



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119700967 A

(43) 申请公布日 2025.03.28

(21) 申请号 202411949862.9

A61P 29/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.02.04

A61P 25/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/28 (2006.01)

62/800869 2019.02.04 US

(62) 分案原申请数据

202080002561.9 2020.02.04

(71) 申请人 阿拉玛布治疗学股份有限公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 张彦丰

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

专利代理人 李波 蔡晓菡

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

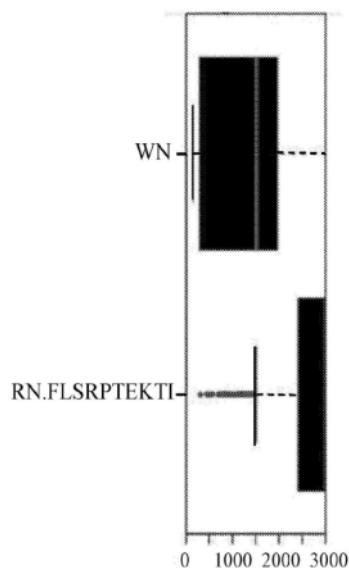
权利要求书1页 说明书31页 附图3页

(54) 发明名称

连接蛋白43抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及连接蛋白43抗体及其用途。本公开一般涉及治疗与星状细胞或骨细胞中Cx43半通道开放相关联的疾病或病况的组合物和方法，优选治疗炎性疾病或病况，或神经退行性疾病，如脊髓损伤。



1. 一种药物组合物, 用于抑制细胞中Cx43半通道开放, 优先用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病, 所述药物组合物包含一种抗-Cx43抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的运载体, 所述抗-Cx43抗体或其抗原结合片段包含:

由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的第一重链互补决定区(CDR)序列、由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的第一重链CDR序列和由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的第一重链CDR序列; 和

由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的第一轻链CDR序列、由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的第一轻链CDR序列和由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的第一轻链CDR序列。

2. 如权利要求1所述的组合物, 其中所述抗-Cx43抗体或其抗原结合片段包含重链可变区, 其由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成, 和轻链可变区, 其由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成。

3. 如权利要求2所述的组合物, 其中所述抗-Cx43抗体或其抗原结合片段包含重链, 其由选自SEQ ID NO:11、13、15和17的氨基酸序列组成, 和轻链, 其由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成。

4. 如权利要求1-3的任一项所述的药物组合物, 其中所述炎性疾病或病况或神经退行性疾病是脊髓损伤。

5. 一种抗-Cx43抗体或其抗原结合片段用于制备抑制细胞中Cx43半通道开放的药物, 优先用于制备治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病的药物用途。

6. 如权利要求5所述的用途, 其中所述抗-Cx43抗体或其抗原结合片段包含重链可变区, 其由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成, 和轻链可变区, 其由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成。

7. 如权利要求6所述的用途, 其中所述抗-Cx43抗体或其抗原结合片段包含重链, 其由选自SEQ ID NO:11、13、15和17的氨基酸序列组成, 和轻链, 其由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成。

8. 如权利要求5-7的任一项所述的用途, 其中所述炎性疾病或病况或神经退行性疾病是脊髓损伤。

连接蛋白43抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日为2020年2月4日的中国专利申请202080002561.9“连接蛋白43抗体及其用途”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2019年2月4日提交的美国临时申请第62/800,869号的优先权权益,通过引用将该申请的公开内容全文纳入本文。

技术领域

[0004] 本公开一般涉及抗连接蛋白 (Cx) 43抗体及其在治疗与细胞(例如星状细胞和骨细胞)中Cx43半通道开放相关联的疾病或病况的用途。

背景技术

[0005] 估计仅在美国就有约400,000个患者患有脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI), 每年还增加14,000以上新病例。虽然急性炎症反应是为了保留组织完整性和区分创伤性病变的防御机制, 但过度反应会限制成功恢复的可能性。组织肿胀, 尤其在椎管的紧密限制下, 将减少组织灌注并导致继发性缺血。组织的延迟损失影响大部分患者中的功能恢复, 现在还没有有效的治疗选择。

[0006] 已显示在50年前, 在不存在损伤的情况下注射ATP足以诱发急性炎性反应。将嘌呤信号转导与炎症介导物联系起来的关键观察结果是嘌呤能受体P2RX7的活化引发小胶质细胞成熟和IL-1 β 的分泌。虽然认识到腺嘌呤核苷(即ATP及其代谢物)是炎症介导物, 但对于脊髓损伤中嘌呤能信号转导的作用知之甚少。脊髓损伤导致创伤周围区域过度和持续的ATP释放, P2RX7抑制减少炎症反应, 促进功能恢复。

[0007] 先前的研究显示星状细胞至少部分通过连接蛋白43 (Cx43) 半通道的开放释放ATP。连接蛋白是一类具有双通道功能的蛋白质。其传统作用是形成间隙连接, 组成连接两个相邻细胞胞质的两个停靠半通道。间隙连接能允许离子和小分子, 包括Ca²⁺ cAMP, IP₃, ATP, 谷氨酰胺和葡萄糖的细胞至细胞的传输。已发现未相对(unopposed)半通道构成受控胶质递质释放的通道。由于其相对较大的孔内径(约10 Å), 开放的半通道能促使小胞质化合物流出, 其中许多, 包括ATP和谷氨酰胺一旦释放将起到递质作用。半通道开放通常是严格受控的, 因为许多半通道的延长开放与细胞存活不相容。

[0008] 已发现Cx43涉及其它炎性疾病, 例如无菌和感染性炎症, 例如感染性肺部疾病、骨关节炎和脊髓损伤。

[0009] 因此, 存在对治疗脊髓损伤, 例如通过抑制开放的Cx43半通道进行所述治疗的有效方法和组合物的需要。

发明内容

[0010] 本文提供了一种治疗与Cx43半通道开放(例如过度或延长开放)相关联的疾病或病况的组合物和方法, 例如炎性疾病或病况或神经退行性疾病, 如脊髓损伤、阿尔茨海默氏

病、骨关节炎等。

[0011] 在一个方面,本文提供了抗Cx43抗体,或其抗原结合片段,包括:

[0012] 分别具有SEQ ID N0:1、2和3的氨基酸序列的第一、第二和第三重链互补决定区(CDR)序列;和

[0013] 分别具有SEQ ID N0:4、5和6的氨基酸序列的第一、第二和第三轻链互补决定区(CDR)序列。

[0014] 在一些实施方式中,抗体或其片段可具有重链可变区,其具有SEQ ID N0:7的氨基酸序列,和轻链可变区,其具有SEQ ID N0:8的氨基酸序列。

[0015] 另一个方面涉及一种抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有选自SEQ ID N0:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID N0:18的氨基酸序列。

[0016] 在另一个方面,本文提供了与位于氨基酸序列FLSRPTEKTI (SEQ ID N0:19)内的表位结合的抗体。在一些实施方式中,表位可包括一个或多个氨基酸,选自:SEQ ID N0:19的R4,P5,E7,K8,和I10。在一个实施方式中,表位由SEQ ID N0:19的R4,P5,E7,K8和I10组成。在一些实施方式中,表位可包括SEQ ID N0:19的全部10个氨基酸。在一些实施方式中,表位可由SEQ ID N0:19的全部10个氨基酸组成。

[0017] 另一个方面涉及分离的抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其片段与任何本文公开的抗体或其片段交叉竞争与Cx43的结合。在一些实施方式中,抗体或其片段能抑制或减少或阻断细胞中Cx43半通道的开放。

[0018] 另一个方面涉及一种分离的抗Cx43抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段与本文公开的具有SEQ ID N0:1-18之一或更多的抗体或其片段交叉竞争与Cx43的结合,其中优选所述抗体或其片段结合于一个位于FLSRPTEKTI (SEQ ID N0:19)的氨基酸序列内的表位,其中更优选地,该表位包含一个或多个选自SEQ ID N0:19的R4,P5,E7,K8和I10的氨基酸,其中甚至更优选地,该表位由SEQ ID N0:19的所有十个氨基酸组成。

[0019] 在一些实施方式中,本文公开的抗体或其片段能抑制或减少或防止细胞中Cx43半通道的开放。在一些实施方式中,所述开放是过度的或长期的开放。

[0020] 本文还公开了用于抑制细胞内Cx43半通道开放的药物组合物,优先用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病,例如脊髓损伤,包含本文公开的一种或多种抗体或其片段和药学上可接受的运载体。在一些实施方式中,所述开放是过度的或长期的开放。

[0021] 另一个方面涉及本文公开的抗体或其片段的用途,用于制备抑制细胞中Cx43半通道开放的药物,优先所述药物用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病,例如脊髓损伤。在一些实施方式中,所述开放是过度的或长期的开放。

[0022] 另一个方面涉及一种抑制细胞中Cx43半通道开放的方法,优先用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病,例如脊髓损伤,包括使细胞接触有效量的本文公开的的抗体或其片段。在一些实施方式中,所述开放是过度的或长期的开放。

[0023] 另一个方面涉及治疗与星状细胞或骨细胞中Cx43半通道开放相关的疾病或病况的方法,优先治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病例如脊髓损伤,包括对需要的患者施用治疗有效量的本文公开的抗体或其片段。在一些实施方式中,所述开放是过度的或长期的开放。

[0024] 本发明具体涉及以下方案:

- [0025] 1. 一种抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包含:
- [0026] 分别具有SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列的第一、第二和第三重链互补决定区(CDR)序列;和
- [0027] 分别具有SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列的第一、第二和第三轻链互补决定区(CDR)序列。
- [0028] 2. 如方案1所述的抗体或其片段,包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
- [0029] 3. 一种抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。
- [0030] 4. 一种抗Cx43抗体或其抗原结合片段,其中当与Cx43结合时,其结合至位于FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列内的表位。
- [0031] 5. 如方案4所述的抗体或其片段,其中所述表位包含选自:SEQ ID NO:19的R4,P5,E7,K8,和I10的一个或多个氨基酸。
- [0032] 6. 如方案4所述的抗体或其片段,其中所述表位由SEQ ID NO:19的R4,P5,E7,K8和I10组成。
- [0033] 7. 如方案4所述的抗体或其片段,其中所述表位包含SEQ ID NO:19的所有十个氨基酸。
- [0034] 8. 如方案4所述的抗体或其片段,其中所述表位由SEQ ID NO:19的所有十个氨基酸组成。
- [0035] 9. 一种分离的抗Cx43抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段与方案1-8中任一项的抗体或其片段交叉竞争与Cx43的结合。
- [0036] 10. 一种分离的抗Cx43抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段与方案1-3中任一项的抗体或其片段交叉竞争与Cx43的结合,其中优选所述抗体或其片段结合于位于FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列内的表位,其中更优选地,该表位包含选自SEQ ID NO:19的R4,P5,E7,K8和I10的一个或多个氨基酸,其中甚至更优选地,该表位包含SEQ ID NO:19的所有十个氨基酸。
- [0037] 11. 如方案1-10中任一项所述的抗体或其片段,其抑制细胞中Cx43半通道的开放。
- [0038] 12. 一种药物组合物,用于抑制细胞中Cx43半通道开放,优先用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病,包括方案1-11任一所述的抗体或其片段和药学上可接受的运载体。
- [0039] 13. 如方案12所述的药物组合物,其中神经退行性疾病是脊髓损伤。
- [0040] 14. 方案1-11任一抗体或其片段的用途,用于制备抑制细胞中Cx43半通道开放的药物,优先用于制备治疗治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病,例如脊髓损伤的药物。
- [0041] 15. 一种抑制细胞中Cx43半通道开放的方法,优先用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病,例如脊髓损伤,包括使细胞接触有效量的方案1-11任一所述的抗体或其片段。
- [0042] 16. 一种治疗与星状细胞或骨细胞中Cx43半通道开放关联的疾病或病况的方法,优先用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病,例如脊髓损伤,包括对有需要的患者施用治疗有效量的方案1-11任一所述的抗体或其片段,其中优选所述开放是过度或长期开

放。

附图说明

[0043] 图1.抗体筛选原始数据的箱形图。具体来说,框的底部和顶部是数据的第25和第75个百分位。靠近箱中间的条是第50个百分点(中位数)。晶须在分位数间范围的1.5处,表明数据集中的统计异常(Mcgill等人,(1978)美国统计学家,32:12-16)。

[0044] 图2.在高严格条件下用抗体探测肽FLSRPTEKTI的全取代(full substitution)分析的字母图。基础序列列于图下方,基线序列的有义信号在红线处。给定位置的取代绘于对该置換记录的信号强度处。

[0045] 图3.组2肽上探测的抗体显示与含有目标序列C末端残基的肽结合增加。在肽中起始位置至终止位置划线,高度为信号记录的高度。

具体实施方式

[0046] 应理解,前面的一般性描述和下面的详细描述都只是示例性和解释性的,不对本公开的组合物和方法构成限制。

[0047] 本文公开了与抗Cx43抗体或其抗原结合片段有关的组合物和方法。在一些实施方式中,本文公开的组合物出乎意料地显示了相对于PCT出版公开号W02015/027120和W02017/147561(在此完整引入以供参考)中公开的那些更卓越的活性、可入药性(例如减少的毒性)、稳定性和/或可开发性(例如减少的生产成本)。在一些实施方式中,优点是出乎意料的。

[0048] 定义

[0049] 方便起见,将说明书、实施例和所附权利要求中使用的特定术语汇集在此。除非另外定义,否则,本文中所使用的所有技术和科学术语都具有本文所属领域普通技术人员通常所理解的含义。

[0050] 本文所用的下列术语和词语将具有下列意义:

[0051] 本文使用冠词“一个”和“一种”表示一个或一个以上的(即至少一个)该冠词语法上的宾语。举例而言,“一种元件”表示一个元件或者一个以上的元件。

[0052] 本文所用术语“约”表示在所示值20%以内,更优选10%以内并且最优选5%以内的可接受误差。

[0053] “抗Cx43抗体”是与Cx43(例如其胞外结构域)免疫特异性结合的抗体。抗体可以是分离的抗体。与Cx的这种结合显示例如不大于1 μ M,不大于100nM或不大于50nM的 K_D 值。可用本领域技术人员已知的任何方法测定 K_D ,例如表面质子共振实验或细胞结合实验。抗Cx43抗体可以是单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0054] 本文所用的“抗体”是包含与目标表位结合的结合域的蛋白质。术语抗体包括单克隆抗体,所述单克隆抗体包括免疫球蛋白重链和轻链分子,单重链可变域抗体,和其变体和衍生物,包括单克隆和单重链可变结构域抗体的嵌合变体。结合域基本由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码,其中蛋白质与抗原免疫特异性结合。已被认识的免疫球蛋白基因包括 κ , λ , α , γ , δ , ϵ 和 μ 恒定区基因,以及大量免疫球蛋白可变区基因。轻链被归类为 κ 或 λ 。重链被归类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,这进而确定了免疫球蛋白类别,分别为IgG、IgM、IgA、IgD

和IgE。对于大多数脊椎生物,包括人和鼠物种,典型的免疫球蛋白结构单元包括四聚体,其包含两对相同的多肽链,每对具有一条“轻”(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。“VL”和“VH”分别指这些轻链和重链。“C_L”和“C_H”指轻链和重链的恒定区。每条V_L和V_H上的三个β-链环负责与抗原结合,称作“互补决定区”或“CDR。”“Fab”(抗原结合片段)区包括来自抗体的每条重链和轻链的一个恒定区和一个可变区即V_L,C_L,V_H和C_H1。

[0055] 抗体包括完整的免疫球蛋白和其抗原结合片段。术语“抗原结合片段”指与抗原结合或与完整抗体(即其衍生来源的完整抗体)竞争抗原结合(即特异性结合)的抗体多肽片段。可用本领域熟知的重组或生物化学方法产生抗原结合片段。示范性抗原结合片段包括Fv,Fab,Fab',(Fab')₂,CDR,互补位和单链Fv抗体(scFv),其中V_H和V_L链结合在一起(直接或通过肽接头)形成连续的多肽。

[0056] 抗体还包括变体、嵌合抗体和人源化抗体。本文所用的术语“抗体变体”指在重链和/或轻链中具有单个或多个突变的抗体。在一些实施方式中,突变存在于可变区中。在一些实施方式中,突变存在于恒定区中。“嵌合抗体”指这样的抗体,其中重链和轻链氨基酸序列中每一条的一部分与衍生自特定物种或属于特定科的抗体对应序列同源,但链的剩余区段与另一物种或科的对应序列同源。通常在这些嵌合抗体中,轻链和重链可变区模拟衍生自哺乳动物物种的抗体可变区,而恒定区与衍生自另一种物种的抗体的序列同源。这些嵌合形式的一种显著优点是例如能使用来自非人宿主生物的轻易可得的杂交瘤或B细胞便利地从目前已知的序列衍生可变区,而从例如人细胞制备物衍生恒定区。虽然可变区具有容易制备的优点,且其特异性不受其来源影响,来自人的恒定区将较难在抗体注射入人个体时引发免疫应答,相较其恒定区来自非人来源的对应抗体而言。然而,定义并不限于该具体例子。“人源化”抗体指一种分子,其具有基本衍生自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点,分子的剩余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可包括融合在恒定区上的完整可变区或仅移植到可变区中的合适框架区的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型或以一个或多个氨基酸取代修饰,例如修饰成更像人免疫球蛋白。人源化抗体的一些形式保留了所有的CDR序列(例如人源化小鼠抗体,其包含来自小鼠抗体的全部六个CDR)。人源化抗体的其它形式具有一个或多个CDR(一、二、三、四、五或六个),它们相对于原始抗体有所改变,也称作“衍生自”一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0057] 如本文所述,抗体氨基酸残基可根据Kabat的通用编号系统编号(Kabat等(1991)《免疫学热门蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第五版.NIH,公共卫生局(Public Health Service),马里兰州贝塞斯达)。

[0058] 如本文抗体和作为靶标的Cx43的表位之间的结合的上下文中所用术语“结合”指分子间的非共价相互作用的过程。优选地,所述结合具有特异性。抗体的特异性可以基于亲和力确定。特异性抗体对其表位的结合亲和力或解离常数K_D小于10⁻⁷M,优选小于10⁻⁸M。

[0059] 术语“亲和力”指抗体的结合结构域与表位之间结合反应的强度。其是在结合结构域和表位之间作用的吸引力和排斥力的总和。本文所用的术语亲和力指解离常数K_D。

[0060] 术语“抗原”指一种分子或分子部分,其能与选择性结合物质例如抗体结合,还能用于动物以产生与该抗原的表位结合的抗体。抗原可具有一个或多个表位。

[0061] 术语“表位”包括任意能够特异性结合免疫球蛋白或T细胞受体的决定区,优选多肽决定区。在某些实施方式中,表位决定簇包括有化学活性的成组表面分子(例如氨基酸、

糖侧链、磷酰基或磺酰基基团),而在某些实施方式中,表位决定簇可具有特定的三维结构特点和/或特定的荷电特点。在一个实施方式中,表位是由抗体结合的抗原的区域。在一些实施方式中,当抗体在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其目标抗原时,称为与抗原特异性结合。表位作图的方法是本领域熟知的,例如X光共结晶学鉴定、基于阵列的寡肽扫描、定点诱变、高通量诱变作图和氢-氘交换。可从连续氨基酸或由于蛋白质三级结构折叠并置的不连续氨基酸形成表位。连续氨基酸形成的表位通常在与变性溶剂接触后仍然维持,而三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理后丧失。表位通常包含呈现独特空间构象的至少3个、更通常至少5个或约8-10个氨基酸。

[0062] 与表位结合的抗体上的位点称作“互补位”,其通常包括与表位一旦结合后紧邻表位的氨基酸残基。见Sela-Culang等,Front Immunol. 2013; 4:302。

[0063] “免疫组织化学”或“IHC”指在细胞或组织切片中检测的过程,其能够实现在生物组织中免疫特异性识别感兴趣抗原的抗体的结合及其随后的检测。IHC技术的综述可见例如Ramos-Vara等,Veterinary Pathology 2014年1月卷51号(1),42-87,在此完整引入以供参考。为了评估IHC结果,开发了不同的定型和半定量评分系统。参见例如Fedchenko等,Diagnostic Pathology,2014;9:221,在此完整引入以供参考。一个例子是H分数,它是通过将具有染色强度序数值(从“无信号”的0到“强信号”的3得分)的细胞百分数与300个可能的值相乘的结果相加而得出的。

[0064] “免疫特异性的”或“免疫特异性地”(有时与“特异地”可互换使用)指通过免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的域与感兴趣代表的一个或多个表位结合,但基本不识别和结合包含抗原分子的混合群体的样品中的其它分子的抗体。通常,用例如实时无标签生物层干涉技术,例如Octet® HTX生物传感器,或用表面等离子体共振例如BIACORE™,或用溶液亲和力ELISA测定的抗体与同源抗原免疫特异性结合的 K_d 值不大于50nM。这些技术的使用是本领域熟知的。

[0065] 术语“表面等离子体共振”是指一种光学现象,可通过检测生物传感器基质中蛋白质浓度的变化来分析实时生物分子相互作用,例如使用BIACORE™系统(药物生物传感器公司(Pharmacia Biosensor AB),瑞典乌普萨拉和新泽西州皮斯卡塔)。

[0066] 生物层干涉术是无标签的技术,用于测定生物分子相互作用。它是一种光学分析技术,其分析两种表面反射白光的干涉模式:在生物传感器尖端的一层固定化蛋白质和一层内部参比。与生物传感器尖端结合的分子数量中的任何改变导致可实时测量的干涉模式变化(Abdiche, Y.N., 等,Analytical Biochemistry, (2008), 377 (2), 209-217)。在一些实施方式中,用“基于实时生物层干涉仪的生物传感器(Octet HTX技术)”评估本文公开的一些抗Cx43抗体的结合特征。

[0067] 术语“交叉竞争”,“交叉竞争性”,“交叉阻断”,“交叉阻断的”和“交叉阻断性”在本文中可互换使用,指抗体或其片段通过本文抗Cx43抗体的变构调节直接或间接干涉目标Cx43的结合。抗体或其片段能干涉另一种抗体或其片段与目标结合的程度以及因此是否可根据本公开称作交叉阻断或交叉竞争可用竞争性结合实验确定。一种特别适合的定量交叉竞争实验使用FACS或基于AlphaScreen的方法,以测定标记的(例如带His标签、生物素化或放射性标记)抗体或其片段与另一种抗体或其片段之间竞争与其目标结合的能力。一般说,交叉竞争性抗体或其片段因此是例如能在交叉竞争实验中与目标结合的抗体,因此在实验

过程中或在第二种抗体或其片段存在下根据公开内容免疫球蛋白单可变区或多肽被记录的置换(displacement)达到最大理论置换(例如被需要被交叉阻断的冷(未标记)抗体或其片段置换)的最高100% (例如在基于FACS的竞争实验中) 被给定量的要测试的潜在交叉阻断性抗体或其片段置换。优选因此交叉竞争性抗体或其片段具有10% - 100%之间,更优选50% - 100%之间的记录的置换。

[0068] 抗体之间的交叉竞争性还可用实时无标记生物层干涉术实验测定。两种抗体之间的交叉竞争可表示成由于自身结合(第一种和第二种抗体是相同抗体)第二种抗体的结合低于北京信号。两种抗体之间的交叉竞争可表示成例如小于基线自身背景结合(第一种和第二种抗体是相同抗体)的第二种抗体结合%。

[0069] 术语“抑制”、“阻断”和“减少”可在本文中互换使用,指生物活性(例如半通道开放)的任何统计学显著的减少。例如,“抑制”或“阻断”可以指生物活性减少约10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或100%。

[0070] 术语“对象”或“患者”包括人或其他哺乳动物,其接受预防性或治疗性处理。

[0071] 本文所用的术语“处理”、“治疗”是指诸如本文所述的治疗或预防措施。“治疗”方法采用向患者(例如患有炎性疾病或病况或神经退行性疾病的患者)施用本文提供的Cx43配体,以预防,治愈,延迟,降低炎性疾病或病况或神经退行性疾病的严重性或减轻其一种或多种症状,或者为了将患者的生存期延长至超出在没有此类治疗的情况下预期的生存期。“治疗”的方法还采用向患者施用本文提供的Cx43配体(例如抗体)以在患者中提供超出在不存在这种治疗的情况下预期的治疗。

[0072] 如本文所用,术语“有效量”是指当施用给患者时足以实现疾病的治疗、预后或诊断的试剂(例如Cx43配体,如抗Cx43抗体)的量。治疗有效量可以根据患者和所治疗的疾病或病症,对象的体重和年龄,疾病或病症的严重程度以及给药方式等而变化,这些都可由本领域普通技术人员容易地确定。给药剂量范围可以是例如约1ng至约10,000mg,约5ng至约9,500mg,约10ng至约9,000mg,约20ng至约8,500mg,约30ng至约7,500mg,约40ng至约7,000mg,约50ng至约6,500mg,约100ng至约6,000mg,约200ng至约5,500mg,约300ng至约5,000mg,约400ng至约4,500mg,约500ng至约4,000mg,约1μg至约3,500mg,约5μg至约3,000mg,约10μg至约2,600mg,约20μg至约2,575mg,约30μg至约2,550mg,约40μg至约2,500mg,约50μg至约2,475mg,约100μg至约2,450mg,约200μg至约2,425mg,约300μg至约2,000,约400μg至约1,175mg,约500μg至约1,150mg,约0.5mg至约1,125mg,约1mg至约1,100mg,约1.25mg至约1,075mg,约1.5mg至约1,050mg,约2.0mg至约1,025mg,约2.5mg至约1,000mg,约3.0mg至约975mg,约3.5mg至约950mg,约4.0mg至约925mg,约4.5mg至约900mg,约5mg至约875mg,约10mg至约850mg,约20mg至约825mg,约30mg至约800mg,约40mg至约775mg,约50mg至约750mg,约100mg至约725mg,约200mg至约700mg,约300mg至约675mg,约400mg至约650mg,约500mg,或约525mg至约625mg本文提供的抗体或其抗原结合片段。给药可以是例如每周、每两周、每三周、每4周、每5周或每6周。可调节剂量方案以提供最佳治疗响应。有效量还是试剂的任何毒性或有害效果(副作用)最小化和/或被有益效果抵消的量。给药可以是静脉内精确或约6mg/kg或12mg/kg每周静脉内给药,或者以12mg/kg或24mg/kg每两周静脉内给药。其它给药方案如下所述。

[0073] 合适领域的普通技术人员能够一般理解本文所使用的重组核酸技术、微生物学、

免疫学、抗体工程和分子和细胞生物学领域内的其它术语。例如,制备重组DNA,进行寡核苷酸合成和实施组织培养与转化可采用常规技术(如电穿孔、转染或脂质转染)。酶促反应和纯化技术可按照生产商的说明书或按照本领域常规操作或按照本文所述来进行。以上所述技术和方法可以一般性地按照如本领域所知、亦如本说明书所引用和论述的众多综合性和专论性文献中所述来进行。参见,例如Sambrook等,2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (《分子克隆:实验室手册》) (第3版,冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港),该书通过援引纳入本文通用于所有目的。除非特别说明,本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药学化学中使用的命名以及实验室方法和技术是本领域公知且普遍使用的。对于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及治疗患者,可使用标准技术。

[0074] 如本文所用,术语“包含”或“包括”是指存在于给定实施方式中,但未包含未指定要素的组合物,方法及其各自的组分。

[0075] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方式所需的那些要素。该术语允许存在实质上不影响本公开的该实施方式的基本和新颖的或功能的特征的附加要素。

[0076] 术语“由……组成”是指本文所述的组合物,方法及其各自的组分,其排除了在该实施方式的描述中未列举的任何要素。

[0077] 本说明书和所附权利要求书中,单数形式“一”和“所述”包括复数含意,除非另有明确说明。因此,例如,一种方法摄包括一种或多种方法,和/或本文所述类型步骤,这些方法对于本领域技术人员在阅读本公开等后将变得显而易见。

[0078] 在以下小节中进一步详细描述本公开的各个方面和实施方式。

[0079] Cx43

[0080] 各种细胞能够通过半通道和连接蛋白形成的间隙连接彼此通信,并与胞外环境通信。连接蛋白在人体中普遍表达。六个连接蛋白组成一个半通道,两个半通道组成一个间隙连接通道。间隙连接是位于相邻细胞之间质膜内的一组通道,它们介导胞间通讯。半通道是与间隙连接通道分开的实体。半通道允许胞内区室与胞外环境之间的分子交换。

[0081] 许多细胞表达称作连接蛋白(Cx)43半通道的半通道。连接蛋白-43也称为间隙连接 α -1蛋白(GJA1),它是一种4382kDa的蛋白,由382个氨基酸组成(NCBI参考序列:NP_000156.1)。GJA1包含一个长C末端尾,一个N末端结构域和多个跨膜结构域。蛋白质四次通过磷脂双层,保留其C和N端与胞质接触。C末端尾由50个氨基酸组成,包括翻译后修饰位点以及转录因子、细胞骨架元件和其他蛋白质的结合位点。结果,C末端尾对于调节pH门控和通道装配等功能至关重要。值得注意的是,编码该尾的GJA1基因(NCBI基因ID:2697)的DNA区高度保守,这表明它要么对突变具有抗性,要么在突变后变得致命。同时,N末端域参与通道门控和寡聚,因此可控制通道开放和关闭状态之间的切换。跨膜结构域形成间隙连接通道,而胞外环促进正确通道对接。此外,两个胞外环形成与两个六聚体相互作用的二硫键,形成一个完整的间隙连接通道。

[0082] Cx在许多免疫过程调节中起到重要作用。最近报道显示,Cx43半通道在无菌损伤以及感染性炎性疾病中的病理性作用(Li等, *Scientific Reports* (2018) 8:166, doi: 10.1038/s41598-017-18452-1)。无菌炎症是常见事件,其由物理、化学或代谢损伤触发。不同的损伤导致细胞应激和随之的应激反应。存在许多类型的应激反应(例如蛋白质解折叠

反应,综合应激反应,氧化应激),通常彼此牵连。应激反应触发炎症。当存在损伤时,无法化解炎症,导致有害循环,其在许多人类疾病,包括癌症、代谢和遗传病的病理生理中起到关键作用。

[0083] 由无菌炎症导致的急性病况包括缺血再灌注损伤 (IRI)、创伤(例如脊髓损伤、创伤性脑损伤、周围神经损伤)、结晶诱导的炎症和毒素接触。急性心肌梗死、脑梗死、急性肾损伤和实体器官移植都是发生IRI的病况。关节内结晶沉积导致痛风性关节炎,引发炎症的经典临床症状,包括发红、疼痛、发热、肿胀和功能丧失。毒素例如对乙酰氨基酚或蛇毒诱导肝和肌肉损伤。创伤,包括挤压伤,引发突发炎症反应;内源性和微生物诱因(由于接触细菌)也可在这种情况下引起炎症。

[0084] 触发或由无菌炎症引起的慢性疾病包括颗粒诱导的肺部疾病,例如石棉沉滞症和矽肺病;慢性肺部疾病,例如囊性纤维化和特发性肺纤维化;心血管疾病,例如动脉粥样硬化;慢性心力衰竭的某些原因;某些肿瘤病例;关节炎(例如骨关节炎和类风湿关节炎 (RA))和自身免疫性疾病。

[0085] 感染性炎症可由多种病原体引起,例如许多组织中的细菌和真菌。

[0086] 在各种实施方案中,无论原因如何,均可通过本文公开的抗Cx43抗体治疗炎性疾病。如本文所用的炎性疾病是指以炎症为特征的大量疾病和病症。例子包括关节炎、过敏、哮喘、自身免疫性疾病、乳糜泻、肾小球肾炎、肝炎,炎性肠病(包括克罗恩病和溃疡性结肠炎)、再灌注损伤和移植排斥。自身免疫性疾病是指免疫系统攻击其自身的蛋白质、细胞和组织的疾病,或其中免疫效应T细胞对内源性自身肽自身反应并引起组织破坏的疾病。因此,针对对象自身的抗原(称为自身抗原)产生了免疫应答。自身免疫疾病的完整列表和综述可参见《自身免疫疾病》(Rose和Mackay,2014年,学术出版社(Academic Press))。自身免疫疾病包括但不限于类风湿性关节炎,克罗恩病,1型糖尿病,脱发,多发性硬化症,狼疮,系统性红斑狼疮(SLE),自身免疫性脑脊髓炎,重症肌无力(MG),桥本氏甲状腺炎,古巴斯捷氏综合征,天疱疮(例如寻常天疱疮),格雷夫氏病,自身免疫性溶血性贫血,自身免疫性血小板减少性紫癜,具有抗胶原蛋白抗体的硬皮病,混合性结缔组织病,多发性肌炎,恶性贫血,特发性阿迪森氏病,自身免疫性不育,肾小球性肾炎(例如急进性肾小球肾炎、增生性肾小球肾炎),大疱性类天疱疮,干燥综合征,胰岛素抗性和自身免疫性糖尿病。

[0087] 慢性神经退行性疾病期间过度或长期Cx43半通道开放也已显示通过干扰代谢梯度和过分释放有毒分子以诱导细胞死亡来促进疾病进展。参见例如Orellana等人,(2011),《神经退行性疾病-进展,预防,保护和监测》,第10章,连接蛋白半通道在神经退行性中的作用,doi:10.5772/28054;Bosch等,Front Cell Neurosci. 2014;8:242;和Vicario等,Front. Physiol.,2017,第8卷,第1060篇,doi:10.3389/fphys.2017.01060;全部在此完整引入以供参考。因此,使用本文公开的组合物抑制或减少Cx43半通道开放可用于治疗各种神经退行性疾病,例如阿尔茨海默氏病(AD),溶酶体贮积症,细菌性脑膜炎,肌萎缩性侧索硬化症,缺氧,局部缺血,青光眼,精神分裂症,重度抑郁,双相情感障碍,癫痫症,脑外伤,创伤后应激障碍,帕金森氏病,唐氏综合征,脊髓小脑性共济失调,亨廷顿舞蹈病,放射治疗引起的神经退行性,长期应激引起的神经退行性以及与正常衰老或滥用神经活化药物(例如酒精,鸦片类,甲基苯丙胺,苯环利定和可卡因)相关的神经退行性。

[0088] 抗-Cx43抗体

[0089] 抑制或减少Cx43半通道的开放可以减少或抑制细胞中Cx43半通道的开放,从而治疗例如炎性疾病或病症或神经退行性疾病。如此,抗Cx43抗体可用作消炎和/或神经保护治疗中的有效试剂。

[0090] 在某些实施方案中,抗Cx43抗体可以是单克隆抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,抗Cx43抗体可以是修饰的,例如嵌合或衍生自小鼠抗Cx43抗体的人源化抗体。在一些实施方案中,抗Cx43抗体是与人Cx43蛋白(例如,胞外环或其部分)上存在的表位结合的抗体或其抗原结合片段。

[0091] 示范性抗Cx43抗体可具有一个或多个以下CDR序列:

[0092] 重链:

[0093] CDR1 (SEQ ID NO.:1) : GYTFTSYY

[0094] CDR2 (SEQ ID NO.:2) : INPSNAGT

[0095] CDR3 (SEQ ID NO.:3) : TREGNPYYTMNY

[0096] 轻链:

[0097] CDR1 (SEQ ID NO.:4) : QSLLNSGNQKTY

[0098] CDR2 (SEQ ID NO.:5) : GAS

[0099] CDR3 (SEQ ID NO.:6) : QNDHSYPFT

[0100] 在一些实施方案中,已经令人惊讶地发现,与在PCT公开号WO 2015/027120和WO 2017/147561中公开的抗体相比,具有上述CDR序列的抗体显示出优异的结合亲和力和/或抗体稳定性。不希望受理论的束缚,据信重链CDR2中的“NG”至“NA”突变可减少脱酰胺作用。抗体特别是在CDR区的脱酰胺作用可能导致结合亲和力变化,抗体降解,和电荷变体变化,从而影响抗体功能并增加抗体生产成本。这样,本文公开的CDR提供了改进的结合亲和力和抗体稳定性,从而产生了优于PCT公开号WO 2015/027120和WO 2017/147561中公开的那些有利技术效果。

[0101] 可以使用例如CDR移植,种系建模和3-D结构分析来人源化和优化单克隆抗体,以增加抗体的可药用性和/或可开发性。在一些实施方案中,人源化后抗Cx43抗体可以具有以下可变域中的一个或两个:

[0102] 重链可变区 (SEQ ID NO.:7) :

[0103] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNAGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNPYYTMNYWGQGTLTVSS

[0104] 轻链可变区 (SEQ ID NO.:8) :

[0105] DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKTYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDFRGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDHSYPFTFGQGTKLEIK

[0106] 在选择的实施方案中,抗Cx43抗体可以具有融合至例如人IgG1、IgG2或IgG4的恒定区的可变域,其可以任选地包含一个或多个突变。在一些实施方案中,可以将突变设计为减少或最小化抗体的细胞毒性效应功能,同时保持结合亲和力和抗体稳定性。例如,抗Cx43抗体可具有一个或多个以下重链序列(其中粗体部分对应于可变区,非粗体部分对应于恒定区):

[0107] >Ab#C重链 (SEQ ID NO.:9)

- [0108] **EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI
GGINPSNgGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNP
YYTMNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKV
DKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK**
- [0109] >Ab#E重链 (SEQ ID NO.:10)
- [0110] **EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI
GGINPSNgGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNP
YYTMNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHPKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGK**
- [0111] >Ab#G重链 (SEQ ID NO.:11)
- [0112] **EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI
GGINPSNaGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNP
YYTMNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHPKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGK**
- [0113] >Ab#I重链 (SEQ ID NO.:12)
- [0114] **EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI
GGINPSNgGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNP
YYTMNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKV
DKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK**
- [0115] >Ab#K重链 (SEQ ID NO.:13)
- [0116] **EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI
GGINPSNaGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNP
YYTMNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKV
DKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK**
- [0117] >Ab#M重链 (SEQ ID NO.:14)

- EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI
GGINPSNgGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNP
YYTMNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
[0119] DKRVESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGK**
- [0120] >Ab#0重链 (SEQ ID NO.:15)
- EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI
GGINPSNaGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNP
YYTMNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
[0121] DKRVESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGK**
- [0122] >Ab#Q重链 (SEQ ID NO.:16)
- EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI
GGINPSNgGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNP
YYTMNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
[0123] DKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGK**
- [0124] >Ab#S重链 (SEQ ID NO.:17)
- EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI
GGINPSNaGTNFNEKFKNRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGNP
YYTMNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
[0125] DKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGK**
- [0126] 在一些实施方式中,抗Cx43抗体可具有一个或多个以下轻链序列(其中粗体部分对应于可变区,非粗体部分对应于恒定区):
- [0127] >Ab#E, Ab#G, Ab#I, Ab#K, Ab#M, Ab#0, Ab#Q, Ab#S的轻链 (SEQ ID NO.:18)
- DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNSGNQKTYLAWYQQKPGQPP
KLLIYGASTRESGVPDFRGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDHSYPFTF
[0128] GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC**
- [0129] 在又一个实施方案中,抗Cx43抗体可包含两种或更多种抗Cx43抗体的混合物或掺混物(cocktail),每种抗Cx43抗体结合Cx43上的相同或不同表位。
- [0130] 在一些实施方案中,可以制备双特异性抗体,其中至少一种特异性是本文公开的

抗Cx43抗体或其抗原结合片段。另一特异性可以针对与所治疗的炎性疾病或神经退行性疾病有关的另一靶标。

[0131] 在一个方面,提供了Cx43配体用于制备治疗炎性疾病或神经退行性疾病的药物的用途。在另一方面,提供了一种抑制患者内炎症或神经退行性的方法,该方法包括向患者施用有效量的Cx43配体。

[0132] 抗Cx43抗体的制备

[0133] 可以使用本领域通常已知的各种方法来制备抗Cx43抗体。例如,噬菌体展示技术可以用于筛选人抗体文库,以产生用于治疗的完全人单克隆抗体。高亲和力的粘合剂可被视为中和研究的候选对象。另外,可使用常规的单克隆方法,其中可以用人蛋白质,经鉴定和测试的候选结合物,以及通过将重链和轻链的结合位点移植到人抗体编码序列中而最终产生的人源化抗体免疫小鼠或兔。

[0134] 抗体通常包含两对相同的多肽链,每对均具有一条全长的“轻”链(通常具有约25kDa的分子量)和一条全长的“重”链(通常具有约50-70kDa的分子量)。各链的氨基末端部分包含约100-110或更多个氨基酸的可变区,通常负责抗原识别。各链的羧基末端部分定义为通常负责效应物功能的恒定区。重链和轻链中每一条的可变区通常表现出相同的总体结构,包括由三个超变区(也称为互补决定区或CDR)连接的四个相对保守的框架区(FR)。每对两根链的CDR通常通过框架区对齐,能够与特定表位结合。从N端到C端,轻链和重链都包含结构域FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3和FR4。各结构域氨基酸的分配通常与Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(《免疫学热门蛋白的序列》)(马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究院(National Institutes of Health)(1987和1991))或Chothia和Lesk, J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Chothia等,Nature 342:878-883(1989)的定义一致。

[0135] 随着单克隆抗体的发展,抗体作为药物成为有用和令人感兴趣的药物。单克隆抗体可以使用通过培养中的连续细胞系产生抗体分子的任何方法来产生。制备单克隆抗体的合适方法的例子包括Kohler等的杂交瘤方法(1975,Nature 256:495-497)和人B细胞杂交瘤方法(Kozbor,1984,J.Immunol.133:3001;和Brodeur等,1987,单克隆抗体生产技术和应用,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc),纽约,第51-63页)。

[0136] 可以修饰单克隆抗体以用作治疗剂。一个例子是“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源。其他例子是此类抗体的片段,只要它们表现出所需的生物活性即可。参见美国专利号4,816,567和Morrison等(1985),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855。一个相关的发展是“CDR移接”抗体,其中抗体包含一个或多个来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的互补决定区(CDR),而抗体链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源。

[0137] 另一个发展是“人源化”抗体。非人抗体的人源化方法是本领域众所周知的(参见美国专利号5,585,089和5,693,762;另见Cécile Vincke等人,J.Biol.Chem.2009;284:3273-3284以人源化λ抗体)。通常,人源化抗体由非人动物产生,然后通常来自抗体非抗原识别部分的某些氨基酸残基被修饰为与对应同种型人抗体中的所述残基同源。可以例如使

用本领域中描述的方法进行人源化 (Jones等人, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann等人, 1988, *Nature* 332:323-327; Verhoeven等人, 1988; (*Science* 239:1534-1536) , 通过用啮齿动物可变区的至少一部分替代人抗体的相应区域来实现。

[0138] 最近的发展是不接触人类抗原的人抗体 (“完全人抗体”)。使用在不产生内源性小鼠免疫球蛋白的情况下能够产生人类抗体库的转基因动物 (例如小鼠) , 通过用抗原 (通常具有至少 6 个连续氨基酸) 免疫来产生此类抗体, 其可任选缀合于运载体。见例如 Jakobovits 等人, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555; Jakobovits 等人, 1993, *Nature* 362:255-258; 和 Bruggermann 等人, 1993, *Year in Immunol.* 7:33。在这些方法的一个实例中, 通过使其中编码小鼠重链和轻链免疫球蛋白链的内源性小鼠免疫球蛋白基因座丧失能力, 并将编码人重链和轻链蛋白的基因座插入其基因组中来生产转基因动物。然后将具有少于全部修饰的部分修饰的动物杂交, 以获得具有所有所需免疫系统修饰的动物。施用免疫原后, 这些转基因动物产生的抗体对具有人 (而非鼠) 氨基酸序列 (包括可变区) 的这些抗原具有免疫特异性。见 PCT 公开号 W096/33735 和 W094/02602, 引入以供参考。其它方法如美国专利号 5,545,807, PCT 公开号 W091/10741, W090/04036, 和 EP 546073B1 及 EP 546073A1 所述, 引入以供参考。如本文所述, 人抗体还可通过在宿主细胞中表达重组 DNA 或在杂交瘤细胞中表达而产生。

[0139] 在一些实施方案中, 噬菌体展示技术可以用于筛选治疗性抗体。在噬菌体展示中, 可以在丝状噬菌体表面展示抗体库, 并且可以针对与免疫原结合的噬菌体筛选构建的文库。抗体噬菌体是基于噬菌体的基因工程以及抗原指导的选择和噬菌体繁殖的反复实验。该技术允许体外选择 Cx43 单克隆抗体。噬菌体展示过程始于抗体文库的制备, 然后将可变重 (VH) 和可变轻 (VL) PCR 产物连接到噬菌体展示载体中, 最终分析单克隆抗体的克隆。将代表抗体库的 VH 和 VL PCR 产物连接到噬菌体展示载体 (例如噬菌粒 pComb3X) 中, 该载体经工程改造可将 VH 和 VL 表达为融合到最初源自 M13 噬菌体的大肠杆菌丝状噬菌体的 pIII 次要衣壳蛋白上的 scFv。然而, 噬菌体展示载体 pComb3X 不具有编码大肠杆菌中完整噬菌体所必需的所有其他基因。对于那些基因, 将辅助噬菌体添加到用噬菌体展示载体文库转化的大肠杆菌中。结果得到噬菌体文库, 每个噬菌体在其表面表达 Cx43 单克隆抗体, 并携带有各自核苷酸序列的载体。噬菌体展示还可以用于在某些大肠杆菌菌株中产生 Cx43 单克隆抗体本身 (不与噬菌体衣壳蛋白连接)。在 VL 和 VH 序列后, 在噬菌体展示载体中工程化了其他 cDNA, 以表征和纯化产生的 mAb。具体而言, 重组抗体可具有血凝素 (HA) 表位标签和聚组氨酸, 以易于从溶液中纯化。

[0140] 多种抗体噬菌体文库由感染辅助噬菌体的约 10^8 个独立大肠杆菌转化体产生。使用生物淘选, 可以通过单克隆抗体表达的表面筛选与上述免疫原序列或其片段噬菌体结合的文库。循环淘选可以抽出可能非常稀有的抗原结合克隆, 并由多轮噬菌体与抗原结合 (固定在 ELISA 板上或固定在细胞表面的溶液中) , 洗涤, 洗脱和在大肠杆菌中再扩增噬菌体结合子组成。在每一轮中, 通过洗去非结合子并选择性洗脱结合的噬菌体克隆, 从池中选择特异性结合子。三轮或四轮后, 噬菌体克隆通过其表面 Cx43 单克隆抗体的高度特异性结合是固定免疫原上定向选择的特征。

[0141] 另一种方法是将适于通过亲和色谱法纯化的 C 末端 His 标签添加到上面列出的免疫原序列中。可以将纯化的蛋白质与合适的佐剂一起接种到小鼠中。可以测试在杂交瘤中

产生的单克隆抗体与免疫原的结合,并且可以如本文的测定中所述筛选阳性结合子。

[0142] 完全人抗体也可以从噬菌体展示文库中产生(如在Hoogenboom等人,1991,J.Mol.Biol.227:381和Marks等人,1991,J.Mol.Biol.222:581中公开的)。这些过程通过在丝状噬菌体表面展示抗体库以及随后通过与所选抗原的结合来选择,以模仿免疫选择。PCT公开号W099/10494中描述了一种这样的技术,其通过引用并入本文,其描述了使用这种方法分离用于MPL-和msk-受体抗体的高亲和力和功能激动性抗体。

[0143] 可以确定编码上述抗体的核苷酸序列。此后,也可以通过重组方法生产嵌合,CDR移接,人源化和完全人抗体。可以使用本领域通常已知的材料和方法将编码抗体的核酸引入宿主细胞并表达。

[0144] 本文提供了针对Cx43的抗体。优选抗体结合Cx43。在优选的实施方案中,本发明提供了编码重链和轻链免疫球蛋白分子的核苷酸序列和包含它们的氨基酸序列,特别是对应于其可变区的序列。在优选实施方案中,提供了对应于CDR,特别是从CDR1至CDR3的序列。在另外的实施方案中,本公开内容提供了表达此类免疫球蛋白分子的杂交瘤细胞系和由其产生的单克隆抗体,优选纯化的针对人Cx43的人单克隆抗体。

[0145] 本公开内容的抗Cx43抗体的轻链和重链可变区的CDR可以移接到来自相同或另一物种的框架区(FR)。在某些实施方案中,抗Cx43抗体的轻链和重链可变区的CDR可被移接到共有人FR。为了产生共有人FR,将来自几个人重链或轻链氨基酸序列的FR进行比对以鉴定共有的氨基酸序列。抗Cx43抗体重链或轻链的FR可被来自不同重链或轻链的FR替换。抗Cx43抗体重链和轻链FR中的稀有氨基酸通常不被替换,而其余FR氨基酸可以被替换。稀有氨基酸是特定氨基酸,它们位于FR中通常不被发现的位置。来自本公开内容的抗Cx43抗体的移接的可变区可以与不同于抗Cx43抗体的恒定区的恒定区一起使用。或者,移接的可变区是单链Fv抗体的一部分。CDR嫁接描述于例如美国专利号6,180,370、5,693,762、5,693,761、5,585,089和5,530,101,出于任何目的通过引用并入本文。

[0146] 在一些实施方案中,本发明的抗体可以由杂交瘤细胞系产生。在这些实施方案中,本发明的抗体以约4pM至1μM之间的解离常数(KD)结合Cx43。在本公开的某些实施方案中,抗体以小于约100nM,小于约50nM或小于约10nM的KD结合Cx43。

[0147] 在实施方案中,本公开的抗体是IgG1,IgG2,IgG3或IgG4同种型,例如IgG1同种型。在某些实施方案中,抗体包含人κ或λ轻链和人IgG1,IgG2或IgG4重链。在实施方案中,将抗体的可变区连接至IgG1、IgG2或IgG4同种型的恒定区。在实施方案中,将抗体的可变区连接至除了IgG1、IgG2或IgG4同种型的恒定区以外的恒定区。在某些实施方案中,已经克隆了本公开的抗体以在哺乳动物细胞中表达。

[0148] 在替代实施方案中,本发明的抗体可以在杂交瘤细胞系以外的细胞系中表达。在这些实施方式中,编码特定抗体的序列可以用于转化合适宿主细胞,例如哺乳动物细胞。根据这些实施方案,可以使用将多核苷酸引入宿主细胞的任何已知方法来实现转化,包括例如将多核苷酸包装在病毒(或病毒载体)中并用病毒(或载体)或通过本领域已知的转染方法转导宿主细胞。此类方法例如美国专利号4,399,216、4,912,040、4,740,461和4,959,455(出于任何目的,通过引用将其全部结合在此)。通常,使用的转化方法可能取决于待转化的宿主。将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域众所周知的,包括但不限于葡聚糖介导的转染,磷酸钙沉淀,多烯介导的转染,原生质体融合,电穿孔,将多核苷酸包封在脂

质体中,以及DNA直接显微注射到细胞核中。

[0149] 根据本公开的方法的某些实施方案,使用标准连接技术将本公开的编码Cx43抗体的重链恒定区、重链可变区、轻链恒定区或轻链可变区的氨基酸序列的核酸分子插入合适的表达载体中。在一个优选的实施方案中,将Cx43抗体重链或轻链恒定区附加到合适的可变区C-末端,并连接到表达载体中。通常选择载体以在所用的特定宿主细胞中起作用(即,载体与宿主细胞机制相容,从而可以发生基因的扩增和/或基因的表达)。有关表达载体的综述,参见Goeddel编),1990,Meth. Enzymol.第185卷,学术出版社(Academic Press).纽约州。

[0150] 通常,在任何宿主细胞中使用的表达载体可以包含用于质粒维持以及用于克隆和表达外源核苷酸序列的序列。此类序列通常包括一条或多条以下核苷酸序列:启动子,一个或多个增强子序列,复制起点,转录终止序列,包含供体和受体剪接位点的完整内含子序列,编码多肽分泌前导序列的序列,核糖体结合位点,聚腺苷酸化序列,用于插入编码要表达的多肽的核酸的多接头区域,和选择标志物元件。这些序列是本领域熟知的。

[0151] 本公开的表达载体可以从起始载体例如可商购的载体构建。这样的载体可以包含或可以不包含所有期望的侧翼序列。当上述一种或多种侧翼序列尚未存在于载体中时,可以将它们单独获得并连接到载体中。用于获得每条侧翼序列的方法是本领域技术人员众所周知的。

[0152] 在构建载体并且将包含抗Cx43抗体的编码轻链或重链或轻链和重链的核酸分子插入载体的适当位点后,可以将完整的载体插入合适的宿主中用于扩增和/或多肽表达的细胞。抗Cx43抗体的表达载体转化入所选宿主细胞可以通过众所周知的方法实现,包括转染,感染,磷酸钙共沉淀,电穿孔,显微注射,脂质转染,DEAE-葡聚糖介导的转染或其他已知技术。选择的方法将部分取决于所用宿主细胞的类型。这些方法和其他合适的方法是技术人员众所周知的,并且例如在上文的Sambrook等人中提出。

[0153] 宿主细胞在适当条件下培养时,会合成抗Cx43抗体,随后可从培养基(如果宿主细胞将其分泌到培养基中)或直接从产生它的宿主细胞(如果未分泌)中收集。合适的宿主细胞的选择将取决于多种因素,例如所需的表达水平,对于活性(例如糖基化或磷酸化)而言理想或必需的多肽修饰以及折叠成生物活性分子的难易程度。

[0154] 可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域众所周知的,包括但不限于可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的许多永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,HeLa细胞,仓鼠肾(BHK)细胞,人类胚胎肾细胞(HEK),猴肾细胞(COS),人类肝细胞癌细胞(例如Hep G2)和许多其他细胞系。在某些实施方案中,可以通过确定哪些细胞系具有高表达水平并产生具有组成型Cx43结合特性的抗体来选择细胞系。在另一个实施方案中,可以从B细胞谱系中选择不产生其自身抗体但是具有产生和分泌异源抗体的能力的细胞系(例如,小鼠骨髓瘤细胞系NS0和SP2/0)。

[0155] 表位作图和相关技术

[0156] 本公开提供了抗Cx43抗体,其与在Cx43分子的一个或多个结构域例如胞外环内发现的一个或多个氨基酸相互作用。抗体结合的表位可以包括位于一个或多个胞外环内的2个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9或更多个)氨基酸的一个或多个连续序列。替代地或另外地,表位可以包括位于一个或多个胞外环(例如构象表位)内的1个或多个非连续氨基酸

(或氨基酸序列)。

[0157] 可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术来确定抗体是否“与在多肽或蛋白质内一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例如常规的交叉阻断实验,例如在《抗体》(Antibodies), Harlow和Lane (冷泉港出版社,冷泉港,纽约) 中描述的那些。其他方法包括丙氨酸扫描突变分析,肽印迹分析(Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248:443-63),肽裂解分析晶体学研究和NMR分析。另外,可以采用诸如表位切除,表位提取和抗原化学修饰的方法(Tomer (2000) Prot. Sci. 9:487-496)。

[0158] 可以用于鉴定抗体相互作用的多肽内氨基酸的另一种方法是通过质谱检测氢/氘交换。一般而言,氢/氘交换方法涉及氘标记目标蛋白质,然后将抗体与氘标记的蛋白质结合。接下来,蛋白质/抗体复合物被转移到水中,被抗体复合物保护的氨基酸内的可交换质子比不属于界面的氨基酸内的可交换质子以较慢的速率经历由氘到氢的反向交换。结果,形成蛋白质/抗体界面一部分的氨基酸可能保留氘,因此与未包含在界面中的氨基酸相比,其质量相对较高。抗体解离后,对目标蛋白进行蛋白酶裂解和质谱分析,从而揭示氘标记的残基,这些残基对应于与抗体相互作用的特定氨基酸。见例如Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267:252-259; Engen和Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A。

[0159] 修饰辅助分析(MAP),也称为基于抗原结构的抗体分析(ASAP),是一种根据每种抗体与化学或酶修饰抗原表面的结合图谱的相似性将针对同一抗原的大量单克隆抗体(mAb)分类的方法(参见US2004/0101920,通过引用整体并入本文)。每个类别可以反映独特的表位,该独特的表位与另一类别所代表的表位明显不同或部分重叠。该技术可以快速过滤遗传上相同的抗体,从而使表征可以集中在遗传上不同的抗体上。当用于杂交瘤筛选时,MAP可能有助于鉴定产生具有所需特性的mAb的罕见杂交瘤克隆。MAP可用于将本发明的抗体分类为结合不同表位的抗体组。

[0160] 本公开提供结合相同表位或表位一部分的抗Cx43抗体。同样地,本公开还包括抗Cx43抗体,其与本文所述的任何特定示例性抗体竞争结合Cx43或其片段。例如,本公开包括抗Cx43抗体,其与一种或多种获自本文描述的那些抗体的抗体交叉竞争结合Cx43。

[0161] 通过使用本领域已知的常规方法,可以容易地确定抗体是否与参照抗Cx43抗体结合相同的表位或竞争与之结合。例如,为了确定测试抗体是否与本发明的参照抗Cx43抗体结合相同的表位,可以使参照抗体在饱和条件下结合Cx43或肽。接下来,评估测试抗体结合Cx43分子的能力。如果测试抗体在参照抗Cx43抗体饱和结合后能够结合Cx43,则可以得出结论,测试抗体与参照抗Cx43抗体结合的表位不同。另一方面,如果在与参照抗Cx43抗体饱和结合后测试抗体不能与Cx43结合,则测试抗体可与本公开的参照抗Cx43抗体结合相同的表位。

[0162] 为了确定抗体是否与参照抗Cx43抗体竞争结合,可以在两个方向上执行上述结合方法:在第一方向上,可以使参照抗体在饱和条件下结合至Cx43,然后评估测试抗体与Cx43分子的结合。在第二方向上,可以使测试抗体在饱和条件下结合至Cx43,然后评估参照抗体与Cx43分子的结合。如果在两个方向上只有第一(饱和)抗体能够结合Cx43分子,那么可以得出结论,测试抗体和参照抗体竞争结合Cx43。如本领域普通技术人员将理解的,与参照抗体竞争结合的抗体可能未必与参照抗体结合相同的表位,而是可能通过结合重叠或相邻表位在空间上阻断参照抗体的结合。

[0163] 如果两种抗体各自竞争性地抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合,则两种抗体会结合到相同或重叠的表位上。即,如竞争结合实验中测量的,一种抗体的1、5、10、20或100倍过量抑制另一种抗体的结合至少50%,但优选为75%,90%或甚至99%(参见,例如,Junghans等人,Cancer Res.199050:1495-1502)。或者,如果抗原中基本上所有减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变都减少或消除了另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同的表位。如果某些减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变减少或消除了另一种抗体的结合,则两种抗体的表位重叠。

[0164] 然后可以进行其他常规实验(例如,肽突变和结合分析),以确认观察到的测试抗体结合的缺乏实际上是由于与参考抗体结合到相同的表位还是空间阻滞(或其他现象)是造成缺乏观察到的结合的原因。可以使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或本领域可用的任何其他定量或定性抗体结合测定法进行此类实验。

[0165] 在各种实施方式中,本文提供了与位于氨基酸序列FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:19)内的表位结合的抗体。在一些实施方式中,表位可包括选自:SEQ ID NO:19的R4,P5,E7,K8,和I10的一个或多个氨基酸。在一个实施方式中,表位由SEQ ID NO:19的R4,P5,E7,K8和I10组成。在一些实施方式中,表位可包括SEQ ID NO:19的全部10个氨基酸。在一些实施方式中,表位可由SEQ ID NO:19的全部10个氨基酸组成。

[0166] 药物组合物及其用途

[0167] 在另一方面,提供了可用于本文公开的方法中的药物组合物,即,用于抑制星状细胞或骨细胞中Cx43半通道的开放,优先用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病。

[0168] 在一些实施方案中,药物组合物包含Cx43配体和药学上可接受的运载体。可以将Cx43配体与药学上可接受的运载体一起配制为药物组合物。另外,药物组合物可包括例如使用该组合物治疗患者以抑制星状细胞或骨细胞中Cx43半通道开放的说明,优先用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病。

[0169] 在一个实施方案中,Cx43配体可以是抗Cx43抗体或其抗原结合片段。

[0170] 本文中,“药学上可接受的运载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂和其它赋形剂。优选地,运载体适用于肠胃外、口腔或局部给药。取决于给予途径,该活性化合物(例如小分子或生物剂)可被包被在某材料中,以保护该化合物免受酸和可能使该化合物失活的其它自然条件的作用。

[0171] 药学上可接受的运载体包括用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌水溶液或分散液和无菌粉剂,以及用于制备片剂、丸剂、胶囊等的常规赋形剂。配制药学活性物质的这类介质和试剂的用法是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂都与活性化合物不相容,否则应考虑在本文提供的药物组合物中使用这些介质或试剂。补充性活性化合物也可掺入所述组合物。

[0172] 药学上可接受的运载体可以包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的例子包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸,盐酸半胱氨酸,硫酸氢钠,偏亚硫酸氢钠,亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如棕榈酸抗坏血酸酯,丁基羟基茴香醚(BHA),丁基羟基甲苯(BHT),卵磷脂,没食子酸丙酯,α-生育酚等;以及(3)金属螯合剂,例如柠檬酸,乙二胺四乙酸(EDTA),山梨糖醇,酒石酸,磷酸等。

[0173] 可以在本文提供的药物组合物中使用的合适的水性和非水性运载体的实例包括

水,乙醇,多元醇(例如甘油,丙二醇,聚乙二醇等)及其合适的混合物,和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。当需要时,例如通过使用包衣材料,例如卵磷脂,在分散液的情况下,通过保持所需的粒径,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在许多情况下,组合物中有用地包含等张剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。组合物中包含延迟吸收的物质如单硬脂酸盐和明胶可延长可注射组合物的吸收。

[0174] 这些组合物还可包含功能性赋形剂,例如防腐剂,湿润剂,乳化剂和分散剂。

[0175] 在制备和储存条件下,治疗性组合物通常应无菌、无热源和稳定。可将组合物配制成为溶液、微乳剂、脂质体或适合高药物浓度的其他有序结构。

[0176] 可将所需量的活性化合物和上述组分之一或其组合根据需要掺入合适溶剂后通过例如过滤灭菌,从而制备无菌注射液。通常,分散系可通过将活性活化物加入含有碱性分散介质和上述其它所需成分的无菌载剂中来制备。在用于制备无菌注射液的无菌粉末情况下,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥(冻干),得到由其之前无菌过滤的溶液得到活性组分和任何其它所需组分的粉末。可在无菌条件下将活性剂与其它药学上可接受的运载体以及可能需要的任何防腐剂,缓冲剂或推进剂混合。

[0177] 可通过灭菌步骤(见上)和加入各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等确保防止微生物的出现。组合物中也可能需要包含等张剂,如糖、氯化钠等。此外,可通过加入能延迟吸收的物质例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射药物形式的延长吸收。

[0178] 包含Cx43配体的药物组合物可以单独或联合治疗给药。例如,组合疗法可包括本文提供的组合物,其包含Cx43配体和至少一种或多种其他治疗剂,例如本领域已知的一种或多种额外治疗剂(如抗炎药),将在下面进一步详细讨论。

[0179] 给药方案经调节能提供最优的所需效果(例如治疗效果)。例如,可以是一次推注,按时间分次给药或根据治疗情况的紧急性成比例地降低或增加剂量。

[0180] 用于施用抗体的示例性剂量范围包括:10-1000mg(抗体)/kg(患者体重),10-800mg/kg,10-600mg/kg,10-400mg/kg,10-200mg/kg,30-1000mg/kg,30-800mg/kg,30-600mg/kg,30-400mg/kg,30-200mg/kg,50-1000mg/kg,50-800mg/kg,50-600mg/kg,50-400mg/kg,50-200mg/kg,100-1000mg/kg,100-900mg/kg,100-800mg/kg,100-700mg/kg,100-600mg/kg,100-500mg/kg,100-400mg/kg,100-300mg/kg和100-200mg/kg。示例性的剂量时间表包括每三天一次,每五天一次,每七天一次(即每周一次),每十天一次,每十四天一次(即每两周一次),每二十一天一次(即,每三周一次),每28天一次(即每四周一次)和每月一次。

[0181] 有利的是配制成单位剂量的胃肠道外组合物以便于给药和剂量均一性。本文中所用的单位剂量指作为单个剂量用于待治疗患者的物理上离散的单位,每个单位包含预定量的活性剂与所需药物运载体,该预定量经测算能够产生任何所需的治疗效果。本发明中单位剂量形式的规格取决于或直接依赖于(a)活性化合物的独特特性和待实现的具体治疗效果,以及(b)复合这种活性化合物用于个体中治疗灵敏度的领域中的固有限制。

[0182] 可改变本文公开的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,从而获得就具体患者、组合物与给药方式有效实现所需治疗应答且对患者无毒性的活性成分量。对于给药,本文所用术语“胃肠外给药”表示除肠道和局部给药外的给药形式,通常通过注射,包括但不

限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下(subcapsular)、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注给药。

[0183] 本文所用的术语“肠胃外给药”和“胃肠外给予”是指除肠内(即,通过消化道)和局部给药以外的给药方式,通常通过注射或输注给药,包括但不限于静脉内,肌肉内,动脉内,鞘内,囊内,眼内,心内,皮内,腹膜内,经气管,皮下,表皮下,关节内,包膜下,蛛网膜下,脊柱内,硬膜外和胸骨内注射和输注。静脉内注射和输注通常(但不限于)用于抗体给药。

[0184] 当本文提供的药剂作为药物施用给人或动物时,它们可以单独给予或作为含有例如0.001至90% (例如0.005至70%,例如0.01至30%)活性成分与药物学上可接受运载体的组合的药物组合物给予。

[0185] 一方面,可以通过实现治疗协同作用来证明根据本公开的组合改善的效力。

[0186] 当给定剂量下两种产品的组合比相同剂量下两种产品各自的最佳效果更好时,使用术语“治疗协同作用”。在一个实例中,通过对所需参数重复测量(例如,时间因子)使用从方差的双向分析获得的估值将组合与最佳单一药剂进行比较来评估治疗协同作用。

[0187] 术语“添加剂”是指两种或多种产品在给定剂量下的组合等效于两种或多种产品各自获得的功效总和,而术语“超添加剂”是指组合使用时比两种或两种以上产品获得的功效总和更有效。

[0188] 本文还提供了一种用于抑制细胞中Cx43半通道的开放,优先用于治疗炎性疾病或病况或神经退行性疾病的方法,包括在有此需要的对象中施用本文公开的任何一种或多种抗Cx43抗体。

[0189] 在各种实施方案中,本文公开的方法可以包括向对象施用有效量的抗Cx43抗体或其抗原结合片段。通常,可以治疗和/或预防地施用有效量。

[0190] 可以将治疗适当地施用于苦于,患有,易患此类疾病或处于发展此类疾病的风险中的对象,特别是人类。可以通过对象或保健提供者的诊断测试或意见(例如,基因测试,酶或蛋白质标记,家族史等)来任意客观或主观确定“有风险”的那些对象。识别需要这种治疗的对象可依赖于对象或卫生保健专业人员的判断中,并且可以是主观的(例如意见)或客观的(例如可以通过测试或诊断方法测量)。

[0191] 制剂给药

[0192] 本公开内容的制剂,包括但不限于重建和液体制剂,可根据已知方法,施给需要用抗Cx43抗体治疗的哺乳动物,优选人,例如作为丸剂静脉内推注,或在一段时间内连续输注,或通过肌肉内,心室内,腹膜内,脑脊髓内,皮下,关节内,滑膜内,鞘内,口服,局部或吸入途径施用。

[0193] 在实施方案中,通过静脉内或皮下(即,在皮肤下)给药将制剂施用给哺乳动物。为此可使用注射器注射制剂。但是,还可以使用其他给药制剂的装置,例如注射装置(例如INJECT-EASE™和GENJECT™装置);进样笔(例如,GENPEN™);自动注射器设备,无针设备(例如MEDIJECTOR™和BIOJECTOR™);和皮下贴片输送系统。

[0194] 在一个具体的实施方案中,本公开涉及用于单剂给药单元的试剂盒。这样的试剂盒包括治疗性蛋白质或抗体的水性制剂的容器,包括单腔或多腔预装注射器。示例性的预填充注射器可从德国拉芬斯堡的维特尔有限公司(Vetter GmbH)获得。

[0195] 蛋白质的合适剂量(“治疗有效量”)将取决于,例如,要治疗的病状,病状的严重程

度和病程,是否出于预防或治疗目的而给予该蛋白质,先前的治疗方法,患者的临床病史和对抗Cx43抗体的应答,所用制剂的形式以及主治医师的判断力。抗Cx43抗体可以一次或经过一系列治疗适当地施用于患者,并且可以从诊断开始的任何时间施用于患者。抗Cx43抗体可以单独治疗或与其他可用于治疗所述疾病的药物或疗法联用。

[0196] 对于抗Cx43抗体,用于向患者给药的初始候选剂量可以在约0.1-100或1-20mg/kg的范围内,其可以采取一次或多次分给药的形式。然而,其他剂量方案可能是有用的。通过常规技术可以容易地监测这种治疗的进展。

[0197] 根据本公开的某些实施方案,可以在一段确定的时间内向对象施用多剂量的抗Cx43抗体(或包含抗Cx43抗体和本文提及的任何其他治疗活性剂的组合的药物组合物)。根据本公开内容的该方面的方法包括向对象依次施用多剂量的本公开内容的抗Cx43抗体。如本文所用,“顺序施用”是指每剂量的抗Cx43抗体在不同的时间点(例如,在以预定间隔(例如,小时,天,周或月)分开的不同天)上施用于对象。本公开内容包括以下方法,该方法包括:依次向患者施用单剂初始剂量的抗Cx43抗体,然后依次施用一剂或多剂抗Cx43抗体,并任选地随后施用一剂或多剂第三剂的抗Cx43抗体。抗Cx43抗体可以以0.1mg/kg至约100mg/kg之间的剂量施用。

[0198] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指本发明的抗Cx43抗体的时间给药顺序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时给予的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”是在初始剂量之后给予的剂量;“第三剂量”是在第二剂量之后给予的剂量。初始,第二和第三剂量都可以包含相同量的抗Cx43抗体,但通常在给药频率上可能彼此不同。然而,在某些实施方案中,在治疗过程中,初始,第二和/或第三剂量中所含的抗Cx43抗体的量彼此不同(例如,适当地向上或向下调整)。在某些实施方案中,在治疗方案开始时以“负荷剂量”施用两次或更多(例如2、3、4或5)次剂量,随后以较低频率施用后续剂量(例如“维持剂量”)。

[0199] 在本公开的某些示例性实施方式中,每个第二和/或第三剂量在紧接前一剂给药后的第1至26(例如1、1¹/₂、2、2¹/₂、3、3¹/₂、4、4¹/₂、5、5¹/₂、6、6¹/₂、7、7¹/₂、8、8¹/₂、9、9¹/₂、10、10¹/₂、11、11¹/₂、12、12¹/₂、13、13¹/₂、14、14¹/₂、15、15¹/₂、16、16¹/₂、17、17¹/₂、18、18¹/₂、19、19¹/₂、20、20¹/₂、21、21¹/₂、22、22¹/₂、23、23¹/₂、24、24¹/₂、25、25¹/₂、26、26¹/₂等)周施用。如本文所用,短语“紧接在前的剂量”是指在多次给药的顺序中,抗Cx43抗体的剂量,其在该顺序中的下一个剂量的给药之前,在没有中间干预的情况下向患者给药。

[0200] 根据本公开内容的该方面的方法可包括向患者施用任何数量的第二剂量和/或第三剂量的抗Cx43抗体。例如,在某些实施方案中,仅向患者施用单次第二剂量。在其他实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多)第二剂量。例如,在某些实施方案中,仅向患者施用单次第三剂量。在其他实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多)第三剂量。

[0201] 在涉及多个第二剂量的实施方案中,每个第二剂量可以与其他第二剂量相同的频率施用。例如,每个第二剂量可以在紧接前一剂量后1-2周或1-2个月施给患者。类似地,在涉及多个第三剂量的实施方案中,每个第三剂量可以与其他第三剂量相同的频率施用。例如,每个第三剂量可以在紧接前一剂量后2-12周施给患者。在本公开的某些实施方案中,向患者施用第二和/或第三剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。给药频率也可以在医生的治疗过程中根据临床检查后各个患者的需要进行调整。

[0202] 本公开包括其中以第一频率(例如,每周一次,每两周一次,每三周一次,每月一次,每两个月一次)向患者施用1-10或2-6负荷剂量的施用方案,然后以较低的频率对患者给予两次或多次维持剂量。例如,根据本公开的该方面,如果以例如每月一次的频率(例如,每月一次两次,三个,四个或更多次的负荷剂量)的频率来施用负荷剂量,则维持剂量可以每五周一次,每六周一次,每七周一次,每八周一次,每十周一次,每十二周一次等方式给予患者。

[0203] 实施例

[0204] 下列实施例,包括进行的实验和获得的结果仅用于说明目的,而不应解释为限制本公开。

[0205] 实施例1:抗体结合亲和力

[0206] 根据以下方案测试优化的抗体序列与Cx43的结合亲和力。

[0207] 使用基于实时生物层干涉仪的生物传感器(Octet HTX)分析确定Cx43与选定的纯化抗Cx43抗体结合的平衡解离常数(K_D 值)。涂有生物素化抗原(0.01ug/mL)的Octet链霉亲和素(SA)生物传感器用于捕获抗Cx43抗体。将上完样的传感器浸入纯化的对照抗体的两倍稀释系列中(起始浓度为100nM)。所有结合研究均在25°C的测定缓冲液(含0.1%BSA,0.02%吐温-20的的PBS(pH 7.2))中进行,板以1000rpm的速度摇动。通过处理数据并使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将其拟合为1:1结合模型,确定动力学结合(K_a)和解离(K_d)速率常数。结合解离平衡常数(K_D)由动力学速率常数计算为:

[0208] $K_D(M) = K_d/K_a$

[0209] 结合亲和力结果(表1)表明,通常至少保持了结合亲和力,并且在许多情况下,令人惊讶地提高了结合亲和力。

[0210] 表1.各种抗体的结合亲和力

样品编号	$K_D(M)$	$K_a(1/Ms)$	$K_d(1/s)$
对照	8.84E-09	1.87E+05	1.65E-03
Ab#E	2.15E-09	2.10E+05	4.51E-04
Ab#C	2.76E-09	2.54E+05	7.03E-04
Ab#G	2.31E-09	1.91E+05	4.42E-04
Ab#I	3.06E-09	2.00E+05	6.11E-04
Ab#M	2.98E-09	2.00E+05	5.95E-04
Ab#K	2.83E-09	2.22E+05	6.29E-04
Ab#O	3.36E-09	2.01E+05	6.77E-04
Ab#Q	2.53E-09	2.55E+05	6.47E-04
Ab#S	3.42E-09	1.96E+05	6.71E-04

[0212] 实施例2.Fc受体结合分析

[0213] Fc效应子功能是通过Fc与受体的结合来介导的。受体包括FCRI,FCRIIa,FCRIIb,FCRIIIa,FCRIIIb,C1q和FcRn.通常期望降低与大多数Fc受体的结合亲和力,预期使FcRn的潜在体内毒性最小化,同时保持抗体半衰期。以下表面等离子体共振(SPR)和酶联免疫吸附测定(ELISA)方案用于测试各种抗体对不同Fc受体的结合。

[0214] A.FCRI结合

[0215] 实验:Biacore 8K

[0216] 芯片:CM5

[0217] (1) 固定化

[0218] 通过在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS来制备活化剂。混合物活化CM5传感器芯片420秒。然后将30 μ g/mL的10mM NaAc (pH 4.5) 中的THETM His标签抗体以30 μ L/分钟注入通道1-8,持续400秒。用1M乙醇胺-HCl (GE) 使芯片失活。

[0219] (2) 捕获配体并运行分析物

[0220] 将运行缓冲液 (1xHBS-EP+) 中的2 μ g/mL CD64以10 μ L/分钟注入通道1-4的Fc2中,持续30秒。6种浓度 (40、20、10、5、2.5和1.25nM) 分析物20170905-Ab#C、Ab#G和跑样缓冲液以30 μ L/分钟依次注入到通道1-4的Fc1至Fc2中,结合阶段为180,然后解离为400。根据分析物浓度按升序重复6个捕获配体和运行分析物的循环。在每个解离阶段后注入作为再生缓冲液的10mM甘氨酸, pH 1.5。

[0221] 将运行缓冲液 (1xHBS-EP+) 中的2 μ g/mL CD64以10 μ L/分钟注入通道1-6的Fc2中,持续30秒。8种浓度 (10240、5120、2560、1280、640、320、160和80nM) 的分析物Ab#K、Ab#O、Ab#S和跑样缓冲液以30 μ L/分钟依次注入到通道1-6的Fc1至Fc2中,结合阶段为60 μ L/分钟,然后解离为90 μ L/分钟。根据分析物浓度按升序重复8个捕获配体和运行分析物的循环。在每个解离阶段后注入作为再生缓冲液的10mM甘氨酸, pH 1.5。

[0222] (3) 再生

[0223] 用10mM甘氨酸pH 1.5再生芯片。

[0224] (4) 数据分析

[0225] 没有捕获配体的表面通道Fc1用作参比减法 (reference subtraction) 的对照表面。每个相互作用的最终数据均从参照通道和缓冲通道数据中扣除。通过1:1结合模式拟合AB#C、AB#G与CD64结合的实验数据。分析物Ab#K, Ab#O, Ab#S的10240nM曲线被移除,以获得更好的拟合。用稳态亲和力拟合相对实验数据,并在下表2中示出。

[0226] 表2.FCRI结合

分析物	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	评价
Ab#C	4.39E+05	7.27E-04	1.66E-09	1:1 结合
Ab#G	4.80E+05	2.23E-03	4.65E-09	
Ab#K	无		1.76E-06	稳态亲和力
Ab#O			2.35E-06	
Ab#S			2.61E-06	

[0228] 所有抗体均显示出低或无FCRI结合,这是有利的。

[0229] B. 与Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb的结合

[0230] 实验:Biacore 8K

[0231] 芯片:CM5

[0232] (1) 固定化

[0233] 通过在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS来制备活化剂。混合物活化CM5传感器芯片420秒。然后将30 μ g/mL的10mM NaAc (pH 4.5) 中的THETM His标签抗体以30 μ L/分钟注入通道1-8,持续400秒。用1M乙醇胺-HCl (GE) 使芯片失活。

[0234] (2) 捕获配体并运行分析物

[0235] 将运行缓冲液(1xHBS-EP+)中的 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa或Fc γ RIIIb以 $10\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速注入通道1-8的Fc2中,持续15秒。将分析物分别注入通道1-8。在60秒的缔合阶段,接着90秒的解离过程中,以 $30\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速监测一系列分析物浓度(参见下表3)。在每个解离阶段后注入作为再生缓冲液的 10mM 甘氨酸, pH 1.5。

[0236] 表3. 分析物浓度

分析物	测试的浓度(nM)
Ab#C	0, 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120, 10240
其它	0, 320, 640, 1280, 2560, 5120, 10240, 20480, 40960

[0238] (3) 再生

[0239] 用 10mM 甘氨酸pH 1.5再生芯片。

[0240] (4) 数据分析

[0241] 没有捕获配体的表面通道Fc1用作参比减法(reference subtraction)的对照表面。每个相互作用的最终数据均从参照通道和缓冲通道数据中扣除。通过稳态亲和模式拟合与Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb结合的抗体的实验数据,并在下表4中显示。

[0242] 表4. Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, 和Fc γ RIIIb结合

样品编号	与Fc γ RIIa结合	与Fc γ RIIb结合	与Fc γ RIIIa结合	与Fc γ RIIIb结合
Ab#C	3.03E-06	9.72E-06	1.78E-06	4.31E-06
Ab#G	1.79E-05	1.32E-05	无/结合非常弱	无/结合非常弱
Ab#K	无/结合非常弱	无/结合非常弱	2.64E-05	无/结合非常弱
Ab#O	3.30E-05	1.78E-05	无/结合非常弱	无/结合非常弱
Ab#S	无/结合非常弱	无/结合非常弱	无/结合非常弱	无/结合非常弱

[0244] 所有抗体均显示出低或无Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, 和Fc γ RIIIb结合,这是有利的。

[0245] C. 与FcRn结合

[0246] 实验:Biacore 8K

[0247] 芯片:CM5

[0248] (1) 缓冲液交换

[0249] 根据说明手册,使用脱盐柱将人FcRn的缓冲液更换为跑样缓冲液(50mM Na_2HPO_4 、 50mM NaH_2PO_4 、 150mM NaCl , 0.05% 吐温20, pH 6.0)。用Nanodrop测定浓度。

[0250] (2) 固定化

[0251] 通过在注射前立即混合 400mM EDC和 100mM NHS(GE)来制备活化剂。用混合物以 $10\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速活化CM5传感器芯片420秒。然后将 10mM NaAc (pH 5.5)中的 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗体分别以 $10\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速注入通道1-8的Fc2中60秒。相对Fc1被阻断。用 1M 乙醇胺-HCl(GE)以 $10\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速灭活芯片420秒。

[0252] (2) 运行分析物

[0253] 将分析物FcRn分别注入通道1-8。在60秒的缔合阶段,接着90秒的解离过程中,以 $30\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速监测8个浓度的FcRn($0, 93.75, 187.5, 375, 750, 1500, 3000$ 和 6000nM)。每

轮相互作用分析循环后,用1xPBS (pH 7.4)以10 μ L/分钟的流速再生传感器芯片表面30秒。

[0254] (3) 再生

[0255] 用1xPBS (pH7.4) 再生芯片。

[0256] (4) 数据分析

[0257] 没有固定化抗体的表面通道Fc1用作参比减法(reference subtraction)的对照表面。每个相互作用的最终数据均从参照通道和缓冲通道数据中扣除。用稳态亲和力模式拟合相对实验数据,并在下表5中示出。

[0258] 表5.FcRn结合

配体	K_D (M)
Ab#C	2.40E-06
Ab#G	2.39E-06
Ab#K	2.56E-06
Ab#O	2.57E-06
Ab#S	2.43E-06

[0260] 所有抗体显示理想的相似FcRn结合。

[0261] D.通过ELISA对C1q的结合

[0262] 平板(Nunc)在4°C以3 μ g/mL的抗体包被过夜。封闭并洗涤后,将C1q在封闭缓冲液(600、189.75、60.01、18.98、6.00、1.90、0.60、0.19、0.06和0.02 μ g/mL)中进行半对数滴定,并在室温下孵育2小时。然后洗涤板,随后与第二抗体绵羊抗人C1q Ab-HRP一起孵育1小时。洗涤后,加入TMB底物,并用2M HC1终止相互作用。使用酶标仪(Molecular Device)读取450nm处的吸光度,并在下表6中示出。

[0263] 表6.C1q结合

抗体	K_D
Ab#C	61nM
Ab#G	无结合
Ab#K	弱结合
Ab#O	无结合
Ab#S	无结合

[0265] 所有抗体均显示出低或无C1q结合,这是有利的。

[0266] 实施例3.表位作图

[0267] 为了重建目标分子表位,使用固相Fmoc合成法合成了基于肽的表位模拟物文库。通过接枝专有亲水性聚合物配方,然后使用二环己基碳二亚胺(DCC)与N-羟基苯并三唑(HOBt)与叔丁氧基羰基-六亚甲基二胺(BochMDA)反应,随后使用三氟乙酸(TFA)裂解Boc-基团,获得氨基官能化的聚丙烯支持物。通过定制的改良JANUS液体处理站(Perkin Elmer),使用标准的Fmoc-肽合成方法在氨基官能化固相支持物上合成肽。

[0268] 使用支架上的化学连接肽(CLIPS)技术完成结构模拟物的合成。CLIPS技术允许将肽结构化为单环,双环,三环,片状折叠,螺旋状折叠及其组合。CLIPS模板与半胱氨酸残基偶联。肽中的多个半胱氨酸的侧链与一个或两个CLIPS模板偶联。例如,将0.5mM的P2 CLIPS(2,6-双(溴甲基)吡啶)溶液溶解在碳酸氢铵(20mM, pH 7.8)/乙腈(1:3(v/v))中。将该溶液

添加到肽阵列上。CLIPS模板将结合肽阵列(455孔板,带3μl孔)固相结合肽中存在的两个半胱氨酸的侧链。将肽阵列在溶液中轻轻摇动30至60分钟,同时将其完全覆盖在溶液中。最后,将肽阵列用过量的H₂O充分洗涤,并在70°C的PBS(pH 7.2)中的含有1% SDS/0.1% 2,2'-(乙二氧基)二乙硫醇的破坏缓冲液中超声处理30分钟,然后再在水中超声处理45分钟。携带T3 CLIPS的肽以类似的方式制备,但现在使用三个半胱氨酸。

[0269] 根据以下设计合成了不同组的肽。请注意,某些微型卡上肽的实际顺序是随机的。

	组 1	组 2
标签	RN.FLSRPTEKTI	WN
说明	衍生自前导序列 FLSRPTEKTI 的单残基取代变体。在该系列中,肽中的每个残基都被所有其他蛋白质残基取代,且有一个残基的偏移。	来自前导肽序列 FLSRPTEKTI 的长度为 5、6、7、8 和 9 的肽,具有一个残基的偏移。
[0270]	FWSRPTEKTI(SEQ ID NO. 20) FLSRPTEKTC(SEQ ID NO. 21) FLGRPTEKTI(SEQ ID NO. 22) FLSRPTEKDI(SEQ ID NO. 23) FLSRPTEKYI(SEQ ID NO. 24) FLSRWTEKTI(SEQ ID NO. 25) FLSRPSEKTI(SEQ ID NO. 26) FLNRPTEKTI(SEQ ID NO. 27) FLSRPFEKTI(SEQ ID NO. 28) FLSRPTEKTG(SEQ ID NO. 29)	FLSRP(SEQ ID NO. 30) LSRPT(SEQ ID NO. 31) SRPTE(SEQ ID NO. 32) RPTEK(SEQ ID NO. 33) PTEKT(SEQ ID NO. 34) TEKTI(SEQ ID NO. 35) FLSRPT(SEQ ID NO. 36) LSRPTE(SEQ ID NO. 37) SRPTEK(SEQ ID NO. 38) RPTEKT(SEQ ID NO. 39)

[0271] 在ELISA中测试抗体与每种合成肽的结合。将肽阵列与一抗溶液一起孵育(在4°C过夜)。洗涤后,将肽阵列与1/1000稀释的适当抗体过氧化物酶偶联物(SBA;山羊抗人HRP偶联物,Southern Biotech)在25°C孵育1小时。洗涤后,加入过氧化物酶底物2,2'-叠氮基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐(ABTS)和20μl/ml的3% H₂O₂。一小时后,测量显色。用电荷耦合器件(CCD)-照相机和图像处理系统对显色进行定量。

[0272] 从CCD相机获得的值范围是0到3000mAU,类似于标准的96孔板ELISA读数器。结果被量化并存储到实验室数据库中。偶尔,会有孔含有气泡,从而产生假阳性值,需要对卡进行人工检查,并将由气泡引起的任何值都记为0。

[0273] 为了验证合成肽的质量,平行合成了一组独立的阳性和阴性对照肽。用市售抗体3C9和57.9进行筛选(参见Posthumus等(1990)病毒学杂志64:3304-3309)。

[0274] 图1给出了完整数据组的图形概述。此处的箱形图描绘了每个数据集,并指示了每个数据集中的平均ELISA信号,分布和离群值。根据实验条件(抗体量,封闭强度等),可获得不同的ELISA数据分布。

[0275] 在高严格条件下测试抗体,得到与肽阵列的结合(图2和图3)。两个肽组各自分开分析。

[0276] 对用前导序列FLSRPTEKTI的取代变体分析记录的数据表明,R4、P5、E7、K8和I10位置对于抗体结合是关键的,这些位置上的许多置换会减弱信号强度(图2),除了同源置换例如R4K以外。

[0277] 分析前导序列FLSRPTEKTI的截短变体记录的数据,表明该序列的C端对于结合发生是必须的(图3),而且至少5个残基的存在不能耐受置换。

[0278] 总而言之,在包含两种类型的衍生前导序列FLSRPTEKTI的肽变体的肽阵列上测试了抗体-单残基突变体和截短变体。该抗体在高严格条件下产生可检测的结合。抗体结合对于残基R4、P5、E7、K8和I10的置换是敏感的,并且偏向前导序列C末端部分。

[0279] 实施例4.抗体稳定性

[0280] 抗体稳定性是影响开发,功效,生产成本等的重要因素。序列优化后,评估了关键稳定性参数。测试了在酸性和高温条件下各种抗体的种类分布概况。所有抗体显示改进的稳定性。

[0281] SE-UPLC(尺寸排阻超高效液相色谱仪)

[0282] 制剂:PBS,pH 6.5或7.2

[0283] 浓度(mg/mL):5.28,5.13,5.00,5.17,5.01,5.26,4.92,5.04,4.99,5.12(全部在约5mg/mL)

[0284] 条件:室温,酸处理,然后在4°C存放1周或在40°C存放1周

[0285] 将2μL样品以0.3mL/分钟的流速经10分钟注入ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200,1.7μm,4.6x 150mm色谱柱中。使用50mM磷酸钠,500mM NaCl,pH 6.2的流动相。所有抗体在各种pH,加热和储存条件下均显示出所需的稳定性。

[0286] B.rCE-SDS(还原毛细管电泳-十二烷基硫酸钠)

[0287] 制剂:PBS,pH 6.5,7.2,6.2

[0288] 浓度(mg/mL):0.5

[0289] 条件:室温,酸性处理,然后在4°C存放1周或在40°C存放1周

[0290] 样品在还原标记缓冲液中制备,然后提交给LabChip GXII系统(PerkinElmer)。所有抗体在各种pH,加热和储存条件下均显示出所需的稳定性。

[0291] 实施例5.半通道开放实验

[0292] A.体外实验

[0293] 可以使用例如染料吸收测定法在体外测试本文公开的抗体对半通道开放或阻断的作用。该染料可以是荧光示踪染料(例如,溴乙锭或荧光黄)。

[0294] 在一个示例中,可以使用流体流动回路设备(FFLA)(平行板流动室)或其变化形式。FFLA模拟骨骼中的动态流体微环境,以产生流体流动剪切应力(FFSS)。细胞在平行板流动室中培养,使细胞暴露于稳定的层流中。

[0295] 骨细胞感受FFSS在骨细胞腔/小管网络中产生的机械应力。已经提出骨液流动是由血管外压力以及骨细胞施加的周期性机械负荷驱动的,并且最大生理负荷为8至30达因/cm²。在某些方面,FFSS水平在先前研究中测量骨内流体流动的研究报告的生理值范围内。流体剪切应力的大小可以通过调节流动回路的柱高来改变。

[0296] 用于评估半通道功能的实验可使用足够小以穿过半通道孔的荧光示踪分子。如果半通道关闭,分子将无法通过。如果半通道是开放的,染料可以穿过并导致细胞发荧光,从而可以定量荧光。当溴乙锭与DNA结合时,它会发出荧光。一旦荧光黄位于细胞内部,它就会发出荧光。

[0297] 染料转移方法可以包括将细胞暴露于胞外荧光通透性示踪剂。胞外通透性示踪剂是保留在细胞外的分子,除非在某些条件下细胞膜通透性增加。在某些方面,示踪剂的质量小于1、2或3kDa。在其它方面,示踪剂将具有净电荷。此类通透性示踪剂包括但不限于阴离

子染料荧光黄 (LY; 净电荷 = -1) 和阳离子探针溴乙锭 (EtD; 净电荷 = +1), 碘丙啶 (PI; 净电荷 = +2)。与DNA结合后, EtBr的荧光会增强, 从而增加对比度并使其更易于识别。在某些方面, 在不同时间段或在施加刺激以打开半通道后去除胞外染料, 并量化每个细胞中保留的荧光强度。在某些方面, 在快照图像中定量荧光强度。

[0298] 体外测定中用于测试半通道开放/阻断的物质包括:

[0299] 表达半通道的细胞或细胞系。可使用本领域已知的方法和/或表达载体获得, 分离或工程化表达各种连接蛋白半通道的细胞或细胞系。

[0300] 骨细胞: 从动物(包括小鼠, 大鼠, 兔, 鸡)等分离的原代骨细胞或包括但不限于MLO-Y4细胞等的骨细胞系。

[0301] 成骨细胞: MLO-A5成骨细胞被用作对照, 因为它们表达连接蛋白43, 但是在阿仑膦酸盐刺激下它们似乎不开放。

[0302] 示踪分子包括但不限于荧光黄, 溴乙锭, 伊文思蓝, Alexa350, Alexa488和Alexa594。

[0303] Cx43 (E2) : Cx43 (E2) 抗体对Cx43半通道具有特异性。Cx43E2结合Cx43半通道的第二个细胞外环, 并阻止半通道打开。

[0304] 确定抗体是否打开或关闭/阻断半通道的方法包括以下一个或多个步骤:

[0305] (a) 分离, 获得或产生表达连接蛋白的细胞或细胞系。例如, 原代骨细胞可以从骨灰质分离。可以使用本领域已知的其他方法分离其他细胞类型。在某些方面, 颅骨骨细胞分离自动物(例如16天胚胎鸡颅骨或新生小鼠)。将动物断头, 切下颅骨并迅速浸入70%酒精中。然后将颅骨放入 α MEM中, 并用PBS洗涤多次。将清洁的骨骼置于新鲜的 α MEM中。将骨头切碎, 切成1.5毫米面积大小。可用胶原酶处理骨块, 以去除软组织和类骨质, 然后使用EDTA脱钙。最后, 通过用胶原酶和剧烈搅拌处理, 从骨块中释放出骨细胞。

[0306] (b) 从长骨中分离原代骨细胞。可以从2-3周龄的小鼠或大鼠中分离出长骨骨细胞。例如, 给小鼠服用过量麻醉剂, 然后将其颈脱臼, 断头并浸入70%的乙醇中。分离关节末端仍然完整的股骨和胫骨。将腿迅速浸入70%酒精中, 然后置于 α MEM中。 α MEM中的腿用PBS洗涤。去除大部分肌肉, 并从肌腱/韧带分离。将清洁的骨骼置于新鲜的 α MEM中。清洁完所有骨头后, 在用PBS冲洗骨髓之前, 用手术刀切开每个骨头的两端。将骨切成1.5至2mm的长度, 并用胶原酶处理。在一实例中, 用胶原酶依次处理骨块9次以去除所有其他组织和类骨质, 然后使用EDTA脱钙。

[0307] (c) 培养细胞或细胞系。例如, 原代和/或溶骨细胞系在胶原蛋白包被的平板上培养, 并浸入含有通透性示踪剂的记录培养基(不含 HCO_3 的 α -MEM培养基, 用HEPES缓冲)中。

[0308] (d) 施用测试抗体。使培养的细胞与测试抗体接触所需的时间。

[0309] (e) 确定通透性示踪剂的吸收。通透性示踪剂的摄取是通过检测细胞内示踪剂的量来确定的。在某些方面, 使用延时记录。可基于示踪剂或使用的其他探针的荧光波长在配有日蚀滤光片的显微镜记录不同细胞感兴趣区域的荧光。在某些方面, 快速冷却的数码相机每2分钟捕获一次图像, 并使用ImageJ软件执行图像处理。所收集的数据可以绘制成初始荧光和感兴趣时间的荧光相对于基础荧光的倍数差异。

[0310] 对于快照图像, 可以将细胞暴露于通透性示踪剂5-10分钟, 用PBS冲洗多次, 并用甲醛固定。在某些方面, 用显微镜拍摄荧光视野的至少三张显微照片。图像分析是通过

ImageJ软件完成的。测量随机细胞的像素密度均值。

[0311] 连接蛋白半通道的开放或阻断可以通过例如用流体流动剪切应力和/或AD(它们都已知能打开Cx43半通道)和受试抗体一起处理骨细胞来确认。如果测试抗体阻断Cx43半通道,则此通道的阻断将被流体流动剪切应力和/或AD逆转。为了控制Cx43半通道的阻断,用Cx43(E2)抗体(一种特异性抑制Cx43半通道开放的多克隆抗体)处理骨细胞。

[0312] 在特定实例中,在不存在或存在20 μ M AD的情况下,用1 μ g/ml Cx43(E2)抗体或测试抗体处理ML0-Y4溶骨细胞30分钟。与未处理的基础摄取水平相比,进行溴乙锭染料摄取并进行定量。该测定在钙的存在下进行。低钙条件可以用作对照(开放半通道)。Cx43(E2)抗体或测试抗体可阻断AD诱导的骨细胞半通道的开放。

[0313] 抑制软骨细胞中Cx43半通道的开放(例如通过化学试剂等)可以抑制炎症和骨关节炎的发展。可以使用本文描述的方法检测软骨细胞中的半通道开放。使用ELISA分析测定Cx43半通道释放的促炎因子(PGE2和ATP)。阻断半通道开放的药物可用于治疗炎性疾病,如OA。

[0314] 用于评估Cx43通道活性的体外细胞模型。从小鼠腿骨关节中分离出原代软骨细胞。可以检测到药剂对软骨细胞中Cx43半通道开放和间隙连接偶联的作用,并评估了时间和剂量依赖性效应。例如,使用荧光黄(Luciferyellow)或Alexa染料通过染料摄取测定法评估半通道开放。通过使用ELISA分析检测PGE₂和ATP的释放来测量下游效应。

[0315] 下文显示了具体方案。

[0316] 免疫印迹.将ML0-Y4细胞在60mm培养皿中以3x10⁵接种48小时。在裂解缓冲液(5mM Tris, 5mM EDTA, 5mM EGTA加蛋白酶抑制剂, 20 μ l/ml 芴甲基磺酰氟(PMSF), 20 μ l/ml N-乙基马来酰亚胺, 10 μ l/ml NaVO₄和10 μ l/ml 亮蛋白肽)中收集小鼠心脏组织, 均质化, 并在100,000xg下于4°C离心30分钟, 然后重悬于裂解缓冲液中。通过10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离粗膜蛋白, 转移到硝酸纤维素膜上, 并用识别Cx43的C末端的抗-Cx43CT(1:300稀释)或识别Cx43的第二个胞外环的抗-Cx43 E2(1:500稀释)或针对Cx43的第二个胞外环的单克隆抗体(1:100稀释)印迹。使用Odyssey红外检测系统(LI-COR, 美国内布拉斯加州林肯)检测二抗, 即红外IRDye®800抗兔IgG(1:15000)的荧光。

[0317] 免疫荧光分析将ML0-Y4细胞培养在胶原蛋白包被的玻璃盖玻片上。将细胞用PBS漂洗2次,并与冷70%乙醇在-20°C下孵育20分钟。使用PFA会破坏富含赖氨酸的表位,因此不建议使用。然后用PBS漂洗细胞两次以除去乙醇。之后,用封闭溶液(PBS中的2%山羊血清,2%鱼皮明胶和1%牛血清白蛋白)封闭细胞过夜。接着,分别用PBS中不同浓度的单克隆抗体标记细胞,然后用FITC偶联的山羊抗小鼠抗体和WGA-alexa594(Invitrogen)标记(分别在封闭溶液中以1:400和1:1500稀释)。用奥林巴斯BH-2荧光显微镜观察细胞,并用NIH Image J软件离线处理图像。

[0318] 染料摄取对半通道活性的分析使用快照照片评估染料摄取量。将ML0-Y4细胞铺在涂有胶原蛋白的35mm皿上,并与记录培养基,无HCO₃⁻的盐水培养基(用10mM HEPES缓冲),盐组合物(以mM为单位包含154NaCl, 5.4KCl, 1.8CaCl₂, 1.0MgCl₂, 5葡萄糖)一起孵育。在低浓度二价阳离子培养基(低[X²⁺])加入0.5mM EGTA,但不添加CaCl₂和MgCl₂。包含50 μ M EtBr的记录或低[X²⁺]培养基用于快照记录。细胞在5分钟内暴露于100 μ M的EtBr中,然后用PBS漂洗3次并用2%甲酰胺固定。在具有罗丹明滤光片的倒置显微镜(卡尔蔡司)中,用10倍干物镜

拍摄至少3张荧光视野显微照片。使用软件图像J离线进行图像分析。测量了30个随机细胞的像素密度的平均值。

[0319] 间隙连接的染料偶联分析。将ML0-Y4细胞接种在涂有胶原蛋白的35mm皿中,并与记录培养基(不含HCO₃⁻的 α MEM培养基,用10mM HEPES缓冲)孵育。使用购自Eppendorf(Eppendorf)的微操纵器InjectManNI 2和Femtojet在37°C下用alexafluor 350(Invitrogen,尤金,俄勒冈,美国)(在PBS中10mM)对细胞进行微注射。注射alexafluor 3502分钟后测量染料转移。对染料偶联指数进行计数,以计算染料转移的细胞数量。在配备有氩弧灯照明和尼康Eclipse(日本尼康)的倒置显微镜下观察染料偶联(激发波长为330-380nm;发射波长为420nm以上)。

[0320] 间隙连接的细胞降落伞染料转移分析ML0-Y4细胞在12孔板中生长至汇合。供体细胞与5 μ M钙黄绿素橙-红-AM(790Da)和5 μ M俄勒冈绿488BAPTA-2-AM(1752Da)在37°C孵育40分钟。间隙连接胞间通讯之后,可以同时用作为间隙连接可渗透示踪染料的钙黄绿素红-橙和间隙连接通道不可渗透的染料俄勒冈绿488BAPTA-2标记细胞。通过胰蛋白酶消化从板中去除预加载的供体细胞。预加载的细胞铺在未标记受体细胞顶部(“降落伞”),以供体与受体之比1:4培育。细胞贴壁任意时间,如1小时,然后小心洗涤3次,并室温下在新鲜的2%PFA中固定10分钟,然后再次漂洗3次。用荧光显微镜检查细胞。对于钙黄绿素红-橙转移,调整阈值以清楚地区分染料转移边界。染料转移阳性标准是检测接触细胞的钙黄绿素红-橙/俄勒冈绿488BAPTA-2,钙黄绿素红-橙阳性和俄勒冈绿488BAPTA-2阴性。染料转移几乎不可检测(<1%)。在我们发现俄勒冈绿488BAPTA-2绿色阳性细胞处拍摄影像。

[0321] 打开半通道的流体流动剪切应力。使用蠕动泵,通过重力驱动的流体流,将平行板的流动室通过一定厚度的垫片分隔开,从而形成流体流。垫片的厚度决定了通道高度,其与流速一起调节,以产生16达因/厘米²的应力水平。循环培养基是用10mM HEPES缓冲的 α -MEM。

[0322] B. 体内试验

[0323] 在某些方面,通过将候选试剂注射入长骨中并使用荧光示踪染料(例如钙黄绿素或伊文思蓝)来检测骨细胞中半通道的开放或阻断来确定骨细胞中Cx43的调节。

[0324] 用于分析骨细胞中半通道的体内分析的一个例子使用3-4个月大的小鼠或大鼠。动物称重。通过腹膜内(IP)注射将测试抗体引入动物。2-4小时后,将荧光示踪染料(即,伊文思蓝,Alexa 594)注射到动物的侧尾静脉中或通过IP注射。注意:最多可以注射动物体重的1%(以体积计)。在某些方面,在注射尾静脉之前将动物加热以扩张尾静脉。2-4小时后,杀死动物,切下无肌肉组织的胫骨和股骨,并用PBS清洗多次。将骨骼固定在低聚甲醛中,并在4°C下于14%EDTA溶液中脱钙两周,或在恒定搅拌下于室温下脱钙3-5天。骨骼在PBS中洗涤,并在PBS中的30%蔗糖中浸泡过夜,然后包埋在OCT化合物中。通常根据需要在模具中调节骨骼的位置。使用低温恒温器切5 μ m厚的冷冻切片,将切片用PBS冲洗,然后使用PBS中的50%甘油固定。可以在荧光显微镜下检查骨切片,并使用Image J定量吸收示踪染料的骨中骨细胞的程度。

[0325] 骨细胞中Cx43半通道的开放可通过打开骨细胞中Cx43半通道的胫骨上的机械负荷来确认。这可以作为体内骨细胞中半通道开放的阴性对照。对于阳性对照,使用骨细胞中缺乏Cx43的小鼠。该小鼠通过10-kb DMP-1Cre和Cx43 flox小鼠杂交而产生。

[0326] Cx43条件性敲除 (cKO) 小鼠。由于纯合的Cx43整体敲除具有致死性,为了检查在骨细胞中表达的Cx43的作用,因此生成了骨细胞特异性Cx43敲除小鼠。将 floxed Cx43基因的纯合小鼠与Cx43整体杂合的小鼠杂交,以促进骨细胞中Cx43的完全缺失。然后将Cx43f1/-小鼠(子代的50%)与表达由人DMP-1启动子驱动的Cre重组酶的小鼠杂交。这样产生的小鼠为Cx43 f1/-, DMP1 Cre+或Cx43 f1/-, DMP1 Cre- (小比例为Cx43f1/f1或Cx43-/-)。通过免疫组织化学证实了Cx43缺陷的骨细胞。

[0327] 研究可包括8组小鼠:用Cx43 (E2) 处理的WT,无Cx43 (E2) 的WT,用Cx43 (E2) 处理的cKO,无AD Cx43 (E2) 的cKO,用测试抗体 (TA) 处理的WT,无TA的WT,经TA处理的cKO和无TA的cKO。以150μg/kg体重对小鼠施用Cx43 (E2) 或TA。与WT小鼠相比,使用Cx43 (E2) 或TA处理可以预期KO中的炎症会增加。在没有Cx43 (E2) 或TA处理的情况下,WT和基因敲除小鼠之间的骨转移应该相似。

[0328] 可以用于测试本文公开的Cx43抗体的脊髓损伤动物模型由例如 Sharif - Alhoseini等人, Spinal Cord, 2017年8月; 55(8): 714-721) 综述, 通过引用整体并入本文。例如, Webb, Biochem Pharmacol., Biochem Pharmacol. 2014年1月1日; 87(1): 121-30, 在此完整引入以供参考) 综述了用于测试本文公开的Cx43抗体的炎症(例如类风湿性关节炎, 炎性肠病和多发性硬化) 动物模型。

[0329] 本公开的各个方面可以单独使用、组合使用、或者以前面描述的实施例中未具体讨论的各种配置使用,因此在其应用上不限于在前面的描述中阐述的或者在附图中示出的部件的细节和布置。例如,一个实施方式中描述的方面可以以任何方式与其它实施方式中描述的方面组合。

[0330] 虽然已经讨论了本主题公开的特定实施方式,但是以上说明书是说明性的而非限制性的。在阅读本说明书后,本公开的许多变化对于本领域技术人员而言将变得显而易见。本公开的全部范围应该通过参考权利要求及其等同物的全部范围和说明书以及这些变化来确定。

[0331] 通过引用纳入

[0332] 说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请均出于所有目的通过引用整体并入本文,其程度如同每个单独的出版物或专利或专利申请被具体指出通过引用并入。

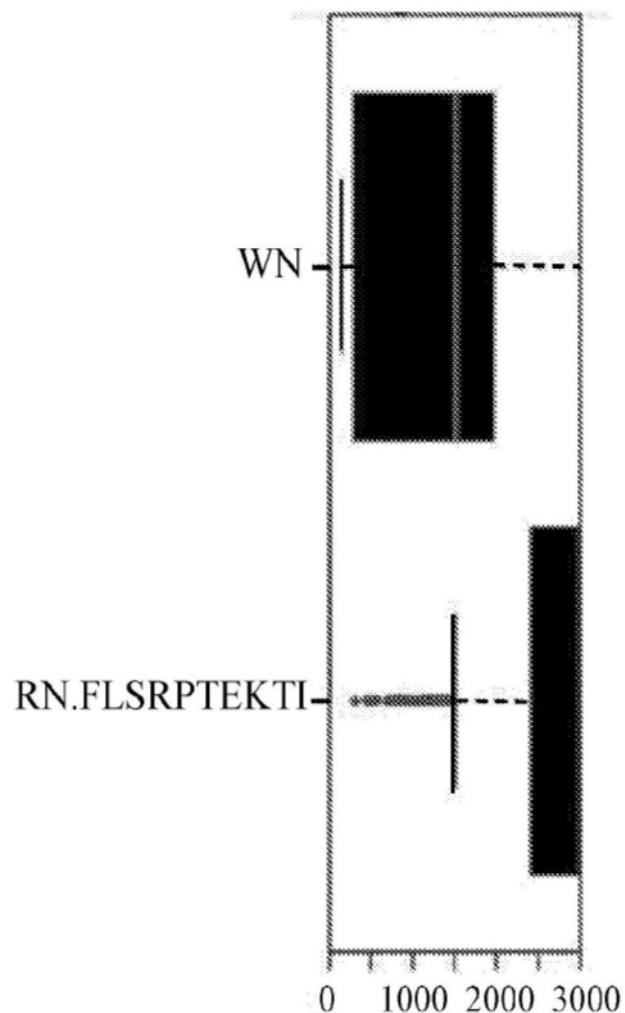


图1

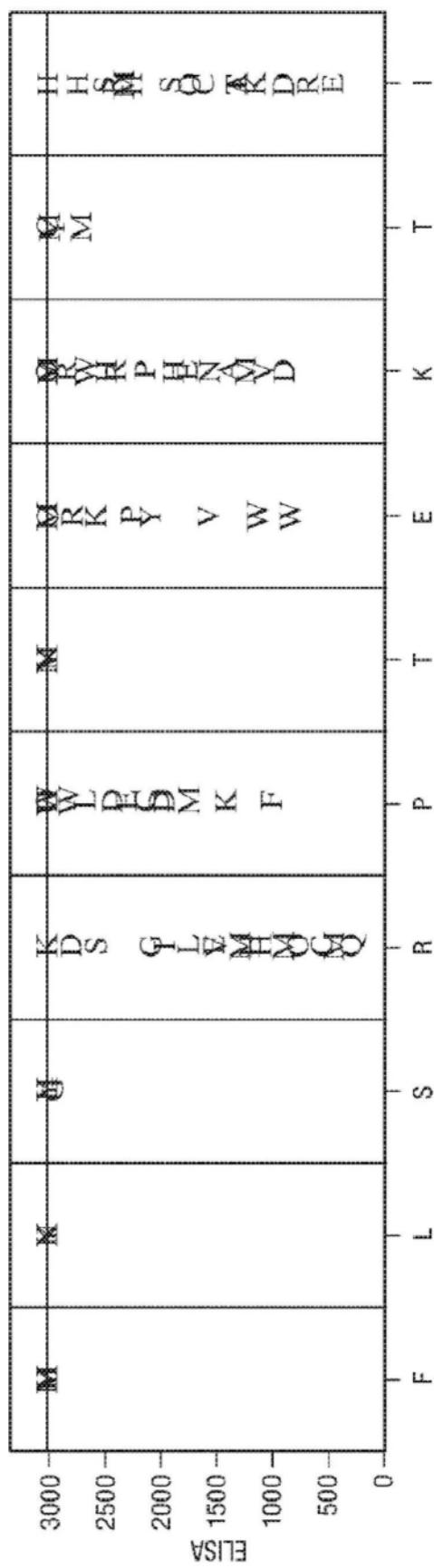


图2

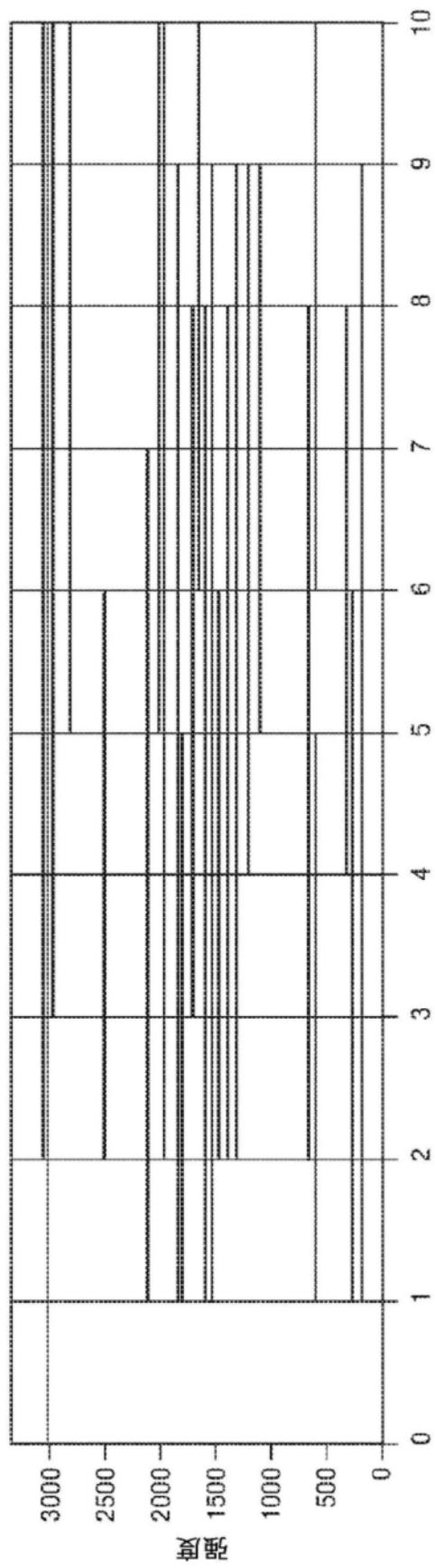


图3