



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110087681 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201780073146.0

(22)申请日 2017.09.28

(30)优先权数据

62/401,158 2016.09.28 US

62/421,038 2016.11.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.05.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/053880 2017.09.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/064255 EN 2018.04.05

(71)申请人 佐马美国有限公司

地址 美国加利福尼亚

申请人 MUSC研究发展基金会

(72)发明人 玛丽娜·勒尔 马克·鲁宾斯坦

哈森·伊萨弗拉斯 卢埃林·劳

欧·李 丹尼尔·H·贝丁格

克里斯廷·卡姆菲尔德·林德

艾格尼丝·肖邦·霍姆斯

竹内俊彦 劳伦·施维默 霍·江

阿默·M·米尔扎

科克·W·约翰逊

(74)专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司 11018

代理人 潘怀仁 王珍仙

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/24(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书60页

序列表17页 附图32页

(54)发明名称

结合白细胞介素-2的抗体和其用途

(57)摘要

本发明一般涉及对抗人类白细胞介素2(IL-2)的人类抗体和使用所述抗体调节IL-2活性的方法以及在治疗如癌症、自身免疫疾病或感染的病状方面的用途。

1. 一种人类或人源化抗体,其结合人类白细胞介素-2 (IL-2),亲和力 K_D 为 1×10^{-10} M或更低,并抑制IL-2与IL-2受体 α (IL-2 α) 亚基的结合,

其中所述抗体通过IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 和IL-2 $\beta\gamma$ 抑制IL-2信号传导,并且

其中所述抗体通过IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 抑制IL-2信号传导的程度要比通过IL-2 $\beta\gamma$ 更大。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体不完全阻断人类IL-2与表达人类或小鼠IL-2 β 或IL-2 $\beta\gamma$ 复合物的细胞的结合。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体在变构位点结合IL-2与IL-2 α 、IL-2 $\beta\gamma$ 或IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 的结合。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体是负调节剂抗体,任选地,其中所述抗体能够使IL-2与IL-2受体 α (IL-2 α) 之间的结合亲和力减弱至少约2倍,任选地高达1000倍。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中与所述抗体复合的IL-2与表达IL-2 β 和 γ c的CHO细胞以5nM或更低的EC50结合,或其中与所述抗体复合的IL-2与表达IL-2 β (而并非 γ c)的CHO细胞以100nM或更低的EC50结合。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体与人类IL-2和小鼠、大鼠或兔的IL-2中的一种或多种结合。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体在表达IL-2 α 、IL-2 β 和 γ c的细胞中抑制IL-2对STAT5活化的刺激的程度要大于表达IL-2 β 和 γ c而并非IL-2 α 的细胞。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体在表达IL-2 α 、IL-2 β 和 γ c的细胞中抑制IL-2对STAT5活化的刺激200倍或更高。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体在表达IL-2 β 和 γ c而并非IL-2 α 的细胞中抑制IL-2对STAT5活化的刺激10倍或更低。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体在表达IL-2 α 、IL-2 β 和 γ c的细胞中抑制IL-2对增殖的刺激的程度要大于表达IL-2 β 和 γ c而并非IL-2 α 的细胞。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制IL-2对表达IL-2 α 、IL-2 β 和 γ c的NK细胞的增殖的刺激超过15倍。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制IL-2对表达IL-2 β 和 γ c而并非IL-2 α 的BaF3细胞的增殖的刺激小于10倍。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体选自由以下组成的组: XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042或XPA.92.099。

14. 一种结合人类白细胞介素-2 (IL-2) 的抗体,其包含

(a) SEQ ID NO:17、20、23或26中所示的重链CDR1氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体;

(b) SEQ ID NO:18、21、24或27中所示的重链CDR2氨基酸序列,其来自与(a)相同的重链可变区,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体;和

(c) SEQ ID NO:19、22、25或28所示的重链CDR3氨基酸序列,其来自与(a)相同的重链可变区,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体。

15. 一种结合人类白细胞介素-2 (IL-2) 的抗体, 其包含:

(a) SEQ ID NO:17、20、23或26中所示的重链CDR1氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的其变异体;

(b) SEQ ID NO:18、21、24或27中所示的重链CDR2氨基酸序列, 其来自与(a)相同的重链可变区, 或与其具有至少70%同一性的其变异体; 和

(c) SEQ ID NO:19、22、25或28中所示的重链CDR3氨基酸序列, 其来自与(a)相同的重链可变区, 或与其具有至少70%同一性的其变异体。

16. 一种结合人类白细胞介素-2 (IL-2) 的抗体, 其包含:

(a) SEQ ID NO:17、20、23或26中所示的重链CDR1氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的其变异体;

(b) SEQ ID NO:18、21、24或27中所示的独立选择的重链CDR2氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的其变异体; 和

(c) 独立选择的SEQ ID NO:19、22、25或28中所示的重链CDR3氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的其变异体。

17. 根据权利要求14至16中任一项所述的抗体, 其中所述重链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个示于SEQ ID NO:17-28中的任一个中。

18. 根据权利要求14至16中任一项所述的抗体, 其中所述重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列中的三个示于SEQ ID NO:17-28中的任一个中。

19. 根据权利要求14至18中任一项所述的抗体, 其包含与SEQ ID NO:1、3、5或7中所示的重链可变区氨基酸序列有至少85%同一性的氨基酸序列。

20. 根据权利要求14至19中任一项所述的抗体, 其包含与SEQ ID NO:1、3、5或7中所示的重链可变区氨基酸序列有至少95%同一性的氨基酸序列。

21. 根据权利要求14至16中任一项所述的抗体, 其包含多肽序列, 所述多肽序列具有与重链可变区中的所有三个HCDR, 或SEQ ID NO:17-28中任一个所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3的所述氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列。

22. 根据权利要求14至21中任一项所述的抗体, 其中一个或多个重链框架氨基酸已被来自另一人类抗体氨基酸序列的相应氨基酸置换。

23. 根据权利要求14至22中任一项所述的抗体, 其还包含SEQ ID NO:29-40中任一个所示的任何一个轻链CDR氨基酸序列。

24. 根据权利要求14至23中任一项所述的抗体, 其包含SEQ ID NO:29-40中任一个所示的至少两个轻链CDR氨基酸序列。

25. 根据权利要求14至24中任一项所述的抗体, 其包含SEQ ID NO:29-40中任一个所示的至少三个轻链CDR氨基酸序列。

26. 根据权利要求14至22中任一项所述的抗体, 其包含:

(a) SEQ ID NO:29、32、35或38中所示的轻链CDR1氨基酸序列, 或其中一个或两个氨基酸已被改变的变异体;

(b) SEQ ID NO:30、33、36或39中所示的轻链CDR2氨基酸序列, 其来自与(a)相同的轻链可变区, 或其中一个或两个氨基酸已被改变的变异体; 和

(c) SEQ ID NO:31、34、37或40中所示的轻链CDR3氨基酸序列, 其来自与(a)相同的轻链

可变区,或其中一个或两个氨基酸的变异体已被改变的变异体。

27. 一种结合人类白细胞介素-2 (IL-2) 的抗体,其包括:

(a) SEQ ID NO:29、32、35或38中所示的轻链CDR1氨基酸序列,或与其具有至少70%同一性的其变异体;

(b) SEQ ID NO:30、33、36或39中所示的轻链CDR2氨基酸序列,其来自与(a)相同的轻链可变区,或与其具有至少70%同一性的其变异体;和

(c) SEQ ID NO:31、34、37或40中所示的轻链CDR3氨基酸序列,其来自与(a)相同的轻链可变区,或与其具有至少70%同一性的其变异体。

28. 根据权利要求14至22中任一项所述的抗体,其包含:

(a) SEQ ID NO:29、32、35或38中所示的轻链CDR1氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的变异体;

(b) SEQ ID NO:30、33、36或39中所示的独立选择的轻链CDR2氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的变异体;和

(c) SEQ ID NO:31、34、37或40中所示的独立选择的轻链CDR3氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的变异体。

29. 根据权利要求26至28所述的抗体,其中所述轻链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个示于SEQ ID NO:29-40中的任一个中。

30. 根据权利要求23至29中任一项所述的抗体,其包含与SEQ ID NO:9、11、13或15中任一个所示的轻链可变区氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列。

31. 根据权利要求30所述的抗体,其包含与SEQ ID NO:9、11、13或15中任一个所示的轻链可变区氨基酸序列有至少85%同一性的氨基酸序列。

32. 根据权利要求30所述的抗体,其包含与SEQ ID NO:9、11、13或15中任一个所示的轻链可变区氨基酸序列有至少95%同一性的氨基酸序列。

33. 根据权利要求32所述的抗体,其包含SEQ ID NO:9、11、13或15中任一个所示的轻链可变区氨基酸序列。

34. 根据权利要求26至29中任一项所述的抗体,其包含多肽序列,所述多肽序列具有与轻链可变区的所有三个LCDR,SEQ ID NO:29-40中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列。

35. 根据权利要求26至29中任一项所述的抗体,其包含(i)与轻链可变区的所有三个LCDR,SEQ ID NO:29-40中任一个所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列;和(ii)与重链可变区的所有三个HCDR,SEQ ID NO:17-28中任一个所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3的氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列。

36. 一种结合人类白细胞介素-2 (IL-2) 的抗体,其包含轻链可变区和/或重链可变区,其中

(a) 所述轻链可变区至少包含选自SEQ ID NO:29、32、35或38的CDR1,或与其有至少80%同一性的序列;选自SEQ ID NO:30、33、36或39的CDR2,或与其有至少80%同一性的序列;和/或选自SEQ ID NO:31、34、37或40的CDR3,或与其有至少80%同一性的序列;和/或其中

(b) 所述重链可变区至少包含选自SEQ ID NO:17、20、23或26的CDR1,或与其有至少

80%同一性的序列;选自SEQ ID NO:18、21、24或27的CDR2,或与其有至少80%同一性的序列;和/或选自SEQ ID NO:19、22、25或28的CDR3,或与其有至少80%同一性的序列。

37. 根据权利要求31所述的抗体,其中

(a) 所述轻链可变区至少包含选自SEQ ID NO:29、32、35或38的CDR1,或与其有至少90%同一性的序列;选自SEQ ID NO:30、33、36或39的CDR2,或与其有至少90%同一性的序列;和选自SEQ ID NO:31、34、37或40的CDR3,或与其有至少90%同一性的序列;和/或其中

(b) 所述重链可变区至少包含选自SEQ ID NO:17、20、23或26的CDR1,或与其有至少90%同一性的序列;选自SEQ ID NO:18、21、24或27的CDR2,或与其有至少90%同一性的序列;和选自SEQ ID NO:19、22、25或28的CDR3,或与其有至少90%同一性的序列。

38. 根据权利要求14至37中任一项所述的抗体,其抑制IL-2与IL-2受体 α (IL-2 R- α) 亚基的结合。

39. 根据权利要求14至38中任一项所述的抗体,其中所述抗体部分抑制IL-2与IL-2 R β γ 复合物的结合。

40. 根据权利要求14至39任一项所述的抗体,其中所述抗体在变构位点结合IL-2与IL-2 R α 、IL-2 R β γ 或IL-2R $\alpha\beta$ γ 的结合。

41. 根据权利要求14至40中任一项所述的抗体,其中所述抗体是负调节剂抗体,任选地,其中所述抗体能够使IL-2与IL-2受体 α (IL-2 R α) 之间的结合亲和力减弱至少约2倍,任选地高达1000倍。

42. 根据权利要求14至41中任一项所述的抗体,其中所述抗体不会使IL-2与IL-2 R β γ 复合物的结合EC50变化超过3倍。

43. 根据权利要求14至42中任一项所述的抗体,其中所述抗体与人类IL-2和小鼠、大鼠或兔的IL-2中的一种或多种结合。

44. 根据权利要求14至43中任一项所述的抗体,其中所述抗体响应于用IL-2刺激所述IL-2 R而抑制细胞中的STAT5活化。

45. 根据权利要求14至44中任一项所述的抗体,其是人类抗体或人源化抗体。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其还包含重链恒定区,其中所述重链恒定区是经修饰或未经修饰的IgG、IgM、IgA、IGD、IgE、其片段或其组合。

47. 根据权利要求26至38中任一项所述的抗体,其中一个或多个轻链框架氨基酸已被来自另一人类抗体氨基酸序列的相应氨基酸置换。

48. 根据权利要求14至16、26至28或35中任一项所述的抗体,其中所述抗体选自由以下组成的组:XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042或XPA.92.099。

49. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其还包含衔接于所述轻链可变区的人类轻链恒定区。

50. 根据权利要求50所述的抗体,其中所述轻链恒定区是经修饰或未经修饰的 λ 轻链恒定区、 κ 轻链恒定区、其片段或其组合。

51. 根据权利要求14至41中任一项所述的抗体,其以 10^{-10} M或更低的亲和力 K_D 结合人类白细胞介素-2 (IL-2)。

52. 一种分离的核酸分子,其包含编码根据权利要求1至51中任一项所述的重链或轻链的核苷酸序列。

53. 一种表达载体,其包含可操作地连接于表达控制序列的根据权利要求52所述的核酸分子。

54. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求53所述的载体或根据权利要求49所述的核酸分子。

55. 根据权利要求54所述的宿主细胞,其包含编码重链和轻链可变区的核酸分子,其中所述重链和轻链核酸由不同的核酸或在相同的核酸上表达。

56. 一种使用根据权利要求54或55所述的宿主细胞产生抗体的方法,其包含在合适的条件下培养根据权利要求54或55所述的宿主细胞并回收所述抗体。

57. 一种抗体,其通过根据权利要求56所述的方法产生。

58. 一种无菌医药组合物,其包含根据权利要求1至52中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

59. 一种抑制有需要的患者的IL-2活性的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的根据权利要求1至52中任一项所述的抗体或根据权利要求58所述的医药组合物的步骤。

60. 一种用于治疗与增加的白细胞介素-2 (IL-2) 或白细胞介素-2受体 (IL-2 R) 水平或活性相关的疾病、病状或病症的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的根据权利要求1至51中任一项所述的抗体或根据权利要求58所述的医药组合物的步骤。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述疾病、病状或病症选自由以下组成的组:癌症、微生物感染、哮喘和自身免疫性疾病。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:黑素瘤、肾细胞癌、淋巴瘤、肉瘤、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、胃癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、头颈癌、皮肤癌和鳞状细胞癌 (SCC)。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述给药降低所述个体中的肿瘤体积。

64. 根据权利要求60至63中任一项所述的方法,其中所述给药增加所述个体中的CD8+ T细胞与CD4+ T细胞的比率。

65. 根据权利要求60至64中任一项所述的方法,其中静脉内、肿瘤内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮内或皮下给予所述抗体。

66. 根据权利要求60至65中任一项所述的方法,其中所述抗体结合第二药剂一起给予。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述第二药剂是IL-2、IL-2变体、检查点抑制剂、CART/TIL剂,肿瘤抗原抗体或疫苗。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自由以下组成的组:抗PD-1抗体、抗PDL-1抗体、抗CTLA-4抗体、PD-1抑制剂、PDL-1抑制剂或CTLA-4抑制剂。

69. 根据权利要求67所述的方法,其中当所述第二药剂是IL-2或IL-2变体时;所述抗体能够在给药前与IL-2或IL-2变体复合或分开给予。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述IL-2或IL-2变体和所述IL-2抗体以1:1摩尔比给予。

71. 根据权利要求69或70所述的方法,其中将所述IL-2抗体与IL-2或IL-2变体组合给予使IL-2的治疗指数(TI)增加至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍或更多。

72. 根据权利要求69所述的方法,其还包含给予检查点抑制剂、CART/TIL剂、肿瘤抗原

抗体或疫苗。

73. 根据权利要求60至72中任一项所述的方法,其中所述抗体每周一次、每2周一次、每月两次、每月一次、每两个月一次或每三个月一次给予。

73. 一种组合物,其包含根据权利要求1至51中任一项所述的抗体或根据权利要求58所述的医药组合物,其用于治疗与增加的白细胞介素-2 (IL-2) 或白细胞介素-2受体 (IL-2 R) 相关的病状或病症。

74. 一种组合物,其包含根据权利要求1至51中任一项所述的抗体或根据权利要求58所述的医药组合物,其用于治疗与增加的IL-2或IL-2 R表达或活性相关的病状或病症。

75. 一种用于调节细胞中的IL-2活性的方法,其包含使所述细胞与一定量的有效调节所述细胞中的IL-2活性的根据权利要求1至51中任一项所述的抗体或根据权利要求58所述的医药组合物接触的步骤。

结合白细胞介素-2的抗体和其用途

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2016年9月28日提交的美国临时专利申请第62/401,158号和2016年11月11日提交的美国临时专利申请第62/421,038号的优先权权益,其全部内容通过引用并入本文中。

[0003] 通过引用并入电子递交的材料

[0004] 通过引用整体并入的是与本文同时提交的计算机可读核苷酸/氨基酸序列表,其标识如下:文件名:51134_Seqlisting.txt;大小:20,399字节;创建时间:2017年9月28日。

技术领域

[0005] 本发明一般涉及白细胞介素-2 (IL-2) 抗体和用于治疗与IL-2信号传导相关的病状的疗法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的IL-2抗体。

背景技术

[0006] 白细胞介素-2 (IL-2) 是一种15kDa肽,其是具有4个 α 螺旋束的细胞因子家族的一员(Wang等人,《免疫学年评(Annual review of immunology)》27,29-60(2009))。白细胞介素-2最初在1976年被鉴别为T细胞生长因子,其已被描述为多种名称,包括T细胞生长因子(TCGF)、淋巴细胞条件培养基(LCM)因子、T细胞促有丝分裂因子(TMF)、杀伤辅助因子(KHF)和T细胞替代因子(TRF)(Lotze MT,《人类细胞因子中的白细胞介素-2:基础和临床研究手册(Interleukin-2, In Human Cytokines: Handbook for basic and clinical research)》,第81-96页(1992);Smith等人,《细胞因子参考(Cytokine Reference)》,第113-125页(2001))。IL-2由多种细胞产生,包括CD4T细胞、CD8T细胞、树突状细胞(DC)、天然杀伤(NK)细胞和天然杀伤T(NKT)细胞。IL-2在广泛的信号之后产生,包括T细胞受体(TCR)的参与,并且在TCR和如CD28的共刺激分子在初始T细胞上接合后快速和瞬时产生。IL-2分泌的瞬时性质取决于TCR信号的转录诱导和通过共刺激信号稳定IL-2mRNA,之后的IL-2基因的转录沉默和IL-2mRNA的快速降解。近年来已描述经典的自动调节反馈环,其中IL-2抑制其自身的产生(Malek TR,《免疫学年评》26,453-479(2008))。

[0007] IL-2受体(IL-2R)由三条链组成:IL-2R α (也称为CD25)、IL-2R β (也称为CD122)和常见的 γ 链, γ c(也称为CD132)。三条受体链在各种细胞类型上单独并且以不同方式表达。IL-2通过IL-2R β 和 γ c之间的相互作用发出信号,其激活细胞路径,如Jak/Stat、PI3K-AKT和MAPK路径。

发明内容

[0008] 本发明提供用于治疗与IL-2信号传导相关,或者其中IL-2信号传导的调节可以引起改善的临床(或免疫)响应的疾病或病症的方法和组合物。本发明提供结合人类IL-2的抗体。提供本文所述的抗体,其对IL-2与任何或所有IL-2R链(IL-2R α 、IL-2R β 和 γ c)的结合可以具有不同的作用。特别地,本发明提供使用所述抗体治疗癌症的方法。

[0009] 在各个实施例中,本发明提供一种对IL-2具有特异性的抗体,其亲和力 K_D 为 2×10^{-9} M或更低。在各个实施例中,本发明提供一种对IL-2具有特异性的抗体,其亲和力 K_D 为 1×10^{-10} M或更低。在示例性实施例中,本文所述的抗IL-2抗体至少以 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M或更低的亲和力结合。在某些实施例中,通过表面等离子体共振或KinExA测定来测量亲和力。

[0010] 在各个实施例中,抗体通过IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 和IL-2R $\beta\gamma$ 抑制IL-2信号传导,并且抗体通过IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 抑制IL-2信号传导的程度要比通过IL-2R $\beta\gamma$ 更大。

[0011] 在一个相关实施例中,抗体结合IL-2并抑制IL-2与IL-2受体 α (IL-2R α)亚基的结合。在各个实施例中,抗体通过IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 抑制IL-2信号传导的程度要比通过IL-2R $\beta\gamma$ 更大。

[0012] 在一个相关实施例中,抗体不完全阻断人类IL-2与表达人类或小鼠IL-2R β 或IL-2R $\beta\gamma$ 复合物的细胞的结合。在相关方面,抗体在变构位点结合IL-2与IL-2R α 或IL-2R β 和 γ c链的结合。

[0013] 在各个实施例中,抗体是负调节剂抗体,任选地,其中抗体能够使IL-2和IL-2受体 α (IL-2R α)之间的结合亲和力减弱至少约2倍,任选地高达1000倍。在其它实施例中,本文所述的抗体能够使IL-2和IL-2R α 之间的结合亲和力减弱至少2-1000倍、10-100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍或1000倍。在各个实施例中,与IL-2复合的抗体与表达IL-2R β 和 γ c的细胞结合,EC₅₀为约5nM或更低。在各个实施例中,抗体结合表达IL-2R β (而并非 γ c)的细胞,EC₅₀为约200nM或更低。在一些实施例中,与IL-2复合的抗体与表达IL-2R β 和 γ c的细胞结合,EC₅₀在0.1-100nM、0.1-10nM、1-5nM范围内。在各个实施例中,与IL-2复合的抗体与表达IL-2R β 和 γ c的细胞结合,EC₅₀为1、2、3、4或5nM。在一些实施例中,与IL-2复合的抗体与表达IL-2R β (而并非 γ c)的细胞结合,EC₅₀在10-500nM,10-300nM,10-200nM范围内。在各个实施例中,与IL-2复合的抗体与表达IL-2R β 和 γ c的细胞结合,EC₅₀为10、50、100、150或200nM。在相关的实施例中,与IL-2复合的抗体与表达IL-2R β 和 γ c的细胞结合比表达IL-2R β (而并非 γ c)的细胞高9至40倍。

[0014] 在各个实施例中,抗体与人类IL-2和小鼠、大鼠或兔IL-2中的一种或多种结合。

[0015] 在各个实施例中,抗体在表达IL-2R α 、IL-2R β 和 γ c的细胞中抑制IL-2对STAT5活化的刺激的程度要大于表达IL-2R β 和 γ c而并非IL-2R α 的细胞。例如,在表达小鼠IL-2R α 、R β 和 γ c的细胞(例如,CTLL-2)中,EC₅₀变化可以在293到793倍范围内,而表达小鼠IL-2R β 和 γ c的细胞(例如,小鼠原代NK细胞)为13-16倍。对于表达人类IL-2R α 、R β 和 γ c的细胞(例如,NK92细胞系),EC₅₀变化可以在495至1855倍范围内,而表达人类IL-2R β 和 γ c的细胞(人类CD25+耗尽的原代NK细胞)为45至104倍或工程化表达人类R β 和 γ c的CHO-K1细胞为5至9倍。与小鼠R β 和 γ c相比,小鼠R α 、R β 和 γ c的EC₅₀变化比率高18至60倍(对照抗体MAB602(也称为克隆5355)为76倍),并且与人类R β 和 γ c相比,人类R α 、R β 和 γ c的EC₅₀变化比率高9至19倍(MAB602为50倍)。在一个相关实施例中,抗体在表达小鼠IL-2R α 、IL-2R β 和 γ c的细胞中抑制IL-2对STAT5活化的刺激200倍或更高,对于在表达人类IL-2R α 、IL-2R β 和 γ c的细胞中抑制400倍或更高。在一个相关实施例中,抗体在表达人类IL-2R β 和 γ c而并非IL-2R α 的细胞中抑制IL-2对STAT5活化的刺激小于10倍(CHO-R $\beta\gamma$)或150倍(例如,在人类CD25+耗尽的原代NK细胞中),或在表达小鼠IL-2R β 和 γ c的细胞(例如,小鼠NK细胞)中抑制小于20倍。

[0016] 在各个实施例中,抗体在表达IL-2R α 、IL-2R β 和 γ c的细胞中抑制IL-2对增殖的刺激的程度要大于表达IL-2R β 和 γ c而并非IL-2R α 的细胞。在各个实施例中,抗体抑制IL-2刺激表达IL-2R α 、IL-2R β 和 γ c的NK细胞的增殖超过20倍。在各个实施例中,抗体抑制IL-2刺激表达IL-2R β 和 γ c,但不表达IL-2R α 的BaF3细胞的增殖小于12倍。

[0017] 在一个实施例中,IL-2抗体是单克隆抗体。

[0018] 在各个实施例中,IL-2抗体是人类或人源化抗体。

[0019] 在各个实施例中,抗体选自由以下组成的组:XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042或XPA.92.099。

[0020] 在一个方面,本发明提供一种结合人类白细胞介素-2(IL-2)的抗体,其包含(a) SEQ ID NO:17、20、23或26中所示的重链CDR1氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体;(b) SEQ ID NO:18、21、24或27中所示的重链CDR2氨基酸序列,其来自与(a)相同的重链可变区,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体;(c) SEQ ID NO:19、22、25或28所示的重链CDR3氨基酸序列,其来自与(a)相同的重链可变区,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体。

[0021] 在相关方面,本发明提供一种结合人类白细胞介素-2(IL-2)的抗体,其包含:(a) SEQ ID NO:17、20、23或26中所示的重链CDR1氨基酸序列,或与其具有至少70%同一性的其变异体;(b) SEQ ID NO:18、21、24或27中所示的重链CDR2氨基酸序列,其来自与(a)相同的重链可变区,或与其具有至少70%同一性的其变异体;(c) SEQ ID NO:19、22、25或28中所示的重链CDR3氨基酸序列,其来自与(a)相同的重链可变区,或与其具有至少70%同一性的其变异体。

[0022] 在另一方面,本发明提供一种结合人类白细胞介素-2(IL-2)的抗体,其包含:(a) SEQ ID NO:17、20、23或26中所示的重链CDR1氨基酸序列,或与其具有至少70%同一性的其变异体;(b) SEQ ID NO:18、21、24或27中所示的独立选择的重链CDR2氨基酸序列,或与其具有至少70%同一性的其变异体;(c) SEQ ID NO:19、22、25或28中所示的独立选择的重链CDR3氨基酸序列,或与其具有至少70%同一性的其变异体。

[0023] 在某些实施例中,重链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个示于SEQ ID NO:17-28中的任一个中。在一个相关实施例中,重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列中的三个示于SEQ ID NO:17-28中的任一个中。

[0024] 在一些实施例中,本文设想的抗体包含与SEQ ID NO:1、3、5或7中所示的重链可变区氨基酸序列有至少85%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,本文提供一种抗体,其包含与SEQ ID NO:1、3、5或7中所示的重链可变区氨基酸序列有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0025] 进一步设想本文所述的抗体包含多肽序列,其具有与重链可变区中的所有三个HCDR,SEQ ID NO:17-28中任一个所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3的氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0026] 在某些实施例中,本文设想的抗体包含一个或多个重链框架氨基酸,其已被来自另一人类抗体氨基酸序列的相应氨基酸置换。

[0027] 在一个实施例中,本文设想的抗体还包含SEQ ID NO:29-40中任一个所示的任何一个轻链CDR氨基酸序列。在其它实施例中,本文设想的抗体包含SEQ ID NO:29-40中任一

个所示的至少两个轻链CDR氨基酸序列。在其它实施例中,本文设想的抗体包含SEQ ID NO: 29-40中任一个所示的至少三个轻链CDR氨基酸序列。

[0028] 在另一方面,本文所述的抗体包含(a) SEQ ID NO: 29、32、35或38中所示的轻链CDR1氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体;(b) SEQ ID NO: 30、33、36或39中所示的轻链CDR2氨基酸序列,其来自与(a)相同的轻链可变区,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体;(c) SEQ ID NO: 31、34、37或40中所示的轻链CDR3氨基酸序列,其来自与(a)相同的轻链可变区,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体。

[0029] 在替代实施例中,本文设想的抗体包含:(a) SEQ ID NO: 29、32、35或38中所示的轻链CDR1氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体;(b) SEQ ID NO: 30、33、36或39中所示的独立选择的轻链CDR2氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体;(c) SEQ ID NO: 31、34、37或40中所示的独立选择的轻链CDR3氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变异体。

[0030] 在某些实施例中,轻链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个示于SEQ ID NO: 29-40中的任一个中。

[0031] 进一步设想本文所述的抗体包含与SEQ ID NO: 9、11、13或15中任一个所示的轻链可变区氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列。在一个相关实施例中,抗体包含与SEQ ID NO: 9、11、13或15中任一个所示的轻链可变区氨基酸序列有至少85%同一性的氨基酸序列。在另一实施例中,抗体包含与SEQ ID NO: 9、11、13或15中任一个所示的轻链可变区氨基酸序列有至少95%同一性的氨基酸序列。在又一个实施例中,抗体包含SEQ ID NO: 9、11、13或15中任一个所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0032] 在另一个实施例中,本文所述的抗体包含多肽序列,其具有与轻链可变区中的所有三个LCDR,SEQ ID NO: 29-40中任一个所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0033] 在某些实施例中,本文所述的抗体包含(i)与轻链可变区的所有三个LCDR,SEQ ID NO: 29-40中任一个所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列,和(ii)与重链可变区的所有三个HCDR,SEQ ID No: 17-28中任一个所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3的氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0034] 在各个实施例中,本发明提供一种包含轻链可变区和/或重链可变区的结合白细胞介素-2(IL-2)的抗体,其中(a)轻链可变区至少包含:选自SEQ ID NO: 29、32、35或38的CDR1,或与其有至少80%同一性的序列;选自SEQ ID NO: 30、33、36或39的CDR2,或与其有至少80%同一性的序列;和/或选自SEQ ID NO: 31、34、37或40的CDR3,或与其有至少80%同一性的序列;和/或其中(b)重链可变区至少包含:选自SEQ ID NO: 17、20、23或26的CDR1,或与其有至少80%同一性的序列;选自SEQ ID NO: 18、21、24或27的CDR2,或与其有至少80%同一性的序列;和/或选自SEQ ID NO: 19、22、25或28的CDR3,或与其有至少80%同一性的序列。

[0035] 在各个实施例中,本发明提供一种包含轻链可变区和/或重链可变区的结合IL-2的抗体,其中(a)轻链可变区至少包含:选自SEQ ID NO: 29、32、35或38的CDR1,或与其有至少90%同一性的序列;选自SEQ ID NO: 30、33、36或39的CDR2,或与其有至少90%同一性的序列;和/或选自SEQ ID NO: 31、34、37或40的CDR3,或与其有至少90%同一性的序列;和/或

其中 (b) 重链可变区至少包含:选自 SEQ ID NO:17、20、23或26的 CDR1,或与其有至少90%同一性的序列,选自 SEQ ID NO:18、21、24或27的 CDR2,或与其有至少90%同一性的序列,和/或选自 SEQ ID NO:19、22、25或28的 CDR3,或与其有至少90%同一性的序列。

[0036] 在某些实施例中,本文所述的抗体抑制 IL-2 与 IL-2 受体 α (IL-2R α) 亚基的结合。在一个相关实施例中,本文所述的抗体不完全阻断 IL-2 与 IL-2R β γ 复合物的结合。

[0037] 在某些实施例中,本文所述的抗体在变构位点结合 IL-2 与 IL-2R α 、IL-2R β 、IL-2R γ 和/或 IL-2R β γ 的结合。在某些实施例中,本文所述的抗体结合 IL-2 并诱导构象变化,其影响对 IL-2R α 、IL-2R β 和/或 γ c 的结合偏好。

[0038] 在某些实施例中,本文所述的抗体不会使 IL-2 与 IL-2R β γ 复合物的结合 EC50 变化超过3倍。

[0039] 在某些实施例中,本文所述的抗体响应于用 IL-2 刺激 IL-2R 而抑制细胞中的 STAT5 活化。

[0040] 在一些实施例中,本发明的抗体还包含重链恒定区,其中所述重链恒定区是经修饰或未经修饰的 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段或其组合。

[0041] 在某些实施例中,提供一种抗体,其中一个或多个轻链框架氨基酸已被来自另一人类抗体氨基酸序列的相应氨基酸置换,任选地,其中所述框架包含图12中所示的一个或多个变化。

[0042] 在一个方面,本发明的抗体选自由以下组成的组: XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042或 XPA.92.099。

[0043] 在一个实施例中,本文所述的抗体还包含附接于所述轻链可变区的人类轻链恒定区。在一些实施例中,轻链恒定区是经修饰或未经修饰的 λ 轻链恒定区、 κ 轻链恒定区、其片段或其组合。

[0044] 在另一方面,本发明提供一种分离的核酸分子,其包含编码如本文所述的重链或轻链的核苷酸序列。在各个实施例中,核苷酸序列示于 SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14或16中。

[0045] 在另一方面,本发明提供一种表达载体,其包含可操作地连接于表达控制序列的本文所设想的核酸分子。还设想一种包含本发明的表达载体或核酸分子的宿主细胞。在某些实施例中,本发明提供一种包含编码重链和轻链可变区的核酸分子的宿主细胞,其中重链和轻链核酸由不同的核酸或在相同的核酸上表达。

[0046] 在相关方面,本发明提供一种使用如本文所述的宿主细胞产生抗体的方法,所述方法包含在合适的条件下培养宿主细胞并回收所述抗体。还提供一种通过本文公开的方法产生的抗体。

[0047] 本发明还设想一种无菌医药组合物,其包含如本文所公开的抗体和药学上可接受的载体。

[0048] 在另一方面,本发明提供一种抑制有需要的患者的 IL-2 活性的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的本文所设想的抗体或医药组合物的步骤。在各个实施例中,设想所述方法抑制细胞群,如调节性 T 细胞/CD25^{hi}、T 效应子/CD 25^{lo} 和/或具有高亲和力三聚体 IL-2 受体 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) 或 IL-2R α 的细胞中的 IL-2 活性。

[0049] 在另一方面,本发明提供一种治疗与增加的白细胞介素-2 (IL-2) 或白细胞介素-2

受体 (IL-2R) 表达或活性相关的疾病、病状或病症的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的本文所设想的抗体或医药组合物的步骤。

[0050] 在各个实施例中,本发明提供一种治疗其中白细胞介素-2 (IL-2) 信号传导的调节有益于改善个体的免疫响应的疾病、病状或病症的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的本文所设想的抗体或医药组合物的步骤。

[0051] 在另一方面,本发明提供一种治疗选自癌症、微生物感染、哮喘和自身免疫疾病组成的组的疾病、病状或病症的方法。

[0052] 在各个实施例中,癌症选自以下组成的组:黑素瘤、肾细胞癌、淋巴瘤、肉瘤、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、胃癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、膀胱癌、头颈癌、皮肤癌和鳞状细胞癌 (SCC)。

[0053] 在各个实施例中,微生物感染是病毒、细菌或真菌感染。

[0054] 在各个实施例中,向有需要的个体给予治疗有效量的本文所设想的抗体或医药组合降低个体的肿瘤体积。

[0055] 在各个实施例中,向有需要的个体给予治疗有效量的本文所设想的抗体或医药组合增加个体中CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞的比率。在各个实施例中,抗体使CD8⁺与CD4⁺T细胞的比率增加至少约1倍,任选地高达100倍。在其它实施例中,本文所述的抗体能够将CD8⁺与CD4⁺T细胞的比率增加至少1-100倍、10-100倍、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、25倍、50倍或100倍。

[0056] 在各个实施例中,本文公开的抗体通过静脉内、动脉内、腹膜内、肿瘤内、肌肉内、皮内或皮下给予。

[0057] 在各个实施例中,本文公开的抗体与第二药剂组合给予。在相关实施例中,第二药剂是IL-2、IL-2变异体或可以增加IL-2水平的药剂、检查点抑制剂、CART/TIL药剂、肿瘤抗原抗体或疫苗。在相关实施例中,检查点抑制剂选自以下组成的组:抗PD-1抗体、抗PDL-1抗体、抗CTLA-4抗体、PD-1抑制剂、PDL-1抑制剂或CTLA-4抑制剂。

[0058] 在各个实施例中,当抗体与IL-2组合给予时,IL-2或IL-2变异体和IL-2抗体以1:1的摩尔比给予。在各个实施例中,将IL-2抗体与IL-2或IL-2变异体组合给予使IL-2的治疗指数 (TI) 增加至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍或更多。

[0059] 在各个实施例中,设想抗体可以与IL-2和第二药剂 (例如检查点抑制剂、CART/TIL药剂、肿瘤抗原抗体或疫苗) 组合给予。

[0060] 在各个实施例中,本文提供一种治疗疾病 (例如癌症) 的方法,其包含将IL-2抗体与IL-2组合给予,任选地还与检查点抑制剂或其它辅助肿瘤疗法组合给予,由此使得对抗非IL-2反应性肿瘤类型的功效现在对生长和/或癌转移抑制敏感。

[0061] 在各个实施例中,IL-2可以在给予之前与抗体复合,伴随给予或不给予本文所述的另一第二药剂。

[0062] 在各个实施例中,本文公开的抗体每周给予一次、每2周给予一次、每月给予两次、每月给予一次、每两个月给予一次或每三个月给予一次或更少。

[0063] 在各个实施例中,当预先混合IL-2和IL-2抗体时,可以每周两次一起给予所述药剂。在各个实施例中,以0.1至10mg/kg的剂量给予IL-2。在各个实施例中,静脉内给予IL-2抗体。

[0064] 如果添加与IL-2抗体相关的IL-2剂量,那么设想IL-2依序给予,例如在同一天给予,并且在某些实施例中,IL-2抗体在给予IL-2之前给予。在各个实施例中,每周给予IL-2抗体一次,伴随在给予抗体后每周一次或每周多次给予IL-2。

[0065] 在各个实施例中,IL-2抗体每周给予1次,并且IL-2疗法(例如Proleukin)根据已知处方方案给予,但是以较低的IL-2剂量给予。

[0066] 在各个实施例中,本发明提供一种方法,其用于给予包含本文公开的抗体或医药组合物的组合物来治疗与增加或减少的IL-2或IL-2R表达或活性相关的病状或病症。

[0067] 在一个方面,本发明提供一种用于调节细胞中的IL-2活性的方法,其包含使细胞与一定量的有效调节细胞中的IL-2活性的本文公开的抗体或医药组合物接触的步骤。

[0068] 还设想一种包含结合IL-2的本发明的任何前述抗体或组合物的组合物,或其制备药剂中的用途,其用于治疗与IL-2或IL-2R表达或活性相关的本文所述的任何病症。还设想包含任何前述抗体或组合物的注射器,例如单次使用或预先填充的注射器;无菌密封容器,例如小瓶、瓶子、器皿;和/或试剂盒或包装体,任选地具有合适的使用说明书。

[0069] 应理解,本文所述的每个特征或实施例或组合是本发明任何方面的非限制性说明性实例,并且因此,意指可与本文所述的任何其它特征或实施例或组合组合。例如,在用如“一个实施例”、“一些实施例”、“某些实施例”、“另外的实施例”、“特定示例性实施例”和/或“另一实施例”之类的语言描述特征的情况下,这些类型的实施例中的每一个是旨在与本文所述的任何其它特征或特征组合组合的特征的非限制性实例,但不必列出每个可能的组合。这些特征或特征组合适用于本发明的任何方面。在公开处于范围内的数值的实例时,这些实例中的任一个均涵盖为范围的可能端点,涵盖此类端点之间的任何和所有数值,并且涵盖较高和较低端点的任何和所有组合。

[0070] 本文的标题是出于方便读者而并非意图为限制性的。根据具体实施方式和/或附图和/或权利要求书,本发明的其它方面、实施例和变型将显而易见。

附图说明

[0071] 图1A和图1B显示所选克隆的重链和轻链与XPA.92.099序列的多序列比对。

[0072] 图2A-2D显示在存在可变IL-2浓度下,XPA.92.019(图2A)、XPA.92.041(图2B)、XPA.92.042(图2C)、XPA.92.099(图2D)与表达IL-2R β 或IL-2R β γ 的细胞的结合的测量结果。

[0073] 图3A-3C显示在不存在及存在固定浓度的IL-2(100nM)下,XPA.92.019(图3A)、XPA.92.041(图3B)和XPA.92.042(图3C)抗体滴定和与表达IL-2R β 或IL-2R β γ 的细胞的结合的测量结果。

[0074] 图4A-4C显示在0.001-100ng/mL抗IL-2抗体或对照存在下,BaF3-IL-2R β γ (图4A)、NK-92(图4B)和CTLL-2(图4C)细胞对IL-2对IL-2的增殖响应。

[0075] 图5A-5C显示IL-2抗体随EC50变化对IL-2诱导的NK92(图5A)、BaF3-IL-2R β γ (图5B)和CTLL-2细胞(图5C)增殖的作用。

[0076] 图6显示不同物种的IL-2序列的比对和IL-2蛋白上的IL-2R α 链结合位点。

[0077] 图7A-7C显示在抗IL-2抗体复合物或对照存在下,人类NK-92(图7A)、人类原代NK细胞(R α 耗尽)(图7B)或小鼠原代NK细胞(图7C)中STAT5的经IL-2诱导的磷酸化。

[0078] 图8A-8G显示在体内给予IL-2/抗体复合物后,脾脏中T细胞和NK细胞亚群频率的图示:CD8+的百分比(图8A);CD4+的百分比(图8B);CD8+CD44hi的百分比(图8C);CD4+CD44+CD25hi的百分比(图8D);CD8+与CD4+细胞的比率(图8E);NK细胞的百分比(图8F)和C57BL/6小鼠的NK细胞(图8G)的平均颗粒酶B(GRZB)产量。

[0079] 图9A-9F显示用媒剂对照(图9A);IL-2/抗IL-2抗体复合物(图9B);单独的抗PD-1抗体(图9C);IL-2/mAb、XPA.92.099+抗PD-1抗体(图9D);单独的抗CTLA-4抗体(图9E)和IL-2/mAb、XPA.92.099+抗CTLA-4抗体(图9F)处理的皮下LLC异种移植小鼠模型中个体肿瘤的反应。在每个图中,第29天的线代表处理的最后一天。

[0080] 图10A-10B显示用IL-2/抗IL-2抗体复合物(IL-2cx)和抗PD-1处理的皮下LLC异种移植小鼠的平均肿瘤尺寸(图10A)和随后的存活百分比(图10B)。抗体单组和联合治疗。误差棒表示±平均值标准误差(SEM),每组n=15只小鼠。

[0081] 图11A-11F显示来自用单独或与抗PD-1抗体组合的IL-2/抗IL-2抗体复合物(使用XPA.92.019或XPA.92.099IL-2抗体)处理的皮下LLC异种移植小鼠模型的T细胞亚群百分比的图示(CD8+的百分比,图11A;CD8+的CD44+的百分比,图11B;CD4+的百分比,图11C;CD4+的CD25+的百分比,图11D;CD8+的IFN γ +的百分比,图11E;CD8+/CD4+的比率,图11F)。

[0082] 图12显示如IMGT系统针对IL-2抗体指定的重链和轻链可变区和互补决定区(CDR)的序列和相应的序列标识(ID)编号(NO),XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042和XPA.92.099。

[0083] 图13A-13C显示用与200nM的固定浓度的指定抗体预复合的各种剂量的IL-2处理持续24小时的人类PBMC的分析。对样品进行NK细胞标记物和CD69表达的染色,并通过流式细胞术,在淋巴细胞/CD3-/CD56亮上门控,来进行分析。将CD69的平均荧光强度(MFI)对供体603(图13A)和供体625(图13B)的IL-2浓度作图。测定抗体处理曲线相对于单独IL-2的EC50值的倍数变化(图13C)。

[0084] 图14A-14C显示用与200nM的固定浓度的指定抗体预复合的各种剂量的IL-2处理持续24小时的人类PBMC。对样品进行T_{reg}标记物和CD69表达的染色,并通过流式细胞术,在淋巴细胞/CD3+CD4+/CD25+CD127-上门控,来进行分析。将CD69的MFI相对于供体603(图14A)和供体625(图14B)的IL-2浓度作图。测定抗体治疗曲线相对于单独IL-2的EC50值的倍数变化(图14C)。

[0085] 图15A和15B显示用与200nM的固定浓度的指定抗体预复合的各种剂量的IL-2处理24小时的人类PBMC的T_{reg}体内平衡。对样品进行T_{reg}标记物的染色,并通过流式细胞术,在淋巴细胞/CD3+/CD4+/CD25+CD127-上门控,来进行分析。示出供体603(图15A)和供体625(图15B)的总CD4+群的T_{regs}的出现率。

[0086] 图16示出接受CT26结肠癌细胞并用单独的IL-2处理的动物中的肿瘤生长结果的分析结果。

[0087] 图17显示接受CT26结肠癌和不同摩尔比的IL2:mAb IL2的动物中的肿瘤生长结果,其证明与接受其它比率的IL-2/抗体组合处理的动物相比,接受1:1比率的抗体与IL-2的动物具有改善的抗肿瘤生长功效。

[0088] 图18显示用1:1或2:1摩尔比的mAb:IL2复合物处理的动物中结肠细胞系的较慢肿瘤生长。

具体实施方式

[0089] 本发明提供了涉及对抗白细胞介素-2 (IL-2) 的人类抗体的材料、方法和用途。特别地,本发明提供使用所述抗体治疗癌症的方法。

[0090] 本发明提供了例如通过结合配偶体、IL-2R α 、IL-2R $\alpha\beta$ γ 和IL-2R β γ 的信号传导而与IL-2相互作用并调节IL-2活性的分子或药剂。本发明提供用于治疗癌症、微生物感染、哮喘和自身免疫疾病的治疗剂。本文公开的组合物有利地具有调节肿瘤中免疫细胞活性的能力,从而在一个方面,提供一种通过影响直接或间接影响肿瘤生长的细胞群来治疗癌症的方法。

[0091] 定义

[0092] 本文所用的术语仅出于描述特定实施例的目的,而并非意图为限制性的。

[0093] 如本文所用,“CHO”是指中国仓鼠卵巢细胞。

[0094] 如本文所用,“CHO-K1”是指亲本CHO细胞系的亚克隆,其源自成年中国仓鼠的卵巢。

[0095] 如本文所用,“IL-2”是指白细胞介素-2。

[0096] 如本文所用,“IL-2R”是指白细胞介素-2受体。IL-2R由三个链或亚基组成:IL-2R α (也称为CD25)、IL-2R β (也称为CD122) 和常见的 γ 链, γ_c (也称为CD132)。术语“IL-2R β 和 γ_c ”可与术语“IL-2R β γ ”互换使用,指代缺少 α 亚基并且包含 β 和 γ 亚基的IL-2R。

[0097] 如本文所用,“T_{reg}”或“T_{regs}”是指调节性T细胞。

[0098] 术语“抗体”以最广义使用,并包括完全组装的抗体、四聚体抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、可以结合抗原的抗体片段(例如,Fab'、F'(ab)2、Fv、单链抗体、双抗体、Fcab)和包含前述的重组肽,只要其展现出所需的生物活性即可。“免疫球蛋白”或“四聚体抗体”是由两条重链和两条轻链组成的四聚体糖蛋白,各自包含可变区和恒定区。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学切割产生。抗体片段或抗原结合部分尤其包括Fab、Fab'、F(ab')2、Fv,结构域抗体(dAb)、互补决定区(CDR)片段、CDR-移植抗体、单链抗体(scFv)、单链抗体片段、嵌合抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、线性抗体;整合重组抗体、三链抗体(tribody)或双链抗体(bibody)、胞内抗体、纳米抗体、小模块化免疫药物(SMIP)、抗原结合域免疫球蛋白融合蛋白、骆驼化抗体、含VHH抗体或其变异体或衍生物,和含有至少一部分免疫球蛋白的多肽,其足以赋予与多肽结合的特异性抗原,如一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR序列,只要所述抗体保留所需的生物学活性即可。

[0099] “免疫球蛋白”或“天然抗体”是四聚体糖蛋白。在天然存在的免疫球蛋白中,每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对具有一个“轻”(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100到110或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基末端部分界定了主要负责效应功能的恒定区。人类轻链被分类为 κ 和 λ 轻链。重链分类为 μ 、 Δ 、 γ 、 α 和 ϵ ,并将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过具有约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,并且重链还包括具有约10个更多个氨基酸的“D”区。一般参见《基础免疫学(Fundamental Immunology)》,第7章(Paul,W.编,第2版Raven Press,纽约(1989))(出于所有目的,通过引用整体并入)。每个轻/重链对的可变区形成抗体结合位点,使得完整的免疫球蛋白具有两

个结合位点。

[0100] 如本文所用,“重链可变区”是指抗体分子的区域,其包含所述抗体重链可变结构域的至少一个互补决定区(CDR)。重链可变区可含有所述抗体重链的一个、两个或三个CDR。

[0101] 如本文所用,“轻链可变区”是指抗体分子的区域,其包含所述抗体轻链可变结构域的至少一个互补决定区(CDR)。轻链可变区可含有所述抗体轻链的一个、两个或三个CDR,取决于抗体,其可以是 κ 或 λ 轻链。

[0102] “单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群获得的抗体,即,除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变之外,构成群体的各个抗体是相同的。

[0103] 如本文所用,“抗体变异体”是指在参考抗体可变区结构域的可变区中含有至少一个氨基酸取代、缺失或插入的抗体多肽序列。变异体可以与未经修饰的抗体基本同源或基本相同。

[0104] 如本文所用,“嵌合抗体”是指含有源自两种不同抗体的序列的抗体(参见例如,美国专利第4,816,567号),所述抗体通常源自不同物种。最典型地,嵌合抗体包含人类和啮齿动物抗体片段,通常是人类恒定区和小鼠可变区。

[0105] “中和抗体”是能够消除或显著降低与其结合的靶抗原的生物学功能的抗体分子。因此,“中和”抗靶抗体能够消除或显著降低生物学功能,如酶活性、配体结合或细胞内信号传导。

[0106] “分离的”抗体是已经从其天然环境的组分中鉴别和分离并回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在各个实施例中,抗体将被纯化(1)到超过抗体的95重量%,如通过劳里法(Lowry method)测定,并且最优选地超过99重量%,(2)到足以通过使用旋转杯式序列分析仪获得至少15个残基的N末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)到均质,通过使用考马斯(Coomassie)蓝或优选地,银染色在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常,通过至少一个纯化步骤制备分离的抗体。

[0107] 如本文所用,“特异性结合”呈“靶特异性”,“特异于”靶标或与靶抗原“免疫反应”的抗体是指以比类似抗原要高的亲和力与靶抗原结合的抗体或抗体物质。在本发明的一个方面,与其与其它,即非人类物种的靶标的结合亲和力相比,靶标结合多肽或其片段、变异体或衍生物将以更大亲和力与人类靶标结合,但是识别和结合靶标的直系同源物的结合多肽在所提供的范围内。

[0108] 例如,作为“特异于”其同源抗原的抗体或其片段的多肽表明,抗体的可变区以可检测的偏好识别和结合相关多肽(即,能够借助于结合亲和力方面的可测量差异将相关多肽与同一家族的其它多肽区分开,尽管家族成员之间可能存在局部序列同一性、同源性或相似性)。应理解,特异性抗体还可以通过与抗体可变区外的序列相互作用,特别是在分子的恒定区中,与其它蛋白质(例如,金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)蛋白A或ELISA技术中的其它抗体)相互作用。用于确定用于本发明的方法的抗体的结合特异性的筛选测定是所属领域熟知的并且是常规实践的。关于此类测定的全面论述,参见Harlow等人(编),《抗体:实验室手册(Antibodies A Laboratory Manual)》;冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory);纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor, NY) (1988),第6章。可以使用所属领域

已知的任何方法产生用于所述方法的抗体。

[0109] 术语“表位”是指能够被一个或多个抗原结合区处的选择性结合剂(如抗体)识别并结合的任何分子的部分。表位通常由分子的化学活性表面基团组成,如氨基酸或碳水化合物侧链,并且具有特定的三维结构特征以及荷质比特征。如本文所用,表位可以是连续的或非连续的。此外,表位可以是模拟物(模拟表位),因为其包含与用于产生抗体的表位相同的三维结构,但是不包含或仅包含在靶标中所见的用于刺激抗体免疫响应的一些氨基酸残基。如本文所用,模拟表位并不视为与选择性结合剂结合的表位不同的抗原;选择性结合剂识别表位和模拟表位的相同三维结构。

[0110] 当结合本发明的抗体物质和多肽使用时,术语“衍生物”是指通过如泛素化;与治疗或诊断剂结合;标记(例如,用放射性核素或各种酶);共价聚合物附接(如PEG化(用聚乙二醇衍生化))和利用化学合成通常不存在于人类蛋白质中的氨基酸(如鸟氨酸)的插入或取代的技术化学修饰的多肽。衍生物保留了本发明的未衍生化分子的结合特性。

[0111] 术语“治疗有效量”在本文中用于表示本发明的靶特异性组合物有效改善或减轻待治疗的疾病的症状或体征的量。

[0112] 与本文方法一起使用的术语“治疗(treat/treated/treating/treatment)”是指暂时或永久地、部分或完全地消除、减少、抑制或改善事件、疾病或病状的临床症状、表现或进展。所述治疗不一定是绝对有用的。

[0113] 本发明方法提供靶特异性抗体,其可包含本文所示的那些示例性序列、其片段、变异体和衍生物;包括本文所述的靶特异性抗体的医药调配物的用途。取决于其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将免疫球蛋白分为不同类别,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其可以进一步划分为亚类或同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。不同的同种型具有不同的效应功能;例如IgG1和IgG3同种型具有ADCC活性。如果本文公开的抗体包含恒定结构域,那么其可以是这些亚类或同种型中的任何一种。

[0114] 本发明提供一种靶特异性抗体,其可包含图12中所示的那些示例性序列、其片段、变异体和衍生物;包括上述靶特异性抗体的医药调配物;制备医药调配物的方法;和用医药调配物和化合物治疗患者的方法。本文所述并用于本发明方法的抗体可显示呈小于或等于约 2×10^{-9} M、或约 1×10^{-10} M、或小于或等于约 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或 10^{-13} M或更小、或 10^{-10} 到 10^{-13} M的 K_D 的对一种或多种IL-2抗原的结合亲和力。所述亲和力可以使用常规技术容易地测定,如通过平衡透析;通过使用表面等离子共振(SPR)技术(例如,BIAcore 2000仪器,使用制造商概述的一般程序);通过使用 125 I标记的靶抗原的放射免疫测定;或者通过以下实例中阐述的或所属领域技术人员已知的另一种方法。例如,可以通过Scatchard等人(《纽约科学院年报(Ann NY, Acad. Sci.)》,51:660,1949)的方法分析亲和力数据。

[0115] KinExA动力学排除测定也适用于测量抗体对其抗原的亲和力。KinExA技术测量溶液相中的结合事件,而不是溶液相和固相之间的结合事件。此外,虽然许多测量结合事件的方法需要通过固定或标记来修饰至少一种反应物,但KinExA方法不需要修饰研究中的分子。KinExA方法被认为允许测量比目前可用的其它方法更宽范围的结合常数。关于KinExA装置和抗体表征操作的其它描述可从制造商(爱达荷州博伊西(Boise, ID)的Sapidyne Instruments公司)获得,并且可以在公开的文献中找到,例如美国专利第6,664,114号和

Darling等人,“动力学排除分析技术:分子相互作用的表征(Kinetic Exclusion Assay Technology:Characterization of Molecular Interactions)”,2:647-657(2004)。

[0116] 白细胞介素2(IL-2)

[0117] 白细胞介素-2(IL-2)是一种15kDa肽,其是具有4个 α 螺旋束的细胞因子家族的一员(Wang等人,《免疫学年评》27,29-60(2009))。白细胞介素-2最初在1976年被鉴别为T细胞生长因子,其已被描述为多种名称,包括T细胞生长因子(TCGF)、淋巴细胞条件培养基(LCM)因子、T细胞促有丝分裂因子(TMf)、杀伤辅助因子(KHF)和T细胞替代因子(TRF)(Lotze MT,《人类细胞因子中的白细胞介素-2:基础和临床研究手册》,第81-96页(1992);Smith等人,《细胞因子参考》,第113-125页(2001))。IL-2主要由活化的CD4⁺T细胞产生,其次由活化的CD8⁺T细胞产生,并且在较低程度上由活化的树突状细胞(DC)、天然杀伤(NK)细胞和天然杀伤T(NKT)细胞产生。IL-2在TCR和如CD28的共刺激分子在初始T细胞上接合后快速和瞬时产生。IL-2分泌的瞬时性质取决于TCR信号的转录诱导和通过共刺激信号稳定IL-2mRNA,之后的IL-2基因的转录沉默和IL-2mRNA的快速降解。近年来已描述经典的自动调节反馈环,其中IL-2抑制其自身的产生(Malek TR,《免疫学年评》26,453-479(2008))。

[0118] 最初主要被视为免疫刺激因子,后续研究也揭示了在免疫耐受方面的作用(Malek TR,《免疫学年评》26,453-479(2008))。现在普遍认为IL-2具有复杂作用,其有助于免疫激活、特异性记忆和免疫耐受的维持(Waldmann T,《关节炎研究(Arthritis research)》4(3)S161-167(2002);Bachmann和Oxenius,《EMBO报告(EMBO reports)》8,1142-1148(2007))。IL-2刺激的特定作用取决于生物学背景,包括例如辅助T细胞的存在,通过CD28信号传导的共刺激和调节性T细胞的抑制等因素。这种生物学背景的一部分通过三种IL-2受体链在不同细胞类型和不同条件,如急性抗原刺激或慢性感染下的差异表达介导。此外,IL-2和其受体受正负反馈机制调节(Boyman和Sprent,《自然评论:免疫学(Nat Rev Immunol)》12,180-190(2012))。

[0119] IL-2突变蛋白

[0120] 与野生型IL-2相比,IL-2变异体(突变蛋白)可具有改善的治疗效果。已经产生了对IL-2R β 具有降低的结合亲和力的IL-2突变蛋白,如BAY 50-4798(含有IL-2的N88R突变)和Selectikine(含有IL-2的D20T突变)(Shanafelt等人,《自然生物技术(Nat. Biotechnol.)》19:1197-1202(2000);Laurent等人,《转化医学杂志(J. Transl. Med.)》11,5(2013))。然而,当在临床试验中进行测试时,这些IL-2突变蛋白在患者中并未显示出降低的毒性。已经产生了对IL-2R α 具有降低的亲和力的IL-2突变蛋白(例如‘无 α 突变蛋白’GA501和GA504(Carmenate等人,《免疫学杂志(J. Immunol.)》190:6230-38(2013);Klein等人,《癌症研究(Cancer Res.)》73,486(2013))。激动性IL-2突变蛋白H9和D10(也称为IL-2超级因子)与IL-2R β 结合,亲和力增加200倍,并且有效结合二聚体IL-2R而不需要IL-2R α ;所述结合引起体外和体内STAT5磷酸化和细胞增殖增加(Levin等人,《自然(Nature)》484:529-33(2012))。通过将四个突变引入H9(L18R、Q22E、Q126T和S130R)并保留IL-2R β 结合来工程化H9突变体H9-RETR,但其显示出对 γ c的亲和力显著降低(Mitra等人,《免疫(Immunity)》42:815-25)。IL-2突变蛋白还描述于W02014/100014、W02015164815、W0205/118016、W02016/030350、US 8,759,486和US 9,266,938中。

[0121] 白细胞介素2受体(IL-2R)

[0122] IL-2的受体由三条链组成:IL-2R α (也称为CD25)、IL-2R β (也称为CD122) 和常见的 γ 链, γ c (也称为CD132)。三条受体链在各种细胞类型上单独并且以不同方式表达。IL-2通过IL-2R β 和 γ c之间的相互作用发出信号,其激活细胞路径,如Jak/Stat、PI3K-AKT和MAPK路径。通过与IL-2R α 相互作用赋予对IL-2更高的敏感性,所述IL-2R α 可以独立地结合IL-2并促进与其它两条链的结合,形成高亲和力三聚体受体复合物(Malek TR,《免疫学年评》26,453-479(2008))。IL-2R α ,也称为Tac抗原,对IL-2具有特异性,而IL-2R β 用于IL-2和IL-15,有时也称为共同的 β 链。IL-2R γ ,也称为常见 γ 链,由许多细胞因子共有,包括IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21(Malek TR,《免疫学年评》26,453-479(2008);Smith KA,《细胞因子参考》,第1459-1469页(2001);Boyman和Sprent《自然评论:免疫学》12,180-190(2012))。

[0123] 作为治疗剂的IL-2

[0124] IL-2(阿地白介素)的重组修饰形式在1992年被美国FDA批准用于治疗转移性肾细胞癌(RCC)并在1998年批准用于治疗转移性黑素瘤(MM)。已显示其可有效改善一部分患者的存活率,从而在一小部分患者中引起持久、完全和明显有效的消退(Dutcher等人,《癌症免疫治疗杂志(Journal for Immunotherapy of Cancer)》2(26)(2014);Rosenberg SA,《免疫学杂志》192,5451-5458(2014))。同时,大多数患者经历严重的副作用,其通常包括血管渗漏综合征(VLS)、肺水肿、低血压、肾损伤、CNS损伤和心脏副作用。尽管大多数副作用可能是可逆的,但仍需要对治疗进行管理,其需要在专家免疫治疗中心住院治疗;这一点,以及接受治疗的严格资格要求,限制了阿地白介素的利用(Dutcher等人,《癌症免疫治疗杂志》2(26)(2014))。阿地白介素治疗的另一个缺点是需要多次静脉内剂量超过5天持续数周,这是由于快速肾脏清除导致给予的IL-2的半衰期较短。

[0125] 最近在理解IL-2的多重作用及其潜在机制和相互作用方面取得的进展有助于解释IL-2活性看似异常的影响。例如,调节性T细胞表达高水平的IL-2R α (CD25),使其对低水平的IL-2敏感。因此,用低浓度IL-2治疗更可能刺激抑制路径,而非效应T细胞,其在活化前表达极少的IL-2R α 。除了提供免疫抑制之外,调节性T细胞还可以为IL-2提供汇点(sink),进一步降低效应T细胞被活化的可能性。总之,这些影响可有助于降低反应率,并可解释高剂量IL-2治疗达到抗肿瘤响应的要求(Boyman和Sprent,《自然评论:免疫学(Nature reviews.Immunology)》12,180-190(2012))。最后,研究人员报道了肺内皮细胞上IL-2受体的表达,这可能引起IL-2对这些细胞类型的直接影响。已提出,治疗益处所需的高剂量IL-2能够活化内皮细胞上低水平的IL-2受体,这可能造成导致VLS、肺水肿和低血压的损害(Boyman和Sprent,《自然评论:免疫学》12,180-190(2012);Rafi-Janaajreh等人,《免疫学杂志》163,1619-1627(1999);Krieg等人,PNAS 107,11906-11911(2010);Downie等人,《美国呼吸道细胞和分子生物学杂志(American journal of respiratory cell and molecular biology)》7,58-65(1992))。

[0126] 已经提出并测试了多种方法作为基于IL-2的肿瘤学免疫疗法的潜在改进,其包括1)对IL-2进行工程化以减少(Shanafelt等人,《自然生物技术(Nature biotechnology)》18,1197-1202(2000))或增加(Levin等人,《自然》484,529-533(2012))其与IL-2R β γ 的相互作用,或减少其与IL-2R α 的相互作用(Charych等人,《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》22,680-690(2016),美国专利第9,266,938号);2)用IL-2融合或结合增加半衰期(WO2012/

065086;WO2013/177187;WO2015/118016);3) 使用抗受体抗体增强IL-2治疗(WO 2008/003473);4) 将IL-2与靶向癌抗原的抗体结合(WO 2016/030350;Sujomoto等人,《抗癌研究(Anticancer Res.)》34(1),89-97(2014));5) 将IL-2与IL-2R α 融合(WO 2016/022671);6) 使用调节IL-2活性的抗IL-2抗体(Boyman等人,《科学(Science)》311,1924-1927(2006);Létourneau等人,PNAS 107,2171-2176(2010);Spangler等人,《免疫》42,815-825(2015);Tomala和Kovar,《肿瘤免疫学(Oncimmunology)》5(2016)) (美国专利公开号20100310501和20130142755;WO 2007/095643;WO 2014/108748;WO 2015/109212;WO 2016005950)。虽然已经发表了调节IL-2与IL-2受体的相互作用的多项抗IL-2抗体报告,但这些描述的是小鼠抗人类IL-2或抗鼠IL-2,以证明这一有前景的方法的概念的证据(Krieg等人,PNAS 107,11906-11911(2010);Boyman等人,《科学》311,1924-1927(2006);Létourneau等人,PNAS 107,2171-2176(2010)) (美国专利公开号20130142755)。理想地,治疗性抗体来源于人类,而由鼠或其它物种人源化的抗体也可以是可接受的。替代抗体的使用引入了结合特性的细微差别的风险,其可能并未完全概括最终治疗候选物的活性。多项研究强调了这些抗体表位差异的功能性结果(Su等人,《科学转化医学(Science translational medicine)》7,311(2015);Rojas等人,《免疫学(Immunobiology)》218,105-113(2013);Garcia-Martinez等人,《国际免疫学(International immunology)》24,427-446(2012))。

[0127] 抗体

[0128] 如上所述,“免疫球蛋白”或“天然抗体”是四聚体糖蛋白。在天然存在的免疫球蛋白中,每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对具有一个“轻”(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条重链在一端具有可变结构域(VH),紧接着是许多恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(VL),在另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对准。据信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面(Chothia等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》196:901-917,1987)。

[0129] 免疫球蛋白可变结构域展现出由三个高变区或CDR连接的相对保守的框架区(FR)的相同的一般结构。从N末端到C末端,轻链和重链均包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。每个结构域的氨基酸分配符合Kabat免疫目的的蛋白质序列(Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest)的定义(马里兰州贝塞斯达的美国国家卫生研究院(National Institutes of Health,Bethesda,Md.) (1987和1991)),或Chothia和Lesk,《分子生物学杂志》196:901-917,1987;Chothia等人,《自然》342:878-883,1989。

[0130] 抗体的高变区是指抗体的负责抗原结合的CDR氨基酸残基。高变区包含来自CDR的氨基酸残基[例如,轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变结构域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3),如Kabat等人,《免疫目的的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第5版公共卫生署,美国国家卫生研究院,马里兰州贝塞斯达(1991)所述];和/或来自高变环的残基(例如,轻链可变区中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)和重链可变结构域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3),如[Chothia等人,《分子生物学杂志》196:901-917(1987)]所述。CDR也已根据ImMunoGenTics(IMG)编号进行鉴别和编号(Lefranc,M.-P.,《免疫学家(The Immunologist)》,7,132-136(1999);Lefranc,M.-P.等人,《发育与比较免疫学

(Dev. Comp. Immunol.)》, 27, 55-77 (2003), 其描述轻链和重链可变结构域中的CDR位置如下: CDR1, 大约残基27到38; CDR2, 大约残基56到65; 和CDR3, 大约残基105到116 (种系) 或残基105到117 (重排)。在一个实施例中, 设想CDR位于重链或轻链与本文公开的那些长度大致相似的抗体的轻链可变结构域中的大约残基26-31 (L1)、49-51 (L2) 和88-98 (L3) 处, 和重链可变结构域中的大约残基26-33 (H1)、51-58 (H2) 和97-110 (H3) 处。然而, 所属领域的技术人员理解, 当鉴别特定抗体的序列时, CDR残基的实际位置可以与上述预测的残基不同。

[0131] 框架或FR残基是除高变区残基之外的那些可变结构域残基。

[0132] 单克隆抗体是指从基本上同质的抗体群获得的抗体, 其中混合物中的所有抗体具有衍生自单个克隆的单个氨基酸序列。单克隆抗体通常是高度特异性的, 并且针对单个抗原位点或表位。相反, 多克隆抗体制剂通常包括针对相同或不同决定簇 (表位) 的具有不同氨基酸序列的抗体的混合物。除了其特异性之外, 单克隆抗体的优点在于其同源培养物中合成, 不受具有不同特异性和特征的其它免疫球蛋白的污染。

[0133] 如下所述, 本文设想的抗体, 包括本文所述的单克隆抗体、人类抗体、人源化抗体和其它抗体通常通过重组或通过体外或体内操纵遗传密码的其它方法产生, 并且因此不一定反映天然的特定抗体。

[0134] 单克隆抗体可以通过Kohler等人首次描述的杂交瘤方法制得 (《自然》, 256: 495-7, 1975) (Harlow&Lane;《抗体: 实验室手册》, 冷泉港实验室出版社: 纽约州冷泉港 (1988); Goding,《单克隆抗体: 原理与实践 (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)》, 第59-103页 (学术出版社 (Academic Press), 1986), 或可以通过重组DNA方法制备 (参见例如, 美国专利第4, 816, 567号)。单克隆抗体也可以使用例如Clackson等人 (《自然》352: 624-628, 1991) 和Marks等人 (《分子生物学杂志》222: 581-597, 1991) 中所述的技术从噬菌体抗体文库中分离。用于产生单克隆抗体的其它方法是所属领域普通技术人员所熟知的。

[0135] 通过常规免疫球蛋白纯化程序, 例如蛋白A-琼脂糖凝胶、疏水相互作用色谱 (HIC)、离子交换色谱、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析和/或亲和色谱适当地将单克隆抗体 (如通过上述方法产生的那些) 与培养基、腹水或血清分离。

[0136] IL-2抗体

[0137] 本发明涵盖使用编码靶特异性抗体的氨基酸分子。由噬菌体展示文库产生完全人类抗人类IL-2抗体。本文所述的IL-2抗体差异调节人类IL-2与不同IL-2受体链的相互作用。具体地说, 目标是鉴别能够预防或减少IL-2与IL-2R α 相互作用, 同时保持允许进行IL-2R β 和 γ c结合和信号传导的抗体。为了实现这一点, 使用经工程改造以表达人类IL-2受体链的不同组合的细胞构建新颖筛选方法, 以鉴别预测具有差异IL-2调节特性的抗配体抗体。使用基于流式细胞术的筛选, 基于抗体对IL-2限制或对工程化细胞系结合的允许性的影响对抗体进行分层。相关抗体也与IL-2复合, 并在功能测定中使用IL-2依赖性细胞系进行测试, 所述细胞系表达所有三种受体链或仅表达IL-2R β 和 γ c。体内测试证实, 在这些细胞系上具有不同活性模式的抗体介导对小鼠中T细胞亚群的不同影响。出人意料的是, 在体内优先刺激CD8⁺而非CD4⁺T细胞的最强差异的抗体具有受体结合允许的混合模式, 例如, 不完全阻断IL-2R α 结合的抗体引起体内治疗后T细胞的CD8⁺/CD4⁺比率高于完全阻断IL-2R α 结合的抗体。同样出人意料的是, 发现CD8⁺/CD4⁺T细胞中发生最大变化的抗体对IL-2R β γ 细胞中的信号传导具有较小程度的抑制。在肿瘤学模型中测试hIL-2与这些抗体的复合

物,单独和与其它免疫调节抗体组合,进一步验证了其作为免疫治疗剂的潜力。

[0138] 在一些实施例中,人类抗靶抗体的氨基酸序列包含图12中所示的抗体XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042或XPA.92.099的成熟(即缺失信号序列)轻链可变区(VL)的氨基酸序列的一个或多个CDR或SEQ ID NO:9、11、13或15或其变体,包括人源化抗体或本文所述的任何其它变体。在一些实施例中,VL包含从任何一种前述抗体的轻链的CDR1开始到CDR3末端的氨基酸序列。

[0139] 在一个实施例中,靶特异性抗体包含轻链CDR1、CDR2或CDR3(LCDR1、LCDR2、LCDR3),其中每一个独立地选自具有轻链可变区的抗体的CDR1、CDR2和CDR3区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:9、11、13或15中所示的VL区的氨基酸序列,编码SEQ ID NO:9、11、13或15中所示的VL区的核酸;或由编码SEQ ID NO:10、12、14或16中所示的VL区的核酸分子编码。

[0140] 在一些实施例中,人类抗靶抗体的氨基酸序列包含图12中所示的抗体XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042或XPA.92.099的成熟(即缺失信号序列)重链可变区(VH)的氨基酸序列的一个或多个CDR或SEQ ID NO:1、3、5或7或其变体,包括人源化抗体或本文所述的任何其它变体。在一些实施例中,VH包含从任何一种前述抗体的重链的CDR1开始到CDR3末端的氨基酸序列。

[0141] 在一个实施例中,靶特异性抗体包含重链CDR1、CDR2或CDR3(HCDR1、HCDR2、HCDR3),其中每一个独立地选自具有重链可变区的抗体的CDR1、CDR2和CDR3区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1、3、5或7中所示的VH区的氨基酸序列,编码SEQ ID NO:1、3、5或7中所示的VH区的核酸,或由编码SEQ ID NO:2、4、6或8中所示的VH区的核酸分子编码。

[0142] 靶特异性抗体的多肽可包含抗体的CDR1、CDR2和CDR3区,所述抗体包含选自由以下组成的组的VH区的氨基酸序列:XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042或XPA.92.099。

[0143] 在另一个实施例中,抗体包含如上公开的成熟轻链可变区和如上公开的成熟重链可变区,任选地如图12中所示配对。

[0144] 在示例性实施例中,本发明设想:单克隆抗体,其保留SEQ ID NO:17-40中任一个的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3中的任何一个、两个、三个、四个、五个或六个,其分别任选地包括任何此类CDR中的一个或两个突变(例如保守或非保守取代),并且任选地如图12中所示配对;多克隆抗体,其保留SEQ ID NO:17-28中任一个的所有HCDR1、HCDR2、HCDR3或重链可变区,任选地包括任何此类CDR中的一个或两个突变,任选地还包含任何合适的重链恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2或IgE、其人类序列或其杂合体;单克隆抗体,其保留任一个SEQ ID NO:29-40的所有LCDR1、LCDR2、LCDR3或轻链可变区,任选地包括任何此类CDR中的一个或两个突变,任选地还包含任何合适的轻链恒定区,例如 κ 或 λ 轻链恒定区、其人类序列或其杂合体。

[0145] 在一些实施例中,抗体包含所有三个轻链CDR、所有三个重链CDR或轻链和重链的所有六个CDR,如图12中所示配对。在一些示例性实施例中,来自抗体的两个轻链CDR可以与来自不同抗体的第三轻链CDR组合。或者,来自一种抗体的LCDR1可以与来自不同抗体的LCDR2以及来自又另一种抗体的LCDR3组合,特别是在CDR是高度同源的情况下。类似地,来自一种抗体的两个重链CDR可以与来自不同抗体的第三个重链CDR组合;或来自一种抗体的HCDR1可以与来自不同抗体的HCDR2和来自又另一种抗体的HCDR3组合,特别是在CDR是高度

同源的情况下。

[0146] 在一些实施例中,提供一种抗体,其包含具有以下多肽:与SEQ ID NO:1、3、5或7所示的重链可变区有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的氨基酸序列;和/或与SEQ ID NO:9、11、13或15所示的轻链可变区有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的氨基酸序列,所述抗体还包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3中的至少一个、两个、三个、四个、五个或全部。在一些实施例中,与轻链可变区具有百分比同一性的氨基酸序列可包含轻链CDR中的一个、两个或三个。在其它实施例中,与重链可变区具有百分比同一性的氨基酸序列可包含重链CDR中的一个、两个或三个。

[0147] 在另一个实施例中,提供一种抗体,其包含具有以下多肽:与图12中的抗体序列的重链可变区中的所有三个HCDR或SEQ ID NO:17-28中所示的CDR有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的氨基酸序列。

[0148] 在一个相关实施例中,提供一种抗体,其包含具有以下多肽:与图12中的抗体序列的轻链可变区中的所有三个LCDR或SEQ ID NO:29-40中所示的CDR有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的氨基酸序列。

[0149] 在另一实施例中,提供一种抗体,其包含具有以下多肽:与图12中的抗体序列的重链和轻链可变区中的所有六个CDR或SEQ ID NO:17-40中示出的CDR有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的氨基酸序列。

[0150] 设想本发明的抗体可在抗体的CDR区中具有一个、或两个或更多个氨基酸取代,例如非保守或保守取代。

[0151] 在一个相关实施例中,框架的残基被改变。可以改变的重链框架区位于围绕重链CDR残基的称为H-FR1、H-FR2、H-FR3和H-FR4的区域内,并且可以改变的轻链框架区的残基位于围绕轻链CDR残基的称为L-FR1、L-FR2、L-FR3和L-FR4的区域内。框架区内的氨基酸可以经例如人类框架或人类共有框架中所鉴别的任何合适的氨基酸置换。

[0152] XPA.92.019的重链和轻链氨基酸序列分别在SEQ ID NO:1和9中示出。XPA.92.041的重链和轻链氨基酸序列分别在SEQ ID NO:3和11中示出。XPA.92.042的重链和轻链氨基酸序列分别在SEQ ID NO:5和13中示出,并且XPA.92.099的重链和轻链氨基酸序列分别在SEQ ID NO:7和15中示出。

[0153] 在各个实施例中,当抗体与IL-2复合并注射到哺乳动物宿主中时,所述复合物引起CD8⁺ T细胞、NK细胞、NK T细胞、CD4⁺ T细胞、肿瘤反应性CD8⁺T细胞或肿瘤反应性CD4⁺ T细胞中的一种或多种扩增。

[0154] 在各个实施例中,本文所述的抗体诱导IL-2的构象变化,其影响受体亚基的使用或生物活性。

[0155] 进一步设想本发明的抗体可以用作所属领域熟知和本文所述的抗体的较小抗原

结合片段。

[0156] 抗体片段

[0157] 抗体片段包含完整全长抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fcab和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);多特异性抗体片段,如双特异性、三特异性等抗体(例如,双抗体、三抗体、四抗体);微抗体;螯合重组抗体;三链抗体或双链抗体;胞内抗体;纳米抗体;小模块化免疫药物(SMIP);结合域免疫球蛋白融合蛋白;骆驼化抗体;含VHH抗体;和由抗体片段形成的其它多肽。参见例如Holliger&Hudson,2005《自然生物技术(Nat.Biotech.)》23:1126-36;Eyer&Hruska,《兽医学(Veterinari Medicina)》57:439-513,2012。

[0158] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,呈由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段,每个结构域具有单个抗原结合位点;和残留的“Fc”片段,其名称反映了其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,呈包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段。“单链Fv”或“scFv”抗体片段包含通过接头肽连接的抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。优选地,Fv多肽还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得Fv能够形成用于抗原结合的所需结构,产生单链抗体(scFv),其中VL和VH区通过合成接头配对形成单价分子,使其能够制成单一蛋白质链(Bird等人,《科学》242:423-426,1988,和Huston等人,PNAS 85:5879-5883,1988)。关于scFv的综述,参见Pluckthun,《单克隆抗体的药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)》,第13卷,Rosenburg和Moore编,斯普林格出版社(Springer-Verlag),纽约,第269-315页(1994)。Fd片段由VH和CH1结构域组成。

[0159] 其它抗体片段包括结构域抗体(dAb)片段(Ward等人,《自然》341:544-546,1989),其由VH结构域组成。双抗体是二价抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用的接头太短而不允许在同一链上的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一个链的互补结构域配对,并产生两个抗原结合位点(参见例如EP 404,097;WO 93/11161;Holliger等人,PNAS 90:6444-6448,1993和Poljak等人,《结构(Structure)》2:1121-1123,1994)。双抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0160] 缺乏轻链的功能性重链抗体天然存在于护士鲨(nurse shark)(Greenberg等人,《自然》374:168-73,1995)、须鲨(wobbegong shark)(Nuttall等人,《分子免疫学(Mol Immunol.)》38:313-26,2001)和骆驼科(Hamers-Casterman等人,《自然》363:446-8,1993;Nguyen等人,《分子生物学杂志》275:413,1998),如骆驼、单峰骆驼、羊驼和大羊驼。在这些动物中,抗原结合位点被减少到单个结构域,VHH结构域。这些抗体仅使用重链可变区形成抗原结合区,即这些功能性抗体是仅具有结构H2L2的重链同二聚体(称为“重链抗体”或“HCAb”)。据报道,骆驼科动物VHH与含有铰链、CH2和CH3结构域且缺少CH1结构域的IgG2和IgG3恒定区重组(Hamers-Casterman等人,同上)。例如,美洲驼IgG1是常规(H2L2)抗体同种型,其中VH与含有铰链、CH1、CH2和CH3结构域的恒定区重组,而美洲驼IgG2和IgG3是缺乏CH1结构域并且不含轻链的仅有重链的同种型。已发现骆驼科动物VHH结构域以高亲和力结合抗原(Desmyter等人,《分子化学杂志(J.Biol.Chem.)》276:26285-90,2001)并且在溶液中具有高稳定性(Ewert等人,《生物化学(Biochemistry)》41:3628-36,2002)。经典的仅VH片段难以以可溶形式产生,但当框架残基变得更加类似VHH时,可以获得溶解度和特异性结

合的改善。(参见例如,Reichman等人,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》1999,231:25-38)。产生具有骆驼科重链的抗体的方法描述于例如美国专利公开号20050136049和20050037421中。

[0161] 抗体重链的可变结构域,分子量仅为15kDa的全功能抗原结合片段,被称为纳米抗体(Cortez-Retamozo等人,《癌症研究(Cancer Research)》64:2853-57,2004)。可如Conrath等人(《抗菌剂与化疗(Antimicrob Agents Chemother)》45:2807-12,2001)中所述,或使用Reverts等人,《生物治疗专家意见(Expert Opin.Biol.Ther.)》.5(1):111-24(2005)中所述的重组方法由免疫的单峰骆驼产生纳米抗体文库。

[0162] 双特异性Fab-scFv(“双链抗体”)和三特异性Fab-(scFv)(2)(“三链抗体”)的产生描述于Schoonjans等人(《免疫学杂志》165:7050-57,2000)和Willemms等人(《色谱法杂志B辑:生物医学与生命科学分析技术(J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.)》786:161-76,2003)中。对于双链抗体或三链抗体,scFv分子与VL-CL(L)和VH-CH1(Fd)链中的一个或两个融合,例如,以产生三链抗体,两个scFv与Fab的C末端融合,而在双链抗体中,一个cFv与Fab的C末端融合。另外的基于Fab的双特异性形式描述于Wu等人,mAbs 7:470-482,2015中。

[0163] 由通过肽接头(无铰链)或通过IgG铰链与CH3融合的scFv组成的“微抗体”描述于Olafsen等人,《蛋白质工程、设计与选择(Protein Eng Des Sel.)》17(4):315-23,2004中。

[0164] 胞内抗体是单链抗体,其展现出胞内表达并且可以操纵胞内蛋白质功能(Biocca等人,《欧洲分子生物学学会会刊(EMBO J.)》9:101-108,1990;Colby等人,PNAS.101:17616-21,2004)。包含保留胞内区域中的抗体构建体的细胞信号序列的胞内抗体可以如Mhashilkar等人(《欧洲分子生物学学会会刊》14:1542-51,1995)和Wheeler等人(《美国生物实验学学会联合会会刊(FASEB J.)》17:1733-5.2003)中所述产生。反式抗体是细胞可渗透的抗体,其中蛋白质转导结构域(PTD)与单链可变片段(scFv)抗体融合(Heng等人,《医学假说(Med Hypotheses.)》64:1105-8,2005)。

[0165] 进一步设想对靶蛋白有特异性的呈SMIP或结合域免疫球蛋白融合蛋白的抗体。这些构建体是单链多肽,其包含与实施抗体效应功能所需的免疫球蛋白结构域融合的抗原结合结构域。参见例如WO 03/041600、美国专利公开号20030133939和美国专利公开号20030118592。

[0166] 可以将一个或多个CDR共价或非共价地并入分子中以使其成为免疫粘附素。免疫粘附素可以并入CDR作为较大肽链的一部分,可以将CDR共价连接到另一条多肽链,或者可以非共价地并入CDR。CDR允许免疫粘附素特异性结合相关特定抗原。

[0167] 因此,包含抗体的重链可变区或轻链可变区的一个、两个和/或三个CDR(例如,单独或串联的单一CDR、2个、3个CDR或其它多个CDR重复、或单独或串联重复的2或3个CDR的组合;任选地,伴随CDR或重复之间的间隔区氨基酸序列)的多种组合物可以通过所属领域已知的技术产生。

[0168] 嵌合和人源化抗体

[0169] 由于嵌合或人源化抗体在人体中的免疫原性低于亲本非人类(例如小鼠)单克隆抗体,因此其可用于治疗人类,而且过敏反应的风险要小得多。

[0170] 可以使用所属领域已知的标准程序产生嵌合单克隆抗体,其中非人类(例如小鼠)

单克隆抗体的可变Ig结构域与人类恒定Ig结构域融合(参见Morrison等人,PNAS 81,6841-6855(1984);和Boulianne等人,《自然》312,643-646,(1984))。

[0171] 人源化抗体可通过多种方法实现,包括例如:(1)将非人类互补决定区(CDR)移植到人类框架和恒定区上(所属领域称为通过“CDR移植”人源化的过程),(2)移植整个非人类可变结构域,但通过置换表面残基将其“隐藏(cloaking)“在人类表面上(所属领域称为”饰面(veneering)“的过程),或者(3)在确定不可能对抗原结合或蛋白质折叠产生不利影响,但可能降低人类环境中的免疫原性的位置取代人类氨基酸(例如,人类工程化™(HUMAN ENGINEERING™))。在本发明中,人源化抗体将包括经“CDR-移植”、“人源化”、“饰面”和“人类工程化™”的抗体。这些方法公开在例如Jones等人,《自然》321:522-525(1986);Morrison等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.)》,81:6851-6855(1984);Morrison和Oi,《高等免疫学(Adv.Immunol.)》,44:65-92(1988);Verhoeyer等人,《科学》239:1534-1536(1988);Padlan,《分子免疫学》,28:489-498(1991);Padlan,《分子免疫学》,31:169-217(1994);Studnicka等人,美国专利第5,766,886号;Studnicka等人,《蛋白质工程化(Protein Engineering)》7:805-814,1994;Co等人,《免疫学杂志》152,2968-2976(1994);Riechmann等人,《自然》332:323-27(1988);和Kettleborough等人,《蛋白质工程化》4:773-783(1991),其中每一篇均通过引用并入本文。CDR移植技术在所属领域中是已知的,参见例如Riechmann等人,《自然》332:323-27(1988)。其它抗体人源化方法由Safdan等人,《生物技术与基因工程化综述(Biotech.Gen.Eng.Rev.)》29:175-86,2013综述。

[0172] 来自转基因动物的人类抗体

[0173] 还可以使用不具有内源免疫球蛋白产生的转基因动物产生针对靶蛋白的人类抗体,并将其改造成含有人类免疫球蛋白基因座。例如,WO 98/24893公开了具有人类Ig基因座的转基因动物,其中由于内源性重链和轻链基因座的失活,所述动物不产生功能性内源免疫球蛋白。WO 91/00906还公开了能够对免疫原产生免疫响应的转基因非灵长类动物哺乳动物宿主,其中所述抗体具有灵长类恒定区和/或可变区,并且其中内源免疫球蛋白编码基因座被取代或失活。WO 96/30498和美国专利第6,091,001号公开了Cre/Lox系统的用途,其用于修饰哺乳动物中免疫球蛋白基因座,如置换全部或部分恒定区或可变区以形成修饰的抗体分子。WO 94/02602公开了具有灭活的内源性Ig基因座和功能性人类Ig基因座的非人类哺乳动物宿主。美国专利第5,939,598号公开了制备转基因小鼠的方法,其中小鼠缺乏内源性重链,并表达包含一个或多个异种恒定区的外源免疫球蛋白基因座。还参见美国专利第6,114,598号、第6,657,103号和第6,833,268号;Green LL,《近期药物发现技术(Curr Drug Discovery Technol.)》,11(1),74-84,2014;Lee等人,《自然生物技术》,32:356-363,2014;Lee和Owen,《分子生物学中的方法(Methods Mol Biol.)》,901:137-48,2012。

[0174] 使用上述转基因动物,可以对选定的抗原分子产生免疫响应,并且可以从动物中除去产生抗体的细胞并用于产生分泌人类单克隆抗体的杂交瘤。免疫方案、佐剂等是所属领域已知的,并且用于例如如WO 96/33735中所述的转基因小鼠的免疫。所述出版物公开了对抗多种抗原分子的单克隆抗体,包括IL-6、IL-8、TNF α 、人类CD4、L选择蛋白、gp39和破伤风毒素。可以测试单克隆抗体抑制或中和相应蛋白质的生物学活性或生理学作用的能力。WO 96/33735公开了对抗IL-8的单克隆抗体,其衍生自用IL-8免疫的转基因小鼠的免疫细胞,阻断IL-8诱导的嗜中性粒细胞功能。在WO 96/34096和美国专利公开号20030194404;以

及美国专利公开号20030031667中也公开了对用于免疫转基因动物的抗原具有特异性的人类单克隆抗体。

[0175] 适用于制得单克隆抗体的其它转基因动物包括Medarex HuMAb-MOUSE®,其描述于美国专利第5,770,429号和Fishwild等人,《自然生物技术》14:845-851(1996)中,其含有来自未经重排的人类抗体基因的基因序列,其编码人类抗体的重链和轻链。HuMAb-MOUSE®的免疫能够产生针对靶蛋白的完全人类单克隆抗体。

[0176] 此外,Ishida等人《克隆干细胞(Cloning Stem Cells.)》4:91-102(2002)描述了TransChromo小鼠(TCMOUSE™),其包含兆碱基大小的人类DNA区段并且包含整个人类免疫球蛋白(hIg)基因座。TCMOUSE™具有完全多样化的hIg库,包括IgG的所有亚类(IgG1-G4)。用各种人类抗原免疫TCMOUSE™产生包含人类抗体的抗体响应。

[0177] 还参见Jakobovits等人,PNAS,90:2551(1993);Jakobovits等人,《自然》,362:255-258(1993);Bruggemann等人,《免疫年报(Year in Immunol.)》,7:33(1993);美国专利第5,591,669号;美国专利第5,589,369号;美国专利第5,545,807号;和美国专利公开号20020199213。美国专利公开号20030092125描述了用于将动物的免疫响应偏向所需表位的方法。人类抗体也可以通过体外活化的B细胞产生(参见美国专利第5,567,610号和第5,229,275号)。

[0178] 来自展示技术的人类抗体

[0179] 用于制得重组人类抗体基因库,以及在丝状噬菌体表面上展示编码的抗体片段的技术的发展已经提供了直接制得人类抗体的方法。通过噬菌体技术产生的抗体作为抗原结合片段(通常是scFv或Fab片段)在细菌中产生,因此缺乏效应功能。可以通过两种策略之一引入效应功能:可以将片段工程化为例如用于在哺乳动物细胞中表达的完整抗体,或具有能够触发效应功能的第二结合位点的双特异性抗体片段。

[0180] 举例来说,一种制备用于噬菌体展示技术的抗体文库的方法包括以下步骤:用靶抗原或其抗原部分免疫包含人类免疫球蛋白基因座的非人类动物以产生免疫响应,从免疫动物提取产生抗体的细胞;从提取的细胞中分离RNA,逆转录RNA以产生cDNA,使用引物扩增cDNA,并将cDNA插入噬菌体展示载体中,使得抗体在噬菌体上表达。可以以这种方式获得本发明的重组靶特异性抗体。

[0181] 在另一实例中,可以从未经免疫的动物中提取产生抗体的细胞,从提取的细胞中分离RNA并逆转录以产生cDNA,使用引物扩增cDNA,并插入噬菌体展示载体中,使得抗体在噬菌体上表达。噬菌体展示过程通过在丝状噬菌体表面上展示抗体库来模拟免疫选择,并随后通过其与所选抗原的结合来选择噬菌体。一种此类技术描述于WO 99/10494中,其描述了使用此类方法分离MPL和msk受体的高亲和力和功能性激动性抗体。可以通过筛选重组组合抗体文库,例如scFv或Fab噬菌体(使用由人类淋巴细胞衍生的mRNA制备的人类VL和VH cDNA制备)展示文库,来分离本发明的抗体。用于制备和筛选此类文库的方法是所属领域已知的。参见例如美国专利第5,969,108号。存在用于产生噬菌体展示文库的市售试剂盒(例如,法玛西亚(Pharmacia)重组噬菌体抗体系统,目录号27-9400-01;和Stratagene SurfZAP.TM。噬菌体展示试剂盒,目录号240612)。还有其它方法和试剂可用于产生和筛选抗体展示文库(参见例如,Ladner等人,美国专利第5,223,409号;Kang等人,PCT公开号WO 92/18619;Dower等人,PCT公开号WO 91/17271;Winter等人,PCT公开号WO 92/20791;

Markland等人,PCT公开号W0 92/15679;Breitling等人,PCT公开号W0 93/01288;McCafferty等人,PCT公开号W0 92/01047;Garrard等人,PCT公开号W0 92/09690;Fuchs等人(1991)《生物/技术(Bio/Technology)》9:1370-1372;Hay等人(1992)《(人类抗体与杂交瘤(Hum.Antibod.Hybridomas)》3:81-85;Huse等人(1989)《科学》246:1275-1281;McCafferty等人,《自然》(1990)348:552-554;Griffiths等人(1993)EMBO J 12:725-734;Hawkins等人(1992)《分子生物学杂志》226:889-896;Clackson等人(1991)自然》352:624-628;Gram等人(1992)PNAS 89:3576-3580;Garrad等人(1991)《生物/技术》9:1373-1377;Hoogenboom等人,(1991)《核酸研究(Nuc Acid Res)》19:4133-4137;和Barbas等人,(1991)PNAS 88:7978-7982;以及Omidfar&Daneshpour,《药物发现专家意见(Exp.Op.Drug Disc.)》10:651-669,2015。

[0182] 在一个实施例中,为了分离具有所需特征的对靶抗原具有特异性的人类抗体,筛选人类VH和VL文库以选择具有所需特异性的抗体片段。这一方法中所用的抗体文库可以是如本文和所属领域所述制备和筛选的scFv文库(McCafferty等人,PCT公开号W0 92/01047,McCafferty等人,《自然》348:552-554(1990));和Griffiths等人,(EMBO J 12:725-734(1993))。优选使用靶蛋白作为抗原筛选抗体文库。

[0183] 或者,通过PCR分开克隆抗体的Fd片段(VH-CH1)和轻链(VL-CL),并在组合噬菌体展示文库中随机重组,然后可以选择其与特定抗原结合。Fab片段在噬菌体表面上表达,即与编码其的基因物理连接。因此,通过抗原结合选择Fab共同选择Fab编码序列,其随后可以扩增。通过数轮抗原结合和再扩增(称为淘选的程序),富集并最终分离对抗原有特异性的Fab。

[0184] 1994年,描述了一种称为“引导选择(guided selection)”的抗体人源化方法。引导选择利用噬菌体展示技术的能力用于小鼠单克隆抗体的人源化(参见Jespers,L.S.等人,《生物/技术》12,899-903(1994))。为此,可以将小鼠单克隆抗体的Fd片段与人类轻链文库组合展示,然后用抗原选择所得杂合Fab文库。因此,小鼠Fd片段提供了引导选择的模板。随后,将所选人类轻链与人类Fd片段文库组合。所得文库的选择完全产生人类Fab。

[0185] 已经描述了从噬菌体展示文库中获得人类抗体的各种程序(参见例如,Hoogenboom等人,《分子生物学杂志》,227:381(1991);Marks等人,《分子生物学杂志》,222:581-597(1991);美国专利第5,565,332号和第5,573,905号;Clackson,T.和Wells,J.A.,TIBTECH 12,173-184(1994))。特别地,源自噬菌体展示文库的抗体的体外选择和进化已成为强有力的工具(参见Burton,D.R.和Barbas III,C.F.,《高等免疫学》57,191-280(1994);Winter,G.等人,《免疫学年评》12,433-455(1994);美国专利公开号20020004215和W0 92/01047;美国专利公开号20030190317;和美国专利第6,054,287号和第5,877,293号)。

[0186] 通过表达为噬菌体蛋白融合物(例如,与M13基因III)的一条链与表达为可溶性片段的互补链的结合,将Fv片段展示在噬菌体的表面上。设想噬菌体可以是丝状噬菌体,如I类噬菌体:fd、M13、f1、If1、lke、ZJ/Z、Ff之一和II类噬菌体Xf、Pf1和Pf3之一。噬菌体可以是M13或fd或其衍生物。

[0187] 选择了初始的人类VL和VH区段后,“混合和匹配”实验,其中筛选所选VL和VH区段的不同配对以进行靶结合,以选择优选的VL/VH对组合(参见例如,Kang等人,PNAS 88:11120-11123,(1991))。另外,为了进一步改善抗体的质量,优选的VL/VH对的VL和VH区段可

以随机突变,优选在VH和/或VL的任何CDR1、CDR2或CDR3区域内,在类似于体内体细胞突变过程的过程中进行,所述过程负责在天然免疫反应期间抗体的亲和力成熟。这种体外亲和力成熟可以通过使用分别与VH CDR1、CDR2和CDR3或VL CDR1、CDR2和CDR3互补的PCR引物扩增VL和VH区域来完成,所述引物已经用某些位置处的四个核苷酸碱基的随机混合物“掺入(spiked)”,使得所得PCR产物编码VL和VH区段,其中随机突变已被引入VH和/或VL CDR3区。可以重新筛选这些随机突变的VL和VH区段以结合靶抗原。

[0188] 在从重组免疫球蛋白展示文库中筛选和分离靶特异性抗体后,可以从展示包装中(例如,从噬菌体基因组中)回收编码所选抗体的核酸,并通过标准重组DNA技术将其亚克隆到其它表达载体中。如果需要,可以进一步操作核酸以产生本发明的其它抗体形式,如下所述。为了表达通过筛选组合文库分离的重组人类抗体,将编码抗体的DNA克隆到重组表达载体中并引入哺乳动物宿主细胞中,如本文所述。

[0189] 设想噬菌体展示方法可以在细菌或宿主细胞的突变菌株中进行。突变菌株是具有遗传缺陷的宿主细胞,所述遗传缺陷使得在其内复制的DNA相对于其亲本DNA发生突变。实例突变菌株是NR9046mutD5和NR9046mut T1。

[0190] 还设想噬菌体展示方法可以使用辅助噬菌体进行。这是一种用于感染含有缺陷噬菌体基因组的细胞的噬菌体,其功能是弥补缺陷。有缺陷的噬菌体基因组可以是噬菌粒或噬菌体,其中一些功能编码基因序列被去除。辅助噬菌体的实例是M13K07、M13K07基因III 3号;和展示或编码与衣壳蛋白融合的结合分子的噬菌体。

[0191] 使用如W0 92/01047中公开的分级双组合方法通过噬菌体展示筛选方法产生抗体,其中含有H或L链克隆的单个菌落用于感染编码另一条链(L或H)的完整克隆文库,并且所得双链特异性结合成员根据噬菌体展示技术,如其中所述的那些技术进行选择。所述技术也在Marks等人,《生物/技术》,10:779-783(1992)中公开。

[0192] 用于在酵母、微生物和哺乳动物细胞表面上展示肽的方法也已用于鉴别抗原特异性抗体。参见例如,美国专利第5,348,867号;第5,723,287号;第6,699,658号;Wittrup,《生物技术新见(Curr Op.Biotech)》,12:395-99(2001);Lee等人,《生物技术趋势(Trends in Biotech.)》21(1)45-52(2003);Surgeeva等人,《先进药物递送评论(Adv Drug Deliv.Rev.)》58:1622-54(2006)。抗体文库可以附接于酵母蛋白,如凝集素,有效地模拟免疫系统中B细胞对抗体的细胞表面展示。

[0193] 除噬菌体展示方法外,还可以使用体外展示方法和微生物细胞展示分离抗体,包括核糖体展示和mRNA展示(Amstutz等人,《生物技术新见》.12:400-05(2001))。使用核糖体展示的多肽的选择描述于Hanes等人,(PNAS,94:4937-4942(1997))和授予Kawasaki的美国专利第5,643,768号和第5,658,754号中。核糖体展示也适用于抗体的快速大规模突变分析。选择性诱变方法还提供了产生具有改善的活性的抗体的方法,其可以使用核糖体展示技术进行选择。

[0194] 氨基酸序列变异体

[0195] 可以产生包含抗体的一个、两个、三个、四个、五个和/或六个CDR的经修饰的多肽组合物,其中改变CDR以提供对靶分子的增加的特异性或亲和力。抗体CDR中的位点通常是经连续修饰,例如,通过首先用保守选择取代(例如,疏水氨基酸取代不同的疏水性氨基酸),然后用更多不同的选择取代(例如,疏水性氨基酸取代带电荷的氨基酸),然后可以在

靶位点进行缺失或插入。例如,使用围绕CDR的保守框架序列,产生与这些共有序列互补的PCR引物,以扩增位于引物区之间的抗原特异性CDR序列。用于克隆和表达核苷酸和多肽序列的技术在所属领域中是公认的[参见例如Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第2版,纽约州冷泉港(1989)]。将扩增的CDR序列接合到合适的质粒中。包含一个、两个、三个、四个、五个和/或六个克隆CDR的质粒任选地含有与CDR连接的其它多肽编码区。

[0196] 可以通过下文更详细描述保守或非保守氨基酸取代进行修饰。“插入”或“缺失”优选在约1到20个氨基酸,更优选1到10个氨基酸范围内。可以通过使用重组DNA技术在抗体多肽分子中系统地进行氨基酸取代并测定所得重组变异体的活性来引入变异。可以在不同物种在核酸方面不同的位点(可变位置)处或在高度保守区(恒定区)中进行核酸改变。所属领域描述了用于改变抗体序列和表达适用于本发明的抗体多肽组合物的方法。参见例如美国专利第8,569,462号。另一种变异体是氨基酸取代变异体。这些变异体在抗体分子中除去至少一个氨基酸残基,并在其位置插入不同的残基。设想高变区或CDR区或框架区中任一个内的置换诱变。保守取代涉及用同类中的另一成员置换氨基酸。非保守取代涉及用另一类的成员置换这些类别中的一种的成员。

[0197] 基于所涉及残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性进行保守氨基酸取代。例如,非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸(Ala,A)、亮氨酸(Leu,L)、异亮氨酸(Ile,I)、缬氨酸(Val,V)、脯氨酸(Pro,P)、苯丙氨酸(Phe,F)、色氨酸(Trp,W)和蛋氨酸(Met,M);极性中性氨基酸包括甘氨酸(Gly,G)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、半胱氨酸(Cys,C)、酪氨酸(Tyr,Y)、天冬酰胺(Asn,N)和谷氨酰胺(Gln,Q);带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸(Arg,R)、赖氨酸(Lys,K)和组氨酸(His,H);带负电的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E)。

[0198] 未参与维持抗体正确构象的任何半胱氨酸残基也可以被取代,通常经丝氨酸取代,以改善分子的氧化稳定性并防止发生异常交联。相反,可以将半胱氨酸键添加到抗体中以改善其稳定性(特别是当抗体是抗体片段,如Fv片段的情况下)。

[0199] 改变糖基化

[0200] 还可以产生相对于亲本抗体具有经修饰的糖基化模式的抗体变异体,例如,缺失抗体中发现的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0201] 抗体的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链衔接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链酶促衔接的识别序列。多肽中这些三肽序列中任一种的存在产生了潜在的糖基化位点。因此,可以通过改变氨基酸序列,将N-连接的糖基化位点添加到抗体中,使得其含有这些三肽序列中的一种或多种。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种与羟基氨基酸的衔接,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基插入或取代原始抗体的序列,可以将O-连接的糖基化位点添加到抗体中。

[0202] Fc聚糖影响IgG与Fc受体和C1q的结合,并且因此对IgG效应功能至关重要。可以产生具有经修饰的Fc聚糖和改变的效应功能的抗体变异体。例如,具有经修饰的末端糖(如唾

液酸、核心岩藻糖、二等分N-乙酰葡糖胺和甘露糖残基)的抗体可具有改变的与Fc γ RIIIa受体的结合和改变的ADCC活性。在另一个实例中,具有经修饰的末端半乳糖残基的抗体可以具有改变的与C1q的结合和改变的CDC活性(Raju,《免疫学新见(Curr.Opin.Immunol.)》20:471-78,2008)。

[0203] 还设想在所述方法中使用的是具有不存在或减少的岩藻糖基化的抗体分子,其展现出改善的ADCC活性。在所属领域中已知多种方式来实现此目的。参见,例如,Yamane-Ohnuki等人,《生物技术与生物工程(Biotechnol Bioeng.)》87:614-22(2004);Rothman等人,《分子免疫学》26:1113-23(1989);Shields等人,《生物化学杂志(J Biol Chem.)》277:26733-40(2002);Shinkawa等人,《生物化学杂志》278:3466-73(2003);Umana等人,《自然生物技术》17:176-80(1999);Ferrara等人,《生物技术与生物工程》93:851-61(2006)。抗体的糖基化和方法综述于Niewa和Sato,《药理学科学杂志(J.Pharmaceutical Sciences)》104:930-41,(2015)中。

[0204] 具有改变的效应功能的变异体

[0205] 设想用于所述方法的抗体的其它修饰。在一个方面,可能需要在效应功能方面修饰本文使用的抗体,例如以增强抗体在治疗癌症方面的有效性。一种用于修饰效应功能的方法教导了可以在Fc区中引入半胱氨酸残基,从而允许在所述区域中形成链间二硫键。由此产生的同型二聚体抗体可具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。参见Caron等人,《实验医学杂志(J.Exp Med.)》176:1191-1195(1992)和Shopes,B《免疫学杂志》148:2918-2922(1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体也可以使用异双官能交联剂制备,如Wolff等人,《癌症研究》53:2560-2565(1993)中所述。或者,可以工程化抗体,其具有两个Fc区并由此可以具有增强的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson等人,《抗癌药物设计(Anti-Cancer Drug Design)》3:219-230(1989)。

[0206] 在本发明的某些实施例中,例如可能需要使用抗体片段而非完整抗体来增加治疗功效。在这种情况下,可能需要修饰抗体片段以增加其血清半衰期,例如,将如PEG或其它水溶性聚合物(包括多醣聚合物)的分子添加到抗体片段中以增加半衰期。

[0207] 如本文所用,术语“补救受体结合表位”是指IgG分子(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区的表位,其负责增加IgG分子的体内血清半衰期。补救受体结合表位优选构成其中来自Fc结构域的一个或两个环的任何一个或多个氨基酸残基被转移到抗体片段的类似位置的区域。在一个实施例中,转移来自Fc结构域的一个或两个环的三个或更多个残基。在另一个实施例中,表位取自(例如IgG的)Fc区的CH2结构域,并转移到抗体的CH1、CH3或VH区,或多于一个此类区域。或者,表位取自Fc区的CH2结构域并转移到抗体片段的CL区或VL区或这两者。

[0208] 本发明的抗体可以包含人类Fc部分,人类共有Fc部分或其变异体,其保留与Fc补救受体相互作用的能力[参见例如,Sarmay等人,《分子免疫学》29:633-9(1992)]。

[0209] Shields等人报道了参与结合所有人类Fc受体的IgG1残基位于铰链近端的CH2结构域,并且分为如下两类:1)可与所有FcR直接相互作用的位置,其包括Leu234-Pro238、Ala327和Pro329(并且可能是Asp265);2)影响碳水化合物性质或位置的位置,其包括Asp265和Asn297。影响与Fc受体II结合的其它IgG1残基如下:(最大作用)Arg255、Thr256、

Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298和(较低作用)His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378和Lys414。A327Q、A327S、P329A、D265A和D270A降低了结合。减少与Fc受体IIIA结合的另外的IgG1残基是所属领域已知的。另见Presta等人,《生物化学学会学报(Biochem.Soc.Trans.)》30:487-490,2001)和美国专利第6,194,551号、第6,737,056号、第5,624,821号和美国专利公开号20040132101,其全部内容通过引用并入本文。

[0210] 共价修饰

[0211] 还设想将包含共价修饰的抗体用于所述方法中。如果适用,其可以通过化学合成或通过抗体的酶促或化学切割来制得。通过使抗体的靶向氨基酸残基与能够与所选的侧链或N-或C-末端残基反应的有机衍生剂反应,将抗体的其它类型的共价修饰引入分子中。

[0212] 半胱氨酰残基最常与 α -卤代乙酸盐(和相应的胺),如氯乙酸或氯乙酰胺反应,得到羧甲基或羧酰胺甲基衍生物。半胱氨酰残基也通过与溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基)丙酸、磷酸氯乙酰胺、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡啶基二硫化物、对氯汞基苯甲酸盐、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑反应来衍生。

[0213] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的组氨酰基、赖氨酰基精氨酰基、酪氨酰基、谷氨酰胺基和天冬酰胺基羟基化。制备所述修饰的方法公开在美国专利第8,926,976号中,所述专利通过引用并入本文。

[0214] 通过与碳二亚胺(RN.dbd.C.dbd.N-R')反应选择性地修饰羧基侧基(天冬氨酰基或谷氨酰基),其中R和R'是不同的烷基,如1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或1-乙基-3-(4-氮杂-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,天冬氨酰基和谷氨酰基残基通过与铵离子反应转化为天冬酰胺酰基和谷氨酰胺基残基。

[0215] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化;丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化;赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E.Creighton,《蛋白质:结构和分子特性(Proteins:Structure and Molecular Properties)》,W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman&Co.),旧金山,第79-86页(1983));N-末端胺的乙酰化和任何C-末端羧基的酰胺化。

[0216] 另一种类型的共价修饰涉及将糖苷化学或酶促偶联到抗体。这些程序是有利的,因为其不需要在具有N-或O-连接糖基化的糖基化能力的宿主细胞中产生抗体。取决于所用的偶联模式,糖可以附接到(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基,(c)游离巯基,如半胱氨酸的巯基,(d)游离羟基,如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基,(e)芳香族残基,如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳香族残基,或(f)谷氨酰胺的酰胺基。这些方法描述于W0 87/05330和Aplin和Wriston,《CRC生物化学重要评论(CRC Crit.Rev.Biochem.)》,第259-306(1981))。

[0217] 去除抗体上存在的任何碳水化合物部分可以通过化学或酶促方式完成。化学去糖基化需要将抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物。所述处理引起除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)外的大多数或所有糖的裂解,同时保持抗体完整。Hakimuddin等人(生物化学与生物物理学集刊《Arch.Biochem.Biophys.》259:52(1987))和Edge等人,《分析生物化学(Anal.Biochem.》118:131(1981))描述了化学去糖基化。抗体上碳水化合

物部分的酶促切割可以通过使用多种内切和外切糖苷酶来实现,如Thotakura等人(《酶学方法(Meth.Enzymol.)》138:350(1987))所述。

[0218] 抗体的另一种类型的共价修饰包含将抗体与多种非蛋白质聚合物中的一种连接,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、聚氧乙烯化山梨糖醇、聚氧乙烯化葡萄糖、聚氧乙烯化甘油、聚氧化烯或多糖聚合物(如葡聚糖)。所述方法在所属领域中是已知的。

[0219] 衍生物

[0220] 如上所述,当结合抗体物质和多肽使用时,衍生物是指通过如泛素化;与治疗或诊断剂结合;标记(例如,用放射性核素或各种酶);共价聚合物附接,如PEG化(用聚乙二醇衍生化)和利用化学合成氨基酸(如鸟氨酸)的插入或取代的技术化学修饰的多肽。本文公开的抗体的衍生物也适用作治疗剂,并可用于本文方法中。

[0221] 结合部分可以共价地或通过离子、范德华力(van der Waals)或氢键并入抗体物质中或与抗体物质附接,例如并入放射性核苷酸或链霉亲和素识别的生物素化核苷酸。

[0222] 抗体可以通过柔性接头,例如(Gly₄Ser)₃与IL-2或其变异体共价附接。参见例如Tomala等人,《(ACS Chemical Biology)》8,871-876(2013)。

[0223] 聚乙二醇(PEG)可以与抗体物质附接,以提供更长的体内半衰期。PEG基团可以具有任何适宜的分子量并且可以是直链或支链的。PEG的平均分子量优选为约2千道尔顿(“kDa”)到约100kDa,更优选约5kDa到约50kDa,最优选约5kDa到约10kDa。PEG基团将通过PEG部分上的天然或工程化反应性基团(例如,醛基、氨基、硫醇基或酯基)酰化或还原性烷基化到抗体物质上的反应性基团(例如,醛、氨基或酯基)来附接到本发明的抗体物质。可以使用所属领域熟知的技术进行向抗体物质添加PEG部分。参见例如,国际公开号WO 96/11953和美国专利第4,179,337号。

[0224] 抗体物质与PEG的连接通常在水相中进行,并且可以通过逆相分析型HPLC容易地监测。通过制备型HPLC纯化PEG化物质,并通过分析型HPLC,氨基酸分析和激光解吸质谱法表征。

[0225] 抗体结合物

[0226] 抗体可以以其“裸露”或未结合的形式给予,或者直接结合到其它治疗剂或诊断剂,或者可以间接结合到包含此类其它治疗剂或诊断剂的载体聚合物。

[0227] 通过使用放射性同位素、亲和标记(如生物素、抗生物素蛋白等)、酶标记(如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶等)荧光或发光或生物发光标记(如FITC或罗丹明(rhodamine))、顺磁原子等可以可检测方式标记抗体。完成这种标记的程序在所属领域中是熟知的;例如参见(Sternberger,L.A.等人,《组织化学与细胞化学杂志(J.Histochem.Cytochem.)》18:315(1970);Bayer,E.A.等人,《酶学方法》62:308(1979);Engval,E.等人,《免疫》109:129(1972);Goding,J.W.《免疫学方法杂志(J.Immunol.Meth.)》13:215(1976))。

[0228] 抗体部分的结合描述于美国专利第6,306,393号中。一般技术也描述于Shih等人,《国际癌症期刊(Int.J.Cancer)》41:832-839(1988);Shih等人,《国际癌症期刊》46:1101-1106(1990);和Shih等人,美国专利第5,057,313号中。所述一般方法涉及使具有氧化碳化合物部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能团并载有多种药物、毒素、螯合剂、硼加合物或其它治疗剂的载体聚合物反应。这一反应产生初始希夫碱(Schiff base)(亚胺)键,其可通过还原成仲胺来稳定以形成最终结合物。

[0229] 载体聚合物可以是例如具有至少50个氨基酸残基的氨基葡聚糖或多肽。用于将药物或另一种药剂与载体聚合物结合的各种技术是所属领域已知的。可以使用多肽载体代替氨基葡聚糖,但多肽载体在链中应具有至少50个氨基酸残基,优选100-5000个氨基酸残基。氨基酸中的至少一些应为赖氨酸残基或谷氨酸或天冬氨酸残基。赖氨酸残基的侧链胺以及谷氨酰胺和天冬氨酸的侧链羧酸盐适于附接药物、免疫调节剂、螯合剂、硼加成物或其它治疗剂。合适的多肽载体的实例包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、其共聚物以及这些氨基酸和其它氨基酸(例如丝氨酸)的混合聚合物,以在所得负载的载体和结合物上赋予所需的溶解性。可以结合抗体的药剂的实例包括本文所述的细胞毒性剂或化学治疗剂中的任一种。

[0230] 或者,可以通过将抗体组分与治疗剂直接结合来制备结合抗体。除了治疗剂直接附接于氧化抗体组分外,一般程序与间接结合方法类似。例如,抗体的碳水化合物部分可以附接到聚乙二醇以延长半衰期。

[0231] 或者,治疗剂可以通过二硫键形成,或使用异双功能交联剂,如N-琥珀酰基-3-(2-吡啶基二巯基)丙酸酯(SPDP)附接在还原的抗体组分的铰链区。Yu等人,《国际癌症期刊》56:244(1994)。用于此类结合的一般技术在所属领域中是熟知的。参见例如,Wong,《蛋白质结合和交联化学(Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking)》(CRC出版社1991);Upeslakis等人,“通过化学方法修饰抗体(Modification of Antibodies by Chemical Methods)”,《单克隆抗体:原理和应用(Monoclonal Antibodies:Principles and Applications)》,Birch等人(编),第187-230页(Wiley-Liss公司1995);Price,“合成肽衍生抗体的制造和表征(Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies)”,《单克隆抗体:制造、工程化和临床应用(Monoclonal Antibodies: Production,Engineering and Clinical Application)》,Ritter等人(编),第60-84页(剑桥大学出版社(Cambridge University Press)1995)。所属领域已知多种双功能蛋白偶联剂,如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二巯基)丙酸酯(SPDP)、亚氨基四氢噻吩(iminothiolane;IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(例如己二酰亚胺酸二甲酯HCL)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双叠氮基化合物(如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(如双(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0232] 抗体的重组产生

[0233] 编码本文所述抗体的DNA可以使用常规方法分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。这通常需要克隆DNA,或优选地,克隆编码抗体的mRNA(即cDNA)。使用标准技术进行克隆和测序,例如聚合酶链式反应(PCR), (参见例如Sambrook等人(1989)《分子克隆实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Guide)》,第1-3卷,冷泉港出版社;Ausubel等人(编),《分子生物学方案(Protocols in Molecular Biology)》,约翰威利父子公司(John Wiley&Sons)(1994),其通过引用并入本文)。

[0234] 使用标准技术进行测序(参见例如Sambrook等人(1989)《分子克隆实验指南》,第1-3卷,冷泉港出版社;和Sanger,F.等人(1977)PNAS 74:5463-5467,其通过引用并入本文)。通过比较所克隆的核酸的序列与所公开的人类免疫球蛋白基因和cDNA的序列,技术人

员将能够根据所测序区容易地确定 (i) 免疫球蛋白多肽 (包括重链的同种型) 的种系片段用途 (ii) 重链和/或轻链可变区的序列, 包括由N-区添加和体细胞突变过程产生的序列。免疫球蛋白基因序列信息的一个来源是马里兰州贝塞斯达的美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information)、美国国家医学图书馆 (National Library of Medicine)、美国国家卫生研究院。

[0235] 分离后, 可将DNA置于表达载体中, 然后将其转染到宿主细胞中, 如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、人类胚肾293细胞 (例如293E细胞)、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 或者不以其它方式产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞, 以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成体。抗体的重组产生是所属领域中熟知的。

[0236] 为了重组产生抗体, 分离编码其的核酸并插入可复制的载体中以进一步克隆 (扩增DNA) 或用于表达。编码单克隆抗体的DNA易于使用常规程序分离和测序 (例如, 通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。有很多载体可供使用。载体组分通常包括但不限于以下中的一种或多种: 信号序列、复制起点、一种或多种选择标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列, 其在所属领域中已知并有所描述。

[0237] 在各个实施例中, SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14或16中所示的核苷酸序列适用于表达本文的抗体或其片段。

[0238] 在一些实施例中, 不同的核酸分子编码靶特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。在其它实施例中, 相同的核酸分子编码靶特异性抗体的重链和轻链可变区。在一个实施例中, 核酸编码本发明的靶特异性抗体, 以及由本文所述的核酸编码的任何多肽。

[0239] 在一个方面, 本发明的核酸分子包含编码SEQ ID NO:9、11、13或15中示出的抗体XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042和XPA.92.099的VL氨基酸序列的核苷酸序列或其一部分。在相关方面, VL氨基酸序列是共有序列。在一些实施例中, 核酸编码所述抗体的轻链CDR的氨基酸序列。在一些实施例中, 所述部分是包含CDR1-CDR3的连续部分。在一个实施例中, 所述部分包含轻链CDR1、CDR2或CDR3区中的至少一个、两个或三个, 任选地具有不同的人类或人类共有框架, 并且任选地, 在总共3个CDR中具有1个、或最多2个、或最多3个突变。

[0240] 在一个实施例中, 本发明提供了抗原结合化合物, 包括功能片段, 其具有SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13或15中任一个所示的可变区氨基酸序列。在一个相关实施例中, 前述抗原结合化合物选自由以下组成的组: 完全组装的四聚体抗体、单克隆抗体、人源化抗体; 人类抗体; 嵌合抗体; 多特异性抗体、抗体片段, Fab、F(ab')₂; FV; scFv或单链抗体片段; 双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、线性抗体; 螯合重组抗体、三链抗体或双链抗体、胞内抗体、纳米抗体, 小模块化免疫药物 (SMIP)、结合域免疫球蛋白融合蛋白、骆驼化抗体、含VHH抗体或这些抗体中的任何一种的变体或衍生物, 其包含本发明的一个或多个CDR序列并展现出所需的生物学活性; 或两种或更多种抗体的混合物。本发明的抗原结合化合物优选保留 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} M或更低的IL-2结合亲和力, 如通过表面等离子体共振测量。

[0241] 在一个方面, 本发明的抗体包含重链可变区或轻链可变区, 如氨基酸序列SEQ ID NO:1、3、5或7和SEQ ID NO:9、11、13或15中分别所示, 如图12中所配对。进一步设想抗体可包含上述氨基酸序列中示出的抗体的全部或部分。在一个实施例中, 抗体包含SEQ ID NO:17-28的重链的CDR1、CDR2或CDR3中的至少一个, 或SEQ ID NO:29-40的轻链的CDR1、CDR2或CDR3中的至少一个, 如图12中所配对。

[0242] 在一个实施例中,重链包含鉴别为重链CDR3序列的氨基酸序列。此类“重链CDR3序列”(HCDR3)包括鉴别为图12和SEQ ID NO:19、22、25或28中所示的重链CDR3序列的氨基酸序列。或者,与图12中鉴别的任何HCDR3氨基酸序列相比,HCDR3序列包含含有一个或多个氨基酸变化(例如,取代、插入或缺失)的氨基酸序列。优选的取代包括在图12的另一个HCDR3内的相应位置上的氨基酸取代。或者,HCDR3序列可包含HCDR3的共有氨基酸序列,如根据本文所示序列所确定。

[0243] 包含上述HCDR3序列的重链还可以包含“重链CDR1序列”(HCDR1),其包括在SEQ ID NO:17、20、23或26或图12中鉴别为HCDR1的任何氨基酸序列,与SEQ ID NO:17、20、23或26或图12中鉴别的任何HCDR1相比,含有一个或多个氨基酸变化,优选在图12的另一个HCDR1内的相应位置上的氨基酸取代的氨基酸序列,或本文所述的HCDR1的共有序列。

[0244] 或者,包含上述HCDR3序列的重链还可以包含“重链CDR2序列”(HCDR2),其包括在SEQ ID NO:18、21、24或27或图12中鉴别为HCDR2的任何氨基酸序列,与SEQ ID NO:18、21、24或27或图12中鉴别的任何HCDR2相比,含有一个或多个氨基酸变化,优选在图12的另一个HCDR2内的相应位置上的氨基酸取代的氨基酸序列,或本文所述的HCDR2的共有序列。

[0245] 包含上述重链CDR3序列的重链还可以包含(a)上述重链CDR1序列和(b)上述本发明的重链CDR2序列。

[0246] 本发明的一个方面提供一种结合靶抗原的包含重链的抗体,所述重链包含下文所述的重链CDR序列中的任何一个、两个和/或三个。

[0247] 上述任何重链CDR序列还可包括添加到CDR任一末端的氨基酸。本文进一步详细描述本发明的抗体和抗原结合化合物的变异体和衍生物的制备,包括含有氨基酸类似物的变异体或衍生物的亲和力成熟或制备。示例性变异体包括含有氨基酸序列内相应氨基酸的保守或非保守取代,或用不同人类抗体序列的相应氨基酸取代氨基酸的变异体。

[0248] 包含上述任何一条重链的抗体还可以包含轻链,优选结合靶抗原的轻链,最优选包含下述轻链CDR序列的轻链。

[0249] 本发明的另一方面提供一种结合靶抗原的包含轻链的抗体,所述轻链包含下文所述的轻链CDR序列中的任何一个、两个和/或三个。

[0250] 优选地,轻链包含被鉴别为轻链CDR3序列的氨基酸序列。此类“轻链CDR3序列”(LCDR3)包括在图12和SEQ ID NO:31、34、37或40中被鉴别为轻链CDR3序列的氨基酸序列。或者,与图12中鉴别的任何轻链CDR3氨基酸序列相比,轻链CDR3序列包含含有一个或多个氨基酸变化(例如,取代、插入或缺失)的氨基酸序列。优选的取代包括在图12的另一轻链CDR3内的相应位置上的氨基酸取代。

[0251] 包含上述轻链CDR3序列的轻链还可以包含“轻链CDR1序列”,其包括在SEQ ID NO:29、32、35或38或图12中鉴别为轻链CDR1的任何氨基酸序列,与SEQ ID NO:29、32、35或38或图12中鉴别的任何轻链CDR1相比,含有一个或多个氨基酸变化,优选在图12的另一个轻链CDR1内的相应位置上的氨基酸取代的氨基酸序列。

[0252] 或者,包含上述轻链CDR3序列的轻链还可以包含“轻链CDR2序列”,其包括在SEQ ID NO:30、33、36或39或图12中鉴别为轻链CDR2的任何氨基酸序列,与图12中鉴别的任何轻链CDR2相比,含有一个或多个氨基酸变化,优选SEQ ID NO:30、33、36或39或图12的另一轻链CDR2内的相应位置上的氨基酸取代的氨基酸序列。

[0253] 在相关方面,本发明设想一种纯化的多肽,其包含SEQ ID NO:17-28的至少一个HCDR,或SEQ ID NO:29-40的至少一个LCDR,其中重链可变区的框架区和轻链可变区的框架区包含来自人类抗体的框架区。在另一个实施例中,重链可变区的框架区和轻链可变区的框架区通过氨基酸取代化学改变,以与不同的人类抗体序列更具同源性。例如,在每个重链框架区(H-FR1-4)内,设想重链可变区的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个天然框架区残基通过氨基酸取代改变,并且其中在每个轻链框架区(L-FR1-4)内,轻链可变区的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个天然框架残基通过氨基酸取代改变。

[0254] 包含上述轻链CDR3序列的轻链还可以包含(a)上述轻链CDR1序列和(b)上述轻链CDR2序列。

[0255] 包含上述任何一个轻链可变区的抗体还可以包含重链可变区,任选地如图12中所述配对,优选结合靶抗原的重链可变区,并且最优选包含上述重链CDR序列的重链可变区。

[0256] 在另一个实施例中,抗体包含选自自由SEQ ID NO:1、3、5和7组成的组的重链可变区,和选自自由SEQ ID NO:9、11、13和15组成的组的轻链可变区。

[0257] 在相关方面,核酸分子包含编码SEQ ID NO:9、11、13或15中任一个的轻链氨基酸序列的核苷酸序列或其一部分。在一个实施例中,核酸分子包含SEQ ID NO:10、12、14或16中任一个的轻链核苷酸序列或其一部分。本发明的核酸分子还包括所有核酸序列,包括SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14或16中的序列,并且核酸序列基于遗传密码多样性包含简并密码子,所述核酸序列编码本文所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列或本文所述的任何HCDR或LCDR,并且如SEQ ID NO:17-28和29-40所示,以及在高度严格条件下与编码本文所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列或本文所述的任何HCDR或LCDR,并且如SEQ ID NO:17-28和29-40所示的核酸序列杂交的核酸,如本文中所述的那些。

[0258] 在一些实施例中,核酸分子编码VL氨基酸序列,其与SEQ ID NO:9、11、13或15中所示的VL氨基酸序列有至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性。本发明的核酸分子包括在高度严格条件下与编码SEQ ID NO:9、11、13或15的轻链可变区氨基酸序列的核酸序列杂交的核酸,如本文中所述的那些,或具有SEQ ID NO:10、12、14或16的轻链可变区核酸序列的核酸。

[0259] 进一步设想本发明的核酸分子包含编码抗体XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042和XPA.92.099中任一种的VH氨基酸序列的核苷酸序列或其一部分。在一些实施例中,核酸编码所述抗体的重链CDR的氨基酸序列。在一些实施例中,所述部分是包含重链CDR1-CDR3的连续部分。在一个实施例中,所述部分包含重链CDR1、CDR2或CDR3区中的至少一个、两个或三个,任选地具有不同的人类或人类共有框架,并且任选地,在总共3个CDR中具有1个、或最多2个、或最多3个突变。

[0260] 在相关方面,核酸分子包含编码SEQ ID NO:1、3、5或7的重链之一的重链氨基酸序列的核苷酸序列或其一部分。在一个实施例中,核酸分子包含SEQ ID NO:2、4、6或8的重链核苷酸序列或其一部分。

[0261] 在一些实施例中,核酸分子编码VH氨基酸序列,其与SEQ ID NO:1、3、5或7中所示的VH氨基酸序列有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在相关方面,VH氨基酸序列是共有序列。本发明的核酸分子还包括在高度严格条件下与编

码SEQ ID NO:1、3、5或7的重链可变区氨基酸序列的核酸序列杂交的核酸,如本文所述的那些,或具有SEQ ID NO:2、4、6或8中任一个的重链可变区核酸序列的核酸。

[0262] 进一步设想本发明的核酸可编码选自XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042和XPA.92.099的抗体的全长轻链或重链,其中全长轻链或全长重链分别包含轻链恒定区或重链恒定区,轻链恒定区任选地包括未经修饰或经修饰的 κ 或 λ 区,并且重链恒定区包括任何类别,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE的未经修饰或经修饰的恒定区。

[0263] 在一个方面,全长可变轻链抗体包含SEQ ID NO:9、11、13或15中示出的序列。进一步设想编码全长轻链的核苷酸编码SEQ ID NO:9、11、13或15中示出的序列,并包含SEQ ID NO:10、12、14或16中所示的核苷酸序列。

[0264] 在一个方面,全长可变重链抗体包含SEQ ID NO:1、3、5或7中任一个的序列。进一步设想编码全长重链的核苷酸编码SEQ ID NO:1、3、5或7的重链序列,并且包含SEQ ID NO:2、4、6或8中任一个所示的核苷酸序列。

[0265] 在另一实施例中,本发明提供一种结合IL-2的抗体,其包含轻链可变区和/或重链可变区,其中(a)轻链可变区至少包含:选自SEQ ID NO:29、32、35或38的CDR1,或与其有至少80%同一性的序列;选自SEQ ID NO:30、33、36或39的CDR2,或与其有至少80%同一性的序列;和/或选自SEQ ID NO:31、34、37或40的CDR3,或与其有至少80%同一性的序列;和/或其中(b)重链可变区至少包含:选自SEQ ID NO:17、20、23或26的CDR1,或与其有至少80%同一性的序列;选自SEQ ID NO:18、21、24或27的CDR2,或与其有至少80%同一性的序列;和/或选自SEQ ID NO:19、22、25或28的CDR3,或与其有至少80%同一性的序列。

[0266] 在一个相关实施例中,轻链可变区至少包含:选自SEQ ID NO:29、32、35或38的CDR1,或与其有至少90%同一性的序列;选自SEQ ID NO:30、33、36或39的CDR2,或与其有至少90%同一性的序列;和选自SEQ ID NO:31、34、37或40的CDR3,或与其有至少90%同一性的序列;和/或重链可变区至少包含:选自SEQ ID NO:17、20、23或26的CDR1,或与其有至少90%同一性的序列;选自SEQ ID NO:18、21、24或27的CDR2,或与其有至少90%同一性的序列;和选自SEQ ID NO:19、22、25或28的CDR3,或与其有至少90%同一性的序列。

[0267] 在示例性实施例中,本发明的抗体包含人类 κ 或人类 λ 轻链或由其衍生的氨基酸序列,或人类重链或由其衍生的序列,或重链和轻链这两者,一起形成单链、二聚体、四聚体或其它形式。

[0268] 用于在本文载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞是上述原核生物、酵母或高等真核细胞。用于此目的的合适原核生物包括真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科,如埃希氏菌属(*Escherichia*),例如大肠杆菌、肠杆菌、欧文氏菌(*Erwinia*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、变形杆菌、沙门氏菌(*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌(*Serratia*),例如,粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)和志贺氏菌(*Shigella*),以及枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)等杆菌(例如,1989年4月12日公布的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌41P)、铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)等假单胞菌和链霉菌。一种大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294(ATCC 31,446),但其它菌株,如大肠杆菌B,大肠杆菌X1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌W3110(ATCC 27,325)也是合适的。这些实例是说明性而非限制性的。

[0269] 除原核生物外,真核微生物,如丝状真菌或酵母是抗体编码载体的合适克隆或表

达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或普通面包酵母是低等真核宿主微生物体中最常用的。然而,许多其它属、种和菌株通常可用并适用于本文,如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主,例如乳酸克鲁维酵母 (*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母 (*K.wickerhamii*) (ATCC 24,178)、克鲁维雄酵母 (*K.waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K.drosophilorum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K.thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母 (*K.marxianus*);耶氏酵母属 (*yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母属 (*Candida*);瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*);许旺酵母属 (*Schwanniomyces*),如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌,如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉菌属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主,如构巢曲霉 (*A.nidulans*) 和黑曲霉 (*A.niger*)。

[0270] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经由如以下的宿主鉴别出多种杆状病毒株和变异体和相应容许的昆虫宿主细胞:草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*)。多种用于转染的病毒株公开可用,例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变异体和家蚕 NPV 的 Bm-5 病毒株,并且所述病毒可以根据本发明用作本文中的病毒,具体来说用于转染草地贪夜蛾细胞。

[0271] 棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、烟草、浮萍和其它植物细胞的植物细胞培养物也可用作宿主。

[0272] 适用的哺乳动物宿主细胞系的实例是中国仓鼠卵巢细胞,包括 CHOK1 细胞 (ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44 和中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub 等人, PNAS 77:4216 (1980));由 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651);人类胚肾系 (293 或 293 细胞亚克隆用于悬浮培养中的生长, (Graham 等人,《普通病毒学期刊 (J.Gen Virol.)》36:59, 1977);幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10);小鼠塞尔托利氏细胞 (mouse sertoli cell) (TM4, Mather,《生殖生物学 (Biol.Reprod.)》23:243-251, 1980);猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587);人类宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34);水牛大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442);人类肺细胞 (W138, ATCC CCL 75);人类肝细胞 (Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51);TRI 细胞 (Mather 等人,《纽约科学院年报》383:44-68 (1982));MRC 5 细胞;FS4 细胞;和人类肝癌细胞系 (Hep G2)。

[0273] 用上述表达或克隆载体转化或转染宿主细胞以产生抗体,并在适当时经修饰的常规营养培养基中培养,以诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。此外,具有由选择性标记物分隔的多转录单位拷贝的新颖载体和转染细胞系对于结合靶标的抗体的表达特别有用和优选。

[0274] 当使用重组技术时,抗体可以在细胞内,在周质空间中产生,或直接分泌到培养基中,包括从微生物培养物中分泌。如果在细胞内产生抗体,那么作为第一步,例如通过离心

或超滤除去宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Better等人(《科学》240:1041-43,1988;《ICSU短报(ICSU Short Reports)》10:105(1990);和PNAS 90:457-461(1993))描述了一种分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的程序。还参见(Carter等人,《生物/技术》10:163-167(1992))。

[0275] 或者,可以使用原核或真核体外翻译在无细胞系统中合成抗体(参见Stech和Kubick,《抗体(Antibodies)》4:12-33,2015)。

[0276] 抗体组合物可以使用例如羟磷灰石色谱阳离子或离子交换色谱和亲和色谱来纯化,其中亲和色谱是熟知的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适合性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人类 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等人,《免疫学方法杂志62:1-13,1983)。蛋白G推荐用于所有小鼠同种型和人类 $\gamma 3$ (Guss等人,《欧洲分子生物学学会会刊》5:15671575(1986))。亲和配体所附接的基质通常是琼脂糖,但也可以使用其它基质。机械稳定的基质,如受控微孔玻璃(controlled pore glass)或聚(苯乙烯二乙烯基)苯,与可用琼脂糖实现的结果相比,可以实现更快的流速和更短的加工时间。当抗体包含CH₃结构域时,Bakerbond ABX™树脂(新泽西州菲利普斯堡(Phillipsburg,N.J.)JT Baker)适用于纯化。取决于待回收的抗体,用于蛋白质纯化的其它技术,如离子交换柱上分级分离、乙醇沉淀、逆相HPLC、二氧化硅色谱、肝素SEPHAROSE®上的色谱、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上的色谱、色谱焦聚、SDS-PAGE以及硫酸铵沉淀也是可用的。

[0277] 在一个实施例中,IL-2抗体可以使用Bergmaschi等人,JBC 283(7),4189-4199(2007)和Gaston等人,《公共科学图书馆:综合(PLoS One.)》27;8(11):e81768(2013)(其全部内容通过引用并入本文)中如关于IL-15/IL-15R复合物所述的方法单独产生或与IL-2共表达。例如,IL-2和IL-2抗体可以在相同细胞类型的质粒上,在单个质粒或多个质粒上共表达,并且在制造的重组表达阶段允许复合。或者,IL-2和IL-2抗体在不同细胞中表达,然后在单独的步骤中复合在一起。

[0278] 筛选方法

[0279] 有效的治疗依赖于鉴别没有显著毒性的有效药剂。可以通过所属领域已知的方法针对结合亲和力来筛选抗体。例如,可以使用凝胶迁移测定、蛋白质印迹、放射性标记的竞争测定、利用色谱法的共分级分离、共沉淀、交联、ELISA、表面等离子体共振,KinExA等,其描述于例如《分子生物学现行方案(Current Protocols in Molecular Biology)》(1999)约翰威利父子公司,纽约中,其全部内容通过引用并入本文。

[0280] 用于评定生物活性和IL-2活性调节(例如,通过IL-2抗体)的方法是所属领域已知的。例如,中和可以通过中和测定来测量,并表示为引起50%最大(IC₅₀)值的抑制浓度。通过确定引起第二分子或细胞活性的最大生物响应的半抑制所需的分子浓度,可以计算出给定分子的IC₅₀值。IC₅₀越低,分子抑制所需蛋白质活性的效力越大。

[0281] 通过流式细胞术筛选IL-2抗体

[0282] IL-2抗体与人类IL-2受体R α 或R β 和 γc 的结合可以使用所属领域已知的方法,通过流式细胞术筛选天然包含或经工程化以表达人类IL-2受体IL-2R α 、IL-2R β 或R β 和 γc 的细胞来评定。

[0283] IL-2抗体调节IL-2诱导的增殖

[0284] 使用发光细胞活力测定进行评估IL-2抗体调节IL-2诱导的表达不同IL-2受体复合物(IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 或IL-2R $\beta\gamma$)的细胞的增殖,包括对主要阻断IL-2R α 相互作用的抗体的细胞增殖的影响。例如,活性可以通过增殖测定来测量,并表示为EC50(引起50%最大效应的有效浓度)值。通过确定引起最大生物响应的一半所需的分子浓度,可以计算出给定分子的EC50值。EC50越低,分子引发所需活性的效力越大。

[0285] IL-2诱导的STAT5磷酸化

[0286] IL-2抗体对IL-2活性的调节可以通过测量表达不同IL-2受体复合物(IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 或IL-2R $\beta\gamma$)的细胞中的IL-2诱导的下游转录因子信号转导因子和转录激活因子5(STAT5)的活性来评定。在添加到表达不同IL-2受体复合物的细胞之前,可以预先复合各种剂量的IL-2和抗IL-2抗体。通过免疫测定法测量磷酸化(活化,pSTAT5)和STAT5的总水平,并计算磷酸化STAT5的百分比。可以如上所述计算EC50和IC50值。

[0287] 评定所属领域已知的IL-2活性的其它方法可用于分析本文抗体的生物学作用。IL-2可以给予于小鼠或其它哺乳动物,并且可以通过测量免疫细胞(如效应子、辅助细胞或调节性T细胞、NK细胞或树突状细胞)的频率或活性来分析其活性。

[0288] 还可以通过监测颗粒酶B的上调或增加的在IL-2反应细胞中分泌干扰素 γ 的能力来测量IL-2的活性。还可以通过IL-2反应细胞中的KI67检测来测量IL-2活性。在小鼠中,可以将BRDU注射到动物中,并测量BRDU在IL-2反应细胞中的并入量。在小鼠中,成为CD44hi或CD25hi的CD8+或CD4+ T细胞的频率是IL-2活性的量度。进行这些测定的方法是所属领域已知的。

[0289] 组合疗法

[0290] 本发明的IL-2抗体可以与第二药剂一起给予,并且所述组合可以适用于治疗如本文所述的疾病或病症。在使用针对IL-2的抗体的情况下,如果多于一种IL-2抗体有效结合相应的靶抗原,那么设想可以将针对靶抗原的不同表位的两种或更多种抗体混合,使得抗体组合提供针对治疗的病状或病症的进一步改善的功效。包含一种或多种本发明抗体的组合物可以给予于患有或易患与IL-2或IL-2R相关的病状或病症的人类或哺乳动物。

[0291] 两种治疗剂的同时给药不要求同时或通过相同途径给予药剂,只要在药剂发挥其治疗作用的时段内存在重叠即可。设想同时或依序给药,如在不同天或周给予。

[0292] 或者,第二药剂可以是其它治疗剂,如细胞因子、生长因子、抑制剂和针对其它靶抗原的抗体。

[0293] 设想本发明的治疗剂可以在相同的调配物中同时给予。进一步设想,所述药剂以单独的调配物给予并同时给予,其中同时是指在彼此30分钟内给予的药剂。进一步设想可以同时给予第二药剂。

[0294] 另一方面,在给予其它组合物之前给予IL-2抗体。在先给药是指在进行另一种药剂的治疗之前一周范围内,在给予另一种药剂之前最多30分钟给予抗体。进一步设想在给予另一种组合物或药剂之后给予药剂。随后给药意在描述抗体治疗后30分钟到抗体给予后一周,例如30分钟、1小时、2小时、4小时、1天、2天等的给药。进一步设想可以在给予IL-2抗体之前或之后以这种方式给予第二种药剂。

[0295] 适当时,进一步设想可给予其它辅助疗法。例如,适当时,还可以给予患者外科手术治疗、化学疗法、细胞毒性剂、光动力疗法、免疫调节或放射疗法。

[0296] 进一步设想当本文的抗体与第二药剂组合给予时,例如,其中第二药剂是细胞因子或生长因子或化学治疗剂,给药还包括使用放射治疗剂或放射疗法。与抗体组合物组合给予的放射疗法由治疗医师确定进行给予,并且通常以给予正在进行癌症治疗的患者的剂量给予。

[0297] 细胞毒性剂是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。所述术语旨在包括放射性同位素(例如,I131、I125、Y90和Re186)、化学治疗剂和毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或合成毒素或其片段。非细胞毒性剂是指不抑制或阻止细胞功能和/或不引起细胞破坏的物质。非细胞毒性剂可包括可被活化以具有细胞毒性的试剂。非细胞毒性剂可包括珠粒、脂质体、基质或颗粒(参见例如美国专利公开2003/0028071和2003/0032995,其通过引用并入本文)。此类药剂可以与根据本发明的抗体结合、偶联、连接或缔合。

[0298] 在一个实施例中,第二药剂是检查点抑制剂(例如,抗PDL-1抗体、抗CTLA-4抗体、PD-1抑制剂或PDL-1抑制剂PD-1)。在其它实施例中,本发明的IL-2抗体可以与嵌合抗原受体T细胞/肿瘤浸润淋巴细胞(CART/TIL)疗法或药剂组合。在其它实施例中,本发明的IL-2抗体可以与疫苗疗法组合。在又一个实施例中,本发明的IL-2抗体可以与靶向肿瘤特异性抗原的其它抗体或药剂组合。

[0299] 嵌合抗原受体(CAR)通过用由肿瘤特异性抗体的(scFv)胞外结构域组成的受体复合物转导的CD4⁺或CD8⁺ T细胞的扩增产生,通过CD4⁺或CD8⁺的铰链和跨膜结构域连接到细胞质信号传导区(Haji-Fatahaliha等人,《人造细胞、纳米医学和生物技术(Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology)》44:1339-1349(2016))。已经将一些CAR工程化以表达共刺激信号传导结构域(例如,CD28、OX40或41BB),其可以赋予这些细胞更大的细胞毒活性。

[0300] 肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)通常是从新鲜肿瘤样品或血液中分离的CD4⁺或CD8⁺ T细胞,用IL-2扩增,然后静脉内输注回提供样品的患者中。任选地,使用载有一种或多种肿瘤抗原的APC进行肿瘤抗原特异性CD4⁺或CD8⁺ T细胞的扩增。在细胞输注后,通常向患者给予IL-2(高剂量或低剂量)以维持TIL活性(Nayar等人,《肿瘤免疫学》4(4),e1002720(2015))。在另一种方法中,用对所选肿瘤抗原具有特异性的受体转导T细胞。所述方法包括取用外周血单核细胞(PBMC),然后用对所选肿瘤抗原具有特异性的TCR转导T细胞并扩增这些细胞。

[0301] 在一些实施例中,IL-2抗体与IL-2或IL-2变异体组合给予。在各个实施例中,抗体可以在给予前与IL-2复合,或者IL-2和IL-2抗体可以如本文所述组合给予(Garcia-Martinez和Leon,《国际免疫学》24:427-446(2012); Spangler等人,《免疫》,42:815-825; Arenas-Ramirez等人,《免疫学趋势(Trends in Immunol.)》36:763-777)。设想当抗体与IL-2组合给予时,IL-2的量小于所用的治疗剂量,例如低于700,000国际单位(IU)/kg(0.04mg/kg)。在一些实施例中,IL-2以约300,000到6000,000IU/kg、约250,000到500,000IU/kg、约100,000到250,000IU/kg、约10,000到100,000IU/kg、或约1,000至10,000IU/kg、或约500至5,000IU/kg的剂量给予。在各个实施例中,基于摩尔比,复合物中IL-2与IL-2抗体的比率为1:1。在各个实施例中,基于摩尔比,复合物中IL-2与IL-2抗体的比率并非1:1,例如,比率为约5:1、4:1、3:1、2:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10或更高。在各个实施例中,IL-2特异性抗体是本文所述的XPA.92.019。

[0302] 在各个实施例中,当IL-2和IL-2抗体在给药前预混合时,所述药剂可以每周两次一起给予。在各个实施例中,IL-2以0.1至10mg/kg的剂量与如本文所述的抗体剂量一起给予。在各个实施例中,静脉内给予IL-2抗体。

[0303] 如果添加与IL-2抗体相关的IL-2剂量,那么设想IL-2依序给予,例如在同一天给予,并且在某些实施例中,IL-2抗体在给予IL-2之前给予。在各个实施例中,每周给予IL-2抗体一次,伴随在给予抗体后每周一次或每周多次给予IL-2。

[0304] 在各个实施例中,IL-2抗体每周给予1次,并且IL-2疗法(例如Proleukin)根据已知处方方案给予,但是以较低的IL-2剂量给予。

[0305] 进一步设想本文的抗体和IL-2的组合增加IL-2作为抗肿瘤药物的治疗指数(TI)。在各个实施例中,当与本发明的抗IL-2抗体组合给予时,IL-2的TI增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多。

[0306] 设想IL-2可以依照与抗体给药相同的方案给予,或者如果IL-2与抗体分开给予,那么可以按照如针对其它IL-2治疗剂(如PROLEUKIN®)所示给予,或者以与先前使用的治疗剂量相比要低的剂量给予。目前推荐的PROLEUKIN®(阿地白介素)治疗方案每8小时通过15分钟静脉内输注给予。使用以下方案来治疗患有转移性肾细胞癌(转移性RCC)或转移性黑素瘤的成年患者。每个疗程包括间隔一个休息期的两个为期5天的治疗周期。每8小时通过15分钟静脉内输注来给予600,000国际单位/千克(0.037mg/kg)剂量,最多14个剂量。休息9天后,重复进行另外14个剂量的方案,每个疗程最多28个剂量(如果耐受)。所述方案可以根据需要由治疗医师进行调整。设想当IL-2与抗体一起给予时,与标准剂量的IL-2相比,投药减少。另外的给药方案也在以下详细描述中示出。

[0307] 涵盖但不限制与本发明的抗体一起使用的化学治疗剂和其它药剂,其包括但不限于表1中列出的那些。

[0308] 表1:化学治疗剂和其它药剂

[0309]

<p><u>烷化剂</u></p> <p><u>氮芥</u></p> <p>二氯甲基二乙胺</p> <p>环磷酰胺</p> <p>异环磷酰胺</p> <p>美法仑(melphalan)</p> <p>苯丁酸氮芥</p> <p><u>亚硝基脲</u></p>	<p><u>天然产物</u></p> <p><u>抗有丝分裂药物</u></p> <p><u>紫杉烷类</u></p> <p>太平洋紫杉醇</p> <p>长春花生物碱</p> <p>长春碱(VLB)</p> <p>长春新碱</p> <p>长春瑞滨</p>
--	---

[0310]

<p>卡莫司汀(BCNU) 洛莫司汀(CCNU) 司莫司汀(甲基-CCNU)</p> <p><u>乙烯亚胺/甲基三聚氰胺</u> 三乙撑蜜胺(TEM) 三乙撑硫代磷酰胺(triethylene thiophosphoramide) (塞替派) 六甲三聚氰胺 (HMM, 六甲蜜胺)</p> <p><u>磺酸烷酯</u> 白消安</p> <p><u>三嗪</u> 达卡巴嗪(DTIC)</p> <p><u>抗代谢物</u> <u>叶酸类似物</u> 氮甲喋呤 曲美沙特(Trimetrexate) 培美曲塞(Pemetrexed) (多靶点抗叶酸剂)</p> <p><u>嘧啶类似物</u> 5-氟尿嘧啶 氟脱氧尿苷 吉西他滨 胞嘧啶阿拉伯糖苷 (AraC, 阿糖胞苷) 5-氮杂胞苷 2,2'-二氟脱氧-胞苷</p> <p><u>嘌呤类似物</u> 6-巯基嘌呤 6-硫鸟嘌呤 硫唑嘌呤 2'-脱氧柯福霉素 (喷司他汀(pentostatin)) 红羟基壬基腺嘌呤(EHNA) 氟达拉滨磷酸盐(fludarabine phosphate)</p>	<p>Taxotere®(多西他赛(docetaxel)) 雌莫司汀 雌莫司汀磷酸盐</p> <p><u>表鬼白毒素</u> 依托泊苷(etoposide) 替尼泊苷(teniposide)</p> <p><u>抗生素类</u> 放线菌素 D 道诺霉素(daunomycin)(红比霉素 (rubido-mycin)) 多柔比星(doxorubicin)(阿霉素 (adria-mycin)) 米托蒽醌艾达霉素 (mitoxantroneidarubicin) 博莱霉素(bleomycin) 斯普卡霉素(splicamycin)((光神霉素 (mithramycin)) 丝裂霉素 C 更生霉素 阿非迪霉素(aphidicolin)</p> <p><u>酶</u> L-天冬酰胺酶 L-精氨酸酶</p> <p><u>放射增敏剂</u> 甲硝唑 米索硝唑(misonidazole) 去甲米索硝唑 哌莫硝唑(pimonidazole) 依他硝唑(etanidazole) 尼莫唑(nimorazole) RSU 1069 EO9 RB 6145 SR4233 烟酰胺 5-溴脱氧尿苷 5-碘脱氧尿苷 溴脱氧胞苷</p>
---	---

[0311]

<p>2-氯脱氧腺苷 (克拉屈滨(cladribine), 2-CdA)</p> <p><u>I型拓扑异构酶抑制剂</u> 喜树碱(camptothecin) 拓扑替康(topotecan) 伊立替康(irinotecan)</p> <p><u>生物反应调节剂</u> G-CSF GM-CSF</p> <p><u>分化剂</u> 维甲酸衍生物</p> <p><u>激素和拮抗剂</u> <u>肾上腺皮质类固醇/拮抗剂</u> 泼尼松(prednisone)和等效物 地塞米松 氨鲁米特(ainoglutethimide)</p> <p><u>孕激素类</u> 己酸羟孕酮 乙酸甲羟孕酮 乙酸甲地孕酮</p> <p><u>雌激素类</u> 己烯雌酚 炔雌醇/等效物</p> <p><u>抗雌激素</u> 他莫昔芬(tamoxifen)</p> <p><u>雄激素类</u> 丙酸睾酮 氟甲睾酮/等效物</p> <p><u>抗雄激素</u> 氟他胺 促性腺激素释放 激素类似物 亮丙立德(leuprolide)</p>	<p><u>杂类作用剂</u> <u>铂配位络合物</u> 顺铂 卡铂 奥沙利铂(oxaliplatin) 蒽二酮 米托蒽醌</p> <p><u>取代脲</u> 羟基脲</p> <p><u>甲基胍衍生物</u> N-甲基胍(MIH) 甲基胍</p> <p><u>肾上腺皮质抑制剂</u> 米托坦(<i>o,p'</i>-DDD) 氨鲁米特</p> <p><u>细胞因子</u> 干扰素(α、β、γ) 白细胞介素-2</p> <p><u>光敏剂</u> 血卟啉衍生物 Photofrin® 苯并卟啉衍生物 Npe6 锡卟啉(SnET2) 苯博瑞德-a(pheboride-a) 细菌叶绿素-a 茶酞菁 酞菁 锌酞菁</p> <p><u>辐射</u> X射线 紫外光 伽马辐射 可见光 红外辐射 微波辐射</p>
--	---

[0312]

<u>非甾体抗雄激素</u> 氟他胺	
-----------------------	--

[0313] 病症的治疗

[0314] 在另一个实施例中,本文所述的任何类型的抗体均可用于所述方法中。在示例性实施例中,靶特异性抗体是人类、嵌合或人源化抗体。在另一个示例性实施例中,靶标是人类,并且患者是人类患者。或者,患者可以是表达与靶特异性抗体交叉反应的靶蛋白的哺乳动物。可以向表达与抗体交叉反应的靶蛋白的非人类哺乳动物(例如灵长类动物)给予抗体以用于兽医学目的或作为人类疾病的动物模型。

[0315] 在一个实施例中,本发明提供一种治疗本文所述的疾病、病状或病症的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的本文设想的IL-2抗体或医药组合物的步骤。

[0316] 在另一个实施例中,本发明提供一种用于治疗与增加的IL-2或IL-2R表达相关的疾病、病状或病症的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的本文设想的抗体或医药组合物的步骤。

[0317] 在另一个实施例中,本发明提供一种用于治疗选自癌症、微生物感染、哮喘和自身免疫疾病组成的组的疾病、病状或病症的方法。

[0318] 在一个实施例中,本发明提供一种用于治疗癌症或预防癌症复发的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的如本文所设想的IL-2抗体或医药组合物。

[0319] 在各个实施例中,本发明提供一种用于改善基于IL-2的疗法的一种或多种副作用的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的本文设想的抗体或医药组合物。此类副作用的实例包括血管渗漏综合征和肺水肿、肾损伤、CNS损伤和心脏副作用(以及如以下的症状:低血压、腹泻、少尿、发冷、呕吐、呼吸困难、皮疹、胆红素血症、血小板减少症、恶心、意识模糊、肌酐增加、呼吸病症、昏迷、酸中毒、呼吸暂停、急性肾衰竭、凝血障碍、呼吸困难、发烧、心脏骤停、心肌梗塞、精神病、败血症、SGOT增加、麻木、室上性心动过速和死亡)。

[0320] 还提供一种降低接受IL-2疗法的个体中的有效IL-2剂量的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的本文设想的抗体或医药组合物。设想给予本文所述的IL-2抗体可降低个体中改善所治疗的疾病或病症的一种或多种症状所需的IL-2的剂量(与不存在IL-2抗体治疗所需的剂量相比),有效增加IL-2治疗的治疗窗。

[0321] 可以用本发明的抗体(或本文所述的调配物)治疗的示例性病状或病症包括癌症,如选自自由以下组成的组的癌症:食道癌、胰腺癌、转移性胰腺癌、胰腺转移性腺癌、膀胱癌、胃癌、纤维化癌、神经胶质瘤、恶性神经胶质瘤、弥漫性内生性脑桥神经胶质瘤、复发性儿童脑赘瘤肾细胞癌、透明细胞转移性肾细胞癌、肾癌、前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、IV期前列腺癌、转移性黑素瘤、黑素瘤、恶性黑素瘤、复发性皮肤黑素瘤、黑素瘤脑转移瘤、IIIA期皮肤黑素瘤、IIIB期皮肤黑素瘤、IIIC期皮肤黑素瘤、IV期皮肤黑素瘤、恶性头颈黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状细胞非小细胞肺癌、乳腺癌、复发转移性乳腺癌、肝细胞癌、霍奇金氏淋巴瘤(hodgkin's lymphoma)、滤泡性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、晚期B细胞NHL、包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的HL、多发性骨髓瘤、慢性骨髓白血病、慢性淋巴细胞性白血病、里氏综合征(richter's syndrome)、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症

(waldenstrom macroglobulinemia)、成人胶质母细胞瘤、成人神经胶质肉瘤、复发性胶质母细胞瘤、复发性儿童横纹肌肉瘤、复发性尤文肉瘤(ewing sarcoma)/外周原始神经外胚层肿瘤、复发性神经母细胞瘤、复发性骨肉瘤、结直肠癌、鼻咽非角化型癌、复发性鼻咽未分化型癌、宫颈腺癌、宫颈腺鳞癌、宫颈鳞状细胞癌、复发性宫颈癌、IVA期宫颈癌、IVB期宫颈癌、肛管鳞状细胞癌、转移性肛管癌、复发性肛管癌、复发性头颈癌、头颈鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌、结肠癌、胃癌、晚期胃结肠癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌(gastroesophageal junction adenocarcinoma)、骨赘瘤、软组织肉瘤、骨肉瘤、胸腺癌、尿路上皮癌、复发性梅克尔细胞癌(merkel cell carcinoma)、III期梅克尔细胞癌、IV期梅克尔细胞癌、骨髓增生异常综合征和复发性蕈样真菌病和塞扎里综合征(Sezary syndrome)。在相关方面,本发明提供一种治疗癌症的方法,其包含向有需要的个体给予治疗有效量的本文设想的抗体或医药组合物。

[0322] 在某些实施例中,癌症选自以下组成的组:黑素瘤、肾细胞癌、淋巴瘤、白血病、肉瘤、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、膀胱癌、头颈癌、皮肤癌和鳞状细胞癌(SCC)。

[0323] 在各个实施例中,本文提供一种治疗疾病(例如癌症)的方法,其包含将IL-2抗体与IL-2组合给予,任选地还与检查点抑制剂或其它辅助肿瘤疗法组合给予,由此使得对抗非IL-2反应性肿瘤类型的功效现在对生长和/或癌转移抑制敏感。

[0324] 在相关方面,癌症是转移性的。在相关方面,癌转移包括骨或骨骼组织、肝、肺、肾或胰腺的转移。设想本文的方法减少个体的肿瘤尺寸或肿瘤负荷,和/或减少个体的癌转移。

[0325] 在各个实施例中,所述方法将肿瘤尺寸减小10%、20%、30%或更多。在各个实施例中,所述方法将肿瘤尺寸减小10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0326] 在各个实施例中,所述方法降低肿瘤生长的能力并导致,如所属领域的标准方法,包括实体肿瘤响应评估标准(Response Evaluation Criteria In Solid Tumors;RECIST)和免疫响应标准(immune response criteria;irRC)所界定的稳定疾病。

[0327] 在一个实施例中,在需要所述治疗的动物中治疗癌症包含向动物给予有效量的IL-2特异性抗体或包含本文所述抗体,任选地与IL-2组合的组合物。

[0328] 可通过本发明的方法治疗的病状优选发生在哺乳动物中。哺乳动物包括例如人类和其它灵长类动物,以及宠物或伴侣动物(如狗和猫)、实验动物(如大鼠、小鼠和兔)和农畜(如马、猪、绵羊和牛)。

[0329] 医药组合物的调配

[0330] 为了将本发明的抗体给予人类或试验动物,优选将抗体调配在包含一种或多种药学上可接受的载体的组合物中。短语“药学上或药理学上可接受的”是指当使用所属领域熟知的途径给予时不会产生过敏或其它不良反应的分子实体和组合物,如下所述。“药学上可接受的载体”包括任何和所有临床上适用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。

[0331] 此外,化合物可与水或普通有机溶剂形成溶剂化物。还设想所述溶剂化物。

[0332] 抗体通过任何合适的方式给予,包括肠胃外、皮下、腹膜内、肿瘤内、肺内和鼻内,

并且如果需要局部治疗,进行病灶内给予。肠胃外输注包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮内或皮下给药。另外,抗体可以通过脉冲输注适当地给予,特别是在抗体剂量下降的情况下。优选通过注射给予给药,最优选静脉内、肌肉内或皮下注射,部分取决于给药是短暂的还是长期的。设想其它给药方法,包括表面给药,特别是透皮给药、经粘膜给药、直肠给药、口服给药或局部给药,例如通过靠近所需部位置放的导管给药。

[0333] 含有本文所述抗体作为活性成分的本发明的医药组合物可以含有药学上可接受的载体或添加剂,其取决于给药途径。所述载体或添加剂的实例包括水、药学上可接受的有机溶剂、胶原、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、酪蛋白、明胶、琼脂、双甘油、甘油、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人类血清白蛋白(HSA)、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、药学上可接受的表面活性剂等。所用的添加剂选自但不限于上述或其组合,适当时,取决于本发明的剂型。

[0334] 医药组合物的配方将根据所选择的给药途径(例如,溶液、乳液)而变化。包含待给予的抗体的合适组合物可以在生理学上可接受的媒剂或载体中制备。对于溶液或乳液,合适的载体包括例如水溶液或醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒剂可包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖(Ringer's dextrose)、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或非挥发性油。静脉内媒剂可包括各种添加剂、防腐剂或流体、营养物或电解质补充剂。

[0335] 多种水性载体,例如无菌磷酸盐缓冲盐水溶液、抑菌水、水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等,并且可包括经历温和化学修饰等的用于增强稳定性的其它蛋白质,如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。

[0336] 通过将具有所需纯度的抗体与任选的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备抗体的治疗调配物以供储存(《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》第16版,Osol, A.编.(1980)),其呈冻干调配物或水溶液形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六羟季铵、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷酯(如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0337] 本文的调配物还可含有多于一种所治疗的具体适应症所必需的活性化合物,优选具有互补活性但不会相互产生不利影响的活性化合物。此类分子宜以对预期目的有效的量组合存在。

[0338] 活性成分也可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸酯)微胶囊,分别在胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或在粗乳液中。这些技术公开于《雷明顿药物科学》第16版,Osol, A.编(1980)。

[0339] 用于体内给予的调配物必须是无菌的。这易于通过无菌过滤膜过滤来完成。

[0340] 水性悬浮液可以含有与适于制造水性悬浮液的赋形剂混合的活性化合物。这些赋形剂是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶;分散剂或润湿剂可以是天然存在的磷脂,例如卵磷脂;或环氧乙烷与脂肪酸的缩合产物,例如聚氧乙烯硬脂酸酯;或环氧乙烷与长链脂肪族醇的缩合产物,例如十七亚乙基氧基十六醇 (heptadecaethyl-eneoxycetanol);环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物,如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯;或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物,如聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。水性悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯。

[0341] 本文所述的抗体可以冻干储存,并在使用前在合适的载体中复原。已证明这种技术对常规免疫球蛋白有效。可以采用任何合适的冻干和复原技术。所属领域技术人员应了解,冻干和复原可以引起不同程度的抗体活性损失,并且可能必须调整使用量以进行补偿。

[0342] 本文所述的IL-2抗体可以以与一种或多种另外的抗体的共调配物形式制备和给予。在一个方面,抗体中的至少两种识别并结合不同抗原。在另一个方面,多种抗体中的至少两种可以特异性地识别和结合相同抗原的不同表位。

[0343] 适于通过添加水制备水性悬浮液的可分散剂和颗粒提供与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性化合物。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂由以上已提及的那些试剂例示。

[0344] 这些调配物中抗体的浓度可以广泛变化,例如小于约0.5%,通常为或至少约1%到多达15或20重量%,并且将主要基于流体体积、粘度等,根据所选择的特定给药方式进行选择。因此,用于肠胃外注射的典型医药组合物可以制成含有1ml无菌缓冲水和50mg抗体。用于静脉内输注的典型组合物可以制成含有250ml无菌林格氏溶液和150mg抗体。用于制备可肠胃外给药的组合物的实际方法对于所属领域技术人员来说是已知的或显而易见的,并且描述在例如《雷明顿药物科学》,第15版,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司 (Mack Publishing Company, Easton, Pa.) (1980) 中。抗体的有效剂量介于每次给药每千克体重0.01mg至1000mg范围内。

[0345] 医药组合物可以呈无菌可注射水性、油性悬浮液、分散液或用于无菌的可注射溶液或分散液的即用型制备的无菌散剂形式。悬浮液可以根据已知技术使用上文提及的那些合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂调配。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如呈在1,3-丁二醇中的溶液形式。载体可为溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物、植物油、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的非挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的非挥发性油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。此外,脂肪酸,如油酸可用于制备可注射剂。

[0346] 在所有情况下,所述形式必须是无菌的并且流动性必须达到存在流畅注射能力的程度。可例如通过使用如卵磷脂的涂层、通过在分散液的情况下维持所需的粒度和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。其在制造和储存条件下必须稳定,并且必须防止微生物体,如细菌和真菌的污染作用。可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来预防微生物体的作用。在许多情况下,将优选包括等渗

剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可实现可注射组合物的延长吸收。

[0347] 可以与摄取或吸收增强剂一起调配适用于给药的组合物以增加其功效。这些增强剂包括例如水杨酸盐、甘氨酸胆酸盐/亚油酸盐、乙醇酸盐、抑肽酶、杆菌肽、SDS、癸酸盐等。参见例如,Fix(《药物科学杂志(J.Pharm.Sci.)》,85:1282-1285(1996))和Oliyai和Stella(《药理学与毒理学年评(Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.)》,32:521-544(1993))。

[0348] 设想抗体组合物用于调节靶活性,包括靶与其同源受体或配体的结合、靶介导的信号传导等。特别地,所述组合物在基本上没有副作用的浓度下展现出抑制性质,并且因此可用于延长的治疗方案。例如,抗体组合物与一种或多种其它药剂(例如IL-2、PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、CTLA-4抑制剂)的共同给予可以实现对所治疗的病状或病症的有益抑制,同时有效减少患者的毒副作用。

[0349] 此外,设想用于本发明中的组合物的亲水性和疏水性的特性很好地平衡,从而增强其在体外和特别是体内用途中的效用性,而缺乏这种平衡的其它组合物的效用性显著降低。具体地,设想用于本发明中的组合物在水性介质中具有适当的溶解度,其允许体内吸收并有生物可用性,同时还具有一定程度的脂质溶解度,这允许化合物穿过细胞膜到达假定作用位点。因此,当将其递送到靶抗原活性位点时,所设想的抗体组合物是最有效的。

[0350] 给药和投药

[0351] 在一个方面,本发明的方法包括给予包含本文所述的抗体的医药组合物的步骤。在某些实施例中,医药组合物是无菌组合物。

[0352] 使用任何医学上可接受的用于将治疗剂直接或间接引入哺乳动物个体的方式进行本发明的方法,包括但不限于注射、口服、鼻内、表面、透皮、肠胃外、吸入喷雾、阴道或直肠给药。如本文所用,术语肠胃外包括皮下、静脉内、肌肉内和脑池内注射,以及导管或输注技术。还设想在特定部位通过皮内、肿瘤内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射和/或手术植入给药。

[0353] 在一个实施例中,通过直接注射到部位或通过持续递送或持续释放机制在需要治疗的癌症或受影响组织的部位进行给予,其可以在内部递送制剂。例如,能够持续递送组合物(例如,可溶性多肽、抗体或小分子)的可生物降解的微球体或胶囊或其它可生物降解的聚合物构型可包括在癌症附近或癌症位点植入的本发明的调配物中。

[0354] 治疗组合物还可以在多个部位递送给患者。多次给药可以同时进行或者可以在一段时间内给予。在某些情况下,提供治疗组合物的连续流动是有益的。可以基于周期给予另外的治疗,例如,每周一次、每两周一次、每月两次、每月一次、每两个月一次、或每三个月一次或以更长的间隔给予。

[0355] 呈给定剂量的抗体组合物的量可以根据给予治疗的个体的大小以及所治疗的病症的特征而变化。在示例性治疗中,可能需要给予约1毫克/天、5毫克/天、10毫克/天、20毫克/天、50毫克/天、75毫克/天、100毫克/天、150毫克/天、200毫克/天、250毫克/天、500毫克/天或1000毫克/天。这些浓度可以以单一剂型或多剂量形式给予。首先在动物模型中,然后在临床测试中进行的标准剂量反应研究揭示针对特定疾病状态和患者群的最佳剂量。

[0356] 在本发明中还设想给定剂量中IL-2抗体的量可以根据给予治疗的个体的大小以及所治疗的病症的特征而变化。抗体组合物可以0.1到15mg的剂量范围,以历经30-60分钟

的静脉内输注形式每周两次给予每1、2或4周,直到出现疾病进展或不可接受的毒性。在各个实施例中,抗体组合物可以0.3-30mg/kg的剂量范围皮下或肌肉内给予,每周两次或每1、2或4周给予。在各个实施例中,剂量可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9或30mg/kg。在各个实施例中,抗体组合物可以0.3至3mg/kg的剂量范围静脉内给予,每周两次或每1、2或4周给予。或者,抗体组合物可以0.5-5mg/kg的剂量范围皮下或肌肉内给予,每周两次或每1、2或4周给予。

[0357] 在各个实施例中,当IL-2与IL-2抗体组合给予时,给予的IL-2的剂量在约0.05mg/kg至1mg/kg或约0.05至0.5mg/kg范围内。在各个实施例中,当与IL-2抗体组合给予时,IL-2的剂量为约0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.75mg/kg或1.0mg/kg,或当以重量量给予时,剂量为约1.0 μ g-50 μ g或约1.0 μ g、3.0 μ g、5.0 μ g、7.5 μ g、10 μ g、12.5 μ g、15 μ g、20 μ g、25 μ g、30 μ g、35 μ g、40 μ g或50 μ g。抗IL2mAb给药范围可以是0.05至5mg/kg。在各个实施例中,IL-2抗体以约0.05mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1.0mg/kg、1.25mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、3.0mg/kg、3.5mg/kg、4.0mg/kg、4.5mg/kg或5mg/kg的剂量给予,或当以重量量给予时,以约50到1000mg,或约30mg、50mg、100mg、125mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg或1000mg的剂量给予。例如,在小鼠中给予的1:1摩尔比的mAb:IL2可以15 μ g:1.5 μ g(即0.75mg/kg:0.075mg/kg)投配。如果预先混合,人类中的示例性剂量方案可为约0.1mg/kg mAb+0.01mg/kg IL-2,或如果单独给予,那么为1-5mg/kg mAb+0.005至0.05mg/kg IL-2。

[0358] 还将显而易见的是,如果将另外的治疗剂与本发明的治疗剂组合给予,那么可以对剂量加以调整。

[0359] 试剂盒

[0360] 作为另外的方面,本发明包括试剂盒,其包含一种或多种化合物或组合物,其以便于其用于实施本发明方法的方式包装。在一个实施例中,此类试剂盒包括本文所述的化合物或组合物,其包装在容器,如密封瓶或容器中,伴随标签贴在容器上或包括在包装中,所述标签描述了化合物或组合物在实施方法中的用途。优选地,化合物或组合物以单位剂型包装。所述试剂盒还可以包括适合于根据特定给药途径给予组合物或用于实施筛选测定的装置。优选地,试剂盒含有描述抗体组合物用途的标签。

[0361] 根据以下实例,本发明的其它方面和详情将显而易见,所述实例是说明性而非限制性的。

[0362] 实例

[0363] 实例1:淘选对抗IL-2的高亲和力抗体

[0364] 使用EZ-link Micro NHS-PEG4-生物素化试剂盒(伊利诺伊州罗克福德(Rockford, IL)的Pierce公司),根据制造商方案使用1:10比率的IL-2与生物素试剂生物素化重组人类IL-2(C125A突变体,以色列雷霍沃特(Rehovot, Israel)的Reprokine公司)。

[0365] 使用可溶性淘选法用生物素化的IL-2淘选单链Fv(scFv)噬菌体展示文库(加利福尼亚州伯克利(Berkeley, CA)的标记临床研究公司(XOMA))。单独地对 κ 和 λ 子文库进行淘选。对于第一轮噬菌体淘选,将文库的50 \times 文库等效物(对于 κ ,约7 $\times 10^{12}$ cfu,并且对于 λ ,约1 $\times 10^{13}$)在室温下封闭1小时,通过与10%牛奶/PBS 1:1混合进行旋转。通过向链霉亲和素

包被的磁性DYNABEADS®M-280(赛默飞世尔(ThermoFisher))中添加封闭的噬菌体并旋转培育45分钟,从封闭的噬菌体中取消选择链霉亲和素的结合物。再次重复取消选择(deselection)步骤。使用磁体从噬菌体中分离珠粒。进行取消选择步骤的同时,通过在室温下旋转45分钟,使200pmol的生物素化的IL-2与链霉亲和素包被的磁性DYNABEADS®M-280结合。通过将取消选择的噬菌体添加到与磁性链霉亲和素珠粒结合的生物素化的IL-2(每个子文库100pmol)并旋转培育1.5小时来进行选择。选择后,用0.5%牛奶/PBS-0.1%TWEEN将未结合的噬菌体从珠粒洗涤3次,每次5分钟,然后用0.5%牛奶/PBS再洗涤3次,每次5分钟。通过添加100mM三乙胺并在室温下旋转培育30分钟,在洗涤步骤后从珠粒中洗脱结合的噬菌体。通过添加等体积的1M Tris-HCl(pH 7.4),中和洗脱的噬菌体。然后将洗脱和中和的噬菌体收集到50mL Falcon管(Falcon编号352070)中,并用于感染对数期生长的TG1+cytFkpA细菌细胞(OD600约0.5)。在37°C下在不进行振荡的情况下感染30分钟,然后在37°C下伴随100rpm振荡另外培育30分钟。将细胞涂铺在补充有100µg/mL羧苄青霉素、34µg/mL氯霉素和2%葡萄糖的2xYT培养基(2YTCCmG)的琼脂生物测定板上,并在30°C培育过夜以使菌苔生长过夜。

[0366] 在准备用作下一轮的输入物时,通过使用M13K07辅助噬菌体进行重复感染来营救100×的上一轮输出物。这是通过使用从上一轮淘选的输出物中刮下的细胞对2xYTCm培养基进行接种来进行的。测量OD_{600nm}起始培养物的600并进行调节以反映约0.05的起始OD_{600nm}。细胞在37°C下在振荡下生长,直到细胞达到OD_{600nm}约0.5的对数生长期。在37°C下在不进行振荡的情况下使用M13K07(马萨诸塞州的新英格兰生物学实验室公司(New England Biolabs,MA))在感染复数(MOI) = 约20下感染细胞30分钟,然后在37°C下在150rpm振荡下另外培育30分钟。在37°C下进行感染后,将细胞沉淀并转移至补充有25µg/mL卡那霉素、100µg/mL羧苄青霉素和2%阿拉伯糖的新2xYT培养基(2YTCKAra)中。将培养物在25°C下培养过夜。通过离心将噬菌体与细胞和碎片分离,并回收所得上清液并用作下一轮淘选的输入物。通过用于每一轮淘选的输入物的量以及所得噬菌体输出物的滴度来监测选择富集。

[0367] 对于第二轮和第三轮淘选,除了以下不同之处外,使用在第1轮中所遵循的相同的溶液相方案。用于第2轮和第3轮淘选中的噬菌体输入物的量是约 1.0×10^{10} cfu。对于第二轮,在选择中使用25和10pmol的生物素化抗原,并且对于第三轮,使用10pmol的生物素化抗原。在第二轮中,将未结合的噬菌体用0.5%牛奶/PBS-0.1%TWEEN从珠粒洗涤5次,每次5分钟,然后用0.5%牛奶/PBS再洗涤5次,每次5分钟。在第三轮淘选中,将珠粒用0.5%牛奶/PBS-0.1%TWEEN洗涤5次,每次5分钟,然后用0.5%牛奶/PBS-0.1%TWEEN快速洗涤3次,之后进行5次5分钟洗涤,并用0.5%牛奶/PBS快速洗涤3次。

[0368] 实例2:筛选周质提取物中的抗体

[0369] 通过标准方法制备含有分泌抗体片段的细菌周质提取物(PPE)以用于筛选IL-2结合物。将单个菌落挑选到96孔板中,所述96孔板填充有补充有100µg/mL羧苄青霉素和0.1%葡萄糖的2YTC培养基。使培养物在37°C下在振荡下生长,直到达到对数生长期(OD_{600nm} = 0.5)。然后通过添加1mM IPTG终浓度诱导菌落产生可溶性片段抗体,并在25°C下在振荡下培育过夜。使用添加1:3体积比的冰冷PPB溶液(加利福尼亚州霍利斯特的天惠华公司(Teknova,Hollister,CA))和具有complete不含EDTA游离蛋白酶抑制剂混合片(印第安纳

州的罗氏公司 (Roche, IN) 双蒸水 (ddH₂O) 的标准方法, 由诱导细胞制备含有可溶性片段抗体的PPE。

[0370] ELISA

[0371] 如下通过ELISA测定PPE。将384孔链霉亲和素包被的板(纽约州罗契斯特的赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY))或384孔MaxiSorp(纽约州罗契斯特的赛默飞世尔科技公司)在4℃下,用生物素化的IL-2(在PBS中,1μg/mL)(针对链霉亲和素包被的板)、IL-2(在PBS中,1μg/mL)(针对MaxiSorp板)或PBS(作为对照)包被过夜。用5%BSA/PBS封闭PPE 1小时,然后添加到包被的ELISA板(20微升/孔)中并在室温(RT)下培育1小时。用鼠抗V5mAb(西格玛(Sigma))在室温下检测结合的scFv片段1小时,然后是山羊抗小鼠HRP结合的抗血清(伊利诺伊州罗克福德的赛默科技公司(Thermo Scientific, Rockford, IL))。在ELISA筛选的每个阶段后,用PBS-0.1%TWEEN-20(加利福尼亚州霍利斯顿的天惠华公司)进行三次洗涤。用20微升/孔可溶性3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物(KPL)在450nm吸光度下显色,并用1M H₂SO₄(20微升/孔)终止。

[0372] 在与链霉亲和素捕获的生物素化rhIL-2结合方面,测量相对于背景>3倍,和在初步筛选中与单独链霉亲和素结合方面,相对于背景<3倍的样品被指定为初始命中物。挑选初级命中物并将其重排在新培养板上,并且制备PPE并如上重新筛选。在结合IL-2方面,再次测量相对于背景>3倍的样品和在对照板上结合<3倍的样品被指定为二次命中物。再次重排二次命中物,然后通过ELISA在直接涂布在培养板上的rhIL-2上筛选PPE用于三级筛选。

[0373] 重新格式化

[0374] 确定二级命中物的DNA序列,并将在三级筛选中结合的13个独特克隆重新格式化为IgG2形式。对所选命中物的可变重链(VH)和轻链(VL)进行PCR扩增,克隆到含有抗体恒定区序列的质粒载体中,并使用标准方法瞬时转染到293E细胞中以产生用于进一步表征的物质。

[0375] 利用SPR的结合

[0376] 对于初步动力学结合分析,将培养物上清液中的IgG注射到ProteOn X100(伯乐(Biorad))上的固定化抗人类Fc表面上,然后注射5种浓度的rhIL-2或通过运行缓冲液(含有1%BSA的HBS-EP+),使用标准方法进行动力学结合分析。使用ProteOn分析软件,估计出亲和力处于个位数到两位数的nM范围内(表2)。为了确定这些抗体是否与IL-2受体结合竞争,第二项实验测试了可溶性IL-2Rβ(R&D Systems)是否可以与由类似捕获的IgG结合的IL-2结合。三种抗体XPA.92.011、XPA.92.012和XPA.92.013明显允许IL-2Rβ的结合,而对于其它10种抗体捕获的IL-2没有检测到这种结合(表2)。

[0377] 表2:通过SPR测量的与重组人类IL-2(rhIL-2)和IL-2Rβ结合的IL-2抗体。

[0378]

抗体	rhIL-2亲和力(nM)	允许Rβ结合
XPA.92.001	4.9	否
XPA.92.002	20.2	否
XPA.92.003	3.9	否
XPA.92.004	98	否
XPA.92.005	5.5	否

XPA.92.006	3.5	否
XPA.92.007	2.1	否
XPA.92.008	3.0	否
XPA.92.009	3.3	否
XPA.92.010	17	否
XPA.92.011	2.3	是
XPA.92.012	27	是
XPA.92.013	41	是

[0379] 亲和力成熟

[0380] 由于三种IL-2R β 允许的抗体的亲和力较低,具有快速动力学,所以使用轻链改组对其进行亲和力成熟。将来自三种抗体中的每一种的VH区克隆到VL文库中。使用溶液相方案针对生物素化的IL-2淘选这一新Fab文库。

[0381] 淘选轻链改组文库

[0382] 对于第一轮噬菌体淘选,将来自亲和力成熟文库的约 1×10^{11} 噬菌体在室温下封闭1小时,通过与SuperBlock(赛默飞世尔)1:1混合旋转。通过向链霉亲和素包被的磁性DYNABEADS M -280中添加封闭的噬菌体并旋转培育30分钟,从封闭的噬菌体中取消选择链霉亲和素的结合物。再次重复取消选择步骤。使用磁体从噬菌体中分离珠粒。在进行取消选择步骤的同时,通过在室温下旋转培育1小时,使10pmol的生物素化的IL-2结合链霉亲和素包被的磁性DYNABEADS M -280。通过将取消选择的噬菌体添加到与磁性链霉亲和素珠粒结合的生物素化的IL-2并旋转培育1.5小时来进行选择。选择后,用0.5% Superblock PBS-0.1% TWEEN将未结合的噬菌体从珠粒洗涤5次,每次5分钟,然后用0.5% Superblock PBS再洗涤3次,每次5分钟。通过添加100mM三乙胺并在室温下旋转培育30分钟,在洗涤步骤后从珠粒中洗脱结合的噬菌体。通过添加等体积的1M Tris-HCl (pH 7.4),中和洗脱的噬菌体。然后将洗脱的中和的噬菌体收集到50mL Falcon管(Falcon编号352070)中,并用于感染对数期生长的TG1+cytFkpA细菌细胞(OD600约0.5)。在37°C下在不进行振荡的情况下感染30分钟,然后在37°C下伴随100rpm振荡另外培育30分钟。将细胞涂铺在补充有100 μ g/mL羧苄青霉素、34 μ g/mL氯霉素和2%葡萄糖的2xYT培养基(2YTCCmG)的琼脂生物测定板上,并在30°C培育过夜以使菌苔生长过夜。

[0383] 为了除去污染的亲本scFv克隆,用NheI-HF(NEB)和BsmI消化来自第1轮输出物的DNA,其均切割scFv噬菌粒但不切割Fab噬菌粒。将所得DNA转化到TG1+cytFkpA细胞中,并如上所述产生噬菌体。

[0384] 伴随以下变化,使用与第1轮类似的方案完成另一轮淘选。使用KingFisher仪器对抗链霉亲和素包被的磁性DYNABEADS M -280进行三次30分钟的约 5×10^{10} 个噬菌体的取消选择。将1pmol生物素化的IL-2包被到链霉亲和素包被的磁性DYNABEADS M -280上,向其中添加取消选择的噬菌体,并使用KingFisher培育1小时以供混合。最后,用0.5% Superblock/PBS-0.1% TWEEN将未结合的噬菌体从珠粒洗涤5次,每次5分钟,然后用0.5% Superblock/PBS再洗涤5次,每次5分钟。

[0385] 利用SPR的动力学排序

[0386] 使用Biacore 4000通过SPR进行亲和力成熟克隆的初步筛选以进行解离率(off-

rate) 排序。按照制造商说明书和试剂 (Biacore) 通过胺偶联制备Biacore CM5芯片,其中抗Fab捕获试剂固定在所有四个流动池的点1、2、4和5上。如上所述制备PPE的四个96孔板,然后用Biacore运行缓冲液(有1%BSA的HBS-EP+) 1:1稀释,并通过离心过滤通过0.2 μ m Multiscreen板(密理博公司(Millipore))。在点1或5上注射稀释的、过滤的PPE 3分钟,然后以30 μ l/min以高性能模式注射缓冲液或50nM IL-2 3分钟。监测解离5分钟。使用点2或4和无IL-2缓冲液注射对IL-2注射液进行双重参照。使用Biacore 4000评估软件分析数据。将所捕获的>45RU的Fab和脱落率<0.01sec⁻¹的37个样品命名为命中物并进行进一步筛选。

[0387] 如上所述对指定为命中物的样品进行测序并通过SPR重新筛选,除了注射PPE 2分钟,并且以30、10、3和0nM注射IL-2。通过拟合结合率(on-rate)和解离率来分析数据,从中计算出亲和力估计值在10nM至0.06nM范围内。

[0388] 实例3:IL-2调节抗体的另外筛选

[0389] 将CHO-K1细胞工程化以表达人类IL-2受体,用于抗-IL-2抗体的新型筛选和功能测定。使用所属领域已知的荧光激活细胞分选(FACS)方法选择表达高、中或低水平的IL-2R α (CHO/R α)、IL-2R β (CHO/R β) 或IL-2R β 和 γ c (CHO/R β γ)的CHO-K1细胞的稳定克隆。用人类IL-2受体转染鼠来源的BaF3细胞系以赋予IL-2反应性,并将所得细胞系与IL-2断开并用于增殖测定中抗体活性的表征。估计表达水平(受体/细胞数)并测试多个细胞系在结合、信号传导或增殖测定中的最佳性能。选择以下细胞系克隆用于各种测定(表3)。

[0390] 表3:人类IL-2受体表达水平(受体/细胞)。

[0391]

细胞系(克隆编号)	R α	R β	R γ
CHO/IL-2 R α (编号 6)	2e5	--	--
CHO/IL-2 R β (编号 4-29)	--	6e5	--
CHO/IL-2 R β γ (编号 20-21)	--	2e5	2.5e5
CHO/IL-2 R β γ (编号 17)	--	8e3	1e4
BaF3/IL-2 R β γ (编号 66)	--	2e4	7e3
NK92	4e3	5e3	6e3

[0392] --未用人类IL-2受体基因转染

[0393] 周质提取物(PPE)的流式细胞术筛选

[0394] 为了鉴别具有所需特性的抗体,在存在和不存在饱和量的IL-2的情况下,在CHO/R α 、CHO/R β 、CHO/R β γ 和亲本CHO-K1细胞上筛选含有可溶性抗体片段的PPE。筛选鉴别出1)不与CHO/R α 或亲代细胞结合的克隆,和2)在存在但不存在IL-2的情况下结合CHO/R β 或CHO/R β γ 细胞的克隆。细胞在Excel302和2mM L-谷氨酰胺(西格玛编号14324C-500mL)中生长。在测试当天,将细胞洗涤,染色并再悬浮于FAC缓冲液(PBS和5%BSA和0.1%叠氮化钠)中。用CFSE(英杰(Invitrogen)编号C34554)或Cell Trace Brilliant Violet(英杰编号34557)染色CHO-K1和CHO/R β 细胞。将染色的CHO-K1和CHO/R β 与未染色的CHO/R β γ 细胞混合。向含有可溶性抗体片段(PPE)的96孔V底板(科斯塔(Costar))中的每个孔中添加CHOk1、CHOk1-IL-2R β 和CHO/R β γ 细胞和IL-2,使得每个孔含有最终浓度为100nM的50,000个/细胞类型加IL-2(Reprokine编号RK60568)。在具有含有由相同批次制备的PPE的孔的另一个单独96孔V

底板中,将用CFSE染色的CHO-K1细胞与未染色的CHO/R α (每孔每种细胞类型50,000个)和IL-2混合,最终浓度为100nM。使所有样品在4°C下培育1-2小时,然后用FAC缓冲液洗涤。接下来,将1 μ g/mL小鼠抗c-myc (罗氏编号11667149001)添加到细胞中并使其在4°C下培育1小时。培育后,再次洗涤细胞,并以1:1000的稀释度将抗小鼠重链和轻链抗体(杰克逊免疫研究实验室(Jackson ImmunoResearch)编号115-136-146)添加到细胞中,并在4°C下培育30分钟到1小时。使用FACScan流式细胞仪分析样品。选择与亲本CHO-K1细胞相比,在CHO/R β 或CHO/R β γ 细胞上显示结合至少2倍的样品,和在CHO/R α 细胞上结合不到2倍的样品进行进一步表征。

[0395] 流式细胞术筛选纯化的IgG

[0396] 在将噬菌体衍生的抗体片段重新格式化成长人类IgG后,在CHO/R α 、CHO/R β 、CHO/R β γ 上筛选纯化的抗体,并如上所述生长和染色亲本CHO-K1细胞。为了表征抗IL-2抗体的结合效力,将IgG连续滴定并添加到含有细胞和固定的最终浓度的IL-2 (Reprokine编号RK60568)的孔中。在另一个试验中,连续滴定IL-2并添加到含有细胞和固定量的抗IL-2抗体的孔中以测量抗体的结合功效。这允许在4°C下培养1至1.5小时。通过以1:1000添加抗人类重链和轻链(杰克逊免疫研究编号109-136-088)并在4°C下培育30分钟到1小时来检测结合的抗体。使用BD FACs Canto流式细胞仪分析样品。在增加的IL-2浓度存在下,纯化的抗体与表达不同IL-2R链的CHO细胞的结合显示在图2A-2D中。在恒定[IL-2]存在下滴定所选的纯化的抗体显示在图3A-3D中。如通过流式细胞术测量的结合细胞的抗体的EC₅₀显示在表4中。

[0397] 表4:与表达人类IL-2受体的细胞结合的IL-2/mAb复合物的EC₅₀ (观察到半数最大结合的抗体浓度)。

[0398]

抗体	CHO/IL-2 R β (编号4-29)(nM)	CHO/IL-2 R β γ (编号20-21)(nM)	R β /R β + γ c 比率
XPA.92.019	23	1.3	18
XPA.92.041	22	2.5	9
XPA.92.042	25	2.6	10
XPA.92.099	76	2.0	38

[0399] 实例4:IL-2诱导的细胞增殖

[0400] 背景和方法

[0401] 为了评估抗体对表达高亲和力三聚体或低亲和力二聚体IL-2R复合物的细胞的相对作用,采用两种细胞系进行细胞增殖试验。用人类IL-2受体 β 和 γ 链转染的NK谱系,NK-92的人类细胞系和小鼠淋巴细胞系BaF3均显示出响应IL-2的增殖活性。NK-92细胞系表达形成三聚体高亲和力IL-2受体复合物所需的所有三条链,R α 、R β 和 γ c,并且依赖于IL-2进行生长。BaF3细胞通常依赖于IL-3进行生长,然而,一旦用IL-2受体转染,细胞就从IL-3断开并转至IL-2以获得生长依赖性。用于这些实验的BaF3克隆仅用IL-2R β 和 γ c链转染,并且因此通过人类IL-2受体的低亲和力二聚体复合物进行信号传导。评估抗体调节IL-2诱导的增殖对表达高亲和力三聚体IL-2受体复合物(NK-92细胞,IL-2R $\alpha\beta\gamma$)或较低亲和力二聚体复合物(BaF3细胞,IL-2R $\beta\gamma$)的细胞的影响。这使得能够比较由不同受体复合物介导的IL-2诱导的增殖的抑制程度,包括证明主要阻断IL-2R α 相互作用的抗体对细胞增殖的影响。

[0402] 方法

[0403] 将NK-92细胞维持在含有12.5%FBS、12.5%马血清(Hyclone)、0.2mM肌醇、0.02mM叶酸(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich));0.1mM 2-巯基乙醇(生命科技公司(Life Technologies))以及15ng/mL人类IL-2(纽约州谷木屋(Valley Cottage NY)的Reprokine)的 α MEM(生命科技公司)中。将BaF3IL-2R β γ 细胞维持在具有10%FBS、0.4mg/mL遗传霉素(生命科技公司)和100ng/mL hIL-2的RPM中。将细胞离心沉淀,在DPBS中洗涤,并在不含IL-2的完全生长培养基中再悬浮过夜。在过夜IL-2停止后,再次洗涤细胞并以25,000个细胞/孔接种到不透明平底96孔板中不含IL-2的细胞各自生长培养基中。

[0404] 将IL-2滴定和抗体稀释液混合并在37°C下培育30分钟,之后添加到细胞中。培育后,将这些样品与细胞一起添加到培养板中以达到每孔100 μ l的最终浓度,并将板置于37°C培育箱中持续48小时。IL-2滴定测定中的最终抗体浓度为30 μ g/mL。

[0405] 在培育箱中48小时后,取出培养板并使其平衡至室温。将CellTiterGlo溶液以100微升/孔(威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega, Madison WI))添加到每个孔中。然后将培养板置于振荡器上2分钟以诱导细胞裂解,在室温下再培育8分钟,并且然后在具有500mS累积时间的FlexStation 3发光计(加利福尼亚州森尼韦尔的分子仪器公司(Molecular Devices, Sunnyvale CA))上读数。使用S形剂量反应四参数拟合在Prism(加利福尼亚州拉荷亚的格拉夫帕德软件公司(GraphPad Software, La Jolla CA))中分析发光值,以测定如图4A、4B和4C中所示的EC₅₀值。这些结果表明IL-2抗体,XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042和XPA.92.099对表达所有三种受体(R α β γ)的细胞的增殖的影响要大于对仅表达 β γ 复合物(R β γ)的细胞的增殖。还发现IL-2抗体,XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042和XPA.92.099在表达IL-2R α β γ (NK92和CTLL-2细胞)和IL-2R β γ (BaF3细胞)的细胞中抑制IL-2诱导的增殖的程度要大于MAB602对照抗体(分别为图5A-5C)。

[0406] 表5:增殖测定:在表达人类受体的细胞中,相较于未结合的IL-2的EC₅₀,mAb/IL-2

[0407] 复合物的EC₅₀(EC₅₀倍数变化)

[0408]

抗体	NK92(huR α β γ) (EC ₅₀ 倍数变化)	BaF3/IL-2HuR β γ (EC ₅₀ 倍数变化)	比率 (huR α β γ /R β γ)
XPA.92.019	33	5.2	6
XPA.92.041	35	3.9	9
XPA.92.042	52	5.0	10
XPA.92.099	22	2.4	9
作比较: MAB602	15	1.2	13

[0409] 表6:增殖测定:在表达小鼠受体的细胞中,相较于未结合的IL-2的EC₅₀,mAb/IL-2复合物的EC₅₀(EC₅₀倍数变化)

[0410]

抗体	CTLL-2(μ Ra β γ) (EC ₅₀ 倍数变化)
XPA.92.019	130
XPA.92.041	58
XPA.92.042	156
XPA.92.099	54
作比较: MAB602	18

[0411] 实例5:SPR研究

[0412] 使用Biacore 4000和标准捕获方法通过SPR测量抗体亲和力。简单地说,根据制造商说明书,通过胺偶联将来自抗人类抗体捕获试剂盒(Biacore)的抗人类IgG(Fc特异性)固定在CM-5传感器芯片的所有四个流动池的点1、2、4和5上。运行缓冲液是含有1%BSA的HBS-EP+。以10 μ l/min的流速注射2 μ g/mL的抗体2分钟。将rhIL-2以介于0.11nM-10nM的5个浓度以3倍连续稀释度一式三份地注射3分钟,并监测解离10分钟。使用Biacore 4000评估软件分析数据。亲和力如表7所示。

[0413] 表7:所选抗体对人类IL-2的动力学和亲和力。

[0414]

抗体	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (M)
XPA.92.019	3.7e6	3.4e-5	9.5e-12
XPA.92.041	5.6e6	3.2e-4	5.8e-11
XPA.92.042	8.9e6	2.5e-4	2.8e-11
XPA.92.099	5.5e6	2.4e-4	4.4e-11
作比较:MAB602			1.2e-10

[0415] 如上所述通过SPR测定IL-2抗体与人类、兔和小鼠IL-2的物种交叉反应性,不同之处在于IL-2以介于30nM至1nM的4种浓度以3倍连续稀释度一式两份地注射。与人类序列相比,来自其它物种的IL-2的氨基酸序列示于图6中。从PubMed结构数据库检索来自多种物种的IL-2的序列(猪:caa40071;大鼠:aaa41427;兔:np_001156652;人类:np_000577;小鼠:aab39206)。将这些序列输入vector NTI®(Lifetech)并使用alignx工具进行比对。亲和力估计值汇总在表8中。

[0416] 表8:物种交叉反应性:IL-2抗体对来自小鼠、大鼠或兔的IL-2的亲和力。

[0417]

抗体	小鼠 (M)	大鼠 (M)	兔 (M)
XPA.92.019	1e-7	>1e-6	2e-10
XPA.92.041	4e-8	1e-9	5e-10
XPA.92.042	1e-8	6e-9	6e-10
XPA.92.099	无结合	无结合	9e-11
作比较:MAB602	1e-8	未测得	未测得

[0418] 实例6:内源表达细胞系情况下的功能信号传导测定

[0419] IL-2R α (CD25) 的存在增加了二聚体IL-2受体(IL-2R β γ)对IL-2细胞因子的亲和力。在人类中,许多免疫细胞仅表达二聚体受体,包括初始和记忆T细胞以及CD56dim NK细

胞。相比之下,三聚体IL-2R (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) 存在于调节性T细胞、CD56亮NK细胞上,并且由效应T细胞瞬时表达。具有内源水平的IL-2R表达的细胞系以天然比率维持受体和信号传导组分的水平,并含有完整的信号传导路径。转录因子信号转导因子和转录激活因子5 (STAT5) 的激活是由IL-2通过IL-2受体介导的关键早期信号传导事件。STAT5磷酸化的结果是参与细胞过程(例如增殖、存活和凋亡)的多种基因的表达增加。为了评定抗IL-2抗体候选物在具有人类IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 或IL-2R $\beta\gamma$ 组分的内源表达的细胞系上影响IL-2信号传导的能力,如下所述测量STAT5a和b的磷酸化。

[0420] 人类NK-92细胞系中STAT5a、b的磷酸化

[0421] 为了比较抗体/IL-2复合物诱导表达三聚体受体(IL-2R $\alpha\beta\gamma$) 的细胞上STAT5磷酸化的能力,使用NK-92细胞系(ATCC)。这是NK细胞系,其依赖于IL-2进行生长并且维持细胞毒性能力和特征性NK细胞表面标记物。对于CD25 (IL-2R α) 的表达,其均匀地高。将细胞洗涤两次,然后在含有10%FBS (Hyclone) 但不含IL-2的RPMI-1640培养基(生命科技公司)中在37°C,5%CO₂培育箱中过夜饥饿。第二天,将细胞以每孔100,000个细胞的浓度接种在PBS和0.5%BSA中。将各种剂量的IL-2和100nM的指定抗IL-2抗体在37°C下预复合15-30分钟,之后每孔添加50 μ l到含有NK-92细胞的培养板。将细胞在37°C下刺激30分钟,然后添加100 μ l冷PBS以终止反应。将板在1500rpm,4°C下离心3分钟。随后,除去上清液并向每个孔中添加80 μ l冷MSD裂解缓冲液。通过在振荡平台上在4°C下培育1小时来完全裂解细胞。按照制造商说明书使用MSD Phospho (Tyr694) /总STAT5a、b全细胞裂解物试剂盒(MesoScale Discovery;目录号K15163D-2)测量总的和磷酸化的STAT5a、b。在Sector Imager 6000 (MesoScale Discovery)上读板。在Prism 6.05版(格拉夫帕德)中使用S形剂量反应方程通过非线性回归拟合曲线。

[0422] 如所预期的,同种型对照(抗KLH)和无抗体对照对IL-2信号传导高度敏感,EC₅₀值分别为0.9和0.6pM(图7A)。相对于同种型对照,所有测试的化合物均显示IL-2诱导的STAT5a、b的磷酸化的EC₅₀增加。参照抗体MAB602相对于同种型对照诱导了1000倍的EC₅₀值变化(从0.9pM到900pM)。XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042之间的倍数变化相似,EC₅₀值分别增加900pM、1150pM和1700pM。XPA.92.099在所述测定中使EC₅₀值变化较小,从0.9pM变为463pM。

[0423] 人类原代NK细胞中STAT5a、b的磷酸化

[0424] 为了检查抗体/IL-2复合物在具有二聚体受体(IL-2R $\beta\gamma$) 的细胞上调节STAT5路径的能力,利用纯化的原代NK细胞。进行另外的CD25+耗尽,确保仅存在具有二聚体IL-2R的细胞。使用密度梯度离心分离来自各种供体的外周血单核细胞(PBMC)。简单地说,在50ml锥形物中使稀释的全血在Ficoll(西格玛)溶液上层叠。在没有制动器的情况下将这些层在室温下以400 \times g离心30分钟。收集细胞带,加以洗涤并冷冻成等分试样。为了分离NK细胞用于PhosphoSTAT5分析,将一小瓶PBMC解冻,并使用MACS人类NK细胞分离试剂盒(美天旎生物技术有限公司(Miltenyi Biotech);目录号:130-092-657)按照制造商说明书分离NK细胞。使纯化的NK细胞在含有10%FBS (Hyclone) 但不含IL-2的RPMI-1640培养基(生命科技公司)中在37°C,5%CO₂培育箱中静置过夜。第二天,使用磁珠分离从NK细胞群中除去CD25+NK细胞。简单地说,将细胞再悬浮于MACS缓冲液(PBS(生命科技公司)和1%牛血清白蛋白(西格玛)中,并与生物素抗人类CD25(ebioscience)抗体(每50 μ l细胞溶液1 μ l抗体)一起培育。在室

温下培育10分钟后,洗涤细胞并再悬浮于40 μ l MagniSort链霉亲和素阳性选择珠粒(ebioscience)中。在室温下再培育10分钟后,使体积达到2.5mL并通过EasySep Magnet(干细胞科技公司(STEMCELL Technologies))在室温下培育5分钟进行分离。将未结合的细胞转移到干净的试管中并在室温下再培育5分钟以确保所有CD25+细胞完全耗尽。

[0425] 为了完成PhosphoSTAT5a、b测定,将NK细胞以每孔100,000个细胞的浓度接种在PBS和0.5%BSA中。将各种剂量的IL-2和100nM的指定抗IL-2抗体在37 $^{\circ}$ C下预复合15-30分钟,之后每孔添加50 μ l到含有NK细胞的培养板。将细胞在37 $^{\circ}$ C下刺激30分钟,然后添加100 μ l冷PBS以终止反应。将板在1500rpm,4 $^{\circ}$ C下离心3分钟。随后,除去上清液并向每个孔中添加80 μ l冷MSD裂解缓冲液。通过在振荡平台上在4 $^{\circ}$ C下培育1小时来完全裂解细胞。按照制造商说明书使用MSD Phospho (Tyr694) / 总STAT5a、b全细胞裂解物试剂盒(MesoScale Discovery;目录号K15163D-2)测量总的和磷酸化的STAT5a、b。在Sector Imager 6000(MesoScale Discovery)上读板。在Prism 6.05版(格拉夫帕德)中使用S形剂量反应方程通过非线性回归拟合曲线。

[0426] 与现有文献一致,二聚体受体对IL-2细胞因子的敏感性较低,如通过以下所见:与NK-92细胞相比,无抗体和同种型对照(抗KLH)样品的EC₅₀值较高(分别为133和127pM)(图7B)。相对于同种型对照,所有测试化合物均显示IL-2诱导的STAT5a、b的磷酸化的EC₅₀值增加。参考抗体MAB602相对于同种型对照诱导EC₅₀值发生10倍变化(从128pM到1302pM)。XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042的倍数变化相似,EC₅₀值分别为5041pM、4520pM和5124pM。在所述测定中,XPA.92.099使EC₅₀值略微低于其它XPA.92抗体,EC₅₀值为3054pM。表9汇总了表达人类IL-2受体的细胞的EC₅₀倍数变化。

[0427] 表9:pSTAT5a、b测定:在内源表达人类受体的细胞中,相较于未结合的IL-2的EC₅₀的mAb/IL-2复合物的EC₅₀(倍数变化)。

[0428]

抗体	NK92 (huR $\alpha\beta\gamma$) (EC ₅₀ 倍数变化)	人类原代 NK 细胞 (huR $\beta\gamma$) (EC ₅₀ 倍数变化)	EC ₅₀ 的比率 (R $\alpha\beta\gamma$ /R $\beta\gamma$)
XPA.92.019	966	40	24
XPA.92.041	1233	35	35
XPA.92.042	1855	41	45
XPA.92.099	495	24	21
作比较: MAB602	959	10	96

[0429] 小鼠原代NK细胞中STAT5a、b的磷酸化

[0430] 小鼠中的NK细胞与其人类对应物的不同之处在于其仅表达二聚体IL-2受体。为了测量IL-2/抗体复合物影响小鼠信号传导的能力,获得来自3只雌性BALB/C小鼠的脾脏,并通过40 μ M细胞过滤器(Falcon)使用1mL注射器(碧迪公司(Becton Dickinson))的后部推动器官产生单细胞悬浮液。洗涤脾细胞,然后再悬浮于RBC裂解缓冲液(西格玛)中,并使其在室温下培育5分钟。然后在RPMI-1640(生命科技公司)和10%FBS(Hyclone)中洗涤细胞。根据制造商说明书,使用MACS小鼠NK分离试剂盒II(Miltenyi)分选NK细胞。洗涤细胞,加以计数,并在PBS和0.5%BSA缓冲液的每个孔中接种100,000个细胞。将各种剂量的IL-2和100nM的指定抗IL-2抗体在37 $^{\circ}$ C下预复合15-30分钟,之后每孔添加50 μ l到含有NK细胞的培养板。

将细胞在37°C下刺激30分钟,然后添加100 μ l冷PBS以终止反应。将板在1500rpm,4°C下离心3分钟。随后,除去上清液并向每个孔中添加细胞80 μ l冷MSD裂解缓冲液。通过在振荡平台上在4°C下培育1小时来完全裂解细胞。按照制造商说明书使用MSD Phospho (Tyr694) /总STAT5a、b全细胞裂解物试剂盒 (MesoScale Discovery; 目录号K15163D-2) 测量总的和磷酸化的STAT5a、b。在Sector Imager 6000 (MesoScale Discovery) 上读板。在Prism 6.05版 (格拉夫帕德) 中使用S形剂量反应方程通过非线性回归拟合曲线。

[0431] 无抗体和同种型对照的EC₅₀值与人类原代NK细胞中观察到的非常相似(图7C) (分别为139pM和116pM)。相对于同种型对照,所有测试化合物均显示IL-2诱导的STAT5a、b的磷酸化的EC₅₀值增加。参考抗体MAB602相对于同种型对照诱导EC₅₀值发生3倍变化(从116pM到361pM)。XPA.92.019、XPA.92.041、XPA.92.042和XPA.92.099的倍数变化各自约为10-15倍,EC₅₀值分别为1723pM、1352pM、1663pM和1912。表10汇总了表达小鼠IL-2受体的细胞的EC₅₀倍数变化。

[0432] 表10:pSTAT5a、b测定:在内源表达鼠受体的细胞中,相较于未结合的IL-2的EC₅₀的mAb/IL-2复合物的EC₅₀ (倍数变化)。

[0433]

抗体	CTLL-2 (μ R $\alpha\beta\gamma$) (EC ₅₀ 倍数变化)	小鼠原代 NK 细胞 (μ $\beta\gamma$) (EC ₅₀ 倍数变化)	EC ₅₀ 的比率 (R $\alpha\beta\gamma$ /R $\beta\gamma$)
XPA.92.019	523	15	35
XPA.92.041	404	12	34
XPA.92.042	793	14	57
XPA.92.099	293	17	17
作比较: MAB602	227	3	76

[0434] 实例7:体内给予IL-2/抗体复合物后淋巴细胞亚群的分析

[0435] 正常C57BL/6小鼠腹膜内注射媒剂对照或1 μ g hIL-2(图8A-D),或1.5 μ g hIL-2(图8F和8G),其与5倍过量的同种型对照抗体或抗IL-2mAb预培育,如第0天、第2天和第4天所示。在第6天,使用标准技术收集脾脏,并如下对流式细胞术亚群进行染色。分离脾脏并解离以产生单细胞悬浮液。使用RBC裂解缓冲液(Gibco,赛默飞世尔)裂解红细胞。将细胞在FACS缓冲液(PBS和2%FBS和叠氮化钠(0.1%))中洗涤两次,并涂铺在96孔V底板(1 \times 10⁶个细胞/孔)中。在FACS缓冲液用下列荧光标记的抗体的混合物染色细胞:CD4(GK1.5)、CD8(53-6.7)、CD25(PC61.5)、CD44(IM7)、CD122(TM- β 1)、IFN γ (XMG1.2)和NK1.1(PK136)、颗粒酶B(GB12),其购自博莱德(Biolegend)、Ebioscience、BD Biosciences或生命科技公司)。将样品在染色混合物中在冰上培育20-60分钟,洗涤两次并在BD LSRII或BD Accuri上读取。对于颗粒酶B染色的分析,将用表面标记物染色并洗涤的样品固定并按照制造商说明书用cytofix/cytoperm缓冲液(BD Biosciences)渗透化,随后用抗颗粒酶B抗体在冰上染色20-60分钟。将样品洗涤两次并在BD LSRII或BD Accuri上读取。使用FlowJo软件(Treestar)或CFlow(BD Biosciences)分析数据。为了分析淋巴细胞亚群,在淋巴细胞,然后在如下谱系标记物上分选:CD8+对CD4表达/CD8+细胞的CD44hi%;CD4+细胞的CD25hi和CD44hi%;和CD8、CD4或NK1.1阳性细胞的百分比。图8A-8D显示了相关T细胞亚群的汇总,并且图8E显示了根据图8A和8B中的数据计算的CD8+/CD4+ T细胞的比率。图8F显示

了总淋巴细胞的NK1.1+细胞的频率。图8G显示在与IL-2/抗IL-2抗体接触后小鼠中NK细胞的颗粒酶B产量。

[0436] 这些结果表明抗IL-2抗体对体内CD8/CD4比率以及NK细胞水平和活性具有一定影响。

[0437] 实例8:皮下肺癌小鼠模型中单独和与检查点抑制剂组合的抗体/IL-2复合物的处理

[0438] 为了证明抗IL-2抗体在肿瘤异种移植动物模型中的作用,将C57/BL6小鼠皮下接种路易斯氏肺癌(Lewis lung carcinoma) LLC-A9F1 (LLC) 细胞(2.5×10^5 个细胞)并使肿瘤在没有处理的情况下生长10天以确诊(处理开始于第11天)。在随机化处理之前去除异常值。患有LLC肿瘤的六组小鼠的处理各自如下进行处理:(1)仅载体对照, $n=10$ 只小鼠;(2)IL-2与抗IL-2(XPA.92.099)单克隆抗体复合(IL-2/mAb)(通过IP注射每48小时给予, $1\mu\text{g}$ IL-2和 $5\mu\text{g}$ mAb), $n=5$ 只小鼠;(3)单独的抗PD-1mAb(来自Bioxcel的RMP1-14克隆,每周2次给予 $200\mu\text{g}$), $n=10$ 只小鼠;(4)IL-2/mAb(XPA.92.099)和抗PD-1mAb组合, $n=5$ 只小鼠;(5)单独的抗CTLA-4mAb(来自Bioxcel的UC10-4F10-11,每周2次给予 $200\mu\text{g}$), $n=10$ 只小鼠;或(6)IL-2/mAb(XPA.92.099)和抗CTLA-4mAb组合, $n=5$ 只小鼠。以盲法形式进行肿瘤测量(长度和宽度),并且以 mm^2 为单位描述面积。图9显示了如上所述处理的个体小鼠的肿瘤面积随时间的曲线图。虽然处理的小鼠数量太少而无法达到显著性,但相较于对照或单一药剂处理,IL-2/抗IL-2复合物与抗PD-1或抗CTLA-4的组合作用仍有可能更大程度地减少肿瘤生长并诱导完全反应(图9)。

[0439] 为了进一步评估抗IL-2抗体的抗肿瘤作用,进行具有更多数量的小鼠($n=15$ /组)的实验。如上所述,用LLC肿瘤细胞接种小鼠。确诊肿瘤并将小鼠随机分组后,如下处理四组小鼠(每组15只):(1)仅载体对照(PBS);(2)抗PD-1mAb(RMP1-14克隆),每周2次,皮下(sc)注射 $200\mu\text{g}$;(3)IL-2/mAb复合物(克隆99,每48小时,IP注射, $2\mu\text{g}$ IL-2+ $10\mu\text{g}$ mAb);(4)如组(2)和(3)中所述的IL-2/mAb99+抗PD-1mAb的组合。以盲法形式进行肿瘤测量(长度和宽度),并且以 mm^2 为单位描述面积。图10A显示了如上所述的每个处理组的平均肿瘤体积随时间的曲线图。误差棒表示平均值的标准误差(SEM)。尽管与对照处理小鼠相比,IL-2/抗IL-2复合物和抗PD-1单一疗法显著降低了肿瘤生长,但IL-2/抗IL-2复合物与任一抗PD-1的组合作用要显著大于单独的任一试剂。图10B显示了来自同一实验的存活情况图。对照组中没有小鼠具有完全反应(没有肿瘤可检测到),而单独的IL-2/mAb99组中有一只小鼠,单独的抗PD-1组中有两只,并且组合处理组有6只实现了此类完全反应。

[0440] 实例9:IL-2/抗体复合物对患有皮下LLC肿瘤的小鼠中的免疫细胞的影响

[0441] 为了在肿瘤攻击期间评估抗体/IL-2复合物对体内免疫细胞的作用,如上所述向小鼠注射 1×10^6 个LLC肿瘤。肿瘤注射后21天,将具有确诊肿瘤的小鼠随机分成5组,并按如下方式处理:(1)对照(无Ab或IL-2);(2)抗PD-1mAb(RMP1-14克隆), $200\mu\text{g}$ 每周皮下给予两次;(3)IL-2/mAb99复合物($2\mu\text{g}$ IL-2+ $10\mu\text{g}$ mAb),每2天通过IP注射;(4)如组(2)和(3)中所述的IL-2/mAb99+抗PD-1mAb的组合;(5)IL-2/mAb19复合物($2\mu\text{g}$ IL-2+ $10\mu\text{g}$ mAb,在第1、3、5、9、13和17天通过IP注射);(6)如组(2)和(5)中所述的IL-2/mAb19+抗PD-1mAb的组合。在开始处理后第19天,处死小鼠并如下分析免疫细胞。针对细胞表面标记物的表达如上所述分离和分析脾细胞。为了评定 CD8^+ T细胞产生干扰素 γ (IFN γ)的能力,在(RPMI和10%FBS)

中用巴豆醇12-十四烷酸酯-13-乙酸酯(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (PMA, 50ng/mL) 和离子霉素(1 μ M) 刺激脾细胞10-12小时,并用布雷菲尔德菌素A(brefledin A) (Goglistop, BD Biosciences) 进行刺激。然后针对细胞外CD8将细胞染色,固定并渗透化(Cytofix/Cytoperm, BDBiosciences),然后在细胞内染色IFN γ 。在使用FlowJo软件(Treestar)或CFlow(BD Biosciences)分析的BD LSRII或BD Accuri上读取样品。为了分析CD8⁺ T细胞响应,在淋巴细胞和CD8⁺ T细胞上对细胞进行门控,并评估IFN γ 阳性细胞的百分比。图11中的图表显示用IL-2/mAb复合物处理引起CD8⁺ T细胞的频率增加(图11A),以及活化的CD8⁺ T细胞的比例增加(CD44^{hi}%, 图11B),但在CD4⁺ T细胞的频率(图11C)或呈CD25^{hi}(T_{regs})的CD4⁺细胞的百分比(CD25^{hi}%, 图11D)方面未看到增加。图11进一步显示IL-2/mAb处理引起CD8⁺ T细胞的频率增加,所述细胞在用PMA/I刺激后能够产生IFN γ (图11E);并且引起CD8⁺/CD4⁺ T细胞的比率增加(图11F)。

[0442] 实例10: IL-2/抗体复合物对人类免疫细胞的作用

[0443] 除T细胞和NK细胞外,其它免疫和非免疫细胞类型也表达功能性IL-2受体。这些细胞类型包括B细胞、单核细胞、粒细胞、以及一些报道中的内皮细胞。许多这些细胞类型组成性地表达IL-2R α ,或者可以响应某些细胞因子或刺激因子来表达IL-2R α 。进行实验以检查用IL-2/mAb复合物处理如何影响表达三聚体IL-2受体(IL-2R $\alpha\beta\gamma$)的细胞中的活化。PBMC含有显著百分比的各种免疫细胞亚群,并且因此提供评定抗IL-2抗体对关键细胞群的影响的有用工具。被报告表达功能性三聚体IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 的细胞包括:CD56^亮NK细胞、活化的CD8T细胞、T_{regs}、单核细胞和B细胞。分析由T细胞和NK细胞中的IL-2信号传导诱导的CD69标记物的表达水平作为活化的读数。此外,测定IL-2/mAb复合物处理后CD4T细胞群中的T_{regs}的频率。

[0444] 使用密度梯度离心分离来自各种供体的PBMC。在50mL锥形管中使稀释的全血在Ficoll(西格玛)溶液上层叠。在没有制动器的情况下将这些层在室温下以400 \times g离心30分钟。收集细胞带,加以洗涤并冷冻成等分试样。将等分试样解冻在完全RPMI培养基(RPMI 1640(生命科技公司)+10%FBS(Hyclone)+2mM L-谷氨酰胺)中。洗涤两次后,对细胞进行计数并以1 \times 10⁶个PBMC/孔以50 μ l体积涂铺在96孔圆底板中。将各种剂量的重组人类IL-2(以色列的Reprokine)和200nM的指定抗IL-2抗体在37 $^{\circ}$ C下预复合30分钟,之后每孔添加50 μ l到含有细胞的培养板。随后将板在37 $^{\circ}$ C下培育20-24小时。培育完成后,除去上清液,用FACS缓冲液(PBS(生命科技公司)、0.5%BSA(西格玛)和0.1%叠氮化钠(天惠华))洗涤细胞两次。将样品在室温下用人类TruStain FcX(博莱德)Fc封闭10分钟并且每个样品分在两个孔中。一组用以下荧光标记的抗体(博莱德)混合物染色:CD69(FN50)、CD4(OKT4)、CD8a(SK1)、CD127(A019D5)、CD25(M-A251)、CD3(HIT3a)。第二组用以下荧光标记的抗体(博莱德)混合物染色:CD3(HIT3a)、CD56(HCD56)、CD19(HIB19)、CD69(FN50)、CD14(M5E2)。将样品在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中培育60分钟。将其用FACS缓冲液洗涤两次,并用50 μ l BD Cytofix(碧迪)在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中固定20分钟。用FACS缓冲液洗涤样品两次,并在BD FACSCanto II上读取。用FlowJo软件(Treestar)和格拉夫帕德Prism(第7版)使用3参数拟合分析数据。

[0445] 通过门控淋巴细胞,然后是CD3⁻和CD56⁺群来鉴别NK细胞。在所述CD56⁺群中,最亮的约10%代表CD56^亮NK细胞。在CD56^亮NK细胞中,观察到IL-2处理对CD69表达的剂量依赖性作用,对于供体603或625,EC50值分别为7.6nM(图13A)或9.5nM(图13B)。参考抗体MAB602诱导EC50值发生5-10倍变化(图13C)。用XPA.92.019、XPA.92.042或XPA.92.099进行的处理也

显示出EC50值出现与如在MAB602情况下看到的类似的增加(图13C)。这表明这些抗IL-2抗体降低了对表达IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 的CD56^亮NK细胞上IL-2诱导的活化的敏感性。

[0446] 为了分析T_{reg}群中CD69的诱导,分析表达以下分布的淋巴细胞:CD3+CD4+CD25+CD127⁻。与CD56^亮NK细胞一样,观察到IL-2处理的剂量依赖性作用,对于供体603或625,EC50值分别为28nM(图14A)或22nM(图14B)。参考抗体MAB602诱导EC50值发生5-10倍变化(图14C)。用XPA.92.042或XPA.92.099进行的处理也显示出EC50值出现与MAB602相似的增加,而XPA.92.019诱导10-15倍的更高变化(图14C)。

[0447] IL-2提供的信号传导对Treg生长和体内平衡至关重要。如图15A和图15B所示,针对所述测定中使用的IL-2浓度,T_{regs}的百分比对于无抗体对照保持相对不变。然而,对于供体603(图15A)和625(图15B),添加预复合的IL-2/抗IL-2抗体以剂量依赖性方式降低T_{regs}的频率。在高浓度IL-2下,Treg细胞的频率与未进行抗体处理的样品相似或比其略高。然而,在低于10ng/mL的IL-2浓度下,用所有测试抗体刺激24小时后鉴别到显著较少的T_{regs}。这表明,XPA.92.019、XPA.92.042和XPA.92.099抗体抑制T_{reg}体内平衡所需的IL-2信号。

[0448] 实例11:IL-2/抗体复合物对鼠结肠癌模型中的免疫细胞的影响

[0449] 为了确定抗IL-2抗体/IL-2复合物是否有效治疗结肠癌,将CT26细胞皮下植入小鼠,随后给予抗体/IL-2处理。

[0450] 肿瘤细胞. CT26鼠结肠肿瘤细胞最初购自ATCC。将肿瘤细胞从一个冷冻小瓶中解冻,并使用具有10%热灭活的FBS的适当的完整RPMI培养基置于体外培养物中。

[0451] 动物. 使用从杰克逊实验室(Jackson Laboratories)购得的7-8周龄的雌性Balb/c小鼠。使小鼠适应4天并关养在动物设施中,呈18个笼中的每一个中有四只小鼠,随意提供食物和水,并在研究开始之前适应4天。在植入肿瘤细胞(第0天)之前、在可通过卡尺测量到肿瘤之前每周一次、处理开始前一天和肿瘤生长和处理期间每周两次对小鼠进行称重。

[0452] 处理. 从Reprokine(以色列)获得IL-2,并在标记临床研究公司制备抗IL-2抗体。将在无菌水中制备的IL-2的储备溶液适当稀释到投配溶液,以将200 μ l体积的50 μ g、100 μ g、150 μ g和1.5 μ g递送到相应组的每只小鼠。在给药当天,IL-2和抗体组合在给药溶液中一起调配。

[0453] 体内功效研究:将CT26细胞培养物扩增约一周,直到备好足够数量的细胞植入小鼠中。在植入当天,在用温胰蛋白酶/EDTA溶液短暂处理后,从处于指数期生长的培养物中收集细胞,之后添加含血清的培养基并在无菌的1 \times PBS中洗涤两次。在植入之前和期间,将细胞悬浮液保持在冰上以保持细胞活力和粘附能力。在最后一次离心后,对细胞进行计数并在无菌的1 \times PBS中适当地再悬浮到7.5 $\times 10^6$ 个/毫升的最终浓度。通过使用0.4%台盼蓝(trypsin blue)溶液测定活力,并且发现呈94.5%。将肿瘤细胞(0.75 $\times 10^6$ 个)皮下植入麻醉小鼠的左侧腹中,体积为100 μ l。仔细监测小鼠并每天记录临床观察结果。在给药处理后每天称重小鼠,并通过长度(L)和宽度(W)的卡尺测量每周测定肿瘤生长两次;肿瘤尺寸用公式(L \times W²)/2计算。在植入细胞后6天,肿瘤变得可成形,并且当使用计算机生成的随机化模板将肿瘤随机分入处理组时,肿瘤达到约100mm³的尺寸,确保各组之间的肿瘤平均值和标准偏差相似。随机化后,小鼠通过腹膜内途径接受测试物。

[0454] 结果:仅用IL-2处理的动物的肿瘤生长结果分析显示,尽管与媒剂对照(第20天时为约2600m³)相比,在IL-2 50 μ g和100 μ g处理组中,从第10-20天开始肿瘤生长有所降低(第

20天时分别为约1300m³和400m³),但这些小鼠嗜睡并且在动物中存在一定死亡率(3)(图16)。这与文献中的临床前报告以及临床中有效IL-2疗法的挑战性质一致。低于2.5mg/kg的单独的IL-2剂量具有最小的抗肿瘤功效。

[0455] 相比之下,与媒介剂对照相比,IL-2与抗IL-2抗体以1:1的比率组合给予显示IL-2:mAb组合的改善的治疗指数(TI),以及在IL-2mAb存在下,1:1摩尔比(1:10质量比)的重要性以及极低剂量的IL-2的抗肿瘤功效。向小鼠给予各种剂量的IL-2和抗体,如表11所示。

[0456] 表11

[0457]

设计	小鼠数	处理/IP途径	剂量(微克/小鼠)/体积	投药方案
疗法 肿瘤(约 100 mm ³) 随机化后 开始处理	6	对照媒介剂	NA/200 μl	每3天一次 1.5周
	6	mAb19 + IL-2 (1:1 摩尔比)	15 微克/小鼠+ 1.5 微克/小鼠	每3天一次 1.5周
	6	mAb19 + IL-2 (1:2 摩尔比)	15 微克/小鼠+ 3.0 微克/小鼠	每3天一次 1.5周
	6	mAb19 + IL-2 (3:1 摩尔比)	15 微克/小鼠+ 0.5 微克/小鼠	每3天一次 1.5周
	6	mAb19 + IL-2 (1:2 摩尔比; ½总剂量 对上述第3组)	7.5 微克/小鼠+ 1.5 微克/小鼠	每3天一次 1.5周

[0458] 图17展现出与接受其它比率的IL-2/抗体组合处理的动物相比,接受1:1比率的抗体与IL-2的动物具有改善的抗肿瘤生长功效。此外,这些动物中没有出现致死性,并且没有明显的不良体重减轻,也没有不良行为体征。

[0459] 这些结果表明,极低剂量的IL-2与抗IL2mAb组合展现出中等至良好的抗肿瘤功效,并且以15μg:1.5μg(即0.75mg/kg:0.075mg/kg)投配的1:1摩尔比的mAb19:IL2是最有效的比率。应注意,第9天的mAb:IL2 15μg:1.5μg组与所有其它组在统计学上显著不同。

[0460] 进行另外的研究以进一步分析IL-2/抗IL-2抗体处理的摩尔比方面。处理方案如下表12所示。

[0461] 表12

[0462]

设计	小鼠数	处理/IP途径	剂量(微克/小鼠)/体积	投药方案
疗法 肿瘤(约 100 mm ³) 随机化后 开始处理	11-12	对照媒介剂	NA/200 μl	每3天一次 1.5周(即 第1、4、7、10天)
	11-12	mAb19 + IL-2 (1:1 摩尔比)	15 微克/小鼠+ 1.5 微克/小鼠	每3天一次 1.5周
	11-12	mAb19 + IL-2 (2:1 摩尔比)	30 微克/小鼠+ 1.5 微克/小鼠	每3天一次 1.5周

[0463] 结果显示在图18中,并且示出,在第7天和第10天,mAb:IL2 15μg:1.5μg组中较慢的肿瘤生长与媒介剂对照组在统计学上显著不同,并且mAb:IL2 30μg:1.5μg组中的生长与对照相比也较低。实验表明,极低剂量的IL-2与抗IL2mAb组合显示出抗肿瘤功效,并且以15μg:1.5μg(即0.75mg/kg:0.075mg/kg)投配的1:1摩尔比的mAb:IL2至少与2:1比率一样有效。

在任何这些剂量组中均没有出现致死性或明显的不良事件。因此,在这些研究中表明了至少6倍(15:0.5至15:3.0)的治疗指数,而伴随单独的IL-2的相当功效伴随有一定程度的死亡率。

[0464] 所属领域的技术人员预期会进行如阐述于上文说明性实例中的本发明中的大量修改和变化。因此,本发明应仅受所附权利要求书的限制。

50	55	60																
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr			
65					70					75					80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85						90					95			
Ala	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly			
				100					105						110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser												

115

<210> 2

<211> 357

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<223> XPA.92.019 HV

<400> 2

gaagtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tctctgtcag cctctggatt caccttcagt tactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctagagtg ggtggcagat atatcaaagc atggaagtaa taaatattac 180
gcagactctg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagac cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag acctgaggac acggctgtat attactgtgc gaccacctac 300
tatgatagta gtgggttggc ctactggggc cagggaacce tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> XPA.92.041 HV

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26) .. (33)

<223> H-CDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (51) .. (58)

<223> H-CDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.042 HV
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26) .. (33)
 <223> H-CDR1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51) .. (58)
 <223> H-CDR2
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97) .. (106)
 <223> H-CDR3
 <400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Asp Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Ser Ser Ser Ala Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 6
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> XPA.92.042 HV
 <400> 6

gaggtccagc tggtagcagtc tggaaacagag gtgaaaaagg ccggggactc tctgaagatt 60
 tcctgtaagg gttctggata caactttgac acgtactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggagag gcctggagtg gatgggcacc atctatcctg ctgactctga caccagatat 180
 agtccgtcct tccaaggcca ggtcacatg tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtggg gcagcctgag ggccctcggac accgcatgt attactgtgc gagttcagc 300
 agctctgcct atgacatttg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc a 351

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> XPA.92.099 HV

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26) .. (33)

<223> H-CDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (51) .. (58)

<223> H-CDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (97) .. (110)

<223> H-CDR3

<400> 7

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

	100	105	110
Gln Gly Thr	Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
<210>	8		
<211>	363		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<220>			
<221>	misc_feature		
<223>	XPA.92.099 HV		
<400>	8		
	caggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctgggaggtc cctgagactc	60	
	tcctgtgcag cctctggatt cacettcaat agatatgcca tgagctgggt cgcagggt	120	
	ccaggcaagg ggctagagtg ggtggcgatg atatacattg atggaggtaa tcaatattac	180	
	acagactccg tgagtggcgg attcaccatc tccagagaca attccaagac cacgctgttt	240	
	ctgcaaatgg acagcctgag aactgaggac acggctgtgt attattgtgt gagatccccg	300	
	gcgggggact gggttgcta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	360	
	tca	363	
<210>	9		
<211>	109		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<223>	XPA.92.019 LV (λ)		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(26) .. (31)		
<223>	L-CDR1		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(49) .. (51)		
<223>	L-CDR2		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(88) .. (98)		
<223>	L-CDR3		
<400>	9		
Ser Tyr Glu	Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln		

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

<210> 10

<211> 327

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<223> XPA.92.019 LV (λ)

<400> 10

tcctatgagc tgacacagcc accctcgggtg tcagtatccc caggacaaac ggccaggatc 60
acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaga tttgcttatt ggtaccagca gaaggcaggc 120
caggcccctg tactgggtcat ctatgaggac acaaacgac cctccgggat ccctgagaca 180
ctgtctggct ccagttcagg gacaacggcc accttgacca tcagtggggc ccaggaggag 240
gatgaagctg actactattg ttactccaca gacaacactg gtggtctctg ggtgttcggc 300
ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> XPA.92.041 LV (λ)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26) .. (31)

<223> L-CDR1

<220>

<213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.042 LV (λ)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26) .. (31)
 <223> L-CDR1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49) .. (51)
 <223> L-CDR2
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (88) .. (97)
 <223> L-CDR3
 <400> 13
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Arg Lys Phe Ala
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Arg Ser Asp Ser Tyr
 85 90 95
 Val Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105
 <210> 14
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> XPA.92.042 LV (λ)
 <400> 14

tcctatgagc tgacacagcc accctcgggtg tcagtggtccc caggacaaac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagatgcatt gccaaagaaa tttgcttact ggtaccagca gaagtcaggc 120
 caggcccctg tcctgggtgat atatcaagac actaagaggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcagtgacgt ccaggcagag 240
 gacgacgctg actattattg tcagtcagcc gacagaagtg attcttatgt cttcggagct 300
 gggaccaagc tcaccgtcct aggt 324

<210> 15

<211> 109

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> XPA.92.099 LV (κ)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27) .. (32)

<223> K-CDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50) .. (52)

<223> K-CDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89) .. (98)

<223> K-CDR3

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Pro Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Asn His

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile

35 40 45

Phe Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ala Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Asp Tyr Pro Ser

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100	105
<210> 16	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> XPA.92.099 LV (κ)	
<400> 16	
gacatccaga tgaccagtc tccttctec ctgtctgctt ctattggaga cagagtcacc 60	
atcccctgcc aggcgagtga ggacattagt aatcatttaa gttggtatca gcagaaacca 120	
gggaaagccc ctaaaccct gatcttcgat gcatccgatt tggaaacagg ggtcccatca 180	
aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttgctctca ccatcagcag cctgcggcct 240	
gatgattttg caactatta ctgccaccag tatcatgatt atccctcgta cacttttggc 300	
cacgggacca agctggagat caaacgt 327	
<210> 17	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> 智人	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<223> XPA.92.019 HV H-CDR1	
<400> 17	
Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr Gly	
1 5	
<210> 18	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> 智人	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<223> XPA.92.019 HV H-CDR2	
<400> 18	
Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys	
1 5	
<210> 19	
<211> 12	
<212> PRT	
<213> 智人	

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.019 HV H-CDR3
 <400> 19
 Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.041 HV H-CDR1
 <400> 20
 Gly Tyr Asn Phe Asp Thr Tyr Trp
 1 5
 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.041 HV H-CDR2
 <400> 21
 Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Asp Thr
 1 5
 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.041 HV H-CDR3
 <400> 22
 Ala Arg Phe Ser Ser Ser Ala Tyr Asp Ile
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 8
 <212> PRT

<213> 智人
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.92.042 HV H-CDR1
<400> 23
Gly Tyr Asn Phe Asp Thr Tyr Trp
1 5
<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.92.042 HV H-CDR2
<400> 24
Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Asp Thr
1 5
<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.92.042 HV H-CDR3
<400> 25
Ser Ser Ala Tyr Asp Ile Ala Arg Phe Ser
1 5 10
<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.92.099 HV H-CDR1
<400> 26
Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr Ala
1 5
<210> 27
<211> 8

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.019 LV (λ) L-CDR3
 <400> 31
 Tyr Ser Thr Asp Asn Thr Gly Gly Leu Trp Val
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.041 LV (λ) L-CDR1
 <400> 32
 Ala Leu Pro Arg Gln Phe
 1 5
 <210> 33
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.041 LV (λ) L-CDR2
 <400> 33
 Lys Asp Thr
 1
 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.041 LV (λ) L-CDR3
 <400> 34
 Asp Ser Ser Gly Thr Tyr His Gln Ser Ala
 1 5 10

<210> 35
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.042 LV (λ) L-CDR1
 <400> 35
 Ala Leu Pro Arg Lys Phe
 1 5
 <210> 36
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.042 LV (λ) L-CDR2
 <400> 36
 Gln Asp Thr
 1
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.042 LV (λ) L-CDR3
 <400> 37
 Gln Ser Ala Asp Arg Ser Asp Ser Tyr Val
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> XPA.92.099 LV (κ) K-CDR1
 <400> 38
 Glu Asp Ile Ser Asn His

XPA.92.019
在存在IL-2下与细胞的结合

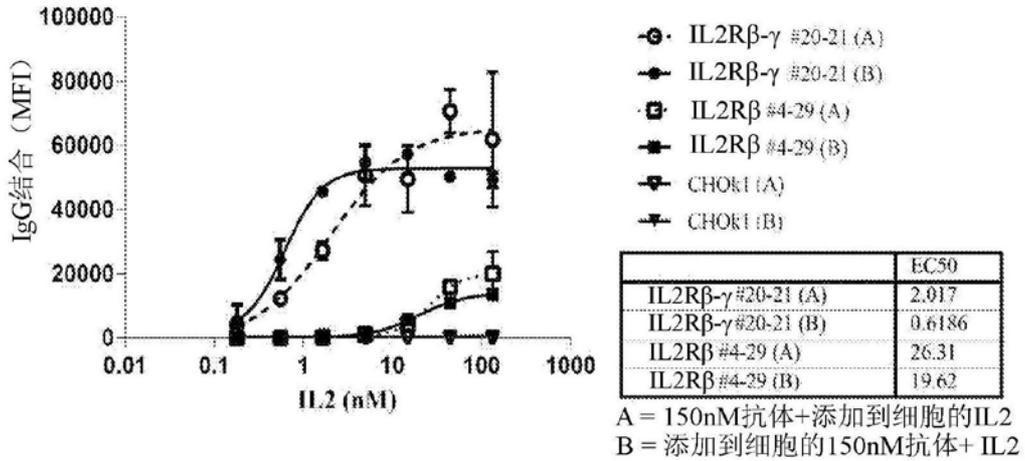


图2A

XPA.92.041
在存在IL-2下与细胞的结合

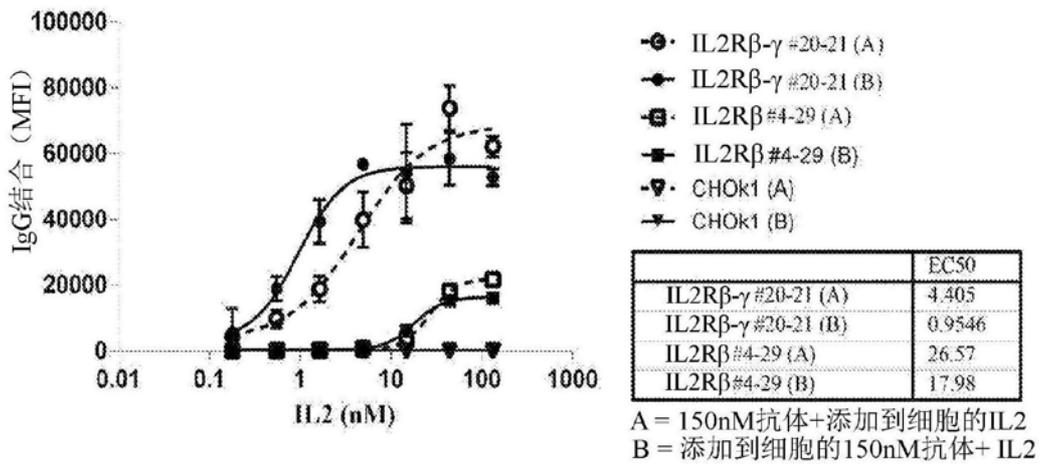


图2B

XPA.92.042
在存在IL-2下与细胞的结合

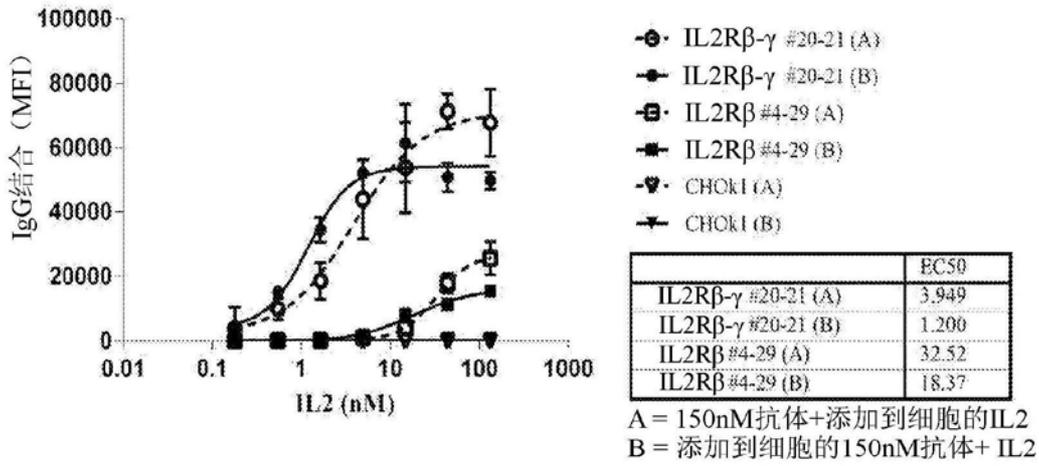


图2C

XPA.92.099
在存在IL-2下与细胞的结合

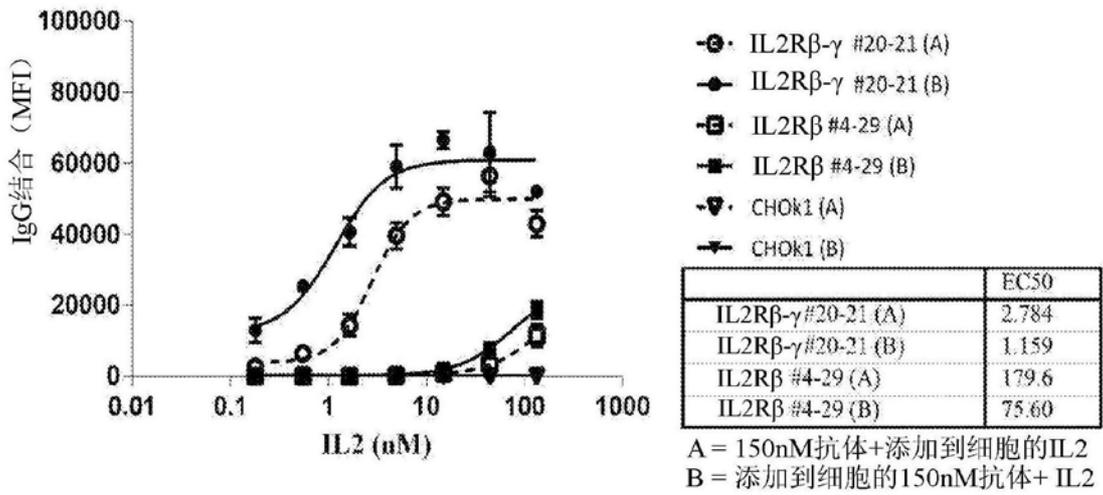


图2D

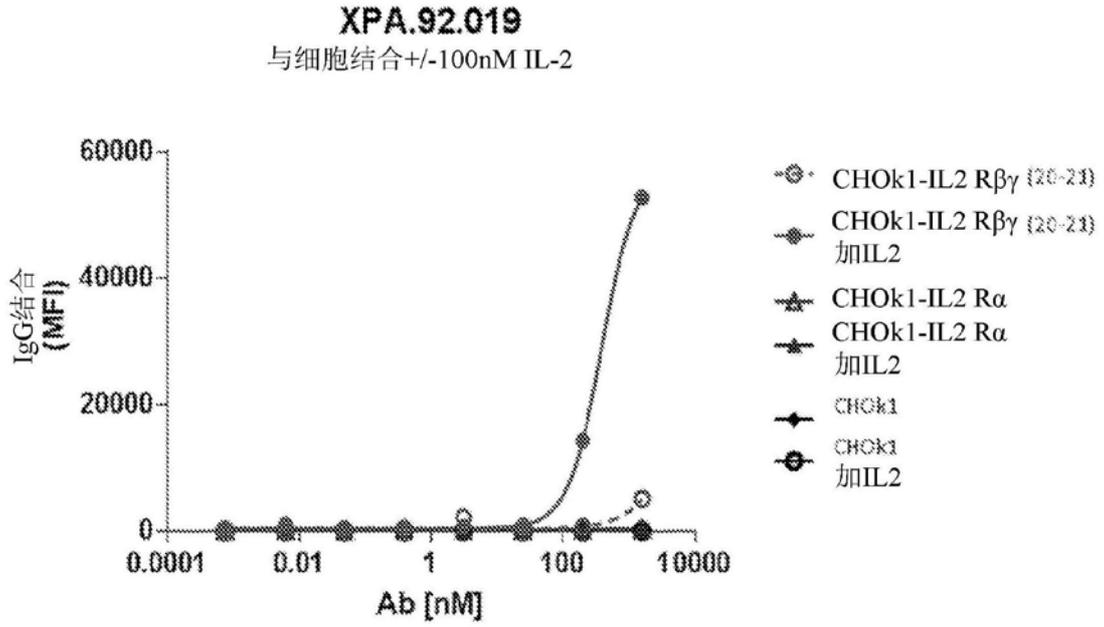


图3A

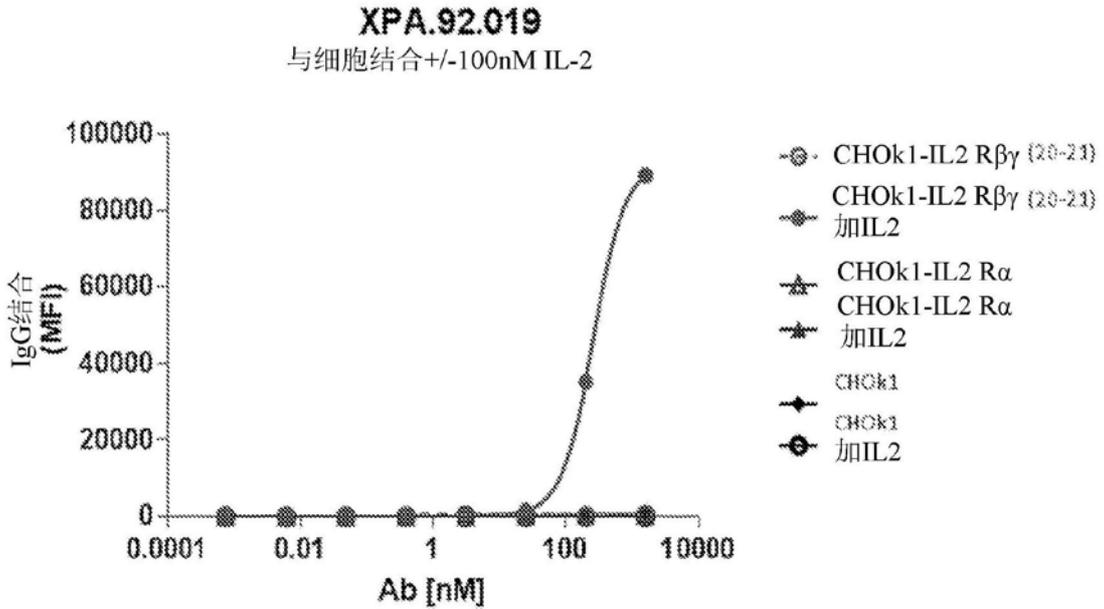


图3B

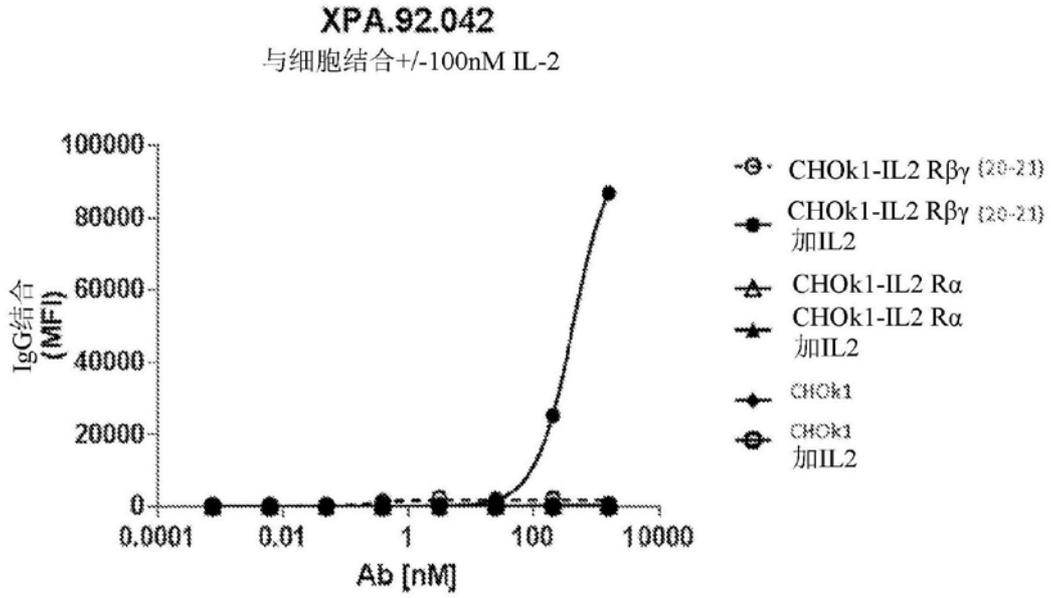


图3C

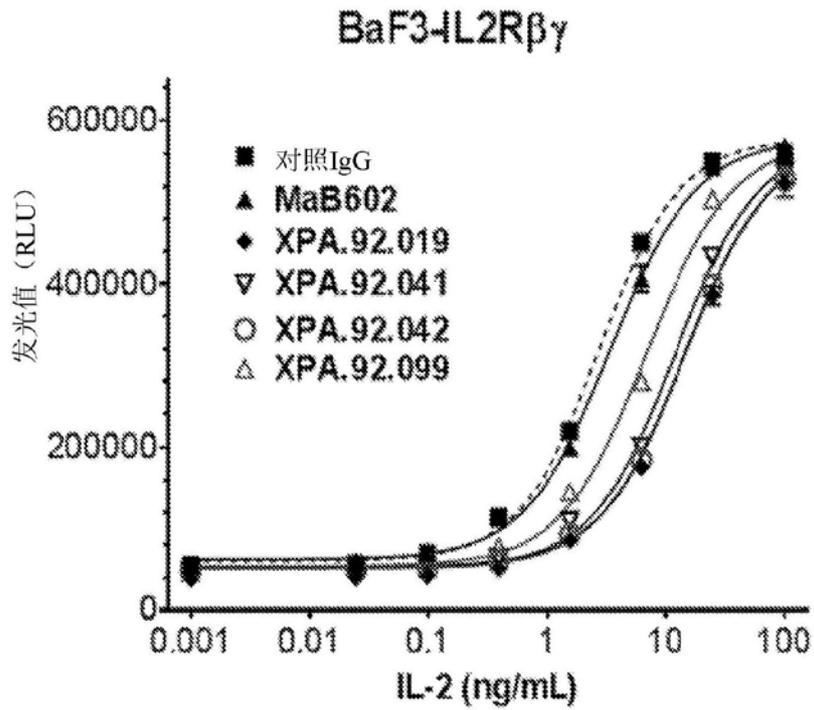


图4A

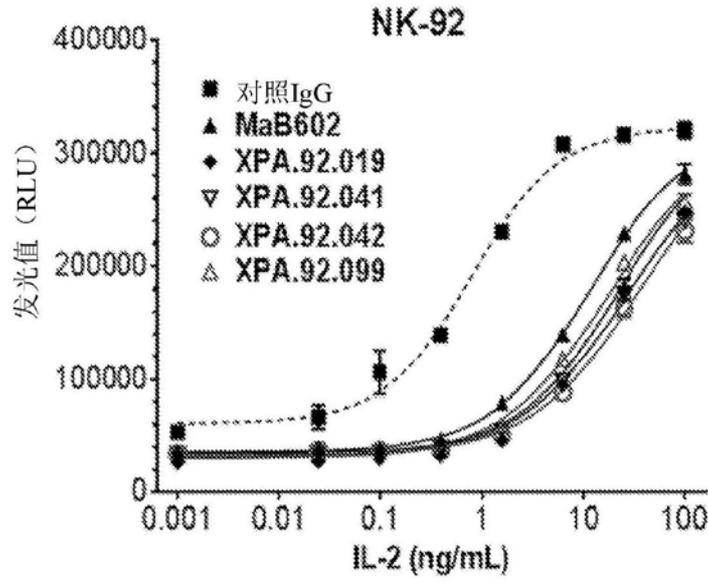


图4B

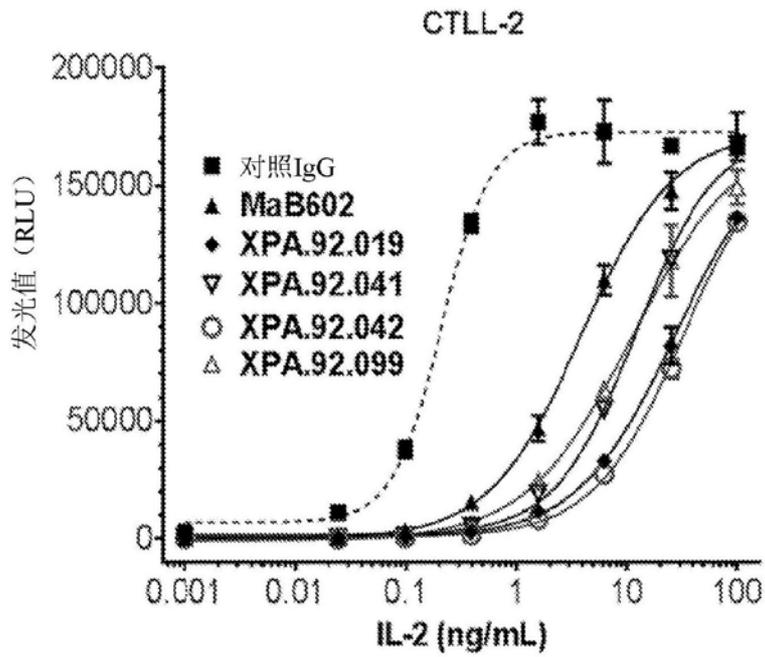


图4C

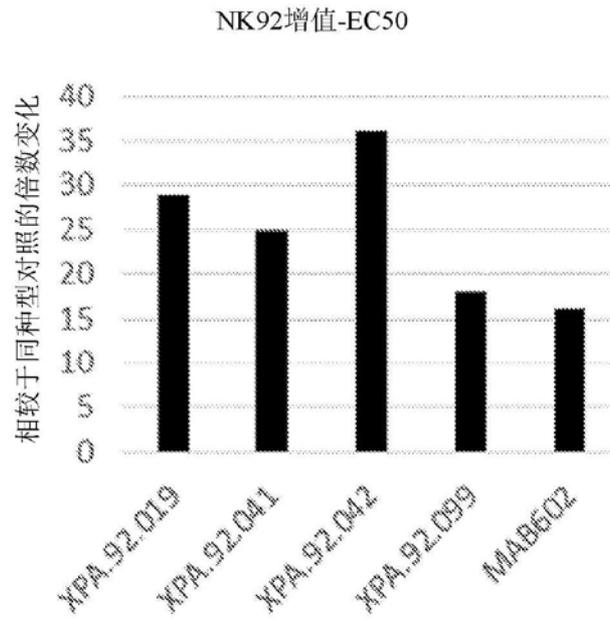


图5A

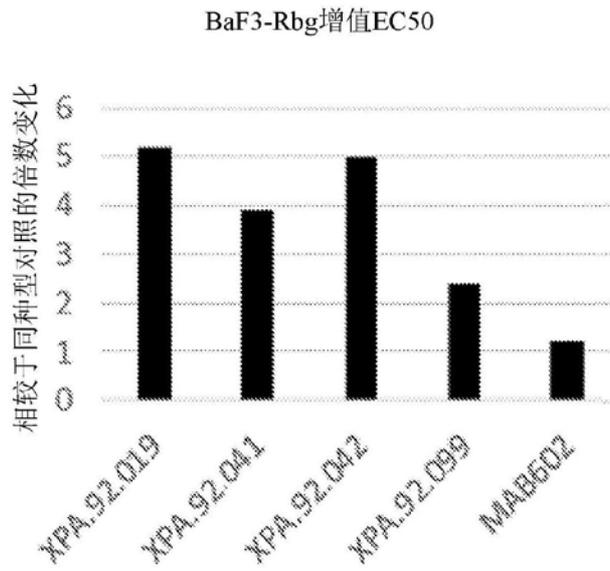


图5B

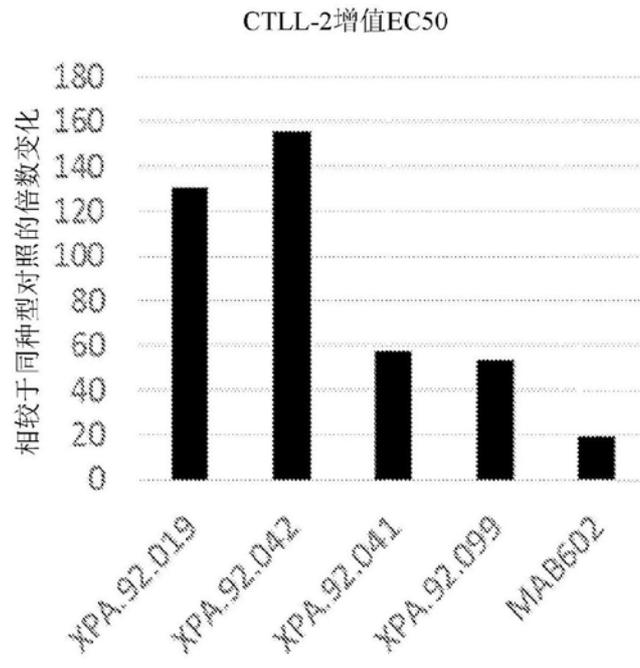


图5C

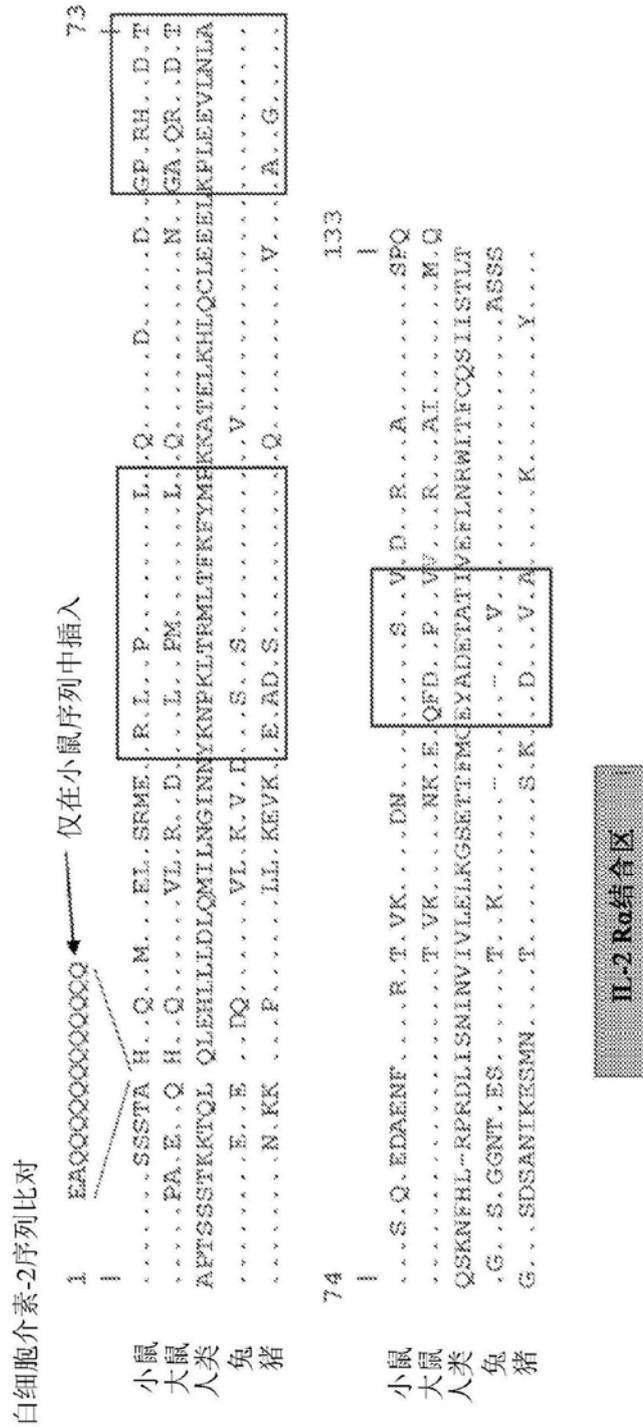


图6

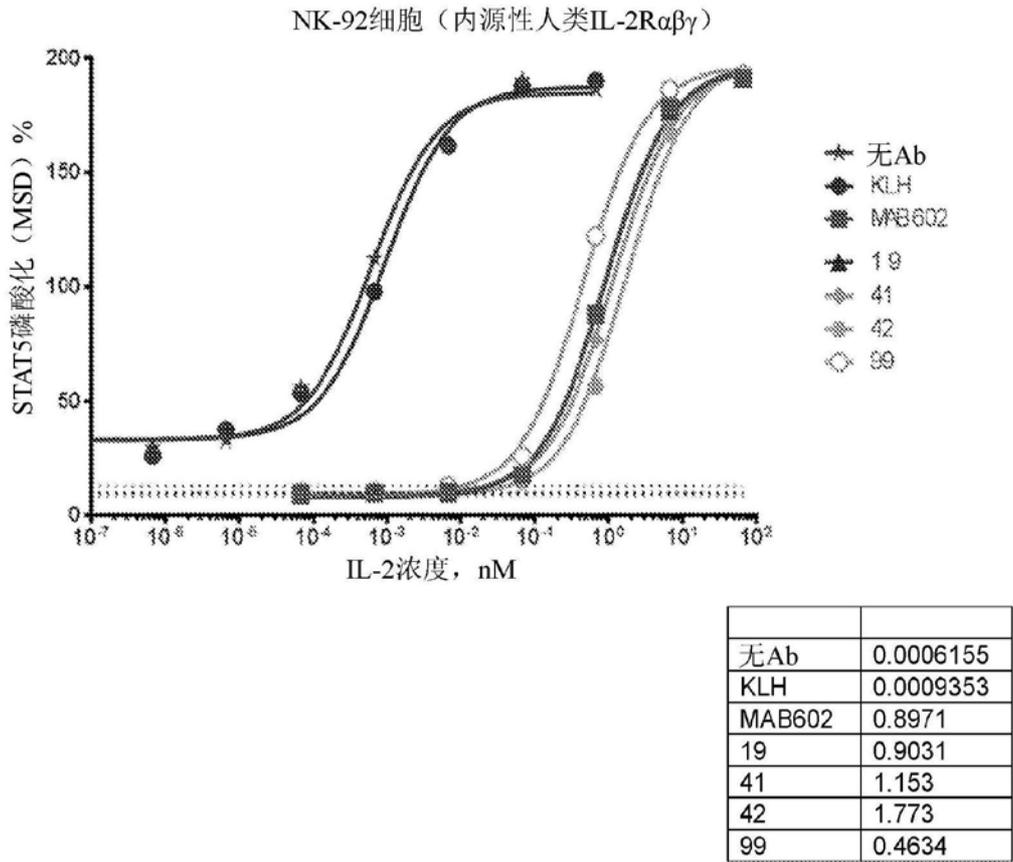


图7A

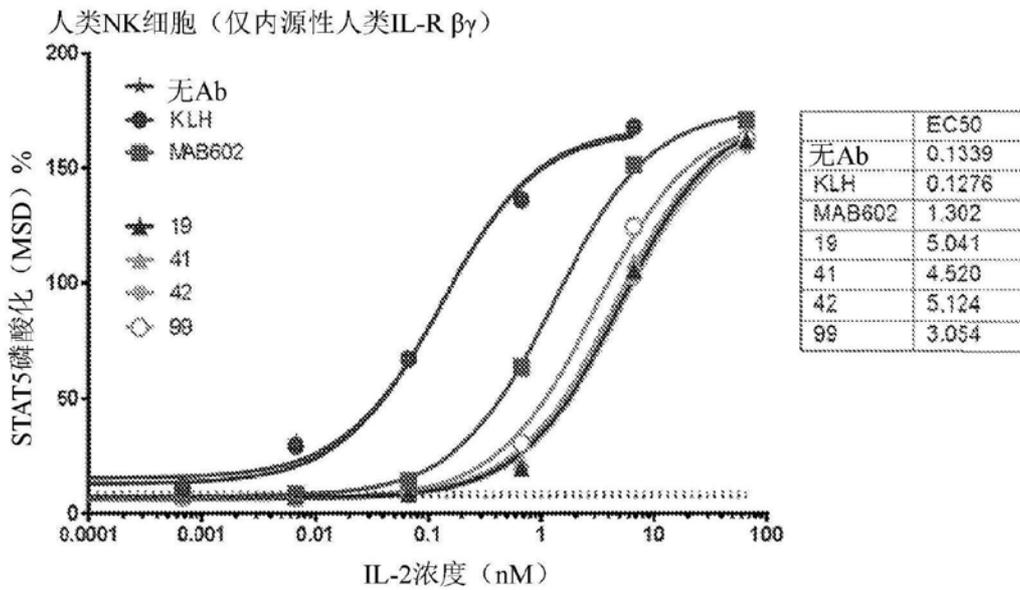


图7B

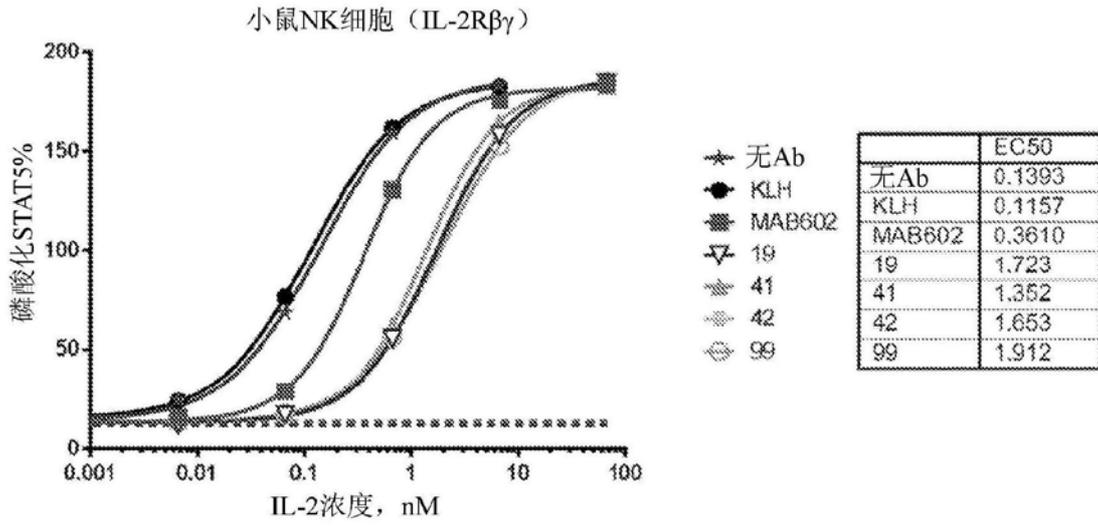


图7C

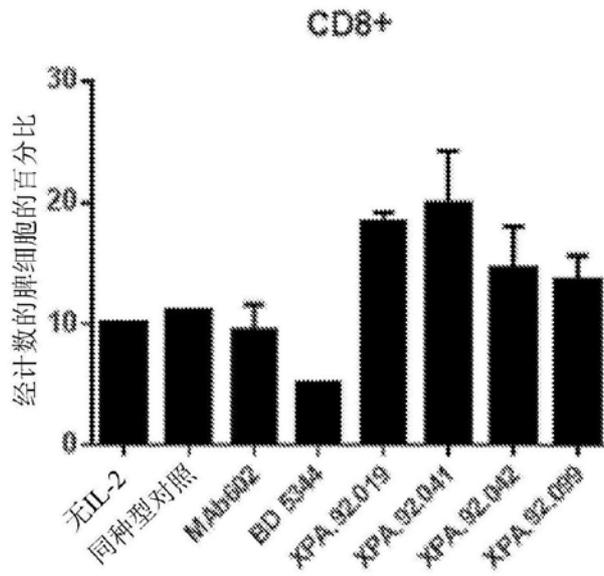


图8A

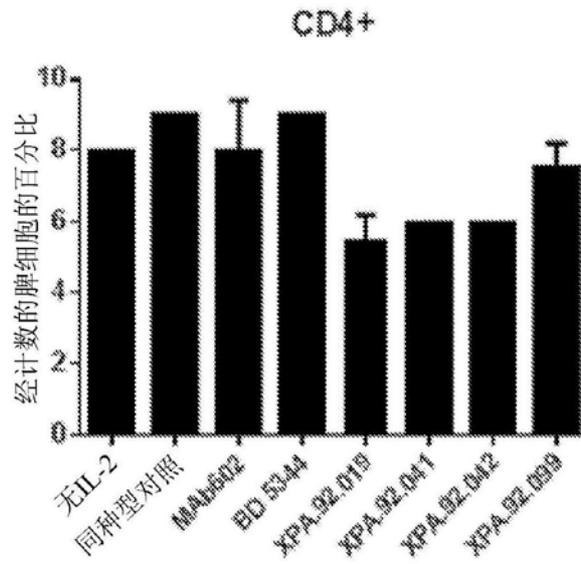


图8B

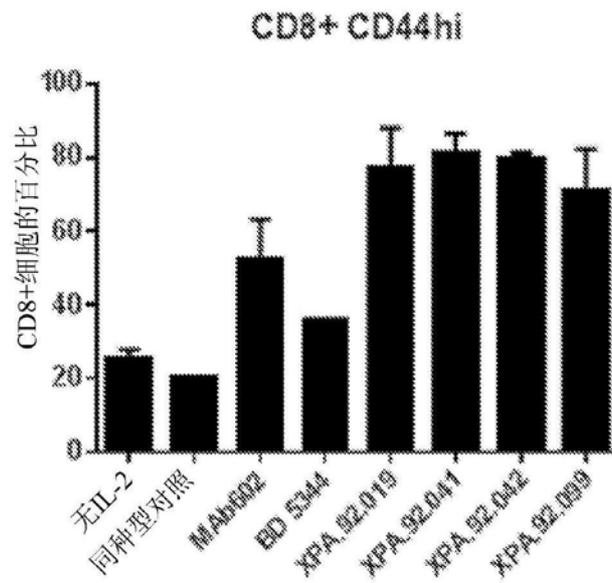


图8C

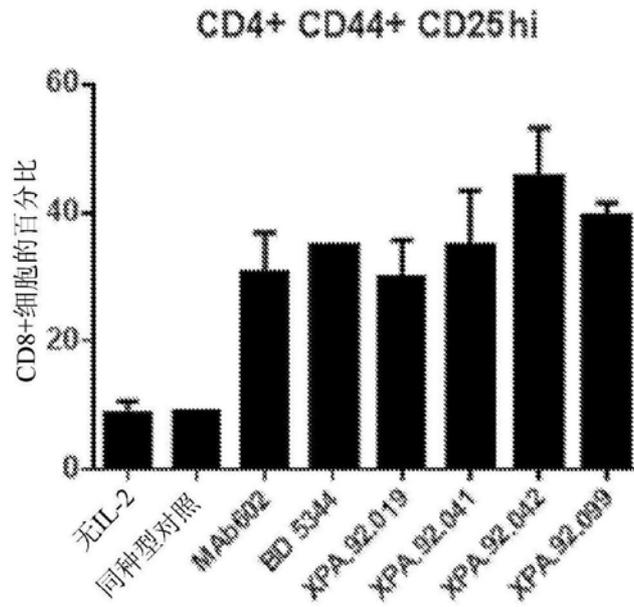


图8D

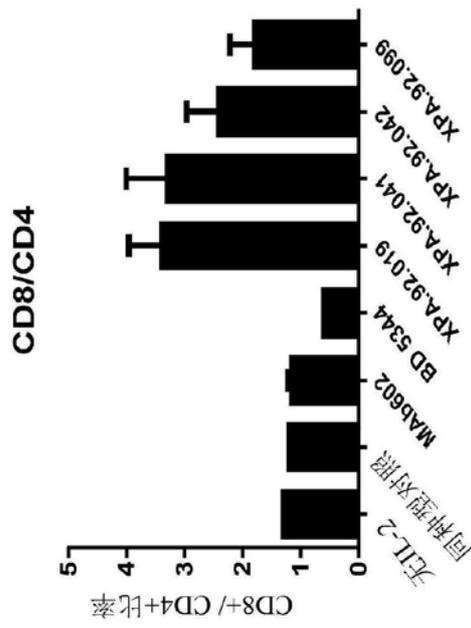


图8E

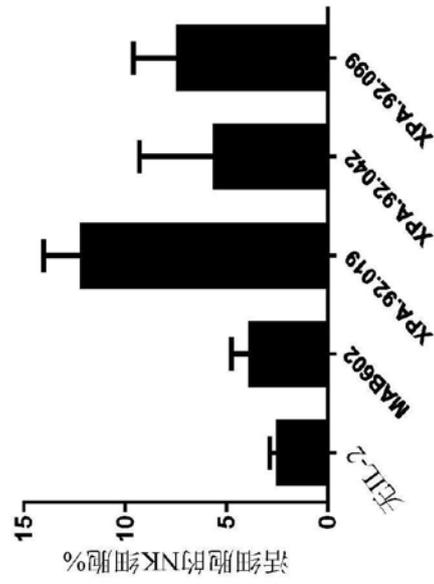


图8F

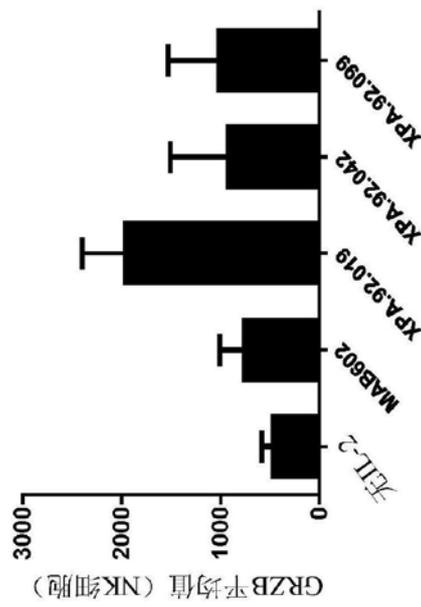


图8G

媒介对照

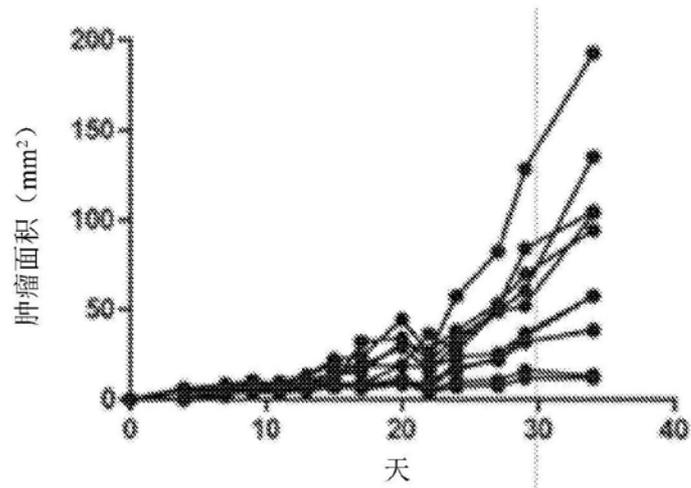


图9A

IL-2/mAb99

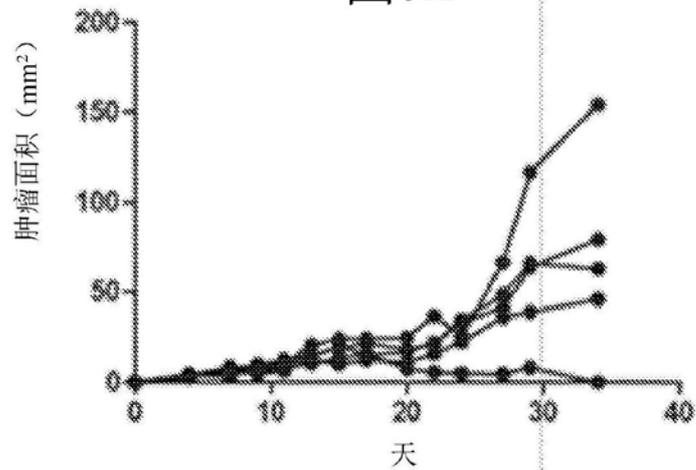


图9B

抗PD-1 mAb

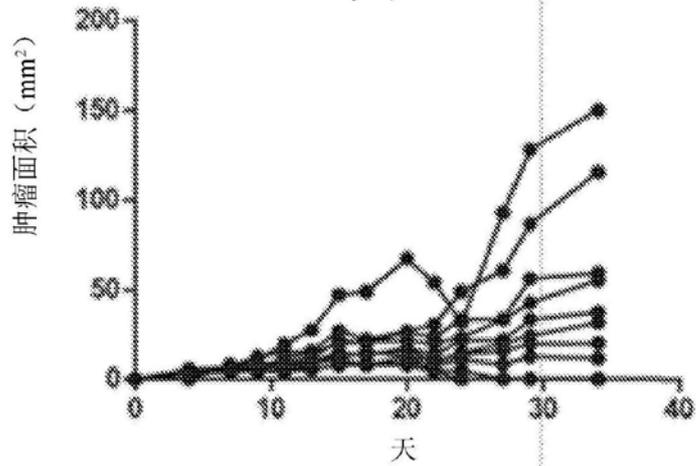


图9C

IL-2/mAb99 +
抗PD-1 mAb

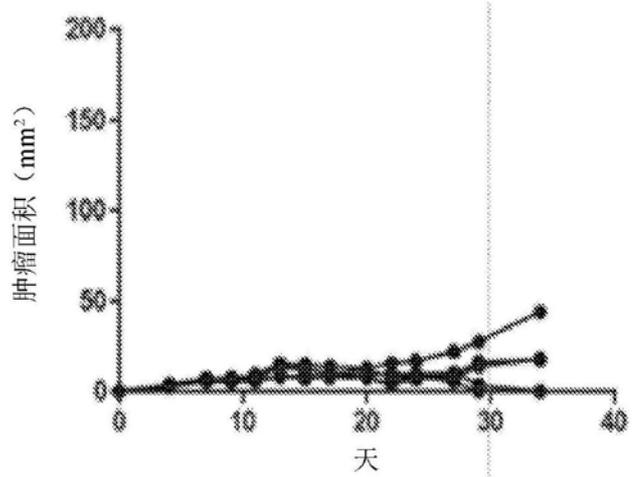


图9D

抗CTLA-4 mAb

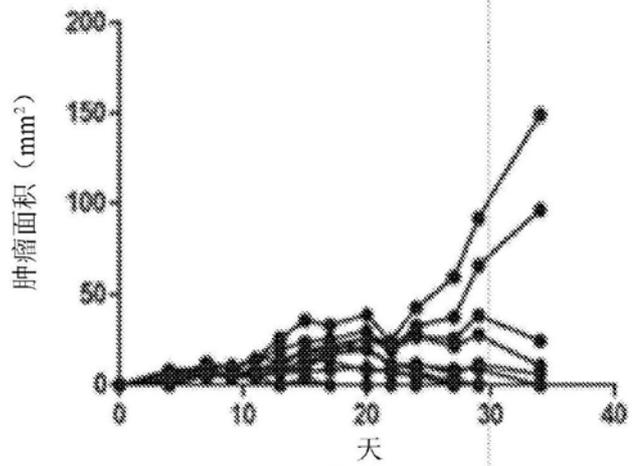


图9E

IL-2/mAb99 +
抗CTLA-4 mAb

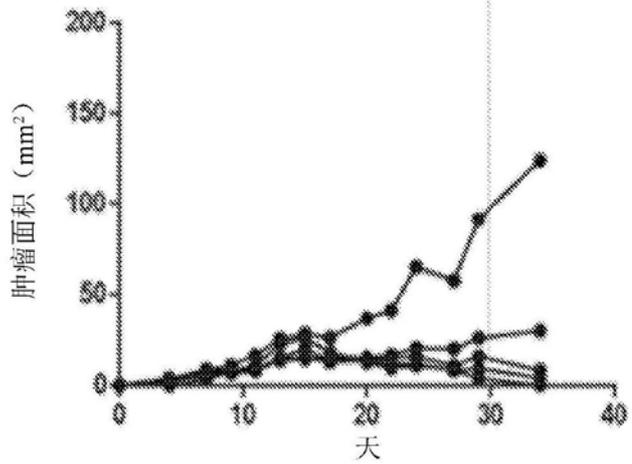


图9F

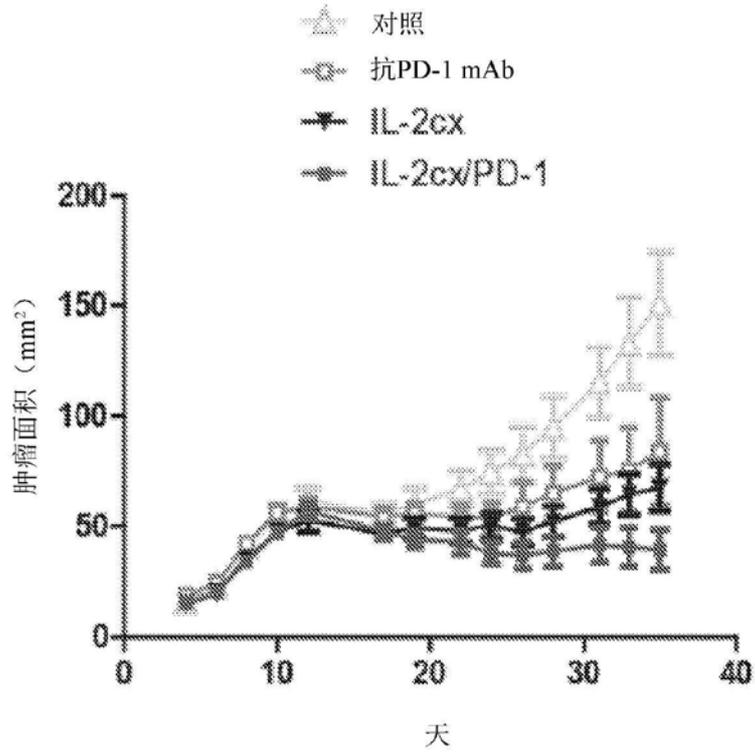


图10A

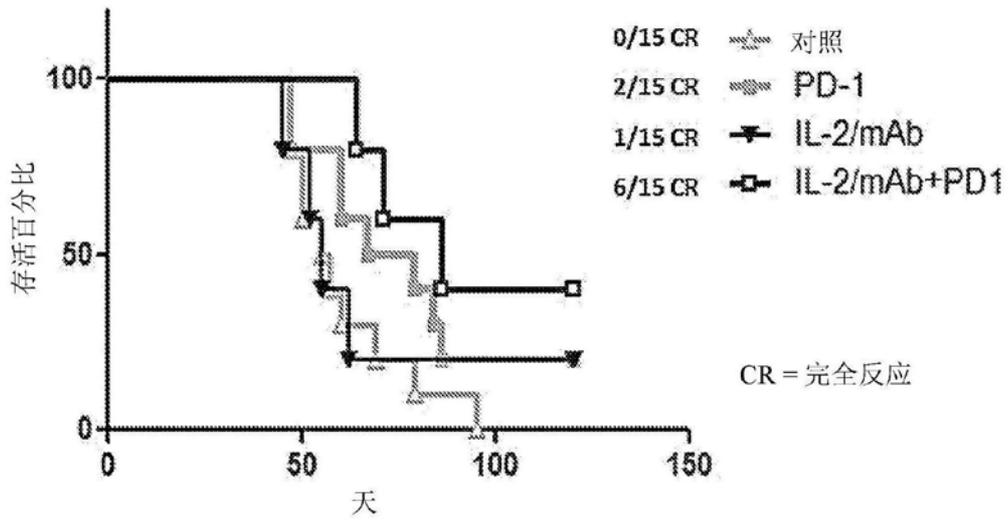


图10B

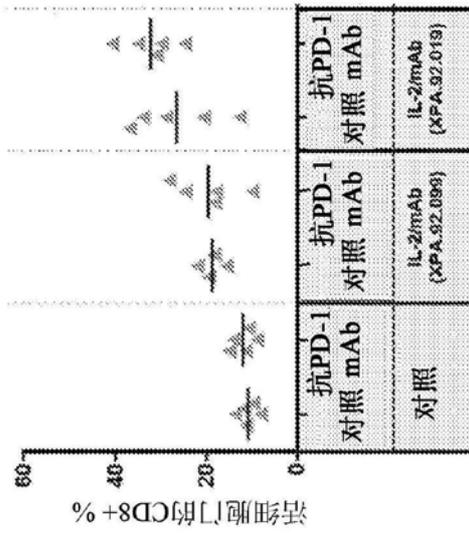


图11A

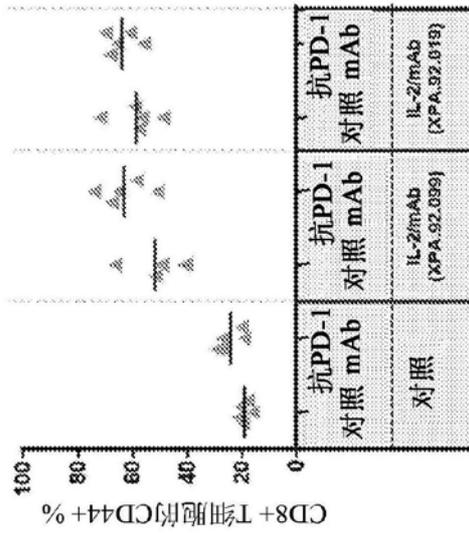


图11B

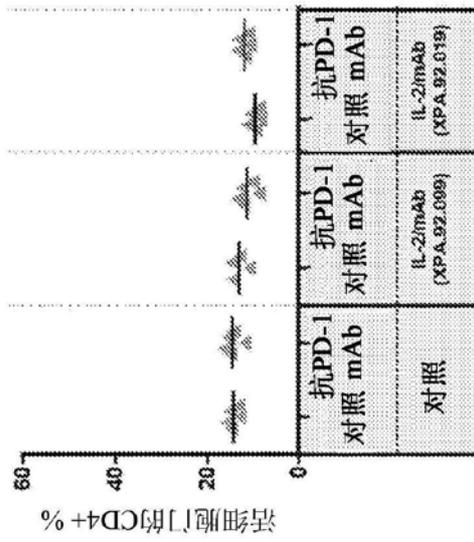


图11C

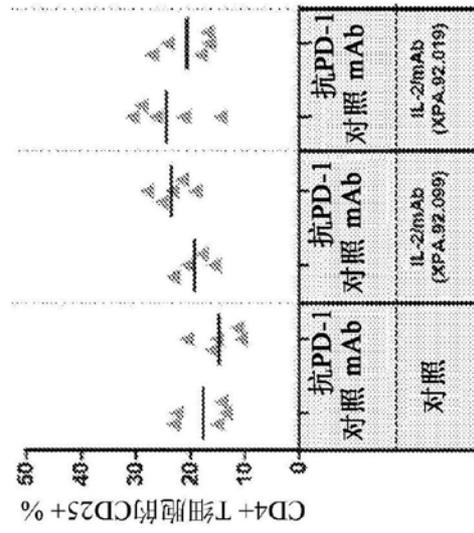


图11D

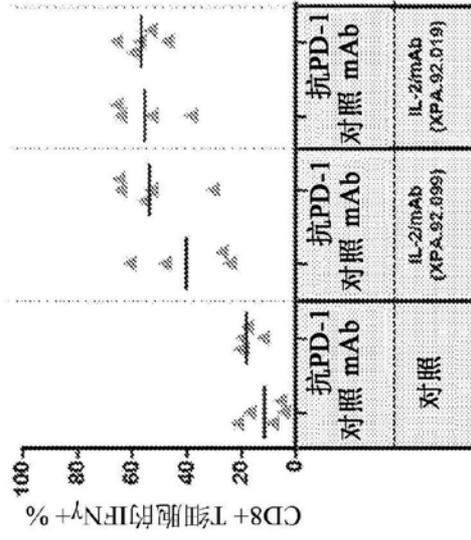


图11E

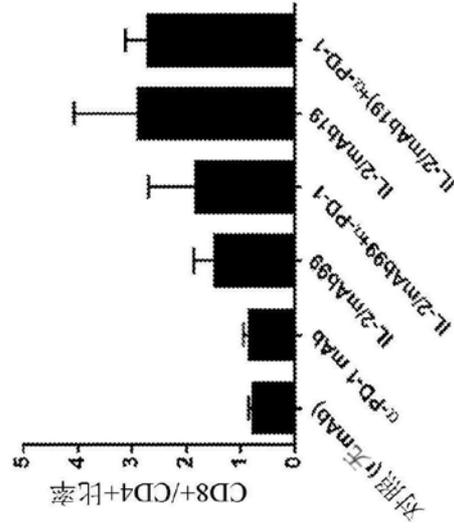


图11F

SEQ ID NO:	名称	序列
1	XPA.92.019 HV H-CDR1 26-33 H-CDR2 51-58 H-CDR3 97-108	EVQLVESGGG LVQFGRSLRL SCAASGFTFS YYGMHWVRQA FGKGLEWVAD ISNDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKTTLY LQMSLRLPED TAVIYCATPY YDSSGLDIWG QGTLIVTSS
2	XPA.92.019 HV	gaagtgccagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt tactatggca tgcactgggt cgcgccagct ccaggcaagg gcttagagtg gctggcagat atatcaaatg atggaagtaa taatattac gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagac cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag acctgaggac acgctgtat attactgtgc gaccccttac tatgatagta gtgggttggc ctactgggac cagggaaacc tggtcacogt ctccctca
3	XPA.92.041 HV H-CDR1 26-33 H-CDR2 51-58 H-CDR3 97-106	EVQLVQSGAE VRKPGESLKI SKGSGYNFD TYWIGWVRQM FGRGLEWVMT IYPADSDTRY SPSFQSQVTI SADXISITAY LQWGSILRASD TAMYYCARFS SSAYDIWCGG TMVTVSS
4	XPA.92.041 HV	gaggtccagc tgggtacagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatt tcctgtaagg gttctggata caactttgac acgtactgga tcggctgggt gcgccagatg cccgggagag gcttgagtg gatgggcacc atctatcctg ctgactctga caccagatat agcccgctct tccaaaggcca ggtcaccacc tcagccgaca agtccatcag caccgctac ctgcaagtgg geagcctgag gctctggac accgccatg attactgtgc gaggtttagc agttctgcct atgacatttg gggccaaggg acaatggtea ccgtctcttc a
5	XPA.92.042 HV H-CDR1 26-33 H-CDR2 51-58 H-CDR3 97-106	EVQLVQSGTE VRKAGDSLKI SKGSGYNFD TYWIGWVRQM FGRGLEWVMT IYPADSDTRY SPSFQSQVTM SADXISITAY LQWGSILRASD TAMYYCARFS SSAYDIWCGG TMVTVSS
6	XPA.92.042 HV	gaggtccagc tgggtacagtc tggaaacagag gtgaaaaaag ccggggagtc tctgaagatt tcctgtaagg gttctggata caactttgac acgtactgga tcggctgggt gcgccagatg cccgggagag gcttgagtg gatgggcacc atctatcctg ctgactctga caccagatat agtcogtctt tccaaaggcca ggtcaccatg tcagccgaca agtccatcag caccgctac ctgcaagtgg geagcctgag gctctggac accgccatg attactgtgc gaggttcagc agctctgcct atgacatttg gggccaaggg acaatggtea ccgtctcttc a
7	XPA.92.099 HV H-CDR1 26-33 H-CDR2 51-58 H-CDR3 97-110	EVQLVESGGG LVKPGRSRL SCAASGFTFN RYAMSWVRQA FGKGLEWVAM ISFDGNGQYY TDSVSGRFTI SRDNSKTTLF LQMSLRLTED TAVIYCVRSP AGDWVAYFDY WGQGLIVTVS S

图12

SEQ ID NO:	名称	序列
8	XPA.92.099 HV	caggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaat agatatccca tgagctgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctagagtg ggtggcgatg atatcattg atggaggtaa tcaatattac acagactccg tgagtggccg attcaccatc tccagagaca attccaagac cacgtgtgtt ctgcaaatgg acagcctgag aactgaggac acggctgtgt attattgtgt gagatccccg gcgggggact gggttgccta cttgactac tggggccagg gaacctgggt caccgtctcc tca
9	XPA.92.019 LV (λ) H-CDR1 26-31 H-CDR2 49-51 H-CDR3 88-98	SYELTQPPSV SVSPGQTARI TCSGDALPKR FAYWYQKAG QAPVLVIYED NKRPSGIPET LSGSSSGTTA TLTISGAOEE DEADYYCYST DNTGGLWFVG GGTKLTVLG
10	XPA.92.019 LV (λ)	tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcaagtatccc caggacaaac ggcaggatc acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaga ttgtcttatt ggtaccagca gaaggcaggc caggccccctg tactggtcat ctatgaggac acaaaaagac cctcgggat cctgagaca ctgtctgct ccagttcagg gacaacggcc accttgacca tcagttggggc ccaggaggag gatgaagctg actactattg ttactccaca gacaacactg gtggtctctg ggtgttcggc ggaggacca agctgacctt cctaggt
11	XPA.92.041 LV (lambda) H-CDR1 26-31 H-CDR2 49-51 H-CDR3 88-98	SYELTQPPSV SVSPGQTARI TCSGDALPRQ FAYWYQKFG QAPVLVIYKD TERPSGIPER FSGSSSGTTV TLTISGVQAE DEADYYCQSA DSSGTYHFVG GGTQLTVLG
12	XPA.92.041 LV (λ)	tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcaagtgtccc caggacagac ggcaggatc acctgctctg gagatgcgtt gccagggcaa ttgtcttatt ggtaccagca gaagccaggc caggccccctg tgctggtgat atataagac actgagaggc cctcagggat cctgagcga ttctctgct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcagttgagt ccaggcagaa gacgaggctg actattactg tcaatcagca gacagcagtg gtacttatca cgtgtttgga ggaggcacc accctgacctt cctaggt
13	XPA.92.042 LV (λ) H-CDR1 26-31 H-CDR2 49-51 H-CDR3 88-97	SYELTQPPSV SVSPGQTARI TCSGDALPRK FAYWYQKSG QAPVLVIYQD TKRPSGIPER FSGSSSGTTV TLTISDVQAE DDADYYCQSA DRSDSYVFGA GTKLTVLG

图12续

SEQ ID NO:	名称	序列
14	XPA.92.042 LV (λ)	tcctatgagc tgacacagcc accctcgggtg tcaagtgtccc caggacaaac ggccaggatc acctgctctg gagatgcatt gccaaagaaaa ttigtcttact ggtaccagca gaagtcaaggc caggccccctg tctgtgtgat atatcaagac actaagagcc cctcagggat cctgtagcga ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcaagtacgt ccaggcagag gacgagcctg actattattg tcagtcagcc gacagaagtg attcttatgt ctccggagct gggaccaagc tcaccgtcct aggt
15	XPA.92.099 LV (κ) L-CDR1 27-32 L-CDR2 50-52 L-CDR3 89-98	DIQMTQSPSS LSASIGDRVT IPCQASEDIS NHLSWYQQKP GKAPKPLIFD ASDLETGVPS RFGSGSGTD FALTISSLRP DDFATYYCHQ YHDYPSYTFG HGTKLEIKR
16	XPA.92.099 LV (κ)	gacatccaga tgaccacagtc tccttcctcc ctgtctgctt ctattggaga cagagtcacc atccctgcc aggcgagtgga ggacattagt aatcatttaa gttggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaaaccctt gatcttcgat gcatccgatt tggaacaggg ggtcccatca aggttcagtg gaagtggate tgggacagat ttgtctctca ccatcagcag cctgcggcct gatgattttg caacttatta ctgccaccag talcatgatt atccctcgtta cacttttggc cacgggacca agctggagat caaacgt
17	XPA.92.019 HV H-CDR1	GFIFSYYG
18	XPA.92.019 HV H-CDR2	ISNDGSNK
19	XPA.92.019 HV H-CDR3	RPEDTAVYCAT
20	XPA.92.041 HV H-CDR1	GYNFDTYW
21	XPA.92.041 HV H-CDR2	IYPADSDT
22	XPA.92.041 HV H-CDR3	ARFSSAYDI
23	XPA.92.042 HV H-CDR1	GYNFDTYW
24	XPA.92.042 HV H-CDR2	IYPADSDT

图12续

SEQ ID NO:	名称	序列
25	XPA.92.042 HV H-CDR3	SSAYDIARFS
26	XPA.92.099 HV H-CDR1	GFTFNRYA
27	XPA.92.099 HV H-CDR2	ISFDGGNQ
28	XPA.92.099 HV H-CDR3	VRSPAGDWVAYFDY
29	XPA.92.019 LV (λ) L-CDR1	ALPRKF
30	XPA.92.019 LV (λ) L-CDR2	EDN
31	XPA.92.019 LV (λ) L-CDR3	YSTDNTGGLWV
32	XPA.92.041 LV (λ) L-CDR1	ALPRQF
33	XPA.92.041 LV (λ) L-CDR2	KDT
34	XPA.92.041 LV (λ) L-CDR3	DSSGTYHQSA
35	XPA.92.042 LV (λ) L-CDR1	ALPRKF
36	XPA.92.042 LV (λ)	QDT

图12续

SEQ ID NO:	名称	序列
37	L-CDR2 XPA.92.042 LV (λ) L-CDR3	QSADRSDSYV
38	XPA.92.099 LV (κ) L-CDR1	EDISNH
39	XPA.92.099 LV (κ) L-CDR2	DAS
40	XPA.92.099 LV (κ) L-CDR3	HQYHDYFSYT

HV = 重链可变区

LV = 轻链可变区

图12续

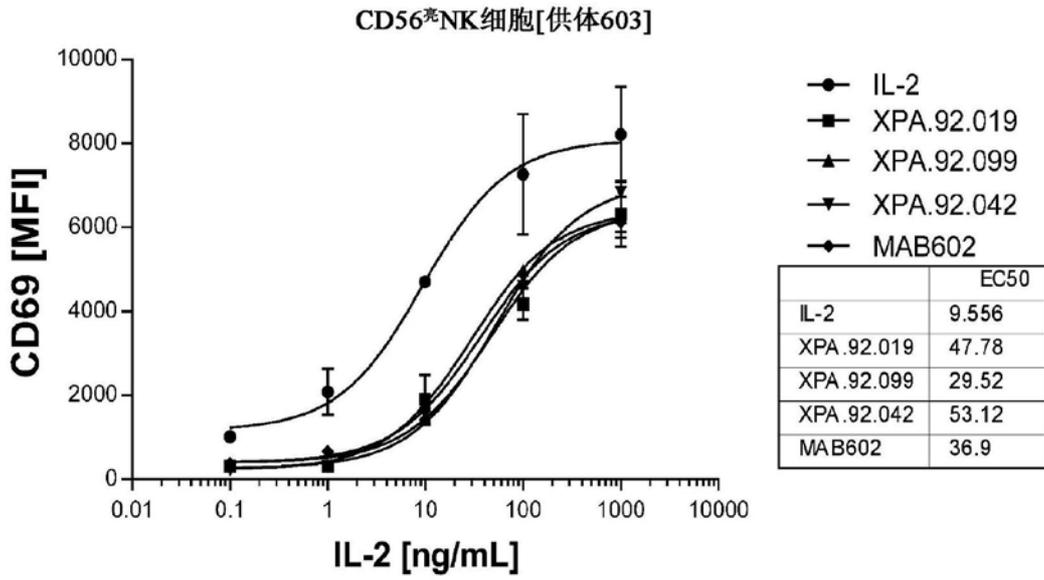


图13A

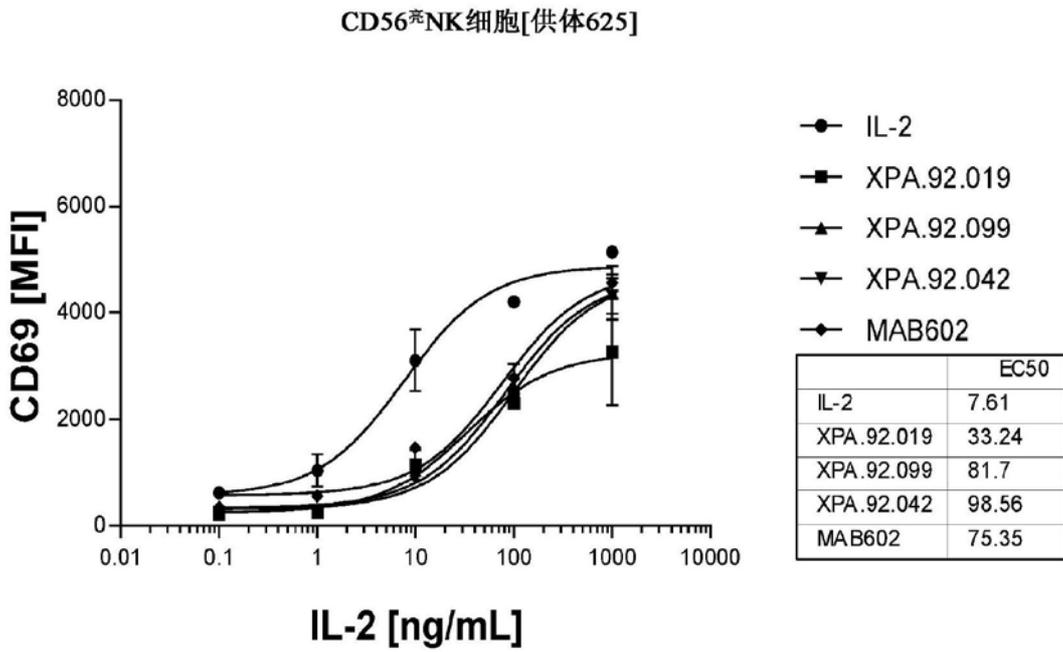


图13B

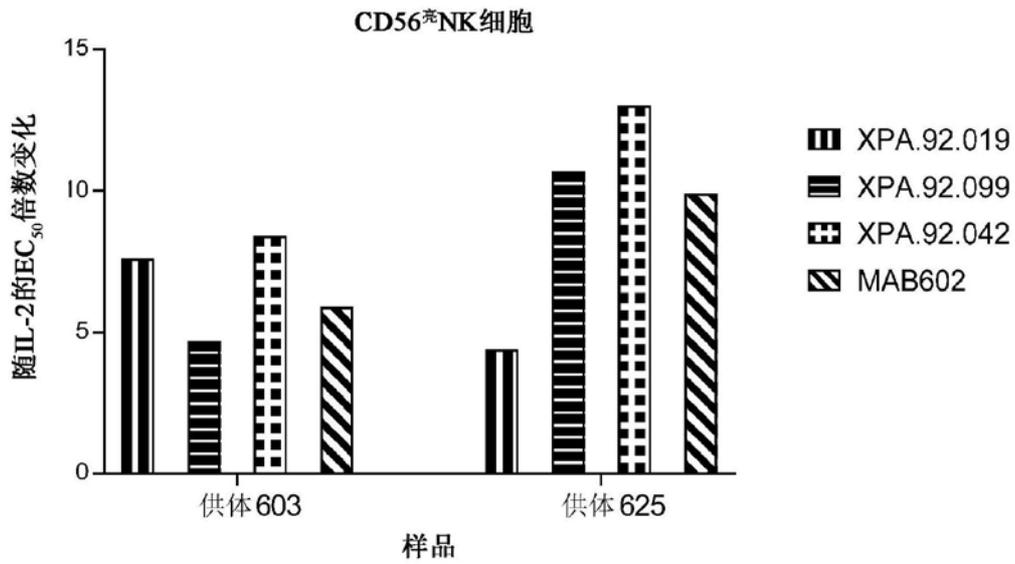


图13C

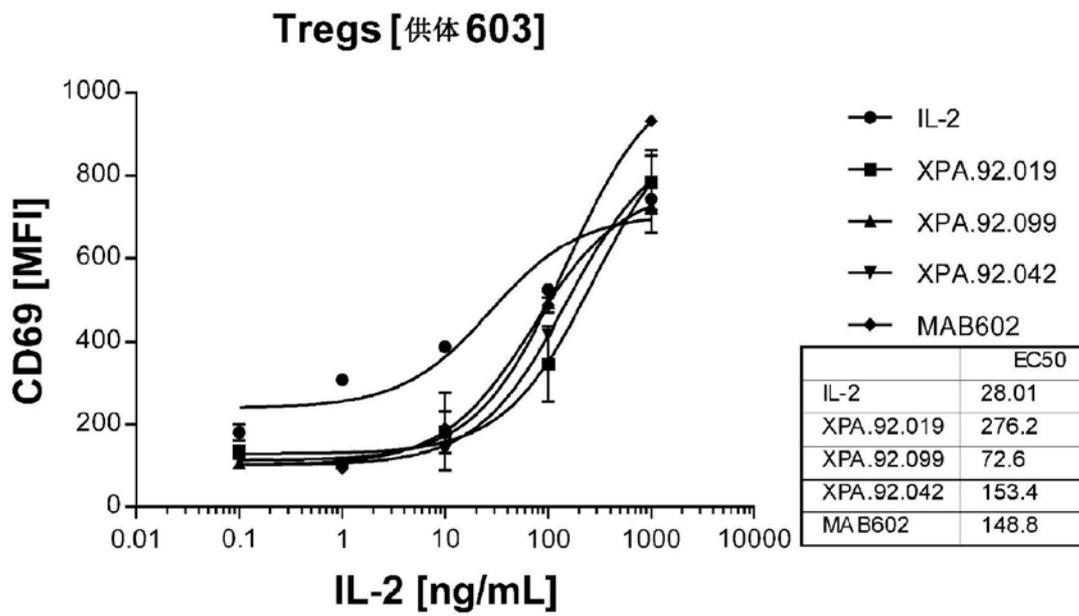


图14A

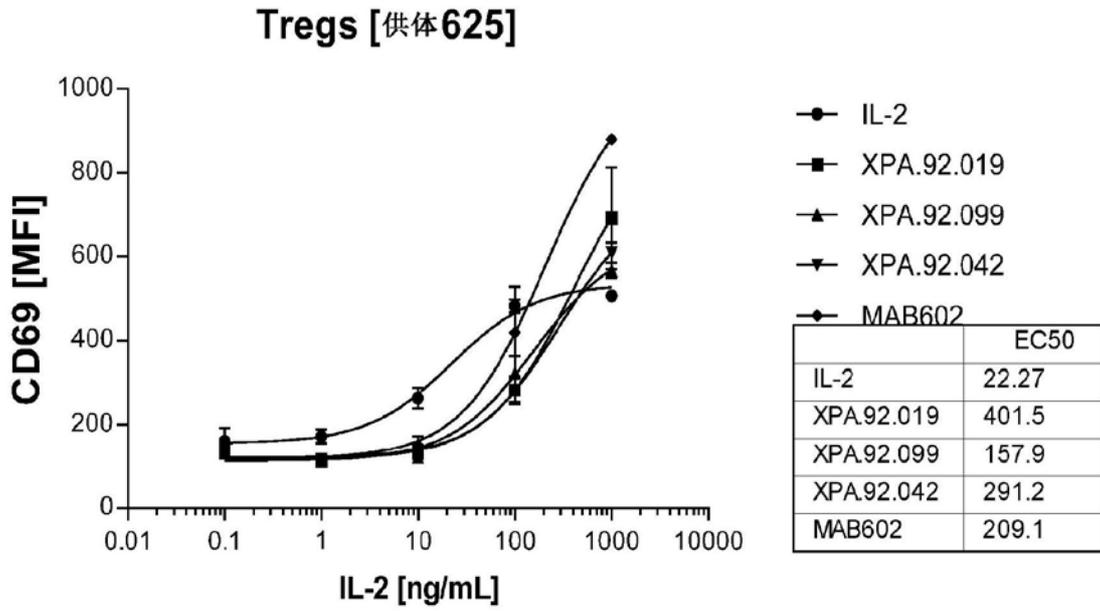


图14B

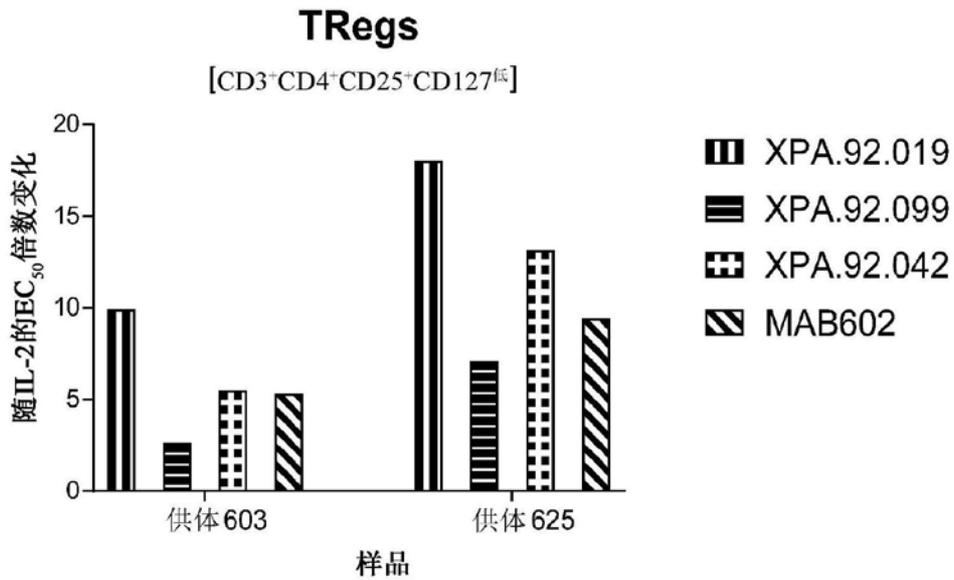


图14C

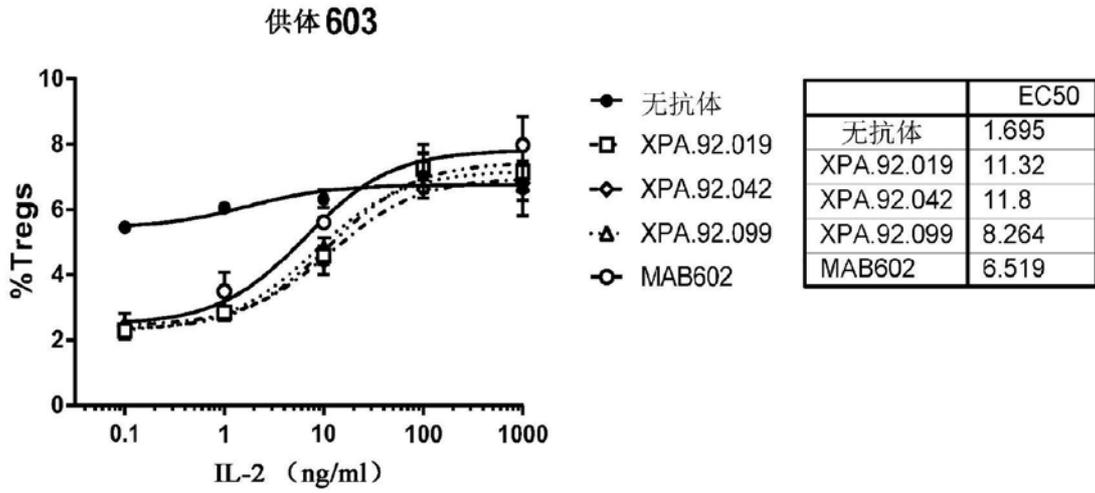


图15A

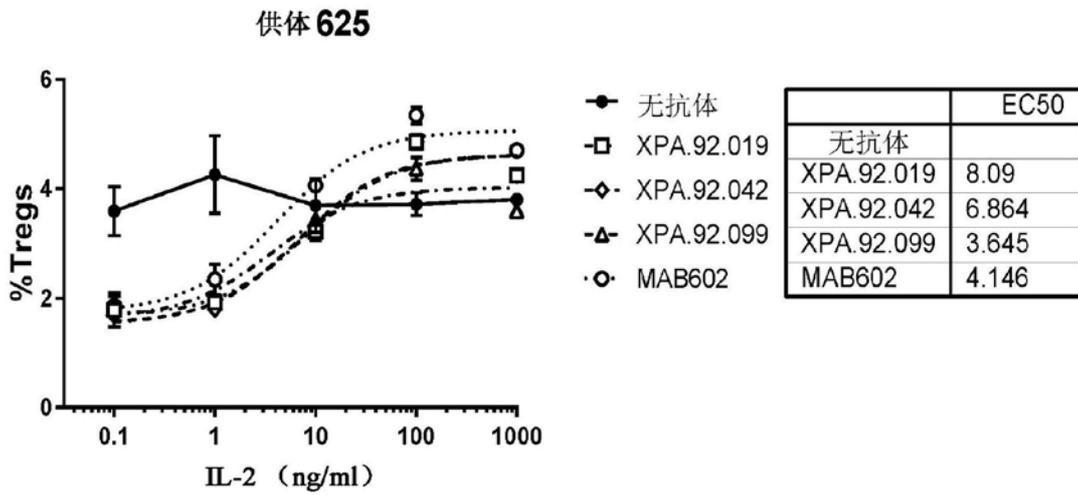


图15B

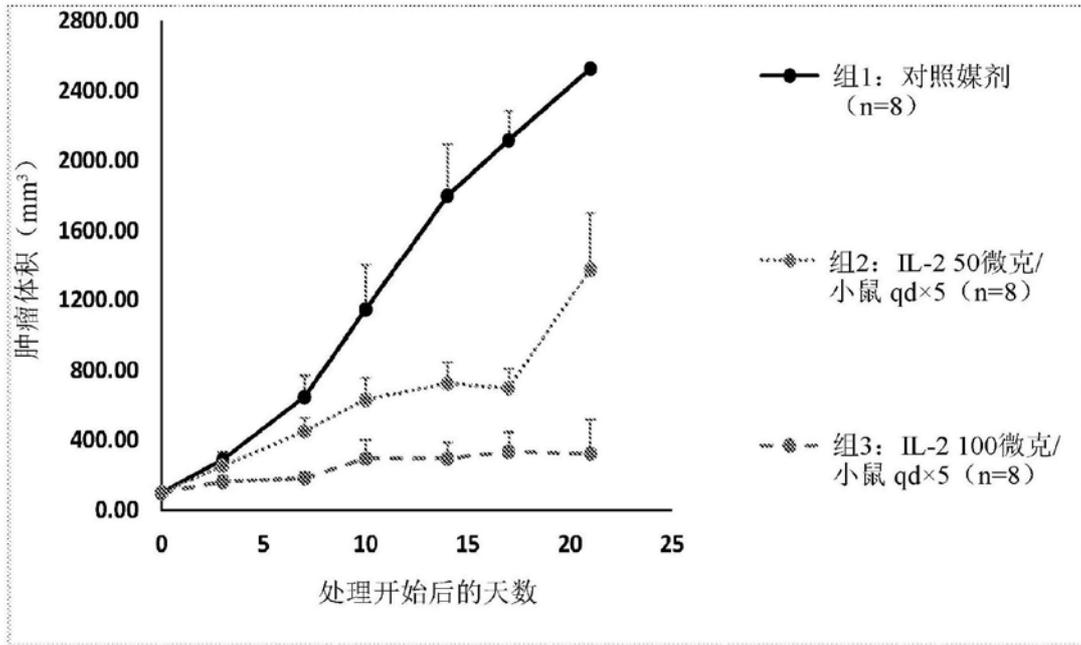


图16

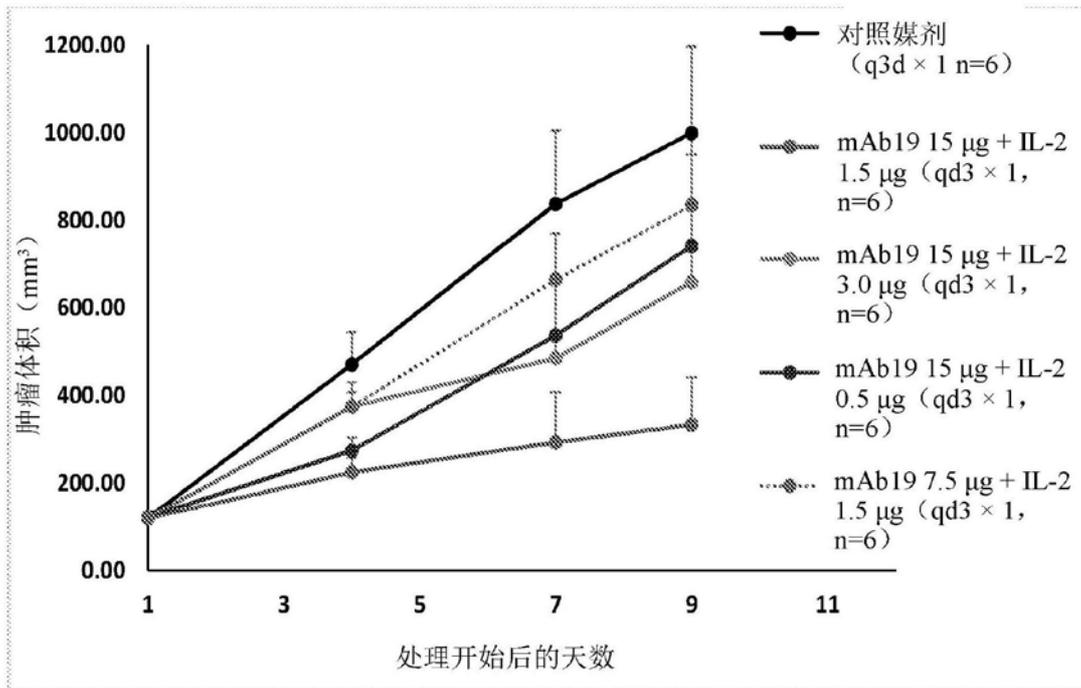


图17

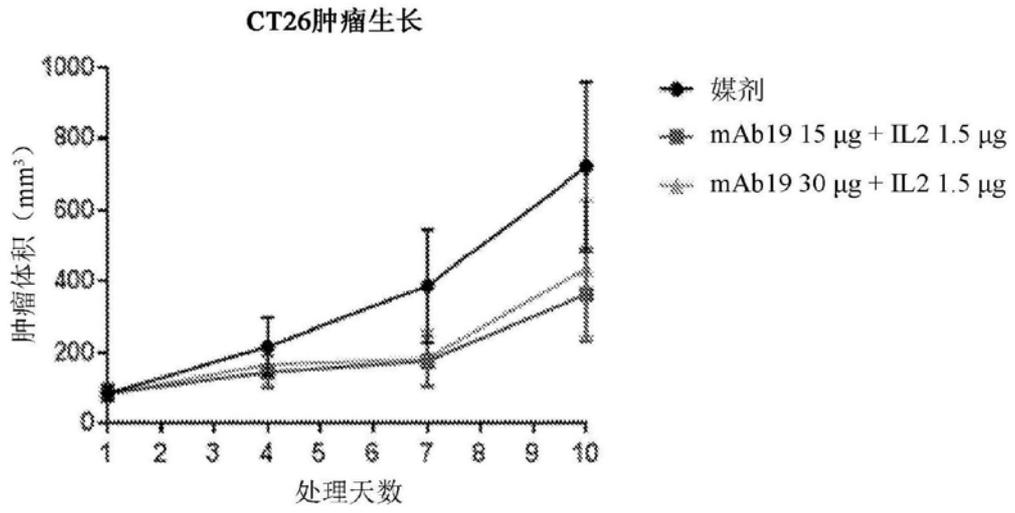


图18