



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118406688 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 30

(21) 申请号 202410615191.6

C07K 16/40 (2006.01)

(22) 申请日 2014.03.14

C12N 5/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/85 (2006.01)

61/791,822 2013.03.15 US

A61K 39/395 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 7/10 (2006.01)

201480015180.9 2014.03.14

A61P 9/10 (2006.01)

(71) 申请人 武田药品工业株式会社

A61P 29/00 (2006.01)

地址 日本

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(72) 发明人 A·尼克森 J·A·肯尼斯顿

S·R·科莫

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

专利代理师 陈艳娟 王艳波

(51) Int. Cl.

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书1页 说明书23页

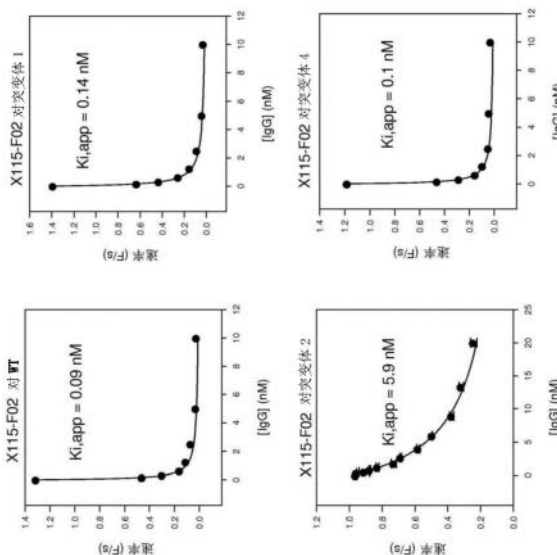
序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

抗血浆激肽释放酶抗体

(57) 摘要

本发明的名称为抗血浆激肽释放酶抗体。本文公开的是能够结合血浆激肽释放酶并抑制其活性的抗体。这样的抗体与血浆激肽释放酶的催化结构域中的一个或多个关键残基相互作用。所述抗体也可包含特定的重链互补决定区3 (CDR) 基序和任选地在重链可变区和轻链可变区中得某些位置的特定残基。



1. 编码结合人血浆激肽释放酶 (pKa1) 的抗体的核酸, 其中所述抗体包括:  
重链可变区, 其包括包含序列HYIMM的互补决定区1 (HC CDR1)、包含序列GIYSSGGITVYADSVKKG的互补决定区2 (HC CDR2)、和包含以下序列的互补决定区3 (HC CDR3):
  - (i) RRIGIPRRDAFDI;
  - (ii) RRIGIPRRDEFDI;
  - (iii) RRTGAPRRDAFDI;
  - (iv) RRTGSPRRDAFDI;
  - (v) RRTGLPRRDAFDI; 或
  - (vi) RRTGIPRRDEFDI; 和轻链 (LC) 可变区, 其包含具有序列RASQSISWLA的互补决定区1 (LC CDR1)、具有序列KASTLES的互补决定区2 (LC CDR2)、和具有序列QQYNTYWT的互补决定区3 (LC CDR3)。
2. 根据权利要求1所述的核酸, 其中抗体是全长抗体或其抗原结合片段。
3. 根据权利要求2所述的核酸, 其中抗体是IgG。
4. 根据权利要求1或权利要求2所述的核酸, 其中抗体是人抗体或人源化的抗体。
5. 根据权利要求1或权利要求2所述的核酸, 其中抗体抑制血浆激肽释放酶的活性至少80%。
6. 根据权利要求1或权利要求2所述的核酸, 其中抗体具有小于约1nM的表观 $K_i$  ( $K_i$ , app)。
7. 根据权利要求1或权利要求2所述的核酸, 其中相对于在位置R551、Q553、Y555、T558和R560包含一个或多个突变的血浆激肽释放酶突变体, 抗体优先结合血浆激肽释放酶。
8. 根据权利要求1或权利要求2所述的核酸, 其中抗体是全长抗体或其抗原结合片段。
9. 根据权利要求8所述的核酸, 其中抗原结合片段是可溶性Fab (sFab)。
10. 一种载体, 其包含权利要求1至9中任一项所述的核酸。
11. 根据权利要求10所述的载体, 其中载体是表达载体。
12. 一种宿主细胞, 其包含权利要求10或权利要求11所述的载体。
13. 根据权利要求12所述的宿主细胞, 其中宿主细胞是哺乳动物细胞。
14. 根据权利要求13所述的宿主细胞, 其中哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。
15. 一种产生结合血浆激肽释放酶 (pKa1) 的抗体的方法, 所述方法包括:  
在培养基中培养根据权利要求12至14中任一项所述的宿主细胞, 从而产生抗体。
16. 根据权利要求15所述的方法, 进一步包括从培养基中回收抗体。
17. 根据权利要求15或权利要求16所述的方法, 进一步包括纯化抗体。

## 抗血浆激肽释放酶抗体

[0001] 本申请为申请日是2014年3月14日、申请号是202010662282.7、发明名称为“抗血浆激肽释放酶抗体”的中国专利申请的分案申请；申请号为202010662282.7的中国专利申请为申请日是2014年3月14日、申请号是201480015180.9、发明名称为“抗血浆激肽释放酶抗体”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2013年3月15日提交的美国临时申请号61/791,822的申请日的权益，其全部内容通过引用并入本文。

### 发明背景

[0004] 血浆激肽释放酶是接触系统的丝氨酸蛋白酶组分，并且是不同炎症性疾病、心血管病、感染病(脓毒症)和肿瘤学疾病的潜在药物靶(Sainz I.M.等,Thromb Haemost 98,77-83,2007)。在暴露于外源或带负电荷的表面时通过因子XIIa激活接触系统,或在内皮细胞表面上通过脯氨酰羧肽酶激活接触系统(Sainz I.M.等,Thromb Haemost 98,77-83,2007)。血浆激肽释放酶的激活经其对因子XII的反馈激活增强了内在凝聚并且经产生促炎性九肽缓激肽而加重炎症。作为循环中的主要激肽原酶,血浆激肽释放酶主要负责在脉管系统中产生缓激肽。血浆激肽释放酶的主要天然抑制剂——C1-抑制剂蛋白(C1-INH)的遗传缺陷导致遗传性血管性水肿(HAE)。患HAE的患者遭受通常由未知的触发剂促发的疼痛性水肿的急性发作(Zuraw B.L.等,N Engl J Med 359,1027-1036,2008)。

[0005] 通过动物模型中药理学试剂的使用或遗传研究,血浆激肽释放酶-激肽系统(血浆KKS)已经牵涉到各种疾病。因此,非常感兴趣的是鉴定抑制血浆激肽释放酶活性的试剂,从而有效治疗与血浆激肽释放酶相关的疾病。

### 发明内容

[0006] 本发明是基于由人血浆激肽释放酶(PKa1)的催化结构域和DX2930(特异性结合人PKa1并有效抑制其活性的抗体)的Fab片段形成的复合物的晶体结构的测定,以及血浆激肽释放酶(PKa1)和抗体二者中对于两个分子之间的相互作用和/或对于pKa1活性的抑制是关键性的残基的鉴定。

[0007] 因此,本公开特征在于能够抑制其活性(例如,至少50%)的抗PKa1抗体、包括其的药学组合物以及药学组合物用于治疗与血浆激肽释放酶相关的疾病和病症的用途。

[0008] 在一个方面中,本公开提供了结合人血浆激肽释放酶(PKa1)的分离的抗体,其中所述抗体与人PKa1中的一个或多个氨基酸残基相互作用并且抑制其活性至少50%。与抗体相互作用的PKa1中的氨基酸残基可以是V410、L412、T413、A414、Q415、R416、L418、C419、H434、C435、F436、D437、G438、L439、W445、Y475、K476、V477、S478、E479、G480、D483、F524、E527、K528、Y552、D554、Y555、A564、D572、A573、C574、K575、G576、S578、T596、S597、W598、G599、E600、G601、C602、A603、R604、Q607、P608、G609、V610和Y611,如在图2中指示的(粗体的和加下划线的)。

[0009] 在一些实例中,抗PKa1抗体可结合PKa1的表位,所述表位包括PKa1中的下述区段之一(图2):V410-C419、H434-L439、Y475-G480、F524-K528、Y552-Y555、D572-S578、T596-R604或Q607-Y611。

[0010] 在其他实例中,抗体相对于在位置R551、Q553、Y555、T558和R560包含一个或多个突变的PKa1的突变体(例如,失活突变体)(例如,图5中显示的突变体2)优先结合PKa1。

[0011] 在另一方面中,本公开提供了结合人血浆激肽释放酶的分离的抗体,其中抗体包括重链可变区,其包括互补决定区1(HC CDR1)、互补决定区2(HC CDR2)和互补决定区3(HC CDR3)。抗体中的HC CDR3包括基序 $X_{99}R_{100}X_{101}G_{102}X_{103}P_{104}R_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}X_{110}X_{111}$ (SEQ ID NO:58),其中 $X_{99}$ 是R或Q, $X_{101}$ 是T、I、R、S或P, $X_{103}$ 是V、I或L, $X_{106}$ 是R或W, $X_{107}$ 是D或N, $X_{108}$ 是A、S、D、E或V, $X_{109}$ 是F或L, $X_{110}$ 是D、E或N,和 $X_{111}$ 是I、N、M或S。

[0012] 在一些实例中, $X_{99}$ 可以是Q和 $X_{101}$ 可以是I、R、S或P。在其他实例中, $X_{106}$ 可以是W和 $X_{111}$ 可以是N、M或S。可选地或另外, $X_{101}$ 可以是I, $X_{108}$ 可以是E,和 $X_{103}$ 可以是I或L。在仍其他实例中, $X_{101}$ 可以是I和 $X_{103}$ 可以是I或L,或 $X_{103}$ 可以是I或L和 $X_{110}$ 可以是D、E或N。

[0013] 在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体的重链可变区包括HC CDR1中的 $H_{31}$ 。可选地或另外,重链可变区包括框架区1(FR1)中的 $F_{27}$ 、 $F_{29}$ 或二者。

[0014] 本文所述的抗PKa1抗体可进一步包括轻链可变区,其包括互补决定区1(LC CDR1)、互补决定区2(LC CDR2)和互补决定区3(LC CDR3)。在一些实施方式中,LC CDR2包括 $K_{50}$ 、 $L_{54}$ 、 $E_{55}$ 、 $S_{56}$ 或其组合。可选地或另外,轻链可变区进一步包括框架区3(FR3)中的 $G_{57}$ 。当必要时,轻链可变包区括框架区2(FR2)中的 $N_{45}$ 。

[0015] 本文所述的任何抗PKa1抗体均可抑制PKa1的活性至少50%(例如,至少80%、90%、95%或99%)。在一些情况下,抗体的表观 $K_i(K_{i,app})$ 小于约1nM(例如,小于约0.1nM,或小于约0.05nM)。可选地或另外,本文所述的抗PKa1抗体对PKa1的结合亲和力( $K_D$ )可小于 $10^{-6}$ M(例如,小于 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M或 $10^{-9}$ M)。

[0016] 本文所述的抗PKa1抗体可以是全长抗体或其抗原结合片段。可选地或另外,抗体可以是人抗体或人源化的抗体。

[0017] 也在本公开内容范围内的是用于治疗与血浆激肽释放酶相关的各种疾病和病症的药学组合物,或用于制造用于治疗所述疾病和病症的药物的药学组合物。药学组合物每个包含如本文所描述的一种或多种抗PKa1抗体和药学上可接受的载体。

[0018] 此外,本文所述的是治疗与血浆激肽释放酶相关的疾病的方法,包括向需要其的受试者施用有效量的药学组合物,所述药学组合物包含本文所述的一种或多种抗PKa1抗体。在一些实例中,受试者是人患者,其被诊断患有所述疾病、怀疑具有所述疾病,或处在所述疾病的风险中。

[0019] 下面说明书中阐释本发明的一个或多个实施方式的细节。通过下述附图和若干实施方式的详细说明以及通过所附的权利要求,本发明的其他特征或优势将显而易见。

## 附图说明

[0020] 下述附图形成本说明书的一部分并且被包括以进一步显示本公开的某些方面,其可通过参考这些附图的一个或多个结合本文呈现的具体实施方式的详细描述被好地理解。

[0021] 图1显示了衍生DX2930的亲本抗体M0162-A04的重链可变区( $V_H$ )和轻链可变区( $V_L$ )

的氨基酸序列,和它们与所指示的相应种系 $V_H$ 和 $V_L$ 基因的比对。指出了与种系序列相比, M0162-A04中的变化(粗体的)。

[0022] 图2显示了人血浆激肽释放酶的催化结构域(全长人PKa1的残基391-638)的氨基酸序列(SEQ ID NO:40)。粗体的和加下划线的残基指参与和DX2930的Fab片段相互作用的那些残基,如通过下面实施例1讨论的晶体结构所鉴定的。

[0023] 图3是显示源自针对人PKa1的M0162-A04的许多抗体突变体的表观 $K_i$  ( $K_{i,app}$ )的图。

[0024] 图4是显示针对野生型PKa1和许多PKa1突变体的克隆X115-F02(见下面表1)的表观 $K_i$  ( $K_{i,app}$ )的图。

[0025] 图5显示毕赤酵母属(*Pichia*)细胞中产生的许多PKa1突变体(催化结构域)的氨基酸序列。

[0026] 发明详述

[0027] DX-2930是源自亲本克隆M0162-A04的全人IgG。M0162-A04的 $V_H$ 和 $V_L$ 的氨基酸序列显示在图1中。它们与相应的种系 $V_H$ 基因(VH3\_3-23)和 $V_L$ 基因(VK1\_L12)的比对也显示在图1中。与M0162-A04的HC CDR3相比,DX-2930的HC CDR3包括T101I、I103V和A108E的变化(见下面表2;DX-2930的HC CDR3与M0199-A08一致)。Chothia编号方案(Chothia Numbering Scheme)用于本公开。<http://www.bioinf.org.uk/abs/>。

[0028] 下面表1提供了DX-2930、其亲本抗体M0162-A04和其变体的结构信息。也参见US20120201756和US20110200611。

[0029] 表1.DX-2930和相关变体的结构特性

名称	性质
M162-A04	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 这是在初始噬菌体展示选择工作中发现的 DX-2930 的亲本抗体(<math>K_{i,app} = 2.5 \text{ nM}</math>)。</li> <li>• 该抗体在重链的 CDR3 中的 3 个关键氨基酸和种系化位置与 DX-2930 不同。</li> </ul>
M199-A08	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 使用 Hv-CDR3 掺加 (spiking) 方法，在 M0162-A04 的亲性和成熟 (affinity maturation) 之后发现的 Fab (<math>K_{i,app} \sim 0.06 \text{ nM}</math>)。</li> <li>• 该抗体在可变区与 DX-2930 具有相同的氨基酸但是不是种系化的并且不包含 Fc 片段。</li> </ul>
X115-F02	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 全人 IgG, <math>\kappa</math> 轻链</li> <li>• 轻链中的 1 个氨基酸突变成它们的种系序列。</li> <li>• 优化 X115-F02 的 DNA 序列，用于在 CHO 细胞中表达</li> <li>• 在亚克隆至 pRH1-CHO 载体之后，在 293T 细胞中瞬时表达</li> </ul>
DX-2930 (X124-G01)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 全人 IgG, <math>\kappa</math> 轻链</li> <li>• 轻链中的 1 个氨基酸和重链中的 2 个氨基酸突变成它们的种系序列。</li> <li>• 为了在 CHO 细胞中表达，DX-2930 的 DNA 序列被优化，并且被克隆至 pEh1 载体，以使用谷氨酰胺合酶系统稳定表达。</li> <li>• 修饰 DX-2930 的 Fc，以去除 C-末端赖氨酸残基，以便获得更均质的产物。</li> </ul>

[0031] 测定 DX-2930 的 Fab 片段和人血浆激肽释放酶 (PKa1) 的催化结构域之间形成的复合物的晶体结构 (以不同的分辨率)。基于晶体结构提供的结构信息，鉴定了人 PKa1 的催化结构域和抗体 ( $V_H$  和  $V_L$  二者中) 二者中的许多相互作用的残基。PKa1 中的相互作用的残基是开发能够抑制 PKa1 活性的抗体的重要靶标。类似地，抗体中的相互作用的残基也提供了用于设计具有高抑制活性的抗 PKa1 抗体的重要结构信息。

[0032] 此外，进行亲和性成熟分析，以使用克隆 M0162-A04 作为亲本开发高亲和性抗 PKa1

抗体。从亲和性成熟获得的结果与晶体结构提供的结构信息相匹配。基于结构信息和亲和性成熟结果,鉴定了特定的VH和VL基序/残基,用于设计具有高抑制活性的抗PKa1抗体。

[0033] 因此,本文所述的是能够结合血浆激肽释放酶(例如,人血浆激肽释放酶;PKa1)和抑制其活性的抗体,及其用于治疗与血浆激肽释放酶相关的疾病和病症的用途。这样的抗体与PKa1的催化结构域中的一个或多个关键残基相互作用和/或在重链可变区(例如,HC CDR1或HC CDR3)或轻链可变区(例如,LC CDR2)或二者中包括特定的基序/残基。

[0034] 结合PKa1的抗体

[0035] 本公开提供了结合PKa1,尤其是PKa1比如人PKa1的催化结构域的分离的抗体。本文使用的术语“分离的抗体”指基本上不含天然缔合分子的抗体,即,天然缔合的分子以干重计占包含抗体的制剂至多20%。可通过任何适当的方法测量纯度,例如,柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳和HPLC。

[0036] 抗体(以复数形式互换使用)是免疫球蛋白分子,其通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点能够特异性结合靶标,比如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等。如本文所使用,术语“抗体”不仅包括完整的(即,全长)多克隆或单克隆抗体,而且包括其抗原结合片段(比如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv)、单链(scFv)、其突变体、包括抗体部分的融合蛋白、人源化的抗体、嵌合抗体、双抗体、线性抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和包括具有必要特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的构型(configuration),包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体,和共价修饰的抗体。抗体包括任何类的抗体,比如IgD、IgE、IgG、IgA或IgM(或其亚类),并且抗体不需要具有任何具体的类的性质。根据其重链的恒定结构域的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可命名为不同的类。有五个主要的免疫球蛋白类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的若干可进一步分成亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应不同类免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是熟知的。

[0037] 本文所述的抗体能够结合PKa1,尤其是PKa1(例如,人PKa1)的催化结构域,从而抑制PKa1的活性。在一些情况下,本文所述的抗体可抑制PKa1的活性至少50%,例如,60%、70%、80%、90%、95%或更高。抑制常数(K<sub>i</sub>)提供了抑制剂效力的测量;其是使酶活性降低一半需要的抑制剂的浓度并且不取决于酶或底物浓度。可通过常规方法,比如下面实施例2中描述的方法,测定抗PKa1抗体的抑制活性。

[0038] 在一些实例中,通过表观K<sub>i</sub>(K<sub>i,app</sub>)值测定抗PKa1抗体的抑制活性。通过测量不同浓度的抗体对反应程度(例如,酶活性)的抑制作用获得在不同底物浓度的抗体的K<sub>i,app</sub>值;将作为抑制剂浓度的函数的准一级速率(pseudo-first order rate)常数的变化拟合至Morrison方程式(方程式1),产生对表观K<sub>i</sub>值的评估。从K<sub>i,app</sub>对底物浓度的图的线性回归分析提取的y-截距获得K<sub>i</sub>。

$$[0039] \quad v = v_o - v_o \left( \frac{(K_{i,app} + I + E) - \sqrt{(K_{i,app} + I + E)^2 - 4 \cdot I \cdot E}}{2 \cdot E} \right) \quad \text{方程式 1}$$

[0040] 在一些实例中,本文所述的抗PKa1抗体的K<sub>i,app</sub>值小于1nM,例如,0.5nM、0.2nM、0.1nM、0.09nM、0.08nM、0.07nM、0.06nM、0.05nM、0.04nM、0.03nM、0.02nM、0.01nM或更低。可

随后根据本领域已知的和本文所述的(实施例2)方法评估抗体的 $K_{i,app}$ 值。

[0041] 本文所述的抗体可以是鼠科、大鼠、人或任何其他来源(包括嵌合的或人源化的抗体)的。在一些实例中,抗体包括修饰的恒定区,比如免疫惰性的恒定区,例如,不触发补体介导的裂解或不刺激抗体-依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的恒定区。可使用美国专利号5,500,362中公开的方法评估ADCC活性。在其他实施方式中,如Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624、PCT申请号PCT/GB99/01441和/或UK专利号9809951.8描述修饰恒定区。

[0042] 本文所述的任何抗体可以是单克隆或多克隆的。“单克隆抗体”指同质性(homogenous)抗体群体和“多克隆抗体”指异质性(heterogeneous)抗体群体。这两个术语不限制抗体的来源或制备其的方式。

[0043] 在一个实例中,本文所述的方法中使用的抗体是人源化的抗体。人源化的抗体指非人(例如鼠)抗体的形式,其是包含最少源自非人免疫球蛋白序列的特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其抗原结合片段。对于大部分,人源化的抗体是人免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者的互补决定区域(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)比如小鼠、大鼠或兔子的具有期望特异性、亲和性和能力的CDR的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人残基替换。此外,人源化的抗体可包括既不在接受者抗体也不在输入的CDR或框架序列中发现的残基,但是被包括以进一步改善和优化抗体性能。一般而言,人源化的抗体包括基本上所有的至少一个和通常两个可变区,其中所有或基本上所有的CDR区域对应非人免疫球蛋白的那些,和所有的或基本上所有的FR区域是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化的抗体也最佳包括至少一部分免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区或结构域(Fc)。抗体可具有如WO 99/58572中描述的修饰的Fc区域。其他形式的人源化的抗体具有一个或多个相对于初始抗体被改变的CDR(一、二、三、四、五、六个),其也称为“源自”一个或多个来自初始抗体的CDR的一个或多个CDR。人源化的抗体也可参与亲和性成熟。

[0044] 在另一实例中,本文所述的抗体是嵌合抗体,其可包括来自人抗体的重链恒定区和轻链恒定区。嵌合抗体指具有来自第一物种的可变区或部分可变区以及来自第二物种的恒定区的抗体。典型地,在这些嵌合抗体中,轻链和重链二者的可变区模拟源自一个哺乳动物物种(例如,非人哺乳动物比如小鼠、兔子和大鼠)的抗体的可变区,而恒定部分与源自另一哺乳动物比如人的抗体的序列同源。在一些实施方式中,可对可变区和/或恒定区进行氨基酸修饰。

[0045] 在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体具有对PKa1或其催化结构域适当的结合亲和力。如本文所使用,“结合亲和力”指表观缔合常数或 $K_A$ 。 $K_A$ 是解离常数( $K_D$ )的倒数。本文所述的抗体可具有至少 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ M或更低的结合亲和力( $K_D$ )。增加的结合亲和力对应下降的 $K_D$ 。抗体与第一靶标相对于第二靶标的更高的亲和性结合可以由与结合第二靶标的 $K_A$ (或数值 $K_D$ )相比更高的结合第一靶标的 $K_A$ (或更小数值 $K_D$ )指示。在这样的情况下,抗体相对于第二靶标(例如,处于第二构型的相同蛋白质或其模拟物(mimic);或第二蛋白质)具有对第一靶标(例如,处于第一构型的蛋白质或其模拟物)的特异性。结合亲和力(例如,对于特异性或其他比较)的差异可以是至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000或 $10^5$ 倍。

[0046] 可通过各种方法测定结合亲和力,包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离子共振,或光谱学(例如,使用荧光试验)。对于评估结合亲和力的示例性条件是在HBS-P缓冲液(10mM HEPES pH7.4,150mM NaCl,0.005% (v/v)表面活性剂P20)中。这些技术可用于测量结合的结合蛋白质作为靶蛋白质浓度的函数的浓度。结合的结合蛋白质([结合的])的浓度与游离靶蛋白质([游离的])的浓度和靶标上结合蛋白质的结合位点的浓度有关,其中(N)是每个靶分子的结合位点的数量,如下述方程式:

[0047]  $[结合的] = [N][游离的] / (K_d + [游离的])$

[0048] 不总是必须进行精确测定 $K_A$ ,但是,因为有时足以获得亲和性的定量测量,例如,使用比如ELISA或FACS分析方法测定,亲和性与 $K_A$ 成比例,并且因此可用于比较,比如确定更高的亲和性是否是例如2倍更高,以获得亲和性的定性测量或获得亲和性的推导,例如,通过功能试验例如体外或体内试验中的活性。

[0049] 人血浆激肽释放酶中抗体靶向特异性残基

[0050] 在一些实施方式中,抗PKa1抗体与人PKa1中催化结构域的一个或多个残基(例如,至少3、5、8、10、15、20、25、30、35、40或45个)相互作用,所述催化结构域包括V410、L412、T413、A414、Q415、R416、L418、C419、H434、C435、F436、D437、G438、L439、W445、Y475、K476、V477、S478、E479、G480、D483、F524、E527、K528、Y552、D554、Y555、A564、D572、A573、C574、K575、G576、S578、T596、S597、W598、G599、E600、G601、C602、A603、R604、Q607、P608、G609、V610和Y611(数量基于全长前激肽释放酶氨基酸序列)。这些残基的位置指示在图2中(粗体的和加下划线的)。根据下面实施例1中描述的晶体结构,这些残基鉴定为对于PKa1活性是重要的。

[0051] 在一些实施方式中,抗PKa1抗体与人PKa1催化结构域中的一个或多个残基(例如,至少3、5、8、10、15、20或23个)相互作用,所述催化结构域包括L418、C419、H434、C435、D437、G438、L439、Y475、D483、F524、D572、A573、C574、K575、G576、S578、T596、S597、W598、G599、E600、G601和C602(数量基于全长前激肽释放酶氨基酸序列)。

[0052] 在一些实施方式中,抗PKa1抗体与人PKa1催化结构域中的一个或多个残基(例如,至少3、5或8个)相互作用,所述催化结构域包括K476、V477、S478、E479、G480、Y552、D554和Y555(数量基于全长前激肽释放酶氨基酸序列)。

[0053] 在一些实施方式中,抗PKa1抗体与人PKa1的催化结构域中的一个或多个残基(例如,至少3、5、8或10个)相互作用,所述催化结构域包括V410、L412、T413、A414、Q415、R416、E527、K528、A603和R604(数量基于全长前激肽释放酶氨基酸序列)。

[0054] 在一些实施方式中,抗PKa1抗体与人PKa1的催化结构域中一个或多个残基(例如,至少3、5、或6个)相互作用,所述催化结构域包括W445、Q607、P608、G609、V610和Y611(数量基于全长前激肽释放酶氨基酸序列)。

[0055] 在一些实施方式中,抗PKa1抗体与人PKa1的催化结构域中的一个或多个残基(例如,至少3、5、8或9个)相互作用,所述催化结构域包括F524、D572、A573、C574、K575、G576、S578、G601和C602(数量基于全长前激肽释放酶氨基酸序列)。

[0056] 在一些实施方式中,抗PKa1抗体与人PKa1的催化结构域中的一个或多个残基(例如,至少3、5或8个)相互作用,所述催化结构域包括L418、C419、H434、C435、D437、G438、Y475和D483(数量基于全长前激肽释放酶氨基酸序列)。

[0057] 在一些实施方式中,抗PKa1抗体与人PKa1的催化结构域中的一个或多个残基(例如,至少3或4个)相互作用,所述催化结构域包括S597、W598、G599和E600(数量基于全长前激肽释放酶氨基酸序列)。

[0058] 相互作用意思是由两个结合配体(binding partner)形成的复合物中两个残基之间的距离小于预定的值,例如, $< 6 \text{ \AA}$ 、 $< 4 \text{ \AA}$ 或 $< 2 \text{ \AA}$ 。例如,一个结合配体中的相互作用的残基可在来自复合结构上另一结合配体的残基的至少1原子的给定阈值(例如, $< 6 \text{ \AA}$ 、 $< 4 \text{ \AA}$ 或 $< 2 \text{ \AA}$ )内具有至少1原子。相互作用不必实际结合。相互作用的残基提示参与抗体识别。

[0059] 在一些实施方式中,本文所述的抗体在包括上面列举的一个或多个残基的表位结合人PKa1。“表位”指靶化合物上由抗体比如Fab或全长抗体结合的位点。表位可以是线性的,其长度通常是6-15个氨基酸。可选地,表位可以是构象的。

[0060] 在一些实例中,本文所述的抗PKa1抗体结合包括下述区段的表位:V410-C419、H434-L439、Y475-G480、F524-K528、Y552-Y555、D572-S578、T596-R604或Q607-Y611。

[0061] 在一些实例中,本文公开的抗体特异性结合PKa1或其中的表位。“特异性结合”(本文替换使用)靶或表位的抗体是本领域熟知的术语,并且测定这样的特异性结合的方法也是本领域熟知的。如果分子相比可选的靶,更经常、更快速,以更长的持久性和/或以更大的亲和性与具体的靶抗原反应或结合,认为所述分子展示“特异性结合”。如果抗体与结合其他物质相比,以更大的亲和性、抗体亲抗原性、更容易和/或以更长的持久性结合,则所述抗体“特异性结合”靶抗原。例如,特异性(或优先)结合人PKa1或其中表位的抗体是比其结合其他抗原或相同抗原中其他表位,以更大亲和性、抗体亲抗原性、更容易和/或以更长的持久性结合该靶抗原的抗体。通过阅读本定义,也理解,例如,特异性结合第一靶抗原的抗体可以或不可以特异性或或优先结合第二靶抗原。这样,“特异性结合”或“优先结合”不一定需要(尽管其可包括)专一性结合。一般而言,但是没必要,提及结合意思是优先结合。

[0062] 在一个实例中,本文所述的抗PKa1抗体与在R551、Q553、Y555、T558和R560中的一个或多个处包括突变的突变体例如实施例3中描述的突变体2相比,优先结合野生型。这样的抗体可以与突变体相比以相当更高的亲和性(例如,至少2倍、5倍、10倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍更高)结合野生型PKa1。可选地或另外,抗体相对于突变体展示针对野生型pKa1相当更高的抑制活性(例如,至少2倍、5倍、10倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍更高)。

[0063] 在其他实例中,本文所述的抗PKa1抗体结合活性PKa1,包括野生型pKa1和其功能变体。相对于其与失活突变体的结合,抗体可优先结合活性PKa1。

[0064] 具有特定的基序和/或残基的抗血浆激肽释放酶抗体

[0065] 在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体包括 $V_H$ 和 $V_L$ ,其每个包括在框架区侧翼的三个CDR(FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4;见图1)。重链的CDR3可包括基序: $X_{99}R_{100}X_{101}G_{102}X_{103}P_{104}R_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}X_{110}X_{111}$ ,其中 $X_{99}$ 是R或Q, $X_{101}$ 是T、I、R、S或P, $X_{103}$ 是V、I或L, $X_{106}$ 是R或W, $X_{107}$ 是D或N, $X_{108}$ 是A、S、D、E或V, $X_{109}$ 是F或L, $X_{110}$ 是D、E或N,和 $X_{111}$ 是I、N、M或S。在一些实例中, $X_{99}$ 是Q和 $X_{101}$ 是I、R、S或P。可选地或另外, $X_{106}$ 是W和 $X_{111}$ 是N、M或S。在其他实例中, $X_{101}$ 是I, $X_{108}$ 是E,和 $X_{103}$ 是I或L;或 $X_{101}$ 是I和 $X_{103}$ 是I或L。在仍其他实例中, $X_{103}$ 是I或L和 $X_{110}$ 是D、E或N。

[0066] 另外,这样的抗pKa1抗体可包括基于本文讨论的晶体结构被鉴定为参与和人PKa1的催化结构域相互作用的一个或多个其他残基。这些残基可位于V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>链中。例子包括V<sub>H</sub>的FR1中的E1、V2、F27、T28、F29和S30,HC CDR1中的H<sub>31</sub>;LC CDR1中的S31和W32,V<sub>L</sub>链的FR1中的Y49,LC CDR2中的K50、T53、L54和E55和S56,以及V<sub>L</sub>链的FR3中的G57和V58。

[0067] 如上述的抗PKa1抗体可使用任何种系重链和轻链V基因作为框架。重链V基因包括但不限于IGHV1-2、IGHV1-3、IGHV1-8、IGHV1-18、IGHV1-24、IGHV1-45、IGHV1-46、IGHV1-58、IGHV1-69、IGHV2-5、IGHV2-26、IGHV2-70、IGHV3-7、IGHV3-9、IGHV3-11、IGHV3-13、IGHV3-15、IGHV3-20、IGHV3-21、IGHV3-23、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHV3-43、IGHV3-48、IGHV3-49、IGHV3-53、IGHV3-64、IGHV3-66、IGHV3-72、IGHV3-73、IGHV3-74、IGHV4-4、IGHV4-28、IGHV4-31、IGHV4-34、IGHV4-39、IGHV4-59、IGHV4-61、IGHV4-B、IGHV5-51、IGHV6-1和IGHV7-4-1。

[0068] 在一些实施例中,抗体使用κ轻链。轻链VK基因包括但不限于用于下述的V基因:IGKV1-05、IGKV1-06、IGKV1-08、IGKV1-09、IGKV1-12、IGKV1-13、IGKV1-16、IGKV1-17、IGKV1-27、IGKV1-33、IGKV1-37、IGKV1-39、IGKV1D-16、IGKV1D-17、IGKV1D-43、IGKV1D-8、IGKV2-24、IGKV2-28、IGKV2-29、IGKV2-30、IGKV2-40、IGKV2D-26、IGKV2D-29、IGKV2D-30、IGKV3-11、IGKV3-15、IGKV3-20、IGKV3D-07、IGKV3D-11、IGKV3D-20、IGKV4-1、IGKV5-2、IGKV6-21和IGKV6D-41。在其他实例中,抗体使用λ轻链,例如,任何IGLV1-IGLV10。

[0069] 抗体也可使用任何种系重链J区段(例如,重链IGJH1-IGJH6)和轻链J区段(例如,IGJK1、IGJK2、IGJK3、IGJK4或IGJK5),其可经历变异,比如在C-末端、N-末端,或二者的缺失。

[0070] 种系抗体基因/区段序列是本领域熟知的。见,例如,<http://www.vbase2.org/vbstat.php>。

[0071] 在一些实例中,本文所述的抗PKa1抗体使用VH3\_3-23和/或VK1\_L12作为重链和/或轻链的框架。其可包括基本上类似的HC CDR1、HC CDR2和/或HC CDR3,和LC CDR1、LC CDR2和/或LC CDR3,如M0162-A04中的那些(图1),例如,与M0162-A04中相应的CDR区域相比,包含5、4、3、2或1个氨基酸残基变异。

[0072] 在其他实例中,抗PKa1抗体包括:V<sub>H</sub>链,其包括与M0162-A04相应的V<sub>H</sub> CDR至少75%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性的V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2和V<sub>H</sub> CDR3;和V<sub>L</sub>链,其包括与M0162-A04相应的V<sub>L</sub> CDR至少75%(例如,80%、85%、90%、95%、或98%)同一性的V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2和V<sub>L</sub> CDR3。

[0073] 可选地,抗PKa1抗体包括与M0162-A04的V<sub>H</sub>链(成熟的或前体)至少75%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性的V<sub>H</sub>链和/或与M0162-A04的V<sub>L</sub>链(成熟的前体)至少75%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性的V<sub>L</sub>链。

[0074] 使用Karlin和Altschul的算法Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990,如Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77,1993改良的算法,测定两个氨基酸序列的“同一性百分数”。这样的算法并入了Altschul等的J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(2.0版本)。可用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索,分数=50,字长=3,以获得与感兴趣的蛋白质分子同源的氨基酸序列。当两个序列之间存在空隙时,可使用空隙化的BLAST,如Altschul等的Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997中描述的。当利用BLAST和空隙化BLAST程序时,可使用各自程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认

参数。

[0075] 在一些情况下,保守突变可引入M0162-A04中的CDR,例如,在其中如基于晶体结构确定的残基不可能参与和PKa1相互作用的位置。如本文所使用,“保守氨基酸取代”指其中进行氨基酸取代不改变蛋白质的相对电荷或尺寸特征的氨基酸取代。可根据本领域普通技术人员已知的改变多肽序列的方法制备变体,比如见汇编这样方法的参考文献,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook,等,eds.,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel,等,eds.,John Wiley&Sons,Inc.,New York。氨基酸的保守取代包括在下述组的氨基酸内进行的取代:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;和(g)E、D。

[0076] 在一些实施方式中,本文描述的抗PKa1抗体不是US20110200611中描述的那些,该专利通过引用并入本文。

[0077] 在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体结合如DX-2930一样的表位和/或竞争与DX-2930的结合,条件是抗PKa1抗体不是DX-2930。在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体结合PKa1中的序列SWGE(SEQ ID NO:48)和/或DACKG(SEQ ID NO:49)。在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体不结合PKa1中的序列SWGE(SEQ ID NO:48)和/或DACKG(SEQ ID NO:49)。在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体结合PKa1中的序列GL、SEG、TSWGEG(SEQ ID NO:50)和/或DACKG(SEQ ID NO:49)。在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体不结合PKa1中的序列GL、SEG、TSWGEG(SEQ ID NO:50)和/或DACKG(SEQ ID NO:49)。在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体不结合序列LVTNEECQKRYQDYKITQQ(SEQ ID NO:51)、WVTGWGFSKEKGEI(SEQ ID NO:52)、ACKGDSGGPL(SEQ ID NO:53)、SWGDI(SEQ ID NO:54)、HDIALIKL(SEQ ID NO:55)、TPFSQIKEI I IHQNY(SEQ ID NO:56)和/或AHCFDGLPLQDVWRIY(SEQ ID NO:57)。

[0078] 在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体结合位于PKa1的活性结构域中的表位(整个表位或其一部分)并且不同于DX-2930的表位。这样的抗体的表位可与DX-2930的那些表位具有重叠残基。可选地,在两个表位之间可能没有重叠残基。

[0079] DX-2930全长重链和轻链的序列显示在下方。

[0080] DX-2930重链氨基酸序列(451个氨基酸)

[0081] EVQLLES~~GGGLVQ~~PGGSLRLS~~CAASGFTFSHYIMMWVRQ~~APGKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRF  
TISRDN~~S~~KNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIW~~GGQGM~~TV~~VSSASTKGPSV~~FPLAPSSKSTSGGT~~  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLS~~SVVTV~~PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV~~  
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPG(SEQ ID NO:46)

[0082] DX-2930轻链氨基酸序列(213个氨基酸)

[0083] DIQMTQSPSTLSASV~~GDRV~~ITCRASQSISSWLA~~WYQQKPKAPKLLIYKASTLES~~GVPSR~~FSGSGS~~  
TEFTLTISS~~LQ~~PD~~FATYYCQQYNTY~~WTFGQGT~~KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV~~CLLN~~FNYP~~P~~REAK~~  
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQ~~DSK~~STY~~LS~~SSTL~~TLSKADYEKHKVYACEVTHQGL~~SSPV~~TKSFNR~~GEC(SEQ ID

NO:47)

[0084] 在上面的序列中,恒定区是斜体的和CDR区域是加粗的和加下划线的。

[0085] 抗体制备

[0086] 可通过本领域已知的任何方法制备如本文所描述的能够结合PKa1的抗体。见,例如,Harlow和Lane,(1988) *Antibodies:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Laboratory,New York。

[0087] 在一些实施方式中,可通过常规的杂交瘤技术制备对靶抗原(例如,人PKa1或其催化结构域)特异性的抗体。全长靶抗原或其片段,任选地结合载体蛋白比如KLH,可用于免疫宿主动物,用于产生结合该抗原的抗体。免疫宿主动物的路线和方案一般按照抗体刺激和生产的既定的和常规的技术,如本文进一步描述。用于产生小鼠抗体、人源化抗体和人抗体的一般技术是本领域已知的和本文所述的技术。考虑任何哺乳受试者,包括人或来自其的抗体产生细胞可被操作,以用作产生哺乳细胞系,包括人杂交瘤细胞系的基础。典型地,宿主动物腹膜内、肌肉、口服、皮下、足底内和/或皮内接种一定量的免疫原,包括如本文所描述的免疫原。

[0088] 可从淋巴细胞和永生化的骨髓瘤细胞,使用Kohler,B.和Milstein,C.(1975) *Nature* 256:495-497或如Buck,D.W.等,*In Vitro*,18:377-381(1982)改良的一般体细胞杂交技术制备杂交瘤。可用的骨髓瘤系,包括但不限于X63-Ag8.653和来自Salk Institute,Cell Distribution Center,San Diego,Calif.,USA的那些,可用于杂交。一般而言,该技术涉及使用融合剂比如聚乙二醇,或通过本领域技术人员熟知的的电学技术,使骨髓瘤细胞和淋巴细胞融合。融合之后,从融合培养基分离细胞并且在选择性生长培养基比如次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)培养基上生长,以消除未杂交的亲本细胞。本文所述的任何补充有血清或没有血清的培养基可用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一可选方案,EBV永生化的B细胞可用于产生本文所述的抗PKa1单克隆抗体。如果需要,则扩展和亚克隆杂交瘤,并且通过常规的免疫试验程序(例如,放射免疫分析、酶免疫试验或荧光免疫试验)分析上清液的抗免疫原活性。

[0089] 可用作抗体来源的杂交瘤包括产生能够干扰PKa1活性的单克隆抗体的亲本杂交瘤的所有衍生物、子代细胞。产生这样的抗体的杂交瘤可在体外或体内使用已知的程序生长。如果需要,单克隆抗体可通过常规的免疫球蛋白纯化程序比如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱和超滤从培养基或体液中分离。如果存在非期望的活性,可例如通过使制品在连接至固相的由免疫原制备的吸附剂上运行并且从免疫原洗脱或释放期望的抗体,而去除非期望的活性。使用双功能或衍生化试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester)(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl<sub>2</sub>或R<sub>1</sub>N=C=NR,其中R和R<sub>1</sub>是不同的烷基基团,用靶抗原或包含缀合至在待免疫的物种中是免疫原性的蛋白质的靶氨基酸序列的片段免疫宿主动物可产生大量的抗体(例如,单克隆抗体),所述免疫原性的蛋白质是例如钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0090] 如果需要,可对感兴趣的抗体(单克隆或多克隆)(例如,通过杂交瘤产生的)测序并且然后多核苷酸序列可克隆至载体,用于表达或增殖。编码感兴趣的抗体的序列可保持在宿主细胞的载体中并且可然后扩展宿主细胞并且冷冻用于进一步使用。可选的,多核

核苷酸序列可用于遗传操作以“人源化”抗体或改善抗体的亲和性(亲和性成熟),或其他特征。例如,恒定区可被工程化为更类似的人恒定区,以避免如果抗体用于人类的临床试验和治疗的免疫应答。可期望基因操作抗体序列,以获得对靶抗原更大的亲和性和抑制PKa1活性更大的效力。对本领域技术人员显而易见,可对抗体进行一个或多个多核苷酸改变并且仍维持其对靶抗原的结合特异性。

[0091] 在其他实施方式中,可通过使用商业上可得的小鼠获得全人抗体,所述小鼠已经被工程化以表达特定的人免疫球蛋白。设计为产生更期望的(例如,全人抗体)或更强健的免疫应答的转基因动物也可用于产生人源化的或人抗体。这样的技术的例子是来自Amgen, Inc.的Xenomouse<sup>RTM</sup>(Fremont, Calif.)和来自Medarex, Inc.的HuMAb-Mouse<sup>RTM</sup>和TC Mouse<sup>TM</sup>(Princeton, N.J.)。另外可选的,抗体可通过噬菌体展示或酵母技术进行重组。见,例如,美国专利号5,565,332、5,580,717、5,733,743和6,265,150;以及Winter等,(1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455,和。可选地,噬菌体展示技术(McCafferty等,(1990) *Nature* 348:552-553)可用于从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因谱系(gene repertoires)在体外产生人抗体和抗体片段。

[0092] 可经常规方法制备完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段。例如,可通过胃蛋白酶消化抗体分子产生F(ab')<sub>2</sub>片段,和可通过还原F(ab')<sub>2</sub>片段的二硫键产生Fab片段。

[0093] 可经例如常规的重组技术产生基因工程化的抗体,比如人源化的抗体、嵌合抗体、单链抗体和双特异性抗体。在一个实例中,编码对靶抗原特异性的单克隆抗体的DNA可容易地使用常规的程序(例如,通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)分离和测序。杂交瘤细胞用作这样的DNA的优选来源。一旦分离,DNA可置入一个或多个表达载体中,其然后转染至宿主细胞比如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞——否则不能产生免疫球蛋白蛋白质,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。见,例如,PCT公开号WO 87/04462。然后,可例如通过代替同源的鼠序列取代人重链和轻链恒定结构域的编码序列来修饰DNA,Morrison等,(1984) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851,或通过共价结合至免疫球蛋白编码序列,所有或部分编码序列用于非免疫球蛋白多肽,来修饰DNA。以该方式,基因工程化的抗体,比如“嵌合”或“杂交”抗体,可被制备为具有靶抗原的结合特异性。

[0094] 开发的用于产生“嵌合抗体”的技术是本领域熟知的。见,例如,Morrison等(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81,6851;Neuberger等(1984) *Nature* 312,604;和Takeda等(1984) *Nature* 314:452。

[0095] 构建人源化的抗体的方法也是本领域熟知的。见,例如,Queen等,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033(1989)。在一个实例中,亲本非人抗体的VH和VL的可变区根据本领域已知的方法进行三维分子模拟分析。接下来,使用相同分子模拟分析鉴定被预测为对于形成正确的CDR结构是重要的框架氨基酸残基。平行地,从任何抗体基因数据库使用亲本VH和VL序列作为搜索查询鉴定具有与亲本非人抗体同源的那些氨基酸序列的人VH和VL链。然后选择人VH和VL受体基因。

[0096] 可来自亲本非人抗体或其功能变体的CDR区域替换所选择的人受体基因内的CDR区域。当必要时,预测对于和CDR区域相互作用是重要的亲本链的框架区中的残基(见上面说明书)可用于取代人受体基因中相应的残基。

[0097] 可经重组技术通过连接编码重链可变区的核苷酸序列和编码轻链可变区的核苷酸序列来制备单链抗体。优选地,柔性接头并入在两个可变区之间。可选地,可采用描述用于产生单链抗体的技术(美国专利号4,946,778和4,704,692),以产生噬菌体或酵母scFv文库,并且可根据常规程序从库中鉴定对PKa1特异的scFv克隆。阳性克隆可进行进一步筛选,以鉴定抑制PKa1活性的那些。

[0098] 可使用本领域熟知的方法表征根据本领域已知的和本文所描述的方法获得的抗体。例如,一个方法是鉴定抗原所结合的表位,或“表位绘图”。有许多本领域已知的方法用于绘图和表征蛋白质上表位的位置,包括解析抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争试验、基因片段表达试验和基于合成肽的试验,如例如在Harlow和Lane的Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999中11章描述。在另外的实例中,表位绘图可用于确定抗体所结合的序列。表位可以是线性表位,即,包含在单个的氨基酸段中,或由氨基酸的三维相互作用形成的构型表位,其可能没必要包含在单个段(初级结构线性序列)中。可分离或合成(例如,重组)不同长度(例如,至少4-6个氨基酸长)的肽并用于抗体的结合试验。在另一实例中,可在系统筛选中,通过使用源自靶抗原序列的重叠肽和通过抗体测定结合,测定抗体所结合的表位。根据基因片段表达试验,使编码靶抗原的开放阅读框随机或通过特异性基因构建片段化,并且测定与待测试抗体的抗原的表达片段的反应性。可例如通过PCR产生基因片段,并且然后在存在放射性氨基酸的情况下体外转录和翻译成蛋白质。然后通过免疫沉淀和凝胶电泳测定抗体与放射性标记的抗原片段的结合。也可通过使用展示在噬菌体颗粒表面上的随机肽序列大文库(噬菌体文库)鉴定某些表位。可选地,定义的重叠肽片段的文库可在简单的结合试验中用于测试抗体的结合而被测试。在另外的实例中,可进行抗原结合结构域的诱变、结构域交换实验和丙氨酸扫描诱变,以鉴定对于表位结合必要的、足够的和/或必须的残基。例如,可使用其中PKa1多肽的各种片段已经用来自密切相关、但是抗原性不同的蛋白质(比如神经营养蛋白家族的另一成员)的序列替换(交换)的靶抗原的突变体进行结构域交换实验。通过评估抗体与突变体PKa1(例如,下面实施例2中描述的那些突变体)的结合,可评估具体的抗原片段对抗体结合的重要性。

[0099] 可选地,可使用结合相同抗原的已知其他抗体进行竞争试验,以测定抗体是否如其他抗体一样结合相同表位。竞争试验是本领域技术人员熟知的。

[0100] 可应用本领域已知的任何适当的方法,例如,如本文所描述的表位绘图方法,以确定抗PKa1抗体是否结合如本文所描述的PKa1中的一个或多个特异性残基/区段。此外,可通过常规技术测定抗体与PKa1中一个或多个那些限定的残基的相互作用。例如,可根据下面实施例1中公开的方法测定晶体结构,并且相应地可测定PKa1中的残基和抗体中一个或多个残基之间的距离。基于这样的距离,可测定PKa1中的特定残基是否与抗体中的一个或多个残基相互作用。此外,可应用适当的方法,比如竞争试验和靶诱变试验,以测定候选抗PKa1抗体相比另一靶标比如突变体PKa1与PKa1的优先结合。

#### [0101] 药学组合物

[0102] 一种或多种上述抗PKa1抗体可与药学上可接受的载体(赋形剂),包括缓冲液混合,以形成用于减轻与PKa1相关的疾病或病症的药学组合物。“可接受的”意思是载体必须与组合物的活性成分相容(和优选地,能够稳定活性成分)并且不对待治疗的受试者有害。

药学上可接受的赋形剂(载体)包括本领域熟知的缓冲液。见,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams和Wilkins, Ed. K.E. Hoover。在一个实例中,本文所述的药学组合物包含大于一种识别靶抗原的不同表位/残基的抗PKa1抗体。

[0103] 用于本方法的药学组合物可包括药学上可接受的以冻干制剂或水溶液形式的载体、赋形剂或稳定剂。(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams和Wilkins, Ed. K.E. Hoover)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度对接受者无毒,并且可包括:缓冲液,比如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(比如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵/苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯比如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,比如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,比如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,比如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂,比如EDTA;糖,比如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的抗衡离子,比如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,比如TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。本文进一步描述了药学上可接受的赋形剂。

[0104] 在一些实例中,本文所述的药学组合物包括包含抗PKa1抗体的脂质体,其可通过本领域已知的方法制备,比如Epstein,等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang,等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980);和美国专利号4,485,045和4,544,545中描述的。在美国专利号5,013,556中公开了具有增强循环时间的脂质体。用包括磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生化的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物,可通过反相蒸发方法产生尤其有用的脂质体。通过限定孔径大小的过滤器挤出脂质体,以产生具有期望直径的脂质体。

[0105] 抗PKa1抗体也可捕获在通过例如凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如,分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗滴乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚甲基丙烯酸甲酯微胶囊。这样的技术是本领域已知的,见,例如,Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)。

[0106] 在其他实例中,本文所述的药学组合物可配制为持续释放形式。持续释放制剂的适当例子包括包含抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质,该基质为成形制品的形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和7乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物比如LUPRON DEPOT<sup>TM</sup>(由乳酸-乙醇酸共聚物和亮丙瑞林乙酸酯组成的可注射的微球)、蔗糖乙酸酯异丁酯和聚D-(-)-3-羟基丁酸。

[0107] 用于体内施用的药学组合物必须是无菌的。这容易通过例如无菌过滤膜的过滤实现。治疗性抗体组合物一般放入具有无菌入口的容器,例如,具有皮下注射针可刺破的阻塞物的静脉溶液包或小瓶。

[0108] 本文所述的药学组合物可以是为单位剂量形式,比如片剂、丸剂、胶囊、粉末、颗粒剂、溶液或悬液或栓剂,用于口服、肠胃外或直肠施用,或通过吸入或吹入法施用。对于制备固体组合物比如片剂,可将主要活性成分与药学载体——例如常规的制片成分比如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶和其他药学稀释剂例如水——混合,以形成固体预制剂组合物,其包含本发明化合物或其无毒的药学上可接受的盐的均质混合物。当提及这些预制剂组合物是均质的,意思是活性成分在组合物中均匀分散,以使组合物可容易细分成同等有效的单位剂量形式,比如片剂、丸剂和胶囊。该固体预制剂组合物然后细分成包含0.1至约500mg本发明活性成分的上述类型的单位剂量形式。新组合物的片剂或丸剂可被涂布或以其他方式调节,以提供赋予延长作用优势的剂量形式。例如,片剂或丸剂可包括内剂量和外剂量组分,后者为对前者包封的形式。两种组分可由肠溶层分开,所述肠溶层用于抵抗胃中的崩裂并且允许内组分完整穿过十二指肠或延迟释放。各种材料可用于这样的肠溶层或涂层,这样的材料包括许多聚合酸和聚合酸与作为紫胶、十六醇和醋酸纤维素的这样材料的混合物。适当的表面活性剂包括,尤其是,非离子试剂,比如聚氧乙烯脱水山梨糖醇(例如Tween™ 20、40、60、80或85)和其他脱水山梨糖醇(例如Span™ 20、40、60、80或85)。具有表面活性剂的组合物适宜地包括0.05和5%之间的表面活性性,和可以是0.1和2.5%之间的表面活性剂。将明白,如果需要,可添加其他成分,例如甘露醇或其他药学上可接受的媒介。

[0109] 可使用商业上可得的脂肪乳液,比如Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™和Lipiphysan™,制备合适的乳液。活性成分可溶解在预混合乳液组合物中或可选地其可溶解在油(例如大豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)和与磷脂(例如卵磷脂(egg phospholipid)、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合后形成的乳液中。应理解,可添加其他成分,例如丙三醇或葡萄糖,以调整乳液的张力。适当的乳液通常包含上至20%,例如,5和20%之间的油。脂肪乳液可包括0.1和1.0.im,尤其0.1和0.5.im,并且pH范围是5.5至8.0的脂肪液滴。

[0110] 乳液组合物可以通过混合抗PKa1抗体与Intralipid™或其组分(大豆油、卵磷脂、丙三醇和水)而制备的那些。

[0111] 用于吸入或吹入的药学组合物包括药学上可接受的水性或有机溶剂或其混合物中的溶液和悬液和粉末。液体或固体组合物可包含如上所阐释的适当的药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,通过口服或鼻的呼吸途径施用组合物,用于局部或全身性作用。

[0112] 可通过使用气体雾化在优选地无菌药学上可接受的溶剂中的组合物。雾化的溶液可直接从雾化设备吸入或雾化设备可连接至面罩、帷帐或间歇正压呼吸机。可优选地口服或经鼻从以适当方式递送制剂的设备施用溶液、悬浮或粉末组合物。

[0113] 抗PKa1抗体用于治疗与血浆激肽释放酶相关疾病/病症的用途

[0114] 本文所述的抗PKa1抗体有效治疗与PKa1相关的疾病或病症。可通过本文所述的血浆激肽释放酶结合蛋白治疗(或预防)的这样的疾病和病况的例子包括:风湿性关节炎、痛风、肠道疾病、口腔黏膜炎、神经性疼痛、炎性疼痛、椎管狭窄退行性脊椎病、动脉或静脉血栓症、术后肠梗阻、主动脉瘤、骨关节炎、血管炎、水肿、遗传性血管性水肿、脑水肿、肺栓塞、中风、心室辅助设备或支架诱导的凝血、头部创伤或瘤周脑水肿、脓毒、急性大脑中动脉(MCA)缺血性事件(中风)、再狭窄(例如,血管成形术之后)、系统性红斑狼疮性肾炎、烧伤和

DME。本文所述的血浆激肽释放酶结合蛋白也可用于促进创伤愈合。本文所述的血浆激肽释放酶结合蛋白也可用作通过包括但不限于阻碍产生促血管生成缓激肽的机制的肿瘤学治疗。

[0115] 为了实施本文公开的方法,有效量的上述药学组合物可经适当的路径施用至需要治疗的受试者(例如,人),比如静脉内给药,例如,作为大丸剂或通过在规定时间内经肌内、腹膜内、颅内脊髓、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、吸入或局部路径持续注入。商业上可得的用于液体制剂的雾化器,包括喷嘴雾化器和超声雾化器,用于施用。液体制剂可直接雾化和冻干粉末可在重构之后雾化。可选地,抗PKa1抗体可使用碳氟化合物制剂和定量吸入器雾化,或作为冻干和研磨粉末吸入。

[0116] 通过本文所述的方法治疗的受试者可以是哺乳动物,更优先地是人。哺乳动物包括但不限于农场动物、体育动物、宠物、灵长类、马、狗、猫、小鼠和大鼠。需要治疗的人受试者可以是具有、处在或怀疑具有与PKa1相关疾病/病症风险的人患者,比如上面叙述的那些。可通过常规医学检查例如实验室检测、器官功能检测、CT扫描或超声鉴定具有PKa1相关疾病或病症的受试者。怀疑具有任何这样的疾病/病症的受试者可能显示该疾病/病症的一个或多个症状。处在疾病/病症风险中的受试者可以是具有该疾病/病症的一个或多个风险因素的受试者。

[0117] 如本文所使用,“有效量”指赋予受试者疗效的所需的单独或结合一种或多种其他活性试剂的每个活性试剂的量。如本领域技术人员认识到,取决于正治疗的具体病况;病况的严重程度;个体患者参数,包括年龄、身体条件、尺寸、性别和体重;治疗的持续时间;并行治疗(如果存在的话)的性质;施用的具体路径等因素,有效量在健康从业者的知识和技能之内变化。这些因素是本领域技术人员熟知的并且可用不过多的常规实验解决。一般优选的是使用最大剂量的单个组分或其组合,即,根据健康医学判断的最高安全剂量。但是,本领域技术人员将理解,患者可由于医学原因、心理原因或实际上任何其他原因而坚持更低剂量或容许剂量。

[0118] 经验考虑,比如半衰期,一般有助于确定剂量。例如,与人免疫系统相容的抗体,比如人源化的抗体或全人抗体,可用于延长抗体的半衰期并且防止抗体被宿主的免疫系统攻击。可在治疗期间测定和调整施用的频率,并且一般而言,但是不是必要的,基于与PKa1相关的疾病/病症治疗和/或抑制和/或改善和/或延迟。可选地,抗PKa1的持续连续释放制剂可以是适当的。用于实现持续释放的各种制剂和设备是本领域已知的。

[0119] 在一个实例中,如本文所描述的用于抗PKa1抗体的剂量可凭经验在已经给予一种或多种施用(一种或多种)抗体的个体中测定。个体给予增加剂量的拮抗物。为了评估拮抗物的效力,可根据疾病/病症的指示剂。

[0120] 一般而言,为了施用本文所述的任何抗体,初始候选剂量可以是约2mg/kg。为了本公开的目的,典型的每日剂量范围可从约任何0.1 $\mu$ g/kg至3 $\mu$ g/kg至30 $\mu$ g/kg至300 $\mu$ g/kg至3mg/kg,至30mg/kg至100mg/kg或更多,这取决于上面提到的因素。为了在数天或更长时间的重复施用,这取决于病况,持续治疗直到发生症状期望的抑制或直到实现足够的治疗性水平,以减轻与PKa1相关的疾病或病症,或其症状。示例性给药方案包括施用约2mg/kg的初始剂量,随后每周约1mg/kg抗体的保持量,或随后每隔一周约1mg/kg的保持量。但是,其他剂量方案可能是有用的,这取决于从业者希望实现的药物代谢动力学衰退模式。例如,考虑

一至四次一周的给药。在一些实施方式中,可使用约3 $\mu$ g/mg至约2mg/kg(比如约3 $\mu$ g/mg、约10 $\mu$ g/mg、约30 $\mu$ g/mg、约100 $\mu$ g/mg、约300 $\mu$ g/mg、约1mg/kg、和约2mg/kg)的给药范围。在一些实施方式中,给药频率是每周、每2周、每4周、每5周、每6周、每7周、每8周、每9周或每10周一次;或每月、每2个月或每3个月或更长时间一次。该疗法的过程容易通过常规的技术和试验监测。给药方案(包括使用的抗体)可随着时间的推移而改变。

[0121] 在一些实施方式中,对于正常体重的成人患者,可施用约0.3至5.00mg/kg的剂量范围。具体的剂量方案,即,剂量、时机和重复,取决于具体的个体和个体的医学历史,以及单个试剂的特性(比如试剂的半衰期,和本领域熟知的其他考虑因素)。

[0122] 为了本公开的目的,适当的抗PKa1抗体剂量取决于采用的具体抗体(或其组合物)、疾病/病症的类型和严重程度、抗体施用为预防性目的还是治疗性目的、之前的疗法、患者的临床历史和对拮抗物的应答和主治医生的判断。通常临床医生将施用抗PKa1抗体,直到达到实现期望结果的剂量。抗PKa1抗体的施用可以是连续的或间歇的,这取决于例如接受者的生理学条件、施用的目的是治疗性还是预防性和专业从业者已知的其他因素。抗PKa1抗体的施用可在预先选择的时间段内基本上是连续的或可以是一系列间隔的剂量,例如,在发展PKa1相关的疾病或病症之前、期间或之后。

[0123] 如本文所使用,术语“治疗”指应用或施用包括一种或多种活性试剂的组合物至具有与PKa1相关的疾病/病症、疾病/病症的症状或对该疾病/病症的易患病体质的受试者,目的是治愈、痊愈、减轻、缓解、改变、补救、减轻、改善或影响病症、疾病的症状或对疾病/病症的易患病体质。

[0124] 减轻与PKa1相关的疾病/病症包括延迟疾病的发展或进展或减轻疾病严重程度。减轻疾病不必要求治疗结果。如本文使用,“延迟”与PKa1相关的疾病/病症的发展意味着推迟、阻碍、减缓、迟延、稳定和/或延迟疾病的进展。该延迟可具有不同的时间长度,这取决于治疗的疾病和/或个体的历史。“延迟”或减缓疾病发展或延迟疾病出现的方法是当与不使用该方法比较时,降低在给定时间框架内发展疾病的一个或多个症状的概率和/或在给定时间框架内减少症状的程度的方法。这样的比较通常基于临床研究,使用足够产生统计学上显著结果的许多受试者。

[0125] 疾病的“发展”或“进展”意思是初始临床表现和/或随后疾病的进展。可使用本领域熟知的标准临床技术检测和评估疾病的发展。但是,发展也指不可检测的进展。为了本公开的目的,发展或进展指症状的生物过程。“发展”包括发生、复发和出现。如本文所使用与PKa1相关的疾病/病症的“出现”或“发生”包括初始出现和/或复发。

[0126] 在一些实施方式中,本文所述的抗PKa1抗体以足够体内抑制PKa1的活性至少20%(例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大)的量施用至需要治疗的受试者。在其他实施方式中,以有效降低PKa1水平至少20%(例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大)的量施用抗体。

[0127] 医学领域人员已知的常规方法可用于施用药学组合物至受试者,这取决于待治疗的疾病的类型或疾病的位点。该组合物也可经其他常规的路径施用,例如,口服、肠胃外、通过吸入喷雾、局部、直肠、经鼻、含服、阴道或经植入的储库施用。如本文所使用的术语“肠胃外”包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内和颅内注射或注入技术。另外,其可经施用的可注射的储库式路径(injectable depot routes),比如

使用1个月、3个月或6个月储库式可注射的或生物可降解的材料和方法施用至受试者。

[0128] 可注射的组合物可包含各种载体,比如植物油、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、异丙基豆蔻酸、乙醇和多元醇(丙三醇、丙二醇、液体聚乙二醇等)。对于静脉内注射,可通过滴入方法施用水溶性的抗体,由此注入包含抗体和生理学上可接受的赋形剂的药物制剂。生理学上可接受的赋形剂可包括,例如,5%的右旋糖、0.9%的生理盐水、林格氏溶液或其他适当的赋形剂。肌肉制剂,例如,适当的可溶性盐形式的抗体的无菌制剂可在比如注射用水、0.9%的生理盐水或5%的葡萄糖溶液的药学赋形剂中溶解和施用。

[0129] 在一种实施方式中,经位点特异性或靶向局部递送技术施用抗PKa1抗体。位点特异性或靶向局部递送技术的例子包括抗PKa1抗体的各种可植入储库式来源或局部递送导管,比如注入导管、内置导管或针导管、合成移植物、外膜包裹物、分流器和支架或其他可植入设备;位点特异性载体;直接注射或直接施用。见,例如,PCT公开号WO 00/53211和美国专利号5,981,568。

[0130] 也可使用包含反义多核苷酸、表达载体或亚基因多核苷酸的治疗性组合物的靶向递送。受体介导的DNA递送技术描述在,例如,Findeis等,Trends Biotechnol. (1993)11:202;Chiou等,Gene Therapeutics:Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A.Wolff, ed.) (1994);Wu等,J.Biol.Chem. (1988) 263:621;Wu等,J.Biol.Chem. (1994) 269:542;Zenke等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1990) 87:3655;Wu等,J.Biol.Chem. (1991) 266:338中。

[0131] 在基因疗法方案中,对于局部施用,以约100ng至约200mg的DNA范围施用包含多核苷酸(例如,编码本文所述的抗PKa1抗体的那些)的治疗性组合物。在一些实施方式中,在基因疗法方案期间,也可使用的浓度范围是约500ng至约50mg、约1 $\mu$ g至约2mg、约5 $\mu$ g至约500 $\mu$ g和约20 $\mu$ g至约100 $\mu$ g的DNA或更多。

[0132] 可使用基因递送媒介递送本文所述的治疗性多核苷酸和多肽。基因递送媒介可以是病毒或非病毒起源的(大体上见,Jolly,Cancer Gene Therapy (1994) 1:51;Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845;Connelly,Human Gene Therapy (1995) 1:185;和Kaplitt,Nature Genetics (1994) 6:148)。可使用内源哺乳或异源启动子和/或增强子诱导这样的编码序列的表达。编码序列的表达可以是组成型的或受调控的。

[0133] 用于递送期望的多核苷酸和在期望的细胞中表达的基于病毒的载体是本领域熟知的。示例性基于病毒的媒介包括但不限于重组逆转录病毒(见,例如,PCT公开号WO 90/07936、WO 94/03622、WO 93/25698、WO 93/25234、WO 93/11230、WO 93/10218、WO 91/02805、美国专利号5,219,740和4,777,127、GB专利号2,200,651和EP专利号0 345 242)、基于 $\alpha$ 病毒的载体(例如,辛德华斯病毒载体、塞姆利基森林病毒(ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、罗斯河病毒(ATCC VR-373、ATCC VR-1246)和委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR 1249、ATCC VR-532))和腺伴随病毒(AAV)载体(见,例如,PCT公开号WO 94/12649、WO 93/03769、WO 93/19191、WO 94/28938、WO 95/11984和WO 95/00655)。也可采用如Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147中描述的连接至杀死腺病毒的DNA的施用。

[0134] 也可采用非病毒递送媒介和方法,包括但不限于单独与杀死腺病毒连接或不连接

的聚阳离子缩合的DNA(见,例如,Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147);连接配体的DNA(见,例如,Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985);真核细胞递送媒介细胞(见,例如,美国专利号5,814,482、PCT公开号W0 95/07994、W0 96/17072、W0 95/30763和W0 97/42338)和核酸电荷中和或与细胞膜的融合。也可采用裸露DNA。示例性裸露DNA的引入方法描述在PCT公开号W0 90/11092和美国专利号5,580,859中。可用作基因递送媒介的脂质体描述在美国专利号5,422,120、PCT公开号W0 95/13796、W0 94/23697、W0 91/14445和EP专利号0524968中。另外的方法描述在Philip, Mol. Cell. Biol. (1994) 14:2411, 和Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581中。

[0135] 在本文所述的方法中使用的具体的剂量方案,即,剂量、时机和重复取决于具体的受试者和该受试者的医学历史。在一些实施方式中,大于一种抗PKa1抗体,或抗PKa1抗体和另一适当的治疗剂的组合可施用至需要治疗的受试者。拮抗物可以是彼此相同类型的或不同的。抗PKa1抗体也可结合用于增强和/或补充试剂效力的其他试剂来使用。

[0136] 可通过本领域熟知的方法评估对于与PKa1相关的疾病/病症的治疗效力。

[0137] 用于减轻与血浆激肽释放酶相关的疾病/病症的试剂盒

[0138] 本公开也提供了用于减轻与血浆激肽释放酶相关的疾病/病症的试剂盒。这样的试剂盒可包括一个或多个包含抗PKa1抗体例如任何一种本文所述的那些抗体的容器。

[0139] 在一些实施方式中,试剂盒可包括根据本文所述的任何方法的使用说明书。包括的说明书可包括施用抗PKa1抗体治疗、延迟出现或减轻如本文所述的那些目标疾病的描述。试剂盒可进一步包括基于鉴定该个体是否具有目标疾病来选择适于治疗的个体的描述。在仍其他实施方式中,说明书包括向处在目标疾病风险的个体施用抗体的描述。

[0140] 与使用抗PKa1抗体相关的说明书一般包括与期望治疗的剂量、给药方案和施用路径相关的信息。容器可以是单位剂量、大包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。在本发明试剂盒中提供的说明书通常是标签或包装插入物(例如,试剂盒中包括的纸片)上的书写的说明书,但是机器可读的说明书(例如,在磁盘或光盘上携带的说明书)也是可接受的。

[0141] 标签或包装插入物指示组合物用于治疗、延迟与PKa1相关的疾病或病症的出现和/或减轻。可提供用于实施本文所述任何方法的说明书。

[0142] 本发明的试剂盒在适当的包装中。适当的包装包括但不限于小瓶、瓶子、广口瓶、柔性包装(例如,密封的聚酯或塑料袋)等。也考虑结合专用设备使用的包装,比如吸入器、鼻的施用设备(例如,雾化器)或注入设备比如微型泵。试剂盒可具有无菌入口(例如容器可以是具有可被皮下注射针刺破的阻塞物的静脉溶液包或小瓶)。容器也可具有无菌入口(例如容器可以是具有可被皮下注射针刺破的静脉内溶液包或小瓶)。组合物中的至少一种活性试剂是如本文所述的那些抗PKa1抗体。

[0143] 试剂盒可任选地提供另外的组分,比如缓冲液和解释信息。通常,试剂盒包括容器和在容器上或与容器结合的标签或包装插入物(一个或多个)。在一些实施方式中,本发明提供了包括上述试剂盒内容物的制造制品。

[0144] 一般技术

[0145] 除非另外指出,本发明的实施采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其是本领域的技术。这样的技术充分阐释在文献中,比如, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版(Sambrook等,1989) Cold Spring

Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait,ed.,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:ALaboratory Notebook(J.E.Cellis,ed.,1998)Academic Press;Animal Cell Culture (R.I.Freshney,ed.,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures (A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell,eds.,1993-8)J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.);Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir和C.C.Blackwell,eds.);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller和M.P.Calos,eds.,1987);Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel等eds.,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等,eds.,1994);Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan等,eds.,1991);Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons,1999);Immunobiology (C.A.Janeway和.Travers,1997);Antibodies (P.Finch,1997);Antibodies:a practical approach (D.Catty.,ed.,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach (P.Shepherd和C.Dean,eds.,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual (E.Harlow和D.Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies (M.Zanetti和J.D.Capra,eds.,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0146] 不需进一步阐释,相信本领域技术人员可基于上述说明书充分使用本发明。所以,下述具体实施方式仅仅解释为示意性的,并且绝不限于本公开的其它部分。本文引用的所有公开出版物通过引用为了提及的目的或主题并入本文。

[0147] 实施例1:基于DX-2930-PKα1复合物的晶体结构,人血浆激肽释放酶的催化结构域中关键残基的鉴定

[0148] 与His标签融合的人血浆激肽释放酶的催化结构域(图2)在昆虫细胞中表达并且初始通过镍亲和性柱纯化。经胰蛋白酶消化从血浆激肽释放酶去除His标签并且通过苯胺亲和性柱、随后SEC柱,纯化游离血浆激肽释放酶。在PAGE凝胶上检查纯化的产品。结果指示适当表达和纯化人血浆激肽释放酶的催化结构域。

[0149] 经常规重组技术制备DX-2930并纯化。经常规方法产生DX-2930的重组Fab片段并纯化。

[0150] 以各种浓度在允许形成抗体-PKα1复合物的适当条件下混合DX-2930Fab片段和人血浆激肽释放酶的催化结构域。使用HPLC检查因此形成的复合物,以测定复合物中抗体-PKα1比。因此,鉴定适当的浓度的抗体和PKα1,用于形成1:1复合物。

[0151] 在允许结晶的各种条件下保存抗体-PKα1复合物。对结晶的复合物进行衍射分析。基于衍射统计测定晶体结构(2.1 Å和2.4 Å)。

[0152] 根据晶体结构,鉴定人PKα1催化结构域中参与和DX-2930相互作用的残基。在图2中指示这些残基(粗体的和加下划线的),其提供人PKα1催化结构域的氨基酸序列(人PKα1的残基391-638)。

[0153] 另外,也基于晶体结构鉴定与PKα1相互作用的DX-2930中的残基,包括重链可变区中的E1、V2、F27、T28、F29、S30、H31、R100、I101、G102、V103、P104、R105、R106、D107、G107、K108和D111,和轻链可变区中的S31、W32、Y49、K50、T53、L54、E55、S56、G57和V58。

[0154] 这些结果指示DX-2930的HC CDR3是与PKa1相互作用的主要区域(见图1)并且HC CDR1和FR1中的几个残基也可能有助于和PKa1的相互作用。在轻链中,发现LC CDR2区域有助于相互作用。

[0155] 此外,结果也指示可允许在HC CDR3区域的某些位置的变异。例如,103位需要小的疏水残基,比如V或I。作为另一实施例,R106可用W替换,并且E108可用S或D替换,而基本上不影响PKa1结合活性。类似地,D110用E替换。

[0156] 实施例2:亲和性成熟结果匹配源自晶体结构的结构信息

[0157] 抗体M0162-A04的重链可变区,尤其是HC CDR3区域,进行亲和性成熟。产生在HC CDR3区域中的一个或多个位置具有氨基酸突变的各种突变体一个或多个位置具有氨基酸突变的各种突变体,并且根据常规方法测定它们的 $K_{i,app}$ 值。

[0158] 简言之,在30°C一起温育各种浓度的PKa1和Fab 1小时。底物肽(可被PKa1切割)然后添加至该PKa1-Fab混合物。然后,测量底物肽切割/蛋白水解的比例,并且针对Fab的浓度绘图。该图拟合至莫里森方程式,其计算 $K_{i,app}$ 值。因此获得的结果显示在图3和下面表2中:

[0159] 表2.Hv-CDR3亲和性成熟结果的总结

初始名称	Hv CDR3	$K_{i,app}$ (nM)	SEQ ID NO
M0162-A04	RRTGIPRRDAFDI	2.5	1
M0199-A11	--R-----	2	2
M0201-F11	--S-----	3	3
M0202-A08	-----W----	2.8	4
M0201-A06	-----V---	3.8	5
M0202-E03	-----E-	2	6

	M0199-B01	-----N	1.6	7
	M0200-B01	-----S	3.6	8
	M0201-H06	---V-----	0.6	9
	M0202-H05	---V---V---	0.26	10
	M0201-H08	---V----L-N	0.8	11
	M0200-E11	---V-----N	0.4	12
	M0200-H07	---V---N---N	0.4	13
	M0202-F06	---V--W----	0.33	14
	M0200-A10	---V---S---	0.25	15
	M0202-G03	---V---S-E-	0.4	16
	M0202-A12	Q--V---S-N-	0.1	17
	M0202-H03	---V--W-D---	0.1	18
	M0201-A07	---V---E---	0.1	19
[0161]	M0202-C02	--P-V-----	0.6	20
	M0202-B04	--S-V-----	0.2	21
	M0202-E06	--R-V---D---	0.06	22
	M0202-A01	--I-V-----	0.3	23
	M0202-D09	--I-V---S---	0.2	24
	M0200-D03	--I-V---S--M	0.1	25
	M0202-C09	--I-V---D---	0.06	26
	<b>M0199-A08</b>	<b>--I-V---E---</b>	<b>0.06</b>	<b>27</b>
	X133-B02	--I-----	2.2	28
	X133-D06	--I-----E---	0.33	29
	X135-A01	----A-----	247.7	30
	X133-G05	----S-----	1405.6	31
	X133-F10	----L-----	14.7	32
	X135-A03	-----E---	1.1	33

[0162] 亲和性成熟结果指示在HC CDR3区域中某些位置的变异与亲本M0162-A04克隆相比,产生高亲和性/抑制性抗PKa1抗体。这些结果与上面实施例1中提供的结构信息匹配。注意,克隆M0199-A08的HC CDR3区域与DX-2930的相同。

[0163] 实施例3: 血浆激肽释放酶中的突变对抗体抑制活性的影响

[0164] 检查突变体X115-F02针对各种PKa1突变体的抑制活性。

[0165] X115-F02是与如DX-2930相同的IgG,除了其包含在DX-2930中没有的C-末端赖氨酸残基并且在HEK293T细胞而不是CHO细胞中表达(上面表1)。X115-F02的结合特异性和亲和性与DX-2930相同。

[0166] 在该研究中使用的血浆激肽释放酶的野生型和四个突变体(图5)是从毕赤酵母菌表达和纯化的重组催化结构域。突变体1包含活性位点的S3亚位点的下述突变:S478A、N481A、S506A、Y507A)(数量基于全长前激肽释放酶氨基酸序列)。突变体2包含活性位点的S1'亚位点的下述突变:R551A、Q553A、Y555A、T558A、R560A。突变体4包含远离活性位点的下述突变:N396A、S398A、W399A。发现突变体3是无活性的并且所以没有在活性试验中测试。突变体3包含活性位点的S1'亚位点的下述突变:D572A、K575A、D577A。

[0167] 使用上面实施例2中描述的方法进行X115-F02针对野生型PKa1和突变体的抑制活性并且测定 $K_{i,app}$ 值。如图4中显示,突变体1和4中的突变不显著影响血浆激肽释放酶的X115-F02抑制的效力。令人吃惊地,突变体2中的突变降低效力约65倍。这些结果指示残基

R551A、Q553A、Y555A、T558A、R560A和它们临近的残基可能对于X115-F02 (DX-2930) 的抑制活性是重要的。

[0168] 其他实施方式

[0169] 本说明书中公开的所有特征可以任何组合结合。本说明书中公开的每个特征可被用于相同、等价或类似目的的可选的特征替换。因此,除非另外明确指出,公开的每个特征仅仅是一般系列等同或类似特征的例子。

[0170] 从上面的说明书,本领域技术人员可容易确定本发明的本质特征,并且在不背离其精神和范围的情况下,可对本发明作出各种改变和改进,以使其适应各种适用和条件。因此,其他实施方式也权利要求范围内。

轻 V 基因 = VK1\_L12 HK102/V1/L12a; J 基因 = JK1

559A-M0162-A04: DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC RASQSISSWLA WYQQKPGKAP**N**LLIY **K**ASTLES CDR2  
 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC RASQSISSWLA WYQQKPGKAP LLIY AS+LES  
 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC RASQSISSWLA WYQQKPGKAP**K**LLIY **D**ASSLES  
 种系 :  
 559A-M0162-A04: GVPSTRFSGSGGTEFTLTISSLQPDFFATYYC QQYN**T**YWT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 34)  
 GVPSTRFSGSGGTEFTLTISSLQPDFFATYYC QQYN+YWT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 35)  
 GVPSTRFSGSGGTEFTLTISSLQPDFFATYYC QQYNS**Y**WT FGQGTKVEIK  
 种系 :  
 FR1 CDR1 CDR2 CDR3 CDR4  
 FR2 FR3 FR4

重 V 基因 = VH3\_3-23; J 基因 = JH3

559A-M0162-A04: EVQLLESGGGLVQPFGGSLRSLSCAASGFTFS **HYIMM** WVRQAPGKLEWVS **GIYSSGGITV**YADSVKQ CDR2  
 EVQLLESGGGLVQPFGGSLRSLSCAASGFTFS Y M WVRQAPGKLEWVS I SGG T YADSVKQ  
 EVQLLESGGGLVQPFGGSLRSLSCAASGFTFS **SYAMS** WVRQAPGKLEWVS **AISGSGGTY**YADSVKQ  
 种系 :  
 559A-M0162-A04: RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AY** RRTGIPRRDAFDI WQGGTMVTVSS (SEQ ID NO:37)  
 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA AFDI WQGGTMVTVSS (SEQ ID NO:38)  
 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AK** AFDI WQGGTMVTVSS (SEQ ID NO:39)  
 种系 :  
 FR1 CDR1 CDR2 CDR3 CDR4  
 FR2 FR3 FR4

图1



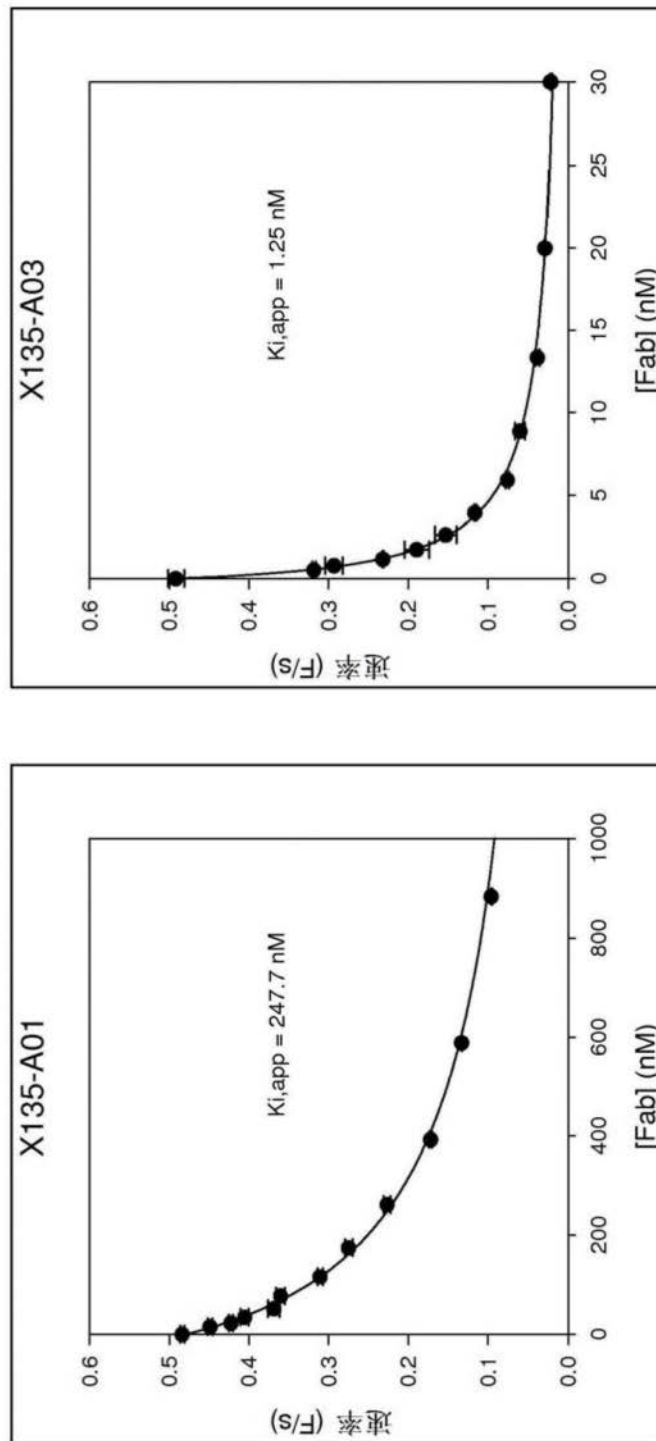


图3

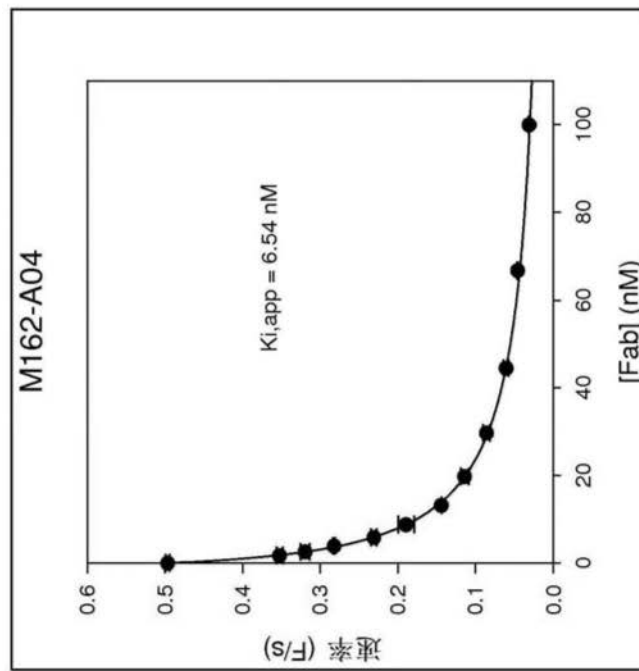
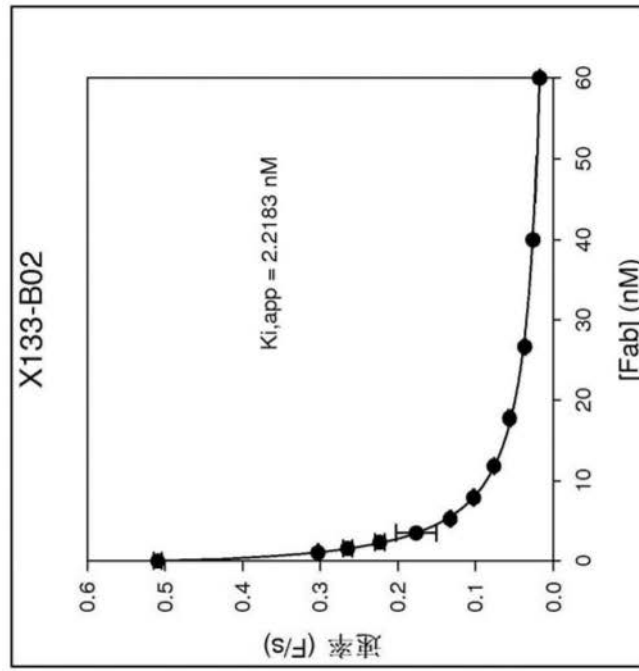


图3(续)

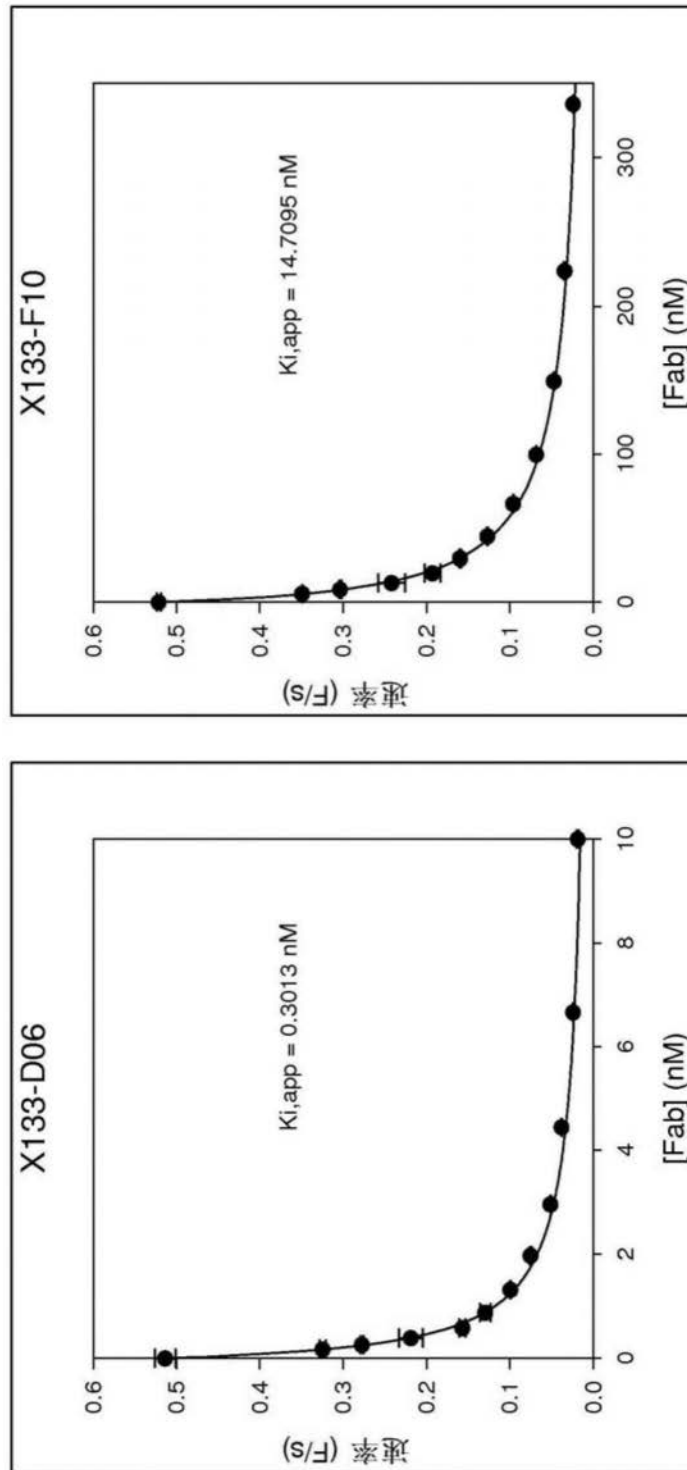


图3 (续)

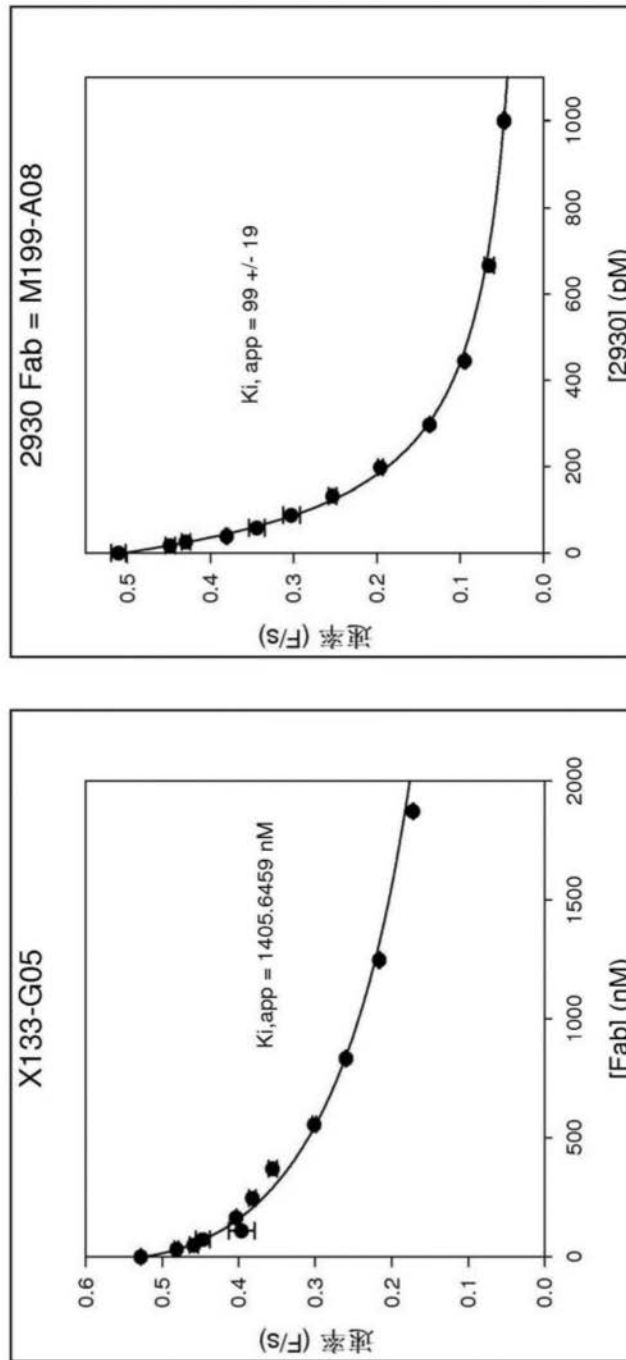


图3 (续)

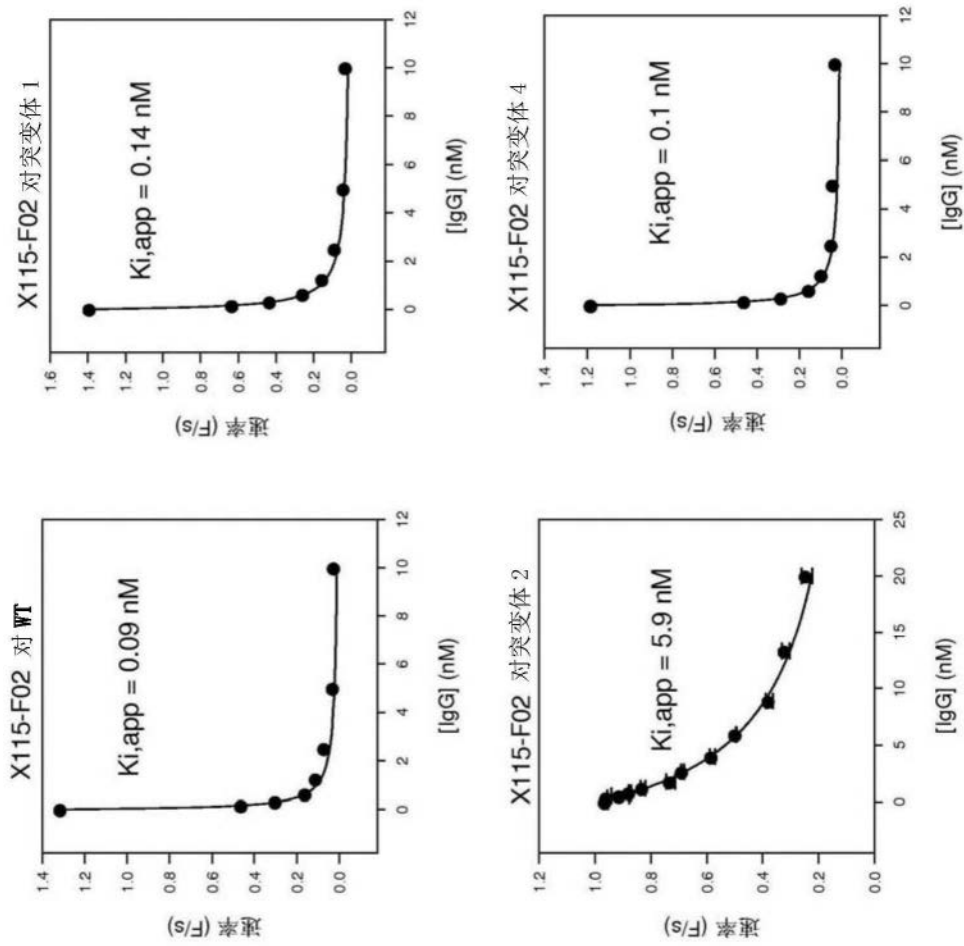


图4



591	—	(klkb1)-Mut1-forPichia RLVGITSWGE GCARREQPGV YTKVAEYMDW ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 41) (klkb1)-Mut2-forPichia RLVGITSWGE GCARREQPGV YTKVAEYMDW ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 42) (klkb1)-Mut3-forPichia RLVGITSWGE GCARREQPGV YTKVAEYMDW ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 43) (klkb1)-Mut4-forPichia RLVGITSWGE GCARREQPGV YTKVAEYMDW ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 44) (klkb1)-parentforPichia RLVGITSWGE GCARREQPGV YTKVAEYMDW ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 45)
638	—	ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 41) ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 42) ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 43) ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 44) ILEKTQSSDG KAQMOSPA (SEQ ID NO: 45)

图5(续)