体和转染的细胞系对于表达结合靶标的抗体是特别有用的和优选的。

[0358] (8) 培养宿主细胞

[0359] 可以将用于产生本公开抗体的宿主细胞培养在多种培养基中。可商购获得的培养基,如汉姆氏F10(Ham's F10)(Sigma)、最低必需培养基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)以及杜氏改良伊格氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Sigma)适用于培养宿主细胞。另外,以下文献中所述的任何培养基也可以用作宿主细胞的培养基:Ham等(Meth.Enz.58:44,1979);Barnes等,Anal.Biochem.102:255(1980);美国专利号4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或5,122,469;W090103430;W0 87/00195;或美国专利公布号30,985。这些培养基中的任一种可以根据需要用以下各项补充:激素和/或其他生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙盐、镁盐以及磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如庆大霉素(gentamicin)药物)、痕量元素(定义为通常以微克分子范围内的最终浓度存在的无机化合物)以及葡萄糖或等效的能量来源。还可以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其他的必需补充剂。培养条件,如温度、pH值等是先前与被选用于表达的宿主细胞一起使用的培养条件,并且对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0360] (9) 抗体纯化

[0361] 当使用重组技术时,抗体可以在细胞内,在周质间隙中产生,或直接被分泌到培养基中,包括从微生物培养物分泌在内。如果抗体在细胞内产生,那么作为第一步骤,例如通过离心或超滤去除微粒碎片(是宿主细胞或溶解的碎片)。Better等,Science 240:1041-43,1988;ICSU Short Reports 10:105(1990);以及Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:457-461(1993)描述了用于分离被分泌至大肠埃希氏菌的周质间隙中的抗体的程序[还参见Carter等,Bio/Technology 10:163-167(1992)]。

[0362] 可以使用例如羟磷灰石色谱法、阳离子或阴离子交换色谱法以及亲和色谱法来纯化由微生物或哺乳动物细胞制备的抗体组合物,其中亲和色谱法是优选的纯化技术。蛋白

质A作为亲和配体的适合性取决于存在于抗体中的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。可以使用蛋白质A纯化基于人类 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62:1-13, 1983)。蛋白质G被推荐用于所有小鼠同种型和用于人类 $\gamma 3$ (Guss等, EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。与亲和配体连接的基质最经常是琼脂糖, 但其他基质也是可供使用的。与可以使用琼脂糖实现的流速和处理时间相比, 机械上稳定的基质(如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)使得流速更快并且使得处理时间更短。当抗体包含CH3结构域时, Bakerbond ABXTM树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)可用于纯化。用于蛋白质纯化的其他技术, 如在离子交换柱上进行的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅上进行的色谱法、在肝素SEPHAROSE[®]上进行的色谱法、在阴离子或阳离子交换树脂(如多聚天冬氨酸柱)上进行的色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE以及硫酸铵沉淀也是可供使用的, 这取决于有待回收的抗体。

[0363] 筛选方法

[0364] 有效治疗剂取决于对缺少显著毒性的有效药剂进行鉴定。可以通过本领域已知的方法针对结合亲和力对抗体进行筛选。举例来说, 可以使用凝胶阻滞测定法、蛋白质印迹法、放射性标记的竞争测定法、通过色谱法进行的共同分级分离、共同沉淀、交联、ELISA等, 以上各项描述于例如Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY中, 所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0365] 在本公开的一个实施方案中, 筛选调节靶标抗原活性的抗体的方法包括使测试抗体与靶标多肽接触以及测定抗体与靶标配体之间的复合体的存在。在这些测定法中, 典型地对配体进行标记。在适当的孵育后, 将游离的配体与以结合形式存在的配体分离, 并且游离或未复合的标记的量是特定抗体结合靶标配体的能力的量度。

[0366] 在本公开的另一个实施方案中, 针对对于靶标多肽具有适合的结合亲和力的抗体片段或CDR使用高通量筛选。简单地说, 在固体基质上合成大量不同的小肽测试化合物。使肽测试抗体与靶标多肽接触并且进行洗涤。然后通过本领域熟知的方法检测结合的多肽。也可以将本公开的经过纯化的抗体直接涂于用于上述药物筛选技术中的培养板上。另外, 可以使用非中和抗体来捕捉靶标并且将它固定于固体支撑物上。

[0367] 用于评估抗TGF β 抗体对TGF β 的生物活性的中和作用的方法是本领域已知的。参见例如美国专利7,867,496。体外生物测定法的实例包括: (1) 在软琼脂中在EGF存在下诱导NRK细胞的群落形成(Roberts等(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:5339-5343); (2) 诱导原始间叶细胞分化以表达软骨表型(Seyedin等(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:2267-2271); (3) 抑制Mv1Lu貂肺上皮细胞(Danielpour等(1989) J. Cell. Physiol., 138:79-86)和BBC-1猴肾细胞(Holley等(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5989-5992)生长; (4) 抑制C3H/HeJ小鼠胸腺细胞的有丝分裂发生(Wrann等(1987) EMBO J., 6:1633-1636); (5) 抑制大鼠L6成肌细胞分化(Florini等(1986) J. Biol. Chem., 261:16509-16513); (6) 测量纤维连接蛋白的产生(Wrana等(1992) Cell, 71:1003-1014); (7) 诱导与荧光素酶报告基因融合的纤溶酶原激活物抑制剂I (PAI-1) 启动子(Abe等(1994) Anal. Biochem., 216:276-284); (8) 夹心酶联免疫吸附测定法(Danielpour等(1989) Growth Factors. 2:61-71); 以及(9) Singh等(2003) Bioorg. Med. Chem. Lett., 13(24):4355-4359中所述的细胞测定法。

[0368] 在一些实施方案中, 抗体中和TGF $\beta 1$ 和TGF $\beta 2$ 的效力是中和TGF $\beta 3$ 的效力的至少2至

50倍、10至100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍,或比中和TGFβ3的效力大20%至50%、50%至100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0369] 用于评估TGFβ的生物活性和对TGFβ的中和作用(例如TGFβ抗体)的另外的方法提供于实施例中。举例来说,中和作用可以通过中和测定法来测量并且表示为IC₅₀值。可以通过测定分子对第二分子或细胞活性的最大生物反应引出半数抑制作用所需的浓度来计算给定分子的IC₅₀值。IC₅₀越低,则分子抑制所需蛋白质活性的效力越大。本文所涵盖的示例性中和测定法包括但不限于白细胞介素-11释放测定法和HT-2/IL-4细胞增殖测定法。另外,可以进行TGFβ活性测定法以确定所述抗体是否优先地抑制一种TGFβ亚型,包括pSMAD磷酸化测定法或rhLAP结合测定法。在另一个实施方案中,相较于对TGFβ3的IC₅₀,所述抗体对TGFβ1和TGFβ2的IC₅₀更低(即结合更佳、效力更大)。

[0370] 组合疗法

[0371] 在一个实施方案中,将本公开的抗体与可用于治疗如本文所述的疾病或病症的第二药剂一起施用。如果鉴定出超过一种有效结合靶标抗原的抗体,那么预期可以将针对靶标抗原的不同表位和/或优先地结合TGFβ的不同亚型的两种或更多种抗体混合以使得抗体共同的组合使针对与靶标多肽相关的病状或病症的功效得到进一步提高。包含一种或多种本发明抗体的组合物可以向患有或易患有待治疗的与靶标多肽相关的病状或病症的人或哺乳动物施用。

[0372] 并行地施用两种治疗剂不需要同时或通过相同的途径施用所述药剂,只要所述药剂发挥它们的治疗作用的时间段上存在重叠即可。涵盖了同时或依序施用,也涵盖了在不同天或不同周施用。

[0373] 第二药剂可以是其他治疗剂,如细胞因子、生长因子、针对其他靶标抗原的抗体、抗炎剂、抗凝剂、抑制细胞外基质产生的药剂、将降低或减小血压的药剂、将减少胆固醇、甘油三酯、LDL、VLDL或脂蛋白(a)或增加HDL的药剂、将增加或降低胆固醇调节蛋白水平的药剂、抗赘生药物或分子。对于患有过度增殖性病症(如癌症或肿瘤)的患者,还涵盖了与第二治疗手段(如放射疗法、化学疗法、光动力学疗法或手术)的组合。

[0374] 预期本公开的抗体与第二药剂可以同时相同的制剂中给予。进一步预期,所述药剂在单独的制剂中施用并且并行地施用,其中并行地是指在彼此相隔30分钟之内给予药剂。

[0375] 在另一个方面,在施用抗体组合物之前施用第二药剂。在施用之前指的是在使用抗体治疗前一周至在施用抗体前30分钟的时间范围内施用第二药剂。进一步预期,在施用抗体组合物之后施用第二药剂。在施用后意指描述了在抗体治疗后30分钟至在抗体施用后一周的时间范围内进行施用。

[0376] 进一步预期,在适当时可以施用其他辅助疗法。举例来说,在适当时还可以向患者施用细胞外基质降解蛋白、手术疗法、化学疗法、细胞毒性剂或放射疗法。

[0377] 进一步预期,在将抗体与第二药剂组合施用时,例如像其中第二药剂是细胞因子或生长因子或化学治疗剂,施用还包括了使用放射治疗剂或放射疗法。与抗体组合物组合施用的放射疗法如由治疗医师所决定并且以典型地给予针对癌症接受治疗的患者的剂量加以施用。

[0378] 细胞毒性剂是指抑制或阻止细胞功能和/或对细胞造成破坏的物质。该术语意图

包括放射性同位素(例如I131、I125、Y90以及Re186)、化学治疗剂以及毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或合成毒素,或其片段。非细胞毒性剂是指不抑制或阻止细胞功能和/或不对细胞造成破坏的物质。非细胞毒性剂可以包括可以经过活化而具有细胞毒性的药剂。非细胞毒性剂可以包括珠粒、脂质体、基质或粒子(参见例如美国专利公布2003/0028071和2003/0032995,以引用的方式并入本文)。这些药剂可以与根据本公开的抗体缀合、偶合、连接或缔合。

[0379] 所涵盖的用于与本公开的抗体一起使用的化学治疗剂包括但不限于表I中所列的那些:

[0380] 表I

[0381]	<u>烷化剂</u> <u>氮芥</u> 二氯甲基二乙胺 (mechlorethamine) 环磷酰胺 (cyclophosphamide) 异环磷酰胺 (ifosfamide) 美法仑 (melphalan) 苯丁酸氮芥 (chlorambucil) <u>亚硝基脲</u> 卡莫司汀 (carmustine, BCNU) 洛莫司汀 (lomustine, CCNU) 司莫司汀 (semustine, 甲基-CCNU) <u>乙撑亚胺 / 甲基 - 三聚氰胺</u> (methyl-melamine) 三亚乙基三聚氰胺 (TEM) 三亚乙基硫代磷酰胺 (噻替派 (thiotepa)) 六甲基三聚氰胺 (HMM, 六甲蜜胺 (altretamine)) <u>烷基磺酸盐</u>	<u>天然产品</u> <u>抗有丝分裂药物</u> <u>紫杉烷类 (taxanes)</u> 紫杉醇 (paclitaxel) 长春花生物碱 长春碱 (vinblastine, VLB) 长春新碱 (vincristine) 长春瑞滨 (vinorelbine) Taxotere® (多烯紫杉醇 (docetaxel)) 雌莫司汀 (estramustine) 磷酸雌莫司汀 <u>表鬼臼毒素 (Epidodophylotoxin)</u> 依托泊苷 (etoposide) 替尼泊苷 (teniposide) <u>抗生素</u> 放线菌素 D (actinomycin D) 道诺霉素 (daunomycin) (红比霉素 (rubidomycin))

[0382]

白消安 (busulfan)	亚德里亚霉素 (阿霉素 (adriamycin))
<u>三嗪类</u>	米托蒽醌 (Mitoxantrone)
达卡巴嗪 (dacarbazine, DTIC)	伊达比星 (idarubicin)
<u>抗代谢物</u>	博来霉素 (bleomycin)
<u>叶酸类似物</u>	丝普卡霉素 (splicamycin) (光神霉素 (mithramycin))
甲氨蝶呤	丝裂霉素 C (mitomycin C)
三甲曲沙 (Trimetrexate)	更生霉素 (dactinomycin)
培美曲塞 (Pemetrexed) (多靶向抗叶酸剂)	阿非迪霉素 (aphidicolin)
<u>嘧啶类似物</u>	<u>酶</u>
5-氟尿嘧啶	L-天冬酰胺酶
氟脱氧尿苷	L-精氨酸酶
吉西他滨 (gemcitabine)	<u>放射增敏剂</u>
胞嘧啶阿拉伯糖苷 (cytosine arabinoside, AraC, 阿糖胞苷 (cytarabine))	甲硝哒唑 (metronidazole)
5-氮杂胞嘧啶核苷	迷索硝唑 (misonidazole)
2,2'-二氟脱氧-胞嘧啶核苷	去甲基迷索硝唑
<u>嘌呤类似物</u>	哌莫硝唑 (pimonidazole)
6-巯嘌呤	依他硝唑 (etanidazole)
6-硫鸟嘌呤	尼莫拉唑 (nimorazole)
硫唑嘌呤	RSU 1069
2'-脱氧助间型霉素 (2'-deoxycoformycin) (喷司他丁 (pentostatin))	EO9
赤式羟基壬基-腺嘌呤 (EHNA)	RB 6145
磷酸氟达拉滨 (fludarabine phosphate)	SR4233
2-氯脱氧腺苷 (克拉屈滨 (cladribine), 2-CdA)	烟酰胺 (nicotinamide)
<u>I 型拓扑异构酶抑制剂</u>	5-溴代脱氧尿苷
喜树碱 (camptothecin)	5-碘代脱氧尿苷
拓扑替康 (topotecan)	溴代脱氧胞嘧啶核苷
伊立替康 (irinotecan)	<u>其他药剂</u>
<u>生物反应调节剂</u>	<u>铂配位络合物</u>
G-CSF	顺铂 (cisplatin)
GM-CSF	卡铂 (carboplatin)
<u>分化剂</u>	奥沙利铂 (oxaliplatin)
视黄酸衍生物	蒽二酮 (Anthracenedione)
<u>激素和拮抗剂</u>	米托蒽醌
<u>肾上腺类固醇/拮抗剂</u>	<u>取代的脲</u>
强的松 (prednisone) 和等效物	羟基脲
地塞米松 (dexamethasone)	<u>甲胍衍生物</u>
氨鲁米特 (aminoglutethimide)	N-甲胍 (MIH)
<u>孕酮</u>	丙卡巴胍 (procabazine)
己酸羟孕酮	<u>肾上腺皮质抑制剂</u>
甲氧基孕酮乙酸酯	米托坦 (mitotane) (<i>o,p'</i> -DDD)
甲地孕酮 (megestrol acetate)	氨鲁米特
<u>雌激素</u>	<u>细胞因子</u>
己烯雌酚 (diethylstilbestrol)	干扰素 (α 、 β 、 γ)
乙炔基雌二醇/等效物	白细胞介素-2
<u>抗雌激素药</u>	<u>光敏剂</u>
他莫昔芬 (tamoxifen)	血卟啉衍生物
<u>雄激素</u>	Photofrin®
丙酸睾酮	苯并卟啉衍生物
氟甲睾酮 等效物	Npe6
	初卟啉锡 (SnET2)
	苯博瑞德-a (pheboride-a)

[0383]	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="300 161 790 537"> <u>抗雄激素药</u> 氟他米特 (flutamide) 促性腺激素释放激素类似物 亮丙瑞林 (leuprolide) <u>非类固醇抗雄激素药</u> 氟他米特 </td><td data-bbox="790 161 1228 537"> 细菌叶绿素-a 萘酞菁 (naphthalocyanine) 酞菁 酞菁锌 <u>放射疗法</u> X射线 紫外光 γ放射疗法 可见光 红外线放射疗法 微波放射疗法 </td></tr> </table>	<u>抗雄激素药</u> 氟他米特 (flutamide) 促性腺激素释放激素类似物 亮丙瑞林 (leuprolide) <u>非类固醇抗雄激素药</u> 氟他米特	细菌叶绿素-a 萘酞菁 (naphthalocyanine) 酞菁 酞菁锌 <u>放射疗法</u> X射线 紫外光 γ放射疗法 可见光 红外线放射疗法 微波放射疗法
<u>抗雄激素药</u> 氟他米特 (flutamide) 促性腺激素释放激素类似物 亮丙瑞林 (leuprolide) <u>非类固醇抗雄激素药</u> 氟他米特	细菌叶绿素-a 萘酞菁 (naphthalocyanine) 酞菁 酞菁锌 <u>放射疗法</u> X射线 紫外光 γ放射疗法 可见光 红外线放射疗法 微波放射疗法		

[0384] 还预期第二药剂是抗纤维化剂。示例性抗纤维化剂包括但不限于降低转化生长因子-β (TGF-β) 活性的其他药剂 (包括但不限于GC-1008 (Genzyme/MedImmune); 乐德木单抗 (lerdelimumab) (CAT-152; 泰博 (Trabio) (Cambridge Antibody)); 美替木单抗 (metelimumab) (CAT-192, Cambridge Antibody); LY-2157299 (Eli Lilly); ACU-HTR-028 (Opko Health)), 包括靶向一种或多种TGF-β亚型的抗体、TGF-β受体激酶TGFBR1 (ALK5) 和TGFBR2的抑制剂, 以及受体后信号转导通路调节剂; 趋化因子受体信号转导调节剂; 内皮素受体拮抗剂, 包括靶向内皮素受体A和B的抑制剂以及选择性靶向内皮素受体A的抑制剂 (包括但不限于安贝生坦 (ambrisentan); 阿伏生坦 (avosentan); 波生坦 (bosentan); 克拉生坦 (clazosentan); 达卢生坦 (darusentan); BQ-153; FR-139317; L-744453; 马西替坦 (macitentan); PD-145065; PD-156252; PD163610; PS-433540; S-0139; 西他生坦钠 (sitaxentan sodium); TBC-3711; 齐泊腾坦 (zibotentan)); 降低结缔组织生长因子 (CTGF) 活性的药剂 (包括但不限于FG-3019 (FibroGen)), 并且还包括其他CTGF中和抗体; 基质金属蛋白酶 (MMP) 抑制剂 (包括但不限于MMPI-12、PUP-1以及三氟醋酸替加泊肽 (tigapotide triflutate)); 降低表皮生长因子受体 (EGFR) 活性的药剂, 包括但不限于埃罗替尼 (erlotinib)、吉非替尼 (gefitinib)、BMS-690514、西妥昔单抗 (cetuximab)、靶向EGF受体的抗体、EGF受体激酶抑制剂以及受体后信号转导通路调节剂; 降低血小板衍生生长因子 (PDGF) 活性的药剂 (包括但不限于甲磺酸伊马替尼 (Imatinib mesylate) (Novartis)), 并且还包括PDGF中和抗体、靶向PDGF受体 (PDGFR) 的抗体、PDGFR激酶活性抑制剂以及受体后信号转导通路抑制剂; 降低血管内皮生长因子 (VEGF) 活性的药剂 (包括但不限于阿西替尼 (axitinib)、贝伐单抗 (bevacizumab)、BIBF-1120、CDP-791、CT-322、IMC-18F1、PTC-299以及雷莫芦单抗 (ramucirumab)), 并且还包括VEGF中和抗体、靶向VEGF受体1 (VEGFR1, Flt-1) 和VEGF受体2 (VEGFR2, KDR)、VEGFR1的可溶形式 (sFlt) 的抗体以及其中和VEGF的衍生物, 以及VEGF受体激酶活性抑制剂; 多种受体激酶的抑制剂, 如抑制血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子和血小板衍生生长因子的受体激酶的BIBF-1120; 干扰整合素功能的药剂 (包括但不限于STX-100和IMGN-388), 并且还包括整合素靶向抗体; 干扰IL-4 (包括但不限于AER-001、AMG-317、APG-201以及sIL-4Rα) 和IL-13 (包括但不限于AER-001、AMG-317、安芦珠单抗 (anrukinzumab)、CAT-354、贝辛白介素 (cintredekin besudotox)、MK-6105、QAX-576、SB-313、SL-102以及TNX-650) 的促纤维化活性的药剂, 并且还包括任一种细胞因子的中和抗体、靶向IL-4受体或IL-13受体、IL-4受体的可溶形式的抗体或其据报道结合并中和IL-4和IL-13的衍生物, 包括IL-13的全部或一部分和毒素 (特别是假单胞菌内毒素) 的嵌合蛋白, 经由JAK-STAT激酶通路进行信号转导; 干扰上皮间质转化的药剂, 包括mTor抑制剂 (包括但

不限于AP-23573);降低铜水平的药剂,如四硫钼酸盐;减少氧化应激的药剂,包括N-乙酰半胱氨酸和四硫钼酸盐;以及干扰素 γ 。还涵盖了如下的药剂,所述药剂是磷酸二酯酶4(PDE4)抑制剂(包括但不限于罗氟司特(Roflumilast));磷酸二酯酶5(PDE5)抑制剂(包括但不限于米罗那非(miroadenafil)、PF-4480682、柠檬酸西地那非(sildenafil citrate)、SLx-2101、他达拉非(tadalafil)、优地那非(udenafil)、UK-369003、伐地那非(vardenafil)和敏喘宁(zaprinast));或花生四烯酸通路调节剂,包括环加氧酶和5-脂氧合酶抑制剂(包括但不限于齐留通(Zileuton))。进一步涵盖了减少组织重塑或纤维化的化合物,包括脯氨酰基水解酶抑制剂(包括但不限于1016548、CG-0089、FG-2216、FG-4497、FG-5615、FG-6513、制纤菌素A(Takeda)、鲁非罗尼(lufironil)、P-1894B以及沙非罗尼(safironil)),和过氧化物酶体增殖物活化受体(PPAR)- γ 激动剂(包括但不限于吡格列酮(pioglitazone)和罗格列酮(rosiglitazone))。

[0385] 所涵盖的其他特异性抗纤维化剂包括松弛素(relaxin)、吡非尼酮(pirfenidone)、优氟尼(ufironil)、塞福尼(surifonil)、CAT-192、CAT-158;安倍生坦(ambresentan)、赛林(thelin);FG-3019(一种CTGF抗体);抗EGFR抗体;EGFR激酶抑制剂;特罗凯(tarceva);吉非替尼;PDGF抗体、PDGFR激酶抑制剂;格列卫(gleevec);BIBF-1120,是VEGF、FGF和PDGF受体抑制剂;抗整合素抗体;IL-4抗体;四硫钼酸盐(一种铜螯合剂);干扰素- γ ;NAC,是一种半胱氨酸前药;肝细胞生长因子(HGF);KGF;血管紧张素受体阻断剂、ACE抑制剂、凝乳酶抑制剂;COX和LO抑制剂;齐留通;孟鲁司特(monteleukast);阿瓦斯汀(avastin);他汀类(statins);PDE5抑制剂,如西地那非、优地那非、他达拉非、伐地那非或敏喘宁;罗氟司特;依那西普(etanercept)(Enbrel);促凝剂;前列腺素,如PGE2、PRX-08066、5HT2B受体拮抗剂;贝辛白介素(一种与遗传工程化的假单胞菌外毒素缀合的嵌合人类IL13);罗氟司特(一种PDE4抑制剂);FG-3019(一种抗结缔组织生长因子人类单克隆抗体);GC-1008(一种TGF- β 人类单克隆抗体);曲前列尼尔(treprostinil)(一种前列环素类似物);干扰素- α ;QAX-576(一种IL13调节剂);WEB 2086(一种PAF受体拮抗剂);甲磺酸伊马替尼;FG-1019;苏拉明(Suramin);波生坦;IFN-1b;抗IL-4;抗IL-13;牛磺酸、烟酸、NF- κ B反义寡核苷酸;以及氧化氮合酶抑制剂。

[0386] 病症的治疗

[0387] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种用于抑制靶标活性的方法,所述方法是通过向有需要的患者施用靶标特异性抗体而实现的。可以治疗性地使用本文所述的任何类型的抗体。在示例性实施方案中,靶标特异性抗体是人类抗体、嵌合抗体或人源化抗体。在另一个示例性实施方案中,靶标是人类并且患者是人类患者。或者,患者可以是表达与靶标特异性抗体交叉反应的靶标蛋白的哺乳动物。可以向用于兽医学目的或用作人类疾病的动物模型的表达与抗体交叉反应的靶标蛋白的非人类哺乳动物(即灵长类动物)施用抗体。这些动物模型可用于评价本公开靶标特异性抗体的治疗功效。

[0388] 在一个实施方案中,本公开提供了一种用于治疗与TGF- β 表达相关的病状或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所述的抗体或药物组合物。

[0389] 可以用结合TGF β 的抗体物质(例如本公开的抗体)治疗的与TGF β 表达相关的示例性病状或病症包括癌症,如肺癌、前列腺癌、乳腺癌、肝癌、食道癌、结肠直肠癌、胰腺

癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、纤维变性癌症、神经胶质瘤以及黑色素瘤、眼睛(例如眼部、视力、眼科或眼科学)疾病、病状或病症、与纤维化相关的疾病、病状或病症,例如纤维增生性疾病、病状或病症,或伴有相关纤维化的疾病、病状或病症。

[0390] 纤维增生性疾病、病状或病症或者伴有相关纤维化的疾病包括累及体内任何器官或组织的疾病,所述任何器官或组织包括但不限于皮肤、肺、肾脏、心脏、脑以及眼睛。纤维增生性疾病、病状或病症或者伴有相关纤维化的疾病包括但不限于肺纤维化、特发性肺纤维化、细支气管周围纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病(COPD)、小气管疾病(例如阻塞性细支气管炎)、肺气肿、成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ALI)、因感染剂或毒性剂所致的肺纤维化、肾纤维化、由所有病因所致的肾小球肾炎(GN),例如肾小球膜增生性GN、免疫性GN以及新月体性GN;肾小球硬化症、肾小管间质损伤、肾间质性纤维化、肾纤维化以及肾间质性纤维化的所有成因、由药物暴露(包括对移植接受者进行的环孢菌素治疗,例如环孢菌素治疗)的并发症引起的肾纤维化、HIV相关肾病、移植肾病、糖尿病性肾脏疾病(例如糖尿病性肾病)、肾源性全身性纤维化、糖尿病、特发性腹膜后纤维化、硬皮病、肝纤维化、与过度瘢痕形成和进行性硬化相关的肝脏疾病,包括因所有病因所致的肝硬化;胆道系统的病症、可归因于感染的肝功能失调、纤维囊性疾病、心血管疾病,如充血性心力衰竭;扩张性心肌病、心肌炎、血管狭窄、心脏纤维化(例如梗塞后心脏纤维化)、后壁心肌梗塞、左心室肥大、静脉闭塞性疾病、再狭窄(例如血管成形术后再狭窄)、动静脉移植失败、动脉粥样硬化、高血压、高血压性心脏病、心脏肥大、肥厚型心肌病、心力衰竭、主动脉疾病、进行性全身性硬化、多发性肌炎、全身性红斑狼疮、皮炎、筋膜炎、雷诺氏综合征、类风湿性关节炎、增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病或与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、碱烧伤(例如角膜碱烧伤)、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离、佩罗尼氏病、全身性硬化、脊髓损伤后、骨质疏松症、卡-恩二氏病、克罗恩氏病、瘢痕形成、马凡氏综合征、卵巢早衰、阿尔茨海默氏病和帕金森氏病、因手术切口或机械性创伤所致的纤维化、与眼部手术相关的纤维化,以及由创伤或手术伤口引起的在伤口愈合期间皮肤中出现的过度或肥厚性瘢痕或瘢痕瘤形成。

[0391] 示例性眼睛疾病(例如眼部、视力、眼科或眼科学疾病)、病状或病症包括但不限于纤维增生性病症、眼睛纤维化、眼科纤维组织形成、视网膜功能失调、与视网膜功能失调相关的纤维化、湿性或干性黄斑变性、增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、碱烧伤(例如角膜碱烧伤)、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜

或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离。

[0392] 示例性的眼睛纤维增生性疾病、病状或病症、眼睛纤维化、眼部纤维化或眼科纤维组织形成包括但不限于增生性玻璃体视网膜病、由任何病因所致的玻璃体视网膜病、与视网膜功能失调相关的纤维化、与湿性或干性黄斑变性相关的纤维化、与眼部手术(如对青光眼的治疗、视网膜复置术、白内障摘除术或任何种类的引流程序)相关的纤维化、角膜和结膜中的瘢痕形成、角膜内皮纤维化、与碱烧伤相关的纤维化、白内障手术后晶状体囊纤维化、斜视手术中围绕眼外肌的组织中过度瘢痕形成、前囊下白内障和后囊膜浑浊、眼睛前段纤维化疾病、角膜基质纤维化(例如与角膜浑浊相关)、小梁网纤维化(例如与青光眼相关)、眼睛后段纤维化疾病、纤维血管性瘢痕形成(例如眼睛视网膜或脉络膜血管结构中)、视网膜纤维化、视网膜前纤维化、视网膜神经胶质增生、视网膜下纤维化(例如与年龄相关性黄斑变性相关)、与视网膜和青光眼手术后相关的纤维化、与糖尿病性视网膜病中的组织收缩相关的牵拉性视网膜脱离。

[0393] 在不同的实施方案中,眼睛纤维增生性疾病、病状或病症是从由以下各项组成的群组中选出:增生性玻璃体视网膜病、与眼部手术相关的纤维化、白内障手术后晶状体纤维化、角膜基质纤维化以及碱烧伤。

[0394] 可以用根据本发明的抗体物质治疗的示例性癌症包括癌症,如肺癌、前列腺癌、乳腺癌、肝细胞癌、食道癌、结肠直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、纤维变性癌症、神经胶质瘤以及黑色素瘤。

[0395] 已观测到,许多人类肿瘤(deMartin等,EMBO J.,6:3673(1987);Kuppner等,Int.J.Cancer,42:562(1988))和许多肿瘤细胞系(Derynck等,Cancer Res.,47:707(1987);Roberts等,Br.J.Cancer,57:594(1988))产生TGF β ,并且表明了那些肿瘤可以逃避正常的免疫监视的可能性机制。

[0396] TGF β 亚型在癌症中的表达是复杂的并且可变的,其中TGF β 亚型的不同组合在具体癌症中具有不同的作用。TGF β 分子可以充当肿瘤抑制剂和肿瘤促进剂。举例来说,动物中TGF β 信号转导的缺失或下调可能会导致乳腺癌、肠癌、胰腺癌、结肠癌以及鳞状细胞癌增加,从而指示TGF β 的存在对于防止或减缓肿瘤进展是重要的(Yang等,Trends Immunol 31:220-27,2010)。然而,已知TGF β 过表达具有促致癌性并且在许多肿瘤类型中检测到TGF β 的表达增加(Yang等(同上))。

[0397] 另外的复杂情况还公开于美国专利7,927,593中。举例来说,不同的TGF β 亚型看起来与不同类型的癌症更为相关。举例来说,TGF β 1和TGF β 3在卵巢癌以及它的进展中所起的作用可能大于TGF β 2;而TGF β 1和TGF β 2在分级较高的软组织肉瘤肿瘤中的表达高于TGF β 3。在人类乳腺癌中,TGF β 1和TGF β 3高表达,其中TGF β 3表达与总体存活率有关,而有淋巴结转移和阳性TGF β 3表达的患者具有较差的预后结果。然而,在结肠癌中,TGF β 1和TGF β 2的表达高于TGF β 3,并且所存在的循环水平大于在无癌症个体中的循环水平。在神经胶质瘤中,TGF β 2对于细胞迁移是重要的。从最近的研究来看,尚不清楚在具体癌症中抑制哪些TGF β 亚型最有用并且抑制达到何种程度最有用。

[0398] 免疫细胞于肿瘤部位中的浸润被认为是肿瘤生长的一个常见的促成因素。这些免

疫细胞浸润物可能因有助于清除肿瘤而具有有益的作用,但是还可能因使得对肿瘤抗原具有耐受性而产生有害作用。已显示,TGF β 可以影响肿瘤中免疫细胞的水平(参见例如Yang等,Trends Immunol 31:220-27,2010;Flavell等,Nature Immunol 10:554-567,2010;Nagarau等,Expert Opin Investig Drugs 19:77-91,2010)。举例来说,TGF β 抑制浸润肿瘤以便从体内清除肿瘤的自然杀伤细胞。TGF β 还抑制细胞毒性T细胞和CD4+辅助T细胞的活性,这些细胞类型有助于清除肿瘤(Yang(同上))。TGF β 还在调节树突状细胞活性中起作用,它是例如通过抑制树突状细胞向损伤部位迁移以及呈递抗原以促进免疫应答来起作用的。树突状细胞既对TGF β 有反应也分泌TGF β 。举例来说,树突状细胞浸润肿瘤并且溶解细胞,分泌TGF β 并且活化调节性T细胞,继而可能会阻止对肿瘤的清除(Flavell等(同上))。另外,骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)是在肿瘤进展期间扩充的骨髓衍生细胞。MDSC抑制T细胞增殖,抑制树突状细胞成熟,并且抑制自然杀伤细胞的活性,从而协助细胞逃避免疫应答(Li等,J Immunol.182:240-49,2009)。已经证明,TGF β 会促进MDSC抑制自然杀伤细胞活性的作用(Li等(同上);Xiang等,Int J Cancer124:2621-33,2009)。不同的TGF β 亚型在这些免疫过程中的每一个过程中的作用尚不明确。选择性靶向TGF β 亚型并且在不同程度上对它们进行抑制可以有助于调节宿主免疫反应以对抗并清除肿瘤。

[0399] 在某些实施方案中,本文所述的抗体或组合物调节肿瘤中的免疫细胞。在一些实施方案中,所述抗体或组合物增加肿瘤中自然杀伤(NK)细胞的数量和/或增强NK细胞的细胞溶解活性。在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物减少肿瘤中调节性T细胞的数量和/或抑制调节性T细胞的功能。举例来说,在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物抑制调节性T细胞下调免疫应答或迁移至免疫应答部位的能力。

[0400] 在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物使肿瘤中的细胞毒性T细胞的数量增加和/或增强CTL活性,例如加强、提高或促进CTL活性。举例来说,在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物使CTL的穿孔素和颗粒酶的产生增加并且提高CTL的细胞溶解活性。

[0401] 在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物使肿瘤中单核细胞衍生的干细胞(MDSC)的数量减少和/或抑制MDSC的功能。举例来说,在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物抑制MDSC抑制免疫应答的能力,抑制MDSC的免疫抑制活性和/或抑制MDSC促进调节性T细胞的扩充和/或功能的能力。

[0402] 在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物使肿瘤中树突状细胞(DC)的数量减少和/或抑制树突状细胞的致耐受性功能(例如致耐受性作用)。举例来说,在不同的实施方案中,本文所述的抗体或组合物降低CD8+树突状细胞的致耐受性作用。

[0403] 在不同的实施方案中,如本文所述的抗体XPA.42.068、XPA.42.089或XPA.42.681或其变体中的任一种调节上述免疫活性中的一种或多种。

[0404] 如先前所述,TGF β 表达还已牵涉到如肾硬化、肺纤维化以及肝硬化的不同组织的纤维组织形成的发病;以及如慢性肝炎、类风湿性关节炎、血管再狭窄以及皮肤瘢痕瘤的不同病况的发病。在一些示例性实施方案中,使用本文所述的抗体来治疗纤维化或纤维化病状。示例性纤维化或纤维化疾病包括但不限于肾小球肾炎、成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、糖尿病、糖尿病性肾脏疾病、肝纤维化、肾纤维化、肺部纤维化、梗塞后心脏纤维化、纤维囊性疾病、纤维变性癌症、后壁心肌梗塞、左心室肥大、肺纤维化、肝硬化、静脉闭塞性

疾病、脊髓损伤后、视网膜和青光眼手术后、血管成形术后再狭窄、肾间质性纤维化、动静脉移植失败以及瘢痕形成。

[0405] 在一个实施方案中,治疗需要所述治疗的动物的这些病症或病状包括向所述动物施用有效量的抗体或包含本文所述抗体的组合物。

[0406] 可用本公开方法治疗的病状优选地存在于哺乳动物中。哺乳动物包括例如人类和其他灵长类动物,以及宠物或伴侣动物,如狗和猫;实验室动物,如大鼠、小鼠以及家兔;以及家畜,如马、猪、绵羊以及牛。

[0407] 非治疗性用途

[0408] 本公开的抗体可以被用作作用于靶标的亲和纯化剂或用于针对靶标蛋白的诊断测定法中,例如检测它在特定细胞、组织或血清中的表达。还可以将抗体用于体内诊断测定法中。一般来说,为了实现这些目的,使用放射性核素(如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S)对抗体进行标记以可以使用免疫闪烁扫描术对抗体进行定位。

[0409] 可以将本公开的抗体用于任何已知的测定方法中,如竞争性结合测定法、直接和间接夹心测定法(如ELISA)以及免疫沉淀测定法。Zola. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 第147-158页 (CRC Press, Inc. 1987)。还可以将抗体用于免疫组织化学以使用本领域已知的方法对组织或细胞样本进行标记。

[0410] 可以将靶标特异性抗体用于常规的免疫测定法中,所述免疫测定法包括而限于ELISA、RIA、FACS、组织免疫组织化学、蛋白质印迹法或免疫沉淀法,这些技术都是本领域熟知的技术。本公开的抗体可以用于检测人类和其他哺乳动物体内的靶标。本公开提供了一种用于检测生物样本中的靶标的方法,所述方法包括使生物样本与本公开的靶标特异性抗体接触以及对结合的抗体进行检测。在一个实施方案中,使用可检测标记直接对靶标特异性抗体进行标记。在另一个实施方案中,未对靶标特异性抗体(第一抗体)进行标记,而对可以结合靶标特异性抗体的第二抗体或其他分子进行标记。如本领域技术人员所熟知,选择能够特异性结合特定种类和类别的第一抗体的第二抗体。举例来说,如果靶标特异性抗体是人类IgG,那么二抗可以是抗人类IgG。可以结合抗体的其他分子包括而限于蛋白质A和蛋白质G,这两者均可商购自例如Pierce Chemical公司。

[0411] 预期将上文所公开的免疫测定法用于实现多种目的。举例来说,可以使用靶标特异性抗体来检测细胞培养物中的细胞中或细胞表面上或分泌到组织培养基中的靶标。可以使用靶标特异性抗体测定已经过不同化合物处理的细胞的表面上或分泌到组织培养基中的靶标的量。可以使用这种方法鉴定可用于抑制或活化靶标表达或分泌的化合物。根据这种方法,用测试化合物将细胞的一个样本处理一段时间,同时保持另一个样本未经过处理。如果将测量靶标的总水平,那么使细胞溶解并且使用上述免疫测定法中的一种对总靶标水平进行测量。将经过处理的细胞中的总靶标水平与未经过处理的细胞相比较以确定测试化合物的作用。

[0412] 标记

[0413] 在一些实施方案中,对抗体物质进行标记以有助于对它进行检测。“标记”或“可检测部分”是可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理手段检测的组合物。举例来说,适用于本公开中的标记包括放射性标记(例如 ^{32}P)、荧光团(例如荧光素)、电子致密试剂、酶(例如ELISA中常用的酶)、生物素、毛地黄毒苷,或者可以例如通过将放射性标

记并入到半抗原或肽中而可以被检测到或可以用于检测与半抗原或肽具有特异性反应性的抗体的半抗原和蛋白质。

[0414] 适用于本发明中的标记的实例包括但不限于荧光染料(例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红(Texas red)、若丹明等)、放射性标记(例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶以及ELISA中所常用的其他酶),以及比色标记,如胶态金、有色玻璃或塑料珠粒(例如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)。

[0415] 可以根据本领域熟知的方法使标记与测定的所需组分直接或间接偶合。优选地,在一个实施方案中,使用用于缀合根据本公开的活性剂的异氰酸酯试剂使标记与生物聚合物共价结合。在本公开的一个方面,可以使用本公开的双功能异氰酸酯试剂使标记与生物聚合物缀合以形成未与活性剂连接的标记生物聚合物缀合物。标记生物聚合物缀合物可以被用作中间体来合成根据本公开的经过标记的缀合物或可以被用于检测生物聚合物缀合物。如上文所示,可以使用多种多样的标记,其中对标记的选择取决于所需的灵敏度、与测定的所需组分缀合的简便性、稳定性要求、可供使用的仪器以及处置规定。经常通过间接手段连接非放射性标记。一般来说,使配体分子(例如生物素)与分子共价结合。然后使配体与另外的分子(例如抗生物素蛋白链菌素分子)结合,所述另外的分子本身就是可检测的或与信号系统(如可检测酶、荧光化合物或化学发光化合物)共价结合。

[0416] 还可以使本公开的化合物与信号产生化合物直接缀合,例如通过与酶或荧光团缀合。适用作标记的酶包括但不限于水解酶,特别是磷酸酶、酯酶以及糖苷酶;或氧化酶,特别是过氧化物酶。适用作标记的荧光化合物(即荧光团)包括但不限于荧光素和它的衍生物、若丹明和它的衍生物、丹磺酰、伞酮等。适合的荧光团的另外的实例包括但不限于伊红(eosin)、TRITC-胺、奎宁(quinine)、荧光素W、吖啶黄(acridine yellow)、丽丝胺若丹明(lissamine rhodamine)、B磺酰氯红突素(B sulfonyl chloride erythroscein)、三(联吡啶)钌、德克萨斯红、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、黄素腺嘌呤二核苷酸等。适用作标记的化学发光化合物包括但不限于萤光素和2,3-二氢酞嗪二酮,例如鲁米诺(luminol)。关于可以用于本公开方法中的不同的标记或信号产生系统的综述,参见美国专利号4,391,904。

[0417] 用于检测标记的手段是本领域技术人员熟知的。因此,例如,在标记具放射性的情况下,用于检测的手段包括闪烁计数器或如自动射线照相术中的照相胶片。当标记是荧光标记时,它可以通过以适当波长的光激发荧光染料并且检测所产生的荧光来检测。可以通过使用如电荷耦合装置(CCD)或光电倍增器等电子检测器来目视检测荧光。类似地,可以通过提供酶的适当底物并且检测所生成的反应产物来检测酶标记。可以通过观测与标记相关的颜色来简单地检测比色或化学发光标记。适用于本公开方法中的其他标记和检测系统对于本领域技术人员将是显而易见的。这些经过标记的调节剂和配体可以用于诊断疾病或健康状况。

[0418] 药物组合物的配制

[0419] 为了向人类或测试动物施用本公开的抗体物质,优选地将抗体物质配制成包含一种或多种药学上可接受的载体的组合物。短语“药学上或药理学上可接受的”是指当使用如下文所述的本领域熟知的途径施用时不会产生过敏或其他不利反应的分子实体和组合物。“药学上可接受的载体”包括任何和所有临床上有用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0420] 另外,化合物可以与水或常见的有机溶剂形成溶剂合物。也涵盖了这些溶剂合物。

[0421] 通过任何适合的手段(包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内以及鼻内施用)施用抗体,并且必要时对于局部治疗,通过病变内施用来施用。肠胃外输注包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮内或皮下施用。另外,适当地通过脉冲输注来施用抗体,特别是在抗体剂量递减的情况下。优选地通过注射,最优选地静脉内或皮下注射进行给药,这在某种程度上取决于施用是短期的还是长期的。涵盖了其他施用方法,包括局部,特别是经皮、经粘膜、经直肠、口服或局部施用(例如经由被放置在靠近所需部位处的导管)。注射,尤其是静脉内注射是优选的。

[0422] 含有本公开的抗体物质作为活性成分的本公开的药物组合物可以含有药学上可接受的载体或添加剂,这取决于施用途。这些载体或添加剂的实例包括水、药学上可接受的有机溶剂、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯树胶、酪蛋白、明胶、琼脂、双甘油、甘油、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白(HSA)、甘露醇、山梨糖醇、乳糖、药学上可接受的表面活性剂等。所使用的添加剂在适当时从(但不限于)上述试剂或其组合中选出,这取决于本公开的剂型。

[0423] 药物组合物的制剂将根据所选择的施用途而不同(例如溶液、乳剂)。包含有待施用的抗体的适当的组合物可以在生理学上可接受的媒介物或载体中制备。对于溶液或乳剂,适合的载体包括例如水溶液或醇/水溶液、乳剂或混悬液,包括生理盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物可以包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖以及氯化钠、乳酸林格氏液(lactated Ringer's)或不挥发性油。静脉内媒介物可以包括不同的添加剂、防腐剂或流体、营养素或电解质补充剂。

[0424] 多种水性载体,例如无菌磷酸盐缓冲生理盐水溶液、抑菌水、水、缓冲水、0.4%生理盐水、0.3%甘氨酸等,并且可以包括用于增强稳定性的其他蛋白质,如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等,所述蛋白质经过适度的化学修饰等。

[0425] 通过将具有所需纯度的抗体与任选的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编著(1980))混合,以冻干制剂或水溶液的形式制备抗体的治疗性制剂以用于储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐以及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖以及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0426] 本文的制剂还可以含有治疗具体的适应症所需的超过一种活性化合物,优选地具有互补活性并且不会彼此不利地影响的活性化合物。这些分子适当地以有效用于预期目的

的量组合存在。

[0427] 还可以将活性成分包封于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别在胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米粒子以及纳米胶囊)中或粗乳剂中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这些技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编著(1980)中。

[0428] 有待用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可以容易地通过经由无菌滤膜过滤来实现。

[0429] 水性混悬液可以含有活性化合物与适用于制造水性混悬液的赋形剂的混合物。这些赋形剂是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶以及阿拉伯树胶;分散剂或湿润剂可以是天然存在的磷脂,例如卵磷脂,或环氧烷与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧化乙烯硬脂酸酯),或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物(例如十七烷基-烯氧十六醇(heptadecaethyl-eneoxycetanol)),或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物(如聚氧化乙烯山梨糖醇单油酸酯),或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物(例如聚乙烯失水山梨糖醇单油酸酯)。水性混悬液还可以含有一种或多种防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯。

[0430] 可以将本公开的抗体冻干以用于储存并且在临用前在适合的载体中复原。已显示这种技术在常规免疫球蛋白的情况下是有效的。可以使用任何适合的冻干和复原技术。本领域技术人员应了解,冻干和复原可能会导致抗体活性不同程度的损失并且可能必须对用量进行调整来补偿。

[0431] 适用于通过添加水来制备水性混悬液的可分散粉剂和颗粒剂提供了活性化合物与分散剂或湿润剂、悬浮剂以及一种或多种防腐剂的混合物。适合的分散剂或湿润剂以及悬浮剂的实例有上文已提及的那些。

[0432] 抗体在这些制剂中的浓度可以在广泛范围内变化,例如从低于约0.5重量%,通常等于或至少约1重量%至多达15重量%或20重量%,并且根据所选择的具体施用方式,主要基于流体体积、粘度等来进行选择。因此,可以制备用于肠胃外注射的典型药物组合物以含有1ml无菌缓冲水和50mg抗体。可以制备用于静脉内输注的典型组合物以含有250ml的无菌林格氏溶液和150mg抗体。用于制备可肠胃外施用的组合物的实际方法将是本领域技术人员已知或显而易见的并且更详细地描述于例如Remington's Pharmaceutical Science,第15版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.(1980)中。抗体的有效剂量在每次施用每公斤体重0.01mg至1000mg的范围内。

[0433] 药物组合物可以呈无菌可注射水性、油性混悬液、分散液或用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂的形式。可以使用上文所提及的那些适合的分散剂或湿润剂以及悬浮剂,根据已知的技术配制混悬液。无菌可注射制剂也可以是于无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液,例如于1,3-丁二醇中的溶液。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇以及液体聚乙二醇等)、其适合的混合物、植物油、林格氏溶液以及等渗氯化钠溶液的溶剂或分散介质。另外,无菌不挥发性油被常规地用作溶剂或悬浮介质。为了实现这个目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,脂肪酸(如油酸)可以用于制备注射剂。

[0434] 在所有情况下,所述形式必须是无菌的并且必须具有流动性以达到易于注射的程

度。可以例如通过使用如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。它在制造和储存的条件下必须是稳定的并且必须经过防腐处理以对抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用。可以通过不同的抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,希望包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来使可注射组合物的吸收延长。

[0435] 可以用摄取或吸收增强剂配制可用于施用的组合物来增强它们的功效。这些增强剂包括例如水杨酸盐、甘胆酸盐/亚油酸盐、乙醇酸盐、抑肽酶、杆菌肽、SDS、癸酸盐等。参见例如Fix(J.Pharm.Sci.,85:1282-1285(1996))以及Oliyai和Stella(Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.,32:521-544(1993))。

[0436] 涵盖了用于抑制靶标活性的抗体组合物,所述靶标活性包括靶标与它的同源受体或配体结合、靶标介导的信号转导等。具体来说,所述组合物在大致上无副作用的浓度下展现出抑制特性,并且因此可用于长期治疗方案。举例来说,将抗体组合物与另一种更具毒性的细胞毒性剂共同施用可以对所治疗的病状或病症实现有益的抑制作用,同时有效地减少对患者的毒性副作用。

[0437] 另外,所涵盖的用于本公开中的组合物的亲水性和疏水性特性是均衡的,从而增强了它们用于体外并且尤其用于体内用途的效用,而缺乏这种平衡的其他组合物的效用大致上较小。确切地说,所涵盖的用于本公开中的组合物在水性介质中具有适度的溶解性,从而使得所述组合物能够在体内被吸收和生物利用,同时在脂质中也具有一定程度的溶解性,从而允许所述化合物穿过细胞膜到达假定的作用部位。因此,所涵盖的抗体组合物在可以将它们递送到具有靶标抗原活性的部位时具有最大限度的有效性。

[0438] 施用和给药

[0439] 在一个方面,本公开的方法包括施用药物组合物的步骤。在某些实施方案中,药物组合物是无菌组合物。

[0440] 本公开的方法可以使用任何医学上接受的手段来实施以将治疗剂直接或间接地引入到哺乳动物受试者体内,所述手段包括但不限于注射、口服摄取、鼻内、局部、经皮、肠胃外、吸入喷雾、经阴道或直肠施用。如本文所用的术语肠胃外包括皮下、静脉内、肌肉内和脑池内注射以及导管或输注技术。也涵盖了通过皮内、乳腺内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射和/或在具体部位进行手术植入所进行的施用。

[0441] 在一个实施方案中,在需要治疗的癌症、纤维化或患病组织的部位处,通过直接注射到所述部位中或经由可以在内部递送制剂的持续递送或持续释放机构进行施用。举例来说,在被植入到癌症、纤维化或患病组织或器官的部位附近或部位处的本公开制剂中可以包括能够持续递送组合物(例如可溶性多肽、抗体或小分子)的生物可降解微球体或胶囊或其他生物可降解聚合物配置。

[0442] 也可以在多个部位向患者递送治疗性组合物。多次施用可以同时进行或可以在一段时间内施用。在某些情况下,提供治疗性组合物的连续流是有益的。可以定期施用另外的疗法,例如每小时、每天、每周、每2周、每3周、每月或以更长的时间间隔施用一次。

[0443] 在本公开中还涵盖了施用多种药剂,如将抗体组合物连同如本文所述的第二药剂一起施用,所述第二药剂包括但不限于化学治疗剂或可用于治疗纤维化的药剂。

[0444] 在给定给药中抗体组合物的量可以根据正在接受疗法施用的个体的大小以及所治疗的病症的特征而变化。在示例性治疗中,可能需要施用约1毫克/天、5毫克/天、10毫克/天、20毫克/天、50毫克/天、75毫克/天、100毫克/天、150毫克/天、200毫克/天、250毫克/天、500毫克/天或1000毫克/天。这些浓度可以作为单次剂型或作为多次剂量施用。首先在动物模型中,然后在临床试验中进行的标准剂量-反应研究揭示了用于具体的疾病病况和患者群体的最佳剂量。

[0445] 还将显而易见的是,如果将传统治疗剂与本公开的治疗剂组合施用,那么可以对剂量作出改动。

[0446] 试剂盒

[0447] 作为另一个方面,本公开包括了试剂盒,所述试剂盒包括一种或多种化合物或组合物,所述化合物或组合物以某种方式包装以有助于将它们用于实施本公开的方法。在一个实施方案中,这种试剂盒包括本文所述的化合物或组合物(例如包含单独的靶标特异性抗体或靶标特异性抗体与第二药剂的组合物),所述化合物或组合物被包装在如密封瓶或器皿的容器中,所述容器上附着有或所述包装中包括了标签,所述标签描述了所述化合物或组合物在实施所述方法中的使用。优选地,所述化合物或组合物以单位剂型包装。所述试剂盒可以进一步包括一种适用于根据特定的施用途径或为了实施筛选测定法而施用组合物的装置。优选地,所述试剂盒容纳描述了抗体组合物的使用的标签。

[0448] 从以下实施例,本公开的另外的方面和细节将是显而易见的,所述实施例意图具有说明性而非限制性。

[0449] 实施例

[0450] 实施例1.从抗体噬菌体展示文库中分离抗TGF β 抗体

[0451] 为了分离一组能够中和人类TGF β 活性的抗体,如下文所述使用TGF β 蛋白的三种亚型,即TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3对人类抗体噬菌体展示文库进行淘选。

[0452] 淘选:

[0453] 首先利用制造商的方案,通过使用NHS-PEG4-生物素(Pierce,Rockford,IL)进行生物素化来制备TGF β 抗原(PeproTech,Rocky Hill,NJ,#100-21.、100-35B、100-36E)。简单地说,通过添加20 \times PBS以使pH值达到约6.0来中和储存于低pH值缓冲液中的TGF β 抗原。添加30倍摩尔过量的上述预先活化的生物素并且混合,然后在室温下保持20分钟。然后,添加等体积的10mM甘氨酸(pH 3.0)并且立即使用6kDa至8kDa截留透析单元针对10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 3.5)对样本进行透析。利用可溶性淘选法,使用生物素化的TGF β 对Fab噬菌体展示文库(XOMA,Berkeley,CA)进行淘选。在三轮选择中单独地对每种TGF β 亚型进行淘选。单独地对 κ 和 λ 子文库进行淘选。

[0454] 对于第一轮噬菌体淘选,在冰上于1mL 5%牛奶/PBS中将文库的50 \times 文库等效物(约 2×10^{12} cfu)封闭1小时。通过将经过封闭的噬菌体加入到涂有抗生物素蛋白链菌素的磁性DYNABEADS ® M-280中并且在旋转下孵育30分钟以从经过封闭的噬菌体中淘汰与抗生物素蛋白链菌素结合的噬菌体。再次重复该淘汰步骤。使用磁体将珠粒与噬菌体分离。在淘汰步骤同时,通过在室温下在旋转下孵育30分钟使200皮摩尔的生物素化的TGF β 结合涂有抗生物素蛋白链菌素的磁性DYNABEADS ® M-280。在结合后,使用5%牛奶-PBS将生物素化的TGF β 珠粒洗涤两次。通过将淘汰的噬菌体加入到与磁性抗生物素蛋白链菌素珠粒

结合的生物素化的TGFβ中并且在旋转下孵育1.5小时至2小时来进行选择。在选择后,使用Kingfisher磁性粒子处理器(Thermo Scientific)从珠粒洗去未结合的噬菌体,所述磁性粒子处理器经过编程而使用PBS-0.1%TWEEN将珠粒快速地洗涤3次,继而用PBS再快速地洗涤3次。在洗涤步骤后,通过添加100mM三乙胺并且在室温下在旋转下孵育30分钟将结合的噬菌体从珠粒上洗脱。通过添加等体积的1M Tris-HCl (pH 7.4) 来中和洗脱的噬菌体。然后将洗脱并且经过中和的噬菌体收集到50mL锥形离心管(Falcon tube) (Falcon, 编号352070) 中并且用于对对数生长的TG1细菌细胞(OD_{600} 约0.5) 进行感染。在37℃下在不进行振荡的情况下感染30分钟,继而在37℃下在以90rpm进行振荡下再孵育30分钟。将细胞接种于补充有100μg/mL羧苄青霉素(Carbenicillin) 和2%葡萄糖的2YT培养基(2YTCG) 的琼脂生物测定培养板上并且在30℃下孵育过夜以使得菌苔生长过夜。

[0455] 为了准备用于下一轮的输入物,通过使用MK07辅助噬菌体进行超感染来营救100×上一轮输出物。这是通过使用从上一轮淘选的输出物中刮下的细胞对2YTCG培养基进行接种来进行的。测量起始培养物的 OD_{600nm} 并且进行调节以反映约0.05的起始 OD_{600nm} 。在37℃下在振荡下培养细胞直到细胞达到对数生长期(OD_{600nm} 约0.5) 为止。在37℃下,在不进行振荡的情况下,使用MK07(New England Biolabs,MA) 在感染复数(MOI) = 约20下将细胞感染30分钟,继而在37℃下在以150rpm进行振荡下再孵育30分钟。在37℃下进行感染后,使细胞沉淀并且转移至补充有50μg/mL卡那霉素和100μg/mL羧苄青霉素的新2YT培养基(2YTCK) 中。在25℃下将培养物培养过夜。通过离心将噬菌体与细胞和碎片分离,并且回收所得上清液并且用于下一轮淘选的输入物。通过被用于每一轮淘选的输入物的量以及所得噬菌体输出物的滴度来监测选择富集。

[0456] 对于第二轮和第三轮淘选,除了以下不同之处外,使用在第1轮中所遵循的相同的溶液相方案。被用于第2轮和第3轮淘选中的噬菌体输入物的量是约 1.0×10^{11} cfu。对于第2轮,在选择中使用100皮摩尔的生物素化的抗原,并且对于第3轮,使用50皮摩尔的生物素化的抗原。在选择后使用Kingfisher从珠粒上洗去未结合的噬菌体。在第2轮中,Kingfisher经过编程而使用PBS-0.1%TWEEN将珠粒洗涤3次,持续2分钟,继而使用1ml PBS洗涤2分钟,重复3次。在第3轮淘选中,使用PBS-0.1%TWEEN将珠粒洗涤3次,持续6分钟,继而用PBS进行两次4分钟洗涤和一次6分钟洗涤。

[0457] 通过标准方法制备含有分泌的抗体片段的细菌周质提取物以用于筛选TGFβ结合剂。将单独的菌落挑取到填充有补充有100μg/mL羧苄青霉素和0.1%葡萄糖的2YTC培养基的96孔培养板中。将培养物在37℃下在振荡下培养直到达到对数生长期(OD_{600nm} = 0.5) 为止。然后通过添加1mM(最终) IPTG并且在25℃下在振荡下孵育过夜来诱导菌落产生可溶性片段抗体。使用标准方法,通过添加1:3体积比的冰冷PPB溶液(Teknova,Hollister,CA) 和含完全无EDTA蛋白酶抑制剂混合片的双蒸水(ddH_2O) 以从经过诱导的细胞制备含有可溶性片段抗体的周质提取物(PPE)。然后使用PPE筛选TGF-β结合剂。

[0458] 筛选:

[0459] 使用两种替代性筛选测定形式来鉴定结合TGFβ的克隆,包括与所有三种TGFβ亚型结合并且在序列方面独特的克隆。第一种筛选测定法使用了基于培养板的免疫测定法而另一种筛选测定法是使用SPR筛选法进行的。基于培养板的测定法包括在室温下使用于PBS缓冲液中的1μg/mL的抗His抗体克隆AD.1.10(R&D Systems,Minneapolis,MN) (1μg/mL) 涂布

不透明的384孔白色EIA培养板,持续四小时。然后在PBS-TWEEN中将培养板洗涤3次,然后在室温下使用含0.5%BSA的PBS-TWEEN封闭1小时。随后,添加30微升/孔的生物素化的TGF β ,其中TGF β 1和TGF β 2是0.1 μ g/mL,而TGF β 3是0.2 μ g/mL,稀释于封闭缓冲液中。然后,添加30 μ L周质提取物并且在4 $^{\circ}$ C下在平缓的培养板振荡器上孵育过夜。在PBS-TWEEN中将培养板洗涤3次,然后将50微升/孔的在DELFI A测定稀释缓冲液(PerkinElmer)中稀释的2.5 μ g/mL抗生物素蛋白链菌素-镧(SA-Eu,PerkinElmer)加入每个孔中并且在室温下在振荡器上孵育30分钟。使用PBS-TWEEN将培养板洗涤7次,并且添加50微升/孔的DELFI A增强试剂(PerkinElmer),并且在振荡器上在室温下放置8分钟,然后在Molecular Devices FlexStation 3培养板读数器上以TRF模式进行读数,其中收集时间是200-1200 μ s,并且激发波长=345nm,发射波长=618nm,并且截止波长=590nm,高PMT设置,20次读数孔,将信号是阴性PPE对照的信号的2.1倍以上的样本认为呈阳性。

[0460] 通过BIACORE A100直接结合测定法来进行SPR测定法。在这个测定中,使用BIACORE胺偶合试剂盒(GE Healthcare,Piscataway,NJ),经由标准胺偶合化学方法制备CM5BIACORE芯片。将TGF β 抗原在乙酸盐(pH 4.0)中稀释至6 μ g/mL并且注射7分钟(点1,是TGF β 1)和10分钟(点2和4,是TGF β 2和TGF β 3)。这个操作将3400RU与4800RU之间的每种TGF β 抗原固定化。使用1M乙醇胺使样本去活化。将周质提取物与含2mg/mLBSA的HBS-EP+(Teknova)1:1稀释并且经由0.2 μ M Millex GV滤板(Millipore)过滤,然后以30微升/分钟注射240秒,解离30秒。在每次PPE注射后,注射100mM HCl,持续10秒以再生。使用BIACORE A100软件中的稳定早期报告点来评价PPE的结合水平。针对每种TGF β 亚型独立地测定出临界水平均在视觉上高于背景水平。针对TGF β 1、TGF β 2以及TGF β 3的RU临界值分别是245、175以及125。

[0461] 亲和力成熟:

[0462] 对一种抗体,即XPA.42.068进行亲和力成熟以提高它针对TGF β 3的亲和力和效力,所述抗体针对TGF β 1和TGF β 2的结合和中和活性显著大于针对TGF β 3的结合和中和活性。使用TGF β 2和TGF β 3对由亲和力成熟产生的序列变体的文库进行淘选,其中主要针对改良的TGF β 3结合来筛选输出克隆。

[0463] 对于筛选,通过BIACORE A100直接结合测定法来进行SPR测定法。在这个测定中,使用BIACORE胺偶合试剂盒,经由标准胺偶合化学方法制备CM5BIACORE芯片。将TGF β 抗原在乙酸盐(pH 4.0)中稀释至1 μ g/mL并且注射5分钟(点1和5,分别是TGF β 3和TGF β 1)和8分钟(点2,是TGF β 2)。这个操作将200RU与450RU之间的每种TGF β 固定化。使用1M乙醇胺使样本去活化。将周质提取物与含2mg/mL BSA的HBS-EP+1:1稀释并且经由0.2 μ m Millex GV滤板(Millipore)过滤,然后以30微升/分钟注射240秒,解离600秒。在每次PPE注射后,注射100mM HCl,持续10秒以再生。将已扣除参照的数据绘制成曲线并且目视检查看起来似乎具有更大稳定性或更高结合水平的克隆。在进一步表征研究中包括了一种被命名为.XPA.42.681的衍生克隆,所述克隆据证明与TGF β 3的结合有所增强。

[0464] 将所选择的克隆重排成IgG2抗体。将所选择的Fab片段的可变重链(VH)和可变轻链(VL)进行PCR扩增,克隆到含有抗体恒定区序列的质粒载体中,并且使用标准方法短暂地转染到293E细胞中以产生用于进一步表征(包括下文所述的研究在内)的物质。

[0465] 实施例2.测量TGF β 抗体的结合亲和力

[0466] 使用表面等离子体共振 (SPR) 技术对抗体针对TGFβ亚型TGFβ1、TGFβ2以及TGFβ3的结合亲和力(KD)、解离速率(kd)以及缔合速率(ka)进行表征。使用两种方法进行分析。一种方法是抗原直接固定化法,其中将TGFβ蛋白以低密度固定于表面,注射多个浓度的抗体以进行动力学分析。另一种方法是通过注射不同浓度的所注射TGFβ蛋白进行的固定化抗体法。

[0467] 固定化抗体动力学方法:

[0468] 在BIAcore 2000系统(GE Healthcare)上使用CM4感测器芯片(GE Healthcare)。在固定化之前,通过使用100mM HCl、甘氨酸(pH 2.0)、50mM NaOH以及运行缓冲液进行两次30秒注射(每次以50微升/分钟的流速进行注射)来对芯片进行预处理。用于固定化的运行缓冲液是含10mM Hepes、150mM氯化钠、3mM EDTA以及0.05%聚山梨醇酯20的HEPES缓冲生理盐水(HBS-EP+) (Teknova)。通过将新混合的0.1M N-羟基丁二酰亚胺(NHS)与0.4M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)的1:1溶液以10微升/分钟注射7分钟来使芯片表面活化。在活化注射后,将于乙酸盐(pH 4.5)中的1μg/mL抗TGFβ抗体以10微升/分钟注射1分钟,其中进行注射以达到120RU。将1M盐酸乙醇胺-NaOH(pH 8.5)注射8分钟以封闭表面。所使用NHS、EDC以及乙醇胺均来自BIAcore胺偶合试剂盒。

[0469] 使用补充有1mg/mL BSA(Sigma Aldrich, St. Louis MO)的上述HBS-EP+缓冲液的经过充分脱气的形式的运行缓冲液进行动力学分析。以50微升/分钟进行TGFβ样本注射,持续4分钟,解离时间是900秒。以10nM、2nM、0.4nM、0.08nM(350ng/mL,进行5倍连续稀释)注射每种TGFβ蛋白(TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3),使用空白对照包围每个浓度系列并且一式四份进行注射。然后通过将含100mM HCl的3M MgCl₂注射三次,每次30秒,继而最终进行30秒空白缓冲液注射来进行再生。

[0470] 使用Scrubber2(BioLogic Software, Campbell Australia)对数据进行分析并且通过扣除空白流槽数据和包围的空白注射的平均值进行双重参照。通过同时拟合(KD)、解离速率(kd)以及缔合速率(ka)来对数据进行拟合,并且示出于下表2中。在表2中还包括了被命名为BM-1的先前经过测量的对比抗体(1D11, R&D Systems MAB1835)的数据。BM-1的数据是在BIAcore A100上产生的。简单地说,将BM-1抗体以约100RU的密度捕捉于高密度家兔抗小鼠Fc CM5芯片表面(GE Healthcare)上。以30微升/分钟注射浓度与上述浓度相同的TGFβ蛋白。对这些数据进行双重参照并且在BIAcore A100软件中进行分析。

[0471] 表2. 由利用固定化的抗体和注射的TGFβ进行的测定法获得的亲和力数据

抗体	TGFβ1			TGFβ2			TGFβ3		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
XPA.42.068	1.53E+07	9.05E-04	59 pM	1.04E+07	5.35E-04	51 pM	8.45E+06	3.84E-03	455 pM
XPA.42.089	4.40E+07	1.67E-04	3.8 pM	1.62E+07	4.14E-04	25 pM	7.70E+06	1.09E-02	1.4 nM
XPA.42.681	4.25E+07	7.20E-05	1.7 pM	1.71E+07	4.99E-05	2.9 pM	1.30E+07	7.50E-05	5.7 pM
BM-1	1.90E+07	1.40E-03	72 pM	1.10E+07	2.00E-03	170 pM	6.50E+06	3.10E-04	48 pM

[0473] 如在这种测定法中使用固定化的抗体所测量的亲和力数据显示,XPA.42.681在任何抗体当中对三种TGFβ亚型中的每一种均具有最强(最紧密)的结合作用,并且还以相似的亲和力结合每种TGFβ亚型。另外,与BM-1抗体相比,抗体XPA.42.068和XPA.42.089与TGFβ1和TGFβ2亚型的结合作用是类似的或更强,但与BM-1抗体相比或相对于与TGFβ1和TGFβ2的结合作用,对TGFβ3亚型显示出显著较小的结合作用。

[0474] 固定化TGFβ亲和和力法:

[0475] 在BIACORE 2000系统上使用具有平面型-COOH表面的CM1感测器芯片(GE Healthcare)。在固定化之前,通过使用100mM HCl、甘氨酸(pH 2.0)、50mM NaOH、1% SDS以及运行缓冲液进行两次30秒注射(每次以50微升/分钟的流速进行注射)来对芯片进行预处理。用于固定化的运行缓冲液是含10mM Hepes、150mM氯化钠、3mM EDTA以及0.05%聚山梨醇酯20的HEPES缓冲生理盐水(HBS-EP+)。通过将新混合的0.1M N-羟基丁二酰亚胺(NHS)与0.4M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)的1:1溶液以20微升/分钟注射4分钟来使芯片表面活化。在活化注射后,以20微升/分钟注射0.1μg/mL TGFβ于乙酸盐(pH 4.0)中的溶液,持续数分钟。每种TGFβ在它自己的流槽上利用单独的活化步骤,以使得TGFβ1固定于Fc2上,TGFβ2固定于Fc3上,并且TGFβ3固定于Fc4上,使用Fc1作为活化和失活的空白对照。以一系列1分钟至2分钟注射的形式进行TGFβ注射,在每次注射之间查看固定化的水平。每种TGFβ配体的目标固定化密度是30RU。在TGFβ固定化注射后,将1M盐酸乙醇胺-NaOH(pH 8.5)注射4分钟以封闭表面。所使用的NHS、EDC以及乙醇胺来自于BIACORE胺偶合试剂盒并且TGFβ1、TGFβ2以及TGFβ3来自于R&D Systems。

[0476] 对于亲和力分析,将运行缓冲液转变成补充有1mg/mL BSA(Sigma Aldrich, St.Louis MO)的上述HBS-EP+缓冲液的经过充分脱气的形式。将每种抗体在运行缓冲液中稀释至5μg/mL(33.3nM)并且制备4份五倍连续稀释液,从而对于每种抗体设立33.33nM、6.67nM、1.33nM、267pM以及53pM的浓度。然后使用Kinject配置以50微升/分钟将这些抗体注射四分钟,解离时间是900秒。然后通过以50微升/分钟注射12μL的100mM HCl(14.4秒),继而进行18秒的缓冲液注射来进行再生。在所有流槽上同时进行注射并且按一式四份进行样本注射,对于每种抗体使用空白注射包围每组递减浓度注射组。这意味着在第二次注射相同样本之前,将所有其他浓度的所有抗体均注射一次。

[0477] 使用Scrubber2(BioLogic Software,Campbell Australia)对数据进行分析并且通过扣除空白流槽数据和包围的空白注射的平均值进行双重参照。通过同时拟合(KD)、解离速率(kd)以及缔合速率(ka)来对数据进行拟合,并且示出于下表3中。

[0478] 表3. 由利用固定化的TGFβ和注射的抗体进行的测定法获得的亲和力数据

抗体	TGFβ1			TGFβ2			TGFβ3		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
XPA.42.068	5.44E+06	1.70E-03	313 pM	7.30E+06	7.98E-04	109 pM	5.45E+06	6.96E-03	1.3 nM
XPA.42.089	5.98E+06	1.06E-03	177 pM	4.80E+06	1.39E-03	290 pM	3.40E+06	5.70E-02	>17 nM
XPA.42.681	1.14E+07	3.63E-04	32 pM	1.28E+07	3.94E-04	31 pM	1.23E+07	6.65E-04	54 pM
BM-1	1.28E+07	3.90E-03	304 pM	7.00E+06	6.84E-03	977 pM	5.05E+06	9.46E-04	188 pM

[0480] 与表2中的固定化的抗体结果一致,在使用固定化的抗原进行的测定法中所测量的亲和力数据(表3)也显示,XPA.42.681在任何抗体当中对三种TGFβ亚型中的每一种均具有最强(最紧密)的结合作用,其中对每种TGFβ亚型的亲和力相似。另外,与BM-1相比,XPA.42.068和XPA.42.089与TGFβ1和TGFβ2亚型的结合作用是类似的或更强,但与BM-1抗体相比或相对于与TGFβ1的结合作用,与TGFβ3亚型的结合作用显著较小。使用固定化抗体测定法所测量的速率常数相比于使用固定化抗原测定法所测量的速率常数的差异可能由系统固有的复杂性所引起,然而每种测定法均提供了相对高质量的动力学数据和跨越TGFβ亚型以及在抗体间相对于彼此在结合特性方面的一致性。

[0481] 实施例3. 测量TGFβ抗体对受体的竞争

[0482] 通过SPR竞争测定法对抗体抑制或阻断三种TGFβ配体中的每一种与TGFβ受体结合的能力进行表征。TGFβ经由II型TGFβ受体(TGFβ-RII)进行信号转导,所述II型TGFβ受体是一种丝氨酸苏氨酸激酶跨膜蛋白并且需要I型TGFβ受体蛋白(TGFβ-RI)的细胞质缔合以进行活化。TGFβ-RI的配体结合作用尚不明确并且TGFβ-RI的重组形式在所测试的浓度下未表现出与TGFβ1、TGFβ2或TGFβ3配体或者那些配体的TGFβ-RII结合形式中的任一种发生任何结合,并且因此不能在受体竞争实验中作出评价。III型TGFβ受体(TGFβ-RIII)具有膜结合形式和可溶性形式两种并且被认为不牵涉TGFβ的信号转导。TGFβ-RIIb是在N端附近含有具有26个氨基酸的插入物的剪接型变体并且具有能够与所有三种TGFβ亚型以良好亲和力结合的独特特性。TGFβ-RII仅与TGFβ1和TGFβ3配体紧密结合,而TGFβ-RIII与TGFβ2配体的结合最佳。

[0483] 在BIAcore 2000系统上使用CM5感测器芯片(GE Healthcare)。在固定化之前,通过使用100mM HCl和50mM NaOH进行若干次30秒注射(每次以50微升/分钟的流速进行注射)来对芯片进行预处理。用于固定化的运行缓冲液是含10mM Hepes、150mM氯化钠、3mM EDTA以及0.05%聚山梨醇酯20的HEPES缓冲生理盐水(HBS-EP+)。通过将新混合的0.1M N-羟基丁二酰亚胺(NHS)与0.4M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)的1:1溶液以10微升/分钟注射7分钟来使芯片表面活化。在活化注射后,以20微升/分钟注射于乙酸盐(pH 4.5)中的5μg/mL的TGFβ-RII、TGFβ-RIIb或TGFβ-RIII(R&D Systems),持续4分钟,并且使得将1000RU至4000RU的每种TGFβ受体固定化。然后,将1M盐酸乙醇胺-NaOH(pH 8.5)注射8分钟以封闭表面。所使用的NHS、EDC以及乙醇胺均来自BIAcore胺偶合试剂盒。Fc1是活化和去活化的对照。

[0484] 使用补充有1mg/mL BSA的上述HBS-EP+缓冲液的经过充分脱气的形式的运行缓冲液进行竞争测定法。将TGFβ配体以100ng/mL(10nM)至40ng/mL(4nM)用于除空白对照之外的所有注射中,并且与10μg/mL(66.6nM)的竞争抗体和对照抗体一起制备。在开始运行BIAcore之前,在室温下使样本达到平衡,持续40分钟。然后以10微升/分钟注射平衡了的样本,持续2分钟。每一个循环通过将甘氨酸(pH 2.5)以50微升/分钟注射一次,持续9.6秒(8μL)来进行再生。至少一式两份运行样本并且分析所结合的TGFβ的水平。

[0485] 如下表4中所示,抗体XPA.42.068、XPA.42.089、XPA.42.681以及BM-1对比物的结果表明这些抗体中的每一种均阻断了所有三种TGFβ配体与TGFβ-RII和TGFβ-RIII受体的缔合,并且没有产生明显的差别。这种受体竞争谱在经过测试但数据在本公开中未示出的所有其他抗体当中并非是普遍存在的。

[0486] 表4. 受体竞争测定EC50 (nM抗体)

	XPA.42.068	XPA.42.089	XPA.42.681	BM-1
TGFβ1/TGFβ-RII	2.0E-09	1.7E-09	2.3E-09	2.4E-09
TGFβ2/TGFβ-RII	2.2E-09	1.8E-09	1.7E-09	2.8E-09
[0487] TGFβ3/TGFβ-RII	1.4E-09	3.4E-08	1.2E-09	1.6E-09
TGFβ1/TGFβ-RIII	6.0E-10	1.2E-09	2.2E-09	2.1E-09
TGFβ2/TGFβ-RIII	2.4E-09	1.6E-09	2.1E-09	2.5E-09
TGFβ3/TGFβ-RIII	1.9E-09	3.1E-08	1.1E-09	1.4E-09

[0488] XPA.42.068、XPA.42.089、XPA.42.681以及BM-1抗体在受体竞争中的效力一般与

它们对不同的TGFβ亚型的亲和力相关。

[0489] 实施例4. 测量TGFβ抗体间的表位竞争

[0490] 对XPA.42.068和XPA.42.089抗体结合TGFβ蛋白上的独立或重叠表位的能力进行评价。虽然这种逐对分析会由于在不同的TGFβ亚型之间抗体的亲和力有所不同并且由于TGFβ配体会发生共价同二聚从而使得结合以每个同二聚体两个IgG的比率进行(例如自行配对)而并不简单,但是研发了一种基于可溶性竞争的测定法。

[0491] 在BIAcore 2000系统上使用CM5传感器芯片(GE Healthcare)。在固定化之前,通过使用100mM HCl以50微升/分钟的流速进行四次30秒注射来对芯片进行预处理。用于固定化的运行缓冲液是含10mM Hepes、150mM氯化钠、3mM EDTA以及0.05%聚山梨醇酯20的HEPES缓冲生理盐水(HBS-EP+)。通过将新混合的0.1M N-羟基丁二酰亚胺(NHS)与0.4M 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)的1:1溶液以10微升/分钟注射7分钟来使芯片表面活化。在活化注射后,以10微升/分钟注射于乙酸盐(pH 4.5)中的1μg/mL的抗体XPA.42.089,持续注射数分钟。对注射进行监测并且依序进行以建立非常接近于300RU的固定化水平。将1M盐酸乙醇胺-NaOH(pH 8.5)注射8分钟以封闭表面。所使用NHS、EDC以及乙醇胺均来自BIAcore胺偶合试剂盒。Fc1是活化和去活化的对照。

[0492] 使用补充有1mg/mL BSA的上述HBS-EP+缓冲液的经过充分脱气的形式的运行缓冲液进行竞争测定法。除空白对照之外,将TGFβ1、TGFβ2以及TGFβ3以0.1μg/mL(4nM)用于所有注射中,并且与20μg/mL(133nM)的竞争抗体一起制备。还包括了TGFβ-RIIb-Fc重组受体(R&D Systems)作为竞争物。在开始运行BIAcore之前,在室温下使样本达到平衡,持续40分钟。然后在所有流槽上以30微升/分钟注射平衡了的样本,持续3分钟。每一个循环通过将50mM NaOH以50微升/分钟注射一次,持续6秒(5μL),继而进行30秒的缓冲液注射来进行再生。按一式两份运行样本并且在3分钟结束时分析所结合的TGFβ的水平。

[0493] 表5. 结合竞争(固定化的XPA.42.089)

		TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3
	空白	-0.568	0.0655	0.3684
[0494]	抗体编号	63.85	61.05	23.65
	XPA.42.068	10.85	5.18	7.32
	XPA.42.089	1.7	0.3635	9.77
	TGFβ-RIIb	-0.316	38.2	-0.378

[0495] 如上表5中所示,这些数据指示XPA.42.068与XPA.42.089展示出彼此强烈竞争结合每种TGFβ亚型。这些值表示在注射复合物期间所测量的平均RU或TGFβ结合的信号强度。这显示出在存在已复合的抗体时信号大幅减少。在注射期间复合物的任何解离均会使得游离TGFβ或单价结合的TGFβ由XPA.42.089捕捉抗体结合。已显示,TGFβ-RIIb与TGFβ2的相互作用比与TGFβ1和TGFβ3蛋白的相互作用要弱得多,并且快速的解离速率会使得相对于高亲和力XPA.42.089对TGFβ2的竞争相对较差。在竞争测定中没有测试源自于XPA.42.068的XPA.42.681抗体。

[0496] 实施例5. 测量TGFβ抗体对rhLAP的竞争

[0497] 进行另外的竞争测定以确定抗体是否还与TGFβ的潜在形式相互作用。TGFβ原蛋白在高尔基体内由弗林蛋白酶样转化酶切割成N端具有249个氨基酸的潜在相关肽和C端具有112个氨基酸的成熟TGFβ1。

[0498] 在BIAcore 2000系统上使用CM5感测器芯片(GE Healthcare)。在固定化之前,通过使用100mM HCl和50mM NaOH进行若干次30秒注射(每次以50微升/分钟的流速进行注射)来对芯片进行预处理。用于固定化的运行缓冲液是含10mM Hepes、150mM氯化钠、3mM EDTA以及0.05%聚山梨醇酯20的HEPES缓冲生理盐水(HBS-EP+)。通过将新混合的0.1M N-羟基丁二酰亚胺(NHS)与0.4M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)的1:1溶液以10微升/分钟注射7分钟来使芯片表面活化。在活化注射后,以10微升/分钟注射于乙酸盐(pH 4.5)中的2 μ g/mL的重组人类TGF β 1潜在相关肽(rhLAP) (R&D Systems),持续4分钟,并且使得将400RU的rhLAP固定化。将1M盐酸乙醇胺-NaOH (pH 8.5)注射8分钟以封闭表面。Fc1是活化和去活化的对照。

[0499] 使用补充有1mg/mL BSA的如上经过充分脱气的HBS-EP+缓冲液的运行缓冲液进行rhLAP竞争测定法。将TGF β 1以0.25 μ g/mL (10nM) 用于除空白对照之外的所有注射中并且与10 μ g/mL (66.6nM) 的竞争抗体和对照抗体一起制备。在开始运行BIAcore之前,在室温下使样本达到平衡,持续40分钟。然后在对照表面和rhLAP表面上以40微升/分钟注射平衡了的样本,持续2分钟。每一个循环通过将100mM HCl以100微升/分钟注射两次,持续9.6秒(16 μ L)来进行再生。按一式两份运行样本并且分析所结合的TGF β 1的水平。

[0500] 在rhLAP竞争测定中各自测试抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及BM-1对比物。没有测试源自于XPA.42.068的XPA.42.681抗体。如图1中所示,XPA.42.068、XPA.42.089以及BM-1各自展现出对rhLAP的高水平竞争,从而指示这些抗体与TGF β 的活性形式相互作用而不识别潜在的TGF β 。

[0501] 实施例6.在HT-2测定中测量TGF β 抗体的中和作用

[0502] 为了测定抗体是否在功能上中和TGF β 亚型,对Ruegger等(J Immunol.144:1767-76;1990)的测定方法进行改编,其中将HT-2鼠类T细胞与IL-4一起并且在添加了TGF β 1、TGF β 2或TGF β 3或未添加TGF β 1、TGF β 2或TGF β 3的情况下进行培养。TGF β 亚型经由反式激活促进细胞周期停滞的基因来抑制HT-2细胞的IL-4依赖性生长。IL-4通过活化如c-myc和GM-CSF的靶标来反式激活促有丝分裂基因表达程序;而TGF β 信号转导会反式激活抑制c-myc和GM-CSF表达的基因。如果通过中和抗体消除TGF β 信号转导,那么HT-2细胞则增殖。通过CELL TITERGLO® (Promega,编号G7571)活力测定法来对生长的差异进行评定,所述活力测定法对ATP进行测量作为具有代谢活性的细胞的读数。

[0503] 通过每2天至3天于RPMI+10%FBS、10mM Hepes、2mM谷氨酰胺、50 μ M 2-ME中以1.5e4-2.5e4个细胞/毫升平分一次来维持HT-2鼠类T细胞。将新鲜的重组小鼠IL-2 (R&D Systems)以200IU/mL从浓缩储备液加入到每个烧瓶中。第1天,将细胞在培养基中洗涤以去除IL-2并且以每孔10,000个细胞与2000IU/mL的重组小鼠IL-4 (R&D Systems)一起分配到不透明的96孔培养板中。在与或未与经过一系列滴定的抗体一起预先孵育1小时后,添加TGF β 1、TGF β 2或TGF β 3 (PeproTech,编号100-21、100-35B、100-36E)。在37℃下孵育48小时后,在MDS Flexstation3上使用CELL TITERGLO®根据制造商的建议对活细胞群体进行评定。

[0504] 表6.HT-2细胞中和测定

[0505]	抗体	TGF β 2	TGF β 1	TGF β 3
	XPA.42.068	+	98.0	0.0
	XPA.42.089	+	57.0	0.0
	XPA.42.681	+	有效	30.3
	BM-1	+	220.0	196.0

[0506] 最初在HT-2测定中在单个10 μ g/ml的稀释点下测试抗体对TGF β 2活性的中和作用,并且确定每种抗体均呈阳性,其中在所测试的单个点下抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681的效力大于BM-1对比抗体的效力。然后测定对TGF β 1和TGF β 3的中和作用并且针对经过一系列6点稀释的每种抗体计算IC₅₀。再次,XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681中的每一种在对TGF β 1的中和作用方面所表现出的效力大于BM-1对比物,但仅发现XPA.42.681展现出较大的TGF β 3中和效力,并且因此是最有效的泛TGF β 抑制剂(表6)。XPA.42.681在这个测定中展现出增强的效力,其中所测试的最低浓度显著抑制TGF β 1,并且因此不能进行具体IC₅₀计算。

[0507] 实施例7.在IL-11释放测定中测量TGF β 抗体的中和作用

[0508] 第二种中和测定法评定了A549肺癌细胞由TGF β 所介导的IL-11分泌,所述IL-11分泌是肺成纤维细胞和上皮细胞中的促纤维化反应的一部分。TGF β 还介导MDA-MB-231细胞分泌IL-11,从而促进向骨转移。这种测定法模拟了由TGF β 所介导的促成纤维化和转移性疾病的生物反应。IL-11释放测定法改编自Rapoza等(J Immunol,Methods 316:18-26:2006),其中将A549细胞接种到96孔培养板中,并且在第二天,使用或不使用与中和抗体一起或未与中和抗体一起预先孵育的TGF β 亚型对细胞进行处理。通过ELISA对细胞培养上清液中的IL-11释放进行评定。

[0509] 在这个测定中,将A549细胞培养于F12+10%血清中。在分析前一天,使用维尔烯(versene)使细胞脱壁(以维持受体表达)并且以40,000个细胞/孔接种到96孔平底培养板中。第二天,将EC80的TGF β 1、TGF β 2或TGF β 3在加入细胞中之前与或未与经过一系列稀释的抗体一起预先孵育1小时。作为对照,将单独TGF β 、TGF β +抗KLH-G2对照抗体或单独培养基加入到培养板中。在37℃下24小时后,收集上清液并且通过ELISA使用IL-11Duo Set ELISA试剂盒(R&D Systems),根据制造商的建议对IL-11进行评定。

[0510] 表7. IL-11释放测定-IC₅₀(ng/mL)

[0511]	抗体	TGF β 1	TGF β 2	TGF β 3
	XPA.42.068	220.5	110.5	1795.0
	XPA.42.089	37.0	58.0	0.0
	XPA.42.681	0.4	1.0	0.8
	BM-1	292.0	498.0	12.0

[0512] 如上表7中所示并且类似于HT-2测定,IL-11释放测定的结果指示XPA.42.681在任何抗体当中对三种TGF β 亚型中的每一种均是最有效的。与HT-2测定相对比,XPA.42.681抗体对IL-11的释放展现出剂量依赖性作用,这使得能够确定IC₅₀,并且还揭示了针对每种TGF β 亚型的IC₅₀值大体上相似。抗体XPA.42.068和XPA.42.089也对TGF β 1和TGF β 2亚型显示出良好的中和作用(效力大于BM-1对比物),但是与BM-1抗体相比较或相对于对TGF β 1和TGF β 2的中和作用,对TGF β 3的中和作用显著较小。

[0513] 实施例8. 在pSMAD2测定中测量TGFβ抗体的中和作用

[0514] 为了进一步对抗体进行表征,研发了一种磷酸基-SMAD2 (pSMAD2) 测定法以评定对TGFβ经由TGFβRII/TGFβRI受体复合体进行的信号转导的中和作用。将Detroit 562细胞维持于IMDM+10%FBS中。使用维尔烯使细胞脱壁并且以每孔500,000个细胞接种到6孔培养皿中。第二天,使细胞在无血清IMDM中血清饥饿3小时,之后使细胞暴露于与或未与抗体一起预先孵育1小时的TGFβ1、TGFβ2或TGFβ3 30分钟。在37℃下30分钟后,使细胞溶解并且通过ELISA,使用可商购的试剂盒(Cell Signaling Technology,Danvers,MA),根据制造商关于检测的建议来评定pSMAD2和总SMAD2。将pSMAD2的百分比针对总SMAD2进行标准化并且由经过标准化的% pSMAD2来计算每种克隆相对于抗KLH对照的抑制百分比(图2)。t检验(双侧)显示出XPA.42.681抗体在中和所有TGFβ亚型的pSMAD信号转导方面比BM-1对比抗体显著更有效($p < 0.05$)。另外,相对于BM-1对比物,XPA.42.068针对TGFβ2显著更有效。

[0515] 实施例9. 在调节性T细胞测定中测量TGFβ抗体活性

[0516] 为了对抗体对内源性TGFβ的活性进行表征,基于与Tran等(Blood 110:2983-2990;2007)类似的方法,建立了一种调节性T (Treg) 细胞测定法。使用EasySep T细胞富集试剂盒(StemCell Technologies,Vancouver,BC)从冷冻的人类PBMC小瓶中分离出T细胞。使用10μg/ml的与培养板结合的抗人类CD3抗体(eBioscience, San Diego, CA)和2μg/ml的可溶性抗人类CD28抗体(eBioscience)使T细胞活化。还同时使用15μg/ml的TGFβ抗体或对照对细胞进行处理。在4天后,在4℃下使用抗人类CD4-FITC(BD Biosciences)和抗人类CD25-A647(BioLegend, San Diego, CA)对细胞进行染色,持续30分钟。在室温下将细胞用FOXP3固定缓冲液(BioLegend)固定20分钟,并且在室温下用FOXP3透化缓冲液(BioLegend)透化15分钟。使用抗人类FOXP3-PE(BioLegend)的1:25稀释液对细胞进行染色并且在BD FACSCanto™系统上进行分析。使用Flowjo软件对CD4+细胞进行门控并且对CD4+CD25+Foxp3+亚群进行定量。在这个测定中使用4或5名不同的PBMC捐献者来对抗体进行评价并且示出了来自2名捐献者的代表性数据(图3)。

[0517] 虽然由于在细胞群体中存在捐献者依赖性差异而发现了一系列的活性,但是总体上,XPA.42.681和BM-1对比抗体抑制Treg细胞群体,而XPA.42.068和XPA.42.089抗体在这个测定中提供了部分活性。

[0518] 实施例10. 在EMT测定中测量TGFβ抗体活性

[0519] 上皮向间质转化(EMT)使得肿瘤细胞能够自我更新而促进癌症侵袭和转移。对EMT的诱导是由包括TGFβ1、TGFβ2以及TGFβ3在内的细胞因子所驱动的,并且取决于组织类型,所有这三种亚型可能依序地牵涉到EMT中(Boyer等,Dev.Biol.208:530-545,1999;Bhowmick等,Mol.Biol.Cell 12:27-36,2001;Camenisch等,Dev.Biol.248:170-181,2002)。类似于Mani等(Cell 133:704-715;2008),使用原代人类乳腺上皮细胞(HMEC)研发了一种EMT测定法以确定抗体在体外是否抑制这个过程。

[0520] 如制造商所建议将人类乳腺上皮细胞(Lonza,Basel,Switzerland)培养于MEGM完全培养基(Lonza)中。对于传代培养,将细胞用胰蛋白酶处理并且在接种前用胰蛋白酶中和溶液(Lonza)处理。将HMEC细胞以3500个细胞/平方厘米接种于8孔腔室培养载玻片中并且使用或不使用与或未与抗体一起预先孵育30分钟的2.5ng/ml TGFβ处理。将细胞在37℃下孵育8天并且在4天后添加新鲜的培养基+试剂。在第8天,在室温下用4%多聚甲醛将细胞固

定15分钟。在PBS中将细胞冲洗两次并且在PBS+0.25%Triton X-100中透化10分钟,之后使用PBS-TWEEN+10%山羊血清封闭30分钟。在4℃下针对间质标记使用抗人类波形蛋白(Cell Signaling Technology,Danvers,MA)以及针对上皮标记使用抗人类E-钙粘蛋白(Cell Signaling Technology)(分别1:200或1:500稀释)将细胞染色过夜。将细胞在PBS中洗涤3次并且在室温下与在封闭溶液中稀释的适当的二抗Alexa Fluor 488山羊抗家兔或Alexa Fluor 568山羊抗家兔(Invitrogen,Carlsbad,CA)一起孵育1小时并且避光。将载玻片洗涤并且使用Gold抗淬灭试剂(Anti-Fade)/DAPI封固,之后进行荧光显微术。

[0521] 在抗KLH对照抗体存在下使HMEC细胞暴露于TGFβ会引起波形蛋白染色增加以及总细胞密度降低,这符合TGFβ介导的生长停滞以及向间质表型分化。XPA.42.681、XPA.42.068以及XPA.42.089抗体对由TGFβ1介导的EMT的中和作用基于波形蛋白染色减少是明显的,这与细胞密度增加有关,而对于BM-1对比物观测到中等反应,因为波形蛋白染色存在,但是程度不同于抗KLH对照(数据未示)。另外,虽然每种抗体均抑制由TGFβ2驱动的EMT,但是基于波形蛋白信号强度、E-钙粘蛋白染色以及增加的细胞密度,BM-1对比抗体的效力看来似乎较小。在对由TGFβ3介导的EMT的中和作用方面,XPA.42.681抗体最为有效,其次是BM-1和XPA.42.068,而XPA.42.089看来似乎与抗KLH对照没有差异。

[0522] 实施例11.TGFβ抗体在异种移植小鼠模型中的肿瘤抑制作用

[0523] 在由Detroit 562产生的异种移植模型中评价抗体XPA.42.068和XPA.42.089抑制肿瘤生长的能力,Detroit 562是一种人类咽癌细胞系(Van Aarsen等,Cancer Res.68:561-70;2008)。将每只动物 5×10^6 个Detroit 562细胞于BD MATRIGEL™(1:1,200μL)中皮下植入于八到九周大的Nu/Nu小鼠(Charles River Laboratories)的左下腹侧部位中。将动物随机化到各自具有十二只小鼠的测试组中:抗KLH人类IgG2同种型对照组(10mg/kg)、XPA.42.068(1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg剂量)、XPA.42.089(1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg剂量)、BM-1对比物(3mg/kg)或小鼠.同种型对照IgG1(3mg/kg)。每周进行两次给药和肿瘤体积测量(图4)。在7次剂量的抗体处理后,在最后一次给药(第28天)后次日将动物处死。对于所有测量结果,通过单侧斯图登氏t检验(Student's t-test)确定统计显著性。

[0524] 如图4中所示,经过XPA.42.089处理的肿瘤倾向于小于经过XPA.42.068处理的肿瘤,在与抗KLH人类IgG2对照组相比较时,在高剂量水平下具有显著性差异。在第28天将所有测试组中的肿瘤生长抑制百分比(TGI)与IgG对照抗体相比较。在第28天,来自XPA.42.068(3mg/kg和10mg/kg)、XPA.42.089(3mg/kg和10mg/kg)以及BM-1对比物(3mg/kg)处理组的肿瘤显著小于1mg/kg处理组(P值<0.05)。另外,使用图凯氏方差分析检验(Tukey's ANOVA testing),与IgG对照组相比,10mg/kg的XPA.42.068以及3mg/kg和10mg/kg的XPA.42.089显示出显著性差异(表8)。

[0525] 表8.在异种移植肿瘤模型中的肿瘤生长抑制作用

组	第 28 天		
	TGI%	图凯氏多重比较方差分析 p 值 P<0.05?	t 检验 单侧 p 值
3 mg/kg BM-1 相比于小鼠 IgG1	70.1	否	0.0089
1 mg/kg XPA.42.068 相比于抗 KLH IgG2	21.3	否	0.3037
3 mg/kg XPA.42.068 相比于抗 KLH IgG2	63.3	否	0.0339
10 mg/kg XPA.42.068 相比于抗 KLH IgG2	99.8	是	0.0014
1 mg/kg XPA.42.089 相比于抗 KLH IgG2	51.4	否	0.0948
3 mg/kg XPA.42.089 相比于抗 KLH IgG2	87.3	是	0.0045
10 mg/kg XPA.42.089 相比于抗 KLH IgG2	93.4	是	0.0024

[0527] 使用抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681在Detroit 562异种移植模型中进行进一步评价。将每只动物 5×10^6 个Detroit 562细胞于BD MATRIGEL™ (1:1,200μL) 中皮下植入于八到九周大的Nu/Nu小鼠 (Charles River Laboratories) 的左下腹侧部位中。将动物随机化到各自具有十二只小鼠的测试组中：抗KLH人类IgG2同种型对照组 (3mg/kg)、XPA.42.068 (1mg/kg或3mg/kg剂量)、XPA.42.089 (1mg/kg或3mg/kg剂量)、XPA.42.681 (1mg/kg或3mg/kg剂量)、BM-1对比物 (1mg/kg或3mg/kg剂量)。每周进行两次给药和肿瘤体积测量 (图5)。在7次剂量的抗体处理后,在最后一次给药 (第30天) 后次日将动物处死。对于所有测量结果,通过单侧斯图登氏t检验确定统计显著性。

[0528] 如图5和表9中所示,在第30天,与对照抗体相比较,经过3mg/kg的XPA.42.681、XPA.42.089以及BM-1对比物处理的肿瘤在TGI百分比和平均肿瘤体积方面显示出显著性差异。使用图凯氏方差分析检验在这些组间进行比较未显示出显著性差异。

[0529] 表9. 在异种移植肿瘤模型中的肿瘤生长抑制作用

组 (相比于抗 KLH IgG2)	第 30 天		
	TGI%	图凯氏多重比较方差分析 p 值 p<0.05?	t 检验 单侧 p 值
XPA.42.068 (1 mg/kg)	15.9	否	0.3434
XPA.42.068 (3 mg/kg)	42.7	否	0.1046
XPA.42.681 (1 mg/kg)	30.4	否	0.2183
XPA.42.681 (3 mg/kg)	78.7	否	0.0119
BM-1 (1 mg/kg)	20.7	否	0.3010
BM-1 (3 mg/kg)	79.3	否	0.0096
XPA.42.089 (1 mg/kg)	18.5	否	0.3030
XPA.42.089 (3 mg/kg)	81.8	否	0.0094

[0532] 实施例12. TGFβ抗体在同基因小鼠模型中的肿瘤抑制作用

[0533] 还使用改编自Nam等 (Cancer Res. 68:3915-23;2008) 的方案,使用4T1乳腺癌细胞,在同基因模型中对抗体XPA.42.068和XPA.42.089抑制肿瘤生长的能力进行评价。在第0天,将250,000个4T1细胞皮下植入于八周大的Balb/c雌性小鼠的第4乳腺脂肪垫中。将动物随机化到各自具有十二只小鼠的测试组中并且每周三次以10mg/kg的单个剂量水平施用以下抗体 (从第-1天开始): 抗KLH人类IgG2同种型对照、XPA.42.068、XPA.42.089、BM-1对比物或小鼠同种型对照IgG1。在实验过程中每周两次测量肿瘤体积并且数据示出于图6中。研究结束时的肿瘤体积数据指示与KLH对照抗体相比, XPA.42.068和XPA.42.089均显著抑制肿

瘤生长。

[0534] 另外,在研究的最后一天(第23天)将动物处死并且取出肿瘤以测定肿瘤重量。相对于人类或小鼠对照抗体,XPA.42.089、XPA.42.068以及BM-1抗体中的每一种均显著降低肿瘤质量(图7)。

[0535] 使用抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681在4T1同基因模型中进行进一步评价。在第0天,将250,000个4T1细胞皮下植入于八周大的Ba1b/c小鼠的第4乳腺脂肪垫中。将动物随机化到各自具有十二只小鼠的测试组中并且每周三次以10mg/kg的单个剂量水平施用以下抗体(从第-1天开始):抗KLH人类IgG2同种型对照、XPA.42.068、XPA.42.089、XPA.42.681、BM-1或小鼠同种型对照IgG1。在实验过程中每周两次测量肿瘤体积并且数据示出于图8中。研究结束时的肿瘤体积数据指示与人类或小鼠对照抗体相比,抗体XPA.42.068、XPA.42.089、XPA.42.681以及BM-1中的每一种均显著抑制肿瘤生长。

[0536] 另外,在研究的最后一天(第21天)将动物处死并且取出肿瘤以测定肿瘤重量。相对于人类或小鼠对照抗体,XPA.42.089、XPA.42.068、XPA.42.681以及BM-1抗体中的每一种均显著降低肿瘤质量(图9)。

[0537] 实施例13.TGFβ抗体在小鼠肿瘤模型中对NK细胞的体内作用

[0538] 为了评价TGFβ抗体是否在体内对肿瘤中存在的自然杀伤(NK)细胞展现出免疫调节作用,对在上述4T1同基因模型实验中从小鼠体内取出的分离的肿瘤进行消化以产生单细胞悬浮液。简单地说,将新鲜收集的肿瘤切碎并且在含2.5mg/mL胶原酶II和2.5mg/mL胶原酶IV的HBSS中消化(在37℃下15分钟)。对细胞进行计数并且以2e6个/毫升重悬于PBS、0.5%BSA、0.1%NaN₃以及10μg/mL的2.4G2抗小鼠Fc封闭抗体(eBioscience, San Diego, CA)中,并且在4℃下孵育15分钟。在含0.5%BSA的PBS中洗涤后,在4℃下使用抗CD335(抗Nkp46)抗体(BioLegend, San Diego, CA)将细胞染色30分钟,所述抗体经过缀合以用于在流式细胞测量分析的情况下进行免疫荧光染色。CD335也被称为Nkp46,是仅表达于CD3-CD56⁺NK细胞上的一种细胞表面标记,并且被认为是用于NK细胞的通用标记。将细胞在新鲜制备的2%多聚甲醛中固定并且在BD FACSCanto™系统上分析。还制备了单色对照以用于补偿。如图10中所示,与同种型对照抗体相比,XPA.42.089抗体显著提高从小鼠体内取出的肿瘤内NK细胞标记Nkp46(CD335)的表达。BM-1、XPA.42.068以及XPA.42.681抗体没有引起Nkp46出现类似程度的增加。

[0539] 实施例14.TGFβ抗体在小鼠肿瘤模型中对MDSC的体内作用

[0540] 为了评价TGFβ抗体是否在体内对肿瘤中存在的骨髓衍生抑制性细胞(MDSC)(CD11b⁺/Gr1⁺)展现出免疫调节作用,如上文所述制备在4T1同基因模型实验中从小鼠体内取出的分离的肿瘤并且在4℃下使用经过缀合以用于在流式细胞测量分析的情况下进行免疫荧光染色的抗CD11b抗体和抗Gr1抗体(BioLegend, San Diego, CA)染色30分钟。CD11b也被称为α_M-整合素,并且髓系分化抗原Gr1也被称为Ly6G,它们都是共表达于MDSC上的细胞表面标记。将细胞在新鲜制备的2%多聚甲醛中固定并且在BD FACSCanto™系统上分析。还制备了单色对照以用于补偿。如图11中所示,与同种型对照抗体相比,XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681抗体显著减少从小鼠体内取出的肿瘤内骨髓衍生抑制性细胞(MDSC,CD11b⁺/Gr1⁺)的聚集。BM-1对比抗体没有展现出MDSC类似程度的减少。

[0541] 实施例15.TGFβ抗体在小鼠肿瘤模型中对树突状细胞的体内作用

[0542] 为了评价TGF β 抗体是否在体内对肿瘤中存在的树突状细胞(DC)展现出免疫调节作用,如上文所述制备在4T1同基因模型实验中从小鼠体内取出的分离的肿瘤并且在4℃下使用经过缀合以用于在流式细胞测量分析的情况下进行免疫荧光染色的抗CD11c抗体(BioLegend, San Diego, CA)染色30分钟。CD11c也被称为 α_x 整合素,是DC上存在的一种细胞表面标记。将细胞在新鲜制备的2%多聚甲醛中固定并且在BD FACSCanto™系统上分析。还制备了单色对照以用于补偿。如图12中所示,与同种型对照抗体相比,XPA.42.089抗体显著减少从小鼠体内取出的肿瘤内DC标记CD11c的表达。BM-1、XPA.42.068以及XPA.42.681抗体没有展现出CD11c类似程度的减少。

[0543] 实施例16. TGF β 抗体在小鼠肿瘤模型中对调节性T细胞的体内作用

[0544] 为了评价TGF β 抗体是否在体内对肿瘤中存在的调节性T细胞(Treg)展现出免疫调节作用,如上文所述制备在4T1同基因模型实验中从小鼠体内取出的分离的肿瘤并且在4℃下使用经过缀合以用于在流式细胞测量分析的情况下进行免疫荧光染色的抗CD4抗体、抗CD25抗体以及抗FOXP3抗体(BioLegend, San Diego, CA)染色30分钟。CD4也被称为L3T4,并且CD25也被称为低亲和力IL-2R α ,并且FOXP3也被称为叉头框蛋白(Forkhead box protein)P3,它们各自是Treg细胞上存在的细胞表面标记。将细胞在新鲜制备的2%多聚甲醛中固定并且在BD FACSCANTO™系统上分析。还制备了单色对照以用于补偿。如图13中所示,与同种型对照抗体相比,XPA.42.068抗体显著减少从小鼠体内取出的肿瘤内Treg细胞的聚集。BM-1、XPA.42.089以及XPA.42.681抗体没有展现出T-reg细胞类似程度的减少。

[0545] 实施例17. TGF β 抗体在小鼠肿瘤模型中对细胞毒性T细胞的体内作用

[0546] 为了评价TGF β 抗体是否在体内对肿瘤中存在的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)展现出免疫调节作用,如上文所述制备在4T1同基因模型实验中从小鼠体内取出的分离的肿瘤并且在4℃下使用经过缀合以用于在流式细胞测量分析的情况下进行免疫荧光染色的抗CD8抗体(BioLegend, San Diego, CA)染色30分钟。CD8是CTL上存在的一种细胞表面标记。将细胞在新鲜制备的2%多聚甲醛中固定并且在BDFACSCANTO™系统上分析。还制备了单色对照以用于补偿。如图14中所示,与同种型对照抗体相比,XPA.42.068抗体显著提高从小鼠体内取出的肿瘤内CTL的水平。BM-1、XPA.42.089以及XPA.42.681抗体没有展现出CTL类似程度的增加。

[0547] 上述结果表明本文所公开的抗TGF β 抗体在体内能够减小肿瘤体积大小并且能够对浸润肿瘤并且促进肿瘤生长的免疫细胞进行调节。这就表明了本文所述的抗TGF β 抗体在治疗癌症,特别是上述实施例中的任一种或多种免疫细胞浸润于肿瘤细胞中的癌症中将提供治疗益处。

[0548] 实施例18. 提高NK细胞的细胞溶解活性

[0549] 研发了一种自然杀伤(NK)细胞共培养系统以模拟体内NK细胞与肿瘤细胞之间的长期相互作用,从而对抗TGF β 抗体提高NK细胞的细胞溶解活性的能力进行评价。使用产生TGF β 的小鼠乳腺癌细胞系4T1。从正常的Balb/c小鼠的脾脏中纯化NK细胞并且将其在6孔培养板中与CFSE标记的4T1肿瘤细胞在IL-2(500IU/ml)存在下一起共培养48小时。将抗TGF β 抗体和对照抗体添加到共培养系统中并且在48小时后收集NK细胞。在共培养后立即通过细胞内染色来测量NK细胞的IFN γ 产生。将NK细胞分选为CFSE阴性细胞并且通过标准杀伤测定法针对Yac-1肿瘤细胞系来分析它们的细胞溶解活性。在96孔圆底培养板中以20:1的效

效应物:靶标(E:T)比率将NK细胞与CFSE标记的Yac-1细胞一起共培养4小时。使用碘化丙啶(PI)染色剂来标记细胞死亡。

[0550] 与抗KLH处理组相比较,在抗体处理组中,NK细胞显示出IFN γ 产生有所升高,但并非显著增加。在杀伤测定中,在20:1的效应物:靶标比率下,BM-1抗体以及XPA.42.089和XPA.42.681抗体均显著提高NK细胞的细胞溶解活性(图15)。此外,XPA.42.089和XPA.42.681抗体使得NK细胞杀伤靶标肿瘤细胞的能力增强至97.8%和96.7%,这些水平显著大于基准对比物($P<0.0001$)。这一结果指示本公开的TGF β 中和抗体可以在体外显著提高因与产生TGF β 的肿瘤细胞长期相互作用而受到抑制的NK细胞的细胞溶解活性。

[0551] 实施例19.对CD8+树突状细胞的致耐受性功能的抑制作用

[0552] 研发了一种基于混合淋巴细胞反应(MLR)的体外系统以评价抗TGF β 抗体抑制CD8+树突状细胞(DC)上TGF- β 的致耐受性功能的能力。MLR是一种用于测试DC的抗原呈递而不将外部抗原加入到系统中的典型实验。将来自正常的Balb/c小鼠的脾脏切成小碎片并且在振荡孵育箱中在37°C下在10%RPMI和1mg/ml IV型胶原酶中孵育1小时。在添加EDTA,再持续5分钟后,经由尼龙网过滤溶液。使用生物素化的抗CD11c抗体对CD11c+DC进行染色并且使用来自Stemcell Technologies的生物素纯化试剂盒进行阳性选择。使用CD8抗体对CD11c+DC进行染色。在BD FACSAria™细胞分选仪上对CD8+和CD8-群体进行分选。将CD8+DC与抗TGF β 抗体或对照抗体一起培养24小时并且以1:10比率混合到CD8-DC中。使用来自Stemcell Technologies的T细胞阴性选择试剂盒从正常的B6脾脏中对T细胞进行纯化并且使用CFSE进行标记。然后在96孔圆底培养板中将混合的DC与B6T细胞一起共培养5天。通过T细胞增殖来评价CD8+DC的免疫抑制功能。如果CD8+DC抑制CD8-DC呈递抗原的能力,那么B6T细胞在较小程度上增殖。如果抗TGF β 抗体阻断自分泌TGF β 并且抑制CD8+DC的致耐受性功能,那么B6T细胞在较大程度上增殖。

[0553] 如图16中所示,与抗KLH对照组相比较,对于BM-1处理组几乎未观测到T细胞增殖方面的变化。相反,与对照抗KLH处理组相比,XPA.42.089和XPA.42.681抗体均显著增加T细胞增殖,并且XPA.42.681对T细胞增殖的作用与基准抗体BM-1相比也是显著的。这些数据显示,通过阻断TGF- β ,可以减少CD8+DC对免疫原性DC的致耐受性作用,从而可以使得免疫原性DC的抗原呈递得以增强。

[0554] 实施例20.增强CTL功能

[0555] 研发了一种体外系统以模拟CTL在肿瘤条件下的活化并且确定CTL功能是否可以由抗TGF β 抗体增强。通过CD25的表达来评价CTL的活化并且通过对穿孔素和颗粒酶B(GzmB)进行染色来评价CTL的功能(Massague等,Cancer Cell 8:369-380,2005)。通过T细胞阴性选择(Stemcell Technologies)从正常的Balb/c脾脏中对T细胞进行纯化。使用T细胞活化/扩充试剂盒(Miltenyi Biotec,Auburn,CA)以抗CD3抗体和抗CD28抗体涂布MAC珠粒。在96孔圆底培养板中,在20 μ l的4T1培养上清液存在下,在抗TGF β 抗体和对照抗体存在下,以1:1的比率将2 $\times 10^6$ 个/毫升浓度的T细胞和涂有抗CD3和抗CD28的MAC珠粒一起共培养48小时。使用细胞表面上CD25的表达来评价CTL的活化,并且使用通过使用FoxP3染色方案进行细胞内染色所测定的GzmB(图17A)和穿孔素(图17B)的表达来评价CTL的功能。

[0556] 与所公布的数据相一致,在抗体处理组与对照组之间未观测到CD25表达方面的变化。经过BM-1处理的CTL在GzmB和穿孔素的表达方面显示出极小的变化。然而,与对照抗KLH

处理相比,XPA.42.089和XPA.42.681抗体均显著增加CTL中GzmB的表达($P<0.001$)。此外,经过XPA.42.089处理的CTL中GzmB表达的增加显著大于对比物BM-1($P<0.05$)。对于穿孔素的表达,与经过对照抗KLH处理的CTL相比,经过XPA.42.089处理的CTL和经过XPA.42.681处理的CTL均产生显著更多的穿孔素($P<0.05$)。另外,与BM-1对比物相比,XPA.42.681在显著更大的程度上提高CTL中穿孔素的表达($P<0.05$)。因此,XPA.42.089和XPA.42.681均可以在这个体外培养系统中恢复由从肿瘤细胞分泌的TGF- β 所抑制的GzmB和穿孔素的表达,并且因此提供了通过中和由肿瘤细胞产生的TGF β 来加强CTL功能的机制。

[0557] 实施例21.对MDSC和Treg功能的抑制作用

[0558] 研发了一种体外共培养系统以评价骨髓衍生抑制性细胞(MDSC)对调节性T细胞(Treg)的扩充和功能的作用,以及本公开的抗TGF β 抗体抑制MDSC和Treg活性的能力。

[0559] 已知MDSC会抑制针对肿瘤的免疫应答并且促进肿瘤侵袭和转移,还会促进Treg的扩充和功能,所述Treg据知会下调免疫应答。将 7×10^3 个4T1肿瘤细胞于50 μ l的1 \times PBS中接种到雌性BALB/c小鼠的腹部乳腺中。在第21天收集脾脏并且经由生物素标记的CD11b抗体和生物素阳性选择试剂盒(Stemcell Technologies)来对MDSC进行纯化。同时,收集正常的BALB/c脾脏并且经由T细胞阴性选择试剂盒(Stemcell Technologies)来对T细胞进行纯化。使用抗CD4-FITC和抗CD25-PE对细胞进行染色。使用FACSARIATM细胞分选仪(BD Bioscience)对双重阳性细胞进行分选。将Treg群体用CFSE标记并且在抗TGF β 抗体或对照抗体存在下以1:1的比率与来自注射了4T1肿瘤的小鼠的MDSC一起共培养5天。通过CFSE分裂来测量Treg的扩充。为了评价MDSC对Treg功能的作用,将从注射了4T1的BalB/c小鼠收集的MDSC用CFSE标记并且在抗TGF β 抗体或对照抗体存在下与Treg一起共培养5天。将Treg分选为共培养物中的CFSE阴性群体。将来自正常的BALB/c小鼠的T细胞用CFSE标记并且以 2×10^6 个细胞/毫升与抗CD3和抗CD28珠粒一起接种。将所分选的Treg添加到培养系统中。通过分析T细胞的CFSE分裂的次数来测量Treg的抑制性功能。

[0560] 实施例22.TGF β 抗体在小鼠模型中对纤维化的抑制作用

[0561] 还在纤维化动物模型中评价本公开的抗体抑制纤维化(例如肺纤维化、肾纤维化)的能力。

[0562] 肾纤维化

[0563] 使用肾纤维化模型对抗TGF β 抗体进行评价(Ling等,J.Am.Soc.Nephrol.14:377-388;2003)。每天一次将环孢素A(Cyclosporine A,CsA,30mg/kg)或橄榄油(作为媒介物对照)皮下注射于食用低盐饮食(LSD,50-100ppm NaCl)的6周-7周大的雄性ICR小鼠体内,持续4周以诱发肾纤维化疾病。维持对照小鼠食用正常饮食并且不接受CsA。在开始CsA处理之前一天开始进行抗TGF β 抗体XPA.42.089或IgG对照抗体的腹膜内给药(2.5mg/kg,TIW)。使动物安乐死,并且收集血清、尿以及肾脏以对组织学和肾脏功能终点进行评价。

[0564] 使用标准技术,通过使用苏木精(hematoxylin)-伊红(H&E)和马森三色染色剂(Masson trichrome)对经过福尔马林固定和石蜡包埋的肾脏切片(5- μ m)进行染色来进行组织病理学研究。对CsA诱发的组织病理学变化的评估可以包括对经过编码的切片进行的普通接受的半定量评定(Ling等,Am.J.Physiol.277:F383-F390,1999)以及基于肾小管损伤、间质浸润、小动脉增厚、肾小管间质扩张以及纤维化中的任一项或全部的评估,包括例如通过对每个肾脏切片中患病面积的百分比进行计数来进行评定。使用马森三色染色剂对

来自正常对照小鼠、注射了CsA以及经过XPA.42.089抗体处理的小鼠的矢状肾脏切片进行染色。在注射了CsA的小鼠的肾小管间质中观测到由CsA诱发的纤维化的产生,而在对照动物中没有观测到。另外,在经过CsA处理的小鼠中观测到一些肾小管的管腔直径有所增加。使用XPA.42.089抗体进行处理会减少在肾小管间质中所观测到的由CsA诱发的纤维化的量并且减小肾小管的直径。

[0565] 还可以通过血清肌酐酞、血尿素氮以及肾功能失调的尿生物标记中的任一项或全部来评价肾脏功能。

[0566] 血清血尿素氮 (BUN) 是肾功能失调的指示物。在这个研究中,与食用饲料或食用LSD的对照小鼠相比,在暴露于CsA的小鼠中,BUN显著增加(图18)。与IgG对照抗体相比,使用XPA.42.089进行处理会显著降低血清BUN。

[0567] 蛋白尿或尿中白蛋白积聚增加是病肾中肾小球功能失调的特征。在这个研究中,相对于食用饲料或食用LSD的对照小鼠,在CsA小鼠中,尿白蛋白增加至几乎四倍(图19)。与经过IgG对照抗体处理的小鼠相比,使用XPA.42.089进行处理使得蛋白尿得到显著改善。

[0568] 尿IV型胶原蛋白的水平反映了肾中ECM沉积和纤维化的程度,相对于食用饲料或食用LSD的对照小鼠,在CsA小鼠中,尿IV型胶原蛋白的水平显著增加(图20)。与IgG对照抗体相比,使用XPA.42.089进行处理能够适度地减少尿IV型胶原蛋白。

[0569] 对肾脏组织进行定量RT-PCR以测定牵涉到纤维化的基因的表达。使用RNeasy试剂盒(Qiagen,Germantown,MD)根据制造商的方案从肾脏(皮质和髓质)中分离总RNA。使用随机引物和MULTISCRIBE™ RT (Applied Biosystems,Carlsbad,CA)合成第一条cDNA链。然后在LIGHTCYCLER 480实时PCR系统(Roche Applied Science,Indianapolis,IN)上使用SYBR绿色混合物(Roche)对2μl的cDNA进行定量RT-PCR。将值针对亲环素进行标准化并且使用比较性CT法计算。TGF-β1是成纤维细胞分化和ECM蛋白(包括III型胶原蛋白)沉积的强有力的诱导因子。在与对照小鼠相比时,在经过CsA处理的动物中,TGF-β1的表达是几乎两倍(图21A)。与IgG对照抗体相比,使用XPA.42.089进行处理能够显著降低肾中TGF-β1的表达水平。对于III型胶原蛋白的表达观测到相似的作用,其中在经过CsA处理的小鼠中观测到中度升高(图21B)。与经过IgG对照抗体处理的小鼠相比,使用XPA.42.089进行处理能够降低III型胶原蛋白的表达水平。

[0570] 肺纤维化

[0571] 可以主要如Wilson等(J.Exp.Med.207:535-552;2010)所述使用肺纤维化模型。在第-1天、第3天以及第5天使C57BL/6小鼠麻醉并且使用含0.15U硫酸博来霉素(Calbiochem,La Jolla,CA)的生理盐水在存在或不存在抗体(例如n=每组10只,500μg)的情况下进行气管内滴注。在第7天将动物处死以对肺组织学、肺胶原蛋白含量(例如胶原蛋白沉积)以及炎症浸润进行分析。对于肺组织学,使用马森三色染色剂对经过石蜡包埋的肺组织的5-μm切片进行染色。使用Sircol测定法对肺损伤进行定量,所述肺损伤被测量为支气管肺泡灌洗液(BAL)中的胶原蛋白以及肺中的胶原蛋白沉积。通过流式细胞测量术在BAL中测量炎症浸润。

[0572] 实施例23.对TGFβ介导的眼科学病症的治疗

[0573] 本公开的抗TGF-β抗体可以用于治疗许多眼科学(即眼睛)疾病和病状,包括例如眼睛的纤维化疾病(例如与纤维增生性病况相关的疾病)。

[0574] 中和视网膜色素上皮细胞中的TGFβ1

[0575] 维持上皮表型对于组织稳态来说是关键。在视网膜中,视网膜色素上皮(RPE)的反分化会导致视网膜功能失调和纤维化,并且TGFβ通过多种机制促成视网膜的反分化,其中一些机制依赖于SMAD2通路的活化。使用pSMAD2测定法评价本公开的抗体对抗RPE细胞中TGFβ反应的活化的能力。

[0576] 将视网膜色素上皮(RPE)细胞(Lonza,编号194987)维持于视网膜色素上皮细胞生长培养基(Lonza,编号00195409)中。使用胰蛋白酶使细胞脱壁,中和胰蛋白酶(胰蛋白酶中和溶液,Lonza,编号CC-5002),并且使细胞沉淀,以1e6个细胞/毫升重悬并且以100,000个-200,000个细胞/孔接种到6孔培养皿中。第二天,洗涤细胞并且添加RPE基础培养基(Lonza,编号00195406)以使细胞停滞在G0/G1期。次日,使用与或未与10μg/ml的如下抗体一起预先孵育5分钟的10ng/ml TGFβ1(Peprotech,编号100-21)对细胞进行处理:抗TGFβ抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681、基准抗体BM-1和BM-2,或对照抗KLH-G2抗体。在37℃下30分钟后,在含有新鲜加入的1mM苯甲基磺酰氟(PMSF)的细胞溶解缓冲液(Cell Signaling Technology,Danvers,MA)中使细胞溶解。在4℃下振荡5分钟后,将细胞刮下并且分配到96深孔培养板中以在冰上溶解20分钟。在4℃下将溶解产物以3K短暂离心5分钟。将溶解产物根据制造商的建议稀释和运行以进行磷酸基-SMAD2(Cell Signaling,编号7348)和总SMAD2(Cell Signaling,编号7244)检测。

[0577] 如图22中所示,TGFβ1处理引起RPE细胞中的pSMAD2稳固增加,这能够由抗体XPA.42.089、XPA.42.068和XPA.42.681以及基准抗体中的每一种显著中和。这些数据表明XPA.42.089、XPA.42.068以及XPA.42.681可以对抗RPE细胞中由TGFβ介导的信号转导并且指示这些抗体可以用于治疗视网膜功能失调。

[0578] 增生性玻璃体视网膜病

[0579] 增生性玻璃体视网膜病(PVR)是视网膜脱离手术中最常见的失败原因。PVR的特征在于视网膜上方和下方的玻璃体腔内纤维血管膜形成,从而引起后续的视网膜脱离。不同的因素促进了PVR的进展,并且TGFβ被认为起到了关键的作用。在PVR患者的玻璃体内富含TGFβ,并且TGFβ的特征性功能,如诱导上皮向间质转化(EMT)、刺激细胞外基质产生、使细胞膜收缩以及诱发炎症,都是在PVR进展中的负面因素。

[0580] 为了评价本公开抗体的作用,在家兔模型中诱发实验性PVR(Oshima等,2002,Gene Ther. 9:1214-1220;Fastenberg等,Gene Ther.2002,9:1214-1220)。通过肌肉内注射异氟烷或氯胺酮(ketamine)和甲苯噻嗪(xylazine)使成年有色素家兔麻醉。使用1滴10%盐酸苯肾上腺素、1%托吡卡胺(tropicamide)以及1%硫酸阿托品(atropine sulfate)使瞳孔放大。将 5.0×10^5 个家兔结膜成纤维细胞于0.1ml BSS溶液中经由睫状环注射到每只家兔的一个眼睛的玻璃体腔内。睫状环玻璃体切除术将诱发PVR模型。之后立即向各组10只动物施用BSS、抗TGFβ抗体(例如XPA.42.089、XPA.42.681,5mg)或对照抗体(例如抗KLH-G2)的单次玻璃体内注射,并且任选地每周重复一次。在第1天、第3天、第5天、第7天、第10天、第14天以及第28天通过检眼镜对所有注射过的眼睛进行检查,使用由Fastenberg等,Am.J.Ophthalmol.93:565-572,1982所述的临床标准将PVR分为六期。

[0581] 角膜碱烧伤

[0582] 呈角膜碱烧伤形式的眼部创伤是一个严重的临床问题并且可能会引起严重并且

永久的视力障碍。角膜细胞和上皮细胞的活化以及炎症细胞(如单核细胞/巨噬细胞)的流入牵涉到在角膜组织受到碱损害后损伤的发病机理并且可能会导致持久性上皮缺损。此外,由这些细胞分泌的基质金属蛋白酶(MMP,明胶酶)使基底膜分解会导致病理性溃疡形成和基质穿孔。角膜表面因丧失缘干细胞而发生结膜化以及角膜基质浑浊和新血管生成都会损伤患者在随后愈合期中的视力。多种生长因子和细胞因子(包括TGF- β 在内)被认为牵涉到在碱烧伤后角膜中出现的组织破坏和后期瘢痕形成。

[0583] 为了评价本公开抗体的作用,使用小鼠碱烧伤模型(Saika等,Am.J.Pathol.2005,166:1405-18)。简单地说,在全身和表面麻醉下将3 μ l的1N氢氧化钠溶液施加于成年C57BL/6小鼠(n=72)的右眼中以引起眼部表面的碱烧伤。在碱暴露后2小时以及第5天、第10天和第15天施用抗TGF- β 抗体(例如XPA.42.089、XPA.42.681)或对照抗体(例如抗KLH-G2)(n=24/组)。利用对角膜进行荧光素染色来观测表面缺损(例如上皮受损)。在第3天、第5天、第10天以及第20天,在角膜荧光素检查后,在使用溴脱氧尿苷标记后2小时将眼球摘出并且在石蜡中或冷冻切片机中处理以进行组织学研究。

[0584] 晶状体纤维化

[0585] 在损伤后,晶状体上皮细胞进行EMT,这会导致受损的晶状体中纤维化组织的形成。在白内障摘除术以及植入人工眼内晶状体后在人类晶状体囊中观测到类似的现象。这种EMT相关纤维化反应在临床上是不利的,这是因为它可能会导致剩余晶状体前囊浑浊和收缩以及后囊浑浊。眼房水含有丰富的TGF- β 并且已表明TGF- β 在晶状体上皮细胞的损伤相关性EMT中的作用。

[0586] 为了评价本公开抗体的作用,在小鼠模型中诱发实验性角膜纤维化(Saika等,Am J Pathol.2004,164:651-663)。通过腹膜内注射戊巴比妥钠(pentobarbital sodium)(70mg/kg)使成年小鼠(4周至6周大)麻醉。在局部施加散瞳剂和奥布卡因(oxybuprocaine)滴眼剂(作为麻醉剂)后,使用26号皮下注射器针头的针身部分在右眼中经由角膜切口在中心前囊中形成小切口。之后立即向所述眼睛施用抗TGF β 抗体(例如XPA.42.089、XPA.42.681)或对照抗体(例如抗KLH-G2)(n=24/组),每周两次,持续整个研究阶段。左眼充当未受损伤的对照。损伤的深度是约300 μ m,或所述针头的针身部分长度的约1/4,从而导致在囊破损周围形成纤维化组织。在滴注氧氟沙星(ofloxacin)软膏剂后,使动物愈合,持续6小时至8周。通过腹膜内注射溴脱氧尿苷对增殖中的细胞进行标记,继而在2小时后将动物处死并且将每只眼睛摘出以进行分析。

[0587] 青光眼手术后

[0588] 青光眼手术的长期结果的主要决定因素是伤口愈合反应。在结膜和巩膜造口术部位水平上的手术后过度瘢痕形成与不良的手术后压力控制有关。在这种手术中使用抗增殖剂5-氟尿嘧啶(5-FU)和丝裂霉素C(MMC)也可能会引起广泛的细胞死亡和细胞凋亡并且可能会引起角膜糜烂和囊性无血管滤过泡。

[0589] 为了评价本公开的抗体对这些与青光眼手术相关的病状的作用,使用家兔模型(Mead等,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.2003,44:3394-3401)。在全身麻醉(氯胺酮和甲苯噻嗪)下在新西兰白兔(New Zealand White rabbit)(12周和14周大)的左眼上进行青光眼滤过手术。在十二点钟方向放置部分厚度的8-0号丝制角膜牵引缝合线,以暴露上结膜。提起以穹窿为基底的结膜瓣,并且对结膜下腔进行钝性分离以达到距角膜缘后方15mm处。使

用MVR手术刀形成部分厚度的巩膜隧道,从角膜缘后方4mm处开始并且延续直到在角膜前基质中刚好可以看到手术刀为止。然后使22号/25-mm静脉内插管穿过巩膜隧道直到在透明的角膜中可以看到插管针为止。插管针进入前房,使插管前进到瞳孔中间部位,并且将针抽出。最后,对插管进行修剪并且在它的巩膜端将它斜切以使它从插入点伸出1mm,并且使用10-0号尼龙缝合线将管固定于巩膜表面。在针上使用两条间断缝合线以及中心的褥式10-0号尼龙缝合线将结膜切口闭合以提供不透水的闭合。在手术结束时滴注一滴1%硫酸阿托品和0.1%倍他米松磷酸钠(betamethasone sodium phosphate)、0.5%硫酸新霉素软膏剂。然后将动物随机分配以接受抗TGF β 抗体(例如XPA.42.089、XPA.42.681)或对照抗体(例如抗KLH-G2)(例如5mg/mL;16/组)的结膜下注射(100 μ L)的手术后疗程。在手术(第0天)后第2天、第3天、第4天、第7天、第9天、第11天以及第14天在表面麻醉(0.5%盐酸丙对卡因(proxymetacaine)滴眼剂,每只眼睛1滴)下,使用30号针进行结膜下注射。在上直肌的鼻缘处距角膜缘后方5mm处注射抗体。在与手术部位成180°处施用5-FU。

[0590] 在局部滴注0.5%盐酸丙对卡因滴眼剂后,使用手持式眼压计对两只眼睛中的眼内压进行测量。对结膜外观和引流部位进行观测。在手术后规定时间由不知情的观测者对所有动物进行检查。从第0天到第4天每天对两只眼睛评估一次(对侧的未处理的眼睛被用作对照),并且之后定时,至少每周两次进行评估。使用测径规测量包括长度、宽度以及高度在内的滤过泡的特征,并且记录眼内压。引流滤过泡血管分布的特征通过将结膜区域分成象限并且对外观进行评分来分级(0分:无血管;+1分:正常血管分布;+2分:充血;以及+3分:非常充血)。进行裂隙灯检查以鉴定前房的活动性(0分:未发炎;1分:有细胞;2分:有纤维蛋白;以及3分:眼前房积脓)和前房深度,所述前房深度被记录为深(+2分)、浅(+1分)或平坦(0分)。在将利多卡因(lignocaine)荧光素局部放入左眼中之后对角膜上皮病变的持续时间进行评估并且根据患病角膜的面积进行分级(0级:无;1级:<5%;2级:<50%;3级:<75%;4级:<90%;5级:高达100%)。将滤过泡生存时间视作主要功效终点。滤过泡功能不良被定义为在深前房存在下平坦、血管化以及有瘢痕形成的滤过泡的外观。对滤过泡的面积和高度、前房深度和活动性,以及每个象限中结膜的血管分布全部进行分析。还对来自一些动物的组织进行处理以进行组织学研究(例如结膜下胶原蛋白沉积)。

[0591] 预期本文公开的抗TGF β 抗体在眼睛中的纤维化发病期间抑制TGF β 活性,从而减少纤维化沉积并且改善与眼睛纤维化相关的症状。

[0592] 如上述说明性实施例中所示出的在本公开中的多处改进和变更预期被本领域技术人员所想到。因此,仅应当对本公开施以如所附权利要求书中所出现的这些限制。

<110> 佐马技术有限公司
 <120> 对TGF- β 具有特异性的抗体
 <130> 27129/45863
 <150> 61/493,230
 <151> 2011-06-03
 <160> 30
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 克隆XPA. 42.068重链

<400> 1
 caggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctctctggata cacccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acactgggtg cacaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagatcattc 300
 ctgtggctgg ttccctctga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcacgcgc 360
 tcttca 366

[0001]

<210> 2
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 克隆XPA. 42.068重链

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(33)
 <223> H-CDR1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(58)
 <223> H-CDR2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(111)
 <223> H-CDR3

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 克隆XPA. 42.068轻链

[0002]

<400> 3
 tcttctgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc caggagagaa ggccaggatt 60
 acctgtgggg ggaataacat tggacgtaaa agtgtacatt ggtaccagca gaggccaggc 120
 caggcccttg ttgtggtcct ctactatgat agagtcagac cctcagggat ccctgagcga 180
 ttttctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaccagggt cgaagccggg 240
 gatgaggccg actatctttg tcagggtgtg gataacacta gtgagcatgt ggtcttcggc 300
 ggaggcaccc agctgaccgt cctaggc 327

<210> 4
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 克隆XPA. 42.068轻链

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(31)
 <223> L-CDR1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(51)
 <223> L-CDR2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (88)..(97)
 <223> L-CDR3

<400> 4

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Glu
1 5 10 15

Lys Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Arg Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Leu Tyr
35 40 45

Tyr Asp Arg Val Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Val Trp Asp Asn Thr Ser Glu His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 5

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

[0003]

<220>

<221> misc feature

<223> 克隆XPA. 42.089重链

<400> 5

caggtgcagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tctctgaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggggacta 300
tgggaggttc gggcccttcc gtcggtctac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 克隆XPA. 42.089重链

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> H-CDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)
 <223> H-CDR2

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(110)
 <223> H-CDR3

 <400> 6
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Gly Leu Trp Glu Val Arg Ala Leu Pro Ser Val Tyr Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0004]

<210> 7
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成核苷酸

 <220>
 <221> misc feature
 <223> 克隆XPA. 42.089轻链

 <400> 7
 tcctatgagc tgacacagcc accctcagtg tccgtggccc cgggacagac ggccagaatt 60
 acctgtgggg caaatgacat tggaagtaaa agtgtccact ggtaccagca gaaggcaggc 120
 caggccctgt tactggctgt ctctgaagat atcatccggc cctcagggat cctgagcga 180
 atctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
 gatgaggcgg actattactg tcaagtttgg gatagggata gtgatcaata tgtcttttga 300
 actgggacca aggtcacctg cctagc 327

 <210> 8
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

 <220>
 <221> MISC_FEATURE

	<223> 克隆XPA. 42. 089轻链	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (26).. (31)	
	<223> L-CDR1	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (49).. (51)	
	<223> L-CDR2	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (88).. (97)	
	<223> L-CDR3	
	<400> 8	
	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
	1 5 10 15	
	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Ala Asn Asp Ile Gly Ser Lys Ser Val	
	20 25 30	
	His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Ser	
	35 40 45	
	Glu Asp Ile Ile Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser	
	50 55 60	
	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly	
	65 70 75 80	
[0005]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Asp Ser Asp Gln	
	85 90 95	
	Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105	
	<210> 9	
	<211> 366	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<223> 克隆XPA. 42. 681重链	
	<400> 9	
	caggttcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acactggtgg cacaactat	180
	gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagatcattc	300
	ctgtggctgg ttcctctga tgcctttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc	360
	tcttca	366
	<210> 10	
	<211> 122	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	

[0006]

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 克隆XPA.42.681重链

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(33)
<223> H-CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(58)
<223> H-CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(111)
<223> H-CDR3

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 327
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 克隆XPA.42.681轻链

<400> 11
tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc caggaaagac ggccaggatt 60
acctgtgggg gaaacaacat tggatttaga agtgtgcact ggtaccaaca gaagtcaggc 120
caggeccctg tcctgggtcat ctattttgat cgcgcccggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctgcct ccaactctga gaacacggcc accctgacca tcaggagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtgaca gtgatgatct agtccttcggc 300

ggaggcaccc agctgaccgt cctaggt 327

<210> 12
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 克隆XPA. 42. 681轻链

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26).. (31)
<223> L-CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49).. (51)
<223> L-CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (88).. (98)
<223> L-CDR3

<400> 12

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

[0007]

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Phe Arg Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Phe Asp Arg Ala Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser
50 55 60

Asn Ser Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Asp
85 90 95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 克隆XPA. 42. 068 - H-CDR1

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA.42.068 - H-CDR2

<400> 14

Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr
1 5

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA.42.068 - H-CDR3

<400> 15

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15

[0008]

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA.42.068 - L-CDR1

<400> 16

Asn Ile Gly Arg Lys Ser
1 5

<210> 17
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA.42.068 - L-CDR2

<400> 17

Tyr Asp Arg
1

<210> 18
<211> 10

[0009]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA. 42.068 - L-CDR3

<400> 18

Gln Val Trp Asp Asn Thr Ser Glu His Val
1 5 10

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA. 42.089 - H-CDR1

<400> 19

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA. 42.089 - H-CDR2

<400> 20

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
1 5

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA. 42.089 - H-CDR3

<400> 21

Ala Arg Gly Leu Trp Glu Val Arg Ala Leu Pro Ser Val Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC FEATURE

<223> 克隆XPA. 42. 089 - L-CDR1

<400> 22

Asp Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC FEATURE

<223> 克隆XPA. 42. 089 - L-CDR2

<400> 23

Glu Asp Ile
1

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0010]

<220>

<221> MISC FEATURE

<223> 克隆XPA. 42. 089 - L-CDR3

<400> 24

Gln Val Trp Asp Arg Asp Ser Asp Gln Tyr
1 5 10

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC FEATURE

<223> 克隆XPA. 42-681 - H-CDR1

<400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

[0011]

<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA. 42-681 - H-CDR2

<400> 26

Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr
1 5

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA. 42-681 - H-CDR3

<400> 27

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA. 42-681 - L-CDR1

<400> 28

Asn Ile Gly Phe Arg Ser
1 5

<210> 29
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA. 42-681 - L-CDR2

<400> 29

Phe Asp Arg
1

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 克隆XPA. 42-681 - L-CDR3

<400> 30

[0012]

Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Asp Leu Val
1 5 10

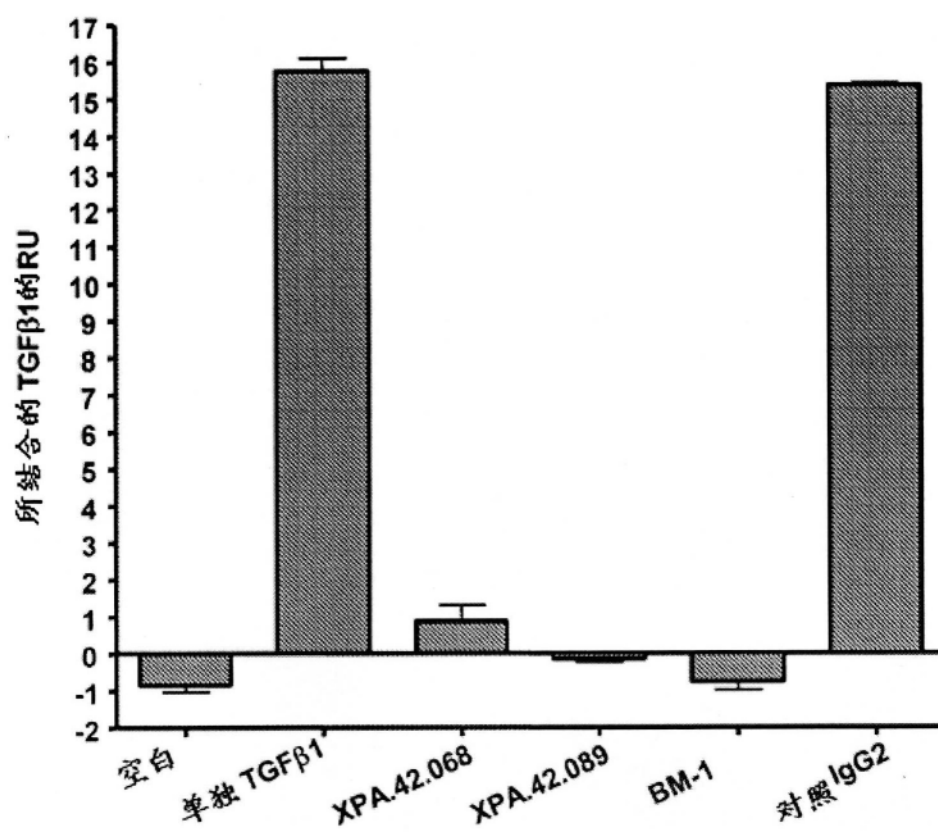


图1

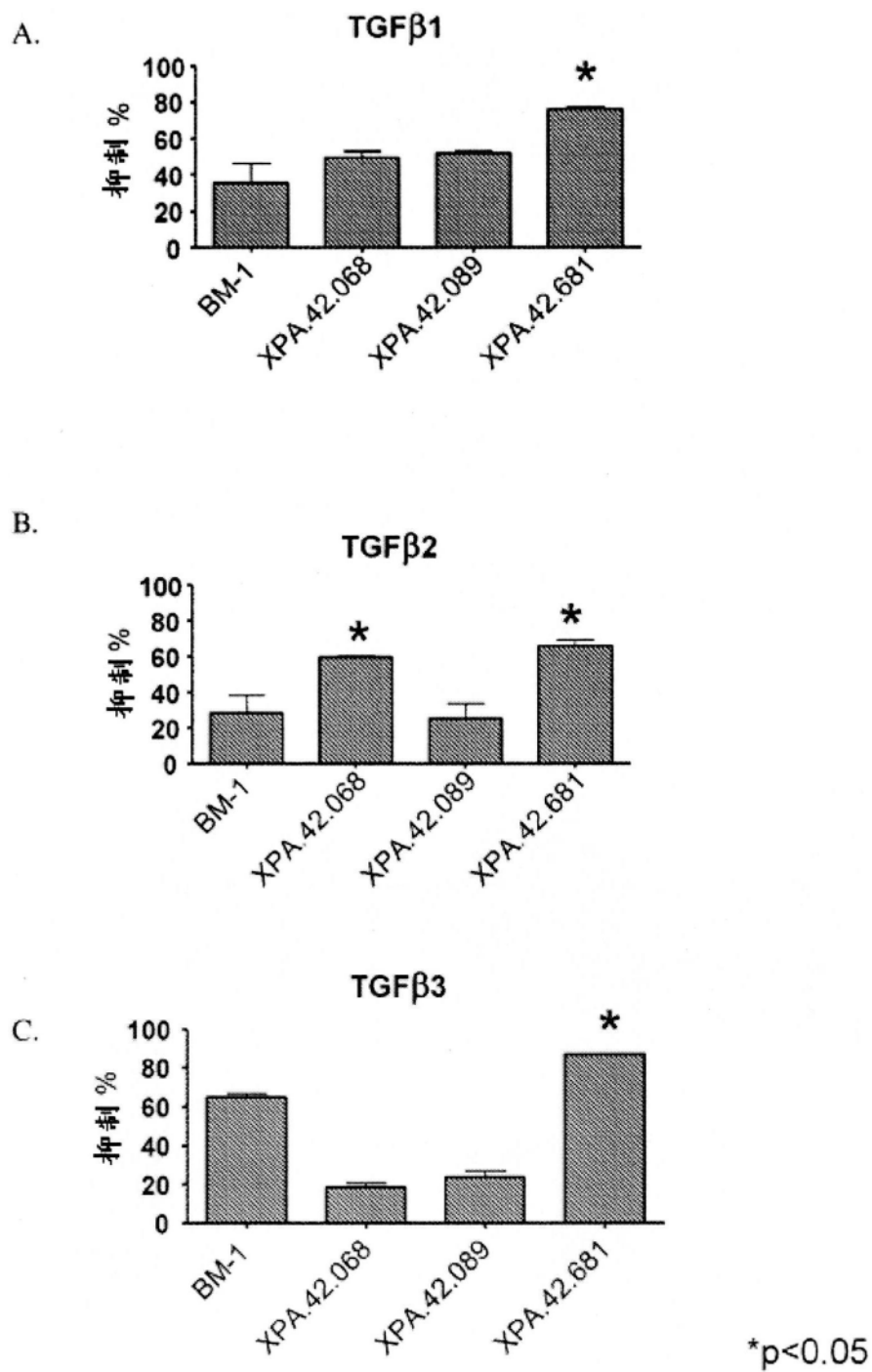


图2

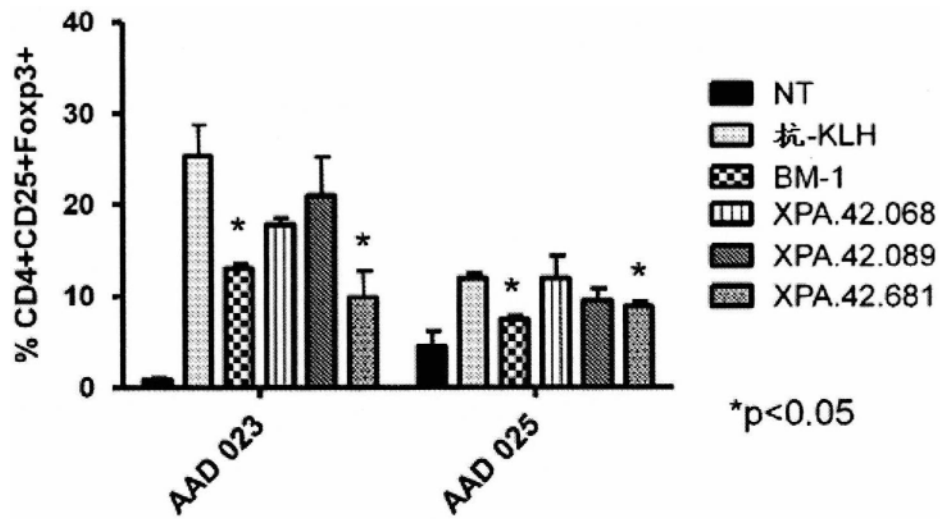


图3

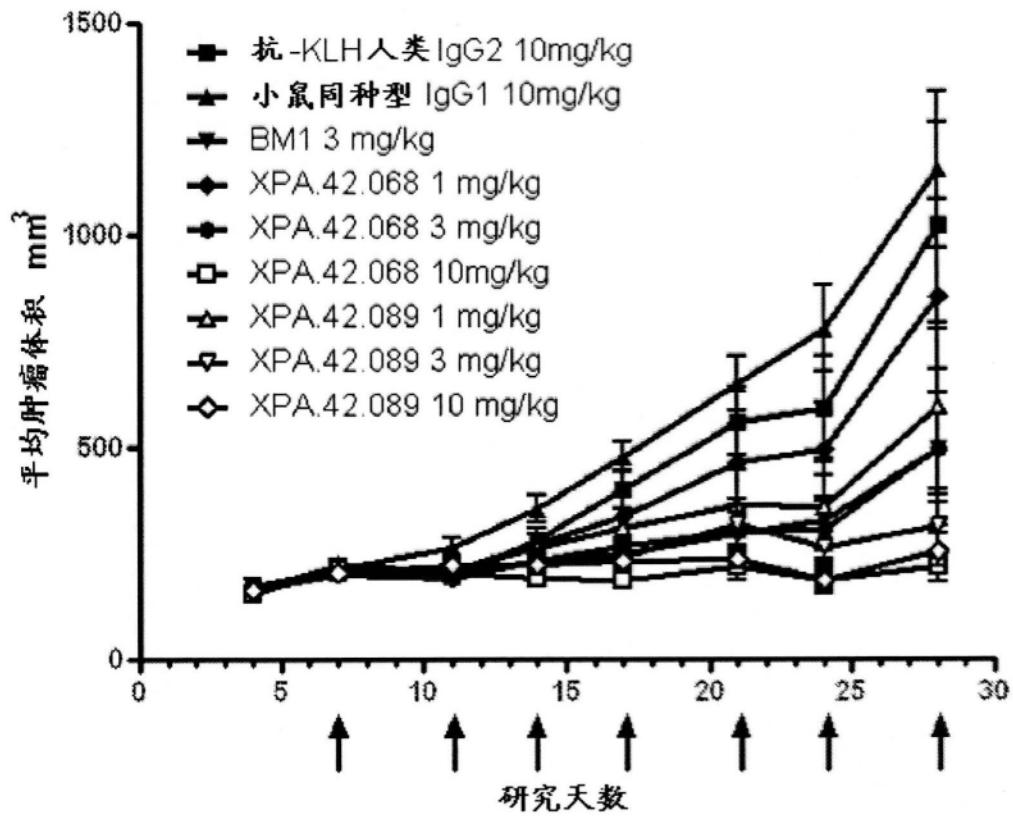


图4

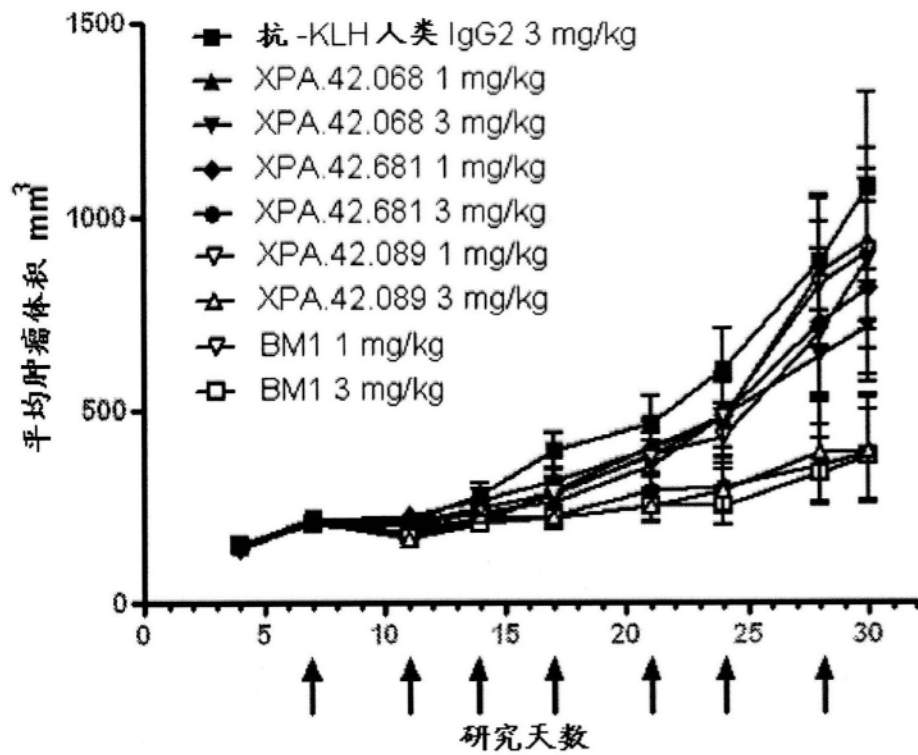


图5

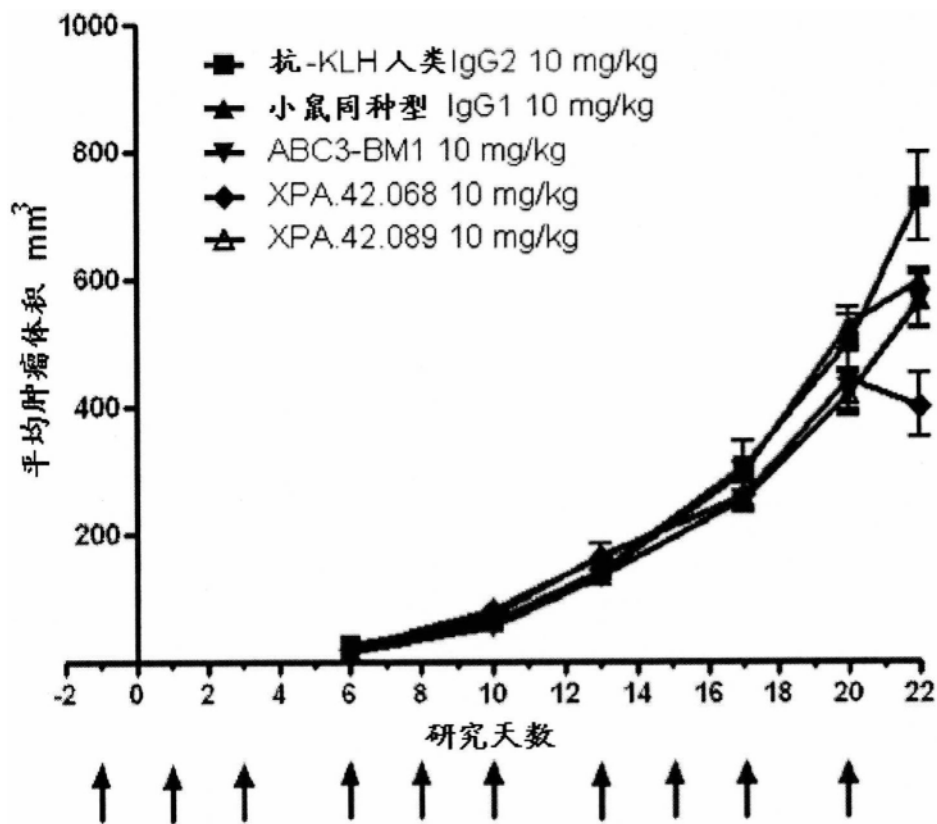


图6

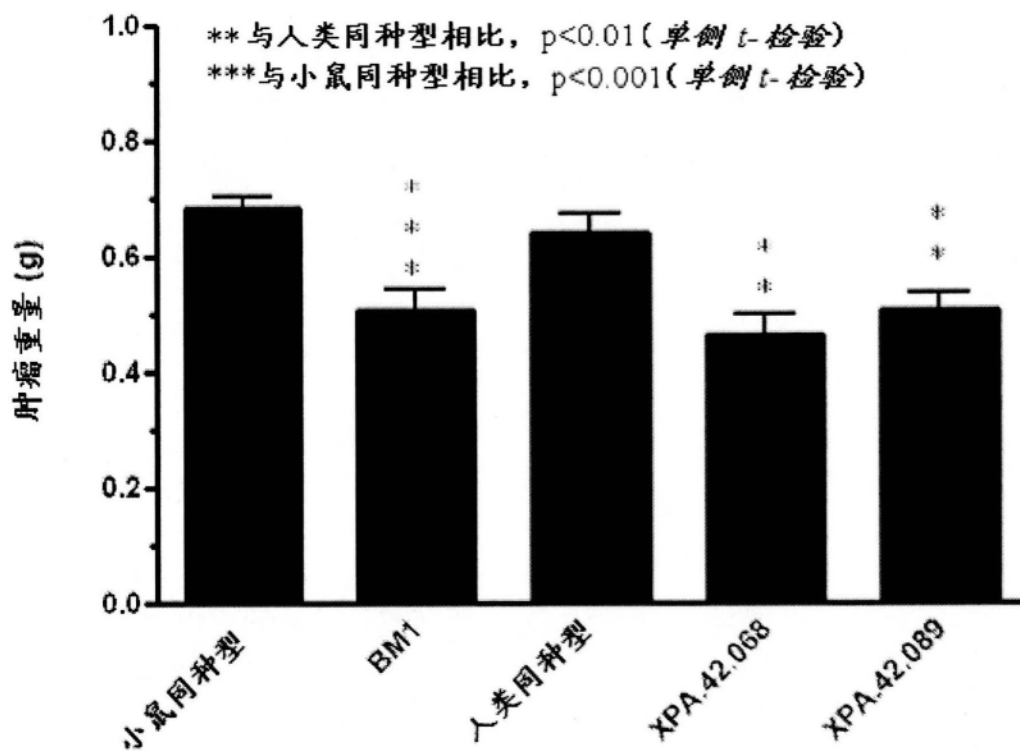


图7

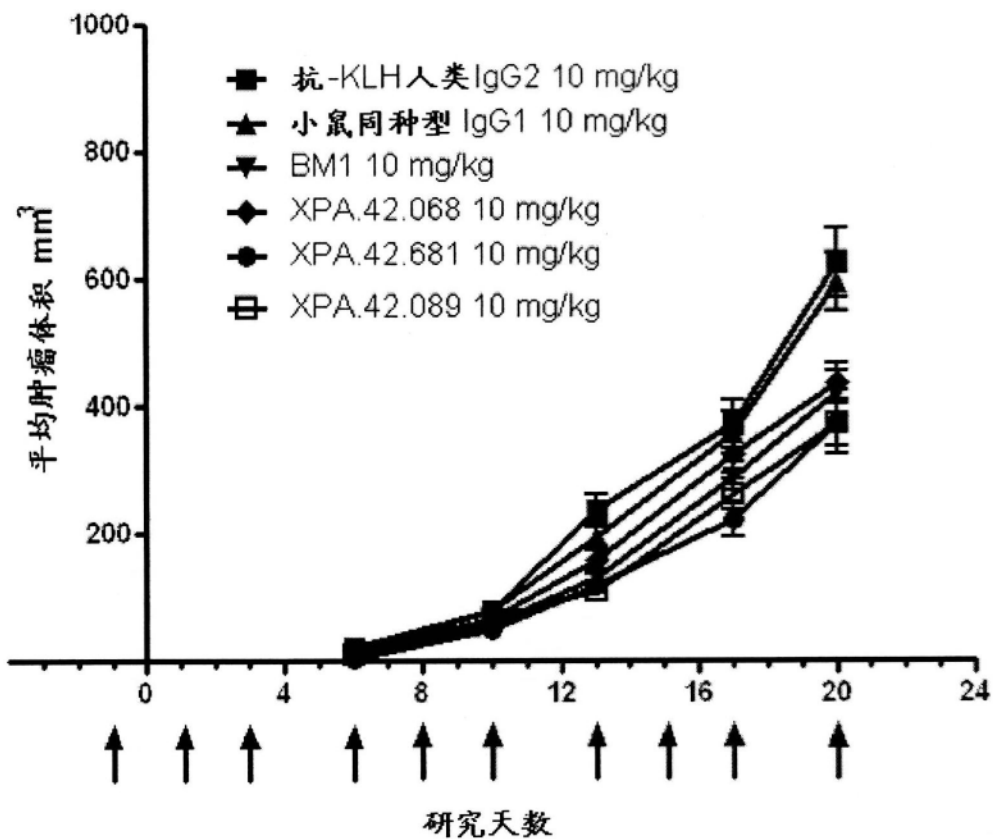


图8

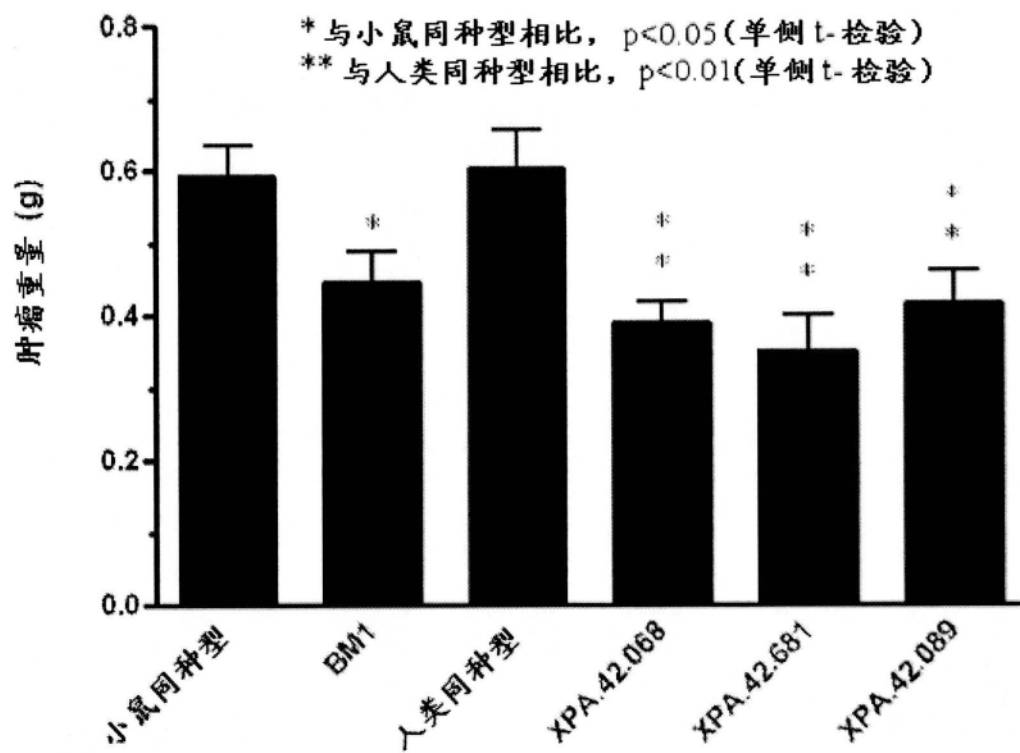


图9

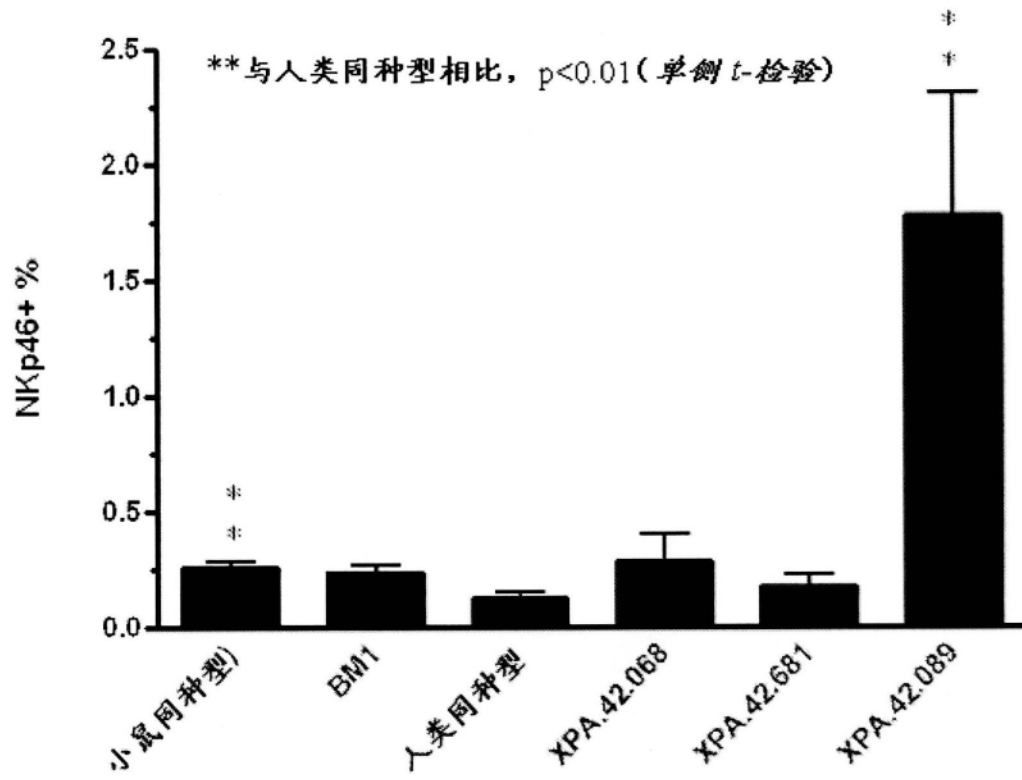


图10

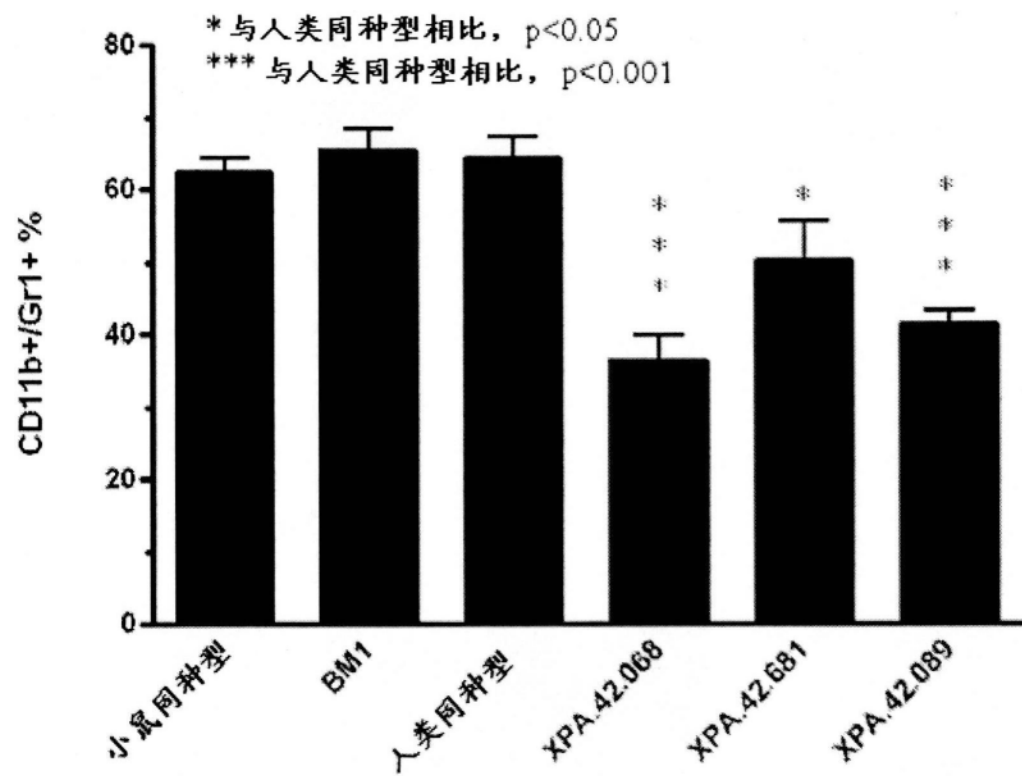


图11

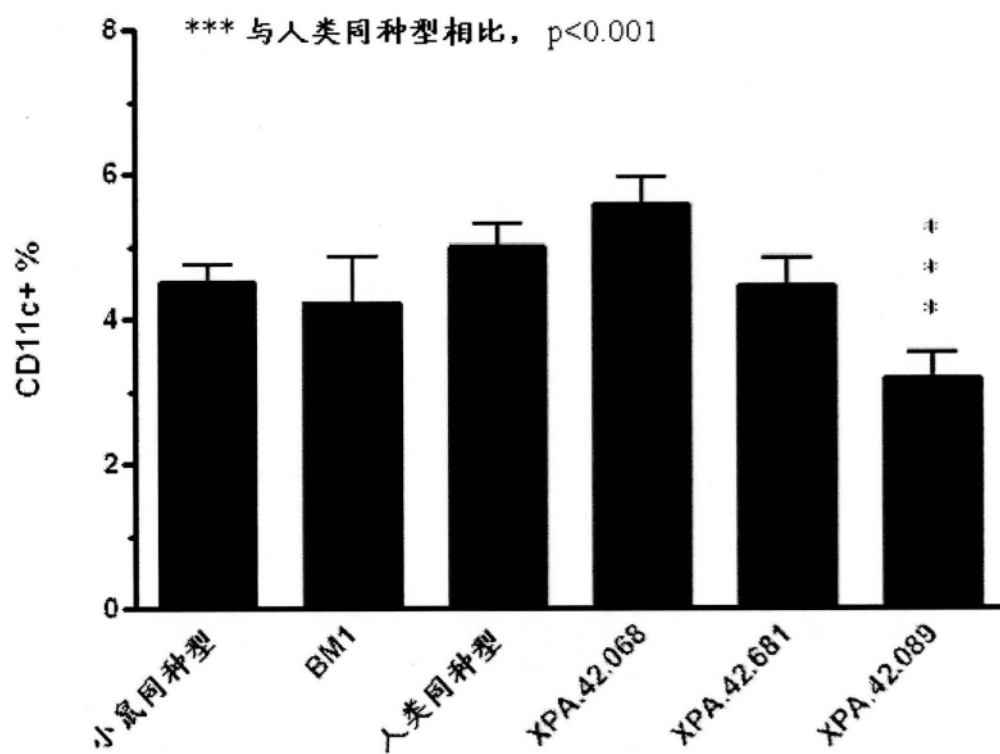


图12

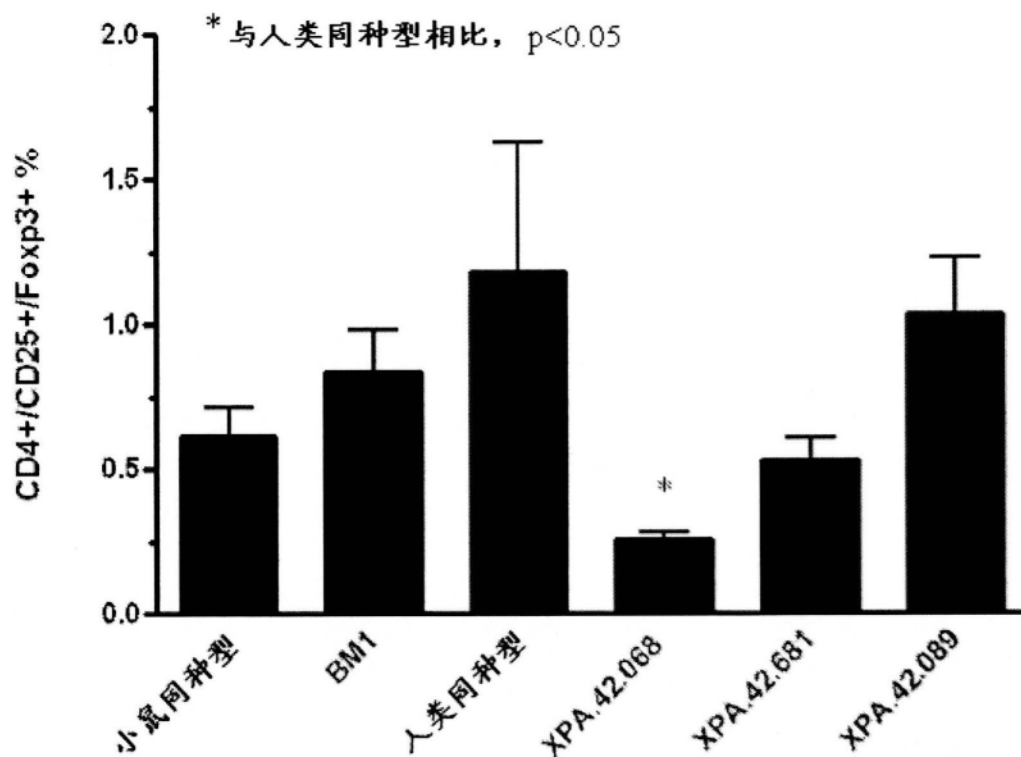


图13

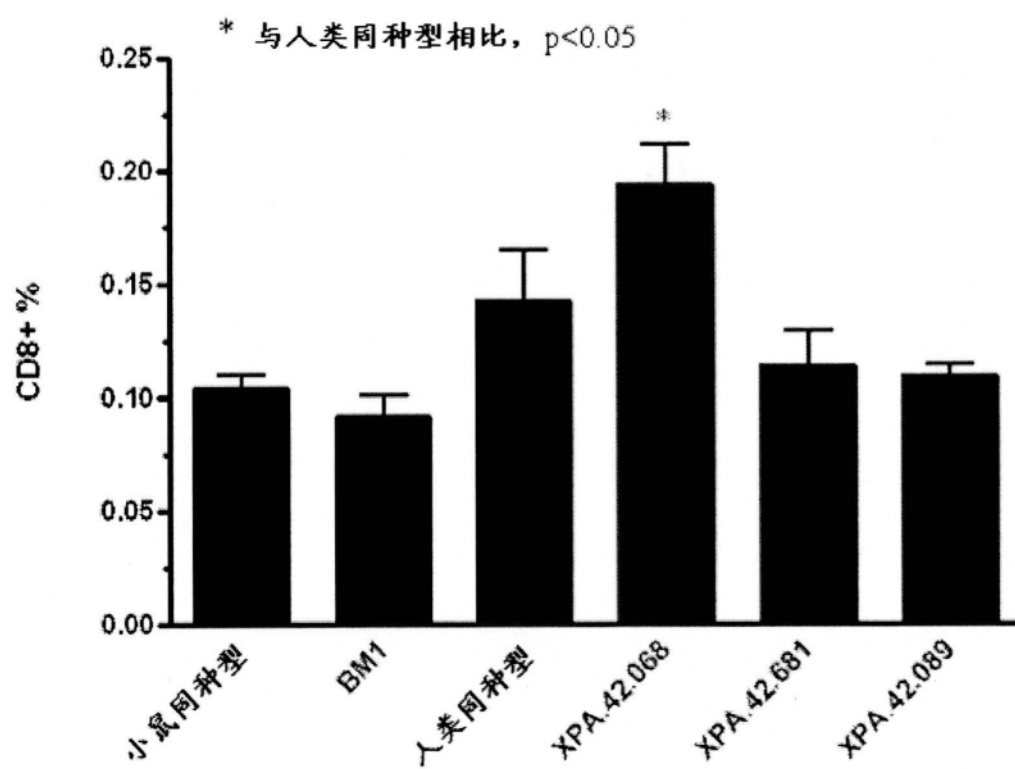


图14

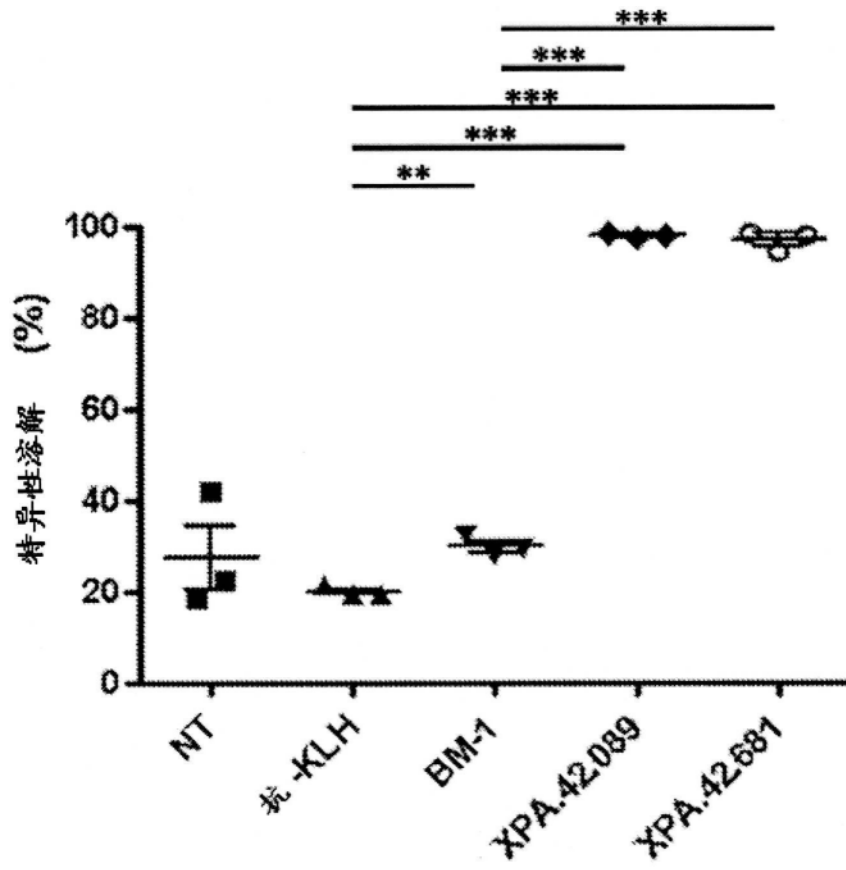


图15

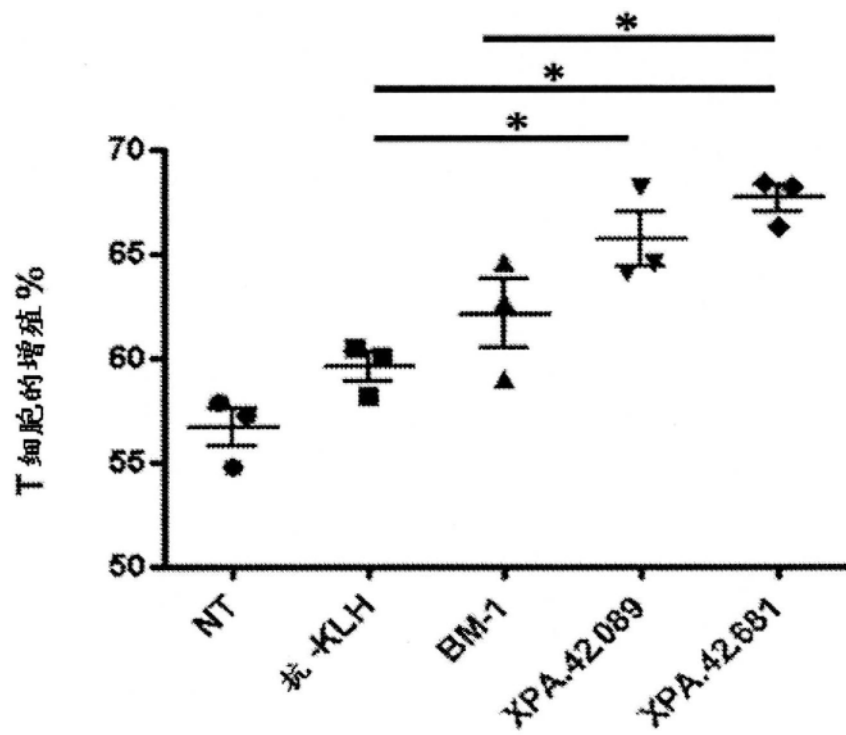


图16

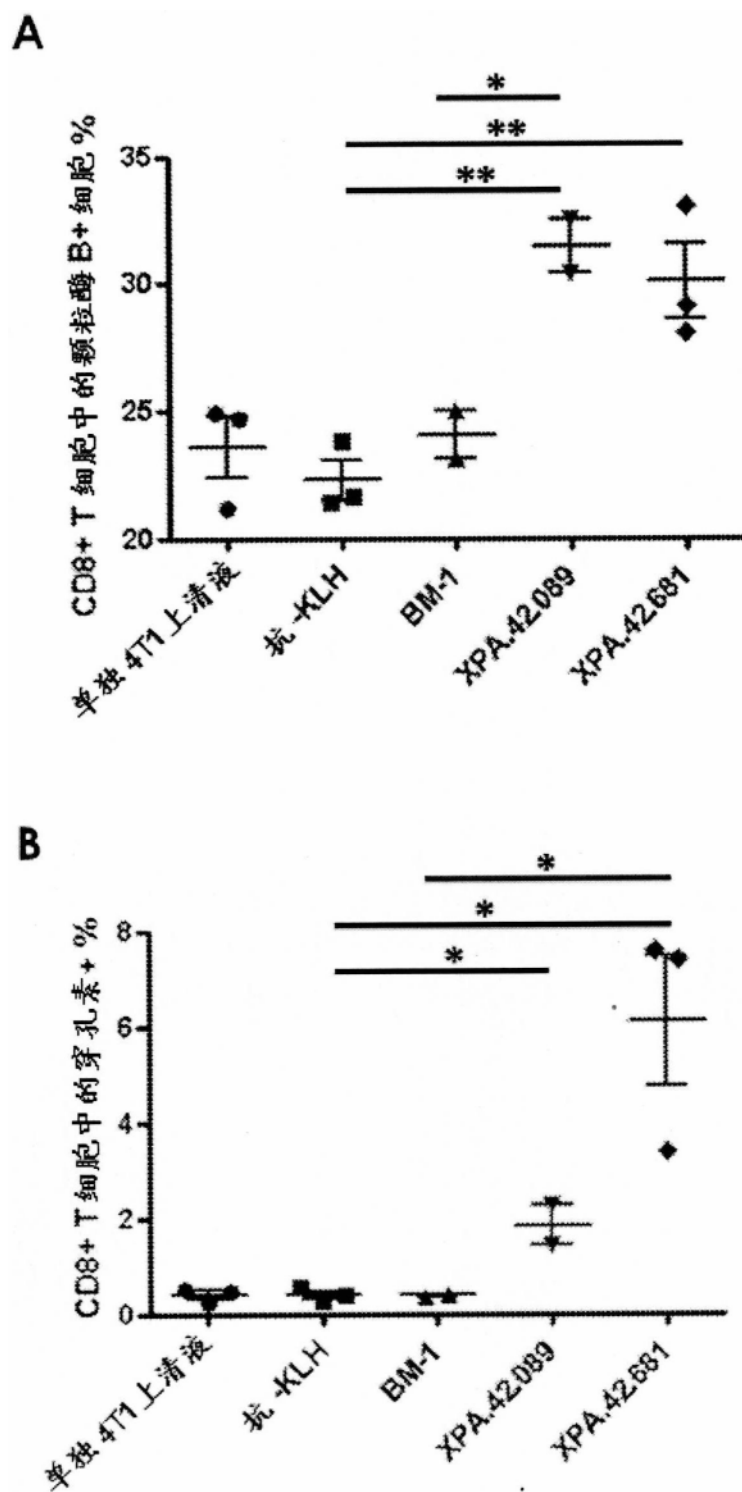


图17

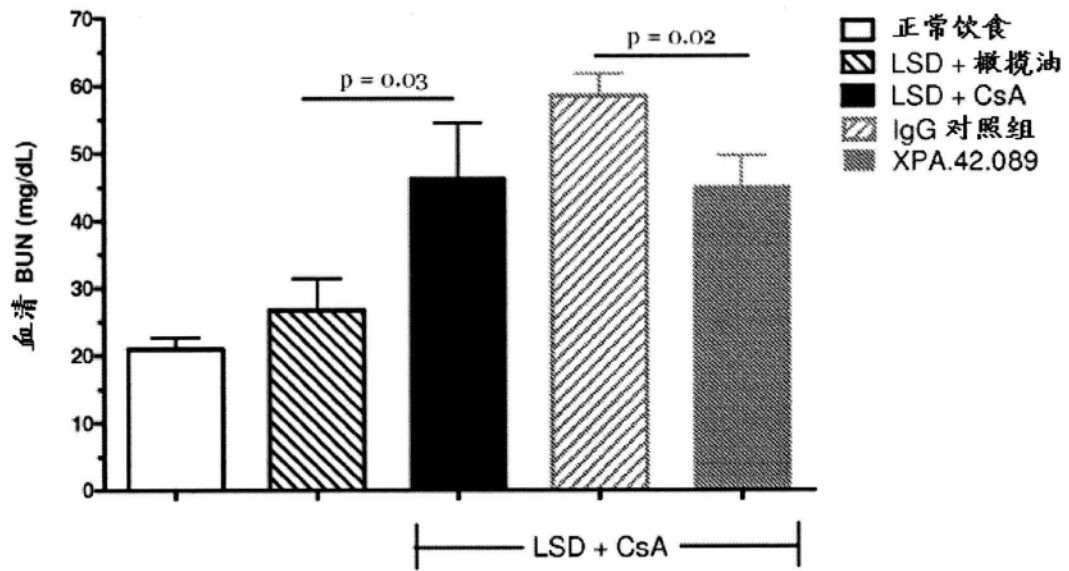


图18

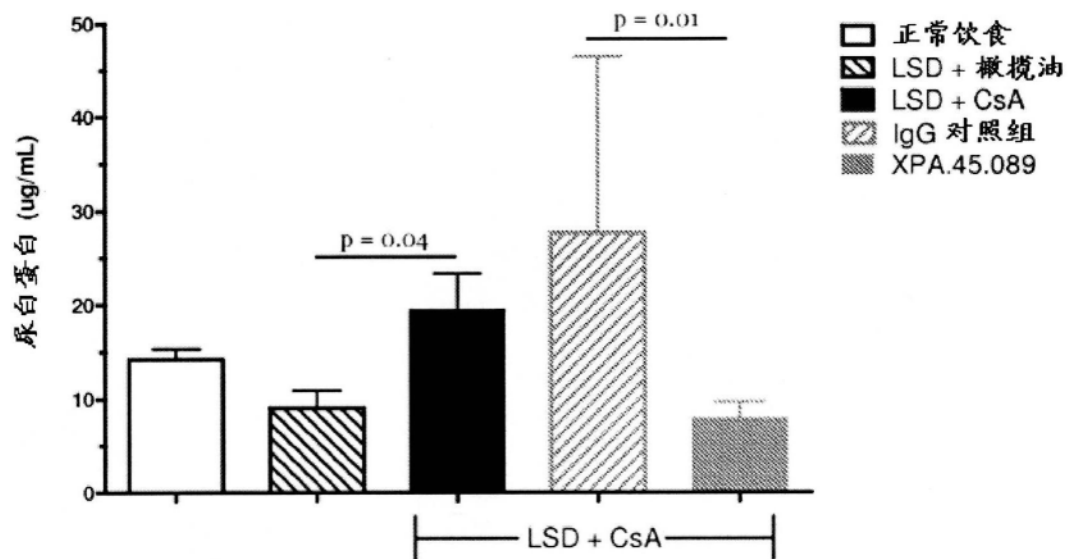


图19

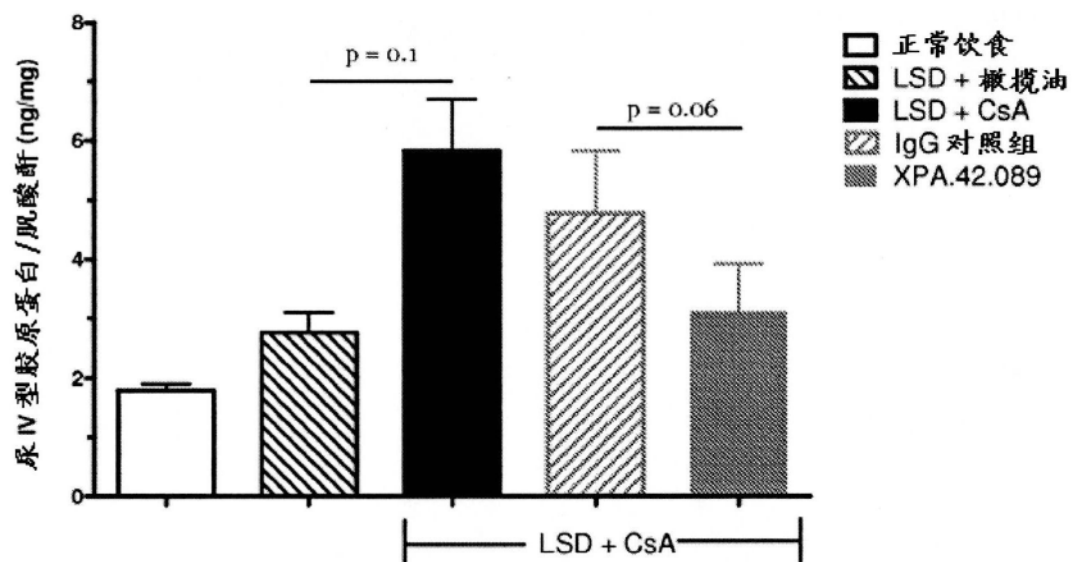


图20

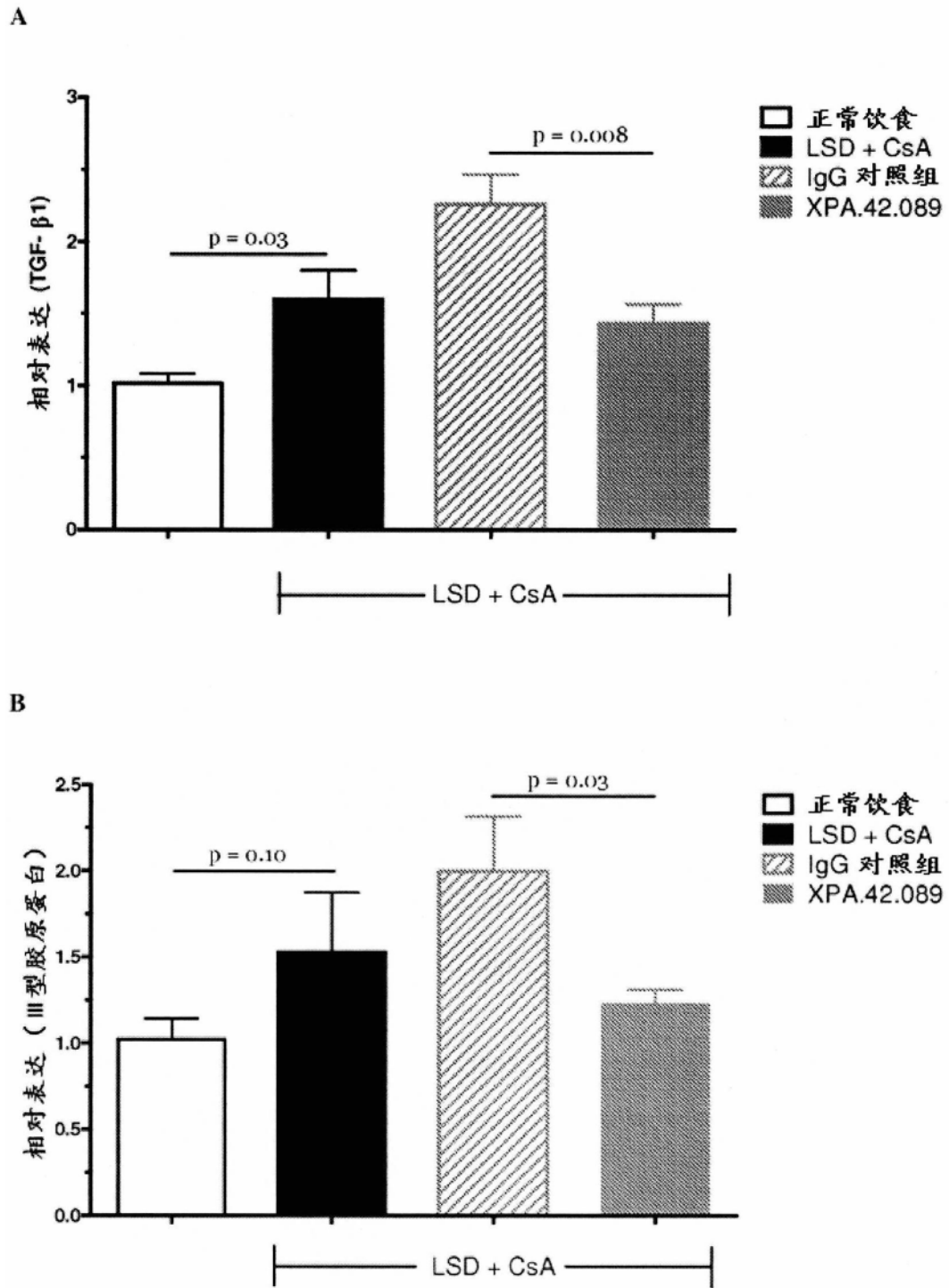


图21

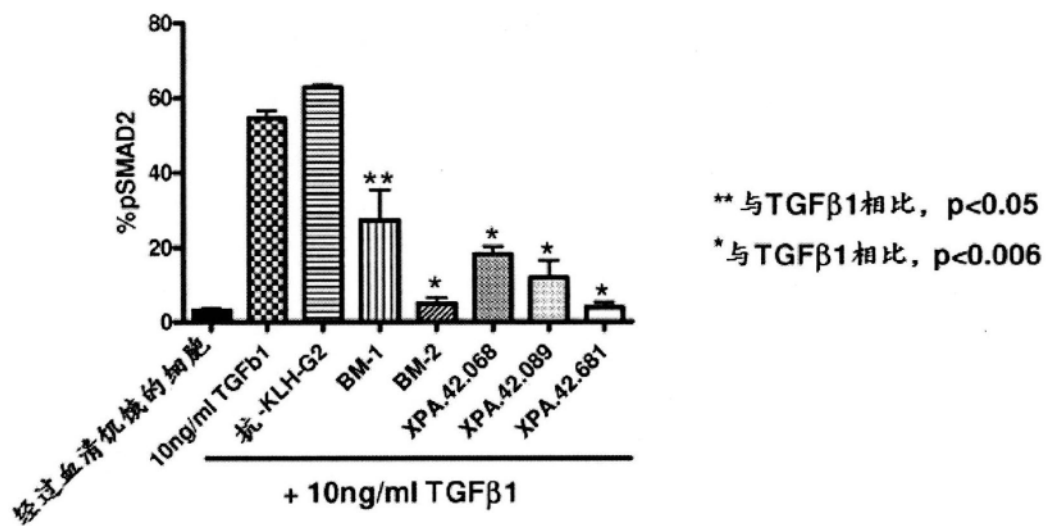


图22