



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105611944 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201480056156. X

C07K 16/22(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 12. 17

C07K 16/28(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/00(2006. 01)

13198753. 9 2013. 12. 20 EP

14158331. 0 2014. 03. 07 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 04. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/078233 2014. 12. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/091655 EN 2015. 06. 25

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 C·克莱因 P·米勒 M·托马斯

A·齐佩利乌斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书2页 说明书26页

序列表15页 附图5页

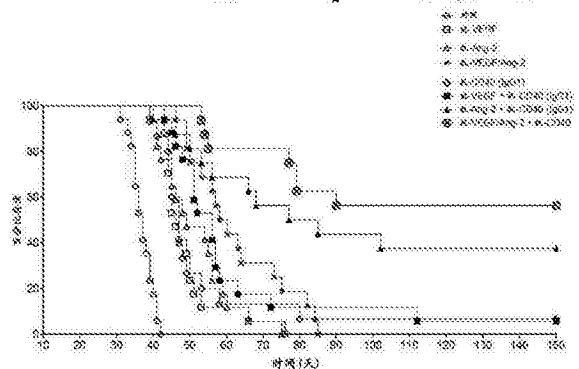
(54) 发明名称

抗 ANG2 抗体和 CD40 激动剂的组合法

(57) 摘要

本发明涉及结合人血管生成素 2(ANG-2) 的抗体与 CD40 激动剂的组合法。

AE 18/24/33 2012 MGC38 肿瘤, 抗-VEGF/Ang-2 + CD40, 在 20g 裸鼠小鼠中



1. 一种结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其中该抗体与CD40激动剂组合施用,
  - a) 用于治疗癌症或延迟癌症进展,或b) 用于延长罹患癌症的患者的存活,或c) 用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或d) 用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。
2. 一种结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其中该抗体与CD40激动剂组合施用,
  - a) 用于治疗癌症或延迟癌症进展,b) 用于延长罹患癌症的患者的存活。
3. 用于依照前述权利要求任一项使用的抗ANG2抗体,其中所述抗ANG2抗体是人的或人源化的。
4. 用于依照前述权利要求任一项使用的抗ANG2抗体,其中根据表面等离子共振(Biacore™)的测定,所述抗ANG2抗体以小于 $1.0 \times 10^{-8}$  mol/1的 $K_D$ 值特异性结合人ANG2。
5. 用于依照前述权利要求任一项使用的抗ANG2抗体,其中所述抗ANG2抗体是IgG抗体。
6. 用于依照前述权利要求任一项使用的抗ANG2抗体,其中所述抗ANG2抗体以15nM或更少的IC50抑制人ANG-2与TIE2受体的相互作用。
7. 用于依照前述权利要求任一项使用的抗ANG2抗体,其中所述CD40激动剂是激动性CD40抗体或激动性CD40L多肽。
8. 用于依照前述权利要求任一项使用的抗ANG2抗体,其中所述CD40激动剂是激动性CD40抗体。
  9. 依照权利要求8的结合人ANG-2的抗体,
    - i) 其中所述抗ANG2抗体包含
      - (a) SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;  
或
      - (b) SEQ ID NO:3的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:4的轻链可变域氨基酸序列;  
且
    - ii) 其中所述激动性CD40抗体包含
      - (a) SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列;  
或
      - (b) SEQ ID NO:7的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:8的轻链可变域氨基酸序列;
  10. 依照权利要求8的结合人ANG-2的抗体,
    - i) 其中所述抗ANG2抗体包含
      - SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;或
      - 且
    - ii) 其中所述激动性CD40抗体包含
      - SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列;或
  11. 用于依照权利要求8使用的抗ANG2抗体,其中所述抗ANG2抗体是结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体。
  12. 依照权利要求9或11的结合人ANG-2的抗体,
    - i) 其中所述结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含
      - SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;和

SEQ ID NO:9的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:10的轻链可变域氨基酸序列；  
且

ii)其中所述激动性CD40抗体包含

SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。

13. 依照权利要求9或11的的结合人ANG-2的抗体，

i)其中所述结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, 和SEQ ID NO:14的氨基酸序列；且

ii)其中所述激动性CD40抗体包含

SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。

14. 用于依照前述权利要求任一项使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体，其中所述癌症是肺癌，非小细胞肺(NSCL)癌，支气管肺泡细胞肺癌，骨癌，胰腺癌，皮肤癌，头或颈癌，皮肤或眼内黑素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛门区癌，胃癌(stomach cancer)，胃癌(gastric cancer)，结肠癌，乳腺癌，子宫癌，输卵管癌，子宫内膜癌，宫颈癌，阴道癌，外阴癌，何杰金(Hodgkin)氏病，食道癌，小肠癌，内分泌系统癌，甲状腺癌，甲状旁腺癌，肾上腺癌，软组织肉瘤，尿道癌，阴茎癌，前列腺癌，膀胱癌，肾或输尿管癌，肾细胞癌，肾盂癌，间皮瘤，肝细胞癌，胆癌，中枢神经系统(CNS)赘生物，脊柱肿瘤，脑干胶质瘤，多形性成胶质细胞瘤，星形细胞瘤，施万细胞瘤，室管膜瘤，髓母细胞瘤，脑膜瘤，鳞状细胞癌，垂体腺瘤，淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

15. 用于依照权利要求14使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体，其中所述癌症包含实体瘤。

## 抗ANG2抗体和CD40激动剂的组合疗法

[0001] 本发明涉及结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体与CD40激动剂的组合疗法。

[0002] 发明背景

[0003] 在血管发生和血管重塑中发挥关键作用的血管生成素是正在生长中的肿瘤的促血管发生性设备的一部分。重要的是,它们是在抗VEGF疗法期间导致继发抗性的主要因素之一(Saharinen,P.,et al.,Trends Mol Med 17(2011)347-362)。血管生成素-1(Ang1)和血管生成素-2(Ang2)二者均是Tie2-受体配体。虽然Ang1趋向于使血管稳定和成熟(Yancopoulos,G.D.,et al.,Nature 407(2000)242-248),但是Ang2通过使血管去稳定而促进肿瘤血管发生和生长。Ang2由此在功能上与Ang1对立(Cascone,T.et al.,J Clin Oncol 30(2012)441-444)。与此一致,已经发现阻断Ang2而非Ang1使肿瘤血管正常化(Falcon,B.L.,H.Hashizume,et al.,Am J Pathol 175(2009)2159-2170)且帮助克服针对抗VEGF疗法的获得性抗性(Chae,S.S.,W.S.Kamoun,et al.,Clin Cancer Res 16(2010)3618-3627;Thomas,M.,et al.PLoS One 8(2013)e54923)。

[0004] 免疫调控性抗体提供一种治疗办法,而且可用于直接加强抗肿瘤免疫应答或用作抗癌疫苗的佐剂(Melero,I.,et al.,Nat Rev Cancer 7(2007)95-106)。激动性抗CD40抗体构成这些试剂中最有效类别之一。CD40是在抗原呈递细胞(APC)诸如树突细胞,B细胞和巨噬细胞上表达的肿瘤坏死因子超家族的细胞表面成员。抗CD40激动剂的临床前研究提示用交联性抗体触发抗原呈递细胞(APC)上的CD40能代替正常情况下经由CD40配体提供的CD4T细胞辅助,而且推动CD8效应器T细胞的激活以及扩充(Li,F.et al.,Science 333(2011)1030-1034)。另外,CD40激活的巨噬细胞还可以发挥直接杀肿瘤功能(Beatty,G.L.,et al.,Science 331(2011)1612-1616;Vonderheide,R.H.,et al.,Oncoimmunology 2(2013)e23033)。

[0005] 免疫抑制性肿瘤微环境对抗肿瘤免疫和免疫治疗性治疗办法造成了一项主要障碍(Beatty,G.L.,et al.,Science 331(2011)1612-1616)。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明的发明人发现,抗ANG2抗体增强CD40激动剂治疗癌症或延迟肿瘤进展或延长罹患癌症(例如实体瘤)的患者的存活的功效。进展延迟,存活更长以及剂量降低及副作用的风险更低的潜力代表了对患者的主要益处。

[0008] 惊人的是,用抗ANG2抗体与CD40激动剂组合治疗肿瘤显示肿瘤进展前时间和存活时间方面的强协同效应(而抗VEGF抗体与CD40激动剂组合的治疗只显示较小效果)。

[0009] 本发明的一个方面是一种结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其中该抗体与CD40激动剂组合施用,a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。

[0010] 本发明的另一个方面是一种CD40激动剂,其中该CD40激动剂与结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体组合施用,a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或b)用于延长罹患癌症的患

者的存活,或c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。

[0011] 一方面,本发明提供一种方法,其用于a)治疗癌症或延迟癌症进展,或b)延长罹患癌症的患者的存活,或c)刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或d)使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感,其中该方法包括将有效量的抗ANG2抗体和有效量的CD40激动剂施用于有所需要的患者的步骤。

[0012] 另一方面,本发明提供抗ANG2抗体在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中该抗体与CD40激动剂一起施用。

[0013] 本发明的另一个方面是结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其用于制备用于下述各项的药物:

[0014] a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或

[0015] b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或

[0016] c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或

[0017] d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感;

[0018] 其中该抗体与CD40激动剂一起施用。

[0019] 本发明的另一个方面是CD40激动剂,其用于制备用于下述各项的药物:

[0020] a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或

[0021] b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或

[0022] c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或

[0023] d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感;

[0024] 其中该CD40激动剂与结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体一起施用。

[0025] 本发明的另一个方面是一种结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其与CD40激动剂组合,a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。

[0026] 本发明的另一个方面是一种结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其与CD40激动剂组合,用于制备用于下述各项的药物:

[0027] a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或

[0028] b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或

[0029] c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或

[0030] d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。

[0031] 一方面,本发明提供一种方法,其用于a)治疗癌症或延迟癌症进展,或b)延长罹患癌症的患者的存活,或c)刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效

效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或d)使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感,其中该方法包括将有效量的抗ANG2抗体和有效量的CD40激动剂施用于有所需要的患者的步骤。

[0032] 本发明的另一个方面是结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体和CD40激动剂,它们组合a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。

[0033] 本发明的另一个方面是结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体和CD40激动剂,它们用于制备用于下述各项的药物:

[0034] a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或

[0035] b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或

[0036] c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或

[0037] d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。

[0038] 本发明的另一个方面是结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体和CD40激动剂组合在制备用于下述各项的药物中的用途:

[0039] a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或

[0040] b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或

[0041] c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或

[0042] d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。

[0043] 在一个实施方案中,该抗ANG2抗体是人或人源化抗体。

[0044] 优选的是,该抗ANG2抗体以小于 $1.0 \times 10^{-8}$  mol/1的 $K_D$ 值特异性结合人ANG2,如通过表面等离子共振(Biacore™)测定的。

[0045] 优选的是,该抗ANG2抗体是IgG抗体,而且更加优选的是,该抗ANG2抗体是人IgG1或IgG4亚类的。

[0046] 在一个优选实施方案中,该抗ANG2抗体以15nM或更少的IC50抑制人ANG-2与TIE2受体的相互作用。

[0047] 在一个实施方案中,该CD40激动剂是激动性CD40抗体或激动性CD40L多肽。

[0048] 在一个优选实施方案中,该CD40激动剂是激动性CD40抗体。

[0049] 在一个实施方案中,

[0050] i)该抗ANG2抗体包含

[0051] (a)SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;或

[0052] (b)SEQ ID NO:3的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:4的轻链可变域氨基酸序列;

[0053] 且

[0054] ii)该激动性CD40抗体包含

- [0055] (a)SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列;或
- [0056] (b)SEQ ID NO:7的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:8的轻链可变域氨基酸序列;
- [0057] 在一个优选实施方案中,
- [0058] i)该抗ANG2抗体包含SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;或
- [0059] 且
- [0060] ii)该激动性CD40抗体包含SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列;或
- [0061] 在一个优选实施方案中,该抗ANG2抗体是结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体。
- [0062] 在一个优选实施方案中,
- [0063] i)该结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含
- [0064] SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;和
- [0065] SEQ ID NO:9的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:10的轻链可变域氨基酸序列;
- [0066] 且
- [0067] ii)该激动性CD40抗体包含
- [0068] SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。
- [0069] 在一个优选实施方案中,
- [0070] i)该结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,和SEQ ID NO:14的氨基酸序列;
- [0071] 且
- [0072] ii)该激动性CD40抗体包含SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。
- [0073] 在一个优选实施方案中,该癌症包含实体瘤。
- [0074] 在一个优选实施方案中,该癌症是结直肠癌,卵巢癌,成胶质细胞瘤,胃癌,胰腺癌,乳腺癌,肺癌,肝细胞癌。
- [0075] 附图简述
- [0076] 图1抗ANG2抗体(和抗ANG2+抗VEGF抗体(=抗VEGF/ANG2))与激动性CD40抗体组合的体内抗肿瘤功效(延迟癌症进展(肿瘤生长)和延长所治疗的患者存活)-该图呈现来自3项独立实验的合并数据。用图中所示抗体组合治疗小鼠。
- [0077] 图2抗ANG2抗体(双特异性)与激动性CD40抗体组合在皮下同基因MC38结肠癌模型中的体内抗肿瘤功效。
- [0078] 2A:激动性CD40抗体单一疗法(空心圆形)与对照(实心正方形)相比的肿瘤生长抑制。
- [0079] 2B:双特异性ANG2/VEGF抗体单一疗法(空心正方形)与对照(实心正方形)相比的

肿瘤生长抑制。

[0080] 2C:激动性CD40抗体和双特异性ANG2/VEGF抗体的组合(空心三角形)与对照(实心正方形)相比的肿瘤生长抑制。

[0081] 图3抗ANG2抗体(双特异性)与激动性CD40抗体组合在雌性Balb/c小鼠中的同基因CT26WT模型中的体内抗肿瘤功效。

[0082] 发明详述

[0083] 本发明涉及一种抗ANG2抗体,其用于在患者中治疗癌症的方法,该方法包括将该抗ANG2抗体和CD40激动剂施用于该受试者,而且发明人在本发明中证明这种药剂组合导致(肿瘤生长)癌症进展延迟和所治疗的患者存活延长。

[0084] 人血管生成素-2(ANG-2)(或者缩写成ANGPT2或ANG2)(SEQ ID No:15)记载于Maisonpierre,P.C.,et al.,*Science* 277(1997)55-60及Cheung,A.H.,et al,*Genomics* 48(1998)389-91。发现血管生成素-1和-2(ANG-1(SEQ ID No:108)和ANG-2(SEQ ID No:107))是Ties的配体,Ties是在血管内皮内选择性表达的一个酪氨酸激酶家族(Yancopoulos,G.D.,et al.,*Nature* 407(2000)242-48)。血管生成素家族现在有四个确定的成员。血管生成素-3和-4(Ang-3和Ang-4)可能代表小鼠和人中的相同基因座广泛分歧的对应物(Kim,I.,et al.,*FEBS Lett*,443(1999)353-56;Kim,I.,et al.,*J Biol Chem* 274(1999)26523-28)。ANG-1和ANG-2最初是在组织培养实验中分别作为激动剂和拮抗剂鉴定的(关于ANG-1参见Davies,S.,et al.,*Cell*,87(1996)1161-1169;及关于ANG-2参见Maisonpierre,P.C.,et al.,*Science*277(1997)55-60)。所有已知的血管生成素均主要结合Tie2,而且Ang-1和-2二者均以3nM(Kd)的亲合力结合Tie2(Maisonpierre,P.C.,et al.,*Science*277(1997)55-60)。显示Ang-1支持EC存活及促进内皮完整性(Davis,S.,et al.,*Cell*,87(1996)1161-1169;Kwak,H.J.,et al.,*FEBS Lett* 448(1999)249-53;Suri,C.,et al.,*Science* 282(1998)468-71;Thurston,G.,et al.,*Science* 286(1999)2511-14;Thurston,G.,et al.,*Nat.Med.*6(2000)460-63),而ANG-2具有相反的效果,而且在存活因子VEGF或碱性成纤维细胞生长因子缺失下促进血管去稳定和退化(Maisonpierre,P.C.,et al.,*Science* 277(1997)55-60)。然而,ANG-2功能的许多研究提示更加复杂的情况。ANG-2可能是在血管萌芽和血管退化二者中发挥作用的血管重塑的复杂调节物。支持ANG-2的此类作用的是,表达分析揭示ANG-2在促血管发生性萌芽的成体设置中与VEGF一起快速诱导,而ANG-2在血管退化的设置中在VEGF缺失下诱导(Holash,J.,et al.,*Science* 284(1999)1994-98;Holash,J.,et al.,*Oncogene*18(1999)5356-62)。与背景依赖性作用一致,ANG-2特异性结合相同的内皮特异性受体,即受Ang-1活化的Tie-2,但是对其活化具有背景依赖性影响(Maisonpierre,P.C.,et al.,*Science* 277(1997)55-60)。

[0085] 术语“人ANG2”指人蛋白血管生成素2(SEQ ID NO:15)。如本文中使用的,“结合人ANG2”或“特异性结合人ANG2”或“结合人ANG2的”或“抗ANG2抗体”指抗体以KD值为 $1.0 \times 10^{-8}$  mol/1或更低,在一个实施方案中,KD值为 $1.0 \times 10^{-9}$  mol/1或更低的结合亲和力特异性结合人ANG2抗原。结合亲和力是用标准结合测定法测定的,诸如表面等离子共振技术(BIAcore®,GE-Healthcare Uppsala,Sweden)。如此,如本文中使用的,“结合人ANG2的抗体”指以KD为 $1.0 \times 10^{-8}$  mol/1或更低(在一个实施方案中, $1.0 \times 10^{-8}$  mol/1- $1.0 \times 10^{-13}$  mol/1),在一个实施方案中,KD为 $1.0 \times 10^{-9}$  mol/1或更低(在一个实施方案中, $1.0 \times 10^{-9}$  mol/1-



$1.0 \times 10^{-13}$  mol/l)的结合亲和力特异性结合人ANG2抗原的抗体。

[0086] 典型地,对于本文所述治疗有用的结合人ANG2的抗体披露和详细记载于例如WO2010/069532(例如,优选的是,抗ANG2抗体<ANG-2>Ang2i\_LC06,<ANG-2>Ang2i\_LC07,或<ANG-2>Ang2i\_LC10);WO2011/014469(例如,优选的是,抗ANG2抗体H1H685P);US2011/150895(例如抗ANG2抗体SAIT-Ang-2-5,SAIT-Ang-2-6或其人源化型式);WO2009/097325(例如抗体MEDI 1/5,其特征不在于MEDI 1的VL(WO2009/097325中的SEQ ID No:3)和MEDI 5的VH(WO2009/097325中的SEQ ID No:7));WO2009/105269;WO 2006/068953;或WO 03/030833。

[0087] 在一个优选实施方案中,对于本文所述治疗有用的结合人ANG2的抗体特征在于包含:

[0088] (a)SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;或

[0089] (b)SEQ ID NO:3的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:4的轻链可变域氨基酸序列。

[0090] 在一个优选实施方案中,该抗ANG2抗体是结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体。

[0091] 典型地,对于本文所述治疗有用的结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体披露和详细记载于例如WO2010/040508,WO2011/117329或WO2012/131078。还有,WO2010/069532;WO2011/014469;US2011/150895;WO2009/097325;WO2009/105269;WO2006/068953;或WO03/030833中记载的ANG2抗体的VH和VL可以在使用WO2010/040508,WO 2011/117329,或WO2012/131078中记载的抗VEGF结合臂和结构的双特异性抗体内使用。

[0092] 在一个优选实施方案中,该结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含

[0093] SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;

[0094] 和

[0095] SEQ ID NO:9的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:10的轻链可变域氨基酸序列。

[0096] 在一个优选实施方案中,该结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,和SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0097] CD40抗原是一种50kDa细胞表面糖蛋白,它属于肿瘤坏死因子受体(TNF-R)家族(Stamenkovic et al.,EMBO J.8:1403-10(1989))。CD40在许多正常和肿瘤细胞类型中表达,包括B淋巴细胞,树突细胞,单核细胞,巨噬细胞,胸腺上皮,内皮细胞,成纤维细胞,和平滑肌细胞(Paulie S.et al.,Cancer Immunol.Immunother.20:23-8(1985);Banchereau J.et al.,Adv.Exp.Med.&Biol.378:79-83(1995);Alderson M.R.et al.,J.of Exp.Med.178:669-74(1993);Ruggiero G.et al.,J.of Immunol.156:3737-46(1996);Hollenbaugh D.et al.,J.of Exp.Med.182:33-40(1995);Yellin M.J.et al.,J.of Leukocyte Biol.58:209-16(1995);及Lazaar A.L.et al.,J.of Immunol.161:3120-7(1998))。CD40在所有B淋巴瘤和70%的所有实体瘤中表达。尽管组成性表达,然而CD40在抗原呈递细胞中受成熟信号(诸如LPS,IL-1 $\beta$ ,IFN- $\gamma$ 和GM-CSF)上调。

[0098] CD40激活在调节激素和细胞免疫应答中发挥至关重要作用。在没有CD40激活的情

况下抗原呈递能导致耐受,而CD40信号传导能逆转此类耐受,增强所有抗原呈递细胞(APC)的抗原呈递,导致辅助细胞因子和趋化因子的分泌,提高共刺激分子表达和信号传导,及刺激免疫细胞的细胞溶解活性。CD40在B细胞增殖,成熟和类转换中发挥至关重要作用(Foy T.M.et al.,Ann.Rev.of Immunol.14:591-617(1996))。破坏CD40信号传导途径导致异常血清免疫球蛋白同种型分布,缺少CD4+T细胞引发,和次级体液应答缺陷。例如,X连锁的高IgM综合征是一种与人CD40L基因中的突变有关的疾病,而且其特征在于没有能力影响个体来生成除IgM同种型以外的抗体,指示有效的免疫应答需要CD40和CD40L之间的生产性相互作用。

[0099] CD40L对CD40的咬合导致CD40胞质域与TRAF(TNF-R相关因子)联合(Lee H.H.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:1421-6(1999);Pullen S.S.et al.,Biochemistry 37:11836-45(1998);Grammar A.C.et al.,J.of Immunol.161:1183-93(1998);Ishida T.K.et al.,Proc.Acad Acad.Sci.USA 93:9437-42(1996);Pullen S.S.et al.,J.of Biol.Chem.274:14246-54(1999))。与TRAF的相互作用会在NF $\kappa$ B和Jun/AP1途径二者的激活中登顶(Tsukamoto N.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:1234-9(1999);Sutherland C.L.et al.,J.of Immunol.162:4720-30(1999))。根据细胞类型,此信号传导导致细胞因子诸如IL-6(Jeppson J.D.et al.,J.of Immunol.161:1738-42(1998);Uejima Y.et al.,Int.Arch.of Allergy&Immunol.110:225-32(1996)),IL-8(Gruss H.J.et al.,Blood 84:2305-14(1994);von Leoprechting A.et al.,Cancer Res.59:1287-94(1999);Denfeld R.W.et al.,Europ.J.of Immunol.26:2329-34(1996)),IL-12(Cella M.et al.,J.of Exp.Med.184:747-52(1996);Ferlin W.G.et al.,Europ.J.of Immunol.28:525-31(1998);Armant M.et al.,Europ.J.of Immunol.26:1430-4(1996);Koch F.et al.,J.of Exp.Med.184:741-6(1996);Seguin R.and L.H.Kasper,J.of Infect.Diseases 179:467-74(1999);Chaussabel D.et al.,Infection&Immunity 67:1929-34(1999)),IL-15(Kuniyoshi J.S.et al.,Cellular Immunol.193:48-58(1999))和趋化因子(MIP1 $\alpha$ ,MIP1 $\beta$ ,RANTES,等等)(McDyer J.F.et al.,J.of Immunol.162:3711-7(1999);Schaniel C.et al.,J.of Exp.Med.188:451-63(1998);Altenburg A.et al.,J.of Immunol.162:4140-7(1999);Deckers J.G.et al.,J.of the Am.Society of Nephrology 9:1187-93(1998))分泌增强,MHC I和II类表达升高(Santos-Argumedo L.et al.,Cellular Immunol.156:272-85(1994)),及粘附分子(例如ICAM)(Lee H.H.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.96:1421-6(1999);Grousson J.et al.,Archives of Dermatol.Res.290:325-30(1998);Katada Y.et al.,Europ.J.of Immunol.26:192-200(1996);Mayumi M.et al.,J.of Allergy&Clin.Immunol.96:1136-44(1995);Flores-Romo L.et al.,Immunol.79:445-51(1993))和共刺激分子(例如B7)(Roy M.et al.,Europ.J.of Immunol.25:596-603(1995);Jones K.W.and C.J.Hackett,Cellular Immunol.174:42-53(1996);Caux C.et al.,Journal of Exp.Med.180:1263-72(1994);Kiener P.A.et al.,J.of Immunol.155:4917-25(1995))表达升高。通过CD40咬合诱导的细胞因子增强T细胞存活和活化。

[0100] 在细胞和免疫功能增强以外,CD40激活的效果还包括:通过趋化因子和细胞因子的细胞募集和分化;单核细胞活化;细胞溶解性T淋巴细胞(CTL)和天然杀伤(NK)细胞的溶解细胞活性升高;在CD40阳性肿瘤中诱导凋亡;CD40阳性肿瘤的免疫原性增强;和肿瘤特异性

抗体生成。还完善建立了CD40激活在细胞介导的免疫应答中的作用,综述见Grewal et al.,*Ann.Rev.of Immunol.*16:111-35(1998);Mackey et al.,*J.of Leukocyte Biol.*63:418-28(1998);及Noelle R.J.,*Agents&Actions--Suppl.*49:17-22(1998)。

[0101] 使用交叉引发模型系统的研究显示APC的CD40激活能置换细胞溶解性T淋巴细胞(CTL)的生成对辅助T细胞的需要(Bennett et al.,*Nature* 393:478-480(1998))。来自CD40L缺陷型小鼠的证据指示辅助T细胞引发明显需要CD40信号传导(Grewal I.S.et al.,*Science* 273:1864-7(1996);Grewal I.S.et al.,*Nature* 378:617-20(1995))。CD40激活将其它情况下耐受原性,携带抗原的B细胞转变成胜任的APC(Buhlmann J.E.et al.,*Immunity* 2:645-53(1995))。CD40激活诱导脐带血祖先成熟和分化处树突细胞(Flores-Romo L.et al.,*J.of Exp.Med.*185:341-9(1997);Mackey M.F.et al.,*J.of Immunol.*161:2094-8(1998))。CD40激活还诱导单核细胞分化成功能性树突细胞(Brossart P.et al.,*Blood* 92:4238-47(1998))。而且,经由APC-CD40诱导的细胞因子,CD40激活增强NK细胞的溶细胞活性(Carbone E.et al.,*J.of Exp.Med.*185:2053-60(1997);Martin-Fontecha A.et al.,*J.of Immunol.*162:5910-6(1999))。这些观察结果指示通过诱导APC成熟,辅助细胞因子分泌,共刺激分子上调,和效应器功能增强,CD40在免疫应答的起始和增强中发挥至关重要作用。

[0102] CD40信号传导在体液和细胞毒性免疫应答的起始和成熟中的至关重要作用使得此系统成为免疫增强的一种理想靶物。此类增强对于发起针对肿瘤抗原(通常经由活化的APC的交叉引发呈递给免疫系统)的有效免疫应答会是特别重要的(Huang A.Y.et al.,*Ciba Foundation Symp.*187:229-44(1994);Toes R.E.M.et al.,*Seminars in Immunol.*10:443-8(1998);Albert M.L.et al.,*Nature* 392:86-9(1998);Bennett S.R.et al.,*J.of Exp.Med.*186:65-70(1997))。

[0103] 几个小组证明了CD40激活对于体外和体内抗肿瘤应答的有效性(Toes R.E.M.et al.,*Seminars in Immunol.*10:443-8(1998))。使用肾细胞癌的肺转移模型和通过病毒转化细胞的皮下肿瘤,两个小组独立证明了CD40激活能逆转对肿瘤特异性抗原的耐受,导致有效的T细胞抗肿瘤引发(Sotomayor E.M.et al.,*Nature Medicine* 5:780-787(1999);Diehl L.et al.,*Nature Medicine*5:774-9(1999))。还报告了在SCID小鼠中的人乳腺癌系模型中关于CD40L和抗CD40抗体处理在免疫细胞缺失下的抗肿瘤活性(Hirano A.et al.,*Blood*93:2999-3007(1999))。最近显示在小鼠模型中通过抗CD40抗体的CD40激活根除CD40+和CD40-淋巴瘤(French R.R.et al.,*Nature Medicine* 5:548-53(1999))。而且,先前Glennie及其同事的研究得出结论,对于诱导体内肿瘤清除,通过抗CD40抗体的信号传导活性比能够募集效应器的其它抗表面标志物抗体更加有效(Tutt A.L.et al.,*J.of Immunol.*161:3176-85(1998))。与这些观察结果一致,在测试抗CD40抗体针对体内CD40+肿瘤细胞的活性时,大部分但非全部杀肿瘤活性与CD40信号传导而非ADCC有关(Funakoshi S.et al.,*J.of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunol.*19:93-101(1996))。在另一项研究中,用多种药剂离体处理骨髓树突细胞,并测试体内抗肿瘤活性。这些研究证明CD40L刺激的DC是最成熟且最有效的发起抗肿瘤应答的细胞。

[0104] 还已经通过比较野生型和CD40-/-小鼠对肿瘤疫苗的响应证明CD40在抗肿瘤免疫中的至关重要作用。这些研究显示CD40-/-小鼠没有能力实现在正常小鼠中观察到的肿瘤

免疫(Mackey M.F.et al.,Cancer Research 57:2569-74(1997))。在另一项研究中,用肿瘤细胞刺激来自荷瘤小鼠的脾细胞,并离体用活化性抗CD40抗体处理,显示具有增强的肿瘤特异性CTL活性(Donepudi M.et al.,Cancer Immunol.Immunother.48:153-164(1999))。这些研究证明CD40在CD40阳性和阴性肿瘤二者中的抗肿瘤免疫中占据至关重要的位置。由于CD40在淋巴瘤,白血病,多发性骨髓瘤,大多数鼻咽,膀胱,卵巢,和肝癌,和一些乳腺和结直肠癌中表达,因此活化CD40会具有广泛的临床应用。

[0105] 如本文中使用的,“CD40激动剂”包括激动CD40/CD40L相互作用的任何模块。如此语境中使用的,CD40优选指人CD40,使得CD40激动剂优选是人CD40的激动剂。典型地,这些模块会是激动性CD40抗体或激动性CD40L多肽。举例而言,这些抗体包括特异性激动CD40/CD40L结合相互作用的人抗体,嵌合抗体,人源化抗体,双特异性抗体,scFv,和抗体片段。在一个优选实施方案中,激动性CD40抗体会包含嵌合的,完全人的或人源化的CD40抗体。在另一个优选实施方案中,激动性CD40抗体会包含嵌合的,完全人的或人源化的CD40抗体。

[0106] “激动剂”与细胞上的受体组合并起始与该受体的天然配体起始的反应或活性相似或相同的反应或活性。“CD40激动剂”诱导任何或所有(但不限于)下述应答:B细胞增殖和/或分化;经由诸如ICAM-1,E-选择蛋白,VC-AM,等等分子的细胞间粘附上调;促炎症细胞因子(诸如IL-1,IL-6,IL-8,IL-12,TNF,等等)分泌;经由CD40受体的信号转导,通过诸如TRAF(例如TRAF2和/或TRAF3),MAP激酶诸如NIK(NF- $\kappa$ B诱导激酶),I- $\kappa$ B激酶(IKK/ $\beta$ ),转录因子NF- $\kappa$ B,Ras和MEK/ERK途径,PI3K-AKT途径,P38-MAPK途径,等等等途径;通过诸如XIAP,mcl-1,bcl-x,等等分子的抗凋亡信号转导;B和/或T细胞记忆生成;B细胞抗体生成;B细胞同种型转换,MHC II类和CD80/86的细胞表面表达上调,等等。

[0107] 激动剂活性意指比阴性对照诱导的激动剂活性要大至少30%,35%,40%,45%,50%,60%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,或100%的激动剂活性,如在B细胞应答的测定法中测量的。

[0108] 在一个优选实施方案中,CD40激动剂具有比阴性对照诱导的激动剂活性要大至少2倍或至少3倍的激动剂活性,如在B细胞应答的测定法中测量的。

[0109] 如此,例如,在感兴趣的B细胞应答是B细胞增殖的情况下,激动剂活性会以比由阴性对照诱导的B细胞增殖的水平要大至少2倍或至少3倍的水平诱导B细胞增殖。

[0110] 在一个实施方案中,不结合CD40的抗体充当阴性对照。“没有显著激动剂活性”的物质会展现比由阴性对照诱导的激动剂活性要大不超过约25%,优选比由阴性对照诱导的激动剂活性要大不超过约20%,15%,10%,5%,1%,0.5%,或甚至不超过约0.1%的激动剂活性,如在B细胞应答的测定法中测量的。

[0111] 如本文中使用的,“激动性CD40抗体”,或“活化性CD40抗体”或“激动剂或活化性抗CD40抗体”表示在添加至表达CD40的细胞,组织或生物体时结合人CD40且将一种或多种CD40活性提高至少约20%的抗体。在一些实施方案中,抗体将CD40活性活化至少40%,50%,60%,70%,80%,85%。

[0112] 在一些实施方案,在CD40L存在下添加活化性抗体。

[0113] 在另一个优选实施方案中,如下测量激动性CD40抗体的激动剂活性:

[0114] 抗CD40抗体对细胞系Jy的免疫原性的提高

[0115] 在RPMI培养基中培养和维持CD40阳性JIYOYE细胞(ATCC CCL 87)(“Jy细胞”)。将

J1Y0YE细胞与本发明的抗CD40抗体(21.4.1)或与同种型匹配的抗体(抗KLH)一起在完全RPMI培养基中温育24小时。清洗细胞并用25mg丝裂霉素C(Sigma)/7ml培养基处理60分钟。然后以1:100比率将这些细胞与分离的人T细胞一起于37°C(5%CO<sub>2</sub>)温育6天。然后收集T细胞,清洗,并针对新鲜的铬51(New England Nuclear,Boston,Mass.)标记的J1Y0YE细胞测定CTL活性的水平。以%特异性细胞溶解=(细胞溶解Jy(cpm)-自发细胞溶解(cpm))/(总细胞溶解(cpm)-自发细胞溶解(cpm))计算特异性CTL活性。

[0116] 在一个优选实施方案中,如本文中使用的,激动性CD40抗体将CD40阳性J1Y0YE细胞(ATCC CCL 87)中的免疫原性提高至少50%,如体外J1Y0YE细胞(ATCC CCL 87)测定法中测量(如上所述)的。

[0117] 激动性CD40抗体(在本文中也可称作抗CD40活化性抗体)能经由数种重要机制促成肿瘤根除。这些中首要的是活化宿主树突细胞进行增强的肿瘤抗原加工和呈递,以及CD40阳性肿瘤细胞自身增强的抗原呈递或免疫原性,导致肿瘤特异性CD4+和CD8+淋巴细胞活化。可以通过下述来介导别的抗肿瘤活性,即CD40信号传导的其它免疫增强效果(生成趋化因子和细胞因子,募集和活化单核细胞,和增强CTL和NK溶细胞活性),以及通过诱导凋亡或通过刺激体液应答(导致ADCC)对CD40+肿瘤的直接杀伤。凋亡和垂死的肿瘤细胞也能变成由CD40激活的APC加工和呈递的肿瘤特异性抗原的一个重要来源。

[0118] 本发明描述了结合人CD40且作为CD40激动剂起作用的分离的抗体或其抗原结合部分。

[0119] 激动性CD40抗体记载于例如Beatty et al.,*Science* 331(2011)1612-1616; R.H.Vonderheide et al.,*J Clin Oncol* 25,876(2007);Khalil,M,et al.,*Update Cancer Ther.*2007June 1;2(2):61-65。作为模型抗体的激动性CD40大鼠抗小鼠IgG2a单抗FGK45记载于S.P.Schoenberger,et al.,*Nature* 393,480(1998);小鼠交叉反应性激动性CD40抗体克隆1C10记载于Santos-Argumedo L. et al.,*Cell Immunol.*156(1994)272-285及Heath AW et al.,*Eur J Immunol* 24(1994)1828-34。处于临床试验的例子有例如CP-870,893和Dacetuzumab(一种激动性CD40抗体,CAS号880486-59-9,SGN-40;人源化S2C6抗体)(Khalil,M,et al.,*Update Cancer Ther.*2007June 1;2(2):61-65)。

[0120] 在一个优选实施方案中,激动性CD40抗体是CP-870,893,它是一种完全人的IgG2激动性CD40抗体,由Pfizer开发。它以 $3.48 \times 10^{-10}$ M的KD结合人CD40,但不阻断CD40L结合(参见例如US 7,338,660或EP 1476185,其中CP-870,893称作抗体21.4.1)。CP-870,893(US 7,338,660的抗体21.4.1)特征在于包含(a)重链可变域氨基酸序列QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSS(SEQ ID NO:5)(它对应于US 7,338,660的SEQ ID NO:42);(b)轻链可变域氨基酸序列DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:6)(它对应于US 7,338,660的SEQ ID NO:44);和/或具有由杂交瘤21.4.1(它具有美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-3605)生成的抗体的重链可变域和轻链可变域氨基酸序列。

[0121] Dacetuzumab和其它人源化S2C6抗体记载于US 6,946,129和US8,303,955。

[0122] 因此,在一个优选实施方案中,在组合疗法中与ANG-2或ANG-2/VEGF抗体一起使用

的激动性CD40抗体特征在于包含(a)重链可变域氨基酸序列QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSS(SEQ ID NO:5)(它对应于US 7,338,660的SEQ ID NO:42);(b)轻链可变域氨基酸序列DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:6)(它对应于US 7,338,660的SEQ ID NO:44);和/或具有由杂交瘤21.4.1(它具有美国典型培养物保藏中心(ATCC)登录号PTA-3605)生成的抗体的重链可变域和轻链可变域氨基酸序列。

[0123] Dacetuzumab和其它人源化S2C6抗体记载于US 6,946,129和US8,303,955。

[0124] 在一个优选实施方案中,在组合疗法中与ANG-2或ANG-2/VEGF抗体一起使用的激动性CD40抗体是人源化S2C6抗体。例如,人源化S2C6抗体基于鼠单抗S2C6(以PTA-110保藏于ATCC)的重和轻链可变域的CDR1,2和3。鼠单抗S2C6的重和轻链可变域的CDR1,2和3记载和披露于US 6,946,129。在一个实施方案中,激动性CD40抗体是Dacetuzumab。在一个实施方案中,激动性CD40抗体特征在于包含(a)重链可变域氨基酸序列EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWRQAPGKLEWVARVIPNAGGTSYNQKFGRFTLSVDNSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGLVTVS(SEQ ID NO:7);(b)轻链可变域氨基酸序列DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHNSGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:8)。

[0125] 在一个实施方案中,激动性CD40抗体是人抗体。如本文中使用的,术语“人抗体”表示可变和恒定域序列衍生自人序列的抗体。人激动性CD40抗体详细记载于WO 03/040170,据此通过援引收录其完整公开内容。人抗体在本发明的治疗方法中提供实质性优点,因为它们预期最小化与在人患者中使用非人抗体有关的免疫原性和变应性反应。

[0126] 对于本发明有用的其它例示性人抗CD40抗体包括具有WO03/040170中记载的称作3.1.1,3.1.1H-A78T,3.1.1H-A78T-V88A-V97A,7.1.2,10.8.3,15.1.1,21.4.1,21.2.1,22.1.1,22.1.1H-C109A,23.5.1,23.25.1,23.28.1,23.28.1H-D16E,23.29.1,24.2.1,3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V和23.28.1L-C92A的抗体的氨基酸序列的抗体以及包含任何例示性抗体的CDR或可变区的抗体。

[0127] 在某些实施方案中,癌症或肿瘤治疗抑制癌症细胞增殖,抑制或阻止肿瘤重量或体积增大,和/或引起肿瘤重量或体积减小。在一些实施方案中,癌症治疗延长患者存活。在某些实施方案中,肿瘤生长与不治疗的那些相比抑制至少50%,55%,60%,65%,70%或75%。在一些实施方案中,癌症或肿瘤是CD40阳性的。

[0128] 在本发明中,术语“CD40L”或其在本领域的别名“CD154”包括所有哺乳动物CD40L,例如人,大鼠,非人灵长动物,鼠及其片段,变体,寡聚体,和缀合物,它们结合至少相应哺乳动物CD40多肽,例如人CD40。在本发明中,所施用的CD40L可以包含CD40L多肽或编码所述CD40L多肽的DNA。特别地,此类CD40L多肽和DNA包括天然CD40L序列及其片段,变体,和寡聚体,如披露于Immunex美国专利No.6,410,711;美国专利No.6,391,637;美国专利No.5,981,724;美国专利No.5,961,974和美国已公布申请No.20040006006,通过援引将所有这些专利和申请及其中披露的CD40L序列完整收入本文。

[0129] CD40L多肽可用作依照本发明的CD40激动剂,而且特别包括天然CD40L序列及其片

段,变体,和寡聚体,如披露于Immunex美国专利No.6,410,711;美国专利No.6,391,637;美国专利No.5,981,724;美国专利No.5,961,974和美国已公布申请No.20040006006,通过援引将所有这些专利和申请及其中披露的CD40L序列完整收入本文。

[0130] 术语“表位”意指抗原上能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由分子(诸如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面编组组成,而且表位通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。构象和非构象表位的区别在于在变性溶剂存在下丧失对前者而非后者的结合。

[0131] 如本文中使用的,“可变域”(轻链可变域VL,重链可变域VH)意指直接参与该抗体对抗原的结合的成对轻和重链域中的每一个。可变轻和重链域具有相同的整体结构,而且每个域包含四个框架(FR)区,它们的序列广泛保守,通过三个“高变区”(或互补决定区,CDR)连接。框架区采取 $\beta$ -片层构象,而CDR可形成连接 $\beta$ -片层结构的环。每条链中的CDR通过框架区保持它们的三维结构且与来自另一条链的CDR一起形成抗原结合位点。抗体的重和轻链CDR3区在依照本发明的抗体的结合特异性/亲和力中发挥特别重要的作用且因此提供本发明的又一个目标。

[0132] 在本文中使用时,术语“抗体的抗原结合部分”指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。抗体的抗原结合部分包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。“框架”或“FR”区是除本文中定义的高变区残基以外的那些可变域区域。因此,抗体的轻和重链可变域自N端至C端包含域FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,和FR4。尤其,重链的CDR3是对抗原结合贡献最大且限定抗体的特性的区域。CDR和FR区依照Kabat et al.,*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)的标准定义和/或来自“高变环”的那些残基来确定。

[0133] 如本文中使用的,术语“核酸”或“核酸分子”意图包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链的或双链的,但是优选是双链DNA。

[0134] 如本申请中使用的,术语“氨基酸”意指成组的天然发生的羧基 $\alpha$ -氨基酸,包括丙氨酸(三字母代码:ala,一字母代码:A),精氨酸(arg,R),天冬酰胺(asn,N),天冬氨酸(asp,D),半胱氨酸(cys,C),谷氨酰胺(gln,Q),谷氨酸(glu,E),甘氨酸(gly,G),组氨酸(his,H),异亮氨酸(ile,I),亮氨酸(leu,L),赖氨酸(lys,K),甲硫氨酸(met,M),苯丙氨酸(phe,F),脯氨酸(pro,P),丝氨酸(ser,S),苏氨酸(thr,T),色氨酸(trp,W),酪氨酸(tyr,Y),和缬氨酸(val,V)。

[0135] 抗体的“Fc部分”不直接参与抗体对抗原的结合,但是展现多种效应器功能。“抗体的Fc部分”是技术人员公知的且基于木瓜蛋白酶对抗体的切割定义的术语。抗体或免疫球蛋白根据它们重链恒定区的氨基酸序列来分类:IgA,IgD,IgE,IgG和IgM,而且这些中的几个可进一步分成亚类(同种型),例如IgG1,IgG2,IgG3,和IgG4,IgA1,和IgA2。不同类的免疫球蛋白依照重链恒定区分别称作 $\alpha$ , $\delta$ , $\epsilon$ , $\gamma$ ,和 $\mu$ 。基于补体活化,C1q结合和Fc受体结合,抗体的Fc部分直接参与ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)和CDC(补体依赖性细胞毒性)。补体活化(CDC)由补体因子C1q结合大多数IgG抗体亚类的Fc部分起始。虽然抗体对补体系统的影响依赖于某些条件,但是对C1q的结合是由Fc部分中的限定结合位点引起的。此类结合位点是现有技术已知的且记载于例如Boackle,R.J.,et al.,*Nature* 282(1979)742-743;Lukas,T.J.,et al.,*J.Immunol.*127(1981)2555-2560;Brunhouse,R.,and

Cebra, J. J., *Mol. Immunol.* 16(1979)907-917; Burton, D. R., et al., *Nature* 288(1980)338-344; Thommesen, J. E., et al., *Mol. Immunol.* 37(2000)995-1004; Idusogie, E. E., et al., *J. Immunol.* 164(2000)4178-4184; Hezareh, M., et al., *J. Virology* 75(2001)12161-12168; Morgan, A., et al., *Immunology* 86(1995)319-324; EP 0 307 434。此类结合位点是例如L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331和P329(编号依照Kabat, E. A.的EU索引, 见下文)。亚类IgG1, IgG2和IgG3的抗体通常显示补体活化和C1q和C3结合, 而IgG4不活化补体系统且不结合C1q和C3。

[0136] 在一个实施方案中, 本文所述抗体是人IgG类的(即IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚类的)。

[0137] 在一个优选实施方案中, 本文所述抗体是人IgG1亚类或人IgG4亚类的。在一个实施方案中, 本文所述抗体是人IgG1亚类的。在一个实施方案中, 本文所述抗体是人IgG4亚类的。

[0138] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体包含自人起源衍生的Fc部分和优选人恒定区的所有其它部分。如本文中使用的, 术语“自人起源衍生的Fc部分”意指Fc部分是亚类IgG1, IgG2, IgG3或IgG4的人抗体的Fc部分, 优选来自人IgG1亚类的Fc部分, 来自人IgG1亚类的突变Fc部分(在一个实施方案中, 具有突变L234A+L235A), 来自人IgG4亚类的Fc部分或来自人IgG4亚类的突变Fc部分(在一个实施方案中, 具有突变S228P)。

[0139] 在一个实施方案中, 本文所述抗体特征在于恒定链是人起源的。此类恒定链是现有技术公知的且记载于例如Kabat, E. A.(参见例如Johnson, G. and Wu, T. T., *Nucleic Acids Res.* 28(2000)214-218)。

[0140] 本发明包含治疗需要治疗的患者的方法, 其特征在于对患者施用治疗有效量的本文所述抗ANG2抗体及治疗有效量的CD40激动剂(例如激动性CD40抗体)。本发明包含本文所述抗ANG2抗体及CD40激动剂(例如激动性CD40抗体)用于所述疗法的用途。

[0141] 本文所述抗体优选是通过重组手段生成的。此类方法是现有技术广泛知道的, 而且包含原核和真核细胞中的蛋白质表达及随后抗体多肽的分离且通常纯化至药学可接受纯度。为了蛋白质表达, 通过标准方法将编码轻和重链或其片段的核酸插入表达载体中。在适宜原核或真核宿主细胞(诸如CHO细胞, NS0细胞, SP2/0细胞, HEK293细胞, COS细胞, 酵母, 或大肠杆菌细胞)中实施表达, 并自细胞(自上清液或在细胞裂解后)回收抗体。

[0142] 抗体的重组生成是现有技术公知的且记载于例如综述性文章Makrides, S. C., *Protein Expr. Purif.* 17(1999)183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8(1996)271-282; Kaufman, R. J., *Mol. Biotechnol.* 16(2000)151-161; Werner, R. G., *Drug Res.* 48(1998)870-880。

[0143] 抗体可以存在于全细胞中, 细胞裂解物中, 或部分纯化的形式, 或实质性纯的形式。通过标准技术(包括碱/SDS处理, CsCl成带, 柱层析, 琼脂糖凝胶电泳, 和本领域公知的其它技术)实施纯化以消除其它细胞成分或其它污染物, 例如其它细胞核酸或蛋白质。参见Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York(1987)。

[0144] NS0细胞中的表达记载于例如Barnes, L. M., et al., *Cytotechnology* 32(2000)109-123; Barnes, L. M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73(2001)261-270。瞬时表达记载于例如



Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30(2002)E9. 可变域的克隆记载于 Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989)3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(1992)4285-4289; Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204(1997)77-87. Schlaeger, E.-J. and Christensen, K., in Cytotechnology 30(1999)71-83及 Schlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194(1996)191-199记载了一种优选的瞬时表达系统(HEK 293)。

[0145] 将依照本发明的重和轻链可变域与启动子, 翻译起始, 恒定区, 3'非翻译区, 聚腺苷酸化, 和转录终止的序列组合以形成表达载体构建物。可以将重和轻链表达构建物组合成单一载体, 共转染, 连续转染, 或分开转染入宿主细胞中, 然后融合宿主细胞以形成表达这两条链的单一宿主细胞。

[0146] 例如, 对于原核生物合适的控制序列包括启动子, 任选的操纵基因序列, 和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子, 增强子和聚腺苷酸化信号。

[0147] 当核酸放置成与另一核酸序列处于功能性关系时, 它是“可操作连接的”。例如, 如果前序列(presequence)或分泌前导的DNA表达成参与多肽的分泌的前蛋白(preprotein), 那么它与多肽的DNA可操作连接; 如果启动子或增强子影响编码序列的转录, 那么它与该序列可操作连接; 或者如果核糖体结合位点的定位推动翻译, 那么它与编码序列可操作连接。通常, “可操作连接”意味着所连接的DNA序列是毗邻的, 而且在分泌前导的情况中是毗邻且在同一读码框的。然而, 增强子不必是毗邻的。连接通过方便的限制性位点处的连接来实现。如果不存在此类位点, 那么依照常规实践使用合成寡核苷酸接头或接头。

[0148] 通过常规免疫球蛋白纯化规程将单克隆抗体与培养液恰当分开, 诸如例如蛋白A-Sepharose, 羟磷灰石层析, 凝胶电泳, 透析, 或亲和层析。编码单克隆抗体的DNA和RNA易于使用常规规程来分离和测序。杂交瘤细胞可充当此类DNA和RNA的来源。一旦分离, 就可以将DNA插入表达载体中, 然后将表达载体转染入其它情况下不生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞(诸如HEK 293细胞, CHO细胞, 或骨髓瘤细胞)中, 以在宿主细胞中获得重组单克隆抗体的合成。

[0149] 如本文中使用的, 表述“细胞”, “细胞系”, 和“细胞培养物”可互换使用, 而且所有此类名称包括后代。如此, 词语“转化子”和“经转化细胞”包括原代受试细胞及其衍生的培养物, 不管传代的次数。还要理解的是, 由于有意或无意的突变, 所有后代在DNA内容方面可以不是精确相同的。包括具有与初始转化细胞中所筛选的相同的功能或生物学活性的变体后代。

[0150] 在另一个方面, 本发明提供含有本发明的一种或一组单克隆抗体或其抗原结合部分, 与药学可接受载剂一起配制的组合物, 例如药物组合物。

[0151] 如本文中使用的, “药学可接受载剂”包括任何和所有溶剂, 分散介质, 涂层, 抗菌剂和抗真菌剂, 等张和吸收/再吸收延迟剂, 等等是生理学相容的。优选的是, 载剂适合于注射或输注。

[0152] 本发明的组合物可以通过多种本领域已知方法来施用。正如技术人员会领会的, 施用路径和/或模式会根据期望结果而变化。

[0153] 药学可接受载剂包括无菌含水溶液或分散体和用于制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。此类介质和药剂对于药学活性物质的用途是本领域已知的。在水以外, 载剂

还可以是例如等张缓冲盐水溶液。

[0154] 不管所选择的施用路径,通过本领域技术人员知道的常规方法将可以以合适水合形式使用的本发明的化合物和/或本发明的药物组合物配制成药学可接受剂量形式。

[0155] 本发明的药物组合物中活性组分的实际剂量水平可以变化,从而获得活性组分对特定患者,组合物,和施用模式有效实现期望治疗性应答,对患者无毒的量(有效量)。所选择的剂量水平会取决于多种药动学因素,包括所采用的本发明特定组合物或其酯,盐或酰胺的活性,施用路径,施用时间,所采用的特定化合物的排泄速率,与所采用的特定组合物组合使用的其它药物,化合物和/或材料,所治疗的患者的年龄,性别,重量,状况,整体健康和在先医学史,及医学领域公知的类似因素。

[0156] 术语“方法治疗”或其等同语在应用于例如癌症时指设计成减少或消除患者中癌细胞的数目,或减轻癌症的症状的规程或作用过程。癌症或其它增殖性病证的“治疗方法”并非必然表示癌细胞或其它病症事实上会消除,细胞或病症的数目事实上会减少,或癌症或其它病症的症状事实上会减轻。通常,即使成功的可能性较低,都是鉴于患者的医学史和估算存活预期,仍然认为诱导总体有益作用过程,也会实施治疗癌症的方法。

[0157] 术语“组合施用”或“共施用”,“组合疗法”,“一起施用”或“组合治疗”指例如作为分开的配制剂/应用(或作为单一配制剂/应用)施用本文所述抗ANG2抗体,和本文所述激动性CD40抗体。共施用可以是同时的或者是任意次序顺序的,其中优选有一段时间所有活性剂同时发挥它们的生物学活性。同时或顺序(例如静脉内(i.v.),经由连续输注)共施用所述抗体和所述别的药剂。在顺序共施用这两种治疗剂时,或是在同一天以两次分开的施用药剂,或是在第1天施用一种药剂并在第2天至第7天,优选第2天至第4天共施用第二种药剂。如此,在一个实施方案中,术语“顺序”表示在第一种成分剂量给药之后7天内,优选的是在第一种成分剂量给药的之后4天内;而术语“同时”表示在相同的时间。术语“共施用”就抗ANG2抗体和/或激动性CD40抗体的维持剂而言表示维持剂可以同时共施用,如果治疗周期对两种药物都是适宜的话,例如每周。或者,例如,每个第一天至第三天施用另一药剂,并且每周施用所述抗体。或者,顺序共施用维持剂,或是在一天内或是在几天内。

[0158] 不言自明的是,以“治疗有效量”(或简单的说,“有效量”)将抗体施用于患者,该量的相应化合物或组合会引发研究人员,兽医,医生或其他临床医师寻求的组织,系统,动物或人的生物学或医学应答。

[0159] 如本文中使用的,术语“患者”或“受试者”优选指需要治疗癌症,或癌前状况或损害的人。然而,术语“患者”也可以指需要治疗的非人动物,例如哺乳动物,诸如小鼠,犬,猫,马,牛,猪,绵羊和非人灵长动物,等等。

[0160] 共施用的量和共施用的时机会取决于所治疗的患者的类型(物种,性别,年龄,重量,等)和状况及所治疗的疾病或疾患的严重程度。所述抗ANG2抗体和别的药剂以一次或在一系列治疗里(例如在同一天或在次日)恰当地共施用于患者。

[0161] 根据疾病的类型和严重程度,约0.1mg/kg至50mg/kg(例如0.1-20mg/kg)所述抗ANG2抗体和/或激动性CD40抗体是这两种药物共施用于患者的初始候选剂量。本发明包含依照本发明的抗体用于治疗罹患癌症(尤其是结肠癌,卵巢癌,成胶质细胞瘤,胃癌,胰腺癌,乳腺癌,肺癌,肝细胞癌)的患者的用途。

[0162] 在抗ANG2抗体与激动性CD40抗体的组合以外,还可以施用化疗剂。

[0163] 在一个实施方案中,可以与本文所述抗ANG2抗体和本文所述激动性CD40抗体一起施用的此类别的化疗剂包括但不限于抗肿瘤剂,包括烷化剂,包括:氮芥,诸如二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、美法仑(melphalan)和苯丁酸氮芥(chlorambucil);亚硝基脲(nitrosourea),诸如卡莫司汀(carmustine)(BCNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、和司莫司汀(semustine)(methyl-CCNU);Temodal<sup>TM</sup>(替莫唑胺(temozolamide))、乙撑亚胺/甲基蜜胺诸如三乙撑蜜胺(TEM)、三乙烯硫代磷酰胺(塞替派(thiotepa))、六甲基蜜胺(HMM,六甲蜜胺(altretamine));烃基磺酸酯,诸如白消安(busulfan);三嗪,诸如达卡巴嗪(dacarbazine)(DTIC);抗代谢物,包括叶酸类似物,诸如甲氨喋呤(methotrexate)和三甲曲沙(trimetrexate),嘧啶类似物,诸如5-氟尿嘧啶(5FU)、氟脱氧尿苷、吉西他滨(gemcitabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(AraC,阿糖胞苷(cytarabine))、5-氮胞苷、2,2'-二氟脱氧胞苷,嘌呤类似物,诸如6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、硫唑嘌呤(azathioprine)、T-脱氧柯福霉素(喷司他丁(pentostatin))、erythrohydroxynonyladenine(EHNA)、磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate)、和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨(cladribine),2-CdA);天然产物,包括抗有丝分裂药物,诸如帕利他赛(paclitaxel)、长春花生物碱(包括长春碱(vinblastine)(VLB)、长春新碱(vincristine)、和长春瑞滨(vinorelbine))、泰索帝(taxotere)、雌莫司汀(estramustine)、和磷酸雌莫司汀;表鬼臼毒素(pipodophylotoxin),诸如依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide);抗生素,诸如放线菌素D(actinomycin D)、道诺霉素(daunomycin)(柔红霉素(rubidomycin))、多柔比星(doxorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、伊达比星(idarubicin)、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicamycin)(光辉霉素(mithramycin))、丝裂霉素C(mitomycin C)、和放线菌素(actinomycin);酶,诸如L-天冬酰胺酶;生物学应答改性剂,诸如干扰素- $\alpha$ 、IL-2、G-CSF和GM-CSF;包括铂配位复合物的混杂剂,诸如奥沙利铂(oxaliplatin)、顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin),蒽二酮,诸如米托蒽醌(mitoxantrone),取代的脲,诸如羟基脲、甲基胍衍生物,包括N-甲基胍(MIH)和丙卡巴胍(procabazine)、肾上腺皮质阻抑剂,诸如米托坦(mitotane)(o,p-DDD)和氨鲁米特(aminoglutethimide);激素和拮抗剂,包括肾上腺皮质类固醇拮抗剂,诸如强的松(prednisone)及等效物、地塞米松(dexamethasone)和氨鲁米特(aminoglutethimide);Gemzar<sup>TM</sup>(吉西他滨(gemcitabine))、妊娠素,诸如己酸羟基孕酮(hydroxyprogesterone caproate)、乙酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate)和乙酸甲地孕酮(megestrol acetate);雌激素,诸如己烯雌酚(diethylstilbestrol)和乙炔雌二醇等效物;抗雌激素,诸如他莫昔芬(tamoxifen);雄激素,包括丙酸睾酮(testosterone propionate)和氟甲睾酮(flouxymesterone)/等效物;抗雄激素,诸如氟他胺(flutamide)、促性腺激素释放激素类似物和亮丙瑞林(leuprolide);和非类固醇抗雄激素,诸如氟他胺(flutamide)。靶向后成机制的疗法包括但不限于组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,脱甲基化剂(例如Vidaza)和释放转录阻抑(ATRA)疗法也可以与抗原结合蛋白质组合。在一个实施方案中,化疗剂选自下组:紫杉烷(像例如帕利他赛(泰素(Taxol))、多西他赛(泰索帝(Taxotere))、经修饰的帕利他赛(例如Abraxane和Opaxio)、多柔比星、舒尼替尼(Sutent)、索拉非尼(Nexavar)、和其它多激酶抑制剂、奥沙利铂、顺铂和卡铂、依托泊苷、吉西他滨、和长春碱。在一个实施方案中,化疗剂选自下组:紫杉烷(像例如帕利他赛(Taxol)、多西他赛(Taxotere)、经修饰的帕利他赛

(例如Abraxane和Opaxio)。在一个实施方案中,别的化疗剂选自5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸、伊立替康、或奥沙利铂。在一个实施方案中,化疗剂为5-氟尿嘧啶、亚叶酸和伊立替康(FOLFIRI)。在一个实施方案中,化疗剂为5-氟尿嘧啶和奥沙利铂(FOLFOX)。

[0164] 与别的化疗剂的组合疗法具体例子包括例如有紫杉烷(例如多西他赛或帕利他赛)或经过修饰的帕利他赛(例如Abraxane或Opaxio),多柔比星,卡培他滨和/或贝伐珠单抗(Avastin)的疗法,用于治疗乳腺癌;有卡铂,奥沙利铂,顺铂,帕利他赛,多柔比星(或经过修饰的多柔比星(Caelyx或Doxil)),或托泊替康(Hycamtin)的疗法,用于卵巢癌;有多激酶抑制剂,MKI(Sutent, Nexavar, 或706)和/或多柔比星的疗法,用于治疗肾癌;有奥沙利铂,顺铂和/或放射的疗法,用于治疗鳞状细胞癌;有泰素和/或卡铂的疗法,用于治疗肺癌。

[0165] 因此,在一个实施方案中,该别的化疗剂选自下组:紫杉烷(多西他赛或帕利他赛或经过修饰的帕利他赛(Abraxane或Opaxio),多柔比星,卡培他滨和/或贝伐珠单抗,用于治疗乳腺癌。

[0166] 在抗ANG2抗体/激动性CD40抗体组合疗法的一个实施方案中,不施用别的化疗剂。

[0167] 本发明还包含用于治疗罹患此类疾病的患者的方法。

[0168] 本发明进一步提供用于制备包含有效量的依照本发明的抗体以及药学可接受载剂的药物组合物的方法及依照本发明的抗体用于此类方法的用途。

[0169] 本发明进一步提供有效量的依照本发明的抗体用于制备药剂的用途,优选与药学可接受载剂一起,该药剂用于治疗罹患癌症的患者。

[0170] 本发明还提供有效量的依照本发明的抗体用于制备药剂的用途,优选与药学可接受载剂一起,该药剂用于治疗罹患癌症的患者。

[0171] 下面列出本发明的一些具体实施方案:

[0172] 1.一种结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其中该抗体与CD40激动剂组合施用,

[0173] a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。

[0174] 2.一种结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其中该抗体与CD40激动剂组合施用,

[0175] a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,b)用于延长罹患癌症的患者的存活。

[0176] 3.依照实施方案1或2使用的抗ANG2抗体,其中该抗ANG2抗体是单克隆抗体。

[0177] 4.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体,其中该抗ANG2抗体是人的或人源化的。

[0178] 5.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体,其中该抗ANG2抗体以小于 $1.0 \times 10^{-8} \text{mol/l}$ 的 $K_D$ 值特异性结合人ANG2,如通过表面等离子共振(Biacore™)测定的。

[0179] 6.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体,其中该抗ANG2抗体是IgG抗体。

[0180] 7.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体,其中该抗ANG2抗体以15nM或更少的IC<sub>50</sub>抑制人ANG-2与TIE2受体的相互作用。

[0181] 8.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体,其中该CD40激动剂是激动性CD40抗体或激动性CD40L多肽。

[0182] 9.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体,其中该CD40激动剂是激动性CD40

抗体。

[0183] 10. 依照实施方案9的结合人ANG-2的抗体，

[0184] i) 其中该抗ANG2抗体包含

[0185] (a) SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列；或

[0186] (b) SEQ ID NO:3的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:4的轻链可变域氨基酸序列；

[0187] 且

[0188] ii) 其中该激动性CD40抗体包含

[0189] (a) SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列；或

[0190] (b) SEQ ID NO:7的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:8的轻链可变域氨基酸序列；

[0191] 11. 依照实施方案9的结合人ANG-2的抗体，

[0192] i) 其中该抗ANG2抗体包含SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列；或

[0193] 且

[0194] ii) 其中该激动性CD40抗体包含SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。

[0195] 12. 依照实施方案9使用的抗ANG2抗体，其中该抗ANG2抗体是结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体。

[0196] 13. 依照实施方案10的结合人ANG-2的抗体，

[0197] i) 其中该结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含

[0198] SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列；和

[0199] SEQ ID NO:9的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:10的轻链可变域氨基酸序列；

[0200] 且

[0201] ii) 其中该激动性CD40抗体包含

[0202] SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。

[0203] 14. 依照实施方案10的结合人ANG-2的抗体，

[0204] i) 其中该结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, 和SEQ ID NO:14的氨基酸序列；

[0205] 且

[0206] ii) 其中该激动性CD40抗体包含

[0207] SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。

[0208] 15. 依照前述实施方案任一项使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体，其中该癌症是肺癌，非小细胞肺(NSCL)癌，支气管肺泡细胞肺癌，骨癌，胰腺癌，皮肤癌，头或颈癌，皮肤或眼内黑素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛门区癌，胃癌(stomach cancer)，胃癌

(gastric cancer), 结肠癌, 乳腺癌, 子宫癌, 输卵管癌, 子宫内膜癌, 宫颈癌, 阴道癌, 外阴癌, 何杰金氏病, 食道癌, 小肠癌, 内分泌系统癌, 甲状腺癌, 甲状旁腺癌, 肾上腺癌, 软组织肉瘤, 尿道癌, 阴茎癌, 前列腺癌, 膀胱癌, 肾或输尿管癌, 肾细胞癌, 肾盂癌, 间皮瘤, 肝细胞癌, 胆癌, 中枢神经系统(CNS)赘生物, 脊柱肿瘤, 脑干胶质瘤, 多形性成胶质细胞瘤, 星形细胞瘤, 施万细胞瘤, 室管膜瘤, 髓母细胞瘤, 脑膜瘤, 鳞状细胞癌, 垂体腺瘤, 淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

[0209] 16. 依照实施方案15使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体, 其中该癌症包含实体瘤。

[0210] 17. 依照实施方案15或16使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体, 其中该癌症是结肠癌, 卵巢癌, 成胶质细胞瘤, 胃癌, 胰腺癌, 乳腺癌, 肺癌, 肝细胞癌。

[0211] 18. 依照前述实施方案任一项使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体, 其中在治疗方法, 该抗ANG2抗体和该CD40激动剂同时, 分开或顺序施用于受试者。

[0212] 氨基酸序列的说明

[0213] SEQ ID NO:1 <ANG-2>E6Q的可变重链域VH

[0214] SEQ ID NO:2 <ANG-2>E6Q的可变轻链域VL

[0215] SEQ ID NO:3 <ANG-2>Ang2i\_LC06的可变重链域VH

[0216] SEQ ID NO:4 <ANG-2>Ang2i\_LC06的可变轻链域VL

[0217] SEQ ID NO:5 CP-870,893(US 7,338,660的抗体21.4.1)的可变重链域VH

[0218] SEQ ID NO:6 CP-870,893(US 7,338,660的抗体21.4.1)的可变轻链域VL

[0219] SEQ ID NO:7 人源化S2C6重链可变域VH变体

[0220] SEQ ID NO:8 人源化S2C6轻链可变域VL变体

[0221] SEQ ID NO:9 <VEGF>贝伐珠单抗的可变重链域VH

[0222] SEQ ID NO:10 <VEGF>贝伐珠单抗的可变轻链域VL

[0223] SEQ ID NO:11 双特异性ANG2/VEGF抗体XMAb1-<VEGF>轻链

[0224] SEQ ID NO:12 双特异性ANG2/VEGF抗体XMAb1-<ANG2>轻链

[0225] SEQ ID NO:13 双特异性ANG2/VEGF抗体XMAb1-<VEGF>重链

[0226] SEQ ID NO:14 双特异性ANG2/VEGF抗体XMAb1-<ANG2>重链

[0227] SEQ ID NO:15 人血管生成素-2(ANG-2)

[0228] SEQ ID NO:16 人血管内皮生长因子(VEGF)

[0229] SEQ ID NO:17 <VEGF>B20-4.1的可变重链域VH

[0230] SEQ ID NO:18 <VEGF>B20-4.1的可变轻链域VL

[0231] 下面描述本发明的实施方案:

[0232] 1. 一种结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体, 其中该抗体与CD40激动剂组合施用,

[0233] a) 用于治疗癌症或延迟癌症进展, 或b) 用于延长罹患癌症的患者的存活, 或c) 用于刺激免疫应答或功能, 诸如T细胞活性(在一个实施方案中, CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中, CD40激活的巨噬细胞活性), 或d) 用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。

[0234] 2. 一种结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体, 其中该抗体与CD40激动剂组合施用,

[0235] a) 用于治疗癌症或延迟癌症进展, b) 用于延长罹患癌症的患者的存活。

- [0236] 3.
- [0237] i)结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体
- [0238] 和
- [0239] ii)CD40激动剂
- [0240] 的组合在制备用于下述各项的药物中的用途:
- [0241] a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,或b)用于延长罹患癌症的患者的存活,或c)用于刺激免疫应答或功能,诸如T细胞活性(在一个实施方案中,CD8效应器T细胞活性)或巨噬细胞活性(在一个实施方案中,CD40激活的巨噬细胞活性),或d)用于使得癌症对结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体的治疗易感。
- [0242] 4.
- [0243] i)结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体
- [0244] 和
- [0245] ii)CD40激动剂
- [0246] 的组合在制备用于下述各项的药物中的用途:
- [0247] a)用于治疗癌症或延迟癌症进展,b)用于延长罹患癌症的患者的存活。
- [0248] 5.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体或用途,其中该抗ANG2抗体是人的或人源化的。
- [0249] 6.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体或用途,其中该抗ANG2抗体以小于 $1.0 \times 10^{-8}$  mol/l的 $K_D$ 值特异性结合人ANG2,如通过表面等离子共振(Biacore™)测定的。
- [0250] 7.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体或用途,其中该抗ANG2抗体是IgG抗体。
- [0251] 8.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体或用途,其中该抗ANG2抗体以15nM或更少的IC<sub>50</sub>抑制人ANG-2与TIE2受体的相互作用。
- [0252] 9.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体或用途,其中该CD40激动剂是激动性CD40抗体或激动性CD40L多肽。
- [0253] 10.依照前述实施方案任一项使用的抗ANG2抗体或用途,其中该CD40激动剂是激动性CD40抗体。
- [0254] 11.依照实施方案10的结合人ANG-2的抗体或用途,
- [0255] i)其中该抗ANG2抗体包含
- [0256] (a)SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;或
- [0257] (b)SEQ ID NO:3的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:4的轻链可变域氨基酸序列;
- [0258] 且
- [0259] ii)其中该激动性CD40抗体包含
- [0260] (a)SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列;或
- [0261] (b)SEQ ID NO:7的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:8的轻链可变域氨基酸序列;

- [0262] 12. 依照实施方案10的结合人ANG-2的抗体或用途,
- [0263] i)其中该抗ANG2抗体包含SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;或
- [0264] 且
- [0265] ii)其中该激动性CD40抗体包含SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列;或
- [0266] 13. 依照实施方案10使用的抗ANG2抗体或用途,其中该抗ANG2抗体是结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体。
- [0267] 14. 依照实施方案10使用的抗ANG2抗体或用途,其中另外与该CD40激动剂组合施用或组合使用结合人VEGF的抗体。
- [0268] 15. 依照实施方案13的结合人ANG-2的抗体或用途,
- [0269] i)其中该结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含
- [0270] SEQ ID NO:1的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链可变域氨基酸序列;和
- [0271] SEQ ID NO:9的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:10的轻链可变域氨基酸序列;
- [0272] 且
- [0273] ii)其中该激动性CD40抗体包含
- [0274] SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。
- [0275] 16. 依照实施方案13的结合人ANG-2的抗体或用途,
- [0276] i)其中该结合人ANG-2且结合人VEGF的双特异性抗体包含SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,和SEQ ID NO:14的氨基酸序列;
- [0277] 且
- [0278] ii)其中该激动性CD40抗体包含SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。
- [0279] 17. 依照实施方案14的结合人ANG-2的抗体或用途,
- [0280] i)其中该结合人VEGF的抗体包含SEQ ID NO:9的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:10的轻链可变域氨基酸序列;
- [0281] 且
- [0282] ii)其中该激动性CD40抗体包含SEQ ID NO:5的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链可变域氨基酸序列。
- [0283] 18. 依照前述实施方案任一项使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体或用途,其中该癌症是肺癌,非小细胞肺(NSCL)癌,支气管肺泡细胞肺癌,骨癌,胰腺癌,皮肤癌,头或颈癌,皮肤或眼内黑素瘤,子宫癌,卵巢癌,直肠癌,肛门区癌,胃癌(stomach cancer),胃癌(gastric cancer),结肠癌,乳腺癌,子宫癌,输卵管癌,子宫内膜癌,宫颈癌,阴道癌,外阴癌,何杰金氏病,食道癌,小肠癌,内分泌系统癌,甲状腺癌,甲状旁腺癌,肾上腺癌,软组织肉瘤,尿道癌,阴茎癌,前列腺癌,膀胱癌,肾或输尿管癌,肾细胞癌,肾盂癌,间皮瘤,肝细胞癌,胆癌,中枢神经系统(CNS)赘生物,脊柱肿瘤,脑干胶质瘤,多形性成胶质细胞瘤,星形细胞瘤,施万细胞瘤,室管膜瘤,髓母细胞瘤,脑膜瘤,鳞状细胞癌,垂体腺瘤,淋巴瘤或淋巴



细胞性白血病。

[0284] 19. 依照实施方案18使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体或用途,其中该癌症包含实体瘤。

[0285] 20. 依照实施方案18或19的抗体或用途,其中该癌症进一步特征在于ANG-2表达或过表达。

[0286] 21. 依照实施方案18至20任一项使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其中该癌症是结肠癌,卵巢癌,成胶质细胞瘤,胃癌,胰腺癌,乳腺癌,肺癌,肝细胞癌。

[0287] 22. 依照前述实施方案任一项使用的结合人血管生成素2(ANG-2)的抗体,其中在治疗方法中,该抗ANG2抗体和该CD40激动剂同时,分开或顺序施用于受试者。

## 实施例

### [0288] 实施例1

[0289] 对人ANG-2与TIE2受体的相互作用的抑制(实验A)

[0290] 通过受体相互作用ELISA显示了对人ANG-2/人Tie2相互作用的阻断。将384孔Maxisorp板(Nunc)用0.5 $\mu$ g/ml人Tie2(R&D Systems,UK,产品目录号313-TI或内部生产的材料)于室温包被2小时,并用补充有0.2%Tween-20和2%BSA(Roche Diagnostics GmbH,DE)的PBS在摇动下于室温封闭1小时。此时,将经过纯化的抗体在PBS中的稀释液与0.2 $\mu$ g/ml人血管生成素-1/2(R&D Systems#923-AN/CF,R&D Systems,UK,产品目录号623-AN或内部生产的材料)一起于室温温育1小时。清洗后,添加0.5 $\mu$ g/ml生物素化抗血管生成素-1/2克隆(R&D Systems#BAF923,BAM0981R&D Systems,UK)和1:3000稀释的链霉亲和素HRP(Roche Diagnostics GmbH,DE,产品目录号11089153001)的混合物1小时。此后,将板用PBST清洗6次。将板用新鲜制备的ABTS试剂(Roche Diagnostics GmbH,DE,缓冲液#204 530 001,片剂#11 112 422 001)于室温显色30分钟。于405nm测量吸光度。

[0291] 下表汇总了所获得的抑制性浓度。

[0292]

抗体	ANG2/Tie2相互作用ELISA
Ang2i-LC06	0.1nM

[0293] 对人ANG-2与TIE2受体的相互作用的抑制(实验B)

[0294] 在384孔微量滴定板(MicroCoat,DE,产品目录号464718)上于室温实施相互作用ELISA。每个温育步骤后,将板用PBST清洗3次。将ELISA板用5 $\mu$ g/ml Tie-2蛋白质包被1小时。此后,将孔用补充有0.2%Tween-20和2%BSA(Roche Diagnostics GmbH,DE)的PBS封闭1小时。将经过纯化的双特异性Xmab抗体在PBS中的稀释液与0.2 $\mu$ g/ml人血管生成素-2(R&D Systems,UK,产品目录号623-AN)一起于室温温育1小时。清洗后,添加0.5 $\mu$ g/ml生物素化抗血管生成素-2克隆BAM0981(R&D Systems,UK)和1:3000稀释的链霉亲和素HRP(Roche Diagnostics GmbH,DE,产品目录号11089153001)的混合物1小时。此后,将板用PBST清洗3次。将板用新鲜制备的ABTS试剂(Roche Diagnostics GmbH,DE,缓冲液#204 530 001,片剂#11 112 422 001)于室温显色30分钟。于405nm测量吸光度,并确定IC<sub>50</sub>。

[0295] XMa1(一种结合人ANG2和人VEGF的双特异性抗体(参见WO2011/117329及序列SEQ ID NO:11-14)显示以12nM的IC<sub>50</sub>抑制ANG-2结合Tie-2(ANG2/Tie2受体相互作用抑制)。

[0296] 实施例2

[0297] 抗ANG2抗体与激动性CD40抗体的组合的体内抗肿瘤功效(延迟(肿瘤生长)癌症的进展和延长所治疗的患者的存活)

[0298] 方法

[0299] 给C57BL/6小鼠皮下注射500,000个同基因MC-38肿瘤细胞,并在第16天(此时肿瘤达到40-60mm<sup>3</sup>的大小)开始治疗。

[0300] 当肿瘤达到1500mm<sup>3</sup>的大小时,依照兽医规章对小鼠处以安乐死(终点)。作为抗ANG2抗体,使用基于<ANG-2>Ang2i\_LC06的VH和VL(SEQ ID NO:3-4)的单特异性IgG1抗体。作为小鼠交叉反应性替代,使用基于<VEGF>B20-4.1的VH和VL(SEQ ID NO:17-18)的VEGF抗体,代替<VEGF>贝伐珠单抗的VH和VL(SEQ ID NO:9-10),因为贝伐珠单抗不是小鼠交叉反应性的。单独或组合使用这些抗体。出于类似原因,代替激动性CD40抗体CP-870,893(U.S.7,338,660的抗体21.4.1)(见SEQ ID NO:5-6的VH和VL),使用小鼠交叉反应性激动性CD40抗体克隆1C10(参见Santos-Argumedo L.et al.,Cell Immunol.156(1994)272-285; Heath AW et al.,Eur J Immunol 24(1994)1828-34;可得自例如Abnova,产品目录#MAB5607),具体是小鼠IgG1型式(它可以自克隆1C10的可变区VH和VL与小鼠IgG1恒定区的组合生成,或者也可以自Rockefeller University获得)。为了比较,还检查了与单特异性抗VEGF抗体<VEGF>B20-4.1(SEQ ID NO:17-18)的组合。然而,可以使用激动性CD40抗体CP-870,893(US 7,338,660的抗体21.4.1)和双特异性ANG2/VEGF抗体XMab1(SEQ ID NO:11-14)进行转基因人源化小鼠的相似实验或临床试验,基于作用机制预期相似的结果。

[0301] 依照下述进度表以所示剂量应用治疗。

[0302]

肿瘤细胞注射	起始日, 注射500,000个同基因MC-38肿瘤细
--------	----------------------------

[0303]

	胞, 第16天开始治疗, 此时肿瘤达到40-60 mm <sup>3</sup> 的大小
单独的激动性CD40抗体	5 mg/kg, i.p., 第16, 18, 21和24天
单独的抗ANG2抗体	10 mg/kg, i.p., 第16和21天
单独的抗VEGF抗体	10 mg/kg, i.p., 第16和21天
抗ANG2抗体及抗VEGF抗体 (抗VEGF/Ang-2)	均为剂量10 mg/kg, i.p., 第16和21天
抗ANG2抗体 及 激动性CD40抗体	10 mg/kg, i.p., 第16和21天  5 mg/kg, i.p., 第16, 18, 21和24天
抗ANG2抗体及抗VEGF抗体 (抗VEGF/Ang-2) 及 激动性CD40抗体	均为剂量10 mg/kg, i.p., 第16和21天  5 mg/kg, i.p., 第16, 18, 21和24天
抗VEGF抗体 及 激动性CD40抗体	10 mg/kg, i.p., 第16和21天  5 mg/kg, i.p., 第16, 18, 21和24天

[0304] 结果

[0305] 结果显示于图1。该图呈现来自3项独立实验的合并数据。用图中所示抗体组合治疗小鼠。

[0306] 小结

[0307] 我们的数据证明所有使用的试剂自身均展现一些抗肿瘤活性。虽然激动性抗CD40抗体在与抗VEGF抗体组合时确实只展现较小的效果,但是激动性CD40抗体与抗ANG2抗体(或是单特异性ANG2抗体或是抗ANG2/抗VEGF抗体的组合)的组合在肿瘤细胞生长,延迟进展和延长存活方面显示强协同效应。激动性CD40抗体的组合和抗ANG2/抗VEGF抗体的组合能观察到最强的效果。大比例的荷瘤小鼠通过抗Ang-2和抗CD40或组合抗ANG2/抗VEGF抗体(抗VEGF/Ang-2)和抗CD40的组合治疗得到治愈。因此,这些组合可能给癌症患者提供实质性的治疗益处。

[0308] 实施例3

[0309] 抗ANG2抗体(双特异性)与激动性CD40抗体的组合在皮下同基因MC38结肠癌模型中的体内抗肿瘤功效

[0310] 于37℃在水饱和气氛中于5%CO<sub>2</sub>在补充有10%FCS和2mM L-谷氨酰胺的Dulbecco氏改良Eagle培养基(DMEM, PAN Biotech)中培养鼠结直肠腺癌细胞系MC-38(得自Beckman Research Institute of the City of Hope, California, USA)的细胞。在接种那天,用PBS

自培养瓶收获MC38肿瘤细胞,并转移入培养基中,离心,在PBS中清洗一次并重悬浮。为了细胞注射,将最终的滴度调整至 $1 \times 10^7$ 个细胞/ml。随后,将100 $\mu$ l此悬浮液( $1 \times 10^6$ 个细胞)皮下接种入6-10周龄雌性C57BL/6N小鼠中。用对照抗体(MOPC-21(10mg/kg, i.p., 每周一次)和/或2A3(100 $\mu$ g, i.p., 一次);Bio X Cell, West Lebanon)及用双特异性抗ANG2抗体与抗CD40单克隆抗体FGK45(激动性CD40大鼠抗小鼠IgG2a单抗FGK45(S.P.Schoenberger, et al., Nature, 393, 480(1998), 可得自Bio X Cell)CD40克隆FGK.45, 100 $\mu$ g, i.p., 一次, 与双特异性ANG2/VEGF抗体的第一剂同时)的组合处理多组动物。该双特异性是基于<ANG-2>E6Q的VH和VL(SEQ ID NO:1-2)(用于ANG2结合臂)的双特异性ANG2/VEGF抗体。作为小鼠交叉反应性替代VEGF结合臂,将<VEGF>B20-4.1的VH和VL(SEQ ID NO:17-18)用于双特异性抗体,替换<VEGF>贝伐珠单抗的VH和VL(SEQ ID NO:9-10)。然而,结构与XMab1相同(只是VH/VL<VEGF>用B20-4.1的小鼠交叉反应性VH/VL<VEGF>替换)。

[0311] 在肿瘤建立并达到50-80mm<sup>3</sup>(用于单一疗法)或200mm<sup>3</sup>(用于组合)的平均大小后开始治疗。一周两次测量肿瘤体积,并平行监测动物重量。结果显示于图7。双特异性ANG2/VEGF抗体与激动性CD40单抗的组合在同基因MC38小鼠腺癌模型中显示胜过单一疗法改善的抗肿瘤功效,肿瘤在第21天进入消退(TGI>100%)。在第32天,10只动物中的5只没有肿瘤。

[0312]

	TGI	研究
激动性CD40抗体	62% (第21天)	CSF1R_Pz_MC38_008
双特异性Ang2/VEGF抗体	30% (第20天)	CSF1R_Pz_MC38_009
激动性CD40抗体和 双特异性Ang2/VEGF抗体 的组合	>100% (第21天)	CSF1R_Pz_MC38_011

[0313] 实施例4

[0314] 单独或组合的Ang2/VEGF抗体(CrossMab;LC06/B20.4.1)和CD40抗体(FGK4.5; iTME-0004-0005)在雌性Balb/c小鼠中的同基因CT26WT模型中的抗肿瘤功效

[0315] 实验规程

[0316] 测试药剂

[0317] 双特异性ANG2/VEGF抗体基于<ANG-2>E6Q的VH和VL(SEQ ID NO:1-2)(用于ANG2结合臂)。作为小鼠交叉反应性替代VEGF结合臂,将<VEGF>B20-4.1的VH和VL(SEQ ID NO:17-18)用于双特异性抗体,替换<VEGF>贝伐珠单抗的VH和VL(SEQ ID NO:9-10)。然而,结构与XMab1相同(只是VH/VL<VEGF>用B20-4.1的小鼠交叉反应性VH/VL<VEGF>替换)。双特异性ANG2/VEGF抗体是在Roche Diagnostics GmbH(Penzberg, Germany)生成的。CD40抗体(FGK4.5; iTME-0004-0005)得自Adipogen/Biomol。

[0318] 抗体缓冲液包括20mM组氨酸和140mM氯化钠(pH 6.0)。施用前自储液在上文所述缓冲液中适当稀释抗体溶液。

[0319] 细胞系和培养条件

[0320] 于37℃在水饱和气氛中于5%CO<sub>2</sub>在补充有10%胎牛血清(PAA Laboratories, Austria)和2mM L-谷氨酰胺的RPMI 1640中常规培养鼠CT26WT细胞系。

[0321] 动物

[0322] 依照承诺的指导方针(GV-Solas;Felasa;TierschG)在无特定病原体的条件下以12小时光照/12小时黑暗的日周期维持到达时6-7周龄的雌性Balb/c小鼠(购自Charles River, Sulzfeld, Germany)。实验性研究方案得到了当地政府的审查和批准(Regierung von Oberbayern;登记号55.2-1-54-2531.2-32-10)。到达后,将动物在动物房中维持一周以适应新环境和进行观察。定期进行持续健康监测。随意提供食物(Altromin)和水(经过过滤的)。

[0323] 监测

[0324] 每天对动物管理临床症状和不利效果检测。对于监测,贯穿实验,一周两次记录动物体重,并在随机化后用测径器测量肿瘤体积。

[0325] 动物治疗

[0326] 在随机化那天(肿瘤体积为约130mm<sup>3</sup>,肿瘤细胞接种后12天)开始动物治疗。应用了下述剂量,施用路径和治疗进度表。

[0327] 表1:所应用的剂量,施用路径和治疗进度表

[0328]

化合物	剂量(mg/kg)	施用路径	治疗进度表
组氨酸缓冲液	---	IP	一周一次, 5次
RO6872840 Crossmab (LC06/B20.4.1)	10	IP	一周一次, 2次(第12/19天)
CD40 (FGK4.5 iTME-0004-0005)	100µg/小鼠	IP	第12天
CD40 + LC06/B20.4.1	100µg/小鼠 + 10	IP	第12天 + 一周一次, 2次(第12/19天)

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司 (E. Hoffmann-La Roche AG)

<120> 抗 ANG2 抗体和 CD40 激动剂的组合法

<130> P31903 WO

<150> EP13198753.9

<151> 2013-12-20

<150> EP14158331.0

<151> 2014-03-07

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> <ANG-2> E6Q 的可变重链域 VH

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
20 25 30

[0001]

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser  
115 120 125

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> <ANG-2> E6Q 的可变轻链域 VL

<400> 2

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 3

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> <ANG-2> Ang2i\_LC06 的可变重链域 VH

<400> 3

[0002]

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

<210> 4

<211> 110

<212> PRT  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> <ANG-2> Ang2i-LC06 的可变轻链域 VL  
  
 <400> 4  
 Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
 20 25 30  
  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
 35 40 45  
  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
  
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
 65 70 75 80  
  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
 85 90 95  
  
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln  
 100 105 110

[0003]

<210> 5  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> 人 (Homo sapiens)  
  
 <400> 5  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
  
 Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Met Glu Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr  
 100 105 110  
  
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125



<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人 (Homo sapiens)  
 <400> 6  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

[0004]

<210> 7  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 人源化 S2C6 重链可变域变体  
 <400> 7  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人源化 S2C6 轻链可变域变体

&lt;400&gt; 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
65 70 75 80

[0005]

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr  
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; &lt;VEGF&gt; 贝伐珠单抗的可变重链域 VH

&lt;400&gt; 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 10  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> <VEGF> 贝伐珠单抗的可变轻链域 VL

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

[0006] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 11  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> XMab1 -<VEGF>轻链

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

[0007] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 12  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> XMab1 -<ANG2>轻链

<400> 12

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
 100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
 180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 195 200 205

[0008]

Glu Pro Lys Ser Cys  
 210

<210> 13  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> XMab1 -<VEGF>重链

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
225 230 235 240

[0009]

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 14  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> XMab1 -<ANG2>重链

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 165 170 175

[0010]

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His  
 225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320

[0011]

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
 355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460



<210> 15  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> 人 (Homo sapiens)  
 <400> 15  
 Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys  
 20 25 30  
 Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro  
 35 40 45  
 Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala  
 50 55 60  
 Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys  
 85 90 95  
 Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile  
 100 105 110  
 [0012] Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly  
 115 120 125  
 Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp  
 130 135 140  
 Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp  
 165 170 175  
 Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu  
 180 185 190  
 Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser  
 195 200 205  
 Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn  
 210 215 220  
 Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn  
 225 230 235 240  
 Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn  
 245 250 255  
 Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr

		260						265							270	
	Val	Ala	Lys	Glu	Glu	Gln	Ile	Ser	Phe	Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Val	Phe
			275					280					285			
	Lys	Ser	Gly	His	Thr	Thr	Asn	Gly	Ile	Tyr	Thr	Leu	Thr	Phe	Pro	Asn
		290					295					300				
	Ser	Thr	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Tyr	Cys	Asp	Met	Glu	Ala	Gly	Gly	Gly
	305					310					315					320
	Gly	Trp	Thr	Ile	Ile	Gln	Arg	Arg	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Asp	Phe	Gln
					325					330					335	
	Arg	Thr	Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Val	Gly	Phe	Gly	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu
			340					345						350		
	Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Glu	Phe	Val	Ser	Gln	Leu	Thr	Asn	Gln	Gln	Arg
			355					360					365			
	Tyr	Val	Leu	Lys	Ile	His	Leu	Lys	Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Tyr
		370					375					380				
	Ser	Leu	Tyr	Glu	His	Phe	Tyr	Leu	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Tyr	Arg
	385					390					395					400
[0013]	Ile	His	Leu	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ser	Ile
					405					410						415
	Ser	Gln	Pro	Gly	Asn	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Asp	Asn	Asp	Lys
				420					425					430		
	Cys	Ile	Cys	Lys	Cys	Ser	Gln	Met	Leu	Thr	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Asp
			435					440					445			
	Ala	Cys	Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Met	Tyr	Tyr	Pro	Gln	Arg	Gln
		450					455						460			
	Asn	Thr	Asn	Lys	Phe	Asn	Gly	Ile	Lys	Trp	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Gly	Ser
	465					470					475					480
	Gly	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ala	Thr	Thr	Met	Met	Ile	Arg	Pro	Ala	Asp	Phe
				485						490					495	
	Ser	Gly														
	<210>	16														
	<211>	191														
	<212>	PRT														
	<213>	人 (Homo sapiens)														
	<400>	16														
	Met	Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	Trp	Val	His	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
	1				5					10						15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
 20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
 50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu  
 65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro  
 85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His  
 100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys  
 115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly  
 130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr  
 145 150 155 160

[0014] Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln  
 165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
 180 185 190

<210> 17  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> <VEGF> B20-4.1 的可变重链域 VH

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Asn Gly Ser  
 20 25 30

Trp Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val  
115

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> <VEGF> B20-4.1 的可变轻链域 VL

<400> 18

[0015]

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Arg Arg Ser  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Ser Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

AE 19/24/33 2012 MC38 肿瘤, 抗-VEGF/Ang-2 + CD40, 在20g雌性小鼠中

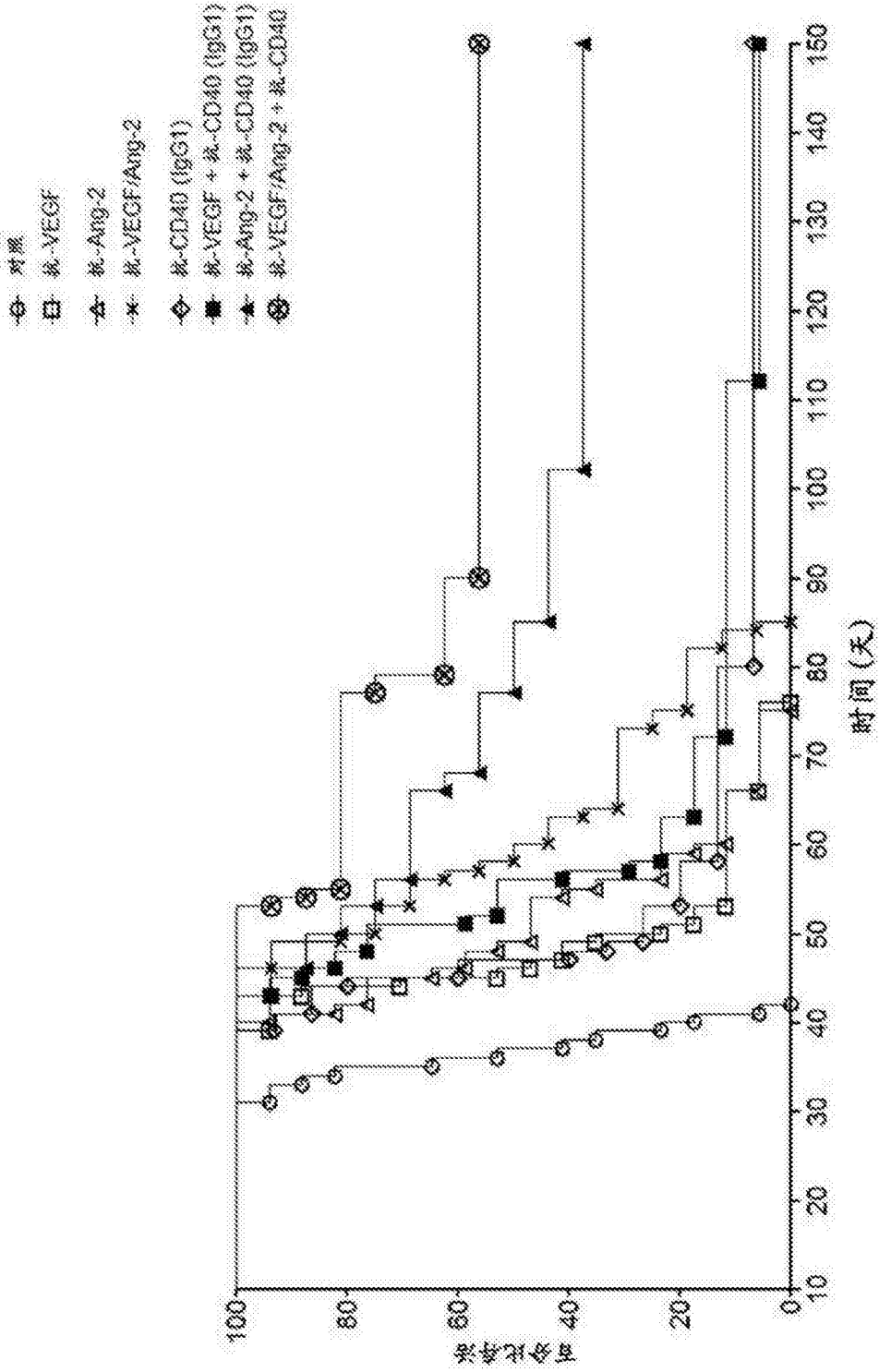


图1

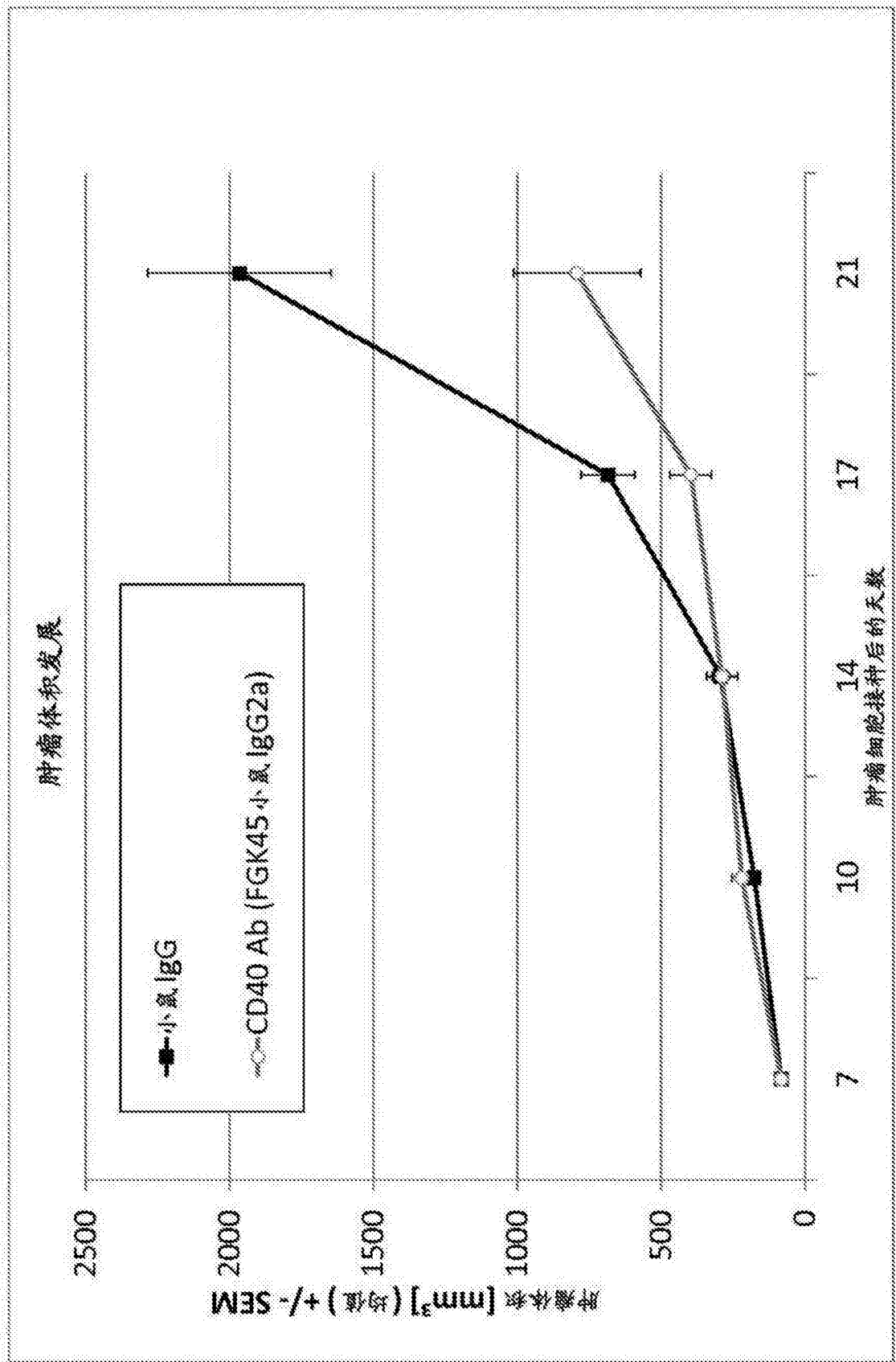


图2A

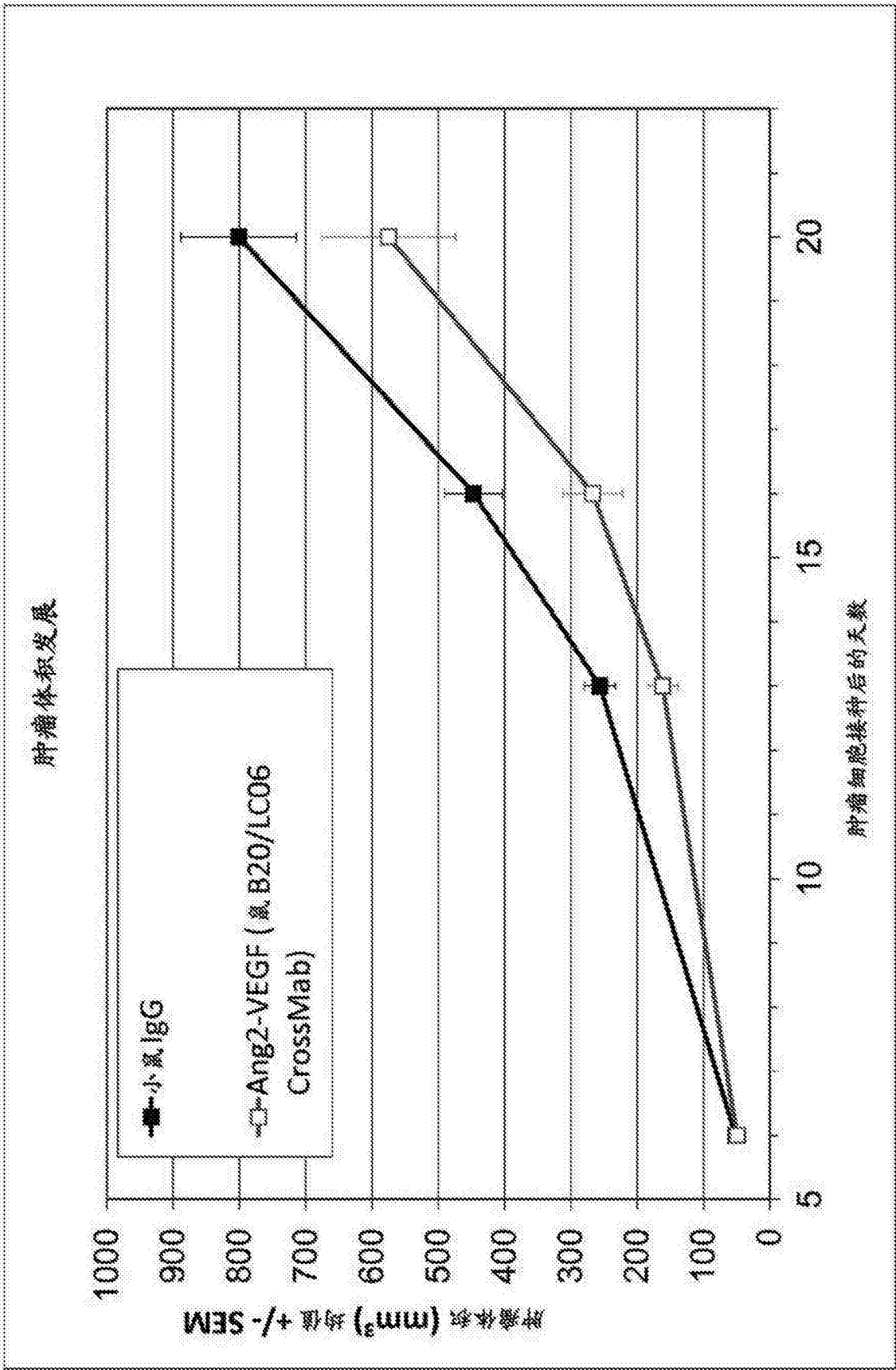


图2B

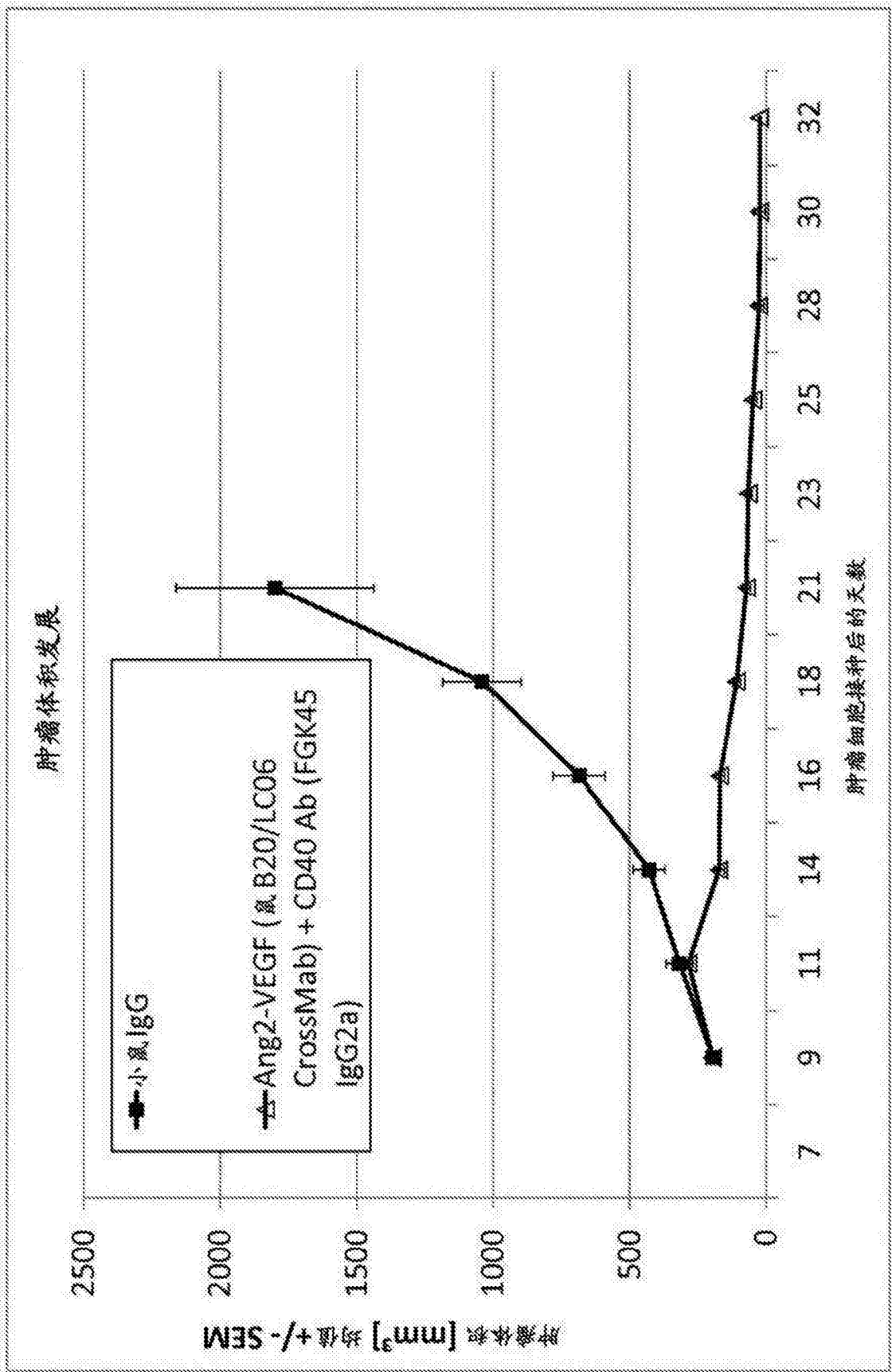


图2C



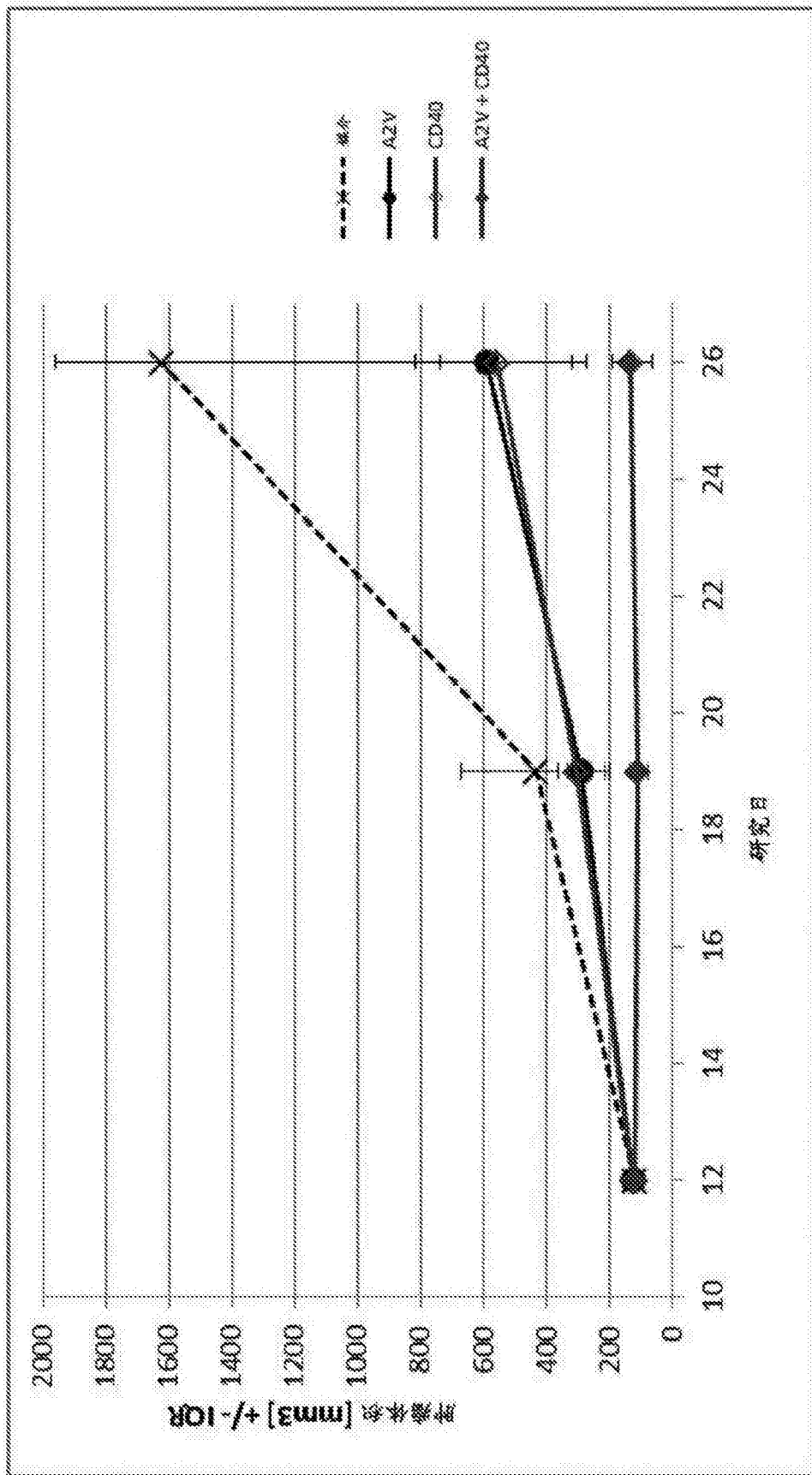


图3