



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107207590 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201580073656.9

阿尼什·卡拉特·韦拉特

(22)申请日 2015.12.11

彼得·斯拉夫内

(30)优先权数据

1422502.3 2014.12.17 GB

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 刘振佳

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.07.17

(51)Int.Cl.

*G07K 16/24*(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/079384 2015.12.11

*A61K 39/395*(2006.01)

*A61P 35/00*(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/096640 EN 2016.06.23

*A61P 35/02*(2006.01)

(71)申请人 癌症研究技术有限公司

地址 英国伦敦

(72)发明人 弗朗西丝·罗丝玛丽·巴尔克威尔

约翰·麦卡弗蒂

杰勒德·约翰·格拉哈姆

权利要求书3页 说明书29页 附图14页

(54)发明名称

抗CXCL12抗体分子及其用途

(57)摘要

公开了抗CXCL12抗体分子及其用途,特别是能够抑制CXCL12的体外和体内生物活性的抗CXCL12抗体分子及其用于治疗CXCL12介导的疾病用途。

1. 分离的抗CXCL12抗体分子,其与人CXCL12特异性结合并且抑制CXCL12介导的生物活性,其中所述抗体分子与具有如SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的CXCL12的表位结合,所述表位包含以下氨基酸:(a) P10和R12,以及任选地E15、I28、P32、N45和/或K54中的一个或更多个;或者(b) P10和Q48,以及任选地K54和N45中的一个或更多个。

2. 权利要求1所述的抗CXCL12抗体分子,其中所述抗体分子具有选自以下的一种或更多种生物活性:抑制CXCL12诱导的癌细胞生长、抑制癌细胞迁移、抑制癌细胞黏附和/或抑制癌症转移。

3. 权利要求1或权利要求2所述的抗CXCL12抗体分子,其中所述抗体分子具有抑制血管发生的生物活性。

4. 权利要求3所述的抗CXCL12抗体分子,其中所述血管发生是VEGF诱导的血管发生。

5. 分离的抗CXCL12抗体分子,其与人CXCL12特异性结合并且抑制CXCL12介导的生物活性,其中所述抗体分子包含:(a) CDR-H1,其具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:12的氨基酸序列;以及(b) CDR-H2,其具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:13的氨基酸序列;以及(c) CDR-H3,其具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

6. 权利要求5所述的抗CXCL12抗体分子,其还包含:(d) CDR-L1,其具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者带有一个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:15的序列;以及(e) CDR-L2,其具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:16的序列;以及(f) CDR-L3,其具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:17的序列。

7. 分离的抗CXCL12抗体分子,其与人CXCL12特异性结合并且抑制CXCL12介导的生物活性,其中所述抗体分子包含:(a) CDR-H1,其具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:1的氨基酸序列; (b) CDR-H2,其具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:2的氨基酸序列;以及(c) CDR-H3,其具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

8. 权利要求7所述的抗CXCL12抗体分子,其还包含:(d) CDR-L1,其具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:4的序列; (e) CDR-L2,其具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:5的序列;以及(f) CDR-L3,其具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:6的序列。

9. 权利要求5至8中任一项所述的抗CXCL12抗体分子,其中与SEQ ID NO:1至6或SEQ ID NO:12至17中的任何一种相比,所述抗体分子的CDR的氨基酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸替换、缺失或插入。

10. 前述权利要求中任一项所述的抗CXCL12抗体分子,其中所述抗CXCL12抗体结合CXCL12并且包含:

抗体VH结构域,其选自:114\_3H1 VH结构域(SEQ ID NO:7),以及包含具有SEQ ID NO:3之氨基酸序列的VH CDR3和任选地一个或更多个具有选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之氨

氨基酸序列的VH CDR的VH结构域;和/或

抗体VL结构域,其选自:114\_3H1 VL结构域(SEQ ID NO:9),以及包含一个或更多个具有选自SEQ ID NO:4、5和6之氨基酸序列的VL CDR的VL结构域。

11. 前述权利要求中任一项所述的抗CXCL12抗体分子,其中所述抗CXCL12抗体结合CXCL12并且包含:

抗体VH结构域,其选自:113\_1H12 VH结构域(SEQ ID NO:18),以及包含具有SEQ ID NO:14之氨基酸序列的VH CDR3和任选地一个或更多个具有选自SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13之氨基酸序列的VH CDR的VH结构域;和/或

抗体VL结构域,其选自:113\_1H12 VL结构域(SEQ ID NO:20),以及包含一个或更多个具有选自SEQ ID NO:15、16和17之氨基酸序列的VL CDR的VL结构域。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的抗CXCL12抗体分子,其包含:(a)与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VH序列、(b)与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VL序列、或者(c)如(a)中的VH序列和如(b)中的VL序列。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的抗CXCL12抗体分子,其包含:(a)与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VH序列、(b)与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VL序列、或者(c)如(a)中的VH序列和如(b)中的VL序列。

14. 前述权利要求中任一项所述的抗CXCL12抗体分子,其中所述抗体分子为完全抗体、单克隆抗体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、scFv、scFv-Fc、胞内抗体、纳米抗体、双链抗体、三链抗体、双特异性抗体和嵌合抗体。

15. 前述权利要求中任一项所述的抗CXCL12抗体分子,其中所述抗体分子为人抗体或人源化抗体。

16. 免疫缀合物,其包含根据权利要求1至15中任一项所述的抗体分子。

17. 权利要求16所述的免疫缀合物,其中所述抗体分子与例如细胞毒性部分或免疫刺激性部分的治疗活性部分缀合。

18. 权利要求16或权利要求17所述的免疫缀合物,其中所述细胞毒性部分为烷化剂、生物碱、铂配位络合物、细胞毒性肽、放射性药剂或能够转化成细胞毒性部分的前药。

19. 药物组合物,其包含根据权利要求1至18中任一项所述的抗体分子或免疫缀合物,以及可药用赋形剂。

20. 根据权利要求1至18中任一项所述的抗体分子或免疫缀合物,其用于治疗人体或动物体的方法。

21. 根据权利要求20所述的用于治疗人体或动物体的方法的抗体分子或免疫缀合物,其中所述方法用于治疗CXCL12介导的疾病。

22. 根据权利要求1至18中任一项所述的抗体分子或免疫缀合物,其用于治疗CXCL12介导的癌症或用于治疗WHIM综合征的方法。

23. 根据权利要求22所述的抗体分子或免疫缀合物,其中所述CXCL12介导的癌症过表达CXCL12。

24. 根据权利要求1至18中任一项所述的抗体分子或免疫缀合物在制备用于治疗CXCL12介导的癌症的药物中的用途。

25. 治疗患有CXCL12介导的癌症的个体的方法,其包括向有此需要的个体施用根据权

利要求1至18中任一项所述的抗体分子或免疫缀合物。

26. 权利要求22至25中任一项所述的用于治疗方法的抗体或免疫缀合物、用途或方法，其中所述CXCL12介导的癌症过表达CXCL12。

27. 权利要求22至26中任一项所述的用于治疗方法的抗体或免疫缀合物、用途或方法，其中所述抗体抑制VEGF诱导的血管发生和/或抑制CXCL12诱导的癌细胞迁移。

28. 权利要求22至27中任一项所述的用于治疗方法的抗体、用途或方法，其中所述癌症为卵巢癌、乳腺癌、骨癌、前列腺癌、甲状腺癌、胰腺癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、眼内淋巴瘤、滤泡中心性淋巴瘤、CML、结直肠癌、口腔鳞状癌、宫颈癌、神经母细胞瘤、肾癌、例如胶质瘤和星形细胞瘤的脑癌、横纹肌肉瘤、例如小细胞肺癌的肺癌、黑素瘤、例如B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)的B细胞恶性肿瘤、以及例如急性髓性白血病(AML)或急性淋巴细胞白血病的白血病。

29. 权利要求22至28中任一项所述的用于治疗方法的抗体、用途或方法，其中所述抗体与化学治疗剂、抗体治疗、免疫调节治疗、外科手术联合施用，或者与放射治疗联合施用，或者与细胞介导的治疗联合施用。

30. 权利要求22至29中任一项所述的用于治疗方法的抗体、用途或方法，其中所述抗体与血管发生抑制剂联合施用。

31. 权利要求30所述的用于治疗方法的抗体、用途或方法，其中所述血管发生抑制剂选自：靶向促血管发生生长因子受体的抗体或肽-抗体融合体，例如贝伐珠单抗(**Avastin®**)、西妥昔单抗(**Erbitux®**)、雷莫芦单抗(**Cyramza®**)、依库克单抗、HuMV833、2C3、阿柏西普(**Zaltrap®**)和IMC-1C11；小分子激酶抑制剂，例如索拉非尼(**Nexavar®**)、舒尼替尼(**Sutent®**)、帕唑帕尼(**Votrient®**)、依维莫司(**Afinitor®**)、AEE788、AAL881、AAL993、ZD4190、ABT-869(利尼伐尼)、PTK787(瓦他拉尼)、AMG706(莫特沙尼)、西地尼布(Recentin)、阿西替尼(**Inlyta®**)、凡德他尼(**Caprelsa®**)、SU6668、ZD1839、替拉替尼、尼达尼布(**Vargatef®**)、丙氨酸布立尼布、BMS-605541、BMS-645737、CEP-7055、多韦替尼、CP-547,632、E7080、GW654652、KRN633、替沃扎尼、OSI-930、PD173074、PF-00337210、SU1498、司马沙尼(SU5416)、SU5614、SU11657、SU14813、TKI-28、TKI-31和ZM323881；天然血管发生抑制剂，例如内皮细胞抑制素和血管抑素；以及能够抑制血管发生的药物，例如沙利度胺、角鲨胺和血管酶。

32. 根据权利要求1至15中任一项所述的抗体分子，其用于对患有CXCL12介导之病症的患者进行诊断或预后的方法。

33. 权利要求32所述的用于诊断或预后方法的抗体分子，其中所述方法包括使用所述抗体来确定样品中CXCL12的存在或量，并使CXCL12的存在或量与用CXCL12抑制剂治疗所述患者的可能结果相关联。

34. 根据权利要求1至18中任一项所述的抗体分子或免疫缀合物，其用于成像方法。

## 抗CXCL12抗体分子及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗CXCL12抗体分子及其用途,并且更具体地涉及能够抑制CXCL12的生物活性的抗CXCL12抗体分子及其用于治疗癌症的用途。

### 背景技术

[0002] C-X-C模体趋化因子12(C-X-C motif chemokine 12,CXCL12)(也被称为基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor 1,SDF-1))是人中由CXCL12基因编码的CXC趋化因子蛋白。已知其与两种G蛋白偶联受体CXCR4和CXCR7结合。其参与许多发育和生理过程,包括造血和血管发生。CXCL12通过凭借CXCR4依赖性机制从骨髓募集内皮祖细胞(endothelial progenitor cell,EPC)而在血管发生中发挥作用,使其成为致癌作用和与肿瘤进展相关的新血管形成中的重要因子。迁移是CXCL12影响肿瘤发生和进展的另一个重要方式。CXCL12还在数种癌症的器官-特异性转移中具有作用,其中表达受体CXCR4的癌细胞被吸引到释放CXCL12配体的转移靶组织。CXCL12还起募集CXCR4阳性基质细胞的作用并且调节免疫细胞浸润。例如,CXCL12可通过募集调节性T细胞来帮助形成转移前的小生境(niche),产生免疫抑制性环境(Zhao等,Oncoimmunology,1(2):152-161,2012)。在前列腺癌中,癌症相关成纤维细胞(cancer associated fibroblast,CAF)通过CXCL12来参与单核细胞募集和M2极化(Comito等,Oncogene,33:2423-2431,2014)。在胰腺癌模型中,高水平的CXCL12与低数量的T细胞相关,并且通过用PD-L1和CXCR4抑制剂进行联合治疗可增强T细胞浸润。T细胞浸润的这种增强伴随着肿瘤体积的显著减小,突显了CXCL12/CXCR4轴在癌症的免疫控制中的作用(Feig等,PNAS,110(50):第20212-20217页,2013)。

[0003] 因此,鉴于其在肿瘤生长、存活和血管发生中的作用,CXCL12/CXCR4/CXCR7途径作为潜在的治疗靶标已引起相当大的关注(Balkwill等,Seminars in Cancer Biology,14:171-179,2004)。

[0004] WO 2008/018641(Ono Pharmaceutical Co.Ltd和Medarex,Inc.)公开了与SDF-1特异性结合的人单克隆抗体,并且提出其用于治疗包括乳腺癌、多发性骨髓瘤和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)在内的多种B细胞恶性肿瘤以及自身免疫病的医疗用途。Zhong等(Clinical Cancer Research,19:4433-4445,2013;DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-0943)公开了仓鼠单克隆抗体30D8的人源化形式,并且显示其在体外测定中能够与人和鼠CXCL12结合。

### [0005] 发明概述

[0006] 广泛地说,本发明基于抗CXCL12抗体分子的亲和力成熟及其在基于细胞的测定中和体内显示抗体分子能够抑制CXCR4诱导的癌细胞迁移和/或能够抑制VEGF诱导的体外血管发生的功能验证。这些特性使得本发明的抗体分子能够用于治疗癌症,特别是通过抑制转移和/或肿瘤新血管形成来治疗癌症。

[0007] 因此,在第一方面,本发明提供了分离的CXCL12抗体分子,其与人和任选地鼠CXCL12特异性结合并且抑制CXCL12介导的生物活性,其中所述抗体分子与具有如SEQ ID

NO:24所示氨基酸序列的人CXCL12的表位结合,所述表位包含以下氨基酸:(a) P10和R12,以及任选地E15、I28、P32、N45和/或K54中的一个或多个;或者(b) P10和Q48,以及任选地K54和N45中的一个或多个。

[0008] 在另一方面,本发明提供了抗CXCL12抗体分子,其包含:(a) CDR-H1,其具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:1的氨基酸序列;(b) CDR-H2,其具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:2的氨基酸序列;以及(c) CDR-H3,其具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:3的氨基酸序列;以及任选地(d) CDR-L1,其具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:4的序列;(e) CDR-L2,其具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:5的序列;以及(f) CDR-L3,其具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:6的序列。

[0009] 在另一方面,本发明提供了抗CXCL12抗体分子,其包含:(a) CDR-H1,其具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:12的氨基酸序列;以及(b) CDR-H2,其具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:13的氨基酸序列;以及(c) CDR-H3,其具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及任选地:(d) CDR-L1,其具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者带有一个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:15的序列;以及(e) CDR-L2,其具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:16的序列;以及(f) CDR-L3,其具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者带有1、2、3个或多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:17的序列。

[0010] 在另一方面,本发明提供了包含如本文中所公开的抗体分子或免疫缀合物以及可药用赋形剂的药物组合物。

[0011] 在另一方面,本发明提供了如本文中所公开的抗体分子或免疫缀合物,其用于治疗人体或动物体的方法。

[0012] 在另一方面,本发明提供了如本文中所公开的抗体分子或免疫缀合物,其用于治疗CXCL12介导的病症的方法。

[0013] 在另一方面,本发明提供了如本文中所公开的抗体分子或免疫缀合物在制备用于治疗CXCL12介导的病症的药物中的用途。

[0014] 在另一方面,本发明提供了治疗患有CXCL12介导的病症的个体的方法,其包括向有此需要的个体施用如本文中所公开的抗体分子或免疫缀合物。

[0015] 在另一方面,本发明提供了本发明抗体分子,其用于对患有CXCL12介导之病症的患者进行诊断或预后的方法。例如,所述方法可包括使用所述抗体来确定样品中CXCL12的存在或量,并使CXCL12的存在或量与用CXCL12抑制剂治疗患者的可能结果相关联。

[0016] 在本发明的医疗用途和治疗方法中,优选地,CXCL12介导的病症是癌症,包括癌症和/或免疫细胞迁移和/或转移。可使用本发明的抗体或免疫缀合物来治疗的癌症类型包括卵巢癌、乳腺癌、骨癌、前列腺癌、甲状腺癌、胰腺癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤(non-

Hodgkin's lymphoma)、眼内淋巴瘤、滤泡中心性淋巴瘤 (follicular centre lymphoma)、CML、结直肠癌、口腔鳞状癌 (oral squamous carcinoma)、宫颈癌、神经母细胞瘤、肾癌、例如胶质瘤和星形细胞瘤的脑癌、横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma)、例如小细胞肺癌的肺癌、黑素瘤、例如B细胞慢性淋巴细胞白血病 (B-cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL) 的B细胞恶性肿瘤、以及例如急性髓性白血病 (acute myeloid leukaemia, AML) 和急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia) 的白血病。在另一些实施方案中, 本发明可用于治疗WHIM综合征。

[0017] 在另一些用途中, 类似于小分子CXCR4抑制剂 (普乐沙福 (Plerixafor), AMD3100) 的用途, 本发明可用于治疗其中CXCL12信号传导参与例如细胞动员 (例如在例如准备细胞移植时骨髓中的干细胞动员) 的病症。

[0018] 现在将参照附图通过举例而非限制的方式来描述本发明的一些实施方案。然而, 根据本公开内容, 本发明的多个其他方面和实施方案对本领域技术人员将是显而易见的。

[0019] 本文中“和/或”的情况被视为具体公开了各自具有或不具有另一个的两个指定特征或要素。例如, “A和/或B”被视为分别具体公开了 (i) A、(ii) B以及 (iii) A和B, 正如各自在本文中被单独列出。

[0020] 除非上下文另外指出, 否则上述特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施方案, 并且同样地适用于所描述的所有方面和实施方案。

#### [0021] 附图简述

[0022] 图1. 用于表达抗CXCL12抗体的载体系统。A) 使用pSANG10-3F载体的单链抗体 (single chain antibody, scFv) 表达。在该质粒中, scFv基因的转录在噬菌体T7启动子的控制之下。限制性位点NcoI、XhoI、NheI和NotI有利于将可变的重链 (VH) 和轻链 (VL) 基因亚克隆到Fab和IgG表达载体中。B) 使用pBIOCAM-7载体的Fab抗体表达。该质粒包含在CMV启动子的控制之下的双顺反子Fab表达盒。存在于重链基因和轻链基因之间的P2A序列允许通过核糖体跳读机制来释放其下游的抗体重多肽链 (VH-CH1)。P2A肽在翻译后通过弗林蛋白酶切割 (Furin cleavage) 从抗体轻链中除去。C) 使用pBIOCAM1-2双质粒系统的IgG表达。重链表达盒 (VH-CH1-CH2-Ch3) 和轻链表达盒位于两个不同的质粒中。质粒pBIOCAM-1编码轻链基因, 并且pBIOCAM-2编码重链盒。抗体基因的转录在两个质粒中的CMV启动子控制之下。pSANG10-3F和pBIOCAM7中与抗体基因融合的六-组氨酸 (6X-His) 和三-FLAG标签能够实现所表达抗体的纯化和免疫检测。

[0023] 图2. 抗-CXCL12Fab和IgG的SDS-PAGE分析。先导抗CXCL12抗体及其亲本克隆在HEK-293细胞中作为Fab和IgG表达。使用**SYPRO®Red**染色在还原性SDS-PAGE凝胶上使亲和纯化的抗体可视化。克隆093\_2D06、093\_2A02、114\_3H1 (标记为114\_3H01) 和113\_1H12分别作为Fab (泳道1至4) 和IgG (泳道5至8) 上样。一些Fab制备物中VH-CH1带的拖尾可能是由于FLAG标签的切割 (这在Flag标记的蛋白质中经常发生)。

[0024] 图3. 使用SPR的抗CXCL12抗体的亲和力测量。A) 多个浓度的先导和亲本抗CXCL12 Fab与固定在链霉亲和素芯片 (用链霉亲和素预固定的羧甲基葡聚糖基质) 上的生物素化CXCL12结合的传感图 (sensogram)。B) 使用1:1朗缪尔结合模型 (Langmuir binding model) 确定114\_3H1 (标记为114\_3H01) 的结合常数。亲本克隆093\_2D06由于其非常快的脱离速率 (off-rate) 而使用稳态结合模型来计算其平衡解离常数 (KD)。C) 抗体113\_1H12及其亲本克

隆093\_2A02显示出双相结合特征 (biphasic binding profile)。使用双态结合模型来确定这些抗体的结合常数。Biacore T100评价软件用于所有计算。

[0025] 图4. CXCL12诱导的卵巢癌细胞迁移。A) 通过涂覆有胶原蛋白的多孔膜来分离上室中荧光标记的人卵巢癌细胞 (TOV-21G) 和下室中的CXCL12。通过荧光扫描来量化细胞穿过膜的迁移。B) 通过滴定CXCL12 (范围为20至1200ng/ml) 来确定用于诱导细胞迁移的最佳人CXCL12浓度。在抑制测定中选择80ng/ml的CXCL12来刺激细胞迁移。所有误差条均表示标准偏差。

[0026] 图5. 抗CXCL12抗体对癌细胞迁移的抑制。使用荧光扫描来量化荧光标记的TOV-21G细胞向CXCL12的transwell迁移。将0.39至500nM的114\_3H1 (标记为114\_3H01) 和113-1H12IgG的滴定物与下室中的80ng/ml (10nM) 人CXCL12混合以测试这些抗体对CXCL12诱导的迁移的影响。使用抗溶菌酶抗体 (500nM) 作为同种型对照。所有误差条均表示标准偏差。

[0027] 图6. 抗CXCL12抗体对血管发生的抑制。将人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 平板接种在已经在经明胶包被的室载玻片上培养6天的成纤维细胞上。将这两种细胞类型在包含VEGF以及先导抗CXCL12抗体114\_3H1和113\_1H12的培养基中共培养7天。与溶菌酶结合的IgG (非特异性IgG) 用作测定的同种型对照 (图A)。在共培养7天之后, 针对血小板/内皮黏附分子-1 (PECAM-1, 血管发生的标志物) 对细胞进行染色以通过光学显微术使小管的形成和分支可视化。使用AngioSys图像分析软件来计算小管总数、分支接合处数 (图6A) 和总小管长度 (图6B)。

[0028] 图7. CXCL12抗体114\_3H1和113\_1H12的重链和轻链序列比对。

[0029] 图8. CXCL12抗体114\_3H1和113\_1H12与WO 2008/018641的抗体的重链和轻链序列比对的序列比对。

[0030] 图9A和B. 迁移踪迹, 其示出了确定抗体 (人IgG2形式的113\_1H12 (hAB113)、嵌合鼠IgG2a形式的113\_1H12 (mAB113) 和嵌合鼠IgG2a形式的114\_3H1 (mAB114)) 在人CXCL12存在下阻断鼠转移性黑素瘤细胞系 (B16F10) 和人卵巢癌细胞系 (TOV-21) 的迁移的有效性的实验结果。

[0031] 图10. 基于B16F10黑素瘤细胞的体内实验转移模型细胞迁移测定的结果, B16F10黑素瘤细胞需要CXCR4以迁移到肺并开始转移。在第0天, 通过尾静脉注射将B16F10黑素瘤细胞引入C57B1小鼠中, 并在第1天开始处理。处理方案为每天两次5mg/kg的临床CXCR4抑制剂AMD3100 (普乐沙福), 或者每周两次10、15或20mg/kg嵌合鼠IgG2a形式的抗CXCL12抗体。对照组的小鼠用20mg/kg的对照抗体每周处理两次。所有小鼠均在第14天被处死 (cull), 并量化肺中转移性集落的数量。用20mg/kg剂量的113\_1H12实现与AMD3100等效的抑制水平。

[0032] 图11. 体外细胞transwell迁移测定的结果, 其显示本发明的抗CXCL12抗体以scFv-Fc和人IgG2形式阻断人CXCL12诱导的TOV21G癌细胞迁移。

[0033] 发明详述

[0034] 抗-CXCL12抗体分子

[0035] 除非另外说明, 否则本文中根据Kabat编号方案来对抗体残基进行编号。

[0036] CXCL12的全长氨基酸序列如SEQ ID NO: 23所示, 并且由89个氨基酸组成。用于选择例示抗体的68个氨基酸的合成的CXCL12片段的氨基酸序列示于SEQ ID No: 24。以下实例中描述的表位作图研究使用具有SEQ ID NO: 25所示氨基酸序列的野生型成熟CXCL12多肽

(其包含多组氨酸标签和接头序列)。优选地,本发明的抗体分子能够与这样的CXCL12多肽结合,所述多肽包含与如SEQ ID NO:23所示的第1至68位氨基酸具有至少90%序列同一性的多肽或其片段,其中所述片段是生物活性的。本发明的抗体分子或免疫缀合物的生物活性的实例包括与CXCL12结合以例如阻断CXCL12与CXCR4的相互作用以及任选地还阻断CXCL12与CXCR7的相互作用。此外,可被本发明的抗体分子或免疫缀合物抑制(拮抗)的CXCL12生物活性包括抑制VEGF诱导的体外血管发生和/或抑制CXCL12诱导的癌细胞迁移和/或扩散和/或转移。本发明的抗体分子或免疫缀合物还可抑制CXCL12在调节免疫细胞浸润中的作用。在本文中的实例中描述了用于确定癌细胞的迁移和转移的测定。

[0037] 如以下实例中详细描述,初级抗CXCL12抗体的体外亲和力成熟以两步进行。首先,通过轻链混编(shuffling)使初级抗体序列多样化以产生衍生物文库。其次,使用经调整的选择和筛选操作来从轻链混编文库中鉴定亲和力提高的变体。使用轻链混编来使初级抗CXCL12抗体多样化的基本原理如下。体内(免疫前B-细胞库)或体外(“McCafferty文库”)天然免疫库的最初多样性来自于种系可变基因区段的组合重排。轻链可变区(VL)由长V基因片区段和短连接(J)基因区段的组合编码。相比之下,编码重链可变区(VH)的基因由三个基因区段(V区段、J区段和多样性(D)区段)装配,并且因此两条可变链更具多样性。由于这种提高的多样性,尤其是在CDR3区中,VH结构域趋向于在抗原结合和限定表位特异性中发挥主导作用。由于VL结构域也有助于精细调整结合亲和力和抗体表达水平,因此重要的是在文库中具有尽可能多的VH-VL组合以鉴定具有期望表达特性的高亲和力抗体。在以下实例中,通过将20种抗CXCL12抗体的重链可变区与 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链可变结构域的库组合产生 $2 \times 10^8$ 的轻链混编文库。因此,每个原始重链与约1000万个新的轻链配偶体配对。在严格条件下进行三轮噬菌体展示选择以从链混编文库中富集高亲和力结合剂。在每一轮时通过降低抗原浓度或使用更严苛且更长的清洗步骤来提高选择条件的严格性。这样的选择操作有利于具有较低解离常数的抗体克隆优先富集。

[0038] 亲和力成熟选择在溶液相中进行从而允许精确控制抗原浓度,其是决定选择的严格性的重要参数。该过程鉴定到两种表现出最低解离常数的抗体(114\_3H1和113\_1H12),其被选择作为用于进行详细表征和优化的先导抗体。114\_3H1和113\_1H12及其亲本克隆(分别为093\_2D06和093\_2A02)的完全动力学分析证实在轻链混编之后亲和力提高。对于114\_3H1而言,1nM的计算亲和力代表比其亲本抗体093\_2D06( $KD=3.8\mu M$ )提高了3800倍。由于另一亲本抗体093\_2A02的亲和力( $KD=16.7nM$ )在开始时相对较高,因此其子克隆113\_1H12的亲和力提高导致 $KD=3.7nM$ 。

[0039] 除结合和动力学研究之外,还在基于细胞的功能测定中测试抗体分子的生物特性以确定其可能的体内效力,因为这不一定与结合相关联,尤其是如果抗体分子旨在调节复杂的生物功能。鉴于CXCL12在癌症转移和建立肿瘤支持性脉管系统中的作用,本发明抗体分子的生物特性包括抑制CXCL12诱导的癌细胞迁移和/或抑制VEGF诱导的体外血管发生。

[0040] 可使用transwell迁移测定来确定抑制CXCL12诱导的癌细胞迁移的生物特性,在此使用的是用于研究白细胞的趋化应答的Boyden室测定(Boyden, J. Exp. Med. 115, 453-46, 1962)的改进形式,其中确定接种在上室中的荧光标记癌细胞(例如人卵巢癌细胞TOV-21G)穿过多孔膜并且进入包含CXCL12的下室的迁移。

[0041] 可使用基于细胞的测定来确定抑制血管发生的生物特性,其中在包含抗CXCL12抗

体和VEGF的培养基中一起培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和成纤维细胞。这两种细胞类型在VEGF存在下的相互作用导致形成类似于体内小毛细管的三维管,参见Hetheridge等(Biochem.Soc.Trans.39,1597-1600,2011)。

[0042] 使用体外癌细胞迁移测定和血管发生测定来测试两种先导抗体114\_3H1和113\_1H12以评价其功能特征。两种抗体均抑制CXCL12诱导的卵巢癌细胞迁移,其中114\_3H1表现超过113\_1H12。对于两种抗体而言,在该测定中观察到的IC<sub>50</sub>与来自SPR分析的计算KD值相当。此外,抗体克隆113\_1H12显著抑制VEGF诱导的血管发生,而抗体克隆114\_3H1部分地抑制VEGF诱导的血管发生。

[0043] 不希望被任何特定的理论限制,抗体特性的这种差异可以是以下事实的结果: CXCL12可以通过与CXCR4和CXCR7二者的相互作用来诱导血管发生。因此,可能114\_3H1仅阻断CXCL12/CXCR4相互作用,但不阻断CXCL12/CXCR7,导致部分地抑制血管发生。相比之下,113\_1H12可能阻断CXCL12与CXCR4和CXCR7二者结合,导致更优地抑制CXCL12诱导的血管发生。

[0044] 因此,本发明提供了基于抗体克隆113\_1H12或114\_3H1的抗体分子。

[0045] 在一方面,本发明提供了抗CXCL12抗体分子,其包含基于抗体114\_3H1的CDR序列的以下至少1、2、3、4、5或6种CDR序列:

[0046] (a) CDR-H1,其具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:1的氨基酸序列;和/或

[0047] (b) CDR-H2,其具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和/或

[0048] (c) CDR-H3,其具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和/或

[0049] (d) CDR-L1,其具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:4的序列;和/或

[0050] (e) CDR-L2,其具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:5的序列;和/或

[0051] (f) CDR-L3,其具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:6的序列。

[0052] 在一个实施方案中,抗CXCL12抗体分子包含上文限定的全部六种CDR,其任选地具有一个或更多个氨基酸替换、缺失或插入。

[0053] 在另一方面,本发明提供了抗CXCL12抗体分子,其包含基于抗体113\_1H12的CDR序列的以下至少1、2、3、4、5或6种或者更多种CDR序列:

[0054] (a) CDR-H1,其具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:12的氨基酸序列;和/或

[0055] (b) CDR-H2,其具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和/或

[0056] (c) CDR-H3,其具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:14的氨基酸序列;和/或

[0057] (d) CDR-L1,其具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者带有一个或更多个氨基酸替

换、缺失或插入的SEQ ID NO:15的序列;和/或

[0058] (e) CDR-L2,其具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:16的序列;和/或

[0059] (f) CDR-L3,其具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者带有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入的SEQ ID NO:17的序列。

[0060] 在一个实施方案中,抗CXCL12抗体分子包含上文限定的全部六种CDR(SEQ ID NO:12至17),其任选地具有一个或更多个氨基酸替换、缺失或插入。

[0061] 轻链可变区(VL)由长V基因区段和短连接(J)基因区段的组合编码。相比之下,编码重链可变区(VH)的基因由三个基因区段(V区段、J区段和多样性(D)区段)装配,并且因此两条可变链更具多样性。由于这种提高的多样性,尤其是在CDR3区中,VH结构域趋向于在抗原结合和限定表位特异性中发挥主导作用。

[0062] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了这样的抗CXCL12抗体分子,其包含与来源于不同抗体分子之轻链组合的如本文中所述限定的例示抗体的重链CDR,所述CDR任选地各自具有1、2、3个或更多个氨基酸替换、缺失或插入。

[0063] 在另一方面,本发明提供了抗CXCL12抗体,其包含:(a) VH结构域,其包含选自以下的至少一种、至少两种或全部三种VH CDR序列:(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H2、以及(iii)包含选自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H3;以及(b) VL结构域,其包含选自以下的至少一种、至少两种或全部三种VL CDR序列:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-L2、以及(c)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR-L3。

[0064] 在另一方面,本发明的抗体分子包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,VH序列相对于参照序列包含一个或更多个替换、插入或缺失,同时抗体分子保留与CXCL12结合的特性,以及任选地一种或更多种如本文中描述的本发明抗CXCL12抗体分子的其他生物活性。优选地,VH结构域包含选自以下的1、2或3个CDR:(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H2、以及(iii)包含选自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H3。

[0065] 在另一方面,本发明的抗体分子包含VL结构域,其包含SEQ ID NO:9所示氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,VH序列相对于参照序列包含一个或更多个替换、插入或缺失,同时抗体分子保留与CXCL12结合的特性,以及任选地一种或更多种如本文中描述的本发明抗CXCL12抗体分子的其他生物活性。优选地,VL结构域包含选自以下的1、2或3个CDR:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-L2、以及(c)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR-L3。

[0066] 在一些实施方案中,本发明的抗体分子包含:VH结构域,其包含SEQ ID NO 7所示氨基酸序列或者与SEQ ID NO:7具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列;以及VL结构域,其包含SEQ ID NO 9所示氨基酸序列或者与SEQ ID NO:9具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的序列。

[0067] 在另一方面,本发明提供了本发明的抗CXCL12抗体,其包含:(a) VH结构域,其包含选自以下的至少一种、至少两种或全部三种VH CDR序列:(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-H2、以及(iii)包含选自SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-H3;以及(b) VL结构域,其包含选自以下的至少一种、至少两种或全部三种VL CDR序列:(i)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2、以及(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L3。

[0068] 在另一方面,本发明的抗体分子包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:18所示氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,VH序列相对于参照序列包含一个或更多个替换、插入或缺失,同时抗体分子保留与CXCL12结合的特性,以及任选地一种或更多种如本文中描述的本发明抗CXCL12抗体分子的其他生物活性。优选地,VH结构域包含选自以下的1、2或3个CDR:(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-H2、以及(iii)包含选自SEQ ID NO:14氨基酸序列的CDR-H3。

[0069] 在另一方面,本发明的抗体分子包含VL结构域,其包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,VH序列相对于参照序列包含一个或更多个替换、插入或缺失,同时抗体分子保留与CXCL12结合的特性,以及任选地一种或更多种如本文中描述的本发明抗CXCL12抗体分子的其他生物活性。优选地,VL结构域包含选自以下的1、2或3个CDR:(i)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2、以及(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L3。

[0070] 在一些实施方案中,本发明的抗体分子包含:VH结构域,其包含SEQ ID NO:18所示氨基酸序列或者与SEQ ID NO:18具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列;以及VL结构域,其包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列或者与SEQ ID NO:20具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0071] 在另一方面,本发明提供了能够与具有如SEQ ID NO:24或25所示氨基酸序列的CXCL12的表位结合的抗CXCL12抗体分子,所述表位包含以下氨基酸:(a) P10和R12,以及任选地E15、I28、P32、N45和/或K54中的一个或更多个;或者(b) P10和Q48,任选地K54和N45中的一个或更多个。例示的抗体114\_3H1与表位(a)结合,抗体113\_1H12与表位(b)结合。

[0072] E15在参与受体或肝素结合的区域之外。所有的其他表位残基在参与受体结合的区域之内,其根据全长蛋白质在UniProt P48061 (SDF1\_HUMAN)的编号为29至33、39至41、48至50、60至70)。

[0073] 在一方面,本发明提供了分离的抗体分子,其结合CXCL12并且包含114\_3H1VH结构域(SEQ ID NO:7)和/或114\_3H1VL结构域(SEQ ID NO:9)。优选地,CXCL12是人CXCL12,并且任选地还是鼠CXCL12。

[0074] 在另一方面,本发明提供了分离的抗体分子,其结合CXCL12并且包含113\_1H12VH结构域(SEQ ID NO:18)和/或113\_1H12VL结构域(SEQ ID NO:20)。优选地,CXCL12是人CXCL12,并且任选地还是鼠CXCL12。

[0075] 通常来说,VH结构域与VL结构域配对以提供抗体抗原结合位点,但是如以下进一

步讨论的,VH结构域单独可用于结合抗原。在一些优选实施方案中,114\_3H1或113\_1H12VH结构域(SEQ ID NO:7或18)与114\_3H1或113\_1H12VL结构域(SEQ ID NO:9或20)配对,使得形成包含114\_3H1或113\_1H12VH和VL两个结构域的抗体抗原结合位点。在另一些实施方案中,使114\_3H1或113\_1H12 VH与不同于114\_3H1或113\_1H12VL的VL结构域配对。轻链混杂性(promiscuity)是本领域中公认的。

[0076] 可以从114\_3H1或113\_1H12VH或VL结构域获取一个或多个CDR,并将其并入合适的框架中。这在下面进一步讨论。114\_3H1 VH CDR H1、H2和H3分别示于SEQ ID NO:1、2和3。114\_3H1 VL CDR L1、L2和L3分别示于SEQ ID NO:4、5和6。113-1H12 VH CDR H1、H2和H3分别示于SEQ ID NO:12、13和14。113\_1H12 VL CDR L1、L2和L3分别示于SEQ ID NO:15、16和17。

[0077] 在一方面,本发明提供了抗CXCL12抗体,其结合CXCL12并且包含:

[0078] 抗体VH结构域,其选自:114\_3H1 VH结构域(SEQ ID NO:7),以及包含具有SEQ ID NO:3之氨基酸序列的VH CDR3以及任选地一个或多个具有选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2之氨基酸序列的VH CDR的VH结构域;和/或

[0079] 抗体VL结构域,其选自:114\_3H1VL结构域(SEQ ID NO:9),以及包含一个或多个具有选自SEQ ID NO:4、5和6之氨基酸序列的VL CDR的VL结构域。

[0080] 在一方面,本发明提供了抗CXCL12抗体,其结合CXCL12并且包含:

[0081] 抗体VH结构域,其选自:113\_1H12VH结构域(SEQ ID NO:18),以及包含具有SEQ ID NO:14之氨基酸序列的VHCDR3以及任选地一个或多个具有选自SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13之氨基酸序列的VHCDR的VH结构域;和/或

[0082] 抗体VL结构域,其选自:113\_1H12VL结构域(SEQ ID NO:20)以及包含一个或多个具有选自SEQ ID NO:15、16和17之氨基酸序列的VL CDR的VL结构域。

[0083] 如实例中所示,本发明的抗体分子可以耐受对CDR序列的许多氨基酸改变,同时保留亲本抗体的特性。例如,与SEQ ID NO:1至6和12至17中的任何一个相比,抗体分子的CDR的氨基酸序列可各自包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸替换、缺失或插入。

[0084] 如本领域中公知的,CDR可以存在于一系列的不同抗体类型或框架区,其任选地涉及一个或多个另外的序列改变以确保保留如本文中所公开抗体的有用特性。例如,图11显示,本发明的抗体在scFv-Fv融合体和IgG2形式中具有功能性。

[0085] VH和VL结构域各自通常包含负责抗原结合散布有框架区的三个互补决定区(CDR)。在一个示例性实施方案中,本发明提供了这样的抗体分子,其包含:含有分别具有SEQ ID NO:1、2和3的序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的VH结构域;和/或含有分别具有SEQ ID NO:4、5和6的序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的VL结构域。在另一个示例性实施方案中,本发明提供了这样的抗体分子,其包含:含有分别具有SEQ ID NO:12、13和14的序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的VH结构域;和/或含有分别具有SEQ ID NO:15、16和17的序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的VL结构域。

[0086] 本发明还提供了scFv形式的抗CXCL12抗体分子,其与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:22具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。

[0087] 一般性地,本发明涉及能够抑制CXCL12的生物活性的抗体分子,即本领域技术人

员所理解的拮抗剂抗体分子。例如,可以在体外癌细胞迁移测定和体内血管发生测定中确定特性。生物活性包括抑制CXCL12诱导的癌细胞生长、抑制癌细胞迁移、抑制癌细胞黏附、抑制癌症转移和/或血管发生,例如VEGF诱导的血管发生。任选地,本发明的抗体分子通过结合并隔离CXCL12从而阻止其与其所存在的生物系统中的受体相互作用来发挥功能。

[0088] 抗CXCL12抗体分子的结合动力学和亲和力(表示为平衡解离常数Kd)可以使用标准技术(例如表面等离子体共振(例如,使用BIAcore分析))来确定,例如如以下实验例中所述的。或者,可以使用用目的抗体的Fab形式和CXCL12进行的放射性标记抗原结合测定(RIA)来测量Kd。

[0089] 抗CXCL12抗体分子对CXCL12的解离常数可以是小于50nM、小于40nM、小于30nM、小于20nM、小于10nM、或小于1nM。例如,抗体分子对CXCL12的亲和力可以是1nM至20nM,例如9nM至15nM。优选地,本发明的抗体分子对人CXCL12的亲合常数(K<sub>d</sub>)为小于10nM,更优选小于5nM,并且最优选小于3nM。此外,本发明的抗体优选地还与其他物种的CXCL12(例如鼠CXCL12)结合,使其与动物疾病模型相容。与CXCL12结合的亲和常数可使用本领域公知的技术(例如如以下实验例中例示的Biacore SPR分析)来确定。

[0090] 根据上述方面或实施方案中任一项的本发明抗CXCL12抗体分子是单克隆抗体,包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。抗体分子可以是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、scFv-Fc、双链抗体(diabody)、或F(ab')<sub>2</sub>完全抗体、三链抗体(triobody)、双特异性抗体或嵌合抗体。

[0091] 根据本发明的抗体的优选形式包括IgG、scFv-Fc、Fab和scFv。在另一个实施方案中,抗CXCL12抗体分子可以是全抗体。例如,IgG、IgA、IgE或IgM或者任何同种型亚类,特别是IgG1和IgG4。抗CXCL12抗体分子可以是单克隆抗体。抗体分子及其构建和使用方法在例如Hollinger&Hudson,Nature Biotechnology 23(9):1126-1136(2005)中描述。

[0092] 抗体分子通常包含含有免疫球蛋白重链可变结构域(VH)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL)的抗原结合结构域,但是仅含有重链可变结构域(VH)的抗原结合结构域也是可能的(例如骆驼或鲨鱼抗体)。这样的抗体包括在本发明的范围内。

[0093] 在一些情况下,可以修饰本发明的抗体分子以改变抗体分子糖基化的程度。这可以通过改变氨基酸序列使得产生或除去亲本抗体中存在的一个或更多个糖基化位点来实现。特别地,当抗体分子包含Fc区时,已知改变与Fc区连接的碳水化合物可以改变抗体分子的特性,特别地通过降低Fc区的岩藻糖基化,可提高ADCC功能。

[0094] 在不含污染物例如能够结合其他多肽和/或血清组分的抗体的意义上,如本文中所述的抗CXCL12抗体分子可以是分离的。对于大多数目的而言,单克隆抗体是优选的,但是也可以使用多克隆抗体。

[0095] 产生抗CXCL12抗体分子的方法包括用蛋白质或其片段免疫接种哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔、马、山羊、绵羊或猴)。可以使用本领域中已知的多种技术中的任一种从经免疫接种的动物获得抗体,并优选地使用抗体与目的抗原的结合进行筛选。例如,可以使用Western印迹技术或免疫沉淀(Armitage等,1992,Nature 357:80-82)。从动物分离抗体和/或抗体产生细胞(antibody-producing cell)可伴随处死动物的步骤。

[0096] 作为用肽免疫接种哺乳动物的替代或补充,可以使用例如在其表面上展示功能性免疫球蛋白结合结构域的λ噬菌体或丝状噬菌体从重组产生的所表达免疫球蛋白可变结构

域的文库获得蛋白质特异性的抗体。该文库可以是天然的,即由从未被任何蛋白质(或片段)免疫接种的生物体获得的序列构建,或者可以是使用从已暴露于目的抗原的生物体获得的序列构建的文库。

[0097] 在本发明中,可以使用实例中所描述的方法来筛选具有拮抗特性的抗CXCL12抗体的另一些实例。在产生和/或分离之后,可以测试抗CXCL12抗体分子的生物活性。例如,可以确定选自以下的一种或更多种生物活性:抑制CXCL12诱导的癌细胞生长、抑制癌细胞迁移、抑制癌细胞黏附、抑制癌症转移和/或血管发生(例如VEGF诱导的血管发生)。

[0098] 抗体分子之间的竞争可以在体外容易地进行测定,例如使用ELISA和/或通过向一种抗体分子标记特异性报道分子来测定,所述特异性报道分子可以在一种或更多种其他未标记的抗体分子存在下被检测到,以使得能够鉴定结合相同表位或重叠表位的抗体分子。这样的方法对于本领域普通技术人员而言是容易知晓的。

[0099] 本发明还提供了编码本发明的抗体分子的核酸分子。所述核酸分子可用于表达抗CXCL12抗体分子,例如通过将核酸序列并入具有可操作地连接至编码抗CXCL12抗体分子之核酸以控制其表达的控制序列的表达载体中进行。载体可以包含其他序列,例如驱动所插入核酸表达的启动子或增强子、使得抗CXCL12抗体分子作为融合体产生的核酸序列和/或编码分泌信号使得在宿主细胞中产生的多肽从细胞分泌的核酸。可以选择或构建包含合适调节序列的合适载体,所述调节序列包括启动子序列、终止子片段、多聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因以及其他合适的序列。载体可以是质粒或者是病毒,例如噬菌体或噬菌粒,视情况而定。更多细节参见例如Molecular Cloning:a Laboratory Manual:第二版,Sambrook等,1989,Cold Spring Harbour Laboratory Press.Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel等编辑,John Wiley&Sons,1992中详细描述了许多已知的核酸操作技术和方案,例如核酸构建体的制备、诱变、测序、将DNA导入细胞中和基因表达,以及蛋白质分析。

[0100] 抗CXCL12抗体分子可以如下获得:将载体转化到该载体在其中具有功能的宿主细胞中,培养宿主细胞使得产生抗CXCL12抗体分子,并从宿主细胞或周围培养基中回收抗CXCL12抗体分子。在本领域中,原核和真核细胞用于该目的的,包括大肠杆菌(E.coli)菌株、昆虫细胞(例如用杆状病毒转化的)、酵母、以及例如COS或CHO细胞的真核细胞。宿主细胞的选择可用于控制在这些细胞中表达的抗CXCL12抗体分子的特性,例如控制多肽沉积在宿主细胞中的条件,或者影响例如其糖基化和磷酸化的特性。如果多肽被表达为与合适的信号前导肽偶联,则其可以从细胞分泌到培养基中。在通过表达产生之后,可以根据具体情况从宿主细胞和/或培养基中分离和/或纯化本发明的抗体分子,并随后如所期望地使用,例如用于配制组合物,所述组合物可包含一种或更多种另外的组分,例如载体,如本申请其他部分所述的。

[0101] 因此,在另一些方面,本发明提供了编码本发明的抗CXCL12抗体分子的核酸;包含编码抗CXCL12抗体分子的核酸的表达载体,所述核酸与控制序列可操作地连接以指导其表达;以及转化有该表达载体的宿主细胞。在又一方面,本发明提供了产生本发明的抗CXCL12抗体分子的方法,所述方法包括培养宿主细胞并分离由此产生的抗CXCL12抗体分子。

[0102] 衍生化的抗体分子

[0103] 本发明的抗体分子还可以被衍生化以改变其特性,特别是其药理学特性,例如半

衰期(例如,延长半衰期)。一个实例是使抗体分子与可用于提高多肽治疗剂的半衰期或其他药理学特性的聚(亚烷基二醇)分子,特别是聚乙二醇(PEG)分子缀合。聚乙二醇化是用于改变治疗性多肽(例如,肽、蛋白质和抗体)的特性的已知策略。通常来说,使PEG分子与多肽连接用于改变其构象、静电或疏水特性,并且导致改善其生物学和药理学特性,例如提高药物溶解度、降低剂量频率、调节(尤其是延长)循环半衰期、提高药物稳定性以及提高对蛋白水解性降解的抗性。聚乙二醇化通过使多肽与一个或更多个PEG聚合物分子缀合提高治疗性多肽的分子量来起作用。这特别地适用于作为完全抗体的片段的抗体分子类型,例如Fab片段。

[0104] 这可以通过使抗体分子中存在的合适官能团与反应性聚(亚烷基二醇)分子反应来对本发明的抗体分子进行。根据本发明抗体分子中可用的官能团,可以以选择性方式例如通过鉴定抗体分子中合适的反应性半胱氨酸残基来使抗体分子聚乙二醇化。聚(亚烷基二醇)分子在本领域中可互换地称为聚(环氧烷烃)分子,并且为聚醚。聚(亚烷基二醇)分子可以具有支链、支链、梳形或星形结构,并且通常是高度水溶性的。此外,碱性聚(亚烷基二醇)结构可以提供有一个或更多个例如羟基、胺、羧酸、烷基卤或硫醇基的反应性官能团以有利于聚(亚烷基二醇)分子与例如多肽的其他物质反应。优选的聚(亚烷基二醇)分子包括在一个或更多个羟基位置被化学基团(例如具有1至4个碳原子的烷基)取代的那些。根据本发明使用的优选聚(亚烷基二醇)分子是聚乙二醇(“PEG”)分子,但是本领域技术人员也能够使用例如聚丙二醇或聚乙二醇-聚丙二醇共聚物的其他聚(亚烷基二醇)分子来衍生化本发明的抗体分子。包括PEG在内的聚(亚烷基二醇)分子的分子量通常为约400Da至约80kDa,更优选约1kDa至约60kDa,并且更优选约5kDa至约50kDa,例如分子量为10kDa、20kDa、30kDa或40kDa。可以根据本发明使用的聚(亚烷基二醇)分子是本领域中公知的,并且可以公开获得,例如从例如SigmaAldrich的可商购获得来源公开获得。

[0105] 本发明还提供了免疫缀合物,其包含与一种或更多种细胞毒剂缀合的本文中描述的抗CXCL12抗体分子,所述细胞毒剂例如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白质毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或者其片段)、或放射性同位素。

[0106] 在一方面,本发明的免疫缀合物是其中抗体与一种或更多种药物(例如化学治疗药物)缀合的抗体-药物缀合物(antibody-drug conjugate,ADC)。抗体部分任选地通过接头与药物连接。

#### [0107] 成像应用

[0108] 本发明的抗体分子可被另外标记以使其能够与其治疗用途结合或独立于其治疗用途而用于成像。用于标记抗体的技术是本领域中公知的,其使抗体能够用于一系列的成像和光谱应用。这可以用于许多不同的医学或研究应用,例如用于肿瘤学、心血管医学或移植排斥的领域。

[0109] 抗体分子用于成像的用途的一个具体实例涉及放射性核素标记在核医学成像技术中的用途,所述核医学成像技术例如单光子发射计算机断层显像(Single Photon Emission Computed Tomography,SPECT),其是检测从放射性核素发射的 $\gamma$ 射线以产生放射性核素在样品或对象中的分布的二维图像的成像技术,以及正电子发射断层摄影(Positron Emission Tomography,PET),其是通过检测引入到样品或对象中的正电子发射放射性核素间接发射的 $\gamma$ 射线对的三维图像的成像技术。具有放射性核素标记的抗体分子

也可用于其中组合成像技术的多模态研究,通过选择在多于一种成像技术中具有活性的放射性核素或者通过用多于一种类型的标记来标记抗体分子。

[0110] 本发明的抗体分子可以用放射性核素(例如作为复合物)提供或者与可与标记相关的第二分子(例如接头)缀合的放射性核素标记。用于成像技术或治疗的放射性核素的实例包括:锝、铈、铜、钴、镓和铟的同位素,例如Tc-99m、Re-186、Re-188、Co-57、Ga-67、In-111(SPECT)、Cu-64、Cu-60、Cu-61、Cu-62、Cu-67、Tc-94m、Ga-68、Co-55(PET)。通常来说,锝同位素用于成像目的,铈同位素用于治疗目的,且铜同位素用于成像和治疗二者。

#### [0111] 医疗用途

[0112] 已报道CXCL12通过凭借CXCR4依赖性机制从骨髓中募集内皮祖细胞(EPC)来参与血管发生,使其成为致癌作用和与肿瘤进展相关的新血管形成中的显著因子。CXCL12还在肿瘤转移中起作用,其中表达受体CXCR4的癌细胞被吸引到释放配体CXCL12的转移靶组织。因此,鉴于其在肿瘤生长、存活和血管发生中的作用,CXCL12/CXCR4/CXCR7途径作为潜在的治疗靶标已引起相当大的关注。

[0113] 因此,如在Balkwill等,Seminars in Cancer Biology,14:171-179,2004中综述的,已经显示CXCL12在肿瘤的器官特异性转移中是重要的。表达CXCL12/CXCR4的肿瘤包括卵巢癌、乳腺癌、骨癌、前列腺癌、甲状腺癌、胰腺癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、眼内淋巴瘤、滤泡中心性淋巴瘤、CML、结直肠癌、口腔鳞状癌、宫颈癌、神经母细胞瘤、肾癌、例如胶质瘤和星形细胞瘤的脑癌、横纹肌肉瘤、例如小细胞肺癌的肺癌、黑素瘤、例如B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)的B细胞恶性肿瘤、以及例如急性髓性白血病(AML)的白血病。

[0114] 已知CAF分泌CXCL12,并且这在乳腺癌(Orimo等,Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion,Cell,121(3):335-348,2005)和胰腺癌(Feig等,Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer.P.N.A.S.,110:50:20212-20217:2013)中直接提高血管发生和肿瘤生长。此外,在胰腺癌模型中,高水平的CXCL12与低数量的T细胞相关,并且通过用PD-L1和CXCR4抑制剂进行联合治疗可提高T细胞浸润。T细胞浸润的这种提高伴随着肿瘤体积的显著减小,凸显了CXCL12/CXCR4轴在癌症的免疫控制中的作用(Feig等,PNAS,110(50):第20212-20217页,2013)。

[0115] 已经显示某些化学治疗剂、抗血管发生剂和照射引起CXCL12/CXCR4的额外上调,这有助于治疗后的肿瘤复发。CXCL12的水平升高触发内皮祖细胞的动员(Shaked等,Cancer Cell,14(3):263-273,2008)和单核细胞向肿瘤募集(Hughes等,Cancer Res,75(17):OF1-OF13,2015),其刺激肿瘤侵袭、新血管形成和转移以及抑制抗肿瘤免疫应答。因此,本发明的抗CXCL12抗体与这些类型的CXCL12/CXCR4诱导剂的组合可具有临床益处。

[0116] 在另一些实施方案中,本发明的抗体分子或免疫缀合物可用于治疗WHIM综合征(疣、低丙球蛋白血症、感染和先天性骨髓粒细胞缺乏综合征(Myelokathexis syndrome)),其是由趋化因子受体CXCR4中突变引起的以慢性非循环性中性粒细胞减少症为特征的罕见先天性免疫缺陷病。

[0117] 在一些实施方案中,本发明的抗体分子或免疫缀合物可以与另外的癌症治疗联合施用或与放射治疗联合施用。例如,本发明的抗体分子或免疫缀合物可以与化学治疗剂、抗

体治疗、免疫调节治疗、外科手术联合施用,或者与放射治疗联合施用,或者与细胞介导的治疗联合施用。在一些实施方案中,抗体分子和另外的癌症治疗一起施用,任选地作为组合配方一起施用。或者,抗体分子和另外的癌症治疗可以交替施用,其中在抗体分子之前施用另外的癌症疗法,或者在抗体分子之后施用另外的癌症治疗。该组合可以根据临床实践施用,例如以约一周至三周的间隔施用。

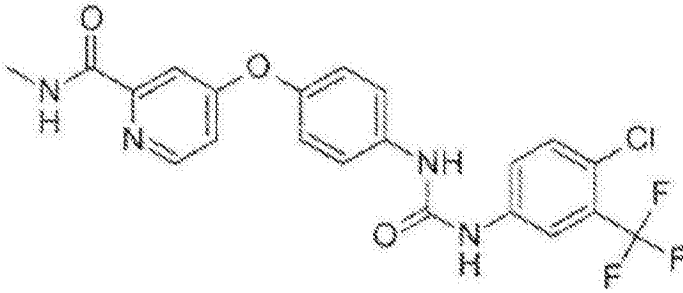
[0118] 在一个具体实施方案中,本发明的抗体分子与血管发生抑制剂联合施用。基于本发明抗体分子的作用方式,与血管发生抑制剂的联合治疗可提供相加或协同效应(参见Liang等,CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway,Biochem.Biophys.Res.Commun.359(3):716-722,2007)。

[0119] 本文中所使用的血管发生抑制剂包括直接或间接抑制血管发生、血管生成或不期望的血管渗透性的药剂。应当理解,血管发生抑制剂包括结合并阻断血管发生因子或其受体的血管发生活性的那些药剂。参见例如,Grothey和Galanis(2009)Nat.Rev.Clin.Oncol.6(9):507-18(例如表1列出了大分子VEGF抑制剂);Ivy,Wick和Kaufman(2009)Nat.Rev.Clin.Oncol.6(9):569-7(例如补充表1列出了小分子受体酪氨酸激酶抑制剂)。

[0120] 血管发生抑制剂包括靶向促血管发生生长因子受体的抗体或肽-抗体融合体,例如贝伐珠单抗(**Avastin®**)、西妥昔单抗(**Erbix®**)、雷莫芦单抗(**Cyramza®**)、依库单抗(Icrucumab)、HuMV833、2C3、阿柏西普(**Zaltrap®**)和IMC-1C11。另一些血管发生抑制剂包括小分子激酶抑制剂,例如索拉非尼(**Nexavar®**)、舒尼替尼(**Sutent®**)、帕唑帕尼(**Votrient®**)、依维莫司(**Afinitor®**)、AEE788、AAL881、AAL993、ZD4190、ABT-869(利尼伐尼)、PTK787(瓦他拉尼)、AMG706(莫特沙尼)、西地尼布(Recentin)、阿西替尼(**Inlyta®**)、凡德他尼(**Caprelsa®**)、SU6668、ZD1839、替拉替尼、尼达尼布(**Vargatef®**)、丙氨酸布立尼布、BMS-605541、BMS-645737、CEP-7055、多韦替尼、CP-547,632、E7080、GW654652、KRN633、替沃扎尼(Tivozanib)、OSI-930、PD173074、PF-00337210、SU1498、司马沙尼(Semaxanib,SU5416)、SU5614、SU11657、SU14813、TKI-28、TKI-31和ZM323881。天然血管发生抑制剂的实例是内皮细胞抑制素和血管抑素。用于抑制血管发生的另一些药物包括沙利度胺、角鲨胺和血管酶(angiozyme)。

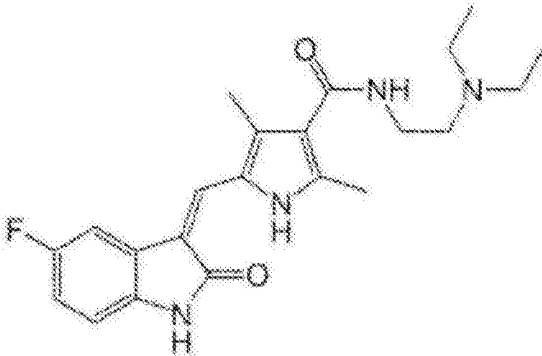
[0121] 贝伐珠单抗(**Avastin®**)是根据Presta等,(1997)Cancer Res.57(20):4593-4599产生的重组人源化抗VEGF单克隆抗体。阿柏西普是由与人IgG1的Fc部分融合的VEGF结合部分组成的重组肽-抗体融合体。索拉非尼(**Nexavar®**)是阻断受体酪氨酸激酶VEGFR、PDGFR(血小板衍生生长因子受体)、RAF丝氨酸/苏氨酸激酶和c-KIT的多激酶抑制剂。在化学术语中,索拉非尼被命名为4-[4-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]氨基甲酰基氨基]苯氧基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺,并且具有以下结构:

[0122]



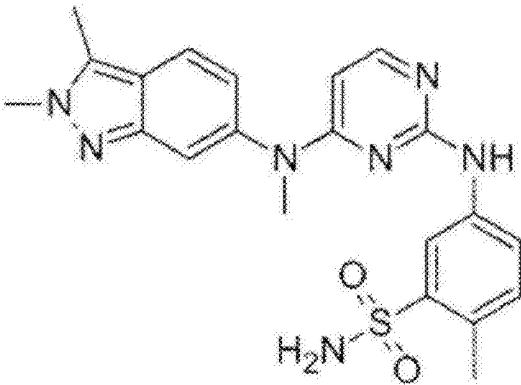
[0123] 舒尼替尼(**Sutent®**)是用于治疗癌症的小分子多靶向受体酪氨酸激酶抑制剂。其通过靶向PDGFR和VEGFR来抑制细胞信号传导。在化学术语中,舒尼替尼被命名为N-(2-(2-乙基氨基乙基)-5-[(Z)-(5-氟-2-氧代-1H-咪唑-3-亚基)甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-甲酰胺,并且具有以下结构:

[0124]



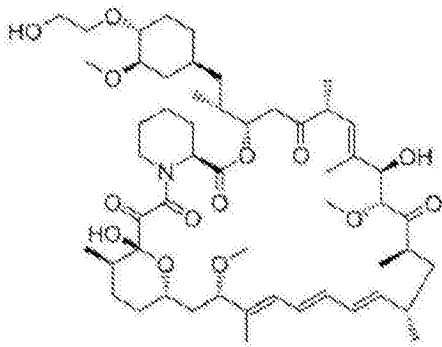
[0125] 帕唑帕尼(**Votrient®**)是用于治疗癌症的多激酶抑制剂。已知其靶向c-KIT、PDGFR和VEGFR。在化学术语中,其被命名为5-[[4-[(2,3-二甲基-2H-咪唑-6-基)甲基氨基]-2-嘧啶基]氨基]-2-甲基苯磺酰胺,并且具有以下结构:

[0126]



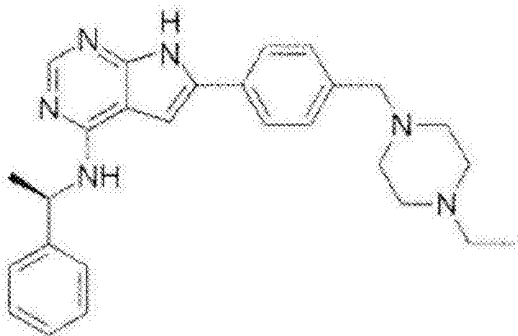
[0127] 依维莫司(**Afinitor®**)是靶向mTOR(雷帕霉素的哺乳动物靶标)的信号转导抑制剂。在化学术语中,其被命名为二羟基-12-[(2R)-1-[(1S,3R,4R)-4-(2-羟基乙氧基)-3-甲氧基环己基]丙-2-基]-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-11,36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0三十三碳-16,24,26,28-四烯-2,3,10,14,20-五酮,并且具有以下结构:

[0128]



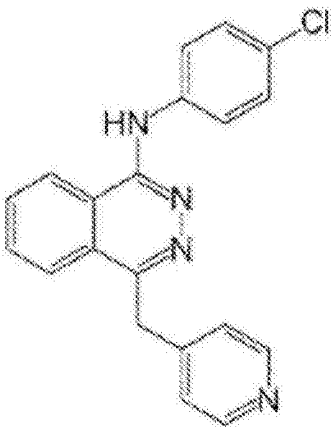
[0129] AEE788是被评估用于癌症治疗的小分子药物。其为EGFR(表皮生长因子受体)和VEGFR两个家族成员的组合抑制剂。在化学术语中,其被命名为6-[4-[(4-乙基哌嗪-1-基)甲基]苯基]-N-[(1R)-1-苯基乙基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺,并且具有以下结构:

[0130]



[0131] PTK787(瓦他拉尼)是被开发用于治疗癌症的抑制血管发生的蛋白激酶抑制剂。其抑制VEGF受体、PDGFR-β和c-kit。在化学术语中,其被命名为N-(4-氯苯基)-4-(吡啶-4-基甲基)酞嗪-1-胺,并且具有以下结构:

[0132]



[0133] 另外的化学治疗剂的实例包括EGFR途径抑制剂,例如抗-EGFR抗体或EGFR激酶抑制剂,例如西妥昔单抗、帕尼单抗、易瑞沙(吉非替尼或N-(3-氯-4-氟-苯基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉-4-基丙氧基)喹啉-4-胺)、或特罗凯(厄洛替尼(erlitionib)或N-(3-乙炔基苯基)-6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹啉-4-胺)、或其他药剂,例如Herceptin™(曲妥珠单抗)。化学治疗剂的另一一些实例包括:烷化剂,例如顺铂、卡铂和奥沙利铂;葱环类;植物生物碱,例如紫杉烷和长春花生物碱;以及拓扑异构酶抑制剂,例如伊立替康、拓扑替康、安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷和替尼泊苷;或者氟尿嘧啶(5FU)。

[0134] 在另一个可能方案中,本发明的抗体分子可以与免疫治疗剂一起施用,所述免疫

治疗剂例如免疫途径剂,小分子剂,或者对PD-1、PDL-1、CTLA-4或OX40具有特异性的抗体。

[0135] 在另一个可能方案中,本发明的抗体分子可以是其中抗体分子与药物或毒素连接的抗体-药物缀合物。这可以进行以使药物或毒素定向于存在CXCL12的生物系统中的靶位点。该方法可需要工程化抗体分子以提供能够与药物或毒素反应的官能团,或者作为替代地为抗体分子提供能够与药物或毒素反应的接头基团。在本发明的这个方面,药物也可以是用在患者中的位靶点处转化成活性药物的前药。

[0136] 因此,本发明提供了包含与细胞毒性部分或免疫刺激性部分缀合的本发明抗体分子的免疫缀合物。举例来说,细胞毒性部分可以是烷化剂、生物碱、铂配位络合物、细胞毒性肽、放射性药剂(radioactive agent)或能够转化成细胞毒性部分的前药。

[0137] 在另一方面,本发明涉及抗体分子,其用于CXCL12相关病症的诊断或预后的方法。在一些实施方案中,本发明的抗体分子可用于鉴定作为整体考虑与更广泛种类的患者相比可能对治疗更具响应性的患者的测定。这进而可以使得例如使用本发明抗体分子的治疗针对最可能作出响应的那些患者,同时为治疗不太可能成功的患者提供替代形式的治疗。在相关方面,本发明提供了测定样品中CXCL12的存在的方法,所述方法包括使样品与本发明的抗体分子接触,使得CXCL12与抗体分子结合以形成复合物,并检测因此产生的复合物。作为替代或补充,所述方法还可以使用本发明的抗体分子作为用于检测CXCL12与捕获抗体结合的试剂。优选地,所述方法包括使用抗体来确定样品中CXCL12的存在或量,并使CXCL12的存在或量与用CXCL12抑制剂治疗患者的可能结果相关联。

[0138] 在这种情况下,抗体分子可以以ELISA-型形式使用,或者以其他方式与可检测分子连接而标记,所述可检测分子例如但不限于放射性或荧光标记或者利用显色底物的酶。在该技术中使用的放射性标记的实例是<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>H或<sup>14</sup>C。在该技术中使用的荧光分子的实例是绿色荧光蛋白、异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸罗丹明(TRICT) Cy3和Cy5染料。在该技术中可使用的具有显色底物的酶的实例是过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖氧化酶。

[0139] 优选地,本发明的方法是对从所述个体获得的样品进行的体外方法。因此,在本发明的一些实施方案中,所述方法可包括从所讨论的个体获得样品和/或制备用于分析的样品的初始步骤。用于所述方法的样品的优选实例包括血液样品、组织样品或细胞样品。

[0140] 存在对本领域技术人员显而易见的上述技术的另一些变化形式。

#### [0141] 药物组合物

[0142] 本发明的抗CXCL12抗体分子或免疫缀合物可以与可药用赋形剂一起包含在药物组合物中。可药用赋形剂可以是进入药物组合物中的化合物或化合物组合,其不引起二次反应并且允许例如促进抗CXCL12抗体分子的施用、提高其寿命和/或其在体内的效力,或者提高其在溶液中的溶解度。这些可药用载体是公知的,并且本领域技术人员可根据抗CXCL12抗体分子的施用模式对其进行调整。

[0143] 在一些实施方案中,抗CXCL12抗体分子或免疫缀合物可以在施用前重构的冻干形式提供。例如,冻干的抗体分子可以在施用于个体之前在无菌水中重构并与盐水混合。

[0144] 抗CXCL12抗体分子通常以药物组合物的形式施用,所述药物组合物可包含除抗体分子之外的至少一种组分。因此,除抗CXCL12抗体分子之外,药物组合物还可包含可药用的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员公知的其他材料。这样的材料应当没有毒性并且不应妨碍抗CXCL12抗体分子的效力。载体或其他材料的确切性质将取决于施用途

径,如以下讨论的,所述施用途径可以通过推注、输液、注射或任何其他合适的途径。

[0145] 对于静脉内施用(例如通过注射),包含抗CXCL12抗体分子的药物组合物可以是无热原并且具有合适pH、等张性和稳定性的肠胃外可接受的水溶液的形式。本领域相关技术人员能够很好地使用例如等张载体(例如氯化钠注射剂、林格注射剂、乳酸化林格注射剂)来制备合适的溶液。可以根据需要使用防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂,包括:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐以及其他有机酸;抗氧化剂,例如抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3'-戊醇;以及间甲酚);低分子量多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;盐形成性反荷离子,例如钠;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,例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0146] 包含抗CXCL12抗体分子的药物组合物可以单独施用或者与其他治疗组合根据待治疗的病症同时或依次施用。

[0147] 如本文中所述的抗CXCL12抗体分子可用于人体或动物体的治疗方法,其包括预防性治疗(例如,在个体中病症发生之前的治疗以降低个体中发生该病症的风险、延迟其发生、或降低其发生后的严重程度)。所述治疗方法可包括将抗CXCL12抗体分子施用于有此需要的个体。

[0148] 施用通常以“治疗有效量”进行,这足以显示对患者的益处。这样的益处可以是至少改善至少一种症状。实际的施用量以及施用速率和时间过程将取决于所治疗病症的性质和严重程度、被治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的原因、组合物的递送部位、施用方法、施用时间表以及医学从业者已知的其他因素。治疗的处方(例如剂量决定等)在全科医师及其他医生的责任范围内,并且可取决于被治疗疾病的症状严重程度和/或进程。抗体分子的合适剂量是本领域中公知的(Ledermann J.A.等(1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; Bagshawe K.D.等(1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4:915-922)。可以使用在本文中或Physician's Desk Reference (2003)中指出的适于所施用药物类型的具体剂量。抗体分子的治疗有效量或合适剂量可以通过比较其体外活性和在动物模型中的体内活性来确定。用于将在小鼠和其他测试动物中的有效剂量外推至人的方法是已知的。精确的剂量将取决于许多因素,包括抗体是用于预防还是用于治疗、待治疗部位的大小和位置、抗体的精确性质(例如,全抗体、片段)以及任何与抗体连接的可检测标记或其他分子的性质。

[0149] 对于全身应用而言,典型的抗体剂量将为100 $\mu$ g至1g,并且对于局部应用而言为1 $\mu$ g至1mg。可以施用初始较高的负荷剂量,随后一个或更多个较低的剂量。通常来说,抗体将是全抗体,例如根据铰链区和Fc区中氨基酸序列差异的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。这些不同的同种型影响抗体分子的体内半衰期及其诱导效应子功能的能力。因此,IgG同种型的选择可用于工程化本发明抗体分子的体内特性。对于中和可溶性抗原(例如CXCL12),效应子功能较不关键,并且因此可优选使用缺乏效应子功能的抗体同种型(如IgG2)来确定CXCL12中和的益处,而不受宿主免疫系统的干扰。

[0150] 这是成年患者的单次治疗剂量,其可以针对儿童和婴幼儿成比例地调整,并且还可与分子量成比例地调整用于其他抗体形式。由医师决定,治疗可以以每天一次、每周两次、每周一次或每月一次的间隔重复。治疗对于皮下施用可以是每两周至四周,以及对于静脉内施用可以是每四周至八周。治疗可以是周期性的,并且施用之间的时间为约两周或更久,例如约三周或更久、约四周或更久,或者约一个月。治疗可以在外科手术之前和/或之后给予,和/或可以直接施用或施加在外科手术治疗或侵入性操作的解剖部位。合适的配方和施用途径如上所述。

[0151] 在一些优选实施方案中,根据剂量,抗CXCL12抗体分子的治疗效果可以持续数个半衰期。例如,单剂量的抗CXCL12抗体分子的治疗效果可以在个体中持续1个月或更久、2个月或更久、3个月或更久、4个月或更久、5个月或更久、或者6个月或更久。

[0152] 材料和方法

[0153] 通过噬菌体展示技术产生CXCL12中和抗体

[0154] 在CXCL12上淘选抗体文库

[0155] 使用含有超过100亿个scFv形式的抗体克隆的“McCafferty天然抗体文库”来分离抗CXCL12抗体,然后在基于细胞的测定中筛选所得到的抗体,以评估阻断CXCL12-CXCR4相互作用的潜力。更详细地,在固定在链霉亲和素或中性亲和素(neutravidin)上的生物素化CXCL12上进行两轮淘选。为了避免富集与链霉亲和素或中性亲和素结合的抗体克隆,采用了两种策略。第一轮淘选使用已经耗尽任何链霉亲和素结合剂的噬菌体文库在固定在链霉亲和素上的生物素化CXCL12上进行(称为“去选择(de-selection)”或“减法选择(subtractive selection)”)。对于第2轮,使用中性亲和素(代替链霉亲和素)来固定CXCL12。在针对CXCL12、链霉亲和素、中性亲和素和非特异性抗原(NCK1)的TRF结合测定中测试从第2轮淘选输出制备的多克隆噬菌体以确定特异性富集。观察到的结合信号是CXCL12特异性的,并且对链霉亲和素、中性亲和素和NCK1没有观察到可检出的结合。

[0156] 抗CXCL12抗体筛选

[0157] 对来自第2轮淘选输出的scFv群体进行PCR扩增,并克隆到pSANG10-3F表达载体中并转化到BL21中。psANG10-3F编码scFv基因下游的六组氨酸标签(用于Ni亲和纯化)和三-FLAG标签(用于检测)。将940个单独的转化体挑选到10×96孔培养板中,并使用自动诱导培养基诱导抗体表达。测试过夜诱导后分泌到培养物上清液中的重组单克隆抗体与CXCL12的结合。将含有分泌的scFv的培养物上清液用于TRF结合测定,其中使用与铈缀合的抗-FLAG抗体检测与生物素化CXCL12(固定在96孔板中的链霉亲和素上)的scFv结合。信号高于1000FU(高于背景的100倍)的克隆被认为是CXCL12结合阳性的。

[0158] 发现筛选的克隆的约24%(224/940)是CXCL12结合阳性的。精选前184个克隆用于序列分析和进一步表征。使用4种引物通过Sanger测序产生精选克隆的序列,并组装每个克隆的共有序列。使用BLAZE抗体分析软件分析共有序列的CDR和框架区。通过将分析集中于重链和轻链的CDR3中的变异,发现了118种独特的scFv序列。在这些序列中,在其他CDR或框架残基中存在额外的变化,提供另外38个独特的序列,即来自所测序的184种中的156种独特序列。对框架区的详细分析揭示偏向于某些重链和轻链种系家族。Vh3(62%)和Vh1(43%)是发现频率最高的重链家族,同时Vk1(58%),其次是Vk2(17%)主导轻链序列。

[0159] 表1. 初级CXCL12抗体的序列分析的快照。使用BLAZE软件分析框架区和CDR区,并

且基于VH和VL CDR3序列中的相似性将抗体聚类(例如,093\_E11和093\_E10)。

[0160]

克隆ID	VH种系	VL种系	VH CDR3	VL CDR3
093_1C03	Vh1_DP-5_(1-24)	Vλ3_3h	LISGSYRLEDYF.....DH	QAWDSSTG.....YV
093_2G07	Vh3_Dp-86_(3-66)	Vk1_DPK1_(018,08)	EASDPRYYDSSGYYYGM.....DV	QQYDNLp.....LT
093_2A11	Vh3_DP-42_(3-53)	Vk1_DPK4_(A20)	EASDPRYYDSSGYYYGM.....DV	QKYSAP.....RT
093_2H09	Vh1_DP-88_(1-e)	Vk2_DPK1S_(A17)	DYNDWGAF.....EL	VQGTHWP.....WT
093_1H10	Vh1_dP-5_(1-24)	Vk1_DPK4_(A20)	EGYDSSGYGARPRYYYYGM....DV	QQSYNTP.....RT
093_1E11.093_1E10	Vh3_DP-53_(3-74)	Vk2_DPK18_(A17)	DSL DGN GSGSWDDAF.....DI	VQGTHWP.....WT
093_2G12	Vh1_DP-5_(1-24)	Vλ6_6a	GSAYVYGSGSYKAPYYYYGMDV	QSYTSSN.....QV
093_2B01	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK1_(018,08)	GMGYGM.....DL	QQYDNLp.....YT
093_2F10	Vh3_Dp-17_(3-23)	Vλ2_DPL10_(2b2)	EGGDPTTPTTT.....TV	CSYAGPFT.....VI
093_2F12	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vλ1_DPL3_(1g)	DDSTADL.....DY	AAVDDSLSGP.....YV

[0161] 鉴定阻断CXCL12与CXCR4结合的抗体

[0162] 从初步筛选和序列分析鉴定到一大批独特的CXCL12结合剂。为了鉴定阻断CXCL12-CXCR4相互作用的抗体,建立了使用流式细胞术的基于细胞的CXCL12-CXCR4结合测定。人急性淋巴细胞白血病细胞系(MOLT-4)被鉴定为用于CXCL12-CXCR4结合测定的理想的表达CXCR4的细胞系,因为发现其是CXCR7表达阴性的。在该测定中,使用与藻红蛋白(phycoerythrin)缀合的链霉亲和素(链霉亲和素-PE)检测生物素化CXCL12与表达CXCR4的MOLT-4细胞的结合。然后测试抗CXCL12抗体抑制这种相互作用的能力。

[0163] 首先,进行大量的预实验以确定最佳测定参数(例如检测方法、CXCL12的量、封闭剂的浓度等),以实现最大测定灵敏度。测试一步结合检测方法,并将其与两步结合检测方法进行比较。一步结合检测方法涉及利用已经与链霉亲和素-PE预复合的生物素化CXCL12对MOLT-4细胞直接染色,并通过流式细胞术检测结合。相比之下,两步结合检测方法涉及用生物素化CXCL12孵育MOLT-4细胞,洗涤,然后用链霉亲和素-PE染色,然后进行通过流式细胞术的结合检测。与用一步检测方法观察到的荧光的广泛分布相比,两步检测方法产生了尖的荧光峰。此外,CXCL12和链霉亲和素-PE的预复合会导致CXCL12分子的四聚体呈递。这会导致可阻碍单体scFv对CXCL12-MOLT-4细胞相互作用之阻断的亲和力效应。由于这些原因,选择了用于检测CXCL12结合的两步方法用于阻断测定。剂量响应分析鉴定用于测定的CXCL12的最佳浓度为7.5μg/ml。

[0164] 将从40μg/ml开始的生物素化CXCL12的两倍稀释系列与表达CXCR4的MOLT-4细胞一起孵育。使用流式细胞术通过链霉亲和素-PE检测CXCL12与细胞结合的结合。将每个测试样品观察到的平均荧光相对于CXCL12浓度作图。

[0165] 基于初步筛选中的重链CDR3序列多样性和结合信号,在该测定中选择来自从初步筛选中鉴定的118种抗CXCL12抗体的39个克隆用于阻断。由这些克隆产生scFv抗体,并通过固定化金属离子亲和色谱进行纯化。然后,在CXCL12-MOLT-4细胞结合测定中测试经纯化抗体(和非特异性抗体)的阻断活性。基于CXCL12-MOLT-4细胞结合的抑制百分比,选择20种阻断活性大于45%的抗体进行进一步研究(表2)。

[0166] 表2. 来自基于细胞的CXCL12-CXCR4结合测定的前20种阻断抗体。

[0167]

排名	克隆ID	细胞结合测定中的百分比阻断
1	093_1C03	99

2	093_2A02	96
3	093_2D06	94
4	093_1F01	87
5	093_2G07	86
6	093_2G10	83
7	093_1C04	65
8	093_2C02	64
9	093_2E04	63
10	093_1A10	63
11	093_1A08	59
12	093_1G07	58
13	093_2G09	57
14	093_1A09	54
15	093_1F09	54
16	093_1G10	51
17	093_2E12	51
18	093_2D05	51
19	093_2A10	46
20	093_1A11	45

[0168] 初级抗CXCL12抗体的亲和力成熟和功能表征

[0169] 初级抗体噬菌体展示选择和筛选鉴定了阻断CXCL12与CXCR4结合的数种抗体。治疗应用通常需要单克隆抗体具有低至亚纳摩尔范围的亲和力以实现期望的临床效力。在低严格条件下从“McCafferty文库”淘选通常产生亲和力为10nM至1 $\mu$ M的初级抗体。通常将这样的抗体在体外亲和力成熟,以得到用于给定应用的足够亲和力。

[0170] 抗体的体外亲和力成熟可以通过模拟在体液免疫应答期间发生的体内过程来实现。对抗原刺激的初始响应涉及从表达低亲和力抗体的大且多样化的免疫前B细胞库中选择抗原特异性B细胞。然后,这些初级的低亲和力抗体经历称为体细胞超突变的过程,其中其在重链和轻链可变区中积累点突变。表达高亲和力抗体的B细胞与表达低亲和力抗体的B细胞竞争抗原刺激而存活并增殖。通过重复循环的体细胞高频突变和表达较高亲和力抗体的B细胞的优先扩增,免疫系统逐渐建立对入侵病原体的有效应答。类似于体内过程,通常使用的体外亲和力成熟策略涉及两个关键步骤:初级抗体序列的多样化和使用选择平台(例如噬菌体展示技术)的亲和力提高的抗体的选择性富集。初级抗体序列的多样化可以通过使用随机或靶向诱变在可变区中引入突变来实现。或者,可以通过称为链混编的方法将所选择的重链或轻链与配偶体链的库重组来产生重链和轻链可变区的新组合。

[0171] 鉴于抗体的模块化性质,可以通过简单的克隆容易地产生链混编文库,因此这是选择的用于亲和力成熟初级抗CXCL12抗体的方法。由于重链可变结构域通常在抗原结合和限定表位特异性中发挥主导作用,因此轻链混编优于重链混编以保留初级抗体的结合表位。

[0172] 链混编文库的构建和在CXCL12上的严格噬菌体展示选择

[0173] 为了产生轻链混编文库,通过PCR扩增前20种阻断抗体的抗体重链区。将得到的PCR产物克隆到噬菌体展示轻链文库制备物中,所述制备物包含天然 $\lambda$ 和 $\kappa$ 轻链可变区配偶体的库(在载体pSANG4中)。将随后的质粒群体转化到大肠杆菌TG1中以产生含有 $2.6 \times 10^8$ 个scFv克隆的文库。因此,每个原始重链与约1000万个新的轻链配偶体配对。为了评估重链插入的频率,通过菌落PCR筛选分析来自轻链混编文库的20个随机克隆。20个克隆中的19个显示全长scFv基因的存在(未示出),表明文库中约95%的克隆是轻链混编重组体。

[0174] 从任何文库中成功分离高亲和力抗体需要可以选择性地富集高亲和力结合剂的严格选择条件。可以使用减小抗原浓度通过噬菌体选择的迭代循环来富集具有高亲和力的抗体。该方法依赖于对有限量抗原的竞争和具有较低解离常数的变体的优先富集。为了精确控制抗原浓度,在溶液相中进行噬菌体展示选择。允许噬菌体抗体在溶液中与生物素化抗原结合,并随后使用经链霉亲和素涂覆的表面捕获结合的噬菌体用于洗涤和洗脱。在该步骤中,可通过包括许多严苛且长的洗涤步骤来进一步提高选择的严格性。

[0175] 为了从轻链混编文库中分离高亲和力的抗CXCL12抗体,在生物素化CXCL12上进行三轮溶液相选择。通过针对一定范围的抗原浓度选择噬菌体抗体并将输出数与“无抗原”对照进行比较,凭经验确定每轮的最佳抗原浓度。第三轮还包括一组这样的选择,其中对捕获的噬菌体-抗原复合物进行17小时洗涤(每小时用含有0.2% Tween-20的磷酸缓冲盐水洗涤6次)以进一步提高严格性。

[0176] 筛选用于亲和力成熟的单克隆结合剂的选择输出

[0177] 对来自第3轮选择输出的scFv群体进行PCR扩增,并克隆到pSANG10-3F表达载体中,并将得到的质粒DNA转化到大肠杆菌BL21DE3细胞中。将960个单独的转化体挑选到 $10 \times 96$ 孔培养板中,并使用自动诱导培养基诱导抗体表达。在TRF结合测定中筛选过夜诱导后分泌到培养物上清液中的重组单克隆抗体结合CXCL12的能力。发现从多个选择输出筛选出的48%(458/960)克隆对于CXCL12结合是阳性的。这些克隆显示的结合信号显著优于从天然文库分离的克隆的结合信号。从链混编选择输出筛选出的37%克隆显示高于10,000个荧光单位(FU)的结合信号。相比之下,仅12%的天然文库分离的克隆显示超过10,000FU的结合信号。由于在筛选中测试的克隆未对表达进行归一化,因此观察到的CXCL12结合提高可能是由于提高的表达或提高的亲和力。

[0178] 使用BLAZE抗体序列分析软件分析CXCL12结合克隆。重链和轻链CDR3多样性的分析鉴定了227个独特的克隆。尽管在链混编文库的构建中使用了20种不同的VH基因,但在鉴定到的227个独特克隆中仅代表了9种VH基因。在这个组中,有四个主要的克隆家族。这些来源于原始克隆093\_2A02(122/227)、093\_2D06(38/227)、093\_2G07(24/227)和093\_2A10(22/227)的VH基因。类似于从天然文库分离的克隆,这些链混编克隆的VL种系使用以V $\kappa$ 1(63%)和V $\kappa$ 2(22%)种系家族为主。

[0179] 在初步筛选中对于特定克隆观察的CXCL12结合信号取决于抗体表达和亲和力的组合效应。由于抗体表达在克隆与克隆之间显著变化,所以通过其在初步筛选中的结合信号对抗体进行排名并不一定与其亲和力相关联。因此,使用独立于表达的二次筛选测定以鉴定具有优异结合动力学的高亲和力抗CXCL12抗体。在该筛选测定中,使用表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)分析前150种抗CXCL12 scFv抗体的解离常数(脱离速率)。抗体-抗原相互作用的解离常数是与浓度无关的,并且因此不需要将不同抗体表

达归一化。然而,由于scFv抗体在溶液中二聚化的倾向,单价抗体-抗原(1:1)相互作用的精确测量是复杂的,并且常常导致结合常数的错误测定。因此,将在scFv-SPR筛选中显示低解离常数的24种抗体的组重新形式化为Fab抗体,用于进行另一循环的“脱离速率筛选”。与scFv不同,Fab抗体在单体形式是稳定的,并且对于准确的动力学分析是最佳的。抗体克隆114\_3H1(来自于093\_2D06)和113\_1H12(来自于093\_2A02)在所测试的24种Fab抗体中显示出最佳的脱离速率(即最低解离常数)。选择这两个克隆作为先导抗CXCL12抗体进行详细表征。这些抗体的序列提供在序列表中。

[0180] 在哺乳动物细胞中作为Fab和IgG表达和纯化抗CXCL12抗体

[0181] 直到第二循环脱离速率筛选的所有抗体工作均使用scFv形式的抗体进行。由于在大肠杆菌中的高效表达,scFv形式非常适合于噬菌体展示选择和随后筛选大量克隆以鉴定一组先导抗体。然而,存在很多与这种形式相关的限制,使其对于下游生物物理学和生物学表征不是最佳的。例如,由于在溶液中二聚化的倾向,scFv的亲和力测定很复杂。scFv分子的稳定性差使其易于聚集和沉淀,从而限制了其长期储存。此外,来自大肠杆菌的scFv制备物中高水平内毒素的存在限制了其在许多基于细胞的测定中的使用。因此,从初步筛选测定鉴定的scFv通常被重新形式化为更大且更稳定的抗体形式,并在哺乳动物细胞中表达用于下游表征和体内测试。将两种先导抗CXCL12抗体及其亲本克隆重新形式化为Fab和IgG。Fab对于准确测定结合常数是最佳的。而IgG对于大部分临床批准的抗体和开发中的抗体是优选形式。其优异的体内半衰期和参与宿主免疫系统的能力对于治疗疾病(例如,癌症)是理想的。此外,IgG分子的二价性质极大增强了其在体外和体内的抗原中和能力。

[0182] 本发明的抗CXCL12抗体的序列可以在设计用于产生抗体分子的任何合适的表达系统中使用。该工作中讨论的所有scFv抗体均由pSANG10-3F载体表达,其中单个T7启动子驱动通过甘氨酸-丝氨酸接头连接的重和轻可变结构域的表达(图1A)。在该系统中,scFv基因被转录为单mRNA并且被翻译为单蛋白质。相比之下,常用的哺乳动物Fab和IgG表达系统使用单独转录和翻译重链和轻链基因的表达盒。在这里,我们使用双顺反子载体(pBIOCAM-7)在HEK-293细胞中瞬时表达抗CXCL12Fab(图1B)。在pBIOCAM7中,抗体轻链(VL+CL)和重链(VH+CH)基因被编码来自猪捷申病毒1(teschovirus-1)的“核糖体跳读”肽(称为P2A肽)的基因区段分隔开。该Fab表达系统产生整个Fab盒(VL+CL-P2A-VH+CH)的单mRNA转录物。然而,在翻译期间,核糖体在P2A肽的C末端跳过甘氨酸-脯氨酸肽键的合成,导致紧邻其下游的多肽链的释放。然后,重链和轻链多肽在内质网(endoplasmic reticulum,ER)中独立地折叠并组装以形成Fab分子。轻链C末端的弗林蛋白酶切割位点有助于从Fab蛋白翻译后去除P2A肽。

[0183] 为了以IgG形式表达抗CXCL12抗体,使用双质粒系统,其中重链和轻链表达盒携带在两个不同的质粒上(图1C)。在将这些质粒共转染到HEK-293细胞中后,重链和轻链基因被单独转录和翻译,之后在ER中组装成IgG分子。根据铰链区和Fc区中氨基酸序列的差异,将IgG抗体分为4种同种型(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。这些不同的同种型影响抗体分子的体内半衰期及其诱导效应子功能的能力。因此,可以使用IgG同种型的选择来工程化本发明抗体分子的体内特性。对于中和可溶性抗原(例如CXCL12),效应子功能较不关键。事实上,为了确定CXCL12中和的益处而不受宿主免疫系统的干扰,期望具有缺乏效应子功能的抗体用于后续的体内实验。因此,我们选择IgG2同种型,其表现出降低的抗体依赖性细胞介导的细胞

毒性 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (complement dependent cytotoxicity, CDC)。

[0184] 对于Fab和IgG表达,将先导抗体 (114\_3H1和113\_1H12) 及其亲本克隆 (093\_2D06和093\_2A02) 的可变区亚克隆到pBIOCAM-7载体和IgG2表达质粒 (pBIOCAM-1和pBIOCAM2-IgG2) 中。制备这些质粒的转染质量DNA,并转染到HEK-293F细胞中用于瞬时抗体表达。分别使用镍和蛋白G亲和色谱方法从细胞培养物上清液 (转染后6天) 纯化Fab和IgG抗体。如图2所示,纯化的Fab和IgG由预期大小的重链和轻链结构域构成。

[0185] 抗CXCL12抗体的亲和力测量

[0186] 对先导抗CXCL12抗体及其亲本克隆进行全动力学分析以确定亲和力成熟后结合常数的提高。使用SPR分析Fab抗体与固定在链霉亲和素芯片上的生物素化CXCL12的结合 (图3)。使用适合于每种结合相互作用的结合模型测定这些抗体的平衡解离常数 (KD) (图3B和C)。在所测试的四种抗体中,114\_3H1对CXCL12的亲和力最高, KD为1nM。这表明在链混编后,与其亲本克隆093\_2D06 (KD=3800nM) 相比亲和力提高了3800倍。093\_2A02及其亲和力成熟变体113\_1H12二者都表现出双相结合特征:初始速解离相快,然后是慢得多的第二解离相。这种结合特征通常与涉及抗体 (或任何其他分析物) 诱导的配体构象变化导致两步结合的结合相互作用相关。通过SPR分析113\_1H13和092\_2A02的两种不同制备物。使用这两个蛋白质批次获得了类似的结果,证实所观察到的结合特征不是人为的或特定蛋白质制备物的问题。只有来自相同VH谱系的抗体表现出双相结合的事实支持这些抗体可能具有两步结合机制的假设。因此,使用双态结合模型确定这些抗体的亲和力 (图3C)。计算的113\_1H12和093\_2D06的结合亲和力分别为3.7nM和16.7nM,其表明轻链混编后亲和力提高了4.5倍。

[0187] 先导抗CXCL12抗体对癌细胞迁移的抑制

[0188] 表达CXCR4的癌细胞向富CXCL12环境的迁移是许多恶性肿瘤中促进转移的关键因素之一。CXCL12/CXCR4依赖性癌细胞迁移的抑制是本发明的治疗性抗CXCL12抗体分子的重要生物学特性。因此,使用transwell迁移测定测试先导抗体114\_3H1和113\_1H12阻断CXCL12诱导的卵巢癌细胞迁移的能力。这里使用的transwell迁移测定是用于研究白细胞趋化应答的Boyden室测定的改进形式。在该测定中,分析了接种在上室中的荧光标记人卵巢癌细胞 (TOV-21G) 穿过多孔膜并进入含有CXCL12的下室的迁移 (图4A)。先前的研究表明, CXCL12二聚体在较高的浓度下形成,可以抑制细胞迁移。因此,凭经验确定用于刺激细胞迁移的最佳CXCL12浓度 (图4B)。

[0189] 为了评估先导抗CXCL12抗体抑制CXCL12诱导的卵巢癌细胞迁移的能力,在上述transwell迁移测定中进行114\_3H1 IgG和113\_1H12 IgG的滴定。两种抗体均以剂量依赖性方式抑制TOV-21G细胞的迁移 (图5)。114\_H01和113\_1H12的半数最大抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为4.6 (±0.5) nM和13.2 (±4.1) nM。这些值与通过SPR确定的平衡解离常数相一致。进一步的重复实验产生了更高质量的数据,证实114\_H01和113\_1H12的IC<sub>50</sub>值分别为5nM和9nM。

[0190] 先导抗CXCL12抗体对血管发生的抑制

[0191] 肿瘤的存活和增殖很大程度上依赖于提供氧和营养物的充分供应的支持性血管网络。CXCL12/CXCR4轴在促进新血管形成 (血管发生) 以建立肿瘤支持性血管系统中发挥关键作用。CXCL12和CXCR4与VEGF (公知的促血管发生因子) 形成正反馈回路。在该回路中, VEGF刺激CXCL12和CXCR4二者的表达。相反, CXCL12诱导的CXCR4激活上调内皮细胞产生

VEGF。因此,在体外血管发生测定中测试先导抗CXCL12抗体以评价其抑制小管形成和分支的能力。

[0192] 在该测定中,将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和成纤维细胞一起在含有抗CXCL12抗体和VEGF的培养基中培养。这两种细胞类型在VEGF存在下的相互作用导致形成三维管,其类似于体内小毛细血管。通过免疫组织化学在共培养7天后分析抗CXCL12抗体的抑制作用(图6)。

[0193] 用于分析血管发生的最有价值的参数是小管长度和每个小管的分支数。内皮细胞在VEGF刺激后形成分支小管,并且这不受非特异性抗体存在的影响。利用113\_1H12观察到小管形成和分支的显著抑制(图6B)。

[0194] 与WO 2008/018641的抗体的比较

[0195] WO 2008/018641描述了两个抗CXCL12抗体对:1D3和1H2以及1C6和2A5。所述抗体对识别CXCL12中的共同表位。

[0196] 将WO 2008/018641中抗体的重链和轻链的序列与本发明抗体的序列进行比对,并且比对结果示出在图8中。这表明与本发明的抗体114\_H01和113\_1H12相比,这些抗体的CDR序列中存在显著性差异。

[0197] 还比较了抗体的亲和力。抗体114\_H01对人CXCL12的亲合常数( $K_D$ )为2.4nM,且抗体113\_1H12为4.2nM。这与对于WO 2008/018641中抗体所报道的值进行了比较:1D3 $K_D$ =151nM;1H2 $K_D$ =176nM;1C6 $K_D$ =3.6nM和2A5 $K_D$ =4.6nM。亲和力数据表明,本发明的抗体114\_H01和113\_1H12具有与对WO 2008/018641中抗体所报道的最佳结果一样好或比其更好的亲和力,尽管使用Fab形式的抗体而不是IgG,这通常导致相对于现有技术低估了本发明的抗体的亲和力。

[0198] 表位作图

[0199] 将抗体113\_1H12和114\_H01结合的表位与WO 2008/018641中公开的四种示例性抗体结合的表位进行比较。这些实验表明113\_1H12与WO 2008/018641的抗体1D3和1H2部分地共享表位,而114\_3H1具有与WO 2008/018641的抗体仅共享一个残基的独特表位。E15在参与受体或肝素结合的区域之外。所有的其他表位残基都在参与受体结合的区域之内,其根据全长蛋白质在UniProt P48061(SDF1\_人)的编号为29-33、39-41、48-50、60-70)。WO 2008/018641公开了参与受体结合的残基位于氨基酸残基7-19之间。

抗体	强烈降低/消除结合的替换	部分降低结合的替换
[0200] 114_3H1	P10A, R12A	E15A, I28A, P32A, N45A, K54A
113_1H12	P10A, Q48A	K54A, N45A
1D3和1H2	P10A, N45A, Q48A	
2A5和1C6	P10A, E15A, N45A, R47A	F13A, I28A, K54A

[0201] 在嵌合鼠IgG2a骨架中的抗CXCL12单克隆抗体的特性

[0202] 将113\_1H12和114\_3H1的可变区克隆到鼠IgG2a表达系统中,允许用产生具有鼠恒定区和人可变区的嵌合抗体。这种嵌合抗体可优选用于免疫活性动物中的体内测试以降低在施用全人抗体之后可能发生的针对抗体的免疫应答。

[0203] A) 迁移测定

[0204] 使用鼠转移性黑素瘤细胞系(B16F10)和人卵巢癌细胞系(TOV21G)研究嵌合鼠IgG2a和全人IgG2形式的抗体阻断人和鼠细胞系的细胞迁移的能力。

[0205] 所有抗体均以50μg/ml的浓度使用。人CXCL12配体(Peprotech)以500ng/ml的浓度使用。在DMEM(用于B16F10研究)或RPMI(用于TOV21G研究)中制备抗体和配体。对于每个时间推移迁移测定,在盖玻片迁移室内的胶原蛋白-细胞混合物中使用 $3 \times 10^6$ 至 $4 \times 10^6$ 个细胞。将细胞悬液与胶原蛋白混合物以1(细胞):2(胶原蛋白)的比例组合。胶原蛋白混合物由1:2:15比例的碳酸氢钠、10X MEM和胶原蛋白(3mg/ml, Sigma)构成。将抗体添加到细胞-胶原蛋白混合物中,并将所得混合物插入到迁移室中,在此通过在37°C下孵育30分钟使胶原蛋白聚合。一旦聚合,添加CXCL12配体以产生趋化因子梯度,并使用时间推移成像确定细胞向CXCL12的运动。在3.5至4小时的时间内以1张照片/分钟的间隔拍摄图像。时间推移成像允许使细胞迁移踪迹可视化,然后使用Image J软件对其进行分析以确定细胞迁移的程度。

[0206] B16F10细胞在CXCL12和3种阻断抗体存在下的迁移距离在图9A和9B中示出。

[0207] 所有抗体(人IgG2形式的113\_1H12(hAB113)、嵌合鼠IgG2a形式的113\_1H12(mAB113)和嵌合鼠IgG2a形式的114\_3H1(mAB114))在B16F10细胞中均有效地显著阻断细胞迁移,并且在TOV-21细胞中也一定程度上阻断。在该测定中,人IgG2形式的113\_1H12(hAB113)在阻断TOV21G细胞迁移方面是无活性的,而mAB113是完全活性的,mAB114在一定程度上介于其之间。然而,从图5的结果我们知道,人IgG2形式的113\_1H12抗体可以抑制TOV21G细胞系向CXCL12的迁移,因此这里的无活性结果可能是异常现象。这些结果总结在图9A中。

[0208] 此外,所有三种抗体均有效地抑制B16F10细胞的CXCL12依赖性迁移。这在图9B中图示出。因此,这些实验证实嵌合鼠IgG2a形式的抗体在体外迁移测定中发挥作用,并且能够抑制癌细胞迁移。

## [0209] B) 血清稳定性测试

[0210] 测试嵌合鼠 IgG2a 形式的抗体 114\_3H1 和 113\_1H12 的血清稳定性。使用人血清进行血清稳定性测定。将抗体以 100 $\mu$ g/ml 的浓度在血清中孵育 6、12、24 和 48 小时。将含有抗体的血清在 DMEM 或 RPMI 中稀释至浓度为 50 $\mu$ g/ml，并用于如上文 A 中所述的时间推移迁移测定。这些实验发现嵌合鼠 IgG2a 形式的抗体在血清中在 48 小时内稳定，并且在血清中 48 小时后在抑制 CXCL12 依赖性 B16F10 细胞迁移方面依然有活性。这证实这两种抗体在血清中都非常稳定。

## [0211] C) 体内肺转移

[0212] B16F10 黑素瘤细胞需要 CXCR4 用于迁移到肺并开始转移。使用简单的实验转移体内模型来评价嵌合鼠 IgG2a 抗体干扰 CXCL12 并因此阻断转移发生的能力。在第 0 天，通过尾静脉注射将 B16F10 黑素瘤细胞引入 C57B1 小鼠中，并在第 1 天开始处理。处理方案为每天两次 5mg/kg 的临床 CXCR4 抑制剂 AMD3100 (普乐沙福)，或者每周两次 10、15 或 20mg/kg 鼠 IgG2a 形式的抗 CXCL12 抗体。对照组的小鼠用 20mg/kg 的鼠 IgG2a 对照抗体每周处理两次。所有小鼠均在第 14 天被处死，并通过手动计数量化肺中转移性集落的数量。如图 10 所示，嵌合鼠 114\_3H1 和 113\_1H12 两种抗体均具有抑制转移发生的活性。特别地，抗体 113\_1H12 的效力更高，并且在 20mg/kg 下产生的抑制与用 5mg/kg 的 CXCR4 的小分子拮抗剂 AMD3100 观察到的抑制等效。因此，这两种抗体在体内均具有抑制 CXCR4 依赖性肺转移的活性。

[0213] 序列表

[0214] 抗体 114\_3H1

[0215] SEQ ID NO:1:CDR-H1 氨基酸序列 (来自 Ab114\_3H1)

[0216] ELSMH

[0217] SEQ ID NO:2:CDR-H2 氨基酸序列 (来自 Ab114\_3H1)

[0218] GFDPEDGETIYAQKFQG

[0219] SEQ ID NO:3:CDR-H3 氨基酸序列 (来自 Ab114\_3H1)

[0220] RVWGSYRPNDAFDI

[0221] SEQ ID NO:4:CDR-L1 氨基酸序列 (来自 Ab114\_3H1)

[0222] RASQSISDYVN

[0223] SEQ ID NO:5:CDR-L2 氨基酸序列 (来自 Ab114\_3H1)

[0224] AASTSQS

[0225] SEQ ID NO:6:CDR-L3 氨基酸序列 (来自 Ab114\_3H1)

[0226] QQSYSPPYT

[0227] SEQ ID NO:7:VH 结构域氨基酸序列

[0228] 114\_3H1 可变重链

[0229] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWGMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVT  
 MTEDTSTDTAYMELSSLGSEDTAVYYCARRVWGSYRPNDAFDIWGQGLVTVSS

[0230] SEQ ID NO:8:VH 结构域核酸序列

[0231] &gt;114\_3H1\_VH

[0232] CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
 GTTCCGGATACACCCTCACTGAATTATCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGG

AGGTTTTGATCCTGAAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACAT  
CTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGGGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACGCGTT  
TGGGGGAGTTATCGCCCAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0233] SEQ ID NO:9:VL结构域氨基酸序列

[0234] 114\_3H1可变轻链

[0235] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISDYVNWYQQKPGKAPNLLMF AASTSQSGVPSRFTGSGSGT  
DFTLTISSLQPEDFATYFCQQSYSPPYTFGQGTKVEIKR

[0236] SEQ ID NO:10:VL结构域核酸序列

[0237] >114\_3H1\_VL

[0238] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGCGACAGAGTCACCATCACTTGC  
CGGGCAAGTCAGAGCATAAGCGACTATGTA AACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCAACCTCCTGATGTT  
TGCTGCATCCACTTCGAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCACTGGCAGCGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCA  
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTTCTGTCAACAGAGTTACAGTCCGCCCTACACTTTTGCCAG  
GGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT

[0239] SEQ ID NO:11:114\_3H1\_scFv

[0240] 先导抗体序列

[0241] >114\_3H1

[0242] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVT  
MTEDTSTDTAYMELSSLGSEDTAVYYCARRVWGSYRPNDAFDI WGQGLTVTVSSLEGGGGSGGGSGGGASDIQMTQ  
SPSSLSASVGDRTITCRASQISDYVNWYQQKPGKAPNLLMF AASTSQSGVPSRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDF  
ATYFCQQSYSPPYTFGQGTKVEIKRAAASAHHHHHKLDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

[0243] 抗体113\_1H12

[0244] SEQ ID NO:12:CDR-H1氨基酸序列113\_1H12

[0245] NYGIS

[0246] SEQ ID NO:13:CDR-H2氨基酸序列113\_1H12

[0247] WISAYNGNTNYAQLQG

[0248] SEQ ID NO:14:CDR-H3氨基酸序列113\_1H12

[0249] AGGVYYDYFTDY

[0250] SEQ ID NO:15:CDR-L1氨基酸序列113\_1H12

[0251] SGSRSNIGSNSVN

[0252] SEQ ID NO:16:CDR-L2氨基酸序列113\_1H12

[0253] NNDERPS

[0254] SEQ ID NO:17:CDR-L3氨基酸序列113\_1H12

[0255] AAWDDSLNVGEL

[0256] SEQ ID NO:18:VH结构域氨基酸序列

[0257] 113\_1H12可变重链

[0258] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQLQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAGGVYYDYFTDYWGQGMVTVSS

[0259] SEQ ID NO:19:VH结构域核酸序列

[0260] >113\_1H12\_VH

[0261] ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCC  
TGCAAGACTTCTGGTTACACCTTTACCAACTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG  
GATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACGAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAG  
ACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGCGCGAGA  
GCCGGCGGAGTCTATTACGATTATTTACGGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

[0262] SEQ ID NO:20:VL结构域氨基酸序列

[0263] 113\_1H12可变轻链

[0264] QSELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNSVNWYQQLPGTAPKLLIYNNDERPSGVPDRFSGSKSG  
TSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNVGELFGGGTKLTVLG

[0265] SEQ ID NO:21:VL结构域核酸序列

[0266] >113\_1H12\_VL

[0267] CAGTCTGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCT  
GGAAGCCGCTCCAACATCGGAAGTAATTCTGTAAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCAT  
TTATAATAATGATGAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG  
CCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTTCTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGTCGGGGAG  
CTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTAGGT

[0268] SEQ ID NO:22:113\_1H12 scFv

[0269] 先导抗体序列

[0270] >113\_1H12\_scFv

[0271] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQLQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAGGVYYDYFTDYWGQGTMTVTVSSLEGGGGSGGGSGGGASQSELTQPP  
SASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNSVNWYQQLPGTAPKLLIYNNDERPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEA  
DYFCAAWDDSLNVGELFGGGTKLTVLGAAASAHHHHHKLDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

[0272] SEQ ID NO:23:CXCL12氨基酸序列(全长序列)

[0273] >sp|P48061-2|SDF1\_HUMAN基质细胞衍生因子1的同种型α0S=人(Homo  
sapiens)GN=CXCL12

[0274] MNAKVVVVVLVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPFRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQ  
VCIDPKLKWIQEYLEKALNK

[0275] SEQ ID NO:24:用于抗体选择的合成的CXCL12氨基酸序列。对应于全长CXCL12蛋  
白的第22至89位氨基酸

[0276] KPVLSYRCPFRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK

[0277] SEQ ID NO:25:用于表位作图在大肠杆菌中表达的重组“野生型”CXCL12(包括His  
标签和接头)

[0278] KPVLSYRCPFRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKA  
AASAHHHHHK

[0279] 参考文献:

[0280] 本说明书中提到的所有文献均通过引用整体并入本文。

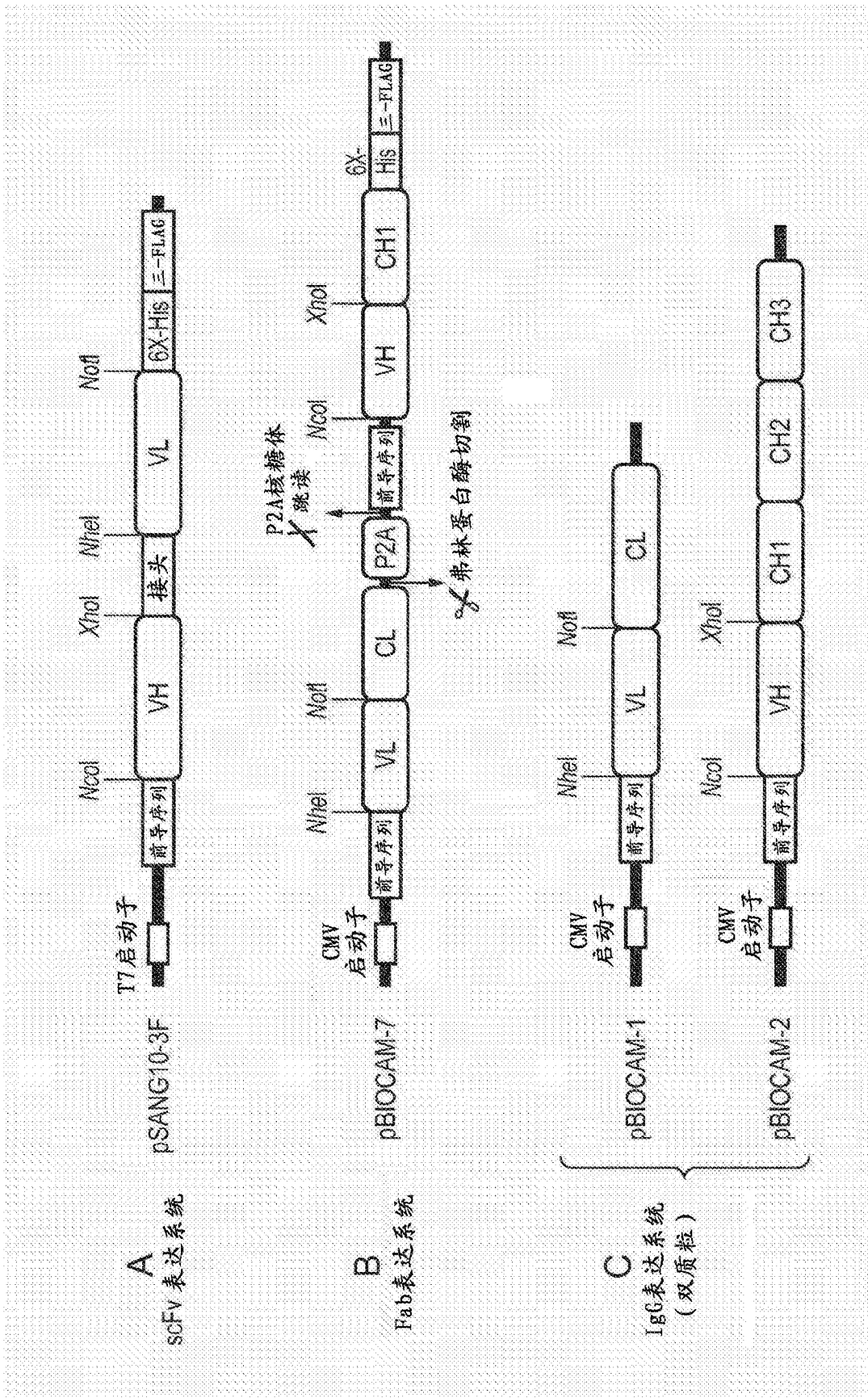


图1

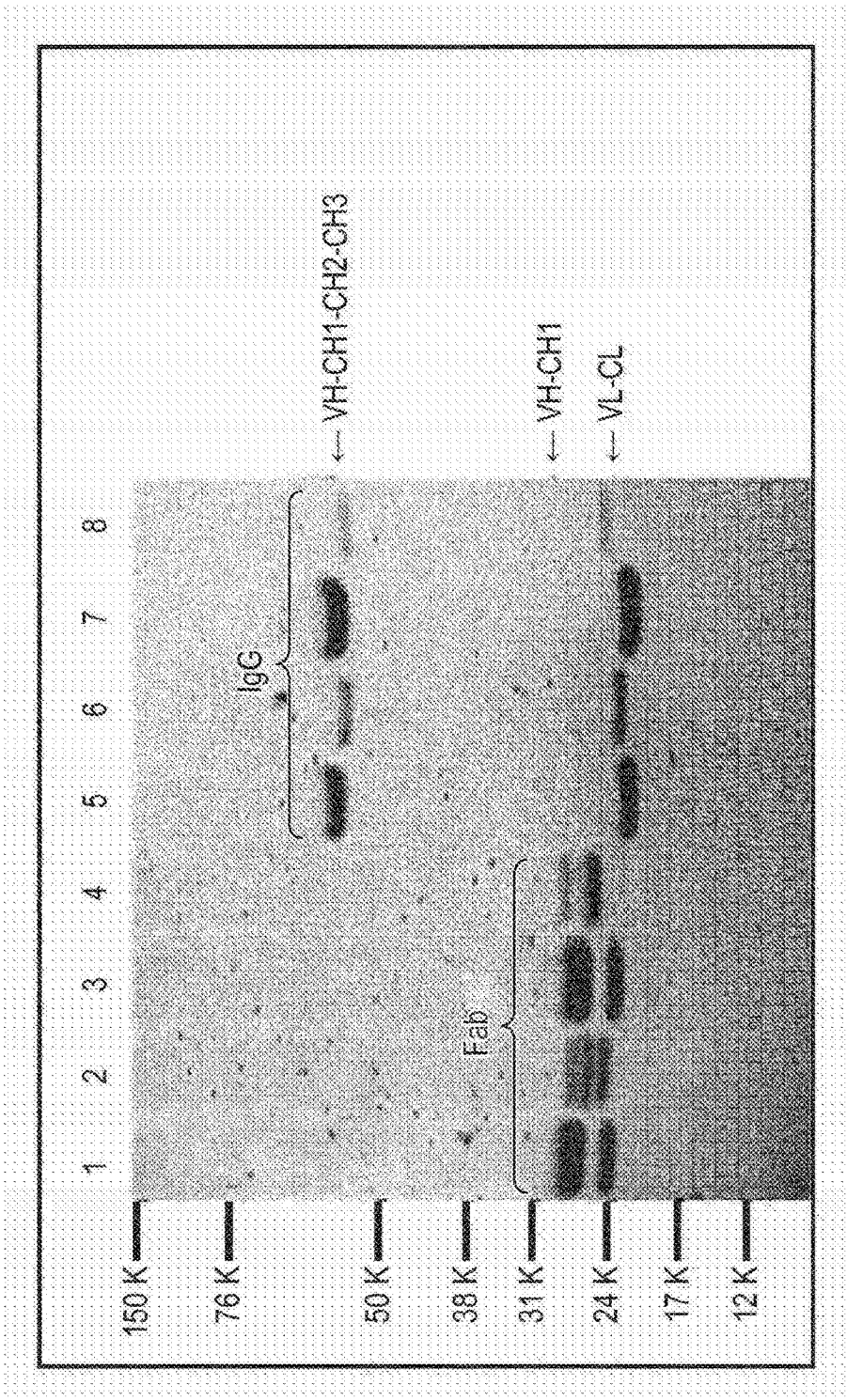


图2

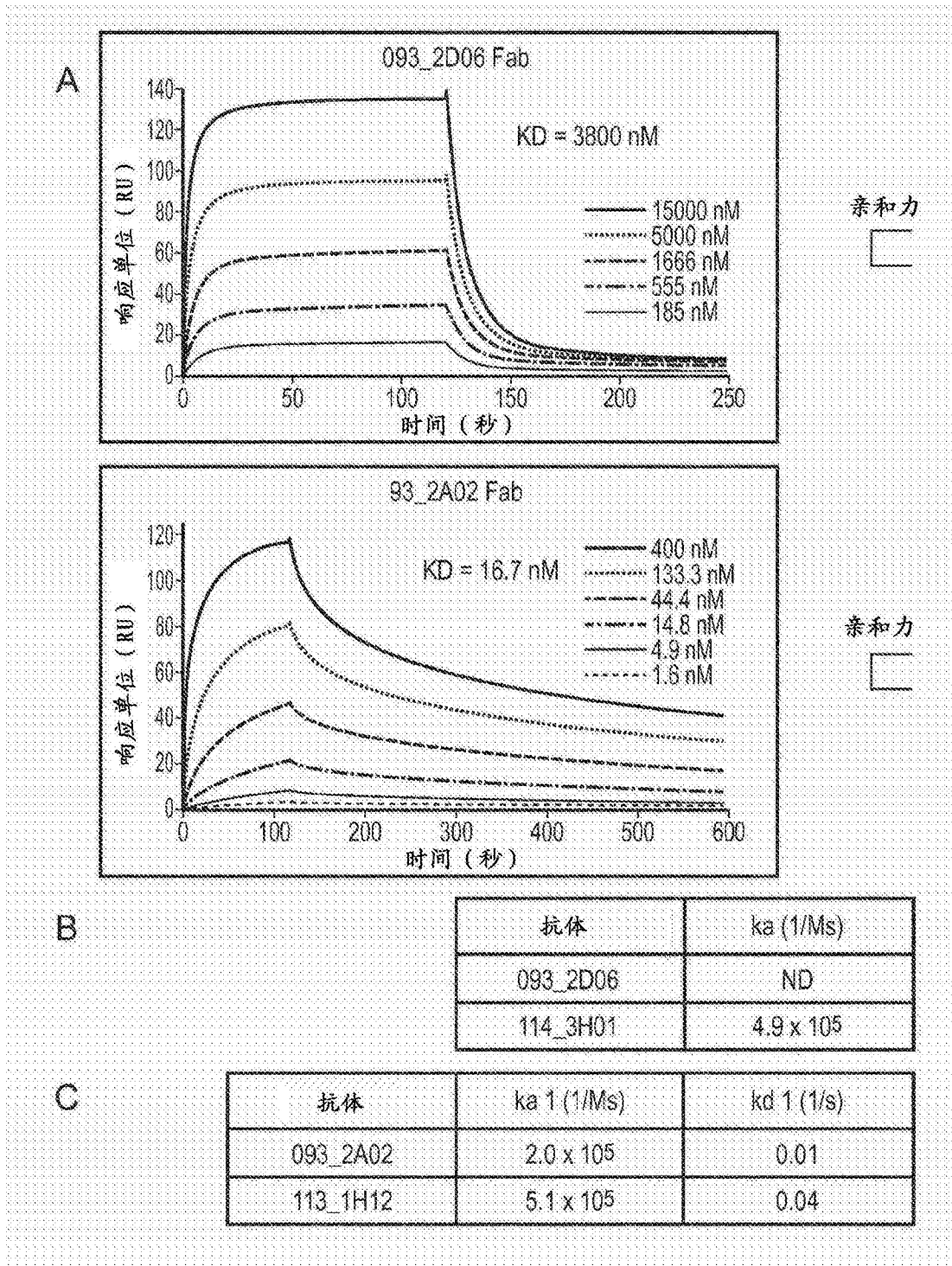
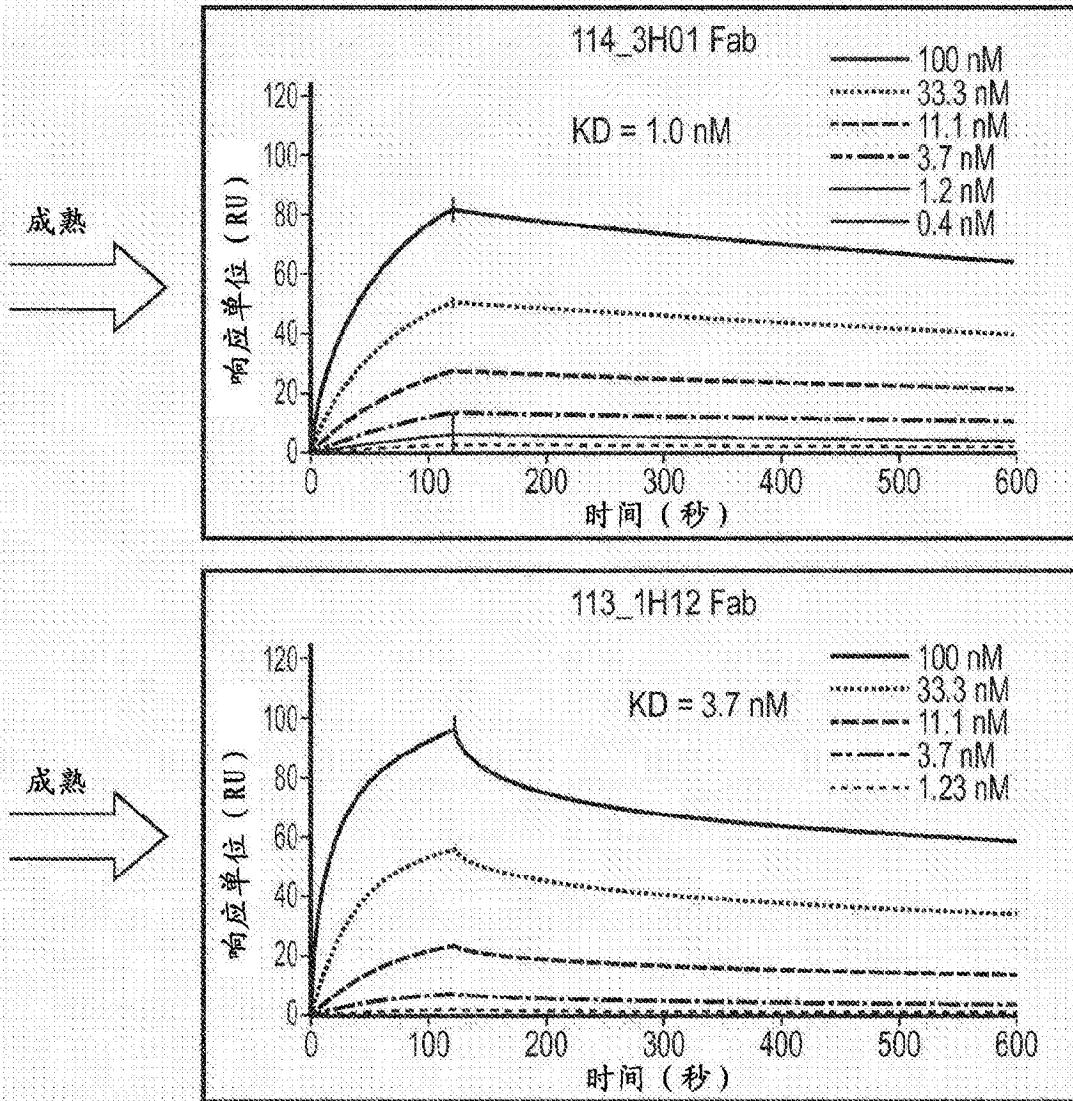


图3



kd (1/s)	KD (M)
ND	$3.7 \times 10^{-6}$
$5.1 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-9}$

ka 2 (1/Ms)	kd 2 (1/s)	KD (M)
0.007	$22.2 \times 10^{-4}$	$16.7 \times 10^{-9}$
0.015	$7.9 \times 10^{-4}$	$3.7 \times 10^{-9}$

图3(续)

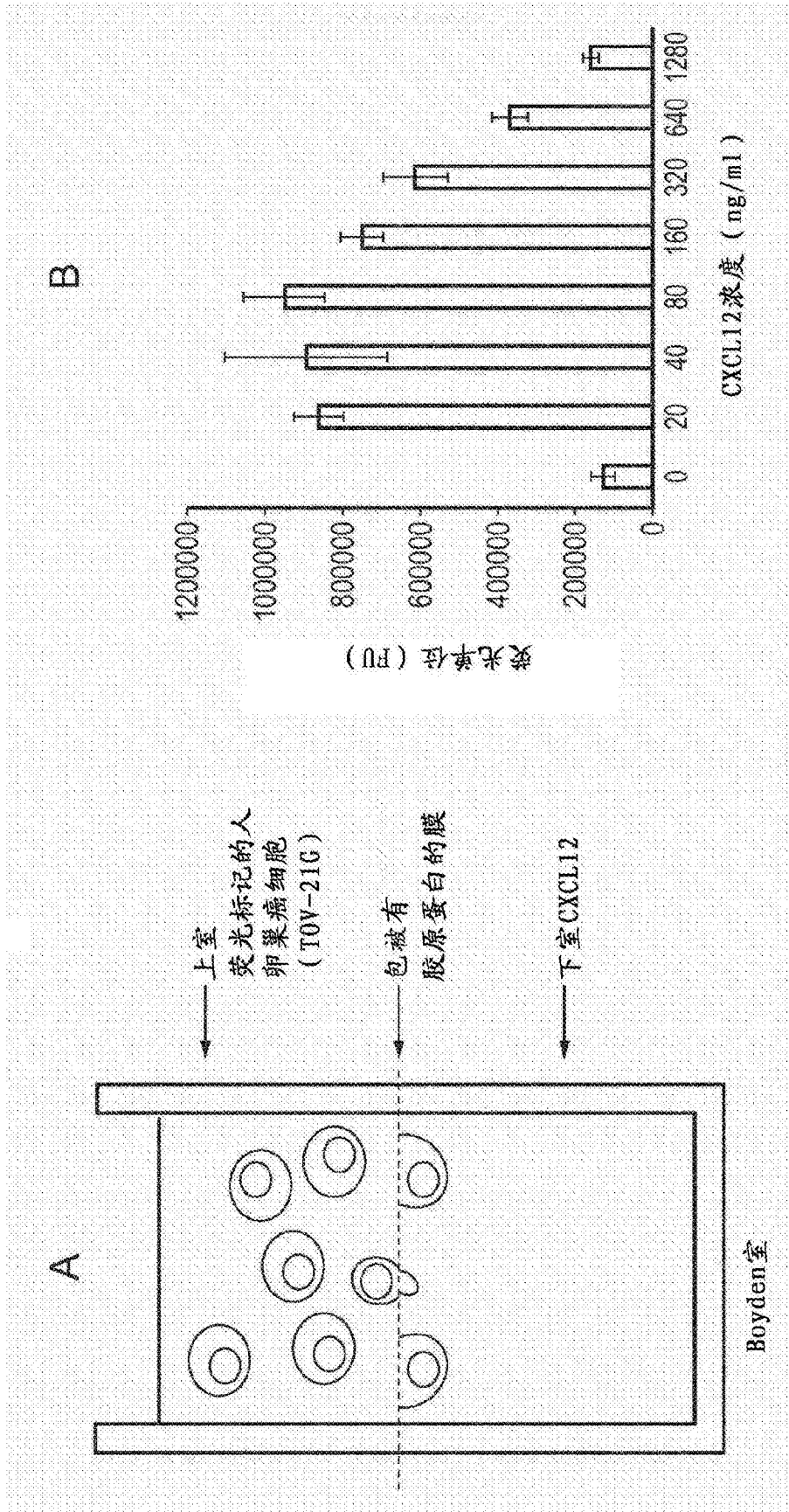


图4

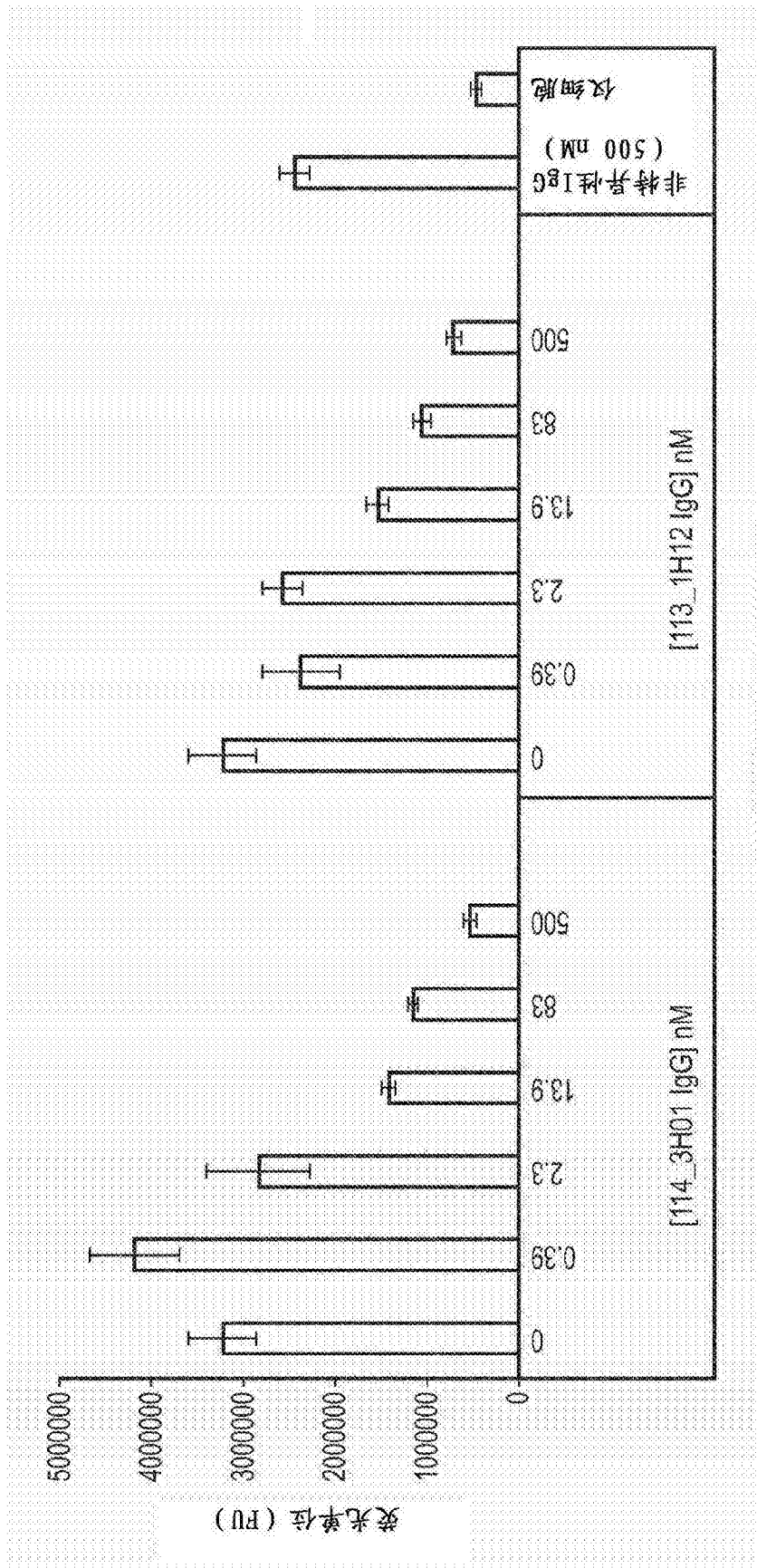


图5

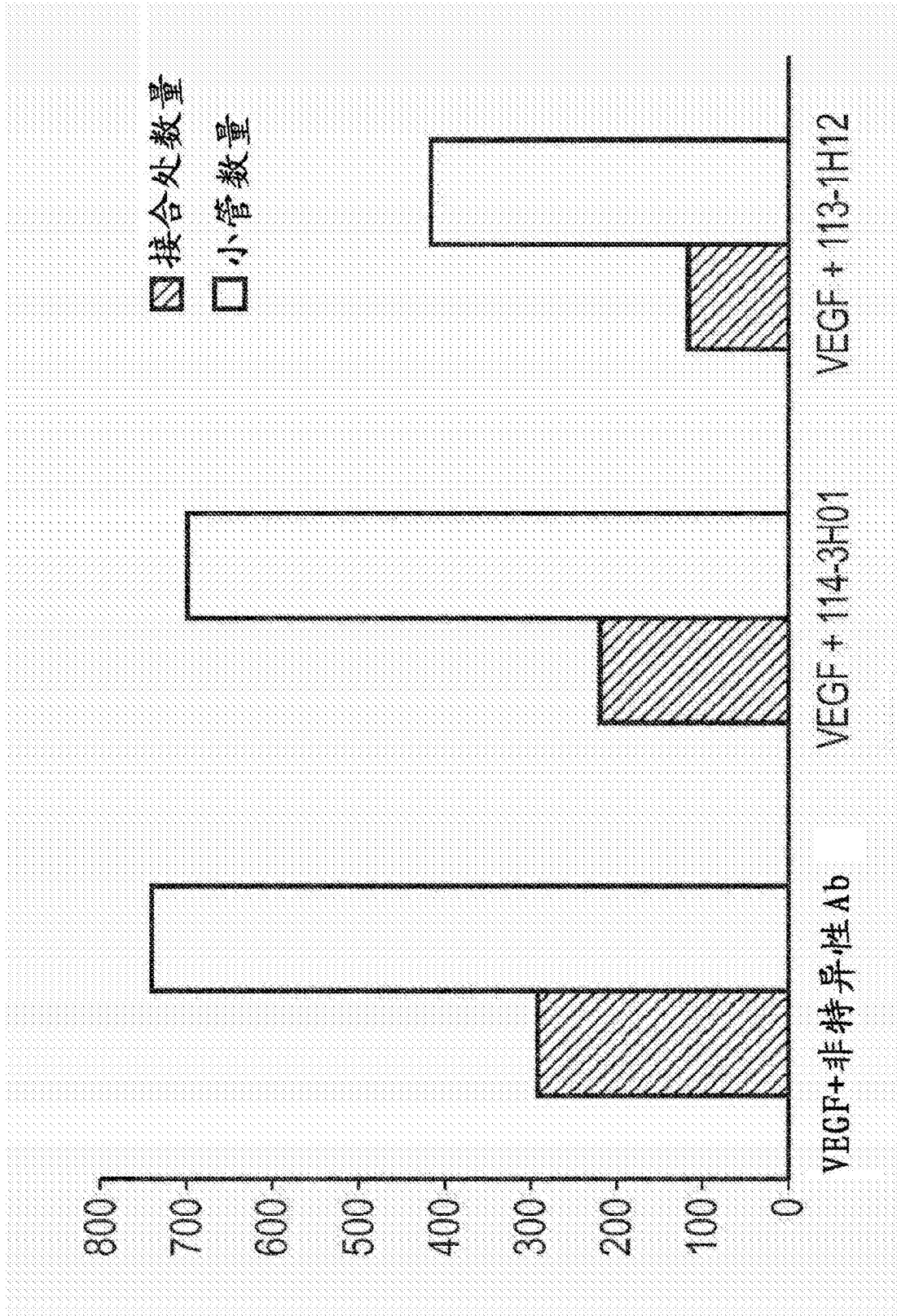


图6A

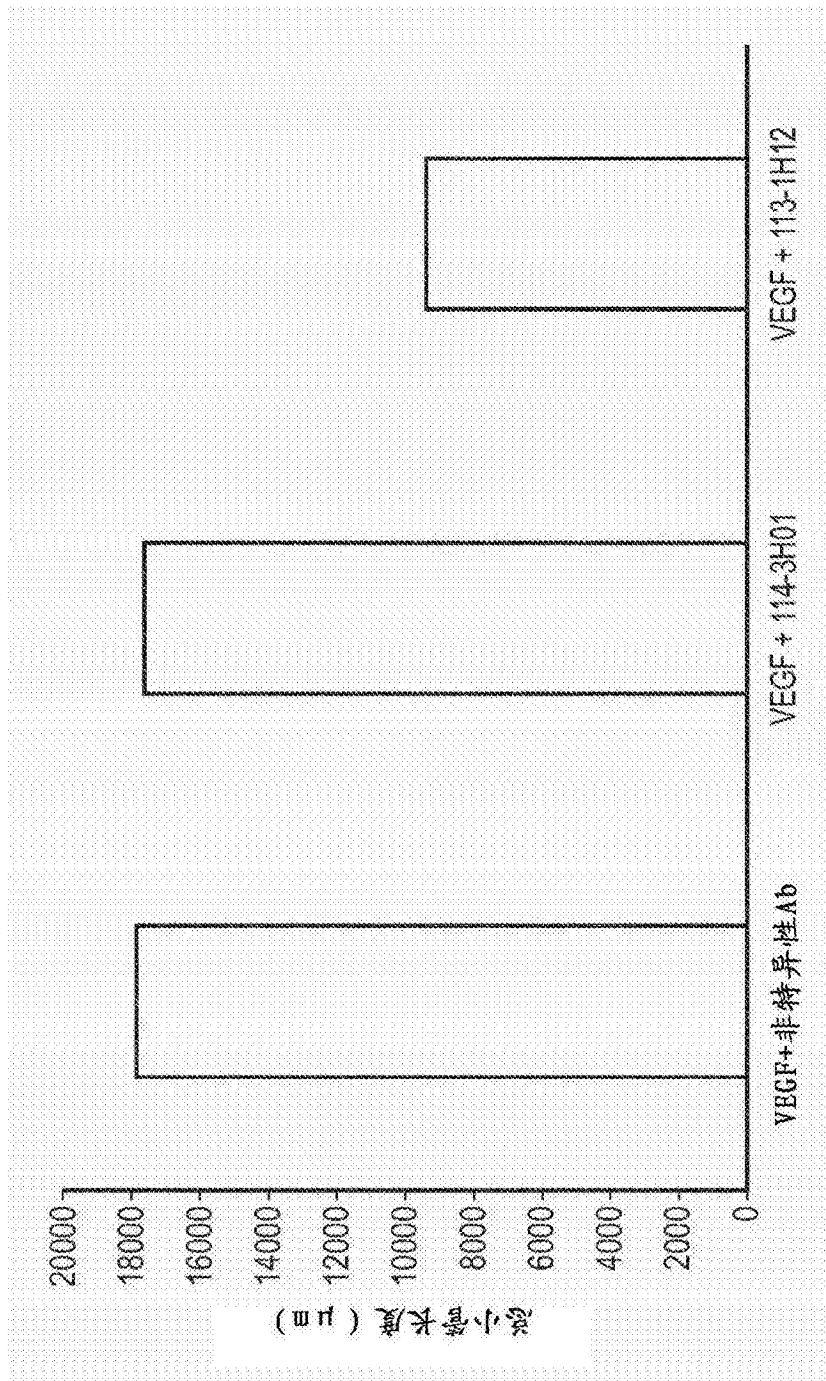


图6B

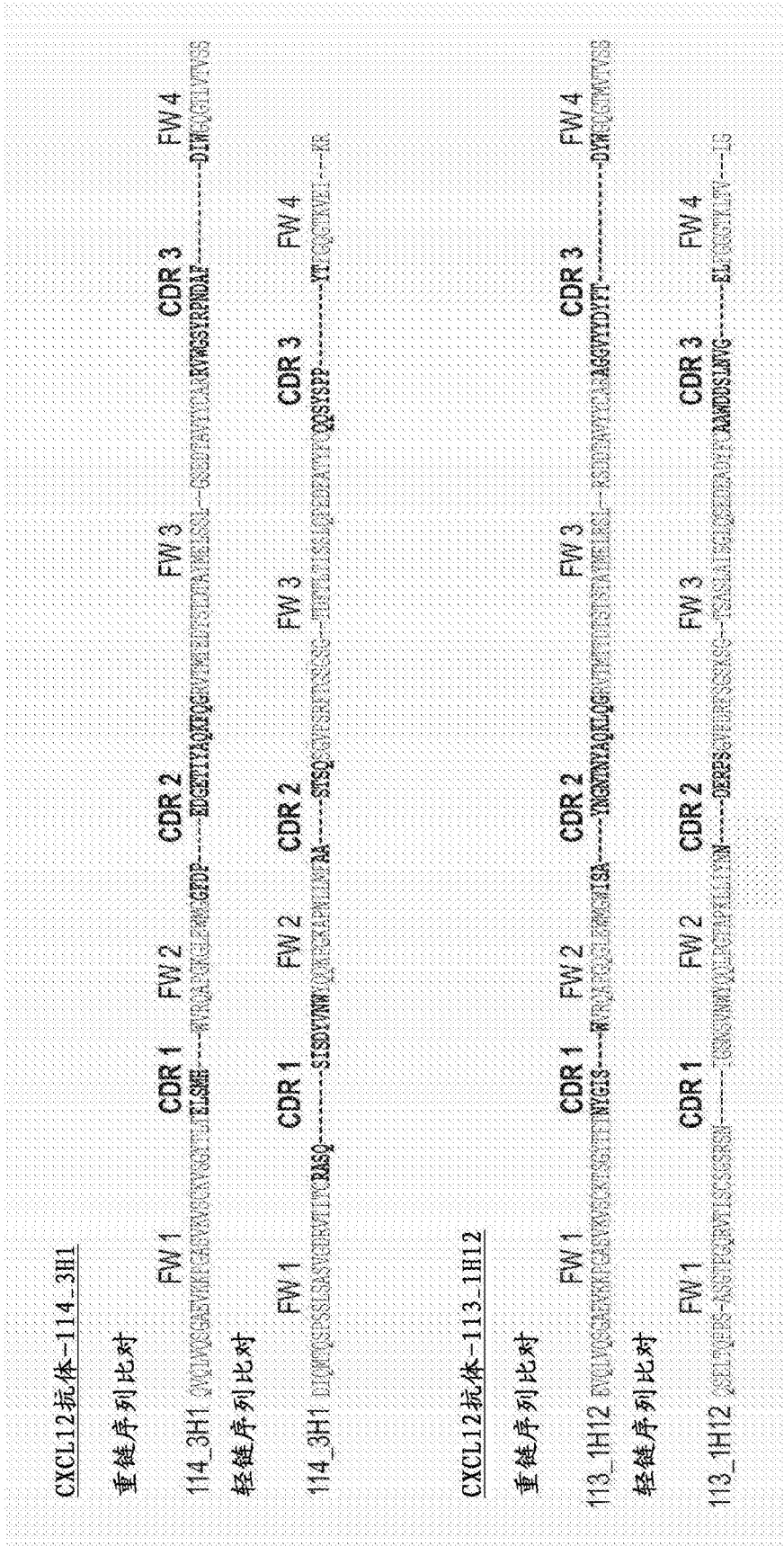


图7

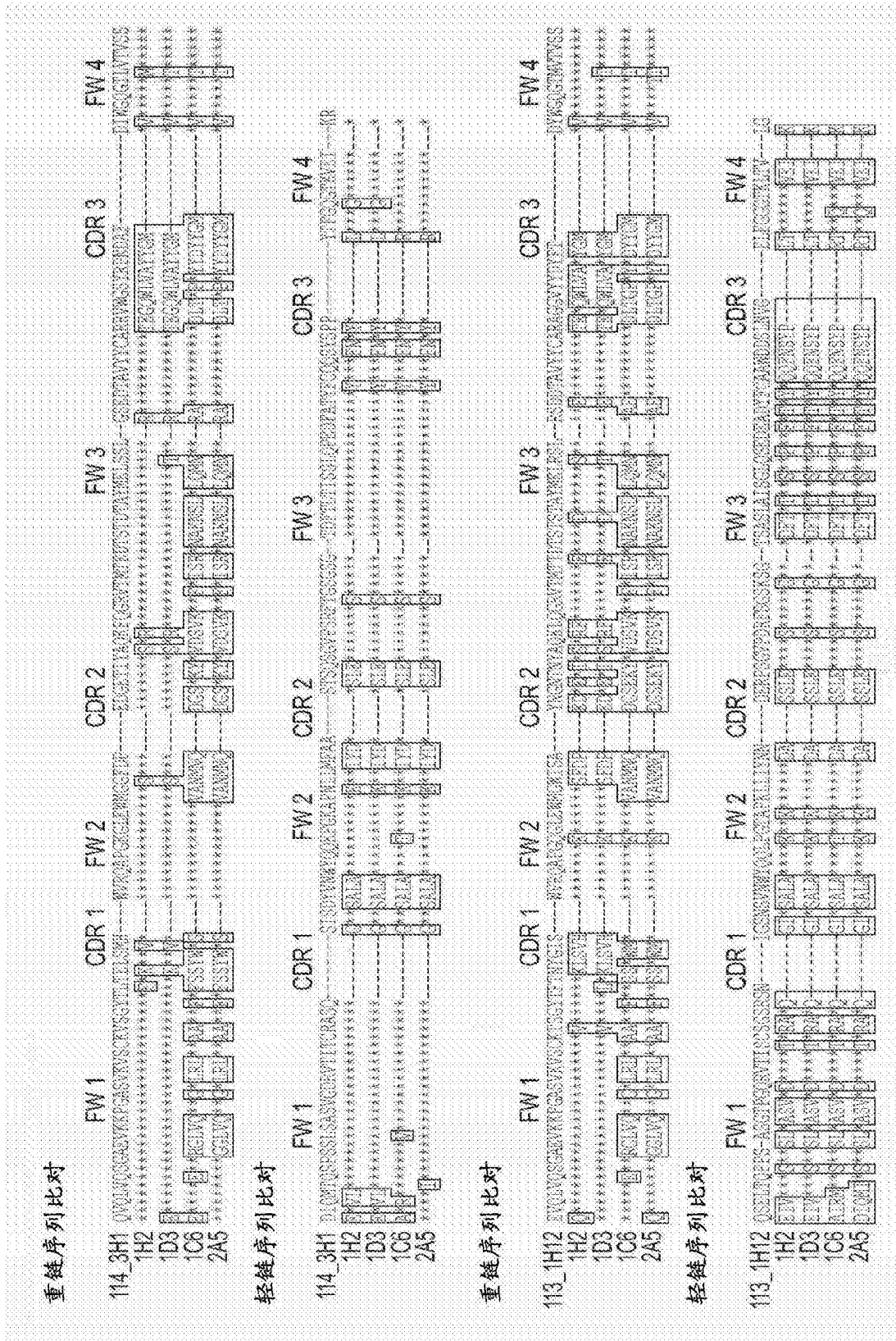


图8

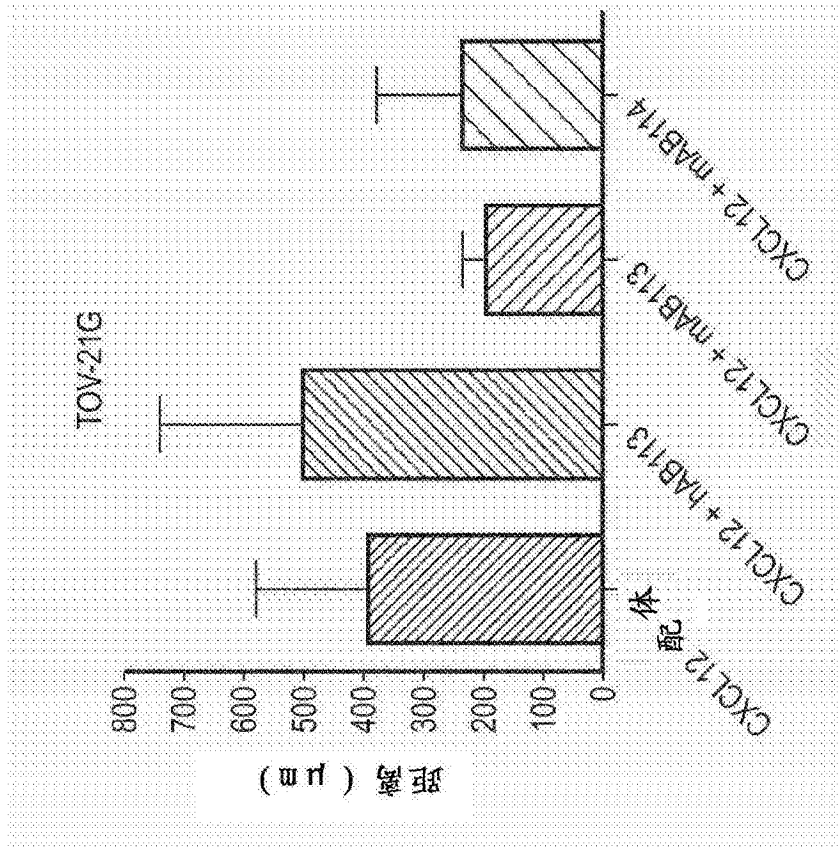


图9A

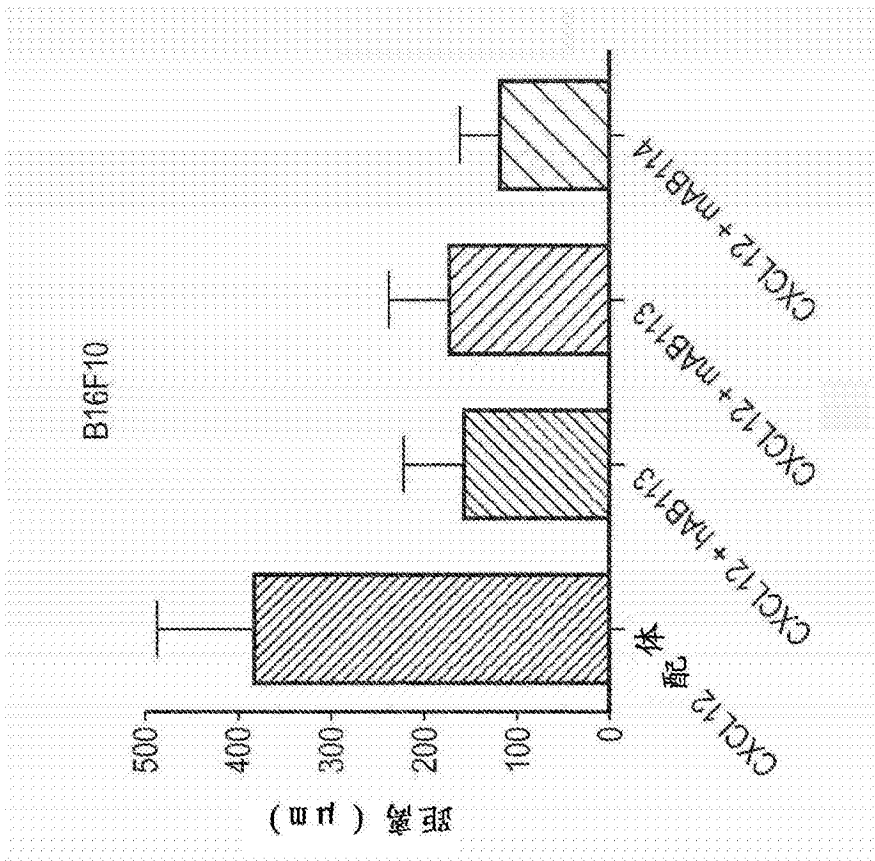


图9B

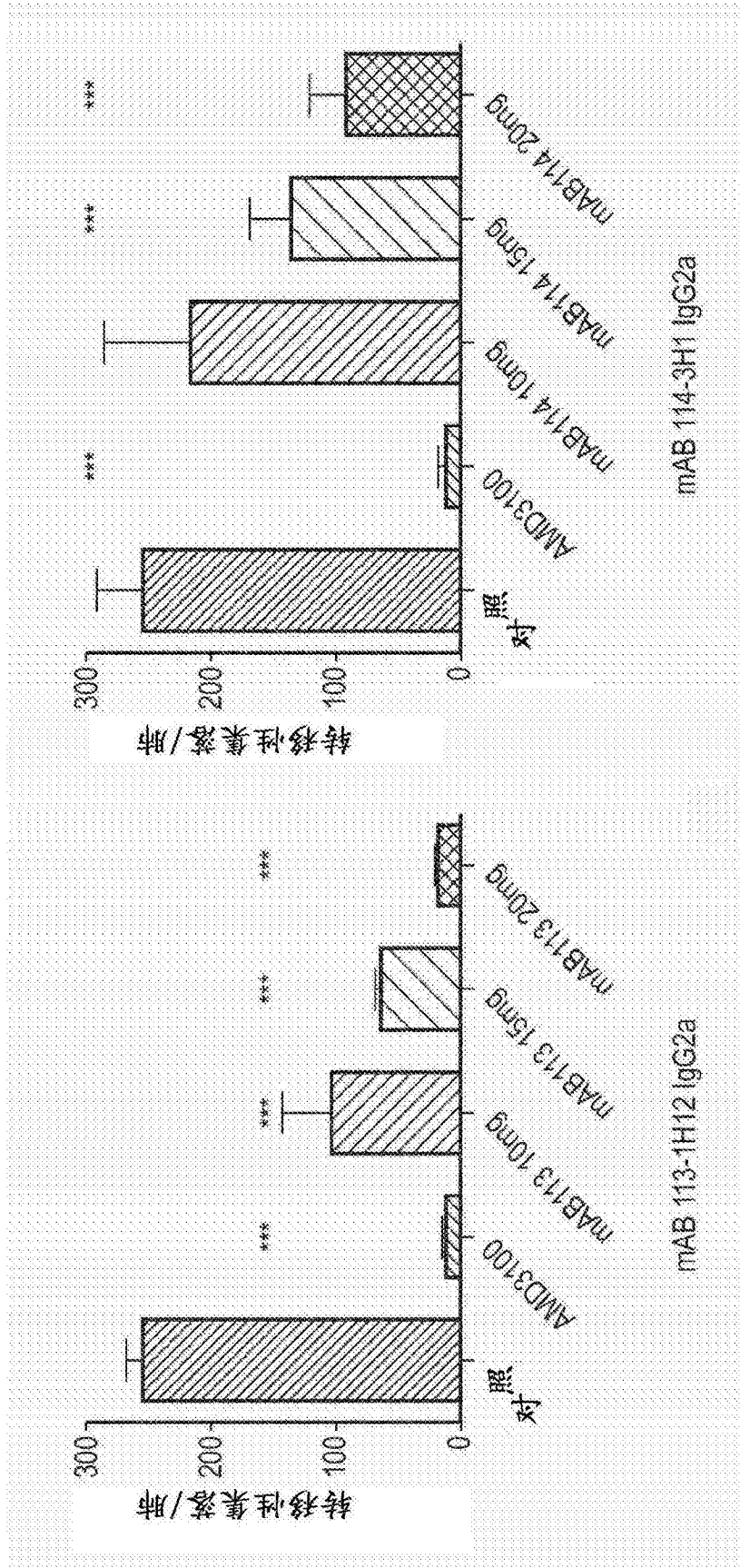


图10

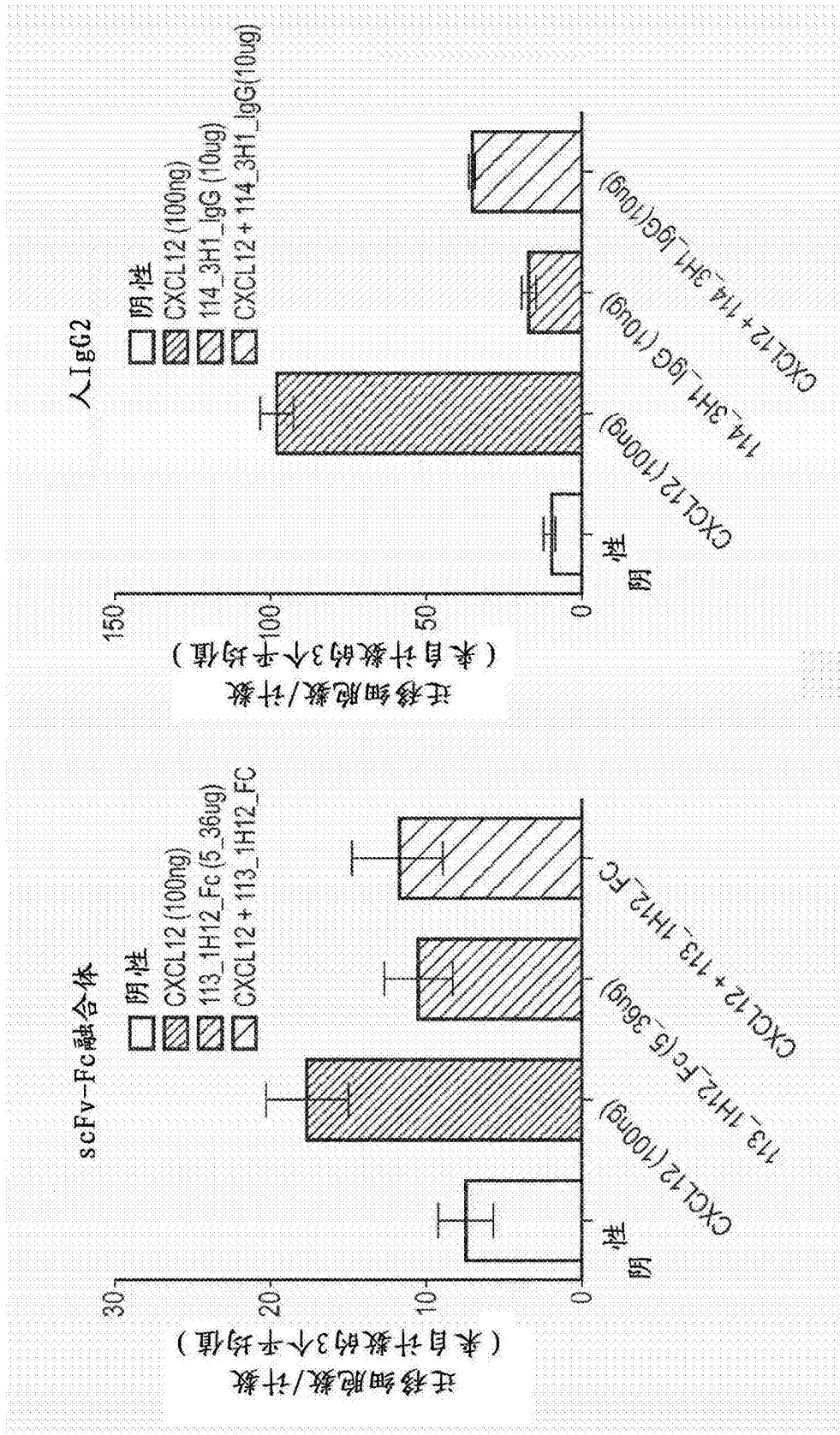


图11