(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111417406 B
(45)授权公告日 2025.02.21

(21)申请号 201880074891.1
(22)申请日 2018.11.29
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111417406 A
(43)申请公布日 2020.07.14
(30)优先权数据
2017904822 2017.11.29 AU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.19
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2018/051272 2018.11.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/104385 EN 2019.06.06
(73)专利权人 CSL有限公司
地址 澳大利亚维多利亚州
(72)发明人 I•威克斯多姆 A•巴兹莫雷利 M•皮尔斯
(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陶家蓉 杨昀
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61K 38/19(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
(56)对比文件
Chieko Shima等.“Neuroprotective Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Ischemia-Reperfusion Injury of the Retina.Ophthalmic Research.2012,第48卷(第48期),第199-207页.
Ji-Jing Yan等.The protective effect of G-CSF on experimental is.《Am Soc Nephrol》.2020,第31卷(第31期),第731-746页.
审查员 陈依晗

权利要求书2页 说明书46页
序列表16页 附图11页

(54)发明名称

治疗或防止缺血-再灌注损伤的方法

(57)摘要

本公开涉及用于防止或治疗受试者的缺血-再灌注损伤的方法,所述方法包括施用抑制粒细胞集落刺激因子(G-CSF)信号传导的化合物。在一些示例中,缺血-再灌注损伤是由于组织或器官移植或与组织或器官移植相关。在一些示例中,所述化合物是抗体。

CN 111417406 B

1.抑制粒细胞集落刺激因子(G-CSF)信号传导的化合物的用途,用于制备一种用于停止或阻止受试者的肾缺血-再灌注损伤发展的药物,其中所述肾缺血-再灌注损伤是由于肾移植相关,和其中所述抑制G-CSF信号传导的化合物是特异性结合并中和G-CSF信号传导的抗体,所述抗体包含:

(i)重链可变区(VH),包含:

a. 如SEQ ID NO:6所示的互补决定区(CDR)1;

b. 如SEQ ID NO:7所示的CDR2;和

c. 如SEQ ID NO:8所示的CDR3;和

(ii)轻链可变区(VL),包含:

a. 如SEQ ID NO:9所示的CDR1;

b. 如SEQ ID NO:10所示的CDR2;和

c. 如SEQ ID NO:11所示的CDR3,其中所述抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血或再灌注前0-48小时施用;和

其中所述抑制G-CSF信号传导的化合物以足以在再灌注后24小时具有一种或多种以下作用的量施用:

(i)降低或防止血清或血浆肌酸酐水平升高;

(ii)降低或防止血清或血浆尿素水平升高;

(iii)减少或防止嗜中性粒细胞浸润;

(iv)减少或防止巨噬细胞浸润;

(v)减少或防止补体C5激活;以及

(vi)减少或防止C5b-9沉积。

2.如权利要求1所述的用途,其中所述抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血或再灌注前约24小时施用。

3.如权利要求1或2所述的用途,其中所述抑制G-CSF信号传导的化合物以足以在再灌注后24小时降低或抑制以下中的一种或多种的表达的量施用:

(i)肾损伤分子1(KIM-1);

(ii)中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL);

(iii)白细胞介素1β(IL-1β);

(iv)白细胞介素6(IL-6);

(v)肿瘤坏死因子α(TNFα);

(vi)补体成分5a受体1(C5AR1);

(vii)巨噬细胞炎性蛋白2-α(MIP2-α);

(viii)细胞间粘附分子1(ICAM-1);

(ix)E-选择蛋白;

(x)C-X-C基序趋化因子配体1(CXCL1);

(xi)白细胞介素8受体β(IL-8Rβ);和

(xii)单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)。

4.如权利要求1或2所述的用途,其中将所述抑制G-CSF信号传导的化合物施用至所述受试者,其中所述受试者是肾移植接受者。

5.如权利要求1或2所述的用途,其中将所述抑制G-CSF信号传导的化合物在器官采集之前施用至肾移植供体和/或在移植之前施用至肾。

6.如权利要求1或2所述的用途,其中所述抑制G-CSF信号传导的化合物施用至:

(i)在移植肾之前或之时的组织或器官移植接受者,然后将所述肾移植到肾移植接受者中;

(ii)在收集肾之前的肾移植供体;收集肾并将所述肾移植到肾移植接受者中;

(iii)体外的所收获的肾,并将所收获的肾移植到肾移植接受者中。

7.如权利要求1或2所述的用途,其中所述抗体含有SEQ ID NO: 4所示氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO: 5所示氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

8.如权利要求1或2所述的用途,其中所述抗体含有SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO: 3所示氨基酸序列的VL。

治疗或防止缺血-再灌注损伤的方法

[0001] 相关申请资料

[0002] 本申请要求于2017年11月29日提交的题为“治疗或防止缺血-再灌注损伤的方法”的澳大利亚专利申请第2017904822号的优先权。该申请的全部内容在此引入作为参考。

[0003] 序列表

[0004] 本申请与序列表以电子形式提交。序列表的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0005] 本公开涉及通过拮抗粒细胞集落刺激因子(G-CSF)信号传导治疗或防止受试者的缺血-再灌注损伤的方法及其在例如器官移植中的用途。

背景技术

[0006] 缺血-再灌注损伤(IRI)是由缺血引起的病理状况,即限制或减少对组织或器官(例如用于移植的死亡供体器官)的血液供应,随后再灌注和再氧合。缺血导致细胞缺氧和营养缺乏,代谢废物去除不足,并可迅速导致坏死和炎症。缺血一段时间后组织或器官的再灌注使血液供给和氧返回,然而再灌注本身可加重由初始缺血引起的氧化和炎症并引起进一步损伤。复氧可以引起对细胞蛋白质、DNA和质膜的氧化损伤。这种氧化损伤又可导致自由基的释放,从而导致进一步的细胞损伤。再灌注损伤的特征尤其在于产生活性氧类、补体激活、细胞炎症和内皮细胞损伤。

[0007] 在器官移植中,缺血-再灌注损伤可以定义为“热”IRI或“冷”IRI。热IRI在器官移植手术期间或在各种形式的休克或创伤期间原位发生。冷IRI发生在体外保存期间,并且通常在器官移植手术期间与热IRI偶联。

[0008] 先天免疫系统和适应性免疫系统在缺血-再灌注损伤的发病机制中起关键作用。在先天免疫方面,由死亡细胞释放的危险信号激活Toll样受体,导致细胞和可溶性因子的激活和/或产生,所述细胞和可溶性因子调节炎性细胞募集和炎性介质(例如趋化因子、细胞因子和自由基)的产生。嗜中性粒细胞是缺血和再灌注后的主要炎性细胞应答者。在炎性环境中,树突状细胞吸收并加工来自死亡细胞的抗原,迁移至淋巴结并激活适应性免疫系统的抗原特异性细胞。因此,缺血-再灌注损伤的发病机制是复杂的,并且组织损伤可能通过多种机制发生,如细胞死亡、微血管功能障碍、转录重编程、补体的激活以及先天和适应性免疫系统。

[0009] 缺血-再灌注损伤是移植(包括肾移植)中的常见事件,并且是确定短期和长期移植结果的相关因素。在肾移植中,IRI可影响内皮细胞和肾小管上皮细胞,并可导致急性肾损伤和延迟的移植功能(DGF),从而损害移植存活。DGF是死亡供体或扩展标准供体肾移植后更频繁的早期并发症之一,并且主要是由IRI引起的肾小管上皮细胞坏死引起的(Schröppel B等人,Kidney Int.2014)。

[0010] 目前正在临床试验中检验以治疗缺血-再灌注损伤的化合物包括依库珠单抗(eculizumab),其为针对补体级联的C5组分的人源化单克隆抗体(Rother R等人《自然生物

技术》2007(Rother R,et al.Nat Biotechnol.2007))。粒细胞集落刺激因子(G-CSF)作为治疗再灌注损伤的治疗剂也已经被研究,参见Nogueira等人《细胞物理生物化学》(2006)(Nogueira et al.,Cell Phys Biochem(2006))和Lu B等人《肾病学》(2008)(Li et al.,Nephrology(2008))。这些研究表明G-CSF治疗在肾缺血中具有保护作用。

[0011] 然而,防止或治疗缺血-再灌注损伤的有效疗法是难以理解的。因此,本领域技术人员根据上文将清楚,需要防止或治疗由缺血-再灌注损伤引起的损伤的策略和方法。

发明内容

[0012] 在本发明的制备中,本发明人进行了与先前教导相反的教导,即G-CSF可能在缺血-再灌注损伤中具有保护作用,而是研究了抑制G-CSF信号传导对缺血-再灌注损伤的作用。本发明人发现,通过施用抑制G-CSF信号传导的化合物,减轻了缺血-再灌注损伤的影响。另外,本发明人发现通过抑制G-CSF信号传导,它们可以在C5水平抑制补体激活的类似程度上防止或治疗缺血-再灌注损伤。这些发现为通过抑制G-CSF信号传导来防止或治疗缺血-再灌注损伤的方法提供了基础。

[0013] 因此,在一个示例中,本公开提供了用于防止或治疗受试者的缺血-再灌注损伤的方法,所述方法包括施用抑制粒细胞集落刺激因子(G-CSF)信号传导的化合物。

[0014] 本公开还提供了抑制G-CSF信号传导的化合物,其用于防止或治疗缺血-再灌注损伤。

[0015] 本公开还提供了抑制G-CSF信号传导的化合物在制备用于防止或治疗缺血-再灌注损伤的药物中的用途。

[0016] 在一些示例中,缺血和/或再灌注损伤是由于或与器官移植、冷器官储存、脑死亡、动脉粥样硬化、血栓形成、血栓栓塞、脂质栓塞、创伤、出血、支架、手术、血管成形术、旁路手术、全缺血、心肌梗塞、中风、外周血管疾病、脓毒症、肿瘤或其组合有关。

[0017] 在一些示例中,所述缺血-再灌注损伤是热缺血-再灌注损伤。在一些示例中,所述缺血-再灌注损伤是冷缺血-再灌注损伤。

[0018] 在一些示例中,向受试者施用抑制G-CSF信号传导的化合物。

[0019] 在一个示例中,所述缺血-再灌注损伤是由于或与以下的一种或多种有关:

[0020] (i)器官移植;

[0021] (ii)外科手术;

[0022] (iii)创伤;

[0023] (iv)脓毒症;

[0024] (v)肿瘤;和

[0025] (vi)中风。

[0026] 在一个示例中,缺血-再灌注损伤是由于手术或与手术相关。在一个示例中,缺血-再灌注损伤是由于冠状动脉旁路手术,例如双旁路(其中绕过了两条冠状动脉(例如,左冠状动脉前降支(LAD)和右冠状动脉(RCA));三旁路(其中绕过了三条血管,例如LAD、RCA和左旋支动脉(LCX));四旁路(其中绕过了四条血管(例如LAD、RCA、LCX和LAD的第一对角动脉));或五旁路(绕过五条动脉)。

[0027] 在一个示例中,缺血-再灌注损伤是由于或与器官移植,例如实体器官移植相关。

在一个示例中,器官移植是肾移植。在一个示例中,器官移植是肝移植。在一个示例中,器官移植是心脏移植。在一个示例中,器官移植是胰腺移植。在一个示例中,器官移植是肺移植。在一个示例中,器官移植是胃移植。在一个示例中,器官移植是肠移植。在一个示例中,器官移植是睾丸移植。

[0028] 在更进一步的示例中,器官移植是皮肤移植,例如,全层皮肤移植。

[0029] 在一个示例中,缺血-再灌注损伤是由于组织移植或与组织移植相关。在一个示例中,组织移植是血管移植。在一个示例中,组织移植是皮肤移植,例如血管化的皮肤。在一个示例中,组织移植是胰岛移植。在一个示例中,组织移植是角膜移植。在一个示例中,组织移植是肌肉骨骼移植。

[0030] 当缺血-再灌注损伤是由于移植或与移植相关时(例如,器官移植),可以在移植之前、期间和/或之后施用抑制G-CSF信号传导的化合物。在一些示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物施用至受试者,其中受试者是组织或器官移植接受者。在一些示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物施用至组织或器官移植供体。

[0031] 在一些示例中,组织或器官移植供体是活供体。在一些示例中,组织或器官移植供体是死亡供体。在一些示例中,组织或器官移植供体是脑死亡捐献(DBD)供体。在一些示例中,组织或器官移植供体是循环死亡捐献(DCD)供体。在一些示例中,组织或器官移植供体是扩展标准供体(ECD)。在一些示例中,组织或器官移植供体是标准供体(SCD)。

[0032] 在一些示例中,在器官移植之前,将抑制G-CSF信号传导的化合物体外施用至收获的器官。例如,收获的器官可以在移植之前用包含抑制G-CSF信号传导的化合物的溶液灌注或输注。

[0033] 本公开还提供组织或器官移植的方法或用于改善组织或器官移植的结果或改善移植的组织或器官的功能或用于防止延迟的移植功能的方法,所述方法包括将抑制G-CSF信号传导的化合物体外施用至所收获的组织或器官,并将所收获的组织或器官移植到组织或器官移植接受者中。

[0034] 在一些示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物施用至器官移植供体和/或器官移植接受者和/或收获的器官。在一些示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物施用至器官移植供体和器官移植接受者。在一些示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物施用至器官移植供体和收获的器官。在一些示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物施用至器官移植接受者和收获的器官。

[0035] 在本公开的一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注之前施用,例如,在移植(例如,器官移植)的情况下,抑制G-CSF信号传导的化合物在移植的器官(例如,器官)的再灌注之前施用至器官移植接受者(例如,抑制G-CSF信号传导的化合物是在移植之前或在移植期间但在再灌注之前施用,例如,在限制血流的夹子释放之前)。

[0036] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血之前施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血或再灌注之前的0天(例如,紧接在缺血或再灌注之前)至缺血或再灌注之前的7天之间施用。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注或缺血之前0天至6天或5天或4天之间施用。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注或缺血之前0至72小时之间施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注或缺血之前6至48小时之间施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注或缺血之前12至36

小时之间施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注或缺血之前约24小时施用。

[0037] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注或缺血之前至少1小时施用(并且在再灌注或缺血之前至多7天)。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注或缺血前至少2小时或至少4小时或至少6小时或至少8小时或至少10小时或至少12小时或至少14小时或至少16小时或至少18小时或至少20小时或至少22小时或至少24小时施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注或缺血之前至少24小时施用。

[0038] 当讨论本文化合物的施用时间时,该讨论应涉及化合物的多次施用。例如,当陈述在缺血或再灌注前0天至7天之间施用化合物时,本公开涵盖在缺血或再灌注前0天至7天之间多次施用化合物(例如,2或3或4或5等)。

[0039] 另外,在移植的情况下,化合物可以在移植后多次施用。

[0040] 当讨论本文化合物的施用时间时,本公开内容也将用于提供对化合物的单次施用的明确支持。

[0041] 根据前述内容,本公开内容提供了移植(例如,器官移植)或用于改善移植结果(例如,器官移植)或改善移植功能(例如,移植器官)或用于防止延迟的移植功能的方法,这对于本领域技术人员而言是显而易见的,所述方法包括在收集组织或器官之前向移植供体施用抑制G-CSF信号传导的化合物;收集移植物(例如,组织/器官)并将组织或器官移植到器官移植接受者中。

[0042] 本公开还提供了用于从组织或器官供体制备移植组织或器官以改善组织或器官移植接受者中的组织或器官功能的方法,所述方法包括在收集所述组织或器官之前向所述组织或器官供体施用抑制G-CSF信号传导的化合物。

[0043] 本公开还提供了用于防止组织或器官移植排斥的方法,所述方法包括在收集所述组织或器官之前向组织或器官供体施用抑制G-CSF信号传导的化合物,收集所述组织或器官,以及将所述组织或器官移植到组织或器官移植接受者中。

[0044] 在一些示例中,所述方法另外包括向移植接受者施用抑制G-CSF信号传导的化合物。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物在移植之前或在移植组织或器官时或其周围施用至移植接受者。在另一个示例中,在组织或器官移植手术期间向移植接受者施用抑制G-CSF信号传导的化合物。

[0045] 本公开还提供了一种器官移植或用于改善组织或器官移植的结果或改善移植的组织或器官的功能或用于防止延迟的移植功能的方法,所述方法包括在移植所述组织或器官之前向移植接受者施用抑制G-CSF信号传导的化合物,然后将所述器官移植到所述移植接受者中。

[0046] 在一个示例中,器官移植供体是脑死亡的。例如,器官供体是活的并且在生命支持上,但是脑死亡。本文描述了另外的供体并用于本公开的该示例。

[0047] 在向器官供体施用的情况下,抑制G-CSF信号传导的化合物可以在器官采集之前,例如在器官采集之前的0和72小时之间施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在器官采集之前6和48小时之间施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在器官采集之前12和36小时之间施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在器官收集之前约24小时施用。

[0048] 在施用至脑死亡供体的情况下,可以在脑死亡和器官采集之间的时间施用抑制G-CSF信号传导的化合物。在一些示例中,可以在宣布脑死亡的48小时内,例如在宣布脑死亡的24小时或12小时或6小时内施用抑制G-CSF信号传导的化合物。

[0049] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以单剂量施用。

[0050] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以多剂量施用。例如,在移植之前或移植期间将化合物施用给移植接受者,然后在移植之后将一个或多个另外的剂量施用给接受者。在另一个示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物施用给移植供体或供体组织或器官,然后在移植后将一个或多个额外剂量施用给移植接受者。

[0051] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以防止或治疗有效量施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.01mg/kg至约50mg/kg,例如约0.05mg/kg至约30mg/kg,例如约0.1mg/kg至约20mg/kg,例如约1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.1mg/kg至约1mg/kg的剂量施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.4mg/kg至约0.5mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.1mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.2mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.3mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.4mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.5mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.6mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.7mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.8mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约1mg/kg的剂量施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约2mg/kg至约8mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约4mg/kg至约6mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约5mg/kg的剂量施用。

[0052] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以引起中性粒细胞减少的量施用。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物以引起短暂性中性粒细胞减少的量施用,例如持续少于一周或少于5天或少于3天或少于1天的时间段。

[0053] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以不引起中性粒细胞减少的量施用。

[0054] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止炎症的量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止氧化损伤的量施用。

[0055] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以具有一种或多种以下作用的量施用:

[0056] (i)减少或防止嗜中性粒细胞浸润,例如在器官移植的情况下浸入移植器官中;和

[0057] (ii)减少或防止巨噬细胞浸润,例如在器官移植的情况下浸入移植器官中。

[0058] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止嗜中性粒细胞浸润的量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止巨噬细胞浸润的量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或抑制白细胞介素8受体β(IL-8Rβ)的表达的量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或抑制单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)的表达的量施用。

[0059] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以具有一种或多种以下作用的

量施用:

[0060] (i)降低或防止血清或血浆肌酸酐水平升高;和

[0061] (ii)降低或防止血清或血浆尿素水平升高。

[0062] 如本文所述,血清或血浆肌酸酐水平和血清或血浆尿素水平是肾功能的量度,并且可用于例如在本文所述的肾移植的情况下评估延迟的移植功能。

[0063] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或防止血清或血浆肌酸酐水平升高的量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或防止血清或血浆尿素水平升高的量施用。

[0064] 尿中白蛋白和/或血液水平的增加也可指示肾功能受损或肾损伤。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或防止尿白蛋白水平升高的量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或防止受试者尿液中血液水平升高的量施用。

[0065] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或抑制以下一种或多种的表达的量施用,例如在器官移植的情况下通过移植器官的细胞施用:

[0066] (i)肾损伤分子1(KIM-1);

[0067] (ii)中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL);

[0068] (iii)白细胞介素1β(IL-1β);

[0069] (iv)白细胞介素6(IL-6);

[0070] (v)肿瘤坏死因子α(TNFα);

[0071] (vi)补体成分5a受体1(C5AR1);

[0072] (vii)巨噬细胞炎性蛋白2-α(MIP2-α);

[0073] (viii)细胞间粘附分子1(ICAM-1);

[0074] (ix)E-选择蛋白;

[0075] (x)C-X-C基序趋化因子配体1(CXCL1);

[0076] (xi)白细胞介素8受体β(IL-8Rβ);和

[0077] (xii)单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)。

[0078] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止补体C5激活的量施用。

[0079] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止C5b-9沉积的量施用,例如在器官移植的情况下在移植器官的细胞表面上。

[0080] 用于评估前述每种的方法是本领域已知的和/或本文描述的。此外,本领域技术人员将理解,相对于施用抑制G-CSF信号传导的化合物之前受试者中的量,或相对于相应对照受试者中的量,术语“减少”在本文中用于指上面列出的任何项目的较低量。

[0081] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物与另一种化合物组合施用。在一些示例中,其它化合物为硫化氢。在一些示例中,另一种化合物是抗炎化合物和/或特异性地抑制或降低上文(i)-(x)中列出的一种或多种分子的表达或活性。在一些示例中,其它化合物是免疫抑制剂,例如环孢菌素。合适的免疫抑制剂将是本领域已知的并且包括在James&Mannon《当前移植报告》(2015)(James&Mannon,Curr Transplant Rep(2015))中描述的那些,其通过引用并入本文。可选地或另外地,其它化合物为皮质类固醇,诸如泼尼松和/或泼尼松龙。可选地或另外地,其他化合物是甲氨蝶呤。可选地或另外地,其他化合物是环磷酰

胺。可选地或另外地,其它化合物是霉酚酸酯。在一些示例中,另一种化合物是TRO40303,如Le Lamer等人《转化医学杂志》(2014)(Le Lamer et al.,J Transl Med(2014))中所述。在一些示例中,另一种化合物是超氧化物歧化酶。在一些示例中,其它化合物为二甲双胍。在一些示例中,其它化合物是大麻素或其合成类似物。在一些示例中,其它化合物是移植手术中常用的化合物。

[0082] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物与细胞组合施用。在一些示例中,细胞是干细胞,例如间充质干细胞。

[0083] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物与基因治疗组合施用。

[0084] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物与另一种化合物同时施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在另一种化合物之前施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在另一种化合物之后施用。

[0085] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物和另一种化合物均施用至器官移植接受者。合适的其它化合物如上所述。

[0086] 在一个示例中,在收集用于移植的器官之前将抑制G-CSF信号传导的化合物施用至器官移植供体,并且将另一种化合物施用至器官移植接受者,任选地与抑制G-CSF信号传导的化合物组合。合适的其它化合物如上所述。

[0087] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物结合G-CSF或G-CSF受体(G-CSFR)。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物结合G-CSF。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物结合G-CSF受体(G-CSFR)。

[0088] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物是蛋白质。

[0089] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物是包括与G-CSFR结合或特异性结合并中和G-CSF信号传导的抗体可变区的蛋白质。本文提及“结合”G-CSFR的蛋白质或抗体为“特异性结合”G-CSFR的蛋白质或抗体提供字面支持。

[0090] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物是包括与G-CSF结合或特异性结合并中和G-CSF信号传导的抗体可变区的蛋白质。本文提及“结合”G-CSF的蛋白质或抗体为“特异性结合”G-CSF的蛋白质或抗体提供字面支持。

[0091] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物是包括Fv的蛋白质。在一些示例中,蛋白质选自包含以下各项组成的组:

[0092] (i)单链Fv片段(scFv);

[0093] (ii)二聚体scFv(di-scFv);或

[0094] (iv)双抗体;

[0095] (v)三抗体;

[0096] (vi)四抗体;

[0097] (vii)Fab;

[0098] (viii)$F(ab')_2$;

[0099] (ix)Fv;

[0100] (x)(i)至(ix)中的一个,其连接至抗体、Fc或重链恒定结构域(C_H)2和/或C_H3的恒定区;

[0101] (xi)(i)至(ix)中的一个,其连接至白蛋白、其功能片段或变体或与白蛋白结合的

蛋白质(例如,抗体或其抗原结合片段);或

[0102] (xii)抗体。

[0103] 在一个示例中,蛋白质是抗体。在一个示例中,抗体是裸抗体。示例性抗体描述于WO2012171057中,其通过引用并入本文。

[0104] 在一个示例中,蛋白质是以至少约5nM的亲和力结合在细胞表面上表达的hG-CSFR的抗体。在一个示例中,蛋白质是以至少约4nM的亲和力结合在细胞表面上表达的hG-CSFR的抗体。在一个示例中,蛋白质是以至少约3nM的亲和力结合在细胞表面上表达的hG-CSFR的抗体。在一个示例中,蛋白质是以至少约2nM的亲和力结合在细胞表面上表达的hG-CSFR的抗体。在一个示例中,蛋白质是以至少约1nM的亲和力结合在细胞表面上表达的hG-CSFR的抗体。

[0105] 在一个示例中,蛋白质是以至少约5nM的IC50抑制表达hG-CSFR的BaF3细胞的G-CSF诱导的增殖的抗体。在一个示例中,蛋白质是以至少约4nM的IC50抑制表达hG-CSFR的BaF3细胞的G-CSF诱导的增殖的抗体。在一个示例中,蛋白质是以至少约3nM的IC50抑制表达hG-CSFR的BaF3细胞的G-CSF诱导的增殖的抗体。在一个示例中,蛋白质是以至少约2nM的IC50抑制表达hG-CSFR的BaF3细胞的G-CSF诱导的增殖的抗体。在一个示例中,蛋白质是以至少约1nM的IC50抑制表达hG-CSFR的BaF3细胞的G-CSF诱导的增殖的抗体。在一个示例中,蛋白质是以至少约0.5nM的IC50抑制表达hG-CSFR的BaF3细胞的G-CSF诱导的增殖的抗体。

[0106] 在一个示例中,蛋白质是嵌合的、去免疫的、人源化的、人的或灵长类化的。在一个示例中,蛋白质或抗体是人的。

[0107] 在一个示例中,蛋白质包括抗体可变区,所述抗体可变区与G-CSFR结合或特异性结合并竞争性抑制抗体C1.2G与G-CSFR的结合,所述抗体C1.2G包括重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),所述重链可变区(V_H)包括SEQ ID NO:4所示的序列,所述轻链可变区(V_L)包括SEQ ID NO:5所示的序列。

[0108] 在一个示例中,蛋白质结合包括选自SEQ ID NO:1的111-115、170-176、218-234和/或286-300的一个或两个或三个或四个区内的残基的表位。

[0109] 在一个示例中,蛋白质是包括含有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的轻链可变区(VL)的抗体。

[0110] 在一个示例中,蛋白质是包括含有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的VL的抗体。

[0111] 在一个示例中,蛋白质是包括VH和VL的抗体,该VH包括VH的三个CDR,该VH包括SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,该VL包括VL的三个CDR,该VL包括SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

[0112] 在一个示例中,蛋白质是包括VH和VL的抗体,该VH包括VH的三个CDR,该VH包括SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,该VL包括VL的三个CDR,该VL包括SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

[0113] 在一个示例中,蛋白质是抗体,其包括:

[0114] (i)含有SEQ ID NO:14或18所示氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的轻链;或

[0115] (ii)含有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的一条重链,包含SEQ ID NO:18所示的

氨基酸序列的一条重链,包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的两条轻链。

[0116] 序列表的关键字

[0117] SEQ ID NO:1-具有C-末端多组氨酸标签的智人G-CSFR(hG-CSFR)的氨基酸25-335

[0118] SEQ ID NO:2-C1.2的V_H

[0119] SEQ ID NO:3-C1.2的V_L

[0120] SEQ ID NO:4-C1.2G的V_H

[0121] SEQ ID NO:5-C1.2G的V_L

[0122] SEQ ID NO:6-C1.2的HCDR1

[0123] SEQ ID NO:7-C1.2的HCDR2

[0124] SEQ ID NO:8-C1.2的HCDR3

[0125] SEQ ID NO:9-C1.2的LCDR1

[0126] SEQ ID NO:10-C1.2的LCDR2

[0127] SEQ ID NO:11-C1.2的LCDR3

[0128] SEQ ID NO:12-C1.2的HCDR3的共有序列

[0129] SEQ ID NO:13-C1.2的LCDR3的共有序列

[0130] SEQ ID NO:14-具有稳定化IgG4恒定区的C1.2G重链

[0131] SEQ ID NO:15-具有kappa恒定区的C1.2G轻链

[0132] SEQ ID NO:16-示例性h-G-CSFR的序列

[0133] SEQ ID NO:17-包括具有C-末端多组氨酸标签的食蟹猕猴G-CSFR(cynoG-CSFR)的Ig和CRH结构域的多肽

[0134] SEQ ID NO:18-具有稳定化IgG4恒定区和缺少C-末端赖氨酸的C1.2G重链。

附图说明

[0135] 图1是肾热缺血-再灌注损伤模型中再灌注后24小时的血清肌酸酐浓度的图示。与用100μg的同种型对照抗体处理的小鼠相比,用100μg的抗G-CSFR抗体VR81处理的小鼠显著降低了血清肌酸酐浓度。单向ANOVA(使用Bonferroni校正),*p<0.05,***p<0.005(n=8只小鼠/组)。结果代表两个独立实验-也参见图7。

[0136] 图2是肾热缺血-再灌注损伤模型中再灌注后24小时的血浆尿素浓度的图示。与用100μg的同种型对照抗体处理的小鼠相比,用100μg的抗G-CSFR抗体VR81处理的小鼠显著降低了血浆尿素浓度。未配对T检验*p<0.05(n=8只小鼠/组)。结果代表两个独立实验-也参见图8。

[0137] 图3是肾组织中每高倍视野(HPF)的嗜中性粒细胞计数的图示。与再灌注后24小时评估的用100μg同种型对照抗体处理的小鼠中观察到的嗜中性粒细胞浸润相比,用100μg抗G-CSFR抗体VR81处理的小鼠显著减少了热肾IRI模型中的嗜中性粒细胞肾浸润。单向ANOVA(使用Bonferroni校正),*p<0.05,**p<0.01,***p<0.005(n=5-6只小鼠/组)。

[0138] 图4是肾组织中每高倍视野(HPF)的巨噬细胞计数(HPF)的图示。与再灌注后24小时评估的用100μg同种型对照抗体处理的小鼠中观察到的巨噬细胞浸润相比,用100μg抗G-CSFR抗体VR81处理的小鼠在热肾IRI模型中显著减少巨噬细胞肾浸润。单向ANOVA(使用Bonferroni校正),*p<0.05,**p<0.01(n=5-6只小鼠/组)。

[0139] 图5是肾组织中每高倍视野(HPF)的(A)嗜中性粒细胞和(B)巨噬细胞计数的图示。与再灌注后24小时评估的用500μg同种型对照抗体处理的小鼠中观察到的嗜中性粒细胞浸润相比,用500μg抗G-CSFR抗体VR81处理的小鼠在热肾IRI模型中显著降低嗜中性粒细胞和巨噬细胞肾浸润。单向ANOVA(使用Bonferroni校正),****p<0.0001(n=5-6只小鼠/组)。

[0140] 图6是在热IRI模型中肾小管损伤的图示,其由在治疗的小鼠的肾皮质中观察到的肾小管坏死的程度确定(假(sham);100μg抗G-CSFR抗体VR81;100μg的同种型对照抗体)。使用荧光显微术通过半定量方法评估坏死(Lu B等人《肾病学》2008(Lu B et al.Nephrology2008))。对肾小管坏死程度进行分级并使用改良的评分系统(参见表3)。单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.005(n=8只小鼠/组,而不是假,其中n=3)。

[0141] 图7是通过qRT-PCR评估的热肾IRI模型中肾组织中KIM-1、NGAL、IL-6、IL-8Rβ/CXCR2、MCP-1/CCL2、CXCL1、MIP-2/CXCL2、ICAM-1和C5aR mRNA表达的图示。与用同种型对照抗体治疗相比,剂量为500μg/小鼠的VR81治疗显著降低了(A)KIM-1、NGAL、IL-6、IL-8Rβ/CXCR2、MCP-1/CCL2、CXCL1、and(B)MIP-2/CXCL2、ICAM-1和C5aR的表达。对于VR81与Ab对照的单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验*p<0.05,**p<0.01,***p<0.005。

[0142] 图8是在热肾IRI模型中嗜中性粒细胞($CD11b^+Gr1^+$)的百分频率的图示,如相比用100μg同种型对照抗体处理的小鼠和假手术小鼠中,通过流式细胞术在用100μg抗G-CSFR抗体VR81或100μg抗C5抗体(BB5.1)处理的小鼠的(A)肾和(B)外周血中评估的。与用同型对照抗体治疗的小鼠相比,在假手术小鼠和用VR81或BB5.1处理的小鼠的肾中观察到的中性粒细胞($CD11b^+Gr1^+$)水平明显降低。在所有组中,血液中的嗜中性粒细胞群相似并且不受处理的影响。单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验,*p<0.05,**p<0.01(n=7-8只小鼠/组而不是假,其中n=4)。

[0143] 图9是热肾IRI模型中血清肌酸酐浓度的图示。与用100μg的同种型对照抗体处理的小鼠相比,用100μg的抗G-CSFR抗体VR81或100μg的抗C5抗体BB5.1处理显著降低了肌酸酐浓度。用VR81和BB5.1观察到的降低没有显著差异。单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.005(n=7-8只小鼠/组)。

[0144] 图10是热肾IRI模型中血浆尿素浓度的图示。与用100μg的同种型对照抗体处理的小鼠相比,用100μg的抗G-CSFR抗体VR81或100μg的抗C5抗体BB5.1处理显著降低了血浆尿素浓度。用VR81和BB5.1观察到的降低没有显著差异。单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验,*p<0.05,**p<0.01(n=7-8只小鼠/组)。

[0145] 图11是热肾IRI模型中血清尿素浓度的图示。与用500μg的同种型对照抗体处理的小鼠相比,用500μg的抗G-CSFR抗体VR81处理的小鼠显著降低了血清尿素浓度。单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验*p<0.05,**p<0.01(n=6-8只小鼠/组)。

[0146] 图12是热肾IRI模型中血清肌酸酐浓度的图示(平均值±SEM)。与用500μg的同种型对照抗体处理的小鼠相比,用500μg的抗G-CSFR抗体(VR81)处理的小鼠显著降低了血清肌酸酐浓度。单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验*p<0.05(n=6-8只小鼠/组)。

[0147] 图13是热肾IRI模型中(A)血液和(B)肾中嗜中性粒细胞($CD11b^+Gr1^+Ly6G^+$)的百分频率的图示。与用500μg/小鼠的同种型对照抗体处理相比,用200μg/小鼠和500μg/小鼠的

抗G-CSFR抗体VR81处理显著降低了肾中嗜中性粒细胞的频率。统计:单向ANOVA(使用Bonferroni校正),*p<0.05,**p<0.01(n=6-7只小鼠/组)。

[0148] 图14是血浆C5a(A)和肾C5b-9沉积(B)的图示。

[0149] 图15是热肾IRI模型中血液和肾中嗜中性粒细胞(CD11b+Gr1+Ly6G+)的频率的图示。与用同种型对照抗体治疗相比,缺血前1h用500μg/小鼠的抗G-CSFR抗体VR81处理显著降低了肾中嗜中性粒细胞的频率。与用同种型对照抗体处理相比,用500μg/小鼠对照抗体BB5.1处理没有显著降低肾中嗜中性粒细胞的频率。统计:单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验*p<0.05,**p<0.01(n=5-8只小鼠/组)。

具体实施方式

[0150] 一般

[0151] 在整个说明书中,除非另有特别说明或上下文另有要求,提及单个步骤、物质组成、步骤组或物质组成组应被认为包括一个和多个(即一个或更多个)那些步骤、物质组成、步骤组或物质组成组。

[0152] 本领域技术人员将理解,除了具体描述的那些之外,本公开易于变化和修改。应当理解,本公开包括所有这样的变化和修改。本公开还包括本说明书中单独或共同提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征中的任何两个或更多个的任何和所有组合。

[0153] 本公开不限于这里描述的具体示例的范围,这些示例仅用于示例性目的。如本文所述,功能等同的产物、组合物和方法显然在本公开的范围内。

[0154] 除非另有明确说明,否则本文中本公开的任何示例均应作必要的变通而应用于本公开的任何其他示例。

[0155] 除非另外具体定义,否则本文使用的所有技术和科学术语应具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义(例如,细胞培养、分子遗传学、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学)。

[0156] 除非另有说明,本公开中使用的重组蛋白、细胞培养和免疫技术都是标准程序,为本领域技术人员熟知。这些技术在以下来源的文献中都有描述和解释,例如,约翰·威利父子出版公司出版的《分子克隆实用指南》(J.Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning,John Wiley and Sons(1984));冷泉港实验室出版社出版的J.Sambrook等人的《分子克隆:实验室手册》(J.Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989));IRL出版社出版的T.A.Brown(编者)的《基本分子生物学:实用方法》第1卷和第2卷(T.A.Brown(editor),Essential Molecular Biology:A Practical Approach,Volumes 1and 2,IRL Press(1991);IRL出版社出版的D.M.Glover和B.D.Hames(编者)的《DNA克隆:一种实用的方法》第1-4卷(D.M.Glover and B.D.Hames(editors),DNA Cloning:A Practical Approach,Volumes 1-4,IRL Press(1995和1996);格林出版联合公司与约翰威立父子出版公司出版的F.M.Ausubel等人(编者)的《最新分子生物学实验方法汇编》(F.M.Ausubel et al.(editors),Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience)(1988,包括到目前为止的所有更新);冷泉港实验室的Ed Harlow和

David Lane(编者)的《抗体:实验室手册》(Ed Harlow and David Lane(editors),Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory,(1988));以及约翰·威利父子出版公司出版的J.E.Coligan等人(编者)的《免疫学实验指南》(Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons)(包括目前为止的所有更新)。

[0157] 本文中可变区及其部分、免疫球蛋白、抗体及其片段的描述和定义可通过在以下文献中的讨论进一步阐明:Kabat,免疫相关蛋白质序列,国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达1987和1991(Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1987and 1991),Bork等人《生物分子杂志》242,309-320,1994(Bork et al.,J Mol.Biol.242,309-320,1994),Chothia和Lesk《分子生物杂志》196:901-917,1987(Chothia and Lesk J.Mol Biol.196:901-917,1987),Chothia等人《自然》342,877-883,1989(Chothia et al.Nature 342,877-883,1989),和/或Al-Lazikani等人《生物分子杂志》273,927-948,1997(Al-Lazikani et al.,J Mol Biol 273,927-948,1997)。

[0158] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应理解为“X和Y”或“X或Y”,并应被视为对两种含义或其中一种含义提供明确支持。

[0159] 在整个说明书中,单词“包括(comprise)”或诸如“包括(comprises或comprising)”将被理解为暗示包括所述元件、整体或步骤,或一组元件、整体或步骤,但不排除任何其他元件、整体或步骤,或一组元件、整体或步骤。

[0160] 如本文所用,术语“衍生自”应理解为表示指定的整数可从特定来源获得,尽管不必直接从该来源获得。

[0161] 选定的定义

[0162] 如本公开所涵盖,“化合物”可采取多种形式中的任一种,包括天然化合物、化学小分子化合物或生物化合物或大分子。示例性化合物包括抗体或抗体的抗原结合片段、核酸、多肽、肽和小分子。

[0163] 本文中提及的“粒细胞集落刺激因子”(G-CSF)包括G-CSF的天然形式,其突变形式,例如非格司亭(filgrastim)和聚乙二醇化形式的G-CSF或非格司亭。该术语还包括保留与G-CSFR(例如,人G-CSFR)结合的活性并诱导信号传导的G-CSF的突变形式。

[0164] G-CSF是粒细胞产生的主要调节剂。G-CSF由骨髓基质细胞、内皮细胞、巨噬细胞和成纤维细胞产生,并且通过炎性刺激物诱导产生。G-CSF通过G-CSF受体(G-CSFR)起作用,其在早期骨髓祖细胞、成熟嗜中性粒细胞、单核细胞/巨噬细胞、T和B淋巴细胞和内皮细胞上表达。

[0165] 仅出于命名而非限制的目的,人G-CSFR的示例性序列在NCBI参考序列:NP_000751.1中列出(并且在SEQ ID NO:16中列出)。来自其他物种的G-CSFR的序列可以使用在此提供的序列和/或在公共数据库中和/或使用标准技术确定(例如,如在以下中描述:格林出版联合公司与约翰威立父子出版公司出版的Ausubel等人(编者)的《最新分子生物学实验方法汇编》(1988,包括到目前为止的所有更新)或冷泉港实验室出版社出版的J.Sambrook等人的《分子克隆:实验室手册》)提及人G-CSFR可缩写为hG-CSFR,而提及食蟹猴G-CSFR可缩写为cynoG-CSFR。参考可溶性G-CSFR是指包括G-CSFR的配体结合区的多肽。G-CSFR的Ig和CRH结构域参与配体结合和受体二聚化(Layton等人《生物化学杂志》272:

29735-29741,1997(Layton et al.,J.Biol Chem.,272:29735-29741,1997)和Fukunaga等人《欧洲分子生物学学会杂志》10:2855-2865,1991(Fukunaga et al,EMBO J.10:2855-2865,1991))。包括受体的这些部分的可溶形式的G-CSFR已经用于受体的各种研究,并且在受体的位置78、163和228处的游离半胱氨酸的突变有助于在不影响配体结合的情况下表达和分离可溶受体多肽(Mine等人《生物化学》43:2458-2464 2004(Mine et al.,Biochem.,43:2458-2464 2004))。

[0166] 如本文所用,术语“缺血-再灌注损伤”是指在缺血一段时间或缺氧后当血液供给返回组织或器官时(缺氧或氧不足后)引起的组织或器官损伤。缺血期间血液中氧和营养物质的缺乏造成一种状况,其中循环的恢复通过氧化应激的诱导而不是正常功能的恢复导致炎症和氧化损伤。缺血-再灌注损伤(IRI)也称为“再灌注损伤”、“再灌注性损伤”和“复氧损伤”。如本文所用,“缺血-再灌注损伤”包括热缺血-再灌注损伤和冷缺血-再灌注损伤。

[0167] 如本文所用,术语“缺血”(也称为“贫血”)是指对组织的血液供应的限制,引起细胞代谢所需的氧和葡萄糖的缺乏,以及引起代谢废物的累积和减少的去除。

[0168] 如本文所用,术语“再灌注”涉及到组织的血流或氧的恢复。

[0169] 如本文所用,术语“病况”是指对正常功能的破坏或干扰,并且不限于任何特定病况,并且将包括疾病或病症。

[0170] 如本文所用,术语“防止(preventing)”、“防止(prevent)”或“防止(prevention)”包括施用本公开的化合物,从而至少部分地停止或阻止病况的至少一种症状的发展。该术语还包括治疗缓解的受试者以防止或阻止复发。

[0171] 如本文所用,术语“治疗(treating)”“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”包括施用本文所述的化合物,从而减少或消除特定疾病或病况的至少一种症状。

[0172] 如本文所用,术语“嗜中性粒细胞减少”用于指低于正常范围的下限的绝对嗜中性粒细胞计数(ANC),例如小于2000个细胞/μL血液,或小于1500个细胞/μL血液,或小于1000个细胞/μL血液的ANC,例如小于500个细胞/μL血液(参见Sibille等人.2010Br J Clin Pharmacol70(5):736-748)。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以不引起严重中性粒细胞减少的量施用。如本文所用,术语“严重嗜中性粒细胞减少”用于指小于1000个细胞/μL血液的绝对嗜中性粒细胞计数(ANC)。

[0173] 如本文所用,术语“受试者”应理解为意指任何动物(包括人),例如哺乳动物。示例性受试者包括但不限于人和非人灵长类。例如,受试者是人。

[0174] 根据前述段落,对于本领域技术人员显而易见的是,供体(例如,器官供体)或接受者(例如,器官接受者)包括哺乳动物,例如人。

[0175] 术语“蛋白质”应包括单一多肽链,即通过肽键连接的一系列连续氨基酸,或彼此共价或非共价连接的一系列多肽链(即多肽复合物)。例如,一系列多肽链可以使用合适的化学键或二硫键共价连接。非共价键的示例包括氢键、离子键、范德华力和疏水相互作用。

[0176] 术语“多肽”或“多肽链”将从前述段落理解为意指通过肽键连接的一系列连续氨基酸。

[0177] 术语“分离的蛋白质”或“分离的多肽”是这样的蛋白质或多肽,其由于其出处或来源而不与天然状态下伴随其的天然相关组分相关;基本上不含来自相同来源的其他蛋白质。使用本领域已知的蛋白纯化技术,可以使蛋白基本上不含天然相关组分或通过分离基

本上纯化。“基本上纯化的”是指蛋白质基本上不含污染物剂,例如,至少约70％或75％或80％或85％或90％或95％或96％或97％或98％或99％不含污染物剂。

[0178] 术语“重组体”应理解为是指人工遗传重组的产物。因此,在包括抗体抗原结合结构域的重组蛋白的上下文中,该术语不包括受试者体内天然存在的抗体,其是在B细胞成熟期间发生的天然重组的产物。然而,如果这样的抗体是分离的,则认为它是包括抗体抗原结合结构域的分离的蛋白质。类似地,如果使用重组方法分离和表达编码蛋白质的核酸,则所得蛋白质是包括抗体抗原结合域的重组蛋白质。重组蛋白质还包括当其在表达其的细胞、组织或受试者内时通过人工重组方式表达的蛋白质。

[0179] 如本文所用,术语“抗原结合位点”应指由能够结合或特异性结合抗原的蛋白质形成的结构。抗原结合位点不必是一系列连续的氨基酸,甚至是单一多肽链中的氨基酸。例如,在由两条不同多肽链产生的Fv中,抗原结合位点由V_L和V_H的一系列氨基酸组成,其与抗原相互作用并且通常但不总是在每个可变区中的一个或多个CDR中。在一些示例中,抗原结合位点是V_H或V_L或Fv。

[0180] 本领域技术人员将意识到,“抗体”通常被认为是包括由多条多肽链(例如,包括V_L的多肽和包括V_H的多肽)组成的可变区的蛋白质。抗体通常还包括恒定结构域,在重链的情况下,其中一些可以排列为恒定区,恒定区包括的恒定片段或可结晶片段(Fc)。V_H和V_L相互作用形成Fv,所述Fv包括能够特异性结合一种或几种密切相关抗原的抗原结合区。通常,来自哺乳动物的轻链是κ轻链或λ轻链并且来自哺乳动物的重链是α、δ、ε、γ或μ。抗体可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2)或亚类。术语“抗体”还包括人源化抗体、灵长类化抗体、人抗体和嵌合抗体。

[0181] 术语“全长抗体”、“全抗体”或“完整抗体”可互换使用,是指相对于抗体的抗原结合片段,基本上完整形式的抗体。具体地,完整抗体包括具有包括Fc区的重链和轻链的那些。恒定区可以是野生型序列恒定区(例如,人野生型序列恒定区)或其氨基酸序列变体。

[0182] 如本文所用,“可变区”是指能够特异性结合抗原并且包括互补性决定区(CDR)的氨基酸序列的如本文定义的抗体的轻链和/或重链的部分;即CDR1、CDR2和CDR3以及框架区(FR)。示例性可变区包括三个或四个FR(例如,FR1、FR2、FR3和任选的FR4)以及三个CDR。在衍生自IgNAR的蛋白质的情况下,该蛋白质可能缺乏CDR2。V_H指重链的可变区。V_L指轻链的可变区。

[0183] 本文使用的术语“互补性决定区”(合成CDR;即CDR1、CDR2和CDR3)指抗体可变区的氨基酸残基,其存在是抗原结合所必需的。每个可变区通常具有识别为CDR1、CDR2和CDR3的三个CDR区。分配给CDR和FR的氨基酸位置可以根据Kabat,免疫相关蛋白质序列,国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达1987和1991(Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1987and 1991)或在本公开内容中的其他编号系统,例如,Chothia和Lesk《分子生物杂志》196:901-917,1987(Chothia and Lesk J.Mol Biol.196:901-917,1987);Chothia等人《自然》342,877-883,1989(Chothia et al.Nature 342,877-883,1989);和/或Al-Lazikani等人《生物分子杂志》273:927-948,1997(Al-Lazikani et al.,J Mol Biol 273:927-948,1997)的规范编号系统;Lefranc等人《发育与比较免疫学》27:55-77,2003(Lefranc et al.,Devel.And Compar.Immunol.,27:55-77,2003)的IMGT编号系统;或Honnegher和Plükthun

《分子生物杂志》309:657-670,2001(Honnegher and Plükthun J.Mol.Biol.,309:657-670,2001)的AHO编号系统。例如,根据Kabat的编号系统,V_H框架区(FR)和CDR如下定位:残基1-30(FR1)、31-35(CDR1)、36-49(FR2)、50-65(CDR2)、66-94(FR3)、95-102(CDR3)和103-113(FR4)。根据Kabat的编号系统,V_L FR和CDR如下定位:残基1-23(FR1)、24-34(CDR1)、35-49(FR2)、50-56(CDR2)、57-88(FR3)、89-97(CDR3)和98-107(FR4)。本公开不限于如Kabat编号系统所定义的FR和CDR,而是包括所有编号系统,包括以上所讨论的那些。在一个示例中,本文提及的CDR(或FR)是关于根据Kabat编号系统的那些区。

[0184] “构架区”(FR)是除CDR残基之外的那些可变区残基。

[0185] 如本文所用,术语“Fv”应理解为意指任何蛋白质,无论是由多个多肽组成还是由单个多肽组成,其中V_L和V_H缔合并形成具有抗原结合位点(即能够特异性结合抗原)的复合物。形成抗原结合位点的V_H和V_L可以在单个多肽链中或在不同的多肽链中。此外,本公开的Fv(以及本公开的任何蛋白质)可以具有多个抗原结合位点,其可以结合或可以不结合相同的抗原。该术语应理解为包括直接衍生自抗体的片段以及对应于使用重组方法产生的这种片段的蛋白质。在一些示例中,V_H不与重链恒定结构域(C_H)1连接和/或V_L不与轻链恒定结构域(C_L)连接。示例性的含有Fv的多肽或蛋白质包括Fab片段、Fab'片段、F(ab')片段、scFv、双抗体、三抗体、四抗体或更高级的复合物,或与恒定区或其结构域连接的上述任何一种,例如C_H2或C_H3结构域,例如小抗体。“Fab片段”由免疫球蛋白的单价抗原结合片段组成,并且可以通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体以得到由全轻链和重链的一部分组成的片段,或者可以使用重组方法产生。抗体的“Fab'片段”可通过用胃蛋白酶处理完整抗体,然后还原得到由全轻链和包括V_H和单个恒定区的重链的一部分组成的分子而获得。以这种方式处理的每个抗体获得两个Fab'片段。Fab'片段也可以通过重组方法产生。抗体的“F(ab')2片段”由通过两个二硫键结合在一起的两个Fab'片段的二聚体组成,并且通过用胃蛋白酶处理整个抗体分子而获得,而无需随后的还原。“Fab2”片段是包括使用例如亮氨酸拉链或C_H3结构域连接的两个Fab片段的重组片段。“单链Fv”或“scFv”是含有抗体的可变区片段(Fv)的重组分子,其中轻链的可变区和重链的可变区通过合适的柔性多肽接头共价连接。

[0186] 如本文所用,关于化合物或其抗原结合位点与抗原的相互作用的术语“结合”意指所述相互作用取决于抗原上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在。例如,抗体识别并结合特定蛋白质结构,而不是通常结合蛋白质。如果抗体结合表位“A”,则在包含标记的“A”和蛋白质的反应中,包含表位“A”(或游离的,未标记的“A”)的分子的存在将减少结合至抗体的标记的“A”的量。

[0187] 如本文所用,术语“特异性结合(specifically bind)”或“特异性结合(bind specifically)”应理解为意指与替代性抗原或细胞相比,本公开的化合物与其表达的特定抗原或细胞,更频繁地,更快速地,以更大的持续时间和/或以更大的亲和力反应或缔合。例如,与G-CSFR(例如,hG-CSFR)结合的化合物的亲和力比与其他细胞因子受体或通常由多反应性天然抗体(即通过已知与人类天然存在的多种抗原结合的天然存在的抗体)识别的抗原结合的亲和力大(例如20倍或40倍或60倍或80倍至100倍或150倍或200倍)。一般地,但不是必须地,对结合的提及意指特异性结合,并且每个术语应被理解为对另一个术语提供明确的支持。

[0188] 如果蛋白质或抗体结合的多肽的解离常数(K_D)小于另一种多肽的蛋白质或抗体

的K_D,则可以认为该蛋白质或抗体“优先结合”了该多肽。在一个示例中,如果蛋白质或抗体以比另一多肽的蛋白质或抗体的KD高至少约20倍或40倍或60倍或80倍或100倍或120倍或140倍或160倍的亲和力(即,KD)结合多肽,则认为该蛋白质或抗体优先结合该多肽。

[0189] 出于澄清的目的并且如基于本文所示例的主题对于本领域技术人员显而易见的,在本说明书中提及“亲和力”是指蛋白质或抗体的K_D。

[0190] 为了澄清的目的并且如基于本文的描述对于本领域技术人员将是显而易见的,提及“至少约...的亲和力”将被理解为意指亲和力(或K_D)等于所述的值或更高(即,当亲和力较低时所述的值),即,2nM的亲和力大于3nM的亲和力。换句话说,该术语可以是“X或更小的亲和力”,其中X是本文所述的值。

[0191] “至少约...的IC_{50}”应理解为意指IC_{50}等于所述值或更大(即,即当IC_{50}较低时所述的值),即,2nM的IC_{50}大于3nM的IC_{50})。换句话说,该术语可以是“X或更小的IC_{50}”,其中X是本文所述的值。

[0192] 如本文所用,术语“表位”(同义“抗原决定簇”)应理解为意指包括抗体结合的抗原结合位点的蛋白质所结合的hG-CSFR的区域。该术语不必限于与蛋白质接触的特定残基或结构。例如,该术语包括跨越与蛋白质接触的氨基酸的区和/或在该区外的5-10或2-5或1-3个氨基酸。在一些示例中,该表位包括当hG-CSFR折叠时彼此靠近定位的一系列不连续氨基酸,即“构象表位”。例如,构象表位在对应于SEQ ID NO:1的111-115、170-176、218-234和/或286-300的一个或多个或两个或更多个或全部区中包括氨基酸。本领域技术人员还将知道,术语“表位”不限于肽或多肽。例如,术语“表位”包括分子(如糖侧链、磷酰基侧链或磺酰基侧链)的化学活性表面基团,并且在某些示例中可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。

[0193] 术语“竞争性抑制”应理解为意指本公开的蛋白质(或其抗原结合位点)减少或防止所述的抗体或蛋白质结合至G-CSFR,例如结合至hG-CSFR。这可能是由于蛋白质(或抗原结合位点)和抗体结合相同或重叠表位。从前述显而易见的是,蛋白质不需要完全抑制抗体的结合,而是仅需要将结合降低统计学显著的量,例如至少约10%或20%或30%或40%或50%或60%或70%或80%或90%或95%。优选地,所述蛋白质使抗体的结合降低至少约30%,更优选至少约50%,更优选至少约70%,还更优选至少约75%,甚至更优选至少约80%或85%,甚至更优选至少约90%。用于测定竞争性抑制结合的方法是本领域已知的和/或本文描述的。例如,抗体在存在或不存在蛋白质的情况下暴露于G-CSFR。如果在蛋白质存在下结合的抗体少于在蛋白质不存在下结合的抗体,则认为蛋白质竞争性抑制抗体的结合。在一个示例中,竞争性抑制不是由于空间位阻。

[0194] 在两个表位的上下文中,“重叠”应被认为是指两个表位共享足够数目的氨基酸残基以允许结合一个表位的蛋白质(或其抗原结合位点)竞争性抑制结合另一个表位的蛋白质(或抗原结合位点)的结合。例如,“重叠”表位共享至少1或2或3或4或5或6或7或8或9或20个氨基酸。

[0195] 如本文所用,术语“中和”应理解为意指化合物能够阻断、减少或防止细胞中通过G-CSFR的G-CSF介导的信号传导。用于测定中和的方法是本领域已知的和/或本文描述的。

[0196] 防止或治疗缺血-再灌注损伤

[0197] 本公开提供例如用于防止或治疗受试者的缺血-再灌注损伤的方法,其包括施用

抑制粒细胞集落刺激因子G-CSF信号传导的化合物。例如,所述化合物结合G-CSF或G-CSFR。

[0198] 缺血-再灌注损伤可以由自然事件(例如,在心肌梗塞或中风之后血流恢复)、创伤、肿瘤引起,或者由一个或多个外科手术程序或其他治疗干预引起,所述外科手术或其他治疗干预使已经经受减少的血液或氧气供应的组织或器官的血流或氧气恢复。

[0199] 在一个示例中,所述缺血-再灌注损伤由外科手术程序引起。这样的外科手术包括,例如,冠状动脉旁路手术、移植手术、冠状血管成形术、器官移植手术等(例如,心肺旁路手术)。

[0200] 在一些示例中,缺血和/或再灌注损伤是由于或与器官移植、冷器官储存、脑死亡、动脉粥样硬化、血栓形成、血栓栓塞、脂质栓塞、创伤、出血、支架、手术、血管成形术、旁路手术、全缺血、心肌梗塞、中风、外周血管疾病、手术、脓毒症或其组合有关。

[0201] 在一些示例中,缺血-再灌注损伤是由于器官移植或与器官移植相关。在一些示例中,器官是实体器官。在一些示例中,器官移植是肾移植。在一些示例中,器官移植是肝移植。在一些示例中,器官移植是心脏移植。在一些示例中,器官移植是胰腺移植。在一个示例中,器官移植是肺移植。在一个示例中,器官移植是胃移植。在一个示例中,器官移植是肠移植。在一个示例中,器官移植是睾丸移植。

[0202] 在一个示例中,缺血-再灌注损伤是由于组织移植或与组织移植相关。在一个示例中,组织移植是血管移植。在一个示例中,组织移植是皮肤移植,例如血管化的皮肤。在一个示例中,组织移植是胰岛移植。

[0203] 缺血-再灌注损伤的作用包括器官功能障碍、梗塞、炎症、氧化损伤、线粒体膜电位损伤、细胞凋亡、再灌注相关的心律失常、心肌顿抑、心脏脂毒性、缺血-衍生的疤痕形成,及其组合。对于肾移植引起的或与肾移植有关的缺血-再灌注损伤,作用还包括急性肾损伤和延迟的移植功能(DGF)。

[0204] 在一些示例中,本公开的方法防止或降低移植后急性肾损伤的可能性。例如,本公开的方法防止或降低以下中的一个或多个的风险:

[0205] • 血浆肌酸酐水平从基线增加至少≥0.3mg/dL(26.52μmol/L)或≥1.5-至2倍;

[0206] • 每小时每千克小于约0.5mL尿,持续至少6小时;和/或

[0207] • 需要肾替代治疗。

[0208] 在一些示例中,本公开的方法防止或降低移植(例如,肾移植)后延迟的移植功能的可能性。如本领域技术人员将知晓的,延迟的移植功能与不良的长期移植结果、慢性移植排斥和/或器官存活相关。例如,本公开的方法防止或降低以下中的一个或多个的风险:

[0209] • 在移植功能开始前大约7天内需要进行一次或多次血液透析治疗;

[0210] • 第0天和第7天之间的肌酸酐减少率小于70%。

[0211] 在一些示例中,本公开的方法防止或降低以下中的一个或多个的可能性:

[0212] • 原发性移植无功能:移植后肾从未充分发挥功能的病况,并且患者尽管有移植仍需要透析;和/或

[0213] • 缓慢移植功能:定义为血清肌酸酐大于3毫克(mg)/分升,移植后第5天不需要透析。

[0214] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止例如移植器官中的炎症的量施用。如本文所用,术语“炎症”或“炎症反应”涉及发生在经历炎症的组织中的

一组变化。特别地,炎症涉及对有害刺激物(包括病原体、受损细胞或刺激物质)的生物反应。确定炎症的方法是本领域已知的,并且包括但不限于测量红细胞沉降率(ESR),其中较高的ESR指示炎症,测量C-反应蛋白(CRP),其中较高水平的CRP指示炎症,和白细胞计数(在炎症中增加)。

[0215] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止例如移植器官中的氧化损伤的量施用。如本文所用,术语"氧化损伤"涉及在氧恢复期间可由反应性物质引起的生物分子损伤。氧化性损伤可涉及脂质过氧化、氧化性DNA损伤和对蛋白质的氧化性损伤。测定脂质过氧化的方法包括,但不限于,通过HPLC测定MDA(丙二醛)-TBA(硫代巴比妥酸),和通过质谱法定量异前列烷(其为多不饱和脂肪酸过氧化的特定终产物)。确定DNA氧化损伤的方法包括但不限于测量8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8OHdG)。确定对蛋白质的氧化损伤的方法包括但不限于定量个别氨基酸氧化产物,包括犬尿氨酸(来自色氨酸)、双酪氨酸(其似乎是代谢稳定的并且可以在尿中检测)、缬氨酸和亮氨酸氢氧化物、L-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA)、邻酪氨酸、2-氧代-组氨酸、谷氨酸半醛和己二酸半醛,以及羰基测定法(包括蛋白质羰基的测定)。线粒体膜电位($\Delta\psi\iota\eta$)涉及穿过线粒体内膜的质子梯度形式的膜电位。用于评估线粒体膜电位损伤的方法是本领域技术人员已知的,并且包括用于监测膜电位的荧光探针的使用,包括JC1染料(细胞技术)以及在允许绿色(485nm和535nm)和红色荧光(550nm和600nm)定量的激发和发射波长下的总荧光的测量。已知任何组织或器官的长期缺血诱导线粒体膜电位损伤。

[0216] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止嗜中性粒细胞和/或巨噬细胞浸润的量施用。如本文所用,术语"嗜中性粒细胞浸润"和"巨噬细胞浸润"是指组织或细胞中嗜中性粒细胞和巨噬细胞响应于多种物质在由于缺血-再灌注损伤引起的炎症反应位点处释放而募集或累积。例如,可以在器官移植后的供体器官组织中发生嗜中性粒细胞和/或巨噬细胞的浸润。测量嗜中性粒细胞和/或巨噬细胞浸润的方法是本领域技术人员已知的。例如,嗜中性粒细胞或巨噬细胞可以直接测量,例如通过荧光显微术可视化,或间接地通过测量受影响组织中嗜中性粒细胞/巨噬细胞特异性蛋白或酶的丰度或活性。用于测量嗜中性粒细胞和/或巨噬细胞浸润的合适方法描述于Soo-Jeong Yu等人Korean J Intern Med(2008)和Pulli等人PloS One(2013)。

[0217] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止补体C5激活的量施用。用于测量补体C5a激活的方法包括但不限于通过酶联免疫吸附测定(ELISA)评估血浆C5a水平。

[0218] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以减少或防止C5b-9沉积的量施用。用于测量C5b-9沉积的方法包括但不限于通过肾切片的免疫荧光染色的分析。

[0219] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低以下中的一种或多种的表达的量施用:

[0220] • 白细胞介素8受体β(IL-8Rβ);

[0221] • 单核细胞趋化蛋白1(MCP-1);

[0222] • 肾损伤分子1(KIM-1);

[0223] • 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL);

[0224] • 白细胞介素1β(IL-1β);

[0225] • 白细胞介素6(IL-6);

[0226] • 肿瘤坏死因子α(TNFα);

[0227] • 补体成分5a受体1(C5AR1);

[0228] • 巨噬细胞炎性蛋白2-α(MIP2-α);

[0229] • 细胞间粘附分子1(ICAM-1);

[0230] • E-选择蛋白;和

[0231] • C-X-C基序趋化因子配体1(CXCL1)。

[0232] 测量基因表达水平的方法是本领域已知的。例如,基因的表达水平可以通过定量mRNA的量来测量,例如通过northern印迹或通过定量逆转录PCR(qRT-PCR),如Riedy等人《生物技术》(1995)(Riedy et al Biotechniques(1995))中所述。或者,或另外,基因的表达水平可通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光联免疫吸附测定(FLISA)、免疫荧光或免疫印迹(参见冷泉港实验室出版社出版的J.Sambrook等人的《分子克隆:实验室手册》)对基因编码的蛋白质的水平进行定量来测量。

[0233] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或防止例如与肾移植相关的延迟的移植功能的量施用。延迟的移植功能是急性肾损伤的表现,导致移植后尿少,增加了移植的免疫原性和急性排斥发作的风险,并且降低了长期存活。用于检测延迟的移植功能的合适的生物标志物包括NGAL、KIM-1、肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)、白细胞介素18(IL-18)、YKL-40(40kDa肝素结合糖蛋白和几丁质结合糖蛋白,参见例如Hakala等人《生物化学期刊》(1993)(Hakala et al.,J Biol Chem 1993),凝聚素,和血清胱抑素C。用于检测延迟的移植功能的这样的生物标志物描述于Malyszko等人《科学报告》(2015)(Malyszko et al.,Sci Rep(2015)),其通过引用并入本文。

[0234] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或防止血清或血浆肌酸酐水平升高的量施用。本领域技术人员将理解增加的血清(或血浆)肌酸酐水平是受损的肾功能的指标。当肾由于任何原因例如由于缺血-再灌注损伤而受损时,血液中的肌酸酐水平将由于肾对肌酸酐的不良清除而升高。因此,异常高水平的肌酸酐警告肾可能的功能障碍或衰竭。用于测量血清(或血浆)肌酸酐水平的合适方法是本领域已知的,例如使用碱性苦味酸盐的Jaffe反应,并且描述于Peake和Whiting《临床生物化学评论》(2006)(Peake and Whiting,Clin Biochem Rev(2006))。

[0235] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或防止血清或血浆尿素水平升高的量施用。升高的血清或血浆尿素水平是受损的肾功能的指标,并且可由缺血-再灌注损伤引起。血清或血浆尿素可通过本领域已知的任何合适的方法测量。例如,血清或血浆尿素可以通过化学方法测量,例如二乙酰(由二乙酰单肟和酸产生)与尿素反应形成二嗪,或通过酶促方法测量,例如使用尿素酶产生和测量氨或谷氨酸脱氢酶,其中测量NADH的消耗。例如,Cell Biolabs'尿素测定试剂盒基于Berthelot反应,其中尿素首先降解为氨和二氧化碳,其进一步与碱性显影剂反应以产生蓝绿色产物,所述蓝绿色产物可用标准分光光度板读取器在580-630nm之间的光密度下测量。用于测量血清或血浆尿素水平的合适的方法包括在Lamb E等人,"肾功能检验"(第25章):临床化学和分子诊断学Tietz教科书(2012)(Lamb E et al.,Kidney Function Tests(Chapter 25):Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics(2012))。

[0236] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或防止尿白蛋白水平升高的量施用。增加的尿白蛋白水平是受损的肾功能的指标,并且可由缺血-再灌注损伤引起。尿白蛋白水平可通过本领域已知的任何合适的方法测定。例如,尿白蛋白水平可以使用微量白蛋白尿检验来测量。

[0237] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以足以降低或防止受试者尿液中血液水平升高的量施用。尿血(又称为"血尿")是受损的肾功能的指标,可由缺血-再灌注损伤引起。可通过本领域已知的任何合适的方法测量受试者尿液中的血液水平。例如,受试者尿液中的血液水平可以使用尿液检棒测量,或通过尿液样品的显微镜检查来检测红细胞的存在。

[0238] 抗体

[0239] 在一个示例中,根据任何示例的本文所述的化合物是包括抗体的抗原结合位点的蛋白质。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物是抗体。在一些示例中,抗体结合G-CSFR。在一些示例中,抗体结合G-CSF。

[0240] 产生抗体的方法是本领域已知的和/或描述于Harlow和Lane(编者)抗体:实验室手册,冷泉港实验室,(1988年)(Harlow and Lane(editors)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,(1988))。通常,在这样的方法中,G-CSFR或G-CSF(例如,hG-CSFR或hG-CSF)或其区(例如,细胞外结构域)或其免疫原性片段或表位或表达并展示其的细胞(即,免疫原),任选地与任何合适的或期望的载体、佐剂或药学上可接受的赋形剂一起配制,施用至非人动物,例如小鼠、鸡、大鼠、兔、豚鼠、狗、马、牛、山羊或猪。免疫原可以鼻内、肌内、皮下、静脉内、皮内、腹膜内或通过其它已知途径施用。

[0241] 单克隆抗体是本公开考虑的抗体的一个示例性形式。术语"单克隆抗体"或"mAb"是指能够结合相同抗原(例如结合抗原内的相同表位)的均质抗体群。该术语不旨在限制抗体的来源或其制备方式。

[0242] 为了制备mAb,可以使用多种已知技术中的任何一种,例如,US4196265或上述Harlow和Lane(1988)中举例说明的方法。

[0243] 或者,使用ABL-MYC技术(NeoClone,Madison WI 53713,USA)产生分泌MAb的细胞系(例如,如Largaespada等人《免疫学方法杂志》197:85-95,1996(Largaespada et al,J.Immunol.Methods.197:85-95,1996)中所述)。

[0244] 也可以通过筛选展示文库,例如噬菌体展示文库,例如,如US6300064和/或US5885793中所述,来产生或分离抗体。例如,本发明人已经从噬菌体展示文库中分离了完全的人抗体。

[0245] 本公开的抗体可以是合成抗体。例如,抗体为嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或去免疫抗体。

[0246] 在一个示例中,本文描述的抗体是嵌合抗体。术语"嵌合抗体"是指其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种(例如,鼠,例如小鼠)或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源的抗体,而所述链的剩余部分与衍生自另一物种(例如,灵长类动物,例如人)或属于另一抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源。用于产生嵌合抗体的方法描述于例如US4816567;和US5807715。

[0247] 本公开的抗体可以是人源化的或人的。

[0248] 术语“人源化抗体”应理解为是指具有衍生自非人物种抗体的抗原结合位点或可变区和基于人抗体的结构和/或序列的剩余抗体结构的嵌合抗体亚类。在人源化抗体中,抗原结合位点通常包含来自移植到人抗体的可变区中的适当FR上的非人抗体的互补性决定区(CDR)和来自人抗体的剩余区。抗原结合位点可以是野生型的(即,与非人抗体的那些相同)或通过一个或多个氨基酸取代修饰。在一些情况下,人抗体的FR残基被相应的非人残基替代。

[0249] 将非人抗体或其部分(例如,可变区)人源化的方法是本领域已知的。可以按照US5225539或US5585089的方法进行人源化。不排除用于使抗体人源化的其它方法。

[0250] 本文所用的术语“人抗体”是指具有可变区(例如V_H、V_L)和任选的恒定区的抗体,所述恒定区衍生自或对应于在人中例如在人种系或体细胞中发现的序列。

[0251] 示例性人抗体在本文中描述并且包括C1.2和C1.2G和/或其可变区。与非人抗体相比,这些人抗体在人中提供降低的免疫原性的优点。示例性抗体描述于WO2012171057中,其通过引用并入本文。

[0252] 含有蛋白质的抗体结合结构域

[0253] 单结构域抗体

[0254] 在一些示例中,本公开的化合物是或包括单结构域抗体(其可与术语“结构域抗体”或“dAb”互换使用)的蛋白质。单结构域抗体是包括抗体重链可变区的全部或部分的单一多肽链。在某些示例中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,MA;参见,例如,US6248516)。

[0255] 双抗体、三抗体、四抗体

[0256] 在一些示例中,本公开的蛋白质是或包括双抗体、三抗体、四抗体或更高级的蛋白质复合物,例如WO98/044001和/或WO94/007921中描述的那些。

[0257] 单链Fv(scFv)

[0258] 本领域技术人员将知道,scFv在单一多肽链中包括V_H和V_L区以及V_H和V_L之间的多肽接头,所述多肽接头使scFv能够形成抗原结合所需的结构(即,使单一多肽链的V_H和V_L彼此缔合以形成Fv)。例如,接头包括超过12个氨基酸残基,其中$(Gly_4Ser)_3$是scFv更有利的接头之一。

[0259] 重链抗体

[0260] 重链抗体在结构上不同于许多其它形式的抗体,只要它们包括重链,但不包括轻链。因此,这些抗体也称为“仅重链的抗体”。重链抗体存在于例如骆驼和软骨鱼(也称为IgNAR)中。

[0261] 在以下参考文献WO94/04678、WO97/49805和WO 97/49805中特别找到了来自骆驼科动物的重链抗体及其可变区的一般性描述及其生产和/或分离和/或使用方法。

[0262] 来自软骨鱼的重链抗体及其可变区和它们的生产和/或分离和/或使用方法的一般描述尤其见于WO2005/118629。

[0263] 其它抗体和抗体片段

[0264] 本公开还考虑了其他抗体和抗体片段,例如:

[0265] (i)如US5,731,168中所述的“关键和孔”双特异性蛋白;

[0266] (ii)例如,如US4,676,980中所述的异源缀合蛋白质;

[0267] (iii)使用如US4,676,980中所述的化学交联剂(例如,Neod)产生的异源缀合蛋白质;和

[0268] (iv)Fab_3(例如,如EP19930302894中所述)。

[0269] V-样蛋白质

[0270] 本公开的化合物的示例是T细胞受体。T细胞受体具有结合成类似于抗体Fv模块的结构的两个V-结构域。Novotny等人《美国国家科学院院刊》88:8646-8650,1991(Novotny et al.,Proc Natl Acad Sci USA 88:8646-8650,1991)描述了如何将T细胞受体的两个V-结构域(称为α和β)融合并表达为单链多肽,以及如何改变表面残基以降低直接类似于抗体scFv的疏水性。描述包括两个V-α和V-β结构域的单链T细胞受体或多聚体T细胞受体的生产的其它出版物包括WO1999/045110或WO2011/107595。

[0271] 包括抗原结合结构域的其它非抗体蛋白质包括具有V-样结构域的蛋白质,其通常是单体的。包括此类V-样结构域的蛋白质的示例包括CTLA-4、CD28和ICOS。包括此类V-样结构域的蛋白质的进一步公开内容包括在WO1999/045110中。

[0272] 阿迪连接素(Adnectin)

[0273] 在一个示例中,本公开的化合物是阿迪连接素。阿迪连接素基于人纤连蛋白的第十种纤连蛋白III型(^{10}Fn3)结构域,其中环区被改变以赋予抗原结合。例如,可以工程化在^{10}Fn3结构域的β-夹层的一端的三个环,以使阿迪连接素能够特异性识别抗原。更多细节参见US20080139791或WO2005/056764。

[0274] 抗运载蛋白(Anticalin)

[0275] 在另一个示例中,本公开的化合物是抗运载蛋白。抗运载蛋白衍生自脂质运载蛋白,脂质运载蛋白是转运小疏水分子如类固醇、胆红素(bilin)、类视黄醇和脂质的细胞外蛋白家族。脂质运载蛋白具有刚性β-片状二级结构,在锥形结构的开口端具有多个环,其可以被工程化以结合抗原。这样的工程化脂质运载蛋白被称为抗运载蛋白。关于抗运载蛋白的进一步描述,参见US7250297B1或US20070224633。

[0276] 亲和体

[0277] 在另一个示例中,本公开的化合物是亲和体。亲和体是来源于金黄色葡萄球菌的蛋白质A的Z结构域(抗原结合结构域)的支架,其可以被工程化以结合抗原。Z结构域由大约58个氨基酸的三螺旋束组成。已经通过表面残基的随机化产生了文库。更多细节参见EP1641818。

[0278] Avimer

[0279] 在另一个示例中,本公开的化合物是Avimer。Avimer是衍生自A-结构域骨架家族的多结构域蛋白质。约35个氨基酸的天然结构域采用限定的二硫键结构。多样性是通过改组A-结构域家族所显示的天然变异而产生的。更多细节参见WO2002088171。

[0280] 锚蛋白重复蛋白(DARPin)

[0281] 在另一个示例中,本公开的化合物是设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)。锚蛋白重复蛋白来源于锚蛋白,锚蛋白是介导整合膜蛋白质附着于细胞骨架的蛋白家族。单个锚蛋白重复是由两个α-螺旋和一个β-转角组成的33残基基序。它们可以通过随机化每个重复的第一个α-螺旋和β-转角中的残基而被工程化以结合不同的靶抗原。通过增加组件数目可以增加它们的结合界面(亲和力成熟方法)。更多细节参见US20040132028。

[0282] 可溶性G-CSFR

[0283] 本公开还考虑了G-CSFR的可溶形式,其与天然存在的膜相关G-CSFR竞争G-CSF相互作用。本领域技术人员可容易地制备受体的可溶形式,参见例如美国专利申请第5,589,456号和Honjo等人,Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun.61(Pt 8):788-790,2005。

[0284] 去免疫的抗体和蛋白质

[0285] 本公开还涵盖去免疫化的抗体或蛋白质。去免疫的抗体和蛋白质具有一个或多个表位,例如,去除(即,突变)的B细胞表位或T细胞表位,从而降低哺乳动物产生针对该抗体或蛋白质的免疫应答的可能性。用于产生去免疫抗体和蛋白的方法是本领域已知的并且描述于例如WO2000/34317、WO2004/108158和WO2004/064724中。

[0286] 基于本文的描述,用于引入合适的突变并表达和测定所得蛋白质的方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0287] 蛋白质突变

[0288] 本公开还考虑了本公开的蛋白质的突变形式。在这方面,本文提供的数据指示在本公开的蛋白质的CDR内的除了可以进行的示例性改变之外还可以改变的位点。本领域技术人员将理解,在本公开的上下文中,可以另外地或可选地在含有蛋白质的可变区的框架区内进行改变而不抑制或显著降低其功能。

[0289] 例如,与本文所述序列相比,这种突变蛋白质包括一个或多个保守氨基酸取代。在一些示例中,所述蛋白质包括30个或更少或20个或更少或10个或更少(例如,9个或8个或7个或6个或5个或4个或3个或2个)保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链和/或亲水性和/或亲水性的氨基酸残基取代。

[0290] 在一个示例中,当与天然存在的蛋白质相比时,突变体蛋白质具有仅一个或两个或三个或四个或五个或六个保守氨基酸改变,或不超过一个或两个或三个或四个或五个或六个保守氨基酸改变。下文提供保守氨基酸改变的细节。如本领域技术人员例如根据本文的公开内容将知道的,可以合理地预测这样的微小变化不会改变蛋白质的活性。

[0291] 本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-支链侧链(例如、苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0292] 本公开还涵盖了本公开的蛋白质(例如,CDR,例如CDR3)中的非保守氨基酸改变(例如,取代)。例如,本发明人已经识别了可以在保持本公开的蛋白质的活性的同时进行的几个非保守氨基酸取代。在一个示例中,所述蛋白质例如在CDR3(例如CDR3)中包括少于6个,或5个,或4个,或3个,或2个,或1个非保守氨基酸取代。

[0293] 本公开还涵盖了与本文所述序列相比的一个或多个插入或缺失。在一些示例中,蛋白质包括10个或更少的,例如9个或8个或7个或6个或5个或4个或3个或2个插入和/或缺失。

[0294] 恒定区

[0295] 本公开涵盖本文所述的包括抗体恒定区的蛋白质和/或抗体。这包括与Fc融合的

抗体的抗原结合片段。

[0296] 可用于产生本公开的蛋白质的恒定区序列可从许多不同来源获得。在一些示例中,蛋白质的恒定区或其部分衍生自人抗体。恒定区或其部分可以衍生自任何抗体类别,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何抗体同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一个示例中,恒定区是人同种型IgG4或稳定的IgG4恒定区。

[0297] 在一个示例中,与天然或野生型人IgG1或IgG3 Fc区相比,恒定区的Fc区具有降低的诱导效应子功能的能力。在一个示例中,效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。用于评估含有Fc区的蛋白质的效应子功能水平的方法是本领域已知的和/或本文描述的。

[0298] 在一个示例中,Fc区是IgG4 Fc区(即,来自IgG4的恒定区),例如,人IgG4 Fc区。合适的IgG4 Fc区的序列对于本领域技术人员而言是显而易见的和/或可在公众可获得的数据库中获得(例如,从国家生物技术信息中心获得的文献)。

[0299] 在一个示例中,恒定区是稳定的IgG4恒定区。术语“稳定的IgG4恒定区”应理解为是指已经被修饰以降低Fab臂交换或进行Fab臂交换或形成半抗体的倾向或形成半抗体的倾向的IgG4恒定区。“Fab臂交换”是指人IgG4的一种蛋白质修饰,其中IgG4重链和附接的轻链(半分子)交换为来自另一IgG4分子的重链-轻链对。因此,IgG4分子可以获得识别两个不同抗原的两个不同Fab臂(导致双特异性分子)。Fab臂交换在体内天然发生,并且可以通过纯化的血细胞或还原剂(如还原的谷胱甘肽)在体外诱导。当IgG4抗体解离形成各自含有单一重链和单一轻链的两个分子时,形成“半抗体”。

[0300] 在一个示例中,稳定的IgG4恒定区包括在根据Kabat系统的铰链区的位置241处的脯氨酸(Kabat等人,免疫相关蛋白质序列,华盛顿美国卫生和人类服务部,1987和/或1991(Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services,1987and/or 1991))。该位置对应于根据EU编号系统的铰链区的位置228(Kabat等人,免疫相关蛋白质序列,华盛顿美国卫生和人类服务部,2001(Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services,2001)和Edelman等人《美国国家科学院院刊》63,78-85,1969(Edelman et al.,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85,1969))。在人IgG4中,该残基通常是丝氨酸。在丝氨酸取代脯氨酸之后,IgG4铰链区包括序列CPPC。在这方面,本领域技术人员将知道,“铰链区”是抗体重链恒定区的富含脯氨酸的部分,其连接赋予抗体的两个Fab臂移动性的Fc和Fab区。铰链区包括参与重链间二硫键的半胱氨酸残基。根据Kabat的编号系统,通常将其定义为从人IgG1的Glu226至Pro243的延伸。通过将形成重链间二硫(S-S)键的第一个和最后一个半胱氨酸残基置于相同位置,可以将其它IgG同种型的铰链区与IgG1序列比对(参见例如WO2010/080538)。

[0301] 稳定的IgG4抗体的另外的示例是其中人IgG4(根据EU编号系统)的重链恒定区中位置409处的精氨酸被赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸或亮氨酸取代的抗体(例如WO2006/033386中所述)。恒定区的Fc区可以另外地或可选地在对应于405的位置处包括选自由以下各项组成的组的残基:丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和亮氨酸(根据EU编号系统)。任选地,所述铰链区在位置241处包括脯氨酸(即,CPPC序列)(如上文所述)。

[0302] 在另一个示例中,Fc区是经修饰而具有降低的效应子功能的区,即“非免疫刺激Fc区”。例如,Fc区是在选自268、309、330和331的一个或多个位置处包括取代的IgG1 Fc区。在另一个示例中,Fc区是包括以下改变中的一个或多个的IgG1 Fc区:E233P、L234V、L235A和G236缺失和/或以下改变中的一个或多个:A327G、A330S和P331S(Armour等人《欧洲免疫学杂志》29:2613-2624,1999(Armour et al.,Eur J Immunol.29:2613-2624,1999);Shields等人《生物化学杂志》276(9):6591-604,2001(Shields et al.,J Biol Chem.276(9):6591-604,2001))。非免疫刺激性Fc区的其它示例描述于例如Dall'Acqua等人《免疫学杂志》177:1129-1138 2006(Dall'Acqua et al.,J Immunol.177:1129-1138 2006);和/或Hezareh《病毒学杂志》75:12161-12168,2001(Hezareh J Virol;75:12161-12168,2001)。

[0303] 在另一个示例中,Fc区是嵌合Fc区,例如,其包括来自IgG4抗体的至少一个C_H2结构域和来自IgG1抗体的至少一个C_H3结构域,其中所述Fc区在选自240、262、264、266、297、299、307、309、323、399、409和427(EU编号)的一个或多个氨基酸位置包括取代(例如WO2010/085682中所述)。示例性取代包括240F、262L、264T、266F、297Q、299A、299K、307P、309K、309M、309P、323F、399S和427F。

[0304] 其它修改

[0305] 本公开还涵盖了对本公开的抗体或蛋白质的另外的修饰。

[0306] 例如,抗体包括一个或多个增加蛋白质半衰期的氨基酸取代。例如,所述抗体包括Fc区,所述Fc区包括一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代增加Fc区对新生Fc区的亲和力。例如,Fc区在较低pH(例如,约pH 6.0)下对FcRn具有增加的亲和力,以促进内体中的Fc/FcRn结合。在一个示例中,与Fc区在约pH 7.4下的亲和力相比,Fc区在约pH 6下对FcRn具有增加的亲和力,这促进Fc在细胞再循环后再释放到血液中。这些氨基酸取代可用于通过降低从血液的清除来延长蛋白质的半衰期。

[0307] 示例性氨基酸取代包括根据EU编号系统的T250Q和/或M428L或T252A、T254S和T266F或M252Y、S254T和T256E或H433K和N434F。额外的或替代的氨基酸取代描述于例如US20070135620或US7083784中。

[0308] 在一个示例中,本公开的蛋白质另外包括白蛋白、其功能性片段或变体。在一个示例中,白蛋白、其功能性片段或变体是血清白蛋白,例如人血清白蛋白。在一个示例中,白蛋白、其功能片段或变体包括一个或多个氨基酸取代、缺失或插入,例如,不超过5个或4个或3个或2个或1个取代。适合用于本公开的氨基酸取代对于本领域技术人员将是显而易见的并且包括天然存在的取代和工程化的取代,如例如在WO2011051489、WO2014072481、WO2011103076、WO2012112188、WO2013075066、WO2015063611和WO2014179657中描述的那些。

[0309] 蛋白质生产

[0310] 在一个示例中,通过在足以产生例如如本文所述和/或本领域已知的蛋白质的条件下培养杂交瘤来产生根据任何示例的本文所述的蛋白质。

[0311] 重组表达

[0312] 在另一个示例中,本文根据任何示例描述的蛋白质是重组的。

[0313] 在重组蛋白的情况下,可以将编码该蛋白的核酸克隆到表达构建体或载体中,然后将其转染到宿主细胞如大肠杆菌细胞(E.coli cells)、酵母细胞、昆虫细胞,或哺乳动物

细胞,例如猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚肾(HEK)细胞,或骨髓瘤细胞,其不另外产生蛋白质。用于表达蛋白质的示例性细胞是CHO细胞、骨髓瘤细胞或HEK细胞。实现这些目的的分子克隆技术是本领域已知的,并且描述于例如格林出版联合公司与约翰威立父子出版公司出版的Ausubel等人(编者)的《最新分子生物学实验方法汇编》(Ausubel et al.,(editors),Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience)(1988,包括到目前为止的所有更新)或冷泉港实验室出版社出版的Sambrook等人的《分子克隆:实验室手册》(1989)(Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))。多种克隆和体外扩增方法适于构建重组核酸。生产重组抗体的方法在本领域中也是已知的,参见,例如,US4816567或US5530101。

[0314] 分离后,将与启动子可操作连接的核酸插入表达构建体或表达载体中,用于进一步克隆(DNA扩增)或用于在无细胞系统或细胞中表达。

[0315] 如本文所用,术语“启动子”在其最广泛的上下文中考虑并且包括基因组基因的转录调节序列,包括精确转录起始所需的TATA盒或起始元件,具有或不具有改变核酸表达(例如,响应于发育和/或外部刺激,或以组织特异性方式)的额外调节元件(例如,上游激活序列、转录因子结合位点、增强子和沉默子)。在本文中,术语“启动子”也用于描述重组的、合成的或融合的核酸或衍生物,其赋予、激活或增强与其可操作地连接的核酸的表达。示例性启动子可以含有一个或多个特异性调节元件的额外拷贝,以进一步增强所述核酸的表达和/或改变所述核酸的空间表达和/或时间表达。

[0316] 如本文所用,术语“可操作地连接”意指相对于核酸定位启动子,使得所述核酸的表达受所述启动子控制。

[0317] 许多用于在细胞中表达的载体是可用的。载体组分通常包括但不限于以下的一种或多种:信号序列、编码蛋白质(例如,来自本文提供的信息)的序列、增强子元件、启动子和转录终止序列。本领域技术人员知道用于表达蛋白质的合适序列。示例性的信号序列包括原核分泌信号(例如,pelB、碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II等)、酵母分泌信号(例如,转化酶前导序列、α因子前导序列或酸性磷酸酶前导序列)或哺乳动物分泌信号(例如,单纯性疱疹gD信号)。

[0318] 在哺乳动物细胞中有活性的示例性启动子包括巨细胞病毒立即早期启动子(CMV-IE)、人延长因子1-α启动子(EF1)、小核RNA启动子(U1a和U1b)、α-肌球蛋白重链启动子、猿猴病毒40启动子(SV40)、劳斯肉瘤病毒启动子(RSV)、腺病毒主要晚期启动子、β-肌动蛋白启动子;包括CMV增强子/β-肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子或其活性片段的杂合调节元件。有用的哺乳动物宿主细胞系的示例是通过SV40(COS-7,ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1系;和人胚肾细胞系(在悬浮培养中亚克隆生长的293或293细胞;幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);或中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。

[0319] 适用于在酵母细胞中表达的典型启动子,例如选自巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和粟酒裂殖酵母(S.pombe)的酵母细胞,包括但不限于ADH1启动子、GAL1启动子、GAL4启动子、CUP1启动子、PHO5启动子、nmt启动子、RPR1启动子或TEF1启动子。

[0320] 用于将分离的核酸或包含该核酸的表达构建体导入细胞用于表达的手段是本领

域技术人员已知的。用于给定细胞的技术取决于已知的成功技术。将重组DNA导入细胞的方法包括显微注射、DEAE-葡聚糖介导的转染,脂质体介导的转染,例如使用lipofectamine(Gibco,MD,美国)和/或cellfectin(Gibco,MD,美国),PEG介导的DNA摄取、电穿孔和微粒轰击,例如通过使用涂有DNA的钨或金颗粒(Agracetus Inc.,WI,美国)进行。

[0321] 用于产生蛋白质的宿主细胞可以在多种培养基中培养,这取决于所使用的细胞类型。可商购获得的培养基如Ham's F10(Sigma)、最小必需培养基((MEM)、(Sigma))、RPMI-1640(Sigma)和Dulbecco's改良的Eagle's培养基((DMEM),Sigma)适用于培养哺乳动物细胞。用于培养本文讨论的其它细胞类型的培养基是本领域已知的。

[0322] 蛋白质的分离

[0323] 分离蛋白质的方法是本领域已知的和/或本文描述的。

[0324] 当蛋白质分泌到培养基中时,可首先使用市售蛋白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤装置)浓缩来自此类表达系统的上清液。蛋白酶抑制剂如PMSF可以包括在任何前述步骤中以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素以防止外来污染物的生长。可选地,或另外地,可以例如使用连续离心将上清液从表达蛋白质的细胞中过滤和/或分离。

[0325] 从细胞制备的蛋白质可以使用例如离子交换、羟磷灰石层析、疏水作用层析、凝胶电泳、透析、亲和层析(例如,蛋白质A亲和层析或蛋白质G层析)或前述的任何组合来纯化。这些方法是本领域已知的并且描述于例如WO99/57134或冷泉港实验室的Ed Harlow和David Lane(编者)的《抗体:实验室手册》(1988)(Ed Harlow and David Lane(editors),Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory,(1988))。

[0326] 本领域技术人员还将知道,可以修饰蛋白质以包括便于纯化或检测的标签,例如,聚组氨酸标签,例如,六组氨酸标签,或流感病毒血凝素(HA)标签,或猿猴病毒5(V5)标签,或FLAG标签,或谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签。然后使用本领域已知的方法(例如亲和纯化)纯化得到的蛋白质。例如,通过使包含hexa-his标签的蛋白质的样品与特异性结合固定在固体或半固体支持物上的hexa-his标签的镍-次氮基三乙酸(Ni-NTA)接触,洗涤样品以除去未结合的蛋白质,并且随后洗脱结合的蛋白质来纯化包含hexa-his标签的蛋白质。或者,或另外,在亲和纯化方法中使用结合标签的配体或抗体。

[0327] 基于核酸的G-CSF信号传导抑制剂

[0328] 在本公开的一个示例中,根据本公开的任何示例的如本文所述的治疗性和/或防止性方法涉及降低G-CSF和/或G-CSFR的表达。例如,这种方法涉及施用减少编码G-CSF或G-CSFR的核酸的转录和/或翻译的化合物。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物是核酸,例如,反义多核苷酸、核酶、PNA、干扰RNA、siRNA、微小RNA。

[0329] 在另一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物是编码抑制G-CSF信号传导的蛋白质化合物(例如,抗体或其抗原结合片段)的核酸。

[0330] 反义核酸

[0331] 术语“反义核酸”应理解为是指与编码如在本公开的任何示例中所述的多肽的特定mRNA分子的至少一部分互补并且能够干扰转录后事件(如mRNA翻译)的DNA或RNA或其衍生物(例如,LNA或PNA)或其组合。反义方法的使用是本领域已知的(参见例如Hartmann和Endres(编者)《反义方法手册》Kluwer(1999)(Hartmann and Endres(editors),Manual of

Antisense Methodology,Kluwer(1999))。

[0332] 本公开的反义核酸将在生理条件下与靶核酸杂交。反义核酸包括对应于结构基因或编码区的序列或影响对基因表达或剪接的控制的序列。例如,所述反义核酸可对应于编码G-CSF或G-CSFR的核酸的靶向编码区,或5'-非翻译区(UTR)或3'-UTR或其组合。它可以与内含子序列部分互补,内含子序列可以在转录期间或之后剪接出来,例如仅与靶基因的外显子序列剪接出来。反义序列的长度应该是编码G-CSF或G-CSFR的核酸的至少19个连续核苷酸,例如至少50个核苷酸,如至少100、200、500或1000个核苷酸。可以使用与整个基因转录物互补的全长序列。长度可以是100-2000个核苷酸。反义序列与靶转录物的同一性程度应该至少为90%,例如95-100%。

[0333] 例如,在WO2011032204中描述了针对G-CSF或G-CSFR的示例性反义核酸。

[0334] 催化性核酸

[0335] 术语"催化性核酸"是指特异性识别不同底物并催化该底物化学修饰的DNA分子或含DNA分子(本领域也称为"脱氧核酶"或"DNAzyme")或RNA或含RNA分子(也称为"核酶"或"RNAzyme")。催化核酸中的核酸碱基可以是碱基A、C、G、T(对于RNA为U)。

[0336] 通常,催化性核酸包含用于特异性识别靶核酸的反义序列和核酸裂解酶活性(在本文中也称为"催化结构域")。可用于本公开的核酶类型是锤头型核酶和发夹型核酶。

[0337] RNA干扰

[0338] RNA干扰(RNAi)可用于特异性抑制特定蛋白的产生。不受理论的限制,该技术依赖于dsRNA分子的存在,所述dsRNA分子包含与目的基因或其部分的mRNA(在这种情况下是编码G-CSF或G-CSFR的mRNA)基本相同的序列。所述dsRNA可以方便地从重组载体宿主细胞中的单一启动子产生,其中所述有义和反义序列侧翼为不相关序列,所述不相关序列使得所述有义和反义序列杂交形成dsRNA分子,所述不相关序列形成环结构。用于本公开的合适dsRNA分子的设计和产生完全在本领域技术人员的能力范围内,特别考虑WO99/32619、WO99/53050、WO99/49029和WO01/34815。用于RNAi的此类dsRNA分子包括但不限于短发夹RNA(shRNA)和双功能shRNA。

[0339] 杂交的有义和反义序列的长度应该各自为至少19个连续核苷酸,例如至少30或50个核苷酸,例如至少100、200、500或1000个核苷酸。可以使用对应于整个基因转录物的全长序列。长度可以是100-2000个核苷酸。有义和反义序列与靶转录物的同一性程度应该为至少85%,例如至少90%,例如95-100%。

[0340] 示例性小干扰RNA("siRNA")分子包括与靶mRNA的约19-21个连续核苷酸相同的核苷酸序列。例如,siRNA序列以二核苷酸AA开始,包括约30-70%(例如,30-60%,例如40-60%,例如约45%-55%)的GC含量,并且与待引入的哺乳动物的基因组中除了靶标之外的任何核苷酸序列不具有高百分比同一性,例如通过标准BLAST检索确定。

[0341] 适体

[0342] 在另一个示例中,化合物是核酸适体(适应性寡聚物)。适体是能够形成二级和/或三级结构的单链寡核苷酸或寡核苷酸类似物,所述二级和/或三级结构提供与特定靶分子(例如蛋白质或小分子,例如G-CSF或G-CSFR)结合的能力。因此,适体是与抗体类似的寡核苷酸。通常,适体包含约15到约100个核苷酸,例如约15到约40个核苷酸,例如约20到约40个核苷酸,因为长度落在这些范围内的寡核苷酸可以通过常规技术制备。

[0343] 适体可以从适体文库中分离或识别。适体文库例如通过将随机寡核苷酸克隆到载体(或在RNA适体情况下的表达载体)中而产生,其中随机序列侧翼为提供PCR引物结合位点的已知序列。选择提供所需生物学活性(例如,与G-CSF或G-CSFR特异性结合)的适体。例如,使用SELEX(通过指数富集的配体的系统进化)选择具有增加的活性的适体。用于产生和/或筛选适体文库的合适方法描述于例如Elloington和Szostak《自然》346:818-22,1990(Elloington and Szostak,Nature 346:818-22,1990);US 5270163;和/或US 5475096。

[0344] 测定化合物的活性

[0345] 与G-CSFR及其突变体结合

[0346] 从本文的公开内容,本领域技术人员将显而易见的是,本公开内容的一些化合物结合hG-CSFR的配体结合结构域和hG-CSFR的配体结合结构域的特定突变形式(例如,具有或不具有某些点突变的SEQ ID NO:1)和/或结合人和食蟹猴G-CSFR。用于评估与蛋白质的结合的方法是本领域已知的,例如如Scopes(在:蛋白质纯化:原理与实践,第三版,施普林格出版公司,1994(In:Protein purification:principles and practice,Third Edition,Springer Verlag,1994))中所述。这种方法通常涉及标记蛋白质并使其与固定化化合物接触。洗涤除去非特异性结合蛋白后,检测标记物的量,从而检测结合蛋白的量。当然,可以固定蛋白质并标记抑制G-CSF信号传导的化合物。也可以使用淘筛型(Panning-type)测定。或者或另外,可使用表面等离子体共振测定。

[0347] 上述测定法也可用于检测化合物与hG-CSFR或其配体结合结构域(例如,SEQ ID NO:1)或其突变形式的结合水平。

[0348] 在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置167处的赖氨酸和/或其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置168处的组氨酸,在其结合SEQ ID NO:1基本上相同的水平(例如,在10%或5%或1%内)。

[0349] 在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置287处的精氨酸的水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约100倍或150倍或160倍或200倍。在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置287处的精氨酸的水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约160倍。

[0350] 在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置237处的组氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约20倍或40倍或50倍或60倍。在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置237处的组氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约50倍。

[0351] 在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置198处的甲硫氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约20倍或40倍或60倍或70倍。在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置198处的甲硫氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约40倍。

[0352] 在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置172处的酪氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约20倍或30

倍或40倍。在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置172处的酪氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约40倍。

[0353] 在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置171处的亮氨酸的水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约100倍或120倍或130倍或140倍。在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置171处的亮氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约140倍。

[0354] 在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置111处的亮氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约20倍或40倍或60倍或70倍。在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置111处的亮氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低至少约60倍。

[0355] 在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置168处的组氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低不超过5倍或4倍或3倍或2倍或1倍。

[0356] 在一个示例中,本公开的蛋白质结合至SEQ ID NO:1的多肽,其中丙氨酸取代SEQ ID NO:1的位置167处的赖氨酸,其水平比其结合至SEQ ID NO:1的多肽低不超过5倍或4倍或3倍或2倍或1倍。

[0357] 使用生物传感器方便地确定结合水平。

[0358] 本公开涵盖了前述特征的任何组合。在一个示例中,本文所述的蛋白质具有在前七个段落中阐述的所有结合特征。

[0359] 表位作图

[0360] 在另一个示例中,绘制由本文所述的蛋白质结合的表位。表位作图方法对于本领域技术人员是显而易见的。例如,制备了跨越hG-CSFR序列或其包括目的表位的区的一系列重叠肽,例如包块10-15个氨基酸的肽。然后使蛋白质与每种肽接触并确定其结合的肽。这允许确定包括与蛋白质结合的表位的肽。如果多个非连续肽被蛋白质结合,则蛋白质可结合构象表位。

[0361] 或者,或另外,hG-CSFR内的氨基酸残基例如通过丙氨酸扫描诱变而突变,并且确定降低或阻止蛋白质结合的突变。减少或阻止蛋白质结合的任何突变可能在蛋白质结合的表位内。

[0362] 本文例示了另一种方法,其涉及将hG-CSFR或其区域与本公开的固定化蛋白质结合,并用蛋白酶消化所得复合物。然后分离保持与固定化蛋白质结合的肽,并例如使用质谱法对其进行分析,以确定其序列。

[0363] 另一种方法涉及将hG-CSFR或其区域中的氢转化为氘核并将所得蛋白质结合至本公开的固定化蛋白质。然后将氘核转化回氢,分离hG-CSFR或其区域,用酶消化并例如使用质谱法分析以识别包含氘核的那些区,已经通过结合本文所述的蛋白质而保护其免于转化为氢。

[0364] 任选地,确定蛋白质对hG-CSFR或其表位的解离常数(Kd)。hG-CSFR结合蛋白的“Kd”或“Kd值”在一个示例中通过放射性标记的或荧光标记的hG-CSFR结合测定来测量。该

测定在滴定系列未标记的hG-CSFR的存在下用最小浓度的标记的G-CSFR平衡蛋白质。洗涤除去未结合的hG-CSFR后,测定标记的量,其指示蛋白质的Kd。

[0365] 根据另一个示例,通过使用表面等离振子共振测定,例如,使用具有固定化hG-CSFR或其区域的BIAcore表面等离振子共振(BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ),测量Kd或Kd值。

[0366] 在一些示例中,选择具有与C1.2或C1.2G相似的Kd或更高的Kd的蛋白质,因为它们可能竞争与hG-CSFR的结合。

[0367] 确定竞争性结合

[0368] 用于确定竞争性抑制单克隆抗体C1.2或C1.2G的结合的蛋白质的测定对于本领域技术人员将是显而易见的。例如,将C1.2或C1.2G缀合至可检测标记,例如荧光标记或放射性标记。然后将标记的抗体和检验蛋白混合并与hG-CSFR或其区域(例如,包括SEQ ID NO:1的多肽)或表达其的细胞接触。然后确定标记的C1.2或C1.2G的水平,并与当标记的抗体与hG-CSFR、区或细胞在不存在蛋白质的情况下接触时确定的水平进行比较。如果在存在检验蛋白质的情况下标记的C1.2或C1.2G的水平与不存在该蛋白质的情况相比降低,则认为该蛋白质竞争性地抑制C1.2或C1.2G与hG-CSFR的结合。

[0369] 任选地,所述检验蛋白质缀合至C1.2或C1.2G的不同标记。这种替代标记允许检测检验蛋白质与hG-CSFR或其区域或细胞的结合水平。

[0370] 在另一个示例中,在使hG-CSFR或其区或细胞与C1.2或C1.2G接触之前,允许蛋白质结合hG-CSFR或其区(例如,包括SEQ ID NO:1的多肽)或表达其的细胞。与不存在该蛋白质的情况相比,在该蛋白质存在下结合的C1.2或C1.2G的量的减少表明该蛋白质竞争性地抑制C1.2或C1.2G与hG-CSFR的结合。还可使用经标记的蛋白质且首先允许C1.2或C1.2G结合至G-CSFR来执行相互测定。在这种情况下,与不存在C1.2或C1.2G的情况相比,在存在C1.2或C1.2G的情况下与hG-CSFR结合的标记蛋白质的量减少表明该蛋白竞争性地抑制C1.2或C1.2G与hG-CSFR的结合。

[0371] 可以用本文所述的hG-CSFR和/或SEQ ID NO:1的突变形式和/或与C1.2或C1.2G结合的hG-CSFR的配体结合区进行任何前述测定。

[0372] 确定中和

[0373] 在本公开的一些示例中,化合物能够中和hG-CSFR信号传导。

[0374] 本领域已知用于评估化合物中和配体通过受体的信号传导的能力的各种测定。

[0375] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物减少或阻止G-CSF与hG-CSFR结合。这些测定可以使用标记的G-CSF和/或标记的蛋白质作为如本文所述的竞争性结合测定进行。

[0376] 在另一个示例中,当在G-CSF存在下培养$CD34^+$骨髓细胞时,抑制G-CSF信号传导的化合物减少CFU-G的形成。在这样的测定中,将$CD34^+$骨髓细胞在存在或不存在检验化合物的情况下,在存在G-CSF(例如,约10ng/ml细胞培养基)和任选地干细胞因子(例如,约10ng/ml细胞培养基)的半固体细胞培养基中培养。在粒细胞克隆(CFU-G)形成足够的时间后,确定克隆或菌落的数量。与在不存在抑制G-CSF信号传导的化合物的情况下相比,在存在抑制G-CSF信号传导的化合物的情况下菌落数目的减少指示抑制G-CSF信号传导的化合物中和G-CSF信号传导。通过检验抑制G-CSF信号传导的化合物的多个浓度,确定IC_{50},即IC_{50}是发生CFU-G形成的最大抑制的50%时的浓度。在一个示例中,IC_{50}为0.2nM或更小,例如0.1nM或

更小,例如0.09nM或更小,或0.08nM或更小,或0.07nM或更小,或0.06nM或更小,或0.05nM或更小。在一个示例中,IC_{50}为0.04nM或更小。在另一个示例中,IC_{50}为0.02nM或更小。前述IC_{50}与本文所述的任何CFU-G测定有关。

[0377] 在另一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物降低了在G-CSF存在下培养的表达hG-CSFR的细胞(例如,BaF3细胞)的增殖。在G-CSF(例如0.5ng/ml)存在下和在存在或不存在检验化合物的情况下培养细胞。用于评价细胞增殖的方法是本领域已知的,并且包括例如MTT还原和胸腺嘧啶核苷酸掺入。认为与在没有该化合物的情况下观察到的水平相比降低增殖水平的化合物中和G-CSF信号传导。通过检验化合物的多个浓度,确定IC_{50},即产生最大细胞增殖抑制50%的浓度。在一个示例中,IC_{50}为6nM或更小,例如5.9nM或更小。在另一个示例中,IC_{50}为2nM或更小,或1nM或更小,或0.7nM或更小,或0.6nM或更小,或0.5nM或更小。前述IC_{50}与本文所述的任何细胞增殖测定有关。

[0378] 在另一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在施用G-CSF后降低体内造血干细胞和/或内皮祖细胞的动员和/或例如在施用G-CSF后降低体内嗜中性粒细胞的数量(然而这不是必需的)。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物任选地在施用G-CSF或其修饰形式(例如聚乙二醇化G-CSF或非格司亭)之前、之时或之后施用。评估造血干细胞(例如表达CD34和/或Thy1)和/或内皮祖细胞(例如表达CD34和VEGFR2)和/或嗜中性粒细胞(在形态学上鉴定和/或表达例如CD10、CD14、CD31和/或CD88)的数目。认为与在没有化合物的情况下观察到的水平相比降低细胞水平的化合物中和G-CSF信号传导。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物减少嗜中性粒细胞的数目而不诱导嗜中性粒细胞减少。

[0379] 本公开涵盖了用于评估G-CSF信号传导的中和的其它方法。

[0380] 确定效应子功能

[0381] 如本文所讨论的,本公开的一些蛋白质具有降低的效应子功能。用于评价ADCC活性的方法是本领域已知的。

[0382] 在一个示例中,使用^{51}Cr释放测定、铕释放测定或^{35}S释放测定来评估ADCC活性的水平。在这些测定的每一个中,将表达G-CSFR的细胞与一种或多种所述抑制G-CSF信号传导的化合物在足以使化合物被细胞吸收的条件下培养一段时间。在^{35}S释放测定的情况下,表达hG-CSFR的细胞可以与^{35}S-标记的甲硫氨酸和/或半胱氨酸一起培养足以使标记的氨基酸掺入到新合成的蛋白质中的时间。然后在存在或不存在所述蛋白质和存在免疫效应细胞,例如,外周血液单核细胞(PBMC)和/或NK细胞的情况下培养细胞。然后检测细胞培养基中的^{51}Cr、铕和/或^{35}S的量,并且与在不存在蛋白质的情况下相比,在蛋白质的存在下几乎没有或没有变化(或与在包括人IgG1 Fc的抗hG-CSFR抗体的存在下观察到的水平相比,化合物的水平降低)表明该蛋白质具有降低的效应子功能。公开了用于评估由蛋白质诱导的ADCC水平的测定的示例性出版物包括Hellstrom等人《美国国家科学院院刊》83:7059-7063,1986(Hellstrom,et al.Proc.Natl Acad.Sci.USA 83:7059-7063,1986)和Bruggemann等人《实验医学杂志》166:1351-1361,1987(Bruggemann,et al.,J.Exp.Med.166:1351-1361,1987)。

[0383] 用于评估由蛋白质诱导的ADCC水平的其它测定包括用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(美国加利福尼亚州CellTechnology,Inc.)或CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(美国威斯康星州Promega)。

[0384] 还可以进行C1q结合测定以证实该蛋白质能够结合C1q并且可以诱导CDC。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人《免疫学方法杂志》202:163,1996(Gazzano-Santoro et al,J.Immunol.Methods 202:163,1996))。

[0385] 确定半衰期

[0386] 本公开内容所涵盖的一些蛋白质具有改善的半衰期,例如,与未修饰的蛋白质相比,经修饰以延长其半衰期。用于测定具有改善的半衰期的蛋白质的方法对于本领域技术人员将是显而易见的。例如,评估蛋白质结合新生Fc受体(FcRn)的能力。在这点上,增加的对FcRn的结合亲和力增加了分子的血清半衰期(参见例如Kim等人《欧洲免疫学杂志》24:2429,1994(Kim et al.,Eur J Immunol.,24:2429,1994))。

[0387] 本公开内容的蛋白质的半衰期也可以通过药代动力学研究来测量,例如根据Kim等人《欧洲免疫学杂志》24:542,1994(Kim et al,Eur J of Immunol 24:542,1994)所述的方法。根据该方法,将放射性标记的蛋白质静脉内注射到小鼠中,并且定期测量其血浆浓度作为时间的函数,例如在注射后3分钟至72小时。由此获得的清除曲线应当是双相的,即,α相和β相。为了测定蛋白质的体内半衰期,计算β相清除率并与野生型或未修饰的蛋白质进行比较。

[0388] 治疗功效

[0389] 可以使用体内测定评估化合物治疗缺血-再灌注损伤的功效。例如,通过使用如Bohl等人《美国生理学杂志-心脏与循环生理学》(2009)(Bohl et al.,Am J Physiol Heart Circ Physiol(2009)),Hartsock等人《可视化实验杂志》(2016)(Hartsock et al.,J Vis Exp(2016)),Greenberg等人《酶学方法》(2008)(Greenberg et al.,Methods Enzymol(2008)),或Zhang等人《美国实验生物学会联合会会刊》(2016)(Zhang et al.,The FASEB Journal(2016))中所述的小鼠模型。

[0390] 组合物

[0391] 在一些示例中,如本文所述的化合物可以口服、肠胃外、通过吸入喷雾、吸附、吸收、局部、直肠、鼻、颊、阴道、心室内,经由植入型储库以含有常规无毒药学上可接受的载体的剂型施用,或通过任何其他方便的剂型施用。本文所用的术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、腹膜内、鞘内、心室内、胸骨内和颅内注射或输注技术。

[0392] 用于将化合物制备成适于施用的形式(例如药物组合物)的方法是本领域已知的,并且包括例如在雷明登氏药学全书(Remington’s Pharmaceutical Sciences)(Remington’sPharmaceuticalsciences)(宾夕法尼亚州伊斯顿,麦克出版社,第18版,1990年(18th ed.,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1990))和美国药典:国家处方集(U.S.Pharmacopeia:National Formulary)(宾夕法尼亚州伊斯顿,麦克出版社,1984年(Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1984))中所述的方法。

[0393] 本公开的药物组合物特别可用于肠胃外施用,例如静脉内施用或皮下施用或施用到器官或关节的体腔或内腔中。用于施用的组合物将通常包括溶解于药学上可接受的载体(例如水性载体)中的抑制G-CSF信号传导的化合物的溶液。可以使用各种水性载体,例如,缓冲盐水等。组合物可以根据需要含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。本公开的化合物在这些制剂中的浓度可以广泛变化,并且将主要基于流体体积、粘度、体重等根据所

选择的具体施用模式和患者的需要来选择。示例性载体包括水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5％人血清白蛋白。也可以使用非水性媒介物如混合油和油酸乙酯。脂质体也可用作载体。所述媒介物可以含有少量增强等渗性和化学稳定性的添加剂,例如,缓冲剂和防腐剂。

[0394] 在配制时,本公开的化合物将以与剂量制剂相容的方式并且以治疗/防止有效的量施用。制剂易于以各种剂型施用,例如上述类型的可注射溶液,但也涵盖其它药学上可接受的形式,例如片剂、丸剂、胶囊或其它用于口服施用的固体、栓剂、阴道栓剂、鼻溶液或喷雾剂、气雾剂、吸入剂、脂质体形式等。也可以使用药物“缓释”胶囊或组合物。缓释制剂通常设计为在延长的时间内提供恒定的药物水平,并且可用于递送本公开的化合物。

[0395] WO2002/080967描述了用于施用包括用于治疗例如哮喘的抗体的气雾化组合物的组合物和方法,其也适于施用本公开的蛋白质。

[0396] 组合治疗

[0397] 在一个示例中,本公开的化合物与可用于治疗本文所述的疾病或病况的另一种化合物组合施用,作为组合的或另外的治疗步骤或作为治疗制剂的另外的组分。

[0398] 例如,其它化合物为抗炎化合物。可选地或另外地,所述其它化合物为免疫抑制剂。可选地或另外地,其它化合物为皮质类固醇,诸如泼尼松和/或泼尼松龙。可选地或另外地,其他化合物是甲氨蝶呤。可选地或另外地,其他化合物是环磷酰胺。可选地或另外地,其它化合物是霉酚酸酯。可选地或另外地,另一种化合物是组织纤溶酶原激活剂(t-PA)。

[0399] 在一些示例中,其它化合物抑制或降低以下一种或多种的表达或活性:

[0400] (i)肾损伤分子1(KIM-1);

[0401] (ii)中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL);

[0402] (iii)白细胞介素1β(IL-1β);

[0403] (iv)白细胞介素6(IL-6);

[0404] (v)肿瘤坏死因子α(TNFα);

[0405] (vi)补体成分5a受体1(C5AR1);

[0406] (vii)巨噬细胞炎性蛋白2-α(MIP2-α);

[0407] (viii)细胞间粘附分子1(ICAM-1);

[0408] (ix)E-选择蛋白;

[0409] (x)C-X-C基序趋化因子配体1(CXCL1);

[0410] (xi)白细胞介素8受体β(IL-8Rβ);和

[0411] (xii)单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)。

[0412] 在一些示例中,其它化合物为硫化氢。在一些示例中,另一种化合物是环孢菌素。在一些示例中,另一种化合物是TRO40303,如Le Lamer等人《转化医学杂志》(2014)(Le Lamer et al.,J Transl Med(2014))中所述。在一些示例中,另一种化合物是超氧化物歧化酶。在一些示例中,其它化合物是大麻素或其合成类似物。

[0413] 在一些示例中,其它化合物是移植手术中常用的化合物。

[0414] 在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物与另一种化合物同时施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在另一种化合物之前施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在另一种化合物之后施用。

[0415] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物与细胞组合施用。在一些示例中,细胞是干细胞,例如间充质干细胞。

[0416] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物与基因治疗组合施用。

[0417] 施用剂量和时间

[0418] 本公开的化合物的合适剂量将取决于具体化合物、待治疗的病况和/或所治疗的受试者而变化。例如通过从次优剂量开始并逐渐改变剂量以确定最佳或有用剂量来确定合适的剂量是熟练医师的能力。或者,为了确定用于治疗/防止的合适剂量,使用来自细胞培养测定或动物研究的数据,其中合适的剂量在包括几乎无毒性或无毒性的活性化合物的ED_{50}的循环浓度范围内。剂量可以在该范围内变化,这取决于采用的剂型和使用的施用途径。治疗/防止有效剂量最初可从细胞培养测定中估计。可以在动物模型中配制剂量以达到包括细胞培养中确定的IC_{50}(即,达到症状的最大抑制一半的化合物浓度)的循环血浆浓度范围。此类信息可用于更准确地确定人类中的有用剂量。可以例如通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。

[0419] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物被全身施用。在一些示例中,局部施用抑制G-CSF信号传导的化合物。

[0420] 本领域技术人员将理解,为了防止或治疗受试者的缺血-再灌注损伤,抑制G-CSF信号传导的化合物不必直接施用于受试者。例如,所述化合物可以在移植给受试者之前施用至器官供体或器官(例如收获的器官),由此降低移植后受试者中产生的缺血-再灌注损伤的影响。因此,可以在不直接施用至受治疗者抑制G-CSF信号传导的化合物的情况下治疗受治疗者的缺血-再灌注损伤。

[0421] 在一些示例中,向受试者施用抑制G-CSF信号传导的化合物。在一些示例中,受试者是器官移植接受者。

[0422] 在一些示例中,本公开的方法包括施用防止或治疗有效量的本文所述的化合物。

[0423] 术语“治疗有效量”是当施用时改善受试者的预后和/或状态和/或将本文所述的临床病况的一种或多种症状降低或抑制至低于所观察到的和接受为该病况的临床诊断或临床特征的水平的量。待施用的量将取决于待治疗病况的具体特征、待治疗病况的类型和阶段、施用模式和受试者的特征,例如一般健康、其它疾病、年龄、性别、基因型和体重。本领域技术人员能够根据这些和其它因素确定合适的剂量。因此,该术语不应被解释为将本公开内容限于特定量,例如化合物的重量或量,相反,本公开内容涵盖足以在受试者中实现所述结果的抑制G-CSF信号传导的化合物的任何量。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的治疗有效量的化合物不诱导中性粒细胞减少。

[0424] 如本文所用,术语“防止有效量”应指足以防止或抑制或延迟临床病况的一种或多种可检测症状发作的化合物量。本领域技术人员将知道,这样的量将取决于例如所施用的具体化合物和/或特定受试者和/或病况的类型或严重程度或水平和/或病况的诱因(遗传的或其它的)而变化。因此,该术语不应被解释为将本公开内容限于特定量,例如化合物的重量或量,相反,本公开内容涵盖足以在受试者中实现所述结果的抑制G-CSF信号传导的化合物的任何量。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的防止有效量的化合物不诱导嗜中性粒细胞减少。

[0425] 对于本文所述的化合物的体内施用,正常剂量可以从每天个体体重的约10ng/kg

直至约100mg/kg或更多变化。本文描述了示例性的剂量及其范围。对于几天或更长时间的重复施用,取决于待治疗的疾病或病症的严重程度,可以持续治疗直至实现期望的症状抑制。

[0426] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.1mg/kg至约30mg/kg,例如约1mg/kg至约10mg/kg,或约2mg/kg至约8mg/kg,或约4mg/kg至约6mg/kg的初始(或负荷)剂量施用。然后,抑制G-CSF信号传导的化合物可以以约0.01mg/kg至约5mg/kg,例如约0.05mg/kg至约1mg/kg,例如约0.1mg/kg至约1mg/kg,例如约0.1mg/kg或0.5mg/kg或1mg/kg或2mg/kg或3mg/kg或4mg/kg或5mg/kg的较低维持剂量施用。维持剂量可以每7-30天,例如每10-15天,例如每10或11或12或13或14或15天施用。在这方面,可以使用维持剂量以维持受试者血液中的化合物的治疗有效水平持续一段时间,例如在器官移植手术之后。

[0427] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.1mg/kg至约1mg/kg的剂量施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.4mg/kg至约0.5mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.1mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.2mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.3mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.4mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.5mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.6mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.7mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.8mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约1mg/kg的剂量施用。

[0428] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约0.01mg/kg至约50mg/kg,例如约0.1mg/kg至约40mg/kg,例如约2mg/kg至约30mg/kg,例如约5mg/kg至约25mg/kg的剂量施用。

[0429] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约2mg/kg至约8mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约4mg/kg至约6mg/kg的剂量施用。

[0430] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物是以约10mg/kg至约40mg/kg的剂量施用。在一个示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约20mg/kg至约30mg/kg的剂量施用。

[0431] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物是以约5mg/kg的剂量施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约10mg/kg的剂量施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以约25mg/kg的剂量施用。

[0432] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在没有较高负荷剂量或较低维持剂量的情况下施用。

[0433] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物以单剂量施用。

[0434] 在一些示例中,例如每7-30天,如每10-22天,例如每10-15天,例如每10或11或12或13或14或15或16或17或18或19或20或21或22天施用多个剂量。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物每7天或每14天或每21天施用。

[0435] 在一些示例中,在开始治疗时,向哺乳动物施用在连续7天或连续6天或连续5天或连续4天内抑制G-CSF信号传导的化合物。

[0436] 在对治疗没有充分反应的哺乳动物的情况下,可以在一周内施用多个剂量。或者,

或另外,可施用增加的剂量。

[0437] 在另一个示例中,对于经历不良反应的哺乳动物,初始(或负荷)剂量可在一周内的数天内或连续数天内分开。

[0438] 根据本公开的方法施用化合物可以是连续的或间歇的,这取决于例如接受者的生理状况,施用的目的是治疗性的还是防止性的,以及本领域技术人员已知的其它因素。化合物的施用可以是在预先选择的时间段内基本上连续的,或者可以是在病况发展期间或之后的一系列间隔的剂量进行。

[0439] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血之前施用。因此,在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血前0天(例如缺血前即刻)至缺血前7天之间施用。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血前0天至6天或5天或4天之间施用。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血前0-48小时施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血前12至36小时之间施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血前约24小时施用。在其它示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血后施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血之前和之后施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血期间,例如在组织或器官移植手术期间施用。

[0440] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血前至少1小时施用(例如在缺血前至多7天或更长时间施用)。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在缺血前至少2小时或至少4小时或至少6小时或至少8小时或至少10小时或至少12小时或至少14小时或至少16小时或至少18小时或至少20小时或至少22小时或至少24小时施用。

[0441] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注之前施用。因此,在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注前0天(例如,立即再灌注)至7天之间施用。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注前0天至6天或5天或4天之间施用。例如,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注前0至48小时之间施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注前12和36小时之间施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注前约24小时施用。在其它示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注后施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注之前和之后施用。

[0442] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注前至少1小时施用。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注前至少2小时或至少4小时或至少6小时或至少8小时或至少10小时或至少12小时或至少14小时或至少16小时或至少18小时或至少20小时或至少22小时或至少24小时(例如,长达7天或更长)施用。

[0443] 组织或器官移植

[0444] 当缺血-再灌注损伤是由于组织或器官移植或与组织或器官移植相关时,可以在移植之前、期间或之后施用抑制G-CSF信号传导的化合物。因此,在一些示例中,在移植前施用抑制G-CSF信号传导的化合物。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在移植期间施用,例如在夹紧释放之前,此时血流恢复至移植器官。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在移植后施用。

[0445] 在一些示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物施用至受试者,其中受试者是组织或器官移植接受者。在一些示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注前施用至组织或器官移植接受者。在一个示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物在再灌注后施用至组织

或器官移植接受者。

[0446] 在一些示例中,将抑制G-CSF信号传导的化合物在组织或器官收获之前施用至组织或器官移植供体。

[0447] 在一些示例中,组织或器官移植供体是活供体。在一些示例中,供体是死亡供体。根据器官的质量和/或循环和呼吸功能停止的顺序和机制,死亡供体可分为几组。在Panduranga&Akinlolu(美国肾病学会临床杂志,4:1827-1831,200(Clin J Am Soc Nephrol 4:1827-1831,200))中描述了死亡供体的分类。

[0448] 在一些示例中,供体是脑死亡捐献(DBD)供体,也称为'脑死亡'供体。DBD供体是原发性脑死亡的供体,但其循环系统自然地或通过医学措施(例如,机械通气、药物、主动脉内气囊泵或体外机器氧合装置)保持功能。在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在器官收获之前施用至DBD供体并且通过血液循环分配至潜在的移植器官。

[0449] 在一些示例中,供体是循环死亡捐献(DCD)供体,也称为'心脏死亡捐献'供体或'无心跳供体'。DCD供体是其循环功能在器官收获之前已经丧失(例如,心脏死亡)的供体。在一些示例中,可能需要人工循环例如通过心-肺旁路仪器将施用至DCD供体的化合物递送至预期用于收获和移植的器官。DCD供体可进一步分为其他亚组。在一些示例中,DCD供体是受控DCD(cDCD)供体。cDCD供体是其生命支持将被撤出并且其家人已经在手术室的受控环境中给予器官捐献书面同意的供体。在一些示例中,DCD供体是不受控制的DCD(uDCD)供体。uDCD供体是,例如,在获得器官捐献同意之前,并将导管放置在股血管和腹膜中以冷却器官,直到获得同意之前在急诊室或医院其他地方到期的供体。uDCD供体也是已经同意器官捐献但在获得器官期间遭受需要CPR的心脏骤停的供体。

[0450] 在一些示例中,供体是扩展标准供体(ECD)。ECD是在死亡时年龄为60岁或更大或年龄为50至59岁并且具有以下三个标准中的任两个的供体:(1)死亡原因为脑血管意外;(2)既往高血压病史;(3)大于1.5mg/dL的终末血清肌酸酐。

[0451] 在一些示例中,供体是标准供体(SCD)。SCD是年龄小于50岁的供体。通常,将在脑死亡后发生捐献且不符合任何ECD标准(参见上文)的所有死亡供体视为SCD。

[0452] 在一些示例中,抑制G-CSF信号传导的化合物在确定脑死亡之后不久施用,或在考虑到法律、伦理和患者考虑时脑死亡可行之后不久尽快施用。主治医师或移植外科医生将认识到影响从合适的供体采集器官和将采集的器官移植到合适的接受者中的时间的多种因素。因此,在一些示例中,在脑死亡发生和取出用于移植的器官之间的任何时间向供体施用抑制G-CSF信号传导的化合物。

[0453] 在一些示例中,在组织或器官移植之前,将抑制G-CSF信号传导的化合物体外施用至所采集的组织或器官。例如,收获的组织或器官可以在移植之前用包含抑制G-CSF信号传导的化合物的溶液灌注或输注。

[0454] 试剂盒

[0455] 本公开的另一个示例提供了含有用于治疗如上所述的缺血-再灌注损伤的化合物的试剂盒。

[0456] 在一个示例中,所述试剂盒包括(a)容器,所述容器包括任选地在药学上可接受的载体或稀释剂中的如本文所述的抑制G-CSF信号传导的化合物;和(b)包装插页,其具有降低受试者中缺血-再灌注损伤作用的说明书。

[0457] 根据本公开的该示例,包装插页在容器上或与容器相关联。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。这些容器可以由多种材料例如玻璃或塑料形成。该容器保持或容纳有效治疗缺血-再灌注损伤的组合物并且可以具有无菌的进入端口(例如,该容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是抑制G-CSF信号传导的抑制G-CSF信号传导的化合物。标签或包装插页表明该组合物用于治疗适合于治疗的受试者,例如器官移植接受者,具有关于所提供的化合物和任何其他药物的施用量和间隔的特定指导。该试剂盒可以进一步包含另外的容器,其包含药学上可接受的稀释缓冲液,例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和/或右旋糖溶液。该试剂盒可以进一步包括从商业和使用者观点所期望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0458] 本公开包括以下非限制性实施例。

[0459] 实施例

[0460] 实施例1:方法和材料

[0461] 小鼠

[0462] 10-12周龄的成年雄性C57BL/6野生型小鼠获自澳大利亚珀斯动物资源中心。将小鼠饲养在墨尔本圣文森特医院(St.Vincent's Hospital Melbourne)内批准的动物设施中,所有涉及动物的实验均由墨尔本圣文森特医院的动物伦理委员会批准。

[0463] 热肾缺血-再灌注损伤模型

[0464] 通过i.p.施用85mg/kg氯胺酮和15mg/kg甲苯噻嗪来麻醉小鼠。在小鼠被麻醉后,将它们置于加热垫上以在手术期间将它们的核心体温维持在37℃。做中线腹部切口,钝性解剖肾蒂。右肾切除术后,将微血管夹(Roboz,Rockville,MD)放置在左肾蒂上22min,同时将动物在培养箱中保持在37℃的并充分水合。缺血后取出钳,观察肾以确认完全再灌注。然后用5-0丝将手术创口缝合成两层。在手术期间将温热的生理盐水(100ml/kg)滴注到腹膜腔中。使小鼠在加热灯下恢复2h,然后保持在加热垫上。小鼠再灌注后24h安乐死,并获得血液和肾样品。假手术小鼠仅进行右肾切除术,没有IR。

[0465] 抗体

[0466] 在开始缺血前24h,以100μg/小鼠的剂量,腹膜内注射抗小鼠G-CSFR(Ch5E2-VR81-mIgG1κ)、同种型对照(BM4,小鼠同种型IgG1κ)或抗C5抗体(muBB5.1-mIgG1κ)(Rother R等人《自然生物技术》2007(Rother R,et al.Nat Biotechnol.2007))。在剂量滴定研究中,在局部缺血前24h腹膜内注射200μg/小鼠或500μg/小鼠的抗小鼠G-CSFR(Ch5E2-VR81-mIgG1κ)。同种型对照以最高剂量注射,因此500μg/小鼠。VR81为抗鼠G-CSFR胞外结构域产生的小鼠单克隆IgG1κ抗体,如所述阻断G-CSF与G-CSFR结合(Campbell等人《免疫学杂志》197(11)(2016)4392-4402(Campbell et al.Journal of Immunology,197(11)(2016)4392-4402))。在这方面,VR81为本文和WO2012171057中所述的C1.2和C1.2G的小鼠替代抗体。

[0467] 肾功能评估

[0468] 通过在再灌注后24小时测量血清肌酸酐和血清或血浆尿素来评估肾功能。使用基于Jaffé方法的动力学比色测定测量肌酸酐,在Roche COBAS Integra 400Plus分析仪上分析。Cell Biolabs'尿素测定试剂盒基于Berthelot反应。尿素首先降解为氨和二氧化碳,其进一步与碱性显影剂反应以产生蓝绿色产物,所述蓝绿色产物可用标准分光光度板读取器

在580-630nm之间的光密度下测量。

[0469] 肾组织学和评分

[0470] 肾组织切片(4mm)用10％福尔马林固定,石蜡包埋,然后用H&E染色。组织学评分用半定量方法评估(Lu B等人《肾病学》2008(Lu B et al.Nephrology 2008))。简单地说,以盲法方式评价最少两个切片中皮质、皮质-髓质结合处和髓质中的每一个的三个高倍视野。对肾小管坏死程度进行分级,并使用改良的评分系统:0＝正常肾;1＝最小(#10％受侵);2＝轻度(10-25％受侵);3＝中度(26-50％受侵);4＝严重(51-75％受侵);和5＝非常严重(75％受侵)。

[0471] 补体激活和沉积

[0472] 小鼠血浆补体的激活用小鼠C5a DuoSet ELISA试剂盒(DY2150;R&D Systems,Minneapolis,MN)测量。通过免疫荧光测定肾切片中的C5b-9沉积(参见下文)。

[0473] 免疫荧光

[0474] 将速冻的活组织检查样品切成5mm厚的切片,干燥,并立即处理或储存在280℃下直至进一步分析。用丙酮固定和水化后,使用以下对切片进行染色:兔抗小鼠C9 Alexa 488(Bioss抗体,Woburn,MA)、大鼠抗小鼠Ly-6GFITC(Hycult Bio-tech)、大鼠抗小鼠F4/80FITC(Bio-Rad,Raleigh,NC)或FITC缀合的同种型匹配对照Ab:rat IgG1(BD Biosciences,San Diego,CA)。使用荧光/共聚焦显微镜(Nikon A1R)分析载玻片。使用ImageJ软件10.2版(国立卫生研究院)对未处理的TIFF图像进行荧光强度定量分析(原始积分密度)。

[0475] RNA提取、互补DNA合成、定量实时聚合酶链反应

[0476] 根据制造商的说明,使用PureLink RNA迷你试剂盒(Life Technologies,Carlsbad,CA)从冷冻小鼠肾中分离总RNA。使用NanoDrop分光光度计(NanoDrop Technologies,Oxfordshire,UK)测定总RNA质量和数量。通过在含有0.5μg Oligo(dT)引物和1μg随机引物(均来自Invitrogen,Carlsbad,CA)的50-μL反应混合物中于70℃孵育1.0μg总RNA 10分钟进行第一链互补DNA合成。然后加入含有10mM dNTP,300U SuperScript III重组核糖核酸酶抑制剂,60U RNaseOUT重组核糖核酸酶抑制剂,0.1M DTT和第一链缓冲液(均来自Invitrogen)的50-μL反应混合物。在42℃进行逆转录1小时,在70℃进行逆转录10分钟。将互补DNA保存在-20℃。根据制造商的说明(Applied Biosystem,Bedford,MA)使用TaqMan Universal PCR主混合系统进行实时聚合酶链反应。

[0477] 肾消化及外周血制备

[0478] 用解剖刀将肾的1/8片切成较小的片,将其在37℃下在振荡条件下在500ul I型胶原酶(在PBS 2mM EDTA中10ug/ml)中消化30分钟。将组织消化物通过70um滤器分离细胞。使用RCRB缓冲液(156mM NH4Cl,11.9mM NaHCO3,0.097mM EDTA,pH7.3)裂解红细胞。最后将细胞重悬于PBS 2mM EDTA中。

[0479] 将外周血收集到EDTA包被的管中,使用RCRB缓冲液(如上所述)裂解红细胞,并将细胞再悬浮于PBS 2mM EDTA中。

[0480] 流式细胞术

[0481] 将肾和外周血的单细胞悬液再悬浮于含有2mM EDTA的PBS中。用下列Ab’s染色细胞:PE-缀合的抗小鼠Gr-1(R86-8C5;BD Biosciences)、别藻蓝蛋白Cy7-缀合的抗小鼠Ly6G

(1A8;BD Biosciences)、FITC-缀合的抗小鼠CD11b(M1/70;BD Biosciences)、PECy7-缀合的抗小鼠CD69(H1.2F3;BD Biosciences)、eFluor450-缀合的抗小鼠CD62L(MEL-14;eBiosecience)、别藻蓝蛋白-缀合的抗小鼠CD45.2(104;eBioseciences)。加入FcR阻断抗小鼠CD16/32(93;Biolegend)以减少非特异性结合,并使用可固定的活/死黄(Thermo Fisher Scientific)排除死细胞。使用BD Cytofix固定缓冲液(BD Biosciences)将样品固定过夜,然后在BD Fortessa上使用FlowJo软件进行分析。

[0482] 统计分析

[0483] 使用GraphPad Prism软件进行统计检验。使用单向ANOVA与检验后Bonferroni校正或Kruskal-Wallis检验与Dunn's多重比较检验比较多个组。使用不成对的Student t检验(双尾)或Mann-WhitneyU检验比较两组。结果表示为平均值±SEM。p值<0.05被认为是统计学显著的。

[0484] 实施例2:在热肾IRI模型中抑制G-CSF信号传导降低血清肌酸酐和血浆尿素浓度

[0485] 为了评估在经历热肾缺血-再灌注损伤(IRI)的小鼠中抑制G-CSF信号传导是否减少肾损伤,进行了血清肌酸酐和血浆/血清尿素浓度的分析。

[0486] 与用100μg同种型对照抗体(n=8;平均值±SEM;134.38±20.57)处理的小鼠中的血清肌酸酐浓度相比,用100μg抗G-CSFR抗体(VR81)(n=8;平均值±SEM;66.13±25.18)处理的小鼠中观察到血清肌酸酐浓度的显著降低(图1,表1)。

[0487] 与同种型对照抗体(n=8;平均值±SEM;292.49±21.35)相比,在用抗G-CSFR抗体(VR81)(n=8;平均值±SEM;159.02±44.42)处理的小鼠中观察到血浆尿素浓度显著降低(图2,表1)。IRI前用抗G-CSFR抗体(VR81)处理的小鼠中血清肌酸酐和血浆尿素的浓度与未进行处理或手术(假)的小鼠中观察到的相当(图1和2;表1)。此外,用VR81处理的小鼠中血清肌酸酐和血浆尿素的浓度与用抗C5抗体(BB5.1)处理的小鼠中观察到的没有统计学差异(图9和10)。

[0488] 表1用100μg抗G-CSFR抗体(VR81)或同种型对照抗体经腹膜内(IP)-热肾IRI模型处理的小鼠的血清肌酸酐和血浆尿素水平。

[0489]

小鼠号码	治疗组	血清肌酸酐（μmol/l）	血浆尿素（mg/dL）
2276	同种型对照	183	324
2278	同种型对照	90	225
2279	同种型对照	208	373
2285	同种型对照	122	302
2286	同种型对照	85	295
2289	同种型对照	205	335
2290	同种型对照	55	185
2275	同种型对照	127	299
2277	抗 G-CSFR（VR81）	148	322
2280	抗 G-CSFR（VR81）	19	71
2281	抗 G-CSFR（VR81）	35	94
2282	抗 G-CSFR（VR81）	208	384
2283	抗 G-CSFR（VR81）	38	159
2284	抗 G-CSFR（VR81）	35	117
2287	抗 G-CSFR（VR81）	26	57
2288	抗 G-CSFR（VR81）	20	64

[0490] 实施例3:在热肾IRI模型中抑制G-CSF信号传导减少肾组织中的炎性浸润

[0491] 为了评估抗G-CSFR抗体(VR81)对受到热肾缺血-再灌注损伤(IRI)的小鼠的施用效果,根据实施例1通过免疫荧光显微术测量嗜中性粒细胞和巨噬细胞向肾组织的浸润。

[0492] 与用100μg的同种型对照抗体处理的小鼠相比,用100μg的抗G-CSFR抗体(VR81)处理的小鼠在肾的皮质髓质结合处的管状间质内的嗜中性粒细胞和巨噬细胞的浸润显著减少。在假手术小鼠中观察到很少/没有浸润(图3和图4)。单向ANOVA(具有Bonferroni校正)用于检验显著性。

[0493] 在单独的实验中,与用500μg的同种型对照抗体处理的小鼠相比,用200μg和500μg的VR81处理的小鼠中嗜中性粒细胞和巨噬细胞的浸润也显著减少(表2和图5)。

[0494] 表2在肾D'Agostino&Pearson综合正常检验的皮质髓质结合处的管状间质内嗜中性粒细胞和巨噬细胞浸润的减少。VR81与Ab对照(*p<0.05,**p<0.01)的单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验。

[0495]

治疗	嗜中性粒细胞（计数/HPF）	巨噬细胞（计数/HPF）
假	2.28±0.52	2.29±0.61
Ab 对照（500 μg）	51.0±6.40	52.0±3.38
VR81（200 μg）	27.0±5.15	20.0±7.07
VR81（500 μg）	8.17±1.99**	7.00±1.73*

[0496] 实施例4:在热肾IRI模型中抑制G-CSF信号传导减少肾皮质中的坏死

[0497] 在用100μg的抗G-CSFR抗体(VR81)处理的小鼠的热肾IRI模型中评估肾皮质中的肾损伤。根据表3将肾小管坏死程度分级并表示为肾小管损伤(TI)评分。由两个独立的操作者在不知道治疗组的情况下确定TI,评估肾小管损伤受侵百分比(坏死、铸型形成、细胞肿胀和扩张)。

[0498] 在用抗G-CSFR抗体(VR81)处理的小鼠的肾中观察到肾小管损伤减少的趋势(图6;显示每只小鼠两次独立评估的平均值)。如预期,假手术小鼠未显示肾小管损伤。

[0499] 表3:定义肾皮质中坏死细胞的百分比和相应的肾小管损伤(TI)评分的参考表。

[0500]

肾小管损伤(TI)评分	%肾小管坏死(仅皮质)
0	正常
1	<10
2	10-25
3	26-50
4	51-75
5	>75

[0501] 实施例5:在肾组织热肾IRI模型中KIM-1、NGAL、IL-6、IL-8Rβ/CXCR2、MCP-1/CCL2、CXCL1、MIP-2/CXCL2、ICAM-1和C5aR mRNAR表达

[0502] 在最初的实验中,在热肾IRI模型中诱导缺血/再灌注损伤前24h给小鼠注射100μg/小鼠的抗G-CSFR抗体VR81。再灌注后,从肾中分离RNA,并如实施例1所述进行qRT-PCR。确定KIM-1、NGAL、IL-6、IL-8Rβ/CXCR2、MCP-1/CCL2、ICAM-1、C5aR、IL-1β、TNFα、CXCL1、MIP-2/CXCL2和E-选择蛋白的mRNA转录水平。这些基因的转录水平被定量并相对于GAPDH标准化。

[0503] 与用同种型对照抗体处理相比,以100μg/小鼠24h剂量的抗G-CSFR抗体(VR81)处理降低了NGAL、IL-6、IL-8Rβ/CXCR2、ICAM-1、C5aR、MIP-2/CXCL2、MCP-1/CCL2、E-选择蛋白和CXCL1的基因表达。这些数据表明抑制G-CSF信号传导在降低与IRI相关的炎症应答中是有效的。在用抗C5抗体(BB5.1)处理的小鼠的肾中观察到上述基因的类似模式的降低的表达。

[0504] 使用200μg/小鼠或500μg/小鼠的VR81的剂量确认初始结果。表4和图7显示,与用同种型对照抗体处理相比,以500μg/小鼠的剂量进行VR81处理显著降低了KIM-1、NGAL、IL-6、IL-8Rβ/CXCR2、ICAM-1、C5aR、MIP-2/CXCL2、MCP-1/CCL2和CXCL1的表达。

[0505]

表 4：在给予 200 μg 或 500 μg 的 VR81 的小鼠的肾组织中趋化因子受体和细胞因子的相对表达。D'Agostino & Pearson 综合正常检验。对于 VR81 与 Ab 对照的单向 ANOVA Kruskal-Wallis 检验，Dunn's 多重比较检验（* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005）。

	KIM-1	NGAL	IL-6	CXCR2 /IL-8R	MCP-1 /CCL2	CXCL1	MIP-2 /CXCL2	ICAM-1	C5aR
对照（500 ug）	343.4±69.70	386±83.32	1.42±0.787	0.917±0.173	1.195±0.273	3.786±0.410	1.38±0.249	5.09±0.936	2.44±0.176
VR81（200 ug）	183.3±48.6†	213.8±83.03†	0.488 ± 0.258†	0.244±0.159†	0.650±0.112†	2.45 ± 0.597†	0.788±0.169†	3.13±0.748	1.45±0.312
VR81（500 ug）	0.271±0.076**	2.859±0.583**	0.0207±0.015**	0.141±0.077**	0.005±0.016**	0.168±0.040***	0.016±0.003***	1.40±0.196**	0.435±0.089***

[0506] 实施例6:在热肾IRI模型中抑制G-CSF信号传导减少嗜中性粒细胞向肾中的浸润

[0507] 根据实施例1中描述的方法,通过组织消化和流式细胞术计数肾嗜中性粒细胞($CD11b^+Gr1^+$)和白细胞($CD11b^-Gr1^-CD45.2^+$)。根据总细胞群的PI染色确定活细胞的百分比。

[0508] 与用同种型对照抗体处理的小鼠相比,在用100μg/小鼠的抗GCSFR抗体(VR81)或抗C5抗体(BB5.1)处理的小鼠(和假处理的小鼠)的肾中观察到减少的嗜中性粒细胞数目

(图8A)。所有实验组中的外周血嗜中性粒细胞数目相似(图8B)。

[0509] 类似地,与用同种型对照抗体处理的小鼠相比,在用200μg/小鼠或500μg/小鼠的VR81处理的小鼠的肾中观察到的嗜中性粒细胞数目显著减少(图13A)。然而,相对于同种型对照抗体,在外周血中观察到的嗜中性粒细胞没有显著减少(图13B)。

[0510] 这些数据表明用抗G-CSFR抗体(VR81)处理减少嗜中性粒细胞浸润到肾中并且不显著影响外周血中嗜中性粒细胞的数目。

[0511] 在所有实验组小鼠的肾或外周血中的嗜中性粒细胞CD69或CD62L的表达没有观察到显著差异。

[0512] 与用同种型对照抗体处理的小鼠相比,在用抗G-CSFR抗体(VR81)或抗C5抗体(BB5.1)处理的小鼠的肾中没有观察到白细胞百分比($CD11b^{-}Gr1^{-}CD45.2^{+}$)的显著差异。

[0513] 实施例7:热肾IRI模型中的VR81剂量滴定

[0514] 在实施例1中描述的热肾IRI模型中的剂量滴定研究中,在缺血-再灌注损伤前24h以200μg/小鼠或500μg/小鼠的剂量注射抗小鼠G-CSFR抗体(VR81)。用500μg/小鼠的同种型对照抗体处理的小鼠用作对照。

[0515] 如表5和图11和12所示,在用500μgVR81处理的小鼠中,血清肌酸酐和血清尿素水平显著降低,但在用200μg VR81或500μg同种型对照抗体处理的小鼠中,血清肌酸酐和血清尿素水平没有显著降低。

[0516] 表5给予200μg和500μg VR81/小鼠的小鼠中的血清肌酸酐和血清尿素水平。D'Agostino&Pearson综合正常检验。VR81与Ab对照(*p<0.05,**p<0.01)的单向ANOVA Kruskal-Wallis检验,Dunn's多重比较检验。

[0517]

	肌酸酐(μM)	尿素(mg/dL)
对照(500ug)	127.3±19.5	507.7±75.2
VR81(200ug)	116.0±38.5	344±94.2
VR81(500ug)	22.4±1.0*	84.42±3.27**

[0518] 实施例8:在热肾IRI模型中抑制G-CSF信号传导降低补体C5激活和C9沉积

[0519] 为了评估对经受热肾缺血-再灌注损伤(IRI)的小鼠施用抗G-CSFR抗体(VR81)的效果,使用小鼠C5a ELISA试剂盒通过分析血浆中的C5a测量补体C5激活,并根据实施例1通过肾切片的免疫荧光染色测量C5b-9沉积。

[0520] 如表6和图14A所示,与用500μg同种型对照抗体处理的小鼠相比,用500μg VR81处理的小鼠血浆C5a水平显着降低。

[0521] 如表6和图14B所示,与用500μg同种型对照抗体处理的小鼠相比,用500μg VR81处理的小鼠的肾中C5B-9沉积也有显著降低。

[0522] 表6在用200μg或500μg VR81处理的小鼠中补体C5激活和C5b-9沉积(*p<0.05,**p<0.02,***p<0.001与Ab对照)

[0523]

治疗	C5a（ng/mL）	C5b-9 沉积（RawIntDen）
假	2.93±0.26	$3.52\pm0.38\times10^{5}$
Ab 对照（500 μg）	25±0.99	$1.14\pm0.17\times10^{7}$
VR81（200 μg）	17.31±1.95	$7.73\pm1.6\times10^{6}$
VR81（500 μg）	10.69±0.90	$4.31\pm0.78\times10^{6}$

[0524] 实施例9:缺血前1h施用G-CSF信号传导抑制剂降低了热肾IRI模型中肾和血液中嗜中性粒细胞的频率

[0525] 为了评估在热肾IRI模型中缺血前1小时给小鼠施用抗G-CSFR抗体(VR81)的效果,根据实施例1所述方法通过组织消化和流式细胞术测量肾和血液中嗜中性粒细胞(CD11b+Gr1+Ly6G+)的频率。500μg/小鼠抗C5抗体,BB5.1,用于比较。

[0526] 与用同种型对照抗体处理相比,缺血前1h用500μg/小鼠抗G-CSFR抗体VR81处理显著降低了血液和肾中嗜中性粒细胞的频率(图15)。与用同种型对照抗体处理相比,用500μg/小鼠对照抗体BB5.1处理没有显著降低肾中嗜中性粒细胞的频率。这些结果证明,在缺血前1h用G-CSF信号传导抑制剂治疗,虽然不如缺血前24h治疗有效(图13),但足以显著降低血液和肾中的嗜中性粒细胞数量。

[0001] 序列表

[0002] <110> CSL有限公司

[0003] <120> 524789

[0004] <130> 治疗或防止缺血-再灌注损伤的方法

[0005] <160> 18

[0006] <170> PatentIn 3.5版

[0007] <210> 1

[0008] <211> 319

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 人工

[0011] <220>

[0012] <223> 具有C-末端多组氨酸标签的智人G-CSFR(hG-CSFR)的氨基酸25-335

[0013] <400> 1

[0014] Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp

[0015] 1 5 10 15

[0016] Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp

[0017] 20 25 30

[0018] Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly

[0019] 35 40 45

[0020] Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr

[0021] 50 55 60

[0022] Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Ala Leu Asn

[0023] 65 70 75 80

[0024] Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly

[0025] 85 90 95

[0026] Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr

[0027] 100 105 110

[0028] Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu

[0029] 115 120 125

[0030] Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln

[0031] 130 135 140

[0032] Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser

[0033] 145 150 155 160

[0034] His Cys Ser Ile Pro Arg Lys His Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly

[0035] 165 170 175

[0036] Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln

[0037] 180 185 190

[0038] Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu

[0039] 195 200 205

[0040] Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys

[0041] 210 215 220

[0042] Leu Gln Leu Ser Trp Glu Pro Trp Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln

[0043] 225 230 235 240

[0044] Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala

[0045] 245 250 255

[0046] Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly

[0047] 260 265 270

[0048] Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp

[0049] 275 280 285

[0050] Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg

[0051] 290 295 300

[0052] Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr His His His His His His His His

[0053] 305 310 315

[0054] <210> 2

[0055] <211> 118

[0056] <212> PRT

[0057] <213> 人工

[0058] <220>

[0059] <223> C1.2的VH

[0060] <400> 2

[0061] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0062] 1 5 10 15

[0063] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Tyr

[0064] 20 25 30

[0065] Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0066] 35 40 45

[0067] Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Val Thr Pro Tyr Ala Asp Ser Val

[0068] 50 55 60

[0069] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0070] 65 70 75 80

[0071] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0072] 85 90 95

[0073] Ala Met Leu Gly Glu Leu Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr

[0074] 100 105 110

[0075] Leu Val Thr Val Ser Ser

[0076] 115

[0077] <210> 3

[0078] <211> 107

[0079] <212> PRT

[0080] <213> 人工

[0081] <220>

[0082] <223> C1.2的VL

[0083] <400> 3

[0084] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0085] 1 5 10 15

[0086] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr

[0087] 20 25 30

[0088] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0089] 35 40 45

[0090] Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Gln Asn Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0091] 50 55 60

[0092] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0093] 65 70 75 80

[0094] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

[0095] 85 90 95

[0096] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Val Glu Ile Arg

[0097] 100 105

[0098] <210> 4

[0099] <211> 118

[0100] <212> PRT

[0101] <213> 人工

[0102] <220>

[0103] <223> C1.2G的VH

[0104] <400> 4

[0105] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0106] 1 5 10 15

[0107] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Tyr

[0108] 20 25 30

[0109] Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0110] 35 40 45

[0111] Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Val Thr Pro Tyr Ala Asp Ser Val

[0112] 50 55 60

[0113] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0114] 65 70 75 80

[0115] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0116] 85 90 95

[0117] Ala Lys Leu Gly Glu Leu Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
[0118] 100 105 110
[0119] Leu Val Thr Val Ser Ser
[0120] 115
[0121] <210> 5
[0122] <211> 107
[0123] <212> PRT
[0124] <213> 人工
[0125] <220>
[0126] <223> C1.2G的VL
[0127] <400> 5
[0128] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0129] 1 5 10 15
[0130] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
[0131] 20 25 30
[0132] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0133] 35 40 45
[0134] Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0135] 50 55 60
[0136] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0137] 65 70 75 80
[0138] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
[0139] 85 90 95
[0140] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0141] 100 105
[0142] <210> 6
[0143] <211> 5
[0144] <212> PRT
[0145] <213> 人工
[0146] <220>
[0147] <223> C1.2的HCDR1
[0148] <400> 6
[0149] Leu Tyr Trp Met Gly
[0150] 1 5
[0151] <210> 7
[0152] <211> 17
[0153] <212> PRT
[0154] <213> 人工
[0155] <220>

[0156] <223> C1.2 HCDR2

[0157] <400> 7

[0158] Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Val Thr Pro Tyr Ala Asp Ser Val Lys

[0159] 1 5 10 15

[0160] Gly

[0161] <210> 8

[0162] <211> 9

[0163] <212> PRT

[0164] <213> 人工

[0165] <220>

[0166] <223> C1.2 HCDR3

[0167] <400> 8

[0168] Leu Gly Glu Leu Gly Trp Phe Asp Pro

[0169] 1 5

[0170] <210> 9

[0171] <211> 11

[0172] <212> PRT

[0173] <213> 人工

[0174] <220>

[0175] <223> C1.2 LCDR1

[0176] <400> 9

[0177] Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

[0178] 1 5 10

[0179] <210> 10

[0180] <211> 6

[0181] <212> PRT

[0182] <213> 人工

[0183] <220>

[0184] <223> C1.2 LCDR2

[0185] <400> 10

[0186] Ala Ser Asn Leu Gln Asn

[0187] 1 5

[0188] <210> 11

[0189] <211> 9

[0190] <212> PRT

[0191] <213> 人工

[0192] <220>

[0193] <223> C1.2 LCDR3

[0194] <400> 11

[0195] Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

[0196] 1 5

[0197] <210> 12

[0198] <211> 8

[0199] <212> PRT

[0200] <213> 人工

[0201] <220>

[0202] <223> C1.2的HCDR3的共有序列

[0203] <220>

[0204] <221> 变体

[0205] <222> (5)..(5)

[0206] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:

[0207] 色氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、

[0208] 谷氨酸和组氨酸

[0209] <220>

[0210] <221> 变体

[0211] <222> (6)..(6)

[0212] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:

[0213] 苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、甘氨酸和

[0214] 异亮氨酸

[0215] <220>

[0216] <221> 变体

[0217] <222> (7)..(7)

[0218] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:天冬氨酸、

[0219] 甲硫氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、亮氨酸、缬氨酸、精氨酸

[0220] 和组氨酸

[0221] <220>

[0222] <221> 变体

[0223] <222> (8)..(8)

[0224] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:脯氨酸、

[0225] 谷氨酸、丙氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、

[0226] 苏氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、丝氨酸、甘氨酸、精氨酸、

[0227] 赖氨酸

[0228] <400> 12

[0229] Leu Gly Glu Leu Xaa Xaa Xaa Xaa

[0230] 1 5

[0231] <210> 13

[0232] <211> 9

[0233] <212> PRT

[0234] <213> 人工

[0235] <220>

[0236] <223> C1.2的LCDR3的共有序列

[0237] <220>

[0238] <221> 变体

[0239] <222> (1)..(1)

[0240] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:

[0241] 谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、丙氨酸或丝氨酸

[0242] <220>

[0243] <221> 变体

[0244] <222> (2)..(2)

[0245] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:

[0246] 谷氨酰胺、缬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酸

[0247] <220>

[0248] <221> 变体

[0249] <222> (3)..(3)

[0250] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:丝氨酸或

[0251] 甘氨酸

[0252] <220>

[0253] <221> 变体

[0254] <222> (4)..(4)

[0255] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:

[0256] 色氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸和

[0257] 亮氨酸

[0258] <220>

[0259] <221> 变体

[0260] <222> (5)..(5)

[0261] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:谷氨酸、

[0262] 甲硫氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、丝氨酸、缬氨酸、

[0263] 天冬酰胺、甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、组氨酸、酪氨酸、

[0264] 赖氨酸或苏氨酸

[0265] <220>

[0266] <221> 变体

[0267] <222> (6)..(6)

[0268] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:

[0269] 酪氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸或苏氨酸

[0270] <220>

[0271] <221> 变体

[0272] <222> (7)..(7)

[0273] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:脯氨酸、

[0274] 丙氨酸、组氨酸、甘氨酸和赖氨酸

[0275] <220>

[0276] <221> 变体

[0277] <222> (8)..(8)

[0278] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:亮氨酸、

[0279] 谷氨酰胺、甲硫氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、

[0280] 赖氨酸、组氨酸、甘氨酸

[0281] <220>

[0282] <221> 变体

[0283] <222> (9)..(9)

[0284] <223> X是选自包含以下各项组成的组的氨基酸:

[0285] 苏氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、丝氨酸、

[0286] 组氨酸、脯氨酸、色氨酸、异亮氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸

[0287] 和缬氨酸

[0288] <400> 13

[0289] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

[0290] 1 5

[0291] <210> 14

[0292] <211> 445

[0293] <212> PRT

[0294] <213> 人工

[0295] <220>

[0296] <223> 具有S241P突变的C1.2G重链IgG4

[0297] <400> 14

[0298] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0299] 1 5 10 15

[0300] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Tyr

[0301] 20 25 30

[0302] Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0303] 35 40 45

[0304] Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Val Thr Pro Tyr Ala Asp Ser Val

[0305] 50 55 60

[0306] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0307] 65 70 75 80

[0308] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0309] 85 90 95

[0310] Ala Lys Leu Gly Glu Leu Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr

[0311] 100 105 110

[0312] Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
[0313] 115 120 125
[0314] Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
[0315] 130 135 140
[0316] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
[0317] 145 150 155 160
[0318] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[0319] 165 170 175
[0320] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[0321] 180 185 190
[0322] Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
[0323] 195 200 205
[0324] Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
[0325] 210 215 220
[0326] Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
[0327] 225 230 235 240
[0328] Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
[0329] 245 250 255
[0330] Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
[0331] 260 265 270
[0332] Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
[0333] 275 280 285
[0334] Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
[0335] 290 295 300
[0336] Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
[0337] 305 310 315 320
[0338] Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
[0339] 325 330 335
[0340] Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
[0341] 340 345 350
[0342] Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
[0343] 355 360 365
[0344] Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
[0345] 370 375 380
[0346] Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
[0347] 385 390 395 400
[0348] Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
[0349] 405 410 415
[0350] Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

[0351] 420 425 430

[0352] His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

[0353] 435 440 445

[0354] <210> 15

[0355] <211> 214

[0356] <212> PRT

[0357] <213> 人工

[0358] <220>

[0359] <223> 具有kappa轻链的C1.2G

[0360] <400> 15

[0361] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0362] 1 5 10 15

[0363] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr

[0364] 20 25 30

[0365] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0366] 35 40 45

[0367] Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0368] 50 55 60

[0369] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0370] 65 70 75 80

[0371] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

[0372] 85 90 95

[0373] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

[0374] 100 105 110

[0375] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

[0376] 115 120 125

[0377] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

[0378] 130 135 140

[0379] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

[0380] 145 150 155 160

[0381] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

[0382] 165 170 175

[0383] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

[0384] 180 185 190

[0385] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

[0386] 195 200 205

[0387] Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0388] 210

[0389] <210> 16

[0390] <211> 836

[0391] <212> PRT

[0392] <213> 智人

[0393] <400> 16

[0394] Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile

[0395] 1 5 10 15

[0396] Leu Leu Leu Pro Gly Ser Leu Glu Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser

[0397] 20 25 30

[0398] Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile

[0399] 35 40 45

[0400] Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg

[0401] 50 55 60

[0402] Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp

[0403] 65 70 75 80

[0404] Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln

[0405] 85 90 95

[0406] Ala Phe Leu Ser Cys Cys Leu Asn Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu

[0407] 100 105 110

[0408] Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn

[0409] 115 120 125

[0410] Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp

[0411] 130 135 140

[0412] Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser

[0413] 145 150 155 160

[0414] Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp

[0415] 165 170 175

[0416] Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser His Cys Cys Ile Pro Arg Lys His

[0417] 180 185 190

[0418] Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala

[0419] 195 200 205

[0420] Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val

[0421] 210 215 220

[0422] Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu

[0423] 225 230 235 240

[0424] Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys Leu Gln Leu Cys Trp Glu Pro Trp

[0425] 245 250 255

[0426] Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro

[0427] 260 265 270

[0428] Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu

[0429] 275 280 285

[0430] Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr

[0431] 290 295 300

[0432] Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp

[0433] 305 310 315 320

[0434] Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr Val

[0435] 325 330 335

[0436] Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg Gln Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val

[0437] 340 345 350

[0438] Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val Pro Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile

[0439] 355 360 365

[0440] Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile

[0441] 370 375 380

[0442] Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro

[0443] 385 390 395 400

[0444] Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala Leu Val Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Thr

[0445] 405 410 415

[0446] Ser Arg Pro Thr Pro Val Val Phe Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu

[0447] 420 425 430

[0448] Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly

[0449] 435 440 445

[0450] Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly

[0451] 450 455 460

[0452] Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu

[0453] 465 470 475 480

[0454] Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro

[0455] 485 490 495

[0456] Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met

[0457] 500 505 510

[0458] Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser

[0459] 515 520 525

[0460] His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln

[0461] 530 535 540

[0462] Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr

[0463] 545 550 555 560

[0464] His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala

[0465] 565 570 575

[0466] Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro

[0467] 580 585 590

[0468] Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala
[0469] 595 600 605
[0470] Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr Leu Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser
[0471] 610 615 620
[0472] Glu Leu His Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Leu Thr
[0473] 625 630 635 640
[0474] Cys Leu Cys Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys Ser Pro Asn Arg Lys Asn
[0475] 645 650 655
[0476] Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala His Ser Ser Leu Gly Ser
[0477] 660 665 670
[0478] Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala Phe Gln Leu Pro Gly Leu
[0479] 675 680 685
[0480] Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Glu Asp Glu Lys
[0481] 690 695 700
[0482] Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser Ser Glu Thr Cys Gly Leu
[0483] 705 710 715 720
[0484] Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln Gly Asp Pro Arg Ala Val
[0485] 725 730 735
[0486] Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln Ser Gly Thr Ser Asp Gln Val Leu Tyr
[0487] 740 745 750
[0488] Gly Gln Leu Leu Gly Ser Pro Thr Ser Pro Gly Pro Gly His Tyr Leu
[0489] 755 760 765
[0490] Arg Cys Asp Ser Thr Gln Pro Leu Leu Ala Gly Leu Thr Pro Ser Pro
[0491] 770 775 780
[0492] Lys Ser Tyr Glu Asn Leu Trp Phe Gln Ala Ser Pro Leu Gly Thr Leu
[0493] 785 790 795 800
[0494] Val Thr Pro Ala Pro Ser Gln Glu Asp Asp Cys Val Phe Gly Pro Leu
[0495] 805 810 815
[0496] Leu Asn Phe Pro Leu Leu Gln Gly Ile Arg Val His Gly Met Glu Ala
[0497] 820 825 830
[0498] Leu Gly Ser Phe
[0499] 835
[0500] <210> 17
[0501] <211> 319
[0502] <212> PRT
[0503] <213> 人工
[0504] <220>
[0505] <223> 具有C-末端多组氨酸标签的食蟹猕猴G-CSFR(cynoG-CSFR)的Ig和CRH结构域

[0506] <400> 17

[0507] Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp

[0508] 1 5 10 15

[0509] Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp

[0510] 20 25 30

[0511] Leu Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly

[0512] 35 40 45

[0513] Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Ser Gln Gln Ser Thr Ile Thr

[0514] 50 55 60

[0515] Leu Pro His Leu Asn His Thr Arg Ala Phe Leu Ser Cys Ala Leu Asn

[0516] 65 70 75 80

[0517] Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly

[0518] 85 90 95

[0519] Tyr Pro Pro Ala Val Pro Arg Asn Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr

[0520] 100 105 110

[0521] Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu

[0522] 115 120 125

[0523] Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln

[0524] 130 135 140

[0525] Thr Gln Gly Asp Ser Ile Met Asp Cys Val Pro Glu Asp Gly Gln Ser

[0526] 145 150 155 160

[0527] His Cys Ser Ile Pro Arg Arg His Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly

[0528] 165 170 175

[0529] Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln

[0530] 180 185 190

[0531] Leu Cys Leu Glu Pro Met Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu

[0532] 195 200 205

[0533] Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys

[0534] 210 215 220

[0535] Leu Gln Leu Ser Trp Glu Pro Trp Gln Pro Ala Leu His Ile Asn Gln

[0536] 225 230 235 240

[0537] Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Ser Gly Glu Ala Ser Trp Ala

[0538] 245 250 255

[0539] Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Arg Tyr Glu Leu Cys Gly

[0540] 260 265 270

[0541] Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp

[0542] 275 280 285

[0543] Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asn Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg

[0544] 290 295 300

[0545] Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr His His His His His His His His
[0546] 305 310 315
[0547] <210> 18
[0548] <211> 444
[0549] <212> PRT
[0550] <213> 人工
[0551] <220>
[0552] <223> 具有S241P突变且缺乏C-末端赖氨酸残基的C1.2G重链IgG4
[0553] <400> 18
[0554] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0555] 1 5 10 15
[0556] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Tyr
[0557] 20 25 30
[0558] Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0559] 35 40 45
[0560] Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Val Thr Pro Tyr Ala Asp Ser Val
[0561] 50 55 60
[0562] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0563] 65 70 75 80
[0564] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0565] 85 90 95
[0566] Ala Lys Leu Gly Glu Leu Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
[0567] 100 105 110
[0568] Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
[0569] 115 120 125
[0570] Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
[0571] 130 135 140
[0572] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
[0573] 145 150 155 160
[0574] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[0575] 165 170 175
[0576] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[0577] 180 185 190
[0578] Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
[0579] 195 200 205
[0580] Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
[0581] 210 215 220
[0582] Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
[0583] 225 230 235 240

[0584] Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
[0585] 245 250 255
[0586] Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
[0587] 260 265 270
[0588] Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
[0589] 275 280 285
[0590] Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
[0591] 290 295 300
[0592] Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
[0593] 305 310 315 320
[0594] Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
[0595] 325 330 335
[0596] Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
[0597] 340 345 350
[0598] Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
[0599] 355 360 365
[0600] Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
[0601] 370 375 380
[0602] Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
[0603] 385 390 395 400
[0604] Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
[0605] 405 410 415
[0606] Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
[0607] 420 425 430
[0608] His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[0609] 435 440

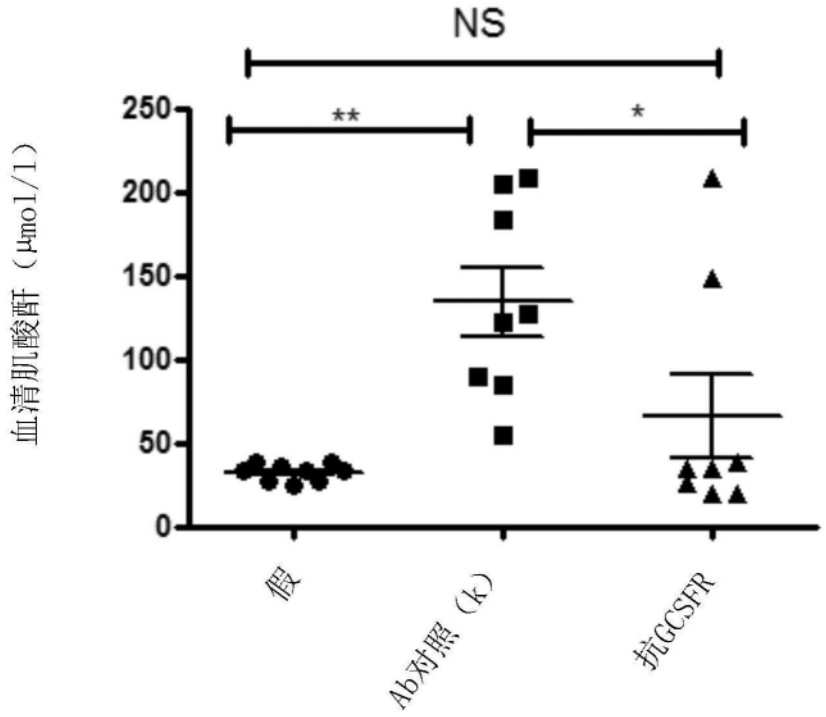

NS
**
*
250
200
150
100
50
0
血清肌酸酐（μmol/l）
假
Ab对照（k）
抗GCSFR

图1

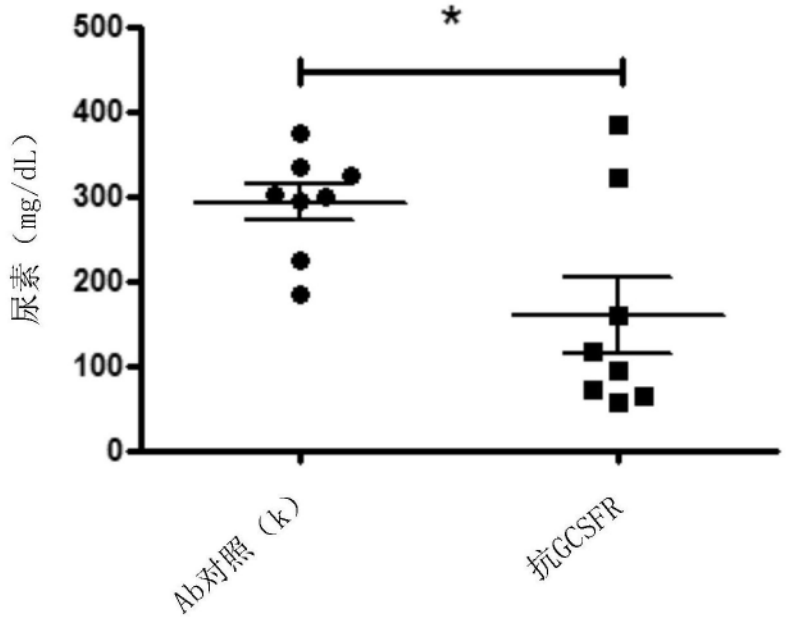

*
500
400
300
200
100
0
尿素（mg/dL）
Ab对照（k）
抗GCSFR

图2

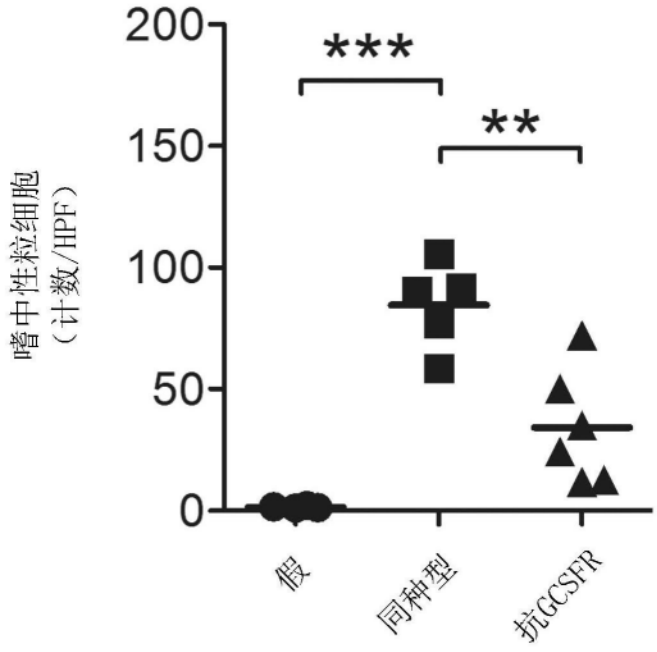

200
150
100
50
0
***
**
嗜中性粒细胞
（计数/HPF）
假
同种型
抗GCSFR

图3

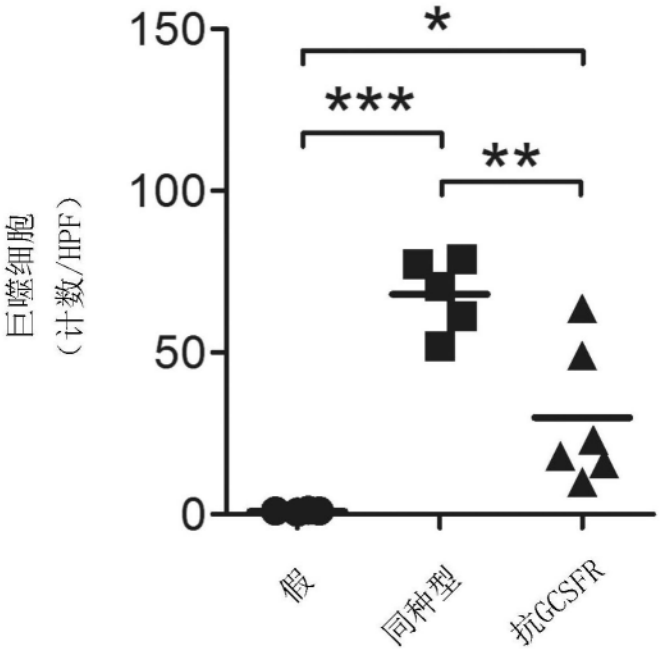

150
100
50
0
*
***
**
巨噬细胞
（计数/HPF）
假
同种型
抗GCSFR

图4

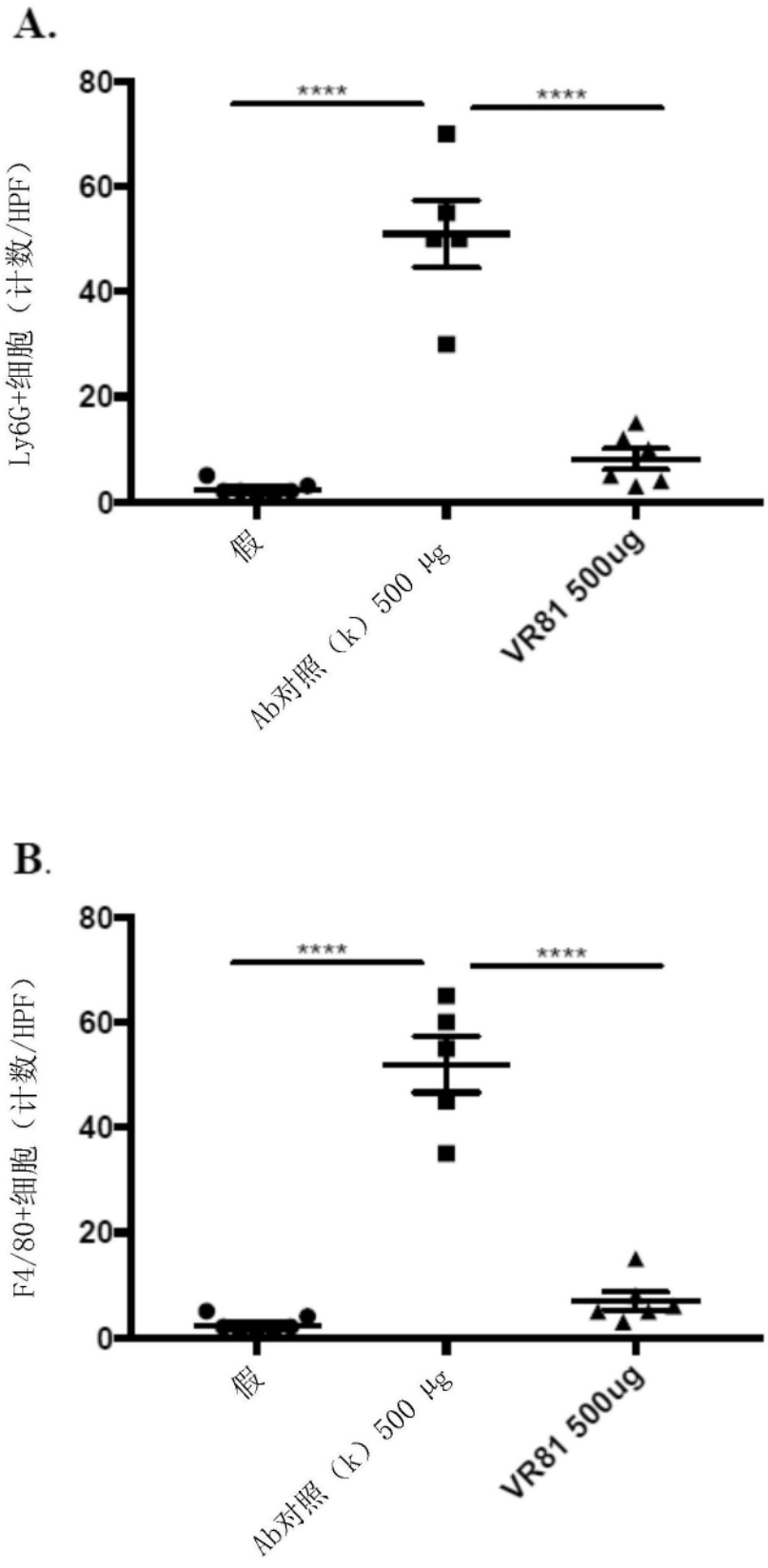

A.
Ly6G+细胞（计数/HPF）
80
60
40
20
0
****
****
假
Ab对照（k）500 μg
VR81 500ug
B.
F4/80+细胞（计数/HPF）
80
60
40
20
0
****
****
假
Ab对照（k）500 μg
VR81 500ug

图5

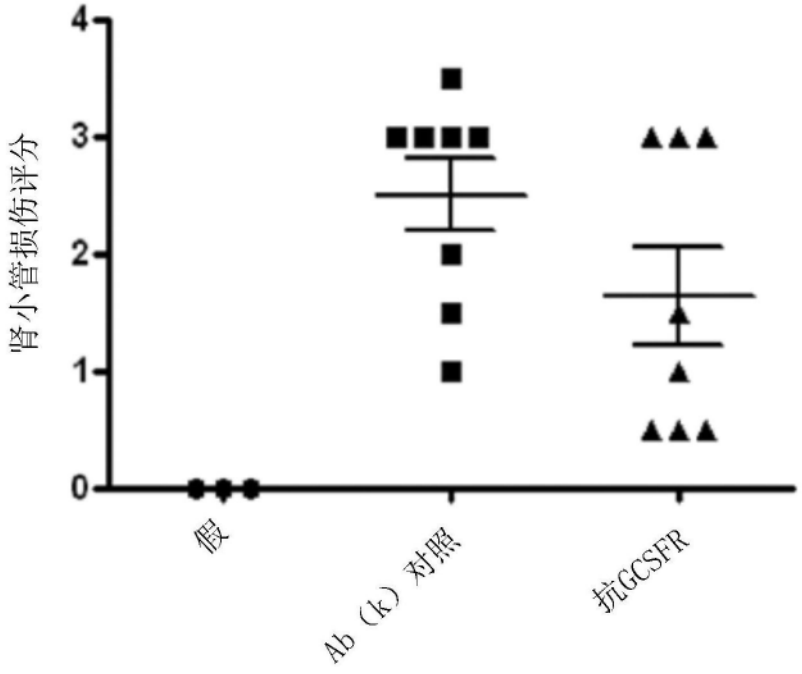

肾小管损伤评分
4
3
2
1
0
假
Ab（k）对照
抗GCSFR

图6

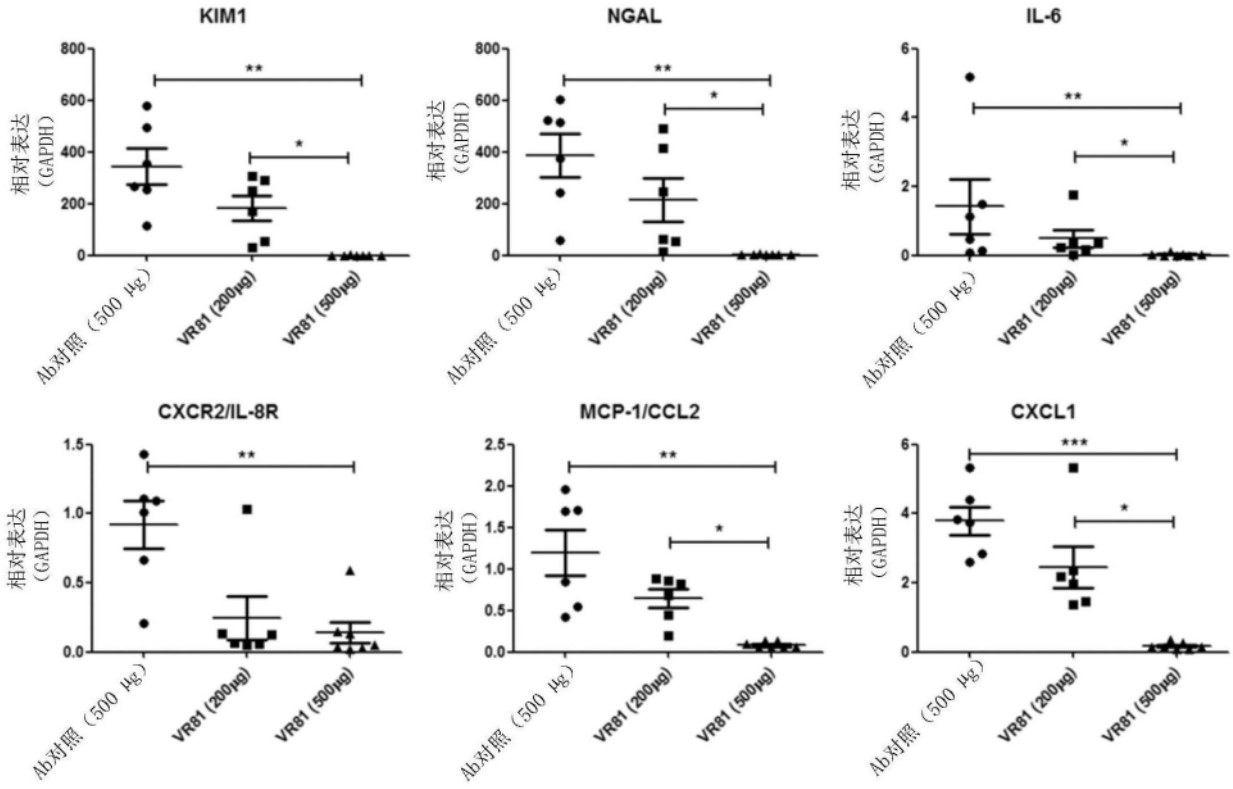

KIM1
NGAL
IL-6
CXCR2/IL-8R
MCP-1/CCL2
CXCL1
相对表达
（GAPDH）
Ab对照（500 μg）
VR81 (200μg)
VR81 (500μg)

图7A

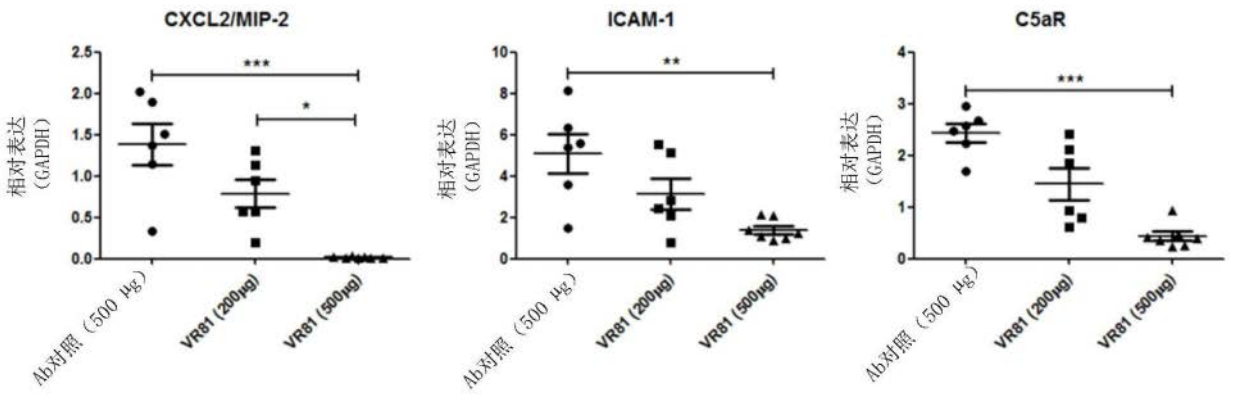

CXCL2/MIP-2
ICAM-1
C5aR
相对表达
(GAPDH)
***
*
**
***
Ab对照（500 μg）
VR01 (200μg)
VR01 (500μg)

图7B

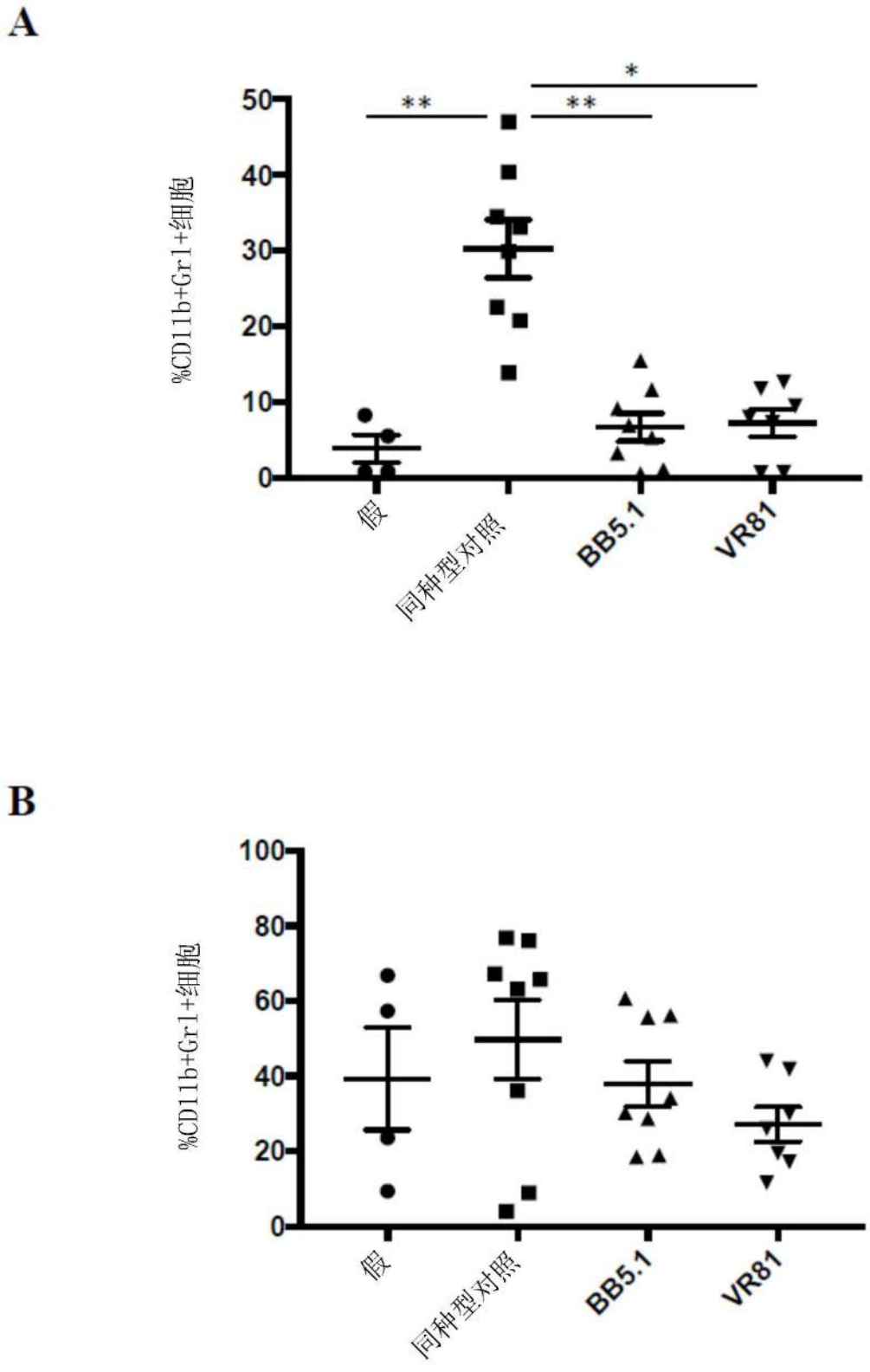

A
%CD11b+Gr1+细胞
50
40
30
20
10
0
**
**
*
假
同种型对照
BB5.1
VR81
B
%CD11b+Gr1+细胞
100
80
60
40
20
0
假
同种型对照
BB5.1
VR81

图8

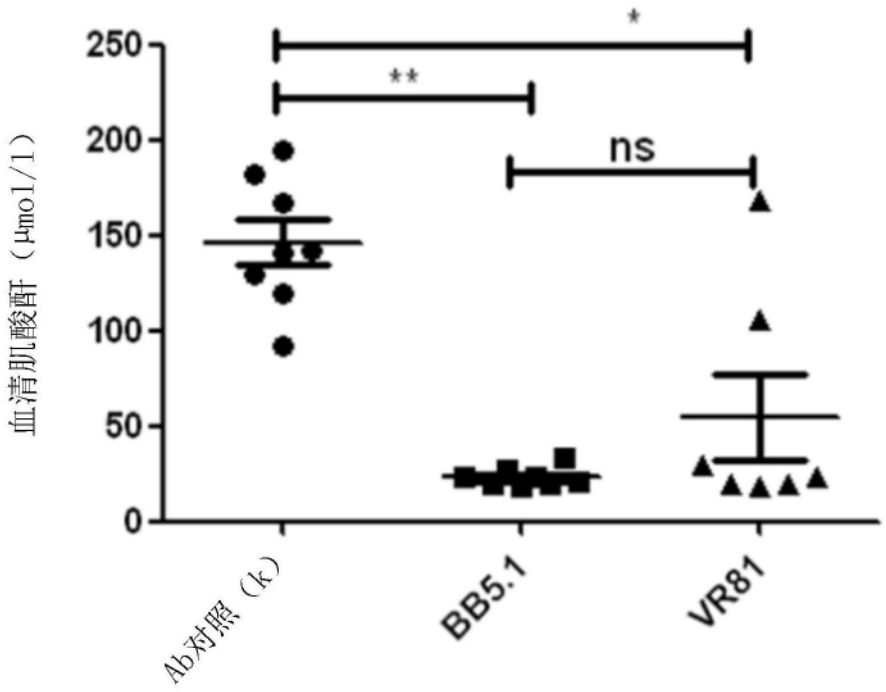

血清肌酸酐（μmol/l）
250
200
150
100
50
0
*
**
ns
Ab对照（k）
BB5.1
VR81

图9

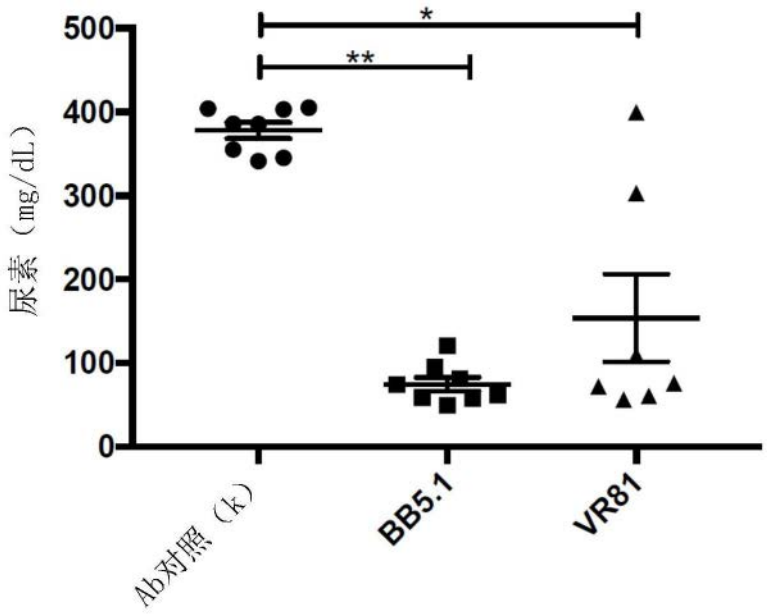

尿素（mg/dL）
500
400
300
200
100
0
*
**
Ab对照（k）
BB5.1
VR81

图10

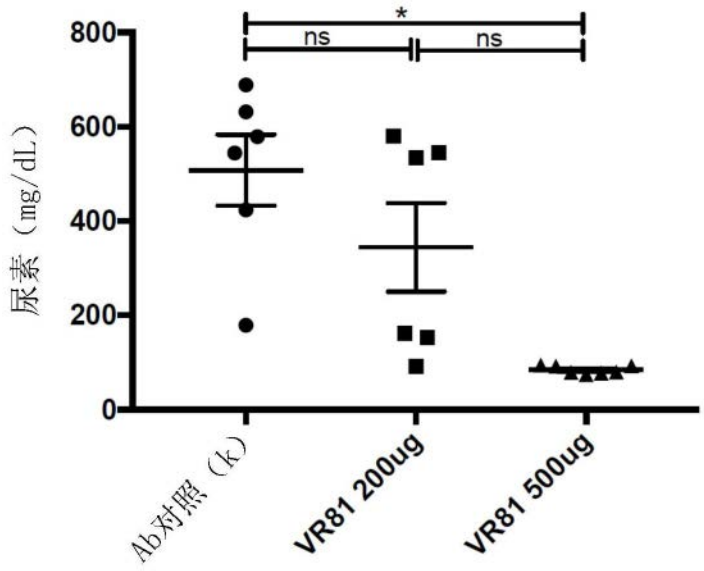

*
ns
ns
800
600
400
200
0
尿素（mg/dL）
Ab对照（k）
VR81 200ug
VR81 500ug

图11

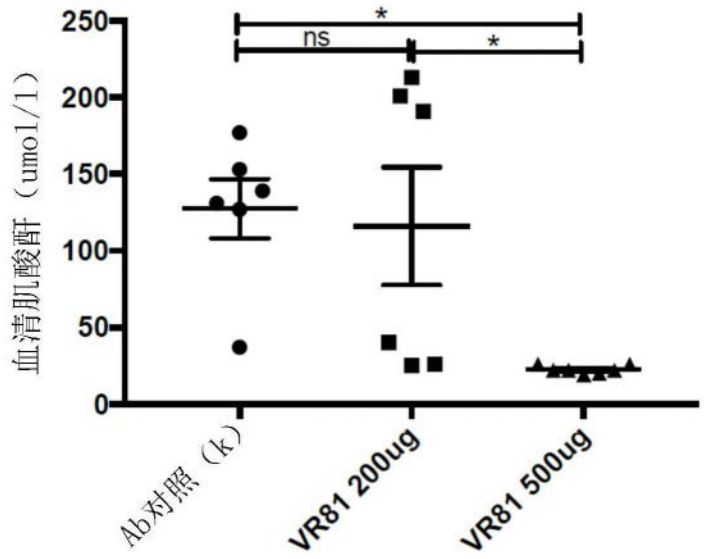

*
ns
*
250
200
150
100
50
0
血清肌酸酐（umol/l）
Ab对照（k）
VR81 200ug
VR81 500ug

图12

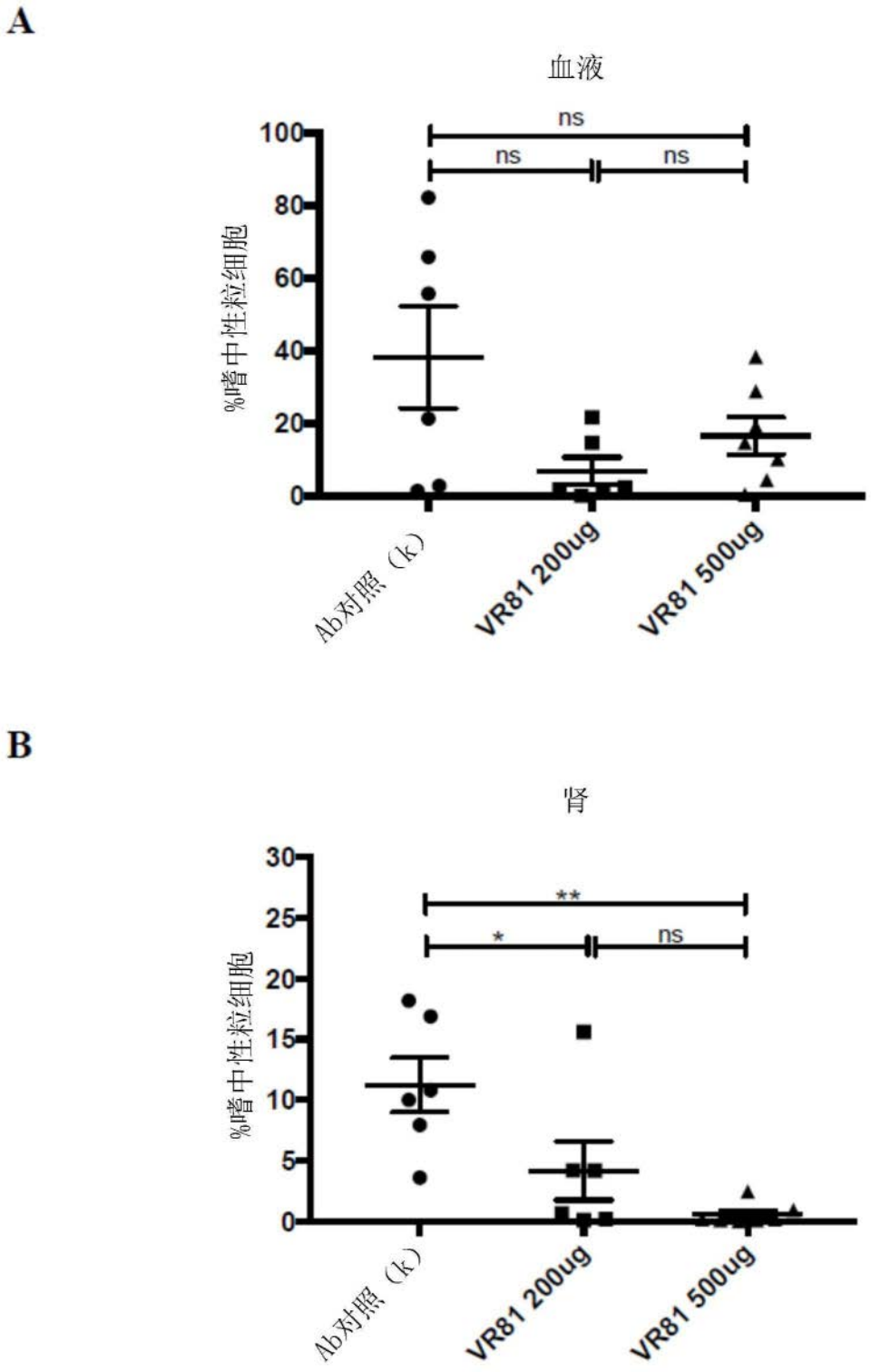

A
血液
ns
ns
ns
100
80
60
40
20
0
%嗜中性粒细胞
Ab对照（k）
VR81 200ug
VR81 500ug
B
肾
**
*
ns
30
25
20
15
10
5
0
%嗜中性粒细胞
Ab对照（k）
VR81 200ug
VR81 500ug

图13

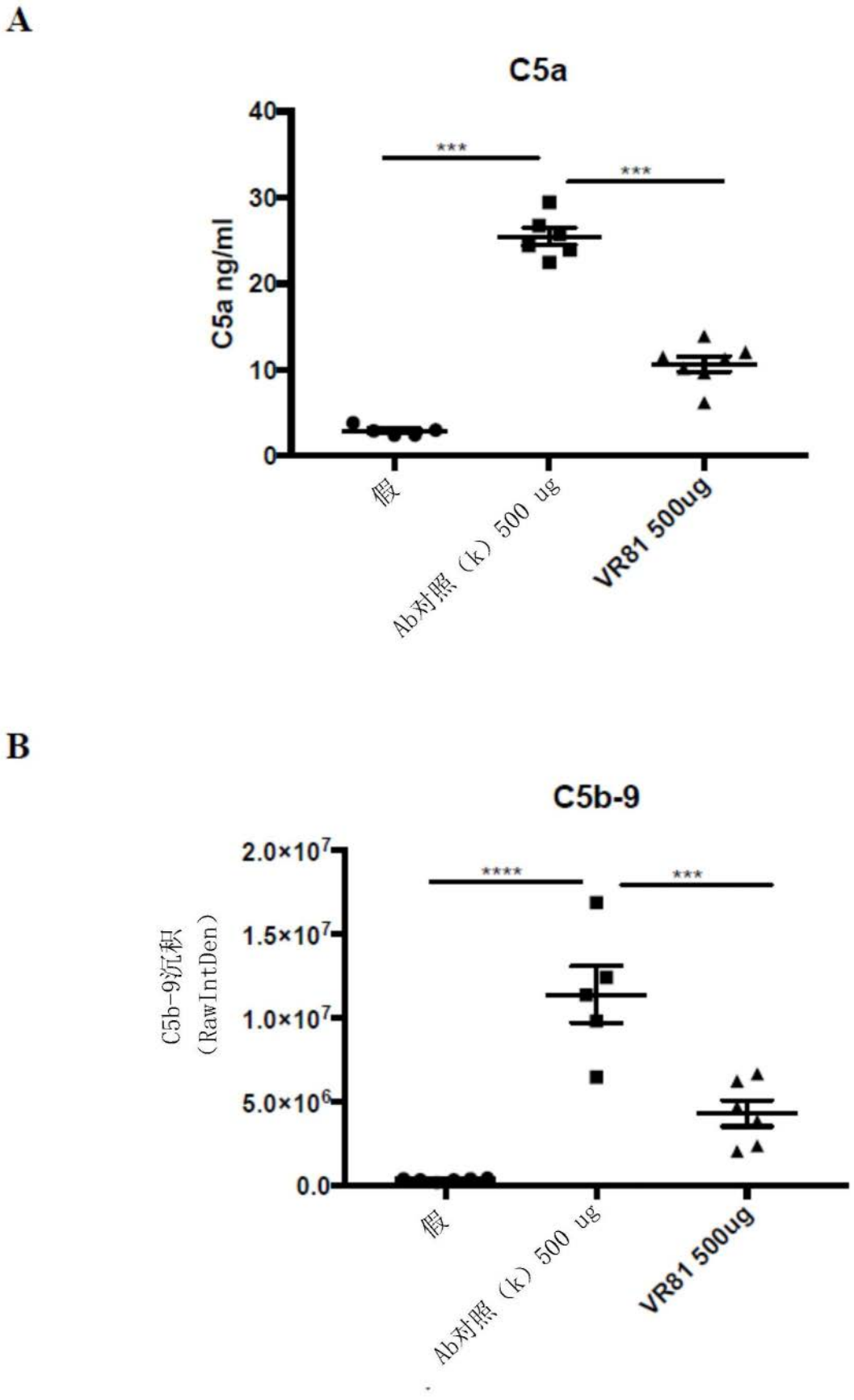

A
C5a
C5a ng/ml
40
30
20
10
0
***
***
假
Ab对照（k）500 ug
VR81 500ug
B
C5b-9
C5b-9沉积
（RawIntDen）
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0.0
****
***
假
Ab对照（k）500 ug
VR81 500ug

图14

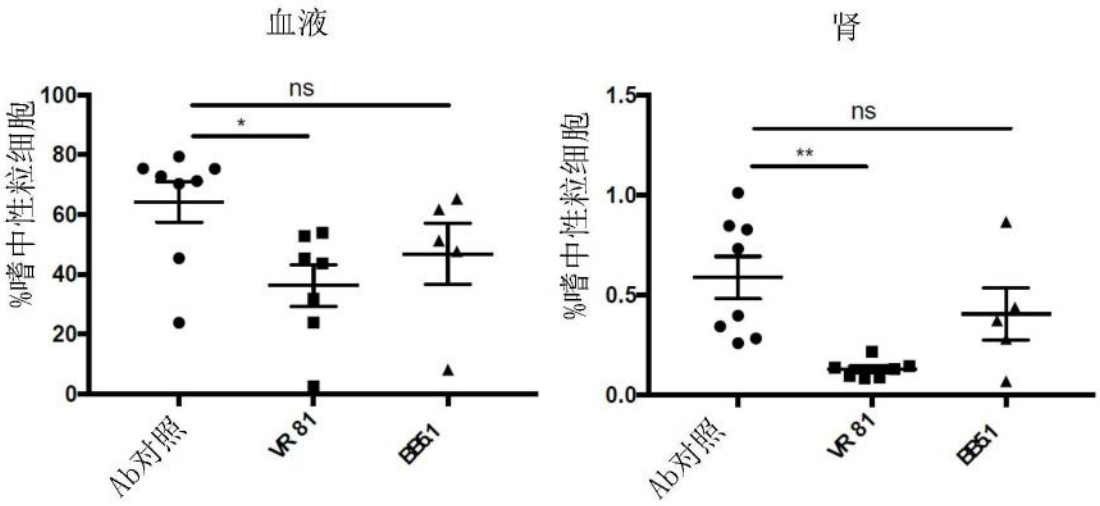

血液
肾
%嗜中性粒细胞
100
80
60
40
20
0
ns
*
Ab对照
VR81
BB51
%嗜中性粒细胞
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
**
Ab对照
VR81
BB51

图15