



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102405237 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 04

(21) 申请号 201080017671. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 05

C07K 16/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

61/158, 285 2009. 03. 06 US

A61K 39/00 (2006. 01)

61/168, 130 2009. 04. 09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 10. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/026413 2010. 03. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02010/102244 EN 2010. 09. 10

(71) 申请人 卡罗拜奥斯制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 克里斯托弗·R·贝炳东

杰弗里·T·亚兰东

瓦尔盖斯·帕拉斯

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

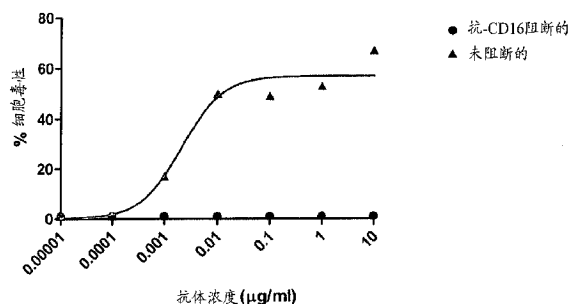
权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 2 页

(54) 发明名称

利用 EphA3 抗体治疗白血病和慢性骨髓增生性疾病

(57) 摘要

本发明提供用于治疗骨髓增生性病症的包含抗 EphA3 抗体的方法和组合物。



1. 杀伤在细胞表面上表达 EphA3 的骨髓增生性病症细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与抗 EphA3 抗体接触,其中所述抗 EphA3 抗体 (i) 激活 EphA3 和 (ii) 诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

2. 治疗患有骨髓增生性病症并具有在细胞表面上表达 EphA3 的骨髓增生性病症细胞的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的抗 EphA3 抗体,其中所述抗 EphA3 抗体 (i) 激活 EphA3 和 (ii) 诱导 ADCC。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述骨髓增生性病症细胞是慢性骨髓增生性病症 (CMPD) 细胞。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述 CMPD 细胞是 BCR-ABL 阴性的 CMPD 细胞。

5. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述 CMPD 细胞是 CML 细胞。

6. 如权利要求 5 所述的方法,还包括给予至少一种其它治疗剂,其中所述至少一种其它治疗剂是化疗剂。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述化疗剂是甲磺酸伊马替尼、尼罗替尼或达沙替尼。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体包含人重链 $\gamma 1$ 或 $\gamma 3$ 恒定区。

9. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体是低岩藻糖基化的。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体与 mAb IIIA4 竞争结合 EphA3。

11. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体是重组抗体或嵌合抗体。

12. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体是人抗体。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体是单克隆抗体。

14. 如权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体是多克隆抗体。

15. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体包含 mAb IIIA4 的 V_H 区 CDR3 和 V_L 区 CDR3。

16. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体包含 mAb IIIA4 的 V_H 和 V_L 区的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

17. 杀伤在表面上表达 EphA3 的骨髓增生性病症细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与激活 EphA3 或诱导 ADCC 的抗 EphA3 抗体接触,其中所述骨髓增生性病症细胞是急性骨髓性白血病 (AML) 细胞或骨髓增生异常综合症 (MDS) 细胞。

18. 治疗患有骨髓增生性病症并具有在细胞表面上表达 EphA3 的骨髓增生性病症细胞的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的抗 EphA3 抗体,其中所述抗 EphA3 抗体激活 EphA3 或诱导 ADCC,其中所述骨髓增生性病症是 AML 或 MDS。

19. 如权利要求 17 或 18 所述的方法,其中所述骨髓增生性病症细胞是 AML 细胞。

20. 如权利要求 19 所述的方法,还包括给予至少一种其它治疗剂,其中所述至少一种其它治疗剂是单独的阿糖胞苷或阿糖胞苷与柔红霉素的组合。

21. 如权利要求 17 或 18 所述的方法,其中所述抗体激活 EphA3。

22. 如权利要求 17-20 中任一项所述的方法,其中所述抗体包含人重链恒定区。

23. 如权利要求 17-38 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体与 mAb IIIA4 竞争

结合 EphA3。

24. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体是 $(\text{Fab}')_2$ 。

25. 如权利要求 17-23 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体是重组抗体或嵌合抗体。

26. 如权利要求 17-25 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体是人抗体。

27. 如权利要求 17-26 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体是多克隆抗体。

28. 如权利要求 17-26 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体是单克隆抗体。

29. 如权利要求 17-28 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体是包含 Fab、Fab' 或 Fv 的多价抗体。

30. 如权利要求 17-29 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体包含 mAb IIIA4 的 V_H 和 V_L 区。

31. 如权利要求 17-29 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体包含 mAb IIIA4 的 V_H 和 V_L 区的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

32. 如权利要求 17-29 中任一项所述的方法,其中所述抗体包含 mAb IIIA4 的 V_H 区 CDR3 和 V_L 区 CDR3。

33. 如权利要求 17-32 中任一项所述的方法,其中所述抗 EphA3 抗体诱导 ADCC。

34. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述抗体阻断 ephrinA5 配体与 EphA3 的结合。

35. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述抗体是低岩藻糖基化的。

36. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述抗体具有人 $\gamma 1$ 或 $\gamma 3$ 恒定区。

37. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述抗体阻断 ephrinA5 配体与 EphA3 的结合。

38. 如权利要求 22-32 中任一项所述的方法,其中人重链恒定区是 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 区。

39. 确定 AML 患者或 MDS 患者是否是抗 EphA3 抗体治疗的候选者的方法,所述方法包括:

提供来自所述患者的样品,其中所述样品包含骨髓增生性病症细胞;以及
检测所述骨髓增生性病症细胞上 EphA3 的表达。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其中检测母细胞上的 EphA3。

41. 如权利要求 39 所述的方法,其中检测干细胞上的 EphA3。

42. 如权利要求 39 所述的方法,其中检测母细胞和干细胞上的 EphA3。

43. 如权利要求 39 所述的方法,其中所述检测 EphA3 表达的步骤包括检测细胞表面上的蛋白表达。

44. 如权利要求 39 所述的方法,其中所述检测 EphA3 表达的步骤包括检测 EphA3 的 RNA 水平。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其中检测 EphA3 的 RNA 水平包括进行扩增反应。

46. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述扩增反应包括 RT-PCR。

47. 确定 CMPD 患者是否是抗 EphA3 抗体治疗的候选者的方法,所述方法包括:

提供来自所述患者的包含瘤性干细胞的样品;以及
检测所述瘤性干细胞的 EphA3 表达。

48. 监测具有 EphA3⁺ 骨髓增生性细胞的骨髓增生性病症患者的治疗功效的方法,其中所述骨髓增生性病症是 AML 或 MDS,所述方法包括:

从进行了骨髓增生性病症的治疗性处理后的患者获得包含骨髓增生性病症干细胞和 / 或母细胞的样品 ; 以及

检测所述骨髓增生性病症干细胞和 / 或母细胞上 EphA3 的表达。

49. 监测具有表达 EphA3 的瘤性骨髓增生性病症干细胞的 CMPD 患者的治疗功效的方法, 所述方法包括 :

从进行了 CMPD 的治疗性处理后的患者获得包含瘤性干细胞的样品 ; 以及

检测所述干细胞上 EphA3 的表达。

利用 EphA3 抗体治疗白血病和慢性骨髓增生性疾病

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2009 年 3 月 6 日提交的美国临时申请第 61/158,285 号和于 2009 年 4 月 9 日提交的美国临时申请第 61/168,130 号的优先权。通过引用将每个申请并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] Eph 受体酪氨酸激酶 (Eph) 属于一大类受体酪氨酸激酶 (RTK), 即在酪氨酸残基磷酸化蛋白的激酶。Eph 和它们的膜结合 ephrin 配体 (ephrin) 控制细胞定位和组织结构 (Poliakov, et al., Dev Cell 7 :465-80, 2004)。与其它受体酪氨酸激酶相反, Eph 受体活化不仅需要配体结合和二聚化, 而且需要预先形成的配体寡聚体的参与。因此, Eph 受体的酪氨酸磷酸化需要 ephrin 配体以它们的聚集或膜粘附形式存在 (Davis et al., Science 266 :816-819, 1994)。功能性和生物化学 Eph 应答在较高的配体寡聚状态时发生 (Stein et al., Genes Dev 12 :667-678, 1998)。

[0005] 在其它模式功能中, 各种 Eph 和 ephrin 已被证明在血管发育中起作用。在成年人中还观察到一些 ephrin 及其受体的不受调节 (de-regulated) 的再现与肿瘤侵袭、转移和新生血管发生有关。例如, 显性负性的可溶 EphA2 或 A3 蛋白对体外 ephrin 诱导的内皮细胞功能和体内的肿瘤血管发生和发展有影响 (Nakamoto, et al, Microsc Res Tech 59 :58-67, 2002 ; Brantley-Sieders, et al, Curr Pharm Des 10 :3431-42, 2004 ; Brantley, et al Oncogene 21 :7011-26, 2002 ; Cheng, et al. Neoplasia 5 :445-56, 2003 ; 和 Dobrzanski, et al Cancer Res 64 :910-9, 2004)。此外, 已经发现 Eph 家族成员在多种人类实体瘤的肿瘤细胞上过表达 (Brantley-Sieders, et al, Curr Pharm Des 10 :3431-42, 2004 ; Marme, Ann Hematol 81 Suppl 2 :S66, 2002 ; 和 Booth, et al, Nat Med 8 :1360-1, 2002)。

[0006] 据报道, 在加速期和急变期的慢性骨髓性白血病 (CML) 患者的 CD34⁺ 细胞上, EphA3 被激活并过表达 (Cilloni et al, American Society of Hematology, Abstract 1092, 2008 (可在 2008 年 11 月 14 日后可在线获得))。据 Cilloni 等报道, 当将原代 CML 细胞或 EphA3 转染的正常细胞与被称为阻断抗体的特异性单克隆抗体一起孵育时, 所述抗体诱导原代细胞和转染细胞的增殖显著下降, 集落生长降低并诱导向粘附特征的改变。所述抗体在正常对照细胞或慢性期 CML 患者的细胞中没有诱导任何显著的改变。

[0007] 还没有关于 EphA3 是其它骨髓增生性病症中的治疗靶标的报道。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明在一定程度上基于以下发现: 获自慢性骨髓性白血病 (CML)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性骨髓单核细胞白血病 (CMML)、青少年骨髓单核细胞白血病 (JMML)、骨髓增生异常综合症 (MDS)、真性红细胞增多症 (PV)、原发性血小板增多症 (ET) 或特发性骨髓纤维化 (EVI) 患者的骨髓和外周血样品中的瘤性骨髓细胞 (包括瘤性骨髓干细胞) 在其细胞表面表达 EphA3 蛋白, 并且可以用活化的抗 EphA3 抗体或诱导 ADCC 的抗体杀伤这类细胞。

[0010] 一方面,本发明提供了杀伤 AML 细胞、MDS 细胞、CMML 细胞、JMML 细胞、CML 细胞、PV 细胞、ET 细胞或 IM 细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与抗 EphA3 抗体接触。一方面,本发明提供了治疗 AML、CCML、JMML、MDS、CML、PV、ET 或 IM 患者的方法,所述方法包括给予所述患者抗 EphA 抗体。在一些实施方案中,所述抗 EphA3 抗体使 EphA3 二聚化。在一些实施方案中,所述抗 EphA3 抗体激活 EphA3 并通过凋亡杀伤靶细胞。在一些实施方案中,所述抗 EphA3 抗体通过诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 杀伤靶细胞。在一些实施方案中,本发明提供了杀伤在表面上表达 EphA3 的骨髓增生性病症细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与抗 EphA3 抗体接触,其中所述抗 EphA3 抗体 (i) 激活 EphA3 和 (ii) 诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。在一些实施方案中,本发明提供了治疗患有骨髓增生性病症并具有在细胞表面上表达 EphA3 的骨髓增生性病症细胞的患者方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的抗 EphA3 抗体,其中所述抗 EphA3 抗体 (i) 激活 EphA3 和 (ii) 诱导 ADCC。在一些实施方案中,本发明提供了杀伤在表面上表达 EphA3 的骨髓增生性病症细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与激活 EphA3 或诱导 ADCC 的抗 EphA3 抗体接触,其中所述骨髓增生性病症细胞是急性骨髓性白血病 (AML) 细胞或骨髓增生异常综合征 (MDS) 细胞。在一些实施方案中,本发明提供了治疗患有骨髓增生性病症并具有在细胞表面上表达 EphA3 的骨髓增生性病症细胞的患者方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的抗 EphA3 抗体,其中所述抗 EphA3 抗体激活 EphA3 或诱导 ADCC,其中所述骨髓增生性病症是 AML 或 MDS。

[0011] 在一些实施方案中,本发明方法所用的抗 EphA3 抗体是重组或嵌合抗体。在一些实施方案中,所述抗 EphA3 抗体是人抗体。所述抗 EphA3 抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗 EphA3 抗体是包含 Fab、Fab' 或 Fv 的多价抗体。在一些实施方案中,所述抗体是 $F(ab')_2$ 。在一些实施方案中,所述抗 EphA3 抗体与 mAb IIIA4 竞争结合 EphA3。在一些实施方案中,所述抗体与 mAb IIIA4 结合相同的表位。在典型的实施方案中,所述抗体不阻断 ephrin 配体 (例如, ephrin-A5) 与 EphA3 的结合。在一些实施方案中,所述抗 EphA3 抗体包含 mAb IIIA4 的 V_H 和 V_L 区。在一些实施方案中,所述抗 EphA3 抗体包含 mAb IIIA4 的 V_H 和 V_L 区的 CDR1、CDR2 和 CDR3。在一些实施方案中,所述抗体包含 mAb IIIA4 的 V_H 区 CDR3 和 V_L 区 CDR3。在一些实施方案中,所述抗体诱导 ADCC。因此,在一些实施方案中,所述抗体具有活性同种型,例如,所述抗体具有人重链 $\gamma 1$ 或 $\gamma 3$ 恒定区。在一些实施方案中,所述抗体不诱导 ADCC,例如所述抗体具有人重链 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 恒定区。

[0012] 在本发明的背景下,“激活 EphA3 或诱导 ADCC 的抗 EphA3 抗体”是指 (i) 激活 EphA3、(ii) 诱导 ADCC 或 (iii) 激活并诱导 ADCC 的抗体。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,用本文所述的抗 EphA3 抗体治疗骨髓增生性病症患者,并且所述患者还接受所述疾病的另一种治疗剂的治疗。因此,在一些实施方案中,所述方法包括给予一种或多种其它治疗剂。例如,当骨髓增生性病症是 CML 时,其它治疗剂包括甲磺酸伊马替尼 (imatinib mesylate)、尼罗替尼 (nilotinib)、达沙替尼 (dasatinib) 或另一种化疗剂。当骨髓增生性病症是 AML 时,所述其它治疗剂可以是单独的阿糖胞苷或阿糖胞苷与柔红霉素的组合。

[0014] 正常的骨髓母细胞和干细胞在其细胞表面上不表达 EphA3。因此,另一方面,本发

明提供了鉴定骨髓增生性病症患者是否是抗 EphA3 抗体治疗的候选者的方法,其中所述方法包括检测所述患者的骨髓母细胞和 / 或干细胞的 EphA3 表达。

[0015] 在一些实施方案中,本发明提供了确定 AML 患者或 MDS 患者是否是抗 EphA3 抗体治疗的候选者的方法,所述方法包括:提供所述患者的样品,其中所述样品包含骨髓增生性病症细胞;和检测所述骨髓增生性病症细胞上 EphA3 的表达。在一些实施方案中,本发明提供了确定 CMPD 患者是否是抗 EphA3 抗体治疗的候选者的方法,所述方法包括:提供所述患者的包含瘤性干细胞的样品;和检测所述瘤性干细胞的 EphA3 表达。在一些实施方案中,本发明提供了监测具有 EphA3⁺ 骨髓增生性细胞的骨髓增生性病症患者的治疗功效的方法,其中所述骨髓增生性病症是 AML 或 MDS,所述方法包括:从进行了骨髓增生性病症治疗性处理之后的患者获得包含骨髓增生性病症干细胞和 / 或母细胞的样品;和检测所述骨髓增生性病症干细胞和 / 或母细胞上 EphA3 的表达。在一些实施方案中,本发明提供了监测具有表达 EphA3 的瘤性骨髓增生性病症干细胞的 CMPD 患者的治疗功效的方法,所述方法包括:从进行了 CMPD 治疗性处理后的患者获得包含瘤性干细胞的样品;和检测所述干细胞上 EphA3 的表达。

[0016] 可以使用公知的技术检测 EphA3 表达。因此,在一些实施方案中,检测 EphA3 的表达包括,例如,使用流式细胞仪检测细胞表面的蛋白表达。在一些实施方案中,所述检测 EphA3 表达的步骤包括,例如,使用诸如 RT-PCR 的扩增反应检测 EphA3RNA 水平。

[0017] 本发明还提供了用于治疗骨髓增生性病症患者的、包含本文所述的抗 EphA3 抗体的药物组合物。

[0018] 附图简要说明

[0019] 图 1 提供的数据显示工程化人抗 EphA3 抗体与白血病干细胞的结合。用以下抗体对 AML 原代骨髓细胞进行染色,用于流式细胞仪分析(每个样品 50,000 个事件):工程化人抗 EphA3 抗体或 IgG1 对照和 FITC 偶联的抗人 IgG;PE 偶联抗 CD34;PEcy5 偶联抗 CD38;和 APC 偶联抗 CD123 抗体。A)CD34 分析的同种型对照画门。(B)用抗 EphA3 和抗 CD34 染色的样品。(C)CD34 和 CD38 染色的样品(R2 表示 CD34⁺CD38⁻细胞)。(D)对 CD34⁺CD38⁻细胞上 EphA3 和 CD123 表达的鉴定(R2 门)。

[0020] 图 2 提供的数据表明工程化人抗 EphA3 抗体诱导 CD16 介导的 ADCC 活性。将来自原发性血小板增多症患者的外周血单核细胞用作靶标。在所示浓度的抗 EphA3 抗体的存在下,以 200 : 1 的效应细胞:靶标的比例添加正常个体的 PBMC 效应细胞。在抑制 Fc 介导的效应功能的抗 CD16 抗体的存在下(圆形)或在不存在 CD16 阻断抗体的条件下(三角形),通过测定 16 小时后的 LDH 释放来分析 ADCC 活性。

[0021] 图 3 提供的数据显示 α 1,6 岩藻糖缺陷型工程化人抗 EphA3 抗体(IgG1k)表现出增强的 ADCC 活性。LK63 靶细胞与所示浓度的岩藻糖基化的抗 EphA3 抗体(阴影线柱)或 kifunensine 处理的细胞所产生的 α 1,6 岩藻糖缺陷型抗体(实心柱)一起孵育。以 100 : 1 的效应细胞:靶标的比例添加 PBMC 效应细胞,持续 16 小时,并通过测定 LDH 释放确定 ADCC 活性。

[0022] 图 4 提供了人工程化抗体的凋亡活性数据。来自 CML 患者的骨髓细胞(通过流式细胞仪 98% 为 EphA3⁺)与所示浓度的人工程化抗 EphA3 抗体或 IgG1 对照抗体一起于 96 孔微滴定孔(每孔 2×10^5 个细胞)中孵育 24 小时。然后用膜联蛋白 V-FITC 和碘化丙啶对

细胞进行染色,并进行流式细胞仪分析。显示经历凋亡(膜联蛋白 V- 阳性)的细胞的百分比。

[0023] 发明的详细描述

[0024] 本文使用的术语“骨髓增生性病症”是指分类为慢性骨髓增生性病症(CMPD)的某些慢性骨髓增生性疾病;急性骨髓性白血病(AML);骨髓增生异常综合症(MDS);慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML);和青少年骨髓单核细胞性白血病(JMML)。在本发明的背景下,“骨髓增生性病症”因而是指慢性骨髓性白血病(CML);真性红细胞增多症(PV);原发性血小板增多症(ET);特发性骨髓纤维化(IM),也被称为原发性骨髓纤维化;AML;MDS;CMML和JMML。术语“JMML”包括被称为青少年慢性骨髓性白血病(JCML)、婴儿慢性骨髓单核细胞白血病和婴儿期单体7综合症的所有诊断。可以利用已知的标准诊断骨髓增生性病症,例如世界卫生组织(WHO)标准、法美英(FAB)分类系统、国际预后评分系统(IPSS)等。在2008年WHO分类中,CMPD被称为骨髓增生性瘤(MPN)。骨髓增生性病症常见的特征为存在特定的突变。例如,CML的特征为存在BCR-ABL。PV、ET和IM是“非BCR-ABL”(本文还称为“无BCR-ABL”或“BCR-ABL阴性”)的CMPD,因为这些病症没有BCR-ABL。但是BCR-ABL阴性病症的特征通常为存在JAK2突变,该突变在CML中是罕见的。

[0025] 本文使用的术语“骨髓干细胞”或“干细胞”是特征为CD34⁺、CD123⁺和CD38⁻的造血干细胞。

[0026] 术语“骨髓增生性病症细胞”是指具有骨髓增生性病症特征的瘤性骨髓细胞。该术语包括可能还未被认为是恶性的骨髓细胞(例如具有骨髓增生异常综合症特征的骨髓细胞)以及诸如恶性急性白血病细胞的恶性细胞。该术语包括母细胞和干细胞。

[0027] 本文可交替使用的术语“癌细胞”或“肿瘤细胞”是指瘤性细胞。该术语包括良性以及恶性的细胞。瘤性转化与肿瘤细胞相对于其所来源于的细胞类型的表型改变有关。所述改变可以包括接触抑制的消失,形态改变和异常生长(参见,Freshney,Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique(第3版,1994))。

[0028] 本发明背景下的“抑制癌的生长”是指减慢骨髓增生性病症患者的癌细胞负载的生长和/或降低癌细胞负载。因此,“抑制癌的生长”包括杀伤癌细胞。

[0029] 本文使用的“EphA3”是指Eph受体A3。该受体还被称作“人胚胎激酶”、“hek”、“eph样酪氨酸激酶1”、“etk1”或“tyro4”。EphA3属于蛋白酪氨酸激酶家族中的ephrin受体亚家族。EPH和EPH相关受体参与介导发育事件。

[0030] EPH亚家族的受体通常具有单个激酶结构域和1个胞外区,所述胞外区包含1个Cys富集结构域和2个III型纤维连接蛋白重复。基于ephrin受体的胞外结构域序列的相似性及它们结合ephrin-A和ephrin-B配体的亲和力,将ephrin受体分成两组。EphA3与ephrin-A配体结合。EphA3核酸和蛋白序列是已知的。示例性的人EphA3氨基酸序列可以通过登录号(EAW68857)获得。

[0031] 为了本发明的目的,EphA3的“活化”引起EphA3的磷酸化和凋亡。激活EphA3的抗体或“激活抗体”引起EphA3的磷酸化和凋亡,并且因而被认为是本发明背景中的激动剂。EphA3可通过二聚化而被激活,这引起凋亡。在一些实施方案中,激活EphA3的抗体与mAb IIIA4竞争结合EphA3。通常,“激活”抗体与配体结合结构域(EphA3的氨基酸29-202)结合,其中氨基酸残基131、132和136对结合是至关重要的。在一些实施方案中,所述激活抗

体与包括人 EphA3 蛋白的配体结合结构域中的残基 131、132 和 136 的位点结合。

[0032] 在本发明中,“EphA3 抗体”或“抗 EphA3 抗体”可以互换使用,是指与 EphA3 特异性地结合的抗体。在一些实施方案中,所述抗体可以使 EphA3 二聚化。该术语包括在存在 ephrin 配体(例如, ephrin-A5)结合的情况下与 EphA3 结合的抗体,以及能够与配体结合位点结合的抗体。

[0033] “在存在 ephrin 配体结合的情况下与 EphA3 结合的 EphA3 抗体”是指不显著阻止诸如 ephrin-A5 的 ephrin 配体与 EphA3 结合的抗体。包含 EphA3 和 ephrin 配体(例如 ephrin-A5)的结合反应中这种抗体的存在使 ephrin 配体与 EphA3 的结合降低少于约 30%,通常少于 20%或 10%。

[0034] 术语“mAb IIIA4”是指单克隆抗体 IIIA4,其最初是针对 LK63 人急性前 B 白血病细胞而被激发的,以用于亲和分离 EphA3(Boyd, et al. J Biol Chem 267 :3262-3267,1992)。mAb IIIA4 与天然 EphA3 球状 ephrin 结合结构域结合(例如,Smith,et al.,J. Biol. Chem 279 :9522-9531,2004)。它被保藏于欧洲动物细胞培养物保藏中心(European Collection of Animal Cell Cultures),登录号为 91061920(参见,例如,EP 专利号 EP0590030)。

[0035] 本文使用的“具有活性同种型的抗体”是指具有能够与免疫效应细胞上存在的 Fc 受体结合的人 Fc 区的抗体。“活性同种型”包括 IgG1、IgG3、IgM、IgA 和 IgE。该术语包括具有包含调节 Fc 效应功能的修饰的人 Fc 区的抗体,所述修饰例如糖基化的糖组成和/或水平的突变或改变。

[0036] “Fc 区”是指除第一恒定区免疫球蛋白结构域外的抗体恒定区。因此,Fc 是指 IgA、IgD 和 IgG 的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域,IgE 和 IgM 的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域,以及这些结构域的柔性铰链 N 端。对 IgA 和 IgM,Fc 可以包括 J 链。对于 IgG,Fc 包括免疫球蛋白结构域 C γ 2 和 C γ 3 以及 C γ 1 和 C γ 之间的铰链。本领域内应当理解,Fc 区的边界可以变化,但是,人 IgG 重链 Fc 区通常被定义为包括残基 C226 或 P230 到其羧基端,利用的编号是根据 Kabat 等的 EU 索引(1991, NTH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.)。术语“Fc 区”可以表示分离的该区域,或表示抗体或抗体片段环境中的该区域。“Fc 区”包括 Fc 区的天然存在的等位基因变体以及调节效应功能的修饰。Fc 区还包括不引起生物功能改变的变体。例如,可以从免疫球蛋白 Fc 区的 N 端或 C 端缺失一个或多个氨基酸而基本上不损失生物功能。可以根据本领域已知的一般规则选择这类变体以便对活性的影响最小(参见,例如,Bowie,et al., Science 247 :306-1310,1990)。

[0037] 本文使用的“抗体”是指这样的一种蛋白:其在功能上被定义为结合蛋白,并且在结构上被定义为包含被本领域技术人员公认的、来源于编码产抗体动物的基因的免疫球蛋白的框架区的氨基酸序列。抗体可以由一个或多个多肽组成,所述多肽基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及众多的免疫球蛋白可变区基因。轻链被分为 κ 或者 λ 。重链被分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或者 ϵ ,其分别依次定义免疫球蛋白类型 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

[0038] 已知典型的免疫球蛋白(抗体)结构单元包括四聚体。每个四聚体由两个相同的多肽链对组成,每对具有一条“轻”链(大约 25kD)和一条“重”链(大约 50-70kD)。每条链的 N 端界定大约 100 到 110 个或者更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语

可变轻链 (V_L) 和可变重链 (V_H) 分别表示这些轻链和重链。

[0039] 本文使用的术语“抗体”包括保留结合特异性的抗体片段。例如,存在大量良好表征的抗体片段。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区的二硫键的 C 端消化抗体而产生 $F(ab)'_2$, 它是 Fab 的二聚体,其自身是通过二硫键与 $VH-CH1$ 连接的轻链。在温和条件下, $F(ab)'_2$ 可以被还原来断裂铰链区的二硫键,从而将 $(Fab')_2$ 二聚体转化为 Fab' 单体。 Fab' 单体本质上是具有部分铰链区的 Fab (参见, *Fundamental Immunology* (基础免疫学), W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993) 对于其他抗体片段更详细的说明)。尽管不同抗体片段是以完整抗体的消化来限定,本领域技术人员应当理解,可以通过化学方法或利用重组 DNA 方法重新合成片段。因此,本文使用的术语抗体还包括通过完整抗体的修饰而产生的抗体片段或利用重组 DNA 方法合成的抗体片段。

[0040] 抗体包括 V_H-V_L 二聚体, V_H-V_L 二聚体包括诸如单链 Fv 抗体 (sFv 或 scFv) 的单链抗体 (以单一多肽链存在的抗体),其中可变重链区和可变轻链区被连接到一起 (直接地或通过肽接头) 而形成连续多肽。单链 Fv 抗体是共价连接的 V_H-V_L ,其可以从包括直接连接的或通过肽编码接头连接的 V_H 和 V_L 编码序列的核酸表达 (例如, Huston, et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85 :5879-5883, 1988)。尽管 V_H 和 V_L 作为单条多肽链互相连接,但 V_H 和 V_L 结构域非共价相联。

[0041] 或者,抗体可以是另一片段。例如,还可以利用重组技术来产生可溶性蛋白或获自展示方法的片段形式的其它片段。抗体还可以包括双抗体 (diantibodies) 和微型抗体。本发明的抗体还包括重链二聚体,例如来自骆驼 (camelid) 的抗体。为了本发明的目的,所用抗体的形式可以激活骨髓增生性细胞表面上存在的 EphA3 或者可以通过 ADCC 杀伤骨髓增生性细胞。因此,在一些实施方案中,抗体是二聚体。在其它实施方案中,抗体可以为具有活性同种型的单体形式。在一些实施方案中,抗体为可以与 EphA3 进行交联的多价形式,例如,三价或四价形式。

[0042] 本文使用的“V-区”是指抗体可变区结构域,其包含框架 1、CDR1、框架 2、CDR2 和框架 3 的节段,包括 CDR3 和框架 4,该节段是由于 B 细胞分化期间重链和轻链 V-区基因的重排被添加到 V-节段。

[0043] 本文使用的“互补决定区 (CDR)”是指每条链的三个高变区,其分隔开由轻链和重链可变区确定的 4 个“框架”区。CDR 主要负责与抗原表位的结合。每条链的 CDR 通常从 N 端开始连续编号,被称为 CDR1、CDR2 和 CDR3,并且通常由特定 CDR 所处的链来识别。因此, V_H CDR3 位于其所在抗体的重链的可变结构域,而 V_L CDR1 是来自其所在抗体的轻链可变结构域的 CDR1。

[0044] 在一个物种内不同轻链或重链的框架区序列是相对保守的。抗体的框架区 (即组成性轻链和重链的联合框架区) 用于在三维空间中定位和排列 CDR。

[0045] 可以利用本领域各种公知的定义来确定 CDR 和框架区的氨基酸序列,例如, Kabat, Chothia, 国际 ImMunoGeneTics 数据库 (IMGT), 和 AbM (参见, 例如, Johnson et al., 同上; Chothia & Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (免疫球蛋白高变区的典型结构). *J. Mol. Biol.* 196, 901-917; Chothia C. et al., 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions (免疫球蛋白高变区的构象). *Nature* 342, 877-883; Chothia C. et al., 1992, structural repertoire

of the human VH segments(人 VH 节段的结构组成). J. Mol. Biol. 227,799-817; Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol 1997,273(4))。

[0046] 抗原结合位点的定义还描述于下列文献:Ruiz et al., IMGT, 国际 ImMunoGeneTics 数据库. Nucleic Acids Res., 28,219-221(2000); 和 Lefranc, M.-P. IMGT, 国际 ImMunoGeneTics 数据库. Nucleic Acids Res. Jan 1;29(1):207-9(2001); MacCallum et al., Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography(抗体-抗原相互作用:接触分析和结合位点拓扑图), J. Mol. Biol., 262(5),732-745(1996); 和 Martin et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86, 9268-9272(1989); Martin, et al., Methods Enzymol, 203,121-153, (1991); Pedersen et al., Immunomethods, 1,126, (1992); 和 Rees et al., In Sternberg M. J. E. (ed.), Protein Structure Prediction(蛋白结构预测). Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

[0047] “表位”或“抗原决定簇”是指抗原上的抗体结合位点。表位可以由连续氨基酸形成,或由蛋白的三级折叠所安排的非连续氨基酸形成。当暴露于变性溶剂时,由连续氨基酸形成的表位通常被保留,而由三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理时通常丢失。表位通常包含处于特定空间构象的至少 3 个氨基酸,更常见的,至少 5 或 8-10 个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括,例如, X-射线晶体衍射法和二维核磁共振。参见,例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology(分子生物学方法的表位作图实验步骤), Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed(1996)。

[0048] 本文使用的“嵌合抗体”是指这样的免疫球蛋白分子,其中 (a) 恒定区或其一部分被改变、替换或交换,使得抗原结合位点(可变区)与不同的或改变的类型、效应功能和/或物种的恒定区连接,或与赋予嵌合抗体新特性的完全不同的分子(例如,酶、毒素、激素、生长因子、药物等)连接;或 (b) 可变区或其一部分被改变、替换或与具有不同或改变抗原特异性的可变区或其一部分交换;或与另一物种或另一抗体类型或亚类的相应序列交换。

[0049] 本文使用的“人源化抗体”是指这样的免疫球蛋白分子,其中来自供体抗体的 CDR 被移植到人框架序列上。人源化抗体的框架序列中还可以包含供体来源的残基。人源化抗体还可以包含人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。人源化抗体还可以包含既不存在于受体抗体也不存在于输入的 CDR 或者框架序列中的残基。可以利用本领域已知的方法进行人源化(例如, Jones et al., Nature 321:522-525;1986; Riechmann et al., Nature 332:323-327,1988; Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536,1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596,1992; 美国专利号 4,816,567), 包括诸如“超级人源化”抗体 (Tan et al., J. Immunol. 169:1119,2002) 和“表面重建”(例如, Staelens et al., Mol. Immunol. 43:1243,2006; 和 Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969,1994) 的技术。

[0050] 在本发明的背景下,“人工程化(humaneered™)”的抗体是指具有参照抗体的结合特异性的工程化人抗体。本发明所用的工程化人抗体具有包含源自供体免疫球蛋白的最小序列的免疫球蛋白分子。在一些实施方案中,所述工程化人抗体可以仅保留参照抗体 CDR3 区的最小必需结合特异性决定簇。通常,通过将编码来自参照抗体重链 CDR3 区的结合特异性决定簇(BSD)的 DNA 序列与人 V_H 节段序列连接,并将参照抗体的轻链 CDR3 BSD 与人 V_L

节段序列连接,从而工程化得到工程化人抗体。“BSD”是指介导结合特异性的 CDR3-FR4 区或该区的一部分。因此,结合特异性决定簇可以是 CDR3-FR4、CDR3、CDR3 的最小必需结合特异性决定簇(其指当存在于抗体 V 区时赋予结合特异性的任何小于 CDR3 的区)、D 节段(关于重链区),或赋予参照抗体结合特异性的 CDR3-FR4 的其它区。工程化人抗体的方法提供在美国专利申请公开第 20050255552 号和美国专利申请公开第 20060134098 号中。

[0051] 本文使用的术语“人抗体”是指本质上是人的抗体,即具有人免疫系统的 FR 区以及通常有 CDR 区。因此,该术语包括人源化的和人工程化(humaneered™)的抗体以及从利用人免疫系统重建的小鼠分离出的抗体和从展示文库分离到的抗体。

[0052] “低岩藻糖基化(hypofucosylated)”的抗体制剂是指 α 1,6-岩藻糖的平均含量少于天然存在的 IgG 抗体制剂的 50%的抗体制剂。如本领域内所理解的,“低岩藻糖基化”是用来指抗体的群体。

[0053] “去岩藻糖基化”的抗体缺少与 IgG 重链的 CH2 结构域连接的 α 1,6-岩藻糖。

[0054] 当涉及核酸部分时,使用的术语“异源的”表示该核酸包括两个或更多个子序列,所述子序列通常在自然界彼此之间不具有相同的关联。例如,通常通过重组方式产生核酸,所述核酸具有例如来自无关基因的两个或更多个序列,经排列而形成新的功能性核酸。同样,异源蛋白通常是指两个或更多个在自然界彼此之间不具有相同的关联的子序列。

[0055] 当涉及例如细胞、核酸、蛋白或载体时,使用的术语“重组的”表示所述细胞、核酸、蛋白或载体已经通过导入异源核酸或蛋白或天然核酸或蛋白的改变而被修饰,或所述细胞来源于如此修饰过的细胞。因此,例如,重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞中不存在的基因,或者表达异常表达、低表达或者根本不表达的天然基因。本文的术语“重组核酸”表示最初通过例如利用聚合酶和核酸内切酶来操作核酸而在体外形成的通常不在自然界中存在的形式的核酸。采用这种方式可以实现不同序列的可操作连接。因此,线性形式的分离的核酸,或通过通常不连接的 DNA 分子连接在一起而体外形成的表达载体,都被认为是本发明目的中的重组。应当理解,一旦制备重组核酸并将其再导入宿主细胞或生物体,它将非重组地复制,即,利用宿主细胞的体内细胞机制而不是体外操作进行复制;但是,一旦重组产生这种核酸,尽管随后是非重组地复制,其仍被认为是本发明目的中的重组。同样,“重组蛋白”是利用重组技术,即通过如上文所述的重组核酸的表达而制备的蛋白。

[0056] 当涉及蛋白或肽时,短语与抗体“特异性(或选择性)地结合”或“特异性(或选择性)地与...发生免疫反应”是指所述抗体与目的蛋白的结合反应。在本发明的背景下,抗体与 EphA3 的结合亲和力通常为其与其它抗原的结合亲和力的至少 100 倍。

[0057] 术语“平衡解离常数(K_D)”是指解离速率常数(k_d , 时间⁻¹)除以结合速率常数(k_a , 时间⁻¹, M⁻¹)。可以用本领域内已知的任何方法测定平衡解离常数。本发明的抗体是高亲和力抗体。这类抗体的亲和力超过 500nM、通常超过 50nM 或 10nM。因此,在一些实施方案中,本发明的抗体的亲和力为 500nM-100pM、或 50 或 25nM-100pM、或 50 或 25nM-50pM 或 50nM 或 25nM-1pM。

[0058] 本文使用的“癌治疗剂”是指以治疗有效量给予癌症患者时,能治愈或至少部分遏制疾病的症状以及与疾病相关的并发症的试剂。

[0059] 对于两个或更多个多肽(或核酸)序列,术语“相同的”或者“同一性”百分比是指通过使用下文所述默认参数的 BLAST 或者 BLAST2.0 序列比较算法,或者通过手动比对和

肉眼检查（参见，例如，NCBI 网站）测定时，两个或更多个序列或子序列是相同的或具有规定百分比的相同氨基酸残基（或核苷酸）（即，当在比较窗口或者指定区域内进行最大对应性的比较和比对时，在规定区域具有约 60% 的同一性，优选 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或者更高的同一性）。这些序列被称为“基本上相同的”。“基本上相同的”序列还包括具有缺失和 / 或添加的序列，以及具有取代的序列，以及天然存在的变体，例如，多态性或等位基因变体和人工变体。如下所述，优选的算法能够解决空位等问题。优选地，蛋白序列同一性存在于至少为约 25 个氨基酸长的区，或更优选为 50-100 个氨基酸长的区，或蛋白的全长。

[0060] 本文使用的“比较窗口”包括一段序列的参照，该序列的连续位置数通常选自 20 至 600，通常约 50 至约 200，更通常约 100 至约 150，其中对两个序列进行最佳比对后，一个序列可以与相同连续位置数的参照序列进行比较。用于序列比较比对方法是本领域公知的。可以通过如下方法进行用于序列比较的最佳比对，例如，Smith & Waterman 的局部同源性算法，*Adv. Appl. Math.* 2 :482(1981)，Needleman & Wunsch 的同源性比对算法，*J. Mol. Biol.* 48 :443(1970)，Pearson & Lipman 的相似性方法搜索，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85 :2444(1988)，这些算法的计算机化实施方式 (Wisconsin Genetics Software Package 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTAW，Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)，或手动比对和肉眼检查（参见，例如，*Current Protocols in Molecular Biology*（现代分子生物实验技术）(Ausubel et al., eds. 1995 supplement)）。

[0061] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性百分比的算法的优选实例包括 BLAST 和 BLAST 2.0 算法，如 Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25 :3389-3402(1977) 和 Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215 :403-410(1990) 中所述。利用本文描述的参数通过 BLAST 和 BLAST 2.0 测定本发明核酸和蛋白的序列同一性百分比。BLASTN 程序（对于核苷酸序列）使用以下默认值：字符长 (W) 为 11，预期值 (E) 为 10， $M = 5$ ， $N = -4$ 和两条链的比较。对于氨基酸序列，BLASTP 程序使用以下默认值：字符长为 3，预期值 (E) 为 10 和 BLOSUM62 评分矩阵（参见 Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 :10915(1989)）比对 (B) 为 50，预期值 (E) 为 10， $M = 5$ ， $N = -4$ 和两条链的比较。

[0062] 两条多肽基本上相同表示第一多肽与针对第二多肽产生的抗体发生免疫交叉反应。因此，例如，当两条肽的区别仅为保守型取代时，第一多肽与第二多肽通常是基本上相同的。

[0063] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学纯的”的物质是指本质上或基本上不含在天然状态下通常与之相伴的组分的物质。通常利用诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法的分析化学技术来确定纯度和同质性。制剂中以优势种类存在的蛋白是基本上纯化的。在一些实施方案中，术语“纯化的”表示蛋白在凝胶电泳中基本上只产生一个条带。优选地，这表示该蛋白至少为 85% 纯，更优选的至少为 95% 纯，最优选的至少为 99% 纯。

[0064] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可以互换使用，是指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于这样的氨基酸聚合物，其中一个或者多个氨基酸残基是对应天然存在氨基酸的人工化学模拟物，这些术语也适用于包含修饰残基的天然存在的氨基酸聚合物、和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0065] 术语“氨基酸”，是指天然存在的和合成的氨基酸，以及与天然存在的氨基酸功能

类似的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及随后进行修饰的氨基酸,例如,羟脯氨酸, γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构的化合物,例如,与氢、羧基、氨基和 R 基结合的 α 碳,例如,高丝氨酸,正亮氨酸,甲硫氨酸亚砷,甲硫氨酸甲基砷。这种类似物可以具有修饰的 R 基(例如,正亮氨酸)或者修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”是指这样的化合物,其结构不同于氨基酸的一般化学结构,但功能类似于天然存在的氨基酸。

[0066] 本文的氨基酸可以用它们公知的 3 字母代号或者 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会(Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母代号表示。同样地,核苷酸可以用它们公认的单字母代码表示。

[0067] “保守型修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。对于具体的核酸序列,保守型修饰的变体是指编码相同的或者基本上相同的氨基酸序列的核酸,或当核酸不编码氨基酸序列时,表示基本上相同的或相关的(例如,天然连续的)序列。因为遗传密码具有简并性,很多功能相同的核酸编码大部分蛋白。例如,密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 均编码丙氨酸。因此,在由密码子规定为丙氨酸的每个位置,该密码子可以被改变为另一个所述对应密码子而不会改变编码的多肽。这种核酸变异是“沉默变异”,这是保守型修饰变异中的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列还描述了该核酸的沉默变异。本领域技术人员应当理解,在一定情况下,核酸中的每个密码子(除了 AUG 和 TGG, AUG 通常是甲硫氨酸的唯一密码子, TGG 通常是色氨酸的唯一密码子)都可以被修改而产生功能相同的分子。因此,对于表达产物来说描述的序列通常隐含编码多肽的核酸的沉默变异,但这不适用于实际使用的探针序列。

[0068] 对于氨基酸序列而言,本领域技术人员应当理解,如果对核酸、肽、多肽或蛋白序列的各个取代、缺失或添加仅改变、添加或缺失编码序列中的单个氨基酸或小部分氨基酸,则认为是“保守型修饰的变体”,其中所述改变导致氨基酸被化学类似的氨基酸取代。提供功能相似氨基酸的保守取代表是本领域公知的。这种保守型修饰的变体是除本发明的多态性变体、种间同系物和等位基因之外,但并不排除它们。通常,保守型取代在以下彼此之间进行:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天门冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见,例如 Creighton, Proteins(1984))。

[0069] 术语“a”或“an”通常意图表示“一个或多个”,除非文中指出并非这样。

[0070] 引言

[0071] 本发明在一定程度上基于以下发现:可以通过使表达 EphA3 的骨髓增生性病症细胞与激活抗体和/或诱导 ADCC 的抗体接触来杀伤骨髓增生性病症患者中的表达 EphA3 的瘤性母细胞和/或瘤性干细胞。因此,一方面,本发明提供了治疗 CML、PV、ET、IM、AML、MDS、CMML 或 JMML 患者的方法,包括给予患者抗 EphA3 激活抗体。在一些实施方案中,本发明的方法包括将诱导 ADCC 的抗 EphA3 抗体给予 CML、PV、ET、IM、AML、MDS、CMML 或 JMML 患者。在一些实施方案中,给予 CML、PV、ET、IM、AML、MDS、CMML 或 JMML 患者的抗 EphA3 抗体(i)是抗 EphA3 激活抗体并(ii)诱导 ADCC。

[0072] 在一些实施方案中,用于本发明的抗 EphA3 抗体不阻断 EphA3 与 ephrin(例如, ephrin-A5)的结合。在一些实施方案中,所述抗体使 EphA3 二聚化。在一些实施方案中,所述抗体与 EphA3 进行交联。在一些实施方案中,所述抗体与 mAb IIIA4 竞争结合 EphA3,例如,所述抗体可以与 Mab IIIA4 结合相同的表位。在一些实施方案中,所述抗体具有活性同种型,其中重链恒定结构域可以与免疫效应细胞上存在的 Fc 受体结合,导致 ADCC。

[0073] 抗 EphA3 抗体

[0074] 可以利用 EphA3 蛋白或片段激发本发明的抗 EphA3 抗体,或通过重组方法产生本发明的抗 EphA3 抗体。许多技术都可用于测定抗体结合特异性。参见,例如,Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (抗体:实验室手册)(1988),其中描述了可用于测定抗体的特异性免疫反应性的免疫分析形式及条件。

[0075] 在一些实施方案中,抗 EphA3 抗体是多克隆抗体。制备多克隆抗体的方法是本领域技术人员已知的(例如,Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory manual* (抗体:实验室手册)(1988); *Methods in Immunology*)。可以在哺乳动物中通过一次或多次免疫剂注射来激发多克隆抗体,并且如果需要,注射佐剂。所述免疫剂包括 EphA3 受体蛋白或其片段。

[0076] 在一些实施方案中,抗 EphA3 抗体是单克隆抗体。可以利用杂交瘤法制备单克隆抗体,例如 Kohler & Milstein *Nature* 256:495(1975)描述的方法。在杂交瘤法中,通常用免疫剂来免疫小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物以激发淋巴细胞,所述淋巴细胞产生或能够产生特异性结合该免疫剂的抗体。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。

[0077] 可以利用本领域已知的各种技术产生人单克隆抗体,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581(1991))。Cole 等人和 Boerner 等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (单克隆抗体和癌症疗法), p. 77(1985)和 Boerner et al., *J. Immunol.* 147(1):86-95(1991))。同样,可以通过将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物(例如,内源免疫球蛋白基因部分失活或完全失活的小鼠)来制备人抗体。通过激发,观察到人抗体的产生,其在各个方面与在人类中观察到的抗体非常类似,包括基因重排、组装和抗体各项功能。该方法描述于例如,美国专利第 5,545,807 号、第 5,545,806 号、第 5,569,825 号、第 5,625,126 号、第 5,633,425 号、第 5,661,016 号,和下列科学出版物: Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783(1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996); Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995)。

[0078] 在一些实施方案中,抗 EphA3 抗体是嵌合或人源化的单克隆抗体。如上文所述,抗体的人源化形式是嵌合免疫球蛋白,其中人抗体的 CDR 被具有所需特异性、亲和力及能力的非人物种(诸如小鼠、大鼠或兔)的 CDR 替换。

[0079] 本发明使用的抗体可以是多种形式。在一些实施方案中,抗体可以包括 Fc 区,例如人 Fc 区。例如,该抗体包括结合 EphA3 并具有活性同种型的 IgG 抗体。在一些实施方案中,所述抗体可以是抗体的活性片段(例如,可以使 EphA3 二聚化的片段)或可以包含抗体的衍生物,例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv 或单结构域抗体("dAb")。例如,在一些实施方案中,所述抗体可以是 F(ab')₂。可用于本发明的抗体的其它示例性实施方案包

括纳米激活抗体 (nanobodies) 或骆驼激活抗体。还可以利用本领域技术人员公知的方法将这些抗体进行重组工程化。如上所述,可以利用已知的技术产生这些抗体。本领域技术人员应当理解,在一些实施方案中,当抗体采用可以是单价的形式(例如,Fv 或 Fab 形式)时,该抗体作为诸如三价或四价抗体的多价抗体使用。产生多价抗体的方法是已知的(参见,例如,King et al., Cancer Res. 54 :6176-6185,1994)。

[0080] 在许多实施方案中,用于本发明的抗体具有 Fc 恒定区,该 Fc 恒定区具有效应功能,例如,与免疫效应细胞上存在的 Fc 受体结合。示例性的“效应子功能”包括 C1q 结合;补体依赖性细胞毒性;Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC);吞噬;细胞表面受体(例如,B 细胞受体)的下调等。这类效应功能通常需要 Fc 区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)进行联合,并可以利用已知的分析法评价这类效应功能(参见,例如,下文引用的参考文献)。

[0081] 具有活性同种型并与效应细胞(诸如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞和 NK 细胞)上的 Fc 受体结合的抗 EphA3 抗体可以通过 ADCC 诱导细胞死亡。

[0082] Fc 区可以来自天然存在的 IgG1,或其它活性同种型,包括 IgG3、IgM、IgA 和 IgE。“活性同种型”包括这样的抗体,其中 Fc 区包含修饰而增强与 Fc 受体的结合或者提高抗体功效。这种 Fc 恒定区可以包括增强与 Fc 受体结合的修饰,例如糖基化水平的突变、改变等。本领域中已知许多可用于修饰 Fc 区的方法。例如,美国专利申请公开号 20060039904 描述了具有增强的效应功能的 Fc 受体的变体,所述增强的效应功能包括对一个或多个 Fc 配体(例如, Fc γ R, C1q)的结合亲和力的改变。此外,这种 Fc 变体具有改变的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性。其它 Fc 变体包括以下文献公开的变体:Ghetie et al., Nat Biotech. 15 :637-40,1997; Duncan et al., Nature 332 :563-564,1988;Lund et al., J. Immunol 147 :2657-2662, 1991;Lund et al., Mol Immunol 29 :53-59,1992;Alegre et al., Transplantation 57 :1537-1543,1994;Hutchins et al., Proc Natl Acad Sci USA 92 :11980-11984,1995; Jefferis et al., Immunol Lett. 44 :111-117,1995;Lund et al., FASEB J 9 :115-119, 1995;Jefferis et al., Immunol Lett 54 :101-104,1996;Lund et al., J Immunol 157 :4963-4969,1996;Armour et al., Eur J Immunol 29 :2613-2624,1999;Idusogie et al., J Immunol 164 :4178-4184,2000;Reddy et al., J Immunol 164 :1925-1933,2000;Xu et al., Cell Immunol 200 :16-26,2000;Idusogie et al., J Immunol 166 :2571-2575,2001; Shields et al., J Biol Chem 276 :6591-6604,2001;Jefferis et al., Immunol Lett 82 :57-65,2002;Presta et al., Biochem Soc Trans 30 :487-490,2002;Lazar et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 103 :4005-4010,2006;美国专利第 5,624,821 号、第 5,885,573 号、第 5,677,425 号、第 6,165,745、第 6,277,375 号、第 5,869,046 号、第 6,121,022 号、第 5,624,821 号、第 5,648,260 号、第 6,194,551 号、第 6,737,056 号、第 6,821,505 号、第 6,277,375 号、第 7,335,742 号和第 7,317,091 号;以及 PCT 公开 WO 94/2935、WO 99/58572、WO 00/42072、WO 02/060919 和 WO 04/029207。

[0083] 在一些实施方案中,可以修饰 Fc 区的糖基化。例如,修饰可以是去糖基化,例如,通过改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点。这种方法更详细地描述于美国专利第 5,714,350 号和第 6,350,861 号。还可以制备具有改变的糖基化类型的 Fc 区,诸如岩藻

糖残基的量减少的低岩藻糖基化 Fc 变体或具有增加的二等分 GlcNAc 结构的 Fc 变体。可以通过,例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来实现这类碳水化合物修饰。具有改变的糖基化机制的细胞(包括酵母和植物)在本领域中已有描述,并且可以用做宿主细胞来表达本发明的重组抗体,从而产生具有改变的糖基化的抗体。用于修饰糖基化的技术包括下列文献中公开的技术,例如,Umana et al., Nat. Biotechnol 17:176-180, 1999; Davies, et al., Biotechnol Bioeng. 74:288-294, 2001; Shields et al., J Biol Chem 277:26733-26740, 2002; Shinkawa et al., J Biol Chem 278:3466-3473, 2003; Niwa et al Clin. Cancer Res. 10:6248-6255, 2004; Presta et al., Biochem Soc Trans 30:487-490, 2002; Kanda et al., Glycobiology 17:104-118, 2006; 美国专利第 6,602,684 号、第 6,946,292 号和第 7,214,775 号; 美国专利申请公开号 20070248600、20070178551、20080060092、20060253928; PCT 公开 WO 00/61739、WO 01/292246、WO 02/311140 和 WO 02/30954; 以及 Potillegent™ 技术 (Biowa, Inc. Princeton, N. J.); 和 GlycoMAb™ 糖基化工程技术 (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)。通常在低岩藻糖基化抗体的制备中,抗体分子中的至少 50-70%,通常分子中的至少 80%或分子中的至少 90%缺少岩藻糖。

[0084] 在本发明的一些实施方案中,对抗体进行额外的工程化来降低免疫原性,例如,以便抗体适合于重复给药。用于产生免疫原性降低的抗体的方法包括人源化和人工程化的方法以及诸如脱免疫的修饰技术,在脱免疫中,抗体在例如一个或多个框架区被进一步工程化以去除 T 细胞表位。

[0085] 在一些实施方案中,抗体是人工程化 (HUMANEERED™) 的抗体。人工程化的抗体是具有参照抗体的结合特异性的工程化人抗体,其是通过以下方式获得的:将编码参照抗体重链 CDR3 区的结合特异性决定簇 (BSD) 的 DNA 序列与人 V_H 节段序列连接,并将参照抗体的轻链 CDR3 BSD 与人 V_L 节段序列连接。产生这类抗体的方法提供于美国专利申请公开号 20050255552 和美国专利申请公开号 20060134098 中。

[0086] 可以进一步将抗体脱免疫,从而从抗体的 V 区去除一个或多个预测的 T 细胞表位。这类方法描述于,例如 WO 00/34317 中。

[0087] 在一些实施方案中,可变区由人 V 基因序列组成。例如,可变区序列与人类种系 V 基因序列具有至少 80% 的同一性,或至少 85% 或至少 90% 的同一性,或者更高的同一性。

[0088] 本发明使用的抗体可以包含人恒定区。轻链恒定区可以是人 κ 或 λ 恒定区。重链恒定区通常是 γ 链恒定区,例如, γ -1 或 γ -3 恒定区。

[0089] 在一些实施方案中,例如,当抗体是片段时,该抗体可以被偶联到另一分子,例如,为了提供延长的体内半衰期,所述另一分子例如聚乙二醇(聚乙二醇化)或血清白蛋白。抗体片段 PEG 化的实例提供于 Knight et al., Platelets 15:409, 2004 (关于阿昔单抗); Pedley et al., Br. J. Cancer 70:1126, 1994 (关于抗 CEA 抗体); 和 Chapman et al., Nature Biotech. 17:780, 1999 中。

[0090] 抗体特异性

[0091] 用于本发明的抗体激活 EphA3 和 / 或通过 ADCC 杀伤 EphA3⁺ 细胞。适用于本发明的抗体的实例是具有 mAb IIIA4 的结合特异性的抗体。单克隆抗体 mAb IIIA4 与天然 EphA3 球状 ephrin 结合结构域结合 (Smith et al., J. Biol Chem. 279:9522-9531, 2004;

和 Vearing et al., Cancer Res. 65 :6745-6754, 2005)。与 EphA3 表面结合的高亲和力 mAb IIIA4 对 ephrin-A5 与 EphA3 相互作用的总亲和力几乎没有影响。

[0092] 在一些实施方案中,使用与 mAb IIIA4 竞争结合 EphA3 的单克隆抗体,或使用与 mAb IIIA4 结合相同表位的单克隆抗体。可以使用多种竞争性结合测定来测定两种抗体与相同抗原结合之间的竞争。例如,为了这个目的可以使用夹心 ELISA 测定。在示例性的测定中,利用捕获抗体包被孔的表面来进行 ELISA。然后向捕获表面添加亚饱和浓度的带有标签的抗原。该蛋白通过特异性的抗体:抗原相互作用而结合抗体。洗涤后,向 ELISA 中添加连接有可检测部分的二抗。如果该抗体与捕获抗体结合抗原上的相同位点,或干扰与该位点的结合,则该抗体将不能结合靶蛋白,因为所述位点已不再能用于结合。但是如果该二抗识别抗原上的不同位点,则它将能够结合。通过对结合的可检测标记进行定量,可以测定结合。利用单个抗体作为捕获和检测抗体来确定背景,而通过用抗原特异性抗体进行捕获并利用针对抗原上的标签的抗体进行检测来确定最大信号。利用背景和最大信号作为参照,可以采用配对方式评价抗体以确定特异性。通常通过这种竞争性测定确定具体抗体与另一抗体识别相同表位的能力。

[0093] 利用如上所述的任意测定,在第一抗体存在的条件下,如果第二抗体与抗原的结合降低至少 30%,通常至少约 40%、50%、60%或 75%,经常是至少约 90%,则认为所述第一抗体竞争性抑制所述第二抗体的结合。

[0094] 在一些实施方案中,所述抗体与 mAb IIIA4 结合相同的表位。IIIA4 及工程化的人衍生物的表位位于 EphA3 的 N 末端球状配体结合结构域中(下文所示的部分人 EphA3 序列中的氨基酸 29-202):

[0095] 1 MDCQLSILLL LSCSVLDSFG ELIPQPSNEV NLLDSKTIQG ELGWISYPSH GWEEISGVDE

[0096] 61 HYTPIRTYQV CNVMDHSQNN WLRTNWVPRN SAQKIYVELK FTLRDCNSIP LVLGTCKETF

[0097] 121 NLYYMESDDD HGVKFREHQF TKIDTIAADE SFTQMDLGDR ILKLNTEIRE VGPVNKKGFY

[0098] 181 LAFQDVGACV ALVSVRVYFK KC

[0099] IIIA4 抗体结合在受体附近,而基本上不干扰 EphrinA5 与受体的结合。抗体 IIIA4 的表位由 Smith et al., J. Biol. Chem. 279 :9522, 2004 使用定点诱变进一步表征。在本分析中,132 位的甘氨酸突变至谷氨酸 (G132E),这消除了与 IIIA4 的结合。缬氨酸 133 突变至谷氨酸 (V133E) 使 EphA3 与 IIIA4 抗体的结合降低大约 100 倍。本发明人随后观察到,精氨酸 136 也是表位的一部分。在大鼠中的高度保守的 EphA3 蛋白的序列中,该残基变为亮氨酸 (R136L)。大鼠 EphA3 不与 IIIA4 或 IIIA4 的工程化人衍生物结合。因此,G132、V133 和 R136(以上序列中粗体并划线的)是 IIIA4 表位中重要的氨基酸。

[0100] 结合亲和力

[0101] 在一些实施方案中,适用于本发明的抗体对人 EphA3 具有高的结合亲和力。用于本发明的目的,如果抗体的解离常数 (K_D) < 约 10nM,例如,约 5nM,或约 2nM,或约 1nM,或更低,则抗体和抗原间存在高亲和力结合。可以使用多种方法测定抗体对其靶抗原的结合亲和力,例如表面等离子体共振测定、饱和测定或诸如 ELISA 或 RIA 的免疫测定,这些都是本领域技术人员公知的。用于测定结合亲和力的示例性方法是如 Krinner 等 (2007), Mol. Immunol. Feb ;44(5) :916-25. (2006 年 5 月 11 日电子出版) 所述,在 Biacore™ 2000 装置 (Biacore AB, Freiburg, Germany) 上利用 CM5 传感芯片进行的表面等离子体共振分析。

[0102] 抗 EphA3 抗体可以与 EphA3 的任何区结合。在一些实施方案中,抗 EphA3 抗体激活 EphA3。通常,所述抗体使 EphA3 二聚化。在一些实施方案中,所述抗体使 EphA3 聚集。在一些实施方案中,还可以使用具有活性同种型(诸如 IgG1、IgG3、IgM、IgA 或 IgE)并且通过 ADCC 对骨髓增生性病症细胞具有细胞毒性的抗 EphA3 抗体。本发明使用的抗体还可以是多价的,包括单体形式在内,该单体进行交联或以其它方式发生多聚而形成多价抗体。

[0103] 在一些实施方案中,用于本发明的抗体不与 EphA3 配体竞争结合 EphA3,而在其它的实施方案中,用于本发明的 EphA3 抗体可以竞争 EphA3 配体(诸如 ephrin,例如, ephrin-A5)与 EphA3 的结合。可以利用如上所述的技术鉴定与配体竞争结合 EphA3 的抗体,其中使用诸如 ephrin-A5 的 ephrin 配体替代另一种抗体用于竞争分析。

[0104] 在示例性的实施方案中,抗 EphA3 抗体包含 mAb IIIA4 的 V_L 和 V_H 区。在其它的实施方案中,抗 EphA3 抗体包含 mAb IIIA4 的 CDR 1、2 和 3。在一些实施方案中,抗 EphA3 抗体包含 mAb IIIA4 的 CDR3。表 1 提供了与 mAb IIIA4 结合相同表位的抗体的 CDR 序列(根据 Kabat 编号限定)。通过 ELISA 测定对 EphA3 抗原的亲和力。因此,本发明的抗体还可以具有表 1 所示的重链和/或轻链 CDR。

[0105] 表 1

[0106]

抗体	CDRH1	CDRH2	CDRH3	亲和力 (nM)
IIIA4	SYWIN	DIYPGSGNTNYDEKFKR	SGYYEDFDS	2.5
FA3AM-H12A	TYWIS	DIYPGSGNTNYDEKFQG	SGYYEEFDS	3.2
K3D	TYWIS	DIYPGSGNTNYDEKFEG	SGYYEEFDS	25

[0107]

抗体	CDRL1	CDRL2	CDRL3	亲和力 (nM)
IIIA4	RASQEISGYLG	AATLDS	VQYANYPYT	2.5
FA3AM-H12A	RASQGIISYLA	AASSLQS	VQYANYPYT	3.2
K3D	RASQGIISYLA	AASSLQS	VQYMNYPYT	25

[0108] 可以利用目的特征的已知测定来鉴定本文所述的用在本发明中的抗体。因此,可以通过以下来鉴定抗体:筛选激活 EphA3 的能力(例如,使用实施例中所描述的凋亡测定)、筛选诱导 ADCC 的能力(例如使用实施例中所描述的 ADCC 测定)和利用上文所述的测定筛选结合特异性和亲和力。

[0109] 非抗体的 EphA3 结合剂

[0110] 还可以给予白血病或 CMPD 患者与 EphA3 结合并使 EphA3 受体二聚化或激活 EphA3 受体的其它蛋白。这类蛋白包括可溶性 Ephrin A5-Fc 蛋白。

[0111] 其它 EphA3 结合剂包括结合 EphA3 的支架蛋白。因此, EphA3 结合剂可以是以类似于抗体的方式靶向于抗原并结合抗原的“抗体模拟物”。当使用抗体模拟物时,该模拟物

的形式能够使 EphA3 二聚化。例如,可以使用二聚体或多价形式的抗体模拟物。

[0112] 某些抗体模拟物使用非免疫球蛋白蛋白支架作为抗体可变区的备选蛋白框架。例如,Ku 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 :6552-6556, 1995) 公开了基于细胞色素 b562 的抗体替代物,其中细胞色素 b562 的两个环被随机化并选择用于结合牛血清白蛋白。发现个体突变体与抗 BSA 抗体类似选择性地结合 BSA。

[0113] 美国专利第 6, 818, 418 号和第 7, 115, 396 号公开了抗体模拟物,其特征存在于纤维连接蛋白或纤维连接蛋白样蛋白支架和至少一个可变环。这些基于纤维连接蛋白的抗体模拟物被称为 Adnectin,其表现出与天然的或工程化抗体相同的许多特征,包括对任意靶配体的高亲和力和特异性。这些基于纤维连接蛋白的抗体模拟物的结构与 IgG 重链可变区的结构类似。因此,这些模拟物表现出与天然抗体在性质和亲和力方面的类似的抗原结合特性。此外,这些基于纤维连接蛋白的抗体模拟物表现出某些优于抗体和抗体片段的优势。例如,这些抗体模拟物不依赖二硫键来维持天然折叠稳定性,因此,在通常能破坏抗体的条件下也是稳定的。此外,因为这些基于纤维连接蛋白的抗体模拟物的结构与 IgG 重链的结构类似,所以可体外进行环随机化和改组的过程,类似于体内抗体亲和力成熟的过程。

[0114] Beste 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 :1898-1903, 1999) 公开了基于脂笼蛋白 (lipocalin) 支架的抗体模拟物 (Anticalin®)。脂笼蛋白由 β -桶组成,在蛋白末端具有 4 个高变环。将这些环进行随机诱变并选择与例如荧光素结合。3 种变体表现出与荧光素的特异性结合,其中一种变体表现出类似于抗荧光素抗体的结合。进一步的分析表明所有的随机化位点都是可变的,这表明 Anticalin® 适合用作抗体的替代物。因此, Anticalins® 是小的单链肽,通常为 160-180 个残基,其提供优于抗体的数种优势,包括生产成本降低,贮存稳定性增加和免疫反应减弱。

[0115] 美国专利第 5, 770, 380 号公开了利用杯芳烃 (calixarene) 的刚性非肽有机支架的合成抗体模拟物,所述支架连接有作为结合位点的多个可变肽环。所述肽环相对彼此均从杯芳烃的几何学同侧伸出。因为这种几何构象,所有环都可用于结合,从而增加了对配体的结合亲和力。但是,与其它抗体模拟物相比,基于杯芳烃的抗体模拟物不是仅仅由肽组成,因此它相对不易受蛋白酶的攻击。支架也不是仅仅由肽、DNA 或 RNA 组成,表明该抗体模拟物在极端环境条件下是相对稳定的,并具有长的寿命。另外,因为基于杯芳烃的抗体模拟物相对较小,它不易于产生免疫原性应答。

[0116] Murali 等 (Cell Mol Biol 49 :209-216, 2003) 描述了将抗体缩小成更小的模拟肽的方法,所述更小的模拟肽被称为“抗体样结合模拟肽”(ABiP),它们也可以被用做抗体的替代物。

[0117] WO 00/60070 公开了具有 CTL4A 样 β -夹心结构的多肽链。肽支架具有 6-9 条 β 链,其中两个或更多个多肽 β 环构成其它分子的结合结构域,例如抗原结合片段。支架的基本设计是人源的,因此降低了诱导免疫应答的风险。与标准抗体相比, β 夹心支架可能在体内具有提高的稳定性和药代动力学特性,因为该分子包含第二个非免疫球蛋白二硫桥。由于抗原结合结构域可以位于单个肽链的相反末端, β 夹心还有利于双特异性单体分子的设计。

[0118] 除了非免疫球蛋白框架外,还在包含 RNA 分子和非天然寡聚体的化合物(例如,蛋白酶抑制剂、苯二氮、嘌呤衍生物和 β -转角模拟物)中模拟了抗体特性。因此,非抗体

EphA3 结合剂还可以包括这类化合物。

[0119] 在一些实施方案中,本发明使用的 EphA3 结合剂与 mAb IIIA4 竞争结合 EphA3。可以利用已知测定来鉴定这类试剂,例如本文描述的示例性竞争测定。

[0120] 对适于抗 EphA3 治疗的候选患者的鉴定

[0121] 本发明还提供了确定骨髓增生性病症患者是否是抗 EphA3 抗体治疗的候选者的方法。所述方法包括检测来自患者的骨髓增生性病症细胞上 EphA3 的表达。在一些实施方案中,检测母细胞上 EphA3 的表达。在一些实施方案中,检测干细胞上 EphA3 的表达。在一些实施方案中,检测母细胞和干细胞上 EphA3 的表达。

[0122] 在一些实施方案中,可以评价骨髓增生性病症患者的血液样品(例如血清或血浆样品)中可溶性 EphA3 水平的升高(例如,与未患骨髓增生性病症的正常患者比较),从而确定该患者是否是抗 EphA3 抗体治疗的候选者。在一些实施方案中,可以测定患者中可溶性 EphA3 的水平,从而监测抗 EphA3 抗体的治疗功效。可以利用已知的免疫测定来检测可溶性 EphA3,例如 ELISA。

[0123] 可以利用本领域内已知的方法来检测 EphA3 表达。通常,免疫测定可以用来检测 EphA3 蛋白的水平。免疫测定包括 ELISA、荧光活化细胞分选等。或者,可以通过检测编码 EphA3 的 mRNA 的水平来检测 EphA3 表达。通常,可以使用核酸扩增方法来对 RNA 进行定量,例如 RT-PCR。

[0124] 从患者获得包含骨髓增生性病症细胞的样品来评价 EphA3 表达。所述样品通常是外周血样品,但是也可以分析其它合适的样品,例如骨髓样品。

[0125] 如果包含骨髓增生性病症细胞的样品中存在的母细胞、干细胞或两者表达 EphA3,则认为该患者是抗 EphA3 抗体治疗的候选者。因此,本文所用的“EphA3⁺ 患者”是相对于来自正常对照(例如未患造血性病症的患者)的细胞,在骨髓增生性病症细胞上表达 EphA3 的患者。

[0126] 骨髓增生性病症的治疗

[0127] 一方面,本发明的方法包括给予患有 AML、CML、PV、ET、IM、MDS、CMML 或 JMML 并具有在细胞表面上表达 EphA3 的瘤性骨髓增生性病症细胞的患者抗 EphA3 剂,所述抗 EphA3 剂通常为抗 EphA3 抗体。在一些实施方案中,将诸如抗体的抗 EphA3 剂给予具有表达 EphA3 的瘤性骨髓干细胞(特征为 CD34⁺、CD123⁺ 和 CD38⁻)的患者。因此,按照本发明,用抗 EphA3 剂(例如抗 EphA3)治疗的患者(例如 AML 患者)可以具有表达 EphA3 的造血干细胞和母细胞。用本文所述的方法和组合物治疗的其它患者可以仅在母细胞上表达 EphA3。其它患者还可以仅在干细胞上表达 EphA3。在一些实施方案中,用抗 EphA3 抗体治疗的患者是具有在表面上表达 EphA3 的骨髓增生性病症母细胞的 AML 或 MDS 患者。

[0128] 可以通过以下技术来鉴定白血病和骨髓增生性病症干细胞:诸如利用流式细胞仪进行免疫分型的常用技术,或体外细胞培养技术或体内移植实验。

[0129] 干细胞是多能祖细胞,其在功能上可以被进一步定义为具有自我更新能力的细胞(参见例如,Reya et al, Nature 414:105-111,2001 以及其中引用的参考文献)。例如,长期培养起始细胞(LTC-IC)测定可以证实这点,在该测定中将细胞培养在辐射过的骨髓基质饲养细胞上。在本测定中,长期连续转移集落(例如至少 5 周,例如 Guan and Hogge (2000) Leukemia 14:2135)的能力表明干细胞的存在。还可以在生长因子的存在下,

在甲基纤维素中培养干细胞来源的集落来进行连续转移测定,所述生长因子例如干细胞因子(SCF)、白细胞介素-3(IL3)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和红细胞生成素(EPO)的组合。

[0130] 通过在免疫系统缺陷的小鼠(SCID/NOD小鼠;van Rhenen et al., Clin. Cancer. Res. 11:6520-6527, 2005)中的连续转移传代进行用于鉴定干细胞的体内移植。

[0131] 在流式细胞仪分析中,白血病或慢性骨髓增生性病症(CMPD)干细胞通常存在于CD34-阳性、CD38-阴性细胞的区室中(但是大约10%的AML病例是CD34-阴性)。在CD38-阴性细胞区室中,白血病或CMPD干细胞可以被鉴定为CD123-阳性细胞(Jordan et al., Leukemia 14:1777-1784, 2000),但是其它标志物也可以用于鉴定干细胞,包括CD117、CD45RA或CD133。

[0132] 母细胞是能够参与粒细胞生成的单能细胞。母细胞比正常的人单核细胞和多形核血细胞大,并且可以通过显微镜从血涂片鉴定,或者通过流式细胞仪分析鉴定,所述流式细胞仪分析是基于母细胞的前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)高于单核细胞和粒细胞。

[0133] 可以将抗EphA3组合物配制为用于多种药物递送系统。所述组合物还可以包含一种或多种生理学可接受的赋形剂或载体以用于合适的制剂。本发明使用的合适制剂可以参考Remington: The Science and Practice of Pharmacy(雷明顿制药科学和实践),第21版,Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins, 2005。药物递送方法的简述参见Langer, Science 249:1527-1533(1990)。

[0134] 在适于向患者注射的溶液(例如注射用无菌等渗水溶液)中提供本发明方法所用的抗EphA3抗体。将抗EphA3抗体以合适的浓度溶解或悬浮于可接受的载体中。在一些实施方案中,载体是水性的,例如,水、盐水、磷酸盐缓冲液等。根据需要,组合物可以包含辅助药用物质来接近生理条件,例如pH调节和缓冲剂,渗透压调节剂等。

[0135] 给予骨髓增生性病症患者的本发明的药物组合物的量足以至少部分遏制疾病或该疾病及其并发症的症状。足以实现该目的的量被定义为“治疗有效剂量”。通过监测患者对治疗的反应来确定治疗有效剂量。指示治疗有效剂量的典型基准是本领域已知的,并根据疾病而不同。例如,血液或骨髓中具有特定骨髓增生性病症特征的异常骨髓细胞数量的减少可以指示治疗功效。

[0136] 选择抗EphA3抗体的剂量以便为患者提供有效的治疗,所述剂量为约0.1mg/kg体重-约25mg/kg体重或每位患者约1mg-约2g。所述剂量通常为约0.5mg/kg或约1mg/kg-约10mg/kg,或约50mg-约1000mg/患者。在一些实施方案中,给予抗体的量低于约0.1mg/kg体重,例如,用量为约20mg/患者或更低。根据抗体的药代动力学(例如抗体在循环中的半寿期)和药效学应答(例如抗体治疗效果的持续时间),可以按合适的频率重复所述剂量,所述频率可以为每天一次到每三个月一次。在一些实施方案中,当抗体或修饰的抗体片段具有约7到约25天的体内半寿期时,按每周一次到每3个月一次重复抗体给药。在其它的实施方案中,按大约每月一次给予所述抗体。

[0137] 给予的有效量取决于疾病的严重程度和患者的整体健康状况,包括诸如年龄、体重、性别、给药途径等的其它因素。根据需要的以及患者能耐受的剂量和频率,可以进行抗EphA3抗体的单次或多次给药。在任一种情况下,所述方法提供足够量的抗EphA3抗体以有效治疗骨髓增生性病症。

[0138] 可以将抗 EphA3 抗体或抗 EphA3 激动结合剂（例如诱导 EphA3 的二聚化或激活 EphA3）与一种或多种其它治疗剂联合使用来治疗骨髓增生性病症。可以与抗 EphA3 结合剂联合给药的治疗剂包括以下化合物，例如 MYLOTARG®（注射用吉妥单抗（gemtuzumab ozogamicin））；诸如甲磺酸伊马替尼（GLEEVEC®）、尼罗替尼（TASIGNA®）和达沙替尼（SPRYCEL®）的酪氨酸激酶抑制剂；干扰素- α 和各种化疗剂。

[0139] 在一些实施方案中，可以将抗 EphA3 激活抗体与一种或多种其它治疗剂联合使用来治疗慢性骨髓性白血病患者，其中所述患者的白血病性干细胞表达 EphA3。这类治疗剂包括各种化疗剂和甲磺酸伊马替尼（GLEEVEC®）。

[0140] 在一些实施方案中，可以将抗 EphA3 抗体（例如，激活抗体）与一种或多种其它药剂联合使用来治疗急性骨髓性白血病。这类药剂包括单独的阿糖胞苷和阿糖胞苷与柔红霉素的组合。

[0141] 在一些实施方案中，可以将抗 EphA3 激活抗体与一种或多种其它治疗剂联合使用来治疗 BCR-ABL 为阴性的 CMPD 患者。这类抑制剂包括 JAK2 抑制剂，其是本领域已知的，并且正在进行临床评价。

[0142] 患者可以接受一种或多种这些其它治疗剂作为联合疗法。或者，可以相继地用其它治疗剂治疗患者。

[0143] 在一些实施方案中，将抗 EphA3 激活抗体给予经历骨髓移植的患者。

[0144] 在一些实施方案中，通过任意合适途径（包括但不限于静脉内、皮下、肌肉、鼻内或腹膜内途径）的注射或输注给予抗 EphA3 抗体或其它 EphA3 激活结合剂。在一些实施方案中，在患者给药之前，将抗 EphA3 抗体在生理盐溶液中稀释用于注射。例如通过 15 分钟到 2 小时的静脉内输注给予所述抗体。

[0145] 提供下列实施例只是为了说明而非限制。本领域技术人员应当容易认识到，改变或者修改各种非关键参数也能产生基本上类似的结果。

实施例

[0146] 实施例 1. 在表面上表达 EphA3 的 CMPD 和白血病的鉴定

[0147] 将流式细胞仪用于评价诊断为骨髓增生性病症的患者的肿瘤细胞表面上 EphA3 的表达。将从外周血（黄层细胞制备物；外周血单核细胞（PBMC））或骨髓抽吸物分离的细胞以 1×10^6 个细胞/0.1ml 悬浮于流式细胞缓冲液（PBS, 2mM EDTA、2% 胎牛血清、0.05% 叠氮化钠）中，所述缓冲液具有 $1 \mu\text{g}$ 正常 IgG（大鼠 IgG；US Biological 或抗 FcR 抗体）来阻断 Fc-受体结合。添加 $5 \mu\text{g/ml}$ 的抗 EphA3 抗体或阴性对照人 IgG1，并于冰上孵育 20 分钟。通过在流式细胞缓冲液中进行稀释来洗涤细胞，并以 1000rpm 离心 5 分钟。将细胞团重悬于在流式细胞缓冲液中稀释（1 : 20）的 FITC 偶联的山羊 F(ab)'₂ 抗人 IgG 抗体（Caltag）中，并于冰上孵育 20 分钟。通过离心将细胞洗涤一次，并重悬于含有以 1 : 1000 稀释的碘化丙啶（Sigma）的流式细胞缓冲液中。利用流式细胞仪分析不结合碘化丙啶的活细胞，从而与用阴性对照抗体染色的细胞相比，鉴定出表达 EphA3 的细胞。

[0148] 表 2 表明：在一部分急性和慢性骨髓性白血病中和骨髓增生性病症（包括特发性骨髓纤维化和原发性血小板增多症）外周血单核细胞中的细胞表面可检测到 EphA3。

[0149] 表 2. 利用流式细胞仪对骨髓和外周血（PBMC）样品的表面 EphA3 进行检测的流式

细胞筛选总结

[0150]

肿瘤类型	受试样品数	EphA3 阳性样品 *	EphA3 阳性样品 (%)
AML	41	26	63
CML	10	5	50
MDS	16	7	44
IM (PBMC)	1	1	
ET (PBMC)	1	1	
PV (PBMC)	2	1	

[0151] * 如果样品中至少 5% 的细胞表现出的免疫荧光高于用同种型对照抗体染色的样品中的荧光强度,则将样品定义为阳性。

[0152] 还评价 AML 中白血病干细胞的表面 EphA3 表达。用抗 CD34、CD38 和 CD123 的抗体对 AML 患者中骨髓来源的细胞进行染色,以鉴定白血病干细胞群(特征为 CD34- 阳性、CD123- 阳性和 CD38- 阴性)。PE 偶联的抗 CD34、PEcy5 偶联的抗 CD38 和 APC 偶联的抗 CD123 抗体用于流式细胞仪分析(每个样品 50,000 个事件)。EphA3 特异性的工程化人抗体与 CD34、CD38 画门细胞的结合显示在图 1 中。所有 CD123- 阳性(CD34- 阳性和 CD38- 阴性)的白血病干细胞对于 EphA3 的表达都是阳性的。

[0153] 在正常造血 CD34- 阳性干细胞上检测不到 EphA3(数据未显示)。此外,在体外集落形成测定中,抗 EphA3 抗体不干扰正常的造血作用。

[0154] 实施例 2. 对抗 EphA3 抗体诱导骨髓增生性病症细胞凋亡的能力的评价

[0155] 本实施例表明,抗 EphA3 抗体诱导骨髓增生性病症细胞的凋亡。

[0156] 评价与 EphA3 结合的工程化人激活抗体在体外诱导原代细胞凋亡的能力,所述原代细胞从骨髓增生性病症患者或个体分离。将细胞以 2.5×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔“U”形底平板中的 0.1ml 培养基(含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640)。添加抗 EphA3 抗体或人 IgG1 同种型对照抗体至 $10 \mu\text{g/ml}$ – 1ng/ml 的终浓度,并将平板在 37℃ 和 5% 二氧化碳的组织培养箱中孵育 24 小时。作为诱导凋亡的阳性对照,将单独的细胞样品与喜树碱($10 \mu\text{M}$; Calbiochem)一起孵育。孵育结束时,收获细胞,并通过 1000rpm 离心 5 分钟来洗涤细胞,随后在含有 $5 \mu\text{l}$ FITC 偶联的膜联蛋白 V(BD Pharmingen, 产品号 51-65874X) 和 $5 \mu\text{l}$ 碘化丙啶(产品号 51-66211E) 的 0.1ml $1 \times$ 膜联蛋白 V 结合缓冲液(BD Pharmingen, Cat # 556547, 产品号 51-66121E) 中避光室温孵育 15 分钟。向每管添加 $400 \mu\text{l}$ $1 \times$ 结合缓冲液,并利用流式细胞仪鉴定膜联蛋白 V 染色的凋亡细胞。图 4 提供的数据显示工程化人抗体的凋亡活性。

[0157] 表 3 所示的结果表明:所述抗体在几个样品中诱导凋亡的水平与喜树碱相当。对于只有少部分细胞表达 EphA3 的样品,抗 EphA3 抗体诱导其中相似的少部分细胞的凋亡,这表明,凋亡的诱导对 EphA3- 阳性细胞是特异性的。

[0158] 表 3. 与 EphA3 结合的工程化人激活抗体诱导的凋亡 (PB :外周血, BM :骨髓)。

[0159]

样品	疾病	EphA3 ⁺ 细胞 (%)	抗 EphA3 介导的凋亡 (%细胞死亡)	喜树碱介导的凋亡 (%细胞死亡)
PB-1	ET	27	64	78
PB-2	PV	6	1.8	73.2
BM,06	AML	65	85.5	59.8
BM,07	AML	80	46.7	47.8

[0160] 实施例 3. 对抗 EphA3 抗体在骨髓增生性病症细胞中诱导 ADCC 能力的评价

[0161] 缺少 α 1,6- 岩藻糖的抗 EphA3 抗体的制备

[0162] 将表达重组工程化人抗 EphA3 抗体 (IgG1k) 的 CHO 细胞培养在含有 $2\mu\text{g/ml}$ kifunensine 的 CHO-SFM II 培养基 (Invitrogen) 中,以产生具有缺少 α 1,6- 岩藻糖的修饰糖基化模式的抗体 (Zhou et al, Biotechnol. Bioeng. 99 :652-665, 2008)。由蛋白 A 亲和层析纯化的抗体表现出 α 1,6- 岩藻糖水平显著降低,仅有少于 10% 的抗体分子含有该糖部分,所述 α 1,6- 岩藻糖的水平是通过蛋白印迹上的扁小扁豆 (Lens culinaris) 凝集素 (Sigma) 的结合来测定。

[0163] ADCC 测定

[0164] 按照标准技术,通过聚蔗糖 - 泛影钠密度分离从血液黄层样品分离人 PBMC 效应细胞。将来自白血病或骨髓增生性病症患者的骨髓或外周血的原代单核细胞用作 ADCC 测定中的靶细胞。以 100 : 1 或 200 : 1 的效应细胞 : 靶细胞的比值,将肿瘤靶细胞与 PBMC 人效应细胞孵育 16 小时。通过 CytoTox 96 分析 (Promega) 测定死细胞释放的乳酸脱氢酶 (LDH)。在本分析中,在不存在效应细胞的条件下,靶细胞与抗体的孵育没有表现出可检测的细胞毒性。

[0165] 代表性的 ADCC 测定结果显示在图 2 中,其中在 PBMC 效应细胞的存在下,抗 EphA3 抗体 (IgG1k) 诱导杀伤人原发性血小板增多症细胞。本测定中,所述抗体表现出有效的 ADCC 活性。加入抗 CD16 抗体消除了抗 EphA3 抗体的细胞毒性活性,这表明 ADCC 是由 CD16 受体 (FcRIII) 介导的。以 $5\mu\text{g/ml}$ 的浓度添加抗 CD16 抗体 (BD Pharmingen)。

[0166] 在 ADCC 测定中,将缺少 α 1,6- 岩藻糖的抗体制备物与岩藻糖基化的抗体进行比较评价。在图 3 所示的测定中,前 B 细胞白血病来源的细胞系 LK63 被用作靶标。本测定中,缺少 α 1,6- 岩藻糖的抗体显著强于岩藻糖基化的抗体。对于低水平 (0.1ng/ml) 的去岩藻糖基化的抗体,检测到 ADCC 活性,而该浓度的岩藻糖基化的抗体没有表现出可检测的 ADCC 活性。

[0167] 如表 4 所示,工程化的人抗 EphA3 抗体还表现出对来自 AML 患者骨髓样品的原代人肿瘤细胞的有效 ADCC 活性,并且还表现出对来自真性红细胞增多症患者外周血的 EphA3- 阳性细胞的 ADCC 活性。

[0168] 表 4. 工程化的人抗 EphA3 抗体对来自白血病或骨髓增生性疾病患者的细胞的 ADCC 活性 (PB :外周血 ;BM :骨髓)

[0169]

样品	疾病	EphA3 ⁺ 细胞 (%)	抗 EphA3 介导的 ADCC(16 小时时的细胞 毒性百分比)
PB-1	ET	27	70
PB-2	PV	6	8
BM,06	AML	65	85.5
BM,07	AML	80	46.7
BM,157260	AML	65	70

[0170] 表 5 总结了来自 AML 和骨髓增生异常综合症患者的骨髓抽吸物的一组原代样品中表达 EphA3 的细胞的细胞表型数据,并且表 5 显示了每个样品中由抗 EphA3 抗体通过直接诱导凋亡或通过效应细胞介导的 ADCC 活性所杀伤的细胞的比例。在这些样品中,对于能鉴定到 CD123⁺CD34⁺CD38⁻ 白血病干细胞 (LSC) 的每个样品,这些 LSC 中 100% 都是 EphA3 表达阳性的。在大多数样品中,由工程化人抗 EphA3 抗体介导的 ADCC 或凋亡所杀伤的细胞百分比与利用流式细胞仪检测为 EphA3 阳性细胞的百分比存在良好的相关性,这表明所述抗体对表达 EphA3 的细胞的特异性。

[0171] 表 5 恶性母细胞和白血病干细胞上 EphA3 表达的总结:工程化人抗体通过两种独立的机制杀伤 EphA3⁺ 细胞

[0172]

患者 样品	对骨髓样品的流式细胞仪分析					抗 EphA3 活性	
	EphA3 ⁺ (总 细胞的%)	CD34 ⁺ 骨髓		白血病干细胞 (CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD123 ⁺)		通过 ADCC 杀伤的 总细胞 %	通过凋 亡杀伤 的总细 胞%
		CD34 ⁺ (总 细胞的%)	EphA3 ⁺ (CD34 ⁺ 细胞的%)	LSC (总细 胞的%)	EphA3 ⁺ (LSC 的%)		
AML1	0	0	0	0	N/A	0	0
AML2	51	59	98	0	N/A	86	86
AML3	83	81	100	N/D	N/A	47	50
AML4	88	40	100	25	100	95	79
AML5	55	90	64	0	N/A	72	79
AML6	21	20	100	12	99	20	22
AML7	16	77	12	10	100	20	15
AML8	24	0	0	0	N/A	22	20
AML9	31	16	36	0	N/A	40	45
AML10	41	43	92	0	N/A	50	48
AML11	55	56	99	0	N/A	65	75
AML12	14	27	22	0	N/A	20	15
MDS1	15	17	22	1	100	25	20
MDS2	9	28	35	3	100	20	19

[0173]

[0174] 本说明书中引用的全部出版物、专利申请、登录号和其它参考文献在此通过引用并入本文,就如各个独立出版物或者专利申请是具体并单独指明通过引用并入本文一样。

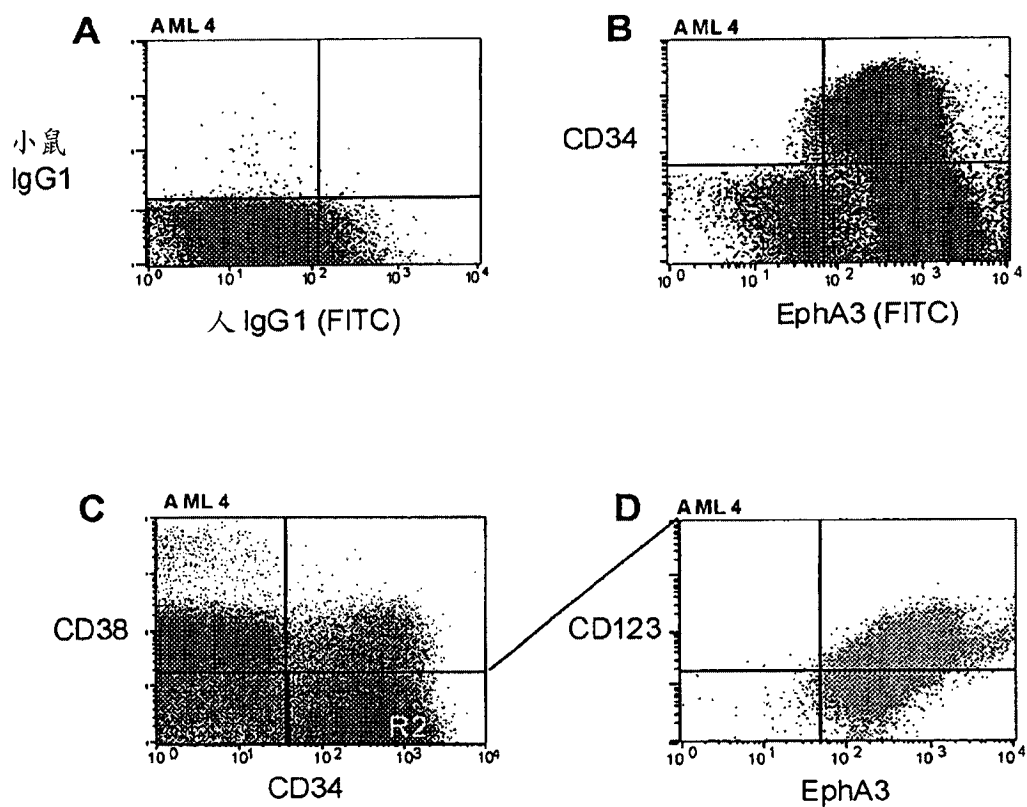


图 1

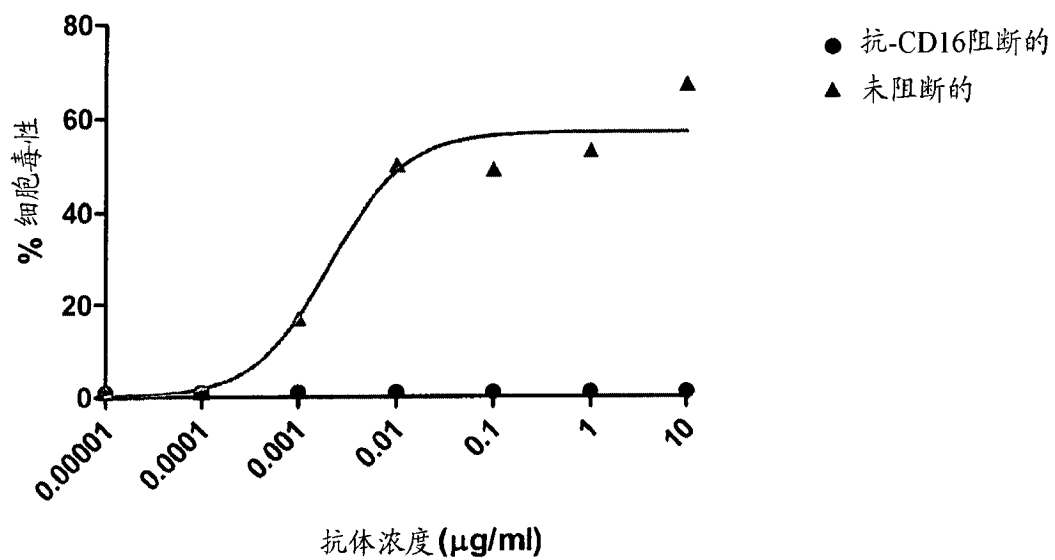


图 2

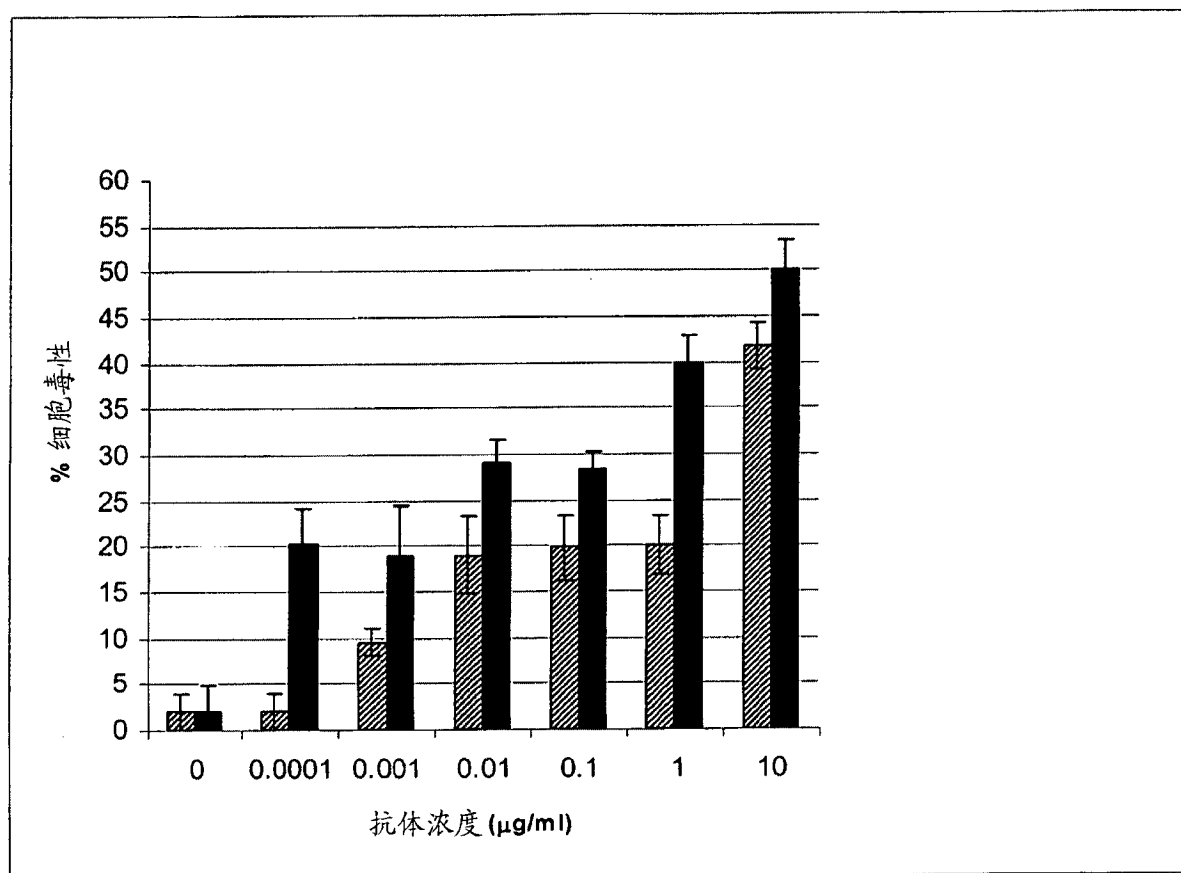


图 3

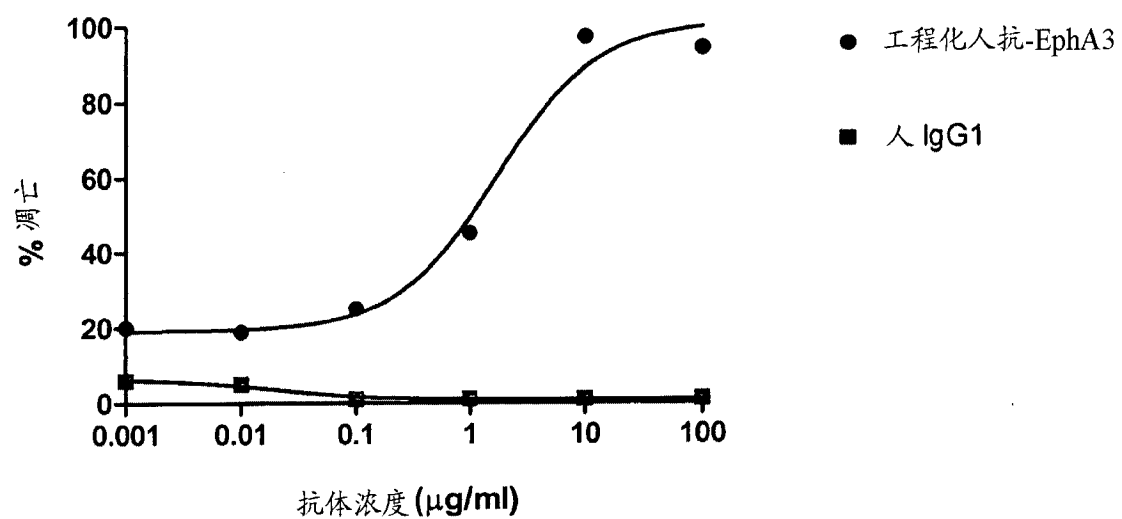


图 4