



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106459195 B

(45)授权公告日 2018.07.20

(21)申请号 201580019206.1

(22)申请日 2015.03.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106459195 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(30)优先权数据

1403875.6 2014.03.05 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.10.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2015/050647 2015.03.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/132602 EN 2015.09.11

(73)专利权人 坎塔吉亚有限责任公司

地址 瑞典隆德

(72)发明人 H·阿格斯坦 T·菲奥雷塔斯

M·贾拉斯

C·A-C·马姆博格黑格 (续)

(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.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 103459424 A,2013.12.18,说明书第

[0029]-[0030]、[0041]-[0051]、[0066]-

[0069]、[0075]-[0079]段,实施例1、5、6,图12、

13,表5.

W0 2012/177595 A1,2012.12.27,全文.

Do-Young Yoon,et al.Antibodies to

Domains II and III of the IL-1 Receptor

Accessory Protein Inhibit IL-1b Activity

But Not Binding:Regulation of IL-1

Responses Is Via Type I Receptor,Not the

Accessory Protein.《The Journal of

Immunology》.1998,第160卷(第7期),3170-

3179.

审查员 曲凯

权利要求书5页 说明书44页

序列表9页 附图11页

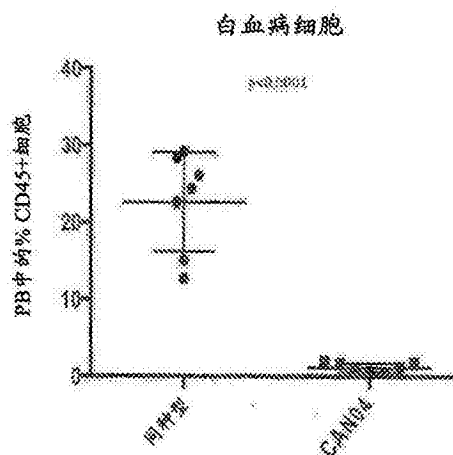
(54)发明名称

抗人白介素-1受体辅助蛋白(IL1 RAP)抗体及其用途

(57)摘要

本公开文本提供对人白介素-1受体辅助蛋白(IL1 RAP)具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段能够抑制抗体‘CAN04’对人IL1 RAP的结合。本公开文本进一步提供此类抗体或抗原结合片段在IL-1相关疾病和状况(包括癌症,诸如急性髓细胞样白血病和黑素瘤)的治疗和/或诊断中的用途。

A.



[转续页]

[接上页]

(72)发明人 K·肖斯特罗姆 A·斯韦德贝格

K·冯瓦亨费尔德

1. 一种对人白介素-1受体辅助蛋白 (IL1RAP) 的域2具有结合特异性的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:

(i) 包含由SEQ ID NO:1限定的可变区或其由SEQ ID NO:8、9、10或11限定的人源化型式的三个CDR的重链可变区,

和

(ii) 包含由SEQ ID NO:2限定的可变区或其由SEQ ID NO:15、16或17限定的人源化型式的三个CDR的轻链可变区。

2. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段展现下述特性:

- a) 200pM或更大的对人IL1RAP的结合亲和力 (K_D);
- b) 与来自食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 的IL1RAP的交叉反应性;
- c) 对IL1信号传导的抑制性作用;
- d) 在一种或多种癌细胞系中诱导ADCC的能力;和
- e) 在结合至一种或多种癌细胞系后内在化的能力。

3. 依照前述权利要求任一项的抗体或其抗原结合片段,其包含完整抗体或由完整抗体组成。

4. 依照权利要求1或2的抗体或其抗原结合片段,其包含选自下组的抗原结合片段或由选自下组的抗原结合片段组成:Fv片段,Fab样片段和域抗体。

5. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区SEQ ID NO:1或其由SEQ ID NO:8、9、10或11限定的人源化型式和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区或其由SEQ ID NO:15、16或17限定的人源化型式。

6. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区。

7. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:8至11任一的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8至11任一的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:15至17任一的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15至17任一的氨基酸序列组成的轻链可变区。

8. 依照权利要求7的抗体或其抗原结合片段,其包含:

a) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变区;

b) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变区;

c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变区;

d) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变区;

e) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区;

f) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区;

g) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区;

h) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区;

i) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的轻链可变区;

j) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的轻链可变区;

k) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的轻链可变区; 或

l) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的轻链可变区。

9. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链恒定区或其部分和轻链恒定区或其部分。

10. 依照权利要求9的抗体或其抗原结合片段, 其中该重链恒定区是选自下组的免疫球蛋白亚型的: IgG1, IgG2, IgG3和IgG4。

11. 依照权利要求10的抗体或其抗原结合片段, 其中该重链恒定区是免疫球蛋白亚型IgG1的。

12. 依照权利要求11的抗体或其抗原结合片段, 其中该重链恒定区包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或其具有K97R、D239E和/或L241M突变或没有C端赖氨酸的变体或由SEQ ID NO:19的氨基酸序列或其具有K97R、D239E和/或L241M突变或没有C端赖氨酸的变体组成。

13. 依照权利要求9的抗体或其抗原结合片段, 其中该轻链恒定区是卡帕(κ)或拉姆达(λ)轻链的。

14. 依照权利要求13的抗体或其抗原结合片段, 其中该轻链恒定区是卡帕轻链的。

15. 依照权利要求14的抗体或其抗原结合片段, 其中该轻链恒定区包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列或其具有W40R和/或V83L突变的变体或由SEQ ID NO:18的氨基酸序列或其具有W40R和/或V83L突变的变体组成。

16. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段, 其包含Fc区。

17. 依照权利要求16的抗体或其抗原结合片段, 其中该Fc区是非天然发生的。

18. 依照权利要求17的抗体或其抗原结合片段, 其中该Fc区包含表1中鉴定的一项或多项突变。

19. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段, 其中该Fc区中的岩藻糖残基缺失或低。

20. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含用于延长该药剂的体内半衰期的模块。

21. 依照权利要求20的抗体或其抗原结合片段, 其中该用于延长体内半衰期的模块选自下组: 聚乙二醇, 人血清清蛋白, 糖基化基团, 脂肪酸和葡聚糖(dextran)。

22. 依照权利要求21的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或其抗原结合片段包含聚乙二醇。

23. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其进一步包含细胞毒性模块。
24. 依照权利要求23的抗体或其抗原结合片段,其中该细胞毒性模块包含放射性同位素或由放射性同位素组成。
25. 依照权利要求24的抗体或其抗原结合片段,其中该放射性同位素选自下组:β-发射体,螺旋-发射体,转换电子-发射体,α-发射体,和低光子能量-发射体。
26. 依照权利要求24的抗体或其抗原结合片段,其中该放射性同位素具有在该药剂附近创建高剂量吸收率的局部吸收能量的发射样式。
27. 依照权利要求24的抗体或其抗原结合片段,其中该放射性同位素选自下组:远程β-发射体;中程β-发射体;低能量β-发射体;转换或螺旋-发射体;和α-发射体。
28. 依照权利要求27的抗体或其抗原结合片段,其中该放射性同位素是¹⁷⁷Lu。
29. 依照权利要求23的抗体或其抗原结合片段,其中该细胞毒性模块包含细胞毒性药物或由细胞毒性药物组成。
30. 依照权利要求29的抗体或其抗原结合片段,其中该细胞毒性药物选自下组:细胞抑制性药物;抗雄激素药物;可的松和其衍生物;膦酸盐/酯;甾酮-5-α-还原酶抑制剂;和细胞因子。
31. 依照权利要求30的抗体或其抗原结合片段,其中该细胞毒性药物适合于在激活疗法中使用。
32. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体多肽进一步包含可检测模块。
33. 依照权利要求32的抗体或其抗原结合片段,其中该可检测模块包含放射性同位素或由放射性同位素组成。
34. 依照权利要求33的抗体或其抗原结合片段,其中该放射性同位素选自下组:^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁸⁹Zr, ¹²³I和²⁰¹Tl。
35. 依照权利要求34的抗体或其抗原结合片段,其中该放射性同位素是⁸⁹Zr。
36. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体多肽包含一对可检测和细胞毒性放射性核素。
37. 依照权利要求36的抗体或其抗原结合片段,其中该放射性同位素能够作为可检测模块和还作为细胞毒性模块以多模态方式同时起作用。
38. 依照权利要求37的抗体或其抗原结合片段,其中该可检测模块包含顺磁性同位素或由顺磁性同位素组成。
39. 依照权利要求38的抗体或其抗原结合片段,其中该顺磁性同位素选自下组:¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁵²Cr和⁵⁶Fe。
40. 依照权利要求32至39任一项的抗体或其抗原结合片段,其中该可检测模块是通过成像技术可检测的。
41. 依照权利要求23或32的抗体或其抗原结合片段,其中该细胞毒性模块和/或可检测模块是经连接模块间接接合至该抗体或其抗原结合片段的。
42. 依照权利要求41的抗体或其抗原结合片段,其中该连接模块是螯合剂。
43. 依照权利要求42的抗体或其抗原结合片段,其中该螯合剂选自下组:1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)的衍生物,去铁胺(DFO),二乙撑三胺五乙酸(DTPA)

的衍生物, S-2-(4-异硫氰基苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸 (NOTA) 的衍生物和 1,4,8,11-四氮杂环十二烷-1,4,8,11-四乙酸 (TETA) 的衍生物。

44. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段不包含细胞毒性模块。

45. 一种药物组合物, 其包含有效量的依照权利要求1至44任一项的抗体或其抗原结合片段和药学可接受稀释剂, 载剂或赋形剂。

46. 依照权利要求45的药物组合物, 其适应胃肠外投递。

47. 依照权利要求46的药物组合物, 其适应静脉内投递。

48. 依照权利要求46的药物组合物, 其适应表面投递。

49. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段, 其用于药物。

50. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段, 其用于在受试者中治疗赘生性病症, 其中该赘生性病症与表达IL1RAP的细胞有关。

51. 依照权利要求50的用于治疗赘生性病症的抗体或其抗原结合片段, 其中该赘生性病症是赘生性血液学病症。

52. 依照权利要求51的用于治疗赘生性病症的抗体或其抗原结合片段, 其中该赘生性血液学病症选自下组: 慢性髓细胞样白血病 (chronic myeloid leukemia), 骨髓增生性病症 (myeloproliferative disorder), 骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome), 急性成淋巴细胞性白血病 (acute lymphoblastic leukemia) 和急性髓细胞样白血病 (acute myeloid leukemia)。

53. 依照权利要求52的用于治疗赘生性病症的抗体或其抗原结合片段, 其中该赘生性血液学病症是慢性髓细胞样白血病。

54. 依照权利要求52的用于治疗赘生性病症的抗体或其抗原结合片段, 其中该赘生性血液学病症是急性成淋巴细胞性白血病。

55. 依照权利要求50的用于治疗赘生性病症的抗体或其抗原结合片段, 其中该赘生性病症与该受试者的身体内实体瘤的形成有关。

56. 依照权利要求55的用于治疗赘生性病症的抗体或其抗原结合片段, 其中该实体瘤选自下组: 前列腺癌, 乳腺癌, 肺癌, 结直肠癌, 黑素瘤, 膀胱癌, 脑/CNS癌, 宫颈癌, 食道癌, 胃癌, 头/颈癌, 肾癌, 肝癌, 淋巴瘤, 卵巢癌, 胰腺癌和肉瘤。

57. 依照权利要求56的用于治疗赘生性病症的抗体或其抗原结合片段, 其中该实体瘤是黑素瘤。

58. 依照权利要求1至44任一项的抗体或其抗原结合片段制备用于在受试者中治疗或诊断赘生性病症的药物的用途, 其中该赘生性病症与表达IL1RAP的细胞有关。

59. 依照权利要求58的用途, 其中该赘生性病症是赘生性血液学病症。

60. 依照权利要求59的用途, 其中该赘生性血液学病症选自下组: 慢性髓细胞样白血病, 骨髓增生性病症, 骨髓增生异常综合征, 急性成淋巴细胞性白血病和急性髓细胞样白血病。

61. 依照权利要求60的用途, 其中该赘生性血液学病症是慢性髓细胞样白血病。

62. 依照权利要求60的用途, 其中该赘生性血液学病症是急性成淋巴细胞性白血病。

63. 依照权利要求58的用途, 其中该赘生性病症与该受试者的身体内实体瘤的形成有

关。

64. 依照权利要求63的用途,其中该实体瘤选自下组:前列腺癌,乳腺癌,肺癌,结直肠癌,黑素瘤,膀胱癌,脑/CNS癌,宫颈癌,食道癌,胃癌,头/颈癌,肾癌,肝癌,淋巴瘤,卵巢癌,胰腺癌和肉瘤。

65. 依照权利要求64的用途,其中该实体瘤是黑素瘤。

66. 依照权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其用于治疗对用IL-1信号传导的抑制剂治疗易感的疾病或状况。

67. 依照权利要求66的抗体或其抗原结合片段,其中该对用IL-1信号传导的抑制剂治疗易感的疾病或状况选自下组:类风湿性关节炎,幼年型关节炎,骨关节炎,家族性寒冷自身炎症综合征(FCAS),穆-韦(Muckle-Wells)病,新生儿发作多系统炎性疾病(NOMID),家族性地中海热(FMF),化脓性关节炎坏疽性脓皮症和痤疮(PAPA)综合征,成人发作斯提耳(Still)氏病,高IgD综合征,2型糖尿病,巨噬细胞活化综合征,TNF受体相关周期性综合征,布劳(Blau)病,强直性脊柱炎,Sweets病,狼疮关节炎,阿尔茨海默(Alzheimer)氏病,银屑病,哮喘,动脉粥样硬化,结节病,特应性皮炎,系统性红斑狼疮,大疱性类天疱疮,I型糖尿病,慢性阻塞性肺病,幽门螺旋杆菌胃炎,炎性肠病,丙型肝炎,缺血-再灌注损伤,多发性硬化,奈瑟球菌或肺炎球菌脑膜炎,结核病,白塞(Bechet)氏综合征,败血性休克,移植物抗宿主病,哮喘,成人T细胞白血病,多发性骨髓瘤,牙周炎,肥胖和肥胖相关疾病,椎间盘疾病,肠易激综合征,施尼茨勒(Schnitzler)综合征,变态反应/特应性皮炎和痛风。

68. 依照权利要求1至44任一项的抗体或其抗原结合片段制备用于治疗对用IL-1信号传导的抑制剂治疗易感的疾病或状况的药物的用途。

69. 依照权利要求68的抗体或其抗原结合片段的用途,其中该对用IL-1信号传导的抑制剂治疗易感的疾病或状况选自下组:类风湿性关节炎,幼年型关节炎,骨关节炎,家族性寒冷自身炎症综合征(FCAS),穆-韦(Muckle-Wells)病,新生儿发作多系统炎性疾病(NOMID),家族性地中海热(FMF),化脓性关节炎坏疽性脓皮症和痤疮(PAPA)综合征,成人发作斯提耳(Still)氏病,高IgD综合征,2型糖尿病,巨噬细胞活化综合征,TNF受体相关周期性综合征,布劳(Blau)病,强直性脊柱炎,Sweets病,狼疮关节炎,阿尔茨海默(Alzheimer)氏病,银屑病,哮喘,动脉粥样硬化,结节病,特应性皮炎,系统性红斑狼疮,大疱性类天疱疮,I型糖尿病,慢性阻塞性肺病,幽门螺旋杆菌胃炎,炎性肠病,丙型肝炎,缺血-再灌注损伤,多发性硬化,奈瑟球菌或肺炎球菌脑膜炎,结核病,白塞(Bechet)氏综合征,败血性休克,移植物抗宿主病,哮喘,成人T细胞白血病,多发性骨髓瘤,牙周炎,肥胖和肥胖相关疾病,椎间盘疾病,肠易激综合征,施尼茨勒(Schnitzler)综合征,变态反应/特应性皮炎和痛风。

抗人白介素-1受体辅助蛋白 (IL1 RAP) 抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及用于治疗 and 诊断与IL-1生物标志物(具体是IL1RAP)有关和/或响应IL-1信号传导抑制的疾病和状况的基于抗体的药剂。特别地,提供了用于治疗 and 诊断癌症,包括但不限于慢性髓细胞样白血病(CML),急性髓细胞样白血病(AML)和与实体瘤形成有关的癌症(诸如黑素瘤,肺癌,和乳腺癌)的基于抗体的药剂。

[0002] 发明背景

[0003] 白介素-1生物学

[0004] 白介素-1 (IL-1) 是一种有力的促炎症细胞因子,它能由多种细胞类型响应感染和炎症而生成,包括单个核巨噬细胞。IL-1家族由七种激动剂(包括IL-1 α 和IL-1 β)和三种天然发生受体拮抗剂(包括IL-1受体拮抗剂(IL-1Ra))组成(Dinarello,CA,Blood 1996,87(6):2095-147)。已经鉴定了两种IL-1受体,IL-1R I型和IL-1R II型。这两种受体均能与IL-1家族分子的所有三种形式相互作用。IL-1RI负责介导IL-1-诱导的细胞激活。然而,IL-1/IL-1RI复合物自身不能发信号,但是依赖于与第二受体链,IL-1R辅助蛋白(IL1RAP)的联合(Dinarello,CA,Blood 1996,87(6):2095-147)。与IL-1RI形成对比,IL-1RII不在结合至IL-1后诱导细胞激活,如此IL-1RII作为调节性诱饵受体发挥功能,导致可供结合IL-1RI的IL-1的净减少。

[0005] 在IL1信号传导以外,IL1RAP对于介导IL33(经由ST2/IL1RAP复合物)和IL36(经由IL1Rrp2/IL1RAP复合物)的效果是至关重要的(Garlanda et al.,Immunity 2013 Dec 12;39(6):1003-18)。

[0006] IL-1是一种有力的促炎症细胞因子,它在局部感染或炎症部位处被诱导且牵涉对多种生理和细胞事件的调节(汇总于Dinarello,CA,CHEST,2000,118:503-508和Dinarello,CA,Clin Exp Rheumatol,2002,20(5Suppl 27):S1-13)。它能够激活数种细胞类型,包括白细胞和内皮细胞。IL-1通过促进粘附分子,细胞因子,趋化因子和其它炎性介导物诸如前列腺素E₂和氧化氮(NO)的生成和表达来诱导并放大免疫学应答。结果是,局部炎症得到放大和维持。另外,IL-1-诱导的炎性介导物的生成导致发热,头痛,低血压和重量减轻。而且,IL-1是一种造血生长因子且已经显示出降低骨髓移植期间患者中的淋巴细胞和血小板最低点。IL-1还已经显示出通过诱导血管内皮生长因子生成来促进血管发生,由此促进风湿性关节中的血管翳形成和血供。最后,IL-1已经显示出在风湿性疾病中促进骨和软骨降解。

[0007] IL-1在疾病中的作用

[0008] IL-1牵涉多种疾病和状况,范围从痛风到癌症(综述参见Dinarello et al.,2012,Nature Reviews 11:633-652和Dinarello,2014,Mol.Med.20(suppl.1):S43-S58;通过援引将其公开内容收入本文),包括:

- [0009] • 关节,骨和肌肉疾病,诸如类风湿性关节炎和骨关节炎;
- [0010] • 遗传性系统性自身炎性疾病,诸如家族性地中海热;
- [0011] • 系统性自身炎性疾病,诸如系统性幼年型特发性关节炎和成人发作斯提耳

(Still)氏病;

[0012] • 常见炎症性疾病,诸如痛风和2型糖尿病;

[0013] • 急性发作缺血性疾病,诸如心肌梗死;和

[0014] • 癌症。

[0015] 多种用于阻断IL-1活性的疗法得到批准且在开发中。靶向IL-1开始于1993,引入了anakinra (Kineret;Amgen),一种重组形式的天然发生IL-1受体拮抗剂(IL-1Ra),其阻断IL-1 α 和IL-1 β 二者的活性;这种治疗剂后来已经用于证明IL-1在众多疾病中的作用(见上文)。由于它较好的安全性记录,较短的半衰期和多种施用路径,anakinra当前统治着IL-1治疗剂领域。用抗体或可溶性受体中和IL-1也已经证明是有效的,而且可溶性诱饵受体rilonacept (Arcalyst;Regeneron)和抗-IL-1 β 中和性单克隆抗体canakinumab (Ilaris;Novartis)现在已经得到批准。其它治疗性办法(包括IL-1 α 中和,靶向IL-1 β 的治疗性疫苗和嵌合IL-1Ra)处于早期临床试验中。另外,IL-1生成的口服活性小分子抑制剂(诸如胱天蛋白酶1抑制剂)已经得到批准且处于测试中。

[0016] IL1RAP作为赘生性病症的生物标志物

[0017] 肿瘤生物标志物指它的量或修饰指示肿瘤状态,进展特征,和对疗法的响应的内源蛋白质或代谢物。它们存在于肿瘤组织或体液中且涵盖多种分子,包括转录因子,细胞表面受体,和分泌的蛋白质。有效的肿瘤标志物是大大需要的,因为它们具有通过推动癌症在早期阶段的诊断和通过帮助个性化治疗来降低癌症死亡率的潜力。在最近十年期间,对癌发生和肿瘤进展的改善理解已经揭示了多种潜在的肿瘤标志物。预测应用当前的技术(诸如组织微阵列,抗体阵列,和质谱术)在不远的将来会发现甚至更多。

[0018] 白介素-1受体辅助蛋白(IL1RAP)先前已经鉴定为与血液病学赘生性病症(诸如慢性髓细胞样白血病(CML),急性髓细胞样白血病(AML)和骨髓增生异常综合征(MDS))有关的细胞表面生物标志物(例如参见Cantargia AB的WO 2011/021014; Järås et al.,2010, ProcNatlAcadSci USA 107(37):16280-5;Askmyr et al.,2013,Blood.121(18):3709-13;和Barreyro et al.,2012,Blood 120(6):1290-8,通过援引将其公开内容收入本文)。最近,还已经揭示了IL1RAP作为实体瘤(诸如黑素瘤)的诊断和治疗生物标志物的有用性(参见Cantargia AB的WO 2012/098407,通过援引将其公开内容收入本文)。

[0019] 本发明如此寻求提供改良抗体用于诊断和治疗与IL1RAP生物标志物有关和/或响应IL-1和/或IL-33信号传导抑制的疾病和状况。

[0020] 发明概述

[0021] 本发明的第一个方面提供一种对白介素-1受体辅助蛋白('IL1RAP')具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段('抗体多肽'),其中该抗体或抗原结合片段能够抑制参照抗体'CAN04'对人IL1RAP的结合。

[0022] “白介素-1受体辅助蛋白”,“IL1RAP”和“IL1-RAP”具体包括人IL1RAP蛋白质,例如如GenBank登录号AAB84059,NCBI参照序列:NP_002173.1和UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9NPH3-1中记载的(还可参见Huang et al.,1997,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.94(24),12829-12832,通过援引将其公开内容收入本文)。IL1RAP在科学文献中也称作IL1R3,C3orf13,FLJ37788,IL-1RAcP和EG3556。

[0023] 如此,本发明的抗体多肽对IL1RAP具有特异性。“特异性”意味着该抗体多肽能够

在体内,即在生理条件下(IL1RAP在生理条件下在人体内存在)结合IL1RAP。优选的是,该抗体多肽在体内不结合任何其它蛋白质。此类结合特异性可以通过本领域公知方法来测定,诸如ELISA,免疫组织化学,免疫沉淀,Western印迹和使用表达IL1RAP的转染细胞的流式细胞术。有利的是,该抗体多肽能够选择性结合IL1RAP,即它对IL1RAP的结合比对任何其它蛋白质要强至少10倍。

[0024] “参照抗体‘CAN04’”包括如下的完整IgG抗体,其包含分别具有氨基酸序列SEQ ID NO:1和2的重和轻链可变区的。除非另有说明,本文中提到的“CAN04”指如下的完整IgG抗体,其包含(a)包含由SEQ ID NO:1定义的可变区和由SEQ ID NO:19定义的恒定区的重链,和(b)包含由SEQ ID NO:2定义的可变区和由SEQ ID NO:18定义的恒定区的轻链。或者,可以使用人源化型式的CAN04(‘hCAN04’)作为参照抗体。例如,参照抗体可以是如下的完整IgG抗体,其包含(a)包含由SEQ ID NO:8至11任一定义的可变区和由SEQ ID NO:19定义的恒定区的重链,和(b)包含由SEQ ID NO:15至17任一定义的可变区和由SEQ ID NO:18定义的恒定区的轻链。

[0025] 如下文讨论的,参照抗体‘CAN04’结合IL1RAP的域2。如此,会领会,本发明的抗体或抗原结合片段也结合IL1RAP的域2。

[0026] “能够抑制参照抗体‘CAN04’对人IL1RAP的结合”意味着本发明的抗体多肽的存在完全或部分抑制‘CAN04’对人IL1RAP的结合。此类竞争性结合抑制可以使用本领域公知的测定法和方法来测定,例如使用带有固定化的IL1RAP的BIAcore芯片及在有和无要测试的抗体多肽的情况下与参照抗体‘CAN04’一起温育。或者,可以使用成对作图法,其中将参照抗体‘CAN04’固定化至BIAcore芯片的表面,使IL1RAP抗原结合至固定化的抗体,然后对第二抗体测试同时IL1RAP结合能力(参见‘BIAcore Assay Handbook’,GE Healthcare Life Sciences,29-0194-00 AA 05/2012;通过援引将其公开内容收入本文)。

[0027] 又或者,竞争性结合抑制可以使用流式细胞术来测定,例如测试测试抗体是否能够抑制CAN04参照抗体对细胞表面抗原的结合,可以将表达抗原的细胞与测试抗体一起预温育20分钟,之后清洗细胞,并与缀合至可以通过流式细胞术来检测的荧光团的参照CAN04抗体一起温育。如果与测试抗体的预温育降低流式细胞术中参照CAN04抗体的检测,那么测试抗体抑制参照抗体对细胞表面抗原的结合。如果要测试的抗体展现高的对IL1RAP的亲和力,那么可以使用缩短的预温育时段(或甚至根本没有预温育)。

[0028] 又或者,竞争性结合抑制可以使用ELISA(例如如实施例J中记载的)来测定。

[0029] “抗体或其抗原结合片段”包括实质性完整的抗体分子,以及嵌合抗体,人源化抗体,分离的人抗体,单链抗体,双特异性抗体,抗体重链,抗体轻链,抗体重和/或轻链的同二聚体和异二聚体,和抗原结合片段和其衍生物。合适的抗原结合片段和衍生物包括但不限于Fv片段(例如单链Fv和成二硫键Fv),Fab样片段(例如Fab片段,Fab’片段和F(ab)2片段),单一可变域(例如VH和VL域)和域抗体(dAb,包括单一和双重型式[即dAb-接头-dAb])。使用抗体片段而非完整抗体的潜在优势是数倍(several-fold)。片段更小的尺寸可导致改良的药理学特性,诸如更好的实体组织渗透。而且,抗原结合片段诸如Fab,Fv,ScFv和dAb抗体片段可以在大肠杆菌中表达及自大肠杆菌分泌,如此容许容易生成大量的所述片段。

[0030] 短语“抗体或其抗原结合片段”也意图涵盖抗体模拟物(例如具有高度稳定性,仍容许在某些位置引入可变性的非抗体支架结构)。生物化学领域技术人员会熟悉许多此类

分子,如Gebauer & Skerra,2009,Curr Opin Chem Biol 13(3):245-255中讨论的(通过援引将其公开内容收入本文)。例示性抗体模拟物包括:affibody(也称作Trinectins;Nygren,2008,FEBS J,275,2668-2676);CTLD(也称作Tetranectin;Innovations Pharmac.Technol.(2006),27-30);adnectin(也称作monobody;Meth.Mol.Biol.,352(2007),95-109);anticalin(Drug Discovery Today(2005),10,23-33);DARPin(锚蛋白;Nat.Biotechnol.(2004),22,575-582);avimer(Nat.Biotechnol.(2005),23,1556-1561);microbody(FEBS J,(2007),274,86-95);肽适体(Expert.Opin.Biol.Ther.(2005),5,783-797);Kunitz域(J.Pharmacol.Exp.Ther.(2006)318,803-809);affilin(Trends.Biotechnol.(2005),23,514-522);affimer(Avacta Life Sciences,Wetherby,UK)。

[0031] 本发明的范围内还包括的是嵌合T-细胞受体(也称作嵌合T细胞受体,嵌合免疫受体,和嵌合抗原受体或CAR)(参见Pule et al.,2003,Cytotherapy 5(3):211-26,通过援引将其公开内容收入本文)。这些是工程化受体,将任意的特异性嫁接到免疫效应细胞上。典型地,CAR用于将单克隆抗体的特异性嫁接到T细胞上;通过逆转录病毒载体易化它们编码序列的转移。此类分子的最常见形式是如下的融合物,其包含自单克隆抗体衍生的单链可变片段(scFv),融合至CD3- ζ (捷塔)跨膜和内域。当T细胞表达这种融合分子时,它们识别并杀死表达所转移的单克隆抗体特异性的靶细胞。

[0032] 本领域技术人员会进一步领会,本发明还涵盖修饰型式的抗体和其抗原结合片段,无论现在或将来存在的,例如通过共价附着聚乙二醇或另一合适聚合物(见下文)进行修饰。

[0033] 生成抗体和抗体片段的方法是本领域公知的。例如,抗体可以经采用诱导抗体分子体内生成,筛选免疫球蛋白文库(Orlandi et al.,1989.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:3833-3837;Winter et al.,1991,Nature 349:293-299,通过援引将其公开内容收入本文)或由培养的细胞系生成单克隆抗体分子的数种方法任一来生成。这些包括但不限于杂交瘤技术,该人B-细胞杂交瘤技术,和Epstein-Barr病毒(EBV)-杂交瘤技术(Kohler et al.,1975.Nature 256:4950497;Kozbor et al.,1985.J.Immunol.Methods 81:31-42;Cote et al.,1983.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:2026-2030;Cole et al.,1984.Mol.Cell.Biol.62:109-120,通过援引将其公开内容收入本文)。

[0034] 用于生成单克隆抗体的合适方法还披露于“Monoclonal Antibodies:A manual of techniques”,H Zola(CRC Press,1988,通过援引将其公开内容收入本文)和“Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Applications”,J G R Hurrell(CRC Press,1982,通过援引将其公开内容收入本文)。

[0035] 同样,抗体片段可以使用本领域公知的方法来获得(参见例如Harlow & Lane,1988,“Antibodies:A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,通过援引将其公开内容收入本文)。例如,依照本发明的抗体片段可以通过抗体的蛋白分解性水解或编码片段的DNA在大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞培养物或其它蛋白质表达系统)中的表达来制备。或者,抗体片段可以通过常规方法通过完整抗体的胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化来获得。

[0036] 本发明的抗体通过援引称作‘CAN04’的鼠衍生抗体的可变区来定义,其包含:

[0037] (a) 具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的重链可变区:

[0038] Q V Q L Q Q S G P E L L K P G A S

[0039] V K I S C K A S G Y A F S S S W M

[0040] N W V K Q R P G K G L E W I G R I

[0041] Y P G D G N T H Y S G K F K G K A

[0042] T L T A D K S S S I A Y M Q L S S

[0043] L T S E D S A V Y F C G E G Y L D

[0044] P M D Y W G Q G T S V T V S S

[0045] [SEQ ID NO:1]

[0046] 知

[0047] (b) 具有氨基酸序列SEQ ID NO:2的轻链可变区:

[0048] D I Q M T Q T T S S L S A S L G D

[0049] R V T I S C S A S Q G I N N Y L N

[0050] W Y Q Q K P D G T V K L L I H Y T

[0051] S G L H A G V P S R F S G S G S G

[0052] T D Y S L T I S N L E P E D V A T

[0053] Y Y C Q Q Y S I L P W T F G G G T

[0054] K L E I K R

[0055] [SEQ ID NO:2]。

[0056] 如本文中使用的,术语“氨基酸”包括标准的20种遗传编码的氨基酸和它们的对应‘D’型(与天然‘L’型相比)立体异构体, ω -氨基酸和其它天然发生氨基酸,非常规氨基酸(例如 α,α -双取代的氨基酸,N-烷基氨基酸,等)和化学衍生化氨基酸(见下文)。

[0057] 当具体列举氨基酸时,诸如“丙氨酸”或“A1a”或“A”,该术语指L-丙氨酸和D-丙氨酸二者,除非另有明确说明。其它非常规氨基酸也可以是本发明多肽的合适成分,只要该多肽保留期望的功能特性。对于所示肽,每一个所编码的氨基酸残基在适宜时以与该常规氨基酸的俗名对应的单字母名称代表。

[0058] 在一个实施方案中,本文中定义的抗体多肽包含L-氨基酸或由L-氨基酸组成。

[0059] 本领域技术人员会领会,可以使用任何包含上述可变区的完整IgG抗体作为参照抗体来鉴定竞争性抑制CAN04结合至IL1RAP的本发明抗体多肽。

[0060] 如此,在一个实施方案中,用作参照来测定竞争性结合物的CAN04抗体是如下的完整IgG抗体,其包含:

[0061] (a) 包含嫁接到鼠IgG1或IgG2a恒定区上的SEQ ID NO:1的可变域的重链

[0062] (b) 包含嫁接到鼠卡帕恒定区上的SEQ ID NO:2的可变域的轻链。

[0063] 或者,该参照抗体可以是如下的嵌合,完整IgG抗体,其包含:

[0064] (a) 包含嫁接到人IgG1恒定区(例如,如由pFUSEss-CHlg-hG1载体InvivoGen, San Diego, USA编码的)上的SEQ ID NO:1的可变域的重链

[0065] (b) 包含嫁接到人卡帕恒定区(例如,如由pFUSE2ss-CLlg-hk载体InvivoGen, San Diego, USA编码的)上的SEQ ID NO:2的可变域的轻链。

[0066] 典型地,竞争性结合因为测试抗体在抗原上参照抗体(在这种情况下,CAN04)所结合的表位处或至少非常接近处结合而发生。然而,本领域技术人员会领会,竞争性结合也可以由于空间干扰而发生;如此,测试抗体可以在与参照抗体结合的表位不同的表位处结合但仍然可以是足以阻碍参照抗体结合抗原的尺寸或构造。

[0067] 本发明的抗体和抗原结合片段是在基于展现使得它们作为癌症诊断和治疗剂特别合适的特性广泛筛选大量的抗IL1RAP抗体之后鉴定的。

[0068] 如此,在一个实施方案中,该抗体或抗原结合片段展现一项或多项下述特性:

[0069] (a) 200pM或更大的对人IL1RAP的结合亲和力(K_D),即该 $K_D \leq 200pM$ (例如,如在实施例A中测定的);

[0070] (b) 与来自食蟹猴(*Macaca fascicularis*)的IL1RAP的交叉反应性(例如,如在实施例D中测定的);

[0071] (c) 对IL1信号传导的抑制性作用(IL-1 α 和/或IL-1 β ;例如,如在实施例E中测定的);

[0072] (d) 在一种或多种癌细胞系(诸如CML,ALL和/或黑素瘤细胞系)中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的能力(例如,如在实施例F中测定的);和/或

[0073] (e) 在结合至一种或多种癌细胞系(诸如CML,AML和/或黑素瘤细胞系)后内在化的能力(例如,如在实施例G中测定的)。

[0074] 有利的是,该抗体或抗原结合片段展现所有上述特性。

[0075] 在一个备选实施方案中,该抗体或抗原结合片段展现上述特性(a),(b),(c)和(e)中的一项或多项,但是不能诱导ADCC。

[0076] 在一个实施方案中,该抗体或抗原结合片段能够结合IL1RAP胞外域上的如下表位,该表位与IL1RAP上参照抗体CAN04能够结合的表位至少部分交叠。如此,该抗体或抗原结合片段可以能够结合位于IL1RAP域2之处/之内的表位(参见Wang et al.,2010,Nature Immunology,11:905-912,通过援引将其公开内容收入本文),即在IL1RAP氨基酸135至234内(参见UniProtKB/Swiss-Prot内的登录号Q9NPH3)。例如,该抗体或抗原结合片段所结合的表位可以位于IL1RAP氨基酸135至154,155至174,175至194,195至214之内或介于氨基酸215至234之间。然而,会领会,该表位可以是非线性的。

[0077] 在一个实施方案中,本发明的抗体多肽包含完整抗体(诸如IgG1抗体)或由完整抗体(诸如IgG1抗体)组成。

[0078] 在一个备选实施方案中,本发明的抗体多肽包含抗原结合片段或由抗原结合片段组成,该抗原结合片段选自下组:Fv片段(例如单链Fv和成二硫键Fv),Fab样片段(例如Fab片段,Fab'片段和F(ab)₂片段)和域抗体(例如单一V_H可变域或V_L可变域)。

[0079] 在又一个实施方案中,如上文讨论的,本发明的多肽包含抗体模拟物或由抗体模拟物组成,该抗体模拟物选自包含下述各项或由下述各项组成的组:affibody,tetranectin(CTLD),adnectin(monobody),anticalin,DARPin(锚蛋白),avimer,iMab,microbody,肽适体,Kunitz域和affilin。

[0080] 在一个优选实施方案中,依照本发明第一个方面的抗体或其抗原结合片段包含包含下述CDR的重链可变区:

[0081] a)GYAFSSS[SEQ ID NO:3]或与其具有至少60%序列同一性的氨基酸序列,例如至

少70%，80%，或90%序列同一性；

[0082] b) YPGDGN[SEQ ID NO:4]或与其具有至少60%序列同一性的氨基酸序列，例如至少70%，80%，或90%序列同一性；和/或

[0083] c) GYLDPMDY[SEQ ID NO:5]或与其具有至少60%序列同一性的氨基酸序列，例如至少70%，80%，或90%序列同一性。

[0084] 如此，该抗体或其抗原结合片段可以包含包含SEQ ID NO 3,4和5的CDR的重链可变区。

[0085] 例如，该抗体或其抗原结合片段可以包含具有CAN04参照抗体的对应区域的氨基酸序列，即SEQ ID NO:1的重链可变区。

[0086] 然而，会领会，可以耐受CDR序列内低水平的突变（典型地，仅仅一个或两个氨基酸）而没有丧失该抗体或抗原结合片段对IL1RAP的特异性。

[0087] 百分比同一性可以通过例如Expasy设备地点 (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) 处的LALIGN程序 (Huang and Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357, 通过援引将其公开内容收入本文) 来确定，使用全局比对选项，评分矩阵BLOSUM62，打开缺口罚分-14，延长缺口罚分-4作为参数。或者，两种多肽之间的百分比序列同一性可以使用合适的计算机程序来确定，例如威斯康星大学遗传计算小组的GAP程序，而且会领会，百分比同一性是关于其序列已经最佳比对的肽计算的。

[0088] 或者，可以使用Clustal W程序 (如Thompson et al., 1994, Nucl. Acid Res. 22: 4673-4680中记载的，通过援引将其收入本文) 来进行比对。所使用的参数可以是如下的：

[0089] -快速成对比对参数：K-元组（词）尺寸；1，窗口尺寸；5，缺口罚分；3，顶部对角线的数目；5。评分方法：x百分比。

[0090] -多重比对参数：缺口打开罚分；10，缺口延长罚分；0.05。

[0091] -评分矩阵：BLOSUM。

[0092] 或者，可以使用BESTFIT程序来确定局部序列比对。

[0093] 在又一个优选实施方案中，依照本发明第一个方面的抗体或其抗原结合片段包含包含下述CDR的重链可变区：

[0094] a) GYAFSSSWMN[SEQ ID NO:6]或与其具有至少60%序列同一性的氨基酸序列，例如至少70%，80%，或90%序列同一性；

[0095] b) RIYPGDGNTHYSGKFKG[SEQ ID NO:7]或与其具有至少60%序列同一性的氨基酸序列，例如至少70%，80%，或90%序列同一性；和

[0096] c) GYLDPMDY[SEQ ID NO:5]或与其具有至少60%序列同一性的氨基酸序列，例如至少70%，80%，或90%序列同一性。

[0097] 例如，该抗体多肽可以包含包含SEQ ID NO 6,7和5的CDR的重链可变区。

[0098] 如上文指出的，CAN04参照抗体是鼠抗体。然而，可以人源化这种抗体的成分重和轻链以生成对于在人中使用更加合适的抗体多肽，例如由于它们降低的免疫原性。例如，可以将SEQ ID NO 3,4和5的CDR（或SEQ ID NO 6,7和5的CDR）嫁接到人可变区框架中。

[0099] 本领域技术人员会领会，对于人疗法，优选使用人或人源化抗体。人源化形式的非人（例如鼠）抗体是遗传工程化嵌合抗体或抗体片段，其优选具有最低限度衍生自非人抗体的部分。人源化抗体包括如下的抗体，其中人抗体（受体抗体）的互补决定区用来自具有期

望功能性的非人物种(供体抗体)诸如小鼠,大鼠或家兔的互补决定区的残基替换。在一些情况中,人抗体的Fv框架残基用对应非人残基替换。人源化抗体还可以包含受体抗体中或输入互补决定区或框架序列中均没有找到的残基。一般而言,人源化抗体会包含实质性整个如下的至少一个和典型地两个可变域,其中所有或实质性所有互补决定区对应于非人抗体的那些且所有或实质性所有框架区对应于有关人共有序列的那些。最佳地,人源化抗体还包括至少一部分抗体恒定区,诸如Fc区,典型地衍生自人抗体(参见例如Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 通过援引将其公开内容收入本文)。

[0100] 用于人源化非人抗体的方法是本领域公知的。一般地,人源化抗体具有一个或多个来自非人来源的引入其中的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作输入残基,典型地取自输入可变域。人源化本质上可以如记载的那样实施(参见例如Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536; US4,816,567, 通过援引将其公开内容收入本文), 通过用对应的啮齿动物互补决定区替代人互补决定区。因而,此类人源化抗体是嵌合抗体,其中实质性少于完整人可变域已经用来自非人物种的对应该序列替代。在实践中,人源化抗体典型地可以是如下的人抗体,其中一些互补决定区残基和可能地一些框架残基用来自啮齿动物抗体的类似位点的残基替代。

[0101] 人抗体也可以使用本领域已知的各种技术来鉴定,包括噬菌体展示文库(参见例如Hoogenboom&Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole et al., 1985, In: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147:86-95, 通过援引将其公开内容收入本文)。

[0102] 如此,本发明的抗体或其抗原结合片段可以是人源化的,例如它可以包含如下的重链可变区,该重链可变区具有下述SEQ ID NO:8至11任一的氨基酸序列之一或与其具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:

[0103] a)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S
S V K V S C K A S G Y A F S S S
W M N W V R Q A P G Q G L E W M
G R I Y P G D G N T H Y A Q K F
Q G R V T L T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C
G E G Y L D P M D Y W G Q G T L
V T V S S

[0104] [SEQ ID NO:8];

[0105] b)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S
S V K V S C K A S G Y A F T S S
W M N W V R Q A P G Q G L E W M
G R I Y P G D G N T H Y A Q K F

Q G R V T L T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C
G E G Y L D P M D Y W G Q G T L
V T V S S

[0106] [SEQ ID NO:9];

[0107] c)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S
S V K V S C K A S G Y T F T S S
W M N W V R Q A P G K G L E W M
G R I Y P G D G Q T H Y A Q K F
Q G R V T L T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C
G E G Y L D P M D Y W G Q G T L
V T V S S

[0108] [SEQ ID NO:10];或

[0109] d)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S
S V K V S C K A S G Y T F T S S
W M N W V R Q A P G K G L E W M
G R I Y P G D G Q T H Y A Q K F
Q G R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C
G E G Y L D P M D Y W G Q G T L
V T V S S

[0110] [SEQ ID NO:11]。

[0111] 例如,该抗体或其抗原结合片段可以包含具有SEQ ID NO:8至11任一 的氨基酸序列的重链可变区。

[0112] 在一个相关优选实施方案中,该抗体或其抗原结合片段包含包含下述CDR的轻链可变区:

[0113] a) SASQGINNYLN[SEQ ID NO:12]或与其具有至少60%序列同一性的氨基酸序列,例如至少70%,80%,或90%序列同一性;

[0114] b) YTSGLHA[SEQ ID NO:13]或与其具有至少60%序列同一性的氨基酸序列,例如至少70%,80%,或90%序列同一性;和/或

[0115] c) QQYSILPWT[SEQ ID NO:14]或与其具有至少60%序列同一性的氨基酸序列,例如至少70%,80%,或90%序列同一性。

[0116] 如此,该抗体或其抗原结合片段可以包含包含SEQ ID NO 12,13和14的CDR的轻链可变区。

[0117] 例如,该抗体或其抗原结合片段可以包含具有鼠CAN04参照抗体的对应区域的氨基酸序列,即SEQ ID NO:2的轻链可变区。

[0118] 正如上文详述的重链可变区的情况,会领会,可以人源化本发明抗体多肽的轻链可变区以生成对于在人中使用更加合适的药剂。例如,可以将SEQ ID NO 12,13和14的CDR嫁接到人可变区框架中。

[0119] 如此,该抗体或其抗原结合片段可以包含包含SEQ ID NO:15至17任一的氨基酸序列或与其具有至少90%序列同一性的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15至17任一的氨基酸序列或与其具有至少90%序列同一性的氨基酸序列组成的轻链可变区:

[0120] a)

```
D I Q M T Q S P S S L S A S V G
D R V T I T C S A S Q G I N N Y
L N W Y Q Q K P G K A P K L L I
H Y T S G L H A G V P S R F S G
S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D V A T Y Y C Q Q Y S I L P W
T F G G G T K V E I K R
```

[0121] [SEQ ID NO:15];

[0122] b)

```
D I Q M T Q S P S S L S A S V G
D R V T I T C Q A S Q G I N N Y
L N W Y Q Q K P G K A P K L L I
H Y T S G L H A G V P S R F S G
S G S G T D Y T L T I S S L E P
E D V A T Y Y C Q Q Y S I L P W
T F G G G T K V E I K R
```

[0123] [SEQ ID NO:16];或

[0124] c)

```
D I Q M T Q S P S S L S A S V G
D R V T I T C Q A S Q G I N N Y
L N W Y Q Q K P G K A P K L L I
H Y T S G L H A G V P S R F S G
S G S G T D F T L T I S S L E P
E D V A T Y Y C Q Q Y S I L P W
T F G G G T K V E I K R
```

[0125] [SEQ ID NO:17]。

[0126] 例如,该抗体或其抗原结合片段可以包含具有SEQ ID NO:15至17任一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0127] 在一个实施方案中,该抗体或其抗原结合片段包含包含SEQ ID NO:1任一的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1任一的氨基酸序列组成的鼠重链可变区和包含SEQ ID NO:2任一的氨基酸序列或由SEQ ID NO:2任一的氨基酸序列组成的鼠轻链可变区。

[0128] 或者,该抗体或其抗原结合片段可以包含包含SEQ ID NO:8至11任一的氨基酸序

列或由SEQ ID NO:8至11任一的氨基酸序列组成的人源化重链可变区和包含SEQ ID NO:15至17任一的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15至17任一的氨基酸序列组成的人源化轻链可变区。

[0129] 例如,该抗体或其抗原结合片段可以包含:

[0130] a) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0131] b) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0132] c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0133] d) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0134] e) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0135] f) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0136] g) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0137] h) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0138] i) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0139] j) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的轻链可变区;

[0140] k) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的轻链可变区;或

[0141] l) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的轻链可

变区。

[0142] 本领域技术人员会领会,上文定义的本发明人源化抗体或抗原结合片段可以进一步包含重链恒定区,或其部分(参见下文)。

[0143] 在一个实施方案中,该抗体多肽包含IgG重链(诸如IgG1,IgG2,IgG3或IgG4重链)的CH1,CH2和/或CH3区。如此,该抗体多肽可以包含部分或整个来自IgG1重链的恒定区。例如,该抗体多肽可以是如下的Fab片段,其包含CH1和CL恒定区,分别与任何上文定义的重和轻可变区组合。

[0144] 同样,上文定义的本发明抗体或抗原结合片段可以进一步包含轻链恒定区,或其部分(参见下文)。例如,该抗体多肽可以包含来自卡帕或拉姆达轻链的CL区。

[0145] 例如,该抗体多肽可以包含下述恒定区:

[0146] (a) Ig卡帕链C区(人(*Homo sapiens*))(UnitProt登录号P01834)

[0147] TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS
KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

[0148] [SEQ ID NO:18]

[0149] (b) Ig伽马-1链C区(人(*Homo sapiens*))(UnitProt登录号P01857)

[0150] ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[0151] [SEQ ID NO:19]

[0152] 在一个备选实施方案中,可以利用上述恒定区的天然发生变体(例如参见 Jefferis&Lefranc,2009,MAbs 1(4):332-8,通过援引将其公开内容收入本文)。例如,该轻链恒定区可以包含具有W40R和/或V83L突变的SEQ ID NO:18或由具有W40R和/或V83L突变的SEQ ID NO:18组成和/或该重链恒定区可以包含具有K97R,D239E和/或L241M突变,或没有C端赖氨酸/K的SEQ ID NO:19或由具有K97R,D239E和/或L241M突变,或没有C端赖氨酸/K的SEQ ID NO:19组成(其中氨基酸突变的位置是使用Eu编号方案定义的,其不同于SEQ ID NO:18和19中的编号;参见Edelman et al.,1969,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,63:78-85,通过援引将其公开内容收入本文)。

[0153] 如此,例示性的本发明抗体多肽包含:

[0154] (a) 包含SEQ ID NO:1,8,9,10或11的可变区连同SEQ ID NO:19的恒定区的重链;
和

[0155] (b) 包含SEQ ID NO:2,15,16或17的可变区连同SEQ ID NO:18的恒定区的轻链。

[0156] 在一个相关实施方案中,该抗体多肽可以包含抗体Fc区(例如IgG重链的CH2和CH3区)。技术人员会领会,该Fc部分可以来自IgG抗体,或来自不同类的抗体(诸如IgM,IgA,IgD或IgE)。在一个实施方案中,该Fc区来自IgG1,IgG2,IgG3或IgG4抗体。

[0157] 该Fc区可以是天然发生的(例如内源生成的抗体的一部分)或可以是人工的(例如相对于天然发生Fc区包含一处或多处点突变)。

[0158] 正如本领域中充分证明的,抗体的Fc区介导它的血清半衰期和效应器功能,诸如

补体依赖性细胞毒性 (CDC), 抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 和抗体依赖性细胞吞噬 (ADCP)。

[0159] 改造治疗性单克隆抗体或Fc融合蛋白的Fc区容许生成更好地适合它们需要的药理学活性的分子 (Strohl, 2009, Curr Opin Biotechnol 20 (6):685-91, 通过援引将其公开内容收入本文)。

[0160] (a) 用于延长半衰期的工程化Fc区

[0161] 改进治疗性抗体的功效的一种办法是提高它的血清持续性, 由此容许更高的循环水平, 较低频率的施用和较低的剂量。

[0162] IgG的半衰期取决于它对新生儿受体FcRn的pH依赖性结合。在内皮细胞表面上表达的FcRn以pH依赖性方式结合IgG且保护它免于降解。

[0163] 一些在pH 6.0, 而非pH 7.4选择性结合FcRn的抗体在多种动物模型中展现更高的半衰期。

[0164] 位于CH2和CH3域之间的界面的数种突变, 诸如T250Q/M428L (Hinton et al., 2004, J Biol Chem. 279 (8):6213-6, 通过援引将其公开内容收入本文) 和M252Y/S254T/T256E+H433K/N434F (Vaccaro et al., 2005, Nat. Biotechnol. 23 (10):1283-8, 通过援引将其公开内容收入本文) 已经显示出在体内提高IgG1对FcRn的结合亲和力且延长IgG1的半衰期。

[0165] (b) 用于改变效应器功能的工程化Fc区

[0166] 取决于治疗性抗体或Fc融合蛋白应用, 可能想要降低或提高效应器功能 (诸如ADCC)。

[0167] 对于靶向细胞表面分子的抗体, 尤其是免疫细胞上的那些, 消除效应器功能可能是某些临床适应证需要的。

[0168] 相反, 对于意图用于肿瘤学用途 (诸如在白血病和实体瘤的治疗中; 见下文) 的抗体, 提高效应器功能可以改进治疗活性。

[0169] 四种人IgG同种型以不同亲和力结合活化性Fc γ 受体 (Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa), 抑制性Fc γ RIIb受体, 和补体第一成分 (C1q), 产生非常不同的效应器功能 (Bruhns et al., 2009, Blood. 113 (16):3716-25, 通过援引将其公开内容收入本文)。

[0170] IgG对Fc γ Rs或C1q的结合依赖于位于铰链区和CH2域中的残基。CH2域的两个区域对于Fc γ R和C1q结合是至关重要的, 而且在IgG2和IgG4中具有独特序列。将IgG2第233-236位残基和IgG4第327, 330和331位残基替代入人IgG1显示出大大降低ADCC和CDC (Armour et al., 1999, Eur J Immunol. 29 (8):2613-24; Shields et al., 2001, J Biol Chem. 276 (9):6591-604, 通过援引将其公开内容收入本文)。而且, Idusogie等人证明不同位置 (包括K322) 的丙氨酸替代显著降低补体活化 (Idusogie et al., 2000, J Immunol. 164 (8):4178-84, 通过援引将其公开内容收入本文)。类似地, 鼠IgG2A CH2域中的突变显示出降低对Fc γ RI, 和C1q (Steurer et al., 1995, J Immunol. 155 (3):1165-74, 通过援引将其公开内容收入本文) 的结合。

[0171] 已经在人IgG1的CH2域中进行了众多突变, 并在体外测试它们对ADCC和CDC的影响 (参见上文引用的参考文献)。值得注意的是, 第333位处的丙氨酸替代据报告提高ADCC和CDC二者 (Shields et al., 2001, 在前; Steurer et al., 1995, 在前)。Lazar等人记载了三

重突变体 (S239D/I332E/A330L), 其具有更高的对Fc γ RIIIa的亲和力和更低的对Fc γ RIIb的亲和力, 导致增强的ADCC (Lazar et al., 2006, PNAS 103 (11): 4005-4010, 通过援引将其公开内容收入本文)。使用相同突变来生成具有升高的ADCC的抗体 (Ryan et al., 2007, Mol. Cancer Ther. 6: 3009-3018, 通过援引将其公开内容收入本文)。Richards等人研究了略微不同的三重突变体 (S239D/I332E/G236A), 其具有改良的Fc γ RIIIa亲和力和Fc γ RIIa/Fc γ RIIb比, 介导增强的巨噬细胞对靶细胞的吞噬 (Richards et al., 2008, Mol Cancer Ther. 7 (8): 2517-27, 通过援引将其公开内容收入本文)。

[0172] 由于它们缺少效应器功能, 对于在没有细胞消减的情况下封闭受体 (即抑制IL-1信号传导), IgG4抗体代表一种优选的IgG亚类。IgG4分子能在称作Fab臂交换的动态过程中交换半分子。这种现象也能在体内在治疗性抗体和 内源IgG4之间发生。

[0173] S228P突变已经显示出防止这种重组过程, 容许设计更低不可预测的治疗性IgG4抗体 (Labrijn et al., 2009, Nat Biotechnol. 27 (8): 767-71, 通过援引将其公开内容收入本文)。

[0174] 工程化Fc区的例子显示于下文表1和实施例J。

[0175] 表1

[0176] 工程化Fc的例子

[0177]

同种型	物种	突变*	FcR/C1q 结合	效应器 功能
IgG1	人	T250Q/M428L ¹	升高的 对FcRn的结合	延长的 半衰期
IgG1	人	M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F ²	升高的 对FcRn的结合	延长的 半衰期
IgG1	人	M428L/N434S ³	升高的 对FcRn的结合	延长的 半衰期
IgG1	人	E233P/L234V/L235A/?G236 + A327G/A330S/P331S ^{4,5}	降低的 对FcγRI结合	降低的 ADCC 和CDC
IgG1	人	S239D/S298A/I332E + S239D/A330L/I332E ⁶	升高的 对FcγRIIIa的结合	升高的 ADCC
IgG1	人	S239D/I332E ⁷	升高的 对FcγRIIIa的结合	升高的 ADCC
IgG1	人	S298A/E333A/K334A ⁸	升高的 对FcγRIIIa的结合	升高的 ADCC
IgG1	人	E333A ⁹	升高的 对FcγRIIIa的结合	升高的 ADCC 和CDC
IgG1	人	P257I/Q311 ¹⁰	升高的 对FcRn的结合	不变的 半衰期
IgG1	人	K326W/E333S ¹¹	升高的 对C1q的结合	升高的 CDC

[0178]

IgG1	人	S239D/I332E/G236A ¹²	升高的 FcγRIIa/FcγRIIb比	升高的 巨噬细胞吞噬
IgG1	人	K322A ⁸	降低的 对C1q的结合	降低的 CDC
		N297S		降低的 (消除的) ADCC
		N297Q		降低的 (消除的) ADCC
		R292P + V305I +/- F243L ¹³		升高的 ADCC
		P247I/A339Q ¹⁴		升高的 ADCC
IgG4	人	S228P ¹⁵	-	降低的 Fab臂交换
IgG2a	小鼠	L235E + E318A/K320A/K322A ¹¹	降低的 对FcγRI和C1q 的结合	降低的 ADCC 和CDC

[0179] *Fc氨基酸突变的位置是使用Eu编号方式定义的,其不同于上文SEQ ID NO:18和19中的编号;参见Edelman et al.,1969,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,63:78-85)

[0180] 表1的参考文献

[0181] 1.Hinton et al.,2004,J.Biol.Chem.279 (8):6213-6

[0182] 2.Vaccaro et al.,2005,Nat Biotechnol.23(10):1283-8

[0183] 3.ZaleVsky et al.,2010,Nat.Biotechnology 28(2):157-159

[0184] 4.Armour KL.et al.,1999,Eur J Immunol.29(8):2613-24

[0185] 5.Shields RL.et al.,2001,J Biol Chem.276(9):6591-604

[0186] 6.Masuda et al.,2007,Mol Immunol.44(12):3122-31

[0187] 7.Bushfield et al.,2014,Leukemia 28(11):2213-21

[0188] 8.Okazaki et al.,2004,J Mol Biol.;336(5):1239-49

[0189] 9.Idusogie et al.,2000,J Immunol.164(8):4178-84

[0190] 10.Datta-Mannan A.et al.,2007,Drug Metab.Dispos.35:86-94

[0191] 11.Steurer W.et al.,1995,J Immunol.155(3):1165-74

[0192] 12.Richards et al.,2008,Mol Cancer There.7(8):2517-27

[0193] 13.US 7,960,512 B2

[0194] 14.EP 2213683

[0195] 15.Labrijn AF.et al.,2009.Nat Biotechnol.27(8):767-71

[0196] 在又一个实施方案中,可以经由修饰其中CH2域内碳水化合物模块来改变Fc区的效应器功能。

[0197] 例如,已知Fc区中岩藻糖残基缺少或低的治疗性抗体可以在人中展现增强的ADCC活性(例如参见Peipp et al.,2008,Blood 112(6):2390-9;Yamane-Ohnuki&Satoh,2009,MAbs 1(3):230-26;Iida et al.,2009,BMC Cancer 9:58,通过援引将其公开内容收入本文)。低岩藻糖抗体多肽可以通过在含有甘露糖苷酶抑制剂,诸如几夫碱(kinfunensine)的培养基中培养的细胞中表达来生成(见下文实施例I)。

[0198] 其它将抗体的糖基化修饰成低岩藻糖型式的方法包括在不能代谢鼠李糖的细胞中使用细菌酶GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖还原酶(例如使用ProBioGen AG,Berlin,Germany的GlymaxX®技术)。

[0199] 另一种创建低岩藻糖抗体的方法是通过在抗体生成细胞中抑制或消减 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶(例如使用Lonza Ltd,Basel,Switzerland的Potelligent®CHOK1 SV技术)。

[0200] 如上文记录的,本发明的抗体多肽可以在任何Fc介导的效应器功能存在或缺失下对IL-1信号传导发挥抑制性作用(见实施例E)。

[0201] 在一个实施方案中,本发明的抗体多肽可以发挥抑制性作用对IL-1超家族内的一种或多种补充的(或替换的)细胞因子,包括但不限于IL-33和/或IL-36。

[0202] 白介素-33(IL-33)诱导辅助T细胞,肥大细胞,嗜曙红粒细胞和嗜碱性粒细胞生成2型细胞因子。这种细胞因子先前称作NF-HEV'高内皮小静脉(HEV)中的核因子(NF)',因为它最初是在这些专门化细胞中鉴定。IL-33通过与受体ST2(也称作IL1RL1)和IL-1受体辅助蛋白(IL1RAP)的相互作用,激活NF- κ B和MAP激酶信号传导途径中驱动极化Th2细胞生成2型细胞因子(例如IL-5和IL-13)的胞内分子来介导它的生物学效应。认为在体内IL-33对2型细胞因子的诱导诱导在施用IL-33后在粘膜器官中观察到的严重病理性变化。

[0203] 白介素-36(IL-36)是一种经IL-36受体主要作用于幼稚CD4+T细胞的细胞因子。已知它激活NF- κ B和丝裂原活化的蛋白质激酶在皮肤病理学中发挥作用。已经发现它激活T细胞增殖和IL-2释放。

[0204] 本领域技术人员会领会,本发明的抗体多肽可完全或部分抑制IL-1,IL-33和/或IL-36信号传导。例如,信号传导可以相对于本发明多肽缺失下的信号传导抑制至少10%,20%,30%,50%,75%或更多。

[0205] 本发明多肽对IL-1,IL-33和/或IL-36信号传导的抑制的程度可以使用本领域公知的方法来测定。

[0206] 例如,对IL-1信号传导的抑制可以如下文实施例E中描述的那样来测量。

[0207] 同样,对IL-33信号传导的抑制可以如实施例E中描述的那样来测量。

[0208] 对IL-36信号传导的抑制可以通过本领域已知的方法来测量。例如,滑膜成纤维细胞的IL-36刺激导致NF- κ B和MAP激酶激活。或者,IL-36- α ,- β 和- γ 响应抗CD3/抗CD28刺激而提高T-细胞增殖(参见Vigne et al.,2012,Blood120(17):3478-87,通过援引将其公开内容收入本文)。

[0209] 在一个实施方案中,该抗体或其抗原结合片段可以进一步包含用于延长该抗体或抗原结合片段的体内半衰期的模块,诸如但不限于聚乙二醇(PEG),人血清清蛋白,糖基化基团,脂肪酸和葡聚糖(dextran)。此类进一步模块可以使用本领域公知的方法与结合模块缀合或其它方式组合。

[0210] 下述改进蛋白质半衰期的已知方法中任何一项或多项可以用于这个目的:

[0211] (a) PEG化

[0212] 一种广泛使用的用于改进蛋白质半衰期的方法是将聚乙二醇(PEG)模块共价连接至蛋白质。PEG是如下的水溶性聚合物,由于它们较大的流体动力学体积,在PEG化的药物周围创建护罩[Molineux,G.,Pegylation:engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy.Cancer Treat Rev,2002.28Suppl A:p.13-6,通过援引将其公开内容收入本文]。PEG化的蛋白质展现降低的肾清除和蛋白质水解,降低的毒性,降低的免疫原性和升高的溶解性[Veronese,F.M.and J.M.Harris,Introduction and overview of peptide and protein pegylation.Adv Drug Deliv Rev,2002.54(4):p.453-6;Chapman,A.P.,PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy:a review.Adv Drug Deliv Rev,2002.54(4):p.531-45]。PEG化已经用于数种基于蛋白质的药物,包括第一批PEG化分子天冬酰胺酶和腺苷脱氨酶[Veronese,F.M.and J.M.Harris,Introduction and overview of peptide and protein pegylation.Adv Drug Deliv Rev,2002.54(4):p.453-6;Veronese,F.M.and G.Pasut,PEGylation,successful approach to drug delivery.Drug Discov Today,2005.10(21):p.1451-8,通过援引将其公开内容收入本文]。

[0213] 为了获得最大程度延长半衰期和保留生物学活性的成功PEG化的蛋白质,能影响结局的数项参数是重要的且应当予以考虑。PEG分子可以不同,而且已经用于PEG化蛋白质的PEG变体包括PEG和单甲氧基-PEG。另外,它们可以是线性的或分支的[Wang,Y.S.,et al.,Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications.Adv Drug Deliv Rev,2002.54(4):p.547-70]。所使用的PEG分子的尺寸可以变化,而且已经将尺寸范围介于1和40kDa之间的PEG模块连接至蛋白质[Wang,Y.S.,et al.,Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications.Adv Drug Deliv Rev,2002.54(4):p.547-70;Sato,H.,Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins.Adv Drug Deliv Rev,2002.54(4):p.487-504;Bowen,S.,et al.,Relationship between molecular mass and duration of activity of polyethylene glycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mutein.Exp Hematol,1999.27(3):p.425-32;Chapman,A.P.,et al.,Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives.Nat Biotechnol,1999.17(8):p.780-3]。另外,附着至蛋白质的PEG模块的数目可以

变化,而且1至6个PEG单元附着至蛋白质的例子已有报告[Wang,Y.S.,et al.,Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications.Adv Drug Deliv Rev,2002.54(4):p.547-70; Bowen,S.,et al.,Relationship between molecular mass and duration of activity of polyethylene glycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mutein.Exp Hematol,1999.27(3):p.425-32]。而且,已经利用PEG以及各种用于缀合的反应性基团之间接头的存在或缺失。如此,可以直接地或通过使用 γ -氨基丁酸作为接头将PEG连接至N端氨基基团,或具有反应性氨基或羟基基团的氨基酸残基(Lys,His,Ser,Thr和Tyr)。另外,可以将PEG偶联至羧基(Asp,Glu,C端)或硫氢基(Cys)基团。最后,可以使用酶转谷氨酰胺酶特异性PEG化Gln残基,而且PEG的烷基胺衍生物已有记载[Sato,H.,Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins.Adv Drug Deliv Rev,2002.54(4):p.487-504]。

[0214] 已经显示了提高PEG化程度导致体内半衰期延长。然而,本领域技术人员会领会,PEG化工艺会需要在个体的基础上特别为抗体多肽进行优化。

[0215] PEG可以在天然发生二硫键处偶联,如WO 2005/007197中记载的,通过援引将其公开内容收入本文。二硫键可以经由添加不危害蛋白质三级结构的化学桥来稳定化。这容许利用构成二硫键的两个硫的缀合硫醇选择性来创建桥,用于PEG的位点特异性附着。由此规避将残基改造入肽来附着至靶分子的需要。

[0216] 也可以共价缀合多种备选嵌段共聚物,如WO 2003/059973中记载的,通过援引将其公开内容收入本文。治疗性聚合物缀合物能展现改良的热特性,结晶,粘附,膨胀,涂层,pH依赖性构象和生物分布。而且,它们能实现延长的循环,缀合物通过胞饮被细胞摄取后在次级溶酶体的蛋白水解和酸性环境中释放生物活性剂和更加有利的物理化学特性由于大分子的特征(例如生物学流体中升高的药物溶解性)。包含亲水性和疏水性嵌段的共-嵌段共聚物在溶液中形成聚合物微团。在微团分解后,各个嵌段共聚物分子得到安全排出。

[0217] (b) 融合蛋白

[0218] 在本发明包含或其它方式在于抗体模拟物的使用(见上文)的情况下,下述类型的融合蛋白对于在体内延长半衰期可能是有用的。

[0219] IgG融合蛋白

[0220] 人免疫球蛋白G(IgG)分子具有大约20天的循环半衰期。IgG分子的Fc部分已经广泛用于创建由Fc部分和具有治疗性用途的蛋白质组成的融合蛋白。此类融合蛋白展现与它们缺少Fc的对应物相比延长的半衰期。例如,这种策略用于开发依那西普(etanercept),一种由可溶性人p75肿瘤坏死因子受体和人IgG的Fc部分之间的融合蛋白构成的抗风湿药物[Goldenberg,M.M.,Etanercept,a novel drug for the treatment of patients with severe,active rheumatoid arthritis.Clin Ther,1999.21(1):p.75-87;discussion 1-2,通过援引将其公开内容收入本文]。

[0221] Fc连接的蛋白质如下生成,即通过标准遗传工程方案创建Fc和感兴趣多肽的抗原结合区之间的融合蛋白。Fc基团融合至感兴趣蛋白质的C端。由于IgG铰链区中半胱氨酸残基的存在,Fc融合蛋白作为二硫化物连接的同二聚体表达。这进一步提高它们的有效尺寸和延长循环半衰期。另外,由于与对应的单体形式相比改良的对它的受体/配体的亲合力,

同二聚体构建物可以具有升高的功能性活性。

[0222] 人血清清蛋白融合蛋白

[0223] 人血清清蛋白 (HSA) 是循环中最丰富的天然发生血液蛋白质且具有19天的半衰期 [Osborn, B.L., et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 303 (2) : p. 540-8, 通过援引将其公开内容收入本文]。如此, HAS 对于创建具有改良的半衰期的融合蛋白是一种合适的融合配偶。由于HAS稳定化通向蛋白水解的蛋白质和延长在身体中的停留时间的能力, HSA融合蛋白展现延长的半衰期 [Veronese, F.M. and J.M. Harris, Introduction and overview of peptide and protein pegylation. Adv Drug Deliv Rev, 2002. 54 (4) : p. 453-6]。已经生成HSA融合蛋白, 包括IL-2, IFN- α 和- β 和生长激素 (GH) 在内, 而且显示出具有改良的药动力学特性。Albuferon (HSA-IFN- α) 和albutropin (HSA-GH) 分别在食蟹猴中展现比缺少HSA基团的相应对应物要长18和6倍的半衰期 [Osborn, B.L., et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 303 (2) : p. 540-8; Osborn, B.L., et al., Albutropin: a growth hormone-albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. Eur J Pharmacol, 2002. 456 (1-3) : p. 149-58]。

[0224] HAS连接的蛋白质如下生成, 即通过标准遗传工程方案创建HSA和感兴趣蛋白质之间的融合蛋白。HSA基团可以添加于N或C端。由于该修饰添加至蛋白质的末端, 因此干扰蛋白质的结构和如此它的功能的风险与诸如蛋白质内部的PEG化等修饰相比相当低。另外, 避免干扰蛋白质的活性位点的机会因HSA基团可以添加于感兴趣蛋白质的N或C端这一事实而升高 [Osborn, B.L., et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 303 (2) : p. 540-8; Osborn, B.L., et al., Albutropin: a growth hormone-albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. Eur J Pharmacol, 2002. 456 (1-3) : p. 149-58; Syed, S., K.E. Kelly, and W.P. Sheffield, Inhibition of thrombin by hirudin genetically fused to wild-type or mutant antithrombin. Thromb Res, 1996. 84 (6) : p. 419-29], 取决于哪种更加可能导致维持生物学活性的融合蛋白。如此, 在albuferon和albutropin的情况中, HSA的C端分别与IFN- α 或GH的N端融合, 创建功能活性水蛭素-HSA融合蛋白, HSA基团不得不融合至水蛭素的C端。这些结果指示靶蛋白质的特性决定N端还是C端的融合是最佳的。

[0225] (c) 糖基化

[0226] 将新的含唾液酸碳水化合物引入蛋白质 (糖工程) 已经显示出改进体内半衰期。这种方法可用于天然糖基化蛋白质或正常情况下缺少糖基化的蛋白质 [Elliott, S., et al., Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. Nat Biotechnol, 2003. 21 (4) : p. 414-21, 通过援引将其公开内容收入本文]。

[0227] 蛋白质的糖基化可以是N连接的或O连接的碳水化合物的形式。典型地, N连接的碳水化合物附着至共有序列 (Asn-X-Ser/Thr), 其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸。O-糖基

化发生于Ser/Thr残基。

[0228] 为了生成糖基化的蛋白质,可能需要引入新的糖基化位点。为了发生糖基化,可以在酵母,昆虫或哺乳动物细胞系统中实施表达。然而,酵母细胞中的糖基化样式不同于哺乳动物细胞,生成高糖基化的蛋白质,与免疫原性升高的风险有关。比较而言,昆虫细胞可能是优选的,因为糖基化样式与哺乳动物细胞中的相似,而细胞周期更短,因此表达过程更快。达依泊汀(darbepoetin)- α 是在CHO细胞中表达的经修饰人促红细胞生成素的一个例子。它含有两个额外的N-糖基化位点,导致体内半衰期延长3倍[Elliott,S.,et al., Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. Nat Biotechnol, 2003. 21 (4):p. 414-21]。

[0229] 糖基化的一种备选方法是将碳水化合物基团化学添加至蛋白质。在这种方法中,表达裸蛋白质,例如在大肠杆菌中。在表达和纯化后,在完全合成的无细胞工艺中糖基化蛋白质。该方法就要添加的碳水化合物的数目,尺寸和类型而言提供极大的灵活性。

[0230] (d) 脂肪酸酰化/肉豆蔻酰化

[0231] 脂肪酸具有高亲和力和高能力的HSA结合。可以利用这一特征来改进蛋白质的半衰期。如此,可以将脂肪酰基附着至蛋白质的氨基酸,如此生成脂肪酰基酰化的蛋白质。在到达循环后,脂肪酰基基团能够结合至循环HSA,导致蛋白质的体内半衰期延长。

[0232] 使用这种方法开发地特胰岛素,它是通过在二甲基甲酰胺/DMSO中用脂肪酸羟基-琥珀酰亚胺酯处理胰岛素在Lys^{B29}处用肉豆蔻酸脂肪酰基酰化的[Kurtzhals,P.,et al., Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo. Biochem J, 1995. 312 (Pt 3):p. 725-31; Hamilton-Wessler,M.,et al., Mechanism of protracted metabolic effects of fatty acid acylated insulin, NN304, in dogs: retention of NN304 by albumin. Diabetologia, 1999. 42 (10):p. 1254-63,通过援引将其公开内容收入本文]。这生成体内半衰期由于HSA的结合而延长的胰岛素类似物。

[0233] (e) 葡聚糖(dextran)

[0234] 葡聚糖导致蛋白质的固定化,导致缓慢释放和由此延长蛋白质的半衰期。葡聚糖-链激酶已经在俄国上市用于溶栓疗法。另外,缀合至葡聚糖的胰岛素,促生长素抑制素(它用于表达促生长素抑制素受体的肿瘤的治疗和诊断)和核糖体灭活性药物天花粉蛋白具有显著延长的半衰期[Baudys,M.,et al., Extending insulin action in vivo by conjugation to carboxymethyl dextran. Bioconjug Chem, 1998. 9 (2):p. 176-83; Chan, W.L.,et al., Lowering of trichosanthin immunogenicity by site-specific coupling to dextran. Biochem Pharmacol, 1999. 57 (8):p. 927-34; Wulbrand,U.,et al., A novel somatostatin conjugate with a high affinity to all five somatostatin receptor subtypes. Cancer, 2002. 94 (4Suppl):p. 1293-7,通过援引将其公开内容收入本文]。

[0235] 在基于蛋白质的药物以外,葡聚糖已经用于改进抗生素和细胞毒性药物的半衰期[Yura,H.,et al., Synthesis and pharmacokinetics of a novel macromolecular prodrug of Tacrolimus (FK506), FK506-dextran conjugate. J Control Release,

1999.57(1):p.87-99;Nakashima,M.,et al.,In vitro characteristics and in vivo plasma disposition of cisplatin conjugated with oxidized and dicarboxymethylated dextrans.Biol Pharm Bull,1999.22(7):p.756-61;Kim,D.S.,Y.J.Jung,and Y.M.Kim,Synthesis and properties of dextran-linked ampicillin Drug Dev Ind Pharm,2001.27(1):p.97-101,通过援引将其公开内容收入本文]。

[0236] 葡聚糖缀合使用高碘酸活化的葡聚糖通过还原性胺化或通过使用溴化氰来进行[Wulbrand,U.,et al.,A novel somatostatin conjugate with a high affinity to all five somatostatin receptor subtypes.Cancer,2002.94(4Suppl):p.1293-7;Kim,D.S.,Y.J.Jung,and Y.M.Kim,Synthesis and properties of dextran-linked ampicillin Drug Dev Ind Pharm,2001.27(1):p.97-101,通过援引将其公开内容收入本文]。所使用的葡聚糖的尺寸可以变化,而且已经使用范围为9至82kDa的葡聚糖[Kim,D.S.,Y.J.Jung,and Y.M.Kim,Synthesis and properties of dextran-linked ampicillin Drug Dev Ind Pharm,2001.27(1):p.97-101;Behe,M.,et al.,Biodistribution,blood half-life,and receptor binding of a somatostatin-dextran conjugate.Med Oncol,2001.18(1):p.59-64,通过援引将其公开内容收入本文]。

[0237] 在改进药物的半衰期以外,葡聚糖缀合物还可以降低免疫原性[Chan,W.L.,et al.,Lowering of trichosanthin immunogenicity by site-specific coupling to dextran.Biochem Pharmacol,1999.57(8):p.927-34,通过援引将其公开内容收入本文]。

[0238] 如此,在本发明的第一个方面的一个实施方案中,本发明的多肽是或包含“融合”多肽。

[0239] 在为了改善药动学特性融合至模块以外,会领会,本发明的多肽也可以融合至诸如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或蛋白A等多肽以易于纯化所述多肽。此类融合物的例子是本领域技术人员公知的。类似地,所述多肽可以融合至寡组氨酸标签,诸如His6,或受到抗体识别的表位,诸如众所周知的Myc标签表位。与所述多肽的任何变体或衍生物的融合也包括在本发明的范围中。会领会,保留或改善期望特性,诸如IL-1R结合特性或体内半衰期的融合物(或其变体,衍生物或融合物)是优选的。

[0240] 如此,融合物可以包含上文详述的氨基酸序列连同别的赋予所述本发明多肽以期望特征的部分;例如,该部分可以是在检测或分离该多肽,或促进该多肽的细胞摄取中有用的。该部分可以是例如生物素模块,放射性模块,发荧光模块,例如小荧光团或绿色荧光蛋白(GFP)荧光团,正如本领域技术人员公知的。该模块可以是免疫原性标签,例如Myc标签,正如本领域技术人员知道的,或者可以是能够促进该多肽的细胞摄取的亲脂性分子或多肽域,正如本领域技术人员知道的。

[0241] 本领域技术人员会领会,本发明的抗体多肽可以包含一种或多种已经修饰或衍生化的氨基酸或由一种或多种已经修饰或衍生化的氨基酸组成。

[0242] 一种或多种氨基酸的化学衍生物可以通过与官能性侧基的反应来实现。此类衍生化分子包括例如那些其中游离氨基基团已经衍生化形成氢氯化胺,对甲苯磺酰基基团,羧基苯甲酸基基团,叔丁氧羰基基团,氯乙酰基基团或甲酰基基团的分子。游离的羧基基团可以衍生化形成盐,甲酯和乙酯或其它类型的酯和酰肼。游离的羟基基团可以衍生化形成O-

酰基或O-烷基衍生物。还作为化学衍生物包括的是那些含有20种标准氨基酸的天然发生氨基酸衍生物的肽。例如：4-羟基脯氨酸可以替代脯氨酸；5-羟基赖氨酸可以替代赖氨酸；3-甲基组氨酸可以替代组氨酸；高丝氨酸可以替代丝氨酸，而鸟氨酸替代赖氨酸。衍生物还包括含有一处或多处添加或删除的肽，只要必要活性得到维持。其它包括的修饰是酰胺化，氨基末端酰化（例如乙酰化或巯基乙酸酰胺化），末端羧基酰胺化（例如用氨或甲胺），和类似末端修饰。

[0243] 本领域技术人员会进一步领会，肽模拟物化合物也可能是有用的。术语‘肽模拟物’指模拟作为治疗剂的特定肽的构象和期望特征的化合物。

[0244] 例如，所述多肽不仅包括其中氨基酸残基通过肽（-CO-NH-）联接连接的分子，而且包括其中肽键是倒转的分子。此类逆反肽模拟物可以使用本领域已知方法生成，例如诸如Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237中记载的那些，通过援引将其收入本文。这种办法涉及生成含有涉及主链，不涉及侧链取向的变化的伪肽。含有NH-CO键代替CO-NH肽键的逆反肽对蛋白分解的抗性高得多。或者，所述多肽可以是肽模拟物化合物，其中一个或多个氨基酸残基是通过-y (CH₂NH)-键替换常规酰胺联接连接的。

[0245] 又或者，可以完全摒弃肽键，前提是使用保留氨基酸残基的碳原子之间的间隔的适直接头模块；该接头模块具有与肽键实质性相同的电荷分布和实质性相同的平面性可能是有益的。

[0246] 还会领会，所述多肽可以方便地在它的N-或C端封闭，从而帮助降低对 外部蛋白分解性消化的易感性。

[0247] 还已经使用多种非编码的或经修饰的氨基酸诸如D-氨基酸和N-甲基氨基酸来修饰哺乳动物肽。另外，假定的生物活性构象可以通过共价修饰，诸如环化或通过引入内酰胺或其它类型的桥来稳定化，例如参见Veber et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2636和Thursell et al., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111: 166, 通过援引将其收入本文。

[0248] 本发明的抗体多肽可以用功能性模块提升以推动它们的预定用途，例如作为诊断剂（例如体内成像剂）或治疗剂。如此，在一个实施方案中，该抗体多肽直接或间接连接至治疗性模块。

[0249] 在一个实施方案中，依照前述权利要求任一项的抗体或其抗原结合片段进一步包含治疗性（例如细胞毒性）模块。

[0250] 可以使用任何合适的治疗性模块。一种合适的治疗性模块是能够降低或抑制生长，或特别地杀死癌细胞（或相关干细胞或祖细胞）的模块。例如，该治疗剂可以是细胞毒性模块。该细胞毒性模块可以包含一种或多种放射性同位素或由一种或多种放射性同位素组成。例如，该一种或多种放射性同位素可以各自独立选自下组：β-发射体，螺旋-发射体，转换电子-发射体，α-发射体，和低光子能量-发射体。可能期望该一种或多种放射性同位素各自独立具有在该药剂附近创建高吸收剂量的局部吸收能量的发射样式。例示性的放射性同位素可以包括远程β-发射体，诸如⁹⁰Y, ³²P, ¹⁸⁶Re/¹⁸⁸Re, ¹⁶⁶Ho, ⁷⁶As/⁷⁷As, ⁸⁹Sr, ¹⁵³Sm；中程β-发射体，诸如¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ⁶⁷Cu, ¹⁶¹Tb, ¹⁰⁵Rh；低能量β-发射体，诸如⁴⁵Ca或³⁵S；转换或螺旋-发射体，诸如⁵¹Cr, ⁶⁷Ga, ⁹⁹Tc^m, ¹¹¹In, ^{114m}In, ¹²³I, ¹²⁵I, ²⁰¹Tl；和α-发射体，诸如²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ac, ²²⁵Ac, ²¹²Pb, ²⁵⁵Fm, ²²³Ra, ¹⁴⁹Tb和²²¹At。其它放射性核素是可得且会有可能用于治疗。

[0251] 在一个优选实施方案中,该抗体多肽连接至放射性同位素¹⁷⁷Lu (或以其它方式用放射性同位素¹⁷⁷Lu标记)。

[0252] 或者,该治疗模块可以包含一种或多种治疗性(诸如细胞毒性)药物或由一种或多种治疗性(诸如细胞毒性)药物组成,例如,细胞抑制性药物;抗雄激素药物;可的松和其衍生物;膦酸盐/酯;甾酮-5- α -还原酶抑制剂;硼附加物;细胞因子;毒胡萝卜素和它的代谢物;毒素(诸如皂草素或刺孢霉素);化疗剂(诸如抗代谢物);或在癌症治疗中有用的任何其它治疗性或细胞毒性药物。

[0253] 例示性的治疗性/细胞毒性药物可以包括例如:

[0254] • 细胞抑制剂,特别是那些具有剂量限制性副作用的,包括但不限于环磷酰胺,苯丁酸氮芥,异环磷酰胺,重硫酸盐(busulphane),洛莫司汀,紫杉烷,雌莫司汀磷酸盐和其它氮芥,抗生素(包括多柔比星,刺孢霉素和埃斯波霉素),长春花生物碱,氮丙啶,含铂化合物,内皮抑素,烷基磺酸酯,亚硝基脲,三氮烯,叶酸类似物,嘧啶类似物,嘌呤类似物,酶,取代的脲,甲基胍衍生物,柔红霉素,两亲胺,

[0255] • 抗雄激素,诸如氟他胺和比卡鲁胺和其代谢物;

[0256] • 可的松和其衍生物;

[0257] • 膦酸盐/酯,诸如二膦酸盐/酯和双膦酸盐/酯(buphosphonate);

[0258] • 甾酮-5- α -还原酶抑制剂;

[0259] • 硼附加物;

[0260] • 细胞因子;

[0261] • 毒胡萝卜素和它的代谢物。

[0262] 或者,该细胞毒性模块可以包含一种或多种适合于激活疗法,诸如光子激活疗法,中子激活疗法,中子引发的螺旋电子疗法,同步加速器辐照疗法或低能量X-射线光子激活疗法中使用的模块或由其组成。

[0263] 例如,凭借本发明的抗体多肽,会有可能使用同步加速器放射(或低能量X-射线)作为放射疗法的进步,主要聚焦于所谓的光激活放射疗法(PAT),其中来自外部X-射线辐照的局部能量沉积通过与预施用的高Z肿瘤靶向剂的相互作用在癌组织中增强。

[0264] PAT治疗模态利用来自同步加速器来源的单色X-射线,诸如由格勒诺布尔的欧洲同步加速器辐射设施(ESRF)的ID17生物学束线提供的,和预期在将来的其它设施可得的,诸如新的瑞典同步加速器设施,Max-IV。

[0265] 要在兰德的即将到来的欧洲裂变源(ESS)进行的关于“诱发的螺旋电子肿瘤疗法”的研究提供又一种潜在治疗模态。反应堆生成的热和半热中子长久以来已经用于硼-中子-捕捉-疗法,BNCT,用于临床前实验和用于用给出高局部吸收能量的诱发的 α -粒子和反冲核(⁷L)治疗脑肿瘤二者。一种类似的办法是使用中子和合适的用对中子具有高有效截面的稳定的核标记的肿瘤靶向分子。例如,抗体或肽可以用稳定的钆(¹⁵⁷Gd)标记并作为由Gd核捕捉的中子的靶分子起作用,所谓的钆中子捕捉疗法(GdNCT)。通过蒙特卡洛技术,计算肿瘤和周围组织中的剂量分布,它源自 γ -光子,中子,核反冲,以及来自钆或其它潜在元素的特征性x-射线,内部转换和螺旋-电子。

[0266] 任选地,本发明的抗体多肽可以进一步包含可检测模块。例如,可检测模块可以包含放射性同位素或由辐照组成,诸如选自下组的放射性同位素:^{99m}Tc,¹¹¹In,⁶⁷Ga,⁶⁸Ga,

^{72}As , ^{89}Zr , ^{123}I 和 ^{201}Tl 。任选地, 该药剂可以包含一对可检测的和细胞毒性的放射性核素, 诸如 $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ 或 $^{124}\text{I}/^{211}\text{At}$ 。或者, 该抗体多肽可以包含能够以多模态方式作为可检测模块和还作为细胞毒性模块同时起作用的放射性同位素以提供所谓的“多模态治疗剂”。该结合模块可以如此偶联至具有多重成像 (例如 SPECT, PET, MRI, 光学, 或超声波) 的能力连同使用细胞毒性药物, 诸如放射性核素或活性疗法药剂的治疗能力的纳米颗粒。

[0267] 或者, 该可检测模块可以包含顺磁性同位素或由顺磁性同位素组成, 诸如选自下组的顺磁性同位素: ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr 和 ^{56}Fe 。

[0268] 在该抗体多肽包含可检测模块的情况中, 该可检测模块可以通过成像技术诸如 SPECT, PET, MRI, 光学或超声波成像可检测的。

[0269] 治疗性和/或可检测模块 (诸如放射性同位素, 细胞毒性模块, 诸如此类) 可以直接或间接连接至抗体或其片段。合适的接头是本领域知道的, 而且包括例如辅基, 非酚接头 (N-琥珀酰亚胺基-苯甲酸酯; 十二硼酸的衍生物), 大环和五环螯合剂二者的螯合模块, 诸如 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA) 的衍生物, 去铁胺 (DFO), 二乙撑三胺五乙酸 (DTPA) 的衍生物, S-2-(4-异硫氰基苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸 (NOTA) 的衍生物和 1,4,8,11-四氮杂环十二烷-1,4,8,11-四乙酸 (TETA) 的衍生物, 3,6,9,15-四氮杂双环[9.3.1]-十五碳-1(15),11,13-三烯-4-(S)-(4-异硫氰基苄基)-3,6,9-三乙酸 (PCTA) 的衍生物, 5-S-(4-氨基苄基)-1-氧杂-4,7,10-三氮杂环十二烷-4,7,10-三乙酸 (DO3A) 的衍生物和其它螯合模块。

[0270] 一种优选的接头是 DTPA, 例如如 ^{177}Lu -DTPA-[本发明的抗体多肽] 中使用的。又一种优选的接头是去铁胺, DFO, 例如如 ^{89}Zr -DFO-[本发明的抗体多肽] 中使用的。

[0271] 然而, 本领域技术人员会领会, 本发明的抗体多肽的一些医学用途会不需要细胞毒性或诊断性模块的存在。

[0272] 如此, 在本发明抗体的治疗效果通过抑制 IL-1 信号传导 (或 IL-33 和/或 IL-36 信号传导) 来介导的情况中, ‘裸’ 抗体多肽可能是合适的。例如, 在治疗效果通过本发明抗体对免疫细胞的直接效果来介导的情况中, 例如降低炎症, 抗体缺少任何细胞毒性活性可能是有利的。

[0273] 如上文讨论的, 用于生成本发明抗体多肽的方法是本领域公知的。

[0274] 方便地, 该抗体多肽是或包含重组多肽。用于生成此类重组多肽的合适方法是本领域公知的, 诸如在原核或真核宿主细胞中表达 (例如参见 Green&Sambrook, 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Fourth Edition, Cold Spring Harbor, New York, 据此通过援引收录该文件中的有关公开内容)。

[0275] 本发明的抗体多肽也可以使用商品化的体外翻译系统来生成, 诸如家兔网织红细胞裂解物或小麦胚芽裂解物 (自 Promega 可得)。优选的是, 该翻译系统是家兔网织红细胞裂解物。方便地, 该翻译系统可以偶联转录系统, 诸如 TNT 转录-翻译系统 (Promega)。这种系统具有在与翻译相同的反应中自编码 DNA 多核苷酸生成合适的 mRNA 转录物的优点。

[0276] 本领域技术人员会领会, 或者, 本发明的抗体多肽可以人工合成, 例如使用公知的液相或固相合成技术 (诸如 t-Boc 或 Fmoc 固相肽合成)。

[0277] 本发明的第二个方面提供一种分离的核酸分子, 其编码本发明的第一个方面的抗体或抗原结合片段, 或其成分多肽链。“核酸分子” 包括 DNA (例如基因组 DNA 或互补 DNA) 和

mRNA分子,其可以是单链的或双链的。“分离的”意味着该核酸分子并非位于细胞内或以其它方式在细胞内提供。

[0278] 在一个实施方案中,该核酸分子是cDNA分子。

[0279] 本领域技术人员会领会,该核酸分子可以是为了在特定的宿主细胞中,例如在人细胞中表达该抗体多肽经过密码子优化的(例如参见Angov,2011,Biotechnol.J.6(6):650-659,通过援引将其公开内容收入本文)。

[0280] 本发明的范围内还包括下述:

[0281] (a) 本发明的第三个方面提供一种载体(诸如表达载体,其包含依照本发明的第二个方面的核酸分子;

[0282] (b) 本发明的第四个方面提供一种宿主细胞(诸如哺乳动物细胞,例如人细胞,或中国仓鼠卵巢细胞,例如CHOK1SV细胞),其包含依照本发明的第二个方面的核酸分子或依照本发明的第三个方面的载体;和

[0283] (c) 本发明的第五个方面提供一种生成依照本发明的第一个方面的抗体多肽的方法,其包括在所述多肽表达的条件下培养一群依照本发明的第四个方面的宿主细胞,并自其分离该多肽。

[0284] 本发明的第六个方面提供一种药物组合物,其包含药学有效量的依照本发明的第一个方面的抗体或抗原结合片段和药学可接受稀释剂,载剂,佐剂或赋形剂。

[0285] 本领域技术人员会领会,该药物组合物中还可以包括别的化合物,包括螯合剂诸如EDTA,柠檬酸盐,EGTA或谷胱甘肽。

[0286] 该药物组合物可以以本领域已知方式制备,其是足够贮存稳定的且适合施用于人和动物。例如,该药物组合物可以是冻干的,例如经由冷冻干燥,喷射干燥,喷射冷却,或经由使用来自超临界颗粒形成的颗粒形成。

[0287] “药学可接受的”意味着不降低本发明的抗体多肽的IL1RAP结合活性的有效性的无毒材料。此类药学可接受缓冲剂,载剂或赋形剂是本领域公知的(参见Remington's Pharmaceutical Sciences,18th edition,A.R Gennaro,Ed.,Mack Publishing Company (1990)和Handbook of Pharmaceutical Excipients,3rd edition,A.Kibbe,Ed.,Pharmaceutical Press (2000),通过援引将其公开内容收入本文)。

[0288] 术语“缓冲液”意图表示含有酸-碱混合物,目的是稳定pH的水溶液。缓冲液的例子有Trizma,Bicine,Tricine,MOPS,MOPSO,MOBS,Tris,Hepes,HEPBS,MES,磷酸盐,碳酸盐,乙酸盐,柠檬酸盐,乙醇酸盐,乳酸盐,硼酸盐,ACES,ADA,酒石酸盐,AMP,AMPD,AMPSO,BES,CABS,二甲胍酸盐,CHES,DIPSO,EPPS,乙醇胺,甘氨酸,HEPPSO,咪唑,咪唑乳酸,PIPES,SSC,SSPE,POPSO,TAPS,TABS,TAPSO和TES。

[0289] 术语“稀释剂”意图表示目的是稀释药物制剂中的抗体多肽的水溶液或非水溶液。稀释剂可以是盐水,水,聚乙二醇,丙二醇,乙醇或油(诸如红花油,玉米油,花生油,棉籽油或芝麻油)中的一项或多项。

[0290] 术语“佐剂”意图表示添加至配制剂以提高本发明的抗体多肽的生物学效果的任何化合物。佐剂可以是具有不同阴离子的锌,铜或银盐中的一项或多项,其中阴离子例如但不限于氟化物,氯化物,溴化物,碘化物,硫氰酸盐,亚硫酸盐,氢氧化物,磷酸盐,碳酸盐,乳酸盐,乙醇酸盐,柠檬酸盐,硼酸盐,酒石酸盐,和不同酰基组成的乙酸盐。佐剂也可以是阳

离子聚合物,诸如阳离子纤维素醚,阳离子纤维素酯,脱乙酰化透明质酸,壳聚糖,阳离子树状聚物,阳离子合成聚合物诸如聚(乙烯基咪唑),和阳离子多肽诸如多组氨酸,多赖氨酸,多精氨酸,和含有这些氨基酸的肽。

[0291] 赋形剂可以是碳水化合物,聚合物,脂质和矿物质中的一项或多项。碳水化合物的例子包括乳糖,葡萄糖,蔗糖,甘露醇,和环糊精,它们例如为了易于冻干而添加至组合物。聚合物的例子有淀粉,纤维素醚,纤维素羧甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,羟乙基纤维素,乙基羟乙基纤维素,藻酸盐,角叉菜胶,透明质酸和其衍生物,聚丙烯酸,聚磺酸,聚乙二醇/聚环氧乙烷,聚环氧乙烷/聚环氧丙烷共聚物,不同水解程度的聚乙烯醇/聚乙酸乙烯酯,和聚乙烯吡咯烷酮,均为不同分子量,它们例如为了粘度控制,为了实现生物粘附,或为了保护脂质免于化学和蛋白分解性降解而添加至组合物。脂质的例子有脂肪酸,磷脂,单,二,和三酸甘油酯,神经酰胺,鞘脂和糖脂,均为不同酰基链长度和饱和度,蛋卵磷脂,大豆卵磷脂,氢化的蛋和大豆卵磷脂,它们为了与聚合物的原因相似的原因而添加至组合物。矿物质的例子有滑石,氧化镁,氧化锌和氧化钛,它们为了获得诸如减少液体积聚或有利的色素特性等好处而添加至组合物,。

[0292] 本发明的抗体多肽可以配制成任何类型的本领域已知的适合投递其的药物组合物。

[0293] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物可以是脂质体的形式,其中在其它药学可接受载剂以外,组合该抗体多肽与两性剂,诸如脂质,其以聚集形式作为微团,不溶性单层和液晶存在。对于脂质体制剂合适的脂质包括但不限于甘油单酯,甘油二酯,硫脑苷脂,溶血卵磷脂,磷脂,皂苷,胆汁酸,等等。合适的脂质还包括在极性首基中通过聚(乙二醇)修饰以延长血流循环时间的上述脂质。此类脂质体制剂的制备可以见例如US 4,235,871,通过援引将其公开内容收入本文。

[0294] 本发明的药物组合物也可以是生物可降解微球体的形式。脂肪族聚酯,诸如聚(乳酸)(PLA),聚(乙醇酸)(PGA),PLA和PGA的共聚物(PLGA)或聚(己内酯)(PCL),和聚酐已经广泛作为生物可降解聚合物用于生产微球体。此类微球体的制剂可以见US 5,851,451和EP 0 213 303,通过援引将其公开内容收入本文。

[0295] 在又一个实施方案中,本发明的药物组合物以聚合物凝胶的形式提供,其中使用聚合物诸如淀粉,纤维素醚,纤维素羧甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,羟乙基纤维素,乙基羟乙基纤维素,藻酸盐,角叉菜胶,透明质酸和其衍生物,聚丙烯酸,聚乙烯基咪唑,聚磺酸,聚乙二醇/聚环氧乙烷,聚环氧乙烷/聚环氧丙烷共聚物,不同水解程度的聚乙烯醇/聚乙酸乙烯酯,和聚乙烯吡咯烷酮来增稠含有该药剂的溶液。该聚合物也可以包含明胶或胶原。

[0296] 或者,该抗体多肽可以仅仅在盐水,水,聚乙二醇,丙二醇,乙醇或油(诸如红花油,玉米油,花生油,棉籽油或芝麻油),黄蓍胶,和/或各种缓冲液中溶解。

[0297] 会领会,本发明的药物组合物可以包括用于增强活性抗体多肽作用的离子和限定pH。另外,该组合物可以经受常规制药学操作,诸如杀菌和/或可以含有常规佐剂诸如防腐剂,稳定剂,润湿剂,乳化剂,缓冲剂,填充剂,等。

[0298] 依照本发明的药物组合物可以经本领域技术人员知道的任何合适路径来施用。如此,可能的施用路径包括胃肠外(静脉内,皮下,和肌肉内),表面,眼,鼻,肺,口腔,口服,胃

肠外,阴道和直肠。来自植入物的施用也是可能的。

[0299] 在一个优选实施方案中,该药物组合物胃肠外施用,例如静脉内,脑室内,关节内,动脉内,腹膜内,鞘内,心室内,胸骨内,颅内,肌肉内或皮下,或者它们可以通过输注技术来施用。它们以无菌水溶液的形式方便地使用,其可以含有其它物质,例如,足够的盐或葡萄糖以使该溶液与血液等张。在必要时,水溶液应当适当缓冲(优选至pH 3至9)。合适的胃肠外配制剂在无菌条件下的制备易于通过本领域技术人员公知的标准制药技术来完成。

[0300] 适合于胃肠外施用的配制剂包括无菌注射水和非水溶液,其可以含有抗氧化剂,缓冲剂,抑菌剂和使得该配制剂与预定受众的血液等张的溶质;和无菌水和非水悬浮液,其可以包括悬浮剂和增稠剂。该配制剂可以以单位剂量或多个剂量容器呈现,例如密封的安瓿和管形瓶,而且可以在冷冻-干燥(冻干)条件中贮存,只需要临使用前添加无菌液体载剂,例如注射用水。即席注射溶液和悬浮液可以自先前描述种类的无菌粉剂,颗粒剂和片剂制备。

[0301] 如此,本发明的药物组合物特别适合于胃肠外,例如静脉内施用。

[0302] 或者,该药物组合物可以鼻内或通过吸入来施用(例如,使用合适的推进剂,诸如二氯二氟甲烷,三氯氟甲烷,二氯四氟乙烷,氢氟烷诸如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134A3或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(HFA 227EA3),二氧化碳或其它合适气体,以来自增压容器,泵,喷射或雾化器的气雾剂喷射呈现的形式)。在增压气雾剂的情况中,通过提供阀来投递计量的量,可以确定剂量单位。该增压容器,泵,喷射或雾化器可以含有该活性多肽的溶液或悬浮液,例如使用乙醇和推进剂的混合物作为溶剂,其可以另外含有润滑剂,例如山梨聚糖三油酸酯。供吸入器或吹入器中使用的胶囊和筒(例如自明胶生成)可以配制成含有本发明的化合物和合适的粉剂基材诸如乳糖或淀粉的粉剂混合物。

[0303] 气雾剂或干粉剂配制剂优选安排成使得每个计量的剂量或‘喷’含有至少1mg本发明化合物以投递于患者。会领会,气雾剂的总体日剂量会随患者而变化,而且可以以单剂或更加常见地以贯穿该天的多个分剂施用。

[0304] 或者,本发明的抗体多肽可以以栓剂或阴道栓剂的形式施用,或者它们可以以洗剂,液剂,乳膏剂,软膏剂或扑粉剂的形式表面应用。本发明的化合物也可以经皮施用,例如通过使用皮肤贴剂。它们也可以通过眼路径来施用。

[0305] 对于眼科使用,本发明的抗体多肽可以配制成等张的,pH调节的,无菌盐水中的微粉化悬浮液或优选等张的,pH调节的,无菌盐水中的溶液,任选与防腐剂诸如苯扎氯铵组合。或者,它们可以在软膏剂诸如凡士林(petrolatum)中配制。

[0306] 对于表面应用于皮肤,本发明的抗体多肽可以配制成合适的含有活性化合物的软膏剂,其中活性化合物在例如与下述一项或多项的混合物中悬浮或溶解:矿物油,液体凡士林,白凡士林,丙二醇,聚氧乙烯聚氧丙烯化合物,乳化蜡和水。或者,它们可以配制成合适的洗剂或乳膏剂,在例如下述一项或多项的混合物中悬浮或溶解:矿物油,山梨聚糖单硬脂酸酯,聚乙二醇,液体石蜡,聚山梨酯60,鲸蜡硬脂醇,鲸蜡硬脂醇,2-辛基十二烷醇,苯甲醇和水。

[0307] 该药物组合物会以药学有效剂量施用于患者。如本文中使用的,‘治疗有效量’,或‘有效量’,或‘治疗有效’指对于给定状况和施用方案提供治疗效果的数量。这是预先确定的活性材料的数量,计算为联合需要的添加剂和稀释剂,即载剂或施用媒介产生期望的治疗

效果。进一步地,它意图表示足以降低和最优选预防宿主活性,功能和响应的临床显著缺乏的量。或者,治疗有效量足以引起宿主中临床显著状况的改善。正如本领域技术人员领会的,化合物的量可以依赖于它的比活性而变化。合适的剂量的量可以含有预先确定数量的活性组合物,计算为联合需要的稀释剂产生期望的治疗效果。在本发明的方法和制造组合物的用途中,提供治疗有效量的活性成分。治疗有效量可以由普通技能的医学或兽医工作者基于患者特征(诸如年龄,重量,性别,状况,并发症,其它疾病,等)来确定,正如本领域公知的。药学有效剂量的施用可以通过以单独剂量单位的形式单次施用或其它情况数个更小的剂量单位且同样通过以特定间隔多次施用再分剂二者来进行。或者,可以作为延长时段上的连续输注来提供剂量。

[0308] 在本发明的抗体多肽的诊断性用途的背景中,如本文中使用的,‘药学有效量’,或‘有效量’,或‘诊断有效’指为诊断,例如为体内成像目的提供可检测信号的量。

[0309] 该抗体多肽可以以各种浓度配制,取决于所使用的多肽的功效/毒性。例如,该配制剂可以以介于0.1 μ M和1mM之间,更优选介于1 μ M和500 μ M之间,介于500 μ M和1mM之间,介于300 μ M和700 μ M之间,介于1 μ M和100 μ M之间,介于100 μ M和200 μ M之间,介于200 μ M和300 μ M之间,介于300 μ M和400 μ M之间,介于400 μ M和500 μ M之间,介于500 μ M和600 μ M之间,介于600 μ M和700 μ M之间,介于800 μ M和900 μ M之间或介于900 μ M和1mM之间的浓度包含活性抗体多肽。典型地,该配制剂以介于300 μ M和700 μ M之间的浓度包含活性抗体多肽。

[0310] 典型地,该抗体多肽(有或无治疗性模块)在人患者中的治疗剂量会在100 μ g至1g每次施用(基于体重70kg,例如介于300 μ g至700mg之间每次施用)的范围中。例如,最大治疗剂量可以在0.1至10mg/kg每次施用的范围中,例如介于0.1和5mg/kg之间或介于1和5mg/kg之间或介于0.1和2mg/kg之间。会领会,此类剂量可以以不同间隔施用,如由肿瘤学家/内科医生确定的;例如,可以每天,每周两次,每周,每两周或每月施用一剂。

[0311] 本领域技术人员会领会,本发明的药物组合物可以单独施用或与癌症治疗中使用的其它治疗剂组合施用,诸如抗代谢物,烷化剂,蒽环类药物和其它细胞毒性抗生素,长春花生物碱,依托泊苷,铂化合物,紫杉烷,拓扑异构酶I抑制剂,抗增殖免疫抑制剂,皮质类固醇,性激素和激素拮抗剂,和其它治疗性抗体(如曲妥珠单抗)。

[0312] 本领域技术人员会进一步领会,本发明的多肽和药物配制剂在医学和兽医领域二者中具有效用。如此,本发明的方法可用于治疗人和非人动物(诸如马,犬和猫)二者。然而,优选的是,患者是人。

[0313] 对于兽医用途,本发明的化合物作为恰当可接受配制剂依照常规兽医实践来施用,而且兽医外科医生会决定剂量方案和施用路径,它们会是对特定的动物最适宜的。

[0314] 本发明的第七个方面提供依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段,其用于医药。

[0315] 在一个实施方案中,本发明的抗体多肽和配制剂可以用于治疗罹患或有风险患上IL1RAP作为生物标志物的疾病或适应证的患者或受试者。

[0316] 如此,本发明的相关的第八个方面提供依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段,其用于对受试者中与赘生性病症有关的病理性细胞,或干细胞或祖细胞诱导细胞死亡和/或抑制生长和/或增殖,其中该细胞表达IL1RAP。

[0317] 本发明的又一个相关的第九个方面提供依照本发明的第一个方面的抗体或抗原

结合片段,其用于在受试者中治疗和/或诊断赘生性病症,其中该赘生性病症与表达IL1RAP的细胞有关。

[0318] “治疗”包括对患者的治疗性和预防性处理二者。术语“预防性”用于涵盖本文中描述的药剂或其配制剂在患者或受试者中预防赘生性病症或癌细胞扩散,传播,或转移或降低赘生性病症或癌细胞扩散,传播,或转移可能性的用途。术语“预防性”还涵盖本文中描述的药剂或其配制剂在先前已经治疗过赘生性病症的患者中预防赘生性病症复发的用途。

[0319] “诊断”包括在体内(即在患者的身体内)或离体(即在自患者的身体取出的组织或细胞样品内)检测癌性细胞。

[0320] “与表达IL1RAP的细胞有关的赘生性病症”包括此类病症,其中直接或间接对该病症负有责任的病理性细胞在该细胞表面上表达IL1RAP。会领会,该表达IL1RAP的细胞可以是癌细胞,例如肿瘤细胞本身。另外,此类细胞包括直接或间接对个体中赘生性病症的发生负有责任的病理性干细胞(即癌干细胞,或CSC)和祖细胞。CSC的例子披露于Visvader&Lindeman,2008,Nat Rev Cancer 8:755-768,通过援引将其公开内容收入本文。

[0321] 或者或另外,该表达IL1RAP的细胞可以与该赘生性病症间接相关,例如,它们可以介导赘生性细胞存活需要的细胞过程。本发明的抗体药剂可以在这一事件中靶向对肿瘤的血供(血管发生)至关重要的细胞或抑制针对恶性细胞(例如遏制性巨噬细胞或T-细胞)的有益免疫应答的细胞。

[0322] 根据治疗上是否想要杀死表达IL1RAP的靶细胞,可以使用依照本发明的第一个方面的抗体或抗原结合片段,它能够诱导ADCC。例如,在表达IL1RAP的靶细胞是癌细胞(诸如CML,AML,ALL,黑素瘤,肺癌细胞,等)的情况下,该抗体或抗原结合片段能够诱导ADCC以消除此类细胞可能是有利的。然而,会领会,治疗好处也可以使用缺乏ADCC活性的抗体或抗原结合片段来实现,例如经由抑制IL-1(或IL-33或IL-36)信号传导,导致肿瘤附近的血管发生降低。

[0323] 在一个实施方案中,该赘生性病症是赘生性血液学病症。

[0324] 例如,该抗体或其抗原结合片段可以用于治疗和/或诊断选自下组的赘生性病症:慢性髓细胞样白血病(CML),骨髓增生性病症(MPD),骨髓增生异常综合征(MDS),急性成淋巴细胞性白血病(ALL)和急性髓细胞样白血病(AML)。

[0325] 在又一个实施方案中,该抗体或其抗原结合片段用于治疗 and/或诊断受试者的身体内与实体瘤的形成有关的赘生性病症。

[0326] 如此,该抗体或其抗原结合片段可以用于治疗选自下组的赘生性病症:前列腺癌,乳腺癌,肺癌,结直肠癌,黑素瘤,膀胱癌,脑/CNS癌,宫颈癌,食道癌,胃癌,头/颈癌,肾癌,肝癌,淋巴瘤,卵巢癌,胰腺癌,和肉瘤。

[0327] 与本发明的治疗性和预防性方面有关,本领域技术人员会领会,该抗体多肽对与该赘生性病症有关的细胞的表面上存在的IL1RAP的结合可导致对IL1RAP的生物学活性的调控(即升高或降低)。然而,此类调控效果不是必需的;例如,本发明的抗体多肽可仅仅凭借对与实体瘤有关的细胞的表面上的IL1RAP的结合(其继而可以触发免疫系统诱导细胞死亡(例如通过ADCC和/或通过药剂内细胞毒性/发射性模块的存在))引发治疗性和预防性效果。

[0328] “IL1RAP的生物学活性”包括牵涉与赘生性病症有关的细胞上的IL1RAP的任何相

互作用或信号传导事件。例如,在一个实施方案中,该抗体多肽能够阻断一种或多种共同受体对IL1RAP(诸如IL1R1,ST2,C-KIT和/或IL1RL2)的结合。

[0329] 本发明的抗体多肽对IL1RAP的生物学活性的此类抑制可以是完全的或部分的。例如,与未曾暴露于该抗体多肽的与该赘生性病症有关的细胞中IL1RAP的生物学活性相比,该药剂可以将IL1RAP的生物学活性抑制至少10%,优选至少20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%或90%,和最优选100%。在一个优选实施方案中,与未曾暴露于该抗体多肽的与该赘生性病症有关的细胞中IL1RAP的生物学活性相比,该抗体多肽能够将IL1RAP的生物学活性抑制50%或更多。

[0330] 同样,会领会,对与该赘生性病症有关的细胞的生长和/或增殖的抑制可以是完全的或部分的。例如,与未曾暴露于该抗体多肽的与该赘生性病症有关的细胞的生长和/或增殖相比,该抗体多肽可以将与该赘生性病症有关的细胞的生长和/或增殖抑制至少10%,优选至少20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%或90%,和最优选100%。

[0331] 本发明的第十个方面提供依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段,其用于制备在受试者中治疗或诊断赘生性病症的药物,其中该赘生性病症与表达IL1RAP的细胞有关的。

[0332] 在一个实施方案中,该赘生性病症是赘生性血液学病症。

[0333] 例如,该抗体或其抗原结合片段可以用于治疗和/或诊断选自下组的赘生性病症:慢性髓细胞样白血病(CML),骨髓增生性病症(MPD),骨髓增生异常综合征(MDS),急性成淋巴细胞性白血病(ALL)和急性髓细胞样白血病(AML)。

[0334] 在又一个实施方案中,该抗体或其抗原结合片段用于治疗 and/或诊断受试者的身体内与实体瘤的形成有关的赘生性病症。

[0335] 如此,该抗体或其抗原结合片段可以用于治疗选自下组的赘生性病症:前列腺癌,乳腺癌,肺癌,结直肠癌,黑素瘤,膀胱癌,脑/CNS癌,宫颈癌,食道癌,胃癌,头/颈癌,肾癌,肝癌,淋巴瘤,卵巢癌,胰腺癌,和肉瘤。

[0336] 本发明的第十一个方面提供用于在受试者中治疗或诊断赘生性病症的方法,其包括对该受试者施用有效量的依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段的步骤,其中该赘生性病症与表达IL1RAP的细胞有关。

[0337] 在一个实施方案中,该赘生性病症是赘生性血液学病症。

[0338] 例如,该方法可以用于治疗和/或诊断选自下组的赘生性病症:慢性髓细胞样白血病(CML),骨髓增生性病症(MPD),骨髓增生异常综合征(MDS),急性成淋巴细胞性白血病(ALL)和急性髓细胞样白血病(AML)。

[0339] 在又一个实施方案中,该方法用于治疗 and/或诊断受试者的身体内与实体瘤的形成有关的赘生性病症。

[0340] 如此,该方法可以用于治疗选自下组的赘生性病症:前列腺癌,乳腺癌,肺癌,结直肠癌,黑素瘤,膀胱癌,脑/CNS癌,宫颈癌,食道癌,胃癌,头/颈癌,肾癌,肝癌,淋巴瘤,卵巢癌,胰腺癌,和肉瘤。

[0341] 在又一个实施方案中,本发明的抗体多肽和配制剂可以用于治疗罹患或有风险患上对IL-1(或IL-33或IL-36)信号传导的抑制剂治疗易感的疾病或状况的患者或受试者。

[0342] 如此,本发明的第十二个方面提供依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合

片段,其用于治疗对用IL-1信号传导的抑制剂治疗易感的疾病或状况。

[0343] 此类状况或疾病状态是本领域公知的(参见Dinarello et al.,2012,Nature Reviews 11:633-652和Dinarello,2014,Mol.Med.20 (suppl.1):S43-S58,通过援引将其公开内容收入本文),而且包括但不限于下述:

[0344] 类风湿性关节炎,所有类型的幼年型关节炎,包括系统性发作幼年型特发性关节炎(SOJIA),骨关节炎,家族性寒冷自身炎症综合征(FCAS),穆-韦(Muckle-Wells)病,新生儿发作多系统炎性疾病(NOMID),家族性地中海热(FMF),化脓性关节炎坏疽性脓皮症和瘰疬(PAPA)综合征,成人发作斯提耳(Still)氏病,高IgD综合征,2型糖尿病,巨噬细胞活化综合征,TNF受体相关周期性综合征,布劳(Blau)病,强直性脊柱炎,Sweets病,狼疮关节炎,阿尔茨海默(Alzheimer)氏病,银屑病,哮喘,动脉粥样硬化,结节病,特应性皮炎,系统性红斑狼疮,大疱性类天疱疮,I型糖尿病,慢性阻塞性肺病,幽门螺旋杆菌胃炎,炎性肠病(包括溃疡性结肠炎和克罗恩(Crohn)氏病),丙型肝炎,缺血-再灌注损伤,多发性硬化,奈瑟球菌或肺炎球菌脑膜炎,结核病,白塞(Bechet)氏综合征,败血性休克,移植物抗宿主病,哮喘,I型糖尿病,阿尔茨海默(Alzheimer)氏病,动脉粥样硬化,成人T细胞白血病,多发性骨髓瘤,牙周炎,肥胖和肥胖相关疾病(例如,代谢综合征,心肥大,充血性心力衰竭,静脉曲张,多囊卵巢综合征,胃食管反流疾病(GERD),脂肪肝疾病,结直肠癌,乳腺癌,子宫癌,慢性肾衰竭,中风和高尿酸血症),椎间盘疾病,肠易激综合征,施尼茨勒(Schnitzler)综合征,变态反应/特应性皮炎和痛风。

[0345] 还认为阻断IL-1信号传导在治疗心肌梗死中是有益的。一项广泛的临床试验当前正在试图确认心肌梗死后IL1B抗体阻断的功效(使用Canakinumab)(CANTOS试验;参Ridker et al.,2011,Am Heart Journal 162(4):597-605,通过援引将其公开内容收入本文)。

[0346] 对于此类适应证,会领会,治疗好处也可以使用结合IL1RAP并由此阻断与免疫细胞有关的IL-1(或IL-33或IL-36)信号传导的抗体或抗原结合片段来实现。可以修饰此类抗体以缺乏ADCC活性。

[0347] 本发明的第十三个方面提供依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段制备用于治疗对用IL-1(或IL_33或IL-36)信号传导的抑制剂治疗易感的疾病或状况的药物的用途。

[0348] 本发明的第十四个方面提供用于在受试者中治疗对用IL-1(或IL_33或IL-36)信号传导的抑制剂治疗易感的疾病或状况的方法,其包括对该受试者施用有效量的依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段的步骤。

[0349] 本发明的第十五个方面提供用于受试者中对用IL-1(或IL-33或IL-36)信号传导的抑制剂治疗易感的疾病或状况的ADCC介导的治疗或提升的方法,其包括对该受试者施用有效量的依照本发明的第一个方面的能够诱导ADCC的抗体或其抗原结合片段的步骤。

[0350] 本发明的第十六个方面提供用于在受试者中检测癌细胞的体外方法,该方法包括:

[0351] (a) 提供来自要测试的受试者的细胞(例如白血干/祖细胞或活检组织)的样品;

[0352] (b) 任选地,提取和/或纯化该样品中存在的该细胞;

[0353] (c) 使依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段接触该样品中存在的细

胞；

[0354] (d) 测定该抗体多肽是否结合该细胞，

[0355] 其中该抗体多肽对该细胞的结合指示受试者的组织中存在癌细胞。

[0356] 本发明的第十七个方面提供用于鉴定会受益于用依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段治疗的癌症患者的体外方法，该方法包括：

[0357] (a) 提供来自要测试的患者的癌细胞（例如白血干/祖细胞或活检组织）的样品；

[0358] (b) 任选地，提取和/或纯化该样品中存在的该细胞；

[0359] (c) 使依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段接触该样品中存在的细胞；

[0360] (d) 测定该抗体多肽是否结合该细胞，

[0361] 其中该抗体多肽对该癌细胞的结合指示患者会受益于用依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段治疗。

[0362] 本领域技术人员会领会，有许多方式来实施此类测定法。例如，该免疫测定法可以是同质的或更优选异质的。该测定法也可以以竞争性或更优选非竞争性型式实施。

[0363] 在一个实施方案中，来自患者的血液样品（白血病）或活检（实体瘤）上表达的IL1RAP是使用流式细胞术或免疫组织化学测量的，超出阈值的表达指示患者会受益于用依照本发明的第一个方面的抗体或其抗原结合片段治疗。

[0364] 在上述体外方法的优选实施方案中，步骤(d)是通过流式细胞术，免疫组织化学或ELISA实施的。

[0365] 然而，可以使用对于在体外检测抗体-抗原相互作用合适的其它测定法。

[0366] 本发明的第十八个方面提供用于治疗癌症患者的方法，该方法包括对使用依照本发明的第十六个或第十七个方面的方法鉴定为具有癌症的受试者施用有效治疗所述癌症的治疗剂。在一个实施方案中，例示性的治疗剂是依照本发明的第一个方面的抗体多肽。

[0367] 在一个实施方案中，该方法包括：

[0368] (a) 使用依照本发明的第十六个或第十七个方面的方法对来自要测试的受试者的样品细胞（例如白血干/祖细胞或活检组织）排列超出阈值标准表达IL1RAP的癌细胞的存在；

[0369] (b) 选择如下的受试者进行治疗，该受试者在步骤(a)中测试的样品细胞含有具有超出阈值标准的IL1RAP表达的癌细胞；和

[0370] (c) 对步骤(b)中选择的受试者施用有效治疗所述癌症的治疗剂，例如依照本发明的第一个方面的抗体多肽。

[0371] 在一个相关实施方案中，该方法包括：

[0372] (a) 获得来自受试者的样品细胞（例如白血干/祖细胞或活检组织）；

[0373] (b) 使用依照本发明的第十六个或第十七个方面的方法对所述细胞测试超出阈值标准表达IL1RAP的癌细胞的存在；

[0374] (c) 选择如下的受试者进行治疗，该受试者在步骤(b)中测试的样品细胞含有具有超出阈值标准的IL1RAP表达的癌细胞；并

[0375] (d) 对步骤(c)中选择的受试者施用有效治疗所述癌症的治疗剂，例如依照本发明的第一个方面的抗体多肽。

[0376] 除非上下文另外指明,本发明的给定方面,特征或参数的偏好和选项应当视为已经与本发明的所有其它方面,特征和参数的任何和所有偏好和选项组合公开。例如,在一个实施方案中,本发明提供一种完整IgG1抗体,其包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:16的轻链可变区,用于治疗AML。

[0377] 此说明书中明显公开在先的文件的列举或讨论不应必然理解为承认该文件是现有技术的一部分或是公知常识。

[0378] 当在权利要求书和/或说明书中与术语“包含”联合使用时,词语“一个”或“一种”的使用可以表示“一”,但是它也与“一或多”,“至少一”,和“一或多于一”的含义一致。

[0379] 当与上文描述和附图联合考虑时,会更好领会和理解本发明的这些和其它实施方案。然而,应当理解,虽然上文描述指出本发明的各种实施方案和其众多具体细节,但是是作为例示而非限制给出的。可以在本发明的范围内进行许多替代,修饰,添加和/或重排而不背离其精神,而且本发明包括所有此类替代,修饰,添加和/或重排。

[0380] 附图简述

[0381] 下述图形成本说明书的一部分,而且包括用来进一步展示本发明的某些方面。通过与本文中呈现的具体实施方案的详述组合参考一幅或多幅这些图,可以更好地理解本发明。

[0382] 图1。例示性抗体在间接ELISA中对人IL-1RAP的结合。发现本发明的例示性抗体CAN04拥有最高的对人IL-1RAP的亲合力。

[0383] 图2。本发明的例示性抗体(CAN04)对人CML和AML细胞的结合。(A)该图显示在0.1 μ g/1 mL的浓度用IL1RAP靶向性单克隆抗体染色的KU812细胞的MFI值,并揭示CAN04具有所比较的抗体中最高的MFI。(B)CAN04显示对五份原代AML样品的特异性结合。(C)在三份原代CML样品中,CAN04显示特异性结合。

[0384] 图3。抗体CAN04的例示性人源化变体均结合表达IL1RAP的BV173细胞,其中变体6显示最高的均值荧光强度。

[0385] 图4。例示性抗体CAN04阻断(A) IL-1 β , (B) IL-1 α , 和(C) IL-33信号传导 的能力。

[0386] 图5。原代原始CML细胞在IL1b存在下的总细胞扩充在例示性抗体CAN04的情况中与对照和参照抗体二者相比显著降低。该图显示来自三份患者个体样品的组合结果,针对由没有抗体或有同种型对照抗体的培养组成的对照标准化。

[0387] 图6。体外ADCC测定法显示例示性抗体CAN04诱导CML细胞的特异性细胞杀伤。(A) KU812, LAMA84, 和BV173细胞通过添加0.1 μ g/mL CAN04受到特异性杀伤。(B) 由例示性抗体CAN04介导的细胞杀伤是剂量依赖性的,如用BV173靶细胞显示的。(C) 通过1 μ g/mL CAN04诱导来自两名CML原始细胞危象(blast crisis)患者的原代细胞的细胞杀伤。(D) 来自三名携带T315I突变的CML原始细胞危象患者的细胞对由CAN04介导的ADCC效果敏感。每项实验用来自不同供体的NK细胞实施至少两次,而且所呈现的数据显示来自每名供体的一项代表性实验。

[0388] 图7。显示例示性CAN04抗体有效诱导黑素瘤细胞(SKMEL5细胞系)的特异性细胞杀伤的体外ADCC测定法。在测试的所有浓度,低至0.1 μ g/mL, CAN04显示高特异性杀伤。该实验用来自不同供体的NK细胞实施至少两次,而所呈现的数据显示一项代表性实验。

[0389] 图8。(A) 显示与CAN04-AF488缀合抗体(绿色)一起在冰上温育2小时,或于37 $^{\circ}$ C温

育2小时,或与CAN04-AF488缀合抗体(绿色)一起于37℃温育16小时的LAMA细胞的共焦图像(一片光学切片,约0.9μm厚)。在冰上温育2小时后(“冰2h”)能观察到清楚限定的结合至大多数细胞的细胞膜的抗体。与CAN04-AF488缀合抗体(绿色)一起于37℃温育2小时后,在膜结合以外,抗体开始进入细胞(内在化)且现在还局限在胞质溶胶中。于37℃温育16小时后,细胞膜结合仍然存在,而且抗体内在化在大多数细胞中产生了CAN04-AF488抗体的积累。比例尺(右边图像)在所有图像中代表20μm。(B) CAN04-特异性结合和内在化的对照:共焦图像(一片光学切片,约0.9μm厚)显示与AF488缀合同种型对照抗体一起在冰上或于37℃温育2小时,或于37℃温育16小时的LAMA细胞。同种型对照抗体在任何这些状况中显示没有特异性结合。记录到对细胞残骸和坏死细胞(弱绿色)的微弱结合。比例尺(右边图像)在所有图像中代表20μm。

[0390] 图9。用CAN04处理显著降低白血病负担。(A) 移植后第36天时,用例示性抗体CAN04处理的小鼠中外周血中白血病细胞的频率与同种型对照相比要更低(1.2%对22.7%, $p < 0.0001$)。(B) 在CAN04的情况中血小板(PLT)计数保持处于正常水平($p = 0.0001$)。(C) 在处死时,在CAN04的情况中骨髓中白血病细胞的频率降低(38.7%对91.5%; $p < 0.0001$)。(D) 用CAN04处理的小鼠中脾中白血病细胞的频率与同种型对照相比要更低(27.6%对70.4%; $p = 0.0063$)。

[0391] 图10。低岩藻糖和Fc突变对ADCC活性的影响,如使用SKMEL5细胞测定的。(A) CAN04 (Fc-1) 正常岩藻糖, CAN04 (Fc-1) 低岩藻糖, Fc-4和Fc-7在SKMEL-5中的ADCC活性。(B) CAN04 (Fc-1) 正常岩藻糖, CAN04 (Fc-1) 低岩藻糖, Fc-2和Fc-3在SKMEL-5中的ADCC活性。(C) CAN04 (Fc-1) 正常岩藻糖, CAN04 (Fc-1) 低岩藻糖, Fc-5, Fc-6和Fc-8在SKMEL-5中的ADCC活性。

实施例

[0392] A. 本发明的例示性抗体对IL1-RAP蛋白的结合亲和力

[0393] (i) Biacore研究--鼠起源的抗IL1RAP抗体

[0394] 材料和方法

[0395] 依照捕捉试剂盒的技术手册和BIAcore T200 (Biacore Life Sciences, GE Healthcare Europe GmbH, Uppsala, Sweden) 的标准操作原理在CM5芯片上固定化山羊抗小鼠IgG。

[0396] 结合分析循环由三个步骤组成: (i) 在芯片表面上通过固定化的抗小鼠抗体捕捉配体; (ii) 分析物结合捕捉到的配体; 和 (iii) 结合的分析物解离。

[0397] 在每个结合循环之后使用制造商推荐的条件再生捕捉分子表面。

[0398] 所有结合循环于25℃运行。

[0399] 在五个循环的启动之后,在循环开始时以30μl/min的流速注射每种抗体(100nM)达120秒;然后以30μl/min的流速注射分析物(100nM)达120秒,接着监测解离期达300秒。

[0400] 连同比较物抗IL1RAP抗体(CAN01和CAN03)测试本发明的一种例示性抗体(CAN04)。

[0401] 结果和结论

[0402] 结果显示于下文表2:

[0403] 表2

[0404] K_{on} , K_{off} 和 K_D 的测量

	抗体	ka (1/M•s)	kd (1/s)	K_D (M)
[0405]	CAN01	2.34E+05	3.35E-04	1.43E-09
	CAN03	2.26E+05	7.25E-05	3.21E-10
	CAN04	4.27E+05	4.72E-05	1.10E-10

[0406] 本发明的例示性抗体CAN04展现出最高的对人IL1RAP的亲合力。

[0407] (ii) ELISA研究—鼠起源的抗IL1RAP抗体

[0408] 材料和方法

[0409] 实施了一项间接ELISA测定法。一式两份分析所有样品。用在0.01M PBS, pH 7.4中稀释的100ng重组hIL1RAP 21-367 (100 μ l/孔) 包被Nunc-MaxiSorp 96Micro Well™板, 并于4℃温育过夜。用ELISA清洗缓冲液 (0.01M PBS, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 清洗板, 接着是使用150 μ l/孔ELISA封闭溶液 (PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 的封闭步骤。于室温 (RT) 摇动温育1小时后, 再次使用ELISA清洗缓冲液清洗板。以三倍连续稀释 (范围从1000ng/ml到0.5ng/ml) 在ELISA封闭溶液中稀释样品, 然后转移至ELISA板, 100 μ l/孔。将板于RT摇动温育1小时, 然后用ELISA清洗溶液清洗。添加100 μ l/孔缀合至碱性磷酸酶的家兔抗小鼠IgG (DAKO, 1:1000) 并于RT摇动温育1小时。清洗板, 接着添加底物 (4-硝基苯基磷酸二钠盐六水合物, SIGMA, 1mg/ml), 100 μ l/孔。此后将板于RT摇动温育, 并连续测量405nm吸光度达30分钟。取0分钟时的吸光度作为背景信号。

[0410] 结果和结论

[0411] 结果显示于图1。

[0412] 发现本发明的例示性抗体CAN04拥有最高的对人IL1RAP的结合信号。

[0413] (iii) ELISA研究—人源化型式的例示性‘CAN04’抗体

[0414] 材料和方法

[0415] 将16种CAN04人源化变体 (hCAN04) 的重和轻链可变域亚克隆入含有人恒定域的载体:

[0416] -用于 V_L 域的卡帕恒定域 [SEQ ID NO:18]

[0417] -用于 V_H 域的IgG1za重链恒定域 [SEQ ID NO:19]

[0418] 以200ml的体积 (摇瓶) 在CHO K1SV细胞中瞬时表达抗体。

[0419] 使用蛋白A亲和层析纯化抗体。

[0420] 通过SDS-PAGE和SE-HPLC分析纯化的抗体。

[0421] 如上所述实施了一项间接ELISA测定法, 改变在于以三倍连续稀释以3.5nM开始稀释样品并以四份重复运行。

[0422] 结果和结论

[0423] 结果显示于表3。

[0424] 表3

[0425] hIL1RAP的亲合力, 如通过ELISA测定的

[0426]

抗体	重链*	轻链**	$K_D(pM)$
CAN04(鼠)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	88 ± 2
hCAN04变体1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15	125 ± 2
hCAN04变体2	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 15	171 ± 4
hCAN04变体3	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 15	450 ± 68
hCAN04变体4	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15	470 ± 50
hCAN04变体5	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 16	135 ± 2
hCAN04变体6	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 16	173 ± 4
hCAN04变体7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 16	526 ± 44
hCAN04变体8	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 16	402 ± 64
hCAN04变体9	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 17	210 ± 4
hCAN04变体10	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 17	301 ± 5
hCAN04变体11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 17	504 ± 26
hCAN04变体12	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 17	620 ± 68

[0427] *重链还包含IgG1za重链恒定域[SEQ ID NO:19]。

[0428] **轻链还包含卡帕恒定域[SEQ ID NO:18]。

[0429] 16种人源化型式的CAN04中的4种显示出最小限度的或没有对IL1RAP的结合(数据未显示)。

[0430] B. 本发明的例示性抗体对表达IL1RAP的细胞的结合

[0431] (i) 流式细胞术研究--鼠起源的抗IL1RAP抗体

[0432] 材料和方法

[0433] 用针对IL1RAP生成的抗体或有关同种型对照对慢性髓细胞样白血病(CML)细胞系KU812细胞染色。对于检测,使用抗mIg-APC二抗。

[0434] 连同7种比较物抗IL1RAP抗体(CAN01,CAN02,CAN03,CAN05,CAN07,CAN08和CAN09)测试本发明的一种例示性抗体(CAN04)。还包括一种同种型阴性对照抗体。

[0435] 对于原代白血病细胞的分析,分别以 $1\mu\text{g/mL}$ 和 $5\mu\text{g/mL}$ 的浓度用CAN04-PE或PE缀合的同种型对照对3份CD34富集的CML患者样品和5份单个核细胞富集的急性髓细胞样白血病(AML)患者样品染色。使用FACSCANTO流式细胞仪(BD)分析细胞。[0436] 结果和结论

[0437] 表达IL1RAP的KU812白血病细胞的染色揭示CAN04具有与同种型对照和靶向IL1RAP的其它比较物抗体相比要更高的均值荧光强度(MFI)(图2A)。在流式细胞术分析中使用CAN04标记来自5名AML和3名CML患者的原代细胞导致超出同种型对照的染色(图2B-C)。本研究显示CAN04以比测试的其它单克隆抗体要更高的MFI特异性结合CML细胞系上的IL1RAP,而且CAN04还结合原代CML和AML细胞。

[0438] (ii) 流式细胞术研究--人源化型式的‘CAN04’抗体

[0439] 材料和方法

[0440] 用1 μ g/mL测试抗体或有关同种型对照对慢性髓细胞样白血病(CML)细胞系BV173细胞染色。对于检测,使用抗hIgG-PE二抗。使用FACS CANTO流式细胞仪(BD)分析细胞。

[0441] 测试抗体包括1种嵌合抗IL1RAP抗体(‘嵌合’)和12种不同人源化型式的本发明例示性CAN04抗体(‘变体1’至‘变体12’)。

[0442] 结果和结论

[0443] 表达IL1RAP的BV173白血病细胞的染色显示人源化CAN04变体以不同强度染色,但是均以超出同种型对照的水平(见图3)。CAN04的人源化变体1,2,5,6,9和10(见表3)展现最强的标记。

[0444] C. 本发明例示性抗体的表位/域作图

[0445] 材料和方法

[0446] 为了了解不同抗体克隆在IL1RAP上何处结合,对该蛋白质实施了一项结构分析,揭示该受体的胞外部分可以分成三个独特域,此后称作域1,2和3(D1,D2,D3)(参见Wang et al.,2010,Nature Immunology,11:905-912,通过援引将其公开内容收入本文)。为了确定不同抗体克隆的域结合样式,生成了一系列受体构建物,并在一项ELISA测定法中测试对这些构建物的结 合。

[0447] 实施了一项间接ELISA测定法。一式两份分析所有样品。用在0.01M PBS,pH 7.4中稀释的100ng Rec hIL1RAP域123(aa21-367)(阳性对照),Rec hIL1RAP域12(aa21-234),域1(aa21-134)或Rec hIL1RAP域3(aa235-367)(100 μ l/孔)包被Nunc-MaxiSorp 96 Micro Well™板,并于4℃温育过夜。用ELISA清洗缓冲液(0.01M PBS,0.05%Tween 20,pH 7.4)清洗板,接着是使用150 μ l/孔ELISA封闭溶液(PBS,0.5%BSA,0.05%Tween 20,pH 7.4)的封闭步骤。于室温(RT)摇动温育1小时后,再次使用ELISA清洗缓冲液清洗板。以三倍连续稀释(范围从1000ng/ml到0.5ng/ml)在ELISA封闭溶液中稀释CAN01,CAN03,CAN04,CAN05,CAN07,CAN08和KMT-1(阳性对照),然后转移至ELISA板,100 μ l/孔。将板于RT摇动温育1小时,然后用ELISA清洗溶液清洗。添加100 μ l/孔缀合至碱性磷酸酶的家兔抗小鼠IgG(DAKO,1:1000)并于RT摇动温育1小时。清洗板,接着添加底物(4-硝基苯基磷酸二钠盐六水合物,SIGMA,1mg/ml),100 μ l/孔。此后将板于RT摇动温育,并连续测量405nm吸光度达30分钟。取0分钟时的吸光度作为背景信号。

[0448] 连同9种比较物抗IL1RAP单克隆抗体(CAN01,CAN02,CAN03,CAN05,CAN07,CAN08,CAN10,和CAN11)以及作为阳性对照的多克隆抗IL1RAP抗体(KMT-1)测试本发明的一种例示性抗体(CAN04)。

[0449] 结果和结论

[0450] 测试靶物验证的大多数抗IL1RAP抗体结合域3(D3)。然而,本发明的例示性CAN04抗体的独特之处在于它结合域2(D2)。全部域作图数据可见下文表4中的汇总。

[0451] 表4

[0452] 例示性抗IL1RAP抗体克隆的表位作图。

[0453]

克隆	域123 (aa21-367)	域12 (aa21-234)	域1 (aa21-134)	域3 (aa235-367)	建议表位
CAN03	+			+	D3
CAN05	+	+	+		D1
CAN07	+			+	D3
CAN08	+			+	D3
CAN04	+	+			D2
[0454]					
CAN01	+			+	D3
CAN02	+				nd*
KMT-1	+	+	+	+	多克隆

[0455] nd*=未测定,因为表位作图数据不能清楚鉴定这些构建物的具体域,这可归于对含有来自超过一个域的序列元件(例如D2-D3连接处)的结构表位的结合。

[0456] D. 本发明的例示性抗体的特异性/交叉反应性

[0457] 材料和方法

[0458] 较好的先导候选抗体的一项重要特色在于它以相等或接近相等的效力与有关毒物物种中的同源蛋白交叉反应。依照一般管理方针,对一种啮齿动物和一种非啮齿动物的结合会是优选的情景,但是这对于抗体是罕见的情况,而是许多实验室努力鉴定除灵长动物以外的任何有关毒物物种。

[0459] 对于本研究,预期对非人灵长动物像猕猴(rhesus) (*Macaca mulatta*) 或食蟹猴(*cynomolgus*) (*Macaca fascicularis*) 的交叉反应性,因为这些物种中的IL1RAP蛋白与人IL1RAP蛋白分享99%同源性。

[0460] 选择多种潜在先导抗体并在一项ELISA测定法中测试对重组食蟹猴IL1RAP(aa21-367)的结合。

[0461] 连同8种比较物抗IL1RAP单克隆抗体(CAN01, CAN02, CAN03, CAN07, CAN08, CAN09, 来自R&D的Mab676)和多克隆抗IL1RAP抗体(KMT-1)测试本发明的一种例示性抗体(CAN04)。

[0462] 结果和结论

[0463] 令人惊讶的是,发现测试的数种比较物抗IL1RAP抗体不与食蟹猴IL1RAP交叉反应,在它们中包括来自R&D的商品化参照抗体mAb676,表5。

[0464] 表5

[0465] 对食蟹猴IL1RAP的结合

[0466] (粗体的值表示鉴定为与来自食蟹猴的IL1RAP交叉反应的克隆)

	克隆	对重组食蟹猴IL1RAP的结合(OD405)
[0467]	CAN01	0.324
	CAN02	0.014
	CAN09	0.022
	CAN03	0.870
	CAN04	0.416
[0468]	CAN07	0.111
	CAN08	0.375
	mAb676 (R&D)	0.037
	KMT-1	0.481

[0469] E. 本发明的例示性抗体对IL-1 α , IL-1 β 和IL-33信号传导的抑制

[0470] (i) HEK-Blue IL-33/IL-1 β 细胞系中CAN04对IL-1信号传导的影响

[0471] 材料和方法

[0472] 因为IL1RAP是IL-1受体复合物的功能性部分,所以抗体对IL1RAP的结合也可能抑制IL-1信号传导。既然多种肿瘤细胞类型已经显示出利用IL-1作为生长因子,那么这可能是介导抗肿瘤效果的另外一种重要机制。

[0473] 为了测试潜在先导候选抗体阻断IL-1信号传导的能力,设立了一种IL-1依赖性报告基因测定法。HEK-Blue IL-33/IL-1 β 细胞 (InvivoGen) 响应IL-1信号传导而释放碱性磷酸酶,它通过比色测定法来量化。为了测试先导候选物的抑制能力,以50,000个细胞/孔在板中分发HEK-Blue细胞并与测试抗体一起温育45分钟,之后在测定中对每种配体以0.3ng/ml的终浓度用IL-1 α , IL-1 β 或IL-33刺激。抗体的最终测定浓度为100nM-0.01nM。在对照孔中,用PBS替换抗体。将细胞于37°C温育过夜,之后测量释放的碱性磷酸酶的量。还通过在高浓度的抗体(10mg/ml)存在下在别的刺激缺失下温育细胞对抗体测试潜在的激动效应。如此会以碱性磷酸酶的释放记录任何IL-1R激动效应。

[0474] 连同两种比较物抗IL1RAP单克隆抗体(CAN01和CAN03)和同种型阴性对照抗体测试本发明的一种例示性抗体(CAN04)。

[0475] 结果和结论

[0476] 如图4(A)中描绘的,例示性抗体CAN04诱导突出的对IL-1 β 信号传导的抑制。比较物抗体CAN03也产生可检测的抑制但显著少于CAN04。比较物CAN01和同种型对照均不产生任何可测量的对IL1信号传导的抑制。

[0477] 在阻断IL-1 β 以外,CAN04还是IL-1 α 和IL-33信号传导的有力抑制剂;分别见图4(B)和(C)。

[0478] 测试的候选物无一显示任何激动效应。

[0479] (ii) 在原代CML细胞中的影响

[0480] 材料和方法

[0481] 自3名处于慢性期的具有慢性髓细胞样白血病(CML)的患者采集骨髓抽吸物或外周血。通过在Lymphoprep上离心来分离单个核细胞,并使用抗CD34抗体和磁珠(Miltenyi

biotech) 对样品富集CD34⁺细胞。CD34⁺细胞保存在液氮中直至使用,那时将它们融化并用针对CD34和CD38的抗体染色。使用碘化丙啶作为存活力标志物。使用FACS Aria细胞分选器,以2500个细胞/孔的密度将可存活CD34⁺CD38⁻细胞分选入装有100μl没有补充物的无血清Stemspan培养基的96孔组织培养物处理板。分选后,在总共100uL Stemspan中将IL1b和测试抗体添加至孔以产生含0-0.4ng/mL IL1b和0-10μg/mL抗体的200μl/孔的终体积。将板于37℃,5%CO₂温育7天,之后使用Countbright计数珠和FACS Canto对可存活(7AAD⁻)细胞的数目计数。

[0482] 连同一种比较物抗IL1RAP单克隆抗体(CAN01)和同种型阴性对照抗体测试本发明的一种例示性抗体(CAN04)。

[0483] 结果和结论

[0484] 如图5中显示的,CD34⁺CD38⁻原代慢性期CML细胞在IL1b存在下的培养导致升高的细胞扩充。IL1-诱导的细胞扩充升高在对培养物添加例示性CAN04抗体后显著降低($p < 0.0001$)。也是与另一种IL1RAP靶向性抗体CAN01比较,CAN04显著更加有效地降低总细胞扩充($p = 0.0022$)。我们得出结论,CAN04对IL1RAP的结合干扰原代原始CML细胞中由IL1诱导的细胞扩充中的刺激。

[0485] F. 本发明的例示性抗体的ADCC效果

[0486] (i) 慢性髓细胞样白血病(CML)细胞系

[0487] 材料和方法

[0488] 使用慢性髓细胞样白血病(CML)细胞系KU812,LAMA84和BV173,或来自三名处于原始细胞危象的具有CML的患者的原代细胞作为体外抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)测定法中的靶细胞。简言之,用PKH26(Sigma-Aldrich,St Louis,MO)依照制造商的说明书标记靶细胞,并以5,000-10,000个细胞每孔的密度接种入96孔板。随后,以不同浓度对孔添加本发明的例示性抗体CAN04或同种型对照抗体并温育30分钟,之后对每个孔添加100,000个NK效应细胞。NK细胞是在知情同意后通过使用NK细胞负细胞分离试剂盒依照制造商的说明书(Miltenyi Biotech,BergischGladbach, Germany)自健康志愿者提取的。使用一种非特异性人IgG1抗体作为该实验中的同种型阴性对照(Eureka Therapeutics,Emeryville,CA)。通过使用FACS CANTO流式细胞仪(BD)检测7-AAD阳性细胞来评估细胞死亡的程度。每项实验用来自不同供体的NK细胞实施至少两次。

[0489] 结果和结论

[0490] 体外ADCC测定法显示了本发明的例示性抗体CAN04指导NK细胞杀死CML细胞系KU812,LAMA84和BV173,程度比同种型对照要更高(图6A)。使用BV173靶细胞对CAN04的剂量滴定显示了对细胞杀伤的影响是剂量依赖性的,提高CAN04浓度实现更高层次的细胞杀伤(图6B)。已经进展成原始细胞危象的慢性髓细胞样白血病只展示对酪氨酸激酶抑制剂处理的瞬时影响且如此强加一个重大治疗问题。用来自两名CML原始细胞危象患者个体的原代细胞进行的ADCC测定法显示了这些细胞对由CAN04和NK细胞诱导的细胞的细胞毒性敏感(图6C)。另外,来自三名包容T315I突变(其引起对数种酪氨酸激酶抑制剂的抗性)的CML原始细胞危象患者的原代细胞展示相似的敏感性(图6D)。总而言之,该实验显示了CAN04具有指导NK细胞进行CML细胞系以及原代原始细胞危象CML细胞的特异性细胞杀伤的能力,而且由CAN04诱导的细胞毒性效应是剂量依赖性的。

[0491] (ii) 黑素瘤细胞系

[0492] 材料和方法

[0493] 使用恶性黑素瘤细胞系SKMEL-5作为体外抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)测定法的靶物。简言之,用PKH26(Sigma-Aldrich,St Louis,MO)依照制造商的说明书标记靶细胞,并以5,000-10,000个细胞每孔的密度接种入96孔板。随后,以不同浓度对孔添加CAN04或同种型对照抗体并温育30分钟,之后对每个孔添加100,000个NK效应细胞。NK细胞是在知情同意后通过使用NK细胞负细胞分离试剂盒依照制造商的说明书(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach,Germany)自健康志愿者提取的。使用一种非特异性人IgG1抗体作为该实验中的对照(Eureka Therapeutics,Emeryville,CA)。通过使用FACS CANTO流式细胞仪(BD)检测7-AAD阳性细胞来评估细胞死亡的程度。每项实验用来自不同供体的NK细胞实施至少两次。

[0494] 结果和结论

[0495] 体外ADCC测定法显示了CAN04指导NK细胞杀死SKMEL-5细胞系,程度比匹配同种型对照高得多(图7)。CAN04的剂量滴定显示了CAN04在低浓度有效诱导ADCC(图7)。总之,这些数据证明了CAN04具有以剂量依赖性方式指导NK细胞进行SKMEL-5的特异性细胞杀伤的能力,而且CAN04。

[0496] G. 本发明的例示性抗体的内在化

[0497] 材料和方法

[0498] 细胞和培养条件:LAMA-84细胞(一种自处于原始细胞危象的具有慢性髓细胞样白血病的患者建立的细胞系)得自DSMZ(Braunschweig,Germany),并依照供应商的推荐培养。简言之,在含10%FBS,1%谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素的RPMI 1640中于5%CO₂,37℃培养细胞。每2-3天将细胞培养物拆分至0.5x 10⁶个细胞/ml的密度。自DSMZ接收后细胞后使用它们直至12代。

[0499] 将来自悬浮细胞系LAMA-84的细胞在补充有1%牛血清清蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中清洗一次,在补充有5%人AB+血清(来自Sigma)的PBS-BSA中重悬浮,并于室温(RT)温育5分钟。添加AlexaFluor488(AF488)标记的IL-1RAP选择性抗体CAN04或同种型匹配对照抗体至10μg/ml的终浓度。在冰上或于37℃分发(温育)细胞2或16小时。

[0500] 对于共焦显微术(LSM 510 Meta Zeiss共焦显微镜)的图像分析,将细胞在PBS-1%BSA中清洗两次,简短离心,接着在3%低聚甲醛(在PBS中)中重悬浮,固定20分钟(于4℃)。然后将细胞离心,在含有0.001%Triton X-100(PBS-TX)和核标志物(DAPI)的PBS中重悬浮,并使之于RT温育5分钟。简短离心后,在PBS-TX中重悬浮细胞,并在玻璃底显微镜孔中分发。然后让细胞贴壁1小时。经共焦扫描细胞来收集图像数据,提供薄光学切片中穿过细胞中心(通过核标志物来描绘)的AlexaFluor488荧光的高分辨率图像。经软件图像分析(Zeiss Zen2010)实施抗体对细胞膜的结合和/或内在化的抗体的进一步分析。

[0501] 结果和结论

[0502] 以借助共焦激光扫描显微术记录的高分辨率成像数据和通过对这一数据的图像分析展现了CAN04对细胞膜的结合和它进入细胞(“内在化”)的能力的结构关系。

[0503] 图像数据呈现显示于图8。

[0504] H. 本发明的例示性抗体的体内治疗功效

[0505] 材料和方法

[0506] 给非条件化NOD/SCID小鼠移植致死剂量的先前通过转化人脐带血CD34+细胞(通过指导MLL/AF9融合物和激活的NRAS基因表达的cDNA的逆转录病毒整合)生成的MA9Ras细胞。用靶向IL1RAP的例示性CAN04抗体或对应同种型对照抗体处理白血病小鼠。贯穿实验一周两次通过腹膜内注射来施用抗体,移植后第3天给予第一次处理。除作为1000μg推注给予的第一剂以外,每剂抗体为500μg。在严重疾病的迹象后(如通过驼背,毛皮不整洁,和活动性降低判断的)或由于实体瘤,处死小鼠。

[0507] 结果和结论

[0508] 给免疫缺陷小鼠移植人白血病细胞,并用CAN04(一种靶向IL1RAP的单克隆抗体)处理。与同种型对照抗体相比,外周血中白血病细胞的频率在移植后第36天显著降低,而且血小板计数在给予CAN04的小鼠中保持正常,指示功能性更高的造血(图9A-B)。CAN04处理导致骨髓和脾中的白血病细胞显著降低(图9C-D)。我们得出结论,抗IL1RAP免疫疗法在MA9Ras异种移植模型中减轻外周血,骨髓,和脾中的人白血病。结果支持抗IL1RAP免疫疗法对于AML是一种新的有希望的治疗策略。

[0509] I. (a) 低岩藻糖抗体和(b)Fc突变对ADCC活性的影响

[0510] 材料和方法

[0511] 将CAN04的人源化重链可变域变体(包含SEQ ID No:9)亚克隆入含有IgG1za人恒定域(SEQ ID NO:19)的载体。

[0512] 将CAN04的人源化轻链可变域变体(包含SEQ ID No:16)亚克隆入含有卡帕人恒定域(SEQ ID NO:18)的载体。

[0513] 为了检查低岩藻糖的影响,通过将所得载体共转染入在含有几夫碱的培养基中培养的HEK293细胞来瞬时表达hCAN04抗体“Fc-1”(见下文)。使用通过在几夫碱缺失下的表达而生成的抗体Fc-1作为‘正常岩藻糖’对照。

[0514] 为了解决hCAN04的各种Fc工程化突变体如何影响ADCC活性,如下生成遗传工程化hCAN04变体:

[0515] Fc-1=(带有野生型Fc的人源化CAN04;即表3中的hCAN04变体6)

[0516] Fc-2=(与Fc-1一样但带有突变S239D/S298A/I332E)

[0517] Fc-3=(与Fc-1一样但带有突变S239D/A330L/I332E)

[0518] Fc-4=(与Fc-1一样但带有突变S239D/I332E)

[0519] Fc-5=(与Fc-1一样但带有突变S298A/E333A/K334A)

[0520] Fc-6=(与Fc-1一样但带有突变N297Q)

[0521] Fc-7=(与Fc-1一样但带有突变N297S)

[0522] Fc-8=(与Fc-1一样但带有突变P247I/A339Q)

[0523] 其中氨基酸突变的位置是使用Eu编号方案定义的,其不同于上文SEQ ID NO:18和19中的编号;参见Edelman et al.,1969,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,63:78-85。

[0524] 使用蛋白A亲和力层析纯化抗体。

[0525] 使用SKMEL5细胞系实施ADCC测定法。

[0526] 结果和结论

[0527] 在几夫碱存在下生成的hCAN04的一种低岩藻糖变体优于正常岩藻糖CAN04变体

(图10)。

[0528] Fc突变对ADCC活性的影响取决于进行的突变。如此：

[0529] (a) 人源化CAN04的Fc-6和Fc-7变体的ADCC活性被完全消除；

[0530] (b) 人源化CAN04的Fc-3, Fc-4, 和Fc-5变体的ADCC活性得到增强, 甚至相对于CAN04的低岩藻糖变体而言；

[0531] (c) 人源化CAN04的Fc-8变体的ADCC活性与CAN04的低岩藻糖型式的ADCC活性相似

[0532] (d) 人源化CAN04的Fc-2变体的ADCC活性与CAN04的正常岩藻糖形式的ADCC活性相似。

[0533] 实施例J. 通过ELISA对竞争性结合的分析

[0534] 方案

[0535] • 所有样品应当一式两份分析。

[0536] • 用100ul/孔在0.01M PBS, pH 7.4中稀释的重组hIL1RAP 21-367 (1ug/ml) 包被Nunc-MaxiSorp 96Micro Well™板。

[0537] • 将板于4℃温育过夜。

[0538] • 用ELISA清洗缓冲液 (0.01M PBS, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 清洗板。

[0539] • 添加150μl/孔ELISA封闭溶液 (PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, pH 7.4)。

[0540] • 将板于室温 (RT) 摇动温育1小时。

[0541] • 用ELISA清洗缓冲液清洗板。

[0542] • 对孔添加测试项目 (例如mAb 1, mAb 2) 的样品 (100ul/孔, 10ug/ml)。

[0543] • 将板于RT温育1小时。

[0544] • 用ELISA清洗溶液清洗板。

[0545] • 对所有孔添加参照抗体CAN04的溶液 (100ul/孔, 1ug/ml)。

[0546] • 将板于RT温育1小时。

[0547] • 用ELISA清洗缓冲液清洗板。

[0548] • 添加100μl/孔合适的缀合至碱性的缀合至碱性磷酸酶的家兔抗小鼠 IgG 二抗 (如果测试项目是人抗体的话, 合适的二抗会是山羊抗小鼠 IgG (Fc特异性) -碱性磷酸酶抗体, SIGMA, A1418)

[0549] • 将板于RT摇动温育1小时。

[0550] • 用清洗缓冲液清洗板。

[0551] • 每孔添加100μl pNPP底物 (4-硝基苯基磷酸二钠盐六水合物, SIGMA, 1mg/ml)。

[0552] • 将板于RT摇动温育并连续测量405nm处吸光度达30分钟。应当取0min时的吸光度作为背景信号。

- [0001] 序列表
- [0002] <110>坎塔吉亚有限责任公司 (Cantargia AB)
- [0003] <120>抗人白介素-1受体辅助蛋白 (IL1 RAP) 抗体及其用途
- [0004] <130>CANBA/P57678PC
- [0005] <150>GB1403875.6
- [0006] <151>2014-03-05
- [0007] <160>19
- [0008] <170>BiSSAP 1.2
- [0009] <210>1
- [0010] <211>117
- [0011] <212>PRT
- [0012] <213>人工序列
- [0013] <220>
- [0014] <223>鼠衍生抗体序列
- [0015] <400>1
- [0016] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Leu Lys Pro Gly Ala
- [0017] 1 5 10 15
- [0018] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
- [0019] 20 25 30
- [0020] Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
- [0021] 35 40 45
- [0022] Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr His Tyr Ser Gly Lys Phe
- [0023] 50 55 60
- [0024] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ile Ala Tyr
- [0025] 65 70 75 80
- [0026] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
- [0027] 85 90 95
- [0028] Gly Glu Gly Tyr Leu Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
- [0029] 100 105 110
- [0030] Val Thr Val Ser Ser
- [0031] 115
- [0032] <210>2
- [0033] <211>108
- [0034] <212>PRT
- [0035] <213>人工序列
- [0036] <220>
- [0037] <223>鼠衍生抗体序列
- [0038] <400>2

[0039]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0040]	1 5 10 15
[0041]	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
[0042]	20 25 30
[0043]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
[0044]	35 40 45
[0045]	His Tyr Thr Ser Gly Leu His Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0046]	50 55 60
[0047]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
[0048]	65 70 75 80
[0049]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ile Leu Pro Trp
[0050]	85 90 95
[0051]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[0052]	100 105
[0053]	<210>3
[0054]	<211>7
[0055]	<212>PRT
[0056]	<213>人工序列
[0057]	<220>
[0058]	<223>鼠衍生抗体序列
[0059]	<400>3
[0060]	Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
[0061]	1 5
[0062]	<210>4
[0063]	<211>6
[0064]	<212>PRT
[0065]	<213>人工序列
[0066]	<220>
[0067]	<223>鼠衍生抗体序列
[0068]	<400>4
[0069]	Tyr Pro Gly Asp Gly Asn
[0070]	1 5
[0071]	<210>5
[0072]	<211>8
[0073]	<212>PRT
[0074]	<213>人工序列
[0075]	<220>
[0076]	<223>鼠衍生抗体序列
[0077]	<400>5

[0078]	Gly Tyr Leu Asp Pro Met Asp Tyr
[0079]	1 5
[0080]	<210>6
[0081]	<211>10
[0082]	<212>PRT
[0083]	<213>人工序列
[0084]	<220>
[0085]	<223>鼠衍生抗体序列
[0086]	<400>6
[0087]	Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn
[0088]	1 5 10
[0089]	<210>7
[0090]	<211>17
[0091]	<212>PRT
[0092]	<213>人工序列
[0093]	<220>
[0094]	<223>鼠衍生抗体序列
[0095]	<400>7
[0096]	Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr His Tyr Ser Gly Lys Phe Lys
[0097]	1 5 10 15
[0098]	Gly
[0099]	<210>8
[0100]	<211>117
[0101]	<212>PRT
[0102]	<213>人工序列
[0103]	<220>
[0104]	<223>鼠衍生抗体序列
[0105]	<400>8
[0106]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0107]	1 5 10 15
[0108]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
[0109]	20 25 30
[0110]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0111]	35 40 45
[0112]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe
[0113]	50 55 60
[0114]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0115]	65 70 75 80
[0116]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0117]	85																90				95			
[0118]	Gly	Glu	Gly	Tyr	Leu	Asp	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu								
[0119]	100								105				110											
[0120]	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115																		
[0121]	<210>9																							
[0122]	<211>117																							
[0123]	<212>PRT																							
[0124]	<213>人工序列																							
[0125]	<220>																							
[0126]	<223>鼠衍生抗体序列																							
[0127]	<400>9																							
[0128]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser								
[0129]	1	5				10				15														
[0130]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Ser	Ser								
[0131]	20				25				30															
[0132]	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met								
[0133]	35				40				45															
[0134]	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asn	Thr	His	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe								
[0135]	50				55				60															
[0136]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr								
[0137]	65				70				75				80											
[0138]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys								
[0139]	85				90				95															
[0140]	Gly	Glu	Gly	Tyr	Leu	Asp	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu								
[0141]	100				105				110															
[0142]	Val	Thr	Val	Ser	Ser																			
[0143]	115																							
[0144]	<210>10																							
[0145]	<211>117																							
[0146]	<212>PRT																							
[0147]	<213>人工序列																							
[0148]	<220>																							
[0149]	<223>鼠衍生抗体序列																							
[0150]	<400>10																							
[0151]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser								
[0152]	1	5				10				15														
[0153]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser								
[0154]	20				25				30															
[0155]	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met								

[0156]	35	40	45
[0157]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Gln Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe		
[0158]	50	55	60
[0159]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0160]	65	70	75
[0161]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0162]	85	90	95
[0163]	Gly Glu Gly Tyr Leu Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
[0164]	100	105	110
[0165]	Val Thr Val Ser Ser		
[0166]	115		
[0167]	<210>11		
[0168]	<211>117		
[0169]	<212>PRT		
[0170]	<213>人工序列		
[0171]	<220>		
[0172]	<223>鼠衍生抗体序列		
[0173]	<400>11		
[0174]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[0175]	1	5	10
[0176]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser		
[0177]	20	25	30
[0178]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
[0179]	35	40	45
[0180]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Gln Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe		
[0181]	50	55	60
[0182]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0183]	65	70	75
[0184]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0185]	85	90	95
[0186]	Gly Glu Gly Tyr Leu Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
[0187]	100	105	110
[0188]	Val Thr Val Ser Ser		
[0189]	115		
[0190]	<210>12		
[0191]	<211>11		
[0192]	<212>PRT		
[0193]	<213>人工序列		
[0194]	<220>		

[0195]	<223>鼠衍生抗体序列			
[0196]	<400>12			
[0197]	Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn			
[0198]	1	5	10	
[0199]	<210>13			
[0200]	<211>7			
[0201]	<212>PRT			
[0202]	<213>人工序列			
[0203]	<220>			
[0204]	<223>鼠衍生抗体序列			
[0205]	<400>13			
[0206]	Tyr Thr Ser Gly Leu His Ala			
[0207]	1	5		
[0208]	<210>14			
[0209]	<211>9			
[0210]	<212>PRT			
[0211]	<213>人工序列			
[0212]	<220>			
[0213]	<223>鼠衍生抗体序列			
[0214]	<400>14			
[0215]	Gln Gln Tyr Ser Ile Leu Pro Trp Thr			
[0216]	1	5		
[0217]	<210>15			
[0218]	<211>108			
[0219]	<212>PRT			
[0220]	<213>人工序列			
[0221]	<220>			
[0222]	<223>鼠衍生抗体序列			
[0223]	<400>15			
[0224]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0225]	1	5	10	15
[0226]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr			
[0227]		20	25	30
[0228]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[0229]		35	40	45
[0230]	His Tyr Thr Ser Gly Leu His Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0231]		50	55	60
[0232]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0233]	65	70	75	80

[0234]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ile Leu Pro Trp
[0235]	85 90 95
[0236]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[0237]	100 105
[0238]	<210>16
[0239]	<211>108
[0240]	<212>PRT
[0241]	<213>人工序列
[0242]	<220>
[0243]	<223>鼠衍生抗体序列
[0244]	<400>16
[0245]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0246]	1 5 10 15
[0247]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
[0248]	20 25 30
[0249]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0250]	35 40 45
[0251]	His Tyr Thr Ser Gly Leu His Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0252]	50 55 60
[0253]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0254]	65 70 75 80
[0255]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ile Leu Pro Trp
[0256]	85 90 95
[0257]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[0258]	100 105
[0259]	<210>17
[0260]	<211>108
[0261]	<212>PRT
[0262]	<213>人工序列
[0263]	<220>
[0264]	<223>鼠衍生抗体序列
[0265]	<400>17
[0266]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0267]	1 5 10 15
[0268]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
[0269]	20 25 30
[0270]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0271]	35 40 45
[0272]	His Tyr Thr Ser Gly Leu His Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0273]	50	55	60
[0274]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
[0275]	65	70	75
[0276]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ile Leu Pro Trp		
[0277]	85	90	95
[0278]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
[0279]	100	105	
[0280]	<210>18		
[0281]	<211>106		
[0282]	<212>PRT		
[0283]	<213>人工序列		
[0284]	<220>		
[0285]	<223>鼠衍生抗体序列		
[0286]	<400>18		
[0287]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
[0288]	1	5	10
[0289]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
[0290]	20	25	30
[0291]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
[0292]	35	40	45
[0293]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
[0294]	50	55	60
[0295]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
[0296]	65	70	75
[0297]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
[0298]	85	90	95
[0299]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0300]	100	105	
[0301]	<210>19		
[0302]	<211>330		
[0303]	<212>PRT		
[0304]	<213>人工序列		
[0305]	<220>		
[0306]	<223>鼠衍生抗体序列		
[0307]	<400>19		
[0308]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
[0309]	1	5	10
[0310]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
[0311]	20	25	30

[0312]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
[0313]			35					40					45			
[0314]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
[0315]		50					55				60					
[0316]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
[0317]	65					70				75					80	
[0318]	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
[0319]				85					90					95		
[0320]	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
[0321]				100					105					110		
[0322]	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
[0323]				115				120					125			
[0324]	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
[0325]		130					135					140				
[0326]	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
[0327]	145					150				155					160	
[0328]	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
[0329]				165					170					175		
[0330]	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
[0331]				180					185					190		
[0332]	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
[0333]			195					200					205			
[0334]	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
[0335]		210					215					220				
[0336]	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
[0337]	225					230				235					240	
[0338]	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
[0339]				245					250					255		
[0340]	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
[0341]				260					265					270		
[0342]	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
[0343]			275					280					285			
[0344]	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
[0345]		290					295					300				
[0346]	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
[0347]	305					310				315					320	
[0348]	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
[0349]				325					330							

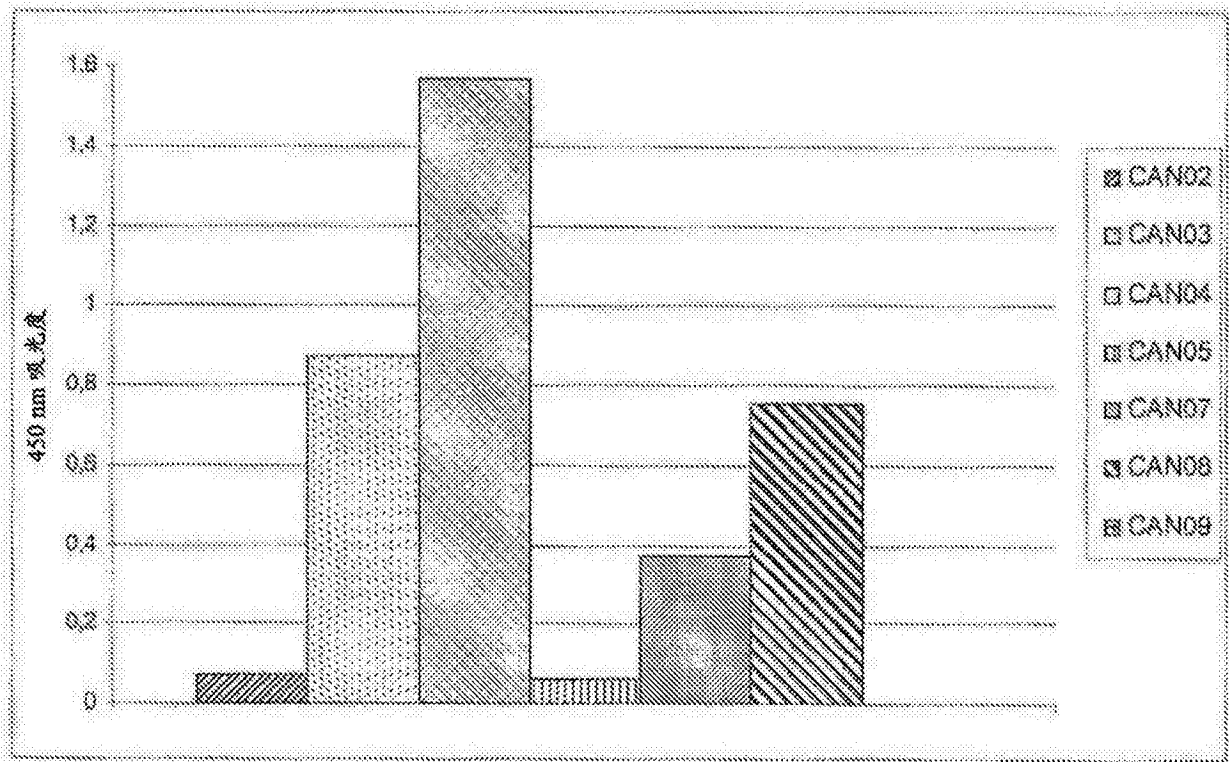


图1

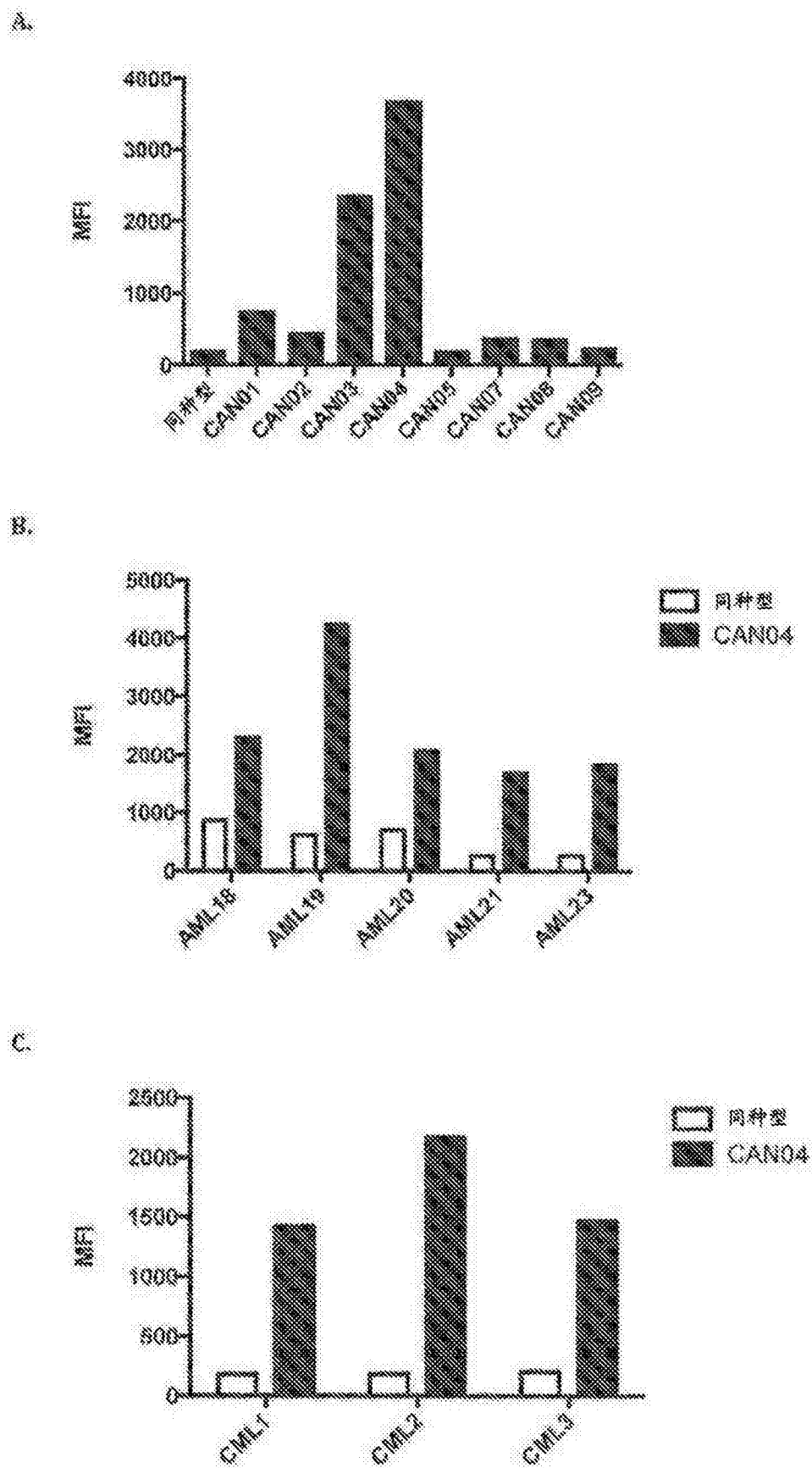


图2

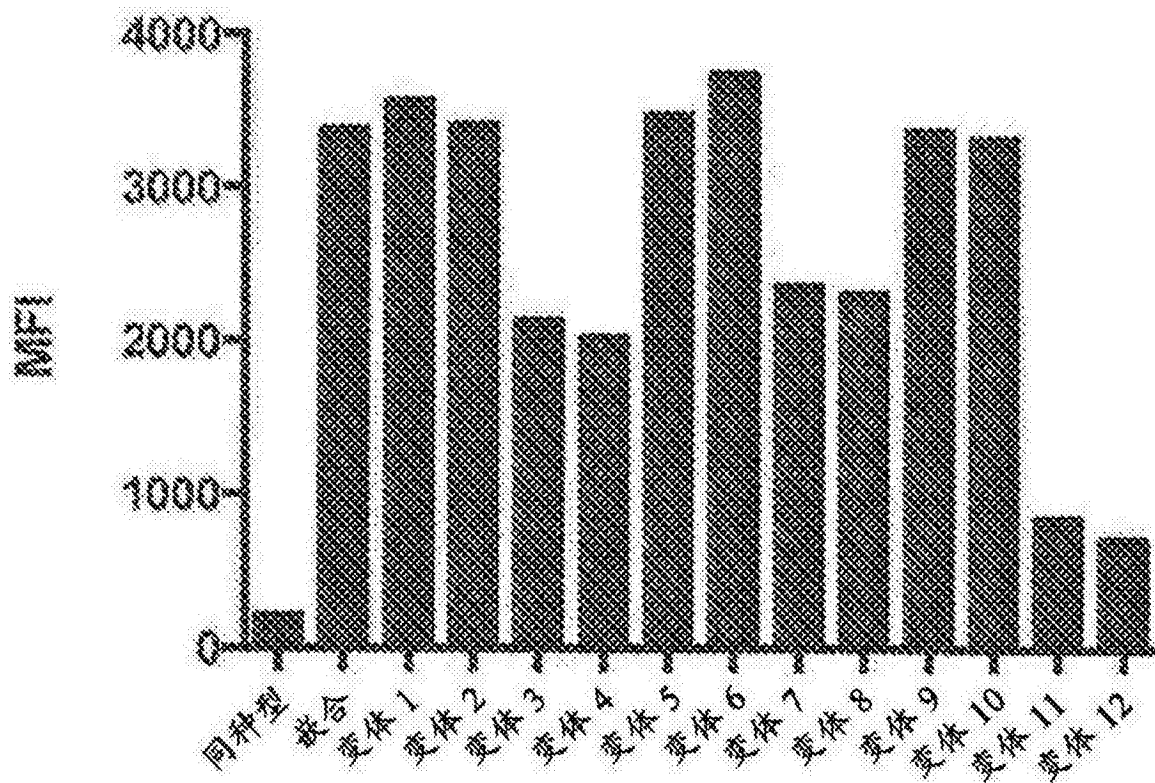


图3

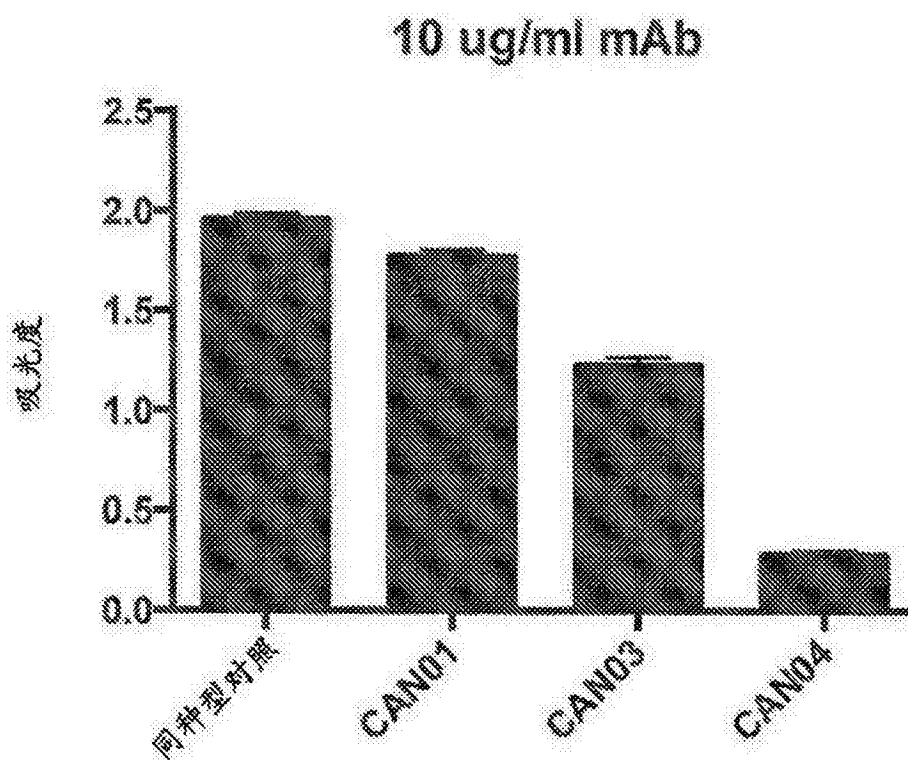


图4 (A)

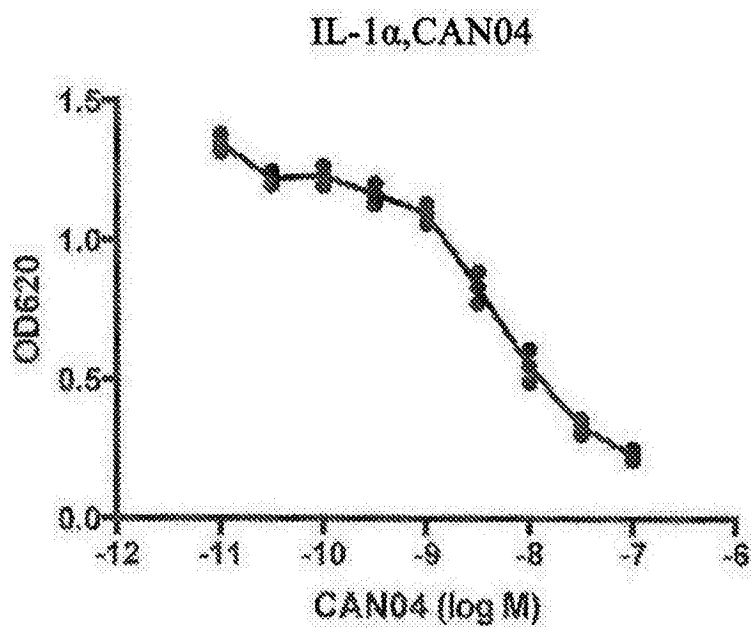


图4 (B)

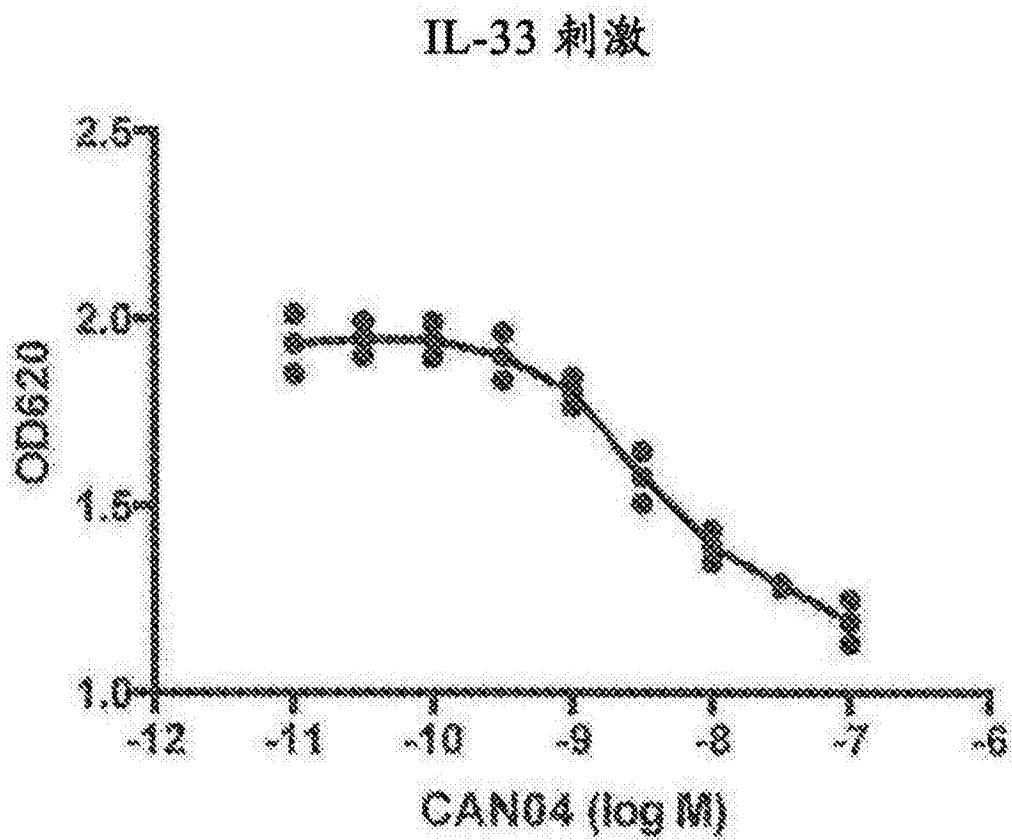


图4 (C)

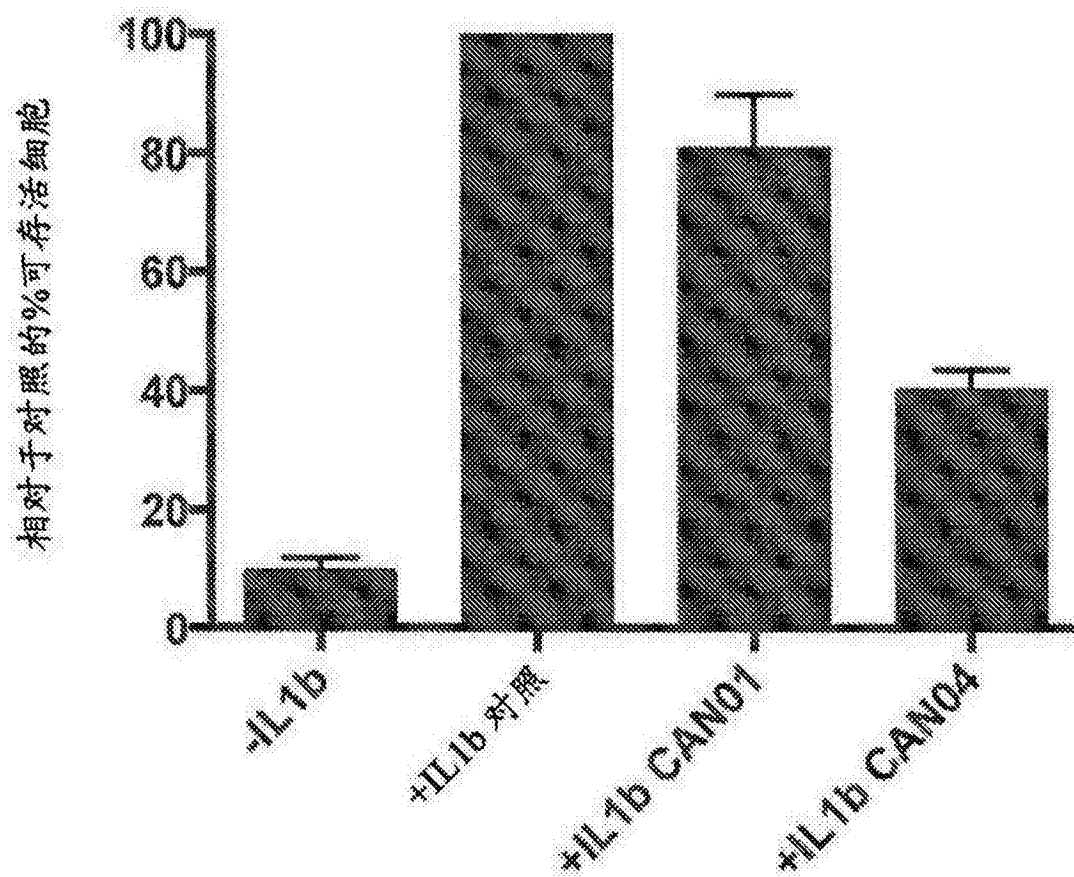


图5

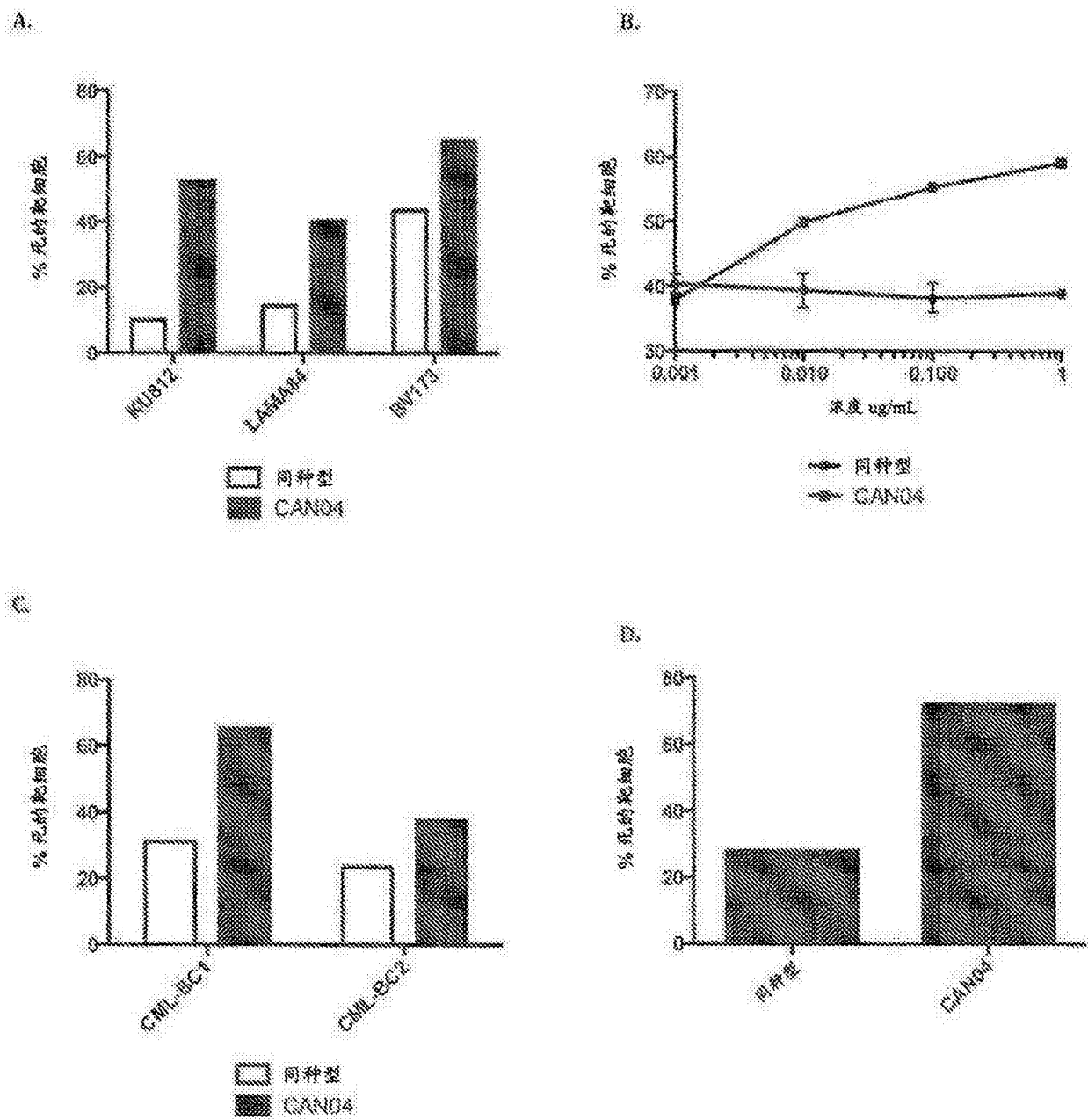


图6

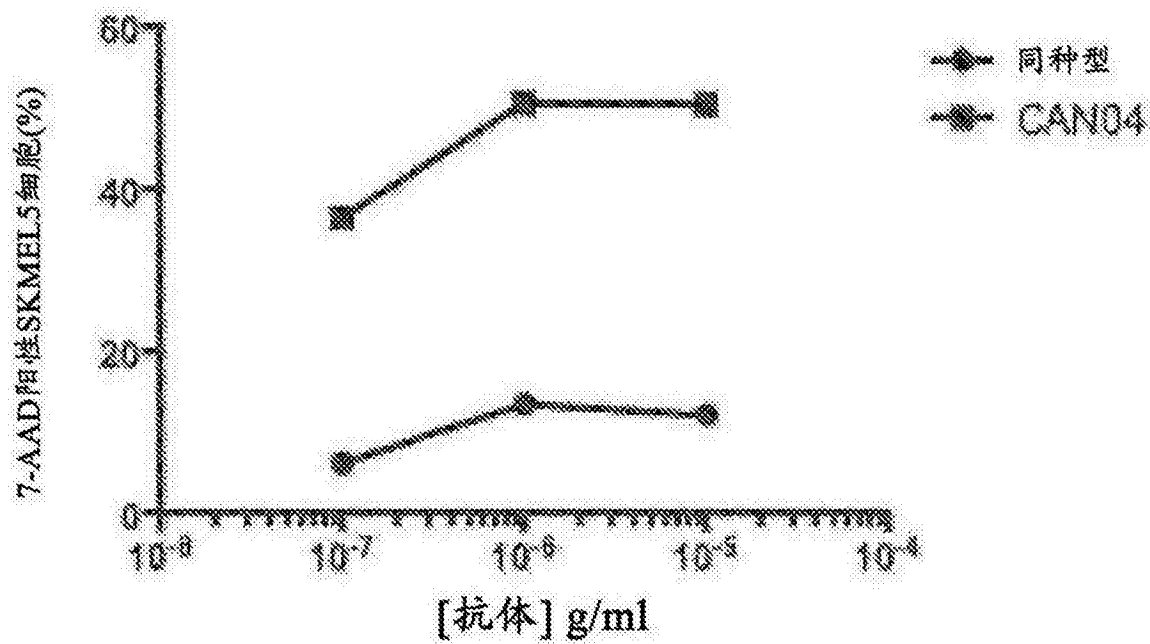
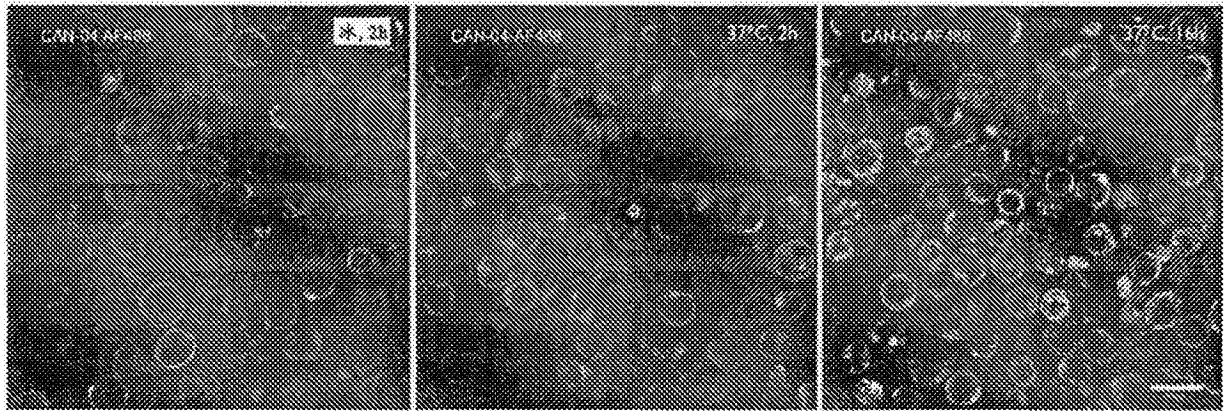


图7

(A)



(B)

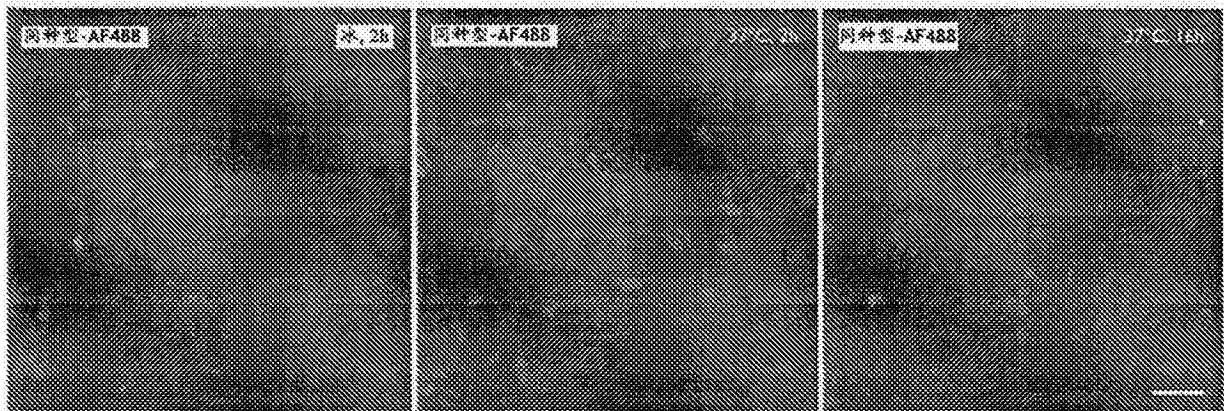


图8

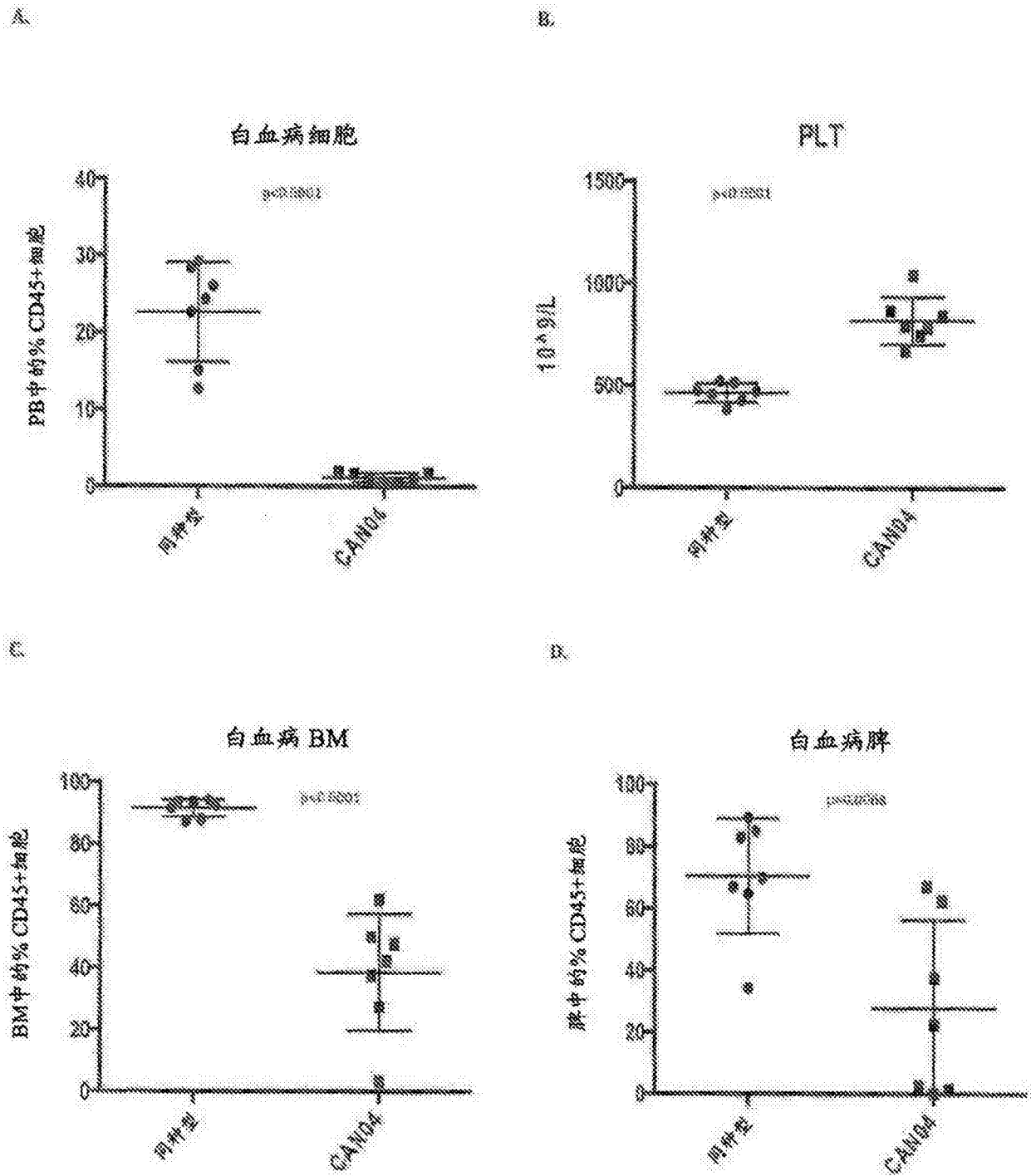


图9

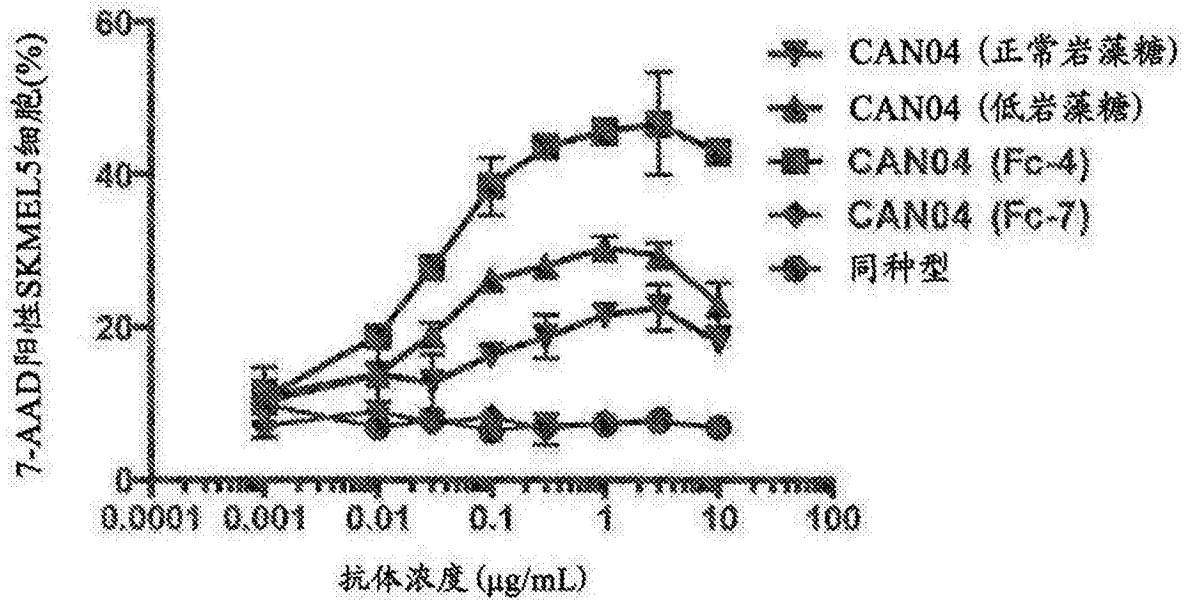


图10 (A)

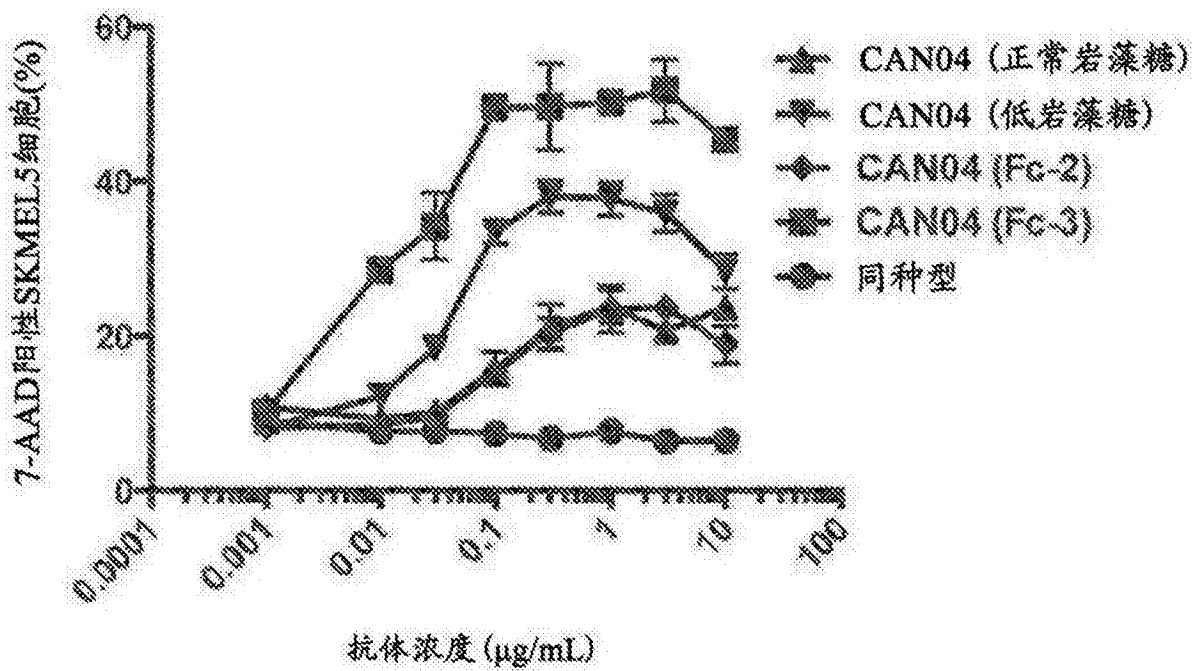


图10 (B)

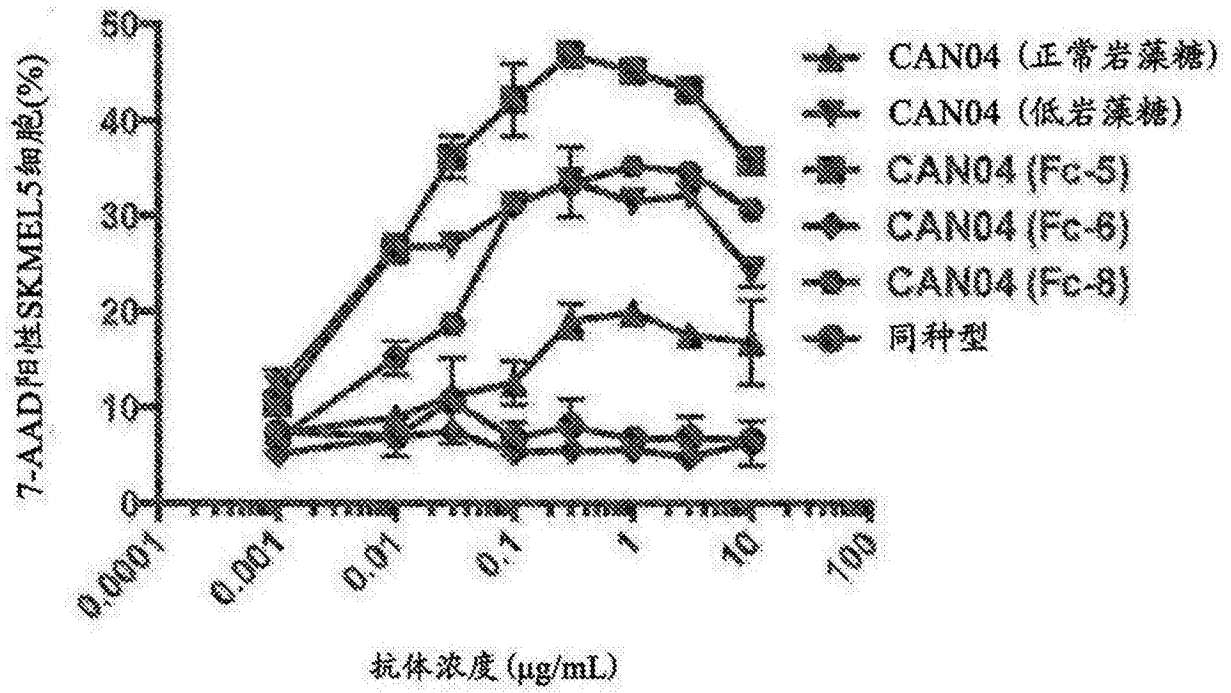


图10 (C)