



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110461878 A

(43)申请公布日 2019. 11. 15

(21)申请号 201880019797.6

(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

(22)申请日 2018.03.19

代理人 刘依云 乔雪微

(30)优先权数据

62/473,554 2017.03.20 US

(51)Int.Cl.

C07K 16/30(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/00(2006.01)

2019.09.20

C07K 16/44(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/023123 2018.03.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/175310 EN 2018.09.27

(71)申请人 癌症治疗实验室有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 A·爱泼斯坦 胡培声

权利要求书3页 说明书13页

序列表10页 附图11页

按照条约第19条修改的权利要求书3页

(54)发明名称

用于在癌症疗法中靶向坏死的人源化抗核抗体

(57)摘要

提出了具有增强的结合亲和力和肿瘤摄取的人源化单克隆抗核抗体。特别优选的抗体是H-CDR3的定点突变体,与非人源化非突变的形式相比,该定点突变体具有高达约8倍提高的亲和力。在另外优选的方面,将此类人源化抗体用于肿瘤坏死靶向地递送免疫调节剂、免疫效应物、和其他治疗剂或诊断剂。

— F3 — I — CDR3 — I — F4 — I

mINT-MLV GSGTDFILSINSVETEDFGMYFCQSSSSWPLFGAGTKLEIK

HELV GSGTDFILTSRLEPEDFAVYYCQSSSSWPLFGQGTKEIK

hxB-B10LV GSGTDFILTSRLEPEDFAVYYCQSSSSWPLFGQGTKEIK

\* \* \* \* \*

EP/ScFv

HV	Linker (GSSSS)	LV
----	-------------------	----

1. 一种人源化抗核抗体,相对于相应的非人源化抗体,该人源化抗核抗体对核靶标具有提高的结合亲和力。

2. 如权利要求1所述的人源化抗体,其中该核靶标是单链DNA。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的人源化抗体,其中该人源化抗体具有比相应的非人源化抗体高至少2倍的结合亲和力。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的人源化抗体,其中该人源化抗体具有比相应的非人源化抗体高至少4倍的结合亲和力。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的人源化抗体,其中该人源化抗体具有比相应的非人源化抗体高至少8倍的结合亲和力。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的人源化抗体,其中相对于相应的非人源化抗体,该人源化抗体在H-CDR3中具有突变的氨基酸。

7. 如权利要求6所述的人源化抗体,其中H-CDR3中突变的氨基酸选自下组,该组由以下组成:<sup>107</sup>Phe→Arg、<sup>101</sup>Ile→His、<sup>102</sup>Gly→Arg、<sup>109</sup>Tyr→Thr、<sup>103</sup>Val→Ser、<sup>104</sup>Arg→Thr、<sup>109</sup>Tyr→Arg、和<sup>104</sup>Arg→Leu。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的人源化抗体,其中该人源化抗体具有以下各项中的至少一种:

H-CDR1序列,其包含TRYWMH (SEQ ID NO:1);

H-CDR2序列,其包含GAIYPGNSDTSYNQKFKG (SEQ ID NO:2);

H-CDR3序列,其包含EEIGVRRWFAY (SEQ ID NO:3);

L-CDR1序列,其包含RARQSSISNYLH (SEQ ID NO:4);

L-CDR2序列,其包含ASQSSIS (SEQ ID NO:5);以及

L-CDR3序列,其包含QQSNSWPLT (SEQ ID NO:6)。

9. 如权利要求1-6中任一项所述的人源化抗体,其中该人源化抗体具有VH序列,该VH序列包含

**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYWMHWVRQAP**

**GQALEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR**

**GEEIGVRRWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7)。**

10. 如权利要求1-6中任一项所述的人源化抗体,其中该人源化抗体具有VL序列,该VL序列包含IVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQSSISNYLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQSSISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:8)。

11. 一种杂合分子,该杂合分子包含与治疗剂和显像剂中至少一种偶联的如权利要求1-10中任一项所述的抗体的至少结合部分。

12. 如权利要求11所述的杂合分子,其中该抗体的至少结合部分是全长抗体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fab<sub>2</sub>片段、或scFv。

13. 如权利要求11-12中任一项所述的杂合分子,其中该治疗剂包含以下各项中的至少一种:细胞因子或其部分、趋化因子或其部分、髓源性抑制细胞 (MDSC) 的抑制剂、M2巨噬细胞的抑制剂、放射性同位素、共刺激分子、toll样受体 (TLR) 激动剂或配体、干扰上皮间充质转化 (EMT) 的分子、和化学治疗药。

14. 如权利要求11-12中任一项所述的杂合分子,其中该显像剂包含放射性同位素、PET

标记、和SPECT标记中的至少一种。

15. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-10中任一项所述的抗体或如权利要求11-14中任一项所述的杂合分子。

16. 如权利要求15所述的药物组合物,该药物组合物被配制成用于注射。

17. 一种用于靶向坏死细胞的方法,该方法包括使该坏死细胞与如权利要求1-10中任一项所述的抗体或如权利要求11-14中任一项所述的杂合分子接触。

18. 如权利要求17所述的方法,其中该坏死细胞是肿瘤微环境中的坏死肿瘤细胞。

19. 如权利要求17-18中任一项所述的方法,其中接触步骤在体内进行。

20. 一种将治疗剂递送至含有坏死肿瘤细胞的肿瘤微环境的方法,该方法包括:  
提供与如权利要求1-10中任一项所述的抗体偶联的治疗剂;并且

在允许该抗体与该肿瘤微环境中坏死细胞中的核靶标结合的条件下,使该微环境中的坏死肿瘤细胞与该治疗剂接触。

21. 如权利要求20所述的方法,其中该治疗剂包含以下各项中的至少一种:细胞因子或其部分、趋化因子或其部分、髓源性抑制细胞(MDSC)的抑制剂、M2巨噬细胞的抑制剂、放射性同位素、共刺激分子、toll样受体(TLR)激动剂或配体、干扰上皮间充质转化(EMT)的分子、和化学治疗药。

22. 如权利要求20-21中任一项所述的方法,其中该肿瘤是实体瘤。

23. 如权利要求20-22中任一项所述的方法,该方法进一步包括给予脉管系统通透性增强剂的步骤。

24. 一种将显像剂递送至含有坏死肿瘤细胞的肿瘤微环境中的方法,该方法包括:  
提供与如权利要求1-10中任一项所述的抗体偶联的显像剂;并且

在允许该抗体与该肿瘤微环境中坏死细胞中的核靶标结合的条件下,使该微环境中的坏死肿瘤细胞与该显像剂接触。

25. 如权利要求24所述的方法,其中该显像剂包含放射性同位素、PET标记、和SPECT标记中的至少一种。

26. 如权利要求24-25中任一项所述的方法,其中该肿瘤是实体瘤。

27. 如权利要求24-26中任一项所述的方法,该方法进一步包括给予脉管系统通透性增强剂的步骤。

28. 一种从鼠抗体产生亲和力优化的人源化抗体的方法,该方法包括:

鉴定与该鼠抗体序列具有预定最小同一性的人抗体序列;

将针对VH和VL的鼠CDR移植到经鉴定的人抗体序列的相应VH和VL中,以此获得嵌合VH和VL序列;

使用嵌合VH和VL序列产生scFv杂合体,并且在H-CDR3中进行定点诱变以产生scFv杂合体文库;

使用亲和力选择以从该scFv杂合体文库中鉴定结合物;并且

将该结合物的嵌合VH和VL序列移植到人抗体序列中,以此获得该亲和力优化的人源化抗体。

29. 如权利要求28所述的方法,其中除CDR外,该预定最小同一性是至少90%同一性。

30. 如权利要求28-29中任一项所述的方法,其中该scFv杂合体是噬菌体展示杂合体。

31. 如权利要求28-30中任一项所述的方法,其中H-CDR3中的定点诱变针对该H-CDR3的单个氨基酸位置进行。

32. 如权利要求28-31中任一项所述的方法,其中经至少三个连续的选择/富集循环进行该亲和力选择。

33. 如权利要求28-32中任一项所述的方法,其中该亲和力选择进一步包括在H-CDR3和/或框架区中进行另外的定点诱变的至少一个步骤。

## 用于在癌症疗法中靶向坏死的人源化抗核抗体

### 相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2017年3月20日提交的美国临时专利申请序列号US62/473,554的优先权权益,其内容通过引用并入本文。

### 技术领域

[0002] 本发明的领域涉及抗体,并且特别是涉及靶向肿瘤坏死的人源化抗体。

### 背景技术

[0003] 本背景描述包括可用于理解本发明的信息。这并非承认本文提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明相关,或者明确或隐含地引用的任何出版物是现有技术。

[0004] 所有出版物和专利申请通过引用结合在此,其程度就像这些出版物或专利申请中的每一个都是明确地和单独地通过引用结合在此的一样。当并入的参考文献中的定义或使用的术语与本文所提供的该术语的定义不一致或相反时,适用本文所提供的该术语的定义,而不适用该参考文献中该术语的定义。

[0005] 先前针对在细胞死亡后可获得的通用的细胞内抗原的单克隆抗体已经用于实体瘤的免疫疗法中(参见,例如,Cancer Research[癌症研究],48:5842-5848,1988;Hybridoma[杂交瘤],12(6):689-698,1993;或Cancer Biotherapy&Radiopharmaceuticals[癌症生物疗法和放射性药物],13(4):255-68,1998)。有利地,这种方法靶向存在于所有肿瘤中但通常在身体的正常组织中不可获得的肿瘤坏死区域。例如,已经研究了三种“肿瘤坏死靶向(“TNT”)鼠单克隆抗体,并且其包括针对组蛋白H1和DNA的muTNT-1,与组蛋白组分H1和H3的共同表位结合的muTNT-2,和主要结合单链DNA的muTNT-3。值得注意的是,荷瘤小鼠的生物分布分析表明,与muTNT-1和muTNT-2相比,TNT-3在肿瘤中显示出最高摄取,并且已经提出了TNT-3用于实体瘤的放射免疫疗法(参见,例如,Cancer Biother Radiopharm[癌症生物治疗和放射药物]1998年8月;13(4):255-68)。在可替代的方法中,构建了嵌合TNT-3抗体/鼠干扰素- $\gamma$ 融合蛋白用于实体恶性肿瘤的免疫疗法(参见,例如,Hybrid Hybridomics[杂合杂交瘤]2003年8月;22(4):197-207)并且其展现出各种所希望的特征。

[0006] 遗憾地,鼠单克隆抗体在人中具有免疫原性,并因此在人患者中具有极大受限的治疗潜力。为帮助解决与免疫原性相关联的问题,使用人恒定区和鼠可变区构建嵌合TNT-3抗体,所述人恒定区占该嵌合TNT-3抗体分子的65%。然而,由于这种嵌合抗体仍包含约35%的鼠残基,抗体保持免疫原性。

[0007] 为进一步降低嵌合抗体的免疫原性,可以采用各种方法。最简单的人源化方法之一是互补决定区(CDR)移植,其中六个抗体CDR被简单地移植到相应的人框架区中,这进一步使鼠残基的数量减少了约25%。遗憾地,尽管CDR移植至少在某些情况下已被成功用于若干种抗体的人源化,但移植通常改变结合谱,导致对抗原的亲合力的不希望的降低(参见,例如,J Mol Biol[分子生物学杂志]224:487-499,1992),如其他地方所报道的,所述降低高达数百倍(参见,例如,Proc.Natl Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],89(10):4285-

9,1992)。因此,在大多数情况下,必须将CDR移植与一些框架残基的微调相结合,这些框架残基对于恢复人源化抗体的亲和力可能是重要的。然而,可能有助于CDR结构的重要框架残基的数量相对较多,并且经常妨碍基于原理的抗体设计。而且,框架残基与一个或多个CDR之间的相互作用进一步使分析复杂化,使得微调方法通常耗时且不可预测。

[0008] 在又另一种方法中,通过CDR的逐步突变恢复人源化抗体的亲和力(参见,例如,Proc.Natl Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],95,6037-6042,1998)。仍有一些报道,VH链的CDR区的多样性对于大多数抗体特异性是足够的,并且指出体细胞突变可以实现出人意料的高亲和力。实际上,H-CDR3显示出在抗原结合中起主导作用,如通过早期研究所示,所述早期研究表明单独的重链或甚至单个VH结构域能以与完整抗体相当的亲和力结合抗原(参见,例如,Nature[自然]341,544-546,1989;和J.Immunol.Methods[免疫方法杂志]193,177-187,1996)。当然,所选CDR的修饰可能再次导致结合位点的整体构型的变化,又再次导致高水平的不可预测性。

[0009] 因此,存在对于允许靶向肿瘤微环境(特别是坏死细胞)的人源化抗体组合物和方法的需要,以允许对肿瘤的免疫应答进行位点特异性调节。

## 发明内容

[0010] 本发明的主题涉及具有提高的结合特征的人源化TNT抗体的组合物以及产生和使用所述抗体的方法。

[0011] 在本发明的主题的一个方面,诸位发明人考虑了相对于相应的非人源化抗体,对核靶标(例如,DNA,尤其是单链DNA(ssDNA))具有提高的结合亲和力的人源化抗核抗体。特别地,预期的人源化抗体比相应的非人源化抗体具有高至少2倍,更典型地至少4倍,并且最典型地至少8倍的结合亲和力。而且,相对于相应的非人源化抗体,优选的人源化抗体在H-CDR3中具有突变的氨基酸。例如,H-CDR3中突变的氨基酸可以是107Phe→Arg、101Ile→His、102Gly→Arg、109Tyr→Thr、103Val→Ser、104Arg→Thr、109Tyr→Arg、和104Arg→Leu。

[0012] 从不同的角度看,人源化抗体可以具有以下各项中的至少一种:包含TRYWMH(SEQ ID NO:1)的H-CDR1序列、包含GAIYPGNSDTSYNQKFKG(SEQ ID NO:2)的H-CDR2序列、包含EEIGVRRWFAY(SEQ ID NO:3)的H-CDR3序列、包含RARQISISNYLH(SEQ ID NO:4)的L-CDR1序列、包含ASQISIS(SEQ ID NO:5)的L-CDR2序列、和包含QQSNSWPLT(SEQ ID NO:6)的L-CDR3序列。因此,在仍另外预期的方面,人源化抗体可以具有VH序列,该VH序列包含:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYWMHWVRQAPGQALEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGLVTVSS(SEQ ID NO:7);和/或具有VL序列,该VL序列包含:

IVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQISISNYLHWYQQKPGQAPR

LLIYYASQISISGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO:8)。

[0013] 在本发明的主题的另一个方面,诸位发明人还考虑了杂合分子,该杂合分子至少包括本文预期的与治疗剂和/或显像剂偶联的人源化抗体的结合部分。例如,抗体的合适的结合部分包括全长抗体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fab<sub>2</sub>片段、和scFvs,而预期的治疗剂包括细

胞因子或其部分、趋化因子或其部分、髓源性抑制细胞 (MDSC) 的抑制剂、M2巨噬细胞的抑制剂、放射性同位素、共刺激分子、toll样受体 (“TLR”) 激动剂或配体、干扰上皮间充质转换 (“EMT”) 的分子、和/或化学治疗药。预期的显像剂包括放射性同位素、正电子发射断层扫描 (PET) 标记、和/或单光子发射型计算机断层扫描 (SPECT) 标记。因此, 诸位发明人还考虑了包含如本文所提出的抗体或杂合分子的药物组合物。最典型地, 这种药物组合物将被配制用于注射。

[0014] 在本发明的主题的又另一个方面, 诸位发明人考虑了靶向坏死细胞的方法, 其中此类方法将包括使坏死细胞与如本文提出的抗体或杂合分子接触的步骤。虽然不限于本发明的主题, 但典型优选坏死细胞是肿瘤微环境中的坏死肿瘤细胞, 和/或接触步骤在体内进行。

[0015] 因此, 诸位发明人还考虑了将治疗剂或显像剂递送至包含坏死肿瘤细胞的肿瘤微环境的方法。在这种方法中, 提供了与如本文提出的抗体偶联的治疗剂或显像剂。然后在允许抗体与肿瘤微环境中坏死细胞中的核靶标结合的条件下, 使坏死肿瘤细胞在微环境中与治疗剂或显像剂接触。

[0016] 在优选的方面, 治疗剂包含细胞因子或其部分、趋化因子或其部分、MDSC的抑制剂、M2巨噬细胞的抑制剂、放射性同位素、共刺激分子、TLR激动剂或配体、干扰EMT的分子、和化学治疗药中的至少一种, 而显像剂包含放射性同位素、PET标记、和SPECT标记中的至少一种。最典型地, 肿瘤是实体瘤, 并且使用脉管系统通透性增强剂 (例如, IL-2) 可以增强治疗剂或显像剂的递送。

[0017] 在本发明的主题的仍另外的方面, 诸位发明人进一步考虑了从鼠抗体产生亲和力优化的人源化抗体的方法。最典型地, 这种方法将包括以下步骤: 鉴定与鼠抗体序列具有预定最小同一性 (例如, 除CDR之外, 至少90%、或92%、或94%、或96%) 的人抗体序列。在另一个步骤中, 将针对VH和VL的鼠CDR移植到经鉴定的人抗体序列的相应VH和VL中, 以此获得嵌合VH和VL序列, 并且使用嵌合VH和VL序列产生scFv杂合体。然后在H-CDR3中进行定点诱变以产生scFv杂合体文库, 并且使用亲和力选择 (和/或成熟) 从scFv杂合体文库鉴定结合物。在又一个步骤中, 将结合物的嵌合VH和VL序列移植到人抗体序列中, 以此获得亲和力优化的人源化抗体。

[0018] 最典型地, scFv杂合体是噬菌体展示杂合体, 但还可以是RNA展示杂合体。而且, 通常优选 (但非必需) 的是H-CDR3中的定点诱变针对H-CDR3的单个氨基酸位置。同样, 优选的是 (但非必需) 经至少三个连续的选择/富集循环进行亲和力选择。在需要时, 亲和力选择可以进一步包括在H-CDR3和/或框架区中另外的定点诱变的至少一个步骤。

[0019] 从以下对优选实施例的详细描述以及附图中, 本发明主题的各种目的、特征、方面和优点将变得更加明显, 在附图中相同的数字表示相同的组成部分。

## 附图说明

[0020] 图1A、1B和1C提供了示意图, 这些示意图说明人、鼠和人源化蛋白质部分的VH (图1A) 和VL (图1B) 序列的示例性比对, 以及示例性EP/scFv的一般组装 (图1C)。在图1A中, mTNT-3/HV是SEQ ID NO:9; EP/HV是SEQ ID NO:10, 并且HuFd138/HV是SEQ ID NO:11。在图1B中, mTNT/LV是SEQ ID NO:12, EP/LV是SEQ ID NO:13, 并且huB-B10/LV是SEQ ID NO:14。

[0021] 图2说明EP/ScFv的H-CDR3的突变和其文库针对粗DNA的淘选。EEIGVRRWFAY (SEQ ID NO:3) 结构域是重链CDR3序列。阴影“X”可以是20种天然存在的氨基酸中的任何一种。引物Pr1到Pr11分别是SEQ ID NO:16到26。

[0022] 图3是描绘经连续几轮淘选的结合的示例性增加的图。

[0023] 图4是说明结合的噬菌粒的克隆结果的图。

[0024] 图5是具有示例性人源化IgG样品的SDS凝胶的照片。

[0025] 图6是描绘所选的突变体抗体蛋白 (EP27、EP7、EP35、EP103、EP54、EP102和EP51) 的示例性相对亲和力的图。

[0026] 图7显示了根据本发明的主题的免疫染色的所选人源化抗体的各种显微照片。

[0027] 图8是显示EP2和EP51人源化抗体的亲和力测量的图。

[0028] 图9A至9D描绘了根据本发明的主题的各种人源化抗体在各种组织和时间点处的生物分布的示例性图。

[0029] 图10描绘了在没有脉管渗透增强的情况下,一种根据本发明的主题的人源化抗体在各种组织中的生物分布的示例性图。

### 具体实施方式

[0030] 诸位发明人已经发现,针对各种靶标的抗体不仅可以被人源化,而且以概念上简单有效的方式还可以在其抗原亲和力方面得到提高。例如,并且如下文更详细描述,诸位发明人将鼠抗核抗体转化为具有显著提高的亲和力的人源化抗体。

[0031] 更具体地,并且基于所希望的鼠抗体(例如,与ssDNA结合的鼠抗体),在抗体数据库中鉴定具有最高氨基酸同一性的相应的人抗体序列。最典型地,除了CDR之外,适合的人抗体序列将具有至少90%、或至少92%、或至少94%、或至少96%的预定最小同一性。一旦被鉴定,然后使用本领域熟知的常规方法,将针对VH和VL的鼠CDR移植到人序列中,从而获得嵌合VH和VL序列。当然,应该理解,这种移植步骤可以在体外或经由计算机模拟(其中实验中不需要实际的嵌合序列)进行。无论移植方式如何,然后使用嵌合VH和VL序列作为基础结构产生scFv杂合体,用于亲和力成熟或根据需要进行其他改善。再一次,存在从本领域已知的实际核酸部分或序列信息制备scFv的许多方法,并且认为产生这种scFv的所有方式都适用于本文。在特别优选的方面,scFv与选择系统融合,该选择系统允许具有所希望的亲和力或其他分子特性的变体的快速鉴定和克隆扩增。例如,适合用于本文的选择系统包括各种噬菌体淘选系统(例如,基于pIII、pVIII、pIX)和RNA展示系统(例如,基于嘌呤霉素连接),并且应当理解,所有已知的亲和力成熟方式和所选闭合的分离被认为都适用于本文。因此,克隆选择和/或亲和力成熟可以包括靶向CDR和/或框架区中的至少一个的断续性定点诱变的一个或多个步骤。

[0032] 在本发明的主题的另外的方面,诸位发明人注意到,仅通过修饰H-CDR3部分,可以提高亲和力和甚至生物利用度/摄取。值得注意的是,诸位发明人进行了单个氨基酸扫描,并发现所选择的突变体具有也如下文更详细显示的显著增加的结合。有利地,可以使用scFv型式而不是测试全长抗体(典型地是IgG)来完成这种诱变。如将容易理解的,然后将scFv的亲和力提高的嵌合VH和VL序列移植到人抗体序列中以此获得亲和力优化的人源化抗体。然后在各种测定中测试制备的人源化的和亲和力提高的抗核抗体,以确认也如下



文更详细地显示的合适的和选择性的结合。

[0033] 关于如此制备的抗体的预期用途,应当理解,本文提出的抗核抗体在靶向坏死(并且尤其是肿瘤微环境中的坏死细胞)方面特别有益。由于肿瘤微环境通常是难以靶向的环境(该环境促进免疫逃避的各种机制(例如,缺氧降低NK细胞活性,缺乏营养物和氧促进EMT,等)),特异性递送和保留各种免疫刺激因子至微环境被认为是特别有益于免疫疗法。

[0034] 在这方面,应当理解,术语“细胞凋亡”和“坏死”在本文中不可互换使用,而是指两种大部分不同的细胞死亡机制和途径。虽然细胞凋亡是明确定义的程序性细胞死亡过程,涉及特化的信号传导事件和分阶段的细胞关闭(cell shut-down)(例如,起泡、细胞皱缩、核碎裂、染色质凝聚,DNA断裂,mRNA降解),但坏死通常被证明是细胞死亡的杂乱无章的过程,其中细胞器功能的伴随性丧失、细胞破裂和细胞内容物释放到环境中。此外,坏死通常伴有炎性细胞反应。而且,应当理解,坏死是免疫系统“看到”肿瘤并做出免疫反应的部位。这是重要的,因为将有效负荷递送至坏死将有助于免疫系统识别肿瘤并对肿瘤起反应,并因此是这些治疗有效负荷的优选递送部位。

[0035] 诸位发明人因此还考虑了使用抗体及其片段将显像剂和/或治疗剂递送至肿瘤微环境。最典型地,抗体或其片段将具有与核靶标(并且尤其是ssDNA)的特异性结合(即,例如,通过表面等离子共振(SPR)或其他技术测定的以小于 $10^{-7}$ M、并且更典型地小于 $10^{-8}$ M的Kd结合)。最典型地(但不一定在所有情况下),与ssDNA的结合将独立于组蛋白和其他核蛋白的存在。

[0036] 当然,应当理解,显像剂和/或治疗剂可以按多种方式(包括共价和非共价结合)与抗体(或其片段)偶联。最典型地,偶联将是共价偶联,其可以使用常规偶联化学例如氨基基团反应试剂(例如,N-羟基-琥珀酰亚胺酯、各种醛、碳二亚胺化合物、环氧化物、亚氨酸酯等)或巯基基团反应试剂(例如,各种马来酰亚胺,硫醇等)实现,或可以经由重组克隆技术实施,其中抗体(片段)在框架内与任选的接头融合,该接头在框架内与第二目的蛋白融合。可以由所希望的长度(例如,以提供所希望的空间距离)、氨基酸组成(例如,以提供可切割接头或柔性接头)等选择适合的接头。在仍另外预期的偶联模式中,偶联可以是非共价的并且以特别优选的方式,偶联由已知结合对的元件提供,例如生物素/抗生物素蛋白、纤维素/纤维素结合蛋白、镍-次氨基三乙酸(Ni-NTA)/寡组氨酸基等。

[0037] 关于诊断剂,预期所有可检测的(并且优选定量可检测的)试剂被认为适用于本文。此外,应该注意,可以使用本领域已知的适合方法在离体(例如,在组织切片上)和/或体内进行检测。例如,视觉上可检测的显像剂包括荧光团、发光基团、催化活性基团(例如,以沉淀染料和/或活化发色体或发光体),放射线照相可检测的基团(例如,PET、SPECT、NMR标记、放射性同位素等)。

[0038] 同样,并且关于治疗剂,预期所有治疗剂被认为适用于本文。然而,在本发明主题的特别优选的方面,治疗剂将具有免疫刺激作用。最典型地,这种刺激物作用将逆转或中和导致在肿瘤微环境中癌细胞免疫逃避的一种或多种机制。例如,当免疫逃避基于M2巨噬细胞或调节性T细胞(Treg)的募集时,适合的治疗剂将包括特异性地失活或破坏此类抑制性细胞的那些(例如,吉西他滨,RP-182(参见US9492499的SEQ ID NO:121)或环磷酰胺)。另外地,或可替代地,当免疫逃避基于在效应细胞和/或辅助细胞情况下的检查点抑制时,考虑了CTLA4或PD1的结合物或拮抗剂(例如,伊匹木单抗(ipilimumab),派姆单抗

(pembrolizumab)等)。

[0039] 相反,还应当理解,可以通过使用治疗剂来增强免疫疗法,其中该治疗剂具有免疫刺激活性。可以通过使用与抗体或其片段偶联的共刺激信号来实现这种免疫刺激活性,优选在一种或多种肿瘤(新)抗原的上下文中。例如,共刺激信号包括4-1BBL、OX40L、GITRL、TIM3、LFA3、ICAM1、ICOSL等。另外,应当理解,免疫刺激剂将还包括免疫刺激细胞因子,例如IL-2、IL-12、IL15、IL-15超激动剂、TLR激动剂和配体等。仍另外地,应当理解,治疗剂还可以包含将吸引另外的免疫活性细胞的(促炎)趋化因子。在此上下文中,应当理解,治疗剂将通常不会在坏死部位杀死肿瘤细胞(因为坏死细胞已经不是活的),但促进针对坏死组织近端的肿瘤细胞的增强的免疫反应(例如,利用抗原扩散和抗原级联,或通过逆转免疫抑制性机制)。

[0040] 需要时,治疗剂还可以包括将靶向有助于肿瘤微环境中EMT(上皮间充质转化)的因子(包括IL-8和TNF- $\beta$ )的药剂。因此,适合的治疗剂还将包括结合或以其他方式隔离IL-8和TNF- $\beta$ 的那些。

[0041] 另外,治疗剂还可包括用于治疗癌症的更常规药物。例如,典型的抗癌药物包括抗代谢物、干扰微管形成或分解的药物、DNA烷化剂和拓扑异构酶抑制剂、细胞毒性药物等,所有这些都可以在肿瘤微环境中普遍存在的条件下被切割。预期的治疗剂还包括放射治疗剂,例如 $\alpha$ 和 $\beta$ 发射体(例如,Bi-213、Pb-212、I-131、Ac-225、Sr-89等)。此类药剂将通常影响在肿瘤或肿瘤微环境内的非坏死肿瘤细胞。

[0042] 因此,并且如下文更详细地显示,诸位发明人通常考虑靶向坏死细胞(通常是肿瘤细胞,最典型地是肿瘤微环境中的坏死肿瘤细胞)的方法,该方法包括使坏死细胞与特异性结合核靶标(并且尤其是ssDNA)的结合剂接触的步骤。而且,可以在体内或体外以此类方法进行接触。例如,在体外进行该步骤的情况下,可能需要相对少量(例如,在0.001 $\mu$ g-100 $\mu$ g之间、或在0.01 $\mu$ g-0.1 $\mu$ g之间、或在0.001 $\mu$ g-0.01 $\mu$ g之间)的抗体。在其他方面,当在体内进行该步骤的情况下,可能需要相对大量(例如,在0.01mg-100mg之间、或在0.1mg-10mg之间、或在1mg-10mg之间)的抗体。当然,应当理解,当抗体与显像剂和/或治疗剂偶联时,抗体的量还将至少部分地由所希望的效果所需的显像剂和/或治疗剂的类型和数量决定。

[0043] 因此,发明人还考虑了将治疗剂和/或显像剂递送至含有坏死肿瘤细胞的肿瘤微环境的方法。如上所述,这种方法将通常包括提供与结合核靶标(并且尤其是ssDNA)的抗体偶联的治疗剂或显像剂的步骤,以及在允许该抗体与肿瘤微环境中坏死细胞中的核靶标结合的条件下,使微环境中的坏死肿瘤细胞与治疗剂或显像剂接触(优选体内)的另外的步骤。

[0044] 此外,本文考虑的方法可以进一步包括增加肿瘤坏死的一个或多个步骤,从而增强经修饰的抗体摄取进入肿瘤,以此优化治疗剂或诊断剂有效负载的递送。例如,适合的另外的步骤包括放射疗法、化学疗法、或免疫疗法,并且尤其是低剂量节律化学疗法和放射疗法。

### 实例

[0045] 试剂:具有谷氨酰胺合成酶基因扩增系统的质粒pEE6hCMV-B和pEE12购自龙沙生物医药股份有限公司(Lonza Biologies)(斯拉夫(Slough),英国)。限制性内切核酸酶、T4DNA连接酶、和其他分子生物学试剂购自新英格兰生物实验室(New England Biolabs)

(贝弗利, 马萨诸塞州) 或德国宝灵曼公 (Boehringer Mannheim) (印第安纳波利斯, 印第安纳州)。RPMI-1640培养基、MEM非必需氨基酸溶液、青霉素-链霉素溶液、降解的粗DNA、ABTS (2,2'-偶氮苯-2-甲酸) 购自西格玛化学品公司 (Sigma Chemical Co.) (圣路易斯, 密苏里州)。含有和不含谷氨酰胺的杂交瘤无血清培养基 (SFM培养基) 购自生命技术公司 (Life Technologies, Inc.) (盖瑟斯堡, 马里兰州), 并且经透析的胎牛血清获得自HyClone实验室公司 (罗根, 犹他州 (Logan, UT))。从杜邦公司 (DuPont) / 新英格兰核公司 (New England Nuclear) (北比勒利卡, 马萨诸塞州) 获得作为在0.1N氢氧化钠中的碘化钠的碘-125。六周龄BALB/c小鼠购自哈伦-斯普拉格道利公司 (Harlan-Sprague Dawley) (印第安纳波利斯, 印第安纳州)。

[0046] EP/ScFv的设计和组装: 通过搜索人抗体数据库, 两个序列, huFd138HV和hu B-B10LV分别与重链和轻链的原始TNT-3氨基酸序列具有最高的同一性。因此, 它们被用作主模板以分别构建EP可变重链和轻链。然后将六个CDR简单地移植到相应的人框架区中。使用在已知的人抗体中观察到的密码子使用将六个鼠TNT-3CDR序列转化成相应的核苷酸序列。将可变重链和轻链序列与 (GSSSS) 3接头组合以构建EP/ScFv。将设计的DNA序列分成8个重叠的寡核苷酸并合成。

[0047] 通过连续组装PCR获得全长ScFv, 并在5' 和3' 末端用一对引物进行扩增。将用NotI和SpeI消化的PCR产物克隆到pBlueScript SK (-) 中。通过DNA测序, 选择具有正确序列的一个克隆作为用于下一个突变的标准模板。为恢复和提高EP抗体候选物 (还在本文中被称为EP或huTNT IgG1或抗体) 的亲和力, 进行了H-CDR3结构域上的覆盖11个密码子的位点特异性随机突变。设计了一组含有11个位点特异性突变的引物。使用PCR, 逐步引入11个氨基酸残基的随机突变。通过PCR, 用在5' 和3' 末端的一对引物扩增11个突变的人源化的ScFv。然后纯化PCR产物, 并用NotI和SpeI消化, 并插入消化的 $\lambda$ 噬菌体SurfZAP<sup>TM</sup>载体中。然后将包装的SurfZAP<sup>TM</sup>载体感染的宿主细胞XL-1进行扩增, 并用ExAssist<sup>TM</sup>辅助噬菌体切割成噬菌粒pSurfscript<sup>TM</sup> SK (-)。噬菌粒在SOLR细胞中生长以消除辅助噬菌体, 并在XL-1细胞中扩增。EP/ScFv表达为融合蛋白 (ScFv/cpIII), 并允许用VCSM13辅助噬菌体掺入重组噬菌粒颗粒的外壳蛋白。回收噬菌粒, 并通过PEG沉淀从扩增的上清液中浓缩。

[0048] 根据STRATAGENE方案, 对涂覆在25ml烧瓶上的粗DNA进行四轮生物淘选。简言之, 对于每次淘选, 使用在3ml PBS中的 $>10^{12}$ 个噬菌粒。用10次PBST洗涤去除未结合的噬菌体, 并且用5ml甘氨酸-HCl (pH 2.2) 洗脱结合的噬菌体。通过将100 $\mu$ l感染的细菌铺板到选择性平板上以便于对菌落形成单位 (c. f. u.) 计数来确定洗脱的噬菌体的滴度。通过噬菌体-ELISA测试来自第四轮淘选的ScFv噬菌体与粗DNA的反应性, 其中在ELISA平板的每个孔中涂覆100 $\mu$ l的10 $\mu$ g/ml粗DNA。用兔抗M13抗体、随后是山羊抗兔抗体辣根过氧化物酶缀合物来检测结合的噬菌体。在用底物 (ABTS) 孵育10min后测定A<sub>405</sub>值, 并通过ELISA读数器测量。

[0049] EP IgG的构建和表达: 为恢复完整的抗体分子, 将EP/ScFv转化为EPIgG1。为实现此目的, 使用设计用于引入合适的限制性内切核酸酶位点的引物, 从克隆载体中对EP重链和轻链的可变区进行PCR扩增。将重链可变区引入表达载体pEE6hCMV-B中, 其中人 $\gamma$  1恒定区 (CH) 被事先克隆进pEE6hCMV-B。将轻链可变区插入含有人VL恒定区cDNA的表达载体pEE12中。最终的表达载体是pEE6hCMV-B/EP HC和pEE12/EP LC, 分别含有人轻链和重链的转录盒, 每个转录盒在CMV主要立即早期启动子的控制下。pEE12/EP LC还含有在SV40早期

启动子的控制下的可选择标记谷氨酰胺合成酶的cDNA序列。在每个载体完成后,将pEE6hCMV-B/EP HC和pEE12/EP LC载体共转染到宿主NS0鼠骨髓瘤细胞中用于表达EP IgG1。通过间接ELISA,使用涂覆有10 $\mu$ g/ml降解的粗DNA的96孔微量滴定板,初始鉴定含有抗体产物的上清液。通过24小时生产率测定来鉴定产量最高的克隆。通过有限稀释法进行两轮亚克隆后,对产量最高的克隆进行扩增,并通过蛋白A亲和色谱和离子交换色谱从细胞培养上清液中逐步纯化EP IgG1。通过SDS-PAGE检测EP抗体的纯度。

[0050] 通过ELISA测定粗DNA结合:为测量EP IgG候选物的DNA结合活性,将96孔ELISA平板用100 $\mu$ l的10 $\mu$ g/ml粗DNA涂覆,并用1%BSA-PBS封闭,将EP IgG候选物的连续稀释液添加至孔,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。将经纯化的chTNT-3用作标准品。使用0.05%PBST进行三次洗涤去除任何未结合的抗体,然后添加山羊抗人IgG二抗缀合物辣根过氧化物酶,随后添加显色底物。通过ELISA读数器测量OD<sub>405</sub>。

[0051] 通过间接免疫荧光染色对Raji细胞中的EP候选物进行定位:为观察Raji细胞中这些EP IgG候选物的定位,进行间接免疫荧光染色。简言之,将Raji细胞用10%缓冲的中性福尔马林固定,并用PBS洗涤。将200 $\mu$ l PBS中的104个Raji细胞与各种EP抗体在1.5ml管中在37 $^{\circ}$ C下反应1小时。用PBST将细胞洗涤5次,并通过离心去除未结合的抗体。在1:30稀释液中添加FITC缀合的山羊抗人IgG抗体,并且最终将Raji细胞收集于20 $\mu$ l PBS中,并铺在载玻片上用于在荧光显微镜下观察。

[0052] 碘-125标记的MAb的制备:使用经改进的氯胺-T方法制备碘-125标记的MAb。简言之,将1mCi的I<sup>125</sup>和20 $\mu$ l的氯胺-T水溶液(2mg/ml)添加至含有100 $\mu$ l PBS中100 $\mu$ g MAb的5-ml试管中。2min后用10 $\mu$ l的焦亚硫酸钠水溶液猝灭该溶液。然后使用Sephadex G-25柱纯化每种反应混合物,这通常产出90%-95%的回收率。利用用于注射的PBS稀释放射标记的MAb,在4 $^{\circ}$ C下储存,并在标记后2小时内给予。

[0053] 结合和生物分布研究:通过使用Raji细胞的常规的固定细胞放射免疫测定评估放射标记的MAb的体外免疫反应性。简言之,将放射性碘化的MAb(约100,000cpm/管)与10<sup>6</sup>个固定的Raji细胞按一式三份孵育1小时,伴随间歇混合。孵育后,将细胞用PBS中的1%BSA洗涤3次。通过在 $\gamma$ 计数器中测量细胞沉淀相关联的放射性来检测结合的MAb。为确定EP抗体的亲合力常数(K<sub>a</sub>),使用抗原细胞,固定的Raji伯基特淋巴瘤细胞。将各种浓度(10ng-110ng)的<sup>125</sup>I-标记的EP抗体与10<sup>6</sup>个固定的Raji细胞在室温下伴随不断混合进行孵育,用PBST洗涤3次去除未结合的放射性,并然后在 $\gamma$ 计数器中对结合的放射性的量计数,并通过斯卡查德(Scatchard)分析用于计算亲合力常数(K<sub>a</sub>)。通过K=- (斜率/2) 测定亲合力常数K<sub>a</sub>。

[0054] 为检测一种或多种EP抗体和chTNT-3的生物分布,将6周龄雌性无胸腺裸鼠在左侧腹部皮下注射含有10<sup>7</sup>个LS174T人结肠腺癌细胞的0.2ml接种物。使肿瘤生长直至它们达到直径约1cm。在每个组中(n=5),用含有100 $\mu$ Ci/10 $\mu$ g <sup>125</sup>I-标记的MAb的0.1ml接种物对单个小鼠进行静脉注射。在注射后的不同时间处死小鼠,取出器官、血液和肿瘤并称重。然后测量样品中的放射性并表示为% ID/g和肿瘤/器官比率(cpm/克肿瘤/cpm/克器官)。使用Wilcox秩和检验确定显著性水平。

[0055] 人源化TNT-3/ScFv的设计和构建:为设计V区的人源化TNT-3框架,诸位发明人搜索了人抗体数据库,并发现两种人抗体,huFd138HV和hu B-B10LV分别与重链和轻链的原始

TNT-3氨基酸序列具有最高的同一性。huFd138HV在框架1、2、3和4方面与mTNT-3重链序列具有81%同源性(参见图1A);hu B-B10LV在框架1、2、3和4方面与mTNT-3轻链序列具有74%同源性(参见图1B)。为了降低框架置换对H-CDR构象的影响,保留了三个残基(I<sup>48</sup>、T<sup>74</sup>和Y<sup>95</sup>),其被怀疑是重要的或由于接近重链框架上的CDR序列。维持重链和轻链的六个互补决定区(CDR)的原始序列,并且所有其他的序列被人序列置换。将EP候选物的可变重链和轻链序列与(GSSSS)<sub>3</sub>接头组合以构建EP/ScFv(参见图1C)。进一步关于图1A-1B,显示了鼠TNT-3和人TNT-3模板的氨基酸序列比对。图1A说明了鼠TNT-3(mTNT-3)、huFd138HV和EP重链的比对;图1B说明了mTNT-3、hu B-B10LV和EP轻链模板的比对。文本中提供了针对每个人模板的编号。对基于Kabat定义的轻链和重链的框架和CDR序列进行了标记。\*表示被人氨基酸置换的残基;#是指保持的鼠残基。图1C示意性地显示用(GSSSS)<sub>3</sub>接头构建到EP/ScFv中的HV和LV。值得注意的是,其中六个CDR被简单移植到人框架中的EP/ScFv通过噬菌体-ELISA仅显示出对粗DNA的非常弱的反应。这表明这种框架的置换导致了EP/ScFv亲和力的大幅下降。

[0056] EP/ScFv的H-CDR3突变和其文库针对粗DNA的淘选:为提高EP/ScFv的亲和力,进行了H-CDR3结构域上的位点特异性随机突变,通过PCR将11个引物(它们各自含有如图2所示的随机突变的密码子)逐个引入重链,并产生突变的ScFv的11个子文库。

[0057] 将十一个子文库相等地混合在一起,插入消化的 $\lambda$ 噬菌体SurfZAP<sup>TM</sup>载体中。将用SpeI和NotI消化的EP ScFv插入 $\lambda$ 噬菌体SurfZAP载体中,并然后切成pSurfscript SK(-)载体。这允许EP/ScFv有待表达为融合蛋白(ScFv/cpIII),并构成具有352种多样性的通用文库。对于淘选,将此文库扩增至10<sup>12</sup>个克隆,并用M13辅助噬菌体拯救。在每轮淘选后,通过噬菌体ELISA检测与粗DNA结合的文库。随着淘选时间的增加,观察到结合增加(图3:选择展示EP的噬菌体,并通过洗脱DNA包被的烧瓶来富集。每次淘选运行后,将上清液在预先涂覆有DNA的96孔ELISA平板中孵育。洗涤后,添加HRP缀合的抗M13抗体,并且将ABTS用作底物,然后在405nm处读板)。三轮淘选后文库的结合比最初的多4倍。四轮淘选后,超过90%的回收克隆在DNA结合方面呈阳性(图4:通过PEG沉淀从克隆制备噬菌粒颗粒,并重悬于1% Blotto/TBS封闭缓冲液中。将100 $\mu$ l的10<sup>9</sup>cfu的每种样品添加至粗DNA涂覆的ELISA平板孔中。通过用PBST洗涤去除未结合的噬菌粒。用抗M13多克隆抗体、随后用HRP-山羊抗兔IgG检测结合的噬菌粒。使用ABTS作为底物在405nm处测量酶活性),这表明已经进行了高富集过程。

[0058] EP IgG的构建、表达和纯化:基于来自4轮淘选的噬菌体ELISA的筛选结果,选择具有最高OD<sub>405</sub>值的16个克隆并测序。测序分析显示,所有16个克隆在H-CDR3中含有8个不同的核苷酸和氨基酸序列。基于噬菌体ELISA对克隆结合的确定的确定受限于含有ScFv融合蛋白的噬菌体的纯化和数量。具有比二价IgG低8到10倍亲和力的单价ScFv会放大此缺点。为进一步评估其亲和力之间的差异,并了解结合和H-CDR3上位点突变之间的关系,以及恢复整个IgG抗体的能力,将8个突变体的所有ScFv转化为相应的IgG1,其用谷氨酰胺合成酶基因扩增系统表达。通过24小时ELISA测定选择最高产量的克隆。当细胞系在1L生物反应器中扩增时,收集含有EP IgG1的其上清液,并通过蛋白A亲和色谱逐步纯化。纯化后获得约10 $\mu$ g/ml的EP IgG。SDS-PAGE测定表明EP IgG1(本文在被称为EP或huTNT IgG 1)的八个突变体已经被适当地组装(图5:泳道(a)低范围标记(伯乐公司(BioRad));(b)EP2;(c)EP7;(d)EP27.1;e. EP35.2;(f)EP51;g EP54;(h)EP102;(i)EP103;(j)chTNT-3)。在约25kD和55kD处展示两

个条带,分别对应于EP IgG1轻链和重链的分子量。

[0059] 对EP突变体亲和力的测定和对突变的表征:为测量EP IgG1候选物的结合活性是否已经提高,诸位发明人使用ELISA来检测它们对粗DNA的结合活性。从图6可以容易地看出,与chTNT-3相比,八个候选物的亲和力均显著提高(从1.45倍到8倍)。在此,为测量结合粗DNA的EP突变体的相对亲和力,通过ELISA测试各种浓度的经纯化的EP IgG1。获得剂量依赖性反应的曲线,并通过最佳拟合线方程(经纯化的chTNT-3被用作标准品)测定它们在0.30D处的浓度。由在0.30D处的EP浓度/chTNT-3浓度的比率代表它们的相对亲和力。

[0060] 亲和力和突变的组合分析显示具有最高亲和力的2个候选物(EP/m7和EP/27.1)在m7Ile→His和27.1Gly→Arg的相应的突变情况下,获得了约8倍的提高(参见表1)。这些克隆中的另外两个,即EP/35.2和EP/m103(其中35.2Tyr和m103Arg分别变为Thr和Leu)获得亲和力的4倍增加。剩余4个克隆,即m54、m102、m2和m51(其中变化分别为m54Arg→Leu、m102Tyr→Arg、m2Phe→Arg、m51Val→Ser)也表现出亲和力在从1.46至2.34倍范围的增加。

突变体	突变	频率	与 DNA 的相对结合
2	<sup>107</sup> Phe→Arg	1/16	1.85
7	<sup>101</sup> Ile→His	2/16	8.0
27.1	<sup>102</sup> Gly→Arg	3/16	8.25
35.2	<sup>109</sup> Tyr→Thr	6/16	4.0
51	<sup>103</sup> Val→Ser	1/16	1.46
54	<sup>104</sup> Arg→Thr	1/16	2.34
102	<sup>109</sup> Tyr→Arg	1/16	1.98
103	<sup>104</sup> Arg→Leu	1/16	4.0

表1

[0061] 对具有提高亲和力的突变体的H-CDR3的氨基酸特性的分析显示,在四个突变体中带正电荷的氨基酸(如Arg和His)置换了现有残基,而其他三个突变体显示用含有羟基基团的氨基酸置换。这些结果暗示残基的静电势或氢键结合电位的变化有助于观察到的抗体与粗DNA结合的提高。在一个特例(m103)中,用Leu置换Arg也使结合活性增加了四倍。

[0062] 免疫荧光显微镜研究:为观察EP IgG候选物对抗原Raji细胞的特异性,进行了间接免疫荧光染色。如图7所示,EP IgG候选物全部染色固定的Raji细胞,给出核染色模式。EP2、7、27.1、35.2、51、102和103产生了与chTNT-3相似的突出性核边缘染色;仅EP54产生了均匀的核染色模式。在所有制剂情况下均未观察到细胞质或细胞表面染色。使用等效剂量,免疫荧光染色的最强强度的顺序是51、2、chTNT3>7、27.1、54、102>103和35.2,这非常不同于它们与粗DNA结合的结果。在ELISA研究中对粗DNA具有最佳亲和力的EP7和27.1没有显示对固定的Raji细胞的相应反应,但对粗DNA具有相对低亲和力的EP51和2有趣地产生最强的染色模式。

[0063] 通过RIA测定EP的亲合力常数(Ka):基于免疫荧光染色的结果,通过RIA测定对Raji细胞显示出最佳亲和力的两种EP IgG候选物(EP51和EP2)的亲合力常数(Ka)。两种EP IgG候选物均用<sup>125</sup>I标记,并与固定的Raji细胞孵育,并且将结合的放射性用于计算亲合力常数(图8)。EP51和EP2的亲合力常数分别是 $2.8 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 和 $2.1 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 。与chTNT3(具有亲合力常数 $1.4 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ )相比,EP51和EP2显示出对抗原Raji细胞更强的亲和力。EP51和EP2的Ka

值与对粗DNA和抗原Raji细胞的反应一致,并且与chTNT-3相似。

[0064] 图9A和9C显示在生物分布3天后,使用I-125标记的人源化抗体在携带结肠26的小鼠中的生物分布研究。图9B和9D显示7天后的生物分布。数据显示为在不同时间点后注射剂量/克和正常器官与肿瘤比率(n=5只小鼠)。

[0065] 图10中示出携带LS174T结肠癌的裸鼠(n=5)中EP51人源化抗体的生物分布分析,该分析显示在第3、5和7天在肿瘤中的特异性和稳定摄取。通过比较,正常器官显示标记抗体的摄取减少,表明从血池中清除并且没有脱靶结合。如表2所示,生物分布分析进一步表明,EP51具有与chTNT-3相似的生物分布特征。

	结合%		LS174T 中的肿瘤 摄取%		血液摄取%	
	Raji	CHO	2天	5天	2天	5天
huTNT3/m2 (EP2)	65	35	2.69	1.33	3.45	2.46
huTNT3/m7 (EP7)	28	22	ND			
huTNT3/m27 (EP27)	36	23	4.0	2.14	7.67	4.84
huTNT3/m35 (EP35)	29	18	2.07	1.18	4.10	1.35
<b>huTNT3/m51 (EP51)</b>	<b>70</b>	<b>--</b>	<b>5.90</b>	<b>4.97</b>	<b>10.7</b>	<b>8.5</b>
huTNT3/m54 (EP54)	29	25	3.48	1.26	3.75	3.05
huTNT3/mlO3(EP103)	39	29	ND			
<b>chTNT3</b>	<b>85</b>	<b>35</b>	<b>5.62</b>	<b>4.28</b>	<b>11.1</b>	<b>8.28</b>

表2

[0066] 到第2天和第5天,LS174T模型中EP51的肿瘤摄取百分比分别是5.90和4.97,与chTNT3相当(5.62和4.28)。血液摄取百分比的量也非常相似。然而,尽管具有比chTNT-3高1.5倍的Ka,EP2的肿瘤摄取百分比似乎远低于chTNT-3的肿瘤摄取百分比。到第二天和第五天,在LS174T肿瘤模型中EP2的肿瘤摄取百分比分别为2.69和1.33,这远低于chTNT-3的肿瘤摄取百分比。显示在图9中(对于EP27.1和EP35.2亚克隆)和图10中(对于EP51)的另外的生物分布研究表明与chTNT-3和完全人TNT抗体NHS76相比,肿瘤中增强的摄取(尤其是对于EP51)。令人印象深刻地,EP51从3天到7天仅有少量%的注射剂量/克下降,表明该人抗体被肿瘤显著保留,而正常组织中的摄取由于阴性结合和血液清除而失去反应性。

[0067] 从以上数据可以看出,通过框架置换随后通过六个CDR移植的初始人源化TNT-3构建体仅显示出边缘可检测的亲和力,尽管它们在HV和LV中的人源化框架分别与mTNT3具有81%和74%相同的序列。该发现表明,用简单的六个CDR移植进行的人源化已经改变了CDR的原始构象。为恢复亲和力,通过一组引物引入H-CDR3的位点特异性随机突变。在λ噬菌体上展示具有突变的H-CDR3的EP ScFv文库。在对粗DNA进行4轮选择后,与初始人源化TNT-3的边缘可检测的亲和力相比,具有显著高亲和力的八个突变体已被有效富集。

[0068] 结合粗DNA的ELISA研究显示,八个突变体均显示出比亲本抗体chTNT-3更高的亲和力(从1.45到8.25倍)。对H-CDR-3序列的分析表明,大多数具有高亲和力的突变已被带正电荷的氨基酸(如Arg和His)或含有羟基基团的氨基酸置换。这些结果表明,残基的静电势或氢键电位的变化可能有助于改善抗体与粗DNA的结合。有趣地,两个具有最佳亲和力的突



变体EP7和EP27.1,在EP27.1Gly→Arg和EP7Ile→His的相应的突变后,获得亲和力的8倍提高。氨基酸Arg和His对结合DNA的潜在作用已在鼠和人抗DNA自身抗体中得到强调。Arg是DNA结合中最重要和最通用的氨基酸。它可以与碱基配对的鸟嘌呤以及未配对的和碱基配对的胞嘧啶形成氢键,并且可以通过与DNA糖磷酸骨架并且与促进结合的柔性侧链的广泛的相互作用而适合于进入大DNA沟或小DNA沟。这可能部分解释了具有用Arg的相同置换的EP27.1、EP2和EP102的亲和力提高。然而,在一个特例中,用Leu置换Arg 104也使结合活性增加了四倍。显然,Arg置换的简单积累不会增加结合DNA的亲和力。Arg 104→Leu的修饰可使Arg 105处于更好的位置用于与DNA相互作用。

[0069] 根据噬菌体展示和结合选择对EP突变体的CDR3上突变位点的分析显示H-CDR3内残基98至100、105、106和108是最保守的,并且取代主要发生在残基101至104、107和109处。相反,在残基101、104、106和109处观察到最高的突变频率。完整的保守残基可能起到直接与抗原接触并为确定特异性做出更多贡献的作用。诸位发明人还发现原始H-CDR3含有两个Arg残基(Arg104,Arg105),这与抗dsDNA自身抗体(其在H-CDR3中具有至少一个并且在大多数情况下具有两个或三个Arg)一致。Arg104可以被取代,并且Arg105是保守的。保守的Arg 105处于位于H-CDR3的中心的位置使得它可以通过氢键和盐桥有效地与DNA相互作用。保守的Arg 105与其他保守残基结合可能在DNA特异性结合中发挥关键作用,并且高突变频率的残基可能对调节抗体的亲和力做出更多贡献。

[0070] 在ELISA和免疫荧光染色中突变体的反应强度的不同级别及其在Raji细胞中的不同分布模式表明,针对相同抗原的一些突变体的表位由于其H-CDR3的突变而改变或移位。使用用于选择的粗DNA进行测试。使用粗DNA用于选择的决定是基于以下证据:衍生自Raji细胞核的chTNT3可以在很大程度上结合单链DNA。尽管chTNT-3显示出与粗DNA的强烈反应,但chTNT-3可能更容易结合细胞核中复杂形式的DNA。对粗DNA以及Raji细胞具有约2倍chTNT-3亲和力的EP/m51在体内显示出与chTNT-3相似的生物分布。相比chTNT-3,EP/m51的肿瘤摄取%也趋于更好。所有这些表明通过CDR移植与突变组合的mTNT-3的人源化是成功的,并且已经获得具有提高的亲和力的人源化EP抗体。

[0071] 因此,应当理解,(1)H-CDR3上的突变是提高人源化抗体亲和力的有效方法;(2)获得了一种具有相同特异性和更高亲和力的人源化突变体(EP51),其在体内显示出用于临床潜力的良好的生物分布谱;(3)结果表明,可以同时获得针对相同抗原不同表位的人源化抗体,并且通过选择合适的抗原可以避免或控制由于CDR3突变引起的人源化抗体特异性转移的风险;和(4)通过研究EP突变体的特异性和亲和力获得的信息拓宽了chTNT3与核抗原结合的知识,并且可用于提高EP亲和力和特异性。最后,荷瘤小鼠的生物分布研究表明,一个候选物EP35.2在肿瘤中具有高且优异的摄取,在研究的7天后具有良好的保留性,并且在该实验肿瘤模型中在体内表现得比chTNT-3或完全人NHS76优异。

[0072] 在一些实施例中,用于描述和要求保护本发明某些实施例的表示成分的量、特性(如浓度)、反应条件等的数字应被理解为在某些情况下由术语“约”来修饰。因此,在一些实施例中,书面说明书和所附权利要求书中列出的数值参数是近似值,其可以根据特定实施例试图获得的所需特性而变化。在一些实施例中,数值参数应该按照报告的有效数字的数量以及通过应用普通的舍入技术来解释。虽然阐述本发明一些实施例的广泛范围的数字范围和参数是近似值,但是在具体实例中阐述的数值被尽可能地精确地报道。在本发明的



一些实施例中呈现的数值可以含有必然由其各自测试测量中所发现的标准偏差引起的某些误差。

[0073] 如在此的说明书和贯穿随后的整个权利要求书中所使用,“一个”、“一种”以及“该”的含义包括复数参照物,除非上下文清楚地另外指明。而且,如在此的说明书中所使用,“在…中”的含义包括“在…中”和“在…上”,除非上下文清楚地另外指明。如本文中还使用的,并且除非上下文另有指示,否则术语“偶联至”旨在包括直接偶联(其中两个彼此偶联的元件彼此接触)和间接偶联(其中至少一个另外的元件位于两个元件之间)。因此,术语“偶联至”和“与……偶联”同义使用。

[0074] 对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本文的发明构思的情况下,除了已经描述的那些之外的更多修改是可能的。因此,除了在所附权利要求的范围中之外,本发明的主题不受限制。此外,在解释说明书和权利要求书时,所有术语应以与上下文一致的尽可能广泛的方式解释。特别地,术语“包括”和“包含”应该被解释为以非排他性的方式指代要素、部件或步骤,从而指示所提及的要素、部件或步骤可以与未明确提及的其他要素、部件或步骤一起存在、或使用、或组合。在说明书或权利要求涉及选自由A、B、C……和N组成的组中的至少一种时,该文字应解释为只需要该组中的一个要素,而不是A加N、或B加N等。

序列表

<110> 癌症治疗实验室有限公司(Cancer Therapeutics Laboratories, Inc.)

<120> 用于在癌症疗法中靶向坏死的人源化抗核抗体

<130> 1023C-1002-W

<150> US62473554

<151> 2017-03-20

<160> 26

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Thr Arg Tyr Trp Met His

1                         5

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

1                         5                         10                         15

Lys Gly

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp Phe Ala Tyr

1                         5                         10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Arg Ala Arg Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu His

1                         5                         10

<210> 5

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 5  
 Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
 1 5  
 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 6  
 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 7  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 7  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 8  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 8

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

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

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

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 智人

&lt;400&gt; 10

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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 11

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

&lt;210&gt; 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

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

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

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

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

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

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 15

Gly Ser Ser Ser Ser  
 1                                   5

<210> 16

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR3突变引物1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (19) .. (19)

<223> 随机突变的密码子

<400> 16

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp  
 1                                   5                                   10                                   15

Phe Ala Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 20 25

<210> 17

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR3突变引物2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (18) .. (18)

<223> 随机突变的密码子

<400> 17

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp  
 1 5 10 15

Phe Xaa Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 20 25

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR3突变引物3

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (17) .. (17)

<223> 随机突变的密码子

<400> 18

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp  
 1 5 10 15

Xaa Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 20 25

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR3 突变引物 4

<220>



<221> 尚未归类的特征

<222> (16) .. (16)

<223> 随机突变的密码子

<400> 19

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Xaa

1                    5                    10                    15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20                    25

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR3突变引物 5

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (15) .. (15)

<223> 随机突变的密码子

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (16) .. (16)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 20

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Xaa

1                    5                    10                    15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20                    25

<210> 21

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR3突变引物 6

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (14) .. (14)

<223> 随机突变的密码子

<400> 21

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Xaa Arg Trp

1	5	10	15
Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
	20	25	
<210>	22		
<211>	26		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	H-CDR3突变引物 7		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(13) .. (13)		
<223>	随机突变的密码子		
<400>	22		
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Xaa Arg Arg Trp			
1	5	10	15
Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
	20	25	
<210>	23		
<211>	26		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	H-CDR3突变引物8		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(12) .. (12)		
<223>	随机突变的密码子		
<400>	23		
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Xaa Val Arg Arg Trp			
1	5	10	15
Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
	20	25	
<210>	24		
<211>	26		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	H-CDR3突变引物 9		

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (11) .. (11)

<223> 随机突变的密码子

<400> 24

Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Glu	Glu	Xaa	Gly	Val	Arg	Arg	Trp
1				5						10					15
Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val						
				20						25					

<210> 25

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR3突变引物 10

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (10) .. (10)

<223> 随机突变的密码子

<400> 25

Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Glu	Xaa	Ile	Gly	Val	Arg	Arg	Trp
1				5						10					15
Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val						
				20						25					

<210> 26

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-CDR3突变引物 11

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (9) .. (9)

<223> 随机突变的密码子

<400> 26

Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Xaa	Glu	Ile	Gly	Val	Arg	Arg	Trp
1				5						10					15
Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val						
				20						25					

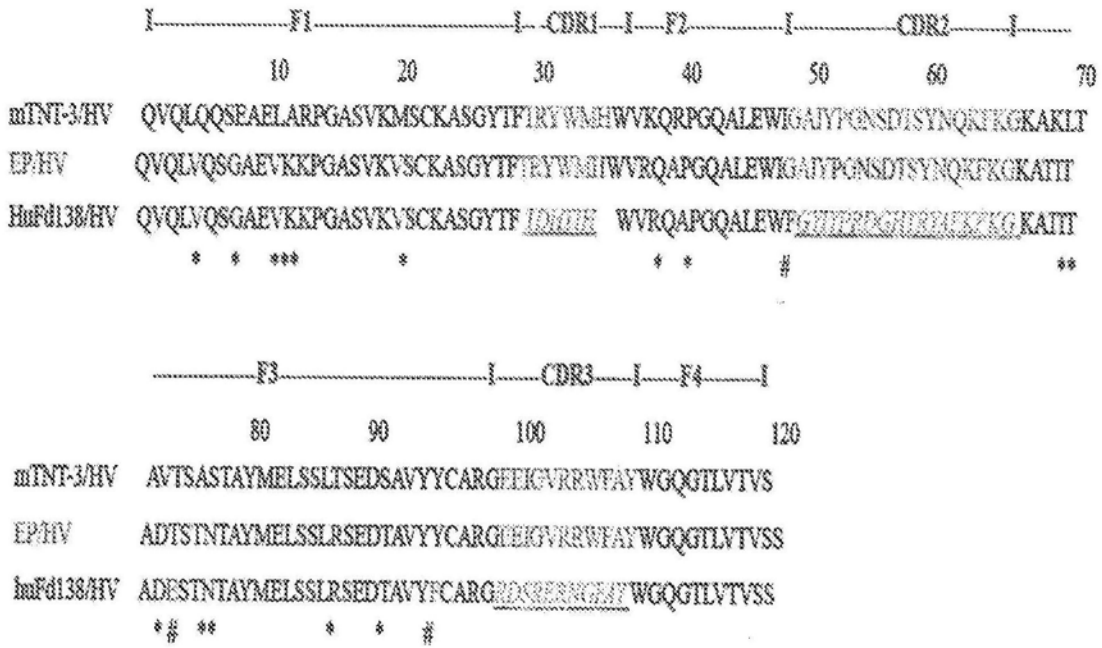


图1A

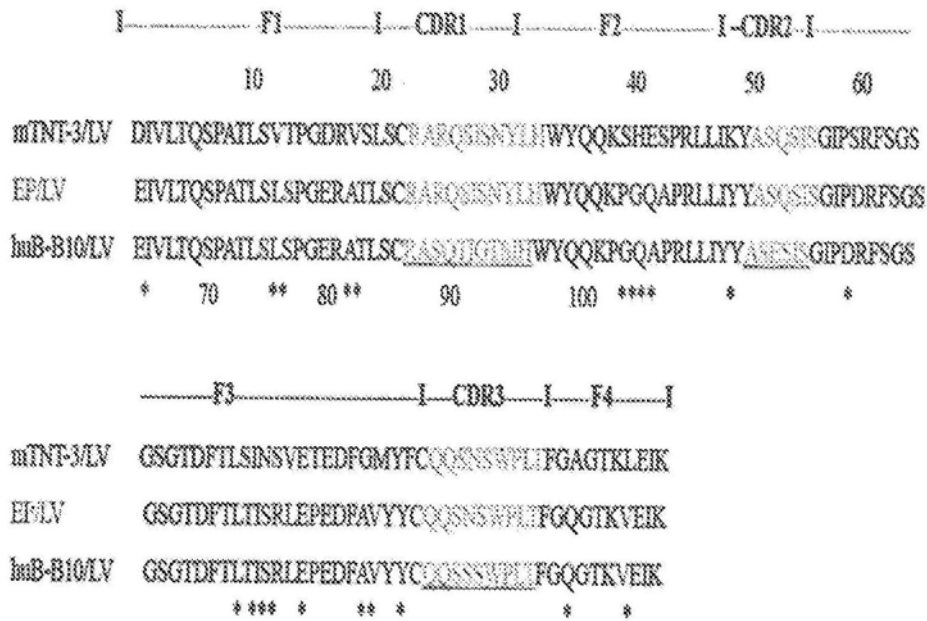


图1B

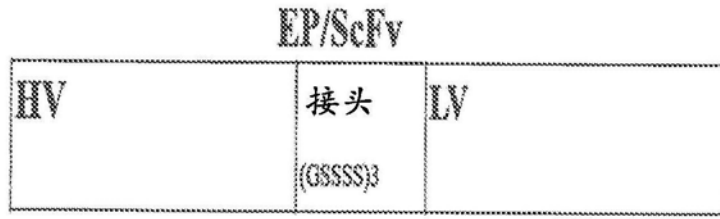


图1C

主模板的H-CD3序列	
EP/ScFv	DTAVYYCARG <del>EEIGVRRWFAYWGQGLVTVSS</del>
	——H-CDR3——
引物	
Pr1	AVYYCARGEEIGVRRWFAXWGQGLV
Pr2	AVYYCARGEEIGVRRWFXYWGQGLV
Pr3	AVYYCARGEEIGVRRWXYWGQGLV
Pr4	AVYYCARGEEIGVRRXFAYWGQGLV
Pr5	AVYYCARGEEIGVRRWFPAYWGQGLV
Pr6	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGLV
Pr7	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGLV
Pr8	AVYYCARGEEVRRWFAYWGQGLV
Pr9	AVYYCARGEEGVRRWFAYWGQGLV
Pr10	AVYYCARGEXIGVRRWFAYWGQGLV
Pr11	AVYYCARGXEIGVRRWFAYWGQGLV

图2

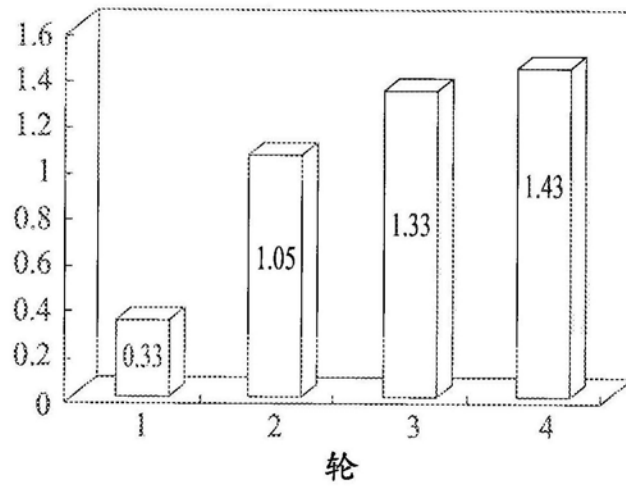


图3

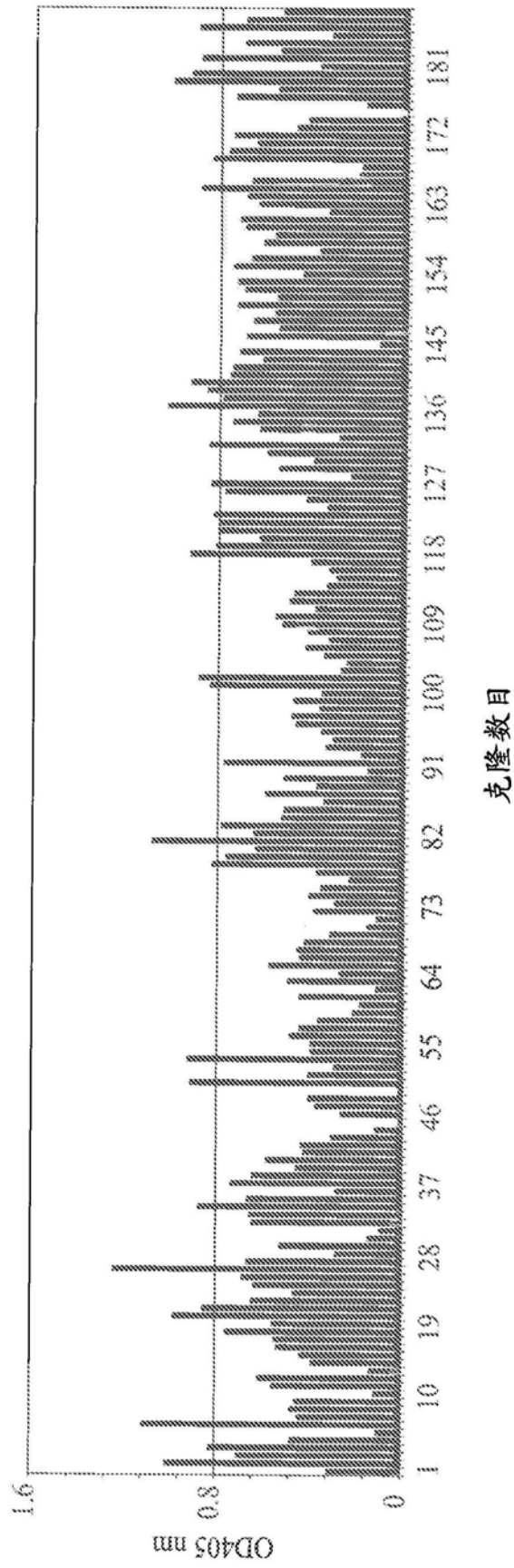


图4



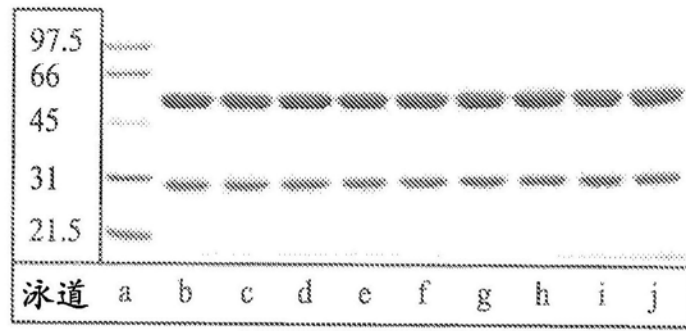


图5

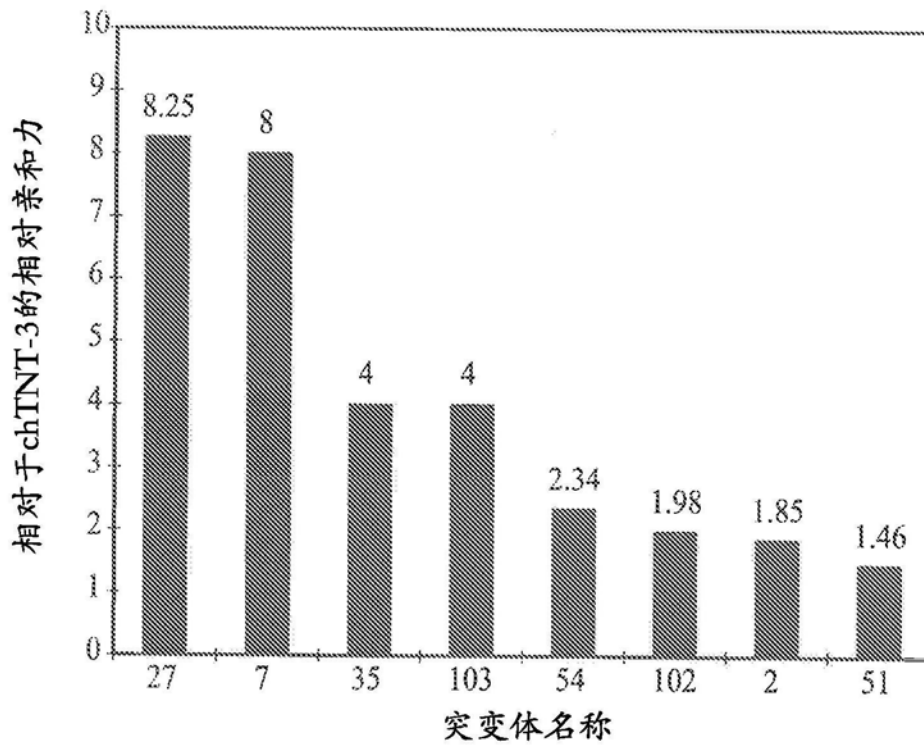


图6

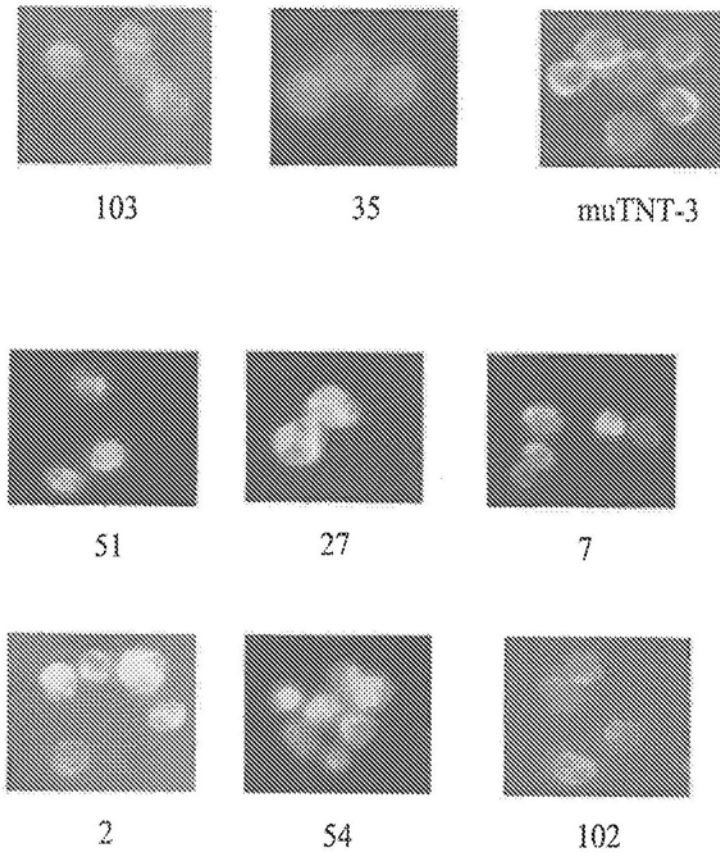


图7

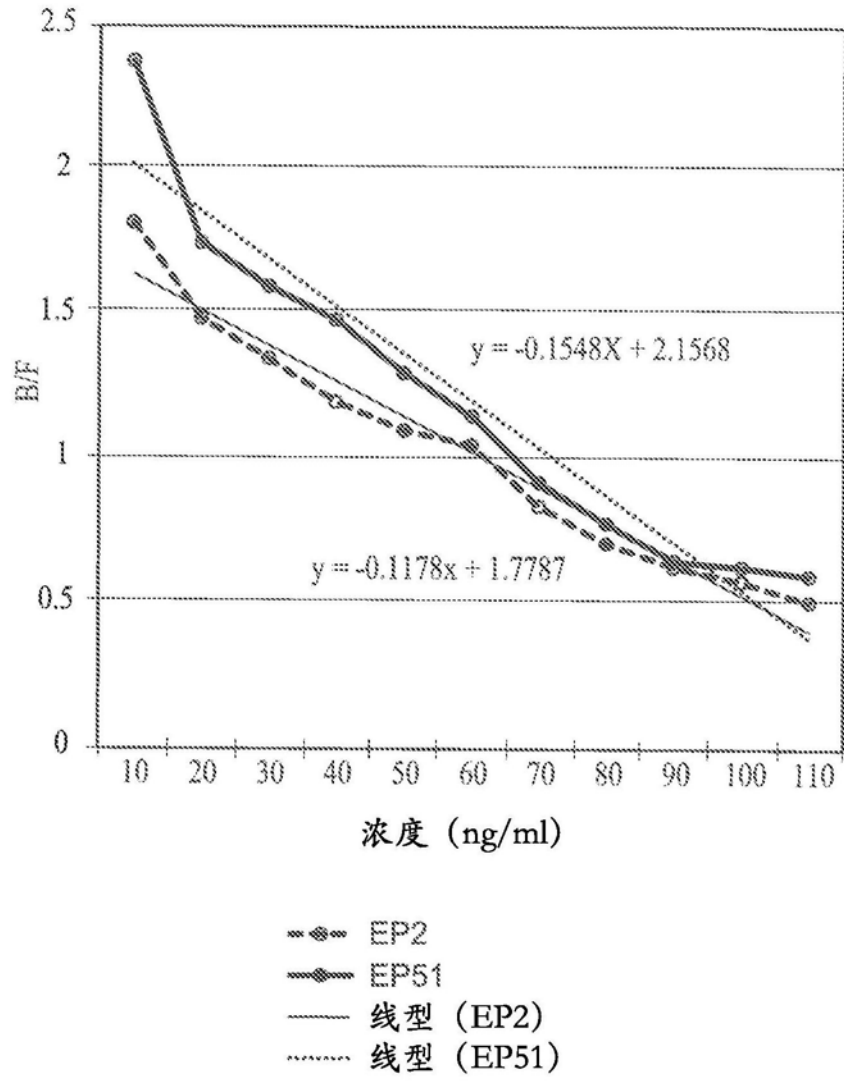


图8

在携带结肠26的BALB/C小鼠中I-125的  
3天生物分布

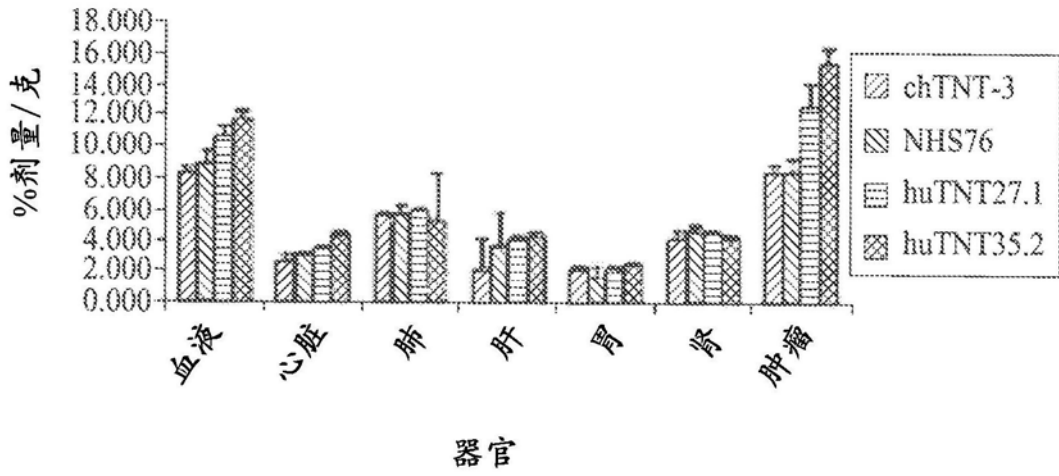


图9A

在携带结肠26的BALB/C小鼠中I-125的  
7天生物分布

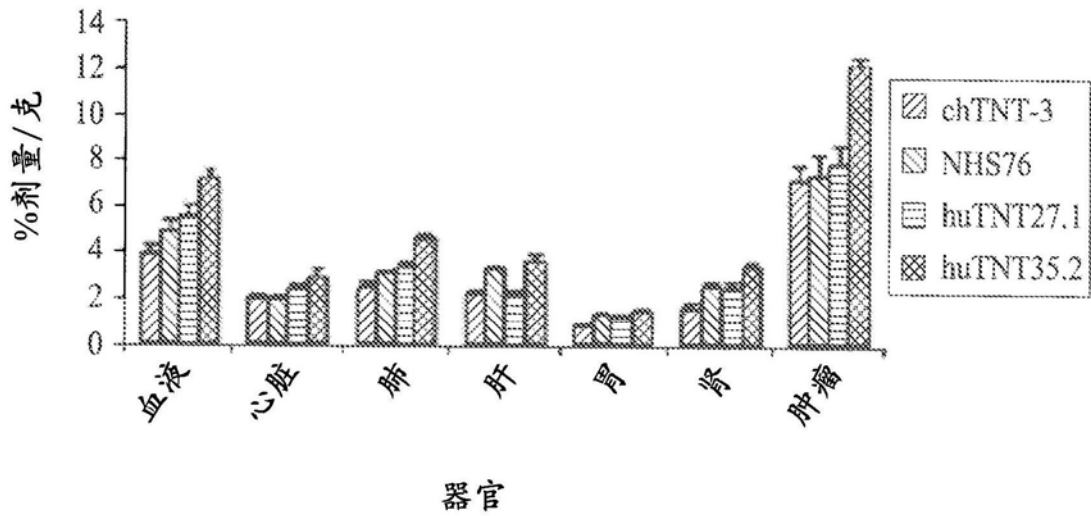


图9B

在携带结肠26的BALB/C小鼠中I-125的  
3天生物分布

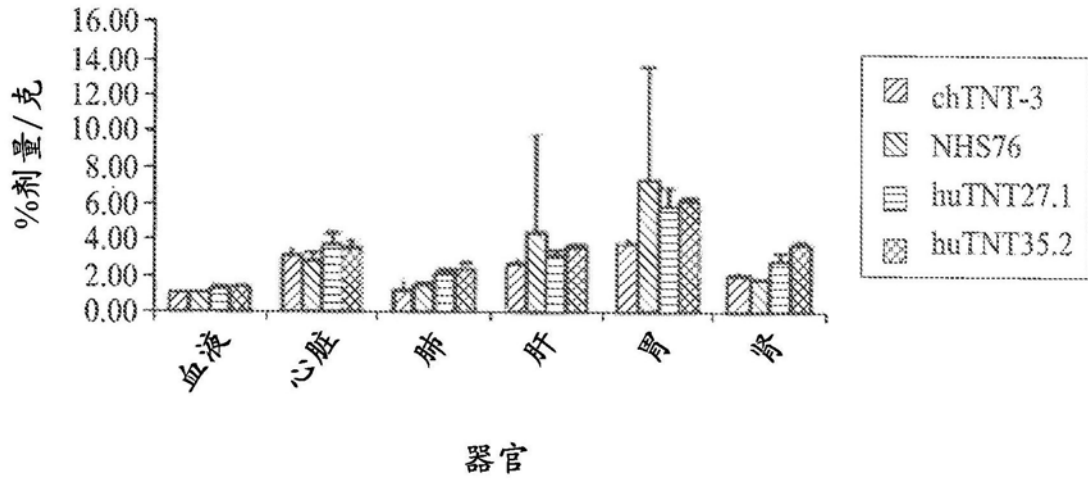


图9C

在携带结肠26的BALB/C小鼠中I-125的  
7天生物分布

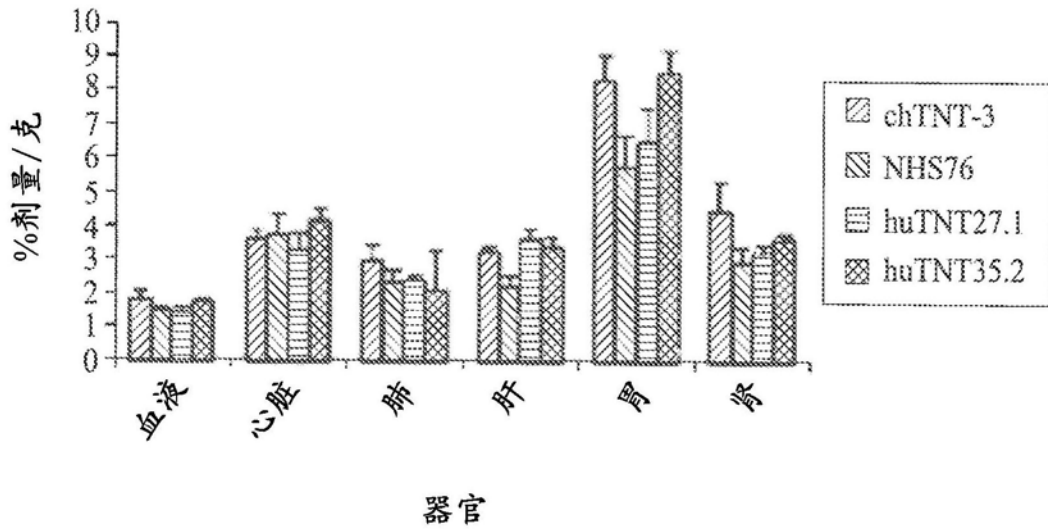


图9D

在携带LS174T的裸鼠中I-125 huEP51的生物分布

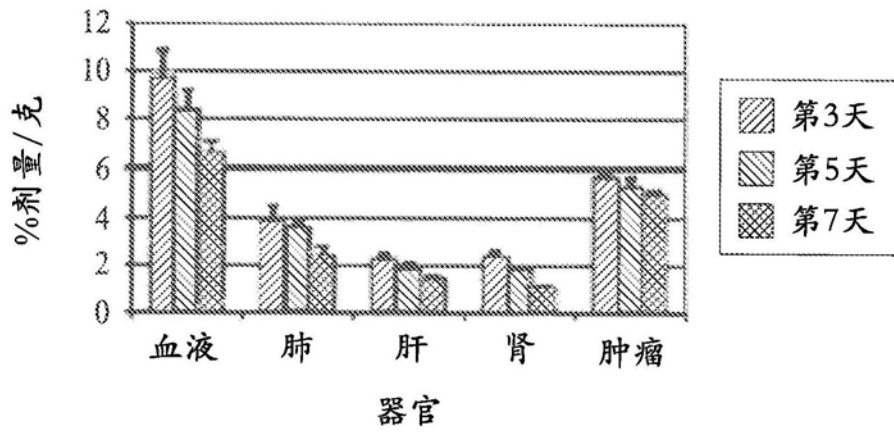


图10

1. 一种人源化抗核抗体, 相对于相应的非人源化抗体, 该人源化抗核抗体对核靶标具有提高的结合亲和力, 其中相对于相应的非人源化抗体, 该人源化抗体在H-CDR3中具有突变的氨基酸, 并且该H-CDR3突变的氨基酸选自下组, 该组由以下组成: <sup>107</sup>Phe→Arg、<sup>101</sup>Ile→His、<sup>102</sup>Gly→Arg、<sup>109</sup>Tyr→Thr、<sup>103</sup>Val→Ser、<sup>104</sup>Arg→Thr、<sup>109</sup>Tyr→Arg、和<sup>104</sup>Arg→Leu。

2. 如权利要求1所述的人源化抗体, 其中该核靶标是单链DNA。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的人源化抗体, 其中该人源化抗体具有比相应的非人源化抗体高至少2倍的结合亲和力。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的人源化抗体, 其中该人源化抗体具有比相应的非人源化抗体高至少4倍的结合亲和力。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的人源化抗体, 其中该人源化抗体具有比相应的非人源化抗体高至少8倍的结合亲和力。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的人源化抗体, 其中该人源化抗体具有以下各项中的至少一种:

H-CDR1序列, 其包含TRYWMH (SEQ ID NO: 1);

H-CDR2序列, 其包含GAIYPGNSDTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 2);

H-CDR3序列, 其包含EEIGVRRWFAY (SEQ ID NO: 3);

L-CDR1序列, 其包含RARQSSISNYLH (SEQ ID NO: 4);

L-CDR2序列, 其包含ASQSSIS (SEQ ID NO: 5); 以及

L-CDR3序列, 其包含QQSNSWPLT (SEQ ID NO: 6)。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的人源化抗体, 其中该人源化抗体具有VH序列, 该VH序列包含

**QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTRYWMHWVRQAP**

**GQALEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDT**

**AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 7)**。

8. 如权利要求1-5中任一项所述的人源化抗体, 其中该人源化抗体具有VL序列, 该VL序列包含

**IVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQSSISNYLHWYQQKPGQAPR**

**LLIYYASQSSISGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTF**

**GQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8)**。

9. 一种杂合分子, 该杂合分子包含与治疗剂和显像剂中至少一种偶联的如权利要求1-8中任一项所述的抗体的至少结合部分。

10. 如权利要求9所述的杂合分子, 其中该抗体的至少结合部分是全长抗体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fab<sub>2</sub>片段、或scFv。

11. 如权利要求9-10中任一项所述的杂合分子, 其中该治疗剂包含以下各项中的至少一种: 细胞因子或其部分、趋化因子或其部分、髓源性抑制细胞 (MDSC) 的抑制剂、M2巨噬细胞的抑制剂、放射性同位素、共刺激分子、toll样受体 (TLR) 激动剂或配体、干扰上皮间充质转化 (EMT) 的分子、和化学治疗药。

12. 如权利要求9-10中任一项所述的杂合分子,其中该显像剂包含放射性同位素、PET标记、和SPECT标记中的至少一种。

13. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-10中任一项所述的抗体或如权利要求9-12中任一项所述的杂合分子。

14. 如权利要求13所述的药物组合物,该药物组合物被配制用于注射。

15. 一种用于靶向坏死细胞的方法,该方法包括使该坏死细胞与如权利要求1-8中任一项所述的抗体或如权利要求9-12中任一项所述的杂合分子接触。

16. 如权利要求15所述的方法,其中该坏死细胞是肿瘤微环境中的坏死肿瘤细胞。

17. 如权利要求15-16中任一项所述的方法,其中接触步骤在体内进行。

18. 一种将治疗剂递送至含有坏死肿瘤细胞的肿瘤微环境的方法,该方法包括:

提供与如权利要求1-8中任一项所述的抗体偶联的治疗剂;并且

在允许该抗体与该肿瘤微环境中坏死细胞中的核靶标结合的条件下,使该微环境中的坏死肿瘤细胞与该治疗剂接触。

19. 如权利要求18所述的方法,其中该治疗剂包含以下各项中的至少一种:细胞因子或其部分、趋化因子或其部分、髓源性抑制细胞(MDSC)的抑制剂、M2巨噬细胞的抑制剂、放射性同位素、共刺激分子、toll样受体(TLR)激动剂或配体、干扰上皮间充质转化(EMT)的分子、和化学治疗药。

20. 如权利要求18-19中任一项所述的方法,其中该肿瘤是实体瘤。

21. 如权利要求18-20中任一项所述的方法,该方法进一步包括给予脉管系统通透性增强剂的步骤。

22. 一种将显像剂递送至含有坏死肿瘤细胞的肿瘤微环境中的方法,该方法包括:

提供与如权利要求1-8中任一项所述的抗体偶联的显像剂;并且

在允许该抗体与该肿瘤微环境中坏死细胞中的核靶标结合的条件下,使该微环境中的坏死肿瘤细胞与该显像剂接触。

23. 如权利要求22所述的方法,其中该显像剂包含放射性同位素、PET标记、和SPECT标记中的至少一种。

24. 如权利要求22-23中任一项所述的方法,其中该肿瘤是实体瘤。

25. 如权利要求22-24中任一项所述的方法,该方法进一步包括给予脉管系统通透性增强剂的步骤。

26. 一种从鼠抗体产生亲和力优化的人源化抗体的方法,该方法包括:

鉴定与该鼠抗体序列具有预定最小同一性的人抗体序列;

将针对VH和VL的鼠CDR移植到经鉴定的人抗体序列的相应VH和VL中,以此获得嵌合VH和VL序列;

使用嵌合VH和VL序列产生scFv杂合体,并且在H-CDR3中进行定点诱变以产生scFv杂合体文库;

使用亲和力选择以从该scFv杂合体文库中鉴定结合物;并且

将该结合物的嵌合VH和VL序列移植到人抗体序列中,以此获得该亲和力优化的人源化抗体。

27. 如权利要求26所述的方法,其中除CDR外,该预定最小同一性是至少90%同一性。



28. 如权利要求26-27中任一项所述的方法,其中该scFv杂合体是噬菌体展示杂合体。

29. 如权利要求26-28中任一项所述的方法,其中H-CDR3中的定点诱变针对该H-CDR3的单个氨基酸位置进行。

30. 如权利要求26-29中任一项所述的方法,其中经至少三个连续的选择/富集循环进行该亲和力选择。

31. 如权利要求26-30中任一项所述的方法,其中该亲和力选择进一步包括在H-CDR3和/或框架区中进行另外的定点诱变的至少一个步骤。