(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116472282 A
(43)申请公布日 2023.07.21

(21)申请号 202180069033.X
(22)申请日 2021.10.08
(30)优先权数据
2020-170478 2020.10.08 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.04.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/037296 2021.10.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/075439 JA 2022.04.14
(71)申请人 国立大学法人东海国立大学机构
地址 日本爱知县
申请人 株式会社英仙蛋白质科学
(72)发明人 清井仁 石川裕一 中岛麻梨绘 大平悠太 大屋顺平 野村富美子 胜见惠子 阪本爱弥 鹈饲由范 松浦正
(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 龙淳 狄茜
(51)Int.Cl.
C07K 14/705(2006.01)

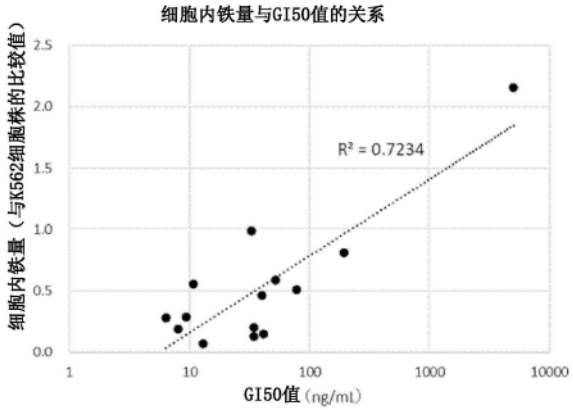
权利要求书1页 说明书15页
序列表6页 附图5页

(54)发明名称

抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法

(57)摘要

本发明的课题在于提供抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法。根据本发明，提供一种抗人转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法，该判定方法以细胞内铁量为指标，该抗人转铁蛋白受体抗体具有抑制人转铁蛋白与人转铁蛋白受体结合的作用。



CN 116472282 A

1.一种抗人转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法,其特征在于:

所述判定方法以细胞内铁量为指标,

所述抗人转铁蛋白受体抗体具有抑制人转铁蛋白与人转铁蛋白受体结合的作用。

2.如权利要求1所述的方法,其特征在于:

其是利用了细胞内铁量与所述抗体的药效的相关性的药效或感受性的判定方法。

3.如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

根据与基准样品的铁量的相对值判定所述抗体的药效或感受性。

4.如权利要求1～3中任一项所述的方法,其特征在于:

细胞内铁量低于基准值时,判定为所述抗体的药效或感受性高。

5.如权利要求1～4中任一项所述的方法,其特征在于:

判定所述抗体对癌的药效或感受性。

6.如权利要求5所述的方法,其特征在于:

癌为血液癌。

7.如权利要求5或6所述的方法,其特征在于:

癌为急性髓性白血病(AML)。

8.如权利要求1～7中任一项所述的方法,其特征在于:

所述抗体是识别人转铁蛋白受体的第629～633位氨基酸的抗体。

9.如权利要求1～8中任一项所述的方法,其特征在于:

所述抗体是重链第一互补决定区(VH CDR1)、重链第二互补决定区(VH CDR2)、重链第三互补决定区(VH CDR3)分别为序列号1、2、3且轻链第一互补决定区(VL CDR1)、轻链第二互补决定区(VL CDR2)、轻链第三互补决定区(VL CDR3)分别为序列号4、5、6的抗体。

10.如权利要求1～9中任一项所述的方法,其特征在于:

所述抗体是重链具有序列号7且轻链具有序列号8的抗体。

抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法。

背景技术

[0002] 转铁蛋白受体(Transferrin receptor;TfR)是在细胞表面表达的TypeII膜蛋白。TfR通过与配体转铁蛋白(TF)结合,将铁运入细胞内,维持细胞的生存和分裂。据报道,TfR在大多数正常细胞中低表达,例如在皮肤表皮基底细胞、小肠上皮细胞等若干细胞中低表达(非专利文献1～3)。但是,在成红细胞和胎盘滋养层细胞中,由于铁摄取需求大,所以高表达TfR(非专利文献4和5)。

[0003] 在专利文献1中记载了抗转铁蛋白受体抗体对于血液癌等癌的治疗有用。另外,在专利文献2中记载了包含抗转铁蛋白受体抗体的、向细胞内摄取铁的抑制剂。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:国际公开WO2014/073641号公报

[0007] 专利文献2:国际公开WO2020/105621号公报

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:P.Ponka,C.N.Lok,The transferrin receptor:role in health and disease,Int.J.Biochem.Cell Biol.31(1999)1111-1137.

[0010] 非专利文献2:D.R.Richardson,P.Ponka,The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells,Biochim.Biophys.Acta 1331(1997)1-40.

[0011] 非专利文献3:Daniels TR.Delgado T,Rodriguez JA,Helguera G,Penichet ML.The transferrin receptor part I:Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer.Clinical Immunology(2006)121,144-158

[0012] 非专利文献4:J.E.Levy,O.Jin,Y.Fujiwara,F.Kuo,N.C.Andrews,Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system,Nat.Genet.21(1999)396-399.

[0013] 非专利文献5:Khatun R,Wu Y,Kanenishi K,Ueno M,Tanaka S,Hata T,Sakamoto H.,Immunohistochemical study of transferrin receptor expression in the placenta of pre-eclamptic pregnancy.,Placenta.2003;24(8-9):870-6.

发明内容

[0014] 发明所要解决的课题

[0015] 如上所述,抗转铁蛋白受体抗体对癌等疾病具有治疗效果,但关于判定其药效或感受性的见解尚不为人所知。本发明所要解决的课题在于提供抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法。

[0016] 用于解决课题的方法

[0017] 本发明的发明人为了解决上述课题而进行了研究，结果发现，能够将细胞内铁量用作用于判定抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的指标(生物标志物)，从而完成了本发明。

[0018] 即，根据本发明，可以提供以下的发明。

[0019] ＜1＞一种抗人转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法，其以细胞内铁量为指标，上述抗人转铁蛋白受体抗体具有抑制人转铁蛋白与人转铁蛋白受体的结合的作用。

[0020] ＜2＞如＜1＞所述的方法，其是利用了细胞内铁量与上述抗体的药效的相关性的药效或感受性的判定方法。

[0021] ＜3＞如＜1＞或＜2＞所述的方法，其中，根据与基准样品的铁量的相对值判定上述抗体的药效或感受性。

[0022] ＜4＞如＜1＞～＜3＞中任一项所述的方法，细胞内铁量低于基准值时，判定为上述抗体的药效或感受性高。

[0023] ＜5＞如＜1＞～＜4＞中任一项所述的方法，其中，判定上述抗体对癌的药效或感受性。

[0024] ＜6＞如＜5＞所述的方法，其中，癌为血液癌。

[0025] ＜7＞如＜5＞或＜6＞所述的方法，其中，癌为急性髓性白血病(AML)。

[0026] ＜8＞如＜1＞～＜7＞中任一项所述的方法，其中，上述抗体是识别人转铁蛋白受体的第629～633位氨基酸的抗体。

[0027] ＜9＞如＜1＞～＜8＞中任一项所述的方法，其中，上述抗体是重链第一互补决定区(VH CDR1)、重链第二互补决定区(VH CDR2)、重链第三互补决定区(VH CDR3)分别为序列号1、2、3且轻链第一互补决定区(VL CDR1)、轻链第二互补决定区(VL CDR2)、轻链第三互补决定区(VL CDR3)分别为序列号4、5、6的抗体。

[0028] ＜10＞如＜1＞～＜9＞中任一项所述的方法，其中，上述抗体是重链具有序列号7且轻链具有序列号8的抗体。

[0029] 发明的效果

[0030] 根据本发明，能够判定抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性。

附图说明

[0031] 图1表示各个TfR突变片段进行点突变的部位。

[0032] 图2表示TfR436与可溶性野生型TfR(sTfR)和TfR突变片段的反应性。

[0033] 图3表示TfR436的Tf-TfR结合抑制活性。

[0034] 图4表示AML临床样本中的细胞内铁量与GI50值的关系。

[0035] 图5表示Kasumi-1皮下移植模型中的TfR436抗体的抗肿瘤效果。

[0036] 图6表示HL60皮下移植模型中的TfR436抗体的抗肿瘤效果。

[0037] 图7表示KO52尾静脉移植模型中的TfR436抗体的寿命延长效果。

[0038] 图8表示CCRF-CEM静脉移植模型中的TfR436抗体的寿命延长效果。

具体实施方式

[0039] 接着,对本发明更详细地进行说明。

[0040] 定义和一般技术

[0041] 本说明书中,只要没有特别定义,关于本发明所使用的科学技术术语则包含本领域技术人员所通常理解的意思。一般而言,本说明书所记载的涉及细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、蛋白质和核酸化学以及杂交而使用的命名法及其技术是技术领域所周知的,能够通常使用。

[0042] 一般而言,本发明的方法和技术在只要没有特别表示,则能够根据本技术领域所公知的现有技术在本说明书中整体引用,以论述的各种一般参考文献和更具体的参考文献所记载的方式实施。

[0043] ＜本发明的方法＞

[0044] 本发明的具有抑制人转铁蛋白与人转铁蛋白受体的结合的作用的抗人转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法是以细胞内铁量为指标的方法。优选抗人转铁蛋白受体抗体是识别人转铁蛋白受体的第629～633位氨基酸的抗体。具体而言,在细胞内铁量低于基准值时,能够判定为抗体的药效或感受性高。

[0045] 本发明的方法优选是利用了细胞内铁量与上述抗体的药效的相关性的药效或感受性的判定方法。更优选能够根据与基准样品的铁量的相对值来判定上述抗体的药效或感受性。作为基准样品,例如能够使用K562等作为基准的细胞、或含有作为基准的量的铁的对照样品。例如,作为基准样品使用K562细胞时,当测定对象细胞的细胞内铁量以相对于K562细胞的细胞内铁量的相对值(比较值)计为1以下时、优选为0.8以下时、更优选为0.7以下时、进一步优选为0.6以下时,能够判定为抗体的药效或感受性高。

[0046] 血清中的3价铁以与转铁蛋白结合的状态运输。结合有3价铁的转铁蛋白与细胞表面的转铁蛋白受体结合时,摄入细胞内的内体中。与转铁蛋白一起摄入细胞内的3价铁在内体内由金属还原酶STEAP3还原为2价铁。2价铁由DMT1(2价金属转运体1)运到细胞质,成为铁池(也称为动态铁池,Labile iron pool)。Labile iron pool的2价铁用于DNA合成、DNA修复,或者用于线粒体中的能量生成、血色素合成和Fe-S簇生物合成,或作为储存铁储存。另外,细胞内的2价铁的一部分经由存在于细胞膜的膜体转运蛋白从细胞的内侧向外侧运输。如上所述,细胞内铁与细胞内的铁利用相关。在本发明中,发现了能够通过以细胞内铁量为指标,具体而言,当细胞内铁量低于基准值时,可以判定为抗体的药效或感受性高。

[0047] 为了通过本发明的方法判定抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性,能够通过测定来自被检测者的生物体试样(样本)中的细胞内铁量并将该测定结果与对照水平(基准值)比较来进行。

[0048] 作为被检测者,为需要利用抗转铁蛋白受体抗体的治疗的被检测者,作为一例,可以列举患有癌的被检测者。

[0049] 作为生物体试样,例如可以列举活检样本(被检测者为癌患者时,为包含癌细胞的样本等)。

[0050] 细胞内铁量的测定能够通过常规方法进行,也能够使用市售的测定试剂盒来进行。例如,能够采用使用金属检测铁测定LS(菲啰嗪法)(Metallogenics#FE31M),利用酶标仪(96孔板)迅速地对试样中的铁(Fe^{2+}、Fe^{3+})进行定量。

[0051] 在本发明中，为了判定抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性，可以在投予抗转铁蛋白受体抗体之前，测定来自被检测者的生物体试样中的细胞内铁量。

[0052] 当判断为细胞内铁量低于规定的基准值时，能够判定为该被检测者的抗转铁蛋白受体抗体的药效高、即对于抗转铁蛋白受体抗体具有感受性。因此，细胞内铁量能够作为用于对可期待治疗效果的患者继续积极治疗的标志物使用。另一方面，当判断为细胞内铁量高于规定的基准值时，能够判定为该被检测者的抗转铁蛋白受体抗体的药效低、即对于抗转铁蛋白受体抗体不具有感受性。判定不仅可以将具体的数值作为基准进行判定，还可以基于颜色的浓淡等通过视觉能够掌控的数值以外的基准进行判定。

[0053] 在本发明中，优选判定抗体对癌的药效或感受性。作为癌，可以为实体癌(例如肺癌、大肠癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、前立腺癌、肝癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、皮肤癌等)或血液癌(例如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤等)中的任意的癌，优选为血液癌。特别优选癌为急性髓性白血病(AML)。

[0054] ＜关于抗体＞

[0055] TfR

[0056] 人转铁蛋白受体(TfR)是由人3号染色体所编码的由760个氨基酸构成的单次跨膜蛋白(序列号9)。该蛋白也被作为CD71抗原而被熟知，据认为参与细胞的铁摄取，参与细胞的增殖。本发明的TfR在结构上没有特别限定，也包括单体、多聚体、在细胞膜中表达的完整型(intact form)、构成细胞外区域的可溶型、截短型(truncated form)、或因基因突变、缺失等而得到的突变型(mutation form)、受到磷酸化等翻译后修饰的形式(form)等，是指全部的人TfR。

[0057] 反应和反应性

[0058] 在本说明书中，“进行反应”和“反应性”在没有特别说明时，是指相同的意思。即，是指抗体识别抗原。该抗原可以是在细胞膜表达的完整TfR，也可以是截短型、可溶型。另外，可以是保持立体结构的TfR，也可以是变性的TfR。作为研究反应性的方法，可以列举流式细胞术(FACS)、酶联免疫吸附检测法(ELISA)、蛋白质印迹(western-blot)、荧光微量测定技术(FMAT)、表面等离子体共振(BIAcore)、免疫染色、免疫沉淀等。

[0059] 作为流式细胞术所使用的抗体，利用FITC等的荧光物质、生物素等标记的抗体，也可以是没有被标记的抗体。根据所使用的抗体有无标记及其种类，使用荧光标记亲和素、荧光标记抗人免疫球蛋白抗体等。反应性能够通过在样本中添加足够量的抗TfR抗体(通常最终浓度为0.01～10μg/mL)来进行，通过与阴性对照抗体、阳性对照抗体的反应性进行比较来评价。

[0060] 抗体

[0061] 在本说明书中，根据需要，按照习惯使用以下的缩写(括号内)。

[0062] 重链(H链)、轻链(L链)、重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)、互补决定区(CDR)、第一互补决定区(CDR1)、第二互补决定区(CDR2)、第三互补决定区(CDR3)重链的第一互补决定区(VH CDR1)、重链的第二互补决定区(VH CDR2)、重链的第三互补决定区(VH CDR3)轻链的第一互补决定区(VL CDR1)、轻链的第二互补决定区(VL CDR2)、轻链的第三互补决定区(VL CDR3)。

[0063] 在本说明书中，“抗体”这一术语与免疫球蛋白意义相同，可以按照该技术领域通

常所知的去理解。具体而言，抗体这一术语不由制作抗体的任意的特定方法限定。例如，抗体这一术语中，有重组抗体、单克隆抗体、多克隆抗体，但不限定于这些。

[0064] 在本说明书中，“人抗体”这一术语是指可变区和恒定区的序列为人序列的任意的抗体。该术语包括具有来自人基因的序列，但包括例如进行了以使其以认为会降低免疫原性、增加亲和性、除去可能引起不希望的折叠的半胱氨酸等方式变化的抗体。另外，该术语也包括能够实施不是人细胞特有的糖苷化、在非人细胞中通过重组制作的这种抗体。这些抗体能够通过各种方式制得。

[0065] 在本说明书中，“人源化抗体”这一术语是指非人来源的抗体，非人种的抗体序列中的特征性的氨基酸残基置换成人抗体的对应位置中被识别的残基。该“人源化”的工序被认为可降低所得到的抗体在人中的免疫原性。应当理解为，使用该技术领域中公知的技术能够对非人来源的抗体进行人源化。例如，参照Winter等，Immunol.Today14:43～46(1993)。作为对象的抗体，能够将CH1、CH2、CH3、铰链区和/或阅读框区置换为对应的人序列，通过重组DNA技术以工程学制作。例如，能够参照WO92/02190以及美国专利第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,761号、第5,693,792号、第5,714,350号和第5,777,085号。在本说明书中，“人源化抗体”这一术语在其含义范围内包括嵌合人抗体和CDR移植抗体。

[0066] 在抗体的可变区中，阅读框区域(FR)的序列只要实质上不影响对所对应的抗原的特异性结合性即可，没有特别限定。优选使用人抗体的FR区域，也能够使用人以外的动物种(例如小鼠、大鼠)的FR区域。

[0067] 在抗体的一个方式中，除了可变区还包含恒定区(例如IgG型抗体)。恒定区的序列没有特别限定。例如，能够使用公知的人抗体的恒定区。作为人抗体的重链恒定区(CH)，只要属于人免疫球蛋白(以下记为hIgG)即可，但优选为hIgG类的CH，进一步优选能够使用属于hIgG类的hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4的亚类中的任一种。另外，作为轻链恒定区(CL)，属于hIg即可，能够使用κ簇或λ簇的CL。另外，也能够使用人以外的动物种(例如小鼠、大鼠)的恒定区。

[0068] 在本说明书中，“改变体”或“改变抗体”是指在亲本抗体的可变区(CDR序列和/或FR序列)的氨基酸序列中置换、缺失、添加和/或插入了1个或多个氨基酸。

[0069] 在本发明中，“亲本抗体”是指VH具有序列号7所示的氨基酸序列、VL具有序列号8所示的氨基酸序列的TfR436抗体。在氨基酸序列中，缺失、添加、置换和/或插入了1个或数个(例如1～8个、优选为1～5个、更优选为1～3个、特别优选为1或2个)的氨基酸。作为用于制备对TfR具有结合活性的抗体的氨基酸序列的本领域技术人员所熟知的方法，已知有对蛋白质导入突变的方法。例如，只要是本领域技术人员，能够通过定点诱变法(Hashimoto-Gotoh,T,Mizuno,T,Ogasahara,Y,anDNAkagawa,M.(1995)An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis.Gene 152,271-275、Zoller,MJ,and Smith,M.(1983)Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors.Methods Enzymol.100,468-500、Kramer,W,Drutsa,V,Jansen,HW,Kramer,B,Pflugfelder,M,and Fritz,HJ(1984)The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction.Nucleic Acids Res.12,9441-9456、Kramer W,and Fritz HJ(1987)Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods.Enzymol.154,350-367、

Kunkel,TA(1985)Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad Sci U S A.82,488-492)等,在对TfR具有结合活性的抗体的氨基酸序列中适当导入突变,由此能够制备与对TfR具有结合活性的抗体同等功能的改变抗体。也能够使用这种在抗体的可变区或恒定区中存在1个或数个氨基酸突变且对TfR具有结合活性的抗体。

[0070] 在本说明书中,“活性与亲本抗体同等”是指对人TfR的结合活性同等。“同等”不一定需要是相同程度的活性,活性可以得到增强,或者以具有活性为限,也可以活性降低。作为活性降低的抗体,例如,能够列举与原抗体相比具有30%以上的活性、优选为50%以上的活性、更优选为80%以上的活性、进一步优选为90%以上的活性、特别优选为95%以上的活性的抗体。

[0071] 作为结合活性,是指识别抗原。该抗原可以是在细胞膜表达的完整TfR,也可以是截短型、可溶型。另外,可以是保持立体结构的TfR,也可以是变性的TfR。例如,作为研究结合活性的方法,可以列举流式细胞术(FACS)、酶联免疫吸附检测法(ELISA)、蛋白质印记(western-blot)、荧光微量测定技术(FMAT)、表面等离子体共振(BIAcore)等。

[0072] 抗体的Tf-TfR结合抑制活性的测定能够如下所述进行。将TfR溶液在基板(96孔板等)中分注并静置、固定、封闭。接着,将经HRP标记的Tf溶液分注,进一步添加抗体,在室温中使其反应。此后,对基板进行清洗,添加显色试剂(TMB等)使其反应,用酶标仪测定吸光度。通过上述操作能够对该抗体评价Tf-TfR结合抑制活性。

[0073] 对于抗体不限定其来源,可以为人抗体、小鼠抗体、大鼠抗体等来自任意动物的抗体。另外,可以为嵌合化抗体、人源化抗体等。作为本发明中的抗体的优选方式之一,为人抗体。

[0074] 根据后述的产生抗体的细胞、宿主或者纯化方法,抗体的氨基酸序列、分子量、等电点或糖链的有无、形态等可以不同。例如,本发明所记载的氨基酸序列在翻译后受到修饰的情况也包括在本发明中。另外,对于已知的翻译后修饰以外的部位的翻译后修饰也包括在本发明中。另外,使抗体在原核细胞,例如大肠杆菌中表达时,在本来的抗体的氨基酸序列的N末端添加甲硫氨酸残基。在本发明中也可以使用这样的抗体。对于已知的翻译后修饰以外的部位的翻译后修饰也包括在本发明中。

[0075] 抗体的制作

[0076] (1)通过噬菌体展示文库获得与抗原反应的scFv

[0077] 抗体的获取能够通过该技术领域已知的各种方法来制备。例如,能够使用噬菌体展示技术,提供包含对TfR具有亲和性的各种抗体的储库的文库。接着,对这些文库进行筛选,能够鉴定并分离针对TfR的抗体。优选噬菌体文库是利用从人B细胞分离的mRNA制备的人VL和VHcDNA而生成的scFv噬菌体展示文库。制备和筛选这样的文库的方法是该技术领域所已知的。从将人TfR作为抗原筛选得到的显示反应性的噬菌体克隆中回收遗传物质。通过对所选择的噬菌体的基因进行解析,能够确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的VH和VL的DNA序列。若使用该scFv的序列而将scFv IgG化,则能够获得人抗体。

[0078] (2)scFv的IgG化(人抗体的制作)

[0079] 制作H链和L链的表达载体,使其在宿主细胞中表达,通过将分泌上清回收、纯化而获得人抗体。另外,通过使VH和VL在同一载体中表达(串联型)也能获得人抗体。这些方法是

公知的，能够参考WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、WO95/15388、WO97/10354等。

[0080] 具体而言，通过将编码VH的DNA与编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的其它DNA分子连结，能够获得全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在该技术领域是已知的(例如Kabat，E.A.等，(1991)Sequencesof Proteins of Immunological Interest，第5版，U.S.Department of Health and Human Services，NIH Publication No.91-3242)，包含这些区域的DNA片段能够通过标准的PCR扩增得到。重链恒定区可以为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD的恒定区，最优选为IgG1或IgG2的恒定区。IgG1恒定区序列可以为Gm(1)、Gm(2)、Gm(3)、Gm(17)等在不同个人之间产生的任意的各种等位基因或同种异型。这些同种异型相当于IgG1恒定区中的天然存在的氨基酸置换。

[0081] 通过将编码VL的DNA与编码轻链恒定区CL的其它DNA分子连结，能够获得全长L链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在该技术领域是已知的(例如Kabat，E.A.等，(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，U.S.Department of Health and Human Services，NIH Publication No.91-3242)，包含这些区域的DNA片段能够通过标准的PCR扩增得到。轻链恒定区可以为κ或λ的恒定区。κ恒定区可以为Inv(1)、Inv(2)、Inv(3)等在不同个人之间产生的任意的各种等位基因。λ恒定区可以来自3个λ基因中的任一种。

[0082] 通过将如上所述得到的编码H链和L链的DNA插入表达载体中而制作表达载体，使其在宿主细胞中表达，通过将所分泌的上清回收、纯化，能够获得人抗体。表达载体可以列举质粒、逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、花椰菜花叶病毒和烟草花叶病毒等植物病毒、黏粒、YAC、EBV来源的附加体等。表达载体和表达调控序列以适合所使用的表达用宿主细胞的方式选择。抗体轻链基因和抗体重链基因能够分别插入载体中，或者也能够将两种基因插入同一表达载体中。将抗体基因通过标准的方法(例如，抗体基因片段上的互补的限制性位点与载体的连结、或不存在限制性位点时为平滑末端连结)插入表达载体中。

[0083] 合适的载体是如上所述能够以使任意的VH或VL序列容易插入并使其表达的方式通过工程学制作得到的载体，其具有适当的限制性位点，编码功能性完整的人CH或CL免疫球蛋白序列。这样的载体通常在所插入的J区域中的剪接提供部位和人C区域中先行的剪接接受部位之间、或在人CH外显子内存在的剪接区域中还发生剪接。聚腺苷酸化和转录结束在位于编码区域下游的天然染色体部位发生。另外，重组表达载体也能够编码促进宿主细胞来源的抗体链分泌的信号肽。抗体链基因能够以信号肽在框内与免疫球蛋白链的氨基末端连结的方式在载体中克隆化。信号肽可以为免疫球蛋白信号肽，或者也可以为异种性信号肽(即非免疫球蛋白来源的信号肽)。

[0084] 抗体的表达载体除了抗体基因和调控序列以外，还可以具有控制载体在宿主细胞中复制的序列(例如复制起点)、选择标记基因等附加序列。选择标记基因促进载体导入的宿主细胞的选择。例如，通常，选择标记基因在载体所导入的宿主细胞上赋予对G418、潮霉素、甲氨嘌呤等药物的耐性。优选的选择标记基因中，有二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(在dhfr-宿主细胞中与甲氨嘌呤选择/扩增一起使用)、新霉素磷酸转移酶基因(G418选择用)和谷氨酸合成酶基因。

[0085] 利用由以上方法制作的抗体基因表达载体对宿主细胞进行转化。作为宿主细胞，

只要是细菌、酵母、动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等能够产生抗体的细胞即可，可以为任意细胞，但优选为动物细胞。作为动物细胞，可以列举中国仓鼠卵巢细胞CHO/dhfr(-)细胞CHO/DG44细胞、来自猴的细胞COS细胞(A.Wright&S.L.Morrison,J.Immunol.160,3393-3402(1998))、SP2/0细胞(小鼠骨髓瘤)(K.Motmans et al.,Eur.J.Cancer Prev.5,512-5199(1996),R.P.Junghans et al.,Cancer Res.50,1495-1502(1990))等。另外，转化时可以合适使用脂质体法(R.W.Malone et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,6007(1989),P.L.Felgner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,7413(1987)、电穿孔法、磷酸钙法(F.L.Graham&A.J.van der Eb,Virology 52,456-467(1973))、DEAE-Dextran法等。

[0086] 对转化体进行培养后，从转化体的细胞内或培养液分离人抗体。抗体的分离、纯化能够将离心分离、硫酸铵分级、盐析、超滤、亲和层析、离子交换层析、凝胶过滤层析等的方法适当组合而利用。

[0087] 抗体片段

[0088] 能够基于抗体或基于编码抗体的基因的序列信息来制作抗体片段。作为抗体片段，可以列举Fab、Fab'、$F(ab')_2$、scFv、dsFv抗体。

[0089] Fab是通过将IgG在半胱氨酸存在下进行木瓜蛋白酶消化而得到的、由L链和包含H链可变区、CH1区域和铰链部的一部分的H链片段所构成的分子量约5万的片段。本发明中，能够通过将上述抗体进行木瓜蛋白酶消化而获得。另外，也能够将编码上述抗体的H链的部分和L链的DNA重组入适当的载体，使用该载体进行转化，从所得到的转化体制备Fab。

[0090] Fab'是通过将后述的$F(ab')_2$的H链间的二硫键切断而得到的分子量约5万的片段。本发明中，能够通过将上述抗体进行胃蛋白酶消化，使用还原剂切断二硫键而获得。另外，也能够与Fab同样使用编码Fab'的DNA通过基因工学来制备。

[0091] $F(ab')_2$是通过将IgG进行胃蛋白酶消化得到的、由L链和包含H链可变区、CH1区域和铰链部的一部分的H链片段所构成的片段(Fab')由二硫键结合的分子量约10万的片段。本发明中，通过将上述抗体进行胃蛋白酶消化而获得。另外，也能够与Fab同样使用编码$F(ab')_2$的DNA通过基因工学来制备。

[0092] scFv是将由H链可变区和L链可变区构成的Fv通过适当的肽接头连接一个链的C末端和另一个的N末端而单链化的抗体片段。作为肽接头，例如能够使用柔软性高的$(GGGGS)_3$等。例如，能够使用编码上述抗体的H链可变区和L链可变区的DNA和编码肽接头的DNA构建编码scFv抗体的DNA，将其重组入适当的载体，使用该载体进行转化，从所得到的转化体制备scFv。

[0093] dsFv是在H链可变区和L链可变区的适当的位置导入Cys残基，使H链可变区和L链可变区被二硫键稳定化的Fv片段。各链中的Cys残基的导入位置能够基于由分子模拟所预测的立体结构来确定。本发明中，例如根据上述抗体的H链可变区和L链可变区的氨基酸序列预测立体结构，基于这样的预测，构建分别编码导入了突变的H链可变区和L链可变区，将其组入适当的载体，使用该载体进行转化，从所得到的转化体制备dsFv。

[0094] 另外，也能够使用适当的接头使scFv抗体、dcFv抗体等连结，或者融合链霉亲和素，而将抗体片段多聚体化。

[0095] 通过以下的实施例更详细地说明本发明，但是本发明不受实施例的限定。

[0096] 实施例

[0097] 在以下的实施例中,使用国际公开WO2014/073641号公报的第0090和0091段记载的TfR436抗体。

[0098] 以下表示TfR436抗体的CDR序列。

[0099] VH CDR1:SYGMH(序列号1)

[0100] VH CDR2:VISYDGSNKYYADSVKG(序列号2)

[0101] VH CDR3:DSNFWSGYYSPVDV(序列号3)

[0102] VL CDR1:TRSSGSIASNSVQ(序列号4)

[0103] VL CDR2:YEDTQRPS(序列号5)

[0104] VL CDR3:QSYDSAYHWV(序列号6)

[0105] 以下表示TfR436抗体的VH序列和VL序列。

[0106] TfR436 VH(序列号7)

[0107] DVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFKSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDSNFWSGYYSPVDVWGQGTTVTVSS

[0108] TfR436 VL(序列号8)

[0109] NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNSVQWYQQRPGSAPITVIYEDTQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLQTEDEADYYCQSYDSAYHWVFGGGTKLAVL

[0110] 实施例1:TfR436抗体的结合部位的鉴定

[0111] TfR436抗体不与小鼠TfR发生交叉反应,但是与仓鼠TfR显示交叉反应性。进行TfR中的转铁蛋白(Transferrin)(TF)结合部位(第569～760位氨基酸)的氨基酸序列的比对。在人TfR序列中,选出与仓鼠、与小鼠不同的氨基酸。对选出的氨基酸如图1所示进行点突变,制作了可溶性TfR突变片段。

[0112] (1)可溶性野生型TfR(wild type TfR,sTfR)和TfR突变片段(TfR mutant fragment,MF1～MF7)的制作

[0113] 全合成编码人TfR胞外域(第89～760位氨基酸)或者图1所示的各个TfR突变片段(MF1～MF7)和AAARGGPEQKLISEEDLN SAVDHHHHHH(序列号10)的碱基序列。在表达载体pCAGGS(非专利文献2.:Niwa et al.1991)中重组了新霉素耐性基因和DHFR基因的载体的多克隆位点中插入各个合成的基因,制作了pCAGGS-Neo-DHFR-sTFR-myc-his表达质粒。使用Expifectamine(Thermo Fisher scientific)上述质粒转染Expi293细胞(Thermo Fisher scientific),以37℃、8%CO_2、135rpm培养5天。此后通过离心回收培养上清,在AKTA prime(Cytiva)上连接HisTrapHP(Cytiva)柱,结合缓冲液使用20mM咪唑/DPBS,洗脱缓冲液使用500mM咪唑/DPBS,纯化了sTfR或者MF1～MF7。洗脱的蛋白质使用Zeba spin column(Thermo scientific)以30mM HEPES、5%海藻糖、pH7.2进行缓冲液交换。

[0114] (2)TfR436抗体的结合部位的鉴定

[0115] 将上述纯化的sTfR或者MF1～MF7用PBST(Phosphate Buffered Saline with Tween20,TaKaRa)稀释,从600ng/mL以3倍稀释制备7个梯度。此后,在Ni-NTA HisSorb Strips 96孔板(QIAGEN)中以100μL/孔分注稀释液,置于摇动器,在室温下使其反应。1小时后用PBST缓冲液清洗5次,以100μL/孔分注TfR436抗体(1μg/mL),置于摇动器,在室温下反应1小时。此后,用PBS-T缓冲液清洗5次,以100μL/孔分注50,000倍稀释的二次抗体F(ab')$_2$Fragment Anti-Human IgG Fcγ(Jackson Immuno Research)在室温下反应1小时。用

PBST缓冲液清洗5次后，以100μL/孔分注TMB可溶性反应剂(高敏度)(Scy Tek Laboratories)，在室温、避光下反应3分钟后，以100μL/孔添加TMB终止液(Scy Tek Laboratories)用，摇动器振动1分钟，用酶标仪测定450nm(ref.620nm)的吸光度。

[0116] 结果如图2所示，可观察到TfR436抗体与TfR突变片段MF5的反应性降低，与其它突变片段的反应性没有观察到降低。即，将TfR的第629位、第630位、第633位氨基酸置换为其它氨基酸时，TfR436抗体无法识别TfR。暗示第629～633位氨基酸是TfR436抗体的识别表位。

[0117] 实施例2:Tf-TfR结合抑制中TfR436抗体和比较用抗体的比较

[0118] (1)比较用抗体A24的制作

[0119] 专利文献US2008/0193453中记载了针对人TfR的A24抗体。为了将TfR436抗体与该抗体进行比较，获得了保藏的杂交瘤(Hybridoma)，生产抗体。具体而言，将杂交瘤在RPMI1640(Thermo Fisher Scientific)、FBS 10％的培养基中以细胞浓度成为1～2×10^5/mL的方式接种，以37℃的5％CO_2培养箱进行培养。扩大培养后，通过离心回收细胞，用PBS清洗2次后，在无血清培养基cosmedium005(COSMOBIO)、0.5％Nutridoma-CS(Roche)中进一步扩大培养至550mL。在细胞融合5天后通过离心回收培养上清。

[0120] 将所回收的上清对蛋白质A载体(Ab-Capcher ExTra:PROTENOVA公司)上样，将与蛋白质A结合的抗体用0.1M盐酸甘氨酸缓冲液(pH2.7)进行洗脱，迅速地用1M Tris盐酸缓冲液(pH 8.5)中和。此后使用Ultracel超滤盘(Merck Millipore)在PBS进行缓冲液交换。

[0121] (2)Tf-TfR结合抑制中TfR436抗体与其它公司抗体的比较

[0122] 将实施例1中记载的sTfR用PBST调整为5.0μg/mL，在MaxiSorp96孔板(Nunc)中以100μL/孔分注稀释液，在4℃静置一晚进行固定。在第二天舍弃固定液，以100％Block-Ace(DS Pharma Biomedical)200μL/孔进行室温静置，进行封闭。在1小时后用PBST缓冲液清洗5次后，以50μL/孔分注HRP标记的Tf(2μg/mL)，再以50μL/孔添加TfR436抗体、A24抗体(从10μg/mL开始2倍稀释系列)或holo-Tf(Sigma，从300μg/mL开始2倍稀释系列)。在室温反应1小时后，用PBST缓冲液清洗5次，以100μL/孔分注TMB可溶性反应剂(高敏度)，在室温避光下使其反应。25分钟后，以100μL/孔添加TMB终止液，用摇动器振动1分钟。此后，用酶标仪测定450nm(ref.620nm)的吸光度。

[0123] 结果如图3所示，TfR436抗体以相当低的用量(100ng/mL)完全抑制了Tf-TfR的结合。另一方面，A24抗体以10μg/mL的用量也没能完全抑制Tf-TfR的结合，仅能抑制Tf-TfR的结合的50％。暗示在Tf-TfR的结合抑制中TfR436抗体是优异的。

[0124] 实施例3:AML临床样本中的细胞内铁量与利用TfR436抗体得到的增殖抑制效果(GI50)的比较

[0125] 为了验证AML临床样本中的细胞内铁量与由TfR436抗体暴露得到的增殖抑制效果的关系性，实施了以下的试验。

[0126] (1)利用TfR436抗体得到的AML临床样本的增殖抑制效果

[0127] 使用AML临床样本算出由TfR436抗体暴露得到的增殖抑制效果(GI50值)。具体而言，从AML临床样本(骨髓或末梢血)中分离出单核细胞，将所得到的细胞以成为5000个/90μL的方式悬浮在MethoCult H4534 Classic without EPO(STEMCELL#ST-04534)中，接种在96孔板中。将TfR436抗体用RPMI-1640培养基(ThermoFisher#11875119)稀释，以成为最终

浓度5000、1000、500、100、50、10、5、1ng/mL和0(无添加)的方式,对来自AML临床样本的细胞分别添加10μL。在37℃的5%CO_2培养箱内培养7天后,向各孔添加100μL的CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega#G7572)并混合,在10分钟后以光度计检测荧光。将仅添加培养基的孔作为空白对照,算出以TfR436抗体无添加孔中的平均值作为100%时的各抗体浓度下的增殖率之后,使用XLfit算出GI50值。

[0128] (2)AML临床样本中的细胞内铁量的测定

[0129] 使用AML临床样本测定细胞内铁量。具体而言,从AML临床样本收集1.0×10^7个细胞后,用DPBS清洗3次。对细胞团添加250μL的LysisM Reagent(Roche#04719 956001)和2.5μL的6N-HCl并混合,在室温下静置1小时。离心后,将回收的上清用于铁定量。通过同样的操作制备了作为标准样品的K562细胞株并进行了冻存。铁定量根据金属检测铁测定LS(菲啰嗪法)(Metallogenics#FE31M)实施。此外,对每个AML临床样本的细胞内铁定量也进行了K562细胞株的细胞内铁定量,算出其比较值。

[0130] (3)细胞内铁量与由TfR436抗体得到的增殖抑制效果的关系

[0131] 将各AML临床样本中的细胞内铁量与由TfR436抗体得到的增殖抑制效果(GI50值)的关系示于图4。

[0132] 其结果,AML临床样本的细胞内铁量和GI50值显示出相关性,如果细胞内铁量为低值,则GI50值也显示出低值的倾向。由此暗示了如果AML临床样本中细胞内铁量为低值时,则由TfR436抗体可能显示出充分的药理效果。

[0133] 实施例4:细胞株中的细胞内铁量与由TfR436抗体得到的增殖抑制效果(GI50)的比较

[0134] 为了证实实施例3中所检验得到的细胞内铁量与由于TfR436抗体暴露得到的增殖抑制效果的相关性,使用细胞株实施了以下的试验。(1)细胞株中的细胞内铁量的测定

[0135] 使用Kasumi-1(美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection),ATCC#CRL-2724)、HL60(JCRB细胞库#JCRB0085)、KO52(JCRB细胞库#JCRB0123)、CCRF-CEM(ATCC#CCL-119)测定细胞内铁量。具体而言,各细胞株以成为1.0×10^5cells/mL的方式,Kasumi-1和HL60悬浮于RPMI1640+20%FBS培养基、KO52悬浮于Alpha-MEM+10%FBS培养基、CCRF-CEM悬浮于RPMI1640+10%FBS培养基,在T75烧瓶中接种20mL。将阴性对照单克隆抗体以最终浓度5μg/mL的方式添加,在37℃的5%CO_2培养箱内中培养。96小时后回收细胞,用PBS清洗后,对各细胞株每1.0×10^7个细胞添加250μL的LysisM Reagent和2.5μL的6N-HClbig并混合,在室温下静置1小时。离心后,将回收的上清用于铁定量。作为标准样品,用RPMI1640+10%FBS培养基与其它细胞株同样进行培养,回收并制备K562(ATCC#CCL-243)细胞株的上清用于铁定量。铁定量根据金属检测铁测定LS(菲啰嗪法)实施。将测得的铁量除以作为试样使用的细胞数,求出每1个细胞的细胞内铁量,然后算出各细胞株的细胞内铁量相对于K562细胞株的细胞内铁量的比较值。

[0136] (2)由TfR436抗体得到的细胞株的增殖抑制效果

[0137] 使用Kasumi-1、HL60、KO52、CCRF-CEM,算出由TfR436抗体暴露得到的增殖抑制效果(GI50值)。具体而言,将各细胞株以成为10000个/50μL的方式悬浮于各种最佳的细胞培养用培养基,接种在96孔板中。对于TfR436抗体和阴性对照单克隆抗体,使用同样的培养基,从最终浓度5000ng/mL以公比成为3.16倍的方式分别稀释制备9个梯度。将这些抗体添

加培养基和抗体无添加培养基对各细胞株分别添加50μL。在37℃的5％CO_2培养箱内培养96小时后，在各孔中添加20μL的CellTiter 96AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega#G3580)并混合，在37℃的5％CO_2培养箱内静置4小时后，检测505nm的吸光度。将仅添加培养基的孔作为空白对照，算出以抗体无添加的孔中的平均值作为增殖率100％时的各抗体浓度下的增殖率后，使用MasterPlex ReaderFit算出GI50值。

[0138] (3)各细胞株中的细胞内铁量与由TfR436抗体得到的增殖抑制效果将各细胞株中的细胞内铁量与由TfR436抗体得到的增殖抑制效果(GI50值)示于表1。

[0139] 其结果，与实施例3的图4中的细胞内铁量与由TfR436抗体得到的增殖抑制效果(GI50值)的相关性一致，验证的细胞株的细胞内铁量均为低值，GI50值显示低值。暗示了TfR436抗体对于这些细胞内铁量低的细胞株可能显示充分的药理效果。

[0140] [表1]

[0141]

细胞株	与K562的比较值	GI50(ng/mL)
Kasumi-1	0.43	39.0
HL60	0.21	43.5
KO52	0.33	84.0
CCRF-CEM	0.13	37.5

[0142] 实施例5:Kasumi-1皮下移植模型中的TfR436抗体的抗肿瘤效果

[0143] 为了验证细胞系来源的异种移植(cell line-derived xenograft,CDX)模型中的TfR436抗体的药理效果，使用实施例4中验证的Kasumi-1的皮下移植模型实施了以下的试验。

[0144] 将急性髓性白血病细胞株Kasumi-1用RPMI-1640、10％FBS、1％P/S培养。将扩大培养得到的细胞以1000rpm离心5分钟，回收细胞团，悬浮在不含抗生素和血清的RPMI-1640培养基中，制备为2×10^8/mL，在冰冷下添加等量的Matrigel，颠倒混合，将其100μL移植到小鼠的右腹侧部皮下。移植细胞数为1×10^7/只。

[0145] 经时测定所移植的个体的平均肿瘤体积，在确认了肿瘤体积的增加趋势的移植21天后，使用生物实验数据统计分析EXSUS(Version8.1，株式会社EPクロア)根据肿瘤体积实施了随机分组。组结构为n＝8，4组。

[0146] 将给药量设为10mL/kg，以阴性抗体组(10mg/kg)为对照组，给药组中以1、3、10mg/kg的用量将TfR436抗体以每周1次、共计2次实施给药。给药后，每周2次利用游标卡尺进行肿瘤测定，求出各组的肿瘤体积。抗肿瘤效果的判定根据肿瘤体积进行判定。

[0147] 肿瘤体积通过下式算出。

[0148] 肿瘤体积＝(短径)^2×长径×0.5

[0149] 将肿瘤体积平均值的经时变化示于图5。在TfR436抗体1mg/kg以上的浓度中确认了用量依赖性的抗肿瘤效果，在全部组中确认了相对于阴性抗体组的显著差异(2组为p＝0.0012;3、4组为p<0.0001)。特别是对于10mg/kg给药组，全部个体的肿瘤消失，在试验结束日(移植60日)也没有确认到肿瘤的再增殖。

[0150] 实施例6:HL60皮下移植模型中的TfR436抗体的抗肿瘤效果

[0151] 为了验证细胞系来源的异种移植(cell line-derived xenograft,CDX)模型中的TfR436抗体的药理效果，使用实施例4中验证的HL60的皮下移植模型实施了以下的试验。

[0152] 将急性早幼粒细胞白血病细胞株HL60用RPMI-1640、10％FBS、1％P/S培养。将扩大培养得到的细胞以1000rpm离心5分钟，回收细胞团，悬浮在不含抗生素和血清的RPMI-1640培养基中，制备为2×10^{8}/mL，在冰冷下添加等量的Matrigel，颠倒混合，将其100μL移植到小鼠的右腹侧部皮下。移植细胞数为1×10^{7}/只。

[0153] 经时测定所移植的个体的平均肿瘤体积，在确认了肿瘤体积的增加趋势的移植9天后，使用生物实验数据统计分析EXSUS(Version8.1，株式会社EPクロア)根据肿瘤体积实施了随机分组。组结构为n＝5，5组。

[0154] 将给药量设为10mL/kg，阴性对照组中将柠檬酸、给药组中以0.3、1、3、10mg/kg的用量将TfR436抗体以每周1次、共计4次实施给药。给药后，每周2次利用游标卡尺进行肿瘤测定，求出各组的肿瘤体积。抗肿瘤效果的判定根据肿瘤体积进行判定。

[0155] 肿瘤体积通过下式算出。

[0156] 肿瘤体积＝(短径)^{2}×长径×0.5

[0157] 将肿瘤体积平均值的经时变化示于图6。在TfR436抗体1mg/kg以上的浓度中确认了用量依赖性的抗肿瘤效果。特别是对于10mg/kg给药组，全部个体的肿瘤消失，在给药结束49天后(移植79天)也没有确认到肿瘤的再增殖。在10mg/kg组中确认了在统计学上具有显著性差异(p＝0.0011)。

[0158] 实施例7:KO52尾静脉移植模型中的TfR436抗体的寿命延长效果

[0159] 为了验证细胞系来源的异种移植(cell line-derived xenograft，CDX)模型中的TfR436抗体的药理效果，使用实施例4中验证的KO52的尾静脉移植模型实施了以下的试验。

[0160] 将急性髓母细胞性白血病细胞株KO52用Alpha-MEM、10％FBS、1％P/S培养。将扩大培养得到的细胞以1000rpm离心10分钟，回收细胞团，悬浮在注射用生理盐水中，制备为2.5×10^{7}/mL。将所制备的细胞悬浮液保存在冰水中并带入饲养室，在29G注射器(マイジェクター)中分别填充1只份，将其200μL通过小鼠尾静脉移植。移植细胞数为5×10^{6}/只。

[0161] 在移植细胞3天后，使用生物实验数据统计分析EXSUS(Version8.1，株式会社EPクロア)根据体重实施随机分组。细胞移植时细胞液漏出等存在问题的个体预先在分组时排除。组结构为n＝6，3组。分组后，以每周2～3次的频度进行小鼠的观察，通过全身状态的观察确认到衰弱、体温降低等濒死的征兆时，出于人道目的实施安乐死。

[0162] 将给药量设为10mL/kg，阴性对照组中将柠檬酸、给药组中将TfR436抗体以10mg/kg的用量每2周1次、共计2次实施给药。2个给药组的1组中，在第2次给药后，在第4周再进行2周1次的给药，实施共计4次给药。

[0163] 试验期间进行小鼠的观察，实施生死判定。在移植后104天结束试验，通过小鼠的生存时间实施统计分析。其结果，根据与阴性对照组的比较，TfR436抗体给药组中，2次给药组在Log-Rank检测中显示p＝0.0003、在Wilcoxon检测中显示p＝0.0003，4次给药组在Log-Rank检测中显示p＝0.0019、在Wilcoxon检测中显示p＝0.0016，分别确认了显著的寿命延长效果(图7)。此外，4次给药组的1只的死亡例根据剖检结果判定为不是由于KO52移植的影响，而是由于scid小鼠特有的自然发生胸腺肿瘤导致的死亡。

[0164] 实施例8:CCRF-CEM静脉移植模型中的TfR436抗体的寿命延长效果

[0165] 为了验证细胞系来源的异种移植(cell line-derived xenograft，CDX)模型中的TfR436抗体的药理效果，使用实施例4中验证的CCRF-CEM的静脉移植模型实施了以下的试

验。

[0166] 将T细胞性急性白血病细胞株CCRF-CEM用RPMI-1640、10％FBS、1％P/S培养。将扩大培养得到的细胞以1000rpm离心5分钟，回收细胞团，悬浮在注射用生理盐水中，制备为2.5×10^{7}/mL。将其200μL通过小鼠尾静脉移植。移植细胞数为5×10^{6}/只。

[0167] 在移植细胞3天后，使用生物实验数据统计分析EXSUS(Version8.1，株式会社EPクロア)根据体重实施了随机分组。细胞移植时细胞液漏出等存在问题的个体预先在分组时排除。组结构为n＝10，5组。

[0168] 关于给药，在分组当日的移植3天后和移植7天后作为初次给药，以表2所示的时间表对每组实施共计5次。以每周2次的频度实施小鼠的体重测定，直至试验结束。在直至移植30天后以每周2次、在31天以后直至试验结束的移植97天每天实施小鼠的全身状态的观察。以每周2次的频度实施小鼠体重测定，算出相对于分组时的体重的比率。在体重减少率超过20％时，出于人道目的，使小鼠安乐死。此外，通过全身状态的观察，在确认到衰弱、体温降低等濒死的征兆时，也出于人道目的实施安乐死。

[0169] [表2]

[0170]

组	处置	给药用量（mg/kg）	n	给药频度	总给药次数	给药通路	初次给药日
1	空白（PBS）	0	10	2 次/周	5 次	静脉	第 3 天
2	TfR436	1	10	2 次/周	5 次	静脉	第 3 天
3	TfR436	10	10	2 次/周	5 次	静脉	第 3 天
4	TfR436	1	10	2 次/周	5 次	静脉	第 7 天
5	TfR436	10	10	2 次/周	5 次	静脉	第 7 天

[0171] 在全部给药组中，确认了与阴性对照PBS组相比显著的寿命延长效果(Wilcoxon检测)(关于图8和表3的初次给药为移植3天后的高用量组(第3天、10mg/kg)，在试验结束时80％的小鼠生存，确认了显著的寿命延长效果。另外，在低用量组中，TfR436也显著延长小鼠的生存时间，显示了优异的寿命延长效果。

[0172] [表3]

[0173]

组	检测	调整 p 值	标记
1 PBS	-	-	-
2（第 3 天，1mg/kg）	Log-Rank	0.0005	***
	Wilcoxon	p<0.0001	***
3（第 3 天，10mg/kg）	Log-Rank	p<0.0001	***
	Wilcoxon	p<0.0001	***
4（第 7 天，1mg/kg）	Log-Rank	0.1069	n.s.
	Wilcoxon	0.0074	**
5（第 7 天，10mg/kg）	Log-Rank	0.0052	**
	Wilcoxon	0.0001	***

[0174] n.s.:无显著差异

[0175] *:p<0.05

[0176] **:p<0.01

[0177] ***:p<0.001。

序列表

<110> 株式会社英仙蛋白质科学

<120> 抗转铁蛋白受体抗体的药效或感受性的判定方法

<130> F21732A-WO

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

400> 3

Asp Ser Asn Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Ser Val Gln
1 5 10

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 人
<400> 5
Tyr Glu Asp Thr Gln Arg Pro Ser
1 5
<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人
<400> 6
Gln Ser Tyr Asp Ser Ala Tyr His Trp Val
1 5 10
<210> 7
<211> 123
<212> PRT
<213> 人
<400> 7
Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Lys Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ser Asn Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 8
<211> 111
<212> PRT
<213> 人
<400> 8
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

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

<210> 9
<211> 760
<212> PRT
<213> 人
<400> 9

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

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val
180 185 190
Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg
195 200 205
Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
210 215 220
Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
225 230 235 240
Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
245 250 255
Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
260 265 270
Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe
275 280 285
Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
290 295 300
Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
305 310 315 320
Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr
325 330 335
Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp
340 345 350
Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser
355 360 365
Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile
370 375 380
Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
385 390 395 400
His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala
405 410 415
Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met
420 425 430
Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile
435 440 445
Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr
450 455 460
Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr
465 470 475 480
Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val

485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn

500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp

515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe

530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp

545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu

565 570 575

Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu

580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn

595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp

610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln

625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu

645 650 655

Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys

660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro

675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser

690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys

705 710 715 720

Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala

725 730 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp

740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe

755 760

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 重组标签

<400> 10

Ala Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
1 5 10 15

Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
20 25

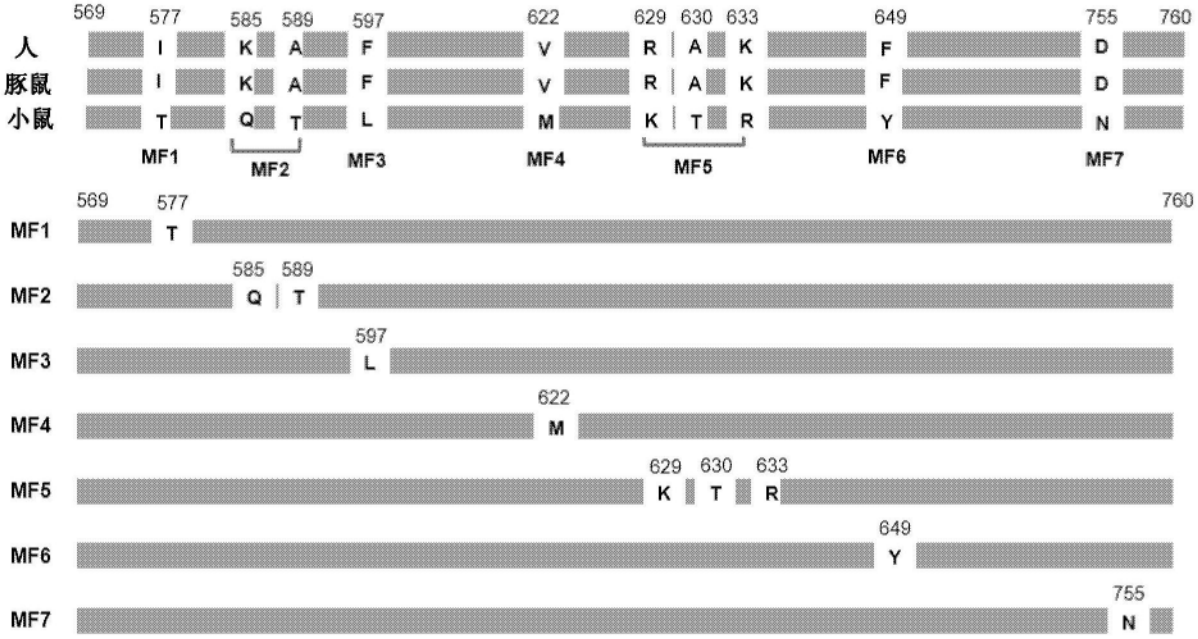

569
577
585
589
597
622
629
630
633
649
755
760
人
豚鼠
小鼠
I K A F V R A K F D
I K A F V R A K F D
T Q T L M K T R Y N
MF1
MF2
MF3
MF4
MF5
MF6
MF7
MF1 569 577 T 760
MF2 585 589 Q T
MF3 597 L
MF4 622 M
MF5 629 630 633 K T R
MF6 649 Y
MF7 755 N

图1

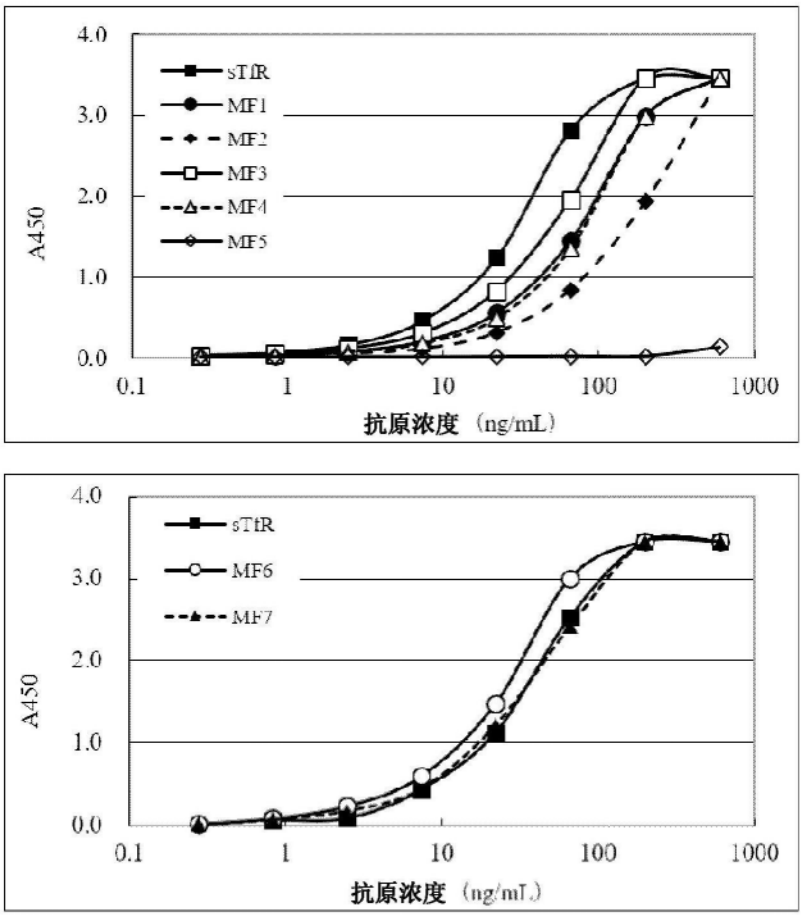

4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
A450
sTfR
MF1
MF2
MF3
MF4
MF5
0.1
1
10
100
1000
抗原浓度（ng/mL）
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
A450
sTfR
MF6
MF7
0.1
1
10
100
1000
抗原浓度（ng/mL）

图2

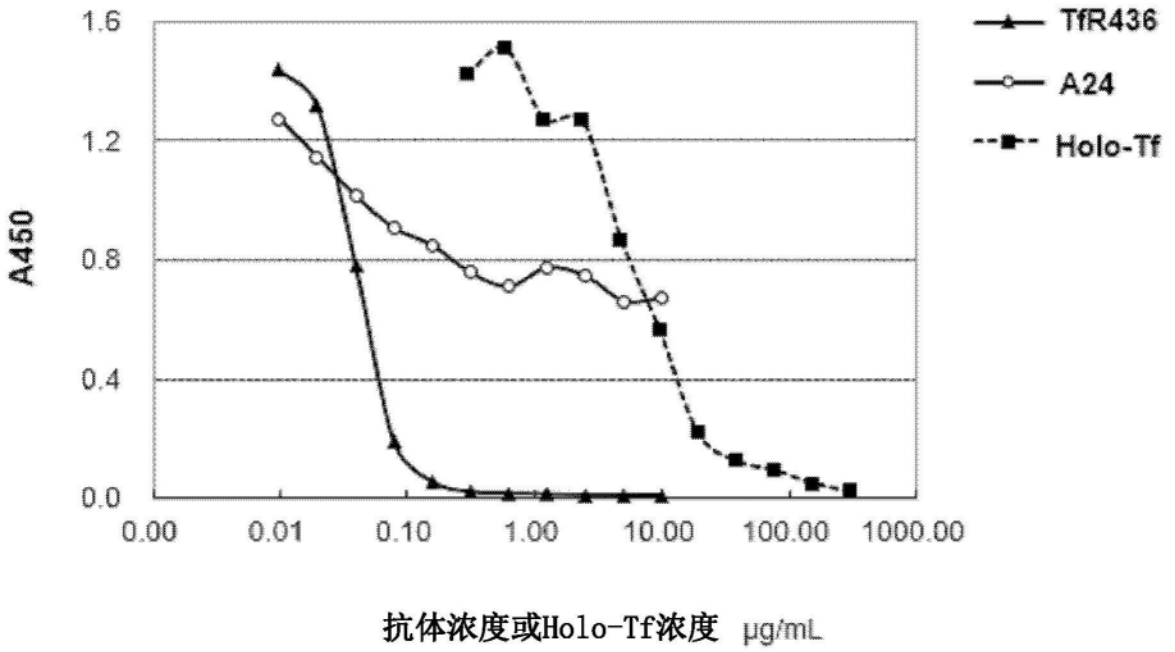

TfR436
A24
Holo-Tf
A450
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
0.00
0.01
0.10
1.00
10.00
100.00
1000.00
抗体浓度或Holo-Tf浓度 μg/mL

图3

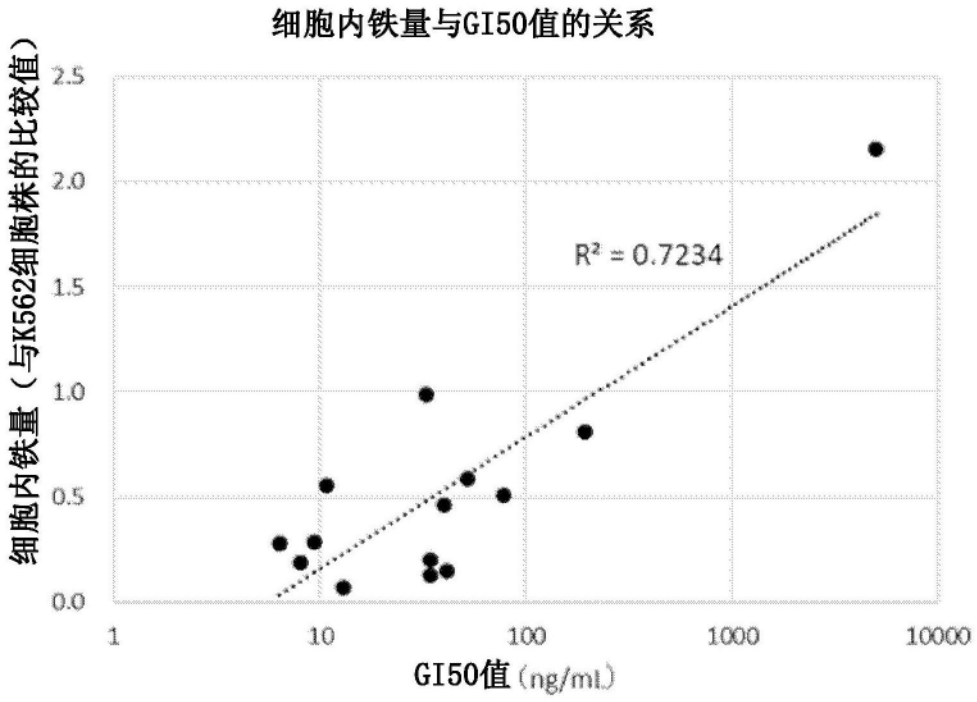

细胞内铁量与GI50值的关系
细胞内铁量（与K562细胞株的比较值）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
R² = 0.7234
1
10
100
1000
10000
GI50值（ng/mL）

图4

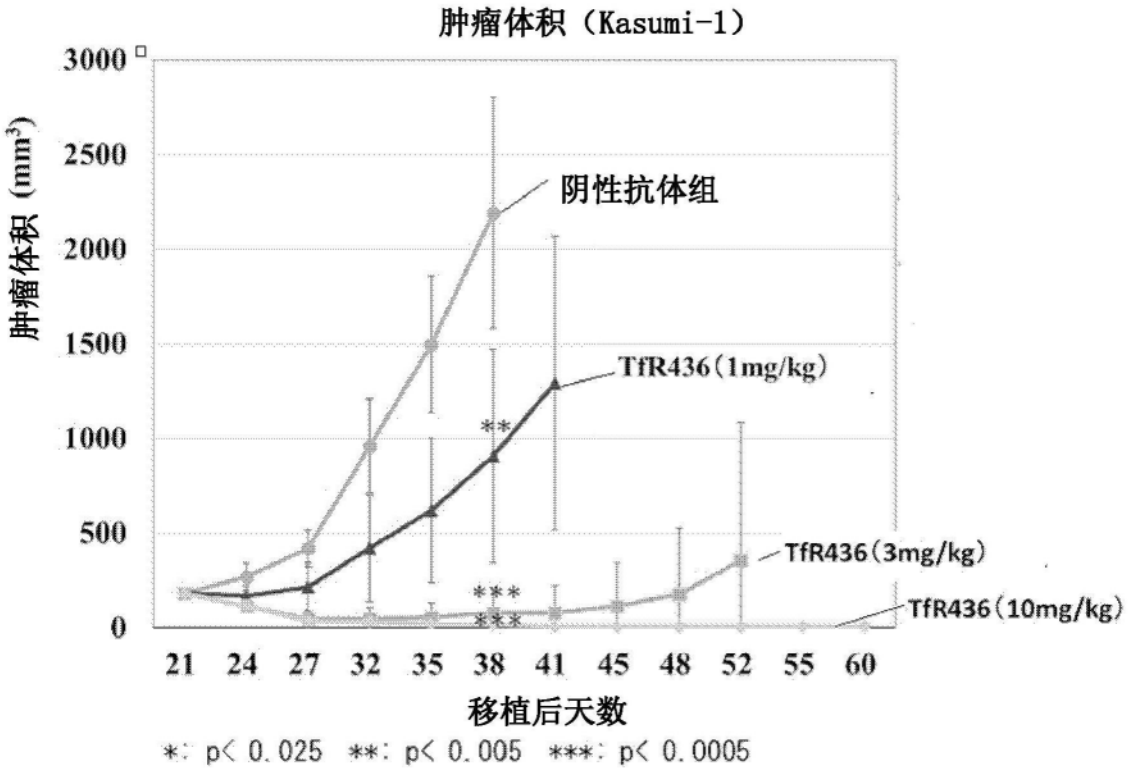

肿瘤体积（Kasumi-1）
肿瘤体积（mm³）
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
阴性抗体组
TfR436(1mg/kg)
TfR436(3mg/kg)
TfR436(10mg/kg)
**
***
***
21 24 27 32 35 38 41 45 48 52 55 60
移植后天数
*: p< 0.025 **: p< 0.005 ***: p< 0.0005

图5

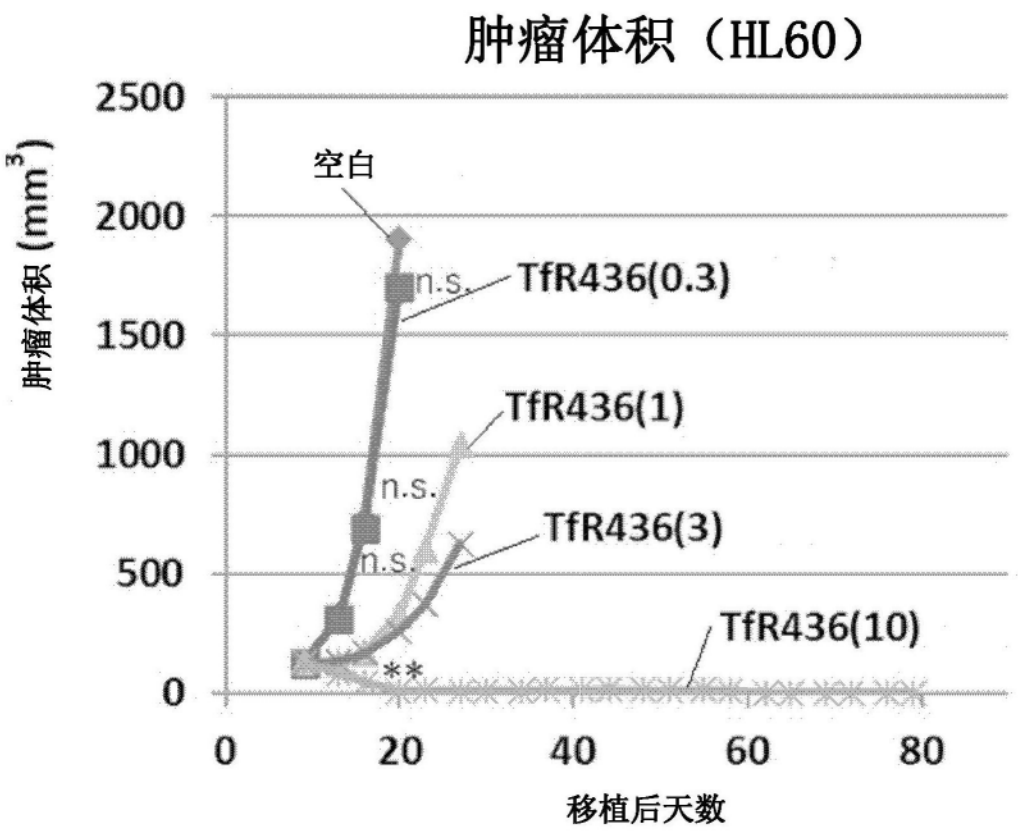

肿瘤体积（HL60）
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
空白
n.s.
TfR436(0.3)
TfR436(1)
n.s.
TfR436(3)
n.s.
TfR436(10)
**
0
20
40
60
80
移植后天数

图6

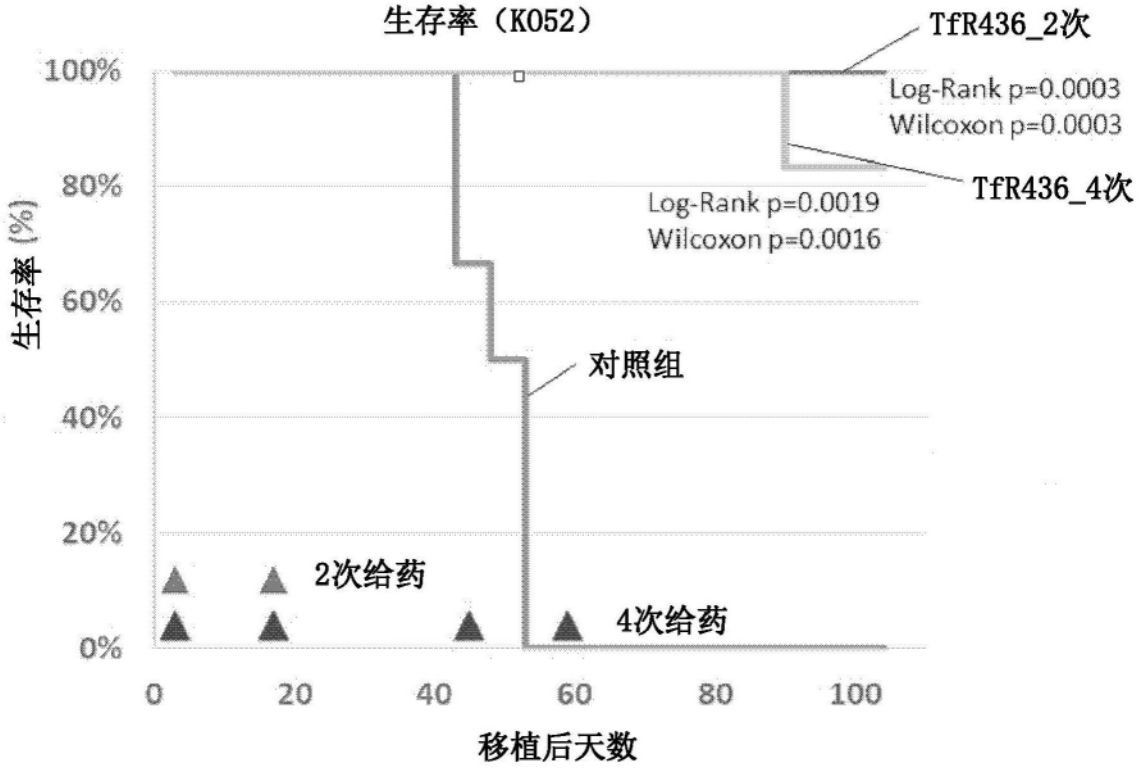

生存率（K052）
TfR436_2次
Log-Rank p=0.0003
Wilcoxon p=0.0003
TfR436_4次
Log-Rank p=0.0019
Wilcoxon p=0.0016
对照组
生存率 (%)
100%
80%
60%
40%
20%
0%
2次给药
4次给药
0
20
40
60
80
100
移植后天数

图7

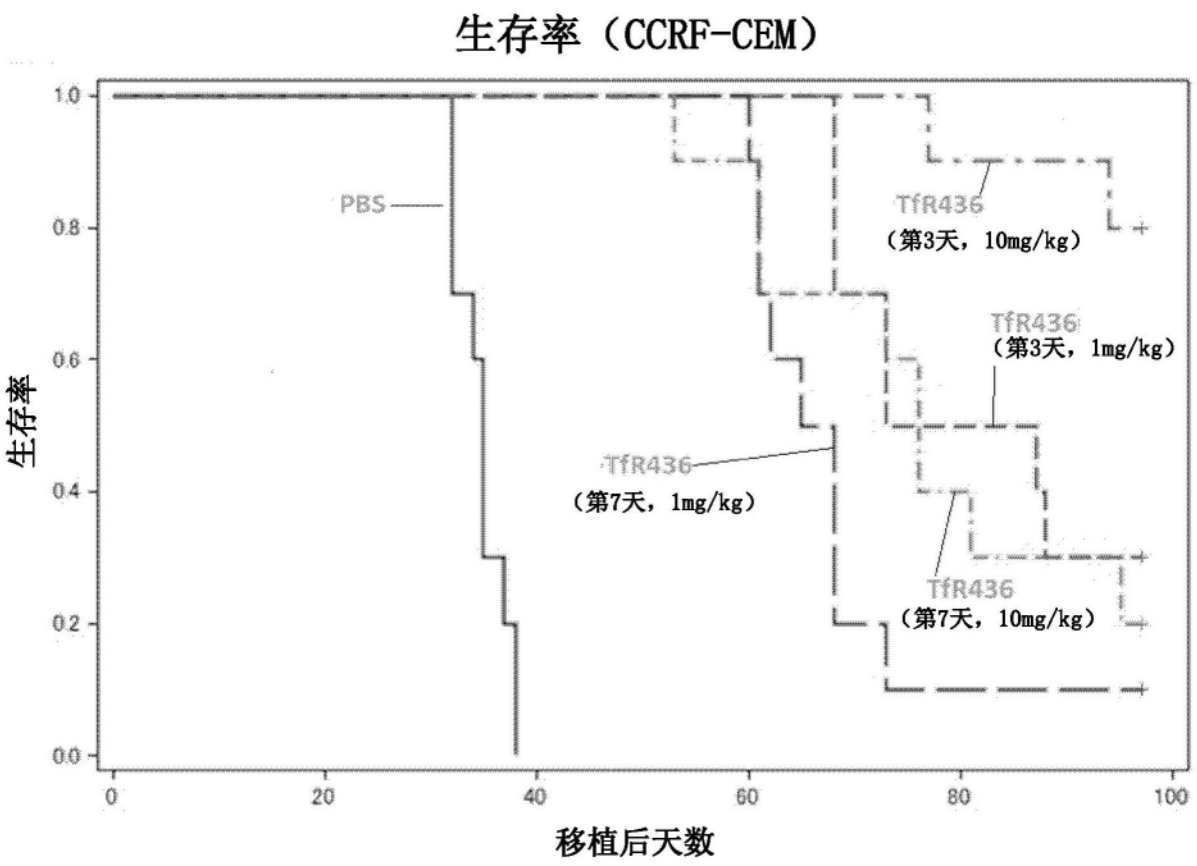

生存率（CCRF-CEM）
生存率
移植后天数
PBS
TfR436
（第3天，10mg/kg）
TfR436
（第3天，1mg/kg）
TfR436
（第7天，1mg/kg）
TfR436
（第7天，10mg/kg）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
20
40
60
80
100

图8