



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105622757 A
(43) 申请公布日 2016. 06. 01

(21) 申请号	201610139419. 4	(51) Int. Cl.	
(22) 申请日	2011. 02. 04	<i>C07K 16/40</i> (2006. 01)	
(30) 优先权数据		<i>A61K 39/395</i> (2006. 01)	
61/301, 550 2010. 02. 04 US		<i>A61P 35/00</i> (2006. 01)	
(62) 分案原申请数据		<i>A61P 9/00</i> (2006. 01)	
201180017532. 0 2011. 02. 04		<i>A61P 35/04</i> (2006. 01)	
(83) 生物保藏信息		<i>A61P 43/00</i> (2006. 01)	
IDAC 260310-01 2010. 03. 26		<i>G01N 33/573</i> (2006. 01)	
IDAC 260310-02 2010. 03. 26			
IDAC 260310-03 2010. 03. 26			
IDAC 050210-01 2010. 02. 05			
IDAC 050210-02 2010. 02. 05			
IDAC 050210-03 2010. 02. 05			
IDAC 050210-04 2010. 02. 05			
(71) 申请人	吉联亚生物科技有限公司		
地址	美国加利福尼亚州		
(72) 发明人	S · A · 麦克考雷 H · 罗德里格斯		
C · A · 加西亚 V · 史密斯			
(74) 专利代理机构	上海专利商标事务所有限公		
司	31100		
代理人	余颖		

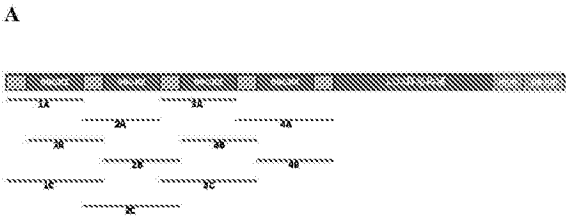
权利要求书1页 说明书58页
序列表16页 附图7页

(54) 发明名称

结合赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的抗体和其
使用方法

(57) 摘要

本公开提供赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 多肽
结合剂,包含例如特异结合 LOXL2 多肽的抗体 ;和
还提供包含其的组合物。所述结合剂能用于多种
也提供的治疗和诊断方法。



1. 一种特异结合由图1和SEQ ID NO:1所示序列的氨基酸325-434所定义表位的赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)的分离抗体。
2. 一种治疗LOXL2相关病症的药盒,所述药盒包含
含有如权利要求1所述的经分离LOXL2结合剂的组合物,和
药学上可接受的载体或赋形剂。
3. 一种诊断LOXL2相关病症的方法,所述方法包含:
通过用权利要求1所述的分离抗体接触所述样品,评价对象的样品中LOXL2的水平,
其中样品内LOXL2水平相较参比样品改变指示存在LOXL2相关病症。
4. 一种通过用如权利要求1所述的分离抗体接触样品或细胞组织来抑制LOXL2活性的方法。
5. 一种降低对象中肿瘤生长的方法,所述方法包含给予所述对象如权利要求1所述的抗体。
6. 一种抑制对象中血管生成的方法,所述方法包含给予所述对象如权利要求1所述的抗体。
7. 一种通过给予所述对象如权利要求1所述的抗体来抑制对象中纤维化疾病的方法。
8. 一种使用如权利要求1所述的抗体通过检测LOXL2水平和/或活性来监控对象响应LOXL2治疗的方法。

结合赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)的抗体和其使用方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2010年2月4日提交的美国临时专利申请第61/301,550号的权益,该专利申请通过引用全文纳入本文以用于所有目的。

[0003] 背景

[0004] 癌症在美国和其他发达国家中是严重的公共健康问题。当前,在美国四分之一的死亡病例由癌症引起。癌症疗法涉及用化疗药物治疗病人以杀死肿瘤细胞。然而,肿瘤细胞亚组通常耐受药物治疗并且在起始位点和远端转移位点存活而重新繁殖,导致可检测到的疾病复发和发病。很多癌肿瘤细胞有侵入和转移能力增加、和药物抗性改变的特性,认为其经历了形态转变,包含或类似与EMT(上皮间充质转化)。经历EMT的细胞丧失上皮细胞的正常粘着特性并经历一系列改变,包含E-钙粘着蛋白表达的丧失和间充质标记的表达、移动性增加、侵入性增加和对细胞死亡的抗性增加。

[0005] 已从鸡、大鼠、小鼠、牛和人中纯化赖氨酰氧化酶型酶。已知的赖氨酰氧化酶型酶包含长约205个氨基酸的共有催化结构域,其位于所述蛋白羧基末端部分且含有该酶的活性位点。所述活性位点包括含保守氨基酸序列的铜结合位点,所述序列含配位Cu(II)原子的4个组氨酸残基。所述活性位点还包含赖氨酰酪氨酰酮(LTQ)辅因子,由赖氨酸和酪氨酸残基(对应于大鼠赖氨酰氧化酶的lys314和tyr349,以及人赖氨酰氧化酶的lys320和tyr355)之间的分子内共价连接形成。形成LTQ辅因子的酪氨酸残基周围序列也在赖氨酰氧化酶型酶中保守。所述催化结构域还包含10个保守性半胱氨酸残基,其参与5个二硫键的形成。所述催化结构域还包括纤连蛋白结合域。最后,所述催化结构域中存在含有4个半胱氨酸残基的类似生长因子和细胞因子受体结构域的氨基酸序列。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明提供特异结合LOXL2多肽的抗体,并且还提供包含其的组合物。所述抗体能用于多种也提供的治疗和诊断方法。

[0008] 因此,本发明包括但不限于所述下列实施方式。

[0009] 1. 特异性结合由序列中氨基酸325-434所定义表位的赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)的分离抗体示于图1和SEQ ID NO:1。

[0010] 2. 如实施方式1所述的分离抗体,其中所述表位包含序列TPAMGLQKK(SEQ ID NO:2)内的氨基酸。

[0011] 3. 如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体抑制LOXL2多肽的酶活性。

[0012] 4. 如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体不抑制LOXL2多肽的酶活性。

[0013] 5. 如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体结合表位的亲和性约为 10^7M^{-1} -约 10^{12}M^{-1} 。

[0014] 6. 如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体包含重链,并且其中所述抗体的重链是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的同种型。

[0015] 7. 如实施方式1所述的分离抗体,其中所述结合剂进行可检测标记。

[0016] 8. 如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'。

- [0017] 9.如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体是人源化抗体。
- [0018] 10.如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体是嵌合抗体。
- [0019] 11.如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体包含选自非肽合成聚合物、脂质、脂肪酸、多糖、糖类或造影剂的共价连接部分。
- [0020] 12.如实施方式11所述的分离抗体,其中所述合成聚合物是聚(乙二醇)聚合物。
- [0021] 13.如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体固定在固体支持物上。
- [0022] 14.如实施方式1所述的分离抗体,其中所述抗体包含共价或非共价连接到抗体上的癌症化疗剂。
- [0023] 15.一种治疗LOXL2相关病症的药盒,所述药盒包含
- [0024] 含有如实施方式1所述的分离LOXL2结合剂的组合物,和
- [0025] 药学上可接受的载体或赋形剂。
- [0026] 16.如实施方式15所述的药盒,其中所述LOXL2相关病症是肿瘤、转移、血管生成或纤维化。
- [0027] 17.如实施方式15所述的药盒,其中所述LOXL2结合剂包含可检测标记、治疗剂或两者都有。
- [0028] 18.一种诊断LOXL2相关病症的方法,所述方法包含:
- [0029] 通过将所述样品接触实施方式1所述的分离抗体,评价对象的样品中LOXL2的水平,
- [0030] 其中样品内LOXL2水平相较参比样品的改变指示LOXL2相关病症的出现。
- [0031] 19.如实施方式18所述的方法,其中所述LOXL2相关病症是肿瘤、转移、血管生成或纤维化。
- [0032] 20.如实施方式19所述的方法,其中样品内LOXL2水平相较参比样品的增加指示其肿瘤或转移的出现或肿瘤或转移生长的增加。
- [0033] 21.如实施方式20所述的方法,其中所述参比样品是取样时间点比对象样品更早的样品或与对象样品组织类型相同的未影响组织的样品,或者另一个体的样品。
- [0034] 22.如实施方式18所述的方法,其中所述抗体进行可检测标记。
- [0035] 23.一种通过用如实施方式1所述的分离抗体接触样品或细胞组织来抑制LOXL2活性的方法。
- [0036] 24.如实施方式23所述的方法,其中接触发生在体外或离体。
- [0037] 25.如实施方式23所述的方法,其中接触发生在体内。
- [0038] 26.如实施方式23所述的方法,其中抑制LOXL2降低选自肿瘤生长、血管生成和纤维化的对象病症。
- [0039] 27.一种降低对象中肿瘤生长的方法,所述方法包含给予所述对象如实施方式1所述的抗体。
- [0040] 28.如实施方式27所述的方法,其中所述肿瘤是原发性肿瘤或转移肿瘤。
- [0041] 29.如实施方式27所述的方法,其中所述肿瘤是实体瘤。
- [0042] 30.一种抑制对象中血管生成的方法,所述方法包含给予所述对象如实施方式1所述的抗体。
- [0043] 31.一种通过给予所述对象如实施方式1所述的抗体来抑制对象中纤维化疾病的

方法。

[0044] 32. 一种使用如实施方式1所述的抗体通过检测LOXL2水平和/或活性来监控对象响应抗LOXL2治疗的方法。

[0045] 附图简要说明

[0046] 图1显示人LOXL2蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。示出所述信号肽序列(氨基酸1-25),所述四个富含半胱氨酸清除受体(SRCR)域,和所述催化结构域。SRCR1从氨基酸58-159(包含端点)延伸;SRCR2从氨基酸188-302(包含端点)延伸, SRCR3从氨基酸325-425(包含端点)延伸, SRCR4从氨基酸435-544(包含端点)延伸和催化结构域从氨基酸548-774(包含端点)延伸。

[0047] 图2中图片A显示所述人LOXL2蛋白的示意图,示出所述SRCR1、SRCR2、SRCR3和SRCR4结构域。还示出所述催化结构域(标记的“LOX样结构域”),和某些合成LOXL2构建中存在的myc表位标签和His6纯化标签(标记的“6X his”)的定位。示意图下面显示由结构域多肽集合表示的序列部分,用于实施例4中讨论的作图实验。也参见表2。

[0048] 图2中图片B显示所述多肽的所述氨基酸序列,示意图示于图2中图片A。

[0049] 图3显示进行的ELISA实验结果以评价AB0023与所述不同人赖氨酰氧化酶型蛋白(赖氨酰氧化酶、图中命名为“LOXFL”;LOXL1;LOXL2;LOXL3和LOXL4)的结合。不同浓度的抗LOXL2抗体AB0023用于探测1ug/ml靶蛋白。只有LOXL2与所述抗体结合。

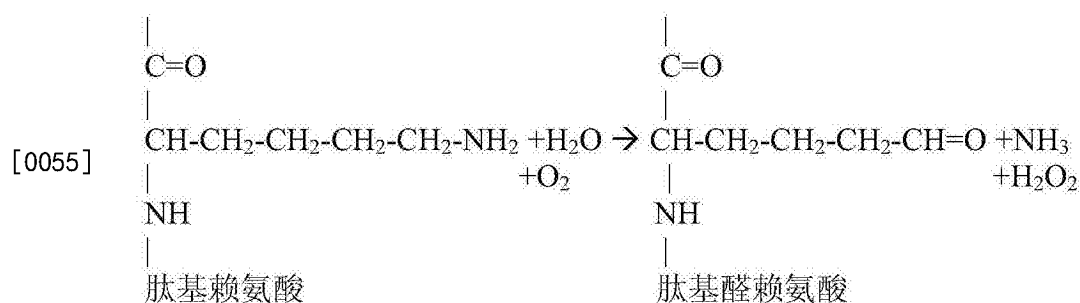
[0050] 图4显示人LOXL2、人LOXL3和人LOXL4中SRCR4结构域的氨基酸序列之间的比对。

[0051] 图5显示人(H)、小鼠(M)、大鼠(R)和猕猴(Cynomolgus)(C)中LOXL2蛋白催化结构域的氨基酸序列的比对。所述小鼠、大鼠和猕猴蛋白中,与人蛋白不同的残基用下划线指示。序列上的星号指示两个残基,所述残基处从大鼠到人序列的单个氨基酸改变使大鼠蛋白结合AB0030抗体。

[0052] 图6提供AB0023重链和轻链(分别为V_H和V_L)的可变区的氨基酸序列;和AB0024重链和轻链的全长氨基酸序列。

[0053] 定义

[0054] 本文所用的术语“赖氨酰氧化酶型酶”指催化赖氨酸和羟赖氨酸残基的ε-氨基氧化脱氨的蛋白家族成员,该氧化脱氨导致肽基赖氨酸转变成肽基-α-氨基己二酸-δ-半醛(醛赖氨酸)并释放化学计量的氨和过氧化氢:



[0056] 此反应最常胞外发生于胶原和弹性蛋白中的赖氨酸残基上。醛赖氨酸的醛基具有反应性且能与其它醛赖氨酸和赖氨酸残基自发缩合,导致胶原分子交联以形成胶原纤维。

[0057] 已从鸡、大鼠、小鼠、牛和人中纯化赖氨酰氧化酶型酶。已知的赖氨酰氧化酶型酶包含长约205个氨基酸的共有催化结构域,其位于所述蛋白羧基末端部分且含有该酶的活

性位点。所述活性位点包括含保守氨基酸序列的铜结合位点,所述序列含配位Cu(II)原子的4个组氨酸残基。所述活性位点还包含赖氨酰酪氨酰酮(LTQ)辅因子,由赖氨酸和酪氨酸残基(对应于大鼠赖氨酰氧化酶的lys314和tyr349,以及人赖氨酰氧化酶的lys320和tyr355)之间的分子内共价连接形成。形成LTQ辅因子的酪氨酸残基周围序列也在赖氨酰氧化酶型酶中保守。所述催化结构域还包含10个保守性半胱氨酸残基,其参与5个二硫键的形成。所述催化结构域还包括纤连蛋白结合域。最后,所述催化结构域中存在含有4个半胱氨酸残基的类似生长因子和细胞因子受体结构域的氨基酸序列。

[0058] 此酶家族中分离和表征的第一个成员是赖氨酰氧化酶(EC 1.4.3.13);也称为蛋白-赖氨酸6-氧化酶、蛋白-L-赖氨酸:氧6-氧化还原酶(脱氨基)或LOX。参见例如Harris等, *Biochim. Biophys. Acta* 341:332-344(1974);Rayton等, *J. Biol. Chem.* 254:621-626(1979);Stassen, *Biophys. Acta* 438:49-60(1976)。

[0059] 随后发现了其它赖氨酰氧化酶型酶。这些蛋白称为“LOX样”或“LOXL”。它们都包含上述共有催化结构域并具有类似氧化赖氨酸脱氨酶的酶活性。目前,已知人和小鼠中都存在5种不同赖氨酰氧化酶型酶:LOX和4种LOX相关或LOX样蛋白LOXL1(也标注为“赖氨酰氧化酶样”、“LOXL”或“LOL”)、LOXL2(也标注为“LOR-1”)、LOXL3和LOXL4。编码所述5种赖氨酰氧化酶型酶的基因各位于不同染色体。参见例如Molnar等(2003) *Biochim Biophys Acta*.1647:220-224;Csiszar(2001) *Prog. Nucl. Acid Res.* 70:1-32;2001年11月8日公开的WO 01/83702和美国专利第6,300,092号,其都通过引用纳入本文。已从鼠EC细胞系中分离出名为LOXC的LOX样蛋白,其与LOXL4具有一些相似性但表达模式不同。Ito等(2001) *J. Biol. Chem.* 276:24023-24029。从果蝇(*Drosophila*)中分离了2种赖氨酰氧化酶型酶DmLOXL-1和DmLOXL-2。

[0060] 尽管所有赖氨酰氧化酶型酶共有共同的催化结构域,但它们也彼此不同,特别是在其氨基末端区。所述4种LOXL蛋白与LOX相比具有氨基末端延伸。因此,人LOX前体原(preproLOX)(即信号序列切割前的初级翻译产物,见下)包含417个氨基酸残基;LOXL1包含574个,LOXL2包含638个,LOXL3包含753个而LOXL4包含756个。

[0061] LOXL2、LOXL3和LOXL4在其氨基末端区含有4个重复的富含半胱氨酸清除受体(SRCR)结构域。这些结构域在LOX或LOXL1中不存在。在分泌、跨膜或胞外基质蛋白中发现SRCR结构域,已知该结构域在许多分泌和受体蛋白中介导配体结合。Hoheneste等(1999) *Nat. Struct. Biol.* 6:228-232;Sasaki等(1998) *EMBO J.* 17:1606-1613。LOXL3在SRCR结构域外还包含氨基末端区的核定位信号。富含脯氨酸的结构域看来是LOXL1特有的。Molnar等(2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1647:220-224。各种赖氨酰氧化酶型酶的糖基化模式也不同。

[0062] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”包含任意同种型的抗体或免疫球蛋白,保持特异结合抗原的抗体片段,包括但不限于Fab、Fv、scFv和Fd片段,嵌合抗体,人源化抗体,单链抗体以及含有抗体和非抗体蛋白的抗原结合部分的融合蛋白。所述抗体能进行可检测标记,例如用放射性同位素、产生可检测产物的酶、荧光蛋白等。所述抗体还可偶联于其它部分,如特异性结合对成员,如生物素(生物素-亲和素特异性结合对的成员)等。所述抗体也可以结合固体支持物,包括但不限于聚苯乙烯平板或珠等。所述术语也包含Fab'、Fv、F(ab')₂和保持特异结合抗原的其他抗体片段、和单克隆抗体。抗体可以单价或双价。

[0063] “抗体片段”包含完整抗体的部分,例如完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的示例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线形抗体(Zapata等(1995)Protein Eng. 8(10):1057-1062);单链抗体分子;形成自抗体片段的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生各含单个抗原结合位点的两个相同抗原结合片段,称为“Fab”片段,和残留的“Fc”片段,该命名反映易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并仍能交联抗原的F(ab')₂片段。

[0064] “Fv”是含有完整抗原识别与结合位点的最小抗体片段。该区由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域以紧密非共价结合的二聚体组成。在该构象中各可变结构域的三个CDR相互作用限定V_H-V_L二聚体表面的抗原结合位点。六个CDR共同将抗原结合特异性赋予抗体。但是,即使单个可变结构域(或仅含3个抗原特异性CDR的Fv一半)仍具有识别并结合抗原的能力,尽管亲和性通常低于完整的结合位点。

[0065] 所述“Fab”片段也包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH₁)。Fab片段与Fab'片段的区别在于重链CH₁结构域羧基末端处添加有数个额外残基,包括抗体绞链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文对Fab'的命名,其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基。F(ab')₂抗体片段最初生成为中间有铰链半胱氨酸的成对Fab'片段。还已知抗体片段的其它化学偶联。

[0066] 来自任意脊椎动物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定结构域的氨基酸序列分为称作κ和λ的两种截然不同类型中的一种。根据其重链上恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同种类。有五种主要的免疫球蛋白类型:IgA, IgD, IgE, IgG, 和IgM, 这些中的几种还可分成亚类(同种型),例如IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 和IgA2。

[0067] “单链Fv”或“sFv”抗体片段含有抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。在一些实施方式中,Fv多肽的V_H和V_L结构域之间还包含多肽接头,这可使sFv形成抗原结合所需结构。有关sFv的综述参见Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies(《单克隆抗体的药理学》),第113卷, Rosenberg和Moore编, 纽约施普林格出版社(Springer-Verlag, New York), 第269-315页(1994)。

[0068] 术语“双抗体”指具有两个抗原-结合位点的小抗体片段,该片段包含在同一多肽链中相互连接的重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)(V_H-V_L)。使用长度过短以至于无法在同一条链的两个结构域之间形成配对的接头时,推动该结构域与另一条链的互补结构域配对,产生两个抗原-结合位点。有关双抗体的更详细说明参见例如, EP 404,097; WO 93/11161; 和Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)。

[0069] 本文所用的术语“亲和性”涉及两个药剂的可逆结合的平衡常数,并且以解离常数(K_d)表示。抗体对特异抗原的亲和性可比抗体对无关氨基酸序列的亲和性至少高2倍、至少高3倍、至少高4倍、至少高5倍、至少高6倍、至少高7倍、至少高8倍、至少高9倍、至少高10倍、至少高20倍、至少高30倍、至少高40倍、至少高50倍、至少高60倍、至少高70倍、至少高80倍、至少高90倍、至少高100倍、至少高1000倍或更高。例如,抗体对靶蛋白的亲和性能是约100纳摩尔(nM)-约0.1nM、约100nM-约1皮摩尔(pM)、或约100nM-约1飞摩尔(femtomolar)(fM)或更高。本文使用的术语“亲合力”涉及两个或更多试剂复合物稀释后解离的抗性。所述术语“免疫反应”和“优先结合”涉及抗体和/或抗原结合片段方面时可在本文中互换使用。

[0070] 术语“结合”涉及两个分子之间的直接联合,例如由于共价、静电、疏水、和离子和/

或氢键相互作用,包含例如盐桥和水桥的相互作用。对象抗LOXL2(例如抗LOXL2抗体或抗原结合片段)特异结合LOXL2多肽内的表位。非特异结合指亲和性小于约 10^{-7} M的结合,例如,亲和性为 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M等的结合。

[0071] 本文使用的术语“CDR”或“互补决定区”意在指重链和轻链多肽的可变区内发现的非毗连抗原结合位点。所述特定区域描述于Kabat等,J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977); Kabat等,美国卫生和公共服务部(U.S.Dept.of Health and Human Services),Sequences of Proteins of Immunological Interest(“具有免疫学重要性的蛋白质序列”)(1991); Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);和MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),其中所述定义包括相互比较时重叠的氨基酸残基或氨基酸残基亚组。尽管如此,应用任一定义指抗体或接枝抗体或其变体的CDR均应落入本文所定义和使用的术语的范围。所述氨基酸残基包括上文引用的各参考文献中定义的CDR,如下表1所示以作对比。

[0072] 表1:CDR定义

[0073]

(1)	(2)	(3)	(4)
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
(5) V _H CDR1	(6) 31-35	(7) 26-32	(8) 30-35
(9) V _H CDR2	(10) 50-65	(11) 53-55	(12) 47-58
(13) V _H CDR3	(14) 95-102	(15) 96-101	(16) 93-101
(17) V _L CDR1	(18) 24-34	(19) 26-32	(20) 30-36
(21) V _L CDR2	(22) 50-56	(23) 50-52	(24) 46-55
(25) V _L CDR3	(26) 89-97	(27) 91-96	(28) 89-96

[0074] 1残基编号遵循Kabat等的命名法,同上

[0075] 2残基编号遵循Chothia等的命名法,同上

[0076] 3残基编号遵循MacCallum等的命名法,同上

[0077] 本文所用的术语“框架”涉及抗体可变区使用时,意在指抗体可变区内CDR区外的所有氨基酸残基。可变区框架通常是不连续的氨基酸序列,长度为约100-120氨基酸,但仅意在指CDR外的那些氨基酸。本文使用的术语“框架区”意在指由CDR分开的框架的每个结构域。

[0078] “分离”抗体是已从其天然环境的组成中鉴定并分离和/或回收的抗体。其自然环境的污染成分是会干扰抗体的诊断或治疗应用的材料,并可以包含酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质的溶质。在一些实施方式中,抗体纯化至(1)按罗氏(Lowry)法确定超过95%抗体重量,例如,超过99%重量;(2)纯化程度足以获取N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基,通过使用转杯式测序仪获取;或者(3)通过还原或非还原条件下的SDS-PAGE趋于均质,用考马斯蓝或银染。分离的抗体包含重组细胞内的原位抗体,因为该抗体天然环境中的至少一种组分将不存在。然而,通常分离的抗体由至少一个纯化步骤制备。

[0079] 短语“保守性氨基酸取代”指基于某些共有性质的氨基酸分组。一种确定个体氨基酸之间共有性质的功能性方法是分析同源生物体对应蛋白之间氨基酸改变的归一化频率(Schulz,G.E.和R.H.Schirmer,Principles of Protein Structure(《蛋白结构原理》),施

普林格出版公司(Springer-Verlag))。根据此类分析,可限定氨基酸组,其中某组内的氨基酸优选彼此互换,从而对总体蛋白结构的影响彼此最相似(Schulz,G.E.和R.H.Schirmer, Principles of Protein Structure(《蛋白结构原理》),施普林格出版公司)。以这种方法定义的氨基酸组的示例包含:

[0080] (i)带电基团,由Glu和Asp、Lys、Arg和His组成,

[0081] (ii)带正电基团,由Lys、Arg和His组成,

[0082] (iii)带负电基团,由Glu和Asp组成,

[0083] (iv)芳族基团,由Phe、Tyr和Trp组成,

[0084] (v)氮环基团,由His和Trp组成,

[0085] (vi)较大脂肪族非极性基团,由Val、Leu和Ile组成,

[0086] (vii)微极性基团,由Met和Cys组成,

[0087] (viii)小残基基团,由Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln和Pro组成,

[0088] (ix)脂肪族基团,由Val、Leu、Ile、Met和Cys组成,以及

[0089] (x)小羟基基团,由Ser和Thr组成。

[0090] “同源性”或“相同性”或“相似性”指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可通过比较各序列中的位置来各自确定同源性和相同性,所述序列可进行比对用于比较目的。当比较序列的等同位点被相同碱基或氨基酸占据时,所述分子在所述位点相同;当等同位点被相似氨基酸残基占据时(例如在位阻和/或电子特性上相似),所述分子称为在所述位点同源(相似)。同源性/相似性或相同性百分比的表达指对比序列的共有位点处相同或相似氨基酸数目的函数。“不相关”或“非同源”序列与参比序列共有小于40%相同性,或小于25%相同性。比较两个序列时,缺失残基(氨基酸或核酸)或出现额外残基也降低相同性和同源性/相似性。

[0091] 所述术语“同源性”描述用于鉴定有相似功能或基序的基因或蛋白的基于数学的序列相似性比较。参比氨基酸(蛋白)序列(例如,本文所示序列)可以用作“查询序列”来运行针对公共数据库的搜索,例如鉴定其他家族成员,相关序列或同源物。这类研究能使用Altschul等,1990,J.Mol.Biol.,215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版本)来运行。可利用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索(评分=100、字长=12)以获得与参比核酸同源的核苷酸序列。可利用XBLAST程序进行BLAST氨基酸搜索(评分=50、字长=3),以获得与参比氨基酸序列同源的氨基酸序列。为了获得缺口比对以用于比较目的,可如Altschul等,1997, Nucleic Acids Res.,25(17):3389-3402所述利用缺口BLAST。利用BLAST和缺口BLAST程序时,可使用各程序(如XBLAST和BLAST)的默认参数(见万维网:ncbi.nlm.nih.gov)。

[0092] 本文所用的术语“相同性”指比对序列以最大程度达到序列匹配,即考虑缺口和插入时,两条或更多序列中相应位置上相同核苷酸或氨基酸残基的百分数。相同性易于用已知方法计算,包括但不限于Computational Molecular Biology(计算机分子生物学),Lesk,A.M.编,纽约牛津大学出版社(Oxford University Press),1988;Biocomputing: Informatics and Genome Projects(生物运算:信息学和基因组工程),Smith,D.W.编,纽约学术出版社(Academic Press),1993;Computer Analysis of Sequence Data(序列数据的计算机分析),第I部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编,新泽西州胡马纳出版公司(Humana Press),1994;Sequence Analysis in Molecular Biology(分子生物学的序列分

析), von Heinje, G., 学术出版社, 1987; 和 Sequence Analysis Primer (序列分析引物), Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, 纽约 M 斯托克顿出版社 (M Stockton Press), 1991; 和 Carillo, H. 和 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988) 所述的方法。设计测定相同性的方法以给出测试序列之间的最大匹配。另外, 测定相同性的方法在公共可用计算机程序中编码。测定两个序列之间相同性的计算机程序方法, 包括但不限于, GCG 程序包 (Devereux, J. 等, Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984)), BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul, S.F. 等, J. Molec. Biol. 215:403-410 (1990) 和 Altschul 等, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1997))。BLAST X 程序在 NCBI 和其他来源 (BLAST Manual, Altschul, S. 等, 马里兰州贝塞斯达的 NCBI NLM NIH, 20894; Altschul, S. 等, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)) 中公开可用。也可用熟知的史密斯-沃特曼 (Smith Waterman) 算法测定相同性。

[0093] 所述术语“基本相同”指含有与第二氨基酸序列中所比对氨基酸残基(i)相同, 或(ii)保守取代的足够或最小数目的氨基酸残基的第一氨基酸序列, 从而所述第一和第二氨基酸序列能有共同的结构域和/或共同的功能活性。例如, 含有与 LOXL2 有至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同性的共同结构域的氨基酸序列称为与 LOXL2 多肽足够或基本相同。对核酸序列而言, 本文使用的术语“基本相同”指含有与第二核酸序列中所比对核苷酸相同的足够或最小数目的核苷酸的第一核酸序列, 从而所述第一和第二核苷酸序列编码有共同功能活性的多肽, 或编码共同结构多肽域或共同功能多肽活性。

[0094] 本文所用的术语“治疗”、“治疗的”等指获得所需的药理学和/或生理学作用。从完全或部分防止疾病或其症状方面来说, 这种作用可以是预防性的, 和/或从部分或完全治愈疾病和/或由该疾病产生的不良影响来说, 这种作用可以是治疗性的。本文所用的术语“治疗”包括在哺乳动物, 例如人中进行任何疾病治疗, 包括:(a) 在可能易患该疾病或症状但尚未诊断患有该疾病的对象中防止该疾病的发生;(b) 抑制疾病, 即阻滞其发展; 和(c) 缓解疾病, 即引起该疾病消退。

[0095] 术语“个体”、“对象”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用, 指哺乳动物, 包括但不限于: 鼠类(大鼠、小鼠)、非人灵长动物、人、犬、猫、有蹄类(如马、牛、羊、猪、山羊)等。

[0096] “治疗有效量”或“有效量”指给予哺乳动物或其它对象治疗疾病时, 足以影响这种疾病治疗的化合物(如对象抗体)用量。“治疗有效量”取决于抗体、疾病及其严重程度、待治疗对象的年龄、体重等。

[0097] “生物样品”包括从个体获得的各种样品类型, 并可用于诊断或监测实验。该定义包括生物来源的血液和其它液体样品, 固体组织样品如活检样品或组织培养物或由其衍生的细胞, 以及它们的后代。所述定义也包含在获得后以任何方式操作的样品, 所述方式例如试剂处理、溶解、或富集某些成分, 如多核苷酸。所述术语“生物样品”包含临床样品, 还包含培养的细胞、细胞上清、细胞裂解物、血清、血浆、生物液体和组织样品。在进一步描述本发明之前, 应理解, 本发明不限于所述的具体实施方式, 因为它们当然可能变化。还应理解, 本文所用术语的目的仅是描述具体实施方式, 不用来构成限制, 因为本发明的范围仅受所附权利要求书的限制。

[0098] 应理解, 给出数值范围时, 除非文中另有明确说明, 该范围上下限之间、以下限单位的十分之一为间隔的各间插数值, 以及所述范围的任何其它指出或间插数值均包括在本

发明实施方式范围内。所述较小范围内可独立地包含这些较小范围的上下限，它们也属于本发明范围，除非明确地排除所述范围的界限。设定范围包含一个或两个限值时，本发明也包括排除所述限值之一或两个的范围。

[0099] 除非另外定义，本文使用的所有技术和科学术语具有本发明领域普通技术人员通常所理解的同样含义。本文提及的所有出版物均通过引用纳入本文，以公开和描述与所引用出版物相关的方法和/或材料。

[0100] 应注意到，本文和所附权利要求书所用的单数形式“一个”、“一种”和“这种”包括复数含义，除非另有明确说明。应注意到，权利要求书可撰写成排除任何任选要素。同样，这种说明应用作引用权利要求元素相关地使用这类排除性术语，如“只有”、“仅仅”等，或使用“负”限制的前提基础。

[0101] 提供本文讨论的出版物仅针对其在本申请提交日之前的公开。本文中所有内容均不应解释为承认本发明对象事件不能凭借在先发明而先于这些出版物。此外，所提供的出版日期可能与实际公开日期不同，这可能需要单独确认。

[0102] 发明详述

[0103] 本公开提供赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)多肽结合剂，如特异结合LOXL2多肽的抗体；还提供包含其的组合物。所述结合剂能用于多种也提供的治疗和诊断方法。

[0104] 本公开提供特异结合LOXL2表位的经分离赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)结合剂(即和抗LOXL2抗体)，其中所述LOXL2表位由图1(SEQ ID NO:1)所示氨基酸序列内的氨基酸定义。

[0105] 在一些实施方式中，由对象抗LOXL2抗体结合的表位能是：1)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的303-547氨基酸内的氨基酸定义；2)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的303-425氨基酸内的氨基酸定义；3)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的325-434氨基酸内的氨基酸定义；4)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的303-434氨基酸内的氨基酸定义；5)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的426-547氨基酸内的氨基酸定义；或6)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的435-547氨基酸内的氨基酸定义。结合对象抗LOXL2抗体的表位能包含序列TPAMGLQKK(SEQ ID NO:2)内的氨基酸。

[0106] 结合对象抗LOXL2抗体的表位能包含序列VWGMVCGQNWGIVEAMVVCRLGLGFASNAFQETWYWHG(SEQ ID NO:3)内的氨基酸。

[0107] 在一些实施方式中，对象经分离LOXL2结合剂抑制LOXL2多肽的酶活性。在一些实施方式中，所述抑制是非竞争性的。在一些实施方式中，对象经分离LOXL2结合剂不抑制LOXL2多肽的酶活性。在一些实施方式中，对象经分离LOXL2结合剂与AB0023抗体竞争结合LOXL2表位。在一些实施方式中，对象经分离LOXL2结合剂不与AB0023抗体竞争结合LOXL2表位。

[0108] 在一些实施方式中，由对象抗LOXL2抗体结合的表位能是：1)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的58-324氨基酸内的氨基酸定义；2)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的58-159氨基酸内的氨基酸定义；3)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的58-187氨基酸内的氨基酸定义；4)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的160-302氨基酸内的氨基酸定义；或5)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的188-302氨基酸内的氨基酸定义。在一些所述实施方式中，所述试剂抑制LOXL2多肽的酶活性。在一些实施方式中，所述抑制是非竞争性的。在一些所述实施方式中，所述试剂不抑制LOXL2多肽的酶活性。

[0109] 在一些实施方式中,由对象抗LOXL2抗体结合的表位能是:1)由图1和SEQ ID NO:1所述氨基酸序列的546-744氨基酸内的氨基酸定义。在一些所述实施方式中,所述试剂抑制LOXL2多肽的酶活性。在一些实施方式中,所述抑制是非竞争性的。在一些所述实施方式中,所述试剂不抑制LOXL2多肽的酶活性。

[0110] 在上文任一个实施方式中,所述对象结合剂结合表位的亲和性约为 10^7M^{-1} -约 10^{12}M^{-1} 。在上文任一个实施方式中,对象抗体包含免疫球蛋白重链,并且所述抗体的重链能是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在上文任一个实施方式中,对象结合剂能进行可检测标记。在上文任一个实施方式中,对象抗体能是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'。对象抗体能是人源化或嵌合抗体。

[0111] 在上文任一个实施方式中,可修饰对象结合剂。例如,对象结合剂或对象抗体:1)包含共价连接的非肽合成聚合物;2)包含聚(乙二醇)聚合物;3)包含共价连接的脂质或脂肪酸部分;4)包含共价连接的多糖或碳水化合物部分;5)包含造影剂;6)固定在固体支持物上;7)是单链Fv(scFv)抗体;8)多聚scFv;或9)包含共价或非共价连接到所述抗体上的癌症化疗药剂。

[0112] 本公开提供治疗与LOXL2相关病症的药盒,所述药盒包含:含有如本文所述经分离LOXL2结合剂的组合物;和药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方式中,所述LOXL2相关病症是肿瘤、转移、血管生成或纤维化。在一些实施方式中,所述LOXL2结合剂包含可检测标记、治疗部分、或两者都有。在一些实施方式中,所述组合物无热原。在一些实施方式中,所述组合物是冻干的。

[0113] 本公开提供诊断LOXL2相关病症的方法,包含:通过用对象经分离LOXL2结合剂接触所述样品来评价对象样品中LOXL2的水平,其中样品的LOXL2水平相较参比样品改变指示LOXL2相关病症的发生。在一些实施方式中,所述LOXL2相关病症是肿瘤、转移、血管生成或纤维化。在一些实施方式中,样品中LOXL2水平相较参比样品增加指示存在肿瘤或其转移或者肿瘤或转移生长增加。在一些实施方式中,所述参比样品是取样时间点比对象样品更早的样品或与对象样品组织类型相同的未影响组织的样品,或者另一个体的样品。在一些实施方式中,所述LOXL2结合剂进行可检测标记。

[0114] 本公开提供通过用对象经分离LOXL2结合剂(即抗LOXL2抗体或其抗体结合片段)接触样品、细胞或组织或给予对象本发明的LOXL2结合剂来抑制LOXL2的方法。在一些实施方式中,所述试剂与LOXL2的结合抑制了LOXL2的酶活性。在一些实施方式中,接触发生在体外或离体。在一些实施方式中,接触发生在体内。在一些实施方式中,抑制LOXL2降低对象中的肿瘤生长和/或转移。在一些实施方式中,抑制LOXL2降低对象中的血管生成。在一些实施方式中,抑制LOXL2降低对象中的纤维化。

[0115] 本公开提供减低对象中肿瘤生长的方法,所述方法包含给予对象抗LOXL2结合剂。在一些实施方式中,所述肿瘤是原发性肿瘤或转移肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是实体瘤。

[0116] 本公开提供抑制对象中血管生成的方法,所述方法包含给予对象分离的抗LOXL2结合剂。

[0117] 本公开提供抑制对象中纤维化疾病的方法,所述方法包含给予对象分离的抗LOXL2结合剂。

[0118] 在上述任一个治疗方法中,能通过肠胃外给予来给药或接触。在上述任一个治疗方法中,所述方法还包含共同给予第二治疗剂。所述第二治疗剂能是治疗的生物(如抗体)或化疗剂。

[0119] 本公开提供通过检测LOXL2水平和/或活性来监控对象响应给予对象抗LOXL2结合剂的方法。

[0120] 在上述任一个方法中,所述抗LOXL2结合剂能标记有可检测标记物或共价或非共价连接治疗部分。

[0121] LOXL2结合剂

[0122] 本发明提供结合LOXL2多肽区的药剂,本文中一般称为“LOXL2多肽结合剂”、“LOXL2结合剂”或“抗LOXL2结合剂”。抗LOXL2结合剂包含结合LOXL2区的结合剂和抑制LOXL2酶活性的结合剂。所述抑制结合剂包含用作竞争性抑制剂或非竞争性抑制剂的药剂。合适的LOXL2结合剂是抗LOXL2抗体(或其抗原结合片段)。

[0123] 本公开提供特异结合LOXL2的抗体。本文中所述抗体也称为“抗LOXL2抗体”。对象抗LOXL2抗体特异性结合存在于LOXL2部分内的表位,如下面更详细描述。

[0124] 本文使用的“表位”指LOXL2多肽中辅助LOXL2多肽和抗LOXL2结合剂之间结合相互作用的连续或非连续氨基酸残基。由抗LOXL2结合剂例如抗LOXL2抗体结合的表位,包含线形表位(如毗连氨基酸段形成的表位)和构象表位(如非毗连氨基酸段形成的表位)。特异结合抗LOXL2结合剂例如抗LOXL2抗体的表位,本文中也称为“LOXL2表位”。LOXL2表位(如定义表位的LOXL2多肽内的残基)能有总长约3个氨基酸-约15个氨基酸或更长,如LOXL2表位能有总长3个氨基酸(aa)、4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、20aa、25aa、30aa、40aa或50aa。如上所述,所述包含LOXL2表位的氨基酸可以连续或不连续。

[0125] 如图1所示,未加工的LOXL2多肽从氨基末端到羧基末端包含:a)信号肽;b)第一富含半胱氨酸清除受体(SRCR)结构域,本文称为SRCR1;c)第二SRCR结构域,本文称为SRCR2;d)第三SRCR结构域,本文称为SRCR3;e)第四SRCR结构域,本文称为SRCR4;和f)催化结构域。SRCR1和SRCR2由28个氨基酸连接;SRCR2和SRCR3由22个氨基酸连接;和SRCR3和SRCR4由9个氨基酸连接;其中,所述连接氨基酸在本文中称为“接头”氨基酸或“接头”。所述LOXL2的成熟(或加工)形式通过在SRCR2和SRCR 3之间剪切以释放含有信号序列、SRCR1和SRCR2的多肽而从未加工形式生成。因此,所述LOXL2的成熟、加工形式从氨基末端到羧基末端包含:i) SRCR3;ii)接头;iii)SRCR4;iv)接头;和v)催化结构域。

[0126] LOXL2多肽包含的氨基酸序列与图1(SEQ ID NO:1)所示氨基酸序列的约400氨基酸(aa)-约450aa、约450aa-约500aa、约500aa-约550aa、约550aa-约600aa、约600aa-约650aa、约650aa-约700aa、约700aa-约750aa或约750aa-约774aa的连续区段有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性。本文使用的“LOXL2多肽”包含人LOXL2多肽。

[0127] 在一些实施方式中,LOXL2多肽包含的氨基酸序列与图1(SEQ ID NO:1)所示氨基酸序列的1-774氨基酸有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性。

[0128] 在一些实施方式中,LOXL2多肽从氨基末端到羧基末端包含:i)SRCR3;ii)接头;iii)SRCR4;iv)接头;和v)催化结构域;并且包含的氨基酸序列与图1(SEQ ID NO:1)所示氨

氨基酸序列的325-774氨基酸有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性。

[0129] 在一些实施方式中, LOXL2多肽从氨基末端到羧基末端包含:i)SRCR1; ii)接头; iii)SRCR2; iv)接头; 和v)催化结构域; 并且包含的氨基酸序列与图1(SEQ ID NO:1)所示氨基酸序列的58-774氨基酸有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性。

[0130] 如图1所示的LOXL2多肽的所述未加工和所述成熟形式与人LOXL3和人LOXL4的所述未加工和成熟形式有约55%的氨基酸序列相同性。如图1所示的LOXL2多肽的SRCR3-4区与人LOXL3和人LOXL4的SRCR3-4区有约58%-60%的氨基酸序列相同性。如图1所示的LOXL2多肽的SRCR3区与人LOXL3和人LOXL4的SRCR3区有约64%的氨基酸序列相同性。如图1所示的LOXL2多肽的SRCR4区与人LOXL3和人LOXL4的SRCR4区有约55%-57%的氨基酸序列相同性。如图1所示的LOXL2多肽的SRCR1-2区与人LOXL3和人LOXL4的SRCR1-2区有约45%-48%的氨基酸序列相同性。如图1所示的LOXL2多肽的SRCR1区与人LOXL3和人LOXL4的SRCR1区有约57%-59%的氨基酸序列相同性。如图1所示的LOXL2多肽的SRCR2区与人LOXL3和人LOXL4的SRCR2区有约39%-44%的氨基酸序列相同性。如图1所示的LOXL2多肽的催化结构域与人LOXL3和人LOXL4的催化结构域有约65%-67%的氨基酸序列相同性。

[0131] 在一些实施方式中, 对象抗LOXL2抗体显示对LOXL2的抑制活性, 例如在某些实施方式中, 对象抗LOXL2抗体抑制LOXL2多肽的酶活性。在一些实施方式中, 对象抗LOXL2抗体降低肿瘤生长和/或转移。因此, 例如, 在一些实施方式中, 对象抗LOXL2抗体: 1) 特异结合LOXL2部分出现的表位; 2) 抑制LOXL2多肽的酶活性; 和3) 降低肿瘤生长和/或转移。在另一些实施方式中, 对象抗LOXL2抗体: 1) 特异结合LOXL2部分出现的表位; 但是基本不抑制LOXL2多肽的酶活性, 和基本不降低肿瘤生长和/或转移。

[0132] 在一些实施方式中, 与没有药剂时LOXL2多肽的酶活性相比, 对象抗LOXL2抗体将LOXL-2酶活性抑制至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、或至少约90%或更多。

[0133] 对象抗LOXL2抗体会在一些实施方式中抑制LOXL2多肽的酶活性, 其半最大抑制浓度(IC₅₀)为约1nM-约500nM, 或少于1nM。例如, 在一些对象抗LOXL2抗体抑制LOXL2多肽的酶活性的实施方式中, 抗LOXL2抗体抑制酶活性的IC₅₀为约1nM-约10nM、约10nM-约50nM、约50nM-约100nM、约100nM-约150nM、约150nM-约200nM、约200nM-约250nM、约250nM-约300nM、约300nM-约350nM、约350nM-约400nM、约400nM-约450nM或约450nM-约500nM。在一些对象抗LOXL2抗体抑制LOXL2多肽的酶活性的实施方式中, 所述抗LOXL2抗体抑制酶活性的IC₅₀小于1nM。

[0134] 本文所述或本领域已知的任何合适方法能评价抗LOXL2结合剂是否抑制LOXL2的酶活性。实施例中提供适用于测定对象抗LOXL2抗体对LOXL2多肽的酶活性的效果的试验方法示例。对象抗LOXL2抗体能抑制作用于胶原底物(如I型胶原)的LOXL2多肽的酶活性。

[0135] 在一些实施方式中, 对象抗LOXL2抗体基本不抑制LOXL2多肽的酶活性。例如, 在一些实施方式中, 与没有抗LOXL2抗体时LOXL2多肽的酶活性相比, 对象抗LOXL2抗体对LOXL2多肽的酶活性抑制(如果到任何可检测的程度)小于约10%、小于约5%、小于约2%、小于约

1%。因此,在下面讨论中,如果对象抗LOXL2抗体称为显示对LOXL2多肽的酶活性“没有抑制”,或如果对象抗LOXL2抗体称为“没有抑制”LOXL2多肽的酶活性,与没有抗LOXL2抗体时LOXL2多肽的酶活性相比,抗LOXL2抗体对LOXL2多肽的酶活性抑制(如果到任何可检测的程度)小于约10%、小于约5%、小于约2%、小于约1%。

[0136] 在一些实施方式中,对象抗体降低肿瘤生长和/或转移。在一些实施方式中,相对于没有抗体情况下观察,对象抗体降低转移发生率,并且在进一步测试中抑制转移肿瘤生长。肿瘤抑制能使用便捷测量方法定量。所述转移发生率能通过检测相对扩散(如涉及器官系统的数目)和这些位点中的相对肿瘤负荷来评价。转移生长能通过合适的微观或宏观分析确定。肿瘤转移能降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些实施方式中,所述抗体相对于没有降低LOXL2酶活性的其他抗体或混合物来评价。所述测试抗体能在肿瘤接种时、原发性肿瘤生长建立后或局部和/或远端转移建立后给予。所述测试抗体的单次或多次给予能使用任何便捷给药模式,包括但不限于,静脉内、腹膜内、肿瘤内、皮下和皮内。

[0137] 对象抗LOXL2抗体显示结合LOXL2多肽内表位的高亲和性。例如,对象抗体结合LOXL2多肽内表位的亲和性为至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M、至少约 10^{-12} M或高于 10^{-12} M。对象抗体结合LOXL2多肽上所存在表位的亲和性为约 10^{-7} –约 10^{-8} M、约 10^{-8} –约 10^{-9} M、约 10^{-9} –约 10^{-10} M、约 10^{-10} –约 10^{-11} M、约 10^{-11} –约 10^{-12} M或大于 10^{-12} M。

[0138] 例如,在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合LOXL2多肽(例如人LOXL2多肽),在约4℃、25℃、37℃或42℃温度测量时,解离常数(Kd)等于或低于约100nM、低于约10nM、低于约1nM、低于约0.5nM、低于约0.1nM、低于约0.01nM、或低于约0.005nM。

[0139] 在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的同种型。在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体是IgG4的同种型。在一些实施方式中,所述抗体包含重链氨基酸241处的Ser-Pro取代。参见例如Angal等,(1993)Molec. Immunol. 30:105。

[0140] 结合SRCR3-接头-SRCR4区内表位的LOXL2结合剂

[0141] 在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合SRCR3-接头-SRCR4区内的表位,所述区称为“SRCR3-4”。SRCR3-4区能包含与SEQ ID NO:1的氨基酸325-544、氨基酸325-547、氨基酸303-544、或氨基酸303-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-544、氨基酸325-547、氨基酸303-544、或氨基酸303-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0142] 在一些示例中,对象抗LOXL2抗体与如WO 2009/035791和US2009/0053224所述的AB0023抗体,和/或如WO 2009/035791和US2009/0053224所述的AB0024(包含人框架(FR)序列的AB0023抗体的相应部分)抗体竞争结合。如WO 2009/035791和US 2009/0053224所述的AB0023和AB0024抗体在本文分别称为“AB0023”和“AB0024”。在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合SRCR3-4内的表位;和ii)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。AB0023和AB0024的氨基酸序列示于图6。

[0143] 与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内表位的对象抗LOXL2抗体,在

一些实施方式中结合与AB0023和AB0024相同的表位。与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内表位的对象抗LOXL2抗体,在一些实施方式中结合与AB0023和AB0024结合表位重叠的表位。与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内表位的对象抗LOXL2抗体,在一些实施方式中结合与AB0023和AB0024结合表位不重叠的表位;例如,所述抑制能是由于对象抗LOXL2已经结合SRCR3-4区内表位时AB0023或AB0024与其表位结合的位阻,或是由于抗LOXL2与其表位结合诱导的AB0023和AB0024所结合表位的变构。

[0144] 如上所述,在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体抑制LOXL2多肽的酶活性。因此,在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合SRCR3-4内的表位;和b)抑制LOXL2的酶活性。在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合SRCR3-4内的表位;b)抑制LOXL2的酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。在另一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合SRCR3-4内的表位;b)抑制LOXL2的酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0145] 在某些实施方式中,特定排除AB0023抗体和AB0024抗体

[0146] 在另一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合SRCR3-4内的表位;和ii)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0147] 在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体包含V_H和V_L区,其中:1)所述V_H区包括含有与AB0023重链可变区CDR有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同性的氨基酸序列的1、2或3个重链可变区CDR;和2)所述V_L区包括含有与AB0023轻链可变区CDR有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同性的氨基酸序列的1、2或3个轻链可变区CDR。

[0148] 接头-SRCR3-接头-SRCR4-接头区内的表位

[0149] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-544、氨基酸303-545、氨基酸303-546、氨基酸303-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0150] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-544、氨基酸303-545、氨基酸303-546、或氨基酸303-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0151] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-544、氨基酸303-545、氨基酸303-546、或氨基酸303-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0152] c)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-544、氨基酸303-545、氨基酸303-546、或氨基酸303-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0153] d)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸

303-544、氨基酸303-545、氨基酸303-546、或氨基酸303-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0154] e)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-544、氨基酸303-545、氨基酸303-546、或氨基酸303-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与前述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0155] f)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-544、氨基酸303-545、氨基酸303-546、或氨基酸303-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0156] SRCR3-接头-SRCR4-接头区内的表位

[0157] 在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-544、氨基酸325-545、氨基酸325-546、或氨基酸325-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0158] a)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-544、氨基酸325-545、氨基酸325-546、或氨基酸325-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)抑制LOXL2酶活性。

[0159] b)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-544、氨基酸325-545、氨基酸325-546、或氨基酸325-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与前述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0160] c)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-544、氨基酸325-545、氨基酸325-546、或氨基酸325-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0161] d)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-544、氨基酸325-545、氨基酸325-546、或氨基酸325-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0162] e)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-544、氨基酸325-545、氨基酸325-546、或氨基酸325-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与所

述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0163] f)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-544、氨基酸325-545、氨基酸325-546、或氨基酸325-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0164] 接头-SRCR3-接头区内的表位

[0165] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合SRCR3区内(并且不在SRCR4内)的表位。SRCR3区能包含与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0166] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0167] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0168] c)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0169] d)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0170] e)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0171] f)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至

少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0172] a)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)抑制LOXL2酶活性。

[0173] b)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与所述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0174] c)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0175] d)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0176] e)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与所述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0177] f)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-425、氨基酸303-425、氨基酸303-434、或氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0178] 接头-SRCR3区内的表位

[0179] 在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-425有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0180] a)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-425有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)抑制LOXL2酶活性。

[0181] b)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-425有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性

的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与所述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0182] c)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-425有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0183] d)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-425有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0184] e)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-425有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与所述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0185] f)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-425有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0186] SRCR3-接头区内的表位

[0187] 在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0188] a)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)抑制LOXL2酶活性。

[0189] b)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与所述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0190] c)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0191] d)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0192] e)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸

325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与所述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0193] f)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸325-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0194] 接头-SRCR3-接头区内的表位

[0195] 在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0196] a)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)抑制LOXL2酶活性。

[0197] b)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与所述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0198] c)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0199] d)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0200] e)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位，例如，i)结合与所述AB0023抗体相同的表位；ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位；或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0201] f)在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体：a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸303-434有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位；b)不抑制LOXL2酶活性；和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0202] 接头-SRCR4-接头区内的表位

[0203] 在某些实施方式中，对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸426-544、氨基酸426-545、氨基酸426-546、或氨基酸426-547有至少约90%、至少约95%、至少约

98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0204] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸426-544、氨基酸426-545、氨基酸426-546、或氨基酸426-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0205] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸426-544、氨基酸426-545、氨基酸426-546、或氨基酸426-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0206] c)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸426-544、氨基酸426-545、氨基酸426-546、或氨基酸426-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0207] d)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸426-544、氨基酸426-545、氨基酸426-546、或氨基酸426-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0208] e)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸426-544、氨基酸426-545、氨基酸426-546、或氨基酸426-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0209] f)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸426-544、氨基酸426-545、氨基酸426-546、或氨基酸426-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0210] 所述SRCR4-接头区内的表位

[0211] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合SRCR4区内(并且不在SRCR3内)的表位。SRCR4区能包含与SEQ ID NO:1的氨基酸435-544、氨基酸435-545、氨基酸435-546、或氨基酸435-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸435-544、氨基酸435-545、氨基酸435-546、或氨基酸435-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0212] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸435-544、氨基酸435-545、氨基酸435-546、或氨基酸435-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸性序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制

LOXL2酶活性。

[0213] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸435-544、氨基酸435-545、氨基酸435-546、或氨基酸435-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0214] c)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸435-544、氨基酸435-545、氨基酸435-546、或氨基酸435-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0215] d)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸435-544、氨基酸435-545、氨基酸435-546、或氨基酸435-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0216] e)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸435-544、氨基酸435-545、氨基酸435-546、或氨基酸435-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0217] f)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸435-544、氨基酸435-545、氨基酸435-546、或氨基酸435-547有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0218] 所述SRCR3和SRCR4之间接头内的表位

[0219] 在某些示例中,对象抗LOXL2抗体特异结合包含SRCR3和SRCR4之间接头区内氨基酸的表位。所述SRCR3和SRCR4之间接头区能包含与下列氨基酸序列:TPAMGLQKK(SEQ ID NO:2)有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:2有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0220] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:2有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0221] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:2有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表

位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0222] c)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:2有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0223] d)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:2有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0224] e)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:2有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0225] f)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:2有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0226] LOXL2的氨基酸459-497内的表位

[0227] 在某些示例中,对象抗LOXL2抗体特异结合SRCR4的氨基酸459-497内的表位。因此,例如,在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与氨基酸序列:VWGMVCGQNWGIVEAMVVCRLGLGFASNAFQETWYWHG(SEQ ID NO:3)有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0228] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:3有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0229] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:3有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与所述AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0230] c)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:3有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0231] d)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:3有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0232] e)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:3有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的

表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位,例如,i)结合与AB0023抗体相同的表位;ii)结合与AB0023抗体结合表位重叠的表位;或iii)结合与AB0023抗体结合表位不重叠的表位。

[0233] f)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:3有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;b)不抑制LOXL2酶活性;和c)不与AB0023抗体和/或AB0024抗体竞争结合SRCR3-4内的表位。

[0234] 在某些实施方式中,特定排除结合氨基酸序列VWGMVCGQNWGIVEAMVVCRQLGLGFASNAFQETWYWHG(SEQ ID NO:3)内表位的抗体。

[0235] 结合SRCR1-2内表位的LOXL2结合剂

[0236] 在一些实施方式中,诸如对象抗LOXL2抗体的LOXL2结合剂特异结合SRCR1-接头-SRCR2区内的表位,所述区称为“SRCR1-2”。SRCR1-2区能包含与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-302、或58-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在一些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-302、或58-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0237] SRCR1-接头-SRCR2-接头区内的表位

[0238] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0239] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0240] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0241] SRCR1内的表位

[0242] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合SRCR1区内(并且不在SRCR2内)的表位。SRCR1区能包含与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-159有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-159有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0243] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-159有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0244] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-159有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0245] SRCR1-接头内的表位

[0246] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合SRCR1-接头区内的表位。SRCR1-接头区能包含与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-187有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-187有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0247] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-187有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0248] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-187有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0249] SRCR2内的表位

[0250] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合SRCR1区内(并且不在SRC2内)的表位。SRCR2区能包含与图1所述氨基酸序列的氨基酸188-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸188-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0251] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸188-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0252] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸188-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0253] 接头-SRCR2区内的表位

[0254] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合接头-SRCR2区内的表位。接头-SRCR2区能包含与图1所述氨基酸序列的氨基酸160-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸160-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0255] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸160-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0256] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸160-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0257] 所述SRCR2-接头区内的表位

[0258] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合SRCR2-接头区内的表位。SRCR2-接头区能包含与图1所述氨基酸序列的氨基酸188-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在某些实施方式

中,对象抗LOXL2抗体特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸188-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0259] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸188-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0260] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸188-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0261] 所述接头-SRCR2-接头区内的表位

[0262] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合接头-SRCR2-接头区内的表位。接头-SRCR2-接头区能包含与图1所述氨基酸序列的氨基酸160-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸160-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0263] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸160-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0264] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸160-324有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0265] SRCR1-接头-SRCR2区内的表位

[0266] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合SRCR1-接头-SRCR2区内的表位。SRCR1-接头-SRCR2区能包含与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0267] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0268] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与图1所述氨基酸序列的氨基酸58-302有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0269] 结合所述催化结构域内表位的LOXL2结合剂

[0270] 在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体结合LOXL2多肽催化结构域内的表位。LOXL2多肽催化结构域能包含与SEQ ID NO:1的氨基酸546-774有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列。因此,例如,在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸546-774有至少约90%、至少约

95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位。

[0271] a)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1的氨基酸546-774有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)抑制LOXL2酶活性。

[0272] b)在某些实施方式中,对象抗LOXL2抗体:a)特异结合与SEQ ID NO:1有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或100%氨基酸序列相同性的氨基酸序列内的表位;和b)不抑制LOXL2酶活性。

[0273] 在某些实施方式中,特定排除结合含有SEQ ID NO:1中酪氨酸593(Y593)和/或组氨酸739(H739)的表位的抗体。

[0274] 修饰

[0275] 对象抗LOXL2抗体能包含如下所述的一种或多种修饰。

[0276] 在一些实施方式中,对象抗体在羧基末端包含游离巯基(-SH),其中所述游离巯基能用于连接抗体到第二多肽(如第二抗体,包含对象抗体)、支架蛋白、载体等。

[0277] 在一些实施方式中,对象抗体包含一种或多种非天然产生的氨基酸。在一些实施方式中,所述非天然产生的氨基酸包含羰基、乙酰基、氨氧基、胍基、酰胍基、氨基脒基、叠氮基或炔基。示例性非天然产生氨基酸的公开参见例如,美国专利号7,632,924。包括非自然产生的氨基酸能提供聚合物、第二多肽、支架蛋白等的连接。例如,连接水溶性聚合物的对象抗体能通过将包含羧基的水溶性聚合物(如PEG)与包括含有氨氧基、胍基、酰胍基或氨基脒基的非天然编码氨基酸的对象抗体反应而生成。如另一个示例,连接水溶性聚合物的对象抗体能通过将包括含炔氨基酸的对象抗体与含有叠氮部分的水溶性聚合物(如PEG)反应而生成;在一些实施方式中,所述叠氮基或炔基通过酰胺键连接到PEG分子上。“非天然产生的氨基酸”指不是20个常见氨基酸、或焦赖氨酸(pyrolysine)或硒代半胱氨酸(selenocysteine)的氨基酸。可与术语“非天然产生的氨基酸”同义使用的其他术语是“非自然氨基酸”、“非天然氨基酸”、“非自然编码的氨基酸”、和其各个带连字符和不带连字符的形式。所述术语“非天然产生的氨基酸”也包括但不限于,通过修饰自然编码氨基酸(包括但不限于20个常见氨基酸、或焦赖氨酸或硒代半胱氨酸)而产生的氨基酸,但不是其本身通过翻译复合物天然纳入生长多肽链上。所述非天然产生氨基酸的示例包括但不限于,N-乙酰葡萄糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰葡萄糖胺基-L-苏氨酸、和O-磷酸酪氨酸。

[0278] 在一些实施方式中,对象抗体连接(如共价连接)聚合物(如除多肽外的聚合物)。合适的聚合物包含,例如生物相容性聚合物和水溶性生物相容性聚合物。合适的聚合物包含合成聚合物和天然产生的聚合物。合适的聚合物包含,例如取代的或未取代的直链或支链聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧化烯聚合物或支链或非支链多糖,例如均聚多糖或杂聚多糖。合适的聚合物包含,如乙烯-乙烯醇共聚物(通常已知其通用名称EVOH或商品名EVAL);聚甲基丙烯酸丁酯;聚(羟基戊酸酯);聚(L-乳酸);聚己酸内酯;聚(丙交酯-乙交酯共聚物);聚(羟基丁酸酯);羟基丁酸酯-戊酸酯共聚物;聚二氧六环酮(polydioxanone);聚原酸酯;聚酞;聚(乙醇酸);聚(D,L-乳酸);聚(乙醇酸-三亚甲基碳酸酯);聚磷酸酯;聚磷酸酯聚氨酯;聚(氨基酸);氰基丙烯酸酯;聚(碳酸丙二醇酯);聚(碳酸亚胺酯);共聚(醚-酯)(如聚环氧乙烷-聚乳酸(PEO/PLA)共聚物);聚草酸亚烷基酯;聚磷腈;生物分子,例如纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素、淀粉、胶原和透明质酸;聚氨酯;硅酮;聚酯;聚烯烃;聚异丁烯和乙烯-α烯

烃共聚物;丙烯酸聚合物和共聚物;卤乙烯聚合物和共聚物,如聚氯乙烯;聚乙烯醚,如聚乙烯甲醚;聚偏二卤乙烯,如聚偏二氟乙烯和聚偏二氯乙烯;聚丙烯腈;聚乙烯基酮;聚乙烯基芳香烃,如聚苯乙烯;聚乙烯酯,如聚乙酸乙烯酯;乙烯基单体相互间以及与烯烃的共聚物,如乙烯-甲基丙烯酸甲酯共聚物、丙烯腈-苯乙烯共聚物、乙腈-丁二烯-苯乙烯(ABS)树脂和乙烯-乙酸乙烯酯共聚物;聚酰胺,如尼龙66和聚己内酰胺;醇酸树脂;聚碳酸酯;聚氧甲烯;聚酰亚胺;聚醚;环氧树脂;聚氨酯;人造丝;人造丝-三乙酸酯;纤维素;乙酸纤维素;丁酸纤维素;乙酸丁酸纤维素;玻璃纸;硝酸纤维素;丙酸纤维素;纤维素醚;无定形特氟龙;聚(乙二醇);和羧甲基纤维素。

[0279] 合适的合成聚合物包含未取代的和取代的直链或支链聚(乙二醇)、聚(丙二醇)、聚乙烯醇,和其衍生物,如取代的聚(乙二醇),例如甲氧基聚(乙二醇),和其衍生物。合适的天然产生聚合物包含,例如白蛋白、直链淀粉、葡聚糖、糖原和其衍生物。

[0280] 合适的聚合物的平均分子量范围为500Da-50,000Da,例如,5,000Da-40,000Da、或25,000-40,000Da。例如,在对象抗体包含聚(乙二醇)(PEG)或甲氧基聚(乙二醇)聚合物的一些实施方式中,所述PEG或甲氧基聚(乙二醇)聚合物能有约0.5千道尔顿(kDa)-1kDa、约1kDa-5kDa、5kDa-10kDa、10kDa-25kDa、25kDa-40kDa或40kDa-60kDa的分子量范围。

[0281] 如上所述,在一些实施方式中,对象抗体共价连接PEG聚合物。在一些实施方式中,对象scFv多聚体共价连接PEG聚合物。参见例如Albrecht等,(2006)J. Immunol. Methods 310:100。适合蛋白PEG化的方法和试剂为本领域熟知,并可以在例如美国专利号5,849,860中找到。适于偶联蛋白的PEG通常在室温下可溶于水,且具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$,其中R为氢或保护基团如烷基或链烷醇基团,且其中n是1-1000的整数。R为保护基团时,其通常有1-8个碳。

[0282] 偶联到对象抗体的PEG可为线形的。偶联到对象抗体的PEG也可以分支。支链PEG衍生物包括例如,美国专利第5,643,575号中所述,“星形PEG(star-PEG)”和多臂PEG如谢氏聚合物有限公司(Shearwater Polymers)产品目录“聚乙二醇衍生物1997-1998”中所述的那些。本领域对星形PEG有描述,包含例如在美国专利第6,046,305号中。

[0283] 对象抗体能被糖基化,如,能包含共价连接的糖类或多糖部分。抗体的糖基化通常为N-连接或O-连接。N-连接指糖部分连接天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸为酶促连接糖部分与天冬酰胺侧链的识别序列,其中X为脯氨酸以外的任意氨基酸。因此,多肽中任意这些三肽序列的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接糖基化指糖类N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接羟氨基酸,最常见为丝氨酸或苏氨酸,尽管5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸也可使用。

[0284] 添加糖基化位点到抗体可通过改变氨基酸序列使其含有一个或多个上述三肽序列(用于N-连接糖基化位点)而实现。所述改变还可通过用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基添加或取代初始抗体的序列(用于O-连接糖基化位点)而实现。类似地,可通过抗体的天然糖基化位点中的氨基酸改变来实现糖基化位点的去除。

[0285] 对象抗体会在一些实施方式中包含“辐射不透性”标记,例如,能容易用例如x射线观察的标记。辐射不透性材料为本领域技术人员熟知。所述最常见辐射不透性材料包含碘化物、溴化物或钡盐。也已知其他辐射不透性材料且包括但不限于,有机铋衍生物(参见例如美国专利号5,939,045)、辐射不透性多氨基钾酸酯(参见美国专利号5,346,981)、有机铋

复合物(参见例如美国专利号5,256,334)、辐射不透性钡多聚体复合物(参见例如美国专利号4,866,132)等。

[0286] 对象抗体能共价连接于第二部分(如脂质、除对象抗体之外的多肽、合成多聚物、碳水化合物等),使用例如戊二醛、同双功能交联接头或异双功能交联接头。戊二醛通过其氨基部分与多肽交联。同双功能交联接头(如同双功能亚氨基酯、同双功能N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)酯、或同双功能巯基反应性交联接头)包含两个或多个相同的反应部分,并且能用于一步反应过程,其中加入所述交联接头到含有多肽混合物的溶液中以连接。同双功能NHS酯和亚氨基酯与含有多肽的胺交联。在温和碱性pH中,亚氨基酯只与伯胺反应形成亚氨酰胺,并且交联多肽的整体电荷没有受影响。同双功能巯基反应性交联接头包含双马来酰亚胺己烷(BMH)、1,5-二氟-2,4-二硝基苯(DFDNB)和1,4-二-(3',2'-吡啶二硫)丙酰胺基丁烷(DPDPB)。

[0287] 异双官能交联接头有两个或多个不同的反应部分(如氨基反应部分和巯基反应部分),并且与多肽之一通过氨基或巯基反应部分交联,然后与其他多肽通过非反应部分反应。可用多个异双官能卤化乙酰交联接头,如二硫吡啶交联接头。碳二亚胺是用于偶联羧基和氨基产生酰胺键的经典异双官能交联剂示例。

[0288] 对象抗体能固定在固体支持物上。本领域熟知的合适支持物包含但不限于,市售可得柱材料、聚苯乙烯珠、胶乳珠、磁珠、胶体金属颗粒、玻璃和/或硅芯片和表面、硝酸纤维素条、尼龙膜、片、duracytes、反应盘的孔(如,多孔板)、塑料管等。固体支持物能包含任何一种物质,包括例如玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、尼龙、直链淀粉、天然和修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。熟知固定对象抗体到固体支持物的合适方法,包括但不限于离子、疏水、共价相互作用等。固体支持物可溶于或不溶于例如水溶液。在一些实施方式中,合适固体支持物通常不溶于水溶液。

[0289] 对象抗体会在一些实施方式中包含可检测标记。合适的可检测标记包含可通过光谱法,光化学,生物化学,免疫化学,电学,光学或化学手段检测的任何组合物。合适标记包括但不限于,磁珠(如Dynabeads™)、荧光染料(如荧光素异硫氰酸酯、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等)、放射性标记(如³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C或³²P)、酶(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、萤光素酶、和通常用于酶联免疫吸附实验(ELISA)的其他酶)、和比色标记,如胶体金或有色玻璃或塑料(如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)珠。

[0290] 在一些实施方式中,对象抗体包含造影剂或放射性同位素,其中所述造影剂或放射性同位素适用于成像,如对人操作的成像过程。标记的非限制性示例包含放射性同位素,例如¹²³I(碘)、¹⁸F(氟)、⁹⁹Tc(锝)、¹¹¹In(铟)和⁶⁷Ga(镓),和造影剂,例如钆(Gd)、镝和铁。也可获得放射性Gd同位素(¹⁵³Gd)并适用于非人哺乳动物的成像过程。对象抗体能使用标准技术标记。例如,对象抗体能使用氯胺T或1,3,4,6-四氯-3 α ,6 α -二苯基甘脲(dephenylglycouril)碘化。对氟化作用而言,通过氟离子置换反应将氟加入对象抗体。有所述放射性同位素的合成蛋白的综述参见Muller-Gartner,H.,TIB Tech.,16:122-130(1998)和Saji,H.,Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.,16(2):209-244(1999)。对象抗体也可通过标准技术用造影剂标记。例如,标记对象抗体能通过将所述抗体偶联低分子量Gd螯合物,如Gd二亚乙基三胺五乙酸(GdDTPA)或Gd四氮杂环十二烷四乙酸(tetraazacyclododecanetetraacetic)(GdDOTA)参加Caravan等,Chem.Rev.99:2293-2352

(1999)和Lauffer等, *J. Magn. Reson. Imaging*, 3:11-16(1985)。例如,对象抗体能通过将抗体偶联聚赖氨酸Gd螯合物而标记有Gd。参见例如, *Curtet等, Invest. Radiol.*, 33(10):752-761(1998)。或者,对象抗体能通过孵育包含Gd螯合物脂质的顺磁聚合脂质体与亲和素和生物素化抗体而标记有Gd。参见例如, *Sipkins等, Nature Med.*, 4:623-626(1998)。

[0291] 能连接到对象抗体的合适荧光蛋白包括但不限于,来自维多利亚水母(*Aequoria victoria*)的绿色荧光蛋白或其突变体或衍生物,例如描述于美国专利号6,066,476;6,020,192;5,985,577;5,976,796;5,968,750;5,968,738;5,958,713;5,919,445;5,874,304;如增强型GFP。很多所述GFP市售可得,如来自克隆泰克公司(Clontech, Inc)。其他荧光蛋白包含红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、和任何来自珊瑚虫(Anthozoon)种的各种荧光和有色蛋白,如描述于Matz等(1999) *Nature Biotechnol.* 17:969-973等。

[0292] 对象抗体会在一些实施方式中连接(如共价或非共价连接)融合伴侣,如配体、表位标签、肽、除抗体之外的蛋白等。合适的融合伴侣包含肽和多肽,所述肽和多肽使体外稳定性提高(如增强的血清半衰期);提供简易纯化,例如聚组氨酸序列,如6His(HHHHHH, SEQ ID NO:4)等;提供细胞中的融合蛋白分泌;提供表位标签,如GST, 血凝素(HA;如CYPYDVDPYA;SEQ ID NO:5)、FLAG(如DYKDDDDK;SEQ ID NO:6)、c-myc(如EQKLISEEDL;SEQ ID NO:7)等;提供可检测信号,如产生可检测产物的酶(如 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶),或自身可检测的蛋白,如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等;提供多聚化,如多聚化结构域,如免疫球蛋白的Fc部分等。

[0293] 所述融合也包含亲和性结构域,所含肽序列能与例如固定在固体支持物上的结合伴侣互相作用,用于鉴定或纯化。连续单个氨基酸(例如组氨酸)与蛋白融合时,能通过所述融合蛋白与树脂柱(例如镍琼脂糖)的高亲和性结合来用于一步纯化。亲和性结构域的示例包含His5(HHHHHH)(SEQ ID NO:8),HisX6(HHHHHH)(SEQ ID NO:4),C-myc(EQKLISEEDL)(SEQ ID NO:7),Flag(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:6),Strep标记(WSHPQFEK)(SEQ ID NO:9),血凝素如HA标记(YPYDVDPYA;SEQ ID NO:10),谷胱甘肽S-转移酶(GST),硫氧还蛋白,纤维素结合域,RYIRS(SEQ ID NO:11),Phe-His-His-Thr(SEQ ID NO:12),壳质结合域,S肽,T7肽,SH2结构域,C末端RNA标记,WEAAAREACCRECCARA(SEQ ID NO:13),金属结合域如锌结合域或钙结合域,例如来自钙结合蛋白如钙调蛋白、肌钙蛋白C、钙调磷酸酶B、肌球蛋白轻链、恢复蛋白(recoverin)、S调节蛋白(modulin)、视锥蛋白(visinin)、视锥蛋白样蛋白、神经钙蛋白、海马钙结合蛋白(hippocalcin)、频蛋白(frequenin)、钙收缩蛋白、钙蛋白酶大亚基、S100蛋白、小清蛋白、钙结合蛋白D9K、钙结合蛋白D28K和钙视网膜蛋白、内含肽(inteins)、生物素、链霉亲和素、MyoD、亮氨酸拉链序列和麦芽糖结合蛋白。

[0294] 对象抗体在一些实施方式中与结合内源性血脑屏障(BBB)受体的多肽融合。将对象抗体与结合内源性BBB受体的多肽连接有助于穿过所述BBB,如在涉及对所需个体给予对象抗体的对象治疗方法(见下)中。结合内源性BBB的合适多肽包含抗体,例如单克隆抗体,或其特异结合内源性BBB受体的抗原结合片段。合适的内源性BBB受体包括但不限于,胰岛素受体、转铁蛋白受体、瘦素受体、脂蛋白受体、胰岛素样生长因子受体。参见例如,美国专利公开第2009/0156498号。

[0295] 在一些实施方式中,对象抗体包含多胺修饰。对象抗体的多胺修饰增强经修饰抗体在BBB的渗透性。对象抗体可用天然产生或合成的多胺来修饰。参见例如,美国专利第5,

670, 477号。可用的天然产生多胺包含腐胺、亚精胺、精胺、1,3-丙二胺(1,3-deaminopropane)、去甲精胺、对称高亚精胺(syn-homospermidine)、热胺(thermine)、热精胺、嗜热性五胺、均嗜热性五胺(homocaldopentamine)、和刀豆四胺。腐胺、亚精胺和精胺特别有用。合成多胺由经验式CXHYNZ构成,可为环状或非环状,分支或非分支,还包含1-6NR或N(R)₂的3-12个碳原子的烃链,其中R是H、(C₁-C₄)烷基、苯基或苄基。多胺能通过任何标准交联方法连接到抗体。

[0296] 在一些实施方式中,对象抗体修饰成包含糖部分,其中所述糖部分能共价连接到抗体。在一些实施方式中,对象抗体修饰成包含脂质部分,其中所述脂质部分能共价连接到抗体。合适的脂质部分包含,例如N-脂肪酰基,如N-月桂酰、N-油酰等;脂肪胺,例如十二烷胺、油酰胺等;C3-C16长链脂族脂质等。参见例如,美国专利号6,638,513。在一些实施方式中,对象抗体纳入脂质体中。

[0297] 在一些实施方式中,对象抗LOLX2抗体偶联或连接到治疗和/或成像/可检测部分。偶联或连接抗体的方法为本领域熟知。抗体与标记之间的结合包含本领域任何方法,包括但不限于,共价和非共价相互作用。

[0298] 在一个非限制性实施方式中,对象抗LOLX2抗体能结合在递送给肿瘤细胞时可能有毒性的毒素、放射性核素、铁相关化合物、染料、成像试剂、荧光标记或化疗剂。或者,对象抗LOLX2抗体能结合用于免疫检测靶抗原的可检测标记,例如放射性核素、铁相关化合物、染料、成像剂或荧光标记。

[0299] 放射性标记的非限制性示例包含,例如³²P、³³P、⁴³K、⁵²Fe、⁵⁷Co、⁶⁴Cu、⁶⁷Ga、⁶⁷Cu、⁶⁸Ga、⁷¹Ge、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁷⁷Br、⁷⁷As、⁷⁷Br、⁸¹Rb/⁸¹MKr、⁸⁷MSr、⁹⁰Y、⁹⁷Ru、⁹⁹Tc、¹⁰⁰Pd、¹⁰¹Rh、¹⁰³Pb、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹¹³In、¹¹⁹Sb、¹²¹Sn、¹²³I、¹²⁵I、¹²⁷Cs、¹²⁸Ba、¹²⁹Cs、¹³¹I、¹³¹Cs、¹⁴³Pr、¹⁵³Sm、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Eu、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、¹⁹¹Os、¹⁹³Pt、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁷Hg、¹⁹⁹Au、²⁰³Pb、²¹¹At、²¹²Pb、²¹²Bi和²¹³Bi。

[0300] 毒素的非限制性示例包含,例如,白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲菌素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素、单端孢霉烯族毒素(tricothecenes)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)磷脂酶C(PLC)、牛胰腺核糖核酸酶(BPR)、抗病毒蛋白(PAP)、相思豆毒蛋白、眼镜蛇毒因子(CVF)、白树毒素(GEL)、皂草毒蛋白(SAP)和槲寄生凝集素I(viscumin)。

[0301] 铁相关化合物的非限制性示例包含,例如磁性氧化铁颗粒、铁或亚铁颗粒、Fe²⁰³和Fe³⁰⁴。铁相关化合物和标记多肽、蛋白和肽的方法可参见例如美国专利4,101,435和4,452,773,和美国公开申请20020064502和20020136693。

[0302] 在某些实施方式中,对象抗体能共价或非共价偶联到细胞毒素或其他细胞增殖抑制化合物,从而定位所述试剂向肿瘤细胞的递送。例如,所述试剂选自:烷化剂、酶抑制剂、增殖抑制剂、裂解剂、DNA或RNA合成抑制剂、膜渗透性改良剂、DNA代谢物、二氯二乙硫醚衍生物、蛋白生成抑制剂、核糖体抑制剂、凋亡诱导物和神经毒素。

[0303] 在某些实施方式中,对象抗体能偶联用于肿瘤成像的试剂。所述试剂包含:金属、金属螯合剂、镧系元素、镧系元素螯合剂;放射性金属、放射性金属螯合剂、正电子发射体核、微气泡(用于超声)、脂质体、脂质体或纳米球中的微囊化分子、单晶氧化铁纳米化合物、磁共振成像造影剂、光吸收、反射和/或散射剂、胶体颗粒、荧光团如近红外荧光团。在很多实施方式中,所述第二官能团/部分相对较大,如至少25原子质量单位(amu)大小,并且在很多示例中,可为至少50、100或250amu大小。

[0304] 在某些实施方式中,所述第二官能团是螯合金属的螯合物部分,例如,放射性金属或顺磁离子的螯合剂。在其他实施方式中,放射性核素的螯合剂用于放疗或成像过程。螯合剂会配位金属的条件描述于例如Gasnow等美国专利号4,831,175、4,454,106和4,472,509,各通过引用献纳入本文。本文所用的“放射性核素”和“放射性标记”可以互换。

[0305] 适于纳入对象抗LOXL2抗体的放射性核素包含 γ 发射体、正电子发射体、俄歇电子发射体、X射线发射体和荧光发射体。在一些实施方式中,使用 β 或 α 发射体。在放疗中用作毒素的放射性核素的示例包含: ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{67}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{71}Ge 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{77}As 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb / ^{81}MKr 、 ^{87}MSr 、 ^{90}Y 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{100}Pd 、 ^{101}Rh 、 ^{103}Pb 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{119}Sb 、 ^{121}Sn 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{128}Ba 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{131}Cs 、 ^{143}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Eu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{191}Os 、 ^{193}Pt 、 ^{194}Ir 、 ^{197}Hg 、 ^{199}Au 、 ^{203}Pb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 和 ^{213}Bi 。治疗放射性核素的示例包含 ^{188}Re 、 ^{186}Re 、 ^{203}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{109}Pd 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{77}Br 、 ^{211}At 、 ^{97}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{198}Au 和 ^{199}Ag 、 ^{166}Ho 或 ^{177}Lu 。

[0306] ^{99}Tc 就诊断应用是有特定吸引力的放射性同位素,因为其易于应用到所有核医学方向,便宜,产生最小患者放射剂量和有理想核成像属性。其6小时的半衰期意味着需要快速靶向锝标记抗体。因此,在某些实施方式中,修饰对象抗体以包含锝(technium)的螯合剂。

[0307] 在其他实施方式中,所述第二官能团能是放射致敏剂,例如增加细胞对放射敏感性的部分。放射致敏剂的示例包含硝基咪唑、甲硝唑和米索硝唑(见:DeVita, V.T.的Harrison's Principles of Internal Medicine(《哈里森内科学原理》),第68页,纽约麦格劳-希尔公司(The McGraw-Hill Book Co.),1983,通过引用纳入本文)。给予所述包含放射致敏剂作为活性部分的修饰抗体并且定位在所述靶标细胞。个体暴露于放射后,所述放射致敏剂被“激活”并且造成所述细胞的死亡。

[0308] 有广泛范围的能用作螯合剂和能衍生成对象抗体的部分。例如,所述螯合剂能是1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸(DOTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和1-p-异硫氰酸基-苄基-甲基-二亚乙基三胺五乙酸(ITC-MX)的衍生物。所述螯合剂通常在侧链有基团,螯合剂能使用所述基团连接到对象拮抗剂。所述基团包含,例如异硫氰酸苄酯,所述DOTA、DTPA或EDTA能通过其连接到例如氨基上。

[0309] 在一个实施方式中,所述螯合部分是“ N_xS_y ”螯合物部分。如本文定义,所述“ N_xS_y 螯合物”包含双功能螯合剂,能协调结合金属或放射性金属或有 N_2S_2 或 N_3S 核心。示例性 N_xS_y 螯合物描述于Fritzberg等(1998)PNAS 85:4024-29;和Weber等(1990)Chem.1:431-37;和其中引用的参考文献。

[0310] 在一些实施方式中,修饰对象抗LOXL2抗体以包含化疗剂,例如化疗剂共价或非共价连接到对象抗LOXL2抗体。

[0311] 适用于修饰对象抗体的化疗剂(“化疗药物”)包含由化学合成生成的小化学实体。化疗药物包含细胞毒性和细胞生长抑制剂。化疗药物可以包含对细胞有其他效果(例如所述转化状态向分化状态的反转)的那些药物,或抑制细胞复制的那些药物。合适使用的已知细胞毒性剂示例列于,例如Goodman等,“The Pharmacological Basis of Therapeutics (《治疗学的药理学基础》)”第六版,A.B.Gilman等编/纽约麦克米兰出版公司(MacMillan Publishing Co.),1980。这些包含紫杉烷,例如多西他赛和紫杉醇;氮气,例如二氯甲基二乙胺、马法兰、乌拉莫司汀和苯丁酸氮芥;氮丙啶衍生物,例如噻替哌;烷基磺酸根,例如白消安;亚硝基脲,例如洛莫司汀,司莫司汀和链佐星;三氮烯,例如达卡巴嗪;叶酸类似物,例如甲氨蝶呤;嘧啶类似物,例如氟尿嘧啶,阿糖胞苷和阿扎立平;嘌呤类似物,例如巯基嘌呤和硫鸟嘌呤;长春花生物碱,例如长春新碱和长春碱;抗生素,例如放线菌素D、柔红霉素、阿霉素和丝裂霉素;酶,例如铂配位复合物,例如顺铂;取代的脲,例如羟基脲;甲胍衍生物,例如丙卡巴肼;肾上腺皮质抑制剂,例如米托坦;激素和拮抗剂,例如肾上腺糖皮质激素(adrenocortisteroids)(氯泼尼松)、孕激素(己酸羟孕酮,乙酸和乙酸甲地孕酮)、雌激素(己烯雌酚和乙炔雌二醇)和雄激素(丙酸睾酮和氟甲睾酮)。

[0312] 在一些实施方式中,修饰对象抗LOXL2抗体以包含干扰蛋白合成的化疗剂。干扰蛋白合成的药物包含例如嘌呤霉素、环己酰亚胺和核糖核酸酶。

[0313] 目前用于治疗癌症的大部分化疗剂具有适于直接与对象抗体的氨基或羧基化学交联的官能团。例如,游离氨基可获自甲氨蝶呤、多柔比星、柔红霉素、阿糖胞苷(cytosinarabinoside)、博来霉素、氟达拉滨和克拉屈滨,而游离羧基可获自氨甲喋呤、美法仑和苯丁酸氮芥。

[0314] 所述作为游离氨基和羧基的官能团是能使所述药物与例如对象抗体的游离氨基直接交联的各种同双功能和异双功能化学交联剂的靶标。

[0315] 考虑用于修饰对象抗体的化疗剂也包含其他市售可得的化疗剂。仅用于说明,所述化疗能是染色质功能抑制剂、DNA破坏剂、抗代谢剂(例如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、和糖修饰类似物)、DNA合成抑制剂、DNA相互作用剂(例如嵌入剂)或DNA修复抑制剂。

[0316] 化疗剂可由其作用机理分类为例如下组:抗代谢/抗癌剂,例如嘧啶类似物(氮尿苷、卡培他滨、和阿糖胞苷)和嘌呤类似物;叶酸拮抗剂和相关抑制剂;抗增生/抗有丝分裂剂,包含天然产品例如长春花生物碱(长春碱、长春新碱、和微管例如紫杉烷(紫杉醇、多西紫杉醇),长春碱,诺考达唑,大环内酯和诺维本(navelbine),表鬼臼毒素(epidipodophyllotoxins)(依托泊苷、替尼泊苷);DNA破坏剂(放线菌素、安吡啶、博来霉素、喜树碱、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、异环磷酰胺、美法仑、氮芥(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、丙卡巴肼、紫杉酚、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊甙;抗生素例如更生霉素(放线菌素D),柔红霉素,多柔比星(阿霉素),黄胆素,蒽环类抗生素,米托蒽醌,博来霉素,普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素;酶(L天门冬酰胺酶,系统性代谢L天冬酰胺和消灭没有能力合成其自身天冬酰胺的细胞);抗血小板剂;抗增生/抗有丝分裂烷化剂,例如氮芥环磷酰胺及类似物,美法仑,苯丁酸氮芥,和(六甲蜜胺和塞替哌),烷基亚硝基脲(BCNU)及类似物,链佐星),三氮烯-达卡巴嗪(DTIC);抗增生/抗有丝分裂抗代谢剂,例如叶酸类似物(氨

甲喋呤);铂配合物复合物(顺铂、奥洛赛铂(oxiloplatinim)、卡铂),丙卡巴肼,羟基脲,米托坦,氨鲁米特;激素,激素类似物(雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林(goserelin)、比卡鲁胺(bicalutamide),尼鲁米特(nilutamide))和芳香化酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝剂(肝素、合成肝素盐和其他凝血酶抑制剂);纤维蛋白溶解剂(例如组织纤溶酶原激活剂,链激酶和尿激酶),阿司匹林,潘生丁,噻氯匹定,氯吡格雷;抗转移剂;抑分泌剂(布雷菲尔德菌素(breveldin));免疫抑制剂,他克莫司、西罗莫司、硫唑嘌呤、霉酚酸酯;化合物(TNP-470、染料木黄酮)和生长因子抑制剂(血管内皮生长因子抑制剂、成纤维细胞生长因子抑制剂);血管紧张素受体阻滞剂,一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗、利妥昔单抗);细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维甲酸);抑制剂,拓扑异构酶抑制剂(多柔比星(阿霉素)、柔红霉素、更生霉素、京尼平甙、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、伊立替康和米托蒽醌、拓扑替康、伊立替康),皮质激素(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基泼尼松龙、去氢可的松、和泼尼龙);生长因子信号转导激酶抑制剂;功能障碍诱导剂,毒素例如霍乱毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、百日咳杆菌腺苷酸环化酶毒素,或白喉毒素,和胰冬酶激活剂;和染色质。优选化疗剂的剂量与当前处方剂量一致。

[0317] 本文使用的术语“核酸破坏治疗”和“核酸破坏剂”指直接或间接破坏核酸(如DNA、cDNA、基因组DNA、mRNA、tRNA或rRNA)的任何治疗方案。所述试剂的示例包含烷化剂、亚硝基脲、抗代谢剂、植物生物碱、植物提取物和放射性同位素。试剂示例也包含核酸破坏药物,例如5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他滨、S-1(替加氟、5-氯-2,4-二羟基吡啶和氧嗪酮)、5-乙炔基尿嘧啶、阿拉伯糖胞嘧啶(阿糖胞苷)、5-氮杂胞苷(5-AC)、2',2'-二氟-2'-脱氧胞苷(dFdC)、嘌呤抗代谢剂(巯嘌呤、硫唑嘌呤、硫鸟嘌呤)、盐酸吉西他滨(健择(Gemzar))、喷司他丁、别嘌呤、2-氟-阿拉伯糖-腺嘌呤(2F-ara-A)、羟基脲、硫芥(双氯乙基硫醚)、双氯乙基甲胺、美法仑、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、AZQ、丝裂霉素C、二去水卫矛醇、二溴卫矛醇、烷基磺酸盐(白消安)、亚硝基脲(BCNU、CCNU、4-甲基CCNU或ACNU)、丙卡巴肼、氮烯咪胺、雷别卡霉素、蒽环类抗生素例如多柔比星(阿霉素;ADR)、道诺霉素(daunorubicin)(柔红霉素(Cerubicine))、伊达比星(去甲氧基柔毛霉素)和表阿霉素(Ellence)、蒽环类抗生素类似物例如米托蒽醌、放线菌素D、非插入拓扑异构酶抑制剂例如表鬼臼毒素(依托泊甙=VP16、替尼泊苷=VM-26)、鬼臼毒素、博来霉素(博来(Bleo))、培洛霉素、与核酸形成加合物的化合物包含铂衍生物(如顺铂(CDDP)、顺铂的反式类似物、卡铂、异丙铂、四铂(tetraplatin)和奥沙利铂)、喜树碱、拓扑替康、伊立替康(CPT-11)和SN-38。核酸破坏治疗的特定示例包含放射(如聚焦微波、紫外(UV)、红外(IR)、或 α 、 β 或 γ 放射)和环境刺激(如高热))。

[0318] 本文使用的术语“抗增殖治疗”和“抗增殖剂”指任何直接或间接抑制细胞、病毒、细菌或其他单细胞或多细胞生物体增殖的治疗方案,而不论所述治疗或试剂是否破坏核酸。抗增殖剂的特定示例是抑制细胞增殖或者病毒增殖或复制的抗肿瘤和抗病毒药物。示例包括但不限于,环磷酰胺、硫唑嘌呤、环孢菌素A、泼尼松龙、美法仑、苯丁酸氮芥、双氯乙基甲胺、白消安、氮甲喋呤、6-巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、胞嘧啶阿糖胞苷、紫杉醇、长春碱、长春新碱、多柔比星、放线菌素D、光神霉素、卡莫司汀、洛莫司汀、赛氮芥、链脲霉素、羟基脲、顺铂、米托坦、丙卡巴肼、达卡巴嗪和二溴甘露醇。造成核酸复制错误或抑制核酸复制的抗增殖剂是诸如核苷酸与核苷类似物的那些(如AZT或5-AZC)。

[0319] 在另一实施方式中,对象抗LOXL2抗体可偶联于“受体”(所述链霉亲和素)以便预先靶向肿瘤,其中将抗体-受体偶联物给予患者,然后用清除剂去除循环系统中未结合的偶联物,接着给予偶联细胞毒性剂(如放射性核苷酸)的“配体”(如亲和素)。

[0320] 产生抗体的方法

[0321] 对象抗体能由任何已知方法生产,如蛋白合成的传统合成方法;重组DNA方法等。

[0322] 对对象抗体是单链多肽的实施方式而言,能使用标准化学肽合成技术合成。化学合成多肽时,可以通过液相或固相进行所述合成。固相多肽合成(SPPS)是化学合成对象抗体的合适方法示例,其中序列的C末端氨基酸连接到不可溶支持物,然后顺序加入序列中的剩余氨基酸。各种形式SPPS例如Fmoc和Boc可用于合成对象抗体。固相合成技术描述于Barany和Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*(固相肽合成);第3-284页,收录于 *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*(《肽:分析、合成、生物学》)第2卷: *Special Methods in Peptide Synthesis*(肽合成的特定方法), A部分, Merrifield等, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156(1963); Stewart等, *Solid Phase Peptide Synthesis*(固相肽合成), 第2版, 罗克福德的皮尔斯化学公司(Pierce Chem. Co.), Ill(1984); 和 Ganesan A. 2006 *Mini Rev. Med Chem.* 6:3-10 和 Camarero JA等, 2005 *Protein Pept Lett.* 12:723-8。简言之,小型不可溶、多孔珠用在其上构建肽链的功能单位处理。重复偶联/脱保护循环后,固相连接肽的所述游离N末端氨基偶联到单个N保护氨基酸单位上。所述单位然后脱保护,显示可连接另一个氨基酸的新N末端氨基。所述肽保持固定在固相上并且切除前经历过滤步骤。

[0323] 标准重组方法能用于生产对象抗体。例如,将可选连接到恒定区的轻链和重链可变区编码核酸插入表达载体。所述轻链和重链能克隆到相同或不同表达载体中。所述编码免疫球蛋白链的DNA区段可操作连接到确保表达免疫球蛋白多肽的表达载体的对照序列。表达对照序列包括但不限于,启动子(如天然连接或异源启动子)、信号序列、增强子元件和转录终止序列。所述表达对照序列可以是能转化或转染真核宿主细胞(如COS或CHO细胞)的载体的真核启动子系统。一旦所述载体整合到合适宿主中,所述宿主维持在适于高表达核苷酸序列和收集并纯化抗体的条件下。

[0324] 由于所述遗传编码的简并性,多种核酸序列能编码各免疫球蛋白氨基酸序列。所需的核酸序列能通过从头固相DNA合成、聚合酶链反应(PCR)或更早制备的所需多核苷酸变体的突变而生成。寡核苷酸介导的突变是制备靶多肽DNA的取代、缺失和插入变体的合适方法示例。参见Adelman等, *DNA* 2:183(1983)。简言之,通过编码所需突变的寡核苷酸与单链DNA模板的杂交来改变所述靶多肽DNA。杂交后,DNA聚合酶用于合成模板的整个第二互补链,所述模板纳入所述寡核苷酸引物并编码所述靶多肽DNA的选定改变。

[0325] 合适表达载体通常在宿主生物体中或作为游离体或作为宿主染色体DNA的整合部分而复制。通常,表达载体包含选择标记(如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性 or 新霉素抗性)从而可检测所述转化有所需DNA序列的细胞。

[0326] 大肠杆菌(*Escherichia coli*)是能用于克隆对象抗体编码多核苷酸的原核宿主细胞的示例。其他合适使用的微生物宿主包含杆菌,例如枯草杆菌(*Bacillus subtilis*),和其他肠杆菌科,例如沙门菌、沙雷氏菌属和各种假单胞菌种。在这些原核宿主中,也能制备通常包含与所述宿主细胞相容的表达对照序列的表达载体(如复制起点)。另外,会出现

任何数目的各种熟知启动子,例如乳糖启动子系统、色氨酸(Trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。所述启动子通常控制表达,可选与操纵子序列一起控制,并且有核糖体结合位点序列等,以起始和完成转录和翻译。

[0327] 也可用其他微生物表达,如酵母。酵母属(*Saccharomyces*) (如酿酒酵母(*S.cerevisiae*))和毕赤酵母(*Pichia*)是合适酵母宿主细胞的示例,有带所需表达控制序列(如启动子)、复制起点、终止序列的合适载体等。典型启动子包含3-磷酸甘油酸激酶和其他糖酵解酶。诱导型酵母启动子包含,来自醇脱氢酶、异细胞色素C(isocytochrome C)和负责麦芽糖及半乳糖利用的酶的启动子等等。

[0328] 除了微生物,哺乳动物(如在体外细胞培养生长的哺乳动物细胞)也能用于表达和生产对象抗体。参见Winnacker, *From Genes to Clones* (从基因到克隆),纽约州纽约的VCH出版社(VCH Publishers), (1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包含CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系和转化的B细胞或杂交瘤。这些细胞的表达载体能包含表达对照序列,例如复制起点、启动子和增强子(Queen等, *Immunol. Rev.* 89: 49 (1986)), 和需要的处理信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多聚腺苷酸化位点和转录终止序列。合适的表达对照序列的示例是源自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等的启动子。参见Co等, *J. Immunol.* 148: 1149 (1992)。

[0329] 一旦合成(化学或重组),所述对象抗体的全抗体、其二聚体、单独轻链和重链,或其他形式(例如scFv等)能根据本领域的标准工艺纯化,包含硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱、高效液相色谱(HPLC)纯化、凝胶电泳等(通常见Scopes, *Protein Purification* (蛋白纯化)(纽约施普林格出版公司(Springer-Verlag), (1982))。对象抗体能是基本纯,例如至少约80%-85%纯、至少约85%-90%纯、至少约90%-95%纯、或98%-99%、或更纯,例如,没有污染物如对象抗体以外的细胞碎片、大分子等。

[0330] 组合物

[0331] 本公开提供包含对象抗体的组合物。除对象抗体以外,对象抗体组合物可包含以下一种或多种物质:盐,如NaCl、MgCl、KCl、MgSO₄等;缓冲剂,如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)等;增溶剂;去污剂,如非离子型去污剂,如吐温-20等;蛋白酶抑制剂;丙三醇等。

[0332] 本公开提供包括含有对象抗体的药学组合物的组合物。通常,组合物包含有效量的对象抗体。“有效量”指足以产生所需结果的剂量,所述结果例如降低癌症细胞数目、肿瘤大小等,缓解癌症或纤维化疾病症状。通常,所需结果是与对照相比,至少降低癌症或纤维化疾病的症状。对象抗体能以避免血脑屏障的方式递送,如下文详细描述。对象抗体能配制和/或修饰以使所述抗体通过血脑屏障。

[0333] 配制

[0334] 在对象方法中,可利用能够产生所需治疗效果或诊断效果的便捷方式将对象抗体给予宿主。因此,可将所述药剂掺入各种制剂中用于治疗性给药。更具体地,可通过与合适的药学上可接受的载体或稀释剂混合,将对象抗体配制成药物组合物,并可配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,如片剂、胶囊剂、粉末剂、颗粒剂、油膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。

[0335] 在药物剂型中,对象抗体可以其药学上可接受的盐形式给予,或者可单独使用或与其它药学活性化合物适当联合以及组合使用。以下方法和赋形剂仅是示范性且不得以任何方式构成限制。

[0336] 对于口服制剂,对象抗体可单独使用或与合适添加剂联用,例如,常规添加剂,如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉;粘合剂,如结晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;崩解剂,如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠;润滑剂,如滑石粉或硬脂酸镁;如果需要,与稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂和调味剂联用,以制备片剂、粉末剂、颗粒剂或胶囊剂。

[0337] 可通过在水性或非水性溶剂,如植物油或其它类似油、合成的脂族酸甘油酯、高级脂族酸或丙二醇的酯中溶解、悬浮或乳化对象抗体;如果需要,再加入常规添加剂如增溶剂、等渗剂、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂,从而配制成注射剂。

[0338] 通过将有所需纯度抗体与可选的生理上可接受载体、赋形剂、稳定剂、表面活性剂、缓冲液和/或等张剂混合来制备包含对象抗体的药物组合物。可接受载体、赋形剂和/或稳定剂在所使用剂量和浓度下对受体没有毒性,并且包含缓冲液,例如磷酸、柠檬酸、和其他有机酸;抗氧化剂,包含抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、甲硫氨酸和柠檬酸;防腐剂(例如乙醇、苯甲醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯铵或其组合);氨基酸,例如精氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸和其组合;单糖、二糖和其他碳水化合物;低分子量多肽(小于约10个残基);蛋白,例如明胶或血清白蛋白;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、海藻糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡糖胺、N-甲基葡糖胺、半乳糖胺和神经氨酸;和/或非离子表面活性剂,例如吐温、苧泽普流罗尼(Brij Pluronics)、曲通X或聚乙二醇(PEG)。

[0339] 所述药物组合物可以是液体形式、冻干形式或由冻干形式重建的液体形式,其中所述冻干制品在给药前用无菌溶液重建。重建冻干组合物的标准过程是加回到某一体积纯水中(通常等于在冻干中除去的体积);然而含有抗菌剂的溶液可用于胃肠道外给药的药物组合物的生产;也参见Chen(1992)Drug Dev Ind Pharm 18,1311-54。

[0340] 对象药物组合物中的示范性抗体浓度范围可以是约1mg/mL-约200mg/mL或约50mg/mL-约200mg/mL,或约150mg/mL-约200mg/mL。

[0341] 所述抗体的液体制剂可以在pH缓冲溶液中制备,例如在pH范围约4.0-约7.0,或约5.0-约6.0,或者约5.5。适合所述范围内pH的缓冲液示例包含磷酸-、组氨酸-、柠檬酸-、琥珀酸-、乙酸-缓冲液和其他有机酸缓冲液。根据例如制剂的缓冲液和所需张力,所述缓冲液浓度能是约1mM-约100mM,或约5mM-约50mM。

[0342] 等张剂可以包含在抗体制剂中以调制剂剂的张力。示范性等张剂包含氯化钠、氯化钾、甘油和任何氨基酸组的组分、糖和其组合。在一些实施方式中,所述水性制剂等渗,尽管可适用低渗或高渗溶液。所述术语“等渗”表示与一些其他相比的溶液例如生理盐水溶液或血清有相同张力的溶液。等张剂可以约5mM-约350mM的量使用,例如100mM-350mM的量。

[0343] 表面活性剂也可加入到抗体制剂以降低配制抗体的聚集和/或最小化制剂中颗粒的形成和/或降低吸附。示范性表面活性剂包含聚氧乙烯去水山梨糖醇酯脂肪酸酯(吐温)、聚氧乙烯烷基醚(苧泽)、烷基苯基聚氧乙烯醚(曲通-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛

沙姆、普流罗尼)和十二烷基硫酸钠(SDS)。合适的聚氧乙烯去水山梨糖醇脂肪酸酯示例是聚山梨酯20(以商品名吐温20TM销售)和聚山梨酯80(以商品名吐温80TM销售)。合适的聚乙烯-聚丙烯共聚物示例是以商品名普流罗尼(Pluronic)[®]F68和泊洛沙姆(Poloxamer)188TM销售的共聚物。合适的聚氧乙烯烷基醚示例是以商品名苳泽(Brij)TM销售的制品。表面活性剂的示范性浓度范围可以是约0.001%-约1%w/v。

[0344] 也可以加入冻干保护剂以针对冻干过程中的去稳定情况保护易变的活性成分(如蛋白)。例如,已知冻干保护剂包含糖(包含葡萄糖和蔗糖);多元醇(包含山梨糖醇、甘露醇和甘油)和氨基酸(包含丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸)。冻干保护剂能以约10mM-500mM的量纳入。

[0345] 在一些实施方式中,对象制剂包含对象抗体,和一种或多种以上鉴定的试剂(例如表面活性剂、缓冲液、稳定剂、等张剂),并且基本没有一种或多种防腐剂,例如乙醇、苳醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯铵以及其组合。在其他实施方式中,防腐剂包含在制剂中,例如浓度范围为约0.001-约2%(w/v)。

[0346] 例如,对象制剂能是适于胃肠道外给药的液体或冻干制剂,并且能包含:约1mg/mL-约200mg/mL的对象抗体;约0.001%-约1%的至少一个表面活性剂;约1mM-约100mM的缓冲液;可选约10mM-约500mM的稳定剂;和约5mM-约305mM的等张剂;和pH为约4.0-约7.0。

[0347] 另一个实施例中,对象胃肠道外制剂是液体或冻干制剂,包含:约1mg/mL-约200mg/mL的对象抗体;0.04%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;和pH 5.5。

[0348] 另一个实施例中,对象胃肠道外制剂包含冻干制剂,包含:1)15mg/mL对象抗体;0.04%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;和pH 5.5;或2)75mg/mL对象抗体;0.04%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;和pH 5.5;或3)75mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;和pH 5.5;或4)75mg/mL对象抗体;0.04%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;和pH 5.5;或6)75mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;和pH 5.5。

[0349] 另一个实施例中,对象胃肠道外制剂是液体制剂,包含:1)7.5mg/mL对象抗体;0.022%吐温20w/v;120mM L-组氨酸;和250 125mM蔗糖;和pH5.5;或2)37.5mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;和pH 5.5;或3)37.5mg/mL对象抗体;0.01%吐温20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;和pH 5.5;或4)37.5mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;10mM L-组氨酸;125mM海藻糖;和pH 5.5;或5)37.5mg/mL对象抗体;0.01%吐温20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM海藻糖;和pH 5.5;或6)5mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;和pH 5.5;或7)75mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;和pH 5.5;或8)75mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;和pH 5.5;或9)150mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;和pH 5.5;或10)150mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;和pH 5.5;或11)150mg/mL对象抗体;0.02%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;和pH 5.5;或12)10mg/mL对象抗体;0.01%吐温20w/v;20mM L-组氨酸;和40mM氯化钠;和pH 5.5。

[0350] 对象抗体可用于通过吸入给药的气雾制剂。可将对象抗体配制到可接受的加压推进剂,如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。

[0351] 而且,可通过与各种基料,如乳化基料或水溶性基料混合,将对象抗体制成栓剂。可通过栓剂直肠给予对象抗体。栓剂可包括载剂如可可油、碳蜡(carbowax)和聚乙二醇,它们在体温下融化,但在室温下固化。

[0352] 可提供口服或直肠给药的单位剂型,如糖浆剂、酏剂和悬浮剂,其中各剂量单位,例如茶匙、汤匙、片剂或栓剂含有预定量的一种或多种对象抗体。类似地,注射或静脉内给药的单位剂型可在组合物中包含对象抗体,该组合物是溶于无菌水、生理盐水或另一种药学上可接受载体的溶液。

[0353] 本文所用的术语“单位剂型”指适合作为单一剂量用于人和动物对象的物理上独立的单位,各单位含有预定量的对象LOXL2结合剂和药学上可接受的稀释剂、载体或载剂,所述预定量计算成足以产生所需效果。对象LOXL2结合剂的规格取决于所用的具体LOXL2结合剂和要达到的效果,以及宿主中与各抗体相关的药效学。

[0354] 其他给予模式也应用于对象方法。例如,对象抗体能制成栓剂,和在一些示例中的气溶胶和鼻内组合物。对栓剂而言,所述载剂组合物会包含传统粘合剂和载体,例如聚亚烷基二醇或甘油三酯。所述栓剂可以从混合物形成,包含活性成分范围为约0.5%-约10%(w/w),例如优选约1%-约2%。

[0355] 鼻内制剂通常包含既不会引起刺激鼻粘膜也不会明显扰乱纤毛功能的载剂。能使用稀释剂,例如水、盐水溶液或其他已知物质。所述鼻制剂也包含防腐剂,例如但不限于氯丁醇和苯扎氯铵。可存在表面活性剂以增强鼻粘膜对对象蛋白的吸收。

[0356] 对象抗体能作注射用制剂给予。一般,将可注射组合物制备成液体溶液或悬液形式;适合在注射前用液体载剂溶解或悬浮的固体形式。也可乳化该制剂,或者将抗体包封在脂质体载剂中。

[0357] 合适的赋形剂载剂是,例如,水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等,和其组合。此外,如果需要,该载剂可含有少量辅助物质,如湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。本领域技术人员已知或了解制备这类剂型的实际方法。参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学),宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania),第17版,1985。在任何情况下,给予的组合物或制剂含有足以在所治疗对象中实现所需状态的对象抗体含量。

[0358] 药学上可接受的赋形剂,如载剂、佐剂、载体或稀释剂容易公开获得。而且,药学上可接受的辅助物质,如pH调节和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、湿润剂等容易公开获得。

[0359] 在一些实施方式中,对象抗体制成控释制剂。缓释制剂可使用本领域熟知方法制备。缓释制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透基质,其中该基质是成型制品形式,例如膜或微胶囊。缓释基质的示例包含聚酯、L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、水凝胶、聚交酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基水杨酸。可通过使用合适添加剂、控制含水量和发展特定聚合物基质组合物来防止缓释制剂所含抗体的可能生物活性丧失和可能免疫原性变化。

[0360] 控释能用来指很多延长释放剂型中的任何一种。可以认为下列术语基本等同于控释:连续释放、控制释放、延迟释放、持久释放、逐步释放、长期释放、程控释放、延期释放、均衡释放、延滞释放、长效、延后、缓慢释放、间隔释放、持续释放、定时(time coat)、延时释放、延迟作用、延伸作用、分时作用、长时间作用、延长作用、重复作用、缓慢作用、持续作用、

持续作用药物和延长释放。这些术语的进一步讨论见Lesczek Krowczynski的Extended-Release Dosage Forms(延长释放剂型),1987(CRC出版社公司(CRC Press, Inc.))。

[0361] 所述多种控释技术涵盖非常广谱的药物剂型。控释技术包括但不限于物理系统和化学系统。

[0362] 物理系统包括但不限于,有速率控制膜的充储系统,例如微囊化、巨囊化和膜系统;没有速率控制膜的充储系统,例如空心纤维、超微孔三乙酸纤维素、和多孔聚合底物和泡沫;单片系统,包含物理溶解在无孔、聚合物或弹性基质的那些系统(例如不易侵蚀、可侵蚀、环境试剂侵入和可降解),和物理分散在无孔、聚合物或弹性基质的材料(例如不易侵蚀、可侵蚀、环境试剂侵入和可降解);层叠结构,包含与外控制层化学相似或不相似的存储层;和其他物理方法,例如渗透泵,或吸附到离子交换树脂。

[0363] 化学系统包括但不限于,多聚物基质的化学侵蚀(如非均匀或均匀侵蚀),或多聚物基质的生物侵蚀(如非均匀或均匀)。控释系统分类的其他讨论可以参见Agis F.Kydonieus的Controlled Release Technologies:Methods,Theory and Applications(控释技术:方法、理论和应用),1980(CRC出版社公司)。

[0364] 有很多为口服给予开发的控释药物制剂。这些包括但不限于,渗透压控制的胃肠道递送系统;液体压力控制的胃肠道递送系统;膜渗透控制的胃肠道递送系统,包含微孔膜渗透控制的胃肠道递送设备;胃液抗性小肠靶向控制的胃肠道递送设备;凝胶扩散控制的胃肠道递送系统;和离子交换控制的胃肠道递送系统,包含阳离子和阴离子药物。关于控释药物递送系统的其他信息可参见Yie W.Chien的Novel Drug Delivery Systems(新药物递送系统),1992(马塞尔-德克公司(Marcel Dekker, Inc.))。

[0365] 剂量

[0366] 合适剂量能由主治医师或其他合格的医疗人员根据多种临床因素决定。如医学领域所熟知,用于任何一个患者的剂量取决于多种因素,包括患者的大小、体表面积、年龄、给予的特定化合物、患者性别、给药时间和给药途径、总体健康状况和同时给予的其他药物。对象抗体可以给予的量是每剂量1ng/kg体重-20mg/kg体重,例如0.1mg/kg体重-10mg/kg体重,例如0.5mg/kg体重-5mg/kg体重;然而特别是考虑到前述因素,可以预计高于或低于此示例范围的剂量。如果所述方案是持续灌注,也能在每分钟每千克体重1μg-10mg范围内。

[0367] 本领域技术人员容易理解,剂量水平可视具体抗体、症状严重程度和对象对副作用的易感性而改变。本领域技术人员通过各种方式不难确定给定化合物的优选剂量。

[0368] 给予途径

[0369] 利用任何可用的适合药物递送的方法和途径,包括体内和离体方法,以及全身和局部给药途径将对象抗体给予个体。

[0370] 常规和药学上可接受的给药途径包括鼻内、肌内、气管内、皮下、皮内、局部应用、静脉内、动脉内、直肠、经鼻、经口和其它肠道和胃肠外给药途径。如果需要,可组合给药途径,或者根据抗体和/或所需效果进行调节。可以通过单一剂量或多剂量给予对象抗体组合。在一些实施方式中,对象抗体组合是口服给予。在一些实施方式中,对象抗体组合是通过吸入途径给予。在一些实施方式中,对象抗体组合是鼻内给予。在一些实施方式中,对象抗体组合是局部给予。在一些实施方式中,对象抗体组合是颅内给予。在一些实施方式中,对象抗体组合是静脉内给予。

[0371] 可利用任何可获得的常规方法以及适合递送常规药物的途径将所述试剂给予宿主,所述途径包括全身途径或局部途径。通常,考虑使用的给药途径包括但不必定限于肠道、胃肠外或吸入途径。

[0372] 除吸入给药以外的胃肠外给药途径包括但不必定限于:局部、透皮、皮下、肌内、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内和静脉内途径,即除消化道以外的任何给药途径。可进行胃肠道外给药,以影响对象抗体的全身或局部递送。需要全身递送时,给药一般包括药物制剂的侵入性或全身吸收的局部或粘膜给药。

[0373] 也可通过肠道给药将对象抗体递送给对象。肠道给药途径包括但不必定限于口服和直肠(如栓剂)递送。

[0374] “治疗”表示至少与影响所述宿主的病理状况宿主相关的症状缓解,其中缓解从广义上使用,表示至少降低了与所治疗病理状况相关的参数大小如症状,所述病症例如癌症和与其相关的疼痛。如此,治疗也包括病理状况或者至少与其相关的症状得到完全抑制的情况,例如不再发生或者停止如终止,使得宿主不再受到该病理状况的困扰,或者至少不受表征该病理状况的症状的困扰。

[0375] 在一些实施方式中,对象抗体通过注射和/或递送给予,例如到脑动脉内的位点或直接进入脑组织。对象抗体也能直接给予到靶位点,例如通过基因枪递送到靶位点。

[0376] 各种宿主(其中术语“宿主”在本文可与术语“对象”“个体”和“患者”互换)根据对象方法治疗。通常所述宿主是“哺乳动物”或“哺乳类”,其中所述术语广泛用于描述在哺乳动物类之内的生物体,包含食肉目(如狗和猫),啮齿目(如小鼠、豚鼠和大鼠),和灵长目(如人;和非人灵长动物,例如猩猩和猴子)。在一些实施方式中,所述宿主是人。

[0377] 治疗方法

[0378] 本发明还提供预防和/或治疗与血管生成、纤维化、癌症和转移相关的疾病的组合物、药盒、方法。

[0379] 在一个实施方式中,提供治疗或预防对象体内癌症侵入或转移的方法,包含给予对象有效量的对象抗体。

[0380] 在另一个实施方式中,提供降低对象体内肿瘤生长的方法,包含给予对象有效量的对象抗体,从而降低肿瘤生长至少25%、50%、75%、90%或95%。根据一些实施方式中,所述肿瘤可以是转移性肿瘤。

[0381] 在另一个实施方式中,提供增加或增强有转移性肿瘤的对象生存率的方法,包含给予所需对象有效量的对象抗体,因此增加或增强治疗一段时间的对象的存活率。在一些实施方式中,对象存活增加至少10天、1个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、3年、4年、5年、8年或10年。

[0382] 给予患者(例如哺乳动物,如人或非人动物,例如灵长动物、啮齿动物、牛、马、猪、绵羊等)治疗有效量的组合物,以合理的效益/风险比应用于任意医疗用途以通过抑制本文所述疾病或紊乱而有效生成所需治疗效果。对人给予本发明组合物而言,所述组合物可以用本领域普通技术人员已知的方法配制。治疗有效量是实现器官或组织中至少部分所需治疗或预防效果的量。在一个示例中,预防和/或治疗性处理疾病或紊乱所需的对象抗体含量本身并不固定。给予对象抗体的量会根据疾病或紊乱的类型、疾病或紊乱的广泛性、患有疾病或紊乱的生物体大小而改变。

[0383] 当患者经历部分或全部缓解、或疾病征兆或症状减少,和特定包括但不限于存活延长时,实现所述反应。根据包括复发次数、疾病阶段和其他因素在内的预后因素,所述预期无进展存活的时间可以数月到来数年来测量。延长存活包括但不限于至少1个月、约至少2个月、约至少3个月、约至少4个月、约至少6个月、约至少1年、约至少2年、约至少3年或更长的时间。整体存活也可以数月到来数年来测量。所述患者症状可以保持静止或可以降低。

[0384] 本文所述药物制剂可以用于预防或治疗有胶原交联或增加纤维化作为其一部分病因的广泛疾病。例如,所述组合物的适应症也能包含纤维化。纤维化是在损伤组织中作为愈合过程一部分而发生的纤维组织的异常积累。所述组织损伤可以源自物理损伤、炎症、感染、暴露于毒素和其他病因。

[0385] 联合治疗

[0386] 对象抗体能单独(如作为单一治疗)给予所需个体。然而,对象抗体也能与一种或多种其他治疗剂联合给予。合适的治疗剂包含,例如化疗剂、抗肿瘤生物制剂、抗血管新生剂和抗纤维剂以预防或治疗所述疾病或病症。

[0387] 在一些实施方式中,对象抗体能减缓或停滞肿瘤细胞中上皮-间充质转化(EMT)的进展,或诱导间充质-上皮转化(MET)到更低致瘤性状态,因此使所述肿瘤细胞或患病细胞更易接受化疗药物、抗肿瘤生物制剂、抗血管新生剂和抗纤维剂。对象抗体和另一个治疗剂的协同组合用于预防或抑制肿瘤侵入和转移,通过使所述肿瘤细胞对所述治疗剂的细胞毒性效果敏化来抑制原发性肿瘤的生长,并且也有效预防或治疗癌症。

[0388] 本文所用的术语“化疗剂”或“化疗药”(或“化疗”,在用化疗剂的治疗的情况中)指包含用于治疗癌症的任何非蛋白质(即非肽的)化学化合物。化疗剂的示例包含烷化剂,例如塞替派和环磷酰胺(CYTOXANTM);烷基磺酸,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,例如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺和甲基三聚氰胺,包含六甲蜜胺、三亚乙基三聚氰胺、三亚乙基膦酰胺、三亚乙基硫代膦酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(如布拉它辛和布拉它辛酮);喜树碱(包含合成类似物拓扑替康);苔藓抑素;卡利他汀(callystatin);CC-1065(包含其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);自念珠藻环肽(cryptophycin)(特别是(articularly)自念珠藻环肽1和自念珠藻环肽8);多拉司他汀;多卡霉素(duocarmycin)(包含合成类似物、KW-2189和CBI-TMI);艾榴塞洛素;水鬼蕉碱;甬枝珊瑚醇(sarcodictyin);软海绵素(spongistatin);氮芥,例如苯丁酸氮芥、氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺、乌拉莫司汀;亚硝基脲,例如卡莫司汀、吡葡亚硝脲、福莫司汀(foremostine)、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素,例如所述烯二炔抗生素(如卡奇霉素、特别是卡奇霉素 γ 1I和卡奇霉素 ϕ 1I,见如Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994);达内霉素(dynemicin),包含达内霉素(dynemicin A);二膦酸盐,例如氯屈膦酸(clodronate);埃斯培拉霉素(esperamicin);和新抑癌蛋白(neocarzinostatin)发色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿柔比星、放线菌素、安曲霉素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、carabycin、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(AdramycinTM)(包含吗啉代-多柔比星、氨基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉-多柔比星和脱氧

多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、马赛罗霉素、丝裂霉素例如丝裂霉素C、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、甲基丝裂霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、块菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢剂,例如氨甲喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如demopterin、氨甲喋呤、蝶并蝶呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他宾、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他宾、氮尿苷;雄激素,例如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺,例如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸(frolinic acid);醋葡萄糖内酯;醛磷酸胺糖苷;氨基乙酰丙酸;二氢嘧啶脱氢酶灭活剂;安吡啶;阿莫司汀(bestrabucil);比生群;乙茎去氮氨蝶呤(edatraxate);defofamine;秋水仙胺;亚丝醌;依氟鸟氨酸碱盐酸盐(elfornithine);依利醋铵;大环内酯;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇菌多糖;氯尼达明;类美坦西醇,例如美登素和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSKTM;雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢菌毒素(如T-2毒素、疣孢漆斑霉素A、露湿漆斑霉素A和蛇形菌素(anguidine));氨基钾酯;长春地辛;达卡巴嗪;盐酸甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;胍血生;gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C");环磷酸胺;thiopeta;紫杉烷,例如紫杉醇(TAXOLTM,新泽西州普林斯顿市布里斯托-迈尔斯施贵宝公司(Bristol Meyers Squibb Oncology))和多西他赛(TAXOTERETM,法国安东尼市的RPR公司(Rhone-Poulenc Rorer));苯丁酸氮芥;吉西他滨(GemzarTM);6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲喋呤;铂类似物,例如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊甙(VP-16);异环磷酸胺;米托蒽醌;长春新碱(vancristine);长春瑞滨(NavelbineTM);米托蒽醌;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达(xeoloda);伊班膦酸钠;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄醇,例如视黄酸;卡培他滨(capecitabine);和上述任何一个的药学可接受盐、酸或衍生物。"化疗剂"定义还包含用于调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂,例如抗雌激素剂和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包含,例如他莫昔芬(包含NolvadexTM)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬(FarestonTM);肾上腺中调节雌激素生成的芳香化酶抑制剂,例如4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、乙酸甲地孕酮(MegaceTM)、依西美坦、福司曲星、法倔唑、伏氯唑(RivisorTM)、来曲唑(FemaraTM)和阿那曲唑(ArimidexTM);和抗雄激素药,例如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮脯利特和戈舍瑞林;和上述任何一个的药学上可接受盐、酸或衍生物。

[0389] 在一些实施方式中,与对象抗体联合的所述抗肿瘤剂是酪氨酸激酶抑制剂。例如, ZD1839(阿斯特拉赞卡公司(AstraZeneca K.K.)的IressaTM)显示ATP在EGFR(表皮生长因子受体)酪氨酸激酶的ATP结合位点的ATP竞争效果,和通过抑制酪氨酸激酶的自体磷酸化来抑制酪氨酸激酶活性。

[0390] 结果,所述抗癌症效果表达是通过阻断EGFR装配的信号转导(配体例如表皮生长因子(EGF)结合于EGFR的胞外结构域,然后激活胞内结构域中的EGFR酪氨酸激酶,不仅造成EGFR的自体磷酸化而且磷酸化多种胞内靶蛋白,然后将增殖信号从所述癌细胞表面转导到细胞核,引起癌细胞增殖、浸润、转移和血管生成。

[0391] IMC-C225或西妥昔单抗(ErbixTM, EGFR靶向单克隆抗体)识别细胞膜表面的EGFR的受体部分并且抑制EGFR的自体磷酸化,从而抑制酪氨酸激酶活性。针对Her2/Neu(与EGFR同源)的单克隆抗体赫赛汀,和甲磺酸伊马替尼(GLEEVECTM, 原先的STI-571)能抑制BCR-Ab1和c-kit两者的酪氨酸激酶活性。索拉非尼(NexavarTM)是Raf激酶, PDGF(血小板衍生生长因子), VEGF受体2和3激酶和c-Kit的小分子抑制剂。

[0392] 本文使用的针对肿瘤抗原的单克隆抗体是针对由肿瘤和白血病细胞表达的抗原例如肿瘤特异抗原而引起的抗体。所述单克隆抗体也包含完全人抗体和人源化抗体。

[0393] 癌症治疗的其他治疗抗体示例包含曲妥珠单抗(HERCEPTINTM; HER2蛋白的过量表达与临床中更具侵入性疾病和更差预后相关); 利妥昔单抗(RITUXANTM)针对淋巴瘤细胞中CD20产生并且选择性去除正常和恶性CD20+前B和成熟B细胞; 阿来组单抗(CAMPATHTM), 特异靶向B和T细胞上发现的CD52抗原并且用于治疗慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和淋巴瘤的单克隆抗体; 和吉姆单抗奥佐米星(MYLOTARGTM), 联合CD33特异性抗体与化疗药物(奥佐米星)并且指示复发的成年急性淋巴细胞白血病的抗体偶联物。

[0394] 在另一个实施方式中, 抗血管新生药与对象抗体联合以治疗癌症和与异常或不需要的血管新生相关的其他疾病。抗血管新生药的示例包括但不限于, 视黄酸和其衍生物、2-甲氧基雌二醇、ANGIOSTATINTM、ENDOSTATINTM、苏拉明、角鲨胺、金属蛋白酶I的组织抑制剂、金属蛋白酶2的组织抑制剂、纤溶酶原激活物抑制剂1、纤溶酶原激活物抑制剂2、软骨衍生的抑制剂、紫杉醇、血小板因子4、硫酸鱼精蛋白(鲑精蛋白)、硫酸化几丁质衍生物(从雪花蟹壳中制备)、硫酸化多糖肽聚糖复合物(sp-pg)、星形孢菌素、基质代谢调节物, 包含例如脯氨酸类似物((1-氮杂环丁烷-2-羧酸(LACA)、顺羟基脯氨酸、d, I-3, 4-脱氢脯氨酸、硫杂脯氨酸(thiaproline)、 α -联吡啶、 β -氨基丙腈富马酸、4-丙基-5-(4-吡啶)-2(3h)-噁唑酮; 氨甲喋呤、米托蒽醌、肝素、干扰素、2巨球蛋白血清、chimp-3、抑凝乳蛋白酶素、 β -环糊精十四硫酸酯、eponemycin; 烟曲霉素、硫代苹果酸金钠、d-青霉胺(CDPT)、 β -1-抗胶原酶-血清、 α 2-抗纤溶酶、比生群、氯苯扎利二钠、n-2-羧基苯基-4-氯邻氨基苯甲酸二钠或“CCA”、沙利度胺; 血管抑制性类固醇、羧基氨基咪唑(cargboxynaminimidazole); 金属蛋白酶抑制剂如BB94。其他抗血管生成剂包含抗体, 例如, 针对下述血管生长因子的单克隆抗体: bFGF、aFGF、FGF-5、VEGF同种型、VEGF-C、HGF/SF和Ang-1/Ang-2。Ferrara N. 和Alitalo, K. "Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors(血管生长因子和其抑制剂的临床应用)"(1999)Nature Medicine 5:1359-1364。其他抗血管生成剂可以包含VEGF转录抑制剂。

[0395] 诊断方法

[0396] 对象抗体用于检测癌前细胞或癌细胞。因此, 本公开提供了诊断方法, 涉及将获自待检测个体的生物样品接触对象抗LOXL2抗体; 并且检测抗LOXL2抗体与生物样品中表位的结合。所述生物样品能是组织; 包含细胞的液体样品; 或无细胞样品。对象检测方法测定生物样品中LOXL2的出现和/或水平。高于正常、对照值的LOXL2多肽的检测水平指示癌症状态或癌前状态(例如在包含细胞的生物样品中指示癌细胞或癌前细胞的出现)。在一些实施方式中, 所述抗LOXL2抗体被可检测标记。在一些实施方式中, 所述抗LOXL2抗体固定于不溶性支持物(如测试条、珠、多孔板的孔等)。

[0397] 在一些实施方式中, 对象诊断方法检测正在经历或即将经历上皮-间充质转化的

细胞。上皮-间充质转化(EMT)指某一过程,其中有上皮细胞的基因表达/表型特征的细胞变化或改变所述基因或其表达水平,其引起的细胞表型变化由所表达基因的改变或变化显示。EMT能包含接触抑制的丧失、改变的生长控制,和/或增强的侵入性(Christiansen和Rajasekaran, *Cancer Res.*, 66(17):8319-8326(2006);和Thiery等, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 15:740-6(2003))。指示EMT的分子和形态学特征与不良组织分化、组织整体的破坏和转移有关。EMT提供上皮细胞克服通过细胞间连接置于其上的物理束缚并且获得移动表型的机理(Burdsal等, *Development*, 118:829-44(1993);和Nieto等, *Mech, Dev.*, 105:27-35(2001))。

[0398] 通常使用的EMT分子标记包含增加的N钙粘蛋白和波形蛋白表达、β联蛋白的核定位和增加的转录因子生成,例如Snail1(Snail)、Snail2(Slug)、Twist、EF1/ZEB1、SIP1/ZEB2和/或E47,抑制E钙粘蛋白生成。EMT的表型标记包括但不限于迁移和三维侵入能力的增加以及对凋亡的抗性。这些标记还与EMT诱导和癌症表型结合有关。对象诊断方法在一些实施方式中除了检测LOXL2多肽以外,涉及检测一种或多种Snail1(Snail)、Snail2(Slug)、Twist、EF1/ZEB1、SIP1/ZEB2和E47。

[0399] 肿瘤发展期间EMT的发生使肿瘤细胞获得浸润周围组织并最终转移到远端位点的能力。肿瘤细胞内的基因表达改变能指示上皮或上皮样基因表达模式向间充质或间充质样基因表达模式的发展。通过举例方式,E钙粘蛋白丧失的鉴定与转移癌和耐受癌症治疗如EGFR抑制剂和IGF-R1 IGF-R1相关。很多不同类型癌症的分析揭示循环肿瘤细胞、或作为微转移发现的那些,根据标记组表达的改变证明间充质的转化。所述标记包括但不限于EGFR、E钙粘蛋白、ErbB3、RAB25、整联蛋白β6、钙粘蛋白2、成纤维细胞生长因子结合蛋白1、远端缺失同源盒(distal-less homeo box)1、ZEB1(转录因子8)、SIP1和波形蛋白。对象诊断方法在一些实施方式中除了检测LOXL2多肽以外,还涉及检测一种或多种EGFR、E钙粘蛋白、ErbB3、RAB25、整联蛋白β6、钙粘蛋白2、成纤维细胞生长因子结合蛋白1、远端缺失同源盒1、ZEB1(转录因子8)、SIP1和波形蛋白。

[0400] 对象诊断方法在一些实施方式中除了检测LOXL2多肽以外,还涉及检测一种或多种EGFR、E钙粘蛋白、ErbB3、RAB25、整联蛋白β6、钙粘蛋白2、成纤维细胞生长因子结合蛋白1、远端缺失同源盒1、ZEB1(转录因子8)、SIP1、波形蛋白、Snail1(Snail)、Snail2(Slug)、Twist、EF1/ZEB1、SIP1/ZEB2和E47。

[0401] 为评价肿瘤细胞上皮或间充质生物标记表达,包含肿瘤细胞或由所述肿瘤细胞产生的蛋白或核酸的患者样品,能用于例如美国专利应用公开号20070065858所述的方法。简言之,生物标记的表达水平能通过评价肿瘤细胞样品(例如来自患者的肿瘤活检)或其他包含来自肿瘤的物质患者样品(如本文上述的血液、血清、尿、或其他体液或排泄物)中标记量(如绝对值或浓度)来评价。当然,在评价样品中的标记量前,所述细胞样品能用各种熟知的收集后制备和存储技术(如核酸和/或蛋白提取物、固定、存储、冷冻、超滤、浓缩、蒸发、离心等)处理。类似地,肿瘤活检也能用收集后制备和存储技术处理,如固定。

[0402] 检测LOXL2能用对象抗体(例如放射性标记、发色团标记、荧光团标记或酶标记抗体),抗体衍生物(例如偶联有底物或者蛋白-配体对(如生物素-链霉亲和素)的蛋白或配体的抗体),或特异结合生物标记蛋白或其片段的抗体片段(例如单链抗体、分离的抗体高变结构域等),包含肿瘤细胞中通常经历全部或部分翻译后修饰的生物标记蛋白(如糖基化、

磷酸化、甲基化等)。

[0403] 当多种生物标记(如LOXL2和一种或多种前述生物标记)使用对象方法检测时,生物样品中每个生物标记的水平能与正常、对照值相比较,例如相同类型的非癌症样品中各个生物标记的正常水平,或者在单个反应混合物中(即使用试剂,例如对各个生物标记的不同荧光探针)或者在响应一种或多种生物标记的单个反应混合物中。

[0404] 正常(即非癌)人组织中生物标记的表达水平能用多种方法评价。评价所述表达的正常水平能通过评估显示为非癌的细胞部分中生物标记的表达水平,并且然后对比正常表达水平与肿瘤细胞部分的表达水平。由于作为本文所述方法常规表现结果的进一步信息变得可用,能使用生物标记的正常表达的群平均值。或者,所述生物标记表达的正常水平能通过评价获自非癌症患者的患者样品、获自疑似癌症开始前的患者的患者样品,存档患者样品等中的生物标记表达来测定。

[0405] 通常,对象诊断方法涉及将可包含生物标记(如LOXL2多肽)的生物样品与对象抗LOXL2抗体在合适条件下接触足够时间,使所述LOXL2多肽(若有)和所述抗体相互作用和结合,因此形成能去除和/或检测的复合物。生物样品中所存在LOXL2多肽和对象抗LOXL2抗体之间的结合检测能用多种方式进行。

[0406] 例如,进行所述试验的一种方法涉及锚定生物标记或抗LOXL2抗体于固相支持物(也称为底物),和检测锚定在反应末期的固相上的靶生物标记/抗LOXL2抗体复合物。在所述方法的一个实施方式中,来自对象、待测定生物标记出现和/或浓度的样品,能锚定在载体或固相支持物上。在另一个实施方式中,可能有相反的情形,其中抗LOXL2抗体能锚定于固相并且对象样品能作为试验的不固定成分反应。

[0407] 有数种锚定试验成分到固相的已确立方法。这些包括但不限于,通过生物素和链霉亲和素偶联而固定的生物标记或抗LOXL2抗体。所述生物素化的试验成分能使用本领域已知技术(如伊利诺斯州罗克福德的皮尔斯化学品公司(Pierce Chemicals, Rockford, IL)的生物素化试剂盒)从生物素-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺)制备,并且固定于链霉亲和素包被的96孔板的孔内(皮尔斯化学品公司)。在某些实施方式中,所述有固定试验成分的表面能事先制备并保存。其他对所述试验合适的载体或固相支持物包含任何能结合生物标记或探针所属分子类型的材料。熟知的支持物或载体包括但不限于,玻璃、聚苯乙烯、尼龙、聚丙烯、尼龙、聚乙烯、右旋糖苷、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺和磁铁矿。为了用上述方法进行试验,加入未固定成分到所述锚定第二成分的固相。反应完成后,未复合的成分能在任何所形成复合物会保持固定在所述固相的条件下除去(如通过洗涤)。锚定于固相上的LOXL2/抗LOXL2抗体复合物的检测能用本文概述的多种方法完成。在一个实施方式中,所述抗LOXL2抗体为未锚定试验成分时,能用本文所讨论和本领域技术人员熟知的可检测标记来直接或间接标记以用于检测和读取试验目的。

[0408] 如上所述,在一些实施方式中,对象诊断方法涉及使用可检测标记的对象抗LOXL2抗体。关于对象抗体的术语“标记”,意在包含通过偶联(即物理连接)可检测物质与抗体的抗体直接标记,和通过与直接标记的另一试剂反应的抗体间接标记。间接标记的示例包含使用荧光标记第二抗体的第一抗体检测。

[0409] 来自肿瘤细胞的蛋白能使用本领域技术人员熟知的技术分离。例如,使用的蛋白分离方法能是例如Harlow和Lane所述方法(Harlow和Lane, 1988, Antibodies: A

Laboratory Manual(抗体:实验室手册),纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press))。

[0410] 能采用多种形式测定样品是否包含结合对象抗LOXL2抗体的蛋白。所述形式的示例包括但不限于,酶免疫试验(EIA)、放射免疫试验(RIA)、Western印迹分析和酶联免疫吸附实验(ELISA)。技术人员能容易采用已知蛋白/抗体检测方法以用于测定肿瘤细胞是否表达特定生物标记(如LOXL2多肽)。

[0411] 在一种形式中,抗体或抗体片段或衍生物能用于例如Western印迹或免疫荧光技术等方法来检测表达的蛋白。在这些示例中,抗体或蛋白能固定在固体支持物上。合适的固相支持物或载体包含能结合抗原或抗体的任何支持物。熟知的支持物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、右旋糖苷、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁矿。本领域技术人员会了解很多其他用以结合抗体或抗原的合适载体,并且会能适应所述支持物以用于对象方法。例如,从肿瘤细胞中分离的蛋白能进行聚丙烯酰胺凝胶电泳并且固定在固相支持物例如硝酸纤维素上。所述支持物然后能用合适的缓冲液洗涤,随后用可检测标记抗体处理。然后,第二次用缓冲液洗涤固相支持物,以去除未结合的抗体。然后,可通过常规方式检测所述固体支持物上结合的标记量。

[0412] 对ELISA试验而言,特定结合对可以是免疫或非免疫类型。免疫特定结合对由抗原-抗体系统或半抗原/抗半抗原系统例示。能提及荧光素/抗荧光素、二硝基苯基/抗二硝基苯基、生物素/抗生物素、肽/抗肽等。所述特定结合对的抗体成员能由本领域技术人员熟悉的常用方法生成。所述方法涉及用特定结合对的抗原成员来免疫动物。如果所述特定结合对的抗原成员不是免疫原性,例如半抗原,其能共价偶联于载体蛋白以赋予其免疫原性。非免疫结合对包含其中两个组分彼此共有天然亲和性但不是抗体的系统。示例性非免疫对是生物素-链霉亲和素、内源因子-维生素B12、叶酸-叶酸盐结合蛋白等。

[0413] 有多种方法可用特定结合对成员来共价标记抗体。根据特定结合对成员性质、所需连接类型和抗体对多种偶联化学的耐受性来选择方法。生物素能使用市售可得活性衍生物共价偶联到抗体上。这些中的一些是结合到蛋白氨基的生物素-N-羟基-琥珀酰亚胺;通过偶联碳二亚胺结合到碳水化合物部分、醛和羧基的生物素酰肼;和结合到巯基的生物素马来酰亚胺和乙酰基生物素。荧光素能使用荧光素异硫氰酸酯偶联到蛋白氨基。二硝基苯基能使用2,4-二硝基苯硫酸或2,4-二硝基氟苯偶联到蛋白氨基。能使用其他标准的偶联方法来偶联单克隆抗体到特定结合对成员,包含二醛、碳二亚胺偶联、同功能交联和异双功能交联。碳二亚胺偶联是偶联某一物质上的羧基到另一物质上的氨基的有效方法。使用市售可得试剂1-乙基-3-(二甲基-氨基丙基)-碳二亚胺(EDAC)辅助碳二亚胺偶联。

[0414] 包括双功能交联亚氨基酯和双功能N-羟基琥珀酰亚胺在内的同双功能交联剂市售可得,并能用于偶联某一物质上的氨基到另一物质上的氨基。异双功能交联剂是有不同官能团的试剂。最常见的市售可得异双功能交联剂有氨基活性N-羟基琥珀酰亚胺作为一个官能团和巯基反应基作为第二个官能团。最常见的巯基反应基是马来酰亚胺、吡啶基二硫化物和活性卤素。官能团之一能是辐射后与多个基团反应的光活性芳基氮烯。

[0415] 所述特定结合对的可检测标记抗体或可检测标记成员通过偶联报道分子来制备,所述报道分子可为放射性同位素、酶、发荧光、化学发光或电化学材料。两种最常用的放射性同位素是 ^{125}I 和 ^3H 。标准放射性同位素标记过程包含针对 ^{125}I 的氯胺T、乳过氧化物酶和

Bolton-Hunter方法和针对³H的还原甲基化。所述术语“可检测标记”指以所述方式标记分子,从而能通过标记的内源酶活性或通过结合另一自身易检测的成分标记而易于检测。

[0416] 合适使用的酶包括但不限于,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、荧光素酶(包含萤火虫和海肾荧光素酶)、β-内酰胺酶、脲酶、绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白和溶菌酶。使用上述偶联抗体与特定结合对成员的二醛、碳二亚胺偶联、同双功能交联剂和异双功能交联剂来辅助酶标记。

[0417] 所选的标记方法取决于酶上可用的官能团和待标记的材料、和两者对偶联条件的耐受性。用于对象方法的标记方法可以是但不限于任何目前使用的传统方法之一,包含 Engvall 和 Pearlmann, *Immunochemistry* 8,871(1971), Avrameas 和 Temynck, *Immunochemistry* 8,1175(1975), Ishikawa 等, *J. Immunoassay* 4(3):209-327(1983) 和 Jablonski, *Anal. Biochem.* 148:199(1985) 所述方法。

[0418] 能用间接方法,例如使用间隔子或特定结合对的其他成员完成标记。一个这种示例是用未标记链霉亲和素和生物素化酶检测生物素化抗体,顺序加入或同时加入链霉亲和素和生物素化酶。因此,对象抗体能用报道分子直接标记或用特定结合对的第一成员间接标记。当所述抗体偶联到特定结合对的第一成员上时,则通过抗体-特定结合复合物第一成员与如上述标记或未标记的特定结合对第二成员反应来影响检测。

[0419] 另外,能通过未标记抗体与对所述未标记抗体特异的标记抗体反应来检测所述未标记检测抗体。在此示例中,如上使用的“可检测标记”指包含对未标记抗体特异的抗体能结合的表位。所述抗-抗体能直接或间接使用上述方法中任何一种标记。例如,上述抗-抗体能偶联于生物素,其通过与上述链霉亲和素-辣根过氧化物酶系统反应来检测。因此,在一个实施方式中,使用生物素。所述生物素化的抗体进而与链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物反应。原苯二胺、4-氯-萘酚、四甲基联苯胺(TMB)、ABTS、BTS或ASA能用于生色检测。

[0420] 在实施对象方法的一个免疫试验形式中,使用正向夹心试验,其中用传统技术将所述捕获剂固定在支持物表面。用于试验的合适支持物包含合成聚合物支持物,例如聚丙烯、聚苯乙烯、取代的聚苯乙烯、如氨化或羧化的聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚酰胺、聚氯乙烯、玻璃珠、琼脂糖或硝酸纤维素。

[0421] 适于治疗和/或诊断的对象

[0422] 适合用治疗癌症的对象方法(如,减小肿瘤生长和/或转移的对象方法)治疗的对象包含已经诊断有癌症的个体、已经用对象治疗方案以外的治疗方案处理癌症和已经复发的个体;和用对象治疗方案以外的治疗方案处理癌症没有成功的个体,例如,不响应对象治疗方案以外的治疗方案处理。

[0423] 适合用治疗纤维化疾病的对象方法治疗的对象包含已经诊断有纤维化疾病的个体、已经用对象治疗方案以外的治疗方案处理纤维化疾病和已经复发的个体;和用对象治疗方案以外的治疗方案处理纤维化疾病没有成功的个体,例如,不响应对象治疗方案以外的治疗方案处理。

[0424] 本文所述诊断试验的合适对象包含已经就癌或癌前细胞存在进行测试的个体;已经治疗癌症和在治疗后监控癌或癌前细胞存在(如监控治疗有效性)的个体;和已经治疗癌症、减轻癌症、并且减轻后监控癌或癌前细胞存在的个体。

[0425] 药盒

[0426] 本公开提供完成对象治疗或对象诊断方法的药盒。

[0427] 对象药盒包含对象抗体;并能包含一种或多种其他试剂。能人源化对象药盒中的所述对象抗体。对象药盒能包含标记所述抗体的试剂。在一些实施方式中,对象药盒中的所述抗体包含可检测标记。在一些实施方式中,冻干对象药盒中的所述抗体。

[0428] 在一些实施方式中,对象药盒中的所述抗体存在于组合物中,包含:a)所述抗体;和b)药学上可接受赋形剂。在一些实施方式中,例如,当所述药盒用于对象治疗方法时,包含对象抗体的所述组合物无热原。对象药盒用于对象治疗方法时,所述抗体能存在于注射器中。所述抗体能以冻干状态提供,并且在使用前溶于合适液体(例如水溶液,如盐水、磷酸盐缓冲液或其他缓冲水溶液)。

[0429] 对象药盒用于诊断方法时,所述抗体能固定在不溶性支持物(如珠、测试条、多孔板的孔等)上。

[0430] 所述药盒的其他可选成分包含:缓冲液;蛋白酶抑制剂;可检测标记等。按照需要,所述药盒的各个组件可放入单独容器中,或者某些相容性组分可预先合并入单个容器中。

[0431] 除上述组分以外,对象药盒还可包括使用药盒组分实施对象方法的说明书。实施对象方法的说明书通常记录在合适的记录媒介上。例如,所述说明书可印刷在基材如纸或塑料等上。如此,所述说明书在试剂盒中可作为包装插入物存在,处于试剂盒或其组分的容器标签中(即与包装或分装相联)等。在其它实施方式中,通过存在于合适的计算机可读存储介质例如压缩盘只读存储介质(CD-ROM)、数字多功能盘(DVD)、磁盘等上的电子存储数据文件提供所述说明书。在另外一些实施方式中,药盒中不存在实际的说明书,但提供从远程来源例如经互联网获得说明书的手段。该实施方式的一个例子是包括网络地址的药盒,可从所述网络地址查看说明书和/或可从所述网络地址下载说明书。就说明书而言,获得说明书的手段记录在合适的基材上。

实施例

[0432] 提供以下实施例的目的是向本领域普通技术人员完整地公开和描述如何制备和使用本发明,这些实施例不意在限制发明人认为的发明范围,也不代表下述实验是所进行的所有或仅有的实验。努力保证所用数值(如含量、温度等)的准确性,但应允许一些实验误差和偏差。除非另有说明,份数是重量份数,分子量是重均分子量,温度是摄氏度,压力是大气压或接近大气压。可采用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pL,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kbp,千碱基对;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌肉内;i.p.,腹膜内;s.c.,皮下等。

[0433] 实施例1:生成人LOXL2蛋白的抗体

[0434] 全长人LOXL2蛋白(氨基酸序列示于图1),由所述SRCR2和SRCR3结构域之间体内剪切产生的经加工LOXL2片段和所述LOXL2催化结构域用作一系列小鼠免疫中的免疫原。His6纯化标签附加到蛋白的羧基末端。使用包含50%全长LOXL2和50%经加工LOXL2作为免疫原(3mg总体蛋白)和铝胶(Al(OH)₃)作为佐剂(proB免疫)的混合物进行皮下免疫。使用包含90%全长LOXL2和10%经加工LOXL2作为免疫原(0.3mg总体蛋白)和 TiterMax[®] (TiterMax[®], 佐治亚州诺克斯)作为佐剂(RPDS-1免疫)的混合物进行足垫免疫。第二足垫

免疫使用所述LOXL2催化结构域(0.3mg总体蛋白,图1氨基酸546-774)作为免疫原和TiterMax[®]作为佐剂(RPDS-2免疫)。由ELISA检测为抗LOXL2抗体阳性的小鼠血清用于产生杂交瘤库,单个克隆获自所述杂交瘤库。如实施例2所述,从克隆中纯化抗体并且用ELISA试验筛选LOXL2结合。

[0435] 实施例2:对LOXL2结合抗体的ELISA分析

[0436] Nunc Maxisorp[™]板(纽约州罗切斯特的塞摩费舍尔科学有限公司(Thermo Fisher Scientific))用含1 μ g/mL LOXL2的硼酸盐缓冲剂于4 $^{\circ}$ C(每孔100 μ l)包被过夜。次日,所述板用PBST(50mM磷酸钠、140mM氯化钠、0.05%吐温20、pH 7.4)洗涤三次,并且用牛血清白蛋白溶液(含5%BSA的50mM磷酸钠、140mM氯化钠、pH 7.4,每孔200 μ l)环境温度下封闭1小时。然后用300 μ l PBST洗涤板三次,并且将100 μ l体积的实施例1所述杂交瘤克隆的纯化抗体稀释液(2倍)加入到封闭的板中并且在环境温度下孵育1小时。用300 μ l PBST洗涤板三次,并且加入稀释在0.5%BSA溶液(含0.5%BSA的50mM磷酸钠、140mM氯化钠、pH 7.4)中的100 μ l 1:10,000稀释的辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠二抗(伊利诺斯州洛克福特的皮尔斯公司(Pierce, Rockford, IL)),然后在环境温度下孵育1小时。

[0437] 用300 μ l PBST洗涤板三次,然后于环境温度下使用100 μ l 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显影,直到显出温和蓝色(即没有超过1.0的光学浓度)。然后加入100 μ l 1M的盐酸淬灭反应。用SpectraMax[®]M5(加利福尼亚州日照谷的分子设备公司(Molecular Devices, Sunnyvale, CA))在450nm的吸收模式下进行定量。通过吸收值相比抗体浓度作图和拟合所述数据到下方方程来测定解离常数(其中,PL等于吸收值(与结合抗体的浓度成比例),L是抗体浓度(mM),B_{MAX}是最大结合(nM)和K_D是解离常数(nM):

[0438]
$$[PL] = \frac{B_{MAX} * [L]}{K_D + [L]}$$

[0439] 认为有1nM或更小K_d的抗体是LOXL2结合抗体。实施例1所述的三个免疫中,获得72个表达LOXL2结合抗体的杂交瘤。抗体命名用前缀表示获取其的免疫(proB、RPDS-1或RPDS-2),字母M(指“单克隆”)和数字。抗体AB0023对应proBM64;AB0024是AB0023的人源化衍生物。参见共同拥有的US 2009/0053224。抗体AB0030对应proBM20。参见共同拥有的US2009/0053224。抗体还根据其抑制LOXL2酶活性的能力来鉴定,如实施例3所述。

[0440] 72个抗体中的一些(来自RPDS-1和RPDS-2免疫)也针对只含有催化结构域(图1,氨基酸546-774)的LOXL2片段重新筛选。发现其中37个在催化结构域内结合。所述抗体包含RPDS-1M1、RPDS-1M3、RPDS-1M8、RPDS-1M9、RPDS-1M11、RPDS-1M15、RPDS-1M17、RPDS-1M19、RPDS-1M20(AB0030)、RPDS-1M22、RPDS-1M24、RPDS-1M25、RPDS-1M27、RPDS-1M28、RPDS-1M29、RPDS-1M30、RPDS-1M31、RPDS-1M32、RPDS-2M1、RPDS-2M2、RPDS-2M3、RPDS-2M4、RPDS-2M5、RPDS-2M6、RPDS-2M7、RPDS-2M8、RPDS-2M9、RPDS-2M10、RPDS-2M11、RPDS-2M12、RPDS-2M13、RPDS-2M14、RPDS-2M15、RPDS-2M16、RPDS-2M17、RPDS-2M18和RPDS-2M19。

[0441] 实施例3:抑制LOXL2酶活性的抗体试验

[0442] 如实施例2鉴定的所述72个LOXL2结合抗体还就其抑制LOXL2酶活性能力来筛选。使用两个抑制试验:一个使用二氨基戊烷(DAP)作为底物;另一个使用胶原作为底物。在两个试验中,测定LOXL2酶活性使用偶联过氧化氢生成(通过LOXL2在底物脱氨后释放)与辣根

过氧化物酶催化的 Amplex[®] 红(加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司(Invitrogen, Carlsbad, CA))向试卤灵(荧光产物)转化的试验。

[0443] 在试验DAP作为底物的试验中,底物混合物包含50mM硼酸pH 8.0、100uM Amplex[®] 红试剂, $1 \times 10^{-4}\%$ 消泡剂204和30mM二氨基戊烷(DAP)。酶混合物包含50mM硼酸pH 8.0、2单位/mL辣根过氧化物酶(HRP, 密苏里州圣路易斯的西格玛公司(Sigma, St. Louis MO))、50nM LOXL2和 $1 \times 10^{-4}\%$ 消泡剂204。使用胶原作为底物的试验中,所述底物混合物没有DAP并且包含1mg/ml I型胶原(加利福尼亚州圣何赛的BD生物科学公司(BD Biosciences, San Jose, CA))和在所述酶混合物中,LOXL2浓度增加到100nM。根据供应商的说明在使用前聚合胶原,并且保持在冰上直到加入到所述底物混合物中。

[0444] 通过加入50uL底物混合物到50uL酶混合物中起始所述酶反应。在37℃ SpectraMax[®] M5上(加利福尼亚州日照谷的分子装置公司(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)),用544nm激发波长和590nm发射波长的动力学模式进行试验。以30秒间隔于37℃进行测试,持续1小时。在线性区测定进度曲线的斜率,表示为相对荧光单位(RFU)/秒。

[0445] 为了使用LOXL2结合抗体测试LOXL2活性的抑制,实施例2所鉴定72个抗体的各个系列稀释在50uL酶混合物中与LOXL2以环境温度孵育1小时,然后如上所述通过加入50uL的DAP底物混合物起始反应。如上所述收集数据,并且表示为RFU/秒的观察反应速率作为抗体浓度函数作图。

[0446] 如下面方程所示,通过用四参数拟合来拟合所述数据以测定IC₅₀(相对与没有抑制剂时产生50%活性下降的抑制剂浓度),其中y是所述观察反应速率(RFU/秒),范围是没有抗体时反应速率(RFU/秒)减去背景速率(见下),s是通过反应速率与抗体浓度作图生成的曲线的斜率,背景是没有酶和抗体时的反应速率(RFU/秒),和x是抗体的纳摩尔浓度。

$$[0447] \quad y = \frac{\text{范围}}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s} + \text{背景}$$

[0448] 发现没有一种所述抗体完全抑制酶活性。因此,每个IC₅₀值是根据用每个抗体观察的最大抑制的表观IC₅₀(IC₅₀')。对任何有500nM或更少IC₅₀'的抗体进行评分,以用于本公开作为LOXL2活性抑制剂。

[0449] 抗体首先在使用DAP作为底物的试验中测试抑制活性,并且鉴定四个抑制性抗体(表2)。剩余抗体如上述在以胶原为底物的试验中重新测试。使用胶原底物试验,鉴定四个抑制性抗体。在随后实验中,发现DAP底物试验中为抑制性的四个抗体在使用胶原作为底物时也产生抑制。

[0450] 通过这些标准,测定实施例2所鉴定72个LOXL2结合抗体中的8个是LOXL2抑制剂。每个抗体的名称和表观IC₅₀值示于表2。

[0451] 其他实验显示,抑制LOXL2酶活性的抗体中,下列抗体在所述催化结构域内结合: RPDS-2M2、RPDS-2M4、RPDS-1M19、RPDS-1M20(AB0030)、RPDS-1M27和RPDS-1M31。抗体AB0023和RPDS1-M21结合在所述催化结构域外部。

[0452] 表2:抑制性抗体

[0453]

抗体	IC ₅₀ ' (nM)	底物
AB0023	62	DAP, 胶原
RPDS2-M2	90	DAP, 胶原
RPDS-2M4	114	DAP, 胶原
AB0030	35	胶原
RPDS-1M19	33	胶原
RPDS-1M21	32	DAP, 胶原
RPDS-1M27	39	胶原
RPDS-1M31	210	胶原

[0454] 按照布达佩斯条约,抑制性抗体AB0030、RPDS-1M19、RPDS-1M21、RPDS-1M27、RPDS1-M31、RPDS-2M2和RPDS-2M4在2010年3月26日保藏于加拿大卫生部微生物局(BMHC,加拿大马尼托巴省温尼伯市(Winnipeg, Manitoba, Canada)),如表3所示;以及在2010年2月5日和2010年3月26日保藏于加拿大国际保藏局,加拿大公共卫生局国家微生物实验室(NMLHC(International Depositary Authority of Canada, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada),加拿大马尼托巴省温尼伯市(Winnipeg, Manitoba, Canada)),如表3A所示。

[0455] 表3

保藏材料	保藏日期	登录号
RPDS1-M20 (AB0030)	2010年3月26日	050210-04
RPDS-1M19	2010年3月26日	050210-02
RPDS-1M21	2010年3月26日	050210-03
RPDS-1M27	2010年3月26日	050210-01
RPDS1-M31	2010年3月26日	260310-01
RPDS-2M2	2010年3月26日	260310-02
RPDS-2M4	2010年3月26日	260310-03

[0457] 表3A

[0458]

保藏材料	保藏日期	登录号
LOXL2 RPDS M20	2010年2月5日	050210-04
LOXL2 RPDS M19	2010年2月5日	050210-02
LOXL2 RPDS M21	2010年2月5日	050210-03
LOXL2 RPDS M27	2010年2月5日	050210-01
LOXL2 RPDS M31	2010年3月26日	260310-01
MCD LOXL2 RPDS-2 M2	2010年3月26日	260310-02
MCD LOXL2 RPDS-2 M4	2010年3月26日	260310-03

[0459] 根据国际承认用于专利程序的微生物保存的布达佩斯条约和其实施细则的条款下完成所示保藏。这保证了从保藏日起30年保藏的活体培养和保藏所接受保藏样品供给的最近请求后至少五(5)年的维护。所述保藏可按照布达佩斯条约从BMHC或NMLHC获得,并且可用BMHC或NMLHC和本应用受让人之间的协议,所述协议保证由保藏者设置的关于存储材料公共可用性的所有限制会在相关美国专利授权后不可撤销地解除,在相关美国专利颁布后或任何美国或外国专利申请(不管哪个在先)公开后保证存储培养物后代对公共的永久和无限限制可用性,并且保证根据35U.S.C. §122授权美国专利商标局局长决定和局长据此规定(包含37C.F.R. §1.14,特定参考886 OG 638)的后代可用性。

[0460] 本应用的受让人已经同意,如果保藏材料培养物在合适条件下培养时死亡或丢失或损坏,所述材料经过通知,会及时用另一个相同的培养物替换。在违反任何政府权力根据其专利法赋予的权力时,所述保藏材料的可用性不作为实施本发明的许可。

[0461] 实施例4:对人LOXL2抗体的进一步筛选

[0462] 进一步鉴定结合全长LOXL2但不是包含LOXL2催化结构域片段的抗体,以测定其表位定位在催化结构域外何处。为此,使用对应于LOXL2的不同SRCR结构域和其插入接头序列的多肽作为靶标进行ELISA实验。每个多肽所含的LOXL2氨基酸序列部分(如图1所示)和所述多肽的名称分别示于表4的第二和第一列。多肽的氨基酸序列示于图2。

[0463] 对这些试验而言,Nunc板通过100uL 1ug/ml用作靶标的特定多肽溶液在50mM硼酸钠pH 8中4℃包被过夜。用300uL PBST洗涤板三次,然后向每个孔加入200uL含5%BSA的PBS,并且板在环境温度下温和振荡孵育1小时。然后再次洗涤板,每孔用300uL PBST洗三次,再向孔中加入抗体(PBST中的100uL)。在固定浓度100nM或在从10nM起两倍增量稀释(每个孔或每个稀释100uL)的十二点系列稀释下测试抗体。加入抗体溶液后,板在环境温度下温和振荡孵育1小时。然后每孔加入300uL PBST洗涤板三次。在含0.5%BSA的PBS中稀释HRP偶联山羊抗小鼠二抗(伊利诺斯州洛克福特的皮尔斯生物技术公司)10,000倍;每个孔加入100uL所述溶液,并且板在环境温度下温和振荡孵育1小时。每孔加入300uL PBST洗涤板三次然后每孔加入100uL TMB显影,并且在观察到温和蓝色(<10D)后,加入100uL 1N HCl来淬灭反应。用SpectraMax[®]M5(加利福尼亚州日照谷的分子设备公司(Molecular Devices, Sunnyvale, CA))测量450nm吸收来定量颜色。

[0464] 如果作为抗体浓度函数的吸收值产生剂量依赖性信号增加,通过结合多肽评分抗体。对在单独浓度测试的抗体而言,需要不含抗体的孔中所得至少0.50D单位以上的吸收值用于评分抗体为阳性结合。

[0465] 本分析的结果列于表4。一个抗体(RPDS-1M7)显示在SRCR1结构域内结合,但是发现所述抗体不是抑制性(见实施例3)。没有获得结合SRCR2区的抗体。结合SRCR3区的7个抗体(RPDS-1M2、RPDS-1M4、RPDS-1M5、RPDS-1M10、RPDS-1M13、RPDS-1M18、RPDS-1M26)中,没有发现有抑制性(见实施例3)。一个抗体(RPDS-1M21)显示结合于SRCR3和SRCR4之间的序列(SRCR3/4“接头”)并且测定为抑制性(见实施例3、表2)。结合SRCR4区的两个抗体(RPDS-1M14、AB0023)中,发现一个(AB0023)有抑制性(见实施例3、表2)。

[0466] 表4

[0467]

LOXL2 片段	氨基酸	结合抗体
1A	1-159	RPDS-1M7
1B	58-187	RPDS-1M7
1C	1-187	RPDS-1M7
2A	160-302	无
2B	188-324	无
2C	160-324	无
3A	303-425	无
3B	325-434	RPDS-1M2, RPDS-1M4, RPDS-1M5, RPDS-1M10, RPDS-1M13, RPDS-1M18, RPDS-1M21, RPDS-1M26
3C	303-434	RPDS-1M2, RPDS-1M4, RPDS-1M5, RPDS-1M10, RPDS-1M13, RPDS-1M18, RPDS-1M21, RPDS-1M26
4A	426-547	RPDS-1M14, RPDS-1M21, AB0023, AB0024
4B	435-547	RPDS-1M14, AB0023, AB0024

[0468] 这些结果显示抑制性抗体能结合于SRCR3和SRCR4之间的接头序列(RPDS-1M21)和SRCR4结构域(AB0023)。其他上述实验显示抑制性抗体也能结合催化结构域(RPDS-2M2、RPDS-2M4、RPDS-1M19、RPDS-1M20(AB0030)、RPDS-1M27和RPDS-1M31)。

[0469] 实施例5:肽作图

[0470] 合成对应LOXL2中SRCR3和SRCR4的重叠15个氨基酸段的肽(加利福尼亚州海沃德的Elim生物制药公司(Elim Biopharmaceuticals, Hayward, CA)),并且测试其结合AB0023和其人源化衍生物AB0024的能力。肽的氨基酸序列示于表5。在PBS+5%乙腈中溶解冻干肽到终浓度10mM。抗体的2mg/ml储液在PBS(AB0023)或10mM磷酸钠、140mM NaCl(AB0024)中制备。向496 μ l抗体溶液中加入6微升的肽溶液,并且达到1ml终体积(对AB0023用PBS或对AB0024用10mM磷酸钠),获得终浓度60 μ M肽和6.6 μ M抗体,并且在室温25 $^{\circ}$ C孵育1小时。然后注射药品到Agilent 1100 SEC-HPLC柱(Tosoh TSK凝胶G3000SW $\times$ 树脂)。柱用PBS+250mM NaCl、pH 7.4(AB0023)或10mM磷酸钠、250mM NaCl、pH 5.8(AB0024)显影;在0.5ml/分钟速率下,测量UV吸收物质(210nm)的峰面积。因为15聚肽的分子量小于抗体的分子量,抗体-肽复合物的形成不引起任一分子保持时间的改变。因此,对应游离抗体的峰面积增加以及对游离肽的峰面积同时减少,指示抗体-肽复合物的形成。ChemStation软件(加利福尼亚州帕洛阿尔托的安捷仑公司(Agilent, Palo Alto, CA))用于积分峰面积。

[0471] 本分析的结果(概括于表5的最右列)显示肽3、4和5能结合AB0023。尽管表中未显示,所述相同的三个肽也显示结合AB0024。这些肽定义在LOXL2的SRCR4结构域内39个氨基酸的功能表位,具有下列氨基酸序列:

[0472] VWGMVCGQNWGIVEAMVVCRQLGLGFASNAFQETWYWHG

[0473] (SEQ ID NO:3)

[0474] 表5:肽作图

[0475]

肽	序列	SEQ ID NO	AB0023 结合
1	LRLNGGRNPYEGRVE	25	-
2	RVEVLVERNGSLVWG	26	-
3	VWGMVCGQNWGIVEA	27	+
4	VEAMVVCRQLGLGFA	28	+
5	GFASNAFQETWYWHG	29	+
6	WHGDVNSNKVVMMSGV	30	-
7	SGVKCSGTELSLAHC	31	-
8	AHCRHDGEDVACPQG	32	-
9	PQGGVQYGAGVACSE	33	-
10	CSETAPDLVLNAEMV	34	-

[0476] 表5注释:所述肽的氨基酸序列(单字母代码)示于第二列。在第四列,“+”表示肽结合AB0023,“-”表示没有观察到结合。

[0477] 实施例6:丙氨酸筛选突变

[0478] 进行LOXL2的SRCR4结构域丙氨酸筛选突变来鉴定LOXL2的SRCR4结构域中涉及AB0023、AB0024和M14抗体结合的氨基酸残基。为此,构建包含LOXL2的SRCR4结构域(SEQ ID NO:1的氨基酸435-547)编码序列的DNA片段;加入信号序列、接头序列、myc表位标签和(His)₆纯化标签,并且克隆所述构建体。生成其他构建体,从而SRCR4结构域中的某些氨基酸转化成丙氨酸。AB0023、AB0024和M14结合所述多种突变氨基酸序列的能力,对AB0023和AB0024通过ELISA、表面等离子共振(SPR)和SEC-HPLC测定;对M14通过ELISA测定。如实施例2所述,使用不同丙氨酸扫描突变体作为靶标准确进行ELISA试验。

[0479] 对SPR分析而言,抗体与LOXL2SRCR4丙氨酸扫描突变构建体的结合使用ProteOn XPR36仪器(加州赫尔克里斯的伯乐实验室公司(Bio-Rad,Hercules,CA))来测定。蛋白固定在GLC传感器芯片上。GLC传感器芯片用1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸(EDC)和N-羟基磺基琥珀酰亚胺(磺基-NHS)的1:1比率混合物激活,根据生产商说明制备,以30μL/分钟的流速通过芯片300秒。乙酸缓冲液pH 4.5中1μg/mL的蛋白溶液随后以30μL/分钟的流速通过芯片300秒,然后芯片上的未反应位点用1M乙醇胺以30μL/分钟的流速通过芯片300秒来封闭。使用同一过程通过乙酸缓冲液流到表面上来产生参比通道。纯化抗体的稀释

液以100uL/分钟的流速通过表面150秒,并且对照缓冲液包含在所述系列中。使用ProteOn管理器(manager)软件分析原位测听(Sensogram)并且数据在软件内拟合朗格缪尔(Langmuir)模型。所述数据代表4个单独实验的平均值和标准差。

[0480] 使用SRCR4的不同丙氨酸扫描突变体来代替15聚肽,如实施例5所述进行SEC-HPLC。

[0481] 使用所述三个不同方法获得的结果互相一致,表6显示数据的汇编。

[0482] 表6:丙氨酸扫描突变

[0483]

突变	A0023 结合	AB0024 结合	M14 结合
N438A	+	+	+
G440A	+	+	ND
N442A	+	+	ND
Y444A	+	+	+
V450A	+	+	ND
R454A	+	+	ND
G456A	+	+	ND
L458A	+	+	+
W460A	+	+	ND
G465A	+	+	ND
N467A	+	+	ND
G469A	+	+	ND
V471A	+	+	ND
M474A	+	+	ND
V476A	+/-	+/-	ND
R478A	0	0	+
F484A	0	0	ND
S486A	+	+	ND
N487A	+	+	+
F489A	+	+	ND
Q490A	+	+	+
E491A	+	+	ND
T492A	+	+	ND
W493A	+	+	ND
Y494A	+	+	+
W495A	+	+	ND
H496A	+	+	ND

	突变	A0023 结合	AB0024 结合	M14 结合
[0484]	G497A	+	+	ND
	K510A	+	+	+
	S512A	+	+	+

[0485] 表6注释：第一列中的数字指图1所示LOXL2氨基酸序列的氨基酸残基。数字前的字母代表在野生型蛋白中该位点出现的氨基酸(单字母氨基酸代码)。数字后的字母指示在所述特定突变体中,野生型残基转变成丙氨酸。所述剩余列指示所述特定突变多肽是否结合AB0023(第二列)、AB0024(第三列)或M14(第四列)。M14指RPDS-1M14抗体。“+”表示结合,“+/-”表示微弱结合,“0”表示结合没有检测到,“ND”表示“没有完成”。

[0486] 实施例7:AB0023特异结合LOXL2

[0487] 所述赖氨酰氧化酶样蛋白LOXL3和LOXL4也包含4个SRCR结构域,与LOXL2的四个SRCR结构域有一些同源性但不相同。为评价其特异性并且进一步提供关于其表位特性的信息,测试AB0023与LOXL3和LOXL4SRCR序列的结合。如实施例2所述,使用人LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3和LOXL4作为靶标准确进行ELISA试验。图3所示结果表明AB0023不结合任何其他已知的人赖氨酰氧化酶型酶。因此,与其他赖氨酰氧化酶型酶相比,AB0023对LOXL2特异,并且特别是AB0023不结合LOXL3或LOXL4的SRCR4结构域。

[0488] LOXL2、LOXL3和LOXL4的SRCR4结构域的氨基酸序列比对示于图4。LOXL2SRCR4结构域与LOXL3和LOXL4的SRCR4结构域之间氨基酸序列的差异能用于进一步定义AB0023识别的表位。

[0489] 实施例8:M14结合不同于AB0023和AB0024结合的表位

[0490] 上表6显示LOXL2SRCR4结构域的氨基酸478从精氨酸转变为丙氨酸消除了其结合AB0023和AB0024抗体的能力,但不影响其结合M14抗体的能力。这表明M14识别不同于AB0023和AB0024识别的表位。在单独实验中,通过实施例6所述的表面等离子共振分析测定不结合AB0023的F484A突变体结合M14抗体。因此,所述M14抗体定义SRCR4结构域中不同于AB0023和AB0024识别的第二表位。

[0491] 实施例9:催化结构域中的AB0030表位

[0492] AB0030抗体结合人LOXL2的催化结构域并且抑制其酶活性。比较AB0030与人、猕猴、大鼠和小鼠LOXL2蛋白结合的ELISA试验显示AB0023也能结合猕猴LOXL2,但不是大鼠或小鼠LOXL2。当一方面比较人和猕猴LOXL2催化结构域的氨基酸序列,另一方面比较大鼠和小鼠LOXL2时,发现21个氨基酸的序列不同。见图5。因此,通过ELISA和SPR,测试其中每个氨基酸对应人序列单独改变的所述大鼠蛋白变体结合AB0030的能力。

[0493] 这些分析的结果显示两个位点的改变赋予大鼠LOXL2蛋白上AB0030结合能力(图5中星号所示)。这些改变是小鼠残基H595到Y(对应人Y593)和小鼠残基Y741到H(对应人H739)的转变。因此,所示两个残基构成AB0030结合表位的一部分。

[0494] 虽然参考具体实施方式描述了本发明,但本领域技术人员应理解可在不背离本发明真实构思和范围的情况下作出各种改变并用其等同形式替代。此外,可根据本发明目的、

构思和范围进行许多修改以适应特定情况、材料、物质组成、方法、工艺步骤。所有这些修改均应包括在所附权利要求书的范围之内。

<110> 吉联亚生物科技有限公司(Gilead Biologics, Inc)
 S·A·麦克考雷(McCauley, Scott Alan)
 H·罗德里格斯(Rodriguez, Hector)
 C·A·加西亚(GARCIA, CARLOS A.)
 V·史密斯(SMITH, VICTORIA)

<120> 结合赖氨酰氧化酶样2 (LOXL2) 的抗体和其使用方法

<130> ARBS-015W0

<140> PCT/US2011/023791

<141> 2011-02-04

<150> US 61/301,550

<151> 2010-02-04

<160> 45

<170> FastSEQ Windows 4.0 版本

<210> 1

<211> 774

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

[0001]

```

Met Glu Arg Pro Leu Cys Ser His Leu Cys Ser Cys Leu Ala Met Leu
 1          5          10          15
Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Ser Trp Pro His
 20          25          30
Tyr Pro Glu Tyr Phe Gln Gln Pro Ala Pro Glu Tyr His Gln Pro Gln
 35          40          45
Ala Pro Ala Asn Val Ala Lys Ile Gln Leu Arg Leu Ala Gly Gln Lys
 50          55          60
Arg Lys His Ser Glu Gly Arg Val Glu Val Tyr Tyr Asp Gly Gln Trp
 65          70          75          80
Gly Thr Val Cys Asp Asp Phe Ser Ile His Ala Ala His Val Val
 85          90          95
Cys Arg Glu Leu Gly Tyr Val Glu Ala Lys Ser Trp Thr Ala Ser Ser
100          105          110
Ser Tyr Gly Lys Gly Glu Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asn Leu His Cys
115          120          125
Thr Gly Asn Glu Ala Thr Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asn Gly Trp Gly
130          135          140
Val Thr Asp Cys Lys His Thr Glu Asp Val Gly Val Val Cys Ser Asp
145          150          155          160
Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp Asn Ser Leu Ile Asn Gln Ile
165          170          175
Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp Ile Arg Ile Arg Ala Ile Leu
180          185          190
Ser Thr Tyr Arg Lys Arg Thr Pro Val Met Glu Gly Tyr Val Glu Val
195          200          205
Lys Glu Gly Lys Thr Trp Lys Gln Ile Cys Asp Lys His Trp Thr Ala
210          215          220
Lys Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Phe Gly Phe Pro Gly Glu Arg
225          230          235          240
Thr Tyr Asn Thr Lys Val Tyr Lys Met Phe Ala Ser Arg Arg Lys Gln
245          250          255
Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly Thr Glu Ala His Ile
260          265          270
Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu Asp Pro Met Lys Asn
275          280          285
Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly
290          295          300
Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe Arg Lys Ala Tyr Lys
305          310          315          320

```

[0002]

Pro Glu Gln Pro Leu Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile Gly Glu
 325 330 335
 Gly Arg Val Glu Val Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val Cys Asp
 340 345 350
 Asp Lys Trp Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly
 355 360 365
 Phe Gly Ser Ala Lys Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly Gln Gly
 370 375 380
 Ile Gly Pro Ile His Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn Glu Lys
 385 390 395 400
 Ser Ile Ile Asp Cys Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys Asn His
 405 410 415
 Glu Glu Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Thr Pro Ala Met Gly Leu Gln
 420 425 430
 Lys Lys Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val
 435 440 445
 Glu Val Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly Met Val Cys
 450 455 460
 Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met Val Val Cys Arg Gln Leu
 465 470 475 480
 Gly Leu Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln Glu Thr Trp Tyr Trp His
 485 490 495
 Gly Asp Val Asn Ser Asn Lys Val Val Met Ser Gly Val Lys Cys Ser
 500 505 510
 Gly Thr Glu Leu Ser Leu Ala His Cys Arg His Asp Gly Glu Asp Val
 515 520 525
 Ala Cys Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr Gly Ala Gly Val Ala Cys Ser
 530 535 540
 Glu Thr Ala Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr
 545 550 555 560
 Thr Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu
 565 570 575
 Glu Asn Cys Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asp Pro Thr Thr Gly
 580 585 590
 Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln
 595 600 605
 Ser Asp Phe Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp
 610 615 620
 Cys His Arg His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu
 625 630 635 640
 Leu Asn Leu Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe
 645 650 655
 Cys Leu Glu Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu
 660 665 670
 Cys Ala Asn Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met
 675 680 685
 Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro
 690 695 700
 Pro Gly Asp Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val
 705 710 715 720
 Ala Glu Ser Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr
 725 730 735
 Asp Gly His Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe
 740 745 750
 Ser Glu Glu Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn
 755 760 765
 Asn Gln Leu Ser Pro Gln
 770

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

Thr Pro Ala Met Gly Leu Gln Lys Lys
1 5

<210> 3
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 3
Val Trp Gly Met Val Cys Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met
1 5 10 15
Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Leu Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln
20 25 30
Glu Thr Trp Tyr Trp His Gly
35

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 4
His His His His His His
1 5

[0003]

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 5
Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 6
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 7

Cys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 8
His His His His His
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 9
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

[0004]

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 10
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 11
Arg Tyr Ile Arg Ser
1 5

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 12
Phe His His Thr
1

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 13
 Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg
 1 5 10 15
 Ala

<210> 14
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14
 Met Glu Arg Pro Leu Cys Ser His Leu Cys Ser Cys Leu Ala Met Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Ser Trp Pro His
 20 25 30
 Tyr Pro Glu Tyr Phe Gln Gln Pro Ala Pro Glu Tyr His Gln Pro Gln
 35 40 45
 Ala Pro Ala Asn Val Ala Lys Ile Gln Leu Arg Leu Ala Gly Gln Lys
 50 55 60
 Arg Lys His Ser Glu Gly Arg Val Glu Val Tyr Tyr Asp Gly Gln Trp
 65 70 75 80
 Gly Thr Val Cys Asp Asp Phe Ser Ile His Ala Ala His Val Val
 85 90 95
 [0005] Cys Arg Glu Leu Gly Tyr Val Glu Ala Lys Ser Trp Thr Ala Ser Ser
 100 105 110
 Ser Tyr Gly Lys Gly Glu Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asn Leu His Cys
 115 120 125
 Thr Gly Asn Glu Ala Thr Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asn Gly Trp Gly
 130 135 140
 Val Thr Asp Cys Lys His Thr Glu Asp Val Gly Val Val Cys Ser
 145 150 155

<210> 15
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15
 Leu Arg Leu Ala Gly Gln Lys Arg Lys His Ser Glu Gly Arg Val Glu
 1 5 10 15
 Val Tyr Tyr Asp Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Asp Phe Ser
 20 25 30
 Ile His Ala Ala His Val Val Cys Arg Glu Leu Gly Tyr Val Glu Ala
 35 40 45
 Lys Ser Trp Thr Ala Ser Ser Ser Tyr Gly Lys Gly Glu Gly Pro Ile
 50 55 60
 Trp Leu Asp Asn Leu His Cys Thr Gly Asn Glu Ala Thr Leu Ala Ala
 65 70 75 80
 Cys Thr Ser Asn Gly Trp Gly Val Thr Asp Cys Lys His Thr Glu Asp
 85 90 95
 Val Gly Val Val Cys Ser Asp Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp
 100 105 110
 Asn Ser Leu Ile Asn Gln Ile Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp
 115 120 125
 Ile Arg
 130

<210> 16
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 16
 Met Glu Arg Pro Leu Cys Ser His Leu Cys Ser Cys Leu Ala Met Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Ser Trp Pro His
 20 25 30
 Tyr Pro Glu Tyr Phe Gln Gln Pro Ala Pro Glu Tyr His Gln Pro Gln
 35 40 45
 Ala Pro Ala Asn Val Ala Lys Ile Gln Leu Arg Leu Ala Gly Gln Lys
 50 55 60
 Arg Lys His Ser Glu Gly Arg Val Glu Val Tyr Tyr Asp Gly Gln Trp
 65 70 75 80
 Gly Thr Val Cys Asp Asp Asp Phe Ser Ile His Ala Ala His Val Val
 85 90 95
 Cys Arg Glu Leu Gly Tyr Val Glu Ala Lys Ser Trp Thr Ala Ser Ser
 100 105 110
 Ser Tyr Gly Lys Gly Glu Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asn Leu His Cys
 115 120 125
 Thr Gly Asn Glu Ala Thr Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asn Gly Trp Gly
 130 135 140
 Val Thr Asp Cys Lys His Thr Glu Asp Val Gly Val Val Cys Ser Asp
 145 150 155 160
 Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp Asn Ser Leu Ile Asn Gln Ile
 165 170 175
 Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp Ile Arg
 180 185

[0006]

<210> 17
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 17
 Asp Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp Asn Ser Leu Ile Asn Gln
 1 5 10 15
 Ile Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp Ile Arg Ile Arg Ala Ile
 20 25 30
 Leu Ser Thr Tyr Arg Lys Arg Thr Pro Val Met Glu Gly Tyr Val Glu
 35 40 45
 Val Lys Glu Gly Lys Thr Trp Lys Gln Ile Cys Asp Lys His Trp Thr
 50 55 60
 Ala Lys Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Phe Gly Phe Pro Gly Glu
 65 70 75 80
 Arg Thr Tyr Asn Thr Lys Val Tyr Lys Met Phe Ala Ser Arg Arg Lys
 85 90 95
 Gln Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly Thr Glu Ala His
 100 105 110
 Ile Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu Asp Pro Met Lys
 115 120 125
 Asn Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val Ser Cys Val
 130 135 140

<210> 18
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18
 Ile Arg Ala Ile Leu Ser Thr Tyr Arg Lys Arg Thr Pro Val Met Glu
 1 5 10 15
 Gly Tyr Val Glu Val Lys Glu Gly Lys Thr Trp Lys Gln Ile Cys Asp
 20 25 30
 Lys His Trp Thr Ala Lys Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Phe Gly

```

      35      40      45
Phe Pro Gly Glu Arg Thr Tyr Asn Thr Lys Val Tyr Lys Met Phe Ala
  50      55      60
Ser Arg Arg Lys Gln Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly
  65      70      75      80
Thr Glu Ala His Ile Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu
      85      90      95
Asp Pro Met Lys Asn Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val
      100      105      110
Ser Cys Val Pro Gly Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe
      115      120      125
Arg Lys Ala Tyr Lys Pro Glu Gln Pro
      130      135

```

<210> 19
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> 智人

[0007]

```

<400> 19
Asp Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp Asn Ser Leu Ile Asn Gln
  1      5      10      15
Ile Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp Ile Arg Ile Arg Ala Ile
      20      25      30
Leu Ser Thr Tyr Arg Lys Arg Thr Pro Val Met Glu Gly Tyr Val Glu
      35      40      45
Val Lys Glu Gly Lys Thr Trp Lys Gln Ile Cys Asp Lys His Trp Thr
      50      55      60
Ala Lys Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Phe Gly Phe Pro Gly Glu
      65      70      75      80
Arg Thr Tyr Asn Thr Lys Val Tyr Lys Met Phe Ala Ser Arg Arg Lys
      85      90      95
Gln Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly Thr Glu Ala His
      100      105      110
Ile Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu Asp Pro Met Lys
      115      120      125
Asn Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro
      130      135      140
Gly Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe Arg Lys Ala Tyr
      145      150      155      160
Lys Pro Glu Gln Pro
      165

```

<210> 20
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 20
Pro Gly Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe Arg Lys Ala
  1      5      10      15
Tyr Lys Pro Glu Gln Pro Leu Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile
      20      25      30
Gly Glu Gly Arg Val Glu Val Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val
      35      40      45
Cys Asp Asp Lys Trp Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu
      50      55      60
Leu Gly Phe Gly Ser Ala Lys Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly
      65      70      75      80
Gln Gly Ile Gly Pro Ile His Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn
      85      90      95
Glu Lys Ser Ile Ile Asp Cys Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys
      100      105      110
Asn His Glu Glu Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn
      115      120

```

<210> 21
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 21
 Leu Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile Gly Glu Gly Arg Val Glu
 1 5 10 15
 Val Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Lys Trp Asp
 20 25 30
 Leu Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly Phe Gly Ser Ala
 35 40 45
 Lys Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly Gln Gly Ile Gly Pro Ile
 50 55 60
 His Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn Glu Lys Ser Ile Ile Asp
 65 70 75 80
 Cys Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys Asn His Glu Glu Asp Ala
 85 90 95
 Gly Val Arg Cys Asn Thr Pro Ala Met Gly Leu Gln Lys Lys
 100 105 110

<210> 22
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 智人

[0008] <400> 22
 Pro Gly Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe Arg Lys Ala
 1 5 10 15
 Tyr Lys Pro Glu Gln Pro Leu Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile
 20 25 30
 Gly Glu Gly Arg Val Glu Val Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val
 35 40 45
 Cys Asp Asp Lys Trp Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu
 50 55 60
 Leu Gly Phe Gly Ser Ala Lys Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Ile Gly Pro Ile His Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn
 85 90 95
 Glu Lys Ser Ile Ile Asp Cys Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys
 100 105 110
 Asn His Glu Glu Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Thr Pro Ala Met Gly
 115 120 125
 Leu Gln Lys Lys
 130

<210> 23
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 23
 Thr Pro Ala Met Gly Leu Gln Lys Lys Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg
 1 5 10 15
 Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val Glu Val Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser
 20 25 30
 Leu Val Trp Gly Met Val Cys Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala
 35 40 45
 Met Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Leu Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe
 50 55 60
 Gln Glu Thr Trp Tyr Trp His Gly Asp Val Asn Ser Asn Lys Val Val
 65 70 75 80
 Met Ser Gly Val Lys Cys Ser Gly Thr Glu Leu Ser Leu Ala His Cys
 85 90 95
 Arg His Asp Gly Glu Asp Val Ala Cys Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr
 100 105 110
 Gly Ala Gly Val Ala Cys Ser Glu Thr Ala

115

120

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 24
 Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val Glu Val
 1 5 10 15
 Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly Met Val Cys Gly Gln
 20 25 30
 Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln Glu Thr Trp Tyr Trp His Gly Asp
 50 55 60
 Val Asn Ser Asn Lys Val Val Met Ser Gly Val Lys Cys Ser Gly Thr
 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Leu Ala His Cys Arg His Asp Gly Glu Asp Val Ala Cys
 85 90 95
 Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr Gly Ala Gly Val Ala Cys Ser Glu Thr
 100 105 110
 Ala

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

[0009]

<400> 25
 Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val Glu
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 26
 Arg Val Glu Val Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 27
 Val Trp Gly Met Val Cys Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 28

Val	Glu	Ala	Met	Val	Val	Cys	Arg	Gln	Leu	Gly	Leu	Gly	Phe	Ala
1				5					10					15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 29

Gly	Phe	Ala	Ser	Asn	Ala	Phe	Gln	Glu	Thr	Trp	Tyr	Trp	His	Gly
1				5					10					15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 30

Trp	His	Gly	Asp	Val	Asn	Ser	Asn	Lys	Val	Val	Met	Ser	Gly	Val
1				5					10					15

[0010]

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 31

Ser	Gly	Val	Lys	Cys	Ser	Gly	Thr	Glu	Leu	Ser	Leu	Ala	His	Cys
1				5					10					15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 32

Ala	His	Cys	Arg	His	Asp	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Cys	Pro	Gln	Gly
1				5					10					15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 33
Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr Gly Ala Gly Val Ala Cys Ser Glu
1 5 10 15

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 34
Cys Ser Glu Thr Ala Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val
1 5 10 15

<210> 35
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35
Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val Glu Val
1 5 10 15
Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly Met Val Cys Gly Gln
20 25 30
Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Leu
35 40 45
Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln Glu Thr Trp Tyr Trp His Gly Asp
50 55 60
Val Asn Ser Asn Lys Val Val Met Ser Gly Val Lys Cys Ser Gly Thr
65 70 75 80
Glu Leu Ser Leu Ala His Cys Arg His Asp Gly Glu Asp Val Ala Cys
85 90 95
Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr Gly Ala Gly Val Ala Cys Ser
100 105 110

[0011]

<210> 36
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36
Ile Arg Leu Ser Gly Gly Arg Ser Gln His Glu Gly Arg Val Glu Val
1 5 10 15
Gln Ile Gly Gly Pro Gly Pro Leu Arg Trp Gly Leu Ile Cys Gly Asp
20 25 30
Asp Trp Gly Thr Leu Glu Ala Met Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Leu
35 40 45
Gly Tyr Ala Asn His Gly Leu Gln Glu Thr Trp Tyr Trp Asp Ser Gly
50 55 60
Asn Ile Thr Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg Cys Thr Gly Thr Glu
65 70 75 80
Leu Ser Leu Asp Gln Cys Ala His His Gly Thr His Ile Thr Cys Lys
85 90 95
Arg Thr Gly Thr Arg Phe Thr Ala Gly Val Ile Cys Ser
100 105

<210> 37
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

```

Val Arg Leu Ala Gly Gly Arg Ile Pro Glu Glu Gly Leu Leu Glu Val
1      5      10      15
Gln Val Glu Val Asn Gly Val Pro Arg Trp Gly Ser Val Cys Ser Glu
20     25     30
Asn Trp Gly Leu Thr Glu Ala Met Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Leu
35     40     45
Gly Phe Ala Ile His Ala Tyr Lys Glu Thr Trp Phe Trp Ser Gly Thr
50     55     60
Pro Arg Ala Gln Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg Cys Ser Gly Thr
65     70     75     80
Glu Leu Ala Leu Gln Gln Cys Gln Arg His Gly Pro Val His Cys Ser
85     90     95
His Gly Gly Gly Arg Phe Leu Ala Gly Val Ser Cys Met
100    105

```

<210> 38
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 智人

[0012]

```

<400> 38
Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr Thr Tyr Leu
1      5      10      15
Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys
20     25     30
Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asp Pro Thr Thr Gly Tyr Arg Arg
35     40     45
Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
50     55     60
Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg
65     70     75     80
His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu Leu Asn Leu
85     90     95
Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
100    105    110
Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu Cys Ala Asn
115    120    125
Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His
130    135    140
Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
145    150    155    160
Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu Ser
165    170    175
Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly His
180    185    190
Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe Ser Glu Glu
195    200    205
Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu
210    215    220
Ser Pro Gln
225

```

<210> 39
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 小鼠

```

<400> 39
Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Ile Val Gln Gln Thr Ala Tyr Leu
1      5      10      15
Glu Asp Arg Pro Met Ser Leu Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys
20     25     30
Leu Ser Ala Ser Ala Val His Thr Asp Pro Thr Arg Gly His Arg Arg
35     40     45
Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
50     55     60
Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg

```

```

65      70      75      80
His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr Tyr Tyr Asp Leu Leu Ser Leu
      85      90      95
Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
      100     105     110
Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Ser Tyr Glu Cys Ala Asn
      115     120     125
Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His
      130     135     140
Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
      145     150     155     160
Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Val Pro Glu Ser
      165     170     175
Asp Phe Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly Tyr
      180     185     190
Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Val Gly Gly Ala Phe Ser Glu Glu
      195     200     205
Thr Glu Gln Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu
      210     215     220
Ser Val Gln
225

```

<210> 40
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠

[0013]

```

<400> 40
Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Ile Val Gln Gln Thr Ala Tyr Leu
  1      5      10      15
Glu Asp Arg Pro Met Ala Leu Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys
      20      25      30
Leu Ser Ala Ser Ala Val His Thr Asp Pro Thr Arg Gly His Arg Arg
      35      40      45
Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
      50      55      60
Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg
      65      70      75      80
His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr Tyr Tyr Asp Leu Leu Ser Leu
      85      90      95
Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
      100     105     110
Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Ser Tyr Glu Cys Ala Asn
      115     120     125
Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His
      130     135     140
Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
      145     150     155     160
Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Val Pro Glu Ser
      165     170     175
Asp Phe Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly Tyr
      180     185     190
Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Val Gly Gly Ala Phe Ser Glu Glu
      195     200     205
Thr Glu Gln Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu
      210     215     220
Ser Val Gln
225

```

<210> 41
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 长尾猴

```

<400> 41
Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr Thr Tyr Leu
  1      5      10      15

```

Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asn Pro Thr Thr Gly Tyr Arg Arg
 35 40 45
 Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
 50 55 60
 Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg
 65 70 75 80
 His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu Leu Asn Leu
 85 90 95
 Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
 100 105 110
 Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu Cys Ala Asn
 115 120 125
 Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His
 130 135 140
 Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
 145 150 155 160
 Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu Ser
 165 170 175
 Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly His
 180 185 190
 Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe Ser Glu Glu
 195 200 205
 Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu
 210 215 220
 Ser Pro Gln
 225

<210> 42
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> 小鼠

[0014]

<400> 42
 Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
 35 40 45
 Thr Tyr Trp Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 43
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 43
 Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45
 Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg

50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
 85 90 95
 Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys
 130

<210> 44
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 44

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
 35 40 45
 Thr Tyr Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

[0015]

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

<210> 45
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 小鼠

[0016] <400> 45
 Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45
 Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

MERPLCSHLC SCLAMLALLS PLSLAQYDSW PHYPEYFQQP APEYHQPOAP ANVAKIQLRL 60
信号肽

AGQKRKHSEG RVEVYYDGQW GTVCDDDFSI HAAHVVCREL GYVEAKSWTA SSSYGKGEGP 120
SRCR1

IWLDNLHCTG NEATLAActs NGWGVTDCKH TEDVGVCSD KRIPGFKFDN SLINQIENLN 180

IQVEDIRIRA ILSTYRKRTF VMEGYVEVKE GKTWKQICDK HWTAKNSRVV CGMFGFPGER 240

TYNTKVYKMF ASRRKQRYWP FSMDCTGTEA HISSCKLGPQ VSLDPMKNVT CENGLPAVVS 300
SRCR2

CVPQQVFSPD GPSRFRKAYK PEQPLVRLRG GAYIGEGRVE VLKNGEWGTV CDDKWDLVSA 360

SVVCRELGFG SAKEAVTGSR LGQGIGPIHL NEIQCTGNEK SIIDCKFNAE SQGCNHEEDA 420
SRCR3

GVRCNTPAMG LQKKLRLNGG RNPYEGRVEV LVERNGSLVW GMVCGQNWGI VEAMVVCRL 480

GLGFASNAFQ ETWYWHGDVN SNKVVMMSGVK CSGTELSLAH CRHDGEDVAC PQGGVQYGAG 540
SRCR4

VACSETAPDL VLNAEMVQQT TYLEDPRPMFM LQCAMEENCL SASAAQTDPT TGYRLLRFS 600
催化结构域

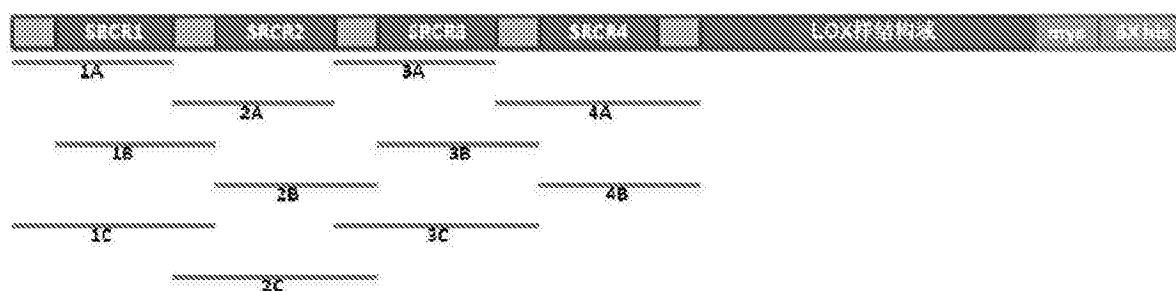
SQIHNNQSD FRPKNGRHAW IWHDCRHYH SMEVFTHYDL LNLNGTKVAE GHKASFCL 660

TECEGDIQKN YECANFGDQG ITMGCWDMYR HDIDCQWVDI TDVPPGDYLF QVVINPNFEV 720

AESDYSNNIM KCRSRYDGHR IWMYNCHIGG SFSEETEKKF EHFSGLLNQ LSPQ 774

SEQ ID NO:1

图1

A**B**

SRCR1A (aa1-159)

MERPLCSHLCSCLAMLALLSPLSLAQYDSWPHYPEYFQQPAPEYHQPOAPANVAKIQRLLAGQK
 RKHSEGRVEVYYDGQWGTVCDDDFSIIHAAHVVCRELGYVEAKSWTASSSYGKGEGPIWLDNLHC
 TGNEATLA ACTSNGWGVTDCKHTEDVGVVCS (SEQ ID NO:14)

SRCR1B (aa58-187)

LRLAGQKRKHSEGRVEVYYDGQWGTVCDDDFSIIHAAHVVCRELGYVEAKSWTASSSYGKGEGPI
 WLDNLHCTGNEATLA ACTSNGWGVTDCKHTEDVGVVCS DKRIPGFKFDNSLINQIENLNIQVED
 IR (SEQ ID NO:15)

SRCR1C (aa1-187)

MERPLCSHLCSCLAMLALLSPLSLAQYDSWPHYPEYFQQPAPEYHQPOAPANVAKIQRLLAGQK
 RKHSEGRVEVYYDGQWGTVCDDDFSIIHAAHVVCRELGYVEAKSWTASSSYGKGEGPIWLDNLHC
 TGNEATLA ACTSNGWGVTDCKHTEDVGVVCS DKRIPGFKFDNSLINQIENLNIQVEDIR
 (SEQ ID NO:16)

SRCR2A (aa160-302)

DKRIPGFKFDNSLINQIENLNIQVEDIRIRAILSTYRKRTVMEGYVEVKEGKTWKQICDKHWT
 AKNSRVVCGMFGFPGERTYNTKVYKMFASRRKQRYWPFMSMDCTGTEAHISSCKLGPQVSLDPMK
 NVTCEGLPAVVSCV (SEQ ID NO:17)

图2

B (续)

SRCR2B (aa188-324)

IRAILSTYRKRTPVMEGYVEVKEGKTWKQICDKHWTAKNSRVVCGMFGFPGERTYNTKVYKMFA
SRRKQRYWPFSSMDCTGTEAHISSCKLGPOVSLDPMKNVTCENGLPAVVSCVPGQVFSPDGPSRF
RKAYKPEQP (SEQ ID NO:18)

SRCR2C (aa160-324)

DKRIPGFKFDNSLINQIENLNLIQVEDIRIRAILSTYRKRTPVMEGYVEVKEGKTWKQICDKHWT
AKNSRVVCGMFGFPGERTYNTKVYKMFASRRKQRYWPFSSMDCTGTEAHISSCKLGPOVSLDPMK
NVTCENGLPAVVSCVPGQVFSPDGPSRFRKAYKPEQP (SEQ ID NO:19)

SRCR3A (aa303-425)

PGQVFSPDGPSRFRKAYKPEQPLVRLRGGAYIGEGRVEVLKNGEWGTVCDKDWLVSASVVCRE
LGFGSAKEAVTGSRLGQGIGPIHLNEIQCTGNEKSIIDCKFNAESQGCNHEEDAGVRCN
(SEQ ID NO:20)

SRCR3B (aa325-434)

LVRLRGGAYIGEGRVEVLKNGEWGTVCDKDWLVSASVVCRELGFSGAKEAVTGSRLGQGIGPI
HLNEIQCTGNEKSIIDCKFNAESQGCNHEEDAGVRCNTPAMGLQKK (SEQ ID NO:21)

SRCR3C (303-434)

PGQVFSPDGPSRFRKAYKPEQPLVRLRGGAYIGEGRVEVLKNGEWGTVCDKDWLVSASVVCRE
LGFGSAKEAVTGSRLGQGIGPIHLNEIQCTGNEKSIIDCKFNAESQGCNHEEDAGVRCNTPAMG
LQKK (SEQ ID NO:22)

SRCR4A (aa426-547)

TPAMGLQKKLRLNGGRNPYEGRVEVLVERNGSLVWGMVCGQNWGIVEAMVVCRLGLGFASNAF
QETWYWHGDVNSNKVVMSGVKCSGTELSLAHCRHDGEDVACPQGGVQYGAGVACSETA (SEQ
ID NO:23)

SRCR4B (435-547)

LRLNGGRNPYEGRVEVLVERNGSLVWGMVCGQNWGIVEAMVVCRLGLGFASNAFQETWYWHGD
VNSNKVVMSGVKCSGTELSLAHCRHDGEDVACPQGGVQYGAGVACSETA (SEQ ID NO:24)

图2(续)

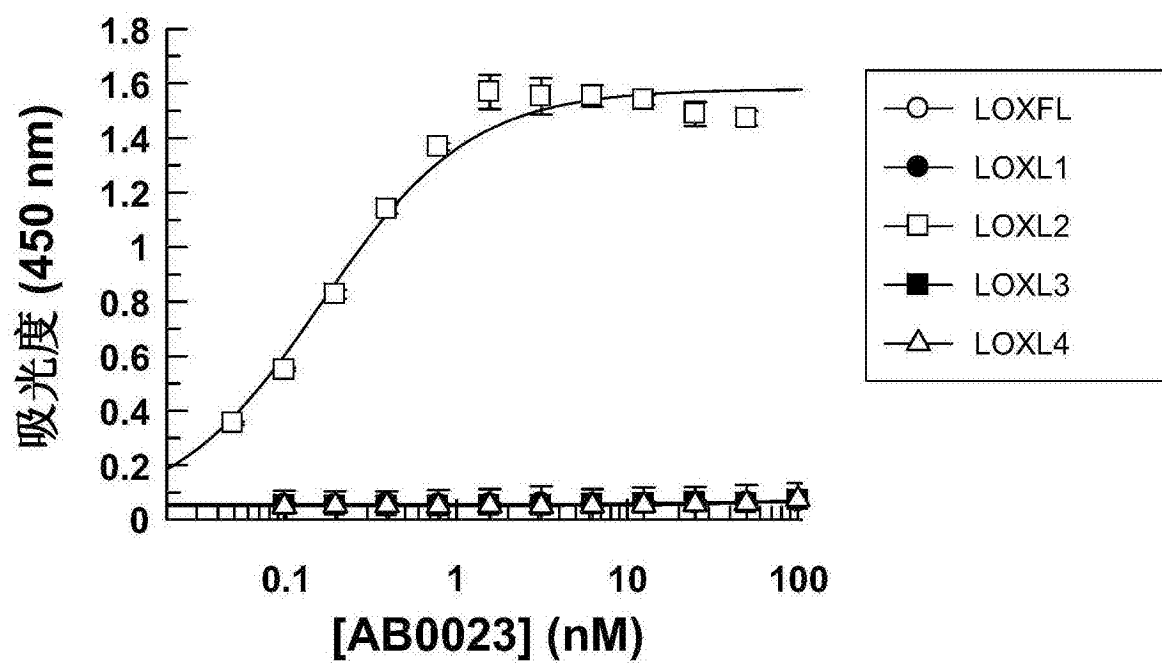


图3

人 LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 的 SRCR4 结构域的比对

LOXL2	LRLNGGRNPY	EGRVEVLVER	NGSLVWGMVC	GQNWGIVEAM	VVCRQLGLGF	ASNAFQETWY
LOXL3	IRLSGGRSQH	EGRVEVQIGG	PGPLRWGLIC	GDDWGTLEAM	VACRQLGLGY	ANHGLQETWY
LOXL4	VRLAGGRIPY	EGLLEVQVEV	NGVPRWGSVC	SENWGLTEAM	VACRQLGLGF	AIHAYKETWF
LOXL2	WHGDVNSNKV	VMSGVKCSGT	ELSLAHCRRH	GEDVACPQGG	VQYGAGVACS	(SEQ ID NO: 35)
LOXL3	WDSG-NITEV	VMSGVRCTGT	ELSLDQCAHH	GTHITCKRTG	TRFTAGVICS	(SEQ ID NO: 36)
LOXL4	WSGTPRAQEV	VMSGVRCSGT	ELALQQCCQRH	GP-VHCSHGG	GRFLAGVSCM	(SEQ ID NO: 37)

图4

★						
人:	PDLVLNAEMV	QQTYYLED RP	MFMLQCAMEE	NCLSASAAQT	DPTTGYRRLL	RFSSQIHNNNG
小鼠:	PDLVLNAE <u>I</u> V	QQT <u>A</u> YYLED RP	<u>MS</u> LLQCAMEE	NCLSASAV <u>H</u> T	DPT <u>R</u> G <u>H</u> RRLL	RFSSQIHNNNG
大鼠:	PDLVLNAE <u>I</u> V	QQT <u>A</u> YYLED RP	<u>MA</u> LLQCAMEE	NCLSASAV <u>H</u> T	DPT <u>R</u> G <u>H</u> RRLL	RFSSQIHNNNG
猕猴:	PDLVLNAEMV	QQTYYLED RP	MFMLQCAMEE	NCLSASAAQT	<u>N</u> PTTGYRRLL	RFSSQIHNNNG
人:	QSDFRPKNGR	HAWIWDHCHR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
小鼠:	QSDFRPKNGR	HAWIWDHCHR	HYHSMEVF <u>T</u> <u>Y</u>	YDLL <u>S</u> LNNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
大鼠:	QSDFRPKNGR	HAWIWDHCHR	HYHSMEVF <u>T</u> <u>Y</u>	YDLL <u>S</u> LNNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
猕猴:	QSDFRPKNGR	HAWIWDHCHR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
人:	QKNYECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	VDITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN
小鼠:	QK <u>S</u> YECANFG	<u>E</u> QGITMGCWD	MYRHDIDCQW	<u>I</u> DITDVPPGD	YLFQVVINPN	<u>Y</u> EV <u>P</u> ESD <u>F</u> SN
大鼠:	QK <u>S</u> YECANFG	<u>E</u> QGITMGCWD	MYRHDIDCQW	<u>I</u> DITDVPPGD	YLFQVVINPN	<u>Y</u> EV <u>P</u> ESD <u>F</u> SN
猕猴:	QKNYECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	<u>I</u> DITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN
★						
人:	NIMKCRSRYD	GHRIMYNNCH	IGGSFSEETE	KKFEHFSGLL	NNQLSPQ	(SEQ ID NO: 38)
小鼠:	NIMKCRSRYD	G <u>Y</u> RIWMYNNCH	<u>V</u> GGA <u>F</u> SEETE	<u>Q</u> KFEHFSGLL	NNQLS <u>V</u> Q	(SEQ ID NO: 39)
大鼠:	NIMKCRSRYD	G <u>Y</u> RIWMYNNCH	<u>V</u> GGA <u>F</u> SEETE	<u>Q</u> KFEHFSGLL	NNQLS <u>V</u> Q	(SEQ ID NO: 40)
猕猴:	NIMKCRSRYD	GHRIMYNNCH	IGGSFSEETE	KKFEHFSGLL	NNQLSPQ	(SEQ ID NO: 41)

图5

AB0023 V_H 序列:

MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTYYLIEWVKQ
RPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR
NWMNFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:42)

AB0023 V_L 序列:

MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVSISCRSSKSLHNSNGNTYLYW
FLQRPQGSPQFLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYP
YTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO:43)

AB0024 V_H 序列:

MGWSLILLELVAVATRVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVRQ
APGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYFCAR
NWMNFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRV
SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID
NO:44)

AB0024 V_L 序列:

MRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLHNSNGNTYLY
WFLQKPGQSPQFLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLE
YPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO:45)

图6