



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102046659 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 04

(21) 申请号 200980118935. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 05. 28

C07K 16/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/13 (2006. 01)

61/130, 394 2008. 05. 30 US

C12N 5/10 (2006. 01)

61/130, 395 2008. 05. 30 US

C12N 15/63 (2006. 01)

61/130, 539 2008. 05. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/045365 2009. 05. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02009/155015 EN 2009. 12. 23

(71) 申请人 伊姆克罗尼责任有限公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 Y·李 D·陆 D·瑟古拉兹

J·R·托恩拉

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 2 页 说明书 29 页

(54) 发明名称

抗-FLT3 抗体

(57) 摘要

本发明提供了以高亲和力特异结合细胞外结构域 4 或 5 内人 FLT3 的完全人抗体。本发明还提供了通过施用有效量的抗体单独或者与抗癌剂或包括甲氨蝶呤的治疗的组合来治疗白血病的方法。

1. 特异结合人 FLT3 (SEQ ID NO. 43) 的抗体, 其包含具有序列 SYMH (SEQ ID NO :2) 的 CDRH1、具有序列 IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO :3) 的 CDRH2、具有序列 GVGAFDAFDI (SEQ ID NO :4) 或 VVAADVADY (SEQ ID NO :5) 的 CDRH3、具有序列 RSSQSLLSNGNLYD (SEQ ID NO :6) 或 RSSQSLLSNGYNYLD (SEQ ID NO :7) 的 CDRL1、具有序列 LGSNRAS (SEQ ID NO :8) 的 CDRL2、具有序列 MQGTHPAIS (SEQ ID NO :9) 或 MQLQTPFT (SEQ ID NO :11) 的 CDRL3。

2. 权利要求 1 的抗体, 其包含具有序列 SYMH (SEQ ID NO :2) 的 CDRH1、具有序列 IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO :3) 的 CDRH2、具有序列 GVGAFDAFDI (SEQ ID NO :4) 的 CDRH3、具有序列 RSSQSLLSNGNLYD (SEQ ID NO :6) 的 CDRL1、具有序列 LGSNRAS (SEQ ID NO :8) 的 CDRL2, 和具有序列 MQGTHPAIS (SEQ ID NO :9) 的 CDRL3。

3. 权利要求 1 或 2 的抗体, 其包含含有氨基酸序列:

DVVMQTSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLSNGNLYDWYLPKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDTDFTLQISRVEAEDVGYYCMQGTHPAISFGQGTREIK (SEQ ID NO :22) 的 VL,

和含有氨基酸序列: EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTDRDSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGVGAFDAFDIWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO :19) 的 VH。

4. 权利要求 1-3 任一项的抗体, 其包含含有 SEQ ID NO :25 的氨基酸序列的重链和含有 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列的轻链。

5. 权利要求 1-4 任一项的抗体, 其包含两条重链和两条轻链, 每条重链包含 SEQ ID NO :25 的氨基酸序列, 每条轻链包含 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列。

6. 权利要求 1 的抗体, 其包含含有氨基酸序列:

DVVMQTSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLP

KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQSLQTPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO :24) 的 VL, 和含有氨基酸序列:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTDRDSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARVVAADVWGGTLTVTVSS (SEQ ID NO :21) 的 VH。

7. 权利要求 1-6 中任一项的任意抗体的片段, 所述片段特异性结合人 FLT3。

8. 分离的多核酸, 其包含编码权利要求 1-7 任一项的抗体或片段的核苷酸序列。

9. 表达载体, 其包含与表达控制元件有效连接的权利要求 8 的多核酸, 使得可表达所编码的抗体或片段。

10. 重组细胞, 其包含权利要求 9 的表达载体, 所述重组细胞能够产生权利要求 1-7 中任一项的抗体或片段。

11. 抗体或片段, 其通过培养权利要求 10 的重组细胞使得产生所述抗体或片段, 并从培养物中回收所述抗体或片段来制备。

12. 药物组合物, 其包含权利要求 1-7 或 11 中任一项的抗体或片段, 以及可药用载体、稀释剂或赋形剂。

13. 如权利要求 1-7 或 11 任一项要求保护的抗体或片段, 其用作药物。

14. 如权利要求 1-7 或 11 任一项要求保护的抗体或片段, 其用于治疗癌症。

15. 如权利要求 14 要求保护的抗体或片段, 其中所述癌症是白血病。

16. 产品, 其含有权利要求 1-7 或 11 中任一项的抗体或片段, 以及同时、分别或依次用

于治疗的相组合的额外抗癌剂或治疗。

17. 如权利要求 16 要求保护的产品,其中所述抗癌剂是甲氨蝶呤。

抗-FLT3 抗体

[0001] 本申请要求均于 2008 年 5 月 30 日提交的美国临时申请号 61/130,395、61/130,539 和 61/103,394 的优先权。

[0002] 本发明涉及对人 Fms 样酪氨酸激酶 3 受体 (FLT3) 特异的人抗体,包括其片段或部分。抗体被用于治疗癌细胞的生长并且可以单独或与抗肿瘤剂(包括但不限于甲氨蝶呤(MTX))组合用于治疗白血病。

[0003] 人 Fms 样酪氨酸激酶 3 受体 (FLT3),也称作胎肝激酶 2 (FLK-2)、干细胞酪氨酸激酶 1 (STK-1) 和 CD135 (SEQ ID NO :43),是 III 类受体酪氨酸激酶的成员。通常,FLT3 在未成熟的骨髓-淋巴细胞前体细胞和树突细胞前体上表达,但是很少在成熟的成人细胞上表达。FLT3 在约 90% 的急性粒细胞白血病 (AML)、多数急性淋巴细胞白血病 (ALL) 和慢性粒细胞白血病的原始细胞危象期 (BC-CML) 中过表达。FLT3 配体 (FL) 的刺激增强了白血病细胞的增殖和存活。FLT3 信号转导的抑制导致树突细胞中的细胞凋亡和免疫应答的抑制。

[0004] 小分子抑制剂不是完全 FLT3 特异的并且可以产生药物抗性。从而,小分子 FLT3 抑制剂还没有提供白血病的有效靶向疗法。非常希望有该未满足的医学需求的新的治疗。抗体方法可以克服与小分子 FLT3 抑制剂相关的一些缺点。首先,抗体对于确定的抗原是特异的,从而避免了抑制多种激酶引起的潜在副作用。其次,FLT3 中和抗体靶定细胞外结构域,其比激酶结构域较不易于突变,降低了药物抗性的可能性。第三,抗体可以募集免疫效应机理,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和/或补体介导的细胞毒性 (CMC),以杀死目标肿瘤细胞,导致增加的治疗功效。最后,FLT3 特异性抗体可以对于野生型(特别在中和性抗体的情况下)和突变的 FLT3(由于免疫效应机理)都是有活性的,扩展了目标患者群体。

[0005] 过去在开发白血病治疗剂包括 FLT3 抑制剂的的努力 (Li Y., 等人, Int. J. Hematol. 82(2) :108-14(2005), Li Y., Drug Development Research 67(6) :495-500(2006). Li Y., 等人, Expert Opinion in Biological Therapy 7(3) :319-330(2007.)) 在很大程度上是不成功的。已经包括了其他开发策略:US5,777,084 杂交瘤抗体;W095/27062 拮抗剂抗体, W094/28391 抗配体的抗体;W02005/094823 小分子。

[0006] Zheng R., 等人, Blood 103(1) :267-274(2004), Li Y., 等人, Blood 104(4) :1137-44(2004), Piloto, O., 等人, Cancer Res. 65(4) :1514-22(2005), Williams B., 等人, Leukemia 19(8) :1432-8(2005), Piloto O., 等人, Cancer Res. 66(9) :4843-51(2006) Piloto O., 等人, Blood 109(4) :1643-1652(2007) 和 Brent R., 等人, AACR Annual Meeting 2007, Los Angeles(2007) 公开了对 FLT3 受体具有高结合亲和力的人拮抗剂抗体。

[0007] 一些抗 FLT3 抗体,包括 EB10、NC7 和 D4-3,抑制 FLT3 的配体依赖性(野生型受体)以及配体独立的(突变受体)活化(见 Piloto, Cancer Res., 上文)。在本发明之前,本发明的抗 FLT3 抗体的确切 CDR 序列和表位结合结构域还是未知的。

[0008] 此外,需要提供备选的抗 FLT3 抑制剂,其与本领域已知的那些抑制剂相比,对 FLT3 具有高结合亲和力并且阻断该配体与 FLT3 受体的结合,因此抑制 FLT3 的活化和其信号途径。本发明试图提供备选的抗 FLT3 抗体,其与本领域已知的那些抑制剂相比对 FLT3

具有提高的配体阻断和结合亲和力。

[0009] 还需要提供备选的抗 FLT3 抑制剂,其诱导细胞表面 FLT3 的快速和有效的内化和下调。本发明试图提供人抗 FLT3 抗体,其与本领域已知的那些抑制剂相比提供了细胞表面 FLT3 的快速和有效的内化和下调。

[0010] 还需要提供备选的抗 FLT3 抑制剂,其抑制白血病中野生型 FLT3 和 MPK、PI3K 和 STAT5 途径的下游激酶的 FL 诱导的磷酸化。本发明试图提供人抗 FLT3 抗体,其与本领域已知的那些抑制剂相比抑制白血病中野生型 FLT3 和 MPK、PI3K 和 STAT5 途径的下游激酶的 FL 诱导的磷酸化。

[0011] 此外,需要提供备选的抗 FLT3 抑制剂,其活化下游免疫效应功能如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的能力提高。本发明试图提供人抗 FLT3 抗体,其与本领域已知的那些抑制剂相比活化下游免疫效应功能如 ADCC 的能力提高。

[0012] 完全人或人源化抗体为成功作为人类治疗剂提供了最大的潜力,因为它们在人体中将比鼠类或嵌合抗体 (如 W095/07348 和 W0 98/25457) 有更小的免疫原性。本发明抗体具有这些前述特征,从而提供了重要的优势。

[0013] 在本发明之前,认识到 FLT3 抑制剂与甲氨蝶呤 (MTX) 的组合在白血病治疗中没有益处。该教条起源于如下报导:利用培养的白血病细胞系,小分子 FLT3 抑制剂和甲氨蝶呤的组合在治疗白血病中无效,而与其他化学疗法的组合有效 (Furukawa, Y. 等人, Leukemia(2007) 21 :1005-1014)。与本发明相关的实验结果表明实际上,靶定 FLT3 的抗体即 EB10 与 MTX 的组合在白血病的动物模型中导致显著提高的存活。

[0014] 本发明提供了结合人 FLT3 的 D4 或 D5 结构域内表位的抗体或其片段。

[0015] 本发明提供了治疗哺乳动物中前癌状况或者癌症的方法,包括对该哺乳动物以有效治疗前癌状况或癌症的量施用 MTX 与 FLT3 抑制剂的组合。本发明还提供了包含连接 MTX 的 FLT3 抑制剂的缀合物。

[0016] 本发明涉及人抗体和其片段,如通过表面等离子共振测定,所述抗体和其片段对于可溶性 FLT3-Fc 融合蛋白以不大于 $4.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 的亲和力结合人抗原 FLT3 (SEQ ID NO : 43)。本发明还涉及结合人抗原 FLT3 的人单克隆拮抗剂抗体和其片段。

[0017] 本发明的一个方面是结合 FLT3 的抗体或其片段,包含具有序列 GYTFTSYMH (SEQ ID NO :1) 或 SYMH (SEQ ID NO :2) 的 CDRH1、具有序列 IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO :3) 的 CDRH2、具有序列 GVGAHDADFID (SEQ ID NO :4) 或 VVAAAVADY (SEQ ID NO :5) 的 CDRH3、具有序列 RSSQSLLHSNGNNYLD (SEQ ID NO :6) 或 RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO :7) 的 CDRL1、具有序列 LGSNRAS (SEQ ID NO :8) 的 CDRL2、具有序列 MQGTHPAIS (SEQ ID NO :9) 或 MQSLQTPFT (SEQ ID NO :11) 的 CDRL3。

[0018] 本发明的一方面是结合 FLT3 的抗体或其片段,包含具有序列 GYTFTSYMH (SEQ ID NO :1) 或 SYMH (SEQ ID NO :2) 的 CDRH1、具有序列 IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO :3) 的 CDRH2、具有序列 GVGAHDADFID (SEQ ID NO :4) 的 CDRH3、具有序列 RSSQSLLHSNGNNYLD (SEQ ID NO :6) 的 CDRL1、具有序列 LGSNRAS (SEQ ID NO :8) 的 CDRL2、和具有序列 MQGTHPAIS (SEQ ID NO :9) 的 CDRL3。在再一个方面,具有前述 CDRs 的抗体在 25°C 以不大于 $4.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 的亲和力特异结合人 FLT3,如通过表面等离子共振测定。

[0019] 在本发明的另一方面,特异结合 FLT3 的抗体或其片段包含具有序

列 GYTFTSYMH(SEQ ID NO:1) 或 SYMH(SEQ ID NO:2) 的 CDRH1、具有序列 IINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:3) 的 CDRH2、具有序列 VVAAAVADY(SEQ ID NO:5) 的 CDRH3、具有序列 RSSQSLHNSGNYLD(SEQ ID NO:7) 的 CDRL1、具有序列 LGSNRAS(SEQ ID NO:8) 的 CDRL2,和具有序列 MQLQTPFT(SEQ ID NO:11) 的 CDRL3。

[0020] 在本发明的另一方面,特异结合人 FLT3 的抗体或其片段包含具有序列 GGTFSSYAIS(SEQ ID NO:12) 或 SYAIS(SEQ ID NO:13) 的 CDRH1、具有序列 GIIPFGTANYAQKFQG(SEQ ID NO:14) 的 CDRH2、具有序列 FALFGFREQAFDI(SEQ ID NO:15) 的 CDRH3、具有序列 RASQSISSYLN(SEQ ID NO:16) 的 CDRL1、具有序列 AASSLQS(SEQ IDNO:17) 的 CDRL2、和具有序列 QQSYSTPFT(SEQ ID NO:18) 的 CDRL3。

[0021] 本发明的另一方面是结合 FLT3 的抗体或其片段,并且包含具有序列:

[0022] DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDTDFTLQISRVEAEDVGVYYCMQGTHPAISFGQGRLEIK(SEQ ID NO:22) 的 VL,

[0023] 和具有序列

[0024] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGVGAHDAFDIWGQGTTVTVSS(SEQ ID NO:19) 的 VH。

[0025] 本发明的另一方面是结合 FLT3 的抗体或其片段,并且包含具有序列:

[0026] DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSLQTPFTFGPGTKVDIK(SEQ ID NO:24) 的 VL,

[0027] 和具有序列:

[0028] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWARQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARVAAAVADYWGQGTTLTVTVSS(SEQ ID NO:21) 的 VH。

[0029] 本发明的另一方面是结合 FLT3 的抗体或其片段,并且包含具有序列:

[0030] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK(SEQ ID NO:23) 的 VL,

[0031] 和具有序列:

[0032] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCATFALFGFREQAFDIWGQGTTLTVTVSS(SEQ ID NO:20) 的 VH。

[0033] 本发明的另一方面是单克隆抗体,其包含 SEQ ID NO:28 的轻链和 SEQ ID NO:25 的重链;或 SEQ ID NO:29 的轻链和 SEQ ID NO:26 的重链;或 SEQ ID NO:30 的轻链和 SEQ ID NO:27 的重链。在本发明的另一方面,抗体包含 SEQ ID NO:28 的两条轻链和 SEQ ID NO:25 的两条重链,或包含 SEQ ID NO:29 的两条轻链和 SEQ ID NO:26 的两条重链;或包含 SEQ ID NO:30 的两条轻链和 SEQ ID NO:27 的两条重链。此类抗体的 FLT3 结合片段是本发明的部分。

[0034] 本发明还涉及编码此类抗体的分离的 DNA 和其部分。本发明的其他方面包括:包含编码所述抗体或其片段的核苷酸序列的分离的多核苷酸;包含连接到表达序列的所述核苷酸序列的表达载体或者包含所述表达载体的重组宿主细胞或重组宿主细胞或其后代,其中该细胞表达所述抗体或其片段。本发明的再一个方面是产生或纯化抗体或其片段的方法,包括在允许表达所述抗体或其片段的条件下培养所述细胞。

[0035] 此外,本发明涉及抑制哺乳动物中癌细胞生长的方法和治疗哺乳动物中白血病的

方法,包括施用有效量的抗体。本发明的抗体可用于治疗瘤性疾病,包括实体瘤和非实体瘤,和用于治疗白血病。本发明的一方面是使用前述抗体或其片段作为药物。在再一方面,前述抗体或其片段将用于治疗癌症,包括但不限于白血病。本发明还提供了本发明抗体用于生产治疗癌症的药物的用途。在优选实施方案中,癌症是白血病。

[0036] 本发明的抗体可以单独使用或与抗肿瘤剂或治疗组合使用。本发明的一方面是使用前述抗体与额外的抗癌剂或治疗的组合。在再一方面,抗癌剂是甲氨蝶呤。

[0037] 天然发生的抗体通常具有两条相同的重链和两条相同的轻链,每条轻链通过链间二硫键共价连接到重链。多个二硫键进一步将两条重链相互连接。工程化的抗体可以包含对天然发生的抗体的结构和/或形式的多种改变。如本文所用,术语“抗体”包括免疫球蛋白分子,其包含4条多肽链:通过二硫键连接的两条重(H)链和两条轻(L)链。各链可以折叠成具有相似大小(110-125个氨基酸)和结构,但是具有不同功能的结构域。

[0038] 轻链可包含一个可变结构域(本文缩写为VL)和/或一个恒定结构域(本文缩写为CL)。抗体(免疫球蛋白)的轻链是 κ 或 λ 轻链。本文使用的表述VL旨在包括 κ 型轻链(V_{κ})和 λ 型轻链(V_{λ})的可变区。轻链恒定区由一个结构域CL构成。

[0039] 重链也可包含一个可变结构域(本文缩写为VH)和/或根据抗体的类别或同种型,三个或四个恒定结构域(CH1、CH2、CH3和CH4)(本文总体缩写为CH)。在人类中,该同种型IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,IgA和IgG进一步又分为亚类或亚型(IgA₁₋₂和IgG₁₋₄)。本发明包括任意上述类型或亚类的抗体。人IgG₁是本发明抗体的优选同种型。

[0040] 通常,该可变结构域在不同抗体之间显示相当多的氨基酸序列可变性,特别是在抗原结合部位处。在每个VL和VH中发现称为高可变区或者互补决定区(这里缩写为CDR)的三个区域,其由称为构架可变区(这里缩写为FR)的较少可变的区域所支持(support)。根据Kabat规则(Kabat等人Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93(1971);Kabat,等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242(1991)或Chothia规则(C. Chothia and A. M. Lesk, J. Mol. Biol. 196(4):901-917(1987).)(A. Martin, <http://www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html>))将氨基酸分配给特定CDR区域或结构域。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0041] 由VL和VH结构域组成的抗体的部分称为Fv(Fragment variable)并构成抗原结合部位。单链Fv(scFv)是在一条多肽链上含有VL结构域和VH结构域的抗体片段,其中一个结构域的N端和另一个结构域的C端通过柔性接头相连(参见,例如美国专利No. 4,946,778(Ladner等人);W088/09344,(Huston等人);W092/01047(McCafferty等人)描述了scFv片段在可溶性重组遗传展示包(比如噬菌体)表面上的展示。

[0042] 用于产生单链抗体的肽接头可以是柔性肽,其经选择以确保VL和VH结构域发生正确的三维折叠和结合。该接头一般为10至50个氨基酸残基。优选地,该接头一般为10至30个氨基酸残基。更优选地,该接头一般为12至30个氨基酸残基。最优选是15至25个氨基酸残基的接头。这些接头肽的非限制性实例是(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃。

[0043] “分离的抗体”是(1)从组分的混合中部分、基本上或完全纯化的抗体;(2)已从组分的天然环境中鉴定和分离和/或回收的抗体;(3)单克隆抗体;(4)不含来自相同物种的其他蛋白质的抗体;(5)由来自不同物种的细胞表达的抗体;或者(6)自然界不存在的抗

体。其天然环境的杂质组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,其可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质溶质。分离抗体的实例包括已经亲合纯化的抗体,由杂交瘤或其他细胞系体外产生的抗体,以及来自于转基因小鼠的人抗体。

[0044] 本文使用的术语“单克隆抗体”指获得自基本上同质的抗体群体的抗体,例如,包含基本上相同的各个抗体的群体,可能存在的天然突变或者次要翻译后变化除外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点(也称为决定簇或表位)。此外,与通常包括针对不同决定簇的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相比,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰形式“单克隆的”表示获得自基本上同质的抗体群体的抗体特性,并且不被视为需要通过任何特定方法生产抗体。

[0045] 如本文所用的术语“人抗体”包括具有对应于人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体(如 Kabat, 等人, 上文和 Chothia 等人, 上文中所述)。本发明的人抗体可包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如体外随机或位点特异性诱变引入或者体内体细胞突变引入的突变),例如在 CDR 中。人抗体可具有至少一个由氨基酸残基替换的位置,例如不由人种系免疫球蛋白序列编码的活性增强的氨基酸残基。但是,本文使用的术语“人抗体”不旨在包括其中来自于另一个哺乳动物物种种系(例如小鼠)的 CDR 序列移植于人构架序列上的抗体。

[0046] 短语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的人抗体,例如使用转染进宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体,分离自重组、组合人抗体文库的抗体,分离自对人免疫球蛋白基因转基因的动物的抗体,或者通过包括将人免疫球蛋白基因序列与其他 DNA 序列剪接的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体具有来自于人种系源免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(参见 Kabat 等人, 见上文和 Chothia 等人, 见上文)。

[0047] Fc(片段结晶区)是由成对重链恒定结构域组成的抗体部分或片段的名称。在 IgG 抗体中,例如,Fc 包含 CH2 和 CH3 结构域。IgA 或 IgM 抗体的 Fc 还包含 CH4 结构域。Fc 与 Fc 受体结合、补体介导的细胞毒性(CMC)和 ADCC 的活化相关联。对于作为多个 IgG 样蛋白质复合物的诸如 IgA 和 IgM 的抗体,复合物形成需要 Fc 恒定结构域。

[0048] 因此,本发明的抗体包括但不限于天然抗体、抗体、人抗体、人源化抗体、重组人抗体、单克隆抗体、其消化片段、特定部分和变体,包括抗体模拟物或者包含模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体部分;其各自含有至少一个 CDR。功能性片段包括结合 FLT3 抗原的抗原结合片段。例如,本发明所涵盖的能够结合 FLT3 或其部分的抗体片段包括二价片段例如具有完整链内二硫键的(Fab')₂,单价片段例如 Fab(抗原结合片段),其表示由 VL、CL、VL、CH1 结构域组成并且未保留重链铰链区(例如通过木瓜蛋白酶消化)的抗体片段,保留重链铰链区的 fabs, facb(例如通过纤维蛋白溶酶消化),F(ab')₂, 缺少二硫键的 Fab', pFc'(例如通过胃蛋白酶或纤维蛋白溶酶消化),Fd(例如通过胃蛋白酶消化,部分还原和再聚集)以及 Fv 或 scFv(例如通过分子生物学技术)。抗体片段还旨在包括,例如结构域缺失的抗体、线性抗体、单链抗体、scFv、单结构域抗体、多价单链抗体、由抗体片段形成的多特异性抗体,包括特异性结合抗原的双抗体、三抗体等。

[0049] 铰链区将抗体的 Fab 和 Fc 部分分开,提供了 Fab 彼此之间以及相对于 Fc 的可动性,以及包括多个二硫键用以两个重链的共价连接。

[0050] 已经开发了保留结合特异性,但是具有希望的其他特征,包括例如双特异性、多价(多于两个结合位点)和紧凑尺寸(例如仅仅结合结构域)的抗体形式。

[0051] 本发明的抗体是 FLT3 特异性的。抗体特异性指抗体选择性识别抗原的特定表位。例如,本发明的抗体可以是单特异性的或双特异性的。双特异性抗体(BsAb)是具有两种不同抗原结合特异性或位点的抗体。在抗体具有超过一种的特异性时,所识别的表位可以与单个抗原或者与多于一个的抗原相关联。因此,本发明提供了结合两种不同抗原的双特异性抗体,其具有至少一种对 FLT3 的特异性。如上所述,此类抗体包括其任何片段。

[0052] 可以根据亲和力和/或亲合力确定本抗体或其片段对 FLT3 的特异性。由抗原与抗体解离的平衡常数(K_D)代表的亲和力度量抗原决定簇与抗体结合部位之间的结合强度。

[0053] 本发明的抗体或其片段结合到 FLT3 的表位,该表位可以包含 FLT3 的五个细胞外结构域区段(下文中简称为“结构域”或“ECD”),即 D1、D2、D3、D4 和 D5 的任一个。本发明的抗体或其片段结合的表位在结构域 D4 或 D5 内。抗体 EB10 和 D4-3 结合到 FLT3 的结构域 4 内的表位,而 NC7 结合到 FLT3 的结构域 5 内的表位。如本文所用的术语“表位”指被本发明抗体识别的抗原上的分散的三维位点。表位是复杂抗原上的免疫活性区域,实际结合 B 细胞受体的区域,并且实际上被 B 细胞产生的抗体分子结合。抗原通常含有至少一个表位并且通常多于一个表位。蛋白质抗原上的表位可以是线性或非线性的。线性表位是包含蛋白质氨基酸序列中连续氨基酸残基的那些表位。线性表位可以需要或不需要构象折叠以形成天然的三维结构并引起免疫应答,该免疫应答产生对所述抗原具有结合特异性的抗体。非线性表位包含非连续的氨基酸残基。从而,非线性表位需要一定程度的蛋白质折叠来使必要的氨基酸残基相互接近,以形成天然的三维结构并引起免疫应答,该免疫应答产生对所述抗原具有结合特异性的抗体。

[0054] 本发明的抗体或其片段结合野生型或突变的 FLT3。FLT3,例如,突变或野生型的 FLT3 经常在 AML 和 ALL 以及其他白血病中表达。它在约三分之一的急性 AML 患者中突变,该突变是由于近膜域的内部串联重复(ITD)或者由于通常涉及激酶结构域(KD)的点突变引起。两种类型的突变都组成型活化 FLT3。除了干扰 FLT3 信号转导,抗 FLT3 抗体还诱导 ADCC,作为诱导细胞毒性的额外机理。

[0055] 本发明的抗体或其片段还包括通过定向突变;亲合力成熟、噬菌体展示或者链改组(chain shuffling)的方法修饰或改善结合特征的那些。可通过突变 CDR 和/或 FW 残基和筛选具有所需特征的抗体结合部位来修饰或改善亲和力和特异性(参见,例如 Yang 等人, J. Mol. Biol., 254 :392-403(1995))。CDR 以多种方式突变。一种方式是将各个残基或残基组合随机化,使得在否则相同的抗体结合部位的群体中,二到二十种氨基酸的子集存在于特定位置上。备选地,可以通过易错 PCR 方法在残基范围内诱导突变(参见例如 Hawkins 等人, J. Mol. Biol. 226 :889-96(1992))。在另一实例中,含有重链和轻链可变区基因的噬菌体展示载体可以在大肠杆菌(E. coli)突变体菌株中增殖(参见,例如 Low 等人, J. Mol. Biol., 250 :359-368(1996))。这些诱变方法是本领域技术人员已知的许多方法的示例。

[0056] 产生替代变体的一种便利方法是使用噬菌体展示的亲和力成熟。简言之,突变几个 CDR 区域的位点,产生每个位点所有可能的氨基酸替代。由此产生的抗体变体作为在每个颗粒中包装的与 M13 的基因 III 产物的融合物以单价形式展示于丝状噬菌体颗粒。然后,针对本文公开的生物学活性(例如结合亲和力、特异性、IC50、EC50、 K_D)筛选噬菌体展示变

体。为了鉴定用于修饰的候选 CDR 区域位点,可进行丙氨酸扫描诱变,以鉴定对抗原结合有显著贡献的 CDR 区域残基。备选地或者另外地,可在一个或多个残基位置对一个或多个 CDR 序列进行随机诱变,而 CDR 有效连接可变区或者 CDR 独立于其他可变区序列,然后使用重组 DNA 技术将改变的 CDR 回复到可变区。一旦产生并表达这些变体抗体,如本文所述对变体组进行筛选,可选择在一个或多个相关测定中具有优越性能的抗体用以进一步开发。

[0057] 除了本文具体描述的抗体之外,可利用本领域技术人员公知的多种重组 DNA 技术容易地设计和生产其他“基本上均匀的”经修饰抗体。例如,构架区在一级结构水平上可与天然序列相差数个氨基酸替代、末端和中间添加和缺失等。此外,多种不同的人构架区可单独或组合用作本发明人源化免疫球蛋白的基础。一般说来,基因的修饰可通过多种公知技术例如位点定向诱变容易地实现。

[0058] 本发明包括 FLT3 结合多肽,其具有基本上与该全长抗 FLT3 抗体的可变区或高变区所述的氨基酸序列相同的氨基酸序列。基本上相同的氨基酸序列在本文中定义为与另一个氨基酸序列有至少 70%,优选至少约 80%,更优选至少约 90% 同源性,如根据 Pearson 和 Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :2444-8(1988)) 的 FASTA 检索方法所确定的。此外,本发明包括保守氨基酸替代,其保留当前公开的抗体的功能特征。

[0059] 本发明包括编码抗 FLT3 抗体重链的核酸序列,其包含本文公开的任一 VH 区或其部分,或者任一 VH CDR,包括其任何变体。本发明也包括编码抗 FLT3 抗体轻链的核酸分子,其包含本文公开的任一 VL 区或其部分,或者任一 VL CDR,包括其任何变体。

[0060] 本发明抗体的每个结构域可以是具有重链或轻链可变结构域的完整抗体,或者可以是功能等同物或者天然结构域的突变体或衍生物,或者构建的合成结构域,例如体外使用例如 WO 93/11236 (Griffiths 等人) 所述的技术。例如,可能将缺少至少一个氨基酸的对应于抗体可变结构域的结构域连接在一起。还包括具有 CDR 序列之一中一个或多个氨基酸替代、突变或缺失的抗体。重要特征性特点是每个结构域与互补结构域相关联形成抗原结合部位的能力。因此,术语可变重链和轻链片段不应解释为排除不具有对特异性有实质作用的物质的变体,包括 CDR 的变体。

[0061] 本发明的抗体可以通过本领域已知的方法产生。这些方法包括 Kohler 和 Milstein, Nature 256 :495-497 (1975) 以及 Campbell, Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas, Burdon 等人编著, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 第 13 卷, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985) 所述的免疫学方法和 Huse 等人, Science 246 :1275-1281 (1989) 所述的重组 DNA 方法。所述抗体也可以从噬菌体展示文库得到,该文库带有 scFv 或 Fab 形式的 VH 和 VL 结构域的组合。VH 和 VL 结构域可以由合成的、部分合成的或者天然得到的核苷酸编码。在一些实施方案中,可以优选带有人抗体片段的噬菌体展示文库。人抗体的其他来源是经改造而表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。

[0062] 可通过切割整个抗体或者通过表达编码该片段的 DNA 来产生抗体片段。可通过 Lamoyi 等人, J. Immunol. Methods 56 :235-243 (1983) 和 Parham, J. Immunol. 131 :2895-2902 (1983) 所述的方法制备抗体片段。这些片段可含有一个或两个 Fab 片段或者 F(ab')₂ 片段。这些片段还可含有单链片段可变区抗体,即 scFv、双抗体或者其他抗体片段。产生这些功能等同物的方法公开于 PCT 申请 WO 93/21319、欧洲专利申请号 239,400 ;

PCT 申请 WO 89/09622 ;欧洲专利申请 338,745 ;以及欧洲专利申请 EP 332,424。在说明书全文中,无论是否特别指出,本发明的术语“抗体”包括其任何片段。

[0063] 用于转化载体和表达本发明抗体的优选宿主细胞是哺乳动物细胞,例如 NSO 细胞(非分泌(0)小鼠骨髓瘤细胞)、293 和 CHO 细胞以及其他淋巴来源的细胞系,例如淋巴瘤、骨髓瘤或杂交瘤细胞。可备选使用其他真核宿主,例如酵母。

[0064] 本发明提供了对 FLT3 特异的分离的抗体或其片段。本发明的抗体能够具有一种或多种下面的活性:1) 展示对 FLT3 的高亲和性结合;2) 阻断配体与 FLT3 受体的结合,从而抑制 FLT3 的活化和其信号途径;3) 诱导细胞表面 FLT3 的快速和有效内化和下调;4) 抑制白血病中野生型 FLT3 和 MPK、PI3K 和 STAT5 途径的下游激酶的 LF 诱导的磷酸化;5) 在人体中展示降低的免疫原性;6) 展示提高的活化下游免疫效应功能如抗体依赖性细胞毒性(ADCC) 的能力;7) 诱导 FLT3 受体内化和 8) 在体外和体内抑制肿瘤生长。在本发明的一方面,本发明的抗 FLT3 抗体是显示一种或多种下面性质(在说明书全文包括实施例中进一步阐明)的人抗体:

[0065] (i) 抑制 FLT3 配体 (FL) 与野生型 FLT3 的结合;

[0066] (ii) 抑制 FL 与内部串联重复突变 FLT3 (FLT3-ITD) 的结合;

[0067] (iii) 结合到 FLT3 的结构域 4 和 / 或结构域 5 内的表位;

[0068] (iv) 中和 FLT3 的 FL 活化;

[0069] (v) 独立于 FL 中和 FLT3 活化;

[0070] (vi) ADCC 的介导;

[0071] (vii) FLT3 的内化;

[0072] (viii) 表面 FLT3 的减少;或

[0073] (ix) 以不大于约 $4.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 的 K_D 结合 FLT3。

[0074] 本发明的抗体结合到 FLT3 的外部结构域并且抑制 FL 与 FLT3 的结合。例如,通过直接结合测定法,使用纯化的或膜结合的受体可以测定抑制。在一个实施方案中,本发明的抗体或其片段优选至少与 FLT3 的天然配体一样强地结合 FLT3。

[0075] 本发明的抗体中和 FLT3。中和通过多种机理发生。一种此类机理是 FL 结合到 FLT3 的细胞外结构域,其刺激 β 亚基的自磷酸化和 FLT3 的底物,包括下游途径 STAT5、Akt、PI3K 和 MAPK 的磷酸化。FLT3 的中和也包括通常与信号转导有关的一种或多种这些活性的抑制、减少、失活和 / 或破坏。此外,中和包括 FLT3 异二聚体以及 FLT3 同二聚体的抑制。因此,中和 FLT3 具有多种效应,包括生长(增殖和分化)、血管发生(血管募集、侵入和转移)和细胞运动性和转移(细胞粘附和侵入)的抑制、减少、失活和 / 或破坏。通过经由但不限于所公开的多种机理中和 FLT3,本发明的抗体降低了 FLT3 激酶活性,从而抑制疾病发展。

[0076] FLT3 中和的一种测量是抑制受体的酪氨酸激酶活性。使用公知的方法,例如,通过测量重组激酶受体的自磷酸化水平,和 / 或天然或合成底物的磷酸化,可以测定酪氨酸激酶抑制。从而,磷酸化测定法可用于测定本发明背景中的中和抗体。例如,使用在 ELISA 测定中或在蛋白质印迹上对磷酸酪氨酸特异的抗体,可以检测磷酸化。酪氨酸激酶活性的一些测定法在 Panek 等人, J. Pharmacol. Exp. Thera. 283 :1433-44 (1997) 和 Batley 等人, Life Sci. 62 :143-50 (1998) 中描述。本发明的抗体引起应答配体的细胞中 FLT3 的酪氨酸磷酸化显著降低至少约 60%、优选至少约 75%,更优选至少约 85-90%。

[0077] FLT3 中和的另一种度量是抑制 FLT3 下游底物的磷酸化。因此,可以测量 STAT5、PI3K、Akt 或 MAPK 的磷酸化水平。

[0078] 此外,检测蛋白质表达的方法可以用于测定 FLT3 中和,其中被测量的蛋白质受到 FLT3 酪氨酸激酶活性的调节。这些方法包括用于检测蛋白质表达的免疫组织化学 (IHC)、用于检测基因扩增的荧光原位杂交 (FISH)、竞争性放射性配体结合测定法、固体基质印迹技术,如 RNA 和 DNA 印迹、反转录酶聚合酶链式反应 (RT-PCR) 和 ELISA。见,例如,Grandis 等人, *Cancer* 78 :1284-92(1996) ;Shimizu 等人, *Japan J. Cancer Res.* 85 :567-71(1994) ;Sauter 等人, *Am. J. Path.* 148 :1047-53(1996) ;Collins, *Glia* 15 :289-96(1995) ;Radinsky 等人, *Clin. Cancer Res.* 1 :19-31(1995) ;Petrides 等人, *Cancer Res.* 50 :3934-39(1990) ;Hoffmann 等人, *Anticancer Res.* 17 :4419-26(1997) ;Wikstrand 等人, *Cancer Res.* 55 :3140-48(1995)。

[0079] 体内测定法也可以用于测定 FLT3 中和。例如,通过促有丝分裂测定法,使用受体配体刺激的细胞系,在抑制剂存在和不存在下观察受体酪氨酸激酶抑制。一种方法涉及测试表达 FLT3 的肿瘤细胞或者经转染而表达 FLT3 的细胞的生长抑制。也可以使用肿瘤模型,如注射到小鼠中的人肿瘤细胞观察抑制。

[0080] 本发明不限于 FLT3 中和的任何具体机理。本发明的抗 FLT3 抗体可以 (1) 外在地结合到 FLT3 细胞表面受体, (2) 阻断与 FL 的结合和随后通过受体相关的酪氨酸激酶介导的信号转导,和 (3) 防止该信号转导级联中 FLT3 和其他下游蛋白质的磷酸化。

[0081] 在另一实施方案中,本发明的抗体下调 FLT3。细胞表面上存在的 FLT3 的量取决于受体蛋白质产生、内化和降解。细胞表面上存在的 FLT3 的量可以通过检测受体或结合到受体的分子的内化而直接测量。例如,可以通过将表达 FLT3 的细胞与经标记的抗体接触或用该抗体包被来测定受体内化。然后剥离、收集并计数膜结合的抗体。通过裂解细胞并检测经标记的组分来测定抗体的内化。

[0082] 通过用抗 FLT3 抗体或其他物质处理后测量细胞上存在的受体的量,例如,通过对经染色细胞进行荧光激活细胞分选分析 FLT3 的表面表达,可以直接测量细胞表面上存在的 FLT3 的量。将染色细胞温育并随时间测量荧光强度。作为对照,可以在受体内化停止的条件下温育部分被染色群体。

[0083] 如下面的实施例所述,可以使用对 FLT3 特异并且不阻断或竞争被测试抗体结合的不同抗体检测和测量细胞表面 FLT3 (Burtrum, 等人, *Cancer Res.* 63 :8912-21 (2003))。在一个实施方案中,用本发明抗体处理表达 FLT3 的细胞导致细胞表面 FLT3 的减少。

[0084] 下调的另一度量是细胞中存在的总受体蛋白质的减少,并且反映了内部受体的降解。因此,用本发明抗体的处理细胞 (尤其癌细胞) 导致总细胞 FLT3 的显著减少。

[0085] 本发明的抗体抑制肿瘤生长。例如,通过向免疫缺陷小鼠注射癌细胞系的细胞可以建立皮下异种移植物肿瘤。然后通过腹膜内注射抗体处理小鼠并以规则间隔测量肿瘤大小。与对照注射相比,本发明的抗体抑制肿瘤生长。在一个实施方案中,本发明的抗体当与抗肿瘤剂组合时促进肿瘤消退。在另一实施方案中,本发明的抗体当以单一疗法使用时促进肿瘤消退。促进肿瘤消退指施用有效量的抗体或有效量的抗体和抗肿瘤剂的组合导致肿瘤尺寸的减小或肿瘤坏死。肿瘤消退可以作为经历具体治疗方案的受试者组的平均值测量,或者可以通过肿瘤消退的治疗组中受试者数目来测量。

[0086] 本发明的抗体可通过本领域中任何已知方法分离或纯化,包括通过硫酸铵或硫酸钠沉淀,然后对盐水进行透析;离子交换层析;亲和或免疫亲和层析以及凝胶过滤或区带电泳。本发明抗体的优选纯化方法是蛋白 A 亲和层析。

[0087] 编码人抗体的 DNA 可通过重组除了 CDR 之外的编码基本上或排他地来源于对应人抗体区域的人恒定区和可变区的 DNA 以及编码来源于人的 CDR 的 DNA 来制备。

[0088] 编码抗体片段的合适 DNA 来源包括表达全长抗体的任何细胞,例如杂交瘤和脾细胞。该片段本身可用作抗体等同物,或者可重组为如上所述的等同物。该部分中所述的 DNA 缺失、重组和其他技术可通过公知方法进行。如本领域中已知的,另一个 DNA 来源是抗体的噬菌体展示文库。本发明举例的抗体通过噬菌体展示技术制备。

[0089] 另外,本发明提供了含有与表达序列、启动子和增强子序列有效连接的上述多核苷酸序列的表达载体。已经开发了用于在原核体系(例如细菌)和真核体系(包括但不限于酵母和哺乳动物细胞培养体系)中有效合成抗体多肽的多种表达载体。本发明的载体可包含染色体区段、非染色体和合成 DNA 序列。

[0090] 可使用任何合适的表达载体。例如,原核克隆载体包括来自大肠杆菌的质粒,例如 colE1, pCR1, pBR322, pMB9, pUC, pKSM 和 RP4。原核载体还包括噬菌体 DNA 的衍生物例如 M13 以及其他丝状单链 DNA 噬菌体。可用于酵母的载体实例有 2 μ 质粒。用于在哺乳动物细胞中表达的合适载体包括公知的 SV-40 衍生物、腺病毒、反转录病毒来源的 DNA 序列和来源于功能性哺乳动物载体组合的穿梭载体,例如上文所述的那些,以及功能性质粒和噬菌体 DNA。

[0091] 其他真核表达载体是本领域中已知的(例如 P. J. Southern 和 P. Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1:327-41(1982); Subramani 等人, Mol. Cell. Biol. 1:854-64(1981); Kaufmann and Sharp, J. Mol. Biol. 159:601-21(1982); Kaufmann 和 Sharp, Mol. Cell. Biol. 159:601-64(1982); Scallan 等人, Proc. Nat. l Acad. Sci. 80:4654-59(1983); Urlaub 和 Chasin, Proc. Nat. l Acad. Sci. 77:4216-20(1980))。

[0092] 可用于本发明的表达载体含有至少一个表达控制序列,其有效连接待表达的 DNA 序列或片段。将控制序列插入载体,以控制和调节所克隆的 DNA 序列的表达。可用的表达控制序列实例有 lac 系统、trp 系统、tac 系统、trc 系统、 λ 噬菌体的主要操纵基因和启动子区域、fd 衣壳蛋白的控制区、酵母糖酵解启动子例如 3-磷酸甘油酸激酶、酵母酸性磷酸酶启动子例如 Pho5、酵母 α 交配因子启动子、以及来源于多瘤病毒、腺病毒、反转录病毒和猿猴病毒的启动子例如早期和晚期启动子或 SV40,以及已知控制基因在原核或真核细胞以及它们的病毒表达的其他序列或者其组合。

[0093] 当希望在酵母中表达基因构建体时,用于酵母的合适选择基因是在酵母质粒 YRp7 中存在的 trp1 基因。Stinchcomb 等人 Nature, 282:39(1979); Kingsman 等人, Gene, 7:141(1979)。trp1 基因提供了缺少在色氨酸中生长的能力的突变酵母菌株的选择标记,例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1。Jones, Genetics, 85:12(1977)。因此,酵母宿主细胞基因组中 trp1 损伤的存在提供了用于通过在缺乏色氨酸时生长检测转化的有效环境。类似地,Leu2 缺乏酵母菌株(ATCC 20,622 或 38,626)由带有 Leu2 基因的已知质粒来补偿。

[0094] 本发明还提供了含有上述表达载体的重组宿主细胞。本发明抗体可在杂交瘤之外的细胞系中表达。包含编码本发明多肽的序列的核酸可用于转化合适的哺乳动物宿主细

胞。

[0095] 根据高水平表达、组成型表达目的蛋白质以及来自宿主蛋白质的最少的污染来选择具体的细胞系。可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域公知的,包括许多永生化细胞系,例如但不限于 COS-7 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞和许多其他细胞,包括淋巴来源的细胞系,如淋巴瘤、骨髓瘤或杂交瘤细胞。其他合适真核细胞包括酵母及其他真菌。可用的原核宿主包括,例如大肠杆菌,例如大肠杆菌 SG-936、大肠杆菌 HB 101、大肠杆菌 W3110、大肠杆菌 X1776、大肠杆菌 X2282、大肠杆菌 DHI 和大肠杆菌 MRC1,假单胞菌属 (*Pseudomonas*),芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 例如,枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。

[0096] 这些重组宿主细胞可用于产生抗体或其片段,其通过在允许该抗体或其片段表达的条件下培养该细胞以及从该宿主细胞或宿主细胞周围的培养基中纯化该抗体或其片段来进行。可通过在目的抗体编码基因的 5' 端插入信号或分泌前导肽编码序列来利于所表达的抗体或片段在重组宿主细胞中靶向分泌 (参见, Shokri 等人, *Appl Microbiol Biotechnol.* 60 :654-64 (2003) ;Nielsen 等人, *Prot. Eng.* 10 :1-6 (1997) ;和 von Heinje 等人, *Nucl. Acids Res.* 14 :4683-90 (1986))。这些分泌前导肽成分可来源于原核或真核序列。因此,适当地使用分泌前导肽,连接于多肽 N 端的氨基酸,以引导多肽从宿主细胞胞质溶胶中移出并分泌进入培养基。

[0097] 转化的宿主细胞通过本领域中已知的方法培养于含有可同化碳源 (糖类例如葡萄糖或乳糖)、氮源 (氨基酸、肽、蛋白质或其降解产物例如蛋白胨、铵盐等) 以及无机盐 (钠、钾、镁和钙的硫酸盐、磷酸盐和 / 或碳酸盐) 的液体培养基中。该培养基还含有,例如,生长促进物质,例如微量元素,例如铁、锌、锰等。

[0098] 本发明的抗体可以与另外的氨基酸残基融合。这些氨基酸残基可以是肽标签,可能便于分离。还可考虑其他使得该抗体归巢到具体器官或组织的氨基酸残基。

[0099] 制备本发明抗体的另一个实施方案是在转基因动物中表达编码本发明抗体的核酸,该转基因动物具有插入的人抗体产生基因组的实质部分并且缺乏内源抗体的产生。转基因动物包括但不限于小鼠、山羊和兔。本发明的另一个实施方案包括在例如动物乳腺中表达抗体编码基因,从而在哺乳过程中分泌该多肽。

[0100] 如下面的实施例中所述,可以从自人重链和轻链可变区基因构建的噬菌体展示文库分离本发明的高亲和力抗 FLT3 抗体。例如,可以从含有重排的可变区基因的外周血淋巴细胞得到本发明的可变结构域。备选地,可变结构域部分,如 CDR 和 FW 区可以来自不同的人序列。三轮选择后超过 90% 的回收克隆对 FLT3 是特异的。对筛选的 Fab 的 FLT3 的结合亲和力可以在 nM 范围内,其与使用杂交瘤技术产生的许多二价抗 FLT3 单克隆抗体一样高。

[0101] 本发明的抗体可以例如从自然发生的抗体或 Fab 或 scFv 噬菌体展示文库得到。通过从天然发生的抗体或杂交瘤选择 VH 或 VL 结构域或从 VH 结构域文库或 VL 结构域文库选择可以得到单结构域抗体。可以理解为单结构域抗体结合的主要决定簇的氨基酸残基可以在 Kabat 或 Chothia 定义的 CDR 内,但是也可以包括其他残基,如否则将埋藏在 VH-VL 异二聚体的 VH-VL 界面中的残基。

[0102] 本发明的抗体还包括通过定向突变;亲和力成熟、噬菌体展示或者链改组 (chain shuffling) 的方法改善结合特征的那些。可通过突变 CDR 和筛选具有所需特征的抗

体结合部位来修饰或改善亲合力和特异性（参见，例如 Yang 等人，J. Mol. Biol.，254：392-403(1995)）。CDR 以多种方式突变。一种方式是将各个残基或残基组合随机化，使得在否则相同的抗体结合部位的群体中，所有二十种氨基酸存在于特定位置上。作为替代地，可以通过易错 PCR 方法在 CDR 残基范围内诱导突变（参见例如 Hawkins 等人，J. Mol. Biol.，226：889-896(1992)）。例如，含有重链和轻链可变区基因的噬菌体展示载体可以在大肠杆菌（E. coli）突变体菌株中扩增（参见，例如 Low 等人，J. Mol. Biol.，250：359-368(1996)）。这些诱变方法是本领域技术人员已知的许多方法中的示例。

[0103] 用于鉴定本发明的 FLT3 结合抗体的蛋白质优选为 FLT3，更优选为 FLT3 的胞外结构域。FLT3 胞外结构域可以为游离的或者缀合到另一分子。

[0104] 本发明的抗体可以融合到额外的氨基酸残基。此类氨基酸残基可以是肽标记，可能方便分离。也预期用于将抗体归巢到特定器官或组织的其他氨基酸残基。

[0105] 在本发明的另一方面，抗 FLT3 抑制剂，包括但不限于本发明的抗体，可以与抗肿瘤剂或抗血管发生剂或者可检测的信号产生剂结合施用或者通过化学或生物合成方法连接后施用。如下文示例，本发明的抗体当结合到带有 FLT3 的细胞时被有效内化。与抗体结合或缀合或连接施用的抗肿瘤剂包括任何物质，其破坏或损害抗体已经结合的肿瘤或者在抗体已经结合的细胞环境中的肿瘤。一方面，抗 FLT3 抑制剂，包括本发明抗体，可以作为缀合物施用，该缀合物特异结合受体并在配体-毒素内化后递送毒素。另一方面，FLT3 抑制剂-抗肿瘤剂缀合物可以直接相互连接或者通过接头、肽或非肽结合。例如，抗肿瘤剂是毒性剂，如化学治疗剂或放射性同位素。合适的抗肿瘤剂是本领域技术人员已知的并且包括蒽环类抗生素（例如，道诺霉素和阿霉素）、auristatin、甲氨蝶呤（MTX）、长春地辛、新制癌菌素、顺铂、苯丁酸氮芥、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、苯丙氨酸氮芥、蓖麻毒蛋白和加利车霉素。使用常规方法将化学治疗剂缀合到抑制剂、抗体或小分子（见例如，Hermentin and Seiler, Behring Inst. Mitt. 82：197-215(1988)）。在一方面，MTX 是本发明的优选抗肿瘤剂。

[0106] 本发明还设想连接到靶标或报道分子部分的抗 FLT3 抗体，所述靶标或报道分子部分包括例如仅仅抗肿瘤剂、其他抗体或报道分子，如诊断系统中的放射性标记的同位素，其中可检测的信号产生物质缀合到抗体。

[0107] 可检测的信号产生物质可在体内和体外用于诊断目的。信号产生物质产生可测量的信号，其通过外部手段，通常通过测量电磁辐射可以检测。通常，信号产生物质是酶或生色团，或通过荧光、磷光或化学发光而发射。生色团包括在紫外或可见区吸收光的染料，并且可以是底物或酶催化的反应的降解产物。

[0108] 本发明还设想连接靶标或报道分子部分的抗 FLT3 抗体。靶标部分是结合对的第一个成员。例如，抗肿瘤剂缀合到这种对的第二个成员，并从而被导向抗 FLT3 抗体结合的部位。此类结合对的常见实例是抗生物素蛋白和生物素。在优选实施方案中，生物素缀合到抗 FLT3 抗体，从而提供抗肿瘤剂或其他部分的靶标，所述肿瘤剂或其他部分缀合到抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。备选地，生物素或另一此类部分连接到本发明的抗 FLT3 抗体并用作例如诊断系统中的报道分子，其中可检测的信号产生剂缀合到抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。

[0109] 用作抗肿瘤剂的合适的放射性同位素也是本领域技术人员已知的。例如，使用 ¹³¹I

或 ^{211}At 。使用常规技术将这些同位素连接到抗体（见例如，Pedley 等人，Br. J. Cancer 68 : 69-73(1993)）。备选地，连接到抗体的抗肿瘤剂是活化前体药物的酶。这样，施用前体药物，其保持无活性形式直到到达肿瘤部位，在那里一旦施用抗体复合体，它就被转化为其细胞毒素形式。实践中，将抗体-酶缀合物施用于患者并允许定位于待治疗的组织区中。然后对患者施用前体药物使得在待治疗的组织区域中发生细胞毒性药物的转化。备选地，缀合到抗体的抗肿瘤剂是细胞因子，如白介素-2(IL-2)、白介素-4(IL-4) 或肿瘤坏死因子 α (TNF- α)。抗体将细胞因子靶向肿瘤使得细胞因子介导肿瘤的破坏或损坏而不影响其他组织。使用常规重组 DNA 技术，将细胞因子在 DNA 水平上融合到抗体。

[0110] 本发明还提供了通过对哺乳动物施用有效量的如前述的抗体来治疗哺乳动物中肿瘤生长的方法。根据本发明待治疗的合适条件涉及优选表达 FLT3 的细胞。不希望限于任何具体机理，本发明方法提供了治疗癌细胞生长，包括 FLT3 刺激的肿瘤生长、器官移植排斥或免疫疾病如自身免疫病。

[0111] 本发明上下文中的“治疗”指治疗性处理，包括抑制、减缓、减轻或逆转与疾病或病症相关的下列病症或非预期生理变化的进程，改善病症的临床症状或者预防病症临床症状的出现。有益或希望的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病或障碍程度的降低或者疾病或障碍稳定（即，疾病或障碍不恶化）、疾病或障碍发展延迟或减缓、疾病或障碍的改善或缓和、以及疾病或障碍的缓解（部分或全部），不论是可检出的或不可检出的。“治疗”还可表示，与未接受治疗时的预期存活相比，存活延长。需要治疗的包括已患疾病的那些。在一个实施方案中，本发明可用作药物。

[0112] 待治疗的一种前癌状况是骨髓增生异常综合征。其他待治疗的癌包括但不限于血液恶性肿瘤，如白血病，如原始细胞危象中的 AML、ALL 和 CML 等等。其他白血病包括表 9 中的那些，其列出了从所选的白血病细胞系的 EB10 染色得到的所选人白血病细胞系中 FLT3 的表达。癌症也可以是实体瘤，如甲状腺或者脑肿瘤。

[0113] 在本发明方法中，向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本发明抗体。用于治疗本文该疾病的本发明组合物的有效剂量根据许多不同因素而不同，所述因素包括施用方式、目标部位、患者生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物以及治疗是治疗性的还是预防性的。本文使用的术语施用表示通过可实现所追求结果的任何方法将本发明抗体递送至哺乳动物。它们可通过例如静脉内或肌肉内施用。尽管本发明的人抗体特别适合用于施用给人，但是它们也可施用给其他哺乳动物。本文使用的术语哺乳动物旨在包括但不限于人、实验动物、家庭宠物和家畜。治疗有效量表示在施用给哺乳动物时有效产生所需治疗作用例如抑制肿瘤生长的本发明抗体量。可使用本领域技术人员已知的常规方法滴定 (titrate) 治疗剂量，以优化安全性和有效性。

[0114] 本发明的药物组合物可包括“治疗有效量”的本发明抗 FLT3 抗体。“治疗有效量”表示在给药时以及所需的时间段内有效实现所需治疗结果的量。抗体的治疗有效量可根据例如下列因素而变化，该因素例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及抗体或抗体部分在个体中引发所需应答的能力。治疗有效量也为：其治疗有益作用超过了抗体或抗体部分任何有毒或有害作用。可调节给药方案以提供最佳的所需应答（例如治疗或预防性应答）。

[0115] 以足以抑制或减少肿瘤或病理状态发展的量，向有需要的患者施用本发明的抗

FLT3 抗体用于治疗性治疗。发展包括,例如肿瘤或病理状况的生长、侵袭、转移和 / 或复发。足以实现这些的量定义为治疗有效剂量。有效实现此用途的量将取决于疾病的严重程度和患者自身免疫系统的整体状态。给药方案也会随着疾病状态和患者状态的变化而变化,通常从单次浓注给药或连续输注至每天多次施用(例如每 4-6 小时),或者根据给予治疗的医生和患者状态所示。本发明抗体治疗有效量的示例性非限制性范围是 0.1-50mg/kg,更优选 3-35mg/kg,更优选 5-20mg/kg。给药量和频率将由治疗患者的医生来确定,可包括每天、每周三次、每周、每两周一次或者频率更低地给予小于 1mg/kg 至高于 100mg/kg 的剂量。每次施用的剂量可以在 1-100、2-75 或 5-60mg/kg 的范围内。然而,应当指出本发明不限于任何特定的剂量。

[0116] 在备选实施方案中,本发明也包括抑制树突细胞活化或者成熟的方法,包括将树突细胞与本发明的抗体单独或者与其他物质的组合接触。本发明的另一方法包括预防器官移植排斥或治疗自身免疫病,如多发性硬化或脑炎,包括施用仅仅本发明的抗体或与其他物质的组合。

[0117] 在本发明的一个实施方案中,抗 FLT3 抗体可以与一种或多种其他抗肿瘤剂组合施用。对于组合疗法的实例,见例如,美国专利号 6,217,866 (Schlessinger 等人, Anti-EGFR antibodies in combination with anti-neoplastic agents); WO 99/60023 (Waksal 等人, Anti-EGFR antibodies in combination with radiation)。可以使用任何合适的抗肿瘤剂,如化学治疗剂、放射或其组合。

[0118] 本领域当前已知或者被评估的抗肿瘤剂可以被分成多种类别,包括例如,有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、抗存活剂、生物应答调节剂、抗激素、和抗血管发生剂。烷化剂的实例包括但不限于,顺铂、环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥和达卡巴嗪。抗代谢物的实例包括但不限于,阿糖胞苷、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、吉西他滨、**ALIMTA®**和拓扑异构酶抑制剂伊立替康(CPT-11)、氨基喜树碱、喜树碱、DX-8951f、拓扑替康(拓扑异构酶 I)、依托泊苷(VP-16),和替尼泊苷(VM-26)(拓扑异构酶 II)。当该抗肿瘤剂是放射时,该放射的来源可以是在待治疗患者的外部(外粒子束放射疗法(external beam radiation therapy-EBRT))或者内部(近距离放射治疗(brachytherapy-BT))。所施用的抗肿瘤剂的剂量取决于多个因素,包括例如药物类型、待治疗肿瘤类型和严重程度以及该药物的施用途径。然而应强调本发明不限于任何特定的剂量。

[0119] 在本发明的一方面,MTX 是与本发明抗体组合的待给予的优选抗肿瘤剂。本文提供的数据阐明与 MTX 组合的抗 FLT3 抗体 EB10 的协同作用。考虑到 Furukawa 等人 (Leukemia 21:1005-1014 (2007)) 公开的体外工作,该组合是尤其新颖和出乎意料的,所述工作报导了同时施用 FLT3 抑制剂 PKC412 与其他化学治疗剂(排除 MTX)对 FLT3 白血病在临床上有效。

[0120] 在本发明中,任何合适的方法或途径可以用于施用本发明的抗 FLT3 抗体和任选地,共同施用抗肿瘤剂和 / 或其他受体的拮抗剂。在本发明的组合疗法中,抗 FLT3 抗体可以在用另一药物开始治疗之前、期间或之后施用,所述药物包括例如,仅仅 MTX,以及其任一组合,即在开始抗肿瘤剂疗法之前和期间、之前和之后、期间和之后,或之前、期间和之后。例如,抗 FLT3 抗体可以在开始放射疗法前 1 到 30 天、优选 3 到 20 天、更优选 5 到 12 天之间

施用。在本发明的优选实施方案中,化学疗法与抗体疗法同时施用,更优选在抗体疗法随后施用。

[0121] 在本发明的另一方面,任一 FLT3 抑制剂可以与 MTX 组合用于治疗白血病。

[0122] 本发明的抗 FLT3 抗体可以与中和涉及肿瘤生长或血管发生的其他受体的抗体施用。在本发明的一个实施方案中,抗 FLT3 抗体与特异结合 EGFR 的受体拮抗剂组合使用。此类受体的另一实例是 VEGFR。本发明的抗 FLT3 抗体可以与 VEGFR 拮抗剂组合使用。在额外的备选实施方案中,FLT3 抗体可以与一种或多种合适的佐剂组合施用,所述佐剂如细胞因子(例如,IL-10 和 IL-13)或其他免疫刺激剂,如,但不限于,趋化因子、肿瘤相关的抗原和肽。此外,这些刺激剂可以与 MTX 施用。然而,应该理解作为单一疗法,施用仅仅抗 FLT3 抗体足以治疗有效方式预防、抑制或减少肿瘤的发展。

[0123] 在本发明中,任何合适的方法或途径可以用于施用本发明的抗 FLT3 抗体,并且任选地,共同施用抗肿瘤剂,如 MTX 和 / 或其他受体的拮抗剂。根据本发明利用的抗肿瘤剂方案包括认为最适合治疗患者的肿瘤状况的任何方案。不同的恶性肿瘤,包括多种形式的白血病可以需要使用特定抗肿瘤抗体和特定抗肿瘤剂,其将根据患者而定。施用途径包括例如,经口、静脉内、腹膜内、皮下、鞘内或肌内施用。施用的拮抗剂剂量取决于多种因素,包括例如,拮抗剂类型、被治疗的肿瘤的类型和严重性和拮抗剂的施用途径。然而,应该强调的是,本发明不限于任何具体的施用方法或途径。

[0124] 应该理解本发明的抗 FLT3 抗体当为了预防或治疗目的用于哺乳动物中时,将以组合物的形式施用,该组合物额外包含可药用的载体。合适的可药用的载体包括例如,水、盐水、磷酸缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等等及其组合的一种或多种。可药用的载体可以进一步包含少量的辅助物质,如增湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增强结合蛋白的货架期或有效性。注射的组合物可以也是本领域公知的,经配制以在施用于哺乳动物后提供活性成分的快速、持续或延迟的释放。

[0125] 本发明还包括用于抑制肿瘤生长和 / 或血管发生的药盒,其包含治疗有效量的人抗 FLT3 抗体。本发明的另一实施方案包括用于抑制肿瘤生长和 / 或血管发生的药盒,其包含治疗有效量的人抗 FLT3 抗体与 MTX。药盒可以还含有涉及肿瘤发生或血管发生的另一生长因子(例如,EGFR, VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2, PDGFR, NGFR, 和 FGFR)的任何合适的拮抗剂。备选地或额外地,本发明的药盒可以还包含抗肿瘤剂。本发明上下文中合适的抗肿瘤剂的实例已经在本文描述。本发明的药盒可以还包含佐剂,其实例已经在上文描述。

[0126] 此外,本发明的范围内包括本抗体在体内和体外用于本领域公知的研究或诊断方法的用途。诊断方法包括试剂盒,其含有本发明的抗体。

[0127] 本发明的抗体以强于 FLT3 配体结合活性的结合强度结合 FLT3,例如,具有约 $200 \times 10^{-12} \text{M}$ 到 $500 \times 10^{-12} \text{M}$ 的 K_D 。结合人 FLT3-Fc 融合蛋白的抗体的 K_D 为在 25°C 测定为 $0.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 到 $5 \times 10^{-10} \text{M}$; 优选的抗体以 $1.0 \times 10^{-10} \text{M}$ 到 $4.75 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $1.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 到 $4.5 \times 10^{-10} \text{M}$, 或不大于 $4.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 的 K_D (所有都在 25°C 测定) 结合到人 FLT3-Fc 融合蛋白。优选地,抗体以 $4.5 \times 10^{-5} 1/\text{s}$ (sec^{-1} , 1/秒) 和 $6 \times 10^{-5} 1/\text{s}$ 、 $5.0 \times 10^{-5} 1/\text{s}$ 和 $5.7 \times 10^{-5} 1/\text{s}$ (所有都在 25°C 下通过如本文所述的表面等离子共振测量) 的解离速率常数 (K_d 或 k_{off}) 结合到 FLT3, 更优选地,抗体以 $5.1 \times 10^{-5} 1/\text{s}$ 和 $5.6 \times 10^{-5} 1/\text{s}$, 或者这些速率常数的 10% 以内的 K_d 或 k_{off} 结合到 FLT3。进一步优选的是抗体以 $0.5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ($1/\text{Ms}$; 1/摩尔 1/秒) 和

$5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$, 或 $1 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 和 $4 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 之间的解离速率常数 (所有都在 25°C 下通过如本文所述的表面等离子共振测量) 结合到 FLT3, 更优选地, 抗体 $1.2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 和 $3.6 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$, 或这些速率常数的 10% 内的 K_a 或 k_{on} 结合到 FLT3。在另一实施方案中, 抗体以解离速率常数 (如通过 25°C 下表面等离子共振测量) 结合到 FLT3, 所述解离速率常数为在相同条件下为 EB10、NC7、或 D4-3 测定的解离速率常数的 10% 以内。

[0128] 本发明包含对 FLT3 特异的单克隆抗体或其片段, 其包含选自表 1 和 2 中 CDR 组成的组的一个或多个 CDR。在另一方面, 本发明是对 FLT3 特异的单克隆抗体或其片段, 其具有序列为: MQGTHPAIS (SEQ ID NO: 9) 的轻链 CDR3 区。在另一方面, 本发明是对 FLT3 特异的单克隆抗体或其片段, 其具有序列为: GVGAFDAFDI (SEQ ID NO: 4) 的重链 CDR3。在不同的方面, 本发明是单克隆抗体或其片段, 包含 (i) 选自 EB10、NC7 和 D4-3 的轻链可变区和 (ii) 选自 EB10、NC7 和 D4-3 的重链可变区。另一方面, 本发明是对 FLT3 特异的单克隆抗体或其片段, 其包含 (i) EB10、NC7 和 D4-3 的轻链可变区和 (ii) EB10、NC7 和 D4-3 的重链可变区, 和 (iii) 人免疫球蛋白 G_1 (hIgG₁) 恒定区。

[0129] 本发明的一方面是结合 FLT3 的表位的抗体或其片段, 其中该表位包含高达五个细胞外结构域 (D1、D2、D3、D4 和 D5), 并且最少包含结构域 D4 或 D5 的一个或两个。在另一方面, 所述表位是 D4。在再一方面, 所述表位是 D5。

[0130] 在本发明的一个实施方案中, 抗体或抗体片段抑制 FLT3 的下游途径包括 STAT5、Akt、PI3K 和 MAPK 的磷酸化。

[0131] 一方面, 本公开的抗体免疫缀合到抗肿瘤剂, 包括 auristatin 或甲氨蝶呤。免疫缀合物可以连接到可检测标记。另一方面是检测方法, 包括将靶细胞样品与抗体或抗体片段接触并通过检测经标记的抗体确定样品是否含有 FLT3。

[0132] 一方面, 治疗组合物有效抑制表达 FLT3 的瘤性细胞的生长或促进表达 FLT3 的人肿瘤的消退。在其他方面, 治疗组合物是当前公开的抗体和可药用的载体。

[0133] 本发明的另一方面是通过对哺乳动物施用有效量的抗体或其抗体片段中和哺乳动物内 FLT3 的活化的方法。另一方面是抑制树突细胞活化或成熟的方法, 包括将树突细胞与有效抑制树突细胞活化或成熟量的当前公开的抗体或片段接触。

[0134] 本发明的另一方面是治疗哺乳动物中癌症的方法, 其包括向哺乳动物施用有效量的已述任一方面的抗体或其片段。本发明还提供了治疗血液恶性肿瘤包括白血病的方法。在本发明中, 白血病包括但不限于: 急性粒细胞白血病 (AML)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性粒细胞白血病原始细胞危象 (原始细胞危象中的 CML) 和骨髓增生异常综合征。本发明提供的另一种治疗方法将使用本发明抗体或其片段与施用另外抗癌剂或治疗相组合。在一种治疗方法中, 该抗癌剂是甲氨蝶呤 (MXT)。

[0135] 因此, 本受体抗体从而可以在体内和体外用于研究、诊断、预防或治疗方法, 其是本领域公知的。本文公开的本发明原理的变型可以由本领域技术人员做出并且预期此类修饰包括在本发明的范围内。

[0136] 应理解并预期, 本领域技术人员可对本文公开的本发明原理做出改变, 并且认为这些改变包含在本发明的范围内。

[0137] 随后的实施例进一步阐述本发明, 但不应以任何方式理解为对本发明范围的限制。它们不应以任何方式解释为对本发明宽范围的限制。对常规方法的详细说明可得自

许多出版物,例如用于构建载体和质粒的方法,将编码多肽的基因插入这些载体和质粒的方法,将质粒引入宿主细胞的方法,以及基因和基因产物表达和对其测定的方法,该出版物包括 Sambrook, J. 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) 和 Coligan, J. 等人 *Current Protocols in Immunology*, Wiley & Sons, Incorporated (1994)。

[0138] 人抗 FLT3 抗体的表达和纯化

[0139] 对于每种抗体,通过合适方法,例如 PCR 克隆,将合适的重链核苷酸序列,例如 SEQ ID NO: 37, 38, 或 39 (分别针对 EB10, NC7 和 D4-3), 置于合适的表达质粒,例如 pGSHC, 并将合适的轻链核苷酸序列,例如 SEQ ID NO: 40, 41, 或 42 (分别针对 EB10, NC7 和 D4-3) 置于合适的表达质粒中,例如 pGSLC。为了建立稳定细胞系,通过电穿孔用线性化重链和轻链质粒共转染合适宿主细胞系例如 NS0 或 CHO 细胞,在合适培养基例如含透析胎牛血清和谷氨酰胺合成酶添加剂的无谷氨酰胺 Dulbecco's Modified Eagle Medium 中培养。通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 针对抗体表达筛选克隆,选择最高的生产者培养于转瓶中。通过合适方法纯化抗体,例如蛋白 A 亲和层析法。

[0140] 本发明包括重组人单克隆抗体 EB10: 一种靶定人 FLT3 受体的全长 IgG1 κ 。它包含亚组 I 的人 γ -1 重链和亚组 II 的人 κ 轻链。通过选择对人 FLT3 受体的高亲和力结合和它阻断配体与受体结合的能力,从人 Fab 噬菌体展示文库分离 EB10Fab。表明在异种移植模型中,EB10 通过涉及免疫效应功能活化的机理以高亲和力选择性结合到人 FLT3, 阻断 FL 结合并介导强烈的抗肿瘤活性。

[0141] 本发明还包括重组人单克隆抗体 NC7: 一种靶定人 FLT3 受体的全长 IgG1 κ 。它包含亚组 I 的人 γ -1 重链和亚组 II 的人 κ 轻链。表明 NC7 以高亲和力结合人 FLT3 并且阻断 FL 结合。

[0142] 本发明还包括重组人单克隆抗体 D4-3: 一种靶定人 FLT3 受体的全长 IgG1 κ 。它包含亚组 I 的人 γ -1 重链和亚组 II 的人 κ 轻链。表明 D4-3 以高亲和力结合人 FLT3 并且阻断 FL 结合。

[0143] 表 1 和 2 提供了本发明多个 CDR 的氨基酸序列和 SEQ ID NO。除了 SEQ ID NOs 1 和 12 (其使用 Chothia 规则确定) 之外,使用 Kabat 规则确定所有 CDR 序列。表 3 提供了本发明相关的多个序列的 SEQ ID NO。编码下述氨基酸序列的多核酸序列也包括在本发明的范围内。

[0144] 表 1: EB10 抗体重链和轻链可变区 CDR 的氨基酸序列

[0145]

	重链	SEQ ID NO.	轻链	SEQ ID NO.
CDR1	GYTFTSYMH SYMH	1	RSSQSLLHSNGN NYLD	6
		2		
CDR2	IINPSGGSTSYAQK FQG	3	LGSNRAS	8
CDR3	GVGAHDAFDI	4	MQGTHPAIS	9

[0146] 表 2 :D4-3 抗体重链和轻链可变区 CDR 的氨基酸序列

[0147]

	重链	SEQ ID NO.	轻链	SEQ ID NO.
CDR1	GYTFTSYMH	1	RSSQSLLSNGYNY	7
	SYMH	2	LD	
CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	3	LGSNRAS	8
CDR3	VVAAAVADY	5	MQSLQTPFT	11

[0148] 表 3 :NC7 抗体重链和轻链可变区 CDR 的氨基酸序列

[0149]

	重链	SEQ ID NO.	轻链	SEQ ID NO.
CDR1	GGTFSSYAIS	12	RASQSISSYLN	16
	SYAIS	13		
CDR2	GIPIFGTANYAQKFQG	14	AASSLQS	17
CDR3	FALFGFREQAQFDI	15	QQSYSTPFT	18

[0150] 表 4 :EB10、NC7 和 D4-3 抗体的 SEQ. ID. NOs 的氨基酸序列

[0151]

抗体	重链			轻链		
	可变区	完整序列, 无信号	完整序列, 有信号	可变区	完整序列, 无信号	完整序列, 有信号
EB10	19	25	31	22	28	34
NC7	20	26	32	23	29	35
D4-3	21	27	33	24	30	36

[0152] 实验中使用的抗体包含没有信号的全长重链和轻链, 如表 4 给出。

[0153] 表 5 :EB10、NC7 和 D4-3 抗体的体内数据总结

[0154]

抗体	FLT3 结合 ELISA (EC ₅₀)	配体-受体 结合竞争 ELISA (IC ₅₀)	FACS (MFI*)	亲和力 K _D (M)	人 ADCC (%)
EB10	0.5-1.0 nM	0.5-1.0 nM	54	1.58 x 10⁻¹⁰	67%
NC7	0.3 nM	0.8 nM	63	4.5 x 10⁻¹⁰	27%
D4-3	0.2 nM	7 nM	72	2.7 x 10⁻¹⁰	7%

[0155] * 使用如下述的 EOL-1 白血病细胞进行 FACS 分析。

[0156] MFI = 平均荧光强度

[0157] 抗-FLT3 抗体的结合表位

[0158] 通过从 C 末端进行性缺失 FLT3 的胞外 Ig 结构域, 构建一系列 FLT3 胞外结构域缺失突变体 -Fc 融合物, 导致产生 5 种构建体, 包括 4 种截短的受体蛋白质: FLT3-D1、FLT3-D1-2、FLT3-D1-3、FLT3-D1-4, 和全长受体 FLT3-D1-5。使用基于 PCR 的策略通过连续缺失 FLT3 ECD 的 Ig- 样结构域产生一组 FLT3 ECD 变体。产生四种缺失变体: Fd1 (氨基酸 24-183), Fd1-2 (氨基酸 24-271), Fd1-3 氨基酸 24-370), 和 Fd1-4 (氨基酸 24-451)。作为阳性对照, 以相似的方式产生含有氨基酸 24-541 的全长 FLT3 (Fd1-5)。使用 NheI 和 HindIII 限制酶位点, 将所有构建体克隆到表达载体 pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中, 在所述限制酶位点, 它们与在 C- 末端融合六组氨酸 (His) 标记的人 IgG1 的 Fc 结构域框内连接。通过 DNA 测序验证每个构建体的完整性。在 COS 细胞中瞬时表达构建体, 并通过蛋白质印迹分析验证每个表达的构建体的正确大小。浓缩细胞培养上清液。通过抗人 Fc ELISA 和通过蛋白质印迹分析估计上清液中每种变体的相对蛋白质浓度检查 FL 与突变受体的结合, 然后在用于结合测定之前调节到大概相同的水平。

[0159] 通过 ELISA 分析 FLT3 ECD 结构域缺失变体与 FL 和抗体的结合。简言之, 用抗 His 抗体 (Qiagen) 包被 96 孔板, 然后在温和摇动下与 FLT3ECD Ig 结构域缺失变体温育 1 小时, 如上述。用 PBST (含有 0.1% **TWEEN®**-20 的磷酸缓冲盐水) 洗涤平板 3 次, 然后与 100 μl/ 孔的抗 FLT3IgG 抗体在 2% M PBST 中的连续稀释液温育。3 次洗涤后, 用 100 μl/ 孔的 HRP- 缀合的抗人 Fab 抗体 (Jackson ImmunoResearch Labs Inc.) 温育平板。在配体结合测定法中, 在 4°C 下用 FL (100ng/ 孔) 过夜包被平板, 接着在温和摇动下与 FLT3 ECD Ig 结构域缺失变体温育 1 小时。3 次洗涤后, 用 100 μl/ 孔的 HRP- 缀合的抗人 Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch Labs Inc.) 温育平板。如上述对平板显色。检查 FL 与突变受体的结合。

[0160] 表位作图研究揭示 EB10 和 D4-3 单价 Fab 片段, 但不是 NC7 Fab 阻断 FLT3 与其配体的结合, 如通过 EB10 和 D4-3 结合 FLT3-D1-4 (但不结合 FLT3-D1-3) 和全长受体这一事实所示, 从而将它们的结合表位定位到人 FL 也结合的 Ig 结构域 4 内。另一方面, NC7 仅仅结合全长受体, 但是不结合任何其他突变体, 从而表明其结合位点位于 Ig 结构域 5 内。因此, 本发明的抗体结合结构域 4 或结构域 5, 其不同于本领域已知的结合结构域 1 到 3 的配体。

[0161] 竞争酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和封闭测定法

[0162] 对于 FLT3 结合测定法,在 4℃ 用抗 His 抗体 (Qiagen,Hilden,Germany) 过夜包被 96 孔板。用封闭缓冲液 (含有 0.1% TWEEN-**20**®和 5% 胎牛血清 (FCS) 的 PBS) 封闭孔 1 小时,然后在室温用 FLT3-Fc (1 μ g/ml $\times$ 100 μ l/孔) 温育 1 小时。用 PBST 洗涤孔三次,然后加入 EB10 或对照 IgG,并在室温温育 1 小时。洗涤后,在室温下用 100 μ l 抗人 κ 链抗体-HRP 缀合物温育平板 1 小时。洗涤平板然后用 100 μ l 3,3',5,5'-四甲基联苯胺温育。用微平板读出器测定 450nm 的吸光度。

[0163] 对于受体-配体阻断测定法,混合不同量的 EB10 或对照 IgG 与固定量的生物素化的 FLT3-Fc 融合蛋白 (45ng/孔) 并在室温温育 1 小时。将混合物转移到用 FL (25ng/孔) 预包被的 96 孔板,然后在室温额外温育 1 小时。洗涤后,加入链霉抗生物素蛋白 HRP 缀合物,并读出 450nm 下的吸光度。计算 FLT3 与 FL 的结合的 50% 抑制所需的抗体浓度 (IC_{50})。

[0164] 通过 ELISA 检查 EB10 结合受体的能力。如表 6 中所示,EB10 以 0.5-1nM 范围内的 EC_{50} 结合 FLT3。

[0165] 在 FL 结合竞争 ELISA 中检查 EB10 阻断受体-配体结合的能力。如表 7 所示,EB10 以 0.5-1nM 范围内的 IC_{50} 阻断 FL 与 FLT3 的结合,而对于对照 IgG 没有看到阻断活性。

[0166] 表 6:通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测量抗 FLT3 抗体的 FLT3 结合活性

[0167]	抗体	与 FLT-3 的结合 (EC_{50})
	EB10	0.5-1.0 nM
	NC7	0.3 nM
	D4-3	0.2 nM

[0168] 表 7:通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测量抗-FLT3 抗体的 FLT3 配体-受体阻断活性

[0169]	抗体	FL 与 FLT-3 结合的阻断 (IC_{50})
	EB10	0.5-1.0 nM
	NC7	0.8 nM
	D4-3	7 nM
	IgG 对照	无阻断

[0170] 因此,本发明的抗体对 FLT3 具有高配体阻断能力和高结合亲和性。

[0171] 通过表面等离子共振 /Biacore™ 分析进行结合动力学分析

[0172] 使用表面等离子共振,如 Biacore 2000™ 生物传感器 (PharmaciaBiosensor, Uppsala, Sweden) 在 25℃ 下测量抗体与 FLT3 的结合动力学。将约 1000RU (参考单位) 的抗体固定到传感器芯片上,并注射浓度为 1.5 ~ 100nM 的可溶性 FLT3-Fc 融合蛋白。在每种浓度下得到传感图并使用仪器的程序,如 BIA Evaluation 2.0 程序评估,以确定速率常数 k_{on} 和 k_{off} 。 K_d , 也称作 k_{off} , 是解离反应的速率常数。 K_a , 也称作 k_{on} , 是结合反应的速率常

数。从测量的速率常数 k_{on} : k_{off} 的比值计算亲和力常数 (K_D) (摩尔, M)。本文示例的抗体 EB10、NC7 和 D4-3 的 K_a 、 K_d 和 K_D 在表 8 中概述。

[0173] 表 8 : 抗体与重组人 FLT3 的结合动力学

[0174]

抗体	K_a (1/Ms) k_{on}	K_d (1/s) k_{off}	K_D (M)
EB10	3.52×10^5	5.55×10^{-5}	1.58×10^{-10}
NC7	1.24×10^5	5.6×10^{-5}	4.5×10^{-10}
D4-3	1.9×10^5	5.1×10^{-5}	2.7×10^{-10}

[0175] 因此, 本发明的抗体对于 FLT3 具有高结合动力学。

[0176] 流式细胞术分析

[0177] 将下面列出的多种细胞 (0.1ml 中 5×10^5) 用冷 PBS 洗涤两次, 然后与 100 μ l PBS 中的 10 μ g/ml 的抗 CD16/CD32 抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA) 温育 30 分钟以封闭多种细胞上的 Fc 受体 (见表 9)。将细胞用冷 PBS 洗涤并与 EB10 (10 μ g/ml) 或者 PBS 中稀释的相应的人 IgG 同种型对照温育 45 分钟。用冷 PBS 洗涤细胞并在冰上用 100 μ l PE-缀合的抗人 F(ab')₂ 二级抗体 (Jackson ImmunoResearch) (1/200 稀释) 温育 45 分钟。洗涤后, 通过流式细胞术如 **Coulter® Epics®** Flow Cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL) 分析细胞; 以平均荧光强度 (MFI) 测量数据。

[0178] 表 9 列出了所选的白血病细胞系的 EB10 染色结果。流式细胞术分析表明 EB10 结合到 EOL-1 细胞上表达的野生型 FLT3, 并且也结合到 BaF3-ITD 细胞上表达的 ITD-突变的 FLT3。在 FLT3- 阴性 JM1 或 BaF3- 对照细胞系上没有观察到 EB10 的结合。

[0179] 表 9 : 通过流式细胞术分析所选的人白血病细胞系中 EB10 与 FLT3 的结合

[0180]

肿瘤细胞系	白血病类型	FLT3 表型	MFI
BaF3/ITD	ALL	ITD 突变体	143.0
EM-3	CML	野生型	37.5
EOL-1	AML	野生型	53.5
SEMK2	ALL	野生型	526.3
MOLM-14	AML	野生型/ITD (杂合的)	68.5
MV-4-11	双表型 B 粒-单核细胞白血病	ITD	16.3
OCI-AML5	AML	野生型	24.3
Reh	ALL	野生型	19.7
RS4	ALL	野生型	91.6
JM1	B 细胞淋巴瘤- 白血病	FLT3 阴性	0.1

[0181] 磷酸化测定

[0182] 在无血清的 RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 培养基中过夜培养细胞。在无血清培养基中用不同浓度的抗体处理细胞 60 分钟。在 37°C 用 30ng/ml FL 刺激细胞 15 分钟。在裂解缓冲液 (50mM Tris, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1mM EDTA, 1mM 苯甲基磺酰氟, 0.5mM 原钒酸钠, 1 μg/ml 抑酶醛肽, 1 μg/ml 抑胃酶肽 A, 和 1 μg/ml 抑肽酶) 中裂解细胞。将来自每个样品的等量细胞裂解物在 4°C 与抗 FLT3 抗体 4G8 (BD Pharmingen) 过夜温育, 然后与蛋白 A 琼脂糖 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) 再温育 2 小时。电泳后, 转移到硝酸纤维素膜 (Invitrogen), 用抗磷酸酪氨酸抗体 4G10 (Upstate Biotechnology) 进行免疫印迹以评估磷酸化的 FLT3。剥离用 Qentix™ 信号增强器 (Pierce, Rockford, IL) 处理的膜, 用抗 FLT3 抗体 S-18 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 再次探测以检测总的 FLT3 蛋白质。使用化学发光 (Amersham, Piscataway, NJ) 显示蛋白质条带。为了检测活化的 MAPK、Stat5 或 AKT, 通过 SDS-PAGE 电泳分离 50 μg 提取的细胞蛋白质, 转移到硝酸纤维素膜, 并用所示的抗体: Phospho-p44/42MAPK 抗体, Phospho-Stat5 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), 或 Phospho-AKT 抗体 (BD Pharmingen) 免疫印迹。为了检测总的 MAPK、Stat5 或 AKT 蛋白质, 剥离膜并用所示抗体: p44/42MAPK 抗体、Stat5 抗体 (Cell Signaling Technology), 或 AKT 抗体 (BD Pharmingen) 再次探测。

[0183] EB10 抑制野生型 FLT3 的 FL 诱导的磷酸化和 ITD- 突变的 FLT3 的配体独立的组成型磷酸化: 在 EOL-1 和 EM3 细胞中, FL 加入强烈地增强了 FLT3 受体磷酸化。用 EB10 温育以剂量依赖方式阻断了 FL 诱导的磷酸化, IC_{50} 为 0.4 ~ 4nM。这些结果表明 EB10 是野生型 FLT3 的配体诱导的活化的有效抑制剂。

[0184] 已知在 AML 中以高频率发现的 ITD 突变引起 FL 独立的受体磷酸化和激酶信号途径的活化。在表 10 中报告了使用 BaF3-ITD 和 MV4 ;11 细胞系, EB10 对突变 FLT3 的组成型活化的抑制效果。BaF3-ITD 和 MV4 ;11 细胞系中突变 FLT3 被组成型磷酸化。与对照抗体相比, EB10 抑制了 BaF3-ITD 细胞中 FL 独立的 FLT3-ITD 磷酸化。在较低的程度, EB10

也显著抑制了 MV4 ;11 细胞中 FL 独立的 FLT3-ITD 磷酸化。总之,这些结果表明 EB10 也是 FLT3-ITD 激酶活性的有效抑制剂。

[0185] 表 10 :EB10 抑制野生型 FLT3 的 LF 诱导的磷酸化和 ITD- 突变 FLT3 的配体独立的组成型磷酸化 :

[0186]

细胞系	FLT3 突变状态	FLT3 磷酸化的抑制 (IC ₅₀)
EOL-1	野生型	0.4 nM
EM3	野生型	4 nM
BaF3-ITD	ITD 突变	4 nM
MV4;11	ITD 突变	40 nM

[0187] 本发明的抗体抑制野生型 FLT3 的 FL 诱导的磷酸化。

[0188] EB10 抑制下游激酶的 FLT3- 介导的活化 :已经鉴定了 MAPK、PI3K 和 Stat5 途径涉及活化的 FLT3 的下游信号传导 (Stirewalt DL and JP, Radich, JP.Nat Rev Cancer 3 : 650-665 (2003))。本发明的抗体抑制白血病中 MPK、PI3K 和 STAT5 途径的下游激酶。

[0189] 使用 BaF3-ITD 和 MV4 ;11 细胞研究了 EB10 对 FLT3-ITD 突变诱导的 FL 独立的 MAPK 磷酸化的影响。EB10 强烈阻断两种细胞系中 MAPK 的磷酸化。这些结果表明 EB10 对 FLT3 配体 - 受体相互作用的阻断导致下游 MAPK 信号途径的抑制 (表 11)。与 EB10 温育抑制了 EOL-1 细胞中 AKT 的 FL 诱导的磷酸化和 BaF3-ITD 细胞中 AKT 的 FL 独立的磷酸化 (表 12)。在 BaF3-ITD 细胞中,FL 独立的 Stat5 磷酸化被 EB10 强烈抑制,而在 EOL-1 中没有影响 (表 13)。

[0190] 表 11 :EB10 抑制下游激酶 MAPK 的 FLT3- 介导的活化

[0191]	细胞系	FLT3 突变状态	MAPK 磷酸化的抑制 (IC ₅₀)
	EOL-1	野生型	0.1 nM
	EM3	野生型	0.1 nM
	BaF3-ITD	ITD 突变	0.1 nM
	MV4;11	ITD 突变	0.4 nM

[0192] 表 12 :EB10 对 AKT 磷酸化的影响

[0193]	细胞系	FLT3 突变状态	AKT 磷酸化的抑制 (IC ₅₀)
	EOL-1	野生型	1 nM
	BaF3-ITD	ITD 突变	0.1 nM

[0194] 表 13 :EB10 抑制 FL 独立的 Stat5 磷酸化

[0195]

细胞系	FLT3 突变状态	Stat5 磷酸化的抑制
		(IC ₅₀)
EOL-1	野生型	无影响
BaF3-ITD	ITD 突变	4nM

[0196]

[0197] 细胞增殖测定

[0198] 收获 EOL-1 细胞并用无血清的 RPMI 1640 培养基洗涤三次。在无血清的 RPMI 1640 培养基中培养细胞 12 小时。对于 BaF3-ITD 细胞,在补充 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中无外源 FL 存在下进行增殖测定。在无血清的 AIM-V 培养基中重构细胞,在平底 96 孔板 ($1 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ /孔) 中一式三份涂平板并与不同浓度的抗体 (从 0 到 100nM) 和 30ng/ml 的 FL 在 37°C 下温育 68 小时。作为背景对照,在不存在外源 FL 的条件下将细胞仅用培养基培育。用 $0.25 \mu\text{Ci}$ /孔的 [³H]-胸苷脉冲细胞 4 小时。收获细胞并在 PerkinElmer Wallace-1205Betaplate 液体闪烁计数器 (Wellesley, MA) 中测量 cpm。计算 EOL-1 细胞的 FL 诱导的增殖的抑制百分比;从所有实验样品的 cpm 推导背景增殖 (即没有用 FL 刺激的细胞样品) 的 cpm。使用下式计算抑制百分比: $[(\text{未处理样品的 cpm} - \text{抗体的 cpm} - \text{处理的样品}) / \text{未处理样品的 cpm}] \times 100\%$ 。

[0199] EB10 抑制表达野生型的白血病细胞的增殖:FL 在白血病细胞在增殖中起重要作用。与 FL 温育增加了 EOL-1 细胞的 [³H]-胸苷摄入。用 EB10 处理以剂量依赖性方式抑制了 EOL-1 细胞的 FL 诱导的增殖 (表 14)。

[0200] 表 14 :EB10 抑制 EOL-1 白血病细胞的 FL 诱导的增殖

[0201]

处理	浓度 (nM)	FL 诱导的增殖的%抑制 (平均值 $\pm$ 标准差)
EB10	1.5	12.4$\pm$2.1
EB10	3	19.4$\pm$1.8
EB10	6	29.3$\pm$6.5
EB10	13	32.9$\pm$1.7

[0202]

EB10	25	37.2±7.2
EB10	50	40.3±11.5
EB10	100	51.8±8.2
对照 IgG	100	0.4±0.1

[0203] EB10 抑制表达 ITD- 突变型 FLT3 的白血病细胞的增殖 :FLT3-ITD 转化的 BaF3 细胞在不存在 FL 刺激下增殖。FL 刺激没有增加 BaF3-ITD 细胞的增殖。EB10 处理以剂量依赖性方式抑制了这些细胞的 FL 独立的增殖 (表 15)。

[0204] 表 15 :EB10 抑制 BaF3 白血病细胞的 FL 诱导的增殖

[0205]

处理	浓度 (nM)	FL- 独立的增殖的 % 抑制 (平均值 ± 标准差)
EB10	1.5	0.5±2.4
EB10	3	0.5±5.6
EB10	6	9.6±3.1
EB10	13	13.0±4.0
EB10	25	23.3±0.6
EB10	50	28.6±3.1
EB10	100	29.2±3.0
对照 IgG	100	2.0±4.0

[0206] 抗体内化测定

[0207] 根据生产商的使用说明使用 IODO- 珠 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) 用 ^{125}I 放射碘化抗体。以 5×10^5 个细胞 / 样品将 EOL-1 细胞等分到微量离心管中 500ml 冷的完全培养基中。加入约 1mg EB10 和 D4- 3^{125}I - 标记的抗体到细胞并在 4℃ 温育 1 小时。在冷 PBS 中洗涤细胞两次, 重悬浮在 500ml 完全培养基中, 然后在 4 或 37℃ 温育 0、30、60、120、240、或 360 分钟。在每个时间点, 在 PBS 中洗涤细胞三次, 然后在 γ 计数器上计数 4℃ 样品以确定结合到细胞表面的放射性的总量。用剥离缓冲液 (100mM 甘氨酸, 2M 尿素, pH 2.5) 剥离 37℃ 样品 5 分钟。在 γ 计数器上计数剥离缓冲液和剥离的细胞沉淀以确定内化的放射性的百分比。

[0208] 表 16. 结合到 EOL-1 细胞表面上 FLT3 的抗 FLT3 抗体的内化

[0209]

抗体	37℃ 下的时间 (分钟)	内化抗体的 % (±SD)
EB10	0	11.1 (9.2)

	30	40.5 (13.2)
	60	55.0 (19.1)
	120	53.9 (10.3)
	240	79.9 (24.9)
	360	50.4 (8.5)
D4-3	0	6.3 (5.1)
	30	30.1 (4.9)
	60	52.2 (1.7)
	120	59.5 (7.3)
	240	60.4 (4.9)
	360	68.5 (17.1)

[0210] 用 EB10 或 D-43 放射性标记的 EOL-1 细胞容易结合到肿瘤细胞表面并且以依赖时间的方式被内化 (表 16)。

[0211] 体外针对人白血病的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)

[0212] 通过标准 ^{51}Cr 释放测定法进行 ADCC 测定。从正常供者血液得到人自然杀伤 (NK) 细胞的富集,如来自 RosettaSep NK 细胞富集混合液;StemCell Technologies, Inc., Vancouver, British Columbia, Canada,或 NK 细胞分离试剂盒 II, Miltenyi Biotec。用 $200\ \mu\text{Ci}$ ^{51}Cr 标记靶细胞 (2×10^6) 2 小时然后洗涤。将事先用 $10\ \mu\text{g/mL}$ (67nmol/L) 对照 IgG、C225、EB10、NC7 或 D4-3mAb 温育 45 分钟以增加数目的 NK 细胞 (0 到 400,000 个细胞) 与 $\sim 4,000$ 个 ^{51}Cr - 标记的靶细胞一式三份在 V 型底的 96 孔板中 37°C 温育 6 小时,或者与 5% SDS 温育以测定总的裂解。为了测量自发释放,将靶细胞 ($100\ \mu\text{l}$ /孔中 4,000 个细胞) 与仅 $100\ \mu\text{l}$ 培养基温育。从每孔上清液收集细胞毒性培养物并在 γ 计数器 (如 1470Wallac WIZARD, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA) 上计数 ^{51}Cr 。以 $100 \times (\text{样品释放} - \text{自发释放}) / (\text{总释放} - \text{自发释放})$ 计算百分比裂解或百分比细胞毒性。

[0213] 不像小分子 FLT3 抑制剂,抗 FLT3 抗体可以启动针对表达 FLT3 的肿瘤细胞的患者免疫应答。具体地,如果表达 FLT3 的细胞用人 IgG 包被,那么抗体可以诱导细胞裂解。该裂解可以是白细胞,尤其表达 Fc 受体的自然杀伤 (NK) 细胞活化的结果。本发明的抗体提供了人抗 FLT3 抗体,其具有提高的活化下游免疫效应功能如 ADCC 的能力。EB10 诱导了强烈的 ADCC 应答;NC7 和 D4-3 诱导了较不强烈的 ADCC 应答 (表 17)。

[0214] 表 17:体外 ADCC 人白血病细胞 FLT3

[0215]	% 细胞毒性		
	E:T 比例	EB10	NC7
	100:1	67	27
	33:1	47	8
	11:1	32	7
	4:1	22	1
			D4-3
			7
			1
			0
			0

[0216] EB10, NC7 和 D4-3 有效治疗白血病异种移植物

[0217] EOL-1 异种移植人 AML 白血病模型 :用 5×10^6 个白血病细胞静脉内 (i. v.) 注射每组 10 只的 NOD-SCID 小鼠。在肿瘤注射后 1 天开始治疗。用 200 μ l 磷酸缓冲盐水 (PBS) 中 500 μ g, 250 μ g 或 100 μ g/ 剂量 EB10 的所示量的腹膜内 (i. p.) 注射每周三次处理小鼠。用纯化的人 IgG (500 μ g/ 剂量) 处理对照组。每天监测小鼠的存活。通过 Log Rank 检验比较治疗组中的存活。

[0218] 对照组中的所有小鼠在 40 天内都发生疾病的广泛传播 (平均存活时间 36.0 ± 3.1 天)。相比,在用 500 μ g, 250 μ g 或 100 μ g/ 剂量的 EB10 治疗的小鼠组中存活显著延长 (平均存活时间分别是 62.3 ± 18.7 , 55.3 ± 18.9 , 或 52.8 ± 18.6 , P 值分别 < 0.001 , < 0.005 , 或 < 0.001)。在用 10 μ g EB10 治疗的组中没有观察到效果,表明 EB10 的抗白血病效果是剂量依赖性的。

[0219] 人白血病细胞的骨髓移植 :在第 20 天从 EB10 处理的小鼠 (500 μ g/ 剂量) 和对照 IgG 处理的组的股骨收获骨髓。在白血病细胞注射后 6 和 14 周通过流式细胞术分析细胞的人 CD45 以确定骨髓的肿瘤细胞浸润程度。用荧光标记的抗人 CD45 抗体使用免疫组织化学染色比较骨髓的肿瘤细胞浸润程度。骨髓中肿瘤细胞的数目在 EB10 处理的小鼠中显著减少。

[0220] BaF3-ITD 白血病模型 :用 5×10^4 个 BaF3-ITD 细胞启动静脉内注射 10 只无胸腺 (nu/nu) 小鼠组。对于统计学分析,使用非参数单尾 Mann-Whitney 秩和检验 (SigmaStat 2.03, SPSS, Inc., Chicago, IL)。在肿瘤注射后 1 天开始处理。用 200 μ l PBS 中 500 μ g/ 剂量或 100 μ g/ 剂量 EB10 的腹膜内注射每周处理小鼠三次。用纯化的人 IgG (500 μ g/ 剂量) 处理对照组。每天监测小鼠的存活。

[0221] 与对照 IgG 处理 (平均存活时间 32.4 ± 10.6 天) 相比,EB10 处理显著延长了小鼠的存活 (对于 500 μ g 剂量为 63.4 ± 44.6 天, $P < 0.05$, 和对于 100 μ g 剂量为 66.5 ± 32.9 天, $P < 0.01$)。这些结果表明 EB10 在野生型 FLT3 和 ITD- 突变 FLT3 模型中在体内是治疗上有效的。

[0222] MOLM14 异种移植 AML 白血病模型 :用 γ 辐射器以 200rads 辐射小鼠然后用 10×10^6 个 MOLM-14 白血病细胞静脉内注射。肿瘤注射后 1 天开始处理。用 10mg/kg 和 0.2mg/kg 剂量的溶于 200 μ l PBS 中的 EB10 腹膜内注射每周处理小鼠两次。用 10 μ g/ml USP 盐水处理对照组。每天监测小鼠存活。通过 Log Rank 检验比较治疗组中的存活。

[0223] EB10 显著延长了存活。分别对于 10mg/kg 和 0.2mg/kg 剂量,中值存活为 63 天到 38.5 天,相比盐水对照为 36 天。该效应是剂量依赖性的,每个剂量比下一个更低剂量显著

更有效。

[0224] SEM-K2 异种移植物人白血病模型：用 5×10^6 个白血病细胞在 10 个一组的 NOD-SCID 小鼠中启动静脉内注射。在肿瘤注射后 1 天开始处理。用 $200 \mu\text{l}$ PBS 中 20mg/kg EB10、NC7 和 D4-3 的腹膜内注射每周两次处理小鼠。用纯化的人 IgG ($500 \mu\text{g}$ /剂量) 处理对照组。每天监测小鼠的存活。通过 Log Rank 检验比较治疗组中的存活。

[0225] 测定 SEM-K2 细胞 (一种表达野生型 FLT3 的人 ALL 细胞系) 中 EB10、NC7 和 D4-3 的体内功效。与人 IgG (中值存活 30.5 天) 相比, EB10、NC7 和 D43 处理都显著延长了 SEM-K2 白血病模型中的存活 (中值存活分别为 108.5 天, $p < 0.0001$; 58.5 天, $p < 0.0001$ 和 55.5 天, $p = 0.0001$)。EB10 的功效明显比 NC7 ($p < 0.0001$) 和 D43 ($p < 0.0001$) 更强。NC7 和 D43 之间没有显著的功效差异 ($p = 0.244$)。

[0226] 通过 PK 研究测定 EB10 功效

[0227] 在重复剂量 PK 研究中, 表明 EB10 在极低剂量下是有效的。发现最大功效的阈值在 2 到 $10 \mu\text{g/ml}$ 之间。EB10 在鼠白血病模型中实现了 41 到 401g/ml 的 C_{avg} , 和 49 到 475g/ml 的 C_{max} 的最大功效。

[0228] 在 SEM-K2 白血病模型中用 EB10 和化学治疗剂甲氨蝶呤 (MTX) 进行组合疗法

[0229] 在开始治疗前 1 天, 用悬浮在 PBS 中的总体积 $200 \mu\text{l}$ 的 5×10^5 SEM-K2 细胞静脉内注射 65 只 7 周龄的雄性 NOD/SCID 小鼠。从研究中退出静脉内接受少于 90% 细胞的小鼠。第二天, 将带有 SEM-K2 白血病细胞的 NOD-SCID 小鼠分成 4 个治疗组, 每组 12 只小鼠:

[0230] 1) USP 盐水 $10 \mu\text{l}$ /克, i. p., 2x/周;

[0231] 2) EB10 10mg/kg , i. p. 2x/周;

[0232] 3) MTX 100mg/kg , Q7D; 和

[0233] 4) MTX 100mg/kg 和 EB10 10mg/kg 的组合。

[0234] 以 10mg/ml 的浓度在 USP 盐水中制备 MTX (Sigma Chemical, Cat#M9929) 并施用 Q7D 三个循环。在 USP 盐水中制备 EB10 并每周两次给药直到第 40 天, 此时最后一只盐水对照动物死亡。以 10ml/kg 腹膜内对所有小鼠给药。在组合组中, 在第 1 天开始, EB10 治疗前施用 MTX 至少 1 小时。每天记录小鼠存活。跟踪小鼠的存活, 并处死任何显示出病态/死亡病征的小鼠; 在处死日标记为死亡。在第 168 天结束研究并到达该点时处死任何小鼠。通过 Log Rank 检验比较治疗组之间治疗组中的存活。

[0235] 测定以最大耐受剂量施用的 MTX 和 EB10 的组合对 ALL 的 SEM-K2 模型中小鼠存活的影响。在具有白血病的对照组中所有小鼠中到第 34 天时 SEM-K2 白血病都迅速发展。EB10 和 MTX 在该模型中都是有效的, 但是这两种物质的组合比作为单一疗法的任一治疗有显著更大的功效。与对照组相比, EB10 疗法显著延长了小鼠存活 ($p < 0.01$)。在较小程度上, MTX 疗法也延长了存活。

[0236] 与单一疗法相比, 用 EB10 和 MTX 的组合疗法具有增强的功效 ($P < 0.001$)。EB10 和 MTX 的组合比该模型中任何其他治疗具有显著更长的中值存活。此外, 组合组中的四只小鼠存活到研究结束 (第 168 天), 而接受其他治疗的小鼠都没有存活到那一天。组合治疗允许某些小鼠存活超过治疗的 150 天, 而作为单一疗法的 EB10 和 MTX 均不能实现该长寿命这一事实表明 EB10 和 MTX 的组合是协同的。考虑到 Furukawa 等人 (Leukemia 21: 1005-1014 (2007)) 发表的体外工作, 该结果是尤其出乎意料的, 所述工作报导, 同时施用

FLT3 抑制剂 PKC412 与除了 MTX 之外的其他化学治疗剂对于 FLT3 白血病是在临床上有效的。