



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109416363 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201780041972.7

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22)申请日 2017.06.02

代理人 陈桢

(30)优先权数据

(51)Int.Cl.

10-2016-0069360 2016.06.03 KR

G01N 33/68(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/53(2006.01)

2019.01.04

G01N 33/50(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

G01N 33/574(2006.01)

PCT/KR2017/005767 2017.06.02

A01K 67/027(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

A61K 39/395(2006.01)

WO2017/209554 KO 2017.12.07

(71)申请人 社会福利法人三星生命公益财团

地址 韩国首尔特别市

(72)发明人 南都铉 李在铉

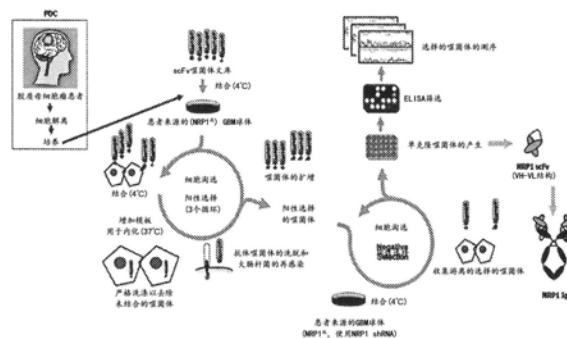
权利要求书1页 说明书20页 附图17页

(54)发明名称

抗NRP1抗体筛选方法

(57)摘要

本公开文本涉及通过使用过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体和包含该肿瘤球体的动物模型筛选抗NRP1抗体或其抗原结合片段的方法,并且更具体地涉及通过分别使用含有NRP1的患者来源的肿瘤球体和移植有该肿瘤球体的动物模型通过体外和体内淘选来筛选抗体或其抗原结合片段的方法。



1. 一种筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括以下步骤:
 - (i) 用包含抗体或其抗原结合片段的文库处理表达NRP1的患者来源的肿瘤球体,以筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段;
 - (ii) 用其中不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体处理筛选的抗体或其抗原结合片段;并且
 - (iii) 从步骤(i)中筛选的抗体或其抗原结合片段中分离或去除与步骤(ii)的患者来源的肿瘤球体结合的抗体或其抗原结合片段。
2. 一种筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括以下步骤:
 - (i) 用包含抗体或其抗原结合片段的文库处理表达NRP1的患者来源的肿瘤球体,从而第一次筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段;
 - (ii) 用第一次筛选的抗体或其抗原结合片段处理不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体;
 - (iii) 向移植有过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体的动物模型给予抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段是通过从步骤(i)中筛选的抗体或其抗原结合片段分离/去除与步骤(ii)的患者来源的肿瘤球体结合的抗体或其抗原结合片段而获得,从而第二次筛选与NRP1结合的抗体或抗原结合片段;并且
 - (iv) 从第二次筛选的抗体或其抗原结合片段中分离或去除与NRP1以外的抗原结合的抗体或其抗原结合片段。
3. 权利要求1或2的方法,其中该抗体或其抗原结合片段被内化到细胞中。
4. 权利要求1或2的方法,其中通过进行以下步骤获得过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体:
 - (a) 解离分离的癌症患者来源的癌组织,并从解离的组织中收集细胞部分;并且
 - (b) 用蛋白酶处理收集的细胞部分,然后过滤、离心和悬浮,由此获得单细胞。
5. 权利要求2的方法,其中移植有过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体的该动物模型是免疫缺陷小鼠。
6. 权利要求5的方法,其中该免疫缺陷小鼠是裸鼠、NOD(非肥胖糖尿病)小鼠、SCID(重症联合免疫缺陷)小鼠、NOD-SCID小鼠或NOG(NOD/SCID I12rg-/-)小鼠。
7. 权利要求1或2的方法,其还包括将通过该方法筛选的抗体或其抗原结合片段转化为IgG形式的步骤。
8. 一种抗体或其抗原结合片段,其通过权利要求1或2的方法筛选,并且与NRP1特异性地结合。
9. 一种用于预防或治疗癌症的组合物,其包含权利要求8的抗体或其抗原结合片段。

抗NRP1抗体筛选方法

技术领域

[0001] 本公开文本涉及通过使用过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体和包含该肿瘤球体的动物模型筛选抗NRP1抗体或其抗原结合片段的方法,并且更具体地涉及通过分别使用含有NRP1的患者来源的肿瘤球体和移植有该肿瘤球体的动物模型通过体外和体内淘汰来筛选抗体或其抗原结合片段的方法。

背景技术

[0002] 神经毡蛋白(NRP)包括首先在神经细胞中发现的NRP1和NRP2。已知NRP1由约923个氨基酸构成,NRP2由约926个氨基酸构成。此外,它们共同具有相似的结构域结构,并且因此具有总共44%的氨基酸同源性。

[0003] 神经毡蛋白(NRP)包括首先在神经细胞中发现的NRP1和NRP2。已知NRP1由约923个氨基酸构成,NRP2由约926个氨基酸构成。此外,NRP1和NRP2共同具有相似的结构域结构,并且因此具有总共44%的氨基酸同源性。

[0004] 已知NRP1是与臂板蛋白3A配体结合的受体,该臂板蛋白3A配体作用于从蛋白辅助受体以调节轴突诱导。然后发现NRP1与血管内皮生长因子(VEGF)配体家族的成员结合,从而介导血管生成。

[0005] 通过血管系统的发育,出现众多的生理过程和病理过程。血液必然充分供应给诸如肿瘤的活跃生长的组织。这些组织通常产生促进新血管形成和维持的促血管生成因子,从而通过血管生成而供应血液。血管生成不是一个简单的过程,而是通过以下步骤完成的:
a) 内皮细胞(EC)从现有的内皮细胞增殖或分化;b) 内皮细胞迁移并聚结形成索状结构;c) 血管索进展为小管形成并且形成在中心具有管腔的血管;d) 现有索或血管的芽开始形成二级血管;e) 原始丛进一步再生长和再生;和f) 内皮细胞被置于内皮管中以便为血管提供维持和调节功能(这些细胞包括在小毛细血管情况下的周细胞、在大血管情况下的平滑肌细胞以及在心脏中的心肌细胞)。

[0006] 已知NRP1在多种人肿瘤细胞系和人类肿瘤(比如胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、睾丸癌、结肠直肠癌、黑素瘤、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、食道癌和前列腺癌)中表达。还已知NRP1参与VEGF和臂板蛋白对癌细胞的增殖、存活和转移的作用。此外,已知的是,根据NRP1表达的程度,癌症进展的程度增加或癌症患者的预后差。

[0007] 当肿瘤生长时,血管生成在从增生到瘤形成的转变中是至关重要的,并且可能在为肿瘤生长和转移提供营养物质中起关键作用。与正常细胞相比,新血管形成允许肿瘤细胞获得生长优势和增殖自主性。由于到可用的毛细血管层的距离的缘故,肿瘤通常以能在仅仅几立方毫米内增殖的单个异常细胞开始,并且能够长期处于停滞的“潜伏”状态,而没有进一步的生长和传播。随后,一些肿瘤细胞转化为血管生成表型,从而激活内皮细胞,并且增殖和成熟为新的毛细血管。这些新形成的血管不仅允许原发肿瘤连续生长,而且还能使转移性肿瘤细胞增殖和再定殖。

[0008] 在这方面,需要能够以高亲和力与NRP1结合并抑制癌细胞生长的抗NRP1抗体,以

治疗其中NRP1过表达的癌症。

[0009] 抗体药物由于其高疗效和靶向治疗特性而在生物制药领域中增长最快。抗生素药物市场是200种生物制药中增长最快的领域,占生物制药市场总量的比例很高(37%),抗体药物的全球市场预计在2012年以11.8%的年均增长率(为515亿美元)增长,在2017年达到899亿美元(2013Biopharmaceutics Trend Report,the Korean Ministry of Trade, Industry and Energy,2013)。

[0010] 作为抗体药物主要靶标的疾病主要集中在特定的疾病,如难治性癌症(49%)和免疫疾病(35%),因此在具有相似适应症的产品之间的市场竞争非常激烈。然而,在疾病中存在细分的治疗靶标,因此用于抗癌疗法的抗体治疗药物的开发领域肯定会在未来继续增长。

[0011] 用于鉴定和获得作为这些抗体药物的主要活性成分的抗体候选物的技术可大体上分为:使用杂交瘤细胞系开发嵌合或人源化抗体、使用转基因小鼠的方法和使用抗体展示技术的方法。

[0012] 1975年,开发了一种杂交瘤技术,该技术使用通过将癌细胞与正常细胞融合而形成的杂交细胞来产生单克隆抗体。从那时起,已经开始抗体药物的积极开发,并且已经开发了鉴定人源化抗体和人抗体的技术,以便解决当给人应用小鼠单克隆抗体时发生的HAMA(人抗小鼠抗体)反应。

[0013] 可以通过转基因小鼠和抗体展示技术(噬菌体展示、酵母展示、核糖体展示等)来举例说明用于产生人抗体的技术领域。使用近来最常尝试的转基因小鼠进行抗体开发是这样的技术,该技术通过将现有的杂交瘤技术应用于移植有人抗体基因的转基因小鼠来产生人单克隆抗体。该技术具有很大的优势,因为它可以由于可能的体内成熟而产生高亲和力抗体,并且可以有效产生人抗体。然而,其缺点在于,转基因小鼠的使用条件昂贵,并且在技术门槛如生产工艺方面是困难的。

[0014] 在抗体展示技术中,噬菌体展示技术是通过在噬菌体表面上展示抗体片段来筛选抗体的技术,并且基于M13PⅢ噬菌体的展示技术是最广泛使用的。然而,由于通过基因重组表达的抗体片段显示在噬菌体的表面上,这些噬菌体显示技术难以筛选细胞表面蛋白(如G蛋白受体)或难以重组表达的抗体。

[0015] 为了解决这些问题,已经开发了在筛选步骤中不使用重组蛋白的策略,其为使用细胞表面蛋白自身进行筛选的策略。

[0016] 在常规的引证参考文献中已经发现,可以通过将抗体候选物与细胞一起孵育来筛选与细胞表面上表达的抗原直接结合的抗体或肽(Andersen PS等人,Proc Natl Acad Sci USA 93:1820-1824,1996;Barry MA等人,Nat Med 2:299-305,1995;Cai X,Garen A.Proc Natl Acad Sci USA 92:6537-6541,1995)。

[0017] 然而,上述基于细胞的展示方法的缺点在于,由于使用在实验室中培养的细胞进行筛选,当通过该方法筛选的抗体实际应用于患者时不能适当地发挥其作用。

[0018] 同时,通过接头将细胞毒性药物与抗体缀合,获得抗体-药物缀合物(ADC)。由于单克隆抗体显示出靶特异性,因此可以将抗体-药物缀合物的药物递送至表达抗原/靶标的肿瘤,该抗原/靶标被具有选择性靶向能力的单克隆抗体识别。理想的是,在给予后在血液中保持前药状态的抗体-药物缀合物不应该是有毒的,并且由于抗体在与其靶肿瘤抗原结合

后被内化到癌细胞中,药物以活性形式释放并杀死肿瘤细胞。

[0019] 因此,确定抗体所结合的靶标/抗原是构建抗体-药物缀合物的重要起点。特别地,抗体所结合的靶标/抗原已成为肿瘤细胞中主要表达(过表达)的细胞表面蛋白。

[0020] 在人癌细胞表面上表达的抗原的定义是指相对于正常组织被过表达或突变和选择性表达的范围广泛的靶标。关键问题是针对基于抗体的疗法来鉴定适当的抗原。这些治疗剂介导抗原或受体功能的变化(即,作为刺激剂或拮抗剂起作用),通过Fc和T细胞活化调节免疫系统,并通过递送与靶向特定抗原的抗体结合的特定药物发挥其功效。已出现可以改变抗体药代动力学、功能、大小和免疫刺激性质的分子技术,作为开发基于抗体的新疗法的关键要素。从治疗性抗体在癌症患者上的临床试验中获得的证据强调了关于靶抗原和抗体之间的亲和力和结合能力、抗体结构的选择和优化抗体的选择的方法(包括治疗方法(信号传导抑制或免疫功能))的重要性。

[0021] 在这些技术背景下,本申请的诸位发明人已经进行了广泛的努力来开发抗癌治疗性抗体,其与已知在各种癌症中表达的NRP1结合并内化到细胞中。因此,诸位发明人使用噬菌体展示技术开发了一种以高亲和力与NRP1结合并且内化到细胞中的抗NRP1抗体,并且发现这种抗NRP1抗体能显著抑制癌细胞的迁移,由此完成本公开文本。

发明内容

[0022] 技术问题

[0023] 本公开文本的目的是提供使用过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体来筛选抗体的方法。

[0024] 本公开文本的另一个目的是提供使用过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体和包含该肿瘤球体的动物模型来筛选抗体的方法。

[0025] 本公开文本的又一个目的是提供通过该方法筛选的抗体或其抗原结合片段。

[0026] 本公开文本的又一个目的是提供用于预防或治疗癌症的组合物,其包含作为活性成分的通过该方法筛选的抗体或其抗原结合片段。

[0027] 技术方案

[0028] 为实现以上目的,本公开文本提供了筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括以下步骤:(i)用包含抗体或其抗原结合片段的文库处理表达NRP1的患者来源的肿瘤球体,并筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段;(ii)用不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体处理筛选的抗体或其抗原结合片段;并且(iii)从步骤(i)中筛选的抗体或其抗原结合片段中分离或去除与步骤(ii)的患者来源的肿瘤球体结合的抗体或其抗原结合片段。

[0029] 本公开文本还提供了筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括以下步骤:(i)用包含抗体或其抗原结合片段的文库处理表达NRP1的患者来源的肿瘤球体,并且进行与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段的第一次筛选;(ii)用第一次筛选的抗体或其抗原结合片段处理不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体;(iii)向移植有过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体的动物模型给予通过从步骤(i)中的抗体或其抗原结合片段分离/去除与步骤(ii)的患者来源的肿瘤球体结合的抗体或其抗原结合片段而获得的抗体或其抗原结合片段,并且对与NRP1结合的抗体或抗原结合片段进行第二次筛选;并且(iv)从第

二次筛选的抗体或其抗原结合片段中分离或去除与NRP1以外的抗原结合的抗体或其抗原结合片段。

[0030] 本公开文本还提供了通过该筛选方法筛选的抗体或其抗原结合片段。

[0031] 本公开文本还提供了包含抗体或其抗原结合片段的用于预防或治疗癌症的组合物。

[0032] 附图简述

[0033] 图1是显示本公开文本的方法的概念视图。

[0034] 图2示意性地显示了根据本公开文本的一个实施方案筛选与神经毡蛋白1 (NRP1) 抗原结合的抗体的方法。

[0035] 图3示意性地显示了体内筛选与NRP1抗原结合的抗体的方法。

[0036] 图4显示了根据本公开文本的一个实施方案的用于产生抗NRP1抗体片段的噬菌粒载体的构型。

[0037] 图5显示了根据本公开文本的一个实施例纯化的每个抗NRP1抗体片段的考马斯染色的结果。

[0038] 图6显示了指示针对NRP1的根据本公开文本的一个实施例筛选的三个抗NRP1抗体片段的结合亲和力的ELISA结果。

[0039] 图7显示了指示依照NRP1浓度的根据本公开文本的一个实施例筛选的三个抗NRP1抗体片段的结合亲和力的ELISA结果。

[0040] 图8显示了为了分析根据本公开文本的一个实施例筛选的三个抗NRP1抗体片段的KD值而进行的SPR分析的结果。

[0041] 图9显示了指示针对过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体的根据本公开文本的一个实施例筛选的抗NRP1抗体片段的结合亲和力的FACS分析结果。

[0042] 图10a至10c是显示根据本公开文本的一个实施例筛选的三个抗NRP1抗体片段的内化功能的共聚焦激光扫描显微照片。

[0043] 图11显示了证实根据本公开文本的一个实施例筛选的抗NRP1抗体片段的结合表位的结果。

[0044] 图12显示了为了筛选过表达NRP1的细胞系而进行的RNA-seq分析的结果。

[0045] 图13显示了三种抗NRP1IgG抗体的纯度。

[0046] 图14显示了三种抗NRP1IgG抗体的内毒素测试的结果。

[0047] 图15显示了通过ELISA测量抗NRP1IgG抗体的KD值的结果。

[0048] 图16显示了三种抗NRP1IgG抗体对人NRP1的特异性结合亲和力。

[0049] 图17显示了证实根据本公开文本的方法筛选的三种抗NRP1IgG抗体内化到患者来源的肿瘤球体中的结果。

[0050] 图18显示了证实根据本公开文本的方法筛选的三种抗NRP1IgG抗体显示出癌细胞特异性内化的结果。

[0051] 图19显示了证实根据本公开文本的方法筛选的三种抗NRP1IgG抗体显示其对正常细胞和癌细胞的结合亲和力之间的差异相比于已知NRP1抗体而言更高的结果。

[0052] 图20显示了证实根据本公开文本的方法筛选的三种抗NRP1IgG抗体展现出优异的抑制癌细胞迁移作用的结果。

[0053] 图21显示了证实根据本公开文本的方法筛选的抗NRP1IgG抗体展现出优异的抑制癌细胞迁移作用的结果。

[0054] 图22显示了证实通过根据本公开文本的方法筛选的抗NRP1IgG抗体改变信号传导物质的结果。

[0055] 图23显示了TUNEL测定的结果,进行该测定以证实通过根据本公开文本的方法筛选的抗NRP1IgG抗体增加细胞凋亡。

[0056] 图24显示了评价根据本公开文本的方法筛选的抗NRP1IgG抗体的抗胶质母细胞瘤功效的结果。

[0057] 图25显示了评价根据本公开文本的方法筛选的抗NRP1IgG抗体的抗肺癌功效的结果。

[0058] 图26显示了证实根据本公开文本的方法筛选的抗NRP1IgG抗体的胶质母细胞瘤特异性结合的结果。

[0059] 图27显示了评价根据本公开文本的方法筛选的抗NRP1IgG抗体在正常组织中的分布的结果。

[0060] 实施本发明的最佳模式

[0061] 除非另外指明,本文所用的所有科学技术术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的那些相同的意义。通常,本文所使用的命名法和下文将描述的实验方法是本领域熟知的并且是常常使用的那些。

[0062] 为了筛选在未来的临床试验中具有高成功可能性并且可以在内化后有效作用于细胞的抗体,诸位发明人已经使用含有NRP1的患者来源的肿瘤球体进行了广泛的努力来开发抗癌治疗性抗体。结果,诸位发明人使用噬菌体展示技术筛选了以高亲和力与NRP1结合并且内化到细胞中的抗体,并且已经证实这种抗体内化到细胞中。

[0063] 因此,在本公开文本的一个实施例中,为了筛选通过与已知在各种癌症中表达的NRP1(神经毡蛋白-1)结合而内化到细胞中的抗体,进行了基于胶质母细胞瘤患者来源的肿瘤球体的噬菌体展示。结果证实,筛选的抗NRP1抗体在与癌细胞表面上表达的NRP1结合后被内化到细胞中(图10a至10c),并且该抗体的结合表位确实不同于常规抗体的结合表位(图11)。

[0064] 因此,在一个方面,本公开涉及筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括以下步骤:(i)用包含抗体或其抗原结合片段的文库处理表达NRP1的患者来源的肿瘤球体,并筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段;(ii)用不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体处理筛选的抗体或其抗原结合片段;和(iii)从步骤(i)中筛选的抗体或其抗原结合片段中分离或去除与步骤(ii)的患者来源的肿瘤球体结合的抗体或其抗原结合片段。

[0065] 如本文所用,术语“表达”表示其中NRP1由结构基因产生的过程,并且包括其中将基因转录成mRNA然后翻译成抗原的过程。通常,NRP1可以促成疾病例如癌症的产生,并且可以过表达以抑制例如癌细胞的凋亡,或者NRP1的过表达可以增加例如癌细胞的侵袭性或迁移。因此,用于筛选根据本公开文本的与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段的方法中的“NRP1的表达”可以表示包括NRP1的过表达或异常激活。

[0066] 如本文所用,术语“抗体”是可以特异性地与靶抗原结合的选自下组的免疫球蛋白,该组由以下组成:IgA、IgE、IgM、IgD、IgY和IgG。抗体由两条轻链和两条重链组成,每条

链由具有可变氨基酸序列的可变结构域和具有恒定氨基酸序列的恒定结构域组成。抗原结合结构域定位在可变区的三维结构的末端。这个抗原结合结构域由互补决定区组成,轻链和重链各自包含三个互补决定区。在可变结构域中,互补决定区具有特别高的氨基酸序列变异性。由于这种高变异性,可以发现针对各种抗原的特异性抗体。本公开文本的范围还包括完整抗体形式以及抗体分子的抗原结合片段。

[0067] 如本文所用,术语“ScFv(单链Fv)”是由连接在一起的轻链和重链可变结构域组成的抗体。在一些情况下,ScFv可包含由具有连接在一起的约15个氨基酸的肽链组成的接头。在这种情况下,ScFv可以具有轻链可变结构域-接头-重链可变结构域的结构、或重链可变结构域-接头-轻链可变结构域的结构,并且具有与亲本抗体相同或相似的抗原特异性。

[0068] 完全抗体是具有两条全长轻链和两条全长重链的结构,并且每条轻链通过二硫键与重链连接。重链的恒定区具有伽马(γ)、缪(μ)、阿尔法(α)、德尔塔(δ)和伊普西龙(ϵ)类型。亚类具有伽马1(γ 1)、伽马2(γ 2)、伽马3(γ 3)、伽马4(γ 4)、阿尔法1(α 1)和阿尔法2(α 2)类型。轻链的恒定区具有卡帕(κ)和兰布达(λ)类型。

[0069] 抗体的抗原结合片段或抗体片段是指具有抗原结合功能的片段,包括Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv等。抗体片段的Fab具有包括轻链和重链的可变区、轻链的恒定区和具有一个抗原结合位点的重链的第一恒定区(CH1)的结构。Fab'与Fab的不同之处在于它具有在重链CH1结构域的C末端的含有一个或多个半胱氨酸残基的铰链区。当Fab'的铰链区的半胱氨酸残基形成二硫键时产生F(ab')₂抗体。用于生成具有仅有重链可变区和轻链可变区的最小抗体片段的Fv片段的重组技术描述于PCT国际公开号WO 88/01649、WO88/06630、WO 88/07085、WO 88/07086和WO 88/09344。双链Fv具有在重链可变区和轻链可变区之间的非共价键合。单链Fv(scFv)通过共价键经由肽接头或直接在C末端与重链可变区和轻链可变区连接。因此,单链Fv(scFv)具有诸如双链Fv之类的二聚体的结构。这样的抗体片段可以使用蛋白质水解酶获得(例如,当用木瓜蛋白酶切割整个抗体时,可以获得Fab,并且当用胃蛋白酶切割完整抗体时,可以获得F(ab')₂片段),它也可以通过基因重组技术产生。

[0070] 如本文所用,术语“抗体(或ScFv)文库”是具有不同序列的各种抗体基因的集合。为了从抗体文库中分离对任何抗原特异的抗体,需要非常高的多样性。构建并使用由不同抗体克隆组成的文库。可以将该抗体文库的抗体基因克隆到例如噬菌粒载体中,并转化到宿主细胞(大肠杆菌)中。

[0071] 如本文所用,术语“核酸”可与术语“基因”或“核苷酸”互换使用。例如,核酸可以选自下组,该组由以下组成:天然/合成DNA、基因组DNA、天然/合成RNA、cDNA和cRNA,但不限于此。

[0072] 如本文所用,术语“噬菌粒”载体是用于噬菌体展示并具有噬菌体复制起点的质粒DNA。它通常具有用作选择标记物的抗生素抗性基因。用于噬菌体展示的噬菌粒载体包括M13噬菌体的gIII基因或其部分,并且ScFv基因与gIII基因的5'端连接并在宿主细胞中表达。

[0073] 如本文所用,术语“辅助噬菌体”是提供必要的遗传信息以便将噬菌粒包装到噬菌体颗粒中的噬菌体。由于噬菌粒包括噬菌体的gIII基因或其部分,用辅助噬菌体感染用噬菌粒转化的宿主细胞(转化体)来提供剩余的噬菌体基因。辅助噬菌体包括M13K07或VCSM13,并且大部分包括抗生素抗性基因,比如卡那霉素抗性基因,从而可以选择用辅助噬

菌体感染的转化体。另外,包装信号是有缺陷的,因此噬菌粒基因而不是辅助噬菌体基因被选择性地包装到噬菌体颗粒中。

[0074] 如本文所用,术语“信号序列”是位于基因的5'端并且用作当由该基因编码的蛋白质分泌到细胞外时的必要信号的核苷酸序列,或者为与其对应的氨基酸序列。

[0075] 如本文所用,术语“噬菌体展示”是指通过将突变多肽和至少一部分外壳蛋白融合而将融合蛋白展示在噬菌体表面(例如纤维状噬菌体颗粒)上的技术。噬菌体展示可用于靶向大的随机化蛋白质变体文库,以便迅速并高效地将与靶抗原以高亲和力结合的序列分类。在噬菌体上展示肽和蛋白质文库已用于筛选上百万种多肽,以鉴定具有特异性结合特性的多肽。

[0076] 噬菌体展示技术为生成和筛选与特异性配体(例如抗原)结合的新蛋白质提供了有力工具。使用噬菌体展示技术,可以生成大的蛋白质变体文库,并且可以对以高亲和力结合靶抗原的序列进行快速分类。将编码突变多肽的核酸与编码病毒外壳蛋白(例如基因III蛋白或基因VIII蛋白)的核酸序列融合。已经开发了单价噬菌体展示系统,其中编码蛋白质或多肽的核酸序列与编码基因III蛋白的一部分的核酸序列融合。在单价噬菌体展示系统中,基因融合物以低水平表达,并且还表达野生型基因III蛋白,从而维持颗粒的感染性。

[0077] 在开发抗体噬菌体展示文库中,证明肽在纤维状噬菌体表面上表达和功能抗体片段在宿主细胞的外周细胞质中表达是重要的。已经以多种方式制备了抗体或抗原结合多肽的文库,例如通过插入随机DNA序列来改变单个基因或通过克隆相关的基因系。可以针对具有期望特征的抗体或抗原结合蛋白的表达来筛选文库。

[0078] 噬菌体展示技术对于产生具有所需特征的抗体具有优于常规杂交瘤和重组方法的若干个优点。该技术允许在不使用动物的情况下在短时间内生成具有各种序列的大抗体文库。杂交瘤或人源化抗体的产生可能花费数月才能制造。此外,因为不需要免疫,噬菌体抗体文库可以产生针对具有毒性或具有低抗原性的抗原的抗体。噬菌体抗体文库也可用于生成和鉴定新型治疗性抗体。

[0079] 可以使用这样的技术,其中使用噬菌体展示文库从原始B细胞Ig组库(repertoires)或免疫或未免疫的人种系序列生成抗体。可以使用各种淋巴组织来制备原始或非免疫的抗原结合文库。

[0080] 用于从噬菌体展示文库中鉴定和分离高亲和力抗体的技术对于分离新的治疗性抗体是重要的。从文库中分离高亲和力抗体可能取决于文库大小、细菌细胞的生产效率和文库多样性。文库的大小因由于抗体或抗原结合蛋白的不适当折叠和终止密码子的存在导致的低效生产而减小。当抗体或抗原结合结构域未适当折叠时,可抑制细菌细胞中的表达。可以通过交替地使在可变/恒定界面表面上的残基或选择的CDR残基突变来增加表达。框架区的序列是当抗体噬菌体文库在细菌细胞中生成时提供适当折叠的一种元件。

[0081] 重要的是在高亲和力抗体分离中生成抗体或抗原结合蛋白的各种文库。已发现CDR3区常常参与抗原结合。重链上的CDR3区就大小、序列和结构空间构象而言变化很大,这使得可使用CDR3区制备多种文库。

[0082] 此外,可在每个位置使用全部20种氨基酸通过随机化可变重链和轻链的CDR区生成多样性。使用全部20种氨基酸导致变体抗体序列的变异性增加并且导致鉴定新型抗体机会增加。

[0083] 如本文所用,术语“神经毡蛋白”或“NRP”共同地包括神经毡蛋白-1 (NRP1)、神经毡蛋白-2 (NRP2) 及其同工型和变体。神经毡蛋白是120-130kDa的非酪氨酸激酶受体。存在多种NRP-1和NRP-2剪接变体和可溶性同工型。神经毡蛋白的基本结构包括五个结构域:三个细胞外结构域(a1a2、b1b2和c)、一个跨膜结构域和一个细胞质结构域。a1a2结构域与补体成分C1r和C1s (CUB) 同源,其通常含有形成两个二硫桥的四个半胱氨酸残基。b1b2结构域与凝血因子V和VIII同源。由于其与安眠蛋白(mepripin)、AS和受体酪氨酸磷酸酶 μ 蛋白的同源性,c结构域的中心部分被命名为MAM。a1a2和b1b2结构域负责配体结合,而c结构域对于同二聚化或异二聚化是关键。

[0084] “神经毡蛋白介导的生物活性”是指其中神经毡蛋白-1发挥重要作用的生理或病理事件。例如,这样的活性可以是胚胎神经系统发育或神经元再生过程中的轴突导向、血管生成(包括血管建模)、肿瘤发生和肿瘤转移,但不限于此。

[0085] 本公开文本的抗体包括单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体等,但不限于此。本公开文本的抗体包括抗体的抗原结合片段或抗体片段,并且该片段可以包括单链Fv (scFV)、单链抗体、Fab片段、F(ab') 片段、二硫键连接的Fvs (sdFV) 和抗独特型(抗Id) 抗体。

[0086] 单克隆抗体是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除可能以占据群体的个体抗体的痕量存在的天然存在的突变外,它们是相同的。单克隆抗体针对单个抗原位点是高度特异性的并且是针对单个抗原位点衍生的。

[0087] “人源化”形式的非人(例如鼠类) 抗体是含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其已由来自非人物种(诸如小鼠、大鼠、兔和非人灵长类) 的高变区(供体抗体) 的残基替换,其具有特异性、亲和力和保持来自受体高变区的残基的能力。

[0088] “人抗体”是衍生自人免疫球蛋白的分子,并且意指构成抗体的所有氨基酸序列(包括互补决定区和结构区) 由人免疫球蛋白构成。

[0089] 重链和/或轻链与源自特定物种或属于特定抗体种类或子类的抗体中的相应序列部分相同或同源,而一个或多个剩余的链与源自另一物种或属于另一抗体种类或子类的“嵌合”抗体(免疫球蛋白) 的抗体以及表现出期望生物活性的此类抗体的片段中的相应序列相同或同源。

[0090] 如本文所用,“抗体可变结构域”是指包括互补决定区(CDR;即CDR1、CDR2和CDR3) 和框架区(FR) 的氨基酸序列的抗体分子的轻链和重链区。VH是指重链的可变结构域。VL是指轻链的可变结构域。

[0091] “互补决定区”(CDR;即CDR1、CDR2和CDR3) 是指抗体可变结构域的氨基酸残基,其对于抗原结合是必需的。每个可变结构域通常具有三个CDR区,标识为CDR1、CDR2和CDR3。

[0092] “框架区”(FR) 是除CDR残基之外的可变结构域残基。每个可变结构域通常具有四个FR,其被标识为FR1、FR2、FR3和FR4。

[0093] 本公开文本的方法包括步骤(i):用包含抗体或其抗原结合片段的文库处理表达NRP1的患者来源的肿瘤球体,并筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段。

[0094] 患者来源的肿瘤球体可以是例如癌症患者来源的肿瘤球体,并且癌症患者来源的肿瘤球体表现出与正常细胞不同的生理特征。这样的生理特征由基因表达模式决定,其中

与正常细胞相比,在癌细胞中的抗原表达特异性地增加或减少。该基因表达模式可以是患者特异性的,或者可以显示患者的组织特异性差异。

[0095] 用于测量患者来源的肿瘤球体和正常细胞的抗原含量的方法可以包括测量和比较编码该抗原的基因或蛋白质的表达水平。优选地,该方法可以通过选自下组的任何一种方法来进行,该组由以下组成:FACS、ELISA、全外显子组测序和RNA测序,但不限于此。

[0096] 在本公开文本中,患者来源的肿瘤球体可以源自实体癌患者,并且实体癌可以选自下组,该组由以下组成:肝癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、结肠癌、头颈癌、膀胱癌、肾细胞癌、乳腺癌、转移癌、前列腺癌、胰腺癌和肺癌,但不限于此。

[0097] 一种用于获得患者来源的肿瘤球体的方法没有特别限制,并且可以例如包括以下步骤:(a)解离分离的癌症患者来源的癌组织,并从解离的组织中收集细胞部分;(b)用蛋白酶处理收集的细胞部分,然后过滤、离心和悬浮,由此获得单细胞。

[0098] 在本公开文本中,蛋白酶可以是能够进行蛋白水解的酶,并且其例子可以包括:通过蛋白质分解代谢降解蛋白质的内肽酶,其水解连接蛋白质中的氨基酸的肽键;和水解蛋白质的N末端或C末端肽键的外肽酶。

[0099] 本公开文本的方法还包括步骤(ii):将筛选的抗体或其抗原结合片段与不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体一起孵育。

[0100] 步骤(ii)是对步骤(i)中筛选的抗体或其抗原结合片段进行阴性选择的步骤。本公开文本的方法还包括步骤(iii):从(i)中筛选的抗体或其抗原结合片段中分离或去除与(ii)的患者来源的肿瘤球体结合的抗体或其抗原结合片段。借助于这个步骤,可以筛选对抗原具有高选择性的抗体。

[0101] 在本公开文本中,在步骤(ii)中使用的不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体可以是不天然表达NRP1的细胞,或人工地工程化为不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体。用于人工地工程化细胞的方法可以是防止NRP1表达的任何方法。优选地,不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体可以通过用与NRP1结合的选自下组的一种或多种进行处理而获得,该组由以下组成:适体、siRNA、单链siRNA、微小RNA和shRNA。

[0102] 在本公开文本中,通过使用不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体仅筛选与NRP1结合的抗体的步骤是就在前一个阳性选择步骤之后进行的阴性选择步骤,并且因此具有提高筛选的抗体对于NRP1的准确性的效果。

[0103] 在一些情况下,本公开文本的方法可以在步骤(ii)期间或之后进一步包括在4°C下进行噬菌体展示的步骤,然后在37°C的升高温度下筛选内化到细胞中的抗体。借助于该步骤,可以筛选内化到细胞中的抗体。

[0104] 可以通过使用电泳、离心、凝胶过滤、沉淀、透析、色谱法(包括离子交换色谱、亲和色谱、免疫吸附色谱、尺寸排阻色谱等)、等电聚焦以及它们的变化和组合来进行抗体或其抗原结合片段的分离或去除,但不限于此。

[0105] 通过例如离心或超滤去除杂质并且通过使用例如亲和色谱法等纯化所得产物,可以进行抗体或其抗原结合片段的分离或去除。可以使用其他另外的纯化技术,例如阴离子或阳离子交换色谱、疏水相互作用色谱、羟基磷灰石色谱等。

[0106] 在另一方面,本公开文本涉及筛选与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括以下步骤:(i)用包含抗体或其抗原结合片段的文库处理表达NRP1的患者来源

的肿瘤球体,并且进行与NRP1结合的抗体或其抗原结合片段的第一次筛选;(ii)用第一次筛选的抗体或其抗原结合片段处理不表达NRP1的患者来源的肿瘤球体;(iii)向移植有过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体的动物模型给予通过从步骤(i)中的抗体或其抗原结合片段分离或去除与步骤(ii)的患者来源的肿瘤球体结合的抗体或其抗原结合片段而获得的抗体或其抗原结合片段,并且对与NRP1结合的抗体或抗原结合片段进行第二次筛选;和(iv)从第二次筛选的抗体或其抗原结合片段中分离或去除与NRP1以外的抗原结合的抗体或其抗原结合片段。

[0107] 与上述筛选方法中描述的配置相同的配置的描述可以同等适用。

[0108] 在本公开文本的另一个实施例中,为了筛选通过与已知在各种癌症中表达的NRP1(神经毡蛋白-1)结合而内化到细胞中的抗体,进行基于胶质母细胞瘤患者来源的肿瘤球体的噬菌体展示,并且然后将第一次筛选的抗体候选物注射到包括患者来源的肿瘤球体的免疫缺陷小鼠中,并进行体内第二次筛选。结果证实,筛选的抗NRP1抗体在与癌细胞表面上表达的NRP1结合后被内化到细胞中(图10a至10c),并且该抗体的结合表位确实不同于常规抗体的结合表位(图11)。

[0109] 具体而言,本公开文本的方法还包括向移植有过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体的动物模型给予抗体或其抗原结合片段的步骤,该抗体或其抗原结合片段是通过从步骤(i)中筛选的抗体或其抗原结合片段分离或去除与步骤(ii)的患者来源的肿瘤球体结合的抗体或其抗原结合片段而获得,并进行与NRP1结合的抗体或抗原结合片段的第二次筛选。

[0110] 包括根据本公开文本的上述步骤的筛选方法使得可能通过移植有过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体的动物模型来充分反映患者的特征。因此,它可以用于筛选患者特异性治疗药物和选择治疗方法,并且还可以以高精度度筛选特别适合于患者特征的抗体或其抗原结合片段。

[0111] 在本公开文本中,移植有过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体的动物模型可以是包括患者来源的肿瘤球体的任何动物。优选地,动物模型可以是免疫缺陷小鼠。“免疫缺陷小鼠”是指通过在基因水平上人工破坏免疫系统的某些元件而生成的小鼠,使得免疫系统变得异常并且可以形成胶质母细胞瘤。最优选地,免疫缺陷小鼠可以是裸鼠、NOD(非肥胖糖尿病)小鼠、SCID(重症联合免疫缺陷)小鼠、NOD-SCID小鼠或NOG(NOD/SCID I12rg^{-/-})小鼠。

[0112] 根据本公开文本的方法可以筛选例如与在患者来源的肿瘤球体中过表达的NRP1结合的抗体,但不限于此。抗体可以是,例如,与NRP1的VEGF₁₆₅结构域结合的抗体,但该抗体的结合表位可以不同于已知与NRP1的VEGF₁₆₅结构域结合的常规抗体(抗体MGRP1685A, Genetech)的结合表位。

[0113] 通过根据本公开文本的方法筛选的抗体或其抗原结合片段可以是例如IgG形式、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fab片段、Fv片段或单链Fv(scFv)片段。优选地,它可以转化为IgG形式。

[0114] 仍然在另一方面,本公开文本涉及通过该方法筛选的抗体或其抗原结合片段。

[0115] 本公开文本的抗体或抗体片段可以在特异性地识别NRP1的范围内包括本文所述的本公开文本的抗NRP1抗体的序列及其生物学等同物。可以另外修饰抗体的氨基酸序列以进一步改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。此类修饰包括例如抗体的氨基酸序列残基的缺失、插入和/或取代。基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,诸如疏水性、亲水

性、电荷和大小,进行此类氨基酸变化。通过分析氨基酸侧链取代基的大小、形状和类型,认识到精氨酸、赖氨酸和组氨酸中的每个是带正电荷的残基;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸具有相似的大小;并且苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸具有相似的形状。基于这些考虑,因此发现精氨酸、赖氨酸和组氨酸;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸;苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸分别是生物学上的功能等同物。

[0116] 在引入突变时,可以考虑氨基酸的疏水指数。根据其疏水性和电荷,为每种氨基酸分配了亲水性指数:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/半胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);以及精氨酸(-4.5)。

[0117] 疏水性氨基酸指数在赋予蛋白质的交互生物学功能方面非常重要。众所周知,用具有相似疏水性指数的氨基酸取代可以保留相似的生物学活性。当参照疏水性指数引入突变时,在显示出疏水性指数差异的氨基酸之间进行取代,该疏水性指数差异优选在 ± 2 内,更优选在 ± 1 内,甚至更优选在 ± 0.5 内。

[0118] 同时,还众所周知,具有相似亲水性值的氨基酸之间的取代导致蛋白质具有等同的生物学活性。如美国专利号4,554,101中所公开的,将以下亲水性值分配给每个氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 ± 1);谷氨酸(+3.0 ± 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 ± 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5)以及色氨酸(-3.4)。

[0119] 蛋白质中不完全改变分子活性的氨基酸取代是本领域已知的。取代最常发生在氨基酸残基例如Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu和Asp/Gly之间。

[0120] 考虑到具有上述生物学等同活性的突变,本公开文本的抗体或编码其的核酸分子被解释为包含显示出与序列表中描述的序列的基本同一性的序列。基本同一性意指通过将本公开文本的序列与任何其他序列尽可能多地进行比对并使用本领域通常使用的算法分析比对的序列,序列显示出至少61%同源性,更优选70%同源性,甚至更优选80%同源性,且最优选90%同源性。用于序列比较的比对方法是本领域众所周知的。NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST)可从例如NCBI获得并且可与互联网上的序列分析程序诸如blastp、blastm、blastx、tblastn和tblastx联合使用。BLAST可在<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>获得。使用该程序的序列同源性比较可以在<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>找到。

[0121] 在本公开文本中,抗体或其抗原结合片段可以结合抗原,例如,涉及癌症或肿瘤的发生、生长和迁移的抗原。抗原的形式可以是例如寡聚物、肽、多肽或蛋白质的形式。

[0122] 在本公开文本的一个实施例中,本公开文本可以提供筛选与NRP1特异性地结合的抗体或其抗原结合片段的方法。

[0123] 在又另一方面,本公开文本涉及包含抗体或其抗原结合片段作为活性成分的用于预防或治疗癌症的组合物。

[0124] 本公开文本可以是例如用于预防或治疗癌症的药物组合物,该药物组合物包含

(a) 药物有效量的根据本发明的针对NRP1的抗体或其抗原结合片段;以及(b) 药学上可接受的载体。本公开文本还涉及用于预防或治疗癌症的方法,其包括向患者给予有效量的根据本公开文本的针对NRP1的抗体或其抗原结合片段。

[0125] 由于组合物使用本公开文本的抗NRP1抗体或其抗原结合片段作为活性成分,因此排除对它们两者共同的描述以避免由重复描述引起的本说明书的过度复杂。

[0126] 如下文所述的实施例中所证明,本公开文本的抗NRP1抗体可以抑制过表达NRP1的癌细胞的迁移。因此,本公开文本的抗体及其抗原结合片段以高亲和力与NRP1结合,因此抑制过表达NRP1的癌细胞的迁移,因而其可用于预防和治疗癌症。

[0127] 在本公开文本的一个实施例中,证实通过本公开文本的方法筛选的抗NRP1抗体能够显示癌细胞特异性内化(实施例9),并且能够在实体癌中表现出增加细胞凋亡和期望的肿瘤生长抑制作用,该实体癌例如胶质母细胞瘤和肺癌(实施例11)。特别证实的是,通过本公开文本的方法筛选的抗NRP1抗体对正常组织具有很小的或没有结合亲和力,表明抗体的副作用可以最小化(实施例12)。

[0128] 如本文所用,术语“预防”意指通过给予根据本发明的组合物抑制或延迟癌症进展的任何作用,并且“治疗”意指癌症的发生抑制、减轻或消除。

[0129] 该组合物适用于过表达NRP1的癌症疾病,例如,胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、睾丸癌、结肠癌、黑素瘤、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、食道癌和前列腺癌。

[0130] 如本文所用,术语“过表达EGFRvIII的癌症”是指与相同组织类型的非癌细胞相比,在癌细胞表面上具有显著更高水平的EGFRvIII的癌症。

[0131] 待包含在本公开文本的组合物中的药学上可接受的载剂是制剂中常用的并且包括但不限于乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯橡胶、磷酸钙、海藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油等。除这些组分外,本公开文本的组合物还可进一步包含例如润滑剂、润湿剂、增甜剂、调味剂、乳化剂、助悬剂和防腐剂。

[0132] 本公开文本的药物组合物可以口服或肠胃外给予。肠胃外给予是通过静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、腹膜内注射、内皮给予、局部给予、鼻内给予、肺内给予、直肠给予等来进行。

[0133] 因为当口服给予时蛋白质或肽被消化,用于口服给予的组合物应当被配制为对活性药物剂包衣或保护以免在胃中降解。另外,药物组合物可通过能够将活性物质转运至靶细胞的任何装置给予。

[0134] 根据本公开文本的组合物的合适剂量可以根据下述因素而变化:诸如配制方法、给予方法、患者年龄、体重、性别、病理状态、饮食、给予时间、给予途径、排泄率和反应敏感性。因此,普通技能的医师可以容易地确定对于所需治疗或预防有效的剂量并给出处方。例如,本公开文本的药物组合物的日剂量为0.0001mg/kg至100mg/kg。如本文所用,术语“药学有效量”是指足以预防或治疗癌症的量。

[0135] 可以使用药学上可接受的载体和/或赋形剂根据本公开所属领域的普通技术人员可以容易地实施的方法来配制本公开文本的药物组合物,从而将其提供为单位剂型或封装在多剂量容器中。此处,该制剂可以是呈油或含水介质中的溶液、悬浮液或乳液的形式,或者是呈提取物、粒剂(grain)、栓剂、粉末、颗粒、片剂或胶囊的形式,并且可以另外包括分散

剂或稳定剂。

[0136] 本公开文本的组合物可以作为单独的治疗剂给予或与另一种治疗剂组合给予,并且可以与常规治疗剂依序或同时给予。

实施例

[0137] 在下文中,将参照实施例进一步详细地描述本公开文本。将对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,这些实施例仅用于说明目的,而不应被解释为限制本公开文本的范围。

[0138] 实施例1:使用患者来源的肿瘤球体第一次鉴定内化抗体

[0139] 为了筛选细胞淘选所需的细胞以鉴定抗NRP1抗体片段,通过RNA-Seq然后通过RPKM(每百万读段中来自于某基因每千碱基长度的读段数)方法(图12)分析从三星医疗中心的难治性癌症研究所(Institute for Refractory Cancer Research at Samsung Medical Center)获得的患者来源的肿瘤球体的NRP1表达水平,并且通过FACS(荧光激活细胞分选)方法选择具有高NRP1表达水平的细胞并将其用于细胞淘选。

[0140] 使用先前制备的合成scFv抗体片段噬菌体文库(Yang等人,Mol.Cells.27:225-235,2009)通过噬菌体展示筛选来鉴定与人NRP1结合的scFv抗体片段。将四个子文库样品中的每一个在400ml培养基(SB/氨苄青霉素/2%葡萄糖)中培养两小时,以回收以噬菌体形式引入大肠杆菌宿主细胞ER2537的噬菌粒载体。当在O.D.600的吸光度达到约0.5至0.7时,通过在5000g离心20分钟除去上清液,然后将细胞悬浮在400ml继代培养基(SB/氨苄青霉素)中。然后,将 10^{12} (噬斑形成单位)的辅助噬菌体(VCSM13)添加至细胞中并孵育一小时。接下来,添加70 μ g/ml的卡那霉素抗生素(在辅助噬菌体中引入的抗生素基因)并在30 $^{\circ}$ C孵育过夜以使噬菌体文库从宿主细胞中分泌出来。然后,使用聚乙二醇(PEG)溶液使通过离心获得的培养物仅以噬菌体的形式沉淀,由此获得噬菌体文库。

[0141] 将如上所述获得的噬菌体文库和具有高NRP1表达的患者来源的肿瘤球体(4×10^6)混合,添加至总共5ml的NBA(神经元基础培养基)中,固定在4 $^{\circ}$ C的旋转器中,然后以360度旋转1至2小时。然后,将细胞以300g离心5分钟以除去不与患者来源的肿瘤球体结合的噬菌体颗粒,然后通过添加5ml的NBA再次洗涤细胞。将这个程序重复四次。在最后一步中,使用置于37 $^{\circ}$ C培养箱中的5ml NBA将患者来源的肿瘤球体和噬菌体置于T烧瓶中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟以诱导附着于细胞表面上的噬菌体颗粒通过内化进入细胞。

[0142] 然后,将细胞溶液置于15ml锥形管中,通过以300g离心5分钟分离细胞,然后用5ml冷PBS(磷酸盐缓冲盐水)洗涤。将该洗涤过程重复6次。随着细胞淘选次数的增加,这些过程的次数增加。然后,添加5ml的0.1M甘氨酸(pH2.2),将混合物在室温下保持5分钟,以使细胞表面附着的噬菌体颗粒与细胞表面分离。然后,通过以300g离心5分钟分离细胞,并向其中添加0.5ml的100mM TEA。将细胞转移至e管并在室温下放置15分钟。接下来,通过以12,000rpm离心5分钟分离细胞碎片,收集细胞中含有噬菌体颗粒的上清液,并通过与1ml的2M Tris(pH 8)混合进行中和。此后,将中和的上清液置于8.5ml含有预生长的ER2537的培养基(SB)中,并在37 $^{\circ}$ C以120rpm孵育,用噬菌体颗粒感染大肠杆菌宿主细胞ER2537。此后,将培养基以3,000rpm离心15分钟,并将沉淀的ER2537与500 μ l培养基(SB)混合,然后在15cm培养基上铺展。培养后,添加5ml的SB培养基(50%甘油),收集菌落并保存(-80 $^{\circ}$ C)。为了进行重

复的细胞淘选,取来自前一轮淘选的储存的噬菌体溶液1ml并进行噬菌体颗粒扩增。在宿主细胞ER2537中孵育后,添加辅助噬菌体,并通过PEG沉淀分离回收的噬菌体颗粒。这些颗粒以相同的方式用于下一轮淘选。进行第三轮淘选,细胞淘选程序显示在图2中。已经证实,随着淘选轮数的增加,淘选后的噬菌体颗粒与淘选前的噬菌体颗粒的比率增加。这意味着通过细胞淘选扩增了内化的噬菌体颗粒。结果显示在以下表1中。

[0143] [表1]使用患者来源的肿瘤球体的细胞淘选

[0144]

	输入	洗涤	输出	输出/输入
第1轮	1.1×10^{13}	2.2×10^4	2.7×10^3	$2.5/10^{10}$
第2轮	2.5×10^{13}	5.0×10^3	1.32×10^5	$5.28/10^9$
第3轮	1.5×10^{13}	3.1×10^4	1.49×10^6	$9.93/10^7$

[0145] 实施例2:用于筛选抗NRP1抗体片段候选物的ELISA和测序

[0146] 通过宿主细胞(ER2537)感染证实从第3轮细胞淘选中回收的噬菌体颗粒为培养基中的菌落。取出这些菌落,接种到含有200 μ l的SB/氨苄青霉素培养基的96孔板中,然后在37 $^{\circ}$ C下孵育2至3小时。

[0147] 然后,用终浓度为1mM的IPTG(异丙基 β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷)处理每个孔,用于诱导scFv-pIII蛋白表达,并在30 $^{\circ}$ C孵育过夜。将孵育的平板在3,000rpm下离心15分钟,并移除上清液。此后,为了从孵育细胞的周质中回收噬菌体颗粒,向每个孔中添加40 μ l的TES溶液(20%w/v蔗糖、50mM Tris、1mM EDTA,pH 8.0)并保持在4 $^{\circ}$ C持续30分钟以裂解细胞。然后,用60 μ l的0.2x TES溶液处理细胞,并在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟以通过渗透压破坏细胞。然后,将平板在3,000rpm下离心15分钟,获得上清液scFv-pIII蛋白。

[0148] 将25 μ l获得的上清液添加至包被有预先制备的人NRP1蛋白的96孔板的每个孔中,然后在室温下孵育1小时,并用TBST和蒸馏水将每个孔洗涤六次。然后,将每个孔与能够结合scFv-pIII的HA标签的HRP缀合的抗HA抗体在室温下孵育1小时,然后用TBST(0.1%吐温20)和蒸馏水洗涤六次。使用TMB溶液来诱导显色反应。用H₂SO₄溶液终止显色反应,并测量450nm OD处的吸光度。

[0149] 分析的克隆总数为384,其中41个克隆(结合亲和力>2倍)显示对人NRP1的高结合亲和力。作为对照,使用了BSA溶液。在41个克隆中,通过ELISA选择了10个具有高结合亲和力的克隆。然后,从10个克隆中回收噬菌粒并进行DNA测序,并选择了总共六个具有不同序列的克隆。除了与1C08具有相同序列的3H10之外,选择了具有不同序列的克隆,并且最后选择了3H10、1A03和4F12克隆作为抗NRP1抗体片段候选物。3H10、1A03和4F12克隆的氨基酸序列显示在下表2和3中。

[0150] [表2]抗NRP1抗体片段的重链FR/CDR序列

[0151]

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4

[0152]

1A03	EVQLL ESGGG LVQFG GSLRLS QAAS	GFTFS SYY	MSWVRQA FGKGLEWV SA	ISFGSS NK	YYADSVQGRFTIS RDNSKNTLYLQM NELRAEDTAVYY C	ARRKK SFDY	WGQGT LTVS S
3H10	EVQLL ESGGG LVQFQ QSLRLS QAAS	QFTFS SYY	MSWVRQA FGKGLEWV SA	ISPGSS NK	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NELRAEDTAVYY C	ARRKY MFDY	WGQGT LTVS S
4F12	EVQLL ESGGG LVQFG GSLRLS QAAS	GFTFS GYA	MSWVRQA FGKGLEWV SG	ISPGSG ST	YYADSVKGRFTIS RDNEKNTLYLQM NELRAEDTAVYY C	AKRKT RFDY	WGQGT LTVS S

[0153] [表3]抗NRP1抗体片段的轻链FR/CDR序列

[0154]

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1A03	QSVLTQ FFSASGT PGQRVTI SCSGF	SSNIG NND	VSWYQ QLFGT APKLLI Y	SCN	NRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAIS GLRSSDEADYY C	GAWVAS LSAYV	FGGGTKL TVTL
3H10	GSVLTQ PPSASGT PGQRVTI SCTGE	SSNIG NND	VYWY QQLPG TAFKL LIY	SQS	NRPSGMPDRFS GSKSGTSASLAI SGLRSEDEADY YC	ASWDSS LSGYV	FGGGTKL TVTL
4F12	QSVLTQ FFSASGT FGRRVTI SQSGS	SSNIG NNE	VYWY QQLPG TAPKL LIY	ANN	KRFSGMPDRFS GSKEGTSASLAI SGLRSEDEADY YC	AAWDSS LNGYV	FGGGTKL TVTL

[0155] 实施例3:使用患者来源的肿瘤球体第二次鉴定内化抗体

[0156] 将从实施例中的第3次细胞淘选中回收的候选抗体通过瘤内注射到皮下移植有在实施例1中使用的患者来源的肿瘤球体的小鼠中。

[0157] 20小时后,处死小鼠,将癌组织解离成单细胞。然后,回收癌细胞中内化的抗体片段,并以与实施例2中所述相同的方式通过ELISA进行分析。

[0158] 该体内细胞淘选程序显示在图3中。已经证实,随着淘选轮数的增加,淘选后的噬菌体颗粒与淘选前的噬菌体颗粒的比率增加。这意味着通过细胞淘选扩增了内化的噬菌体颗粒。结果显示在以下表4中(单位:cfu/ml)。

[0159] [表4]

[0160]

	输入	结合和无内化	输出	输出/输入
第1轮	2.4×10^{13}	3×10^6	8×10^4	$3.3/10^9$
第2轮	3.5×10^{15}	1.8×10^7	1.2×10^5	$3.4/10^{11}$
第3轮	2.5×10^{15}	2.0×10^8	2.4×10^5	$9.6/10^9$

[0161] 实施例4:抗NRP1抗体片段的产生和对NRP1的结合亲和力的分析

[0162] 噬菌粒的基本结构显示在图4中。在以上实施例中使用的宿主细胞ER2537的情况下,scFv不能单独表达,因为位于噬菌体pIII上游的转录抑制密码子(琥珀密码子(UAG))受到抑制。因此,使用作为非抑制型菌株的表达菌株(TOP10F'),将噬菌粒转染到表达菌株中。此后,通过DNA测序证实表达菌株是其中引入每个噬菌粒而没有突变的表达菌株。取表达菌

株菌落,接种到3ml的LB/氨苄青霉素培养基中,然后在37℃下培养过夜。此后,将3ml的过夜培养物转移到400ml的培养基(SB/氨苄青霉素)中并培养直至OD₆₀₀达到0.5至0.7。向其中添加IPTG至终浓度为1mM,然后在30℃下培养过夜。将培养物离心后,使用40ml的TES溶液裂解表达宿主,然后添加60ml的0.2×TES,回收周质中的噬菌体颗粒。通过0.45μm过滤器将回收的上清液过滤。将存在于过滤溶液中的scFv蛋白添加至1ml的Ni-NTA珠(Qiagen)中进行His标签纯化,并在室温下结合1小时。然后,将所得材料填充在重力柱(Bio-rad)中,并通过200mM咪唑溶液回收。在每个克隆的表达和纯化后,通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色证实scFv的大小为约28kDa(图5)。

[0163] 通过ELISA分析纯化的scFv是否对靶NRP1具有结合亲和力。在包被有200ng的NRP1蛋白的96孔板和包被有200ng的BSA作为对照组的96孔板中,在室温下通过ELISA以每克隆5μg/ml的浓度进行结合1小时(重复3次)。此后,用0.1%TBST洗涤每个孔三次,用HRP缀合的HA抗体处理1小时,再次洗涤,然后用TMB溶液孵育5分钟。在用2M硫酸溶液终止显色反应后,测量OD值。

[0164] 结果证实,1A03、3H10和4F12scFv显示出对NRP1的特异性结合亲和力,这和不与NRP1结合的12B scFv不同(图6)。

[0165] 接下来,为了测量每种抗体片段在不同抗体片段浓度下对人NRP1的结合亲和力,用2,000ng/ml、1,000ng/ml、500ng/ml、250ng/ml、125ng/ml、62.5ng/ml、31.25ng/ml或15.62ng/ml浓度的每种scFv处理包被有200ng的NRP1或BSA的96孔板,并分析OD值的变化。关于对NRP1的结合亲和力,12B scFv的OD值并不随浓度变化而变化。然而,在1A03、3H10和4F12scFv的情况下,通过OD值的变化可以证实,与BSA相比,与NRP1结合的scFv随着浓度的增加而增加(图7)。

[0166] 为了精确测量三种scFv抗体片段对NRP1蛋白的结合亲和力的程度,通过使用biacore T100(表面等离子共振(SPR)系统)通过ka和kd值获得最终KD值。KD值是通过将kd值除以ka值而获得的值。KD值越低,对相应物质的结合亲和力就越大。分析结果表明,4F12scFv显示出最低的KD(M)值(73.60×10^{-9}),1A03scFv显示KD(M)值为 89.40×10^{-9} ,3H10scFv显示KD(M)值为 295.4×10^{-9} (图8)。

[0167] 实施例5:使用NRP1过表达细胞系分析抗NRP1抗体片段的结合亲和力

[0168] 在通过ELISA分析对人NRP1蛋白的结合亲和力后,使用具有NRP1高表达的患者来源的肿瘤球体进行FACS分析,以检查抗体片段是否将与存在于实际细胞膜中的NRP1结合。将每种scFv与 5×10^5 患者来源的肿瘤球体在4℃孵育大约1小时,然后用1ml的FACS溶液洗涤细胞3次。然后,用1μg红色荧光(PE;藻红蛋白)标记的HA抗体处理细胞,并在4℃孵育30分钟。接下来,将细胞用1ml的FACS溶液洗涤三次,并使用FACS Calibur™系统进行分析。

[0169] 分析结果表明,与用PE缀合的HA抗体和12B处理的细胞相比,三种抗体片段(包括1A03、3H10和4F12)都确实与过表达NRP1的细胞系特异性地结合(图9)。

[0170] 实施例6:抗NRP1抗体片段对过表达NRP1的癌细胞的穿透能力分析

[0171] 通过细胞免疫荧光染色分析三种抗NRP1抗体片段的细胞内穿透能力。将PD-赖氨酸溶液添加至腔室载玻片中并在室温下包被1至2小时。移除溶液并干燥载玻片。此后,用200μl的含有 5×10^4 个患者来源的肿瘤球体的NBA溶液处理载玻片,然后在37℃下孵育4至5小时以将细胞固定在载玻片上。接下来,去除NBA溶液,将细胞在4%多聚甲醛中在4℃固定

10分钟。用PBS洗涤三次后,用0.1%Triton X-100处理细胞以增加细胞穿透能力。为了将NRP1蛋白染色,同时用抗人NRP1抗体(R&D)和抗NRP1抗体片段处理细胞,并在37℃下孵育15、30和60分钟。用PBS洗涤三次后,用1%BSA溶液在室温下封闭细胞约1小时,以阻断非特异性结合。作为二级抗体,使用绿色荧光(Alexa-Fluor 488)标记的山羊抗小鼠抗体(Invitrogen)使NRP1蛋白可视化,并且使用抗HA抗体(Santacruz biotechnology)使抗NRP1抗体片段可视化,然后在室温下孵育1小时。最后,为了核染色进行DAPI染色。在最后的洗涤之后,将盖玻片固定在载玻片上,然后用共聚焦激光扫描显微镜观察。

[0172] 结果,可以看出,在所有三种抗NRP1抗体片段中,附着于细胞表面的抗NRP1抗体片段和插入细胞中的抗NRP1抗体片段在15分钟和30分钟时混合,但是在约60分钟后,抗NRP1抗体片段大部分通过穿透插入细胞中(图10a至10c)。具体而言,与1A03和3H10相比,随着时间的推移,4F12抗体片段表现出相对高的细胞穿透能力(图10a)。这些结果表明,本公开文本的抗体可用于将蛋白质表达抑制物质或治疗/诊断化学药物递送到癌细胞中。

[0173] 实施例7:从抗NRP1抗体片段到NRP1IgG的转化

[0174] 为了将抗NRP1抗体片段转化为IgG形式,使用Expi 293F表达系统(life technologies)转染NRP1抗体片段的重链和轻链基因序列。为了从培养基中回收抗NRP1IgG抗体,使用ÄKTA蛋白质纯化系统和Amicon离心过滤器进行纯化。产生的量对于IRCR-101(3H10转化为IgG形式)为120mg/l,对于A03为66mg/l,并且对于4F12为15mg/l。为了证实纯化的抗NRP1IgG抗体的纯度,使用了高效液相色谱法。由于IgG的大小为150kD,因此在标记物峰处在16.388分钟时出现的物质是IgG。在这个峰处检测到三种抗NRP1IgG抗体(IRCR-101、1A03和4F12),并且分别显示99.5%、99.4%和99.5%的纯度(图13)。使用鲎阿米巴样细胞裂解物(LAL)QCL-1000™试剂盒确定所产生的三种NRP1抗体的内毒素水平。分析结果表明,三种抗体的内毒素水平为约0.5-3.1EU/mg,其对应于治疗性蛋白质的正常内毒素水平(图14)。

[0175] 通过ELISA和SPR分析,分析了三种抗NRP1IgG抗体对人NRP1的结合亲和力,结果证实结合亲和力以1A03、IRCR-101和4F12的顺序升高。具体而言,4F12具有0.6nM的KD值,为当前治疗性抗体的结合亲和力水平(图15)。通过与具有与人NRP1相似结构的其他蛋白质进行比较来分析对人NRP1的特异性结合亲和力,结果证实所有三种抗NRP1IgG抗体确实仅与人NRP1结合(图16)。

[0176] 实施例8:抗NRP1IgG抗体的结合表位的鉴定

[0177] 由于MNP1685A的结合结构域是VEGF结构域,因此将MNP1685A用作阳性对照。用hNRP1蛋白包被96孔板的每个孔,然后在25℃下与500nM的IRCR-101或MNP1685A一起孵育1小时,用PBST洗涤,然后在室温下与生物素缀合的VEGF或Sema3A一起孵育15分钟。

[0178] 将平板用PBST洗涤,然后向其中添加链霉亲和素-HRP抗体,并通过ELISA来分析TMB显色反应。结果可以看出,MNP1685A和IRCR-101确实都与VEGF 165结合结构域结合(图11的左图)。

[0179] 为了鉴定MNP1685A和IRCR-101的结合表位,用200ng的hNRP1蛋白包被96孔板的每个孔,然后与500nM的IRCR-101或MNP1685A在25℃孵育1小时,用PBST洗涤,然后在MNP1685A处理的孔中处理生物素缀合的IRCR-101,并在室温下在IRCR-101处理的孔中处理生物素缀合的MNP1685A持续15分钟。

[0180] 将平板用PBST洗涤,然后向其中添加链霉亲和素-HRP抗体,并通过ELISA来分析TMB显色反应。结果可以看出,对照和IRCR-101的结合表位确实彼此不同(图11的右图)。

[0181] 实施例9:使用癌细胞和正常细胞分析癌症特异性内化和结合亲和力

[0182] 使用pHrodo[®] Red Microscale标记试剂盒(Thermo#p35363)比较三种抗NRP1IgG抗体进入癌细胞和正常细胞的内化模式。根据该试剂盒的原理,当抗体与生色样品缀合并且抗体在细胞外时,它并不产生颜色。另一方面,当抗体进入细胞并且周围环境被酸化时,其产生颜色。根据这个原理,可以证实抗体的细胞内内化。进行与三种NRP1IgG抗体的缀合,并比较缀合抗体对患者来源的肿瘤球体和正常HUVEC细胞的内化模式。结果,从20分钟开始在患者来源的肿瘤球体中观察到内化抗体(图17)。

[0183] 通过静脉注射将对照IgG、IRCR-101和1A03注射到胶质母细胞瘤皮下模型中。20小时后,将它们处死,通过细胞解离分离成单细胞。然后使用FACS将其针对癌细胞的内在性进行相互比较。在仅筛选通过透化作用内化到癌细胞中的抗体的结果中,IRCR-101和1A03显示出比对照IgG高5倍至6倍的平均荧光强度(MFI)。还证实了体内模型具有如上所述的体外模型的癌细胞特异性内在性(图18)。

[0184] 在4°C的结合温度下,比较了IRCR-101和常规NRP1抗体(MNRP抗体,通过合成在专利(WO 2011143408)中公开的序列在内部生产)对正常细胞和癌细胞的结合亲和力的差异。结果证实,当抗体以相同浓度使用时,常规NRP1抗体对正常细胞显示出比对癌细胞更高的结合亲和力,而IRCR-101显示出对癌细胞的特异性结合亲和力(图19)。

[0185] 实施例10:癌细胞迁移控制和下游因子的构造

[0186] 使用胶质母细胞瘤细胞系U87MG和患者来源的肿瘤球体检查三种NRP1IgG抗体是否会抑制癌细胞迁移。用各抗体处理后,将细胞在37°C下孵育24小时,然后进行分析。结果证实,IRCR-101和1A03各自在两种类型的细胞中显示出超过50%的癌细胞迁移抑制,并且4F12在患者来源的肿瘤球体中显示出约40%的癌细胞迁移抑制(图20)。

[0187] 观察到最终抗NRP1IgG抗体IRCR-101对乳腺癌细胞系MBAMB231和肺癌细胞系A549迁移的抑制,结果证实该抗体以浓度依赖性方式抑制癌细胞迁移。证实当用IRCR-101(10 μ g/ml)处理细胞时,抗体在乳腺癌模型中显示出60%的癌细胞迁移抑制,在肺癌模型中显示出30%的癌细胞迁移抑制(图21)。

[0188] 为了检查用IRCR-101处理后相关信号传导物质的变化,通过免疫印迹分析在15、30和120分钟时胶质母细胞瘤患者来源的肿瘤球体中NRP1、AKT和ERK的变化。证实NRP1在30分钟时由于完全降解而消失,并且AKT和ERK抑制了相关的信号传导机制,因为磷酸化的AKT和ERK减少(图22)。

[0189] 实施例11:IRCR-101在体内模型中的功效评价和靶标观察

[0190] 使用胶质母细胞瘤患者来源的肿瘤球体构建两个皮下模型,并且静脉内注射5mg/kg的IRCR-101,每周三次,测量体积的大小。抗体显示使肿瘤大小减小30%-40%,并且使用免疫荧光的TUNEL测定表明IRCR-101增加了细胞凋亡(图23)。

[0191] 使用胶质母细胞瘤细胞系U87MG构建皮下模型,并且使用该皮下模型比较IRCR-101与常规抗体MNRP1685A(MNRP1685A抗体,通过合成在专利(WO 2011143408A1)中公开的序列在内部构建)的功效。在每周两次给予5mg/kg各抗体的组中,MNRP1685A显示出60%的肿瘤生长抑制,并且IRCR-101显示出80%的肿瘤生长抑制(图24)。

[0192] 使用肺癌细胞系A549构建皮下模型,并使用该皮下模型比较IRCR-101与常规抗体MNRP1685A的功效。在每周两次给予25mg/kg各抗体的组中,MNRP1685A显示出19%的肿瘤生长抑制,并且IRCR-101显示出57%的肿瘤生长抑制(图25)。

[0193] 在胶质母细胞瘤原位模型中,将IRCR-101用荧光物质标记并静脉内注射到模型中,并且观察在15分钟、1小时、1天和2天的荧光强度的时间依赖性变化。结果证实,在第1天,在相应于肿瘤部位的部位出现强荧光,一直到第3天,荧光出现在同一个部位(图26)。

[0194] 实施例12:使用猴TMA评价正常组织中的分布

[0195] 为了检查IRCR-101和常规NRP1抗体(MNRP1685A抗体,通过合成在专利(WO 2011143408A1)中公开的序列在内部构建)的副作用,使用雄性和雌性猴进行TMA(组织微阵列(Tissue microArray))。分析结果表明,与常规NRP1抗体不同,IRCR-101对大多数正常器官组织具有很小的或没有结合亲和力。IRCR-101对正常组织具有很小或没有结合亲和力的事实表明,IRCR-101在临床试验中将显示较少的副作用(图27)。

[0196] 工业实用性

[0197] 根据本公开文本的筛选方法使用患者来源的肿瘤球体,因此可以筛选靶向在患者中特异性过表达的蛋白质的抗体。根据本公开筛选的抗体可用于生产患者特异性抗体,因此可用于开发患者特异性治疗药物。另外,预期通过本公开文本的方法筛选的抗体或其抗原结合片段在未来的临床试验中具有高的成功可能性。此外,根据本公开文本的筛选方法可以筛选内化抗体,因此使其可能筛选适合于生产药物-抗体缀合物(ADC)的抗体。

[0198] 尽管已经参考具体特征对本公开文本进行了详细描述,但是对于本领域技术人员来说清楚的是,该描述仅针对优选实施方案并不限制本公开文本的范围。因此,本公开文本的实质范围将由所附权利要求及其等同物限定。

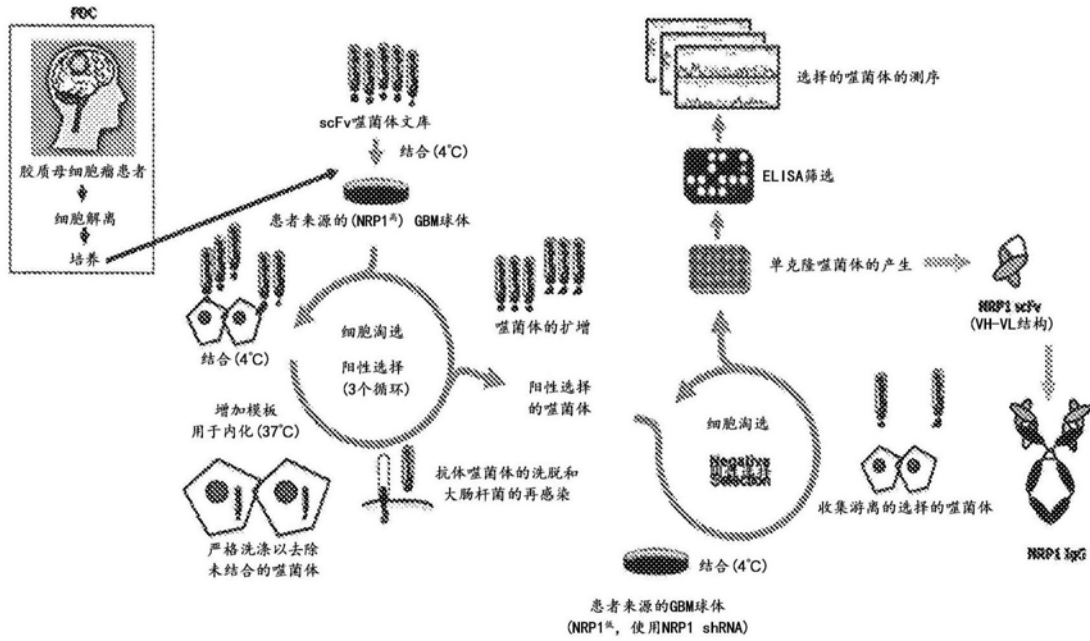


图1

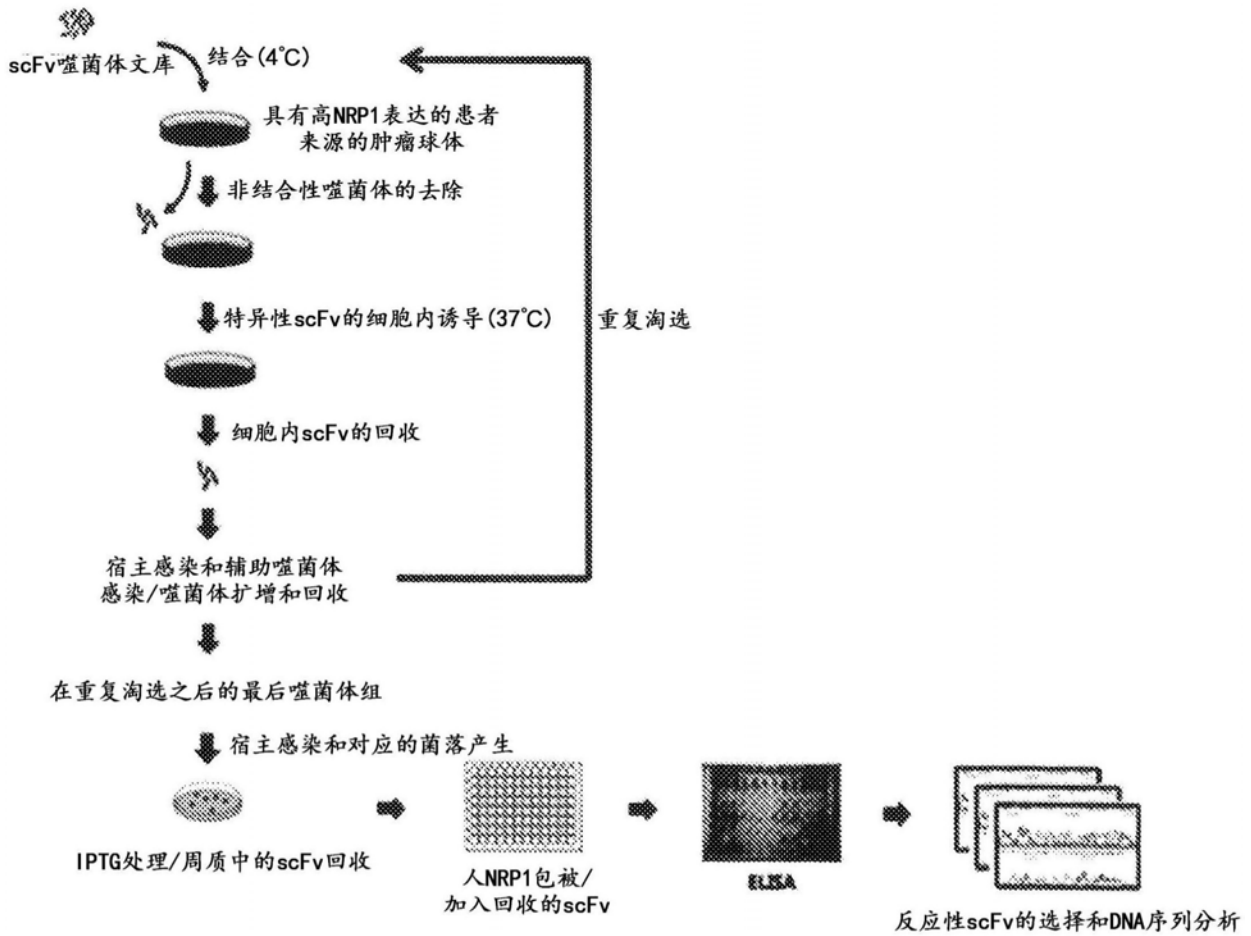


图2

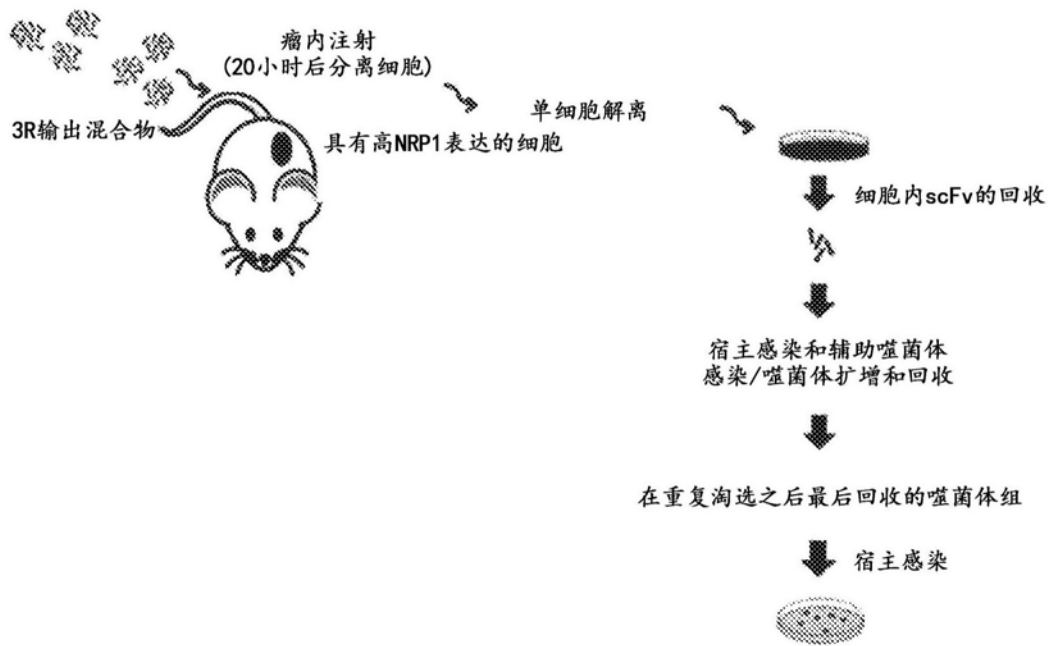


图3

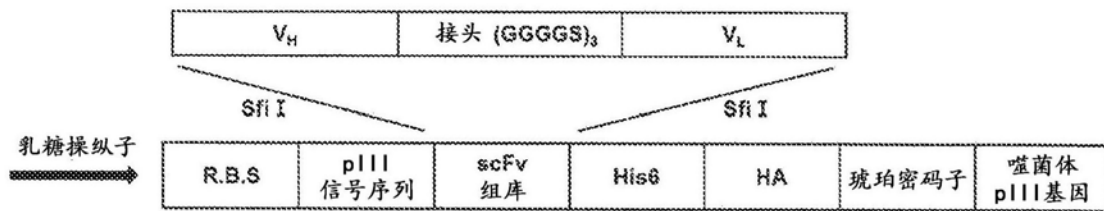


图4

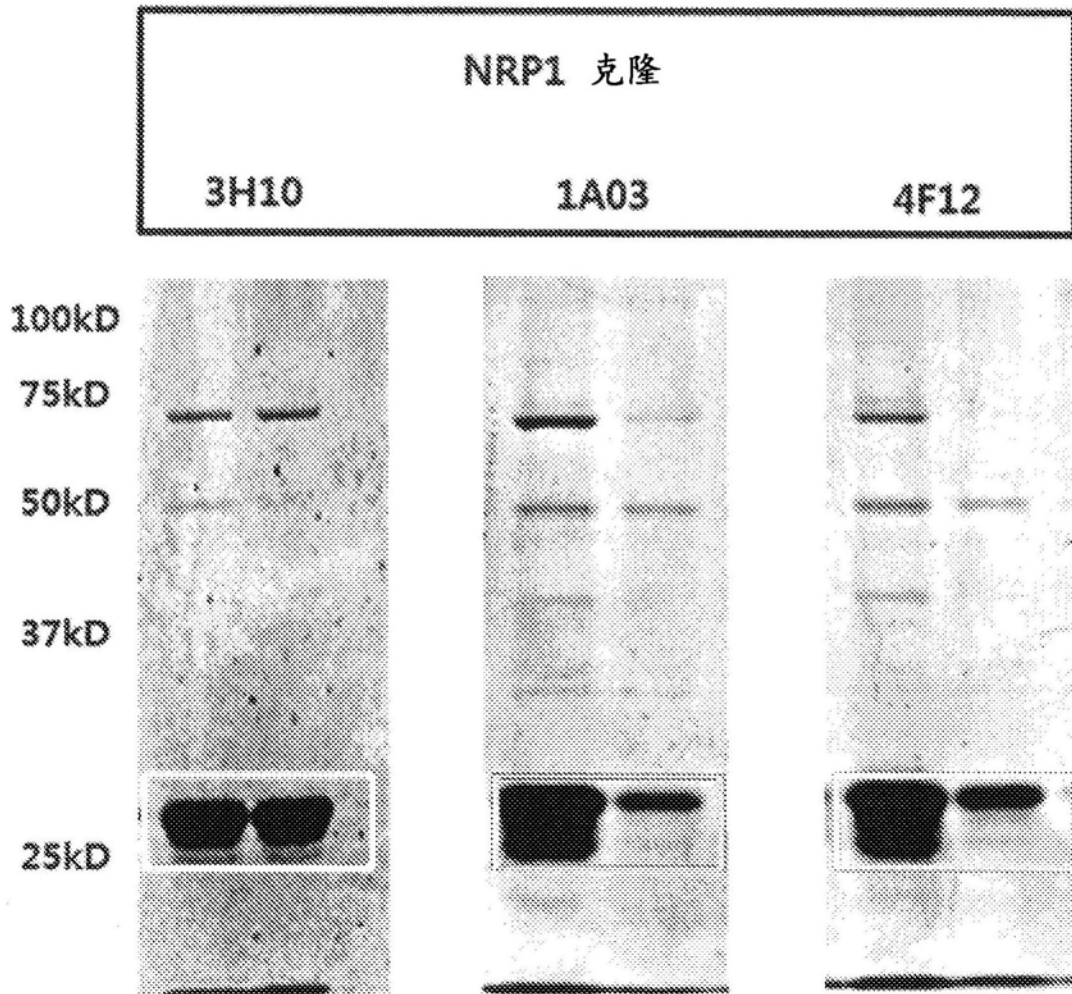


图5

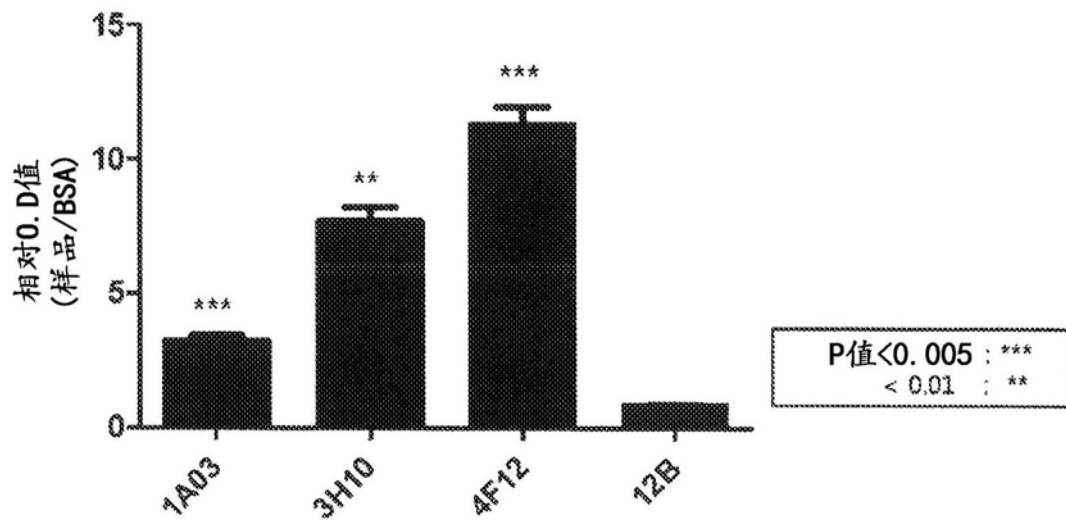


图6

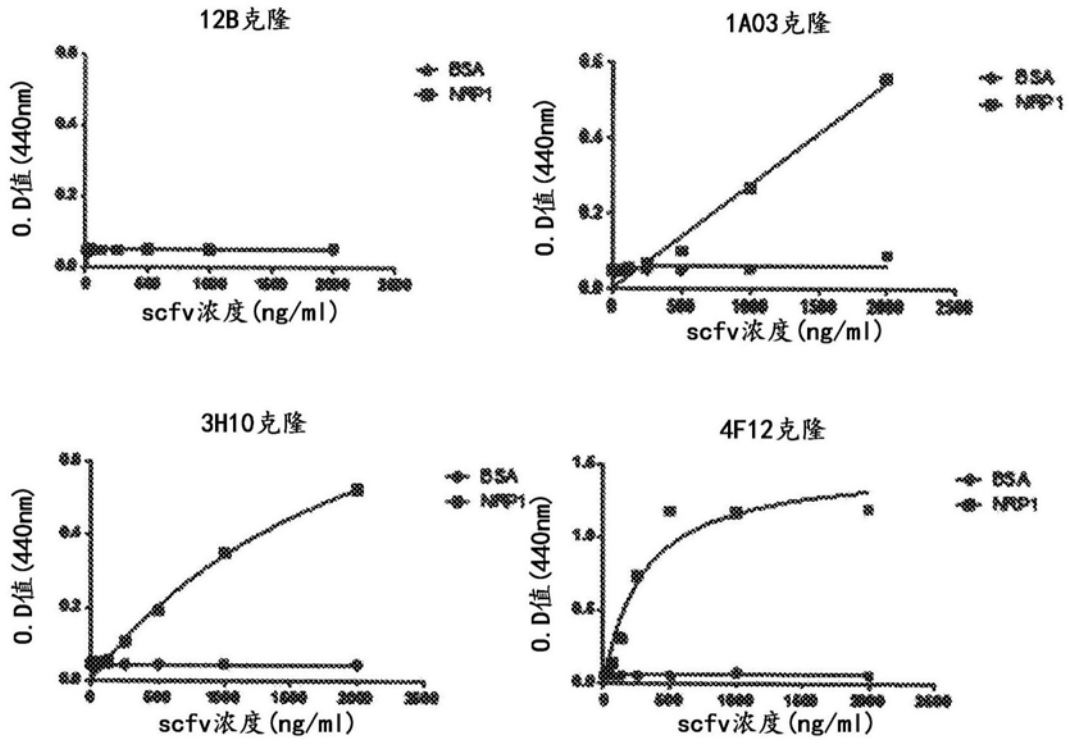


图7

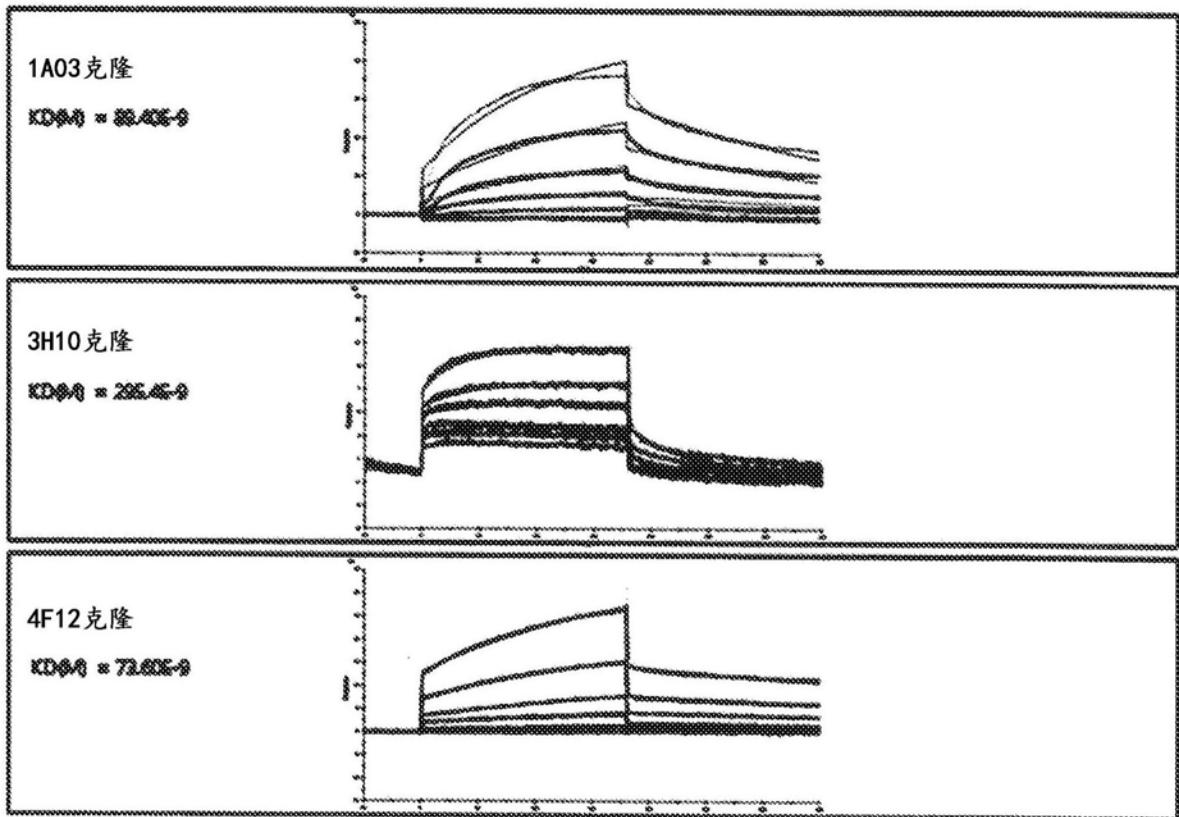


图8

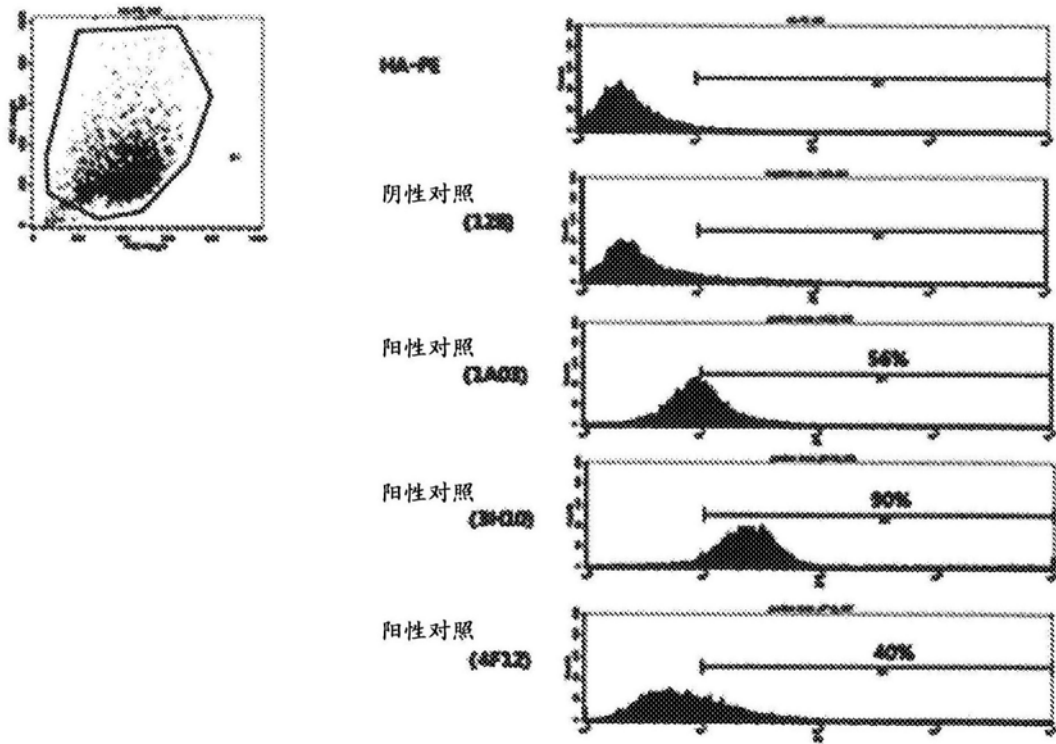


图9

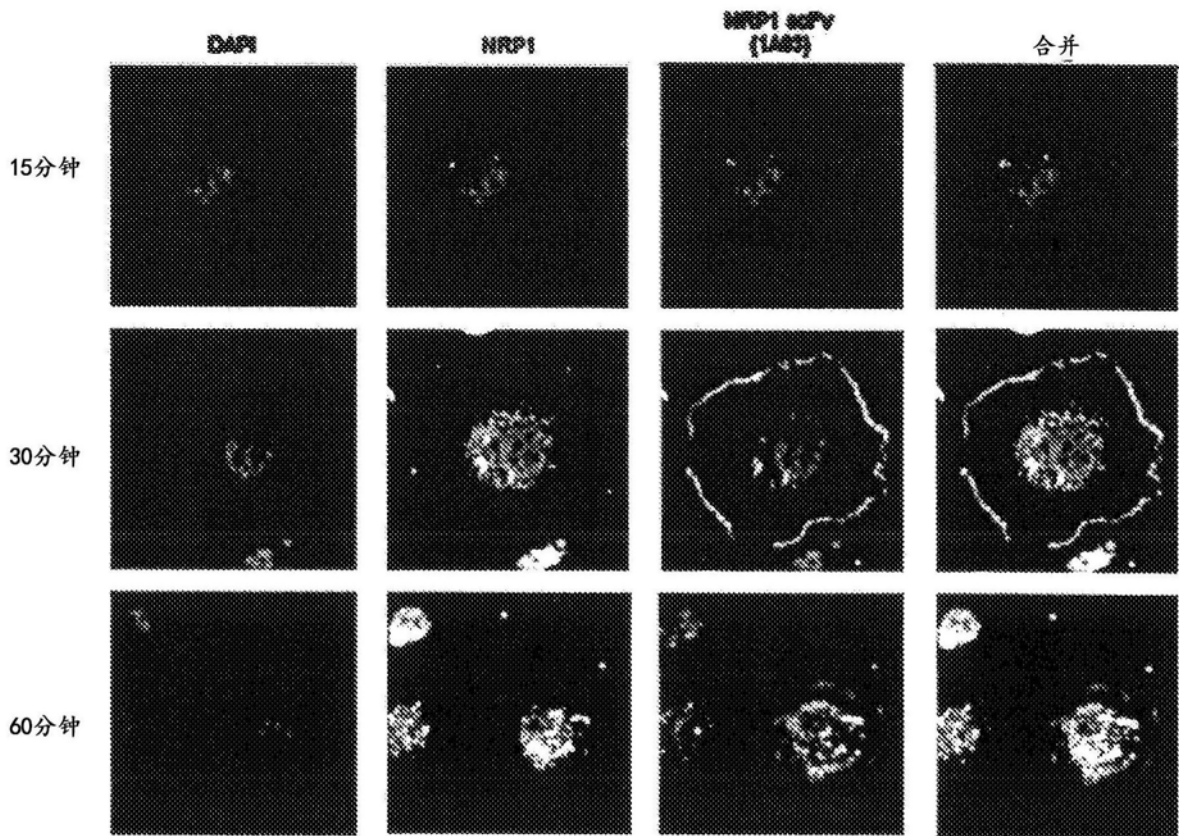


图10a

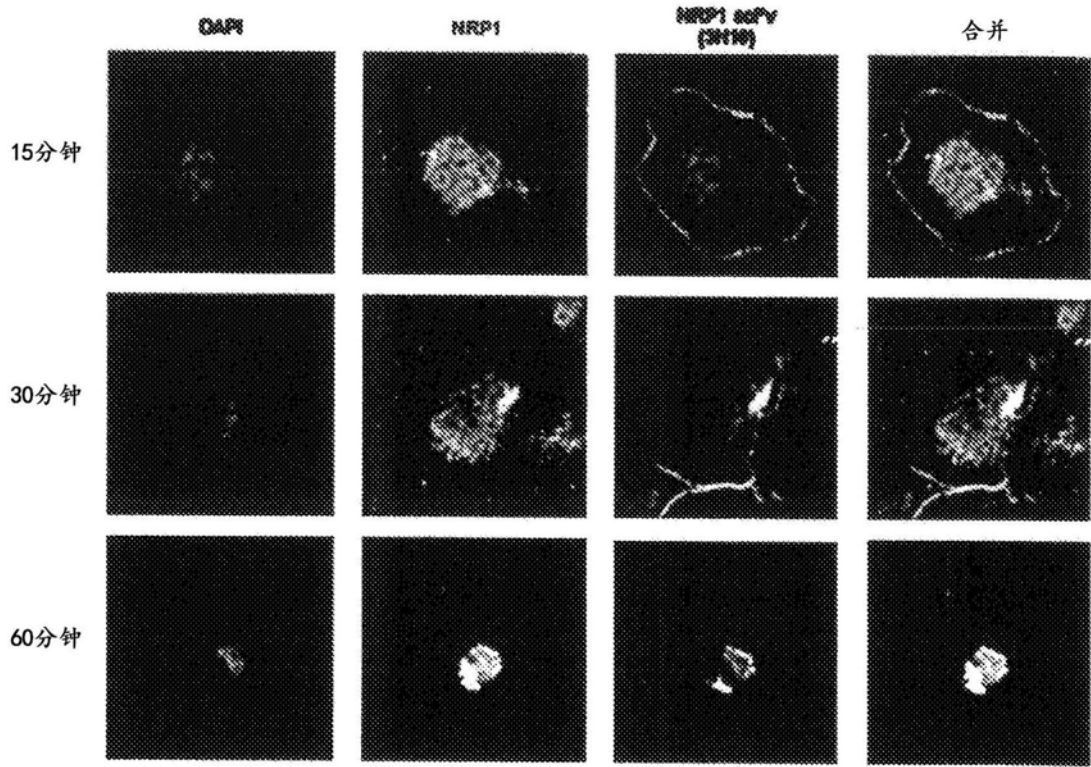


图10b

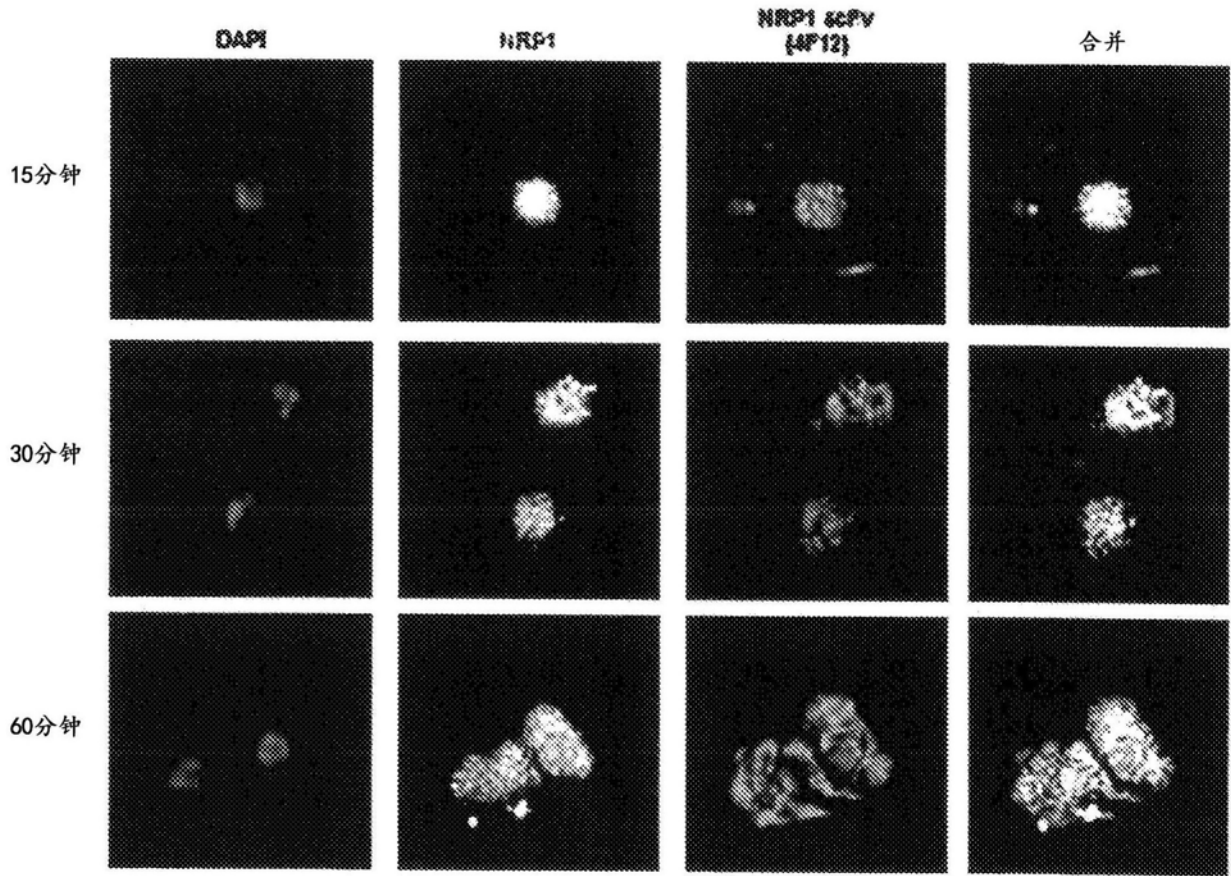


图10c

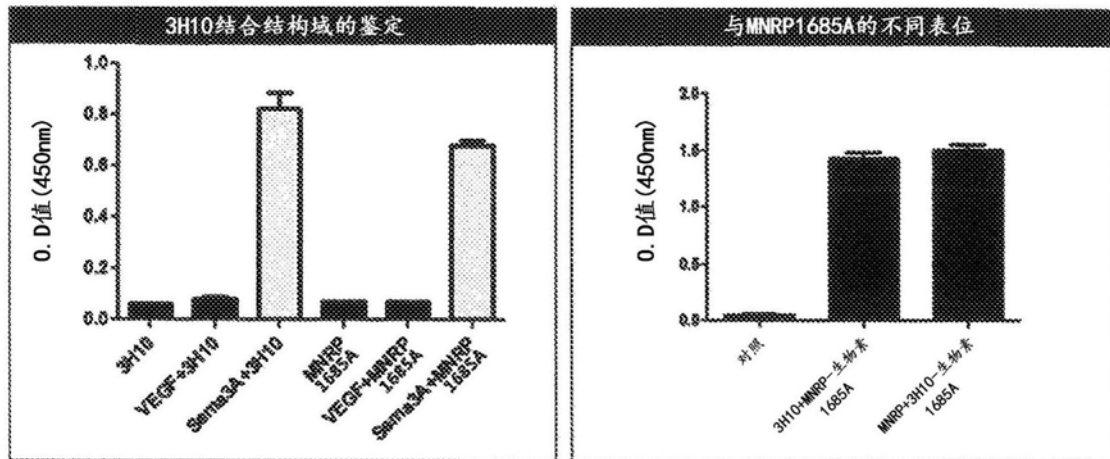


图11

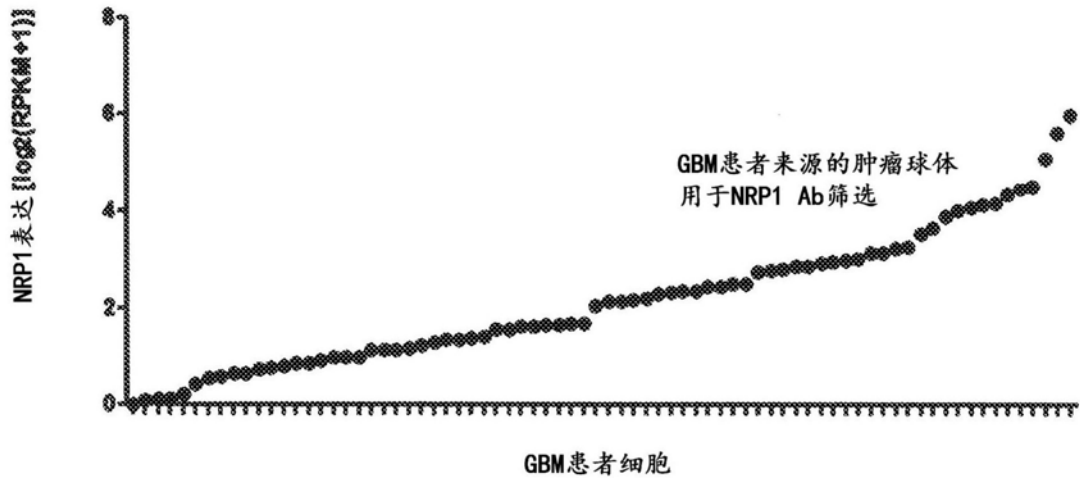


图12

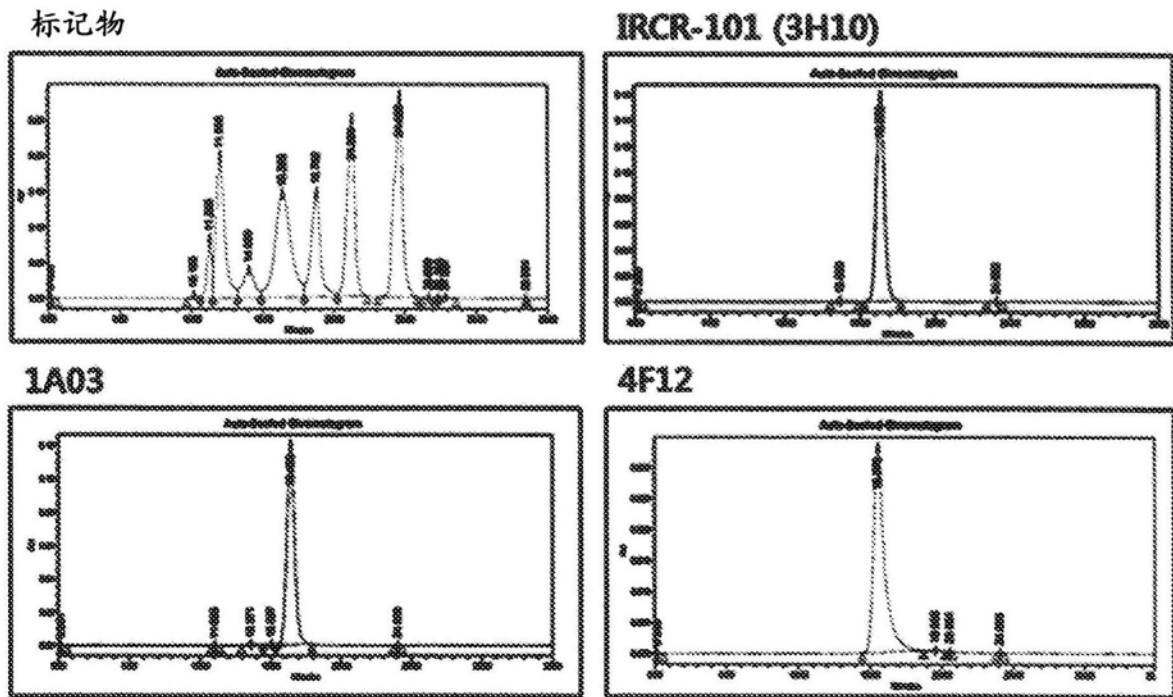


图13

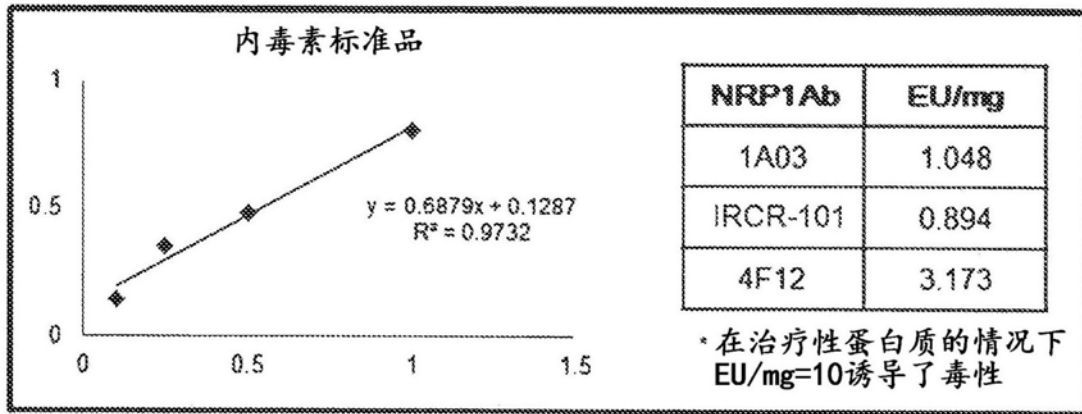


图14

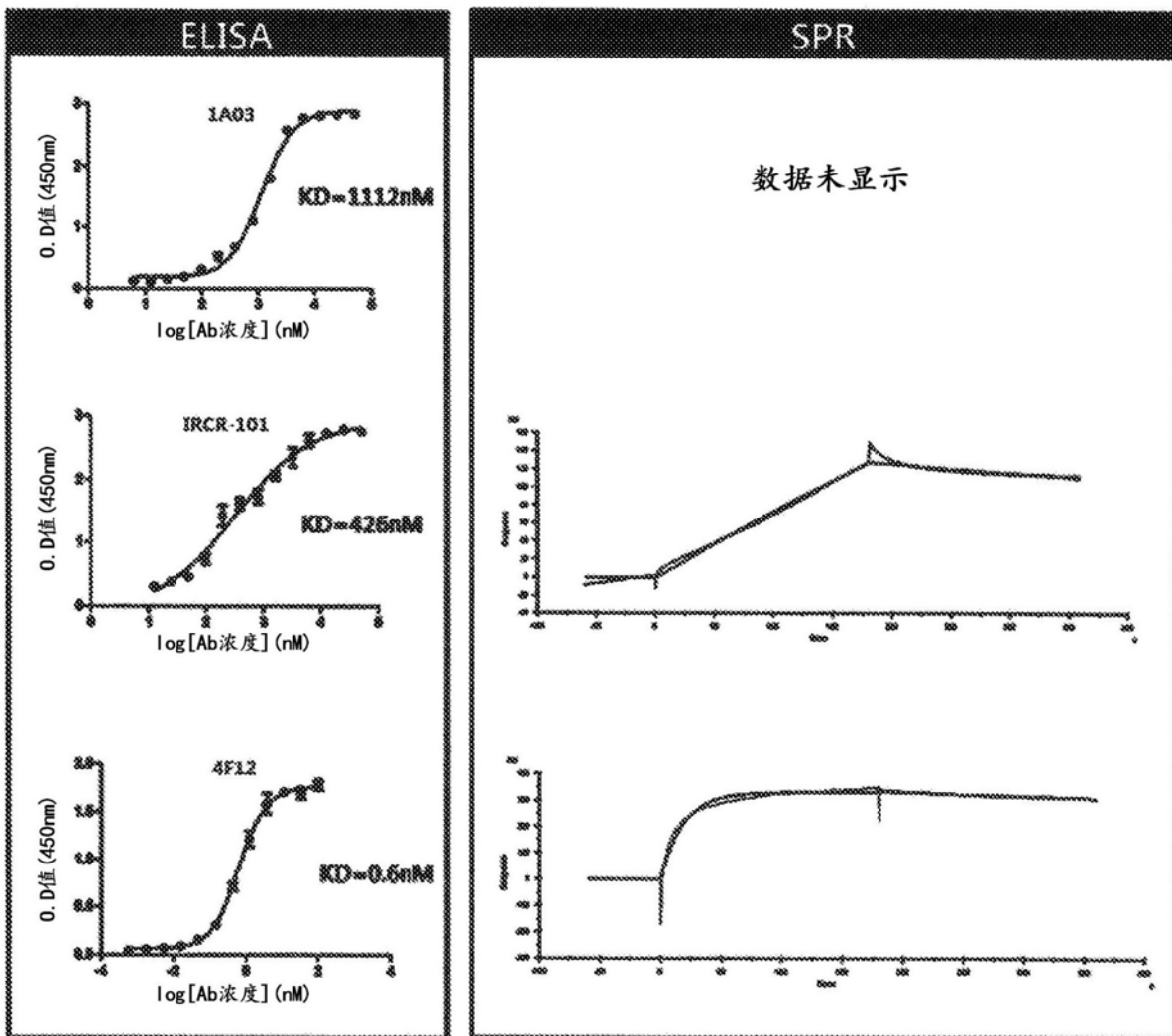


图15

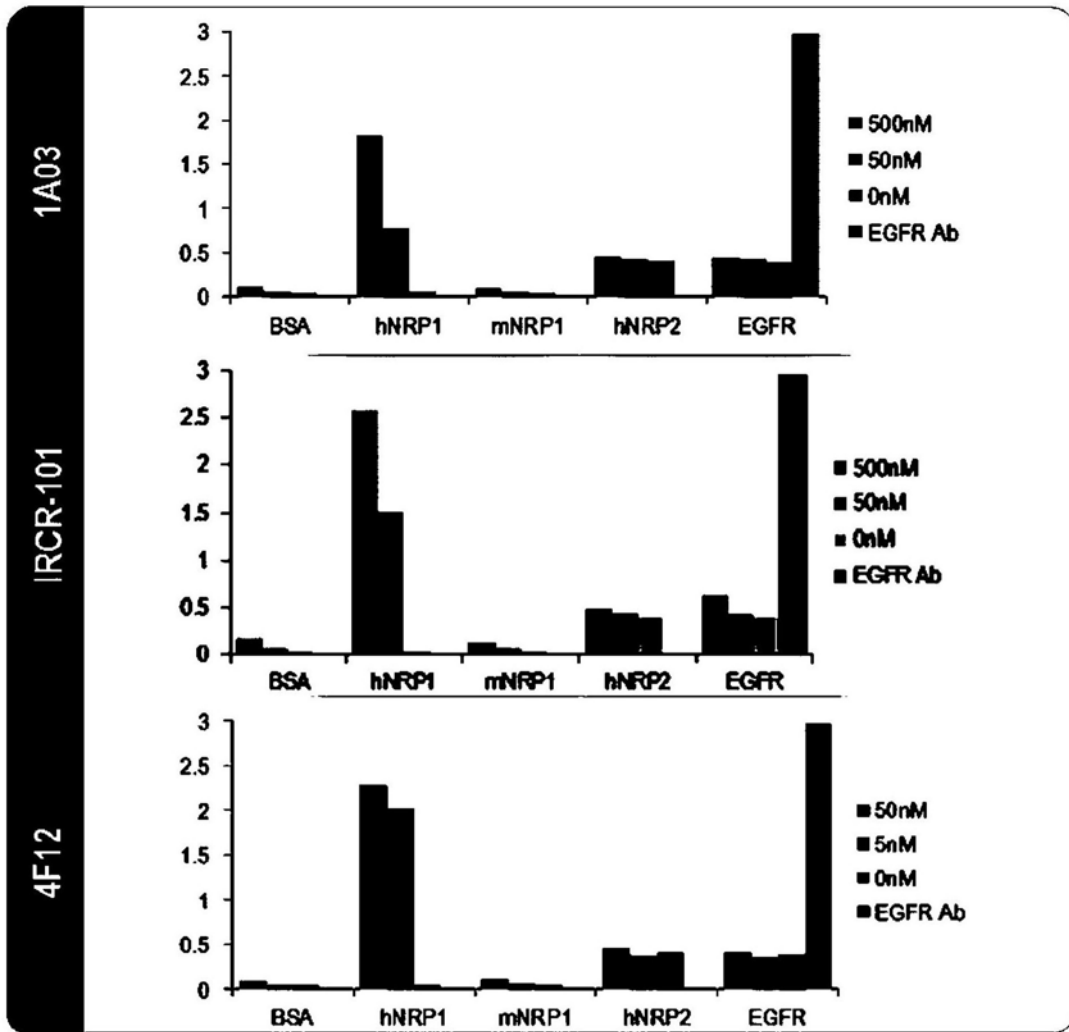


图16

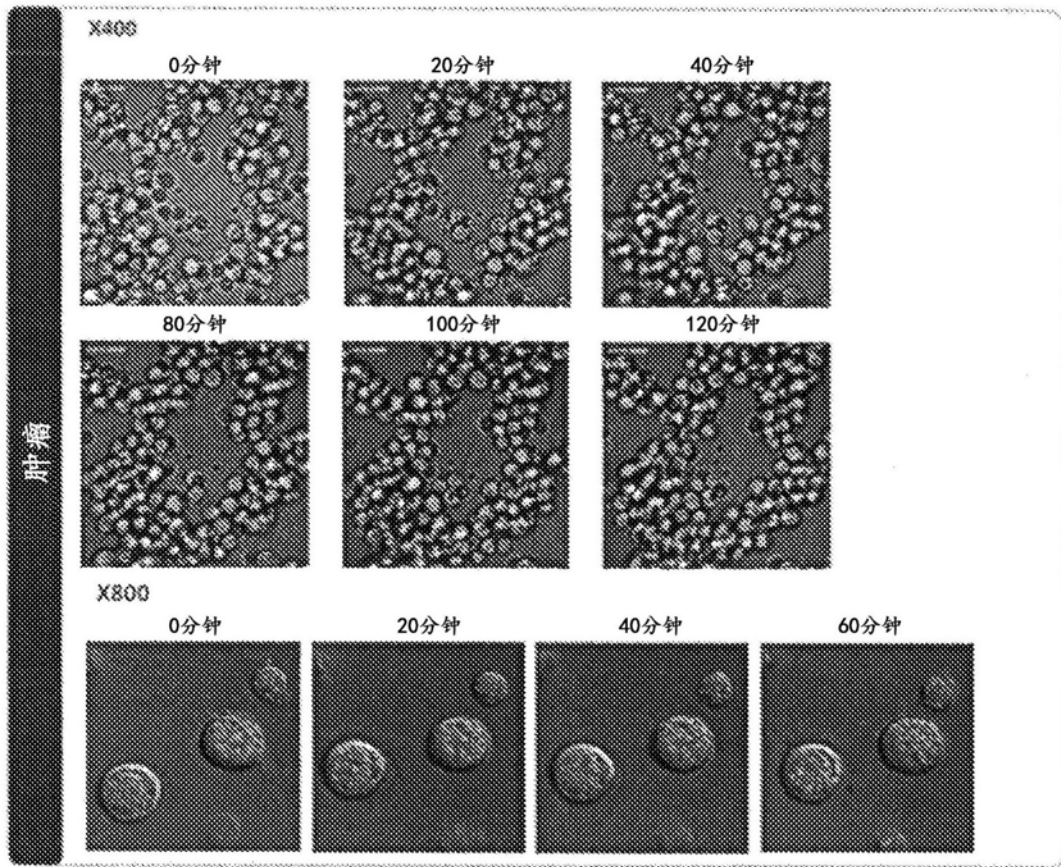


图17

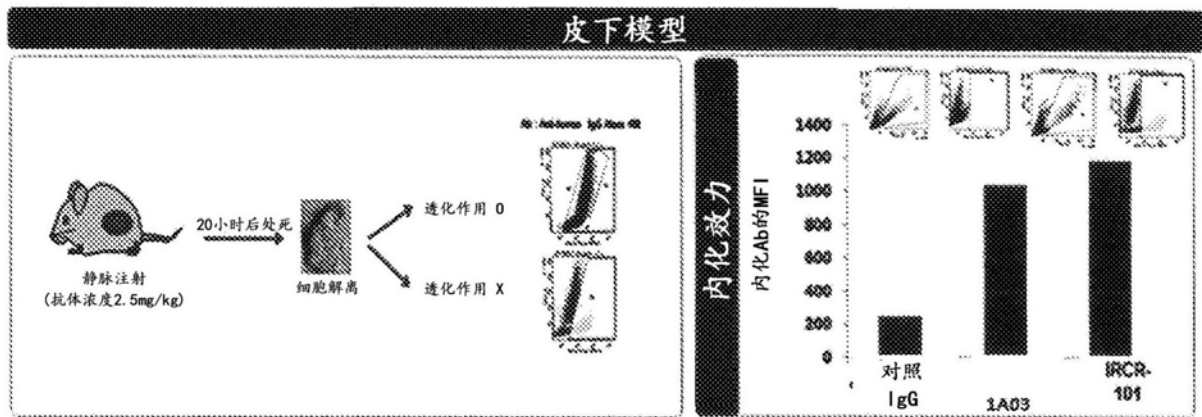


图18

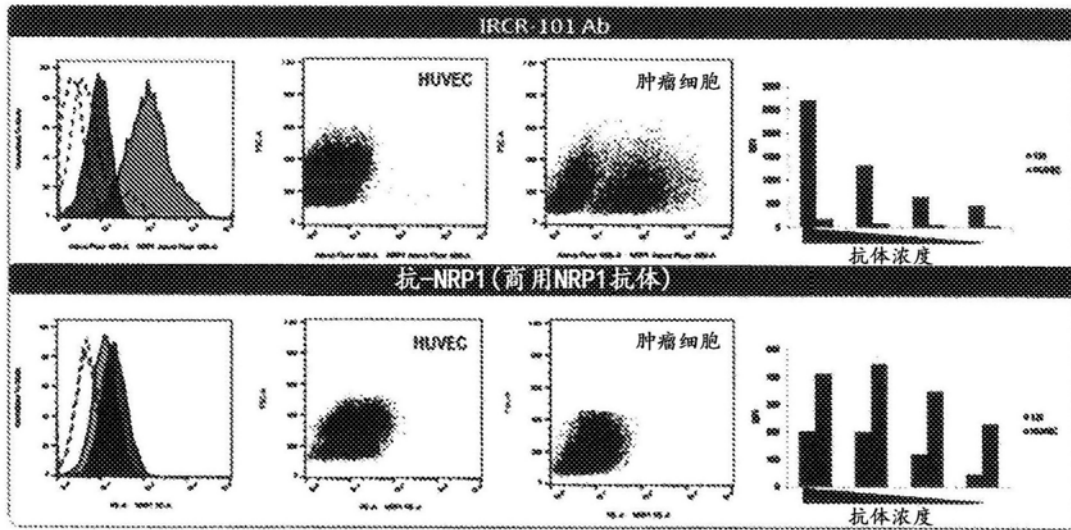


图19

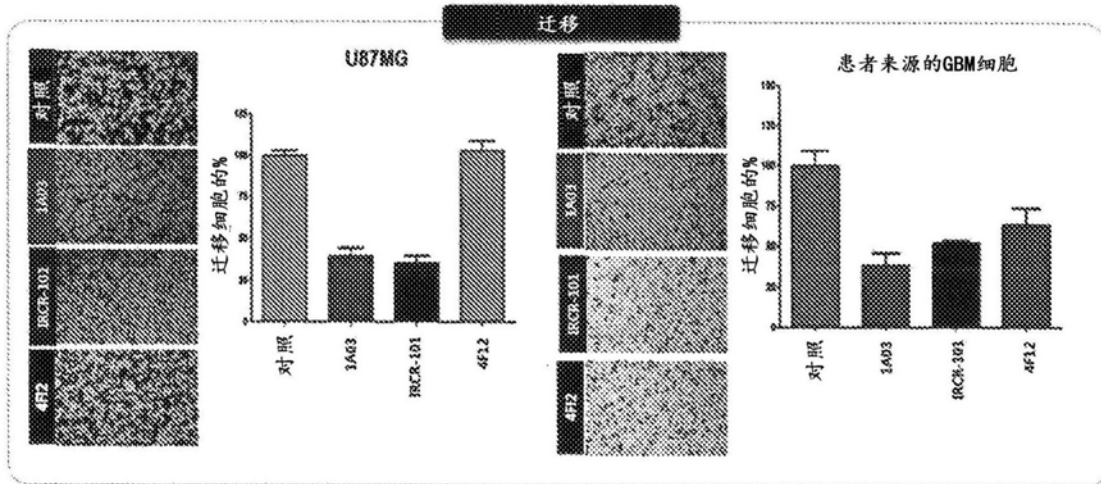


图20

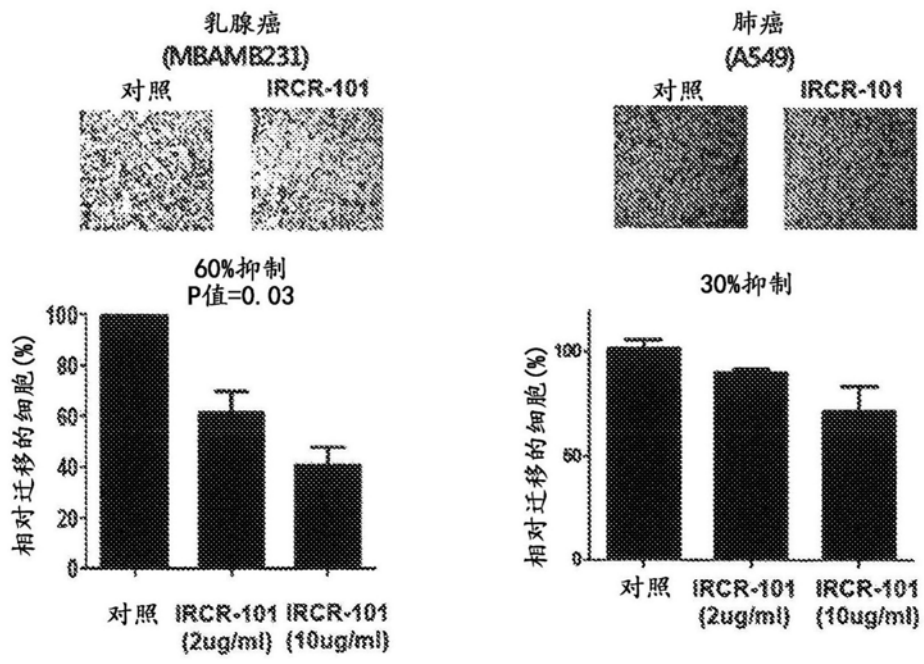


图21

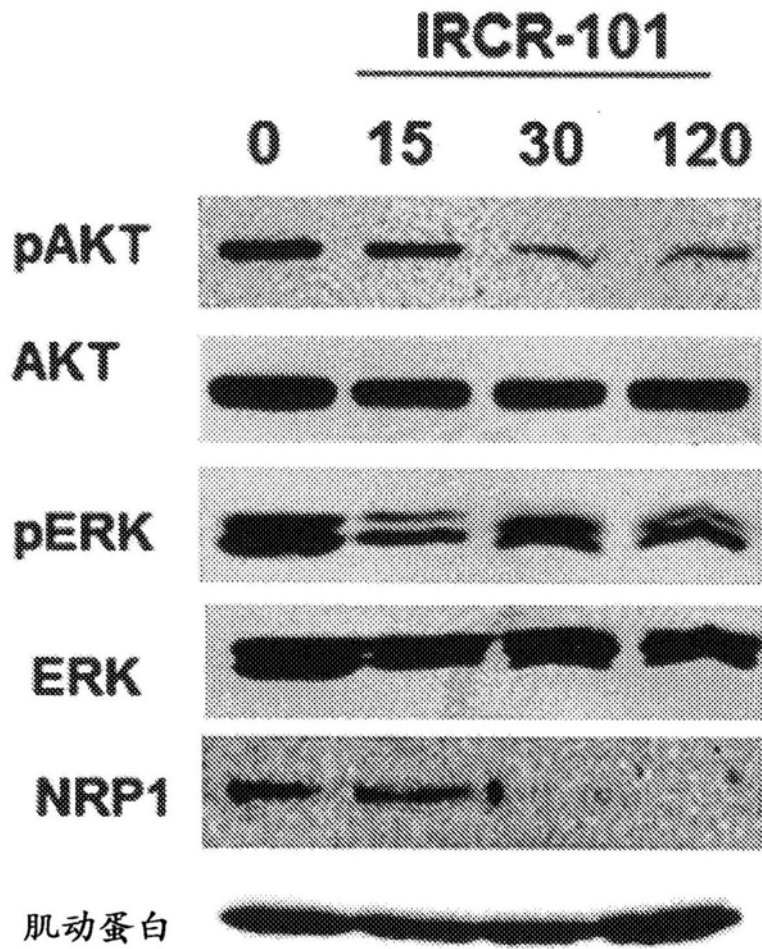


图22

在GBM PDX模型中的前期研究

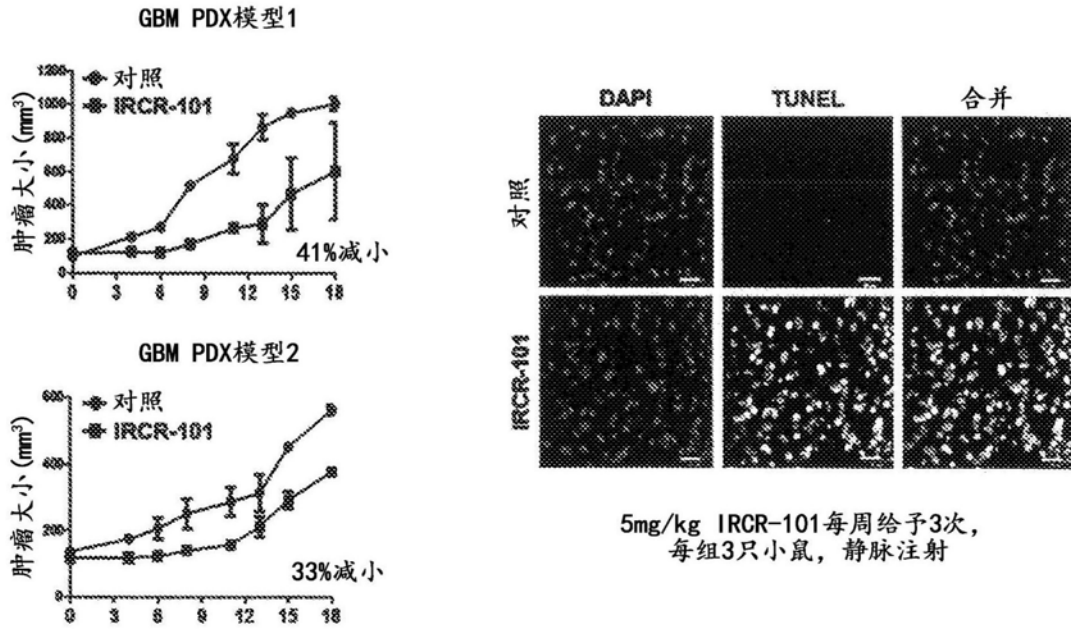


图23

U87MG 皮下异种移植

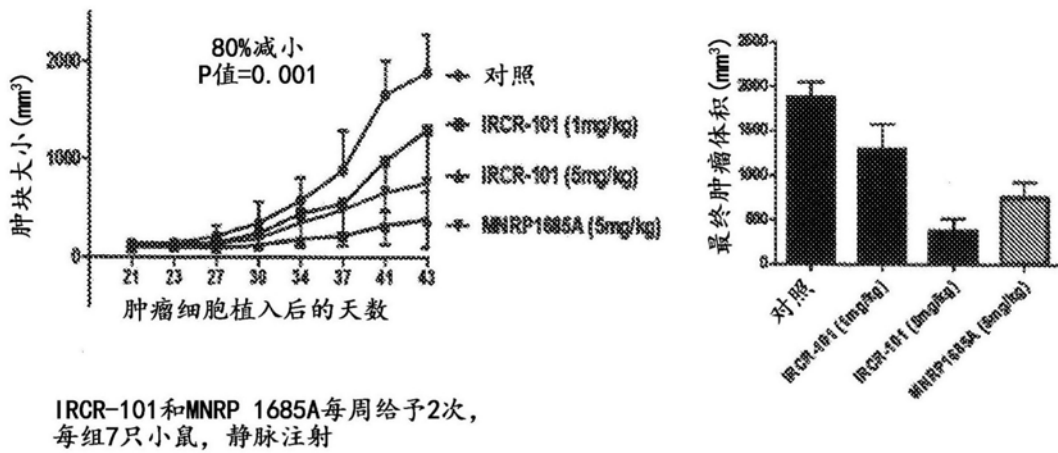


图24

A549 皮下异种移植

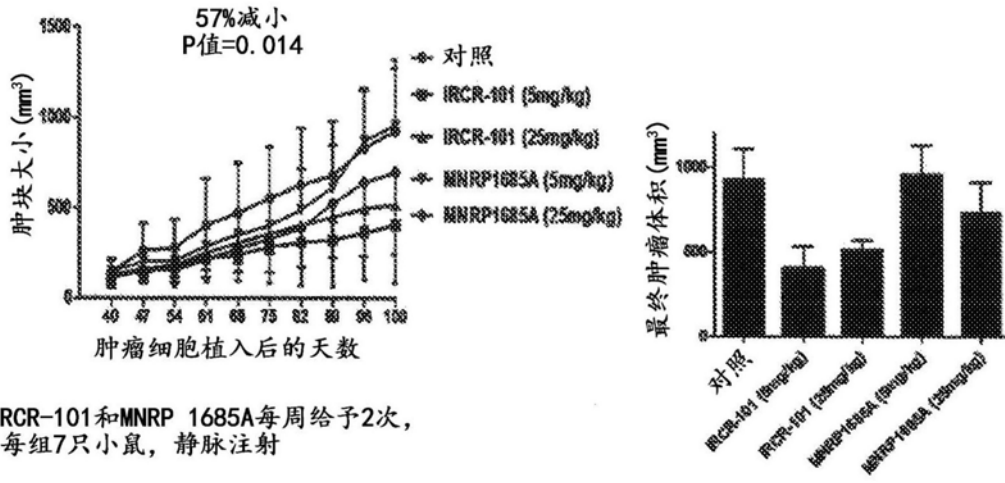


图25

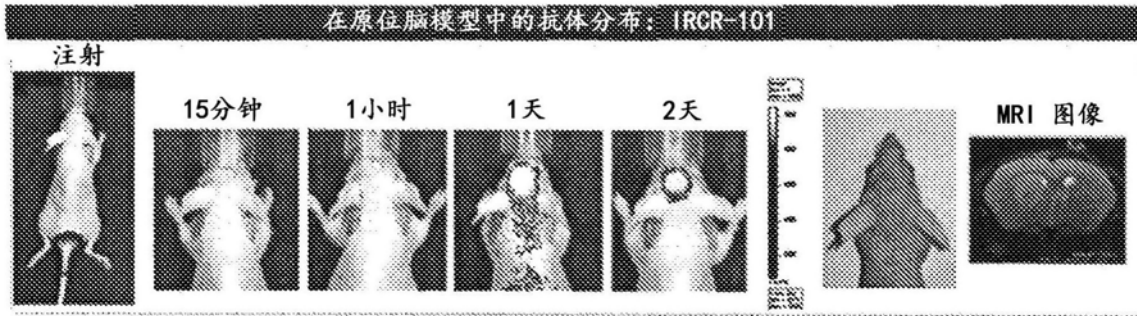


图26

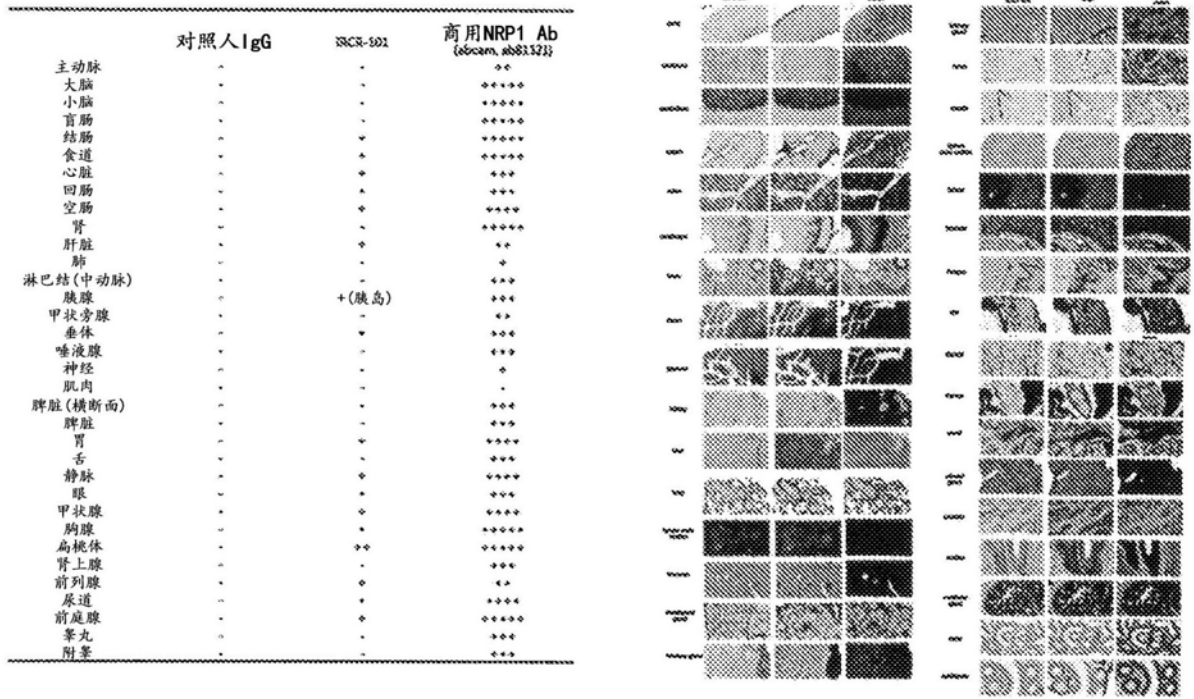


图27

专利名称(译)	抗NRP1抗体筛选方法		
公开(公告)号	CN109416363A	公开(公告)日	2019-03-01
申请号	CN201780041972.7	申请日	2017-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	社会福祉法人三星生命公益财团		
申请(专利权)人(译)	社会福祉法人三星生命公益财团		
当前申请(专利权)人(译)	社会福祉法人三星生命公益财团		
[标]发明人	南都铉 李在铉		
发明人	南都铉 李在铉		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/574 A01K67/027 A61K39/395		
CPC分类号	A01K67/0271 A01K2207/12 A01K2227/105 A01K2267/0331 A61K2039/505 A61P35/00 A61K39/395 C07K16/2863 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2317/92 G01N33/574 G01N33/68 G01N2500/10 A01K67/027 A01K2267/0387 A61K39/39558 G01N33/5005 G01N33/53 G01N33/6854 G01N2500/00 C07K2317/565 C07K2317/567 G01N33/5011		
优先权	1020160069360 2016-06-03 KR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开文本涉及通过使用过表达NRP1的患者来源的肿瘤球体和包含该肿瘤球体的动物模型筛选抗NRP1抗体或其抗原结合片段的方法，并且更具体地涉及通过分别使用含有NRP1的患者来源的肿瘤球体和移植有该肿瘤球体的动物模型通过体外和体内淘选来筛选抗体或其抗原结合片段的方法。

