



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110372795 A

(43)申请公布日 2019.10.25

(21)申请号 201910353780.0

D.H.T.柏曼

(22)申请日 2008.08.01

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30)优先权数据

60/963,246 2007.08.02 US

代理人 许斐斐

60/963,249 2007.08.02 US

(51)Int.Cl.

60/963,282 2007.08.02 US

C07K 16/40(2006.01)

60/963,214 2007.08.02 US

A61K 39/395(2006.01)

60/963,248 2007.08.02 US

A61P 35/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

200880101321.3 2008.08.01

A61P 35/04(2006.01)

(71)申请人 吉利德生物制剂公司

A61P 1/16(2006.01)

地址 美国加利福尼亚州

A61P 13/12(2006.01)

(72)发明人 V.史密斯 S.奥格 P.范瓦拉西拉

A61P 11/00(2006.01)

V.E.巴里 D.马歇尔 A.K.霍尔泽

A61P 9/00(2006.01)

H.罗德里格斯 大保三穗

A61P 17/00(2006.01)

S.A.麦克考雷 C.A.加西亚

G01N 33/573(2006.01)

权利要求书5页 说明书82页 附图18页

(54)发明名称

LOX和LOXL2抑制剂及其应用

鼠单克隆抗-LOXL2抗体

(57)摘要

本申请涉及抗-LOX和抗-LOXL2抗体以及它们在纯化、诊断和治疗方法中的应用。抗体包括单克隆抗体、人源化抗体及其功能片段。可利用抗-LOX和抗-LOXL2抗体鉴定和治疗诸如纤维变性病症等病症，或防止上皮细胞生长状态向间充质细胞状态过渡。

A. 可变重链

MEWSRVIIFILLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTS
VKVSCKASGYAFTYYLIEWVKQRPQGLEWIGVI
NPGSGGTNYNEFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS
(SEQ ID NO: 1)

B. 可变轻链

MRCLAEFLGLLVWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTG
ESVSISCRSSKSLLHSNGNTLYWFLQRPQSPQFL
IYRMSNLASGPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED
VGVYYCMQHLEYPYTFGGGTLKLEIK
(SEQ ID NO: 2)

1. 一种分离的抗体或其抗原结合片段，其特异性结合赖氨酰氧化酶样(LOXL2)蛋白，并包含重链可变区互补决定区(CDR)和轻链可变区CDR，所述重链可变区CDR包含如SEQ ID NO:41、42和43所示的氨基酸序列，以及所述轻链可变区CDR包含如SEQ ID NO:57、58和59所示的氨基酸序列。

2. 权利要求1的抗体或其抗原结合片段，其包含与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链。

3. 权利要求1或2的抗体或其抗原结合片段，其包含与SEQ ID NO:2所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

4. 权利要求1-3任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID NO:2所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

5. 权利要求1-4任一项的抗体，所述抗体特异性结合LOXL2的结合亲和力是结合LOX、LOXL1、LOXL3或LOXL4中至少一种的至少2、5、10、50、100、500或1000倍。

6. 一种人源化抗体或其抗原结合片段，其特异性结合赖氨酰氧化酶样(LOXL2)蛋白，并包含重链可变区互补决定区(CDR)和轻链可变区CDR，所述重链可变区CDR包含如SEQ ID NO:41、42和43所示的氨基酸序列，以及所述轻链可变区CDR包含如SEQ ID NO:57、58和59所示的氨基酸序列。

7. 权利要求6的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含与SEQ ID NO:25、26、27或28所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链。

8. 权利要求6或7的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含与SEQ ID NO:30、31或32所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

9. 权利要求6-8中任一项的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含与SEQ ID NO:25、26、27或28所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID NO:30、31或32所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

10. 权利要求1或5的抗体或其抗原结合片段，其中所述重链可变区包含：

(i) 具有SEQ ID NO:33所示氨基酸序列或SEQ ID NO:33所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代和/或缺失的重链FR1：

- (a) 24位的缬氨酸(V)取代谷氨酰胺(Q)或其保守性取代；
- (b) 30位的缬氨酸(V)取代亮氨酸(L)或其保守性取代；
- (c) 31位的赖氨酸(K)取代缬氨酸(V)或其保守性取代；
- (d) 32位的赖氨酸(K)取代精氨酸(R)或其保守性取代；和
- (e) 35位的丙氨酸(A)取代苏氨酸(T)或其保守性取代；

和氨基酸残基1-19缺失；

(ii) 具有SEQ ID NO:34所示氨基酸序列或SEQ ID NO:34所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的重链FR2：

- (a) 3位的精氨酸(R)取代赖氨酸(K)或其保守性取代；
- (b) 5位的丙氨酸(A)取代精氨酸(R)或其保守性取代；和

(iii) 具有SEQ ID NO:35所示氨基酸序列或SEQ ID NO:35所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的重链FR3：

- (a) 1位的精氨酸(R)取代赖氨酸(K)或其保守性取代；
 - (b) 2位的缬氨酸取代丙氨酸(A)或其保守性取代；
 - (c) 4位的异亮氨酸(I)取代亮氨酸(L)或其保守性取代；
 - (d) 10位的苏氨酸(T)取代丝氨酸(S)或其保守性取代；
 - (e) 16位的谷氨酸(E)取代谷氨酰胺(Q)或其保守性取代；
 - (f) 21位的精氨酸(R)取代苏氨酸(T)或其保守性取代；
 - (g) 23位的谷氨酸取代天冬氨酸(D)或其保守性取代；
 - (h) 25位的苏氨酸(T)取代丝氨酸(S)或其保守性取代；和
 - (i) 29位的酪氨酸(Y)取代苯丙氨酸(F)或其保守性取代；
- (iv) 具有SEQ ID NO:36所示氨基酸序列或SEQ ID NO:36所示氨基酸序列但在7位具有缬氨酸(V)取代赖氨酸(K)或其保守性取代的重链FR4，

并且其中所述轻链可变区包含：

(i) 具有SEQ ID NO:49所示氨基酸序列或SEQ ID NO:49所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的轻链FR1：

- (a) 27位的苏氨酸(T)取代丙氨酸(A)或其保守性取代；
- (b) 28位的脯氨酸(P)取代丙氨酸(A)或其保守性取代；
- (c) 29位的亮氨酸(L)取代脯氨酸(P)或其保守性取代；
- (d) 31位的亮氨酸(L)取代缬氨酸(V)或其保守性取代；
- (e) 37位的谷氨酰胺(Q)取代谷氨酸(E)或其保守性取代；
- (f) 39位的丙氨酸(A)取代缬氨酸(V)或其保守性取代；

和氨基酸残基1-20缺失；

(ii) 具有SEQ ID NO:50所示氨基酸序列或SEQ ID NO:50所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的轻链FR2：

- (a) 2位的酪氨酸(Y)取代苯丙氨酸(F)或其保守性取代；和
- (b) 5位的赖氨酸(K)取代精氨酸(R)或其保守性取代；

(iii) 具有SEQ ID NO:51所示氨基酸序列或SEQ ID NO:51所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的轻链FR3：

- (a) 14位的天冬氨酸(D)取代丙氨酸(A)或其保守性取代；和
- (b) 18位的赖氨酸(K)取代精氨酸(R)或其保守性取代；

(iv) 具有SEQ ID NO:52所示氨基酸序列或SEQ ID NO:52所示氨基酸序列但在7位具有缬氨酸(V)取代亮氨酸(L)或其保守性取代的轻链FR4。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段，其用可检测标记物、治疗性标记物或二者标记。

12. 前述权利要求任一项的抗体或其抗原结合片段，其为Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、遗传改造的抗体或单克隆抗体。

13. 一种治疗LOXL2相关病症的试剂盒，所述试剂盒包含权利要求1-12任一项所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的运载体或赋形剂的组合物。

14. 权利要求13的试剂盒，其中所述LOXL2相关病症是肿瘤、转移、血管生成或纤维化。

15. 权利要求13或14的试剂盒，还包含可检测标记物、治疗性标记物或二者。

16. 权利要求15的试剂盒,还包含描述如何将抗体或其抗原结合片段与可检测标记物、治疗性标记物或二者缀合的书面使用说明。

17. 权利要求13-15任一项的试剂盒,还包含描述如何给予抗体或其抗原结合片段的书面使用说明。

18. 权利要求13-17任一项的试剂盒,其中所述组合物不含热原。

19. 权利要求13-17任一项的试剂盒,其中所述组合物是冻干的。

20. 一种诊断LOXL2相关病症的方法,所述方法包括将对象的样品与权利要求1-12任一项所述的抗体或其抗原结合片段接触来评估所述样品中的LOXL2水平,其中与参比样品相比,该样品中LOXL2水平改变表明有肿瘤或转移的存在或增加。

21. 权利要求1-12任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于诊断LOXL2相关病症的药物中的用途,包括将对象的样品与所述抗体或其抗原结合片段接触来评估所述样品中的LOXL2水平,其中与参比样品相比,该样品中LOXL2水平改变表明有肿瘤或转移的存在或增加。

22. 权利要求20的方法,或权利要求21的用途,其中所述LOXL2相关病症是肿瘤、转移、血管生成或纤维化。

23. 权利要求20或22的方法,或权利要求21或22的用途,其中与参比样品相比,样品中LOXL2水平增加表明有肿瘤或转移的存在或肿瘤或转移性生长的增加。

24. 权利要求20、22或23任一项的方法,或权利要求21-23任一项的用途,其中所述参比样品是在较早时间点取自所述对象的样品或取自另一个体的样品。

25. 权利要求20、22-24任一项的方法或权利要求21-24任一项的用途,其中将所述样品与权利要求1-12中任一项所述抗体或其抗原结合片段接触来检测所述样品中的LOXL2水平。

26. 权利要求25的方法或用途,其中所述抗体或其抗原结合片段是可检测标记的,或是用诊断标记物标记的。

27. 一种将样品或细胞组织与权利要求1-12中任一项所述抗体或其抗原结合片段接触来抑制LOXL2的方法。

28. 权利要求27的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段与LOXL2的接触抑制LOXL2的酶活性。

29. 权利要求27或28的方法,其中接触在体外、体内或离体发生。

30. 权利要求27或28的方法,其中抑制LOXL2降低对象中的肿瘤生长。

31. 权利要求27或28的方法,其中抑制LOXL2降低对象中的血管生成。

32. 权利要求27或28的方法,其中抑制LOXL2降低对象中的纤维化。

33. 一种在对象中降低肿瘤生长、抑制血管生成、抑制纤维变性疾病或减少胞外基质形成的方法,其包括给予权利要求1-12任一项的抗体或其抗原结合片段。

34. 权利要求1-12任一项的抗体或其抗原结合片段在制备用于在对象中降低肿瘤生长、抑制血管生成、抑制纤维变性疾病或减少胞外基质形成的药物中的用途。

35. 权利要求33的方法或权利要求34的用途,其中所述肿瘤是原发性肿瘤或转移瘤。

36. 权利要求33或35的方法,或权利要求34或35的用途,其中所述肿瘤选自:肺癌(包括肺腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌、细支气管肺泡癌、非小细胞癌、小细胞癌、间皮瘤);乳腺癌

(包括导管癌、小叶癌、炎性乳腺癌、透明细胞癌、粘液癌)；结肠直肠癌(结肠癌、直肠癌)；肛门癌；胰腺癌(包括胰腺腺癌、胰岛细胞癌、神经内分泌肿瘤)；前列腺癌；卵巢癌(卵巢上皮癌或表面上皮-间质肿瘤，包括浆液性肿瘤、内膜样瘤和粘液性囊腺癌、性索间质细胞瘤)；肝脏和胆管癌(包括肝细胞癌、胆管癌、血管瘤)；食道癌(包括食道腺癌和鳞状细胞癌)；膀胱癌；子宫癌(包括子宫内膜腺癌、宫乳头状浆液性腺癌、子宫透明细胞癌、子宫肉瘤和平滑肌肉瘤、混合型苗勒肿瘤)；神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、髓质母细胞瘤、和其它脑肿瘤；肾癌(包括肾细胞癌、透明细胞癌、肾母细胞瘤)；头颈癌(包括鳞状细胞癌)；胃癌(胃腺癌、胃肠道间质瘤)；多发性骨髓瘤；睾丸癌；生殖细胞瘤；神经内分泌肿瘤；宫颈癌；胃肠道、乳腺和其它器官的类癌；印戒细胞癌；间充质肿瘤，包括肉瘤、纤维肉瘤、血管瘤、血管瘤病、血管外皮细胞瘤、假血管瘤性间质增生、成肌纤维细胞瘤、纤维瘤病、炎性成肌纤维细胞瘤、脂肪瘤、血管脂肪瘤、颗粒细胞瘤、神经纤维瘤、神经鞘瘤、血管肉瘤、脂肉瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤和非-霍奇金淋巴瘤。

37. 权利要求33、35或36任一项的方法，或权利要求34-36任一项的用途，其中与治疗前对象中的肿瘤相比，治疗后该对象中的肿瘤尺寸减小至少10%、25%、50%、70%、90%、95%或更多。

38. 权利要求33、35-37任一项的方法，或权利要求34-37任一项的用途，其中与未给予所述抗体或其抗原结合片段的对象相比，患肿瘤对象的存活增长至少10天、1个月、3个月、6个月、1年、2年、5年、10年或更长。

39. 权利要求33、35-38任一项的方法，或权利要求34-38任一项的用途，其中对象的转移瘤负荷得到稳定。

40. 权利要求39的方法或用途，其中转移瘤负荷稳定至少10天、1个月、3个月、6个月、1年、2年、5年、10年或更长时间。

41. 权利要求33、35-37任一项的方法，或权利要求34-40任一项的用途，其中所述抗体或其抗原结合片可特异性结合分泌的或成熟形式的hLOX，但不结合具有SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的hLOX前蛋白原。

42. 权利要求41的方法或用途，其中所述hLOX的分泌形式具有SEQ ID NO:8、62或63所示氨基酸序列。

43. 权利要求41的方法或用途，其中所述hLOX的成熟形式具有SEQ ID NO:9所示氨基酸序列。

44. 权利要求33的方法或权利要求34的用途，其中所述纤维变性疾病是肝纤维化、肺纤维化、肾纤维化、心脏纤维化或硬皮病。

45. 权利要求44的方法或用途，其中所述肾纤维化是糖尿病性肾病、肾小球硬化症、糖尿病性肾病、膀胱输尿管反流、小管间质性肾纤维化或肾小球肾炎。

46. 权利要求20、22-33或35-45任一项的方法，其中通过胃肠外给予进行给药或接触。

47. 一种通过检测LOXL水平和/或活性来监测对象对给予权利要求1-12中任一项所述抗体或其抗原结合片段的反应的方法。

48. 权利要求20、22-33或35-45任一项的方法，或权利要求21-36或34-45任一项的用途，其中所述抗体或其抗原结合片段用治疗性标记物或诊断标记物标记。

49. 权利要求20、22-33或35-45任一项的方法，或权利要求21-26或34-45任一项的用

途,还包括给予第二治疗剂。

50. 权利要求49的方法,其中所述第二治疗剂是抗体或化疗剂。

51. 权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其包含与SEQ ID N0:1所示氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列相同性的可变重链。

52. 权利要求1或51的抗体或其抗原结合片段,其包含与SEQ ID N0:2所示氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列相同性的可变轻链。

53. 权利要求1或51-52任一项的抗体或其抗原结合片段,其包含与SEQ ID N0:1所示氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID N0:2所示氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列相同性的可变轻链。

LOX和LOXL2抑制剂及其应用

[0001] 本申请是中国申请号为201510390365.4、发明名称为“LOX和LOXL2抑制剂及其应用”且申请日为2008年8月1日的专利申请的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求以下申请的优先权:2007年8月2日提交的美国临时申请号60/963,282,名为“Methods for Selecting Inhibitors of Tumor Invasion, Angiogenesis, and Metastasis(选择肿瘤侵入、血管生成和转移的抑制剂的方法)”(代理人案件号35120-704.101);2007年8月2日提交的美国临时申请号60/963,249,名为“Treatment of Diseases With Inhibitors of Active Lysyl Oxidase(用活性赖氨酰氧化酶抑制剂治疗疾病)”(代理人案件号35120-706.101);2007年8月2日提交的美国临时申请号60/963,214,名为“Treatment of Diseases Through Inhibition of Both Lysyl Oxidase and Lysyl Oxidase-Like Proteins(通过同时抑制赖氨酰氧化酶和赖氨酰氧化酶样蛋白来治疗疾病)”(代理人案件号35120-706.102);2007年8月2日提交的美国临时申请号60/963,248,名为“Diagnosis or Monitoring of Diseases by Assessing Active Lysyl Oxidase Levels or Activity(通过评估活性赖氨酰氧化酶水平或活性来诊断或监测疾病)(代理人案件号35120-706.103);和2007年8月2日提交的美国临时申请号60/963,246,名为“Combination Therapy Including Lysyl Oxidase Modulators(包含赖氨酰氧化酶调节剂的组合治疗)”(代理人案件号35120-707.101),本申请还与以下申请有关:2008年8月1日提交,名为“Methods for Selecting Inhibitors of Tumor Invasion, Angiogenesis, and Metastasis(选择肿瘤侵入、血管生成和转移的抑制剂的方法)”的共同待批美国专利申请(代理人案件号35120-704.201),序列号[[____]]12/185,054,和2008年8月1日提交,名为“Methods for Selecting Inhibitors of Tumor Invasion, Angiogenesis, and Metastasis(选择肿瘤侵入、血管生成和转移的抑制剂的方法)”的PCT专利申请(代理人案件号35120-704.601),序列号[[____]]PCT/US2008/009354,各份申请通过引用全文纳入本文。

[0004] 序列表的引用

[0005] 序列表在本申请实施例12之后。

[0006] 发明背景

[0007] 癌症是美国及其他发达国家的严重公众健康问题。目前,在美国每4例死亡中即有一例死于癌症。癌症治疗包括用化疗药物治疗患者来杀伤肿瘤细胞。然而,肿瘤细胞的亚组常对药物治疗耐受并能存活,从而在原部位或远端转移部位再次繁衍,进而导致可检测的疾病复发和发病率。据信,具有侵入性增加和转移能力以及药物耐受性改变等特性的许多癌肿瘤细胞经历包括或类似于EMT(上皮-间充质过渡)的形态转化。经历EMT的细胞丧失上皮细胞正常的黏着性并经历各种改变,包括E-钙粘蛋白表达和间充质标记物表达丧失,运动性增加、侵入性增加和对细胞死亡的耐受性增加。

[0008] 目前癌症的主导疗法是外科手术、放疗和化疗。化疗方法,例如抗-肿瘤抗生素,烷化剂、亚硝基脲化合物、长春花-生物碱、类固醇激素和抗-代谢药物构成了肿瘤学家可

用疗剂的主体。虽然在癌症治疗领域已取得了进展,但癌 症依然是主要的健康问题。

[0009] 血管生成是在已有毛细血管外形成新血管,其是各种生理学和病理学过程 中一系列至关重要的事件。正常的组织生长,例如胚胎发育、伤口愈合和月经 周期的特征在于依赖新血管形成来供应氧和营养物以及除去废物。大量不同且 无关的疾病也与新血管系统有关。某些病状中,血管生成较低,应提高以改善 疾病情况。然而,更常见的是,血管生成过度是各种病状的重要特征,包括以 细胞增殖不正常或不受控为特征或与之有关的病状。涉及过度血管生成的病状 包括,例如癌症(实体瘤和血液学肿瘤)、心血管疾病(例如动脉粥样硬化和 再狭窄)、慢性炎症(类风湿性关节炎、克罗恩病)、糖尿病(糖尿病性视网 膜病)、银屑病、子宫内膜异位、新生血管性青光眼和肥胖症(3)。这些病 症可从血管生成的化疗抑制中获益。

[0010] 血管生成过程通常使正常情况下休眠的内皮增殖和迁移,细胞外周基质发 生受控蛋白水解并且通过产生毛细血管而合成新胞外基质组分。新的胞内和胞 间接触的建立,内皮细胞形态分化成毛细血管样管状网络支持它们随后的成 熟、变化、重塑和选择性退化,从而形成高度组织的功能性微血管网络。在正 常情况下,血管内皮与其周围基质组分以及与促血管生成和血管抑制细胞因子 和协调生理学血管生成的生长因子的自分泌、旁 分泌和两侧分泌(amphicrine) 相互作用在空间和时间上受到严格调控。

[0011] 血管生成对肿瘤组织生长至关重要。观察到肿瘤比正常组织具有更多血管 已有 100 多年了。几项实验性研究提示原发性肿瘤生长和转移需要新生血管形 成。与上述良好协调的正常组织生长过程相反,活性肿瘤生长所需的病理性血 管生成通常是持续性和持久的,血管生成表型的初始获得是各种实体瘤和血液 学肿瘤类型产生的共同机制。不能募集和维持血管网络的肿瘤通常在原位保持 休眠,就像无症状的病损。转移也依赖于血管生成:肿瘤细胞要成功转移,其 通常必须能使用原发性肿瘤的血管系统、在循环中活下来、停 在靶器官的微血 管系统中、离开该血管系统、在靶器官中生长并在靶部位诱导血管生成。因此,血管生成看来是转移级联反应开始以及完成所必需的。

[0012] 因此,血管生成对于肿瘤生长和转移的重要性为化疗提供了最佳的潜在靶 位。合适的抗-血管生成剂可通过延迟血管生成的开始(即,阻断“血管生成开 关”)或通过阻断许多肿瘤类型特征性的持续和病灶新血管形成而直接或间接 影响肿瘤-相关的血管生成。现正在多个临床试验中积极研究针对肿瘤-相关内 皮以及涉及持续的病理性血管生成的多种分子和细胞过程及靶标的抗-血管生 成治疗的安全性和效率。然而,就发现和/或鉴定到安全和/或有效的抗血管生 成剂而言,迄今为止成功有限。

[0013] 纤维化是纤维组织的异常累积,作为伤口愈合过程的一部分会在受伤组织 中发生。这种组织损伤可以是物理伤害、炎症、感染、接触毒素和其它原因所 致。

[0014] 例如,肝脏(肝)纤维化可作为对慢性肝损伤的伤口愈合反应的一部分而发 生。纤维化可作为血色病、威尔逊病、酒精中毒、血吸虫病、病毒性肝炎、胆 管阻塞、接触毒素和代 谢紊乱的并发症而发生。据信,这种疤痕组织的形成表 示身体试图包裹受伤的组织。肝纤维化的特征在于胞外基质的累积,这在数量 上与正常肝脏中不同。不作检查,肝纤维化会发展成肝硬化(定义为存在包裹 的结节)、肝衰竭和死亡。

[0015] Li 和 Frieman (Gastroenterol. Hepatol. 14:618-633, 1999) 总结道,肝纤维 化的实际和提出的治疗方案包括去除潜在的诱因(例如,毒素或感染因子); 抑制炎症(使用,例

如皮质激素IL-1受体拮抗剂或其它药剂) ; 使用, 例如 γ 干扰素或抗氧化剂下调星形细胞活化; 促进基质降解; 或促进星形细胞凋亡。虽然近年来有进展, 但许多这些方案仍处于实验阶段, 现有的治疗目的在于抑制炎症而不是致力于潜在的生物化学过程。因此, 本领域仍需要治疗纤维化, 包括肝脏和肺纤维化的材料和方法。

[0016] 高血压、高血压性心脏病、动脉粥样硬化和心肌梗塞导致纤维变性组织累积在心脏和血管中。各种诱因可导致高血压, 进而产生高血压性心脏病 (HHD) 以及发展成心脏停止和心肌梗塞。类似地, 动脉粥样硬化和其它缺血性心脏病 常导致心脏停止。这些心血管疾病均显示出胞外基质累积或纤维变性沉积, 从而导致血管系统僵硬以及心脏组织本身僵硬。纤维变性物质的这种沉积是对高 血压和/或硬化状态所诱导损伤的反应, 但该反应的作用还导致血管和心脏僵硬 以及心室增大等不利作用。此外, 据信在心血管疾病中观察到的心脏纤维变性 增加会破坏或改变心肌细胞通过心脏的组织支架递送的信号, 从而进一步破坏 有效心脏功能并促进心脏停止和心肌梗塞。

[0017] 发明概述

[0018] 上皮-间充质过渡 (EMT) 指这样一种过程, 即, 具有上皮细胞的基因表达/ 表型特征(即, 表达特定蛋白质、因子和分子) 的细胞改变这些基因或它们的表 达水平, 从而导致该细胞的表型改变, 这些表型改变由所表达基因中的改变体现。

[0019] 需要能阻止EMT并有效阻断例如LOX和LOXL2等酶活性的组合物。这 种抑制剂可用于治疗LOX和LOXL2水平异常相关疾病和病症。

[0020] 结合酶的抗体可以是竞争性抑制剂、无竞争性抑制剂 (*uncompetitive inhibitor*) 或非竞争性抑制剂。对于竞争性抑制作用, 抑制剂通常具有与底物相 似的结构。抑制作用在底物浓度低时显著, 但在底物浓度高时可克服。对于无 竞争性抑制作用, 抑制剂与在底物结合活性位点后可用的位点结合。抑制作用 在底物浓度高时最显著。对于非竞争性抑制作用, 抑制剂与远离底物结合位点 的位点结合, 在所有底物浓度上, 相对抑制作用通常相同。在一个实施方式中, 本文所述的抗体或其抗原结合片段特异性结合全长和加工的LOX和LOXL2。在一方面, 全长和加工的LOX或LOXL2是该酶的活性形式。

[0021] 本文提供了特异性结合具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的表位的分离 抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:1所示 氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID NO:2所 示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

[0022] 本文提供的分离抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:1所示氨基酸 序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID NO:2所示氨基 酸序列具有至少 75%氨基酸序列相同性的可变轻链。在一个实施方式中, 分离 抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列具有至少75%氨 基酸序列相同性的可变重链。在另一实施 方式中, 分离抗体或其抗原结合片段 包含与SEQ ID NO:2所示氨基酸序列具有至少75%氨 基酸序列相同性的可变 轻链。在还有另一实施方式中, 分离抗体或其抗原结合片段与本文 所述抗 -LOXL2抗体或其抗原结合片段竞争结合LOXL2, 或与之特异性结合。抗体或 其抗原结合片段特异性结合LOXL2的结合亲和力是结合LOX、LOXL1、 LOXL3或LOXL4中至少一种的 至少2、5、10、50、100、500或1000倍。

[0023] 本文提供人源化抗-LOXL2抗体。人源化抗体或其抗原结合片段可特异性 结合具

有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的表位。在一个实施方式中，所述人源化抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:25、26、27或28所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID NO:30、31或32所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

[0024] 人源化抗体或其抗原结合片段可包含与SEQ ID NO:25、26、27或28所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID NO:30、31或32所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

[0025] 人源化抗体或其抗原结合片段可包含与SEQ ID NO:25、26、27或28所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链。

[0026] 人源化抗体或其抗原结合片段可包含与SEQ ID NO:30、31或32所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。可作出可变重链和可变轻链的组合以评估结合亲和力。

[0027] 本文提供与本文所述抗体或其抗原结合片段竞争结合LOXL2，或与之特异性结合的人源化抗体或其抗原结合片段。

[0028] 本文提供结合LOXL2的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含：

[0029] (i) 具有SEQ ID NO:33所示氨基酸序列或SEQ ID NO:33所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的重链FR1：

[0030] (a) 24位的缬氨酸(V)取代谷氨酰胺(Q)或其保守性取代；

[0031] (b) 30位的缬氨酸(V)取代亮氨酸(L)或其保守性取代；

[0032] (c) 31位的赖氨酸(K)取代缬氨酸(V)或其保守性取代；

[0033] (d) 32位的赖氨酸(K)取代精氨酸(R)或其保守性取代；和

[0034] (e) 35位的丙氨酸(A)取代苏氨酸(T)或其保守性取代；

[0035] 和氨基酸残基1-19缺失；

[0036] (ii) 具有SEQ ID NO:34所示氨基酸序列或SEQ ID NO:34所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的重链FR2：

[0037] (a) 3位的精氨酸(R)取代赖氨酸(K)或其保守性取代；

[0038] (b) 5位的丙氨酸(A)取代精氨酸(R)或其保守性取代；和

[0039] (iii) 具有SEQ ID NO:35所示氨基酸序列或SEQ ID NO:35所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的重链FR3：

[0040] (a) 1位的精氨酸(R)取代赖氨酸(K)或其保守性取代；

[0041] (b) 2位的缬氨酸(V)取代丙氨酸(A)或其保守性取代；

[0042] (c) 4位的异亮氨酸(I)取代亮氨酸(L)或其保守性取代；

[0043] (d) 10位的苏氨酸(T)取代丝氨酸(S)或其保守性取代；

[0044] (e) 16位的谷氨酸(E)取代谷氨酰胺(Q)或其保守性取代；

[0045] (f) 21位的精氨酸(R)取代苏氨酸(T)或其保守性取代；

[0046] (g) 23位的谷氨酸(E)取代天冬氨酸(D)或其保守性取代；

[0047] (h) 25位的苏氨酸(T)取代丝氨酸(S)或其保守性取代；和

[0048] (i) 29位的酪氨酸(Y)取代苯丙氨酸(F)或其保守性取代；

[0049] 和

[0050] (iv) 具有SEQ ID NO:36所示氨基酸序列或SEQ ID NO:36所示氨基酸 序列但在7位具有缬氨酸(V)取代赖氨酸(K)或其保守性取代的重链FR4,

[0051] 并且其中所述轻链可变区包含：

[0052] (i) 具有SEQ ID NO:49所示氨基酸序列或SEQ ID NO:49所示氨基酸 序列但有一个或多个选自下组的取代的轻链FR1:

[0053] (a) 27位的苏氨酸(T)取代丙氨酸(A)或其保守性取代;

[0054] (b) 28位的脯氨酸(P)取代丙氨酸(A)或其保守性取代;

[0055] (c) 29位的亮氨酸(L)取代脯氨酸(P)或其保守性取代;

[0056] (d) 31位的亮氨酸(L)取代缬氨酸(V)或其保守性取代;

[0057] (e) 37位的谷氨酰胺(Q)取代谷氨酸(E)或其保守性取代;

[0058] (d) 38位的脯氨酸(P)取代丝氨酸(S)或其保守性取代;

[0059] (f) 39位的丙氨酸(A)取代缬氨酸(V)或其保守性取代;

[0060] 和氨基酸残基1-20缺失;

[0061] (ii) 具有SEQ ID NO:50所示氨基酸序列或SEQ ID NO:50所示氨基酸 序列但有一个或多个选自下组的取代的轻链FR2:

[0062] (a) 2位的酪氨酸(Y)取代苯丙氨酸(F)或其保守性取代;和

[0063] (b) 5位的赖氨酸(K)取代精氨酸(R)或其保守性取代;

[0064] (iii) 具有SEQ ID NO:51所示氨基酸序列或SEQ ID NO:51所示氨基 酸序列但有一个或多个选自下组的取代的轻链FR3:

[0065] (a) 14位的天冬氨酸(D)取代丙氨酸(A)或其保守性取代;和

[0066] (b) 18位的赖氨酸(K)取代精氨酸(R)或其保守性取代;

[0067] 和

[0068] (iv) 具有SEQ ID NO:52所示氨基酸序列或SEQ ID NO:52所示氨基酸 序列但在7位具有缬氨酸(V)取代亮氨酸(L)或其保守性取代的轻链FR4。

[0069] 在一个实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO 33、37或44 所示氨基酸序列的重链可变区FR1,具有SEQ ID NO 34、38或45 所示氨基酸序列的重链可变区FR2,具有SEQ ID NO 35、39、46、47或48 所示氨基酸序列的重链可变区FR3,具有SEQ ID NO 36或40所示氨基酸序 列的重链可变区FR4,具有SEQ ID NO 49或53所示氨基酸序列的轻链可变 区FR1,具有SEQ ID NO 50、54或60所示氨基酸序列的轻链可变区FR2, 具有SEQ ID NO 51、55或61所示氨基酸序列的轻链可变区FR3,和具有SEQ ID NO 52或56所示氨基酸序列的轻链可变区FR4。

[0070] 本文提供特异性结合LOX的抗体。在一方面,分离抗体或其抗原结合片 段可包含与SEQ ID NO:3所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的 可变重链和与SEQ ID NO:4或5所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同 性的可变轻链。在另一方面,分离抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相 同性的可变重链。在还有另一方 面,分离抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:4或5所示氨基酸序列具有 至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

[0071] 本文提供与本文所述任何抗-LOX抗体或其抗原结合片段竞争结合LOX, 或与之特

异性结合的分离抗体或其抗原结合片段。

[0072] 抗-LOX抗体特异性结合LOX的结合亲和力是结合LOXL1、LOXL2、LOXL3或LOXL4中至少一种的至少2、5、10、50、100、500或1000倍。

[0073] 可用可检测标记物、治疗性标记物或二者标记分离的抗体或其抗原结合片段。

[0074] 在一个实施方式中，抗原结合片段是，例如可变重链、可变轻链、Fv、scFv、Fab、F(ab')2、遗传改造的抗体、单克隆抗体或人源化抗体。

[0075] 本文提供治疗LOX或LOXL2相关病症的试剂盒，该试剂盒包含前述任一项实施方式所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的运载体或赋形剂的组合物。LOX或LOXL2相关病症可以是，例如肿瘤、转移、血管生成或纤维化。试剂盒还可包含可检测标记物、治疗性标记物或二者。试剂盒还可包含描述如何将抗体或其抗原结合片段与可检测标记物、治疗性标记物或二者缀合的书面使用说明。此外，书面使用说明可描述如何给予抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中，试剂盒中的组合物不含热原，在一些情况下可以是冻干的。

[0076] 本文提供诊断LOX或LOXL2相关病症的方法，包括将对象的样品与本文所述抗体或其抗原结合片段接触来评估该样品中的LOX和/或LOXL2水平，其中与参比样品相比，该样品中LOX和/或LOXL2水平改变表明有肿瘤或转移存在或增加。LOX或LOXL2相关病症可以是，例如肿瘤、转移、血管生成或纤维化病症。在一个实施方式中，与参比样品相比，样品中LOX和/或LOXL2水平增加表明有肿瘤或转移存在或肿瘤或转移性生长增加。参比样品是在较早数据点取自该对象的样品或取自另一个体的样品。将该样品与本文所述任何抗体或其抗原结合片段接触来评估该样品中的LOX和/或LOXL2水平。出于检测目的，可视需要，根据用于评估结合的方法对抗体或其抗原结合片段作可检测标记。

[0077] 本文提供通过将样品或细胞组织与本文所述抗体或其抗原结合片段接触来抑制LOXL2的方法。在一个实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段与LOXL2的结合抑制LOXL2的酶活性。

[0078] 本文提供通过将样品或细胞组织与本文所述抗体或其抗原结合片段接触来抑制LOXL的方法。在一个实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段与LOXL的结合抑制LOXL的酶活性。接触可在体外、体内或离体发生。抑制LOX或LOXL2可部分或完全降低对象中的肿瘤生长。抑制LOX或LOXL2可降低对象中的血管生成，从而产生治疗益处。抑制LOX或LOXL2可降低对象中的纤维化，从而产生治疗益处。

[0079] 本文提供降低对象中肿瘤生长的方法，包括给予本文所述抗体或其抗原结合片段。肿瘤可以是原发性肿瘤或转移瘤。在一方面，肿瘤是，例如肺癌（包括肺腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌、细支气管肺泡癌、非小细胞癌、小细胞癌、间皮瘤）；乳腺癌（包括导管癌、小叶癌、炎性乳腺癌、透明细胞癌、粘液癌）；结肠直肠癌（结肠癌、直肠癌）；肛门癌；胰腺癌（包括胰腺癌、胰岛细胞癌、神经内分泌肿瘤）；前列腺癌；卵巢癌（卵巢上皮癌或表面上皮-间质肿瘤，包括浆液性肿瘤（serous tumour）、内膜样瘤和粘液性囊腺癌、性索间质细胞瘤）；肝脏和胆管癌（包括肝细胞癌、胆管癌、血管瘤）；食道癌（包括食道腺癌和鳞状细胞癌）；非-霍奇金淋巴瘤；膀胱癌；子宫癌（包括子宫内膜腺癌、宫乳头状浆液性腺癌、子宫透明细胞癌、子宫肉瘤和平滑肌肉瘤、混合型Muller肿瘤（mixed mullerian tumors））；神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、髓质母细胞瘤（medullablastoma）和其它脑肿瘤；肾癌（包括肾

细胞癌、透明细胞癌、肾母细胞瘤)；头颈癌(包括鳞状细胞癌)；胃癌(胃 腺癌、胃肠道间质瘤)；多发性骨髓瘤；睾丸癌；生殖细胞癌；神经内分泌 肿瘤；宫颈癌；胃肠道、乳腺和其它器官的类癌；印戒细胞癌；间充质肿 瘤，包括肉瘤、纤维肉瘤、血管瘤、血管瘤病、血管外皮细胞瘤、假血管 瘤性间质增生(pseudoangiomatous stromal hyperplasia)、成肌纤维细胞瘤、纤 维瘤病、炎性成肌纤维细胞瘤、脂肪瘤、血管脂肪瘤、颗粒细胞瘤、神经纤 维瘤、神经鞘瘤、血管肉瘤、脂肉瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌瘤或 平滑肌肉瘤。在一个实施方式中，肿瘤是例如结肠肿瘤、卵巢肿瘤、肺肿 瘤、食道肿瘤、乳腺肿瘤、前列腺肿瘤、恶性肿瘤。与对象中治疗前的肿 瘤相比，治疗后该对象中的肿瘤尺寸可减小至少10%、25%、50%、70%、90%、95%或更多。在一方面，与未给予抗体或其抗原结合片段的对象相比，患肿瘤对象的存活可增长至少10天、1个月、3个月、6个月、1年、2年、5年、10年或更长。给予本文所述抗体或其抗原结合片段可稳定对象的转 移瘤负荷。例如，转移瘤负荷可稳定至少10天、1个月、3 个月、6个月、1年、2年、5年、10年或更长时间。

[0080] 本文所述的抗体或其抗原结合片段可特异性结合分泌的或成熟形式的 hLOX，但不结合具有SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的hLOX前蛋白原。在一个实施方式中，hLOX的分泌形式具有SEQ ID NO:8、62或63所示氨基酸序 列。在一个实施方式中，hLOX的成熟形式具有SEQ ID NO:9所示氨基酸序列。

[0081] 本文提供借助本文所述抗体或其抗原结合片段抑制对象的血管生成的方法。

[0082] 本文提供借助本文所述抗体或其抗原结合片段抑制对象的纤维变性疾病 的方法。纤维变性疾病包括但不限于：肝纤维化、肺纤维化、肾纤维化、心脏 纤维化和硬皮病 (schleroderma)。在一个实施方式中，肾纤维化包括但不限于：糖尿病性肾病、膀胱输尿管反流、小管间质性肾纤维化；肾小球肾炎，包括 局灶性节段性肾小球硬化和膜性肾小球肾炎、及肾小球膜毛细血管的肾小 球肾炎。在一个实施方式中，肝纤维化导致肝硬化和相关病症，例如慢性 病毒性肝炎、非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD)、酒精性脂肪肝 (ASH)、非酒 精性脂肪肝 (NASH)、原发性胆汁性肝硬变 (PBC)、胆汁性肝硬变和自身 免疫性肝炎。

[0083] 本文提供通过将样品或细胞组织与本文所述抗体或其抗原结合片段接触 来减少胞外基质形成的方法。在一个实例中，可通过胃肠外给予进行给药或接 触。

[0084] 本文提供通过检测LOX和/或LOXL水平和/或活性来监测对象对给予本 文所述抗体或其抗原结合片段的反应的方法。

[0085] 在一个实施方式中，用治疗性标记物标记所述抗体或其抗原结合片段。

[0086] 本文考虑了组合治疗，其中这些方法还包括给予第二治疗剂。在一个实施 方式中，所述第二治疗剂是抗体或化疗剂。

[0087] 本文提供本文所述抗体或其抗原结合片段在制备制剂中的应用，所述制剂 用于在对象中抑制LOXL2或LOX、降低肿瘤生长、抑制血管生成、抑制纤维 变性疾病或减少胞外基质形成。在一个实施方式中，用治疗性标记物和任选的 诊断标记物标记所述抗体或其抗原结合片段。

[0088] 本文提供本文所述抗体或其抗原结合片段在制备制剂中的应用，所述制剂 用于诊断肿瘤或转移，包括评估患者样品中的LOX和/或LOXL2水平，其中 与参比样品相比，样品 中LOX和/或LOXL2水平改变表明有肿瘤或转移存在 或肿瘤或转移瘤生长增加。在一个实施 方式中，用诊断标记物标记所述抗体或 其抗原结合片段。

[0089] 通过引用纳入

[0090] 如同各份出版物、专利或专利申请专门且单独表明通过引用纳入本文的程度一样,本说明书述及的所有出版物、专利和专利申请通过引用纳入本文。

[0091] 附图简述

[0092] 本发明的特征在随附权利要求书中特别示出。参考以下详述和附图可以更好地理解本发明的特征和优点,详述中列出了采用本发明原理的示范性实施方式。

[0093] 图1说明了赖氨酰氧化酶酶学特征。LOX/L酶通过乒乓机制起作用,米-门二氏动力学描述了这种机制。

[0094] 图2说明了酶促抑制作用的普通模式。

[0095] 图3说明BAPN是LOXL2的竞争性抑制剂。

[0096] 图4说明了酶促抑制作用:LOXL2的普通模式。

[0097] 图5说明了胞外LOXL2定位和胞外LOXL2的功能。

[0098] 图6A提供了结合LOXL2的SRCR3-4区域的抗体的重链可变区的氨基酸序列,图6B提供该抗体的轻链可变区的氨基酸序列。对于各可变区,信号肽以斜体字显示,CDR以下划线显示,恒定框架开始处以黑体字显示。

[0099] 图7A提供了结合LOX的抗体的重链可变区的氨基酸序列,图7B和7C提供了该抗体的两个轻链可变区的氨基酸序列。对于各可变区,信号肽以斜体字显示,CDR以下划线显示。

[0100] 图8提供了利用抗-LOXL2抗体的蛋白质筛选B升级方案。评估了LOXL2酶活性。

[0101] 图9说明了抗-LOXL2抗体AB0023的酶活性。

[0102] 图10说明抗-LOXL2抗体AB0023是非竞争性抑制剂。

[0103] 图11说明了抗-LOXL2抗体AB0023的结合亲和力和解离速率。

[0104] 图12说明了抗-LOXL2抗体AB0023结构域作图;AB0023结合LOXL2的SRCR 3-4结构域。

[0105] 图13显示在胶原I和胶原IV中,来自10ml制备物和放大的100ml制备物及腹水的上清液的抗-LOXL2抗体一致地抑制迁移/侵入。在细胞粘着试验中还观察到部分抑制。在测试样品中,试验中的细胞向血清迁移,检测荧光来测定细胞计数和迁移。最左侧的柱是不存在抗体并且底层含有血清的对照样品(细胞侵入的阳性对照)。左起第二根柱是不存在抗体并且底层不含血清的阴性对照。

[0106] 图14提供鼠单克隆抗体AB0023(抗-hLOXL2)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的氨基酸序列。互补决定区(CDR)以黑体下划线显示。图14还提供鼠单克隆抗体的4种人源化变体。与鼠单克隆抗体不同的人源化可变重链和可变轻链的框架(FR)区中的残基以破折号标记(---)或斜体下划线显示。

[0107] 图15显示M64以剂量依赖性方式结合LOX。批次3的K_D为6.6nM,批次4的K_D为5.0nM,批次5的K_D为5.7nM。

[0108] 图16显示抗-LOX抗体M64的结合亲和力。

[0109] 图17显示抗-LOXL2抗体抑制4种癌症衍生细胞系的细胞生长。

[0110] 图18显示抗-LOX抗体与顺铂的协同作用。还测定了M64对4种细胞系的IC50值。

[0111] 发明详述

[0112] 本发明涉及医学领域,包括癌症诊断和治疗。本发明一方面涉及作为疾病进展标志和治疗剂靶标的LOX和LOXL2。

[0113] 本发明提供利用特异性识别活性或成熟形式的赖氨酰氧化酶(LOX)或赖氨酰氧化酶-样(LOXL)蛋白质的试剂来诊断或监测细胞增殖异常、血管生成和纤维化相关各种疾病的新型方法和相关组合物及试剂盒。

[0114] 提供了诊断或监测对象中癌症转移的方法,包括:评估血液或肿瘤中活性LOX或LOXL2水平或活性,与参比样品相比,血液或肿瘤中活性LOX或LOXL2水平或活性改变表明存在转移瘤生长。

[0115] 如下文所详述的,可通过各种方法评估活性LOX或LOXL2的水平,包括但不限于利用特异性结合活性或成熟形式LOX或LOXL2的免疫组化方法。可采用各种方法检测活性LOX或LOXL2的酶活性,包括但不限于生色测定和荧光测定。

[0116] 本文还提供特异性结合活性形式LOX或LOXL2的抗体或其抗原结合片段,产生针对活性形式LOX或LOXL2的抗体的方法,和利用这些抗体治疗细胞增殖异常、血管生成和纤维化的方法。

[0117] I. 通用定义

[0118] 除非另有限定,本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术人员常规理解相同的意义。本文述及的所有专利、申请、公布的申请和其它出版物通过引用全文纳入本文。如果本部分所示定义与通过引用纳入本文的专利、申请、公布的申请和其它出版物中所示定义相反或不一致,本部分所示定义优先于通过引用纳入本文的定义。本文提供的标题只是为了方便起见,决不是以任何方式限制本发明。

[0119] 本文所用的“一个”表示“至少一个”或“一个或多个”。

[0120] 短语“保守性氨基酸取代”指根据某些共同特性的氨基酸分组。确定各氨基酸之间共同特性的功能方法是分析同源生物的相应蛋白质之间氨基酸改变的标准频率(Schulz, G.E. 和 R.H. Schirmer, Principles of Protein Structure(蛋白质结构的原理), S-V公司(Springer-Verlag))。根据这种分析可确定各组氨基酸,一组内的氨基酸彼此择优互换,因此,它们主要在对蛋白质总体结构的影响上彼此相似(Schulz, G.E. 和 R.H. Schirmer, Principles of Protein Structure(蛋白质结构的原理), S-V公司(Springer-Verlag))。以此方式确定的氨基酸组的例子包括:

[0121] (i) 荷电的组,包含Glu和Asp、Lys、Arg及His;

[0122] (ii) 带正电荷的组,包含Lys、Arg和His;

[0123] (iii) 带负电荷的组,包含Glu和Asp;

[0124] (iv) 芳族的组,包含Phe、Tyr和Trp;

[0125] (v) 氮环的组,包含His和Trp;

[0126] (vi) 大脂族非极性的组,包含Val、Leu和Ile;

[0127] (vii) 略微极性的组,包含Met和Cys;

[0128] (viii) 小残基的组,包含Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln 和Pro;

[0129] (ix) 脂族的组,包含Val、Leu、Ile、Met和Cys;和

[0130] (x) 小羟基的组,包含Ser和Thr。

[0131] 除了以上所示的分组,各氨基酸残基其本身可形成组,单个氨基酸形成的组可通

过上述本领域常规使用的该氨基酸的单字母和/或三字母缩写简单指代。

[0132] “保守性残基”是在相似蛋白质中相对不变的氨基酸。除非被相似氨基酸 替代,通常保守性残基会变化,如上文“保守性氨基酸取代”所述。

[0133] 除非另有专门标注,本文氨基酸序列中所用的字母“x”或“xaa”表示在 该位置可以放置20种标准氨基酸中的任一种。出于肽模拟物(peptidomimetic) 设计的目的,氨基酸序列中的“x”或“xaa”可被靶序列中存在的氨基酸模拟 物替代,或者该氨基酸可被不干扰肽模拟物活性的基本上任何形式的间隔臂替 代。

[0134] “同源性”或“相同性”或“相似性”指两个肽或两个核酸分子之间的序 列相似性。可通过比较各序列中可为比较目的而作比对的位置来各自测定同源 性和相同性。当作比较序列中等价位置为相同碱基或氨基酸所占据,则这些分 子在该位置是相同的;当等价位点为相同或相似氨基酸残基(例如,在空间和/ 或电子性质上相似) 占据时,称这些分子在 该位置同源(相似)。同源性/相似性或 相同性的百分比表述指在作比较序列共有的位置处相同或相似氨基酸的数量 的函数。“无关”或“非同源”的序列与本发明序列的相同性低于 40%,虽然 优选低于20%。在比较两条序列时,缺乏氨基酸或核酸残基或存在额外的残基也会降低相同性和同源性/相似性。

[0135] 术语“同源性”描述在数学上基于比较的序列相似性,该术语用于鉴定具 有相似功能或基序的基因或蛋白质。本发明的核酸(核苷酸、寡核苷酸) 和氨基 酸(蛋白质) 序列可用作“查询序列”对公共数据库进行检索来(例如) 鉴定其它 家族成员、相关序列或同源物。可利用Altschul等, (1990) J.Mol.Biol. 215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版本) 进行这种检索。可利用 NBLAST程序(评分=100,字长=12) 进行BLAST核苷酸序列检索以获得本 发明核酸分子的同源核苷酸序列。可利用XBLAST程序(评分=50,字长=3) 进行BLAST 氨基酸检索以获得本发明蛋白质分子的同源氨基酸序列。为获得 用于比较目的的空位比 对,可如Altschul等 ((1997) Nucleic Acids Res. 25 (17) :3389-3402) 所述利用空位 BLAST。当利用BLAST和空位BLAST程序 时,各程序(例如,XBLAST和BLAST) 可采用默认参数 (参见 www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0136] 本文所用的“相同性”表示当比对序列的最大序列匹配时,即考虑到 空位和插入时,两条或更多条序列中相应位置的相同核苷酸或氨基酸残基 的百分比。不难通过已知方法计算相同性,包括但不限于以下文献所述的 方法:Computational Molecular Biology (计算分子生物学), Lesk, A.M. 编,牛 津大学出版社,纽约,1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (生物计算:信息学和基因组计划), Smith, D.W. 编,学术出版社 (Academic Press), 纽约,1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I (序 列数据的计算机分析,第I部分), Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编,休玛娜 出版社 (Humana Press), 新泽西州,1994; Sequence Analysis in Molecular Biology (分子生物学的序列分析), von Heijne, G., 学术出版社,1987; Sequence Analysis Primer (序列分析引物), Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, MS出版社 (M Stockton Press), 纽约, 1991; Carillo, H. 和 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)。将测定相同性的方法设计成给出所测试序 列间的大匹配。此外,测定相同性的方法编成公众可得的计算机程序。测定两序列之间相同性的计算机程序方法包括但不限于:GCG程序包 (Devereux, J. 等, Nucleic Acids Research 12 (1) :387 (1984))、BLASTP、BLASTN和FASTA (Altschul,

S.F.等,J.Molec.Biol.215:403-410(1990) 和Altschul等,Nuc.Acids Res.25:3389-3402 (1997)。公众可从NCBI和其它来源(BLAST手册,Altschul,S.等,NCBI NLM NIH Bethesda,Md.20894; Altschul,S.等,J.Mol.Biol.215:403-410(1990))获得BLAST X程序。还可利用熟知的Smith Waterman算法测定相同性。

[0137] 术语“基本上相同”表示第一氨基酸序列和第二氨基酸序列之间的相 同性,其中所述第一氨基酸序列含有充足或最低数量的氨基酸残基与所述 第二氨基酸序列中作比对的氨基酸残基i) 相同或ii) 是保守性取代,从而 所述第一和第二氨基酸序列可具有共同的结构域和/或共同的功能活性。例 如,与LOX基本上相同的氨基酸序列含有与LOX具有至少约60%、或65% 相同性,优选75% 相同性、更优选85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同性的共同结构域。例如,含有与LOXL2 具有至少约60%、或65% 相同性,优选75% 相同性、更优选85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同性的共同结构 域的氨基酸序列称为充分或基本上相同。对于核苷酸序列,本文用术语“基 本上相同”指第一核酸序列含有充足或最低数量的核苷酸与第二核 酸序列 中作比对的核苷酸相同,从而该第一和第二核苷酸序列编码具有共同功能 活性的多肽,或编码共同的结构性多肽结构域或共同的功能性多肽活性。例如,与本文提供的核 酸序列具有至少约60%、或65% 相同性,优选75% 相同性、更优选85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同性的核苷酸序列称为基本上相同。

[0138] II. 赖氨酰氧化酶(LOX) 和赖氨酰氧化酶-样(LOXL) 蛋白质

[0139] 实体瘤通常含有低氧张力(缺氧)区域。缺氧细胞在癌症治疗中产生很大 的问题,因为这些细胞具有高度侵袭性、转移性并且耐受治疗。对照这些 特征的潜在机制尚不清楚。转移在乳腺癌中特别成问题,因为对于患有可 检测转移性乳腺癌的大多数患者没有有效的治疗方法(Steeg,PS.Br.Can. Res.2 (6):396-9 (2000))。

[0140] 胞外基质(ECM) 对肿瘤细胞影响很大(Chang和Werb.Trends Cell.Biol. 11:S37-43 (2001); Radisky等.Semin.Cancer Bio.11:87-95 (2001))。缺氧 小鼠显示赖氨酰氧化酶(LOX) 活性组织特异性地增加,这种酶是在ECM形 成和维持中起关键作用的胺氧化酶(Brody等,Am.Rev.Respir.Dis.120: 1289-95 (2001))。最近的微阵列研究证实LOX在各种 细胞系中是缺氧诱导 基因(Denko,NC.Oncogene 22:5907-14 (2003))。然而,还未鉴定LOX 在缺 氧条件下的生物学作用。LOX启动ECM中胶原与弹性蛋白的共价交联, 从而增加不可 溶基质沉积和张力强度(Kagan和Li.J.Cell.Biochem.88: 660-72 (2003))。LOX表达对于伤口愈合和正常结缔组织功能至关重要,敲 除小鼠分娩后很快因心血管不稳定而死亡(Hornstra等,J.Biol.Chem.278: 14387-93 (2003))。LOX活性降低与例如埃勒斯-当洛斯综合症(Ehler-Danlos syndrome) 等疾病相关(Pinnell,SR.J.Invest.Dermatol.79 (增刊1): 90S-92S (1982); Royce等,Biochem.J.192:579-86 (1980); 和Khakoo等,Clin.Genet. 51: 109-14 (1997))。LOX活性增加导致纤维变性和组织重塑性疾病,例如 肝硬化(Kagan, HM.Pathol.Res.PRACT.190:910-0 (1994); Chanki等,Br.J. Dermatol.133:710-5 (1995); Ooshima和Midorikawa.,Jpn.Circ.J.41: 1337-40 (1977))。

[0141] LOX表达升高与肾细胞癌肿瘤分期进展有关(Stassar等,Br.J.Cancer, 85:1372-82 (2001)),在高度转移性和/或侵袭性的乳腺癌细胞系中观察到 LOX表达增加(Kirschmann等,Breast Cancer Res.Treat.55:127-36 (1999); 和Kirschmann等,Cancer

Res. 62:4478-83 (2002))。相反,在ras-转化成纤维细胞的非致瘤性回复体中,LOX起到肿瘤阻遏剂的作用 (Smith-Mungo 和 Kagan. Matrix Biol. 16:387-98 (1998))。在几种癌症类型,例如胃癌、结肠癌和前列腺癌中,LOX丧失与肿瘤发生有关 (Ren等,Cancer Res. 58: 1285-90 (1998); Cxiszar等,Int. J. Cancer 97:636-42 (2002); 和 Kaneda等,Cancer Res. 64:6410-5 (2004))。因此,看来LOX的肿瘤阻遏作用依赖于细胞类型和转化状态。最近证明前肽结构域(不是活性酶)负责肿瘤阻遏活性。在乳腺癌中, LOX表达增加与早期间质反应有关 (Decitre等,Lab. Invest. 78:143-51 (1998)), 在该癌症细胞类型中用反义LOX治疗阻止了体外侵入 (Kirschmann 等,Cancer Res. 62:4478-83 (2002))。

[0142] LOXL2的氨基酸序列与LOX和LOXL的保守性铜-结合和催化结构域 共有广泛的序列同源性。这些保守性结构域由LOX、LOXL和LOXL2基因内维持外显子-内含子结构保守性的5个连续外显子编码。核苷酸和 LOXL2、LOX 及 LOXL 的羧基-末端内的推导氨基酸序列的保守性包括LOX 和 LOXL中的铜-结合结构域 (WEWHSCHQHYH) 和LOXL2中的 WIWHDCHRHYH,其中4个组氨酸为赖氨酰氧化酶蛋白特异性的铜配位复合物提供氮配体 (Krebs 和 Krawetz, Biochim. Biophys. Acta 1202:7-12 (1993))。LOX (DIDCQWWIDITDVXPGNY) 和LOX2 (DIDCQWVVDITDVPPP GDY) 中的活性位点各在COOH-末端含有Tyr残基 (Y), 该残基与Lys残基一起参与这些蛋白质中存在的酰辅因子的形成。LOX和LOXL的特征性的 10个半胱氨酸在LOXL2中类似地具有保守性 (Kagan等, (1994) 刊于 Molecular Biology and Pathology of Elastic Tissue (弹性组织的分子生物学和 病理学) (Mecham, R.P. 和 Roberts, L. 编), 茨巴基金会论坛系列 (Ciba Foundation Symposium Series), Wiley, 奇切斯特, 英国)。在LOXL2-获得的 氨基酸序列中也鉴定到LOX和LOXL蛋白中存在的生长因子和细胞因子受体结构域。LOXL2中也存在富含清除受体半胱氨酸结构域的四个重复。(Saito等, J. Biol. Chem. 272:8157-8160 (1997); Resnick等, Trends Biochem. Sci. 19:5-8 (1994))。

[0143] 在LOXL2cDNA的3'-UTR结构域中注意到3个主要的转录终止位点。第一转录终止位点在终止密码子3'的690bp,第二位点是740bp,最后转录 终止位点在终止密码子3'的900bp。这些mRNA均具有大小略微不同的 3'-UTR。LOXL2基因的大多数外显子-内含子边界显示共有序列 (C/T) AG- 外显子-GT (A/G)。LOXL2基因的11个外显子的大小为112-940bp。虽然 LOXL2基因具有11个外显子,编码铜-结合和催化结构域的5个连续外显子(外显子6-10)显示84%序列相似性,这些外显子大小与LOX和LOXL基因的相应外显子非常相似。LOXL2基因中的所有其它外显子的序列和大小 均不同。除血液白细胞外,已在所有组织中鉴定到LOXL2。已在心脏、肝脏和胰腺中检测到LOXL2mRNA;与脑、肺、骨骼肌、胸腺和肾脏中表达 较低(比例抵御0.5)相比,在胎盘、前列腺、子宫和胰腺中表达明显较高(比 例介于2-3之间) (Jourdan-Le Saux等,J. Biol. Chem., 274 (18):12939-12944 (1999))。

[0144] 不同疾病中LOX和不同LOXL蛋白的表达不同。这可能是因为多种原 因,例如组织分布、加工、结构域、活性调节中的差异,以及这些蛋白质 之间的其它差异。例如,LOX和 LOXL涉及纤维变性疾病,因为LOX和 LOXL在围绕纤维变性区域的肌型成纤维细胞中均高度表达 (Kagen, Pathol. Res. Pract. 190:910-919 (1994); Murawaki等,Hepatology 14:1167-1173 (1991); Siegel等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2945-2949 (1978); Jourdan Le-Saux等,Biochem. Biophys. Res. Comm. 199:587-592 (1994); Kim等,J. Cell Biochem. 72: 181-188 (1999))。LOX和各种LOXL还涉及许多癌症。例 如,已有研究显示在人膀胱癌中LOXL

和LOXL4能后生沉默(epigenetically silenced)并抑制ras/胞外信号-调节的激酶信号传导途径(Wu等,Cancer Res. 67:4123-4129 (2007))。其它研究显示在头颈鳞状细胞癌中LOXL4基因选择性上调和扩增(Gorough等,J.Pathol.212:74-82 (2007))。LOX和LOXL2也显示涉及许多肿瘤,例如结肠和食道癌(Csiszar,Prog.Nucl.Acid Res. 70:1-32 (2001))。在乳腺癌中,LOX和LOXL家族成员也与该癌症有关(Kirschmann等,Cancer Res.62:448-4483 (2002))。

[0145] 赖氨酰氧化酶催化胶原中肽基赖氨酸和羟基赖氨酸以及弹性蛋白中肽基赖氨酸的氧化脱氨基作用。得到的肽基醛自发缩合并经历氧化反应以形成胞外基质的正常结构完整性所需的赖氨酸-衍生共价交联。在赖氨酰氧化酶与其底物的反应中,过氧化氢(H₂O₂)和铵的释放量与肽基醛产物成化学计量关系。参见,例如Kagan等,J.Cell.Biochem.88:660-72 (2003)。

[0146] 赖氨酰氧化酶分泌入胞外环境,然后经蛋白水解切割加工成功能性30 kDa酶和18kDa前肽。30kDa赖氨酰氧化酶具有酶活性,而50kDa酶原没有。前胶原C-蛋白酶将前-赖氨酰氧化酶加工成其活性形式,而前者是Bmp1、T111和T112基因的产物。该酶主要定位在胞外,虽然经加工的赖氨酰氧化酶还定位于胞内和核。编码前肽的序列在LOX和LOXL蛋白质中是中等保守的(60-70%),而编码酶原中定位活性位点的C-末端30kDa区域的序列是高度保守的(约95%)。参见Kagan等,J.Cell Biochem.59:329-38 (1995)。许多生长因子和类固醇,例如TGF-β、TNF-α和干扰素可诱导LOX (Csiszar,Prog.Nucl.Acid Res.70:1-32 (2001))。

[0147] 已知人和小鼠中存在5种不同的赖氨酰氧化酶,LOX和四种LOX相关或LOX-样蛋白(LOXL、LOXL2、LOXL3、LOXL4)。出于本发明的目的,LOX和LOX-样蛋白统称为“LOX/LOXL”。赖氨酰氧化酶的5种形式位于5种不同染色体上。这些家族成员显示在结构和功能上有一定重叠,但显示的功能还是不同。例如,虽然LOX的主要活性是在细胞外氧化胶原和弹性蛋白中的特定赖氨酸残基,但它还可在胞内起作用,从而可能调节基因表达。此外,LOX诱导单核细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞的趋化性。另外,敲除小鼠中LOX的缺失看来在分娩时是致命的(Hornstra等,J.Biol. Chem.278:14387-14393 (2003)),而LOXL缺陷不导致严重的发育表型(Bronson等,Neurosci.Lett.390:118-122 (2005))。

[0148] LOX的主要活性是在细胞外氧化胶原和弹性蛋白中的特定赖氨酸残基,但它还可在胞内起作用,从而可能调节基因表达(Li等,Proc.Natl.Acad. Sci.USA 94:12817-12822 (1997),Giampuzzi等,J.Biol.Chem. 275:36341-36349 (2000))。此外,LOX诱导单核细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞的趋化性(Lazarus等,Matrix Biol.14:727-731 (1995);Nelson等,Proc. Soc.Exp.Biol.Med.188:346-352 (1988))。LOX本身可被许多生长因子和类固醇,例如TGF-β、TNF-α和干扰素诱导(Csiszar,Prog.Nucl.Acid Res. 70:1-32 (2001))。最近的研究将不同生物学功能,例如发育调控、肿瘤抑制、细胞运动性和细胞衰老中的其它作用归于LOX。LOX及其最近发现的氨基氧化酶家族,LOX-样(LOXL)可在它们的胞内和胞外定位中起重要作用。

[0149] 本文所用的术语“赖氨酰氧化酶”指催化以下反应的酶:肽基-L-赖氨酰-肽+O₂+H₂O→肽基-醛基赖氨酰(allysyl)-肽+NH₃+H₂O₂。赖氨酰氧化酶(EC 1.4.3.13)的其它同义词包括蛋白质-赖氨酸6-氧化酶和蛋白质-L-赖氨酸:氧6-氧化还原酶(脱氨基作用)。参

见,例如Harris等,Biochim. Biophys. Acta 341:332-44(1974);Rayton等,J.Biol.Chem.254:621-26 (1979);Stassen,Biophys. Acta 438:49-60(1976)。LOX是在其活性中心具有 酪氨酰酮的赖氨酰加成物的含铜酮蛋白,其催化肽基赖氨酸氧化以形成肽基 α -氨基己二- δ -半醛。一旦形成,该半醛可与邻近的醛或其它赖氨酰基团 自发缩合以形成链内和链间交联。参见,例如Rucker等,Am.J.Clin.Nutr. 67:996S-1002S(1998)。

[0150] 术语“LOX”指所具有的氨基酸序列与以下序列之一表达或翻译的多 肽基本上相同的酶:EMBL/GenBank登录号:M94054 (SEQ ID NO:10) ; AAA59525.1 (SEQ ID NO:11) -mRNA; S45875 (SEQ ID NO:12) ; AAB23549.1 (SEQ ID NO:13) -mRNA; S78694 (SEQ ID NO:14) ; AAB21243.1 (SEQ ID NO:15) -mRNA; AF039291 (SEQ ID NO:16) ; AAD02130.1 (SEQ ID NO:17) -mRNA; BC074820 (SEQ ID NO:18) ; AAH74820.1 (SEQ ID NO:19) -mRNA; BC074872 (SEQ ID NO:20) ; AAH74872.1 (SEQ ID NO:21) -mRNA; M84150 (SEQ ID NO:22) ; AAA59541.1 (SEQ ID NO:23) -基因组DNA。LOX的一种实施方式是具有 某种氨基酸序列的人 赖氨酰氧化酶(hLOX) 前蛋白原 (SEQ ID NO:7),信号 肽切割后的分泌hLOX,例如SEQ ID NO:8或蛋白水解加工后的成熟 hLOX,例如SEQ ID NO:9。

[0151] LOX具有高度保守的蛋白质结构域,在包括人、小鼠、大鼠、鸡、鱼 和果蝇在内的多个物种中是保守性的。人LOX家族具有含205氨基酸LOX 催化结构域的高度保守C-末端区域。保守区域含有铜结合的(Cu)、保守性 细胞因子受体样结构域(CRL) 和赖氨酰-酪氨酰酮辅因子位点(LTQ)。预测的 胞外信号序列以阴影框出(参见通过引用纳入本文的美国临时申请号 60/963,249的图7)。类似地,12个半胱氨酸残基也是保守性的,其中2个 位于前多肽原区域内,而10个在LOX的催化活性加工形式中(Csiszar,Prog. Nucl.Acid Res.70:1-32 (2001))。保守区域还包括纤连蛋白结合结构域。

[0152] LOX的前多肽原区域含有信号肽,经切割(切割位点估计在 Cys21-A1a22之间) 产生信号序列肽和48kDa的氨基酸前肽形式LOX,其仍 是无活性的。该前肽在通过高尔基体时是N-糖基化的,其分泌入胞外环境,金属内切蛋白酶(一种前胶原C-蛋白酶) 在Gly168-Asp169之间切割该酶原或 前肽,该蛋白酶是Bmp1、T111和T112基因的产物。BMP I(骨形态发生蛋白I)是将该前肽加工成功能性30kDa酶和18kDa前肽的前胶原C-蛋白酶。编码该前肽的序列是中等(60-70%) 保守的,而编码该酶原中包含活性位点 的C-末端30kDa区域的序列是高度(约95%) 保守的(Kagan和Li, J.Cell. Biochem.88:660-672 (2003);Kagan等, J.Cell Biochem.59:329-38 (1995))。随后还除去了N-糖基单位。LOX存在未加工和/或加工(成熟)形式。成熟形 式的LOX通常有活性,虽然在一些实施方式中,未加工的LOX也有活性。

[0153] LOXL酶或蛋白质的具体例子见Molnar等,Biochim Biophys Acta. 1647:220-24 (2003);Csiszar,Prog.Nucl.Acid Res.70:1-32 (2001);和2001 年11月8日公布的W0 01/83702,所有这些文献通过引用纳入本文。(在这 三份出版物中应注意:“LOXL1”称为“LOXL”,而在本发明中,利用“LOXL” 总体上指代赖氨酰氧化酶-样蛋白,不只是LOXL1)。这些酶包括LOXL1,由GenBank/EMBL BC015090保藏的mRNA编码;AAH15090.1;LOXL2,由GenBank/EMBL U89942保藏的mRNA编码;LOXL3,由GenBank/EMBL AF282619保藏的mRNA编码;AAK51671.1;和LOXL4,由GenBank/EMBL AF338441保藏的mRNA编码;AAK71934.1。

[0154] 与上述LOX相似的潜在信号肽预计在LOXL、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4的氨基末端。对

于LOXL,预计的信号切割位点介于Gly25-Gln26 之间;对于LOXL2,介于Ala25-Gln26之间;对于LOXL3,介于Gly25-Ser26 之间。前-胶原和前-LOX中BMP-1切割的共有(位点)介于Ala/Gly-Asp之间, 其后常有酸性或荷电残基。产生活性LOXL的潜在切割位点是Gly303-Asp304,然而,其后是非典型的Pro。LOXL3还在Gly447-Asp448 具有潜在的切割位点,其后是Asp,在此位点进行加工可产生大小与活性 LOX相似的活性肽。还在LOXL4内鉴定到BMP-1的潜在切割位点,位于 残基Ala569-Asp570处(Kim等,J.Biol.Chem.278:52071-52074 (2003))。与 LOXL家族的其它成员类似,LOXL2也可经蛋白水解切割并分泌(Akiri等,Cancer Res.63:1657-1666 (2003))。

[0155] LOX和LOXL酶通过乒乓机制起作用,米-门二氏动力学描述了这种 机制(参见图1)。

[0156] LOX或LOXL蛋白的例子包括所具有的氨基酸序列与以下序列之一表达或翻译的多肽基本上相同的酶:EMBL/GenBank登录号:M94054; AAA59525.1—mRNA; S45875; AAB23549.1—mRNA; S78694; AAB21243.1—mRNA; AF039291; AAD02130.1—mRNA; BC074820; AAH74820.1—mRNA; BC074872; AAH74872.1-mRNA; M84150; AAA59541.1—基因组DNA。

[0157] 术语“LOX”和“LOXL”还包括基本上保留了催化赖氨酰残基脱氨基 作用的酶活性的功能片段或衍生物。功能片段或衍生物通常保留其赖氨酰 氧化活性的至少50%、或60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。LOX或LOXL2蛋白还可包括不实质性改变其活性的保守性氨基酸取代。本领域技术人员已知合适的保守性氨基酸取代,通常可作出这种取代而不 改变所得分子的生物学活性。本领域技术人员通常知道在多肽的非必需区 域进行单氨基酸取代不会实质性改变生物学活性。参见,例如Watson等, Molecular Biology of the Gene(基因的分子生物学),第4版,1987,BC出版公 司(The Benjamin/Cummings Pub.Co.),第224页。上文描述了保守性和非- 保守性氨基酸取代。

[0158] LOX和LOXL蛋白中已知不共有的特征是富含清除受体半胱氨酸 (SRCR) 结构域。LOX和LOXL缺乏SRCR结构域,而LOXL2、LOXL3和 LOXL4各在N-末端具有4个SRCR结构域。SRCR 结构域在分泌型、跨膜 或胞外基质蛋白质中发现。还知道SRCR结构域在许多分泌型和受体蛋白 中介导配体结合(Hoheneste等,Nat.Struct.Biol.6:228-232 (1999);Sasaki等,EMBO J.17:1606-1613 (1998))。LOXL的另一独特结构域是存在富含脯氨酸的结构域(Molnar等,Biochimica Biophysica Acta 1647:220-224 (2003))。

[0159] LOX和各种LOXL的组织分布也可能不同。LOX在心脏、胎盘、睾丸、肺、肾脏和子宫中高度表达,但在脑和肝脏中很少表达。LOXL1在胎盘、肾脏、肌肉、心脏、肺和胰腺中表达,与LOX一样在脑和肝脏中很少表达 (Kim等,J.Biol.Chem.270:7176-7182 (1995))。LOXL2在子宫、胎盘和其它 器官中高度表达,但与LOX和LOXL类似,在脑和肝脏中表达很少(Jourdan Le-Saux等,J.Biol.Chem.274:12939:12944 (1999))。LOXL3在睾丸、脾脏 和前列腺中高度表达,在胎盘中中等表达,在肝脏中不表达,而LOXL4在 肝脏中高度表达(Huang等,Matrix Biol.20:153-157 (2001);Maki和Kivirikko, Biochem.J.355:381-387 (2001);Jourdan Le-Saux等,Genomics 74:211-218 (2001);Asuncion等,Matrix Biol.20:487-491 (2001))。

[0160] 在疾病中,LOX和不同LOXL蛋白的表达或参与也不同。这可能是因为许多原因,例如组织分布、加工、结构域、活性调节中的差异,以及这些蛋白质之间的其它差异。例如,

LOX和LOXL涉及纤维变性疾病,因为 LOX和LOXL在围绕纤维变性区域的肌型成纤维细胞中均高度表达 (Kagen, Pathol. Res. Pract. 190: 910–919 (1994); Murawaki 等, Hepatology 14: 1167–1173 (1991); Siegel 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2945–2949 (1978); Jourdan Le-Saux 等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 199: 587–592 (1994); Kim 等, J. Cell Biochem. 72: 181–188 (1999))。LOX和各种LOXL还涉及许多癌症。例如,已有研究显示在人膀胱癌中LOXL和LOXL4能后生沉默(epigenetically silenced)并抑制ras/胞外信号-调节的激酶信号传导途径 (Wu 等, Cancer Res. 67: 4123–4129 (2007))。其它研究显示在头颈鳞状细胞癌 中LOXL4基因选择性上调和扩增(Gorrough 等, J. Pathol. 212: 74–82 (2007))。LOX和LOXL2也显示涉及许多肿瘤,例如结肠和食道癌(Csiszar, Prog. Nucl. Acid Res. 70: 1–32 (2001))。在乳腺癌中,LOX和LOXL家族成员与癌症有关(Kirschmann 等, Cancer Res. 62: 448–4483 (2002))。

[0161] III. 上皮-到-间充质过渡

[0162] 上皮-到-间充质过渡(EMT)指这样一种过程,即,具有上皮细胞的基因表达/表型特征(即,表达特定蛋白质、因子和分子)的细胞改变这些基因或它们的表达水平,从而导致该细胞的表型改变,这些表型改变由所表达基因中的改变体现。

[0163] 上皮和间充质细胞代表不同的谱系,各谱系具有各细胞类型的特异性独特基因表达分布。上皮细胞转化成间充质细胞需要在形态、细胞结构、黏附性、和/或迁移能力中发生改变。晚期肿瘤细胞常显示上皮标记物明显下调和胞间结合丧失,从而导致上皮极性丧失和胞间黏附降低。上皮特征丧失常伴有细胞运动性增加和间充质基因表达。EMT可包括接触抑制作用丧失、生长控制改变和/或侵袭性增强(Christiansen 和 Rajasekaran, Cancer Res., 66 (17): 8319–8326 (2006); 和 Thiery 等, Curr. Opin. Cell. Biol., 15: 740–6 (2003))。表明EMT的分子和形态学特征与组织学分化差、组织完整性破坏和转移有关。EMT为上皮细胞克服胞间结合施加给它们的物理局限性和采取运动表型提供了机制(Burdsal 等, Development, 118: 829–44 (1993); 和 Nieto 等, Mech. Dev., 105: 27–35 (2001))。

[0164] 常规使用的EMT分子标记包括N-钙粘蛋白和波形蛋白表达增加、 β -连环蛋白的核定位和抑制E-钙粘蛋白产生的转录因子,例如Snail1(Snail)、Snail2(Slug)、Twist、EF1/ZEB1、SIP1/ZEB2和/或E47的产生增加。EMT 的表型标记包括但不限于:迁移和三维侵袭的能力增加以及耐受凋亡。这些标记还与EMT的诱导和癌性表型相关。

[0165] 肿瘤进展期间EMT的发生使得肿瘤细胞获得渗入周围组织并最终转移至远端部位的能力。肿瘤细胞中基因表达的改变表明上皮或上皮样基因表达模式发展成间充质或间充质-样基因表达模式。例如,鉴定到E-钙粘蛋白丧失与转移癌以及对癌症治疗剂,例如EGFR抑制剂和IGF-R1抑制剂的耐受有关。基于一组标记物的表达改变,对许多不同类型癌症的分析显示循环肿瘤细胞或作为微小转移被发现的那些细胞证明有间充质转化。这些标记物包括但不限于:EGFR、E-钙粘蛋白、ErbB3、RAB25、整联蛋白 β 6、钙粘蛋白-2、成纤维细胞生长因子结合蛋白1、远侧-低同源盒(distal-less homeo box)1、ZEB1(转录因子8)、SIP1和波形蛋白。

[0166] 例如,上皮-样基因表达分布包括诸如E-钙粘蛋白、ErbB3或EGFR等基因的表达或表达增加。上皮-样基因表达分布可包括这些基因中一种或多种的表达,或者这些基因中至少两种、或至少三种的表达。

[0167] 与前述耐受治疗的癌症以及对其各自治疗产生耐受性的那些基于上皮 的肿瘤细胞/癌症一样,E-钙粘蛋白、ErbB3、RAB25、整联蛋白 β 6、钙粘 蛋白-2、成纤维细胞生长因子结合蛋白1、远侧-低同源盒1、ZEB1(转录因 子8)、SIP1、TGF- β 、FOXC2、GSK-3 β 、Smad-3、Pez、Snai11、Snai12和 ILK、以及波形蛋白的表达水平代表EMT特征共有的基因。总体上,本发明还涉及治疗患有癌症,特别是经历EMT的癌症的患者的方法。本发明人 发现经历EMT或从上皮-样基因表达模式转化成间充质-样基因表达模式的 癌症对LOX/LOXL抑制剂有反应。

[0168] 为评估肿瘤细胞上皮或间充质生物标记表达,可将含有肿瘤细胞、或 这些肿瘤细胞产生的蛋白质或核酸的患者样品用于例如通过引用全文纳入 本文的美国专利申请公布号20070065858所述的方法。简言之,可通过评 估肿瘤细胞样品,例如获自患者的肿瘤活检,或含有源自肿瘤的物质的其 它患者样品(例如,本文上述的血液、血清、尿液或其它体液或分泌物)中标 记物的含量(例如,绝对量或浓度)来评估生物标记的表达水平。当然可以先 对细胞样品施以各种熟知的收集后制备和保藏技术(例如,核酸和/或蛋白质 提取、固定、冷冻、超滤、浓缩、蒸发、离心等),再评估该样品中标记物 的含量。类似地,也可对肿 瘤活检施以收集后制备和保藏技术,例如固定。

[0169] 可以检测有至少一部分展示在表达它的肿瘤细胞表面的生物标记蛋白 的表达情况。技术人员不难测定标记蛋白或究竟是其一部分释放暴露在细 胞表面上。例如,可采用免疫学方法检测整个细胞上的这种蛋白质,或可 采用熟知的计算机序列分析方法预测至 少一个胞外结构域的存在(即,同时 包括分泌型蛋白质和具有至少一个细胞表面结构域的 蛋白质)。可以检测至 少一部分展示在表达它的细胞表面上的标记蛋白的表达情况,而无 需裂解 肿瘤细胞(例如,利用特异性结合蛋白质的细胞表面结构域的标记抗体)。

[0170] 可通过检测转化核酸或蛋白质的表达情况的各种熟知方法来评估生物 标记的表达情况。这种方法的非限制性例子包括,例如检测分泌型、细胞 表面、胞质或核蛋白的免疫 学方法、蛋白质纯化方法、蛋白质功能或活性 测定、核酸杂交方法、核酸逆转录方法和核酸 扩增方法。

[0171] 评估生物标记的表达情况可利用抗体(例如,放射性-标记的、生色团- 标记的、荧 光团-标记的或酶-标记的抗体)、抗体衍生物(例如,与底物或蛋 白-配体对(如生物素-链霉亲和素)的蛋白或配体偶连的抗体)、或特异性结合 生物标记蛋白或其片段,包括经历肿 瘤细胞中常进行的完全或部分翻译后 修饰(例如,糖基化、磷酸化、甲基化等)的生物标记 蛋白的抗体片段(例如, 单链抗体、分离的抗体超变区等)。

[0172] 还可通过制备患者样品中细胞的mRNA/cDNA(即,转录的多核苷酸), 将该mRNA/ cDNA与和生物标记核酸或其片段互补的参比多核苷酸杂交来 评估生物标记的表达情况。可任选先采用各种聚合酶链式反应方法扩增 cDNA,再与参比多核苷酸杂交。可类似地采用定量PCR检测一种或多种 生物标记的表达情况来评估生物标记的表达水平。或者,可采用检测生物 标记突变或变体(例如,单核苷酸多态性、缺失,等等)的许多已知方法来检 测患者中生物标记的存在。

[0173] 可将从样品中获得的转录多核苷酸混合物与固定了与生物标记核酸的 至少一部 分(例如,至少7、10、15、20、25、30、40、50、100、500或更 多核苷酸残基)互补的多核苷酸的 基板接触。如果互补或同源的多核苷酸在 基板上可差别检测(例如,可利用不同生色团或 荧光团检测,或固定在不同 的所选位置),那么可利用一块基板(例如,固定在所选位置的

多核苷酸“基因芯片”微阵列)同时检测多个生物标记的表达水平。当采用的评估生物标记表达的方法涉及一种核酸与另一种杂交时,可采用严谨性杂交条件进行杂交。

[0174] 当本发明方法利用多个本发明生物标记时,可在一份反应混合物(即,利用各生物标记的试剂,例如不同的荧光探针)或对应于一种或多种所述生物标记的各份反应混合物中,将患者样品中各生物标记的表达水平与相同类型的非癌性样品中该多个生物标记各自的正常表达水平作比较。

[0175] 可以各种方法评估正常(即,非癌性)人组织中生物标记的表达水平。可通过以下方式评估这种正常的表达水平:评估看来非癌性的一部分细胞中生物标记的表达水平,然后将该正常表达水平与一部分肿瘤细胞的表达水平作比较。由于常规实施本文所述方法可获得进一步的信息,可利用生物标记的正常表达水平的群体-平均值。或者,可通过评估以下样品中生物标记的表达情况来测定生物标记的正常表达水平:从未患癌症的患者获得的患者样品,从怀疑其癌症发作前的患者获得的患者样品,存档的患者样品。

[0176] 检测生物学样品中生物标记蛋白或核酸存在与否的示范性方法包括从测试对象获得生物学样品(例如,肿瘤相关体液),将该生物学样品与能检测多肽或核酸(例如,mRNA、基因组DNA或cDNA)的化合物或试剂接触。因此,可采用这些检测方法在例如体外生物学样品中以及体内检测mRNA、蛋白质、cDNA或基因组DNA。检测mRNA的体外技术包括,例如Northern杂交和原位杂交。检测生物标记蛋白的体外技术包括但不限于:酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。检测基因组DNA的体外技术包括,例如Sourthern杂交。检测mRNA的体内技术包括,例如聚合酶链式反应(PCR)、Northern杂交和原位杂交。此外,检测生物标记蛋白的体内技术包括将直接针对蛋白质或其片段的标记抗体引入对象。例如,可用放射性标记物标记抗体,而所述标记物在对象中的存在和位置可通过标准成像技术检测。

[0177] 这种诊断和预后试验的通用原理包括制备可含有生物标记和探针的样品或反应混合物,在合适条件下允许该生物标记和探针相互作用和结合充足的时间,因而形成可从反应混合物中取出和/或在其中检测的复合物。可采用各种方式进行这些测定。

[0178] 例如,进行这种测定的一种方法包括将生物标记或探针锚定在固相支持物上(也称为基板),反应结束时检测锚定在该固相上的靶生物标记/探针复合物。在这种方法的一个实施方式中,可将要检验生物标记的存在和/或浓度的患者样品锚定在载体或固相支持物上。在另一实施方式中,相反的情况是可能的,其中探针锚定在固相上,将对象的样品作为该测定的未锚定组分进行反应。

[0179] 已建立了几种方法将试验组分锚定于固相。这些方法包括但不限于:通过生物素和链霉亲和素的偶连以固定生物标记或探针分子。可采用本领域已知的技术(例如,伊利诺斯州罗克福德市皮尔斯化学品公司(Pierce Chemicals, Rockford, IL)的生物素化试剂盒)从生物学-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺)制备这种生物素化试验组分,并将其固定在链霉亲和素-包被的96孔板(皮尔斯化学品公司)的孔中。在某些实施方式中,可预先制备固定有试验组分的表面并保存。这种试验的其它合适载体或固相支持物包括能结合生物标记或探针所属分子类别的任何材料。熟知的支持物或载体包括但不限于:玻璃、聚苯乙烯、尼龙、聚丙烯、尼龙、聚乙烯、右旋糖、直链淀粉(amylose)、天然和改性的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁。为用上述方法进行测定,将未固定组分加到锚定了第二组分的固相上。

反应完成后，可在形成的任何复合物维持固定在固相上的条件下除去（例如，通过洗涤）未形成复合物的组分。可采用本文概述的多种方法检测锚定在固相上的生物标记/探针复合物。在一个实施方式中，当探针是未锚定试验组分时，可为测定的检测和读出目的用本文所述和本领域技术人员熟知的可检测标记物对其直接或间接作标记。

[0180] 还可能直接检测生物标记/探针复合物形成而无需进一步操作或标记任一组分（生物标记或探针），例如采用荧光能量转移技术（即，FET，参见，例如Lakowicz等，美国专利号5,631,169;Stavrianopoulos等，美国专利号4,868,103）。选择第一、供体分子上的荧光团标记物，从而在用波长合适的入射光激发后，其发出的荧光能量会被第二接受体分子上的荧光标记物吸收，进而能因吸收能量而发荧光。或者，供体蛋白分子可简单地利用色氨酸残基的天然荧光能量选择发出不同波长的光的标记物，从而可区分接受体分子与供体。由于标记物之间能量转移的效率与这些分子隔开的距离有关，可评估这些分子之间的空间关系。在这些分子之间发生结合的情况下，试验中接受体分子标记物发出的荧光应最大。可通过本领域熟知的标准荧光检测方法（例如，利用荧光计）方便地检测FET结合事件。

[0181] 在另一实施方式中，可采用诸如实时生物分子相互作用分析（BIA）等技术测定探针识别生物标记的能力，而无需标记任一试验组分（探针或生物标记）（参见，例如Sjolander,S.和Urbaniczky,C.,1991,Anal.Chem.63:2338-2345;Szabo等,1995,Curr.Opin.Struct.Biol.5:699-705）。本文所用的“BIA”或“表面等离振子共振”是实时研究生物特异性相互作用，而无需标记任何相互作用物的技术（例如，BIAcore）。结合表面的质量改变（表示结合事件）导致光在该表面附近的折射率改变（表面等离振子共振（SPR）的光学现象），从而产生可用作生物分子之间的实时反应标志的可检测信号。

[0182] 或者，在另一实施方式中，可用生物标记和探针作为液相中的溶质进行类似的诊断和预后试验。在这种试验中，通过任意的各种标准技术分开形成复合物的生物标记和探针与未形成复合物的组分，所述技术包括但不限于：差速离心、层析、电泳和免疫沉淀。在差速离心中，可通过一系列离心步骤分开生物标记/探针复合物与未形成复合物的试验组分，因为复合物的尺寸和密度不同造成沉降平衡不同（参见，例如Rivas,G.,和Minton,A.P.,1993,Trends Biochem Sci.18(8):284-7）。标准层析技术还可用于分开形成复合物与未形成复合物的分子。例如，凝胶过滤层析利用柱形式的合适凝胶过滤树脂，根据尺寸分离分子；例如可分开较大复合物与较小的未形成复合物的组分。类似地，可利用与未形成复合物的组分相比，生物标记/探针复合物相对不同的电荷特性来区分复合物与未形成复合物的组分，例如利用离子交换层析树脂。本领域技术人员熟知这种树脂和层析技术（参见，例如Heegaard,N.H.,1998,J.Mol.Recognit.Winter 11(1-6):141-8;Hage,D.S.和Tweed,S.A.J.Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997年10月10日；699(1-2):499-525）。还可采用凝胶电泳分开未形成复合物的试验组分与未结合的组分（参见，例如Ausubel等编，Current Protocols in Molecular Biology（最新分子生物学方法），约翰威利父子公司（John Wiley&Sons），纽约，1987-1999）。在该技术中，蛋白质或核酸复合物可根据例如尺寸或电荷而分离。为在电泳过程中维持结合相互作用，通常利用非变性凝胶基质材料和不存在还原剂的条件。本领域技术人员熟知具体试验及其组分的合适条件。

[0183] 在另一实施方式中，可采用本领域熟知的方法，通过原位和体外形式测定生物学样品中生物标记mRNA的水平。术语“生物学样品”应包括从对象分离的组织、细胞、生物学

液体及其分离物,以及存在于对象内的组织、细胞和液体。许多表达检测方法利用分离的RNA。对于体外方法,可采用不对mRNA的分离作出选择的任何RNA分离技术纯化肿瘤细胞的RNA(参见,例如Ausubel等编,最新分子生物学方法,约翰威利父子公司,纽约,1987-1999)。此外,不难采用本领域技术人员熟知的技术加工大量组织样品,例如Chomczynski(1989,美国专利号4,843,155)的单步骤RNA分离方法。

[0184] 分离的mRNA可用于杂交或扩增试验,包括但不限于:Southern或Northern分析、聚合酶链式反应分析和探针阵列。检测mRNA水平的一种诊断方法包括将分离的mRNA接触能杂交所检测的基因编码的该mRNA的核酸分子(探针)。核酸探针可以是例如全长cDNA或其一部分,如至少7、15、30、50、100、250或500个核苷酸长并能在严谨性条件下特异性杂交编码本发明生物标记的mRNA或基因组DNA的寡核苷酸。本文描述了本发明诊断试验所用的其它合适探针。mRNA与探针杂交表明所讨论的生物标记得到表达。

[0185] 一种形式将mRNA固定在固体表面并与探针接触,例如通过用分离的mRNA跑琼脂糖凝胶,并将该mRNA自凝胶转移至膜,例如硝基纤维素膜上。另一方式将探针固定在固体表面,将mRNA与例如艾飞基质公司(Affymetrix)基因芯片阵列中的探针接触。技术人员不难改进已知的mRNA检测方法以便用于检测本发明生物标记所编码mRNA的水平。

[0186] 测定样品中mRNA生物标记的水平的另一方法包括核酸扩增的过程,例如通过RT-PCR(Mullis,1987,美国专利号4,683,202中所列的实验实施方式),连接酶链式反应(Barany,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:189-193),自我维持效率复制(Guatelli等,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878),转录扩增系统(Kwoh等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177),Q-β复制酶(Lizardi等,1988,Bio/Technology 6:1197),滚环复制(Lizardi等,美国专利号5,854,033)或任何其它核酸扩增方法,然后采用本领域技术人员熟知的技术检测扩增的分子。如果这种分子的存在数量非常低,这些检测方案尤其可用于检测核酸分子。本文所用的扩增引物定义为可与某基因的5'或3'区域退火(分别是正链和负链,或反之亦然)并在之间含有短区域的一对核酸分子。扩增引物通常长约10-30个核苷酸,侧接约50-200个核苷酸长的区域。在合适条件下并利用合适试剂,这种引物可扩增包含引物侧接的核苷酸序列的核酸分子。

[0187] 对于原位方法,无需在检测前分离肿瘤细胞的mRNA。在这种方法中,采用已知的组织学方法制备和/或加工细胞或组织样品。然后将该样品固定于支持物,通常是载玻片上,然后与能杂交该生物标记所编码mRNA的探针杂交。

[0188] 除了根据生物标记的绝对表达水平进行测定外,还可根据生物标记的标准化表达水平进行测定。通过比较生物标记的表达与不是生物标记的某基因,例如组成型表达的持家基因的表达来校正该生物标记的绝对表达水平,从而使表达水平标准化。用于标准化的合适基因包括持家基因,例如肌动蛋白基因或上皮细胞-特异性基因。该标准化能比较一种样品,例如患者样品与另一样品,例如非肿瘤样品中的表达水平,或不同来源样品之间的表达水平。

[0189] 或者,表达水平可以是相对表达水平。为测定生物标记(例如,间充质生物标记)的相对表达水平,可在测定所讨论样品的表达水平之前,先测定10份以上、20份以上、30份以上、40份以上、或50份以上正常样品与癌细胞分离物的该生物标记表达水平。测定在大量样品中检验的各基因的平均表达水平,将其用作该生物标记的基线表达水平。然后将测

试样品中生物标记的所测定表达水平(绝对表达水平)除以获得的该生物标记的平均表达水平。从而得到相对表达水平。

[0190] 本发明的另一实施方式检测生物标记蛋白。检测本发明生物标记蛋白的一类试剂是能结合这种蛋白的抗体或其片段,例如可检测标记的抗体。抗体可以是多克隆或单克隆。可利用完整的抗体或其抗原结合片段(例如, Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、单结合链多肽)。对于探针或抗体,术语“标记的”应包括通过将可检测物质偶连(即,物理连接)于该探针或抗体而对其作直接标记,以及通过与作直接标记的另一试剂的反应活性而对该探针或抗体作间接标记。间接标记的例子包括利用荧光标记的第二抗体检测第一抗体和用生物素对DNA探针作末端标记,从而可用荧光标记的链霉亲和素检测。

[0191] 可采用本领域技术人员熟知的技术分离肿瘤细胞的蛋白质。所用的蛋白质分离方法可以是,例如Harlow和Lane(Harlow和Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual(抗体:实验室手册),冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约)所述的。

[0192] 可采用各种形式测定某样品是否含有结合给定抗体的蛋白质。这种形式的例子包括但不限于:酶免疫测定(EIA)、放射性免疫测定(RIA)、蛋白质印迹和酶联免疫吸附测定(ELISA)。技术人员不难改进已知的蛋白质/抗体检测方法以便用于测定肿瘤细胞是否表达本发明的生物标记。

[0193] 在一种形式中,抗体或抗体片段或衍生物可用于诸如蛋白质印迹或免疫荧光技术等方法中来检测表达的蛋白质。在这种应用中,可将抗体或蛋白质固定于固体支持物上。合适的固相支持物或载体包括能结合抗原或抗体的任何支持物。熟知的支持物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、直链淀粉、天然和改性的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁。本领域技术人员知道许多其它合适的载体以便结合抗体或抗原,可改进这种支持物以便用于本发明。例如,可对从肿瘤细胞分离的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将其固定在固相支持物,例如硝基纤维素上。然后可用合适缓冲液洗涤该支持物,然后用可检测标记的抗体处理。随后用缓冲液再次洗涤该固相支持物以除去未结合的抗体。然后可通过常规方式检测固体支持物上的结合抗体量。

[0194] 对于ELISA试验,特异性结合对可以是免疫或非免疫类型的。免疫特异性结合对的例子有抗原-抗体系统或半抗原/抗-半抗原系统。可以有荧光素/抗-荧光素、二硝基苯基/抗-二硝基苯基、生物素/抗-生物素、肽/抗-肽等。可通过本领域技术人员熟悉的常规方法产生特异性结合对的抗体成员。这些方法包括用特异性结合对的抗原成员免疫动物。如果特异性结合对的抗原成员是非免疫原性的,例如半抗原,可将其共价偶联于载体蛋白以赋予其免疫原性。非免疫结合对包括其中的两组分对彼此共有天然亲和力但却不是抗体的系统。示范性非免疫对是生物素-链霉亲和素、内因子-维生素B12、叶酸-叶酸结合蛋白等。

[0195] 可采用各种方法用特异性结合对的成员共价标记抗体。根据特异性结合对的成员的性质,所需连接的类型和抗体对各种偶连化学反应的耐受性来选择方法。可利用商业购得的活性衍生物将生物素共价偶联于抗体。其中一些是结合蛋白质上氨基的生物素-N-羟基-琥珀酰亚胺;通过碳二亚胺偶连结合碳水化合物部分、醛和羧基的生物素酰肼;和结合巯基的生物素马来酰亚胺和碘乙酰基生物素。可利用异硫氰酸荧光素将荧光素偶联于蛋白质氨基。可利用2,4-二硝基苯硫酸酯或2,4-二硝基氟苯将二硝基苯基偶联于蛋白质

胺基。可采用其它标准偶连方法将单克隆抗体偶联于特异性结合对的成员,包括二醛、碳二亚胺偶连,同功能交联(homofunctional cross-linking)和异双功能交联(heterobifunctional cross-linking)。碳二亚胺偶连是将某一物质上的羧基偶联于另一物质上的胺基的有效方法。利用商业购得的试剂1-乙基-3-(二甲基-胺基丙基)-碳二亚胺(EDAC)可促进碳二亚胺偶连。

[0196] 包括双功能亚氨酸酯和双功能N-巯基琥珀酰亚胺酯在内的同双功能交联剂可商业购得,并可用于将某一物质上的胺基偶联于另一物质上的胺基。异双功能交联剂是具有不同官能团的试剂。商业购得的最常见异双功能交联剂具有胺反应活性N-巯基琥珀酰亚胺酯作为官能团,和巯基反应活性基团作为第二官能团。最常见的巯基反应活性基团是马来酰亚胺、吡啶基二硫化物和活性卤素。官能团之一可以是光活性的芳基氮烯,其经照射后可与各种基团反应。

[0197] 可通过偶连于报道分子来制备可检测标记的抗体或特异性结合对的可检测标记成员,所述报道分子可以是放射性同位素、酶、生荧光的、化学发光的或电化学物质。两种常用的放射性同位素是¹²⁵I和³H。标准放射性同位素标记方法包括用于¹²⁵I的氯胺T、乳过氧化物酶和博尔顿-亨特方法(Bolton-Hunter methods)以及用于³H的还原甲基化。术语“可检测标记的”指分子的标记方式使得不难通过该标记物固有的酶活性或通过该标记物与本身不难检测的另一组分结合而检测。

[0198] 适用于本发明的酶包括但不限于:辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、包括萤火虫和海肾的萤光素酶,β-内酰胺酶、脲酶、绿色荧光蛋白(GFP)和溶菌酶。采用二醛、碳二亚胺偶连,上述同双功能交联剂和异双功能交联剂来偶连抗体与特异性结合对的成员可促进酶标记。

[0199] 选择的标记方法依赖于酶上可用的官能团和待标记的物质以及二者对偶连条件的耐受性。本发明所用的标记方法可以是目前采用的任何常规方法之一,包括Engvall和Pearlmann, Immunochemistry 8, 871 (1971), Avrameas和Temynt, Immunochemistry 8, 1175 (1975), Ishikawa等, J. Immunoassay 4 (3) : 209-327 (1983) 和Jablonski, Anal. Biochem. 148:199 (1985) 所述那些方法,但不限于此。

[0200] 可通过间接方法,例如利用间隔臂或特异性结合对的其它成员进行标记。该方法的例子是用顺序或同时加入的未标记链霉亲和素和生物素化酶,链霉亲和素和生物素化酶检测生物素化抗体。因此,按照本发明,可用报道分子直接可检测标记,或用特异性结合对的第一成员间接标记用于检测的抗体。当抗体偶联于特异性结合对的第一成员时,通过将抗体-特异性结合对的第一成员的复合物与如上所述标记或未标记的该结合对第二成员反应来进行检测。

[0201] 此外,可通过将未标记抗体与该未标记抗体的特异性标记抗体反应来检测未标记的抗体。在该例子中,上文所用的“可检测标记的”应表示含有未标记抗体的特异性抗体能结合的表位。可采用上述任何方法直接或间接标记这种抗-抗体。例如,可将抗-抗体偶联于生物素,从而可通过与上述链霉亲和素-辣根过氧化物酶系统反应来检测。因此,一个实施方式利用生物素。生物素化抗体进而与链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物反应。生色检测可利用邻苯二胺、4-氯-萘酚、四甲基联苯胺(TMB)、ABTS、BTS或ASA。

[0202] 在实施本发明的一个免疫测定形式中,采用正向夹心测定,其中采用常规技术将

捕捉试剂固定于支持物表面。用于这些测定的合适支持物包括 合成聚合物支持物,例如聚丙烯、聚苯乙烯、取代的聚苯乙烯,例如胺化 或羧化聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚酰胺、聚氯乙烯、玻璃珠、琼脂或硝基 纤维素。

[0203] IV. 抗-LOX抗体和抗-LOXL2抗体

[0204] 本文提供的抗体可用于诊断血管生成及相关疾病,纤维化及相关疾病,肿瘤或转移。本文提供的抗体抑制血管生成及相关疾病、抑制纤维化及相关疾病 和治疗肿瘤后转移。本文提供的抗体可用于监测本申请所述和本领域已知治疗 方案和方法等的效率。这些方法中可用的抗体和抗原结合片段是,例如特异性 结合LOX或LOXL2的那些。

[0205] 本文还描述了产生所述抗体或其功能片段的细胞系,产生这些细胞系的方法和产生这些抗体或其功能片段的方法。

[0206] 本文利用各种语法形式的“抗体”或“抗体分子”,作为集合名词指代一 群免疫球蛋白分子和/或免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即,含有抗体结合部位或互补位的分子。因此,述及“抗体”还包括述及抗体的任何抗原结合片段。

[0207] 本文所用的“免疫活性”指对某氨基酸残基序列(“结合位点”或“表位”) 具有特异性的抗体或其片段,如果对其它肽/蛋白质具有交叉反应活性,其在配 制以供人用给药的水平没有毒性。“表位”指抗原中能与抗体或其抗原结合片 段形成相互作用的部分。这种结合相互作用可体现为与CDR的一个或多个氨 基酸残基的分子间接触。抗原结合可涉及CDR3 或CDR3对。表位可以是线形 肽序列(即,“连续性的”)或者可以由非连续氨基酸序列构成(即,“构象的” 或“不连续的”)。术语“优先结合”表示结合物质与结合位点的结合亲和力高于其与无关氨基酸序列结合的亲和力。

[0208] 本文所用的术语“亲和力”指两种物质可逆结合的平衡常数,表示为解离 常数(K_d)。亲和力可以是抗体与无关氨基酸序列的亲和力的至少1-倍、至少 2-倍、至少3-倍、至少4-倍、至少5-倍、至少6-倍、至少7-倍、至少8-倍、至少9-倍、至少10-倍、至少20-倍、至少30-倍、至少40-倍、至少50-倍、至少60-倍、至少70-倍、至少80-倍、至少90-倍、至少100-倍、或至少1000- 倍,或更高。抗体与靶蛋白的亲和力可以是,例如约100纳摩尔(nM)-约 0.1nM,约100nM-约1皮摩尔(pM),或约100nM-约1毫毫微摩尔(fM) 或更高。本文所用的术语 “亲合力”指稀释后两种或更多种物质的复合物 对解离的耐受性。抗体和/或抗原结合片段的术语“免疫活性”和“优先结合”可互换使用。

[0209] 术语“抗体”还包括通过采用分子生物学技术工程改造而只包含天然分子 的一部分的分子,只要那些分子能以所需特异性结合特定抗原或氨基酸序列。这种备选抗体分子包括抗体分子的经典已知部分、单链抗体和单链结合分子。

[0210] “抗体结合部位”是抗体分子中包含特异性结合抗原的重链和轻链可变区 和超变区的结构部分。

[0211] 本文所用的术语“CDR”或“互补决定区”应表示在重链和轻链多肽的可 变区内发现的不连续抗原结合部位.Kabat等,J.Biol.Chem.252:6609-6616 (1977);Kabat等, U.S.Dept.of Health and Human Services(美国健康与人类 服务部),“Sequences of proteins of immunological interest(免疫学感兴趣蛋白 质的序列)”(1991);Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);和 MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996) 描述了这些特定区域,当彼此 比较时,这些定义包括重叠氨基酸残基或其子集。然而,将各定

义用于指代抗体或嫁接抗体或其变体的CDR应包括在本文定义和使用的术语的范围内。包括以上引用的任一参考文献所定义的CDR的氨基酸残基列于下表1作为比较。

[0212] 表1:CDR定义

	Kabat¹	Chothia²	MacCallum³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
[0213] V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

[0214] ¹按照Kabat等(同上)命名原则的残基编号

[0215] ²按照Chothia等(同上)命名原则的残基编号

[0216] ³按照MacCallum等(同上)命名原则的残基编号

[0217] 当用于指代抗体可变区时,本文所用的术语“框架”应表示抗体可变区内 CDR区域外的所有氨基酸残基。可变区框架通常是长度介于约100-120个氨基酸之间的不连续氨基酸序列,但应只表示CDR外的那些氨基酸。本文所用的 术语“框架区”应表示由CDR隔开的框架的各结构域。

[0218] “LOX活性的抑制剂”或“LOXL2活性的抑制剂”可以是直接或间接抑制赖氨酰氧化酶活性的抗体或其抗原结合片段,所述活性包括但不限于:基因表达、翻译后修饰、酶促加工或切割、与LOX/LOXL2调节剂结合、LOX/ LOXL2的酶活性或本文所述任何其它活性。

[0219] 本文所用的术语“抗体”指包含必需可变区序列以特异性结合抗原性表位 的分离或重组结合物质。因此,抗体是显示所需生物学活性,例如结合特异性 靶抗原的任何形式的抗体或其片段。因此,其以最广泛的含义使用并专门包括 单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合型抗体、双抗体(diabody)、多特异性抗体(例如,双特异性抗体) 和抗体片段, 包括但不限于单链结合多肽、VH、VL、Fv、scFv、Fab和Fab2等,只要它们 显示所需生物学活性。因此,术语“人抗体”指除可能的非人CDR区域外,含有人来源序列的抗体,该术语不暗示存在Ig分子的完整结构,只是暗示该 抗体在人中的免疫原性最低。

[0220] 术语“结合”指两种分子因例如共价、静电、疏水和离子和/或氢键相互作用而直接缔合,包括例如盐桥和水桥(water bridge)等相互作用。术语“特异 性结合”适用于抗体或其抗原结合片段不与除其表位外的分子显示任何显著结合的情况。在一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段特异性结合人LOX或 人LOXL2,在约4℃、25℃、37℃或42℃检测时,其解离常数Kd等于或小于 约100nM、小于约10nM、小于约1nM、小于约0.5nM、小于约0.1nM、小于约0.01nM、或小于约0.005nM。

[0221] 可采用常规方法制备抗体。例如,可采用标准方法,利用肽或全长赖氨酰 氧化酶蛋白制备多克隆抗血清或单克隆抗体。可用能在哺乳动物中引发抗体反 应的免疫原性形式的肽免疫哺乳动物(例如,小鼠、仓鼠或家兔)。增强肽的免 疫原性的技术包括偶连于载体或本领域熟知的其它技术。例如,可在有佐剂存 在下给予蛋白质或肽。可通过检测血浆或血清中的抗体滴度监测免疫进展。标 准ELISA或其它免疫测定方法可利用免疫原作为抗原以评估抗体水平。免疫 后,可获得抗血清,如果需要,可从血清中分离多克隆抗体。

[0222] 可在细胞培养物、噬菌体或各种动物,例如(但不限于)牛、家兔、山羊、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、绵羊、狗、猫、猴、黑猩猩、猿中产生抗体。因此,本发明方法可用的抗体通常是哺乳动物抗体。可采用噬菌体技术分离初始抗体 或产生特异性或亲合力性质改变的变体。这种技术是本领域的常规和熟知技术。一个实施方式通过本领域已知的重组方法制备抗体。例如,可用包含编码 抗体的DNA序列的载体转染宿主细胞来产生重组抗体。可利用一个或多个载体将表达至少一个VL和一个VH区域的DNA序列转染入宿主细胞。抗体产生和制备的重组方法的示范性描述包括Delves, Antibody Production: Essential Techniques (抗体制备:基本技术) (Wiley, 1997); Shephard等, Monoclonal Antibodies (单克隆抗体) (牛津大学出版社, 2000); 和Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice (单克隆抗体:原理和实践) (学术出版社 (Academic Press), 1993)。

[0223] 还可按照Kenney等 (“Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web. (利用分泌型报道分子网络制备单克隆抗体)” Biotechnology 13:787-790,1995) 所述的方法制备抗体。简言之,给小鼠皮下 (s.c.) 注射佐剂制剂配制的抗原。对于肽抗原,先将肽偶联于牛血清白蛋白并用 弗氏佐剂(FA)配制,再进行免疫。对于蛋白质抗原,用铝胶-胞壁酰二肽 (ALD/MDP) 佐剂配制蛋白质。分离小鼠脾脏和淋巴结的细胞,与合适的细胞融合并培养。分离并克隆HAT-选择细胞的杂交瘤文库。分选细胞,筛选 血清和上清液中是否存在抗体。

[0224] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,可包括完整抗体的抗原结合或可变 区域。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、scFv片段、双抗体、线形抗体 (Zapata等, Protein Eng. 8 (10) :1057-1062 (1995))、单链抗体 分子、单链结合多肽和由抗体片段形成多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗 体产生各含一个抗原结合部位的两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片 段,和残留的“Fc”片段,该名称反映出易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合部位而仍能交联抗原的F(ab')2片段。

[0225] “单链结合多肽”指具有重链可变区、轻链可变区和任选的免疫球蛋白 Fc区的多肽。这种分子是任选通过存在免疫球蛋白Fc区而具有效应功能的单 链可变片段。本领域已知制备单链结合多肽的方法(例如,美国专利申请 2005/0238646)。

[0226] “Fv”指含有抗原-识别和-结合部位的抗体片段。该区域由一个重链可变 域和一个轻链可变域的紧密、非共价缔合的二聚体构成。就是这种构型使得各 可变域的3个CDR相互作用从而在VH-VL二聚体表面上限定了抗原结合部 位。6个CDR共同赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使是一个可变域(或只 含3个抗原特异性CDR的一半Fv)也具有识别和结合抗原的能力,虽然亲和力 低于完整的结合部位。

[0227] “Fab”片段含有“Fv”,还含有轻链恒定区和重链的第一恒定区 (CH1)。Fab片段与 Fab' 片段的区别在于在重链CH1区的羧基末端加入少许残基,包括抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。在本文中,Fab' -SH是Fab' 的名称,其中恒定区的半胱氨酸残基具有游离的巯基团。最初产生的F(ab')2抗体片段是之间具有铰链半胱氨酸的一对Fab' 片段。其它化学偶连的抗体片段也是已知的。

[0228] 根据它们恒定区的氨基酸序列,可将任何有脊椎物种的抗体(免疫球蛋白) 的“轻链”分成两种明显不同类型中的一种,称为 κ 和 λ 。

[0229] 依据它们重链的恒定区的氨基酸序列,可将免疫球蛋白分成不同种类。免 疫球蛋

白有5种主要的类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,这些类别中的几种可再分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定区(Fc)分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0230] 根据它们恒定区的氨基酸序列,可将任何有脊椎物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”分成两种明显不同类型中的一种,称为 κ 和 λ 。

[0231] “单链Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于一根多肽链中。如果需要,Fv多肽还可在VH和VL结构域之间包含多肽接头,从而使得sFv形成抗原结合的所需结构。sFv的综述可参见 Pluckthun刊于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies(单克隆抗体的药理学),第113卷,Rosenburg和Moore编,S-V公司(Springer-Verlag),纽约,第269-315页(1994)。

[0232] 术语“双抗体”指含两个抗原结合部位的小抗体片段,这些片段在同一多肽链(VH-VL)中含有与轻链可变域(VL)相连的重链可变域(VH)。利用很短从而不能在同一链的两个结构域之间进行配对的接头,可迫使这些结构域与另一链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合部位。对双抗体的更全面描述见,例如EP 404,097;W0 93/11161;和 Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:6444-6448(1993)。

[0233] 抗体还可以是双特异性抗体。双特异性抗体是对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆、嵌合型、人或人源化抗体。在本例中,一种结合特异性是对,例如LOX或LOXL2,而另一种是对任何其它抗原的,例如细胞表面蛋白质或受体亚基。在其它实施方式中,双特异性抗体对于LOX和LOXL2具有特异性。

[0234] 本领域已知制备双特异性抗体的方法。重组制备双特异性抗体通常基于两对免疫球蛋白重链/轻链的共同表达,其中两个重链具有不同特异性(Milstein 和Cuello, Nature, 305:537-539(1983))。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(细胞杂交瘤)产生可能有10种不同抗体分子的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常经由亲和力层析步骤纯化正确的分子。类似的方法描述于1993年5月13日公布的W0 93/08829,和Traunecker等,EMBO J., 10:3655-3659(1991)。

[0235] 可采用本领域已知的常规方法将具有所需结合特异性的抗体可变域(抗体-抗原结合部位)融合于免疫球蛋白恒定区序列。所述融合通常是与至少含有铰链区、CH2和CH3区域部分的免疫球蛋白重链恒定区进行融合。在一个实施方式中,含有轻链结合所需部位的第一重链恒定区(CH1)存在于这些融合体的至少一种中。可将编码免疫球蛋白重链融合体和免疫球蛋白轻链(如果需要的话)的DNA插入不同表达载体中,并共同转染入合适的宿主生物。产生双特异性抗体的进一步细节见,例如Suresh等,Methods in Enzymology, 121:210 (1986)。

[0236] 按照W0 96/27011所述的另一方案,可工程改造一对抗体分子之间的界面以尽可能提高从重组细胞培养物中回收的异源二聚体百分比。该界面可包含抗体恒定区的CH3区域的至少一部分。在该方法,第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链被较大侧链替代(例如,酪氨酸或色氨酸)。通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替换大的侧链在第二抗体分子的界面上产生与大侧链的大小相同或相似的补偿“空腔”。这提供了提高异源二聚体产量以超过不想要的终产物,例如同源二聚体的机制。

[0237] 可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段(例如,F(ab')2双特异性抗体)。

文献中描述了从抗体片段制备双特异性抗体的技术。例如,可采用化学连接制备双特异性抗体。Brennan等,Science 229:81(1985)描述蛋白水解切割完整抗体以产生F(ab')2片段的方法。这些片段在有二硫醇络合剂亚砷酸钠存在下被还原以稳定邻位二硫醇并防止分子间形成二硫键。然后将产生的Fab'片段转化成硫代硝基苯甲酸盐(TNB)的衍生物。随后通过用巯基乙胺还原将一种Fab'-TNB衍生物转化成Fab'-硫醇,并与等摩尔量的其它Fab'-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作选择性固定酶的试剂。

[0238] 可从大肠杆菌中直接回收Fab'片段并化学偶连形成双特异性抗体。Shalaby等,J.Exp.Med.175:217-225(1992)描述了制备完全人源化双特异性抗体F(ab')2分子。各Fab'片段分别从大肠杆菌中分泌,体外直接化学偶连形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能结合过表达ErbB2受体的细胞和正常人T细胞以及触发人细胞毒性淋巴细胞对人乳腺癌肿瘤靶细胞的裂解活性。

[0239] 从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的各种技术也已见描述。例如,已利用亮氨酸拉链制备了双特异性抗体。Kostelny等,J.Immunol. 148(5):1547-1553(1992)。通过基因融合将Fos和Jun蛋白质的亮氨酸拉链肽连接于两种不同抗体的Fab'部分。在铰链区还原抗体同源二聚体以形成单体,然后再氧化以形成抗体异源二聚体。还可采用该方法产生抗体同源二聚体。Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)描述的“双抗体”技术为制备双特异性抗体片段提供了备选机制。这些片段含有通过接头与轻链可变域(VL)相连的重链可变域(VH),所述接头很短从而不能在同一链上的两个结构域之间进行配对。因此,迫使一个片段的VH和VL结构域与另一片段的互补VL和VH结构域配对,从而形成两个抗原结合部位。利用单链Fv(sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种方法也已有报道。参见,Gruber等,J.Immunol.152:5368(1994)。

[0240] 考虑了两价以上的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt等,J.Immunol. 147:60(1991)。

[0241] 示范性双特异性抗体可结合本文的给定LOX或LOXL2多肽上的两种不同表位。或者,可组合抗-LOX或抗-LOXL2多肽臂与结合以触发白细胞上分子,例如T-细胞受体分子(如CD2、CD3、CD28或B7),或IgG的Fc受体(Fc γ R),例如Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RIII(CD16)的臂,从而将细胞防御机制集中于表达特定靶多肽的细胞。还可利用双特异性抗体将细胞毒性剂定位表达特定靶多肽的细胞。这些抗体具有靶标-结合臂和结合细胞毒性剂或放射性核素螯合剂,例如EOTUBE、DPTA、DOTA或TETA的臂。另一种感兴趣的双特异性抗体结合靶多肽,还结合组织因子(TF)。

[0242] 抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体也可以是异源偶联物抗体(heteroconjugate antibody)。异源偶联物抗体由两个共价相连的抗体构成。据称,这种抗体,例如能将免疫系统细胞靶向有害细胞(美国专利号4,676,980),治疗HIV干扰(WO 91/00360和WO 92/200373)。可采用已知的合成蛋白质化学方法体外制备抗体,包括涉及交联剂的那些方法。例如,可采用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于该目的的合适试剂的例子包括但不限于:亚胺基硫醇盐(iminothiolate)和甲基-4-巯基丁亚氨酸和例如美国专利号4,676,980所述那些。

[0243] 优选根据效应功能修饰抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体,从而能提高例如抗体在治

疗或预防按照转移中的效力。例如,可将半胱氨酸残基引入Fc区域,从而能在该区域中形成链间二硫键。如此产生的同源二聚抗体可具有改善的内化性能和/或增加的补体介导细胞杀伤作用和抗体依赖性细胞毒性。参见Caron等,J.Exp Med.,176:1191-1195(1992)和Shopes,J.Immunol.,148: 2918-2922(1992)。还可如Wolff等,Cancer Research,53:2560-2565(1993)所述,利用异源双功能交联剂制备抗肿瘤活性增强的同源二聚抗体。或者,可工程改造抗体使之具有双重Fc区并可能增强补体裂解和ADCC性能。参见,例如Stevenson等,Anti-Cancer Drug Design,3:219-230(1989)。

[0244] “分离的抗体”是从其天然环境的组分中鉴定和分离的和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰该抗体的诊断或治疗应用的物质,可包括,例如酶、激素和其它蛋白性或非蛋白性溶质。在一个实施方式中,抗体可以纯化至(1)以抗体的重量计,通过Lowry方法测定到大于80%、85%、90%、95%或99%, (2)利用旋振杯顺序分析仪(spinning cup sequenator)测定到足以获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,和/或(3)利用考马斯蓝或银染色剂,通过SDS-PAGE在还原性或非还原性条件下测定到均质。术语“分离的抗体”的范围包括重组细胞内原位的抗体,因为不存在抗体天然环境的至少一种组分。分离抗体或其抗原结合片段通常包括至少一个纯化步骤。

[0245] 抗体可以是人源化抗体或人抗体。非人(例如,小鼠)抗体的人源化形式包括,例如含有衍生自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合型免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、单链结合多肽、VH、VL或抗体的其它抗原结合子序列)。嵌合型抗体包括重链和轻链可变区与人恒定区(Fc)组合的抗体。人源化抗体包括其中受者互补决定区(CDR)的残基被具有所需特异性、亲和力和性能的非-人物种(供者抗体),例如小鼠、大鼠或家兔CDR的残基替代的人免疫球蛋白(受者抗体)。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非-人残基替代。人源化抗体还可包含既未在受者抗体中也未在输入的CDR或框架序列中发现的残基。人源化抗体通常包含基本上所有或至少一个和通常两个可变区,其中所有或基本上所有CDR区域对应于非人免疫球蛋白的那些,所有或基本上所有FR区域是人免疫球蛋白共有序列的那些。

[0246] 人源化抗体还可含有免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的(Jones等,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等,Nature, 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992))。

[0247] 本领域熟知人源化非人抗体的方法。人源化抗体通常具有引入其中的一个或多个非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”或“供者”残基,一般取自“输入”或“供者”可变域。基本上可按照Winter及其同事(Jones等,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等,Nature,332:323-327(1988));Verhoeyen等.,Science,239:1534-1536(1988))的方法,用啮齿类CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列进行人源化。因此,这种“人源化”抗体包括嵌合型抗体(美国专利号4,816,567),其中基本上小于完整的人可变域被非人物种的相应序列取代。实际上,人源化抗体通常是其中一些CDR残基和可能的一些FR残基被啮齿类抗体类似位点的残基取代的人抗体。

[0248] 还可采用本领域已知的各种技术制备人抗体,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等,J.Mol.Biol., 222:581(1991))。还可采用Cole等和Boerner等的技术制备人单克隆抗体(Cole等,Monoclonal Antibodies and

Cancer Therapy(单克隆抗体和癌症治疗),Alan R.Liss,第77页(1985)和Boerner等,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)。类似地,可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如内源性免疫球蛋白基因部分或完全灭活的小鼠来制备人抗体。刺激后,观察到人抗体产生,这在各方面与在人中观察到的极其相似,包括基因重排、装配和抗体库。例如,美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016和以下科技出版物中描述了该方法:Marks等,Bio/Technology 10,779-783(1992);Lonberg等,Nature 368 856-859(1994);Morrison,Nature 368,812 13(1994);Fishwald等,Nature Biotechnology 14, 845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology 14,826(1996);Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995)。

[0249] 现已开发了能结合LOX或LOXL2并阻断其酶活性的鼠单克隆抗体。通过人源化鼠单克隆抗体抗-LOX和抗-LOXL2抗体的VL和VH序列制备本文所述的人源化及其抗原结合片段。

[0250] 借助遗传工程改造已构建了人源化免疫球蛋白,包括人源化抗体。以前描述的大多数人源化免疫球蛋白包含与特定人免疫球蛋白链的框架(即,接受者或受者)相同的框架和非人(供者)免疫球蛋白链的3个CDR。如本文所述,人源化还可包括鉴定和选择人源化免疫球蛋白链的框架中有限数量的氨基酸的标准,即这些氨基酸应与供者而非受者中那些位置的氨基酸相同,从而能增加包含人源化免疫球蛋白链的抗体的亲和力。

[0251] 本发明部分基于以下模型,即,产生人源化抗体的现有技术(利用,例如小鼠抗体作为CDR来源)中亲和力丧失有两个主要原因:(1)当小鼠CDR与人框架组合时,框架中接近CDR的氨基酸变成人的而非小鼠的。不想受理论的束缚,但这些改变的氨基酸可能略微扭曲了CDR(例如,它们可产生不同于供者小鼠抗体的静电或疏水作用力,而扭曲的CDR可能不能与抗原像CDR在供者抗体中那样有效接触);(2)此外,原始小鼠抗体中接近CDR(但不是CDR的一部分,即,仍是框架的一部分)的氨基酸可能与抗原接触从而促进亲和力。当该抗体被人源化时,这些氨基酸丧失,因为通常所有框架氨基酸被制成了人的。为克服这些问题并产生对所需抗原具有极强亲和力的人源化抗体,可采用以下一种或多种原则构建人源化抗体及其抗原结合片段。

[0252] 一条原则是,利用通常与待人源化的供者免疫球蛋白同源的特定人免疫球蛋白的框架作为受者,或利用许多人抗体的共有框架作为受者。例如,在数据库(例如,国家生物医学研究基金会蛋白质鉴定资源(National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource)或国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)-NCBI的蛋白质序列数据库)中比较小鼠重(或轻)链可变区与人重(或轻)链可变区显示与不同人区域的同源性程度变化极大,例如约40%-约60%、约70%、约80%或更高。通过选择与供者免疫球蛋白的重链可变区同源性最高的人重链可变区之一作为受者免疫球蛋白,可改变少数氨基酸从而将供者免疫球蛋白转变成人源化免疫球蛋白。通过选择与供者免疫球蛋白的轻链可变区同源性最高的人轻链可变区之一作为受者免疫球蛋白,可改变较少氨基酸从而将供者免疫球蛋白转变成人源化免疫球蛋白。采用这些技术通常能降低一个或多个CDR附近的氨基酸被改变从而扭曲其构型的可能性。此外,包含人源化免疫球蛋白链的人源化抗体的精确总体形状可能与供者抗体的形状更类似,从而也降低了扭曲CDR的可能性。

[0253] 还可利用同一人抗体的轻链和重链作为受者序列以提高人源化轻链和重链彼此进行有利接触的可能性。或者,还可利用不同人抗体种系序列的轻链和重链作为受者序列;当采用这种组合时,不难采用常规试验测定VH和VL是否结合感兴趣表位(例如,ELISA)。在一个实施方式中,选择其中轻链和重链可变区序列一起与供者轻链和重链可变区序列在总体上最具同源性的人抗体。有时,会更重视重链序列。无论如何选择受者免疫球蛋白,在一些情况中,可通过在人源化免疫球蛋白链的框架中选择少量氨基酸使之与供者而非受者中那些位置的氨基酸相同以获得较高亲和力。本领域已知亲和力成熟的方法。

[0254] 与小鼠或嵌合型抗体相比,对于人治疗应用,人源化抗体通常具有至少3个潜在优势。由于抗体的效应部分是人的,据信其能更好地与人免疫系统的其它部分相互作用(例如,通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体-依赖性细胞毒性(ADCC)而更有效地破坏靶细胞)。此外,人免疫系统不会将人源化抗体的框架或恒定区识别为外来的,因此,针对这种注射抗体的抗体反应应低于针对完全外来小鼠抗体或部分外来嵌合型抗体的。最后,已知小鼠抗体在人循环中的半衰期远低于人抗体的半衰期。估计人源化抗体的半衰期类似于天然产生的人抗体,从而能给予较小和较低频率的剂量。

[0255] 可通过本领域已知和本文所述的各种方法人源化抗体及其抗原结合片段。类似地,可通过领域已知和本文所述的方法制备人源化抗体。

[0256] 本领域已知,本文也考虑了修饰框架区的方法。有待改变的一个或多个相关框架氨基酸位置的选择取决于各种标准。选择待改变的相关框架氨基酸的一条标准可以是供者和受者分子之间氨基酸框架残基的相对差异。采用该方法选择待改变的相关框架位置的优点在于能避免残基确定中的任何主观偏向或在残基对CDR结合亲和力贡献中的任何偏向。

[0257] 可用于确定待改变的相关氨基酸位置的另一条标准可以是,例如选择已知对于CDR构象至关重要或有贡献的框架残基。例如,典型的框架残基对于CDR构象和/或结构至关重要。就其相关的供者CDR序列而言,采用将典型框架残基作为待改变相关位置的目标可鉴定更相容的氨基酸残基。

[0258] 特定框架位置的氨基酸残基的频率是可用于选择待改变的相关框架氨基酸位置的另一标准。例如,比较选择的框架与亚家族内其它框架序列可揭示在一个或多个特定位置出现频率最低的残基。具有丰度较低残基的位置类似地适合选作在受者可变区框架中改变的位置。

[0259] 还可例如根据与CDR的邻近性选择待改变的相关氨基酸位置。在某些情况下,FR残基可参与CDR构象和/或抗原结合。此外,可类似地采用该标准以按优先次序排列依据本文所述其它标准选择的相关位置。因此,在接近和远离一个或多个CDR的残基之间作出区分代表了减少待改变相关位置数的一种方法。

[0260] 选择待改变的相关氨基酸框架位置的其它标准包括,例如已知或预计位于接近抗原-CDR界面的三维空间或预计能调节CDR活性的残基。类似地,可选择已知或预计能在重链(V_H)和轻链(V_L)可变区界面之间形成接触的框架残基。这种框架位置可通过调节CDR结合袋、抗原(表位)相互作用或V_H和V_L相互作用来影响CDR的构象和/或亲和力。因此,可采用选择这些氨基酸位置来构建各种群体以供筛选结合活性,从而能鉴定替代了对CDR构象具有有害影响的残基或弥补该框架中它处存在的残基的有害影响的框架改变。

[0261] 可选择以便改变的群体框架残基包括溶剂无法接近的氨基酸位置。这种残 基通常包埋在可变区中,因此能影响CDR的构象或V_H和V_L相互作用。可从, 例如多肽的氨基酸侧链所产生环境的相对疏水性和/或通过已知的三维结构数 据预测溶剂可接近性。

[0262] 选择要改变的供者CDR中相关氨基酸位置以及框架区中任何相关氨基酸 位置后,可将一些或全部的所选位置的氨基酸改变引入受者可变区框架和供者 CDR的编码核酸中。改变的框架或CDR序列可分别制备和检验,或者可顺序 或同时组合并检验。

[0263] 任何或所有的改变位置处的变化性可以是少许到多个不同的氨基酸残基, 包括所有20种天然产生的氨基酸或其功能等价物和类似物。在一些情况中, 还可考虑非天然产生的氨基酸,这些氨基酸是本领域已知的。

[0264] 可以灵活选择待改变的氨基酸位置的数量和定位,这取决于所需应用和所 需效率以便鉴定具有所需活性,例如与供者可变区相比,亲和力基本相同或更 高的改变的可变区。就此而言,掺入改变的可变区群体中的改变数量越大,鉴 定显示所需活性,例如结合亲 和力与供者基本相同或更高的至少一种物质的效 率越高。或者,如果用户对于某些氨基酸残基或位置对结合亲和力有不成比例 的影响具有经验或实际数据,则可优选产生改变的可变区的有限群体,其中改 变集中在那些鉴定出的残基或位置内或其周围。

[0265] 例如,如果需要CDR嫁接的可变区,改变的可变区的多样性群体可包 括供者和受者框架之间的所有不相同的框架区位置和所有单CDR氨基酸位置 改变。或者,中间体多样性群体可只包括,例如要与所有单CDR氨基酸位置 改变一起掺入的邻近不相同框架位置的亚组,从而能,例如增加人源化抗体或 抗原结合片段的亲和力。可通过,例如额外地包含所有配对-样CDR氨基酸位 置改变来进一步增加以上群体的多样性。相反,可类似地构建在少至一个框架 和/或一个CDR氨基酸位置处掺入的变体残基集中在预定残基或位置的群体以 便筛选和鉴定改变的抗体可变区。对于以上群体,可通过额外扩充选择的位置 以供改变从而在框架和CDR区域的一个或两个中包含其它相关位置来进一步 增加这种集中群体的多样性。还可利用的在框架区和CDR的一个或两个中有 少数改变到许多改变的大量其它组合,所有组合均能获得改变的可变区的群 体,可筛选这些群体以便鉴定具有所需活性,例如与LOX/LOXL2的结合活性 的至少一种CDR嫁接改变可变区。鉴于本文提供的教导和指导,本领域技术 人员可知,或能确定对框架或供者CDR中的哪些选择残基位置或其亚组作出 改变来产生用于筛选和鉴定本发明改变抗体的群体。

[0266] 可采用本领域已知的常规技术制备人源化抗体和抗原结合片段。此外,常 可大量产生重组制备的抗体,特别是在利用高水平表达载体之时。

[0267] 可采用本领域已知的常规技术测序抗体并测定互补决定区 (CDR) 的氨基 酸序列。一方面,可将一个或多个CDR的氨基酸序列插入,例如人抗体 (或其 抗原结合片段) 框架的合成序列中,从而产生能限制用非人抗体治疗人患者的 不利副反应的人抗体。还可将一个或多个CDR的氨基酸序列插入合成序列, 例如AvimerTM等结合蛋白中,从而产生给予人患者的构建物。可根据待治 疗动物的物种改进这种技术。例如,对于脊椎动物应用,可合成抗体、抗 原结合片段或结合蛋白质以便给予灵长类、牛、马等。

[0268] 在另一方面,采用本领域已知的技术,如本文提供和纳入的那些技术,例 如,可通过重组技术将编码一个或多个CDR的氨基酸序列的核苷酸插入编码 抗体、抗原结合片段或结合蛋白质的现有多核苷酸的限制性内切酶位点。

[0269] 对于高水平表达,最常用的哺乳动物表达系统是利用二氢叶酸还原酶缺陷型(“dhfr-”)中国仓鼠卵巢细胞提供的基因扩增过程的系统。技术人员熟知该系统基于编码DHFR酶的二氢叶酸还原酶“dhfr”基因,该酶催化二氢叶酸转化成四氢叶酸。为获得高产量,用含有功能性dhfr基因以及编码所需蛋白质的基因的表达载体转染dhfr-CHO细胞。在此情况中,所需蛋白质是重链和/或轻链。

[0270] 通过增加竞争性DHFR抑制剂甲氨蝶呤(MTX)的含量,该重组细胞通过扩增dhfr基因而产生耐受性。在标准情况下,所用的扩增单位远大于dhfr基因的尺寸,因此,抗体重链共同扩增。

[0271] 当需要大规模制备蛋白质,例如抗体链时,要同时考虑所用细胞的表达水平和稳定性。在长期培养中,重组CHO细胞群在扩增期间丧失它们对于特异性抗体生产力的均质性,即使它们源自单一的亲代克隆。

[0272] 本申请提供编码本文所述抗体或抗原结合片段的分离的多核苷酸(核酸)、含有这种多核苷酸的载体和将这种多核苷酸转录及翻译成多肽的表达系统。

[0273] 本申请还提供包含至少一种上述多核苷酸的质粒、载体、转录或表达盒形式的构建物。

[0274] 本申请还提供包含一个或多个上述构建物的重组宿主细胞。与产生本文所述抗体或其抗原结合片段的方法一样,提供的编码本文所述任何抗体或其抗原结合片段的核酸本身构成本申请的一方面,所述方法包括从编码核酸进行表达。在合适条件下培养含有所述核酸的重组宿主细胞不难进行表达。表达产生后,可采用任何合适技术分离和/或纯化抗体或抗原结合片段,然后适当使用。

[0275] 提供的本文所述特定抗体、抗原结合片段和编码核酸分子及载体可以是,例如从它们的天然环境分离和/或纯化的基本纯的或均质的形式,或者对于核酸,除编码具有所需功能的多肽的序列外不含或基本上不含其它核酸或基因起源。核酸可包含DNA或RNA,可以是完全或部分合成的。

[0276] 熟知在各种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母菌和杆状病毒系统。本领域可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NS0小鼠黑色素瘤细胞和许多其它细胞。普通的细菌宿主是大肠杆菌。

[0277] 本领域熟知在原核细胞,例如大肠杆菌中表达抗体和抗体片段。其综述可参见,Plückthun, A. Bio/Technology 9:545-551 (1991)。本领域技术人员还可采用在真核细胞培养物中进行表达作为产生本文所述抗体和抗原结合片段的备选方案,最近的综述参见,例如各自通过引用全文纳入本文的Raff, M.E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4:573-576; Trill J.J.等, (1995) Curr. Opinion Biotech 6:553-560。

[0278] 可选择或构建含有合适调控序列,包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和合适的其它序列的合适载体。如果适当,载体可以是质粒、病毒,例如“噬菌体”或“噬菌粒”。更多细节可参见,例如Molecular Cloning:a Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册):第2版, Sambrook等, 1989,冷泉港实验室出版社。核酸操作,例如制备核酸构建物、诱变、测序、将DNA引入细胞和基因表达以及分析蛋白质的许多技术和方法的细节描述于Short Protocols in Molecular Biology(分子生物学的简略

方案),第二版,Ausubel等编,约翰威利父子公司(John Wiley&Sons),1992。Sambrook等和Ausubel等的内容通过引用全文纳入本文。

[0279] 因此,另一方面提供含有本文所述核酸的宿主细胞。还有另一方面提供将这种核酸引入宿主细胞的方法。所述引入可采用任何可用的技术。对于真核细胞,合适的技术包括,例如磷酸钙转染、DEAE葡聚糖、电穿孔、基因枪技术、脂质体-介导的转染和利用逆转录病毒或其它病毒,例如牛痘病毒或杆状病毒(对于昆虫细胞)的转导。对于细菌细胞,合适的技术可包括,例如氯化钙转化、电穿孔和利用细菌噬菌体的转染。

[0280] 引入后可以进行核酸的表达,例如通过在表达基因的条件下培养宿主细胞。

[0281] 在一个实施方式中,核酸整合入宿主细胞的基因组(例如,染色体)。可按照标准技术,通过纳入促进基因组重组的序列来促进整合。

[0282] 本申请还提供一种方法,包括在表达系统中利用上述构建物来表达上述抗体或其抗原结合片段。

[0283] 本申请还涉及编码本文所述结合LOX或LOXL2的抗体或抗原结合片段的分离核酸,例如重组DNA分子或克隆的基因,或其简并变体、其突变体、类似物或片段。

[0284] 本申请在一方面提供编码本文所述结合LOX或LOXL2的抗体或其抗原结合片段的核酸。

[0285] 在进一步的实施方式中,可将本文所述可以或抗原结合片段的重组DNA分子或克隆基因的全部DNA序列操作性连接于可引入合适宿主的表达调控序列。因此,本申请拓展至用包含编码抗体的V_H和/或V_L或其诸部分的克隆基因或重组DNA分子转化的单细胞宿主。

[0286] 另一特征是表达本文所述DNA序列。本领域熟知可通过将DNA序列操作性连接于合适表达载体中的表达调控序列,并利用该表达载体转化合适的单细胞宿主来表达所述DNA序列。

[0287] DNA序列与表达调控序列的这种操作性连接当然包括在该DNA序列上游的正确读框中提供起始密码子,即ATG,如果并非已是DNA序列的一部分。

[0288] 可以提供分离和/或纯化形式的多核苷酸和载体(例如,不含或基本上不含除编码具有所需功能的多肽的多核苷酸以外来源的多核苷酸)。本文所用的“基本纯”和“基本上不含”指含有少于,例如,20%或更少的外来物质、10%或更少的外来物质、5%或更少的外来物质、4%或更少的外来物质、3%或更少的外来物质、2%或更少的外来物质、或1%更少的外来物质的溶液或悬液。

[0289] 可采用各种宿主/表达载体组合来表达本发明的DNA序列。例如,有用的表达载体可以由染色体、非染色体和合成DNA序列的区段构成。合适的载体包括SV40的衍生物和已知的细菌质粒,例如大肠杆菌质粒col E1、Pcr1、Pbr322、Pmb9以及它们的衍生物,质粒,例如RP4;噬菌体DNA,例如噬菌体λ的许多衍生物,例如NM989,和其它噬菌体DNA,例如M13以及丝状单链噬菌体DNA;酵母质粒,例如2u质粒或其衍生物;可用于真核细胞中的载体,例如可用于昆虫或哺乳动物细胞中的载体;衍生自的质粒和噬菌体DNA的组合的载体,例如经修饰而能利用噬菌体DNA或其它表达调控序列的质粒;等等。

[0290] 本文还提供包含一个或多个多核苷酸构建物的重组宿主细胞。与产生抗体或抗原结合片段的方法一样,编码本文提供的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸构成本申请的一方面,所述方法包括从所述多核苷酸进行表达。可通过,例如在合适条件下培养含有

所述多核苷酸的重组宿主细胞来实现表达。然后可采用任何合适的技术分离和/或纯化抗体或抗原结合片段，并适当使用。

[0291] 这些载体中可利用任何表达调控序列-控制与其操作性相连的DNA序列 表达的序列-来表达所述DNA序列。这种有用的表达调控序列包括，例如SV40、CMV、牛痘病毒、多瘤病毒或腺病毒的早期或晚期启动子、lac系统、trp系统、TAC系统、TRC系统、LTR系统、噬菌体λ的主要操纵基因和启动子 区域、fd外壳蛋白的调控区、3-磷酸甘油激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子(例如,Pho5)、酵母菌-交配因子、和已知能控制原核 或真核细胞或它们的病毒的基因表达的其它序列，以及它们的各种组合。

[0292] 熟知在各种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统。合适宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NS0 小鼠黑色素瘤细胞和许多其它细胞。普通的细菌宿主可以是，例如大肠杆菌。

[0293] 本领域熟知在原核细胞，例如大肠杆菌中表达抗体和抗体片段。其综述可参见，Plückthun,A.Bio/Technology 9:545-551 (1991)。本领域技术人员还可采用在真核细胞培养物中进行表达(Raff,M.E. (1993) Curr.Opinion Biotech.4:573-576;Trill J.J.等, (1995) Curr.Opinion Biotech 6:553-560)。

[0294] 还可利用各种单细胞宿主细胞表达DNA序列。这些宿主包括熟知的真核 和原核细胞，例如大肠杆菌、假单胞菌、芽孢杆菌、链霉菌、真菌，如酵母菌 的菌株，以及动物细胞，例如CHO、YB/20、NS0、SP2/0、R1.1、B-W和L-M 细胞、非洲绿猴肾细胞(例如,COS 1、COS 7、BSC1、BSC40、和BMT10)，昆虫细胞(例如,Sf9)，和组织培养物中的人细胞以及植物细胞。

[0295] 应该理解，不是所有的载体、表达调控序列和宿主均等同地良好起作用来 表达DNA序列。也不是所有含同一表达系统的宿主均能等同地良好起作用。然而，本领域技术人员无需过多实验即能选择合适的载体、表达调控序列和宿 主来实现所需表达而不脱离本申请的范围。例如，在选择载体时，必须考虑宿 主，因为载体必须能在其中起作用。还要考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的 能力和该载体所编码的任何其它蛋白质，例如抗生素标记的表达情况。本领域 普通技术人员能选择合适的载体、表达调控序列和宿主以实现所需表达而不脱 离本申请的范围。例如，在选择载体时，要考虑宿主，因为载体要在其中起作用。还要考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力和该载体所编码的任何其它 蛋白质，例如抗生素标记的表达情况。

[0296] 本申请还提供包含至少一种上述多核苷酸的质粒、载体、转录或表达盒形 式的构建物。可以选择或构建含有合适调控序列，包括启动子序列、终止子序 列、多腺苷酸化序列、增强子序列、可选择标记和合适的其它序列的合适载体。如果适当，载体可以是质粒、病毒，例如“噬菌体”或“噬菌粒”。更多细节 可参见，例如Molecular Cloning:a Laboratory Manual(分子克隆:实验室手 册):第2版,Sambrook等,1989,冷泉港实验室出版社。核酸操作，例如制 备核酸构建物、诱变、测序、将DNA引入细胞和基因表达以及分析蛋 白质 的许多已知技术和方法的细节描述于Short Protocols in Molecular Biology(分子生物学的简略方案),第二版,Ausubel等编,约翰威利父子公 司(John Wiley&Sons), 1992。Sambrook等和Ausubel等的内容通过引用全 文纳入本文。

[0297] 选择表达调控序列时，通常要考虑各种因素。这些因素包括，例如该系统 的相对

强度,其可控性及其与待表达的特定DNA序列或基因的相容性,特别要关注可能的二级结构。合适单细胞宿主的选择应考虑,例如它们与所选载体的相容性、它们的分泌特征、它们正确折叠蛋白质的能力、它们的发酵要求、待表达的DNA序列所编码产物对宿主的毒性以及纯化表达产物的难易程度。

[0298] 另一方面提供含有本文所述一种或多种多核苷酸的宿主细胞。还有另一方面提供通过任何可用的技术将所述一种或多种多核苷酸引入宿主细胞的方法。对于真核细胞,合适的技术可包括,例如磷酸钙转染、DEAE葡聚糖、电穿孔、脂质体-介导的转染和利用逆转录病毒或其它病毒(例如牛痘病毒)或杆状病毒(对于昆虫细胞)的转导。对于细菌细胞,合适的技术可包括,例如氯化钙转化、电穿孔和利用细菌噬菌体的转染。

[0299] 引入后可以进行一种或多种多核苷酸的表达,例如在一种或多种多核苷酸表达一种或多种多肽的条件下培养宿主细胞。可利用诱导型系统,通过加入激活剂来诱导表达。

[0300] 在一个实施方式中,可将多核苷酸整合入宿主细胞的基因组(例如,染色体)。按照标准技术,通过纳入促进基因组重组的序列来促进整合。在另一实施方式中,核酸维持在宿主细胞的附加型载体上。

[0301] 本文提供的方法包括在表达系统中利用上述构建物来表达特定多肽。

[0302] 考虑到这些和其它因素,本领域技术人员能构建通过发酵或大规模动物培养来表达DNA序列的各种载体/表达调控序列/宿主组合。

[0303] 除克隆外,可通过重组/合成方法制备编码抗体、抗原结合片段或结合蛋白的多核苷酸。可利用抗体、抗原结合片段或结合蛋白合适的密码子设计多核苷酸。如果序列要用于表达,通常选择所需宿主的优选密码子。可通过标准方法从制备的重叠寡核苷酸装配完整的多核苷酸,并将其装配成完整的编码序列。参见,例如Edge,Nature,292:756(1981);Nambair等,Science,223:1299(1984);Jay等,J.Biol.Chem.,259:6311(1984)。

[0304] 将非天然氨基酸位点特异性地掺入蛋白质的通用方法描述于Christopher J.Noren,Spencer J.Anthony-Cahill,Michael C.Griffith,Peter G.Schultz, Science,244:182-188(1989年4月)。可采用该方法产生含非天然氨基酸的类似物。

[0305] 如上所述,除克隆外,可合成制备编码抗体或其抗原结合片段的DNA序列。可利用抗体或抗原结合片段氨基酸序列合适的密码子设计DNA序列。如果序列要用于表达,通常选择所需宿主的优选密码子。可通过标准方法从制备的重叠寡核苷酸装配完整的序列,并将其装配成完整的编码序列。参见,例如各自通过引用全文纳入本文的Edge,Nature,292:756(1981);Nambair等,Science,223:1299(1984);Jay等,J.Biol.Chem.,259:6311(1984)。

[0306] 术语“佐剂”指能增强免疫反应,特别是对抗原的免疫反应的化合物或混合物。佐剂可用作缓慢释放抗原的组织长效制剂,还可用作非特异性增强免疫反应的淋巴系统激活剂(Hood等,Immunology(免疫学),第二版,1984,Benjamin/Cummings:门洛帕克,加利福尼亚州,第384页)。没有佐剂存在下,单用抗原作初次攻击常不能引发体液或细胞免疫反应。以前已知和利用的佐剂包括但不限于:完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFN)、皂昔、矿物凝胶(例如氢氧化铝)、表面活性物质(例如溶血卵磷脂、普朗尼克(pluronic)多元醇、聚阴离子、肽、油或烃乳剂)、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚,和潜在的有用佐剂,例如

BCG(卡介苗(Bacille Calmette-Guerin)) 和短小棒状杆菌(Corynebacterium parvum)。矿物盐佐剂包括但不限于:氢 氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、氢氧化锌和氢氧化钙。佐剂组合物优选还包含 脂质的脂肪乳剂,其中包含约10% (以重量计) 植物油和约1-2% (以重量计) 磷脂。优选地,佐剂组合物还任选包含具有分散在连续水相中的油性颗粒 的乳剂形式,所述乳剂形式具有形成乳剂的多元醇,其含量为约0.2% (以 重量计)-约49% (以重量计),乳剂形成量的最多15% (以重量计) 的任选可 代谢油,和乳剂稳定量的最多约5% (以重量计) 的任选甘油醚表面活性剂。

[0307] 还可采用上述选择和/或诱变方法对抗体进行亲和力成熟化。亲和力成 熟的抗体的亲和力可以是制备该成熟化抗体的起始抗体(通常是鼠、家兔、鸡、人源化或人抗体)的两倍、五倍、10倍、20倍、30倍或更多。可通过 诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)等方法或本领域技术人员熟悉的其它技术 测定表观亲和力。可通过诸如Scatchard分析等方法或本领域技术人员熟悉的其它技术测定活性。本领域技术人员熟悉的检测表观结合亲和力的其它技术是表面等离振子共振技术(用BIACORE 2000系统分析)(Liljeblad等, Glyco.J.2000, 17:323-329)。标准检测和传统结合试验描述于Heeley,R.P., Endocr.Res.2002,28:217-229。

[0308] 在一个实施方式中,抗体特异性和选择性地结合蛋白水解加工后成熟 或活性形式的LOX,其结合亲和力高于(例如,至少约5倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍、或至少约1000倍)与以下至 少一种的结合亲和力:人LOX的前蛋白原、分泌的人LOX或其它赖氨酰 氧化酶-样或赖氨酰-相关蛋白(例如,LOXL1、LOXL2、LOXL3和LOXL4)。在一个实施方式中,抗体特异性和选择性地结合未加工和/或加工(成熟)形 式的LOX。虽然成熟形式的LOX通常有活性,但在一些实施方式中,未 加工的LOX也有活性。

[0309] 在另一实施方式中,抗体特异性和选择性地结合分泌形式的LOX,例 如信号肽切割后的分泌人LOX,其结合亲和力高于(例如,至少约5倍、至 少约10倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍、或至少约1000 倍)与以下至少一种的结合亲和力:人LOX的前蛋白原、成熟或活性人LOX、或其它赖氨酰氧化酶-样或赖氨酰-相关蛋白(例如,LOXL1、LOXL2、LOXL3和LOXL4)。

[0310] 在还有另一实施方式中,抗体特异性和选择性地结合LOXL2,其结合 亲和力高于(例如,至少约5倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约100 倍、至少约500倍、或至少约1000 倍)与未加工、成熟、活性和/或分泌产 物中至少一种的结合亲和力:人LOX、成熟或活性人 LOX、分泌形式的 LOX或其它赖氨酰氧化酶-样或赖氨酰-相关蛋白(例如,LOXL1、LOXL3 和 LOXL4)。在一个实施方式中,抗体特异性和选择性地结合未加工和/或 加工(成熟)形式的 LOXL2。虽然成熟形式的LOXL2通常有活性,但在一些 实施方式中,未加工的LOXL2也有活性。

[0311] 抗体可同时结合人LOX或人LOXL2,其结合亲和力高于(例如,至少 约5倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍、或 至少约1000倍)与以下至少一种的结合 亲和力:其它赖氨酰氧化酶-样或赖 氨酰-相关蛋白(例如,LOXL1、LOXL3和LOXL4)。

[0312] 结合酶的抗体可以是竞争性抑制剂、无竞争性抑制剂或非竞争性抑制剂。对于竞争性抑制作用,抑制剂通常具有与底物相似的结构。抑制作用在底物浓 度低时显著,但在底物浓度高时可克服。对于无竞争性抑制作用,抑制剂与在 底物结合活性位点后可用的位

点结合。抑制作用在底物浓度高时最显著。对于 非竞争性抑制作用,抑制剂在远离底物结合位点的位点结合。在所有底物浓度 上,相对抑制作用通常相同。图4描述了用作竞争性抑制剂、无竞争性抑制剂 和非竞争性抑制剂的抗体的作用机制。本文所述的抗体可以是竞争性抑制剂、无竞争性抑制剂或非竞争性抑制剂。在一方面,本文所述的抗体可以是非竞争性抑制剂。

[0313] 在一方面,本文所述抗体是非竞争性抑制剂,即,该抗体阻断LOX或 LOXL2的酶活性,而无论这些酶释放与底物(胶原)结合。

[0314] 抗体与LOX/LOXL2的结合可(1)降低或抑制LOX/LOXL2的摄取或 内在化(例如,通过整联蛋白 $\beta 1$ 或其它细胞受体或蛋白)和/或(2)降低或抑 制LOX或LOXL2的酶活性。据信,这种抗体可降低EMT,因此可用于本 文所述的应用。本文所述的抗体可结合LOX或LOXL2的蛋白水解切割位 点,从而有效阻断(抑制) LOX或LOXL2的加工以降低活性LOX或LOXL2 的水平。可通过直接结合LOX或LOXL2或通过间接干扰,包括空间位阻、LOX或LOXL2的酶改变、抑制转录或翻译、mRNA转录物去稳化、LOX 或LOXL2的输出、加工或定位受损而发生这种抑制作用。

[0315] 还采用上述试验进行了LOX/LOXL2与其它蛋白质,例如细胞受体(例 如,摄取受体整联蛋白 $\beta 1$)、BTK (burton无丙种球蛋白病 (agammaglobulinemia) 酪氨酸激酶) 或其它整联蛋白的结合,其中利用了细胞 受体(例如,摄取受体整联蛋白 $\beta 1$)、BTK (burton无丙种球蛋白病酪氨酸激 酶) 或其它整联蛋白,而不是ECM蛋白。

[0316] 选择那些抑制LOX/LOXL2与ECM蛋白质、细胞受体和整联蛋白结合 的抗-LOX/ LOXL2抗体作为进一步开发的候选对象。在一个实施方式中, 抑制LOX/LOXL2结合ECM蛋白 质、细胞受体和整联蛋白的抗-LOX/LOXL2抗体是非-竞争性抑制剂。

[0317] 在一个实施方式中,本文所述的抗体特异性结合LOX的催化结构域。C-末端区域 中的该结构域含有催化活性所需的元件(铜结合位点),贡献羧基 辅因子的酪氨酸和赖氨 酰残基,和10个半胱氨酸残基。进一步的细节参见, Thomassin等, “The Pro-regions of lysyl oxidase和lysyl oxidase-like 1are required for deposition onto elastic fibers(赖氨酰氧化酶和赖氨酰氧化酶-样1 的前区域是沉积到弹性纤维所需的)” J Biol.Chem. 2005年12月30日; 280 (52) :42848-55。

[0318] 本文提供结合LOX和/或抑制LOX活性的抗体或其抗原结合片段。结 合和/或抑制 LOX的抗-LOX抗体及其抗原结合片段可用于本文所述的纯 化、诊断和治疗方法中。抗体可结合全长和/或加工的LOX/LOXL2。

[0319] 本文提供分离的抗体或其抗原结合片段,其包含与SEQ ID N0:3所示氨 基酸序列 具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID N0:4或5 所示氨基酸序列具有至 少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

[0320] 在一方面,本文提供的分离抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID N0:3 所示氨基 酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链。在另一方面,本 文提供的分离抗体或 其抗原结合片段包含与SEQ ID N0:4或5所示氨基酸序列 具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

[0321] 本文还提供与本文所述抗-LOX抗体或其抗原结合片段竞争结合LOX, 或与之特异 性结合的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本文所 述的抗-LOX抗体是非竞争性

抑制剂。

[0322] 任何这种抗体或其抗原结合片段能特异性结合LOX,结合亲和力是结合 LOXL1、LOXL2、LOXL3或LOXL4中至少一种的至少2、5、10、50、100、500或1000倍。

[0323] 在一个实施方式中,本文所述抗体或其抗原结合片段特异性结合全长 和加工的 LOX。在一方面,全长和加工的LOX是该酶的活性形式。

[0324] 本文提供结合LOXL2和/或抑制LOXL2活性的抗体或其抗原结合片 段。结合和/或抑制LOXL2的抗-LOXL2抗体及其抗原结合片段可用于本文 所述的纯化、诊断和治疗方法中。

[0325] 本文提供了特异性结合具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的表位的分离 抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段可包含与SEQ ID NO:1所 示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

[0326] 本文还提供的分离抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:1所示氨 基酸序列具有至少75%氨基酸序列相同性的可变重链和与SEQ ID NO:2所示 氨基酸序列具有至少 75%氨基酸序列相同性的可变轻链。

[0327] 在一方面,本文提供与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列具有至少75%氨基 酸序列相 同性的可变重链。在另一方面,本文提供与SEQ ID NO:2所示氨基酸 序列具有至少75%氨基 酸序列相 同性的可变轻链。

[0328] 本文还提供与前述任一抗体或其抗原结合片段竞争结合LOXL2,或与 之特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0329] 任何这种抗体或其抗原结合片段能特异性结合LOXL2,结合亲和力是结 合LOX、LOXL1、LOXL3或LOXL4中至少一种的至少2、5、10、50、100、500或1000倍。

[0330] 在一个实施方式中,本文所述抗体或其抗原结合片段特异性结合 LOXL2的SRCR3-4区域,因此同时结合全长和加工的LOXL2。在一方面, 全长和加工的LOXL2都是该酶的活性 形式。抗体可,例如特异性结合具有 SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的表位。这种抗体可用作 酶活性的体外无竞争性 部分抑制剂,抑制对1,5-二氨基戊烷底物的约一半酶活性,表观 IC₅₀为20-30 nM。这种抗体可用作非竞争性抑制剂。

[0331] 当人源化抗体时,可通过本领域已知的各种方法同时掺入所有FR和/ 或CDR编码 核酸和所有选择的氨基酸位置改变,所述方法包括,例如重组 和化学合成。例如,可通过如 化学合成受者可变区的核苷酸序列,与供者 CDR编码核酸融合在一起并在选择具有可变氨 基酸残基的位置掺入多个相 应氨基酸密码子而实现同时掺入。

[0332] 本文提供结合LOX或LOXL2的抗体或其抗原结合片段。结合LOX或 LOXL2的抗体 及其抗原结合片段能抑制(部分或完全)或控制/治疗(部分或 完全)LOX或LOXL2表达异常相 关和/或导致的症状。本申请还提供可用于 产生抗体的细胞系,制备所述细胞系的方法, 表达抗体或抗原结合片段以 及纯化它们的方法。

[0333] 技术人员指导可采用本文提供或本领域已知的试验检验采用本文所述 方法产生的特异性结合LOX或LOXL2的抗体及其抗原结合片段结合LOX 或LOXL2的能力(例如,ELISA) 以及亲和力(例如,Biacore或表面等离 振子共振技术)。

[0334] 人源化的抗-LOX和抗-LOXL2抗体可具有一种或多种以下特征:保留 鼠单克隆抗

体的抑制功能,结合亲和力相等或增加并且解离速率慢(例如, K_d 0.1-1nM),结合全长和/或加工的LOX/LOXL2,非竞争性部分抑制酶活性,等于或更好的 I_c50 (例如,约30nM),在细胞迁移/侵入试验中具有抑制活性,在肿瘤细胞的条件化培养基中抑制分泌LOX/LOXL2诱导的EMT-样改变,结合肝脏人肿瘤细胞产生的基质-相关LOX/LOXL2,人LOX/LOXL2和鼠LOX/LOXL2的结合交叉反应性、疗效(例如,部分降低肿瘤尺寸和/或症状)、降低毒性和降低免疫原性。

[0335] 本文提供结合hLOX的人源化抗体、结合hLOX和mLox(鼠LOX)的人源化抗体、结合hLOXL2的人源化抗体和结合hLOXL2和mLOXL2(鼠LOXL2)的人源化抗体。在一方面,人源化抗体是非竞争性抑制剂。

[0336] 在一个实施方式中,人源化抗-LOXL2抗体的VH链具有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28所示氨基酸序列。技术人员应知道可采用本文所述方法在一个或多个CDR或框架区中作出连续的氨基酸修饰以便使得抗体亲和力成熟。可采用本文所述或本领域已知的试验检验通过这种方法修饰的抗体的功能。

[0337] 在另一实施方式中,人源化抗-LOXL2抗体的VL链具有SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31或SEQ ID NO:32所示氨基酸序列。技术人员应知道可采用本文所述方法在一个或多个CDR或框架区中作出连续的氨基酸修饰以便使得抗体亲和力成熟。可采用本文所述或本领域已知的任何试验检验通过这种方法修饰的抗体的功能。

[0338] 本文提供结合LOXL2的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,

[0339] 其中所述重链可变区包含:

[0340] (i) 具有SEQ ID NO:33所示氨基酸序列或SEQ ID NO:33所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的重链FR1:

[0341] (a) 24位的缬氨酸(V)取代谷氨酰胺(Q)或其保守性取代;

[0342] (b) 30位的缬氨酸(V)取代亮氨酸(L)或其保守性取代;

[0343] (c) 31位的赖氨酸(K)取代缬氨酸(V)或其保守性取代;

[0344] (d) 32位的赖氨酸(K)取代精氨酸(R)或其保守性取代;和

[0345] (e) 35位的丙氨酸(A)取代苏氨酸(T)或其保守性取代;

[0346] 和氨基酸残基1-19缺失;

[0347] (ii) 具有SEQ ID NO:34所示氨基酸序列或SEQ ID NO:34所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的重链FR2:

[0348] (a) 3位的精氨酸(R)取代赖氨酸(K)或其保守性取代;

[0349] (b) 5位的丙氨酸(A)取代精氨酸(R)或其保守性取代;和

[0350] (iii) 具有SEQ ID NO:35所示氨基酸序列或SEQ ID NO:35所示氨基酸序列但有一个或多个选自下组的取代的重链FR3:

[0351] (a) 1位的精氨酸(R)取代赖氨酸(K)或其保守性取代;

[0352] (b) 2位的缬氨酸(V)取代丙氨酸(A)或其保守性取代;

[0353] (c) 4位的异亮氨酸(I)取代亮氨酸(L)或其保守性取代;

[0354] (d) 10位的苏氨酸(T)取代丝氨酸(S)或其保守性取代;

[0355] (e) 16位的谷氨酸(E)取代谷氨酰胺(Q)或其保守性取代;

- [0356] (f) 21位的精氨酸(R)取代苏氨酸(T)或其保守性取代；
[0357] (g) 23位的谷氨酸(E)取代天冬氨酸(D)或其保守性取代；
[0358] (h) 25位的苏氨酸(T)取代丝氨酸(S)或其保守性取代；和
[0359] (i) 29位的酪氨酸(Y)取代苯丙氨酸(F)或其保守性取代；
[0360] 和
[0361] (iv) 具有SEQ ID NO:36所示氨基酸序列或SEQ ID NO:36所示氨基酸 序列但在7位具有缬氨酸(V)取代赖氨酸(K)或其保守性取代的重链FR4，
[0362] 并且其中所述轻链可变区包含：
[0363] (i) 具有SEQ ID NO:49所示氨基酸序列或SEQ ID NO:49所示氨基酸 序列但有一个或多个选自下组的取代的轻链FR1：
[0364] (a) 27位的苏氨酸(T)取代丙氨酸(A)或其保守性取代；
[0365] (b) 28位的脯氨酸(P)取代丙氨酸(A)或其保守性取代；
[0366] (c) 29位的亮氨酸(L)取代脯氨酸(P)或其保守性取代；
[0367] (d) 31位的亮氨酸(L)取代缬氨酸(V)或其保守性取代；
[0368] (e) 37位的谷氨酰胺(Q)取代谷氨酸(E)或其保守性取代；
[0369] (d) 38位的脯氨酸(P)取代丝氨酸(S)或其保守性取代；
[0370] (f) 39位的丙氨酸(A)取代缬氨酸(V)或其保守性取代；
[0371] 和氨基酸残基1-20缺失；
[0372] (ii) 具有SEQ ID NO:50所示氨基酸序列或SEQ ID NO:50所示氨基酸 序列但有一个或多个选自下组的取代的轻链FR2：
[0373] (a) 2位的酪氨酸(Y)取代苯丙氨酸(F)或其保守性取代；和
[0374] (b) 5位的赖氨酸(K)取代精氨酸(R)或其保守性取代；
[0375] (iii) 具有SEQ ID NO:51所示氨基酸序列或SEQ ID NO:51所示氨基 酸序列但有一个或多个选自下组的取代的轻链FR3：
[0376] (a) 14位的天冬氨酸(D)取代丙氨酸(A)或其保守性取代；和
[0377] (b) 18位的赖氨酸(K)取代精氨酸(R)或其保守性取代；
[0378] 和
[0379] (iv) 具有SEQ ID NO:52所示氨基酸序列或SEQ ID NO:52所示氨基酸 序列但在7位具有缬氨酸(V)取代亮氨酸(L)或其保守性取代的轻链FR4。
[0380] 在一个实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO 33、37或44 所示氨基酸序列的重链可变区FR1，具有SEQ ID NO 34、38或45 所示氨基酸序列的重链可变区FR2，具有SEQ ID NO 35、39、46、47或48 所示氨基酸序列的重链可变区FR3，具有SEQ ID NO 36或40所示氨基酸序 列的重链可变区FR4，具有SEQ ID NO 49或53所示氨基酸序列的轻链可变 区FR1，具有SEQ ID NO 50、54或60所示氨基酸序列的轻链可变区FR2，具有SEQ ID NO 51、55或61所示氨基酸序列的轻链可变区FR3，和具有SEQ ID NO 52或56所示氨基酸序列的轻链可变区FR4。
[0381] 与本文所述可变重链和可变轻链有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或最多100%相同的可变重链和可变轻链包括在本申请的范 围内。
[0382] 保守性取代是对这些核苷酸序列和/或氨基酸的微小修饰，应包括重链和 轻链编

码核酸和它们的功能片段。这种微小修饰包括,例如因遗传密码的简并性而不改变编码的氨基酸序列的那些修饰以及只导致所编码氨基酸序列的保守性取代的那些修饰或基本上不改变抗体的结合性能的那些修饰。所编码氨基酸的保守性取代包括,例如属于以下组的氨基酸:(1)非极性氨基酸(Gly、Ala、Val、Leu、和Ile);(2)极性中性氨基酸(Cys、Met、Ser、Thr、Asn、和Gln);(3)极性酸性氨基酸(Asp和Glu);(4)极性碱性氨基酸(Lys、Arg和His);和(5)芳族氨基酸(Phe、Trp、Tyr、和His)。其它微小修饰包括在编码本发明重链和轻链多肽的核酸内,只要所述核酸或编码的多肽保留它们的一些或全部本文所述功能并且能用于本文所述方法中。非-保守性取代是未鉴定为保守性取代的那些取代。采用本文所述的方法可确定是否可能用非-保守性氨基酸取代框架氨基酸残基,并可采用本文它处所述试验检验修饰抗体的功能。

[0383] 可采用本领域已知和本文所述的方法筛选修饰的可变重链和可变轻链的结合(能力)和活性。

[0384] 可变区的实质性部分包括三个CDR区域以及它们的间插框架区。该部分还可包括第一和第三框架区之一或二者的至少约50%,所述50%是第一框架区的C-末端50%和第四框架区的N-末端50%。可变区实质性部分的N-末端或C-末端处的其它残基可以是通常不与天然产生的可变区区域相关的那些残基。例如,通过重组DNA技术构建本文所述人源化抗-LOX或抗-LOXL2抗体和抗原结合片段会引入由引入接头编码的N-或C-末端残基,从而有助于克隆或其它操作步骤。其它操作步骤包括引入接头以连接可变区与其它蛋白质序列,包括免疫球蛋白重链、其它可变区(例如,在双抗体的制备中)或下文详细讨论的蛋白质标记物。

[0385] 可评估本申请所包括的抗体的抗-LOX或抗-LOXL2活性,所述抗体包括,例如可变重链或轻链与本文所述那些具有至少50%相同性的那些抗体。

[0386] 本文提供鉴定抑制转移瘤细胞生长的抗体的方法,包括将LOX或LOXL2或表达LOX或LOXL2的细胞与候选抗体接触;和测定LOX或LOXL2的表达或活性,从而将与没有该抗体存在下检测到的表达或活性相比,降低LOX或LOXL2表达或活性的候选抗体鉴定为抑制转移瘤细胞生长的化合物。在具体实施方式中,在低氧条件下将所述抗体与LOX或LOXL2或表达LOX或LOXL2的细胞接触。在一方面,本文所述抗体可以是非-竞争性抑制剂。

[0387] 本文还提供了鉴定增加化疗剂效率的抗体的方法,包括将LOX或LOXL2或表达LOX或LOXL2的细胞与候选抗体接触;和测定LOX或LOXL2的表达或活性,从而将与没有该抗体存在下检测到的表达或活性相比,降低LOX或LOXL2表达或活性的候选抗体鉴定为增加化疗剂抑制或降低转移瘤生长的效率的化合物。

[0388] LOX或LOXL2的任何合适来源可用作本发明方法中的抗体靶标。该酶可从能产生合适产物的本领域已知任何来源,包括酵母、微生物和哺乳动物中衍生、分离或重组产生,所述产物能产生可检测的物质或在合适试验中具有生物学活性。

[0389] 可通过本文所述或本领域已知的任何合适方法评估LOX或LOXL2的酶活性。评估LOX或LOXL2活性的示范性方法包括Trackman等,Anal. Biochem. 113:336-342 (1981);Kagan等,Methods Enzymol. 82A:637-49 (1982);Palamakumbura等,Anal. Biochem. 300:245-51 (2002);Albini等,Cancer Res. 47:3239-45 (1987);Kamath等,Cancer Res. 61:5933-40 (2001);美国专利号4,997,854;和美国专利申请号2004/0248871的方法。例如,可

通过检测和/或定量测定“赖氨酰氧化酶副产物”来评估酶活性,所述副产物是,例如H₂O₂产生;胶原吡啶残残留物、铵产生;醛产物产生;赖氨酰基氧化,脱氧吡啶诺啉(Dpd) - 下文讨论。还可检测的定量测定体外细胞侵袭性能;体外细胞粘着和生长;和体内转移生长。体内模型包括但不限于:合适的同源模型、人肿瘤异种移植模型、常位模型、转移模型、转基因模型和基因敲除模型(参见,例如Teicher, Tumors Models in Cancer Research(癌症研究的肿瘤模型)(休玛娜出版社(Humana Press) 2001))。

[0390] 低氧条件可以是诱导的或天然产生的。低氧区域常发生在实体瘤内。低氧还可采用减少或停止流向肿瘤的动脉血或给予血管收缩化合物而在体内,特别是在实验动物模型中诱导。参见,例如美国专利号5,646,185。示范性血管收缩化合物包括肾上腺素能直接和间接激动剂,例如去甲肾上腺素、肾上腺素、苯肾上腺素和可卡因。可通过本领域目前已知的许多方法观察对象中存在的实体瘤中低氧区域的存在情况,包括核磁共振(NMR)和氧电极pO₂组织学方法。这种方法可用于本发明(如下所述)来鉴定低氧治疗靶区域和指导将治疗组合物给予这些区域。可采用合适的方法体外诱导低氧条件。例如,可在37°C,低氧条件下(<0.1% O₂)将细胞维持在厌氧培养室中,或在37°C,低氧条件下(1-2% O₂)将细胞维持在充有5% CO₂和1-2% O₂并用N₂平衡的模块温育室中。参见,例如Erler等,Mol.Cell.Biol.24:2875-89 (2004)。

[0391] 可采用任何合适的方式将LOX或LOXL2酶或表达LOX或LOXL2的细胞与化合物(例如,LOX/LOXL抑制剂,如抗体)接触任何合适的时间长度。对于皮下递送药剂可接近的肿瘤区域,优选将该化合物直接注射入低氧区域。温育或治疗期间,可将细胞与该化合物接触一次以上。抗体需要的剂量通常是约1微克/毫升到1000微克/毫升,更常见是约100微克/毫升到约800微克/毫升。通过体外培养细胞并将细胞与各种剂量的化合物接触不难测定确切的剂量。细胞与化合物接触的时间长度通常是约5分钟、约15分钟、约30分钟、约1小时、约4小时、约12小时、约36小时、约48小时到约3天或更长时间,甚至无限长时间,更常见的是约24小时。对于体外侵袭试验,可利用任何合适的基质。在一个实施方式中,所述基质是BD科学公司(BD Sciences)的重建基膜MatrigelTM基质。

[0392] 筛选方法还可包括检测FAK水平的步骤。如下所述,FAK(成簇黏附激酶[p125FAK])作为细胞运动性过程的一部分被激活。低氧条件下,当LOX受抑制时,FAK磷酸化不增加。在筛选化合物的试验中,第二步骤可包括检测加入和未加入测试抗体时的磷酸-FAK水平。测试抑制性抗体还降低磷酸-FAK的水平。

[0393] 当与没有抗体存在下观察到的相比,抗体降低LOX或LOXL2的表达或活性时,抗体是LOX或LOXL2表达或生物活性的抑制剂。在一个实施方式中,当与没有抗体存在下观察到的相比,抗体降低转移发生率,并在进一步测试中抑制转移瘤生长时,抗体是LOX或LOXL2的抑制剂。在一方面,本文所述的抗体是非-竞争性抑制剂。可采用任何方便的检测方法定量测定肿瘤抑制。可通过检测在这些部位的相对传播(例如,涉及的器官系统数量)和相对肿瘤负载来评估转移的发生率。可视需要通过显微或宏观分析确定转移瘤生长。可抑制约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多的肿瘤转移。在一些实施方式中,可相对于不影响LOX或LOXL2表达或生物学活性的其它抗体或化合物来评估该抗体。可在肿瘤接种时、确定原发肿瘤生长后、或确定局部和/或远端转移后高于测试抗体。可采用任何方便的给药模式一次或多次给予测试抗体,包括但不限于静脉内、腹膜内、

肿 瘤内、皮下和真皮内。

[0394] 本发明方法可利用表达LOX或LOXL2的任何合适细胞。本文所用的术 语“细胞”包括生物学细胞(例如,CHO、HeLa等)。细胞可以是人或非人的。细胞可以是新鲜分离的(即,原始的)或源自短期或长期-建立的细胞系。示 范性生物学细胞系包括MDA-MB 231人乳腺癌细胞、MDA-MB 435人乳腺 癌细胞、U-87MG神经胶质瘤、SCL1鳞状细胞癌细胞、CEM、HeLa上皮 癌和中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞。这些细胞系描述于,例如马里兰州的罗克 维尔美国模式培养物保藏所(ATCC, Rockville, MD)的细胞系目录。

[0395] 细胞可表达LOX或LOXL2或其内源性或外源性启动子(例如,稳定的基 因转移所致)。本文提供的细胞的内源性表达可以是内源性基因的组成型或诱 导型表达。

[0396] 本文提供的细胞的外源性表达可以是诱导编码LOX或LOXL2或其生物 活性片段的核酸序列,或LOXL或LOXL2启动子核酸序列所致。可利用病毒 载体、磷酸钙、DEAE-葡聚糖、电穿孔、基因枪技术、阳离子脂质试剂或本领 域已知的任何其它方便的技术进行转化。本发明可用的转化方法是常规方法,其实例见“最新分子生物学方法”(Ausubel等编,2000)。赖氨酰氧化酶或其 启动子的外源性表达可以是瞬时的、稳定的或它们的某些组合。可利用组 成型启动子,例如SV40、CMV等和本领域已知的诱导型启动子实现酶的 外源性表达。合适的启动子是会在感兴趣细胞中起作用的那些。

[0397] 本文所述方法是非限制性的,本领域已知的任何其它方法还可用于测试抗-LOX抗体和抗-LOXL2抗体的活性。以下实施例描述了其它试验。

[0398] 可能需要在本发明标记和抗体的诸部分之间引入未结构化(unstructured) 的多肽接头区域。该接头有助于提高灵活性和/或降低任两个片段之间的空间位 阻。该接头还有助于各片段发生合适的折叠。该接头可以是天然来源的,例如 经测定存在于蛋白质的两个结构域之间的随机螺旋中的序列。示范性接头序列 是在RNA聚合酶a亚基的C-末端和N-末端结构域之间发现的接头。天然产生 的接头的其它例子包括在1CI和LexA蛋白质中发现的接头。

[0399] 在接头内,可根据经验测定或通过建模揭示的接头的优选特征来改变氨 基酸序列。选择接头要考虑的包括接头的柔韧性、接头的电荷和某些接头氨基 酸在天然产生的亚基中的存在情况。还可将接头设计成接头中的残基接触 DNA,从而影响结合亲和力或特 异性,或与其它蛋白质相互作用。在一些情况 中,特别是当需要在亚基之间跨越较长距离,或必须将结构域维持在特定构型 时,接头可任选含有额外的折叠结构域。

[0400] 在一些实施方式中,接头的设计优选包括将结构域安排成需要接头跨越较 短的距离,优选短于约10 埃(Å)。然而,在某些实施方式中,接头跨越最多 约50 Å 的距离。

[0401] 本文提供的抗体偶联于或连接于治疗和/或成像/可检测部分。本领域熟知 偶连 或连接抗体的方法。抗体和标记物之间的结合包括本领域已知的任何方 法,包括但不限于:共价和非共价相互作用。

[0402] 在一个非限制性实施方式中,抗体可与毒素、放射性核素、铁-相关化合 物、染料、成像剂、荧光标记物或递送给癌细胞时有毒性的化疗剂。

[0403] 或者,抗体可与可检测标记物结合,例如放射性核素、铁-相关化合物、染料、成像剂或荧光剂以便免疫检测靶抗原。

[0404] 放射性核素的非限制性例子包括,例如³²P、³³P、⁴³K、⁵²Fe、⁵⁷Co、⁶⁴Cu、⁶⁷Ga、⁶⁷Cu、

⁶⁸Ga、⁷¹Ge、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁷⁷Br、⁷⁷As、⁷⁷Br、⁸¹Rb/^{81M}Kr、^{87M}Sr、⁹⁰Y、⁹⁷Ru、⁹⁹Tc、¹⁰⁰Pd、¹⁰¹Rh、¹⁰³Pb、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹¹³In、¹¹⁹Sb、¹²¹Sn、¹²³I、¹²⁵I、¹²⁷Cs、¹²⁸Ba、¹²⁹Cs、¹³¹I、¹³¹Cs、¹⁴³Pr、¹⁵³Sm、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Eu、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、¹⁹¹Os、¹⁹³Pt、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁷Hg、¹⁹⁹Au、²⁰³Pb、²¹¹At、²¹²Pb、²¹²Bi和²¹³Bi。

[0405] 毒素的非限制性例子包括,例如白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、α-八叠球菌、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、石碱草(*sapaonaria officinalis*)抑制剂、白树毒素、米托洁林、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素、单端孢霉烯(*trichothecenes*)、产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)磷脂酶C(PLC)、牛胰腺核糖核酸酶(BPR)、抗病毒蛋白(PAP)、相思豆毒蛋白、眼镜蛇蛇毒因子(CVF)、白树毒素(GEL)、皂草素(SAP)、viscumin。

[0406] 铁-相关化合物的非限制性例子包括,例如磁性氧化铁颗粒、铁或亚铁颗粒、Fe²⁰³和Fe³⁰⁴。铁-相关化合物和标记多肽、蛋白质和肽的方法见,例如美国专利4,101,435和4,452,773,以及公布的美国申请20020064502和20020136693,这些文献均通过引用全文纳入本文。

[0407] 在某些实施方式中,标题抗体共价或非共价偶联于细胞毒素或其它细胞增殖抑制性化合物,从而将该药剂局部递送至肿瘤细胞。例如,该药剂可选自:药物、酶抑制剂、增殖抑制剂、裂解剂、DNA或RNA合成抑制剂、膜渗透性调节剂、DNA代谢物、二氯乙硫醚衍生物、蛋白质产生抑制剂、核糖体抑制剂、凋亡诱导剂和神经毒素。

[0408] 在某些实施方式中,标题抗体可与肿瘤成像所用试剂偶连。这种试剂包括:金属;金属螯合剂;镧系元素;镧系元素螯合剂;放射性金属;放射性金属螯合剂;发射正电子的核;微泡(对于超声波);脂质体;微囊密封在脂质体或纳米球中的分子;单晶氧化铁纳米化合物;磁共振成像造影剂;光吸收、反射和/或散射剂;胶体颗粒;荧光团,例如近红外荧光团。在许多实施方式中,这种二级官能团/部分较大,例如尺寸至少为25原子质量单位,在许多情况下尺寸可以至少是50、100或250原子质量单位。

[0409] 在某些实施方式中,二级官能团是螯合金属的螯合剂部分,例如放射性金属或顺磁性离子的螯合剂。在其它实施方式中,放疗或成像过程中可用放射性核素的螯合剂。

[0410] 本发明可用的放射性核素包括γ-发射体、正电子-发射体、Auger电子-发射体、X-射线发射体和荧光-发射体,治疗应用优选β-或α-发射体。可在放疗中用作毒素的放射性核素包括:³²P、³³P、⁴³K、⁵²Fe、⁵⁷Co、⁶⁴Cu、⁶⁷Ga、⁶⁷Cu、⁶⁸Ga、⁷¹Ge、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁷⁷Br、⁷⁷Br、⁸¹Rb/^{81M}Kr、^{87M}Sr、⁹⁰Y、⁹⁷Ru、⁹⁹Tc、¹⁰⁰Pd、¹⁰¹Rh、¹⁰³Pb、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹¹³In、¹¹⁹Sb、¹²¹Sn、¹²³I、¹²⁵I、¹²⁷Cs、¹²⁸Ba、¹²⁹Cs、¹³¹I、¹³¹Cs、¹⁴³Pr、¹⁵³Sm、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Eu、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、¹⁹¹Os、¹⁹³Pt、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁷Hg、¹⁹⁹Au、²⁰³Pb、²¹¹At、²¹²Pb、²¹²Bi和²¹³Bi。优选的治疗性放射性核素包括¹⁸⁸Re、¹⁸⁶Re、²⁰³Pb、²¹²Pb、²¹²Bi、¹⁰⁹Pd、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、⁷⁷Br、²¹¹At、⁹⁷Ru、¹⁰⁵Rh、¹⁹⁸Au和¹⁹⁹Ag、¹⁶⁶Ho或¹⁷⁷Lu。螯合剂与金属配位的条件描述于,例如Gasnow等的美国专利号4,831,175;4,454,106和4,472,509,各份专利通过引用纳入本文。在本发明中,“放射性核素”和“放射性标记物”可互换。

[0411] 对于诊断应用,⁹⁹Tc是极其有吸引力的放射性核素,因为它对于所有核医学部门

不难获得,廉价,能得到最低的患者放射剂量并具有理想的核成像特性。其半衰期为6小时,意味着锝-标记的抗体需要快速定靶。

[0412] 在还有其它实施方式中,二级官能团可以是放射增敏剂,例如增加细胞对放射敏感性的部分。放射增敏剂的例子包括硝基咪唑、甲硝唑和米索硝唑(参见通过引用纳入本文的:DeVita,V.T.刊于Harrison's Principles of Internal Medicine(哈里森内科学原理),第68页,M-H图书公司(McGraw-Hill Book Co.),纽约,1983)。给予包含放射增敏剂作为活性部分的修饰抗体,并将其定位在靶细胞。各细胞接触放射后,放射增敏剂得到“激发”,从而导致细胞死亡。

[0413] 有各种部分可用作螯合剂并使本发明抗体衍生化。例如螯合剂可以是以下物质的衍生物:1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸(DOTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和1-对-异硫氰酸根-苄基-甲基-二亚乙基三胺五乙酸(ITC-MX)。这些螯合剂通常在侧链上具有基团,借助这些基团螯合剂可用于连接标题拮抗剂。这种基团包括,例如苄基异硫氰酸酯基,DOTA,DTPA或EDTA借助该基团可偶联于,例如氨基。

[0414] 在一个实施方式中,螯合剂部分是“NxSy”螯合剂部分。本文定义的“NxSy 融合剂”包括能配位结合金属或放射性金属并优选具有N2S3或N3S核心的双功能螯合剂。示范性NxSy螯合剂描述于,例如Fritzberg等,(1998) PNAS 85: 4024-29; 和Weber等,(1990) Chem.1:431-37; 及其中引用的参考文献。

[0415] Jacobsen等(PCT申请WO 98/12156)提供了鉴定能结合金属原子的化合物的方法和组合物,即,结合部分的合成文库。可采用该申请所述的方法鉴定结合部分,随后可将该部分加入抗体以获得修饰的抗体。

[0416] 在放射诊断领域中利用偶连蛋白质常遇到的一个问题是放射性标记部分的片段有可能在肾脏中有害地累积。当利用酸-或碱-不稳定的接头形成偶联物时,不难切割放射性螯合剂与蛋白质。如果螯合剂的分子量较低,如标题修饰抗体,抗原结合片段和肽中大多数预计的那样,其不会保留在肾脏中,其能分泌入尿液从而减少肾脏接触放射性(螯合剂)。然而,在某些例子中,出于与标记蛋白质相同的原因,可能优选在标题配体中利用酸-或碱-不稳定的接头。

[0417] 因此,可通过本领域的标准方法合成某些标题标记/修饰抗体来提供反应活性功能域,从而可与,例如配体上的羰基形成酸-不稳定的连接键。合适的酸不稳定连接键的例子包括腙和硫代半卡巴腙官能团。这些连接键通过氧化的碳水化合物分别与携带酰肼、硫代半卡巴腙等官能团的螯合剂反应而形成。

[0418] 或者,可利用碱-可切割的(官能团),其已用于提高放射性标记从肾脏中的清除率。参见,例如Weber等,1990 Bioconjug. Chem. 1:431。通过酰肼连接键将双功能螯合剂偶联于抗体能将碱-敏感性酯部分掺入接头间隔臂。这种含-酯接头单位的例子是乙二醇二(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯),(EGS,购自伊利诺斯州罗克福德市皮尔斯化学品公司(Pierce Chemical Co.,Rockford, IL)),其具有两个1,4-二丁酸单位的两个末端N-巯基琥珀酰亚胺(NHS)酯衍生物,该两单位各自经两个烷基酯连接于一个乙二醇部分。可用合适的含胺BFC(例如,2-氨基苄基DTPA)替代一个NHS酯,而另一NHS酯与有限量的肼反应。得到的酰肼用于偶连拮抗剂,从而形成含有两个烷基酯官能团的配体-BFC连接键。这种偶联物在生理pH下稳定,但在碱性pH下不难切割。

[0419] 通过放射性同位素螯合而作标记的抗体经放射-诱导切割螯合剂并通过配位复合物的解离而丧失放射性同位素。在一些例子中,从复合物解离的金属可重新形成复合物,从而能更快速地清除非特异性定位的同位素,因此,对非靶组织的毒性更低。例如,可将螯合剂化合物,如EDTA或DTPA注入患者以提供螯合剂库来结合释放的放射性金属并促进游离放射性同位素在尿液中排出。

[0420] 在还有其它实施方式中,抗体偶连于硼加成物,例如碳硼烷。例如,本领域熟知可利用侧链(pendant side chain)上的羧基官能团制备碳硼烷。可通过活化碳硼烷的羧基并与胺基缩合实现这种碳硼烷与胺肽的连接,从而产生偶联物。这种修饰的抗体可用于中子俘获疗法。

[0421] 本发明还考虑用,例如治疗可用的并与合适非电离辐射联用的染料来修饰拮抗剂。还考虑了光和卟啉在本发明方法中的应用,van den Bergh, Chemistry in Britain, 22:430-437 (1986) 总结了它们在癌症治疗中的引用,该篇文献通过引用全文纳入本文。

[0422] 本发明的一种实施方式包括用荧光标记物作标记的拮抗剂。普通的荧光标记物包括,例如FITC、PE、德克萨斯红、细胞色素c,等。本领域熟知标记多肽及其片段的技术,例如本文提供的那些。

[0423] 术语“抗癌剂”还包括下述化疗剂。当这种药剂与LOX抑制作用组合时,术语“抗癌剂”还包括利用能减轻细胞中低氧的物质进行治疗。这种物质可包括,例如p53。参见,例如Matoba等,“p53Regulates Mitochondrial Respiration (p53调节线粒体呼吸)”Science, 2006年6月16日,312: 1650-1653;2006年5月24日在线公布,及其中引用的参考文献。驱动癌症细胞接近呼吸途径并远离糖酵解途径的物质优选与LOX抑制剂联用,只要在该情况下LOX不上调。

[0424] 可用作活性部分的化疗剂通常是化学合成的小化学实体,该化疗剂与本发明的拮抗剂偶连时可特异性递送至细胞。化疗剂包括细胞毒性和细胞抑制性药物。化疗剂可包括对细胞具有其它效应,例如将转化状态逆转成分化状态,或抑制细胞复制的那些药剂。可用于本发明的已知细胞毒性剂的例子见,例如Goodman等,“The Pharmacological Basis of Therapeutics (治疗的药理学基础)”,第六版,A.B.Gilman等编,迈克米兰出版公司(Macmillan Publishing Co.),纽约,1980。这些药剂包括紫杉烷、例如紫杉醇和多西他赛;氮,例如氮芥、美法仑、尿嘧啶氮芥和瘤可宁;乙撑亚胺衍生物,例如塞替派;磺酸烷酯,例如白消安;亚硝(基)脲,例如洛莫司汀、司莫司汀和链佐星;三氮烯,例如达卡巴嗪;叶酸类似物,例如甲氨蝶呤;嘧啶类似物,例如氟尿嘧啶、阿糖胞苷和阿扎立平;嘌呤类似物,例如巯嘌呤和硫鸟嘌呤;长春花生物碱,例如长春碱和长春新碱;抗生素,例如放线菌素、柔红霉素、阿霉素、和丝裂霉素;酶,例如铂配位复合物,例如顺铂;取代的脲,例如羟基脲;甲基肼衍生物,例如丙卡巴肼;肾上腺皮质抑制剂,例如米托坦;激素和拮抗剂,例如肾上腺皮质类固醇(泼尼松)、妊娠素(己酸、乙酸羟基孕酮和乙酸甲地孕酮)、雌激素(二乙基己烯雌酚和乙炔雌二醇)、和雄激素(丙酸睾酮和氟甲睾酮)。

[0425] 还可利用干扰蛋白质合成的药物;本领域技术人员已知这种药物,包括嘌呤霉素、放线菌酮和核糖核酸酶。

[0426] 目前用于治疗癌症的大多数化疗剂具有适于和本发明药剂的胺或羧基直接化学

交联的官能团。例如，氨甲蝶呤、阿霉素、柔红霉素、阿糖胞苷、博莱 霉素、氟达拉滨和克拉屈滨上有游离氨基可用，而氨甲蝶呤、美法仑和瘤可 宁上有游离羧酸基团可用。

[0427] 作为游离的氨基和羧酸，这些官能团是能交联这些药物与拮抗剂的游离氨基的各种同双功能和异双功能化学交联剂的靶位。

[0428] 本发明考虑的化疗剂还包括可商品化购得的其它化疗药物。仅是举例，化 疗剂可以是染色质功能的抑制剂、抑制剂、抑制性药物、DNA破坏剂、抗代 谢物(例如，叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和糖修饰的类似物)、DNA 合成抑制剂、DNA相互作用剂(例如，插入剂)、DNA修复抑制剂。

[0429] 可以根据作用机制将化疗剂分类成，例如以下组：抗-代谢物/抗癌剂，例 如嘧啶类似物(氟尿苷、卡培他滨和阿糖胞苷) 和嘌呤类似物、叶酸拮抗剂 和相关的抑制剂，抗增殖/抗有丝分裂剂，包括天然产物，例如长春花生物 碱(长春碱、长春新碱)、和微管(药物)，例如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、长春碱、诺考达唑、艾泊希龙(epothilones) 和诺维本、鬼臼毒素(epidipodophyllotoxins)(依托泊苷、替尼泊苷)、DNA破坏剂(放线菌素、安吖啶、白消安、卡铂、瘤可宁、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺(cytosine)、更生霉素、柔红霉素、阿霉素、表柔比星、异环磷酰胺、美法仑、墨罗他 敏(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、丙卡巴肼、紫杉 醇、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫化磷酰胺和依托泊苷；抗生素，例如 更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素、阿霉素(亚得里亚霉素)、伊达比星、蒽环类、米托蒽醌、博莱霉素、普卡霉素(光神霉素) 和丝裂霉素；酶(系 统性代谢L-天冬酰胺并除去自身不能合成天冬酰胺的细胞的L-天冬酰胺 酶)；抗血小板剂；抗增殖/抗有丝分裂烷化剂，例如 氮芥、环磷酰胺和类似 物、美法仑、瘤可宁)、和(六甲蜜胺和塞替派)、烷基亚硝基脲(BCNU) 和 类似物、链佐星)、三氮杂烯-氮烯咪胺(DTIC)；抗增殖/抗有丝分裂抗代谢 物，例如叶酸类似物(甲氨喋呤)；铂配位复合物(顺铂、奥罗铂 (oxaliplatin)、卡铂)、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦、氨鲁米特；激素、激 素类似物(雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特) 和芳香酶 抑制剂(来曲唑、阿那曲唑)；抗凝剂(肝素、合成的肝素盐和凝血酶的其 它抑制剂)；纤维蛋白溶解剂(例如，组织纤维蛋白溶酶原激活剂、链激酶 和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷；抗迁移剂；抗分 泌剂(breveldin)；免疫抑制剂，他克莫司、西罗莫司、硫唑嘌呤、霉酚酸 酯；化合物(TNP-470、染料木黄酮) 和生长因子抑制剂(血管内皮生长因子 抑制剂、成纤维细胞生长因子抑制剂)；血管紧张素受体阻断剂、氧化氮供 体；反义寡核苷酸；抗体(曲妥珠单抗、利妥昔单抗)；细胞周期抑制剂和 分化诱导物(维甲酸)；抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(阿霉素(亚得里亚霉 素)、柔红霉素、更生霉素、艾尼平甘(eniposide)、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、依立替康和米托蒽醌、托泊替康、依立替康)、皮质类固醇(可 的松、地塞米松、氢化可的松、甲基泼尼松、泼尼松、和泼尼松龙)；生长因子信号转导激酶抑制剂；机能异常诱导物、毒素，例如霍乱毒素、蓖麻 毒蛋白、假单胞菌外毒素、百日咳博德特菌腺苷酸环化酶毒素、或白喉毒 素、和胱冬酶活化剂；和染色质。化疗剂的优选剂量与目前所开处方的剂 量一致。

[0430] 此外，本发明考虑了其它标记物，例如生物素，然后是链霉亲和素-碱 性磷酸酶(AP)、辣根过氧化物酶。

[0431] 本文所用的术语“核酸破坏性治疗”和“核酸破坏剂”指直接或间接 破坏核酸(例如，DNA、cDNA、基因组DNA、mRNA、tRNA或rRNA) 的 任何治疗方案。这种药剂的例子包括烷化

剂、亚硝基脲、抗-代谢物、植物 生物碱、植物提取物和放射性同位素。药剂的例子还包括核酸破坏药物，例如，5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他滨、S-1(替加氟、5-氯-2',4'-二羟基吡啶 和 氧 嘻 酸)、5-乙炔基尿嘧啶、阿糖基胞苷(ara-C)、5-氮胞苷(5-AC)、2',2' - 二氟-2' - 脱氧胞苷(dFdC)、嘌呤抗代谢物(巯基嘌呤、硫唑嘌呤、硫鸟嘌呤)、盐酸吉西他滨(健择)、喷司他丁、别嘌呤醇、2-氟-阿糖基-腺嘌呤(2F-ara-A)、巯基脲、巯芥子气(双氯乙硫醚)、氮芥、美法仑、瘤可宁、环 磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、AZQ、丝裂霉素C、去水卫矛醇、二溴卫 茅醇、烷基磺酸酯(白消安)、亚硝基脲(BCNU、CCNU、4-甲基CCNU或 ACNU)、丙卡巴肼、氨烯咪胺、蝴蝶霉素(rebeccamycin)、葱环类，例如阿 霉素(亚得里亚霉素；ADR)、柔红霉素(Cerubidine)、伊达比星(去甲氧柔 红霉素)和表柔比星(Ellence)、葱环类似物，例如米托蒽醌、放线菌素D、非插入性拓扑异构酶抑制剂，例如鬼臼乙叉甙(依托泊苷=VP16、替尼泊苷=VM-26)、鬼臼毒素(podophylotoxin)、博莱霉素(Bleo)、派来霉素、与核 酸形成加成物的化合物，包括铂衍生物(例如，顺铂(CDDP)、顺铂的反式 类似物、卡铂、异丙铂、四铂和奥沙利铂)、喜树碱、托泊替康、依立替康 (CPT-11)、和SN-38。核酸破坏治疗的具体例子包括放疗(例如，聚焦微波、紫外(UV)、红外(IR)、或 α -、 β -或 γ -射线)和环境冲击(例如，体温过高)。

[0432] 本文所用的术语“抗-增殖治疗”和“抗-增殖剂”表示直接或间接抑制 细胞、病毒、细菌或其它单细胞或多细胞生物增殖的任何治疗方案，而无论该治疗或药剂是否破坏核酸。抗-增殖剂的具体例子是抑制细胞增殖或病 毒增殖或复制的抗肿瘤和抗病毒药物。例子包括环磷酰胺、硫唑嘌呤、环 孢菌素A、泼尼松龙、美法仑、瘤可宁、氮芥、白消安、甲氨喋呤、6-巯基 嘌呤、硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、紫杉醇、长春碱、长春新碱、阿霉素、放线 菌素D、光 神霉素、卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、链唑霉素、羟基脲、顺铂、米托坦、丙卡巴肼、达卡巴嗪和二溴甘露醇等。导致核酸复制错误 或抑制核酸复制的抗增殖剂是，例如核昔和核昔酸类似物(例如，AZT或 5-AZC)。

[0433] 在另一实施方式中，抗-LOX抗体可以偶联于“受体”(例如链霉亲和 素)以便用于肿瘤预-靶向，其中抗体-受体偶联物给予患者，然后利用清除 剂从循环中除去未结合的偶联物，再给予偶连于细胞毒性剂(例如，放射性 核素)的“配体”(例如，亲和素)。

[0434] 标记多肽及其片段的方法包括但不限于本文提供和本领域熟知的那些 方法。当用放射性标记物或毒素标记本发明抗体时，可将抗体制备成可用 于治疗性治疗患者的药物组合物，其中将有效量的药物组合物给予患者。当用可目测观察的标记物标记本发明抗体时，可将抗体制备成可用于诊断 患者的药物组合物，其中将有效量的药物组合物给予患者以便体内成像或 者在体外试验中检验药物组合物。

[0435] V. 组合物

[0436] 当与药学上可接受的运载体或赋形剂组合时，本发明各抗体可用作组合 物。这种药物组合物可用于，例如体内或离体给予对象，用所述抗体诊断和/ 或治疗对象。

[0437] 药学上可接受的运载体对于所给予的患者是生理上可接受的，并且保留了 所给予抗体或肽的治疗特性。药学上可接受的运载体和它们的制剂通常描述 于，例如 Remington's pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学)(第18版，A.Gennaro编，马克出版公司(Mack Publishing Co.)，伊斯顿，宾夕法尼亚 州，1990)。一种示范性药物运载体是 生理盐水。本文所用的短语“药学上 可接受的运载体”表示参与将标题抗体或肽从一个器

官的给药部位或身体 部分携带或运输至另一器官或身体部分的药学上可接受的物质、组合物或 载体,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料。就与 制剂的其它成分相容和不伤害患者的意味而言,这种运载体必须是“可接 受的”。药学上可接受的运载体也不应改变拮抗剂的特定活性。本文它处 提供了示范性的运载体和赋形剂。

[0438] 在一方面,本发明提供与药物给予相容的,药学上可接受或生理学上可接 受的组合物,其包含溶剂(水性或非水性)、溶液、乳液、分散介质、包衣、等 渗和吸收促进或延迟剂。因此,药物组合物或药物制剂指适合对象中的药物应 用的组合物。因此,药物组合物或药物制剂指适合于对象中的药学应用的组合 物。药物组合物和制剂包括一定含量的本发明化合物,例如有效量的本发明拮 抗剂和药学上或生理学上可接受的运载体。

[0439] 可将药物组合物配制成与全身性或局部的特定给药途径相容。因此,这些 药物组合物包含适合经各种途径给予的运载体、稀释剂或赋形剂。

[0440] 在进一步的本发明中,本发明组合物还包含药学上可接受的添加剂以提高 组合物中拮抗剂的稳定性和/或控制组合物的释放速度。本发明的药学上可接受 的添加剂不改变标题拮抗剂的特定活性。优选的药学上可接受的添加剂是糖, 例如甘露醇、山梨醇、葡萄糖、木糖、海藻糖、山梨糖、蔗糖、半乳糖、葡聚 糖、右旋糖、果糖、乳糖和它们的混合物。药学上可接受的本发明添加剂可与 药学上可接受的运载体和/或赋形剂,例如右旋糖组合。或者,优选的药学上可 接受的添加剂是表面活性剂,例如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80以提高肽的 稳定性并降低药物溶液的胶凝作用。可将溶液的0.01%-5%含量的表面活性剂 加入组合物。加入这种药学上可接受的添加剂能提高组合物在保存中的稳定性 和半衰期。

[0441] 通常可按照部位和所治疗疾病改进制剂和递送方法。示范性的制剂包括但 不限于:适合于胃肠外给予的那些制剂,例如静脉内、动脉内、肌肉内或皮下 给予,包括部分在胶束、脂质体或药物释放胶囊(活性剂掺入设计用于缓释的 生物相容包衣)中的制剂;可摄取制剂;局部应用的制剂,例如乳膏、软膏和 凝胶;和诸如吸入剂、气溶胶和喷雾剂等其它制剂。本发明化合物的剂量根据 治疗所需程度和严重性、所给予组合物的活性、对象的总体健康状况和技术人 员熟知的其它考虑事项而有所不同。

[0442] 经肠(口服)给药的制剂可包含在片剂(包衣或未包衣)、胶囊(硬或软)、微球、 乳液、粉末、颗粒、晶体、悬液、糖浆或酏剂。可利用常规非毒性固体运载体 制备固体制剂,所述运载体包括,例如药学级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂 酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁。还可将补充性的活 性化合物(例如,防腐剂、抗菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂)掺入这些制剂。还可 将液体制剂用于经肠给药。运载体可以选自各种油,包括石油、 动物油、植物 油或合成的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油。合适的药物赋形剂包括,例如淀粉、纤维素、滑石粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽糖、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、氯化钠、脱脂奶 粉、甘油、丙二醇、水、乙醇。

[0443] 经肠、胃肠外或经粘膜递送的药物组合物包含,例如水、盐水、磷酸缓冲 盐水、汉 克液、林格液、右旋糖/盐水和葡萄糖溶液。这些制剂可含有辅助物质 以接近生理条件,例 如缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、洗涤剂等。调节剂还可 包括其它活性成分,例如杀菌剂或 稳定剂。例如,该溶液可含有乙酸钠、乳酸 钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、单月桂酸钠或油酸 三乙醇胺。其它胃肠外制剂 和方法描述于Bai (1997) J.Neuroimmunol. 80:65-75; Warren (1997) J.Neurol. Sci. 152:31-38; 和Tonegawa (1997) J.Exp.Med. 186:507-515。胃肠外制

品 可以包封在玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0444] 真皮内或皮下给予的药物组合物可包含无菌稀释剂,例如水、盐水溶液、不挥发的油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,例如苄醇或 对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸、谷胱甘肽或亚硫酸氢钠;螯合 剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和调节张 力的试剂,例如氯化钠或右旋糖。

[0445] 用于注射的药物组合物包括水溶液(水可溶性的)或分散液和临时配制成 无菌可注射液或分散液的无菌粉末。对于静脉内给药,合适的运载体包括生理 盐水、细菌抑制性 水、Cremophor ELTM(新泽西州帕斯帕尼市的巴斯夫公司 (BASF, Parsippany, N.J.))或磷酸 缓冲盐水 (PBS)。运载体可以是含有,例如 水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二 醇等)以及它们的合适混合 物的溶剂或分散介质。可通过,例如利用包衣,如卵磷脂,维持 所需粒度(在 分散液的情况下)以及利用表面活性剂来维持流动性。抗细菌和抗真菌剂包 括,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞。组合物中 可包含等渗剂,例 如,糖,多元醇,例如甘露醇、山梨醇和氯化钠。可以 将得到的溶液包装以便如此使用或冻 干;随后,冻干的制品可在给药前与 无菌溶液混合。

[0446] 药学上可接受的运载体可含有稳定、提高或延迟吸收或清除的化合物。这 种化 合物包括,例如碳水化合物,例如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖;低分子量蛋白 质;降低肽的清除或 水解的组合物;或赋形剂或其它稳定剂和/或缓冲剂。延迟 释放的试剂包括,例如单硬脂酸 铝和明胶。还可利用洗涤剂稳定或增加或降低 药物组合物的吸收,包括脂质体运载体。为 免遭消化,可将化合物与组合物形 成复合物以赋予其耐受酸水解和酶促水解,或者可将化 合物在适当耐受的运载 体,例如脂质体中形成复合物。本领域已知保护化合物免遭消化的 方法(参见, 例如Fix (1996) Pharm Res. 13:1760 1764; Samanen (1996) J.Pharm. Pharmacol. 48:119 135; 和美国专利号5,391,377,描述了口服递送治疗剂的 脂质组合 物)。

[0447] 对于经粘膜或透皮给药,可在制剂中使用对于要渗透的屏障合适的渗透 剂。这种 渗透剂通常是本领域已知的,包括,例如用于经粘膜给药的洗涤剂、胆汁盐和夫西地酸衍 生物。经粘膜给药可通过鼻喷雾剂或栓剂(参见,例如 Sayani (1996) "Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae (经吸收粘膜全身性递送肽和蛋 白质)" Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst. 13:85 184)。对于透皮给药,可将活性化合物 配制成本领域公知的软膏、药膏、凝胶或乳膏。还可利用贴剂实现透皮递送系统。

[0448] 对于吸入递送,可给予气溶胶或轻雾形式的药物制剂。对于气溶胶给药, 可提供 包含表面活性剂和推进剂的细微分级形式的制剂。在另一实施方式中, 将制剂递送至呼吸 组织的装置是汽化制剂的装置。本领域已知的其它递送系统 包括干粉气溶胶、液体递送系 统、吸入器、空气喷射喷雾器和推进剂系统(参 见,例如Patton (1998) Biotechniques 16: 141 143; Dura Pharmaceuticals(杜雷 药物), 圣迭戈, 加利福尼亚州; Aradigm, 海达德, 加 利福尼亚州; Aerogen, 圣克拉拉, 加利福尼亚州; 和Inhale Therapeutic Systems(吸入治 疗系统), 圣卡洛斯, 加利福尼亚州)。

[0449] 可利用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯基乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇 酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。本领域技术人员已知制备这种制剂的方 法。还可从阿扎公司 (Alza Corporation) 和诺瓦药物公司 (Nova Pharmaceuticals, Inc) 商品化购得这些物

质。还可利用脂质体悬液(包括利用抗体或病毒外壳蛋白 靶向细胞或组织的脂质体)作为药学上可接受的运载体。可按照本领域已知的方法制备这些物质,例如美国专利号4,235,871;4,501,728;4,522,811; 4,837,028;6,110,490;6,096,716;5,283,185;5,279,833;Akimaru(1995) Cytokines Mol.Ther.1:197-210;Alving(1995) Immunol.Rev.145:5-31;和Szoka(1980) Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467)所述。本领域已知能持续递送 包括肽在内的小分子的生物可降解微球或胶囊或其它生物可降解的聚合物构 造物(参见,例如Putney(1998) Nat.Biotechnol.16:153-157)。可将本发明化 合物掺入胶束(参见,例如Suntres(1994) J.Pharm.Pharmacol.46:23-28; Woodle(1992) Pharm.Res.9:260-265)。可将拮抗剂粘附于脂质单层或双层 表面。可将拮抗剂粘附于含有酰肼-PEG-(二硬脂酰磷脂酰-1)乙醇胺的脂质 体(参见,例如Zalipsky(1995) Bioconjug.Chem.6:705-708)。或者,可利用 任何形式的脂膜,例如平面脂膜或完整细胞,例如红细胞的细胞膜。可通 过任何方式,包括,例如静脉内、透皮(参见,例如Vutla(1996) J.Pharm.Sci. 85:5-8)、经粘膜或口服给药递送含脂质体和脂质的制剂。

[0450] 本发明组合物可与部位提供的其它治疗部分或成像/诊断部分组合。治疗 部分和/或成像部分可作为不同的组合物,或作为偶连部分提供。如果需要,如 本文它处所述,可为偶连部分纳入接头。

[0451] 还可将本文公开的抗体配制成免疫脂质体。通过本领域已知的方法制备含 有抗体的脂质体,例如Epstein等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688 (1985); Hwang等, Proc.Natl Acad.Sci.USA,77:4030 (1980); 和美国专利 号4,485,045和4,544,545所述。美国专利号5,013,556公开了循环时间提高 的脂质体。

[0452] 可通过反相蒸发方法,用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷脂酰 乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物制备特别有用的脂质体。脂质体经确定孔径的滤 器挤出,从而获得具有所需直径的脂质体。可如Martin等,J.Biol.Chem.,257: 286-288(1982)所述,通过二 硫互换反应将本发明抗体的Fab' 片段偶联于脂质 体。化疗剂(例如,阿霉素)任选包含在脂 质体中。参见,Gabizon等,J.National Cancer Inst.,81(19):1484(1989)。

[0453] 还可利用脂质转染或脂质体将抗-LOX抗体或抗体片段递送入细胞。如果 利用抗体片段,可利用特异性结合靶蛋白结合结构域的最小抑制性片段。例如, 根据抗体的可变 区序列,可将肽分子设计成能保留结合靶蛋白质序列的能力。可以化学合成和/或通过重 组DNA技术产生这种肽。参见,例如Marasco等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893 (1993)。本文的制剂还可含有所治 痘的具体适应症需要的一种以上活性化合物,包括,例 如具有补充活性, 而不会相反地影响彼此的那些化合物。或者,或额外的,组合物可包含增 强其功能的试剂,例如细胞毒性剂、细胞因子、化疗剂或生长抑制剂。这 些分子优选组合存 在,其含量对于所需目的是有效的。还可将活性成分截 留在,例如通过凝聚技术或界面聚 合法制备的微囊,例如分别是羟甲基纤 维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基甲酰化(methylmethacrylate))的微囊中,截留在 胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米 胶囊)或在粗乳液中。这些技术描述于“雷明顿药物科学,同上”。

[0454] 用于体内给药的制剂是无菌的。经无菌滤膜过滤不难实现灭菌。

[0455] 可制备缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物 的半 渗透基质,该基质是成形制品的形式,例如膜或微囊。缓释基质的例子包 括聚酯、水凝胶

(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸)、或聚(乙烯醇)、聚交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、非-可降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,例如LUPRON DEPOT[®] (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球)和聚-D-($-$)-3-羟基丁酸。虽然聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸能在100天期间释放分子,但某些水凝胶在较短的时间内释放蛋白质。当包封的抗体在体内长期维持时,它们可因在37°C接触水分而变性或凝聚,从而导致生物学活性丧失,还可能改变免疫原性。可根据所涉及的机制设计理性方案使之稳定。例如,如果发现凝聚机制是经硫代-二硫化物互换而在分子间形成S-S键,可通过修饰巯基残基、冻干酸性溶液、控制水分含量、利用合适的添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定。

[0456] 本领域技术人员鉴于本文可知道各种其它药物组合物及其制备技术和应用。合适的药物组合物和相关给药技术的细节可参见本文的详细指导,进一步的补充可见,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy(雷明顿:药学科学和实践),第20版,(Lippincott,Williams&Wilkins 2003)等教材。

[0457] 上文描述了本发明考虑的药物组合物。在本发明的一个实施方式中,药物组合物配制成不含热原,因此,它们对于给予人患者是可接受的。本领域普通技术人员熟知如何检验药物组合物的热原和制备不含热原的药物组合物。

[0458] 本发明的一个实施方式考虑了利用本发明的任何药物组合物制备治疗本发明疾病的药物。可根据需要治疗的患者/对象的物理特征配制药物,根据癌性组织的阶段配制成单一制剂或多重制剂。可将本发明药物包装在带有合适标签以便分配到医院和诊所的合适药物包装中,其中该标签表明能治疗对象的本文所述疾病。可将药物包装成单单位或多单位。下述药物包装和试剂盒中可包括本发明药物组合物的剂量和给药的使用说明。

[0459] VI. 亲和纯化

[0460] 本文所述的抗-LOX抗体和抗-LOXL2抗体可用于从细胞培养液、天然来源或组织活检样品(组织和/或血清)中亲和纯化LOX或LOXL2。在该过程中,可用本领域熟知的方法将针对LOX或LOXL2的抗体固定在合适的支持物,例如葡聚糖凝胶树脂或滤纸上。然后将固定的抗体与含有待纯化的LOX或LOXL2的样品接触,随后用合适溶剂洗涤支持物,从而基本上除去样品中除与固定抗体结合的LOX或LOXL2的所有物质。最后,用能从抗体释放LOX或LOXL2的另一合适溶剂洗涤支持物。

[0461] VII. 包装和试剂盒

[0462] 本申请的一个实施方式包括可用于本发明方法的药物包装或试剂盒。这种药物包装或试剂盒的一个实施方式包括本文提供的拮抗剂的制剂(组合物)。

[0463] 本发明一方面涉及实施给予LOX/LOXL2抑制剂的试剂盒。本发明的另一方面涉及实施组合给予LOX/LOXL2抑制剂与一种或多种其它治疗剂的试剂盒。在一个实施方式中,所述试剂盒装有在药物运载体或赋形剂中配制的LOX/LOXL2抑制剂和在一种或多种不同的药物制品中适当配制的至少一种不是LOX/LOXL2抑制剂的治疗剂。

[0464] 药物包装和试剂盒还可在药物制剂中包含赋形剂、运载体、缓冲剂、防腐剂或稳定剂。可将试剂盒的各组分包封在单个容器内,各种容器均位于一个包装内。可将本发明试剂盒设计成适于室温或冷冻保存。

[0465] 此外,这些制剂可含有稳定剂以增加试剂盒的储存寿命,包括,例如牛血清白蛋白。

白(BSA)或其它已知的常规稳定剂。当冻干组合物时,所述试剂盒还可 装有用于重建制剂的溶液制剂。可接受的溶液是本领域熟知的,包括,例如药 学上可接受的磷酸缓冲盐水(PBS)。

[0466] 此外,本文提供的药物包装或试剂盒还可装有本文提供的任何其它部分, 例如它处详述的化疗剂。

[0467] 本发明的药物包装和试剂盒还可装有用于本文提供试验,例如ELISA试 验的组分。或者,试剂盒制品用于免疫测定,例如免疫组化方法来检验患者组 织活检切片。本发明的药物包装和试剂盒还可装有收集样品所用的组件。

[0468] 本发明的药物包装和试剂盒还可装有说明,例如产品说明书、给药方式和 治疗适应症的标签。本文提供的药物包装可装有本文所述的任何组合物。所述 药物包装还可装有预防、降低风险、或治疗本文所述任何疾病适应症的标签。

[0469] 术语“包装材料”指容纳试剂盒诸组分的物理结构。包装材料可维持诸组 分无菌,可用通常用于这种目的的材料(例如,纸、起皱滤膜、玻璃、塑料、箔、安瓿等)制备包装材料。标签或包装插页可包含合适的书面使用说明书。因此,本发明试剂盒还可装有标签或 使用说明书以便在任何本发明方法中使用 试剂盒组分。可本发明化合物连同使用说明书装在试剂盒的一个包装或分配器 中以便在本发明方法中给予化合物。

[0470] 使用说明书可以包含实施本文所述的任何本发明方法的使用说明,包括治 疗、检测、监测或诊断方法。使用说明书还可包含满意的临床终点或可能发生 的任何不利症状的说明,或者管理机构,例如食品药品管理局要求的对于人对 象应用的其它信息。

[0471] 使用说明书可以在“打印材料”,例如在试剂盒内或附以其上的纸或纸板 上,或在附于试剂盒或包装材料的标签上,或结合在含有试剂盒组分的小瓶或 试管上。使用说明书还可包含在计算机可读介质,例如磁盘(软盘或硬盘)、光 盘CD,如CD-或DVDROM/RAM、磁带、电子存储介质,如RAM和ROM, IC提示(IC tip) 和这些材料的混合体,例如磁性/光学存储介质。

[0472] 可将本发明试剂盒的组合物配制成单单位或多单位以供一次检验或多次 检验。

[0473] 在优选的实施方式中,试剂盒的制品不含热原。检验热原的存在和/或特 定水平的方法是本领域的常规方法,可为此目的商品化购得试剂盒。

[0474] 本文提供用于治疗LOX或LOXL2相关疾病的试剂盒,其含有本文所述 抗体或其抗 原结合片段和药学上可接受的运载体或赋形剂的组合物。LOX或 LOXL2相关疾病可以是,例如肿瘤、转移、血管生成或纤维化。在一个实施 方式中,这种试剂盒中的抗体可包含可检测 的标记物、治疗性标记物或同时包 含二者。在另一实施方式中,可以冻干这种试剂盒中的 抗体。

[0475] 本发明的另一方面涉及实施组合给予LOX或LOXL2抑制剂与其它治疗 性化合物的 试剂盒。在一个实施方式中,所述试剂盒包含用药物运载体配制的 LOX或LOXL2抑制剂和在 一种或多种不同的药物制剂中适当配制的至少一种 细胞毒性剂。

[0476] VIII. 诊断方法

[0477] 本发明还提供利用识别不同形式的LOX或LOXL2的试剂来诊断、监测、分期或检测 上述疾病的方法。例如,为此目的可利用针对不同形式的LOX或 LOXL2(分泌、成熟或活性形 式的前蛋白原)的上述抗体。利用识别不同形式的 LOX或LOXL2的试剂来诊断、监测、分期或

检测上述疾病的方法应包括本文 所述的所有疾病和适应症。

[0478] 如上所述,活性LOX或LOXL2被切割,根据其分子量的改变(免疫印迹) 或利用检测未切割与切割形式的LOX/LOXL的抗体以及采用各种检测方法,例如免疫组化方法(IHC) 进行细胞定位来检测。

[0479] 据信,胞外基质和条件化培养基应含有经蛋白水解加工的活性LOX或 LOXL,而未切割的无活性LOX/LOXL应定位于胞内。由于从胞外空间摄取,在胞内也可检测到一些活性、切割的LOX/LOXL。

[0480] 可以收集个体的样品,并通过测定无活性或活性LOX水平进行分析。可 先进行该项分析,再开始利用赖氨酰氧化酶-特异性疗剂的治疗以鉴定活性 LOX/LOXL表达或活性升高的肿瘤。可利用任何样品进行这种诊断分析,所述 样品包括但不限于:细胞、细胞的蛋白质或膜提取物,诸如痰、血液、血清、 血浆或尿液等生物学液体,或诸如组织样品、福尔马林-固定或冷冻的组织切 片等生物学样品。

[0481] 可采用任何合适的方法来检测和分析无活性和/或活性LOX/LOXL。本文 所用的术语“样品”指人、动物的样品,或指研究样品,例如,细胞、组织、器官、液体、气体、气溶胶、浆液、胶体或凝结物质。利用本文所述抗体的样 品还包括但不限于:细胞的蛋白质或膜提取物,诸如痰、血液、血清、血浆或 尿液等生物学液体,或诸如福尔马林-固定或冷冻的组织切 片等生物学样品。术语“样品”还指新鲜取自人或动物的细胞、组织、器官或液体,或指经加工 或保存的细胞、组织、器官或液体。可在体内测试样品,例如无需从人或动物 中取出,或者可在体外测试。可在加工后,例如通过组织学方法测试样品。

[0482] 可采用本领域已知的各种诊断试验技术,例如竞争性结合试验、直接或间 接夹心试验和在异质或均质相中进行的免疫沉淀试验(Zola, Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques(单克隆抗体:技术手册),CRC出版公司 (CRC Press, Inc) . (1987) 第147-158页)。可用可检测部分标记诊断试验所用 抗体。可检测部分直接或间接产生可检测信号。例如,可检测部分可以是 本文所述的任何部分,例如放射性同位素,如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S 或¹²⁵I, 荧光或化学发光化合物,如异硫氰酸荧光素(FITC),德克萨斯红、花青苷、photocyan、罗丹明或萤光素,或酶,如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或辣根 过氧化物酶。可采用本领域已知的将抗体偶联于可检测部分的任何方法, 包括以下文献所述那些:Hunter 等,Nature,144: 945 (1962) ;David等, Biochemistry,13:1014 (1974) ;Pain等, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981) ; Nygren,J.Histochem. 和Cytochem., 30:407 (1982) 。

[0483] 本文提供诊断LOX或LOXL2相关疾病的方法,包括评估对象样品中的 LOX和/或 LOXL2水平,其中与参比样品相比,对象样品中LOX和/或LOXL2 的水平改变表明肿瘤或转移的存在或增加。一方面,LOX或LOXL2相关疾病 是肿瘤、转移、血管生成或纤维化。与参比样品相比,样品中LOX和/或LOXL2 水平增加表明有肿瘤或转移存在或者肿瘤或转移性生长增加。所述参比样品可 以是在较早时间取自对象的样品或另一个体的样品。可将样品与本文 所述抗体 或其抗原结合片段接触来检测样品中LOX和/或LOXL2的水平。在一个实施 方式中,抗体或其抗原结合片段作可检测标记。

[0484] 在一个实施方式中,提供的方法诊断对象的癌症转移,包括:评估对象中 活性LOX 或LOXL2水平或活性,与参比样品相比,血液中活性LOX或LOXL2 水平或活性(例如,基因表达、酶活性等)改变表明有转移性肿瘤生长存在。在 一些情况下,血液中活性LOX或LOXL2水

平或活性可以低于较早检测的,表明该对象的癌症转移风险较高;癌症已转移;或者癌症转移增加。参比样品可源自同一对象,在不同时间取自同一肿瘤或者取自身体的其它部位,或取自另一个体。

[0485] 在另一实施方式中,提供的方法诊断具有肿瘤的对象中的癌症转移,包括:评估肿瘤中活性LOX或LOXL2水平或活性,与参比样品相比,该肿瘤中活性LOX或LOXL2水平或活性改变表明有转移性肿瘤生长存在。在一些情况中,肿瘤中活性LOX或LOXL2水平或活性可以高于较早检测的,表明该对象的癌症转移风险较高;癌症已转移;或者癌症转移增加。参比样品可源自同一对象,在不同时间取自同一肿瘤或者取自身体的其它部位,或取自另一个体。

[0486] 本文还提供的方法对对象中的肿瘤生长或转移分期,包括:评估对象的肿瘤中LOX或LOXL2(例如,hLOX或hLOXL2)水平,与参比样品相比,该肿瘤中LOX和/或LOXL2水平(例如,基因表达、酶活性)改变表明有转移性肿瘤生长存在。在一些情况中,肿瘤中LOX和/或LOXL2水平或活性可以高于同一对象较早检测的,或高于取自正常组织的参比样品中的,表明该患者的肿瘤转移风险较高;肿瘤已转移;或者肿瘤转移增加。

[0487] 对实体瘤进行分期是熟知的。TNM体系是最常用的分期体系之一。国际癌症联合会(International Union Against Cancer)(UICC)和美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer)(AJCC)接受该体系。大多数医疗机构利用TNM体系作为癌症报道的主要方法。PDQ®是NCI的综合癌症数据库,其也利用TNM体系。在本文称为“分期”的TNM体系是基于肿瘤程度、淋巴结的扩散程度和转移的存在。

[0488] 本文还提供监测对象对治疗的反应的方法,包括LOX/LOXL2的调节剂,例如癌症、肿瘤和纤维变性疾病的治疗。该方法包括:给予对象LOX或LOXL2调节剂后检测该对象中C-反应活性蛋白质的水平改变,其中有改变表明该LOX或LOXL2调节剂对该患者有效。C-反应活性蛋白是全身性炎症的重要药效学标记。据信,与给予LOX或LOXL2抑制剂之前相比,C-反应活性蛋白(例如,在对象的血液样品中)的水平降低表明该对象对利用LOX或LOXL2抑制剂进行治疗有反应。

[0489] 检测活性LOX或LOXL2水平可采取免疫测定的形式,该测定用针对该蛋白质的抗体,优选特异性结合活性LOX或LOXL2的抗体来检测活性LOX或LOXL2蛋白是否存在。还可利用抗-LOX/LOXL抗体的抗原结合片段。

[0490] 免疫测定还可与激光诱导的荧光联用(参见,例如各自通过引用纳入本文的Schmalzing和Nashabeh, *Electrophoresis* 18:2184-93(1997);和Bao, J. *Chromatogr.B.Biomed.Sci.* 699:463-80(1997))。还可按照本发明的方法,利用脂质体免疫测定,例如流动-注射脂质体免疫测定和脂质体免疫传感器来测定活性LOX或LOXL2水平(Rongen等, *J.Immunol.Methods* 204:105-133(1997))。免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)特别适用于本发明方法。还可采用放射性免疫测定来检测样品是否对活性LOX或LOXL2呈阳性或检测活性LOX或LOXL2的水平。可采用的放射性免疫测定利用,例如碘-125标记的第二抗体。

[0491] 此外,可检测活性LOX或LOXL2的活性,因而可忽略无活性酶的含量。可利用含标记赖氨酸的可溶性弹性蛋白或可溶性胶原作为底物,采用多种方法检测活性LOX或LOXL2的酶活性。活性试验的细节见Royce等,“Copper metabolism in mottled mouse

mutants. The effect of copper therapy on lysyl oxidase activity in brindled (Mobr) mice (杂色小鼠突变体的铜代谢. 铜治疗 对有斑纹(Mobr) 小鼠中赖氨酰氧化酶活性的作用)" Biochem J. 1982年2月 15日; 202 (2) :369-371。示范性试验是生色试验, 例如 Palamakumbura等, "A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples (检测生物学样品中赖氨酰氧化酶活性的荧光试验)" Anal Biochem. 2002Jan 15; 300 (2) :245-51所述的。

[0492] 除了检测血液(或尿液)中的LOX或LOXL2水平, 还可以检测LOX或 LOXL2活性的二级产物。例如, 赖氨酰氧化酶对赖氨酸残基的酶促作用形成 脱氧吡啶诺琳(Dpd)。Dpd随着骨的破骨降解释放入循环。其不能再利用, 肾脏将其降解, 进而原封不动地分泌入尿液。因此, 可采用基于免疫诊断 系统(IDS) γ BCT Dpd试验的测试来检测酶活性, 所述测定采用以抗-Dpd 抗体包被的管式RIA。

[0493] 本文所述的抗-LOX抗体和抗-LOXL2抗体还可用于诊断胶原代谢异常相关的疾病或病症, 例如各种纤维变性病症, 如肺纤维化, 以及用于增殖性玻璃 体视网膜病变、外科手术瘢痕化、全身性硬化症、硬皮病、伤口收合、肥大性 疤痕、纤维瘤病(特别是迪皮特朗病) 和瘢痕瘤。

[0494] IX. 治疗方法

[0495] 可利用本发明的药物制剂治疗各种疾病和病症, 例如癌症、转移、纤维化 和异常的血管生成。

[0496] 本文提供了通过将样品或细胞组织与本文所述任何抗-LOXL2抗体或其 抗原结合片段接触来抑制LOXL2的方法。所述抗体或其抗原结合片段与 LOXL2结合抑制了LOXL2的酶活性。

[0497] 本文还提供了通过将样品或细胞组织与本文所述任何抗-LOX抗体或其抗 原结合片段接触来抑制LOX的方法。所述抗体或其抗原结合片段与LOX结合 抑制了LOX的酶活性。

[0498] 在任何所述方法中, 接触可以在体外、体内或离体发生。

[0499] 抑制LOX或LOXL2对对象有一种或多种作用, 例如降低肿瘤生长、降 低血管生成、减轻纤维变性疾病和/或减少胞外基质形成。纤维变性疾病包括但 不限于:肝纤维化、肺纤维化、肾纤维化、心脏纤维化和硬皮病。

[0500] 本文提供治疗LOX或LOXL2异常表达相关疾病和病症的方法。疾病和 病症包括但不限于:肿瘤(例如, 原发性或转移性)、血管生成相关病症和纤维 变性病症。

[0501] 本文所用的“预防”指预防、防止症状的发作、防止纤维化相关或 LOX/LOXL2活性相关疾病或病症的进展。本文所用的“治疗”或“治疗方法” 表示停止或延缓本文所述疾病或病症的相关症状的发展。这些术语还包括缓解 现有的不受控或不良症状、防止其它症状和缓解或防止症状的潜在代谢诱因。因此, 这些术语表示具有疾病或症状, 或有可能产生这些疾病或症状的哺乳动 物对象得到的有益结果。当患者经历疾病迹象或症状的部分或完全缓和或减 轻, 特别是包括但不限于存活延长时, 可称有反应。根据预后因素, 包括复发次数、疾病阶段和其它因素检测的预计无进展存活是数月到数年。延长的存活 包括但不限于至少1个月(mo)、约至少2个月(mos.)、约至少3个月、约 至少4个月、约至少6个月、约至少1年、约至少2年、约至少3年、或 更长的时间。患者的症状可保持停滞或能减轻。

[0502] 给予治疗有效量的本发明药物组合物, 该用量对于以适用于任何医学治疗 的合

理效益/风险比产生某些所需疗效是有效的。对于将本发明药物组合物给予人患者,可通过本领域普通技术人员已知的方法将本发明药物组合物配制成基本上不含热原,从而这些组合物不会诱导炎性反应。

[0503] 本文所用的术语“治疗有效量”或“有效量”指单独给予或与另一治疗剂组合给予细胞、组织或对象时能有效防止或缓解疾病病症或该疾病进展的治疗剂量。治疗有效剂量还指足以缓解症状,例如治疗、治愈、防止或缓解相关医学病症,或治疗、治愈、防止或缓解这些病症的速度增加的化合物用量。当将活性成分单独给予个体时,治疗有效剂量单指该成分。当应用某一组合时,治疗有效剂量指产生治疗作用的活性成分的组合用量,而无论是组合、连续或同时给予。例如,当采用体内给予抗-LOX/抗-LOXL2抗体时,常规剂量可以是约10纳克到最多100毫克/千克哺乳动物体重/天或更多,优选约1微克/千克/天到50毫克/千克/天,任选约100微克/千克/天到20毫克/千克/天、500微克/千克/天到10毫克/千克/天、或1毫克/千克/天到10毫克/千克/天不等,取决于给药途径。

[0504] 当患者经历疾病迹象或症状的部分或完全缓和或减轻,特别是包括但不限于存活延长时,可称实现本发明的有效反应。根据预后因素,包括复发次数、疾病阶段和其它因素检测的预计无进展存活时间是数月到数年。延长的存活包括但不限于至少1个月(mo)、约至少2个月(mos.)、约至少3个月、约至少4个月、约至少6个月、约至少1年、约至少2年、约至少3年、或更长的时间。检测的总体存活也是数月到数年。患者的症状可保持停滞,肿瘤负载不增加。

[0505] 具有本领域常规技术的医师或兽医不难测定所需药物组合物的有效量(ED50)并开处方。例如,医师或兽医可将药物组合物中所用的本发明化合物的初始剂量水平定为低于获得所需疗效必需的水平,然后逐步增加该剂量直至获得所需作用。

[0506] 本文所用的术语“对象”表示哺乳动物对象。示范性对象包括但不限于:人、猴、狗、猫、小鼠、大鼠、牛、马、山羊和绵羊。在一些实施方式中,所述对象具有癌症并可用下述本发明试剂治疗。

[0507] 无论所选的给药途径,可将以适当水合形式使用的本发明化合物和/或本发明药物组合物配制成药学上可接受的剂型,如下文所述的,或通过本领域技术人员已知的其它常规方法配制。

[0508] 对于具体患者、组合物和给药方式,可改变本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平,从而获得实现所需治疗反应,而对该患者没有毒性的有效活性成分用量。

[0509] 选择的剂量水平取决于各种因素,包括所用的本发明具体化合物的活性、给药途径、给药时间、所用具体化合物的排出率、治疗的持续时间、与所用具体组合物联用的其它药物、化合物和/或物质、所治疗患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和以前的医疗史以及医学领域熟知的类似因素。

[0510] 在本文提供的一方面,给予抗体导致对象的情况改善。在另一方面,给予抗体防止对象的情况恶化和/或延长患者的存活时间。

[0511] 患者可以是哺乳动物。例如人或非人。这种患者可以有症状或无症状的。

[0512] 可通过本文所述的任何合适途径局部、区域化或全身性给予组合物。

[0513] 一方面,患者的症状得到缓解。缓解可以体现为,例如疼痛减轻、肿瘤大小降低、肿瘤消除、防止肿瘤大小增加或疾病进展、防止形成转移或抑制转移瘤生长、抑制纤维化、

抑制血管生成或它们的组合。

[0514] 对于癌症治疗,如果需要,这些方法还可包括外科手术去除癌症和/或给予抗癌剂或治疗。给予这种抗癌剂或治疗的同时可给予本文所述的组合物。本文它处描述了抗癌剂。

[0515] 一方面,给予本文提供的任何抗体减少或消除了患者进行外科手术或用一种或多种抗癌剂或治疗方法进行治疗的需要。

[0516] 可利用本发明药物制剂治疗的适应症包括不良或不受控的细胞增殖。这种适应症包括良性肿瘤、各种类型的癌症,例如原发性肿瘤和肿瘤转移、再狭窄(例如,冠状动脉、颈动脉和大脑病损)、血液学疾病、内皮细胞的异常刺激(动脉粥样硬化)、外科手术对身体组织的伤害、伤口愈合异常、血管生成异常、初始组织纤维化的疾病、黄斑变性、青光眼、年龄相关的黄斑变性(湿性AMD和干性AMD)、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、多发性硬化症、肝纤维化、肾纤维化、肺纤维化、硬皮病、动脉粥样硬化和阿尔茨海默病、重复性运动障碍(repetitive motion disorder)、未高度血管化的组织的疾病和器官移植植物相关的增殖反应。

[0517] 肝纤维化包括但不限于肝硬变和相关的病症,例如慢性病毒性肝炎、非酒精性脂肪肝(NAFLD)、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、原发性胆汁性肝硬变(PBC)、胆汁性肝硬变和自身免疫性肝炎。

[0518] 肺纤维化包括但不限于:特发性肺纤维化(IPF)或隐原性纤维化肺泡炎、慢性纤维组织形成性间质性肺炎(chronic fibrosing interstitial pneumonia)、间质性肺病(ILD)、弥漫性实质性肺病(diffuse parenchymal lung disease)(DPLD)、肺气肿和慢性阻塞性肺病(COPD)和慢性哮喘。

[0519] 心脏纤维化包括但不限于:充血性心力衰竭、心肌病和心肌梗塞后的心脏功能缺陷。

[0520] 肾纤维化包括但不限于:糖尿病性肾病、膀胱输尿管反流、小管间质性肾纤维化、肾小球肾炎,包括局灶性节段性肾小球硬化和膜性肾小球肾炎、及肾小球膜毛细血管的肾小球肾炎。

[0521] 良性肿瘤中的细胞通常保留它们的分化特征,不以完全不受控的方式分裂。良性肿瘤通常是固定且非转移性的。可采用本发明治疗的良性肿瘤的具体类型包括血管瘤、肝细胞腺瘤、多孔性血管瘤、灶性结节性增生、听觉神经瘤(acoustic neuromas)、神经纤维瘤、胆管腺瘤、胆管囊腺瘤(bile duct cystadenoma)、纤维瘤、脂肪瘤、平滑肌瘤、间皮瘤、畸胎瘤、粘液瘤、结节再生性增生、沙眼、化脓性肉芽肿、痣、子宫平滑肌瘤、甲状腺腺瘤、肾上腺皮质腺瘤和脑垂体腺瘤。

[0522] 在恶性肿瘤中,细胞变得不分化、对身体的生长控制信号没有反应并以不受控方式扩增。恶性肿瘤是侵袭性的,能传播到远端部位(转移性)。恶性肿瘤通常分成两类:原发性和继发性。原发性肿瘤从发现它们的组织中直接产生。继发性肿瘤或转移瘤是源自身体的其它位置但现在传播到远端器官的肿瘤。转移的常见途径是在毗邻结构中直接生长,通过血管或淋巴系统传播和沿着组织面和身体间隙(腹水、脑脊液等)运动。

[0523] 可采用本发明治疗的原发性或继发性癌症或恶性肿瘤的具体类型包括但不限于:肺癌(包括肺腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌、细支气管肺泡癌、非小细胞癌、小细胞癌、间

皮瘤)；乳腺癌(包括导管癌、小叶癌、炎性乳腺癌、透明细胞癌、粘液癌)；结肠直肠癌(结肠癌、直肠癌)；肛门癌；胰腺癌(包括胰腺腺癌、胰岛细胞癌、神经内分泌肿瘤)；前列腺癌；卵巢癌(卵巢上皮癌或表面上皮-间质肿瘤，包括浆液性肿瘤、内膜样瘤和粘液性囊腺癌、性索间质细胞瘤)；肝脏和胆管癌(包括肝细胞癌、胆管癌、血管瘤)；食道癌(包括食道腺癌和鳞状细胞癌)；非-霍奇金淋巴瘤；膀胱癌；子宫癌(包括子宫内膜腺癌、子宫乳头状浆液性腺癌、子宫透明细胞癌、子宫肉瘤和平滑肌肉瘤、混合型苗勒肿瘤)；神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、髓质母细胞瘤、和其它脑肿瘤；肾脏癌症(包括肾细胞癌、透明细胞癌、肾母细胞瘤)；头颈癌(包括鳞状细胞癌)；胃癌(胃腺癌、胃肠道间质瘤)；多发性骨髓瘤；睾丸癌；生殖细胞瘤；神经内分泌肿瘤；子宫颈癌；胃肠道、乳腺和其他器官的类癌；印戒细胞癌；间充质肿瘤，包括肉瘤、纤维肉瘤、血管瘤、血管瘤病、血管外皮细胞瘤、假血管瘤性间质性增生、成肌纤维细胞瘤、纤维瘤病、炎性成肌纤维细胞瘤、脂肪瘤、血管脂肪瘤、颗粒细胞瘤、神经纤维瘤、神经鞘瘤、血管肉瘤、脂肉瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌瘤或平滑肌肉瘤。

[0524] 术语“转移”表示肿瘤细胞侵入宿主组织并转移至远端(常是特定器官部位)的能力。已知这是致死性肿瘤生长的显著特征。转移是通过肿瘤细胞与正常宿主组织和细胞之间一系列复杂的独特相互作用而形成的。就本发明而言，赖氨酰氧化酶活性对于肿瘤的转移性生长至关重要，即，转移瘤的生长(特别是在低氧条件下)。由于低氧肿瘤也是最具侵袭性并耐受传统化疗，调节赖氨酰氧化酶表达和/或功能的试剂能提供抵御转移瘤，特别是耐受化疗的肿瘤的新型疗剂。“转移”与侵袭性不同。如万维网网址 cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer中的“Understanding Cancer Series: Cancer(理解癌症丛书：癌症)”所述，侵袭性指癌细胞直接迁移并渗透入毗邻组织。

[0525] 血液学病症包括可导致血细胞发育异常改变的血细胞异常生长和血液学恶性肿瘤，例如各种白血病。血液学病症的例子包括但不限于：急性髓细胞性白血病、急性前髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征和镰状细胞性贫血。

[0526] 急性髓细胞性白血病(AML)是在成年人中最常发生的极性白血病类型。几种遗传病和免疫缺陷状态与AML风险增加有关。这些病症包括DNA稳定性有缺陷的、导致随机染色体断裂的病症，例如布卢姆综合征、范康尼贫血、L-F宗族(Li-Fraumeni kindreds)、运动失调性毛细血管扩张症和X连锁无丙种球蛋白血症。

[0527] 急性前髓细胞性白血病(APML)代表了AML的不同亚组。该亚型的特征在于含有15;17染色体易位的前髓细胞性胚细胞。该易位导致产生由视黄酸受体和序列PML组成的融合转录物。

[0528] 急性成淋巴细胞性白血病(ALL)是由各种亚型体现出不同临床特征的异源疾病。ALL显示重现性细胞遗传异常(reoccurring cytogenetic abnormality)。最常见的细胞遗传异常是9;22易位。得到的费城染色体(Philadelphia chromosome)表示患者的预后不佳。

[0529] 慢性髓细胞性白血病(CML)是多能干细胞的无性骨髓增生病。CML的特征在于特定染色体异常，其涉及染色体9和22易位，从而产生费城染色体。电离辐射与CML的产生有关。

[0530] 骨髓增生异常综合征(MDS)是因为在包括骨髓、红细胞和巨核细胞谱系在内的一

个或多个造血谱系中存在发育异常改变而分成一组的异源无性 造血干细胞病。这些改变在这三种谱系的一种或多种中导致细胞减少。患有MDS的患者通常产生贫血、嗜中性白细胞减少症(感染)或血小板减少症(出血)相关的并发症。通常约10%-约70%的MDS患者产生急性白血病。

[0531] 已发现给予LOX或LOX2抑制剂能降低已有肿瘤的大小、防止转移并 降低(甚至消除)已有转移瘤的大小(参见,例如Molnar等, (2003) *Biochim Biophys Acta.* 1647:220-224)。

[0532] 本文提供通过给予本文所述任何抗-LOX或抗-LOXL2抗体或其抗原结合片段来降低对象中肿瘤生长的方法。在一个实施方式中,肿瘤是原发性 肿瘤。在另一实施方式中,肿瘤是转移瘤。通过给予本文所述抗体可稳定 对象的转移瘤负载。与治疗前对象中的肿瘤相比,该对象的肿瘤可减小至 少10%、25%、50%、70%、90%、95%或更多。

[0533] 当抗体或其抗原结合片段特异性结合LOXL2时,肿瘤的例子包括但不限于:结肠肿瘤、食道肿瘤、乳腺肿瘤、前列腺肿瘤、鳞状细胞癌或梭形 细胞癌。

[0534] 当抗体或其抗原结合片段特异性结合LOX时,肿瘤的例子包括但不限于:乳腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、子宫肿瘤、肝肿瘤或头颈肿瘤。

[0535] 本文提供在体内防止或降低对象的肿瘤生长、转移瘤生长的方法,包括给予有此需要的对象有效量的LOX或LOXL2活性的抑制剂;和任选的 药学上可接受的运载体或赋形剂,从而防止或降低所治疗对象的肿瘤生长,例如降低至少25%、50%、75%、90%或95%。本发明方法所用合适组合物 的详述见上文。这些方法可用于,例如低氧肿瘤。采用本领域的常规方法 不难鉴定低氧肿瘤。参见,例如美国专利号5,674,693。

[0536] 本文还提供在体内治疗患癌症对象的转移的方法,包括给予有此需要 的对象有效量的LOX或LOXL2抑制剂,从而抑制所治疗对象的肿瘤转移,例如抑制至少25%、50%、75%、90%或95%。在一个实施方式中,抑制剂 特异性抑制人LOX或人LOXL2。上文描述了用于这些方法中的抗体。所 述抗体优选能尽量减少与LOX或LOXL2家族其它成员的交叉反应,因此 降低了并发症和正常组织毒性导致不利副作用的可能性。

[0537] 本文还提供了增加或提高具有转移瘤对象的存活几率的方法,包括给 予有此需要的对象有效量的抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体,从而增加或提 高所治疗对象存活一段时期几率,所述时期是,例如至少10天、1个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、3年、4年、5年、8年、10年或更长 时间。可将对象存活的增加定义为,例如癌症转移的临床前动物模型 (例如, 具有转移性癌症的小鼠)的存活比未用本发明方法治疗的对照动物模型(具 有相同类型的转移性癌症)增加一段时期,例如至少10天、1个月、3个月、6个月、或1年,或至少2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或10倍。或者,还 可将哺乳动物存活的增加定义为,例如具有癌症转移的患者的存活比未用 本发明方法治疗的具有相同类型转移性癌症的患者增加一段时期,例如至 少10天、1个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、3年、4年、5年、8年、10年或更长时间。对照患者可以是安慰剂或用不包括本发明方法作 为治疗的一部分的支持性标准护理,例如化疗、生物学疗法和/或放疗治疗 的患者。

[0538] 本文还提供稳定对象的转移瘤负载的方法,包括给予有此需要的对象 有效量的抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体,从而稳定对象的转移瘤负载一段 时期,例如至少10天、1个 月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、3年、4年、5年、8年、10年或更长时间。可将稳定对象的转

转移瘤负载定义为具有转移瘤负载的临床前动物模型(例如,具有转移瘤的小鼠)的转移瘤负载比未用本发明方法治疗的对照动物模型(具有相同类型的转移瘤)多稳定一段时期,例如至少10天、1个月、3个月、6个月、或1年。

[0539] 本发明治疗方法还包括增加化疗剂效力的方法,包括给予有此需要的对象有效量的抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体;和任选的药学上可接受的运载体或赋形剂,从而增加化疗剂(上文详述的)的效力。还考虑的方法包括与放疗组合递送LOX抑制性制剂。化疗可以用于治疗几乎各种类型的实体瘤,包括脑、乳腺、子宫颈、喉、肺、胰腺、前列腺、皮肤、脊椎、胃、子宫的癌症或软组织肉瘤。放疗还可用于治疗白血病和淋巴瘤(分别是成血细胞和淋巴系统的癌症)。各部位的射线剂量取决于许多因素,包括癌症类型和附近是否存在可被射线破坏的组织和器官。递送的射线通常是X-射线,其剂量依赖于所治疗的组织。放射性药物也称为放射性核苷酸,也可用于治疗癌症,包括甲状腺癌、在胸壁中复发的癌症和癌症传播至骨(骨转移)导致的疼痛。下文更详细地描述了放射性核素。

[0540] 要用本发明方法治疗或诊断的对象包括具有或处于转移瘤生长的风险中的对象。一方面,这种肿瘤可以是,例如肺癌(包括肺腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌、细支气管肺泡癌、非小细胞癌、小细胞癌、间皮瘤);乳腺癌(包括导管癌、小叶癌、炎性乳腺癌、透明细胞癌、粘液癌);结肠直肠癌(结肠癌、直肠癌);肛门癌;胰腺癌(包括胰腺腺癌、胰岛细胞癌、神经内分泌肿瘤);前列腺癌;卵巢癌(卵巢上皮癌或表面上皮-间质肿瘤,包括浆液性肿瘤、内膜样癌和粘液性囊腺癌、性索间质细胞癌);肝脏和胆管癌(包括肝细胞癌、胆管癌、血管瘤);食道癌(包括食道腺癌和鳞状细胞癌);非-Hodgkin淋巴瘤;膀胱癌;子宫癌(包括子宫内膜腺癌、子宫乳头状浆液性腺癌、子宫透明细胞癌、子宫肉瘤和平滑肌肉瘤、混合型苗勒肿瘤);神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、髓质母细胞瘤、和其它脑肿瘤;肾脏癌症(包括肾细胞癌、透明细胞癌、肾母细胞癌);头颈癌(包括鳞状细胞癌);胃癌(胃腺癌、胃肠道间质瘤);多发性骨髓瘤;睾丸癌;生殖细胞瘤;神经内分泌肿瘤;子宫颈癌;胃肠道、乳腺和其他器官的类癌;印戒细胞癌;间充质肿瘤,包括肉瘤、纤维肉瘤、血管瘤、血管瘤病、血管外皮细胞瘤、假血管瘤性间质性增生、成肌纤维细胞瘤、纤维瘤病、炎性成肌纤维细胞瘤、脂肪瘤、血管脂肪瘤、颗粒细胞瘤、神经纤维瘤、神经鞘瘤、血管肉瘤、脂肉瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌瘤或平滑肌肉瘤。在一个非限制性实施方式中,肿瘤是乳腺肿瘤、前列腺肿瘤、肺肿瘤、子宫颈肿瘤、结肠肿瘤或头颈肿瘤。

[0541] 本发明还提供防止或降低对象中肿瘤转移风险的方法,包括给予有此需要的对象有效量的抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体;和任选的药学上可接受的运载体或赋形剂,从而防止或降低肿瘤转移的风险。抑制剂可以是抗体或其抗原结合片段。需要这种预防的对象可以是因各种原因,例如癌症的家族史和致癌环境而在遗传学上倾向于癌症或具有患癌症高风险的个体。

[0542] 涉及癌症发作或产生的人基因的例子包括但不限于:VHL(涉及肾细胞癌的Von Hippel-Landau基因);P16/INK4A(涉及淋巴瘤);E-钙粘蛋白(涉及乳腺癌、甲状腺癌、胃癌的转移);hMLH1(涉及结肠癌、胃癌和子宫内膜癌中的DNA修复);BRCA1(涉及乳腺癌和卵巢癌中的DNA修复);LKB1(涉及结肠癌和乳腺癌);P15/INK4B(涉及白血病,例如AML和ALL);ER(雌激素受体,涉及乳腺癌、结肠癌和白血病);O6-MGMT(涉及脑癌、结肠癌、肺癌和淋巴瘤的DNA修复);GST-π(涉及乳腺癌、前列腺癌和肾癌);TIMP-3(组织金属蛋白酶,涉及结肠

癌肾癌和脑癌转移) ;DAPK1 (DAP激 酶,涉及B细胞性淋巴瘤细胞的凋亡) ;P73 (涉及淋巴瘤细胞的凋亡) ;AR (雄激素受体,涉及前列腺癌) ;RAR- β (视黄酸受体- β ,涉及前列腺癌) ;内皮素-B受体(涉及前列腺癌) ;Rb (涉及视网膜母细胞瘤的细胞周期调节) ; p53 (重要的肿瘤抑制基因) ;P14ARF (涉及细胞周期调节) ;RASSF1 (涉及 信号转导) ;APC (涉及信号转导) ;胱冬酶-8 (涉及凋亡) ;TERT (涉及衰老) ; TERC (涉及衰老) ;TMS-1 (涉及凋亡) ;SOCS-1 (涉及肝癌的生长因子反应) ; PITX2 (肝癌、乳腺癌) ;MINT1;MINT2;GPR37;SDC4;MYOD1;MDR1;THBS1;PTC1;和pMDR1,如通过引用全文纳入本文的Santini等, (2001) Ann. of Intern. Med. 134:573-586所述。这些基因的核苷酸序列可从国家生物技术信息中心(NCBI) 的网址检索。

[0543] 应该注意,虽然白血病是血液癌症,但它可能影响其它器官或者有效 转移。在急性白血病中,可收集身体的中枢神经系统、睾丸、皮肤和任何 其它器官中的异常细胞。因为白血病早已涉及身体的所有骨髓,并且在许多情况下传播至其它器官,例如肝脏、脾脏和淋巴结中,白血病的分期取 决于反映患者的存活前景的其它信息。白血病包括,例如急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性髓细胞性白血病(CML) 和毛细胞性白血病(HCL)。对不同类型的慢性白血病采用不同的分期体系。一些类型不具有任何分期体系。下 文详述了分期方法。

[0544] 对于各种外科手术过程,包括关节外科手术、肠外科手术和瘢痕瘤瘢 痕形成,治疗外科手术期间的身体组织伤害导致异常细胞增殖是可能的。产生纤维变性组织的疾病包括肺气肿。可采用本发明治疗的重复性运动障 碍包括腕管综合征。可采用本发明治疗的细胞增殖性病症的例子是骨肿瘤。本文提供防止或降低对象中因外科手术期间身体组织伤害或产生纤维变性 组织的疾病所致的异常细胞增殖风险的方法,包括给予有此需要的对象有 效量的抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体;和任选的药学上可接受的运载体或 赋形剂,从而防止或降低外科手术期间身体组织伤害导致的异常细胞增殖。抑制剂可以是抗体或其抗原结合片段。需要这种预防的对象可以是因各种 原因,例如癌症的家族史和致癌环境而在遗传学上倾向于癌症或具有患癌 症高风险的个体。在一个实施方式中,所述疾病可以是,例如关节外科手 术、肠外科手术和瘢痕瘤瘢痕形成、产生纤维变性组织的疾病、骨肿瘤的 重复性运动障碍。

[0545] 可采用本发明治疗的器官移植相关增殖性反应包括导致潜在的器官排 斥或相关并发症的增殖性反应。具体地说,这些增殖性反应可在心脏、肺、肝脏、肾脏和其它身体器官或器官系统的移植期间发生。本文提供治疗器 官移植相关的异常增殖性反应的方法,包括给予有此需要的对象有效量的 抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体;和任选的药学上可接受的运载体或赋形剂,从而防止或降低器官移植导致的异常细胞增殖。移植可包括,例如心脏、肺、肝脏、肾脏和其它身体器官或器官系统的移植。

[0546] 本发明组合物的适应症还包括纤维化。可作为受伤组织中伤口愈合过 程一部分而发生的纤维组织异常累积导致纤维化。物理损伤、炎症、感染、接触毒素和其它原因可导致这种组织伤害。纤维化的例子包括肝纤维化、肺纤维化、肾纤维化、心脏纤维化和硬皮病。所述发明的化合物和试剂也 考虑可用于治疗、预防和/或缓解纤维化病症。

[0547] 高血压、高血压性心脏病、动脉粥样硬化和心肌梗塞导致纤维变性组 织累积在心脏和血管中。各种诱因可导致高血压,进而常产生高血压性心脏 病(HHD) 以及发展成心脏

停止和心肌梗塞。类似地,动脉粥样硬化和其它缺血性心脏病常导致心脏停止。这些心血管疾病均显示出胞外基质累积或纤维变性沉积,从而导致血管系统僵硬以及心脏组织本身僵硬。纤维变性物质的这种沉积是对高血压和/或硬化状态所诱导损伤的反应,但该反应的作用还导致血管和心脏僵硬以及心室增大等不利作用。此外,据信在心血管疾病中观察到的心脏纤维变性增加会破坏或改变心肌细胞通过心脏的组织支架递送的信号,从而进一步破坏有效的心脏功能并促进心脏停止和心肌梗塞。由于胞外基质沉积增加在心脏纤维化中确有作用,因此本发明化合物可通过抑制LOX/LOXL2而用于心脏纤维化的预防、治疗和/或缓解。

[0548] 本发明还提供用于治疗或预防与心血管疾病,例如高血压性心脏病(HHD)、心肌梗塞(MI)、动脉粥样硬化、再狭窄(例如,冠状动脉、颈动脉和脑损伤)和心脏缺血事件相关心脏病有关的心脏纤维化的组合物、方法、系统、医学装置或试剂盒。

[0549] MI后的治愈反应可诱导LOX/LOXL2表达,但如果该过程继续下去,未经检查的过度交联导致胞外基质重塑或纤维化,从而造成心脏机能失调。破坏基质和交联的胶原或弹性蛋白的酶看来起作用较慢或效率不高,因此交联事件占上风。除了基质重塑外,由于LOX/LOXL2在上皮-间充质过渡(EMT)中起作用,其进一步造成心肌细胞重塑和心肌细胞肥大。

[0550] MI诱导的初始修复性纤维化是有益的(例如,防止动脉瘤和相关的损伤),可不受阻碍地进行。然而,虽然不想受特定理论或作用机制的束缚,但本发明人相信在这种修复性纤维化阶段后开始抗-LOX/LOXL2治疗能减弱导致心脏机能失调的反应性(不当的)纤维化。例如,可在MI后2、4、6、8、10、12、14、16、16、20、22、24、36或48小时(包括其间的所有整数)开始抗-LOX/LOXL2治疗。此外,可在MI后2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、或14天开始抗-LOX/LOXL2治疗。类似地,血压升高(高血压)导致心脏组织中胶原沉积增加和蛋白质降解减少(Berk等,J.Clin.Invest.,117(3):568-575(2007))。高血压性心脏病或高血压诊断和/或确定后开始抗-LOX/LOXL2治疗能预防、降低或缓解高血压相关的纤维化。可在诊断或检测到血压或全身血压升高后的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、或14天开始这种抗-LOX/LOXL2治疗。

[0551] 另一例子是,可利用生物标记测定不适当水平的交联合适可能发生:例如,LOX水平已显示与C反应性蛋白(CRP)——一种常用的生物标记——有关,当CRP水平高于合适的正常水平时可开始治疗。现有方法和测试试剂盒能更直接地检测尿液或血液中交联胶原端肽的释放。这些胶原片段的水平升高可表明从修复性纤维化向反应性(不当的)纤维化过渡。此外,可检测心脏功能和输出量,包括与心室有效收缩相关的那些。

[0552] 可在病理性心脏病症或疾病,例如高血压、高血压性心脏病(HHD)、心肌梗塞(MI)、动脉粥样硬化和再狭窄之前、同时或之后对对象传递LOX/LOXL2的抑制剂以防止与这些病理性心脏病症或疾病相关的病理性纤维化的发作、降低其风险或治疗该病理性纤维化。例如,可在这种病理性心脏病症或疾病发作后的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、或14天给予LOX/LOXL2的抑制剂。

[0553] 此外,预见治疗持续时间有限。治疗只要持续足够长,从而能防止或减弱反应性纤维化以防止或减轻心脏机能失调即可。例如,当需要较短的治疗持续时间时,可利用短效FAB抗体片段。或者,可在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周(包括其间的所有天数)中,

利用有限剂量的血清半衰期较长 的全长抗体。可采用心脏功能的标准测试连同评估上述相关生物标记来监测进 展并视需要调节剂量。治疗持续时间有限提高了该方法的安全性。

[0554] 肝脏纤维化涉及许多肝脏疾病的病理学过程。如前所述,纤维化可作为血 色病、威尔逊病、酒精中毒、血吸虫病、病毒性肝炎、胆管阻塞、接触毒素和 代谢紊乱的并发症而发生。不作检查,肝纤维化会发展成肝硬化(定义为存在 包裹的结节)、肝衰竭和死亡。例如寄生虫和病毒感染(例如,HBV、HCV、HIV、 血吸虫)等来源或酒精消费的长期应激对肝脏的长期伤害不可避免地导致肝脏 重塑,可能包裹受损区域并保护其余肝脏组织免遭伤害(Li 和Friedman, Gastroenterol.Hepatol.14:618-633,1999)。肝脏纤维化导致胞外基质改变,包 括总胶原含量增加3-10倍和低密度基膜被高密度基质替换,从而损害了肝细 胞、肝脏星形细胞和内皮细胞的代谢和合成功能(Girogescu,M.,Non-invasive Biochemical Markers of Liver Fibrosis(肝脏纤维化的非侵袭性生物化学标 记), J.Gastrointestin.Liver Dis.,15 (2) :149-159 (2006))。因此,本发明的化合 物可通过抑制LOX/LOXL2而用于预防、治疗和/或缓解纤维变性肝脏疾病,本文考虑了这种应用。

[0555] 与肝脏纤维化相似,各种疾病和对肾脏的伤害可导致肾脏纤维化。这种疾 病和伤害的例子包括慢性肾脏疾病、代谢综合征、糖尿病和造成的肾小球肾炎。现已了解到代谢综合征是包括糖尿病标志,例如胰岛素耐受性以及中枢或内脏 肥胖和高血压在内的一组异常情况。其几乎所有的情况中,葡萄糖失调刺激细 胞因子释放和上调胞外基质沉积。导致慢性肾脏疾病、糖尿病、代谢综合征和 肾小球肾炎的其它因素包括高脂血症、高血压和蛋白尿,所有这些进一步伤害 肾脏并进一步刺激胞外基质沉积。因此,不管原发性原因是什么,对肾脏的伤 害导致肾脏纤维化和相伴的肾脏功能丧失(Schena,F.和Gesualdo,L., Pathogenic Mechanisms of Diabetic Nephropathy(糖尿病性肾病的病理学基 质), J.Am.Soc.Nephrol.,16:S30-33 (2005);Whaley-Connelly,A.,和Sower, J.R.,Chronic Kidney Disease and the Cardiometabolic Syndrome(慢性肾病和 心脏代谢综合征), J.Clin.Hypert.,8 (8) :546-48 (2006))。因此,本发明化合物 可用于预防、治疗和/或缓解 纤维变性肾病(慢性肾病、糖尿病性肾病、肾小球 肾炎、代谢综合征),本发明考虑了这种应用。

[0556] 肺纤维化包括许多综合征和疾病。示范性疾病包括特发性肺纤维化(IPF)、特发 性间质性肺炎和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。包括上述疾病在内的大 多数肺纤维化的病理学机制尚不十分清楚,然而,所有疾病均表征为炎性 细胞的内流和随后富含胶原的胞外 基质的合成和沉积增加(Chua等,Am J. Respir.Cell.Mol.Biol.,33:9-13 (2005); Tzortzaki等,J.Histochem.& Cytochem.,54 (6) :693-700 (2006);Armstrong等, Am.J.Respir.Crit.Care Med.,160:1910-1915 (1999))。由于胶原和胞外基质沉积增加在 肺纤维化中确 有作用,本发明化合物可通过抑制LOX/LOXL2而用于肺纤维化的预防、治疗 和/或缓解。

[0557] 硬皮病是其中异常胶原过量产生的自身免疫疾病。这种过量的胶原累积在 身体 中,从而导致硬化(硬化症)、瘢痕形成(纤维化)和其它伤害。所述伤害可 影响皮肤的外观, 或者可只涉及内部器官。硬皮病的症状和严重程度在人与人 之间不同。由于胶原增加在硬 皮病中确有作用,本发明化合物可通过抑制 LOX/LOXL2而用于硬皮病的预防、治疗和/或缓 解。

[0558] 可采用本发明方法治疗或预防的异常血管生成包括伴有以下疾病的那些 异常血管生成:类风湿性关节炎、缺血-再灌注相关的脑水肿和损伤、皮质缺 血、卵巢超常增生和过度血管形成(hypervascularity)、(多囊性卵巢综合征)、子宫内膜异位、银屑病、糖尿病性视网膜病、和其它眼部血管生成疾病, 例如早熟性视网膜病变(retinopathy of prematurity) (晶状体后纤维形成)、肌 变性、角膜移植排异、新生血管性青光眼(neurovascular glaucoma) 和OW综合 征(Oster Webber syndrome)。

[0559] 异常血管生成相关疾病需要或诱导血管生长。例如,角膜血管生成包括3 个阶段:前-血管潜伏期,活性新血管生成和血管成熟及消退。各种血管生成 因子,包括炎性反应的元素,例如白细胞、血小板、细胞因子和类花生酸类物 质,或未鉴定的血浆成分的本体和机制尚待揭示。

[0560] 本文所述的抗-LOX抗体和抗-LOXL2抗体看用于治疗不良或异常血管生 成相关疾病。该方法包括组合给予患不良或异常血管生成的患者LOX/LOXL 抑制剂和并非所述LOX/LOXL抑制剂的抗癌剂或抗血管生成剂。抑制(部分或 完全)血管生成和/或血管生成疾病所需的这些试剂的具体剂量可取决于病症的 严重性、给药途径和可由主治医师决定的相关因素。所接受和有效的每日剂量 通常是足以有效抑制血管生成和/或血管生成疾病的用量。

[0561] 按照该实施方式,本发明的药物制剂可用于治疗不良血管生成相关的各种 疾病,例如视网膜/脉络膜新血管生成和角膜新血管生成。视网膜/脉络膜新血 管生成的例子包括但不限于:贝斯特病(Bests diseases)、近视、视窝(胚胎)、斯塔格特病(Stargarts diseases)、佩吉特病、静脉阻塞、动脉阻塞、镰状细 胞性贫血、结节病、梅毒、弹性纤维假黄瘤、慢性非特异性呼吸阻塞性疾 病(carotid abostructive diseases)、慢性眼葡萄膜炎/玻璃体炎、分枝杆菌感染、莱姆(氏)病、全身性红斑狼疮、早熟性视网膜病变、伊尔斯病、糖尿病性视 网膜病、黄斑变性、贝切特病(Bechets diseases)、导致视网膜炎或脉络膜炎(chroiditis)的感染、假定的眼组织胞浆菌病、扁平部睫状体炎、慢性视网膜 剥离、高浓度综合征、弓形体病、外伤和激光后并发症(post-laser complication)、潮红(rubesis) 相关疾病(角(angle)的新血管生成)和纤维血管 或纤维组织的异常增殖导致的疾病,包括所有形式的增殖性玻璃体视网膜 病变。角膜新血管生成的例子包括但不限于:流行性角(膜)结 膜炎、维生素A 缺乏、接触镜过度佩带、特发性角膜炎、高级边缘角膜炎(superior limbic keratitis)、干燥型翼状胬肉角膜炎(pterygium keratitis sicca)、斯耶格伦综合 征(sjogrens)、红斑痤疮、小水疱病(phylectenulosis)、糖尿病性视网膜病、早熟性视网膜 病变、角膜移植排异、蚕食性角膜溃疡、特里昂边缘变性(Terrien's marginal degeneration)、边缘角质层分离(marginal keratolysis)、多 动脉炎、瓦格纳肉样瘤病(Wegener sarcoidosis)、巩膜炎、类天疱疮样放射 性角膜切开术(periphigoid radial keratotomy)、新生血管性青光眼和晶状体后 纤维组织增生症、梅毒、分枝杆菌感染、脂质 变性、化学品烧灼(chemical burns)、细菌性溃疡、真菌性溃疡、单纯疱疹病毒感染、带状疱 疹感染、原 生动物感染和卡波西肉瘤。

[0562] 在还有另一实施方式中,本发明药物制剂可用于治疗异常血管生成相关的 慢性炎性疾病。该方法包括组合给予患有异常血管生成相关慢性炎性疾病的患 者LOX/LOXL2抑 制剂与并非所述LOX/LOXL2抑制剂的抗癌剂或抗血管生成 剂。慢性炎症取决于连续形成毛

细管抽芽以维持炎性细胞的内流。内流和炎性 细胞的存在产生肉芽肿,因此,维持了慢性炎性状态。利用本发明化合物抑制 血管生成可防止肉芽肿形成,从而缓解疾病。慢性炎性疾病的例子包括但不限于:炎性肠病,例如克罗恩病和溃疡性结肠炎、银屑病和类风湿性关节炎。

[0563] 炎性肠病,例如克罗恩病和溃疡性结肠炎的特征在于胃肠道中各个部位的 慢性炎症和血管生成。例如,克罗恩病是主要影响远端回肠和结肠的慢性透壁 炎性疾病,但也可能发生在自口至肛门和肛周区域的胃肠道任何部分。克罗恩 病的患者通常具有异常疼痛、发热、厌食症、体重丧失和异常肿胀相关的慢性 腹泻。溃疡性结肠炎也是在结肠粘膜中发生的慢性、非特异性、炎性和溃疡性 疾病,其特征在于有血性腹泻存在。这些炎性肠病通常由遍布胃肠道的慢性肉 芽肿炎症导致,包括炎性细胞的圆柱体围绕着新的毛细管抽芽。利用本发明药 物制剂抑制血管生成应能抑制抽芽形成并防止肉芽肿形成。炎性肠病还有肠外 表现,例如皮肤病损。这种病损的特征在于炎症和血管生成,可发生在胃肠道 的许多其它部位。利用本发明药物制剂抑制血管生成应能降低炎性细胞的内流 并防止病损形成。因此,本文提供治疗炎性肠病的方法,包括给予有此需要的 对象有效量的抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体;和任选的药学上可接受的运载体或赋形剂。

[0564] 结节病是另一种慢性炎性疾病,其特征在于是多系统肉芽肿疾病。该疾病的肉芽肿可以在身体的任何部位形成,因此,症状依赖于肉芽肿的部位和该疾 病是否活跃。血管生成性毛细管抽芽产生肉芽肿,从而持续供应炎性细胞。利 用本发明药物制剂抑制血管生成,可抑制这种肉芽肿形成。银屑病也是慢性和 复发性炎性疾病,其特征在于各种大小的 丘疹和斑块。利用本发明药物制剂治 疗应能防止维持特征性病损所需的新血管形成并减轻患者的症状。因此,本文 提供防止维持特征性病损所需的新血管形成并减轻患者的症状 的方法,包括给 予有此需要的对象有效量的抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体;和任选的药学上 可接受的运载体或赋形剂。

[0565] 类风湿性关节炎 (RA) 也是慢性炎性疾病,其特征在于外周关节的非特异性 炎症。据信,关节的滑液衬里中的血管经历血管生成。除了形成新的血管网络, 内皮细胞还释放导致血管翳生长和软骨破坏的因子和活性氧中间体。参与血管 生成的因子可积极促进并帮助维持类风湿性关节炎的慢性发炎状态。单用本发 明药物制剂或与其它抗-RA药剂联用 来治疗可防止维持慢性炎症所需的新血 管形成并减轻RA患者的症状。其它抗-RA试剂是本领域惯用且已知的。因此, 本文提供预防或治疗RA的方法,包括给予有此需要的对象有效量的抗-LOX 抗体或抗-LOXL2抗体;和任选的一种或多种其它抗-RA药剂。

[0566] 除了单用抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体来治疗上述适应症,本文还考虑 了组合治疗。本文提供的方法还可包括给予患者抗癌剂或治疗方法。

[0567] 本文提供通过给予抗-LOX抗体和抗-LOXL2抗体来治疗上述任何适应症 的方法。

[0568] 在一方面,本发明的特征在于通过将肿瘤细胞与至少一种细胞毒性剂和至 少一种抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体接触来抑制所述细胞的侵袭性和转移的 方法。通常,该方法包括将转移瘤细胞与一定用量的至少一种细胞毒性剂和至 少一种抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体接触的步骤,该组合用量能有效降低或 抑制细胞的侵袭性或转移潜能。或者,按照本发明,抗-LOX抗体或抗-LOXL2 抗体可与化疗剂组合以使肿瘤细胞敏化(例如,从EMT状态过 渡到MET状态), 从而通过化疗剂杀伤肿瘤细胞,因此,不仅能防止或抑制肿瘤侵袭性和转

移性，还能抑制原发性肿瘤生长。

[0569] 本发明还可利用任何合适的抗癌剂。

[0570] 本文所用的术语“化疗剂”或“化疗的”(或用化疗剂进行治疗的情况下“化疗”)表示包括用于治疗癌症的任何非蛋白(即,非肽)化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂,例如塞替派和环磷酰胺(CYTOXANTM);磺酸烷酯,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,例如苄替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)、和乌瑞替派(uredopa);乙撑亚胺类和甲基三聚氰胺(methylamelamines),包括六甲蜜胺、三乙烯胺三嗪、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫化磷酰胺和三羟甲蜜胺(trimethylololomelamine);己酸配质类(特别是泡番荔枝辛(bullatacin)和泡番荔枝辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成的类似物托泊替康);苔藓抑素;卡力他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);缩酚酸肽类抗肿瘤药(cryptophycin)(特别是缩酚酸肽类1和缩酚酸肽类8);多拉司他汀;多卡霉素(duocarmycin)(包括合成类似物,KW-2189和CBI-TMI);艾榴塞洛素(eleutherobin);潘克他汀(pancratistatin);萨珂敌汀(sarcodictyin);海绵他汀(spongistatin);氮芥,例如瘤可宁、蔡氮芥、环磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀(foremustine)、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素,例如烯二炔抗生素(例如,刺孢霉素(calicheamicin),特别是刺孢霉素 γ II和刺孢霉素 ϕ II,参见,例如Agnew, Chem. Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994);葱环类,包括葱环A;二膦酸盐,例如氯膦酸盐;埃斯波霉素(esperamicin);以及新制癌菌素生色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素生色团)、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸、博莱霉素、放线菌素C、卡拉比星(carabicin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-二氮杂-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(doxorubicin)(亚得里亚霉素TM)(包括吗啉代-阿霉素、氨基吗啉代-阿霉素、2-吡咯啉代-阿霉素和脱氧阿霉素)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素,例如丝裂霉素C、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗-代谢物,例如甲氨喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如德莫蝶呤(demopterin)、甲氨喋呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素,例如卡普睾酮、丙酸甲雄烷酮、表硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗-肾上腺素,例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸;乙酰葡萄糖酸内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吖啶;贝拉布昔(bestrabucil);比生群;依达曲沙;德福法明(defofamine);地美可辛;地吖醌;依氟鸟氨酸;醋酸羟哇唑;大环内酯类抗肿瘤药(epothilone);依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美登醇类物质(maytansinoids),例如美登素和安丝菌素;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇;二胺硝吖啶;喷司他丁;蛋氨氮芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSKTM;丙亚胺;根霉素;西佐喃;螺旋锗;细格孢氮杂酸;三亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯(特别是T-2毒素、疣孢菌素(verracurin)A、杆孢菌素A和蛇形菌毒素(anguidine));尿烷;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌

泊溴烷;加胞昔(gacytosine);阿糖胞昔("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类,例如紫杉醇(新泽西州普林斯顿布里斯托美时施贵宝肿瘤公司(Bristol Meyers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)TAXOLTM)和多西他赛(法国安东尼RPR公司(Rhone-Poulenc Rorer,Antony,France)TAXOTERETM);瘤可宁;吉西他滨(GemzarTM);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,例如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊甙(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱(vancristine);长春瑞滨(NavelbineTM);诺消灵;替尼泊昔;依达曲沙;柔红霉素;氨基蝶呤;昔洛达(xeoloda);伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲酸类,例如维甲酸;卡培他滨;和上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。“化疗剂”的定义中还包括用于调节或抑制激素对肿瘤作用的抗-激素剂,例如抗-雌激素和选择性雌激素调节剂(SERM),包括,例如他莫昔芬(包括NolvadexTM)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、凯奥昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬(FarestonTM);调节肾上腺中雌激素产生的芳香酶的抑制剂,例如4(5)-咪唑、氨鲁米特、醋酸甲地孕酮(MegaceTM)、依西美坦、福美坦、法倔唑、伏氯唑(RivisorTM)、来曲唑(FemaraTM)和阿那曲唑(ArimidexTM);和抗-雄激素,例如氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、醋酸亮丙瑞林和戈舍瑞林;和上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0571] 在一个非限制性实施例中,本发明包括通过将肿瘤细胞与至少顺铂和至少一种抗-LOX抗体接触来协同抑制肿瘤细胞侵袭性和转移性的方法(见图18)。本文所述的一种实施方式应理解为抗-LOX2抗体可用于这种方法。

[0572] 在一个实施方式中,与LOX/LOXL调节剂联用的抗癌剂是酪氨酸激酶抑制剂。例如,ZD1839(AZKK公司(AstraZeneca K.K.)的IressaTM)显示对EGFR(表皮生长因子受体)酪氨酸激酶的ATP结合位点的ATP有竞争性作用,并通过抑制酪氨酸激酶的自磷酸化而抑制酪氨酸激酶活性。因此,通过阻断与增殖、渗透、分化和转移有关的EGFR-提供的信号转导(配体,例如表皮生长因子(EGF)结合EGFR的胞外结构域,然后活化EGFR酪氨酸激酶的胞内结构域,从而不仅导致EGFR的自磷酸化,还导致各种胞内靶蛋白的自磷酸化,然后将增殖信号从癌细胞表面转导至核,并导致癌细胞的增殖、渗透、转移、血管生成)而表现出抗癌症作用。IMC-C225或西妥昔单抗(ErbituxTM)是EGFR-靶向单克隆抗体,其识别细胞膜表面上EGFR的受体部分并抑制EGFR的自磷酸化,从而抑制酪氨酸激酶活性。赫赛汀是针对EGFR同源的Her2/Neu的单克隆抗体,甲磺酸伊马替尼(GLEEVECTM,以前称为STI-571)能抑制BCR-Ab1和c-kit的酪氨酸激酶活性(2号非专利文件)。索拉法尼(Sorafenib)(NexavarTM)是Raf激酶、PDGF(血小板衍生的生长因子)、VEGF受体2和3激酶和c-Kit的小分子抑制剂。

[0573] 本文所用针对肿瘤抗原的单克隆抗体是用肿瘤和白血病细胞所表达的抗原,优选肿瘤特异性抗原引发的抗体。单克隆抗体还包括全人和人源化抗体。

[0574] 癌症治疗的治疗性抗体的另一例子包括曲妥单抗(HERCEPTINTM; HER2蛋白的过表达与临幊上更具侵袭性的疾病和不佳的预后有关);利妥昔单抗(RITUXANTM)是用淋巴瘤细胞上的CD20产生并选择性消除正常和恶性的CD20+前-B和成熟B细胞;阿仑单抗(CAMPATHTM),特异性靶向B和T淋巴细胞上发现的CD52抗原的单克隆抗体,用于治疗慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和淋巴瘤;和吉姆单抗佐格米星(Gemtuzumab zogamicin)

(MYLOTARGTM)，包含针对CD33的特异性抗体和化疗剂(佐格 米星)的抗体偶联物，其指示可以治疗复发的成人急性髓细胞性白血病。

[0575] 在另一实施方式中，抗-血管生成剂与LOX/LOXL抑制剂组合来治疗癌症 和异常或不良血管生成相关的其它疾病。抗血管生成剂的例子包括但不限于：视黄酸及其衍生物、2-甲氧基雌二醇、ANGIOSTATINTM、ENDOSTATINTM、苏拉明、角鲨胺、金属蛋白酶-I的组织抑制剂、金属蛋白酶-2的组织抑制 剂、纤溶酶原激活物抑制剂-1、纤溶酶原激活物抑制剂-2、软骨-衍生的抑 制剂、紫杉醇、血小板因子4、硫酸鱼精蛋白(鲱精蛋白)、硫酸几丁质衍 生物(从雪花蟹壳制备)、硫酸化多糖肽聚糖复合物(sp-pg)、星形胞菌素、基质代谢的调节物，包括，例如脯氨酸类似物((I-氮杂环丁烷-2-羧酸 (LACA)、顺羟脯氨酸、d, I-3,4-脱氢脯氨酸、硫代脯氨酸、延胡索酸α-二吡 喹基,β-氨基丙腈、4-丙基-5-(4-吡啶基)-2(3h)-唑酮；甲氨喋呤、米托蒽醌、肝素、干扰素、2巨球蛋白-血清、黑猩猩(chimp)-3、糜蛋白酶抑制素、β- 环糊精十四烷硫酸酯、埃坡恩霉素(eponemycin)；烟曲霉素、硫代苹果酸金 钠、d-青霉胺(CDPT)、β-1-抗胶原酶-血清、α.2-抗血纤维蛋白酶、比生群、氯苯扎利二钠、n-2-羧基苯基-4-氯氨基酸二钠或“CCA”、沙立度胺；血管抑 制性类固醇、羧基氨基咪唑(argboxynaminolmidazole)c；金属蛋白酶抑制剂，例如BB94。其它抗-血管生成剂包括针对这些血管生成性生长因子的抗体，优选单克隆抗体：bFGF、aFGF、FGF-5、VEGF同种型、VEGF-C、HGF/SF 和Ang-1/Ang-2。Ferrara N. 和Alitalo,K."Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors(血管生成性生长因子和它们的抑制剂的临 床应用)" (1999) Nature Medicine 5:1359-1364。

[0576] 示范性的抗-纤维变性剂包括但不限于：化合物，例如β-氨基丙腈(BAPN) 以及以下文献公开的化合物：1990年10月23日授予Palfreyman等的美国 专利号4,965,288，名称为“Inhibitors of lysyl oxidase, relating to inhibitors of lysyl oxidase and their use in the treatment of diseases and conditions associated with the abnormal deposition of collagen(赖氨酰氧化酶抑制剂，涉 及赖氨酰氧化酶抑制剂以及它们在治疗胶原异常沉积相关疾病和病症中的 应用)”；1991年3月5日授予Kagan等的U.S.4,997,854，名称为“Anti-fibrotic agents and methods for inhibiting the activity of lysyl oxidase in situ using adjacently positioned diamine analogue substrate(抗纤维变性剂和利用毗邻定 位的二胺类似底物原位抑制赖氨酰氧化酶活性的方法)”，其涉及抑制LOX 来治疗各种病理性纤维变性状态，这些文献通过引用纳入本文。其它示范 性抑制剂描述于1990年7月24日授予Palfreyman等的U.S.4,943,593，名称为“Inhibitors of lysyl oxidase(赖氨酰氧化酶的抑制剂)”，其涉及诸如2-异 丁基-3-氟-、氯-、或溴-烯丙胺等化合物；以及，例如U.S.5,021,456;U.S. 5,5059,714; U.S.5,120,764;U.S.5,182,297;U.S.5,252,608(涉及2-(1-萘氧 基甲基)-3-氟烯丙胺)；和美国专利申请号2004/0248871，这些文献通过引 用纳入本文。示范性抗-纤维变性剂还包括与赖氨酰氧化酶的活性位点上的 羰基反应的伯胺，更具体地说，与羰基结合后产生通过共振稳定的产物的 那些，例如以下伯胺：乙二胺，肼，苯基肼和它们的衍生物、氨基脲和脲 衍生物，氨基腈，例如β-氨基丙腈(BAPN)，或2-硝基乙胺，不饱和或饱 和卤代胺，例如2-溴-乙胺、2-氯乙胺、2-三氟乙胺、3-溴丙胺、对-卤代苄 胺，硒代高半胱氨酸内酯。在另一实 施方式中，抗-纤维变性剂是穿透或不 穿透细胞的铜螯合剂。其它示范性化合物包括间接

抑制剂,这些化合物阻断赖氨酰氧化酶对赖氨酰基或羟基赖氨酰基残基进行氧化脱氨而衍生醛衍生物,例如硫醇胺(thiolamine),特别是D-青霉胺或其类似物,例如2-氨基-5-巯基-5-甲基己酸、D-2-氨基-3-甲基-3-((2-乙酰胺基乙基)二硫代)丁酸、对-2-氨基-3-甲基-3-((2-氨基乙基)二硫代)丁酸、-4-((对-1-二甲基-2-氨基-2-羧乙基)二硫代)丁烷亚磺酸钠、2-乙酰胺基乙基-2-乙酰胺基乙硫醇亚磺酸酯(sulphanate)、4-巯基丁烷亚磺酸钠三水合物。

[0577] 本发明方法可在培养的细胞上,例如体外或离体进行,或者可以在存在于对象中的细胞上进行,例如作为体内治疗方案的一部分。可对人或其它动物对象实施该治疗方案。相对于化疗剂,可采用任何顺序给予本文提供的抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体。有时,抗-LOX抗体或抗-LOXL2抗体与药剂同时或顺序给予。它们可以在不同部位并以不同给药方案给予。本发明组合疗法的疗效增加代表了常规高毒性抗癌剂方案的有希望替代方案。上文详述了这些方法中所用的化疗剂。

实施例

[0578] 参考以下非限制性实施例可更好地理解本申请,提供的实施例是本申请的示范性实施方式。给予以下实施例是为了更全面地说明本发明的实施方式,然而,绝不应理解成限制了本申请的范围。虽然本文示出和描述了本申请的某些实施方式,但应明白提供这些实施方式只是为了举例。本领域技术人员可以想出许多改进、改变和替代方式而不脱离本发明。应该知道可以采用本文所述实施方式的各种替代方式来实施本文所述的方法。

[0579] 实施例1

[0580] 产生鼠单克隆抗-LOX和抗-LOXL2抗体的方法

[0581] 给小鼠(BALB/c (00467))皮下(s.c.)注射佐剂制剂配制的0.05mg抗原(Ag),5次,2-3周为间隔。对于肽抗原,先将肽偶联于牛血清白蛋白,并用弗氏佐剂(FA)配制再进行免疫。对于蛋白质抗原,用铝胶-胞壁酰二肽(ALD/MDP)佐剂配制该蛋白质。

[0582] 在3天期间每天通过皮下、腹膜内(i.p.)和静脉内(i.v.)组合途径给小鼠注射PBS配制的抗原,0.05到0.1毫克/途径。

[0583] 分离小鼠脾脏和淋巴结的细胞,利用50%聚乙二醇与P3X63-Ag8.653骨髓瘤细胞融合。

[0584] 培养细胞,并基本上如Kenney等("Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web(利用分泌捕捉报道网络产生单克隆抗体)" Biotechnology 13:787-790,1995)所述分离HAT-选择细胞的杂交瘤文库。

[0585] 利用具有自动细胞沉积单元的荧光激活细胞分选仪克隆杂交瘤文库。

[0586] 根据Kenney等所述的前向散射、侧向散射和碘化丙啶(propidium iodide)荧光的分析标准将单个活细胞分选入96孔板。

[0587] 利用抗原包被的微量滴定板孔,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)筛选血清和上清液,然后与小鼠血清或杂交瘤上清液温育,再依次与山羊小鼠IgG(Fc-特异性)抗体-HRP偶联物、TMB底物溶液和终止试剂温育。

[0588] 在各次温育之间洗涤平板的各孔以除去未结合的抗体或抗原,并测定结果。

[0589] 采用所述方法鉴定的抗-LOXL2鼠单克隆抗体的VH和VL氨基酸序列分别见图6A和

6B。对于各可变区，信号肽以斜体字显示，CDR以下划线显示，恒定空间的起始处以黑体字显示。

[0590] 采用所述方法鉴定的抗-LOX鼠单克隆抗体的VH氨基酸序列见图7A。采用所述方法鉴定的抗-LOX鼠单克隆抗体的两条VL氨基酸序列见图7B和7C。对于各可变区，信号肽以斜体字显示，CDR以下划线显示。

[0591] 实施例2

[0592] 采用评估LOXL2酶活性的蛋白质筛选B升级方案筛选抗-LOXL2抗体来。

[0593] 首先根据ELISA点测试(ELISA point tests)选择候选抗体。由抗体方案公司(Antibody Solution)对多抗原进行ELISA，选择在感兴趣抗原中显示强烈ELISA信号的抗体在酶试验中作进一步表征。当底物1,5-二氨基戊烷脱氨，而酶再生时，LOXL2产生过氧化氢。

[0594] 采用将过氧化物的产生(LOXL2释放的)与HRP相偶连的生物化学试验，并检测amplex red向荧光产物的转化来评估抗体抑制酶活性的能力。将抗体杂交瘤上清液(10 μ L)加到40 μ L酶混合物(62.5mM硼酸钠pH 8.0, 5单位/mL HRP, 125nM LOXL2, 10ppm消泡剂)中，室温下在96孔全区域黑平板(full area black plate)中温育1小时。加入50 μ L底物溶液(50mM硼酸钠, 100 μ M Amplex红试剂, 20mM 1,5-二氨基戊烷(DAP), 10ppm消泡剂)启动酶反应，37°C，用分子装置公司(Molecular Devices)的M5平板读数计读数。将该平板读数计设置成红色荧光(激发=544nm, 发射=590nm)，动力学模式，1小时。数据记录为荧光与时间反应曲线的斜率。将这些斜率与向酶混合物中加入杂交瘤培养基的对照比较。低于对照的斜率认为是抑制剂。

[0595] 以BAPN(LOXL2的竞争性抑制剂)作为阳性对照，以LOXL2作为阴性对照，测试抗体M1(asc)、M4、M11、M1、M13、M22、M16、M19、M20、M20(asc)和M25测试抗体(参见图8)。

[0596] 一种抗-LOXL2抗体称为AB0023。在酶试验中，抗-LOXL2抗体重复了在10ml制备物中观察到的抑制活性。细胞试验也重现了抑制作用(见下文)。序列分析证实M01、M16、M19和M20的氨基酸序列相同。

[0597] 实施例3

[0598] 抗-LOXL2抗体AB0023和酶活性

[0599] 可评估抗-LOXL2抗体的酶活性并测定IC50。

[0600] 在25nM LOXL2和15mM 1,5DAP存在下，评估浓度升高的抗体M1、M1(asc)、M20和M20(asc)。

[0601] IC50测定

[0602] 采用上述偶连的酶试验，检测所选抗体对LOXL2的剂量反应。用PBST(0.01%吐温-20)制备抗体的一系列稀释液，将10 μ L该稀释液加入40 μ L酶混合物(62.5mM硼酸钠pH 8.0, 5单位/mL HRP, 125nM LOXL2, 10ppm消泡剂)，室温下在96孔全区域黑平板中温育1小时。加入50 μ L底物溶液(50mM硼酸钠, 100 μ M除臭剂红试剂, 20mM 1,5-二氨基戊烷(DAP), 10ppm消泡剂)启动酶反应，采用上述条件，用M5平板读数计读数。将荧光反应-时间函数的斜率对抗体浓度作图，利用GraFit将数据拟合为4参数拟合。该图的中点是表观IC50，还是50%的总反应得到抑制的浓度。

[0603] 发现Ab0023是LOXL2酶活性的部分抑制剂，表观IC50约为30nM(参见图9)。

[0604] 根据部分抑制剂可临床用于治疗性治疗(即,Spence等,(1995) Science 267描述的Nevirapine-an approved HIV-1drug(奈韦拉平-批准的HIV-1药物)),LOXL2的部分抑制剂也可用于治疗性应用。

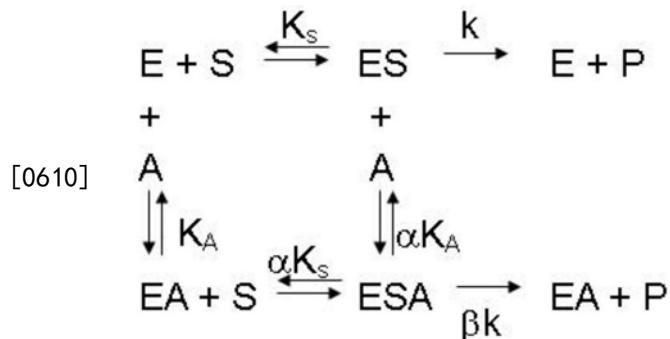
[0605] 实施例4

[0606] 抗-LOXL2抗体AB0023是非竞争性抑制剂

[0607] 评估抗-LOXL2抗体AB0023在1,5DAP浓度升高和抗体浓度升高(1 μM、0.005μM、0.050μM和0.300μM)时的活性。

[0608] 抑制方式

[0609] 采用下述模型检测抗体对LOXL2的抑制方式。在这些实验中,监测抗体浓度升高下,稳态率(steady state rate)对1,5-二氨基戊烷浓度的依赖性。其目的是评估有抗体存在下底物的 K_m 、 k_{cat} 或二者是否改变。采用下图所示模型,利用Grafit总体分析收集的数据。E表示酶,S表示底物,A表示抗体和P表示产物。参数 α 描述了化合物对底物亲和力的作用。 α 值等于1描述了其中化合物同等结合游离酶和酶-底物复合物的情况(可能是非竞争性抑制剂)。该值小于1描述了其中化合物结合酶-底物复合物的相互作用(可能是无竞争性抑制剂)。该值大于1对应于结合游离酶胜过酶-底物复合物的化合物(可能是竞争性抑制剂)。 β 值描述了调节剂对酶速率的作用。抑制剂的该值小于1(对于完全抑制剂, $\beta=0$),激活剂的该值大于1。 K_A 是化合物的解离常数, K_s 是底物的米氏常数, k 是酶的催化速率。从上述荧光反应-时间函数的斜率(IC50测定)测定稳态率。将数据制作成在几种固定的抗体浓度下,稳态率对底物(1,5-二氨基戊烷)浓度依赖性的图,并用GraFit分析。



[0611] 根据以下结果将抗-LOXL2抗体AB0023测定为非-竞争性抑制剂: $\alpha=1$, $K_i=0.067$ 和 $\beta=0.5$ (参见图10)。

[0612] 实施例5

[0613] 采用表面等离振子共振的AB0023抗体结合LOXL2的动力学检测

[0614] 通过表面等离振子共振(SPR)评估AB0023的结合亲和力和解离速率。

[0615] 利用25℃恒温的生物辐射公司(Bio-Rad)的ProteOn仪器检测结合亲和力。采用两种方法,利用胺偶连来测定结合亲和力;一种方法中抗体固定,加入抗原(LOXL2),而另一种方法中抗原(LOXL2)固定,加入抗体。利用ProteOn固定试剂盒提供的1:1的NHS与EDC将抗体或抗原固定在GLC芯片上。首先用NHS/EDC混合物活化芯片,然后将乙酸盐缓冲液,pH4.5配制成1μg/mL的抗原或抗体流过活化的表面来偶连。这通常产生约500 RU的偶连。然后加入1M乙醇胺给活化的芯片表面封端。将偶连的芯片保留在4℃,用50mM氢氧化钠再生。

[0616] 用抗体或抗原的一系列PBST (0.05% 吐温-20) 稀释液检测偶连的芯片来 测定解离常数。利用未偶连通道作为参比,获得了ProteOn上可用的所有6 个通道的数据。利用生物辐射公司的ProteOn管理软件分析收集的数据。

[0617] 发现AB0023紧密结合LOXL2,而释放缓慢。Kd估计为0.1-1.0nM。此外,发现AB0023 具有以下特征: $k_{on}=1.68 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, $k_{off}=1.17 \times 10^{-4}s^{-1}$, $K_D=0.69 nM$ 和 $t_{1/2}=98.7$ 分钟,参见图11。

[0618] 实施例6

[0619] 进行结构域作图,发现AB0023结合SRCR3-4结构域。

[0620] 材料与方法

[0621] 所有平板得自康宁公司 (Corning)。第二抗体和微微底物得自皮尔斯公司 (Pierce)。辣根过氧化物酶 (HRP) 得自西格玛公司 (Sigma)。所有ProteOn试剂 得自生物辐射公司。LOXL2得自研发系统公司 (R&D systems)。本项研究所 用抗体由抗体方案公司制备 或从阿拉贡生物科学公司 (Aragen Biosciences) 的腹水制备。所有其它试剂均尽可能 是最高质量。

[0622] 通过ELISA的结合

[0623] 采用基于ELISA的发光来测定抗体与LOXL2的结合。4°C,用50mM硼 酸盐缓冲液 (pH 8.0) 配制的0.1μg/mL LOXL2或感兴趣抗原包被白色康宁 平板过夜。用BioTek平板洗涤器 洗涤平板,室温下,用PBST (0.05% 吐温 -20) 配制的5% 脱脂奶封闭1小时。用PBST (0.05% 吐温-20) 洗涤平板,然后 立即使用或保存于4°C 干燥器内待用。用PBST (0.01% 吐温-20) 连续稀释待 测试的抗体,每孔加入100μL各稀释液。室温下,平板与测试品温育1小 时,然后用PBST (0.05% 吐温-20) 洗涤。用PBST (0.05% 吐温-20) 配制的5% 脱脂奶将检测抗体(抗- 小鼠HRP偶联物)稀释16,000倍,每孔施加100μL。平板与检测抗体温育1小时,然后用PBST (0.05% PBST) 洗涤。按照生产商 的使用说明书,利用皮尔斯公司的超级信号ELISA微微化 学发光底物 (SuperSignal ELISA pico chemiluminescent substrate) 检测信号。利用分子装 置公司的M5平板读数计检测发光,积分时间为500ms,捕捉所有波长。对数据作背景 校正,利用GraFit程序,以朗缪尔等温方程 (Langmuir isotherm equation) 拟合发光信号 对抗体浓度的依赖性。如果抗原浓度与解离常数相 似,则采用紧密结合的二次方程。报道的解离值从依据这些方程的拟合值 获得;其中PL代表结合复合物的信号,B_{max}是最大结合, K_D是解离常数,L是配体浓度。

[0624] 朗缪尔等温方程:

$$[0625] [PL] = \frac{B_{max} * [L]}{K_D * [L]}$$

[0626] 紧密结合方程:

$$[0627] [PL] = B_{max} * \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \sqrt{([P]_T + [L]_T + K_D)^2 - 4[P]_T [L]_T}}{2[P]_T}$$

[0628] 针对MCD-LOXL2、LOXL2 (研发公司)、SRCR1-2和SRCR 1-4测试 了AB0023。发现 AB0023结合SRCR3-4结构域(参见图12)。

[0629] 实施例7

[0630] 抑制胶原I和胶原IV中的迁移/侵袭以及抑制细胞生长

- [0631] 进行细胞试验以评估AB0023与底物(即,胶原)的结合情况。
- [0632] 简言之,先从各种样品中按比例增加AB0023再进行测试。
- [0633] 马里兰州盖瑟斯堡市特莱维根公司(Trevigen, Gaithersburg, MD)的 Cultrex 96-孔胶原I和胶原IV细胞粘着试剂盒用于抗-血清/抗体上清液筛选。先将MDA MB 231 细胞血清消耗24小时再开始试验。开始那天,在侵袭试验开始前至少4小时(不早于8小时)制备胶原I和胶原IV包被平板。按照生产商的使用说明书包被胶原I和胶原IV平板。将95微升无血清培养基配制的细胞以20,000每孔铺在平板的上部小室中。将含有10%FBS和1x L-谷氨酰胺的150微升培养基等分加入平板的下部小室中。利用多道移液器将5微升各抗-血清置于平板的上部小室中。用移液器上下抽吸一次小心地混合抗-血清与细胞混合物。37°C,将平板与5%CO₂温育48小时。
- [0634] 48小时后,平板即可读数。按照生产商的使用说明书制备含有钙黄绿素AM的细胞解离溶液。还按照生产商的使用说明书洗涤并拆下平板。将125微升含有钙黄绿素AM的细胞解离溶液加入下部小室孔中,平板在37°C温育30分钟。30分钟后,扣击平板的侧面以使细胞疏松,37°C,将平板在孵育箱内再放置30分钟。然后拆下平板,将下部平板置于如下设置的平板读数计中(加利福尼亚州桑尼维尔市分子装置公司的SpectraMax M5):荧光,485-520发射,顶读数,黑色不透明板,灵敏度为30。
- [0635] 在胶原I(图13)和胶原IV中,来自10ml制备物和放大的100ml制备物及腹水的上清液一致地抑制迁移/侵入。
- [0636] 细胞粘着试验
- [0637] 将MDA-MB231细胞涂布在15cm²平板中,在含4.5g/L葡萄糖的DMEM(10%FBS和2mM L-谷氨酰胺)中生长,从而在试验那天汇合。抽出培养基,每块平板用10ml 1mM EDTA PBS洗涤两次。37°C,将细胞在生物安全柜中与另一份10ml 1mM EDTA PBS温育5分钟,然后将细胞吸出平板加入EDTA PBS溶液中,从而自平板中取出细胞。测定细胞浓度,在15ml锥形试管中离心足够的细胞以供试验(50k/孔加上额外的以供移液)。将细胞沉淀物分散在预热的无血清DMEM中,达到500K细胞/毫升,加入CuCl₂至1μM终浓度。将100微升/孔细胞悬液吸入含10微升合适单克隆抗体稀释液的U型底96孔组织培养板。室温下,细胞悬液/单克隆抗体混合物避光温育10分钟。然后将100微升/孔的重悬细胞/单克隆抗体混合物转移至胶原IV包被的96孔板(BD Biocoat,BD生物科学公司(BD Biosciences))。37°C,将平板在生物安全柜中温育1小时。然后吸出孔中的培养基并用麦迪泰克公司(Mediatech)的200微升DPBS小心地洗涤两次以除去未粘附的细胞。然后将DPBS配制的100微升10μM终浓度的钙黄绿素-AM(BD生物科学公司)加入各孔以染色保留的细胞。37°C,将平板在生物安全柜中温育1小时。用分子装置公司的M5平板读数计,以494/517(激发/发射)对平板读数。根据PBS或无关抗体对照进行标准化来计算粘着百分比(%)。
- [0638] 采用该试验,细胞接触AB0023抗体后观察到粘着的部分抑制。
- [0639] 细胞生长
- [0640] 抗-LOXL2抗体抑制四种细胞系的生长:231是乳腺癌细胞系,BT549是乳腺癌细胞系,HT1080是纤维肉瘤,BxPC3是前列腺癌细胞系(图17)。因此,该抗体能有效抑制不同来源癌症(细胞)的生长。
- [0641] 实施例8

[0642] AB0023抑制EMT-样改变

[0643] 采用免疫组化方法评估上皮-间充质改变。

[0644] 为检测细胞是处于EMT还是间充质-上皮过渡(MET)状态,用上皮或间充质状态的细胞蛋白标记,例如E-钙粘蛋白、波形蛋白、纤维结合蛋白和鬼笔毒环肽的特异性抗体染色细胞来检测F-肌动蛋白。

[0645] 罗丹明鬼笔毒环肽染色方案

[0646] 染色之日前24小时接种细胞;24小时后细胞在8-室载玻片中生长至约80%汇合。随后一天,吸出培养基,用1X PBS清洗小室。然后在室温下,用4%低聚甲醛(PFA)固定细胞20分钟,再用1X磷酸缓冲盐水(PBS)清洗一次。室温下,用PBS配制的0.5%皂昔(新泽西州菲利浦斯勃格市JTB公司(JT Baker, Phillipsburg, NJ))处理细胞5分钟进行透化处理。用1X PBS小心清洗小室,向细胞中加入PBS配制的罗丹明鬼笔毒环肽的1:100稀释液(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司(Invitrogen, Carlsbad, Ca)),室温下温育15分钟。用1X PBS清洗小室两次,给载玻片装上Vectashield(加利福尼亚州伯林格姆市的载体实验室(Vector Laboratories, Burlingame, CA))。

[0647] E-钙粘蛋白染色方案

[0648] 染色之日前24小时接种细胞;24小时后细胞在8-室载玻片中生长至约80%汇合。随后一天,吸出培养基,用1X PBS清洗小室。然后用冰冷的甲醇固定细胞,然后在-20℃温育2分钟。细胞用1X PBS清洗一次,向载玻片小室中加入1微克/毫升新泽西州吉布斯城盖尔生物化学公司(Calbiochem, Gibbstown, NJ)的E-钙粘蛋白单克隆抗体。载玻片在37℃再温育1小时。用1X PBS小心清洗小室后,加入第二抗体(抗-小鼠IgG cy3偶连的,宾夕法尼州西格罗夫市杰克逊免疫研究公司(Jackson Immuno Research, West Grove, Pa)),室温下温育30-45分钟。用1X PBS清洗小室两次,装上Vectashield(加利福尼亚州伯林格姆市的载体实验室)。

[0649] 将HS-578t细胞(LOXL2高)的条件化培养基施加于MCF-7细胞(LOXL2低/阴性)。用罗丹明-鬼笔毒环肽(F-肌动蛋白,红色)和Dapi(核,蓝色)染色细胞。

[0650] 发现AB0023抑制条件化培养基诱导的表达LOXL2的肿瘤细胞的EMT-样改变(数据未显示)。

[0651] 实施例9

[0652] 抗-LOXL2抗体AB0023结合基质-相关的LOXL2。

[0653] 在Hs578t细胞中进行内在化和抗体摄取研究

[0654] Hs578t细胞在含有10%FBS和1x谷氨酰胺的DMEM中培养。将细胞接种在8小室载玻片中(新泽西州富兰克林湖市的BDF公司(BD Falcon, Franklin Lakes, NJ)),让它们粘着过夜。对于低汇合度,以每块载玻片30-40,000个细胞接种细胞。24小时后,采用低汇合度检测细胞溶胶中的LOX。对于高汇合度,以每块载玻片100,000个细胞接种细胞。约48-72小时后,采用高汇合度检测基质和胶原相关的LOX。

[0655] 随后一天,将1 μ g/ml(常规生长培养基配制的终浓度)的抗-Lox M64或抗-Lox12M20单克隆抗体(mAb)加入小室。对于连续摄取,在不同时间点温育mAb与细胞:例如,3小时、8小时或24小时(过夜)。连续摄取适当量后,除去培养基,用1X PBS清洗小室。室温下用4%PFA(低聚甲醛)固定细胞20分钟。固定后,室温下用1X PBS洗涤细胞5分钟,然后在

室温下用50mM氯化铵猝灭10分钟。室温下再次用1X PBS洗涤细胞5分钟。

[0656] 室温下,通过加入皂昔缓冲液(PBS配制的0.5%皂昔/1%BSA),20分钟来透化处理细胞。室温下加入皂昔缓冲液配制的第二检测抗体(加利福尼 亚州卡尔斯巴德英杰公司的Alexa Fluor 488驴抗-小鼠IgG),温育细胞30-45分钟。用皂昔缓冲液洗涤细胞3次。给载玻片装上Vectashield(加利福尼 亚州伯林格姆市的载体实验室)。

[0657] 为检测胶原,将细胞与抗-胶原抗体(1:50,Calbiochem抗-胶原I型兔 多克隆,吉布斯城,新泽西州)温育,1小时后用4%PFA固定细胞。所用 的胶原第二抗体是驴抗-兔Cy3(宾夕法尼州西格罗夫市杰克逊实验室(ImmunoJackson Labs))。

[0658] 免疫印迹和免疫荧光分析(数据未显示)表明LOXL2在低密度时主要在 胞内,但在高细胞密度时(汇合细胞),可分泌。检测了汇合细胞的培养基中 以及胞外基质上的LOXL2。活细胞的免疫荧光表明AB0023结合胶原基质 相关的LOXL2。

[0659] 实施例10

[0660] 抗-LOX抗体M64结合LOX

[0661] 评估抗-LOX抗体M64在1,5DAP浓度升高和抗体浓度升高时的活性 (参见图15)。

[0662] 材料与方法

[0663] 所有平板得自康宁公司。第二抗体和微微底物得自皮尔斯公司。Amplex 红试剂得自英杰公司。辣根过氧化物酶(HRP)、1,5-二氨基戊烷、消泡剂得自西 格玛公司。所有ProteOn试剂得自生物辐射公司。LOX由阿里斯托生物科学 公司(Arresto Biosciences) 内部制备。本项研究所用抗体由抗体方案公司制备 或从阿拉贡生物科学公司的腹水制备。所有其它试剂尽可能是最高质量。

[0664] 通过ELISA的结合

[0665] 采用基于ELISA的发光来测定抗体与LOX的结合。4℃,用50mM硼酸 盐缓冲液(pH 8.0)配制的0.1μg/mL LOX或感兴趣抗原包被白色康宁平板过 夜。用BioTek平板洗涤器洗涤平板,室温下,用PBST(0.05%吐温-20)配 制的5%脱脂奶封闭1小时。用PBST(0.05%吐温-20)洗涤平板,然后立即 使用或保存于4℃干燥器内待用。用PBST(0.01%吐温-20)连续稀释待测试 的抗体,每孔加入100μL各稀释液。室温下,平板与测试品温育1小时, 然后用PBST(0.05%吐温-20)洗涤。用PBST(0.05%吐温-20)配制的5%脱脂 奶将检测抗体(抗-小鼠HRP偶联物)稀释16,000倍,每孔施加100μL。平 板与检测抗体温育1小时,然后用PBST(0.05%PBST)洗涤。按照生产商的 使用说明书,利用皮尔斯公司的超级信号ELISA微微化学发光底物检测信 号。利用分子装置公司的M5平板读数计检测发光,积分时间为500ms, 捕捉所有波长。对数据作背景校正,利用GraFit程序,以朗缪尔等温方程 拟合发光信号对抗体浓度的依赖性。如果抗原浓度与解离常数相似,则采 用紧密结合的二次方程。报道的解离值从依据这些方程的拟合值获得;其 中PL代表结合复合物的信号,B_{max}是最大结合,K_D是解离常数,L是配 体浓度。

[0666] 朗缪尔等温方程:

$$[PL] = \frac{B_{max} * [L]}{K_D * [L]}$$

[0668] 紧密结合方程:

$$[0669] \quad [PL] = B_{max} * \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \sqrt{([P]_T + [L]_T + K_D)^2 - 4[P]_T[L]_T}}{2[P]_T}$$

[0670] 测试了三批的抗-LOX抗体M64,发现3批、4批和5批的KD分别为 6.6nM、5.0nM和 5.7nM(图15)。

[0671] 实施例11

[0672] 采用表面等离振子共振的M64抗体结合LOX的动力学检测

[0673] 通过表面等离振子共振 (SPR) 评估M64的结合亲和力。

[0674] 利用25℃恒温的生物辐射公司的ProteOn仪器检测结合亲和力。采用两 种方法,利用胺偶连来测定结合亲和力;一种方法中抗体固定,加入抗原 (LOX),而另一种方法中抗原 (LOX) 固定,加入抗体。利用ProteOn固定试 剂盒提供的1:1的NHS与EDC将抗体或抗原固定在GLC芯片上。首先用 NHS/EDC混合物活化芯片,然后将乙酸盐缓冲液,pH4.5配制1μg/ mL 的抗原或抗体流过活化的表面来偶连。这通常产生约500RU的偶连。然后 加入1M乙醇胺给活化的芯片表面封端。将偶连的芯片保存在4℃,用50 mM氢氧化钠再生。

[0675] 用抗体或抗原的一系列PBST (0.05% 吐温-20) 稀释液检测偶连的芯片来 测定解离常数。利用未偶连通道作为参比,获得ProteOn上可用的所有6个通 道的数据。利用生物辐射公司的ProteOn管理软件分析收集的数据。

[0676] 发现M64的KD为7nM(图16)。

[0677] 实施例12

[0678] 以下是说明书所述序列的列表。

	SEQ ID	序列
	NO	
[0679]	1.	MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTYYLIEWVKQRPGQG LEWIGVINPGSGGTNYNEKFGKATLTADKSSSTAYMQLSSLSDDSAVYFCARNWMNFDYW GQGTTLTVSS
	2.	MRCLAEFLGLLVWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVISCRSSKSLHSNGNTYLYWFLQRP GQSPQFLIYRMSNLASGVPDFSGSGSTAFTLRISRVEADVGVYYCMQHLEYPYTFGGTK LEIK
	3.	MGWSWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFRSYDINWVRQRPEQG

SEQ ID NO	序列
28.	QVQL <u>QSGAE</u> <u>VKPG</u> <u>4</u> SVKVSKAS <u>GYAFTYYLIE</u> WVR <u>QAPGQGLEWIGVINPGSGGTNYN</u> <u>EKFKGRI</u> T <u>TADKS</u> <u>STAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAR</u> <u>NWMNF</u> <u>DY</u> <u>WQGTT</u> <u>TVSS</u>
29.	MRCLAEFLGLLVWIPGAIGDIVMTQAAPS VTGPS EV SISC <u>RSSKSLHNSNGNTLYWFLQ</u> RPGQSPQFLIY <u>RMSNLAS</u> <u>GV</u> <u>PDRSGSGSGT</u> <u>AFTL</u> <u>RISVEAEDVG</u> <u>VYYC</u> <u>MQHLEYPYTF</u> <u>FGG</u> GTKEIK
30.	DIVMTQT <u>PLS</u> <u>SVTPG</u> <u>QP</u> <u>AS</u> <u>ISC</u> <u>RSSKSLHNSNGNTLYWFLQ</u> <u>KPGQSPQFLIY</u> <u>RMSNLAS</u> <u>GVP</u> DRFSGSGSGTA <u>FTL</u> <u>K</u> <u>ISRV</u> <u>EAEDVG</u> <u>VYYC</u> <u>MQHLEYPYTF</u> <u>FGG</u> <u>GT</u> <u>VEIK</u>
31.	DIVMTQT <u>PLS</u> <u>SVTPG</u> <u>QP</u> <u>AS</u> <u>ISC</u> <u>RSSKSLHNSNGNTLYWFLQ</u> <u>KPGQSPQFLIY</u> <u>RMSNLAS</u> <u>GVP</u> DRFSGSGSGT <u>DFTL</u> <u>K</u> <u>ISRV</u> <u>EAEDVG</u> <u>VYYC</u> <u>MQHLEYPYTF</u> <u>FGG</u> <u>GT</u> <u>VEIK</u>
32.	DIVMTQT <u>PLS</u> <u>SVTPG</u> <u>QP</u> <u>AS</u> <u>ISC</u> <u>RSSKSLHNSNGNTLYW</u> <u>LQ</u> <u>KPGQSPQFLIY</u> <u>RMSNLAS</u> <u>GVP</u> DRFSGSGSGT <u>DFTL</u> <u>K</u> <u>ISRV</u> <u>EAEDVG</u> <u>VYYC</u> <u>MQHLEYPYTF</u> <u>FGG</u> <u>GT</u> <u>VEIK</u>
33.	MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAEVLRPGTSVKVSKAS
34.	WVQKRPQGQGLEWIG
35.	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR
36.	WGQGTTLTVSS
37.	QVQL <u>QSGAE</u> <u>L</u> <u>KPG</u> <u>4</u> SVKVSKAS
38.	WV <u>KQ</u> <u>4</u> PGQGLEWIG
39.	RATLTADK <u>S</u> <u>STAYMELSSLRSE</u> <u>DS</u> <u>AVYFCAR</u>
40.	WGQGTT <u>TVSS</u>
41.	GYAFTYYLIE
42.	VINPGSGGTNYNEKFKG
43.	NWNMFDY
44.	QVQL <u>QSGAE</u> <u>V</u> <u>KPG</u> <u>4</u> SVKVSKAS
45.	WVR <u>Q</u> <u>4</u> PGQGLEWIG
46.	RATLTADK <u>S</u> <u>STAYMELSSLRSE</u> <u>DTAVYFCAR</u>
47.	RAT <u>TADKS</u> <u>STAYMELSSLRSE</u> <u>DTAVYYCAR</u>
48.	MRCLAEFLGLLVWIPGAIGDIVMTQAAPS VTGPS EV SISC
49.	WFLQRPGQSPQFLIY
50.	GVPDRFSGSGSGTA <u>FTL</u> <u>K</u> <u>ISRV</u> <u>EAEDVG</u> <u>VYYC</u>
51.	FGGGTKEIK
52.	DIVMTQT <u>PLS</u> <u>SVTPG</u> <u>QP</u> <u>AS</u> <u>ISC</u>
53.	WFLQ <u>KPGQSPQFLIY</u>
54.	GVPDRFSGSGSGTA <u>FTL</u> <u>K</u> <u>ISRV</u> <u>EAEDVG</u> <u>VYYC</u>
55.	FGGGT <u>KEIK</u>
56.	RSSKSLHNSNGNTLY
57.	RMSNLAS
58.	MQHLEYPY
59.	GVPDRFSGSGSGT <u>DFTL</u> <u>K</u> <u>ISRV</u> <u>EAEDVG</u> <u>VYYC</u>
60.	W <u>LQ</u> <u>KPGQSPQFLIY</u>
61.	与 SEQ ID NO: 8 相比, 其它切割位点可以在前蛋白的氨基酸 21 和 22 之间
62.	APPAAGQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRDPGAAPGAANAS AQQPRTPIILLDRNRTAAARTRTAGSSGVTAU <u>GRPRPT</u> <u>ARHWF</u> <u>QAGYSTS</u> <u>RAREAGASRAENQT</u> APGEVPALSNLRPPSRVDGMVGD <u>DPY</u> <u>NPY</u> <u>KYS</u> <u>DDN</u> <u>PYY</u> <u>NNY</u> <u>DTY</u> <u>ERPRPGGRYRPGYGTGY</u> FQYGLPDVLAD <u>PYY</u> <u>IQ</u> <u>ASTY</u> <u>VQKMSM</u> <u>YNLRC</u> <u>AAE</u> <u>ENCL</u> <u>ASTAY</u> <u>RADVRD</u> <u>YDH</u> <u>RV</u> <u>LLRFP</u> <u>QRV</u> KNQGTSDFLPSRPRYSWEWHSCHQHYHSMDEF <u>SHY</u> <u>DLL</u> <u>DANT</u> <u>QRRV</u> <u>AEGH</u> <u>KASF</u> <u>CLED</u> <u>TSC</u> <u>DY</u> <u>GY</u> <u>HRR</u> <u>FACTA</u> <u>HTQGLSPG</u> <u>CYD</u> <u>TY</u> <u>GADIDCQ</u> <u>WIDIT</u> <u>DVKPGNY</u> <u>ILK</u> <u>VSVN</u> <u>PSYL</u> <u>VPE</u> <u>SDY</u> <u>TNN</u> <u>VRC</u> NVVRCDIRYTGHAYASGCTISPY
63.	与 SEQ ID NO: 8 相比, 其它切割位点可以在前蛋白的氨基酸 27 和 28 之间
64.	QQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRDPGAAPGAANASAQQPRT PILLDRNRTAAARTRTAGSSGVTAU <u>GRPRPT</u> <u>ARHWF</u> <u>QAGYSTS</u> <u>RAREAGASRAENQT</u> <u>APGEVP</u> LSNLRPPSRVDGMVGD <u>DPY</u> <u>NPY</u> <u>KYS</u> <u>DDN</u> <u>PYY</u> <u>NNY</u> <u>DTY</u> <u>ERPRPGGRYRPGYGTGY</u> FQYGLPDVLAD <u>PYY</u> <u>IQ</u> <u>ASTY</u> <u>VQKMSM</u> <u>YNLRC</u> <u>AAE</u> <u>ENCL</u> <u>ASTAY</u> <u>RADVRD</u> <u>YDH</u> <u>RV</u> <u>LLRFP</u> <u>QRV</u> <u>KNQGTS</u> DFLPSRPRYSWEWHSCHQHYHSMDEF <u>SHY</u> <u>DLL</u> <u>DANT</u> <u>QRRV</u> <u>AEGH</u> <u>KASF</u> <u>CLED</u> <u>TSC</u> <u>DY</u> <u>GY</u> <u>HRR</u> RFACTA <u>HTQGLSPG</u> <u>CYD</u> <u>TY</u> <u>GADIDCQ</u> <u>WIDIT</u> <u>DVKPGNY</u> <u>ILK</u> <u>VSVN</u> <u>PSYL</u> <u>VPE</u> <u>SDY</u> <u>TNN</u> <u>VRC</u> IRYTGHAYASGCTISPY 人 LOX mRNA 序列 ATGCGCTTCGCTGGACCGTGCTCCGTCTCGGGCCTTGAGCTCTGCGCGCTAGTGCAC GCGCCCCCTCCGCCGCCGCCAACAGCAGCCCCCGCGAGCCGCCGGCTCCGGC GCCTGGCGCCAGCAGATCCAATGGAGAACACAACGGGCAGGTGTCAGCTGCTGAGCCTG GGCTCACAGTACCAGCCTCAGCGCCGCCGGACCCGGCGCCGCCGTCCCTGGTGCAGCC AACGCCTCCGCCAGCAGCCCCGACTCCGATCCTGCTGATCCGCACAACCGCACCGC CGCGCGCAACGCGGACGGCCGGCTCATCTGGAGTCACCGCTGGCCGCCAGGCCACC

SEQ ID NO	序列
[0684]	<pre> GCCCGTCACTGGTTCCAAGCTGGCTACTCGACATCTAGAGCCCGGAAGCTGGCGCTCGC GCGCGGAGAACCAAGACAGCGCCGGAGAAGTTCCTGCGCTAGTAACCTGCGGCCGCC AGCCCGTGGACGGCATGGTGGCGACGACCCCTACAAGTACTCTGACGAC AACCCATTACAACACTACGATACTTATGAAAGGCCAGACCTGGGGCAGGTACCGGC CGGATACGGCACTGGCTACTTCCAGTACGGTCTCCAGACCTGGTGGCCGACCCCTACTA CATCCAGCGTCCACGTACGTGAGAAGATGTCCATGTACAACCTGAGATGCGCGGCCGA GAAAAGTCTGGCCAGTACAGCATACAGGGCAGATGTCAGAGATTATGATCACAGGGT GCTGCTCAGATTCCCCAAAGAGTAAAAACCAAGGGACATCAGATTCTTACCCAGCCG ACCAAGATATTCTGGGAATGGCACAGTTGTCATCAAACATTACACAGTATGGATGAGTTA GCCACTATGACCTGCTTGATGCCAACACCCAGAGGAGAGTGGCTGAAGGCCACAAAGCAA GTTCTGCTTGAAGACACATCCTGTGACTATGGCTACACAGGGCATTCATGACTGCA CACACACAGGGATTGAGTCTGGCTTATGATACTTATGGTCAGACATAGACTGCCAGT GGATTGATATTACAGATGTAACCTGGAAACTATACCTAAAGGTCAGTGTAAACCCCAGC TACCTGGTTCTGAATCTGACTATACCAACAAATGTTGCGCTGTGACATTGCTACACAGG ACATCATGCGTATGCCTCAGGCTGCACAATTCCACCGTAT </pre> <p>65. 人 LOX 蛋白质序列</p> <pre> MRFAWTVLLLGPLQLCALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIWENNGQVFSLSSLGS QYQPQRDRDPGAAPGAANASAQQPRTPILLRDNRRAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWF QAGYSTSRAREAGASRAENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPYKYSDDNPYNNY YDTYERPRPGGRYRPGYGTGYFQYGLPDVLADPYIQAQSTYVQKMSMYNLRCAAEENCLAST AYRADVRDYDHVRLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRYSWEWSCHQHYHSMDEFSHYDLLDA NTQRRVAEGHKASFLEDTSCDYGYHRRFACTAHQTGLSPGCYDTYGADIDCQWIDITDVKP GNYILKVSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHAYASGCTISPY </pre>
[0685]	<p>虽然本文显示可描述了本发明的优选实施方式,本领域技术人员应该明白 提供这些实施方式只是为了举例。本领域技术人员可以想出许多改进、改变和 替代方式而不脱离本发明。应该知道可以采用本文所述实施方式的各种替代方 式来实施本发明。这意味着以下权利要求限定了本发明的范围,本发明应涵盖 这些权利要求范围内的方法和结构以及它们的等价方式。</p>

赖氨酸氧化酶酶学特征

LOX/L酶通过乒乓机制起作用，
米-门二氏动力学描述了这种机制

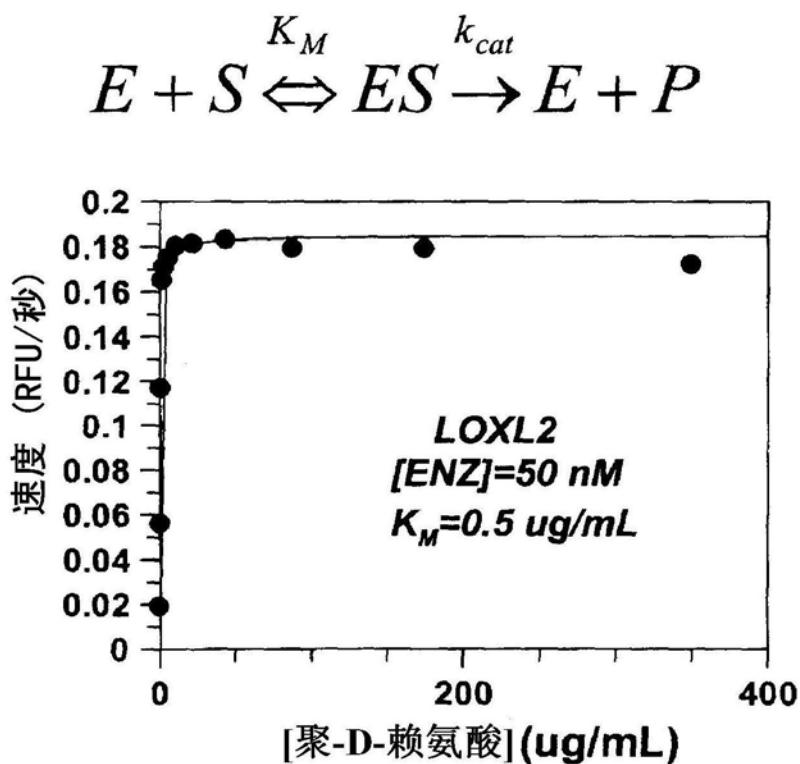


图1

酶促抑制作用的普通模式

竞争性抑制

- 抑制剂通常与底物具有结构相似性
- 抑制作用在底物浓度低时显著，但在底物浓度高时可克服

无竞争性抑制

- 抑制剂与在底物结合活性位点后可用的位点结合
- 抑制作用在底物浓度高时最显著

非竞争性抑制

- 抑制剂与远离底物结合位点的位点结合
- 在所有底物浓度上，相对抑制作用通常相同

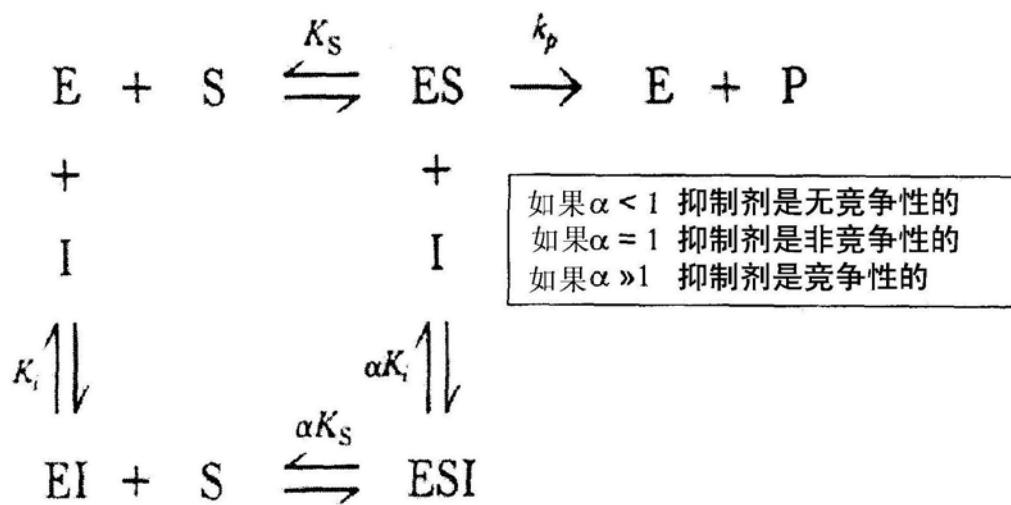


图2

β APN是LOXL2的竞争性抑制剂

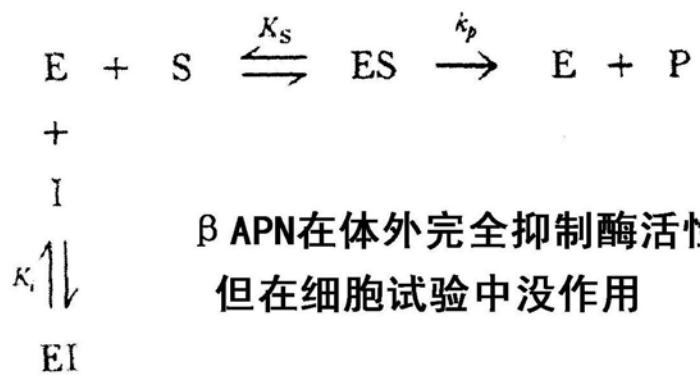
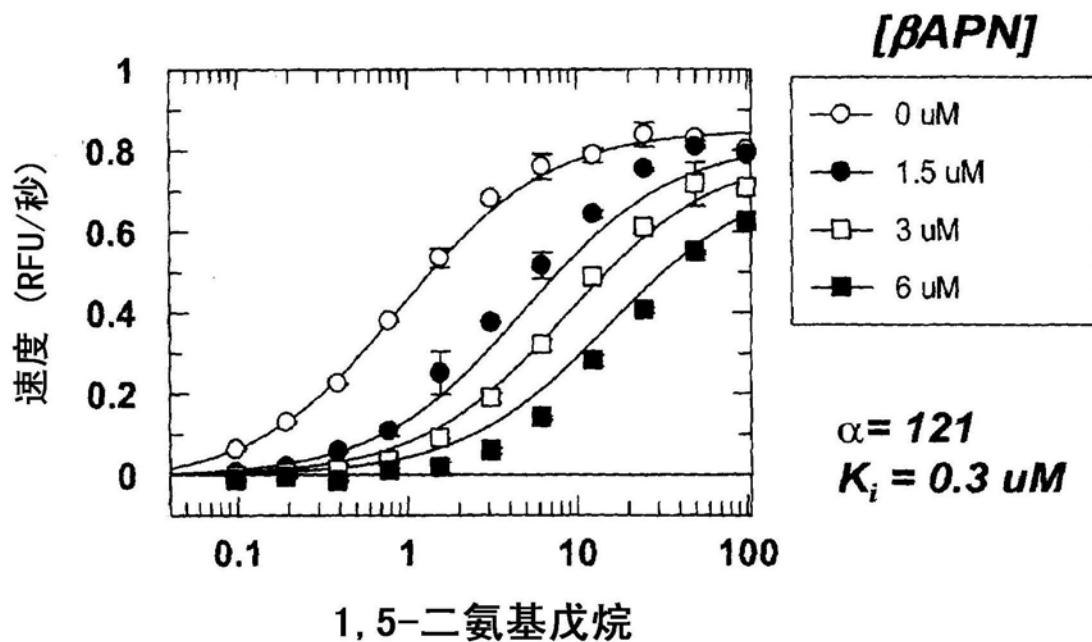


图3

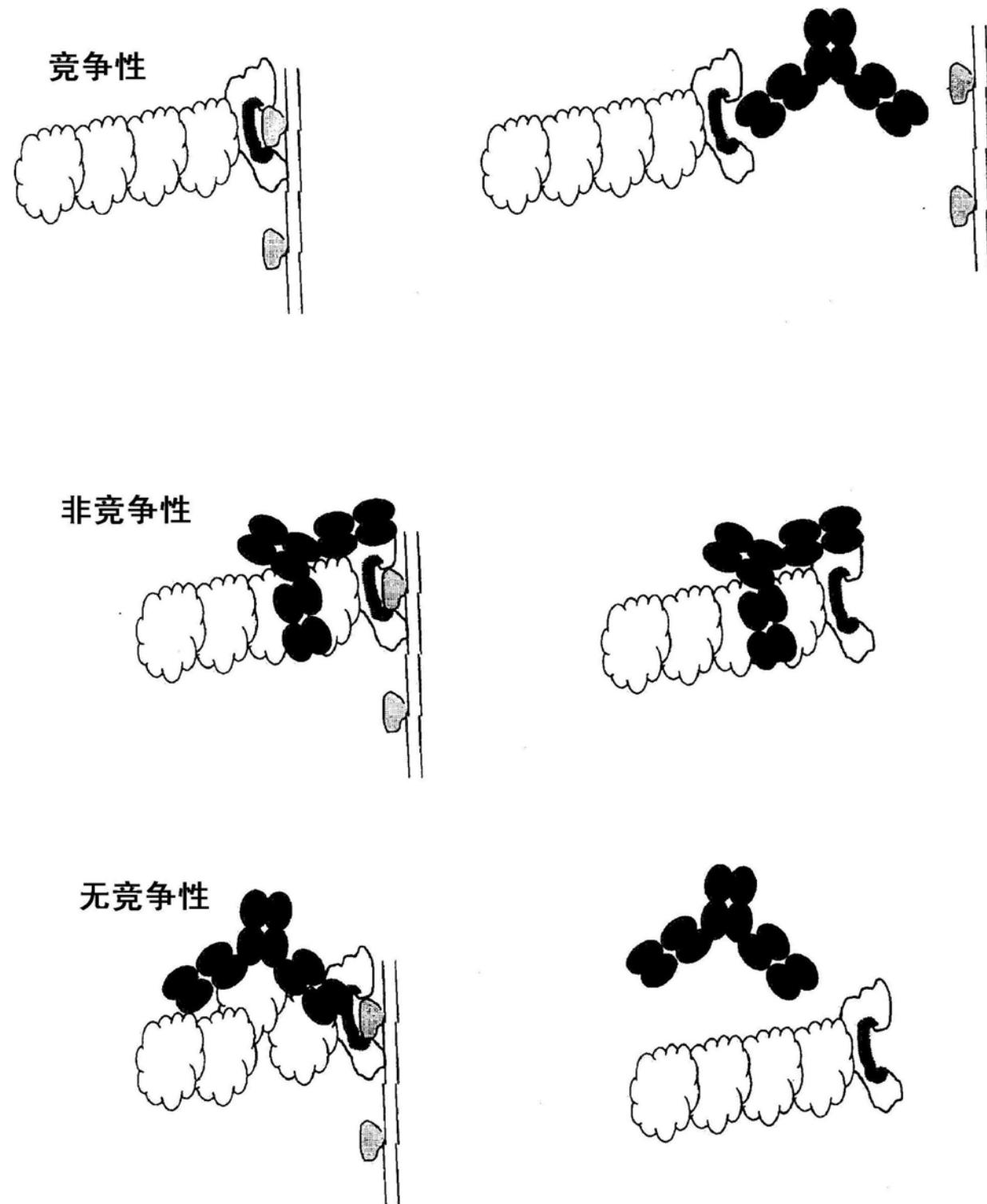
酶促抑制作用：LOXL2的普通模式

图4

胞外LOXL2：定位和功能

在高细胞密度时，LOXL2分泌并检测到与基质结合，
在条件培养基中，阻断抗体在理想情况下结合所有状态
并抑制所有活性

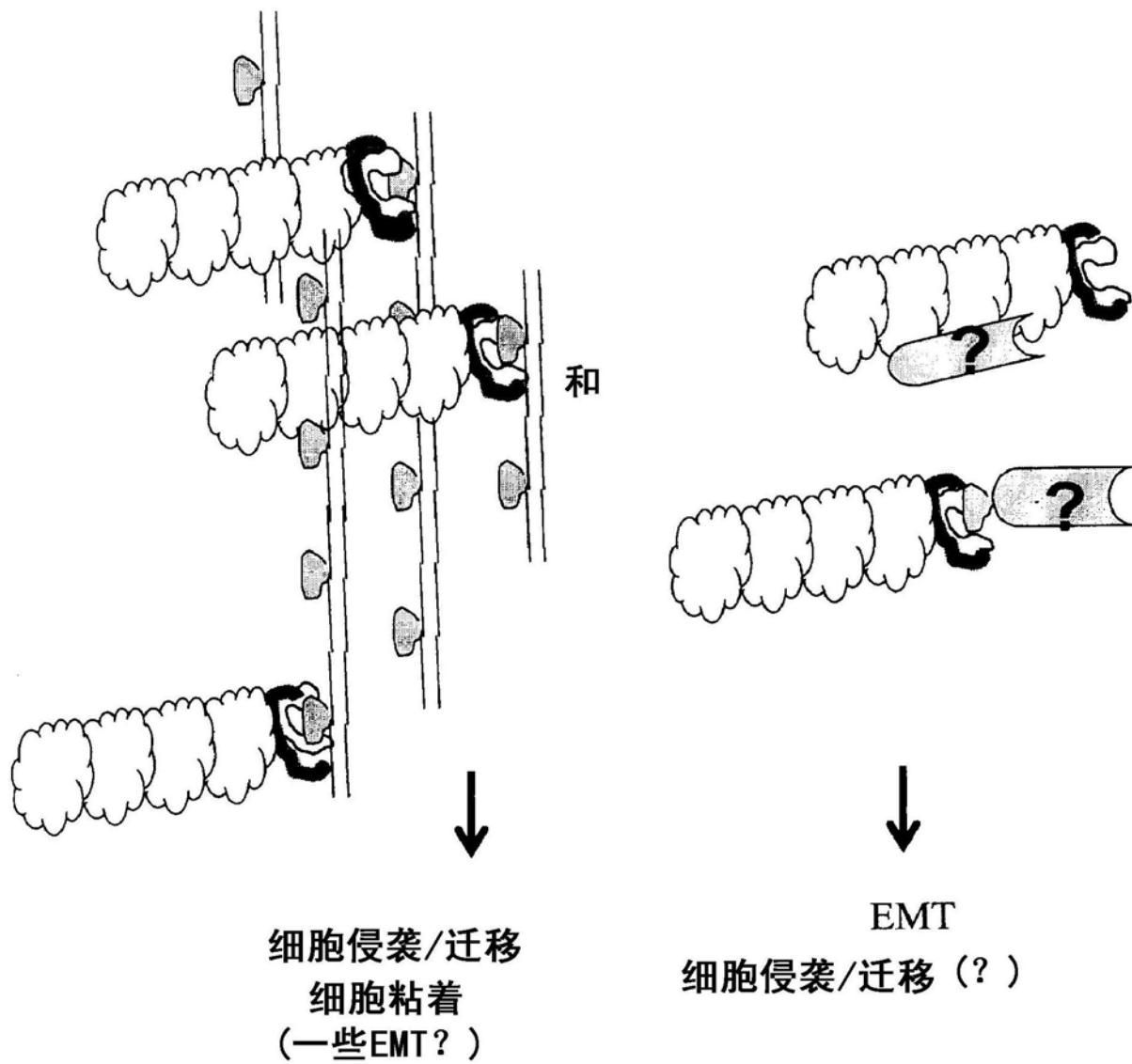


图5

鼠单克隆抗-L0XL2抗体

A. 可变重链

*MEWSR VFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTS
VKVSCKASGYAFTYYLIEWVKQRPGQGLEWIGVI
NPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTA YMQLSS
LTSDDSAVYFCARNWMNF DYWGQGTTLVSS
(SEQ ID NO: 1)*

B. 可变轻链

*MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPS VSVTPG
ESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYWFLQRPGQSPQFL
IYRMSNLASGVVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED
VGVYYCMQHLEYPYTFGGGT KLEIK
(SEQ ID NO: 2)*

图6

抗-LOX抗体

A. 可变重链

*MGWSWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVKPGASVKLSC
KASGYTFRSYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTKYNEK
FKGKAILTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARVYYAMD
YWGQGTSVTVSS...(SEQ ID NO: 3)*

B. 可变轻链1

*MKLPVRLVMFWIPASSSDVLLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS
QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRF
GGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGYYCFQSSHIPLTFGAGTKLE
LKRAD...(SEQ ID NO: 4)*

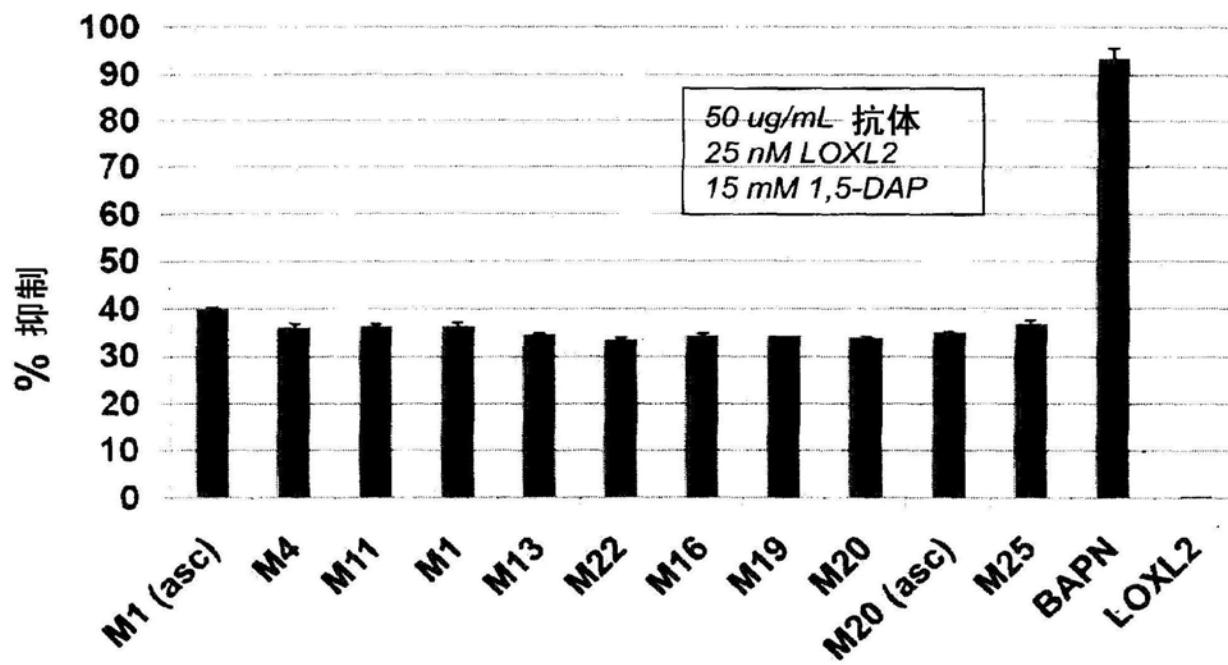
C. 可变轻链2

*MKLPVRLVMFWIPASSSDVLLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS
QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSIRFSGVPDRFG
GGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGYYCFQSSHIPLTFGAGTKLE
KRAD...(SEQ ID NO: 5)*

图7

抗-LOXL2抗体：蛋白质筛选B升级方案

评估LOXL2酶活性

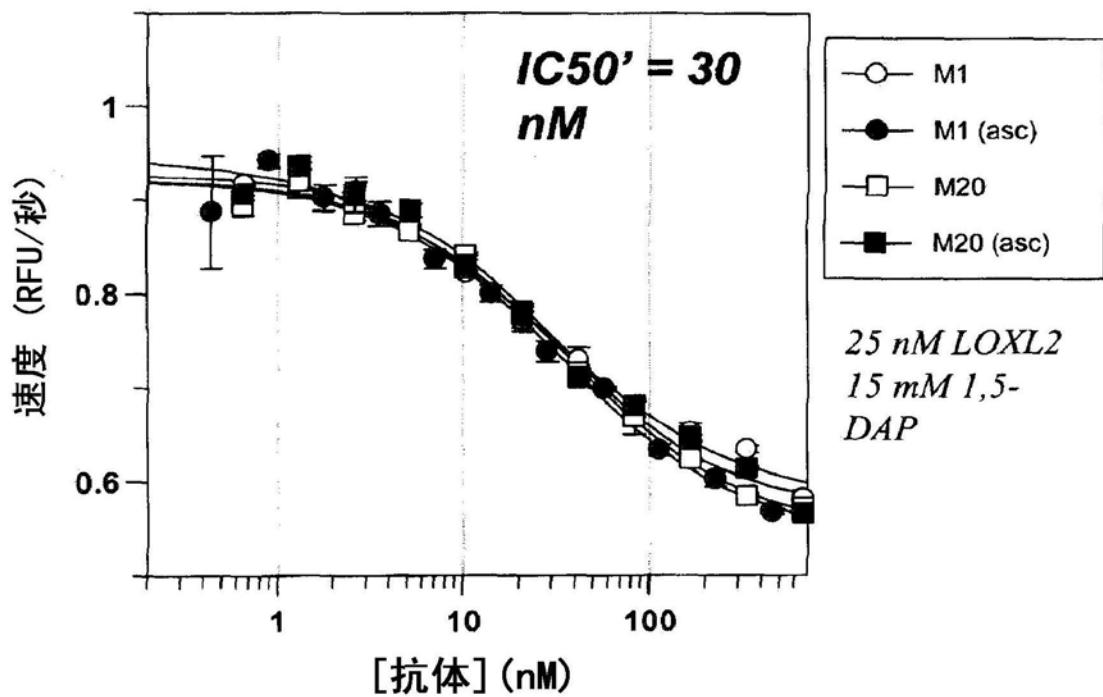


命名为AB0023的抗-LOXL2抗体

- 在酶试验中， α -LOXL2抗体重复了在10 ml制备物中观察到的抑制活性
- 在细胞试验中也重现了抑制作用
- 序列分析证实M01、M16、M19、M20相同。

图8

抗-LOXL2抗体AB0023和酶活性



AB0023是LOXL2酶活性的部分抑制剂，表观IC50约为30 nM。

图9

抗-LOXL2抗体AB0023：非竞争性抑制剂

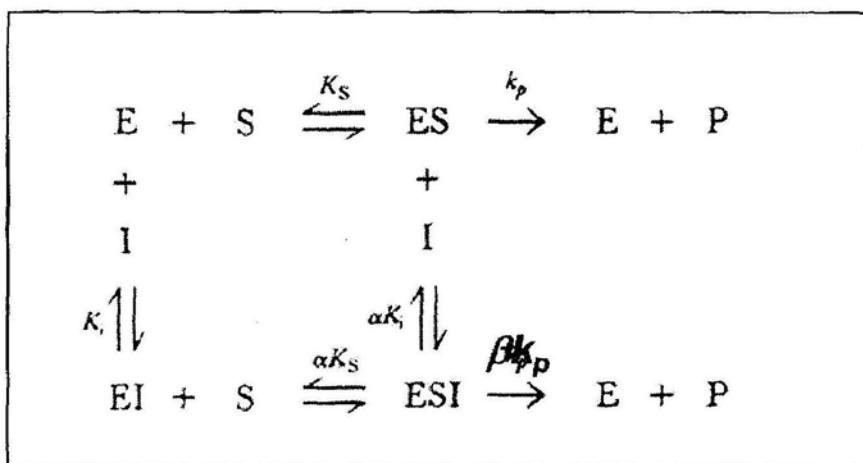
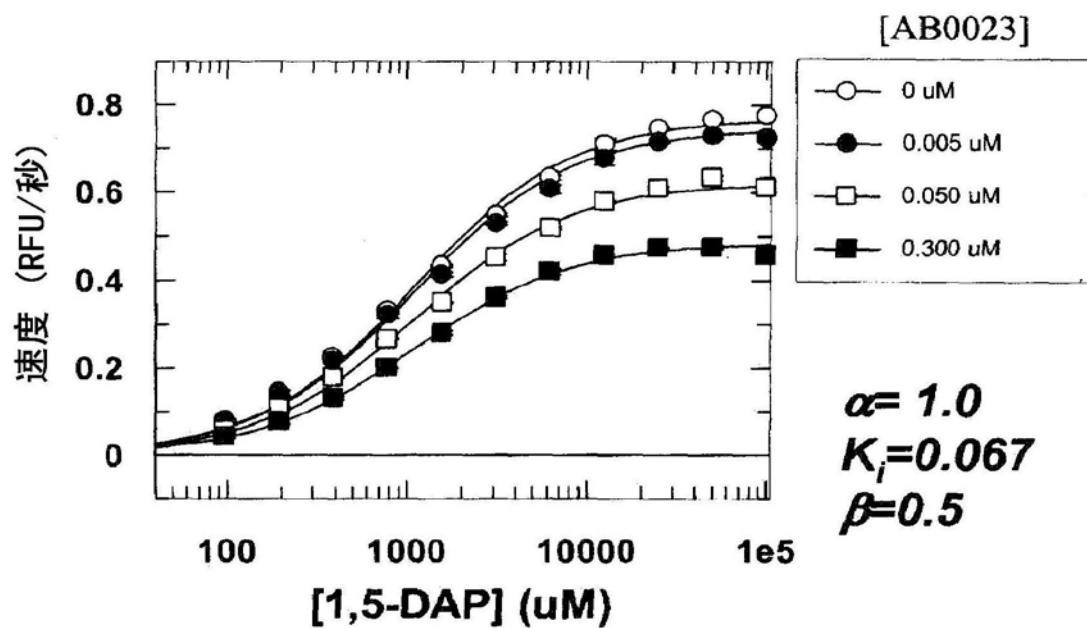
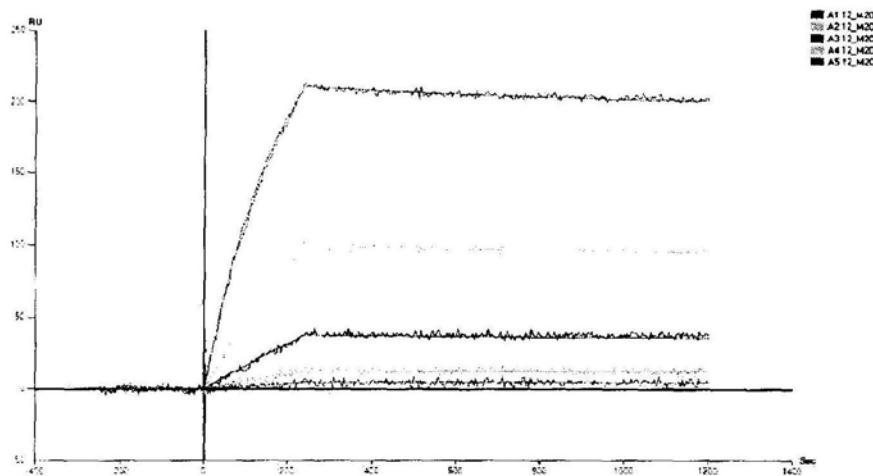


图10

抗-LOXL2抗体AB0023：结合亲和力和解离速率



采用ProteOn进行分析

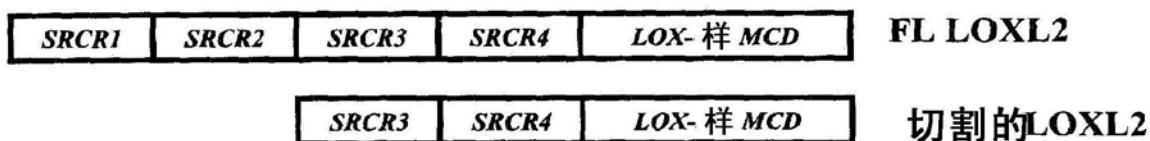
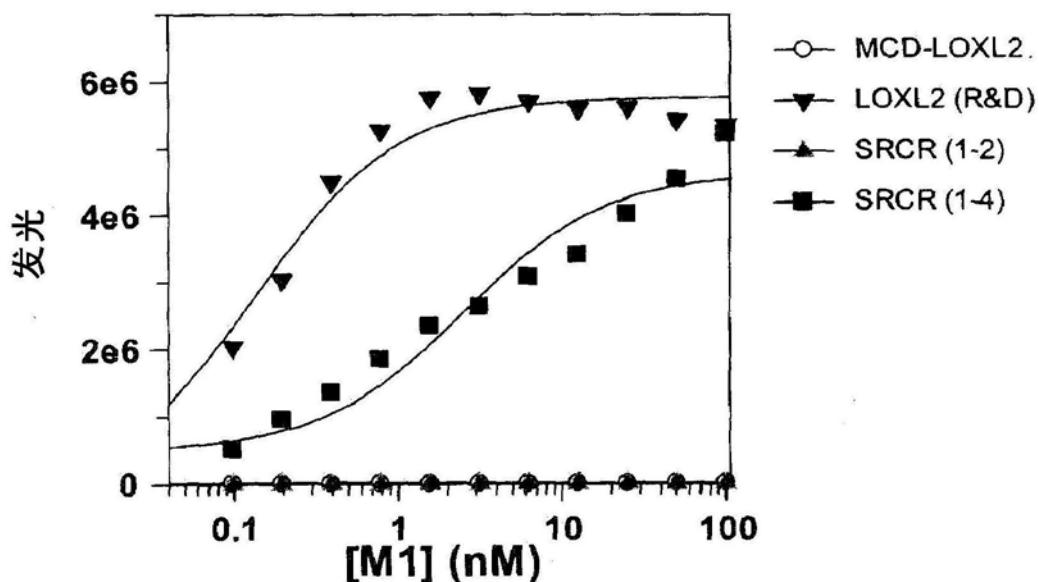
1 ug/ml AB0023 (M20) 固定在芯片上
将各种浓度的LOXL2施加于芯片

- $k_{on} = 1.68 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$
- $k_{off} = 1.17 \times 10^{-4} s^{-1}$
- $K_D = 0.69 nM$
- $t_{1/2} = 98.7 min$

抗体结合非常牢固，释放极其缓慢
各种方法得到的Kd估计值为0.1-1.0 nM

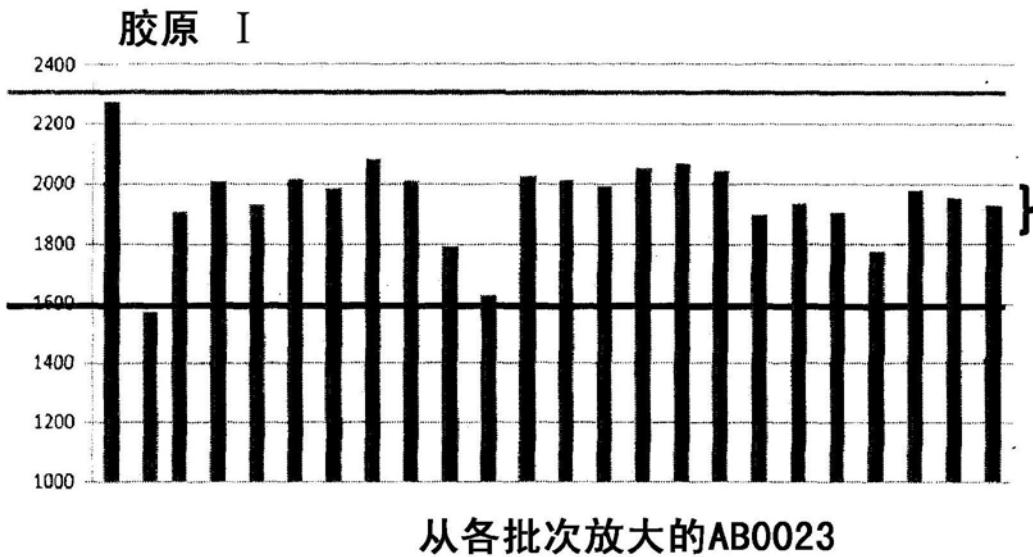
图11

抗-LOXL2抗体AB0023结构域作图
AB0023结合SRCR 3-4结构域



AB0023结合SRCR 3-4结构域

图12

抗-LOXL2抗体AB0023：细胞试验

- 在胶原I和胶原IV中，来自10 ml制备物和放大的100 ml制备物及腹水的上清液的抗-LOXL2抗体一致地抑制迁移/侵入
- 在细胞粘着试验中还观察到部分抑制

图13

A. AB0023 (hL0XL2蛋白质筛选B克隆M20) VH 与 人源化变体1-4

CDR1	GYAFTTYLIE
CDR2	VTPGSGGTNYNEKFKG
CDR3	NWMNFDY

与小鼠单克隆抗体不同的人源化AB0023中的残基(斜体下划线显示)

M20 VH.蛋白
VH 变体 1.蛋白
VH 变体 2.蛋白
VH 变体 3.蛋白
VH 变体 4.蛋白

M20 VH.蛋白
VH 变体 1.蛋白
VH 变体 2.蛋白
VH 变体 3.蛋白
VH 变体 4.蛋白

MEWSRVRIFILLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVLRPGTSVKVSCKASG~~Y~~AFTTYLIEWVKQRPQGLEWIGVI
- - - - - QVOLVQSGAELKKPGASVKVSCKASG~~Y~~AFTTYLIEWVKQAPQGLEWIGVI
- - - - - QvOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG~~Y~~AFTTYLIEWVKQAPQGLEWIGVI
- - - - - QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG~~Y~~AFTTYLIEWVKQAPQGLEWIGVI
- - - - - QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG~~Y~~AFTTYLIEWVKQAPQGLEWIGVI

NPGSGGTNYNEKFKGRATLTADKSTSTAYMELSSRLSEDSAVTF CARNAWNFDYWGQGTTTVSS
NPGSGGTNYNEKFKGRATLTADKSTSTAYMELSSRLSEDTAVYF CARNAWNFDYWGQGTTTVSS
NPGSGGTNYNEKFKGRATLTADKSTSTAYMELSSRLSEDTAVYF CARNAWNFDYWGQGTTTVSS
NPGSGGTNYNEKFKGRATLTADKSTSTAYMELSSRLSEDTAVYF CARNAWNFDYWGQGTTTVSS

B. AB0023 (hL0XL2蛋白质筛选B克隆M20) VL(V_k) 与 人源化变体1-3

CDR1	RSSKSLLHSNGNTLY
CDR2	RMSNLAS
CDR3	MQHLEYPYT

与小鼠单克隆抗体不同的人源化AB0023中的残基(斜体下划线显示)

M20 VL.蛋白
V_k 变体 1.蛋白
V_k 变体 2.蛋白
V_k 变体 3.蛋白

M20 VL.蛋白
V_k 变体 1.蛋白
V_k 变体 2.蛋白
V_k 变体 3.蛋白

M20 VL.蛋白
V_k 变体 1.蛋白
V_k 变体 2.蛋白
V_k 变体 3.蛋白

MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPEGSVISCRSSSKLHNSNGNTLYWFLQRPGQSPQ
- - - - - DIVMTQTPLSVTPGQPASISCRSSSKLHNSNGNTLYWFLQKPGQSPQ
- - - - - DIVMTQTPLSVTPGQPASISCRSSSKLHNSNGNTLYWFLQKPGQSPQ
- - - - - DIVMTQTPLSVTPGQPASISCRSSSKLHNSNGNTLYWFLQKPGQSPQ

FLIYRMSNLASGVPDRFSGGGTAFTLIRSRVEADVGVYCMQHEYPTFGGGTKEIK
FLIYRMSNLASGVPDRFSGGGTAFTLKISRVEADVGVYCMQHEYPTFGGGTKVEIK
FLIYRMSNLASGVPDRFSGGGTDFTLKISRVEADVGVYCMQHEYPTFGGGTKVEIK
FLIYRMSNLASGVPDRFSGGGTDFTLKISRVEADVGVYCMQHEYPTFGGGTKVEIK

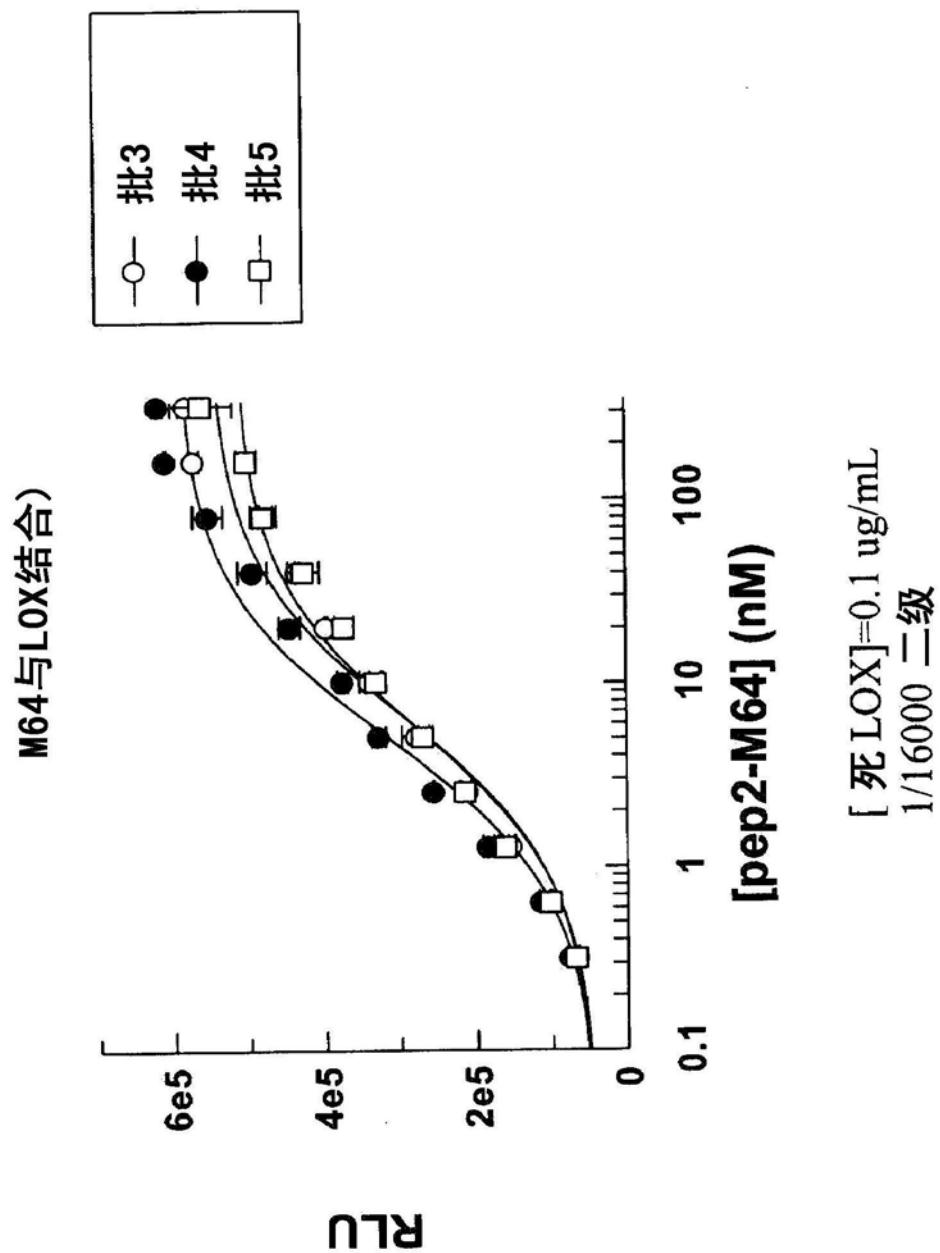


图15

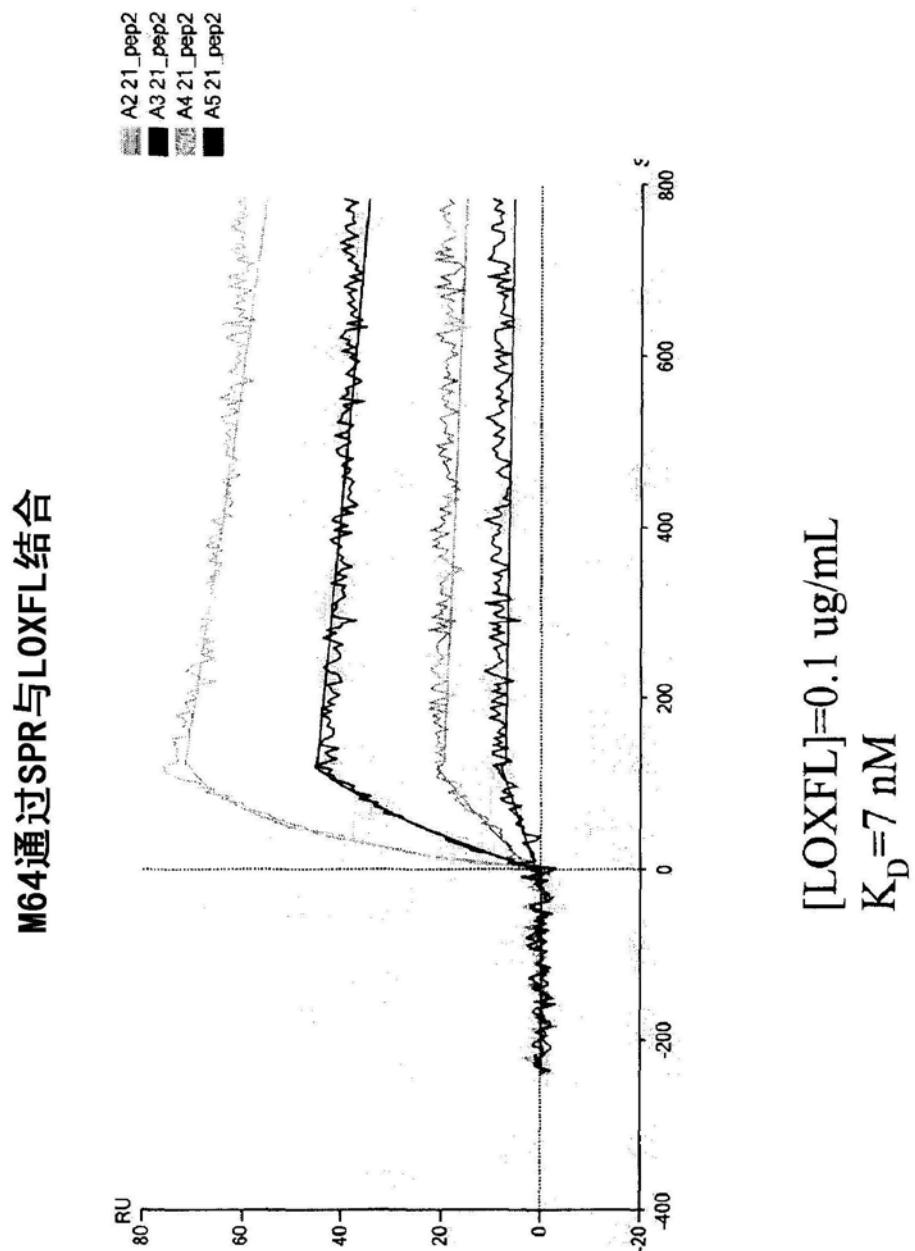


图16

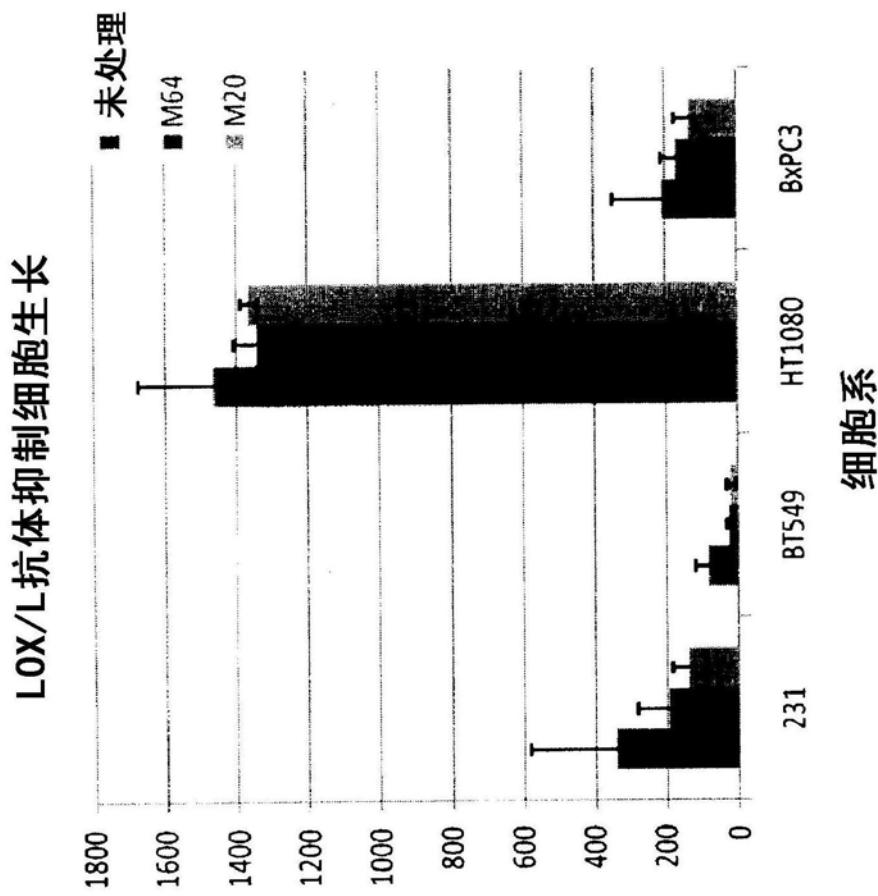
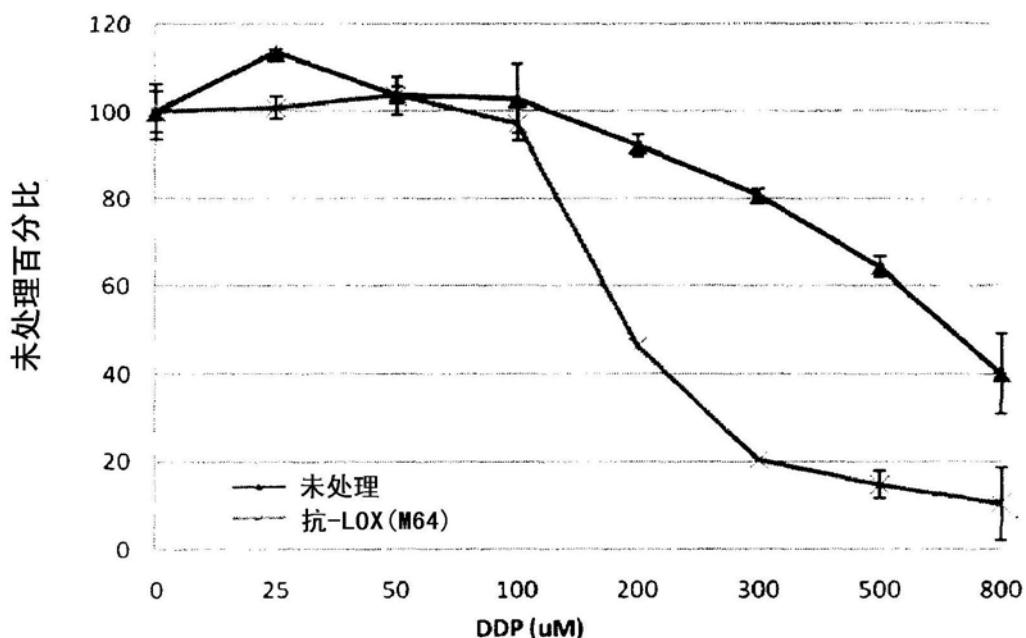


图17

顺铂和抗-LOX的协同作用
TC处理平板上MiaPaCa 2细胞系中的DDP敏感性

**IC50s**

细胞系	未处理 (uM)	抗-LOX (M64) (uM)
231	261.8±72.3	242.2±14.4
HT1080	207.5±6.9	194.2±22.7
MiaPaCa 2	664.6±112.8	174.7±5.7
BT549	384±244.3	197.3±28.5

图18