



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112654395 A

(43) 申请公布日 2021. 04. 13

(21) 申请号 201980053683.8

(22) 申请日 2019.06.17

(30) 优先权数据

18382433.3 2018.06.18 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.02.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/000756 2019.06.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/243893 EN 2019.12.26

(71) 申请人 免疫医疗有限公司

地址 英国剑桥郡

申请人 瓦尔德希伯伦肿瘤研究所

加泰罗尼亚研究和深造学院

(72) 发明人 J·赛瓦内苏阿雷斯

J·阿尼多福尔盖拉

P·A·吉布林 P·E·拜利斯

J·弗兰松 A·热塔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李波 李唐

(51) Int.Cl.

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

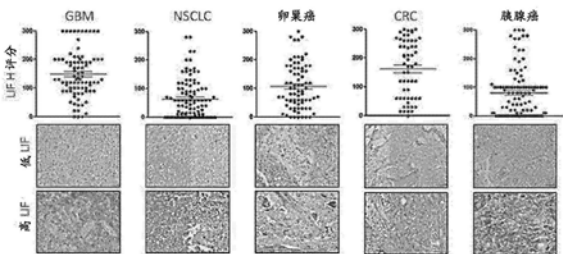
A61K 39/00 (2006.01)

(54) 发明名称

定量LIF的方法及其用途

(57) 摘要

本文描述了用于定量来自生物学样品的总LIF的测定。



1. 一种白血病抑制因子 (LIF) 复合物, 该复合物包含: LIF、与LIF特异性结合的LIF捕获抗体、与LIF特异性结合的LIF检测抗体、以及任选地与LIF特异性结合的LIF治疗性抗体, 其中该LIF检测抗体或该LIF捕获抗体包括A4或其LIF结合片段。

2. 如权利要求1所述的LIF复合物的用途, 其中该LIF捕获抗体或该LIF检测抗体不竞争与该LIF治疗性抗体的结合。

3. 如权利要求1至2中任一项所述的LIF复合物, 其中该LIF治疗性抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1), 其包括SEQ ID NO: 1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;

b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO: 4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;

c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO: 6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;

d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO: 9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;

e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO: 11或12中任一项所阐述的氨基酸序列; 以及

f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO: 13所阐述的氨基酸序列。

4. 如权利要求1至2中任一项所述的LIF复合物, 其中该LIF治疗性抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链可变区 (VH) 序列, 其具有与SEQ ID NO: 14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列; 以及

b) 免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 序列, 其具有与SEQ ID NO: 18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

5. 如权利要求1至2中任一项所述的LIF复合物, 其中该LIF治疗性抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链序列, 其具有与SEQ ID NO: 30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列; 以及

b) 免疫球蛋白轻链序列, 其具有与SEQ ID NO: 34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的LIF复合物, 其中该LIF捕获抗体偶联至表面, 其中该表面包含导电物质, 或其中该导电物质是电极。

7. 如权利要求1至5中任一项所述的LIF复合物, 其中该LIF检测抗体偶联至可检测部分, 其中该可检测部分产生化学信号、电化学信号、发光信号或荧光信号, 或其中该可检测部分产生电化学信号。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的LIF复合物, 其中该LIF检测抗体和该LIF捕获抗体不结合至LIF的在物理上与gp130相互作用的区域。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的LIF复合物, 其中该LIF捕获抗体或该LIF检测抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链可变区序列, 其具有与SEQ ID NO: 41所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列; 以及

b) 免疫球蛋白轻链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的LIF复合物,其中该复合物包含在多孔板的至少一个孔中,其中该复合物包含在96孔板、384孔板或1536孔板的至少一个孔中,或其中该复合物可以每毫升1纳克的水平检测到。

11. 一种定量来自个体的包含白血病抑制因子(LIF)的样品中的LIF的方法,其包括:

a) 使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的捕获抗体接触;

b) 使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的检测抗体接触;

c) 检测该样品中与该捕获抗体和该检测抗体结合的LIF;

其中该LIF检测抗体或该LIF捕获抗体包括A4或其LIF结合片段。

12. 如权利要求11所述的方法,其中该个体已经用LIF治疗性抗体治疗。

13. 如权利要求11至12中任一项所述的方法,其中该LIF治疗性抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1), 其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;

b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;

c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;

d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;

e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及

f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

14. 如权利要求11至12中任一项所述的方法,其中该LIF治疗性抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链可变区 (VH) 序列,其具有与SEQ ID NO:14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及

b) 免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 序列,其具有与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

15. 如权利要求11至12中任一项所述的方法,其中该LIF治疗性抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及

b) 免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

16. 如权利要求11至15中任一项所述的方法,其中该LIF捕获抗体偶联至表面,其中该表面包含导电物质,或其中该导电物质是电极。

17. 如权利要求11至15中任一项所述的方法,其中该LIF检测抗体偶联至可检测部分,其中该可检测部分产生化学信号、电化学信号、发光信号或荧光信号,或其中该可检测部分产生电化学信号。

18. 如权利要求11至17中任一项所述的方法,其中该LIF捕获抗体和该LIF检测抗体不结合至LIF的在物理上与gp130相互作用的区域。

19. 如权利要求11至18中任一项所述的方法,其中该LIF捕获抗体或该LIF检测抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及

b) 免疫球蛋白轻链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

20. 如权利要求11至19中任一项所述的方法,其中该包含LIF的样品包含在多孔板的至少一个孔中,或其中该包含LIF的样品包含在96孔板、384孔板或1536孔板的至少一个孔中。

21. 一种白血病抑制因子(LIF)结合抗体或其片段,其中该LIF结合抗体或其片段包括:

a) 免疫球蛋白重链可变区,该免疫球蛋白重链可变区具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;以及

b) 免疫球蛋白轻链可变区,该免疫球蛋白轻链可变区具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列。

22. 如权利要求21所述的LIF结合抗体或其片段,其中免疫球蛋白重链可变区包括与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约95%相同的氨基酸序列;并且

a) 该免疫球蛋白轻链可变区包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约95%相同的氨基酸序列。

23. 如权利要求21或22中任一项所述的LIF结合抗体或其片段,其中该免疫球蛋白重链可变区包括SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列;并且

a) 该免疫球蛋白轻链可变区包括SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列。

24. 如权利要求21至23中任一项所述的LIF结合抗体或其片段,其中该LIF结合抗体偶联至可检测部分,其中该可检测部分产生化学信号、电化学信号、发光信号或荧光信号,或其中该可检测部分产生电化学信号。

25. 如权利要求21至23中任一项所述的LIF结合抗体或其片段,其中该LIF结合抗体与LIF特异性结合。

定量LIF的方法及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年6月18日提交的欧洲申请序列号18382433.3的权益,其内容通过引用以其整体特此并入。

背景技术

[0003] 白血病抑制因子 (LIF) 是白细胞介素6 (IL6) 细胞因子家族的成员。根据LIF的已知生理学活性、LIF缺乏的临床特征以及健康组织和肿瘤中LIF表达的非临床研究,预期在一系列实体瘤中对LIF的抑制是很好耐受的并产生抗肿瘤功效,这些实体瘤包括但不限于非小细胞肺癌 (NSCLC)、胰腺癌、卵巢癌和多形性胶质母细胞瘤 (GBM)。

[0004] LIF通过与LIFR结合、然后募集gp130以形成能够启动细胞内JAK-STAT激活的三元复合物而发出信号。因此,LIF对LIFR和gp130都有结合位点,为抑制LIF信号传导提供了多种选择。一种策略是直接阻断LIF细胞因子与LIFR的结合。替代性地,抑制LIF信号传导的另一种策略是阻断LIF与gp130的结合。在这种情况下,结合与LIF的gp130结合位点重叠的表位的mAb通过抑制gp130向LIF/LIFR复合物的募集(这对于信号转导是必需的)来阻止下游信号传导。

[0005] 正常健康个体中LIF的典型血浆或血清浓度为0-10pg/ml之间。但是,由于抗体/配体复合物的清除比游离配体的清除慢,因此一旦细胞因子与抗体结合,血浆中总LIF的水平可能会增加。参见例如,Chakraborty A,Tannenbaum S,Rordorf C等人(2012)“Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Canakinumab,a Human Anti-Interleukin-1 β Monoclonal Antibody[人抗白细胞介素1 β 单克隆抗体卡那单抗的药代动力学和药效学特性]”Clin Pharmacokinet[临床药代动力学].51:e1-e18;Dudai S,Subramanian K,Flandre T等人(2015)“Integrated pharmacokinetic,pharmacodynamics and immunogenicity profiling of an anti-CCL21 monoclonal antibody in cynomolgus monkeys[食蟹猴中抗CCL21单克隆抗体的整合药代动力学、药效学和免疫原性分析]”mAbs[单克隆抗体].7:829-837。因此,可以将药物-配体复合物或总配体的积累以及饱和的持续时间并入PK-PD模型中,以预测靶标接合以及在外围中的功效。

发明内容

[0006] 本披露涉及抗白血病抑制因子 (LIF) 抗体的在施用于LIF的gp130结合位点处或附近结合的治疗性抗体后用于检测患者样品(如血液、血浆或血清)中总LIF水平的用途。在使用本文所述的夹心方法的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 中,LIF可以通过将其夹在固定的捕获抗体和与可检测标记物质缀合的另一种抗体(检测抗体)之间来定量检测,其中这些抗体结合至LIF的非重叠表位。在本披露中,LIF的捕获和检测抗体表位另外都不与治疗性mAb h5D8的结合位点重叠。因此,已经鉴定出LIF的三个不同的非重叠表位,使得三种抗体(捕获、检测和治疗性抗体)可以同时结合LIF。这种形式的优点在于,无论是否被该治疗性抗体结合,都可以检测LIF,从而定量样品中存在的“总LIF”(结合的和未结合的)。该测定能够准

确测量20pg/ml (1pM) 和2ng/ml (100pM) 之间的总LIF水平,但不限于此。总LIF水平可以作为重要的治疗指标,并允许临床医生密切监测个体中LIF治疗性抗体的PK/PD动态。

[0007] 在某些方面,本文描述的是白血病抑制因子(LIF)复合物,该复合物包含:LIF、与LIF特异性结合的LIF捕获抗体、与LIF特异性结合的LIF检测抗体、以及任选地与LIF特异性结合的LIF治疗性抗体,其中该LIF检测抗体或该LIF捕获抗体包括A4或其LIF结合片段。在某些实施例中,该LIF复合物的用途是用于定量LIF的体外测定。在某些实施例中,该LIF捕获抗体或该LIF检测抗体不竞争与该LIF治疗性抗体的结合。在某些实施例中,该LIF是人LIF。在某些实施例中,该LIF治疗性抗体包括:(a) 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b) 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c) 免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该LIF治疗性抗体包括:(a) 免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b) 免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该LIF治疗性抗体包括:(a) 免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b) 免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该LIF捕获抗体偶联至表面。在某些实施例中,该表面包括导电物质。在某些实施例中,该导电物质是电极。在某些实施例中,该LIF检测抗体偶联至可检测部分。在某些实施例中,该可检测部分产生化学信号、电化学信号、发光信号或荧光信号。在某些实施例中,该可检测部分产生电化学信号。在某些实施例中,该LIF检测抗体和该LIF捕获抗体不结合至LIF的在物理上与gp130相互作用的区域。在某些实施例中,该LIF捕获抗体或该LIF检测抗体包括:(a) 免疫球蛋白重链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b) 免疫球蛋白轻链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该复合物呈流体。在某些实施例中,该复合物包含在多孔板的至少一个孔中。在某些实施例中,该复合物包含在96孔板、384孔板或1536孔板的至少一个孔中。在某些实施例中,该复合物可以每毫升1纳克的水平检测到。在某些实施例中,该测定具有小于20%或10%的内部可变性。

[0008] 在另一方面,本文描述了一种定量来自个体的包含白血病抑制因子(LIF)的样品中的LIF的方法,其包括:(a) 使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的捕获抗体接触;(b) 使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的检测抗体接触;(c) 检测该样品中与该捕获抗体和该检测抗体结合的LIF。在某些实施例中,该方法在体外进行。在某些实施例中,该LIF是人LIF。在某些实施例中,该个体已经用LIF治疗性抗体治疗。在某些实施例中,该LIF治疗性抗

体包括：(a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1)，其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列；(b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2)，其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列；(c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3)，其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列；(d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1)，其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列；(e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2)，其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列；以及(f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3)，其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中，该LIF治疗性抗体包括：(a) 免疫球蛋白重链可变区 (VH) 序列，其具有与SEQ ID NO:14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列；以及(b) 免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 序列，其具有与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中，该LIF治疗性抗体包括：(a) 免疫球蛋白重链序列，其具有与SEQ ID NO:30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列；以及(b) 免疫球蛋白轻链序列，其具有与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中，该LIF捕获抗体偶联至表面。在某些实施例中，该表面包括导电物质。在某些实施例中，该导电物质是电极。在某些实施例中，该LIF检测抗体偶联至可检测部分。在某些实施例中，该可检测部分产生化学信号、电化学信号、发光信号或荧光信号。在某些实施例中，该可检测部分产生电化学信号。在某些实施例中，该LIF捕获抗体和该LIF检测抗体不结合至LIF的在物理上与gp130相互作用的区域。在某些实施例中，该LIF捕获抗体或该LIF检测抗体包括：(a) 免疫球蛋白重链可变区序列，其具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列；以及(b) 免疫球蛋白轻链可变区序列，其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中，该包含LIF的样品呈流体。在某些实施例中，该包含LIF的样品包含在多孔板的至少一个孔中。在某些实施例中，该包含LIF的样品包含在96孔板、384孔板或1536孔板的至少一个孔中。在某些实施例中，该LIF可以每毫升1纳克的水平检测到。在某些实施例中，该测定具有小于20%的内部可变性。在某些实施例中，该个体是人类个体。在某些实施例中，该方法进一步包括定量该样品中的LIF。在某些实施例中，该方法进一步包括发送包括关于该样品中LIF的量的信息的报告。

[0009] 在另一方面，本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法，该方法包括：(a) 向该个体施用初始剂量的结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体；(b) 确定来自该患有癌症的个体的样品中的白血病抑制因子 (LIF) 的初始剂量后水平。在某些实施例中，该方法进一步包括施用后续剂量的结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体。在某些实施例中，通过根据本披露的方法来确定LIF的初始剂量后水平。在某些实施例中，该LIF治疗性抗体包括：(a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1)，其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列；(b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2)，其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列；(c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3)，其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列；(d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1)，其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列；(e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2)，其包括SEQ ID NO:11

或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平不增加,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平不增加,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。在某些实施例中,该初始剂量是结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的第一剂量。在某些实施例中,该初始剂量是结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的多个剂量中的任何剂量。

[0010] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括:(a)向该个体施用包含结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的初始剂量;(b)接收来自该患有癌症的个体的样品中的白血病抑制因子(LIF)的初始剂量后水平。在某些实施例中,该方法进一步包括施用后续剂量的结合白血病抑制因子(LIF)的抗体。在某些实施例中,通过根据本披露的方法来确定LIF的初始剂量后水平。在某些实施例中,该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至

少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平不增加,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平不增加,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。在某些实施例中,与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。在某些实施例中,该初始剂量是结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的第一剂量。在某些实施例中,该初始剂量是结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的多个剂量中的任何剂量。

[0011] 在另一方面,本文描述了白血病抑制因子(LIF)结合抗体或其片段,其中该LIF结合抗体或其片段包括:免疫球蛋白重链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;和免疫球蛋白轻链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,该LIF结合抗体或其片段包括:免疫球蛋白重链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约95%相同的氨基酸序列;和免疫球蛋白轻链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约95%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,该LIF结合抗体或其片段包括:免疫球蛋白重链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列相同的氨基酸序列;和免疫球蛋白轻链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同的氨基酸序列。在一些实施例中,该LIF结合抗体的用途是用于定量LIF的体外测定。在一些实施例中,该LIF结合抗体偶联至可检测部分。在一些实施例中,该可检测部分产生化学信号、电化学信号、发光信号或荧光信号。在一些实施例中,该可检测部分产生电化学信号。

[0012] 在一些方面,本文描述的包含白血病抑制因子(LIF)复合物,该复合物包含:LIF、与LIF特异性结合的LIF捕获抗体、与LIF特异性结合的LIF检测抗体、以及任选地与LIF特异性结合的LIF治疗性抗体,其中该LIF检测抗体或该LIF捕获抗体包括A4或其LIF结合片段。在某些实施例中,该LIF捕获抗体或该LIF检测抗体不竞争与该LIF治疗性抗体的结合。在某些实施例中,该LIF治疗性抗体包括:免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,

该LIF治疗性抗体包括：免疫球蛋白重链可变区 (VH) 序列，其具有与SEQ ID NO:14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列；以及免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 序列，其具有与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中，该LIF治疗性抗体包括：免疫球蛋白重链序列，其具有与SEQ ID NO:30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列；以及免疫球蛋白轻链序列，其具有与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中，该LIF捕获抗体偶联至表面，其中该表面包含导电物质，或其中该导电物质是电极。在某些实施例中，该LIF检测抗体偶联至可检测部分，其中该可检测部分产生化学信号、电化学信号、发光信号或荧光信号，或其中该可检测部分产生电化学信号在某些实施例中，该LIF检测抗体和该LIF捕获抗体不结合至LIF的在物理上与gp130相互作用的区域。在某些实施例中，该LIF捕获抗体或该LIF检测抗体包括：免疫球蛋白重链可变区序列，其具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列；以及免疫球蛋白轻链可变区序列，其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中，该复合物包含在多孔板的至少一个孔中，其中该复合物包含在96孔板、384孔板或1536孔板的至少一个孔中，或其中该复合物可以每毫升1纳克的水平检测到。

[0013] 在另一方面，本文描述的包括一种定量来自个体的包含白血病抑制因子 (LIF) 的样品中的LIF的方法，其包括：使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的捕获抗体接触；使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的检测抗体接触；检测该样品中与该捕获抗体和该检测抗体结合的LIF；其中该LIF检测抗体或该LIF捕获抗体包括A4或其LIF结合片段。在一些实施例中，该个体已经用LIF治疗性抗体治疗。在一些实施例中，该LIF治疗性抗体包括：免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1)，其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列；免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2)，其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列；免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3)，其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列；免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1)，其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列；免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2)，其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列；以及免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3)，其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在一些实施例中，该LIF治疗性抗体包括：免疫球蛋白重链可变区 (VH) 序列，其具有与SEQ ID NO:14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列；以及免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 序列，其具有与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中，该LIF治疗性抗体包括：免疫球蛋白重链序列，其具有与SEQ ID NO:30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列；以及免疫球蛋白轻链序列，其具有与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中，该LIF捕获抗体偶联至表面，其中该表面包含导电物质，或其中该导电物质是电极。在某些实施例中，该LIF检测抗体偶联至可检测部分，其中该可检测部分产

生化学信号、电化学信号、发光信号或荧光信号,或其中该可检测部分产生电化学信号。在一些实施例中,该LIF捕获抗体和该LIF检测抗体不结合至LIF的在物理上与gp130相互作用的区域。在一些实施例中,该LIF捕获抗体或该LIF检测抗体包括:免疫球蛋白重链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及免疫球蛋白轻链可变区序列,其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,该包含LIF的样品包含在多孔板的至少一个孔中,或其中该包含LIF的样品包含在96孔板、384孔板或1536孔板的至少一个孔中。

[0014] 在另一方面,本文描述的包含白血病抑制因子(LIF)结合抗体或其片段,其中该LIF结合抗体或其片段包括:免疫球蛋白重链可变区,该免疫球蛋白重链可变区具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;和免疫球蛋白轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,该免疫球蛋白重链可变区包括与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约95%相同的氨基酸序列;并且该免疫球蛋白轻链可变区包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约95%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,该免疫球蛋白重链可变区包括SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列;并且该免疫球蛋白轻链可变区包括SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列。在一些实施例中,该LIF结合抗体偶联至可检测部分,其中该可检测部分产生化学信号、电化学信号、发光信号或荧光信号,或其中该可检测部分产生电化学信号。在一些实施例中,该LIF结合抗体与LIF特异性结合。

附图说明

[0015] 图1描绘了蛋白质印迹,其示出了不同抗LIF人源化抗体对LIF诱导的STAT3磷酸化的抑制。

[0016] 图2A和2B描绘了蛋白质印迹,其示出了人源化和亲本5D8抗体对LIF诱导的STAT3磷酸化的抑制。

[0017] 图3A示出了使用h5D8抗体在U-251细胞中抑制LIF的 IC_{50} 。

[0018] 图3B示出了在内源性LIF刺激条件下对pSTAT3的r5D8和h5D8抑制的代表性 IC_{50} 剂量反应曲线。示出的是代表性曲线($n=1$ h5D8, $n=2$ r5D8)。

[0019] 图4描绘了蛋白质印迹,其示出了本披露中描述的不同单克隆抗体对LIF诱导的STAT3磷酸化的抑制。

[0020] 图5描绘了来自人类患者的多形性胶质母细胞瘤(GBM)、NSCLC(非小细胞肺癌)、卵巢癌、结肠直肠癌肿瘤,和胰腺肿瘤中LIF表达的免疫组织化学染色和定量。条代表平均值 $\pm$ SEM。

[0021] 图6是示出使用人源化5D8抗体在非小细胞肺癌小鼠模型中进行的实验的图。

[0022] 图7A示出了r5D8对GBM原位小鼠模型中U251细胞的抑制作用。示出第26天的定量。

[0023] 图7B示出了来自小鼠的数据,该小鼠接种了表达萤光素酶的人U251 GBM细胞,然后每周两次用100、200或300 μ g的h5D8或媒介物治疗。在第7天通过生物发光(精诺真公司(Xenogen) IVIS光谱)确定肿瘤大小。该图示出了个体肿瘤测量,水平条表示平均值 $\pm$ SEM。使用未配对的非参数Mann-Whitney U检验计算统计显著性。

- [0024] 图8A示出了在同系小鼠模型中r5D8对卵巢癌细胞生长的抑制作用。
- [0025] 图8B示出了在第25天的个体肿瘤测量。
- [0026] 图8C展示了当以每周两次200 μ g/小鼠施用r5D8时, h5D8示出了肿瘤生长的显著降低 ($p < 0.05$)。符号为平均值+SEM, 与媒介物相比的统计学显著性 (使用未配对的非参数Mann-Whitney U检验)。
- [0027] 图9A示出了在同系小鼠模型中r5D8对结肠直肠癌细胞生长的抑制作用。
- [0028] 图9B示出了在第17天的个体肿瘤测量。
- [0029] 图10A示出了GBM原位小鼠模型中巨噬细胞向肿瘤部位浸润的减少, 具有代表性图像和CCL22+细胞的定量。
- [0030] 图10B示出了人类器官型组织切片培养模型中巨噬细胞浸润的减少。示出的是代表性图像(左)和定量(右)。
- [0031] 图10C示出了卵巢癌同系小鼠模型中巨噬细胞向肿瘤部位浸润的减少, 具有代表性图像和CCL22+细胞的定量。
- [0032] 图10D示出了结肠直肠癌同系小鼠模型中巨噬细胞向肿瘤部位浸润的减少, 具有代表性图像和CCL22+细胞的定量。
- [0033] 图11A示出了在用r5D8治疗后卵巢癌同系小鼠模型中非骨髓效应细胞的增加。
- [0034] 图11B示出了在用r5D8治疗后结肠直肠癌同系小鼠模型中非骨髓效应细胞的增加。
- [0035] 图11C示出了在用r5D8治疗后NSCLC癌症小鼠模型中CD4+T_{REG}细胞的百分比降低。
- [0036] 图12示出了在存在或不存在抗CD4和抗CD8耗竭抗体的情况下腹膜内施用PBS (对照) 或r5D8每周两次治疗的携带CT26肿瘤的小鼠的数据。该图示出了在d13的个体肿瘤测量, 表示为平均肿瘤体积+SEM。组间的统计差异通过未配对的非参数Mann-Whitney U检验确定。R5D8抑制CT26肿瘤的生长 (* $p < 0.05$)。在存在抗CD4和抗CD8耗竭抗体的情况下, r5D8对肿瘤的生长抑制作用显著降低 (**** $p < 0.0001$)。
- [0037] 图13A展示了与LIF复合的h5D8 Fab的共晶体结构的概观。gp130相互作用位点映射在LIF的表面上 (深色阴影)。
- [0038] 图13B展示了LIF与h5D8之间的详细相互作用, 其示出了形成盐桥的残基和掩埋表面积大于100 $\text{\AA}^2$ 的h5D8残基。
- [0039] 图14A展示了五个h5D8 Fab晶体结构的叠加, 并且指示尽管在不同化学条件下结晶, 但高度相似。
- [0040] 图14B展示了由未配对的Cys100介导的范德华相互作用的广泛网络。该残基是有序的, 参加塑造HCDR1和HCDR3的构象, 并且不参与不希望的二硫键错配。残基之间的距离以虚线示出并标记。
- [0041] 图15A通过ELISA展示了h5D8 C100突变体与人LIF的结合。
- [0042] 图15B通过ELISA展示了h5D8 C100突变体与小鼠LIF的结合。
- [0043] 图16A通过Octet展示了h5D8不阻断LIF和LIFR之间的结合。h5D8与LIF的顺序结合, 随后进行LIFR。
- [0044] 图16B和16C展示了与固定的LIFR或gp130结合的LIF/mAb复合物的ELISA分析。物种特异性过氧化物酶缀合的抗IgG抗体的信号 (-) 和h5D8的抗人抗体, r5d8和B09的抗大鼠

抗体)检测结合固定的LIFR(图16B)或gp130(图16C)涂层板的mAb/LIF复合物的抗体部分。

[0045] 图17A和17B展示了72种不同的人类组织中LIF(图17A)或LIFR(图17B)的mRNA表达。

[0046] 图18示出了本文所述的总LIF测定的示意图。

[0047] 图19A示出了在宽浓度范围内的与治疗性抗体结合的总LIF的总LIF测定的信号检测曲线。

[0048] 图19B描绘了20pg/ml至1.25ng/ml与治疗抗体结合的总LIF的总LIF水平测定的信号检测曲线,其与被给予治疗性抗LIF抗体的患者的人血浆或血清中的总LIF的潜在水平范围重叠,但不限于此。

[0049] 图20A和20B示出了来自六个不同供体的人血清中20pg/ml至1.25ng/ml与治疗性抗体结合的总LIF的总LIF水平测定的均一性,单独地显示(图20A),重叠地显示(图20B)。

[0050] 图21示出,该总LIF测定在10ug/ml至810ug/ml的治疗性抗LIF mAb(h5D8)之间的浓度范围内是稳定的,该治疗性抗LIF mAb结合与LIF的gp130结合位点重叠的表位。

[0051] 图22A描绘了稀释剂的优化测试,这些稀释剂可能会减少一些血清样品中观察到的HAMA干扰。HAMA(人抗小鼠抗体)是与捕获和检测试剂发生交叉反应以产生假阳性信号或高背景的抗动物抗体。

[0052] 图22B示出了在测定开发的优化阶段,两种候选稀释剂的性能比较。

[0053] 图23示出了捕获抗体的不同点涂浓度的优化测试。

[0054] 图24示出了不同捕获抗体的优化测试。mAb1=兔单克隆A4抗体;mAb2=创意诊断公司(Creative Diagnostics);大鼠单克隆抗体,克隆JNH4008E21;目录号DCABH-3367;mAb3=嵌合兔/人A4抗体。

[0055] 图25A-D示出了与固定的LIFR或gp130结合的LIF/mAb复合物的ELISA分析。(图25A和25B)物种特异性过氧化物酶缀合的抗IgG抗体的信号,这些抗IgG抗体检测到了mAb/LIF复合物的与固定的LIFR(图25A)或gp130(图25B)涂覆的板结合的抗体部分。(图25C和25D)亲和素-HR的信号,该亲和素-HR检测到了mAb/Bt-LIF复合物的与固定的LIFR(图25C)或gp130(图25D)涂覆的板结合的Bt-LIF部分。[1C7结合LIFR并阻断LIF结合。28105结合gp130并阻断LIF结合。B09结合LIF的在LIFR和gp130结合位点之外的表位。

[0056] 图26A-C显示了三名受试者中相对于第1剂量的时间的LIF水平:受试者A(图26A)、受试者B(图26B)、受试者C(图26C)。

具体实施方式

[0057] 在一方面,本文描述的是白血病抑制因子(LIF)复合物,该复合物包含:LIF;与LIF特异性结合的LIF捕获抗体;与LIF特异性结合的LIF检测抗体;以及任选地与LIF特异性结合的LIF治疗性抗体。

[0058] 在另一方面,本文描述了一种定量来自个体的样品中的白血病抑制因子(LIF)的方法,其包括:(a)使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的捕获抗体接触;(b)使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的检测抗体接触;以及(c)检测该样品中与该捕获抗体和该检测抗体结合的LIF。

[0059] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括:(a)向该

个体施用初始剂量的结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体; (b) 确定来自该患有癌症的个体的样品中的白血病抑制因子 (LIF) 的治疗后水平。

[0060] 在另一方面, 本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法, 该方法包括: (a) 向该个体施用包含结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体的初始剂量; (b) 接收来自该患有癌症的个体的样品中的白血病抑制因子 (LIF) 的治疗后水平。

[0061] 如本文所用, 术语“个体”、“受试者”和“患者”可互换使用, 且包括被诊断出或怀疑患有肿瘤、癌症或其他赘生物的人。

[0062] 如本文所用, 除非另有指示, 否则术语“抗体”包括抗体的抗原结合片段, 即, 保留与全长抗体结合的抗原特异性结合能力的抗体片段, 例如, 保留一个或多个CDR区的片段。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段; 双抗体; 线性抗体; 重链抗体、单链抗体分子, 例如, 单链可变区片段(scFv)、纳米抗体和由具有不同特异性的抗体片段形成的多特异性抗体, 诸如双特异性抗体。在某些实施例中, 以降低个体对该抗体的免疫反应的方式将这些抗体人源化。例如, 该抗体可以是嵌合的, 例如, 具有人恒定区的非人可变区, 或CDR移植的, 例如, 具有人恒定区和可变区框架序列的非人CDR区。在某些实施例中, 人源化后抗体是去免疫化的。去免疫化涉及去除或使该抗体恒定区中的一个或多个T细胞表位突变。在某些实施例中, 本文所述的抗体是单克隆的。如本文所用, “重组抗体”是包括衍生自两种不同物种或两种不同来源的氨基酸序列的抗体, 并且包括合成分子, 例如, 包括非人CDR和人框架或恒定区的抗体。在某些实施例中, 本发明的重组抗体由重组DNA分子产生或合成。术语“癌症”和“肿瘤”涉及以细胞生长失调为特征的哺乳动物的生理状况。癌症是一类疾病, 其中一组细胞显示不受控制的生长或不想要的生长。癌细胞也可以扩散到其他位置, 这可能导致转移的形成。癌细胞在体内的扩散可以例如通过淋巴或血液发生。不受控制的生长、侵袭和转移形成也被称为癌症的恶性特性。这些恶性特性使癌症与良性肿瘤区分开来, 良性肿瘤典型地不会侵袭或转移。

[0063] 如本文所用, “治疗性抗体”是施用给个体的抗体, 并且旨在产生可用于治疗癌症的一种或多种有益作用。本披露的治疗性抗体包括具有与h5D8相同的CDR序列或不同于h5D8的CDR但具有相似结合特性(表位、亲和力、或生物学效应)并可以产生可用于治疗癌症的一种或多种有益作用的抗体。

[0064] 如本文所用, “参考水平”是指在生物样品中检测到的LIF蛋白水平, 其对应于如下LIF水平, 该LIF水平对应于和治疗性抗体与靶标(例如, LIF)接合一致的升高的水平。可以根据已治疗的个体群体定义参考水平, 并且该参考水平对应于指示该群体中50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%的个体中的最大靶标接合的水平。

[0065] 相对于参考多肽或抗体序列的序列同一性百分比(%)是候选序列中与参考多肽或抗体序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比, 在比对序列并引入缺口后, 必要时, 要获得最大的序列同一性百分比, 并且不考虑将任何保守取代作为序列同一性的一部分。为了确定氨基酸序列同一性百分数的目的的比对可以通过已知的各种方式来实现, 例如, 使用公开可用的计算机软件, 诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。能够确定用于比对序列的合适参数, 包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的算法。然而, 出于本文的目的, 使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列比较计算机程序由基因泰克公司(Genentech, Inc.)编写, 源代码已与用户文

档一起归档在华盛顿特区20559的美国版权局中,其中在美国版权注册号TXU510087下进行了注册。该ALIGN-2程序可从加利福尼亚南旧金山的基因泰克公司公开获得,或可以从源代码中进行编译。该ALIGN-2程序应编译为在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置,并且没有变化。

[0066] 在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A对/与/相对于给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性% (替代性地这可以用短语表示为对/与/相对于给定氨基酸序列B具有或包含特定%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A) 计算如下:100乘以分数X/Y,其中X是在A和B的程序比对中通过序列比对程序ALIGN-2评定为相同匹配的氨基酸残基数,其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的%氨基酸序列同一性将不等于B与A的%氨基酸序列同一性。除非另外特别说明,否则本文使用的所有%氨基酸序列一致性值都是使用ALIGN-2计算机程序如刚才前一段所述获得的。

[0067] 术语“表位”包括能够被抗原结合蛋白诸如抗体结合的任何决定簇。表位是由靶向该抗原的抗原结合蛋白结合的抗原区,并且当抗原是蛋白质时,表位包括直接接触抗原结合蛋白的特定氨基酸。表位最常位于蛋白质上,但在一些情况下可以位于其他种类的分子(诸如糖或脂质)上。表位决定簇可以包括分子的化学活性表面基团,诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基基团,且可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。通常,对特定靶抗原具有特异性的抗体将优先识别蛋白和/或大分子的复杂混合物中靶抗原上的表位。

[0068] 本文所述抗体的结构属性

[0069] 互补决定区(“CDR”)是免疫球蛋白(抗体)可变区的一部分,其主要负责抗体的抗原结合特异性。即使抗体特异性结合相同的靶点或表位,CDR区也从一个抗体到另一个抗体高度可变。重链可变区包括三个CDR区,缩写为VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3;轻链可变区包括三个CDR区,缩写为VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3。这些CDR区在可变区中连续排列,其中CDR1是最N末端,而CDR3是最C末端。散布在CDR之间的是框架区,其有助于结构并且显示出比CDR区少得多的可变性。重链可变区包括四个框架区,缩写为VH-FR1、VH-FR2、VH-FR3和VH-FR4;轻链可变区包括四个框架区,缩写为VL-FR1、VL-FR2、VL-FR3和VL-FR4。包括两条重链和轻链的完整的全尺寸二价抗体将包括:12个CDR,其具有三个独特的重链CDR和三个独特的轻链CDR;16个FR区,其具有四个独特的重链FR区和四个独特的轻链FR区。在某些实施例中,本文所述的抗体最少包括三个重链CDR。在某些实施例中,本文所述的抗体最少包括三个轻链CDR。在某些实施例中,本文所述的抗体最少包括三个重链CDR和三个轻链CDR。给定的CDR或FR的精确氨基酸序列边界可以使用许多众所周知的方案中的任何一个来容易地确定,包括Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],”第5版美国马里兰州贝塞斯达市国立卫生研究院公共卫生服务(“卡巴特(Kabat)”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“乔西亚(Chothia)”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography[抗体-抗原相互作用:接触分析和结合位点拓扑图]”(“接触”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor

variable domains and Ig superfamily V-like domains[IMGT独特的免疫球蛋白和T细胞受体可变结构域和Ig超家族V样结构域编码],”Dev Comp Immunol[发育与比较免疫学], 2003年1月;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);以及Honegger A和Plückthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool[免疫球蛋白可变结构域的又另一种编号方案:自动建模和分析工具],”J Mol Biol[分子生物学杂志], 2001年6月8日;309(3):657-70(“Aho”编号方案)所述的那些。本文从使用不同编号系统提供的可变序列中鉴定出CDR,本文中使用的卡巴特、IMGT、乔西亚编号系统或这三种的任何组合。给定CDR或FR的边界可能会有所不同,取决于用于鉴定的方案。例如,卡巴特方案基于结构比对,而乔西亚方案基于结构信息。卡巴特和乔西亚方案的编号均基于最常见的抗体区序列长度,通过插入字母(例如“30a”)进行插入,并且一些抗体中显现缺失。这两种方案将某些插入和缺失(“indel”)放在不同的位置,从而产生不同的编号。接触方案基于复杂晶体结构的分析,并且在许多方面与乔西亚编号方案相似。

[0070] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的结构域,其涉及抗体与抗原的结合。天然抗体的重链和轻链(分别为VH和VL)的可变结构域通常具有相似的结构,每个结构域包括四个保守框架区(FR)和三个CDR(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology[Kuby免疫学],第六版,W.H.Freeman and Co.[W.H.弗里曼公司],第91页(2007))。单个VH或VL结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用VH或VL结构域从结合抗原的抗体中分离结合特定抗原的抗体,以分别筛选互补的VL或VH结构域的文库(参见例如,Portolano等人,J.Immunol.[免疫学杂志]150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature[自然]352:624-628(1991))。在某些实施例中,本文所述的抗体包括大鼠来源的可变区。在某些实施例中,本文所述的抗体包括大鼠来源的CDR。在某些实施例中,本文所述的抗体包括小鼠来源的可变区。在某些实施例中,本文所述的抗体包括小鼠来源的CDR。

[0071] 可以在CDR中进行改变(例如,取代),例如以改善抗体亲和力。可以在体细胞成熟过程中以高突变率在CDR编码密码子中进行此类改变(参见,例如,Chowdhury,Methods Mol.Biol.[分子生物学方法]207:179-196(2008)),并且可以测试所得变体的结合亲和力。亲和力成熟(例如,使用易错PCR、链改组、CDR随机化或寡核苷酸定向诱变)可用于改善抗体亲和力(参见例如Hoogenboom等人Methods in Molecular Biology[分子生物学方法]178:1-37(2001))。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性地鉴定涉及抗原结合的CDR残基(参见例如Cunningham和Wells Science[科学],244:1081-1085(1989))。CDR-H3和CDR-L3特别是通常靶向的。替代性地或另外地,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定该抗体和抗原之间的接触点。可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基作为取代候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有所需的性质。

[0072] 在某些实施例中,本文描述的抗体包括选自SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42中任一个或多个的CDR。在某些实施例中,使用卡巴特、IMGT、乔西亚编号系统或这三种的任何组合从该序列中选择CDR。给定CDR或FR的边界可能会有所不同,取决于用于鉴定的方案。

[0073] 在某些实施例中,本文所述的抗体除可变区外还包括恒定区。该重链恒定区(C_H)包括四个结构域,缩写为 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和 C_{H4} ,位于完整重链多肽的C末端,即可变区的C末端。该轻链恒定区(C_L)比该 C_H 小得多,且位于完整轻链多肽的C末端,即可变区的C末端。该恒定

区是高度保守的,且包括与稍微不同的功能和特性相关的不同同种型。在某些实施例中,该恒定区对于结合靶抗原的抗体是可有可无的。在某些实施例中,该抗体的恒定区、重链和轻链对于抗体结合都是可有可无的。在某些实施例中,本文所述的抗体缺少轻链恒定区、重链恒定区或两者中的一个或多个。大多数单克隆抗体为IgG同种型;进一步分为四个亚类IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。在某些实施例中,本文所述的抗体包括任何IgG亚类。在某些实施例中,该IgG亚类包括IgG₁。在某些实施例中,该IgG亚类包括IgG₂。在某些实施例中,该IgG亚类包括IgG₃。在某些实施例中,该IgG亚类包括IgG₄。

[0074] 抗体包括负责与补体和Fc受体结合的片段可结晶区(Fc区)。该Fc区包括该抗体分子的C_H2、C_H3和C_H4区。抗体的Fc区负责活化补体和抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。该Fc区也有助于抗体的血清半衰期。在某些实施例中,本文所述的治疗性抗体的Fc区包括促进补体介导的细胞裂解的一个或多个氨基酸取代。在某些实施例中,本文所述的治疗性抗体的Fc区包括促进ADCC的一个或多个氨基酸取代。在某些实施例中,本文所述的治疗性抗体的Fc区包括减少补体介导的细胞裂解的一个或多个氨基酸取代。在某些实施例中,本文所述的治疗性抗体的Fc区包括增加该抗体与Fc受体的结合的一个或多个氨基酸取代。在某些实施例中,该Fc受体包括Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32)、Fc γ RIIB (CD16a)、Fc γ RIIB (CD16b)或其任何组合。在某些实施例中,本文描述的治疗性抗体的Fc区包括一个或多个氨基酸取代,其增加了该抗体的血清半衰期。在某些实施例中,增加该治疗性抗体的血清半衰期的一个或多个氨基酸取代增加了该抗体对新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力。

[0075] 在临床上有用的抗体通常被“人源化”以降低人类个体的免疫原性。人源化抗体改善了单克隆抗体治疗的安全性和功效。一种人源化的常用方法是在任何合适的动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠)中产生单克隆抗体,并用人恒定区代替恒定区,以此方式改造的抗体称为“嵌合的”。另一种常见的方法是“CDR移植”,其用人V-FR代替非人V-FR。在CDR移植方法中,除CDR区外的所有残基都是人源的。在某些实施例中,本文所述的抗体是人源化的。在某些实施例中,本文所述的抗体是嵌合的。在某些实施例中,本文所述的抗体是CDR移植的。

[0076] 确定总LIF水平的方法

[0077] 在未结合状态下,大多数可溶性细胞因子在血液中的半衰期较短,从而导致稳态下的低水平。但是,当被抗体结合时,该半衰期会增加,从而导致更高的稳态水平。测定患者样品中总LIF的水平可用于定义外周靶标接合(例如,治疗性抗LIF抗体对LIF的结合),并告知另外剂量的结合LIF的治疗性抗体。因此,本文描述的方法可用于确定一个或多个剂量的结合LIF的治疗性抗体后对治疗产生反应的个体中的LIF水平。该方法可用于确定对治疗的反应,并用于调整后续治疗。在某些实施例中,可以在用LIF治疗性抗体治疗之前确定LIF的水平以用作基线LIF水平,其中预期治疗增加该患者中的LIF水平。在某些实施例中,没有获得基线,并且可以基于LIF的绝对水平进行治疗改良。

[0078] 本文所述的LIF测定测量被治疗性抗体结合和未结合的LIF,从而确定总LIF水平。如图18所示,该测定形成了包含被捕获抗体1802结合的LIF 1801的分子复合物1800,该捕获抗体被固定在表面1804上,该表面任选地包含导电物质1805,从而可以测量该检测抗体产生的电信号。然后添加检测抗体1806。该检测抗体可以直接或间接偶联至可检测部分。在该复合物中,治疗性抗体1803可与LIF 1801结合。由于捕获抗体1802和检测抗体1806结合到LIF分子的不同部分,因此该测定测量总LIF,无论是被治疗性抗体结合的或未结合的。为

了当前测定的目的,该治疗性抗体是具有5D8的CDR残基或具有与具有5D8 CDR的抗体相似的结合区的抗体。该测定还与结合LIF的相同或基本相同部分的其他治疗性抗体相容。本文详细描述了LIF的被具有5D8 CDR的抗体结合的区域。尽管本文中被5D8结合的残基由晶体结构确定,但与5D8竞争结合的任何抗体都可以用作治疗性抗体,只要该治疗性抗体不与该捕获抗体或检测抗体竞争结合即可。此外,与5D8相比,任何给定的治疗性抗体在被结合的LIF氨基酸残基上可能会略有不同,使得该5D8表位的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或更多个残基可能被结合。

[0079] 进行该测定的一般步骤包括:1) 将捕获抗体吸附或缀合至底物;2) 将该缀合有捕获抗体的底物与包含LIF的生物学样品一起孵育;3) 孵育与LIF检测抗体形成的捕获抗体-LIF复合物;并且4) 测量由该检测抗体产生的信号。然后可以通过与已知LIF浓度的标准曲线比较来定量LIF水平。确切的孵育参数是可变的,但通常范围为在室温下30分钟至120分钟,或在4℃下2小时至过夜,尽管更长的孵育时间与该测定相容。在一些实施例中,孵育参数的范围可以是在37℃下1分钟至30分钟,在室温下1分钟至30分钟,在室温下120分钟至240分钟,在4℃下30分钟至2小时或在4℃下8小时至24小时。可以在任何步骤之后添加洗涤步骤,以去除过量的未结合抗体或血浆/血清组分。在某些实施例中,洗涤缓冲液包含降低非特异性结合的洗涤剂或盐浓度。在某些实施例中,取决于可检测部分,该测量步骤可以包括其他步骤:添加底物以使可检测部分转化为可检测信号。

[0080] 在某些实施例中,该LIF捕获抗体偶联至表面。在某些实施例中,该表面包括导电物质。在某些实施例中,该导电物质是电极。在某些实施例中,该表面是底物。在一些实施例中,该底物衍生自天然来源。在一些实施例中,该底物是合成的。在一些实施例中,衍生自天然来源的底物是细胞外基质(“ECM”)。在一些实施例中,该ECM包括胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白或其组合。在一些实施例中,该ECM包括水凝胶。在某些实施例中,该合成底物包括聚-L-赖氨酸。

[0081] 本文描述的测定可以在从用治疗性抗体治疗或将要用治疗性抗体治疗的个体收集的各种类型的生物学样品上进行。该生物学样品可以是组织样品、肿瘤活检样品、血液样品或尿液样品。在某些实施例中,该样品是血液样品。在某些实施例中,该样品是血浆样品。在某些实施例中,该样品是血清样品。可以在添加到该测定之前稀释该样品。

[0082] 本文所述的测定可用于确定个体对治疗性抗体治疗的反应。可以对来自在已经施用治疗性抗体之前、已经施用治疗性抗体之后或者已经施用治疗性抗体之前和之后的个体的生物学样品进行该测定。该测定可以在初始剂量的结合白血病抑制因子(LIF)的抗体之前进行。该测定可以在初始剂量的结合白血病抑制因子(LIF)的抗体之后进行。可以在初始剂量的结合LIF的抗体后进行该测定。在某些实施例中,LIF的初始剂量后水平从LIF的初始剂量前水平增加2倍或更少。在某些实施例中,LIF的初始剂量后水平从LIF的初始剂量前水平增加2倍至10倍。在某些实施例中,LIF的初始剂量后水平从LIF的初始剂量前水平增加2倍至3倍、2倍至4倍、2倍至5倍、2倍至6倍、2倍至7倍、2倍至8倍、2倍至9倍、2倍至10倍、3倍至4倍、3倍至5倍、3倍至6倍、3倍至7倍、3倍至8倍、3倍至9倍、3倍至10倍、4倍至5倍、4倍至6倍、4倍至7倍、4倍至8倍、4倍至9倍、4倍至10倍、5倍至6倍、5倍至7倍、5倍至8倍、5倍至9倍、5倍至10倍、6倍至7倍、6倍至8倍、6倍至9倍、6倍至10倍、7倍至8倍、7倍至9倍、7倍至10倍、8倍至9倍、8倍至10倍或9倍至10倍。在某些实施例中,LIF的初始剂量后水平从LIF的初始剂量前

水平增加2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在某些实施例中，LIF的初始剂量后水平从LIF的初始剂量前水平增加至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍。在某些实施例中，LIF的初始剂量后水平从LIF的初始剂量前水平增加至多3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

[0083] 如果在治疗后进行该测定，并且与治疗前样品相比或与参考水平相比未观察到LIF水平增加，则可以按更高量或更短时间表施用后续剂量。在某些实施例中，如果在生物学样品中检测到的LIF的量小于约100、200、300、400、500、600、700、800、900pg/mL，或小于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90或100ng/mL，则可以施用与先前的剂量相比增加了量的后续剂量。在某些实施例中，如果在生物学样品中检测到的LIF的量小于约5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100ng/mL，则可以按与先前的剂量相比更短的时间表施用后续剂量。在某些实施例中，如果在生物学样品中检测到的LIF的量小于约1、2、3、4、5、6、7、8或9ng/mL，则可以施用与先前的剂量相比增加了量的后续剂量。在某些实施例中，如果在生物学样品中检测到的LIF的量小于约1、2、3、4、5、6、7、8或9ng/mL，则可以按与先前的剂量相比更短的时间表施用后续剂量。

[0084] 在某些实施例中，如果与先前的剂量之前或没有给药时观察到的水平相比，在生物学样品中检测到的LIF增加小于约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍，则可以施用与先前的剂量相比增加了量的后续剂量。在某些实施例中，如果与先前的剂量之前或没有给药时观察到的水平相比，在生物学样品中检测到的LIF增加小于约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍，则可以按与先前的剂量相比更短的时间表施用后续剂量。

[0085] 捕获抗体和检测抗体

[0086] 当固定在固体支持物上时，本披露的捕获抗体是有用的，并且特异性结合LIF的表位或区域，该表位或区域不同于检测抗体和/或治疗性抗体。该固体支持物可以是板、柱、树脂或溶液中的珠。合适的板包括可立即用于测定若干个样品的那种孔板，如96孔板、384孔板或1,536孔板。普通板包括聚苯乙烯板（例如，中或高粘合性聚苯乙烯）。在一些实施例中，该固体支持物是分析蛋白阵列，诸如抗体阵列，其中该捕获抗体被列阵。也可以使用包含蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、胺偶联树脂或巯基偶联树脂的树脂或柱基质。珠可以是琼脂糖珠或磁性珠，其具有可以通过重力、离心或磁场分离的大小。可以使用包含蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、胺基（用于偶联）或巯基（用于取代）的珠。当固定在固体支持物上时，至少一部分捕获抗体被固定，从而该抗体可以通过Fab结合LIF，并在与适当标记的检测抗体配对时产生信号。抗体的附接可以通过共价相互作用，如硫醇交联、N-氧基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺和酰肼基；或非共价相互作用，如链霉亲和素-生物素偶联、被动吸收或亲和相互作用。在某些实施例中，该固体支持物包括能够诱导电化学信号的导电物质（例如，MSD板；中尺度诊断公司（Meso Scale Diagnostics）；马里兰州罗克维尔；目录号L15XA-3）。可以配置固体支持物，使得可以通过使用自动化系统如洗板机或流体装置如注射泵、蠕动装置或微流体装置来施加样品、检测抗体和洗涤液的添加。

[0087] 当能够结合不同于捕获抗体和/或治疗性抗体的LIF表位或区域时，本发明的检测抗体是有用的。该检测抗体可以是能够被标记的第二抗体特异性结合的未修饰的抗体。该检测抗体可以与可检测部分偶联，这意味着该可检测部分与该抗体共价偶联，或通过小分

子亲和相互作用偶联(例如生物素-链霉亲和素)。该检测抗体可以是被小分子标记的抗体,该小分子能够被能够结合该小分子的经标记分子特异性结合。例如,该检测抗体可以与生物素偶联,该生物素可以被与合适的可检测部分偶联的链霉亲和素结合。在一些实施例中,该检测抗体直接偶联至可检测部分。该检测抗体可以用酶、发光、化学发光、荧光、磷光、放射性或核酸标记部分标记。该酶标记部分包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶。荧光标记部分包括但不限于异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明、赫斯特、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、磺基罗丹明101酰氯(得克萨斯红)、藻红蛋白(PE)、别藻蓝蛋白(APC)、Alexa Flour系列染料及其组合。放射性标记部分包括但不限于 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{14}C 。核酸可检测部分可以是可通过扩增或测序定量的独特核酸序列(条形码)。电化学发光检测部分包括但不限于三-联吡啶钌(II)以及三-联吡啶钌(II)-(4-甲基磺酸盐)、三-联吡啶钌(II)(4-甲基磺酸酯),通过N-羟基琥珀酰亚胺酯缀合至抗体。

[0088] 抗体A4是可以在当前确定总LIF水平的方法中有用地部署的一种抗体。虽然示例用作捕获抗体,但是如果与不同的捕获抗体(例如,本披露的7C3)配对,该抗体也可用作检测抗体。该A4抗体是兔单克隆抗体。A4抗体不干扰h5D8的结合。在某些实施例中,本文描述的A4抗体是一种特异性结合LIF的抗体,其包括重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列相同的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同的氨基酸序列。A4抗体还涵盖A4抗体的CDR的用途,如通过本披露中的任何方法所详细定义的,其被工程化到其他框架区(例如,人源化、多聚化等);或与其他物种的恒定区配合的可变区(例如嵌合抗体)。另外地,可以使用与A4抗体结合相同或相似表位的抗体。E21是一种此类抗体,大鼠单克隆克隆JNH4008E21(创意诊断公司;雪丽(Shirley),纽约州)。E21结合与A4相似的表位,并且与本文所述的测定相容。

[0089] 可以在当前方法中有用地部署的另一种抗体是7C3抗体。7C3是小鼠单克隆抗体,克隆M017C3(生物传奇公司(BioLegend),圣地亚哥)。虽然示例用作检测抗体,但是如果与不同的检测抗体(例如,本披露的A4)配对,该抗体也可用作捕获抗体。7C3抗体还涵盖7C3抗体的CDR的用途,如通过本披露中的任何方法所详细定义的,其被工程化到其他框架区(例如,人源化、多聚化等);或与其他物种的恒定区配合的可变区(例如嵌合抗体)。另外地,可以使用与7C3抗体结合相同或相似表位的抗体。这些抗体包括在LIF的与LIF受体相互作用的区域中结合人LIF的那些抗体。一种此类抗体是B7抗体,兔单克隆抗体,由SEQ ID NO 43(重链可变区)和44(轻链可变区)所阐述。在某些实施例中,本文描述的B7抗体是一种特异性结合LIF的抗体,其包括重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:43所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;以及轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:44所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。另一种此类抗体是D7抗体,兔单克隆抗体,由SEQ ID NO 45(重链可变区)和46(轻链可变区)所阐述。在某些实施例中,本文描述的D7抗体是一种特异性结合LIF的抗体,其包括重链可变区,该重链可变区

包括与SEQ ID NO:45所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列;以及轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。

[0090] 本披露的检测抗体和捕获抗体的理想特征是,两种抗体都不相互干扰与LIF的结合,并且无论治疗性抗体(例如,h5D8)是否与LIF结合,每种抗体都可以结合LIF。在某些实施例中,该捕获抗体或检测抗体均不结合与被h5D8结合的表位重叠的表位。在某些实施例中,该捕获抗体或检测抗体均不结合在被h5D8结合的表位的5、10、15或20埃内的表位。在某些实施例中,该捕获抗体或检测抗体均不结合与该LIF共受体gp130相互作用的表位。

[0091] 本文描述的测定的一个优点是灵敏度。在健康个体中,LIF处于稳态时处于较低水平。在某些实施例中,该测定对血浆或血清中LIF的检测阈值为至少约20pg/ml(例如1pM)、30pg/mL、40pg/mL、50pg/mL、60pg/mL、70pg/mL、80pg/mL、90pg/mL或100pg/mL。本文所述测定的另一个优点是低内部可变性。在某些实施例中,该内部可变性小于约20%、15%、10%、5%、4%或3%。

[0092] 治疗性抗体

[0093] 本文所述的5D8抗体是由用编码人LIF的DNA免疫的大鼠产生的。该抗体的亲本大鼠形式称为r5D8,人源化形式称为h5D8。

[0094] 5D8

[0095] 本文所述的抗体是由用编码人LIF的DNA免疫的大鼠产生的。对一种这样的抗体(5D8)进行了克隆和测序,并且该抗体包括具有以下氨基酸序列的CDR(使用Kabat和IMGT CDR编号方法的组合):对应于SEQ ID NO:1(GFTFSHAWMH)的VH-CDR1、对应于SEQ ID NO:4(QIKAKSDDYATYYAESVKG)的VH-CDR2、对应于SEQ ID NO:6(TCWEWDLDF)的VH-CDR3、对应于SEQ ID NO:9(RSSQSLLDSDGHTYLN)的VL-CDR1、对应于SEQ ID NO:11(SVSNLES)的VL-CDR2以及对应于SEQ ID NO:13(MQATHAPPYT)的VL-CDR3。该抗体已通过CDR移植被人源化,且该人源化版本被称为h5D8。SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:19阐述了h5D8抗体的人源化可变区。

[0096] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括与SEQ ID NO:1(GFTFSHAWMH)所阐述的至少80%或90%相同的VH-CDR1、与SEQ ID NO:4(QIKAKSDDYATYYAESVKG)所阐述的至少80%、90%或95%相同的VH-CDR2以及与SEQ ID NO:6(TCWEWDLDF)所阐述的至少80%或90%相同的VH-CDR3。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括与SEQ ID NO:9(RSSQSLLDSDGHTYLN)所阐述的至少80%或90%相同的VL-CDR1、与SEQ ID NO:11(SVSNLES)所阐述的至少80%相同的VL-CDR2以及与SEQ ID NO:13(MQATHAPPYT)所阐述的至少80%或90%相同的VL-CDR3。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括SEQ ID NO:1(GFTFSHAWMH)所阐述的VH-CDR1、SEQ ID NO:4(QIKAKSDDYATYYAESVKG)所阐述的VH-CDR2、SEQ ID NO:6(TCWEWDLDF)所阐述的VH-CDR3、SEQ ID NO:9(RSSQSLLDSDGHTYLN)所阐述的VL-CDR1、SEQ ID NO:11(SVSNLES)所阐述的VL-CDR2以及SEQ ID NO:13(MQATHAPPYT)所阐述的VL-CDR3。在本披露的CDR的氨基酸序列中设想了某些保守氨基酸取代。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:1、4、6、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:1、4、6、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列

相差1、2、3或4个氨基酸,且不会对结合亲和力造成大于10%、20%或30%的影响。在某些实施例中,特异性结合LIF的抗体包括一个或多个人重链框架区。

[0097] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括与SEQ ID NO:1 (GFTFSHAWMH) 所阐述的至少80%或90%相同的VH-CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG) 所阐述的至少80%、90%或95%相同的VH-CDR2氨基酸序列、以及与SEQ ID NO:8 (TSWEWDLDF) 所阐述的至少80%或90%相同的VH-CDR3氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括与SEQ ID NO:9 (RSSQSLLDSDGHTYLN) 所阐述的至少80%或90%相同的VL-CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:11 (SVSNLES) 所阐述的至少80%相同的VL-CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:13 (MQATHAPPYT) 所阐述的至少80%或90%相同的VL-CDR3氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括SEQ ID NO:1 (GFTFSHAWMH) 所阐述的VH-CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG) 所阐述的VH-CDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:8 (TSWEWDLDF) 所阐述的VH-CDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:9 (RSSQSLLDSDGHTYLN) 所阐述的VL-CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:11 (SVSNLES) 所阐述的VL-CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:13 (MQATHAPPYT) 所阐述的VL-CDR3氨基酸序列。在本披露的CDR的氨基酸序列中设想了某些保守氨基酸取代。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:1、4、8、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:1、4、8、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸,且不会对结合亲和力造成大于10%、20%或30%的影响。

[0098] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括与SEQ ID NO:14、15或17中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括SEQ ID NO:14、15和17中任一项所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化轻链可变区,该人源化轻链可变区包括与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化轻链可变区,该人源化轻链可变区包括SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该抗体特异性结合人LIF。

[0099] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链可变区,该人源化轻链可变区包括与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链可变区,其包括SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列。

[0100] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链可变区,该人源

化轻链可变区包括与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链可变区,其包括SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列。

[0101] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括与SEQ ID NO:30-33中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括SEQ ID NO:30-33中任一项所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列。

[0102] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链,该人源化轻链包括与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括与SEQ ID NO:39所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链,该人源化轻链包括与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括SEQ ID NO:39所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列。

[0103] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合白血病抑制因子(LIF)的重组抗体,其包括:重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:3所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:7所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

[0104] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合白血病抑制因子(LIF)的重组抗体,其包括:重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:2所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:5所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:10所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:12所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在本披露的CDR的氨基酸序列中设想了某些保守氨基酸取代。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:2、5、6、10、12和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:2、5、6、10、12和13中任一项所阐述的氨基酸

序列相差1、2、3或4个氨基酸,且不会对结合亲和力造成大于10%、20%或30%的影响。

[0105] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合白血病抑制因子(LIF)的重组抗体,其包括:重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:3所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:7所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在本披露的CDR的氨基酸序列中设想了某些保守氨基酸取代。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:3、4、7、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:3、4、7、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸,且不会对结合亲和力造成大于10%、20%或30%的影响。

[0106] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括与SEQ ID NO:22-25中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括与SEQ ID NO:26-29中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括SEQ ID NO:22-25中任一项所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括SEQ ID NO:26-29中任一项所阐述的氨基酸序列。

[0107] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括与SEQ ID NO:23所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括SEQ ID NO:23所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括SEQ ID NO:27中任一项所阐述的氨基酸序列。

[0108] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括与SEQ ID NO:39所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的治疗性抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括SEQ ID NO:39所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括SEQ ID NO:27中任一项所阐述的氨基酸序列。

[0109] 由治疗上有用的LIF抗体结合的表位

[0110] 本文描述了人LIF的独特表位,其在被结合时抑制LIF的生物学活性(例如,STAT3磷酸化)且在体内抑制肿瘤生长,并且产生治疗作用。本披露的治疗性抗体可以是不包含h5D8的CDR但是结合至与h5D8相同或相似的表位(氨基酸残基)的治疗性抗体。相似的表位是在指定表位的范围内结合的表位。本文所述的表位由两个不连续的氨基酸片段(从人LIF的残基13到残基32和残基120到138)组成,它们存在于人LIF蛋白的两个不同拓扑域(α 螺旋A和C)。这种结合是弱(范德华力吸引)、中等(氢结合)和强(盐桥)相互作用的组合。在某些

实施例中,接触残基是LIF上的残基,其与抗LIF抗体上的残基形成氢键。在某些实施例中,接触残基是LIF上的残基,其与抗LIF抗体上的残基形成盐桥。在某些实施例中,接触残基是LIF上的残基,其与抗LIF抗体上的残基形成范德华力并在至少5、4或3埃之内。该治疗性抗体可以结合该表位,结合至该表位的较小形式,或与该表位重叠,并用于本文所述的测定中。

[0111] 在某些实施例中,本文描述的治疗性抗体是分离的抗体,其结合以下残基中的任何一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个:SEQ ID NO:40的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,本文描述了结合以下所有残基的分离的抗体:SEQ ID NO:40的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,本文描述了结合以下所有残基的分离的抗体:SEQ ID NO:40的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强或中等相互作用的残基。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强相互作用的残基。在某个实施例中,该抗体与LIF的螺旋A和C相互作用。在某个实施例中,该抗体阻断LIF与gp130的相互作用。

[0112] 治疗适应症

[0113] 在某些实施例中,本文披露的治疗性抗体抑制细胞中的LIF信号传导。在某些实施例中,用于在血清饥饿条件下在U-251细胞中生物抑制该抗体的 IC_{50} 小于或等于约100、75、50、40、30、20、10、5或1纳摩尔。在某些实施例中,用于在血清饥饿条件下在U-251细胞中生物抑制该抗体的 IC_{50} 小于或等于约900、800、700、600、500、400、300、200或100纳摩尔。

[0114] 在某些实施例中,本文披露的治疗性抗体可用于治疗表达LIF的肿瘤和癌症。在某些实施例中,已经将用本披露的抗体治疗的个体选择为具有LIF阳性肿瘤/癌症用于治疗。在某些实施例中,该肿瘤是LIF阳性或产生升高水平的LIF。在某些实施例中,与参考值或一组病理学标准相比,确定LIF阳性。在某些实施例中,LIF阳性肿瘤表达衍生该肿瘤的非转化细胞的2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或更多的LIF。在某些实施例中,该肿瘤已获得LIF的异位表达。LIF阳性肿瘤可以使用例如抗LIF抗体的免疫组织化学在组织学上确定;通过常用的分子生物学方法,诸如像通过实时PCR或RNA-seq进行mRNA定量;或者例如,通过蛋白质印迹、流式细胞术、ELISA或同质蛋白质定量测定(例如,AlphaLISA[®])进行蛋白质定量。在某些实施例中,该抗体可用于治疗诊断为癌症的患者。在某些实施例中,该癌症包括一种或多种癌症干细胞,或者是一种或多种癌症干细胞。

[0115] 在某些实施例中,本文披露的抗体可用于治疗表达LIF受体(CD118)的癌症中的肿瘤。LIF受体阳性肿瘤可以通过组织病理学或流式细胞术确定,并且在某些实施例中,其包括以同种型对照的2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多结合LIF受体抗体的细胞。在某些实施例中,该肿瘤已经获得了该LIF受体的异位表达。在某个实施例中,该癌症是癌症干细胞。在某个实施例中,可以使用抗LIF和抗LIF抗体通过免疫组织化学来确定LIF阳性肿瘤或癌症。在某个实施例中,通过IHC分析确定LIF阳性肿瘤,其中LIF水平在肿瘤的前10%、20%、30%、40%或前50%中。

[0116] 在某些实施例中,该癌症包括乳腺、心脏、肺、小肠、结肠、脾脏、肾脏、膀胱、头、颈、卵巢、前列腺、脑、胰腺、皮肤、骨、骨髓、血液、胸腺、子宫、睾丸和肝肿瘤。在某些实施例中,可以用本发明的抗体治疗的肿瘤包括腺瘤、腺癌、血管肉瘤、星形细胞瘤、上皮癌、生殖细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、血管内皮瘤、血管肉瘤、血肿、肝母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤和/或畸胎瘤。在某些实施例中,该肿瘤/癌症选自以下的组:肢端雀斑痣性黑色素瘤、光化性角化病、腺癌、腺样囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鳞癌、星形细胞肿瘤、巴氏腺癌、基底细胞癌、支气管腺癌、毛细管类癌、癌、癌肉瘤、胆管癌、软骨肉瘤、囊腺瘤、皮内窦瘤、子宫内膜增生、子宫内膜间质肉瘤、子宫内膜样腺癌、室间隔肉瘤、尤文肉瘤、局灶性结节性增生、胃腺瘤、生殖细胞系肿瘤、胶质母细胞瘤、胰高血糖素瘤、成血管细胞瘤、血管内皮瘤、血管瘤、肝腺瘤、肝脏腺癌、肝细胞癌、胰岛素瘤(insulinoma)、上皮内瘤变、上皮内鳞状细胞瘤变、浸润性鳞状细胞癌、大细胞癌、脂肪肉瘤、肺癌、淋巴母细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、平滑肌肉瘤、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、恶性间皮瘤、神经鞘瘤、髓母细胞瘤、髓上皮瘤、间皮瘤、粘液表皮样癌、髓性白血病、神经母细胞瘤、神经上皮腺癌、结节性黑色素瘤、骨肉瘤、卵巢癌、乳头浆液性腺瘤、垂体瘤、浆细胞瘤、假肉瘤、前列腺癌、肺母细胞瘤、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、浆液性癌、鳞状细胞癌、小细胞癌、软组织癌、生长抑素分泌性肿瘤、鳞状癌、鳞状细胞癌、未分化癌、葡萄膜黑色素瘤、疣状癌、阴道/外阴癌、血管活性肠肽瘤(VIPoma)和威尔姆氏瘤(Wilm's tumor)。在某些实施例中,要用一种或多种本发明的抗体治疗的肿瘤/癌症包括脑癌、头颈癌、结肠直肠癌、急性髓性白血病、前B细胞急性淋巴母细胞性白血病、膀胱癌、星形细胞瘤(优选II、III或IV级星形细胞瘤)、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、小细胞癌和非小细胞癌(优选非小细胞肺癌)、肺腺癌、转移性黑色素瘤、非雄激素依赖性转移性前列腺癌、雄激素依赖性转移性前列腺癌、前列腺腺癌和乳腺癌(优选乳腺导管癌和/或乳腺癌)。在某些实施例中,用本披露的抗体治疗的癌症包括胶质母细胞瘤。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括胰腺癌。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括卵巢癌。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括肺癌。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括前列腺癌。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括结肠癌。在某些实施例中,所治疗的癌症包括胶质母细胞瘤、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌或肺癌。在某个实施例中,该癌症对其他治疗是难治的。在某个实施例中,该治疗的癌症是复发的。在某个实施例中,该癌症是复发/难治性胶质母细胞瘤、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌或肺癌。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤或软组织癌。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌、上皮性卵巢癌或胰腺腺癌。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤。在某些实施例中,该癌症包括阑尾癌、直肠癌、转移性混合样脂质肉瘤(metastatic mixoid liposarcoma)和副神经节瘤。

[0117] 治疗方法

[0118] 在某些实施例中,这些治疗性抗体可以通过适合于施用含抗体的药物组合物的任何途径来施用,诸如像皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、肿瘤内或脑内等。在某些实例中,静脉内施用这些抗体。在某些实施例中,以合适的剂量时间表,例如每周、每周两次、每月、每月

两次等施用该抗体。在某些实施例中，每三周一次施用该抗体。可以任何治疗有效量施用该抗体。在某些实施例中，该治疗上可接受的量为约0.1mg/kg与约50mg/kg之间。在某些实施例中，该治疗上可接受的量为约1mg/kg与约40mg/kg之间。在某些实施例中，该治疗上可接受的量为约5mg/kg与约30mg/kg之间。该治疗性抗体可以平剂量施用，而与h5D8抗体所施用个体的体重或质量无关。不论施用该治疗性抗体的个体的体重或质量如何，均可以平剂量施用该h5D8抗体，条件是该个体的质量至少约为37.5千克。可以从约75毫克至约2000毫克施用平剂量的治疗性抗体。可以从约225毫克至约2000毫克、约750毫克至约2000毫克、约1125毫克至约2000毫克或约1500毫克至约2000毫克施用平剂量的治疗性抗体。可以约75毫克施用平剂量的治疗性抗体。可以约225毫克施用平剂量的治疗性抗体。可以约750毫克施用平剂量的治疗性抗体。可以约1125毫克施用平剂量的治疗性抗体。可以约1500毫克施用平剂量的治疗性抗体。可以约2000毫克施用平剂量的治疗性抗体。

[0119] 预期治疗性抗体的其他剂量。可以约50、100、150、175、200、250、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1025、1050、1075、1100、1150、1175、1200、1225、1250、1275、1300、1325、1350、1375、1400、1425、1450、1475、1525、1550、1575、1600、1625、1650、1675、1700、1725、1750、1775、1800、1825、1850、1875、1900、1925、1950、1975、2025、2050、2075或2100毫克施用平剂量的治疗性抗体。可以每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次施用这些剂量中的任何一种。

[0120] 可以基于被施用治疗性抗体的个体的体重或质量的剂量来施用该治疗性抗体。可以从约1mg/kg至约25mg/kg施用体重调整剂量的治疗性抗体。可以从约3mg/kg至约25mg/kg、约10mg/kg至约25mg/kg、约15mg/kg至约25mg/kg或约20mg/kg至约25mg/kg施用体重调整剂量的治疗性抗体。可以约1mg/kg施用体重调整剂量的h5D8。可以约3mg/kg施用体重调整剂量的治疗性抗体。可以约10mg/kg施用体重调整剂量的治疗性抗体。可以约15mg/kg施用体重调整剂量的治疗性抗体。可以约20mg/kg施用体重调整剂量的治疗性抗体。可以约25mg/kg施用体重调整剂量的治疗性抗体。

[0121] 本文所述的测定可用于监测接受治疗性抗体治疗的个体中的靶标接合。例如，如果个体正在接受多个剂量，则可以周期性地测量总LIF水平，以验证靶标与治疗性抗体的接合。在某些实施例中，在整个治疗过程中周期性地展开该测定，例如每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次或每八周一次。如果总LIF的水平保持在参考水平之上或与该个体的治疗前水平相比升高，则不施加任何治疗改良，诸如缩短时间表或增加剂量量。在某些实施例中，该参考水平超过5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90或100ng/mL。

[0122] 如果该总LIF水平低于参考水平或与治疗前LIF水平相比未增加，则该测定还可用于增加剂量量或缩短剂量时间表。在某些实施例中，该参考水平是5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90或100ng/mL。

[0123] 如果本文所述的测定返回的结果表明个体的总LIF低于某个参考水平或在先前的剂量后增加的幅度小于某个参考量，则可以将抗体施用的时间表缩短为每周一次或每两周一次(如果初始时间表是每三周一次)。如果本文所述的测定返回的结果表明个体的总LIF低于某个参考水平或在先前的剂量后增加的幅度小于某个参考量，则可以将抗体施用的时

间表缩短为每周一次、每两周一次或每三周一次(如果初始时间表是每四周一次)。

[0124] 如果本文所述的测定返回的结果表明个体的总LIF低于某个参考水平或在先前的剂量后增加的幅度小于某个参考量,则与先前的剂量相比,可以将抗体施用量增加约25%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%或300%。

[0125] 如果本文所述的测定返回的结果表明个体的总LIF低于某个参考水平或在先前的剂量后增加的幅度小于某个参考量,则将抗体施用量增加至约2000毫克(如果先前的剂量为约1500毫克、约1125毫克、约750毫克、约225毫克或约75毫克)。

[0126] 如果本文所述的测定返回的结果表明个体的总LIF低于某个参考水平或在先前的剂量后增加的幅度小于某个参考量,则将抗体施用量增加至约2000毫克或约1500毫克(如果先前的剂量为约1125毫克、约750毫克、约225毫克或约75毫克)。

[0127] 如果本文所述的测定返回的结果表明个体的总LIF低于某个参考水平或在先前的剂量后增加的幅度小于某个参考量,则将抗体施用量增加至约2000毫克、约1500毫克或约1125毫克(如果先前的剂量为约750毫克、约225毫克或约75毫克)。

[0128] 如果本文所述的测定返回的结果表明个体的总LIF低于某个参考水平或在先前的剂量后增加的幅度小于某个参考量,则将抗体施用量增加至约2000毫克、约1500毫克、或约1125毫克或约750毫克(如果先前的剂量为约225毫克或约75毫克)。

[0129] 如果本文所述的测定返回的结果表明个体的总LIF低于某个参考水平或在先前的剂量后增加的幅度小于某个参考量,则将抗体施用量增加至约2000毫克、约1500毫克、或约1125毫克、或约750毫克或约225毫克(如果先前的剂量为约75毫克)。

[0130] 本文所述的测定还可用于选择用抗LIF治疗性抗体治疗的患者。在某些实施例中,如果生物学样品中的总LIF水平超过约100、200、300、400、500、600、700、800、900pg/mL,或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90或100ng/mL,则未用抗LIF治疗性抗体治疗的个体可以用抗LIF治疗性抗体治疗。在某些实施例中,该生物学样品是血液、血清或血浆。在某些实施例中,该抗LIF治疗性抗体是h5D8。

[0131] 本文详述的任何剂量均可在至少约60分钟的时间段内静脉内施用;但是,根据与每个个体施用相关的条件,此时间段可能会多少有所不同。

[0132] 药学上可接受的赋形剂、载体和稀释剂

[0133] 在某些实施例中,本披露的抗体悬浮在无菌溶液中施用。在某些实施例中,该溶液包括生理上合适的盐浓度(例如,NaCl)。在某些实施例中,该溶液包括约0.6%与1.2%之间的NaCl。在某些实施例中,该溶液包括约0.7%与1.1%之间的NaCl。在某些实施例中,该溶液包括约0.8%与1.0%之间的NaCl。在某些实施例中,可以在约0.9%NaCl中稀释抗体的高度浓缩的母液。在某些实施例中,该溶液包括约0.9%NaCl。在某些实施例中,该溶液进一步包括以下一项或多项:缓冲液,例如,乙酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、琥珀酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐和羟甲基氨基甲烷(Tris);表面活性剂,例如,聚山梨酯80(吐温80)、聚山梨酯20(吐温20)、聚山梨酯和泊洛沙姆188;多元醇/二糖/多糖,例如,葡萄糖、右旋糖、甘露糖、甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和右旋糖酐40;氨基酸,例如,组氨酸、甘氨酸或精氨酸;抗氧化剂,例如,抗坏血酸、蛋氨酸;以及螯合剂,例如,EGTA或EGTA。在某些实施例中,本披露的抗体在施用前被冻干运输/储存和重构。在某些实施例中,冻干的抗体配制品包括增量剂,诸如甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和右旋糖酐40。在某个实施例中,本披露的抗LIF抗体可以作

为浓缩的母液运输和储存,在治疗部位使用时对该母液进行稀释。在某些实施例中,该母液包括约25mM组氨酸、约6%蔗糖、约0.01%聚山梨酸酯和约20mg/mL的抗LIF抗体。在某些实施例中,溶液的pH是约6.0。在某些实施例中,施用给个体的形式是包括约25mM组氨酸、约6%蔗糖、约0.01%聚山梨酯80和约20mg/mL h5D8抗体的水溶液。在某些实施例中,溶液的pH是约6.0。

[0134] 实施例

[0135] 以下实施例是本披露的各方面的进一步的具体实例。1.一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括:(a)向该个体施用初始剂量的结合白血病抑制因子(LIF)的抗体;(b)确定来自该患有癌症的个体的样品中的白血病抑制因子(LIF)的初始剂量后水平。2.根据实施例1所述的方法,其进一步包括施用后续剂量的结合白血病抑制因子(LIF)的抗体。3.根据实施例1所述的方法,其中通过如实施例1-2中任一项所述的方法确定LIF的初始剂量后水平。4.如实施例1所述的方法,其中该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。5.如实施例1所述的方法,其中该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。6.如实施例1所述的方法,其中该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。7.如实施例2至6中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的初始剂量后水平不增加,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。8.如实施例2至6中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。9.如实施例2至6中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。10.如实施例2至6中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平不增加,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。11.如实施例2至6中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。12.如实施例2至6中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。13.如实施例1至12中任一项所述的方

法,其中该初始剂量是结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的第一剂量。14.如实施例1至12中任一项所述的方法,其中该初始剂量是结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的多个剂量中的任何剂量。15.一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括:(a)向该个体施用包含结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的初始剂量;(b)接收来自该患有癌症的个体的样品中的白血病抑制因子(LIF)的初始剂量后水平。16.如实施例15所述的方法,其进一步包括施用后续剂量的结合白血病抑制因子(LIF)的抗体。17.如实施例15所述的方法,其中该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及f.免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。18.如实施例15所述的方法,其中该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:14、15、17或38中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:18-21中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。19.如实施例15所述的方法,其中该LIF治疗性抗体包括:(a)免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:30-33或39中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。20.如实施例16至19中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的治疗前水平相比,LIF的该初始剂量后水平不增加,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。21.如实施例16至19中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。22.如实施例16至19中任一项所述的方法,其中LIF的该初始剂量后水平是可检测的,并且小于2纳克/毫升,并且其中该后续剂量以与该初始剂量相比增加的量施用。23.如实施例16至19中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的治疗前水平相比,LIF的该初始剂量后水平不增加,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。24.如实施例16至19中任一项所述的方法,其中与该个体中的LIF的初始剂量前水平相比,LIF的该初始剂量后水平增加了2倍或更少,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。25.如实施例16至19中任一项所述的方法,其中LIF的该初始剂量后水平是可检测的,并且小于2纳克/毫升,并且其中该后续剂量在治疗时间表中的较早点施用。26.如实施例15至25中任一项所述的方法,其中该初始剂量是结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的第一剂量。27.如实施例15至25中任一项所述的方法,其中该初始剂量是结合白血病抑制因子(LIF)的抗体的多个剂量中的任何剂量。28.LIF复合体的用途,该LIF复合体包含:LIF、与LIF特异性结合的LIF捕获抗体、与LIF特异性结合的LIF检测抗体、以及任选地与LIF特异性结合的LIF治疗性抗体,其中该LIF检测抗体或该LIF捕获抗体包括A4或其LIF结合片段,其中该用途是用于定量LIF的体外测定。29.如实施例28所述的LIF复合物,其中该复合物呈流体。30.如实施例28所述的复合物,

其中该测定具有小于20%的内部可变性。31.一种定量来自个体的包含白血病抑制因子(LIF)的样品中的LIF的方法,其包括:使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的捕获抗体接触;使该包含LIF的样品与特异性结合LIF的检测抗体接触;检测该样品中与该捕获抗体和该检测抗体结合的LIF;其中该LIF检测抗体或该LIF捕获抗体包括A4或其LIF结合片段,其中该方法在体外进行。32.如实施例31所述的方法,其中该LIF是人类LIF。33.如实施例31所述的方法,其中该LIF可以每毫升1纳克的水平检测到。34.如实施例31所述的方法,其中该测定具有小于20%的内部可变性。35.如实施例31所述的方法,其中该个体是人类个体。36.如实施例31所述的方法,其进一步包括定量该样品中的LIF。37.如实施例36所述的方法,其中该包含LIF的样品呈流体。38.如实施例31所述的方法,其进一步包括发送包括关于该样品中LIF的量的信息的报告。39.一种白血病抑制因子(LIF)结合抗体或其片段,其中该LIF结合抗体或其片段包括:免疫球蛋白重链可变区,该免疫球蛋白重链可变区具有与SEQ ID NO:41所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;和免疫球蛋白轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列。40.如实施例39所述的LIF结合抗体在体外测定中用于定量LIF的用途。

[0136] 实例

[0137] 以下说明性实例代表了本文所述的组合物和方法的实施例,并不意味着以任何方式进行限制。

[0138] 实例1-对LIF具有特异性的大鼠抗体的产生

[0139] 将编码人LIF的氨基酸23-202的cDNA克隆到表达质粒(阿尔德弗龙公司(Aldevron GmbH),弗莱堡,德国)中。使用手持式粒子轰击装置(“基因枪”),通过皮内施用涂有DNA的金粒子对各组实验大鼠(威斯达(Wistar))进行免疫。用识别添加到LIF蛋白N末端的标签的抗标签抗体证实了瞬时转染的HEK细胞上的细胞表面表达。一系列免疫后收集血清样品,并在流式细胞术中对用上述表达质粒瞬时转染的HEK细胞进行测试。分离产生抗体的细胞,并根据标准程序与小鼠骨髓瘤细胞(Ag8)融合。如上所述,通过在流式细胞术测定中进行筛选来鉴定产生对LIF具有特异性的抗体的杂交瘤。使用RNA保护剂(RNAlater,目录号AM7020,赛默飞世尔科技公司)制备阳性杂交瘤细胞的细胞沉淀,并进一步处理以用于抗体可变结构域的测序。

[0140] 实例2-对LIF具有特异性的小鼠抗体的产生

[0141] 将编码人LIF的氨基酸23-202的cDNA克隆到表达质粒(阿尔德弗龙公司(Aldevron GmbH),弗莱堡,德国)中。使用手持式粒子轰击装置(“基因枪”),通过皮内施用涂有DNA的金粒子对各组实验小鼠(NMRI)进行免疫。用识别添加到LIF蛋白N末端的标签的抗标签抗体证实了瞬时转染的HEK细胞上的细胞表面表达。一系列免疫后收集血清样品,并在流式细胞术中对用上述表达质粒瞬时转染的HEK细胞进行测试。分离产生抗体的细胞,并根据标准程序与小鼠骨髓瘤细胞(Ag8)融合。如上所述,通过在流式细胞术测定中进行筛选来鉴定产生对LIF具有特异性的抗体的杂交瘤。使用RNA保护剂(RNAlater,目录号AM7020,赛默飞世尔科技公司)制备阳性杂交瘤细胞的细胞沉淀,并进一步处理以用于抗体可变结构域的测序。

[0142] 实例3-对LIF具有特异性的大鼠抗体的人源化

[0143] 从大鼠免疫中选择一个克隆(5D8)用于随后的人源化。使用标准CDR移植方法进行人源化。使用标准分子克隆技术从5D8杂交瘤中克隆出重链和轻链区,并通过Sanger方法测

序。然后针对人的重链和轻链可变序列进行BLAST搜索,并从每个可变序列中选择4个序列作为用于人源化的受体框架。将这些受体框架去免疫化以除去T细胞反应表位。将5D8的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3克隆到4个不同的重链受体框架(H1至H4)和4个不同的轻链框架(L1至L4)中。然后对所有16种不同的抗体测试:在CHO-S细胞(斯莱希斯(Selexis))中的表达;LIF诱导的STAT3磷酸化的抑制;以及通过表面等离子体共振 (SPR) 的结合亲和力。这些实验总结于表1中。

表 1. 5D8 人源化概览			
重链轻链组合	来自图 1 的 LIF 诱导的 pSTAT3 的抑制	SPR 得到的亲和力和 K_{DI} (pM)	表达 (ug/mL)
H0L0	+++	133 ± 46	393
H1L1	-	N/A	627
H1L2	+++	55 ± 23	260
H1L3	+++	54 ± 31	70
H1L4	-	N/A	560
H2L1	-	N/A	369
H2L2	+++	52 ± 22	392
H2L3	++	136 ± 19	185
H2L4	-	N/A	78
H3L1	N/A	N/A	无表达
H3L2	N/A	N/A	无表达
H3L3	N/A	N/A	无表达
H3L4	N/A	N/A	无表达
H4L1	-	N/A	259
H4L2	++	913 ± 308	308
H4L3	+		252
H4L4	-	N/A	186
N/A = 未尝试; H0L0 = 具有完整大鼠重链和轻链可变区的嵌合抗体			

[0146] 细胞培养10天后,在分批补料培养中的锥形瓶中(接种 3×10^5 个细胞/mL,200mL培养体积)比较转染细胞的表达性能。在这一点上,收获细胞并使用蛋白A柱纯化分泌的抗体,然后定量。所有人源化抗体均表达,但使用H3重链的抗体除外。与其他可变区(SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO:19)相比,H2和L2可变区表现良好。

[0147] 通过蛋白质印迹确定在酪氨酸705上LIF诱导的STAT3磷酸化的抑制。将U251神经胶质瘤细胞以100,000个细胞/孔的密度铺板在6孔板中。在进行任何治疗之前,将细胞在完全培养基中培养24小时,之后将血清饥饿8小时。之后,将含有指示抗体的细胞以10 μ g/ml的浓度过夜。治疗后,在包含放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液的磷酸酶和蛋白酶抑制剂中获得蛋白质,进行定量(BCA蛋白质测定,赛默飞世尔科技公司)并用于蛋白质印迹。对于蛋白质印迹,将膜在5%脱脂奶粉-TBST中阻断1小时,并与一抗孵育过夜(p-STAT3,目录号9145,细胞信号传导公司(Cell Signaling)或STAT3,目录号9132,细胞信号传导公司)或30

分钟(β -肌动蛋白过氧化物酶,目录号A3854,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))。然后将膜用TBST洗涤,与二抗一起孵育并再次洗涤。通过化学发光检测蛋白质(SuperSignal底物,目录号34076,赛默飞世尔科技公司)。这些结果示出于图1中。pSTAT3条带越黑,抑制作用越小。在标记为5D8(非人源化大鼠)、A(H0L0)、C(H1L2)、D(H1L3)和G(H2L2)的泳道中,抑制作用较高;在H(H2L3)、O(H4L2)和P(H4L3)中抑制作用中等;在B(H1L1)、E(H1L4)、F(H2L1)、I(H2L4)、N(H4L1)和Q(H4L4)中没有抑制作用。

[0148] 然后通过SPR分析展现出抑制LIF诱导的STAT3磷酸化的抗体,以确定结合亲和力。简而言之,使用Biacore™ 2002仪器观察到了A(H0L0)、C(H1L2)、D(H1L3)和G(H2L2)、H(H2L3)和O(H4L2)人源化抗体与胺偶联的hLIF的结合。在六个配体浓度下,通过在所有传感器芯片表面上生成的所有传感图的数学传感图拟合(朗格缪尔相互作用模型 $[A+B=AB]$)确定动力学常数和亲和力。将每个浓度的最佳拟合曲线(最小Chi²)用于计算动力学常数和亲和力。参见表1。

[0149] 由于实验设置使用二价抗体作为分析物,因此还根据二价分析物拟合模型 $[A+B=AB; AB+B=AB_2]$ 分析最佳拟合传感图,以便获得对人源化抗体的靶标结合机制的更详细见解。使用二价拟合模型 $[A+B=AB; AB+B=AB_2]$ 进行的动力学传感图分析证实了mAb样品的相对亲和力分级。

[0150] 包括H2和L2的人源化5D8因其高结合亲和力和高分批培养产率,而被选作更深入的分析。

[0151] 实例4-克隆5D8的人源化改善了与LIF的结合

[0152] 我们选择H2L2克隆(h5D8)进行进一步分析,并通过SPR比较与亲本大鼠5D8(r5D8)和小鼠克隆1B2的结合。该1B2抗体是先前披露的小鼠抗LIF抗体,先前存放于Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH(DSM ACC3054),并用于比较目的。分别将从大肠杆菌和HEK-293细胞中纯化的重组人LIF用作配体。使用胺偶联化学将人或大肠杆菌来源的LIF共价偶联至Biacore光学传感器芯片的表面,并根据动力学常数计算结合亲和力。

[0153] 材料和方法

[0154] 来自大肠杆菌的人LIF获自密理博公司(Millipore),参考号LIF1010;来自HEK-293细胞的人LIF获自ACRO生物系统公司(ACRO Biosystems),参考LIF-H521b。使用Biacore胺偶联试剂盒(BR-1000-50;GE医疗集团(GE-Healthcare),乌普萨拉),将LIF与传感器芯片偶联。使用CM5光学传感器芯片(BR-1000-12;GE医疗集团,乌普萨拉)在Biacore™ 2002仪器上运行样品。在机器运行(BR-1001-88;GE医疗集团,乌普萨拉)期间使用Biacore HBS-EP缓冲液。结合传感图的动力学分析是使用BIAevaluation 4.1软件进行的。在分析物浓度渐增的情况下,通过在所有传感器芯片表面上生成的所有传感图的数学传感图拟合(朗格缪尔相互作用模型 $[A+B=AB]$)确定动力学常数和亲和力。传感图也根据二价分析物传感器图拟合模型 $[A+B=AB; AB+B=AB_2]$ 进行分析,包括成分分析,以便生成对确定的朗格缪尔抗体-靶亲和力(例如亲和力贡献)的二价贡献的估计。将每个浓度的最佳拟合曲线(最小Chi²)用于计算动力学常数和亲和力。这些亲和力实验的概览示于表2(在大肠杆菌中制成的人LIF)和表3(在HEK 293细胞中制成的人LIF)。

[0155]

表 2. 人源化后改善的 5D8 结合	K _D [pM]	
hLIF (大肠杆菌)	朗格缪尔 1:1 传感图拟合	二价分析物拟合
小鼠 1B2	400 ± 210	1500 ± 200
r5D8 (大鼠)	130 ± 30	780 ± 130
h5D8 (人源化)	26 ± 14	82 ± 25

[0156]

表 3. 人源化后改善的 5D8 结合	K _D [pM]	
hLIF (HEK 293)	朗格缪尔 1:1 传感图拟合	二价分析物拟合
小鼠 1B2	320 ± 150	3900 ± 900
r5D8 (大鼠)	135 ± 100	410 ± 360
h5D8 (人源化)	13±6	63±30

[0157] 来自这组实验的朗格缪尔1:1传感图拟合模型指示,人源化5D8 (h5D8) 抗体与人LIF的亲合力是小鼠1B2和r5D8的约10-25倍。

[0158] 接下来,通过SPR针对多个物种的LIF测试了h5D8抗体。对源自不同物种和表达系统的重组LIF分析物进行了h5D8 SPR结合动力学:人LIF (大肠杆菌,HEK293细胞);小鼠LIF (大肠杆菌,CHO细胞);大鼠LIF (大肠杆菌);食蟹猴LIF (酵母,HEK293细胞)。

[0159] 材料和方法

[0160] 该h5D8抗体通过非共价Fc特异性捕获固定在传感器芯片表面。重组的Ig (Fc) 特异性金黄色葡萄球菌蛋白A/G被用作捕获剂,从而可以将抗LIF抗体在空间上均匀且灵活地呈递给LIF分析物。LIF分析物的来源如下:人LIF (来自大肠杆菌;密理博参考号LIF 1050);人LIF (来自HEK细胞,ACRO生物系统公司LIF-H521);小鼠LIF (大肠杆菌;密理博公司目录号NF-LIF2010);小鼠LIF (来自CHO细胞;瑞普罗金公司 (Reprokine) 目录号RCP09056);猴LIF (酵母,翠丰生物技术公司 (Kingfisher Biotech) 目录号RP1074Y);HEK-293细胞中产生的猴LIF。总体而言,h5D8展现出与几种物种的LIF结合。该亲和力实验的概览示于表4中。

[0161]

表 4. 人源化 5D8 的广泛物种反应性	朗格缪尔 1:1 传感图拟合		
分析物	平均 K _a (1/Ms)[10 ⁵]	平均 K _d (1/S) [10 ⁻⁵]	平均 K _D [pM]
人 LIF (大肠杆菌)	8.5 ± 0.7	7.2 ± 0.7	86 ± 9
人 LIF (HEK-293)	5.5 ± 0.02	3.1 ± 0.7	56 ± 13
小鼠 LIF (大肠杆菌)	21.4 ± 3.7	5.7 ± 1.0	27 ± 6
小鼠 LIF (CHO 细胞)	6.5 ± 0.7	1.1 ± 0.3	17 ± 4
食蟹猴 LIF (酵母)	6.3 ± 0.8	5.4 ± 0.7	89 ± 10
食蟹猴 LIF (HEK-293)	2.4 ± 0.2	3.3 ± 0.3	134 ± 6

[0162] 实例5-人源化克隆5D8在体外抑制LIF诱导的STAT3磷酸化

[0163] 为了确定h5D8的生物学活性,在LIF活化的细胞培养模型中测试了人源化和亲本形式。图2A示出了当神经胶质瘤细胞系与人LIF一起孵育时,人源化克隆展现对STAT3磷酸化(Tyr 705)的抑制作用增加。图2B示出了用不同稀释度的h5D8抗体重复进行的图2A相同设置的实验。

[0164] 方法

[0165] 将U251神经胶质瘤细胞以150,000个细胞/孔的密度铺板在6孔板中。在进行任何治疗之前,将细胞在完全培养基中培养24小时。之后,用r5D8抗LIF抗体或h5D8抗LIF抗体以10μg/ml的浓度过夜治疗或不治疗(对照细胞)。

[0166] 治疗后,在包含放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液的磷酸酶和蛋白酶抑制剂中获得蛋白质,进行定量(BCA蛋白质测定,赛默飞世尔科技公司)并用于蛋白质印迹。对于蛋白质印迹,将膜在5%脱脂乳-TBST中阻断1小时,并与一抗孵育过夜(p-STAT3,目录号9145,细胞信号传导公司或STAT3,目录号9132,细胞信号传导公司)或30分钟(β-肌动蛋白过氧化物酶,目录号A3854,西格玛奥德里奇公司)。然后将膜用TBST洗涤,必要时与二抗一起孵育,并再次洗涤。通过化学发光检测蛋白质(SuperSignal底物,目录号34076,赛默飞世尔科技公司)。

[0167] 实例6-U-251细胞中LIF的内源性水平的h5D8抗体治疗的IC₅₀值。

[0168] 我们还确定了在血清饥饿条件下在U-251细胞中对h5D8的生物抑制作用的IC₅₀低至490皮摩尔(图3A)。参见图3A和3B和表5的代表性结果。

表 5.								
[0169]	细胞系组织	细胞系名称	治疗	IC ₅₀ (nM)				JAK 抑制 (%)
	内源性 LIF 条件			n = 1	n = 2	平均值	SD	平均值
	GBM	U251	h5D8	0.78	0.54	0.66	0.12	84%
[0170]			r5D8	1.6	1.5	1.4	0.15	8.5
				1.2	1.4			

[0171] 方法

[0172] 将该U-251细胞以每6cm板600,000个细胞接种(每种条件)。在血清饥饿(0.1% FBS)下,在37℃下用h5D8以相应的浓度(滴定)处理细胞过夜。作为pSTAT3的阳性对照,将重组LIF(R&D#7734-LF/CF)用于在37℃以1.79nM刺激细胞10分钟。作为pSTAT3的阴性对照,将JAK I抑制剂(Calbiochem#420099)用于在37℃以1μM使用30分钟。然后按照Meso Scale Discovery多点检测系统总STAT3(目录号K150SND-2)和Phospho-STAT3(Tyr705)(目录号K150SVD-2)试剂盒的方案在冰上收获细胞作为裂解物,以测量通过MSD Meso Sector S600可检测的蛋白水平。

[0173] 实例7-与人LIF特异性结合的其他抗体

[0174] 鉴定了特异性结合人LIF的其他大鼠抗体克隆(10G7和6B5),其结合特征的概览显示在下表6中,将克隆1B2用作比较。

[0175] 方法

[0176] 使用重组LIF靶蛋白[人LIF(大肠杆菌);密理博公司目录号LIF 1010和人LIF(HEK293细胞);ACRO生物系统公司目录号LIF-H521b]作为分析物,对固定在CM5光学传感器芯片表面的抗LIF mAb 1B2、10G7和6B5进行动力学实时结合测定。

[0177] 动力学常数和亲和力是通过使用朗格缪尔1:1结合模型应用全局(传感图集的同时拟合)以及单曲线拟合算法通过数学传感图拟合获得的。通过 k_{obs} 分析评估全局拟合的合理性。

[0178]	表 6. 其他抗 LIF 抗体的亲和 力测量		朗格缪尔 1 : 1 传感图拟合		
	分析物	克隆	平均 K_a (1/Ms)	平均 K_d (1/S)	平均 K_D [nM]
[0179]	人 LIF (大肠杆菌)	1B2	$1.1 \pm 0.4E5$	$1.1 \pm 0.3E-3$	9.7 ± 1.4
	人 LIF (HEK-293)	1B2	$2.0 \pm 0.04E6$	$1.4 \pm 0.2E-3$	0.7 ± 0.03
	人 LIF (大肠杆菌)	10G7	$7.9 \pm 5.8E4$	$6.0 \pm 2.3E-4$	12.6 ± 9.5
	人 LIF (HEK-293)	10G7	$3.6 \pm 1.75E5$	$3.1 \pm 0.5E-4$	1.1 ± 0.6
	人 LIF (大肠杆菌)	6B5	N/A	N/A	N/A
	人 LIF (HEK-293)	6B5	$3.6 \pm 1.7E5$	$3.1 \pm 0.5E-4$	62 ± 6

[0180] 实例8-其他抗LIF抗体在体外抑制LIF诱导的STAT3磷酸化

[0181] 测试了其他克隆在细胞培养物中抑制LIF诱导的STAT3磷酸化的能力。如图4所示,与1B2克隆相比,克隆10G7和先前详述的r5D8展现出对LIF诱导的STAT3磷酸化的高度抑制。包括抗LIF多克隆抗血清(阳性)作为阳性对照。尽管6B5没有展现出抑制作用,这可能是由于6B5与本实验中使用的未糖基化LIF的结合可能缺乏。

[0182] 方法

[0183] 将患者来源的神经胶质瘤细胞以150,000个细胞/孔的密度接种在6孔板中。在任何治疗之前,在补充有B27(生命技术公司(Life Technologies))、青霉素/链霉素和生长因子(20ng/ml EGF和20ng/ml FGF-2[派普泰克公司(PeproTech)])的神经元基础培养基(Neurobasal medium)(生命技术公司)组成的GBM培养基中培养细胞24小时。第二天,是否用大肠杆菌中产生的重组LIF或重组LIF和该指示抗体的混合物处理细胞15分钟(抗体的最终浓度为10 μ g/ml,重组LIF的最终浓度为20ng/ml)。治疗后,在包含放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液的磷酸酶和蛋白酶抑制剂中获得蛋白质,进行定量(BCA蛋白质测定,赛默飞世尔科技公司)并用于蛋白质印迹。对于蛋白质印迹,将膜在5%脱脂乳-TBST中阻断1小时,并与一抗孵育过夜(p-STAT3,目录号9145,细胞信号传导公司)或30分钟(β -肌动蛋白过氧化物酶,目录号A3854,西格玛奥德里奇公司)。然后将膜用TBST洗涤,必要时与二抗一起孵育,并再次洗涤。通过化学发光检测蛋白质(SuperSignal底物,目录号34076,赛默飞世尔科技公司)。

[0184] 实例9-LIF在多种肿瘤类型中高度过表达

[0185] 对多种人肿瘤类型进行了免疫组织化学实验,以确定LIF表达的程度。如图5所示,LIF在多形性胶质母细胞瘤(GBM)、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌和结肠直肠癌(CRC)中高表达。

[0186] 实例10-人源化克隆h5D8在非小细胞肺癌小鼠模型中抑制肿瘤生长

[0187] 为了确定人源化5D8克隆在体内抑制LIF阳性癌症的能力,在非小细胞肺癌(NSCLC)小鼠模型中测试了该抗体。图6示出了与媒介物阴性对照相比,用该抗体治疗的小鼠的肿瘤生长降低。

[0188] 方法

[0189] 具有高LIF水平的鼠非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系KLN205被表达萤火虫萤光素酶基因的慢病毒稳定感染,用于体内生物发光监测。为了建立小鼠模型,通过肋间穿刺将 5×10^5 个KLN205非小细胞肺癌(NSCLC)细胞原位植入8周龄免疫感受态同系DBA/2小鼠的左肺中。每周两次用对照媒介物或用15mg/kg或30mg/kg的h5D8抗体腹膜内治疗小鼠,且通过生物发光监测肿瘤的生长。对于生物发光成像,小鼠在1%-2%吸入异氟烷麻醉下接受了0.2mL 15mg/mL D-萤光素的腹膜内注射。使用IVIS系统2000系列(精诺真公司(Xenogen Corp.),阿拉米达,加利福尼亚州,美国)监测生物发光信号,其由高灵敏度的冷却CCD相机组成。使用Living图像软件(精诺真公司)对成像数据进行网格化,且在每个框状区域中整合总生物发光信号。使用目的区域(ROI)中的总光子通量发射(光子/秒)分析数据。结果证明用h5D8抗体治疗促进肿瘤消退。数据呈现为平均值 $\pm$ SEM。

[0190] 实例11-h5D8在多形性胶质母细胞瘤小鼠模型中抑制肿瘤生长

[0191] 在使用表达萤光素酶的人细胞系U251的原位GBM肿瘤模型中,r5D8显著降低每周两次腹膜内(IP)注射施用300 μ g r5D8和h5D8的小鼠的肿瘤体积。该研究的结果示于图7A中(治疗后第26天的定量)。该实验还使用200 μ g或300 μ g人源化h5D8治疗小鼠进行,治疗7天后显示出统计学上显著的肿瘤减少。

[0192] 方法

[0193] 收获稳定表达萤光素酶的U251细胞,在PBS中洗涤,以400g离心5分钟,重悬于PBS中,并用自动细胞计数器(Countess,英杰公司(Invitrogen))计数。将细胞保持在冰上以维持最佳生存力。腹膜内注射氯胺酮(Ketalar50®)/木糖胺(Rompun®)(分别为75mg/kg和10mg/kg)麻醉小鼠。将每只小鼠小心地放置在立体定向设备中并固定。用脱毛膏去除头部的头发,并用解剖刀切开头部皮肤以露出头骨。用钻头小心地在 λ 侧面1.8mm,前面1mm的位置上做一个小切口。使用Hamilton 30G注射器将5 μ L细胞接种到深度为2.5mm的右纹体中。用Hystoacryl组织粘合剂(博朗公司(Braun))闭合头部切口,并给小鼠注射皮下镇痛药美洛昔康(Metacam®)(1mg/kg)。植入每只小鼠的最终细胞数为 3×10^5 。

[0194] 每周两次腹膜内施用h5D8治疗小鼠。肿瘤细胞接种后立即在第0天开始治疗。小鼠共接受2剂h5D8或媒介物对照。

[0195] 体重和肿瘤体积:测量体重2次/周,且在第7天通过生物发光定量肿瘤生长(精诺真公司IVIS光谱)。为了定量体内的生物发光活性,使用异氟烷麻醉小鼠,且腹膜内注射萤光素底物(珀金埃尔默公司(PerkinElmer))(167 μ g/kg)。

[0196] 在第7天评估通过生物发光(精诺真公司IVIS光谱)确定的肿瘤大小。计算每个治疗组的个体肿瘤测量和平均值 $\pm$ SEM。由未配对的非参数Mann-Whitney U检验确定统计显著性。

[0197] 实例12-h5D8在卵巢癌小鼠模型中抑制肿瘤生长

[0198] 在其他两个同系肿瘤模型中评估r5D8的功效。在卵巢原位肿瘤模型ID8中,按腹部体积测量,每周两次腹膜内施用300 μ g r5D8显著抑制肿瘤生长(图8A和8B)。图8C的结果示出了h5D8在200 μ g及以上的剂量下也减少了肿瘤体积。

[0199] 方法

[0200] 在补充有10%胎牛血清(FBS)(Gibco,英杰公司)、40U/mL青霉素和40 μ g/mL链霉素(PenStrep)(Gibco,英杰公司)和0.25 μ g/mL血浆霉素(Plasmocin)(因韦真公司(Invivogen))的杜尔贝科氏改良伊格培养基(DMEM)中培养ID8细胞。

[0201] 收获ID8细胞,在PBS中洗涤,以400g离心5分钟,并且重悬于PBS中。将细胞置于冰上以保持最佳生存力,并用27G针腹膜内注射200 μ L细胞悬液。植入小鼠体内的最终细胞数为 5×10^6 。

[0202] 每周两次按照指示的不同剂量经腹膜内施用h5D8对小鼠进行治疗。测量体重2次/周,且通过使用卡尺(飞世尔科技公司(Fisher Scientific))测量腹围来监测肿瘤的进展。

[0203] 实例13-r5D8在结肠直肠癌小鼠模型中抑制肿瘤生长

[0204] 在患有皮下结肠CT26肿瘤的小鼠中,r5D8(每周两次腹膜内施用300 μ g)显著抑制了肿瘤的生长(图9A和9B)。

[0205] 方法

[0206] 在补充有10%胎牛血清(FBS)、40U/mL青霉素和40 μ g/mL链霉素(PenStrep)和0.25 μ g/mL血浆霉素的洛斯维公园纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute)培养基(RPMI[Gibco,英杰公司])中培养CT26细胞。

[0207] 用胰蛋白酶消化CT26细胞(8×10^5),用PBS冲洗,以400g离心5分钟,并且重悬于100 μ L PBS中。将细胞置于冰上以避免细胞死亡。使用27G针通过皮下注射将该CT26细胞施用于小鼠。

[0208] 从CT26细胞植入后第3天起,每周两次通过腹膜内注射(IP)向小鼠施用300 μ g r5D8或媒介物对照。

[0209] 每周测量三次体重和肿瘤体积。使用卡尺(飞世尔科技公司)测量肿瘤体积。

[0210] 实例14-r5D8减少了肿瘤模型中的炎性浸润

[0211] 如图10A所示,在U251GBM原位模型中,在用r5D8治疗的肿瘤中CCL22(M2极化巨噬细胞的标记物)的表达显著降低。如图10B所示,在使用r5D8的生理相关器官型组织切片培养模型中也证实了这一发现,其中三个患者样品在治疗后CCL22和CD206(MRC1)表达(也是M2巨噬细胞的标记物)显著降低(比较MRC1和CCL22的上限(对照)和下限(经治疗))。此外,r5D8还降低了免疫感受态小鼠中同系ID8(图10C)和CT26(图10D)肿瘤中的CCL22⁺M2巨噬细胞。

[0212] 实例15-r5D8增加非骨髓效应细胞

[0213] 为了研究其他免疫机制,评估了r5D8对肿瘤微环境中T细胞和其他非骨髓免疫效应细胞的作用。如图11A所示,在卵巢原位ID8同系模型中,r5D8治疗导致肿瘤内NK细胞增加

以及总数和活化的CD4⁺和CD8⁺T细胞增加。如图11B所示,类似地,在结肠同系CT26肿瘤模型中,r5D8增加了瘤内NK细胞,增加了CD4⁺和CD8⁺T细胞,且趋向于减少CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-reg细胞。如图11C所示,在r5D8治疗后同系原位KLN205肿瘤模型中还观察到了CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-reg细胞减少的趋势。如图12所示,与T细胞介导功效的要求一致,CT26模型中CD4⁺和CD8⁺T细胞的耗竭抑制了r5D8的抗肿瘤功效。

[0214] T细胞耗竭的方法

[0215] 在补充有10%胎牛血清(FBS[Gibco,英杰公司])、40U/mL青霉素和40μg/mL链霉素(PenStrep[Gibco,英杰公司])和0.25μg/mL血浆霉素(因韦真公司)的RPMI培养基(Gibco,英杰公司)中培养CT26细胞。收集CT26细胞(5x10⁵),用PBS冲洗,以400g离心5分钟,并且重悬于100μL PBS中。将细胞置于冰上以避免细胞死亡。使用27G注射器通过皮下注射将CT26细胞在两肋施用给小鼠。如研究设计所示,每周两次腹膜内施用r5D8治疗小鼠。如研究设计所述,每周两次通过腹膜内注射(IP)向小鼠施用媒介物对照(PBS)、大鼠r5D8和/或抗CD4和抗CD8。伴随施用所有抗体治疗。

[0216] 实例16-与人LIF复合的h5D8的晶体结构

[0217] 将h5D8的晶体结构解析到3.1埃的分辨率,以便确定h5D8与之结合的LIF上的表位,且确定参与结合的h5D8残基。共晶体结构揭示,LIF的N末端环位于h5D8轻链和重链可变区之间的中心位置(图13A)。另外,h5D8与LIF的螺旋A和C上的残基相互作用,从而形成不连续的和构象性的表位。结合是由几种盐桥、H-键和范德华相互作用驱动的(表7,图13B)。LIF的h5D8表位跨越了与gp130相互作用的区域。参见Boulanger,M.J.,Bankovich,J.,Kortemme,T.,Baker,D.&Garcia,K.C.Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130[通过共享的信号传导受体gp130识别不同细胞因子的收敛机制].Molecular cell[分子细胞]12,577-589(2003)。结果总结在下表7中,并在图13中进行了描绘。

[0218]

表 7. 与人 LIF 复合的 h5D8 的 X 射线晶体结构的概览		
LIF 残基 (表位)	相互作用类型	h5D8 残基 (互补位, 卡巴特编号)
Ala13	VDW	L-Tyr49、L-Asn53
Ile14-O	HB	L-Ser50-OG
Ile	VDW	L-His30、L-Tyr32、L-Tyr49、L-Ser50

[0219]

		H-Trp97
Arg15-NE	SB	L-Glu55-OE1、L-Glu55-OE2
Arg15-NH1	SB	L-Glu55-OE1、L-Glu55-OE2
Arg15-NH2	SB	L-Glu55-OE1、L-Glu55-OE2
Arg15-O	HB	L-Asn34-ND2
Arg15	VDW	L-Asn34、L-Leu46、L-Tyr49、 L-Glu55、L-Ser56
		H-Glu96、H-Trp97、H-Asp98、 H-Leu99、H-Asp101
His16-NE2	SB	H-Asp101-OD2
His16	VDW	L-Tyr32、L-Asn34、L-Met89
		H-Trp95、H-Glu96、H-Trp97、 H-Asp101
Pro17	VDW	L-Tyr32、L-Ala91
		H-Trp97
Cys18	VDW	L-Tyr32
		H-Trp33、H-Trp97
His19-NE2	SB	H-Glu96-OE1、H-Glu96-OE2
His19	VDW	H-His31、H-Trp33、H-Glu96
Asn20-OD1	HB	H-Lys52-NZ
Asn20-ND2	HB	H-Asp53-OD1
Asn20	VDW	H-Trp33、H-Lys52、H-Asp53
Gln25-NE2	HB	H-Asp53-OD2
Gln25	VDW	H-His31、H-Ser52C、H-Asp53
Gln29	VDW	H-His31
Gln32	VDW	H-Lys52B
Asp120-OD2	HB	H-Ser30-OG
Asp120	VDW	H-Thr28、H-Ser30
Arg123-NE	HB	H-Thr28-OG
Arg123	VDW	H-Thr28
Gly124	VDW	H-His31
Leu125	VDW	H-His31
Ser127-OG	HB	H-Asp98-OD2
Ser127-O	HB	H-Trp97-NE1
Ser127	VDW	H-His31、H-Trp97、H-Asp98
Asn128-OD1	HB	H-His31-NE2
Asn128	VDW	H-His31
Leu130	VDW	H-Trp97

[0220]	Cys131	VDW	H-Trp97
	Cys134	VDW	H-Trp97
	Ser135-O	HB	L-His30-NE2
	Ser135	VDW	L-His30
	His138	VDW	L-His30
VDW , 范德华 低能量结合; HB , 氢键 (中等能量结合); SB , 盐桥 (高能量结合)			

[0221] 方法

[0222] 将LIF在HEK 293S (Gnt 1^{-/-}) 细胞中瞬时表达, 并使用Ni-NTA亲和层析纯化, 随后在20mM Tris pH 8.0和150mM NaCl中进行凝胶过滤层析。将重组h5D8 Fab在HEK 293F细胞中瞬时表达, 并使用KappaSelect亲和层析随后阳离子交换层析进行纯化。将纯化的h5D8Fab和LIF以1:2.5的摩尔比混合, 并在室温下孵育30分钟, 之后使用EndoH去糖基化。随后使用凝胶过滤层析纯化复合物。将该复合物浓缩至20mg/mL, 并使用稀疏矩阵筛选进行结晶试验。在包含19% (v/v) 异丙醇、19% (w/v) PEG 4000、5% (v/v) 甘油、0.095M柠檬酸钠pH 5.6的条件下于4℃形成晶体。该晶体在加拿大光源 (CLS) 的08ID-1光束线上衍射到3.1 Å 的分辨率。根据Kabsch等人Xds. Acta crystallographica. Section D [晶体学报D部分], Biological crystallography [生物晶体学] 66, 125-132 (2010), 使用XDS收集、处理和缩放数据。根据McCoy等人Phaser crystallographic software [移相器晶体学软件]. J Appl Crystallogr [应用晶体学杂志] 40, 658-674 (2007), 使用移相器通过分子置换来确定结构。使用Coot和phenix.refine进行了模型构建和完善的几次迭代, 直到结构收敛到可接受的R_{工作}和R_{自由}。分别参见Emsley等人Features and development of Coot [Coot的特征和开发]. Acta crystallographica. Section D [晶体学报D部分], Biological crystallography [生物晶体学] 66, 486-501 (2010); 和Adams等人PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution [PHENIX: 全面的基于Python的高分子结构解决方案系统]. Acta crystallographica. Section D [晶体学报D部分], Biological crystallography [生物晶体学] 66, 213-221 (2010)。这些数字是在PyMOL (PyMOL分子图形系统, 版本2.0, 薛定谔有限责任公司 (Schrödinger, LLC)) 中生成的。

[0223] 实例17-h5D8对LIF具有高特异性

[0224] 我们寻求测试了h5D8与其他LIF家族成员的结合, 以确定结合特异性。当在大肠杆菌中生产两种蛋白质时, 使用Octet96分析, h5D8与人LIF的结合比与LIF最高同源性IL-6家族成员制瘤素M (OSM) 的结合大约100倍。当两种蛋白都在哺乳动物系统中产生时, h5D8不展现出与OSM的结合。数据汇总于表8中。

表 8: 通过 Octet 测量的细胞因子 h5D8 亲和力测量的概览

	KD [M]	kon [1/Ms]	kdis [1/s]
h5D8 + huLIF (大肠杆菌)	4.3E-10 +/- 2.0E-11	3.1E+05 +/- 3.1E+03	1.3E-04 +/- 5.8E-06
h5D8 + huLIF (哺乳动物)	1.3E-09 +/- 7.2E-11	1.2E+05 +/- 1.3E+03	1.5E-04 +/- 8.5E-06
h5D8 + huOSM (大肠杆菌)	3.6E-08 +/- 1.4E-09	8.5E+04 +/- 3.1E+03	3.1E-03 +/- 4.1E-05
h5D8 + huOSM (哺乳动物)	ND	ND	N D
h5D8 + huIL-6 (大肠杆菌)	ND	ND	N D

ND = 无结合

[0226] 方法

[0227] Octet结合实验:按照制造商提供的手册使用和制备了试剂。基本动力学实验是使用如下的Octet数据采集软件版本9.0.0.26进行的:传感器/程序的设置:i)平衡(60秒);ii)加载(15秒);iii)基线(60秒);iv)缔合(180秒);以及v)解离(600秒)

[0228] h5D8对细胞因子的Octet亲和力:基本动力学实验是使用如下的Octet数据采集软件版本9.0.0.26进行的:将胺反应性第二代生物传感器(AR2G)在水中水合最低15分钟。h5D8与生物传感器的缀合是根据ForteBio技术说明26(请参阅参考文献)使用胺偶联第二代试剂盒进行的。浸入步骤如下所述在30℃1000rpm下进行:i)水中平衡60秒;ii)在水中20mM ECD,10mM磺基-NHS中活化300秒;iii)将10μg/ml h5D8在pH6.0的10mM乙酸钠中固定600秒;iv)在1M乙醇胺中(pH 8.5)淬灭300秒;v)在水中基线120秒。然后在30℃,1000rpm下通过以下浸入和读取步骤进行动力学实验:vi)1X动力学缓冲液中基线60秒;vii)在1X动力学缓冲液中缔合适当的细胞因子系列稀释液180秒;viii)在1X动力学缓冲液中解离300秒;ix)三个再生/中和循环分别在10mM甘氨酸pH 2.0和1X动力学缓冲液之间交替(每个5秒,3个循环)。再生后,将生物传感器重新用于随后的结合分析。

[0229] 由哺乳动物细胞产生的人重组LIF来自ACRO生物系统公司(LIF-H521b);在哺乳动物细胞中产生的人重组OSM来自R&D(8475-OM/CF);以及大肠杆菌细胞中生产的人重组OSM来自R&D(295-OM-050/CF)。

[0230] 实例18-h5D8fab的晶体结构

[0231] 确定了h5D8 Fab在宽谱化学条件下的五个晶体结构。这些结构的高分辨率指示CDR残基的构象与较小的柔韧性相关,并且在不同的化学环境中高度相似。该抗体的独特特征是在可变重区的第100位存在非典型的半胱氨酸。结构分析表明,半胱氨酸是未配对的,并且在很大程度上是溶剂不可及的。

[0232] H5D8 Fab是通过木瓜蛋白酶消化其IgG,随后使用标准亲和力、离子交换和尺寸层析技术进行纯化而获得的。使用气相扩散方法获得晶体,并确定分辨率在1.65 Å至2.0 Å之间变动的五个晶体结构。尽管结晶条件跨越五个不同的pH水平变动:5.6、6.0、6.5、7.5和8.5,所有结构均在相同的晶体学空间群中解析,并且具有相似的晶胞尺寸(P212121, a ~ 53.8 Å, b ~ 66.5 Å, c ~ 143.3 Å)。这样,这些晶体结构允许比较不受晶体堆积伪

像阻碍和跨越宽谱化学条件的h5D8Fab三维布置。

[0233] 观察所有互补决定区 (CDR) 残基的电子密度,随后对其进行建模。值得注意的是,LCDR1和HCDR2采用了细长的构型,与浅LCDR3和HCDR3区域一起在互补位的中心形成了一个结合槽(图14A)。这五个结构在所有残基上都非常相似,所有原子的均方根偏差在 $0.197 \text{ \AA}$ 与 $0.327 \text{ \AA}$ 之间变动(图14A)。这些结果指示,CDR残基的构象在各种化学环境中均得到保持,包括pH水平在5.6与8.5之间变动以及离子强度在150mM与1M之间变动。对h5D8互补位的静电表面的分析揭示,带正电和带负电区同样有助于亲水性,没有普遍的疏水性斑块。h5D8在HCDR3 (Cys100) 的碱基上具有非典型的半胱氨酸的罕见特征。在所有五个结构中,该游离半胱氨酸是有序的,不会形成任何二硫键错配。另外地,它不被Cys (半胱氨酸化) 或谷胱甘肽 (谷胱甘肽化) 的加入而修饰,并与重链的Leu4、Phe27、Trp33、Met34、Glu102和Leu105的主链和侧链原子发生范德华相互作用($3.5\text{-}4.3 \text{ \AA}$ 距离) (图14B)。最后,Cys100是一个主要被掩埋的结构残基,显现参与介导CDR1和HCDR3的构象。因此,正如我们的五个晶体结构中该区的均匀分布所观察到的,它不太可能与其他半胱氨酸具有反应性。

[0234] 方法

[0235] H5D8-1 IgG获自康泰伦特生物制剂公司 (Catalent Biologics),并在25mM组氨酸、6%蔗糖、0.01%聚山梨酯80 (在pH 6.0) 中配制。使用10K MWC0浓缩器 (密理博公司) 将配制的IgG广泛地缓冲液交换为PBS,之后在37℃下于PBS、1.25mM EDTA、10mM半胱氨酸中以1:100微克木瓜蛋白酶 (西格玛公司) 消化1小时。使用AKTA Start层析系统 (GE医疗集团) 将木瓜蛋白酶消化的IgG流经蛋白A柱 (GE医疗集团)。回收包含h5D8 Fab的蛋白A流通液,并使用10K MWC0浓缩器 (密理博公司) 将其缓冲液交换为pH 5.6的20mM乙酸钠。使用AKTA Pure层析系统 (GE医疗集团) 将所得样品上样到Mono S阳离子交换柱 (GE医疗集团) 上。用1M氯化钾梯度洗脱产生了一个主要的h5D8 Fab峰,该峰在20mM Tris-HCl、150mM氯化钠 (pH 8.0) 中用Superdex200Increase凝胶过滤柱 (GE医疗集团) 回收、浓缩并纯化至大小均一。通过在还原和非还原条件下的SDS-PAGE证实了h5D8 Fab的高纯度。

[0236] 使用10K MWC0浓缩器 (密理博公司) 将纯化的h5D8 Fab浓缩至25mg/mL。使用0ryx 4分配器 (道格拉斯仪器公司 (Douglas Instruments)) 在20℃下使用稀疏矩阵96条件商业筛JCSG TOP96 (Rigaku试剂) 和MCSG-1 (阿纳塔斯公司 (Anatrace)) 设置气相扩散结晶实验。在以下五个结晶条件下四天后,获得并收获晶体:1) 0.085M柠檬酸钠,25.5% (w/v) PEG 4000,0.17M乙酸铵,15% (v/v) 甘油,pH 5.6;2) 0.1M MES,20% (w/v) PEG 6000,1M氯化锂,pH 6.0;3) 0.1M MES,20% (w/v) PEG 4000,0.6M氯化钠,pH 6.5;4) 0.085M HEPES钠,17% (w/v) PEG 4000,8.5% (v/v) 2-丙醇,15% (v/v) 甘油,pH 7.5;5) 0.08M Tris,24% (w/v) PEG 4000,0.16M氯化镁,20% (v/v) 甘油,pH 8.5。在液氮中快速冷冻之前,根据需要,向含有晶体的母液中补充5%-15% (v/v) 甘油或10% (v/v) 乙二醇。以高级光子源光束线23-ID-D (芝加哥,伊利诺伊州) 对晶体进行X射线同步加速器辐射,并在Pilatus3 6M检测器上记录衍射图。使用XDS处理数据,并使用移相器通过分子置换确定结构。在PHENIX中进行了完善,在Coot中建立了迭代模型。在PyMOL中生成图片。所有软件都通过SBGrid访问。

[0237] 实例19-h5D8在半胱氨酸100处的突变保持结合

[0238] 对h5D8的分析揭示,在重链可变区的100位 (C100) 处有一个游离的半胱氨酸残基。

H5D8变体是通过用每个天然存在的氨基酸取代C100而生成的,以表征与人和小鼠LIF的结合以及对人和小鼠LIF的亲合力。使用ELISA和Octet测定表征结合。结果汇总在表9中。ELISA EC50曲线显示在图15中(图15A人LIF和图15B小鼠LIF)。

[0239]

表 9. 通过 Octet 测定确定的亲和力和通过 ELISA 确定的 EC50 的概览				
突变	亲和力/ k_D (M)		结合 EC50 (nM)	
	人 LIF	小鼠 LIF	人 LIF	小鼠 LIF
C100	$< 1.0\text{E-}12 \pm 2.252\text{E-}11$	$9.946\text{E-}11 \pm 8.272\text{E-}12$	0.09878	0.1605
C100S	$8.311\text{E-}10 \pm 5.886\text{E-}11$	$2.793\text{E-}09 \pm 5.925\text{E-}11$	n.d.	n.d.
C100Q	$3.87\text{E-}09 \pm 1.55\text{E-}10$	$2.84\text{E-}09 \pm 4.85\text{E-}11$	10.18	26.33
C100N	$5.59\text{E-}09 \pm 1.01\text{E-}10$	$6.68\text{E-}09 \pm 9.8\text{E-}11$	13.18	45.87
C100E	$2.67\text{E-}09 \pm 4.64\text{E-}11$	$4.1\text{E-}09 \pm 7.56\text{E-}11$	7.179	25.3
C100D	$2.02\text{E-}09 \pm 8.08\text{E-}11$	$6.49\text{E-}09 \pm 7.16\text{E-}11$	11.89	22.88
C100T	$4.36\text{E-}10 \pm 2.1\text{E-}11$	$1.02\text{E-}09 \pm 1.77\text{E-}11$	5.575	8.753
C100G	$2.49\text{E-}09 \pm 4.2\text{E-}11$	$3.33\text{E-}09 \pm 5.42\text{E-}11$	21.94	40.17
C100P	$2.74\text{E-}10 \pm 2.97\text{E-}10$	$< 1.0\text{E-}12 \pm 7.64\text{E-}10$	34.44	101.9
C100A	$< 1.0\text{E-}12 \pm 2.713\text{E-}11$	$< 1.0\text{E-}12 \pm 1.512\text{E-}11$	0.6705	0.9532
C100V	$< 1.0\text{E-}12 \pm 1.805\text{E-}11$	$< 1.0\text{E-}12 \pm 8.086\text{E-}12$	0.2785	0.3647
C100L	$< 1.0\text{E-}12 \pm 1.963\text{E-}11$	$1.998\text{E-}10 \pm 1.055\text{E-}11$	0.454	0.547
C100I	$< 1.0\text{E-}12 \pm 1.424\text{E-}11$	$3.361\text{E-}11 \pm 7.545\text{E-}12$	0.299	0.3916
C100M	$1.155\text{E-}09 \pm 3.400\text{E-}11$	$2.676\text{E-}09 \pm 2.449\text{E-}11$	0.7852	1.563
C100F	$4.376\text{E-}09 \pm 1.127\text{E-}10$	$1.147\text{E-}08 \pm 9.099\text{E-}11$	8.932	21.53
C100Y	$1.444\text{E-}08 \pm$	$2.514\text{E-}08 \pm$	n.d.	n.d.

[0240]		1.159E-09	2.047E-09		
	C100W	2.508E-08 ± 7.036E-09	4.819E-08 ± 4.388E-09	n.d.	n.d.
	C100H	1.304E-10 ± 1.416E-10	4.284E-09 ± 1.231E-10	8.254	n.d.
	C100K	7.477E-08 ± 1.581E-09	6.053E-08 ± 2.589E-09	n.d.	n.d.
	C100R	1.455E-07 ± 6.964E-09	5.142E-08 ± 3.247E-09	n.d.	n.d.

[0241] 方法

[0242] ELISA: 通过ELISA确定h5D8 C100变体与人和小鼠LIF的结合。将重组的人或小鼠LIF蛋白以1 μ g/mL涂在Maxisorp 384孔板上,在4℃下过夜。在室温下将板用1x阻断缓冲液阻断2小时。加入每种h5D8 C100变体的滴定并在室温下结合1小时。将板用PBS+0.05%吐温-20洗涤三次。加入缀合有HRP的抗人IgG,并在室温下结合30分钟。将板用PBS+0.05%吐温-20洗涤三次,并使用1x TMB底物显影。用1M HCl终止反应,并测量在450nm的吸光度。使用Graphpad Prism进行图形生成和非线性回归分析。

[0243] Octet RED96: 使用Octet RED96系统,通过BLI确定了h5D8 C100变体对人和小鼠LIF的亲合力。在1x动力学缓冲液中经过30秒的基线后,将h5D8 C100变体以7.5 μ g/mL加载到抗人Fc生物传感器上。将人或小鼠LIF蛋白的滴定与加载的生物传感器关联90秒,并在1x动力学缓冲液中解离300秒。通过数据分析软件使用1:1全局拟合模型计算KD。

[0244] 实例20-h5D8在体外阻断LIF与gp130的结合

[0245] 为了确定h5D8是否阻止LIF与LIFR结合,使用Octet RED 96平台进行了分子结合测定。通过抗人Fc捕获将H5D8加载到AHC生物传感器上。然后,将生物传感器浸入LIF中,并按预期观察到缔合(图16A,中间三分之一)。随后,将生物传感器浸入不同浓度的LIFR中。观察到剂量依赖性的缔合(图16A,右三分之一)。对照实验证明这种缔合是LIF特异性的(未显示),而不是由于LIFR与h5D8或与生物传感器的非特异性相互作用。

[0246] 为了进一步表征h5D8和LIF的结合,进行了一系列ELISA结合实验。预孵育H5D8和LIF,然后将其引到涂有重组人LIFR (hLIFR) 或gp130的板上。h5D8/LIF复合物与涂覆的底物之间缺乏结合,这指示h5D8以某种方式破坏了LIF与受体的结合。另外地,也使用了不结合LIF(同种型对照,由(-)指示)或在已知结合位点结合LIF的对照抗体(B09不与gp130或LIFR竞争LIF结合;r5D8是h5D8的大鼠亲本版本)。ELISA结果证明,h5D8/LIF复合物能够结合hLIFR(r5D8/LIF复合物也是如此),指示这些抗体不能阻止LIF/LIFR缔合(图16A)。相反,h5D8/LIF复合物(和r5D8/LIF复合物)不能结合重组人gp130(图16B)。这指示当LIF与h5D8结合时,LIF的gp130结合位点受到影响。

[0247] 实例21-人组织中的LIF和LIFR表达

[0248] 为了确定LIF和LIFR的表达水平,对许多不同类型的人体组织进行了实时定量PCR。图17A和17B中所示的平均表达水平以每100ng总RNA的拷贝数给出。大多数组织每100ng总RNA表达至少100个拷贝。在人脂肪组织(肠系膜回肠[1])、血管组织(脉络丛[6]和肠系膜[8])和脐带[68]组织中,LIF mRNA表达最高,而在脑组织(皮质[20]和黑质[28])中最低。在人脂肪组织(肠系膜回肠[1])、血管组织(肺[9])、脑组织[11-28]和甲状腺[66]组

织中,LIFR mRNA表达最高;而在PBMC[31]中最低。食蟹猴组织中的LIF和LIFR mRNA表达水平与人组织中观察到的相似,其中在脂肪组织中LIF表达高,在脂肪组织中LIFR表达高而在PBMC中低(数据未显示)。

[0249] 图17A和图17B的组织编号为:1-脂肪(肠系膜回肠);2-肾上腺;3-膀胱;4-膀胱(膀胱三角);5-血管(大脑:大脑中动脉);6-血管(脉络丛);7-血管(冠状动脉);8-血管(肠系膜(结肠));9-血管(肺);10-血管(肾脏);11-脑(杏仁核);12-脑(尾核);13-脑(小脑);14-脑(皮质:扣带前区);15-脑(皮质:扣带后区);16-脑(皮质:额叶外侧);17-脑(皮质:额叶内侧);18-脑(皮质:枕骨);19-脑(皮质:顶叶);20-脑(皮质:颞叶);21-脑(背缝核(dorsal-raphe-nucleus));22-脑(海马);23-脑(下丘脑:前区);24-脑(下丘脑:后区);25-脑(蓝斑);26-脑(延髓);27-脑(伏核);28-脑(黑质);29-乳腺;30-盲肠;31-外周血单核细胞(PBMC);32-结肠;33-背根节(DRG);34-十二指肠;35-输卵管;36-胆囊;37-心脏(左心房);38-心脏(左心室);39-回肠;40-空肠;41-肾脏(皮质);42-肾脏(延髓);43-肾脏(骨盆);44-肝脏(实质);45-肝脏(支气管:一级);46-肝脏(支气管:三级);47-肺(实质);48-淋巴腺(扁桃腺);49-肌肉(骨骼);50-食道;51-卵巢;52-胰腺;53-松果体;54-垂体腺;55-胎盘;56-前列腺;57-直肠;58-皮肤(包皮);59-脊髓;60-脾(薄壁组织);61-胃(胃窦);62-胃(胃体);63-胃(胃底);64-胃(幽门管);65-睾丸;66-甲状腺;67-气管;68-脐带;69-输尿管;70-子宫(子宫颈);71-子宫(子宫肌层);以及72-输精管。

[0250] 实例22-剂量选择、剂量增量和平剂量

[0251] 抗LIF抗体的剂量选择、剂量增量和平剂量如下所述。将小鼠和食蟹猴用于h5D8的安全性评估。

[0252] 在每周接受高达100mg/kg的IV给药的小鼠和猴的4周GLP毒性研究中,未观察到与治疗相关的副作用。因此,在研究条件下,这两种物种的最高非严重毒性剂量(HNSTD) > 100mg/kg,并且将未观察到的不良作用水平(NOAE)设置为100mg/kg IV。按比例缩放剂量以建立人等效剂量(HED)。采用基于体表面积(BSA)的缩放方法进行HED的估算。根据这些GLP毒理学研究,如下所示进行最大推荐起始剂量(MRSD)的估算:

[0253] • 来自小鼠NOAE的0.81mg/kg IV HED,安全性系数为10倍

[0254] • >10mg/kg IV,基于小鼠的严重毒性剂量的1/10

[0255] • 来自食蟹猴NOAE的3.2mg/kg IV HED,安全性系数为10倍

[0256] • >16.7mg/kg IV,基于HNSTD的1/6

[0257] 根据毒理学研究,并在1期研究中针对晚期癌症患者群体采取保守方法,数据支持1mg/kg(或75mg平剂量)IV的MRSD。

[0258] 在设定MRSD时也已考虑了药理活性剂量(PAD)。根据迄今为止可用的小鼠药理模型中的药理学、PK和LIF水平数据,采用以下方法估算PAD。根据U251小鼠异种移植模型中的剂量反应,最佳有效剂量被认为是每周两次约300 μ g IP;该剂量水平与约230 μ g/mL的最后一次剂量之前的血清水平谷值相关。有证据表明,在此模型中,在此300 μ g剂量下,血清LIF水平已达到最大水平,这也得到了小鼠GLP毒性研究中10、30和100mg/kg剂量下血清LIF水平数据的支持。使用基于与猴PK数据拟合并针对人按比例缩放的2房室模型的PK模型,每3周1500mg的临床剂量将提供约500 μ g/mL的C_谷。类似地,在该U251小鼠异种移植模型中,每周两次的最低有效剂量20 μ g与约20 μ g/mL的最后一次剂量之前的血清水平谷值相关;在小鼠

PK耐受性研究中,有证据表明在该20- μg 剂量下仅达到了最大血清LIF水平的约50%,这得到在0.5mg/kg IV剂量下最小LIF水平的证据的支持。每3周75mg的临床剂量将提供约25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 $C_{\text{谷}}$ 。小鼠同系模型提供的其他PK-PD (LIF水平) 数据支持源自U251小鼠异种移植模型的PAD。

[0259] 因此,根据小鼠和猴的毒理学数据以及小鼠异种移植模型中的最小有效剂量,开始剂量为75mg i.v.被认为是合适的。毒理学数据支持1500至2000mg的最大临床剂量。基于在动物模型中观察到线性PK结合不存在与测试物品相关的不良发现,可以采用平剂量方法。

[0260] 实例23-用以确定白血病抑制因子水平的测定

[0261] MSD板的制备

[0262] MSD板(中尺度诊断公司;目录号R93BA-1)点涂有新鲜稀释的兔A4单克隆捕获抗体(96孔板中每孔5 μl ,PBS+0.03%Triton X-100中100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)并在室温下孵育过夜。第二天,将板用阻断溶液阻断并进行样品制备。可以立即使用各板,或干燥和冷藏以备将来使用。

[0263] 样品制备和标准品

[0264] 质量控制品是在100%正常人血清或血浆(NHS或NHP)池(基质)中大量制备的,其含有饱和量的h5D8治疗性抗体(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和重组人LIF(rhLIF;ACRO生物系统公司(ACRO Biosystems);目录号LIF-H521b),并且可储存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 并在使用前解冻。在正常人血清或血浆中制备标准品(两次浓缩),其含有饱和量的治疗性抗体与几何稀释系列的rhLIF。标准品可在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存并在使用前解冻。解冻后的质量控制品和标准品系列已移液到深孔板的孔中。如果事先冷冻,则将受试者血浆或血清样品解冻。用稀释剂2(中尺度诊断公司;目录号R51BB-4)将标准品、质量控制品和样品以1:2稀释,最终浓度为50%基质且含10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 治疗性抗体,并在室温下孵育30分钟。

[0265] 测定

[0266] 将质量控制和样品一式三份转移到涂覆和阻断的MSD板上。在室温下孵育1小时后,通过洗涤步骤除去MSC-1/LIF复合物。添加Sulfo-TagTM小鼠单克隆检测抗体(生物传奇公司;克隆M017C3;目录号530301),并在孵育后,通过另一个洗涤步骤除去未结合的材料。结合的MSC-1/LIF复合物由MSD S600仪器通过Sulfo-TagTM检测。该系统定量的强度与结合的抗体复合物的量成正比,并表示为RLU(相对光单位)。通过对标准曲线进行插值计算LIF总浓度(以pg/ml计),并将其乘以稀释倍数2,以得出血浆或血清样品中的LIF总浓度。

[0267] 该测定具有如图19A和19B所示的宽的动态范围;如图20A和B所示的高均一性;并在高浓度的治疗性抗体浓度下稳定,如图21所示。

[0268] 对该测定进行了很多优化,包括使用如图22A和图22B所示的稀释剂;该捕获抗体的点涂浓度如图23所示;并且使用的检测抗体如图24所示。

[0269] 实例24-被治疗性抗体和检测抗体结合的表位

[0270] 为了利用捕获ELISA来测量治疗性抗体对靶标的接合,该捕获抗体和检测抗体必须结合至该靶标的不同区域。另外地,如果要测量总靶标(被治疗性抗体结合的和未结合的),则所涉及的所有三种抗体(治疗性、检测和捕获)必须结合该靶标,并且不干扰其他两种抗体的结合。为此,我们寻求在ELISA测定中确定预先形成的LIF/抗体复合物的结合。如图25A和25B所示,检测抗体M017C3可能结合至LIF的与LIF受体相互作用的一部分,因为与

7C3复合的LIF结合至gp130涂覆的板而不是LIF受体涂覆的板。治疗性抗体h5D8可能结合至LIF的与gp130相互作用的一部分,因为与h5D8复合的LIF结合至LIF受体涂覆的板而不是gp130涂覆的板。如图25C和图25D所示,当LIF被生物素化并使用亲和素标记的HR检测到时,可以看到类似的结果。

[0271] 通过使用竞争结合测定针对LIF筛选潜在抗体来确定捕获抗体A4 (SEQ ID NO:41和42所阐述)。这些实验揭示抗体A4展现出与LIF的高结合,并且不干扰治疗性抗体h5D8或M017C3的结合。

[0272] 实例25- 确定患者中的LIF水平

[0273] 使用如实例23中所述的LIF水平测定来确定患有不同癌症的三个人类受试者中的LIF水平。受试者A是一位57岁的白人男性,被诊断患有黏液样脂肪肉瘤。受试者用新辅助阿霉素和异环磷酰胺疗法治疗约4个月,右小腿接受新辅助放疗(5000cGy)约35天。然后对受试者进行治愈性的右小腿广泛切除,右胫后神经以及腓血管、胫前血管、胫后血管和腓血管的解剖。受试者复发胸膜疾病和胸部恶性淋巴结病。受试者用吉西他滨和泰索帝(Taxotere)治疗约41天,以进行性疾病为最佳反应。然后将受试者用达卡巴嗪治疗4个月,以部分反应为最佳反应。受试者在22天后出现放射学进展,并进入h5D8试验。受试者接受了他的第一剂1125mg的h5D8,他的最近剂量(C6)(1500mg)在约136天后。在基线时,受试者没有临床上明显的实验室异常,ECOG表现状态为1。受试者没有外周肿瘤标记物。选择两个胸膜肿块作为靶病灶,选择三个非靶病灶(1个胸膜肿块和2个LNS)。从转移的肺部位收集活检以确定用于h5D8治疗的生物标记物。在进行活检时,受试者显示出升高的LIF水平的证据。受试者A的LIF水平示于图26A中。

[0274] 受试者B是一位66岁的男性,被诊断患有IV期黑素瘤。在h5D8试验之前,受试者接受了一种治疗。最佳反应无法评估,结果未显示(纳武单抗;4个月)。纳武单抗治疗失败表明肿瘤受到了严重的免疫抑制。受试者处于治疗方案(1125mg)中(6周),记录的最佳反应是“进行性疾病”。从转移的皮肤部位收集活检。在收集活检时,通过总LIF测定在受试者中观察到LIF的水平通常更高。总LIF测定的结果示于图26B中。

[0275] 受试者C是一位66岁的白人女性,被诊断患有卵巢癌。受试者在12周时的h5D8 C5评估显示,CA19-9增加(412至1072U/ml),但按照RECIST标准,其靶病灶未见明显增加(107至109mm)。受试者处于治疗方案(1500mg)中(+16周),记录的最佳反应是“稳定的疾病”。从转移的淋巴结部位收集活检以确定用于h5D8治疗的生物标记物。在进行活检时,作为施用h5D8的结果,受试者显示出升高的LIF水平的证据。受试者C的LIF水平在图26C中示出。

[0276] 虽然在本文示出并描述了本发明的优选实施例,但是对本领域技术人员显而易见的是此类实施例仅以示例性的方式提供。在不偏离本发明的情况下,本领域技术人员现在能想到众多变化、改变和取代。应当理解,在实施本发明时,可以采用本文描述的本发明的实施例的各种替代方案。

[0277] 本说明书中提到的所有公开、专利申请、授权专利以及其他文献均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物、专利申请、授权专利或其他文献被具体和单独地指示通过引用以其整体并入。在与本披露中的定义相矛盾的程度,通过引用并入的文本中所含的定义被排除。

[0278] 除非另有定义,本文所使用的所有技术术语具有与本发明所属领域的技术人员通

常所理解的相同的意义。如本说明书和所附权利要求书中所用的,单数形式“一个/一种(a/an)”和“该(the)”包括复数引用,除非上下文明确地指示其他的情况。除非另有说明,否则本文中“或”的任何引用旨在涵盖“和/或”。

[0279] 如本文所用,除非另有指示,术语“约”是指在所述量附近变化至少10%的量。

[0280] 如本文所用,术语“治疗(treat或treating)”是指对设计或旨在减轻与所述生理或疾病状态相关的至少一种体征或症状的对个体的生理或疾病状态的干预。本文所述的关于癌症的治疗是指旨在诱导完全反应、部分反应、所治疗的癌症或肿瘤的进展延迟、肿瘤大小或肿瘤负荷的减少或者肿瘤生长或肿瘤负荷的延迟的干预。治疗还指旨在减少癌症或肿瘤的转移或恶性度的干预。本领域技术人员将认识到,在患有疾病的个体的异质群体中,并非所有个体都会对给定的治疗产生同等或完全的反应。尽管如此,这些个体仍被视为已接受治疗。不成功的治疗通常会导致疾病进展,因此有必要采用其他治疗方法进行额外治疗。在某些方面,本文所述的抗体和方法可用于维持癌症的缓解或预防与治疗的癌症有关的相同癌症或不同癌症的复发。

[0281] 如本文所用,术语“总LIF”是指结合至治疗性抗体的LIF和未结合至治疗性抗体的LIF。如本文所用,术语“总LIF水平”是指总LIF的定量。如本文所述,测量总LIF水平的测定测量结合至治疗性抗体的LIF和未结合至治疗性抗体的LIF。如本文所述,可以确定多种患者样品的总LIF水平,这些样品包括但不限于血液、血浆或血清。

[0282] 序列

[0283]

SEQ ID NO	序列
1	GFTFSHAWMH
2	GFTFSHAW
3	HAWMH
4	QIKAKSDDYATYYAESVKG
5	IKAKSDDYAT
6	TCWEWDLDF
7	WEWDLDF
8	TSWEWDLDF
9	RSSQSLLDSGHTYLN
10	QSLLDSGHTY
11	SVSNLES
12	SVS
13	MQATHAPPYT
14	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISR DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTLLTVSS
15	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCLASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISR DDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTMTVSS
16	EVQLVESGGGVVQGRSLRLSCLASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFSISR DNAKNSLYLQMNSLRVEDTVYYCTCWEWDLDFWGQGTTLTVSS
17	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISR DDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTLLTVSS
18	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGHTYLNWLFQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIK
19	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGHTYLNWLFQQRPGQPPRRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTL KISRVEAEDVGYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIK
20	DIVMTQTPLSLVTPGQPASISCRSSQSLLDSGHTYLNWLLQKPGQPPQLLIYSVSNLESGVPSRFGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGGGTKEIK
21	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGHTYLNWLFQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFNGSGSGTDF TSLISRVEAEDVGYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIK
22	MGWTLVFLFLSVTAGVHSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVAQIKAK SDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS

[0284]

	NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
23	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVQLQESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAK SDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTMTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
24	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAK SDDYATYYAESVKGRFSISRDNANSLYLQMNSLRVEDTVYYCTCWEWDLDFWGQGTMTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
25	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLMESGGGLVLPKGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAK SDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
26	MVSSAQFLGLLLCFQGTTRCDVVMQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWFQQRPGQSPRRLIYSVS NLESGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
27	MVSSAQFLGLLLCFQGTTRCDIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQPPRLIYSVS NLESGVDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
28	MVSSAQFLGLLLCFQGTTRCDIVMTQTPLSLVTPGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLLQKPGQPPQLLIYSVS NLESGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
29	MVSSAQFLGLLLCFQGTTRCDVVMQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQSPRRLIYSVS NLESGVDRFSGSGSGTDFTLISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
30	EVQLVESGGGLVLPKGGSLKLSAASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISR DDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	QVQLQESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISR DDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFSISR

[0285]

	DNAKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYCTCWEWDLDFWQGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKSLSLSPGK
33	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVGQIAKASDDYATYYAESVKGRFTISR DDSKSTFLQMNLLKTEDAVYYCTCWEWDLDFWQGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKSLSLSPGK
34	DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLFQRPQSPRRLIYSVSNLESQVDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLFQRPQSPRRLIYSVSNLESQVDRFSGSGAGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
36	DIVMTQTPLSVTPGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLLQKPGQPPQLLIYSVSNLESQVDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
37	DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLFQRPQSPRRLIYSVSNLESQVDRFSGSGSGTDFT LSISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVGQIAKASDDYATYYAESVKGRFTISR DDSKNTLYLQMNSLKTEDAVYYCTCWEWDLDFWQGQTMVTVSS
39	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVGQIAKASDDYATYYAESVKGRFTISR DDSKNTLYLQMNSLKTEDAVYYCTCWEWDLDFWQGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKSLSLSPGK
40	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQJRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEPPFNLDKLCGPNVTFDPPFHANGTEK AKLVELYRIVVYLGTSIGNITRDQKILNPSALSLSKLNATADILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVDVYGPDTSGKDV QKKKLGCCQLLGKYKQIIAVLAQAF
41	EQLEESVGDVLPKPGASLTLTCTASGFSFSGLYMCWVRQAPGKLEWVACIWTGSTDSTYYATWAKGRFTISKTSST TVTLQMTSLTVADTATYFCARGGGVPGDGALWPGTLTVSS
42	GTLELVMQTTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISNVLVWYQKSGQPPKLIYDASMLASGVPSRFKSGSGTQFTLTI SDLECADGATYYCQSYVYASSYFVNGFGGGTEVV
43	QSLEESGGDLVKPEGSLLTCTASGFSFSTDYVICWVRQAPGKLEWVACIYVGTSGDYYATWAKGRFTISKTSST VTLQMTSLTAADTATYFCAGADNPYDYFNLWPGTLTVSS
44	GTPDMTQTPASMEVAVGGTVTIKQASETISGYLSWYQQKPGQRPKLLMYRASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTI SGVECADEAATYYCQGGYSYSDTDNVFGGGTEVV
45	EQLVESGGGLVQPEGSLLTCKASGIDFSSNYVICWVRQAPGKLEWVACIYVGSSTYYANWAKGRFAISKTSST TVTLEVTSLTAADTATYFCARTVEPYDNLHFWGPGTLVSVSS
46	GTPDMTQTPASMEVAVGGTVTIKQASETISGYLSWYQQKPGQRPKLLMYRASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTI SGVECADEAATYYCQGGYSYSDTDNVFGGGTEVV

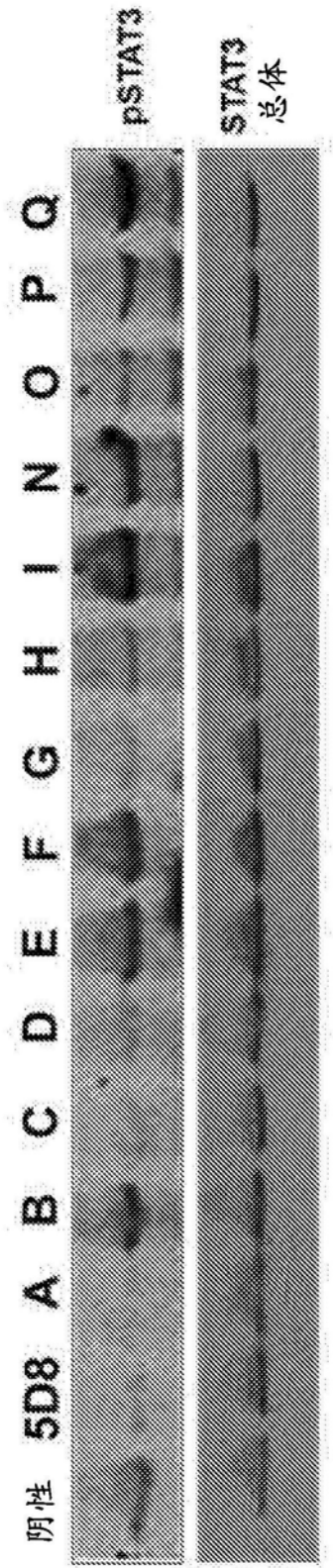


图1

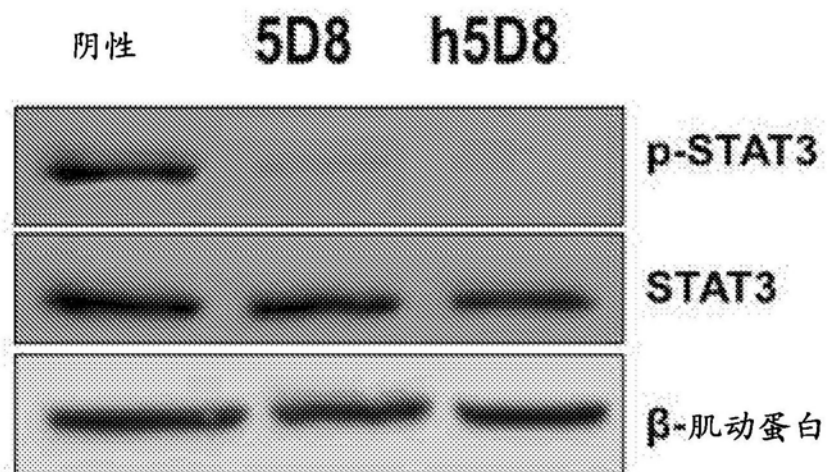


图2A

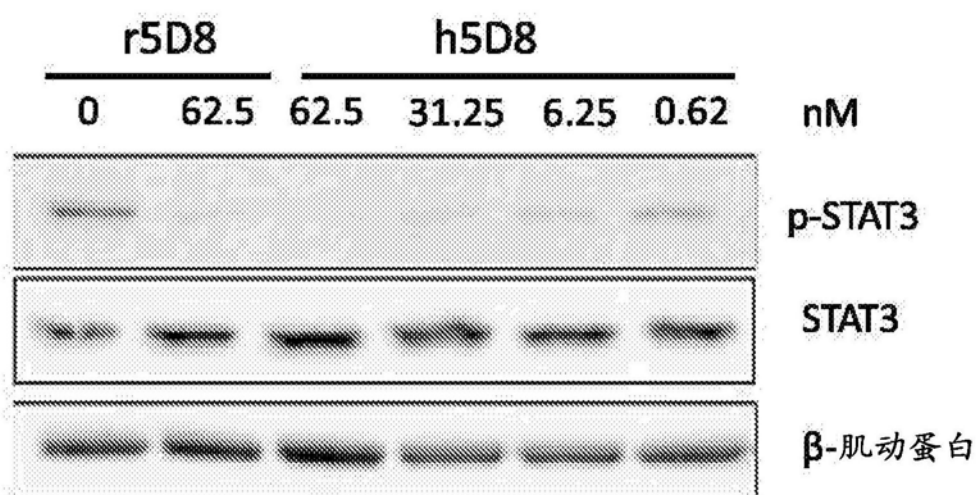


图2B

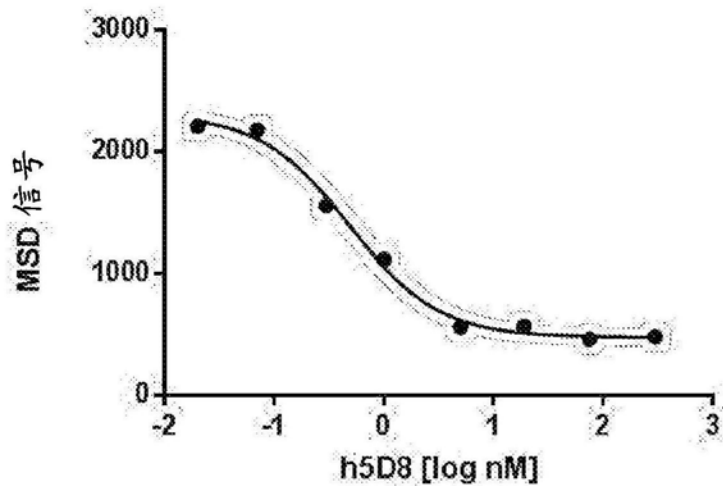


图3A

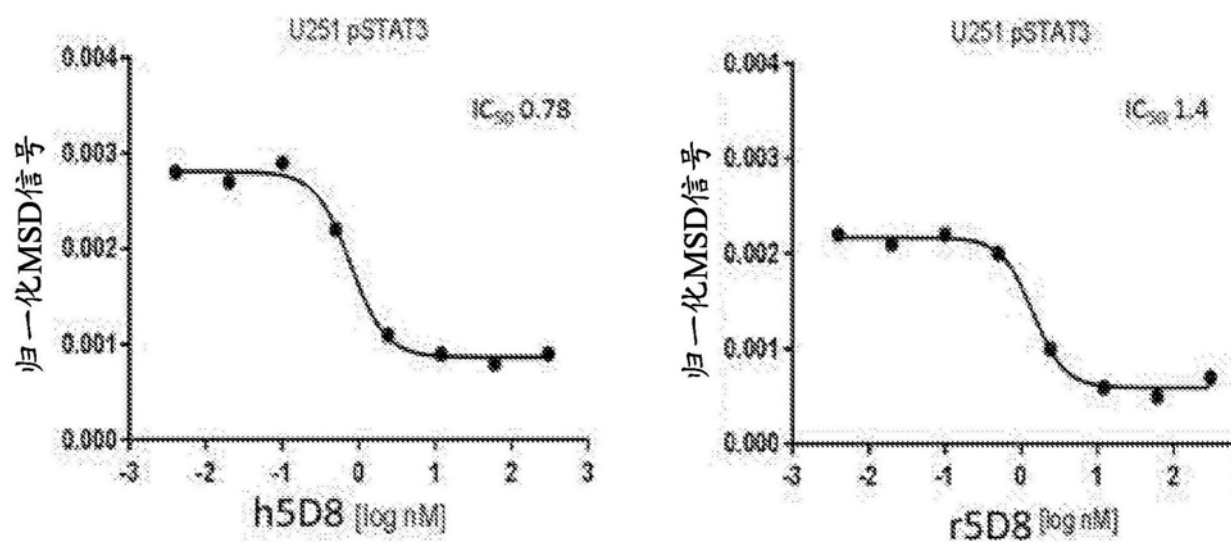


图3B

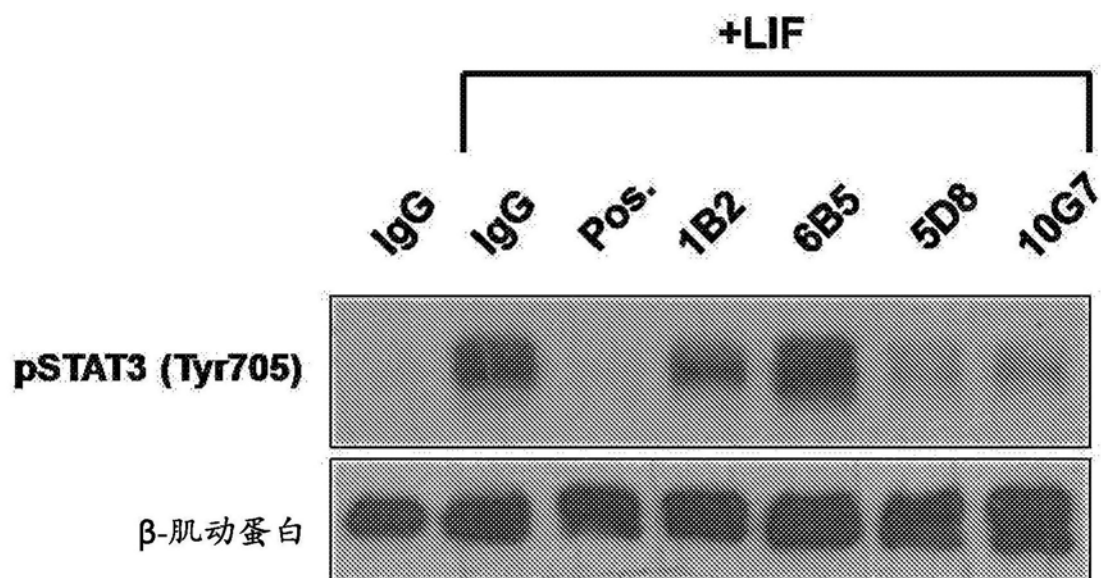


图4

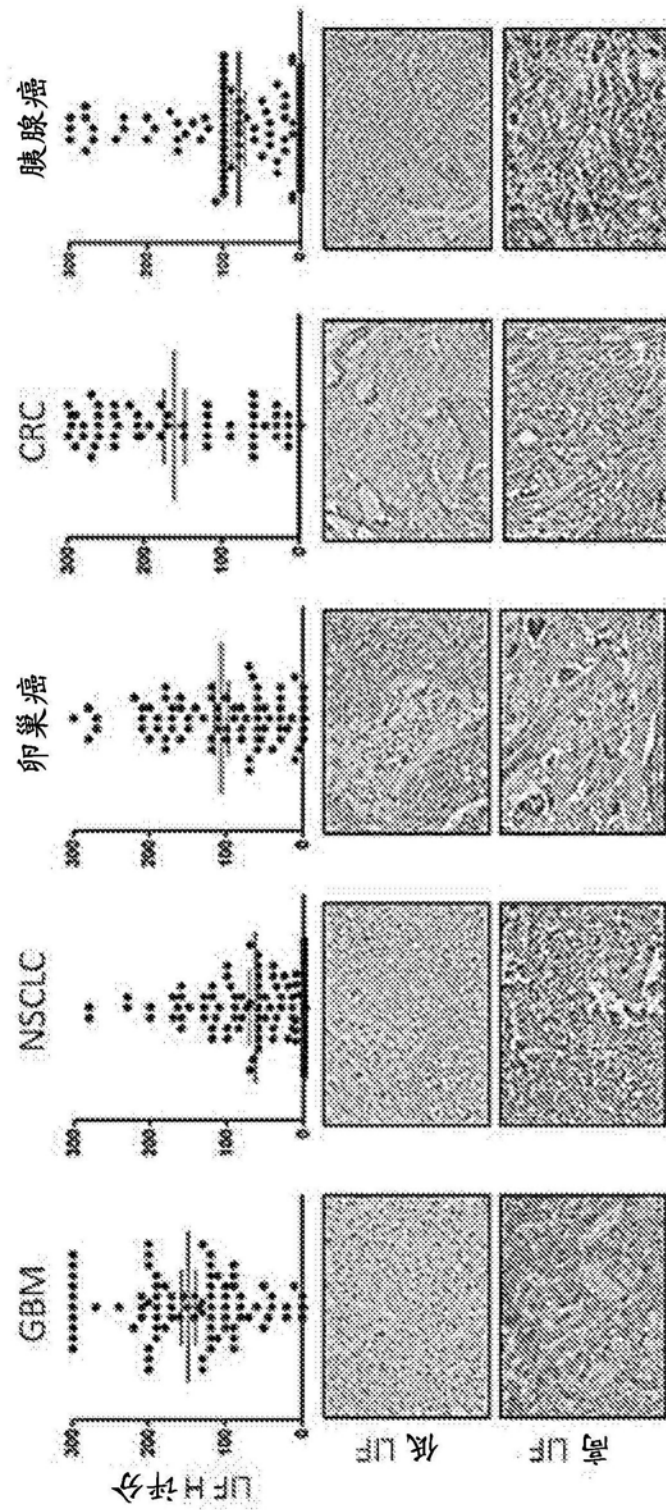


图5

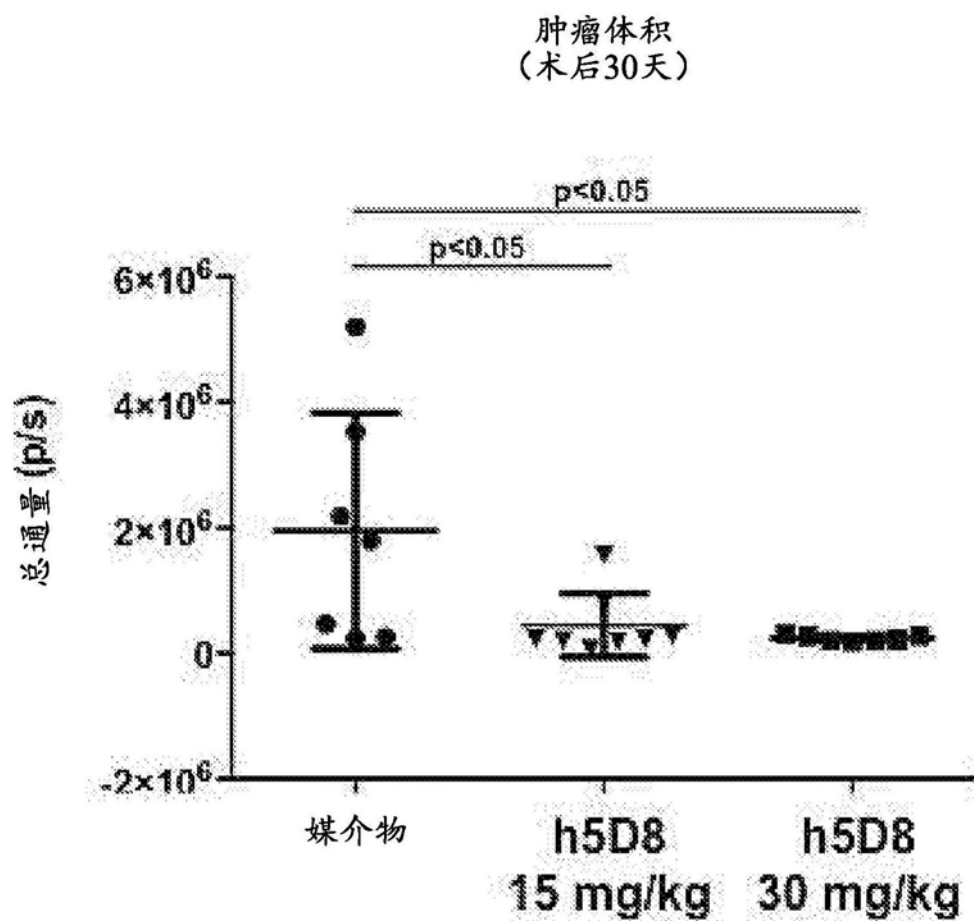


图6

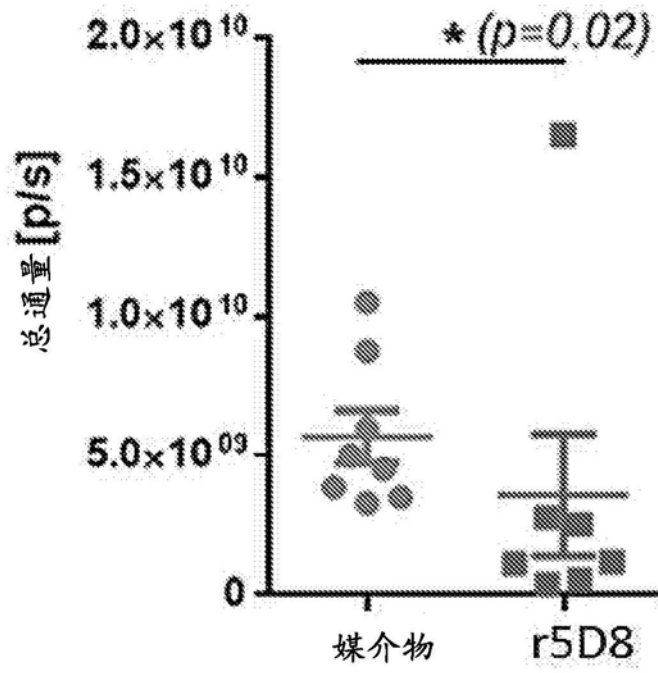


图7A

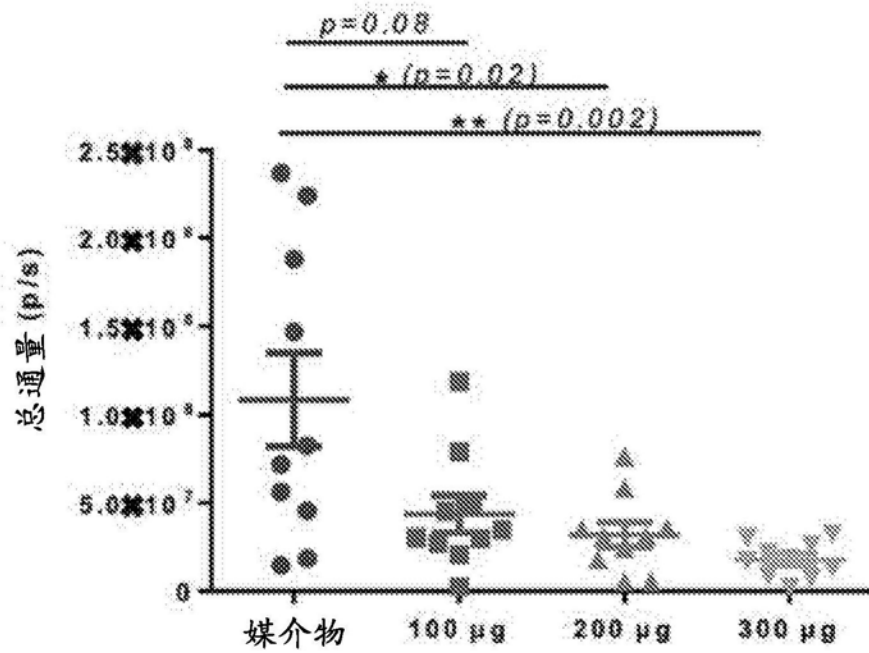


图7B

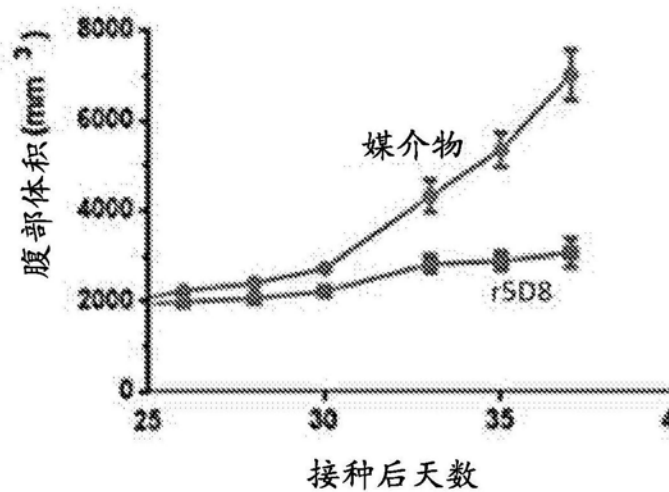


图8A

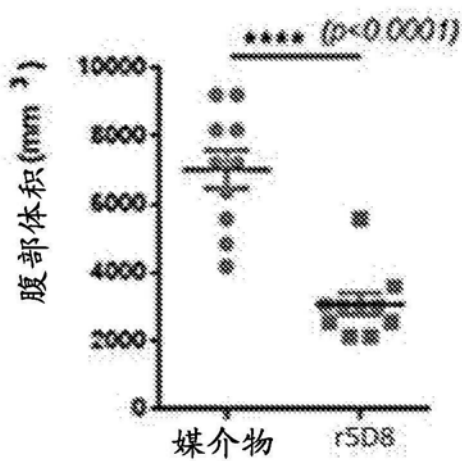


图8B

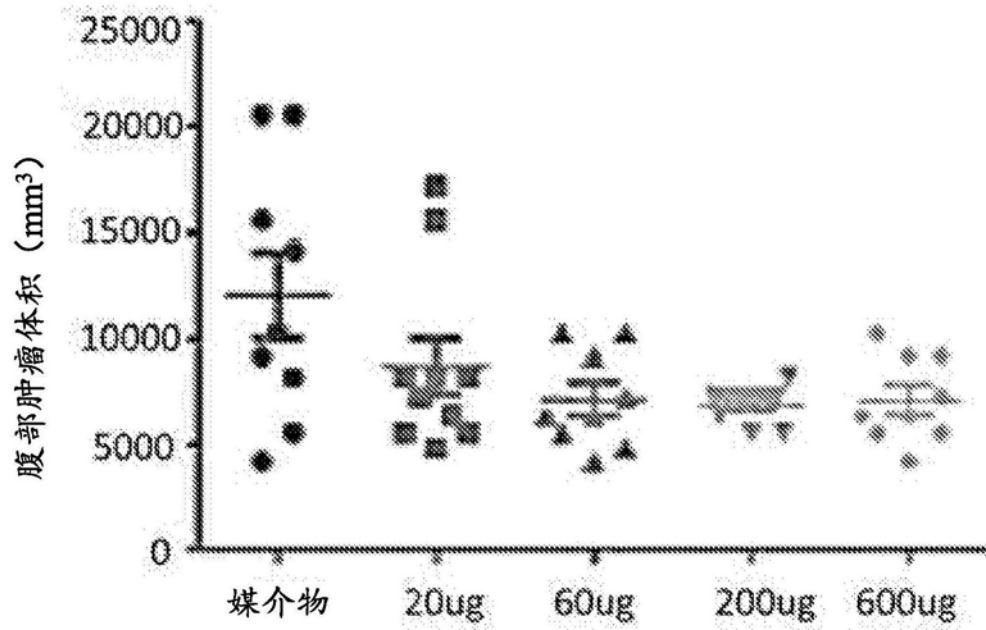


图8C

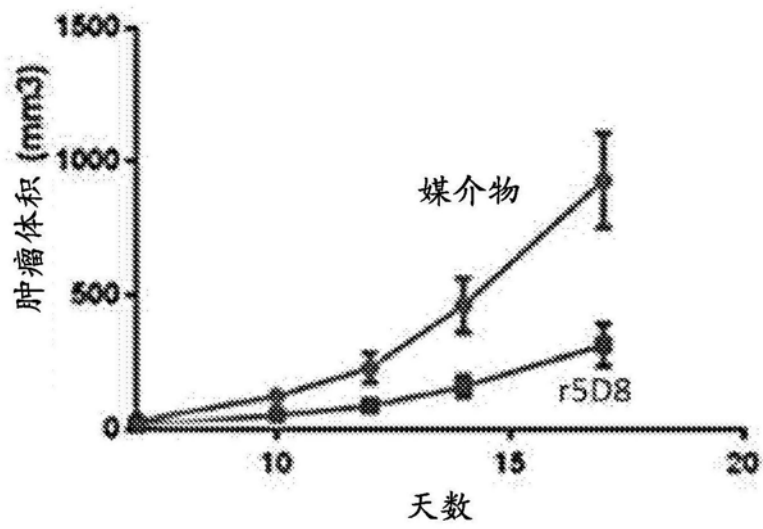


图9A

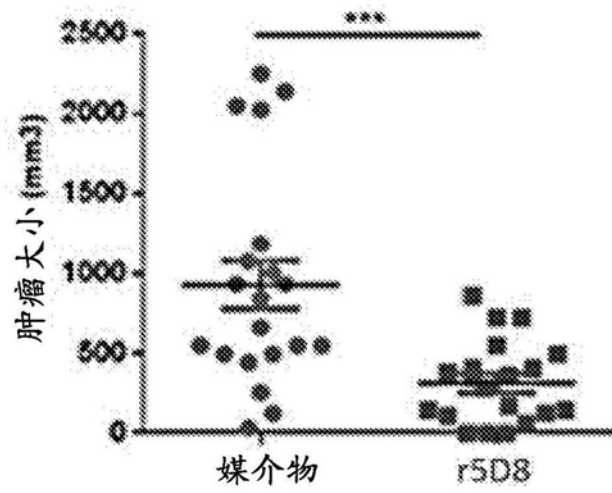


图9B

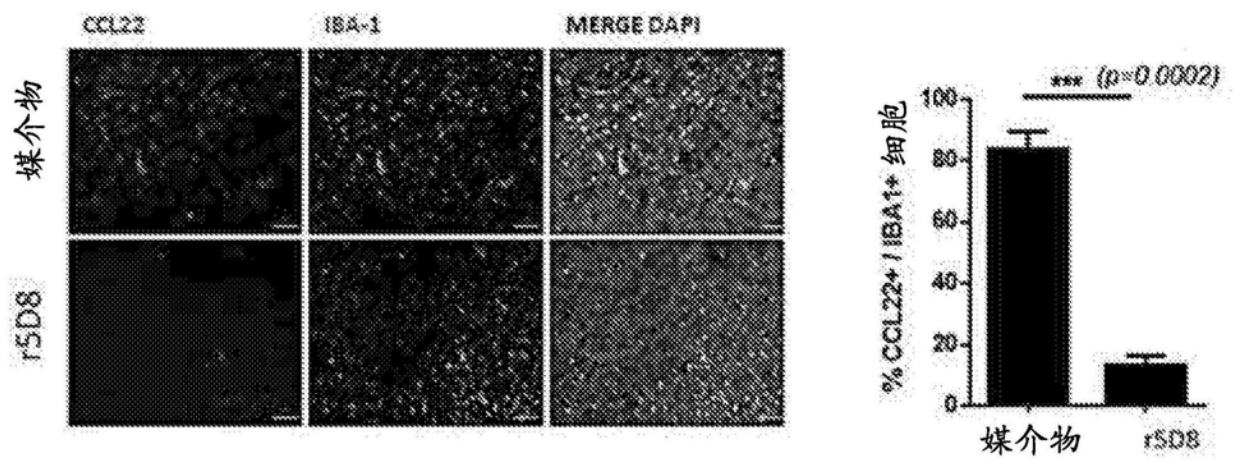


图10A

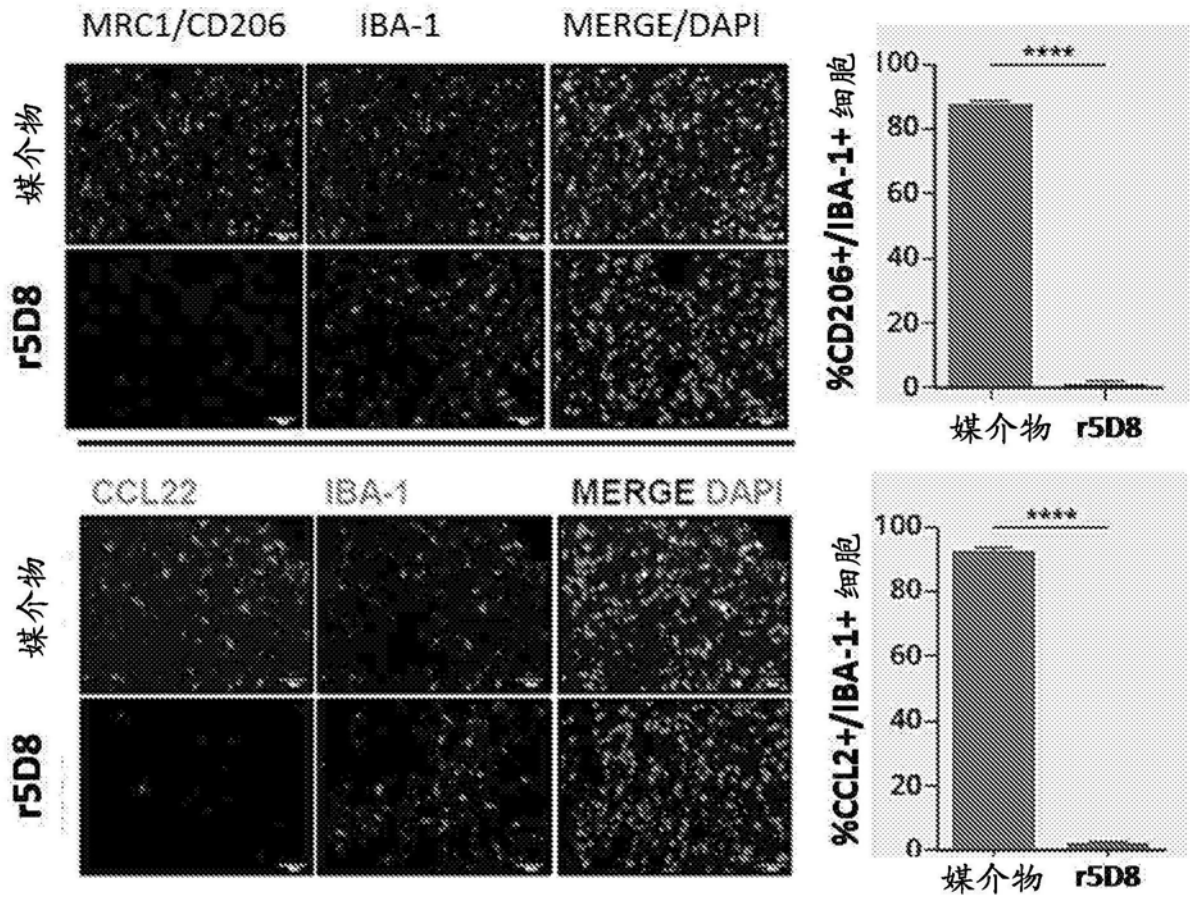


图10B

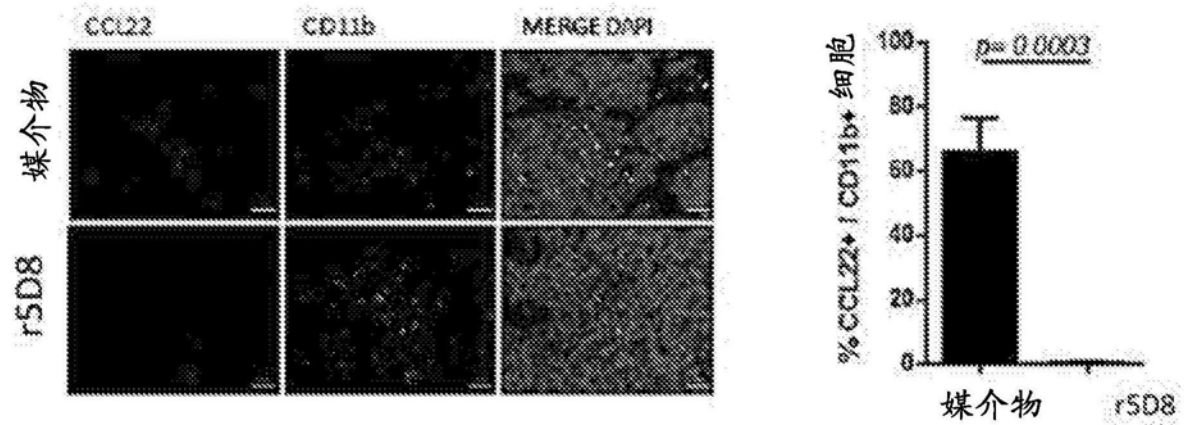


图10C

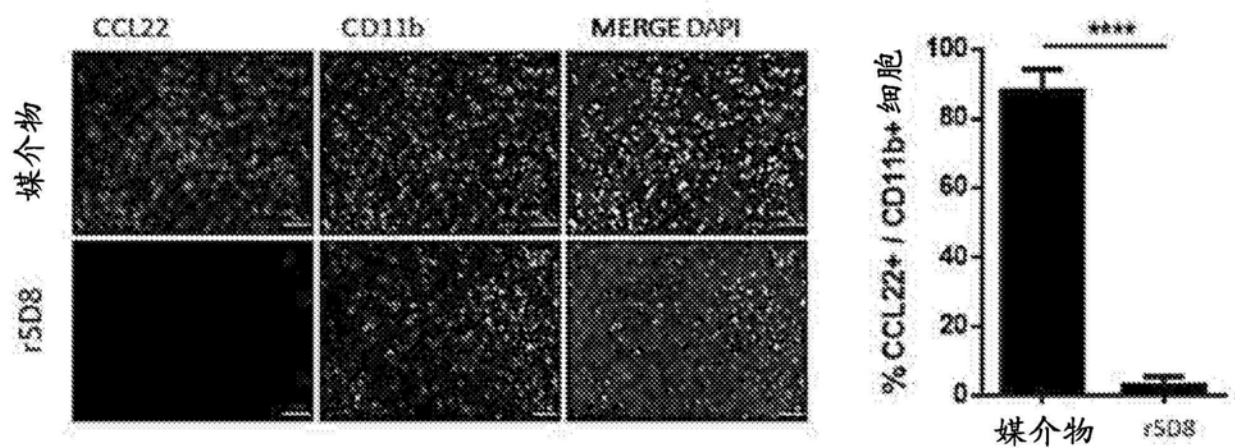


图10D

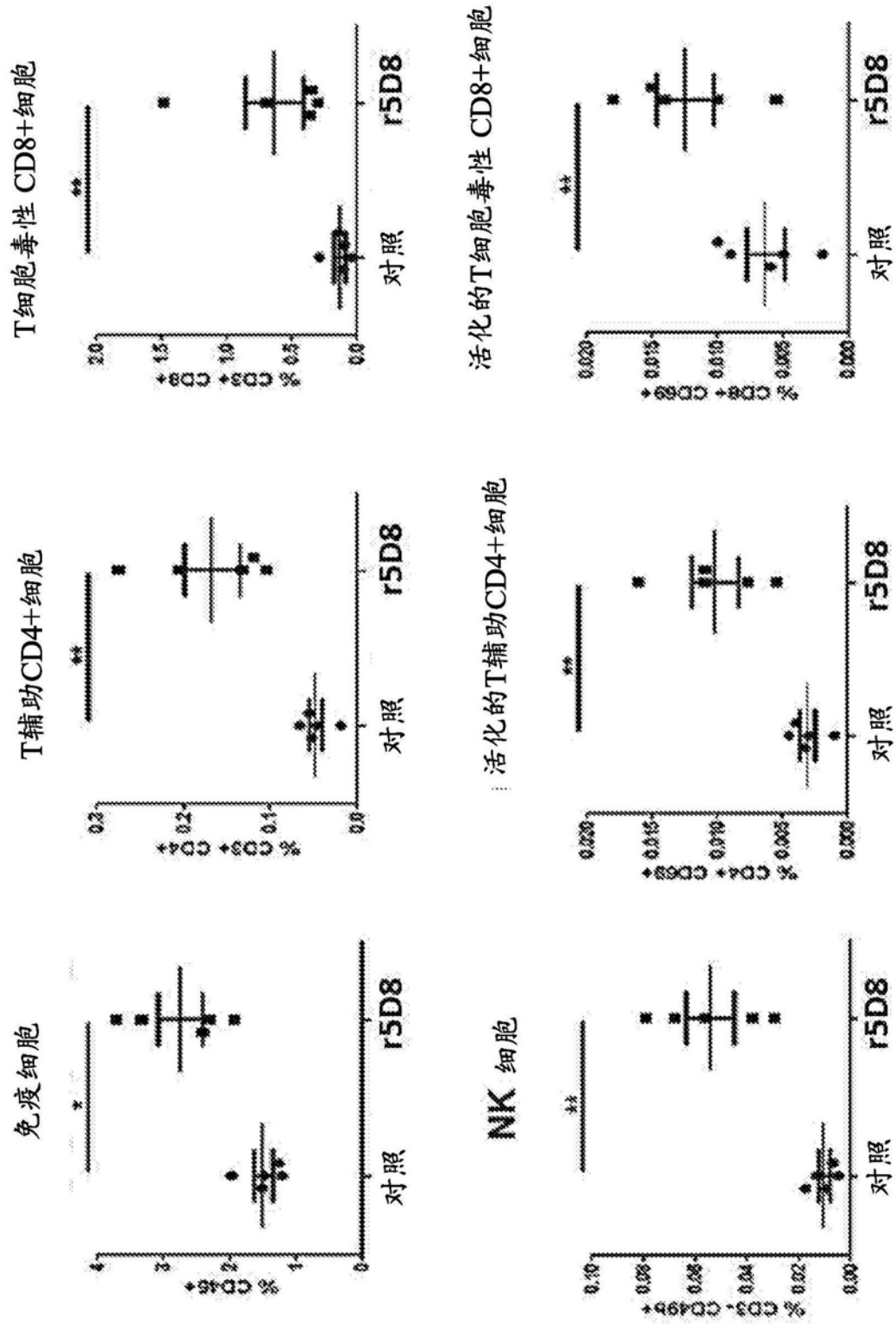


图11A

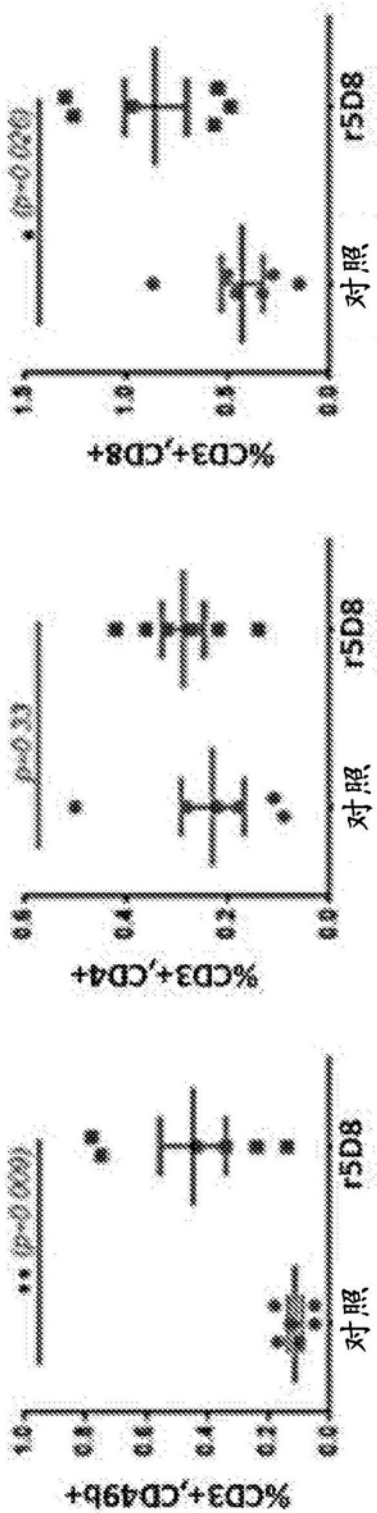


图11B

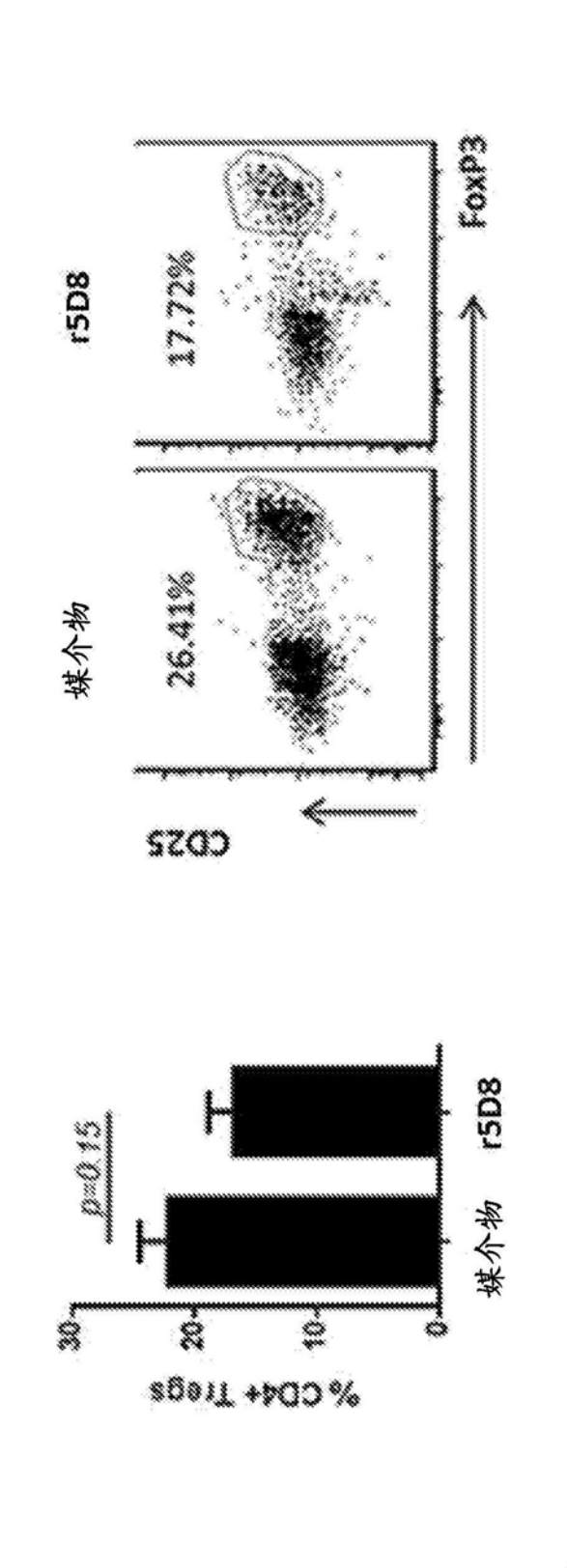


图11C

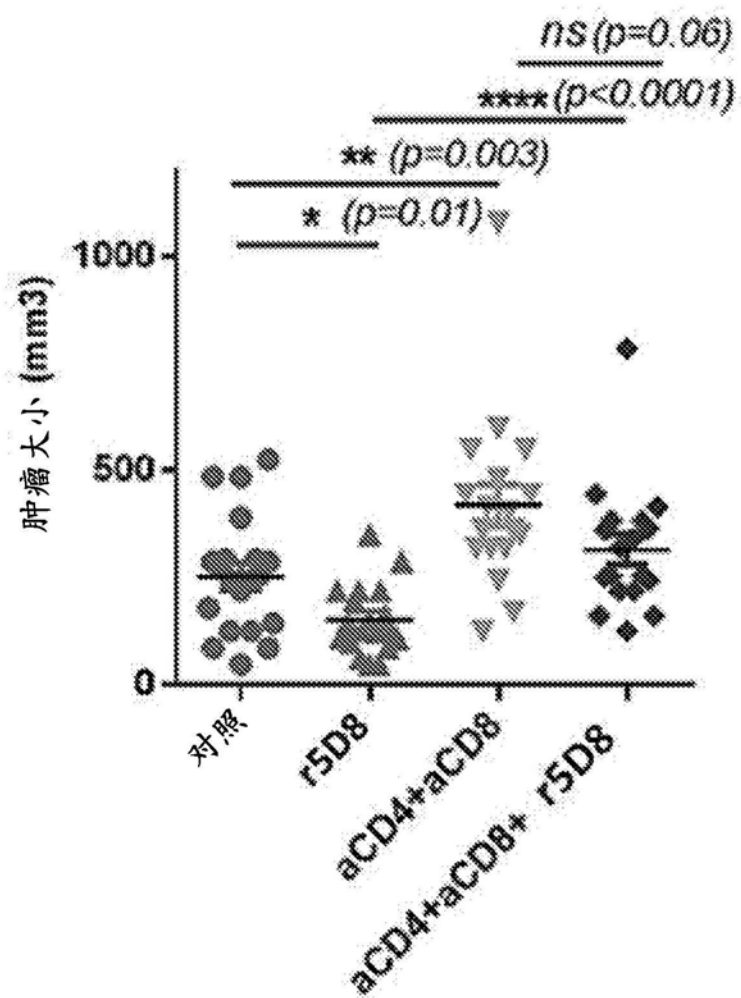


图12

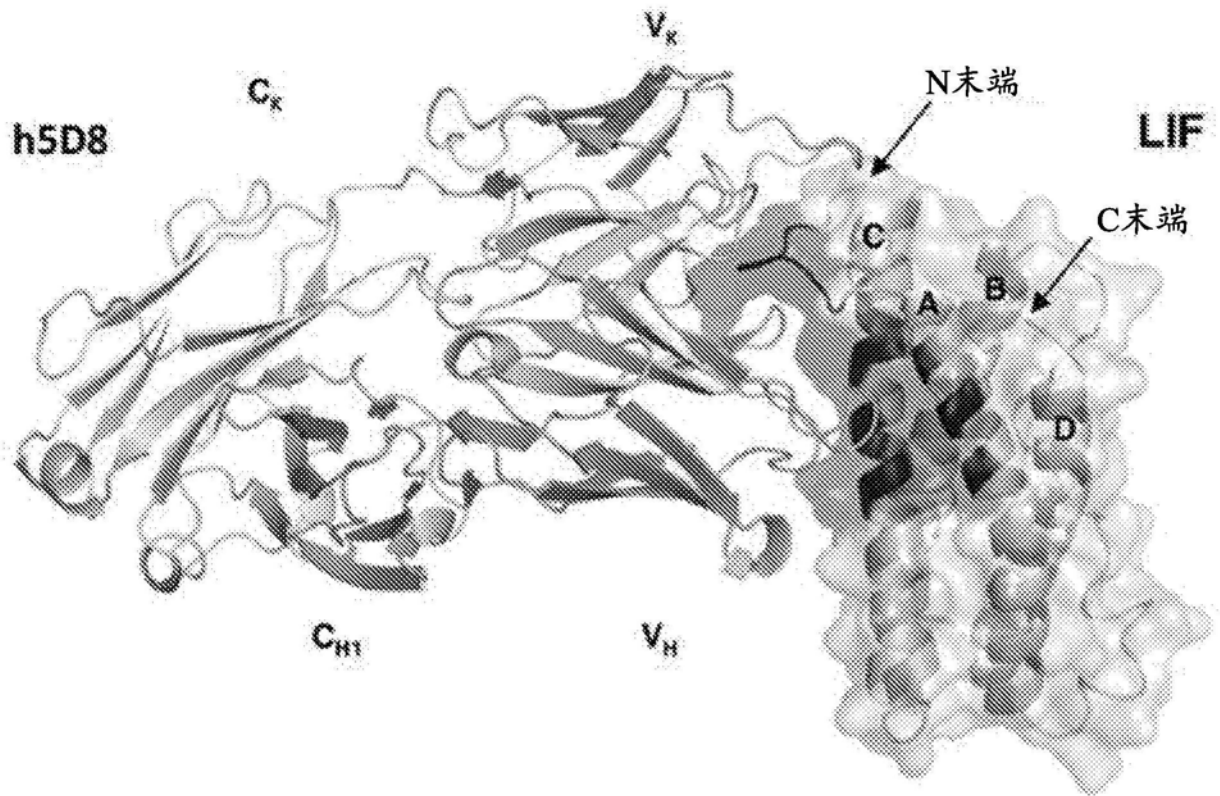


图13A

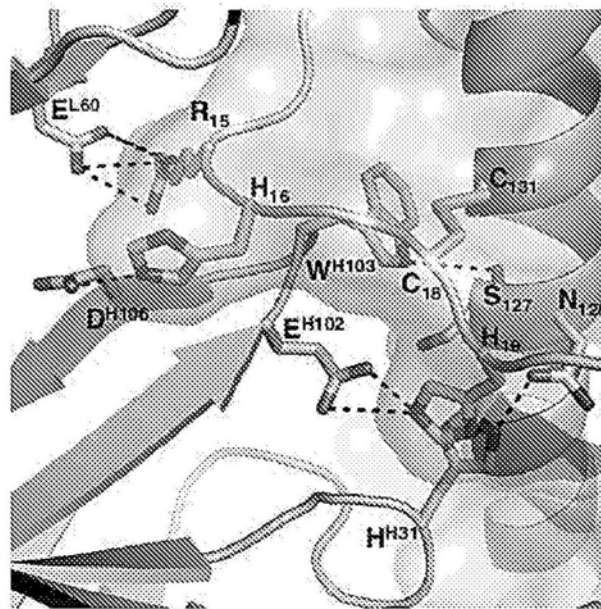


图13B

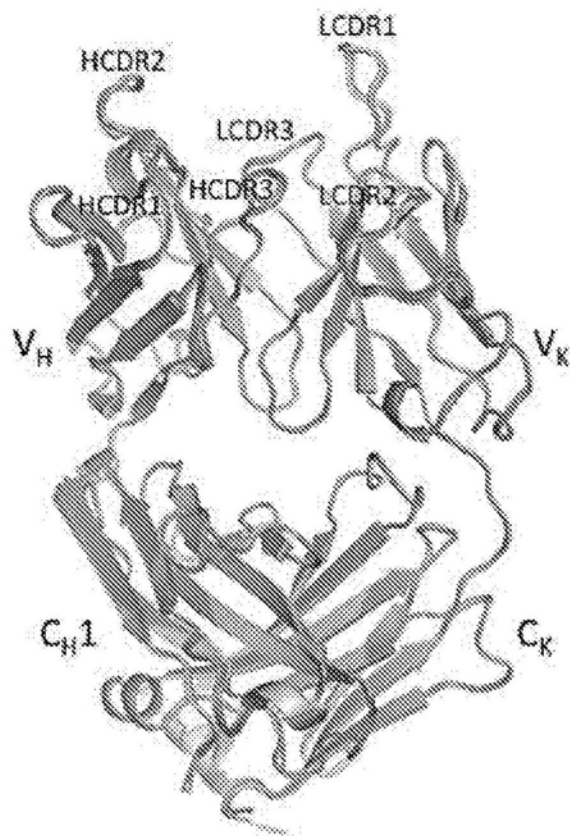


图14A

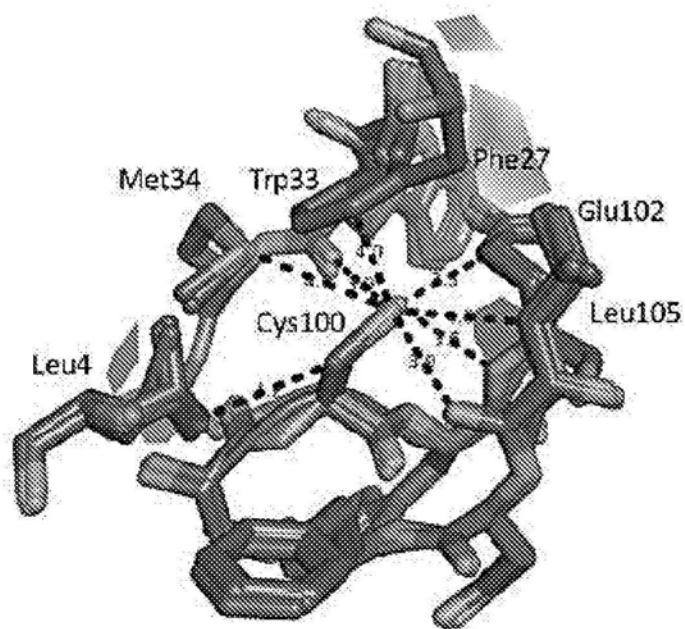
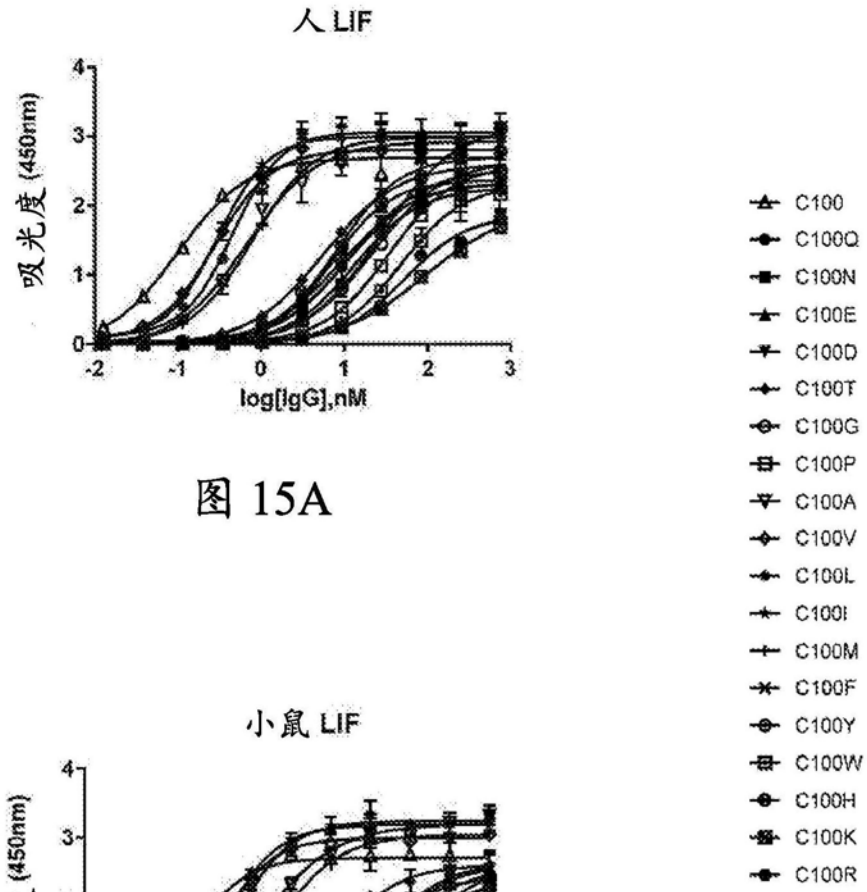


图14B



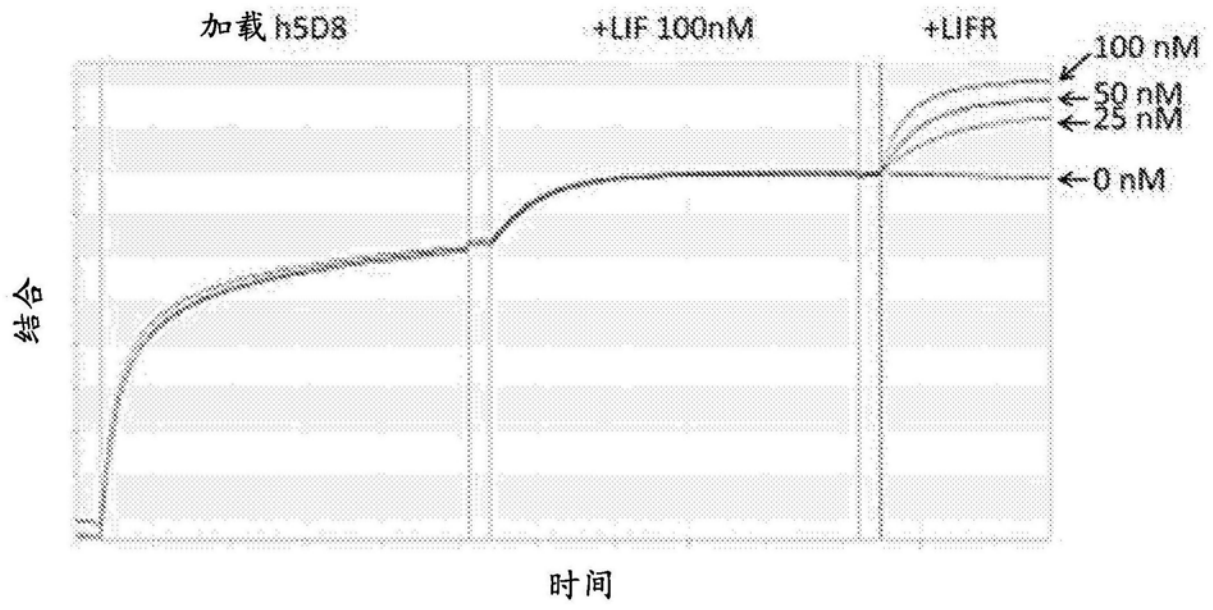


图16A

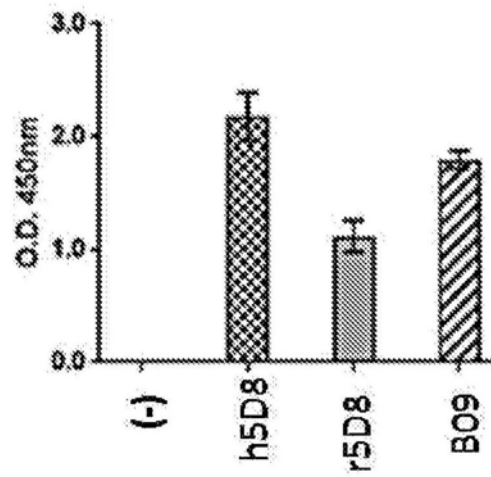


图16B

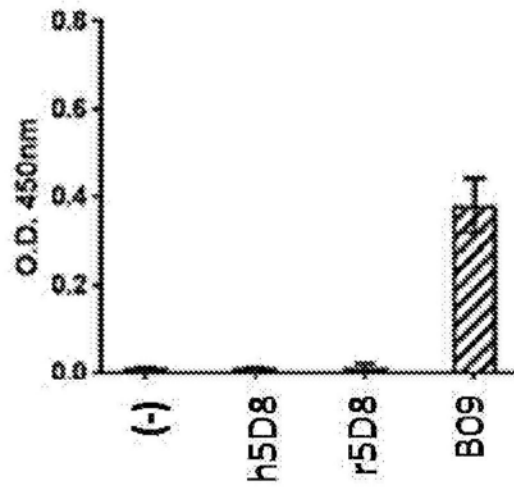


图16C

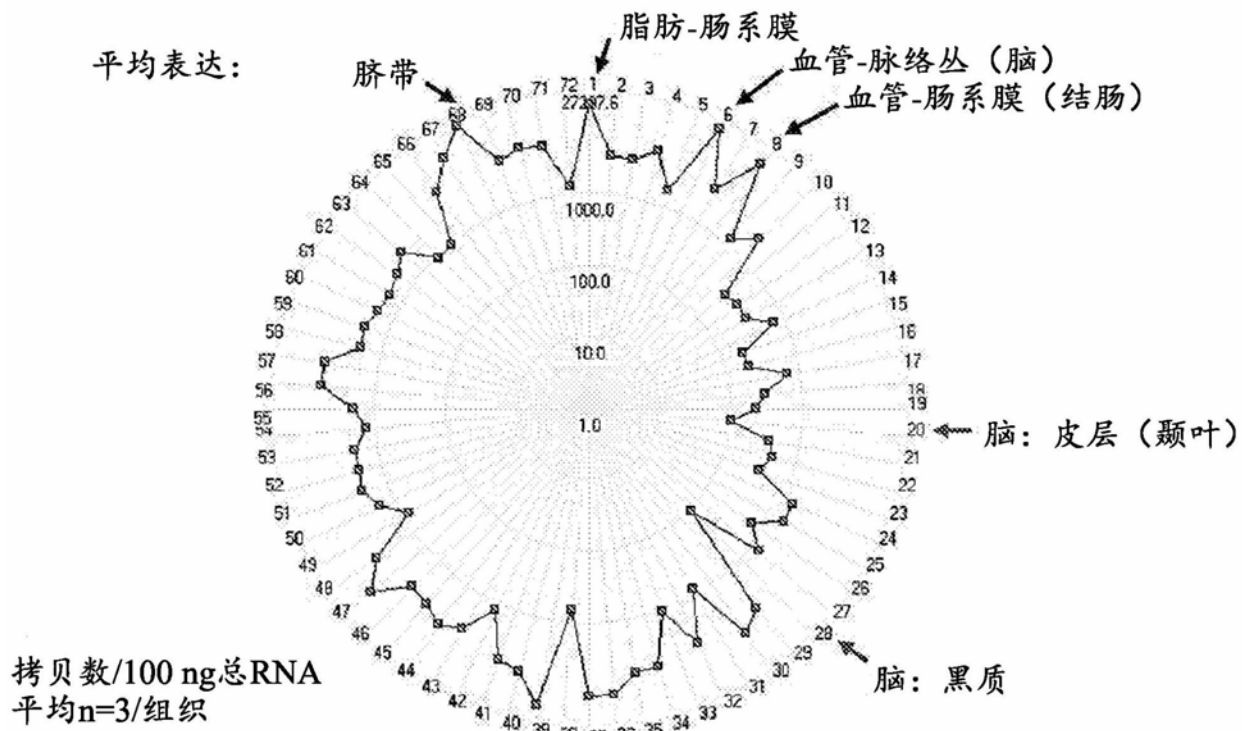


图17A

平均表达:

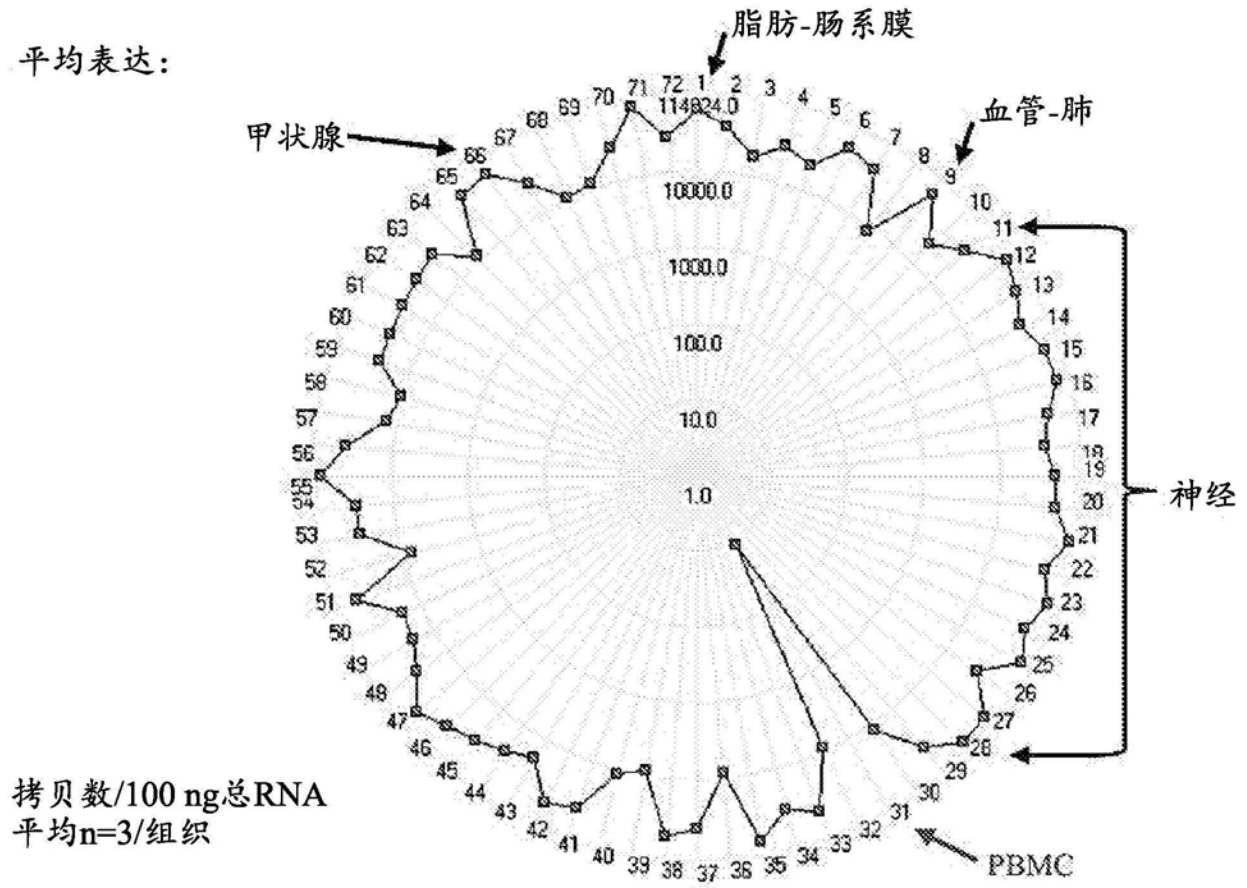


图17B

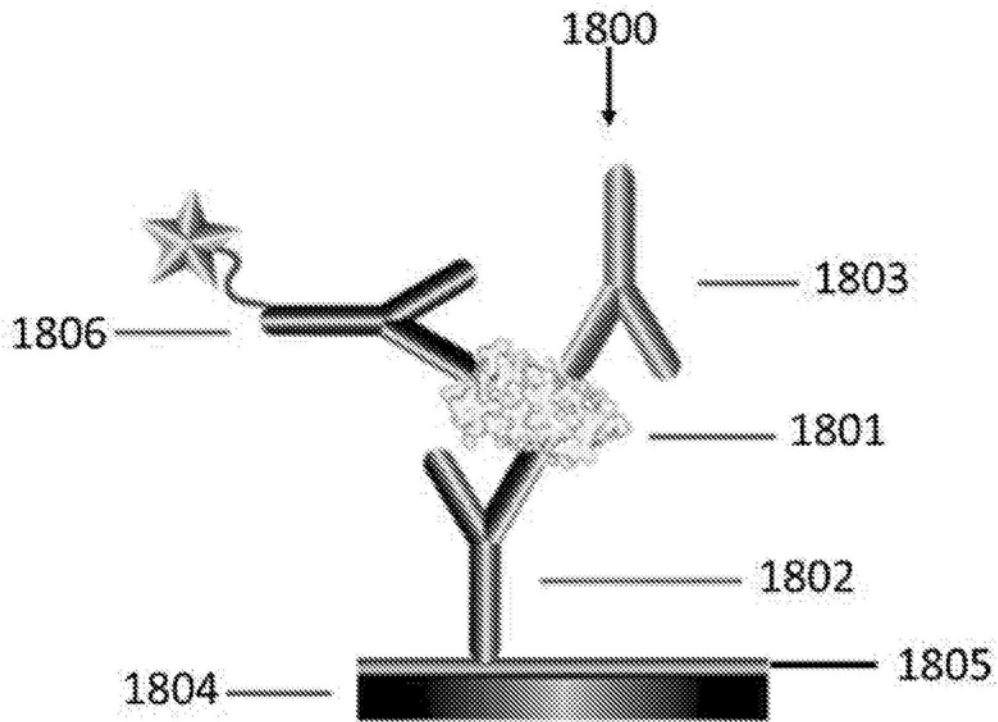


图18

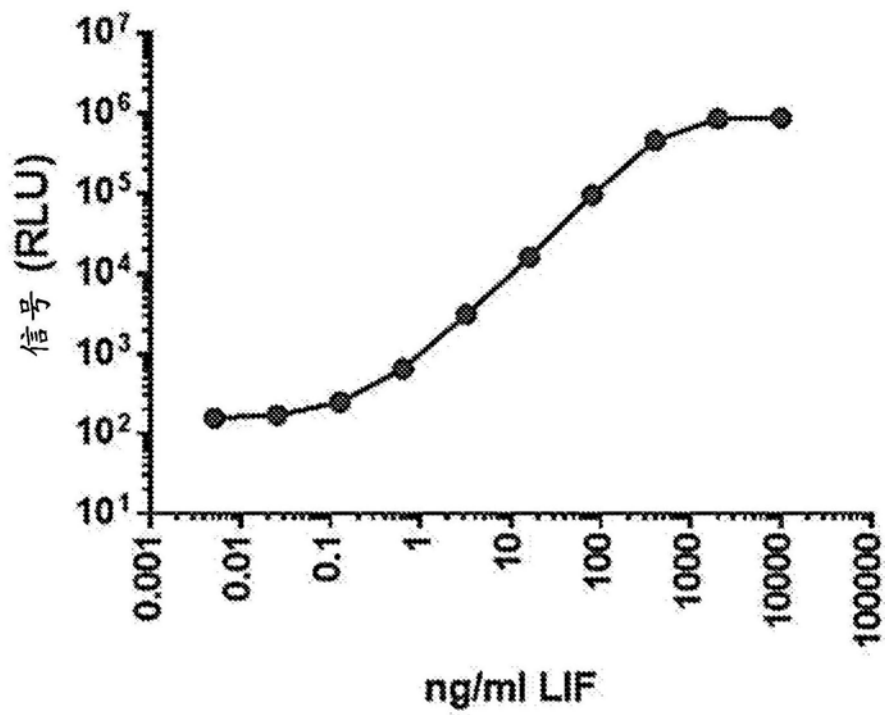


图19A

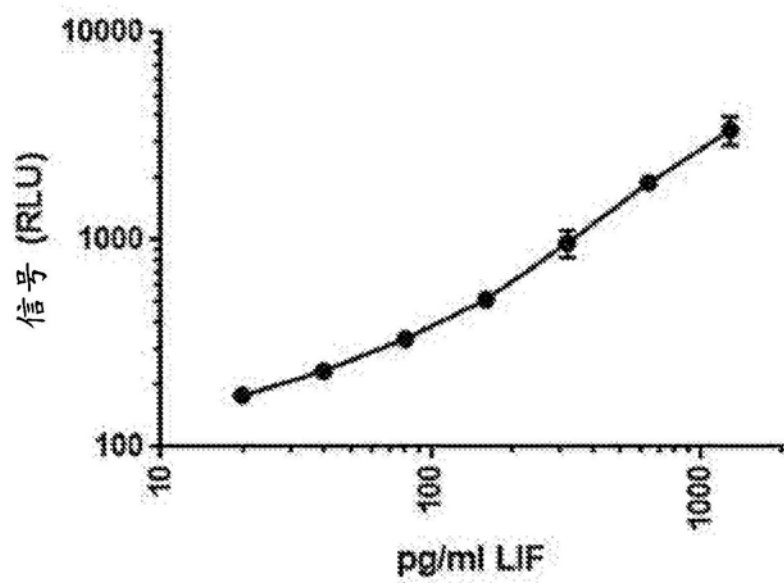


图19B

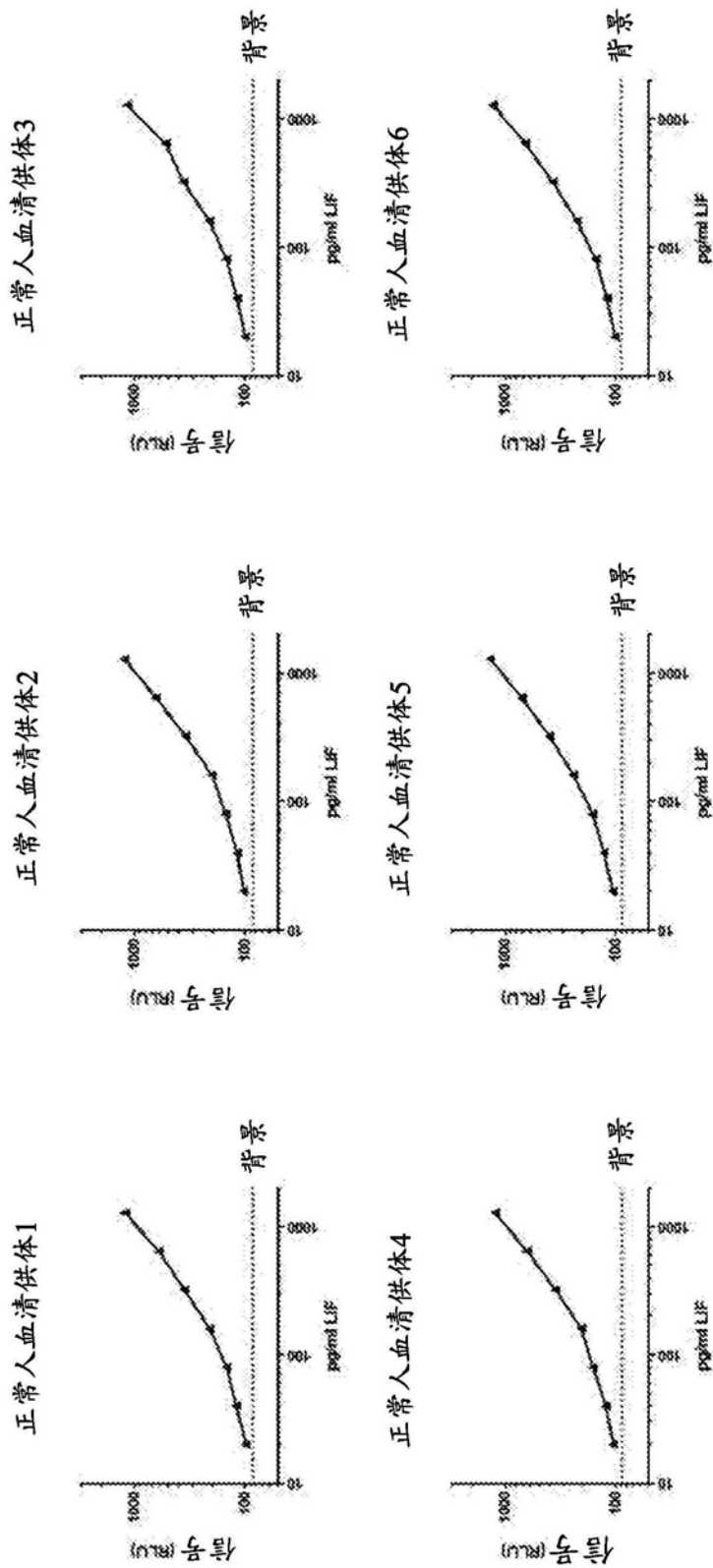


图20A

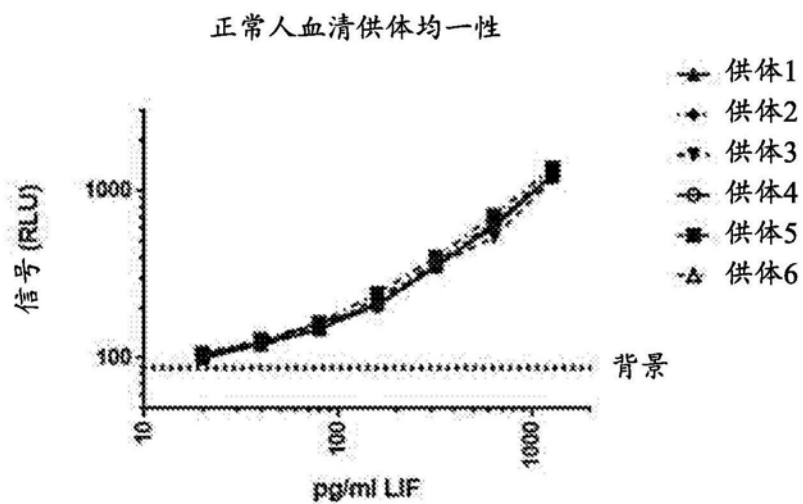


图20B

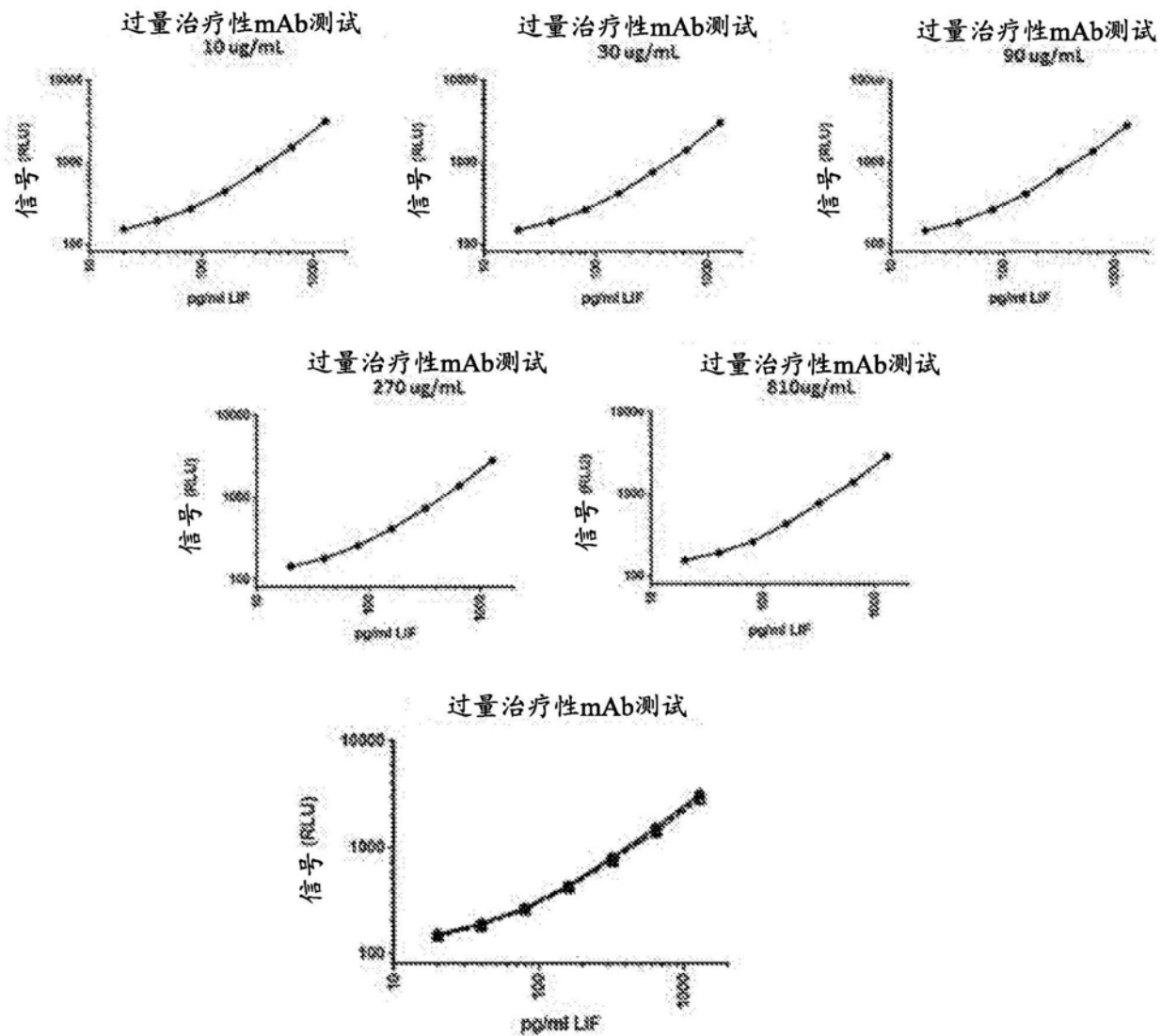


图21

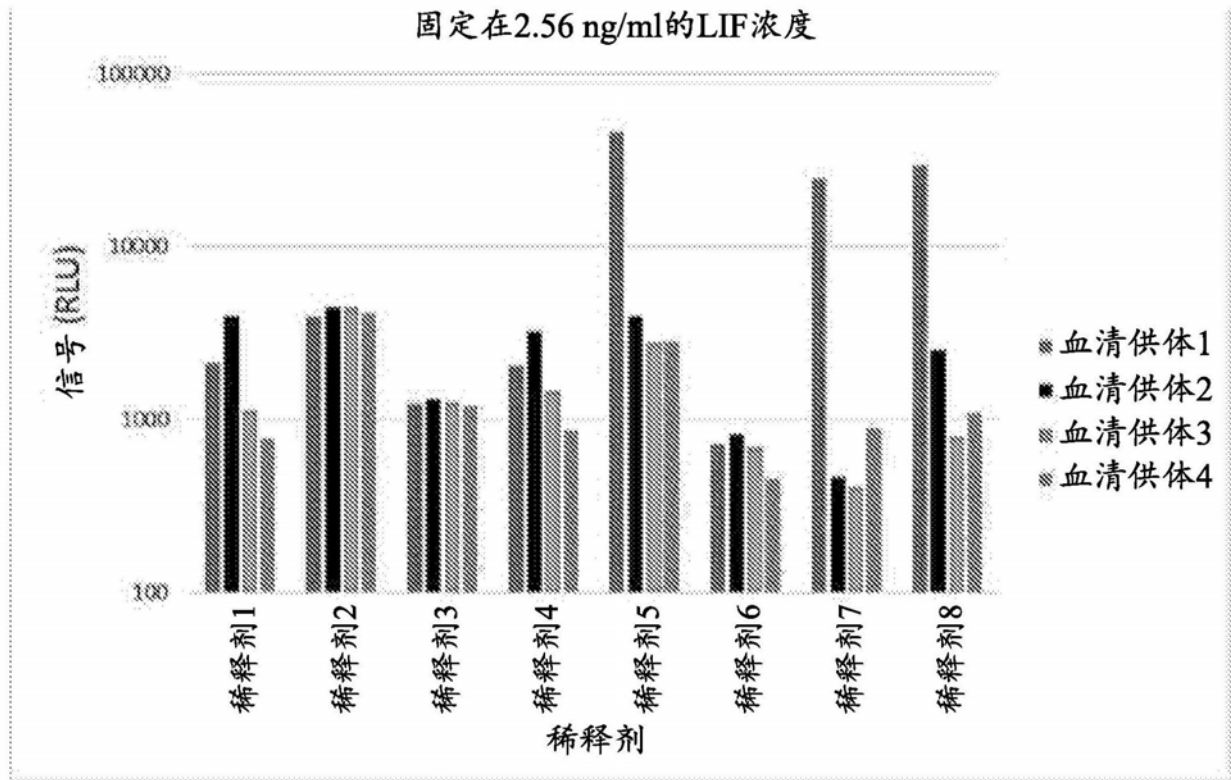


图22A

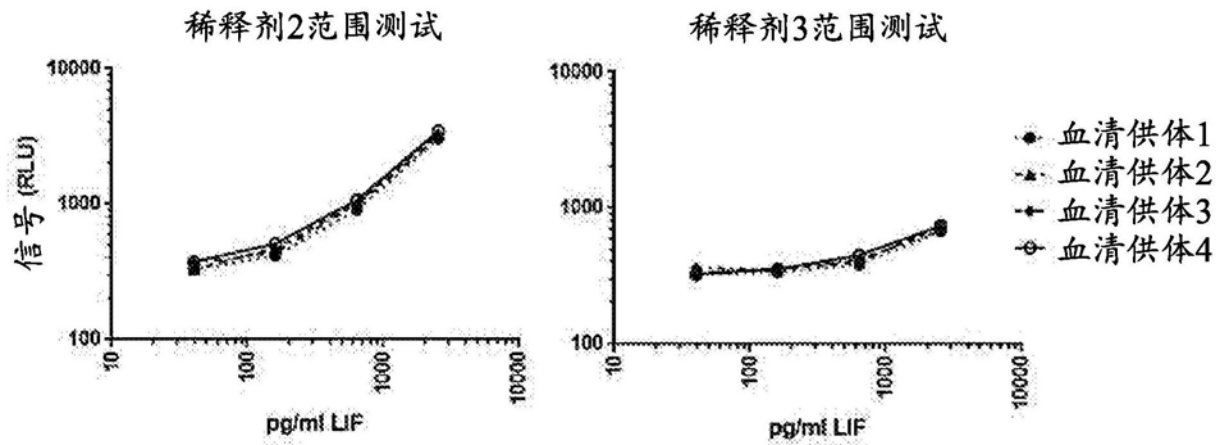


图22B

捕获mAb点涂优化

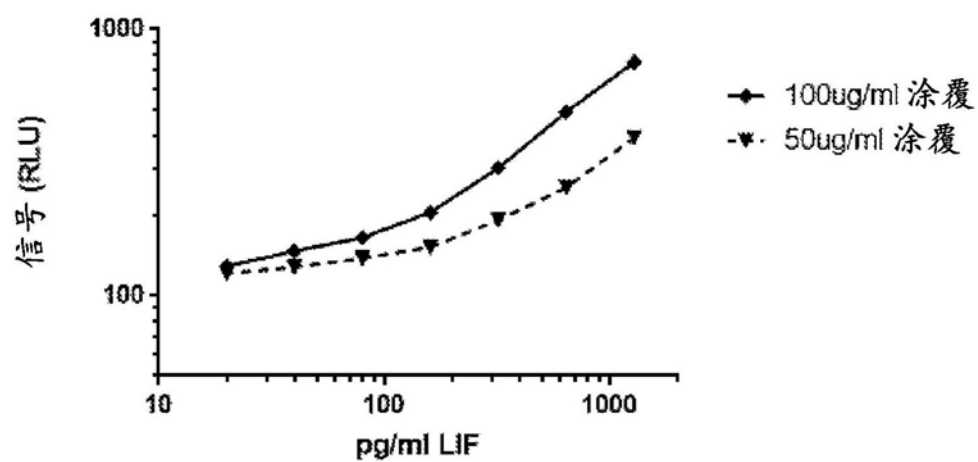


图23

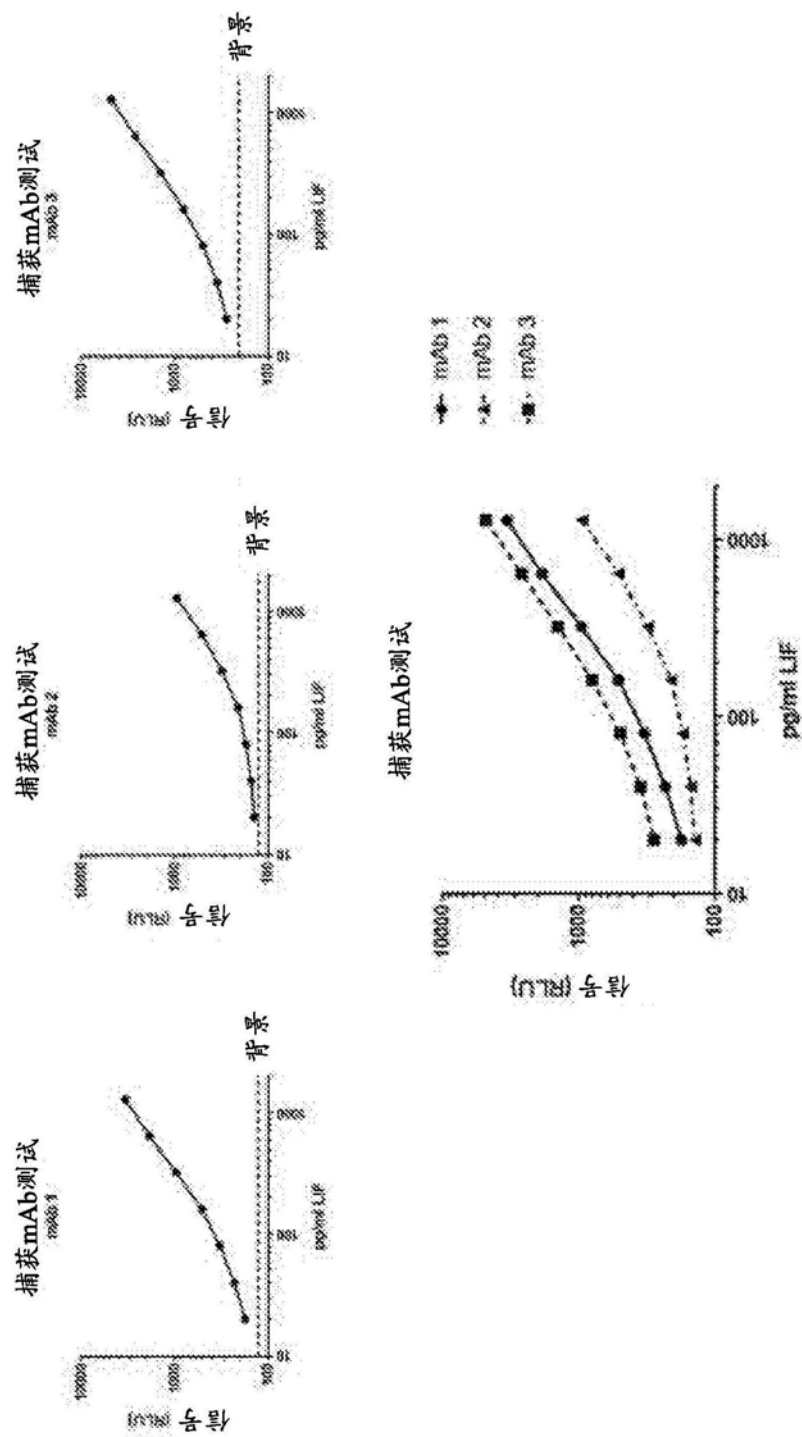


图24

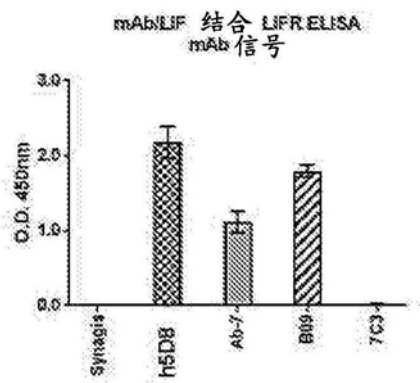


图25A

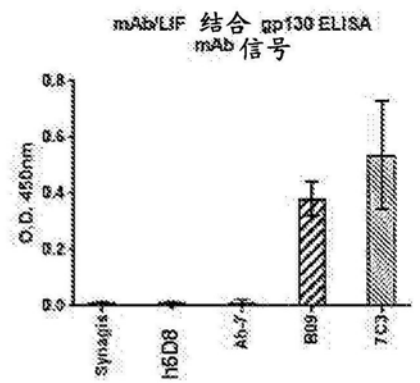


图25B

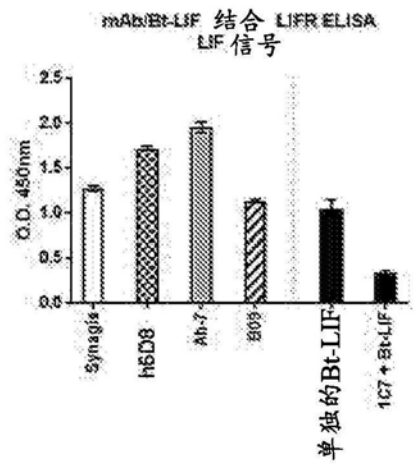


图25C

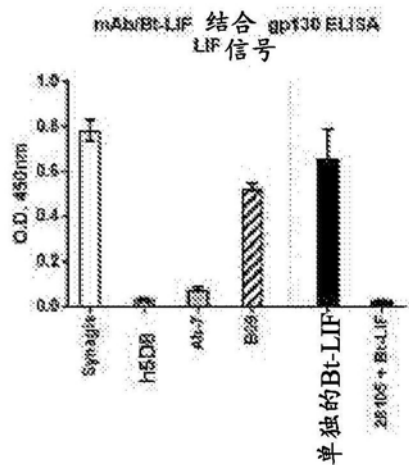


图25D

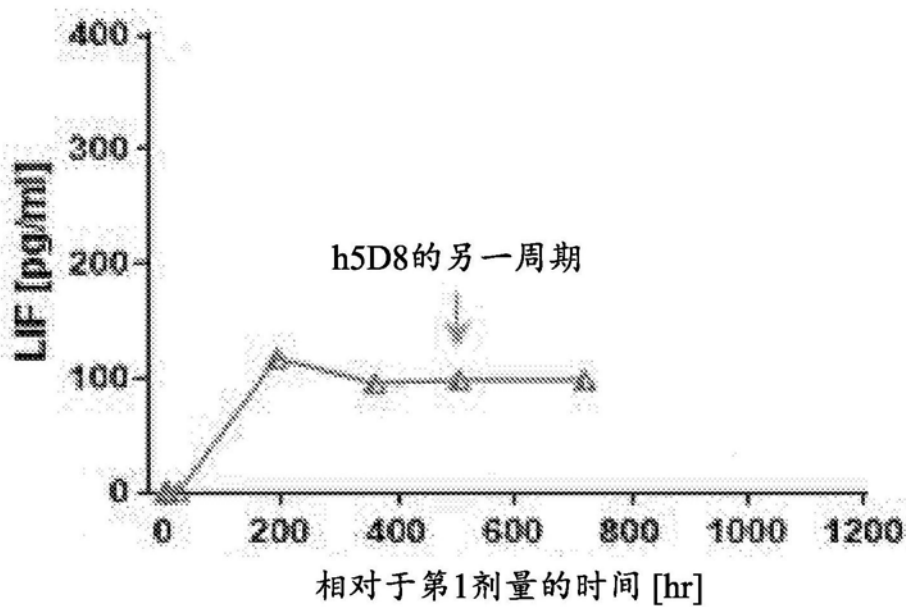


图26A

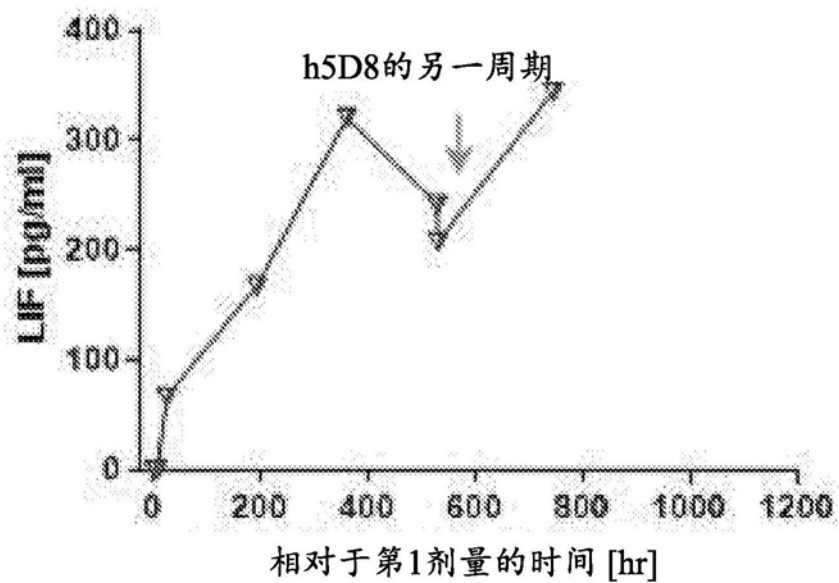


图26B

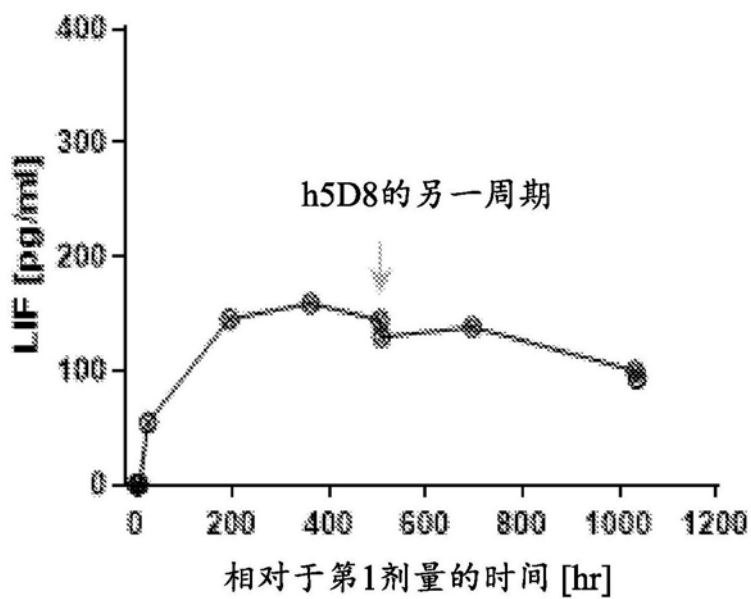


图26C