



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113544143 A

(43) 申请公布日 2021.10.22

(21) 申请号 202080017507.1

(22) 申请日 2020.01.28

(30) 优先权数据

62/797,573 2019.01.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/015457 2020.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/160022 EN 2020.08.06

(71) 申请人 查尔斯·J·罗瑟

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 查尔斯·J·罗瑟

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

G07K 14/52 (2006.01)

G07K 16/24 (2006.01)

G07K 14/00 (2006.01)

G07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书2页 说明书30页

序列表21页 附图39页

(54) 发明名称

用于治疗涉及CXCL1功能的疾病的组合物和方法

(57) 摘要

本公开涉及抗体(例如单克隆抗体)以及其在临床患者评估和治疗中的用途。本公开进一步涉及一种用于调节人CXCL-1蛋白(在下文中被称为CXCL1)的活性的方法。在一个方面中,本文所述的抗体能够被用作用于预防和/或治疗涉及CXCL1功能的疾病(例如病理性血管生成和炎症性疾病)的药物。

1. 一种分离的抗人趋化因子CXCL1单克隆抗体或其分离的抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与具有ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQ TEVIATLKNRGRKAC LNPASPIVKKIIEKMLNSDKSN (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的人趋化因子CXCL1蛋白结合。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的免疫球蛋白重链或其变体和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链或其变体。

3. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链的所述变体在SEQ ID NO:2的氨基酸序列中包含至少一个氨基酸添加、取代、插入和/或缺失。

4. 根据权利要求2或3所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白轻链的所述变体在SEQ ID NO:4的氨基酸序列中包含至少一个氨基酸添加、取代、插入和/或缺失。

5. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是通过使用杂交瘤克隆HL2401产生的。

6. 根据权利要求1到5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段用毒素标记。

7. 根据权利要求1到5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段用放射性核苷酸、荧光染料、荧光蛋白、酶、生物素和/或(链霉)亲和素标记。

8. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述放射性核苷酸是⁶⁴Cu、¹¹¹In、⁹⁹Tc、¹⁴C、¹³¹I、³H、³²P或³⁵S。

9. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述荧光染料是异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明、德克萨斯红、Cy3或Cy5。

10. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述荧光蛋白是藻红蛋白(PE)、别藻蓝蛋白(APC)或绿色荧光蛋白(GFP)。

11. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述酶是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖氧化酶。

12. 一种分离的核酸分子,其编码根据权利要求1到5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

13. 根据权利要求12所述的核酸分子,其中编码具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的所述免疫球蛋白重链的核酸分子包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列。

14. 根据权利要求12或13所述的核酸分子,其中编码具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的所述免疫球蛋白轻链的核酸分子包括SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

15. 一种包含根据权利要求12到14中任一项所述的核酸分子的载体。

16. 一种包含根据权利要求12到14中任一项所述的核酸分子或根据权利要求15所述的载体的宿主细胞。

17. 一种药物组合物,其包含选自由根据权利要求1到11中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求12到14中任一项所述的核酸分子、根据权利要求15所述的载体和根据权利要求16所述的宿主细胞组成的组的至少一种活性成分;和药学上可接受的载体,以及任选地药学上可接受的赋形剂和/或稳定剂。

18. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述药学上可接受的载体是盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和/或固体疏水性聚合物。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其中所述固体疏水性聚合物是薄膜、脂质体或微粒。

20. 根据权利要求17所述的组合物,其进一步包括佐剂。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述佐剂选自咪喹莫特、瑞西莫特、GM-CSF、环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐单抗、干扰素- α 、CpG、寡核苷酸和衍生物、聚-(I:C)和衍生物、RNA、西地那非和具有PLG和病毒体的颗粒形成物组成的组。

22. 一种治疗患有病理性血管生成疾病或由过度新生血管形成引起的疾病的患者的方法,其包括向所述患者施用根据权利要求1到11中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求12到14中任一项所述的核酸分子、根据权利要求15所述的载体和根据权利要求16所述的宿主细胞和/或根据权利要求17到21中任一项所述的组合物。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述病理性血管生成疾病或所述由过度新生血管形成引起的疾病选自具有异常血管生成的癌症、具有异常血管生成的眼科疾病、类风湿性关节炎、银屑病、血管瘤、子宫内膜异位和卡波西肉瘤组成的组。

24. 根据权利要求1到11中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求12到14中任一项所述的核酸分子、根据权利要求15所述的载体和根据权利要求16所述的宿主细胞和/或根据权利要求17到21中任一项所述的组合物作为用于治疗病理性血管生成疾病或由过度新生血管形成引起的疾病的药物的用途。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述病理性血管生成疾病或所述由过度新生血管形成引起的疾病选自具有异常血管生成的癌症、具有异常血管生成的眼科疾病、类风湿性关节炎、银屑病、血管瘤、子宫内膜异位和卡波西肉瘤组成的组。

26. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变结构域和轻链可变结构域,所述重链可变结构域包含由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR)1、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的CDR2和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR3,并且所述轻链可变结构域包含由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的CDR1、由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的CDR2和由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的CDR3。

27. 根据权利要求26所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:12或34的氨基酸序列。

28. 根据权利要求26所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:14、18、36或38组成的组的氨基酸序列。

29. 根据权利要求26所述的抗体或其抗原结合片段,其包含选自SEQ ID NO:16、20、22和24组成的组的氨基酸序列。

30. 根据权利要求26所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变结构域包含有包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的信号肽。

31. 根据权利要求30所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

32. 根据权利要求26所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变结构域包含有包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的信号肽。

33. 根据权利要求32所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:30或32的氨基酸序列。

用于治疗涉及CXCL1功能的疾病的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年1月28日提交的US 62/797,573的优先权。上述申请的内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 作为兼容的ASCII文本文件(.txt)提交的序列表的参考

[0004] 根据EFS-Web法律框架和37CFR§§1.821-825(参见MPEP§2442.03(a)),以ASCII兼容的文本文件形式的序列列表(名称为“3000047-002977_Sequence_Listing_ST25.txt”,创建于2020年1月27日并且大小为39,072字节)与本申请同时提交,并且序列表的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0005] 本公开涉及抗体,例如单克隆抗体,及其在临床患者评估和治疗中的用途。本公开进一步涉及一种用于调节人趋化因子(C-X-C基序)配体1 CXCL-1蛋白(在下文中被称为CXCL1)的活性的方法。在一个方面中,本文所述的抗体能够用作用于预防和/或治疗涉及CXCL1功能的疾病的药物,所述疾病为例如病理性血管生成、炎症疾病和癌症。

背景技术

[0006] 血管生成是一个涉及从已有血管生长新血管的过程。在健康成人中,血管生成在大多数器官中是静止的,然而,血管生成可能在某些病理条件下发生,如在良性或恶性肿瘤生长、视网膜障碍和伤口愈合期间。靶向血管生成以用于治疗癌症是在20世纪70年代提出的,并且临床研究已经导致多种治疗化合物的开发,包括靶向肿瘤发展的这一重要方面的人源化单克隆抗体。靶向血管生成因子VEGF(血管内皮生长因子)的一种人源化单克隆抗体(mAb)贝伐单抗已经获得美国食品和药物管理局(FDA)批准,以用于治疗与标准化疗剂相关的癌症。然而,单独靶向VEGF仅是部分成功的。逃避治疗可能通过各种机制产生,因此仍然需要额外的抗血管生成化合物,其可以单独使用或与抗癌治疗(包括其它mAb)联合使用,以改善癌症患者的临床管理和结局。

[0007] 已知趋化因子(也被称为趋化细胞因子)通过调节细胞从先天免疫系统和适应性免疫系统向病变组织的募集,是炎症反应的关键介质。某些趋化因子的表达和活性失调与癌症的发生和进展有关。具体而言,慢性趋化因子暴露与巨噬细胞和T细胞积聚、巨噬细胞的慢性活化、异常血管生成以及由活性氧物质的存在导致的DNA损伤有关。此外,已知趋化因子调节肿瘤进展期间的关键过程,包括原发性肿瘤生长、肿瘤血管生成和转移性疾病的发展。趋化因子还可能增强上皮-基质相互作用,促进肿瘤生长和侵袭。

[0008] 例如,已知以ELR基序为特征的趋化因子,如人CXCL1/生长相关癌基因(GRO)在体外和体内诱导血管生成。CXCL1结合至并激活趋化因子受体CXCR2,CXCR2被认为是血管生成反应中的关键受体。CXCL1对中性粒细胞具有强效活性,诱导这些细胞显著募集到炎症部位中。中性粒细胞可以合成并储存具有已知血管生成活性的分子,包括血管内皮生长因子(VEGF-A)、CXCL8/IL-8、CXCL1/GRO以及肝细胞生长因子,表明中性粒细胞在由CXC-ELR⁺趋

化因子(包括CXCL1)诱导的血管生成过程中可能发挥关键作用。

[0009] 人CXCL1也起肿瘤相关因子的作用。已经表明,在患有恶性肿瘤(如尿路上皮癌、大肠癌、卵巢癌或恶性黑色素瘤)的患者的组织或血液中,人CXCL1的量在基因水平和蛋白水平上波动。

[0010] US 9,309,312公开了纯化的抗人CXCL1单克隆抗体或其纯化的抗原结合片段,其特异性地识别CXCL1蛋白的若干个氨基酸序列区域。US 9,309,312还公开了在免疫测定方法中使用这些抗体或片段来测量人CXCL1蛋白。

[0011] US 20160108117公开了针对CXCL1的抗体或其片段,所述抗体或片段能够以如通过表面等离子体共振测定的至多16nM的平衡解离常数(KD)结合至人趋化因子CXCL1。US 20160108117还公开了将这些抗体或片段用于病理性血管生成疾病或以受试者中不期望的过度新生血管形成为特征的疾病的体外诊断和/或预后方法中。

[0012] 有利地,本文提供的用于阻断CXCL1的新材料和方法克服了当前血管生成抑制剂药物的不足。本公开的抗CXCL1 mAb可以解决上述局限性。

[0013] 仍然需要开发可以治疗和/或预防涉及病理性血管生成的疾病的更好的方法和组合物。该技术问题的解决方案由权利要求中表征的实施例提供。

发明内容

[0014] 在一个方面中,本公开提供了抗人趋化因子CXCL1单克隆抗体或其抗原结合片段。在另一个方面中,抗体是分离的或重组的。

[0015] 在又一个方面中,本公开提供了抗人趋化因子CXCL1单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与具有ASVATELRCQCLQTLQG IHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNRKAACLNPA S PIVK K I I E K M L N S D K S N (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的人趋化因子CXCL1蛋白结合。

[0016] 在另一个方面中,本文所述的抗体包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的免疫球蛋白重链或其变体和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链或其变体。

[0017] 本公开进一步提供了一种抗体或其抗原结合片段,其中免疫球蛋白重链的变体在SEQ ID NO:2的氨基酸序列中包含至少一个氨基酸添加、取代、插入和/或缺失。在另一个方面中,免疫球蛋白轻链的变体在SEQ ID NO:4的氨基酸序列中包含至少一个氨基酸添加、取代、插入和/或缺失。

[0018] 在另一个方面中,通过使用杂交瘤克隆HL2401产生本文所述的抗体或抗原结合片段。

[0019] 在一个方面中,本文所述的抗体或其抗原结合片段用毒素标记。在另一个方面中,本文所述的抗体或其抗原结合片段用放射性核苷酸、荧光染料、荧光蛋白、酶、生物素和/或(链霉)亲和素标记。在又一个方面中,放射性核苷酸是⁶⁴Cu、¹¹¹In、⁹⁹Tc、¹⁴C、¹³¹I、³H、³²P或³⁵S。在一个方面中,荧光染料是异硫氰酸荧光素(FITC)、若丹明、德克萨斯红、Cy3或Cy5。在另一个方面中,荧光蛋白是藻红蛋白(PE)、别藻蓝蛋白(APC)或绿色荧光蛋白(GFP)。本文所述的酶可以选自由辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖氧化酶组成的组。

[0020] 在一个方面中,本公开提供了一种编码本文所述的抗体或其抗原结合片段的分离的核酸分子。

- [0021] 本公开进一步提供了一种包含本文所述的核酸分子的载体。
- [0022] 在一个方面中,本公开进一步提供了包含本文所述的核酸分子或载体的宿主细胞。
- [0023] 本公开进一步提供了一种药物组合物,其包含选自由本文所述的抗体或其抗原结合片段组成的组的至少一种活性成分、药学上可接受的载体和任选地药学上可接受的赋形剂和/或稳定剂。
- [0024] 本公开进一步提供了一种通过将化合物、组合物、抗体或其抗原结合片段施用给有需要的患者或个体来治疗患者或个体的方法。在一个方面中,所述患者或个体患有病理性血管生成疾病或由过度新生血管形成引起的疾病。在另一个方面中,病理性血管生成疾病或由过度新生血管形成引起的疾病选自由具有异常血管生成的癌症、具有异常血管生成的眼科疾病、类风湿性关节炎、银屑病、血管瘤、子宫内膜异位和卡波西肉瘤组成的组。
- [0025] 本公开进一步提供了一种使用本文所述的抗体或其抗原结合片段来检测样品中的人CXCL1的方法。
- [0026] 在另一个方面中,本文所述的抗体包含重链可变结构域和轻链可变结构域,所述重链可变结构域包含由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR)1、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的CDR2和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR3,并且所述轻链可变结构域包含由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的CDR1、由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的CDR2和由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的CDR3。
- [0027] 在另一个方面中,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:12或34的氨基酸序列。
- [0028] 在另一个方面中,所述重链可变结构域包含选自由SEQ ID NO:14、18、36或38组成的组的氨基酸序列。
- [0029] 在另一个方面中,所述抗体包含选自由SEQ ID NO:16、20、22和24组成的组的氨基酸序列。
- [0030] 在另一个方面中,所述轻链可变结构域包含有包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的信号肽。
- [0031] 在另一个方面中,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。
- [0032] 在另一个方面中,所述重链可变结构域包含有包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的信号肽。
- [0033] 在另一个方面中,所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:30或32的氨基酸序列。

附图说明

- [0034] 本专利或申请文件包含至少一幅彩色绘图。本专利或专利申请出版物的带彩色绘图的副本在请求并支付必要的费用后将由专利局提供。
- [0035] 图1A示出了抗CXCL1中和单克隆小鼠抗体(HL2401)与重组人CXCL1结合,但不与小鼠和大鼠CXCL1结合。
- [0036] 图1B示出了在PBS和血清中CXCL1的表观亲和结合常数(K_D)值。
- [0037] 图1C示出了免疫沉淀,随后进行LC/MS-MS分析,确认HL2401与CXCL1特异性结合。
- [0038] 图1D示出了使用HL2401杂交瘤细胞系的总RNA提取。
- [0039] 图1E示出了使用HL2401 cDNA作为模板的PCR扩增。

- [0040] 图1F示出了HL2401克隆的轻链(VL)中互补决定区(CDR)的编号和区域。
- [0041] 图1G示出了HL2401克隆的重链(VH)中CDR的编号和区域。
- [0042] 图1H示出了使用Rosetta同源性建模服务器的小鼠序列的同源性建模。
- [0043] 图1I示出了扩增的VH、VL和scFv片段的琼脂糖凝胶电泳。
- [0044] 图1J示出了使用HL2401 scFv蛋白的蛋白质印迹分析。
- [0045] 图1K为抗Myc标签单克隆抗体。
- [0046] 图1L示出了ELISA信号,其指示HL2401_scFv蛋白与人CXCL1蛋白相互作用。
- [0047] 图2A示出了人细胞系T24、DU145和PC3表达一系列CXCL1水平。
- [0048] 图2B示出了CXCL1蛋白在稳定转染的细胞中表达。
- [0049] 图2C示出了在体外迁移和侵袭测定中,稳定转染的细胞的迁移潜能。
- [0050] 图2D示出了在管形成测定中,由受稳定转染的细胞影响的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)形成的结构的总长度。
- [0051] 图3A示出了在体外增殖测定中,HL2401对人细胞的增殖的影响。
- [0052] 图3B示出了在体外侵袭测定中,HL2401对人细胞系的侵袭潜能的影响。
- [0053] 图3C示出了HL2401对HUVEC管长度的影响。
- [0054] 图4A示出了在腹膜内施用后HL2401的血浆浓度。
- [0055] 图4B和4C示出了在单次注射HL2401之后,放射性标记的HL2401抗体迅速分布。
- [0056] 图4D示出了离体生物分布数据。
- [0057] 图5A示出了在施用HL2401的情况下无毒性。
- [0058] 图5B示出了在T24和PC3异种移植瘤上对CXCL1的免疫荧光染色。
- [0059] 图6A和6B示出了来自用HL2401治疗的动物的肿瘤中的凋亡指数。
- [0060] 图7示出了使用Rosetta同源性建模服务器的小鼠和人源化模板序列的同源性建模。
- [0061] 图8示出了使用Rosetta同源性建模服务器的小鼠和人源化模板序列的同源性建模。
- [0062] 图9示出了根据本公开的一个实施例的序列比对。
- [0063] 图10示出了根据本公开的另一个实施例的序列比对。
- [0064] 图11A-11C示出了抗原CXCL1和阴性对照蛋白被电泳并转印到硝酸纤维素膜。
- [0065] 图12示出了在大肠杆菌中表达并纯化的HL2401_scFv蛋白的人源化版本,其通过抗His标签抗体检测。
- [0066] 图13示出了在ELISA和蛋白质印迹分析中H2407_scFv形式抗体蛋白的人源化版本与人CXCL1抗原特异性结合。
- [0067] 图14示出了根据本公开的一个实施例的人源化基因的轻链和重链的克隆的示意图。
- [0068] 图15示出了ELISA结果。
- [0069] 图16A-16C示出了抗原人CXCL1和具有鸡溶菌酶蛋白的阴性对照细菌细胞裂解物被电泳并转印到硝酸纤维素膜。
- [0070] 图17A和17B示出了根据本公开的一个实施例的纯化样品的亲和纯化色谱图。
- [0071] 图18A和18B示出了根据本公开的一个实施例的纯化样品的SDS-PAGE凝胶电泳。

[0072] 图19A-19H示出了人源化的抗人CXCL1抗体HumBB2401(也被称为BB2401)和Hum2401在抑制内皮细胞萌芽方面与阿瓦斯汀(Avastin)一样有效。

[0073] 图20A-20F示出了人源化的抗人CXCL1抗体HumBB2401(也被称为BB2401)和Hum2401在抑制内皮细胞管形成方面与阿瓦斯汀一样有效。

具体实施方式

[0074] 本公开证明了过度表达Bcl2原癌基因的人前列腺癌细胞的血管生成潜能增加。具体而言,增加的Bcl2表达增强了人前列腺癌异种移植物的致瘤和血管生成能力。例如,在来自Bcl2过表达的人前列腺癌细胞的条件下培养基中培养人内皮细胞(HUVEC和HDMEC)导致增殖率提高和关键抗凋亡基因/蛋白的表达。这可能提供了相对于在来自具有低Bcl2表达的癌细胞的条件下培养基中生长的内皮细胞的存活优势。处理的内皮细胞和未处理的内皮细胞的比较基因组分析揭示了约250个差异表达的基因($p < 0.001$)。在验证研究之后,趋化因子CXCL1在若干个感兴趣的分泌蛋白中脱颖而出(倍数变化3.96, $p < 2.22E-16$)。

[0075] CXCL1,与G蛋白偶联受体CXCR2相互作用的分泌型生长因子,不仅在血管生成中而且还在炎症中发挥重要作用,并且是中性粒细胞的已知化学引诱剂。通过一系列研究,本发明人表明CXCL1通过调节EGF和ERK 1/2信号传导影响新生血管生成,并且通过提高细胞周期蛋白D3和cdk4水平影响细胞增殖,并且在体外和体内研究中证实了CXCL1在肿瘤建立和存活中的作用。

[0076] 鉴于CXCL1在血管生成中的作用,可以通过阻断CXCL1与CXCR2的结合来抑制血管生成,从而治疗疾病。因此,阻断CXCL1途径的药物制剂能够治疗多种血管生成依赖性疾病,包括但不限于癌症。

[0077] 单克隆抗体(mAb)由于其以高特异性结合至靶标的能力、血浆半衰期长且毒性/副作用低而成为一类新的治疗剂。此外,随着全人类抗体技术的出现,免疫原性问题被避免。因此,单克隆抗体已成为药物组合物的主要成分。

[0078] 目前,还没有公开含有与本公开相同或相似的氨基酸序列的mAb用于抑制血管生成和治疗癌症和其它血管生成依赖性疾病。

[0079] 本公开提供了特异性地结合至CXCL1的mAb。CXCL1 mAb不仅可以结合CXCL1,而且还可以中和CXCL1。

[0080] 在一个实施例中,本公开描述了结合至CXCL1的抗体或其部分。

[0081] 在另一个实施例中,抗体可以用于阻断血管生成,包括治疗血管生成依赖性疾病。此类障碍包括但不限于视网膜病、年龄相关性黄斑变性、慢性关节风湿病和银屑病、与血管的不适当的或不合时宜的侵袭相关的障碍,如糖尿病性视网膜病、新生血管性青光眼、再狭窄、动脉粥样硬化斑块和骨质疏松症中的毛细血管增生,以及与癌症相关的障碍,如实体瘤、实体瘤转移、血管纤维瘤、晶状体后纤维增生、血管瘤、卡波西肉瘤和所有可能需要新生血管形成以支持肿瘤生长的癌症。

[0082] 在另一个实施例中,本公开还提供了包含编码此类抗体的核苷酸序列的核酸;包含此类核酸的载体;包含此类核酸和/或载体的宿主细胞和生物体;和组合物,如药学上可接受的组合物和试剂盒,其包含此类蛋白质、核酸、载体和/或细胞,并且通常包含一种或多种另外的成分,所述成分可以是促进组合物的配制、递送、稳定性或其它特性的活性成分或

非活性成分(例如,各种载体)。

[0083] 在另一个实施例中,本公开还提供了包含编码此类抗体的氨基酸序列的氨基酸。

[0084] 在另一个实施例中,本公开进一步提供了抗体或其片段在调节CXCL1介导的生物活性中的用途,例如,在治疗与其相关的血管生成依赖性疾病中抑制血管内皮细胞增殖和血管生成。

[0085] 有利地,本文提供的用于阻断CXCL1与其同源受体即CXCR2结合的材料和方法克服了当前血管生成抑制剂药物的不足。本公开的抗体靶向不同于经典VEGF/VEGFR途径的独立血管生成途径。CXCL1趋化因子途径是血管生成性的和炎性的。此外,CXCL1趋化因子可以诱导自分泌增殖途径,因为肿瘤细胞表达受体CXCR1和CXCR2。因此,通过抑制CXCL1趋化因子,本公开的抗体或其片段可以抑制血管生成、炎症和增殖。

[0086] 在另一个实施例中,根据本公开的mAb可以被用作药物。特别地,mAb可以用于治疗血管生成依赖性疾病。

[0087] 如本文使用的术语“人CXCL1”是指包含根据Genbank NM_001511的氨基酸序列的蛋白质或其天然突变体。术语“天然突变体”是指在自然界中存在的突变体。此类突变体的示例包括包含在人CXCL1的上述氨基酸序列中具有一个或若干个氨基酸的缺失、取代、添加或插入的氨基酸序列的突变体,以及与人CXCL1的上述氨基酸序列具有95%或更多,优选地98%或更多,并且更优选地99%或更多氨基酸序列同一性的突变体。在本文中,术语“同一性”是指当两个氨基酸序列比对时,所讨论的氨基酸序列中与人CXCL1的氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基的总数的百分比(%),使得在两者之间达到最高可能的一致程度。在这种情况下,可以通过引入间隙或不引入间隙进行序列比对,并且当计算百分比时,包括引入的间隙的数目。此外,术语“若干个”是指2到10之间的整数,如2到7、2到5、2到4以及2到3。天然突变体的具体示例包括基于多态性(如SNP(单核苷酸多态性))的突变体和剪接突变体。上述取代优选地为保守氨基酸取代。如果取代是保守氨基酸取代,则由保守氨基酸取代产生的突变体可以具有与具有上述氨基酸序列的人CXCL1的结构或性质基本上相同的结构或性质。作为保守性氨基酸,例如,非极性氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和色氨酸)和极性氨基酸(除非极性氨基酸以外的氨基酸)、带电荷的氨基酸(酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)和碱性氨基酸(精氨酸、组氨酸和赖氨酸))和不带电荷的氨基酸(除带电荷的氨基酸以外的氨基酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)、支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)和脂肪族氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)是已知的。

[0088] 在一个实施例中,保守取代可以包括由Dayhoff在“蛋白质序列和结构的图谱(The Atlas of Protein Sequence and Structure),第5卷”《国家生物医学研究(Natl.Biomedical Research)》中描述的那些,其内容通过引用以其整体并入本文。例如,在一个方面中,属于下列组中的一个的氨基酸可以互换,从而构成保守交换:第1组:丙氨酸(A)、脯氨酸(P)、甘氨酸(G)、天冬酰胺(N)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);第2组:半胱氨酸(C)、丝氨酸(S)、酪氨酸(Y)、苏氨酸(T);第3组:缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、丙氨酸(A)、苯丙氨酸(F);第4组:赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H);第5组:苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)、组氨酸(H);以及第6组:天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)。在一个方面中,保守氨基酸取代可以选自以下T→A、G→A、A→I、T→V、A→M、T→I、A→V、T→G和/或T→S。

[0089] 在另外的实施例中,保守氨基酸取代可以包括氨基酸被相同类别的另一个氨基酸取代,例如,(1)非极性的:Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp;(2)不带电荷的极性的:Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln;(3)酸性的:Asp、Glu;和(4)碱性的:Lys、Arg、His。其它保守氨基酸取代也可以如下进行:(1)芳香族:Phe、Tyr、His;(2)质子供体:Asn、Gln、Lys、Arg、His、Trp;和(3)质子接受体:Glu、Asp、Thr、Ser、Tyr、Asn、Gln(参见例如美国专利第10,106,805号,其内容通过引用以其整体并入本文)。

[0090] 在另一个实施例中,可以根据表1进行保守取代。用于预测对蛋白质修饰的耐受性的方法可以在例如Guo等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA)》,101(25):9205-9210(2004)中找到,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0091] 在一个方面中,本文所述的序列可以包括1、2、3、4、5、10、15、20、25或30个氨基酸或核苷酸突变、取代、缺失。

[0092] 本文中的术语“抗体”以最广泛的意义使用,并且具体地包括全长单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的生物活性。与抗体的生产相关的各种技术在Harlow等人《抗体:实验室手册(Antibodies:A laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约1988中提供。

[0093] 如本文使用的术语“单克隆抗体”是指含有免疫球蛋白或其片段衍生的框架区(FR)和互补决定区(CDR)并且能够特异性地结合并识别抗原的多肽。因此,本公开中的术语“抗人CXCL1单克隆抗体”是指能够特异性地结合并识别人CXCL1或其片段的多肽。术语“特异性地结合”是指仅结合至靶抗原(本公开中的人CXCL1或其片段)。

[0094] 典型的免疫球蛋白分子由四聚体组成,其中两组通过二硫键彼此连接,每组由被称为重链和轻链的两条多肽链组成。重链包括N末端上的重链可变区(VH)和C末端上的重链恒定区(CH)。轻链包括N末端上的轻链可变区(VL)和C末端上的轻链恒定区(CL)。在这些区域中,VH和VL特别重要,因为它们涉及抗体的结合特异性。VH和VL各包含约110个氨基酸残基,其中存在直接参与与抗原结合特异性的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)和用作可变区的框架结构的四个框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)。已知互补决定区形成与抗原分子互补的构象并决定相关抗体的特异性(E.A.Kabat等人,1991,《免疫学感兴趣的蛋白质序列(Sequences of proteins of immunological interest)》,第1卷,第5版,美国国家卫生研究院(NIH)出版)。尽管恒定区的氨基酸序列在相同物种的抗体中几乎保持不变,但互补决定区的氨基酸序列在抗体中高度可变。因此,互补链决定区也被称为高变区。在可变区中,此类互补决定区(CDR)和框架区按FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4的顺序在从氨基酸末端到羧基末端的方向上排列。VL和VH彼此形成二聚体,以便在免疫球蛋白分子内形成抗原结合位点。关于免疫球蛋白,已知IgG、IgM、IgA、IgE和IgD分类。本公开的抗体可以是任何种类的,并且优选地是IgG。

[0095] 可用于本公开的抗体可以来源于每种动物来源,包括鸟类和哺乳动物。此类动物或鸟类来源的示例包括小鼠、大鼠、豚鼠、兔、山羊、驴、绵羊、骆驼、马、鸡和人。此外,本公开中的“单克隆抗体”可以化学合成或使用重组DNA方法合成。例如,重组抗体,如嵌合抗体和人源化抗体也包含在本公开中。

[0096] “人源化”抗体是人/非人嵌合抗体,其包含源自非人免疫球蛋白的最小序列。对于

大多数情况,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的高变区的残基被来自非人物种(供体抗体)的高变区的残基取代,所述非人物种为例如具有所需的特异性、亲和力和容量的小鼠、大鼠、兔。

[0097] 当在本文中使用时,术语“高变”区是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变结构域中的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)和/或来自“高变环”的那些残基(轻链可变结构域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变结构域中的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3))。

[0098] 如本文所使用的“单克隆抗体或其片段”中的术语“其片段”是指抗体的部分区域,并且具体地说是指具有与抗体的抗原特异性结合活性基本上相当的活性的多肽链或其复合物。此类片段的示例包括含有至少一个上述抗原结合位点的抗体部分,并且具体地,具有至少一个VL和至少一个VH的多肽链或其复合物。此类多肽链或其复合物的具体示例包括通过用各种肽酶切割免疫球蛋白产生的多个充分表征的抗体片段等。此类抗体片段的更具体的示例包括Fab、F(ab')₂和Fab'。Fab是通过用木瓜蛋白酶切割IgG分子产生的片段,通过该片段,切割在比较链部分的二硫键更靠近N末端侧的位置进行。Fab由包含VH和CH1的多肽和轻链组成,CH1在构成CH的3个结构域(CH1、CH2和CH3)中与VH相邻。F(ab')₂是Fab'的二聚体,其通过在比较链部分的二硫键更靠近C末端侧的位置用胃蛋白酶切割IgG分子而产生。Fab'的结构与Fab的结构基本相同,尽管H链比Fab长一些,因为它含有铰链部分(《基础免疫学(Fundamental Immunology)》,Paul编辑,第3版,1993)。Fab'可以通过在温和条件下还原F(ab')₂,并且然后切割铰链区中的二硫键获得。所有这些抗体片段都含有抗原结合位点,使得它们能够特异性地结合至抗原(即,本公开中的人CXCL1或其片段)。

[0099] 本公开中的上述“其片段”可以化学合成或使用重组DNA方法合成。此类片段的示例是使用重组DNA方法新合成的抗体片段。此类片段的具体示例包括但不限于通过具有适当长度和序列的接头肽等人工连接本公开的抗体的一个或多个VL和一个或多个VH而制备的单体多肽分子及其多聚体多肽。此类多肽的示例包括单链Fv(scFv:可变区的单链片段)(参见《皮尔斯目录和手册(Pierce catalog and Handbook)》,1994-1995,皮尔斯化学公司(Pierce Chemical co.),伊利诺伊州罗克福德)和合成抗体,如双抗体、三抗体和四抗体。在免疫球蛋白分子中,VL和VH通常分别位于不同的多肽链(轻链和重链)上。单链Fv是一种合成抗体片段,其具有其中这些可变区与具有足够长度的柔性接头连接且连接区被包含在单个多肽链中的结构。在单链Fv中,两个可变区都可以被自组装以形成单个功能性抗原结合位点。单链Fv可以通过使用已知的技术将编码单链Fv的重组DNA掺入到噬菌体基因组中,并且然后引起该DNA的表达而获得。双抗体是具有基于单链Fv的二聚体结构的结构的分子(Holliger等人,1993,《美国国家科学院院刊》,90:6444-6448)。例如,当上述接头的长度短于约12个氨基酸残基时,单链Fv内的两个可变位点不能进行自组装。然而,导致两个可变位点形成双抗体,并且特别是导致两个单链Fv相互作用,使得一个Fv链的VL和另一个Fv链的VH能够组装。因此,可以形成两个功能性抗原结合位点(Marvin等人,2005,《中国药理学报(Acta Pharmacol.Sin.)》,26:649-658)。此外,将半胱氨酸残基添加到单链Fv的C末端,使得可以形成两条Fv链的二硫键,并且从而稳定的双抗体的形成变得可能(Olafsen等人,2004,《蛋白质工程设计与选择(Prot.Engr.Des.Sel.)》,17:21-27)。如上所述,双抗体是二

价抗体片段。然而,并不要求每个抗原结合位点与相同的表位结合,并且可以具有双特异性,使得抗原结合位点识别并且特异性地结合至不同的表位。三抗体和四抗体分别具有三聚体结构和四聚体结构,以类似于双抗体的方式基于单链Fv结构。三抗体和四抗体分别是三价抗体片段和四价抗体片段,或者可以是多种特异性抗体。

[0100] 此外,上述“其片段”的示例包括使用噬菌体展示文库鉴定的抗体片段(例如,参见McCafferty等人,1990,《自然(Nature)》,第348卷,522-554),并且具有抗原结合能力。此外,还参见例如Kuby,J.,《免疫学(Immunology)》,第三版,1998,W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman&Co.),纽约。

[0101] 可以对本公开的抗体或其片段进行修饰。本文使用的术语“修饰的或修饰”是指使本公开的抗体或其片段具有特异性地结合至人CXCL1的活性(例如糖基化)所需的功能修饰和检测本公开的抗体或其片段所需的用于标记的修饰。在一个实施例中,抗体或其片段与选自由上述蛋白质组成的组的蛋白质的两个或更多个靶标的胞外结构域结合,并且亲和力值(Kd)小于 $1 \times 10^6 \mu\text{m}$ 。此外,可以改变本公开的抗体的糖基化以用于调节抗体对靶抗原的亲和力。此类改变可以通过例如改变抗体序列中的一个或多个糖基化位点来实现。更具体地说,例如,将一个或多个氨基酸取代引入到构成FR内的一个或多个糖基化位点的氨基酸序列中,以便去除糖基化位点,使得可以在这些位点处实现去糖基化。此类去糖基化对于增加抗体对抗原的亲和力是有效的(美国专利第5,714,350号和美国专利第6,350,861号)。任选地,抗体携带进一步的效应子功能,如免疫刺激结构域或毒素。

[0102] “药物组合物”是适合于在医疗环境中施用给人类的组合物。优选地,药物组合物是无菌的并根据GMP指南生产。

[0103] 本公开预期可用于实施本文所述的治疗方法的药物(或治疗)组合物。本公开的治疗组合物包含生理上可耐受的载体以及溶解或分散在其中的作为活性成分的治疗有效量的如本文所述的抗体。在一个优选的实施例中,当出于治疗目的施用给哺乳动物或人类患者时,治疗组合物没有免疫原性或具有降低的免疫原性。治疗有效量是足以在被治疗的组织中产生可测量的血管生成抑制的本公开的抗体的量,即血管生成抑制量。血管生成的抑制可以通过免疫组织化学或通过本领域技术人员已知的其它方法原位测量。

[0104] 药物组合物可以含有游离形式或药学上可接受的盐形式的抗体。如本文所使用的,“药学上可接受的盐”是指所公开的抗体的衍生物,其中所述抗体可以通过制备所述药剂的酸式盐或碱式盐而被修饰。例如,酸式盐由游离碱(通常其中药物的中性形式具有中性-NH₂基团)制备,包括与合适的酸反应。用于制备酸式盐的合适的酸包括有机酸,例如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、水杨酸等;以及无机酸,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。相反,可以存在于抗体上的酸部分的碱式盐的制备可以使用药学上可接受的碱,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等来制备。在一个特别优选的实施例中,药物组合物包含作为乙酸的盐(乙酸盐)、三氟乙酸盐或盐酸(氯化物)的抗体。

[0105] 根据本公开的药物组合物可以包含选自由集落刺激因子,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭(sargramostim))、环磷酰胺、咪喹莫特(imiquimod)、瑞西莫特(resiquimod)和干扰素- α 组成的组的佐剂。在根据本公开的药物组合物的优选的实施例

中,佐剂选自自由集落刺激因子,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特和瑞西莫特组成的组。在根据本公开的药物组合物的优选实施例中,佐剂是环磷酰胺、咪喹莫特或瑞西莫特。甚至更优选的佐剂是Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、聚-1CLC(Hiltonol®)和抗CD40 mAB或其组合。

[0106] 本公开的¹药物还可以包括一种或多种佐剂。佐剂是非特异性地增强或强化免疫应答(例如,由CDS阳性T细胞和辅助T (TH) 细胞介导的对抗原的免疫应答)的物质,并且因此将被认为可用于本公开的¹药物中。合适的佐剂包括但不限于1018ISS、铝盐、AMPLIVAX®、AS15、BCG、CP-870,893、CPG7909、CyaA、dSLIM、鞭毛蛋白或源自鞭毛蛋白的TLR5配体、FLT3配体、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特(ALDARA®)、瑞西莫特、ImuFact IMP321、白介素如IL-2、IL-13、IL-21、干扰素- α 或干扰素- β 或其聚乙二醇化衍生物、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、ISCOM、JuvImmune®、LipoVac、MALP2、MF59、单磷酸基脂质A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、油包水和水包油乳液、OK-432、OM-174、OM-197-MPEC、ONTAK、OspA、PepTel®载体系统、基于聚(丙交酯-共-乙交酯)[PLG]的微粒和葡聚糖微粒、talactoferrin SRL 172、病毒体和其它病毒样颗粒、YF-17D、VEGF trap、R848、 β -葡聚糖、Pam3Cys、Aquila QS21刺激剂,其来源于皂苷、分枝杆菌提取物和合成细菌细胞壁模拟物,以及其它专有佐剂,如Ribi的Detox、Quil或Superfos。如弗氏或GM-CSF的佐剂是优选的。若干种对树突细胞及其制备具有特异性的免疫佐剂(例如MF59)已在先前进行描述(Allison和Krummel,1995)。此外,可以使用细胞因子。若干种细胞因子与影响树突细胞向淋巴组织的迁移(例如TNF-),加速树突细胞成熟为T淋巴细胞的有效抗原呈递细胞(例如GM-CSF、IL-1和IL-4)(美国专利第5,849,589号,具体地通过引用以其整体并入本文)和充当免疫佐剂(例如,IL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN- α 、IFN- β)(Gabrilovich等人,1996)直接相关。

[0107] 还报道了CpG免疫刺激性寡核苷酸可以增强佐剂在疫苗环境中的作用。不受理论的束缚,CpG寡核苷酸通过Toll样受体(TLR)(主要是TLR9)激活先天(非适应性)免疫系统而发挥作用。CpG触发的TLR9激活增强了针对多种抗原的抗原特异性体液和细胞应答,多种抗原包括预防性疫苗和治疗性疫苗中的抗体或蛋白抗原、活病毒或灭活病毒、树突细胞疫苗、自体细胞疫苗和多糖缀合物。更重要的是,即使在没有CD4 T细胞帮助的情况下,它能增强树突细胞的成熟和分化,导致TH1细胞的增强的活化和强细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的产生。即使在通常促进TH2偏向的疫苗佐剂,如明矾(alum)或不完全弗氏佐剂(IFA)的存在下,由TLR9刺激诱导的TH1偏向被维持。当与其它佐剂配制或共同施用,或在如微粒、纳米颗粒、脂质乳液或类似制剂的制剂中时,CpG寡核苷酸显示出甚至更大的佐剂活性,当抗原相对较弱时,这对于诱导强应答是特别必要的。它们还能加速免疫应答,并且能够使抗原剂量减少约两个数量级,在一些实验中,与不含CpG的全剂量疫苗相比抗体反应相当(Krieg,2006)。US 6,406,705 81描述了CpG寡核苷酸、非核酸佐剂和抗原的组合使用以诱导抗原特异性免疫应答。CpG TLR9拮抗剂是Mologen(德国柏林)的dSLIM(双茎环免疫调节剂),它是本公开的¹药物组合物的优选组分。也可以使用其它TLR结合分子,如结合TLR 7、TLR 8和/或TLR 9的RNA。

[0108] 有用的佐剂的其它示例包括但不限于化学修饰的CpG (例如CpR, ldera)、dsRNA类似物,如聚(1:C)及其衍生物(例如AmpliGen®、Hiltonol®、聚-(ICLC)、聚(IC-R)、聚(1:C12U)、非CpG细菌DNA或RNA以及免疫活性小分子和抗体,如环磷酰胺、舒尼替尼、Bevacizumab®、塞来昔布(celebrex)、NCX-4016、西地那非(sildenafil)、他达拉非(tadalafil)、伐地那非(vardenafil)、索拉非尼(sorafenib)、替莫唑胺(temozolomide)、替西罗莫司(temsirolimus)、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼(pazopanib)、VEGF Trap、ZD2171、AZD2171、抗CTLA4、靶向免疫系统的关键结构的其它抗体(例如,抗CD40、抗TGFβ、抗TNFα受体)和SC58175,其可以在治疗上起作用和/或充当佐剂。可用于本公开的上下文中的佐剂和添加剂的量和浓度可以由技术人员容易地确定,而无需过度的实验。

[0109] 优选的佐剂是抗CD40、咪喹莫特、瑞西莫特、GM-CSF、环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐单抗、干扰素-α、CpG寡核苷酸和衍生物、聚-(1:C)和衍生物、RNA、西地那非以及含有PLG或病毒体的颗粒制剂。在一个优选的实施例中,根据本公开的药物组合物,佐剂选自自由集落刺激因子,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特、瑞西莫特和干扰素-α组成的组。

[0110] 在根据本公开的药物组合物的一个优选的实施例中,佐剂选自自由集落刺激因子,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特和瑞西莫特组成的组。在根据本公开的药物组合物的优选实施例中,佐剂是环磷酰胺、咪喹莫特或瑞西莫特。甚至更优选的佐剂是Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、聚-1CLC(Hiltonol®)和抗CD40mAb或其组合。

[0111] 该组合物用于肠胃外施用,如皮下、皮内、肌内或口服施用。为此,将抗体和任选地其它分子溶解或悬浮在药学上可接受的、优选地水性载体中。此外,组合物可以包含赋形剂,如缓冲剂、粘合剂、爆破剂、稀释剂、调味剂、润滑剂等。抗体也可以与免疫刺激物质,如细胞因子一起施用。可以用于此类组合物的赋形剂的广泛清单可以例如获自A.Kibbe,《药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》(Kibbe,2000)。该组合物可以用于防止、预防和/或治疗腺瘤性或癌性疾病。示例性的制剂可以在例如EP2112253中找到。

[0112] 用于制备单克隆抗体和杂交瘤的方法

[0113] 本公开的一个实施例提供了针对CXCL1的中和IgG mAb。具体而言,可以通过首先用CXCL1蛋白免疫合适的动物(如小鼠)来制备针对CXCL1的mAb。然后产生杂交瘤,并使用标准技术(例如ELISA)筛选以用于产生CXCL1反应性IgG抗体。

[0114] 为了产生完全人抗CXCL1抗体,使用从抗体杂交瘤的RNA逆转录的cDNA作为模板,通过PCR获得该抗体的重链(SEQ ID NO:1)和轻链(SEQ ID NO:2)的DNA序列。如本领域所熟知的,单个氨基酸可以由不同的DNA序列编码。因此,该抗体的氨基酸序列可以由不同的DNA序列编码,例如编码重链的氨基酸序列(SEQ ID.NO:2)的SEQ ID.NO:1和编码轻链的氨基酸序列(SEQ ID.NO:4)的SEQ ID.NO:3。这些DNA序列属于本公开的范围。此外,基于抗体结构的公知常识,抗体中的一些氨基酸可以被取代、缺失或添加,而不减损抗体的生物活性。在一些情况下,与原始抗体相比,抗体的氨基酸序列的变化甚至可以改善生物活性和/或改善某些性质。因此,可以修饰这种抗CXCL1抗体的氨基酸序列,以获得具有相似或甚至改进的生化或生物学特性的抗体变体。这些修饰的抗体在本公开的范围之内。

[0115] 本公开的抗CXCL1 mAb可以通过本领域普通技术人员已知的基因工程技术被“人源化”。在选择能够中和CXCL1的高亲和力抗CXCL1 IgG抗体产生克隆(例如,HL2401)之后,对细胞进行基因工程改造,使得来自衍生自抗CXCL1抗体的非人抗体结合位点的高变区可以被“移植”到人IgG抗体的框架区上。该技术被称为互补决定区(CDR)移植,其提供人源化IgG抗体的产生,该人源化IgG抗体具有对CXCL1上给定表位具有特异性的预选非人抗体结合位点。然后在HEK293细胞中大量产生这些IgG抗体,并且然后进行纯化。

[0116] 与上述相似,筛选出人源化的CXCL1 mAb;a)用于使用标准技术(例如ELISA)产生CXCL1反应性IgG抗体,b)用于抑制体外管形成,以及c)用于抑制CXCL1与CXCR2之间的相互作用。

[0117] 本公开的抗体优选地在药学上可接受的载体中施用给受试者。通常,在制剂中使用适量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的载体的示例包括盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。溶液的pH优选地为约5至约8,并且更优选地为约7至约7.5。另外的载体包括缓释制剂,如含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透性基质,该基质为成形制品的形式,例如膜、脂质体或微粒。对于本领域技术人员来说将明显的是,根据例如施用途径和所施用的抗体的浓度,某些载体可能是更优选的。抗体可以通过注射(例如,静脉内、腹膜内、皮下、肌内)或通过确保其以有效形式递送至血流的其它方法(例如输注)被施用至受试者、患者或细胞。抗体也可以通过瘤内途径或瘤周途径来施用,以发挥局部和全身治疗作用。局部或静脉注射是优选的。

[0118] 用于施用抗体的有效剂量和时间表可以根据经验确定,并且进行此类确定在本领域技术人员的能力范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的抗体的剂量将根据例如将接受抗体的受试者、施用的途径、所用抗体的特定类型和被施用的其它药物而变化。单独使用的抗体的典型日剂量可以为每天约1 μ g/kg至高达100mg/kg体重或更多,这取决于上述因素。在施用抗体,优选地用于治疗视网膜病、年龄相关性黄斑变性、慢性关节风湿病和银屑病、与血管的不适当或不合时宜的侵袭相关的障碍,如糖尿病性视网膜病、新生血管性青光眼、再狭窄、动脉粥样硬化斑块和骨质疏松症中的毛细血管增生和与癌症相关的障碍,如实体瘤、实体瘤转移瘤、血管纤维瘤、晶状体后纤维增生、血管瘤、卡波西肉瘤和所有需要新生血管形成以支持肿瘤生长的癌症的抗体之后,可以以本领域技术人员熟知的各种方式来评估治疗性抗体的功效。例如,接受治疗的受试者中癌症的大小、数量和/或分布可以使用标准肿瘤成像技术来监测。与在没有抗体施用的情况下会发生的疾病进程相比,治疗性施用的阻止肿瘤生长、导致肿瘤缩小和/或防止新肿瘤发展的抗体是用于治疗癌症的有效抗体。

[0119] 本公开的一个实施例提供了使用本文所述的抗体或其片段来检测样品中CXCL1的方法。在一个方面中,CXCL1是人CXCL1。具体地,本公开提供了一种用于检测样品中的人CXCL1的方法,包括将样品与本发明的抗体和/或其片段一起孵育的步骤。

[0120] 在一些实施例中,样品是生物样品。

[0121] 术语“生物样品”包括从可以用于诊断或监测测定的生物体获得的各种样品类型。该术语包括生物来源的血液和其它液体样品、固体组织样品,如活检标本,或由其衍生的组织培养物或细胞及其后代。此外,术语“生物样品”可以包括循环肿瘤或其它细胞。术语“生物样品”具体地包括临床样品,并且进一步包括细胞培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、尿、羊水、生物流体(包括用于眼部样品的水性体液和玻璃体)和组织样

品。术语“生物样品”还包括采购后以任何方式处理过的样品,如用试剂处理、增溶或富集某些组分。

[0122] 在一些实施例中,生物样品可以选自体液、其级分、组织提取物和细胞提取物。具体地,生物样品可以选自血浆样品和肿瘤提取物。

[0123] 在一些实施例中,用于检测样品中的人CXCL1的方法进一步包括检测根据本发明的抗体或其片段与人CXCL1结合的步骤。

[0124] 根据本发明的用于检测样品中的人CXCL1的方法可以基于本领域技术人员熟知的各种技术,包括但不限于:

[0125] 蛋白质印迹测定法(CXCL1或其片段存在于细胞裂解物中或存在于被固定于膜上的溶液中,此后在本领域熟知的适当条件下将所述膜与本发明的抗体(优选地标记的抗体)一起孵育),

[0126] ELISA测定法(CXCL1或其片段被固定在微量滴定板上,所述板随后在本领域熟知的适当条件下与本发明的抗体(优选地标记的抗体)一起孵育),

[0127] 免疫组织化学测定法(所述抗体(优选地标记的抗体)用于在本领域熟知的适当条件下对含有表达CXCL1或其片段的固定的细胞或组织的样品进行染色),

[0128] 流式细胞术测定法(所述抗体(优选地标记的抗体)用于在本领域熟知的适当条件下对含有表达CXCL1或其片段的固定的细胞或活细胞的样品进行染色)。

[0129] 在根据本发明的用于检测样品中的人CXCL1的方法的一个实施例中,将本发明的抗体包被在固体支持物上。

[0130] 这些检测技术被描述在例如Sambrook、Fritsch和Maniatis“《分子克隆实验室手册》,第二版,冷泉港实验室,1989”中,其内容通过引用以其整体并入本文。本文涵盖需要使用抗体的任何其它检测技术。可以通过这些技术中的一种或多种来确定样品中人CXCL1的存在和/或量。这些技术中的一些需要用可检测标记物(优选地荧光或发光标记物)标记本发明的抗体。

[0131] 用于诊断用途的抗体可以用适合于通过各种成像方法检测的探针来标记。用于检测探针的方法包括但不限于荧光、光、共焦和电子显微镜;磁共振成像和光谱学;荧光透视、计算机断层扫描和正电子发射断层扫描。合适的探针包括但不限于荧光素、若丹明、曙红和其它荧光团、放射性同位素、金、钷和其它镧系元素、顺磁性铁、氟-18和其它发射正电子的放射性核素。此外,探针可以是双功能或多功能的,并且可以通过所列出的多于一种方法进行检测。这些抗体可以用所述探针直接或间接标记。探针与抗体的连接包括探针的共价连接、探针与抗体的结合以及用于结合探针的螯合化合物的共价连接,以及本领域熟知的其它连接。对于免疫组织化学,疾病组织样品可以是新鲜的或冷冻的,或者可以被包埋在石蜡中并用防腐剂,如福尔马林固定。使含有样品的固定的或包埋的切片与标记的一级抗体和二级抗体接触,其中所述抗体用于原位检测蛋白的表达。上述抗体标记物的示例可以包括荧光染料,例如异硫氰酸荧光素(FITC)、若丹明、德克萨斯红、Cy3和Cy5,荧光蛋白,例如藻红蛋白(PE)、别藻蓝蛋白(APC)和绿色荧光蛋白(GFP),酶,例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶,以及生物素或(链霉)亲和素。抗体可以用放射性核苷酸标记,如⁶⁴Cu、¹¹¹In、⁹⁹Tc、¹⁴C、¹³¹I、³H、³²P或³⁵S,以便可以使用免疫显像(immunoscintigraphy)定位肿瘤。

[0132] 本公开还提供了一种用于从样品中纯化人CXCL1的方法,包括用根据本发明的抗

体和/或其片段孵育样品的步骤。

[0133] 根据本发明的用于从样品中纯化人CXCL1的方法可以基于本领域技术人员熟知的各种技术,包括但不限于流式细胞术测定、免疫沉淀测定。例如,这些检测技术被描述在 Sambrook、Fritsch和Maniatis“《分子克隆实验室手册》,第二版,冷泉港实验室,1989”中。

[0134] 本公开还提供了一种可用于实施根据本发明的用于检测和/或纯化样品中的人CXCL1的方法的试剂盒,该试剂盒包括:至少一种根据本发明的抗体或其片段;和至少一种用于检测根据本发明的抗体或其片段的试剂。

[0135] 用于检测根据本发明的抗体或其片段的试剂可以选自由ELISA试剂、蛋白质印迹试剂和斑点印迹试剂组成的组。

[0136] 本公开还提供了体外或离体诊断和/或预后方法,并且具体地涉及与CXCL1相关的疾病的体外诊断和/或预后方法,特别是受试者中病理性血管生成疾病,特别是透明细胞肾细胞癌的体外诊断和/或预后方法,该方法包括:使用至少一种根据本发明的抗体和/或其片段测定受试者的生物样品中CXCL1的表达和/或表达水平。

[0137] 病理性血管生成的治疗

[0138] 本公开提供了一种用于抑制组织中的血管生成并且从而抑制组织中依赖于血管生成的事件的方法。通常,所述方法包括向所述组织施用包含血管生成抑制量的本公开的抗体的组合物。

[0139] 如先前所述,血管生成包括涉及组织的新生血管形成的多个过程,包括“萌芽”、血管发生或血管扩大,所有这些血管生成过程涉及破坏血管中的细胞外基质胶原。除了创伤性伤口愈合、黄体形成和胚胎发生之外,据信大多数血管生成过程与疾病过程相关,并且因此本治疗方法的使用对该疾病是选择性的。

[0140] 存在多种其中血管生成被认为是重要的疾病,被称为血管生成疾病,包括但不限于炎性障碍,如免疫和非免疫炎症、慢性关节风湿病和银屑病、与血管的不适当的或不合时宜的侵袭相关的障碍,如糖尿病性视网膜病、新生血管性青光眼、再狭窄、动脉粥样硬化斑块和骨质疏松症中的毛细血管增生,以及与癌症相关的障碍,如实体瘤、实体瘤转移瘤、血管纤维瘤、纤维增生、血管瘤、卡波西肉瘤等和需要新生血管形成以支持肿瘤生长的癌症。其它合适的肿瘤包括黑色素瘤、癌、肉瘤、纤维肉瘤、神经胶质瘤和星形细胞瘤。因此,抑制患病组织中的血管生成的方法能改善疾病的症状,并且根据疾病,可以有助于疾病的治愈。

[0141] 在一些方面中,本公开的抗体或其抗原结合片段单独施用或与抗癌治疗,如例如一种或多种化疗剂、一种或多种免疫治疗剂或其组合联合施用。

[0142] 如本文所述,多种组织或由有组织的组织组成的器官中的任一种可以在疾病条件下支持血管生成,所述疾病条件包括皮肤、肌肉、肠、结缔组织、关节、骨等组织,血管可以在血管生成刺激下侵入所述组织中。如本文所用的组织还包括所有体液、分泌物等,如血清、血液、脑脊液、血浆、尿液、滑液、玻璃体肿瘤。

[0143] 代表性的施用途径

[0144] 本公开的抗体可以通过注射或随时间通过逐渐输注被肠胃外施用。尽管待治疗的组织通常可以通过全身性施用在体内进入,并且因此最经常通过治疗组合物的静脉内施用来治疗,但在存在靶向的组织包含靶分子的可能性的情况下,也考虑其它组织和递送方式。因此,抗体及其衍生物可以静脉内、腹膜内、肌内、皮下、肠内、膀胱内、经皮、局部、肠内、口

服或鼻内施用。

[0145] 本文关于一个或多个要素使用如“包括 (comprising)”、“具有”、“包含 (including)”或“含有 (containing)”的术语对本公开的任何方面或实施例的描述旨在为本公开的类似方面或实施例提供支持,该类似方面或实施例为“由该特定要素或多个要素组成”、“基本上由该特定要素或多个要素组成”或“基本上包括该特定要素或多个要素”,除非另有说明或与上下文明显矛盾(例如,本文描述为包括特定要素的组合物应理解为也描述为由该要素组成的组合物,除非另有说明或与上下文明显矛盾)。

[0146] 实例

[0147] 本公开可以通过以下实例进一步证明。应当理解,本公开的范围不限于这些实例。此外,本领域技术人员在阅读本公开之后可以修改或改变本公开;这些修改的变型应被视为等同于实施例,并且落入本公开的范围。

[0148] 以下实例如果未详细地描述,则使用本领域技术人员公知的技术,并且可以遵循由参考文献,如《分子克隆,实验室手册》(Sambrook等人,冷泉港实验室出版社)或《抗体:实验室手册》(Ed Harlow和David Lane,冷泉港实验室出版社)等描述的实验方案或条件或基于制造商的指示。

[0149] 本文提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物在它们不与本说明书的明确教导矛盾的情况下通过引用以其整体(包括所有附图和表格)并入本文。

[0150] 以下是说明用于实施本公开的程序的实例。这些实例不应被解释为限制性的。

[0151] 实例1

[0152] 人抗CXCL1抗体的制备

[0153] 用人重组CXCL1蛋白免疫Balb/cByJ小鼠多次。通过ELISA测定法来确定小鼠血清中的抗CXCL1抗体滴度。在血清中达到高抗CXCL1抗体滴度后,解剖脾脏并分离脾细胞,以使其与骨髓瘤细胞融合,以产生杂交瘤细胞。融合的杂交瘤在选择培养基中生长以产生杂交瘤克隆。

[0154] 使用美国佛罗里达大学跨学科生物技术研究中心 (University of Florida Interdisciplinary Center for Biotechnology Research) (ICBR) 杂交瘤和蛋白核心实验室 (Hybridoma and Protein Core Laboratories) 的标准方案来生产抗CXCL1的小鼠单克隆抗体 (Chang等人,2013)。用约100 μ g的天然CXCL1蛋白免疫两只雌性Balb/cByJ小鼠,该天然CXCL1蛋白具有ASVATELRCQCLQTLQG IHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNRKA CLNPASPIVKKIIEKMLNSDKSN (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列,在无菌生理磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中稀释并在Ribi MPL+TDM佐剂中乳化。免疫原在第1、21、44和192天施用。在第二次免疫和第三次免疫后11至14天采集试验出血。通过蛋白质印迹和ELISA来确定免疫后血清中抗CXCL1抗体的存在。第四次免疫后6天,对小鼠#1实施安乐死,并收集脾淋巴细胞并且与小鼠骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞 (Uehara等人,2005)。收集生长的杂交瘤大量培养物的培养基,并通过ELISA筛选抗CXCL1抗体的产生。通过ELISA检测为阳性的大量培养物随后在使用HUVEC细胞的增殖测定中测试生物效应。生长出在ELISA中对CXCL1表现出反应性并表现出抗增殖作用的培养物,并通过限制稀释进一步克隆。再次通过ELISA对从每个克隆采集的培养基进行测试。通过ELISA对单克隆抗体进行分型,并按照制造商的方案进行IsoStrip测试。收获最终选择的杂交瘤克隆的培养基,并通过蛋白G柱 (通用医疗 (GE Healthcare) 蛋白G琼脂糖

4快速流动(Protein G Sepharose 4Fast Flow))纯化。通过Bradford蛋白测定来确定纯化的单克隆抗CXCL1抗体(HL2401)的浓度,并储存在4℃下用于将来验证。来自瑞士龙沙(Lonza(瑞士巴塞尔))的凝胶凝块LAL测定确保抗体不含内毒素。

[0155] 杂交瘤细胞克隆在RPMI-1640完全培养基中在96孔板中生长。从每个杂交瘤克隆中收集上清液,并使用ELISA测定特异性抗体。在本测定中,ELISA板用可溶性重组人CXCL1包被,并用2%的BSA封闭。然后,适当稀释杂交瘤上清液并加入到每个孔中,然后加入HRP缀合的山羊抗小鼠IgG。然后将板与HRP底物一起孵育,并使用微孔板读取器在650nm的波长下读取OD值。

[0156] 鉴定了多个分泌抗CXCL1抗体的杂交瘤克隆。将分泌针对CXCL1的特异性抗体的杂交瘤克隆扩增至6孔板,并且然后扩增至T-175烧瓶。从烧瓶中收获上清液。使用IgG同种分型试剂盒来确定由杂交瘤克隆分泌的抗体的同种型,并使用相应的抗体亚型作为标准,通过ELISA测定法来测量上清液中抗体的浓度。对杂交瘤上清液中的抗体浓度进行标准化并稀释。抗体上清液用于通过ELISA测定法比较抗体与CXCL1的相对结合亲和力。通过该方法,鉴定了若干个对CXCL1显示高亲和力的单克隆抗体克隆。

[0157] 在初次筛选中鉴定出表达抗CXCL1抗体的杂交瘤克隆并且在二次筛选中鉴定出抑制管形成后,在第三级筛选中检查抗体阻断CXCL1-CXCR2结合的能力。在该第三级筛选测定中,96孔ELISA板用人重组CXCL1包被,并用BSA封闭。在单独的96孔板中,将不同浓度的抗CXCL1抗体与重组人CXCR2混合。将混合物在37℃下孵育1小时,并且然后转移至用BSA封闭的ELISA板上。在冲洗后,向每个孔中加入HRP缀合的山羊抗人IgG,然后加入HRP底物并在微孔板读取器中在650处读取OD。通过该方法,鉴定了一种能够完全阻断CXCL1-CXCR2结合的单克隆抗体克隆,其被命名为HL2401。通过抗体分型,HL2401被确认为IgG。

[0158] 图1A示出了抗CXCL1中和单克隆小鼠抗体(HL2401)与重组人CXCL1结合,但不与小鼠和大鼠CXCL1结合。相反,商业抗体显示出与小鼠、大鼠和人CXCL1的交叉反应。该结果显示,HL2401的特异性优于商业抗体的特异性。

[0159] 图1B显示,CXCL1在PBS和血清(1:4稀释和1:40稀释)中的表观亲和结合常数(K_D)值分别为 175.6 ± 30.0 ng/mL、 386.6 ± 75.4 ng/mL和 252.2 ± 37.1 ng/mL。

[0160] 图1C显示,免疫沉淀后进行LC/MS-MS分析确认HL2401与CXCL1特异性结合。也就是说,CXCL1仅与HL2401免疫沉淀,而不与对照抗体(例如IgG)免疫沉淀。

[0161] mAb可变区的氨基酸序列

[0162] 总RNA使用RNA提取试剂盒由杂交瘤细胞制备。根据制造商的说明,使用SuperScript®III一步RT-PCR系统(Invitrogen™)合成cDNA。然后通过使用如前所述设计的一组引物将cDNA用作PCR的模板(Yuan等人,2004)。PCR产物使用Qiagen PCR清理系统(德国凯杰(Qiagen))纯化,并连接到pCRTM2.1载体中。使用BigDye Terminator v3.1循环测序试剂盒(应用生物系统(Applied Bio-systems))对所选阳性克隆进行测序。氨基酸序列通过使用IMGT和分离的免疫球蛋白基因的轻链和重链的指定CDR从核苷酸序列中确定。

[0163] 图1D示出了使用HL2401杂交瘤细胞系的总RNA提取。

[0164] 图1E示出了使用HL2401 cDNA作为模板的PCR扩增。泳道1和2表示可变重链,并且泳道3和4表示可变轻链。轻链泳道代表异常假基因PCR产物的区段。

[0165] 表1

[0166] HL2401杂交瘤细胞的CDR表示的概述

[0167]	HL2401 克隆	重链 (VH)	轻链 (VL)
	CDR1	SYIYIY (SEQ ID NO: 6)	KASQSVDYDGD SYVN (SEQ ID NO: 9)
[0168]	CDR2	EIDPSHGGPTFN (SEQ ID NO: 7)	AASNLES (SEQ ID NO: 10)
	CDR3	TRESGTGAMDY (SEQ ID NO: 8)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 11)

[0169] 氨基酸序列是从DNA序列中推导出来的。如按照kabat编号所述来选择CDR。

[0170] 图1F示出了HL2401克隆的轻链(VL)中CDR的编号和区域。

[0171] 图1G示出了HL2401克隆的重链(VH)中CDR的编号和区域。

[0172] 可变区基因的分类

[0173] 重链的可变区

[0174]	结果总结:	生产性IGH重排序列:
	V-GENE和等位基因	Musmus IGHV1S81*02
	J-GENE和等位基因	Musmus IGHJ4*01 F

[0175] 轻链的可变区

[0176]	结果总结:	生产性IGK重排序列:
	V-GENE和等位基因	Musmus IGKV3-4*01 F
	J-GENE和等位基因	Musmus IGKJ1*01 F

[0177] HL2401抗体基因的轻链可变区属于免疫球蛋白小鼠 κ , V_{κ} III ($IG_{\kappa}V_3$) 亚组, 并且包含 $J_{\kappa 1}$ 基因区段。重链属于带有 J_{H4} 区段的免疫球蛋白小鼠 V_H I (IGV_{H1}) 亚组基因家族。

[0178] 图1H示出了使用Rosetta同源性建模服务器的小鼠序列的同源性建模。该图是使用PyMole分子图形系统生成的。VH代表可变重链, 并且VL代表可变轻链。

[0179] 构建scFv并测试针对人CXCL-1抗原的生物学活性

[0180] 使用小鼠引物来扩增HL2401抗体基因的可变重链和可变轻链的克隆。使用PCR纯化试剂盒来纯化扩增的VH和VL结构域。使用引出式PCR将得到的VH和VL片段重叠, 并扩增为scFv(单链片段可变区)。编码scFv的基因是VH-接头-VL, 其带有标准的20个氨基酸接头(Gly4Ser)3GGGAR。扩增的基因用BssHII和NheI限制性内切酶消化, 并插入到基于pET的载体(PAB-myc)中, 该载体包含用于控制周质蛋白表达的pe1B启动子(Novagen, 威斯康星州麦迪逊)以及C末端处的6组氨酸标签, 用于通过金属亲和色谱法纯化, 并转化到DH5 α 细菌菌株中。将转化的克隆用氨苄青霉素发酵液在LB中扩增过夜。制备质粒DNA并送去用于DNA测序。将scFv质粒的正确序列转化到T7改组菌株, 并将转化后的细菌用于可溶性蛋白生产。

[0181] 图1I示出了扩增的VH、VL和scFv片段的琼脂糖凝胶电泳(VH: 可变重链; VL: 可变轻链; ScFv: 单链片段可变区)。

[0182] 细菌宿主中ScFv蛋白的诱导

[0183] 将HL2401_scFv克隆转化到T7改组细菌菌株中。T7改组细胞, 并在1.4L 2xYT加上氨苄青霉素培养基中在37°C下生长, 直到对数噬菌体($OD_{600}=0.5$), 用0.3mM的IPTG诱导, 并允许在30°C下生长另外16小时。在诱导后, 通过在4°C下以8000g离心15分钟收获细菌, 并

将沉淀物在-20℃下储存至少2小时。将冷冻的沉淀物短暂解冻,并悬浮在40ml的裂解缓冲液(PBS中1mg/ml溶菌酶加上不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物)(赛默飞世尔科技(Thermo Scientific),马萨诸塞州沃尔瑟姆)中。将裂解混合物在冰上孵育1小时,并且然后加入10mM的MgCl₂和1μg/ml的DNaseI,并且将混合物在25℃下孵育20分钟。将最终的裂解混合物以12000g离心20分钟,并收集上清液。该上清液被称为用于Nickle柱亲和色谱法的周质提取物。

[0184] 使用HL2401 scFv蛋白的蛋白质印迹分析

[0185] 使用纯化的重组人CXCL1蛋白作为蛋白质印迹分析中的靶抗原。将500ng的人CXCL1蛋白和作为阴性对照的1μg的纯化蛋白加载到4-20%梯度Tris-甘氨酸SDS-PAGE上,并转移到硝基纤维素膜上。在室温下,使用3%脱脂乳在PBS中封闭膜3小时。然后,将膜与部分纯化的HL2401_scFv蛋白在4℃下一起孵育过夜。用含0.05%的吐温20缓冲液(PBST)的磷酸钠缓冲盐水洗涤膜3次。将洗涤后的膜与抗c-Myc小鼠IgG在室温下一起孵育1小时,以识别scFv上的c-Myc标签并鉴定与scFv结合的抗原的位置。在用PBST洗涤后,将膜与在PBS中稀释(1:3000v/v)的山羊抗小鼠IgG(H+L)HRP缀合物在室温下一起孵育1小时,并用TMB底物的混合物使特异性免疫反应带可视化。

[0186] 图1J示出了使用HL2401_scFv蛋白的蛋白质印迹分析。泳道M表示分子量标记物。泳道1表示人CXCL1蛋白。泳道2表示阴性对照。

[0187] 蛋白质印迹分析使用染色的TMB检测到约11kDa的带。此外,该蛋白质印迹数据证实了抗体对靶蛋白的特异性。另一方面,如图1K所示,使用抗Myc标签单克隆抗体来识别所表达的scFv蛋白上的Myc标签。将负载抗原的膜与抗myc-HRP(1/2000)抗体一起孵育,并用TMB底物的混合物使特异性免疫反应带可视化。HL2401_scFv蛋白在大肠杆菌中表达并通过抗cMyc抗体检测到部分纯化。

[0188] 用于确认HL2401_scFv蛋白的结合活性的ELISA测试

[0189] 将人CXCL1蛋白在4℃下包被到96孔板上,每孔30ng。该板在室温下在PBS中用3%脱脂乳封闭2小时。用PBST洗涤板并施加不同稀释浓度的抗人CXCL1_scFv抗体。施加带有HRP缀合抗体的抗Myc小鼠单克隆抗体,并用TMB溶液显色。

[0190] 图1L示出了ELISA信号,其指示HL2401_scFv蛋白与人CXCL1蛋白相互作用。

[0191] 实例2

[0192] 图2C、2D和3A-3C示出了CXCL1表达刺激细胞增殖、细胞迁移和侵袭以及内皮管形成。

[0193] 为了确定CXCL1对关键肿瘤细胞和内皮细胞过程的影响,首先测试了人细胞系T24、DU145和PC3的CXCL1及其受体CXCR2的表达水平。

[0194] 图2A示出了膀胱癌细胞系(T24)和前列腺癌细胞系(PC3)表达高水平的CXCL1。另一方面,CXCL1的受体CXCR2在T24细胞中高表达。

[0195] 为了测试CXCL1表达对细胞功能的影响,用CXCL1稳定地转染不表达可检测的CXCL1的肿瘤细胞系,例如DU145,以产生表达CXCL1的肿瘤细胞。另一方面,用靶向CXCL1的shRNA载体稳定地转染高度表达CXCL1的肿瘤细胞系,例如T24和PC3细胞,以敲低其内源性CXCL1表达。使用Fugene HD转染试剂(罗氏诊断学(Roche Diagnostics))将在pCMV6-空载体内克隆的具有序列验证的人CXCL1 cDNA的质粒和仅具有载体的质粒(傲锐基因技术

(Origene Technologies)) 转染到DUi45细胞中,以产生DU145-CXCL1和DUi45-空载体。类似地,将在pRS载体中克隆的CXCL1短发夹RNA (shRNA) 转染到T24和PC3细胞,并使用Fugene HD在pRS载体(傲锐基因)中构建CXCL1质粒扰频(Scr)非有效shRNA。对于DU145克隆使用1,200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的G418(生命科技公司(Life Technologies, Inc.),加利福尼亚州卡尔斯巴德)并且对于T24和PC3克隆使用0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的嘌呤霉素(生命科技)选择稳定的转染子持续14天,并在96孔板中通过限制稀释进行亚克隆。通过RT-PCR证实转染基因整合到基因组中。对于DU145克隆在含有500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的G418的培养基中以及对于T24和PC3克隆在含有0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的嘌呤霉素的培养基中维持稳定的细胞系。

[0196] 图2B示出了在用靶向CXCL1的shRNA载体,即T24-CXCL1-KD4和T24-CXCL1-KD8;和PC3-CXCL1-KD7稳定转染的细胞系中确认了降低的CXCL1蛋白表达。另一方面,在用CXCL1(DU145-CXCL1-OE3和DU145-CXCL1-OE8)稳定转染的DU145细胞中确认了CXCL1的表达。

[0197] 为了确定CXCL1对肿瘤细胞迁移或侵袭的影响,进行了体外迁移和侵袭测定。在6孔的双层侵入室(协同生物医学产品(Collaborative Biomedical Products),美国马萨诸塞州贝德福德)中进行了迁移测定(Gomes Giacoia等人,2014)。聚碳酸酯膜包被有4 mg/mL 的生长因子减少的基质凝胶(BD生物科学(BD Biosciences),加利福尼亚州圣何塞),如针对侵袭测定所述,对照插入物(仅迁移)不含涂层。测试了两个独立的实验设计。首先,将DU145-CXCL1-OE3和DU145-CXCL1-OE8、DU145-空载体、T24-CXCL1-KD4和T24-CXCL1-KD8、T24-shSCR、PC3-CXCL1-KD7和PC3-shSCR细胞以105个细胞/ mL /孔的密度加入到RPMI培养基中的每个插入物中。下部室容纳RPMI培养基,所述RPMI培养基含有10%的FBS作为化学引诱剂。将细胞保持在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的加湿培养箱中24小时。在指定的时间后,移除聚碳酸酯膜的顶部的细胞。用细胞存活指示剂CalceinAM荧光染料(BD生物科学,新泽西州富兰克林湖)将附着至膜的底部的细胞染色1小时,并使用FLUOstar OPTIMA在495 nm 激发和515 nm 发射(BMG LABTECH公司,北卡罗来纳州卡里)下进行定量。

[0198] 图2C显示,在体外迁移和侵袭测定中,与DU145-空载体对照相比,DU145-CXCL1-OE3和DU145-CXCL1-OE8克隆的迁移潜能未增强。然而,与DU145-空载体($p < 0.01$)相比,DU145-CXCL1-OE3和DU145-CXCL1-OE8克隆的侵袭潜能显著增强至少50%。类似地,与PC3-shSCR相比,PC3-CXCL1-KD7细胞的迁移潜能未降低,但与PC3-shSCR($p < 0.01$)相比,PC3-CXCL1-KD7细胞的侵袭潜能显著降低27%。在T24克隆的迁移和侵袭测定中也观察到了相同的现象。具体而言,与T24-shSCR($p < 0.01$)相比,T24-CXCL1-KD8细胞($p < 0.01$)而非T24-CXCL1-KD4细胞显示出细胞迁移的抑制,然而,T24-CXCL1-KD4和T24-CXCL1-KD8克隆均显示出侵袭潜能的显著抑制(至少25%)。这些结果表明,CXCL1的表达可能在肿瘤细胞侵袭和可能的肿瘤细胞迁移中起重要作用。

[0199] 为了测试CXCL1对内皮细胞行为的影响,进行了毛细管形成测定。人脐静脉内皮细胞(HUVEC)管形成测定是在血管生成研究中使用最广泛的体外模型之一。HUVEC细胞表达CXCR2,并且响应于CXCL1刺激进行细胞增殖和萌芽。简言之,将基质凝胶(BD生物科学)加入到96孔板中(每孔50 μl),并允许在37 $^{\circ}\text{C}$ 下固化30分钟。将HUVEC细胞在含0.1%去脂BSA的不含血清和生长因子的EBM2基础培养基中孵育5小时。在条件培养基中以每孔 10^4 个细胞的密度将HUVEC以三份接种在基质凝胶顶部,并孵育6小时。使用尼康ECLIPS E400显微镜(尼康(Nikon),纽约梅尔维尔)采集图像。使用ImageJ测量每孔至少4个视野中管状结构的总长

度。使用由在三个重复的孔中测试的每种条件组成的至少三个独立实验来计算平均值±SD值。

[0200] 使用来自图2B所示的细胞系的条件培养基处理HUVEC培养物。图2D显示,在管形成测定中,当用来自DU145-CXCL1-OE3和DU145-CXCL1-OE8克隆的培养基处理时,在生长因子减少的基质凝胶上由HUVEC形成的结构的总长度显著增加(约60%)。相反,当用来自CXCL1敲低的T24(T24-CXCL1-KD4和T24-CXCL1-KD8)和PC3(PC3-CXCL1-KD7)细胞的条件培养基处理时,管状结构的总长度显著缩短(分别为约50%和约28%)。这些结果表明CXCL1可能通过诱导内皮细胞管形成来促进血管生成。

[0201] 实例3

[0202] 靶向CXCL1抑制增殖、细胞侵袭和内皮管形成

[0203] 为了测试CXCL1抑制剂,如抗CXCL1中和单克隆小鼠抗体(HL2401)是否可以影响增殖,进行了细胞增殖测定。简言之,将每孔 10^3 个细胞(T24、DU145和PC3)接种在96微孔板中,并用指定浓度的HL2401孵育6、24、48和72小时,持续72小时。每种条件都在三个重复的孔中进行测试。通过掺入3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物(MTT)测定细胞增殖。以一式三份进行至少三个独立实验。

[0204] 图3A显示,在72小时的体外增殖测定中,通过HL2401(20和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)显著地抑制了T24、PC3和HUVEC细胞系的增殖,而非DU145细胞的增殖。抗CXCL1 mAb可以完全阻断CXCL1诱导的HUVEC增殖和萌芽。

[0205] 为了测试抗CXCL1中和单克隆小鼠抗体(HL2401)是否可以影响肿瘤细胞侵袭,将T24、DU145和PC3细胞(10^5 个细胞/mL/孔)暴露于在RPMI培养基中的0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CXCL1单克隆抗体(HL2401)。下部室容纳RPMI培养基,所述RPMI培养基含有10%的FBS作为化学引诱剂。在24小时后,去除聚碳酸酯膜顶部的T24、DU145和PC3细胞,同时将附着至膜的底部的T24、DU145和PC3细胞用细胞活力指示剂钙黄绿素AM荧光染料染色1小时并且使用FLUOstar OPTIMA定量。对于迁移和侵袭测定,使用由在三个重复的孔中测试的每种条件组成的至少三个独立实验来计算平均值±SD值。

[0206] 图3B显示,在体外侵袭测定中,在加入HL2401(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)($p < 0.01$)的情况下T24和PC3的侵袭潜能显著降低。通过添加HL2401,DU145的侵袭潜能没有改变。这些结果表明CXCL1抑制剂,如HL2401,可以抑制表达CXCL1的肿瘤细胞的侵袭。

[0207] 为了证明该抗CXCL1抗体的抗血管生成作用,在体外HUVEC管形成测定中评估了该抗体。简言之,将HUVEC细胞接种到包被有基质凝胶的96孔板中。在30分钟后,将先前用不含血清和生长因子的EBM2基础培养基喂养5小时的细胞用上述补充有0、20或100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CXCL1 mAb(HL2401)的培养基接种。在6小时后,获得每个孔的照片图像。使用尼康ECLIPSE E400显微镜(尼康,纽约梅尔维尔)获取图像。记录管结构的总长度。使用ImageJ测量每孔至少4个视野中管状结构的总长度。使用由在三次重复孔中测试的每种条件组成的至少三个独立实验来计算平均值±SD值。

[0208] 图3C显示,在含有20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗CXCL1 mAb(HL2401)的孔中,HUVEC管长度显著缩短,并且在100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时所有萌芽均被抑制。相反,在其中加入相同量(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的正常抗体的对照孔中,未观察到对HUVEC管形成的抑制作用。因此,本公开的抗CXCL1抗体可以完全抑制血管内皮细胞的增殖和萌芽;因此,该抗体能够阻断血管生成。在进一步的研究中,显示

HL2401抗体不与小鼠CXCL1结合。因此,不适合在常规小鼠体内模型中评估该抗体的生物活性。

[0209] 实例4

[0210] 药代动力学研究和生物分布

[0211] 为了确定体内施用对HL2401的影响,在雌性C57BL/6小鼠中进行药代动力学研究以确定在单次施用后血浆暴露于CXCL1抗体。CXCL1抗体被放射性标记。简言之,⁶⁴Cu是用现场回旋加速器(GE PETrace)生产的。⁶⁴CuCl₂ (74MBq) 在300μL的0.1M醋酸钠缓冲液(pH 5.5)中稀释,并与200μL的NOTA-CXCL1抗体(0.5mg/mL)混合。反应在37°C下在持续振荡下进行45分钟。所得到的⁶⁴Cu-NOTA-CXCL1抗体通过PD-10尺寸排阻柱色谱法使用PBS作为流动相来纯化。收集含有⁶⁴Cu-NOTA-CXCL1抗体的放射性级分用于体内研究。

[0212] 在注射后的以下时间点获取血浆样品:零时间(无处理)、12、24和48小时。通过在血浆分离管中在4°C下以3,000rpm离心10分钟,从全血中获得血浆。所有样品均储存在-80°C下直到后续分析。使用间接ELISA来分析样品的CXCL1抗体。在血浆中定量的下限为0.94ng/mL。在WinNonLin v 5.0.3中使用非隔室分析来计算药代动力学参数。

[0213] 在通过尾静脉注射5-10MBq ⁶⁴Cu-NOTA-CXCL1抗体后的不同时间点,使用microPET/microCT Inveon啮齿动物模型扫描仪(西门子医疗解决方案美国公司(Siemens Medical Solutions USA, Inc.))进行ICR小鼠的PET扫描(Envigo,印第安纳州印第安纳波利斯;n=4)。对PET数据进行了数据采集、图像重建和感兴趣区域(ROI)分析。简言之,图像是通过4000万次静态PET扫描获得的,并使用最大后验(MAP)算法重建,而没有衰减或散射校正。每次PET扫描的ROI分析是使用基于衰减校正的全身图像的软件(Inveon研究工作平台(Inveon Research Workplace), IRW)进行的,使用通过剂量校准器(Capintec公司,新泽西州拉姆齐)测量的注射剂量计算。肿瘤和主要器官的定量PET数据以每克组织的注射剂量百分比(%ID/g)的格式呈现。在48小时p.i.的最后一次扫描后,进行了生物分布研究以证实PET数据。将小鼠安乐死并收集血液和主要器官/组织并进行湿称重。使用γ计数器(Perkin-Elmer,康涅狄格州诺沃克)测量组织中的放射性,并表示为%ID/g(平均值±SD)。

[0214] 图4A显示,在腹膜内施用后,HL2401的血浆浓度由于快速分布至外周成分而迅速下降。测定灵敏度的限制阻止了最终消除(即排泄)的表征。在4mg/kg或8mg/kg的单剂量后血浆中HL2401的浓度时间分析分别为22.89ng/g和46.71ng/g (C_{max}), 2.49小时和2.71小时(t_{1/2})和0.046单位和0.044单位(清除率)。

[0215] 类似地,图4B和4C显示,在单次注射0.5mg/kg后,放射性标记的抗体迅速分布,在PET成像上保持在检测限以上超过48小时(在15分钟时C_{max} = 19.15%D/g, t_{1/2α} ≈ 3.5分钟, t_{1/2β} ≈ 44.0小时)。

[0216] 图4D示出了与成像结果很好匹配的离体生物分布数据,从而证实了PET成像的准确性。

[0217] 实例5

[0218] 通过HL2401在异种移植模型中抑制肿瘤生长

[0219] 使用膀胱癌(T24)和前列腺癌(PC3)小鼠异种移植模型在体内评估CXCL1表达对致瘤性和血管生成的重要性。DU145异种移植没有产生,因为DU145细胞不表达CXCL1或CXCR2。因此,HL2401可能在DU145异种移植中产生最小的治疗反应。为了确定用单克隆抗

体靶向CXCL1是否可以抑制异种移植肿瘤生长,在体内施用CXCL1抗体HL2401。动物护理符合《实验动物护理和使用指南(The Guide for Care and Use of Laboratory Animals)》(国家研究委员会)的建议,并经夏威夷大学当地IACUC(University of Hawaii local IACUC)批准。如先前所述(Miyake等人,2015;Sakai等人,2009b),通过接种 2×10^6 个亲本T24细胞和 2×10^6 个亲本PC3细胞,在从Envigo购买的无胸腺BALB/c nu/nu雄性小鼠(6至8周龄)中进行皮下致瘤性测定。在一周后,将携带皮下异种移植肿瘤的小鼠随机分成三组(对照组,4mg/kg或8mg/kg)HL2401并开始治疗。每组包含至少10只小鼠。在任何治疗组中均未发现毒性或体重减轻。HL2401(100 μ l在无菌PBS中稀释)通过腹膜内注射每周两次施用,持续四周。对照小鼠以相同的时间表单独接受IgG。每周用数字卡尺测量肿瘤体积并通过 $V(\text{mm}^3) = \text{长度} \times (\text{宽度})^2 \times 0.5236$ 计算。在细胞接种五周后,处死小鼠,切除肿瘤并通过免疫组织化学染色进行分析。

[0220] 图5A示出了在用HL2401(8mg/kg)处理的小鼠中没有毒性(即没有体重变化或活性变化)。在体内研究的5周终点结束时,对照T24异种移植物的平均大小达到388 mm^3 。每周两次用4mg/kg的HL2401处理的T24异种移植物达到274 mm^3 ($p=0.22$),而当用8mg/kg处理时仅达到224 mm^3 ($p<0.05$)。类似地,用4mg/kg和8mg/kg的HL2401治疗的小鼠中的PC3肿瘤在实验终点(仅显示8mg/kg的HL2401数据)减小(分别为 $p=0.15$ 和 $p<0.05$)。

[0221] 图5B示出了CXCL1和PECAM-1在T24和PC3异种移植肿瘤上的免疫荧光染色以指示CXCL1的位置。在T24和PC3异种移植物中,除了肿瘤相关的内皮细胞外,CXCL1还在肿瘤细胞中表达。切除的异种移植物的IHC分析揭示,当用8mg/kg的HL2401处理时,CXCL1表达降低。与用HL2401治疗的这些肿瘤中的PC3异种移植物和CXCR2表达水平相比,CXCR2表达在T24异种移植物中更为普遍。此外,在来自用8mg/kg的HL2401治疗的动物的T24和PC3肿瘤中显示出白细胞介素6(IL-6)的减少和金属蛋白酶抑制剂4(TIMP4)的增加。该结果与血管生成PCR阵列的数据一致,其中从两个独立实验中查询了84个靶标,并记录了显著的倍数变化偏差。表2示出了IL-6是注意到与CXCL1表达始终相关的基因之一,其它基因包括Jagged1蛋白(JAG1)和软骨调节素-1(LECT1)。还从两个独立的实验中查询了包含84个靶标的肿瘤转移PCR阵列,并记录了显著的倍数变化偏差($p<0.05$)。表2示出了TIMP4是注意到与CXCL1表达始终相关的基因之一,其它基因包括胰岛素样生长因子1(IGF1)和基质金属蛋白酶2(MMP2)。

[0222] 表2

[0223] PCR阵列中血管生成相关基因或转移相关基因的倍数变化

PCR 阵列	基因	T24 (相对于	DU145 (相对	PC3 (相对于
		shSCR)	于空载体)	shSCR)
		CXCL1 KD4	CXCL1 OE8	CXCL1 KD7
[0224] 血管生成阵列 (PAHS-024Z)	白细胞介素 6 (IL6)	0.41 \pm 0.08	3.2 \pm 0.19	0.52 \pm 0.05
	Jagged 1 蛋白 (JAG1)	0.49 \pm 0.11	3.4 \pm 0.16	0.61 \pm 0.09
	软骨调节素-1 (LECT1) \dagger	6.13 \pm 0.24	1.23 \pm 0.19	3.94 \pm 0.18
肿瘤转移阵列 (PAHS-028Z)	胰岛素样生长因子 1 (IGF1)	0.49 \pm 0.07	2.6 \pm 0.29	0.59 \pm 0.11
	基质金属蛋白酶 2 (MMP2)	0.04 \pm 0.02	1.0 \pm 0.16	0.45 \pm 0.11
	金属蛋白酶抑制剂 4 (TIMP4) \ddagger	2.11 \pm 0.21	0.22 \pm 0.04	1.52 \pm 0.30

\dagger 人工血管生成因子 \ddagger 肿瘤侵袭抑制剂

[0225] 该研究的这一机制发现在于CXCL1分别通过调节IL-6和TIMP4来诱导血管生成和侵袭。TIMP4是金属蛋白酶(MMP)家族的组织抑制剂的成员,其由四个成员(TIMP1-4)组成,具有高序列同源性和结构同一性,但具有不同的组织表达、调控和抑制特征。TIMP通过抑制MMP调节,如细胞外基质(ECM)重塑和生长因子及其受体的活性等多种过程。已经注意到包括膀胱和前列腺的多种肿瘤具有较低水平的TIMP4(Melendez-Zajgla等人,2008)。IL-6是一种在炎症和B细胞的成熟中起作用的多功能促炎细胞因子。IL-6表达和功能在炎症相关疾病状态(例如关节炎)以及若干种人类癌症中改变,所述人类癌症包括前列腺癌(Cu1ig,2014)和膀胱癌(Chen等人,2013)。IL-6与其膜受体的结合之后是通过以下若干种途径之一启动信号转导:JAK/STAT、MAPK和/或PI3K途径。除了通过其膜受体进行调节外,IL-6还通过反式信号传导在增殖、迁移和侵袭的调节中起作用(Santer等人,2010)。因此,这些结果表明CXCL1通过a)诱导IL-6影响肿瘤生长,这导致细胞增殖、迁移和侵袭的增强和b)TIMP4的抑制影响肿瘤生长,其可能促进MMP的激活,进一步能够实现细胞生长和运动,而在治疗上靶向CXCL1能抑制这些分子并阻止这些过程。

[0226] 使用切割的胱天蛋白酶-3免疫染色来评估异种移植物中的细胞凋亡指数。分析显示,在用8mg/kg的HL2401处理的T24和PC3异种移植物中切割的胱天蛋白酶-3(细胞凋亡的指示)显著增加。

[0227] 图6A和6B显示,在来自用8mg/kg的HL2401治疗的动物的肿瘤中,在T24中细胞凋亡指数增加了35%($p<0.05$)。在用8mg/kg的HL2401治疗的肿瘤中,PC3异种移植肿瘤的细胞凋亡指数增加了42%($p<0.05$)。为了监测这些异种移植物中相关的血管生成指数,使用PECAM-1免疫染色评估了微血管密度(MVD)。分析显示,在用8mg/kg的HL2401处理的T24和PC3异种移植物中,MVD(血管生成)显著降低。在T24中MVD降低了52%($p<0.05$)并且在来自用8mg/kg的HL2401治疗的动物的PC3肿瘤中降低了43%($p<0.05$)。

[0228] 为了评估这些异种移植物中相关的增殖能力,使用Ki-67免疫染色来评估增殖指数。图6A和6B显示,与观察到的MVD降低一致,在用8mg/kg的HL2401处理的T24和PC3异种移植物中增殖指数的降低是明显的。在T24中增殖指数降低了50%($p<0.05$)并且在用8mg/kg的HL2401治疗的动物的肿瘤中降低了39%($p<0.05$)。这些体内观察结果证实了体外发现,并且证实了CXCL1对肿瘤生长的调节与IL-6表达的增加和TIMP4表达的降低相关的作用,并支持CXCL1的作用以及作为可行治疗靶标的作用。

[0229] 这些结果表明,施用如HL2401的靶向CXCL1的中和抗体通过抑制血管生成和增殖导致内皮萌芽的抑制、细胞侵袭的抑制以及膀胱和前列腺异种移植物生长的减少,以及诱导细胞凋亡(REF)。因此,趋化因子CXCL1的治疗靶向可以提供一种抑制肿瘤建立和生长的新策略。

[0230] 此外,炎性趋化因子CXCL1可以导致炎性细胞,如淋巴细胞和中性粒细胞的募集。已知CXCL1基因的表达伴随中性粒细胞浸润。因此,本公开的抗CXCL1 mAb可以用于治疗各种病症,如癌症和其它增殖性或炎性疾病。

[0231] 总之,CXCL1在人癌上皮细胞中的表达刺激细胞侵入并刺激内皮细胞的萌芽。此外,本公开的抗CXCL1中和单克隆抗体(HL2401)可以:a)抑制细胞增殖,b)抑制细胞侵袭,c)抑制内皮萌芽,以及d)导致通过减少增殖和血管生成以及诱导细胞凋亡来抑制表达CXCL1的皮下异种移植肿瘤。随后,CXCL1的表达与IL-6的表达呈正相关并且与TIMP4的表达呈负

相关。

[0232] 实例6

[0233] HL2401克隆的人源化

[0234] 人源化的单链可变片段(scFv)抗体(Hum HL2401_scFv)

[0235] 在重组人源化的抗体领域中,将鼠CDR序列移植到先前用于人类疗法的良好确立的人免疫球蛋白框架(如赫赛汀(Herceptin)[曲妥珠单抗]的框架区)上是常见的。在本研究中公开的人ScFv的构建中,采用了一种新方法来进行工程改造独特的人类免疫球蛋白框架,以便避免先前关于赫赛汀框架[Genentech]的知识产权问题。因此,所公开的人源化ScFv预计将构成独特的可专利的物质组成。

[0236] 用于该人ScFv抗体的设计策略是为可变重链和轻链框架区中的每一个工程改造最佳人共有序列。该基因工程改造是通过首先鉴定与包含鼠mAb HL2401_scFv的鼠重链和轻链基因直系同源的人免疫球蛋白种系基因来实现的。通过分析人类种系基因,然后设计了人类共有序列,该序列构成最小位置模板并提供足够长度的最佳链包装残基以维持关键CDR残基的整体3-D构象。基于间距和拓扑考虑,预测该人类共有序列的模板以保留原始小鼠单克隆抗体的结合特性。被工程改造的人类共有基因Hum HL2401_scFv预计将编码序列最相似的免疫球蛋白序列,并在原始“亲本”鼠HL2401_scFv序列的互补位内重现三维蛋白质构象和电荷方向。

[0237] 作为用于创建这种保留与其同源抗原的免疫反应性的免疫化学活性的人ScFv的关键设计策略,上述方法本身可以构成可专利的方法或工艺。因此,用于创建人源化的鼠单克隆抗体的基因工程改造策略是基于源自未重排免疫球蛋白基因的选定种系序列,从而基于此类框架应该没有特异突变并且具有最小免疫原性的假设。结合允许对所得的人源化ScFv进行3-D同源性建模的设计工具,可以将预测的人源化ScFv与小鼠单克隆抗体蛋白质结构进行比较,并且通过经由改变VH/VL的界面上包装残基的选择来编辑和重塑可变区,可以保持最佳的CDR构象。出于专利公开的目的,除了涵盖物质组成的权利要求之外,该基因工程改造策略还可以构成方法权利要求。

[0238] 在本公开中,概述了人源化的scFv Hum HL2401_scFv的框架和互补决定区的设计,包括连接重链和轻链的15-氨基酸丝氨酸/甘氨酸接头臂;人源化的ScFv在三个维度上建模;记录了ScFv的纯化,并且将确定ScFv Hum HL2401_scFv与人CXCL1的特异性免疫反应性。

[0239] 一般方法

[0240] HL2401鼠重链的三个CDR区[H-CDR₁、H-CDR₂和H-CDR₃]和鼠轻链的三个CDR区[L-CDR₁、L-CDR₂、L-CDR₃]被移植到优化的人免疫球蛋白重链和轻链框架上。

[0241] 抗体编号方案和CDR定义

[0242] 作为KabatMan数据库<http://www.bioinf.org.uk/>的一部分的抗体编号服务器用于根据增强型Chothia方案对本研究中的所有抗体序列进行编号。在人源化策略中,我们将增强型Chothia编号方案与抗体序列的接触CDR定义相结合,以将鼠抗体轻链和重链的CDR定位在以下位置:H-CDR₁26-35、H-CDR₂47-65、H-CDR₃93-101、L-CDR₁24-36、L-CDR₂46-55和L-CDR₃89-96。

[0243] 基于种系的人类共有模板的选择

[0244] 为了产生人源化的ScFv基因,将小鼠VH和VL的六个互补决定区(CDR)移植到选定的基于种系的人类共有框架(FR)上,显示出最高的氨基酸序列同一性以优化人源化并因此优化所得的ScFv蛋白的预测的免疫原性。使用来自VBASE2-quest服务器<http://www.vbase2.org/V-base> (http://www.imgt.org/IMGT_vquest)和Ig-BLAST服务器(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>)来独立地鉴定在人和小鼠Hum HL2401 VH和VL之间的FR中表现出最高氨基酸序列相似性的人免疫球蛋白种系序列。选择了重链和轻链的最高四个保守人种系免疫球蛋白序列。从这四个人种系免疫球蛋白序列中,设计了共有人类框架,用于移植“亲本”小鼠HL2401_scFv的CDR残基。与基于种系的共有人类FR不同的小鼠VH和VL的FR中的氨基酸序列被适当的人类残基替换,同时在被称为Vernier区残基和链包装残基的位置保留小鼠残基。对于构建这种生物活性的人类ScFv,重要的是每当鼠序列与共有的人类框架序列不同时,框架区中适当的人类残基的替换。这包括被认为是“Vernier区残基”以及链包装残基的人类序列。

[0245] 表3总结了人源化后的抗体基因。

[0246] 表3

基因序列	Z 值 (VH 的人源化)	Z 值 (VL 的人源化)
小鼠基因 (MumHL2401 scFv)	-1.4	-0.6
[0247] HumBB2401 scFv 人源化版本 1	-0.5	0.7
HUM2401-ScFv_1 人源化版本 2	0.8	0.7

[0248] 表4

人源化版本	结构域	蛋白质序列	DNA 序列
[0249] HumBB2401 scFv (人源化版本 1)	VL	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
	VH	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
	全长	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
HUM2401-ScFv_1 人源化版本 2	VL	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
	VH	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19
	全长	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21

[0250] 图7示出了使用Rosetta同源性建模服务器的小鼠和人源化的模板序列的同源性建模。绿色示意图模型表示小鼠序列模板并且耐火砖颜色示意图模型表示HumBB2401 scFv (人源化版本1)。该图是使用PyMole分子图形系统生成的。

[0251] 第二种策略

[0252] HUM2401-ScFv_1 (人源化版本2) 通过将HumBB2401 scFv VL (SEQ ID NO:12) 与VH (SEQ ID NO:18) 融合而产生。

[0253] 图8示出了使用Rosetta同源性建模服务器的小鼠和人源化的模板序列的同源性建模。绿色示意图模型表示小鼠序列模板并且耐火砖颜色示意图模型表示HUM2401-ScFv_1 (人性化版本2)。该图是使用PyMole分子图形系统生成的。

[0254] 图9示出了小鼠基因、MumHL2401 scFv和人源化基因,即HumBB2401 scFv (人源化版本1) 和HUM2401-ScFv_1 (人源化版本2) 之间的序列比对。

[0255] 另外的人源化克隆在表5中示出。

[0256] 表5

[0257]	人源化版本	蛋白质序列	DNA序列
	Hum2401_scFv-3	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23
	HumBB2401-3	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25

[0258] 图10示出了Hum2401_scFv-3与HumBB2401-3之间的序列比对。

[0259] 细菌宿主中ScFv蛋白的诱导

[0260] 将人源化的HL2401_scFv克隆构建到细菌表达载体中并转化到T7改组细菌菌株中。T7改组细胞并在1.5L 2xYT加上氨苄青霉素培养基中在37℃下生长直到对数噬菌体(OD600=0.5),用0.3mM的IPTG诱导,并允许在30℃下生长另外的16小时。在诱导后,通过在4℃下以8000g离心15分钟来收获细菌,并将沉淀物在-20℃下储存至少2小时。将冷冻的沉淀物短暂解冻并悬浮在40ml的裂解缓冲液(在PBS中的1mg/ml溶菌酶加上不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物(赛默飞世尔科技,马萨诸塞州沃尔瑟姆)中。将裂解混合物在冰上孵育1小时,并且然后加入10mM的MgCl₂和1μg/ml的DNase I,并将混合物在25℃下孵育20分钟。将最终裂解混合物以12000g离心20分钟,并收集上清液。该上清液被称为用于蛋白L柱亲和色谱法的周质提取物。

[0261] 使用HL2401_scFv蛋白的蛋白质印迹分析

[0262] 纯化的重组人CXCL1蛋白被用作蛋白质印迹分析中的靶抗原。将500ng的人CXCL1蛋白和作为阴性对照的1μg的纯化蛋白加载到4-20%的梯度Tris-甘氨酸SDS-PAGE上并转移到细胞内膜上。在室温下,将膜在PBS中用3%脱脂乳封闭3小时。之后,将膜与部分纯化的人源化的HL2401_scFv蛋白在4℃下一起孵育过夜。膜用含0.05%的吐温20缓冲液(PBST)的磷酸钠缓冲盐水洗涤3次。清洗后的膜与抗c-Myc小鼠IgG在室温下一起孵育1小时,以识别scFv上的c-Myc标签并鉴定scFv结合的抗原的位置。在用PBST洗涤后,将膜与在PBS中稀释(1:3000v/v)的山羊抗小鼠IgG(H+L)HRP缀合物在室温下一起孵育1小时,并用TMB基底的混合物使特异性免疫反应带可视化。

[0263] 图11示出了抗原CXCL1和阴性对照蛋白被电泳并转印到硝酸纤维素膜上。用人源化版本的scFv抗体探测抗原,然后用抗C Myc小鼠单克隆抗体和与HRP缀合的相应二级抗体进行探测。通过使用TMB可视化结合的抗体。泳道M表示分子标记物,泳道1表示人CXCL1蛋白(300ng),并且泳道2表示阴性对照。图A代表丽春红染色(ponceau staining),图B代表使用纯化的Hum2401scFv抗体的蛋白质印迹分析,并且图C代表使用纯化的HumBB2401scFv抗体的蛋白质印迹分析。

[0264] 另一方面,抗Myc标签的单克隆抗体,用于识别表达的scFv蛋白上的Myc标签。将载有抗原的膜与抗myc-HRP(1/2000)抗体一起孵育,并用TMB底物的混合物使特异性免疫反应带可视化。

[0265] 图12示出了在大肠杆菌中表达并纯化的HL2401_scFv蛋白的人源化版本,其通过抗His标签抗体检测。

[0266] 用于确认HL2401_scFv蛋白的结合活性的ELISA测试

[0267] 将人CXCL1蛋白在4℃下包被到96孔板上,每孔30ng。该板在室温下在PBS中用3%脱脂乳封闭2小时。将板用PBST洗涤3次并施加不同稀释浓度的抗人CXCL1人源化版本scFv抗体。施加带有HRP缀合抗体的抗Myc小鼠单克隆抗体,并用TMB溶液显色。

[0268] 图13示出了在ELISA和蛋白质印迹分析中H2407_scFv形式抗体蛋白的人源化版本

与人CXCL1抗原特异性结合。因为这些抗体的剂量依赖性活性,该ELISA和蛋白质印迹分析结果不相关。

[0269] 实例7

[0270] 设计重新格式化的Hum2401衍生物

[0271] 两种人源化版本的轻链可以与信号肽:MDSQAQVLM LLLWVSGTCG (SEQ ID NO:26) 融合。

[0272] 人源化版本Hum2401衍生物的重链可以与信号肽:MEFGLSWVFLVAILKGVQC (SEQ ID NO:27) 融合。

[0273] Hum2401衍生物的融合蛋白总结于表6中。

[0274] 表6

[0275]

Hum2401融合蛋白	蛋白质序列	DNA序列
Hum2401 VL-信号	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29
Hum2401 VH-信号	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31
HumBB 2401 VH-信号	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33

[0276] 亚克隆到哺乳动物表达载体中

[0277] 如图14所示,对于重链使用EcoR I和Apa I并且对于轻链使用Hind III和BsiWi来亚克隆人源化基因的轻链和重链。首先,将轻链基因克隆到载体中并对质粒DNA进行测序。将正确插入的轻链克隆用于两个版本人源化的重链的第二步亚克隆。连接的克隆被扩增并送去测序。正确插入的重链克隆用于大规模DNA制备。使用无内毒素的试剂盒来制备大量质粒DNA。克隆总结在表7中。

[0278] 表7

[0279]

克隆	蛋白质序列	DNA序列
PCMV-dhfr-H2401轻链克隆5	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:35
Pcmv-dhfrhumBB2401VH克隆1	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:37
Pcmv dhfr-HumBB2401克隆4	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39

[0280] 细胞系HEK293F悬浮培养

[0281] 悬浮HEK 293-F细胞中的瞬时转染和生产

[0282] 1. 转染前大约24小时,以 0.6×10^6 - 0.7×10^6 个细胞/mL通过Freestyle 293-F细胞。将烧瓶(125mL或100mL的带通风膜盖的锥形瓶)放在轨道振动台上,在 37°C 、 $8\% \text{CO}_2$ 下以135rpm旋转。

[0283] 2. 在转染当天,细胞密度应为约 1.2×10^6 - 1.5×10^6 /mL。将细胞稀释到 1×10^6 个细胞/mL。将30mL的细胞加入到每个125mL的摇瓶中。

[0284] a. 用于在锥形瓶中进行小规模生产,所述锥形瓶包含100mL总工作体积的细胞悬浮液,所述细胞悬浮液在线性振荡器中以150rpm孵育。

[0285] b. 在1/10体积的新鲜无血清培养基中制备总共 $1\mu\text{g}$ 高质量质粒DNA(使用Takara Clontech Nucleobond Xtra Midi EF质粒分离试剂盒制备)和每mL培养体积 $2.5\mu\text{g}$ 的PEI(总共 $100\mu\text{g}$ 的DNA)。

[0286] c. 在聚苯乙烯板或管中用适当体积的无血清培养基稀释PEI(不要使用聚丙烯管)。

- [0287] d. 在适当体积的DMEM中稀释质粒DNA,并与PEI悬浮液混合。
- [0288] e. 在室温下孵育混合物30分钟,以允许形成PEI::DNA复合物。
- [0289] f. 将PEI::DNA悬浮液均匀地分散在细胞上。
- [0290] g. 将细胞进一步培养6天。
- [0291] h. 测试人IgG的产率。
- [0292] 转染试剂PEI的制备:
- [0293] PEI (聚乙烯亚胺) 是一种阳离子聚合物,是来自Polysciences (Polysciences, 目录号23966-2) 的25kDa线性聚合物。注意:Portolano等人 (2014) 使用支化形式的PEI (西格玛奥德里奇 (Sigma Aldrich) 目录号408727)。
- [0294] 人源化IgG版本的活性的测定
- [0295] 用于确认HL2401_scFv蛋白的结合活性的ELISA测试
- [0296] 在4°C下将人CXCL1蛋白包被到96孔板上,每孔30ng。该板在室温下在PBS中用3%脱脂乳封闭2小时。用PBST洗涤板3次,并且施加的抗人CXCL1人源化版本IgG抗体在PBS中稀释1/100和1/10,并在室温下置于抗原包被的板中1小时。将带有HRP缀合抗体的驴抗人单克隆抗体稀释1/3000并在室温下施加45分钟,然后用PBST洗涤3次并用TMB溶液显色。
- [0297] 表8和图15显示ELISA结果。
- [0298] 表8

Hum2401 Ab	ELISA 信号		Min
原始的 1/10 稀释	2.098	2.098	2.098
原始的 1/100 稀释	1.848	1.908	1.848
仅抗人 HRP	0.206	0.075	0.075
空白	0.044	0.044	0.044
[0299]			
HumBB2401 Ab	ELISA 信号		Min
原始的 1/10 稀释	2.091	2.094	2.091
原始的 1/100 稀释	1.662	1.665	1.662
仅抗人 HRP	0.151	0.121	0.121
空白	0.043	0.048	0.043

- [0301] 使用人源化的HL2401_IgG衍生物的蛋白质印迹分析
- [0302] 纯化的重组人CXCL1蛋白用作蛋白质印迹分析中的靶抗原。将200ng和500ng的人CXCL1蛋白和以鸡溶菌酶蛋白作为阴性对照的细菌细胞裂解物加载到4-20%梯度的Tris-甘氨酸SDS-PAGE上并转移到细胞内膜上。在室温下,将膜在PBS中使用3%脱脂乳封闭3小时。之后,将膜与人源化的HL2401_IgG变体蛋白的转染上清液在4°C下一起孵育过夜。膜用含0.05%吐温20缓冲液 (PBST) 的磷酸钠缓冲盐水洗涤3次。经洗涤的膜与驴抗人 (H+L) HRP缀合抗体在室温下一起孵育1小时,以识别恒定区的人源化重链和轻链,并且鉴定由重新格式化的人源化抗体结合的抗原的位置,并用TMB底物的混合物使特异性免疫反应带可视化。
- [0303] 图16示出了抗原人CXCL1和具有鸡溶菌酶蛋白的细菌细胞裂解物的阴性对照被电泳并转印到硝酸纤维素膜上。用人源化版本的IgG抗体探测抗原,然后用与HRP缀合的抗人 (H+L) 二级抗体进行探测。通过使用TMB可视化结合的抗体。泳道M表示分子标记物,泳道1代

表人CXCL1蛋白 (200ng), 并且泳道2代表人CXCL1蛋白 (200ng), 泳道3代表阴性对照。分别地, 图A代表SDS-PAGE染色, 图B代表使用纯化的Hum2401 IgG抗体的蛋白质印迹分析, 并且图C代表使用纯化的HumBB2401 IgG抗体的蛋白质印迹分析。

[0304] 使用蛋白G亲和色谱法纯化转染的培养物上清液

[0305] 收获转染的细胞并使用0.45u过滤上清液, 并使用AKTA纯L系统加载蛋白G亲和色谱。使用0.2M甘氨酸pH 2.5洗脱蛋白质并用1M的Tris-HCl pH:9中和。将洗脱的级分分析到SDS-PAGE中。

[0306] 图17A和17B分别示出了Hum2401和HumBB2401 IgG的亲和纯化色谱图。

[0307] 表9总结了亲和纯化色谱结果。

[0308] 表9

[0309]

蛋白质	大约浓度	总体积	浓度mg/ml
Hum2401IgG	1.6mg	3ml	0.539mg/ml
HumBB2401	1mg	3ml	0.35mg/ml

[0310] 图18示出了纯化样品的SDS-PAGE凝胶电泳, 图A代表纯化的蛋白Hum2401峰9的SDS-PAGE染色, 并且图B代表纯化的蛋白Hum2401峰10的SDS-PAGE染色。

[0311] 可递送样品的清单

[0312] 1. 蛋白质样品

[0313]

样品名称	大约总浓度	总体积	浓度mg/ml
Hum2401IgG	1.6mg	3ml	0.539mg/ml
HumBB2401	1mg	3ml	0.35mg/ml

[0314] 2. 质粒DNA样品

[0315]

样品名称	规格	质粒名称	样品
POE-mu H2401scFv	小鼠 scFv	在 T7 启动子下的 ScFv 表达载体 (周质)	质粒 DNA
POE-HumH2401scFv	人源化的 scFv	在 T7 启动子下的 ScFv 表达载体 (周质)	质粒 DNA
POE-HumBBH2401scFv	人源化的 scFv	在 T7 启动子下的 ScFv 表达载体 (周质)	质粒 DNA
Pcmvdhfr-Hum2401 (H+L)	重新格式化的人源化的 IgG 版本	包含人源化基因的哺乳动物表达载体	质粒 DNA
Pcmvdhfr-HumBB2401 (H+L)	重新格式化的人源化的 IgG 版本	包含人源化基因的哺乳动物表达载体	质粒 DNA

[0316] 实例8

[0317] 人源化的抗CXCL1抗体对血管生成的影响

[0318] 人源化的抗CXCL1抗体抑制内皮细胞萌芽

[0319] 图19A-19H示出了人源化的抗人CXCL1抗体BB2401和Hum2401在抑制内皮细胞萌芽方面与阿瓦斯汀一样有效。简言之, 常用浓度 (2mg/ml) 的阳性对照贝伐单抗 (阿瓦斯汀) 显著地减少了萌芽的数量 (图19A) 和萌芽的总长度 (图19E)。小鼠抗人CXCL1抗体HL2401和商业抗人CXCL1抗体 (抗CXCL1) 也显著地减少了萌芽的数量 (图19B和19C) 和萌芽的总长度 (图19F和19G)。与浓度为200µg/ml的阿瓦斯汀相比, 测试了抗人CXCL1抗体BB2401和Hum2401的

效果。浓度为200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的阿瓦斯汀对萌芽的数量(图19D)和萌芽的总长度(图19H)的减少显示出与2mg/ml相似水平的抑制作用。Hum2401具有与阿瓦斯汀相同水平的抑制作用(图19D和19H)。值得注意的是, BB2401对萌芽的数量(图19D)和萌芽的总长度(图19H)表现出比阿瓦斯汀更强的抑制作用。总之, 人源化的抗人CXCL1抗体BB2401和Hum2401对CXCL1的中和导致对血管生成的抑制。星号*、**、***和****分别表示 p 值 ≤ 0.05 、 < 0.01 、 < 0.001 和 < 0.0001 。

[0320] 人源化的抗CXCL1抗体抑制内皮细胞管形成

[0321] 图20A-20F示出了人源化的抗人CXCL1抗体BB2401和Hum2401在抑制内皮细胞管形成方面与阿瓦斯汀一样有效。简言之, 常用浓度(1mg/ml)的阳性对照阿瓦斯汀显著地减少管的总长度(图20D), 但没有减少接头的数量(图20A)。作为对比对照, 小鼠抗人CXCL1抗体HL2401和商业抗人CXCL1抗体(抗CXCL1)没有显著地减少接头的数量(图20B)和管道的总长度(图20E)。测试了BB2401和Hum2401与100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的阿瓦斯汀相比的效果。图20F示出了100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的阿瓦斯汀对管的总长度具有与1mg/ml浓度时相似的抑制作用(图20D)。图20F还示出了BB2401和Hum2401对管的总长度具有与阿瓦斯汀相同水平的抑制作用。星号*、**和***分别表示 p 值 ≤ 0.05 、 < 0.01 和 < 0.001 。

[0322] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾, 否则本文所述的所有方法都可以以任何合适的顺序进行。

[0323] 本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如, “如”)的使用仅旨在更好地阐明本公开而不对本公开的范围构成限制, 除非另有说明。除非明确说明, 否则说明书中的任何语言都不应被解释为表明任何要素对于本公开的实践是必不可少的。

[0324] 本文中专利文件的引用和并入仅为了方便起见, 并不反映此类专利文件的有效性、可专利性和/或可执行性的任何观点。

[0325] 本公开在适用法律允许的最大范围内包括本文提出的方面或权利要求中记载的主题的所有修改和等效物。

[0326] 在本说明书中引用的所有参考文献都通过引用并入本文, 就如同每篇参考文献都被具体地和单独地指示为通过引用并入。任何参考文献的引用都是针对其在申请日之前的公开, 并且不应被解释为承认本公开无权凭借先前的公开而先于此类参考文献。

[0327] 应当理解, 上述要素中的每一个, 或者两个或更多个要素一起也可以在不同于上述类型的其它类型的方法中找到有用的应用。在没有进一步分析的情况下, 前述内容将如此充分地揭示本公开的要点, 以至于其他人可以通过应用当前的知识, 容易地将其适用于各种应用, 而不省略从现有技术的观点来看在很大程度上构成在所附权利要求中阐述的本公开的一般或特定方面的必要特征的特征。前述实施例仅作为示例给出; 本公开的范围仅由所附的权利要求来限制。

序列表

<110> 查尔斯·J·罗瑟

<120> 用于治疗涉及CXCL1功能的疾病的组合物和方法

<130> 3000047-002977

<150> US 62/797,573

<151> 2019-01-28

<160> 39

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> 小白鼠

<400> 1

```

gacattgtgc tgaccaatc tccagettct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttatgt gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
cggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatcctt 240
cctgtggagg aggatgatgg tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgtgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgg 336

```

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> 小白鼠

<400> 2

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
           20           25           30
Gly Asp Ser Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
           35           40           45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Arg Ile Pro Ala
           50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Leu
65           70           75           80
Pro Val Glu Glu Asp Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser
           85           90           95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
           100          105          110

```

<210> 3

<211> 356

<212> DNA

<213> 小白鼠

<400> 3

gaagtgaagc tgggtggagtc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactata tatactgggt gaaacagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagag attgatccta gccatgggtg tcctaccttc 180
 aatgagaagt tcaagaacaa ggccacactg actgtagaca aatcatccag cacagcatac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgacgac tctgcggtct attactgtac aagagagtcg 300
 gggacgggag ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccactc tcacagtctc ctcggg 356

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> 小白鼠

<400> 4

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser His Gly Gly Pro Thr Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 73

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 5

Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
 1 5 10 15
 Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys Ser Pro Gly
 20 25 30
 Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg
 35 40 45
 Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys Ile Ile Glu
 50 55 60
 Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn
 65 70

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 6

Ser Tyr Tyr Ile Tyr
 1 5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

Glu Ile Asp Pro Ser His Gly Gly Pro Thr Phe Asn
 1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 8

Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 9

<211> 15

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 9
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Val Asn
 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 10
 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 11
 Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser

50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser		
	85	90
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
	100	105
		110

<210> 13

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

```

gacatccaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagggccacc 60
atcagctgca aggccagcca gagcgtggac tacgacggcg acagctacgt gaactggtac 120
cagcagaagc cggcaaggc cccaagctg ctgatctacg ccgccagcaa cctggagagc 180
ggcatcccca gcaggttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc 240
agcctgcagc ccgaggactt cgccacctac tactgccagc agagcagcga ggacccttg 300
accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc aagagg 336

```

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
	20	25
Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40
Gly Glu Ile Asp Pro Ser His Gly Gly Pro Thr Phe Asn Glu Lys Phe		
	50	55
Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Lys Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
		95

Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc cggcgccag cgtgaagctg 60
 agctgcaagg ccagcggeta caccttcacc agctactaca tctactgggt gaggcaggcc 120
 cccggccagg gcctggagtg gatcggcgag atcgacceca gccacggcgg cccaccttc 180
 aacgagaagt tcaagaacag ggccaccctg accgtggaca agagcaagag caccgcctac 240
 atggagctga gcagcctgag gagcgaggac accgccgtgt actactgcac caggagagc 300
 ggcaccggcg ccatggacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> 16

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

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

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

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

Gly Glu Ile Asp Pro Ser His Gly Gly Pro Thr Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115	120	125
Gly Gly Gly Ala Arg Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln		
130	135	140
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Ser		
145	150	155
Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Val Asn		
165	170	175
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala		
180	185	190
Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
195	200	205
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp		
210	215	220
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Trp Thr Phe		
225	230	235
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
245	250	

<210> 17

<211> 750

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

```

caggttcagc tggttcagtc tggtgcgga gtaaaaaac cgggtgcgtc tgtaaactg 60
tcttgcaaag cgctcggta cacctcacc tctactaca tctactgggt tcgtcaggcg 120
ccgggtcagg gtctggaatg gatcggtag atcgaccgt ctcacggtg tccgacctc 180
aacgaaaaat tcaaaaaccg tgcgaccctg accgttgaca aatctaaatc taccgcgtac 240
atggaactgt cttctctgcg ttctgaagac accgcggttt actactgcac ccgtgaatct 300
ggtagcgggt cgatggacta ctggggtcag gtagacctg ttaccgtttc ttctgggtgt 360
ggtaggttctg gcggcgccgg ctctggcgga ggtgctcgag gcgggtggcg atcggacatc 420
cagatgacc agtctccgct ttctctgtct gcgtctgtg gtgaccgtgc gaccatctct 480
tgcaaagcgt ctcagtctgt tgactacgac ggtgactett acgttaactg gtaccagcag 540
aaaccgggta aagcgcgga actgetgatc tacgcggcgt ctaacctgga atctggtatc 600
ccgtctcgtt tctctggttc tggttctggt accgacttea cctgaccat ctcttctctg 660
cagccggaag acttcgagac ctactactgc cagcagtctt ctgaagacc gtggaccttc 720
ggtagggta ccaaagtga aatcaaactg 750

```

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser His Gly Gly Pro Thr Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

caggtgcagc tggaggagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgaggctg 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccttacc agctactaca tctactgggt gaggcaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagtg gatcggcgag atcgacceca gccacggcgg cccaccttc 180
 aacgagaagt tcaagaacag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgcegtgt actactgcac caggagagc 300
 ggcaccggcg ccatggacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> 20

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser His Gly Gly Pro Thr Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ala Arg Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
 130 135 140
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Ser
 145 150 155 160
 Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Val Asn
 165 170 175
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
 180 185 190
 Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 210 215 220
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Trp Thr Phe
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 245 250

<210> 21

<211> 750

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 21

caggtgcagc tgggtggagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgaggctg 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactaca tctactgggt gaggcaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagtg gatcggcgag atcgaccca gccacggcgg cccaccttc 180
 aacgagaagt tcaagaacag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcac cagggagagc 300
 ggcaccggcg ccatggacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagcgggtgt 360
 ggtggttctg gcggcggcgg ctctggcgga ggtgctcgag gcggtggcgg atcggacatc 420
 cagatgaccc agagccccag cagcctgagc gccagcgtgg gcgacagggc caccatcagc 480
 tgcaaggcca gccagagcgt ggactacgac ggcgacagct acgtgaactg gtaccagcag 540
 aagccccgca aggcccccaa gctgctgac tacgccgcca gcaacctgga gagcggcatc 600
 cccagcaggt tcagcggcag cggcagcggc accgacttca cctgacat cagcagcctg 660
 cagcccaggg acttcgccac ctactactgc cagcagagca gcgaggacc ctggaccttc 720
 ggccagggca ccaaggtgga gatcaagagg 750

<210> 22

<211> 273

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser His Gly Gly Pro Thr Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ala Arg Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln

130	135	140
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Ser		
145	150	155
Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Val Asn		
	165	170
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala		
	180	185
Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
	195	200
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp		
210	215	220
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Trp Thr Phe		
225	230	235
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ser Gly Ala Glu Gln		
	245	250
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala His His His His His		
	260	265
		270

His

<210> 23

<211> 822

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 23

```

caggtgcagc tggaggagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgaggctg 60
agctgcaagg ccagcggcta cacctcacc agtactaca tctactgggt gaggcaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg gatcggcgag atcgaccca gccacggcgg cccaccttc 180
aacgagaagt tcaagaacag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcac caggagagac 300
ggcaccggcg ccatggacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagcgggtgt 360
ggtggttctg gcggcggcgg ctctggcgga ggtgctcgag gcggtggcgg atcggacatc 420
cagatgacc agagccccag cagcctgagc gccagcgtgg gcgacagggc caccatcagc 480
tgcaaggcca gccagagcgt ggactacgac ggcgacagct acgtgaactg gtaccagcag 540
aagcccggca aggcccccaa getgetgatc tacgccgcca gcaacctgga gagcggcatc 600
cccagcaggt tcagcggcag cggcagcggc accgacttea cctgacat cagcagcctg 660
cagcccagg acttcgccac ctactactgc cagcagagca gcgaggacc ctggaccttc 720
ggccagggca ccaagtgga gatcaagagg gctagcgggt ctgaacagaa actgatctct 780
gaagaagacc tgaacggtgc tcaccaccac caccaccact ag 822

```


Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala His His His His His
 260 265 270

His

<210> 25

<211> 822

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

caggttcagc tggttcagtc tgggtgcgaa gttaaaaaac cgggtgcgtc tgttaaactg 60
 tcttgcaaag cgtctggta caccttcacc tcttactaca tctactgggt tcgtcaggcg 120
 ccgggtcagg gtctggaatg gatcggtgaa atcgaccctg ctcacgggtg tccgaccttc 180
 aacgaaaaat tcaaaaaccg tgcgaccctg accgttgaca aatctaaatc taccgcgtac 240
 atggaactgt cttctctgcg ttctgaagac accgcggttt actactgcac ccgtgaatct 300
 ggtaccgggtg cgatggacta ctggggtcag ggtaccctgg ttaccgtttc ttctggtggt 360
 ggtggttctg gcggcggcgg ctctggcgga ggtgctcgag gcggtggcgg atcggacatc 420
 cagatgacce agtctccgtc ttctctgtct gcgtctgttg gtgaccgtgc gaccatctct 480
 tgcaaagcgt ctcagtctgt tgactacgac ggtgactctt acgttaactg gtaccagcag 540
 aaaccgggta aagcggcgaa actgctgac tacgcggcgt ctaacctgga atctggtatc 600
 ccgtctcggtt tctctggttc tggttctggt accgacttea ccttgaccat ctcttctctg 660
 cagccggaag acttcgcgac ctactactgc cagcagtctt ctgaagacct gtggaccttc 720
 ggtcagggta ccaaagtga aatcaaactg gctagcgggtg ctgaacagaa actgatctct 780
 gaagaagacc tgaacgggtg tcaccaccac caccaccact ag 822

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 26

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly
 20

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 27

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 28

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 28

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Arg Thr His
130 135

<210> 29

<211> 405

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 29

atggattcac aggcccaggt tcttatgta ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagggccacc 120
 atcagctgca aggccagcca gagcgtggac tacgacggcg acagctacgt gaactggtac 180
 cagcagaagc cggcaaggc cccaagctg ctgatctacg ccgccagcaa cctggagagc 240
 ggcattccca gcaggttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc 300
 agcctgcagc ccgaggactt cgccacctac tactgccagc agagcagcga ggaccctgg 360
 accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc aagaggcgta cgcac 405

<210> 30

<211> 146

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 30

Val Leu Glu Phe Ala Thr Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu
 1 5 10 15

Val Ala Ile Leu Lys Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
 20 25 30

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys
 35 40 45

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln
 50 55 60

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser His
 65 70 75 80

Gly Gly Pro Thr Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser
 85 90 95

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 100 105 110

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly
 115 120 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 130 135 140

Pro Tyr

145

<210> 31

<211> 438

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

gtgctggaat tcgccacat ggagtttggg ctgagctggg tttttcttgt ggctatttta 60
 aaaggtgtcc agtgtcaggt gcagctgggt gagagcggcg gcggcctggg gcagcccggc 120
 ggcagcctga ggctgagctg caaggccagc ggctacacct tcaccagcta ctacatctac 180
 tgggtgaggc agggccccgg caaggcctg gagggtgatcg gcgagatcga cccagccac 240
 ggcggcccca ccttcaacga gaagttcaag aacaggttca ccatcagcag ggacaacagc 300
 aagaacaccc tgtacctgca gatgaacagc ctgagggccg aggacaccgc cgtgtactac 360
 tgcaccaggg agagcggcac cggcgccatg gactactggg gccagggcac cctggtgacc 420
 gtgagcagcg ggccctac 438

<210> 32

<211> 146

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 32

Val	Leu	Glu	Phe	Ala	Thr	Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Phe	Leu
1				5					10					15	
Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly	Val	Gln	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser
			20				25					30			
Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys
		35				40						45			
Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln
	50					55					60				
Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	His
65				70					75					80	
Gly	Gly	Pro	Thr	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Asn	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr
				85					90					95	
Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg
			100						105					110	
Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Thr	Gly
		115						120					125		
Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
	130					135					140				

Pro Tyr

145

<210> 33

<211> 438

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 33

```
gtgctggaat tcgccacat ggagtttggg ctgagctggg tttttcttgt ggctatttta 60
aaaggtgtcc agtgtcaggt tcagctggtt cagtctgggt cggaagttaa aaaaccgggt 120
gcgtctgtta aactgtcttg caaagcgtct gttacacct tcaccttta ctacatctac 180
tgggttcgtc aggcgccggg tcagggtctg gaatggatcg gtgaaatcga cccgtctcac 240
ggtggtccga ccttcaacga aaaattcaaa aaccgtgcga ccctgaccgt tgacaaatct 300
aaatctaccg cgtacatgga actgttctct ctgcgttctg aagacaccgc ggtttactac 360
tgcacccgtg aatctggtac cgggtgcgatg gactactggg gtcagggtac cctggttacc 420
gtttcttctg ggccctac 438
```

<210> 34

<211> 136

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 34

```
Ala Thr Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp
1           5           10           15
Val Ser Gly Thr Cys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
           20           25           30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
           35           40           45
Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln
           50           55           60
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu
65           70           75           80
Glu Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
           85           90           95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
           100          105          110
Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
           115          120          125
Lys Val Glu Ile Lys Arg Arg Thr
           130          135
```

<210> 35

<211> 408

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 35

gccacatgg attcacaggc ccaggttctt atgttactgc tgctatgggt atctggtacc 60
 tgtggggaca tccagatgac ccagagcccc agcagcctga gcgccagcgt gggcgacagg 120
 gccacatca gctgcaaggc cagccagagc gtggactacg acggcgacag ctacgtgaac 180
 tggtagcagc agaagcccgg caaggcccc aagctgctga tctacgccgc cagcaacctg 240
 gagagcggca tccccagcag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 300
 atcagcagcc tgcagcccga ggacttcgcc acctactact gccagcagag cagcgaggac 360
 ccctggacct tccggccagg caccaaggtg gagatcaaga ggcgtacg 408

<210> 36

<211> 279

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 36

Gly Tyr Phe Lys Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala
 35 40 45
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser His Gly
 50 55 60
 Gly Pro Thr Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 85 90 95
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly Ala
 100 105 110
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Phe
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Asn Asn Leu Gly Thr His Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Thr
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Asp Arg His Ser Ser Ser Ser Pro Gln Asn Pro
 245 250 255
 Arg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Gly Leu Val
 260 265 270
 Val Asp Met Lys His Glu Asp
 275

<210> 37

<211> 837

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 37

ggctatttta aaggtgtcca gtgtcaggtg cagctggtgg agagcggcgg cggcctggtg 60
 cagccccggcg gcagcctgag gctgagctgc aaggccagcg gctacacctt caccagctac 120
 tacatctact ggggtgaggca ggccccggc aaggccctgg agtggatcgg cgagatcgac 180
 cccagcccacg gcgggccccac cttcaacgag aagttcaaga acaggttcac catcagcagg 240
 gacaacagca agaacaccct gtacctgcag atgaacagcc tgagggccga ggacaccgcc 300
 gtgtactact gcaccaggga gacgggcacc ggcgcatgg actactgggg ccagggcacc 360
 ctggtgaccg tgagcagcgc cagcacgaag ggcccatgg tcttccccct ggcaccctcc 420
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc 480
 gaaccggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc gcctgacca gcggcgtgca caccttcccc 540
 gctgtcctac agtcctcagg acttactec ctcttcagcg tggtgaccgt gcctccaac 600
 aacttgggca cccacaceta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660
 gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccaca 720
 cctgaactec tgggggaccg tcactettec tcttcccccc aaaacccaag agacaccctc 780
 atgatctccc ggaccctga ggtcacaggc ctgggtggtg acatgaagca cgaagac 837

<210> 38

<211> 186

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 38

Gly Tyr Phe Lys Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 1 5 10 15
 Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala
 35 40 45
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser His Gly
 50 55 60
 Gly Pro Thr Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val
 65 70 75 80
 Asp Lys Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 85 90 95
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Gly Thr Gly Ala
 100 105 110
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Met
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ser Val Leu Arg Ser Ser
 180 185

<210> 39

<211> 558

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 39

ggctatttta aagggtcca gtgtcaggtt cagctggttc agtctggtgc ggaagttaa 60
 aaaccgggtg cgtctgtaa actgtcttgc aaagcgtctg gttacacctt cacctcttac 120
 tacatctact gggttcgtca ggcgccgggt cagggtctgg aatggatcgg tgaatcgac 180

ccgtctcacg gtggtccgac cttcaacgaa aaattcaaaa accgtgacgac cctgaccgtt 240
gacaaatcta aatctaccgc gtacatggaa ctgtettctc tgcgttctga agacaccgcg 300
gtttactact gcacccgtga atctggtacc ggtgcatgg actactgggg tcagggtacc 360
ctggttaccg tttcttctgc cagcacgaag ggcccatcgg tcttcccct ggcaccctcc 420
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc 480
gaaccggtga cgggtcgtg gaactcagc gcctgacca gcggcatgca caccttccc 540
tctgtcctac ggtcctct 558

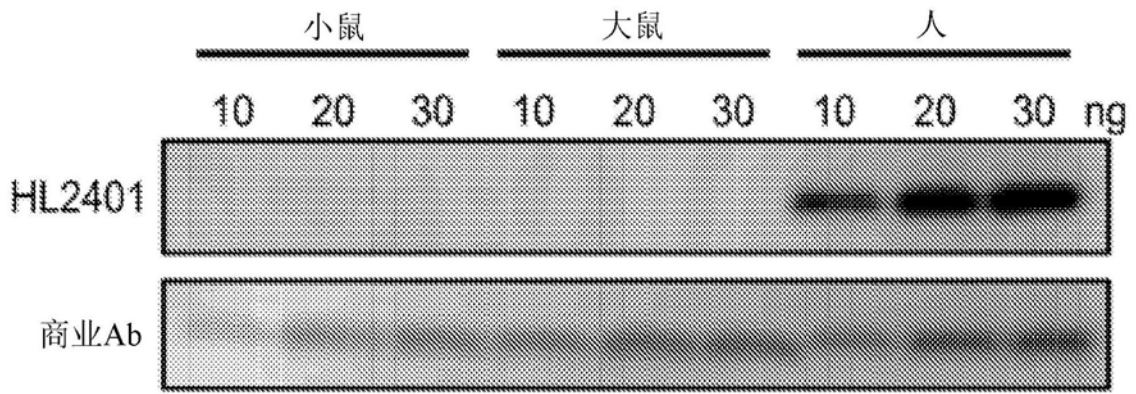


图1A

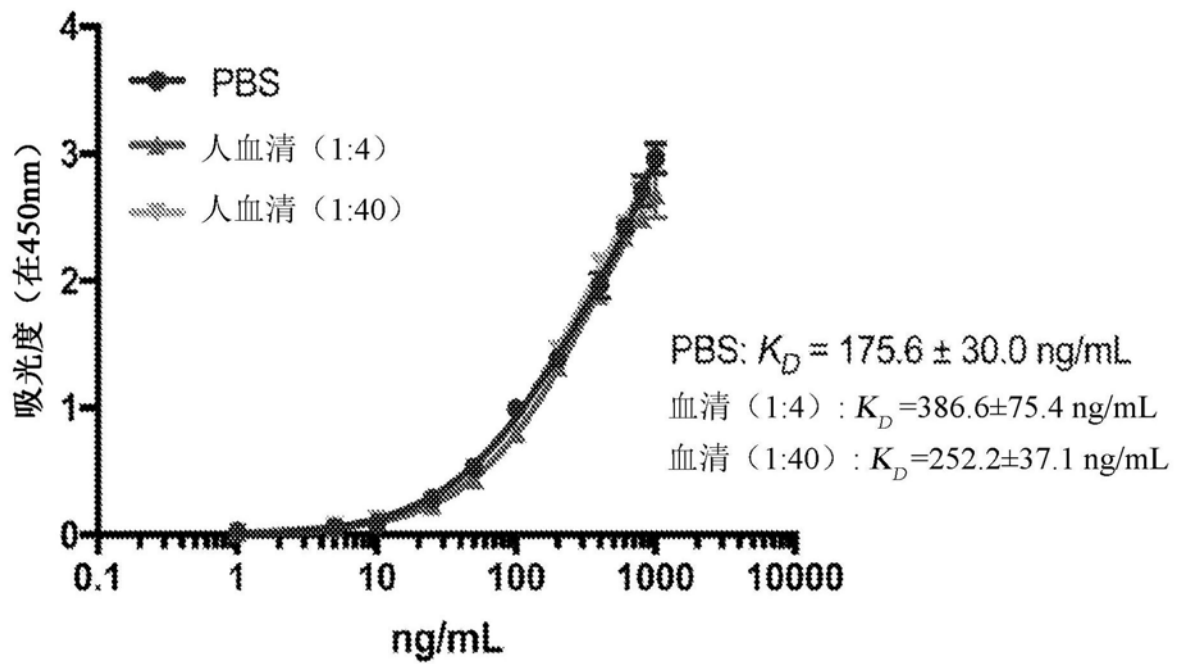


图1B

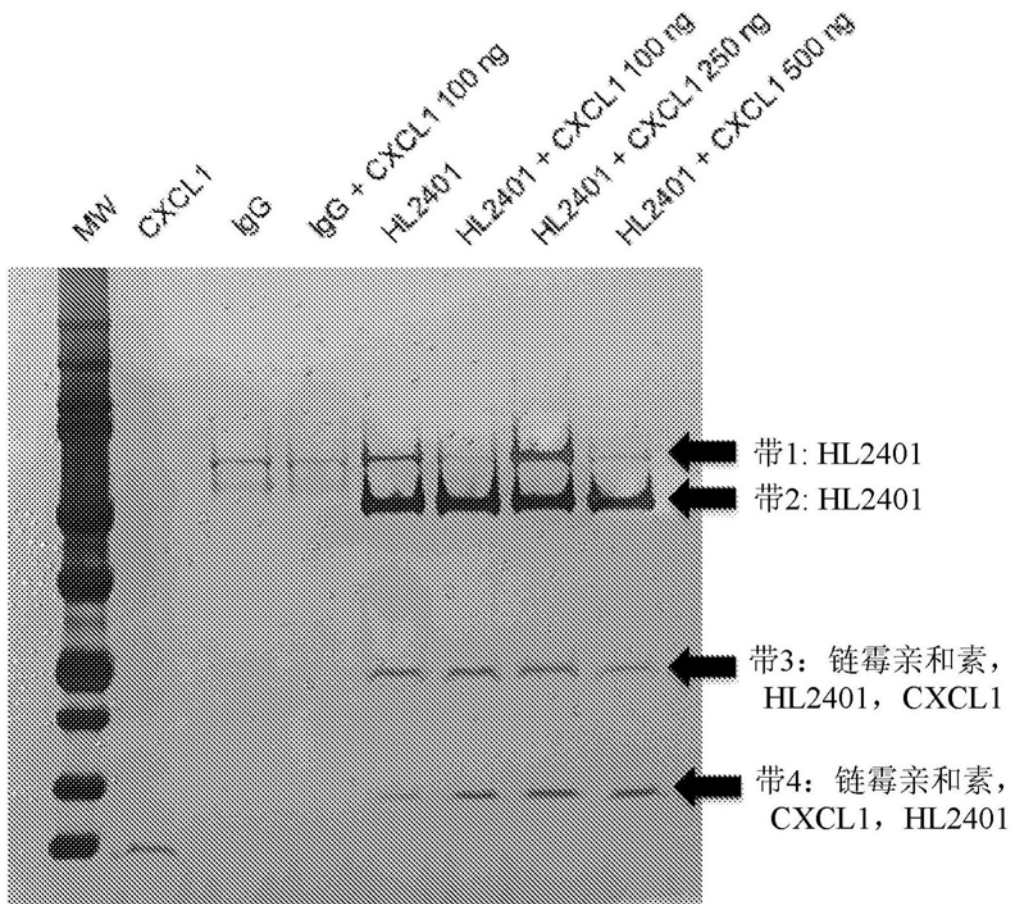


图1C

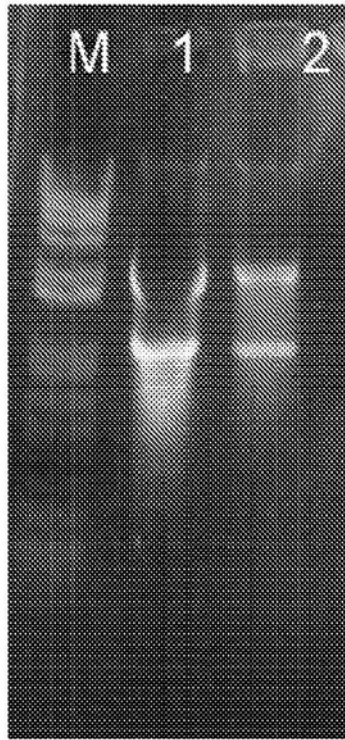


图1D

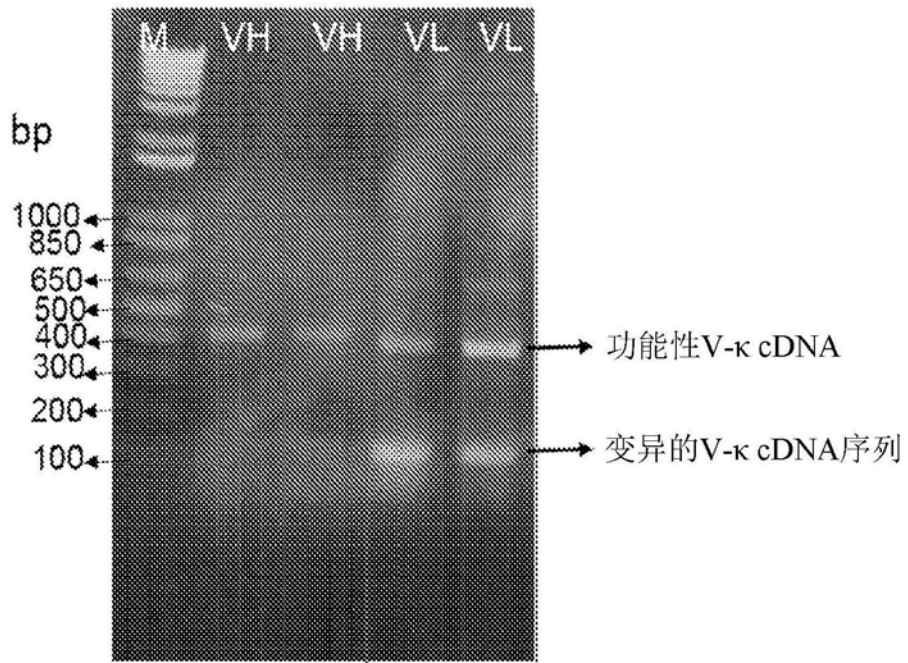


图1E

编号和区域

可变轻链																						
L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19				
D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A				
Chothia编号																						
LFR1																						
CHOTHIA区域																						
CDR4.1																						
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L30A	L30B	L30C	L30D	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	
I	S	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	V	N	W	Y	Q	Q	
CDR4.2																						
L40	L41	L42	L43	L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	
P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	R	I	F	A	R	
CDR4.3																						
L63	L64	L65	L66	L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85
S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	L	P	V	E	E	D	D	G	A	T
CDR4.4																						
L88	L87	L86	L85	L84	L83	L82	L81	L80	L79	L78	L77	L76	L75	L74	L73	L72	L71	L70	L69	L68	L67	L66
Y	Y	C	Q	Q	S	S	E	D	P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	
LFR4																						

图1F

编号和区域

可变重链																			
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20
E	V	K	L	V	E	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L
Chothia编号																			
CHOTHIA区域																			
HFR1																			

CDR-H1																						
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	Y	I	Y	W	V	K	Q	R	P	G	Q
HFR2																						

CDR-H2																						
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
G	L	E	W	I	G	E	I	D	P	S	H	G	G	P	T	F	N	E	K	F	K	N
HFR3																						

CDR-H3																							
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85	
K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	D
HFR4																							

CDR-H4																						
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H107
D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	E	S	G	T	G	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T
HFR4																						

CDR-H3					
H108	H109	H110	H111	H112	H113
T	L	T	V	S	S
HFR4					

图1G

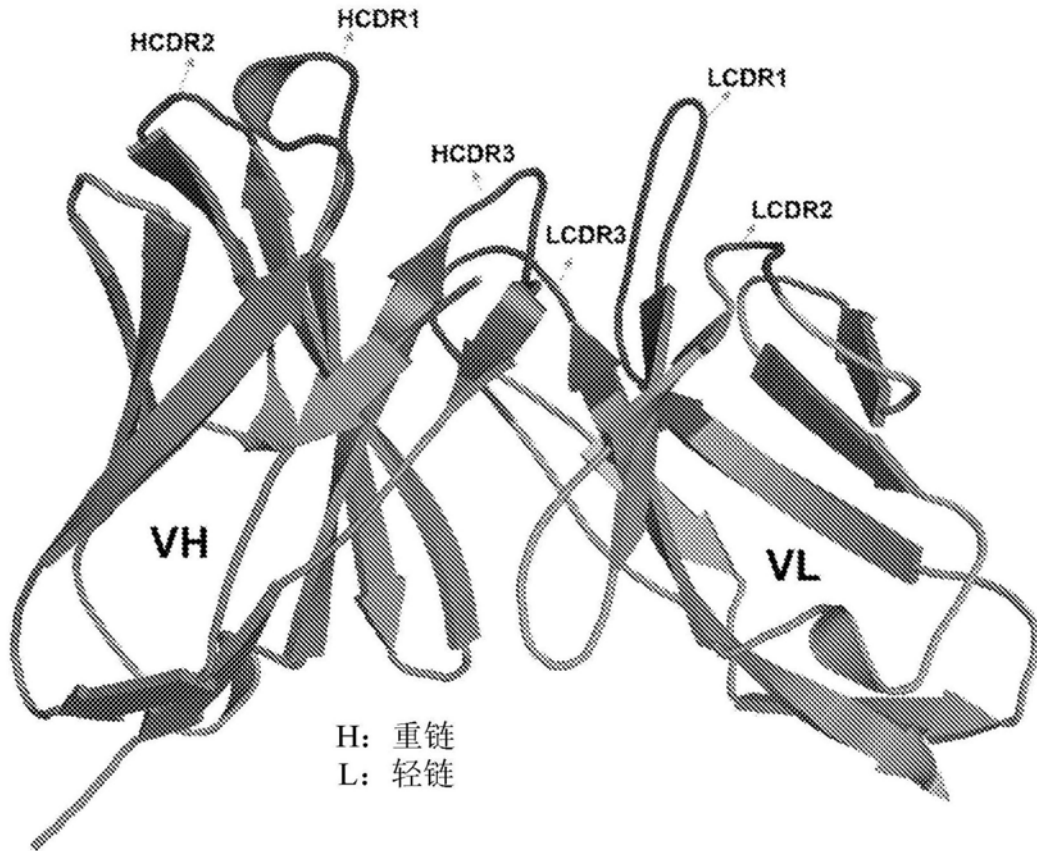


图1H

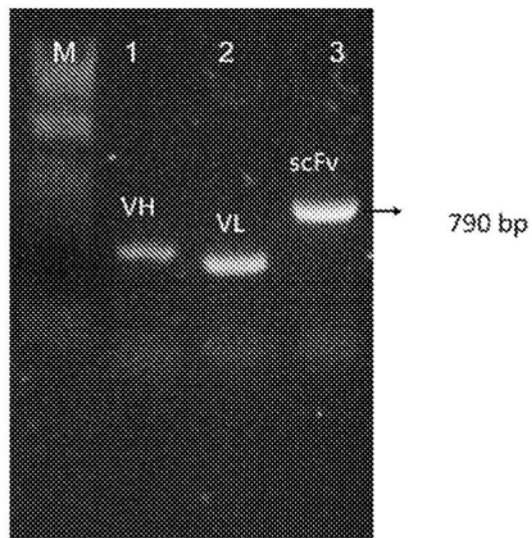


图1I

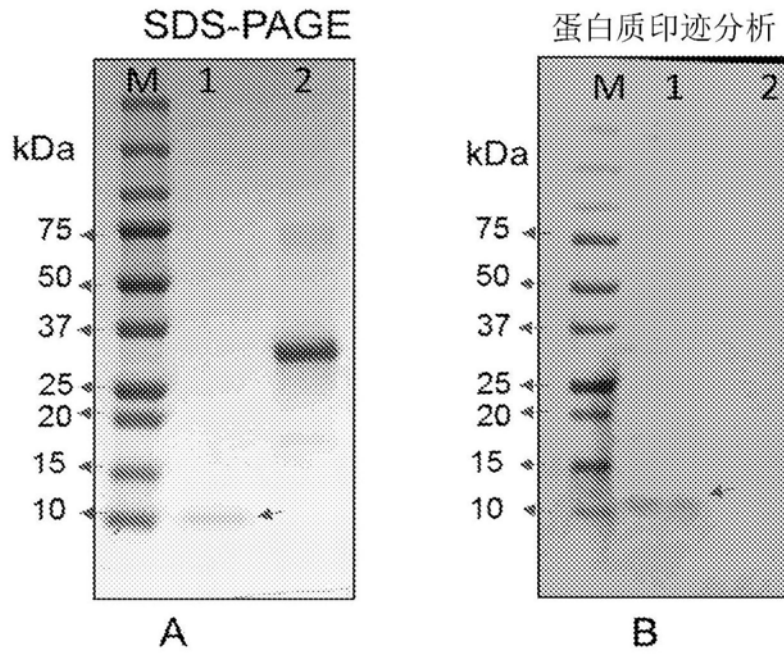


图1J

抗-cMyc Ab蛋白质印迹



丽春红染色



图1K

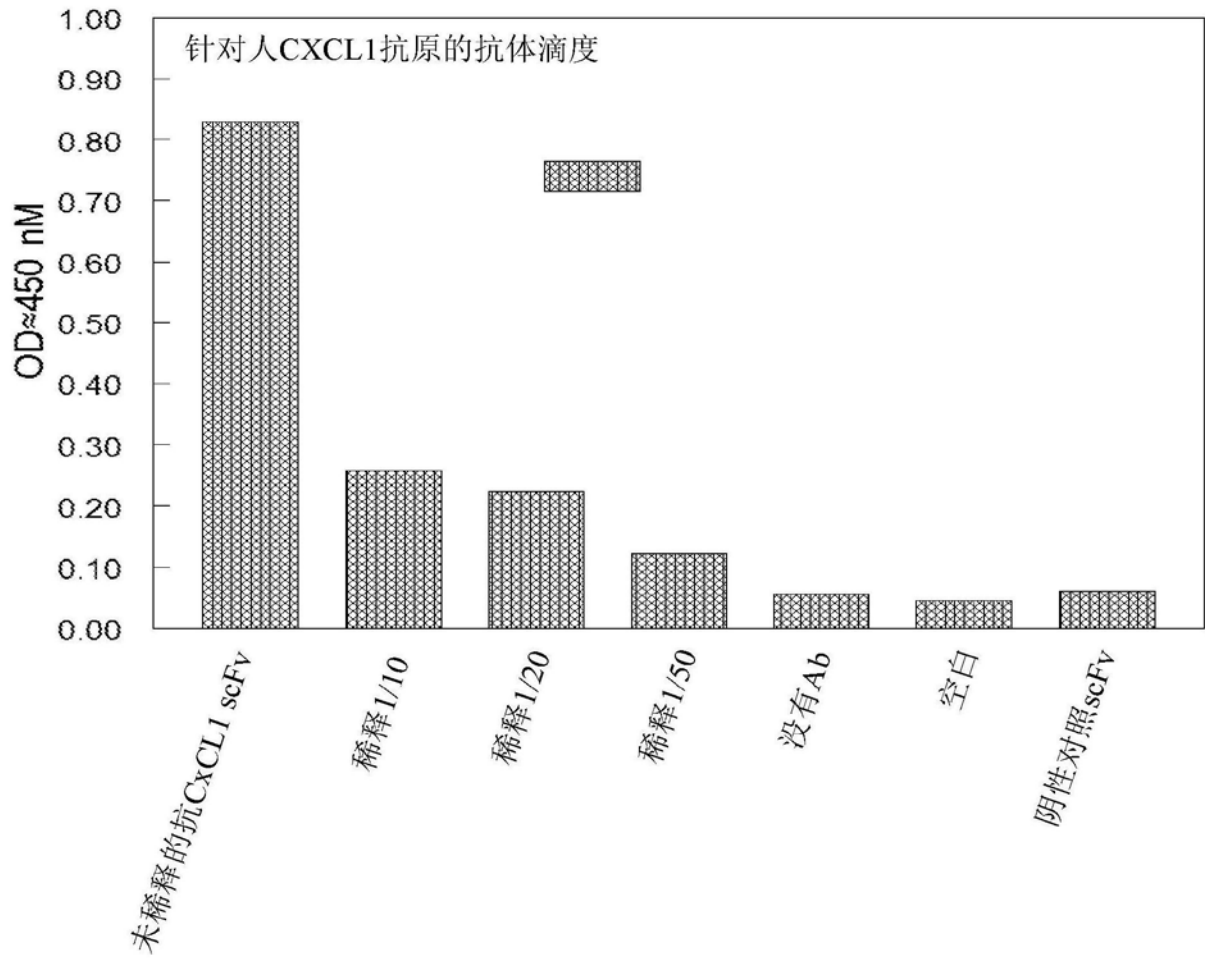


图1L

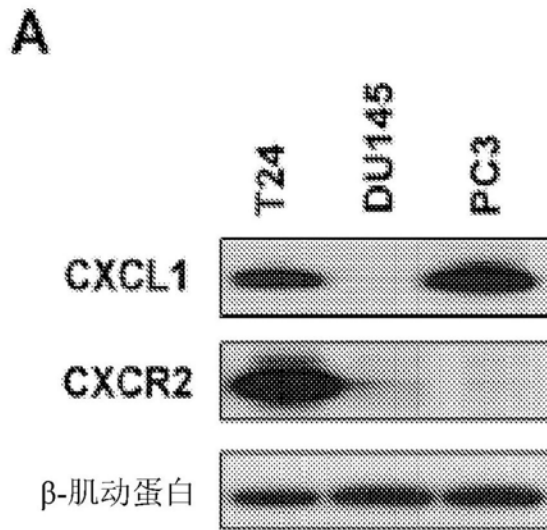


图2A

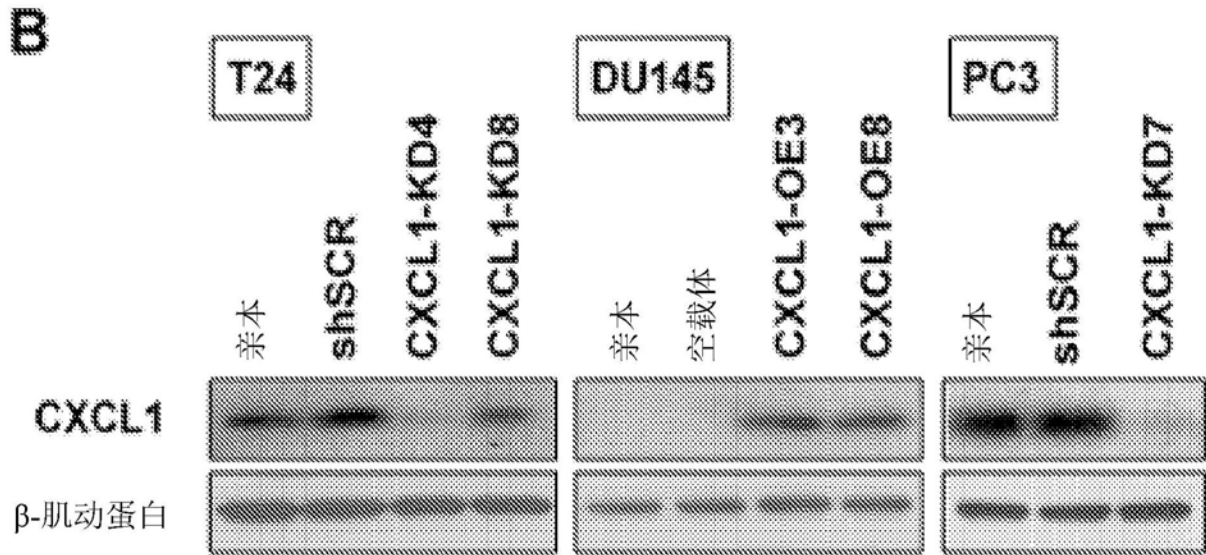


图2B

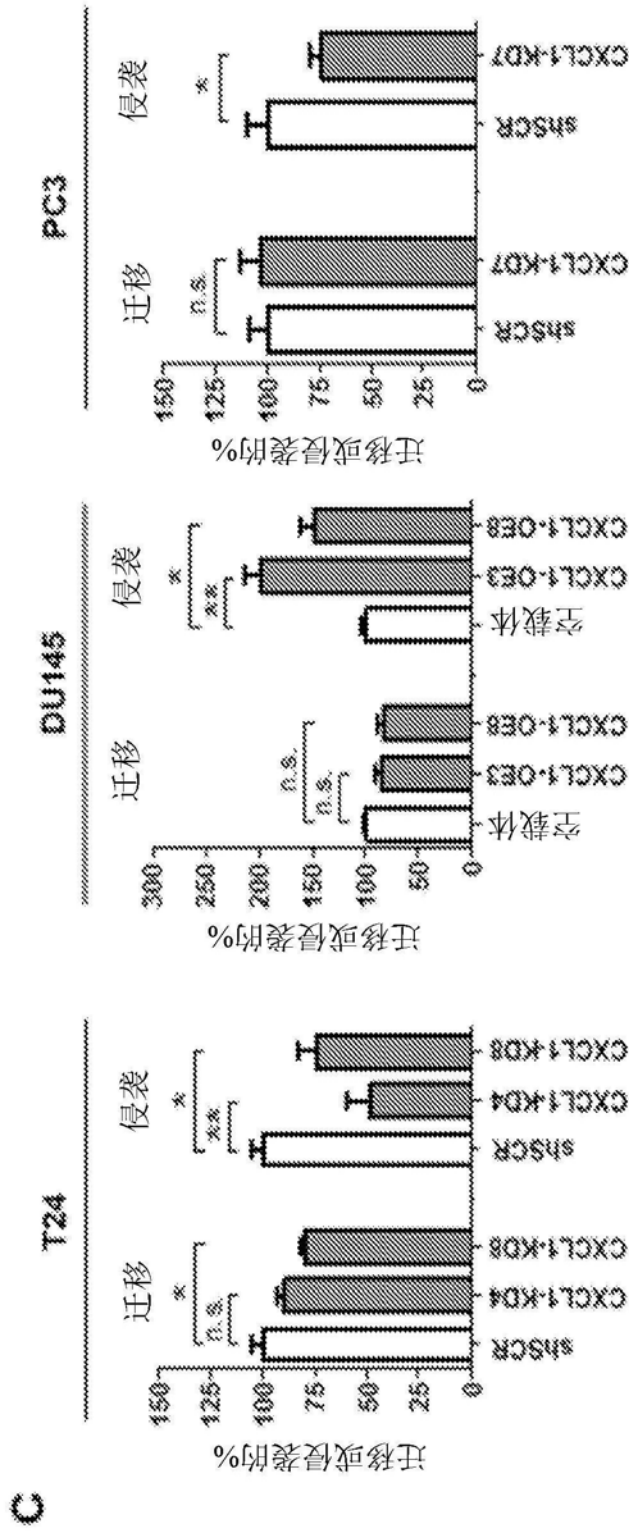


图2C

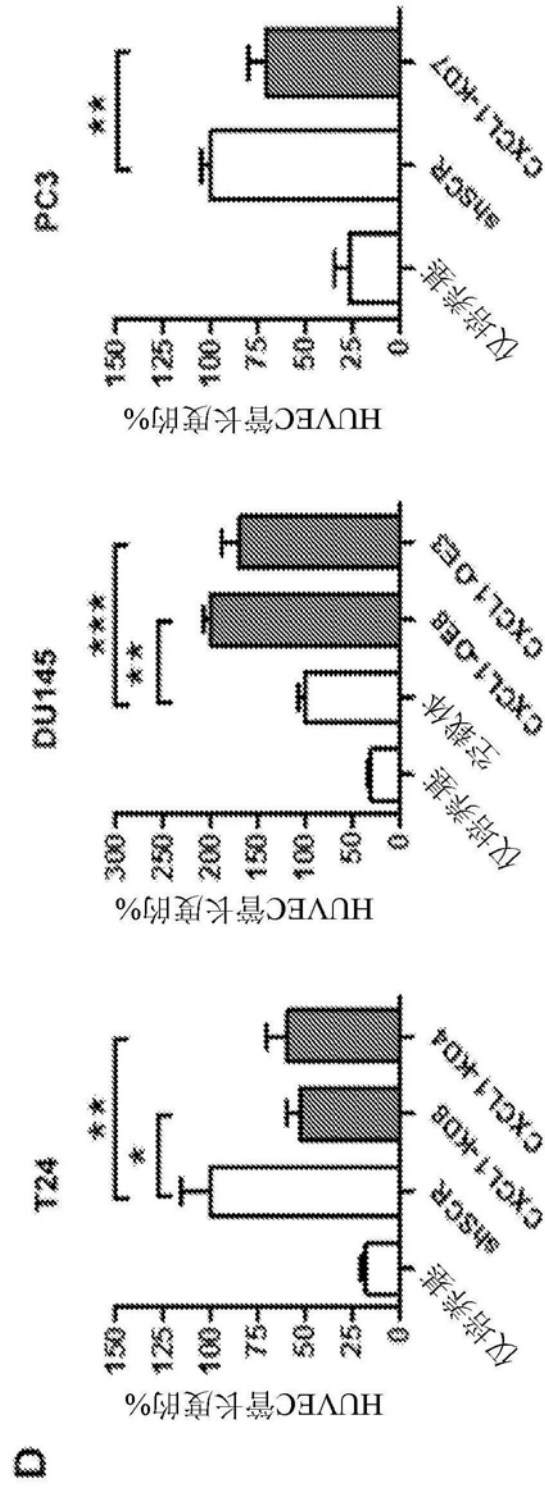


图2D

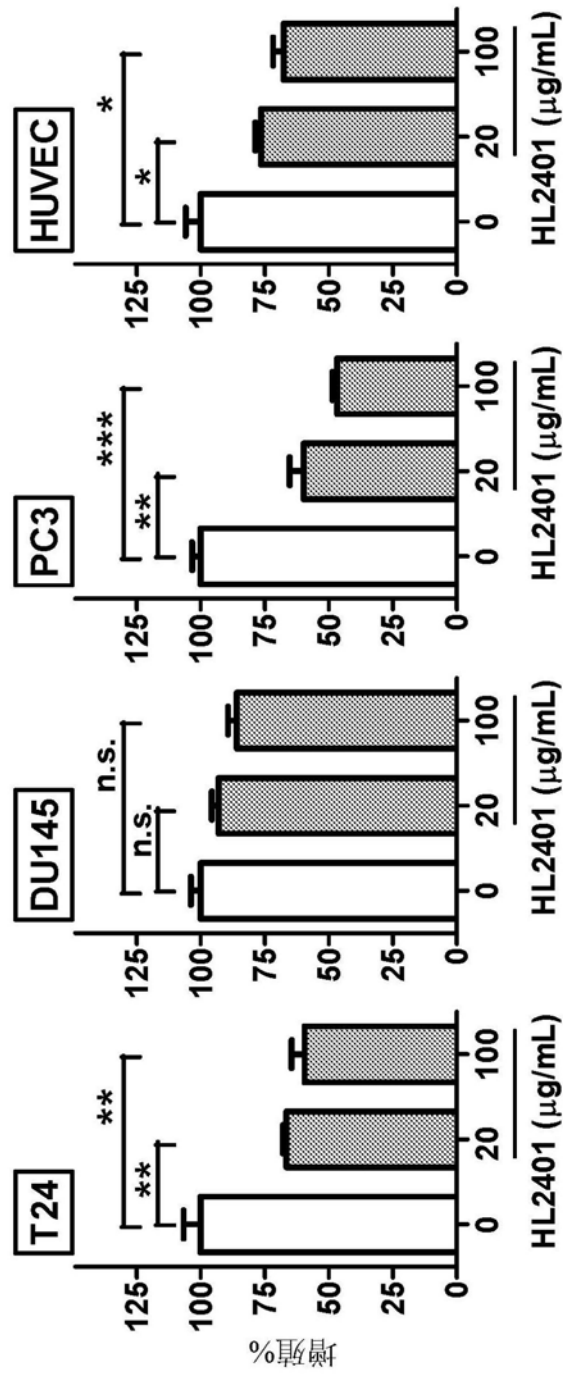


图3A

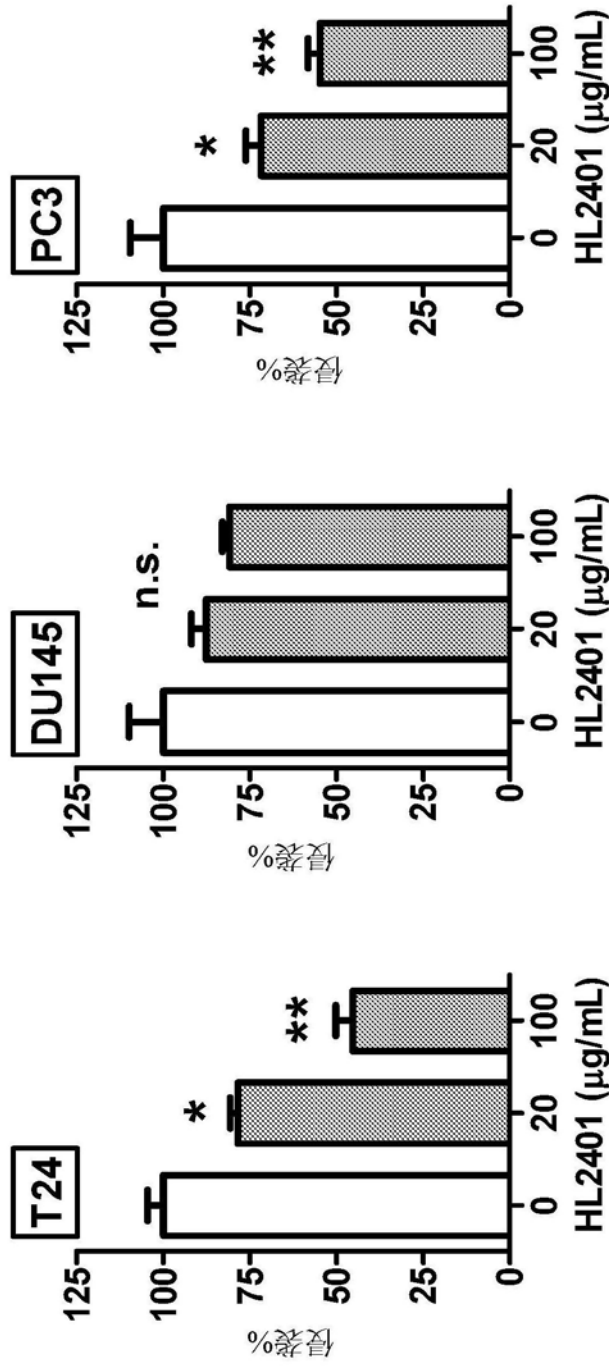


图3B

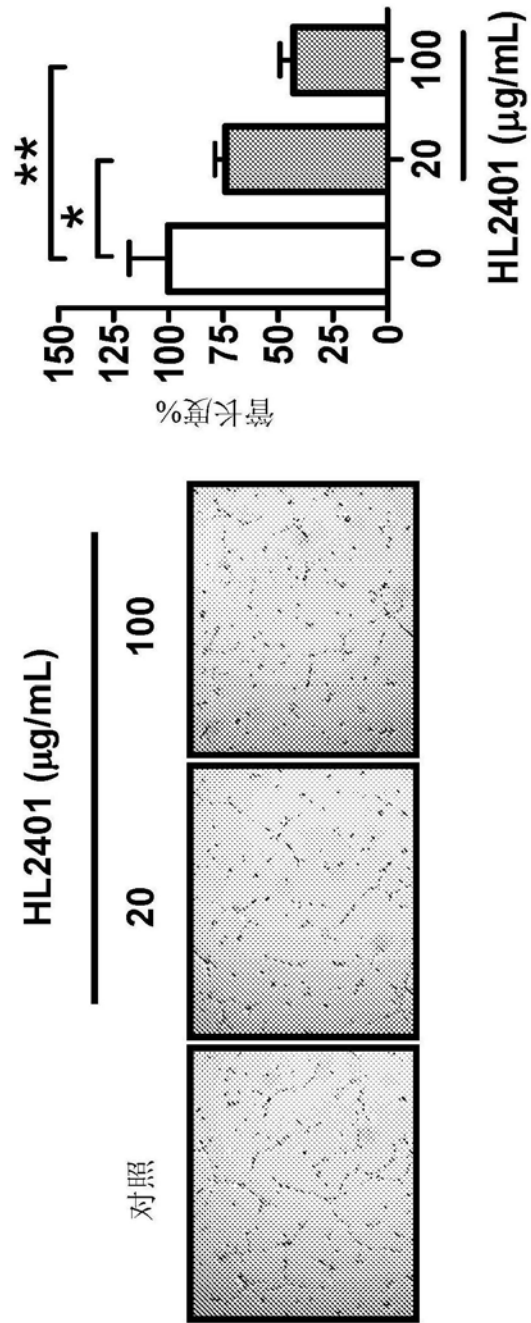


图3C

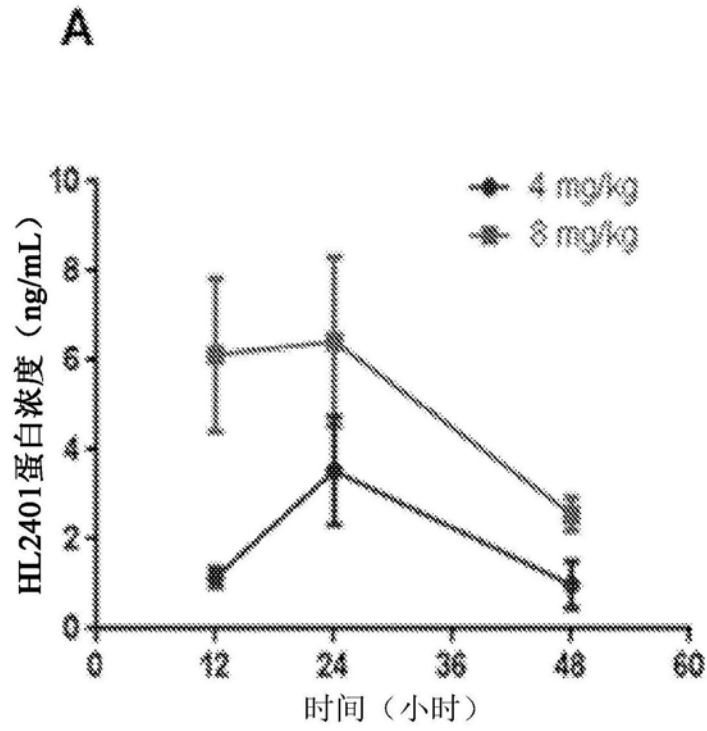


图4A

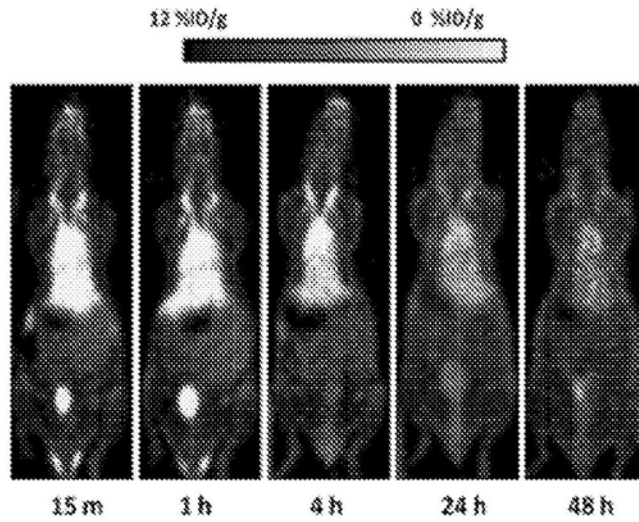


图4B

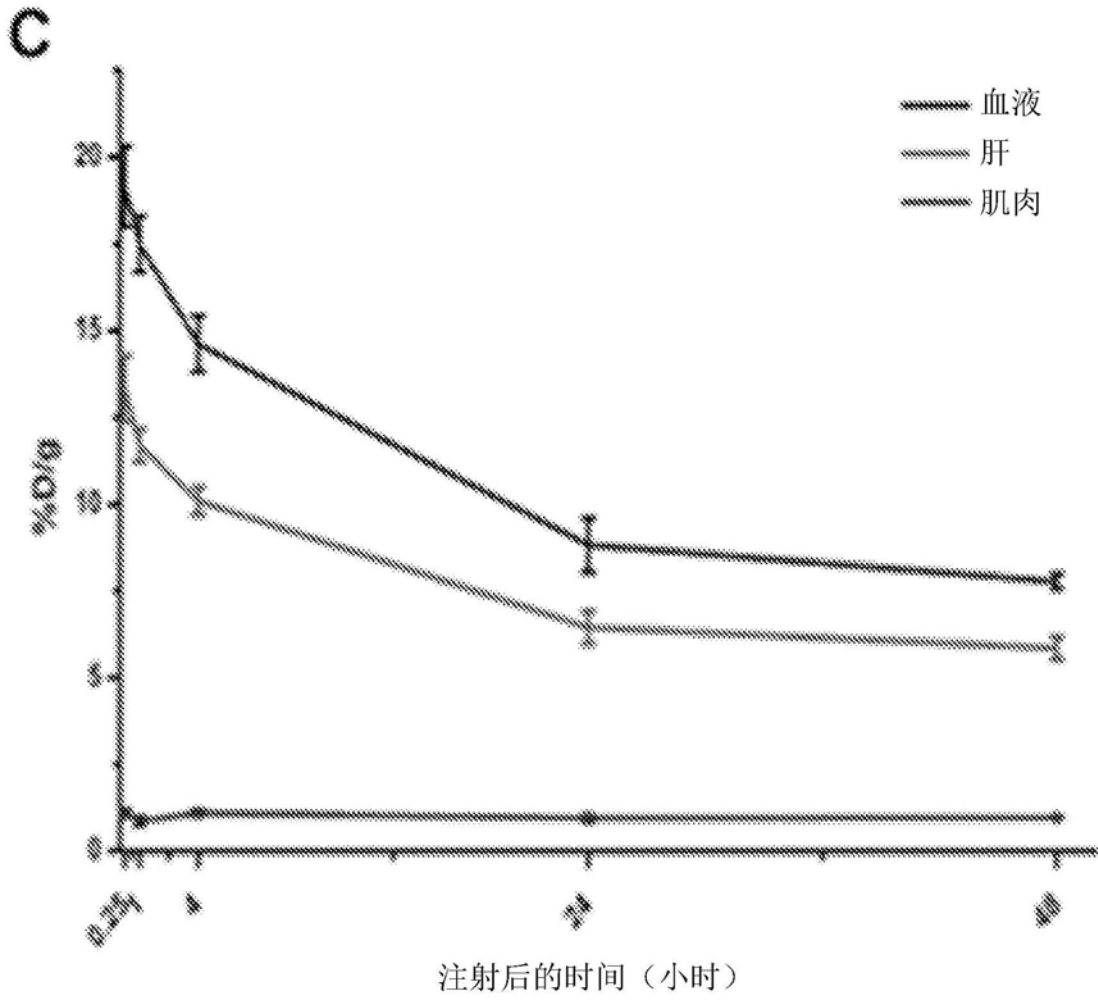


图4C

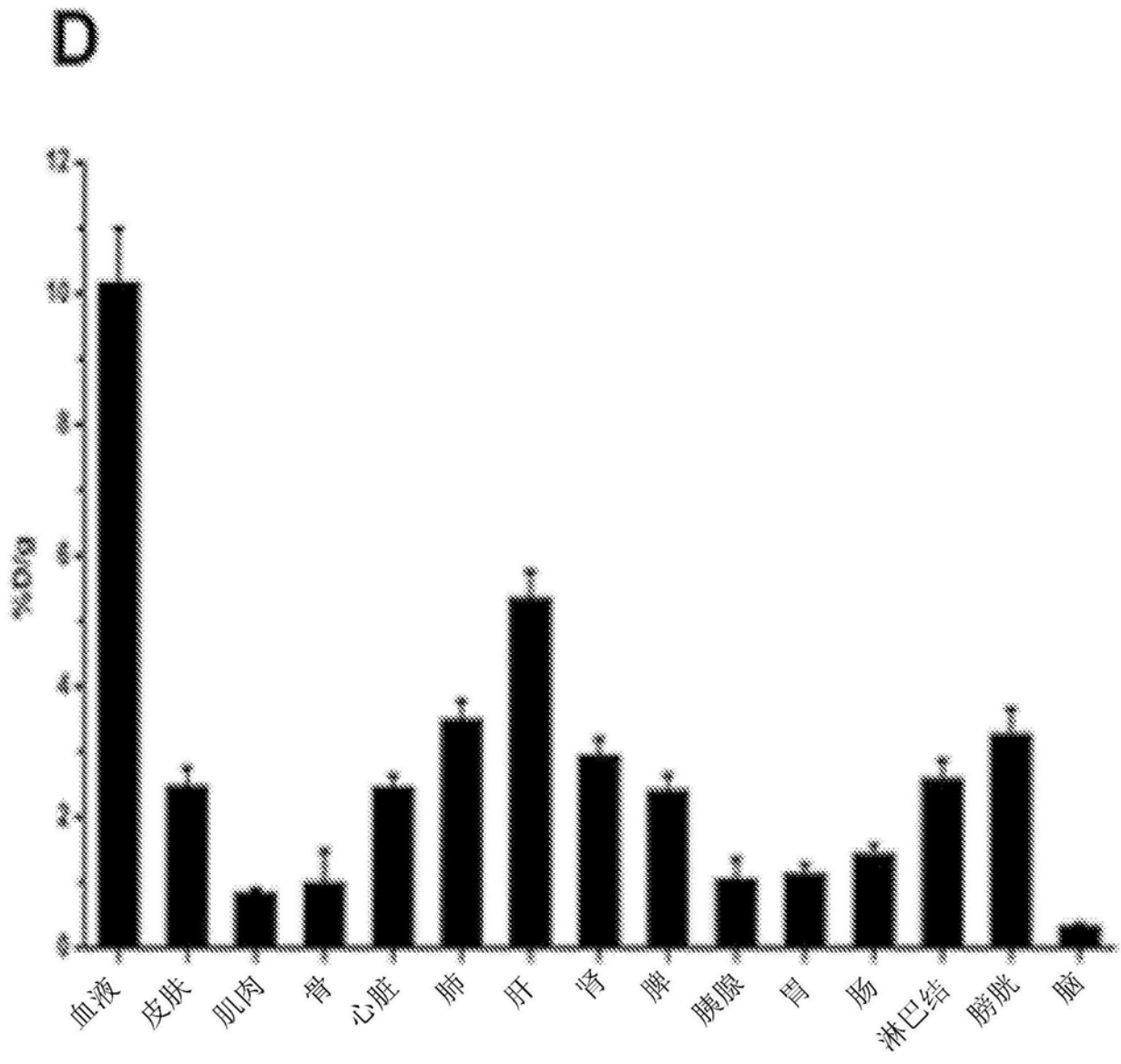


图4D

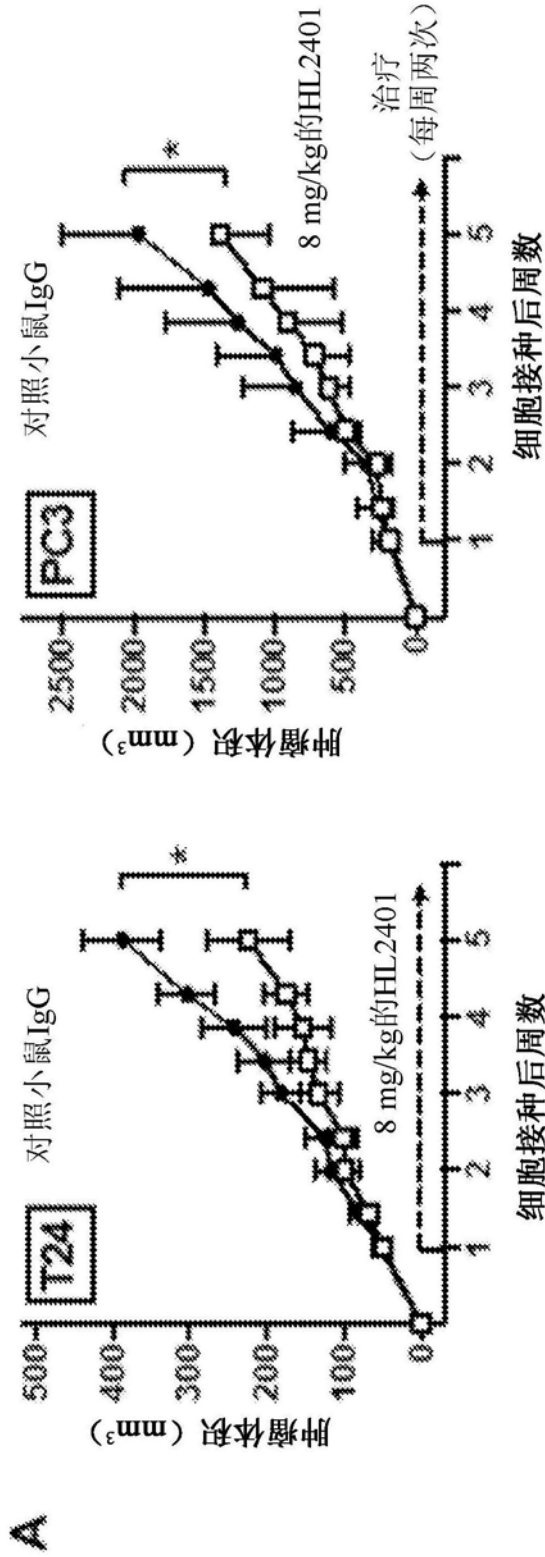


图5A

B

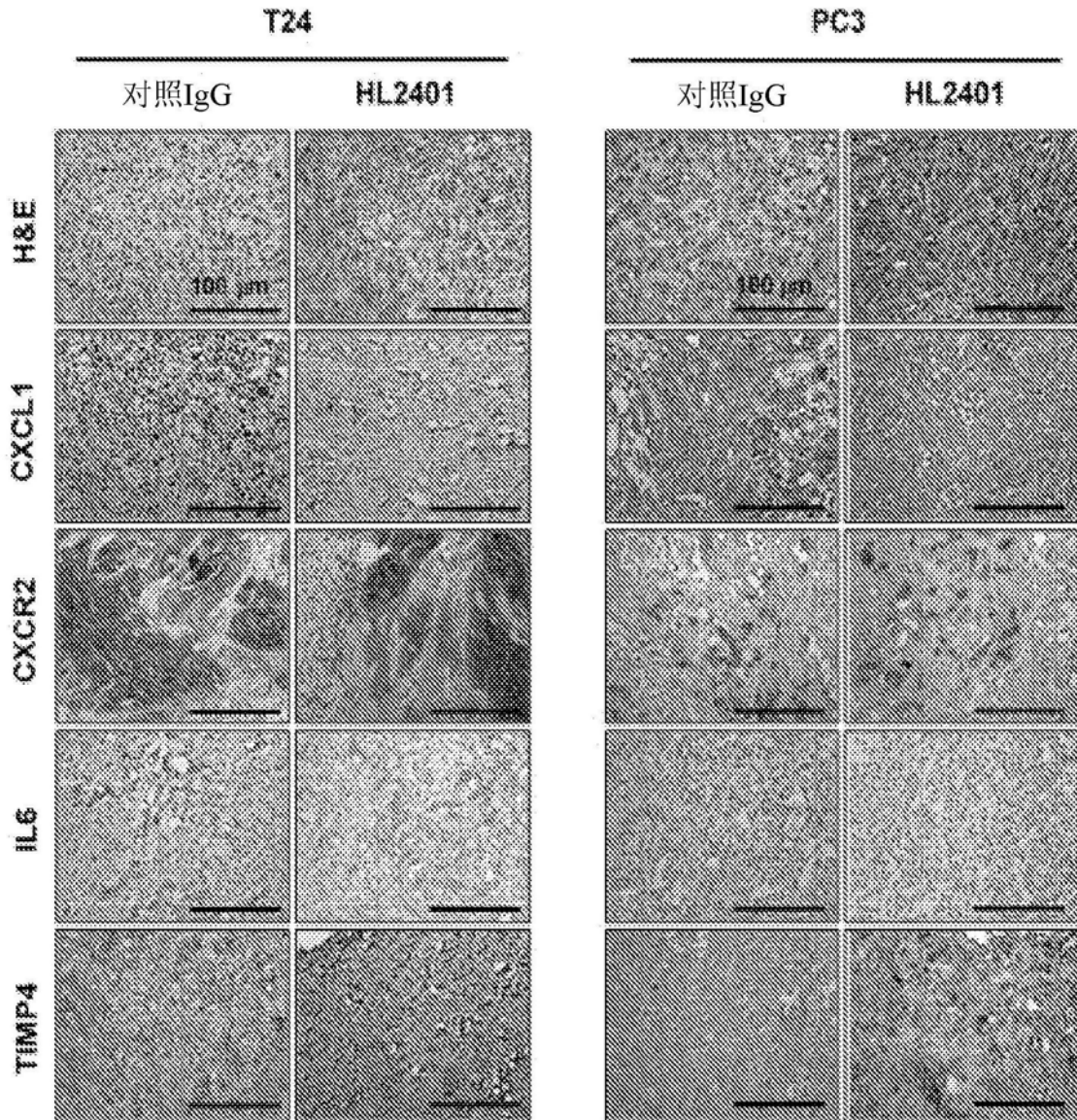


图5B

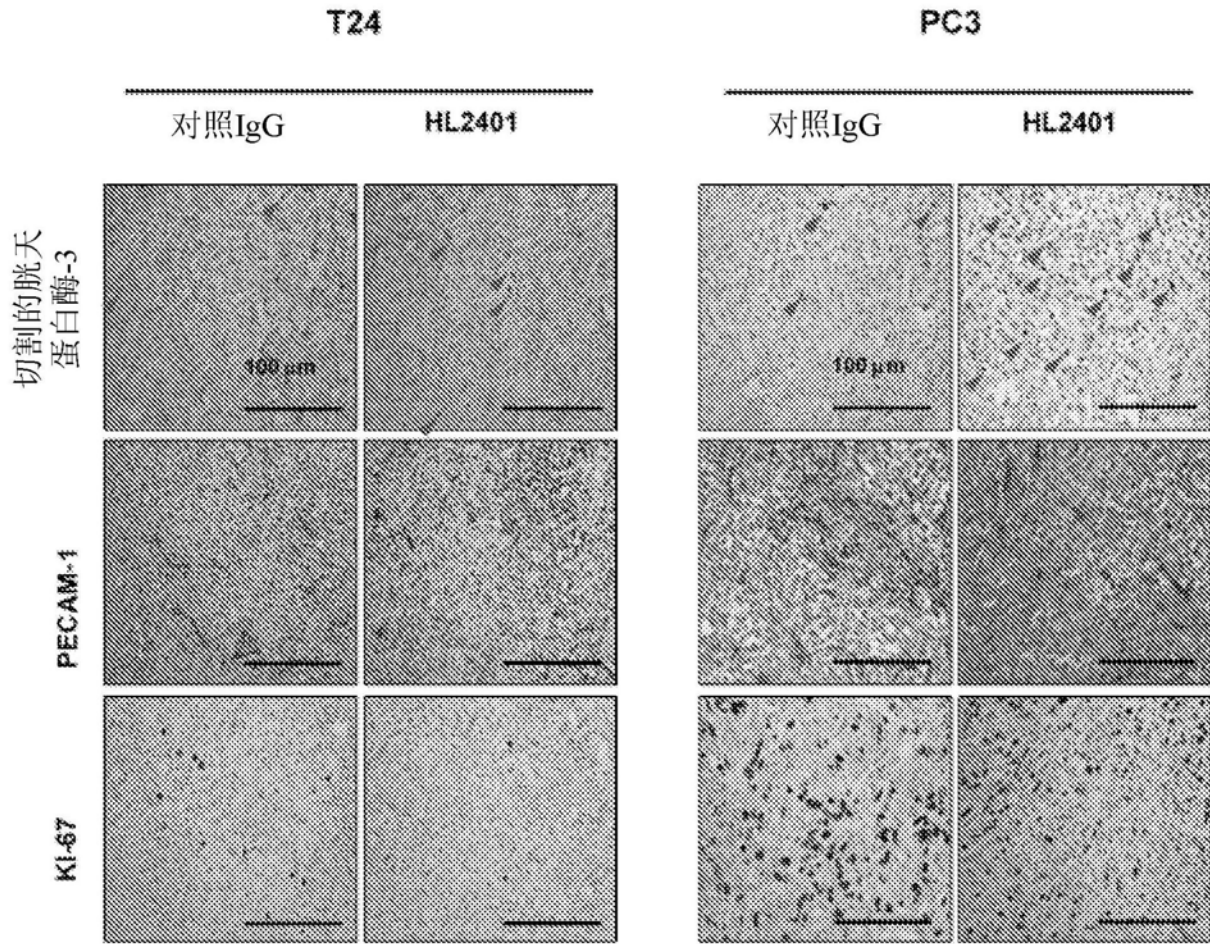


图6A

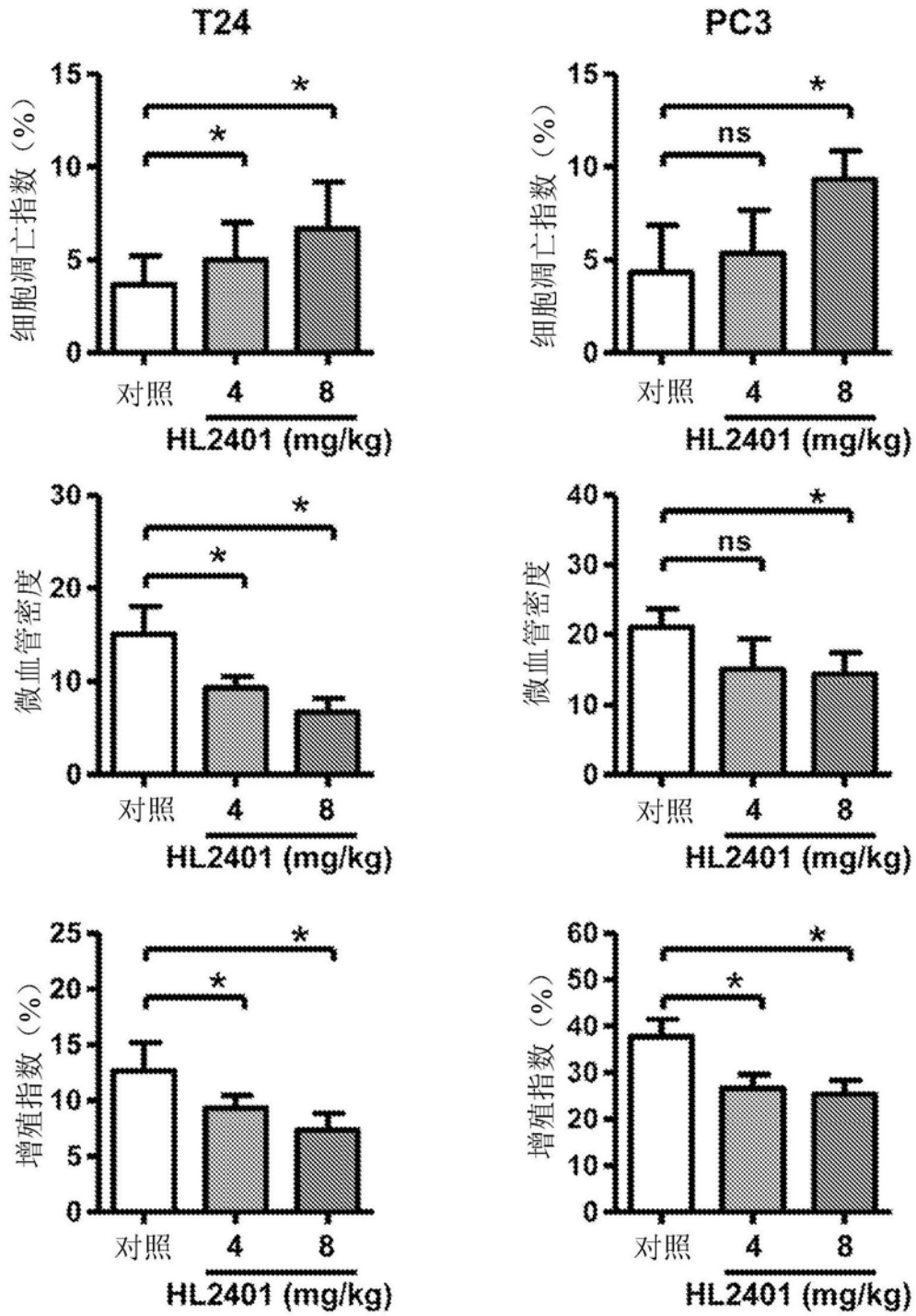


图6B

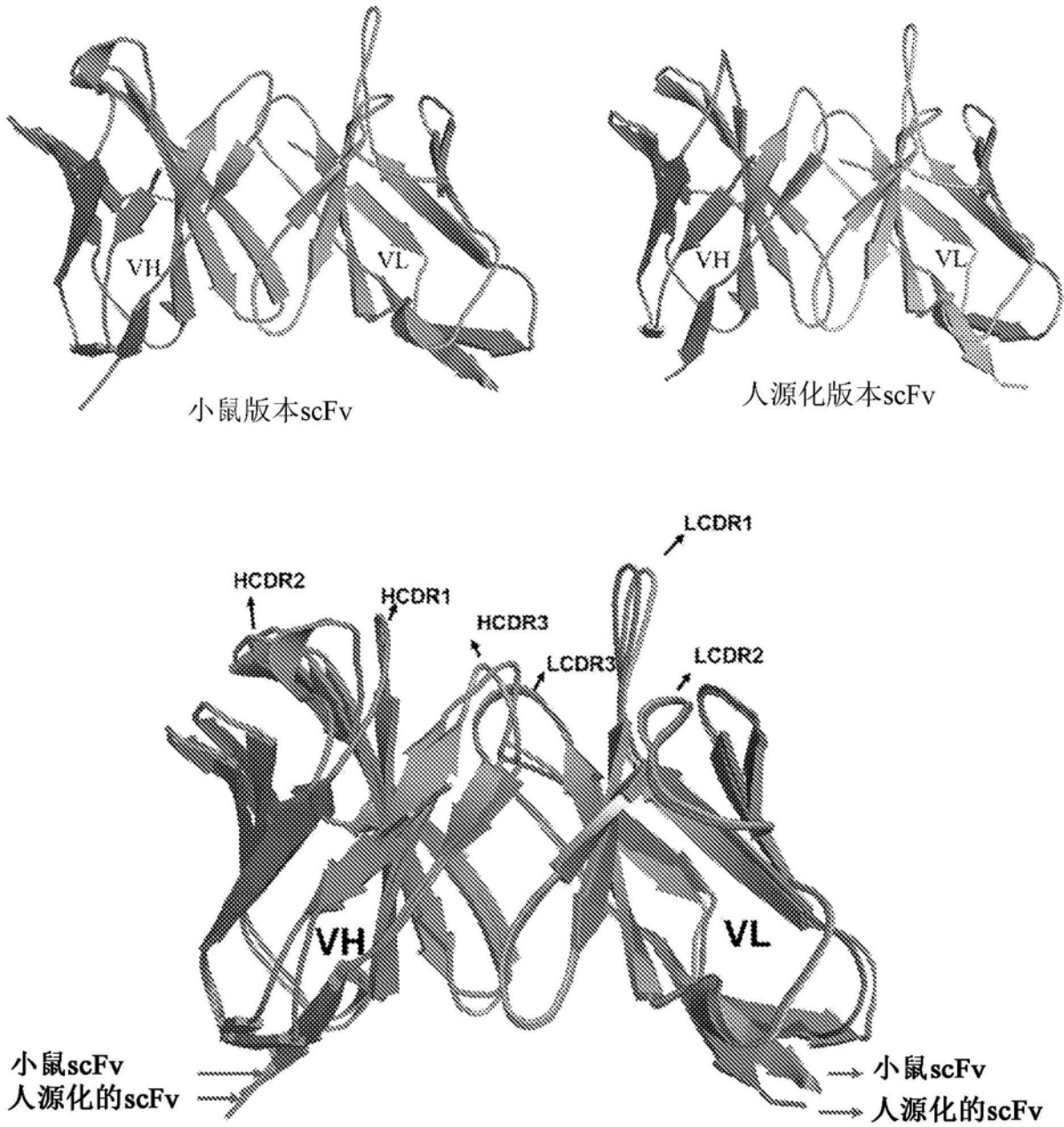


图7

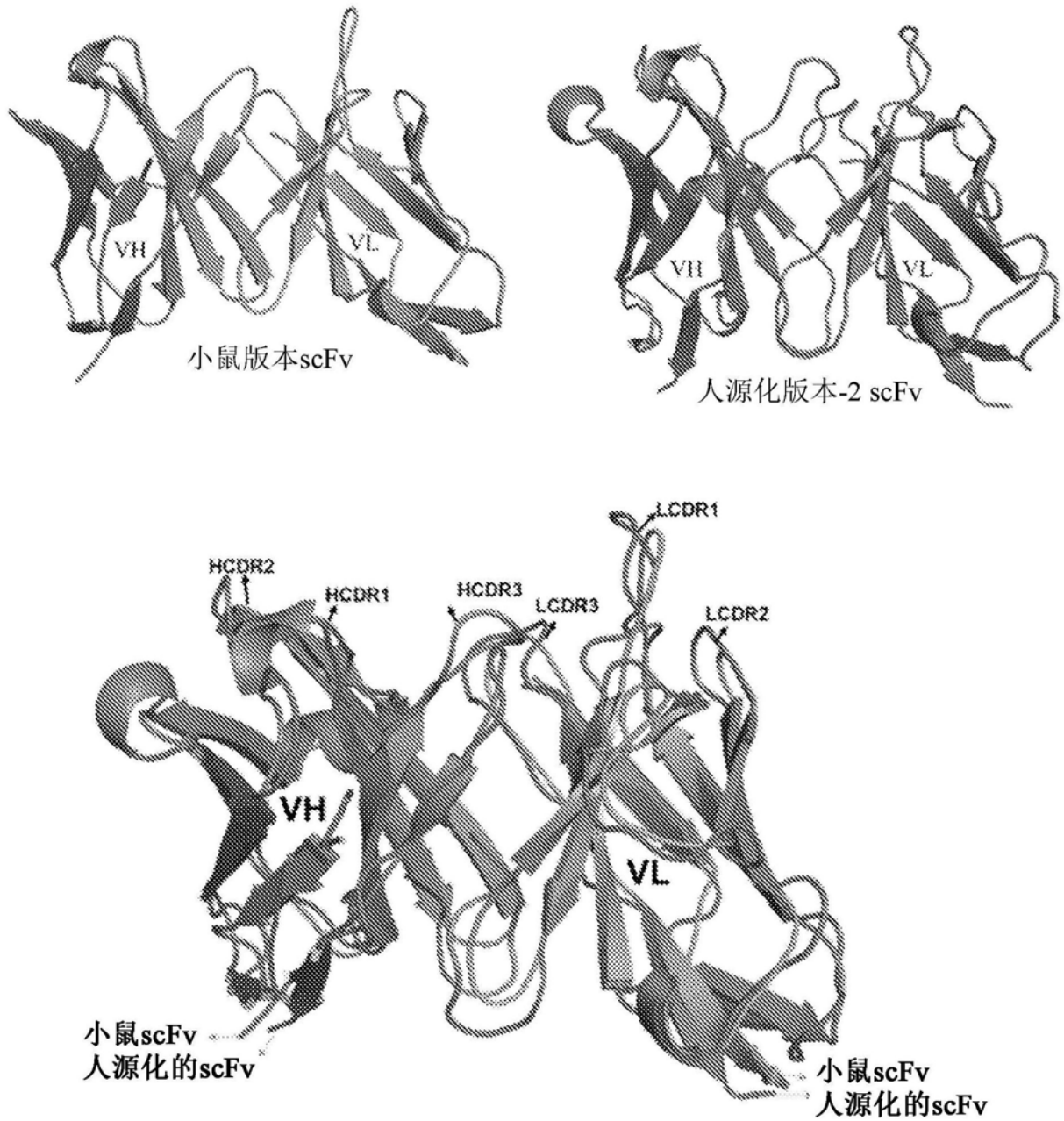


图8



图9

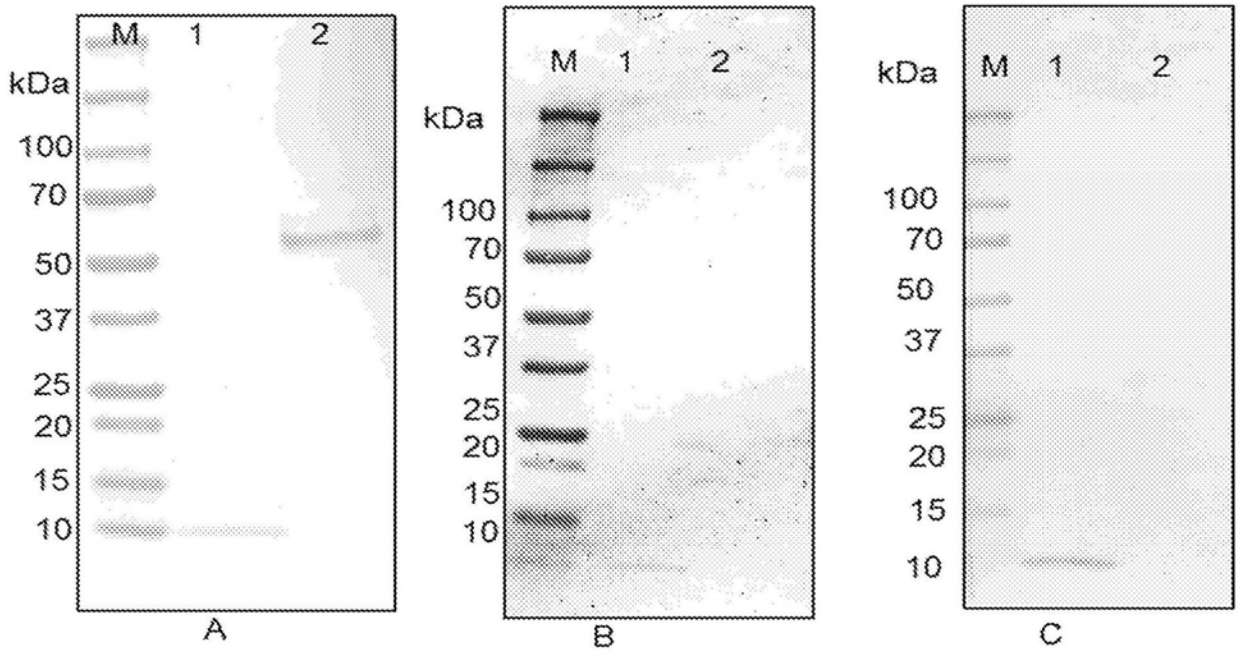


图11

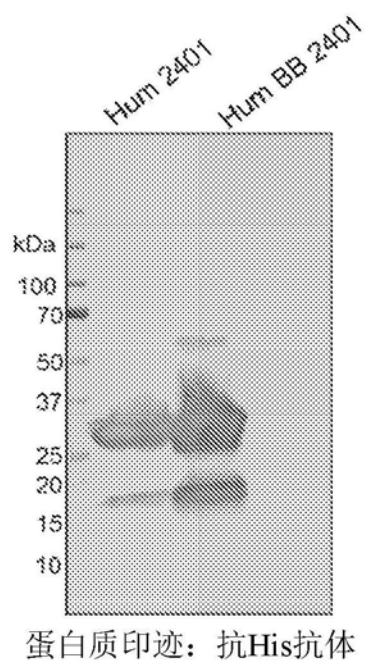


图12

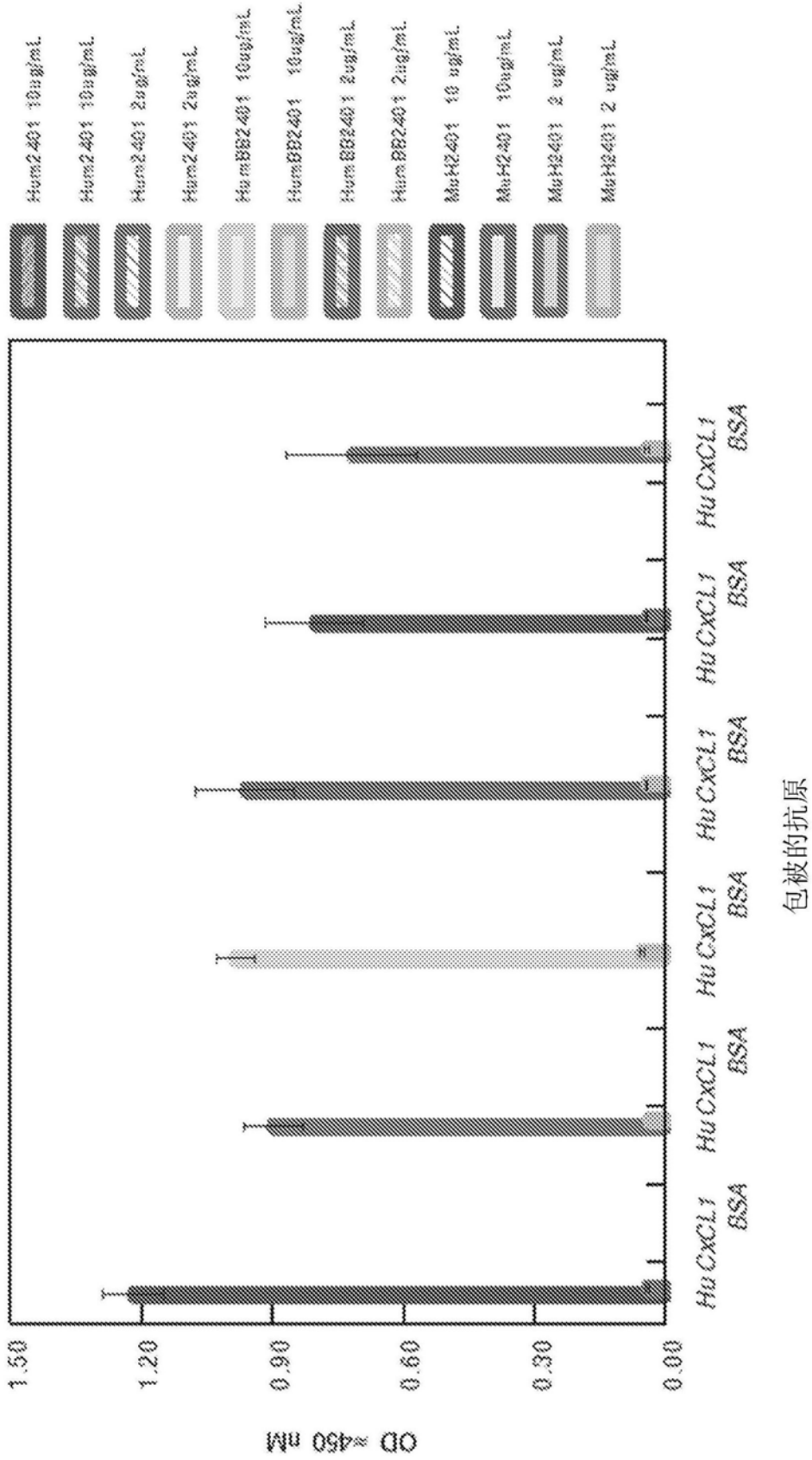


图13

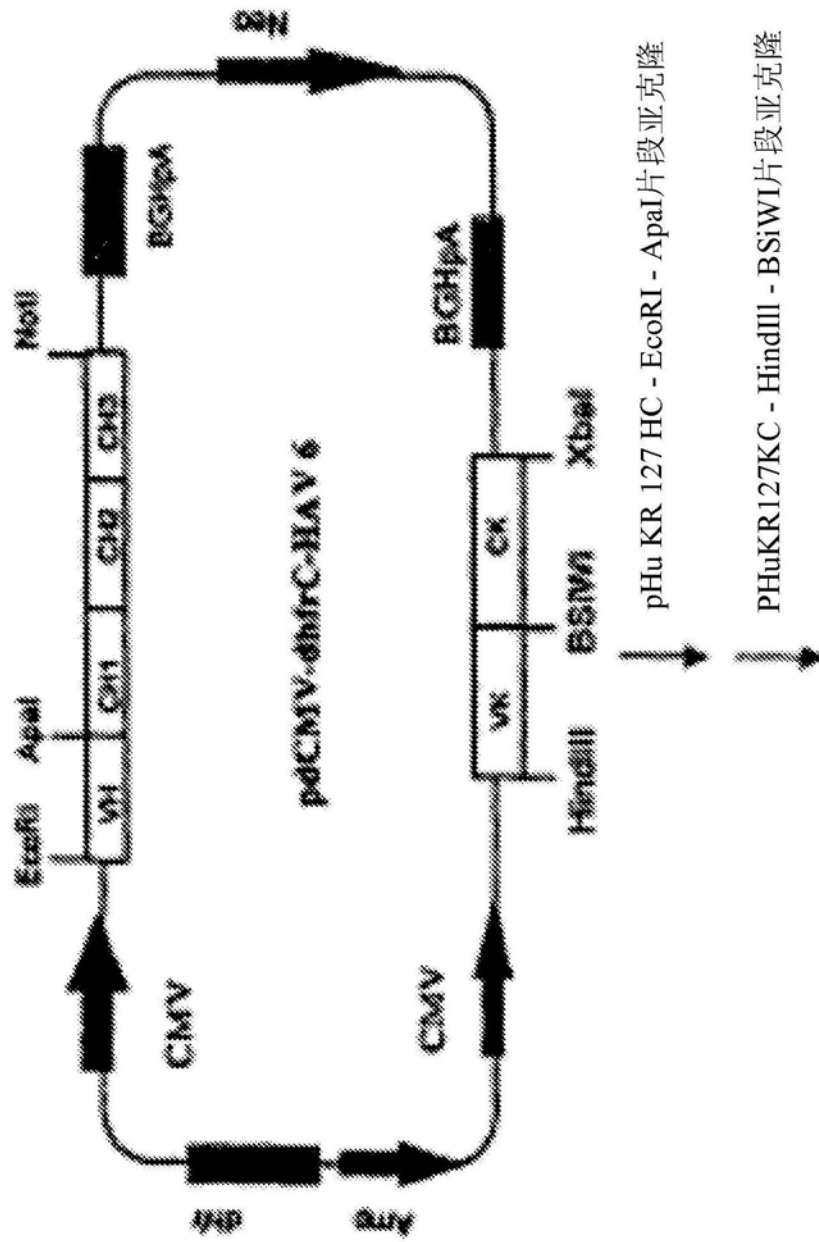


图14

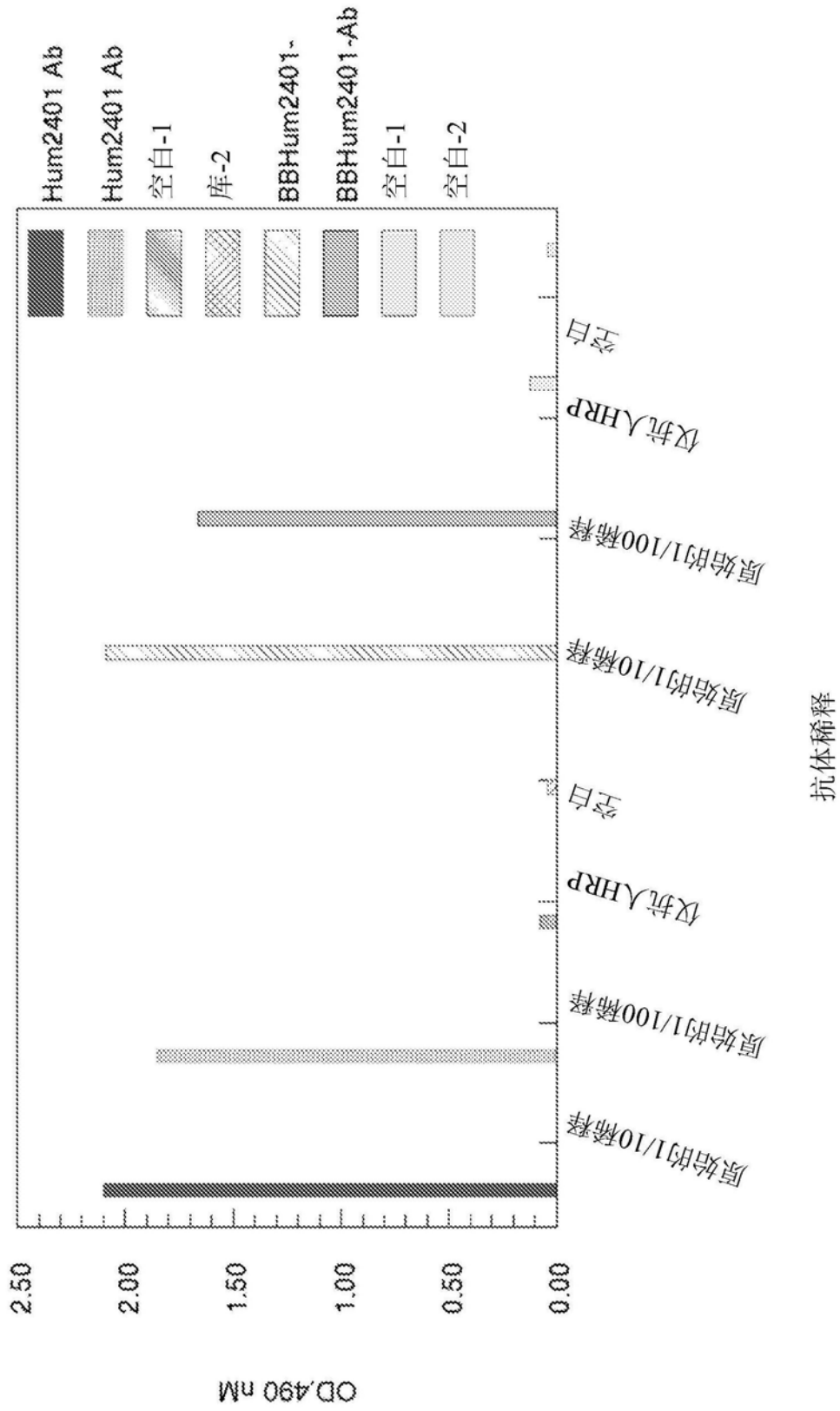


图15

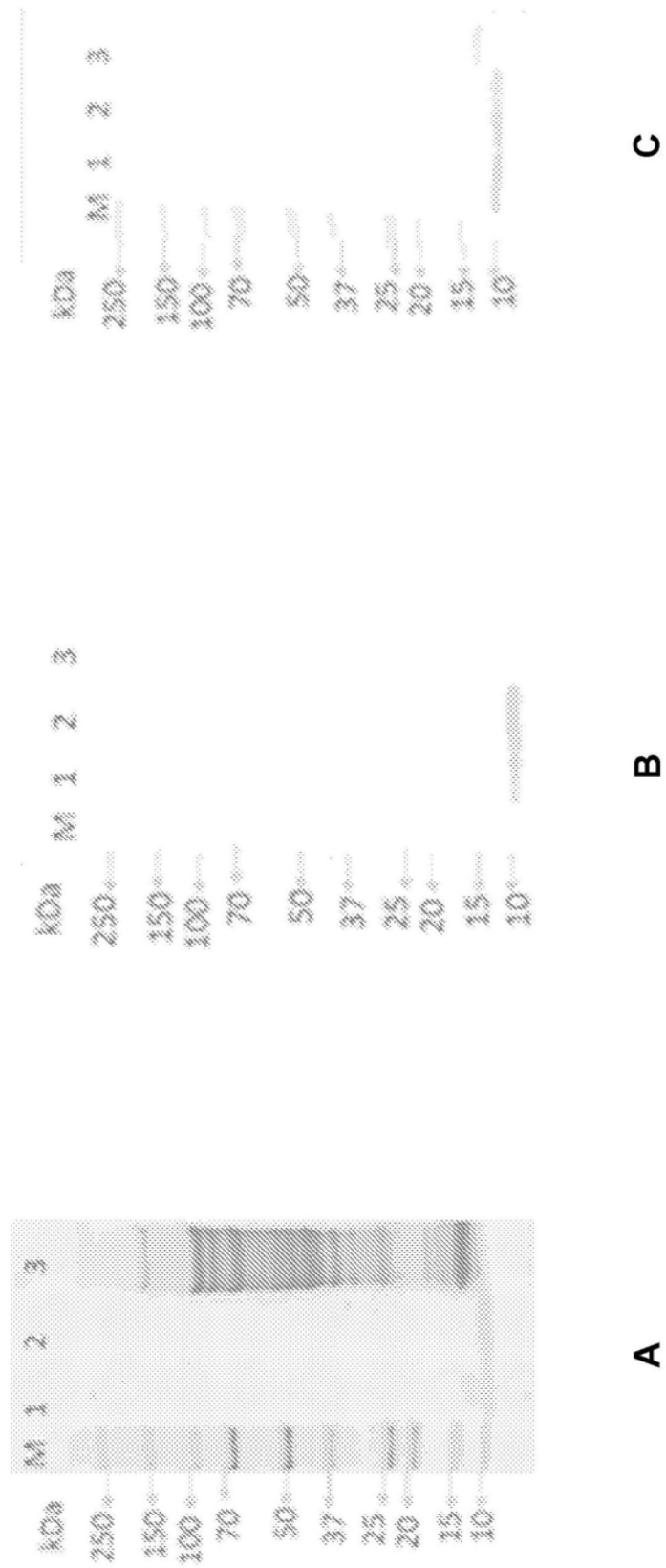


图16

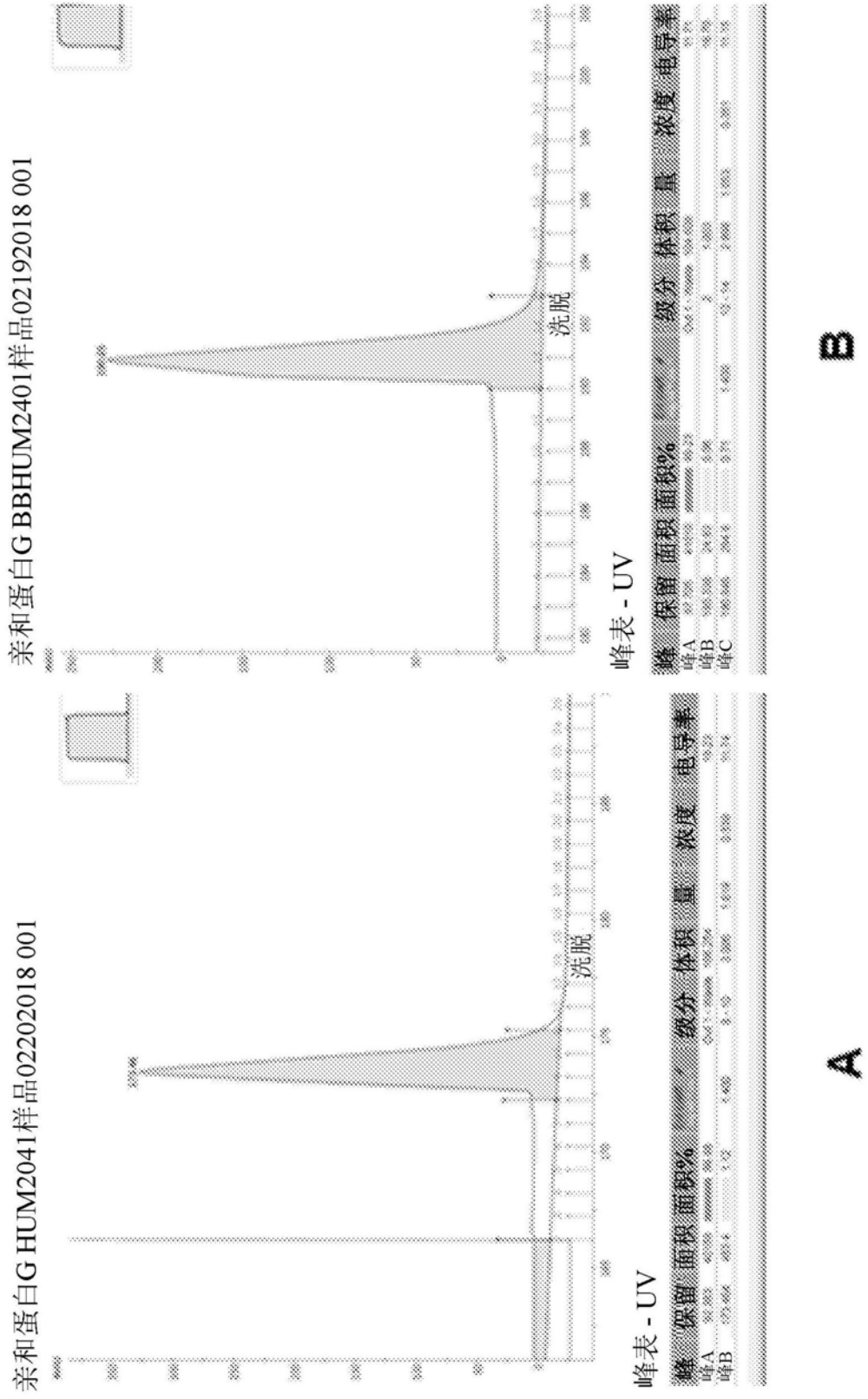


图17

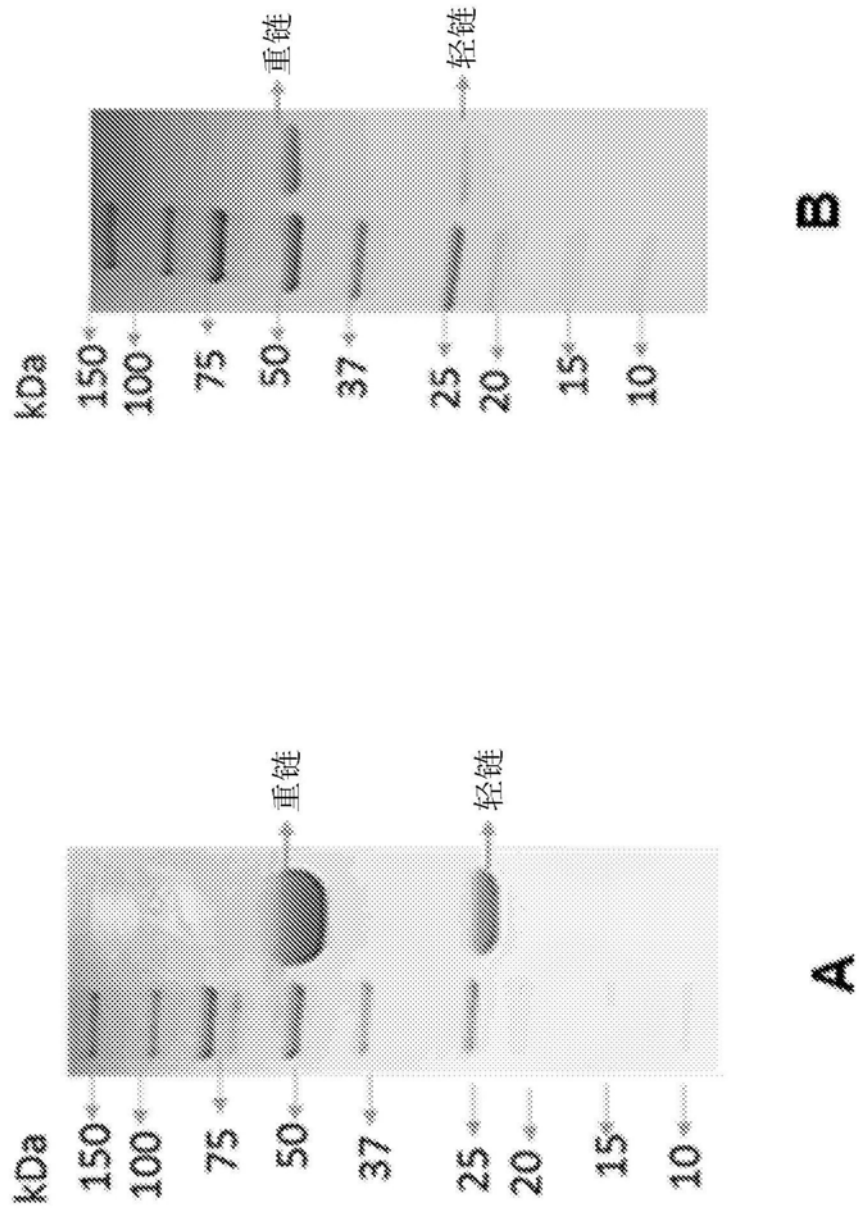


图18

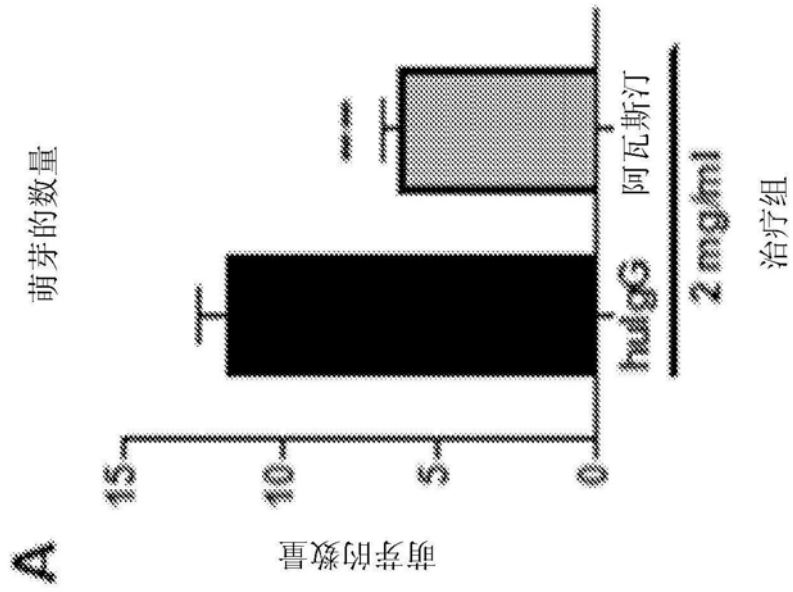


图19A

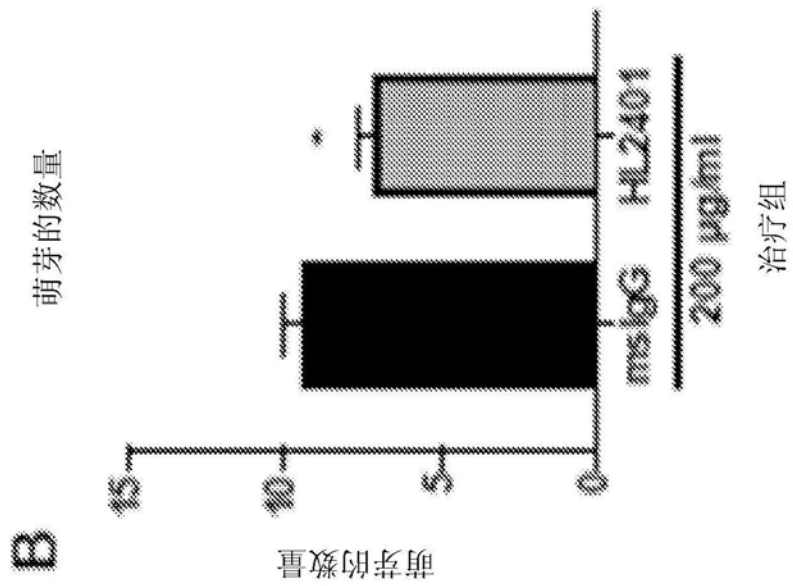


图19B

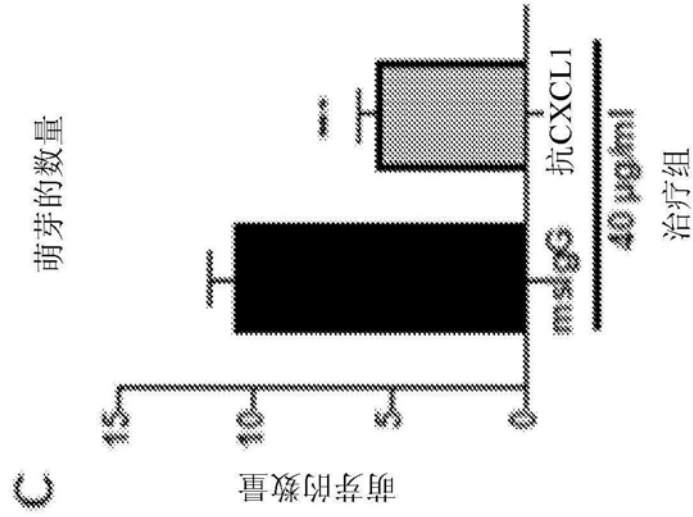


图19C

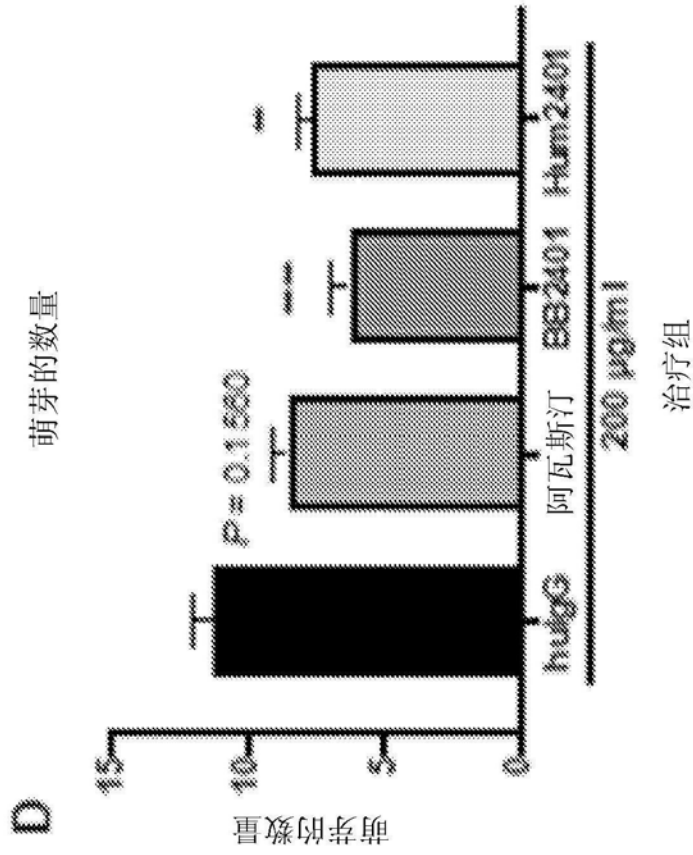


图19D

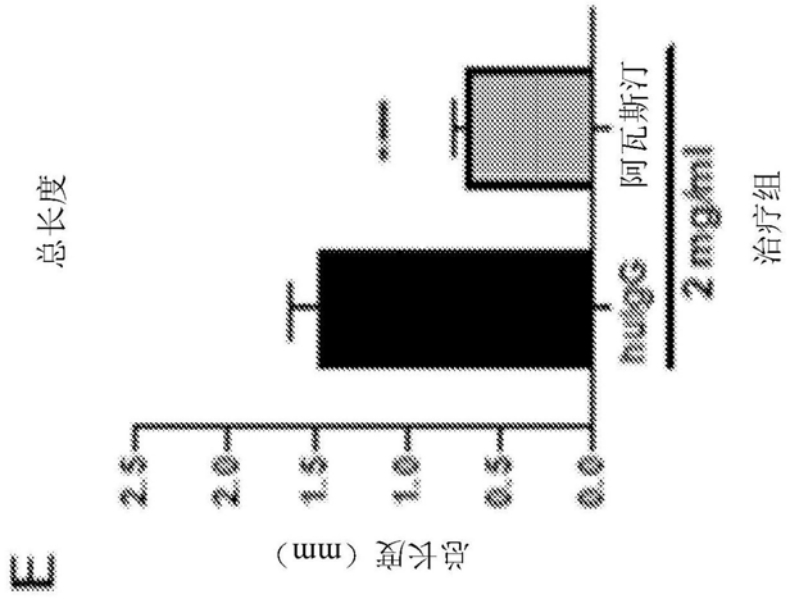


图19E

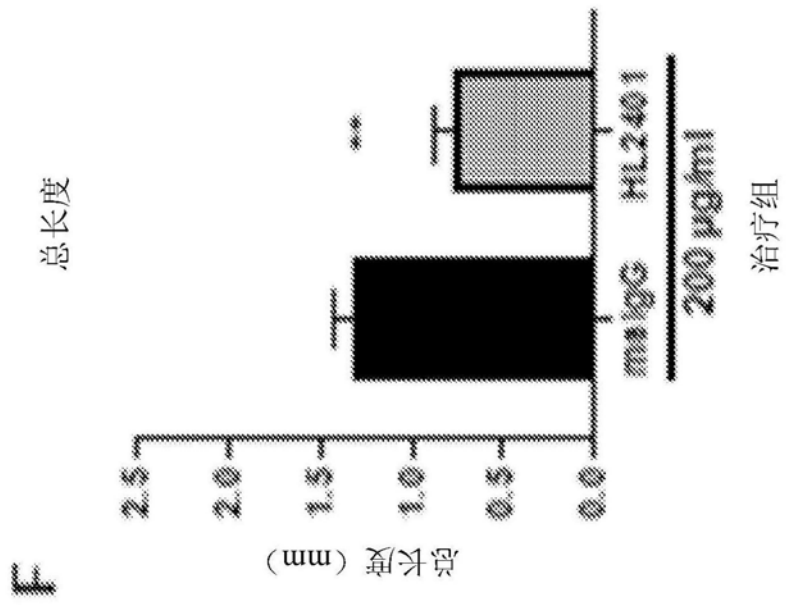


图19F

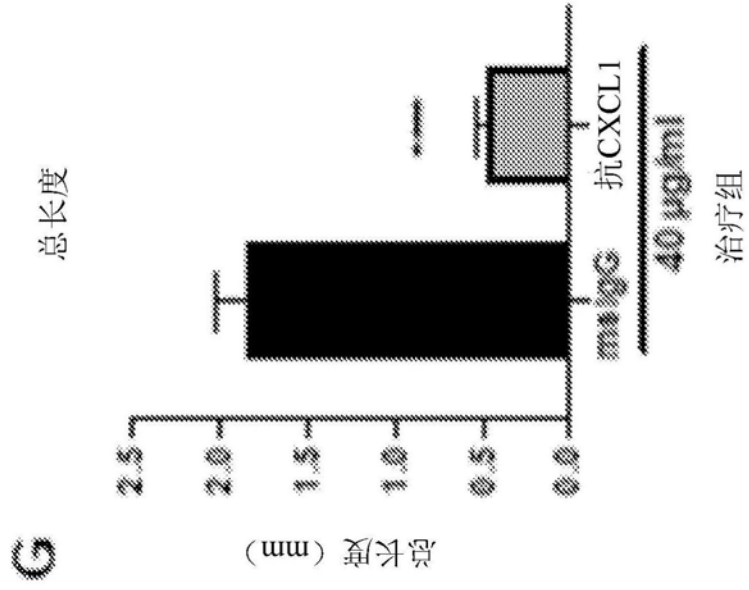


图19G

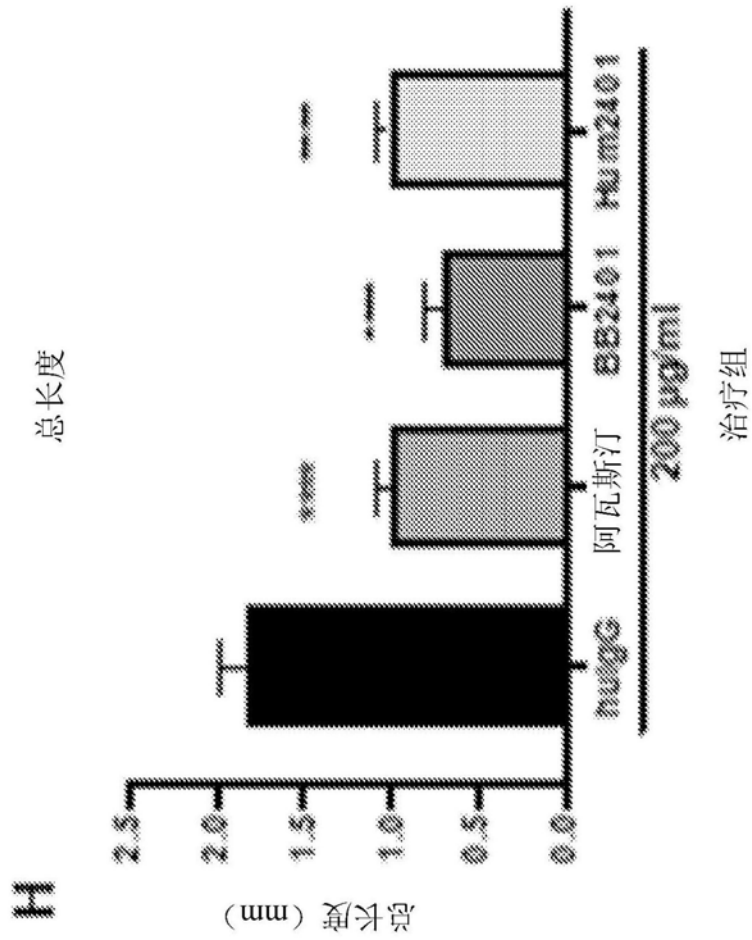


图19H

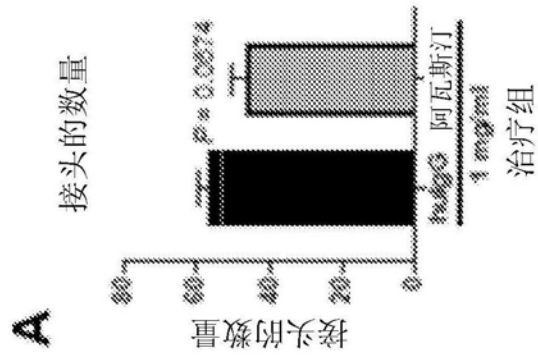


图20A

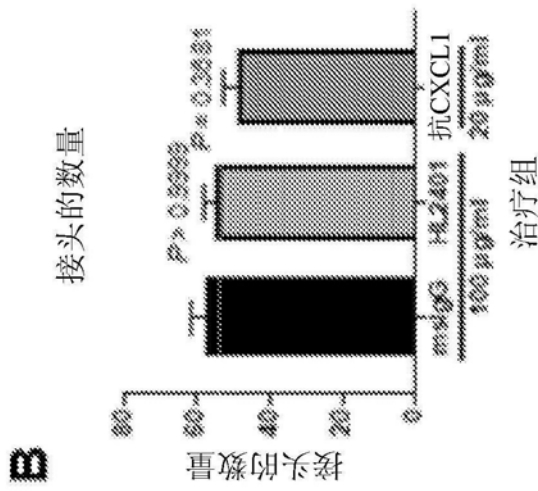


图20B

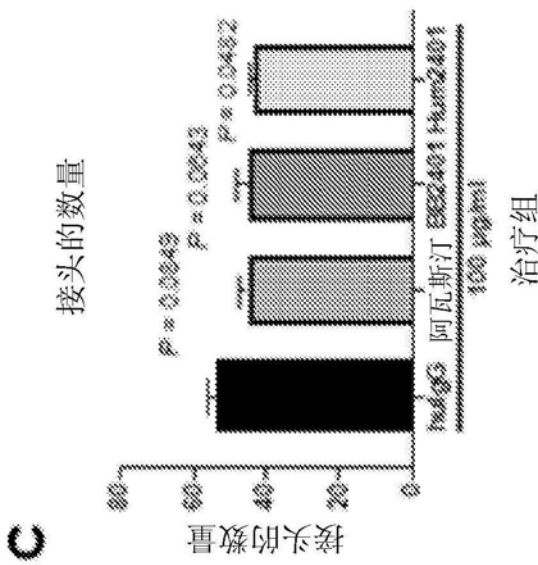


图20C

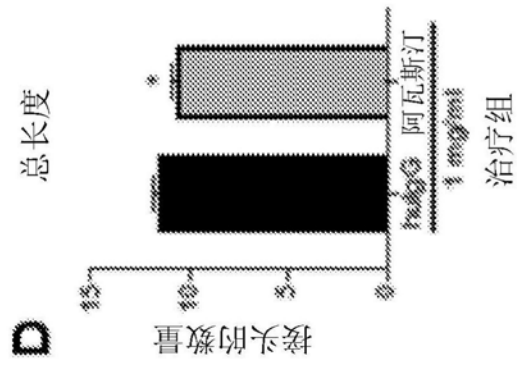


图20D

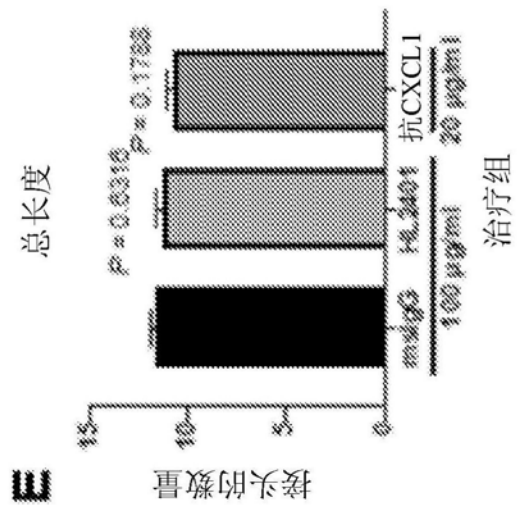


图20E

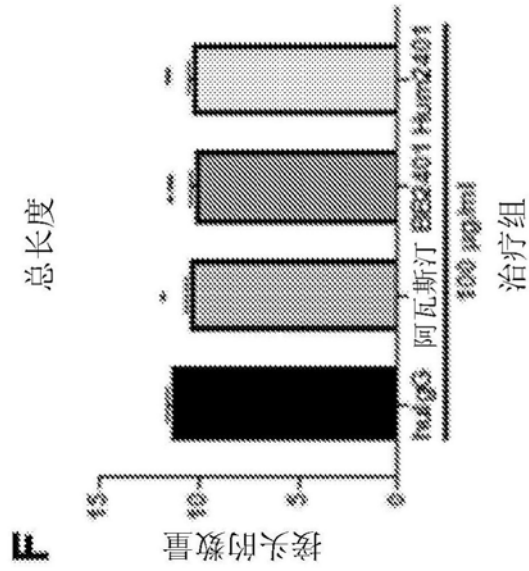


图20F