



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119156399 A

(43) 申请公布日 2024.12.17

(21) 申请号 202380036190.X

(22) 申请日 2023.02.23

(30) 优先权数据

63/313304 2022.02.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/063169 2023.02.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/164581 EN 2023.08.31

(71) 申请人 A&G 药品公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 G·塞雷罗

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 任晓华 彭昶

(51) Int.Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

权利要求书3页 说明书31页

序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

抗人颗粒蛋白前体的全人源单克隆抗体

(57) 摘要

本文描述的是特异性结合人颗粒蛋白前体并且可用于治疗患者的癌症的抗体,特别是单克隆抗体。还提供了其制备和使用方法。

1. 分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:

a) 分别包含CDR序列SEQ ID NO:1、2和3的重链可变区和分别包含CDR序列SEQ ID NO:4、5和6的轻链可变区;

b) 分别包含CDR序列SEQ ID NO:7、8和9的重链可变区和分别包含CDR序列SEQ ID NO:10、11和12的轻链可变区;

c) 分别包含CDR序列SEQ ID NO:13、14和15的重链可变区和分别包含CDR序列SEQ ID NO:16、17和18的轻链可变区;

d) 分别包含CDR序列SEQ ID NO:19、20、21的重链可变区和分别包含CDR序列SEQ ID NO:22、23和24的轻链可变区;

e) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:1-3和7-9;

f) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:4-6和10-12;

g) 重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;

h) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:15-17和21-23;

i) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:18-20和24-26;

j) 重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;

k) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:29-31和35-37;

l) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:32-34和38-40;

m) 重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;

n) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:43-45和49-51;

o) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:46-48和52-54;

p) 重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56;

或a) -p) 中任一项的衍生物;

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人颗粒蛋白前体。

2. 权利要求1的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:

a) 包含SEQ ID NO:25的重链可变区和包含SEQ ID NO:27的轻链可变区;

b) 包含SEQ ID NO:29的重链可变区和包含SEQ ID NO:31的轻链可变区;

c) 包含SEQ ID NO:33的重链可变区和包含SEQ ID NO:35的轻链可变区;或

d) 包含SEQ ID NO:37的重链可变区和包含SEQ ID NO:39的轻链可变区。

3. 前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体被内化到体外和/或体内的表达hu PGRN的细胞中。

4. 前述权利要求中任一项的抗体,其与曲妥珠单抗竞争结合细胞上的hu PGRN受体。

5. 权利要求4的抗体,其选自抗体10C8、16C11、14A6和10B3。

6. 前述权利要求中任一项的抗体,其不与曲妥珠单抗竞争结合细胞上的hu PGRN受体。

7. 权利要求6的抗体,其选自抗体10C8、16C11、14A6和10B3。

8. 权利要求6或7的抗体的组合。

9. 前述权利要求中任一项的抗体,其为分离的单克隆抗体。

10. 权利要求9所述的抗体,其中所述单克隆抗体是人单克隆抗体。

11. 前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体源自人抗体、人IgG、人IgG1、人IgG2、人IgG2a、人IgG2b、人IgG3、人IgG4、人IgM、人IgA、人IgA1、人IgA2、人IgD、人IgE、犬抗体、犬

IgGA、犬IgGB、犬IgGC、犬IgGD、鸡抗体、鸡IgA、鸡IgD、鸡IgE、鸡IgG、鸡IgM、鸡IgY、山羊抗体、山羊IgG、小鼠抗体、小鼠IgG、猪抗体、大鼠抗体、美洲驼抗体、羊驼抗体、鲨鱼抗体和骆驼抗体。

12. 前述权利要求中任一项的抗体的衍生物, 任选地选自 F_{ab} 、 F_{ab2} 、 Fab' 单链抗体、 F_v 、单链、单特异性抗体、双特异性抗体、三聚抗体、多特异性抗体、多价抗体、嵌合抗体、犬-人嵌合抗体、犬-鼠嵌合抗体、包含犬Fc的抗体、人源化抗体、人抗体、犬源化抗体、CDR移植抗体、鲨鱼抗体以及纳米抗体。

13. 前述权利要求中任一项的抗体的衍生物, 其包含与其固定地附接的可检测标记, 任选地, 其中所述可检测标记选自荧光素、DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647、5-羧基-2,7-二氯荧光素、5-羧基荧光素、5-FAM、羟色胺、5-羟色胺(5-HAT)、6-羧基荧光素(6-FAM)、FITC、6-羧基-1,4-二氯-2',7'-二氯荧光素(TET)、6-羧基-1,4-二氯-2',4',5',7'-四氯荧光素(HEX)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(6-JOE)、Alexa fluor、Alexa fluor 350、Alexa fluor 405、Alexa fluor 430、Alexa fluor 488、Alexa fluor 500、Alexa fluor 514、Alexa fluor 532、Alexa fluor 546、Alexa fluor 555、Alexa fluor 568、Alexa fluor 594、Alexa fluor 610、Alexa fluor 633、Alexa fluor 635、Alexa fluor 647、Alexa fluor 660、Alexa fluor 680、Alexa fluor 700、Alexa fluor 750、BODIPY荧光团、BODIPY 492/515、BODIPY 493/503、BODIPY 500/510、BODIPY 505/515、BODIPY 530/550、BODIPY 542/563、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650-X、BODIPY 650/665-X、BODIPY 665/676、FL、FL ATP、FI-神经酰胺、R6G SE、TMR、TMR-X缀合物、TMR-X、SE、TR、TR ATP、TR-X SE、罗丹明、罗丹明110、罗丹明123、罗丹明B、罗丹明B 200、罗丹明BB、罗丹明BG、罗丹明B extra、5-羧基四甲基罗丹明(5-TAMRA)、5GLD、6-羧基罗丹明6G、丽丝胺、丽丝胺罗丹明B、Phallicidine、鬼笔环肽、罗丹明红、Rhod-2、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、羧基-X-罗丹明(5-ROX)、磺酰罗丹明B can C、磺酰罗丹明G Extra、6-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)、四甲基罗丹明(TRITC)、罗丹明WT、德克萨斯红和德克萨斯红-X。

14. 前述权利要求中任一项的抗体, 其包含与其附接的效应物部分, 任选地, 其中所述效应部分选自细胞毒性药物、毒素、白喉毒素A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、酚霉素、依诺霉素以及放射化学品。

15. 权利要求14的抗体, 其进一步包含位于所述抗体和所述效应物部分之间的可裂解接头, 其中所述可裂解接头将效应物部分释放进细胞中或在细胞内释放。

16. 一种分离的多核苷酸, 其编码前述权利要求中任一项的抗体, 任选地, 其中核酸序列为SEQ ID NO:57-64中的至少一个。

17. 一种表达载体, 其包含一个或多个权利要求16的多核苷酸。

18. 一种宿主细胞, 其包含权利要求16的分离的多核苷酸和/或权利要求17的表达载体。

19. 一种组合物, 其包含: 至少一种权利要求1-15中任一项的抗体或衍生物; 至少一种权利要求16的分离的多核苷酸; 或至少一种权利要求17的表达载体; 和/或, 至少一种权利要求18的宿主细胞; 或其组合; 以及药学上可接受的载体。

20. 一种检测细胞上的hu PGRN的方法, 所述方法包括使测试生物样品接触权利要求1-

15中任一项的抗体或衍生物,并且检测结合所述生物样品或其组分的抗体。

21. 权利要求20的方法,其中所述细胞选自乳腺癌、腺癌表皮生长因子受体(EGF-R)乳腺癌、基底乳腺癌、雌激素受体(ER) Luminal型乳腺癌、ER阳性他莫昔芬抗性Luminal型乳腺癌、来曲唑抗性Luminal型乳腺癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、表皮样癌、鳞状细胞癌、食管癌、胃癌、肝细胞癌、肾脏/肾癌、喉癌、肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、间皮瘤、骨髓瘤/白血病、卵巢癌、前列腺癌以及子宫癌细胞。

22. 权利要求20或21的方法,其进一步包括比较测试生物样品或其组分的结合量与对照生物样品或其组分的结合量,其中测试生物样品或其组分的结合相对于对照生物样品或其组分的增加表明在测试生物样品中存在表达hu PGRN的细胞。

23. 权利要求20-22中任一项的方法,其中所述测试生物样品是哺乳动物细胞、组织或血液。

24. 权利要求20-23中任一项的方法,其中所述方法是体内方法或体外方法。

25. 用于治疗、预防和/或改善哺乳动物中癌症的方法,其包括向所述哺乳动物施用至少一种有效剂量的药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-15中任一项的抗体或衍生物。

26. 权利要求25所述的方法,其中所述癌症选自乳腺癌、腺癌表皮生长因子受体(EGF-R)乳腺癌、基底乳腺癌、雌激素受体(ER) Luminal型乳腺癌、ER阳性他莫昔芬抗性Luminal型乳腺癌、来曲唑抗性Luminal型乳腺癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、表皮样癌、鳞状细胞癌、食管癌、胃癌、肝细胞癌、肾脏/肾癌、喉癌、肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、间皮瘤、骨髓瘤/白血病、卵巢癌、前列腺癌以及子宫癌。

27. 权利要求25或26的方法,其中所述抗体包含与其附接的细胞毒性效应物部分,任选地,其中所述效应物部分选自细胞毒性药物、毒素、白喉毒素A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、酚霉素、依诺霉素以及放射化学品。

28. 权利要求25-27中任一项的方法,其中所述抗体进一步包含位于所述抗体和所述效应物部分之间的可裂解接头,其中所述可裂解接头将效应物部分释放进细胞中或在细胞内释放。

29. 权利要求25-28中任一项的方法,其中所述抗体作为抗体-药物缀合物施用。

30. 权利要求25-29中任一项的方法,其中向所述动物施用多个剂量;和/或,其中所述抗体以约1至50mg/kg的剂量施用。

31. 一种试剂盒,其用于检测细胞内或细胞上的hu PGRN表达,所述试剂盒包含前述权利要求中任一项的抗体或衍生物,以及使用说明。

32. 权利要求31的试剂盒,其中所述细胞选自乳腺癌、腺癌表皮生长因子受体(EGF-R)乳腺癌、基底乳腺癌、雌激素受体(ER) Luminal型乳腺癌、ER阳性他莫昔芬抗性Luminal型乳腺癌、来曲唑抗性Luminal型乳腺癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、表皮样癌、鳞状细胞癌、食管癌、胃癌、肝细胞癌、肾脏/肾癌、喉癌、肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、间皮瘤、骨髓瘤/白血病、卵巢癌、前列腺癌以及子宫癌细胞。

33. 权利要求30-32中任一项的试剂盒,其中所述抗体或衍生物为冻干形式。

抗人颗粒蛋白前体的全人源单克隆抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2022年2月24日提交的美国临时申请序列号63/313,304的优先权,其全部内容并入本文。

技术领域

[0003] 本文提供了全人源单克隆抗体 (mAb)。更具体地,本文描述了特异性结合人颗粒蛋白前体(也称为GP88)的mAb。颗粒蛋白前体的其他名称包括颗粒蛋白/上皮蛋白前体、GEP和颗粒体蛋白(acrogranin)。

背景技术

[0004] 已鉴定出一种有前途的癌症治疗和诊断的新靶点,并且称为PC-细胞衍生的生长因子(PCDGF)(也称为颗粒蛋白-上皮蛋白前体[GEP或GP88]或颗粒蛋白前体)。PCDGF(本文称为颗粒蛋白前体)是一种88kDa的糖蛋白,其含有20kDa的糖部分和68kDa的核心蛋白,与上皮蛋白/颗粒蛋白的前体相同,所述上皮蛋白/颗粒蛋白是六个富含双半胱氨酸的多肽的家族,其衍生于颗粒蛋白前体的蛋白酶解加工(Bhandari,V.等,Proc Natl Acad Sci USA 89(5):1715-1719,1992)。该家族中首次被鉴定的成员是6kDa的多肽生长调节因子,从大鼠肾脏中分离的上皮蛋白1和2(Shoyab,M.等,Proc Natl Acad of Sci 87(20):7912,1990)或来自人粒细胞提取物中的颗粒蛋白(Bateman等,Biochem Biophys Res Commun 173(3):1161-1168,1990)。

[0005] 上皮蛋白和颗粒蛋白的互补脱氧核糖核酸(cDNA)的克隆表明,其编码一种63kDa的蛋白质,其含有7.5kDa富含半胱氨酸的上皮蛋白/颗粒蛋白重复序列、信号肽以及几个推定的糖基化位点(Bhandari,V.等,Proc Natl Acad Sci U S A 89(5):1715-1719,1992)。对克隆和表达的前体的生物学功能的研究表明,其不具有生物活性(Bhandari,V.等,1992和Plowman,G.等,J Biol Chem 267(18):13073-13078,1992)。这导致一种假设,即前体需要被加工成6kDa的分子形式以获得生物活性。基于这一假设,大分子量形式被定义为颗粒蛋白/上皮蛋白前体或PGRN,现在称为颗粒蛋白前体。在正常生理条件下,颗粒蛋白前体不被分泌,而是作为成熟颗粒蛋白/上皮蛋白的前体。Serrero实验室的工作报告了从高致瘤性畸胎瘤PC细胞系的培养基中纯化自分泌生长因子,首次提供了所述前体作为具有生物活性的生长因子的生理存在的证明,该前体作为88kDa的糖蛋白,具有17个氨基酸的信号肽和20kDa的糖部分(Zhou,G.等,J Biol Chem 268(15):10863-10869,1993)。在对上皮或间质来源的几种细胞系的其他研究中(Zanocco-Marani,T.等,Cancer Res 59(20):5331-5340,1999;He,Z.等,Cancer Research 62(19):5590,2002;He,Z.等,J Mol Med 81(10):600-612,2003;Serrero,G,Biochem Biophys Res Commun 308(3):409-413,2003),得知颗粒蛋白前体的自分泌产生和分泌导致生长失调,导致体内肿瘤形成,表明颗粒蛋白前体充当致瘤生长因子。

[0006] 自分泌颗粒蛋白前体的高表达水平与恶性程度最高的乳腺癌细胞相关。例如,颗

粒蛋白前体信使核糖核酸(mRNA)和蛋白质表达在永生化、非致瘤性乳腺上皮MCF-10A细胞和雌激素受体阳性(ER+)MCF-7细胞中非常低。相反,在更具侵袭性的雌激素受体阴性(ER-)细胞系(例如MDA-MB-468、453和231)中观察到颗粒蛋白前体水平显著增加(Lu,R.等,Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3993-3998,2000)。进一步研究已证实,颗粒蛋白前体介导17- β 雌二醇(E2)在人类乳腺癌细胞中的生长促进作用;其中,在E2依赖性的MCF-7细胞中,颗粒蛋白前体的过表达使得细胞不依赖E2,而E2受体状态和E2反应性没有改变,导致细胞变为他莫昔芬抗性的(Lu,R.等,Proc Natl Acad Sci USA 98(1):142-147,2001)。此外,已发现接受他莫昔芬治疗的携带颗粒蛋白前体过表达肿瘤的小鼠比未接受他莫昔芬治疗的小鼠形成更大的肿瘤,表明过表达颗粒蛋白前体的ER+乳腺癌细胞不仅对他莫昔芬的生长抑制作用产生抗性,而且其对他莫昔芬产生不利反应,导致体内肿瘤生长受到刺激。除了赋予他莫昔芬抗性之外,数据还表明ER+乳腺癌细胞中颗粒蛋白前体的过表达导致对氟维司群(FASLODEX)、芳香化酶抑制剂来曲唑和化疗药剂阿霉素的抗性(Tangkeangsirisin,W.等,Carcinogenesis 25(9):1587-1592,2004;Abrhale;T.等,BMC Cancer 11:231,2011;Tangkeangsirisin,W.等,Advances in Breast Cancer Research Vol.3No.3:11,2014)。后一项发现得到了Kudoh等人研究(Kudoh,R.等,Cancer Research 60(15):4161,2000)的支持,其中微阵列分析确认颗粒蛋白前体是阿霉素抗性乳腺癌细胞MCF-7/D40中显著(>12倍)上调的基因。此外,在用阿霉素处理15小时的MCF-7细胞中,颗粒蛋白前体上调了17倍。这些结果表明乳腺肿瘤中颗粒蛋白前体表达的增加与化学-抗性相关。

[0007] 尽管对颗粒蛋白前体受体由于其尚未完全克隆而知之甚少,但一些实验室已经研究了介导增殖和生存的颗粒蛋白前体依赖性信号通路(Arechavaleta-Velasco,F.等,Med Oncol 34(12):194,2017)。关于受体,已经证明了特异性的、时间和温度依赖性的颗粒蛋白前体与细胞的结合是可饱和的。使用交联剂DSS将生物素化的颗粒蛋白前体与人乳腺癌细胞交联,显示存在交联带,其表观分子量约为190-200kDa,表明推定的受体的表观分子量为100-110kDa(Xia等,Biochem Biophys Res Commun 245(2):539-543,1998)。不结合或不响应颗粒蛋白前体的细胞并未呈现这种交联蛋白复合物。颗粒蛋白前体介导的细胞内信号传导途径包括MAPK ERK 1/2、PI-3激酶和FAK,其导致细胞周期调节蛋白Cyclin D1和Cyclin B的激活(Zanocco-Marani,T.等,Cancer Res 59(20):5331-5340,1999;Lu,R.等,Proc Natl Acad Sci USA 98(1):142-147,2001;He,Z.等,J Mol Med 81(10):600-612,2003;Jones,M.B.等,Clin Cancer Res 9(1):44-51,2003)。已表明,在Her-2过表达的乳腺癌中,颗粒蛋白前体及其受体可以与Her-2受体而非EGF受体发生相互作用,导致Her-2磷酸化,并且随后导致赫赛汀抗性(Kim,W.E.等,Clin Cancer Res 12(14Pt1):4192-4199,2006)。

[0008] 关于颗粒蛋白前体的生存功能,作用机制调查表明,颗粒蛋白前体通过上调bc1-2表达来阻断他莫昔芬的凋亡作用,并且还强烈刺激血管生成因子血管内皮生长因子(VEGF)和血管生成素-2的表达(Tangkeangsirisin,W.等,Carcinogenesis 25(9):1587-1592,2004)。由于颗粒蛋白前体刺激VEGF,进行了调查以确定颗粒蛋白前体是否还刺激参与转移的其他过程。无论是在MCF-7细胞中过表达还是外源添加,颗粒蛋白前体都刺激迁移、基质金属蛋白酶-9的表达以及侵袭(Tangkeangsirisin,W.等,Tangkeangsirisin,W.等,Cancer Res 64(5):1737-1743,2004;Tangkeangsirisin,W.等,Carcinogenesis 25(9):1587-1592,2004)。除MMP-9外,还报道了MMP-2的激活(He,Z.等,J Mol Med 81(10):600-612,

2003)。因此,颗粒蛋白前体刺激了至少部分地通过分别刺激VEGF和基质金属蛋白酶表达而介导的血管生成和肿瘤细胞侵袭性(He,Z.等,Cancer Research62(19):5590,2002;He等,2003;Tangkeangsirisin,W.等,Cancer Res64(5):1737-1743,2004;Tangkeangsirisin,W.等,Carcinogenesis25(9):1587-1592,2004)。这些数据表明颗粒蛋白前体水平升高与转移增加相关。

[0009] 最近,一种命名为AG01的特异性结合人颗粒蛋白前体的人/鼠嵌合单克隆抗体被证明具有体内功效。AG01治疗的携带MDA-MB-231皮下肿瘤的小鼠显示肿瘤生长速度和肿瘤重量显著降低,而体重和器官重量不受影响(Guha,R.等,Breast Cancer Res Treat186(3):637-653,2021)。

[0010] 因此,存在对于抗人颗粒蛋白前体的mAb的需求,特别是特异性结合人颗粒蛋白前体并且可用于在患者中治疗人类癌症的全人源mAb。

发明内容

[0011] 本文提供了与颗粒蛋白前体(PGRN或GP88)结合的单克隆抗体或抗原结合片段。本文所描述的分选的抗体或抗原结合片段以小于或等于100pM的 K_D 与人颗粒蛋白前体(GP88)结合。例如,本文所描述的分选的抗体或抗原结合片段可以与人颗粒蛋白前体以小于或等于10pM、小于或等于1pM、小于或等于0.1pM或小于或等于0.01pM的 K_D 结合。更具体地,本文所描述的分选的抗体或抗原结合片段还可以与人颗粒蛋白前体以小于或等于0.05pM或小于或等于0.4pM的 K_D 结合,如通过下文所描述的Octet测定来测量或如通过本领域技术人员可用的任何测定来测量。本文中的某些mAb不与mAb AGO 1竞争,mAb AGO 1是一种嵌合单克隆抗体,其含有(a)特异性结合人颗粒蛋白前体的小鼠可变区和(b)人恒定区(Guha,R.等,2021)。本文描述了一种分选的抗体或其抗原结合片段,其结合人颗粒蛋白前体并且进一步与本文所描述的mAb 16C11、10B3、10C8或14A6竞争结合。本文描述了一种分选的抗体或其抗原结合片段,其结合与mAb 16C 11、10B3、10C8或14A6相同的表位。具体地,本文中的mAb包括具有表1中所述的氨基酸序列(使用本领域标准的单字母缩写展示)的抗人颗粒蛋白前体抗体。这些可变区可以连接到IgG1/ κ 同种型恒定区。Chothia和Kabat的CDR残基编号系统是本领域众所周知的,并且在Dondelinger,M.等,Front Immunol 9:2278,2018中有进一步描述,并且用于确定下表1中展示的氨基酸序列。编码可变区(V_H 和 V_L)的示例性cDNA序列也如下所展示。所述单克隆抗体可以进一步包含表1中所描述的抗体的完整重链和/或轻链。在一些实施方案中,所述单克隆抗体可包含此类重链和/或轻链的抗原结合域,例如表1中所示的CDR。在一些实施方案中,本公开提供了编码10C8、16C 11、14A6或10B3抗体(或其功能片段,例如其CDR和/或可变区)的核苷酸序列,和/或与下述等效的特定氨基酸序列,其中等同物可以容易地从SEQ ID NO:1-56中任一个的氨基酸序列和表4中展示的信息以及使用本文中公开的功能测定和其他测定而得到,和/或本领域普通技术人员以其他方式可获得的。在一些实施方案中,本公开还提供了表达载体,其包括包含此类核苷酸序列和/或由此类核苷酸序列组成的分选的核酸(在优选实施方案中为SEQ ID NO:57-64中的任一个或其衍生物)以及含有此类表达载体的宿主细胞(例如细胞系)。本文描述的内容涉及编码本文单克隆抗体的重链或轻链的分选的核酸、包括所述分选的核酸的表达载体和含有表达载体的细胞系。本文还描述了通过识别具有表达颗粒蛋白前体的癌细胞的患者并且向所述患者

施用如本文所描述的抗体或抗原结合片段来治疗患者癌症的方法。已知多种人类癌症表达颗粒蛋白前体,包括卵巢癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肺癌、肾癌、前列腺癌、肝细胞癌、子宫癌、膀胱癌、胆管癌、食管癌、胃癌、喉癌、脑癌、白血病和胶质母细胞瘤。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解相同含义。应理解,前述一般描述和以下详细描述二者都仅是示例性和解释性的,并且不是限制性的。附加特征将在以下的说明书部分中阐述,或者可以通过本文描述的实践而习得。在考虑以下示例性实施方案的描述后,前述特征和其他特征对于本领域技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0012] 附图和照片并入本说明书并构成其一部分,其显示了几个实施方案,并且与说明书共同用于解释本文的原理。值得注意的是,AG0 1与本文所述的、包括在图中的c4F 10是相同的mAb。

[0013] 图1是显示在不同mAb浓度下,不同抗颗粒蛋白前体 (PRGN或GP88) 的mAb与MDA-MB-231细胞的流动结合的条形图。

[0014] 图2是显示不同抗颗粒蛋白前体的mAb的MDA-MB-231细胞迁移百分比的条形图。

[0015] 图3是显示在体内肿瘤生长模型中,接受指定抗体治疗后的肿瘤体积的条形图。所述模型使用注射到无胸腺小鼠体内的MDA-MB-231细胞。术语“ip”是指腹膜内注射本文的治疗性mAb。

[0016] 图4是显示使用新型的全人源mAb 10C8治疗小鼠时,肿瘤体积的折线图。

[0017] 发明详述

[0018] 本公开涉及抗体,包括但不限于全人源单克隆抗体,其特异性结合人颗粒蛋白前体 (hu PRGN、或PRGN、或GP88) 并且可用于治疗癌症,例如但不限于乳腺癌 (例如三阴性乳腺癌 (可以使用例如MDA-MB-231细胞系来举例说明)、腺癌表皮生长因子受体 (EGF-R) 乳腺癌 (可以使用例如MDA-MB-468细胞系来举例说明)、基底乳腺癌 (可以使用例如HS578T细胞系来举例说明)、雌激素受体 (ER) Luminal型乳腺癌 (可以使用例如MCF-7细胞系来举例说明)、ER阳性他莫昔芬抗性Luminal型乳腺癌 (可以使用例如TamR MCF-7细胞系来举例说明)、来曲唑抗性Luminal型乳腺癌 (可以使用例如ACLRTUSM细胞系来举例说明))、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、膀胱癌 (可以使用例如T24细胞系来举例说明)、肾癌、肝细胞癌、胆管癌、食管癌、结直肠癌、胃癌、喉癌、肺癌 (例如非小细胞肺癌 (可以使用例如H1299细胞系来举例说明)、肺腺癌 (可以使用例如A549细胞系来举例说明)、脑癌、骨髓瘤/白血病、间皮瘤 (可以使用例如MST0-H11细胞系来举例说明)、表皮样或鳞状细胞癌 (可以使用例如A431细胞系来举例说明),以及本领域技术人员所公认或发现的表达颗粒蛋白前体 (GP88) 的癌症等。在优选实施方案中,示例性细胞系 (例如可以举例说明癌症的细胞系) 是如下的细胞系,其已知并且可以在标准测定中显示表达和/或结合颗粒蛋白前体 (GP88)、被本公开的抗体和/或衍生物结合或通过本公开的抗体和/或衍生物抑制与颗粒蛋白前体 (GP88) 结合、和/或在体外 (例如使用迁移测定) 和/或体内 (例如使用异种移植) 对所述抗体和/或衍生物作出反应。在一些实施方案中,本公开提供了分离的抗体、其一个或多个抗原结合片段,其结合人颗粒蛋白前体 (GP88) 并且进一步与抗体10C8、16C11、14A6或10B3抗体 (或其功能片段,例如其CDR和/或可变区) 竞争结合;其重链和轻链可变区 (参见表1);和/或包含此类抗体的CDR的多肽 (参

见表1);和/或其衍生物(例如包含其保守氨基酸取代(参见例如表4)),其中任何一种均被视为其等同物。具体地,本文中的mAb包括分别具有表1中所述各个CDR的氨基酸序列的抗人颗粒蛋白前体(GP88)抗体,或其变体,如本文所公开的或本领域普通技术人员将以其他方式认识到的。

[0019] 在优选实施方案中,本公开的抗体包含以下氨基酸和核苷酸序列。本公开的优选抗体可包含10C8、16C11、14A6或10B3抗体的互补决定区(CDR)。表1展示了使用Chothia和Kabat方法的10C8、16C 11、14A6或10B3抗体的CDR。

[0020] 表1:单克隆抗体CDR

抗体	10C8	16C11	14A6	10B3
H-CDR1 (Chothia)	GYTLTSY (SEQ ID NO:1)	GFTFSSY (SEQ ID NO:15)	GFTFSNY (SEQ ID NO:29)	GFTLSGY (SEQ ID NO:43)
H-CDR2 (Chothia)	SAYNGN (SEQ ID NO:2)	WYDGSK (SEQ ID NO:16)	WYDGSN (SEQ ID NO:30)	WYDGSD (SEQ ID NO:44)
H-CDR3 (Chothia)	ELLWFGELLS QYYYYGMDV (SEQ ID NO:3)	DRGIGGDY (SEQ ID NO:17)	GHSVSGGDY (SEQ ID NO:31)	DRGAVAGDY (SEQ ID NO:45)
L-CDR1 (Chothia)	RASQNISRWL A (SEQ ID NO:4)	KSSQTVLY SSNNKNYL A (SEQ ID NO:18)	RASQSVNSF LN (SEQ ID NO:32)	KSSQSVLYNS NNKNLLA (SEQ ID NO:46)
L-CDR2 (Chothia)	RASSLET (SEQ ID NO:5)	WASTRES (SEQ ID NO:19)	AASSLQS (SEQ ID NO:33)	WASTRES (SEQ ID NO:47)
L-CDR3 (Chothia)	QQYNSYYT (SEQ ID NO:6)	QQYYSTPY T (SEQ ID NO:20)	QQSYSTPYT (SEQ ID NO:34)	QQYYGTPYT (SEQ ID NO:48)
H-CDR1 (Kabat)	SYGIS (SEQ ID NO:7)	SYAMH (SEQ ID NO:21)	NYGMH (SEQ ID NO:35)	GYGMH (SEQ ID NO:49)
H-CDR2 (Kabat)	WISAYNGNTN YAQKLQG (SEQ ID NO:8)	VIWYDGSK KYNADSVK G (SEQ ID NO:22)	VIWYDGSNK YYADSVKG (SEQ ID NO:36)	VIWYDGSDKN YADSVKG (SEQ ID NO:50)

[0021]

H-CDR3 (Kabat)	ELLWFGELLS QYYYYGMDV (SEQ ID NO:9)	DRGIGGDY (SEQ ID NO:23)	GHSVSGGDY (SEQ ID NO:37)	DRGAVAGDY (SEQ ID NO:51)
抗体	10C8	16C11	14A6	10B3
L-CDR1 (Kabat)	RASQNISRWL A (SEQ ID NO:10)	KSSQTVLY SSNNKNYL A (SEQ ID NO:24)	RASQSVNSF LN (SEQ ID NO:38)	KSSQSVLYNS NNKNLLA (SEQ ID NO:52)
L-CDR2 (Kabat)	RASSLET (SEQ ID NO:11)	WASTRES (SEQ ID NO:25)	AASSLQS (SEQ ID NO:39)	WASTRES (SEQ ID NO:53)
L-CDR3 (Kabat)	QQYNSYYT (SEQ ID NO:12)	QQYYSTPY T (SEQ ID NO:26)	QQSYSTPYT (SEQ ID NO:40)	QQYYGTPYT (SEQ ID NO:54)
V_H	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTLTS YGISWVRQAP GQGLEWMGW ISAYNGNTNYA QKLQGRVTMT TDTSTSTAYM ELRSLRSDDTA VYYCARELLW FGELLSQYYYY GMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:13)	QVQLVESG GGVQVQGR SLRLSCAA SGFTFSSY AMHWVRQ APGKGLEW VAVIWDYG SKKYNADS VKGRFTISR DNSKNTLY LQMNSLRA EDTAVYYC ARDRGIGG DYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:27)	QVQLVESGG GVVQVQGRSL RLSCAASGF TFSNYGMHW VRQAPGKGL EWWAVIWDY GSNKYYADS VKGRFTISR NSKNTLYLQ MNSLRAEDT AVYYCARGH SVSGGDYW GQGTLVTS S (SEQ ID NO:41)	QVQLVESGGG VVQVQGRSLRL SCAASGFTLS GYGMHWVRQ APDKGLEWVA VIWYDGS DKN YADSVKGRFTI SRDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARDRG AVAGDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:55)
V_L	DIQMTQSPSTL SASVGDRVTIT CRASQNISRW LAWYQQKPGK APKLLIFRASSL ETGVPSRFGG SGSGTEFTLI SSLQPDDFAT YYCQQYNSYY TFGQGRLEIK (SEQ ID NO:14)	DIVMTQSP DSLAVSLG ERATINCKS SQTVLYSS NNKNYLAW YQQKPGQP PKLLIYWAS TRESGVPD RFSGGGSG TDFTLTISS LQAEDVAV YYCQQYYS TPYTFGQG TKLEIN (SEQ ID NO:28)	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VNSFLNWFYQ QTPGKAPKL LIYAASSLQS GVPPRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYCQQSYS TPYTFGQGT KLEIN (SEQ ID NO:42)	DIVMTQSPDSL AVSLGERATIN CKSSQSVLYN SNNKNLLAWF RQKPGQPPKL LIYWASTRESG VPDRFSGSGS GTDFTLTISSL QAEDVAVYFC QQYYGTPYTF GQGTKLEIK (SEQ ID NO:56)

[0022]

[0023] 在一些实施方案中,本公开提供了全人源的抗颗粒蛋白前体抗体,其被内化到表达颗粒蛋白前体的细胞中并与曲妥珠单抗竞争结合HER2,以及出于其中和以及内化特性而使用此类抗体的方法。在优选实施方案中,此类抗体包括本文中称为10C8、16C11、1 4A6或10B3的抗体,和/或此类抗体包含的CDR(参见表1);其重链和轻链可变区(参见表1);和/或其衍生物(例如包含保守氨基酸取代(参见例如表4))。在一些实施方案中,本公开提供了全

人源的抗颗粒蛋白前体抗体,其被内化并且不与本文中公开的抗体或衍生物竞争结合颗粒蛋白前体,以及研究其内化特性的方法。在优选实施方案中,此类抗体包括本文中称为10C8、16C 11、14A6或10B3的抗体;包含其重链和轻链可变区(参见表1);和/或包含表1的CDR;和/或其衍生物(例如包含其保守氨基酸取代(参见例如表4))。所述抗体可以进一步包括表1中所示抗体的至少一部分(最优选地包括其CDR)和/或完整重链和/或轻链,和/或其衍生物,其包含表1中所示的CDR。在一些优选实施方案中,此类抗体可具有下文针对抗体或其等同物所示的可变重链(“VH”)或可变轻链(“VL”)多肽(分别为VH或VL“链”)的氨基酸序列,显示于表1中。在一些实施方案中,本文所描述的分离的抗体或抗原结合片段以高达 3.6×10^{-9} 摩尔(M)的 K_D 与人颗粒蛋白前体结合,如通过下文所描述的Octet测定法(参见例如本文实施例部分)测量的,或如通过技术人员可用的任何测定法测量的。在一些实施方案中,本公开提供了编码10C8、16C 11、14A6或10B3抗体的等同物的特定氨基酸序列的核苷酸序列,其可以容易地从表1中的任何氨基酸序列(即SEQ ID NO:1-56)和表4中展示的信息和/或其等同物/衍生物中获得。在优选实施方案中,10C8抗体包含SEQ ID NO:1-3和7-9;或SEQ ID NO:4-6和10-12;和/或SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;或其变体,如本文所公开的或本领域普通技术人员将以其他方式认识到的。在优选实施方案中,16C 11抗体包含SEQ ID NO:15-17和21-23;或SEQ ID NO:18-20和24-26;和/或SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;或其变体,如本文所公开的或本领域普通技术人员将以其他方式认识到的。在优选实施方案中,14A6抗体包含SEQ ID NO:29-31和35-37;或SEQ ID NO:32-34和38-40;和/或SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;或其变体,如本文所公开的或本领域普通技术人员将以其他方式认识到的。在优选实施方案中,10B3抗体包含SEQ ID NO:43-45和49-51;或SEQ ID NO:46-48和52-54;和/或SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56;或其变体,如本文所公开的或本领域普通技术人员将以其他方式认识到的。

[0024] 在一些实施方案中,本公开还提供了表达载体,其包括分离的核酸,所述分离的核酸包含此类核苷酸序列(在如下所示的优选实施方案中,或其衍生物)和/或由其组成,以及含有此类表达载体的宿主细胞(例如细胞系)。在一些实施方案中,本公开提供了使用所述抗体和/或其片段(例如CDR)(除非另有说明,否则在本文中统称为“抗体”)以治疗涉及颗粒蛋白前体的癌症的方法。在一些实施方案中,本公开还提供了通过识别具有表达颗粒蛋白前体的癌细胞的患者并且向所述患者施用如本文所描述的抗体或抗原结合片段来治疗患者中的癌症的方法。已知多种人类癌症表达颗粒蛋白前体,包括但不限于卵巢癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肺癌、肾癌、前列腺癌、肝细胞癌、子宫癌、膀胱癌、胆管癌、食管癌、胃癌、喉癌、脑癌、白血病和胶质母细胞瘤。因此,在一些优选实施方案中,本文提供了全人源单克隆抗体,其特异性结合人颗粒蛋白前体(PGRN)并且可用于治疗癌症,例如乳腺癌。

[0025] 本文还考虑使用抗体的组合,例如本文所描述的一种或多种抗体与本领域普通技术人员可获得的另一种抗体的组合。例如,在一些实施方案中,可以识别所述组合,其提供与仅使用一种或多种抗体而不使用其他抗体获得的结果(例如中和测定)的统计学显著差异。在一些实施方案中,组合表现出叠加活性和/或优选协同活性。在一些实施方案中,组合可包括10C8、16C11、14A6或10B3抗体(或其衍生物)和其他抗体和/或缀合物。组合还可以包括标准治疗中使用的化疗剂,其中一些化疗剂与抗颗粒蛋白前体疗法组合使用。此类组合物的抗体可以是不同的实体,例如两种或更多种不同的单克隆抗体或其衍生物,或者可以

见于同一实体上,例如双功能抗体(包含多种结合特异性的单个抗体或其衍生物)。本文所描述的此类组合还可与一种或多种可能影响免疫细胞功能的其他药剂(如抗CTLA-4的抗体等)组合。本领域普通技术人员将认识到,许多此类组合可适合用于如本文所述的用途。

[0026] 如本文所用的术语“抗体”是指完整抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。完整抗体是包含至少两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白,所述重链和轻链通过二硫键相互连接。每条重链由重链可变区(本文缩写为 V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为 V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。 V_H 和 V_L 区可进一步细分为高可变区域,称为互补决定区(CDR),其间散布更保守的区域,称为框架区(FR)。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR组成,其从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)。术语“嵌合抗体”是一种抗体分子,其中(a)恒定区或其一部分被改变、替代或交换,使得抗原结合位点(可变区)连接到类别、效应子功能和/或物种不同或改变的恒定区,或连接到赋予嵌合抗体新特性的完全不同的分子,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或(b)可变区或其一部分被改变、替代或交换为具有不同或改变的抗原特异性的可变区。例如,可以通过用来自人类免疫球蛋白的恒定区替代小鼠抗体的恒定区来修饰小鼠抗体。由于用人类恒定区替代,所述嵌合抗体可以保留其识别抗原的特异性,同时与原始小鼠抗体相比,其人类抗原性降低。

[0027] 术语“同种型”是指由重链恒定区基因提供的抗体类别(例如IgM、IgE、IgG,例如IgG1或IgG4)。同种型还包括这些类别之一的修饰形式,其中进行了修饰以改变Fc功能,例如,增强或降低效应子功能或与Fc受体的结合。同种型还是指由轻链恒定区提供的抗体类别(例如K、 λ)。抗体可以包含Fc区,所述Fc区包括一个或多个突变,其影响一个或多个抗体特性,例如稳定性、糖基化模式或其他修饰、效应细胞功能、药代动力学等。在一些实施方案中,抗体具有降低的或最小的糖基化。在一些实施方案中,抗体具有消除的或降低的效应子功能。示例性的Fc突变包括但不限于(i)人IgG1 Fc区突变L234A、L235A、G237A和N297A;(ii)人IgG2 Fc区突变A330S、P331S和N297A;以及(iii)人IgG4 Fc区突变S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A(EU编号)。在一些实施方案中,人IgG2 Fc区包含A330S和P331S突变。在一些实施方案中,人IgG4 Fc区包含S288P突变。在一些实施方案中,人IgG4 Fc区包含S288P和L235E突变。靶向细胞表面抗原的抗体可触发与免疫细胞上的Fc受体(FcR)接合相关的免疫刺激和效应子功能。有许多Fc受体对特定类别的抗体具有特异性,包括IgG(γ 受体)、IgE(ϵ 受体)、IgA(α 受体)和IgM(μ 受体)。Fc区与细胞表面的Fc受体结合可触发许多生物反应,包括抗体包被颗粒的吞噬作用(抗体依赖性的细胞介导的吞噬作用,或ADCP)、免疫复合物的清除、杀伤细胞对抗体包被细胞的裂解(抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性,或ADCC)和炎症介质的释放、胎盘转移以及免疫球蛋白产生的控制。额外地,补体的C1成分与抗体的结合可激活补体系统。补体的激活对于细胞病原体的裂解非常重要。然而,补体的激活也可刺激炎症反应,并且也可涉及自身免疫性超敏反应或其他免疫失调。具有降低的或消除的结合某些Fc受体的能力的变体Fc区可用于开发治疗性抗体和Fc融合多肽构建体,其通过靶向、激活或中和配体功能发挥作用,同时不损害或破坏局部细胞或组织。

Fc结构域单体是指包括第二和第三抗体恒定域(例如CH2和CH3)的多肽链。在一些实施方案中,Fc结构域单体还包括铰链域。在一些实施方案中,Fc结构域单体是任何免疫球蛋白抗体同种型,包括IgG、IgE、IgM、IgA和IgD。额外地,在一些实施方案中,Fc结构域单体是任何IgG亚型(例如IgG 1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3和IgG4)。Fc结构域中的额外突变及这些突变的生物学后果是本领域众所周知的,并且可以应用于本文中的抗体。参见例如美国专利申请公开No.20220002434。

[0028] 如本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指完整抗体的一个或多个片段,其保留了特异性结合给定抗原(例如人颗粒蛋白)的能力。抗体的抗原结合功能可以由完整抗体的片段执行。术语抗体的抗原结合部分或抗原结合片段之内涵盖的结合片段的实例包括Fab片段,其为由 V_L 、 V_G 、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段,其为包含通过铰链区处的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;由 V_G 和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的 V_L 和 V_G 结构域组成的Fv片段;由 V_H 结构域或 V_L 结构域组成的单结构域抗体(dAb)片段(Ward等,1989Nature 341:544-546);以及分离的互补决定区(CDR)。进一步地,尽管Fv片段的两个结构域 V_L 和 V_G 由不同的基因编码,但其可以使用重组方法连接,通过人工肽接头使其能够制成单个蛋白质链,其中 V_L 和 V_G 区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv));参见例如,Bird等,1988Science 242:423-426;以及Huston等,1988Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。此类单链抗体包括抗体的一个或多个抗原结合部分或片段。这些抗体片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获取的,并且以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。抗原结合片段也可并入单结构域抗体、大型抗体(maxibodies)、微型抗体(minibodies)、胞内抗体(intrabodies)、双特异性抗体、三特异性抗体、四特异性抗体、v-NAR以及bis-scFv中(参见例如,Hollinger和Hudson,2005,Nature Biotechnology,23,9,1126-1136)。抗体的抗原结合部分可移植到基于多肽(例如III型纤连蛋白(Fn3))的支架中(参见美国专利No.6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽单体)。抗原结合片段可以并入包含一对串联Fv片段(V_H -CH1- V_H -CH1)的单链分子中,其与互补轻链多肽共同形成一对抗原结合区(Zapata等,1995Protein Eng.8(10):1057-1062;和美国专利No.5,641,870)。

[0029] 术语“表位”是指能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团(例如氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于,在变性溶剂存在下前者的结合会丢失,而后者则没有。如本文所用的术语“结合特异性”是指单个抗体结合位点仅与一种抗原决定簇(例如表位)反应(例如与其具有亲和力)的能力。短语与抗体(例如人颗粒蛋白前体结合抗体)“特异性(或选择性)结合”是指结合反应,其在蛋白质及其他生物分子的异质群体中确定同源抗原的存在。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。如本文所用,术语“亲和力”是指抗体和抗原之间在单个抗原位点处的相互作用强度。在每个抗原位点内,抗体“臂”的可变区在多个位点通过弱非共价力与抗原相互作用;其相互作用越多,亲和力越强。如本文所用,术语“ $K_{\text{结合}}$ ”或“ K_a ”旨在指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而如本文所用,术语“ $K_{\text{解离}}$ ”或“ K_d ”旨在指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用,术语“ K_D ”旨在指解离常数,其由 K_d 与 K_a 的比率(即 K_d/K_a)获取并且以摩尔浓度(M)表示。抗体的 K_D 值可使用本领域中得到确认的方法确定。确定抗体 K_D

的方法包括使用生物传感器系统(例如Biacore系统)测量表面等离子共振,或通过溶液平衡滴定(SET)测量溶液中的亲和力。如本文所用,术语“高亲和力”对于抗体或其抗原结合片段(例如Fab片段)一般是指具有 10^{-9} M或更低的 K_D 的抗体或抗原结合片段。

[0030] 术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合颗粒蛋白前体的分离的抗体基本上不含特异性结合颗粒蛋白前体以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合颗粒蛋白前体的分离的抗体可与其他抗原((例如来自人类以外物种的颗粒蛋白前体)具有交叉反应性。此外,分离的抗体可能基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。如本文中所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单分子组成的抗体分子制剂。单克隆抗体组合物对特定表位表现出单一的结合特异性和亲和力。如本文中所用的术语“人类抗体”旨在包括具有可变区的抗体,所述可变区中框架区和CDR区二者均源自人类来源的序列。进一步地,如果抗体含有恒定区,则恒定区也源自此类人类序列,例如人类种系序列或人类种系序列的突变形式。人类抗体可以包括不是由人类序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入的突变)。术语“人类单克隆抗体”是指显示单一结合特异性的抗体,其所具有的可变区中的框架区和CDR区均源自人类序列。在一个实施方案中,人类单克隆抗体由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括(i)从转基因非人类动物(例如转基因小鼠)获取的B细胞,所述动物具有包含人类重链转基因和轻链转基因的基因组(ii)与永生化细胞融合。“人源化”抗体是保留非人类抗体反应性但在人体中的免疫原性较低的抗体。例如,这可以通过保留非人类CDR区并且将抗体的剩余部分替代为其人类对应部分(即恒定区以及可变区的框架部分)来实现。参见例如Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855,1984;Morrison和Oi,Adv.Immunol.,44:65-92,1988;Verhoeyen等,Science,239:1534-1536,1988;Padlan,Molec.Immun.,28:489-498,1991;以及Padlan,Molec.Immun.,31:169-217,1994。人体工程技术的其他实例包括但不限于美国专利No.5,766,886中公开的Xoma技术。

[0031] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸以及随后经修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团结合的 α 碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基硫。此类类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸一般化学结构不同但以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥作用的结构的化学化合物。

[0032] 术语“保守修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列二者。对于特定核酸序列,保守修饰变体是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的核酸,或者当核酸不编码氨基酸序列的情况下,是指基本相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在密码子指定为丙氨酸的每个位置,所述密码子都可被改变为所描述的任何对应密码子,而不改变所编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其为保守修饰变异的一种。本文中每个编码多肽的核酸序列也描述了所述核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了AUG,其通常为蛋氨酸的唯一密码子,以及TGG,其通常为色氨酸的唯一密码子)都可以被

修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异都隐含在每个所描述的序列中。

[0033] 对于多肽序列,“保守修饰变体”包括对多肽序列的单个取代、缺失或添加,其导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表格是本领域众所周知的。此类保守修饰变体是多态变体、物种间同源物和等位基因的补充,并且不排除它们。以下八组包含彼此保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C)、蛋氨酸(M)(参见例如,Creighton,Proteins(1984))。在一些实施方案中,术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。

[0034] 以下使用标准的三个字母或其他氨基酸缩写,在表2中显示了如本领域技术人员理解的,被认为保守和非保守的氨基酸取代:

[0035] 表2:

原始氨基酸残基	原始氨基酸残基的 示例性保守取代	原始氨基酸残基的 优选保守取代
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-二氨基丁酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

[0038] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同”或100%“同一性”百分比是指两个或更多个相同的序列或子序列。当使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查来测量,以在比较窗口或指定区域上进行比较和比对以获得最大一致性时,如果两个序列具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在指定区域内,或者当未指定时在整个序列内,60%同一性,可选地65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一

性),则两个序列是“基本相同的”。可选地,同一性存在于长度至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域内,或存在于长度为100至500个或1000个或更多个核苷酸(或20、50、200个或更多个氨基酸)的区域内。对于序列比较,通常一个序列充当参考序列,测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,如果需要则指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者也可以指定替代的参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。如本文所用的“比较窗口”包括参考连续位置的数量选自20至600个中的任一者的片段,通常为约50至约200个,更通常为约100至约150个,其中在将一个序列与具有相同连续位置数量的参考序列最优比对后可将两个序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。用于比较的序列的最优比对可以通过例如Smith和Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c的局部同源性算法、Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970的同源性比对算法、Pearson和Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988的相似性检索方法、通过这些算法的计算机实现(Wisconsin Genetics软件包中的GAP, BESTFIT, FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), 或通过手动比对和目视检查(参见例如, Brent等, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)) 进行。适合确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别在Altschul等, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977和Altschul等, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990中描述。执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information) 公开获得。该算法首先涉及识别高得分序列对(HSP), 其通过识别查询序列中长度为W的短词,所述短词在与数据库序列中相同长度的词比对时匹配上或满足某个正值阈值分数T。T称为邻域词分数阈值(Altschul等, 同上)。这些初始邻域词命中充当启动搜索的种子,以查找包含它们的更长HSP。词命中沿着每个序列在两个方向上延伸,只要累积比对分数可以增加。对于核苷酸序列,使用参数M(匹配残基对的奖励分数;始终>0)和N(错配残基的惩罚分数;始终<0) 计算累积分数。对于氨基酸序列,使用评分矩阵计算累积分数。当出现以下情况时,停止词命中在各方向上的延伸:累积比对分数从其到达的最大值下降数量X;由于累积了一个或多个负得分残基比对,累积分数变为零或更低;或者到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)默认使用11的字长(W)、10的期望值(E)、M=5、N=-4以及两条链的比较。对于氨基酸序列, BLASTP程序默认使用3的字长、10的期望值(E)和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989), 50的比对(B)、10的期望值(E)、M=5、N=-4以及两条链的比较。BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如, Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787, 1993)。BLAST算法提供的相似性度量之一是最小总概率(P(N)), 其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然出现匹配的概率的指示。例如,如果测试核酸与参考核酸的比较中的最小总概率小于约0.2、或小于约0.01、或小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。两个氨基酸序列之间的百分比同一性也可以使用E. Meyers和W. Miller的算法(*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, 1988) 来确定,该算法已并入ALIGN程序(版本2.0)中,其使用PAM120权重残基表、缺口长度罚分为12并且缺口罚分为4。此外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性也可以使用Needleman和

Wunsch的算法((J.Mol,Biol.48:444-453,1970)来确定,该算法已并入GCG软件包(可在万维网址gcg.com上获得)中的GAP程序中,其使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵,并且缺口权重为16、14、12、10、8、6或4以及长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0039] 除了上述序列同一性百分比之外,两个核酸序列或多肽基本相同的另一指示是,第一核酸编码的多肽与针对第二核酸编码多肽产生的抗体具有免疫交叉反应性,如下所述。因此,例如当两个肽的差别仅在于保守取代时,一个多肽通常与第二多肽基本相同。两个核酸序列基本相同的另一指示是,所述两个分子或其互补体在严格条件下相互杂交,如下所述。而两个核酸序列基本相同的另一指示是,可以使用相同引物来扩增所述序列。

[0040] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段包含一个或多个与SEQ ID NO:1-56(即表1中所示的CDR序列、VH序列和/或VL序列)中至少一个具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,10C8、16C11、14A6或10B3抗体的等同物包括10C8、16C11、14A6或10B3抗体的一个或多个CDR的衍生物,优选地包括其CDR的最多三(3)个保守氨基酸取代(参见表2),前提是所述衍生物保持其与PGRN(优选地为人PGRN(GP88))结合的能力。在一些实施方案中,10C8、16C11、14A6或10B3抗体的等同物包括10C8、16C11、14A6或10B3抗体的一个或多个VH和/或VL链的衍生物,优选地包括其CDR之外的最多十个保守氨基酸取代(参见表2),前提是所述衍生物保持与PGRN(优选地为huPGRN)结合的能力。在优选实施方案中,任何此类取代允许所述抗体与一个或多个可检测标记、一种或多种细胞毒性剂和/或其他有效载荷(例如,以提供双特异性抗体)缀合,或不干扰所述抗体的缀合。

[0041] 术语“核酸”在本文中术语“多核苷酸”互换使用,并且是指无论单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或键的核酸,所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的,其具有与参考核酸相似的结合特性,并且以与参考核苷酸相似的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽核酸(PNA)。除非另有说明,特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰变体(例如简并密码子取代)和互补序列,以及明确指定的序列。具体地,如下详述,简并密码子取代可通过生成其中一个或多个选定(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081,1991;Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608,1985;以及Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98,1994)。

[0042] 在某些实施方案中,可将编码本文所描述的一种或多种抗体的核酸分子插入到一种或多种表达载体中,如下文中更详细地讨论的。在此类实施方案中,所述抗体可由对应于氨基酸序列的核苷酸编码。编码各种氨基酸(AA)的核苷酸的特定组合(密码子)是本领域众所周知的,如本领域技术人员使用的各种参考文献中所描述的(例如Lewin,B.Genes V,Oxford University Press,1994)。编码所述抗体的氨基酸的核苷酸序列可参考例如表3确定。核酸变体可使用编码所述抗体的任何核苷酸组合。

[0043] 表3:编码氨基酸(AA)的密码子

[0044]

AA	密码子	AA	密码子	AA	密码子	AA	密码子
Phe (F)	TTT	Ser (S)	TCT	Tyr (Y)	TAT	Cys (C)	TGT
	TTC		TCC		TAC		TGC
Leu (L)	TTA		TCA	TERM	TAA	TERM	TGA
	TTG		TCG		TAG	Trp (W)	TGG
	CTT	Pro (P)	CCT	His (H)	CAT	Arg (R)	CGT
	CTC		CCC		CAC		CGC
	CTA		CCA	Gln (Q)	CAA		CGA
	CTG		CCG		CAG		CGG
Ile (I)	ATT	Thr (T)	ACT	Asn (N)	AAT	Ser (S)	AGT
	ATC		ACC		AAC		AGC
	ATA		ACA	Lys (K)	AAA	Arg (R)	AGA
Met (M)	ATG		ACG		AAG		AGG
Val (V)	GTT	Ala (A)	GCT	Asp (D)	GAT	Gly (G)	GGT
	GTC		GCC	GAC	GGC		
	GTA		GCA	Glu (E)	GAA		GGA
	GTG		GCG		GAG		GGG

[0045] 编码可变重链 (V_H) 和可变轻链 (V_L) 氨基酸序列的示例性核苷酸 (例如cDNA) 序列如下所示:

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAGCTATGGTATCAGCTGGG
TGCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACA
ATGGTAACACAAATTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGA
CACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACAC
GGCCGTGTATTATTGTGCGAGAGAGTTATTATGGTTTCGGGGAGTTATTATCCCAAT
ACTATTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC
AG (**SEQ ID NO: 57 (10C8 V_H)**);

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAAATATTAGTCGCTGGTTGGCCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACTCCTGATCTTTAGGGCATCTAGTTTAGAA
ACTGGGGTCCCATCAAGGTTTCGGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCACTTATTACTGCCAACAGTATAAT
AGTTATTACTTTTTGGCCAGGGGACCAGGCTGGAGATCAAAC (**SEQ ID NO: 58**

[0046]

(10C8 V_L));

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGCCATGCACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAT
GGAAGTAAAAAATAACAATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGGATAGGTGGGGACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG (**SEQ ID NO: 59 (16C11 V_H)**);

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGG
GCCACCATCAACTGCAAGTCCAGTCAGACTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAA
CTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACT
GGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCGGGCGGGTCTG
GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTA
TACTGTCAACAATATTATAGTACTCCGTACACTTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG
AGATCAACC (**SEQ ID NO: 60 (16C11 V_L)**);

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAT
GGAAGTAATAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGGGCACTCTGTTTCGGGGGGTACTACTGGGG
CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (**SEQ ID NO: 61 (14A6 V_H)**);

[0047] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCGTGAACAGCTTCTTGAATTGGTATCA
GCAGACACCAGGGAAAGCCCCTAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA
AGTGGGGTCCCACCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA
CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTAC
AGTACCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAC (**SEQ ID NO:
62 (14A6 V_L)**);

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCCTCAGTGGCTATGGCATGCACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGACAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAT
GGAAGTGATAAAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGAGGAGCAGTGGCTGGTACTACTGGGG
CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG (**SEQ ID NO: 63 (10B3 V_H)**);

[0048] 和
GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGG
GCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAACCTCAACAATAAGAA
CCTCTTAGCCTGGTTCCGGCAGAAACCGGGACAGCCTCCTAAGTTGCTCATTTAC
[0049] TGGGCGTCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGGTTCAAGTGGCAGCGGGTCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTT
ATTTCTGTCAGCAATATTATGGTACTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG
GAGATCAAAC (**SEQ ID NO: 64 (10B3 V_L)**).

[0050] 本文还考虑了这些核苷酸序列的变异。还考虑了包含这些核苷酸序列的组合物。此类变异编码抗体或包含其CDR或变体的多肽,如本文公开的或本领域普通技术人员将认识到的。本领域普通技术人员理解,编码10C8、16C 11、14A6或10B3抗体的等同物的特定氨基酸序列的核苷酸序列可以容易地从SEQ ID NO:57-64中任何一个的氨基酸序列和表3中展示的信息得到。例如,可以从氨基酸序列GYTLTSY (SEQ ID NO:1)和表3中展示的信息推断出所述氨基酸序列可以由核苷酸序列GGC TAC ACC CTG ACC AGC TAC (SEQ ID NO:65)编码。本领域普通技术人员将理解,可以以相同的方式推断出编码SEQ ID NO:1-56及其衍生

物的核苷酸序列,并且本文考虑了此类核苷酸序列。本公开还提供了表达载体,其包括包含此类核苷酸序列(在优选实施方案中为SEQ ID NO:57-64或其衍生物中的任何一个)和/或由其组成的分离的核酸,以及含有此类表达载体的宿主细胞(例如细胞系)。

[0051] 术语“可操作地连接”是指两个或更多个多核苷酸(例如DNA)片段之间的功能关系。通常地,所述术语是指转录调控序列与转录序列的功能关系。例如,如果启动子或增强子序列在适当的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录,则该启动子或增强子序列可操作地连接到编码序列。一般地,可操作地连接到转录序列的启动子转录调控序列与所述转录序列在物理上相连,即其为顺式作用的。然而,诸如增强子的一些转录调控序列不需要与其增强转录的编码序列在物理上相连或位于附近。

[0052] 如本文所使用的,术语“优化”是指核苷酸序列已被改变以使用在生产细胞或生物体中优选的密码子来编码氨基酸序列,所述生产细胞或生物体一般是真核细胞,例如毕赤细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人类细胞。优化的核苷酸序列经工程化而完全或尽可能多地保留由起始核苷酸序列(也称为“亲本”序列)最初编码的氨基酸序列。本文的优化序列已经工程化而具有在哺乳动物细胞中优选的密码子。然而,本文还设想了这些序列在其他真核细胞或原核细胞中的优化表达。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也称为优化的。

[0053] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,其指氨基酸残基的聚合物。所述术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另有说明,特定多肽序列还隐含地涵盖其保守修饰变体。

[0054] 如本文所使用的,术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如从转有人类免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)或由此制备的杂交瘤中分离的抗体、从转化以表达人抗体的宿主细胞(例如从转染瘤中)分离的抗体、从重组的组合人抗体文库中分离的抗体以及通过任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体,所述方法涉及将全部或部分人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列。此类重组人抗体具有可变区,其中框架区和CDR区源自人种系免疫球蛋白序列。然而,在某些实施方案中,此类重组人抗体可经受体外诱变(或者,当使用针对人Ig序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),并且因此所述重组抗体的 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列是如下的序列,其虽然源自人种系 V_H 和 V_L 序列并与其相关,但可能并不天然存在于人体内抗体种系库中。

[0055] 术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)或“细胞系”是指已引入重组表达载体的细胞。应理解,此类术语不仅旨在指特定受试者细胞,还旨在指此类细胞的后代。由于可能因突变或环境影响在后续世代中发生某些修饰,因此此类后代实际上可能与亲本细胞不相同,但仍包括在如本文使用的术语“宿主细胞”或“细胞系”的范围内。

[0056] 术语“受试者”包括人类和非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物(例如:哺乳动物和非哺乳动物),例如非人类灵长类动物(例如:食蟹猴)、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非另有说明时,术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。

[0057] 如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”任何疾病或病变(例如乳腺癌)在一个实施方案中是指改善疾病或病变(即,减缓或阻止或减少疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一个实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指减轻或改善至少一种身体参数,包括患者可能无法辨别的参数。在又另一实施方案中,“治疗

(treating)”或“治疗(treatment)”是指调节疾病或病变,无论是身体上的(例如稳定可辨别的症状)、生理上的(例如稳定身体参数),还是二者兼有。在又另一实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指预防或延迟疾病或病变的发作或发展或进展。“预防”在涉及本文所述的适应症时,包括与表达颗粒蛋白前体的癌症相关的病症或病变。

[0058] 术语“载体”旨在指能够运输已与其连接的另一个多核苷酸的多核苷酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指可以连接额外DNA片段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,例如腺相关病毒载体(AAV或AAV2),其中可以将额外DNA片段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其被引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)可以在被引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,并且从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般地,重组DNA技术中利用的表达载体经常为质粒形式。在本说明书中,由于质粒是最常用的载体形式,“质粒”和“载体”可互换使用。然而,也旨在包括履行等同功能的其他形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0059] 抗体可以与药物缀合以形成抗体-药物缀合物(ADC)。通常地,ADC包含药物和抗体之间的接头。接头可以是可降解的或不可降解的接头。可降解接头通常在细胞内环境中容易降解,例如接头在靶位点降解,从而将药物从抗体中释放出来。合适的可降解接头包括例如酶促降解的接头,包括可被细胞内蛋白酶(例如溶酶体蛋白酶或内体蛋白酶)降解的含肽基接头,或糖接头,例如可被葡萄糖醛酸酶降解的含葡萄糖醛酸的接头。肽基接头可以包括例如二肽,例如缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸或缬氨酸-丙氨酸。其他合适的可降解接头包括例如,pH敏感接头(例如在小于5.5的pH下水解的接头,例如脘接头)和在还原条件下降解的接头(例如二硫键接头)。不可降解的接头通常在抗体被蛋白酶水解的条件下释放药物。

[0060] 在与抗体连接前,接头具有能与某些氨基酸残基反应的反应性基团,并且是通过该反应性基团实现连接。优选巯基特异性反应性基团,并且包括例如马来酰亚胺化合物、卤代酰胺(例如碘、溴或氯);卤代酯(例如碘、溴或氯);卤代甲基酮(例如碘、溴或氯),苄基卤化物(例如碘、溴或氯);乙烯基砜、吡啶二硫化物;汞衍生物例如3,6-二(汞甲基)二氧杂环己烷,并且反荷离子为醋酸根、氯离子或硝酸根;以及聚亚甲基二甲基硫醚硫代磺酸盐。接头可以包括例如通过硫代琥珀酰亚胺与抗体连接的马来酰亚胺。药物可以是任何细胞毒性、抑制细胞生长或免疫抑制性的药物。在一些实施方案中,接头连接抗体和药物,并且所述药物具有可以与接头结合的官能团。例如,药物可具有可以与接头形成键的氨基、羧基、巯基、羟基或酮基。在药物直接连接到接头的情况下,药物在与抗体连接前具有反应活性基团。有用的药物类别包括例如,抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化剂、抗生素、叶酸拮抗剂、抗代谢物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。典型的细胞毒性药物包括例如,奥瑞他汀、喜树碱、倍癌霉素(duocar-mycins)、依托泊苷、美登素和美登素类化合物(例如DM1和DM4)、紫杉烷、苯二氮革类或含苯二氮革类药物(例如吡咯并[1,4]苯二氮革类(PBD)、吡啶并苯二氮革类和噁唑烷并苯二氮革类和长春花生物碱)。

[0061] 如本文所使用的,药物-接头可用于在一个简单的步骤中形成ADC。在其他实施方案中,双功能接头化合物可用于在两步或多步过程中形成ADC。例如,半胱氨酸残基在第一

步中与接头的反应性部分反应,并且在后续步骤中,接头上的官能团与药物反应形成ADC。通常,选择接头上的官能团以促进与药物部分上的适当反应性基团的特异性反应。作为非限制性实例,基于叠氮化物的部分可用于与药物部分上的反应性炔基特异性反应。所述药物通过叠氮化物和炔基之间的1,3-偶极环加成共价结合到接头上。其他有用的官能团包括例如酮和醛(适合与酰肼和烷氧基胺反应)、膦(适合与叠氮化物反应)、异氰酸酯和异硫氰酸酯(适合与胺和醇反应)以及活化的酯,例如N-羟基琥珀酰亚胺酯(适合与胺和醇反应)。这些以及其他连接策略是本领域技术人员所熟知的,例如在“Bioconjugation Technology”,第二版(Elsevier)中描述的那些。本领域技术人员可以理解,对于药物部分和接头之间的选择性反应,当选择反应性官能团的互补对时,互补对的每个成员都可以用于接头和药物二者。

[0062] 所述抗体可用于治疗癌症(例如乳腺癌,包括三阴性乳腺癌[TNBC])或其他表现出颗粒蛋白前体表达增加的疾病。三阴性乳腺癌是癌细胞不具有雌激素、孕酮和HER2蛋白的受体的情况。术语“中和”应理解为抗体具有抑制或阻断颗粒蛋白前体导致肿瘤发生的任何生物活性的能力,包括其刺激细胞增殖或诱导实验动物和人类中肿瘤生长的能力。通过各种途径向哺乳动物(包括人类)施用有效量的抗颗粒蛋白前体抗体。

[0063] 在一些优选实施方案中,本公开提供了与PGRN(优选地hu PGRN)结合的分离的单克隆抗体,例如人单克隆抗体,并且优选为抗体10C8、16C 11、14A6或10B3(其可以组合使用)。在一些优选实施方案中,所述抗体源自人抗体、人IgG、人IgG1、人IgG2、人IgG2a、人IgG2b、人IgG3、人IgG4、人IgM、人IgA、人IgA 1、人IgA2、人IgD、人IgE、犬抗体、犬IgGA、犬IgGB、犬IgGC、犬IgGD、鸡抗体、鸡IgA、鸡IgD、鸡IgE、鸡IgG、鸡IgM、鸡IgY、山羊抗体、山羊IgG、小鼠抗体、小鼠IgG、猪抗体、大鼠抗体、美洲驼抗体、羊驼抗体、鲨鱼抗体和骆驼抗体。在一些优选实施方案中,本公开提供了本文公开的抗体的衍生物,任选地选自F_{ab}、F_{ab2}、Fab'单链抗体、F_v、单链、单特异性抗体、双特异性抗体、三聚抗体、多特异性抗体、多价抗体、嵌合抗体、犬-人嵌合抗体、犬-鼠嵌合抗体、包含犬Fc的抗体、人源化抗体、人抗体、犬源化抗体、CDR移植抗体、鲨鱼抗体以及纳米抗体。

[0064] 在一些优选实施方案中,本公开提供了本文公开的抗体的衍生物,其包含与其固定地附接的可检测标记,任选地,其中所述可检测标记选自荧光素、DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor647、5-羧基-2,7-二氯荧光素、5-羧基荧光素、5-FAM、羧色胺、5-羧色胺(5-HAT)、6-羧基荧光素(6-FAM)、FITC、6-羧基-1,4-二氯-2',7'-二氯荧光素(TET)、6-羧基-1,4-二氯-2',4',5',7'-四氯荧光素(HEX)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(6-JOE)、Alexa fluor、Alexa fluor 350、Alexa fluor 405、Alexa fluor 430、Alexa fluor 488、Alexa fluor 500、Alexa fluor 514、Alexa fluor 532、Alexa fluor 546、Alexa fluor 555、Alexa fluor568、Alexa fluor 594、Alexa fluor 610、Alexa fluor 633、Alexa fluor 635、Alexa fluor 647、Alexa fluor 660、Alexa fluor 680、Alexa fluor 700、Alexa fluor 750、BODIPY荧光团、BODIPY 492/515、BODIPY 493/503、BODIPY 500/510、BODIPY 505/515、BODIPY 530/550、BODIPY 542/563、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650-X、BODIPY 650/665-X、BODIPY 665/676、FL、FL ATP、FI-神经酰胺、R6G SE、TMR、TMR-X缀合物、TMR-X、SE、TR、TR ATP、TR-X SE、罗丹明、罗丹明110、罗丹明123、罗丹明B、罗丹明B 200、罗丹明BB、

罗丹明BG、罗丹明B extra、5-羧基四甲基罗丹明(5-TAMRA)、5GLD、6-羧基罗丹明6G、丽丝胺、丽丝胺罗丹明B、Phallicidine、鬼笔环肽、罗丹明红、Rhod-2、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、羧基-X-罗丹明(5-ROX)、磺酰罗丹明B can C、磺酰罗丹明G Extra、6-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)、四甲基罗丹明(TRITC)、罗丹明WT、德克萨斯红和德克萨斯红-X。

[0065] 在一些优选实施方案中,本公开提供了本文公开的抗体的衍生物,其包含与其附接的效应物部分,任选地,其中所述效应物部分选自细胞毒性药物、毒素、白喉毒素A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、酚霉素、依诺霉素以及放射化学品,任选地,其包含位于抗体和效应物部分之间的可裂解接头,其中所述可裂解接头将效应物部分释放进细胞中或在细胞内释放。在一些优选实施方案中,本公开提供了编码本公开的抗体的分离的多核苷酸,任选地,其中核酸序列是本文公开的那些,以及包含所述多核苷酸的表达载体和宿主细胞。在一些优选实施方案中,本公开提供了组合物,其包含至少一种本文公开的抗体或衍生物;至少一种编码此类抗体或衍生物的分离的多核苷酸;或至少一种包含此类多核苷酸的表达载体;和/或,至少一种包含此类多核苷酸和/或表达载体的宿主细胞;或其组合;以及药学上可接受的载体。

[0066] 在一些优选实施方案中,本公开提供了用于检测细胞上的PGRN的方法,所述方法包括使测试生物样品接触本公开的抗体或衍生物,并且检测结合所述生物样品或其组分的抗体。在一些实施方案中,所述方法包括比较测试生物样品或其组分的结合量与对照生物样品或其组分的结合量,其中测试生物样品或其组分的结合相对于对照生物样品或其组分的增加表明在测试生物样品中存在表达PGRN(优选地hu PGRN)的细胞(例如其中测试生物样品是哺乳动物细胞、组织或血液)。所述方法可以是体内方法或体外方法。

[0067] 在一些优选实施方案中,本公开提供了用于治疗、预防和/或改善哺乳动物癌症的方法,其包括向哺乳动物施用至少一个有效剂量的药物组合物,所述药物组合物包含本公开的抗体或衍生物。在一些实施方案中,本公开提供了此类抗体,其包含与其附接的细胞毒性效应物部分,任选地,其中所述效应物部分选自细胞毒性药物、毒素、白喉毒素A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、酚霉素、依诺霉素以及放射化学品。在一些实施方案中,此类抗体可以包含位于抗体和效应物部分之间的可裂解接头,其中所述可裂解接头将效应物部分释放进细胞中或在细胞内释放。在一些此类实施方案中,抗体作为抗体-药物缀合物施用。在一些实施方案中,向动物施用多个剂量;和/或,所述抗体以约1至50mg/kg的剂量施用。

[0068] 本文所描述的抗体(例如多肽)和核酸也可以在施用于宿主之前与一种或多种药学上可接受的载体组合。药学上可接受的载体是生物学上或其他方面无不良影响的材料,例如,所述材料可施用于受试者,而不引起任何不良的生物学效应或与包含所述材料的药物组合物的任何其他组分以有害的方式相互作用。将自然地选择载体以使活性成分的任何降解最小化并且使受试者中的任何有害副作用最小化,如本领域技术人员所熟知的。合适的药学载体及其制剂在例如Remington's: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams&Wilkins(2005)中描述。通常地,在制剂中使用适当量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的载体的实例包括但不限于无菌水、盐水、如林格氏液的缓冲溶液和葡萄糖溶液。所述溶液的pH通常为从约5至约8或从约7至约7.5。其他载体包括缓释制剂,例如含有多肽或其片段的固体疏水聚合物的

半透性基质。基质可以是成型制品的形式,例如薄膜、脂质体或微粒。对本领域技术人员显而易见的是,某些载体会更优选,其取决于例如所施用组合物的施用途径和浓度。所述载体是适合向人类或其他受试者施用多肽和/或其片段的载体。除了免疫原性多肽以外,药物组合物还可以包括载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、佐剂、免疫刺激剂。药物组合物还可以包括一种或多种活性成分,例如抗微生物剂、抗炎剂和麻醉剂。药物组合物可以在含有常规药学上可接受的载体、佐剂和运载剂的剂量单位制剂中,口服、胃肠外、通过吸入喷雾、直肠、结内(intranodal)或局部地施用。如本文所使用的术语“药学上可接受的载体”或“生理学上可接受的载体”是指一种或多种适合于完成或增强核酸、多肽或肽作为药物组合物的递送的制剂材料。“药物组合物”是包含治疗有效量的核酸或多肽的组合物。术语“有效量”和“治疗有效量”各自指用于观察所需治疗效果(例如消除表达PGRN的细胞,例如表达PGRN的癌性细胞)的抗体、核酸等的量。

[0069] 还提供了用于治疗哺乳动物宿主中的一种或多种疾病症状(例如癌症)的方法,包括向哺乳动物施用至少一个或多个有效剂量的本文所描述的一种或多种抗体(和/或其衍生物)。在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体或其片段或衍生物,其包含抗体10C8、16C11、14A6或10B3的CDR和/或可变区的组合中的一种或多种;表1中所示的氨基酸序列和/或由本文公开的或本领域普通技术人员可识别的核苷酸序列编码的氨基酸序列;和/或其取代的衍生物和/或其片段;以及在一些实施方案中其保守取代的变体。所述一种或多种抗体可以以约1至约50mg/kg、约1至约30mg/kg或约5至约30mg/kg的剂量(例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35或40mg/kg中的任一种)施用。在某些实施方案中,所述一种或多种抗体可以以约10mg/kg向哺乳动物施用一次或多次(例如皮内、静脉内、口服、直肠)。当施用多个剂量时,所述剂量可在每个剂量中包含约相同或不同量的抗体。所述剂量也可在时间上以相同或不同的间隔彼此分开。例如,所述剂量可分开约6、12、24、36、48、60、72、84或96小时的任一者、一周、两周、三周、一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、十二个月、1.5年、两年、三年、四年、五年或这些时间段的任一者之前、之后和/或之间的任何时间段。在一些实施方案中,所述抗体可与其他药剂(例如抗感染剂和/或化疗剂)联合施用。此类其他药剂可与抗体同时施用,或在不同时间和/或频率施用。如本领域普通技术人员可轻易地确定的,此类方法的其他实施方案也会是合适的。

[0070] 在一些优选实施方案中,本公开提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:a) 分别包含CDR序列SEQ ID NO:1、2和3的重链可变区和分别包含CDR序列SEQ ID NO:4、5和6的轻链可变区;b) 分别包含CDR序列SEQ ID NO:7、8和9的重链可变区和分别包含CDR序列SEQ ID NO:10、11和12的轻链可变区;c) 分别包含CDR序列SEQ ID NO:13、14和15的重链可变区和分别包含CDR序列SEQ ID NO:16、17和18的轻链可变区;d) 分别包含CDR序列SEQ ID NO:19、20、21的重链可变区和分别包含CDR序列SEQ ID NO:22、23和24的轻链可变区;e) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:1-3和7-9;f) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:4-6和10-12;g) 重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;h) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:15-17和21-23;i) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:18-20和24-26;j) 重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;k) 重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID

NO:29-31和35-37;1)重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:32-34和38-40;m)重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;n)重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:43-45和49-51;o)重链和轻链可变区,其分别包含CDR序列SEQ ID NO:46-48和52-54;p)重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56;或a)-p)中任一项的衍生物;其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人颗粒蛋白前体。在一些优选实施方案中,本公开提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:a)分别包含SEQ ID NO:25的重链可变区和包含SEQ ID NO:27的轻链可变区;b)分别包含SEQ ID NO:29的重链可变区和包含SEQ ID NO:31的轻链可变区;c)分别包含SEQ ID NO:33的重链可变区和包含SEQ ID NO:35的轻链可变区;或d)分别包含SEQ ID NO:37的重链可变区和包含SEQ ID NO:39的轻链可变区。在一些优选实施方案中,抗体被内化到在体外和/或体内的表达hu PGRN的细胞中。在一些优选实施方案中,抗体与曲妥珠单抗竞争结合到细胞上的hu PGRN受体。在一些优选实施方案中,抗体不与曲妥珠单抗竞争结合到细胞上的hu PGRN受体。在一些优选实施方案中,抗体是10C8、16C11、14A6和10B3,或其衍生物。在一些优选实施方案中,本公开提供了此类抗体的组合。在一些优选实施方案中,抗体是分离的单克隆抗体。在一些优选实施方案中,抗体是人单克隆抗体。在一些优选实施方案中,抗体源自人抗体、人IgG、人IgG1、人IgG2、人IgG2a、人IgG2b、人IgG3、人IgG4、人IgM、人IgA、人IgA1、人IgA2、人IgD、人IgE、犬抗体、犬IgGA、犬IgGB、犬IgGC、犬IgGD、鸡抗体、鸡IgA、鸡IgD、鸡IgE、鸡IgG、鸡IgM、鸡IgY、山羊抗体、山羊IgG、小鼠抗体、小鼠IgG、猪抗体、大鼠抗体、美洲驼抗体、羊驼抗体、鲨鱼抗体和骆驼抗体。在一些优选实施方案中,抗体衍生物选自F_{ab}、F_{ab2}、Fab'单链抗体、F_v、单链、单特异性抗体、双特异性抗体、三聚抗体、多特异性抗体、多价抗体、嵌合抗体、犬-人嵌合抗体、犬-鼠嵌合抗体、包含犬Fc的抗体、人源化抗体、人抗体、犬源化抗体、CDR移植抗体、鲨鱼抗体以及纳米抗体。在一些优选实施方案中,抗体或衍生物包含与其固定地附接的可检测标记,任选地,其中所述可检测标记选自荧光素、DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647、5-羧基-2,7-二氯荧光素、5-羧基荧光素、5-FAM、羟色胺、5-羟色胺(5-HAT)、6-羧基荧光素(6-FAM)、FITC、6-羧基-1,4-二氯-2',7'-二氯荧光素(TET)、6-羧基-1,4-二氯-2',4',5',7'-四氯荧光素(HEX)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(6-JOE)、Alexa fluor、Alexa fluor 350、Alexa fluor 405、Alexa fluor 430、Alexa fluor 488、Alexa fluor 500、Alexa fluor 514、Alexa fluor 532、Alexa fluor 546、Alexa fluor 555、Alexa fluor 568、Alexa fluor 594、Alexa fluor 610、Alexa fluor 633、Alexa fluor 635、Alexa fluor 647、Alexa fluor 660、Alexa fluor 680、Alexa fluor 700、Alexa fluor 750、BODIPY荧光团、BODIPY 492/515、BODIPY 493/503、BODIPY 500/510、BODIPY 505/515、BODIPY 530/550、BODIPY 542/563、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650-X、BODIPY 650/665-X、BODIPY 665/676、FL、FL ATP、FI-神经酰胺、R6G SE、TMR、TMR-X缀合物、TMR-X、SE、TR、TR ATP、TR-X SE、罗丹明、罗丹明110、罗丹明123、罗丹明B、罗丹明B 200、罗丹明BB、罗丹明BG、罗丹明B extra、5-羧基四甲基罗丹明(5-TAMRA)、5GLD、6-羧基罗丹明6G、丽丝胺、丽丝胺罗丹明B、Phallicidine、鬼笔环肽、罗丹明红、Rhod-2,6-羧基-X罗丹明(ROX)、羧基-X罗丹明(5-ROX)、磺酰罗丹明B can C、磺酰罗丹明G Extra、6-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)、四甲基罗丹明(TRITC)、罗丹明WT、德克萨斯红和德克萨斯红-X。在一些优选实施方案中,抗体或

衍生物包含与其附接的效应物部分,任选地,其中所述效应物部分选自细胞毒性药物、毒素、白喉毒素A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、酚霉素、依诺霉素以及放射化学品。在一些优选实施方案中,抗体或衍生物可包含位于抗体和效应物部分之间的可裂解接头,其中所述可裂解接头将效应物部分释放进细胞中或在细胞内释放。在一些优选实施方案中,本公开提供了编码本文公开的抗体的分离的多核苷酸,任选地,其中核酸序列是SEQ ID NO:57-64中的至少一个。在一些优选实施方案中,所述多核苷酸可以是包含一个或多个此类多核苷酸的表达载体。在一些优选实施方案中,本公开提供了包含此类分离的多核苷酸和/或表达载体的宿主细胞。在一些优选实施方案中,本公开提供了组合物,其包含任何此类至少一种抗体和/或衍生物;至少一种分离的其编码多核苷酸;至少一种包含和/或编码这些的表达载体;和/或,至少一种包含这些的宿主细胞;或其任意组合;以及药学上可接受的载体。

[0071] 在一些优选实施方案中,本公开提供了用于检测细胞上的hu PGRN(GP88)的方法,所述方法包括使测试生物样品接触本公开的抗体或衍生物,并且检测结合所述生物样品或其组分的所述抗体或衍生物。在一些优选实施方案中,所述细胞可选自乳腺癌、腺癌表皮生长因子受体(EGF-R)乳腺癌、基底乳腺癌、雌激素受体(ER) Luminal型乳腺癌、ER阳性他莫昔芬抗性Luminal型乳腺癌、来曲唑抗性Luminal型乳腺癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、表皮样癌、鳞状细胞癌、食管癌、胃癌、肝细胞癌、肾脏/肾癌(kidney/renal cancer)、喉癌、肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、间皮瘤、骨髓瘤/白血病、卵巢癌、前列腺癌以及子宫癌细胞。在一些优选实施方案中,所述方法包括比较测试生物样品或其组分的结合量与对照生物样品或其组分的结合量,其中测试生物样品或其组分的结合相对于对照生物样品或其组分的增加表明在测试生物样品中存在表达hu PGRN的细胞。在一些优选实施方案中,测试生物样品可以是哺乳动物细胞、组织或血液。在一些优选实施方案中,所述方法是体内方法或体外方法。

[0072] 在一些优选实施方案中,本公开提供了用于治疗、预防和/或改善哺乳动物癌症的方法,其包括向哺乳动物施用至少一个有效剂量的药物组合物,所述药物组合物包含本公开的抗体或衍生物。在一些优选实施方案中,所述癌症选自乳腺癌、腺癌表皮生长因子受体(EGF-R)乳腺癌、基底乳腺癌、雌激素受体(ER) Luminal型乳腺癌、ER阳性他莫昔芬抗性Luminal型乳腺癌、来曲唑抗性Luminal型乳腺癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、表皮样癌、鳞状细胞癌、食管癌、胃癌、肝细胞癌、肾癌、喉癌、肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、间皮瘤、骨髓瘤/白血病、卵巢癌、前列腺癌以及子宫癌。在一些优选实施方案中,所述抗体包含与其附接的细胞毒性效应物部分,任选地,其中所述效应物部分选自细胞毒性药物、毒素、白喉毒素A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、酚霉素、依诺霉素以及放射化学品。在一些优选实施方案中,所述抗体还包含位于抗体和效应物部分之间的可裂解接头,其中所述可裂解接头将效应物部分释放进细胞中或在细胞内释放。在一些优选实施方案中,所述抗体作为抗体-药物缀合物施用。在一些优选实施方案中,向动物施用多个剂量;和/或,所述抗体以约1至50mg/kg的剂量施用。

[0073] 在一些优选实施方案中,本公开提供了用于检测细胞内或细胞上hu PGRN(GP88)表达的试剂盒,所述试剂盒包含前述权利要求中任一项的抗体或衍生物以及使用说明。在一些优选实施方案中,所述细胞选自乳腺癌、腺癌表皮生长因子受体(EGF-R)乳腺癌、基底

乳腺癌、雌激素受体 (ER) Luminal型乳腺癌、ER阳性他莫昔芬抗性Luminal型乳腺癌、来曲唑抗性Luminal型乳腺癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、表皮样癌、鳞状细胞癌、食管癌、胃癌、肝细胞癌、肾脏/肾癌、喉癌、肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、间皮瘤、骨髓瘤/白血病、卵巢癌、前列腺癌以及子宫癌细胞。在一些优选实施方案中,所述抗体或衍生物为冻干形式。

[0074] 以下实施例涉及本文所描述的单克隆抗体。

[0075] 实施例1:抗人颗粒蛋白前体的高亲和力全人源单克隆抗体的发现和分离

[0076] 用人重组组氨酸标记的全长颗粒蛋白前体对人源化小鼠TC-mAbTM进行免疫。这些小鼠的特征已被公开 (Moriwak1, A. et al., Exp Cell Res 390 (2):111914, 2020)。产生人Ab的Tc小鼠 (TC-mAb小鼠) 在小鼠Ig敲除背景下稳定地维持一种来源于小鼠的工程化染色体,所述染色体包含完整的人Ig重链和K链基因座。携带具有人免疫球蛋白 (Ig) 基因座的微型染色体的转染色体 (Tc) 小鼠在用感兴趣的抗原免疫时可有助于开发全人源治疗性单克隆抗体 (Abs)。在这种情况下,TC-mAb小鼠用人重组颗粒蛋白前体免疫。用固定在镍板上的人颗粒蛋白前体通过EIA检查来自免疫小鼠的血清的滴度,用HRP缀合的山羊抗人Fc二抗进行(颗粒蛋白前体)EIA。抗颗粒蛋白前体滴度最高的小鼠用于收集脾脏和淋巴结B细胞,所述细胞通过电穿孔与小鼠骨髓瘤HL-1细胞融合。将融合的杂交瘤单细胞接种在10cm组织培养板中的半固体杂交瘤培养基D中。11天后,从半固体培养基板中挑出1,726个单杂交瘤克隆,并且转移到杂交瘤培养基E中的96孔板(每孔一个克隆)。3天后,用颗粒蛋白前体EIA测定杂交瘤克隆的培养基。所述测定提供了大量克隆。184个克隆的OD₆₅₀>3.0,387个克隆的OD₆₅₀在3.0和2.0之间,423个克隆的OD₆₅₀在2.0和1.0之间,以及334个克隆的OD₆₅₀在1和0.5之间。将OD₆₅₀>3.0的前184个克隆转移到48孔板中,以通过颗粒蛋白前体EIA进行确证筛选,如上文所描述。170个克隆被确认为强阳性。将这些克隆一式两份转移到培养基E中的6孔板中。将细胞在适当的培养条件下低温保存以在液氮中长期储存,同时收集并储存含有分泌的Ig的培养基以备将来评估和选择感兴趣的杂交瘤。从这些克隆中,制备了120个产生抗体的克隆。

[0077] 实施例2.抗颗粒蛋白前体单克隆抗体克隆的进一步的抗原结合特性和选择

[0078] 体外增殖测定。通过跟踪对ERK1/2 (p-ERK1/2) 和AKT (p-AKT) 磷酸化的抑制,测定来自所选定克隆的培养基抑制TNBC细胞MDA-MB-231增殖的能力,ERK1/2 (p-ERK1/2) 和AKT (p-AKT) 的磷酸化是细胞(包括癌细胞)增殖生存路径中众所周知的信号分子。Guha等人在2021年描述了该测定。使用该测定,结果表明,添加AG01会以剂量依赖性方式抑制ERK1/2 (MAP激酶或MAPK) 和生存信号分子p-AKT的磷酸化。经EIA检测与颗粒蛋白前体结合呈阳性的所有全人源杂交瘤克隆均在此信号分子磷酸化测定中用MDA-MB-231三阴性乳腺癌细胞进行了检测。根据这些测定,与作为对照的用人IgG处理的对照细胞相比时,45个克隆显示出对p-ERK1/2、p-AKT或二者的抑制活性的水平>50%。重复测定进一步将显露p-ERK1/2抑制的克隆数量缩小至38个。所述结果在表4中显示。

[0079] 表4:克隆的单克隆抗体的活性

[0080]

克隆	pERK1/2	pAKT
对照	100	100
4F10	20	10
6F6	100	10
7E 6	100	10
7G1	90	50
8F7	50	80
8G6	120	50
8H2	200	50

[0081]

9D2	100	
9E 12	80	
9H3	100	20
9G7	100	
9G8	80	
10B1	100	
10B3	10	50
10C7	10	10
10C8	8	20
10D4	150	
10D7	120	
10D8	100	
10F10	10	
10F5	10	
10H12	10	10
10H6	20	20
10H9	100	
11A11	80	
11B7	80	
11C1	90	20
11C10	20	20
11D10	20	50
11E 2	10	50
11E 8	300	
11G7	100	
11G9	75	
11H7	100	
12A3	100	
12A9	50	
12B9	150	
12C3	120	
12D1	10	50
12E 12	8	10
12E 2	10	10
12G1	8	10
13A2	100	
13B10	75	
13B7	100	
13D4	100	
13F1	300	
13F2	300	

[0082]

13G1	300	
13G7	50	8
13H2	300	
13H7	300	
13H9	200	
14A6	50	8
14A9	50	20
14B1	100	
14B5	100	
14B9	50	50
14D8	20	50
14E 5	50	20
1EF12	100	10
14F4	80	
14F6	200	
14G4	200	
15a9	200	
15B10	100	
15C5	100	
15C8	80	50
15C9	200	
15D1	100	50
15D10	100	
15D5	200	
15E 1	200	
15E 5	100	10
15F2	200	
15F5	100	
16F6	100	
15G11	130	
15G5	200	
15H1	200	
15H5	50	200
15H6	50	10
15H8	200	
15H7	50	
16A6	100	
16A8	100	50
16B1	100	50
16B11	100	
16B2	200	

	16B3	200	
	16C11	80	40
	1E 2	300	
	16E 4	300	
	16G2	50	10
	16G9	200	
	16H1	200	
	16H5	100	40
	16G4	300	
	16G5	300	
	17B12	300	
	17F5	300	
	17G12	300	
	17G3	300	
	18B12	300	
	18B5	300	
[0083]	18B6	100	50
	18B9	300	
	18C1	300	
	18C11	300	
	18C6	100	50
	18D1	300	
	18D9	300	
	18E 1	300	
	18E 5	300	
	18F12	100	
	18F6	200	10
	18F8	200	
	18F8	200	
	18G11	200	
	18G2	200	
	18G5	50	50
	18G9	100	10

[0084] 产生以 >50% 抑制 pERK1/2 和/或 p-AKT 的抗体的克隆以灰色突出显示。随后研究这 45 个克隆以剂量依赖性方式抑制颗粒蛋白前体与 MDA-MB-231 细胞结合的能力。

[0085] 通过流式细胞术的颗粒蛋白前体结合。在 INTELLICYT 流式细胞仪上, 使用其中包含的说明书进行结合测定。进行了额外的结合测定, 包括抗颗粒蛋白前体抗体抑制颗粒蛋白前体与两种细胞系 (人胚肾 HEK-293 和 TNBC MDA-MB-231) 以及几种其他癌细胞 (例如非小细胞癌细胞系 H1299) 结合的能力。在测定的 45 个 mAb 中, 11 个克隆 (在表 5 中以粗体显示) 产生了能够以剂量依赖性方式抑制颗粒蛋白前体结合的抗体。

[0086] 表 5: MDA-MB-231 细胞上颗粒蛋白前体流式结合的抑制

[0087]

克隆	%对照	克隆	%对照
hIgG	100	hIgG	100
c4F10	83	14A6	116
6F6	130	14A9	115
7E 6	104	14B9	45
7G1	187	14D8	140
8F7	120	14E 5	121
8G6	116	14F12	149
8H2	145	15C8	123
10B3	62	15D1	144
10C7	91	15E 5	148
10C8	55	15H5	119
10F10	78	15H6	71
10F5	76	15H7	110
10H12	121	16A8	111
10H6	122	16B1	135
11C1	129	16C11	60
11C10	85	16G2	130
11D10	82	16H5	138
11E 2	136	18B6	108
12D1	144	18C6	125
12E 12	126	18F5	176
12E 2	155	18G5	53
12G1	140	18G9	141
13G7	126	9H3	48

[0088] 几种能够在体外测定中阻断p-ERK1/2的抗体对颗粒蛋白前体结合具有很小的抑制活性,或甚至刺激颗粒蛋白前体与细胞的结合。通过组合几种测定进一步筛选后,检测了四种抗体。图1显示了人抗颗粒蛋白前体抗体以剂量依赖性方式抑制颗粒蛋白前体与TNBC MDA-MB-231细胞的结合,并且具有高于AG0 1的活性,但14A6除外,其加入在本测定中导致了颗粒蛋白前体结合的增加。

[0089] 通过Octet的结合亲和力确定。OctetRed96 BLI技术用于检查选定的全人源抗体与颗粒蛋白前体的结合特性。本文简要描述了所述方法。测定在25°C下进行。通过重复3次将传感器浸入再生缓冲液中、然后浸入中和缓冲液(PBS)中的循环,对预水合(1小时)的抗人Fc捕获(AHC)传感器进行预处理。抗颗粒蛋白前体mAb在预处理的生物传感器上以20 μ g/mL被捕获360秒。然后将传感器浸入类似于颗粒蛋白前体稀释剂(PBS)的基线缓冲液中。随后将传感器浸入如所示的含有颗粒蛋白前体的孔中420秒。解离步骤在测定缓冲液(PBS)中进行600秒。使用以上描述的实验条件,基于 K_{on} 和 K_{off} 确定 K_D 。表6显示了选定mAb的 K_D 。具体地,mAb 16C11、10B3、10C8和14A6具有小于 10^{-9} M的 K_D ,其中10C8的亲和力最高,其 K_D 为 4×10^{-12} M。基于Iso-Gold Rapid Isotyping确定这四种mAb含有IgG1/ κ 同种型。

[0090] 表6:使用Octet测定的选定单克隆抗体的 K_D *

所加载的 mAb ID	响应	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	全 X ²	全 R ²
16C11	0.9324	4.76 x 10 ⁻¹⁰	1.52 x 10 ⁵	7.21 x 10 ⁵	全 X ²	全 R ²
10B3	0.7975	1.36 x 10 ⁻¹⁰	8.68 x 10 ⁴	1.19 x 10 ⁵	0.0569	0.9961
10C8	0.8898	4.13 x 10 ⁻¹²	1.30 x 10 ⁵	5.38 x 10 ⁷	0.0078	0.9995
10C7	0.6235	1.07 x 10 ⁻⁹	8.65 x 10 ⁴	9.28 x 10 ⁵	0.038	0.9976
18G9	0.027	1.32 x 10 ⁻⁵	7.82 x 10 ²	1.04 x 10 ²	0.0681	0.4423
14A6	0.6397	5.87 x 10 ⁻¹⁰	5.03 x 10 ⁴	2.95 x 10 ⁵	0.0014	0.9999
14F12	0.9831	5.23 x 10 ⁻⁹	1.53 x 10 ⁵	7.98 x 10 ⁴	0.0446	0.9967

[0092] *传感器类型:AHC;抗体浓度:50nM;分析物:huPGRN

[0093] 结合AG01表位的单克隆抗体。进行实验以确定任何选定的全人源抗体是否与AG01竞争结合颗粒蛋白前体,以这种方式确定这些mAb是否具有与mAb AG01的表位相似或重叠的表位。这根据Dafferner, A.等, Chem Res Toxicol 30:1897-1910, 2017中描述的方法,在OctetRed96上使用生物膜干涉技术。对每个克隆在OctetRed96上针对AG01进行测试,并且测试与颗粒蛋白前体的串联单克隆共结合。这些测定基本上是通过在AHC传感器上捕获AG01或在HIS1K传感器上捕获颗粒蛋白前体,并且测试所测试抗体的配对或阻断能力来进行的。结果表明,四个选定的全人源颗粒蛋白前体抗体克隆与被AG01先占据的颗粒蛋白前体结合而不受任何干扰。这些数据表明,四种选定的抗体16C11、11C8、10B3和14A6结合的表位与AG01结合的表位不同。使用Myszka, D.等 (Biophys J 75:583-59, 1998) 描述的方法,通过使用Biacore对AG01和mAb 16C11进行详细的表面等离子共振分析,证实了这些结果。

[0094] 实施例3:抗颗粒蛋白前体的单克隆抗体的功能活性

[0095] 迁移试验。遵循Guha等人于2021年中描述的迁移试验。在Transwell室迁移试验中检查了11个克隆,以选择与作为阳性对照的AG01相比,表现出以剂量依赖性方式对TNBC MDA-MB-231细胞迁移的最高抑制的克隆。进一步保留了六个克隆,因其具有以剂量依赖性方式抑制MDA-MB-231细胞迁移的能力。图2中的结果表明,这些mAb可以抑制MDA-MB-231细胞的迁移,其水平与AG01相当甚至更高。具体地,以10μg/mL添加的全人源mAb以30%至50%抑制了MDA-MB-231细胞的迁移,而AG01需要50μg/mL的浓度 (Guha等人, 2021年) 以达到类似的迁移抑制水平。

[0096] 实施例4:抗颗粒蛋白前体的单克隆抗体对体内肿瘤发生的影响

[0097] 随后,在体内检查这些具有最高亲和力的mAb (16C11、10C8、10B3和14A6) 阻断雌性无胸腺裸鼠侧腹皮下注射的MDA-MB-231细胞肿瘤生长的能力。已表明,颗粒蛋白前体表达与肿瘤发生的增加有关 ((Tangkeangsirisin, Hayashi等, 2004), 并且携带TNBC肿瘤的小鼠在用抗颗粒蛋白前体抗体AG01治疗时表现出肿瘤生长的抑制 (Guha等, 2021)。因此,我们使用Guha等, 2021中描述的方法检查了全人源抗颗粒蛋白前体抗体抑制TNBC细胞系MDA-MB-231肿瘤生长的能力。在这些裸鼠中测试了三种抗体。所有抗体均以5mg/kg的浓度测定。无胸腺雌性小鼠皮下注射10⁶个MDA-MB-231细胞。当肿瘤达到100mm³时,将小鼠以每组七只动物随机分为各个实验组。每周两次以5mg/kg的剂量腹膜内注射抗体。在注射抗体之前,每周两次使用卡尺确定肿瘤大小,并且由肿瘤的尺寸确定肿瘤体积。

[0098] 图3显示了与AG01阳性对照和人IgG阴性对照相比时,腹膜内注射全人源抗体对在治疗第25天确定的肿瘤体积的影响。数据显示,与用作阳性对照的AG01相比时,选定抗体

表现出不同程度的肿瘤抑制。这些数据表明,四种所选抗体能够以与mAb AGO 1相似或更高的功效抑制TNBC细胞系的肿瘤生长。

[0099] 基于这些数据和mAb 10C8的结合数据,在整个治疗过程中进一步比较了mAb 10C8和AGO 1的抗肿瘤活性。图4中的图显示了10C8在整个治疗过程中对肿瘤生长的抑制。在5mmg/kg的相同剂量下,10C8具有比AG01高两倍的肿瘤抑制活性 ($P<0.006$)。与作为对照的人IgG相比时,每周注射两次10C8以50%抑制了肿瘤生长。

[0100] 考虑到本文提供的说明书和教导,其他实施方案对本领域技术人员是显而易见的。说明书和实施例仅应被视为示例性的,本文的真实范围和精神由以下权利要求书指明。

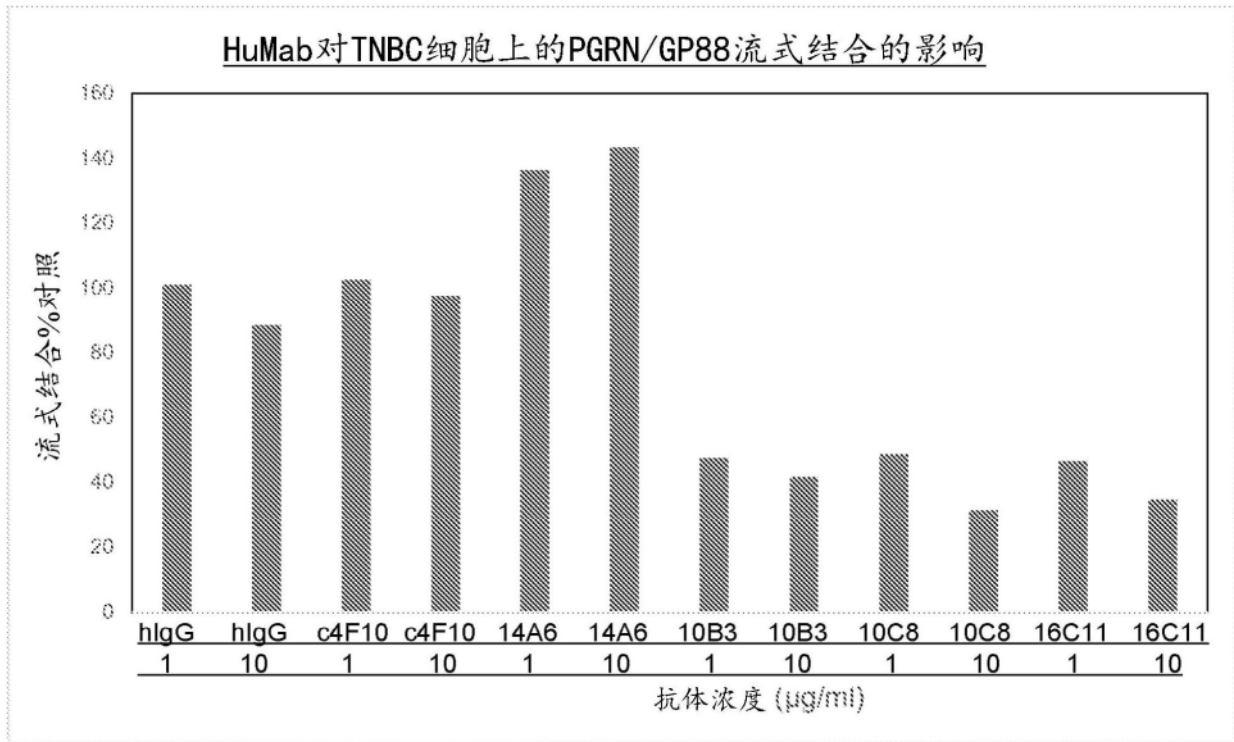


图1

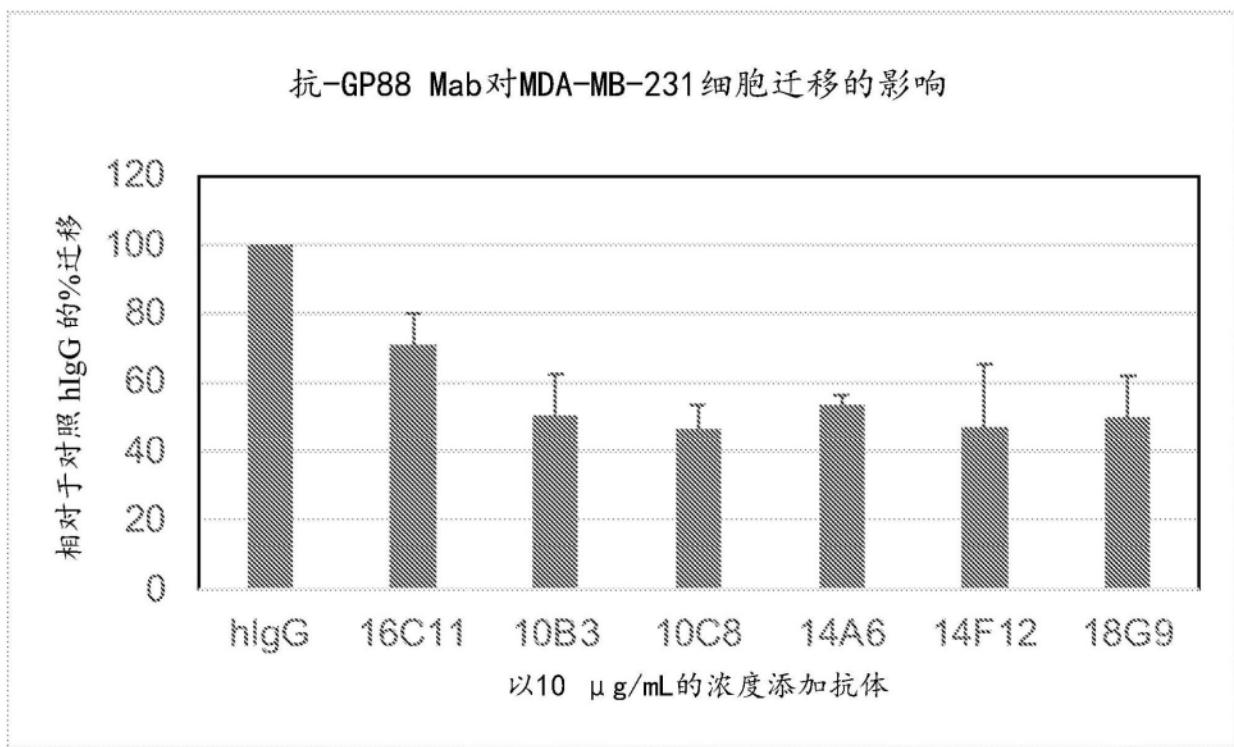


图2

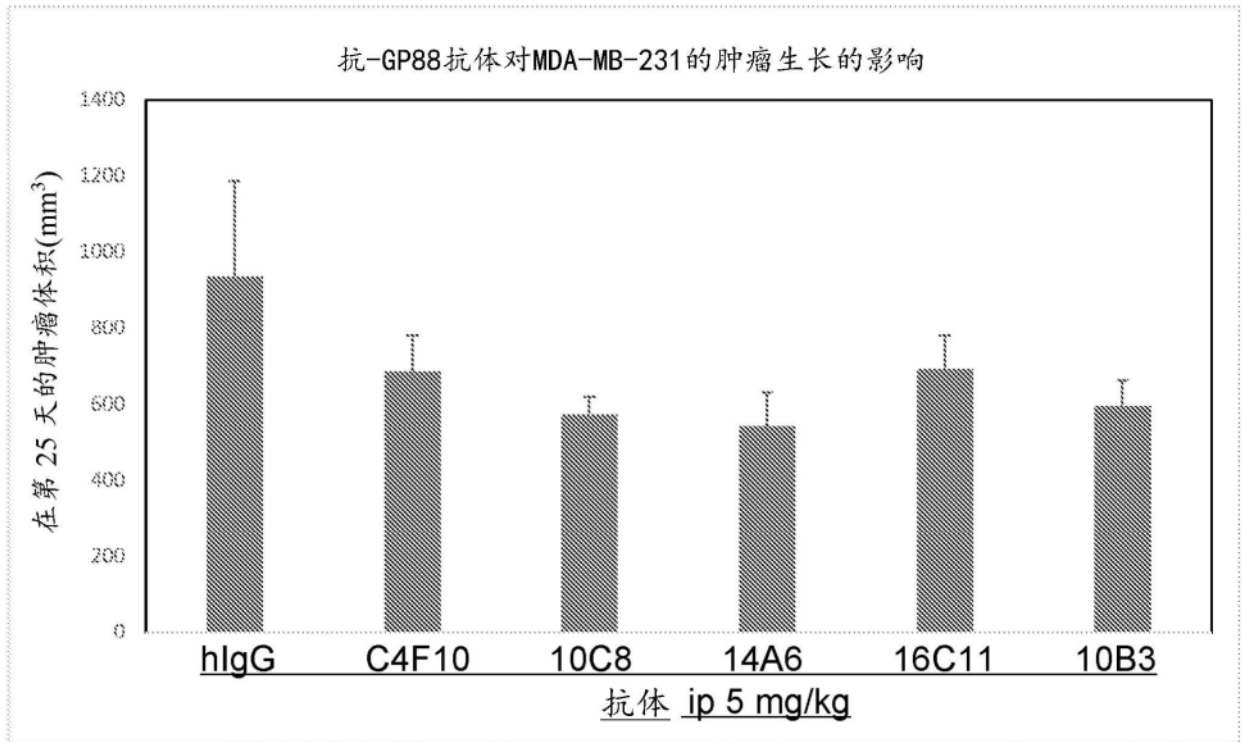


图3

抗-GP88 mAb对TNBC肿瘤生长的影响

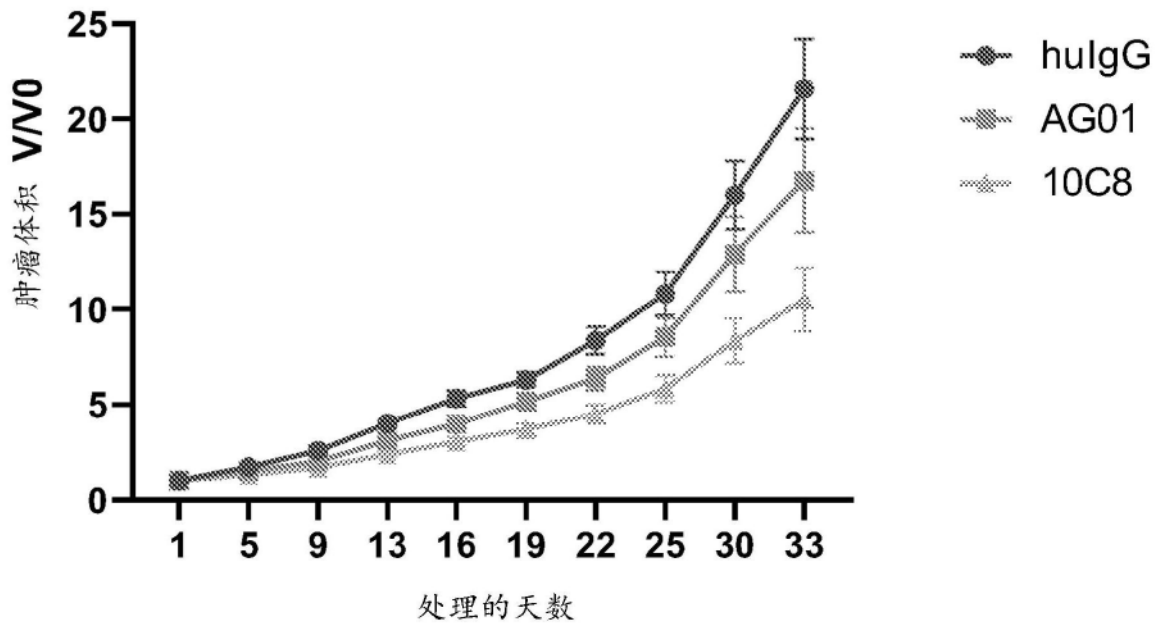


图4