(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112770786 B
(45)授权公告日 2023.10.27

(21)申请号 201980064004.7

(22)申请日 2019.08.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112770786 A

(43)申请公布日 2021.05.07

(30)优先权数据
1813137.5 2018.08.10 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/071627 2019.08.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/030827 EN 2020.02.13

(73)专利权人 米达内克斯股份有限公司
地址 英国爱丁堡

(72)发明人 C·B·伍德 T·C·弗拉托
F·登普西 S·克莱顿

(74)专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728
专利代理师 吕鹏云 尹吉伟

(51)Int.Cl.
A61K 51/08(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 104277102 A,2015.01.14
CN 1915433 A,2007.02.21
CN 103097414 A,2013.05.08
XINYUAN PAN et al..Downregulation of Annexin A1 by short hairpin RNA inhibits the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells.《INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE》.2015,第36卷第406-414页.
江若霞等.膜联蛋白 A1 基因的表达与胆囊癌临床病理的关系及调控信号转导与转录因子3 信号通路对胆囊癌细胞增殖凋亡的影响.《安徽医药》.2018,第22卷(第6期),第1082-1087页.

审查员 李煜

权利要求书2页 说明书26页
序列表20页 附图11页

(54)发明名称

利用抗体的癌症治疗

(57)摘要

本发明提供了用于治疗癌症(包括抗药性癌症)的结合人Anx-A1的抗体。还提供了用于此用途的试剂盒和产品。

CN 112770786 B

1.一种结合人Anx-A1的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗受试者癌症的药物中的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段包含互补决定区(CDR)VLCDR1、VLCDR2、VLCDR3、VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中:

VLCDR1的序列如SEQ ID NO:1、7或8所示;

VLCDR2的序列如SEQ ID NO:2所示;

VLCDR3的序列如SEQ ID NO:3所示;

VHCDR1的序列如SEQ ID NO:4所示;

VHCDR2的序列如SEQ ID NO:5所示;以及

VHCDR3的序列如SEQ ID NO:6所示,

其中Anx-A1在所述癌症的细胞表面表达。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段具有如下CDR:

VLCDR1的序列如SEQ ID NO:1所示;

VLCDR2的序列如SEQ ID NO:2所示;

VLCDR3的序列如SEQ ID NO:3所示;

VHCDR1的序列如SEQ ID NO:4所示;

VHCDR2的序列如SEQ ID NO:5所示;以及

VHCDR3的序列如SEQ ID NO:6所示。

3.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

4.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述抗体是单克隆抗体,或者所述抗原结合片段是Fab、Fab'或$F(ab')_2$抗原结合片段或scFv分子。

5.根据权利要求4所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

i)轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列;和

重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;

ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;和

重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

6.根据权利要求5所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段为单克隆抗体,包含:

i)轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,或与其具有至少70%序列同一性的氨基酸序列;和

ii)重链,所述重链包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,或与其具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。

7.根据权利要求5所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段为单克隆抗体,包含:

i)轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,或与其具有至少70%序列同一性的氨基酸序列;和

ii)重链,所述重链包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,或与其具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。

8.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述癌症对一种或多种化疗剂具有抗性。

9.根据权利要求8所述的用途,其中所述癌症是多药抗药性的。

10.根据权利要求8所述的用途,其中所述癌症对铂基化疗剂具有抗性。

11.根据权利要求8所述的用途,其中所述癌症对顺铂、阿霉素和/或他莫昔芬具有抗

性。

12.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述治疗还包括向所述受试者给药第二治疗剂。

13.根据权利要求12所述的用途,其中所述第二治疗剂是化疗剂。

14.根据权利要求13所述的用途,其中所述化疗剂是一种细胞毒性剂。

15.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述受试者是人。

16.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述癌症选自乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肺癌和胰腺癌。

17.一种试剂盒,其包含权利要求1至7中任一项定义的抗体或其抗原结合片段和化疗剂。

18.权利要求1至7中任一项定义的抗体或其抗原结合片段和第二治疗剂在制备用于分开、同时或顺序治疗受试者的癌症的产品中的用途,其中Anx-A1在所述癌症的细胞表面表达。

19.根据权利要求18所述的用途,其中所述癌症对一种或多种化疗剂具有抗性,和/或所述第二治疗剂是化疗剂。

20.根据权利要求19所述的用途,其中所述癌症是多药抗药性的。

21.根据权利要求19所述的用途,其中所述癌症对铂基化疗剂具有抗性。

22.根据权利要求19所述的用途,其中所述癌症对顺铂、阿霉素和/或他莫昔芬具有抗性。

23.根据权利要求19所述的用途,其中所述化疗剂是一种细胞毒性剂。

24.根据权利要求18所述的用途,其中所述受试者是人。

25.根据权利要求18所述的用途,其中所述癌症选自乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肺癌和胰腺癌。

利用抗体的癌症治疗

技术领域

[0001] 本发明提供一种用于治疗受试者癌症的特异性结合分子。该特异性结合分子结合人膜联蛋白A1(Anx-A1),在特定的实施方案中为抗体或抗体片段。

背景技术

[0002] 癌症是一组以异常细胞生长为特征的疾病。典型地,与癌症相关的异常细胞生长导致肿瘤的形成(由于异常细胞生长而形成的固体细胞团),尽管并非总是如此(特别是在血液癌症中)。在2010年(可获得详细统计数据的最近一年),全世界死于癌症的人(约800万人)比死于任何其他单一原因的人都要多(Lozano等,Lancet 380:2095-2128,2012)。此外,随着世界人口的老龄化,预计癌症发病率会增加。因此,迫切需要用于癌症的新的和改进的疗法。

[0003] 此外,许多癌症死亡是癌症对化疗药物产生抗性的结果。Housman等(Cancers 6:1769-1792,2014)综述了癌症产生抗药性的方法。如其中所详述的,癌症可以通过多种不同的机制产生抗药性,所述机制包括药物的失活或代谢(或防止其代谢活化)、药物靶点的突变或改变以及经由ABC转运体的药物外排。此类机制可能导致癌症产生多药抗药性(MDR)。如下所述,对于用铂基化疗剂进行的治疗,抗药性是一个特殊的问题。

[0004] 铂基化疗剂是多种不同癌症中常见的一线治疗选择,所述多种不同癌症包括睾丸癌、卵巢癌、结肠直肠癌、宫颈癌、乳腺癌、膀胱癌、头颈癌、食道癌、肺癌、间皮瘤、淋巴瘤、脑瘤和神经母细胞瘤。铂基化疗剂包括顺铂、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin)。所有铂基化疗剂基本以相同的方式工作,通过与鸟嘌呤残基的N-7位反应形成链间和链内DNA交联和DNA-蛋白质交联。这种交联抑制DNA的合成和/或修复,并导致凋亡的开始(Shen等,Pharmacol.Rev.64:706-721,2012)。然而,尽管患者通常最初对铂基化疗剂反应良好,但是由于对治疗的抗性发展(特别是在顺铂的情况下),大多数患者随后复发,导致治疗失败(Shen等,同上)。因此,对铂基疗法的抗性发展是当今肿瘤学中的重大挑战。癌症通过多种机制发展出对铂基疗法的抗性,包括减少铂基化疗剂在靶细胞中的积累(由于流入减少和/或流出增加)和(再)激活DNA修复途径。

[0005] 因此,对铂基疗法的抗性发展是当今肿瘤学中的重大挑战。迫切需要针对对传统化疗(特别是铂基化疗)有抗性或已经产生抗性的癌症的新治疗选择。

发明内容

[0006] 本发明人已经发现针对Anx-A1的特定特异性结合分子(例如抗体)在治疗癌症中有效。已经发现该分子在治疗抗药性癌症(包括对铂基化疗具有抗性的癌症)中特别有效。因此,本发明为癌症患者,特别是为对化疗剂具有抗性的癌症患者提供一种新的治疗选择。对于那些疾病对传统化疗无反应的个体,这种治疗选择满足了对新疗法的迫切需求。

[0007] 已发现本发明的特异性结合分子在治疗多种癌症中有效,包括乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肺癌和胰腺癌。

[0008] 乳腺癌是女性中最常见的癌症,并且在世界范围内造成的妇女死亡人数超过其他任何癌症(Becker,Int J Gynaecol Obstet 131(2015),S36-S39)。在英国每年诊断出超过55000例乳腺癌(男性中超过300例)。尽管乳腺癌的死亡率低于许多其他癌症,但在英国,每年有11000多人死于乳腺癌。缺乏雌激素受体、孕激素受体和激素表皮生长因子受体HER2的表达的乳腺癌(称为三阴性乳腺癌)尤其难以治疗,因为许多现代乳腺癌药物都靶向这些受体。已发现本发明的特异性结合分子在治疗乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)中有效,为该疾病提供了重要的新治疗选择。

[0009] 卵巢癌是女性中另一种常见的癌症,其难以治疗。仅在英国,每年就有超过7500例卵巢癌发生,导致超过4000人死亡(卵巢癌通常在晚期被诊断出,因此生存率相对较低)。胰腺癌相对普遍,仅在英国每年就有9000例以上,但已知胰腺癌是最难以治愈的癌症之一,存活率小于1%(同样地,这主要是由于该疾病在晚期被诊断出来)。已经发现本发明的特异性结合分子在治疗这两种癌症中有效,为难以治疗的癌症提供了急需的新疗法。结肠直肠癌(或肠癌)也是一种常见的癌症,在英国每年诊断出42000例病例。尽管结肠直肠癌仅是英国第四大最常见癌症,但它却是导致死亡的第二大最常见癌症。同样,在英国每年超过47000人被诊断出肺癌,但只有5%的人在诊断后存活了十年或更长时间。本发明的特异性结合分子为这些癌症提供了有用的新疗法。

[0010] 全长人Anx-A1具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。Anx-A1是膜联蛋白蛋白家族的成员。该家族的大多数蛋白质(包括Anx-A1)的特征在于存在一个包含四个同源重复域的“核心”区,每个重复域均包含至少一个Ca^{2+}结合位点。该家族的每个成员都由独特的N-端区为特征。Anx-A1是一种单体两亲性蛋白,主要位于表达它的细胞的细胞质中。但是,Anx-A1也可以输出,导致细胞表面定位(D'Acquisto等,Br.J.Pharmacol.155:152-169,2008)。

[0011] 已知Anx-A1在调节免疫系统中起作用,参与先天性免疫系统和适应性免疫系统的各种细胞类型的稳态。例如,Anx-A1已显示出对先天性免疫系统的细胞(如中性粒细胞和巨噬细胞)进行稳态控制,并且还通过调节T细胞受体(TCR)信号强度从而在T细胞中发挥作用(D'Acquisto等,Blood 109:1095-1102,2007)。已证明,使用针对Anx-A1的中和抗体来抑制Anx-A1在适应性免疫系统中的作用在治疗各种T-细胞介导的疾病中有效,包括诸如类风湿性关节炎和多发性硬化症的自身免疫性疾病(WO 2010/064012;WO 2011/154705)。

[0012] 抗Anx-A1抗体还被证明在治疗某些精神疾病中有用,特别是焦虑症、强迫症(OCD)和相关疾病(WO 2013/088111),尽管其发生机制尚不清楚。

[0013] WO 2005/027965证明Anx-A1定位于凋亡细胞的表面,并且抗Anx-A1抗体可以用于监测细胞凋亡。该文献教导了,在此基础上,这种抗体可以因此用于监测和诊断癌症。该文献还教导了凋亡细胞表面上的Anx-A1表达抑制针对细胞的免疫应答。在此基础上,该文献推测结合Anx-A1的抗体能够通过阻断Anx-A1对已开始凋亡的细胞的免疫抑制作用并因此刺激针对癌症的免疫应答,从而用于治疗癌症。

[0014] Oh等(Nature 429:629-635,2004)教导了Anx-A1在某些实体瘤上表达,并且可以用作将放射免疫治疗导向这些癌症的靶标,并且证明这种疗法提高了疾病动物模型的存活率。US 2015/0086553表明抗Anx-A1抗体可以用于癌症治疗和诊断,但是没有教导这种治疗可以如何实施。证明了抗Anx-A1 scFv与胃癌细胞系SNU-1的结合。Wang等(Biochem.BioPhys.Res.Commun.314:565-570,2004)证明了Anx-A1表达与癌症中多药抗药

性之间的相关性。因此，已证明多种疾病(包括癌症)显示与Anx-A1表达有关。但是，在本发明之前，尚未证明抗Anx-A1抗体(尤其是在没有任何共同治疗的情况下使用)可以用于治疗癌症。

[0015] 实际上，本发明证明在癌症治疗中的功效并未扩展到所有结合人Anx-A1的特异性结合分子。本发明提供结合人Anx-A1的特定特异性结合分子，可以有利地用于治疗癌症，特别是用于对化疗药物具有抗性的癌症和/或乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肺癌和胰腺癌。尚不清楚为什么本发明的特异性结合分子在癌症治疗中有效，而其他也与人Anx-A1结合的特异性结合分子却并非如此。不受理论的束缚，推测结合人Anx-A1的特异性结合分子的活性可能取决于被识别的表位。

[0016] WO 2018/146230中公开了许多识别人Anx-A1的单克隆抗体。WO 2018/146230中公开的抗体具有特别有利的性质，因为它们能够以非常高的亲和力与人Anx-A1结合。发明人现已发现，WO 2018/146230中公开的抗体在治疗癌症中有用，如下文进一步所述。

[0017] 因此，在第一方面，本发明提供一种用于治疗受试者癌症的结合人Anx-A1的特异性结合分子，其中：

[0018] (i)所述特异性结合分子包含互补决定区(CDR)VLCDR1、VLCDR2、VLCDR3、VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3，每个所述CDR具有如下氨基酸序列：

[0019] VLCDR1具有SEQ ID NO:1、7或8所示的序列；

[0020] VLCDR2具有SEQ ID NO:2所示的序列；

[0021] VLCDR3具有SEQ ID NO:3所示的序列；

[0022] VHCDR1具有SEQ ID NO:4所示的序列；

[0023] VHCDR2具有SEQ ID NO:5所示的序列；以及

[0024] VHCDR3具有SEQ ID NO:6所示的序列；或者，对于每个序列，与其具有至少85％序列同一性的氨基酸序列；和/或

[0025] (ii)所述特异性结合分子与Anx-A1在非连续表位上结合，所述非连续表位由SEQ ID NO:17的第197-206位、第220-224位和第227-237位氨基酸组成。

[0026] 类似地，本发明提供一种治疗受试者癌症的方法，其包括向所述受试者给药如上定义的特异性结合分子。还提供如上定义的特异性结合分子在制备用于治疗受试者癌症的药物中的用途。

[0027] 在第二方面，本发明提供一种试剂盒，其包含如上定义的特异性结合分子和化疗剂。

[0028] 在第三方面，本发明提供一种用于分开、同时或顺序地用于治疗受试者的癌症的产品，其包含如上定义的特异性结合分子和第二治疗剂。

[0029] 如上所述，本发明提供用于治疗受试者的癌症的结合人Anx-A1的特异性结合分子。如本文所定义的“特异性结合分子”是一种与特定分子伴侣特异性结合的分子，在这种情况下，所述分子伴侣为人Anx-A1。与人Anx-A1特异性结合的分子是一种与人Anx-A1结合的分子，其亲和力大于与其他分子或至少大多数其他分子结合的亲和力。因此，例如，如果使结合人Anx-A1的特异性结合分子与人类细胞的裂解物接触，则该特异性结合分子将主要结合Anx-A1。特别地，特异性结合分子与存在于所述人Anx-A1上的序列或构型结合。当特异性结合分子是抗体时，所述序列或构型是特异性结合分子与之结合的表位。下面描述了被

用于根据本发明用途的特异性结合分子结合的Anx-A1表位。

[0030] 用于本文用途的特异性结合分子不一定只与人Anx-A1结合:所述特异性结合分子可能会与某些其他未定义的靶分子交叉反应,或者当与大量分子的混合物(例如细胞裂解物等)接触时,可能会表现出一定程度的非特异性结合。例如,所述特异性结合分子可能会与人膜联蛋白家族的其他成员和/或与其他动物的Anx-A1蛋白表现出一定程度的交叉反应性。无论如何,用于根据本发明用途的特异性结合分子显示出对Anx-A1的特异性。技术人员将能够使用本领域中的标准技术,例如ELISA、Western印迹、表面等离振子共振(SPR)等,来容易地鉴定特异性结合分子是否对Anx-A1显示出特异性。在特定的实施方案中,用于本文用途的特异性结合分子以小于20nM、15nM或10nM的K_D(解离常数)结合人Anx-A1。在一个优选的实施方案中,用于本文用途的特异性结合分子以小于5nM的K_D结合人Anx-A1。

[0031] 优选在结合条件下测量特异性结合分子与Anx-A1结合的K_D,其中Ca^{2+}离子以至少1mM的浓度存在,并且任选地HEPES以10mM-20mM的浓度存在,并且pH在7至8之间,优选在7.2至7.5(包括)之间的生理水平。可以存在NaCl,例如以100mM-250mM的浓度存在,还可以存在低浓度的去垢剂,例如聚山梨酯20。这种低浓度可以是例如从0.01%v/v到0.5%v/v。可以计算出特定结合分子与其配体之间相互作用的K_D的多种方法在本领域中是众所周知的。已知技术包括SPR(例如,Biacore)和偏振调制的斜入射反射率差(OI-RD)。

[0032] 如上所述,“与人Anx-A1结合”的分子显示出对人Anx-A1分子的特异性。人Anx-A1有三种人类亚型,由四种选择性剪切的Anx-A1 mRNA翻译获得。全长人Anx-A1蛋白是由ANXA1-002或ANXA1-003转录物的翻译获得的,并且如上所述,具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。ANXA1-004和ANXA1-006转录物编码全长人Anx-A1蛋白的片段,其分别具有SEQ ID NO:18和19所示的氨基酸序列。

[0033] 用于根据本发明用途的特异性结合分子结合全长人Anx-A1(即SEQ ID NO:17的Anx-A1,其由ANXA1-002或ANXA1-003转录物编码,其是有346个氨基酸的蛋白)。所述特异性结合分子也可以结合全长Anx-A1的特定片段、部分或变体,例如由ANXA1-004和ANXA1-006转录物编码的片段。

[0034] 如下文所讨论的,抗体(和含有CDR的分子)形成优选的用于根据本发明用途的特异性结合分子。

[0035] 如上所述,WO 2018/146230中公开了许多识别人Anx-A1的单克隆抗体。如技术人员已知的,抗体是包含四条多肽链的蛋白质:两条重链和两条轻链。通常,重链彼此相同,轻链彼此相同。轻链比重链短(因而更轻)。重链包含四个或五个结构域:位于N-端的可变(V_H)域,然后是三个或四个恒定域(从N-端到C-端分别是C_H1、C_H2、C_H3和C_H4(如果存在))。轻链包含两个结构域:位于N-端的可变(V_L)域,位于C-端的恒定(C_L)域。在重链中,非结构化的铰链区位于C_H1和C_H2结构域之间。抗体的两条重链通过存在于铰链区的半胱氨酸残基之间形成的二硫键相连,每条重链分别通过存在于C_H1和C_L结构域的半胱氨酸残基之间的二硫键与一条轻链相连。

[0036] 在哺乳动物中,产生两种类型的轻链,称为lambda(λ)和kappa(κ)。对于κ轻链,可变域和恒定域可以分别称为Vκ和Cκ结构域。轻链是λ还是κ轻链取决于其恒定区:λ和κ轻链的恒定区不同,但在任何给定物种的所有相同类型的轻链中均相同。

[0037] 在一个物种的任何给定同种型的所有抗体中重链的恒定区均相同,但同种型之间

不同(抗体同种型的实例为IgG、IgE、IgM、IgA和IgD类;还存在许多抗体亚型,例如IgG抗体有四种亚型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。抗体的特异性由其可变区的序列决定。在任何个体中,相同类型的抗体之间的可变区序列不同。特别地,抗体的轻链和重链均包含三个高变的互补决定区(CDR)。在一对轻链和重链中,两条链的CDR形成抗原结合位点。CDR序列决定抗体的特异性。

[0038] 重链的三个CDR从N-端到C-端被称为VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,轻链的三个CDR从N-端到C-端被称为VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3。

[0039] WO 2018/146230中公开的一种抗体具有以下CDR序列:

[0040] VLCDR1:RSSQSLENSNAKTYLN(SEQ ID NO:1);

[0041] VLCDR2:GVSNRFS(SEQ ID NO:2);

[0042] VLCDR3:LQVTHVPYT(SEQ ID NO:3);

[0043] VHCDR1:GYTFTNYWIG(SEQ ID NO:4);

[0044] VHCDR2:DIYPGGDYTNYNEKFKG(SEQ ID NO:5);以及

[0045] VHCDR3:ARWGLGYYFDY(SEQ ID NO:6)。

[0046] WO 2018/146230中公开的另一种抗体具有以下CDR序列:

[0047] VLCDR1:RSSQSLENSNGKTYLN(SEQ ID NO:7);

[0048] VLCDR2:GVSNRFS(SEQ ID NO:2);

[0049] VLCDR3:LQVTHVPYT(SEQ ID NO:3);

[0050] VHCDR1:GYTFTNYWIG(SEQ ID NO:4);

[0051] VHCDR2:DIYPGGDYTNYNEKFKG(SEQ ID NO:5);以及

[0052] VHCDR3:ARWGLGYYFDY(SEQ ID NO:6)。

[0053] WO 2018/146230中公开的另一种抗体具有以下CDR序列:

[0054] VLCDR1:RSSQSLENTNGKTYLN(SEQ ID NO:8);

[0055] VLCDR2:GVSNRFS(SEQ ID NO:2);

[0056] VLCDR3:LQVTHVPYT(SEQ ID NO:3);

[0057] VHCDR1:GYTFTNYWIG(SEQ ID NO:4);

[0058] VHCDR2:DIYPGGDYTNYNEKFKG(SEQ ID NO:5);以及

[0059] VHCDR3:ARWGLGYYFDY(SEQ ID NO:6)。

[0060] 因此,WO 2018/146230中公开的抗体具有相同的CDR序列,VLCDR1序列除外。SEQ ID NO:7的VLCDR1序列是在鼠抗体Mdx001中发现的野生型VLCDR1序列,其由从保藏于ECACC、保藏号为10060301的杂交瘤获得的小mRNA序列构建而成。产生了人源化的Mdx001版本,令人惊讶的是,发现这些人源化抗体中VLCDR1序列的修饰产生了增强的抗体。SEQ ID NO:7的第11位甘氨酸残基的取代增强了抗体的稳定性和功能。不受理论的束缚,人们认为这是通过去除CDR的翻译后修饰的位点来实现的。具体而言,人们认为该甘氨酸残基的取代从蛋白质上去除了脱酰胺位点。SEQ ID NO:7所示的VLCDR1序列包含序列基序Ser-Asn-Gly。该序列基序与Asn残基的脱酰胺作用有关,这导致天冬酰胺残基转化为天冬氨酸或异天冬氨酸,这会影响抗体的稳定性和靶标结合。Ser-Asn-Gly基序中的任何一个残基的取代被认为可以去除脱酰胺位点。

[0061] 发明人发现了这样的抗体,其中在SEQ ID NO:7的第11位上的甘氨酸残基(位于上

述脱酰胺位点中的甘氨酸残基)被丙氨酸取代,相对于天然的Mdx001抗体,显示与其靶标(Anx-A1)的结合增强。包含在第11位的甘氨酸被丙氨酸取代的VLCDR1具有氨基酸序列RSSQSLENSNAKTYLN(标粗的氨基酸为通过上述取代引入的丙氨酸),如SEQ ID NO:1所示。此外,还发现包含在第9位被修饰(丝氨酸被苏氨酸取代)的VLCDR1的人源化抗体相对于Mdx001表现出Anx-A1结合增强。包含在第9位的丝氨酸被苏氨酸取代的VLCDR1具有氨基酸序列RSSQSLENTNGKTYLN(标粗的氨基酸为通过上述取代引入的苏氨酸),如SEQ ID NO:8所示。如上所述,发明人已经发现WO 2018/146230中公开的抗体适合用于癌症治疗。

[0062] WO 2018/146230中公开的抗体是通过用人Anx-A1对小鼠进行遗传免疫产生的,这意味着小鼠的免疫系统暴露于整个的、完整的处于其天然构象的人Anx-A1。如实施例中祥述,通过氢-氘交换(HDX)对WO 2018/146230的抗体进行的分析表明,它们在非连续表位上结合人Anx-A1,所述非连续表位由人Anx-A1的第197-206位、第220-224位和第227-237位氨基酸组成(即SEQ ID NO:17的第197-206位、第220-224位和第227-237位氨基酸)。

[0063] 值得注意的是,WO 2018/146230的抗体仅在生理浓度的Ca^{2+}存在下才结合Anx-A1。不受理论的束缚,这被认为是由于其表位在Anx-A1分子上的位置导致的。在不存在Ca^{2+}的情况下,其N-端位于与该非连续表位相邻的“口袋”中。Ca^{2+}与Anx-A1的结合(发生在生理Ca^{2+}浓度下)导致Anx-A1构象的改变,从而导致N-端从核心域的口袋中排出,这被认为会暴露表位,从而使抗体结合。结合Anx-A1的该表位的任何抗体(或类似的特异性结合分子)可以用于本文所述的方法和用途。

[0064] 用于根据本发明用途的特异性结合分子可以包含WO 2018/146230中公开的三种抗体中的任一种的CDR序列或其变体。替代地或另外地,用于根据本发明用途的特异性结合分子可以在与WO 2018/146230的抗体相同的表位上结合Anx-A1。因此,用于根据本发明用途的特异性结合分子:

[0065] (i)包含互补决定区(CDR)VLCDR1、VLCDR2、VLCDR3、VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,每个所述CDR具有如下氨基酸序列:

[0066] VLCDR1具有SEQ ID NO:1、7或8所示的序列;

[0067] VLCDR2具有SEQ ID NO:2所示的序列;

[0068] VLCDR3具有SEQ ID NO:3所示的序列;

[0069] VHCDR1具有SEQ ID NO:4所示的序列;

[0070] VHCDR2具有SEQ ID NO:5所示的序列;以及

[0071] VHCDR3具有SEQ ID NO:6所示的序列;或者,对于每个序列,与其具有至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列;和/或

[0072] (ii)在非连续表位上与人Anx-A1结合,所述非连续表位由SEQ ID NO:17的第197-206位、第220-224位和第227-237位氨基酸组成。

[0073] 在一个优选的方面,(i)的特异性结合分子与(ii)中所述的表位结合。

[0074] “或者,对于每个序列,与其具有至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列”是指每个所述CDR可以具有在相关SEQ ID NO中指定的氨基酸序列,或与其具有至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。因此VLCDR1具有SEQ ID NO:1、7或8所示的序列,或与SEQ ID NO:1、7或8具有至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列;VLCDR2具有SEQ ID NO:2所示的序列,或与SEQ ID NO:2具有至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序

列;VLCDR3具有SEQ ID NO:3所示的序列,或与SEQ ID NO:3具有至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列;VHCDR1具有SEQ ID NO:4所示的序列,或与SEQ ID NO:4具有至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列;VHCDR2具有SEQ ID NO:5所示的序列,或与SEQ ID NO:5具有至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列;VHCDR3具有SEQ ID NO:6所示的序列,或与SEQ ID NO:6具有至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。与特定SEQ ID NO具有至少85%、90%或95%序列同一性(但小于100%序列同一性)的氨基酸序列在本文被称为该SEQ ID NO的变体,例如与SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性但与SEQ ID NO:1具有小于100%序列同一性的氨基酸序列是SEQ ID NO:1的变体。

[0075] 在一个特定的实施方案中,用于根据本发明用途的特异性结合分子包含具有以下氨基酸序列的CDR:

[0076] VLCDR1具有SEQ ID NO:1所示的序列;

[0077] VLCDR2具有SEQ ID NO:2所示的序列;

[0078] VLCDR3具有SEQ ID NO:3所示的序列;

[0079] VHCDR1具有SEQ ID NO:4所示的序列;

[0080] VHCDR2具有SEQ ID NO:5所示的序列;以及

[0081] VHCDR3具有SEQ ID NO:6所示的序列。

[0082] 如所指出的,用于根据本发明用途的特异性结合分子可以包含6个由多肽序列组成的CDR。如本文所用,“蛋白质”和“多肽”是可互换的,并且每一个是指通过一个或多个肽键连接的2个或更多个氨基酸的序列。因此,特异性结合分子可以是多肽。或者,特异性结合分子可以包含一个或多个包含CDR序列的多肽。优选地,用于根据本发明用途的特异性结合分子是抗体或抗体片段。

[0083] 用于根据本发明用途的特异性结合分子可以通过本领域已知的任何方法合成。特别地,可以使用蛋白质表达系统,例如使用原核(例如细菌)细胞或真核(例如酵母、真菌、昆虫或哺乳动物)细胞的细胞表达系统来合成特异性结合分子。可替代的蛋白质表达系统是无细胞的体外表达系统,其中编码特异性结合分子的核苷酸序列在体外转录成mRNA,并且将mRNA翻译成蛋白质。无细胞表达系统试剂盒是广泛可得的,并且可以从例如Thermo Fisher Scientific(美国)购买。或者,可以在非生物系统中化学合成特异性结合分子。液相合成或固相合成可以用于产生可形成用于根据本发明用途的特异性结合分子的或包含在用于根据本发明用途的特异性结合分子中的多肽。技术人员可以使用本领域常见的适当方法容易地产生特异性结合分子。特别地,所述特异性结合分子可以在哺乳动物细胞(如CHO细胞)中重组表达。

[0084] 可以通过本领域中的标准方法(例如,抗体的遗传免疫)产生在如上定义的表位(即,由SEQ ID NO:17的第197-206位、第220-224位和第227-237位氨基酸组成)上与人Anx-A1结合的特异性结合分子,并且通过本领域已知的表位作图的标准方法鉴定具有所需表位的抗体。此类方法的实例包括HDX、表位切除、肽淘选、X射线共结晶、NMR等(Clementi等,Methods Mol.Biol.1131:427-446,2014;Abbott等,Immunology 142(4):526-535,2014)。特异性结合分子还可以通过修饰已知与相关表位结合的现有特异性结合分子(例如通过表达修饰序列)来产生,并且通过本文所述的方法鉴定与相关表位结合的分子。还可以通过与已知与所述表位(例如,如本文所述)结合的抗体竞争或通过比较其与如本文公开的表位及

其表位变体的结合(其中未能与表位变体结合表明与感兴趣的表位特异性结合)来鉴定与相关表位结合的特异性结合分子。

[0085] 如果需要,可以分离(即纯化)用于根据本发明用途的特异性结合分子。如本文所用,“分离”是指特异性结合分子是提供它的任何溶液等的主要组分(即,多数组分)。特别地,如果特异性结合分子最初是在混合物或混合溶液中产生的,则特异性结合分子的分离意味着已经从其中分离或纯化了特异性结合分子。因此,例如,如果所述特异性结合分子是多肽,并且使用如上所述的蛋白质表达系统产生所述多肽,则将特异性结合分子分离以使得特异性结合分子是其存在的溶液或组合物中最丰富的多肽,优选构成溶液或组合物中的大多数多肽,并且相对于天然生产培养基中存在的其他多肽和生物分子是富集的。特别地,分离用于根据本发明用途的特异性结合分子,使得其是溶液或组合物中的主要(多数)特异性结合分子。在优选的特征中,当相对于溶液或组合物中的其他组分的存在,特别是其他多肽组分的存在进行评估时,特异性结合分子以至少60%w/w、70%w/w、80%w/w、90%w/w、95%w/w或99%w/w的纯度存在于溶液或组合物中。

[0086] 如果所述特异性结合分子是蛋白质,例如在蛋白表达系统中,则可以通过定量蛋白质组学分析特异性结合分子的溶液,以鉴定用于根据本发明用途的特异性结合分子是否是主要的,并因此是分离的。例如,可以使用2D凝胶电泳和/或质谱。这种分离的分子可以存在于下文所述的制剂或组合物中。

[0087] 可以使用本领域已知的任何技术来分离本发明的特异性结合分子。例如,可以用诸如聚组氨酸标签、链霉素标签、FLAG标签、HA标签等亲和标签来产生特异性结合分子,以能够使用适当的结合伴侣通过亲和层析来分离分子,例如可以使用Ni^{2+}离子纯化带有聚组氨酸标签的分子。在其中特异性结合分子是抗体的实施方案中,可以利用一种或多种抗体结合蛋白,例如蛋白G、蛋白A、蛋白A/G或蛋白L,使用亲和层析分离特异性结合分子。或者,可以通过例如尺寸排阻层析或离子交换层析分离特异性结合分子。相反,通过化学合成(即通过非生物方法)产生的特异性结合分子很可能以分离的形式产生。因此,如果用于根据本发明用途的特异性结合分子以产生分离的分子的方式合成,则其被认为是分离的,因此不需要特定的纯化或分离步骤。

[0088] 在本发明的实施方案中,当特异性结合分子包含SEQ ID NO:1(或7或8)或2-6的变体的CDR序列时,该变体可以相对于其参考CDR序列(即CDR序列与其的同源性至少为85%,但小于100%)通过取代、添加和/或缺失氨基酸残基进行改变。

[0089] 当通过取代特定氨基酸残基修饰CDR序列时,该取代可以是保守氨基酸取代。如本文所用,术语“保守氨基酸取代”是指其中一个氨基酸残基被具有相似侧链的另一氨基酸残基取代的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸趋于具有相似的特性,因此,对多肽的结构或功能有重要作用的氨基酸的保守取代可以预期比在相同位置的非保守氨基酸取代对多肽的结构/功能的影响要小。具有相似侧链的氨基酸残基家族已经在本领域中被定义,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)、非极性侧链(例如甘氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,保守氨基酸取代可以被认为是其中特定氨基酸残基被同一家族中的不同氨基酸取代的取代。然而,CDR残基的取代同样可以是非保守

取代,其中一个氨基酸被具有属于不同家族的侧链的另一个氨基酸取代。

[0090] 在本发明范围内的氨基酸取代或添加可以使用由遗传密码编码的蛋白原氨基酸、不是由遗传密码编码的蛋白原氨基酸或非蛋白原氨基酸进行。优选地,使用蛋白原氨基酸进行任何氨基酸取代或添加。构成CDR序列的氨基酸可以包括非天然存在的氨基酸,但它们是天然存在的氨基酸的修饰。如果这些非天然存在的氨基酸不改变序列并且不影响特异性,则它们可以用于产生本文所述的CDR而不降低序列同一性,即被认为提供了CDR的氨基酸。例如,可以使用氨基酸的衍生物,例如甲基化的氨基酸。在一个实施方案中,用于根据本发明用途的特异性结合分子不是天然分子,即不是自然界中发现的分子。

[0091] 可以使用任何合适的技术,例如编码DNA序列的定点诱变或固态合成,对SEQ ID NO:1-8所示的CDR的氨基酸序列进行修饰。

[0092] 用于根据本发明用途的特异性结合分子可以包含上述CDR。或者,这种分子可以包含接头部分或框架序列以允许适当呈现CDR。还可以存在其他序列,这可以方便地赋予其他性质,例如,允许分离或鉴定含有CDR的分子的肽序列,例如上文所述的那些。在这种情况下,可以产生融合蛋白。

[0093] 如上所述,用于根据本发明用途的特异性结合分子可以包含与如上所述的SEQ ID NO:1(或7或8)和2-6具有至少85%序列同一性的CDR。在本发明的另一个实施方案中,可以通过相对于SEQ ID NO:1(或7或8)和2-6取代、添加或缺失多达2个氨基酸来修饰每个CDR序列,条件是:如上所述,得到的CDR序列与SEQ ID NO:1(或7或8)和2-6具有至少85%或90%的序列同一性。“取代、添加或缺失”包括取代、添加和缺失的组合。因此,特别地,VLCDR1可以具有有1或2个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:1(或7或8)的序列;VLCDR2可以具有有1个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:2的序列;VLCDR3可以具有有1个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:3的序列;VHCDR1可以具有有1个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:4的序列;VHCDR2可以具有有1或2个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:5的序列;VHCDR3可以具有有1个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:6的序列。优选地,所述SEQ ID NO:1、7或8的1或2个氨基酸取代在该序列的第9位和/或第11位。

[0094] 序列同一性可以通过任何方便的方法来评估。但是,为了确定序列之间的序列同一性程度,可以使用成对或多序列比对的计算机程序,例如EMBOSS Needle或EMBOSS Stretcher(二者均是Rice,P.等,Trends Genet.16,(6),276-277页,2000)可以用于成对序列比对,而Clustal Omega(Sievers F等,Mol.Syst.Biol.7:539,2011)或MUSCLE(Edgar,RC,Nucleic Acids Res.32(5):1792-1797,2004)可以用于多序列比对,尽管可以使用任何其他合适的程序。无论是成对比对还是多个比对,都必须全局(即跨整个参考序列)而不是局部进行。

[0095] 序列比对和同一性百分比计算可以使用例如标准Clustal Omega参数确定:矩阵Gonnet,空位开放罚分6,空位延伸罚分1。或者,可以使用标准EMBOSS Needle参数:矩阵BLOSUM62,空位开放罚分10,空位延伸罚分0.5。或者也可以使用任何其他合适的参数。

[0096] 为了本申请的目的,在通过不同方法获得的序列同一性值之间存在争议的情况下,使用带有默认参数的EMBOSS Needle通过全局成对比对获得的值应视为有效。

[0097] 如上所述,用于根据本发明用途的特异性结合分子优选是抗体或抗体片段。“抗体”是具有上文所述特征的免疫球蛋白。本发明还考虑了天然存在的抗体的变体,其保留

CDR但是存在于不同的框架中，如下文所讨论，并且以相同的方式起作用，即保留对抗原的特异性。因此，抗体包括功能性等同物或同源物，其中天然存在的结构域已被以相同方式起作用的天然或非天然等同物或同源物部分或全部替换。

[0098] 当用于根据本发明用途的特异性结合分子是抗体时，它优选是单克隆抗体。“单克隆抗体”是指由单一抗体种类组成的抗体制剂，即制剂中的所有抗体具有相同的氨基酸序列，包括相同的CDR，因此结合其靶抗原(“靶抗原”是指含有被特定抗体结合的表位的抗原，即抗Anx-A1抗体的靶抗原是Anx-A1)上的相同表位并具有相同的效果。换句话说，用于根据本发明用途的抗体优选不是抗体的多克隆混合物的一部分。

[0099] 如上所述，在抗体中，CDR序列位于重链和轻链的可变域中。CDR序列位于多肽框架内，该框架适当地定位CDR以进行抗原结合。因此，可变域的其余部分(即可变域序列中不形成任何一个CDR的部分的部分)构成框架区。成熟的可变域的N-端形成框架区1(FR1)；CDR1和CDR2之间的多肽序列形成FR2；CDR2和CDR3之间的多肽序列形成FR3；将CDR3连接至恒定域的多肽序列形成FR4。在用于根据本发明用途的抗体中，可变区框架区可以具有任何合适的氨基酸序列，使得该抗体通过其CDR与人Anx-A1结合。恒定区可以是任何哺乳动物(优选人)抗体同种型的恒定区。

[0100] 在本发明的某些实施方案中，所述特异性结合分子可以是多特异性的，例如，双特异性单克隆抗体。多特异性结合分子包含与至少两种不同的分子结合伴侣结合(例如与两种或更多种不同的抗原或表位结合)的区域或结构域(抗原结合区)。在双特异性抗体的情况下，该抗体以如上所述的结构包含两条重链和轻链，除了两条重链和两条轻链的可变域分别不同，因此形成两个不同的抗原结合区。在用于根据本发明用途的多特异性(例如双特异性)结合分子中，例如单克隆抗体中，其中一个抗原结合区具有如本文所定义的用于根据本发明用途的特异性结合分子的CDR序列，因此结合Anx-A1。用于根据本发明用途的多特异性结合分子的其他一个或多个抗原结合区与通过用于根据本发明用途的CDR形成的抗原结合区不同，例如，具有序列不同于本文定义的用于根据本发明用途的特异性结合分子的那些的CDR。特异性结合分子(例如在双特异性抗体中)的一个或多个附加(例如第二)抗原结合区也可以结合Anx-A1，但是在与结合Anx-A1的第一抗原结合区(具有用于根据本发明用途的特异性结合分子的CDR)不同的表位上结合Anx-A1。或者，一个或多个附加(例如第二)抗原结合区可以结合一个或多个附加的(例如第二)不同抗原，该抗原不是Anx-A1。在一个替代的实施方案中，特异性结合分子中(例如抗体中)的两个或更多个抗原结合区可以各自结合相同的抗原，即提供多价(例如二价)分子。

[0101] 特异性结合分子可以是能够结合人Anx-A1的抗体片段或合成构建体。因此，用于根据本发明用途的抗体片段包含抗原结合域(即，由其衍生的抗体的抗原结合域)。在Rodrigo等，Antibodies，第4(3)卷，259-277页，2015中讨论了抗体片段。用于根据本发明用途的抗体片段优选为单克隆的(即它们不是抗体片段的多克隆混合物的一部分)。抗体片段包括例如Fab、F(ab')$_2$、Fab'和Fv片段。在Roitt等，免疫学第二版(Immunology second edition)(1989)，伦敦Churchill Livingstone中讨论了Fab片段。Fab片段由抗体的抗原结合域组成，即，可以看出单个抗体包含两个Fab片段，每个Fab片段由轻链和与其相连的重链N-端部分组成。因此，Fab片段包含完整的轻链以及与其结合的重链的V_H和C_H1结构域。Fab片段可以通过用木瓜蛋白酶消化抗体来获得。

[0102] F(ab')$_2$片段由抗体的两个Fab片段以及重结构域的铰链区组成，包括将两条重链连接在一起的二硫键。换句话说，F(ab')$_2$片段可以看作是两个共价连接的Fab片段。F(ab')$_2$片段可以通过用胃蛋白酶消化抗体来获得。F(ab')$_2$片段的还原产生两个Fab'片段，产生的Fab'片段可以看作是含有附加巯基的Fab片段，巯基可以用于将该片段与其他分子缀合。

[0103] Fv片段仅由轻链和重链的可变域组成。这些不是共价连接的，仅通过非共价相互作用微弱地保持在一起。可以修饰Fv片段以产生称为单链Fv(scFv)分子的合成构建体。这种修饰通常以重组的方式进行，通常通过改造抗体基因以产生其中单个多肽同时包含V_H和V_L结构域的融合蛋白。scFv片段通常包括共价连接V_H和V_L区的肽接头，这有助于分子的稳定性。接头可以包含1至20个氨基酸，例如1、2、3或4个氨基酸，5、10或15个氨基酸，或其他方便的在1至20范围内的中间数。肽接头可以由任何一般方便的氨基酸残基形成，例如由甘氨酸和/或丝氨酸形成。合适的接头的一个实例是Gly_4Ser。可以使用这样的接头的多聚体，例如二聚体、三聚体、四聚体或五聚体，例如$(Gly_4Ser)_2$、$(Gly_4Ser)_3$、$(Gly_4Ser)_4$或$(Gly_4Ser)_5$。然而，接头不是必需存在的，并且V_L结构域可以通过肽键连接至V_H结构域。scFv在本文中定义为抗体片段。

[0104] 特异性结合分子可以是scFv的类似物。例如，scFv可以连接至其他特异性结合分子(例如其他scFv、Fab抗体片段和嵌合IgG抗体(例如，具有人框架))。scFv可以与其他scFv连接，以形成作为多特异性结合蛋白的多聚体，例如二聚体、三聚体或四聚体。双特异性scFv有时被称为双抗体(diabody)，三特异性scFv被称为三抗体(triabody)，四特异性scFv被称为四抗体(tetrabody)。在其他实施方案中，用于根据本发明用途的scFv可以与其他相同的scFv分子结合，从而形成具有单特异性但为多价的多聚体，例如可以形成二价二聚体或三价三聚体。

[0105] 可以使用的合成构建体包括CDR肽。这些是包含抗原结合决定簇的合成肽。也可以使用肽模拟物。这些分子通常是构象受限的有机环，模拟CDR环的结构，并包括与抗原相互作用的侧链。

[0106] 如上所述，在特定的实施方案中，用于根据本发明用途的特异性结合分子包含具有SEQ ID NO:1、7或8和2-6所示氨基酸序列的CDR。具体来说，它们衍生自鼠抗体Mdx001或由鼠抗体Mdx001修饰而来。然而，用于根据本发明用途的抗体或其片段优选是人的或人源化的。

[0107] 用于根据本发明用途的抗体或抗体片段可以是人/小鼠嵌合抗体，或优选地可以是人源化的。对于单克隆抗体和抗体片段尤其如此。当要将分子用作人治疗剂时，需要人源化或嵌合的抗体或抗体片段。出于多种原因使用非人(例如鼠)抗体对人进行的治疗处理可能无效，例如，抗体的体内半衰期短；外源重链恒定区介导的效应子功能弱，这是由于人免疫效应细胞上的Fc受体对非人重链恒定区的识别能力低；患者对抗体的敏化，以及(在鼠抗体的情况下)人抗小鼠抗体(HAMA)反应的产生；以及HAMA对小鼠抗体的中和作用导致治疗效果的丧失。

[0108] 嵌合抗体是具有源自一种物种的可变区和源自另一物种的恒定区的抗体。因此，用于根据本发明用途的抗体或抗体片段可以是包含鼠可变域和人恒定域的嵌合抗体或嵌合抗体片段。

[0109] 如上祥述，抗体的同种型由其重链恒定区的序列限定。用于根据本发明用途的嵌

合抗体可以具有任何人抗体同种型的恒定区，以及每个同种型内的任何亚型。例如，嵌合抗体可以具有IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体的Fc区(即，嵌合抗体可以分别包含重链α、δ、ε、γ或μ的恒定域)，尽管优选地，用于根据本发明用途的抗体是IgG同种型。因此，嵌合抗体可以是任何同种型。嵌合抗体的轻链可以是κ或λ轻链，即它可以包含人λ轻链或人κ轻链的恒定区。相应地，嵌合抗体片段是包含恒定域的抗体片段(例如，Fab、Fab'或$F(ab')_2$片段)。用于根据本发明用途的嵌合抗体片段的恒定域可以如上文针对嵌合单克隆抗体所述。

[0110] 嵌合抗体可以使用任何合适的技术产生，例如重组DNA技术，其中将鼠可变域的DNA序列与一个或多个人恒定域的DNA序列融合，以编码嵌合抗体。如上所述，可以通过使用重组DNA技术产生编码这种多肽的DNA序列，或者通过加工用于根据本发明用途的嵌合抗体以产生期望的片段，从而获得嵌合抗体片段。可以预期嵌合抗体将克服在人类治疗中与使用外源抗体(例如，鼠抗体)相关的体内半衰期短和效应子功能较弱的问题，并且可以降低患者敏化和HAMA发生的可能性。然而，由于在可变域中存在鼠序列，因此当向人类患者给药嵌合抗体时，仍然可能发生患者敏化和HAMA。

[0111] 因此，优选地，用于根据本发明用途的抗体或抗体片段是完全人源化的。人源化抗体是衍生自另一种物种(例如，小鼠)的抗体，其中抗体链的恒定域被人恒定域替换，并且可变区的氨基酸序列被修饰以用人框架序列替换外源(例如鼠)框架序列，从而，优选地，抗体中唯一的非人类序列是CDR序列。人源化抗体可以克服与非人抗体在人类中的治疗性用途相关的所有问题，包括避免或最小化患者敏化和HAMA发生的可能性。

[0112] 抗体人源化通常通过称为CDR嫁接的过程进行，尽管可以使用本领域中的任何其他技术。在Williams,D.G.等，Antibody Engineering，第1卷，由R.Kontermann和S.Dübel编辑，第21章，319-339页中详细地描述了抗体嫁接。在该过程中，首先产生如上所述的嵌合抗体。因此，在抗体人源化的情况下，非人恒定域首先被人恒定域替换，产生包含人恒定域和非人可变域的嵌合抗体。

[0113] 随后的外源(例如鼠)可变域的人源化涉及在最合适的人可变区的FR内插入来自每个免疫球蛋白链的鼠CDR。这是通过将鼠可变域与已知的人可变域的数据库(例如IMGT或Kabat)进行比对来完成的。从最匹配的可变域中识别出合适的人框架区，例如人类和小鼠框架区之间具有高序列一致性的结构域、含有相同长度的CDR的结构域、具有最相似结构的结构域(基于同源建模)等。然后使用重组DNA技术将鼠CDR序列嫁接到先导人类框架序列的适当位置，然后产生人源化抗体并测试其与靶抗原的结合。抗体人源化的过程是技术人员已知和理解的，技术人员可以在没有进一步指导的情况下进行该技术。许多商业公司也提供抗体人源化服务，例如GenScript(美国/中国)或MRC Technology(英国)。如上所述，可以从人源化抗体容易地获得人源化抗体片段。

[0114] 或者，如Frenzel等(Transfus.Med.Hemother.44(5):312-318,2017)中所述，可以利用噬菌体展示技术在体外获得完全人单克隆抗体，无需免疫。

[0115] 因此，用于根据本发明用途的抗体或抗体片段可以衍生自任何物种，例如它可以是鼠抗体或抗体片段。然而，优选抗体或抗体片段是嵌合抗体或抗体片段，即，仅抗体或抗体片段的可变域是非人的，而恒定域都是人的。最佳地，用于根据本发明用途的抗体或抗体片段是人的或人源化的抗体或抗体片段。

[0116] Mdx001的人源化版本已由发明人开发，如WO 2018/146230中所述。已经开发了具

有SEQ ID NO:9(称为L1M2可变区)和SEQ ID NO:10(称为L2M2可变区)所示的氨基酸序列的人源化轻链可变域,其含有上文所述的CDR。在一个特定的实施方案中,用于根据本发明用途的抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或与其具有至少70%(优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的氨基酸序列或由其组成,并且其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1、7或8和2-3具有至少85%的序列同一性。

[0117] 已经开发了具有SEQ ID NO:11(称为H4可变区)和SEQ ID NO:12(称为H2可变区)所示的氨基酸序列的人源化重链可变域。在一个特定的实施方案中,用于根据本发明用途的抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或与其具有至少70%(优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的氨基酸序列或由其组成,并且其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列同一性。

[0118] 在一个特定的实施方案中,用于根据本发明用途的特异性结合分子是IgG1同种型的单克隆抗体,并且包含κ亚型的轻链。L1M2轻链是κ亚型,并具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。H4重链具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。在一个特定的实施方案中,用于根据本发明用途的特异性结合分子是包含L1M2轻链和H4重链的L1M2H4抗体。因此,用于根据本发明用途的特异性结合分子可以是单克隆抗体,其包含以下构成或由以下组成:

[0119] i)轻链,其包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列或与其具有至少70%(优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的氨基酸序列或由其组成,并且其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1、7或8和2-3具有至少85%的序列同一性;以及

[0120] ii)重链,其包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列或与其具有至少70%(优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的氨基酸序列或由其组成,并且其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列同一性。

[0121] 类似地,L2M2轻链是κ亚型,并且具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。H2重链具有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。在一个特定的实施方案中,用于根据本发明用途的特异性结合分子是包含L2M2轻链和H2重链的L2M2H2抗体。因此,用于根据本发明用途的特异性结合分子可以是单克隆抗体,其包含以下构成:

[0122] i)轻链,其包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列或与其具有至少70%(优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的氨基酸序列或由其组成,并且其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1、7或8和2-3具有至少85%的序列同一性;以及

[0123] ii)重链,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或与其具有至少70%(优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的氨基酸序列或由其组成,并且其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列同一性。

[0124] 在一个替代实施方案中,L1M2轻链可以与H2重链配对,并且L2M2轻链可以与H4重链配对。

[0125] 如技术人员已知的,抗体链本质上是带信号序列产生的。抗体信号序列是位于轻链和重链的N-端处的、在可变区的N-端的氨基酸序列。信号序列指导抗体链从产生它们的细胞中输出。如果在细胞表达系统中产生,则具有SEQ ID NO:13-16的氨基酸序列的轻链和重链可以用信号序列编码。L1M2和L2M2轻链的信号序列如SEQ ID NO:20所示;H2和H4重链

的信号序列如SEQ ID NO:21所示。如果用信号序列合成,则因此L1M2链可以用SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列合成;H4链可以用SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列合成;L2M2链可以用SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列合成,H2链可以用SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列合成。编码这样的序列的核苷酸序列可以由技术人员容易地得到,但是编码SEQ ID NO:22-25的抗体链并且可以用于其合成的合适的核苷酸序列的实例分别如SEQ ID NO:26-29所示。

[0126] 如上祥述,本发明提供用于治疗受试者癌症的特异性结合分子(如上所述)。涵盖了在治疗任何癌症中的用途,包括治疗睾丸癌、卵巢癌、结肠直肠癌、宫颈癌、乳腺癌、膀胱癌、胆管癌、胃癌、头颈癌、食道癌、肺癌、胰腺癌、间皮瘤、淋巴瘤、脑瘤和神经母细胞瘤。在一个优选的方面,治疗卵巢癌。在另一个优选的方面,治疗乳腺癌。在一个优选的实施方案中,乳腺癌表达雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体HER2中的一种或多种。在另一个实施方案中,乳腺癌是三阴性的(即,ER-/PR-/HER2-)。在另一个优选的方面,治疗结肠直肠癌。在另一个优选的方面,治疗胰腺癌。在另一个优选的方面,治疗肺癌。根据本发明可以治疗任何类型的癌症,包括上皮癌(包括腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、移行细胞癌等)、肉瘤、白血病和淋巴瘤。

[0127] 根据本发明,可以治疗任何阶段(或等级)的癌症,包括I期、II期、III期和IV期癌症。转移性和局部性(即非转移性)癌症均可被治疗。

[0128] 在本发明的一个特定的实施方案中,癌症表达Anx-A1(这是指癌症中的细胞表达Anx-A1,例如在细胞表面上表达Anx-A1)。对于技术人员而言,确定癌症是否表达Anx-A1是简单的。可以在癌症的活检样品中分析Anx-A1表达,例如通过样品的免疫组织化学分析在蛋白水平上进行分析。可以按照本领域的标准程序,使用抗Anx-A1抗体(例如可以根据本发明使用的上述抗体)对样品进行免疫染色以检测Anx-A1表达。通过使样品透化(例如,使用清洁剂,如本领域中的标准清洁剂),可以检测细胞内和细胞外的Anx-A1。

[0129] 或者,可以例如通过定量PCR(qPCR)在核酸水平分析Anx-A1表达。可以使用本领域标准程序从组织样品中提取mRNA并逆转录为DNA。然后可以通过定量扩增目标Anx-A1序列来确定Anx-A1表达水平。合适的qPCR技术(例如TaqMan)在本领域中是众所周知的。

[0130] 在一个特定的实施方案中,所述癌症过表达Anx-A1。“过表达Anx-A1”是指与来自相同来源的健康组织相比,癌症以更高的水平表达Anx-A1。也就是说,癌细胞比来自相同来源的健康细胞(即非癌细胞)以更高的水平表达Anx-A1。相同来源是指相同的组织。例如,如果卵巢上皮细胞癌以比健康的卵巢上皮组织更高的水平表达Anx-A1,则可以认为卵巢上皮细胞癌过表达Anx-A1。因此,癌组织是否过表达Anx-A1需要定量比较至少两种不同组织(癌组织和健康对照组织)中Anx-A1的表达。可以使用任何合适的技术来进行该比较,尽管qPCR可能是最合适的。对于技术人员而言,确定癌症是否过表达Anx-A1是简单的。在一个特定的实施方案中,在过表达Anx-A1的癌症与健康组织中Anx-A1表达水平之间的差异在统计学上是显著的。在其他实施方案中,相对于相应的健康组织,癌组织中Anx-A1表达增加了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%或以上。

[0131] 在本发明的另一个实施方案中,癌症在其表面表达Anx-A1(也就是说,Anx-A1在癌细胞的表面表达)。Anx-A1在癌细胞表面表达是指细胞表达Anx-A1,并且表达的Anx-A1被输出并定位在细胞表面。如上所述,可以通过免疫组织化学鉴定Anx-A1的细胞表面表达。特别地,为了分析Anx-A1的细胞表面表达,在不进行细胞透化的情况下进行免疫组织化学分析。

这意味着用于检测组织上Anx-A1的抗体无法进入细胞内部，并且只能检测到细胞外(例如，位于表面的)蛋白。输出的Anx-A1通常附着在细胞表面(而不是释放到血浆或任何其他细胞外空间中)，因此，通过未透化细胞的免疫组织化学检测到的任何Anx-A1都可以被认为是位于表面的Anx-A1。但是，按照标准方案，可以在染色之前对组织进行清洗，以去除包括蛋白质在内的松散的细胞外物质。

[0132] 通过本发明治疗的癌症可以是抗药性癌症。也就是说，所述癌症可能对一种或多种化疗剂(化疗药物)具有抗性。Housman等(同上)综述了癌症中的抗药性。如果一种癌症能够耐受化疗药物，即如果该药物对癌症无效(或变得无效)，则可以认为该癌症对该化疗药物具有抗药性。如Housman等(同上)所详述，癌症可以通过多种不同的机制变得抗药，包括药物的失活或代谢(或防止其代谢活化)、药物靶点的突变或改变以及经由ABC转运体的药物外排。鉴定癌症是否具有抗药性的方法是本领域已知的，参见例如Wang等(Genes&Diseases 2:219-221,2015)和Volm&Efferth(Front.Oncol.5:282,2015)的教导，两者均通过引用并入本文。此类方法包括测试药物对离体细胞群的影响，以及对癌细胞进行敏感性/抗性标志物的基因筛选。

[0133] 在一个特定的实施方案中，通过本发明治疗的癌症具有多药抗药性(MDR)。MDR癌症是指对一种以上化疗药物，特别是对一种以上的化疗药物家族有抗药性的癌症。MDR癌症可能对2、3、4或5种或更多种不同的化疗药物或化疗药物家族(或类别)有抗性。术语“MDR癌症”在本领域中是众所周知的，并且根据其在本领域中的含义在本文中使用。MDR癌症可能对所有已知的化疗药物都有抗性。多药抗药性可以通过ABC转运体多药抗药蛋白1(MDR1)、多药抗药性相关蛋白1(MRP1)和乳腺癌抗性蛋白(BCRP)中的一种或多种的表达来介导。这三种都具有广泛的底物特异性，并且能够从表达它们的细胞中排除多种不同类别的化疗剂。

[0134] 实施例中显示了用于根据本发明用途的特异性结合分子在抑制对铂基化疗有抗性的癌细胞的增殖中特别有效。在一个特定的实施方案中，根据本发明治疗的癌症对铂基化疗剂具有抗性。(优选在这种情况下，癌症是乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肺癌或胰腺癌。)铂基化疗剂包括顺铂、奥沙利铂、卡铂和奈达铂，所有这些已被批准用于人类。其他已知的铂基化疗剂包括沙铂(satraplatin)、吡铂(picoplatin)、菲铂(phenanthriplatin)和三铂四硝酸酯(triplatin tetranitrate)。根据本发明治疗的癌症可以对任何或所有这些试剂有抗性。在一个特定的实施方案中，所述癌症对顺铂具有抗性。

[0135] 癌细胞还可以或替代地对包括氮芥类(例如苯达莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺和美法仑)在内的其他双功能烷基化剂具有抗性。

[0136] 在替代的或附加的实施方案中，根据本发明治疗的癌症可以对化疗剂具有抗性，所述化疗剂例如为紫杉烷(例如紫杉醇和多西紫杉醇)、拓扑异构酶抑制剂(例如拓扑替康)、蒽环类药物(例如阿霉素和表阿霉素)和核苷类似物(例如吉西他滨)。优选地，该实施方案中的化疗剂是蒽环类药物，例如阿霉素(也称为亚德里亚霉素)。在另一个实施方案中，根据本发明治疗的癌症对激素治疗剂(例如抗雌激素激素治疗剂，例如他莫昔芬)具有抗性。乳腺癌尤其可能对激素治疗剂(如他莫昔芬)具有抗性。根据本发明治疗的癌症可以对任何或所有这些试剂有抗性。(优选地，在这种情况下，所述癌症是乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肺癌或胰腺癌。)在一个特定的实施方案中，所述癌症对阿霉素具有抗性(任选地除了

对铂基化疗剂具有抗性之外)。

[0137] 如上所讨论地,癌细胞可以通过多种机制获得对铂基化疗剂的抗性。例如,癌症产生的金属硫蛋白和/或谷胱甘肽能够导致铂基药物失活,而此类药物引起的DNA损伤可通过核苷酸切除修复和同源重组的活性途径来修复,从而逆转铂基药物的作用。其他机制也可能起作用,并且可能需要多种非冗余机制来使细胞对铂基疗法产生抗性。被确定为具有铂抗性的患者在最近一次铂基化疗治疗后的6个月内出现肿瘤进展。通过使用克隆生成试验来测试药物暴露后再生细胞的存活,可以将细胞鉴定为具有铂抗性。这可以确定在药物暴露后癌细胞是否能够形成肿瘤或集落。

[0138] 特异性结合分子可以以药物组合物的形式给药至待治疗的受试者。这样的组合物可以包含一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。如本文所用,"药学上可接受的"是指与组合物的其他成分相容并且接受者生理上可接受的成分。组合物的性质和载体或赋形剂材料、剂量等可以根据选择和所期望的给药途径等以常规方式进行选择。剂量同样可以以常规方式确定,并且可以取决分子的性质、患者的年龄、给药方式等。

[0139] 药物组合物可以通过任何合适的方式制备以给药至受试者。这种给药可以是口服、直肠、鼻腔、局部、阴道或肠外给药。本文所用的口腔给药包括颊和舌下给药。本文所用的局部给药包括透皮给药。如本文所定义的肠胃外给药包括皮下、肌内、静脉内、腹膜内和皮内给药。

[0140] 本文所公开的药物组合物包括液体溶液或糖浆、固体组合物(例如粉剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂、乳膏、软膏剂)和本领域通常使用的任何其他形式的组合物。用于此类组合物的合适的药学上可接受的稀释剂、载体和赋形剂是本领域众所周知的。例如,合适的赋形剂包括乳糖、玉米淀粉或其衍生物、硬脂酸或其盐、植物油、蜡、脂肪和多元醇。合适的载体或稀释剂包括羧甲基纤维素(CMC)、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、右旋糖(dextrose)、海藻糖、脂质体、聚乙烯醇、药物级淀粉、甘露醇、乳糖、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖(和其他糖)、碳酸镁、明胶、油、酒精、清洁剂和乳化剂(如聚山梨酸酯)。还可以使用稳定剂、湿润剂、乳化剂、甜味剂等。

[0141] 液体药物组合物,无论是溶液、混悬液还是其他类似形式,都可以包括以下一种或多种:无菌稀释剂,例如注射用水、林格氏液、等渗氯化钠溶液、不挥发性油(例如合成的单甘酯或双甘酯,其可以用作溶剂或悬浮介质)、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如EDTA;缓冲液,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的试剂,例如右旋糖。肠胃外制剂可以装入安瓿瓶、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。可注射的药物组合物优选为无菌的。

[0142] 用于根据本发明用途的药物组合物可以以任何适当的方式给药。尽管可以通过临床试验确定适当的剂量,但是给药的量和频率将由诸如患者的状况以及患者疾病的类型和严重性等因素来确定。方便地,用于根据本发明用途的特异性结合分子可以以每天、每周或每月的剂量或以中等频率的剂量提供给受试者,例如,可以每2、3、4、5或6天,每2、3、4、5或6周,每2、3、4、5或6个月,每年或每半年提供一次剂量。剂量可以以10ng/kg体重到100mg/kg体重的量提供,例如1μg/kg体重至10mg/kg体重,例如10μg/kg体重至1mg/kg体重。熟练的临床医生将能够基于所有相关因素,如年龄、身高、体重和待治疗的疾病,计算出患者的合适

剂量。

[0143] 优选地，将用于根据本发明用途的特异性结合分子或药物组合物以治疗有效量给药至有需要的受试者。“治疗有效量”是指足以显示出对受试者的病情有利的量。量是否足以显示出对受试者的病情有利，可以由医师/兽医确定。

[0144] 该治疗可以进一步包括向受试者给药第二治疗剂。然而，方便地，在根据本发明的用途中，特异性结合分子是在治疗中使用的唯一治疗分子，例如该治疗不与其他细胞毒性剂或免疫治疗剂联合进行。细胞毒性剂如下文所述。免疫治疗剂是起到诱导、增强或抑制免疫反应的作用的给药药剂。

[0145] 在一个特定的实施方案中，用于根据本发明用途的特异性结合分子不用于将第二治疗分子递送至靶癌症。例如，在一个特定的实施方案中，特异性结合分子不与第二治疗分子(例如细胞毒性分子或放射性核素)缀合(并且不为其提供结合伴侣)。

[0146] 当使用时，第二治疗剂可以与结合Anx-A1的特异性结合分子在同一药物组合物中进行给药，或者可以在如上所述的单独的药物组合物中进行给药。(因此，在制备药物的用途中，药物可以含有特异性结合分子(或第二治疗剂)，并且所述治疗可以包括将第二治疗剂(或特异性结合分子)与药物分别、顺序或同时进行给药。)可以将与Anx-A1结合的特异性结合分子和第二治疗剂分开、同时或顺序给药至受试者。如本文所用，“分别”给药是指将特异性结合分子和第二治疗剂同时或至少基本上同时但通过不同的给药途径给药至受试者。如本文所用，“同时”给药是指将特异性结合分子和第二治疗剂通过相同的给药途径同时或至少基本上同时给药至受试者。如本文所用，“顺序”给药是指将特异性结合分子和第二治疗剂在不同时间给药至受试者。特别地，在开始给药第二治疗剂之前完成第一治疗剂的给药。可以进行顺序给药，其中第一和第二治疗剂的给药间隔为10分钟至30天，例如1小时到96小时(或2周)。当顺序给药至受试者时，可以通过相同的给药途径或通过不同的给药途径来给药第一治疗剂和第二治疗剂。

[0147] 第二治疗剂可以是第二抗癌剂，尽管在其他实施方案中可以具有不同的活性，例如，第二治疗剂可以是抗细菌剂或抗真菌剂，或是用于治疗患者的任何其他药剂。在特定的实施方案中，所述第二治疗剂是化疗剂，特别是细胞毒性剂。如本文所指，化疗剂是对恶性细胞和组织具有破坏性的给药药物。细胞毒性剂是破坏细胞或阻止其增殖的物质。可以使用任何种类的任何化疗剂，例如紫杉烷(例如紫杉醇和多西紫杉醇)、拓扑异构酶抑制剂(例如拓扑替康)、蒽环类药物(例如阿霉素和表阿霉素)、核苷类似物(例如吉西他滨)，铂基药物(例如顺铂和卡铂)、烷化剂(例如(例如环磷酰胺)和激酶抑制剂(例如伊马替尼)或如上文所述的其他化疗剂或药物。

[0148] 此类试剂可以与用于根据本发明用途的特异性结合分子组合使用。在一个方面，化疗剂可以是癌症对其具有抗性的药剂(当没有使用用于本发明的特异性结合分子进行治疗时)。或者，化疗剂不是癌症对其具有抗性的药剂(当没有使用用于本发明的特异性结合分子进行治疗时)。

[0149] 用于根据本发明用途的特异性结合分子也可以与放射疗法和/或手术组合给药至受试者。

[0150] 如上祥述，本发明涉及治疗受试者的癌症。治疗可以是(或可以旨在是)治愈性的，但也可以是缓解性的(即仅旨在限制、减轻或改善癌症症状或延长生存期)。优选地，通过治

疗减小肿瘤的大小，或者稳定或降低其生长速率。优选将肿瘤尺寸减小至少10％，优选减小至少20％、30％或50％(例如多达30％、50％、75％或100％)，并且优选降低相同程度的生长。

[0151] 本发明治疗的受试者可以是任何哺乳动物，例如农场动物，例如牛、马、绵羊、猪或山羊，宠物，例如兔子、猫或狗，或灵长类动物，例如猴子、黑猩猩、大猩猩或人。最优选地，受试者是人类。受试者可以是患有癌症或被怀疑患有癌症的任何动物(优选人类)。因此，受试者是需要治疗癌症的个体。

[0152] 因此可以认为本发明提供一种治疗受试者癌症的方法，该方法包括向所述受试者给药结合人Anx-A1的特异性结合分子。治疗、癌症、受试者和/或特异性结合分子可以如上文所定义。

[0153] 类似地，可以看出本发明提供结合人Anx-A1的特异性结合分子在制备用于治疗受试者癌症的药物中的用途。治疗、癌症、受试者和/或特异性结合分子可以如上文定义。

[0154] 在另一方面，本发明提供一种试剂盒，其包含如上定义的结合人Anx-A1的特异性结合分子和化疗剂。合适的化疗剂如上所述。所述特异性结合分子和化疗剂可以在分开的容器中提供，即在分开的组合物中提供，或在单个容器中的单个组合物中提供。每种治疗剂可以以任何适当的形式提供，例如在水溶液中提供或作为冻干物提供。

[0155] 在另一方面，本发明提供一种用于分开、同时或顺序地用于治疗受试者的癌症的产品，其包含如上定义的结合人Anx-A1的特异性结合分子和第二治疗剂。第二治疗剂、癌症和/或受试者可以如上文定义。在一个特定的实施方案中，所述第二治疗剂是化疗剂。所述特异性结合分子和第二治疗剂可以在分开的容器中提供，即在分开的组合物中提供，或在单个容器中的单个组合物中提供。每种治疗剂可以以任何适当的形式提供，例如在水溶液中提供或作为冻干物提供。

[0156] 本申请中引用的所有文件均通过引用整体并入本文。

[0157] 可以通过参考下面的附图和非限制性实施例进一步理解本发明。

附图说明

[0158] 图1显示了抗Anx-A1抗体L1M2H4和L2M2H2对乳腺癌细胞系MCF7增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0159] 图2显示了抗Anx-A1抗体L1M2H4和L2M2H2对乳腺癌细胞系HCC1806增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0160] 图3显示了抗Anx-A1抗体L1M2H4和L2M2H2对卵巢癌细胞系A2780增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0161] 图4显示了抗Anx-A1抗体L1M2H4和L2M2H2对卵巢癌细胞系A2780cis增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0162] 图5显示了抗Anx-A1抗体L2M2H2对卵巢癌细胞系A2780ADR增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0163] 图6显示了抗Anx-A1抗体L1M2H4和L2M2H2对胰腺癌细胞系MIA PaCa-2增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0164] 图7显示了抗Anx-A1抗体L1M2H4和L2M2H2对胰腺癌细胞系BxPC-3增殖的影响。误

差棒表示平均值的标准误差。

[0165] 图8显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和ab65844对乳腺癌细胞系HCC1806增殖的影响。还显示了非特异性对照IgG的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0166] 图9显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和非特异性对照IgG对乳腺癌细胞系MCF7增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0167] 图10显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和非特异性对照IgG对抗他莫昔芬的乳腺癌细胞系MCF-7/TAMR7增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0168] 图11显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和ab65844对卵巢癌细胞系A2780增殖的影响。还显示了非特异性对照IgG的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0169] 图12显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和ab65844对结肠直肠癌细胞系HCT116增殖的影响。还显示了非特异性对照IgG的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0170] 图13显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和非特异性对照IgG对结肠直肠癌细胞系Caco-2增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0171] 图14显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和非特异性对照IgG对结肠直肠癌细胞系SW480增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0172] 图15显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和ab65844对胰腺癌细胞系BxPC-3增殖的影响。还显示了非特异性对照IgG的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0173] 图16显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和非特异性对照IgG对胰腺癌细胞系MIA PaCa-2增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0174] 图17显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和非特异性对照IgG对胰腺癌细胞系PANC-1增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0175] 图18显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和ab65844对肺癌细胞系COR-L23增殖的影响。还显示了非特异性对照IgG的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0176] 图19显示了抗Anx-A1抗体MDX-124和非特异性对照IgG对抗阿霉素的肺癌细胞系COR-L23.5010增殖的影响。误差棒表示平均值的标准误差。

[0177] 图20显示了在乳腺癌小鼠模型中MDX-124治疗的结果。该图显示了四个治疗组的平均肿瘤体积。第1组是对照组,给药剂量仅为媒介物(PBS)。第2组的给药剂量为1mg/kg MDX-124,第3组的给药剂量为10mg/kg MDX-124,第4组的给药剂量为25mg/kg MDX-124。误差棒表示平均值的标准误差。

[0178] 图21显示了在乳腺癌小鼠模型中MDX-124治疗的结果。该图显示了四个治疗组的平均相对肿瘤体积。第1组是对照组,给药剂量仅为媒介物(PBS)。第2组的给药剂量为1mg/kg MDX-124,第3组的给药剂量为10mg/kg MDX-124,第4组的给药剂量为25mg/kg MDX-124。将第12天(第一治疗剂量当天)的肿瘤体积定义为基线肿瘤体积,即相对肿瘤体积为100%。因此,所呈现的相对肿瘤体积对应于每个肿瘤的体积占其在第12天的体积的百分比。

具体实施方式

[0179] 实施例

[0180] 实施例1-抗体对细胞增殖的影响

[0181] 材料

[0182] 从英格兰公共卫生菌种保藏(Public Health England Culture Collections)获得了细胞系MCF7、MCF-7/TAMR7、A2780、A2780cis、A2780ADR、HCT116、Caco-2、SW480、COR-L23、COR-L23.5010、MIA-PaCa-2、PANC-1和BxPC-3。HCC1806细胞系获自ATCC。MCF7是对雌激素受体和孕激素受体呈阳性的人乳腺腺癌细胞系;MCF-7/TAMR7是MCF7的抗他莫昔芬的衍生物;HCC1806是三阴性人类乳腺癌细胞系;A2780是人卵巢癌细胞系;A2780cis是抗顺铂的人卵巢癌细胞系(源自A2780);A2780ADR是抗阿霉素的人卵巢癌细胞系(源自A2780);MIA PaCa-2是人胰腺癌细胞系;BxPC-3是人胰腺腺癌细胞系;PANC-1是人胰腺上皮样癌细胞系;Caco-2是人结肠直肠腺癌细胞系;HCT116是人结肠直肠癌细胞系;SW480是人结肠直肠腺癌细胞系;COR-L23是人肺大细胞癌细胞系;COR-L23.5010是COR-L23的抗阿霉素的衍生物。

[0183] WO 2018/146230中公开了具有本文所述序列的L1M2H4和L2M2H2抗Anx-A1抗体。L1M2H4抗体具有轻链和重链,所述轻链具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述重链具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;L2M2H2抗体具有轻链和重链,所述轻链具有SEQ ID NO:15示的氨基酸序列,所述重链具有SEQ ID NO:16示的氨基酸序列。

[0184] 抗Anx-A1抗体ab65844获自Abcam(英国)。该抗体是结合人Anx-A1第3-24位氨基酸(SEQ ID NO:30)的多克隆兔抗体。该表位序列形成Anx-A1的N-端区域的一部分,如上所述,在不存在Ca^{2+}的情况下,该区域结合在Anx-A1核心的口袋中。

[0185] 方法

[0186] 细胞培养

[0187] 在最初的增殖试验中,细胞在以下培养基中培养:DMEM+Glutamax,10%FBS+青霉素/链霉素(MCF7,MIA PaCa-2,HCC1806),RPMI 1640+2mM L-glu,10%FBS+青霉素/链霉素(BxPc-3,A2780)。在与A2780相同的生长培养基中培养A2780cis和A2780ADR,但在不同的培养阶段包括各自的药物以维持抗药性(即对于A2780cis为顺铂,对于A2780ADR为阿霉素)。

[0188] 在进一步的增殖试验中,在以下条件下在以下培养基中培养细胞:

[0189] MCF7、HCC1806、MIA PaCa-2和PANC-1在含有10%FBS、1%青霉素/链霉素和1%L-谷氨酰胺的DMEM中;

[0190] MCF7/TAMR7在含有1%FBS、1%青霉素/链霉素、1%L-谷氨酰胺和1%胰岛素的无酚红DMEM/F12中;

[0191] A2780、COR-L23、COR-L23.5010和BxPC-3在含有10%FBS、1%青霉素/链霉素和1%L-谷氨酰胺的RPMI中;

[0192] HCT116在含有10%FBS、1%青霉素/链霉素和1%L-谷氨酰胺的McCoy's 5A中;

[0193] SW480在含有10%FBS、1%青霉素/链霉素和1%L-谷氨酰胺的L-15中;

[0194] Caco-2在含有10%FBS、1%青霉素/链霉素、1%L-谷氨酰胺和1%非必需氨基酸溶液的MEM中。

[0195] 另外,在阿霉素存在下培养COR-L23.5010,以维持抗药性。所有细胞系均在37℃含5%CO_2的气氛中培养。

[0196] 细胞增殖试验

[0197] 使用MTT比色试验测量细胞增殖,以测量细胞代谢活性。在该试验中,NADPH依赖性细胞氧化还原酶将黄色的四唑染料MTT还原为不溶性的紫色甲臜产物,通过使用分光光度计在500-600nm处测量吸光度对其进行定量。甲臜的量与细胞增殖水平成正比,而快速分裂

的细胞会还原较高水平的MTT。一式三份进行试验。接种细胞至最终体积为100μL。

[0198] 在初始增殖试验中，以以下密度接种细胞：1×10^5/mL(MCF7，MIA PaCa-2和n＝2的A2780cis)，2×10^5/mL(A2780，A2780ADR和n＝1的A2780cis)，5×10^4/mL(HCC1806)和2.5×10^4/mL(BxPC-3)。

[0199] 在进一步的增殖试验中，以以下密度接种细胞：

[0200] MCF7、HCC1806、A2780、A2780ADR、A2780cis、COR-L23和HCT116为每孔5×10^3个细胞；

[0201] MCF7/TAMR7、COR-L23.5010、SW480、Caco-2、MIA PaCa-2、BxPC-3和PANC-1为每孔1×10^4个细胞。

[0202] 然后在试验之前将细胞培养24小时，然后测量细胞增殖。按照以下方案之一测量细胞增殖：

[0203] (a)在无抗体(作为对照)、在使用1μM抗体(L1M2H4或L2M2H2)或10μM抗体(L1M2H4或L2M2H2)的情况下培养48小时。在多达三种不同的情况下，对各种癌细胞系进行MTT试验(初始增殖试验)；或者

[0204] (b)在不存在抗体或存在浓度为2.5μM、5μM、7.5μM或10μM的抗体的情况下培养72小时。该方案中使用的抗体是L1M2H4(在本文中也称为MDX-124)，市售的抗Anx-A1抗体ab65844，以及非Anx-A1特异性IgG作为同种型对照(Thermo Fisher Scientific，美国，目录号31154)(进一步的增殖试验)。

[0205] 将对照培养物的细胞数定义为增殖试验的基线计数。将其中存在抗体的培养物的细胞计数归一化至基线，并以基线值的百分比表示(称为“生存力”)。使用Mann-Whitney U检验对细胞增殖试验结果进行统计分析。

[0206] ELISA

[0207] ELISA由The Antibody Company(英国)使用标准ELISA技术进行。用25μg/ml全长Anx-A1或Anx-A1 N-端肽(对应于Anx-A1第2-26位氨基酸，SEQ ID NO:31)和包被缓冲液(45mM Na_2CO_3，pH 9.6，补充有1mM $CaCl_2$)在4℃下包被ELISA板17小时。然后在室温下用封闭缓冲液(1mM $CaCl_2$，10mM HEPES，2％w/v BSA)将板封闭1.5小时。

[0208] 然后将一抗(ab65844)施加至板上。将抗体一式两份以四倍稀释在整个板上，从1μg/ml的浓度开始，以2.38×10^{-7}μg/ml的浓度结束。将抗体稀释在补充有0.1BSA的洗涤缓冲液(10mM HEPES，150mM NaCl，0.05％(v/v)吐温-20和1mM $CaCl_2$)中。将一抗在室温下施加到板上1小时，然后用洗涤缓冲液洗涤板。

[0209] 然后施加检测抗体。以1:3000的稀释度使用辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的山羊抗兔抗体(Merck KGaA，德国；目录号AP156P)进行检测。将其在室温下施加到ELISA板上1小时。然后再次用洗涤缓冲液洗涤ELISA板。

[0210] 然后将比色底物OPD(邻苯二胺二盐酸盐，Sigma-Aldrich P4664)施加到板上。根据制造商的说明配制OPD溶液，以产生pH为5的在磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中的0.4mg/ml的OPD溶液。在使用前，每100ml OPD溶液中添加40μl的30％H_2O_2。然后将100μl获得的OPD溶液添加到板的每个孔中。

[0211] 在室温下于黑暗中将板孵育20分钟，然后添加50μl的3M H_2SO_4以终止反应。加入H_2SO_4后，立即在492nm处读取板的吸光度。

[0212] 结果

[0213] 通过ELISA测试了商业购得的抗Anx-A1抗体ab65844,以确认与其所报告表位的结合。该试验证明抗体ab65844与全长Anx-A1和N-端Anx-A1肽均会结合(数据未显示),表明所报道的人Anx-A1的第3-24位氨基酸的表位(SEQ ID NO:30)是正确的。

[0214] 初始增殖试验

[0215] 第一次增殖试验在48小时内进行了增殖测量,并且比较了两种抗体L1M2H4和L2M2H2(相对于不与任何抗体孵育)对感兴趣的细胞系的影响(即使用如上所述的方案(a))。

[0216] 这些用乳腺癌细胞系进行的增殖试验的结果示于图1和2。如所示,L1M2H4抗体在10μM时具有统计学上的显著效果($p<0.001$),尽管仅$n=1$,但降低了MCF7细胞的增殖。在HCC1806细胞系中,L2M2H2抗体还在10μM($n=2$)时显示出统计学上显著的增殖降低($p<0.05$)。

[0217] 卵巢癌细胞系A2780的增殖试验结果如图3所示。如所示,与10μM的L1M2H4抗体孵育后,观察到统计学上显著的增殖降低($p<0.01$)($n=2$)。在抗顺铂的卵巢癌细胞系A2780cis中(图4),与1μM($p<0.001$)和10μM($p<0.01$)($n=2$)的L1M2H4抗体孵育后,观察到了统计学上显著的增殖降低,L2M2H2抗体在10μM时观察到统计学上显著的增殖降低($p<0.05$)($n=3$)。抗阿霉素的卵巢癌细胞系A2780ADR的增殖试验结果如图5所示。L2M2H2抗体对这些细胞的增殖具有显著作用。

[0218] 胰腺癌细胞系的增殖试验结果如图6和7所示。

[0219] 进一步的增殖试验

[0220] 重复增殖试验,测量72小时内的增殖。这些试验比较了本发明的一种抗体(L1M2H4,也称为MDX-124)的作用与非特异性IgG对照对增殖的影响,以及与市售的抗Anx-A1抗体ab65844(如有表明)对增殖的影响。还进行了与不存在任何抗体的情况下的增殖的比较,并将其用作基线。所有实验一式三份进行(对于MDX-124和IgG对照,并且也对ab65844进行了测试,使用这些抗体的实验一式两份进行)。

[0221] 发现MDX-124对HCC1806乳腺癌细胞系的增殖具有显著作用,引起其生存力相对于基线降低了近三分之二(63%)(图8)。非特异性IgG对照对生存力没有影响。发现相对于非特异性IgG对照,MDX-124在所有测试浓度下均引起HCC1806细胞生存力在统计学上显著降低,P值<0.001(在2.5μM的抗体浓度下)或<0.0001(在所有其他抗体浓度下)。值得注意的是,多克隆抗Anx-A1抗体ab65844实际上引起了细胞生存力提高(并因此引起了增殖)。事实上,在所有抗体浓度下,发现相对于ab65844,MDX-124引起HCC1806细胞生存力在统计学上显著降低,P值<0.01(在2.5μM的抗体浓度下)或<0.001(在所有其他抗体浓度下)。该结果证明MDX-124抑制HCC1806细胞的增殖(引起生存力显著降低)。但是,并不是所有抗Anx-A1抗体都能看到这种效果,因为ab65844对细胞生存力具有相反的效果。

[0222] 还发现MDX-124对乳腺癌细胞系MCF7及其抗他莫昔芬的衍生物的增殖具有显著影响(分别为图9和10)。在这两种情况下,非特异性IgG对照将增殖降低高达26%。在最大浓度下,MDX-124引起MCF7细胞生存力显著降低76%,并且引起抗他莫昔芬的MCF7细胞生存力显著降低(然而较低)47%。发现相对于非特异性IgG对照,MDX-124在所有测试浓度下均引起MCF7细胞生存力在统计学上显著降低,其中P值<0.0001。还发现相对于非特异性IgG对照,

MDX-124在5μM和7.5μM(P<0.01)和10μM(P<0.05)的浓度下引起MCD7/TAMR7细胞生存力在统计学上显著降低。这些结果表明,MDX-124在抑制乳腺癌细胞(无论是三阴性还是激素受体阳性细胞系)增殖方面均非常有效。该抗体对抗药性乳腺癌也有效。此作用是特异于MDX-124的,并非在所有抗Anx-A1抗体中都可见。

[0223] 同样,发现MDX-124对卵巢癌细胞系A2780的增殖具有显著效果(图11)。虽然非特异性IgG将增殖降低高达30%(在最大浓度下),但MDX-124对增殖具有两倍以上的影响(最大浓度下引起增殖降低61%)。发现相对于非特异性IgG对照,MDX-124在5μM和7.5μM(P<0.05)和10μM(P<0.01)的浓度下引起A2780细胞生存力在统计学上显著降低。同样,在多克隆抗Anx-A1抗体ab65844中也看不到这一点,该抗体对增殖没有明显影响。对于该抗体,在该抗体的低浓度(高达5μM)下观察到增殖略有增加,而在最大浓度下观察到增殖适度降低,为5%。事实上,发现相对于ab65844,在5μM、7.5μM和10μM的抗体浓度下,MDX-124引起A2780细胞生存力在统计学上显著降低,P值<0.001。

[0224] 还发现MDX-124对结肠直肠癌细胞的增殖具有实质性影响(图12-14)。对HCT116细胞系增殖的结果示于图12。MDX-124将这些细胞的增殖降低一半以上(在最大浓度下降低高达54%的增殖)。非特异性IgG对照对增殖没有实际影响,并且多克隆抗Anx-A1抗体ab65844在不同浓度下具有不同的影响。发现相对于非特异性IgG对照,在所有测试浓度下,MDX-124引起HCT116细胞生存力在统计学上显著降低,P值<0.001(在2.5μM和7.5μM的抗体浓度下)或<0.0001(在5μM和10μM的抗体浓度下)。尽管ab65844的数据略有不一致,但仍有一个明显的总体趋势,抗体再次驱动癌细胞增殖增加,并且发现相对于ab65844,MDX-124在2.5μM(P<0.01)、5μM和10μM(P均<0.001)的抗体浓度下,引起HCT116细胞生存力在统计学上显著下降。没有数据表明ab65844引起增殖降低。

[0225] 使用细胞系Caco-2(图13)和SW480(图14)的结果说明了类似的情况,MDX-124引起增殖显著降低,而非特异性IgG对照的影响最小。发现相对于非特异性IgG对照,在所有测试浓度下,MDX-124引起Caco-2细胞生存力在统计学上显著降低,P值<0.05(在2.5μM和5μM的抗体浓度下)或<0.001(在7.5μM和10μM的抗体浓度下)。发现相对于非特异性IgG对照,MDX-124在所有测试浓度下均引起SW480细胞生存力在统计学上显著降低,P值<0.01(在2.5μM的抗体浓度下)或<0.0001(在所有其他测试的抗体浓度下)。这些结果表明,MDX-124在抑制结肠直肠癌细胞的增殖方面非常有效。同样,这种效果是特异于MDX-124的,并非在所有抗Anx-A1抗体中都可见。

[0226] MDX-124对胰腺癌细胞系的影响如图15-17所示。MDX-124对细胞系BxPC-3的影响如图15所示。同样,MDX-124对细胞增殖具有重大影响,在最大浓度下将增殖降低了一半。非特异性IgG对照对增殖的影响最小,而多克隆抗Anx-A1抗体ab65844再次显著增加了增殖。发现相对于非特异性IgG对照,MDX-124在所有测试浓度下均引起BxPC-3细胞生存力在统计学上显著地降低,P值<0.001(在2.5μM的抗体浓度下)或<0.0001(在所有其他测试的抗体浓度下)。发现相对于ab65844,MDX-124在所有测试的抗体浓度下均引起BxPC-3细胞生存力在统计学上显著地降低,P值<0.001。

[0227] 图16和17分别显示了MDX-124对细胞系MIA PaCa-2和PANC-1的影响。在这两种情况下,MDX-124均引起增殖显著降低将近一半,而非特异性IgG则引起的生存力降低要小得多。发现相对于非特异性IgG对照,MDX-124在5μM和10μM的抗体浓度下引起MIA PaCa-2细胞

生存力在统计学上显著地降低,P值<0.05。发现相对于非特异性IgG对照,MDX-124在所有抗体浓度下均引起PANC-1细胞生存力在统计学上显著地降低,P值<0.05(在2.5μM的抗体浓度下)或<0.001(在所有其他测试的抗体浓度下)。

[0228] MDX-124对肺癌细胞系COR-L23和COR-L23.5010的影响分别如图18和19所示。这些结果表明,MDX-124抗体对增殖具有适度但不利的影响,而非特异性IgG对照和多克隆抗Anx-A1抗体ab65844对增殖表现出非常小的影响。用其他肺癌细胞系获得了相似的结果(数据未显示)。

[0229] 结论

[0230] 暴露于MDX-124引起乳腺癌(包括三阴性、激素受体阳性和抗药细胞系)、结肠直肠癌、卵巢癌、肺癌和胰腺癌的细胞系的增殖显著降低。

[0231] MDX-124对癌细胞增殖的影响是抗体特异性的,即并非所有针对相同靶标(Anx-A1)的抗体都具有相同的影响。事实证明,ab65844未能显著降低其测试的任何细胞系的增殖,并且在大多数情况下确实增加了增殖。非特异性IgG对照也未引起使用MDX-124时所观察到的增殖显著降低。

[0232] 实施例2-表位确定

[0233] HDX分析是使用L1M2H4抗体在德国图宾根大学(University of Tübingen)自然与医学科学研究所(NMI)进行的。

[0234] 样品制备与分析

[0235] 抗体-抗原复合物的形成和氢-氘交换

[0236] 如下制备了五等份抗体-抗原样品和五等份不含抗体的抗原:分别将0.8μL Anx-A1(41μM)、1.8μL抗体(38.7μM)或HEPES缓冲液(10mM HEPES,1mM $CaCl_2$,150mM NaCl,pH 7.4)与1μL HEPES缓冲液和0.5μL $CaCl_2$(8mM)混合,并在20℃下孵育10分钟。加入8.5μL HEPES缓冲液以调节盐含量。将抗体-抗原复合物在0℃冻干过夜,然后在15℃下2h,以尽可能多地除去水分。将十个冻干的等分试样在-20℃冷冻直至进行HDX交换和LC-MS分析。将抗体-抗原复合物和不含抗体的抗原各一等份溶于12.5μL H_2O中,其余溶于12.5μL D_2O中。将等分试样孵育以下时间,从而在分析之前分别准备每个等分试样:

[0237] 0分钟(H_2O参考样品);

[0238] 5分钟、70分钟、360分钟和24小时(D_2O氘交换动力学样品)。

[0239] 通过添加12.5μL新鲜制备的淬灭溶液(在100mM甲酸铵缓冲液中,盐酸胍0.8M和TCEP 0.4M,pH 2.5)淬灭交换。

[0240] 消化性消化

[0241] 加入淬灭溶液后,立即加入0.35μL胃蛋白酶(100μM),在20℃消化2分钟。将等分试样立即放入-20℃预冷的自动采样瓶中,并通过预冷的注射器注射到LC-MS中。

[0242] LC-MS

[0243] 使用反相HPLC(RSLC3000 LC,Thermo Scientific Dionex,伊德斯坦因,德国)将获得的肽混合物注射并进行分离,而无需预处理。使用LC柱(ACQUITY UPLC BEH300 C18 1.7μm 1×50mm Thermo Scientific Dionex,伊德斯坦因,德国)分离样品。在连续的样品运行中进行空白运行和柱洗涤运行。

[0244] 通过使用接近等度的梯度进行31分钟实现色谱分离。洗脱液A为含0.1%甲酸的

水,洗脱液B为含0.1%甲酸的乙腈。在约0℃下按以下方式应用具有变化斜率的优化20分钟线性梯度(分钟/%B):0/8、3/8、11.9/20、31.9/20、33/99、34/99、35/8。进行手动注射。使用20μL体积的样品定量环,进样量为25.35μL。流速为40μL/min。将HPLC洗脱液直接注入QTOF型质谱仪(MaXis HD,Bruker)中。质谱仪以阳离子模式运行,喷雾电压为1.9kV,毛细管温度为275℃,S-Lens射频电压为55V。

[0245] 数据分析

[0246] 使用软件HDExaminer 2.40beta 1 64位(Sierra Analytics,Modest,加利福利亚,美国)对数据进行了分析。简而言之,检查包含不同交换时间点的原始数据集,并检查每个时间点分析有无抗体的Anx-A1。使用Anx-A1序列信息和具有相应保留时间和电荷的消化性肽的序列表,软件识别有和没有进行氘交换的肽,并计算每个肽的氘摄取量作为氘化肽与非氘化肽的质心质量之间的差异。通过使用重叠的肽信息(单个重叠肽的质量转移),可以手动进一步限定表位区域。

[0247] 结果

[0248] 在使用HDExaminer进行初始数据评估后,对单个的消化性肽进行手动验证,以确定是否有统计学意义上的氘摄取。在几个肽重叠的情况下,使用HDX数据进一步限制表位区域,肽的N-端部分不涉及氘摄入,肽的C-端部分涉及氘摄取。整个实验重复两次。在第一次实验中,确定了潜在的表位区域,但是在包含N-端的很长的肽中也观察到统计学上相关的氘摄取,从结构的角度来看,该肽是相当灵活的。在第二次实验中,可以确认表位区域,而N-端没有显示出氘摄取。

[0249] 序列中带下划线的区域表示与抗体结合的表位:

[0250] MAMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDVAALHKAIMVKGVDEATIIDILTKRNNAQRQQIKAAYLQETGKPLDETLKKALTGHLEEVVLALLKTPAQFDADELRAAMKGLGTDEDTLIEILASRTNKEIRDINRVYREELKRDLAKDITSDTSGDFRNALLSLAKGDRSEDFGVNEDLADSDARALYEAGERRKGTDVNVFNTILTTRSYPQLRRVFQKYTKYSKHDMNKVLDLELKGDIEKCLTAIVKCATSKPAFFAEKLHQAMKGVGTRHKALIRIMVSRSEIDMNDIKAFYQKMYGISLCQAILDETKGDYEKILVALCGGN

[0251] 鉴定出的表位区域不在Anx-A1自相互作用区域中,但是来自自相互作用区域的肽在抗体-抗原复合物样品中显示出稍微倾向于更多的氘摄取,这可能是由于当两个Anx-A1分子与抗体的两个臂结合时,局部Anx-A1浓度略有不同。

[0252] 实施例3-MDX-124的体内抗癌活性

[0253] 方法

[0254] 耐受性研究

[0255] 耐受性研究是由Crown Bioscience(美国)进行的。每周给小鼠的剂量为1mg/kg、10mg/kg或29mg/kg的MDX-124,持续两周。在研究期间每天测量每只小鼠的体重。体重的减少将被认为是抗体对小鼠毒性的指标。

[0256] 鼠乳腺癌模型

[0257] 小鼠实验是由Crown Bioscience进行的。使用的小鼠是8-9周龄的雌性BALB/c小鼠。使用的乳腺癌模型利用表达荧光素酶的鼠乳腺癌细胞系4T1-Luc。该细胞系获自ATCC,并且在含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺和2μg/ml嘌呤霉素的RPMI培养基中培养。

[0258] 将小鼠剃毛,然后72小时后植入用于单个小鼠识别目的的应答器芯片。剃毛后立

即使用Bepanthen乳霜，然后每天使用直至肿瘤接种。

[0259] 每只小鼠首先接种5×10^4个4T1-Luc细胞，4T1-Luc细胞悬浮在100μl PBS中。第0天接种至乳腺脂肪垫(左下，从下数第二个垫)，同时小鼠处于气体麻醉状态。接种前用70％乙醇清洁接种部位的皮肤。

[0260] 从第5天开始，使用IVIS光谱体内成像系统(IVIS Spectrum In Vivo Imaging System)(PerkinElmer，美国)每周三次测量肿瘤大小。使用电子卡尺，将生物发光成像用于二维测量每个肿瘤。使用公式$0.5(LxW^2)$估算肿瘤体积，其中L＝肿瘤长度，W＝肿瘤宽度。当平均肿瘤体积达到50-60mm^3时开始治疗。第一次测量肿瘤后，再次在肿瘤周围区域涂上bepanthen乳霜。随后每天使用Bepanthen乳霜。

[0261] 将小鼠分成4组，每组12只，各组之间的平均肿瘤体积一致。每周进行一次治疗。在四个小鼠组中，对照组仅接受媒介物(PBS)。三个实验组分别接受在PBS中的1mg/kg、10mg/kg或25mg/kg剂量的MDX-124。每剂以10ml/kg的体积静脉给与。治疗将持续长达3周。开始治疗后，每周三次进行肿瘤测量。开始治疗之前，每周对小鼠称重3次，此后每天称重。

[0262] 结果

[0263] 为了核实MDX-124对小鼠没有内在毒性，进行了耐受性研究。小鼠给药抗体并监测其体重。在小鼠中没有明显的体重减轻(数据未显示)，表明该抗体在任何测试剂量下对小鼠均无毒性。

[0264] 然后在乳腺癌鼠模型中测试了MDX-124的抗癌作用。每组测试的小鼠的平均肿瘤体积示于图20。在第0天接种肿瘤细胞后，在第12天向所有组给药第一治疗剂量。如所示，到研究的第17天，用MDX-124治疗的小鼠的肿瘤体积明显小于用媒介物治疗的对照小鼠。对照组中肿瘤生长增长的模式持续到第19天。在用MDX-124治疗的组中看到的较小肿瘤体积也对应于这些组中的较小相对肿瘤体积(见图21)。

[0265] 第12天的肿瘤体积定义为基线肿瘤体积(即100％肿瘤体积)。到第19天，用MDX-124治疗的小鼠的肿瘤大小增加了约2.5倍。对照小鼠的肿瘤大小增加了约3.3倍。这意味着，到第19天，与对照组相比，用MDX-124进行治疗可引起肿瘤生长减少约三分之一，这证明了该抗体的抗癌效果。虽然将抗体以三种不同的浓度(1mg/kg、10mg/kg和25mg/kg)给药至小鼠，但是这些治疗方案中的每一种对肿瘤的生长都有相似的影响(即增加给药的抗体的量似乎没有增加治疗效果)。

[0001] 序列表

[0002] <110> 米达内克斯股份有限公司

[0003] <120> 利用抗体的癌症治疗

[0004] <130> FSP1V210133ZX

[0005] <150> GB 1813137.5

[0006] <151> 2018-08-10

[0007] <160> 31

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 16

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0013] <220>

[0014] <223> L1M2H4和L2M2H2的VLCDR1

[0015] <400> 1

[0016] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn

[0017] 1 5 10 15

[0018] <210> 2

[0019] <211> 7

[0020] <212> PRT

[0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0022] <220>

[0023] <223> Mdx001、L1M2H4和L2M2H2的VLCDR2

[0024] <400> 2

[0025] Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser

[0026] 1 5

[0027] <210> 3

[0028] <211> 9

[0029] <212> PRT

[0030] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0031] <220>

[0032] <223> Mdx001、L1M2H4和L2M2H2的VLCDR3

[0033] <400> 3

[0034] Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr

[0035] 1 5

[0036] <210> 4

[0037] <211> 10

[0038] <212> PRT

[0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0040] <220>

[0041] <223> Mdx001、L1M2H4和L2M2H2的VHCDR1

[0042] <400> 4

[0043] Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly

[0044] 1 5 10

[0045] <210> 5

[0046] <211> 17

[0047] <212> PRT

[0048] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0049] <220>

[0050] <223> Mdx001、L1M2H4和L2M2H2的VHCDR2

[0051] <400> 5

[0052] Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

[0053] 1 5 10 15

[0054] Gly

[0055] <210> 6

[0056] <211> 11

[0057] <212> PRT

[0058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0059] <220>

[0060] <223> Mdx001、L1M2H4和L2M2H2的VHCDR3

[0061] <400> 6

[0062] Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

[0063] 1 5 10

[0064] <210> 7

[0065] <211> 16

[0066] <212> PRT

[0067] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0068] <220>

[0069] <223> Mdx001的VLCDR1

[0070] <400> 7

[0071] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

[0072] 1 5 10 15

[0073] <210> 8

[0074] <211> 16

[0075] <212> PRT

[0076] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0077] <220>

[0078] <223> 具有S9T取代的VLCDR1变体

[0079] <400> 8

[0080] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

[0081] 1 5 10 15

[0082] <210> 9

[0083] <211> 112

[0084] <212> PRT
[0085] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0086] <220>
[0087] <223> L1M2轻链可变区
[0088] <400> 9
[0089] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[0090] 1 5 10 15
[0091] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[0092] 20 25 30
[0093] Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0094] 35 40 45
[0095] Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0096] 50 55 60
[0097] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0098] 65 70 75 80
[0099] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
[0100] 85 90 95
[0101] Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0102] 100 105 110
[0103] <210> 10
[0104] <211> 112
[0105] <212> PRT
[0106] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0107] <220>
[0108] <223> L2M2轻链可变区
[0109] <400> 10
[0110] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[0111] 1 5 10 15
[0112] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[0113] 20 25 30
[0114] Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0115] 35 40 45
[0116] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0117] 50 55 60
[0118] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0119] 65 70 75 80
[0120] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Val
[0121] 85 90 95
[0122] Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0123] 100 105 110
[0124] <210> 11
[0125] <211> 118

[0126] <212> PRT
[0127] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0128] <220>
[0129] <223> H4重链可变区
[0130] <400> 11
[0131] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0132] 1 5 10 15
[0133] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0134] 20 25 30
[0135] Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
[0136] 35 40 45
[0137] Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
[0138] 50 55 60
[0139] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0140] 65 70 75 80
[0141] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0142] 85 90 95
[0143] Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0144] 100 105 110
[0145] Met Val Thr Val Ser Ser
[0146] 115
[0147] <210> 12
[0148] <211> 118
[0149] <212> PRT
[0150] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0151] <220>
[0152] <223> H2重链可变区
[0153] <400> 12
[0154] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
[0155] 1 5 10 15
[0156] Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0157] 20 25 30
[0158] Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0159] 35 40 45
[0160] Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
[0161] 50 55 60
[0162] Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0163] 65 70 75 80
[0164] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
[0165] 85 90 95
[0166] Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
[0167] 100 105 110

[0168] Leu Val Thr Val Ser Ser
[0169] 115
[0170] <210> 13
[0171] <211> 219
[0172] <212> PRT
[0173] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0174] <220>
[0175] <223> L1M2轻链
[0176] <400> 13
[0177] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[0178] 1 5 10 15
[0179] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[0180] 20 25 30
[0181] Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0182] 35 40 45
[0183] Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0184] 50 55 60
[0185] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0186] 65 70 75 80
[0187] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
[0188] 85 90 95
[0189] Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0190] 100 105 110
[0191] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0192] 115 120 125
[0193] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0194] 130 135 140
[0195] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0196] 145 150 155 160
[0197] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0198] 165 170 175
[0199] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0200] 180 185 190
[0201] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0202] 195 200 205
[0203] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0204] 210 215
[0205] <210> 14
[0206] <211> 448
[0207] <212> PRT
[0208] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0209] <220>

[0210] <223> H4重链

[0211] <400> 14

[0212] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[0213] 1 5 10 15

[0214] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

[0215] 20 25 30

[0216] Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

[0217] 35 40 45

[0218] Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

[0219] 50 55 60

[0220] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

[0221] 65 70 75 80

[0222] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0223] 85 90 95

[0224] Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[0225] 100 105 110

[0226] Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

[0227] 115 120 125

[0228] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

[0229] 130 135 140

[0230] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

[0231] 145 150 155 160

[0232] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

[0233] 165 170 175

[0234] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

[0235] 180 185 190

[0236] Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

[0237] 195 200 205

[0238] Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

[0239] 210 215 220

[0240] His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

[0241] 225 230 235 240

[0242] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

[0243] 245 250 255

[0244] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

[0245] 260 265 270

[0246] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

[0247] 275 280 285

[0248] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

[0249] 290 295 300

[0250] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

[0251] 305 310 315 320

[0252] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[0253] 325 330 335
[0254] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0255] 340 345 350
[0256] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0257] 355 360 365
[0258] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0259] 370 375 380
[0260] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0261] 385 390 395 400
[0262] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0263] 405 410 415
[0264] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0265] 420 425 430
[0266] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0267] 435 440 445
[0268] <210> 15
[0269] <211> 219
[0270] <212> PRT
[0271] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0272] <220>
[0273] <223> L2M2轻链
[0274] <400> 15
[0275] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[0276] 1 5 10 15
[0277] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[0278] 20 25 30
[0279] Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0280] 35 40 45
[0281] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0282] 50 55 60
[0283] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0284] 65 70 75 80
[0285] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Val
[0286] 85 90 95
[0287] Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0288] 100 105 110
[0289] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0290] 115 120 125
[0291] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0292] 130 135 140
[0293] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

[0294] 145 150 155 160
[0295] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0296] 165 170 175
[0297] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0298] 180 185 190
[0299] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0300] 195 200 205
[0301] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0302] 210 215
[0303] <210> 16
[0304] <211> 448
[0305] <212> PRT
[0306] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0307] <220>
[0308] <223> H2重链
[0309] <400> 16
[0310] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
[0311] 1 5 10 15
[0312] Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0313] 20 25 30
[0314] Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0315] 35 40 45
[0316] Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
[0317] 50 55 60
[0318] Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0319] 65 70 75 80
[0320] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
[0321] 85 90 95
[0322] Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
[0323] 100 105 110
[0324] Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
[0325] 115 120 125
[0326] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
[0327] 130 135 140
[0328] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
[0329] 145 150 155 160
[0330] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[0331] 165 170 175
[0332] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[0333] 180 185 190
[0334] Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
[0335] 195 200 205

[0336] Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
[0337] 210 215 220
[0338] His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
[0339] 225 230 235 240
[0340] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0341] 245 250 255
[0342] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[0343] 260 265 270
[0344] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0345] 275 280 285
[0346] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0347] 290 295 300
[0348] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0349] 305 310 315 320
[0350] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[0351] 325 330 335
[0352] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0353] 340 345 350
[0354] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0355] 355 360 365
[0356] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0357] 370 375 380
[0358] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0359] 385 390 395 400
[0360] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0361] 405 410 415
[0362] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0363] 420 425 430
[0364] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0365] 435 440 445
[0366] <210> 17
[0367] <211> 346
[0368] <212> PRT
[0369] <213> 智人(Homo sapiens)
[0370] <400> 17
[0371] Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn
[0372] 1 5 10 15
[0373] Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro
[0374] 20 25 30
[0375] Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val
[0376] 35 40 45
[0377] Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr

[0378] 50 55 60

[0379] Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile

[0380] 65 70 75 80

[0381] Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu

[0382] 85 90 95

[0383] Lys Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu

[0384] 100 105 110

[0385] Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Ala Ala Met Lys

[0386] 115 120 125

[0387] Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Ala Ser Arg

[0388] 130 135 140

[0389] Thr Asn Lys Glu Ile Arg Asp Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu

[0390] 145 150 155 160

[0391] Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe

[0392] 165 170 175

[0393] Arg Asn Ala Leu Leu Ser Leu Ala Lys Gly Asp Arg Ser Glu Asp Phe

[0394] 180 185 190

[0395] Gly Val Asn Glu Asp Leu Ala Asp Ser Asp Ala Arg Ala Leu Tyr Glu

[0396] 195 200 205

[0397] Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Asn Thr Ile

[0398] 210 215 220

[0399] Leu Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gln Leu Arg Arg Val Phe Gln Lys Tyr

[0400] 225 230 235 240

[0401] Thr Lys Tyr Ser Lys His Asp Met Asn Lys Val Leu Asp Leu Glu Leu

[0402] 245 250 255

[0403] Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Ala Ile Val Lys Cys Ala Thr

[0404] 260 265 270

[0405] Ser Lys Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu His Gln Ala Met Lys Gly

[0406] 275 280 285

[0407] Val Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser

[0408] 290 295 300

[0409] Glu Ile Asp Met Asn Asp Ile Lys Ala Phe Tyr Gln Lys Met Tyr Gly

[0410] 305 310 315 320

[0411] Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu

[0412] 325 330 335

[0413] Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn

[0414] 340 345

[0415] <210> 18

[0416] <211> 204

[0417] <212> PRT

[0418] <213> 智人(Homo sapiens)

[0419] <400> 18

[0420] Met Asn Leu Ile Leu Arg Tyr Thr Phe Ser Lys Met Ala Met Val Ser
[0421] 1 5 10 15
[0422] Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr
[0423] 20 25 30
[0424] Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val Ser
[0425] 35 40 45
[0426] Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala Ala Leu His Lys
[0427] 50 55 60
[0428] Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr Ile Ile Asp Ile Leu
[0429] 65 70 75 80
[0430] Thr Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile Lys Ala Ala Tyr Leu
[0431] 85 90 95
[0432] Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu Lys Lys Ala Leu Thr
[0433] 100 105 110
[0434] Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu Lys Thr Pro Ala Gln
[0435] 115 120 125
[0436] Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Ala Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr Asp
[0437] 130 135 140
[0438] Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Ala Ser Arg Thr Asn Lys Glu Ile
[0439] 145 150 155 160
[0440] Arg Asp Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu Lys Arg Asp Leu Ala
[0441] 165 170 175
[0442] Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe Arg Asn Ala Leu Leu
[0443] 180 185 190
[0444] Ser Leu Ala Lys Gly Asp Arg Ser Glu Asp Phe Gly
[0445] 195 200
[0446] <210> 19
[0447] <211> 115
[0448] <212> PRT
[0449] <213> 智人(Homo sapiens)
[0450] <400> 19
[0451] Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn
[0452] 1 5 10 15
[0453] Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro
[0454] 20 25 30
[0455] Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val
[0456] 35 40 45
[0457] Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr
[0458] 50 55 60
[0459] Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile
[0460] 65 70 75 80
[0461] Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu

[0462] 85 90 95

[0463] Lys Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu

[0464] 100 105 110

[0465] Lys Thr Pro

[0466] 115

[0467] <210> 20

[0468] <211> 20

[0469] <212> PRT

[0470] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0471] <220>

[0472] <223> 轻链信号序列

[0473] <400> 20

[0474] Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

[0475] 1 5 10 15

[0476] Gly Thr Arg Cys

[0477] 20

[0478] <210> 21

[0479] <211> 19

[0480] <212> PRT

[0481] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0482] <220>

[0483] <223> 重链信号序列

[0484] <400> 21

[0485] Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

[0486] 1 5 10 15

[0487] Val His Ser

[0488] <210> 22

[0489] <211> 239

[0490] <212> PRT

[0491] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0492] <220>

[0493] <223> L1M2轻链前序列

[0494] <400> 22

[0495] Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

[0496] 1 5 10 15

[0497] Gly Thr Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro

[0498] 20 25 30

[0499] Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser

[0500] 35 40 45

[0501] Leu Glu Asn Ser Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg

[0502] 50 55 60

[0503] Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe

[0504] 65 70 75 80
[0505] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[0506] 85 90 95
[0507] Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
[0508] 100 105 110
[0509] Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[0510] 115 120 125
[0511] Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[0512] 130 135 140
[0513] Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[0514] 145 150 155 160
[0515] Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
[0516] 165 170 175
[0517] Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
[0518] 180 185 190
[0519] Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
[0520] 195 200 205
[0521] Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
[0522] 210 215 220
[0523] Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0524] 225 230 235
[0525] <210> 23
[0526] <211> 467
[0527] <212> PRT
[0528] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0529] <220>
[0530] <223> H4重链前序列
[0531] <400> 23
[0532] Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
[0533] 1 5 10 15
[0534] Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[0535] 20 25 30
[0536] Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[0537] 35 40 45
[0538] Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[0539] 50 55 60
[0540] Glu Trp Val Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn
[0541] 65 70 75 80
[0542] Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
[0543] 85 90 95
[0544] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[0545] 100 105 110

[0546] Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
[0547] 115 120 125
[0548] Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0549] 130 135 140
[0550] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[0551] 145 150 155 160
[0552] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0553] 165 170 175
[0554] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0555] 180 185 190
[0556] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0557] 195 200 205
[0558] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[0559] 210 215 220
[0560] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
[0561] 225 230 235 240
[0562] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[0563] 245 250 255
[0564] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[0565] 260 265 270
[0566] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[0567] 275 280 285
[0568] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[0569] 290 295 300
[0570] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[0571] 305 310 315 320
[0572] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[0573] 325 330 335
[0574] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[0575] 340 345 350
[0576] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[0577] 355 360 365
[0578] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[0579] 370 375 380
[0580] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0581] 385 390 395 400
[0582] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[0583] 405 410 415
[0584] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[0585] 420 425 430
[0586] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[0587] 435 440 445

[0588] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[0589] 450 455 460
[0590] Pro Gly Lys
[0591] 465
[0592] <210> 24
[0593] <211> 239
[0594] <212> PRT
[0595] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0596] <220>
[0597] <223> L2M2轻链前序列
[0598] <400> 24
[0599] Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
[0600] 1 5 10 15
[0601] Gly Thr Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
[0602] 20 25 30
[0603] Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
[0604] 35 40 45
[0605] Leu Glu Asn Ser Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys
[0606] 50 55 60
[0607] Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe
[0608] 65 70 75 80
[0609] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[0610] 85 90 95
[0611] Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
[0612] 100 105 110
[0613] Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[0614] 115 120 125
[0615] Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[0616] 130 135 140
[0617] Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[0618] 145 150 155 160
[0619] Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
[0620] 165 170 175
[0621] Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
[0622] 180 185 190
[0623] Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
[0624] 195 200 205
[0625] Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
[0626] 210 215 220
[0627] Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0628] 225 230 235
[0629] <210> 25

[0630] <211> 467

[0631] <212> PRT

[0632] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0633] <220>

[0634] <223> H2重链前序列

[0635] <400> 25

[0636] Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

[0637] 1 5 10 15

[0638] Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys

[0639] 20 25 30

[0640] Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe

[0641] 35 40 45

[0642] Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

[0643] 50 55 60

[0644] Glu Trp Met Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn

[0645] 65 70 75 80

[0646] Glu Lys Phe Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser

[0647] 85 90 95

[0648] Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile

[0649] 100 105 110

[0650] Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

[0651] 115 120 125

[0652] Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

[0653] 130 135 140

[0654] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

[0655] 145 150 155 160

[0656] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

[0657] 165 170 175

[0658] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

[0659] 180 185 190

[0660] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

[0661] 195 200 205

[0662] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

[0663] 210 215 220

[0664] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

[0665] 225 230 235 240

[0666] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

[0667] 245 250 255

[0668] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

[0669] 260 265 270

[0670] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

[0671] 275 280 285

[0672] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[0673] 290 295 300
[0674] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[0675] 305 310 315 320
[0676] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[0677] 325 330 335
[0678] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[0679] 340 345 350
[0680] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[0681] 355 360 365
[0682] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[0683] 370 375 380
[0684] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0685] 385 390 395 400
[0686] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[0687] 405 410 415
[0688] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[0689] 420 425 430
[0690] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[0691] 435 440 445
[0692] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[0693] 450 455 460
[0694] Pro Gly Lys
[0695] 465
[0696] <210> 26
[0697] <211> 720
[0698] <212> DNA
[0699] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0700] <220>
[0701] <223> L1M2轻链前序列
[0702] <400> 26
[0703] atggtgtcat ccgctcaatt tctcggtttg cttctcctgt gtttccaagg cacccgctgc 60
[0704] gacgtggtca tgacccagag cccactgagc cttccggtca ccttgggaca gcccgcctca 120
[0705] atttcatgcc ggtccagcca gtccctggag aactccaacg ccaagaccta tctgaactgg 180
[0706] ttccagcagc gccctggaca gtccccgagg cgcctgatct acggcgtcag caacaggttc 240
[0707] tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 300
[0708] tcaagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tacttctgcc tccaagtcac gcacgtgccg 360
[0709] tacactttcg gacaagggac taagctggag atcaagcgga ccgtggcggc cccctctgtg 420
[0710] ttcattttcc ctccctcgga cgaacagctg aagtcgggaa cagcctccgt cgtgtgcctg 480
[0711] ctcaacaact tctacccccg ggaagcgaag gtccagtgga aagtggataa cgcactccaa 540
[0712] tcggggaact cccaggaatc cgtgactgag caggactcga aggattccac ttactccctg 600
[0713] tcgtccaccc tgactctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtcta cgcctgcgaa 660

[0714] gtgacccacc agggtctgag ctcccctgtg accaagagct ttaatcgggg cgaatgttga 720

[0715] <210> 27

[0716] <211> 1404

[0717] <212> DNA

[0718] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0719] <220>

[0720] <223> H4重链前序列

[0721] <400> 27

[0722] atgggatgga ctctcgtgtt ccttttttctc ctctctgtca ctgccggggt gcattcgcaa 60

[0723] gtccagctgg tgcagtcggg agcagaggtg aaaaagcccg gatcgtcagt gaaggtcagc 120

[0724] tgcaaagcct cgggatacac tttcaccaac tactggattg gatgggtcag acaggccccc 180

[0725] ggccaaggac tggagtgggt cggcgacatc taccctgggg gcgactatac caactacaac 240

[0726] gaaaagttca agggacgcgt gacaattacc gccgataaga gcaccagcac tgcctacatg 300

[0727] gagcttagct cattgcggtc cgaggatacc gctgtgtact actgtgcgcg gtggggcctt 360

[0728] ggttactact tcgactactg gggacagggt accatggtca cggtgtcctc cgcgtccacc 420

[0729] aagggtccct ccgtgttccc tctcgcgccg tcctcaaagt ctacctccgg tggaactgcc 480

[0730] gcgctcggtt gtctcgtgaa ggactacttc ccggagcctg tgactgtctc ctggaactcc 540

[0731] ggggccctca ccagcggagt gcacactttc cccgccgtgc tgcaatcctc cggcctgtac 600

[0732] agcctgtcct ccgtcgtgac tgtgcctagc tcctccctgg gaacccagac ctacatctgc 660

[0733] aacgtgaacc acaagccctc caacaccaag gtcgacaaga aggtcgaacc gaagtcgtgc 720

[0734] gacaagactc atacgtgccc tccttgcccg gccccggaac tgctgggagg cccatccgtg 780

[0735] ttcctgttcc cacccaagcc taaggatacc ctgatgatca gcagaacacc ggaagtgacc 840

[0736] tgtgtggtgg tggacgtcag ccacgaagat cccgaggtca agttcaattg gtacgtggac 900

[0737] ggggtggagg tgcacaacgc aaagaccaag ccccgggagg aacagtacaa ctccacctat 960

[0738] cgcgtggtgt cggtgctgac ggtgctgcac caggactggt tgaacggaaa ggagtataag 1020

[0739] tgcaaagtgt cgaacaaggc cctgcccgct cctatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1080

[0740] ggccagccgc gggaacccca ggtctacact ctcccaccga gccgcgacga actgactaag 1140

[0741] aatcaagtgt cgctgacttg cctcgtcaag ggcttctacc cgtccgacat cgccgtggaa 1200

[0742] tgggagagca acggccagcc ggaaaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggattcc 1260

[0743] gacgggtcct tcttcctgta ctcaaaactg accgtggata agtccagatg gcagcagggc 1320

[0744] aatgtctttt catgctccgt gatgcacgag gctctgcata accactacac ccagaagtcg 1380

[0745] ctgtccctgt ccccggggaa gtga 1404

[0746] <210> 28

[0747] <211> 720

[0748] <212> DNA

[0749] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0750] <220>

[0751] <223> L2M2轻链前序列

[0752] <400> 28

[0753] atggtgtcat ccgctcaatt tctcggtttg cttctcctgt gtttccaagg cacccgctgc 60

[0754] gacatcgtca tgacccagac cccattgagc ctttccgtca cgccgggaca gcccgcctcc 120

[0755] atttcctgcc gctcaagcca gtccctggag aactcaaacg ccaagaccta cctgaattgg 180

[0756] tatctgcaga agcctggaca gagcccgcag ctgctgatct acggcgtcag caacaggttc 240

[0757] tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 300

[0758] tcacgcgtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgcc tccaagtcac ccacgtgccg 360

[0759] tacactttcg gacaagggac taaggtcgag atcaagcgga ccgtggcggc cccctctgtg 420

[0760] ttcattttcc ctccctcgga cgaacagctg aagtcgggaa cagcctccgt cgtgtgcctg 480

[0761] ctcaacaact tctacccccg ggaagcgaag gtccagtgga aagtggataa cgcactccaa 540

[0762] tcggggaact cccaggaatc cgtgactgag caggactcga aggattccac ttactccctg 600

[0763] tcgtccaccc tgactctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtcta cgcctgcgaa 660

[0764] gtgacccacc agggtctgag ctcccctgtg accaagagct ttaatcgggg cgaatgttga 720

[0765] <210> 29

[0766] <211> 1404

[0767] <212> DNA

[0768] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0769] <220>

[0770] <223> H2重链前序列

[0771] <400> 29

[0772] atgggatgga ctctcgtgtt ccttttttctc ctctctgtca ctgccggggt gcattcgcaa 60

[0773] gtccagctgg tgcagtcggg accagaggtg aaaaagcccg gagagtcact taagatcagc 120

[0774] tgcaaaggct cgggatacac tttcaccaac tactggattg gttgggtcag acaggccccc 180

[0775] ggcaaaggac tggagtggat gggcgacatc taccctgggg gcgactatac caactacaac 240

[0776] gaaaagttca agggacaagt gacaatttcg gccgataaga gcattagcac tgcatacctt 300

[0777] cagtggagct cattgaaggc ctccgatacc gctatctact actgtgcgcg gtggggcctg 360

[0778] ggatactact tcgactactg gggaaggggt accttggtca cggtgtcctc cgcgtccacc 420

[0779] aagggtccct ccgtgttccc tctcgcgccg tcctcaaagt ctacctccgg tggaactgcc 480

[0780] gcgctcggtt gtctcgtgaa ggactacttc ccggagcctg tgactgtctc ctggaactcc 540

[0781] ggggccctca ccagcggagt gcacactttc cccgccgtgc tgcaatcctc cggcctgtac 600

[0782] agcctgtcct ccgtcgtgac tgtgcctagc tcctccctgg gaacccagac ctacatctgc 660

[0783] aacgtgaacc acaagccctc caacaccaag gtcgacaaga aggtcgaacc gaagtcgtgc 720

[0784] gacaagactc atacgtgccc tccttgcccg gccccggaac tgctgggagg cccatccgtg 780

[0785] ttcctgttcc cacccaagcc taaggatacc ctgatgatca gcagaacacc ggaagtgacc 840

[0786] tgtgtggtgg tggacgtcag ccacgaagat cccgaggtca agttcaattg gtacgtggac 900

[0787] ggggtggagg tgcacaacgc aaagaccaag ccccgggagg aacagtacaa ctccacctat 960

[0788] cgcgtggtgt cggtgctgac ggtgctgcac caggactggt tgaacggaaa ggagtataag 1020

[0789] tgcaaagtgt cgaacaaggc cctgcccgct cctatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1080

[0790] ggccagccgc gggaacccca ggtctacact ctcccaccga gccgcgacga actgactaag 1140

[0791] aatcaagtgt cgctgacttg cctcgtcaag ggcttctacc cgtccgacat cgccgtggaa 1200

[0792] tgggagagca acggccagcc ggaaaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggattcc 1260

[0793] gacgggtcct tcttcctgta ctcaaaactg accgtggata agtccagatg gcagcagggc 1320

[0794] aatgtctttt catgctccgt gatgcacgag gctctgcata accactacac ccagaagtcg 1380

[0795] ctgtccctgt ccccggggaa gtga 1404

[0796] <210> 30

[0797] <211> 22

[0798] <212> PRT

[0799] <213> 智人(Homo sapiens)

[0800] <400> 30

[0801] Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu

[0802] 1 5 10 15

[0803] Gln Glu Tyr Val Gln Thr

[0804] 20

[0805] <210> 31

[0806] <211> 25

[0807] <212> PRT

[0808] <213> 智人(Homo sapiens)

[0809] <400> 31

[0810] Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu

[0811] 1 5 10 15

[0812] Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys

[0813] 20 25

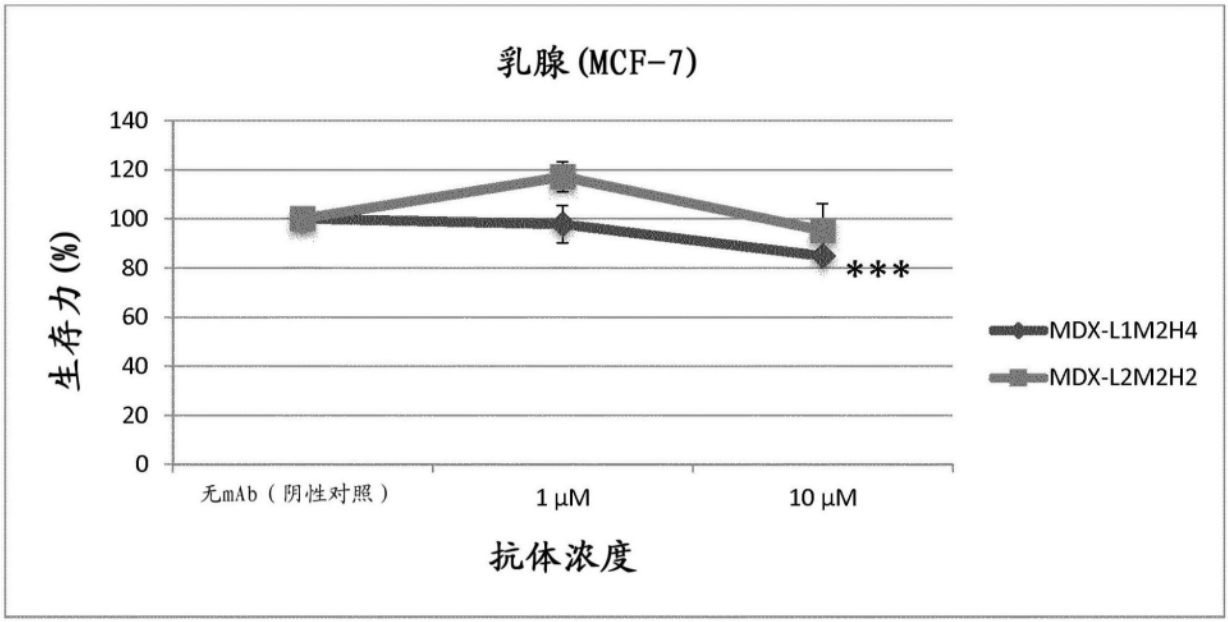
乳腺(MCF-7)
生存力(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
***
无mAb（阴性对照）
1 μM
10 μM
抗体浓度
MDX-L1M2H4
MDX-L2M2H2

图1

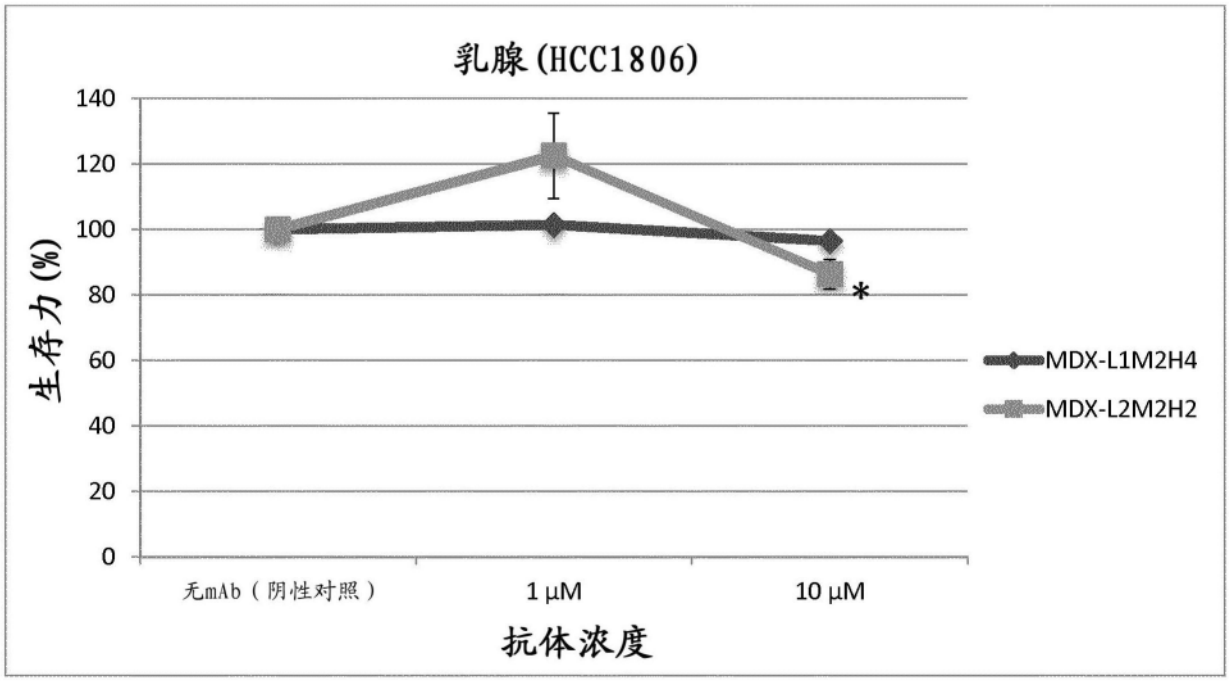
乳腺(HCC1806)
生存力(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
*
无mAb（阴性对照）
1 μM
10 μM
抗体浓度
MDX-L1M2H4
MDX-L2M2H2

图2

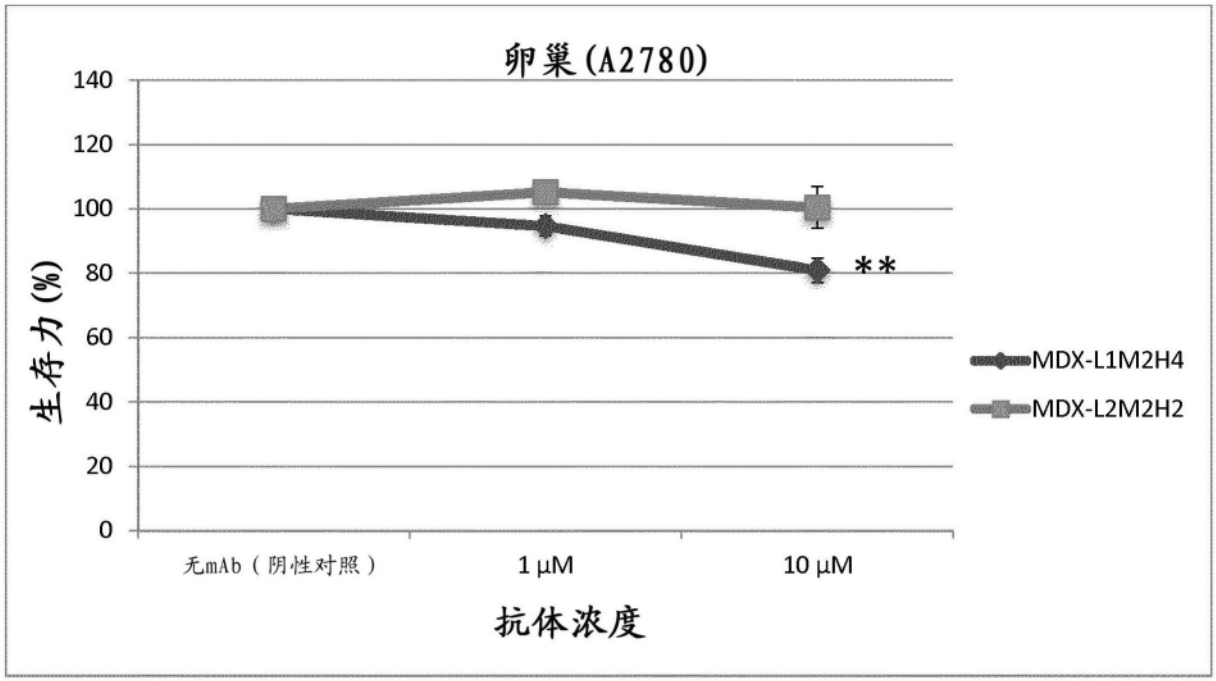
卵巢(A2780)
140
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
**
MDX-L1M2H4
MDX-L2M2H2
无mAb（阴性对照）
1 μM
10 μM
抗体浓度

图3

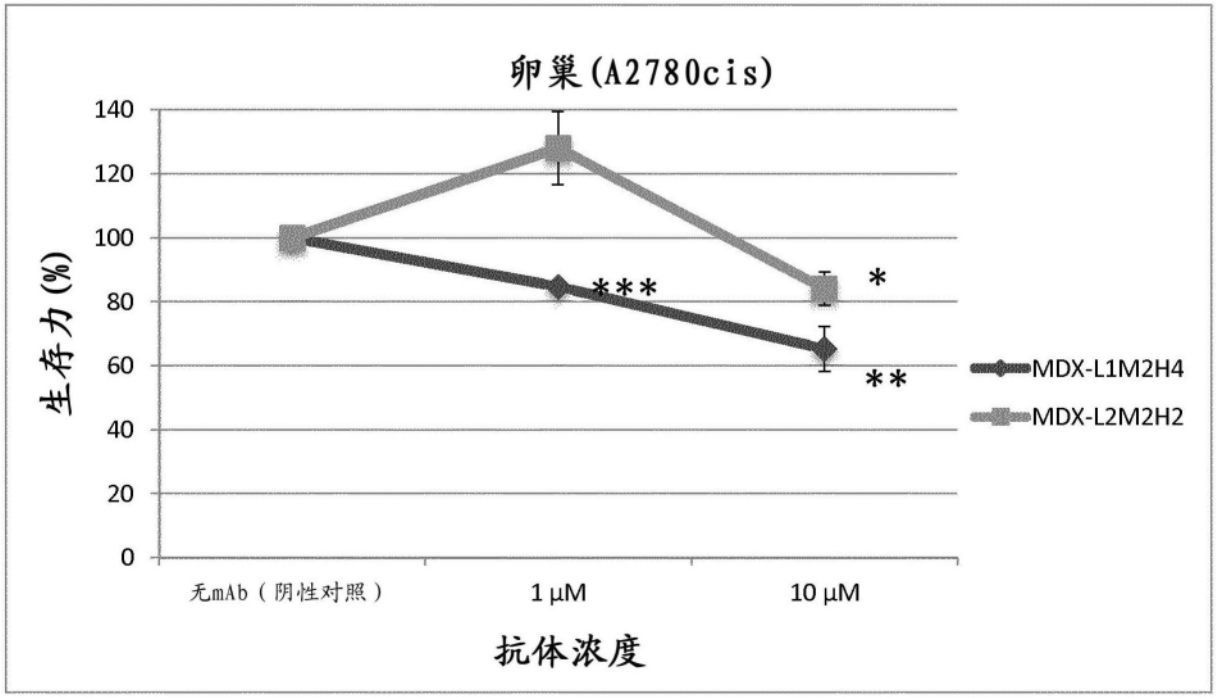
卵巢(A2780cis)
140
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
***
*
**
MDX-L1M2H4
MDX-L2M2H2
无mAb（阴性对照）
1 μM
10 μM
抗体浓度

图4

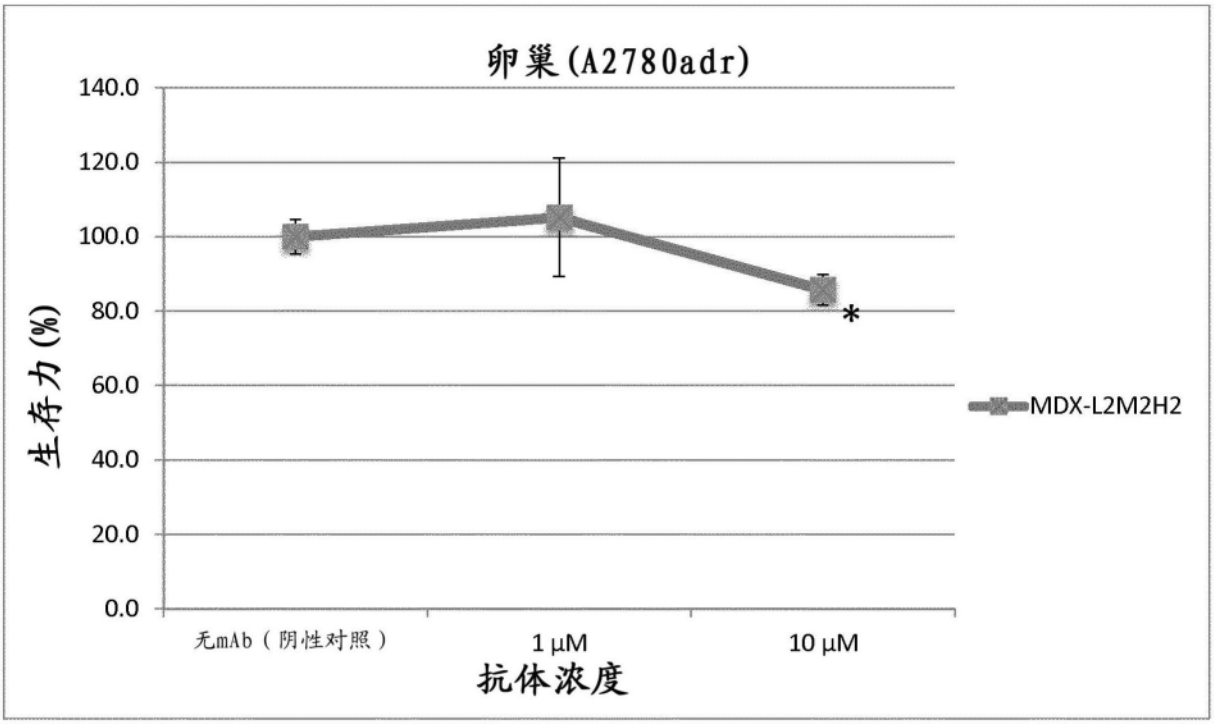
卵巢(A2780adr)
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
生存力(%)
*
MDX-L2M2H2
无mAb（阴性对照）
1 μM
10 μM
抗体浓度

图5

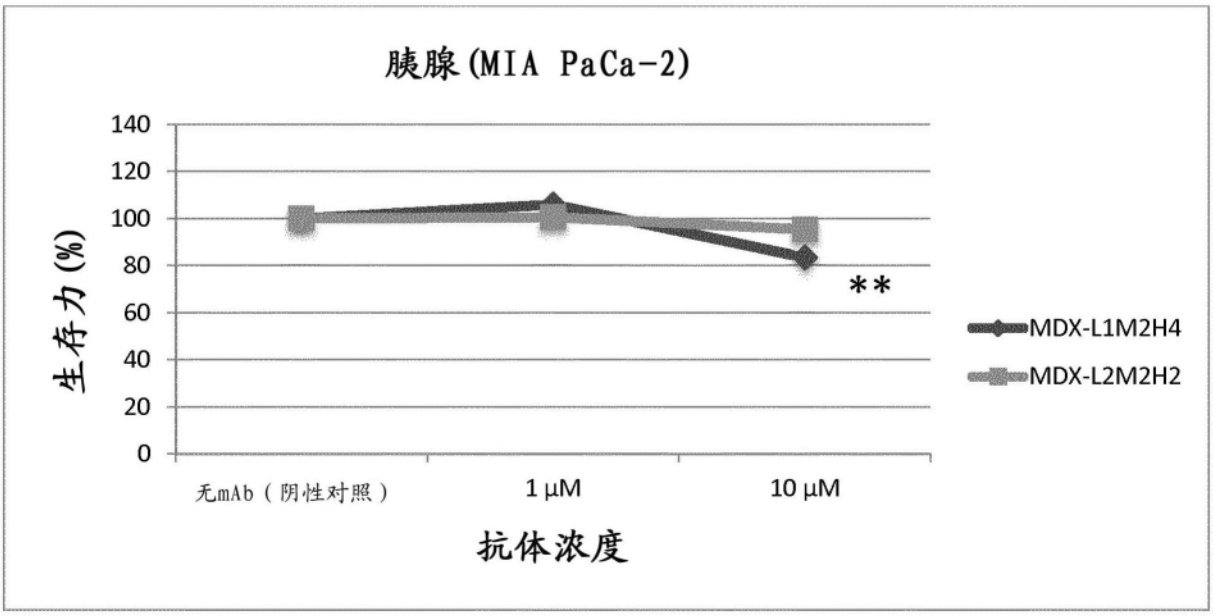
胰腺(MIA PaCa-2)
140
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
**
MDX-L1M2H4
MDX-L2M2H2
无mAb（阴性对照）
1 μM
10 μM
抗体浓度

图6

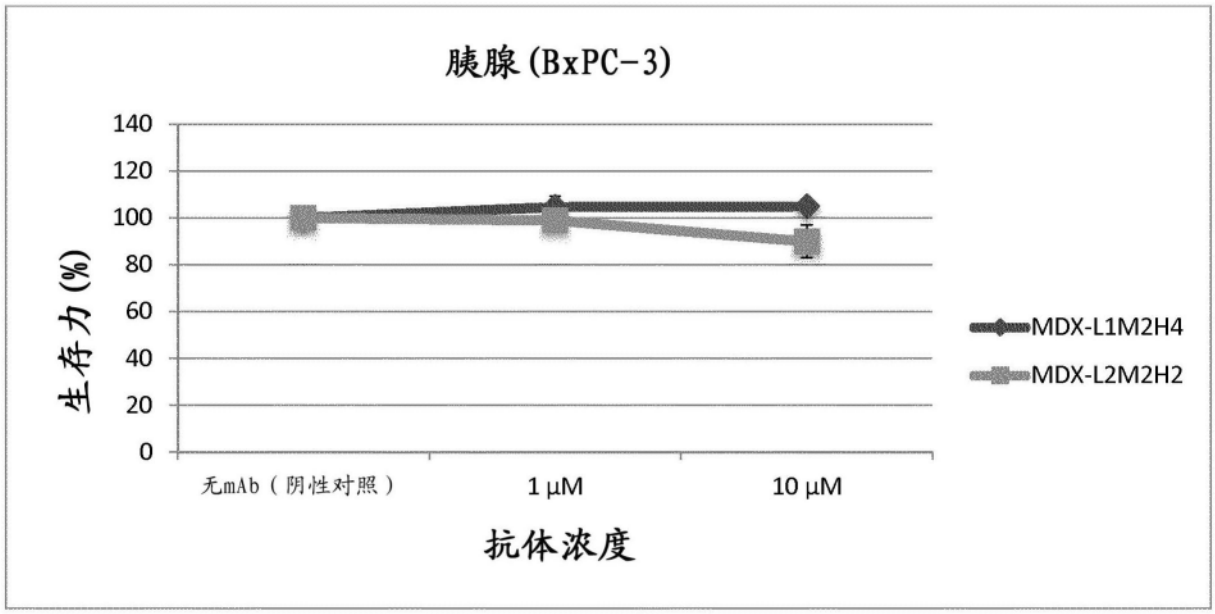
胰腺(BxPC-3)
140
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
无mAb（阴性对照）
1 μM
10 μM
抗体浓度
MDX-L1M2H4
MDX-L2M2H2

图7

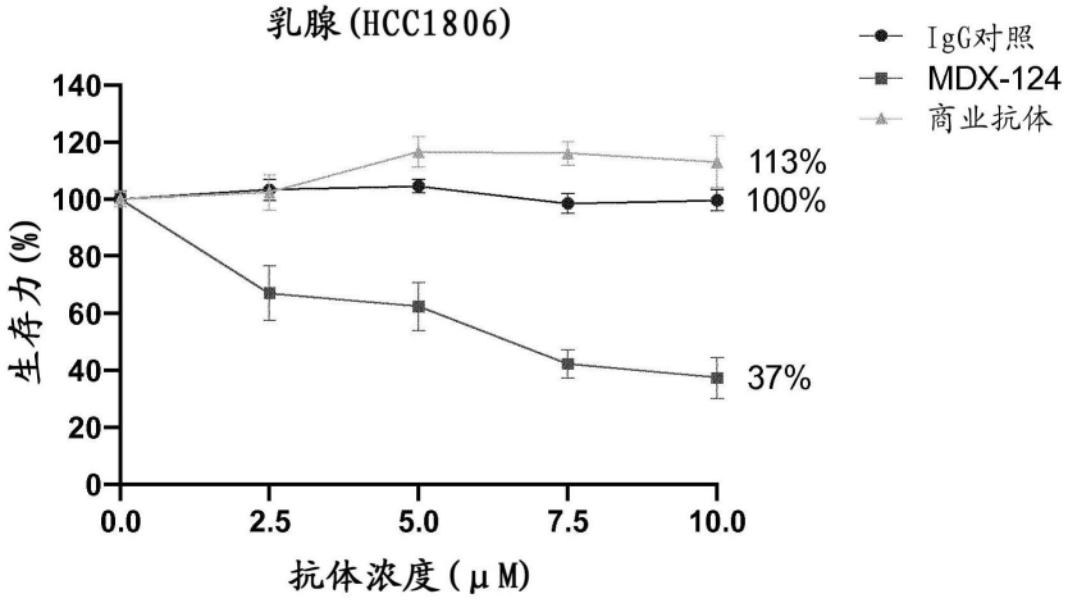
乳腺(HCC1806)
140
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)
IgG对照
MDX-124
商业抗体
113%
100%
37%

图8

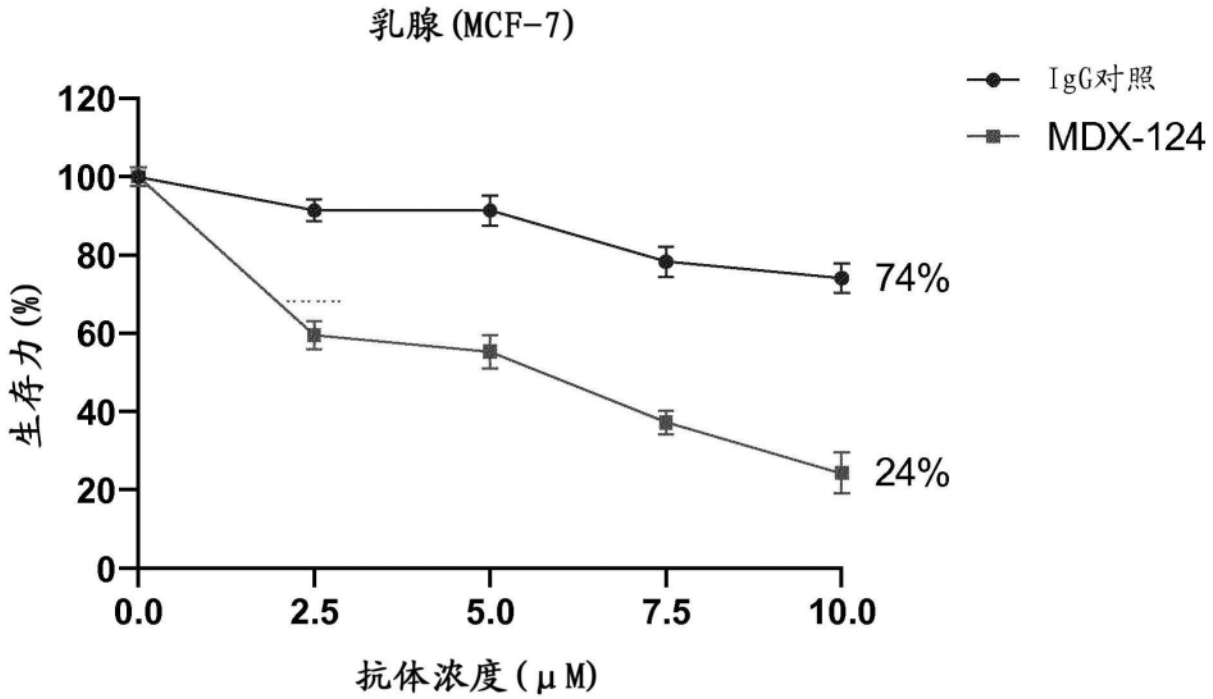
乳腺(MCF-7)
IgG对照
MDX-124
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
74%
24%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图9

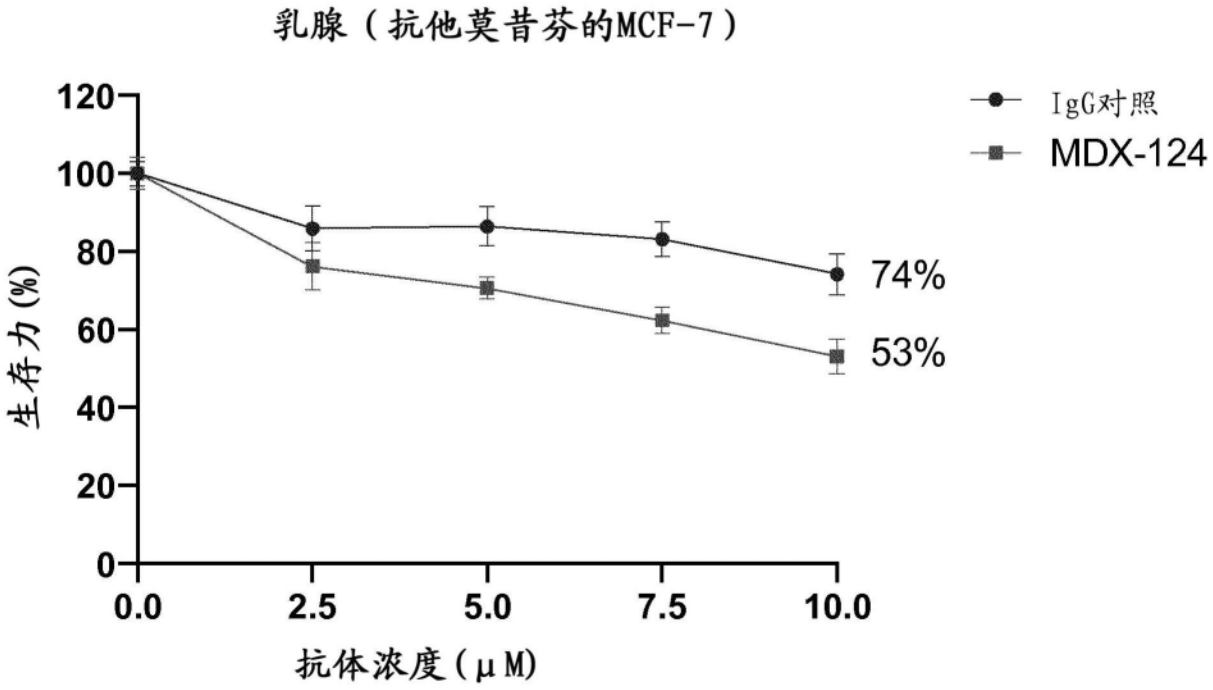
乳腺（抗他莫昔芬的MCF-7）
IgG对照
MDX-124
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
74%
53%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图10

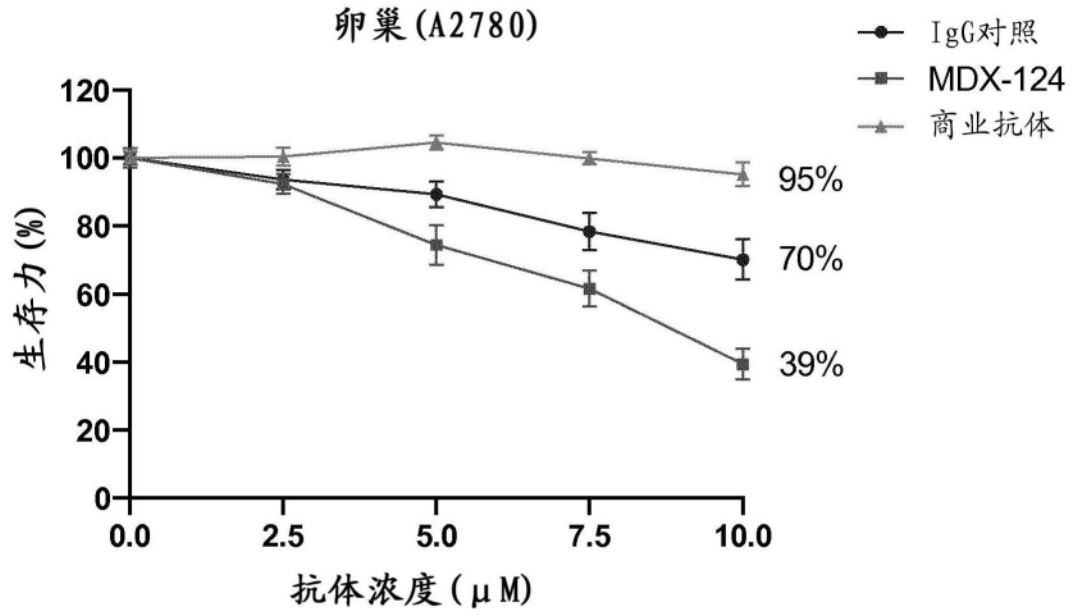
卵巢(A2780)
IgG对照
MDX-124
商业抗体
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
95%
70%
39%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图11

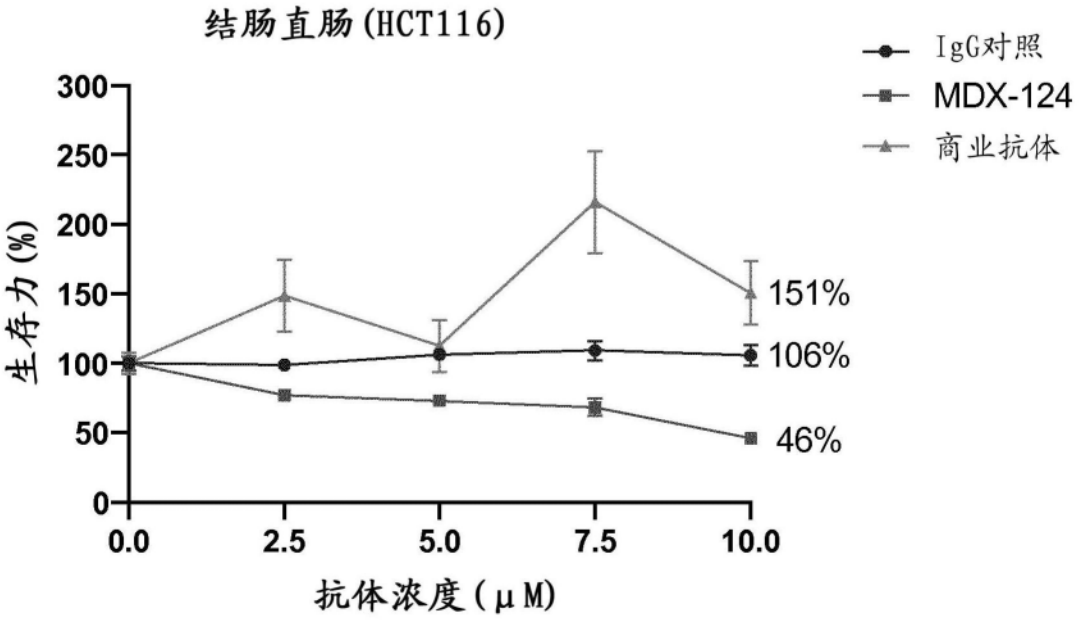
结肠直肠(HCT116)
IgG对照
MDX-124
商业抗体
300
250
200
150
100
50
0
生存力(%)
151%
106%
46%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图12

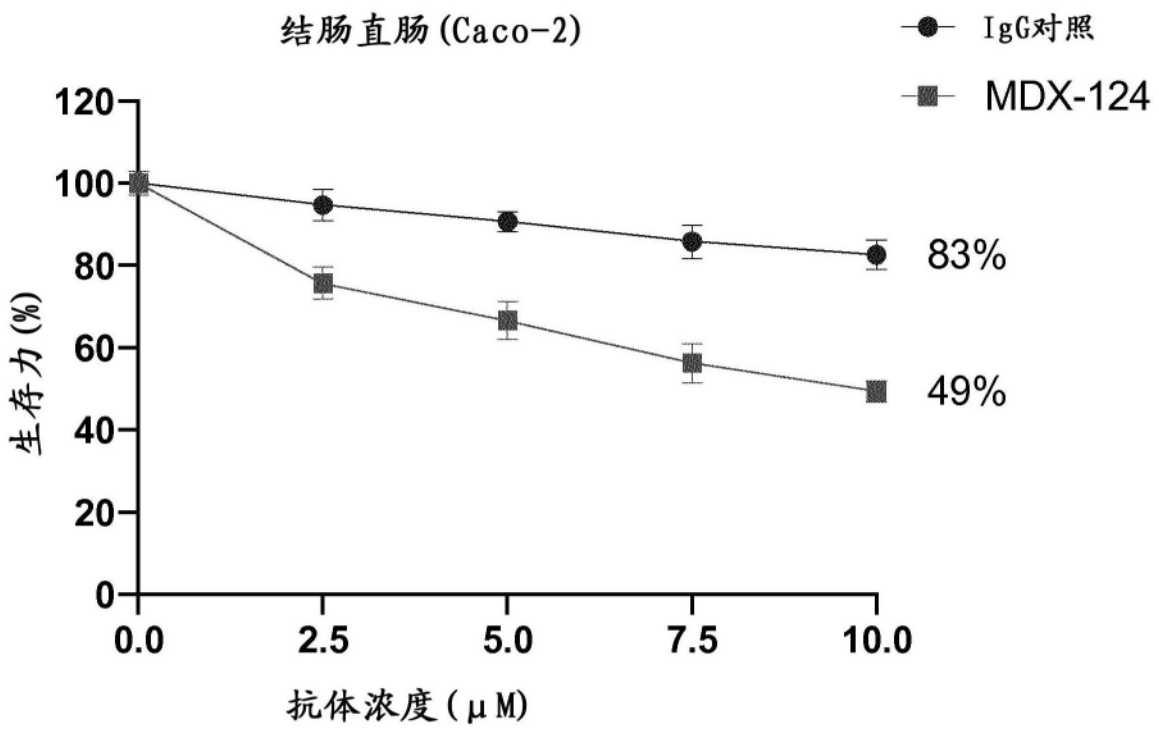
结肠直肠(Caco-2)
IgG对照
MDX-124
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
83%
49%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图13

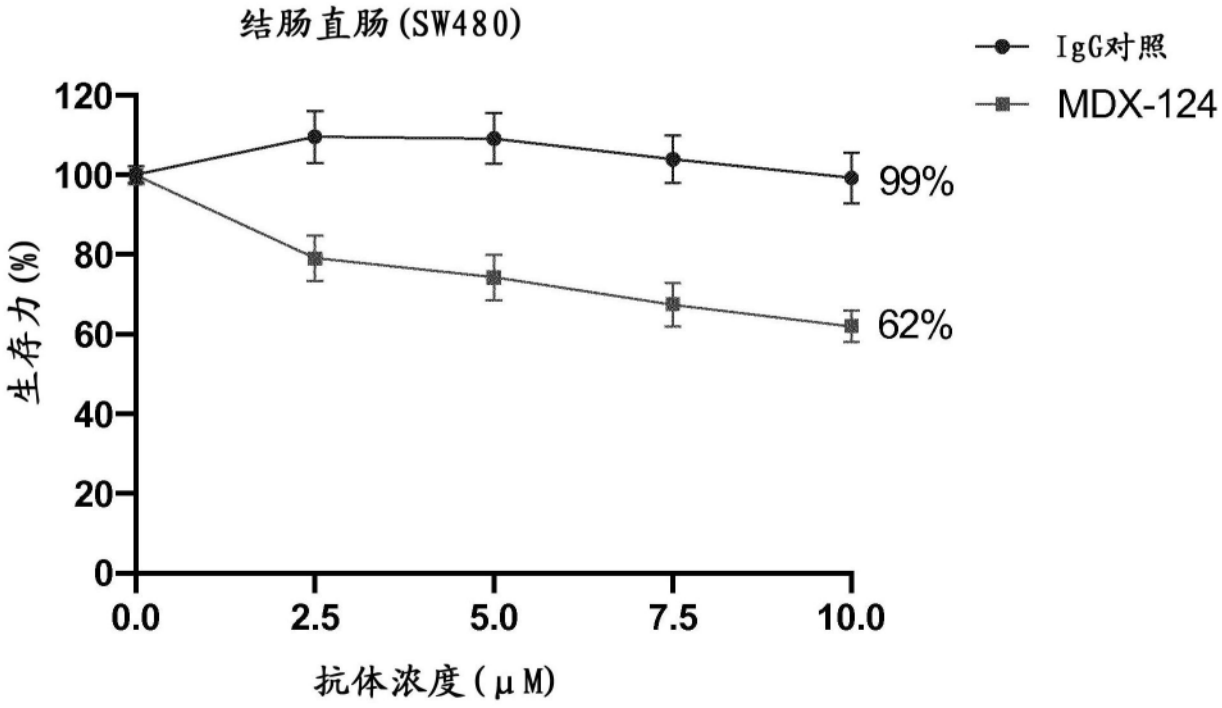
结肠直肠(SW480)
IgG对照
MDX-124
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
99%
62%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图14

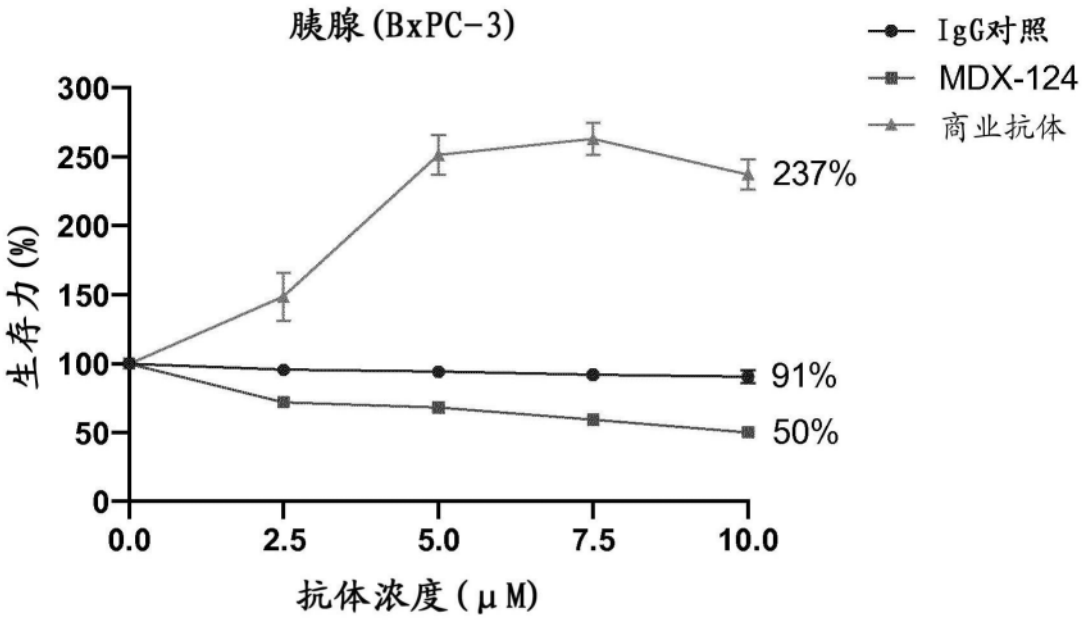
胰腺(BxPC-3)
IgG对照
MDX-124
商业抗体
300
250
200
150
100
50
0
生存力(%)
237%
91%
50%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图15

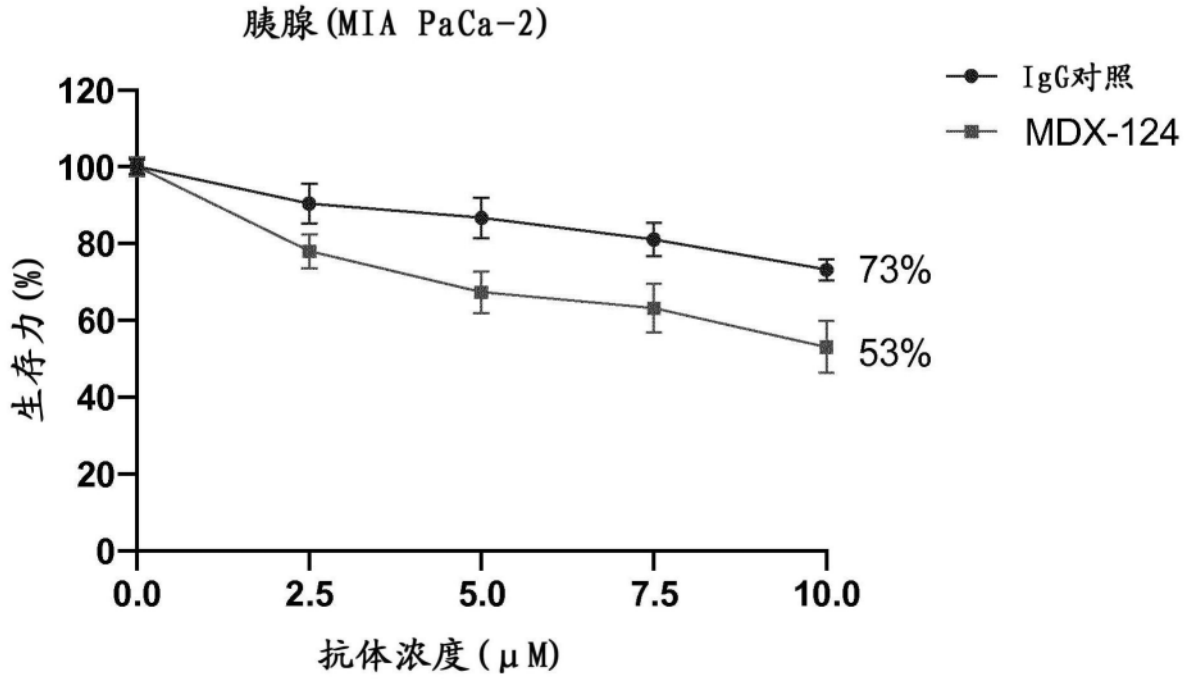
胰腺(MIA PaCa-2)
IgG对照
MDX-124
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
73%
53%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图16

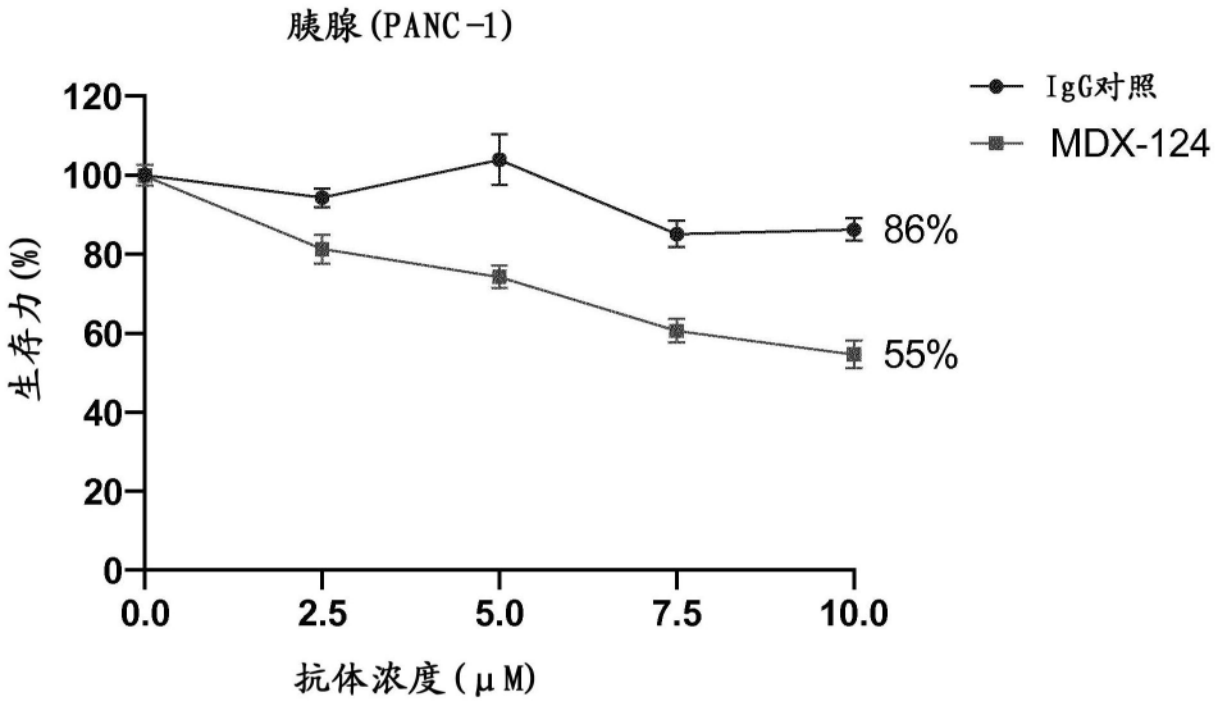
胰腺(PANC-1)
IgG对照
MDX-124
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
86%
55%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图17

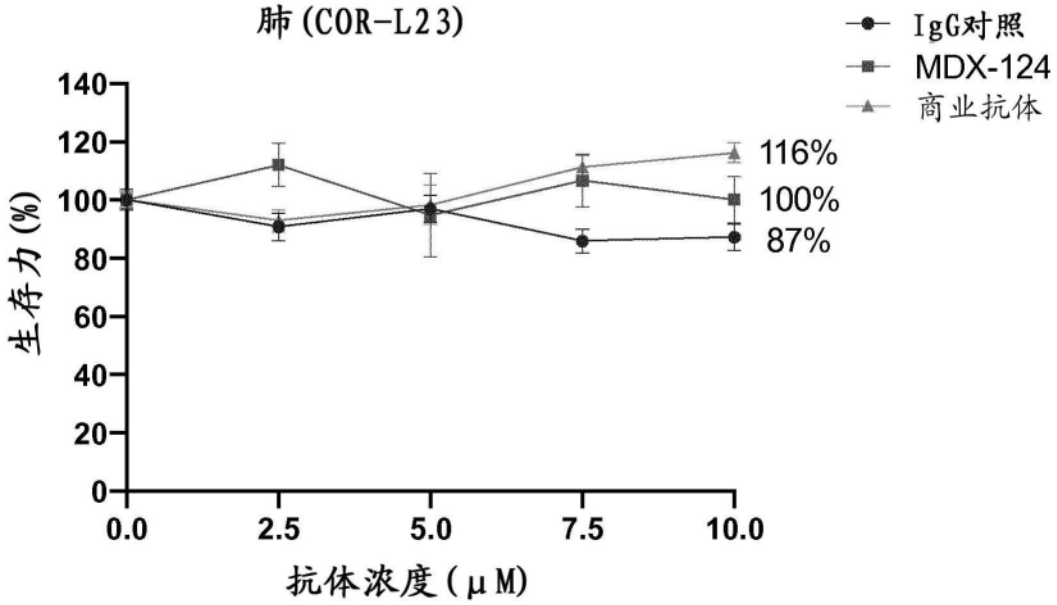
肺(COR-L23)
IgG对照
MDX-124
商业抗体
140
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
116%
100%
87%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图18

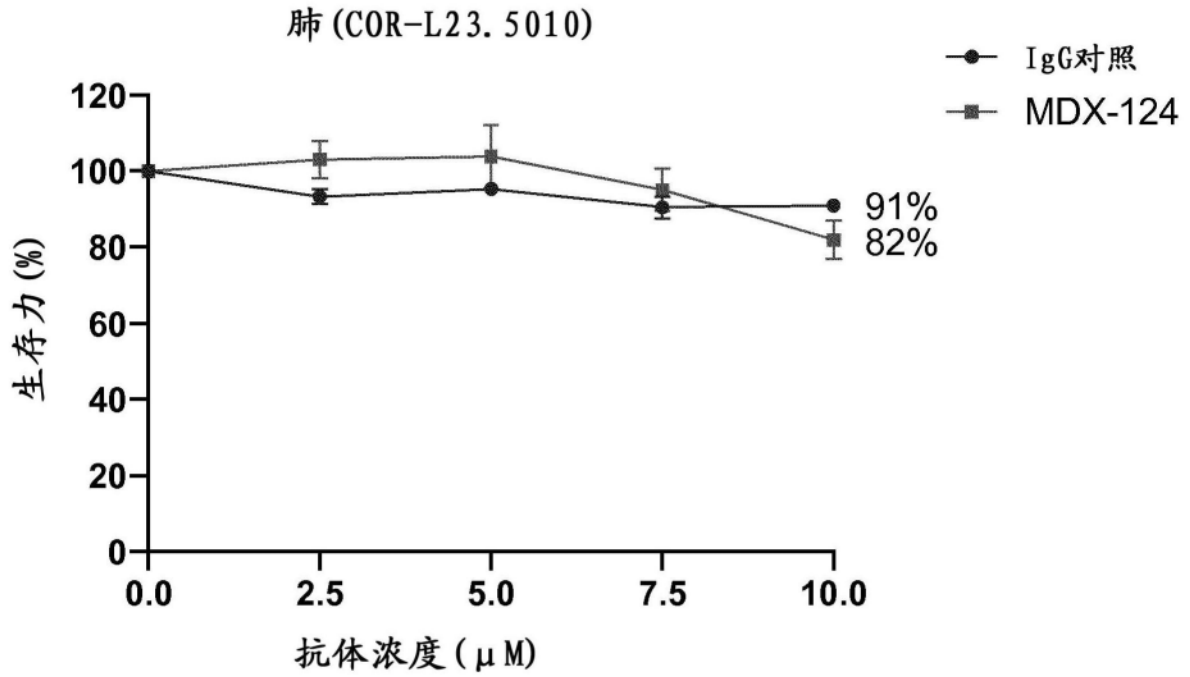
肺(COR-L23.5010)
IgG对照
MDX-124
120
100
80
60
40
20
0
生存力(%)
91%
82%
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
抗体浓度(μM)

图19

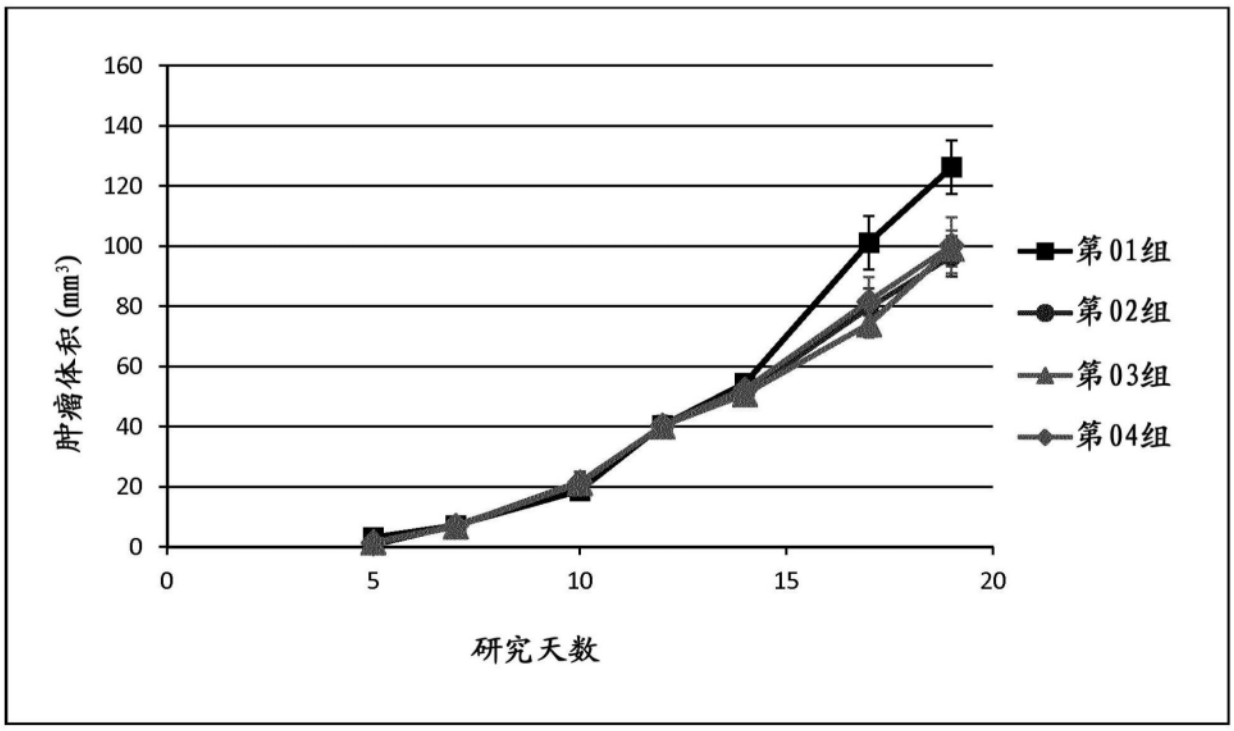
160
140
120
100
80
60
40
20
0
肿瘤体积(mm³)
0
5
10
15
20
研究天数
第01组
第02组
第03组
第04组

图20

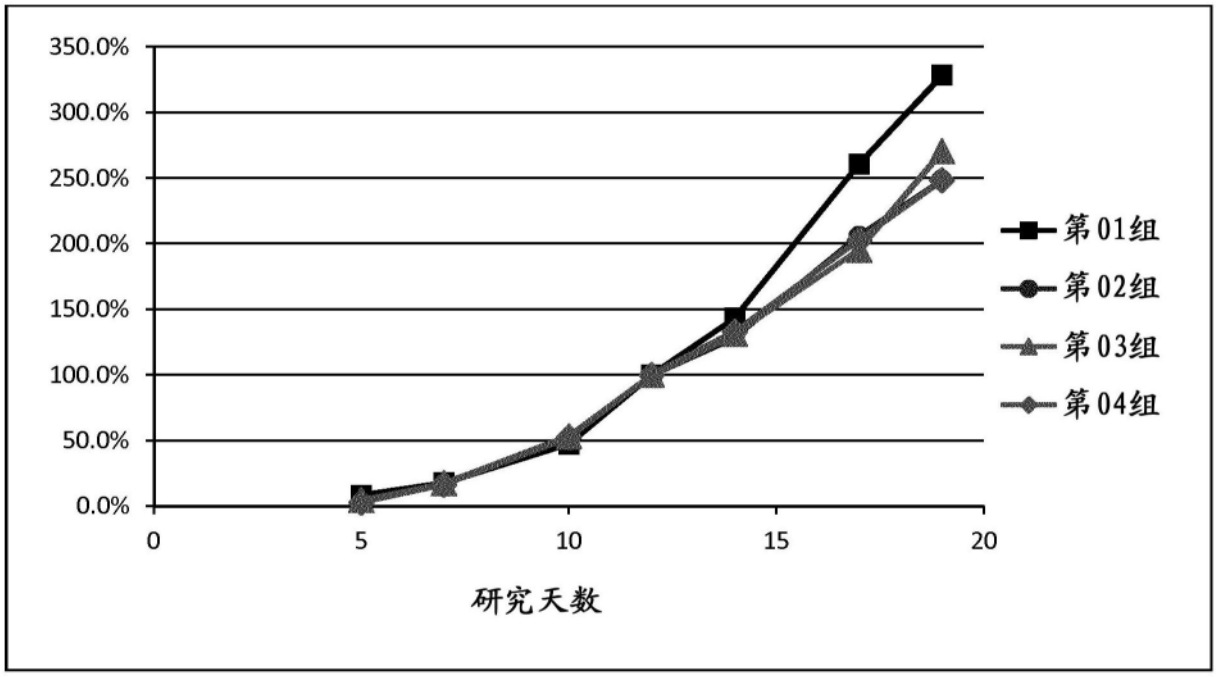
350.0%
300.0%
250.0%
200.0%
150.0%
100.0%
50.0%
0.0%
0
5
10
15
20
研究天数
第01组
第02组
第03组
第04组

图21