



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104321346 B

(45)授权公告日 2018.12.07

(21)申请号 201380026672.3

(22)申请日 2013.05.24

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104321346 A

(43)申请公布日 2015.01.28

(30)优先权数据  
1209096.5 2012.05.24 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.11.21

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/GB2013/051373 2013.05.24

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/175229 EN 2013.11.28

(73)专利权人 医学研究技术理事会  
地址 英国伦敦

(72)发明人 T·约翰逊 P·沃森 D·马修斯  
A·布朗

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127  
代理人 庞东成 李栋修

(51)Int.Cl.  
C07K 16/40(2006.01)

(56)对比文件

W0 2006100679 A2,2006.09.28,  
Roberto Di Niro et al..Construction  
of miniantibodies for the in vivo study  
of human autoimmune diseases in animal  
models..《BMC Biotechnology》.2007,第7卷(第  
46期),1-10.

无.Anti-transglutaminase 2 antibody  
[CUB 7402].《www.abcam.com/  
transglutaminase-2-antibody-cub-7402-  
ab2386.html》.2010,全文.

无.Anti-transglutaminase 2 antibody  
[CUB 7402].《www.abcam.com/  
transglutaminase-2-antibody-cub-7402-  
ab2386.html》.2010,全文.

DI NIRO et al..Characterizing  
monoclonal antibody epitopes by filtered  
gene fragment phage display..《Biochem.  
J.》.2005,889-894.

DI NIRO et al..Characterizing  
monoclonal antibody epitopes by filtered  
gene fragment phage display..《Biochem.  
J.》.2005,889-894.

审查员 马驰

权利要求书4页 说明书77页 附图49页

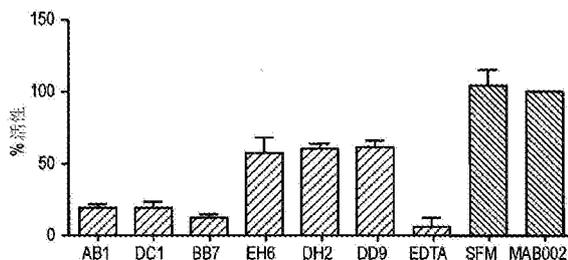
(54)发明名称

抗转谷氨酰胺酶2型的抗体

(57)摘要

本发明提供了与转谷氨酰胺酶2型(TG2)的核心区内的表位选择性结合的抗体及其抗原结合片段。提供了TG2核心内的新型表位。本发明提供了人TG2抑制性抗体及其应用,特别是在医药中的应用,例如在包括乳糜泻、疤痕、纤维化相关疾病、神经退行性/神经疾病和癌症在内的并在的治疗和/或诊断中的应用。

A: TG抑制



1. 一种抗转谷氨酰胺酶2型 (TG2) 的抗体,其包含以下CDR序列:

(a) KASQDINSYLT (LCDR1);

LVNRLVD (LCDR2);

LQYDDFPYT (LCDR3);

THAMS (HCDR1);

TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); 和

LISTY (HCDR3); 或

(b) KASQDINSYLT (LCDR1);

LTNRLMD (LCDR2);

LQYVDFPYT (LCDR3);

SSAMS (HCDR1);

TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); 和

LISPY (HCDR3); 或

(c) KASQDINSYLT (LCDR1);

RTNRLFD (LCDR2);

LQYDDFPYT (LCDR3);

SSAMS (HCDR1);

TISVGGGKTYYPDSVKG (HCDR2); 和

LISLY (HCDR3)。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中,所述抗体具有

(a) 包含下述序列的轻链可变区:

DITMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILLYLVNRLVDGVP SRFSGSGSGQDYAL  
TISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK,

和包含下述序列的重链可变区:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMS WVRQAPGKGLEWVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR  
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLISTYWGQGLVTVSS; 或

(b) 包含下述序列的轻链可变区:

DIKMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLMDGVP SRFSGSGSGQEFL  
TISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK,

和包含下述序列的重链可变区:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIIFSSSAMS WVRQAPGKGLEWVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSR  
SSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGLVTVSS; 或

(c) 包含下述序列的轻链可变区:

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGTDFFF  
T I S S L Q P E D F G T Y Y C L Q Y D D F P Y T F G G G T K L E I K , 或  
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGTDFFLT  
LQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK,

和包含下述序列的重链可变区:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMS WVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR

NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLIISLYWGQGLVTVSS。

3. 一种抗转谷氨酰胺酶2型 (TG2) 的抗体, 其具有:

(a) 包含下述序列的轻链可变区:

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHINGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSG  
TDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK,

和包含下述序列的重链可变区:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGQGLEWIGYINPYNDGAKYNEKFKGKATLTSD  
KSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS; 或

(b) 包含下述序列的轻链可变区:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHVSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSG  
TDFTLKISRVAEDLGVYYCLQVSHVPFTFGSGTKLEIK,

和包含下述序列的重链可变区:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGFINPYNDGTYNEKFKGKATLTSD  
KASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFSSGYWGQGTTLTVSS; 或

(c) 包含下述序列的轻链可变区:

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSG  
TDFTLRISSEVAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK,

和包含下述序列的重链可变区:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNEKFKGKATLTSD  
KSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS;

(d) 包含下述序列的轻链可变区:

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVDYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLT  
ISRGAEDAATYYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK,

和包含下述序列的重链可变区:

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISK  
DSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGLVTVSA;

(e) 包含下述序列的轻链可变区:

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLT  
ISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK,

和包含下述序列的重链可变区:

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISK  
DTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLVTVSA;

(f) 包含下述序列的轻链可变区:

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVAANNYANWIQEKPDHLFTGLIAGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKA  
ALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKVTVLG,

和包含下述序列的重链可变区:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHVVKQNLGKSLEWIGYINPKNGVIYYNQKFKGKATLTVN  
RSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCATALTYWGQGLVTVSA; 或

(g) 包含下述序列的轻链可变区:

DVVMQTPLTLSVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWFQRPQGSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSG  
TDFTLKISRVEADLGVYYCVQGTFFPYTFGGGTKLEIK,

和包含下述序列的重链可变区:

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMTWVKQAPGKGLKWMGWINTSSGVPTYADDFKGRFAFSLE  
TSASTAYLQINNLKSEDTATYFCARPEVAYWGQGLVTVSA。

4. 如权利要求1或3所述的抗体,所述抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。
5. 一种多核苷酸,所述多核苷酸编码权利要求1或3所述的抗体。
6. 一种化合物,所述化合物包含权利要求1或3所述的抗体,和另外的部分。
7. 如权利要求6所述的化合物,其中,所述另外的部分是能够容易检测的部分、或直接或间接具有细胞毒性的部分。
8. 一种药物组合物/制剂,所述药物组合物/制剂包含:权利要求1或3所述的抗体,或权利要求5所述的多核苷酸,或权利要求6所述的化合物,并混合有药学上可接受的赋形剂、佐剂、稀释剂或载剂。
9. 如权利要求8所述的药物组合物/制剂,所述药物组合物/制剂还包含一种或多种另外的活性成分。
10. 如权利要求9所述的药物组合物/制剂,其中,所述组合物/制剂配制为对患者静脉内、肌肉内、或皮下递送。
11. 一种套件试剂盒,所述套件试剂盒包含:权利要求1或3所述的抗体,或权利要求5所述的多核苷酸,或权利要求6所述的化合物;和另外的试剂。
12. 权利要求1或3所述的抗体,或权利要求5所述的多核苷酸,或权利要求6所述的化合物在制备药物中的应用。
13. 权利要求1或3所述的抗体,或权利要求5所述的多核苷酸,或权利要求6所述的化合物在制备药物中的应用,所述药物用于降低或抑制有需要的个体中的TG2活性。
14. 权利要求1或3所述的抗体,或权利要求5所述的多核苷酸,或权利要求6所述的化合物在制备药物中的应用,所述药物用于治疗 and/或诊断乳糜泻、异常伤口愈合、疤痕、炎症肠道疾病、黄斑变性、银屑病、纤维化相关疾病、动脉粥样硬化、再狭窄、炎症性疾病、自身免疫疾病、神经退行性/神经疾病、胶质母细胞瘤、恶性黑色素瘤、胰腺导管腺癌、髓细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、骨髓发育异常综合征、骨髓增生性综合征、妇科癌症、卡波氏肉瘤、汉森氏病、胶原性结肠炎。
15. 如权利要求14所述的应用,其中,所述疤痕是增生性瘢痕或眼部疤痕。
16. 如权利要求14所述的应用,其中,所述纤维化相关疾病是肝纤维化、肺纤维化、心脏纤维化、骨髓纤维化或肾纤维化。
17. 如权利要求16所述的应用,其中,所述肺纤维化是间质性肺病或纤维化肺疾病,所述肾纤维化是肾小球硬化或肾小管间质纤维化。
18. 如权利要求14所述的应用,其中,所述神经退行性/神经疾病是亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病,帕金森氏病,多聚谷氨酰胺疾病,脊髓延髓肌萎缩症,齿状苍白球萎缩,脊髓小脑性共济失调1、2、3、6、7和12,红核苍白球萎缩或脊髓小脑性麻痹。
19. 一种降低或抑制TG2活性的体外方法,所述方法包括对包含TG2的样品施用权利要求1或3所述的抗体,或权利要求5所述的多核苷酸,或权利要求6所述的化合物。

20. 一种制备权利要求1或3所述的抗体,或权利要求6所述的化合物的方法,所述方法包括表达权利要求5所述的多核苷酸。

## 抗转谷氨酰胺酶2型的抗体

[0001] 本发明涉及TG2的抑制剂以及提供和使用这种抑制剂的方法。

[0002] 转谷氨酰胺酶2型 (TG2; 也称作组织转谷氨酰胺酶, tTg) 是广泛的9成员转谷氨酰胺酶家族的一部分, 该家族包括对凝血关键的因子XIIIa, 以及参与角质形成细胞的终末分化的角质形成细胞转谷氨酰胺酶 (TG1) 和表皮转谷氨酰胺酶 (TG3)。另外, 还有其他TG家族成员, 例如迄今未鉴定出确切作用的TG 4型至7型。

[0003] TG2主要通过催化 $\epsilon$  ( $\gamma$ -谷氨酰基) 赖氨酸异二肽键的形成行使作为蛋白交联酶的功能。TG2的表达升高导致异常的蛋白交联, 这种异常的蛋白交联与数种病理相关, 包括各种类型的组织疤痕, 数种脑功能障碍中的神经原纤维缠结的形成和在某些癌症中对化疗的抵抗。TG2还能够使蛋白脱酰氨基。TG2使麦醇溶蛋白脱酰氨基, 而TG2/麦醇溶蛋白复合物是乳糜泻中的主要自身抗原。另外, TG2具有GTP结合功能, 并能够作为GTP酶起作用, 不过这还没有与病理作用相关联。

[0004] 升高的TG2活性主要与异常伤口愈合[1]相关, 导致肝脏[2]、肺[3]、心脏[4]和肾脏纤维化[5]以及动脉粥样硬化[6]。疤痕和纤维化的过程与合成增加相关, 最重要的是与TG2向间隙空间的输出增多相关。一旦在细胞外, TG2就能够通过引入 $\epsilon$  ( $\gamma$ -谷氨酰基) 赖氨酸二肽键[8]而交联细胞外基质 (ECM) 蛋白, 例如纤连蛋白和胶原[7]。研究已表明, 这可加速可用ECM组分的沉积, 而同时对由基质金属蛋白酶 (MMP) 的系统进行的蛋白水解赋予抗性[9, 10]。合在一起, 这导致ECM蛋白的积累, 并因此导致疤痕组织[9]。另外, TG2在疤痕形成过程中显示出具有激活潜在的TGF- $\beta$ 1的作用[11], 并也与白介素6[12]和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 激活途径[13]相关联。

[0005] TG2的体外抑制降低了细胞外基质水平[14], 而来自TG2敲除小鼠的细胞具有较低水平的成熟ECM[9]。泛TG抑制剂在慢性肾脏疾病模型中的体内应用降低了肾小球硬化症和肾小管间质纤维化的发展, 保存了肾功能[15, 16]。在发生了单侧输尿管梗阻的TG2敲除小鼠中也可见类似的益处[17]。

[0006] 有数种神经退行性疾病的特征在于在脑部的退行性区域中存在蛋白聚集体, TG2涉及其形成。表征最好的是亨廷顿氏舞蹈症。亨廷顿氏蛋白 (htt) 在其N端域包含伸展的多谷氨酰胺重复。野生型htt包含少于35个连续的谷氨酰胺, 而疾病相关的htt通常具有超过40个连续谷氨酰胺, 这使得它成为优良的TG2底物。然后, 在亨廷顿疾病患者的纹状体和皮质中形成不溶性聚集体。聚集体发生的频率与疾病的严重性非常相关。

[0007] 阿尔茨海默病的特征在于存在由聚集的淀粉样蛋白 $\beta$ -蛋白构成的胞外衰老斑块和由蛋白 $\tau$ 的高级磷酸化形式构成的胞内神经原纤维缠结体。这些斑块含有大量的 $\epsilon$  ( $\gamma$ -谷氨酰基) 赖氨酸异二肽键。

[0008] 最后, 帕金森病的标志是在受影响的神经元的细胞质中存在称为Lewy小体的 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体, 而该聚集体同样包含 $\epsilon$  ( $\gamma$ -谷氨酰基) 赖氨酸异二肽键。所有的上述蛋白均是TG2的体外良好底物。此外, 脑的受影响区域中比同一患者未受影响的大脑区域中含有更高水平的TG2蛋白。对于疾病相关的凝集蛋白而言特异的TG2底物和TG2表达水平增加之间的关联表明每种疾病中酶促活性TG2都有关键作用。

[0009] 已经显示TG抑制剂在神经退行性疾病的多种生物学模型中发挥治疗效果。在用 $\alpha$ -突触核蛋白和TG2同时转染COS-7细胞的帕金森病细胞培养模型中,形成共价突触核蛋白聚集体(让人联想到帕金森病的Lewy小体),并取决于酶促活性TG2,这是因为C277S失活TG2突变体不能诱导聚集体形成。以胍胺对这些共转染细胞的处理显著降低了 $\alpha$ -突触核蛋白聚集物的量以及含有该聚集体的细胞的百分比。已经有另外两份报告,其中将具有正常长度的蛋白和代表扩大CAG疾病(例如亨廷顿氏病)的扩大的多谷氨酰胺重复蛋白转染到细胞系中,并显示出形成聚集体。以TG竞争性抑制剂单丹酰尸胺对这些细胞的处理导致了核片段化的降低,而胍胺的治疗同时导致核片段化的降低以及蛋白聚集体形成的降低。泛TG抑制剂的实例是获自Zedira GmbH的1,3-二甲基-2-[(2-氧-丙基)硫代]咪唑鎓氯化物,其在数篇公开物中称为NTU283或r283。

[0010] 在亨廷顿氏病的小鼠模型中给药时,胍胺在体内产生有益的治疗效果。与未处理的对照相比,服用胍胺的亨廷顿氏R6/2小鼠表现出运动功能的改进,体重下降严重程度降低,和存活增加。重要的是,在注射后至少60分钟以胍胺给药后,脑组织匀浆中的离体TG2活性下降。在亨廷顿氏病的不同的小鼠模型YAC128品系中,胍胺能降低纹状体萎缩水平,但不能改善动物体重或运动功能,表明胍胺在细胞和组织水平的有益效果,但对疾病症状没有有益效果。

[0011] 可能胍胺对亨廷顿氏小鼠的有益治疗效果与TG2抑制无关的最有说服力的证据来自于使R6/2亨廷顿氏小鼠与该TG2敲除小鼠杂交从而产生在不存在TG2时对神经退行易感的品系。当以胍胺处理R6/2TG2<sup>-/-</sup>小鼠时,运动功能改善和寿命增加与以胍胺处理的R6/2TG2<sup>+/+</sup>小鼠中看到的改善没有显著不同。另外,R6/1和R6/2TG2<sup>-/-</sup>小鼠与R6/1和R6/2TG2<sup>+/+</sup>小鼠相比具有增加的神经元蛋白聚集体水平,表明蛋白聚集机理与这些模型中的TG2转氨酰基活性无关。然而,值得注意的是R6/2TG2<sup>-/-</sup>小鼠与R6/2TG2<sup>+/+</sup>小鼠相比显示出运动障碍发生的延迟以及存活的改善,这表明TG2在R6/2模型的神经退行病理中有作用。

[0012] TG2还与乳糜泻有密切关系,乳糜泻在西欧每100人中影响1人的。乳糜性腹泻是T细胞介导的小肠炎性疾病,由小麦、大麦和黑麦中发现的称为醇溶谷蛋白的一类蛋白引起。这些蛋白中的高脯氨酸和谷氨酰胺含量使它们在消化过程中耐受天然的胃、胰、肠的蛋白酶和肽酶。所得的肽片段保持充分未消化状态进入小肠,并接触肠固有层,在此中被TG2修饰后,它们可以刺激T细胞介导的免疫应答,导致炎症和破坏肠结构。肠TG2使醇溶谷蛋白肽中的特定谷氨酰胺残基去酰胺化成为谷氨酸残基。在HLA-DQ2/8个体中,这些修饰肽被II类MHC分子递呈至相应的自身反应性T细胞。虽然醇溶谷蛋白具有高谷氨酰胺含量(约30%~35%),但这些谷氨酰胺残基中只有少数是人TG2的靶标。TG2的底物特异性、DQ2结合亲和力、和TG2处理的醇溶谷蛋白的T细胞刺激潜力之间良好关联强烈地表明,肽脱酰胺是由TG2介导并在决定疾病严重性中起重要作用。另外,乳糜泻患者产生响应于TG2醇溶蛋白复合物的自身抗体反应。这些抗TG2抗体中发源于小肠和血液中,其在小肠中显示出与细胞外TG2共同定位,在血液中其用作诊断疾病标志物。

[0013] 虽然缺少乳糜泻的模型,但离体实验表明TG2抑制有可能有益于乳糜泻患者。以TG2处理(脱去酰胺基)或非TG2处理(非脱酰胺基)的谷蛋白消化物培养乳糜泻患者小肠活检物均导致产生优先识别脱酰胺谷蛋白肽,而不是非脱酰胺谷蛋白肽的患者T细胞系。而且通过以胍胺阻断乳糜泻活检物中的内源性TG2的活性,与未经胍胺处理的对照相比有超过

一半的所得T细胞系增殖反应降低。细胞系对非脱酰氨基消化物没有很好相应。这些结果意味着,在乳糜泻肠活检中的谷蛋白响应T细胞群体自然偏向于识别脱酰胺谷蛋白肽而不是非脱酰胺基的肽,这些活检物中的内源性TG2活性可导致原位谷蛋白肽脱酰胺作用,以及用TG2抑制剂处理乳糜泻活检物可降低谷蛋白反应性T细胞增殖性响应。

[0014] 另一项研究表明,泛TG抑制剂2-[(2-氧丙基)硫代]咪唑鎓抑制剂在取自乳糜泻患者和对照的薄组织切片中均能够防止谷蛋白肽与内源性蛋白的原位交联。更重要的是,研究者指出以2-[(2-氧丙基)硫代]咪唑鎓温育完整乳糜泻小肠活检物防止了由免疫显性谷蛋白肽的非脱酰胺形式诱导的T-细胞活化。与此相反,在活检物与相同肽的脱酰胺基版本温育时,TG抑制对于控制T细胞活化无效。这些结果表明,在乳糜泻患者活检物中内源性TG2的抑制可以防止谷蛋白肽脱酰胺,并因此降低T-细胞的活化。

[0015] 数项观察结果支持下述假说: TG2在某些类型癌症的发展中起作用。多项研究表明,例如成胶质细胞瘤、恶性黑素瘤、和胰腺导管腺癌等癌症中,与健康组织中相比TG2蛋白在癌症组织中上调。某些癌症的化疗抗性和转移潜能与TG2表达水平之间的正相关已被证实,但在某些细胞类型中TG2已显示出对细胞具有抗凋亡作用,而TG2蛋白表达水平的siRNA下调或以TG2抑制剂进行的处理使这些细胞对凋亡敏感。另一方面,也有报道在某些类型的癌症中TG2表达下调[18]。最近,已经表明TG2是GPR56的结合伴侣,GPR56是在高转移性癌细胞中下调的蛋白,这表明TG2通过其与GPR56相互作用可作为肿瘤抑制蛋白[18]。

[0016] 现有的转谷氨酰胺酶抑制剂分为3个主要类别: 1) 与天然胺底物竞争的竞争性胺抑制剂(例如,脘胺和精胺); 2) 可逆变构抑制剂,例如GTP和新发现的一类具有噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-酮酰肼骨架的化合物; 和3) 不可逆抑制剂,包括2-[(2-氧丙基)硫代]咪唑鎓衍生物(乙酰化活性位点半胱氨酸)、3-卤代-4,5-二氢异噻唑(在活性位点形成稳定的亚氨基硫醚)和插入有各种反应性部分的羰基氧基-L-谷氨酰胺酰基甘氨酸类似物。

[0017] 大多数已经用于上述实验体系,并显示出有益结果。然而,这些抑制剂均未显示出TG亚型特异性,这是因为它们均靶向在转谷氨酰胺酶家族催化核心内的保守性催化三联体。因此,所有这些可能均具有同时抑制因子XIIIa、TG1和TG3的缺点,这由于可预见的副作用而大大地阻止了其在人疾病中的应用。

[0018] WO 2006/100679描述了从具有较高抗TG2抗体滴度的3名成人乳糜泻患者搜集的样本中通过重组技术制备的特异性抗TG2抗体。

[0019] 基于TG2与多种疾病状态有关以及来自非特异性抑制剂的引人注目的数据,需要具有最小脱靶效果的高选择性和高功效的TG2抑制剂。

[0020] 本说明书中看起来现有出版的文件的列表或讨论不必然被看做该文件是现有技术的一部分或公知常识。

[0021] 在第一方面,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与转谷氨酰胺酶2型(TG2)的核心区内的表位选择性结合。

[0022] 在某些实施方式中,认为所述抗体或其抗原结合片段与人TG2、大鼠TG2和/或小鼠TG2的核心区内的表位选择性结合。在特别优选的实施方式中,TG2是人TG2。

[0023] 可以以Genbank登录号NM\_004613、NM\_019386.2和NM\_009373.3找到人、大鼠和小鼠TG2的全长氨基酸序列。这些序列的编码部分如下:

[0024] 人TG2核苷酸序列:

[0025]

atggccgaggagctgggtcttagagaggtgtgatctggagctggagaccaatggccgagaccaccacacggccgacct  
 gtgccgggagaagctgggtggtgcagcggggccagcccttctggctgacctgcactttgagggccgcaactacgagg  
 ccagtgtagacagtctcaccttcagtgtcgtgaccggccagcccttagccaggaggccgggaccaaggcccgtttt  
 ccactaagagatgctgtggaggagggtgactggacagccaccgtgggtggaccagcaagactgcaccctctcgtgca  
 gctcaccaccccgccaacgccccatcgccctgtatcgctcagcctggaggcctccactggctaccagggatcca  
 gctttgtgctggggcacttcattttgccttcaacgcctgggtgccagcggatgctgtgtacctggactcggaagag  
 gagcggcaggagtatgtcctcaccagcagggtttatctaccagggtcggccaagtteatcaagaacataccttg  
 gaatgggcagtttgaagatgggatcc tagacatctgctgatactcttagatgtcaacccaagttectgaaga  
 acgcccggcgtgactgctcccggcagcagccccgtctacgtgggcccgggtggtgagtggcatggtcaactgcaac  
 gatgaccagggtgtgctgctgggacgctgggacaacaactacggggacggcgtcagccccatgtcctggatcggcag  
 cgtggacatcctgcggcgtggaagaaccacggctgccagcgcgtcaagtatggccagtgtgggtcttcgccgccc  
 tggcctgcacagtgtgaggtgctgggcatccctaccgcgtcgtgaccaactacaactcgccccatgaccagaac  
 agcaaccttctcatcgagtacttccgcaatgagtttggggagatccagggtgacaagagcagatgatctggaactt  
 ccactgctgggtggagtcgtggatgaccaggccggacctgcagccggggtacgagggtggcaggccc tggacccaa  
 cgccccaggagaagagcgaaggacgtactgctgtggcccagttccagttcgtgceatcaaggaggcgacctgagc  
 accaagtacgatgcgccc tttgtctttgcccggaggtcaatgccgacgtggttagactggatccagcaggacgatgggtc  
 tgtgcacaaatccatcaaccgttccctgatcgttgggctgaagatcagcactaagagcgtgggcccagacgagcggg  
 aggatatacccacacctacaaatacccagaggggtcctcagaggagaggaggccttcacaaggcggaaccacctg  
 aacaaactggccgagaaggaggagacagggatggccatgcggatccgtgtgggcccagagcatgaacatgggcagtga  
 ctttgacgtctttgcccacatcaccacaacaccgcgtgaggagtacgtctgccgctcctgctctgtgcccgcaccg  
 tcagctacaatgggatcttggggcccagtggtggcaccagtacgtcctcaacctcaacctggagcctttctctgag  
 aagagcgttctctttgcatcctctatgagaaataccgtgactgccttacggagtccaacctcatcaaggtgcgggc  
 cctcctcgtggagccagttatacaacagctacctgctggctgagagggacctctacctggagaatccagaaatcaaga  
 tccggatccttggggagcccaagcagaaacgcaagctgggtggctgaggtgtcctgcagaaccgctcctctgtggcc  
 ctggaaggtgcaccttcaactgtggagggggccggcctgactgaggagcagaagacggtggagatcccagaccccgt  
 ggaggcaggggaggaagttaaggtgagaatggacctgctgccgctccacatgggctccacaagctgggtggtgaact  
 tcgagagcgacaagctgaaggctgtgaagggttccggaatgtcatcattggccccgcctaa

[0026] 人TG2氨基酸序列:

[0027] MAEELVLERCDLELETNGRDHHTADLCREKLVVRRGQPFWLT LHFEGRN YEASVDSL TFS

[0028] VVTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEEGDWTATVVDQQDCTLSLQLTTPANAPIGLYRLSLE

[0029] ASTGYQSSFVLGHFILLFNAWCPADAVYLDSEEEERQEYVLTQQGF IYQGS AKF IKNIPW

[0030] NFGQFEDGILDICLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVS GMVNCNDDQG VLLGR

[0031] WDNNYGDGVSPMSWIGSVDILRRWKNHGCQRVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVV TN

[0032] YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGDKSEMIWNFHCWVESW MTRPDLQPGYEGWQALDPT

[0033] PQEKSEGTGCCPVVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDDGSVHKSINRSL

[0034] IVGLKISTKSVGRDEREDITHYKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLA EKEETGMAMRIRVG

[0035] QSMNMGSDFDVFAHITNNTAE EYVCRLLL CARTVSYNGILGPECGTKYLLNLNLEPFSEK

[0036] SVPLCILEYKYRDCLTESNLIKVRALLVEPVINSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQK

[0037] RKLVAEVS LQNPLPVALEGCTFTVEGAGL TEEQKTVE IPDPVEAGEEVKVRMDLLPLHMG

[0038] LHKLVVNFESDKLKAVKGFNRV IIGPA\*

[0039] 大鼠TG2核苷酸序列:

[0040]

Atggccgaggagctgaacctggagaggtgcgatttggagatacaggccaatggccgtgataccacacggccgacct
gtgccaagagaaaactggtgctgcccggaggccagcgcctccggctgacactgtacttcgagggccgtggctatgagg
ccagcgtggacagacttacatttgggtgccgtgaccggccagatcccagtgaaaggcagggaccaaggcccgcctc
tcaactgtctgacgatgtggaggaggatcctggtcagcctctgtgctggaccaacaggacaatgtcctctctgctgca
gctctgcaccccagccaatgtcctctgttggccagtaccgctcagcctggagacttctactggctaccaaggctcca
gcttcatgctgggtcacttcaatcctgctcttcaatgctgggtgccagcggatgacgtgtacctagattcagaggcg
gagcgcgggaatacgtcctcacacagcagggttcaatcaccagggtctgtcaagttcaatcaagagtgtgacctg
gaactttgggcagtttgaggatgggatcctggatgctgctgatgcttttggatgtgaacccaagtctctgaagg
accgtagccgggactgctcacgacgcagcagtcctcctatgtgggcccgtggtgagcggcatggtcaactgcaat
gatgaccagggtgtgcttctgggtcgtgggacaacaattatggggacggtatcagtcctatggcctggattggcag
cgtggacattctgcggcgtggaaggaacacggctgtcagcaagtgaagtatggccagtgcctgggtgttgcggcgg
tagcctgcacagtgtgcggtgccttggcatcctaccagagtgggtgaccaactacaactccgcccacgaccagaac
agcaacctgctcactgagtaactccgaaacgagtacggggagctggagagcaacaagagcgagatgatctggaattt
ccactgctgggtggagtcttggatgaccaggccagacctacagccaggctatgaggggtggcaggccattgaccca
caccgcaggagaagagcgaaggaacatactgttgtggccagctctcagtcggggccatcaaggagggtgacctgagc
accaagtatgatgcgtccttctgtgttggcgagggtcaacgctgatgtggtggactggatccggcagtcagatgggtc
tgtgctcaaatccatcaacaattccctggctcgtggggcagaagatcagcactaagagcgtgggcccgtgatgaccggg
aggacatcaccatacctacaagtaccagaggggtcccagaggagagggaagtcttaccagagccaaccacctg
aacaactggcagagaaagaggagacaggggtggccaatgggatccgagtgggggatggatgatgacttgggcaatga
ctttgacgtgttggccacatcgccaacgacacctcgagagccgtgagtgccgctcctgctctgtgcccgcactg
tcagctacaacggcgtgctggggcccagagtgtggcactgaggacatcaacctgacctggatccctactctgagaac
agcatecccccttgcacctctacgagaagtacagcgggttgcctgaccgagtcacaacctcaatcaaggtgcccgggtct
cctcgtcgagccagccgctaacagctacctgctggctgagagagatctctacctggagaatcctgaaatcaagatcc
ggatcctgggggagcccagcagaaccgcaaacctgggtggtgaggtgtcctgaagaacccacttctctgatctccctg
tatgactgtgtcttcaactgtggagggggctggcctgaccaaggaacagaagtctgtggaggtctcagacctgtgcc
agcaggagatgcggctcaaggtgcccgttgacctgttcccagctgataattggcctccacaagttgggtggtgaacttcc
agtgtgacaagctgaagtcggtcaagggttaccggaatatacatcatcggcccggcctaag

[0041] 大鼠TG2氨基酸序列:

[0042] MAEELNLERCDLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRRGQRFRLTLYFEGRGYEASVDRLTFG

[0043] AVTGPDPSEEAGTKARFSLSDVVEEGSWSASVLDQQDNVLSLQLCTPANAPVGGYRLSLE

[0044] TSTGYQGSSFMLGHFILLFNAWCPADDVYLDSEAERREYVLTQQGF IYQGSVKF IKSVPW

[0045] NFGQFEDGILDACLMLLDVNPKFLKDRSRDCSRRSSPIYVGRVVS GMVNCNDDQG VLLGR

[0046] WDNNYGDG ISPMAWIGSVDILRRWKEHGCQQVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN

[0047] YNSAHDQNSNLLIEYFRNEYGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPT

[0048] PQEKSEGTGCCPVSVRAIKEGDLSTKYDASFVFAEVNADVVDWIRQSDGSVLKSIINNSL

- [0049] VVGQKISTKSVGRDDREDITYTYKYPEGSPEEREVFTTRANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG  
 [0050] DGMSLGNDFDVFAHIGNDTSESRECRLLLCARTVSYNGVLGPECGTEDINLTLDPYSENS  
 [0051] IPLRILYEKYSGLTESNLIKVRGLLVEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQNR  
 [0052] KLVAEVS LKNPLSDSLYDCVFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDAVKVRVDLFPD IGL  
 [0053] HKLVVNFQCDKLSVKGYRNIIIGPA\*X

[0054] 小鼠TG2核苷酸序列:

[0055]

atggcagaggagctgctcctggagaggtgtgatttggagattcaggccaatggccgtgaccaccacacggccgacct  
 atgccaagagaaaactggtgctgcgtcggtcagcgcctccggetgactctgtactctcaggggcccgtggctacgagg  
 ccagcgtggacagcctcacgttcgggtgctgtgaccggcccagatcccagtgaaagaggcagggaaccaaggcccgcctc  
 tcaactgtctgacaatgtggaggaggatcttggtcagcctcagtgctggaccaacaggacaatgtcctctctctaca  
 gctctgcaccccagccaatgctcctattggcctgtaccgtctcagcctagaggcttctactggctaccagggtcca  
 gctttgtgctgggcccacttcaatcctgctctacaatgcctgggtcccagccgatgatgtgtacctagactcagaggag  
 gagcgacgggaatatgtccttacgcaacagggttcaatctaccaaggctctgtcaagttcaatcaagagtgtgccttg  
 gaactttgggcagttcgaggatggaatcctggatactgcctgatgctcttggatatgaacccaagtctcctgaaga  
 accgtagtcgggactgctcagcccagcagcagtcctatctatgtgggcccgtggtgagcgcctatggtcaactgcaat  
 gatgaccagggtgtgctctcgggcccgtgggacaacaactatggggaatggatcagtcctatggcctggattggcag  
 tgtggacattctgcggcgtggaaggaacacggctgtcagcaagtgaagtacgggcagtgctgggtgtttgcagcgg  
 tggcctgcacagtgctgcgggtgcccgcagcctaccagagtggtgaccaactacaactccgcccacgaccagaac  
 agcaacctgctcctcagagtacttccgaaatgagttcggggagcaggagagcaacaagagcgagatgatctggaactt  
 ccactgctgggtggagtcctggatgaccaggccagacctacagcccggcctatgaggggtggcaggccattgacccca  
 caccacaggagaagagcgaagggacatactgttgtggcccagctctcagtcgagccatcaaggaggagacctgagt  
 accaagtatgatgcacccttcgtgtttgccgaggtcaacgctgatgtggtggactggatccggcaggaagatgggtc  
 tgtgctcaaatccatcaaccgttccctggctgctggggcagaagatcagcactaagagtgtgggcccgtgatgaccggg  
 aggacatcaccatacctacaagtaccagaggggtcaccggaggagaggggaagtcttccaaggccaaccacctg  
 aacaaactggcagagaaagaggagacaggggtggccatgcgcatccagtgggggacagtatgagcatgggcaacga  
 ctctcagcgtgtttgcccacatcggaacgacacctcggagactcagagtgctgctcctctgctctgtgcccgcactg  
 tcagctacaacggggtgctggggcccagtggtggcactgaggacatcaacctgacctggatccctactctgagaac  
 agcatcccacttcgaatcctctacgagaagtacagcgggtgctgacagagtcaaacctcaatcaaggtgcggggcct  
 tctcctcgaaccagctgccaacagctacctgctggctgagagagatctctacctggagaatcccgaatcaagatcc  
 gggctctgggagaacccaagcaaaaccgcaaacgtgtggctgaggtgtccctgaagaacccacttccgateccctg  
 tatgactgcacttctcactgtggagggggctggcctgaccaaggagcagaagctctgtggaagctctcagaccgggtgcc  
 agcggggcatttgggtcaaggcacgggtcagcctgttcccagctgatattggcctccacaagctgggtggtgaacttcc  
 agtgtgacaagctgaagtcggtgaagggttaccggaatgttatcatcggcccggcctaa

[0056] 小鼠TG2氨基酸序列:

- [0057] MAEELLRLERCDLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRRGQRFRLTLYFEGRGY  
 [0058] EASVDSLTFGAVTGPDPSEEAGTKARFSLSDNVEEGSWSASVLDQQDNVL  
 [0059] SLQLCTPANAPIGLYRLSLEASTGYQGSSFVLGHFILLYNAWCPADDVYL  
 [0060] DSEERREYVLTQQGFYQGSVKFIKSVPWNFGQFEDGILDTCMLLDNM

[0061] PKFLKNRSRDCSRRSSPIYVGRVVSAMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDG I S  
[0062] PMAWIGSVDILRRWKEHGCQQVKYGGCWFVA AVACTVLRCLGIPTRVV TN  
[0063] YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGESNKSEMIWNFHCWVESWMT RPDLQPG  
[0064] YEGWQAIDPTPQEKSEGT YCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNAD  
[0065] VVDWIRQEDGSVLK SINRSLVVGQKISTKSVGRDDREDI THTYKYPEGSP  
[0066] EEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVGD SMSGNDFDVFAHIGNDTS  
[0067] ETRECRLLLLCARTVSYNGVLGPECGTEDINLTDPYSENSIPLRILYEKY  
[0068] SGCLTESNLIKVRGLLIEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRVLGEPKQNR  
[0069] KLVAEVS LKNPLSDPLYDCIFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDLVKAR  
[0070] VDLFPTDIGLHKL VVNFQCDKLSVKGYRNVII GPA

[0071] 本发明人已经通过利用包含人TG2核心的氨基酸143至473的重组蛋白免疫小鼠制备了针对TG2的抗体。就TG2特异性和利用所克隆的任何适当候选物的抑制对杂交瘤进行筛选。从其中纯化了IgG以计算功效,并通过噬菌体展示筛选人TG2文库从而对靶标表位作图。

[0072] 通过利用重组TG2核心蛋白制备抗TG2的抗体的本发明方法此前没有被尝试过,该方法令人惊讶地分离并表征了对TG2有高度选择性并显示出强抑制特性的抗TG2抗体。制备抗TG2抗体的现有技术尝试分离了选择性相对较差的抗体,该抗体与转谷氨酰胺酶家族的其他成员交叉反应,因此不代表临床应用的有希望抗体。本发明抗体另一方面是因TG2活性而加重的疾病或由TG2活性介导的疾病的临床试验的有前景候选物。

[0073] 令人惊讶的是,本申请的方法已经产生了比此前制备的抗体有效的多的抗体。此前不能确保通过以核心区进行免疫就可制备是TG2有效抑制剂的抗体。如上所述,作为有效抑制剂的抗体可能对TG2的特异性不足,从而不能有效用于医药。令人惊讶的是,针对分歧区域(特别是,在TG2的不同转谷氨酰胺酶家族成员之间稍有分歧的核心区域)的抗体是有效且有选择性的TG2抑制剂。

[0074] 不希望受任何理论束缚,本发明人认为通过针对仅覆盖中央核心的更小蛋白产生抗体,本发明人不仅能够消除全长蛋白上存在的一些偏好免疫表位,而且还能强制核心靶向。这增加了可选择抗体的多样性,并提供了对核心的更广覆盖。

[0075] 仅以TG2核心免疫去除了酶的大量三级结构(特别是两个羧基末端 $\beta$ 桶结构域)。在天然全长TG2分子内可能可用性较少或免疫原性较少的一些表位可能是更具有吸引力具有本发明所述形式的核心的表位。此处所述抗体识别线性表位(即,在还原SDSPAGE凝胶中与TG2结合),而本发明人此前利用全长TG2作为免疫原分离的抗体中80%是构象依赖性的。本发明人能够显示出重组核心域保留了酶活性,因此可通过暴露在活性位点中或附近的此前不偏好的表位来辅助抑制性抗体的分离。有趣并且令人惊讶的是,通过以核心免疫也制备出针对人TG2的抑制性抗体,条件是假设该重组核心蛋白可能不表现出与全长蛋白相同的折叠特征。

[0076] TG催化核心在TG家族的不同成员之间以及跨物种均高度保守。这意味着,不仅特异性小分子抑制剂的开发而且基于抗体的抑制剂开发均是有技术挑战性的。不过,本公开提供了具有高度选择性的抗体。因此这可反映出以下事实:在TG2催化域中有一些具有一定异质性的区域。本发明抗体因此可利用这些小差异。本发明抗体令人惊讶的选择性使得能够开发可有效干扰TG2活性的治疗剂,因此对于受TG2活性而加重或由TG2活性引起的病症

提供了潜在有效的治疗方法,而这些病症目前没有令人满意的治疗选择。

[0077] 通过比较,证明由来自3名具有高抗TG2抗体滴度的成年乳糜泻患者的样品通过重组技术制备的WO 2006/100679所述抗体在本发明人测试时具有较低功效(实施例2)。在对TG2的选择性和抑制活性方面,本发明抗体远远优于WO 2006/100679的那些抗体。例如,本发明人制备了WO 2006/100679的抗体的Fab片段,将其以与本发明抗体相同的浓度应用于TG2抑制测试中。测试中的Fab片段量以摩尔方式计量是本发明抗体的两倍。但它们仍然未显示出对TG2活性的任何抑制。当在本发明的标准腐胺掺入测试中测试全长WO 2006/100679抗体时,未发现对TG2活性的抑制。因此,本发明的方法和通过这些方法产生的抗体优于此前所述的那些抗体。

[0078] 对于“抗体”本发明包括基本完整的抗体分子、以及嵌合抗体、人源化抗体、人抗体(其中,至少一个氨基酸相对于天然存在的人抗体发生突变)、单链抗体、双特异性抗体、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和/或轻链的同二聚体和异源二聚体,和抗原结合片段和其衍生物。本发明在术语“抗体”和“抗原结合片段”的含义内,还包括抗体及其抗原结合片段的变体、融合体和衍生物。

[0079] 术语“抗体”还包括所有类别的抗体,包括IgG、IgA、IgM、IgD和IgE。因此,所述抗体可以是IgG分子,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的分子。优选的是,本发明抗体是IgG分子,或其抗原结合片段,或其变体、融合体或衍生物。更优选的抗体是IgG2的分子。

[0080] 本发明的抗体、组合物、应用和方法涉及所定义的抗体及其抗原结合片段的变体、融合体和衍生物,以及所述变体或衍生物的融合体,条件是所述变体、融合体和衍生物对TG2具有结合特异性。

[0081] 由于抗体及其抗原结合片段包含一个或多个多肽组分,本文所述的抗体及其抗原结合片段的变体、融合体和衍生物可利用重组多核苷酸通过本领域公知的蛋白工程和定点突变的方法来制备(例如见Molecular Cloning:a Laboratory Manual,3rd edition,Sambrook & Russell,2001,Cold Spring Harbor Laboratory Press,其通过参考并入本文)。

[0082] 因此,可以基于抗体或其抗原结合片段的多肽组分来制备本文所述的抗体或其抗原结合片段的变体、融合体和衍生物。

[0083] 对于“融合体”,本发明包括与任何其它多肽融合的所述多肽。例如,所述多肽可以与诸如谷胱甘肽-S转移酶(GST)或蛋白A等多肽按顺序顺序融合,从而有利于纯化所述多肽。此类融合体的实例是本领域技术人员公知的。类似地,所述多肽可以与例如His6等寡聚氨基酸标签融合,或与例如公知的Myc-标签表位等由抗体识别的表位融合。与所述多肽的任何变体或衍生物融合也包括在本发明范围内。可以理解的是,优选的是保留了所需性质的融合体(或其变体或衍生物),例如对TG2具有结合特异性。

[0084] 融合体可以包括对所述多肽赋予所需特征的另一部分,或由对所述多肽赋予所需特征的另一部分组成;例如,该部分可以用于检测或分离所述多肽,或促进细胞对多肽的摄取。该部分可以是,例如生物素部分、放射性部分、荧光部分,例如小的荧光团或绿色荧光蛋白(GFP)荧光团,这是本领域技术人员公知的。该部分可以是免疫原性标签,例如Myc-tag(如本领域技术人员已知的)或可以是亲脂性分子或能够促进多肽的细胞摄取的多肽域(如本领域技术人员已知的)。

[0085] 对于所述多肽的“变体”，本发明人是指其中一个或多个位置上具有保守的或非保守的氨基酸插入、缺失和/或取代的多肽，条件是这种变化产生的蛋白的基本特性，例如结合性、热稳定性、在一定pH范围内的活性(pH稳定性)都没有显著改变。在此上下文中“显著”是指本领域技术人员会判断出变体的性质可能仍然有所不同，但不会相对于原始蛋白不明显。因此，本发明包括其中所述变化基本上不改变所述多肽活性的多肽变体。特别是，本发明包括其中所述变化基本上不改变TG2结合特异性的多肽变体。

[0086] “保守性取代”是指指定的组合，例如Gly、Ala；Val、Ile、Leu；Asp、Glu；Asn、Gln；Ser、Thr；Lys、Arg；和Phe、Tyr。

[0087] 可利用蛋白工程和定点突变的方法制备所述变体。

[0088] 多肽变体可具有与本文给出的一个或多个氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列，例如与本文规定的一个或多个氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%，或至少99%同一性。

[0089] 可利用适当的计算机程序来确定2条多肽之间的百分比序列同一性，例如威斯康星大学遗传计算组的GAP程序，应当理解的是百分比同一性是相对于序列已经过最佳比对过的多肽而计算的。

[0090] 作为另外的选择，可利用Clustal W程序进行比对(如Thompson等，1994，Nucl. Acid Res. 22:4673-4680中所述，其通过参考并入本文)。

[0091] 所用参数可以如下所示：

[0092] -快速配对比对参数：K-tuple (词) 大小；1，窗口大小；5，空位罚分；3，顶部对角线数量；5. 评分方法：x百分比。

[0093] -多比对参数：空位开放罚分；10，空位延伸罚分；0.05。

[0094] -评分矩阵：BLOSUM。

[0095] 作为另一种选择，BESTFIT程序可用于确定局部序列比对。

[0096] 本发明方法或应用中所用的抗体、抗原结合片段、变体、融合体或衍生物可包含已被修饰或衍生化的一个或多个氨基酸，或由所述一个或多个氨基酸组成。

[0097] 一个或多个氨基酸的化学衍生物可通过与官能性侧链基团反应来实现。所述衍生化分子包括，例如其中游离氨基经衍生而形成胺盐酸盐、对-甲苯磺酰基、羧基苯甲酰基、叔丁氧羰基、氯乙酰基或甲酰基的那些分子。游离羧基可以衍生形成盐、甲基和乙基酯、或其他类型的酯和酰肼。游离羟基可以衍生形成O-酰基或O-烷基衍生物。作为化学衍生物还包括是含有20种标准氨基酸的天然存在氨基酸衍生物的那些肽。例如：4-羟基脯氨酸可以取代脯氨酸；5-羟基赖氨酸可以取代赖氨酸；3-甲基组氨酸可以取代组氨酸；高丝氨酸可以取代丝氨酸；并且鸟氨酸可以取代赖氨酸。衍生物还包括含有一个或多个添加或缺失的肽，只要维持所需的活性即可。其它所包含的修饰有酰胺化、氨基末端酰基化(例如乙酰化或巯基乙酸酰胺化)、末端羧基酰胺化(例如采用氨或甲基胺)和其他末端修饰。

[0098] 本领域技术人员应当理解的是，肽模拟物化合物也可使用。因此，对于“多肽”，本发明包括能够与TG2核心区内的表位结合的肽模拟物化合物。术语‘肽模拟物’是指模拟作为治疗剂的特定肽的构象和所需特征的化合物。

[0099] 例如，所述多肽不仅包括其氨基酸残基通过肽(-CO-NH-)键连接的分子，而且还包括其中的肽键反转的分子。这种逆反式肽模拟物可以使用本领域中已知的方法制备，如

Meziere等(1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237有所描述,其通过参考并入本文。这种方法包括制备含有涉及骨架改变而不是方向改变的假肽。以NH-CO键替代CO-NH肽键的逆反式肽更耐蛋白水解。作为另一种选择,所述多肽可以是下述肽模拟物化合物,其中一个或多个氨基酸残基通过 $-y(CH_2NH)-$ 替代常规酰胺键相连。

[0100] 在另一种选择中,只要使用了保留氨基酸残基的碳原子之间的空隙的适当连接物部分,就可以完全免除肽键;可能有利的是所述连接物部分与肽键基本具有相同的电荷分布和与肽键基本具有相同的平面性。

[0101] 应当理解的是,所述多肽可以常规地在其N-或C-末端封闭,从而有助于降低其对外切蛋白水解消化的易感性。

[0102] 各种各样的未编码氨基酸或修饰氨基酸也已被用于修饰哺乳动物肽,如D-氨基酸和N-甲基。另外,可通过例如环化等共价修饰或通过引入内酰胺或其他类型的桥键来稳定推定的生物活性构象,例如见Veber等,1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2636,和Thursell等,1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111:166,这两篇文献通过参考并入本文。

[0103] 多种合成策略的一个共有主题已经是在基于肽的框架中引入一些环状部分。环状部分限制所述肽结构的构象空间,这通常导致肽对特定生物受体的特异性增加。这一策略的附加优点是在肽中引入环状部分还可以获得对细胞肽酶灵敏度减弱的肽。

[0104] 因此,用于本发明方法和应用中的示例性多肽包括或包含末端半胱氨酸氨基酸。所述多肽可以通过末端半胱氨酸氨基酸的巯醇基团形成二硫键而以异源环状形式存在,或通过末端氨基之间形成酰胺肽键以同源形式存在。如上所述,通过N末端和C末端的半胱氨酸之间的二硫键或酰胺键使小肽环化,可以通过减小蛋白水解作用并且增加结构刚性,可规避线性肽中有时会观察到的特异性和半衰期问题,这可能会产生特异性较高的化合物。通过二硫键环化的多肽具有仍可能受到蛋白水解降解的游离氨基端和羧基端,而通过N末端胺和C末端的羧基之间形成酰胺键而环化的肽因此不再含有游离的氨基或羧基末端。因此,所述肽可以通过C-N键或二硫键连接。

[0105] 本发明不以任何方式受肽环化方法的限制,但涵盖了可通过任何适当合成方法实现环化结构的肽。因此,异源连接可包括但不限于通过二硫键、亚烷基或硫化物桥形成。环状同源肽和环状异源肽的合成方法包括二硫键、硫化物或亚烷基桥,在US 5,643,872中有所公开,其通过参考并入本文。环化方法的其他实例在US 6,008,058中讨论和公开,其通过参考并入本文。

[0106] 合成环状的稳定肽模拟物化合物的另一方法是闭环置换(RCM)。该方法包括以下步骤:合成肽前体,并使其与RCM催化剂接触,从而产生构象受限制的肽。合适的肽前体可以包含两个或多个不饱和C-C键。该方法可以利用固相肽合成技术进行。在本实施方式中,锚定至固相支持物的前体与RCM催化剂接触,然后将产物从固相支持物上切下,从而产生构象受限制的肽。

[0107] D.H.Rich在 *Protease Inhibitors* (Barrett和Selveson编,Elsevier 1986,其通过参考并入本文)中公开的另一种方法是通过在酶抑制剂设计中应用过渡态类似物概念来设计肽模拟物。例如,已知辛伐他汀(staline)的仲醇模拟了胃蛋白酶底物的易断裂酰胺键的四面体过渡态。

[0108] 总之,末端修饰如已知的那样可用于降低对蛋白酶消化的易感性,因此延长溶液

中肽的半衰期,特别是存在蛋白酶的生物液体中肽的半衰期。由于内环化形成稳定的结构和对环状肽观察到的生物活性,多肽环化也是有用的修饰。

[0109] 因此,在一个实施方式中,所述多肽是环状。然而,在替代性实施方式中,所述多肽是线性。

[0110] 对于“与TG2核心区内的表位选择性结合”,本发明是指能够与TG2核心区中表位选择性结合的抗体或其抗原结合片段。对于“能够选择性结合”,本发明包括与TG2核心的结合比其它蛋白至少强10倍的所述抗体衍生结合部分;例如至少强50倍,或至少强100倍。所述结合部分可以在生理条件下,例如在体内,与TG2核心中的表位选择性结合。

[0111] 这类结合特异性可使用表达TG2或TG2核心或其片段的转染细胞通过本领域公知的方法来确定,例如酶接免疫吸附测定(ELISA)、免疫组化、免疫沉淀、蛋白免疫印迹和流式细胞术。测量相对结合强度的适当方法包括:免疫检测,例如其中结合部分是抗体的免疫检测(见Harlow & Lane,“Antibodies:A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,其通过参考并入本文)。作为另一种选择,可以使用竞争性测试或使用Biacore®分析来评估结合(Biacore International AB,Sweden)。

[0112] 优选的是,本发明的抗体或抗原结合片段仅与TG2结合。

[0113] 本领域技术人员应当领会的是,抗体或其抗原结合片段的结合特异性是由组成性重链和轻链的可变区中存在互补决定区(CDR)而赋予的。如下所述,在本文限定的抗体及其抗原结合片段的特别优选实施方式中,对TG2的结合特异性是由存在一个或多个所鉴定的CDR而赋予的。例如,可包含AB-1VL和VH的CDR序列或由其组成的序列包括:KASQDINSYLT、RTNRLFD、LQYDDFPYT、SSAMS、TISVGGGKTYYPDSVKG和LISLY。在另一实例中,可包含BB-7VL和VH的CDR序列或由其组成的序列包括:KASQDINSYLT、LTNRLMD、LQYVDFPYT、SSAMS、TISSGGRSTYYPDSVKG和LISPY。可包含DC-1VL和VH的CDR序列或由其组成的序列包括:KASQDINSYLT、LVNRLVD、LQYDDFPYT、THAMS、TISSGGRSTYYPDSVKG和LISTY。优选的是,此处所述的抗体及其抗原结合片段包括表24A中限定的CDR序列,或CDR和侧翼序列,或由这些序列组成。最优选的是,此处所述的抗体及其抗原结合片段包含示例性抗体AB-1、或BB-7、或DC-1的CDR序列,或CDR和侧翼序列(例如如表24A中限定)。

[0114] 优选的是,所述抗体或其抗原结合片保留了原始抗体的对TG2的结合特异性。“保留结合特异性”是指抗体或其抗原结合片段能够与本发明的示例性抗体竞争结合TG2,本发明的示例性抗体例如有AB-1、AG-1、AG-9、AH-1、AH-3、BB-7、DC-1、EH-6、JE-12、IA-12、DF-4、DH-2、DD-6和/或DD-9(见所附实施例)。例如,所述抗体或其抗原结合片段可与包含下述序列的抗体结合TG2上相同的表位:KASQDINSYLT、RTNRLFD、LQYDDFPYT、SSAMS、TISVGGGKTYYPDSVKG和LISLY。

[0115] “表位”在此意图指代分子中抗体所结合的位点,即,抗原的分子区域。表位可以是抗原的线性表位,其由例如氨基酸序列(即,一级序列)确定,或可以是抗原的三维表位,由抗原的二级结构限定,例如肽链折叠为 $\beta$ 片层或 $\alpha$ 螺旋,或由抗原的三级结构限定,例如螺旋或片层折叠或排布得到抗原的三维结构的方式。

[0116] 确定测试抗体是否能够与另一抗体竞争结合的方法是本领域公知的例如夹心-ELISA或反夹心-ELISA技术),并在例如Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow & 泳道(1988,CSHL,NY,ISBN 0-87969-314-2)有所描述,其通过参考并入本文。

[0117] 对TG2核心区中的表位具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段还可以保留一种或多种与原始抗体(例如,实施例提供的示例性抗体)相同的生物学性质。

[0118] 如上所述,TG2是钙依赖性的多功能蛋白,其在赖氨酸和谷氨酰胺残基之间催化形成Nε-(γ-谷氨酰基)异肽键。TG2包含N端β夹心域,该域包含结合位点(如纤连蛋白)和酶输出所需的序列。其连接至催化核心域。该域中间是由Cys 277、Asp 358和His 355组成的催化三联体,以及几个推定的钙结合位点。其连接到第三域β桶1,其中GTP结合位点使酶具有GTP酶活性。β桶1还含有在细胞粘附中使用的整联蛋白结合位点。β桶1连同第四TG2域、β桶2参与TG2激活所需的构象变化。在高钙情况下,低GTP环境桶1和2由闭合并折叠的无活性形式摆动为使TG2具有线性结构,打开催化核心,允许激活(Pinkas等(2007) PLoS Biol. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. 5(12):e327)。

[0119] 对于“转谷氨酰胺酶2型(TG2)的核心区”,本发明包括TG2的包含上述催化三联体的区域,不包括β夹心域以及β桶1和2。优选的是,核心区包含人TG2的氨基酸143至473或其片段,或者由其组成。

[0120] 人TG2的氨基酸143至473由以下序列组成:

[0121] CPADAVYLDSEEERQEYVLTQQGFYQGS AKF IKNIPWNFGQFEDGILDICLILLDVNPKFLKNAGRDC  
SRRSSPVYVGRVVS GMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGVS PMSWIGSVDILRRWKNHGCQRVKYGCWVFAAVACTVL  
RCLGIPTRVVTNYNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELQGDKSEMIWNFHCWVESWMT RPDLPQGYEGWQALDPTPQEKS  
EGTYCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDDGSVHKSINRSLIVGLKISTKSVGRDEREDITH  
YKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGM

[0122] 因此,在本发明的实施方式中,核心区可由人TG2的氨基酸143至473组成。在该实施方式中,本发明抗体的表位因此可以是由人TG2的氨基酸143至473所限定的区域内的任何表位。因此,所述表位可以是该序列的片段,或者其可由该片段内的各种氨基酸残基构成,这些氨基酸残基可以在一级氨基酸序列中不相互邻接,但在蛋白二级、三级或四级结构中相互定位在一起,本领域技术人员对此可以理解。

[0123] 在本发明的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可整体或部分地与包含人TG2的氨基酸304至326的区域选择性结合。该区域(人TG2的氨基酸304至326)是指图5中的第1组,并包含氨基酸序列AHDQNSNLLIEYFRNEFGELQGD。

[0124] 在进一步的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可整体或部分地与包含人TG2的氨基酸351至365的区域选择性结合。该区域(人TG2的氨基酸351至365)是指图5中的第2组,并包含氨基酸序列YEGWQALDPTPQEKS。

[0125] 在本发明的又一实施方式中,抗体或其抗原结合片段可整体或部分地与包含人TG2的氨基酸450至467的区域选择性结合。该区域(人TG2的氨基酸450至467)是指图5中的第3组,并包含氨基酸序列SEEREAFTRANHLNKLAE。

[0126] 在本发明任何方面的优选实施方式中,抗体或其抗原结合片段抑制TG2活性,例如人TG2活性。

[0127] 在本发明的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可包含一个或多个以下氨基酸序列:

[0128] KASQDINSYLT;和/或

- [0129] RTNRLFD;和/或
- [0130] LQYDDFPYT;和/或
- [0131] SSAMS;和/或
- [0132] TISVGGGKTYYPDSVKG;和/或
- [0133] LISLY。
- [0134] 本发明的抗体或其抗原结合片段可包含一个或多个以下氨基酸序列:
- [0135] TCKASQDINSYLTWF;和/或
- [0136] TLIYRTNRLFDGVP或TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDF;和/或
- [0137] YCLQYDDFPYTFG;和/或
- [0138] FTLSSSAMSWSR或CXAXFTLSSSAMSWSR;和/或
- [0139] WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR或WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXL;和/或
- [0140] YCAKLISLYWG,其中,X是任意氨基酸。
- [0141] 认为上述实施方式的序列包含示例性抗体AB-1(见实施例1)和示例性AB-1抗体的某些指定人源化变体的轻链和重链可变区的互补决定区。在进一步的实施方式中,抗体可包含氨基酸序列KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT;或KASQDINSYLTXXF;或RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXF;或XXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT,其中,X是任意氨基酸。
- [0142] 在进一步的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可包含氨基酸序列TCKASQDINSYLTWF或TCKASQDINSYLTWY;和/或
- [0143] LLIYRTNRLFDGVP或SLIYRTNRLFDGVP或LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDF或SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDF;和/或
- [0144] YCLQYDDFPYTFG;和/或
- [0145] FTFSSSAMSWSR或CXAXFTFSSSAMSWSR;和/或
- [0146] WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR或WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXL;和/或
- [0147] YCAKLISLYWG,其中,X是任意氨基酸。
- [0148] 因此,在实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含以下序列:KASQDINSYLT;和RTNRLFD;和LQYDDFPYT。
- [0149] 在进一步的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含以下序列:SSAMS;和TISVGGGKTYYPDSVKG;和LISLY。
- [0150] 在本发明的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGQDFFLT I S S L E Y E D M G I Y Y C L Q Y D D F P Y T F G G G T K L E I K 或 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGQDFFLT I S S L E Y E D M G I Y Y C L Q Y D D F P Y T F G G G T K L E I K。这些轻链可变区对应于示例性抗体AB-1所示的那些(图7和18)。
- [0151] 作为另一种选择,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列:
- [0152] EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGQDFFLT I S S L E Y E D M G I Y Y C L Q Y D D F P Y T F G G G T K L E I K

[0153] (AB-1\_VK) 或DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWVQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSQDFFLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

[0154] (AB-1\_VK1)。

[0155] 在特别优选的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列:

[0156] EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFFTISLQPEDFGTYCYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

[0157] (hAB-1\_RKE);或DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINSYLTWVQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

[0158] (hAB-1\_RKJ)。这些序列是以上提供的AB-1轻链序列的人源化变体。

[0159] 在本发明的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS或EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS。这些重链可变区对应于示例性抗体AB-1所示的那些(图7和18)。

[0160] 作为另一种选择,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列:

[0161]

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-1\_VH)。

[0162] 在特别优选的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列:

[0163]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-1\_RHA)。该序列是以上提供的AB-1重链序列的人源化变体。

[0164] 因此,设想在实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有:

[0165] i) 至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWVQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSQDFFLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK或DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWVQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSQDFFLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK,或

[0166] EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWVQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSQDFFLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

[0167] (AB-1\_VK),或DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWVQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSQDFFLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

[0168] (AB-1\_VK1),或EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFFTISLQPEDFGTYCYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

[0169] (hAB-1\_RKE),或DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINSYLTWVQQKPGKAPKSLIYRTNR

LFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK

[0170] (hAB-1\_RKJ);和

[0171] i i) 至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS或EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS,或

[0172]

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-1\_VH),或EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKLEWVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-1\_RHA)。

[0173] 在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可包含一个或多个以下氨基酸序列:

[0174] KASQDINSYLT;和/或

[0175] LTNRLMD;和/或

[0176] LQYVDFPYT;和/或

[0177] SSAMS;和/或

[0178] TISSGGRSTYYPDSVKG;和/或

[0179] LISPY。

[0180] 认为上述实施方式的序列包含示例性抗体BB-7的轻链和重链可变区的互补决定区(见图19)。在进一步的实施方式中,抗体可包含氨基酸序列KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXLTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYVDFPYT;或KASQDINSYLTXXXFX;或LTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXXXFX;或FXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYVDFPYT,其中,X是任意氨基酸。

[0181] 因此,在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含以下序列:KASQDINSYLT;和LTNRLMD;和LQYVDFPYT。

[0182] 在本发明任何方面的进一步实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含以下序列:SSAMS;和TISSGGRSTYYPDSVKG;和LISPY。

[0183] 在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列AIKMTQSPSSMYASLGERV IITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIIYYCLQYVDFPYTFGGGTKLEIK。该轻链可变区对应于示例性抗体BB-7中所见的那些(图19)。

[0184] 在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASG IIFSSSAMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDLSRSEDATYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS。该重链可变区对应于示例性抗体BB-7中所见的那些(图19)。

[0185] 因此,据设想在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有:

[0186] i) 至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列AIKMTQSPSSMYASLGERV I I



变区对应于示例性抗体DC-1中所见的那些(图20)。

[0203] 因此,据设想在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有:

[0204] i) 至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列  
DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFFQQKPGKSPKILYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISS  
LEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK;和

[0205] ii) 至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列  
EVQLVESGGGLVPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWVRQTPPEKRLWVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKN  
TLYLQLSSLRSEDVAVYFCARLISTYWGQGTTLTVS。

[0206] 还设想在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有:

[0207] i) 至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列  
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFFQQKPGKAPKSLIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISS  
LQPEDFATYYCYD DFPYTFGQGTKEIK 或  
DITMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFFQQKPGKAPKILYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISS  
LQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKEIK;和/或

[0208] ii) 至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列  
EVQLLESGLLVQPGGSLRLSAAASGFTFSTHAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKN  
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISTYWGQGTTLVTVSS 或  
EVQLLESGLLVQPGGSLRLSAAASGFTLSTHAMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKN  
TLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLISTYWGQGTTLVTVSS。这些序列对应于表23、24和24A中提供的DC-1  
的人源化变体。

[0209] 在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可包含一个或多个以下  
氨基酸序列:

[0210] KASQDINSYLT;和/或

[0211] XXNRLXD;和/或

[0212] LQYXDFPYT;和/或

[0213] XXAMS;和/或

[0214] TISXGGXTYYPDSVKG;和/或

[0215] LISXY,其中,X是任意氨基酸。

[0216] 在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可包含一个或多个以下  
氨基酸序列:

[0217] (K/Q/R) ASQ (D/G) I (N/S/R) (S/N) YL (T/N/A);和/或

[0218] (R/L/V/D/A) (T/V/A) (N/S) (R/N) L (F/M/V/E/Q) (D/T/S);和/或

[0219] (L/Q) Q (Y/H) (D/V/N) (D/T) (F/Y) P (Y/L/W) T;和/或

[0220] (S/T) (S/H/Y) AMS;和/或

[0221] (T/A) IS (V/S/G) (G/S) G (G/R) (K/S) TYY (P/A) DSVKG;和/或

[0222] (L/D) (I/G) (S/G) (L/P/T/V) Y。

[0223] 在本发明任何方面的进一步实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个  
轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列  
QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSVDYMYWYQQKPGSSPRLIYDTSNLAGVPRVFSGSGSGTYSYSLTISR

GAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK。该轻链可变区对应于示例性抗体DD-9中所见的那些(图25)。

[0224] 在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGLVTVSA。该重链可变区对应于示例性抗体DD-9中所见的那些(图25)。

[0225] 因此,据设想在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有:

[0226] i) 至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVDMYQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK;和

[0227] ii) 至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGLVTVSA。

[0228] 在本发明任何方面的进一步实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEADAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK。该轻链可变区对应于示例性抗体DH-2中所见的那些(图26)。

[0229] 在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLVTVSA。该重链可变区对应于示例性抗体DH-2中所见的那些(图26)。

[0230] 因此,据设想在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有:

[0231] i) 至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEADAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK;和

[0232] ii) 至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLVTVSA。

[0233] 在本发明任何方面的实施方式中,据设想抗体或其抗原结合片段可具有:

[0234] i) 至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含与图18至28中任一图所提供的任何VK序列对应的氨基酸序列;和/或

[0235] ii) 至少一个重链可变区,该重链可变区包含与图18至28中任一图所提供的任何VH序列对应的氨基酸序列或其片段、变体或衍生物。

[0236] 如上所示,据设想上述实施方式的抗体或抗原结合片段可包含:与以上给出的一个或多个氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列,例如与以上规定的一个或多个氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性。还设想抗体或抗原结合片段可包含至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多插入、缺失、保守性取代和/或非保守性取代。

[0237] 在第二方面,本发明提供了包含一个或多个以下氨基酸序列的抗体或其抗原结合

片段:

[0238] KASQDINSYLT;和/或

[0239] XXNRLXD;和/或

[0240] LQYXDFPYT;和/或

[0241] XXAMS;和/或

[0242] TISXGGXITYYPDSVKG;和/或

[0243] LISXY,其中,X是任意氨基酸。

[0244] 在一个实施方式中,本发明提供了包含一个或多个以下氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段:

[0245] (K/Q/R) ASQ (D/G) I (N/S/R) (S/N) YL (T/N/A);和/或

[0246] (R/L/V/D/A) (T/V/A) (N/S) (R/N) L (F/M/V/E/Q) (D/T/S);和/或

[0247] (L/Q) Q (Y/H) (D/V/N) (D/T) (F/Y) P (Y/L/W) T;和/或

[0248] (S/T) (S/H/Y) AMS;和/或

[0249] (T/A) IS (V/S/G) (G/S) G (G/R) (K/S) TYY (P/A) DSVKG;和/或

[0250] (L/D) (I/G) (S/G) (L/P/T/V) Y。

[0251] 在一个实施方式中,本发明提供了包含一个或多个以下氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段:

[0252] KASQDINSYLT;和/或

[0253] RTNRLFD;和/或

[0254] LQYDDFPYT;和/或

[0255] SSAMS;和/或

[0256] TISVGGGKTYYPDSVKG;和/或

[0257] LISLY。

[0258] 在一个实施方式中,第二方面的抗体或其抗原结合片段可包含一个或多个以下氨基酸序列:

[0259] TCKASQDINSYLTWF;和/或

[0260] TLIYRTNRLFDGVP或TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSQDFF;和/或

[0261] YCLQYDDFPYTFG;和/或

[0262] FTLSSSAMSWVR或CXAXXFTLSSSAMSWVR;和/或

[0263] WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR或WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXL;和/或

[0264] YCAKLISLYWG,其中,X是任意氨基酸。

[0265] 认为前述实施方式的序列包含示例性抗体AB-1的轻链和重链可变区的互补决定区。

[0266] 在进一步的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可包含氨基酸序列KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT;或KASQDINSYLTXXF;或RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXFX;或XXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT,其中,X是任意氨基酸。

[0267] 在进一步的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可包含氨基酸序列TCKASQDINSYLTWF或TCKASQDINSYLTWY;和/或

[0268] LLIYRTNRLFDGVP或SLIYRTNRLFDGVP或LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF or SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF;和/或

[0269] YCLQYDDFPYTFG;和/或

[0270] FTFSSSAMSWVR或CXAXXFTFSSSAMSWVR;和/或

[0271] WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR或WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXL;和/或

[0272] YCAKLISLYWG,其中,X是任意氨基酸。

[0273] 因此,在一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含以下CDR:KASQDINSYLT;和RTNRLFD;和LQYDDFPYT。

[0274] 在进一步的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含以下CDR:SSAMS;和TISVGGGKTYYPDSVKG;和LISLY。

[0275] 在进一步的实施方式中,第二方面的抗体或其抗原结合片段可具有至少一个轻链可变区,该轻链可变区包含氨基酸序列 DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPVSRFSGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK或 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPVSRFSGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK,或

[0276] EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPVSRFSGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

[0277] (AB-1\_VK),或DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPVSRFSGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

[0278] (AB-1\_VK1),或EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPVSRFSGSGSGTDFFTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

[0279] (hAB-1\_RKE),或DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPVSRFSGSGSGTDFFTISSELEYEDMGIIYYCLQYDDFPYTFGGGTKVEIK

[0280] (hAB-1\_RKJ)。

[0281] 在第二方面的又一实施方式中,抗体或其抗原结合片段可具有至少一个重链可变区,该重链可变区包含氨基酸序列

[0282]

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS或EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS,或

[0283]

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-1\_VH),或EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKLEWVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-1\_RHA)。

[0284] 本发明还提供了具有在第二方面中实施的至少一个轻链可变区和在第二方面中实施的至少一个重链可变区的抗体或其抗原结合片段。

[0285] 为了避免疑问起见,第二方面的抗体或其抗原结合片段可包含与第一方面相关提供的任何氨基酸序列。因此,第二方面的抗体或其抗原结合片段可包括任何图18至28或表14至24和24A中例举的任何VK和/或VK区域,或其任何变体、片段或衍生物。

[0286] 另外,本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段可为或包含本文所述的任何人源化抗体或嵌合抗体,特别是,抗体或其抗原结合片段可包含表14至24和24A中提供的任何序列,或由其组成。

[0287] 据设想第二方面和相关实施方式的抗体或抗原结合片段可包含与以上给出的一个或多个氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列,例如与以上规定的一个或多个氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性。还设想抗体或抗原结合片段可包含至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多插入、缺失、保守性取代和/或非保守性取代。

[0288] 在本发明任何方面的优选实施方式中,抗体或其抗原结合片段可包含完整抗体或由完整抗体组成。作为另一种选择,抗体或其抗原结合片段可基本由完整抗体组成。“基本由……组成”在本发明中是指抗体或其抗原结合片段由完整抗体的足以展示对TG2的结合特异性的部分组成。

[0289] 本发明的抗体或抗原结合片段可为非天然存在的抗体。当然,当抗体是天然存在的抗体时,其以分离形式提供(即,不同于自然中其被发现的形式)。

[0290] 在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可包含以下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Fv片段;Fab片段;和Fab样片段组成的组。在进一步的实施方式中,Fv片段可为单链Fv片段或二硫键结合的Fv片段。在又一实施方式中,Fab样片段可为Fab'片段或F(ab)<sub>2</sub>片段。

[0291] 抗体的可变重链(V<sub>H</sub>)和可变轻链(V<sub>L</sub>)域参与抗原识别,这是通过早期蛋白酶消化实验首先认识到的事实。通过啮齿动物抗体的“人源化”得到了进一步确认。啮齿动物来源的可变域可融合至人来源的恒定域,从而使所得抗体保持啮齿动物亲本抗体的抗原特异性(Morrison等(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,6851-6855)。

[0292] 从涉及均含有一个或多个可变域的抗原片段的细菌表达实验中可知,抗原特异性由可变域赋予,并且不依赖于恒定域。这些分子包括Fab样分子(Better等(1988)Science240,1041);Fv分子(Skerra等(1988)Science 240,1038);单链Fv(ScFv)分子,其中V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>伴侣域经由柔性寡肽连接(Bird等(1988)Science 242,423;Huston等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85,5879);和单域抗体(dAbs),包含分离的V域或由分离的V域组成(Ward等(1989)Nature 341,544)。保留抗体特异性结合位点的抗体片段的合成中涉及的技术的综述可见于Winter & Milstein(1991)Nature 349,293-299。

[0293] 因此,“抗原结合片段”在本发明中包括能够与TG2结合的抗体的功能片段。

[0294] 示例性抗原结合片段可选自由Fv片段(例如,单链Fv和二硫键结合的Fv)和Fab样片段(例如,Fab片段、Fab'片段和F(ab)<sub>2</sub>片段)组成的组。

[0295] 在本发明的实施方式中,抗原结合片段是scFv。

[0296] 使用抗体片段而不是完整抗体的优点是数倍的。片段的小尺寸可改善药理学性质,例如对实体组织的更好渗透。另外,抗原结合片段,例如Fab、Fv、ScFv和dAb抗体片段可以在大肠杆菌中表达并分泌出来,从而能够容易产生大量的所述片段。

[0297] 本发明的范围内还包括抗体及其抗原结合片段的修饰版本,例如,通过共价结合聚乙二醇或其他适合的聚合物来修饰。

[0298] 特别优选的是,抗体或其抗原结合片段是重组分子。

[0299] 产生抗体和抗体片段的方法是本领域公知的。例如,抗体可通过数种利用诱导体内产生抗体分子并筛选免疫球蛋白文库的方法(O r l a n d i 等, 1989.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:3833-3837;Winter等,1991,Nature 349:293-299),或通过培养细胞系产生单克隆抗体分子的方法中的任何一种产生。这些包括但不限于杂交瘤技术、人B-细胞杂交瘤技术和Epstein-Barr病毒(EBV)-杂交瘤技术(Kohler等, 1975.Nature 256:4950497;Kozbor等,1985.J.Immunol.Methods 81:31-42;Cote等, 1983.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:2026-2030;Cole等,1984.Mol.Cell.Biol.62:109-120)。

[0300] 方便的是,本发明提供了抗体或其抗原结合片段,其中,抗体是重组抗体(即其中,抗体通过重组方式产生)。

[0301] 在本发明的任何方面的特别优选实施方式中,抗体可为单克隆抗体。

[0302] 针对所选抗原的适合的单克隆抗体可通过已知技术制备,例如“Monoclonal Antibodies:A manual of techniques”,H Zola(CRC Press,1988)和“Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Applications”,J G R Hurrell(CRC Press, 1982)中公开的那些,其通过参考并入本文。本发明示例性单克隆抗体和其制备的适合的方法在以下实例中提供。

[0303] 还可以利用本领域公知的方法获得抗体片段(例如见,Harlow & Lane,1988,“Antibodies:A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,通过参考并入本文)。例如,本发明的抗体片段可通过对抗体进行蛋白水解或通过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他蛋白表达系统)中表达编码所述片段的DNA而产生。作为另一种选择,抗体片段可通过以常规方法对完整抗体进行胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化而产生。

[0304] 在本发明任何方面的实施方式中,抗体或其抗原结合片段可为人抗体或人源化抗体。

[0305] 本领域技术人员应当领会的是,对于人的治疗或诊断,可以使用人源化抗体。非人(例如,鼠类)抗体的人源化形式是具有源自非人抗体的最小部分的遗传工程化的嵌合抗体或抗体片段。人源化抗体包括其中人抗体(受体抗体)的互补决定区被来自非人物种(供体抗体)的互补决定区的残基替换的抗体,所述非人物种例如为具有所需功能性的小鼠、大鼠或兔。在一些情况下,人抗体的Fv框架残基被对应的非人残基替换。人源化抗体还可以包含既不在受体抗体中存在也不在引入的互补决定区或框架序列中存在的残基。通常,人源化抗体可包含基本所有的至少一个、通常两个可变域,其中所有或基本所有的互补决定区对应于非人抗体的互补决定区,并且所有或基本所有的框架区对应于相关人共有序列的那些框架区域。人源化抗体最佳还包括抗体恒定区的至少一部分,例如Fc区,通常源自人抗体(例如见,Jones等,1986.Nature 321:522-525;Riechmann等,1988,Nature 332:323-329;Presta,1992,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596,其通过参考并入本文)。

[0306] 使非人抗体人源化的方法是本领域公知的。通常,人源化抗体具有一个或多个从

非人来源引入其中的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为引入残基,通常取自所引入的可变域。人源化可基本上按照所述(例如见, Jones等, 1986, Nature 321:522-525; Reichmann等, 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen等, 1988, Science 239:1534-1536; US 4,816,567,其通过参考并入本文),通过以对应的啮齿动物互补决定区替换人互补决定区来进行。因此,所述人源化抗体是嵌合抗体,其中,基本上比完整人可变域更少被非人物种的对应序列替代。实际上,人源化抗体通常可以是其中一些互补决定区残基和可能的一些框架残基被来自啮齿动物抗体的相似位点的残基替换的人抗体。

[0307] 人抗体还可以利用本领域已知的各种技术鉴定,包括是噬菌体展示文库(例如见, Hoogenboom & Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks等, 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole等, 1985, In: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, AlR. Liss, pp. 77; Boerner等, 1991, J. Immunol. 147:86-95, Soderlind等, 2000, Nat Biotechnol 18:852-6和 WO 98/32845,其通过参考并入本文)。

[0308] 此处所用的术语“氨基酸”包括20种标准的遗传编码氨基酸及其相应的‘D’型立体异构体(与天然的‘L’型相比而言),  $\Omega$ -氨基酸其他天然存在的氨基酸、非常规氨基酸氨基酸(例如,  $\alpha, \alpha$ -二取代的氨基酸, N-烷基氨基酸等)和化学衍生的氨基酸。

[0309] 当具体列举氨基酸时,例如“丙氨酸”或“Ala”或“A”,该术语是指L-丙氨酸和D-丙氨酸,除非另外明确说明。其他非常规氨基酸氨基酸也可以是本发明多肽的适合组分,只要该多肽保留所需功能性即可。对于所示的肽,各个所编码的氨基酸残基在适当时由与常规氨基酸通用名称对应的单字母标记表示。

[0310] 在一个实施方式中,本文所述多肽包含L-氨基酸或由L-氨基酸组成。

[0311] 一旦获得了适合的抗体,可对其活性进行测试,例如抗体的结合特异性或生物学活性,例如通过ELISA、免疫组织化学、流式细胞术、免疫沉淀、蛋白免疫印迹等进行测试。可以在对该具体特征给出读数的不同测试中检测生物学活性。

[0312] 在其他方面,本发明提供了编码第二方面和第二方面的相关实施方式的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

[0313] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含以下核苷酸序列或由以下核苷酸序列组成:

[0314] i)

[0315]

GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAG  
TCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAA  
ATAGATTGTTTGTATGGGGTCCCATCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGCAGC  
CTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAA  
ACTGGAATAAAA;和/或

[0316] ii)

[0317]

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG  
ATTCATCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGACAGGAGGCTGGAGTGGGTGCAACCATTA  
GTGTTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGCTTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC

ACCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCTCTA  
CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA。

[0318] 在进一步的实施方式中,本发明提供了分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含图18至28中任一图中列出的任何核酸序列或由图18至28中任一图中列出的任何核酸序列组成。

[0319] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含以下核苷酸序列或由以下核苷酸序列组成:

[0320] i)

[0321]

GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCATCATCACTTGCAAGGCGAG  
TCAGGACATAAATAGTTATTTAACCTGGTTCCAACAGAAACCAGGAAAGTCTCCTAAGACCCTGATCTATCTTACAA  
ATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGCAAGAATTTTTACTCACCATCAGCGGC  
CTGGAACATGAAGATATGGGCATTTATTATTGTCTCCAGTATGTTGACTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAA  
GCTGGAATAAAA;和/或

[0322] ii)

[0323]

GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG  
AATCATTTTTAGTTTCTCTGCCATGTCTTGGGTTCCGACACTCCGGAAAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACTATTA  
GTAGTGGTGGTTCGTTCCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAAC  
ACCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCCCTA  
CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA。

[0324] 在进一步的实施方式中,本发明提供了分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含以下核苷酸序列或由以下核苷酸序列组成:

[0325] i)

[0326]

GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAGAGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAG  
TCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGATCCTGATCTATCTTGTAA  
ATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGT  
CTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAATATGATGACTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAA  
GCTGGAATAAAA;和/或

[0327] ii)

[0328]

GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG  
ATTCCTCTCAGTACCCATGCCATGTCTTGGGTTCCGACACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTA  
GTAGTGGTGGTTCGTTCCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCCTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAAC  
ACCCTATATCTGCAACTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTACCTA  
CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA。

[0329] 优选的是本发明的抗体或其抗原结合片段抑制TG2活性。因此,优选的是本发明抗体抑制TG2酶促活性,从而阻止其发挥将赖氨酸和谷氨酰胺残基与N<sup>ε</sup>-(γ-谷氨酰基)赖氨酸

酸异肽键交联的功能。优选的是, TG2的酶促活性完全消除, 但据设想所述抑制在部分抑制足以提供有用的治疗或非治疗结果的情况下可为部分抑制。本领域技术人员能够确定抑制的程度是否能有效实现所需结果。

[0330] 优选的是抗体或其抗原结合片段对抑制TG2具有特异性。因此, 优选的是抗体或其抗原结合片段不抑制TG1、TG3、TG13和/或TG7活性。据设想, 有效抑制TG2活性但有足够选择性从而其不显著抑制TG1、TG3、TG13和/或TG7活性的抗体可以在医药中特别有用。因此, 优选的是抗体专一性地抑制TG2活性。

[0331] 在其他方面, 本发明提供了这样的抗体或其抗原结合片段: 其与TG2(例如, 人TG2)的结合在任何前述方面的抗体与TG2(例如, 人TG2)结合时会受到抑制或减弱。

[0332] 因此, 本发明包括这样的抗体, 其与TG2的区域内的表位选择性结合, 从而可与前述方面的任何抗体竞争并破坏其结合。

[0333] 在其他方面, 本发明提供了包含任何前述方面的抗体或其抗原结合片段和另外部分的化合物。

[0334] 在一个实施方式中, 另外部分可以是直接或间接具有细胞毒性的部分。

[0335] 对于“直接具有细胞毒性的”, 本发明包括所述部分是本身具有细胞毒性的部分的含义。对于“间接具有细胞毒性的”, 本发明包括所述部分是本身虽然没有细胞毒性但能够诱导细胞毒性的部分的含义, 例如, 通过其作用于另外的分子或通过对其进一步作用而诱导。

[0336] 具有细胞毒性的部分可选自但不限于包含以下部分的组: 直接具有细胞毒性的化学治疗剂、直接具有细胞毒性的多肽、能够将相对无毒性的前药转化为具有细胞毒性的药物的部分、放射敏化剂、直接具有细胞毒性的核酸、编码直接或间接具有细胞毒性的多肽的核酸分子、编码治疗性多肽的核酸分子、或放射性原子。据设想, 放射性原子可以是磷-32、碘-125、碘-131、铟-111、铯-137、铯-138或钷-147中任何一种。

[0337] 具有细胞毒性的化学治疗剂, 例如抗癌剂, 包括: 烷化剂, 包括氮芥类, 例如氮芥(HN<sub>2</sub>)、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑(L-溶肉瘤素)和苯丁酸氮芥; 乙烯亚胺和甲基三聚氰胺, 例如六甲基蜜胺、三胺硫磷; 烷基磺酸酯, 例如白消安; 亚硝基脲类, 例如卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、司莫司汀(甲基-CCNU)和链佐星(链脲霉素); 和三氮烯, 例如达卡巴(DTIC; 二甲基三氮烯基咪唑甲酰胺); 抗代谢药, 包括叶酸类似物, 例如甲氨蝶呤(氨甲蝶呤); 嘧啶类似物, 例如氟尿嘧啶(5-氟尿嘧啶; 5-FU), 氟尿苷(氟脱氧尿苷; FdUR)和阿糖胞苷(胞嘧啶阿拉伯糖苷); 和嘌呤类似物和相关抑制剂, 例如巯嘌呤(6-巯基嘌呤; 6-MP)、硫鸟嘌呤(6-硫鸟嘌呤; TG)和喷司他丁(2'-脱氧柯福霉素)。天然产物, 包括长春花属生物碱, 例如长春碱(VLB)和长春新碱; 表鬼臼毒素, 例如依托泊苷和替尼泊苷; 抗生素, 例如更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素(道诺霉素; 红比霉素)、多柔比星、博来霉素、普卡霉素(光辉霉素)、丝裂霉素(丝裂霉素C); 酶, 例如L-天冬酰胺酶; 和生物学反应调节剂, 例如干扰素 $\alpha$ 和 $\beta$ 。其他药剂, 包括铂配合物, 例如顺铂(顺-DDP)和卡铂; 蒽醌类药物, 例如米托蒽醌和蒽环类; 取代的脲, 例如羟基脲; 甲基胍衍生物, 例如甲基胍(N-甲基胍, MIH); 和肾上腺皮质抑制, 例如米托坦(o, p'-DDD)和氨鲁米特; 紫杉醇及其类似物/衍生物; 和激素激动剂/拮抗剂, 例如氟他胺和他莫昔芬。

[0338] 各种这些试剂预先被附着至抗体和其他靶点递送剂, 因此本发明的包含这些试剂

的化合物可容易地由本领域技术人员制备。例如,碳二亚胺偶联 (Bauminger & Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159; 在此作为参考并入本文) 可用与将各种试剂包括多柔比星与抗体偶联。

[0339] 具有细胞毒性的肽或多肽部分包括导致细胞死亡的任何部分。细胞毒性肽和多肽部分是本领域熟知的并且包括,例如蓖麻毒蛋白、相思豆毒素、假单胞菌外毒素、组织因子等。使他们与靶向部分(例如抗体)连接的方法也是本领域已知的。在Burrows & Thorpe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8996-9000中阐述了蓖麻毒蛋白作为细胞毒性剂的应用,其通过引用并入本文;Ran等(1998) *Cancer Res.* 58, 4646-4653和Huang等(1997) *Science* 275, M7-550阐述了使用导致肿瘤的定位血凝和梗塞的组织因子。Tsai等(1995) *Dis. Colon Rectum* 38, 1067-1074阐述了与单克隆抗体偶联的相思豆毒素A链,其通过引用并入本文。在W0 96/06641中将其它核糖体失活蛋白描述为细胞毒性剂。假单胞菌外毒素也可以用作细胞毒性多肽部分(参见,例如Aiello等(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10457-10461;其通过引用并入本文)。

[0340] 某些细胞因子如TNF $\alpha$ 和IL-2也可以用作细胞毒性剂。

[0341] 某些放射性原子如果以足够的剂量递送也可以是细胞毒性的。因此,细胞毒性部分可以包含放射性原子,所述放射性原子在使用中向靶位点递送足量的放射性以产生细胞毒性。合适的放射性原子包括磷-32、碘-125、碘-131、铟-111、铯-186、铯-188、钇-90,或者任何其它发出足够能量以破坏相邻细胞、细胞器或核酸的同位素。优选地,本发明化合物中同位素和放射性原子的密度可以将大于4000cGy(优选至少6000、8000或10000cGy)的剂量递送至靶位点,并且优选递送至位于靶位点的细胞和其细胞器,特别是细胞核。放射性原子可以以已知的方式结合在抗体上。例如,可以将EDTA或其他螯合剂结合在抗体上并用于结合<sup>111</sup>In或<sup>90</sup>Y。可以用<sup>125</sup>I或<sup>131</sup>I标记酪氨酸残基。

[0342] 细胞毒性部分可以是合适的间接具有细胞毒性的多肽。在特别优选的实施方案中,所述间接具有细胞毒性的多肽为具有酶促活性并能够将相对无毒的前药转化为细胞毒性药物的多肽。当结合部分为抗体时,这个类型的系统通常称为ADEPT(抗体引导的酶前药治疗)。该系统需要靶向部分将酶促部分定位于患者体内的期望位点(即,表达MR的位点,例如与肿瘤相关的血管组织),并且允许所述酶经过一定时间定位于所述位点后施用作为所述酶底物的前药,催化的最终产物为细胞毒性化合物。该方法的目的是使在期望位点的药浓度最大并使正常组织中的药浓度最小(参见Senter, P.D等(1988) "Anti-tumour effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) *Br. J. Cancer* 56, 531-2; 和Bagshawe, K.D.等(1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" *Br. J. Cancer.* 58, 700-703)。

[0343] 细胞毒性物质可以为现有的任何抗癌药,例如烷基化试剂,嵌插入DNA中的药剂,抑制任何关键酶(例如,二氢叶酸还原酶、胸苷合成酶、核糖核苷酸还原酶、核苷激酶或拓扑异构酶)的药剂,或通过与其他任何其它细胞成分相互作用而导致细胞死亡的药剂。依托泊甙是拓扑异构酶抑制剂的实例。

[0344] 所报道的前药系统包括:由大肠杆菌 $\beta$ -葡糖醛酸酶激活的苯酚芥(phenol mustard)前药(Wang等,1992和Roffler等,1991),由人 $\beta$ -葡糖醛酸酶激活的多柔比星前药

(Bosslet等,1994),由咖啡豆 $\alpha$ -半乳糖苷酶激活的另一种多柔比星前药(Azoulay等,1995),由 $\alpha$ -D-半乳糖苷酶激活的道诺霉素前药(Gesson等,1994),由大肠杆菌 $\beta$ -D-半乳糖苷酶激活的5-氟尿苷前药(Abraham等,1994),和由羧肽酶A激活的氨甲蝶呤前药(例如,氨甲蝶呤-丙氨酸)(Kuefner等,1990,Vitols等,1992和Vitols等,1995)。这些前药及其它前药包括在下表1中。

[0345] 表1

酶	前药
羧肽酶 G2	L-谷氨酸的衍生物以及苯甲酸芥、苯胺芥、苯酚芥和苯二胺芥; 这些物质的氟化衍生物
碱性磷酸酶	磷酸依托泊甙 磷酸丝裂霉素
$\beta$ -葡糖醛酸酶	对羟基苯胺芥-葡糖苷酸 表柔比星-葡糖苷酸
青霉素 V 酰胺酶	苯氧酰基 N-阿霉素
[0346] 青霉素 G 酰胺酶	N-(4'-羟苯基乙酰基) 水螅毒素 多柔比星和美发仑
$\beta$ -内酰胺酶	氮芥-头孢霉素对苯二胺 多柔比星衍生物; 长春碱衍生物-头孢霉素、头孢霉素芥, 紫杉醇衍生物
$\beta$ -葡糖苷酶	苯腈甲基- $\beta$ -D-葡糖-吡喃艾杜糖醛酸
硝基还原酶	5-(氮丙啶-1-基)-2,4-二硝基苯甲酰胺
胞嘧啶脱氨酶	5-氟胞嘧啶
羧肽酶 A	氨甲蝶呤-丙氨酸

[0347] (该表改编自Bagshawe (1995) Drug Dev. Res. 34, 220-230, 从此文献中可以得到关于各种此类系统的多篇参考文献全文, Rodrigues, M.L. 等 (1995) Chemistry & Biology 2, 223中阐述了紫杉醇衍生物)。

[0348] 用于形成本发明的酶促部分的合适的酶包括: 外肽酶, 例如羧肽酶G、G1和G2(用于谷氨酰化芥前药), 羧肽酶A和B(用于基于MTX的前药)和氨基肽酶(用于 $\alpha$ -氨基酰MTC前药); 内肽酶, 例如溶栓素(用于凝血酶前药); 水解酶, 例如磷酸酶(例如碱性磷酸酶)或硫酸酯酶(例如芳基硫酸酯酶)(用于磷酸化或硫酸化前药); 酰胺酶, 例如青霉素酰胺酶和芳酰基酰胺酶; 内酰胺酶, 例如 $\beta$ -内酰胺酶; 糖苷酶, 例如 $\beta$ -葡糖醛酸酶(用于 $\beta$ -葡糖醛酸蒽环类),  $\alpha$ -半乳糖苷酶(用于苦杏仁苷)和 $\beta$ -半乳糖苷酶(用于 $\beta$ -半乳糖蒽环类); 脱氨酶, 例如胞嘧啶脱氨酶(用于5FC); 激酶, 例如尿激酶和胸苷激酶(用于丙氧鸟苷); 还原酶, 例如硝基还原酶(用于CB1954和类似物), 偶氮还原酶(用于偶氮苯芥)和DT-心肌黄酶(用于CB1954); 氧化酶, 例如葡萄糖氧化酶(用于葡萄糖), 黄嘌呤氧化酶(用于黄嘌呤)和乳过氧化物酶; DL-消旋酶, 催化性抗体和环糊精。

[0349] 所述前药与细胞毒性药物相比是相对无毒性的。通常, 当在合适的体外细胞毒性试验中测量时, 所述前药具有低于10%的毒性, 优选低于1%的毒性。能够将前药转化为细胞毒药物的部分在与化合物的其余部分分离时很可能是有活性的, 但是有必要仅当(a) 其与所述化合物的其余部分结合时以及当(b) 所述化合物结合、相邻于或被内化在靶细胞时, 它才有活性。

[0350] 当所述化合物的各部分都是多肽时, 两个部分可以通过将多肽交联的任何常规方

式连接,例如在O'Sullivan等(1979)Anal.Biochem.100,100-108中一般性阐述的那些方法。作为另一种选择,可以通过重组DNA技术以融合化合物的方式产生所述化合物,其中DNA的长度包含分别编码本发明化合物的两个部分的区域,所述区域彼此相邻或被编码不破坏所述化合物所需性质的连接肽的区域分开。可以想见,所述化合物的两个部分可完全或部分重叠。

[0351] 细胞毒性部分可以是放射敏化剂。所述放射敏化剂包括氟嘧啶、胸苷类似物、羟基脲、吉西他滨、氟达拉滨、烟酰胺、卤代嘧啶、3-氨基苯甲酰胺、3-氨基苯胍、依他硝唑、哌莫硝唑和米索硝唑(例如见,McGinn等(1996)J.Natl.Cancer Inst.88,1193-11203;Shewach & Lawrence(1996)Invest.New Drugs 14,257-263;Horsm(1995)Acta Oncol.34,571-587;Shenoy & Singh(1992)Clin.Invest.10,533-551;Mitchell等(1989)Int.J.Radiat.Biol.56,827-836;Iliakis & Kurtzm(1989)Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.16,1235-1241;Brown(1989)Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.16,987-993;Brown(1985)Cancer 55,2222-2228)。

[0352] 此外,基因向细胞的递送可以使细胞对放射敏化,例如p53基因或细胞周期蛋白D的递送(Lang等(1998)J.Neurosurg.89,125-132;Coco Martin等(1999)Cancer Res.59,1134-1140)。

[0353] 所述另一部分可以是经放射后变得具有细胞毒性或者释放细胞毒性部分的部分。例如,经适当放射时,硼-10同位素释放具有细胞毒性的 $\alpha$ 粒子(见例如,Goldenberg的US 4,348,376;Primus等(1996)Bioconj.Chem.7,532-535)。

[0354] 相似的是,细胞毒性部分可以是用于光力学治疗的部分,如光敏素(photofrin)(例如见,Dougherty等(1998)J.Natl.Cancer Inst.90,889-905)。

[0355] 具有细胞毒性的部分可以是直接或间接具有细胞毒性的核酸分子。例如,所述核酸分子可以是反义寡核苷酸,其在定位到靶位点时能够进入细胞并导致其死亡。因此,所述寡核苷酸可以是防止重要基因的表达的寡核苷酸,或者引起细胞凋亡的导致基因表达的改变的寡核苷酸。

[0356] 合适的寡核苷酸的实例包括针对bcl\_2(Ziegler等(1997)J.Natl.Cancer Inst.89,1027-1036)以及DNA聚合酶 $\alpha$ 和拓扑异构酶II $\alpha$ (Lee等(1996)Anticancer Res.16,1805-1811)的那些寡核苷酸。

[0357] 肽核酸可用于替代常规的核酸(参见Knudsen & Nielsen(1997)Anticancer drugs 8,113-118)。

[0358] 在本发明化合物的实施方式中,抗体或其抗原结合片段和具有细胞毒性的部分可是融合的多肽。因此,本发明还提供了编码这样化合物的多核苷酸、

[0359] 在进一步的实施方式中,另一部分可以是能够容易检测的部分。据设想能够容易检测的部分可包含适宜量的碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钨-99m、钷、锰或铁中任一种任何。

[0360] 对于“能够容易检测的部分”,本发明包括这样的含义:将本发明化合物施予患者后,当所述部分定位在靶位点时,通常可以由体外和所定位靶标的位点处非侵入性地检测到。因此,本发明中此实施方案的化合物在成像和诊断中是有用的。

[0361] 通常,所述能够容易检测的部分通常是成像中有用的放射性原子或包含成像中有

用的放射性原子。合适的放射性原子包括用于闪烁造影研究的锝<sup>99m</sup>和碘<sup>231</sup>。其它能够容易检测的部分包括,例如用于磁共振成像(MRI)的自旋标记物,例如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。显然,本发明化合物必须具有足够的合适同位素原子以容易地检测所述分子。

[0362] 可以以已知的方法将放射性或其它标记物引入到本发明的化合物中。例如,如果抗体为多肽,其可以是生物合成的或者可以利用合适的氨基酸前体通过化学氨基酸合成法合成,所述氨基酸前体包括,例如氟-19替代氢的氨基酸前体。例如,可以通过抗体内的半胱氨酸残基结合标记物,例如<sup>99m</sup>Tc、<sup>123</sup>I、<sup>186</sup>Rh、<sup>188</sup>Rh和<sup>111</sup>In。可以通过赖氨酸残基结合钇-90。可以利用IODOGEN方法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57)引入碘123。参考文献(“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”, J-F Chatal, CRC Press, 1989)详细阐述了其它方法。

[0363] 在其他方面,本发明提供了包含本发明的任何多核苷酸的载体。

[0364] 典型的原核生物载体质粒是:可获自Biorad Laboratories (Richmond, CA, USA)的pUC18、pUC19、pBR322和pBR329;可获自Pharmacia (Piscataway, NJ, USA) pTrec99A、pKK223-3pKK233-3pDR540和pRIT5;可获自Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA)的pBS载体、Phagescript载体、Bluescript载体、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A。

[0365] 典型哺乳动物细胞载体质粒有:可获自Pharmacia (Piscataway, NJ, USA)的pSVL。诱导性哺乳动物表达载体的实例是同样可获自Pharmacia (Piscataway, NJ, USA)的pMSG。

[0366] 有用的酵母质粒载体为pRS403-406和pRS413-416,并且通常可以从Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA)获取。质粒pRS403、pRS404、pRS405和pRS406为酵母整合质粒(YIp)并引入了酵母的选择标记HIS3、TRP1、LEU2和URA3。质粒pRS413-416为酵母着丝粒质粒(YCp)。

[0367] 可利用本领域技术人员公知的方法来构建包含编码序列和例如适当的转录或翻译对照物的表达载体。

[0368] 另外,本发明提供了包含本发明的任何多核苷酸或载体的宿主细胞。

[0369] 多种表达系统是已知的,包括利用以下物质的系统:细菌(例如大肠杆菌和枯草杆菌),其转染有例如重组噬菌体、质粒或粘粒DNA表达载体;酵母(例如酿酒酵母),其转染有例如,酵母表达载体;昆虫细胞系统,其转染有例如,病毒表达载体(例如杆状病毒);植物细胞系统,其转染有例如病毒或细菌表达载体;动物细胞系统,其转染有例如,腺病毒表达载体。

[0370] 所述载体可包括用于在原核生物中繁殖的原核复制子,例如Col E1 ori,即使所述载体用于在其它非原核细胞类型中表达。所述载体也可以包含合适的启动子,例如能够在经其转化的细菌宿主细胞(例如大肠杆菌)中指导基因表达(转录和翻译)的原核启动子。

[0371] 启动子是由DNA序列形成的表达控制元件,其允许RNA聚合酶的结合以及转录的发生。通常在质粒载体中提供与示例性细菌宿主相容的启动子序列,所述质粒载体包含用于插入本发明DNA片段的方便的限制性位点。

[0372] 适合的宿主细胞中的多核苷酸可以表达以制备本发明的抗体或化合物。因此,所述多核苷酸可以根据已知技术使用,根据本文所含的教导而适当修饰,从而构建表达载体,该载体随后用于转化合适的宿主细胞来表达和产生本发明的抗体或化合物。所述技术包括

美国专利第4,440,859;4,530,901;4,582,800;4,677,063;4,678,751;4,704,362;4,710,463;4,757,006;4,766,075;和4,810,648号中所述的那些,所有这些专利通过引用并入本文。

[0373] 多核苷酸可以与多种其他DNA序列连接,以便于引入到适当宿主中。伴随的DNA将取决于宿主的性质、将DNA引入到宿主中的方式、和是否需要保持游离或整合。

[0374] 通常,多核苷酸以合适的方向以及正确的表达阅读框插入到表达载体中,例如质粒中。必要时,该DNA可以连接至可由所希望宿主识别的适当转录和翻译调节控制核苷酸序列,不过这样的控制通常可在表达载体中获得。因此,该DNA插入物可以可操纵地连接至合适的启动子。细菌启动子包括了大肠杆菌lacI和lacZ启动子、T3和T7启动子、gpt启动子、噬菌体λPR和PL启动子、phoA启动子和trp启动子。真核启动子包括CMV立即早期启动子,HSV胸苷激酶启动子,早期和晚期SV40启动子和逆转录病毒LTR的启动子。其他适合的启动子是本领域技术人员已知的。表达构建体理想地还含有用于转录起始和终止的位点,并且在转录区域中含有用于翻译的核糖体结合位点。(Hastings等,国际专利号WO 98/16643,1998年4月23日出版)。

[0375] 载体随后通过标准技术被导入宿主中。通常,不是所有宿主都会被载体转化,因此有必要选择经转化的宿主细胞。一种选择技术涉及在表达载体中引入DNA序列标记,带有任何必要的控制元件,其编码在经转化细胞中的可选择性状。这些标记包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶、G418或新霉素抗性,和用于培养大肠杆菌和其他细菌的四环素、卡那霉素或氨基青霉素抗性基因。作为另一种选择,所述可选择性状的基因可以在另一载体上,该另一载体用于共转化所需的宿主细胞。

[0376] 随后将已经被本发明的重组DNA转化的宿主细胞在本领域技术人员根据本文公开的教导而已知的适当条件下培养足够时间,从而使得多肽表达,随后可回收所述多肽。

[0377] 通过公知的方法可从重组细胞培养物中回收和纯化所述抗体或化合物,所述方法包括硫酸铵或乙醇沉淀提取、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。最优选的是,采用高效液相色谱(“HPLC”)进行纯化。

[0378] 再另外,本发明提供了产生任何前述方面的抗体或其抗原结合片段的稳定宿主细胞系或通过细胞系中引入外源多核苷酸或本发明载体而获得的本发明化合物。

[0379] 所述宿主细胞可以为原核细胞或真核细胞。细菌细胞是优选的原核宿主细胞,并通常为大肠杆菌菌株,例如从Bethesda Research Laboratories Inc.,Bethesda,MD,USA获取的大肠杆菌DH5株和从Rockville,MD,USA的美国典型培养物保藏中心(ATCC)获取的RR1株(No.ATCC 31343)。优选的真核宿主细胞包括酵母和哺乳动物细胞,优选脊椎动物细胞,例如来自小鼠、大鼠、猴或人的成纤维细胞系的细胞。酵母宿主细胞包括YPH499、YPH500和YPH501,其通常可以从Mratagene Cloning Systems,La Jolla,CA 92037,USA获取。优选的哺乳动物细胞包括可以从ATCC获取的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞CRL61,从ATCC获得的NIH瑞士小鼠胚胎细胞NIH/3T3CRL 1658以及从ATCC获取的猴肾细胞来源的COS-1细胞CRL 1650。

[0380] 除经转化宿主细胞自身之外,本发明还考虑在营养培养基中的这些细胞的培养物,优选单克隆(克隆均一)培养物,或源自单克隆培养物的培养物。

[0381] 在其他方面,本发明提供了药物组合物/制剂,其包含本发明的任何方面的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多核苷酸,或本发明的化合物,其混合有药学上可接受的赋形剂、佐剂、稀释剂或载剂。

[0382] 对于“药学上可接受的”,包括无菌且无热原的制剂。合适的药学载体是制药领域熟知的。所述载体在与本发明化合物相容且对其接受者无害的意义上必须是“可接受的”。所述载体通常是无菌且无热原的水或盐水,然而也可以使用其它可接受的载体。

[0383] 在一个实施方式中,本发明的药物组合物/制剂还可包含另外的活性成分,即,除本发明的抗体或其抗原结合片段之外的治疗活性剂。据设想一个或多个其他活性剂可增强药物组合物/制剂抵抗适合的靶标疾病的功效。在一个实施方式中,另外的活性成分可以是治疗剂,选自参与降低组织疤痕、降低神经原纤维缠结、和/或降低化疗抗性的药剂。

[0384] 在优选的实施方式中,药物组合物/制剂可以是经配制以用于向患者静脉内、肌肉内或皮下递送。

[0385] 优选的是,药物组合物/制剂包含有效治疗上述和进一步下述各种病症的量的本发明的抗体或其抗原结合片段。

[0386] 本发明另一方面提供了套件试剂盒,其包含本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段、或本发明的多核苷酸,或本发明的化合物;和一个或多个另外的试剂。据设想所述另外的试剂可以是上述另外的活性成分中的任何另一种,或任何其他适合的试剂。

[0387] 在又一方面中,本发明提供了治疗有效量的本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段、或本发明的多核苷酸、或本发明的化合物、药物组合物/制剂或套件试剂盒,其用于医药应用。

[0388] TG2显然是多功能酶,并且与多种细胞功能关联,包括核稳定和运输[28,29]、内吞作用[30,31]、GTP酶信号转导[32-34]、凋亡[35,36]、细胞粘附[37-39]、细胞骨架的完整性[28,29]和ECM稳定[9]。小分子抑制剂可阻碍在所有的这些功能,因为它们通常可自由达到细胞外空间和细胞内部。抗体不能进入细胞,并且因此TG2的细胞内作用不会受体内施用的TG2特异性抗体的影响。

[0389] 重要的是TG2的大多数病理作用似乎是在细胞外,例如它在组织疤痕和纤维化,乳糜泻和癌症中的作用。因此在医药中使用选择性结合TG2的抗体可带来额外在一定程度上选择性阻止不需要的细胞内效果,该细胞内效果可以转化为不良的治疗副作用。

[0390] 因此,与以前可用的药物相比,本发明的抗体或其抗原结合片段将提供临床优势,例如在其中TG2交联ECM蛋白纤维化及疤痕疾病、其中醇溶蛋白在细胞外空间脱酰胺的乳糜泻和其中细胞粘附似乎为保护因素的癌症的化疗抗性中阻断TG2。另外,本发明的小抗体片段,例如所述Fab片段可穿过血脑屏障并在脑中抑制TG2,并且可能对TG2参与的神经疾病提供有效的治疗。

[0391] 因此,本发明另一方面提供了本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多核苷酸,或本发明的化合物、药物组合物/制剂或套件试剂盒,其用于降低或抑制有需要的个体中的TG2酶活性。

[0392] 本发明还提供了本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多核苷酸,或本发明的化合物、药物组合物/制剂或套件试剂盒在制备用于降低或抑制有需要的个体中的TG2酶活性的药物中的应用。

[0393] 本发明还提供了降低或抑制有需要的个体中的TG2酶活性的方法,该方法包括对该个体施用本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段,或其变体、融合体或衍生物,或本发明的多核苷酸,或本发明的化合物、药物组合物/制剂或套件试剂盒的步骤。

[0394] 本发明的另一方面提供了治疗有效量的本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多核苷酸,或本发明的化合物、药物组合物/制剂或套件试剂盒,其用于治疗 and/或诊断:乳糜泻、异常伤口愈合、疤痕、硬皮病、瘢痕疙瘩和增生性瘢痕、眼部疤痕、炎性肠道疾病、黄斑变性、格雷夫斯眼病、药物引起的麦角中毒、银屑病、纤维化相关疾病(例如,肝纤维化,肺纤维化如间质性肺病和纤维化肺疾病,心脏纤维化,皮肤纤维化,骨髓纤维化,肾纤维化如肾小球硬化和肾小管间质纤维化)、动脉粥样硬化、再狭窄、炎症性疾病,自身免疫疾病,神经退行性/神经疾病(例如亨廷顿氏病,阿尔茨海默氏病,帕金森氏病,多聚谷氨酰胺疾病,脊髓延髓肌萎缩症,齿状苍白球萎缩(dentatorubral-pallidoluy siatrophy),脊髓小脑性共济失调1、2、3、6、7和12,红核苍白球萎缩(rubropallidal atrophy),脊髓小脑性麻痹)、和/或癌症(如胶质母细胞瘤,如李弗劳明综合征中的胶质母细胞瘤和散发性胶质母细胞瘤,恶性黑色素瘤,胰腺导管腺癌,髓细胞性白血病,急性髓细胞性白血病,骨髓发育异常综合征,骨髓增生性综合征,妇科癌症,卡波氏肉瘤,汉森氏病,胶原性结肠炎)。

[0395] 本发明还提供了治疗有效量的本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多核苷酸,或本发明的化合物、药物组合物/制剂或套件试剂盒在制备药物中的应用,所述药物用于治疗 and/或诊断:乳糜泻、异常伤口愈合、疤痕、硬皮病、瘢痕疙瘩和增生性瘢痕、眼部疤痕、炎性肠道疾病、黄斑变性、格雷夫斯眼病、药物引起的麦角中毒、银屑病、纤维化相关疾病(例如,肝纤维化,肺纤维化如间质性肺病和纤维化肺疾病,心脏纤维化,皮肤纤维化,骨髓纤维化,肾纤维化如肾小球硬化和肾小管间质纤维化)、动脉粥样硬化、再狭窄、炎症性疾病,自身免疫疾病,神经退行性/神经疾病(例如亨廷顿氏病,阿尔茨海默氏病,帕金森氏病,多聚谷氨酰胺疾病,脊髓延髓肌萎缩症,齿状苍白球萎缩,脊髓小脑性共济失调1、2、3、6、7和12,红核苍白球萎缩,脊髓小脑性麻痹)、和/或癌症(如胶质母细胞瘤,如李弗劳明综合征中的胶质母细胞瘤和散发性胶质母细胞瘤,恶性黑色素瘤,胰腺导管腺癌,髓细胞性白血病,急性髓细胞性白血病,骨髓发育异常综合征,骨髓增生性综合征,妇科癌症,卡波氏肉瘤,汉森氏病,胶原性结肠炎)。

[0396] 本发明还提供了治疗和/或诊断患者的以下疾病的方法:乳糜泻、异常伤口愈合、疤痕、硬皮病、瘢痕疙瘩和增生性瘢痕、眼部疤痕、炎性肠道疾病、黄斑变性、格雷夫斯眼病、药物引起的麦角中毒、银屑病、纤维化相关疾病(例如,肝纤维化,肺纤维化如间质性肺病和纤维化肺疾病,心脏纤维化,皮肤纤维化,骨髓纤维化,肾纤维化如肾小球硬化和肾小管间质纤维化)、动脉粥样硬化、再狭窄、炎症性疾病,自身免疫疾病,神经退行性/神经疾病(例如亨廷顿氏病,阿尔茨海默氏病,帕金森氏病,多聚谷氨酰胺疾病,脊髓延髓肌萎缩症,齿状苍白球萎缩,脊髓小脑性共济失调1、2、3、6、7和12,红核苍白球萎缩,脊髓小脑性麻痹)、和/或癌症(如胶质母细胞瘤,如李弗劳明综合征中的胶质母细胞瘤和散发性胶质母细胞瘤,恶性黑色素瘤,胰腺导管腺癌,髓细胞性白血病,急性髓细胞性白血病,骨髓发育异常综合征,骨髓增生性综合征,妇科癌症,卡波氏肉瘤,汉森氏病,胶原性结肠炎),所述方法包括对患者施用治疗有效量的本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多核苷酸,或本发明的化合物、药物组合物/制剂或套件试剂盒。

[0397] 对于“治疗”，本发明包括对受试者/患者的治疗性和预防性处理。术语“预防性”用于涵盖了使用本文所述的抗体、药物、化合物、组合物或试剂盒的用途，该用途在个体中预防或降低病况或异常（例如，纤维化相关的异常）的发生或发展的可能性。

[0398] 优选的是，患者是人，不过患者可以是可获益于治疗的任何其他哺乳动物。例如，患者可以是小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猫、犬、山羊、绵羊、猴或猿。

[0399] 本文所用的“治疗有效量”、或“有效量”、或“治疗有效”是指对于给定的病况和施用方案提供了治疗效果的量。这是相关于所需添加剂和稀释剂（即，载体或施用载质）而计算出的产生所需治疗效果的活性物质的预定量。另外，其还意图表示足以降低或阻止宿主的活性、功能或反应的临床显著缺陷的量。作为另一种选择，治疗有效量足以引起宿主（例如哺乳动物）中临床显著病症的改善。

[0400] 所述试剂（即，抗体、抗原结合片段、其变体、融合体或衍生物）、药物、化合物、药物组合物/制剂和本发明的试剂盒可以利用可注射缓释药物递送系统来递送。这样系统专门设计为减少注射频率。所述系统的实例是Nutropin Depot，其将重组人生长激素（rhGh）封装在可生物降解的微球中，一旦注入后该微球在一段长时间内缓慢释放rhGH。优选的是，递送以肌肉内（i.m.）和/或皮下（s.c.）和/或静脉内（i.v.）方式进行。

[0401] 本发明的试剂、药物、化合物、药物组合物/制剂和试剂盒可通过外科植入装置施用，该外科植入装置将药物直接适当到所需位点。例如，Vitrasert将更昔洛韦直接释放到眼睛中，以治疗CMV视网膜炎。该毒性剂在患病位点的直接应用在没有药物显著系统性副作用的情况下取得了有效治疗。

[0402] 优选的是，本发明的药物和/或药物组合物/制剂是含有每日剂量或单位、每日亚剂量或其适当部分的活性组分的单位剂型。

[0403] 以包含活性成分的药物组合物的形式，可选地以非毒性有机或无机酸、或有机或无机碱或加成盐并且以药学上可接受的剂型，本发明的药剂、药物、化合物、药物组合物和试剂盒通常可通过任何肠胃外途径施用。根据所要治疗的病症和患者，以及施用途径，所述组合物可以以不同的剂量施用。

[0404] 在人疗法中，本发明的药剂、药物、化合物、药物组合物/制剂和试剂盒可单独施用，但通常与根据指定的施用途径和标准药物实践而选择的适合药物赋形剂、稀释剂或载剂混合施用。

[0405] 本发明的药剂、药物、化合物、药物组合物/制剂和试剂盒可胃肠外施用，例如，静脉内、动脉内，腹膜内、鞘内、肌肉内或皮下施用，或它们可以通过输注技术施用。它们最好以无菌水溶液的形式使用，该溶液可含有其他物质，例如，使溶液与血液等渗的足够的盐或葡萄糖。必要时，水溶液应该进行适当缓冲（优选的是缓冲至pH 3至9）。通过本领域技术人员公知的标准制药技术容易实现在无菌条件下适合的肠胃外制剂的制备。

[0406] 适合肠胃外施用的药物和药物组合物包括：水性和非水性无菌注射溶液，所述注射液可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与指定接受者血液等渗的溶质；以及水性和非水性无菌悬浮液，所述悬浮液可包括悬浮剂和增稠剂。药物和药物组合物可以在单剂量或多剂量容器中给出，例如密封的安瓿和小瓶，并且可以在冷冻干燥（冻干）条件下存储，在即将使用前只需要加入无菌液体载剂，例如注射用水即可。即用注射溶液和悬浮液可以由前述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0407] 对于向人患者胃肠外施用,本发明药剂、药物和药物组合物的每日剂量水平通常为以单次给药或分次给药施用的 $1\mu\text{g}$ 至 $10\text{mg}$ /成年人/天。医师在任何情况下均可确定最适合任何个体患者的实际剂量,并且实际剂量随具体患者的年龄、体重和反应而不同。上述剂量是示例性的平均情况。当然会有需要更高或更低剂量范围的个体情况,这也在本发明的范围内。

[0408] 通常,本发明的药物、药物组合物/制剂和试剂盒含有浓度为约 $2\text{mg}/\text{ml}$ 至 $150\text{mg}/\text{ml}$ 或约 $2\text{mg}/\text{ml}$ 至 $200\text{mg}/\text{ml}$ 的本发明的药剂。在优选的实施方式中,本发明的药物、药物组合物/制剂和试剂盒含有浓度为 $10\text{mg}/\text{ml}$ 的本发明药剂。

[0409] 通常,在人体中,本发明的药剂、药物、化合物、药物组合物/制剂和试剂盒的胃肠外施用是优选途径,最为方便。

[0410] 对于兽医学应用,根据正常的兽医实践,本发明的药剂、药物、化合物、药物组合物/制剂和试剂盒作为适合接受的制剂施用,并且兽医会确定最合适于具体动物的给药方案和施用途径。

[0411] 本发明还包括包含本发明多肽结合部分的药学上可接受的酸或碱加成盐的药物组合物/制剂。用于制备可用于本发明的上述基础化合物的药学上可接受的酸加成盐的酸是那些形成无毒性酸加成盐的酸,无毒性酸加成盐即为含有药学上可接受阴离子的盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、乙酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、酒石酸氢盐、琥珀酸盐、马来酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、糖酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羧萘酸盐[即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐)],等等。

[0412] 也可以使用药学上可接受的碱加成盐来制备本发明药剂(即抗体或其抗原结合片段)的药学上可接受的盐形式。

[0413] 可以用作试剂来制备性质为酸性的本发明药剂的药学上可接受碱盐的化学碱是那些与所述化合物形成无毒碱盐的碱。这种无毒碱盐可包括但不限于那些源自药学上可接受阳离子的盐,例如碱金属阳离子(例如,钾和钠)和碱土金属阳离子(例如,钙和镁),铵或水溶性胺加成盐,例如N-甲基葡糖胺-(葡甲胺),以及低级烷醇铵和药学上可接受有机胺的其他碱盐,等等。

[0414] 本发明的药剂和/或多肽结合部分可以冻干储存,并在使用之前在合适的载剂中重构。可以采用任何适合的冻干方法(例如,喷雾干燥、团块干燥)和/或重构技术。本领域的技术人员会理解的是,冻干和重构可导致不同程度的抗体活性损失(例如,对于常规免疫球蛋白,IgM型抗体倾向于比IgG抗体有更大活性损失),并且可能需要上调使用水平来进行补偿。在一个实施方式中,冻干(冷冻干燥)的多肽结合部分在复水时损失不超过其活性(在冷冻干燥之前)的约20%,或不超过约25%,或不超过约30%,或不超过约35%,或不超过约40%,或不超过约45%,或不超过约50%。

[0415] 优选的是,本发明提供了抗体、化合物、药物组合物/制剂、试剂盒、应用或方法,其中,所述有效量的抗体或其抗原结合片段为约 $0.0001\text{mg}/\text{kg}$ 至 $50\text{mg}/\text{kg}$ 的抗体或其抗原结合片段。

[0416] 本领域技术人员理解的是,化合物的精确量可根据其具体活性而变化。适合的剂量可包含预定量的活性组合物,该预定量是为产生与所需稀释剂有关的所需疗效而计算出

的。在本发明的方法和用于制备组合物的用途中,提供了治疗有效量的活性组分。本领域公知的是,本领域普通技术人员或兽医工作者可根据患者特征,例如年龄、体重、性别、病况、并发症、其他疾病等确定治疗有效量。

[0417] 本发明另一方面提供了降低或抑制TG2酶活性的体外方法,所述方法包括对包含TG2的样品施用本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多核苷酸,或本发明的化合物或试剂盒。

[0418] 所述“样品”可以是适当来源,例如哺乳动物来源获得的任何样品。例如,样品可以是包含TG2的组织或细胞样品。示例性组织包括从患者的脑、胃肠道、肺、胰、肝、皮肤、肾、眼、心脏、血管、淋巴结、脊柱和骨骼肌或平滑肌获得的组织。

[0419] 本发明还提供了降低或抑制有需要的个体中的TG2酶活性的方法,所述方法包括对该个体施用有效量的编码本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

[0420] 另一方面提供编码本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸在制备用于降低或抑制有需要的个体中的TG2酶活性的药物中的应用。

[0421] 本发明还提供了降低或抑制TG2酶活性的体外方法,该方法包括对包含TG2的样品,例如包含TG2的组织或细胞样品施用编码本发明任何方面的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

[0422] 在又一方面,本发明提供了本发明第二方面的抗体或抗原结合片段、或包含本发明第二方面的抗体或抗原结合片段的化合物的制备方法,所述方法包括表达本发明的多核苷酸,或培养本发明的稳定宿主细胞系。

[0423] 在其他方面,本发明提供了选择性结合转谷氨酰胺酶蛋白的抗体或其抗原结合片段的制备方法,所述方法包括选择抗体或其抗原结合片段的步骤,所述抗体或其抗原结合片段选择性结合包含转谷氨酰胺酶核心区/催化域,但不包含转谷氨酰胺酶桶或夹心域的多肽。

[0424] 在其他方面,本发明提供了选择本发明第一或第二方面的抗体或其抗原结合片段,或包含本发明第一或第二方面的抗体或抗原结合片段的本发明化合物的方法,所述方法包括选择抗体或其抗原结合片段的步骤,所述抗体或其抗原结合片段选择性结合由人TG2的氨基酸143至473或其片段构成的多肽序列。

[0425] 在一个实施方式中,所述方法可以利用抗体噬菌体展示进行。优选的是抗体或其抗原结合片段是抑制转谷氨酰胺酶蛋白的催化活性的抑制性抗体。

[0426] 在其他方面,本发明提供了选择性结合转谷氨酰胺酶蛋白的抗体或其抗原结合片段的制备方法,所述方法包括对非人动物施用化合物,所述化合物包含:

[0427] i) 包含转谷氨酰胺酶核心区/催化域但不包含转谷氨酰胺酶桶或夹心域的多肽,或其片段;和可选的

[0428] ii) 佐剂。

[0429] 据设想包含转谷氨酰胺酶核心区/催化域但不包含转谷氨酰胺酶桶或夹心域的多肽可包含上述催化三联体,和可选的转谷氨酰胺酶蛋白的GTP结合位点。

[0430] 在一个实施方式中,所述方法可还包括对抗体或其抗原结合片段基于其与转谷氨酰胺酶蛋白的选择性结合来进行选择的步骤。

[0431] 在其他方面,本发明提供了选择性结合转谷氨酰胺酶蛋白的抗体或其抗原结合片

段的选择方法,该方法包括选择抗体或其抗原结合片段的步骤,所述抗体或其抗原结合片段选择性结合由人TG2的氨基酸143至473多肽序列或其片段组成的多肽序列。

[0432] 在又一方面,本发明提供了本发明任何方面的抗体或抗原结合片段的制备方法,所述方法包括对非人动物施用化合物,所述化合物包含:

[0433] i) 由人TG2的氨基酸143至473多肽序列或其片段组成的多肽序列;和可选的

[0434] ii) 佐剂。

[0435] 在一个实施方式中,所述方法可还包括对抗体或其抗原结合片段基于其与TG2(例如人TG2)的选择性结合而进行选择的步骤。

[0436] 在其他方面,本发明提供了可通过任何前述制备或选择抗体或其抗原结合片段的方法获得的抗体或其抗原结合片段。

[0437] 对于“佐剂”,本发明包括任何增强接受者对本发明多肽的免疫响应的药学或免疫学药剂。将免疫佐剂加入疫苗中以刺激免疫系统对靶抗原的响应,但其本身并不赋予免疫性。佐剂的实例包括油乳液;无机化合物例如铝盐(例如氢氧化铝或磷酸铝);有机化合物,例如角鲨烯;病毒颗粒,或任何其他合适的化合物,本领域的技术人员可以理解。

[0438] 在其他方面,本发明提供了分离的多肽,所述多肽由:

[0439] i) 人TG2的氨基酸143至473的多肽序列;

[0440] ii) 人TG2的氨基酸304至326的多肽序列;

[0441] iii) 人TG2的氨基酸351至365的多肽序列;

[0442] iv) 人TG2的氨基酸450至467的多肽序列;或

[0443] 它们的片段、衍生物或多肽模拟物组成。

[0444] 本发明还提供了编码前述方面多肽的分离的多核苷酸。

[0445] 本发明提供了参照说明书和附图基本上如本文所述的用于治疗与TG2活性相关的病症的抗体或其抗原结合片段。

[0446] 本发明还提供了参照说明书和附图基本上如本文所述的抗体或其抗原结合片段的应用。

[0447] 如本文所用,单数形式的“一”、“一个/一种”和“该”包括复数的所指对象,除非上下文明确指出并非如此。因此,例如,提到“一种抗体”则包括多个所述抗体,提到“该剂量”则包括指代一个或多个剂量或本领域技术人员已知的其等同物,等等。

[0448] 本文提到的所有文献通过引用并入本文。

[0449] 现在将参考以下非限制性的附图和实施例来更详细描述本发明。

[0450] 图1:人TG2重组蛋白的产生

[0451] A:由pCIneo-hTG2载体通过PCR产生TG2催化核心cDNA,并将其插入pET21a质粒中。在大肠杆菌中扩增之后,将其以Nhe I和Hind III消化以释放TG2核心cDNA,并在1%琼脂糖凝胶上电泳(泳道3)。参考100bp梯状物(泳道1)和λDNA分子量标记(泳道2)来确定条带大小。

[0452] B:用pET21a TG2核心载体转化大肠杆菌菌株BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL。用IPTG诱导表达4小时。TG2核心蛋白形成不溶体,该不溶体通过离心从裂解物中回收。将这些不溶体再溶解,并在镍柱上纯化37kDa带His标记的TG2核心。通过SDS-PAGE分离10ng,进行蛋白质免疫印记,并以CUB7402抗TG2抗体(泳道2)探测,参考精确plus分子量标记(泳道1)。

[0453] 图2:小鼠中对rhTG2核心蛋白的免疫响应

[0454] A:在首次免疫后45天和二次增强后10天从4只经催化核心免疫的小鼠中采取测试血。将血清连续稀释,并通过针对固定TG2核心蛋白的ELISA检查反应性。

[0455] B通过针对人rh TG2和rh TG2催化核心域进一步筛选反应性。20、40、80ng的蛋白通过SDS PAGE分级分离,并蛋白质免疫印迹至PVDF膜上。对其以1:1000稀释的血清免疫探测。利用抗小鼠 $\gamma$ -链特异性HRP揭示抗体结合。对于大小参考,采用精确p1us分子量标记。

[0456] 图3:针对TG家族成员的杂交瘤反应性

[0457] A:利用包被有重组TG(100ng/孔)的板进行ELISA,以确定对TG2显示良好反应性的109个杂交瘤上清液中的TG类型特异性。利用抗小鼠 $\gamma$ -链特异HRP揭示抗体结合。所筛选的那些杂交瘤的随机选择显示包括表现出交叉反应性的EF4、CG9和FD8。

[0458] B:对9个所选择的杂交瘤进行二重克隆。纯化IgG,并利用ELISA通过包被有100ng各种TG的板测试其在0.1ug/ml时对重组人TG1, TG2, TG3, TG7和因子XIIIa的反应性。数据表示3次独立ELISA的平均OD值 $\pm$ SEM。

[0459] 因子XIIIa在图中表示为TG13。

[0460] 图4:具有针对TG2的抑制活性的杂交瘤鉴定

[0461] 在100ng的rhTG2活性下利用<sup>3</sup>H腐胺掺入测试来筛选对TG2有特异性的32个杂交瘤孔的条件培养基的效果。使用化学泛TG2抑制剂1,3-二甲基-2-[(2-氧-丙基)硫代]咪唑鎓氯化物作为抑制的阳性对照。采用RPMI(非条件培养基)作为阴性对照。包含由Quark biotechnology测试的500ng的TG2抑制抗体以进行比较。数据表示在30分钟内由平行进行的至少3次实验的平均CPM $\pm$ SEM。灰色显示的条显示出显著的TG2抑制( $p < 0.05$ )。

[0462] 图5:抑制性抗体表位作图

[0463] 各抑制性单克隆抗体结合到ELISA平板并针对人TG2噬菌体库淘筛。回收结合至抗体的噬菌体,将其扩增并再进行4轮淘筛。对噬菌体中的TG2文库片段随后测序,并使用重叠序列确定各抗体的表位。随后使用抗体之间的共同序列确定特定抑制性表位的共有序列,并据此将分组抗体。鉴定出3个抑制性表位。

[0464] 图6:具有TG2催化核心的抑制性表位的结构定位

[0465] 将TG2氨基酸序列输入Pymol,并产生结构处于其开放的Ca<sup>2+</sup>激活状态的3D图示,显示推测的钙结合位点(绿色)和催化三联体(灰色)供参考(作图)。随后将共有抑制性表位加入到蓝色(抗体第1组-AB1位点)、红色(抗体第2组-DF4位点)和黄色(抗体第3组,DD9位点)。

[0466] 图7:抑制性抗体的VL序列

[0467] 从各抑制性杂交瘤提取RNA、将其逆转录并利用简并FR1引物、MH1和MH2引物和3个恒定区域引物通过PCR扩增来,扩增VH基因。所得VH和VK序列显示用于AB1。

[0468] 图8. AB1抑制细胞匀浆物中TG2活性的功效

[0469] A:裂解Hep2G细胞,并将45ug蛋白与来自AB1、DH2、DD9、BB7、DC1和EH6的750ng的IgG混合20分钟。随后利用<sup>3</sup>H腐胺掺入TG活性测试对该所得物进行测试,在超过1小时时间采样。计算反应速率,并表示为与随机抗体(MAB002)温育的同一裂解物的百分比。数据表示评价平行进行的2次独立实验的平均百分比抑制 $\pm$ SEM。\* $p < 0.05$

[0470] B:使HepG2细胞暴露于浓度增加的葡萄糖达96小时,从而上调TG2表达。收获细胞,裂解,以SDS-PAGE分级分离25ug裂解物,进行免疫印迹,并利用化学发光端点以AB1 IgG的

1ng/ml溶液进行免疫探测。

[0471] 图9. (表1): TG2抑制性抗体的IC<sub>50</sub>值比较

[0472] 为确定抗人、大鼠和小鼠的各抗体的IC<sub>50</sub>值, 采用了<sup>3</sup>H腐胺测试。采用100ng的人TG2或25ng的小鼠和大鼠TG2来产生反应, 其中在10 $\mu$ l的反应混合物中每小时引入约3000cpm的腐胺。随后从在反应混合物中加入500ng (5 $\mu$ g/ml终浓度) 开始应用各抗体的连续稀释物, 并与TG2温育20分钟, 随后激活反应。在graphpad prism中利用适合的曲线拟合确定反应的酶促速率降低50%时的浓度, 从而计算IC<sub>50</sub>值。将值表示为反应中抑制1ng的TG2的IgG的量(mg/ml计)。

[0473] 图10. 响应于TG2抑制的HK2细胞中细胞外TG活性

[0474] HK2细胞铺在纤连蛋白上, 并在0.1M生物素尸胺和4ng/ $\mu$ l的人抗TG2抗体(AB1) (A部分)、或0.1M生物素尸胺和4ng/ $\mu$ l人抗TG2抗体(DC1) (B部分) 或0.1M生物素尸胺和400 $\mu$ M位点-特异泛TG抑制剂1,3-二甲基-2-[(2-氧-丙基) 硫代]氯化咪唑鎓的存在下温育2小时。通过在纤连蛋白中引入生物素尸胺并利用extravadin-HRP和TMB底物解释引入, 从而测定细胞外TG活性。在96孔读板仪上以450nm测定光密度的变化。数据表示相对于1mg的细胞蛋白而校正的450nm处的平均OD。n=6孔/实验组。

[0475] 图11. 利用<sup>3</sup>H腐胺掺入测试比较抗体AB1和Quark的TG2抑制性抗体的fab片段对TG2的抑制

[0476] 通过加入1 $\mu$ g的Quark在W02006/100679中描述并在Sheffield大学合成的抗体的fab片段或500ng的AB1, 基于在二甲基酪蛋白中引入<sup>3</sup>H腐胺60分钟, 测定100ng的hTG2的TG2活性。数据表示来自重复进行的3次独立实验的作为引入<sup>3</sup>H腐胺(CPM)的平均TG活性 $\pm$ SEM。

[0477] 图12. 利用<sup>3</sup>H腐胺掺入测试比较抗体AB1和Quark的TG2抑制性抗体的fab片段对TG2的百分比抑制

[0478] 将图11的数据另外表示为各时间点的TG活性的百分比, 从而通过应用AB1和Quark抗体fab片段显示对TG2活性的相对比较敲除。

[0479] 图13. 利用<sup>3</sup>H腐胺掺入测试比较抗体AB1和Quark的TG2抑制性抗体的重组大鼠IgG对TG2的抑制

[0480] 通过加入500ng的Quark在W02006/100679中描述并在Medical Research Council Technology合成的TG2抑制性抗体的重组大鼠版本或500ng的AB1, 基于在二甲基酪蛋白中引入<sup>3</sup>H腐胺60分钟, 测定100ng的hTG2的TG2活性。数据表示来自重复进行的3次独立实验的作为引入<sup>3</sup>H腐胺(CPM)的平均TG活性 $\pm$ SEM。

[0481] 图14. 利用<sup>3</sup>H腐胺掺入测试比较抗体AB1和Quark的TG2抑制性抗体的重组大鼠IgG对TG2的百分比抑制

[0482] 将图13的数据另外表示为各时间点的TG活性的百分比, 从而通过应用AB1和Quark重组大鼠IgG显示对TG2活性的相对比较敲除。

[0483] 图15. AB1对HK2细胞中ECM水平的效果

[0484] 加入或不加入TG2抑制性抗体AB1, 通过在ECM中引入<sup>3</sup>H脯氨酸76小时而测定HK-2细胞中成熟胶原水平。数据代表未处理细胞中以平均百分比水平表示的<sup>3</sup>H脯氨酸引入每mg细胞蛋白 $\pm$ SEM。n=2。

[0485] 图16. 抗体的人源化版本的结合ELISA

[0486] 在抗人IgG ELISA中测定来自用人源化轻链和重链载体的不同组合共转染的HEK293F细胞的上清液以确定浓度,并在抗huTG2ELISA中进行测定。各上清液测定三次,确定IC<sub>50</sub>。选择最有力的组合进行进一步研究,并作为候选人源化抗体。

[0487] 图17.通过ELISA对人Tg2测试MRC Quark CTD190

[0488] 96孔板在碳酸盐缓冲液中铺有hTG2 (1 $\mu$ g/ml) 过夜,利用100ng/ml一抗进行ELISA检测。对于CUB利用抗小鼠IgG (SIGMA 3673) 进行检测,对于Quark利用抗大鼠IgG (SIGMA A5795) 进行检测(均为1:5000)。使通过MRC T制备的Quark抗体与人TG2反应。

[0489] 图18:从AB1杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并利用简并信号序列引物MHV4与重链恒定区引物MHCG1,或利用简并信号序列引物MKV4与 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC通过PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0490] 图19:从BB7杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并利用简并信号序列引物MHV4与重链恒定区引物MHCG1,或利用简并信号序列引物MKV4与 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC通过PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0491] 图20:从DC1杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并利用简并信号序列引物MHV4与重链恒定区引物MHCG1,或利用简并信号序列引物MKV4与 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC通过PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0492] 图21:从JE12杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并通过重链恒定区引物MHCG1,或利用信号序列引物MKV1和 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC通过采用5' RACE PCR的PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0493] 图22:从EH6杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并通过重链恒定区引物MHCG2B,或利用信号序列引物MKV和 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC通过采用5' RACE PCR的PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0494] 图23:从AG9杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并利用简并信号序列引物MHV7和重链恒定区引物MHCG1,或利用简并信号序列引物MKV1-11与 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC的混合物通过PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0495] 图24:从AH3杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并利用简并信号序列引物MHV7和重链恒定区引物MHCG2B,或利用信号序列引物MKV1与 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC通过PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0496] 图25:从DD9杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并通过重链恒定区引物MHCG2A,或利用简并信号序列引物MKV5与 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC通过采用5' RACE PCR的PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0497] 图26:从DH2杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并通过重链恒定区引物MHCG2B,或利用简并信号序列引物MKV45与 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC通过采用5' RACE PCR的PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0498] 图27:从DD6杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并通过重链恒定区引物MHCG2B,或利用5' RACE PCR与 $\lambda$ 轻链恒定区引物MLC通过采用5' RACE PCR的PCR进行扩增。所得VH和VK序列如图所示。

[0499] 图28:从IA12杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并简并信号序列引物MHV9与重链恒定区引物MHCG1,或利用简并信号序列引物CL14与 $\kappa$ 轻链恒定区引物MKC通过PCR进行扩增。所

得VH和VK序列如图所示。

[0500] 图29.嵌合抗TG2抗体 (a) cAB003、(b) cBB001、(c) cDC001、(d) cDD9001、(e) cDH001和 (f) 商业TG2抗体CUB7402对重组人TG2的酶促抑制的剂量响应曲线和IC50值。IC50值是3次独立实验的平均值。

[0501] 图30.嵌合抗TG2抗体 (a) cDC001和 (b) 商业TG2抗体CUB7402对重组食蟹猴TG2的酶促抑制的剂量响应曲线和IC50值。

[0502] 图31.人源化抗TG2抗体 (a) hBB001AA、(b) hBB001BB、(c) hAB005和 (d) hAB004对重组人TG2的酶促抑制的剂量响应曲线和IC50值。

[0503] 图32.人源化抗TG2抗体 (a) hBB01AA和 (b) hAB004对重组食蟹猴TG2的酶促抑制的剂量响应曲线和IC50值。

[0504] 图33.鼠类单克隆抗TG2抗体 (a) mAB003、(b) mBB001、(c) mDC001、(d) mDD9001、(e) mDH001和 (f) mDD6001对重组人TG2的酶促抑制的剂量响应曲线和IC50值。

[0505] 图34-人源化版本的AB1抗体的结合ELISA

[0506] 在抗人IgG ELISA中测定来自用人源化AB1轻链和AB1重链载体的不同组合共转染的HEK293F细胞的上清液以确定浓度,并在抗huTG2ELISA中进行测定。各上清液测定三次,确定IC<sub>50</sub>。选择最有力的组合进行进一步研究,并作为候选人源化抗体。

[0507] 图35.抗体与人TG2的抗体 (a) 嵌合抗体cDD9001、cDH001、cDC001、商业TG2抗体CUB7402和同种型匹配对照,(b) 嵌合抗体cBB001和同种型匹配对照以及 (c) 嵌合抗体cAB003和同位素匹配对照结合的剂量响应ELISA结合曲线和EC50数据。

[0508] 图36.抗体与食蟹猴TG2 (a) 嵌合抗体cDD9001、cDH001、cDC001,商业TG2抗体CUB7402和同种型匹配对照、(b) 嵌合抗体cBB001和同种型匹配对照以及 (c) 嵌合抗体cAB003和同位素匹配对照结合的剂量响应ELISA结合曲线和EC50数据。

[0509] 图37.抗体与人TG2 (a) 人源化抗体hBB001AA、HBB001BB、商业TG2抗体CUB7402和同种型匹配对照以及 (b) 人源化抗体hAB004结合的剂量响应ELISA结合曲线和EC50数据。

[0510] 图38.抗体与食蟹猴TG2 (a) 人源化抗体hBB001AA、HBB001BB、商业TG2抗体CUB7402和同种型匹配对照以及 (b) 人源化抗体hAB004和同位素匹配对照结合的剂量响应ELISA结合曲线和EC50数据。

[0511] 图39:人源化AB1对细胞外TG2的结合活性

[0512] 利用测定纤连蛋白中的生物素尸胺引入的ELISA测试由HK2细胞产生的细胞外TG2活性抑制。显示了表示人源化AB1 (hAB005)对TG2活性的抑制和所获得的IC的示例性曲线。

[0513] 图40:人源化BB7对细胞外TG2的结合活性

[0514] 利用测定纤连蛋白中的生物素尸胺引入的ELISA测试由HK2细胞产生的细胞外TG2活性抑制。显示了表示人源化BB7版本 (hBB001AA和hBB001BB)对TG2活性的抑制和所获得的IC的示例性曲线。

[0515] 图41:松胞菌素D、R281和ZDON对照刮擦测试结果和商业抗体CUB7402刮擦测试结果

[0516] 利用WI-38细胞进行刮擦创伤测试,在铺板和过夜生长后,在无血清培养基中洗涤细胞,并利用Essen Wound Maker产生刮擦创伤。去除培养基并以含有对照和测试抗体的无血清培养基95ul/孔置换。将平板放置在Essen Incucyte中,利用Incucyte软件分析创伤的

闭合。对于对照松胞菌素D、R281和Z-Don (图A) 以及商业抗体CUB7402和松胞菌素 (图B), 绘制相对于时间的相对创伤密度。

[0517] 图42: 人源化BB7刮擦测试结果

[0518] 利用WI-38细胞进行刮擦创伤测试, 在铺板和过夜生长后, 在无血清培养基中洗涤细胞, 并利用Essen Wound Maker产生刮擦创伤。去除培养基并以含有对照和测试抗体的无血清培养基95ul/孔置换。将平板放置在Essen Incycyte中, 利用Incucyte软件分析创伤的闭合。对于人源化hBB001AA和对照松胞菌素D (图A) 以及hBB001BB和对照松胞菌素D (图B), 绘制相对于时间的相对创伤密度。

[0519] 图43: 人源化AB1刮擦测试结果。

[0520] 利用WI-38细胞进行刮擦创伤测试, 在铺板和过夜生长后, 在无血清培养基中洗涤细胞, 并利用Essen Wound Maker产生刮擦创伤。去除培养基并以含有对照和测试抗体的无血清培养基95ul/孔置换。将平板放置在Essen Incycyte中, 利用Incucyte软件分析创伤的闭合。对于人源化hAB005和对照松胞菌素D, 绘制相对于时间的相对创伤密度。

[0521] 图44: 嵌合DC1刮擦测试结果。

[0522] 利用WI-38细胞进行刮擦创伤测试, 在铺板和过夜生长后, 在无血清培养基中洗涤细胞, 并利用Essen Wound Maker产生刮擦创伤。去除培养基并以含有对照和测试抗体的无血清培养基95ul/孔置换。将平板放置在Essen Incycyte中, 利用Incucyte软件分析创伤的闭合。对于嵌合抗体cDC001和对照松胞菌素D, 绘制相对于时间的相对创伤密度。

[0523] 图45: 通过Biacore测定人TG2与cAB003固定化抗体的结合

[0524] 左侧显示了在25、50、100和200nM (包括50nM的重复实验) 时在cAB003包被的生物传感器上人TG2注射的结合阶段。从相同实验收集两个长解离阶段, 在右侧显示。拟合以实心黑线显示, 结果如表25所示。

[0525] 图46: 通过Biacore测定食蟹猴TG2与hAB004固定化抗体的结合

[0526] 左侧显示了在25, 50, 100, 200 and 400nM (包括50nM的重复实验) 时在hAB004包被的生物传感器上食蟹猴TG2注射的结合阶段。从相同实验收集两个长解离阶段, 在右侧显示。拟合以实心黑线显示, 结果如表26所示。

[0527] 图47: 在不存在钙时通过Biacore测定人TG2与cDH001固定化抗体的结合

[0528] 左侧显示了在25、50、100和200nM (包括50nM的重复实验) 时在cDH001包被的生物传感器上人TG2注射的结合阶段。从相同实验收集两个长解离阶段, 在右侧显示。拟合以实心黑线显示, 结果如表25所示。

[0529] 实施例1: 通过鉴定3个特异抑制性表位开发适合人体治疗应用的TG2抑制性抗体

[0530] 转谷氨酰胺酶2型 (TG2) 催化相邻肽或蛋白 (包括细胞外基质 (ECM)) 之间 $\epsilon$ - $(\gamma$ -谷氨酰基)-赖氨酸异肽键的形成。升高的细胞外TG2导致加速ECM沉积, 并降低清除, 这导致组织疤痕和纤维化。其还与乳糜泻、神经退行性失调和一些癌症有关。虽然已经开发了大量化合物来抑制转谷氨酰胺酶, 但这些化合物均对TG2均无特异性, 在一定程度上抑制了所有转谷氨酰胺酶。虽然这些抑制剂已经用作这些病例中TG2作用的概念研究的证据, 但缺少亚型特异性阻碍了其在人体中的应用。为解决该问题, 本发明开发出仅抑制TG2活性的高亲和力TG2特异性抗体。

[0531] 包含人TG2核心的氨基酸143至473的重组蛋白在大肠杆菌中产生, 再折叠, 并取

100 $\mu$ g注入4只小鼠,在第2、5、7和10周增强。最后一次增强之后第4天收取脾脏,将脾细胞与Sp2/0-Ag-14骨髓瘤细胞融合。75株杂交瘤上清液显示出对TG2的特异性。在含有100 $\mu$ g TG2的腐胺掺入测试中,就其抑制TG2活性的能力对这些杂交瘤上清液进行筛选。10种TG2特异上清液具有抑制性。随后将这些杂交瘤二倍克隆。利用筛选TG2片段文库的噬菌体展示,对每种抗体作图达到TG2核心域中精确表位,并确定3个单独的抑制性表位。确定了将100ng的TG2的活性降低50%的抗体的量。

[0532] 2个最有效抗体AB1和DC1结合氨基酸304至327,并具有 $1.1 \times 10^{-5}$ mg/ml IgG/ng重组TG2的IC<sub>50</sub>。当施加到培养基中时,应用AB1 & DC1能够成功抑制在人Hep2G细胞中的TG2,和人HK-2细胞的细胞外TG2。

[0533] 因此,以TG2核心域免疫小鼠令人惊讶地能够产生单克隆抗体,该单克隆抗体靶向在催化核心内的之前未报道的表位。这些抗体具有特异性,有效抑制TG2活性,并适合于体外应用。

[0534] 材料和方法

[0535] 转谷氨酰胺酶2催化核心域制备

[0536] 表达人TG2的催化核心域(TG2的残基Cys143-Met 473),使其重折叠并纯化至允许在小鼠中进行免疫。将催化核心域(PCR正义引物GCG CGC GCT AGC TGC CCAGCG GAT GCT GTG TAC CTG GAC,反义GCG CGC AAG CTT CAT CCC TGT CTCCTC CTT CTC GGC CAG)克隆到表达载体pET21a(+)中,并在大肠杆菌菌株BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL(Agilent Technologies)中作为不溶性包涵体表达。简言之,将50 $\mu$ l的感受态BL21(DE3)pLysS细胞用1 $\mu$ l的表达质粒(30ng/ $\mu$ l)转化,并在含有选择性抗生素(100 $\mu$ g/ml氨苄青霉素,34 $\mu$ g/ml氯霉素)和1%葡萄糖的LB琼脂板上铺板,并在37 $^{\circ}$ C温育过夜。挑取单克隆,以将10ml含100 $\mu$ g/ml氨苄青霉素、34 $\mu$ g/ml氯霉素和1%葡萄糖的新鲜LB培养基中接种在37 $^{\circ}$ C和200rpm的振荡温育器中。过夜生长后,将培养物转移到具有1%葡萄糖的100ml 2xYT培养基中,生长至OD<sub>600nm</sub>为0.8,随后转移到1L 2xYT培养基中,直至OD<sub>600nm</sub>再次达到0.8。在1mM IPTG下4小时温育以刺激表达后,成团,并通过在缓冲液A(10mM Tris;1mM EDTA;10mM DTT;1mM PMSF;0.5mg/ml溶菌酶蛋白酶抑制剂片(Roche),pH 8.0)中超声裂解细菌。在40,000x g离心收获包涵体,在洗涤缓冲液B(50mM Tris;1mM EDTA;10mM DTT;2%脱氧胆酸钠,pH 8.0)中洗涤3次,最后在去离子水中洗涤。

[0537] 将包涵体溶解在3.5ml的再溶解缓冲液(40mM Tris-HCl,8M尿素和10mM DTT pH12)中,在重折叠缓冲液(40mM Tris HCl;150mM NaCl;20%甘油;5mM半胱氨酸;0.5mM胱氨酸,pH 8)中于4 $^{\circ}$ C在暗处重折叠16小时。

[0538] 将再溶解的包涵体加载到1ml镍柱上。简言之,将柱以结合缓冲液(40mM Tris;300mM NaCl;10mM咪唑)预平衡,加载包涵体。对柱充分洗涤(40mM Tris;300mM NaCl;30mM咪唑)。以高浓度咪唑缓冲液(40mM Tris;300mM NaCl;300mM咪唑)洗脱重组蛋白。收集含有洗脱蛋白的级分并对适当缓冲液(40mM Tris;300mM NaCl pH 8)透析过夜。利用Bradford蛋白测试评价蛋白。

[0539] HepG2细胞培养物&裂解物

[0540] HepG2细胞由Richard Ross(University of Sheffield)惠赠。细胞在补充有10%胎牛血清(FCS)、100IU青霉素和100 $\mu$ g/ml链霉素、2mM L-谷氨酰胺的DMEM/4.5g/L葡萄糖

(均为GIBCO)中在含有5%CO<sub>2</sub>的95%湿润气氛中37℃常规培养。将2百万细胞接种在10cm皿中,生长48小时。细胞在250μl的STE缓冲液(0.32M蔗糖,5mM Tris,1mM含有蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(1mM)、苯甲脒(5mM)和亮肽素(10μg/ml)的EDTA),中裂解,并冰上超声以产生适合于TG2活性测试的细胞裂解物。

[0541] 人肾2(HK2)细胞:

[0542] HK-2细胞(肾近端肾小管上皮细胞)购自欧洲细胞培养物保藏中心,传3代。细胞在补充有重组EGF(0.1-0.2ng/ml)和牛垂体提取物(20-30ug/ml)的具有L-谷氨酰胺的角质形成细胞无血清培养基(KSFM,Gibco 17005-042)中在含有5%CO<sub>2</sub>的95%湿润气氛中37℃常规培养。对于传代,去除培养基,以1x PBS洗涤一次,然后以1ml的0.25%胰蛋白酶/EDTA(T75培养瓶)于37℃胰化1分钟。细胞重悬在10ml的KSFM中并以400g离心1分钟。去除培养基并将细胞铺在KSFM(1:3至1:5分裂是正常的)中。在实验中使用传5-14代的细胞。细胞通常良好生长至95%汇合。

[0543] 考马斯亮蓝染色和蛋白质免疫印迹

[0544] 通过使5μg的回收蛋白在10%(w/v)聚丙烯酰胺变性凝胶上电泳并以考马斯亮蓝染色溶液(Sigma)染色,从而检查重组蛋白的纯度。

[0545] 通过蛋白质免疫印迹确认TG2核心蛋白合成并测定免疫之后的TG2和TG2核心的反应性水平。按要求将重组蛋白(10至80ng)加载到10%(w/v)聚丙烯酰胺变性或非变性凝胶上,并以100V转印1小时到PVDF膜(Transblot SD,Biorad,UK)上。以TBS/0.1%(v/v)Tween 20中的3%(w/v)BSA使膜在4℃封闭过夜。随后洗涤膜,并以含有1%BSA的TBS/Tween中的单克隆小鼠抗转谷氨酰胺酶抗体进行探测。对于重组TG2核心蛋白的证据和作为抗体筛选的阳性对照,使用1:1000稀释的商业抗体Cub7402(neomarkers)。以抗小鼠γ-链-HRP连接的二抗(Sigma,Poolle,UK)检测一抗的结合。利用ECL化学发光检测系统(Amersham,UK)使条带可视化。

[0546] 小鼠免疫和融合

[0547] 以50μg的抗原(以无菌PBS制成至多50μl体积)和50μl的完全弗氏佐剂的混合物对各小鼠免疫。对四只(8-12周龄)BALB/C小鼠进行注射。利用相同程序进行两次增强免疫(第14天和第35天),不同之处在于对于这些注射使用不完全弗氏佐剂。在第45天,从所有动物采集测试血液,并通过ELISA评估对TG2的反应性。

[0548] 在第10周,对两个最佳的响应动物进一步通过再次以混合有不完全弗氏佐剂的100μg的核心蛋白(PBS中)注射进行增强,并在4天后处死动物以收集脾脏并使其与Sp2/0-Ag-14骨髓瘤细胞融合。从该融合体中,就对TG2蛋白的反应性通过ELISA筛选了约1000个孔。

[0549] 筛选TG2特异性

[0550] 测试条件培养基或纯化的IgG对转谷氨酰胺酶家族成员的反应性。利用板结合测试确定各测试物结合各种转谷氨酰胺酶(TG1,TG2,TG3,TG5,TG7和因子X IIIa;所有均来自Zedira)的能力。微量滴定板(Costar,英国剑桥)在4℃以在50μl的0.1M碳酸氢盐/碳酸盐缓冲液(pH值9.6)中的重组TG(Zedira,德国达姆施塔特)包被过夜。在37℃用含3%w/vBSA的200μl的PBS中对板封闭2小时。用含0.05%吐温20的PBS(洗涤缓冲液)将板洗涤三次,并加入100μl的稀释条件培养基(1:5至1:20稀释)或纯化的抗TG2催化核心的mAb。将板在室温再

温育1小时。重复该洗涤步骤,并加入含有0.05% Tween20 (v:v) 和1%牛血清白蛋白(w:v)的PBS (Sigma公司,英国普尔)溶液中的抗小鼠 $\gamma$ 链-辣根过氧化物酶(1:5000)1小时。经过8次洗涤后,以50 $\mu$ l的3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物显示结合。通过加入25 $\mu$ l的0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>停止反应,并确定450nm处的吸光度。

[0551] 对TG2抑制的筛选

[0552] 根据<sup>3</sup>H-腐胺至N',N'-二甲基酪蛋白中的Ca<sup>2+</sup>依赖性引入,测定TG活性。开始反应前,使重组人TG2 (100ng)与测试样品(条件培养基或纯化IgG)在室温温育20分钟。加入25 $\mu$ l反应混合物(5 $\mu$ l的25mM CaCl<sub>2</sub>,5 $\mu$ l的40mM二硫苏糖醇,5 $\mu$ l <sup>3</sup>H-腐胺化合物和10 $\mu$ l 25mg/ml的N,N'二甲基酪蛋白(对于非酶对照物以100mM EDTA替换25mM CaCl<sub>2</sub>),以启动反应,使样品在37℃温育至多1小时。通常在反应的0、10、30和60分钟时,将10 $\mu$ l等分试样在3MM Whatman滤纸条上,立刻浸入冰冷的10%三氯乙酸(TCA)中以使交联蛋白沉淀。在冰冷的5% TCA中充分洗涤三次,随后以冰冷95%乙醇漂洗3次,然后将空气干燥的滤纸在2ml的闪烁计数液(Ultima Gold Packard,Perkin Elmer)中计数。计算反应速率。1TG单位等于在37℃下每小时引入1nmol的腐胺。

[0553] 将25 $\mu$ l的重组蛋白替换为25 $\mu$ l的细胞裂解物,利用相同的程序评价细胞裂解物中的TG抑制。

[0554] 杂交瘤克隆&从条件培养基纯化抗体

[0555] 从克隆的抑制性杂交瘤中进行单克隆抗体分离。根据常规方法(LoiratMJ等,1992),通过有限稀释方法加倍克隆最初鉴定的杂交瘤孔(以确保稳定性和克隆性),通过ELISA和活性筛选以上述方式测试子克隆。选择的抗体生产克隆在25和75cm<sup>2</sup>培养瓶中扩增,并用无血清培养基(Hyclone,Fisher Scientific,Loughborough,UK)饲养。随着细胞的扩增,收集条件培养基,以便用于使用亲和层析在蛋白G柱(Amersham Life Sciences)上纯化IgG抗体。条件培养基在等体积10mM磷酸钠(pH值7.25)中稀释,并以1.0至2.0ml/分钟的流速施加至所述蛋白G柱。用10倍柱体积的相同缓冲液将柱充分洗涤。结合的抗体在甘氨酸溶液(0.1M;pH值2.7)中洗脱,并以0.15%体积的1M Tris/盐酸(pH9)中和。将样品相对于1000倍体积的磷酸盐缓冲盐水液进行24小时的透析,更换2次缓冲液。

[0556] 抗体表位的噬菌体展示作图

[0557] 利用以下引物通过聚合酶链式反应扩增人TG2的全长编码序列;TG2-FL-15' ATGCCGAGGAGCTGGTCTTAGAGA 3' 和TG2-FL-25' GCGGGGCAATGATGACATTCCGGA 3'。利用Qiagen PCR cleanup试剂盒(Qiagen)纯化约2kb的扩增产物,并利用RQ DNase I (Promega)消化为随机片段。以DNA聚合酶I的Klenow片段和T4DNA聚合酶处理RQ DNase反应,从而产生平末端片段。将这些片段通过凝胶电泳纯化,利用Qiagen凝胶回收试剂盒(Qiagen,Crawley UK)提取50-150bp的片段。

[0558] 将噬菌体展示载体以EcoRV消化,以碱性磷酸酶处理,并通过凝胶电泳和Qiagen凝胶回收试剂盒纯化。100ng的纯化载体与15ng的人TG2cDNA制备平末端片段连接。将所得连接物电穿孔到XL1-Blue电感受态细胞(Agilent Technologies)中,以VCSM13辅助噬菌体(Agilent)挽救片段文库。噬菌体颗粒以2%葡萄糖和4%PEG6000沉淀,并重悬在PBS 0.1% Tween 20 (v:v) 1%BSA (w:v)中。

[0559] 使用以下步骤进行表位作图。以在100 $\mu$ l包被缓冲液中的30 $\mu$ g的单克隆抗体在4℃

包被ELISA孔。经包被的孔用PBS/Tween洗涤,并以400 $\mu$ l PBS中的3%BSA(w:v)在室温下封闭1小时。约 $10^{10}$ 个噬菌体颗粒(100 $\mu$ l)加入被封闭的孔中并在室温下温育1小时。将孔用400 $\mu$ l的PBS/0.5%吐温(v:v)洗涤8次,并用pH 2.2的0.2M甘氨酸洗脱粘附噬菌体。洗脱的噬菌体被用来感染1mlXL1-Blue宿主,并将样品铺设在LB琼脂(60 $\mu$ g/ml氨苄青霉素,15 $\mu$ g/ml四环素)上,将剩余的宿主加入到100ml LB培养基(60 $\mu$ g/ml氨苄青霉素,15 $\mu$ g/ml四环素)中,并在200rpm的振荡温育器中37 $^{\circ}$ C生长过夜,从而产生所选片段的富集文库。重复该富集过程5次,并从最后一轮中选择随机菌落用于测序。

[0560] 确定抗体VL区域的序列

[0561] 引物

[0562] 重链正义引物——对高度简并FR1引物、MH1和MH2(Wang等2000),与3个恒定区引物组合,用于扩增VH基因。

[0563] MH15' CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGTC 3'

[0564] MH25' CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3'

[0565] 小鼠-G15'

[0566] AGGCGCAGTACTACAATCCCTGGGCACAATTTTCTTGTCACC 3'

[0567] 小鼠-G2a 5' AGGCGCAGTACTACAGGGCTTGATTGTGGGCCCTCTGGG 3'

[0568] 小鼠-G2b 5' AGGCGCAGTACTACAGGGGTTGATTGTTGAAATGGGCCCG 3'

[0569]  $\kappa$ 引物

[0570] VK15' CGCTGCGAGCTCGATATTGTGATGACBCAGDC 3'

[0571] VK25' CGCTGCGAGCTCGAGRTTKTGATGACCCARAC 3'

[0572] VK35' CGCTGCGAGCTCGAAAATGTGCTCACCCAGTC 3'

[0573] VK45' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGATGACACAGTC 3'

[0574] VK55' CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACACAGAC 3'

[0575] VK65' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGCTSACYCARTC 3'

[0576] VK75' CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACYCARTC 3'

[0577] VK85' CGCTGCGAGCTCCAAATTGTTCTCACCCAGTC 3'

[0578] K-CONST 5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCTGTTGAA 3'

[0579] 利用Trizol(GIBCO)根据厂商的程序从单克隆杂交瘤细胞( $\sim 10^5$ 个细胞)中提取总RNA,并通过A<sub>260nm</sub>定量。利用ImProm II逆转录酶(Promega)和随机六聚体引物合成cDNA。反应混合物如下:1 $\mu$ g总RNA,0.1 $\mu$ g寡(dN)<sub>6</sub>,12 $\mu$ l ImProm II缓冲液,1 $\mu$ l 10mM dNTPs(Promega),8 $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>,4 $\mu$ l ImProm II逆转录酶(Promega),DEPC处理H<sub>2</sub>O,总反应体积为60 $\mu$ l。RNA和随机引物混合物在70 $^{\circ}$ C加热10分钟,然后置于冰上。加入其余反应组分,并在20 $^{\circ}$ C温育10分钟,然后在40 $^{\circ}$ C再温育40分钟。

[0580] 利用GoTaq聚合酶(Promega)进行VH和VK基因的扩增。各50 $\mu$ l反应含有以下成分:cDNA 2 $\mu$ l,20pmol正义和反义引物,10 $\mu$ l GoTaq反应缓冲液,1 $\mu$ l 10mM dNTPs,5 $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>,2.5u GoTaq聚合酶,H<sub>2</sub>O加至最终体积为50 $\mu$ l。采用以下条件使反应循环35次:初始变性95 $^{\circ}$ C 2分钟;变性94 $^{\circ}$ C 1分钟,退火56 $^{\circ}$ C 1分钟,延伸72 $^{\circ}$ C 1分钟。PCR产物通过凝胶电泳分析,并利用TOPO TA克隆试剂盒(Invitrogen)克隆。选择重链和轻链PCR产物的随机小量制备物进行测序。

[0581] 细胞外TG活性的测定

[0582] 通过改进的细胞ELISA测定细胞外TG活性。利用0.1M EDTA或0.25%胰蛋白酶/EDTA收获HK-2上皮细胞,并在无血清培养基中以 $8 \times 10^4$ 细胞/孔的密度铺种在96孔板上,该96孔板已经以100 $\mu$ l/孔的纤连蛋白(在50mM Tris-HCl中5 $\mu$ g/ml,pH 7.4)(Sigma, Poole UK)包被过夜。在0.1mM生物素尸胺[N-(5-氨基苯基生物素酰胺)三氟乙酸](Molecular Probes, Eugene OR, USA)的存在下,于37 $^{\circ}$ C使细胞贴附2.5h。以3mM EDTA/PBS洗涤板两次,并以5mM EDTA/PBS中的0.1% (w/v) 脱氧胆酸去除细胞。收集上清液,并用于蛋白测定。以50mM Tris-HCl洗涤板,并利用1:5000 extravidin HRP (Sigma, Poole, UK) 在室温处理1h,随后用TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物显示所引入的生物素尸胺。以50 $\mu$ l 2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,在450nm读取吸光度。

[0583] 通过放射性标记测定胶原水平

[0584] 将细胞以 $3.75 \times 10^6/10\text{cm}^2$ 的密度接种在培养皿中,或以 $1 \times 10^6/$ 孔的密度接种在6孔板中。以20 $\mu$ Ci的<sup>3,4</sup>H脯氨酸(1.0mCi/ml, ICN)进行标记从而评估ECM胶原。在标准细胞培养条件下进行标记72h。在标记后,去除培养基,以PBS洗涤细胞,并以pH 7.4的50mM Tris中的2ml的0.25M氢氧化铵在37 $^{\circ}$ C去除10分钟。收集可溶分,利用二喹啉磷酸(BCA)测试确定蛋白浓度。通过体积增加的PBS充分洗涤皿,然后将ECM以在50mM Tris pH 6.8中的2ml的2.5% (w/v) SDS溶解。对皿进行刮擦从而确保完全去除ECM,在 $\beta$ 闪烁计数器中测定放射性为200 $\mu$ l。以每mg溶解的细胞蛋白对计数校正,并表示为平均对照值的百分比。

[0585] 重组批准Quark IgG的产生

[0586] 出于实验目的,从针对人II型转谷氨酰胺酶的抗体的‘人’单链Fv序列产生人-大鼠嵌合抗体。将该抗体称为QPCDTGII(缩写为QCT),可变区序列可在W02006/100679A2中获取。

[0587] 选择大鼠 $\gamma$  2a子类用于重链恒定区,去除糖基化位点从而降低大鼠测试动物中ADCC反应的机会。对于重链所选的大鼠恒定区是013593 (Bruggemann, M. Gene 74:473-482 (1988); Bruggemann, M., Free, J., Diamond, A., Howard, J., Cobbold, S. 和 Waldmann, H. Proc. Natl. Acad. Sci USA 83:6075-6079 (1986)), 来自Kabat数据库 (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH National Technical Information Service, 1991))。 $\kappa$ 轻链的是013718 (Sheppard, H. W. and Gutman, G. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7064-7068 (1981)), 来自Kabat。

[0588] 简言之,通过DNA合成产生(密码子使用适用于哺乳动物密码子偏好)重链和 $\kappa$ 链编码序列。

[0589] 利用引物QCT\_HindIII和QCT\_H\_rev通过PCR扩增重链基因合成产物。PCR的产物用HindIII和NcoMIV切割,并连接到MRCT表达载体。将感受态DH5 $\alpha$ 细菌的克隆以连接产物化学转化,并利用引物HCMVi和大鼠 $\gamma$  1进行PCR筛选。对三个产生预测大小的PCR产物的克隆测序。

[0590] 使用引物QCT\_HindIII和QCT\_L\_rev通过PCR扩增 $\kappa$ 链基因合成产物。将PCR产物用HindIII和PpuMI切割,并连接到表达载体pKN100。将感受态DH5 $\alpha$ 细菌的克隆以连接产物化学转化,并利用引物HCMVi和大鼠 $\kappa$ 进行PCR筛选。对三个产生预测大小的PCR产物的克隆测

序。

[0591] 产生同时编码重链和 $\kappa$ 链的双重插入表达载体,并转化到HEK293T细胞。从两个大规模HEK293T转染收集细胞培养清液,利用ÄKTA Explorer 色谱系统根据制造商的程序在1ml蛋白L-琼脂糖柱上进行亲和纯化。以IgG洗脱缓冲液洗脱单个OD280nm峰,并PBS透析,更换两次PBS。对其同时以280nm处UV吸收和大鼠IgG2a的ELISA进行测定。总产量为约700 $\mu$ g(通过OD<sub>280nm</sub>);303.5 $\mu$ g(通过ELISA)。

[0592] AB1抗体的人源化

[0593] 人VH和VK cDNA数据库

[0594] 来自国际免疫原学数据库2009<sup>101</sup>和免疫学关注蛋白的序列的Kabat数据库Release 5(1999年11月17日最后更新)<sup>102</sup>的人和小鼠免疫球蛋白的蛋白序列用于编辑Kabat比对中的人免疫球蛋白序列的数据库。本发明的数据库包含10,606个VH和2,910个VK序列。

[0595] AB1的分子模型

[0596] 使用建模程序103Modeller程序<sup>103</sup>在自动模式下运行计算小鼠抗体AB1可变区的同源模型。1MQK.pdb,3LIZ.pdb和1MQK.pdb的原子坐标是界面的最高同一性序列模板,VL和VH分别通过对Accelrys的抗体PDB结构数据库进行Blast分析确定。使用这些模板产生20个初始模型,其中最好的通过以其3个最佳环模板对各CDR环进行建模而进行细化。

[0597] hAB1框架选择

[0598] 利用各种选择标准,采用序列分析程序gibsSR来以AB1VHc,VKc和VKc<sub>1</sub>蛋白序列查询人VH和VK数据库。鉴定在小鼠抗体AB1同源模型中的CDR残基5Å内(Kabat分辨)的FW,并标为“5Å邻近”残基。

[0599] 选择AF06220作为FW,基于此构建初始人源化AB1VHc构建体。表1显示了AF06220与鼠类Ab1的比对和残基同一性。表2显示了序列的5Å邻近套层(proximity envelope)。AF062260仅具有1个远离其种系VH基因Z12347的体细胞突变(表3)。

[0600] 选择AY247656作为FW,基于此构建初始人源化AB1VKc构建体。与鼠类AB1的比对和残基同一性在表4中显示;表5显示了序列的5Å邻近套层。该序列显示了5个不同于其种系VK基因X93620的体细胞突变(表6)。

[0601] 选择AF193851作为FW,基于此构建初始AB1VKc<sub>1</sub>构建体。与鼠类AB1的比对和残基同一性在表7中显示。表8显示了序列的5Å邻近套层。该序列没显示出不同于其种系VK基因J00248的体细胞突变(表9)。

[0602] 结合ELISA

[0603] 用不同人源化轻链载体与不同人源化重链载体的组合共转染HEK 293F细胞。重组人TG2用于通过ELISA测定抗体结合。结果表明与轻链版本RKE或RKJ(表11)(代表人源化的不同轻链版本)组合的重链版本RHA(表10)显示出了最佳结合(图16)。

[0604] 重链版本RHA是在人供体序列上移植AB1抗体的小鼠CDR区的未修饰的移植物。然而,轻链版本RKE和RKJ均具有相同的单个5Å邻近残基背景突变F72(Kabat编号-以绿色显示)。该背景突变在标尺<sup>104</sup>、规范<sup>105</sup>或界面<sup>106</sup>残基外侧(见表11)。

[0605] 101.Lefranc,M.P.IMG, the international ImMunoGeneTics database (R)

.Nucleic Acids Res.31,307-310(2003) .

[0606] 102.Kabat,E.A.,Wu,T.T.,Perry,H.M.,Gottesman,K.S.& Foeller,C.Sequences of Proteins of Immunological Interest.NIH National Technical Information Service,(1991) .

[0607] 103.Eswar,N.等.Comparative protein structure modeling using Modeller.Curr.Protoc.Bioinformatics.Chapter 5:Unit 5.6.,Unit(2006) .

[0608] 104.Foote,J.& Winter,G.(1992).Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops.J Mol.Biol.224,487-499.

[0609] 105.Morea,V.,Lesk,A.M.& Tramontano,A.(2000).Antibody modeling: implications for engineering and design.Methods 20,267-279.

[0610] 106.Chothia,C.,Novotny,J.,Bruccoleri,R.& Karplus,M.(1985).Domain association in immunoglobulin molecules.The packing of variable domains.J Mol.Biol.186,651-663.





[0613]

表 7

Kabat 编号 <sup>a</sup>	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
标准 <sup>b</sup>	-	*	*	ABCDEF	-	ABCDEF	***	***	***	ABCDEF	A
规范 <sup>c</sup>	-	L	.....11111	.....1	.....1	.....2	.....2	.....2	.....1	.....3	.....3
界限 <sup>d</sup>	-	L	.....1	.....1	.....1	.....1	.....1	.....1	.....1	.....1	.....1
5A 邻近	*****	**	***	****	*****	*****	*****	*****	**	**	**
AB VKC	-DIQMTQSSMYASLGERVTLIC	.....K	.....WFOQKSRK	.....NTLII	.....KGI	.....SRFSGSGQDFELTISLSEYEDMGIYIC	.....RFF	.....RFGGKLEI-K	.....	.....	.....
AF193851	-.....LIS..V.D.....	.....	.....A.S.....	.....	.....	.....T.T.....C	.....PAU.....	.....	.....	.....	.....V.....

表 8

	5A 邻近残基
AB VKC	DIQMTQCFWFLILNGVFFSGSGQDFEYCFG
AF193851	.....S.....T.....

表 9

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
J00248.seq	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISNYLAWFQQKPKAKPSLIYAASLIQSCVPSRFRFSGSGGSDFTLITSSLQPEDFATYCCQYNSYPP								
AF193851.seq	.....R.....N.....H.T..W								



[0617] 为了迫使产生更可能靶向对TG2活性至关重要的表位而不是TG2分子上其他有利位点的抗体,本发明以TG2催化核心而不是全长TG2分子免疫小鼠。为了产生重组TG2域,从碱基329至1419产生了PCR构建体,并插入Pet21+ (a) 载体中(图1A)。BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL细菌中的该载体插入和表达,产生了包含整个催化核心的从氨基酸143至473的不可溶蛋白。将该蛋白溶解,并在40mM Tris HCl;150mM NaCl;20%甘油;5mM半胱氨酸;0.5mM胱氨酸,pH 8中重折叠。将10ng的该重折叠蛋白在非还原聚丙烯酰胺凝胶上电泳,进行蛋白质免疫印记并以CUB7402进行免疫探测。在37kDa可见明显条带,其与TG2核心预测尺寸一致(图1B)。更大条带也与CUB7402有免疫响应,其最可能代表核心蛋白的聚集体,因为在进行还原凝胶电泳时不存在这些更大条带(数据未示出)。

[0618] 免疫和融合体。

[0619] 以50微克的rhTG2核心对4只小鼠进行免疫。在免疫后约5至9周,从各小鼠取血清样品,并利用血清的连续稀释通过ELISA测试对rh TG2的反应性。所有的小鼠对rhTG2核心表现出了强烈的免疫响应,即使在使用最高稀释(1:51000)时也是如此(图2A)。为确认抗体也识别全长TG2,rhTG2和rhTG2核心蛋白分别在非变性凝胶上电泳,进行蛋白质免疫印迹,并用1/1000稀释的小鼠血清进行免疫探测(图2B)。对于对两种蛋白均具有最强反应性的小鼠(小鼠C)进行增强,回收脾细胞以采用University of Sheffield (Bioserv) 的杂交瘤服务进行融合。

[0620] 阳性杂交瘤的选择和克隆

[0621] 在通过Bioserv选择作为最高阳性的400个杂交瘤孔中,109个的上清液显示出对TG2的持久反应性,然而在ELISA中测试时,仅34个没有与其他关键TG家族成员反应(代表例在图3A中显示)。通过<sup>3</sup>H-腐胺掺入测试就抑制由100ngTG2产生的TG2活性的能力筛选出那些对TG2有特异性的杂交瘤(图4)。该初始筛选表明10个杂交瘤上清液能够抑制TG2活性(AB1;DC1;BB7;EH6;DH2;DD9;JE12;AG9;AH3;DF4)。通过有限稀释对这10个中的9个成功进行克隆。对于克隆DF4,虽然在克隆后对克隆进行了分离,但他们未显示出具有抑制性。在克隆后,从各克隆的杂交瘤中纯化IgG,并再次测试对TG2的选择反应性(图3B)。

[0622] TG2抑制性潜力

[0623] 测试了各克隆杂交瘤的IgG抗体的对人、大鼠和小鼠TG2的TG2抑制活性,基于抑制1ng的TG2所需的IgG量计算出IC<sub>50</sub>。从最有效的AB-1 (1.1x10<sup>-5</sup>mg/ml的IgG)至效果最小的JE12 (12.31.1x10<sup>-5</sup>mg/ml的IgG),抗人TG2的IC<sub>50</sub>值有大约12倍的跨度(图9;表1)。有趣的是,我们只能确定4个抗体(DH2,DD9,EH6和BB7)抗大鼠TG2的IC<sub>50</sub>,其中最好的DH2的IC<sub>50</sub> (2.23x 10<sup>-4</sup>mg/ml的IgG)比抗人TG2活性低约6倍,比抗TG2最好的AB-1抑制剂活性低38倍(图9;表1)。没有任何的抑制性抗体能够抑制小鼠TG2,可能是由于免疫耐受。

[0624] 抑制性抗体的表位作图

[0625] 为了确定TG2中哪些表位对TG2是免疫学独特并且具有抑制性,并且确定这10种抗体是否靶向相同或不同的位点,利用噬菌体展示对各抗体作图。构建TG2噬菌体文库,并针对各mAb进行筛选。然后通过结合噬菌体的共有测序确定表位。

[0626] AB1、AG1、AH1、BB7、DC1、EH6和JE12均显示出整体或部分与包含氨基酸304至326的单一表位结合(图5),并表现出位于在底物结合袋内的活性位点之前(图6)。将该区域命名为AB-1位点,并将靶向该位点的抗体称为第1组抗体。

[0627] DF4独特地靶向位于包含催化三联体中Asp 358的核心前面至后面(图6)的氨基酸351至365的序列(图5)。本发明将其称为第2组。

[0628] DH2和DD9与从氨基酸450至467的序列结合(图5)。这些第3组抗体结合位于与β桶-1结合处附近的核后方的区域,本发明将该区域称为DH2位点。该表位包含推测的钙结合位点(图6)。

[0629] 抗体测序

[0630] 为了确定各抗体的可变轻链序列,从各抑制性杂交瘤提取RNA,进行逆转录,并利用高简并FR1引物对MH1和MH2引物结合扩增VH基因的3种恒定区引物通过PCR进行扩增。

[0631] 对于AB1,所得的VH和VK序列在图7中I显示。

[0632] 蛋白混合物中AB1体外抑制TG2活性的能力

[0633] 抗重组TG2的最有潜力的抑制性抗体是AB1。为了具有治疗价值,必须能够不仅抑制纯溶液中的TG2活性,还要能抑制复杂蛋白溶液中的TG2活性,并且与其它蛋白不以任何方式关联。为了测试这一点,制备了人肝细胞系HepG2的匀浆物。应用0.5μg的AB1能够抑制70%的TG2活性(图8A)。然而,BB7产生了显著更好的抑制,敲减了90%的TG2活性。以AB1对25μg该裂解物进行免疫探测显示没有脱靶关联,在对应于TG2的尺寸处有单一的免疫响应条带(图8B)。

[0634] AB1和DC1抑制细胞外TG2活性的能力

[0635] 为评价这些抗体是否能够抑制细胞系统中的TG2活性。AB1(图10a)和DC1(图10b)施加至培养的人肾2(HK-2)小管上皮细胞,并利用生物素尸胺测试评测细胞外TG活性。与400μM施加的化学泛TG抑制剂1,3-二甲基-2-[(2-氧-丙基)硫代]氯化咪唑鎓相比,AB1当以4ng/ul施加至培养基中时能够实现60%的活性抑制,DC1以4ng/ul施加至培养基中时能够实现55%的活性抑制。

[0636] 抗体AB1与其他已知抑制性抗体的比较

[0637] 为了测试与其他已知TG2抑制性抗体相比较的AB1的有效性,在<sup>3</sup>H腐胺掺入测试中测试了在Quark biotechnology的专利申请WO2006/100679号中描述的抗体的fab片段(图11,12)和全长IgG(图13,14)的TG2活性。500ng的AB1将100ng人TG2的活性抑制了60至80%。相比之下,Quark抗体的fab片段或全长IgG在该测试中均未能显著抑制TG2。

[0638] 讨论

[0639] 显然需要验证TG2对于多种疾病在人体中作为治疗性靶标,在这多种疾病中实验研究已经表明涉及TG2。这些疾病包括:组织疤痕、乳糜泻、神经退行性疾病和一些癌症中的化疗抗性。限于此是因为缺乏能够选择性抑制人体中TG2活性的真正TG2特异性化合物。

[0640] 在本研究中,我们第一次以TG2的片段免疫小鼠,目的是在抑制性表位搜寻中能够分离出针对酶催化核心的广泛的抗TG2抗体。这引发了良好的免疫响应,并且抗体识别rhTG2核心和天然TG2,但不识别其他TG。

[0641] 在分离的抗体中的10个显示出抑制活性。这些抗体随后作图至3个TG2特异性且具有抑制性的表位。已经对这些抗体进行了克隆、测序,并计算了分离的IgG的IC<sub>50</sub>值。靶向底物袋的3种抗体(AB1、DC1和BB7)证明是特别有效的抑制剂。最重要的是,这些抗体在细胞裂解物中和细胞培养物中也均功能良好,表明这些抗体具有在富含蛋白的环境中发挥功能的潜能,这对体内应用至关重要。

[0642] 本发明人确信,成功产生这些抑制性抗体的关键因素在于决定仅用核心蛋白进行免疫。据发明人所知,还没有商业TG2抗体具有任何显著的抑制性潜能。发明人自己尝试利用全长TG2产生了大量抗体,但其中几乎没有抗体对TG2有特异性,并且均没有抑制性。这显然是由于对全长TG2内的蛋白环有明显的免疫原性偏好,许多蛋白环落入催化核心背面,与最广泛使用的TG2抗体CUB7402(aa447aa478)位置相似。

[0643] 令人惊讶的是,本发明的方法产生了有效性高的多的抗体。不受任何理论的束缚,发明人认为简单地通过针对覆盖中间核心的更小蛋白产生抗体,不仅能够消除一些优势免疫学表位,而且还能迫使靶向核心。单独这样做增加了可供选择的抗体的多样性,因此对核心有更广覆盖。不过,仅以核心进行免疫意味着丧失了核心的大多数折叠,因此在整个TG2分子中可能较不易接触的一些表位,在核心处于这种形式时可能是更具有吸引力的表位。假设所有10种抗体均识别线性表位(即,与还原性凝胶上的TG2结合),而本发明人此前利用全长TG2作为免疫原分离的抗体中的80%依赖于构象,这确实表明其可能是主要因素。

[0644] 此前已经有其他研究假设了将TG2抑制性抗体用于人体的想法。Esposito及其同事从乳糜泻患者体内开发了重组抗体,其中推测TG2抗体可具有抑制性作用[19]。这些抗体中的一种已由Quark Biotechnology开发用于商业应用,并递交了专利申请(WO2006/100679)。该抗体显示了在大鼠UUO模型中预防肾纤维化的一些令人激动的早期数据。然而,本发明人制备了该抗体的重组版本,其在ELISA(图17)和免疫印记中与TG2反应,本发明人对于该抗体以高达500ng的IgG/ng TG2实现了很小的抑制,在此情况下本研究中开发的所有抗体基本阻断了所有TG2活性。另外,WO2006/100679描述了这一抗体的小鼠版本的制备,因此在肾疾病的已认知的大鼠模型中长期应用将证明非常困难。

[0645] 本研究中值得注意的是对TG2核心内3个抑制性表位的作图。AB1表位是目前最有利的靶标,参考表位的位置这可能令人惊讶。在预测的TG2活性结构内对其位置的检测[20]表明其在入口中结合催化三联体,这可能是底物袋。由于在本发明筛选测试中使用的底物相对较小(腐胺和二甲基酪蛋白),该位点如此有效可能令人惊讶。然而,表位的位置必须使大的IgG(150kDa)紧紧位于催化位点中。根据表位数据,可预测到DD9位点可能更有效,这是因为其与推测的钙结合位点相关[21]。然而,对文献的研究表明有5个以上推测的Ca<sup>2+</sup>结合位点[21],但其明显具有惊人效果,这不是对所有TG2活性均起到关键作用的。

[0646] DF4位点会是假想的最有效表位,因为抗体与催化三联体中的1个必需氨基酸结合。然而,还不能成功克隆出产生该抑制性抗体的DF4,这样还不可能产生足够的IgG以充分进行IC<sub>50</sub>测试。根据Gunzler等(1982)FEBS Lett.150(2):390-6的工作,实际上可能非常难以克隆出具有过高功效的抗体,Gunzler等的工作提出淋巴细胞需要TG2活性来进行增殖,因此具有更好抑制潜力的抗体可能仅利用重组方法或连续IgG提取系统才有可能。

[0647] 进行该工作时最令人受挫的问题之一是开发的所有抗体均明显不能有效阻断非人TG2活性,而这对于临床前试验至关重要。所有抗体在蛋白质免疫印迹和ELISA中均与大鼠和小鼠TG2反应,在以下情况下强度有很少差异。然而,在本发明制备了IgG的9种抗体中,只能在大鼠中确定4种的IC<sub>50</sub>,并且在小鼠中一种也不能确定。针对大鼠TG2计算出IC<sub>50</sub>的这4种抗体针对大鼠TG2比AB1针对人TG2显示出了小30倍以下的IC<sub>50</sub>,表明任何体内剂量均异常的大。而且,根本没有一种在大鼠细胞裂解物中具有抑制作用。由于在ELISA和蛋白免疫印迹中具有反应性,并且对于AB1在物种之间仅有5个错配,对于DD9在物种之间仅有3个

错配,因此对于抑制的明显物种特异性令人惊讶,显然表明亲合力对于有效抑制的关键重要性。因此对于人TG2已经鉴定出这些抑制性表位,如果要在体内疾病临床前模型中确定它们的价值,现在关键是对大鼠TG2中的这些位点开发出类似抗体。

[0648] 现有多种TG抑制剂可获得。引人注意的是最初由Merke Sharpe Dome开发的硫代咪唑类化合物[22]、本发明已经非常成功地用于治疗实验性肾疤痕[16]的由Griffin及其同事开发的CBZ-谷氨酰基类似物[23]以及成功用于各种癌症模型的由Khosla及其同事[24-27]开发的二氢异噁唑型抑制剂。已经期望对这些化合物进行连续改进可产生可行的人TG2抑制剂,但似乎TG家族的交叉反应性或化合物的潜在毒性似乎妨碍了这一点。最近,将亚酰基氧吡啶描述为新型可逆的TG2抑制剂种类[24],但缺少其与其他TG家族成员的交叉反应性的数据。在2010年关于人疾病中的TG2的Gordon会议上,来自Zedira的Pasternack及其同事提出了下述各种化合物的细节,所述化合物利用侧链Michael受体作为TG2抑制剂,并要求适合于体内应用和的TG2选择性,然而迄今还没有形成对这些内容的完整公开。在同一会议上,Macdonald等的早期工作表明了用于治疗亨廷顿氏舞蹈症的TG2抑制剂设计中的一些有趣进展,但完整公开还需要等待。TG2的小分子抑制剂如果能够实现无疑是最理想的。穿过血脑屏障的组织穿透能力、制备、成本和容易给药正是一些优点。不过本文开发的抗体抑制剂可能在一些情况下是优选的。

[0649] TG2显然是多功能酶,并已经与多种细胞功能相关,包括核稳定和运输[28,29]、胞吞作用吞[30,31]、GTP酶信号转导[32-34]、凋亡[35,36]、细胞粘附[37-39]、细胞骨架完整性[28,29]和ECM稳定[9]。显然,小分子抑制剂可阻止所有这些功能,这是因为小分子抑制剂通常可自由达到细胞外空间和细胞内部。抗体不能进入细胞,因此TG2的细胞内作用不受影响。重要的是,TG2的大多数病理作用表现在细胞外,例如其在组织疤痕和纤维化、乳糜泻和癌症中的作用。因此,使用抗体可带来额外程度的选择性,阻止不需要的细胞内作用。因此,在TG2与ECM蛋白交联的纤维化和疤痕疾病中、在麦醇溶蛋白在细胞外空间去酰胺化的乳糜泻中以及在细胞粘附表现为保护因素的癌症的化疗抗性中,抗体会提供阻断TG2的优势。不过,除非设计出能够穿过血脑屏障的小Fab片段,否则TG2抑制抗体对神经病理的治疗几乎无用。

[0650] 总而言之,本发明首次开发了选择性靶向TG2的TG2抑制性抗体。本发明还鉴定出TG2核心域内的3个新型抑制性表位。抗体AB1的人源化将首次开启在人体中靶向TG2治疗的可能性。

[0651] 参考文献

[0652] 1.Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing:review article.Verderio,E.A.,T.Johnson,and M.Griffin,Amino Acids,2004.26(4):p.387-404.

[0653] 2.Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis.Grenard,P.,S.Bresson-Hadni,S.El Alaoui,M.Chevallier,D.A.Vuitton,and S.Ricard-Blum,J Hepatol,2001.35(3):p.367-75.

[0654] 3.Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat.Griffin,M.,L.L.Smith,and J.Wynne,Br J

Exp Pathol,1979.60 (6) :p.653-61.

[0655] 4.Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation.Small,K.,J.F.Feng,J.Lorenz,E.T.Donnely,A.Yu,M.J.Im,G.W.Dorn,2nd, and S.B.Liggett,J Biol Chem,1999.274(30) :p.21291-6.

[0656] 5.Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring.Johnson,T.S.,A.F.El-Koraie,N.J.Skill,N.M.Baddour,A.M.El Nahas, M.Njloma,A.G.Adam,and M.Griffin,J Am Soc Nephrol,2003.14(8) :p.2052-62.

[0657] 6.Thrombin upregulates tissue transglutaminase in endothelial cells:a potential role for tissue transglutaminase in stability of atherosclerotic plaque.Auld,G.C.,H.Ritchie,L.A.Robbie,and N.A.Booth,Arterioscler Thromb Vasc Biol,2001.21(10) :p.1689-94.

[0658] 7.Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins.Mosher,D.F., Mol Cell Biochem,1984.58(1-2) :p.63-8.

[0659] 8.Transglutaminases.Lorand,L.and S.M.Conrad,Mol Cell Biochem,1984.58(1-2) :p.9-35.

[0660] 9.Modulation of tissue transglutaminase in tubular epithelial cells alters extracellular matrix levels:a potential mechanism of tissue scarring.Fisher,M.,R.A.Jones,L.Huang,J.L.Haylor,M.El Nahas,M.Griffin, and T.S.Johnson,Matrix Biol,2009.28(1) :p.20-31.

[0661] 10.Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring.Johnson,T.S.,N.J.Skill,A.M.El Nahas,S.D.Oldroyd, G.L.Thomas,J.A.Douthwaite,J.L.Haylor, and M.Griffin,J Am Soc Nephrol,1999.10(10) :p.2146-57.

[0662] 11.Do changes in transglutaminase activity alter latent transforming growth factor beta activation in experimental diabetic nephropathy?Huang,L., J.L.Haylor,M.Fisher,Z.Hau,A.M.El Nahas,M.Griffin, and T.S.Johnson,Nephrol Dial Transplant,2010.25(12) :p.3897-910.

[0663] 12.Expression induced by interleukin-6of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2cells.Suto,N.,K.Ikura, and R.Sasaki,J Biol Chem, 1993.268(10) :p.7469-73.

[0664] 13.TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells.Kuncio,G.S.,M.Tsyganskaya,J.Zhu,S.L.Liu,L.Nagy,V.Thomazy, P.J.Davies, and M.A.Zern,Am J Physiol,1998.274(2Pt 1) :p.G240-5.

[0665] 14.Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells.Skill,N.J.,T.S.Johnson,I.G.Coutts,R.E.Saint,M.Fisher, L.Huang,A.M.El Nahas,R.J.Collighan, and M.Griffin,J Biol Chem,2004.279(46) : p.47754-62.

- [0666] 15. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. Johnson, T.S., M. Fisher, J.L. Haylor, Z. Hau, N.J. Skill, R. Jones, R. Saint, I. Coutts, M.E. Vickers, A.M. El Nahas, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18 (12) : p. 3078-88.
- [0667] 16. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. Huang, L., J.L. Haylor, Z. Hau, R.A. Jones, M.E. Vickers, B. Wagner, M. Griffin, R.E. Saint, I.G. Coutts, A.M. El Nahas, and T.S. Johnson, *Kidney Int*, 2009. 76 (4) : p. 383-94.
- [0668] 17. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. Shweke, N., N. Boulos, C. Jouanneau, S. Vandermeersch, G. Melino, J.C. Dussaule, C. Chatziantoniou, P. Ronco, and J.J. Boffa, *Am J Pathol*, 2008. 173 (3) : p. 631-42.
- [0669] 18. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. Xu, L., S. Begum, J.D. Hearn, and R.O. Hynes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103 (24) : p. 9023-8.
- [0670] 19. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. Esposito, C., F. Paparo, I. Caputo, M. Rossi, M. Maglio, D. Sblattero, T. Not, R. Porta, S. Auricchio, R. Marzari, and R. Troncone, *Gut*, 2002. 51 (2) : p. 177-81.
- [0671] 20. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. Pinkas, D.M., P. Strop, A.T. Brunger, and C. Khosla, *PLoS Biol*, 2007. 5 (12) : p. e327.
- [0672] 21. Functional significance of five non规范Ca<sup>2+</sup>-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. Kiraly, R., E. Csosz, T. Kurtan, S. Antus, K. Szigeti, Z. Simon-Vecsei, I. R. Korponay-Szabo, Z. Keresztessy, and L. Fesus, *Febs J*, 2009. 276 (23) : p. 7083-96.
- [0673] 22. 3,5 substituted 4,5-dihydroisoxazoles as transglutaminase inhibitors. Syntex, US Patent 4,912,120, 1990. March.
- [0674] 23. Griffin M, Coutts I G, and S.R, Novel Compounds and Methods of Using The Same., in International Publication Number WO 2004/113363, .2004:GB patent PCT/GB2004/002569.
- [0675] 24. Acylideneoxindoles: a new class of reversible inhibitors of human transglutaminase 2. Klock, C., X. Jin, K. Choi, C. Khosla, P.B. Madrid, A. Spencer, B.C. Raimundo, P. Boardman, G. Lanza, and J.H. Griffin, *Bioorg Med Chem Lett*. 21 (9) : p. 2692-6.
- [0676] 25. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. Siegel, M. and C. Khosla, *Pharmacol Ther*, 2007. 115 (2) : p. 232-45.

- [0677] 26. Structure-based design of alpha-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 and transglutaminase 2. Siegel, M., J. Xia, and C. Khosla, *Bioorg Med Chem*, 2007. 15 (18) : p. 6253-61.
- [0678] 27. Novel therapies for celiac disease. Sollid, L.M. and C. Khosla, *J Intern Med*. 269 (6) : p. 604-13.
- [0679] 28. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Fesus, L. and M. Piacentini, *Trends Biochem Sci*, 2002. 27 (10) : p. 534-9.
- [0680] 29. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Lorand, L. and R.M. Graham, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4 (2) : p. 140-56.
- [0681] 30. Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. Toth, B., E. Garabuczi, Z. Sarang, G. Vereb, G. Vamosi, D. Aeschlimann, B. Blasko, B. Becsi, F. Erdodi, A. Lacy-Hulbert, A. Zhang, L. Falasca, R.B. Birge, Z. Balajthy, G. Melino, L. Fesus, and Z. Szondy, *J Immunol*, 2009. 182 (4) : p. 2084-92.
- [0682] 31. Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha2-macroglobulin and polypeptide hormones. Davies, P.J., D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham, and I.H. Pastan, *Nature*, 1980. 283 (5743) : p. 162-7.
- [0683] 32. GTP binding and signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues in a unique GTP-binding pocket. Iismaa, S.E., M.J. Wu, N. Nanda, W.B. Church, and R.M. Graham, *J Biol Chem*, 2000. 275 (24) : p. 18259-65.
- [0684] 33. The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP and ATP. Iismaa, S.E., L. Chung, M.J. Wu, D.C. Teller, V.C. Yee, and R.M. Graham, *Biochemistry*, 1997. 36 (39) : p. 11655-64.
- [0685] 34. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. Nakaoka, H., D.M. Perez, K.J. Baek, T. Das, A. Husain, K. Misono, M.J. Im, and R.M. Graham, *Science*, 1994. 264 (5165) : p. 1593-6.
- [0686] 35. Searching for the function of tissue transglutaminase: its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death. Fesus, L. and V. Thomazy, *Adv Exp Med Biol*, 1988. 231 : p. 119-34.
- [0687] 36. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. Fesus, L., V. Thomazy, and A. Falus, *FEBS Lett*, 1987. 224 (1) : p. 104-8.
- [0688] 37. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 and beta1 integrin co-signaling. Telci, D., Z. Wang, X. Li, E.A. Verderio, M.J. Humphries, M. Baccarini, H. Basaga, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2008. 283 (30) : p. 20937-47.
- [0689] 38. Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and

cell death. Verderio, E., B. Nicholas, S. Gross, and M. Griffin, *Exp Cell Res*, 1998. 239 (1): p. 119-38.

[0690] 39. A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis. Verderio, E. A., D. Telci, A. Okoye, G. Melino, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2003. 278 (43): p. 42604-14.

[0691] 实施例2: 本发明新型TG2抑制性抗体的测序

[0692] 抗体测序

[0693] 为了确定本发明各抗体的可变区的序列, 利用Qiagen RNeasy迷你试剂盒按照制造商的程序处理杂交瘤细胞团, 以提取RNA。利用1<sup>st</sup>链cDNA合成试剂盒 (GE Healthcare) 采用NotI-dT<sub>18</sub>引物按照制造商的程序将所提取的RNA逆转录, 以产生cDNA。利用Qiagen PCR纯化试剂盒按照制造商的程序清洁cDNA制备物。

[0694] 为确定重链序列, 利用表12所示的简并引物 (MHV1-12) 和恒定区引物 (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3, 或四种引物的混合物) 组通过PCR扩增小鼠cDNA。类似地, 为确定轻链序列, 利用表13所示的简并引物 (MVK1-11) 和恒定区引物MKC扩增小鼠cDNA。

[0695] 如果利用最初的重链PCR设置没有看到扩增产物, 则用NotI-dT<sub>18</sub>引物进行5' RACE PCR (Invitrogen) 来产生cDNA; 并将恒定区引物 (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3, 或四种引物的混合物) 和5' RACE锚定引物GGCCACGCGTCGACTAGTACGGG IGGG IGGG IIG (其中I是脱氧肌酐的碱基) 用于PCR。

[0696] 利用TOPO-TA Cloning<sup>®</sup> 试剂盒 (Invitrogen) 按照制造商的程序, 将所得扩增带连接到pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>载体中, 并送到GATC Biotech AG进行测序。

[0697] 表12: 用于克隆小鼠重链可变区的PCR引物

[0698]

名称	序列
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATCTTCTTC
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAACTGGGTTTTT
MHV4	ATGRAC TTTGGGYTCAGCTTGR TTT
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCT
MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC
MHV7	ATGGratGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTC TTTTGTG
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG
MHCG2A	CAGTGGATAGACCGATGGGGC

MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

[0699] 多义编码 (ambiguity code): R=A或G; Y=C或T; M=A或C; K=G或T; S=G或C; W=A或T。

[0700] MHV表示与小鼠重链可变区基因的前导序列杂交的引物, MHCG表示与小鼠恒定区基因杂交的引物。

[0701] 表13: 用于克隆小鼠κ轻链可变区的PCR引物

[0702]

名称	大小	序列
MKV1	30个	ATGAAGTTGVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKV2	29个	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG
MKV3	30个	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGSGTTC
MKV4	33个	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
MKV5	30个	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	27个	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG
MKV7	31个	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	31个	ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTCAATTG
MKV9	25个	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	27个	ATGTATATATGTTTGTCTATTTCT
MKV11	28个	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
CL12A		ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT
CL12B		ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT
CL13		ATGGATTCACAGGCCAGGTCTTAT
CL14		ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTT
CL15		ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT
CL16		ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT
CL17A		ATGAGGTGCCTARCTSAGTTCCTGRG
CL17B		ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG
CL17C		ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG
MKC	20个	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

[0703] 多义编码: R=A或G; Y=C或T; M=A或C; K=G或T; S=G或C; W=A或T。MKV表示与小鼠κ轻链可变区基因的前导序列杂交的引物, MKC表示与小鼠κ恒定区基因杂交的引物。

[0704] 序列数据

[0705] 除抗体BB7、DC1、JE12、EH6、AG9、AH3、DD9、DH2、DD6和IA12之外, 还对抗体AB1测序。序列在图18至28中给出。

[0706] 实施例3: 本发明嵌合和人源化新型抗TG2抗体的构建和表征

[0707] 为了进一步表征本发明抗体和能够将抗体对于人源化进行排列和排序, 构建了嵌合TG2抗体组(鼠类可变区以及人IgG1和人κ)。用于制备嵌合抗体的方法如下所述。

[0708] 方法

[0709] 人VH和VK cDNA数据库

[0710] 将来自国际免疫原学数据库2009<sup>1</sup>和免疫学关注蛋白的序列的Kabat数据库Release5 (1999年11月17日最后更新)<sup>2</sup>的人和小鼠免疫球蛋白的蛋白序列用于编辑Kabat比对中的人免疫球蛋白序列的数据库。本发明人的数据库包含10,606个VH和2,910个VK序列。

[0711] AB1的分子模型

[0712] 作为第1组抗体(即,结合跨人TG2的氨基酸304至326的表位的抗体)的代表,使用建模程序Modeller程序<sup>3</sup>在自动模式下运行计算小鼠抗体AB1可变区的同源模型。1MQK.pdb,3LIZ.pdb和1MQK.pdb的原子坐标是界面的最高同一性序列模板,VL和VH分别通过对Accelrys的抗体pdb结构数据库进行Blast分析确定。使用这些模板产生20个初始模型,其中最好的通过以其3个最佳环模板对各CDR环进行建模而进行细化。

[0713] hAB1框架选择

[0714] 利用各种选择标准,采用序列分析程序gibsSR来以AB1VHc、VKc和VKc<sub>1</sub>、BB7VHc和VKc和DC1VHc和VKc蛋白序列查询人VH和VK数据库。鉴定小鼠抗体AB1同源模型中的CDR残基5Å内(Kabat分辨)的FW,并标为“5Å邻近”残基。

[0715] 选择AF06220作为FW,基于此构建初始人源化重链版本。表14显示了AF06220与鼠类抗体的比对和残基同一性。表15显示了序列的5Å邻近套层。AF062260仅具有1个远离其种系VH基因Z12347的体细胞突变(表16)。

[0716] 选择AY247656作为FW,基于此构建初始AB1人源化κ轻链。与鼠类AB1抗体κ轻链的比对和残基同一性在表17中显示;表18显示了序列的5Å邻近套层。该序列显示了5个不同于其种系VK基因X93620的体细胞突变(表19)。

[0717] 选择AF193851作为FW,基于此构建其他人源化κ轻链构建体。与鼠类抗体的比对和残基同一性在表20中显示。表21显示了序列的5Å邻近套层。该序列没显示出不同于其种系VK基因J00248的体细胞突变(表22)。

[0718] 表达载体的产生

[0719] 构建嵌合表达载体必须在Hind III限制位点和Kozak序列之前加入适合的VH和VL的前导序列。Kozak序列确保可变区序列的有效翻译。其限定出正确的AUG密码子,核糖体从该密码子出开始翻译,最关键的碱基是AUG起始处上游的位于-3的腺嘌呤。

[0720] 对于重链,构建嵌合表达载体必须在直至天然ApaI限制位点与可变区的J区域的3'端相邻导入人γ<sub>1</sub>恒定区的5'片段。在表达载体中CH编码在插入的VH序列的下游,但缺少V-C内含子。

[0721] 对于轻链,将天然剪接供体位点和BamHI位点添加在V区的下游。剪接供体序列有助于剪接出κV:C内含子,这对VL与恒定区的框内连接是必须的。

[0722] 通过GeneArt®优化并合成可变区的DNA序列。将前导序列选择为在培养的哺乳动物细胞提供良好的抗体表达的序列。

[0723] 利用HindIII+ApaI消化将重链可变区构建体从克隆载体中切下,进行纯化,并连接到以相似方式切割并以磷酸酶处理的MRCT重链表达载体中,并用于转化TOP10细菌。

[0724] 利用HindIII+BamHI消化切下κ链可变区构建体,进行纯化,并连接到以相似方式切割并以磷酸酶处理的MRCTκ轻链表达载体中,用于转化TOP10细菌。

[0725] 抗体表达

[0726] 产生同时编码重链和κ链的双插入表达载体,并转染到HEK293T细胞中。在蛋白G-琼脂糖上根据制造商的程序利用亲和层析纯化细胞培养物上清液。

[0727] 结合ELISA

[0728] 用不同的人源化轻链载体与不同的人源化重链载体的组合共转染HEK 293F细胞。使用重组人TG2通过ELISA测定抗体结合。结果表明与轻链版本RKE或RKJ(表24)(代表人源化的不同轻链版本)组合的重链版本RHA(表23)显示出了最佳结合(图34),因此选择其用于进一步表征。采用相似方法鉴定人源化BB7重链和轻链、和人源化DC1重链和轻链的最佳配对。

[0729] 重链版本RHA是在人供体序列上移植AB1抗体的小鼠CDR区域的未修饰的移植物。然而,轻链版本RKE和RKJ均具有相同的单个5A邻近残基背景突变F72(表24)。该背景突变位于标尺<sup>4</sup>、规范<sup>5</sup>或界面<sup>6</sup>残基外侧。

[0730] 参考文献

[0731] 1.Lefranc,M.P.IMG, the international ImMunoGeneTics database (R).Nucleic Acids Res.31,307-310(2003).

[0732] 2.Kabat,E.A.,Wu,T.T.,Perry,H.M.,Gottesman,K.S.& Foeller,C.Sequences of Proteins of Immunological Interest.NIH National Technical Information Service,(1991).

[0733] 3.Eswar,N.等.Comparative protein structure modeling using Modeller.Curr.Protoc.Bioinformatics.Chapter 5:Unit 5.6.,Unit(2006).

[0734] 4.Foote,J.& Winter,G.(1992).Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops.J Mol.Biol.224,487-499.

[0735] 5.Morea,V.,Lesk,A.M.& Tramontano,A.(2000).Antibody modeling: implications for engineering and design.Methods 20,267-279.

[0736] 6.Chothia,C.,Novotny,J.,Brucoleri,R.& Karplus,M.(1985).Domain association in immunoglobulin molecules.The packing of variable domains.J Mol.Biol.186,651-663.

[0737] 以下表A总结了所产生的嵌合和人源化抗体,并交叉参考附图中所用的标识。

[0738]

鼠类抗体	嵌合抗体	人源化抗体
AB1	cAB001 cAB003	hAB004 (hAB001AE) hAB005 (hAB001AJ)
BB7	cBB001	hBB001AA hBB001BB
DC1	cDC001	hDC001AA hDC001BB
DD6	cDD6001	
DD9	cDD9001	
DH2	cDH001	





[0741]

表 18

	5A 邻近残基
AB_VKc (mAB001VK)	EIVLTQICWFILYGVVFFSGSGSGQDFFFCFG
AY247656	.....YL.....T.T....

表 18 显示位于 CDR 的 5A 封套内的 AB1 抗体 κ 轻链框架残基。残基同一以点(.)字符表示。残基差异在可应用的情况下显示。

表 19

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
X93620.seq	DIQMTQSPSSLSASV	GDRVTITTCQASQDISNYLNWY	QQKPGKAPKLLIYDASNLE	TGVPSRFSGSGTDF	FTTIS	SLQPEDIAIYYCQQYDNLPP			
AY247656.seq E.VL	.....	.....	.....	.....	FG.....	NTYL	.....	.....	.....

表 19 显示 AY247656 具有不同于种系 VK 基因 X93620 的 5 个体细胞突变。残基同一以点(.)字符表示。残基差异在可应用的情况下显示。

[0742]

表 20

Kabat 编号 <sup>2</sup>	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
标识 <sup>4</sup>	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											
规范 <sup>5</sup>	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											
界面 <sup>6</sup>	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											
5A 邻近	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											
CDR	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											
AB_VKc1 (mAB002VK)	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											
AB1_VKc2 (mAB003VK)	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											
BB7_VKc (mBB001VK)	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											
DC1_VKc (mDC001VK)	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											
AF193851	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTTTCKASQ-----DINSYLTWTFQOKPKSPKTLIYRINRIFDGVPSRFSGSGQDFELTSSLEFEDMGIVYCLQYDDIP-----YTFGGGTKLEL-K											

表 20 显示 AF193851 与鼠类抗体的比对和残基同一性。残基同一以点(.)字符表示。残基差异在可应用的情况下显示。空位(-)用于保持 Kabat 编号, 并在可应用情况下显示残基插入或缺失。

表 21

	5A 邻近残基
AB_VKc1 (mAB002VK)	DIQMTQTCWFTILYGVPSGSGGQDFYFCFG
AB1_VKc2 (mAB003VK)	DIQMTQTCWFTILYGVPSGSGGQDFYFCFG
BB7_VKc (mBB001VK)	AIKMTQTCWFTILYGVPSGSGGQDFYFCFG
DC1_VKc (mDC001VK)	DIQMTQTCWFTILYGVPSGSGGQDFYFCFG
AF193851	...M...S.....T..T...

表 21 显示了位于 CDR 的 5A 封套内的抗体 κ 轻链框架残基。残基同一以点(.)字符表示。残基差异在可应用的情况下显示。

[0743]

表 22

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
J00248.seq	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNYLAWFOOKPKGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDE	FATYYCQQYNSYPP							
AF193851.seq	R.....N.....N.....H..T..W..0								

表 22 显示 AF193851 不具有不同于种系 VK 基因 J00248 体细胞突变。残基同一以点(.)字符表示。残基差异在可应用的情况下显示。

表 23

Kabat 编号 <sup>2</sup>	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
标识 <sup>4</sup>	AB	AB	AB	AB	AB	AB	ABC	ABC	ABCDEF	ABCDEF	ABCDEF	ABCDEF
报道 <sup>5</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
杂合 <sup>6</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5A 邻近	*****	**	****	****	****	****	*****	*	*****	*****	*****	*****
CDR												
AB RHA (EAB001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGL	EWVSTISY--GGGKTYYPDSV	KGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKLI						
BB7 RHA (EBB001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGL	EWVSTISS--GGRSTYYPDSV	KGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKLI						
BB7 RHB (hBB001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGL	EWVATISS--GGRSTYYPDSV	KGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKLI						
DC1 RHA (RDC001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGL	EWVSTISS--GGRSTYYPDSV	KGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKLI						
DC1 RHB (hDC001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGL	EWVATISS--GGRSTYYPDSV	KGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKLI						

表 23 显示 AB1、BB7 和 DC1 重链的最终人源化版本的序列对比。空格( )用于保持 Kabat 编号，并在可应用情况下显示残基插入或缺失。



[0745]

表 24A

表 24a 归纳了表 23 和 24 中给出的序列信息，特别是显示了在 AB、BB-7 和 DC-1 抗体的重链和轻链中的 CDR 序列，和具有侧翼区的 CDR。

<p><u>重链-CDR1</u></p> <p>AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB</p>	<p>CAASGTFSSAMSWVR 或 FTFSSAMSWVR 或 SSAMS. CAASGTFSSAMSWVR 或 FTFSSAMSWVR 或 SSAMS. CAASGIFSSAMSWVR 或 IIFSSAMSWVR 或 SSAMS. CAASGTFSTHAMSWVR 或 FTFSTHAMSWVR 或 THAMS. CAASGFTLSTHAMSWVR 或 FTLSTHAMSWVR 或 THAMS.</p>
<p><u>重链-CDR2</u></p> <p>AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB</p>	<p>WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN 或 WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR 或 TISVGGGKTYYPDSVKG. WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN 或 WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR 或 TISSGGRSTYYPDSVKG. WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTL 或 WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDS WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSR 或 TISSGGRSTYYPDSVKG. WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN 或 WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR 或 TISSGGRSTYYPDSVKG. WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN 或 WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR 或 TISSGGRSTYYPDSVKG.</p>

[0746]

<p><u>重链-CDR3</u> AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB</p>	<p>YCAKLISLYWG 或 LISLY. YCAKLISPYWG 或 LISPY. YCAKLISPYWG 或 LISPY. YCAKLISYWG 或 LISTY. FCARLISTYWG 或 LISTY.</p>
<p><u>轻链-CDR1</u> AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB</p>	<p>TCKASQDINSYLTWY 或 KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF 或 KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF 或 KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF 或 KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF 或 KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF 或 KASQDINSYLT.</p>
<p><u>轻链-CDR2</u> AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB</p>	<p>LLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGGTDFE 或 LLIYRTNRLFDGVP 或 RTNRLFD SLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGGTDFE 或 SLIYRTNRLFDGVP 或 RTNRLFD SLIYLTNRLMDGVPSPRFSGSGGTDFE 或 SLIYLTNRLMDGVP 或 LTNRLMD TLIYLTNRLMDGVPSPRFSGSGGQEFL 或 TLIYLTNRLMDGVP 或 LTNRLMD SLIYLVNRLVDGVPSPRFSGSGGTDFE 或 SLIYLVNRLVDGVP 或 LVNRLVD ILIYLVNRLVDGVPSPRFSGSGGQDYA 或 ILIYLVNRLVDGVP 或 LVNRLVD</p>
<p><u>轻链-CDR3</u> AB RKE</p>	<p>YCLQYDDDFPYTFG 或 LQYDDDFPYT.</p>

[0747]

<p>YCLQYDDDFPYTFG          YCLQYVDFPYTFG          YCLQYVDFPYTFG          YCLQYDDDFPYTFG          YCLQYDDDFPYTFG</p>	<p>或 LQYDDDFPYT.          或 LQYVDFPYT.          或 LQYVDFPYT.          或 LQYDDDFPYT.          或 LQYDDDFPYT.</p>
<p>AB RKJ          BB7 RKB          BB7 RKA          DC1 RKA          DC1 RKB</p>	

[0748] 嵌合和人源化抗体的表征

[0749] 根据下述方法测试嵌合和人源化Ab对人和食蟹猴TG2的结合以及对这些酶的酶促抑制。

[0750] 方法

[0751] 用于TG2结合的ELISA测试

[0752] 在ELISA测试中确定结合人和食蟹猴TG2的抗体。将透明聚苯乙烯“Maxisorp”96孔板(Nunc) 4℃用在pH 9.6的50μl 0.05M碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的50ng纯化人或食蟹猴TG2包被过夜。将对照孔用50μl 100μg/ml牛血清白蛋白(BSA)包被。板以300μl pH7.4的含0.1% Tween 20的磷酸盐缓冲盐水(PBS) (PBST) 洗涤三次,并以300μl在PBS中的3% w/v Marvel脱脂乳室温封闭1小时。在以PBST洗涤3次后,将50μl蛋白-A纯化嵌合或人源化抗TG2抗体或人IgG1κ同位素对照抗体或CUB7402(Abcam)在PBS中从最高浓度50nM连续稀释4倍,并以2个平行试验加入板中。室温1小时后,板以PBST洗涤3次,并与50μl在PBS中3% w/v Marvel脱脂乳中以1/5,000稀释的过氧化物酶偶联的山羊抗人IgG (Fc) (Serotec) 温育;或室温下用于包含CUB7402过氧化物酶偶联的1/5,000山羊抗小鼠IgG (Fc) (Sigma)的孔1小时。以PBST洗涤3次后,以50μl TMB底物(Sigma)使板在室温显影5分钟,然后以25μl 0.5M H2SO4终止反应,并在微量滴定板读板仪(BioTek EL808)上读取450nm的吸光度。分析剂量响应曲线,并利用数据的4参数对数拟合(GraphPad Prism)确定EC50值和其他统计学参数。

[0753] 本发明抗体对TG2抑制的基于荧光的转谷氨酰胺酶测试

[0754] 通过在N,N-二甲基化酪蛋白(DMC, Sigma)中引入丹酰赖氨酸KxD(Zedira)来测定纯化人(Zedira)或食蟹猴TG2酶(Trenzime)的转谷氨酰胺酶活性。人或食蟹猴TG2在转酰胺缓冲液(25mM HEPES, pH 7.4, 含250mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2mM DTT和0.05% v/v Pluronic F-127)中分别稀释至1nM和10nM,并与各种浓度的蛋白-A纯化鼠类、嵌合或人源化TG2抗体在384-孔黑色微量滴定板(Corning)中室温下混合180分钟。通过加入DMC和KxD至终浓度分别为10uM和20uM来启动反应,最终反应体积为30u1,使反应在室温RT进行180分钟,利用TecSafire<sup>2</sup>读板仪监测荧光(RFU) (280nm激发, 550nm发射)的增加。数据标准化为百分比活性,其中%活性 = (RFU测试抗体 - RFU低对照) / (RFU高对照 - RFU低对照) x 100,其中低对照包含除酶之外的所有组分,高对照包含除抗体之外的所有组分。

[0755] 利用GraphPad prism软件绘制抗体剂量响应曲线,并利用4参数对数模型拟合以返回IC50和其他统计学参数。结果在图29至33中显示。

[0756] 人源化和鼠类抗TG2抗体的酶抑制和ELISA结合实验的结果和讨论

[0757] 通过对丹酰赖氨酸在N,N-二甲基化酪蛋白中的TG2依赖性引入的剂量依赖性抑制,确定嵌合和人源化TG2抗体抑制人TG2的转酰胺作用的能力(在图29和31中阐释)。来自第1组的嵌合和人源化抗体(例如, cAB003, cBB001, cDC001, hBB001AA, hAB001BB, hAB005和hAB004)在低纳摩尔范围中均显示出对TG2活性的有效抑制,这与在同一范围内显示与固定化人TG2结合的ELISA数据一致(图35和37)。与之相反,商业抗体CUB7402不能抑制人或食蟹猴TG2酶活性(图29F和30B),不过在ELISA测试中与第1组抗体有相当的结合(图35A, 36A, 37A和38A),与CUB7402识别不干扰酶的转酰胺功能的表位相符。因此第1组的抗体由于其抑制酶功能的能力而与其它抗体例如CUB7402有区别,CUB7402可以结合但对酶促活性没有影响。相似的是,第3组中代表性的鼠类和嵌合抗体(例如, mDD9001, mDH001, cDD9001和cDH001)一贯地抑制人TG2转酰胺,但功效低于第1组抗体(图29和33)。来自第1组和第3组的示例性亲本鼠类单克隆抗体对人TG2的抑制(图33)关于其嵌合和人源化版本均显示出相当的效力,表明鼠类抗体的功能效力在人源化版本中得到保留。相似的是,示例性人源化抗体

hBB001AA、hBB001BB和hAB004的人TG2ELISA结合数据(图37)显示出与从嵌合版本cBB001和cAB003获得的数据相当的EC50值,表明结合亲和力同样保留在人源化版本中。嵌合和人源化抗体还显示出对食蟹猴TG2的有力抑制(图30和32)和跨物种的相当ELISA EC50(图36和38),这与食蟹猴TG2中同源表位的保留相符,该食蟹猴TG2中同源表位具有总体99%的序列同一性。相反,对,CUB7402与两种物种的TG2的结合显示出与第1组抗体相当,但对两种酶活性均未抑制(图35-38和29-30)。

[0758] 基于细胞的测试

[0759] 利用以下程序测试了本发明抗体与来自HK-2上皮细胞的细胞外TG2的结合。

[0760] 细胞外TG活性的测定

[0761] 通过改进的细胞ELISA测定细胞外TG活性。利用Accutase收获HK-2上皮细胞,并以无血清培养基中 $2 \times 10^4$ 细胞/孔的密度铺在96孔板中,该96孔板预先以 $100 \mu\text{l}$ /孔的纤粘连蛋白( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,在 $50 \text{mM}$  Tris-HCl中,pH 7.4)(Sigma, Poole UK)包被过夜。细胞在 $37^\circ\text{C}$ 贴附过夜。以DMEM(Life Technologies)替换培养基,加入化合物、抗体或对照,并使其在 $37^\circ\text{C}$ 结合。在孔中加入 $0.1 \text{mM}$ 生物素尸胺[N-(5-氨基苯基生物素酰胺)三氟乙酸](Zedira),并将板返回 $37^\circ\text{C}$ 放置2小时。以 $3 \text{mM}$  EDTA/PBS洗涤板两次,并用在 $5 \text{mM}$  EDTA/PBS中的 $0.1\%$  (w/v)脱氧胆酸移除细胞。收集上清液并用于蛋白测定。以PBS/Tween洗涤板,利用 $1:5000$  extravidin HRP(Sigma, Poole, UK)在室温下1小时,然后加入K Blue底物(SkyBio),从而显示所引入的生物素尸胺。以Red Stop(SkyBio)终止反应,并读取 $4650 \text{nm}$ 处的吸光度。对各抗体在至少3个单独的情况下测试。

[0762] 结果如图39和40所示,并显示出对于所测试抗体获得的示例性曲线和IC50值的表。图39展示了人源化AB1的结果,图40展示人源化BB7的结果。

[0763] hAB005抑制HK2细胞的细胞外TG2,IC50为 $71.85 \text{nM}$ ,并且最大抑制为约30%的对照活性。hBB001AA抑制活性的IC50为 $19.8 \text{nM}$ ,并且最大抑制为40%的对照活性。hBB001BB具有较好的IC50( $4.9 \text{nM}$ ),但最大抑制为约55%的对照。

[0764] 刮擦测试

[0765] 还进行刮擦创伤测试,来评估本发明人源化和/或嵌合抗TG2抗体的结合活性。

[0766] TG2在肺纤维化中显示具有重要作用,TG2敲除小鼠在博来霉素模型中显示出疤痕和纤维化减少(Keith C.Olsen,Ramil E.Sapinoro,R.M.Kottmann,Ajit A.Kulkarni,Siiri E.Iismaa,Gail V.W.Johnson,Thomas H.Thatcher,Richard P.Phipps,and Patricia J.Sime.(2011) Transglutaminase 2 and Its Role in Pulmonary Fibrosis.Am.J of Respiratory & Critical Care Med.1840699-707)。与野生型相比,TG2敲除小鼠的细胞在创伤处的迁移降低。进行刮擦创伤测试以评价本发明人源化和/或嵌合抗TG2抗体对正常肺成纤维细胞(WI-38细胞)层中创伤闭合速度的影响。

[0767] 刮擦测试程序:

[0768] WI-38细胞(正常人肺成纤维细胞ATCC cat#CCL-75)在具有10%FBS的 $\alpha$ MEM培养基(Life Technologies cat#32561)中以 $2 \times 10^4$ /孔铺种在96孔图像锁定平板(Essen cat#4379)中,并过夜生长至 $>97\%$ 汇合。细胞以无血清 $\alpha$ MEM培养基洗涤2次,采用Essen创伤形成器和制造商手册产生刮擦创伤。去除培养基,并以 $95 \mu\text{l}$ /孔的无血清培养基替代。将对照和测试抗体加入孔中。将平板放置在Essen Incucyte中,采用刮擦创伤程序分析创伤的闭合。

[0769] 使用0.1 $\mu$ M的松胞菌素D作为测试对照。R281是一种小分子非特异转谷氨酰胺酶抑制剂,对其以100 $\mu$ M进行测试。Z DON是肽不可逆转谷氨酰胺酶抑制剂,对其以10 $\mu$ M和100 $\mu$ M进行测试。商售TG2抗体Cub7402 (Abcam cat#ab2386)以5 $\mu$ g/ml测试。本发明抗体以所示各种浓度测试至少3次。在所有实验对照中,0.1 $\mu$ M的松胞菌素D和两种浓度的ZDON显示出剂量依赖性效应。

[0770] 刮擦测试的示例性结果如图41至44所示。从图41中可以看出,松胞菌素D、R281和ZDON均抑制创伤闭合(显示ZDON以剂量依赖性方式抑制),但抗体Cub7402不抑制创伤闭合。人源化BB7、人源化AB1和嵌合DC1均抑制创伤闭合。

[0771] 嵌合和人源化抗TG2Ab的亲合力

[0772] 利用Biacore技术评价了本发明的嵌合和人源化Ab组对人TG2和食蟹猴TG2的结合亲合力(K<sub>d</sub>s和解离速率)。程序和结果如下所述,并在图45至47中显示。

[0773] Biacore方法

[0774] 重组人TG2获自Zedira GmbH(目录号:T002)。重组食蟹猴TG2获自Trenzyme。表面等离子共振(SPR)在Biacore T200仪器(GE Healthcare)上测试。将CM5芯片(GE Healthcare目录号:BR-1006-68)通过制造商手册中描述的氨基偶联用单克隆小鼠抗人IgG1(Fc)(MAH)抗体(GE Healthcare目录号:BR-1008-39)包被。HBS-EP+缓冲液(0.01M HEPES,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.05%v/v表面活性剂P20)和HBS-P+缓冲液(0.01M HEPES,0.15M NaCl,0.05%表面活性剂P20)购自GE Healthcare,为10x储备液(目录号:BR-1006-69和BR-1006-71)。氯化钙溶液获自Sigma Aldrich(目录号:21115)。

[0775] 用于确定抗TG2抗体亲和力的方法包括将嵌合或人源化抗体捕获在MAH包被的CM5芯片上,随后在流动缓冲液中注入一系列TG2样品。流动缓冲液为含1mM CaCl<sub>2</sub>的1x HBS-P+,或对于无钙实验为1x HBS-EP+。抗体以10 $\mu$ l/分钟的流速和120秒的接触时间进行抗体捕获,获得约40-80RU的捕获。TG2以25nM至400nM的浓度和至多600秒的接触时间以30 $\mu$ l/分钟的流速注射到固定化抗体上。TG2的解离通常测定至多5400秒(1.5小时)。随后利用3M MgCl<sub>2</sub>以60秒的接触时间和30 $\mu$ l/ml的流速进行芯片的再生,之后在下次进样之前有300s的稳定时间。对于各个人和食蟹猴TG2,在至少2个独立实验中进行至少5次不同浓度的注射。

[0776] 从Biacore T200评价软件中输出动力学数据,并利用GraphPad Prism分析,其中结合相和解离相分别利用一相结合模型和一相指数衰减模型进行分析。对于各曲线分别计算结合速率(k<sub>on</sub>),由所收集的长解离相数据计算解离速率(k<sub>off</sub>)值。当k<sub>off</sub>值计算为<1x10<sup>-5</sup>s<sup>-1</sup>,将值设定为1x10<sup>-5</sup>用于分析,这是因为低于该值的速率不能准确评估。k<sub>on</sub>和k<sub>of</sub>的值在下表中给出,作为多个浓度下各抗体对于各TG2物种分别计算值的平均值+/-1个标准偏差。K<sub>d</sub>值计算为平均k<sub>off</sub>/平均k<sub>on</sub>。

[0777] Biacore实验的结果

[0778] 表25

抗体		人 TG2				
		$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	标准偏差	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	标准偏差	$K_D$ (M)
cAB003	+ $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$1.7 \times 10^5$	$3.2 \times 10^4$	$< 6 \times 10^{-11}$
	- $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$8.6 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^{-10}$
cBB001	+ $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$2.1 \times 10^5$	$6.9 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
	- $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$1.5 \times 10^5$	$1.8 \times 10^4$	$< 7 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$2.4 \times 10^{-5}$	$1.0 \times 10^{-5}$	$2.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-10}$
hAB005 (hAB001AJ)		$< 10^{-5}$	-	$1.9 \times 10^5$	$6.8 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$2.7 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$< 10^{-5}$	-	$2.4 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$3.2 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
cDH001	+ $Ca^{2+}$	$1.8 \times 10^{-5}$	$4.9 \times 10^{-6}$	$2.8 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$6.4 \times 10^{-10}$
	- $Ca^{2+}$	$4.9 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-5}$	$2.1 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$2.3 \times 10^{-8}$
cDD9001	+ $Ca^{2+}$	$1.3 \times 10^{-5}$	$1.8 \times 10^{-6}$	$3.0 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$	$4.3 \times 10^{-10}$
	- $Ca^{2+}$	$7.1 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^{-5}$	$2.3 \times 10^4$	$7.6 \times 10^3$	$3.1 \times 10^{-9}$

[0780] 表25显示了针对人TG2获得的动力学数据。当 $k_{off}$ 速率计算出小于 $10^{-5} s^{-1}$ ，将其值设定为 $10^{-5} s^{-1}$ 以用于分析，这是因为小于该值的速率不能准确确定。

[0781] 表26

抗体		食蟹猴 TG2				
		$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	标准偏差	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	标准偏差	$K_D$ (M)
cAB003	+ $Ca^{2+}$	$1.2 \times 10^{-5}$	$8.1 \times 10^{-6}$	$2.4 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$5.0 \times 10^{-11}$
	- $Ca^{2+}$	$1.3 \times 10^{-5}$	$1.5 \times 10^{-6}$	$1.4 \times 10^5$	$1.9 \times 10^4$	$9.3 \times 10^{-11}$
cBB001	+ $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$2.9 \times 10^5$	$9.0 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
	- $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$1.9 \times 10^5$	$2.1 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$1.8 \times 10^{-5}$	$2.3 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^5$	$7.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^{-11}$
hAB005 (hAB001AJ)		$3.4 \times 10^{-5}$	$4.6 \times 10^{-6}$	$1.4 \times 10^5$	$4.1 \times 10^4$	$2.4 \times 10^{-10}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$3.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$< 3 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$3.7 \times 10^{-5}$	$3.4 \times 10^{-6}$	$2.7 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-10}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$4.2 \times 10^5$	$3.3 \times 10^5$	$2.4 \times 10^{-11}$
cDH001	+ $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$1.5 \times 10^4$	$9.5 \times 10^3$	$< 7 \times 10^{-10}$
	- $Ca^{2+}$	$6.3 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-5}$	$2.6 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$2.4 \times 10^{-9}$
cDD9001	+ $Ca^{2+}$	$1.6 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^{-5}$	$3.1 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$5.2 \times 10^{-10}$
	- $Ca^{2+}$	$4.1 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^{-5}$	$4.6 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$8.9 \times 10^{-10}$

[0783] 表26显示了针对食蟹猴TG2获得的动力学数据。当 $k_{off}$ 速率计算出小于 $10^{-5}s^{-1}$ ，将其值设定为 $10^{-5}s^{-1}$ 以用于分析，这是因为小于该值的速率不能准确确定。

[0784] 图45至47提供了实例Biacore数据设置。由此可见，对于TG2的人源化和嵌合抗体cAB003、cBB001、hAB004、hAB005、hBB001AA、hBB001BB、cDC001具有对人和食蟹猴G2的优异亲和力， $K_D$ 值为120pM或更好。嵌合抗体cDH001和cDD900对人和食蟹猴TG2展示出更慢的结合速率，和更弱的整体亲和力。在不存在钙的情况下，对抗体选择的检查表明除了cDH001和cDD9001以外没有或几乎没有效果，而对于cDH001和cDD9001，其中由于更快的解离速率( $k_{off}$ )而使结合更弱。

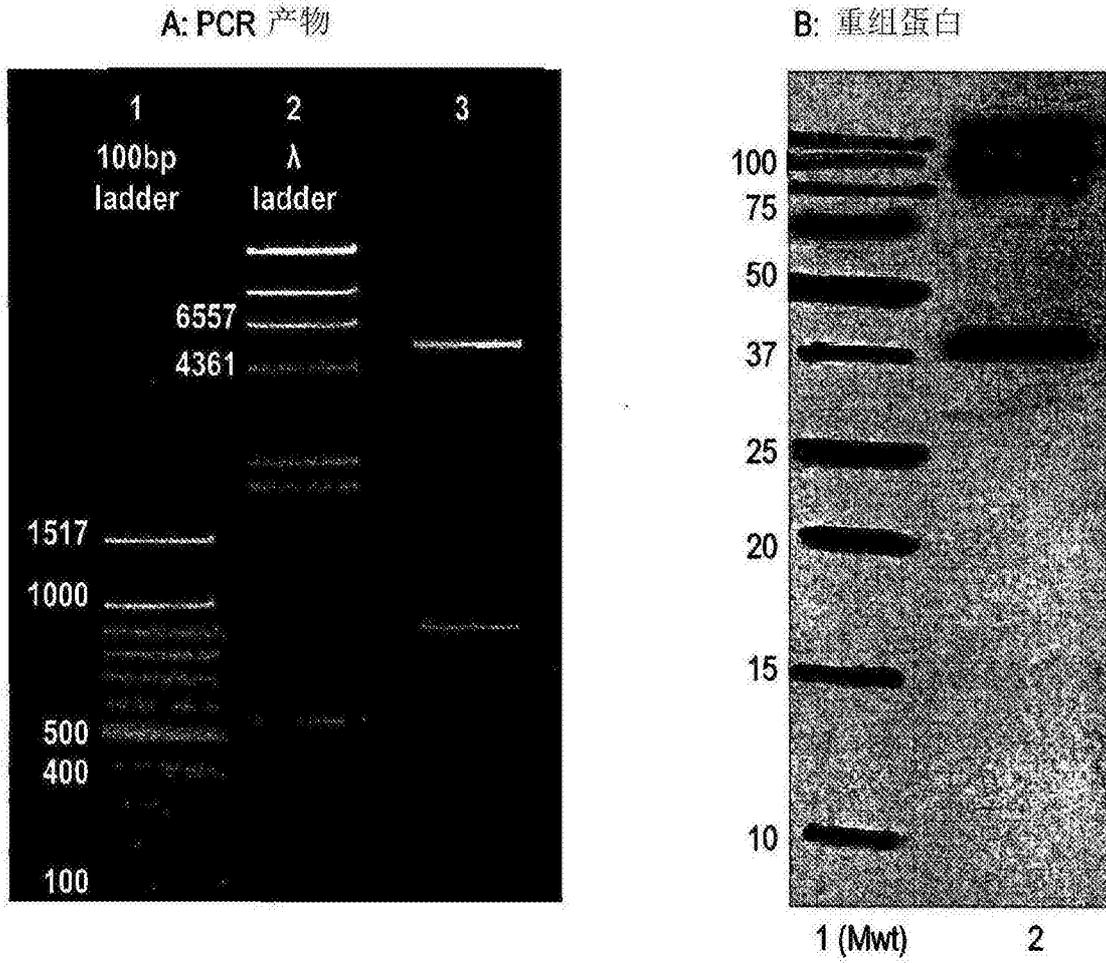
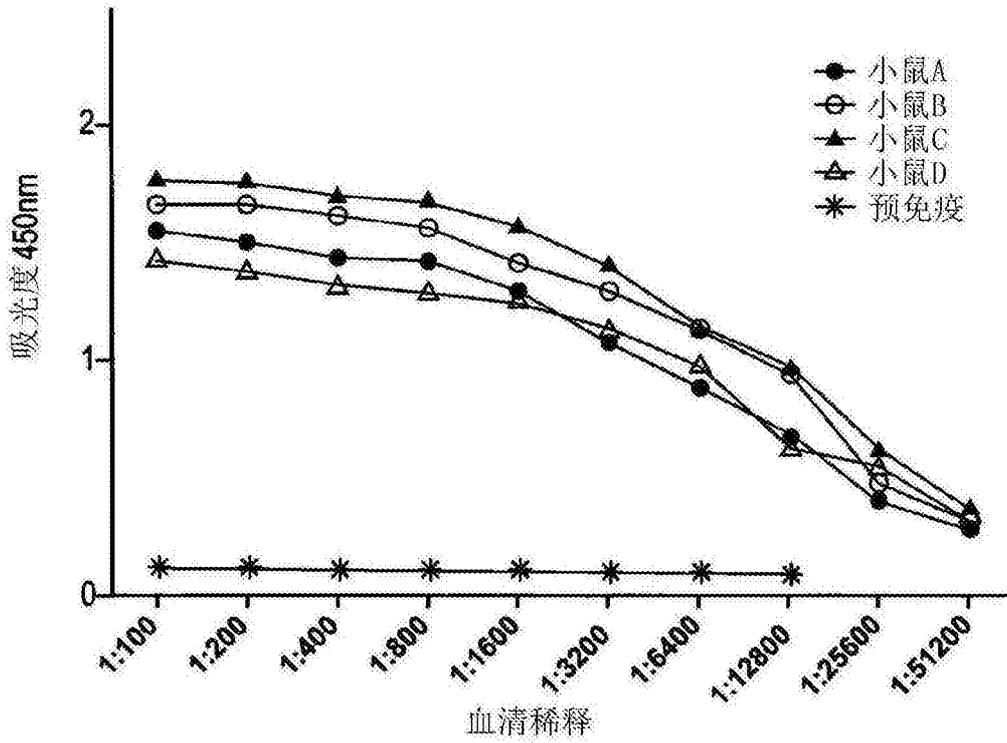


图1

A: 血清ELISA



B: 血清免疫印记

小鼠C

小鼠I

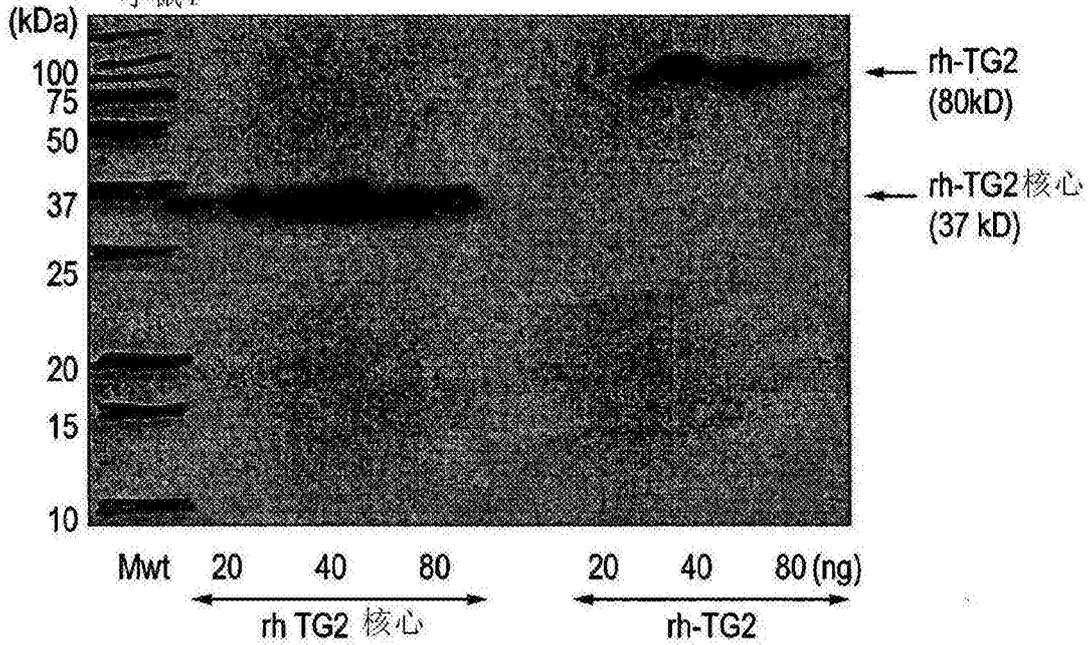
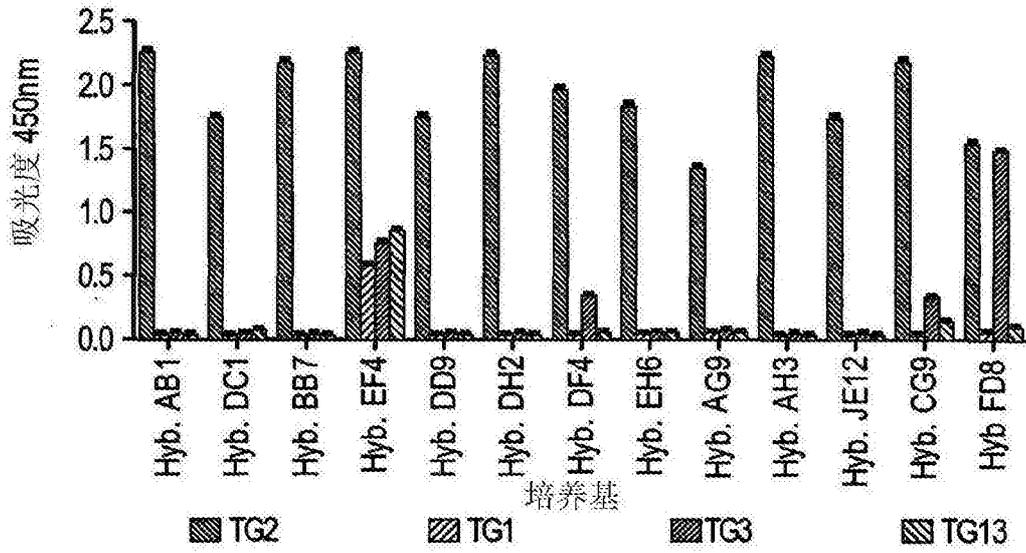


图2

A: 条件培养基的最初筛选



B: 克隆纯化mAb的反应性

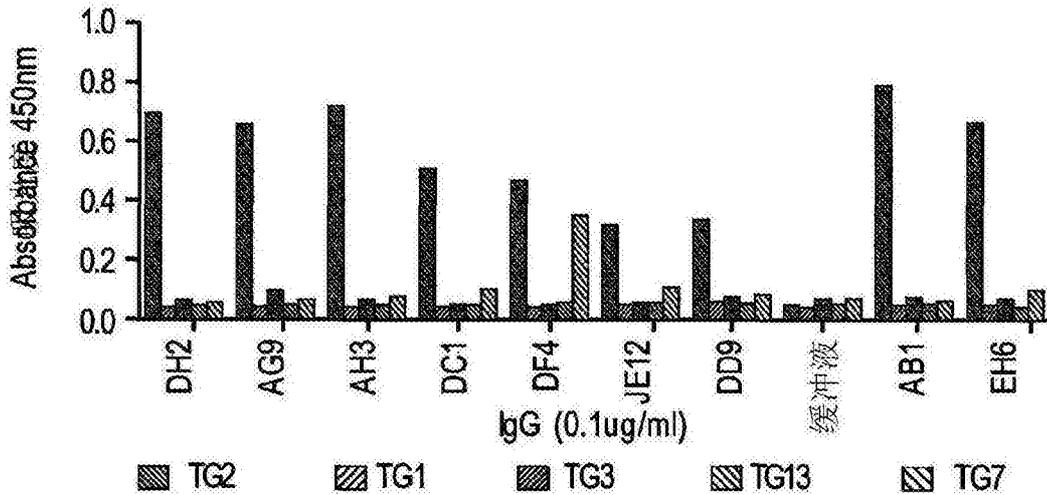


图3

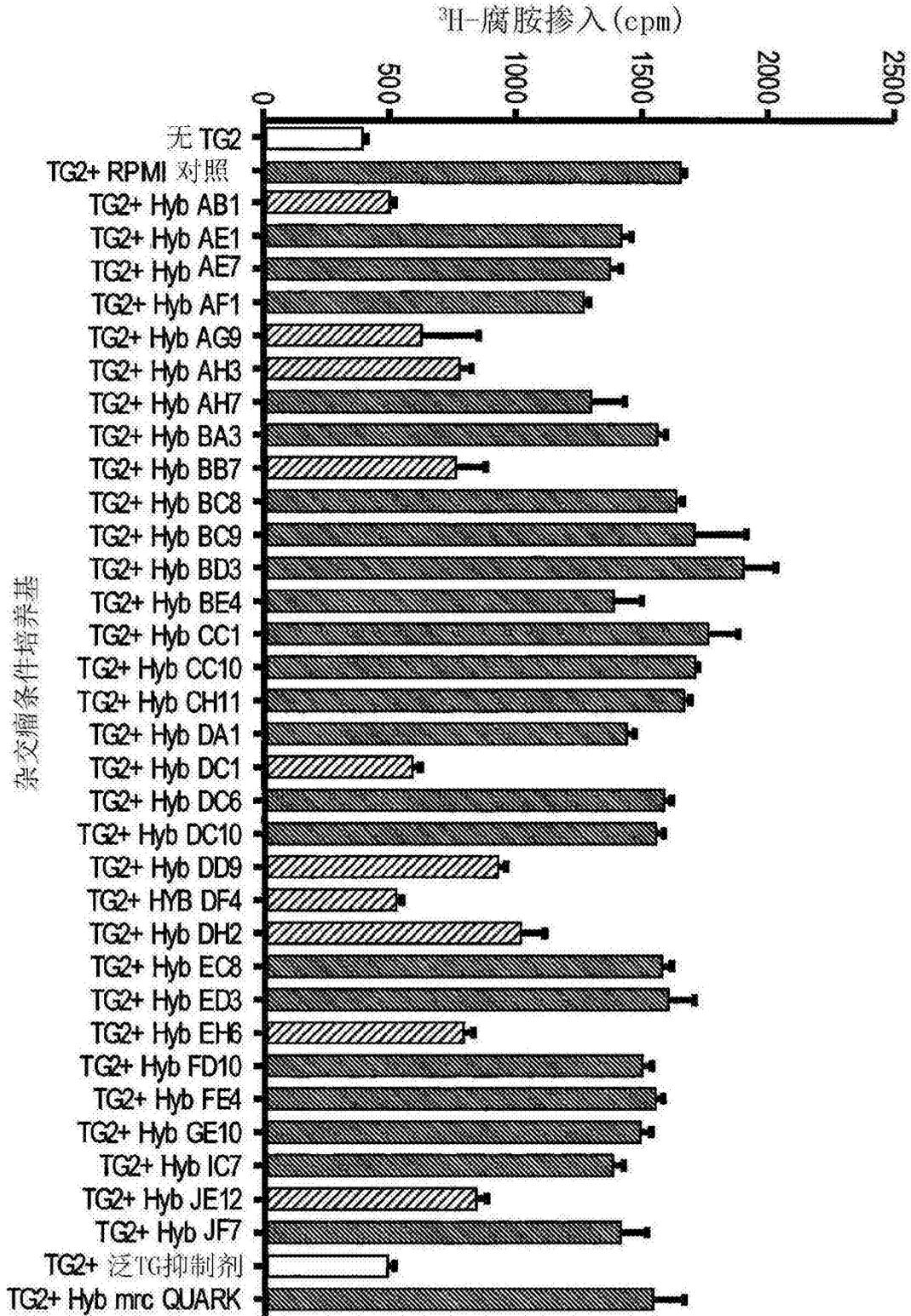


图4



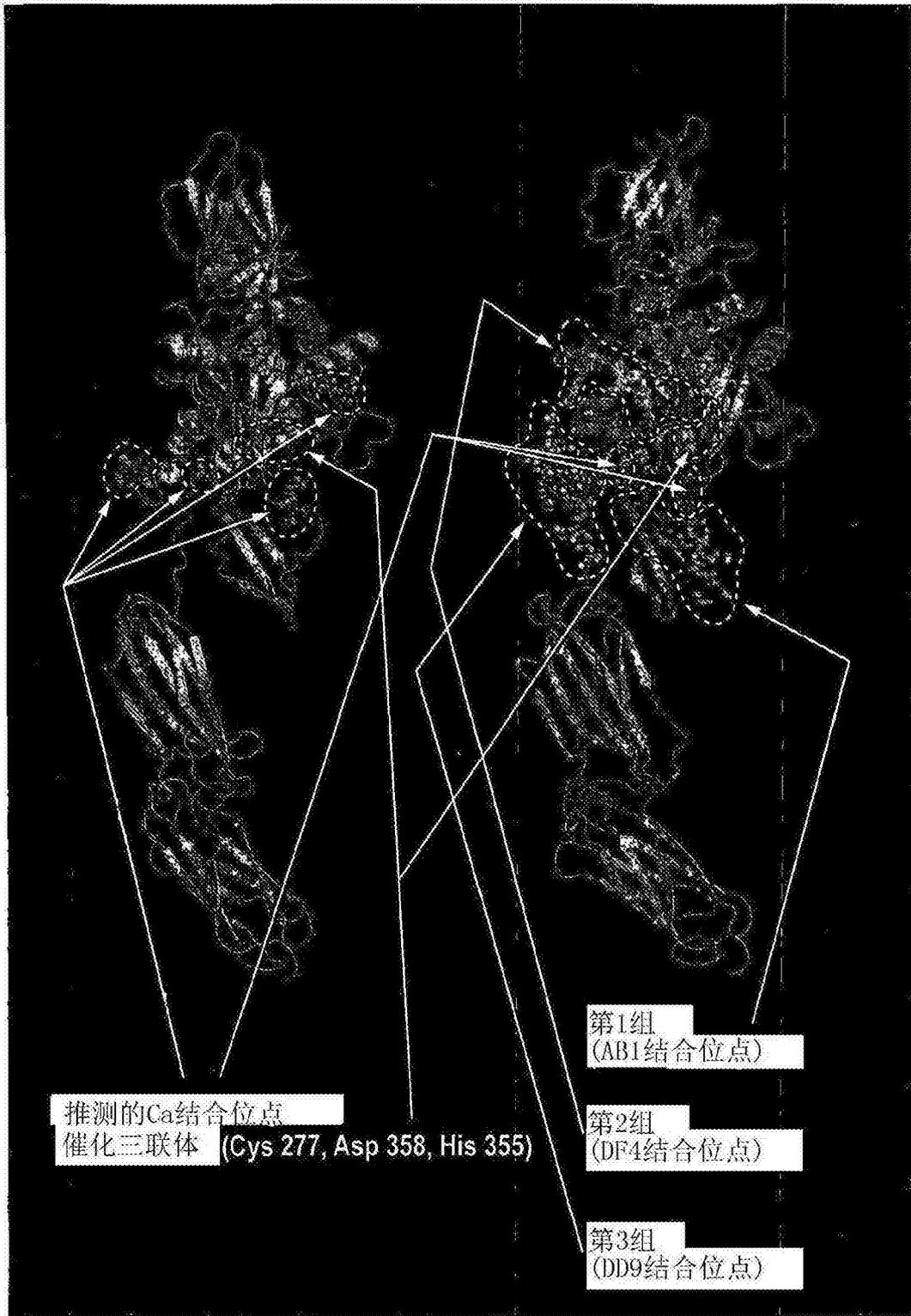


图6

**抗体 AB-1****AB1 VH**

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA  
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTTCGC  
CAGACTCCGGACAGGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAA  
ACCCACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG  
AACACCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTAC  
TGTGCAAAACTAATCAGTCTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

**AB1 VH**

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSQVRQTPDRRLEWVATISVGGGK  
THYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLI SLYWGQGTTLTVSS

**AB1 VK**

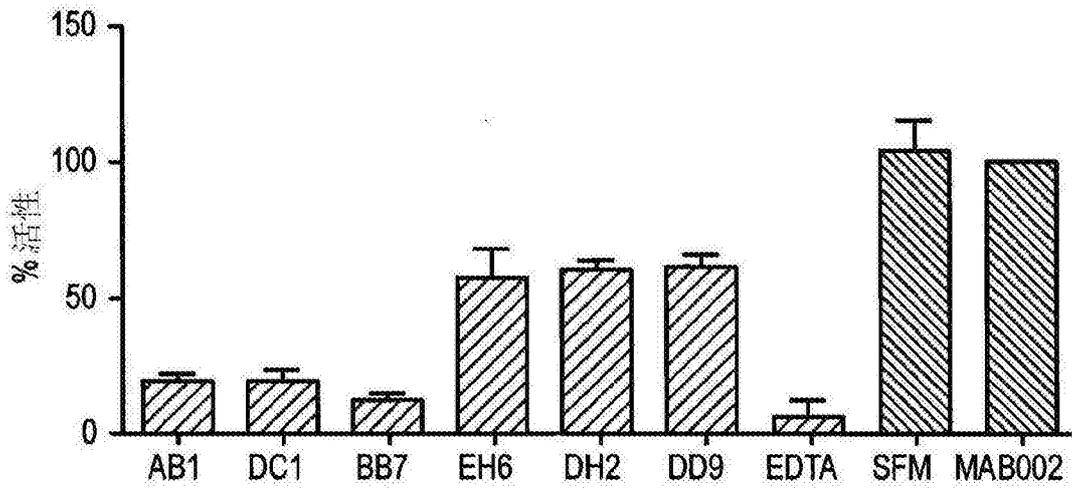
GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTC  
ACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAG  
AAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGG  
GTCCCATCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTTCTCACCATCAGC  
AGCCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCG  
TACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAACCTGGAATAAAA

**AB1 VK**

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKSPKTLIYRTNRLEDG  
VPSRFGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

图7

**A: TG 抑制**



**B: 免疫印迹**

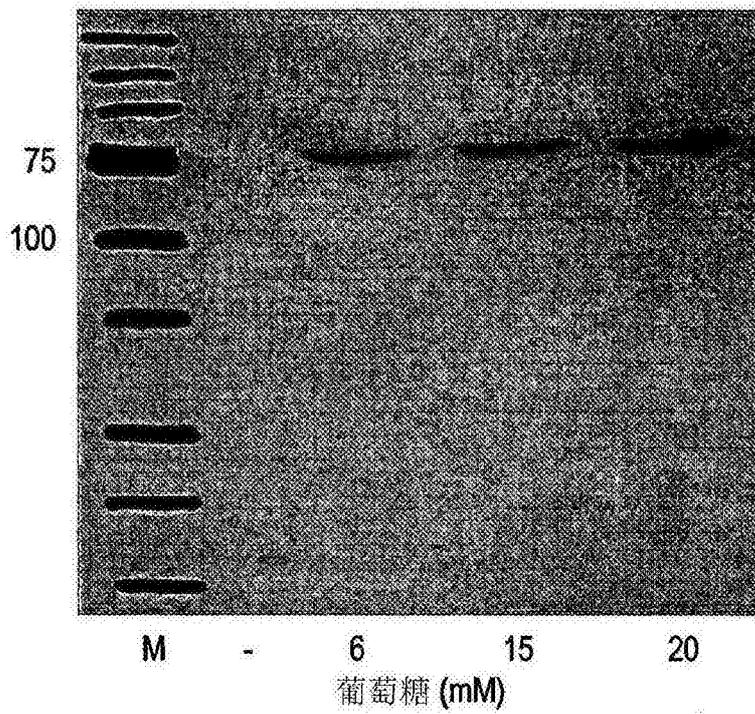
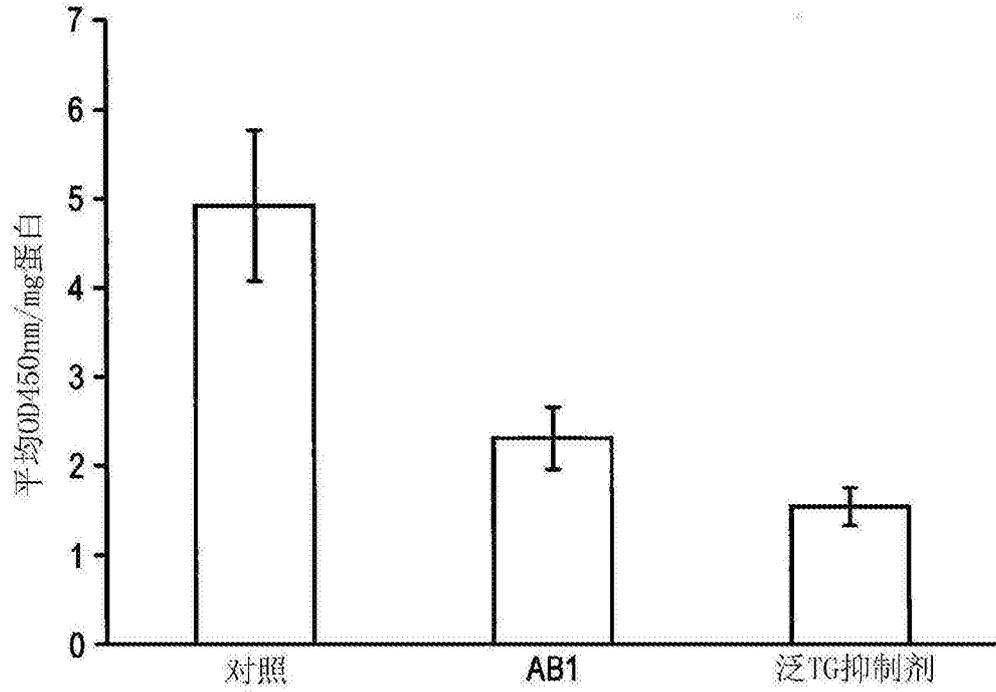


图8

	IC50 hTG2 (mg/ml IgG 每 ng TG2)	IC50 rTG2 (mg/ml IgG 每 ng TG2)	IC50 mTG2 (mg/ml IgG 每 ng TG2)	比例 人/大鼠	相对于 最佳人 抑制剂的 hTG2 IC50比	相对于 最佳人 抑制剂的 rTG2 IC50比
AB1	$1.09 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	1	-
DC1	$1.23 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	1.1	-
BB7	$1.59 \times 10^{-5}$	$3.2 \times 10^{-4}$	NI	20	1.47	29.4
AG9	$4.87 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	4.47	-
DD9	$5.24 \times 10^{-5}$	$3.03 \times 10^{-4}$	NI	6	4.87	29.22
DH2	$6.7 \times 10^{-5}$	$2.23 \times 10^{-4}$	NI	-	6.2	38.13
EH6	$6.9 \times 10^{-5}$	$4.03 \times 10^{-4}$	NI	5.8	6.33	36.714
AH3	$7.8 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	7.1	-
JE12	$12.3 \times 10^{-6}$	NI	NI	-	11.3	-

图9

**A:** 利用抗体AB1的抑制



**B:** 利用抗体DC1的抑制

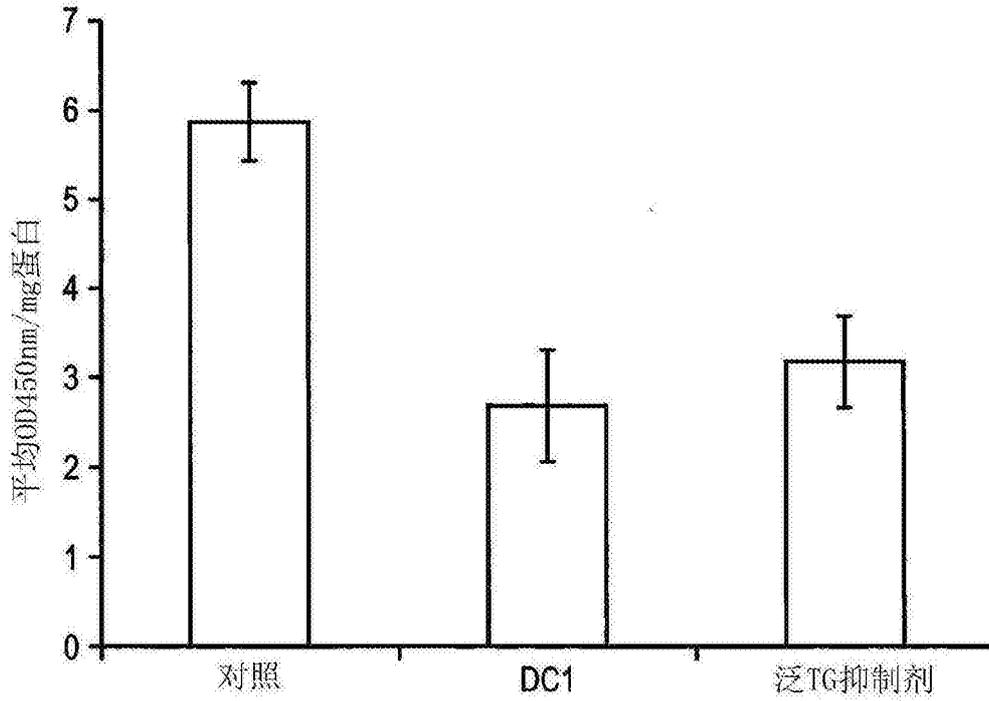


图10

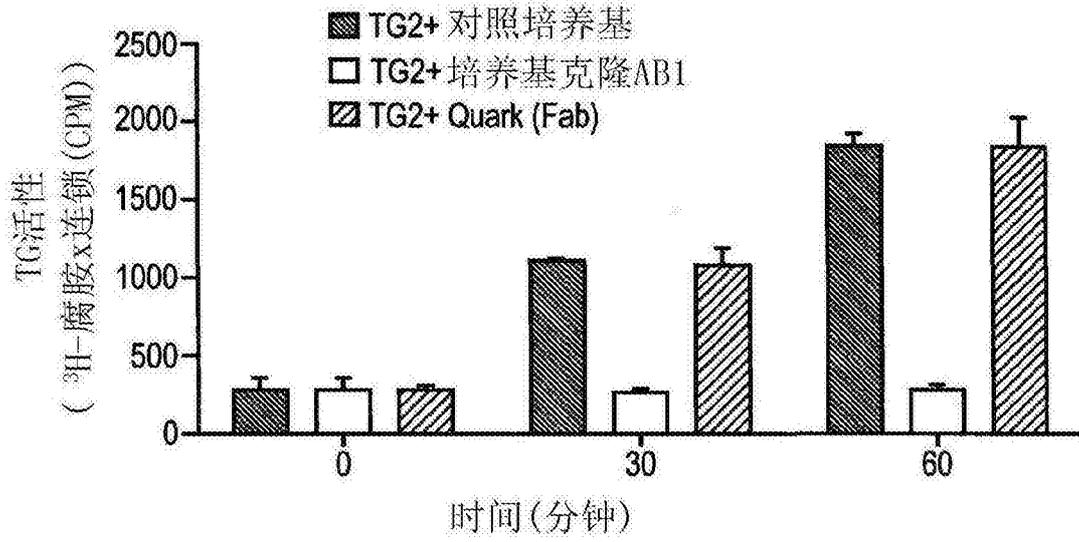


图11

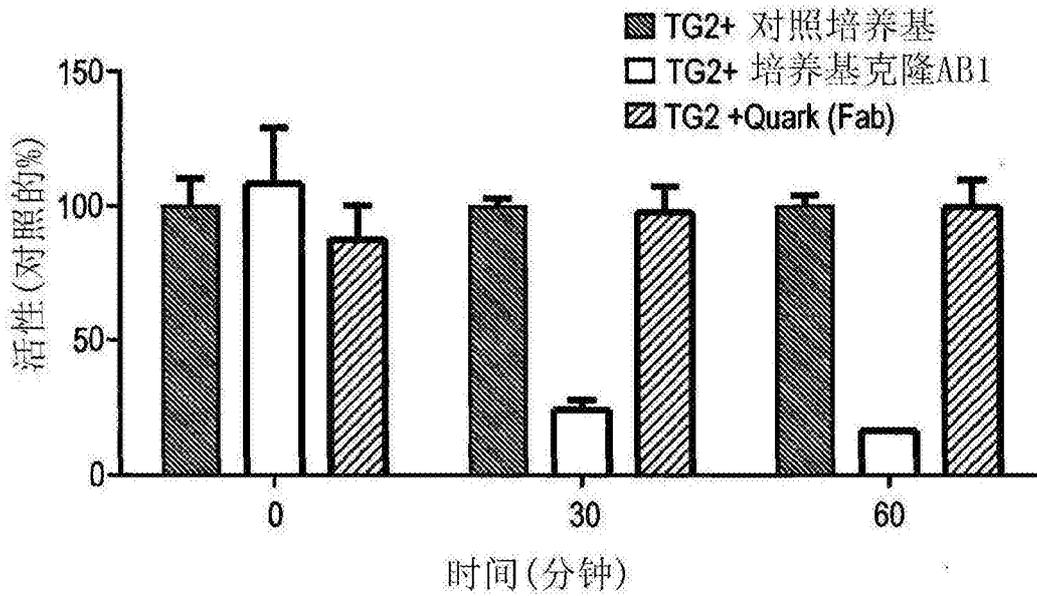


图12

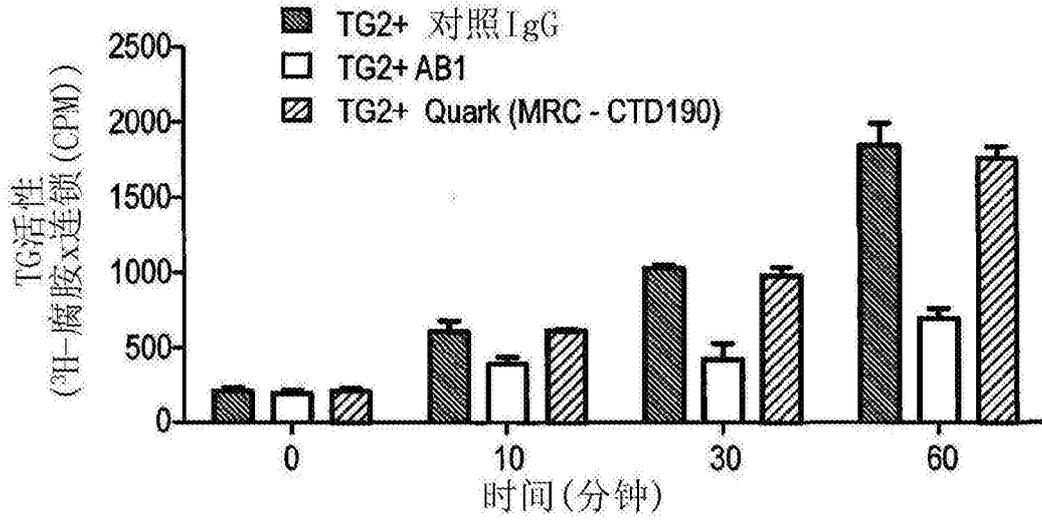


图13

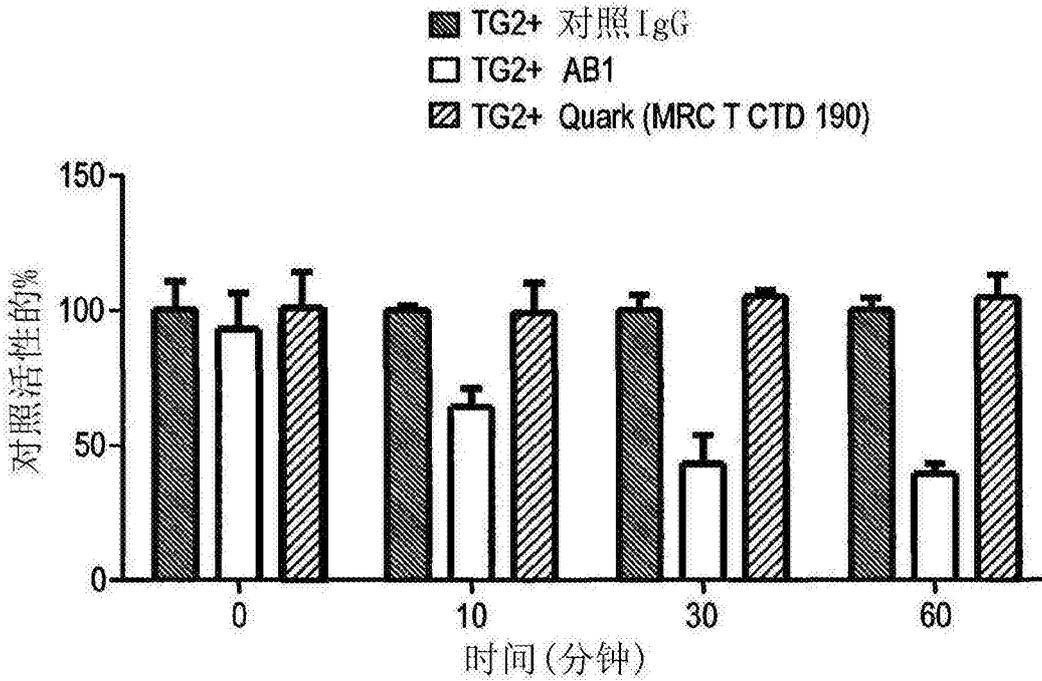


图14

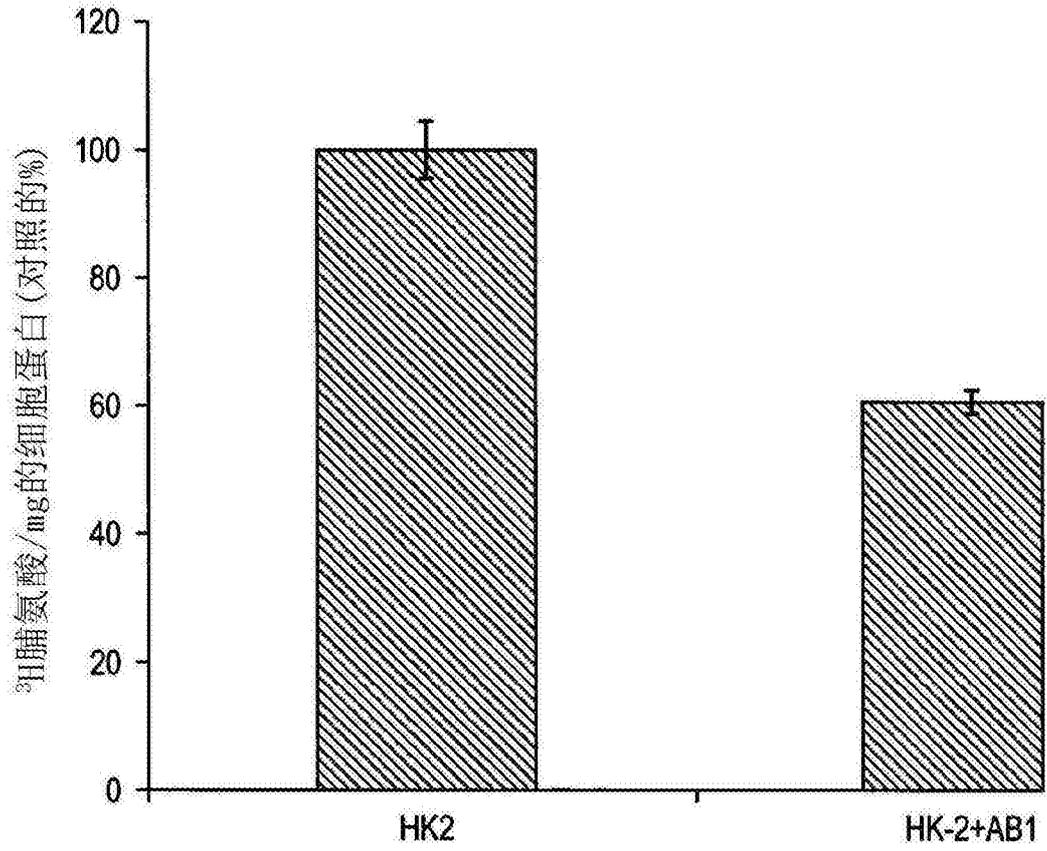


图15

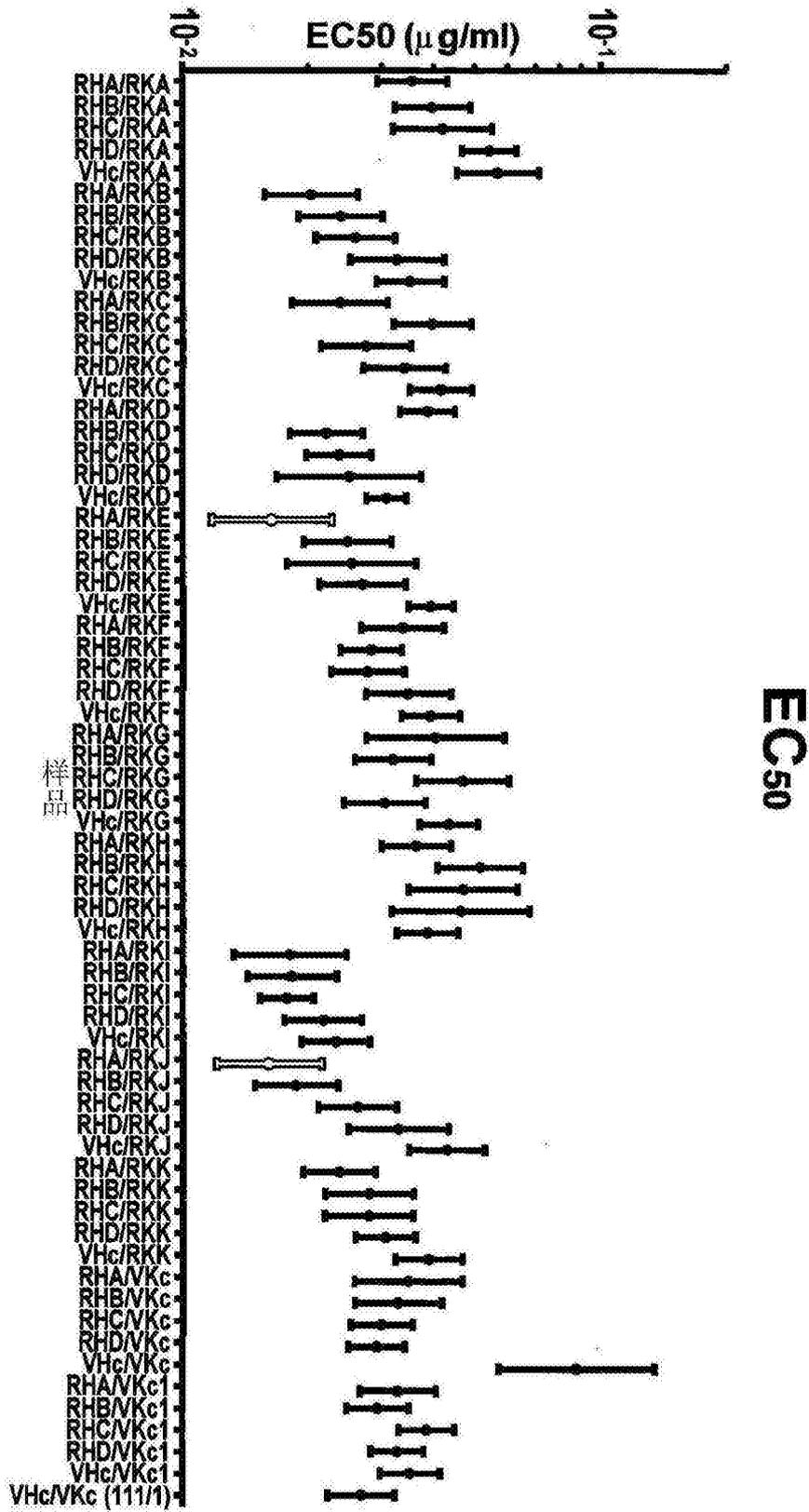


图16

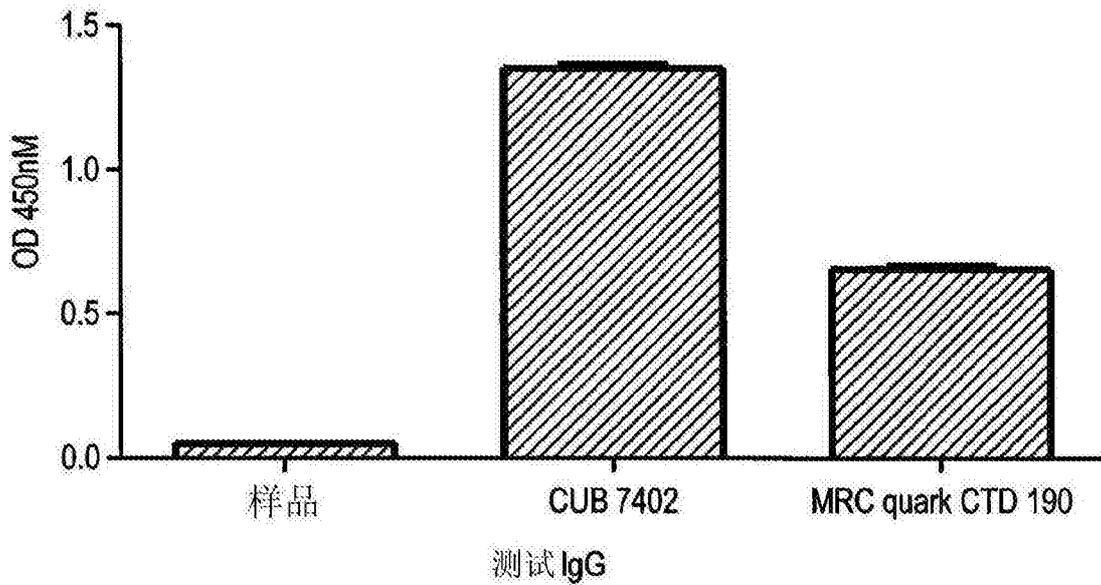


图17

**抗体 AB-1****AB1\_VH**

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCCGCAGACTCCGG  
 ACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATAGTGTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCAGAC  
 AGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCTCTATCTGCAAAT  
 GAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCTCTACT  
 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

**AB1\_VH**

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPD  
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS

**AB1\_VK**

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTAT  
 CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCAGCAGAAACCAGGGA  
 AATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGGGTCCCATCCAGGTTT  
 AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAAGATAT  
 GGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCGGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAAC  
 TGAAATAAAA

**AB1\_VK**

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRF  
 SGSGSGQDFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDFPYTFGGGTKLEIK

图18

**抗体 BB-7****BB7\_VH**

GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGAATCATTTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG  
 AAAAGAGACTGGAGTGGGTGCGCAACTATTAGTAGTGGTGGTTCGTCCACCTACTATCCAGAC  
 AGTGTGAAGGGTTCGATTACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACACCCTATACCTGCAAAT  
 GGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCCCTACT  
 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

**BB7\_VH**

AVQLVESGGGLVKGPGSLKLSCAASGIIIFSSSAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD  
 SVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS

**BB7\_VK**

GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCATCAT  
 CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATTAACTGGTCCAACAGAAACCAGGAA  
 AGTCTCCTAAGACCCTGATCTATCTTACAAATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGGTTT  
 AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGAATTTTACTCACCATCAGCGGCCTGGAACATGAAGATAT  
 GGGCATTTATTATTGTCTCCAGTATGTTGACTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGC  
 TGGAAATAAAA

**BB7\_VK**

AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWVQKPKGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRF  
 SGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLOQYVDFPYTFGGGTKLEIK

图19

**抗体 DC-1****DC1\_VH**

GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATCACTCTCAGTACCCATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG  
AGAAGAGGCTGGAGTGGTTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTTCGTCCACCTACTATCCAGAC  
AGTGTGAAGGGTCGATCACTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTATATCTGCAACT  
GAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTACCTACT  
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

**DC1\_VH**

EVQLVESGGGLVLPFGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGRSTYYPD  
SVKGRFTISRDNVKNLYLQLSSLRSEDVAVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS

**DC1\_VK**

GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAGAGAGAGTCACTAT  
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCAGCAGAAACCAGGGA  
AATCTCCTAAGATCCTGATCTATCTTGTAATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTT  
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATGAAGATAT  
GGGAATTTATTATTGTCTACAATATGATGACTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGC  
TGGAATAAAA

**DC1\_VK**

DITMTQSPSSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPGKSPKILYLVNRLVDGVPSRF  
SGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDEPYTFGGGTKLEIK

图20

**抗体 JE-12****JE12\_VH**

GAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC  
 CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCAGTAGCTATGTTATGCACTGGGTGAAACAGAAGTCTG  
 GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAAGTACAATGAG  
 AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT  
 CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTATT  
 GGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA

**JE12\_VH**

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGGLEWIGYINPYNDGAKYNE  
 KFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

**JE12\_VK**

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT  
 CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGAACATATTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC  
 TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTTTCTGGG  
 GTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGAGT  
 GGAGGCTGAAGATCTGGGAATTTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCCGTTCCAGTTTCG  
 GAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA

**JE12\_VK**

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLOKPGQSPKFLIYKVSNRFSG  
 VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVFPFTFGGGTKLEIK

图21

**抗体 EH-6****EH6\_VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC  
CTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGTTATGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG  
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATTTATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAG  
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACCTCAGACAAAGCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCT  
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTCTCCTCTGGGTACT  
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

**EH6\_VH**

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGFINPYNDGTYNE  
KFKGKATLTSKASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFSSGYWGQGTTLTVSS

**EH6\_VK**

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT  
CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAAATGGTACC  
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGG  
GTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGT  
GGGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCCTTCAAGTTTACATGTTCCCTTTCACGTTCCG  
GCTCGGGGACAAAGTTGAAATAAAA

**EH6\_VK**

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG  
VPDRESGSGSDFTLTKISRVGAEDLGVIYCLQVSHVPFTFGSGTKLEIK

图22

**抗体AG-9****AG9\_VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC  
CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCCTACTACCTATGTTATTCCTGGGTGAAGCAGAAGCCTG  
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG  
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGA  
ACTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTTTCTAGTGACTACT  
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

**AG9\_VH**

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE  
KFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

**AG9\_VK**

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGCGATCAGGCCTCCAT  
CTCTTGCAGATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC  
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG  
GTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAGGATCAGCAGTGT  
GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTCAAGGTTTACATGTTCCGTTTACGTTTCG  
GAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA

**AG9\_VK**

DVLMTONPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG  
VPDRFSGSGSGTDFTLRISSEVAEDLGVYYCFQGSHPVFTFGGGTKLEIK

图23

**抗体 AH-3****AH3 VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC  
 CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCACCTACCTATGTTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGCCTG  
 GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG  
 AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGA  
 ACTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTACT  
 GGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA

**AH3 VH**

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE  
 KFKGKATLTSDKSSTAYMELSSLTSESAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

**AH3 VK**

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTGTCAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCAT  
 CTCTTGCAGATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC  
 TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG  
 GTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGTGT  
 GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATGTTCCGTTTACGTTTCG  
 GAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

**AH3 VK**

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKELIYKVSNRFSG  
 VPDFRSGSGSTDEFTLRISSEVAEDLGVIYCFQGSHPFTFGGGTKLEIK

图24

**抗体DD-9****DD9\_VH**

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCTCAGTCTGAC  
TTGTTCTTTTTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCGGGTATGGGTGTGAGTTGGATTCGTCAGT  
CCTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC  
CCATCCCTGAAGAGCCGGATCACAATCTCCAAGGATTCCTCAAGCAACCAGGTATTCCTCAA  
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTACTGTGCTCGAAGTTGGACTACGG  
CCCCGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

**DD9\_VH**

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKLEWLAHIYWDDDKRYN  
PSLKSRTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPEAFWQGGLVTVSA

**DD9\_VK**

CAAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT  
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAGATTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT  
CCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGT  
GGCAGTGGGTCTGGGACCTTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGGGGCTGAAGATGCTGC  
CACTTATTACTGCCAACAGTGGAAATAGTTCCCCGCTCACGTTTCGGTGTGGGACCAAGCTGG  
AGCTGAAA

**DD9\_VK**

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVDYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVFPVRFSS  
GSGSGTSYSLTISRMGAEAAATYYCQWNSSPLTFGAGTKLELK

图25

**抗体 DH-2****DH2\_VH**

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGAC  
TTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTTCAGC  
CTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC  
CCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGCAACCAGGTATTCCTCAA  
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAAGTGGGACTACGG  
CCCCGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

**DH2\_VH**

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKLEWLAHIYWDDDKRYN  
PSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARS GTTAPFAYWGQGLVTVSA

**DH2\_VK**

CAAATTGTTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT  
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT  
CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGT  
GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGC  
CACTTTTTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTCCCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGG  
AGCTGAAA

**DH2\_VK**

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVPRFS  
GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK

图26

**抗体 DD-6****DD6\_VH**

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGCCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC  
CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCAGTGACTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGAACCTTG  
GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAACCCATAAAAATGGTGTATTACTACAACCAG  
AAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACAGTGAACAGGTCCTCCAACACAGCCTACATGGAGAT  
CCGCAGCCTGACATCGGAAGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACAGCTCTGACTTACTGGG  
GACAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

**DD6\_VH**

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHWVKQNLGKSLEWIGYINPKNGVIYYNQ  
KFKGKATLTVNRSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCATALTYWGQGLVTVSA

**DD6\_VL**

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACCTACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCAC  
TTGTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTGCAGCTAATAACTATGCCAACTGGATCCAAGAAAAC  
CAGATCATTTATTCAGTGGTCTGATAGCTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTGTTCTCTGCC  
AGATTCTCAGGCTCCCTGATAGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGA  
GGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACTATTGGGTGTTCCGGTGGAGGAA  
CCAAAGTGACTGTCTTAGGC

**DD6\_VL**

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVAANNYANWIQEKPDHFTGLIAGTNKRAPGVPA  
RFSGLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGKVTVLG

图27

**抗体 IA-12****IA12\_VH**

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC  
CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACCTATGGAATGACCTGGGTGAAACAGGCTCCAG  
GAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTCCTCTGGAGTGCCAACATATGCTGAT  
GACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGAT  
CAACAACCTCAAAGTGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGACCGGAAGTTGCTTACT  
GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

**IA12\_VH**

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTTYGMTWVKQAPGKGLKWMGWINTSSGVPTYAD  
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKSEDTATYFCARPEVAYWQGTLVTVSA

**IA12\_VK**

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTTCGGTTACCTTTGGACAACCAGCCTCTAT  
CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATGATAATGGAAAGACTTATTTGCATTTGGTTAT  
TTCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGA  
GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT  
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTTCG  
GAGGGGGGACCAAACCTGGAATAAAA

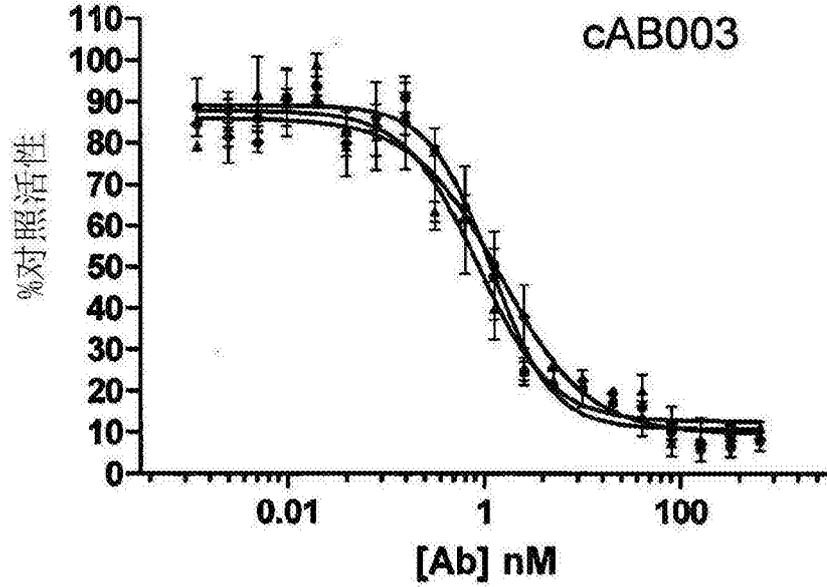
**IA12\_VK**

DVVMTQTPLTTLVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLFQRPQSPRRLIYLVSKLDSG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVIYCVQGTTFPYTFGGGTKLEIK

图28

A

	IC50 nM (SD)
cAB003	1.172 (0.297)



B

	IC50 nM (SD)
cBB001	0.925 (0.228)

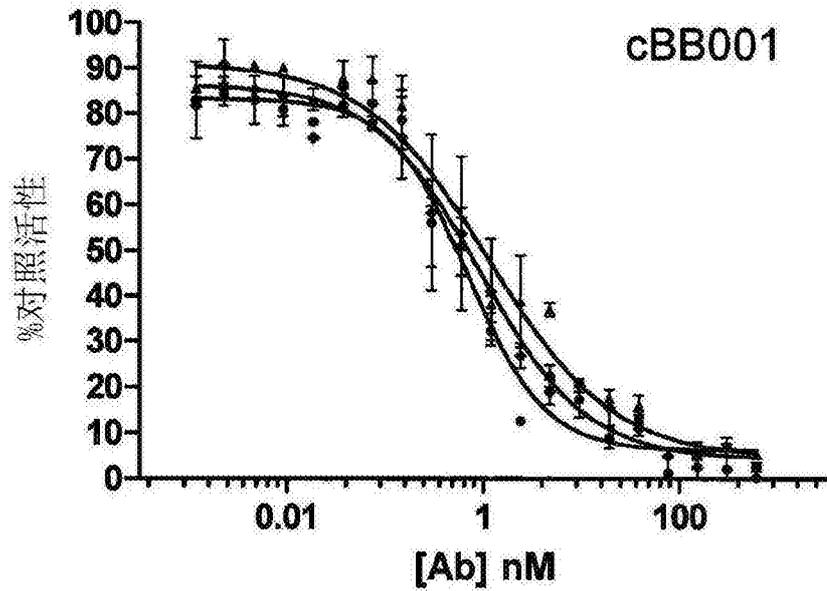
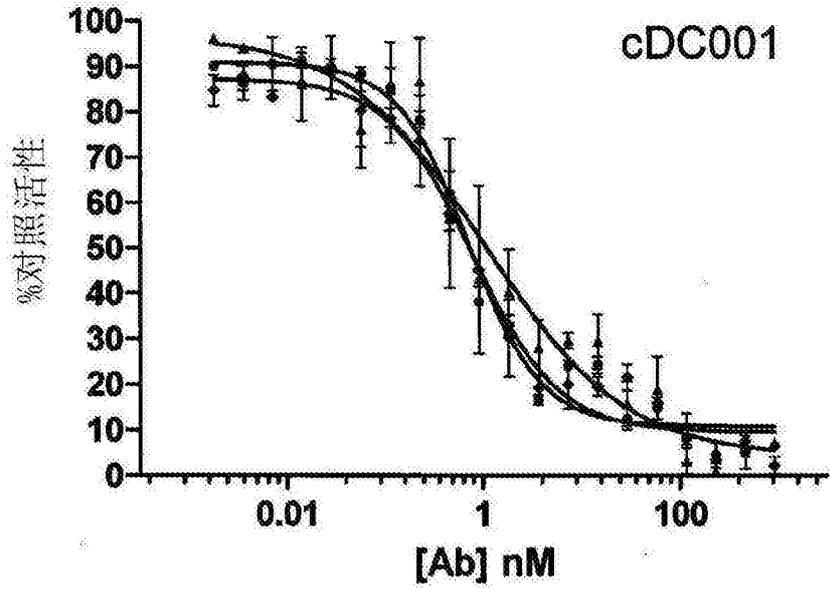


图29

**C**

	IC50 nM (SD)
cDC001	0.851 (0.177)



**D**

	IC50 nM (SD)
cDD9001	172.033 (23.353)

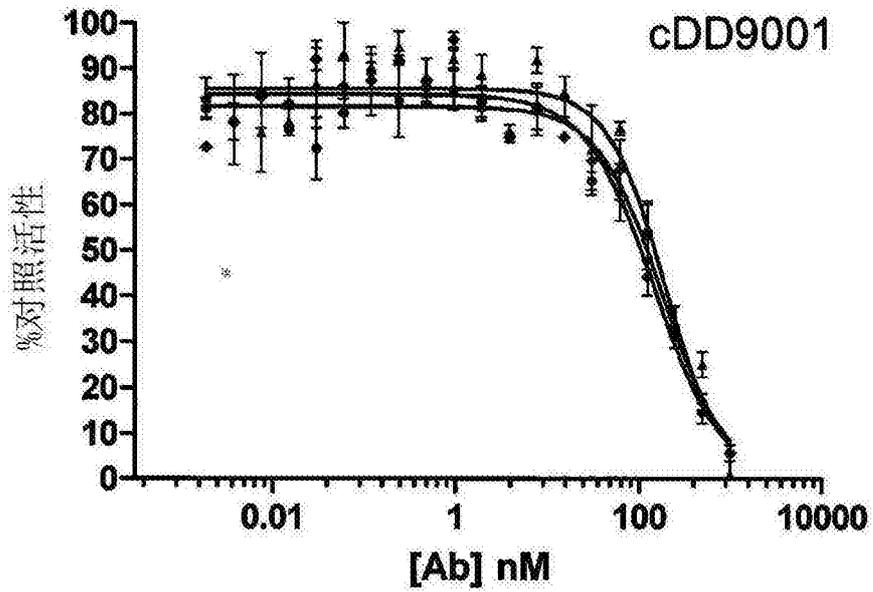
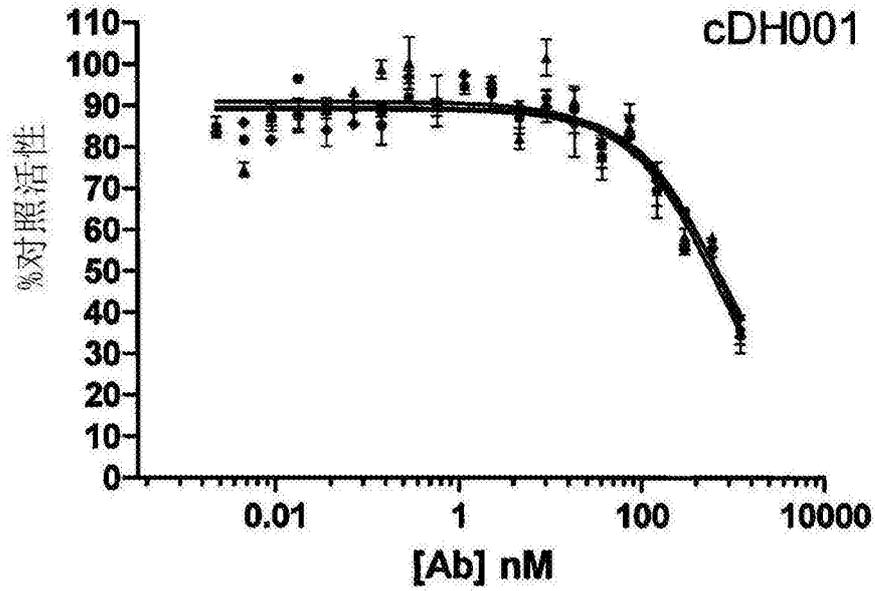


图29 (续)

E

	IC50 nM (SD)
cDH001	829.233 (59.923)



F

	IC50 nM
CUB7402	>100

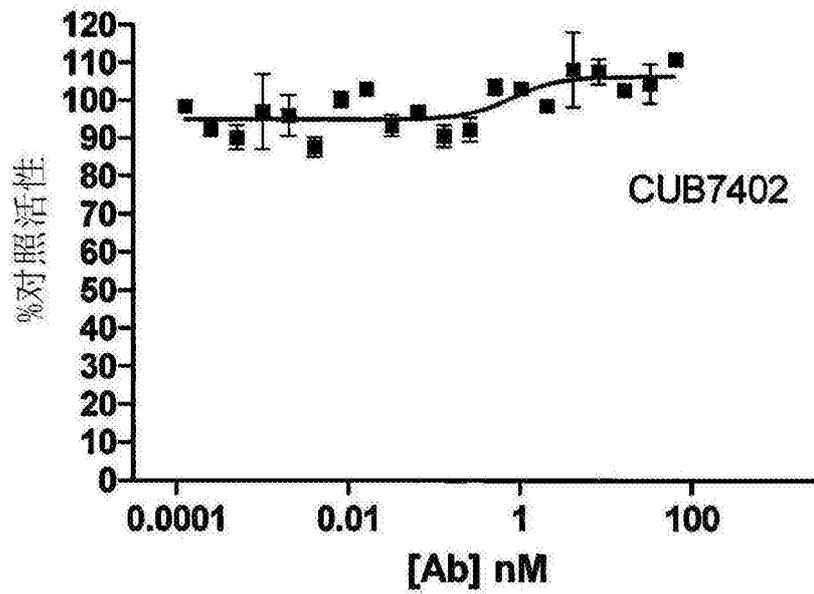
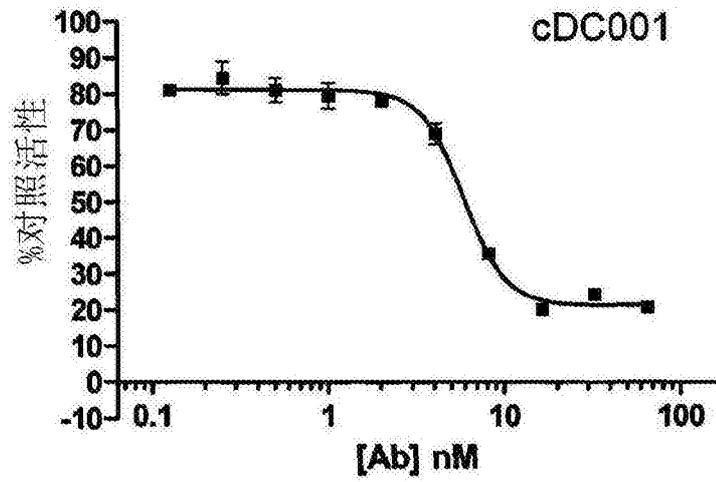


图29 (续)

A

	IC50 nM
cDC001	5.862



B

	IC50 nM
CUB7402	>100

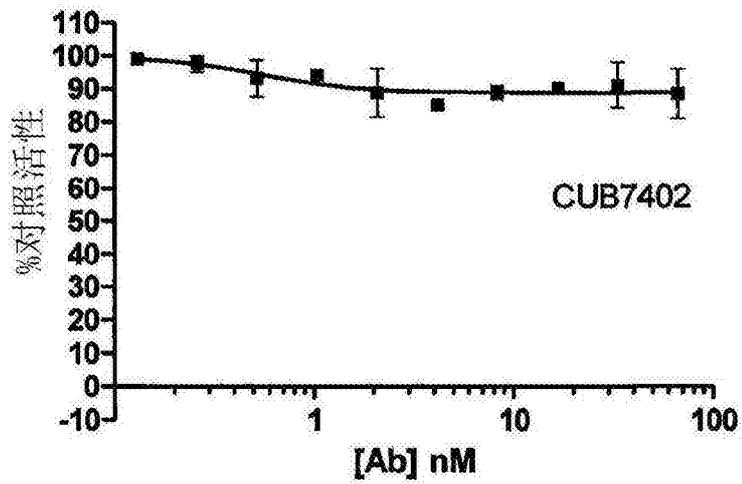
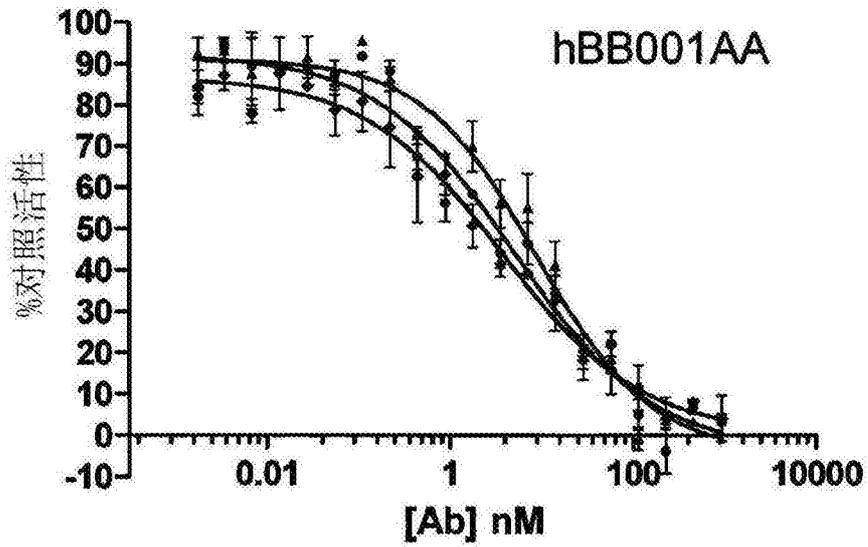


图30

A

	IC50 nM (SD)
hBB001AA	5.987 (2.643)



B

	IC50 nM (SD)
hBB001BB	0.985 (0.140)

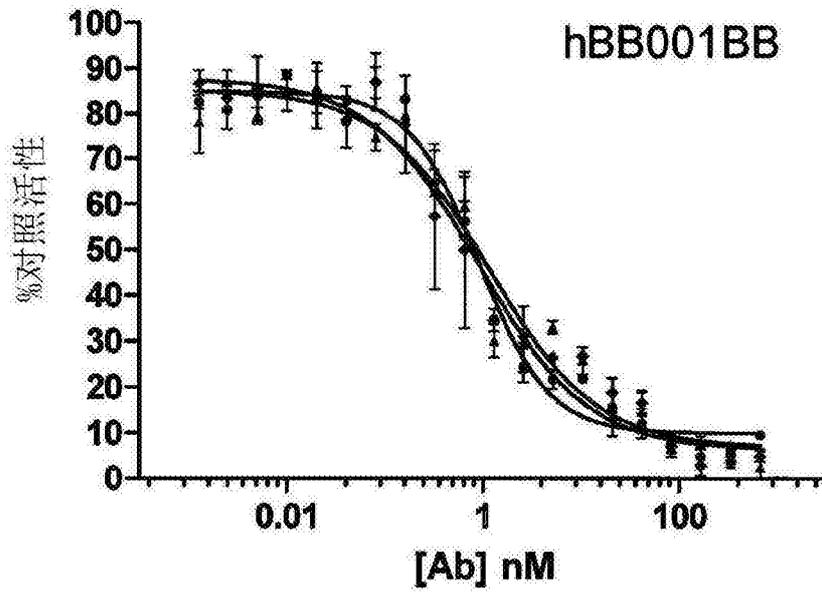
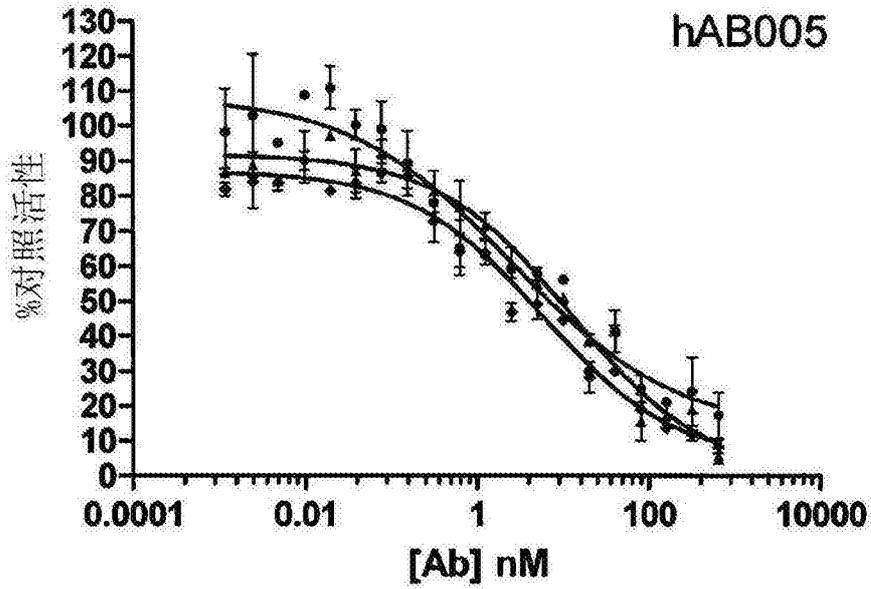


图31

C

	IC50 nM (SD)
hAB005	6.868 (4.895)

示出2个批次



D

	IC50 nM (SD)
hAB004	3.854 (0.886)

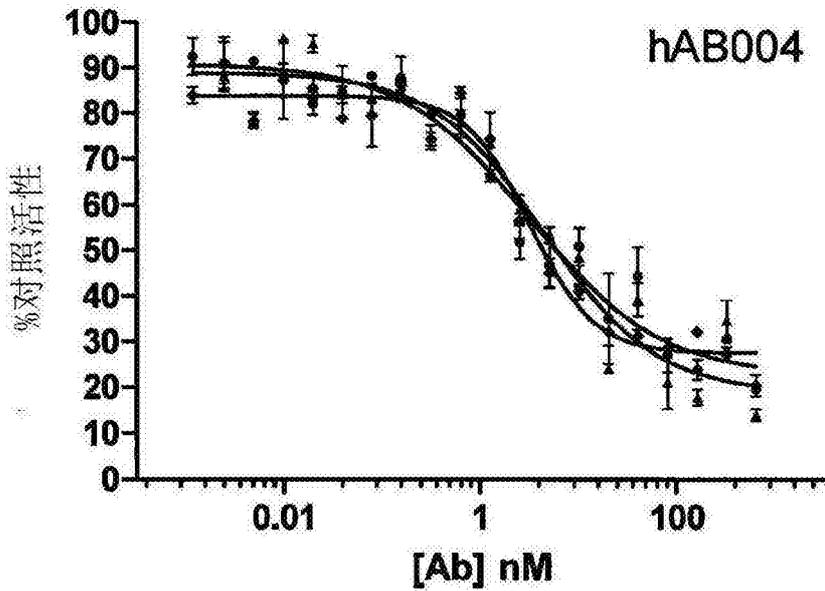


图31 (续)

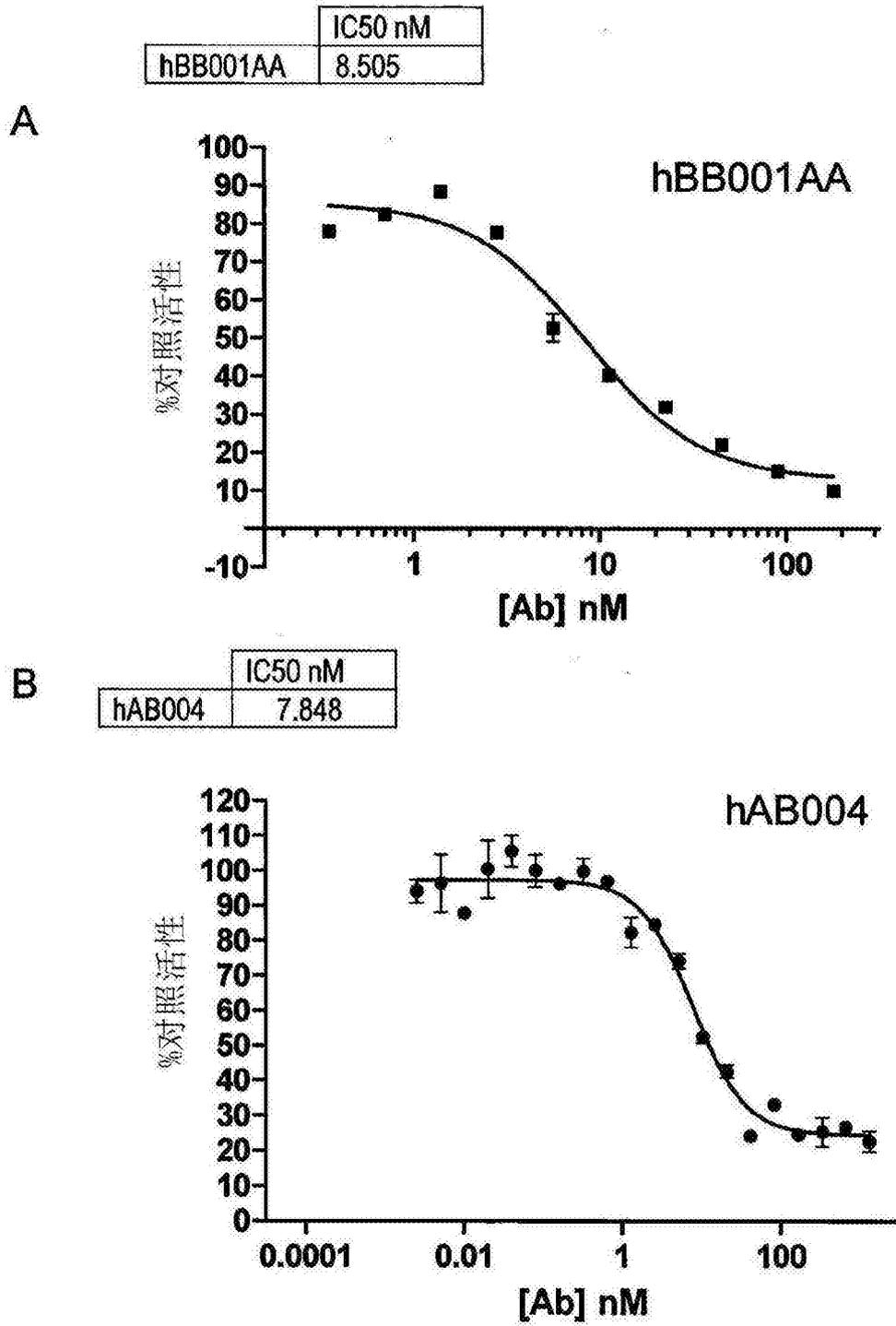


图32

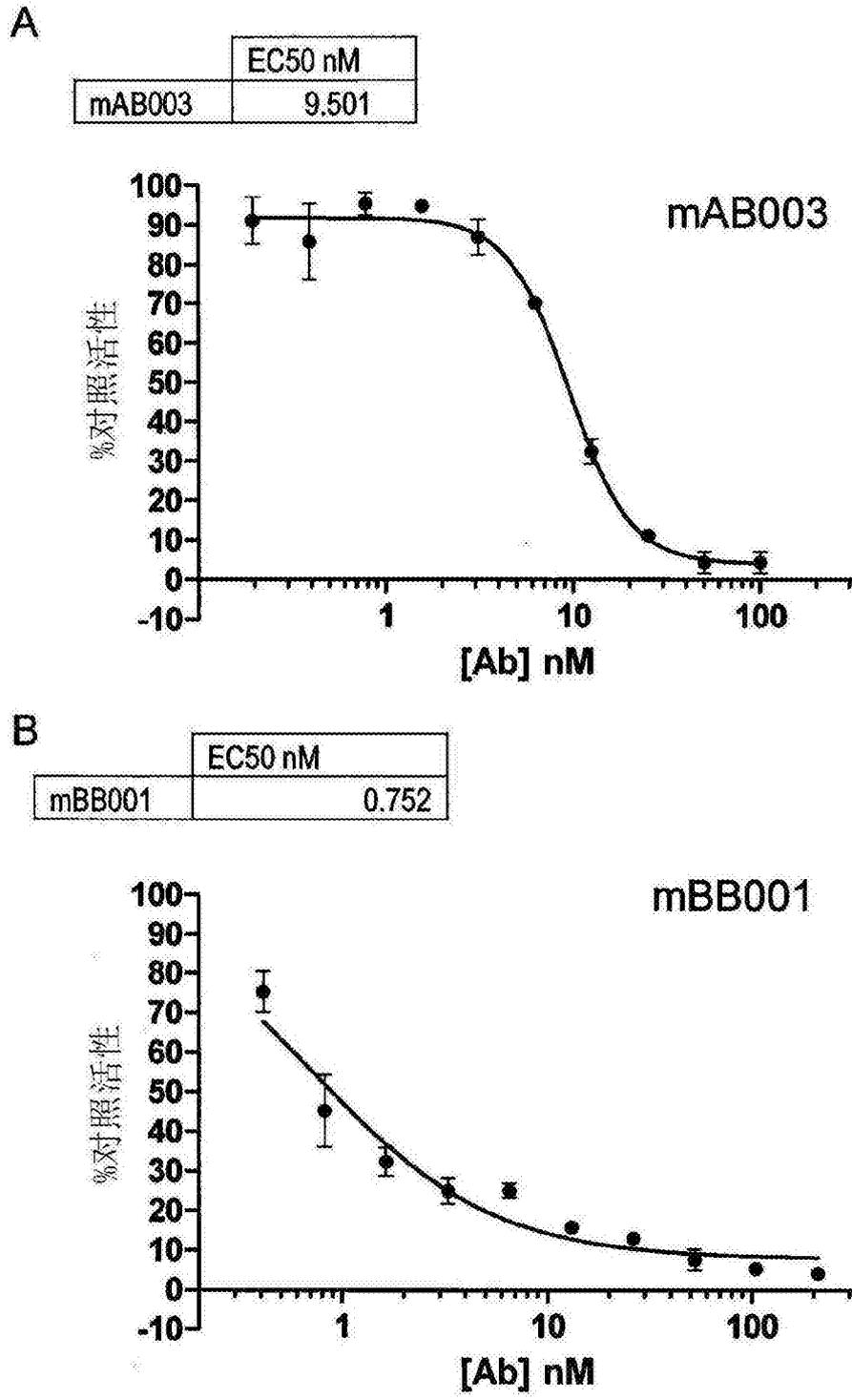
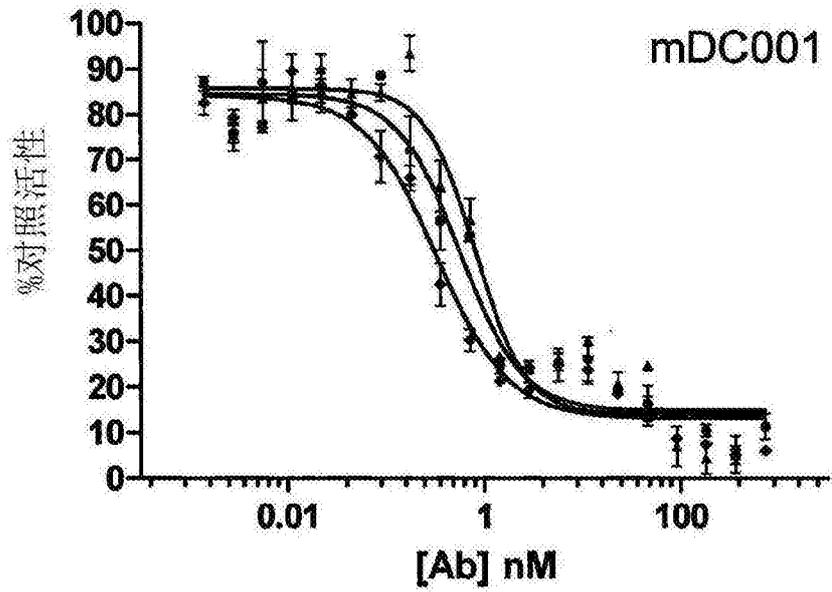


图33

C

	EC50 nM (SD)
mDC001	0.5712 (0.2409)



D

	EC50 nM (SD)
mDD9001	564.233 (83.996)

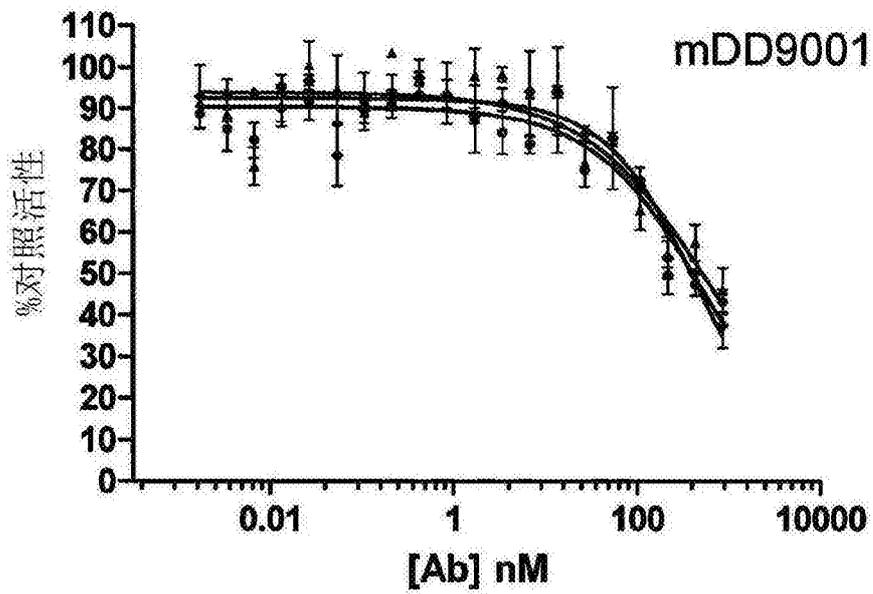
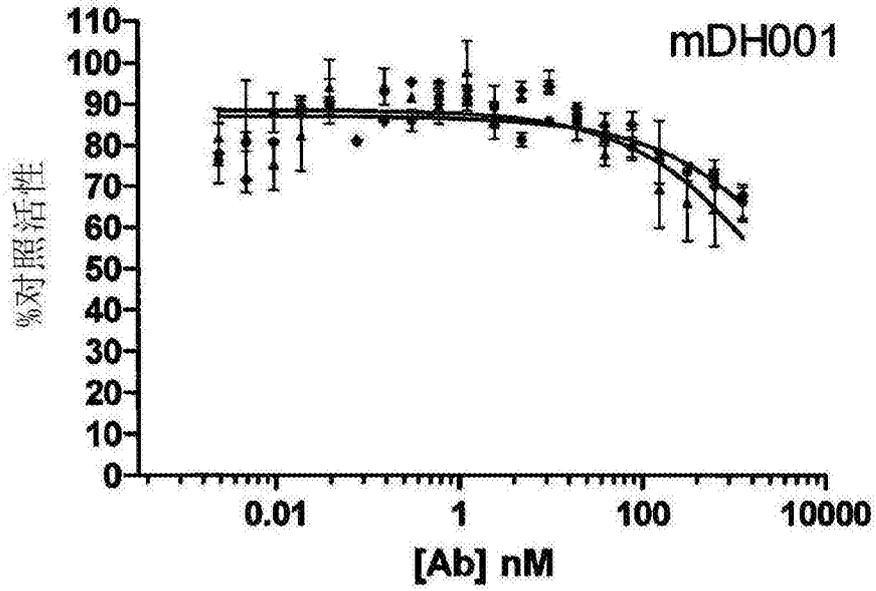


图33 (续)

E

	EC50 nM (SD)
mDH001	~7000



F

	EC50 nM (SD)
mDD6001	43.196 (10.948)

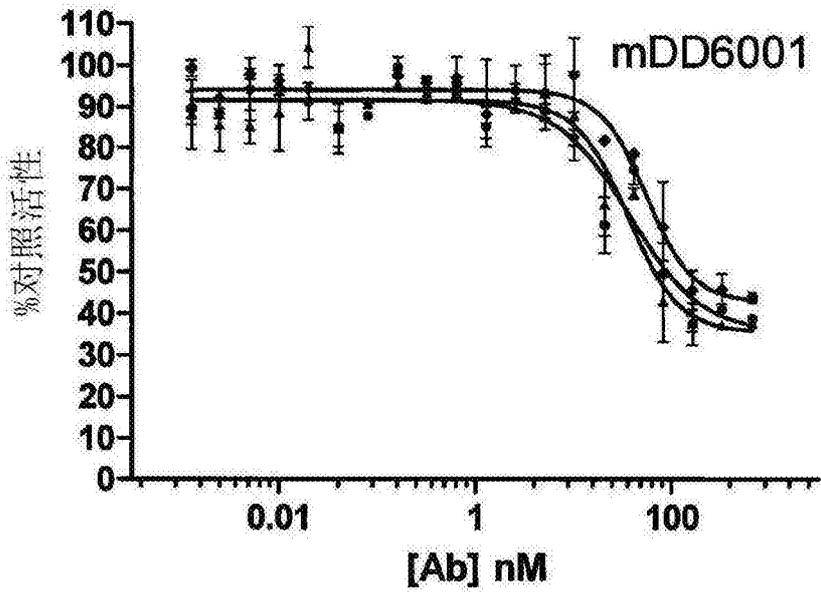


图33 (续)

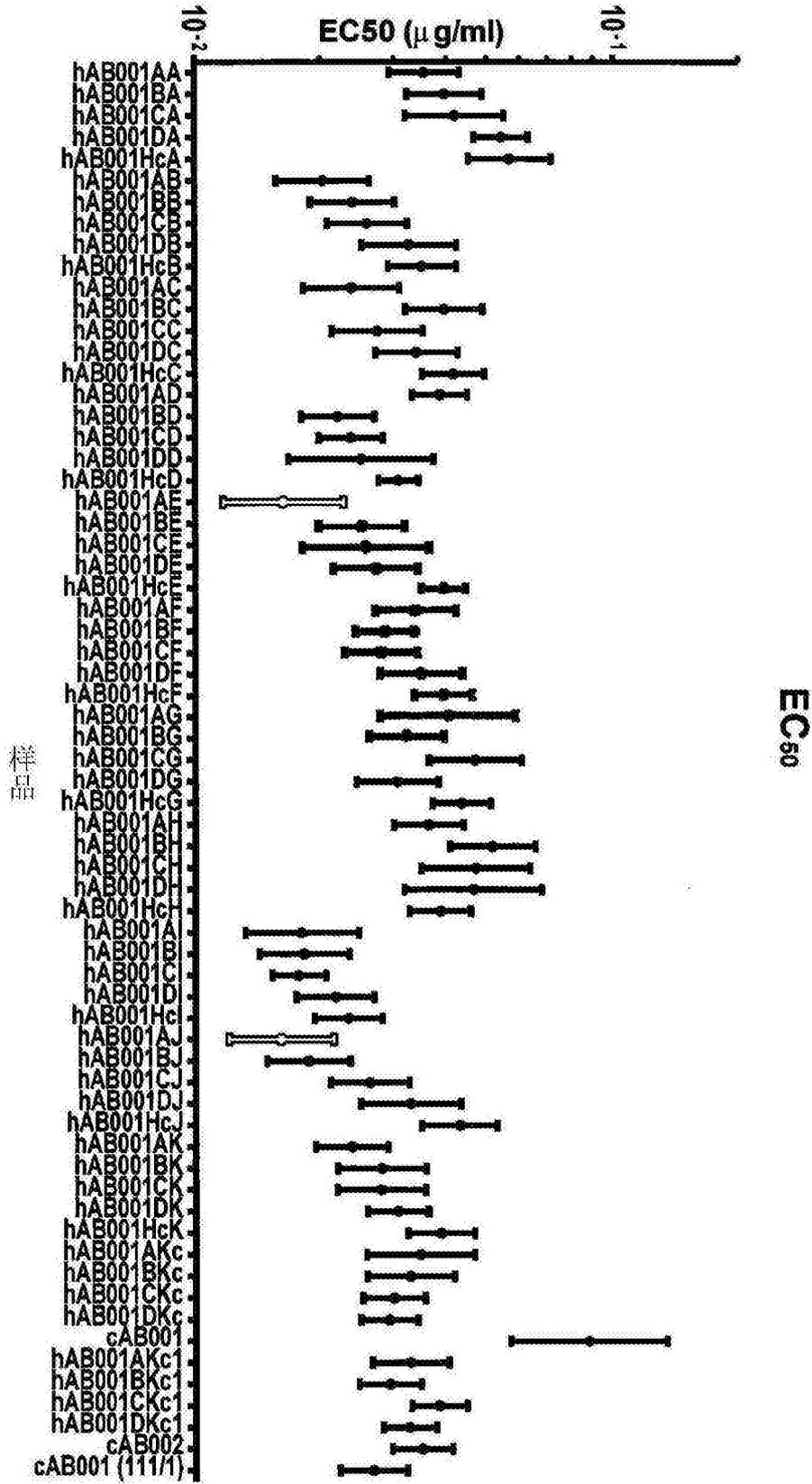


图34

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (nM)	0.3804	0.2099	0.3401	0.4418
r2	0.9991	0.998	0.9968	0.9985
EC50 (95% 置信区间)	0.3291至0.4396	0.1860至0.2368	0.2890至0.4002	0.3927至0.4971

A

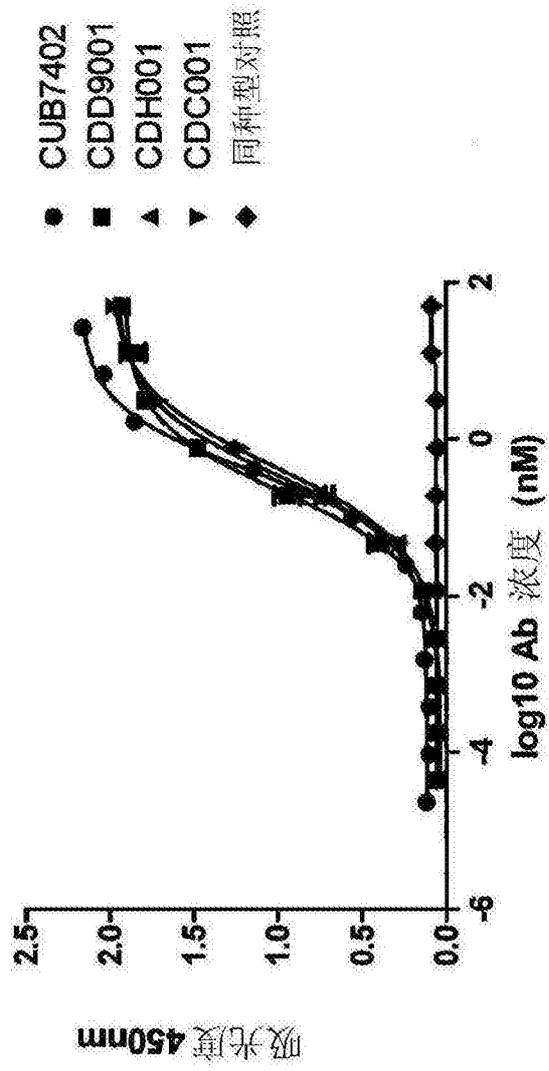
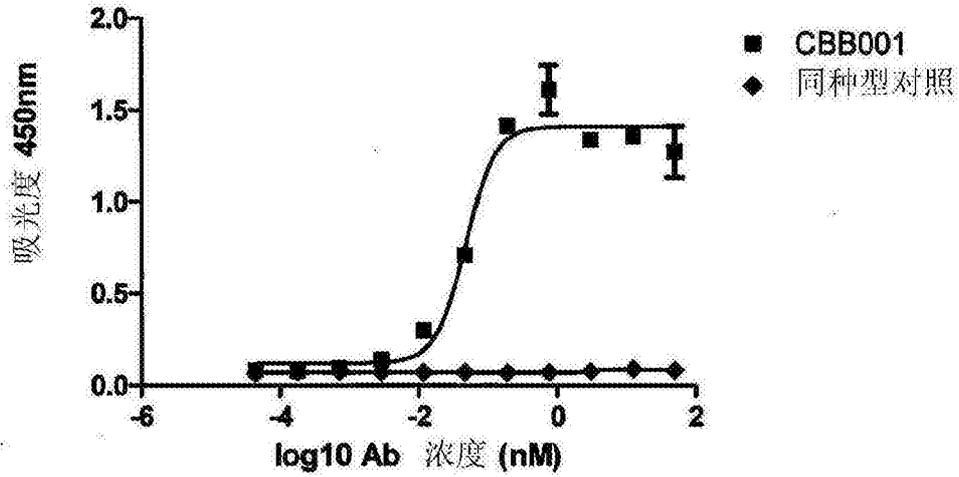


图35

B

CBB001	
EC50 (nM)	0.04811
r <sup>2</sup>	0.9682
EC50 (95% 置信区间)	0.03611 至 0.06410



C

CAB003	
EC50 (nM)	0.06141
r <sup>2</sup>	0.9568
EC50 (95% 置信区间)	0.03066 至 0.1230

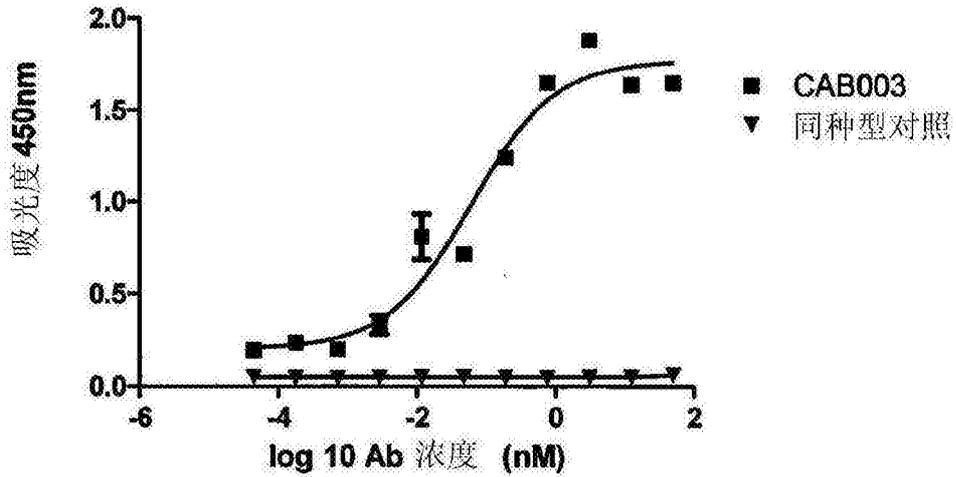
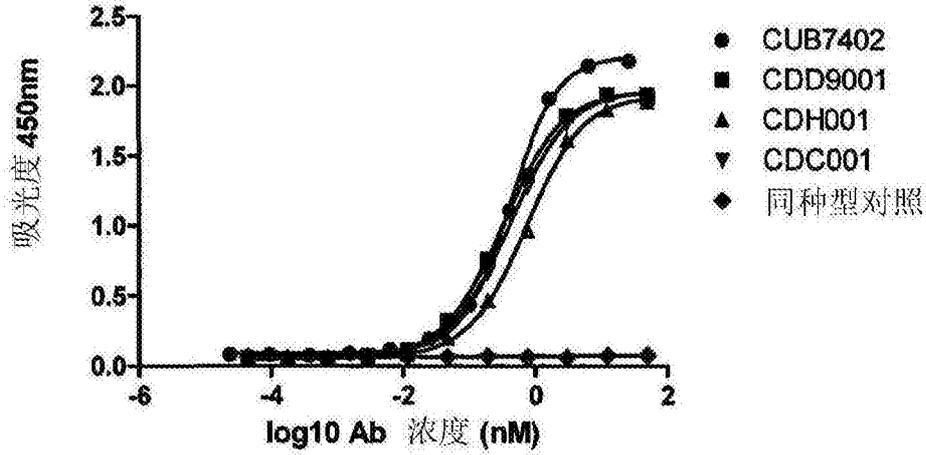


图35 (续)

**A**

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (nM)	0.4161	0.3279	0.7385	0.4177
r2	0.9994	0.9992	0.9986	0.9993
EC50 (95% 置信区间)	0.3762 至 0.4603	0.3040 至 0.3536	0.6682 至 0.8162	0.3887 至 0.4489



**B**

	CBB001
EC50 (nM)	0.05166
r2	0.9383
EC50 (95% 置信区间)	0.03303 至 0.08079

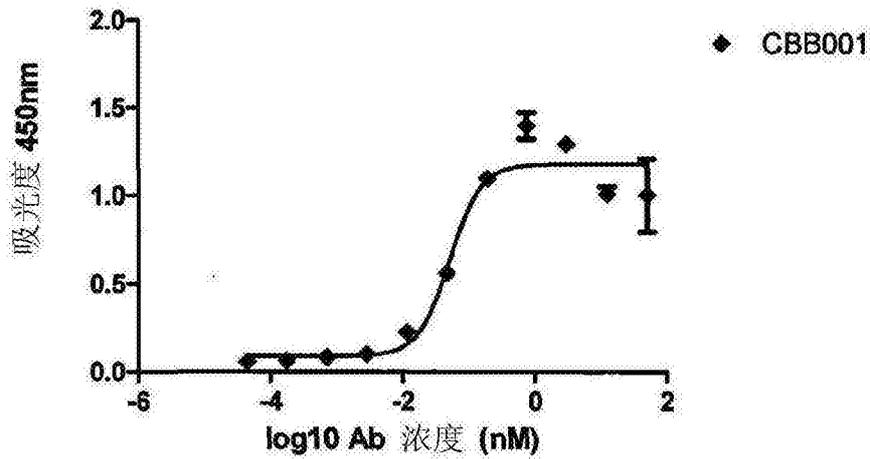


图36

C

CAB003	
EC50 (nM)	0.05682
r2	0.9837
EC50 (95% 置信区间)	0.04054 至 0.07966

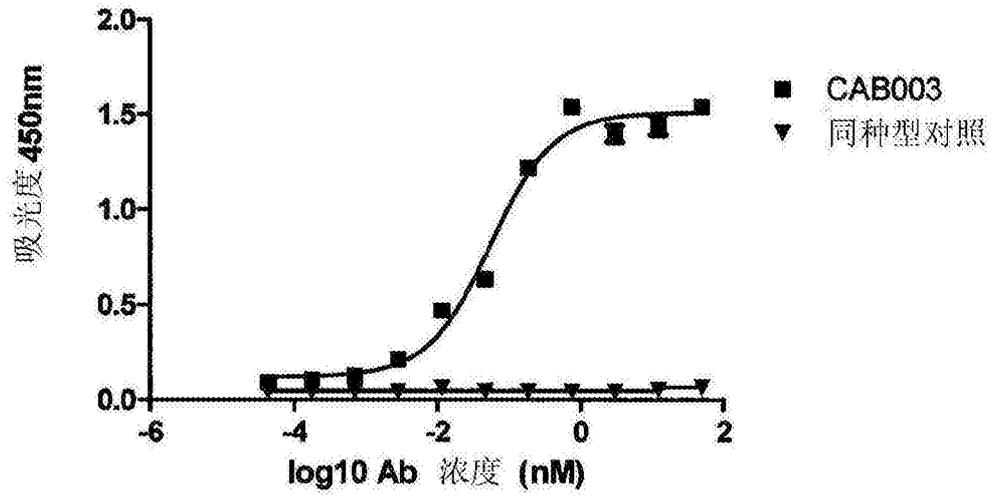
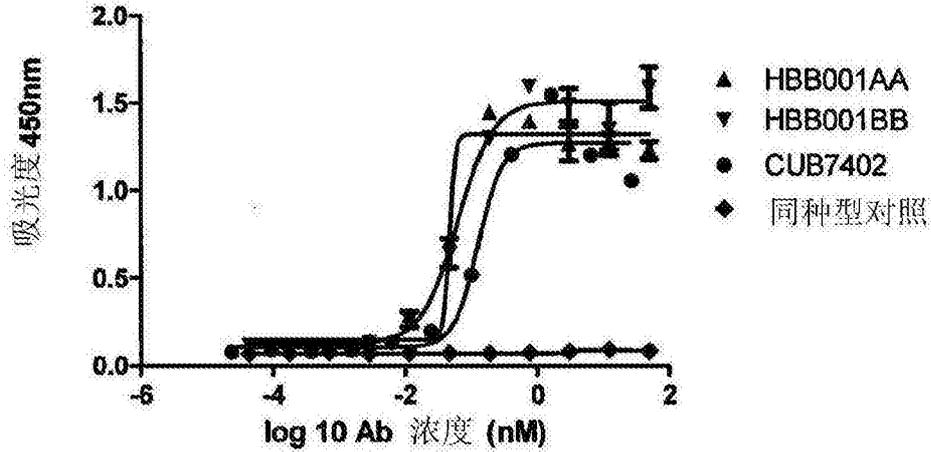


图36 (续)

A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (nM)	0.1277	~ 0.04739	0.06274
r2	0.9588	0.9792	0.9771
EC50 (95% 置信区间)	0.06801 至 0.2396	ND	0.04636 至 0.08491



B

	HAB004
EC50 (nM)	0.02001
r2	0.9794
EC50 (95% 置信区间)	0.01199 至 0.03342

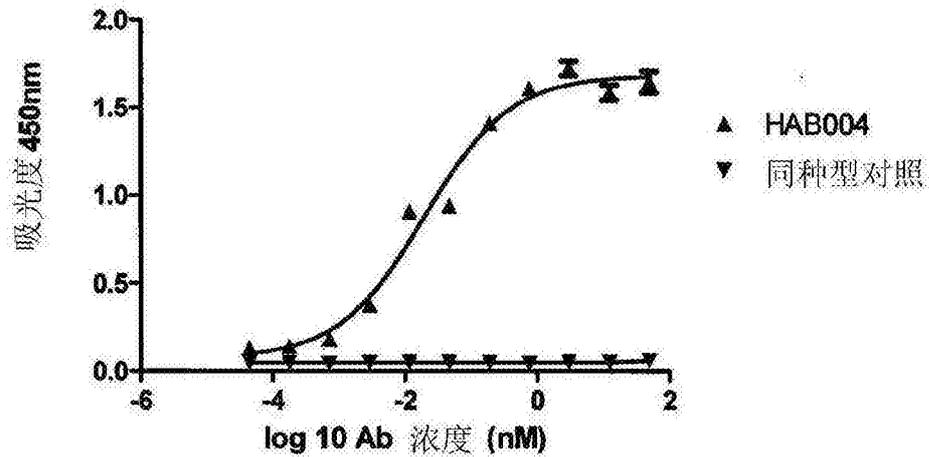
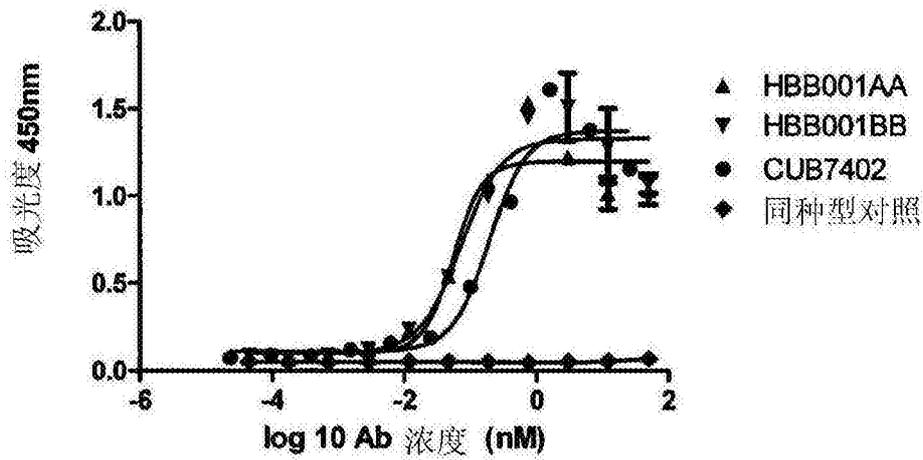


图37

A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (nM)	0.1982	0.0561	0.07377
r2	0.9586	0.9329	0.9361
EC50 (95% 置信区间)	0.09303 至 0.4223	0.03522 至 0.08934	0.04198 至 0.1296



B

	HAB004
EC50 (nM)	0.06117
r2	0.9766
EC50 (95% 置信区间)	0.04047 至 0.09246

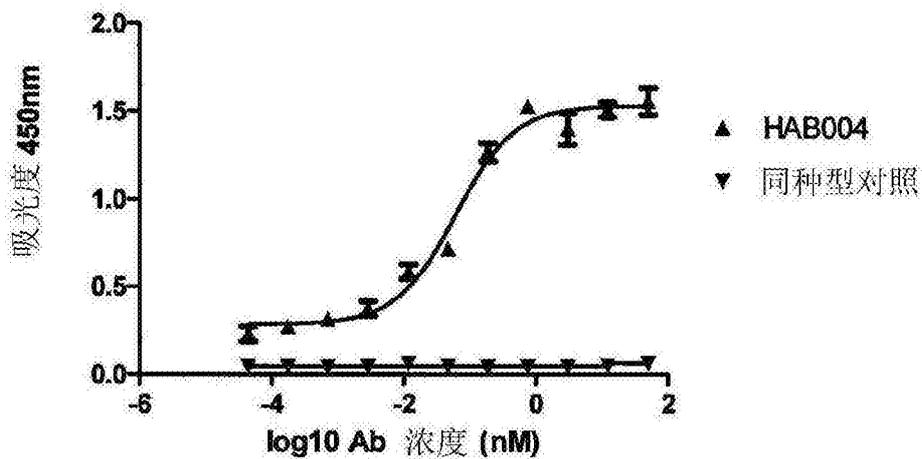


图38

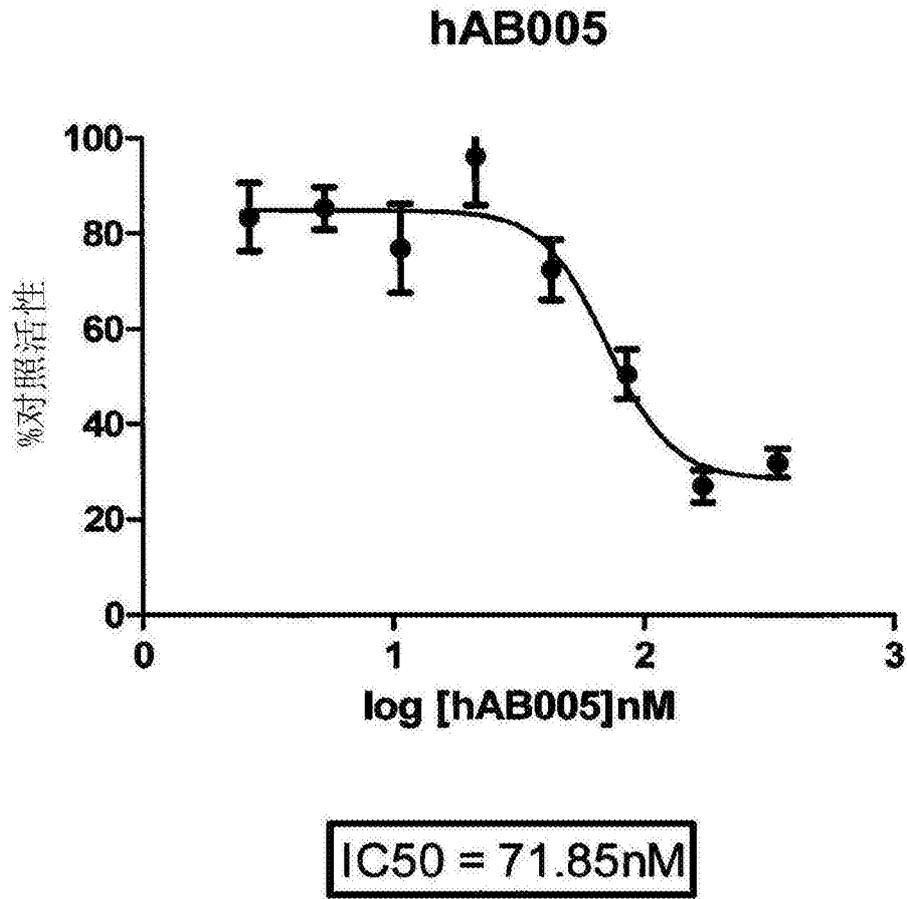


图39

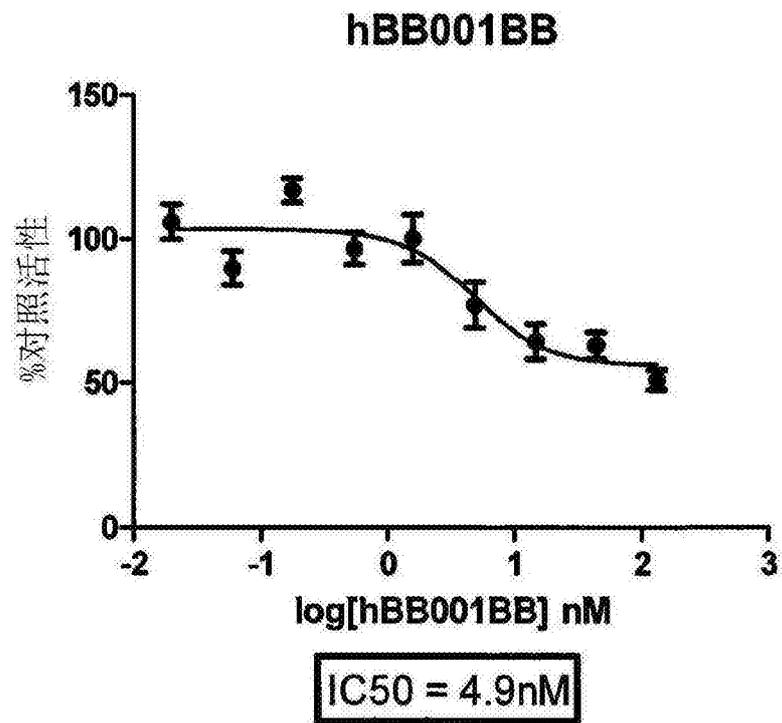
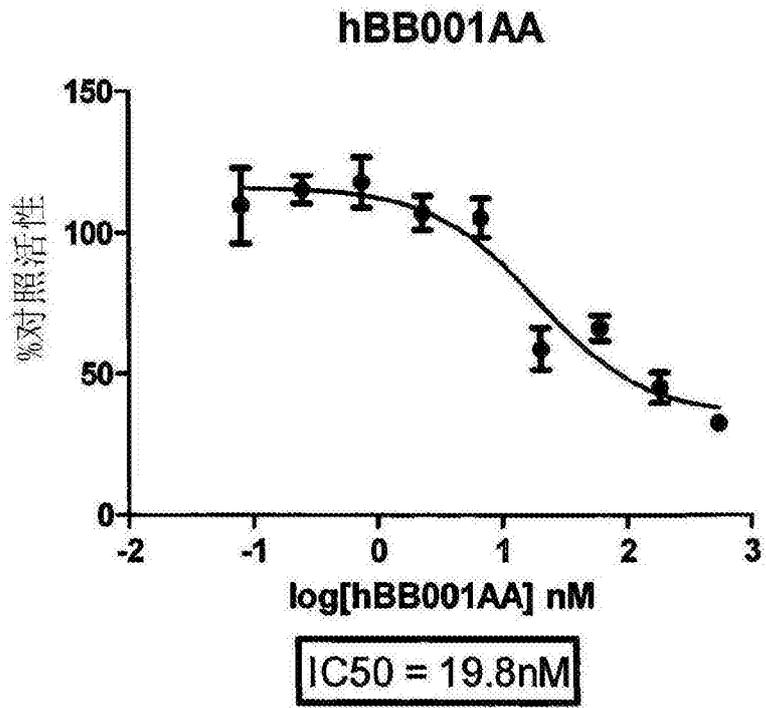


图40

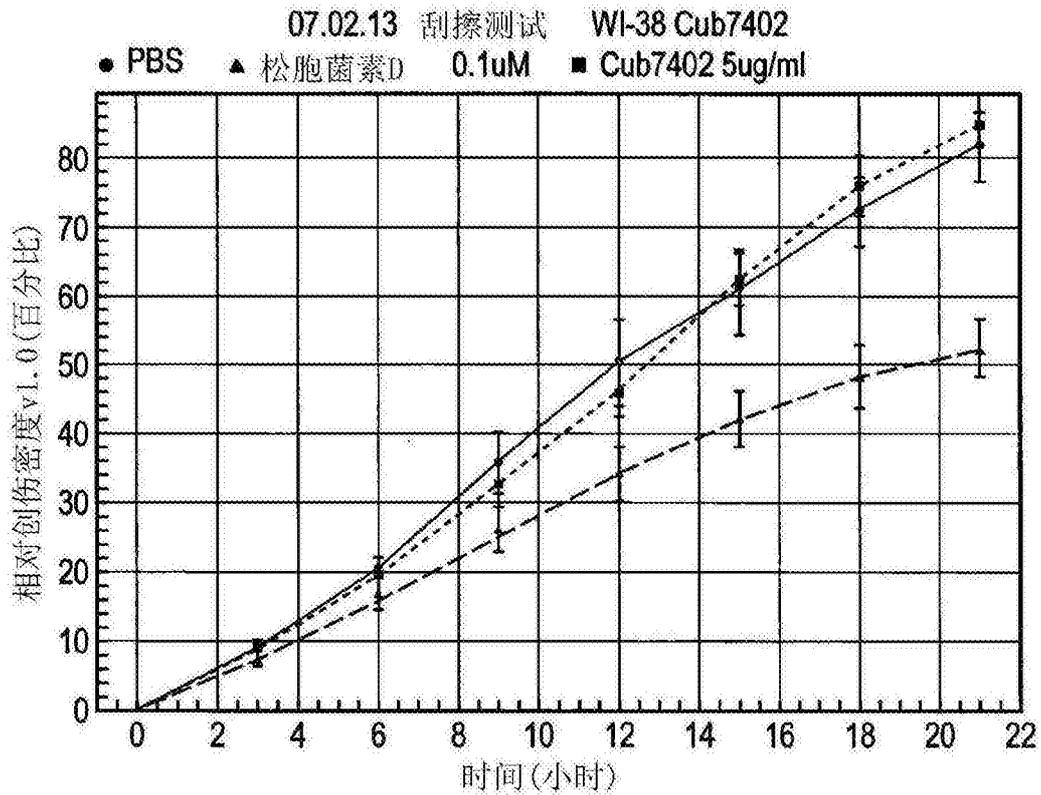
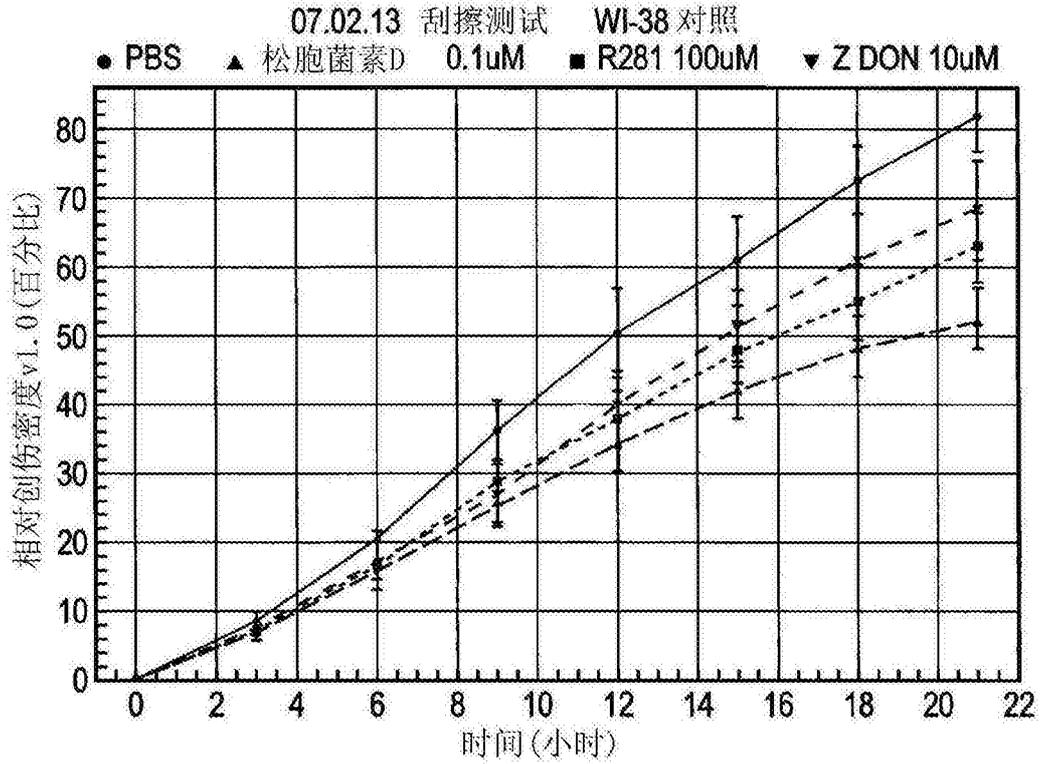


图41

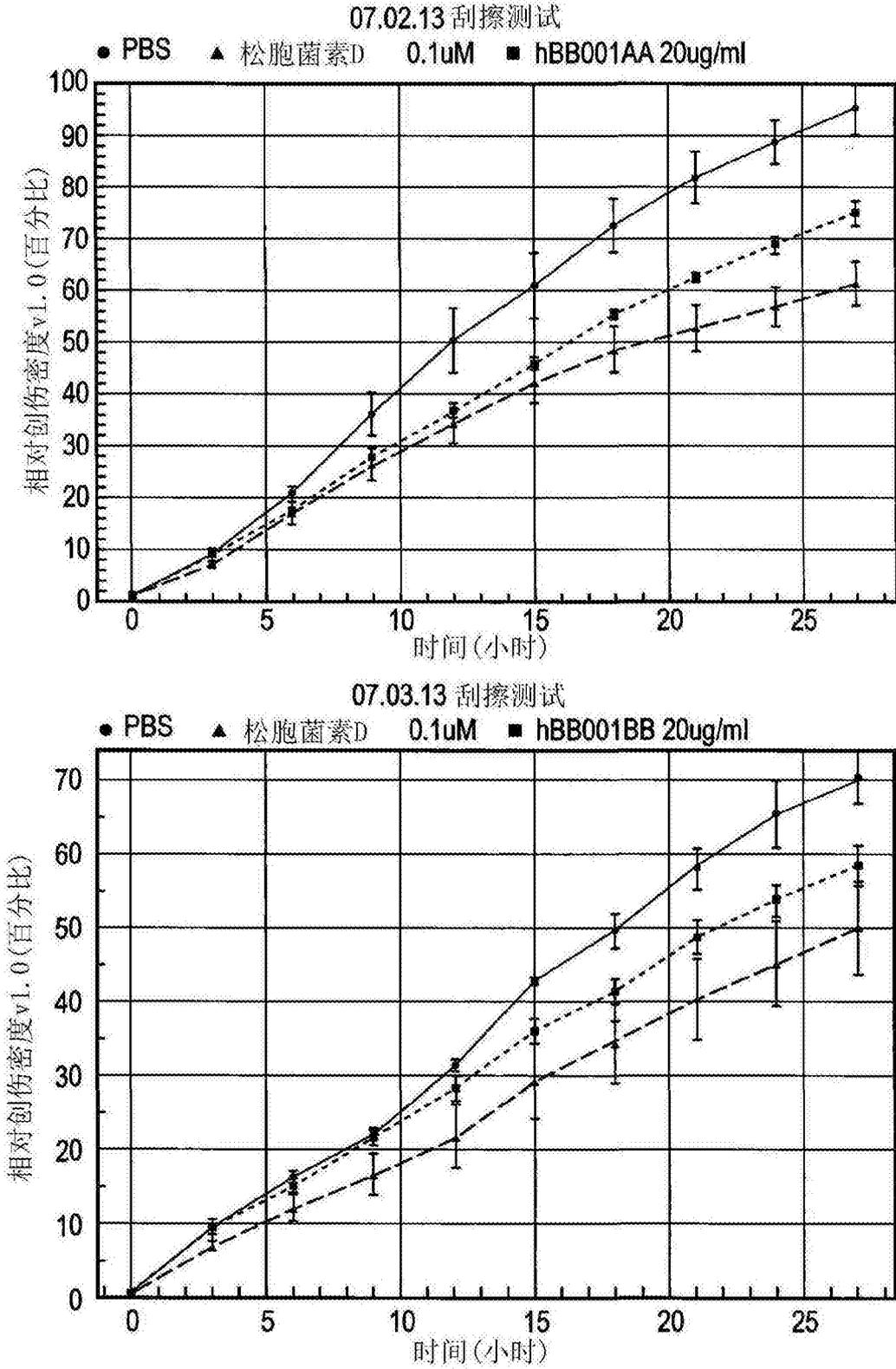


图42

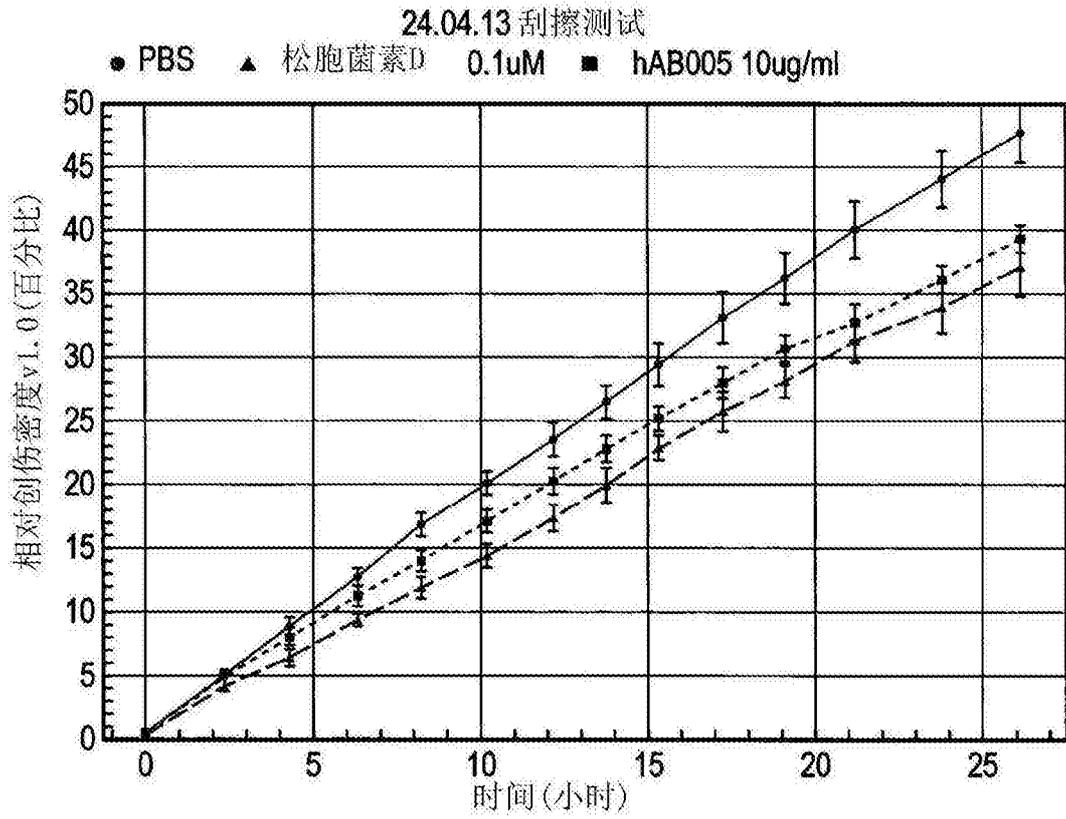


图43

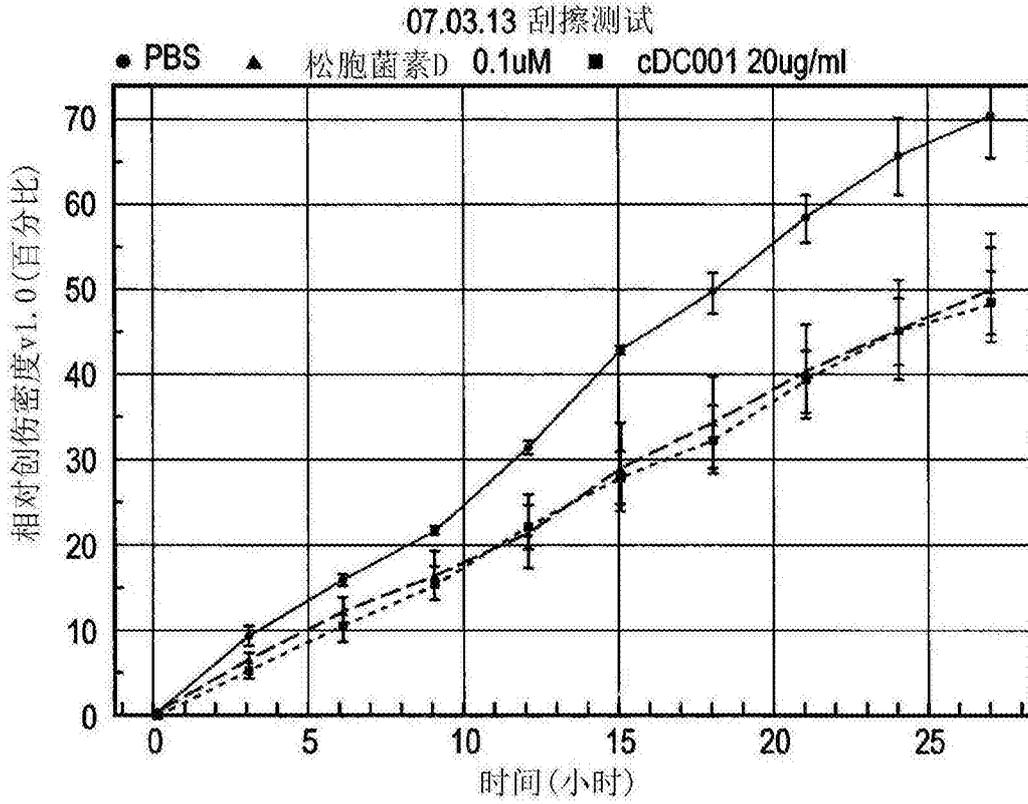


图44

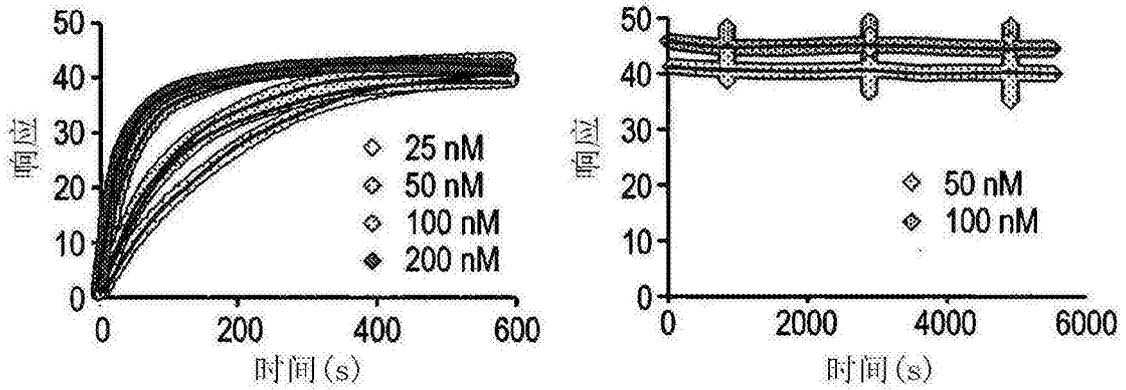


图45

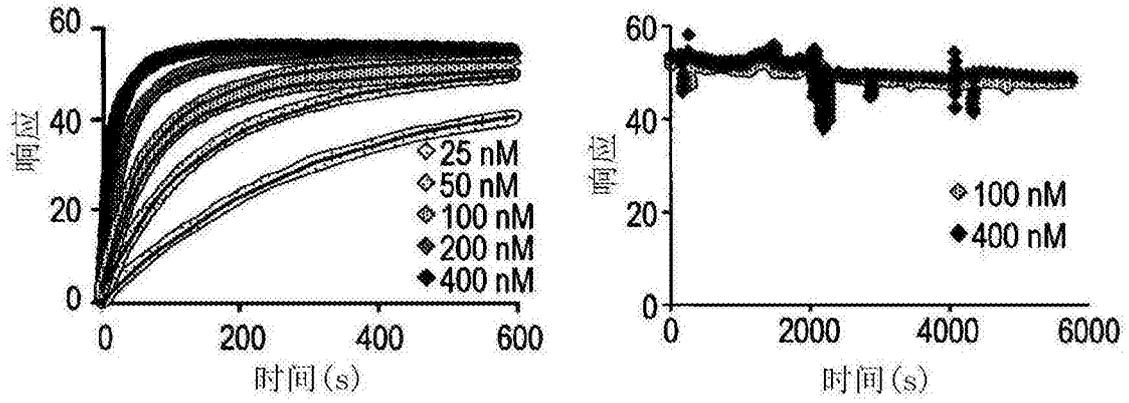


图46

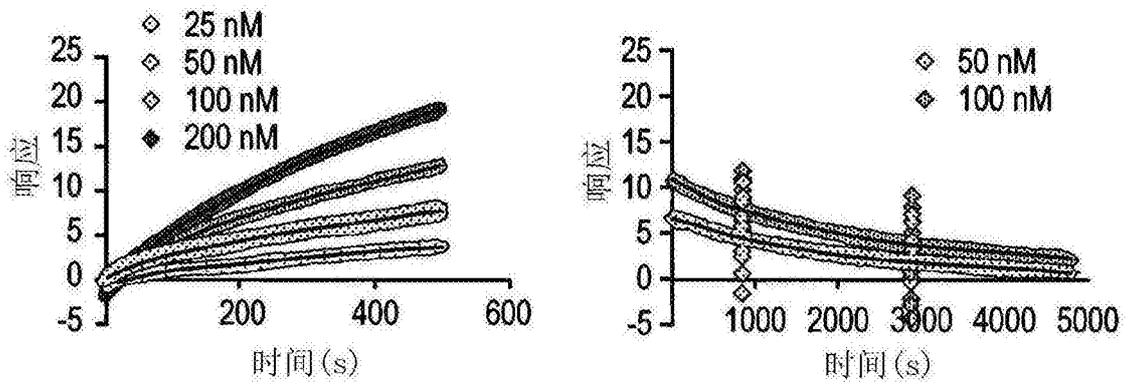


图47