



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108136001 B

(45) 授权公告日 2022.07.29

(21) 申请号 201680025721.5

罗斯玛丽·J·阿克赫斯特

(22) 申请日 2016.04.03

欧·李

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司 11018

申请公布号 CN 108136001 A

专利代理人 袁媛 王珍仙

(43) 申请公布日 2018.06.08

(51) Int.CI.

A61K 45/06 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

62/143,016 2015.04.03 US

A61P 35/00 (2006.01)

62/191,797 2015.07.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2017.11.02

CN 106103488 A, 2016.11.09

(86) PCT国际申请的申请数据

Shuang Wei et al. Tumor-Induced Immune Suppression of In vivo Effector T-Cell Priming is Mediated by the B7-H1/PD-1 Axis and Transforming Growth Factor  $\beta$ . 《Cancer Res》.2008, 第68卷(第13期), 第5432-5438页.

PCT/US2016/025802 2016.04.03

审查员 韩松

(87) PCT国际申请的公布数据

权利要求书4页 说明书50页

W02016/161410 EN 2016.10.06

序列表12页 附图8页

(73) 专利权人 佐马技术有限公司

地址 美国加利福尼亚

专利权人 加州大学董事会

(72) 发明人 阿默·M·米尔扎

(54) 发明名称

使用TGF- $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂治疗癌症

(57) 摘要

本公开大体上涉及使用转化生长因子 $\beta$  (TGF  $\beta$ ) 抑制剂和程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 抑制剂治疗癌症或预防癌症疾病复发的联合治疗, 所述癌症疾病诸如肺癌、前列腺癌、乳腺癌、肝细胞癌、食道癌、结肠直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、纤维化癌、神经胶质瘤和黑色素瘤、以及其转移。

1. 转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )抑制剂和程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)抑制剂在制备用于治疗癌症或预防癌症复发的药物中的应用,其中所述PD-1抑制剂是抗PD-1抗体;并且,其中所述TGF $\beta$ 抑制剂是包含以下各项的结合TGF $\beta$ 的抗体:

- I. (a) 如SEQ ID NO: 19所示的重链CDR1氨基酸序列;
- (b) 如SEQ ID NO: 20所示的重链CDR2氨基酸序列;
- (c) 如SEQ ID NO: 21所示的重链CDR3氨基酸序列;
- (d) 如SEQ ID NO: 22所示的轻链CDR1氨基酸序列;
- (e) 如SEQ ID NO: 23所示的轻链CDR2氨基酸序列;以及
- (f) 如SEQ ID NO: 24所示的轻链CDR3氨基酸序列;

或者

- II. (a) 如SEQ ID NO: 25所示的重链CDR1氨基酸序列;
- (b) 如SEQ ID NO: 26所示的重链CDR2氨基酸序列;
- (c) 如SEQ ID NO: 27所示的重链CDR3氨基酸序列;
- (d) 如SEQ ID NO: 28所示的轻链CDR1氨基酸序列;
- (e) 如SEQ ID NO: 29所示的轻链CDR2氨基酸序列;以及
- (f) 如SEQ ID NO: 30所示的轻链CDR3氨基酸序列;

或者

- III. (a) 如SEQ ID NO: 13所示的重链CDR1氨基酸序列;
- (b) 如SEQ ID NO: 14所示的重链CDR2氨基酸序列;
- (c) 如SEQ ID NO: 15所示的重链CDR3氨基酸序列;
- (d) 如SEQ ID NO: 16所示的轻链CDR1氨基酸序列;
- (e) 如SEQ ID NO: 17所示的轻链CDR2氨基酸序列;以及
- (f) 如SEQ ID NO: 18所示的轻链CDR3氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的应用,其中所述TGF $\beta$ 抗体结合TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2以及TGF $\beta$ 3。

3. 如权利要求1所述的应用,其中所述TGF $\beta$ 抗体以比与TGF $\beta$ 3结合的亲和力更大的亲和力结合TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2。

4. 如权利要求1所述的应用,其中所述TGF $\beta$ 抗体中和TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2的活性的程度大于它中和TGF $\beta$ 3活性的程度。

5. 如权利要求1所述的应用,其中所述TGF $\beta$ 抗体以 $10^{-6}$  M或更小的亲和力Kd结合TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2以及TGF $\beta$ 3。

6. 如权利要求1中所述的应用,其中所述TGF $\beta$ 抗体包含:

- a) 如SEQ ID NO: 25所示的重链CDR1氨基酸序列;
- b) 如SEQ ID NO: 26所示的重链CDR2氨基酸序列;
- c) 如SEQ ID NO: 27所示的重链CDR3氨基酸序列;
- d) 如SEQ ID NO: 28所示的轻链CDR1氨基酸序列;
- e) 如SEQ ID NO: 29所示的轻链CDR2氨基酸序列;以及
- f) 如SEQ ID NO: 30所示的轻链CDR3氨基酸序列。

7. 如述权利要求1所述的应用,其中所述TGF $\beta$ 抗体包含:

- a) 如SEQ ID NO: 13所示的重链CDR1氨基酸序列;

- b) 如SEQ ID NO: 14所示的重链CDR2氨基酸序列；
- c) 如SEQ ID NO: 15所示的重链CDR3氨基酸序列；
- d) 如SEQ ID NO: 16所示的轻链CDR1氨基酸序列；
- e) 如SEQ ID NO: 17所示的轻链CDR2氨基酸序列；以及
- f) 如SEQ ID NO: 18所示的轻链CDR3氨基酸序列。

8. 如权利要求1所述的应用，其中所述TGF $\beta$ 抗体包含：

- g) 如SEQ ID NO: 19所示的重链CDR1氨基酸序列；
- h) 如SEQ ID NO: 20所示的重链CDR2氨基酸序列；
- i) 如SEQ ID NO: 21所示的重链CDR3氨基酸序列；
- j) 如SEQ ID NO: 22所示的轻链CDR1氨基酸序列；
- k) 如SEQ ID NO: 23所示的轻链CDR2氨基酸序列；以及
- l) 如SEQ ID NO: 24所示的轻链CDR3氨基酸序列。

9. 如权利要求5所述的应用，其中所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示并且所述轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示。

10. 如权利要求5所述的应用，其中所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示并且所述轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。

11. 如权利要求5所述的应用，其中所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示并且所述轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。

12. 如权利要求6至11中任一项所述的应用，其中所述抗体还包含重链恒定区，其中所述重链恒定区是修饰的或未修饰的IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段、或其组合。

13. 如权利要求12所述的应用，所述应用还包含与所述轻链可变区连接的人类轻链恒定区。

14. 如权利要求1所述的应用，其中所述癌症选自由以下各项组成的组：食道癌、胰腺癌、膀胱癌、胃癌、纤维化癌、神经胶质瘤、复发性儿童脑膜生物、肾癌、前列腺癌、黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、肝细胞癌、霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、慢性骨髓性白血病、处于缓解期的成人急性骨髓性白血病；伴有Inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11的成人急性骨髓性白血病；伴有t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11的成人急性骨髓性白血病；伴有t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1的成人急性骨髓性白血病；伴有t(9;11)(p22;q23)/MLLT3-MLL的成人急性骨髓性白血病；伴有t(15;17)(q22;q12)/PML-RARA的成人急性早幼粒细胞白血病；烷基化剂相关急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、里氏综合征、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、成人成胶质细胞瘤、成人胶质肉瘤、复发性成胶质细胞瘤、复发性儿童横纹肌肉瘤、复发性尤文氏肉瘤/外周原始神经外胚层肿瘤、复发性成神经细胞瘤、复发性骨肉瘤、结肠直肠癌、鼻咽非角化性癌、复发性鼻咽未分化癌、宫颈腺癌、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、复发性头颈部癌、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌、结肠癌、晚期GI癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌、骨赘生物、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、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以及复发性蕈样真菌病和塞扎里综合征。

15. 如权利要求1所述的应用，其中所述癌症选自由以下各项组成的组：转移性胰腺癌、

恶性神经胶质瘤、弥漫性内在脑桥神经胶质瘤、肾细胞癌、转移性去势抗性前列腺癌、IV期前列腺癌、转移性黑色素瘤、恶性黑色素瘤、皮肤复发性黑色素瘤、黑色素瘤脑转移瘤、IIIA期皮肤黑色素瘤、IIIB期皮肤黑色素瘤、IIIC期皮肤黑色素瘤、IV期皮肤黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、复发性转移性乳腺癌、晚期B细胞NHL、MSI阳性结肠直肠癌、MSI阴性结肠直肠癌和宫颈腺鳞癌。

16. 如权利要求1所述的应用，其中所述癌症选自由以下各项组成的组：转移性胰腺腺癌、透明细胞转移性肾细胞癌、头颈部恶性黑色素瘤和鳞状细胞非小细胞肺癌。

17. 如权利要求1所述的应用，其中所述癌症选自由以下各项组成的组：非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部癌、皮肤癌、黑色素瘤以及鳞状细胞癌(SCC)。

18. 如权利要求1所述的应用，其中所述癌症选自由以下各项组成的组：肺腺癌、粘液性腺瘤、胰腺导管癌和结肠直肠癌、脑低级神经胶质瘤、乳腺浸润性癌、多形性成胶质细胞瘤、黑色素瘤、甲状腺癌、直肠腺癌、肝癌、急性骨髓性白血病、胃腺癌、食管腺癌、子宫体子宫内膜样癌、膀胱癌、肾癌、前列腺癌、口腔癌、大肠癌以及淋巴瘤。

19. 如权利要求1所述的应用，所述应用包括减小所述受试者的肿瘤尺寸或肿瘤负荷。

20. 如权利要求15所述的应用，其中使所述肿瘤尺寸减小20%或更多。

21. 如权利要求1所述的应用，其中所述PD-1抑制剂和所述TGF $\beta$ 抑制剂被配制为药物组合物。

22. 如权利要求21所述的应用，其中所述抑制剂处于同一组合物中。

23. 如权利要求21所述的应用，其中所述抑制剂处于单独的组合物中。

24. 如权利要求1所述的应用，其中并行施用所述抑制剂。

25. 如权利要求1所述的应用，其中在不同的时间或连续施用所述抑制剂。

26. 如权利要求20或21所述的应用，其中所述施用在已经接受抑制剂治疗的受试者中预防癌症复发。

27. 如权利要求1所述的应用，其中每天一次、每周一次、每周两次、每两周一次、每三周一次、每月一次或每两个月一次施用所述抑制剂。

28. 如权利要求1所述的应用，其中以0.1 mg/kg至15 mg/kg的剂量范围施用所述TGF $\beta$ 抑制剂并且以0.1 mg/kg至15 mg/kg的剂量范围施用所述PD-1抑制剂。

29. 如权利要求22或23所述的应用，其中所述施用增加肿瘤中效应T细胞与调节性T细胞的比率。

30. 转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )抑制剂和程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)抑制剂在制备用于增加肿瘤中效应T细胞与调节性T细胞的比率的药物中的应用，其中所述PD-1抑制剂是抗PD-1抗体；并且，

其中所述TGF $\beta$ 抑制剂是包含以下各项的结合TGF $\beta$ 的抗体：

- I. (a) 如SEQ ID NO: 19所示的重链CDR1氨基酸序列；
- (b) 如SEQ ID NO: 20所示的重链CDR2氨基酸序列；
- (c) 如SEQ ID NO: 21所示的重链CDR3氨基酸序列；
- (d) 如SEQ ID NO: 22所示的轻链CDR1氨基酸序列；
- (e) 如SEQ ID NO: 23所示的轻链CDR2氨基酸序列；以及
- (f) 如SEQ ID NO: 24所示的轻链CDR3氨基酸序列；

或者

- II. (a) 如SEQ ID NO: 25所示的重链CDR1氨基酸序列；
- (b) 如SEQ ID NO: 26所示的重链CDR2氨基酸序列；
- (c) 如SEQ ID NO: 27所示的重链CDR3氨基酸序列；
- (d) 如SEQ ID NO: 28所示的轻链CDR1氨基酸序列；
- (e) 如SEQ ID NO: 29所示的轻链CDR2氨基酸序列；以及
- (f) 如SEQ ID NO: 30所示的轻链CDR3氨基酸序列；

或者

- III. (a) 如SEQ ID NO: 13所示的重链CDR1氨基酸序列；
- (b) 如SEQ ID NO: 14所示的重链CDR2氨基酸序列；
- (c) 如SEQ ID NO: 15所示的重链CDR3氨基酸序列；
- (d) 如SEQ ID NO: 16所示的轻链CDR1氨基酸序列；
- (e) 如SEQ ID NO: 17所示的轻链CDR2氨基酸序列；以及
- (f) 如SEQ ID NO: 18所示的轻链CDR3氨基酸序列。

## 使用TGF- $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂治疗癌症

[0001] 本申请要求2015年4月3日提交的美国临时专利申请号62/143,016和2015年7月13日提交的美国临时专利申请号62/191,797的优先权益,这两件美国临时专利申请以引用的方式整体并入本文。

[0002] 本发明是在政府支持下根据由国家卫生研究院(National Institutes of Health)授予的基金号R21CA164772和U01CA084244作出的。政府拥有本发明的某些权利。

[0003] 以电子方式提交的材料以引用的方式并入本文

[0004] 以引用方式整体并入的是同时随本文提交并且被如下标识的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表:在2016年4月1日创建的名称为“49343\_SeqListing.txt”的一份17,107字节ASCII(文本)文件。

### 技术领域

[0005] 本公开大体上涉及用于治疗癌症或预防癌症复发的联合治疗,所述联合治疗包括向有需要的受试者施用治疗有效量的转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )抑制剂和程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)抑制剂。

### 背景技术

[0006] 癌症免疫治疗指的是激活免疫系统以诱导肿瘤消退和疾病稳定的方法(Mellman I等,Nature.480,7378:480-9(2011))。针对某些负免疫调节因子(免疫检查点)的抗体治疗已经被证实在几种癌症类型中作为抗肿瘤治疗是成功的(Postow等,J Clin Oncol 33:9,(2015))。

[0007] 转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )蛋白质家族由哺乳动物中存在的三种不同的亚型(TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、以及TGF $\beta$ 3)组成。TGF $\beta$ 蛋白激活并且调节影响包括细胞增殖性病况、炎症性病况以及心血管病况在内的疾病状态的多种基因反应。TGF $\beta$ 是一种多功能的细胞因子,最初因它能够使正常的成纤维细胞转化成能够进行非贴壁依赖性生长的细胞的能力而得名。TGF $\beta$ 分子主要由造血细胞和肿瘤细胞产生并且可以调节,即刺激或抑制来自多种正常和赘生性组织来源的细胞的生长和分化(Sporn等,Science,233:532(1986)),并且刺激各种基质细胞的形成和扩充。

[0008] 已知TGF $\beta$ 参与许多增殖性和非增殖性细胞过程,如细胞增殖和分化、胚胎发育、细胞外基质形成、骨骼发育、伤口愈合、造血作用以及免疫和炎症反应。参见例如Pircher等,Biochem.Biophys.Res.Commun.,136:30-37(1986);Wakefield等,Growth Factors,1:203-218(1989);Roberts和Sporn,第419-472页,《实验药理学手册》(Handbook of Experimental Pharmacology),M.B.Sporn和A.B.Roberts编著(海德堡的施普林格出版社(Springer,Heidelberg),1990);Massague等,Annual Rev.Cell Biol.,6:597-646(1990);Singer和Clark,New Eng.J.Med.,341:738-745(1999)。并且,TGF $\beta$ 被用于治疗和预防肠粘膜疾病(WO 2001/24813)。还已知TGF $\beta$ 对各种免疫细胞类型具有强免疫抑制作用,包括细胞毒性T淋巴细胞(CTL)抑制(Ranges等,J.Exp.Med.,166:991,1987;Espevik等,J.Immunol.,140:2312,

1988) ;B细胞淋巴细胞增殖和κ轻链表达减少(Lee等,J.Exp.Med.,166:1290,1987) ;造血作用的负调节(Sing等,Blood,72:1504,1988) ;肿瘤细胞上的HLA-DR表达下调(Czarniecki等,J.Immunol.,140:4217,1988) ;以及抑制抗原激活的B淋巴细胞响应于B细胞生长因子的增殖(Petit-Koskas等,Eur.J.Immunol.,18:111,1988)。还参见美国专利7,527,791。

[0009] TGF $\beta$ 亚型在癌症中的表达是复杂的并且可变的,其中TGF $\beta$ 亚型的不同组合在特定癌症中具有不同的作用。TGF $\beta$ 分子既可以充当肿瘤抑制因子,也可以充当肿瘤促进因子。举例来说,动物中TGF $\beta$ 信号转导的缺失或下调可能会导致乳腺癌、肠癌、胰腺癌、结肠癌以及鳞状细胞癌增加,这表示TGF $\beta$ 的存在对于预防或减缓肿瘤进展是重要的(Yang等,Trends Immunol 31:220-27,2010)。然而,已知TGF $\beta$ 过表达具有促致瘤性并且在许多肿瘤类型中检测到表达增加(Yang等(同上))。

[0010] TGF $\beta$ 抗体已经描述于美国专利号7,527,791;7,927,593;7,494,651;7,369,111;7,151,169;6,492,497;6,419,928;6,090,383;5,783,185;5,772,998;5,571,714;以及7,723,486和8,569,462中。

[0011] 程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)也被称为分化簇279(CD279),是在激活的T细胞、B细胞以及巨噬细胞上表达的细胞表面共抑制受体,并且是免疫检查点阻断的组分(Shinohara等,Genomics.,23(3):704,(1994);Francisco等,Immunol Rev.,236:219,(2010))。PD-1在与它的两种配体PD-L1(也被称为B7-H1;CD274)和PD-L2(B7-DC;CD273)相互作用时限制T细胞的活性(Postow等,J Clin Oncol.,33:9,(2015))。PD-1与PD-L1和PD-L2的相互作用减少了T细胞增殖、细胞因子产生、以及细胞毒活性(Freeman GJ等,J Exp Med.,192:1027-34,(2000);Brown JA等,J Immunol.,170:1257-66,(2003))。

[0012] 最近,两种单克隆抗体已经由美国食品和药物管理局(U.S.Food and Drug Administration,FDA)批准用于抑制PD-1免疫治疗。派姆单抗(pembrolizumab)(KEYTRUDA®,默沙东公司(Merck Sharp&Dohme Corp.))被批准用于转移性黑色素瘤,并且纳武单抗(nivolumab)(Opdivo®,百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))被批准用于转移性黑色素瘤和转移性鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)。这两种抗体均与PD-1受体结合并且阻断它与它的配体PD-L1和PD-L2相互作用。

[0013] PD-L1抑制剂还已经被证实在抑制膀胱癌、头颈部癌、以及胃肠癌的实体肿瘤方面是有效的(Herbst RS等,J Clin Oncol.,31:3000(2013);Heery CR等,J Clin Oncol.,32:5s,3064(2014);Powles T等,J Clin Oncol,32:5s,5011(2014);Segal NH等,J Clin Oncol.,32:5s,3002(2014))。

[0014] PD-1抗体已经描述于美国专利号8,735,553;8,617,546;8,008,449;8,741,295;8,552,154;8,354,509;8,779,105;7,563,869;8,287,856;8,927,697;8,088,905;7,595,048;8,168,179;6,808,710;7,943,743;8,246,955;以及8,217,149中。

[0015] 在癌症的背景下,免疫抑制的多种机制可能会阻碍免疫治疗具有有效性。在一些情况下,肿瘤对于单药免疫治疗来说是难治的并且只有一小部分的癌症有完全反应。因此,使用免疫治疗剂的组合将可能是为最佳的患者反应所需的(Hodi FS等,Adv Immunol.,90:341-68,2006;Postow等,J Clin Oncol.,33:9,2015)。

[0016] 最近,抑制TGF $\beta$ 与抑制免疫检查点蛋白CTLA-4的组合已经被证实在抑制黑色素瘤肿瘤生长和转移方面是有效的(Hanks等,J Clin Oncol 32:5s,2014)。使用PD-1/PD-L1抑

制剂和CTLA-4抑制剂的联合免疫治疗方法目前正被评价(Sznol M等,J Clin Oncol.,32:5s,2014;Wolchok JD等,N Engl J Med.,369:122-133,2013;Callahan 等,J Clin Oncol.,32:5s,2014;以及Postow等,J Clin Oncol.,33:9,(2015)中所综述)。研究已经描述了在荷瘤宿主中抑制对主动免疫的细胞反应中使用牵涉到PD-L1和TGF $\beta$ 的单克隆抗体的组合同时阻断PD-L1和TGF $\beta$ 后来自肿瘤引流淋巴结的效应T细胞中IFN  $\gamma$ 的协同上调(Wei等,Cancer Res,68:13,2008)。

## 发明内容

[0017] 本公开大体上涉及在联合治疗中使用TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂治疗癌症或预防癌症复发的材料和方法。抑制TGF $\beta$ 已经被证实会刺激趋化因子分泌和炎症,而阻断PD-1已经被证实能抑制免疫抑制机制。本文所提供的数据表明TGF $\beta$ 抑制剂,特别是在与PD-1抑制剂一起施用时,在小鼠癌症模型中引起肿瘤消退。

[0018] 在各种实施方案中,本公开提供了一种用于治疗癌症或预防癌症复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )抑制剂和程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)抑制剂。

[0019] 在各种实施方案中,所述方法考虑使用结合转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )1、TGF $\beta$ 2以及TGF $\beta$ 3的抗体。在一些实施方案中,所述抗体中和TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2的活性的程度大于中和TGF $\beta$ 3活性的程度。在一些实施方案中,抗体中和TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2的效力是中和TGF $\beta$ 3的效力的至少2倍-50倍、10倍-100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍,或比中和TGF $\beta$ 3的效力大20%-50%、50%-100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。本文所考虑的示例性中和测定包括但不限于白细胞介素-11释放测定和HT-2细胞增殖测定。此外,可以进行TGF $\beta$ 活性测定以确定本文所公开的抗体是否优先地抑制一种TGF $\beta$ 亚型,包括pSMAD磷酸化测定或rhLAP结合测定。在另一个实施方案中,与对TGF $\beta$ 的IC50相比,所述抗体对TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2具有更低的IC50(即更好的结合、更大的效力)。

[0020] 在各种实施方案中,所述方法考虑使用结合TGF $\beta$ 、TGF $\beta$ 2以及TGF $\beta$ 3的抗体,所述抗体包含:如SEQ ID NO:13、19以及25所示的重链互补决定重复序列(CDR)CDR1氨基酸序列、或其与其具有至少85%同一性的变体;如SEQ ID NO:14、20以及26所示的重链CDR2氨基酸序列、或其与其具有至少85%同一性的变体;如SEQ ID NO:15、21以及27所示的重链CDR3氨基酸序列、或其与其具有至少85%同一性的变体;如SEQ ID NO:16、22以及28所示的轻链CDR1氨基酸序列、或其与其具有至少85%同一性的变体;如SEQ ID NO:17、23以及29所示的轻链CDR2氨基酸序列、或其与其具有至少85%同一性的变体;以及如SEQ ID NO:18、24以及30所示的轻链CDR3氨基酸序列、或其与其具有至少85%同一性的变体。在一些实施方案中,预期可用于所述方法中的抗体包含与如SEQ ID NO:2、6以及10所示的重链可变区氨基酸序列至少85%同一的氨基酸序列。在一个相关的实施方案中,所述抗体包含与如SEQ ID NO:2、6以及10所示的重链可变区氨基酸序列至少95%同一的氨基酸序列。

[0021] 在一个相关的实施方案中,所述抗体包含与如SEQ ID NO:4、8以及12所示的轻链可变区氨基酸序列至少85%同一的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗体包含与如SEQ ID NO:4、8以及12所示的轻链可变区氨基酸序列至少95%同一的氨基酸序列。在再另一个实施方案中,所述抗体包含如SEQ ID NO:4、8以及12所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0022] 在各种实施方案中,所述方法考虑使用以比对TGF $\beta$ 3的亲和力更大的亲和力结合TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2的抗体,所述抗体包含:如SEQ ID NO:19所示的重链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:20所示的重链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:21所示的重链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:22所示的轻链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:23所示的轻链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;以及如SEQ ID NO:24所示的轻链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变。

[0023] 在各种实施方案中,所述方法考虑使用这样的抗体,所述抗体中和TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2的活性的程度大于它中和TGF $\beta$ 3活性的程度,所述抗体包含:如SEQ ID NO:19所示的重链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:20所示的重链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:21所示的重链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:22所示的轻链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:23所示的轻链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;以及如SEQ ID NO:24所示的轻链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变。

[0024] 在一个方面,所述方法考虑使用结合TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2以及TGF $\beta$ 3的抗体,所述抗体包含:(a)如SEQ ID NO:25所示的重链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;(b)如SEQ ID NO:26所示的重链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;(c)如SEQ ID NO:27所示的重链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;(d)如SEQ ID NO:28所示的轻链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;(e)如SEQ ID NO:29所示的轻链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;以及(f)如SEQ ID NO:30所示的轻链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变。

[0025] 在另一个方面,本文所述的抗体包含(a)如SEQ ID NO:13所示的重链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;(b)如SEQ ID NO:14所示的重链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;(c)如SEQ ID NO:15所示的重链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;(d)如SEQ ID NO:16所示的轻链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;(e)如SEQ ID NO:17所示的轻链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;以及(f)如SEQ ID NO:18所示的轻链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变。

[0026] 在各种实施方案中,可用于所述方法中的TGF $\beta$ 抑制剂是抗体,所述抗体包含:如SEQ ID NO:19所示的重链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:20所示的重链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:21所示的重链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变

体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:22所示的轻链CDR1氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;如SEQ ID NO:23所示的轻链CDR2氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变;以及如SEQ ID NO:24所示的轻链CDR3氨基酸序列、或其变体,在所述变体中,一个或两个氨基酸已经被改变。

[0027] 在一个相关的实施方案中,本文所述的抗体包含如SEQ ID NO:10所示的重链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0028] 在一个相关的实施方案中,本文所述的抗体包含如SEQ ID NO:2所示的重链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:4所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0029] 在一个相关的实施方案中,本文所述的抗体包含如SEQ ID NO:6所示的重链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:8所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,可用于所述方法中的抗体还包含重链恒定区,其中所述重链恒定区是修饰的或未修饰的IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段、或其组合。

[0031] 在一个实施方案中,本文所用的抗体还包含与所述轻链可变区连接的人类轻链恒定区。在一些实施方案中,所述轻链恒定区是修饰的或未修饰的 $\lambda$ 轻链恒定区、 $\kappa$ 轻链恒定区、其片段、或其组合。

[0032] 在一些实施方案中,预期PD-1抑制剂是结合PD-1的抗体,如具体实施方式中所公开的单克隆抗体。在各种实施方案中,所述抗PD-1抗体抑制或阻断PD-1受体与它的配体PD-L1和PD-L2中的一种或这两者结合。

[0033] 在一个相关方面,本公开描述了与上述TGF $\beta$ 单克隆抗体中的一种或多种组合使用的PD-1抑制剂的用途。

[0034] 在一个相关方面,本公开提供了一种用于治疗癌症或预防癌症复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所考虑的抗体或药物组合物。在某些实施方案中,所述癌症选自由以下各项组成的组:食道癌、胰腺癌、转移性胰腺癌、转移性胰腺癌、膀胱癌、胃癌、纤维化癌、神经胶质瘤、恶性神经胶质瘤、弥漫性内在脑桥神经胶质瘤、复发性儿童脑赘生物、肾细胞癌、透明细胞转移性肾细胞癌、肾癌、前列腺癌、转移性去势抗性前列腺癌、IV期前列腺癌、转移性黑色素瘤、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、皮肤复发性黑色素瘤、黑色素瘤脑转移瘤、IIIA期皮肤黑色素瘤、IIIB期皮肤黑色素瘤、IIIC期皮肤黑色素瘤、IV期皮肤黑色素瘤、头颈部恶性黑色素瘤、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状细胞非小细胞肺癌、乳腺癌、复发性转移性乳腺癌、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、HL,包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),包括自体干细胞移植后的DLBCL;多发性骨髓瘤、慢性骨髓性白血病、处于缓解期的成人急性骨髓性白血病;伴有Inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11的成人急性骨髓性白血病;伴有t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11的成人急性骨髓性白血病;伴有t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1的成人急性骨髓性白血病;伴有t(9;11)(p22;q23)/MLLT3-MLL的成人急性骨髓性白血病;伴有t(15;17)(q22;q12)/PML-RARA的成人急性早幼粒细胞白血病;烷基化剂相关急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、里氏综合征(richter's syndrome)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(waldenstrom macroglobulinemia)、成人成胶质细胞瘤、成人胶质肉瘤、复发性成胶质细胞瘤、复发性儿童横纹肌肉瘤、复发性尤文氏肉瘤(ewing sarcoma)/外周原始神经外胚层肿瘤、复发性成神经细胞瘤、复发性骨肉瘤、结肠直肠癌、MSI阳性结肠直

肠癌、MSI阴性结肠直肠癌、鼻咽非角化性癌、复发性鼻咽未分化癌、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、复发性头颈部癌、头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、卵巢癌、结肠癌、胃癌、晚期GI癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌、骨赘生物、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以及复发性蕈样真菌病和塞扎里综合征 (Sezary syndrome)。

[0035] 在一个相关方面,本公开提供了一种用于治疗癌症或预防癌症复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所考虑的抗体或药物组合物。在某些实施方案中,所述癌症选自由以下各项组成的组:非小细胞肺癌 (NSCLC)、头颈部癌、皮肤癌、黑色素瘤以及鳞状细胞癌 (SCC)。

[0036] 在某些实施方案中,所述癌症在V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物 (KRAS) 致癌基因中具有突变。

[0037] 在某些实施方案中,所述癌症在Harvey大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物 (HRAS) 致癌基因中具有突变。

[0038] 在某些实施方案中,所述癌症在成神经细胞瘤RAS病毒 (v-ras) 致癌基因同源物 (NRAS) 致癌基因中具有突变。

[0039] 在某些实施方案中,所述癌症在RAS致癌基因中具有突变。

[0040] 在一个相关方面,所述癌症选自由以下各项组成的组:肺腺癌、粘液性腺瘤、胰腺导管癌和结肠直肠癌、脑低级神经胶质瘤、乳腺浸润性癌、多形性成胶质细胞瘤、黑色素瘤、甲状腺、直肠腺癌、肾癌 (kidney cancer)、肾癌 (renal cancer)、肝癌、急性骨髓性白血病、胃腺癌、食管腺癌、子宫体子宫内膜样癌、膀胱癌、前列腺癌、口腔癌、大肠癌以及淋巴瘤。

[0041] 预期本文的方法减小受试者的肿瘤尺寸或肿瘤负荷和/或减少受试者的转移。在各种实施方案中,所述方法使肿瘤尺寸减小10%、20%、30%或更多。在各种实施方案中,所述方法使肿瘤尺寸减小10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0042] 预期本文的方法减小肿瘤负荷,并且一旦癌症已经进入缓解期,还减少或预防肿瘤复发。

[0043] 在另一个方面,本公开提供了一种用于治疗与TGF $\beta$ 和PD-1信号转导和/或表达相关的疾病、病况或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所考虑的抗体或药物组合物的步骤。在某些实施方案中,所述疾病、病况或病症选自一组癌症。

[0044] 本公开还考虑了一种无菌药物组合物,所述无菌药物组合物包含TGF $\beta$ 抑制剂、PD-1抑制剂以及药学上可接受的载体。

[0045] 本公开还考虑了一种无菌药物组合物,所述无菌药物组合物包含单独的TGF $\beta$ 抑制剂和药学上可接受的载体。

[0046] 本公开还考虑了一种无菌药物组合物,所述无菌药物组合物包含单独的PD-1抑制剂和药学上可接受的载体。

[0047] 预期本公开的抑制剂,如抗体可以在同一制剂中同时给予。还预期所述抑制剂在单独的制剂中施用并且并行地施用,其中并行地是指在彼此相隔30分钟内给予药剂。还预

期可以与所述抑制剂同时给予第三药剂。

[0048] 在另一个方面,本公开提供了一种用于治疗与TGF $\beta$ 和PD-1信号转导和/或表达相关的疾病、病况或病症或预防其复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所考虑的抗体或药物组合物的步骤,其中所述施用在已经接受抑制剂治疗的受试者中预防癌症的复发。

[0049] 在一些实施方案中,本文所述的TGF $\beta$ 抗体和/或PD-1抗体和其组合或组合物增加肿瘤中自然杀伤(NK)细胞的数目。在各种实施方案中,所述抗体或组合物提高NK细胞的细胞溶解活性。举例来说,在各种实施方案中,本文所述的抗体或组合物增加NK细胞的穿孔素和颗粒酶的产生。

[0050] 在各种实施方案中,本文所述的TGF $\beta$ 抗体和/或PD-1抗体和其组合或组合物使肿瘤中调节性T细胞的数目减少和/或抑制调节性T细胞的功能。举例来说,在各种实施方案中,本文所述的抗体或组合物抑制调节性T细胞下调免疫应答或迁移到免疫应答部位的能力。

[0051] 在各种实施方案中,本文所述的TGF $\beta$ 抗体和/或PD-1抗体和其组合或组合物增加肿瘤中细胞毒性T细胞的数目和/或增强CTL活性,例如加强、提高或促进CTL活性。举例来说,在各种实施方案中,本文所述的抗体或组合物增加CTL的穿孔素和颗粒酶的产生并且提高CTL的细胞溶解活性。

[0052] 在各种实施方案中,本文所述的TGF $\beta$ 抗体和/或PD-1抗体和其组合或组合物增加肿瘤中树突状细胞(DC)的数目和/或抑制树突状细胞的致耐受性功能(例如致耐受性作用)。举例来说,在各种实施方案中,本文所述的抗体或组合物降低CD8+树突状细胞的致耐受性作用。

[0053] 在各种实施方案中,施用本文所述的TGF $\beta$ 抗体和/或PD-1抗体和其组合或组合物增加肿瘤中效应T细胞与调节性T细胞的比率。

[0054] 在各种实施方案中,本公开提供了一种用于增加肿瘤中效应T细胞与调节性T细胞的比率的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )抑制剂和程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)抑制剂。

[0055] 在各种实施方案中,治疗是定期施用的,例如每小时一次、每天一次、每周两次、每周一次、每2周一次、每3周一次、每月一次、每两个月一次或以更长的时间间隔施用。在一个相关的实施方案中,在示例性治疗中,以0.1mg/kg至15mg/kg的剂量范围施用TGF $\beta$ 抑制剂并且以0.1mg/kg至15mg/kg的剂量范围施用PD-1抑制剂。这些浓度可以作为单次剂量或作为多次剂量施用。

[0056] 在各种实施方案中,将所述抑制剂与第三药剂一起施用。在一个实施方案中,所述第三药剂选自由以下各项组成的组:细胞外基质降解蛋白、抗纤维化剂、手术治疗、化学治疗(例如顺铂(cisplatin)加上培美曲塞(pemetrexed)、卡铂(carboplatin)加上紫杉醇(paclitaxel))、细胞毒性剂(例如来那度胺(lenalidomide)、地塞米松(dexamethasone))、或放射治疗(Philips和Atkins, Int Immunol., 27 (1): 39-46 (2015), 该文献以引用的方式并入本文)。示例性第三药剂更详细地公开于具体实施方式中。

[0057] 还考虑了一种包含本公开的结合TGF $\beta$ 或PD-1的前述抗体或组合物中的任一种的组合物或其用于制备用于治疗本文所述的与TGF $\beta$ 和PD-1信号转导和/或表达相关的病症中

的任一种的药物的用途。还考虑了包含前述抗体或组合物中的任一种，任选地具有合适的使用说明书的注射器，例如单次使用或预装药品的注射器；无菌密封容器，例如小瓶、瓶子、器皿；和/或试剂盒或包装。

[0058] 应当了解的是，本文所述的每一个特征或实施方案或组合是本发明的任何方面的一个非限制性说明性实施例，并且因而，意指可与本文所述的任何其它特征或实施方案或组合相组合。举例来说，在用诸如“一个实施方案”、“一些实施方案”、“某些实施方案”、“另外的实施方案”、“具体的示例性实施方案”和/或“另一个实施方案”的措辞描述特征的情况下，这些类型的实施方案中的每一个均是一个特征的一个非限制性实施例，所述特征意图与本文所述的任何其它特征或特征的组合相组合而不必列出每一个可能的组合。这些特征或特征的组合适用于本发明的任何方面。在公开了落入范围内的值的实施例的情况下，这些实施例中的任何一个均被考虑为范围的可能端点，这些端点之间的任何和所有数值均被考虑，并且上端点和下端点的任何和所有组合均被设想。

[0059] 在一个方面，可用于所述方法中的TGF $\beta$ 抗体选自由以下各项组成的组：XPA.42.089、XPA.42.068以及XPA.42.681。XPA.42.089的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列分别如SEQ ID NO:6和8所示。XPA.42.068的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2和4所示，并且XPA.42.681的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列分别如SEQ ID NO:10和12所示。

[0060] 在一个方面，可用于所述方法中的TGF $\beta$ 抗体是非苏木单抗(Fresolimumab)(GC1008，剑桥抗体技术公司(Cambridge Antibody Technology)、健赞公司(Genzyme)以及赛诺菲公司(Sanofi))，目前处在I期临床试验(Morris JC等，PLoS One.2014年3月11日；9(3):e90353,2014;Akhurst和Hata,Nat Rev Drug Discov.,11:790-811,2012)，参见美国专利7,723,486。

[0061] 在一个方面，可用于所述方法中的PD-1抗体选自由派姆单抗(pembrolizumab)、纳武单抗(nivolumab)以及匹迪丽珠单抗(pidilizumab)组成的组。

## 附图说明

[0062] 图1示出了TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂单药治疗和联合治疗在同种异体移植小鼠模型中的肿瘤抑制。图1A示出了被植入了cSCC细胞的小鼠的肿瘤生长。还示出了以占活细胞的百分比(图1B)和占CD45+细胞的百分比(图1C)表示的CD45+细胞、自然杀伤(NK)细胞、调节性T(Treg)细胞、CD4+ T细胞以及CD8+ T细胞的量。

[0063] 图2示出了单个肿瘤对免疫治疗的差异反应。来自图1的数据被分为“反应者”和“进展者”以显示对 $\alpha$ -PD-1(图2A)、 $\alpha$ -TGF $\beta$ (图2B)、以及联合治疗(图2C)的反应的范围。

[0064] 图3示出了单个肿瘤对免疫治疗的差异反应。来自图1的数据被绘制成对照(ctrl)(图3A)、 $\alpha$ -PD-1单药治疗(图3B)、 $\alpha$ -TGF $\beta$ 单药治疗(图3C)、以及 $\alpha$ -PD-1和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 的组合(图3D)随时间推移的单独的肿瘤测量结果。

[0065] 图4示出了化学诱导(DMBA-TPA)皮肤鳞状细胞癌(cSCC)小鼠的肿瘤的CD45+细胞、自然杀伤(NK)细胞、调节性T(Treg)细胞、CD4+ T细胞以及CD8+ T细胞的肿瘤免疫分型测量结果，被表示为占活细胞的百分比和占CD45+细胞的百分比。

[0066] 图5示出了在同基因FVB/N小鼠中化学诱导(DMBA/TPA)Kras驱动和Hras驱动的

cSCC细胞系(FVB-62、FVB-85、FVB-166、FVB-168、FVB-169)以及遗传引发(GEMM)Kras驱动的cSCC细胞系(FVB-1425、FVB-1428)的每兆碱基(MB)突变数和对TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂单药治疗和联合治疗的敏感性。

[0067] 图6示出了化学诱导的SCC肿瘤细胞系FVB-168对泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3和 $\alpha$ -PD1单药治疗和联合治疗的反应。图6A示出了显示疾病进展(持续肿瘤生长)、对所示的治疗有完全反应(即抑制/消退肿瘤生长)或有部分反应的肿瘤的百分比。图6B示出了在该模型中响应于泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3和 $\alpha$ -PD1单药治疗和联合治疗的小鼠存活率百分比。图6C示出了对使用泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3抑制剂和PD-1抑制剂单药治疗和联合治疗进行的处理有反应和无反应(即进展中的肿瘤生长)的肿瘤作为占CD45+的百分比的免疫细胞标志物CD8+效应T细胞(Teff)、CD4+效应T细胞(Teff)、CD4+调节性T(Treg)细胞的水平以及Teff/Treg的比率。

[0068] 图7示出了TGF $\beta$ 1,2特异性抑制剂、泛特异性TGF $\beta$ 1,2,3抑制剂以及PD-1抑制剂单药治疗和联合治疗在同种异体移植小鼠模型中的肿瘤抑制。被表示为在所示处理后0天-25天内的肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。

### 具体实施方式

[0069] 本公开提供了用于治疗癌症或预防癌症复发的治疗剂。本公开提供了与TGF $\beta$ 和PD-1相互作用并且抑制它们的功能效应中的一种或多种,例如像经由结合TGF $\beta$ 或PD-1的配偶体进行信号转导的分子或药剂。本文所公开的组合物有利地具有调节肿瘤中的免疫细胞活性的能力,从而在一个方面,提供了一种通过影响直接或间接影响肿瘤生长的细胞群体来治疗癌症的方法。

[0070] 定义

[0071] 如本文所用的“TGF $\beta$ ”指的是TGF $\beta$ 的任何一种或多种亚型,包括TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2以及TGF $\beta$ 3或其变体。同样,除非另外指明,否则术语“TGF $\beta$ 受体”指的是结合至少一种TGF $\beta$ 亚型的任何受体。

[0072] 如本文所用的“程序性细胞死亡蛋白1”或“PD-1”指的是参与由结合两种配体PD-L1和PD-L2所介导的免疫检查点阻断的细胞表面受体。PD-1与它的配体结合已经被证实会减少T细胞增殖、细胞因子产生、以及细胞毒性活性。

[0073] 如本文所用的抗靶标抗体的“所期望的生物活性”是与TGF $\beta$ 或PD-1结合并且抑制它们的功能效应中的一种或多种的能力。

[0074] 如本文所用的与“靶标”相关的“病况”或“病症”是其中通过本文所述的靶标抑制剂调节靶标活性是有益的病况或病症,并且还包括其它病症,在所述其它病症中,高水平的靶标已经被证实或被怀疑是导致所述病症的病理生理学的原因或促使所述病症恶化的因素、以及其中对所述靶标的调节与临床体征或症状的变化有关的疾病和其它病症。这些病症可以例如通过患有该病症的受试者的受影响的细胞或组织中所分泌的和/或细胞表面上的靶标水平增加和/或靶标信号转导改变来证实。

[0075] 可以用抑制TGF $\beta$ 的抑制剂和抑制PD-1的抑制剂或TGF $\beta$ 和PD-1这两者的抑制剂(例如本文所述的抗体)治疗的示例性疾病、病况或病症包括癌症,如食道癌、胰腺癌、转移性胰腺癌、转移性胰腺腺癌、膀胱癌、胃癌、纤维化癌、神经胶质瘤、恶性神经胶质瘤、弥漫性内在

脑桥神经胶质瘤、复发性儿童脑膜生物、肾细胞癌、透明细胞转移性肾细胞癌、肾癌、前列腺癌、转移性去势抗性前列腺癌、IV期前列腺癌、转移性黑色素瘤、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、皮肤复发性黑色素瘤、黑色素瘤脑转移瘤、IIIA期皮肤黑色素瘤、IIIB期皮肤黑色素瘤、IIIC期皮肤黑色素瘤、IV期皮肤黑色素瘤、头颈部恶性黑色素瘤、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状细胞非小细胞肺癌、乳腺癌、复发性转移性乳腺癌、肝细胞癌、霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、晚期B细胞NHL、HL，包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、多发性骨髓瘤、慢性骨髓性白血病、处于缓解期的成人急性骨髓性白血病；伴有Inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11的成人急性骨髓性白血病；伴有t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11的成人急性骨髓性白血病；伴有t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1的成人急性骨髓性白血病；伴有t(9;11)(p22;q23)/MLLT3-MLL的成人急性骨髓性白血病；伴有t(15;17)(q22;q12)/PML-RARA的成人急性早幼粒细胞白血病；烷基化剂相关急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、里氏综合征、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、成人成胶质细胞瘤、成人胶质肉瘤、复发性成胶质细胞瘤、复发性儿童横纹肌肉瘤、复发性尤文氏肉瘤/外周原始神经外胚层肿瘤、复发性成神经细胞瘤、复发性骨肉瘤、结肠直肠癌、MSI阳性结肠直肠癌、MSI阴性结肠直肠癌、鼻咽非角化性癌、复发性鼻咽未分化癌、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、复发性头颈部癌、头颈部鳞状细胞癌、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌、结肠癌、胃癌、晚期GI癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌、骨赘生物、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、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以及复发性蕈样真菌病和塞扎里综合征。

[0076] “免疫球蛋白”或“天然抗体”是四聚糖蛋白。在天然存在的免疫球蛋白中，每一个四聚体由两对相同的多肽链构成，每一对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50kDa-70kDa)。每一条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的具有约100个至110个或更多个氨基酸的可变区。每一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轻链和λ轻链。重链被分类为μ、Δ、γ、α以及ε，并且将抗体的同种型分别限定为IgM、IgD、IgG、IgA以及IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区由具有约12个或更多个氨基酸的“J”区连接，其中重链还包括具有约10个或更多个氨基酸的“D”区。一般参见《基础免疫学(Fundamental Immunology)》的第7章(Paul,W.编著,第2版,纽约的雷文出版社(Raven Press,N.Y.)(1989)) (以引用的方式整体并入本文用于所有目的)。每一对轻链/重链的可变区形成抗体结合位点，以使得完整的免疫球蛋白具有两个结合位点。

[0077] 每一条重链在一端上具有可变域(VH)，后面是多个恒定域。每一条轻链在一端上具有可变域(VL)并且在它的另一端上具有恒定域；轻链的恒定域与重链的第一恒定域对准，并且轻链可变域与重链的可变域对准。特定的氨基酸残基被认为形成了轻链可变域与重链可变域之间的界面(Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917,1987)。

[0078] 免疫球蛋白可变域表现出由三个高变区或CDR连接的相对保守的框架区(FR)的相同的通用结构。从N末端到C末端，轻链和重链这两者均包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3以及FR4。每一个结构域的氨基酸分配是根据《免疫学相关的蛋白质的Kabat序列(Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest)》(马里兰州贝塞斯达的国家卫生研究院(National Institutes of Health,Bethesda,Md.) (1987年和1991年))；或

Chothia和Lesk (J.Mol.Biol.196:901-917,1987) ; Chothia等 (Nature 342:878-883,1989) 的定义。

[0079] 抗体的高变区指的是抗体中负责抗原结合的CDR氨基酸残基。高变区包含来自CDR的氨基酸残基[例如轻链可变域中的残基24-34 (L1)、50-56 (L2) 和89-97 (L3) 以及重链可变域中的残基31-35 (H1)、50-65 (H2) 和95-102 (H3),如由Kabat等,《免疫学相关的蛋白质序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第5版,马里兰州贝塞斯达的国家卫生研究院的公共卫生服务 (Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (1991) 所述]和/或来自高变环的那些残基(例如轻链可变域中的残基26-32 (L1)、50-52 (L2) 和91-96 (L3) 以及重链可变域中的残基26-32 (H1)、53-55 (H2) 和96-101 (H3),如由 [Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917 (1987) ]所述。CDR还已经根据 ImMunoGenTics (IMGT) 编号来鉴定和编号 (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. 等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)), 该文献如下描述轻链可变域和重链可变域中的CDR位置:CDR1, 大致残基27至38; CDR2, 大致残基56至65; 以及CDR3, 大致残基105至116(生殖系)或残基105至117(经过重排))。在一个实施方案中,预期在具有与本文所公开的那些大致相似的长度的抗体重链或轻链中,CDR在轻链可变域中位于大致残基26-31 (L1)、49-51 (L2) 和88-98 (L3) 处并且在重链可变域中位于大致残基26-33 (H1)、50-58 (H2) 和97-111 (H3) 处。然而,本领域技术人员应当了解的是,在对特定抗体的序列进行鉴定时,CDR残基的实际位置可能不同于上述预测的残基。

[0080] 框架或FR残基是除高变区残基以外的那些可变域残基。

[0081] 如本文所用的“重链可变区”指的是抗体分子中包含所述抗体重链可变域的至少一个互补决定区(CDR)的区域。重链可变区可以含有所述抗体重链的一个、两个或三个CDR。

[0082] 如本文所用的“轻链可变区”指的是抗体分子中包含所述抗体轻链可变域的至少一个互补决定区(CDR)的区域。轻链可变区可以含有所述抗体轻链的一个、两个或三个CDR,所述抗体轻链可以是κ轻链或λ轻链,这取决于所述抗体。

[0083] 术语“抗体”在最广泛的意义上使用并且包括完全组装的抗体、四聚抗体、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、双链抗体)、以及包含以上各项的重组肽,只要它们表现出所期望的生物活性即可。“免疫球蛋白”或“四聚抗体”是由两条重链和两条轻链组成的四聚糖蛋白,所述重链和轻链各自包含可变区和恒定区。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过对完整抗体进行酶促或化学切割来产生。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、双链抗体、三链抗体、四链抗体、微型抗体(minibody)、线性抗体;螯合重组抗体、三体(tribody)或双体(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、骆驼源化抗体、含VHH抗体、或其变体或衍生物、以及含有至少一部分免疫球蛋白的多肽,所述至少一部分免疫球蛋白足以赋予所述多肽以特异性抗原结合性,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期望的生物活性即可。

[0084] “单克隆抗体”指的是从一群基本上均质的抗体中获得的抗体,即除了可能少量存在的可能的天然存在的突变以外,构成该群体的单个抗体是相同的。

[0085] 如本文所用的“抗体变体”指的是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。变体可以与未修饰的抗体是基本上同源的或基本上相同的。

[0086] 如本文所用的“嵌合抗体”指的是含有源自于两种不同抗体的序列的抗体(参见例如美国专利号4,816,567),这两种不同的抗体通常源自于不同的物种。最通常,嵌合抗体包含人类和啮齿类动物抗体片段,一般是人类恒定区和小鼠可变区。

[0087] “中和抗体”是能够消除或显著降低它所结合的靶抗原的生物功能的抗体分子。因此,“中和”抗靶标抗体能够消除或显著降低诸如酶活性、配体结合或细胞内信号转导的生物功能。

[0088] “分离”的抗体是已经从它的天然环境的组分鉴定并且分离和回收的抗体。它的天然环境的污染性组分是会干扰抗体的诊断用途或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素以及其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施方案中,抗体将经过纯化以达到如下的程度:(1)如通过劳里法(Lowry method)所测定,抗体多于95重量%,并且最优选地多于99重量%;(2)足以通过使用转杯式测序仪获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)通过在还原条件或非还原条件下使用考马斯蓝(Coomassie blue)或优选地使用银染色剂进行SDS-PAGE测定具有均一性。分离的抗体包括原位处于重组细胞内的抗体,这是因为抗体的天然环境的至少一种组分将不会存在。然而,通常,将通过至少一个纯化步骤来制备分离的抗体。

[0089] 如本文所用的“特异性结合”靶抗原、“具有靶标特异性”、“对靶标具有特异性”或对靶抗原“具有免疫反应性”的抗体指的是与靶抗原结合的亲和力大于与类似抗原结合的亲和力的抗体或抗体物质。在本公开的一个方面,靶标结合多肽或其片段、变体或衍生物与人类靶标结合的亲和力将大于它与其它(即非人类)物种的靶标的结合亲和力,但识别并且结合所述靶标的直系同源物的结合多肽在所提供的范围内。

[0090] 举例来说,多肽是对它的同源抗原“具有特异性”的抗体或其片段表示所述抗体的可变区以可检测到的优先性识别并且结合所关注的多肽(即虽然在家族成员之间可能存在局部序列同一性、同源性或相似性,但是能够借助于结合亲和力方面的可测量的差异来区分所关注的多肽与同一家族的其它已知多肽)。应当了解的是,特异性抗体还可以经由与抗体可变区以外并且特别是分子恒定区中的序列相互作用来与其它蛋白质(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。测定用于本公开的方法中的抗体的结合特异性的筛选测定是本领域公知的和常规实施的。关于这些测定的综合性论述,参见Harlow等(编著),《抗体:实验室手册(Antibodies A Laboratory Manual)》;纽约州冷泉港的冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory;Cold Spring Harbor, NY)(1988),第6章。用于所述方法中的抗体可以使用本领域已知的任何方法来产生。

[0091] 术语“表位”指的是任何分子中能够在抗原结合区中的一个或多个处由选择性结合剂识别并且结合的那部分。表位通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或碳水化合物侧链)组成,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。如本文所用的表位可以是连续的或不连续的。此外,表位可以是模拟的(模拟表位),这是因为它们包含与用于产生抗体的表位相同的三维结构,但不包含被用于刺激抗体免疫应答的靶标中存在的氨基酸残基或仅包含所述氨基酸残基中的一些。如本文所用的模拟表位不被认为是与由选择性结合

剂结合的表位不同的抗原；所述选择性结合剂识别表位和模拟表位的相同三维结构。

[0092] 术语“衍生物”在结合本公开的抗体物质和多肽使用时指的是通过如下的技术化学修饰的多肽：泛素化、与治疗剂或诊断剂缀合、标记（例如用放射性核素或各种酶标记）、共价聚合物连接（如聚乙二醇化（用聚乙二醇衍生化））以及通过对通常不存在于人类蛋白质中的氨基酸（如鸟氨酸）进行化学合成来进行插入或取代。衍生物保留本公开的未衍生化分子的结合特性。

[0093] “可检测部分”或“标记”指的是可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段检测的组合物。举例来说，有用的标记包括<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、荧光染料、电子致密试剂、酶（例如，如ELISA中所常用）、生物素-抗生素蛋白链菌素、地高辛（dioxigenin）、抗血清或单克隆抗体可获得的半抗原和蛋白质、或具有与靶标互补的序列的核酸分子。可检测部分常常产生可测量的信号，如放射性信号、显色信号或荧光信号，该信号可以被用于对样品中所结合的可检测部分的量进行定量。

[0094] 术语“治疗有效量”在本文用于表示有效改善或减轻待治疗的疾病的症状或体征的本公开的靶标特异性组合物的量。

[0095] 如关于本文的方法所用的术语“治疗（treat）”、“治疗（treated）”、“治疗（treating）”以及“治疗（treatment）”指的是暂时或永久地、部分或完全地消除、减少、抑制或改善事件、疾病或病况的临床症状、表现或进展。这种治疗不需要绝对有用。

[0096] 本发明的方法提供了可以包含本文所示的那些示例性序列、其片段、变体以及衍生物的靶标特异性抗体、包括本文所述的靶标特异性抗体的药物制剂的使用。根据免疫球蛋白重链恒定域的氨基酸序列，免疫球蛋白可以归属于不同的类别，即IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM，所述类别可以进一步被分成亚类或同种型，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1以及IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是公知的。不同的同种型具有不同的效应功能；例如，IgG1同种型和IgG3同种型具有ADCC活性。本文所公开的抗体如果包含恒定域，那么它可以属于这些亚类或同种型中的任一种。

[0097] 用于本发明的方法中的抗体可以对一种或多种TGF $\beta$ 和/或PD-1抗原表现出小于或等于约 $10^{-5}$ M、小于或等于约 $10^{-6}$ M、或小于或等于约 $10^{-7}$ M、或小于或等于约 $10^{-8}$ M、或小于或等于约 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M或 $10^{-12}$ M或更小的Kd的结合亲和力。这样的亲和力可以容易地使用常规技术测定，如通过平衡透析；通过使用表面等离子体共振（SPR）技术（例如BIAcore 2000仪器，使用由制造商所概述的一般程序）；通过使用<sup>125</sup>I标记的靶抗原进行放射免疫测定；或通过以下实施例中所阐述或本领域技术人员已知的另一种方法来测定。亲和力数据可以例如通过Scatchard等（Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660, 1949）的方法来分析。

[0098] KinExA动力学排除测定也可用于测量抗体对它的抗原的亲和力。KinExA技术测量了溶液相中的结合事件，而不是溶液相与固相之间的结合事件。此外，虽然多种用于测量结合事件的方法需要至少一种反应物经由固定化或标记而被修饰，但是KinExA法不需要对所研究的分子进行修饰。KinExA法被认为与当前可供使用的其它方法相比，允许对更广范围的结合常数进行测量。另外的关于用于抗体表征的KinExA装置和操作的说明可获自制造商（爱达荷州博伊西的Sapidyne仪器公司（Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID））并且可以见于公开的文献中，例如美国专利号6,664,114和Darling等，“动力学排除测定技术：分子相互作用的表征（Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of

Molecular Interactions)" , Assay and Drug Development Technologies, 2004, 2:647-657。

[0099] 转化生长因子 $\beta$

[0100] TGF $\beta$ 是一种二硫键连接的二聚体,它作为具有约400个氨基酸(aa)的前原蛋白被合成,在分泌之前该前原蛋白被切割以产生成熟的TGF $\beta$ 。N末端切割片段被称为“潜在相关肽(latency-associated peptide,LAP)”可以与二聚体保持非共价结合,从而使TGF $\beta$ 失活。体内分离的TGF $\beta$ 主要以无活性的“潜在”形式,即与LAP结合的形式存在。潜在的TGF $\beta$ 复合物可以通过几种方式被激活,例如通过与被称为非阳离子依赖性甘露糖-6-磷酸/胰岛素样生长因子II受体的细胞表面受体结合来激活。经由LAP内的糖基化位点处所连接的甘露糖-6-磷酸残基进行结合。在与受体结合时,TGF $\beta$ 以它的成熟形式被释放。成熟的活性TGF $\beta$ 然后能够自由结合它的受体并且发挥它的生物功能。II型TGF $\beta$ 受体中的主要TGF $\beta$ 结合域已经被定位到一个具有19个氨基酸的序列(Demetriou等,J.Biol.Chem., 271:12755, 1996)。还参见美国专利7,867,496和8,569,462。

[0101] 目前,存在五种已知的TGF $\beta$ 亚型(TGF $\beta$ 1至TGF $\beta$ 5;TGF $\beta$ 1-3是哺乳动物的,TGF $\beta$ 4存在于鸡中;并且TGF $\beta$ 5存在于蛙中),所有这些亚型彼此之间是同源的(60%-80%同一性),形成约25kDa的同二聚体,并且对常见的TGF $\beta$ 受体(TGF $\beta$ -RI、TGF $\beta$ -RII、TGF $\beta$ -RIIB、以及TGF $\beta$ -RIII)起作用。TGF $\beta$ 以及TGF $\beta$ 受体的结构和功能方面是本领域公知的(参见例如《细胞因子参考书(Cytokine Reference)》,Oppenheim等编著,加利福尼亚州圣地亚哥的学术出版社(Academic Press, San Diego, Calif.), 2001)。TGF $\beta$ 在物种间是相当保守的。举例来说,大鼠与人类的成熟TGF $\beta$ 1的氨基酸序列几乎相同。还参见美国专利7,867,496。

[0102] TGF $\beta$ 1在生物组织的伤口愈合过程中起重要作用(New Engl.J.Med., 第331卷,第1286页,1994;以及J.Cell.Biol., 第119卷,第1017页,1992)。在受伤组织的部位处,发生诸如炎性细胞和成纤维细胞浸润、细胞外基质(ECM)产生和血管形成、以及细胞生长以用于后续的组织再生的生物反应以修复受损的组织。还参见美国专利7,579,186。

[0103] TGF $\beta$ 2缺陷型小鼠表现出显著的发育缺陷,包括心脏、肺、颅面、四肢、脊椎、眼睛、耳朵以及泌尿生殖器缺陷(Dunker等,Eur J Biol 267:6982-8, 2001)。TGF $\beta$ 3缺陷型小鼠到出生后24小时表现出几乎100%的致死率。这些小鼠显示出显著的上腭缺损和迟缓的肺部发育(Dunker等(同上))。TGF $\beta$ 2还已经牵涉到青光眼的产生(Luthen-Driscol1, Experimental Eye Res 81:1-4, 2005)、与克罗恩氏病(Crohn's Disease)相关的纤维化(Van Assche等, Inflamm Bowel Dis. 10:55-60, 2004)、伤口愈合以及糖尿病性肾病(Pohlers等,Biochim Biophys Acta 1792:746-56, 2009)。

[0104] 已经观测到,许多人类肿瘤(deMartin等,EMBO J., 6:3673 (1987);Kuppner等, Int.J.Cancer, 42:562 (1988))和许多肿瘤细胞系(Derynck等,Cancer Res., 47:707 (1987);Roberts等,Br.J.Cancer, 57:594 (1988))产生TGF $\beta$ 。

[0105] TGF $\beta$ 亚型在癌症中的表达是复杂的并且可变的,其中TGF $\beta$ 亚型的不同组合在特定癌症中具有不同的作用。参见例如美国专利7,927,593。举例来说,TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3在卵巢癌和它的进展中可能起到了比TGF $\beta$ 2更大的作用;而在更高级别软骨肉瘤肿瘤中TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2的表达大于TGF $\beta$ 3。在人类乳腺癌中,TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3是高表达的,其中TGF $\beta$ 3表达似乎与总体存活率有关,有淋巴结转移和阳性TGF $\beta$ 3表达的患者有不佳的预后结果。然而,在结肠癌

中,TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2比TGF $\beta$ 3更高表达,并且与无癌症个体中的循环水平相比,以更大的循环水平存在。在神经胶质瘤中,TGF $\beta$ 2对于细胞迁移是重要的。

[0106] TGF $\beta$ 抗体

[0107] 本公开包括使用编码靶标特异性抗体的氨基酸分子。在示例性实施方案中,可用于本公开的方法中的靶标特异性抗体可以包含人类 $\kappa$ 轻链或人类 $\lambda$ 轻链或由其衍生的氨基酸序列、或者人类重链或由其衍生的序列、或者在一起呈单链、二聚体、四聚体或其它形式的重链和轻链这两者。在一些实施方案中,靶标特异性免疫球蛋白的重链和轻链是不同的氨基酸分子。在其它实施方案中,同一个氨基酸分子含有靶标特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。

[0108] 在一些实施方案中,可用于所述方法中的针对TGF $\beta$ 的人类抗靶标抗体的氨基酸序列包含抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681的成熟(即缺少信号序列)轻链可变区(VL)的氨基酸序列(分别是SEQ ID NO:4、8以及12)的一个或多个CDR或其变体,包括CDR移植抗体、修饰的抗体、人源化抗体、嵌合抗体或人类工程抗体或本文所述的任何其它变体。在一些实施方案中,VL包含从前述抗体中的任一种的轻链的CDR1的起始位置到CDR3的末端位置的氨基酸序列。

[0109] 在一个实施方案中,靶标特异性抗体包含轻链CDR1、CDR2或CDR3(LCDR1、LCDR2、LCDR3),它们各自独立地选自具有轻链可变区的抗体的CDR1区、CDR2区以及CDR3区,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:4、8以及12所示的VL区的氨基酸序列、编码如SEQ ID NO:4、8、以及12所示的VH区的核酸,或由如SEQ ID NO:3、7以及11所示的编码VL区的核酸分子编码。在一个实施方案中,根据Chothia编号,轻链CDR1是从大致残基24到34,CDR2是从大致残基50到56,并且CDR3从大致残基89延伸到97。在一个替代性实施方案中,预期根据ImMunoGenTics (IMGT) 编号,重链CDR位于大致残基27至38处(CDR1);大致残基56至65处(CDR2);以及大致残基105至116(生殖系)或残基105至117处(CDR3)。在一个实施方案中,预期在具有与本文所公开的那些大致相似的长度的抗体轻链的轻链可变域中,轻链CDR位于大致残基26-31(L1)、49-51(L2)以及88-97(L3)处。靶标特异性抗体的多肽可以包含选自由以下各项组成的组的包含VL区的氨基酸序列的抗体的CDR1区、CDR2区以及CDR3区:XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681。

[0110] 在一些实施方案中,针对TGF $\beta$ 的人类靶标特异性抗体包含抗体XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681的成熟(即缺少信号序列)重链可变区(VH)的氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:2、6以及10所示)的一个或多个CDR、或其变体。在一些实施方案中,VH包含从前述抗体的重链中的任一个的CDR1的起始位置到CDR3的末端位置的氨基酸序列。

[0111] 在一个实施方案中,靶标特异性抗体包含重链CDR1、CDR2或CDR3(HCDR1、HCDR2、HCDR3),它们各自独立地选自具有重链可变区的抗体的CDR1区、CDR2区以及CDR3区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:2、6以及10所示的VH区的氨基酸序列、编码如SEQ ID NO:2、6以及10所示的VH区的核酸、或由如SEQ ID NO:1、5以及9所示的编码VH区的核酸分子编码。还预期靶标特异性抗体包含重链CDR1、CDR2或CDR3,它们各自独立地选自具有重链可变区的抗体的CDR1区、CDR2区以及CDR3区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:2、6以及10所示的VH区的氨基酸序列。在一个实施方案中,根据Chothia编号,重链CDR位于以下位置处:CDR1是从大致残基26到35,CDR2是从大致残基50到58并且CDR3从大致残基95延伸到102(或95到

111或95到118)。在一个替代性实施方案中,预期根据ImMunoGenTics (IMGT) 编号,重链CDR位于以下位置处:CDR1,大致残基27至38 (CDR1);大致残基56至65 (CDR2);以及CDR3,大致残基105至116 (生殖系) 或残基105至117 (CDR3)。在一个实施方案中,预期在具有与本文所公开的那些大致相似的长度的抗体重链的重链可变域中,重链CDR位于大致残基26-33 (H1)、50-58 (H2) 以及97-111 (H3) 处。靶标特异性抗体的多肽可以包含选自由以下各项组成的组的包含VH区的氨基酸序列的抗体的CDR1区、CDR2区以及CDR3区:XPA.42.068、XPA.42.089以及XPA.42.681。

[0112] 在另一个实施方案中,所述TGF $\beta$ 抗体包含如上文所公开的成熟轻链可变区和如上文所公开的成熟重链可变区,它们任选地与相应命名的重链或轻链配对、或任选地与不同的重链或轻链配对。

[0113] 在示例性实施方案中,本公开考虑使用:单克隆抗体,所述单克隆抗体保留分别具有以下序列中的任一个的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、或LCDR3中的任何一个、两个、三个、四个、五个、或六个:SEQ ID NO:13、19和25;SEQ ID NO:14、20和26;SEQ ID NO:15、21和27;以及SEQ ID NO:16、22和28;SEQ ID NO:17、23和29;以及SEQ ID NO:18、24和30,任选地在这样的一个或多个CDR中的任一个中包括一个或两个突变,例如保守取代或非保守取代,并且这些CDR任选地配对;单克隆抗体,所述单克隆抗体保留分别具有以下序列中的任一个的所有HCDR1、HCDR2、HCDR3、或重链可变区:SEQ ID NO:13、19和25;SEQ ID NO:14、20和26;以及SEQ ID NO:15、21和27,任选地在这样的一个或多个CDR中的任一个中包括一个或两个突变,所述单克隆抗体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,所述单克隆抗体保留分别具有以下序列中的任一个的所有LCDR1、LCDR2、LCDR3、或轻链可变区:SEQ ID NO:16、22和28;SEQ ID NO:17、23和29;以及SEQ ID NO:18、24和30,任选地在这样的一个或多个CDR中的任一个中包括一个或两个突变,所述单克隆抗体任选地还包含任何合适的轻链恒定区,例如 $\kappa$ 轻链恒定区或 $\lambda$ 轻链恒定区、其人类序列、或其杂合体。

[0114] 在一些实施方案中,可用于所述方法中的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。在一些示例性实施方案中,来自一种抗体的两个轻链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和来自又另一种抗体的LCDR3组合,特别是在这些CDR具有高度同源性的情况下。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,特别是在这些CDR具有高度同源性的情况下。

[0115] 在一些实施方案中,可用于所述方法中的抗体包含多肽,所述多肽具有与如SEQ ID NO:2、6以及10所示的重链可变区具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性的氨基酸序列和/或与如SEQ ID NO:4、8以及12所示的轻链可变区具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的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。在一些实施方案中,与所述轻链可变区具有同一性百分比的氨基酸序列可

以包含所述轻链CDR中的一个、两个或三个。在其它实施方案中，与所述重链可变区具有同一性百分比的氨基酸序列可以包含所述重链CDR中的一个、两个或三个。

[0116] 在另一个实施方案中，可用于所述方法中的抗体包含多肽，所述多肽具有与本文所述的抗体序列的重链可变区中的所有三个HCDR具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性的氨基酸序列，所述CDR如SEQ ID N0:13、19和25；SEQ ID N0:14、20和26；以及SEQ ID N0:15、21和27所示。

[0117] 在一个相关的实施方案中，可用于所述方法中的抗体包含多肽，所述多肽具有与本文所述的抗体序列的轻链可变区中的所有三个LCDR具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性的氨基酸序列，所述CDR如SEQ ID N0:16、22和28；SEQ ID N0:17、23和29；以及SEQ ID N0:18、24和30所示。

[0118] 在另一个实施方案中，可用于所述方法中的抗体包含多肽，所述多肽具有与本文所述的抗体序列的重链可变区和轻链可变区中的所有六个CDR具有至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性的氨基酸序列，所述CDR如SEQ ID N0:13、19和25；SEQ ID N0:14、20和26；SEQ ID N0:15、21和27；SEQ ID N0:16、22和28；SEQ ID N0:17、23和29；以及SEQ ID N0:18、24和30所示。

[0119] 预期本文所述的抗体可以在抗体的CDR区中具有一个或两个或更多个氨基酸取代，例如非保守取代或保守取代。

[0120] 在一个相关的实施方案中，框架的残基被改变。可能发生改变的重链框架区位于被命名为H-FR1、H-FR2、H-FR3以及H-FR4的围绕重链CDR残基的区域内，并且可能发生改变的轻链框架区的残基位于被命名为L-FR1、L-FR2、L-FR3以及L-FR4的围绕轻链CDR残基的区域内。框架区内的氨基酸可以例如被人类框架或人类共有框架中所鉴定的任何合适的氨基酸置换。

[0121] 在示例性实施方案中，本文所述的抗TGF $\beta$ 抗体特异性结合TGF $\beta$ 的选自由TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、以及TGF $\beta$ 3组成的组的至少一种亚型。在其它实施方案中，抗TGF $\beta$ 抗体特异性结合：(a) TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、以及TGF $\beta$ 3 (“泛反应性抗体”或“泛结合抗体”)；(b) TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2；(c) TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3；以及(d) TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。在示例性实施方案中，本文所述的抗TGF $\beta$ 抗体以 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M、或 $10^{-12}$ M或更小的亲和力结合TGF $\beta$ 的至少一种亚型(更低意味着更高的结合亲和力)，或任选地结合两种TGF $\beta$ 亚型或所有TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2或TGF $\beta$ 3，对所述亚型中的一种或多种具有 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M、或 $10^{-12}$ M或更小的亲和力。在其它实施方案中，本文所述的抗体与TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2结合的亲和力是与TGF $\beta$ 3结合的亲和力的至少2倍-50倍、10倍-100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍，或比与TGF $\beta$ 3结合的亲和力高20%-50%、50%-100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100% (例如优先与TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2结合)。或者，本文所述的抗体与TGF $\beta$ 亚型TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2以及TGF $\beta$ 3中的每一种结合的亲和力是彼此的3倍、5倍或10倍以内。

[0122] 在一些实施方案中，抗体中和TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2的效力是中和TGF $\beta$ 3的效力的至少2倍-50倍、10倍-100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍，或比中和TGF $\beta$ 3的效力大20%-

50%、50%-100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0123] XPA.42.089的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列分别如SEQ ID NO:6和8所示。XPA.42.068的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2和4所示，并且XPA.42.681的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列分别如SEQ ID NO:10和12所示。

[0124] 抗体核酸

[0125] 本公开还包括使用编码本文和序列表中所述的靶标特异性抗体的核酸分子，任选地用于重组产生本文所述的抗体或用于产生抗体变体。在一些实施方案中，不同的核酸分子编码靶标特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。在其它实施方案中，同一个核酸分子编码靶标特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。在一个实施方案中，所述核酸编码本公开的靶标特异性抗体以及由本文所述的核酸编码的多肽中的任一种。

[0126] 编码被考虑用于所述方法中的抗TGF $\beta$ 抗体的核酸序列包括所有的核酸序列，包括SEQ ID NO:1、3、5、7、9以及11中的序列；以及基于遗传密码的多样性包含简并密码子的编码以下氨基酸序列的核酸序列，所述氨基酸序列是本文所述的抗体的重链可变区和轻链可变区或本文所述的任何HCDR或LCDR的氨基酸序列并且如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12以及13-30所示；以及在高度严格的条件（如本文所述的那些）下与编码以下氨基酸序列的核酸序列杂交的核酸，所述氨基酸序列是本文所述的抗体的重链可变区和轻链可变区或本文所述的任何HCDR或LCDR的氨基酸序列并且如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12以及13-30所示。

[0127] 本发明的抗体和抗原结合化合物的变体和衍生物的制备，包括亲和力成熟或含有氨基酸类似物的变体或衍生物的制备进一步详细地描述于本文中。示例性变体包括含有氨基酸序列内相应氨基酸的保守取代或非保守取代或者氨基酸被不同人类抗体序列的相应氨基酸置换的那些变体。本文所公开的抗体的变体和片段是使用如本文所述和重组蛋白质生产领域已知的方法制备的。

[0128] 程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)

[0129] PD-1也被称为分化簇279 (CD279)，是具有268个氨基酸的膜蛋白。PD-1是T细胞调节蛋白的CD28/CTLA-4家族的成员 (Ishida Y等, The EMBO J., 11 (11) :3887-95, (1992))。PD-1是在CD4+和CD8+ T细胞、B细胞以及巨噬细胞上表达的细胞表面共抑制受体，并且是免疫检查点阻断的组分 (Shinohara等, Genomics., 23 (3) :704, (1994); Francisco等, Immunol Rev., 236:219, (2010))。PD-1在与它的两种配体PD-L1（也被称为B7-H1;CD274）和PD-L2（B7-DC;CD273）相互作用时限制T细胞的活性 (Freeman GJ等, J.Exp.Med.192 (7) :1027-34, 2000; Latchman Y等, Nat.Immunol., 2 (3) :261-8, 2001; Postow等, J Clin Oncol., 33:9, 2015)。PD-1与PD-L1和PD-L2的相互作用减少了T细胞增殖、细胞因子产生、以及细胞毒活性 (Freeman GJ等, J Exp Med., 192:1027-34, (2000); Brown JA等, J Immunol., 170:1257-66, (2003))。

[0130] PD-1抗体

[0131] PD-1抗体已经描述于美国专利号8,735,553;8,617,546;8,008,449;8,741,295;8,552,154;8,354,509;8,779,105;7,563,869;8,287,856;8,927,697;8,088,905;7,595,048;8,168,179;6,808,710;7,943,743;8,246,955;以及8,217,149中。

[0132] 预期任何已知的抗体均可以用于本发明的方法中。在一些实施方案中，在本发明的方法中使用针对人类PD-1的鼠类单克隆抗靶标抗体。举例来说，体内MAB抗人类PD-1

(BioXCell公司,克隆:RMP1-14,目录号:BE0146)。抗PD-1抗体已经被证实在人类治疗中是有效的,参见例如派姆单抗(KEYTRUDA®,默沙东公司)和纳武单抗(Opdivo®,百时美施贵宝公司),它们是被批准用于人类治疗的抗PD-1抗体。另外的PD-1抗体正处在临床开发中,例如匹迪丽珠单抗(CT-011)(CureTech有限公司)。

[0133] 或者,PD-1抗体是使用本领域已知的和本文所述的技术制备的,包括噬菌体展示技术、杂交瘤技术、转基因小鼠技术等。

[0134] 在各种实施方案中,结合TGF $\beta$ 和PD-1蛋白这两者的双特异性抗体可用于本发明的方法中。

[0135] 单克隆抗体

[0136] 单克隆抗体指的是从一群基本上均质的抗体中获得的抗体。单克隆抗体一般具有高度特异性,并且可以针对单个抗原位点,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)的不同抗体。除了单克隆抗体的特异性之外,它们还因为以下而是有利的:它们是通过均质培养物合成的,未受具有不同特异性和特征的其它免疫球蛋白污染。

[0137] 单克隆抗体可以通过最初由Kohler等(Nature,256:495-7,1975)描述的杂交瘤方法制备(Harlow和Lane;《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press:Cold Spring Harbor,New York)(1988);Goding,《单克隆抗体:原理和操作(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)》,第59-103页(学术出版社,1986)),或可以通过重组DNA方法制备(参见例如美国专利号4,816,567)。还可以使用例如以下文献中所述的技术从噬菌体抗体文库中分离单克隆抗体:Clackson等(Nature 352:624-628,1991);以及Marks等(J.Mol.Biol.222:581-597,1991)。用于产生单克隆抗体的另外的方法是本领域普通技术人员公知的。

[0138] 通过常规的免疫球蛋白纯化程序适当地从培养基、腹水或血清中分离单克隆抗体,如通过上述方法产生的那些,所述常规免疫球蛋白纯化程序例如像蛋白A-琼脂糖凝胶、疏水性相互作用色谱(HIC)、离子交换色谱、羟磷灰石色谱、凝胶电泳、透析和/或亲和色谱。

[0139] 还预期的是,本公开的抗体可以作为本领域公知的和本文所述的抗体的较小抗原结合片段使用。

[0140] 抗体片段

[0141] 抗体片段包含完整全长抗体的一部分,优选地包含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、和Fv片段;双链抗体;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(例如双链抗体、三链抗体、四链抗体);微型抗体;螯合重组抗体;三体或双体;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;骆驼源化抗体;含VHH抗体;以及由抗体片段形成的其它多肽。参见例如Holliger和Hudson(Nat.Biotech.23:1126-36(2005))。

[0142] 用木瓜蛋白酶对抗体进行消化会产生两个相同的抗原结合片段,所述抗原结合片段被称作“Fab”片段,是由VL结构域、VH结构域、CL结构域以及CH结构域组成的一价片段,各自具有单个抗原结合位点;以及残留的“Fc”片段,它的名称反映了它容易结晶的能力。用胃蛋白酶进行处理会产生F(ab')2片段,所述F(ab')2片段是包含在铰链区中由二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段,具有包含抗体的VH结构域和VL结构域的两个“单链Fv”或“scFv”

抗体片段,其中这些结构域存在于单条多肽链中。优选的是,Fv多肽还在VH结构域与VL结构域之间包含使得Fv能够形成为抗原结合所期望的结构,从而产生单链抗体(scFv)的多肽接头,其中VL区与VH区配对以经由使得它们能够成为单条蛋白质链的合成接头形成一价分子(Bird等,Science 242:423-426,1988;以及Huston等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 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113卷,Rosenburg和Moore编著,纽约的施普林格出版社(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994)。Fd片段由VH结构域和CH1结构域组成。

[0143] 另外的抗体片段包括由VH结构域组成的结构域抗体(dAb)片段(Ward等,Nature 341:544-546,1989)。双链抗体是二价抗体,其中VH结构域和VL结构域表达于单条多肽链上,但是使用过短而不允许同一条链上的两个结构域之间进行配对的接头,从而迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对并且形成两个抗原结合位点(参见例如EP 404,097; WO 93/11161; Holliger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448,1993;以及Poljak等,Structure 2:1121-1123,1994)。双链抗体可以具有双特异性或单特异性。

[0144] 缺少轻链的功能性重链抗体天然地存在于铰口鲨(Greenberg等,Nature 374:168-73,1995)、地毯鲨(wobbegong shark)(Nuttall等,Mol Immunol.38:313-26,2001)以及骆驼科动物(Camelidae)(Hamers-Casterman等,Nature 363:446-8,1993;Nguyen等,J.Mol.Biol.275:413,1998),如骆驼、单峰骆驼、羊驼以及美洲驼中。在这些动物中,抗原结合位点被缩减成单个结构域,即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的重链的同二聚体(被称为“重链抗体”或“HCab”)。据报道,骆驼科动物VHH与含有铰链结构域、CH2结构域以及CH3结构域而缺少CH1结构域的IgG2恒定区和IgG3恒定区重组(Hamers-Casterman等(同上))。举例来说,美洲驼IgG1是一种常规的(H2L2)抗体同种型,其中VH与含有铰链结构域、CH1结构域、CH2结构域以及CH3结构域的恒定区重组,而美洲驼IgG2和IgG3是缺少CH1结构域并且不含轻链的只有重链的同种型。已经发现骆驼科动物VHH结构域以高亲和力结合抗原(Desmyter等,J.Biol.Chem.276:26285-90,2001)并且在溶液中具有高稳定性(Ewert等,Biochemistry 41:3628-36,2002)。经典的只有VH的片段很难以可溶性形式产生,但可以在使框架残基发生改变而更类似于VHH时获得溶解度和特异性结合方面的改进。(参见例如Reichman等,J Immunol Methods 1999,231:25-38。)用于产生具有骆驼科动物重链的抗体的方法描述于例如美国专利公开号20050136049和20050037421中。

[0145] 抗体重链可变域是仅具有15kDa分子质量的最小的完全功能性抗原结合片段,这一实体被称为纳米抗体(Cortez-Retamozo等,Cancer Research 64:2853-57,2004)。纳米抗体文库可以如Conrath等(Antimicrob Agents Chemother 45:2807-12,2001)中所述由接受免疫接种的单峰骆驼产生或使用如Revets等,Expert Opin.Biol.Ther.5(1):111-24(2005)中所述的重组方法产生。

[0146] 双特异性Fab-scFv(“双体”)和三特异性Fab-(scFv)(2)(“三体”)的制备描述于Schoonjans等(J Immunol.165:7050-57,2000)以及Willems等(J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.786:161-76,2003)中。对于双体或三体,使scFv分子与VL-CL(L)链和VH-CH1(Fd)链中的一个或这两者融合,例如为了产生三体,使两个scFv与Fab的C末端融合,而在双体中,使一个scFv与Fab的C末端融合。

[0147] 由scFv经由肽接头(无铰链)或经由IgG铰链与CH3融合所组成的“微型抗体”已描述于Olafsen等,Protein Eng Des Sel.17 (4):315-23,2004中。

[0148] 胞内抗体是显示出细胞内表达并且可以操纵细胞内蛋白质功能的单链抗体(Biocca等,EMBO J.9:101-108,1990;Colby等,Proc Natl Acad Sci U S A.101:17616-21,2004)。胞内抗体包含保持抗体构建体处于细胞内区域中的细胞信号序列,可以如以下文献中所述来产生:Mhashilkar等(EMBO J 14:1542-51,1995)以及Wheeler等(FASEB J.17:1733-5.2003)。穿膜抗体(transbody)是可穿透细胞的抗体,其中蛋白转导结构域(PTD)与单链可变区片段(scFv)抗体融合(Heng等,Med Hypotheses.64:1105-8,2005)。

[0149] 还考虑了如下的抗体,所述抗体是对靶蛋白具有特异性的SMIP或结合域免疫球蛋白融合蛋白。这些构建体是单链多肽,这些单链多肽包含与实现抗体效应功能所需的免疫球蛋白结构域融合的抗原结合域。参见例如W003/041600、美国专利公开20030133939以及美国专利公开20030118592。

[0150] 一个或多个CDR可以共价或非共价并入到分子中以使它成为免疫粘附素。免疫粘附素可以包含一个或多个CDR作为较大多肽链的一部分,可以使一个或多个CDR共价连接到另一条多肽链,或可以非共价地包含一个或多个CDR.CDR容许免疫粘附素特异性结合所关注的特定抗原。

[0151] 因此,可以通过本领域已知的技术产生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(例如单独的单个CDR或串联的2个、3个或其它多个CDR重复序列;或单独的2个或3个CDR或串联重复序列的组合;任选地在CDR或重复序列之间存在间隔氨基酸序列)的多种组合物。

#### [0152] 多特异性抗体

[0153] 在一些实施方案中,可能期望产生对相同或不同分子的至少两个不同的表位具有结合特异性的多特异性(例如双特异性)抗靶标抗体。示例性双特异性抗体可以结合靶分子的两个不同的表位。或者,TGF $\beta$ 特异性抗体臂可以与结合PD-1的臂组合。双特异性抗体还可以用于将细胞毒性剂定位到表达或摄取靶标的细胞。这些抗体具有靶标结合臂和结合细胞毒性剂(例如皂草素、抗干扰素-60、长春花生物碱、蓖麻毒素A链、甲氨蝶呤(methotrexate)或放射性同位素半抗原)的臂。双特异性抗体可以被制备成全长抗体或抗体片段(例如F(ab')<sub>2</sub>双特异性抗体)。还参见Spasevska I,BioSciences Master Reviews,2014;Caravella J和Lugovskoy A,Curr Opin Chem Biol.,14 (4) 520-528,2010中对双特异性抗体的方法和治疗益处的综述。

[0154] 根据用于制备双特异性抗体的另一种方法,可以对一对抗体分子之间的界面进行工程化以使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比达到最大。优选的界面包含抗体恒定域的CH3结构域的至少一部分。在这种方法中,将来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)置换。通过用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链而在第二抗体分子的界面上形成与一个或多个大侧链具有相同或相似尺寸的补偿性“空腔”。这提供了提高异二聚体相对于其它不需要的最终产物(如同二聚体)的产率的机制。参见W096/27011。

[0155] 双特异性抗体包括交联抗体或“异源缀合”抗体。举例来说,可以使异源缀合物中的抗体之一与亲和素偶联,使另一抗体与生物素偶联。可以使用任何方便的交联方法制备

异源缀合抗体。合适的交联剂以及许多交联技术是本领域公知的，并且公开于美国专利号4,676,980中。

[0156] 用于由抗体片段产生双特异性抗体的技术也已经描述于文献中。举例来说，可以使用化学连接制备双特异性抗体。Brennan等(Science 229:81-83,1985)描述了其中将完整抗体进行蛋白水解切割以产生F(ab')2片段的程序。在二硫醇络合剂亚砷酸钠存在下将这些片段还原以使邻位二硫醇稳定并且防止分子间二硫键形成。然后使所产生的Fab'片段转化成硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过使用巯基乙胺还原以使Fab'-TNB衍生物之一重新转化成Fab'-硫醇并且与等摩尔量的另一Fab'-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。所产生的双特异性抗体可以被用作用于选择性固定酶的试剂。在又另一个实施方案中，可以使直接从大肠杆菌中回收的Fab'-SH片段在体外化学偶联以形成双特异性抗体。(Shalaby等,J.Exp.Med.175:217-225(1992))。

[0157] Shalaby等,J.Exp.Med.175:217-225(1992)描述了完全人源化的双特异性抗体F(ab')2分子的制备。每一个Fab'片段单独地由大肠杆菌分泌并且在体外经受定向化学偶联以形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够结合过表达HER2受体的细胞和正常人类T细胞，以及触发人类细胞毒性淋巴细胞对人类乳腺肿瘤靶标的溶解活性。

[0158] 用于直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的各种技术也已经描述。举例来说，已经使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体。(Kostelny等,J.Immunol.148:1547-1553,1992)。通过基因融合使来自Fos蛋白和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的Fab'部分连接。将抗体同二聚体在铰链区处还原以形成单体，然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可以用于产生抗体同二聚体。由 Hollinger等(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-48,1993)描述的“双链抗体”技术已经提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。

[0159] 所述片段包含通过接头与轻链可变区(VL)连接的重链可变区(VH)，所述接头过短而不允许同一条链上的两个结构域之间进行配对。因此，一个片段的VH结构域和VL结构域被迫与另一个片段的互补VL结构域和VH结构域配对，从而形成两个抗原结合位点。也已经报道了通过使用单链Fv(scFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等,J.Immunol.152:5368(1994)。

[0160] 或者，双特异性抗体可以是如Zapata等,Protein Eng.8:1057-62(1995)中所述而产生的“线性抗体”。线性抗体包含形成一对抗原结合区的一对串联的Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)。线性抗体可以具有双特异性或单特异性。

[0161] 在另一个实施方案中，双特异性抗体可以是螯合重组抗体(CRAb)。螯合重组抗体识别靶抗原的相邻并且不重叠的表位，并且具有足够的柔性以同时结合两个表位(Neri等,J Mol Biol.246:367-73,1995)。

[0162] 还考虑了具有大于2价的抗体。举例来说，可以制备三特异性抗体。(Tutt等,J.Immunol.147:60,1991)。

[0163] 嵌合抗体和人源化抗体

[0164] 由于嵌合抗体或人源化抗体在人类中的免疫原性小于亲本非人类(例如小鼠)单克隆抗体，因此它们可以被用于治疗人类而有小得多的过敏反应风险。

[0165] 可以使用本领域已知的标准程序(参见Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA81,

6841-6855 (1984) ; 以及Boulianne等,Nature 312,643-646, (1984)) 产生嵌合单克隆抗体, 其中使非人类(例如小鼠) 单克隆抗体的Ig可变域与人类Ig恒定域融合。

[0166] 可以通过多种方法实现人源化抗体, 所述方法包括例如: (1) 将非人类互补决定区(CDR) 移植到人类框架和恒定区上(这一过程在本领域中被称为经由“CDR移植”进行人源化); (2) 移植整个非人类可变域, 但是通过置换表面残基将它们用人类样表面“掩蔽”(这一过程在本领域中被称为“修饰”); 或者可替代地, (3) 在被确定为不可能会不利地影响抗原结合或蛋白质折叠, 但有可能会降低在人类环境中的免疫原性的位置处用人类氨基酸取代(例如HUMAN ENGINEERING<sup>TM</sup>)。在本公开中, 人源化抗体将包括“人源化”抗体、“修饰”抗体以及“HUMAN ENGINEERED<sup>TM</sup>”抗体。这些方法公开于例如Jones等,Nature 321:522-525 (1986); Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison和Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen等, Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immunol. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31:169-217 (1994); Studnicka等的美国专利号5,766,886; Studnicka等, Protein Engineering 7:805-814, 1994; Co等, J. Immunol. 152, 2968-2976 (1994); Riechmann等, Nature 332:323-27 (1988); 以及Kettleborough等, Protein Eng. 4:773-783 (1991), 这些文献中的每一篇以引用的方式并入本文。CDR移植技术是本领域已知的, 参见例如Riechmann等(Nature 332:323-27 (1988))。

[0167] 来自转基因动物的人类抗体

[0168] 针对靶蛋白的人类抗体还可以使用转基因动物产生, 所述转基因动物没有内源性免疫球蛋白产生并且被工程化成含有人类免疫球蛋白基因座。举例来说, WO 98/24893公开了具有人类Ig基因座的转基因动物, 其中所述动物由于内源性重链基因座和轻链基因座失活而不会产生功能性内源性免疫球蛋白。WO 91/00906也公开了能够对免疫原发动免疫应答的转基因非灵长类哺乳动物宿主, 其中所述抗体具有灵长类动物恒定区和/或可变区, 并且其中编码内源性免疫球蛋白的基因座被取代或失活。WO 96/30498和美国专利号6,091,001公开了使用Cre/Lox系统对哺乳动物的免疫球蛋白基因座进行修饰, 如置换全部或一部分恒定区或可变区以形成修饰的抗体分子。WO 94/02602公开了具有失活的内源性Ig基因座和功能性人类Ig基因座的非人类哺乳动物宿主。美国专利号5,939,598公开了制备转基因小鼠的方法, 其中所述小鼠缺乏内源性重链, 并且表达包含一个或多个异种恒定区的外源性免疫球蛋白基因座。还参见美国专利号6,114,598、6,657,103以及6,833,268; Green LL, Curr Drug Discovery Technol., 11(1), 74-84, 2014; Lee EC等, Nature Biotechnology, 32:356-363, 2014; Lee EC和Owen M, Methods Mol Biol., 901:137-48, 2012。

[0169] 使用上述转基因动物, 可以针对所选择的抗原分子产生免疫应答, 并且可以从所述动物体内取出抗体产生细胞并用于产生分泌人类单克隆抗体的杂交瘤。免疫接种方案、佐剂等是本领域已知的, 并且被用于如WO 96/33735中所述对例如转基因小鼠进行免疫接种。该公开专利公开了针对包括IL-6、IL-8、TNFa、人类CD4、L选择素、gp39以及破伤风毒素在内的多种抗原分子的单克隆抗体。可以测试所述单克隆抗体抑制或中和相应蛋白质的生物活性或生理作用的能力。WO 96/33735公开了针对IL-8的单克隆抗体, 这些单克隆抗体源自于接受IL-8免疫接种的转基因小鼠的免疫细胞, 阻断中性粒细胞的由IL-8所诱导的功

能。对被用于对转基因动物进行免疫接种的抗原具有特异性的人类单克隆抗体还公开于WO 96/34096和美国专利申请号20030194404;以及美国专利申请号20030031667中。

[0170] 可用于制备单克隆抗体的另外的转基因动物包括美国专利号5,770,429和Fishwild等(Nat.Biotechnol.14:845-851(1996))中所述的MedarexHuMAb-MOUSE®,它含有来自编码人类抗体的重链和轻链的未重排人类抗体基因的基因序列。对HuMAb-MOUSE®进行免疫接种能够产生针对靶蛋白的完全人类单克隆抗体。

[0171] 此外,Ishida等(Cloning Stem Cells.4:91-102(2002))描述了TransChromo小鼠(TCMOUSE™),所述小鼠包含人类DNA的兆碱基级尺寸的区段并且包含整个人类免疫球蛋白(hIg)基因座。TCMOUSE™具有完全不同的hIg谱库,包括IgG的所有亚类(IgG1-IgG4)。用各种人类抗原对TCMOUSE™进行免疫接种会产生包含人类抗体的抗体反应。

[0172] 还参见Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等,Nature,362:255-258(1993);Bruggermann等,Year in Immunol.,7:33(1993);以及美国专利号5,591,669、美国专利号5,589,369、美国专利号5,545,807;以及美国专利公开号20020199213。美国专利公开号20030092125描述了用于使动物的免疫应答偏向于所期望的表位的方法。还可以通过体外激活的B细胞产生人类抗体(参见美国专利号5,567,610和5,229,275)。

### [0173] 来自展示技术的人类抗体

[0174] 用于制备重组人类抗体基因的谱库以及使编码的抗体片段展示于丝状噬菌体表面上的技术的开发已经提供了一种用于直接制备人类抗体的手段。由噬菌体技术产生的抗体作为抗原结合片段(通常是Fv片段或Fab片段)在细菌中产生并且因此缺乏效应功能。可以通过以下两种策略中的一种引入效应功能:可以将片段工程化成例如在哺乳动物细胞中表达的完整抗体,或工程化成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。

[0175] 举例来说,一种用于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:使用靶抗原或其抗原部分对包含人类免疫球蛋白基因座的非人类动物进行免疫接种以引起免疫应答,从接受免疫接种的动物体内提取抗体产生细胞;从所提取的细胞中分离RNA,对所述RNA进行逆转录以产生cDNA,使用引物扩增cDNA,以及将所述cDNA插入到噬菌体展示载体中以使得抗体在噬菌体上表达。可以用这种方式获得本公开的重组靶标特异性抗体。

[0176] 在另一个实施例中,可以从未接受免疫接种的动物体内提取抗体产生细胞,从所提取的细胞中分离RNA并且进行逆转录以产生cDNA,使用引物扩增所述cDNA,并且插入到噬菌体展示载体中以使得抗体在噬菌体上表达。噬菌体展示法经由使抗体谱库展示于丝状噬菌体表面上,并且继而通过噬菌体与所选择的抗原的结合对它们进行选择来模拟免疫选择。一种这样的技术描述于WO 99/10494中,WO 99/10494描述了使用这样的方法分离针对MPL和msk受体的高亲和力和功能性激动性抗体。通过对重组组合抗体文库,优选地scFv噬菌体展示文库进行筛选来分离本公开的抗体,所述抗体文库是使用由源自于人类淋巴细胞的mRNA制备的人类VL和VH cDNA制备的。用于制备和筛选这些文库的方法是本领域已知的。参见例如美国专利号5,969,108。存在用于产生噬菌体展示文库的可商购获得的试剂盒(例如Pharmacia重组噬菌体抗体系统,目录号27-9400-01;以及Stratagene SurfZAP.TM.噬菌体展示试剂盒,目录号240612)。还存在可以用于产生和筛选抗体展示文

库的其它方法和试剂(参见例如Ladner等的美国专利号5,223,409;Kang等的PCT公开号W0 92/18619;Dower等的PCT公开号W0 91/17271;Winter等的PCT公开号W0 92/20791;Markland等的PCT公开号W0 92/15679;Breitling等的PCT公开号W0 93/01288;McCafferty等的PCT公开号W0 92/01047;Garrard等的PCT公开号W0 92/09690;Fuchs等,(1991)Bio/Technology 9:1370-1372;Hay等,(1992)Hum.Antibod.Hybridomas 3:81-85;Huse等,(1989)Science 246:1275-1281;McCafferty等,Nature (1990) 348:552-554;Griffiths等(1993)EMBO J 12:725-734;Hawkins等(1992)J.Mol.Biol.226:889-896;Clackson等,(1991)Nature 352:624-628;Gram等,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:3576-3580;Garrad等,(1991)Bio/Technology 9:1373-1377;Hoogenboom等,(1991)Nuc Acid Res 19:4133-4137;以及Barbas等,(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7978-7982)。

[0177] 在一个实施方案中,为了分离针对靶抗原具有特异性并且具有所期望的特征的人类抗体,对人类VH和VL文库进行筛选以选择具有所期望的特异性的抗体片段。用于这种方法中的抗体文库优选地是如本文和本领域中所述来制备和筛选的scFv文库(McCafferty等的PCT公开号W0 92/01047;McCafferty等(Nature 348:552-554(1990));以及Griffiths等(EMBO J 12:725-734(1993)))。优选地使用靶蛋白作为抗原对scFv抗体文库进行筛选。

[0178] 或者,将抗体的Fd片段(VH-CH1)和轻链(VL-CL)分别通过PCR克隆并且随机重组成组合噬菌体展示文库,然后可以针对与特定抗原的结合对所述文库进行选择。使Fab片段在噬菌体表面上表达,即与编码它们的基因进行物理连接。因此,通过抗原结合选择Fab共同选择了Fab编码序列,随后可以将所述Fab编码序列扩增。经由几轮抗原结合和重新扩增(这个程序被称作淘选),使对抗原具有特异性的Fab富集并且最终分离。

[0179] 在1994年,描述了一种用于将抗体人源化的方法,该方法被称作“定向选择”。定向选择利用了噬菌体展示技术用于将小鼠单克隆抗体人源化的能力(参见Jespers,L.S.等,Bio/Technology 12,899-903(1994))。为此,可以使小鼠单克隆抗体的Fd片段与人类轻链文库组合展示,然后可以使用抗原对所得到的杂合Fab文库进行选择。小鼠Fd片段从而提供了引导选择的模板。随后,将所选择的人类轻链与人类Fd片段文库组合。对所得到的文库进行选择会产生完全人类Fab。

[0180] 已经描述了用于从噬菌体展示文库中获得人类抗体的多种程序(参见例如Hoogenboom等,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等,J.Mol.Biol,222:581-597(1991);美国专利号5,565,332和5,573,905;Clackson,T.和Wellis,J.A.,TIBTECH 12,173-184(1994))。具体来说,对源自于噬菌体展示文库的抗体进行体外选择和演变已经成为一种强大的工具(参见Burton,D.R.和Barbas III,C.F.,Adv.Immunol.57,191-280(1994);Winter,G.等,Annu.Rev.Immunol.12,433-455(1994);美国专利公开号20020004215和W0 92/01047;美国专利公开号20030190317;以及美国专利号6,054,287和5,877,293)。

[0181] Watkins,“通过捕捉提升物筛选噬菌体表达的抗体文库(Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift)”,Methods in Molecular Biology,《抗体噬菌体展示:方法和方案(Antibody Phage Display:Methods and Protocols)》,178:187-193(2002);以及2003年3月6日公开的美国专利公开号20030044772描述了通过捕捉提升物(capture lift)对噬菌体表达的抗体文库或其它结合分子进行筛选的方法,这种方法包括将候选结合分子固定在固体载体上。

[0182] 通过使作为噬菌体蛋白质融合体表达(例如使用M13基因III)的一条链与作为可溶性片段表达的互补链相缔合来使Fv片段在噬菌体表面上展示。预期所述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中的一种和II类噬菌体:Xf、Pf1以及Pf3中的一种。噬菌体可以是M13或fd或其衍生物。

[0183] 一旦选择了初始人类VL区段和VH区段,就进行“混合和匹配”实验,其中针对靶标结合对不同对的初始选择的VL区段和VH区段进行筛选,以选择优选的VL/VH对组合。此外,为了进一步提高抗体的质量,可以在与在天然免疫应答期间负责抗体亲和力成熟的体内体细胞突变过程类似的过程中,使一对或多对优选的VL/VH的VL区段和VH区段发生随机突变,优选地在VH和/或VL的CDR1区、CDR2区或CDR3区中的任一个内发生随机突变。这种体外亲和力成熟可以通过使用分别与VH CDR1、CDR2以及CDR3或VL CDR1、CDR2以及CDR3互补的PCR引物对VL区和VH区进行扩增来实现,所述引物已经在某些位置上“掺杂”了四个核苷酸碱基的随机混合物以使得所得的PCR产物编码其中随机突变已经被引入到VH和/或VL CDR3区中的VL区段和VH区段。可以针对与靶抗原的结合对这些随机突变的VL区段和VH区段进行重新筛选。

[0184] 在从重组免疫球蛋白展示文库中筛选和分离靶标特异性抗体后,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,并且通过标准重组DNA技术将所述核酸亚克隆到其它表达载体中。如果需要的话,可以如下文所述进一步操纵所述核酸以产生本公开的其它抗体形式。为了表达通过筛选组合文库而分离的重组人类抗体,将编码所述抗体的DNA克隆到重组表达载体中,并且引入到哺乳动物宿主细胞中,如本文所述。

[0185] 预期噬菌体展示法可以在细菌或宿主细胞的增变株中进行。增变株是具有遗传缺陷的宿主细胞,所述遗传缺陷会引起在所述宿主细胞内复制的DNA相对于它的亲本DNA发生突变。示例性增变株是NR9046mutD5和NR9046 mut T1。

[0186] 还预期噬菌体展示法可以使用辅助噬菌体进行。这是一种用于感染含有缺陷性噬菌体基因组的细胞并且用于补足所述缺陷的噬菌体。缺陷性噬菌体基因组可以是去除了一些功能编码基因序列的噬菌粒或噬菌体。辅助噬菌体的实例是M13K07、M13K07基因III 3号;以及展示或编码与衣壳蛋白融合的结合分子的噬菌体。

[0187] 还使用如WO 92/01047中所公开的分层二元组合法(hierarchical dual combinatorial approach)经由噬菌体展示筛选法来产生抗体,在所述分层二元组合法中使用含有H链或L链克隆的单个菌落感染编码另一条链(L或H)的克隆的完整文库,并且根据噬菌体展示技术(如其中所述的那些)对所得的双链特异性结合成员进行选择。这种技术也公开于Marks等(Bio/Technology,10:779-783(1992))中。

[0188] 用于在酵母、微生物以及哺乳动物细胞的表面上展示肽的方法还已经被用于鉴定抗原特异性抗体。参见例如美国专利号5,348,867;5,723,287;6,699,658;Wittrup,Curr Op.Biotech.12:395-99(2001);Lee等,Trends in Biotech.21(1) 45-52(2003);Surgeeva等,Adv.Drug Deliv.Rev.58:1622-54(2006)。可以使抗体文库与酵母蛋白(如凝集素)连接,从而有效地模拟免疫系统中B细胞对抗体的细胞表面展示。

[0189] 除了噬菌体展示法之外,还可以使用体外展示法和微生物细胞展示(包括核糖体展示和mRNA展示)来分离抗体(Amstutz等,Curr.Op.Biotech.12:400-05(2001))。使用核糖体展示对多肽进行选择描述于Hanes等(Proc.Natl Acad Sci USA,94:4937-4942(1997))

以及授予Kawasaki的美国专利号5,643,768和5,658,754中。核糖体展示也可用于对抗体进行快速大规模突变分析。选择性诱变方法也提供了一种产生具有提高的活性的抗体的方法,所述抗体可以使用核糖体展示技术来选择。

[0190] 氨基酸序列变体

[0191] 可以产生包含抗体的一个、两个、三个、四个、五个和/或六个CDR的修饰的多肽组合物,其中CDR被改变以使得对靶分子的特异性或亲和力提高。通常例如通过以下步骤连续地对抗体CDR内的位点进行修饰:首先用保守的选择进行取代(例如用疏水性氨基酸取代不同的疏水性氨基酸),然后用更不相似的选择进行取代(例如用疏水性氨基酸取代带电荷的氨基酸),然后可以在靶位点处产生缺失或插入。举例来说,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引物来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序列和多肽序列的技术是本领域公认的[参见例如Sambrook等,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第2版,纽约的冷泉港(1989)]。将扩增的CDR序列连接到适当的质粒中。包含一个、两个、三个、四个、五个和/或六个克隆的CDR的质粒任选地含有与CDR连接的另外的多肽编码区。

[0192] 可以通过在下文中更详细描述的保守或非保守氨基酸取代进行修饰。“插入”或“缺失”优选地在约1个至20个氨基酸,更优选地1个至10个氨基酸的范围内。可以通过使用重组DNA技术在抗体多肽分子中系统性地进行氨基酸取代并且测定所得的重组变体的活性来引入变异。可以在来自不同物种的核酸有所不同的位点(可变区位置)或高度保守的区域(恒定区)中的位点处进行核酸改变。在本领域中描述了用于改变抗体序列和表达可用于本公开中的抗体多肽组合物的方法。参见例如美国专利8,569,462。

[0193] 如本文所用的术语“补救受体结合表位”指的是IgG分子(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区中负责延长IgG分子的体内血清半衰期的表位。

[0194] 另一种类型的变体是氨基酸取代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸残基被去除并且在它的位置处插入有不同的残基。考虑了高变区或CDR区或框架区中的任一个内的取代诱变。保守取代涉及将氨基酸用属于它的类别的另一个成员置换。非保守取代涉及将属于这些类别之一的成员用属于另一类别的成员置换。

[0195] 基于所涉及的残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质方面的相似性,进行保守氨基酸取代。举例来说,非极性(疏水性)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)以及甲硫氨酸(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)以及谷氨酰胺(Gln,Q);带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸(Arg,R)、赖氨酸(Lys,K)以及组氨酸(His,H);以及带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E)。

[0196] 不参与维持抗体的正确构象的任何半胱氨酸残基也可以被取代,一般被丝氨酸取代,以提高分子的氧化稳定性并且防止异常交联。相反,可以向抗体中添加一个或多个半胱氨酸键以提高它的稳定性(特别是在抗体是诸如Fv片段的抗体片段的情况下)。

[0197] 改变的糖基化

[0198] 还可以产生抗体变体,所述抗体变体相对于亲本抗体具有改变的糖基化模式,例如使所述抗体中存在的一个或多个碳水化合物部分缺失和/或添加所述抗体中不存在的一

个或多个糖基化位点。

[0199] 抗体的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接指的是碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸)是用于使碳水化合物部分与天冬酰胺侧链进行酶促连接的识别序列。这些三肽序列中的任一个在多肽中的存在形成潜在的糖基化位点。因此,可以通过改变氨基酸序列以使它含有这些三肽序列中的一个或多个来将N-连接的糖基化位点添加到抗体中。O-连接的糖基化指的是糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种与羟氨基酸连接,所述羟氨基酸最通常是丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。可以通过将一个或多个丝氨酸残基或苏氨酸残基插入或取代到原始抗体的序列中来将O-连接的糖基化位点添加到抗体中。

[0200] Fc聚糖影响IgG与Fc受体和C1q的结合,并且因此对于IgG效应功能是重要的。可以产生具有修饰的Fc聚糖和改变的效应功能的抗体变体。举例来说,具有修饰的末端糖(如唾液酸、核心岩藻糖、二等分N-乙酰葡糖胺以及甘露糖残基)的抗体可以具有改变的与Fc $\gamma$ RIIIa受体的结合和改变的ADCC活性。在另一个实施例中,具有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,Curr.Opin.Immunol.20:471-78(2008))。

[0201] 也被考虑用于所述方法中的是不存在岩藻糖基化或具有减少的岩藻糖基化的表现出提高的ADCC活性的抗体分子。实现这一目的的多种方式是本领域已知的。举例来说,ADCC效应活性是由抗体分子与Fc $\gamma$ RIII受体结合来介导的,这已经被证实为取决于CH2结构域的Asn-297处的N-连接的糖基化的碳水化合物结构。与天然的岩藻糖基化的抗体相比,非岩藻糖基化的抗体以增加的亲和力结合这种受体并且更高效地触发Fc $\gamma$ RIII介导的效应功能。举例来说,在其中 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基转移酶已经被敲除的CHO细胞中非岩藻糖基化的抗体的重组产生使得抗体的ADCC活性增加到100倍(Yamane-Ohnuki等,Biotechnol Bioeng.87:614-22(2004))。可以经由例如通过siRNA或反义RNA处理以降低岩藻糖基化途径中这种酶或其它酶的活性;将细胞系工程化以敲除所述一种或多种酶;或与选择性糖基化抑制剂一起培养来实现类似的作用(Rothman等,Mol Immunol.26:1113-23(1989))。一些宿主细胞株,例如Lec13或大鼠杂交瘤YB2/0细胞系天然地产生具有更低的岩藻糖基化水平的抗体。(Shields等,J Biol Chem.277:26733-40(2002);Shinkawa等,J Biol Chem.278:3466-73(2003))。例如经由在过表达GnTIII酶的细胞中重组产生抗体而使二等分碳水化合物的水平增加也已经被确定为提高ADCC活性(Umana等,Nat Biotechnol.17:176-80(1999))。已经预测两个岩藻糖残基中只要有一个不存在就可以足以提高ADCC活性(Ferrara等,Biotechnol Bioeng.93:851-61(2006))。

[0202] 具有改变的效应功能的变体

[0203] 考虑了用于所述方法中的抗体的其它修饰。在一个方面,可能期望在效应功能方面对本文所用的抗体进行修饰,例如以增强抗体治疗癌症的有效性。用于改变效应功能的一种方法教导了可以将一个或多个半胱氨酸残基引入到Fc区中,从而允许在这个区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚抗体可以具有改进的内化能力和/或增强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(J.Exp Med.176:1191-1195(1992))以及Shopes,B.(J.Immunol.148:2918-2922(1992))。也可以使用如Wolff等(Cancer

Research 53:2560-2565 (1993) 中所述的异双功能交联剂来制备具有增强的抗肿瘤活性的同二聚抗体。或者,可以将抗体工程化,所述抗体具有双重Fc区,并且从而可以具有增强的补体溶解和ADCC能力。参见Stevenson等(Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989))。此外,已经证实CDR内的序列可以使得抗体与MHC II类结合并且触发不必要的辅助T细胞反应。保守取代可以允许抗体保留结合活性,但丧失它触发不必要的T细胞反应的能力。

[0204] 在本公开的某些实施方案中,可能期望使用抗体片段,而不是完整抗体,以例如增加肿瘤穿透作用。在这种情况下,可能期望修饰抗体片段以延长它的血清半衰期,例如将诸如PEG或其它水溶性聚合物(包括多糖聚合物)的分子添加到抗体片段中以延长半衰期。

[0205] 补救受体结合表位优选地构成其中来自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。甚至更优选的是,来自Fc结构域的一个或两个环的三个或更多个残基被转移。还更优选的是,表位取自Fc区(例如IgG的Fc区)的CH2结构域,并且被转移到抗体的CH1区、CH3区或VH区或多于一个这样的区域中。或者,表位取自Fc区的CH2结构域并且被转移到抗体片段的CL区或VL区或这两者中。

[0206] 因此,本公开的抗体可以包含人类Fc部分、人类共有Fc部分或其保留与Fc补救受体相互作用的能力的变体,包括如下的变体,在所述变体中,参与二硫键键合的半胱氨酸被修饰或被去除、和/或在N末端处添加了met、和/或N末端的20个氨基酸中的一个或多个被去除、和/或与补体相互作用的区域(如C1q结合位点)被去除、和/或ADCC位点被去除[参见例如Sarmay等,Molec. Immunol. 29:633-9 (1992)]。

[0207] Shields等报道参与结合所有人类Fc受体的IgG1残基位于靠近铰链的CH2结构域中并且分为如下两个类别:1) 可以与所有FcR直接相互作用的位置包括Leu234-Pro238、Ala327以及Pro329(以及可能的Asp265);2) 影响碳水化合物性质或位置的位置包括Asp265和Asn297。影响与Fc受体II的结合的另外的IgG1残基如下:(影响最大)Arg255、Thr256、Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298、以及(影响较小)His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378、和Lys414。A327Q、A327S、P329A、D265A以及D270A减少结合。除了上文针对所有FcR所鉴定的残基之外,使与Fc受体III A的结合减少40%或更多的另外的IgG1残基如下:Ser239、Ser267(仅Gly)、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338、以及Asp376。提高与FcRIII A的结合的变体包括T256A、K290A、S298A、E333A、K334A、以及A339T。Lys414显示使得与FcRIIA和FcRIIB的结合减少40%,Arg416使得与FcRIIA和FcRIII A的结合减少30%,Gln419使得与FcRIIA的结合减少30%并且使得与FcRIIB的结合减少40%,并且Lys360使得与FcRIII A的结合提高23%。还参见Presta等(Biochem. Soc. Trans. 30:487-490, 2001),该文献以引用的方式整体并入本文,描述了在IgG1的Fc区中存在几个如下的位置,所述位置仅提高与特定Fc $\gamma$ 受体(R)的结合或者同时提高与一种类型的Fc $\gamma$ R的结合并减少与另一种类型的结合。然后在体外抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定中测试所选择的具有提高的与Fc $\gamma$ RIII A的结合的IgG1变体,并且当使用外周血单核细胞或自然杀伤细胞时,所述变体显示出ADCC的增强。

[0208] 举例来说,美国专利号6,194,551(以引用的方式整体并入本文)描述了具有改变的效应功能的变体,所述变体在人类IgG Fc区中在氨基酸位置329、331或322(使用Kabat编

号)处含有突变,所述变体中的一些显示出减少的C1q结合或CDC活性。作为另一个实例,美国专利号6,737,056(以引用的方式整体并入本文)描述了具有改变的效应物或Fc $\gamma$ 受体结合的变体,所述变体在人类IgG Fc区中在如下氨基酸位置处含有突变:氨基酸位置238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439(使用Kabat编号),所述变体中的一些显示出与ADCC或CDC活性降低相关的受体结合谱。在这些当中,氨基酸位置238、265、269、270、327或329处的突变被认为会减少与FcRI的结合,氨基酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438或439处的突变被认为会减少与FcRII的结合,并且氨基酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435或437处的突变被认为会减少与FcRIII的结合。

[0209] 美国专利号5,624,821(以引用的方式整体并入本文)报道了鼠类抗体的C1q结合活性可以通过使重链的氨基酸残基318、320或322突变来改变,并且置换残基297(Asn)导致溶解活性的去除。

[0210] 美国专利公开号20040132101(以引用的方式整体并入本文)描述了在以下氨基酸位置处具有突变的变体:氨基酸位置240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328、或332(使用Kabat编号)或氨基酸位置234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330、或332(使用Kabat编号),其中位置234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330、或332处的突变可以降低ADCC活性或减少与Fc $\gamma$ 受体的结合。

#### [0211] 共价修饰

[0212] 包含共价修饰的抗体也被考虑用于所述方法中。如果适用的话,它们可以通过化学合成或通过酶促或化学切割抗体来制备。通过使抗体的靶向氨基酸残基与有机衍生化剂反应来将抗体的其它类型的共价修饰引入分子中,所述有机衍生化剂能够与所选侧链或者N末端残基或C末端残基反应。

[0213] 最常使半胱氨酸残基与 $\alpha$ -卤代乙酸酯(和相应的胺),如氯乙酸或氯乙酰胺反应,以产生羧甲基或羧酰胺基甲基衍生物。还通过与溴代三氟丙酮、 $\alpha$ -溴- $\beta$ -(5-咪唑基)丙酸、氯乙酰基磷酸酯、N-烷基顺丁烯二酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡啶基二硫化物、对氯汞苯甲酸酯、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑反应来将半胱氨酸残基衍生化。

[0214] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的组氨酸酰基、赖氨酸酰基、精氨酸酰基、酪氨酸酰基、谷氨酰胺酰基以及天冬酰胺酰基羟基化。用于进行这样的修饰的方法公开于美国专利8,926,976(以引用的方式并入本文)和本领域中。

[0215] 通过与碳二亚胺(R-N.dbd.C.dbd.N-R')反应来选择性修饰羧基侧基(天冬氨酸酰基或谷氨酰基),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-氮鎔-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,通过与铵离子反应将天冬氨酸酰基残基

和谷氨酰基残基转化成天冬酰胺酰基残基和谷氨酰胺酰基残基。

[0216] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酸残基或苏氨酸残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸以及组氨酸侧链的 $\alpha$ -氨基的甲基化(T.E.Creighton,《蛋白质:结构和分子特性(Proteins:Structure and Molecular Properties)》,旧金山的W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman&Co., San Francisco),第79-86页(1983))、N末端胺的乙酰化、以及任何C末端羧基的酰胺化。

[0217] 另一种类型的共价修饰涉及使糖昔与抗体进行化学或酶促偶联。这些程序是有利的,这是因为它们不需要在具有N-连接或O-连接的糖基化的糖基化能力的宿主细胞中产生抗体。根据所使用的偶联方式,可以使一个或多个糖与以下各项连接:(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)芳族残基,如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基;或(f)谷氨酰胺的酰胺基。这些方法描述于W087/05330以及Aplin和Wriston(CRC Crit.Rev.Biochem., 第259-306页(1981))中。

[0218] 可以通过化学方式或酶促方式去除抗体上存在的任何碳水化合物部分。化学脱糖基化需要使抗体暴露于化合物三氟甲烷磺酸或等效的化合物。这种处理会引起大多数或所有糖(除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)以外)的切割,同时保持抗体完整。化学脱糖基化由Hakimuddin等(Arch.Biochem.Biophys.259:52(1987));以及Edge等(Anal.Biochem.118:131(1981))描述。可以通过使用多种内切糖昔酶和外切糖昔酶来对抗体上的碳水化合物部分进行酶促切割,如由Thotakura等(Meth.Enzymol.138:350(1987))所述。

[0219] 抗体的另一种类型的共价修饰包括使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、聚氧乙基化多元醇、聚氧乙基化山梨糖醇、聚氧乙基化葡萄糖、聚氧乙基化甘油、聚氧化烯烃、或多糖聚合物,如葡聚糖。这些方法是本领域已知的。

#### [0220] 衍生物

[0221] 如上所述的衍生物在结合抗体物质和多肽使用时指的是通过如下的技术化学修饰的多肽:泛素化;标记(例如使用放射性核素或各种酶);共价聚合物连接,如聚乙二醇化(使用聚乙二醇衍生化);以及通过化学合成氨基酸(如鸟氨酸)进行插入或取代。本文所公开的抗体的衍生物也可用作治疗剂并且可以用于本文的方法中。

[0222] 可以共价或经由离子键、范德华力(van der Waals)或氢键将缀合的部分并入抗体物质中或与抗体物质连接,例如放射性核苷酸或由抗生物素蛋白链菌素识别的生物素化的核苷酸的并入。

[0223] 可以使聚乙二醇(PEG)与抗体物质连接以提供更长的体内半衰期。PEG基团可以具有任何方便的分子量并且可以是线性的或支化的。PEG的平均分子量优选地将在约2千道尔顿("kD")至约100kDa范围内,更优选地在约5kDa至约50kDa范围内,最优选地在约5kDa至约10kDa范围内。一般将经由PEG部分上的天然或工程化的反应性基团(例如醛基、氨基、硫醇基或酯基)对抗体物质上的反应性基因(例如醛基、氨基或酯基)进行酰化或还原性烷基化来使PEG基团与本公开的抗体物质连接。可以使用本领域公知的技术将PEG部分添加到抗体物质中。参见例如国际公开号WO 96/11953和美国专利号4,179,337。

[0224] 抗体物质与PEG的连接通常在水相中进行并且可以容易地通过反相分析型HPLC监

测。通过制备型HPLC纯化聚乙二醇化的物质，并且通过分析型HPLC、氨基酸分析以及激光解吸质谱进行表征。

[0225] 抗体缀合物

[0226] 抗体可以它的“裸”形式或未缀合的形式施用，或可以与其它治疗剂或诊断剂直接缀合，或可以与包含这些其它治疗剂或诊断剂的载体聚合物间接缀合。在一些实施方案中，使抗体与以下各项缀合：细胞毒性剂，如化学治疗剂、药物、生长抑制剂、毒素（例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段）、或放射性同位素（即放射性缀合物）。合适的化学治疗剂包括：道诺霉素（daunomycin）、多柔比星（doxorubicin）、甲氨蝶呤、以及长春地辛（vindesine）（Rowland等，(1986)（同上））。合适的毒素包括：细菌毒素，如白喉毒素；植物毒素，如蓖麻毒素；小分子毒素，如格德霉素（geldanamycin）（Mandler等，J.Natl.Cancer Inst. 92 (19) : 1573-81 (2000)；Mandler等，Bioorg.Med.Chem.Letters 10: 1025-1028 (2000)；Mandler等，Bioconjugate Chem. 13: 786-91 (2002)）、类美登素（maytansinoid）（EP 1391213；Liu等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93: 8618-23 (1996)）、阿里他汀（auristatin）（Doronina等，Nat.Biotech. 21: 778-84 (2003)）、以及卡奇霉素（calicheamicin）（Lode等，Cancer Res. 58: 2928 (1998)；Hinman等，Cancer Res. 53: 3336-3342 (1993)）。抗体-药物缀合物和方法在Ducry L, mAbs. 6 (1), 2014以及Shen WC, AAPS., 17: 3-7, 2015中综述。

[0227] 可以经由使用放射性同位素、亲和标记（如生物素、亲和素等）、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）等）、顺磁性原子等来可检测地标记抗体。用于实现这样的标记的程序是本领域公知的；例如参见Sternberger, L.A. 等, J.Histochem.Cytochem. 18: 315 (1970)；Bayer, E.A. 等, Meth. Enzym. 62: 308 (1979)；Engval, E. 等, Immunol. 109: 129 (1972)；Goding, J.W.J. Immunol. Meth. 13: 215 (1976)。

[0228] 抗体部分的缀合描述于美国专利号6,306,393中。一般技术还描述于Shih等, Int.J.Cancer 41: 832-839 (1988)；Shih等, Int.J.Cancer 46: 1101-1106 (1990)；以及Shih等的美国专利号5,057,313中。该一般方法包括使具有氧化的碳水化合物部分的抗体组分与载体聚合物反应，所述载体聚合物具有至少一个游离胺官能团并且负载多种药物、毒素、螯合剂、硼附加物或其它治疗剂。该反应产生初始希夫碱（Schiff base）（亚胺）键，该键可以通过还原成仲胺以形成最终缀合物来稳定。

[0229] 载体聚合物可以是例如氨基葡聚糖或具有至少50个氨基酸残基的多肽。用于使药物或其它药剂与载体聚合物缀合的各种技术是本领域已知的。可以使用多肽载体代替氨基葡聚糖，但是多肽载体应当在链中具有至少50个氨基酸残基，优选地100个-5000个氨基酸残基。至少一些氨基酸应当是赖氨酸残基或谷氨酸残基或天冬氨酸残基。赖氨酸残基的侧链以及谷氨酰胺和天冬氨酸的侧羧酸酯基便于连接药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼附加物或其它治疗剂。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、以及这些氨基酸与其它氨基酸（例如丝氨酸）的混合聚合物，以赋予所得的负载的载体和缀合物以理想的溶解特性。可以与抗体缀合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，可以通过使抗体组分与治疗剂直接缀合来制备缀合的抗体。一般程序类似于间接缀合法，不同的是将治疗剂与氧化的抗体组分直接连接。举例来说，可以使抗体的碳

水化合物部分与聚乙二醇连接以延长半衰期。

[0231] 或者,可以经由形成二硫键或使用异双功能交联剂,如N-丁二酰基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)将治疗剂连接在还原的抗体组分的铰链区处。Yu等,Int.J.Cancer 56:244(1994)。用于这种缀合的一般技术是本领域公知的。参见例如Wong,《蛋白质缀合和交联的化学(Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking)》,(CRC出版社,1991);Upeslacis等,“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(编著),第187-230页(威利-利斯公司(Wiley-Liss,Inc.),1995);Price,“合成肽衍生抗体的产生和表征(Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies)”,《单克隆抗体:产生、工程化以及临床应用(Monoclonal Antibodies:Production,Engineering and Clinical Application)》,Ritter等(编著),第60-84页(剑桥大学出版社(Cambridge University Press),1995)。多种双功能蛋白偶联剂是本领域已知的,如N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、酰亚胺酯的双功能衍生物(如己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(如辛二酸二丁二酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双叠氮基化合物(如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(如双(对重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如2,6-二异氰酸甲代亚苯酯)、以及双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

#### [0232] 抗体融合蛋白

[0233] 制备抗体-毒素融合蛋白的方法也是本领域技术人员已知的,其中重组分子包含一种或多种抗体组分和毒素或化学治疗剂。举例来说,抗体-假单胞菌(Pseudomonas)外毒素A融合蛋白已经由以下文献描述:Chaudhary等,Nature 339:394(1989);Brinkmann等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 88:8616(1991);Batra等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 89:5867(1992);Friedman等,J.Immunol.150:3054(1993);Wels等,Int.J.Can.60:137(1995);Fominaya等,J.Biol.Chem.271:10560(1996);Kuan等,Biochemistry 35:2872(1996);以及Schmidt等,Int.J.Can.65:538(1996)。含有白喉毒素部分的抗体-毒素融合蛋白已经由以下文献描述:Kreitman等,Leukemia 7:553(1993);Nicholls等,J.Biol.Chem.268:5302(1993);Thompson等,J.Biol.Chem.270:28037(1995);以及Vallera等,Blood 88:2342(1996)。Deonarain等,Tumor Targeting 1:177(1995)已经描述了具有RNA酶部分的抗体-毒素融合蛋白,而Linardou等,Cell Biophys.24-25:243(1994)制备了包含DNA酶I组分的抗体-毒素融合蛋白。白树毒素(gelonin)被用作Wang等,第209届ACS国家会议摘要(Abstracts of the 209th ACS National Meeting),加利福尼亚州的阿纳海姆(Anaheim,Calif.),1995年4月2日-6日,第1部分,BIOT005的抗体-毒素融合蛋白中的毒素部分。作为另一个实例,Dohlsten等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 91:8945(1994)报道了包含葡萄球菌肠毒素-A的抗体-毒素融合蛋白。

[0234] 适用于制备这些融合蛋白的毒素的实例是蓖麻毒素、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素以及假单胞菌内毒素。参见例如Pastan等,Cell 47:641(1986);以及Goldenberg,CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43(1994)。其它合适的毒素是本领域技术人员已知的。

[0235] 还可以通过将抗体与前药激活酶缀合以将本公开的抗体用于ADEPT中,所述前药激活酶将前药(例如肽基化学治疗剂,参见W081/01145)转化成活性抗癌药物。参见例如W088/07378和美国专利号4,975,278。

[0236] 可用于ADEPT中的免疫缀合物的酶组分包括任何酶,所述酶能够以这样的方式作用于前药以将它转化成它的更具活性的细胞毒性形式。

[0237] 可用于本公开中的酶包括但不限于:可用于将含磷酸酯前药转化成游离药物的碱性磷酸酶;可用于将含硫酸酯前药转化成游离药物的芳基硫酸酯酶;可用于将无毒5-氟胞嘧啶转化成抗癌药物5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;可用于将含肽前药转化成游离药物的蛋白酶,如沙雷氏菌属(*serratia*)蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶以及组织蛋白酶(如组织蛋白酶B和L);可用于转化含有D-氨基酸取代基的前药的D-丙氨酰羧肽酶;可用于将糖基化前药转化成游离药物的碳水化合物切割酶,如 $\alpha$ -半乳糖苷酶和神经氨酸酶;可用于将经过 $\beta$ -内酰胺衍生化的药物转化成游离药物的 $\beta$ -内酰胺酶;以及可用于将在氨基处分别经过苯氧基乙酰基或苯乙酰基衍生化的药物转化成游离药物的青霉素酰胺酶,如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶。或者,具有酶活性的抗体在本领域也被称为抗体酶,可以用于将本公开的前药转化成游离活性药物(参见例如Massey, *Nature* 328:457-458 (1987))。可以如本文所述制备抗体-抗体酶缀合物以用于向肿瘤细胞群体递送抗体酶。

[0238] 可以通过本领域公知的技术,如使用上述异双功能交联试剂使上述酶与抗体共价结合。或者,可以使用本领域公知的重组DNA技术(参见例如Neuberger等,*Nature* 312:604-608 (1984))构建融合蛋白,所述融合蛋白至少包含本公开的抗体的抗原结合区,所述抗原结合区至少与本公开的酶的功能活性部分连接。

[0239] 重组产生抗体

[0240] 可以使用常规程序(例如通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)分离编码本文所述的抗体的DNA并且进行测序。这通常需要对编码抗体的DNA或优选地mRNA(即cDNA)进行克隆。使用标准技术进行克隆和测序,所述标准技术例如像聚合酶链反应(PCR)(参见例如Sambrook等(1989)《分子克隆:实验室指南(Molecular Cloning:A Laboratory Guide)》,第1-3卷,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press);Ausubel等,(编著),《分子生物学实验技术(Protocols in Molecular Biology)》,John Wiley&Sons (1994),这些文献以引用的方式并入本文)。

[0241] 使用标准技术进行测序(参见例如Sambrook等(1989)《分子克隆:实验室指南(Molecular Cloning:A Laboratory Guide)》,第1-3卷,冷泉港出版社;以及Sanger,F.等(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467,该文献以引用的方式并入本文)。通过将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的序列相比较,本领域技术人员将能够容易地根据所测序的区域确定:(i)免疫球蛋白多肽(包括重链的同种型)的生殖系区段使用;以及(ii)重链可变区和轻链可变区的序列,包括由N末端区域添加和体细胞突变过程而产生的序列。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国家卫生研究院的国家医学图书馆的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,National Library of Medicine,National Institutes of Health,Bethesda,Md)。

[0242] 一旦分离,就可以将DNA放入表达载体中,然后将所述载体转染到不另外产生免疫

球蛋白的宿主细胞中,所述宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、人类胚肾293细胞(例如293E细胞)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。抗体的重组产生是本领域公知的。

[0243] 在一个替代性实施方案中,可以通过直接蛋白质测序来测定所关注的免疫球蛋白的氨基酸序列。可以根据通用密码子表设计合适的编码核苷酸序列。

[0244] 为了重组产生抗体,分离编码其的核酸,并且将所述核酸插入可复制的载体中以进一步克隆(DNA扩增)或以进行表达。使用常规程序(例如通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离编码单克隆抗体的DNA并且进行测序。许多载体是可供使用的。载体组分一般包括但不限于以下一个或多个:信号序列、复制起点、一个或多个选择标记基因、增强子元件、启动子以及转录终止序列,它们是本领域已知的和描述的。

[0245] 用于克隆或表达本文的载体中的DNA的合适的宿主细胞是上述原核生物、酵母或高等真核生物细胞。用于这一目的的合适的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(*Enterobacteriaceae*),如埃希氏菌属(*Escherichia*),例如大肠杆菌;肠杆菌属(*Enterobacter*);欧文氏菌属(*Erwinia*);克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*);变形杆菌属(*Proteus*);沙门氏菌属(*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*);沙雷氏菌属(*Serratia*),例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*);和志贺氏菌属(*Shigella*);以及芽孢杆菌属(*Bacilli*),如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)(例如1989年4月12日公开的DD 266,710中所公开的地衣芽孢杆菌41P);假单胞菌属(*Pseudomonas*),如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*);和链霉菌属(*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294(ATCC 31,446),尽管其它菌株,如大肠杆菌B、大肠杆菌X1776(ATCC 31,537)、以及大肠杆菌W3110(ATCC 27,325)也是合适的。这些实例是说明性的而非限制性的。

[0246] 除了原核生物之外,真核微生物(如丝状真菌或酵母)也是用于抗体编码载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通面包酵母(baker's yeast)是低等真核宿主微生物中最常使用的。然而,许多其它属、种以及菌株也是通常可供使用的并且可用于本文中,如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主,例如像乳酸克鲁维酵母(*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)、魏氏克鲁维酵母(*K. wickeramii*)(ATCC 24,178)、华氏克鲁维酵母(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K. drosophilae*)(ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K. thermotolerans*)以及马克斯克鲁维酵母(*K. marxianus*);耶氏酵母(*yarrowia*)(EP 402,226);毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070);念珠菌属(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma reesii*)(EP 244,234);粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*),如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);以及丝状真菌,例如像链孢霉属(*Neurospora*)、青霉属(*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*)。

[0247] 用于表达糖基化抗体的合适的宿主细胞源自于多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。来自宿主,如草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(毛

虫)、埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 以及家蚕 (*Bombyx mori*) 的许多杆状病毒株和变体以及相应的允许的昆虫宿主细胞已经被鉴定。用于转染的多种病毒株是可公开获得的,例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,并且这些病毒可以在本文中用作根据本公开的病毒,特别是用于转染草地贪夜蛾细胞。

[0248] 棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、烟草、浮萍以及其它植物细胞的植物细胞培养物也可以用作宿主。

[0249] 有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 CCL 61)、DXB - 11、DG - 44 以及中国仓鼠卵巢细胞 / - DHFR (CHO, Urlaub 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216 (1980)); 经过SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651); 人类胚肾细胞系(被亚克隆以用于在悬浮培养中生长的293或293细胞(Graham 等, J.Gen Virol.36:59, 1977); 幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10); 小鼠塞尔托利细胞(TM4, Mather (Biol.Reprod.23:243-251, 1980); 猴肾细胞(CV1ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34); 布法罗大鼠肝细胞(buffalo rat liver cell) (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI细胞(Mather等, Annals N.Y Acad.Sci.383:44-68 (1982)); MRC 5细胞; FS4细胞; 以及人肝细胞瘤细胞系(Hep G2)。

[0250] 使用上述用于抗体产生的表达或克隆载体转化或转染宿主细胞,并且将所述宿主细胞培养在常规营养培养基中,所述常规营养培养基被改良为适用于诱导启动子、选择转化体、或扩增编码所期望的序列的基因。此外,通过选择标记分离的具有转录单位的多个拷贝的新型载体和转染的细胞系对于表达结合靶标的抗体是特别有用的和优选的。

[0251] 当使用重组技术时,抗体可以在细胞内,在周质间隙中产生,或直接被分泌到培养基中,包括从微生物培养物产生。如果抗体在细胞内产生,那么作为第一步骤,例如通过离心或超滤去除颗粒碎片(宿主细胞或裂解的片段)。Better等, Science 240:1041-43, 1988; ICSU Short Reports 10:105 (1990); 以及Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:457-461 (1993) 描述了用于分离被分泌到大肠杆菌的周质间隙中的抗体的程序。[还参见Carter等, Bio/Technology 10:163-167 (1992) ]。

[0252] 可以使用例如羟磷灰石色谱、阳离子或阴离子交换色谱、以及亲和色谱来纯化由微生物或哺乳动物细胞制备的抗体组合物,其中亲和色谱是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适合性取决于存在于抗体中的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。可以使用蛋白A纯化基于人类  $\gamma$  1、 $\gamma$  2或  $\gamma$  4重链的抗体(Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62:1-13, 1983)。蛋白G被推荐用于所有小鼠同种型和用于人类  $\gamma$  3 (Guss等, EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。与亲和配体连接的基质最常是琼脂糖,但是其它基质也是可用的。与可以使用琼脂糖实现的流速和处理时间相比,机械稳定的基质,如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯允许更快的流速和更短的处理时间。在抗体包含CH3结构域的情况下,Bakerbond ABX<sup>TM</sup>树脂(新泽西州菲利普斯堡的J.T.Baker公司(J.T.Baker, Phillipsburg, N.J.))可用于纯化。用于蛋白质纯化的其它技术,如在离子交换柱上进行的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅色谱、肝素SEPHAROSE<sup>®</sup>色谱、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸

柱)色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE、以及硫酸铵沉淀也是可用的,这取决于待回收的抗体。

[0253] 筛选方法

[0254] 有效治疗剂取决于鉴定没有显著毒性的有效药剂。可以通过本领域已知的方法针对结合亲和力对抗体进行筛选。举例来说,可以使用凝胶迁移测定、蛋白质印迹、放射性标记竞争测定、通过色谱进行的共同分级分离、共沉淀、交联、ELISA等,它们描述于例如《现代分子生物学实验技术( *Current Protocols in Molecular Biology* )》(1999) 纽约的约翰威立父子公司(John Wiley&Sons, NY)中,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0255] 用于评估抗TGF $\beta$ 抗体对TGF $\beta$ 的生物活性的中和作用的方法是本领域已知的。参见例如美国专利7,867,496。体外生物测定的实例包括:(1)在软琼脂中在EGF存在下诱导NRK细胞的集落形成(Roberts等(1981) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 78:5339-5343);(2)诱导原始间充质细胞分化以表达软骨表型(Seyedin等(1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 82:2267-2271);(3)抑制Mv1Lu貂肺上皮细胞(Danielpour等(1989) *J.Cell.Physiol.*, 138:79-86)和BBC-1猴肾细胞(Holley等,(1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 77:5989-5992)生长;(4)抑制C3H/HeJ小鼠胸腺细胞的有丝分裂发生(Wrann等(1987) *EMBO J.*, 6:1633-1636);(5)抑制大鼠L6成肌细胞分化(Florini等(1986) *J.Biol.Chem.*, 261:16509-16513);(6)测量纤连蛋白的产生(Wrana等(1992) *Cell*, 71:1003-1014);(7)诱导与荧光素酶报告基因融合的纤溶酶原激活物抑制因子I(PAI-1)启动子(Abe等(1994) *Anal.Biochem.*, 216:276-284);(8)夹心酶联免疫吸附测定(Danielpour等(1989) *Growth Factors*, 2:61-71);以及(9)Singh等(2003) *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 13 (24) :4355-4359中所述的细胞测定。

[0256] 在一些实施方案中,抗体中和TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2的效力是中和TGF $\beta$ 3的效力的至少2倍-50倍、10倍-100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍,或比中和TGF $\beta$ 3的效力大20%-50%、50%-100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0257] 用于评估TGF $\beta$ 的生物活性和对TGF $\beta$ 的中和作用(例如由TGF $\beta$ 抗体)的另外的方法是本领域已知的。举例来说,中和作用可以通过中和测定来测量并且表示为IC50值。可以通过测定引出对第二分子或细胞活性的最大生物反应的半数抑制所需的分子浓度来计算给定分子的IC50值。IC50越低,则分子抑制所期望的蛋白质活性的效力越大。本文所考虑的示例性中和测定包括但不限于白细胞介素-11释放测定和HT-2/IL-4细胞增殖测定。此外,可以进行TGF $\beta$ 活性测定以确定所述抗体是否优先地抑制一种TGF $\beta$ 亚型,包括pSMAD磷酸化测定或rhLAP结合测定。

[0258] 用于评估PD-1抑制剂和抗PD-1抗体的中和生物活性的方法是本领域已知的。举例来说,中和作用可以通过中和测定来测量并且表示为IC50值。可以通过测定引出对第二分子或细胞活性的最大生物反应的半数抑制所需的分子浓度来计算给定分子的IC50值。IC50越低,则分子抑制所期望的蛋白质活性的效力越大。本文所考虑的示例性中和测定包括但不限于测量PD-1抗体在人类T细胞中促进T细胞反应的能力、IFN $\gamma$ 释放测定、或白细胞介素-2分泌测定(Wang等,Cancer Immunol Res., 2 (9) :846-56 (2014))。

[0259] 联合治疗

[0260] 本公开的TGF $\beta$ 抑制剂与抑制PD-1的第二药剂一起施用并且所述组合可用于治疗如本文所述的疾病或病症。在使用抗体抑制TGF $\beta$ 和PD-1的情况下,如果多于一种TGF $\beta$ 抗体或PD-1抗体有效结合对应的靶抗原,那么预期可以将针对靶抗原的不同表位和/或优先结

合TGF $\beta$ 或PD-1的不同亚型的两种或更多种抗体混合以使得三种或四种或更多种抗体的组合一起对待用TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂治疗的病况或病症提供更进一步提高的功效。包含一种或多种本发明的抗体的组合物可以向患有或易患与TGF $\beta$ 或PD-1的靶多肽相关的病况或病症的人或哺乳动物施用。

[0261] 并行施用两种治疗剂不需要同时或通过相同的途径施用所述药剂,只要所述药剂发挥它们的治疗作用的时间段上存在重叠即可。考虑了同时施用或顺序施用,也考虑了在不同天或不同周施用。

[0262] 也可以将第三药剂与TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂一起使用。所述第三药剂可以是其它治疗剂,如细胞因子、生长因子、其它靶抗原的其它抑制剂和抗体,例如伊匹单抗(ipilimumab) (YERVOY<sup>®</sup>, 百时美施贵宝公司),它是CTLA-4抗体;贝伐单抗(bevacizumab) (AVASTIN<sup>®</sup>, 基因泰克公司(Genentech)),它是VEGF-A抗体;埃罗替尼(erlotinib) (TARCEVA<sup>®</sup>, 基因泰克公司和OSI药物公司(OSI Pharmaceuticals)),它是作用于EGFR的酪氨酸激酶抑制剂;达沙替尼(dasatinib) (SPRYCEL<sup>®</sup>, 百时美施贵宝公司),它是口服Bcr-Abl酪氨酸激酶抑制剂;IL-21;聚乙二醇化的IFN- $\alpha$ 2b;阿西替尼(axitinib) (INLYTA<sup>®</sup>, 辉瑞公司(Pfizer, Inc.)),它是酪氨酸激酶抑制剂;以及曲美替尼(trametinib) (MEKINIST<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline公司),它是MEK抑制剂(Philips和Atkins, Int Immunol., 27(1):39-46 (2015),该文献以引用的方式并入本文)。

[0263] 如果癌症是V600突变阳性的,就像一些癌症,特别是在黑色素瘤中(Ascierto P等,J Transl Med., 10:85, 2012),那么还预期所述第三药剂是BRAF抑制剂,例如威罗菲尼(vemurafenib)或达拉菲尼(dabrafenib)。

[0264] 预期本公开的抑制剂,如抗体可以在同一制剂中同时给予。还预期所述抑制剂在单独的制剂中施用并且并行地施用,其中并行地是指在彼此相隔30分钟内给予药剂。还预期可以与所述抑制剂同时给予第三药剂。

[0265] 在另一个方面,在施用其它抑制剂组合物之前施用TGF $\beta$ 抑制剂或PD-1抑制剂。先前施用指的是在使用其它抑制剂治疗前一周到在施用其它抑制剂前30分钟的范围内施用抑制剂。还预期的是,在施用另一种抑制剂组合物之后施用抑制剂。随后施用意在描述了在抗体治疗后30分钟到在抗体施用后一周的范围内进行施用。还预期的是,第三药剂可以在TGF $\beta$ 抑制剂或PD-1抑制剂之前以这种方式施用。

[0266] 还预期的是,在适当时间可以施用其它辅助治疗。举例来说,在适当时间还可以向患者施用手术治疗、化学治疗、细胞毒性剂、光动力治疗或放射治疗。

[0267] 还预期的是,在将本文的抑制剂或抗体与第三药剂组合施用时,例如像其中所述第三药剂是细胞因子或生长因子或化学治疗剂,施用还包括了使用放射治疗剂或放射治疗。与抗体组合物组合施用的放射治疗如由治疗医师所决定并且以通常给予针对癌症接受治疗的患者的剂量施用。

[0268] 细胞毒性剂是指抑制或阻止细胞功能和/或对细胞造成破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素(例如I131、I125、Y90以及Re186)、化学治疗剂以及毒素,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/或不对细胞造成破坏的物质。非细胞毒性剂可以包括可以被活化以具有细胞毒性的药剂。非细胞毒性剂可以包括珠粒、脂质体、基质或颗粒(参见例如美国专利公开2003/

0028071和2003/0032995,它们以引用的方式并入本文)。这些药剂可以与根据本公开的抗体缀合、偶联、连接或缔合。

[0269] 被考虑与本公开的抗体一起使用的化学治疗剂包括但不限于表I中所列的那些：

[0270] 表I

<u>烷基化剂</u>		<u>天然产品</u>
<u>氮芥</u>		<u>抗有丝分裂药物</u>
二氯甲基二乙胺 ( mechlorethamine )		紫杉烷
环磷酰胺 ( cyclophosphamide )		紫杉醇
异环磷酰胺 ( ifosfamide )		长春花生物碱
美法仑 ( melphalan )		长春花碱 ( vinblastine, VLB )
苯丁酸氮芥 ( chlorambucil )		长春新碱 ( vincristine )
<u>亚硝基脲</u>		长春瑞滨 ( vinorelbine )
卡莫司汀 ( carmustine, BCNU )		Taxotere® ( 多烯紫杉醇 ( docetaxel ))
洛莫司汀 ( lomustine, CCNU )		雌莫司汀 ( estramustine )
司莫司汀 ( semustine, 甲基-CCNU )		磷酸雌莫司汀
<u>乙烯亚胺/甲基-三聚氰胺</u>		<u>表鬼臼毒素 ( Epipodophylotoxin )</u>
三亚乙基三聚氰胺 ( TEM )		依托泊苷 ( etoposide )
三亚乙基硫代磷酰胺 ( 噻替哌 ( thiotepa ))		替尼泊苷 ( teniposide )
六甲三聚氰胺 ( HMM, 六甲蜜胺 ( altretamine ))		<u>抗生素</u>
<u>烷基磺酸盐</u>		放线菌素D ( actinomycin D )
白消安 ( busulfan )		道诺霉素 ( 红比霉素 ( rubidomycin ))
<u>三嗪</u>		多柔比星 ( 阿霉素 ( adriamycin ))
达卡巴嗪 ( dacarbazine, DTIC )		米托蒽醌 ( mitoxantrone )
<u>抗代谢物</u>		伊达比星 ( idarubicin )
<u>叶酸类似物</u>		博来霉素 ( bleomycin )
甲氨蝶呤		丝普卡霉素 ( splicamycin ) ( 光神霉素 ( mithramycin ))
三甲曲沙 ( Trimetrexate )		丝裂霉素C ( mitomycin C )

<p>培美曲塞 (多靶向抗叶酸剂)</p> <p><u>嘧啶类似物</u></p> <p>5-氟尿嘧啶</p> <p>氟脱氧尿苷</p> <p>吉西他滨 (gemcitabine)</p> <p>胞嘧啶阿拉伯糖苷 (cytosine arabinoside)</p> <p>(AraC、阿糖胞苷 (cytarabine))</p> <p>5-氟杂胞苷</p> <p>2,2'-二氟脱氧-胞苷</p> <p><u>嘌呤类似物</u></p> <p>6-巯基嘌呤</p> <p>6-硫鸟嘌呤</p> <p>硫唑嘌呤 (azathioprine)</p> <p>2'-脱氧柯福霉素 (2'-deoxycytidine) (喷司他丁 (pentostatin))</p> <p>赤式羟基壬基-腺嘌呤 (EHNA)</p> <p>磷酸氟达拉滨 (fludarabine phosphate)</p> <p>2-氯脱氧腺苷 (克拉屈滨 (cladribine), 2-CDA)</p> <p><b>I型拓扑异构酶抑制剂</b></p> <p>喜树碱 (camptothecin)</p> <p>拓扑替康 (topotecan)</p> <p>伊立替康 (irinotecan)</p> <p><b>生物反应调节剂</b></p> <p>G-CSF</p> <p>GM-CSF</p> <p><b>分化剂</b></p> <p>视黄酸衍生物</p> <p><b>激素和拮抗剂</b></p> <p><u>肾上腺皮质类固醇/拮抗剂</u></p> <p>泼尼松 (prednisone) 和等效物</p> <p>地塞米松</p> <p>氨鲁米特 (ainogluthethimide)</p> <p><u>孕激素</u></p> <p>己酸羟孕酮</p> <p>醋酸甲羟孕酮</p> <p>醋酸甲地孕酮</p> <p><u>雌激素</u></p> <p>己烯雌酚 (diethylstilbestrol)</p> <p>乙炔基雌二醇/等效物</p> <p><u>抗雌激素药</u></p> <p>他莫昔芬 (tamoxifen)</p> <p><u>雄激素</u></p> <p>丙酸睾酮</p> <p>氟甲睾酮 (fluoxymesterone) /等效物</p> <p><u>抗雄激素药</u></p> <p>氟他米特 (flutamide)</p> <p>促性腺激素释放激素类似物</p> <p>亮丙瑞林 (leuprolide)</p> <p><u>非类固醇抗雄激素药</u></p> <p>氟他米特</p>	<p>更生霉素 (dactinomycin)</p> <p>阿非迪霉素 (aphidicolin)</p> <p><u>酶</u></p> <p>L-天冬酰胺酶</p> <p>L-精氨酸酶</p> <p><b>放射增敏剂</b></p> <p>甲硝唑 (metronidazole)</p> <p>迷索硝唑 (misonidazole)</p> <p>去甲基迷索硝唑</p> <p>哌莫硝唑 (pimonidazole)</p> <p>依他硝唑 (etanidazole)</p> <p>尼莫拉唑 (nimorazole)</p> <p>RSU 1069</p> <p>EO9</p> <p>RB 6145</p> <p>SR4233</p> <p>烟酰胺</p> <p>5-溴代脱氧尿苷</p> <p>5-碘代脱氧尿苷</p> <p>溴代脱氧胞苷</p> <p><b>其它药剂</b></p> <p>铂配位络合物</p> <p>顺铂</p> <p>卡铂</p> <p>奥沙利铂 (oxaliplatin)</p> <p>蒽二酮 (Anthracenedione)</p> <p>米托蒽醌</p> <p><u>取代的脲</u></p> <p>羟基脲</p> <p><u>甲肼衍生物</u></p> <p>N-甲肼 (MIH)</p> <p>丙卡巴肼 (procabazine)</p> <p><u>肾上腺皮质抑制剂</u></p> <p>米托坦 (mitotane) (<i>o,p'</i>-DDD)</p> <p>氨鲁米特</p> <p><b>细胞因子</b></p> <p>干扰素 (<math>\alpha</math>、<math>\beta</math>、<math>\gamma</math>)</p> <p>白细胞介素-2</p> <p><b>光敏剂</b></p> <p>血卟啉衍生物</p> <p>Photofrin®</p> <p>苯并卟啉衍生物</p> <p>Npe6</p> <p>初卟啉锡 (SnET2)</p> <p>苯博瑞德-a (pheoboride-a)</p> <p>细菌叶绿素-a</p> <p>蔡酞菁</p> <p>酞菁</p> <p>酞菁锌</p> <p><b>放射</b></p> <p>X射线</p> <p>紫外光</p>
--	---

[0272]

[0273]	$\gamma$ 放射 可见光 红外放射 微波放射
--------	------------------------------------

[0274] 治疗病症

[0275] 在另一个实施方案中,本文所述的任何类型的抑制剂可以用于所述方法中。在示例性实施方案中,靶标特异性抗体是人类抗体、嵌合抗体或人源化抗体。在另一个示例性实施方案中,靶标是人类的并且患者是人类患者。或者,患者可以是表达与靶标特异性抗体交叉反应的靶蛋白的哺乳动物。可以向用于兽医学目的或用作人类疾病的动物模型的表达与抗体交叉反应的靶蛋白的非人类哺乳动物(即灵长类动物)施用抗体。这些动物模型可用于评价本公开的靶标特异性抗体的治疗功效(Huang和Balmain,Cold Spring Harb Perspect Med., 4 (9) :a013623, 2014)。

[0276] 在一个实施方案中,本公开提供了一种用于治疗癌症或预防癌症复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂或包含如本文所述的抑制剂中的一种或这两者的药物组合物。

[0277] 可以用TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂(例如本公开的抗体)治疗的示例性病况或病症包括癌症,如食道癌、胰腺癌、转移性胰腺癌、转移性胰腺腺癌、膀胱癌、胃癌、纤维化癌、神经胶质瘤、恶性神经胶质瘤、弥漫性内在脑桥神经胶质瘤、复发性儿童脑赘生物、肾细胞癌、透明细胞转移性肾细胞癌、肾癌、前列腺癌、转移性去势抗性前列腺癌、IV期前列腺癌、转移性黑色素瘤、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、皮肤复发性黑色素瘤、黑色素瘤脑转移瘤、IIIA期皮肤黑色素瘤、IIB期皮肤黑色素瘤、IIC期皮肤黑色素瘤、IV期皮肤黑色素瘤、头颈部恶性黑色素瘤、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状细胞非小细胞肺癌、乳腺癌、复发性转移性乳腺癌、肝细胞癌、霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、晚期B细胞NHL、HL,包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、多发性骨髓瘤、慢性骨髓性白血病、处于缓解期的成人急性骨髓性白血病;伴有Inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11的成人急性骨髓性白血病;伴有t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11的成人急性骨髓性白血病;伴有t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1的成人急性骨髓性白血病;伴有t(9;11)(p22;q23)/MLLT3-MLL的成人急性骨髓性白血病;伴有t(15;17)(q22;q12)/PML-RARA的成人急性早幼粒细胞白血病;烷基化剂相关急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、里氏综合征、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、成人成胶质细胞瘤、成人胶质肉瘤、复发性成胶质细胞瘤、复发性儿童横纹肌肉瘤、复发性尤文氏肉瘤/外周原始神经外胚层肿瘤、复发性成神经细胞瘤、复发性骨肉瘤、结肠直肠癌、MSI阳性结肠直肠癌、MSI阴性结肠直肠癌、鼻咽非角化性癌、复发性鼻咽未分化癌、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、复发性头颈部癌、头颈部鳞状细胞癌、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌、结肠癌、胃癌、晚期GI癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌、骨赘生物、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、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以及复发性蕈样真菌病和塞扎里综合征。

[0278] 可以用根据本发明的抗体组合治疗的示例性癌症包括癌症,如肺腺癌、粘液性腺瘤、胰腺导管癌和结肠直肠癌、脑低级神经胶质瘤、乳腺浸润性癌、多形性成胶质细胞瘤、黑

色素瘤、甲状腺、直肠腺癌、肾癌(kidney cancer)、肾癌(renal cancer)、肝癌、急性骨髓性白血病、胃腺癌、食管腺癌、子宫体子宫内膜样癌、膀胱癌、肾癌、前列腺癌、口腔癌、大肠癌以及淋巴瘤。

[0279] 已经观测到,许多人类肿瘤(deMartin等,EMBO J.,6:3673(1987);Kuppner等,Int.J.Cancer,42:562(1988))和许多肿瘤细胞系(Derynck等,Cancer Res.,47:707(1987);Roberts等,Br.J.Cancer,57:594(1988))产生TGF $\beta$ 并且表明了那些肿瘤逃避正常的免疫监视的可能机制。

[0280] TGF $\beta$ 亚型在癌症中的表达是复杂的并且可变的,其中TGF $\beta$ 亚型的不同组合在特定癌症中具有不同的作用。TGF $\beta$ 分子既可以充当肿瘤抑制因子,也可以充当肿瘤促进因子。举例来说,动物中TGF $\beta$ 信号转导的缺失或下调可能会导致乳腺癌、肠癌、胰腺癌、结肠癌以及鳞状细胞癌增加,这表示TGF $\beta$ 的存在对于预防或减缓肿瘤进展是重要的(Yang等,Trends Immunol 31:220-27,2010)。然而,已知TGF $\beta$ 过表达具有促致癌性并且在许多肿瘤类型中检测到表达增加(Yang等(同上))。

[0281] 另外的复杂情况还公开于美国专利7,927,593中。举例来说,不同的TGF $\beta$ 亚型似乎与不同类型的癌症更相关。TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3在卵巢癌和它的进展中可能起到了比TGF $\beta$ 2更大的作用;而在更高级别软骨肉瘤肿瘤中TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2的表达大于TGF $\beta$ 3。在人类乳腺癌中,TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3高表达,其中TGF $\beta$ 3表达与总体存活率有关,而有淋巴结转移和阳性TGF $\beta$ 3表达的患者有不佳的预后结果。然而,在结肠癌中,TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2比TGF $\beta$ 3更高表达,并且与无癌症个体中的循环水平相比,以更大的循环水平存在。在神经胶质瘤中,TGF $\beta$ 2对于细胞迁移是重要的。

[0282] 免疫细胞向肿瘤部位中的浸润被认为是肿瘤生长的一个常见的促进因素。这些免疫细胞浸润可能通过帮助清除肿瘤而具有有益的作用,但是也可能通过使对肿瘤抗原具有耐受性而产生有害作用。已经显示,TGF $\beta$ 可以影响肿瘤中免疫细胞的水平(参见例如Yang等,Trends Immunol 31:220-27,2010;Flavell等,Nature Immunol 10:554-567,2010;Nagarau等,Expert Opin Investig Drugs 19:77-91,2010)。举例来说,TGF $\beta$ 抑制浸润肿瘤以从体内清除肿瘤的自然杀伤细胞。TGF $\beta$ 还抑制细胞毒性T细胞和CD4+辅助T细胞的活性,这些细胞类型有助于清除肿瘤(Yang(同上))。TGF $\beta$ 还在调节树突状细胞活性中起作用,它是例如通过抑制向损伤部位中迁移和呈递抗原以促进免疫应答来起作用的。树突状细胞既对TGF $\beta$ 有反应也分泌TGF $\beta$ 。举例来说,树突状细胞浸润肿瘤并且溶解细胞,分泌TGF $\beta$ 并且激活调节性T细胞,进而可能会阻止对肿瘤的清除(Flavell等(同上))。此外,骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)是在肿瘤进展期间扩充的骨髓衍生细胞。MDSC抑制T细胞增殖,抑制树突状细胞成熟,并且抑制自然杀伤细胞的活性,从而帮助细胞逃避免疫应答(Li等,J Immunol.182:240-49,2009)。TGF $\beta$ 已经被证实会促进MDSC抑制自然杀伤细胞活性的作用(Li等(同上);Xiang等,Int JCancer 124:2621-33,2009)。各种TGF $\beta$ 亚型在这些免疫过程中的每一个中的作用尚不明确。选择性靶向TGF $\beta$ 亚型并且在不同程度上对它们进行抑制可以有助于调节宿主免疫应答以对抗并清除肿瘤。

[0283] 预期本文的方法减小受试者的肿瘤尺寸或肿瘤负荷和/或减少受试者的转移。在各种实施方案中,所述方法使肿瘤尺寸减小10%、20%、30%或更多。在各种实施方案中,所述方法使肿瘤尺寸减小10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、

65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0284] 预期本文的方法减小肿瘤负荷,并且一旦癌症已经进入缓解期,还减少或预防肿瘤复发。

[0285] 在各种实施方案中,本文所述的TGF $\beta$ 抗体和/或PD-1抗体和其组合或组合物调节肿瘤中的免疫细胞。在一些实施方案中,本文的TGF $\beta$ 抗体和/或PD-1抗体和其组合或组合物增加肿瘤中自然杀伤(NK)细胞的数目和/或增强NK细胞的细胞溶解活性。在各种实施方案中,本文所述的抗体或组合物使肿瘤中的调节性T细胞的数目减少和/或抑制调节性T细胞的功能。举例来说,在各种实施方案中,本文所述的抗体或组合物抑制调节性T细胞下调免疫应答或迁移到免疫应答部位的能力。

[0286] 在各种实施方案中,本文所述的TGF $\beta$ 抗体和/或PD-1抗体和其组合或组合物使肿瘤中的细胞毒性T细胞的数目增加和/或增强CTL活性,例如加强、提高或促进CTL活性。举例来说,在各种实施方案中,本文所述的抗体或组合物增加CTL的穿孔素和颗粒酶的产生并且提高CTL的细胞溶解活性。

[0287] 在各种实施方案中,本文所述的TGF $\beta$ 抗体和/或PD-1抗体和其组合或组合物使肿瘤中树突状细胞(DC)的数目增加和/或抑制树突状细胞的致耐受性功能(例如致耐受性作用)。举例来说,在各种实施方案中,本文所述的抗体或组合物降低CD8+树突状细胞的致耐受性作用。

[0288] 在各种实施方案中,如本文所述的TGF $\beta$ 抗体中的任一种,即XPA.42.068、XPA.42.089或XPA.42.681或其变体调节上文所述的免疫活性中的一种或多种。

[0289] 在一个实施方案中,治疗需要所述治疗的动物的癌症包括向所述动物施用有效量的TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂或包含本文所述的抑制剂的组合物。预期所述抑制剂是TGF $\beta$ 抗体和PD-1抗体。

[0290] 可用本公开的方法治疗的病况优选地存在于哺乳动物中。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;实验室动物,如大鼠、小鼠以及兔;以及农畜,如马、猪、羊以及牛。

[0291] 药物组合物的配制

[0292] 为了向人类或测试动物施用本公开的抑制剂,例如抗体,优选的是将所述抑制剂配制成包含一种或多种药学上可接受的载体的组合物。短语“药学上或药理学上可接受的”是指当使用如下文所述的本领域公知的途径施用时不会产生过敏或其它不良反应的分子实体和组合物。“药学上可接受的载体”包括任何和所有临幊上有用的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0293] 此外,化合物可以与水或常见的有机溶剂形成溶剂化物。这些溶剂化物同样被考虑。

[0294] 所述抑制剂是通过任何合适的手段施用的,包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内施用,以及如果需要局部治疗的话,病灶内施用。肠胃外输注包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、真皮内或皮下施用。此外,通过脉冲输注来适当地施用所述抑制剂,特别是在抗体剂量递减的情况下。优选的是,通过注射,最优先地静脉内或皮下注射进行给药,这部分地取决于施用是短暂的还是长期的。其它施用方法被考虑,包括局部,特别是透皮、经粘膜、经直肠、口服或局部施用(例如经由被放置在靠近所期望的部位处的导管)。

[0295] 含有本文所述的抑制剂作为活性成分的本公开的药物组合物可以含有药学上可接受的载体或添加剂,这取决于施用途径。这些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、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、阿拉伯树胶、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。所使用的添加剂在适当时选自但不限于上述试剂或其组合,这取决于本公开的剂型。

[0296] 药物组合物的制剂将根据所选择的施用途径而变化(例如溶液、乳液)。包含待施用的抑制剂(例如抗体)的适当的组合物可以在生理学上可接受的媒介物或载体中制备。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。肠胃外媒介物可以包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖以及氯化钠、乳酸林格氏液(lactated Ringer's)或不挥发性油。静脉内媒介物可以包括各种添加剂、防腐剂或流体、营养物质或电解质补充剂。

[0297] 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,并且可以包括用于增强稳定性的其它蛋白质,如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等,所述蛋白质经过适度的化学修饰等。

[0298] 通过将具有所期望的纯度的抑制剂与任选的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第16版,0sol,A.编著(1980))混合,以冻干制剂或水溶液的形式制备抑制剂的治疗性制剂以用于储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐以及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,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;以及间甲酚);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、二糖以及其他碳水化合物,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(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

[0299] 本文的制剂还可以含有治疗具体的适应症所需的多于一种活性化合物,优选地具有互补活性而不会彼此不利影响的那些。这些分子适当地以有效用于预期目的的量组合存在。

[0300] 还可以将活性成分包封于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如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、纳米颗粒以及纳米胶囊)中或粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这样的技术公开于《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第16版,0sol,A.编著(1980)中。

[0301] 待用于体内施用的制剂必须是无菌的。这容易通过经由无菌滤膜过滤来实现。

[0302] 水性悬浮液可以含有活性化合物与适用于制造水性悬浮液的赋形剂的混合物。这些赋形剂是助悬剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯

吡咯烷酮、黄蓍胶以及阿拉伯树胶；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族醇的缩合产物（例如十七乙基-烯氧鲸蜡醇）、或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物（如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯）、或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇酐衍生的偏酯的缩合产物（例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。

[0303] 可以将本文所述的抗体冻干以用于储存并且在临用前在合适的载体中复原。这种技术已经被证实在常规免疫球蛋白的情况下是有效的。可以使用任何合适的冻干和复原技术。本领域技术人员应当了解的是，冻干和复原可能会导致不同程度的抗体活性损失并且可能必须对使用水平进行调整以作为补偿。

[0304] 本文所述的TGF $\beta$ 抗体和PD-1抗体可以被制备并且作为共同制剂被施用。在一个方面，所述抗体中的至少两种识别并且结合不同的抗原。在另一个方面，多种抗体中的至少两种可以特异性识别并且结合同一抗原的不同表位。

[0305] 适用于通过添加水来制备水性悬浮液的可分散性粉剂和颗粒剂提供了活性化合物与分散剂或润湿剂、助悬剂以及一种或多种防腐剂的混合物。合适的分散剂或润湿剂以及助悬剂的实例有上文已提到的那些。

[0306] 抗体在这些制剂中的浓度可以广泛地变化，例如从小于约0.5重量%，通常等于或至少约1重量%至多达15重量%或20重量%，并且将根据所选择的具体施用方式，主要基于流体体积、粘度等来选择。因此，可以制备用于肠胃外注射的典型药物组合物以含有1ml无菌缓冲水和50mg抗体。可以制备用于静脉内输注的典型组合物以含有250ml的无菌林格氏溶液和150mg抗体。用于制备可肠胃外施用的组合物的实际方法对于本领域技术人员来说将是已知的或显而易见的并且更详细地描述于例如《雷明顿药物科学 (Remington's Pharmaceutical Science)》，第15版，宾夕法尼亚州伊斯顿的麦克出版公司 (Mack Publishing Company, Easton, Pa.) (1980) 中。抗体的有效剂量在每次施用每公斤体重0.01mg至1000mg的范围内。

[0307] 药物组合物可以呈无菌可注射水性、油性悬浮液、分散液或用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂的形式。可以使用上文已经提到的那些合适的分散剂或润湿剂以及助悬剂，根据已知的技术配制悬浮液。无菌可注射制剂也可以是于无毒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，例如于1,3-丁二醇中的溶液。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇以及液体聚乙二醇等）、其合适的混合物、植物油、林格氏溶液以及等渗氯化钠溶液的溶剂或分散介质。此外，无菌的不挥发性油常规地被用作溶剂或悬浮介质。为了实现这个目的，可以使用任何温和的不挥发性油，包括合成甘油一酯或甘油二酯。此外，脂肪酸（如油酸）可以用于制备注射剂。

[0308] 在所有情况下，所述形式必须是无菌的并且必须是达到易于注射程度的流体。可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。它在制造和储存的条件下必须是稳定的并且必须经过防腐处理以防止微生物（如细菌和真菌）的污染作用。可以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、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下，将期望包括等渗剂，例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收剂，例如单硬脂酸

铝和明胶来使可注射组合物的吸收延长。

[0309] 可用于施用的组合物可以与摄取或吸收增强剂一起配制来增强它们的功效。这样的增强剂包括例如水杨酸盐、甘氨胆酸盐/亚油酸盐、羟乙酸盐、抑肽酶、杆菌肽、SDS、癸酸盐等。参见例如Fix (J.Pharm.Sci., 85:1282-1285 (1996)) ; 以及0liyai和Stella (Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol., 32:521-544 (1993))。

[0310] 抗体组合物被考虑用于抑制靶标活性,所述靶标活性包括靶标与它的同源受体或配体结合、靶标介导的信号转导等。具体来说,所述组合物在基本上无副作用的浓度表现出抑制特性,并且因此可用于长期治疗方案。举例来说,将抗体组合物与另一种更具毒性的细胞毒性剂共同施用可以对所治疗的病况或病症实现有益的抑制作用,同时有效地减少对患者的毒性副作用。

[0311] 此外,被考虑用于本公开中的组合物的亲水性和疏水性的特性是良好平衡的,从而增强了它们对于体外用途和特别是体内用途的效用,而缺乏这种平衡的其它组合物具有显著更小的效用。确切地说,被考虑用于本公开中的组合物在水性介质中具有适度的溶解性,从而容许在体内吸收和生物利用,同时在脂质中也具有一定程度的溶解性,从而容许所述化合物穿过细胞膜到达推定的作用部位。因此,所考虑的抗体组合物在它们可以被递送到靶抗原活性的部位时具有最大的有效性。

#### [0312] 施用和给药

[0313] 在一个方面,本公开的方法包括施用药物组合物的步骤。在某些实施方案中,药物组合物是无菌组合物。

[0314] 本公开的方法是使用任何医学上接受的手段来执行的以将治疗剂直接或间接引入到哺乳动物受试者体内,所述手段包括但不限于注射、口服摄入、鼻内、局部、透皮、肠胃外、吸入喷雾、经阴道或直肠施用。如本文所用的术语肠胃外包括皮下、静脉内、肌内和脑池内注射以及导管或输注技术。同样考虑了通过真皮内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射和/或在具体部位进行手术植入所进行的施用。

[0315] 在一个实施方案中,在需要治疗的癌症或受影响组织的部位处通过直接注射到所述部位中或经由可以在内部递送制剂的持续递送或持续释放机构进行施用。举例来说,在被植入到癌症部位附近或癌症部位处的本公开的制剂中可以包括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配置。

[0316] 也可以在多个部位向患者递送治疗性组合物。多次施用可以同时进行或可以在一段时间内施用。在某些情况下,提供治疗性组合物的连续流是有益的。另外的治疗可以是定期施用的,例如每小时一次、每天一次、每隔一天一次、每周两次、每周三次、每周一次、每2周一次、每3周一次、每月一次、或以更长的时间间隔施用。

[0317] 在本公开中还考虑了施用多种药剂,如抗体组合物联同如本文所述的第三药剂,包括但不限于化学治疗剂。

[0318] 在给定剂量中抑制剂或抗体组合物的量可以根据正在接受治疗施用的个体的体格以及所治疗的病症的特征而变化。在示例性治疗中,可能需要施用约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。这些浓度可以作为单次剂量或作为多次剂量施

用。首先在动物模型中,然后在临床测试中进行的标准剂量-反应研究揭示了用于特定疾病状态和患者群体的最佳剂量。

[0319] 在本公开中还考虑了,在给定剂量中TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂的量可以根据正在接受治疗施用的个体的体格以及所治疗的病症的特征而变化。这两种抑制剂组合物可以每1周-4周以0.1mg至15mg的剂量范围作为静脉内输注在30分钟-60分钟内施用直到疾病进展或不可接受的毒性为止。在各种体现中,剂量可以是1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg。

[0320] 还将明显的是,如果将传统治疗剂与本公开的治疗剂组合施用,那么可以对剂量作出改动。

[0321] 试剂盒

[0322] 作为另一个方面,本公开包括了试剂盒,所述试剂盒包括一种或多种化合物或组合物,所述化合物或组合物以有助于它们用于执行本公开的方法的方式包装。在一个实施方案中,这样的试剂盒包括本文所述的化合物或组合物(例如包含单独的靶标特异性抗体或靶标特异性抗体与另一种抗体或第三药剂的组合的组合物),所述化合物或组合物被包装在诸如密封瓶或器皿的容器中,所述容器上附着有或所述包装中包括了标签,所述标签描述了所述化合物或组合物在实施所述方法中的用途。优选的是,所述化合物或组合物以单位剂量型包装。所述试剂盒还可以包括适用于根据特定的施用途径或为了实施筛选测定来施用组合物的装置。优选的是,所述试剂盒容纳描述了抑制剂组合物的用途的标签。

[0323] 从以下实施例,本公开的另外的方面和细节将是显而易见的,所述实施例意图具有说明性而非限制性。

[0324] 实施例

[0325] 实施例1:化学诱导的皮肤鳞状细胞癌(cSCC)的TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂联合治疗。

[0326] 为了证实TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂联合治疗的作用,向FVB小鼠皮下注射化学诱导的KrasG13C驱动的cSCC肿瘤细胞系168(在体外培养≤2代)。当肿瘤达到约3mm-5mm直径时(植入后约2周-3周),经由腹膜内注射(i.p.)用单独的抗PD-1( $\alpha$ -PD-1)抗体(250 $\mu$ g,克隆:RMP1-14,目录号:BE0146,BioXCell公司)、单独的泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3(抗TGF $\beta$ )抗体(200 $\mu$ g)或组合的 $\alpha$ -PD-1抗体和泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3抗体处理小鼠,以4天时间间隔进行三次处理(在第0天、第4天以及第8天对小鼠进行注射,每组n=7)。随后使用卡尺测量肿瘤尺寸。与对照小鼠相比, $\alpha$ -PD-1单药治疗抑制肿瘤生长,但是在12天-14天之后肿瘤消退不持续。不同于 $\alpha$ -PD-1单药治疗, $\alpha$ -TGF $\beta$ 单药治疗显示出稳健的和持续的活性(>12天-14天)。虽然与匹配的IgG对照处理的小鼠相比, $\alpha$ -PD-1单药治疗和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 单药治疗这两者均诱导肿瘤消退,但是 $\alpha$ -PD-1和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 的组合作用平均来说大于单独的任一种试剂的作用(图1A,\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.0001)。肿瘤被分为 $\alpha$ -PD-1进展者或抗性('res')、 $\alpha$ -PD-1反应者或敏感性('sens')、 $\alpha$ -TGF $\beta$ 反应者(TGF $\beta$ )以及 $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TGF $\beta$ 组合反应者(PD-1TGF $\beta$ )。这些肿瘤中免疫细胞标志物的水平是作为占活细胞的百分比和作为占CD45+细胞的百分比来测量的以评估肿瘤浸润性免疫细胞的群体响应于药物的变化。在第8天,在用抑制剂进行第三次处理之后在每个群组2个-3个肿瘤中通过荧光激活细胞分选(FACS)测量CD45+、自然杀伤(NK)细胞、调节性T(Treg)细胞、CD4+以及CD8+ T细胞(图1B和1C)。升高的CD8+细胞数

被用作 $\alpha$ -TGF $\beta$ 和 $\alpha$ -PD-1抑制剂反应性的生物标志物。

[0327] 实施例2:单个肿瘤对免疫治疗的差异反应。

[0328] 来自图1的数据被分为“反应者”和“进展者”以显示对 $\alpha$ -PD-1免疫治疗和/或 $\alpha$ -TGF $\beta$ 免疫治疗的反应的范围(图2)。在 $\alpha$ -TGF $\beta$ 单药治疗以及 $\alpha$ -PD1和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 联合治疗的情况下,在7只经过处理的小鼠中的3只中观测到植入肿瘤的消退。此外,在组合的 $\alpha$ -PD1和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 处理的情况下,在约50%的病例中观测到完全的肿瘤消退,在给药后四周在没有另外的药物剂量的情况下没有进一步的肿瘤生长(即肿瘤尺寸持续减小)。

[0329] 这些结果显示 $\alpha$ -TGF $\beta$ 抗体和 $\alpha$ -PD-1抗体的组合在促进肿瘤消退方面,以及惊人地,在预防癌症复发方面比单一抗体治疗更有效。

[0330] 实施例3:在化学诱导(DMBA-TPA)的皮肤鳞状细胞癌(cSCC)小鼠中用 $\alpha$ -TGF $\beta$ / $\alpha$ -PD-1联合治疗减小肿瘤尺寸。

[0331] 除了使用同种异体移植模型之外,还使用直接化学诱导的致癌作用的小鼠皮肤模型来评估泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3 $\alpha$ -TGF $\beta$ / $\alpha$ -PD-1联合治疗的抗肿瘤作用。DMBA-TPA(12-O-十四烷酰基-佛波醇-13-乙酸酯)诱导的cSCC模型已经被很好地表征(Balmain A等,Princess Takamatsu Symp., 22:97-108, 1991; Burns PA等,Oncogene, 6(12):2363-9, 1991; Yuspa SH等,Dermatol Symp., 1(2):147-50, 1996; Frame S等,Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 353(1370):839-45, 1998)并且被广泛用于鉴定癌症发生和进展的遗传和分子机制,这些机制将不可能通过研究人类癌症或更简单的模型,如肿瘤同种异体移植物来获得。该模型是通过野生型小鼠中>90%的肿瘤中Hras密码子61的DMBA突变所引发的(Quintanilla M等,Nature., 322(6074):78-80, 1986)。随后用肿瘤促进剂TPA进行多次每两周一次的处理会刺激良性的恶变前乳头状瘤的生长。一定比例的乳头状瘤经过4个月-12个月的时间进展成癌瘤,并且在一些情况下,进展成高侵袭性梭形细胞肿瘤,它们已经丧失了它们的上皮细胞的许多特征。

[0332] 使用荧光素酶敲入小鼠的生物发光报告基因品系(p16(LUC)),在用 $\alpha$ -PD1抗体和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 抗体的组合处理小鼠之前,然后在处理之后测量化学诱导的cSCC的生长。p16-LUC小鼠报告p16(INK4a)基因的表达,该基因是Ras驱动的肿瘤细胞中的肿瘤抑制因子。所述报告基因是由早期赘生事件所激活,从而使得能够使用IVIS光学成像系统将肿瘤可视化和测量肿瘤尺寸。

[0333] 通过在第一周用DMBA局部处理3只小鼠两次并且在随后20周内用TPA处理来引发肿瘤,在约30周时观测到癌瘤生长。在用DMBA处理引发肿瘤之后在32周时对癌瘤进行手术切除。将小鼠成像并且将肿瘤尺寸测量5次(手术切除前:在第0周;以及手术切除后:在第8周、第12周、第21周以及第27周)。

[0334] 当所有小鼠均具有约15mm的癌瘤和小的肺转移(3mm×3mm)时,对癌瘤进行切除并且经由腹膜内注射(i.p.)用组合的 $\alpha$ -PD-1抗体(250 $\mu$ g,克隆:RMP1-14,BioXCell公司)和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 抗体(200 $\mu$ g)处理小鼠,以4天时间间隔进行三次处理(在第8天、第12天以及第16天对小鼠进行注射,n=3)。随后使用发光成像仪测量肿瘤尺寸。联合的 $\alpha$ -PD-1和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 抗体处理在所有3只小鼠中均引起肿瘤消退。

[0335] 针对细胞标志物对从小鼠切除的癌瘤进行免疫分型,在用抑制剂进行第三次处理之后在肿瘤中通过FACS测量CD45+、自然杀伤(NK)细胞、调节性T(Treg)细胞、CD4+以及CD8+

T细胞。肿瘤被分成 $\alpha$ -PD-1进展者、 $\alpha$ -PD-1反应者、 $\alpha$ -TGF $\beta$ 反应者以及 $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TGF $\beta$ 组合反应者。这些肿瘤中免疫细胞标志物的水平是作为占活细胞的百分比和作为占CD45+细胞的百分比来测量的以评估肿瘤浸润性免疫细胞的群体响应于药物的变化(图4)。对用单独的 $\alpha$ -PD-1、单独的 $\alpha$ -TGF $\beta$ 以及 $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TGF $\beta$ 组合进行的处理有反应的肿瘤显示出CD4+和CD8+ T细胞的水平显著增加,其中 $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TGF $\beta$ 组合反应性肿瘤显示出甚至更高水平的CD4+ T细胞子集。此外,单独的 $\alpha$ -TGF $\beta$ 和 $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TGF $\beta$ 组合反应性肿瘤显示出CD8+ T效应(Teff)/T调节性(Treg)CD45+细胞。升高的CD8+ T细胞数被用作 $\alpha$ -TGF $\beta$ 和 $\alpha$ -PD-1抑制剂反应性的生物标志物。

[0336] 实施例4:具有最大的突变负荷的化学诱导的Kras驱动的SCC肿瘤对 $\alpha$ -PD1和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 单药治疗和联合治疗有反应。

[0337] 在同基因FVB/N小鼠中使用化学诱导(DMBA/TPA)Kras驱动和Hras驱动或遗传引发(GEMM)Kras驱动的cSCC细胞系评价TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂单药治疗和联合治疗。化学诱导的肿瘤细胞系往往比遗传诱导的细胞系具有更多的突变。这些更高突变数更类似于人类肿瘤中的突变数(Westcott PW等,Nature,517:489-92,2015)。使用实施例1第[281]段中所述的方法,将以下化学诱导的细胞系:FVB-62、FVB-85、FVB-166、FVB-168、FVB-169与以下Kras驱动的GEMM引发的cSCC模型:FVB-1425、FVB-1428相比较,其中用 $\alpha$ -PD1单药治疗、 $\alpha$ -TGF $\beta$ 单药治疗或组合的 $\alpha$ -PD-1抗体和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 抗体(或对照抗体)将小鼠处理两次,一次在第0天并且一次在第4天,继而在第6天-第10天进行肿瘤免疫分型。这些实验的结果显示只有被报道携带最大突变负荷(即更大的每MB突变数,这更代表了人类肿瘤)的化学诱导的Kras驱动的SCC肿瘤对泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3和 $\alpha$ -PD1单药治疗和联合治疗有反应(图5)。处理敏感性的化学诱导的SCC肿瘤细胞系是具有KrasG13R突变的FVB-168和FVB-169。

[0338] 使用化学诱导的SCC肿瘤细胞系FVB-168,通过测量瘤瘤的减少来评价对泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3和 $\alpha$ -PD1单药治疗和联合治疗的反应并且表示为部分反应、完全反应或进展性疾病(图6A,来自两次独立实验的数据)。泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3和 $\alpha$ -PD1单药治疗将疾病进展抑制了约40%-50%。在单独的任一种治疗之间没有观测到疾病的显著性差异。然而,发现泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3和 $\alpha$ -PD1联合治疗与泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3或 $\alpha$ -PD1单药治疗相比在抑制疾病进展方面显著更有效。与对照动物相比,泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3和 $\alpha$ -PD1联合治疗使得疾病进展减少约90%并且与更好的总体存活率有关(图6B)。

[0339] 肿瘤被分成进展性癌瘤(即一个或多个肿瘤继续生长)或反应性癌瘤(即肿瘤生长被治疗抑制)。这些肿瘤中免疫细胞标志物的水平是作为占CD45+细胞的百分比测量的以评估肿瘤浸润性免疫细胞的群体响应于药物的变化。在第6天-第10天之间在用 $\alpha$ -PD1单药治疗、泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3单药治疗或组合的 $\alpha$ -PD-1和泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3(或对照抗体)处理后在每个群组的肿瘤中通过荧光激活细胞分选(FACS)测量CD8+效应( $T_{eff}$ )细胞、CD4+效应( $T_{eff}$ )细胞、CD4+调节性T( $T_{reg}$ )细胞以及 $T_{eff}/T_{reg}$ 的比率。 $\alpha$ -TGF $\beta$ 和 $\alpha$ -PD-1抑制引起CD8+和CD4+ T效应细胞的扩充(图6C)。

[0340] 这些结果显示具有类似于人类肿瘤的特征的肿瘤对用TGF $\beta$ 抑制剂和PD-1抑制剂的组合进行的处理有高度反应性并且联合治疗减少疾病的总体进展。TGF $\beta$ 抑制剂/PD-1抑制剂联合治疗还使肿瘤中细胞的免疫学特征变为更有利的效应T细胞与调节性T细胞的比率(Teff/Treg)。

[0341] 实施例5:在同种异体移植肿瘤模型中比较TGF $\beta$ 1,2特异性抗体与泛特异性TGF $\beta$ 1,2,3抗体和 $\alpha$ -PD-1联合治疗。

[0342] 为了比较阻断TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2以及TGF $\beta$ 3的抗体与仅阻断TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2的抗体作为单药治疗或在PD-1抑制剂联合治疗中的作用,在Kras驱动的SCC的同种异体移植模型中测定泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3抗体和TGF $\beta$ 1,2特异性抗体。

[0343] 向FVB小鼠(n=70)皮下注射cSCC肿瘤细胞系Hras168( $1.25 \times 10^4$ 个细胞)。一旦肿瘤是明显的(约0.5cm直径,植入后约2周),就将小鼠分为含有具有相似体重和肿瘤尺寸的小鼠的六个实验组(每组n=9-10)。在第0天、第4天以及第8天,用每剂200 $\mu$ g的泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3或 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2和/或每剂250 $\mu$ g的 $\alpha$ -PD-1和/或相同浓度的匹配对照抗体,用三次连续剂量处理小鼠。六个实验组包括:1)对照抗体;2) $\alpha$ -PD1;3) $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2特异性抗体;4)组合的 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2特异性抗体和 $\alpha$ -PD-1;5)泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3抗体;6)组合的泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3抗体和 $\alpha$ -PD-1,经由腹膜内注射(i.p.)。随后使用卡尺测量肿瘤尺寸。与对照相比,泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2单药治疗这两者均抑制肿瘤生长(即肿瘤尺寸减小)并且这两者均比单独的 $\alpha$ -PD-1抗体更有效。此外,泛特异性 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2,3抗体和 $\alpha$ -TGF $\beta$ 1,2抗体这两者在单药治疗和与 $\alpha$ -PD-1的联合治疗中均显示出彼此相当的抗肿瘤活性(图7)。

[0344] 这些结果显示可以阻断TGF $\beta$ 1,2,3亚型或TGF $\beta$ 1,2亚型的抗体与PD-1抑制剂组合在减轻受试者的肿瘤负荷方面是有效的。

[0345] 如上述说明性实施例中所示出的本公开中的许多改动和变化预期被本领域技术人员想到。因此,只有如所附权利要求书中所出现的这样的限制才应当被施加到本公开上。

## 序列表

<110> Mirza等

<120> 使用TGF- $\beta$  抑制剂和PD-1抑制剂治疗癌症

<130> 27129/49343

<150> US 62/191, 797

<151> 2015-07-13

<150> US 62/143, 016

<151> 2015-04-03

<160> 30

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<223> 克隆XPA. 42. 068重链

<400> 1

caggttcagc tggtgcaagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcagg cttctggata cacccitcacc ggctactiata tgcactgggt gcgcacaggcc 120

[0001] cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acactgggtgg cacaactat 180

gcacagaagt ttccaggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcg cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagatcatc 300

ctgtggctgg ttccctctga tgctttgtat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360

tcttca 366

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 克隆XPA. 42. 068重链

<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> (57)..(111)

<223> H-CDR3

&lt;400&gt; 2

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	Thr	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	Phe	Leu	Trp	Leu	Val	Pro	Ser	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp
					100			105				110			

Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
					115			120						

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; DNA

[0002] &lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成核苷酸

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; 克隆XPA.42.068轻链

&lt;400&gt; 3

tcttcgtggcc tgcactcagcc accctcagtg tccgtggccc caggagagaa ggccaggatt 60

accgtgggg ggaataacat tggacgtaaa agtgtacatt ggtaccagca gagggcaggc 120

caggccccctg ttgtggctt ctactatgtat agagtcagac cctcagggat ccctgagcga 180

tttctggctt ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaccagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actattttg tcaggtgtgg gataacacta gtgagcatgt ggtcttcggc 300

ggaggcaccc agctgaccgt cctaggc 327

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

[0002] &lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成肽

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_FEATURE

&lt;223&gt; 合成肽

<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> 4

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

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

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

Tyr	Asp	Arg	Val	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
								55					60		

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

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Asn	Thr	Ser	Glu	His
								85					95		

Val	Val	Phe	Gly	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Gly				
								100			105				

<210> 5  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成核苷酸

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 克隆XPA.42.089重链

<400> 5  
 caggtgcagc tggcacatgc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcc tc ggtgaagg tc  
 60  
 tccatcgaaagg ctatcgagg cacatcagc agcatatgta tc agtgcgggt gcgcacagg cc  
 120  
 cctggacaag ggcttgatgt gatgggaggat atcaatccata tc ttttgtac agcaaactac  
 180  
 gcacagaagt tccaggccag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcc tac  
 240  
 a tggagactga gcagccctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggggacta  
 300  
 tggggagg ttc gggcccttcc gtcggcttac tggggccagg gaacccttgtt caccgttcc  
 360  
 tca  
 363

110  
 -+1 -+- .

<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 克隆XPA. 42. 089重链

<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> 6

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

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

[0004] Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Glu Val Arg Ala Leu Pro Ser Val Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 7  
<211> 327  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成核苷酸

<220>  
<221> nise\_feature  
<223>  $\frac{1}{2} \text{N.A. } \pm 0.089$  纵链

Причины, по которым вспомогательные транспортные средства не могут быть включены в

	acctgtgggg caaatgacat tggaagtaaa agtgtccact ggtaccagca gaaggcaggc	120
	caggccccig tactggtcgt ctctgaagat atcatccggc cctcaggat ccctgagcga	180
	atctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg	240
	gatgaggccg actattactg tcaagtttg gatagggata gtgatcaata tgtcttgga	300
	actgggacca aggtcaccgt cctaggc	327
	<210> 8	
	<211> 109	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成肽	
	<220>	
	<221> MISC FEATURE	
	<223> 克隆XPA. 42.089轻链	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (26)..(31)	
	<223> L-CDR1	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (49)..(51)	
	<223> L-CDR2	
	<220>	
[0005]	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (88)..(97)	
	<223> L-CDR3	
	<400> 8	
	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
	1 5 10 15	
	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Ala Asn Asp Ile Gly Ser Lys Ser Val	
	20 25 30	
	His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Ser	
	35 40 45	
	Glu Asp Ile Ile Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile 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 Arg Asp Ser Asp Gln	
	85 90 95	
	Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105	
	<210> 9	
	<211> 366	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成核苷酸

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; 克隆XPA.42.681重链

&lt;400&gt; 9

caggttcagc tggtgcaagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcc tc agtgaagg tc 60

tcctgcagg cttctggata cacccacc ggcatactata tgcactgggt gcgcacaggcc 120

ccctggacaag ggcttgatgg gatggatgg atcaacccta acactggatgg cacaaactat 180

gcacagaagt ttccaggcag ggtcaccatg accaggaca cgtccatcg cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgc acggccgtt attactgtgc gagatcatc 300

ctgtggctgg ttcccctgta tgctttgat atctgggcc aaggacaat ggtcaccgtc 360

tcttca 366

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成肽

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 克隆XPA.42.681重链

[0006]

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (26)..(33)

&lt;223&gt; H-CDR1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (51)..(58)

&lt;223&gt; H-CDR2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (97)..(111)

&lt;223&gt; H-CDR3

&lt;400&gt; 10

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

Met Glu Leu Ser Val Leu Asp Ser Asp Asp Ile Ala Val Thr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
 100                    105                    110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115                    120

<210> 11  
 <211> 327  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成核苷酸

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 克隆XPA. 42. 681轻链

<400> 11  
 tccttatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc cagggaaagac ggccaggatt        60  
 acctgtgggg gaaacaacat tggattttaga agtgtgcact ggtaccaaca gaagtcaggc        120  
 caggccccctg tcctggcat ctatitgtat cgcgcggc cctcaggat ccctgagcga        180  
 ttctctgcct ccaactctga gaacacggcc accctgacca tcaggagggt cgaagccggg        240  
 gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtgaca gtgatgatct agtcttcggc        300  
 ggaggcaccc agctgaccgt cctaggt        327

[0007]

<210> 12  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成肽

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 克隆XPA. 42. 681轻链

<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> 12

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

Thr Ala Arg Tyr Ile Val Gln Glu Asp Asn Glu Gly Phe Arg Ser Val  
 20                    25                    30

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

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

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

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

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 克隆XPA.42.068-H-CDR1

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr  
 1 5

[0008]

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 克隆XPA.42.068-H-CDR2

<400> 14

Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr  
 1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 克隆XPA.42.068-H-CDR3

<400> 15

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 16  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成肽

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 克隆XPA.42.068-L-CDR1

<400> 16

Asn Ile Gly Arg Lys Ser  
 1 5

<210> 17  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成肽

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 克隆XPA.42.068-L-CDR2

<400> 17

[0009] Tyr Asp Arg  
 1

<210> 18  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成肽

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 克隆XPA.42.068-L-CDR3

<400> 18

Gln Val Trp Asp Asn Thr Ser Glu His Val  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成肽

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 克隆XPA.42.068-L-CDR1

<400> 19

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
1 5

<210> 20  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 克隆XPA.42.089-H-CDR2

<400> 20

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
1 5

<210> 21  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 克隆XPA.42.089-H-CDR3

<400> 21

[0010] Ala Arg Gly Leu Trp Glu Val Arg Ala Leu Pro Ser Val Tyr  
1 5 10

<210> 22  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 克隆XPA.42.089-L-CDR1

<400> 22

Asp Ile Gly Ser Lys Ser  
1 5

<210> 23  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 克隆XPA.42.089-L-CDR2

<400> -

Glu Asp Ile  
1

<210> 24  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 克隆XPA. 42. 089-L-CDR3

<400> 24

Gln Val Trp Asp Arg Asp Ser Asp Gln Tyr  
1 5 10

<210> 25  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 克隆XPA. 42-681-H-CDR1

[0011] <400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr  
1 . 5

<210> 26  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 克隆XPA. 42-681-H-CDR2

<400> 26

Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr  
1 5

<210> 27  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 克隆XPA. 42-681-H-CDR3

<400> 27

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10 15

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 克隆XPA. 42-681-L-CDR1

<400> 28

Asn Ile Gly Phe Arg Ser  
1 5

<210> 29

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

[0012]

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 克隆XPA. 42-681-L-CDR2

<400> 29

Phe Asp Arg

1

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 克隆XPA. 42-681-L-CDR3

<400> 30

Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Asp Leu Val  
1 5 10

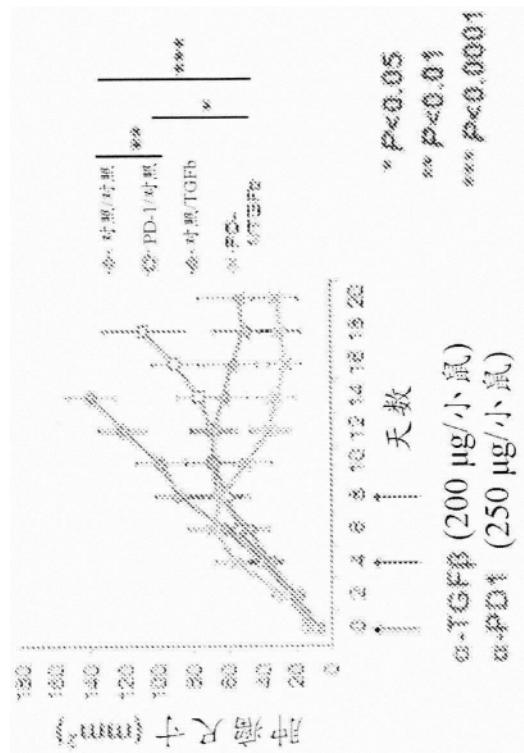


图1A

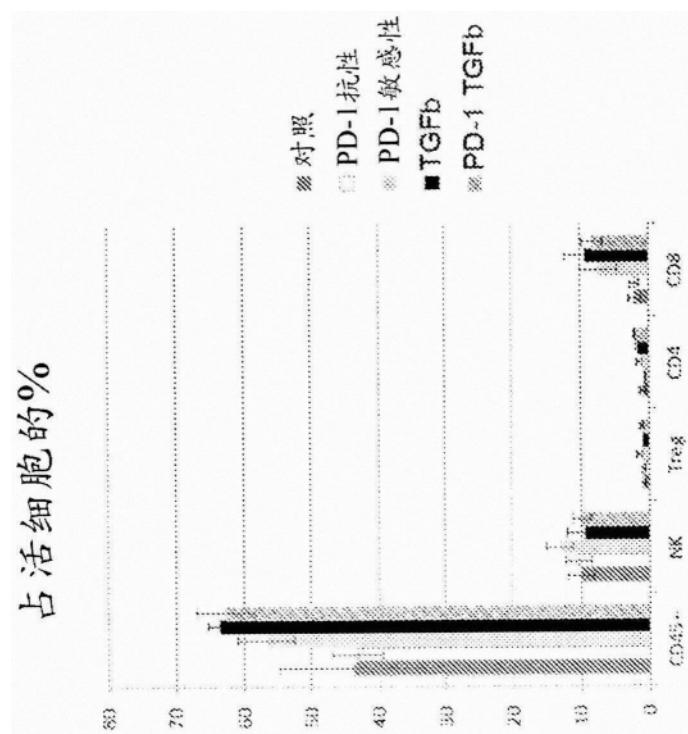


图1B

占CD45+的%

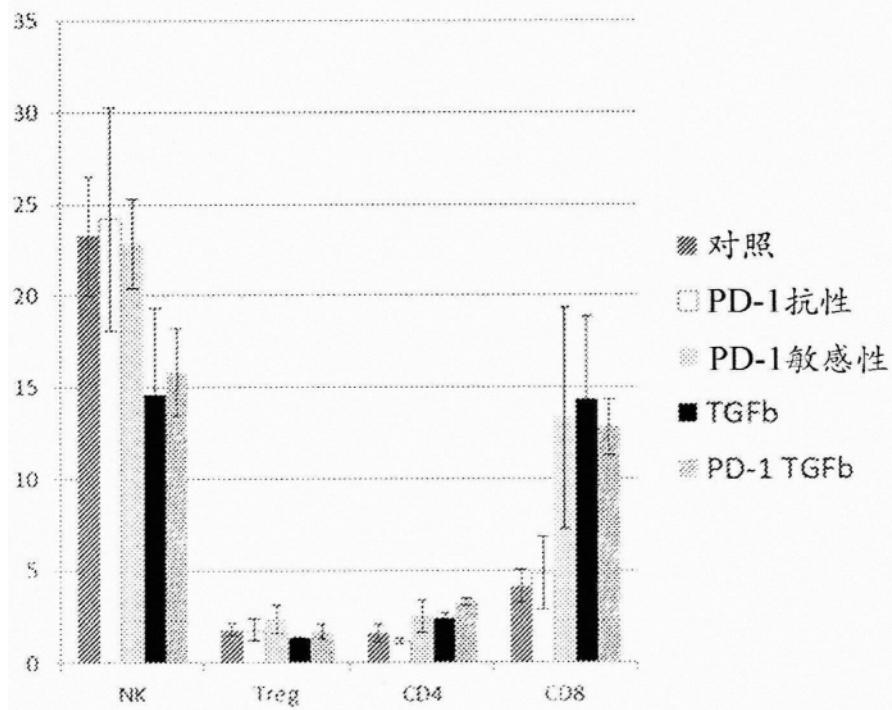


图1C

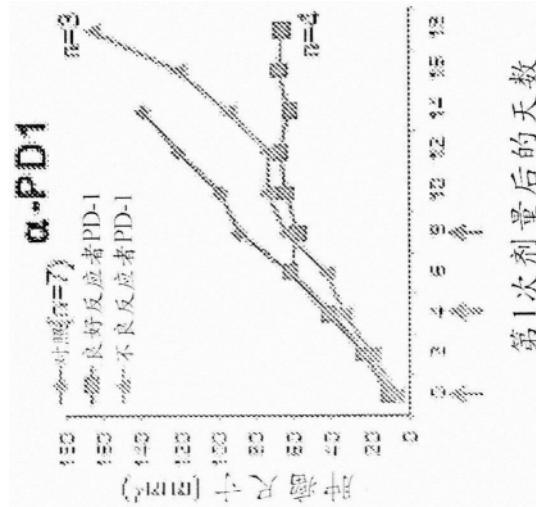
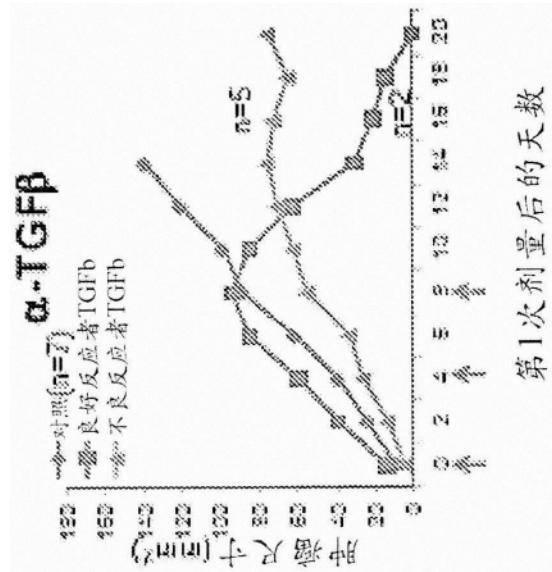
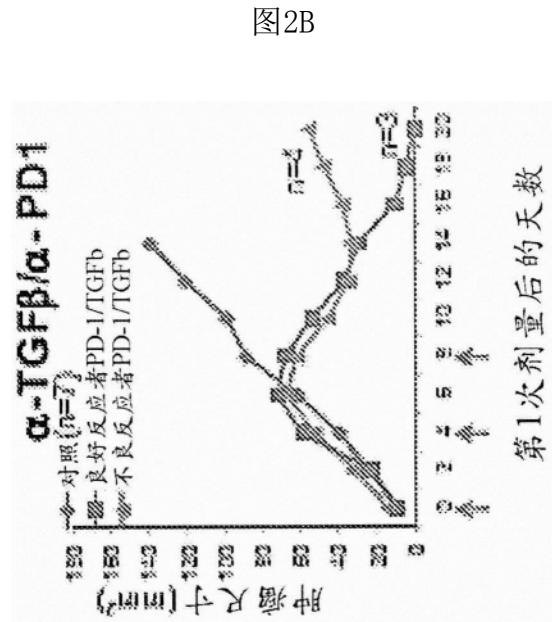


图2A



第1次剂量后的天数



第1次剂量后的天数

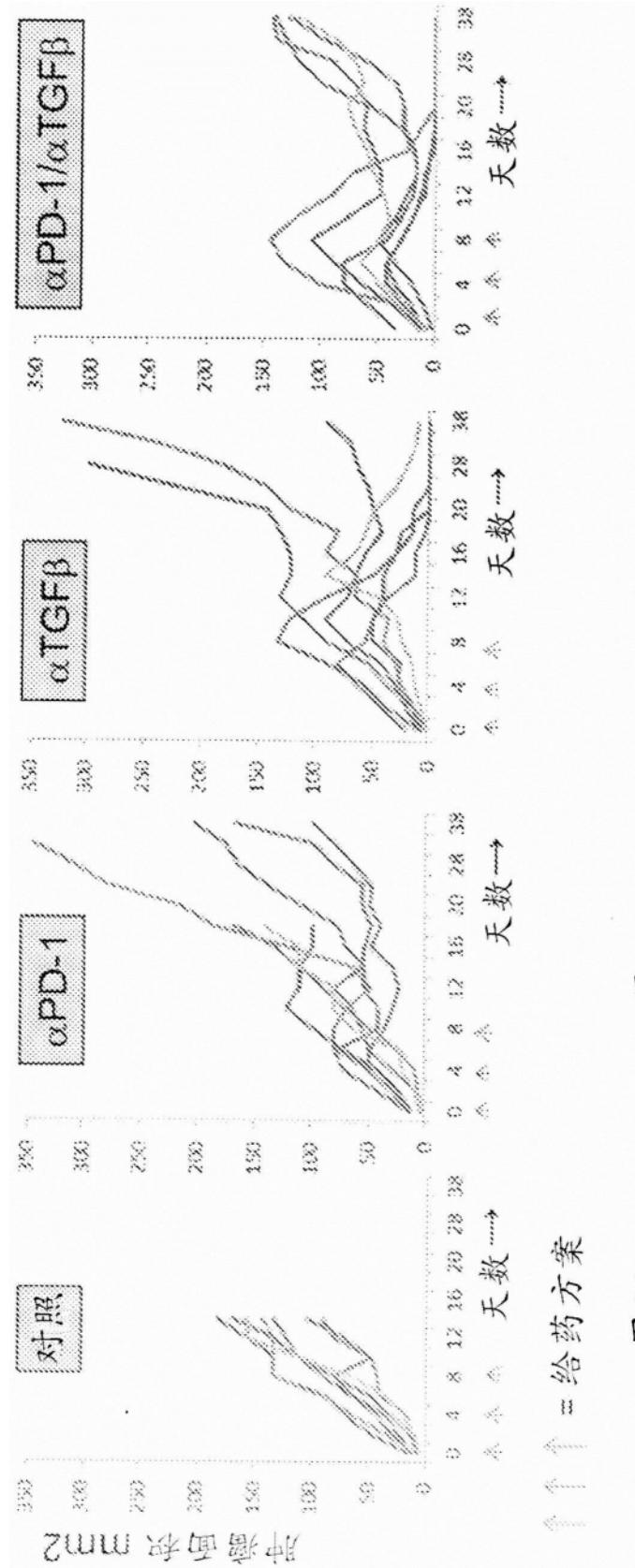


图 3A

图 3B

图 3C

图 3D

↑ = 给药方案  
↓ = 给药方案

## Hras 168 免疫表型分析

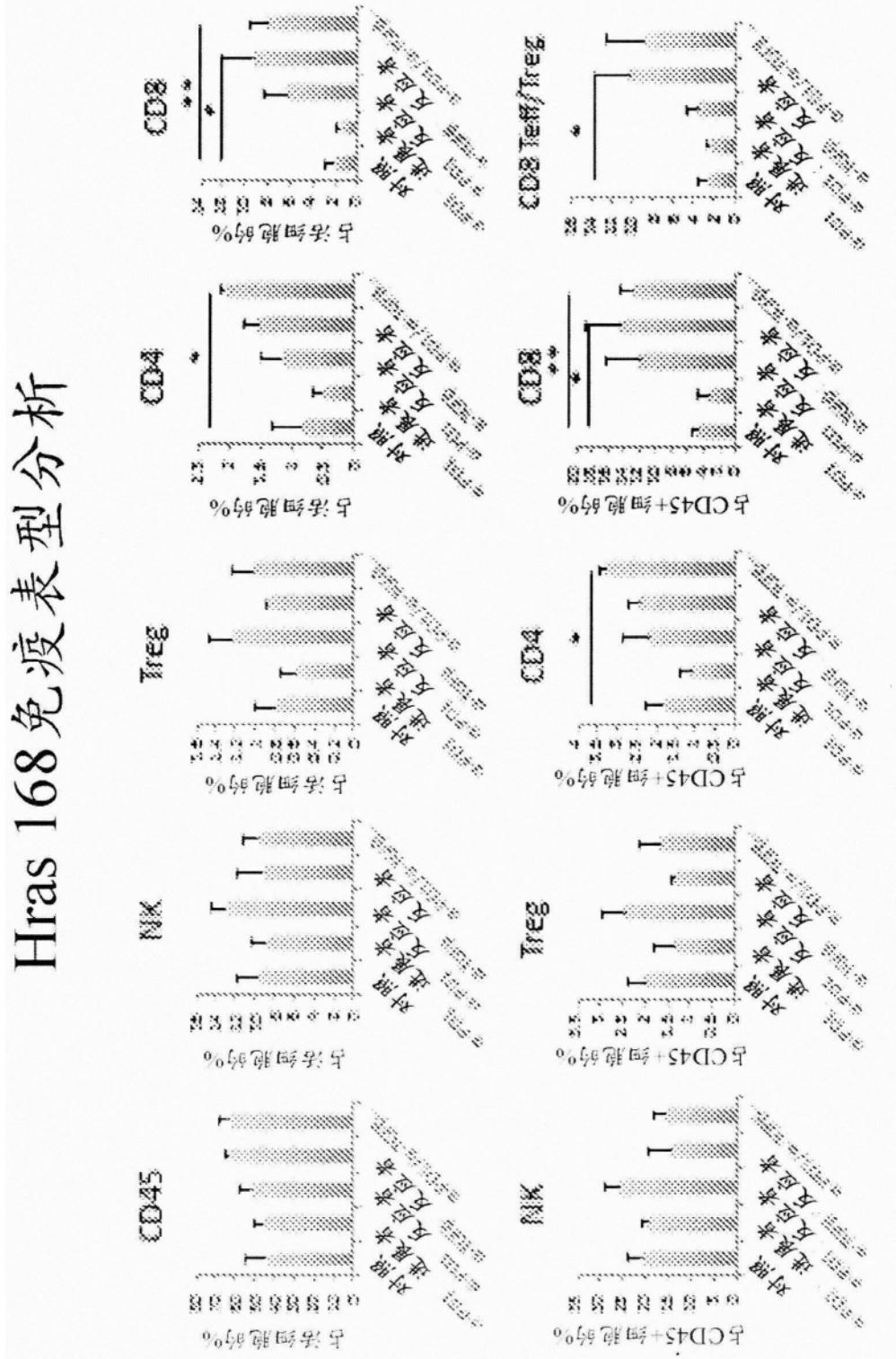


图4

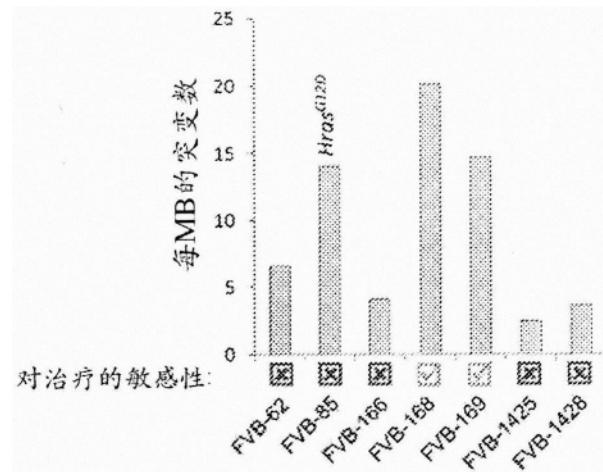


图5

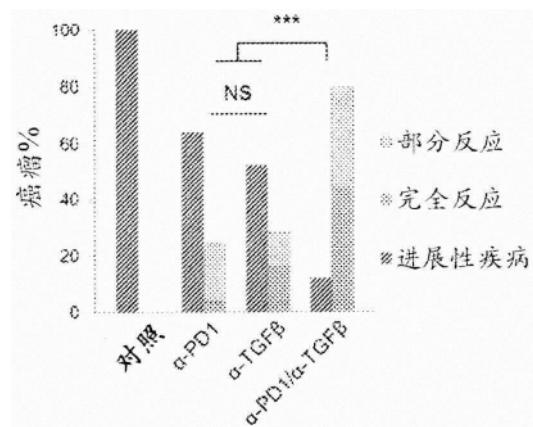


图6A

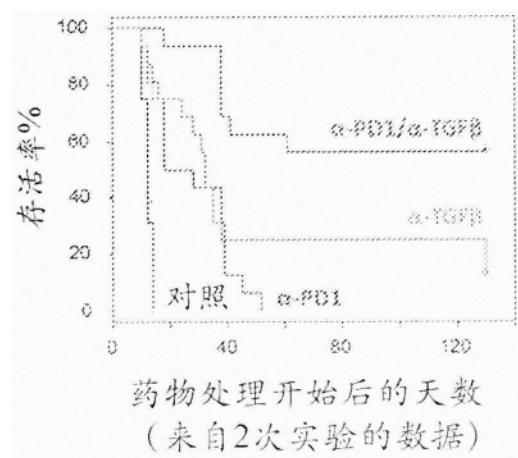


图6B

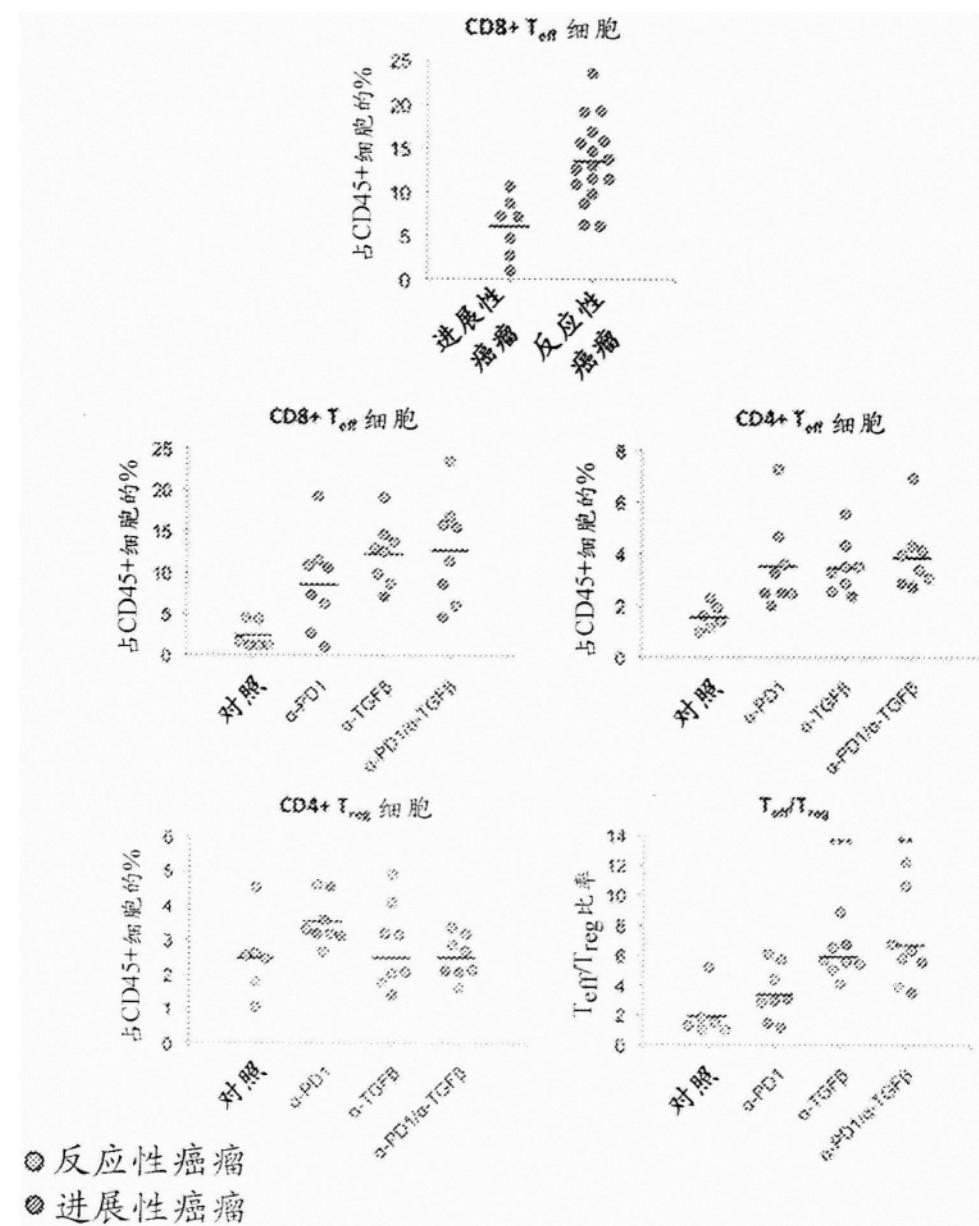


图6C

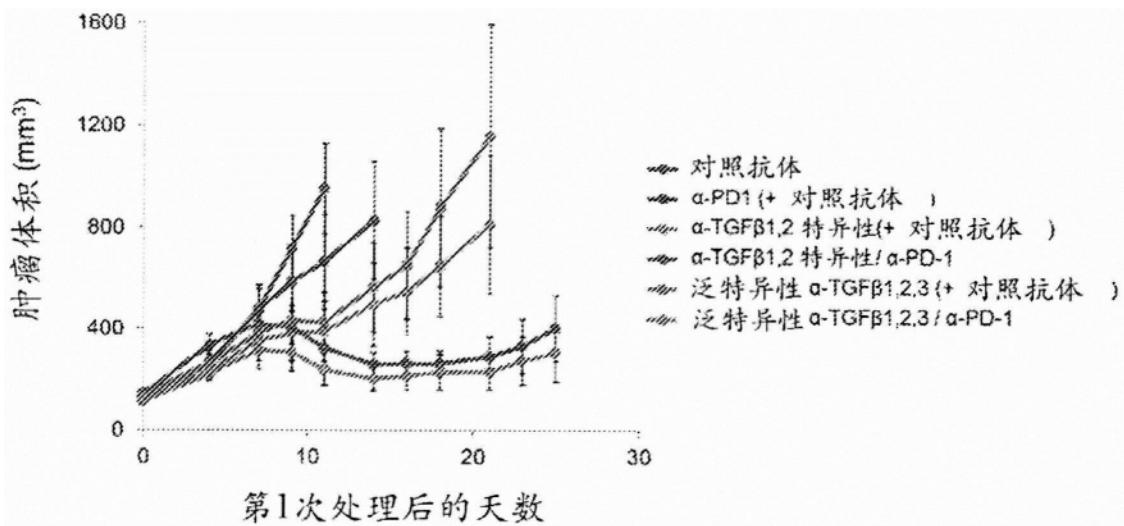


图7