



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101203241 B

(45) 授权公告日 2012. 02. 22

(21) 申请号 200680021851. 8

C07H 21/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 04. 19

C12P 21/08 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/673, 070 2005. 04. 19 US

(56) 对比文件

WO 2004073656 , 2004. 09. 02,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 12. 18

审查员 李康琦

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/015145 2006. 04. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02006/113909 EN 2006. 10. 26

(73) 专利权人 西雅图基因公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 C·麦克多纳格 P·卡特

J·麦基切恩 C·-L·劳

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 范征

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

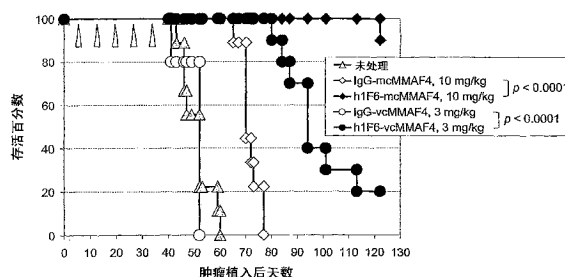
权利要求书 2 页 说明书 44 页 附图 13 页

(54) 发明名称

人源化抗-CD70 结合物和其应用

(57) 摘要

本发明公开了 CD70 结合物, 如人源化抗-CD70 抗体及其片段和衍生物, 它们对 CD70 表达细胞产生细胞毒、细胞抑制和免疫调节作用, 还公开了包含所述抗体、片段或衍生物的药物组合物和药盒。也公开了治疗表达 CD70 的癌症和免疫病的方法, 所述方法包括给予对象所述 CD70 结合物或药物组合物。



1. 一种特异性结合于人 CD70 的抗体或其抗原结合片段,其包含人源化重链可变区氨基酸序列和人源化轻链可变区氨基酸序列,所述人源化重链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18、或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137 所列的氨基酸序列构成,或由与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18、或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137 所列的氨基酸序列相同但在构架区有一个保守性氨基酸取代的序列构成;所述人源化轻链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列构成,或由与 SEQ ID NO:24 相同但在构架区有一个保守性氨基酸取代的序列构成。

2. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述人源化重链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:14 的序列构成,所述人源化轻链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:24 的序列构成。

3. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述人源化重链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18、或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137 的氨基酸序列构成,所述人源化轻链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列构成。

4. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,其包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,所述人源化重链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-467、SEQ ID NO:8 的氨基酸 20-467、SEQ ID NO:12 的氨基酸 20-467、SEQ ID NO:16 的氨基酸 20-467 或 SEQ ID NO:20 的氨基酸 20-467 构成,所述人源化轻链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:26 的氨基酸 21-238 构成。

5. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,它是抗原结合片段,其中所述人源化重链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18、或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137 的氨基酸序列构成,所述人源化轻链可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列构成。

6. 如权利要求 5 所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗原结合片段是 scFv、双抗体、Fab 或 scFv-Fc。

7. 如权利要求 1、4 和 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含抗体效应物结构域。

8. 如权利要求 7 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体效应物结构域介导 ADCC、ADCP 或 CDC。

9. 如权利要求 8 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体效应物结构域介导 ADCP。

10. 如权利要求 7 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体效应物结构域是人抗体效应物结构域。

11. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段偶联于治疗剂。

12. 如权利要求 11 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述治疗剂是化疗药或免疫调节剂。

13. 如权利要求 12 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述治疗剂是化疗药。

14. 如权利要求 11 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述治疗剂是 MMAE 或

MMAF。

15. 如权利要求 12 所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述治疗剂是免疫调节剂。

16. 一种用于治疗表达 CD70 的癌症或免疫病的药物组合物,所述组合物含有权利要求 1-15 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和至少一种药学相容性成分,所述表达 CD70 的癌症或免疫病选自霍奇金病、成胶质细胞瘤、肾细胞癌、鼻咽癌、胶质瘤、骨髓瘤和淋巴瘤。

17. 一种编码权利要求 1-15 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的分离多核苷酸。

18. 一种试剂盒,其包含权利要求 1-15 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,以及使用所述抗体或其抗原结合片段检测生物样品中的 CD70 蛋白的说明书。

19. 权利要求 1-15 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗人对象的癌症的药物中的应用,所述癌症选自霍奇金病、成胶质细胞瘤、肾细胞癌、鼻咽癌、胶质瘤、骨髓瘤和淋巴瘤。

20. 如权利要求 19 所述的应用,其特征在于,所述药物还包含治疗剂。

人源化抗-CD70 结合物和其应用

[0001]

相关申请

[0002] 本申请要求 2005 年 4 月 19 日提交的美国临时专利申请 60/673,070 的优先权,将其全部内容纳入本文作参考。

[0003]

发明背景

[0004] CD70 是各种正常和恶性细胞类型表达的细胞膜-结合性分泌分子的肿瘤坏死因子 (TNF) 家族成员。CD70 的一级氨基酸 (AA) 序列预测了跨膜 II 型蛋白,其羧基端暴露于细胞外,氨基端在质膜的胞浆一侧 (Bowman 等,1994, J. Immunol. 152 :1756-61 ;Goodwin 等,1993, Cell 73 :447-56)。人 CD70 由 20AA 胞质结构域、18AA 跨膜结构域和含有两个可能的 N 连接糖基化位点的 155AA 胞外结构域组成 (Bowman 等,同上 ;Goodwin 等,同上)。用抗-CD70 抗体对表达同位素标记的 CD70 的细胞进行特异性免疫沉淀,产生 29 和 50kDa 的多肽 (Goodwin 等,同上 ;Hintzen 等,1994, J. Immunol. 152 :1762-73)。根据它与 TNF- α 和 TNF- β 的同源性 (尤其是结构链 C、D、H 和 I),预计 CD70 具有三聚体结构 (Petsch 等,1995, Mol. Immunol. 32 :761-72)。

[0005] 最初的免疫组织学研究揭示出,CD70 在生发中心 B 细胞和扁桃体、皮肤和内脏中的罕见 T 细胞上表达 (Hintzen 等,1994, Int. Immunol. 6 :477-80)。后来,有报道称 CD70 在最近抗原活化的 T 和 B 淋巴细胞的细胞表面上表达,去除抗原刺激后其表达降低 (Lens 等,1996, Eur. J. Immunol. 26 :2964-71 ;Lens 等,1997, Immunology 90 :38-45)。在淋巴系统中,活化的天然杀伤细胞 (Orengo 等,1997, Clin. Exp. Immunol. 107 :608-13) 和小鼠成熟外周血树突细胞 (Akiba 等,2000, J. Exp. Med. 191 :375-80) 也表达 CD70。在非淋巴谱系中,在胸腺髓状上皮细胞中检测到 CD70 (Hintzen 等,1994, 同上 ;Hishima 等,2000, Am. J. Surg. Pathol. 24 :742-46)。

[0006] 正常非造血细胞上不表达 CD70。在生理条件下,CD70 表达大多限于最近抗原活化的 T 和 B 细胞,抗原刺激终止后其表达下调。来自动物模型的证据表明,CD70 可能会引起免疫病,如类风湿性关节炎 (Brugnoni 等,1997, Immunol. Lett. 55 :99-104)、牛皮癣性关节炎 (Brugnoni 等,1997, Immunol. Lett. 55 :99-104) 和狼疮 (Oelke 等,2004, Arthritis Rheum. 50 :1850-60)。除可能在炎症反应中起作用外,CD70 也表达于各种转化细胞,包括淋巴瘤 B 细胞、霍奇金和里-施细胞、神经来源的恶性细胞和许多癌。

[0007] 因此,需要可对 CD70- 表达细胞产生临床上有用的细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用的,特别是不会对非 CD70 表达细胞产生不良影响的抗-CD70 抗体和其它 CD70 结合物。这种化合物是表达 CD70 的癌症或 CD70- 表达细胞介导的免疫病的有用治疗剂。(本申请中对任何参考文献的引用并不意味着承认该参考文献是本申请的现有技术。)

[0008]

发明概述

[0009] 本发明提供了 CD70 抗体和相关性 CD70 结合物,以及有关用这种结合物预防或治疗表达 CD70 的癌症和存在 CD70- 表达细胞的免疫病的方法。单独的 CD70 结合物或与治疗剂联用时,对 CD70- 表达细胞产生细胞毒、细胞抑制和 / 或免疫调节作用。

[0010] 一方面,提供了 CD70 结合物。CD70 结合物可以是 (例如) 抗体。在一些实施方式

中,所述结合物包括至少介导对象的 ADCC、ADCP 或 CDC 应答的至少一种效应物结构域。在一些实施方式中,所述结合物在没有偶联于治疗剂的情况下行使细胞抑制、细胞毒或免疫调节作用。在一些实施方式中,所述结合物偶联于具有细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用的治疗剂。该抗体可与单克隆抗体 1F6 或 2F2 竞争结合 CD70。

[0011] 在另一方面,提供了一种治疗对象的表达 CD70 的癌症的方法。所述方法通常包括给予所述对象有效量的 CD70 结合物。在一些实施方式中,所述结合物包括至少介导对象产生 ADCC、ADCP 或 CDC 应答的至少一种效应物结构域。在一些实施方式中,所述结合物在没有偶联于治疗剂的情况下行使细胞抑制、细胞毒或免疫调节作用。在一些实施方式中,所述结合物偶联于具有细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用的治疗剂。

[0012] 所述 CD70 结合物可以是(例如)抗体。所述抗体可包括例如人 IgM 或 IgG 抗体的效应物结构域。IgG 抗体可以是(例如)人 IgG1 或 IgG3 亚型。在一些实施方式中,所述抗体包括人恒定区。在一些实施方式中,所述 CD70 结合物与单克隆抗体 1F6 或 2F2 竞争结合 CD70。在其它实施方式中,所述抗体是人源化 1F6。在其它实施方式中,所述抗体是人源化 2F2。所述抗体可以是(例如)单价、二价或多价。

[0013] 表达 CD70 的癌症可以是:肾肿瘤、B 细胞淋巴瘤、结肠癌、霍奇金病、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、鼻咽癌、脑肿瘤或胸腺癌。肾肿瘤可以是(例如)肾细胞癌。脑肿瘤可以是(例如)胶质瘤、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤或脑膜瘤。所述对象可以是(例如)哺乳动物,如人。

[0014] 在另一方面,提供了一种治疗免疫病的方法。所述方法包括给予对象有效量的 CD70 结合物。在一些实施方式中,该结合物包括至少介导对象产生 ADCC、ADCP 或 CDC 应答的至少一种效应物结构域。在一些实施方式中,该结合物在没有偶联于治疗剂的情况下行使细胞抑制、细胞毒或免疫调节作用。在一些实施方式中,所述结合物偶联于具有细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用的治疗剂。所述 CD70 结合物可以是(例如)抗体。该抗体可包含(例如)人 IgM 或 IgG 抗体的效应物结构域。所述 IgG 抗体可以是(例如)人 IgG₁ 或 IgG₃ 亚型。在一些实施方式中,该抗体包括人恒定区。

[0015] 所述免疫病可以是(例如)T 细胞-介导的免疫病。在一些实施方式中,所述 T 细胞介导的免疫病涉及表达 CD70 的活化 T 细胞。在一些实施方式中,给予抗体-药物偶联物不会大量消耗静息 T 细胞。T 细胞-介导的免疫病也可以是(例如)类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、I 型糖尿病、哮喘、特应性皮炎、过敏性鼻炎、血小板减少性紫癜、多发性硬化、牛皮癣、舍格伦综合征、桥本甲状腺炎、格雷夫斯病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、结核病或移植物抗宿主病。在其它实施方式中,所述免疫病是活化 B-淋巴细胞病。所述对象可以是(例如)哺乳动物,如人。

[0016] 在一个相关方面,也提供了用于治疗表达 CD70 的癌症或免疫病的药物组合物。所述组合物包含 CD70 结合物和至少一种药学相容性成分。还提供了一种药盒,其包括含有 CD70 结合物的容器和含有药学上可接受的稀释剂的第二容器,其中所述结合物是冻干的。

[0017] 参照以下发明详述、本发明具体实施方式的非限制性实施例以及附图和序列表可以更全面地理解本发明。

[0018]

附图简要说明

[0019] 图 1 是人源化 1F6V_H 人源化变体 hV_HE 和 hV_HJ 与 1F6mV_H 和人种系 V_H 外显子 V_H1-2 和 J_H 外显子 JH6 的比对。在比对中, <•> 表示该氨基酸与鼠残基相同。hV_HJ 的 H46 上突出显示的赖氨酸残基 (K) 表示突变回鼠残基。下划线的氨基酸残基表示根据 Kabat 定义在 CDR1 和 CDR2 中的位置, 而框内残基表示用 Chothia 定义鉴定的相应 CDR 中的位置。位置 37、39、45、47、95 和 97 上的 <^> 表示参与 V_H/V_L 接界面的残基。

[0020] 图 2 是人源化 1F6V_H 人源化变体 hV_HH 和 hV_HM 与 1F6mV_H 和人种系 V_H 外显子 V_H1-18 和 J_H 外显子 JH6 的比对。在比对中, <•> 表示该氨基酸与鼠残基相同。hV_HM 的 H46、H67、H68、H69、H70 和 H71 上突出显示的残基表示突变回鼠残基。相似地, hV_HH 的 H67、H68、H69、H70、H71、H80、H81、H82 和 H82A 上突出显示的残基表示突变回鼠残基。下划线的氨基酸残基表示根据 Kabat 定义在 CDR1、CDR2 和 CDR3 中的位置, 而框内残基表示用 Chothia 定义鉴定的相应 CDR 中的位置。位置 37、39、45、47、98 和 100 上的 <^> 表示参与 V_H/V_L 接界面的残基。

[0021] 图 3 是人源化 1F6V_L 变体 hV_LA 与 1F6mV_L 和人种系 V_K 外显子 B3 和 J_K 外显子 J_K-1 的比对。在比对中, <•> 表示该氨基酸与鼠残基相同。下划线的氨基酸残基表示根据 Kabat 定义在 CDR1、CDR2 和 CDR3 中的位置, 而框内残基表示用 Chothia 定义鉴定的相应 CDR 中的位置。位置 42、44、50、52 和 93 上的 <^> 表示参与 V_H/V_L 接界面的残基。

[0022] 图 4A 和 4B 显示人源化 1F6 抗-CD70 抗体介导抗体-依赖性细胞毒作用 (ADCC)。用抗体包被 Na₂⁵¹CrO₄- 标记的靶细胞 (WIL2-S B 淋巴样干细胞、786-0 肾细胞癌细胞和 769-P 肾细胞癌细胞), 并以 10 个 CD16⁺(Fc γ III 受体) 细胞比 1 个靶细胞的效应物: 靶点比与外周血单核细胞 (PBMC) 一起孵育。4 小时后, 在闪烁计数器上测定裂解细胞的上清液。用下式计算特异性裂解百分数 {(受试样品 cpm- 自发性 cpm) ÷ (总 cpm- 自发性 cpm)} × 100。点代表一式三份样品的平均值 ± 标准差。图 4A 显示了与非结合抗体对照 hIgG₁ 和鼠 1F6 抗体相比, 人源化 1F6 变体 HHLA、HJLA 和 HELA 介导的 ADCC 活性。图 4B 显示了嵌合 1F6 和人源化 1F6 变体 HJLA 和 hIgG₁ 介导的肾细胞癌细胞系的抗体导向的裂解。

[0023] 图 5 显示了人源化 1F6 抗-CD70 变体 HJLA 介导补体依赖性细胞毒作用 (CDC)。在人血清作为补体来源的情况下将 LP-1、MHH PreB-1 和 WIL-S 靶细胞与嵌合 1F6、人源化 1F6 (HJLA) 或非结合性人 Ig 混合。37°C 孵育 2 小时后, 加入碘化丙锭, 通过流式细胞术测定细胞活力, 计算裂解活性的量。柱代表一式三份样品的平均值 ± 标准差。

[0024] 图 6 显示了人源化 1F6 抗-CD70 抗体介导抗体-依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)。用红色荧光细胞膜染料 (PKH26, Sigma-Aldrich, Inc., 密苏里州圣路易斯) 标记 786-0CD70⁺ 肾细胞癌靶细胞, 然后用嵌合 1F6、人源化 1F6 (HJLA) 或非结合性人 Ig 在冰上包被 30 分钟。标记的经抗体处理的靶细胞与单核细胞衍生的巨噬细胞混合, 37°C 处理 1 小时, 混合比为 1 个巨噬细胞比 4 个靶细胞。巨噬细胞用 Alexa Fluor[®] 488 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 抗-CD11b 抗体染色, 流式细胞术分析时, 通过发双荧光的巨噬细胞百分数确定细胞吞噬活性百分数。

[0025] 图 7 显示了人源化 1F6 抗-CD70 抗体能延长弥散性淋巴瘤和多发性骨髓瘤异种移植瘤模型小鼠的存活期。(A) 注射 Raji 细胞并用人源化 1F6 抗体或对照非结合性抗体治疗的小鼠的存活期。在注射肿瘤细胞 1 天后开始治疗, 通过腹膜内注射给药, 每四天给药一次, 共给药 6 次 (n = 10 只/组)。(B、C, 左侧) 注射 L363- 或 MM. 1S- 细胞和植入细胞 1

天后开始用人源化 1F6 治疗的小鼠的存活期。通过静脉内注射每周给予一次抗体,共给予 5 次。每周监测小鼠两次,表现出疾病后处死动物 ($n = 7$ 只 / 组)。 (B、C, 右侧) 分析由注射 L363- 或 MM. 1S- 细胞的小鼠收集的血清中 λ 轻链浓度。分别在注射肿瘤后第 35 天和第 42 天收集样品。在所有研究中,给出的 p 值在人源化 1F6- 治疗组和未治疗组之间。

[0026] 图 8 显示了人源化 1F6 介导消耗抗原 - 特异性 CD8+/V β 17+ 细胞。用 M1 肽刺激来自正常 HLA-A0201 供体的 PBMC。 (A) 肽 - 刺激的培养物不处理或通过同时加入梯度剂量的人源化 1F6 抗体处理,如图所示。 9 天后用流式细胞术测定 CD8+/V β 17+ 细胞百分数。 (B) 第 0 天,在不存在 (实心柱) 或存在 (阴影柱) $10 \mu\text{g/ml}$ Fc γ RIII (CD16) 特异性抗体的情况下不处理或用 $1 \mu\text{g/ml}$ 人源化 1F6 处理肽 - 刺激的培养物。 9 天后用流式细胞术测定 CD8+/V β 17+ 细胞的百分数。

[0027] 图 9 显示了抗 -CD70 1F6 抗体对旁观 (bystander) 静息 T 细胞的影响极小。在存在或不存在 $1 \mu\text{g/ml}$ c1F6 的情况下不处理 (无刺激) 或用 M1 肽刺激 (肽刺激) 来自正常 HLA-A0201 供体的 PBMC。培养 9 天后,用 IOtest[®] B Mark TCR V β Repertoire 试剂盒以流式细胞术分析各组中 CD4 和 CD8 细胞中 V β TCR 的代表数量 (representation)。

[0028] 图 10 显示了肾细胞癌的小鼠异种移植瘤模型。 (A) 通过植入约 30mm^3 的肿瘤片段在裸小鼠中产生皮下 786-0 肿瘤 ($N = 5$ 或 6 只 / 组)。建立肿瘤生长,当各组中平均肿瘤大小约为 100mm^3 时开始治疗。从植入肿瘤后第 17 天开始以 q4dx4 方案给予所示剂量的 h1F6-mcMMAF4 或 h1F6-vcMMAF4,如箭头所示。交叉斜杠表示肿瘤 $> 1000\text{mm}^3$ 的动物被处死的时间。 (B) 植入 786-0 肿瘤和开始治疗的详情与 (A) 相同。植入肿瘤后第 13 天开始以 q4dx4 或 q4dx10 方案给予小鼠组 ($N = 5-7$ 只) 0.17mg/kg 的 h1F6-mcMMAF4 或 h1F6-vcMMAF4。Kaplan-Meier 曲线代表肿瘤生长。与第 13 天治疗开始时相比小鼠肿瘤大小达到 4 倍时记录一个事件。检查第 43 天实验结束时肿瘤大小仍未达到 4 倍的小鼠。用对数秩检验产生治疗组和未治疗组的 p 值。

[0029] 图 11 显示了多发性骨髓瘤的小鼠异种移植瘤模型。 (A) 将一千万个 MM-1S 细胞静脉内注射给各 SCID 小鼠。小鼠组 ($N = 8-10$ 只) 不接受治疗,或以 q7dx5 方案接受特定剂量的 IgG-vcMMAF4、IgG-mcMMAF4、h1F6-vcMMAF4 或 h1F6-mcMMAF4,如箭头所示。处死出现后肢瘫痪、弓状体态、颅肿胀和 / 或皮毛不整洁症状的小鼠,对各组的存活百分数作图。用对数秩检验产生治疗组和未治疗组的 p 值。 (B) 从由于上述疾病症状或在植入肿瘤细胞后第 122 天实验结束时处死的小鼠的股骨回收骨髓细胞。用流式细胞术测定各小鼠股骨中表达 CD138 的 MM-1S 细胞的百分数。用 Mann-Whitney 检验获得所示组之间的 p 值。

[0030] 图 12 显示了多发性骨髓瘤的小鼠异种移植瘤模型。 (A) 将一千万个 L363 细胞静脉内注射给各 SCID 小鼠。小鼠组 ($N = 7$ 只) 不接受治疗,或以 q7dx5 方案接受特定剂量的 IgG-vcMMAF4 或 h1F6-vcMMAF4,如箭头所示。处死可触知肿瘤的小鼠,对各组的存活百分数作图。用对数秩检验产生治疗组与未治疗组的 p 值。 (B) 在肿瘤植入后 40 天获得小鼠的血清样品。用 ELISA 测定各小鼠的血清中人 λ 轻链的浓度。用 Mann-Whitney 检验获得所示组之间的 p 值。

[0031] 发明详述

[0032] 本发明提供了 CD70 结合物 and 将这种结合物用于预防或治疗表达 CD70 的癌症和免疫病的方法。所述 CD70 结合物特异性结合于 CD70 (如胞外结构域)。该结合物可包括介导

ADCC、ADCP 和 / 或 CDC 应答的至少一种效应物结构域。该结合物可以在没有偶联于治疗剂的情况下行使细胞抑制、细胞毒或免疫调节作用。所述结合物可偶联于具有细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用的治疗剂。

[0033] 一方面,所述组合物和方法涉及 CD70 结合物,如抗体和抗体衍生物。抗-CD70 抗体可以是单克隆、嵌合或人源化抗体,或其片段或衍生物。在一些实施方式中,抗-CD70 抗体包括抗体恒定区或结构域。所述抗体恒定区或结构域可以是(例如)IgG 亚型的抗体恒定区或结构域。在示范性实施方式中,抗-CD70 抗体、其片段或衍生物与鼠单克隆抗体(mAb) 1F6 或 2F2 竞争结合 CD70,并含有人抗体恒定区序列。在另一示范性实施方式中,抗-CD70 抗体、其片段或衍生物具有效应物结构域(如 Fc 部分),该效应物结构域可与效应物细胞或补体相互作用以介导细胞毒、细胞抑制和 / 或免疫调节作用,导致消耗表达 CD70 的细胞或抑制其增殖。在另一示范性实施方式中,抗-CD70 抗体缺少效应物功能。在另一示范性实施方式中,抗-CD70 抗体偶联于治疗剂。

[0034] 本发明也包括包含 CD70 结合物(如人源化抗-CD70 抗体)的药盒和制品。

[0035] 为了不以限制方式阐明本发明,将发明详述分成以下小部分。

[0036] I. 定义和缩写

[0037] 除非另有定义,本文所用的所有科技术语的含义与所述方法和组合物所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。本文使用商品名时,申请人想要独立地包括该商品名的产品配方、该商品名产品的非专利药和活性药物成分。本文所用的以下术语和短语具有属于它们的含义,除非另有说明。

[0038] 本文所用术语“CD70 结合物”和“抗-CD70 结合物”指抗-CD70 抗体、抗-CD70 抗体的衍生物或片段,或者结合于 CD70 并含有至少一个 CD70 结合抗体的 CDR 或可变区的其它物质或其衍生物。

[0039] 术语“特异性结合”指该结合物以高度选择性方式与其相应抗原相互作用,而不与多种其它抗原(如非-CD70 分子)相互作用。

[0040] 在 CD70 结合物的内容中,本文所用术语“功能性”指该结合物能够结合于 CD70。

[0041] 本文所用术语“抑制”指降低可检测的量,或完全阻止。

[0042] 提到 CD70 结合物对表达 CD70 的细胞的影响时,术语“消耗”指表达 CD70 的细胞数量减少或消失。

[0043] 本文将“完整抗体”和“完整免疫球蛋白”定义为异源四聚体糖蛋白,一般约为 150,000 道尔顿,由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。各轻链通过二硫键共价连接于重链,从而形成异源二聚体。通过此异源二聚体的两条相同重链之间的共价二硫键连接形成异源四聚体。虽然轻链和重链通过二硫键连接在一起,但两条重链之间的二硫键数量随不同免疫球蛋白(Ig)同种型而变化。各条重链和轻链也含有规则间隔的链内二硫桥键。各条重链的氨基端含有可变区(V_H),后接三个或四个恒定区(C_H1 、 C_H2 、 C_H3 和 / 或 C_H4),以及 C_H1 和 C_H2 之间的铰链(J)区。各轻链含有两个结构域,即氨基端可变区(V_L)和羧基端恒定区(C_L)。 V_L 结构域与 V_H 结构域非共价连接,而 C_L 结构域通常通过二硫键共价连接于 C_H1 结构域。相信特定氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面(Chothia 等, 1985, J. Mol. Biol. 186 :651-663)。

[0044] 术语“高变”指在抗体之间序列广泛不同的可变区内的某些序列,它含有直接参

与各具体抗体与其特异性抗原决定簇的结合和特异性的残基。轻链和重链可变区内的高变性集中在称为互补决定区 (CDR) 或高变环 (HVL) 的三个部分。Kabat 等, 1991, 《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, 马里兰州贝塞斯达, 其中通过序列比较确定了 CDR, 而如 Chothia 和 Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196 :901-917 所述按照可变区的三维结构从结构上确定了 HVL。这两种方法鉴定的 CDR 略有不同时, 优选结构定义。如 Kabat 所述 (参见 Kabat 等, “免疫学感兴趣的蛋白质的序列” (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版, 出版号 91-3242, 美国健康和人类服务部, 马里兰州贝塞斯达, 1991), 在轻链可变区中, CDR-L1 大概位于残基 24-34 处, CDR-L2 大概位于残基 50-56 处, CDR-L3 大概位于残基 89-97 处; 在重链可变区中, CDR-H1 大概位于 31-35 处, CDR-H2 大概位于 50-65 处, CDR-H3 大概位于 95-102 处。

[0045] 各条重链和轻链中的三个 CDR 由构架区 (FR) 隔开, 构架区含有不大容易变化的序列。从重链和轻链可变区的氨基端至羧基端以下述顺序分布着 FR 和 CDR: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。FR 的大 β -折叠构型使各链的 CDR 互相接近, 并且接近其它链的 CDR。得到的构象有助于产生抗原结合位点 (参见 Kabat 等, 1991, NIH 出版号 91-3242, 第 I 卷, 第 647-669 页), 但不是所有 CDR 残基一定会直接参与抗原结合。

[0046] FR 残基和 Ig 恒定区一般不直接参与抗原结合, 但可能有助于抗原结合或介导抗体效应物功能。一些 FR 残基可能通过至少以下三种方式对抗原结合施加显著影响: 直接非共价结合于表位、与一个或多个 CDR 残基相互作用、影响轻链和重链之间的接界面。恒定区介导各种 Ig 效应物功能, 如抗体参与抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)、补体依赖性细胞毒作用 (CDC) 和 / 或抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)。

[0047] 根据恒定区的氨基酸序列, 将脊椎动物免疫球蛋白的轻链分为两种明显不同的类型 κ 和 λ 。与其相比, 按照恒定区的序列将哺乳动物免疫球蛋白的重链分为五种主要类型: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。IgG 和 IgA 进一步分为亚型 (同种型), 如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgA2。对应于不同类型的免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。天然免疫球蛋白类型的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0048] 术语“抗体”、“抗-CD70 抗体”、“人源化抗-CD70 抗体”和“变体人源化抗-CD70 抗体”在本文中以最广泛的含义使用, 具体包括全长和天然抗体、单克隆抗体 (包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体 (如双特异性抗体) 和抗体或其抗原结合片段, 如具有所需生物学活性如 CD70 结合性的抗体的可变区和其它部分。

[0049] 术语“单克隆抗体” (mAb) 指获自基本均一抗体群体的抗体; 即, 群体中所含的单个抗体相同, 但可能存在少量天然产生的突变。单克隆抗体的特异性高, 对抗一种抗原决定簇, 也称为表位。修饰词“单克隆”表明是对抗相同表位的基本均一的抗体群体, 并且不应理解为要求用任何具体方法来产生该抗体。可通过本领域已知的任何技术或方法制备单克隆抗体; 例如, 本领域已知首先由 Köhler 等, 1975, Nature 256 :495 描述的杂交瘤方法, 或者重组 DNA 法 (参见例如, 美国专利号 4, 816, 567)。在另一个实施例中, 也可采用 Clackson 等, 1991, Nature 352 :624-628 和 Marks 等, 1991, J. Mol. Biol. 222 :581-597 所述的技术从噬菌体抗体文库分离单克隆抗体。

[0050] 相反, 多克隆抗体制剂中的抗体一般是异源免疫球蛋白同种型和 / 或类型的群

体,并具有各种表位特异性。

[0051] 本文所用术语“嵌合”抗体是一种单克隆抗体类型,其中重链和 / 或轻链的一个或多个区域或结构域中部分或全部氨基酸序列与来自另一物种或属于另一种免疫球蛋白类型或同种型的单克隆抗体的相应序列相同、同源或是其变体,或来自共有序列。嵌合抗体包括这种抗体的片段,条件是该抗体片段具有其母体抗体的所需生物学活性,如结合于同一表位(参见例如美国专利号 4,816,567;和 Morrison 等,1984,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855)。本领域已知生产嵌合抗体的方法。(参见例如 Morrison,1985, Science 229:1202; Oi 等,1986, BioTechniques 4:214; Gillies 等,1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; 美国专利 5,807,715; 4,816,567; 和 4,816,397.)

[0052] 术语“抗体片段”、“抗-CD70 抗体片段”、“人源化抗-CD70 抗体片段”和“变体人源化抗-CD70 抗体片段”指保留了可变区或功能能力如特异性 CD70 表位结合的全长抗-CD70 抗体的一部分。抗体片段的例子包括但不限于: Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv 和 scFv-Fc 片段、双抗体、三抗体、四抗体、线性抗体、单链抗体和由抗体片段形成的其它多特异性抗体。(参见 Holliger 和 Hudson,2005, Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.)

[0053] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段是含有抗体的 V_H 和 V_L 结构域的单链 Fv 变体,其中该结构域以单链多肽的形式存在,能够识别和结合抗原。scFv 多肽任选地含有位于 V_H 和 V_L 结构域之间的多肽接头,此接头使 scFv 能够形成用于结合抗原的三维结构(参见例如, Pluckthun,1994,《单克隆抗体的药理学》(The Pharmacology of Monoclonal Antibody),第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, 纽约,第 269-315 页)。

[0054] 术语“双抗体”指含有两个抗原-结合位点的小抗体片段。各片段含有重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),V_H 和 V_L 连接形成 V_H-V_L 或 V_L-V_H 多肽。采用对于同一条链上两个结构域之间配对来说太短的接头,强迫连接的 V_H-V_L 结构域与另一条链的互补结构域配对,产生两个抗原-结合位点。例如, EP 404097; WO 93/11161; 和 Hollinger 等,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 中更详细地描述了双抗体。

[0055] 术语“线性抗体”指含有能形成一对抗原结合区的一对串联 Fd 节段(V_H-C_H1-V_H-C_H1)的抗体。线性抗体可以是双特异性或单特异性,如 Zapata 等,1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062 所述。

[0056] “人源化抗体”指能够结合预定抗原并包含一可变区多肽链的免疫球蛋白氨基酸序列变体或其片段,该可变区多肽链包含主要具有人免疫球蛋白氨基酸序列的构架区和主要具有非人免疫球蛋白氨基酸序列的 CDR。

[0057] 通常,人源化抗体含有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基在本文中称为“输入”残基,它们一般取自“输入”抗体结构域,具体是可变区。输入的残基、序列或抗体具有所需的亲和力和 / 或特异性,或其它所需抗体生物学活性,如本文所述。

[0058] 通常,人源化抗体包含基本上所有的至少一个、一般是两个可变区,其中所有或基本上全部 CDR 区均对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区,并且所有或基本上全部构架区都是人免疫球蛋白序列的构架区,如来自共有或种系序列。人源化抗体也任选地含有免疫球蛋白,一般是人免疫球蛋白的 Fc 结构域的至少一部分。例如,抗体可含有轻链,并且至少含有重链的可变区。抗体也可适当地包括重链的 C_H1、铰链(J)、C_H2、C_H3 和 / 或 C_H4 区域。

[0059] 人源化抗体可选自任何类型的免疫球蛋白（包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE）或者任何同种型（包括 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄）。当需要人源化抗体具有细胞毒活性时，恒定区或结构域可包括（例如）补体结合性恒定区（如 IgG₁）。不需要这种细胞毒活性时，恒定区可以来自另一类型（如 IgG₂）。人源化抗体可包含来自一种以上类型或同种型的序列，本领域普通技术人员能通过选择具体的恒定区来优化所需的效应物功能。

[0060] 人源化抗体的 FR 和 CDR 区不需要准确对应于母体序列，例如：可通过取代、插入或缺失至少一个残基改变输入 CDR 或共有 FR，以使该位点的 CDR 或 FR 残基不对应于共有或输入抗体。一般不会广泛发生这种突变。通常，至少 75%、更常见至少 90%、最常见大于 95% 的人源化抗体残基对应于母体 FR 和 CDR 序列的残基。

[0061] 本文所用术语“抗体效应物功能”指 Ig 的 Fc 结构域产生的功能。这种功能可以是（例如）抗体-依赖性细胞毒作用、抗体-依赖性细胞吞噬作用或补体依赖性细胞毒作用。可通过（例如）Fc 效应物结构域结合于具有细胞吞噬或裂解活性的免疫细胞上的 Fc 受体或者 Fc 效应物结构域结合于补体系统的成分来实现这种功能。一般地，Fc-结合细胞或补体成分介导的作用导致抑制和/或消耗 CD70 靶向细胞。不想受限于任何具体理论，抗体的 Fc 区可征集表达 Fc 受体 (FcR) 的细胞，并使它们与抗体-包被的靶细胞并列 (juxtapose)。表达 IgG 的表面 FcR (包括 Fc γ RIII (CD16)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD64)) 的细胞可用作破坏 IgG-包被细胞的效应物细胞。这种效应物细胞包括单核细胞、巨噬细胞、天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞。IgG 结合 Fc γ R 能激活抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 或抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)。由 CD16⁺ 效应物细胞通过分泌膜孔道形成蛋白和蛋白酶而介导 ADCC，由 CD32⁺ 和 CD64⁺ 效应物细胞介导细胞吞噬作用（参见《基础免疫学》(Fundamental Immunology)，第 4 版，Paul 编，Lippincott-Raven，纽约，1997，第 3、17 和 30 章；Uchida 等，2004，J. Exp. Med. 199:1659-69；Akwonlop 等，2001，Cancer Res. 61:4061-65；Watanabe 等，1999，Breast Cancer Res. Treat. 53:199-207）。除 ADCC 和 ADCP 外，细胞结合抗体的 Fc 区也可激活补体经典通路，以引发补体依赖性细胞毒作用 (CDC)。与抗体与抗原结合时，补体系统的 C1q 结合于抗体的 Fc 区。C1q 结合于细胞-结合抗体可启动级联反应，包括 C4 和 C2 的蛋白水解激活从而产生 C3 转化酶。由 C3 转化酶将 C3 切割成 C3b 能够激活最终的补体成分，包括 C5b、C6、C7、C8 和 C9。总之，这些蛋白在抗体包被的细胞上形成膜-攻击复合物孔。这些孔破坏了细胞膜的完整性，从而杀死靶细胞（参见《免疫生物学》(Immunobiology)，第 6 版，Janeway 等，Garland Science，纽约，2005，第 2 章）。

[0062] 术语“抗体依赖性细胞毒作用”或 ADCC 是根据抗体-包被的靶细胞与具有裂解活性的免疫细胞（也称为效应物细胞）相互作用而诱导细胞死亡的机制。这种效应物细胞包括天然杀伤细胞、单核细胞/巨噬细胞和嗜中性粒细胞。效应物细胞连接于 Ig 的 Fc 效应物结构域，Ig 通过其抗原结合位点结合于靶细胞。效应物细胞活性引起抗体-包被的靶细胞的死亡。

[0063] 术语“抗体依赖性细胞吞噬作用”或 ADCP 指通过结合于 Ig 的 Fc 效应物结构域的细胞吞噬性免疫细胞（如巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突细胞）使抗体-包被的细胞被内化（完全或部分）的过程。

[0064] 术语“补体依赖性细胞毒作用”或 CDC 指靶点结合抗体的 Fc 效应物结构域激活一系列酶反应，导致在靶细胞膜中形成孔洞的细胞死亡诱导机制。一般地，抗原-抗体复合物

如抗体-包被的靶细胞上的复合物结合并激活补体成分 C1q, 进而激活补体级联反应导致靶细胞死亡。补体的激活也可导致补体成分沉积在靶细胞表面上, 通过结合白细胞上的补体受体 (如 CR3) 而有助于 ADCC。

[0065] 本文所用术语“免疫细胞”指参与调节免疫应答的造血谱系细胞。在典型的实施方式中, 免疫细胞是 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞、单核细胞 / 巨噬细胞或树突细胞。

[0066] 本文所用术语“效应物细胞”指表达免疫球蛋白 Fc 结构域的表面受体 (FcR) 的细胞。例如, 表达 IgG 的表面 FcR 包括 Fc γ RIII (CD16)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD64) 的细胞可用作效应物细胞。这种效应物细胞包括单核细胞、巨噬细胞、天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0067] “治疗剂”是对癌细胞、活化免疫细胞或其它靶细胞群体产生细胞毒、细胞抑制和 / 或免疫调节作用的物质。治疗剂的例子包括细胞毒剂、化疗药、细胞抑制剂和免疫调节剂。

[0068] “细胞毒作用”指消耗、消除和 / 或杀伤靶细胞。“细胞毒剂”指对细胞有细胞毒作用的物质。该术语应包括放射性同位素 (如 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 和 Re^{186})、化疗药和毒素, 如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素, 以及它们的片段。这种细胞毒剂可偶联于抗体, 如人源化抗-CD70 抗体, 并用于 (例如) 治疗需要用该抗体治疗的患者。在一个实施方式中, “细胞毒剂”包括单克隆抗体, 例如与本文所述人源化抗体联用的抗体。

[0069] “化疗药”是用于治疗癌症的化合物。化疗药的例子包括烷化剂, 如硫替派和环磷酰胺 (CYTOXANTM); 烷基磺酸酯如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡; 吡丙啶如苯佐替派、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替派; 氮丙啶和甲蜜胺, 包括六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三甲蜜胺 (trimethylolomelamine); 多聚乙酰 (特别是布拉它辛 (bullatacin) 和布拉它辛酮 (bullatacinone)); 喜树碱 (包括合成类似物拓扑替康); 苔藓抑素; 海绵他汀 (callystatin); CC-1065 (包括其合成类似物阿多来新、卡折来新和比折来新) 和其衍生物; 自念珠藻环肽类 (cryptophycine) (具体是自念珠藻环肽 1 和自念珠藻环肽 8); 多拉司他汀, 耳他汀类 (auristatin) (包括类似物单甲基-耳他汀 E 和单甲基-耳他汀 F (参见例如 2005 年 10 月 27 日公开的美国公开申请号 2005-0238649, 全文纳入本文作参考)); 多卡霉素 (duocarmycin) (包括合成类似物 KW-2189 和 CBI-TMI); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); 水鬼蕉碱 (pancratistatin); sarcodictyin; 软海绵素 (spongistatin); 氮芥如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯乙酰胆固醇氮芥、泼尼莫司汀; 曲磷胺、乌拉莫司汀; 亚硝基脲如卡莫司汀、吡葡亚硝脲、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀; 抗生素如烯二炔 (enediynes) 抗生素 (如卡奇霉素, 具体是卡奇霉素 γ II 和卡奇霉素 ϕ II, 参见例如, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186; 达内霉素 (dynemicin), 包括达内霉素 A; 二膦酸盐, 如氯屈膦酸盐; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新抑癌蛋白生色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素生色团)、阿柔比星、放线菌素、安曲霉素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 c、卡拉比星 (carabycin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素 d、道诺霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星 (阿霉素TM) (包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、黄胆素、马赛罗霉素、丝裂霉素如丝裂霉素 C、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、波非罗霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、块菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比

星;抗代谢剂如甲氨蝶呤和 5- 氟尿嘧啶 (5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物如氟达拉滨、6- 巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物如安西他滨、阿扎胞苷、6- 氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺药如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂如叶烷酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;bestrabucil;比生群;伊达曲沙;地磷酰胺 (defofamine);地莫考辛 (democolcine);地吡醌;艾夫尼辛 (elfornithine);依利醋胺;大环内酯;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;蘑菇多糖;氯尼达明;类美坦西醇如美登素和安丝菌素;米托胍脲、米托蒽醌;莫哌达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2- 乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK[®];雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2', 2'' - 三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素类 (具体是 T-2 毒素、verracurin A、杆孢菌素 A 和蛇形菌素);乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;mitabronitol;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加胞嘧啶;阿糖胞苷 ("Ara-C");环磷酰胺;硫替派;紫杉烷类,如紫杉醇 (泰素[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, 新泽西州普林斯顿) 和多西他赛 (TAXOTERE[®], Rh[®] ne-Poulenc Rorer, 法国安东尼市);苯丁酸氮芥;吉西他滨 (Gemzar[™]);6- 硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊甙 (VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨 (诺维本[™]);二羟基蒽醌;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨蝶呤;适罗达;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂 RFS2000;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO);类视黄醇如视黄酸;卡培他滨;以及上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。此定义也包括用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素药,如抗雌激素药和选择性雌激素受体调节剂 (SERMs),包括例如:他莫昔芬 (包括 Nolvadex[™])、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4- 羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬 (Fareston[™]);抑制芳香酶的芳香酶抑制剂,它能调节肾上腺中的雌激素生产,例如 4(5)- 咪唑、氨鲁米特、乙酸甲地孕酮 (Megace[™])、依西美坦、福美坦、法倔唑、伏氯唑 (Rivisor[™])、来曲唑 (Femara[™]) 和阿那曲唑 (Arimidex[™]);和抗雄激素药如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0070] 本文所用术语“前药”指与母体药物相比对肿瘤细胞的细胞毒性较低并能够被酶激活或转变成活性更高的母体形式的药学活性物质的前体或衍生物形式。参见例如 Wilman, 1986, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy (癌症化疗中的前药)”, Biochemical Society Transactions (生物化学界交易), 14, 第 375-382 页, 第 615 届贝尔法斯特会议;和 Stella 等, 1985, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery (前药: 靶向药物递送的化学方法)”, Directed Drug Delivery (定向药物递送), Borchardt 等, (编), 第 247-267 页, Humana Press。有用的前药包括但不限于可转变为活性更高的细胞毒性游离药物的含磷酸的前药、含硫代磷酸的前药、含硫酸的前药、含肽的前药、D- 氨基酸 - 修饰的前药、糖基化的前药、含 β - 内酰胺的前药、含任选取代的苯氧基乙酰胺的前药和含任选取代的苯基乙酰胺的前药、5- 氟胞嘧啶和其它 5- 氟尿苷前药。可衍生成前药形式的细胞毒药物的例子包括但不限于上述化疗药。

[0071] “细胞抑制作用”指抑制细胞增殖。“细胞抑制剂”指对细胞有细胞抑制作用,从而

抑制特定的细胞亚组生长和 / 或扩增的物质。

[0072] 本文所用术语“免疫调节作用”指刺激（免疫刺激）或抑制（免疫抑制）免疫应答的发生或维持。可通过（例如）清除免疫细胞（如 T 或 B 淋巴细胞）；诱导或产生可调节（如下调）其它细胞的功能能力的免疫细胞；诱导免疫细胞的不应答状态（如不应性）；或提高、降低或改变免疫细胞的活性或功能，包括例如，改变这些细胞表达蛋白质的模式（如改变某些类型的分子如细胞因子、趋化因子、生长因子、转录因子、激酶、共刺激分子或其它细胞表面受体等的产生和 / 或分泌）实现抑制。“免疫调节剂”指对细胞有免疫调节作用的物质。在一些实施方式中，免疫调节剂对促进免疫应答的免疫细胞有细胞毒或细胞抑制作用。

[0073] 术语“标记”指直接或间接偶联于抗体的可检测的化合物或组合物。该标记本身可以被检测到（如放射性同位素标记或荧光标记），或者，在酶标记的情况下，该标记可催化底物化合物或组合物发生可检测的化学改变。可制备标记的抗 -CD70 抗体并用于各种应用，包括体外和体内诊断。

[0074] “分离的”核酸分子是从通常在天然来源的核酸中与其结合的至少一种污染性核酸分子中分离鉴定到的核酸分子。分离的核酸分子并非其天然发现的形式或情形。因此，分离的核酸分子不同于天然细胞中存在的核酸分子。然而，当（例如）核酸分子在染色体上的位置不同于天然细胞时，分离的核酸分子包括通常表达抗体的细胞中所含的核酸分子。

[0075] 术语“控制序列”指在具体的宿主生物体中表达操作性连接的编码序列所必需的多核苷酸序列。适用于原核细胞的控制序列包括例如：启动子、操纵子和核糖体结合位点序列。真核控制序列包括但不限于：启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。这些控制序列可用于在原核和真核宿主细胞中表达和生产抗 -CD70 结合物。

[0076] 一核酸序列与另一核酸序列形成功能性关联时，它们“操作性连接”。例如，如果表达为参与多肽分泌的前蛋白，则核酸前序列或分泌前导物操作性连接于编码多肽的核酸；如果影响了编码序列的转录，则启动子或增强子操作性连接于编码序列；或者如果核糖体结合位点的定位有利于翻译，则核糖体结合位点操作性连接于编码序列。通常，“操作性连接”指连接的 DNA 序列毗连，在分泌性前导物的情况下，毗连并且在阅读框中。然而，增强子任选为毗连的。可通过在方便的限制性位点连接来实现连接。如果不存在这种位点，可采用合成寡核苷酸衔接子或接头来连接 DNA 序列。

[0077] 术语“多肽”指氨基酸聚合物和其等同物，不指特定长度的产物；因此，多肽的定义包括“肽”和“蛋白质”。多肽的定义也包括本文所述的“抗体”。“多肽区”指多肽节段，该节段可含有（例如）一个或多个结构域或基序（如抗体的多肽区可含有（例如）一个或多个互补决定区（CDR））。术语“片段”指一般含有该多肽的至少 20 个毗连或至少 50 个毗连氨基酸的多肽部分。“衍生物”是相对于第二种多肽，含有一个或多个非保守性或保守性氨基酸取代的多肽或其片段；或者通过共价连接第二种分子，例如连接异源性多肽，或通过糖基化、乙酰化、磷酸化等修饰的多肽或其片段。“衍生物”的定义还包括例如，含有一种或多种氨基酸类似物（如非天然氨基酸等）的多肽、含有未取代连接以及本领域已知的其它（天然或非天然）修饰的多肽。

[0078] “分离的”多肽是从天然环境的组分中分离鉴定到和 / 或回收的多肽。其天然环境的污染组分是会干扰该多肽的诊断或治疗应用的物质，可包括酶、激素和其它蛋白性或

非蛋白性溶质。分离的多肽包括分离的抗体,或其片段或衍生物。“抗体”包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体天然环境的至少一种组分不存在。

[0079] 在某些实施方式中,将抗体纯化至(1)按照 Lowry 法测定,纯化至 95 重量%以上,在其它方面纯化至 99 重量%以上,(2)足以用转杯顺序分析仪获得 N 末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度,或者(3)在还原或非还原条件下用考马斯蓝或优选的银染料对 SDS-PAGE 染色时呈现均一性。

[0080] 提到多肽时,术语“异源”指与另一多肽相比来自不同来源(如细胞、组织、生物体或物种),因此两种多肽不同。一般地,异源多肽来自不同物种。

[0081] 提到免疫球蛋白多肽或其片段时,“保守取代”指基本不降低免疫球蛋白多肽或其片段与抗原的特异性结合(例如用 K_D 测定)的一个或多个氨基酸取代(即经标准结合实验如 ELISA 测定,能提高结合亲和力、不显著改变结合亲和力或使结合亲和力降低不超过约 40%、一般不超过约 30%、更一般不超过约 20%、更一般不超过约 10%、或者最一般不超过约 5%的取代)。

[0082] 提到两种或多种核酸或多肽序列时,术语“相同”或“相同性百分数”指比较和比对最大对应性时,两种或多种序列或子序列相同或其中特定百分数的核苷酸或氨基酸残基相同。为了测定相同性百分数,出于最优比较目的比对序列(如可将缺口引入第一种氨基酸序列或核酸序列中,以与第二种氨基酸或核酸序列进行最优比对)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置上的氨基酸残基或核苷酸。如果第一种序列中的位置被与第二种序列的相应位置上相同的氨基酸残基或核苷酸占据,那么这两种分子在该位置上相同。两种序列的相同性百分数是序列共有的相同位置数量的函数(即 $\% \text{相同性} = \text{相同位置的数量} / \text{位置总数} (\text{如重叠位置}) \times 100$)。在一些实施方式中,这两种序列长度相同。

[0083] 提到两种核酸或多肽时,术语“基本相同”指两种或多种序列或子序列的相同性为至少 50%、至少 55%、至少 60%或至少 65%;一般为至少 70%或至少 75%;更一般为至少 80%或至少 85%;更一般为至少 90%、至少 95%或至少 98%(例如用下述方法之一测定)。

[0084] 提到两种或多种多肽序列时,术语“相似”或“相似性百分数”指采用下述方法之一比较和比对最大对应性时,两种或多种序列或子序列中特定百分数的氨基酸残基相同或被保守取代。例如,与第一种序列所含氨基酸数量相同的氨基酸比较时,或与通过(例如)下述方法之一进行的多肽比对比较时,如果第一种氨基酸序列与第二种氨基酸序列中至少 50%、60%、70%、75%、80%、90%或 95%相同或被保守取代,则可认为第一种氨基酸序列与第二种氨基酸序列相似。

[0085] 提到多肽序列时,术语“基本相似”指多肽区序列与参比序列的序列相似性为至少 70%,一般为至少 80%,更一般为至少 85%,或至少 90%或至少 95%。例如,当两种肽的差别仅在于一个或多个保守取代时,该多肽与第二种多肽基本相似。

[0086] 经过本领域已知或本文所述的各种标准免疫试验测定,提到抗 -CD70 抗体或其衍生物时,含有与抗 -CD70 抗体的一种或多种抗原结合区(如重链或轻链可变区,或者重链或轻链 CDR)基本相同或基本相似的一个或多个多肽区的蛋白质能保持与抗 -CD70 抗体识别的 CD70 表位的特异性结合。

[0087] 可用数学算法确定两种序列之间的相同性百分数或相似性百分数。用于比较两种序列的数学算法的优选非限制性例子是经 Karlin 和 Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 90 :5873-5877 改进的 Karlin 和 Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 2264-2268 所述的算法。将这种算法整合到 Altschul 等, 1990, J. Mol. Biol. 215 :403-410 的 NBLAST 和 XBLAST 程序中。可用 NBLAST 程序、评分 = 100、字长 = 12 进行 BLAST 核苷酸搜索, 以获得与编码感兴趣蛋白的核酸同源的核苷酸序列。可用 XBLAST 程序、评分 = 50、字长 = 3 进行 BLAST 蛋白质搜索, 以获得与感兴趣蛋白同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的缺口比对, 可采用缺口 BLAST, 如 Altschul 等, 1997, Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402 所述。或者, 可采用 PSI-Blast 进行迭代搜索, 其检测分子之间的距离关系 (Id.)。采用 BLAST、缺口 BLAST 和 PSI-Blast 程序时, 可利用各程序 (如 XBLAST 和 NBLAST) 的默认参数。用于比较序列的数学算法的另一非限制性例子是 Myers 和 Miller, CABIOS (1989) 的算法。将这种算法整合到作为 GCG 序列比对软件包的一部分的 ALIGN 程序 (2.0 版) 中。利用 ALIGN 程序比较氨基酸序列时, 可使用 PAM120 重量残基表、缺口长度罚分 12 和缺口罚分 4。本领域已知用于序列分析的其它算法, 包括如 Torellis 和 Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10 :3-5 所述的 ADVANCE 和 ADAM; 以及 Pearson 和 Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :2444-8 所述的 FASTA。在 FASTA 中, ktup 是设定搜索的灵敏度和速度的控制选项。如果 ktup = 2, 通过观察比对残基对发现所比较两种序列的相似区域; 如果 ktup = 1, 则检查单个比对氨基酸。对于蛋白质序列 ktup 可设定为 2 或 1, 对于 DNA 序列可设定为 1-6。如果没有特别设定, ktup 默认设定为 2 (蛋白质) 和 6 (DNA)。或者, 可用 CLUSTAL W 算法进行蛋白质序列比对, 如 Higgins 等, 1996, Methods Enzymol. 266 :383-402 所述。

[0088] 本文所用术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用, 所有这些表述均包括其后代。因此, “转化子”和“转化细胞”包括原代对象细胞和由其产生的培养物, 而不管转移次数。也应理解, 由于有意或天然产生的突变, 所有后代的 DNA 含量不一定完全相同。包括其功能或生物学活性与在最初转化细胞中筛选的功能或生物学活性相同的突变后代。使用不同名称时, 应能从文中明确理解。

[0089] 出于治疗目的, 术语“对象”指任何动物, 具体是分类为哺乳动物的动物, 包括人、圈养动物和家畜、动物园动物、运动动物或玩赏动物, 如犬、马、猫、牛等。对象优选为人。

[0090] 本文所用术语“疾病”和“CD70- 相关性失调”和“CD70- 相关性疾病”指能够得益于本文所述抗 -CD70 结合物治疗的任何疾病。“CD70- 相关性失调”和“CD70- 相关性疾病”一般在细胞表面上表达 CD70 或其片段。它包括慢性和急性失调或疾病, 包括使哺乳动物易患所研究疾病的病理学状态。按本文治疗的疾病的非限制性例子包括癌症、血液恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、白血病和淋巴恶性肿瘤、癌以及炎性疾病、血管新生性疾病或免疫病。下文中公开了疾病的具体例子。

[0091] 本文所用术语“治疗”和“疗法”等应包括引起任何临床上需要或有益的作用的治疗和预防或抑制疾病或失调的方法, 所述作用包括但不限于改善或缓解一种或多种症状、消退、减慢或终止疾病或失调的进展。因此, 例如, 术语治疗包括在发生疾病或失调的症状之前或之后给予药物, 从而预防或消除该疾病或失调的所有病征。另一个例子是, 该术语包括在该疾病有临床表现后给予药物, 以抵抗该疾病的症状。另外, 给药影响该疾病或失调的临床参数, 如组织损伤程度或转移的量或程度、治疗是否导致改善疾病时, 在发病后或临床症状后给予药物是本文所述的“治疗”或“疗法”。

[0092] 本文所用术语“预防”指在表达 CD70 的癌症或免疫病出现临床或诊断症状前给予

对象抗-CD70 结合物（如给予具有患表达 CD70 的癌症或免疫病的倾向或高风险的个体），以（a）阻断表达 CD70 的癌症或免疫病，或者其临床或诊断症状的出现或发病，（b）抑制表达 CD70 的癌症或免疫病发病的严重性，或（c）降低表达 CD70 的癌症或免疫病发病的可能性。

[0093] 术语“静脉内输注”指在大于约 15 分钟，通常约 30-90 分钟的时间内将药物如治疗剂引入动物或人患者的静脉内。

[0094] 术语“静脉内推注”或“静脉内推”指在约 15 分钟或更短，通常为 5 分钟或更短的短时间内将药物给予动物或人的静脉内，以使机体接受该药物。

[0095] 术语“皮下给药”指通过从药物容器相对缓慢、持续递送将药物如治疗剂引入动物或人患者皮肤以下，一般引入皮肤和下层组织之间的袋状空间（pocket）内。捏起或拉起皮肤、使其离开下层组织能产生所述袋状空间。

[0096] 用术语“药品说明书”指通常包含在治疗产品的市售包装中的说明书，它含有关于使用这种治疗产品的适应症、用途、给药、禁忌征和 / 或警告的信息。

[0097] “脂质体”是由各种类型的脂质、磷脂或表面活性剂组成的小囊泡，可用于将药物（如抗体）递送给哺乳动物。脂质体的组分通常排列成双层构象，类似于生物膜的脂质排列形式。

[0098] 术语“皮下输注”指采用包括但不限于：30 分钟或更短或者 90 分钟或更短的时间通过从药物容器相对缓慢、持续递送将药物引入动物或人患者皮肤以下，优选引入皮肤和下层组织之间的袋状空间内。任选地，可通过在动物或人患者的皮肤下皮下植入药物递送泵进行这种输注，其中该泵在预定的时间如 30 分钟、90 分钟，或在跨越整个治疗方案的时间上递送预定量的药物。

[0099] 术语“皮下推注”指向动物或人患者的皮肤下给药，其中推注药物递送短于约 15 分钟；在另一方面，短于 5 分钟，在另一方面，短于 60 秒。另一方面，可以给予皮肤和下层组织之间的袋状空间内，所述袋状空间是通过捏起或拉起皮肤、使其离开下层组织而产生的。

[0100] 术语“有效量”指在对象中足以抑制或缓解表达 CD70 的癌症或免疫病的一种或多种临床或诊断症状的抗-CD70 结合物（如抗体或衍生物或其它结合物）的量。按照本文所述方法以“有效方案”给予有效量的药物。术语“有效方案”指足以治疗或预防表达 CD70 的癌症或免疫病的药物量和给药频率的组合。

[0101] 用术语“治疗有效量”指产生有益患者效果，例如细胞的生长阻滞作用或消除的治疗剂的量。一方面，治疗有效量具有凋亡活性，或者能够诱导细胞死亡。另一方面，治疗有效量指能有效地（例如）减缓疾病进展的目标血清浓度。可以用常规方式测定效能，这取决于治疗的疾病。例如，在特征是表达 CD70 的细胞的癌症疾病或失调中，可通过评价至疾病进展时间（TTP）或测定反应速率（RR）来测定效能。

[0102] 本文所用术语“药学上可接受的”指联邦或州证据的管理机构批准的或美国药典或其它普遍认可的药典所列的用于动物，更具体是人的物质。术语“药学相容性成分”指与其一起给予抗-CD70 结合物的药学上可接受的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。

[0103] 本文所用术语“药学上可接受的盐”指药学上可接受的抗-CD70 结合物或治疗剂的有机或无机盐。抗-CD70 结合物或治疗剂含有至少一个氨基，因此可用此氨基或其它合适基团形成酸加成盐。示范性盐包括但不限于：硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯盐、溴

盐、碘盐、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、唾液酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、延胡索酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、蔗糖盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和棕榈酸盐扑酸盐（即 1,1' 亚甲基双-(2 羟基 3 萘甲酸盐)）。药学上可接受的盐可包含另一分子如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其它抗衡离子。抗衡离子可以是稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机部分。而且,药学上可接受的盐的结构中可带有一个以上的带电原子。多个带电原子作为药学上可接受的盐的一部分时,它可含有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可包含一个或多个带电原子和 / 或一个或多个抗衡离子。

[0104] “药学上可接受的溶剂合物”或“溶剂合物”指一种或多种溶剂分子和抗-CD70 结合物和 / 或治疗剂的结合。形成药学上可接受的溶剂合物的溶剂的例子包括但不限于:水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0105] 缩写“AFP”指二甲基缬氨酸-缬氨酸-dolaisoleuine-dolaproine- 苯丙氨酸-对苯二胺。

[0106] 缩写“MMAE”指单甲基耳他汀 E。

[0107] 缩写“AEB”指耳他汀 E 与对乙酰基苯甲酸反应产生的酯。

[0108] 缩写“AEVB”指耳他汀 E 与苯甲酰戊酸反应产生的酯。

[0109] 缩写“MMAF”指 dovaline- 缬氨酸-dolaisoleuine-dolaproine- 苯丙氨酸。

[0110] 缩写“fk”和“phe-lys”指接头苯丙氨酸-赖氨酸。

[0111] II. 抗-CD70 抗体和其衍生物

[0112] 本文所述的组合物和方法包括采用特异性结合于 CD70 的 CD70 结合物。CD70 结合物可对表达 CD70 的癌细胞、活化的免疫细胞或其它靶细胞产生细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用。CD70 结合物可以是（例如）抗-CD70 抗体、抗-CD70 抗体的抗原结合片段、其衍生物、或含有至少一个 CD70 结合抗体的互补决定区（CDR）的其它 CD70 结合物。

[0113] 一方面,CD70 结合物的一个或多个互补决定区（CDR）与单克隆抗体 1F6 的一个或多个 CDR 相同、基本相同或基本相似。（SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 以及 SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 分别列出了 1F6 的重链和轻链可变区的核酸和氨基酸序列,它们公开于国际专利公开号 WO 04/073656;将其内容纳入本文作参考）。例如,该结合物可包含与 mAb 1F6 的相应重链 CDR（H1、H2 或 H3 区）或相应轻链 CDR（L1、L2 或 L3 区）相同或基本相同或基本相似的重链 CDR 和 / 或轻链 CDR。在典型实施方式中,抗-CD70 结合物含有与 mAb 1F6 的相应重链和 / 或轻链 CDR 相同、基本相同或基本相似的两个或三个重链 CDR 和 / 或两个或三个轻链 CDR。

[0114] 例如,在一些实施方式中,当抗-CD70 结合物含有至少一个与 mAb 1F6 的重链 CDR 基本相同或基本相似的重链 CDR 时,该结合物还可含有至少一个与 mAb 1F6 的轻链 CDR 基本相同或基本相似的轻链 CDR。

[0115] 在一些实施方式中,抗-CD70 结合物包含重链或轻链可变区,所述可变区含有 (a) 与 mAb 1F6 的相应 CDR 相同、基本相同或基本相似的一组三个 CDR,和 (b) 一组四个来自人免疫球蛋白的可变区构架区。例如,抗-CD70 抗体可包含重链和 / 或轻链可变区,该可变区含有一组三个 CDR,其中 CDR 组来自单克隆抗体 1F6,和 (b) 一组四个衍生自人 IgG 的构架

区。该抗体任选含有绞链区。在示范性实施方式中,所述抗-CD70 抗体是完全人源化抗体。

[0116] 另一方面,该 CD70 结合物包含与单克隆抗体 2F2 的一个或多个 CDR 基本相同或基本相似的一个或多个互补决定区(CDR)。(SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 以及 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30 分别列出了 2F2 的重链和轻链可变区的核酸和氨基酸序列,它们公开于国际专利公开号 WO 04/073656;将其内容纳入本文作参考)。例如,该结合物可包含与 mAb 2F2 的相应重链 CDR(H1、H2 或 H3 区)或相应轻链 CDR(L1、L2 或 L3 区)相同或基本相同或基本相似的重链 CDR 和 / 或轻链 CDR。在典型实施方式中,抗-CD70 结合物含有与 mAb 2F2 的相应重链和 / 或轻链 CDR 相同、基本相同或基本相似的两个或三个重链 CDR 和 / 或两个或三个轻链 CDR。

[0117] 例如,在一些实施方式中,当抗-CD70 抗体含有至少一个与 mAb 2F2 的重链 CDR 基本相同或基本相似的重链 CDR 时,该抗体或其衍生物还可含有至少一个与 mAb 2F2 的轻链 CDR 基本相同或基本相似的轻链 CDR。

[0118] 在一些实施方式中,抗-CD70 结合物包含重链或轻链可变区,所述可变区含有 (a) 与 mAb 2F2 的相应 CDR 相同、基本相同或基本相似的一组三个 CDR,和 (b) 一组四个来自人免疫球蛋白的可变区构架区。例如,抗-CD70 抗体可包含重链和 / 或轻链可变区,该可变区含有一组三个 CDR,其中 CDR 组来自单克隆抗体 2F2,和 (b) 一组四个衍生自人 IgG 的构架区。该抗体任选含有绞链区。在示范性实施方式中,所述抗-CD70 抗体是完全人源化抗体。

[0119] 在一些实施方式中,构架区选自人种系外显子 V_H 、 J_H 、 V_K 和 J_K 序列。例如,用于人源化 c1F6 V_H 结构域的 FR 的接受体 (acceptor) 序列可选自种系 V_H 外显子 V_H1-18 (Matsuda 等,1993, Nature Genetics 3:88-94) 或 V_H1-2 (Shin 等,1991, EMBO J. 10:3641-3645),就绞链区 (J_H) 而言,是外显子 J_H-6 (Mattila 等,1995, Eur. J. Immunol. 25:2578-2582)。在其它例子中,种系 V_K 外显子 B3 (Cox 等,1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836) 和 J_K 外显子 J_K-1 (Hieter 等,1982, J. Biol. Chem. 257:1516-1522) 可选作用于 c1F6 V_L 结构域人源化的接受体序列。

[0120] 在一些实施方式中,人源化抗-CD70 抗体的构架区序列包含所用的接受体人种系外显子的衍生物,包括再次引入小鼠供体残基的衍生物。这些残基包括在 V_H 的以下一个或多个位置上再次引入小鼠供体残基:H46、H67、H68、H69、H70、H71、H80、H81、H82、H82A 和 H91 (按照 Kabat 编号规则编号)。

[0121] 下表说明各 SEQ ID NO. 所对应的人源化 1F6 的区域。

[0122]

表 1

[0123]

分子	核苷酸或氨基酸	SEQ ID NO
c1F6 重链可变区	核苷酸	1
c1F6 重链可变区	氨基酸	2
h1F6h V_H -D+hIgG ₁ 恒定区	核苷酸	3

h1F6hV _H -D+hIgG ₁ 恒定区	氨基酸	4
h1F6hV _H -E	核苷酸	5
h1F6hV _H -E	氨基酸	6
h1F6hV _H -E+hIgG ₁ 恒定区	核苷酸	7
h1F6hV _H -E+hIgG ₁ 恒定区	氨基酸	8
h1F6hV _H -H	核苷酸	9
h1F6hV _H -H	氨基酸	10
h1F6hV _H -H+hIgG ₁ 恒定区	核苷酸	11
h1F6hV _H -H+hIgG ₁ 恒定区	氨基酸	12
h1F6hV _H -J	核苷酸	13
h1F6hV _H -J	氨基酸	14
h1F6hV _H -J+hIgG ₁ 恒定区	核苷酸	15
h 1F6hV _H -J+hIgG ₁ 恒定区	氨基酸	16
h1F6hV _H -M	核苷酸	17
h1F6hV _H -M	氨基酸	18
h1F6hV _H -M+hIgG ₁ 恒定区	核苷酸	19
h1F6hV _H -M+hIgG ₁ 恒定区	氨基酸	20
c1F6 轻链可变区	核苷酸	21
c1F6 轻链可变区	氨基酸	22
hV _L A	核苷酸	23
hV _L A	氨基酸	24
hV _L A+ 人恒定区	核苷酸	25
hV _L A+ 人恒定区	氨基酸	26
c2F2 重链可变区	核苷酸	27

c2F2 重链可变区	氨基酸	28
c2F2 轻链可变区	核苷酸	29
c2F2 轻链可变区	氨基酸	30

[0124] 在一些实施方式中,CD70 结合物可以是抗体 1F6 或 2F2 的人源化抗体或抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含含有以下氨基酸序列的多肽链:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:24 的多肽链。

[0125] 在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137 的氨基酸序列至少 80% 相同的多肽链。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137 的氨基酸序列至少 85% 相同的多肽链。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137 的氨基酸序列至少 90% 相同的多肽链。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137 的氨基酸序列至少 95% 相同的多肽链。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 20-137 的氨基酸序列至少 99% 相同的多肽链。在一些实施方式中,该多肽不含抗体 1F6 或 2F2 的重链可变区的氨基酸序列。

[0126] 在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列至少 80% 相同的多肽链。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列至少 85% 相同的多肽链。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列至少 90% 相同的多肽链。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列至少 95% 相同的多肽链。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列至少 99% 相同的多肽链。在一些实施方式中,该多肽不含抗体 1F6 或 2F2 的轻链可变区的氨基酸序列。

[0127] 在一些实施方式中,抗-CD70 结合物与单克隆抗体 1F6 或 2F2 竞争结合于人 CD70。在一些实施方式中,CD70 结合物结合于 CD70 时不诱导激动性或拮抗性信号(如不刺激增殖)。在一些实施方式中,CD70 结合物将 CD27 与 CD70 的结合阻断了至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90%。

[0128] CD70 结合物可任选地包含介导或刺激对表达 CD70 的靶细胞的 ADCC、ADCP 和 / 或 CDC 应答的抗体效应物结构域。效应物结构域可以是(例如)Ig 分子的 Fc 结构域。这种 CD70 结合物在(例如)治疗表达 CD70 的癌症或免疫病时可分别对表达 CD70 的癌细胞产生细胞毒或细胞抑制作用,或者对活化的淋巴细胞或树突细胞产生细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用。一般地,CD70 结合物征集和 / 或激活细胞毒性白细胞(如天然杀伤(NK)细胞、吞噬细胞(如巨噬细胞)和 / 或血清补体成分)。

[0129] 抗-CD70 抗体可以是人源化抗体、单链抗体、scFv、双抗体、Fab、小抗体、scFv-Fc、Fv 等。在一些实施方式中,CD70 抗原结合区可连接于效应物结构域,例如免疫球蛋白的铰

链-C_H2-C_H3 结构域或者具有效应物功能的效应物结构域的一部分或片段。抗原结合性抗体片段(包括单链抗体)可包含(例如)可变区以及整个或部分效应物结构域(如单独的 C_H2 和/或 C_H3 结构域或与 C_H1、绞链区和/或 C_L 结构域组合)。另外,抗原结合片段可包含效应物结构域的任何组合。在一些实施方式中,抗-CD70 抗体可以是包含连接于绞链-C_H2-C_H3 结构域的 CD70- 结合性可变区的单链抗体。

[0130] 抗-CD70 抗体的效应物结构域可来自任何合适的人免疫球蛋白同种型。例如,人免疫球蛋白介导 CDC 和 ADCC/ADCP 的能力通常分别为以下顺序: IgM ≈ IgG1 ≈ IgG3 > IgG2 > IgG4 和 IgG1 ≈ IgG3 > IgG2/IgM/IgG4。CD70- 结合性多肽可表达为包含合适恒定区,以产生所需的效应物功能的重组融合蛋白。结合于靶细胞后,抗-CD70 抗体或衍生物可通过抗体效应物功能如 ADCC、CDC 和 ADCP 引发体外和体内的靶细胞破坏。

[0131] CD70 结合物可任选地偶联于治疗剂,如细胞毒剂、细胞抑制剂或免疫调节剂。本文描述了合适的治疗剂。

[0132] 在一些实施方式中,抗-CD70 抗体可以是含有人或非人 Fc 区或其一部分的嵌合抗体。例如,该抗体可包含非人来源的 Fc 结构域或部分,这些来源有(例如)啮齿动物(如小鼠或大鼠)、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、羊驼、马、鸡或猴(如猕猴、恒河猴等)。

[0133] 抗-CD70 结合物如抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性或更多特异性的。多特异性抗体可以对 CD70 不同表位特异和/或可以对 CD70 以及异源蛋白特异。(参见例如 PCT 公开 WO 93/17715、WO 92/08802、WO 91/00360 和 WO 92/05793;Tutt 等,1991, J. Immunol. 147:60-69;美国专利 4,474,893;4,714,681;4,925,648;5,573,920;和 5,601,819;Kostelny 等,1992, J. Immunol. 148:1547-1553)。用于实施本文所述方法的多特异性抗体,包括双特异性和三特异性抗体是免疫特异性结合于 CD70(包括但不限于含有单克隆抗体 2F2 和 1F6 的 CDR 的抗体)和介导 ADCC、ADCP 和/或 CDC 的第二种细胞表面受体或受体复合物,如 CD16/Fc γ RIII、CD64/Fc γ RI、杀伤抑制性或激活受体或补体控制蛋白 CD59 的抗体。在一些实施方式中,多特异性抗体的某部分与第二种细胞表面分子或受体复合物结合能提高抗-CD70 抗体或其它 CD70 结合物的效应物功能。

[0134] 也可根据其结合亲和力描述或说明抗-CD70 抗体和其衍生物和其它结合物。典型的结合亲和力包括解离常数或 K_d 小于 5×10⁻²M、10⁻²M、5×10⁻³M、10⁻³M、5×10⁻⁴M、10⁻⁴M、5×10⁻⁵M、10⁻⁵M、5×10⁻⁶M、10⁻⁶M、5×10⁻⁷M、10⁻⁷M、5×10⁻⁸M、10⁻⁸M、5×10⁻⁹M、10⁻⁹M、5×10⁻¹⁰M、10⁻¹⁰M、5×10⁻¹¹M、10⁻¹¹M、5×10⁻¹²M、10⁻¹²M、5×10⁻¹³M、10⁻¹³M、5×10⁻¹⁴M、10⁻¹⁴M、5×10⁻¹⁵M 或 10⁻¹⁵M 的亲和力。

[0135] 可用本领域已知方法产生抗体。例如,可用各种技术制备单克隆抗体,例如,采用杂交瘤、重组技术和噬菌体呈现技术,或它们的组合。通常,杂交瘤技术可参见例如,Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual* (抗体:实验室手册) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版,1988); 和 Hammerling 等, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤), 第 563-681 页 (Elsevier, 纽约,1981)。可用于制备抗-CD70 抗体的噬菌体呈现法的例子包括例如:Hoogenboom 和 Winter,1991, J. Mol. Biol. 227:381;Marks 等,1991, J. Mol. Biol. 222:581;Quan 和 Carter,2002, *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics in Anti-IgE and Allergic Disease* (开始将单克隆抗体用作抗-IgE 和变应性疾病的治疗剂), Jardieu

和 Fick Jr. 编, Marcel Dekker, 纽约州纽约市, 第 20 章, 第 427-469 页; Brinkman 等, 1995, J. Immunol. Methods 182 :41-50; Ames 等, 1995, J. Immunol. Methods 184 :177-186; Kettleborough 等, 1994, Eur. J. Immunol. 24 :952-958; Persic 等, 1997, Gene 187 :9-18; Burton 等, 1994, Advances in Immunology 57 :191-280; PCT 申请号 PCT/GB91/01134; PCT 公开 WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982、WO 95/20401 和 美国 专 利 5,698,426 ;5,223,409 ;5,403,484 ;5,580,717 ;5,427,908 ;5,750,753 ;5,821,047 ;5,571,698 ;5,427,908 ;5,516,637 ;5,780,225 ;5,658,727 ;5,733,743 和 5,969,108 所述的方法 (将其内容纳入本文作参考)。

[0136] 可用于产生单链抗体的技术的例子包括美国专利 4,946,778 和 5,258,498; Huston 等, 1991, Methods in Enzymology (酶学方法) 203 :46-88; Shu 等, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :7995-7999; 和 Skerra 等, 1988, Science 240 :1038-1040 所述的技术。

[0137] 本领域已知制备双特异性抗体的方法。全长双特异性抗体的传统生产方法基于共同表达两种免疫球蛋白重链 - 轻链对, 其中这两种链特异性不同 (参见例如 Milstein 等, 1983, Nature 305 :537-39)。由于随机分配免疫球蛋白重链和轻链, 这些杂交瘤 (四体杂交瘤) 会产生 10 种不同的抗体分子的潜在混合物, 其中一些抗体分子具有正确的双特异性结构。国际公开号 WO 93/08829 和 Traunecker 等, 1991, EMBO J. 10 :3655-59 中公开了相似的方法。

[0138] 按照不同的方法, 将具有所需结合特异性 (抗体 - 抗原结合位点) 的抗体可变区融合于免疫球蛋白恒定区序列。该融合物一般具有免疫球蛋白重链恒定区, 含有铰链、 C_H2 和 C_H3 区域的至少一部分。在一些实施方式中, 该融合物包含含有轻链结合必需位点的第一种重链恒定区 (C_H1), 其出现于至少一种融合物中。将具有编码免疫球蛋白重链融合物和 (如果需要) 免疫球蛋白轻链的序列的核酸插入不同的表达载体中, 并用它们共转染合适的宿主生物体。在将不等比例的三种多肽链用于构建过程中以产生最优产量的实施方式中, 这将为调整三种多肽片断的相互比例提供极大的灵活性。然而, 当相等比例的至少两种多肽链的表达导致高产量, 或比例不是特别重要时, 有可能将两种或者全部三种多肽链的编码序列插入同一表达载体。

[0139] 在此方法的一个实施方式中, 双特异性抗体的一条臂上含有具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链, 另一条臂上含有杂交免疫球蛋白重链 - 轻链对 (提供第二结合特异性)。这种不对称结构有利于从不想要的免疫球蛋白链组合中分离所需双特异性化合物, 因为仅在一半双特异性分子中存在免疫球蛋白轻链便于分离 (参见例如, 国际公开号 WO 94/04690, 在此整体作为本文参考文献)。

[0140] 关于双特异性抗体的进一步讨论参见例如, Suresh 等, 1986, Methods in Enzymology 121 :210; Rodrigues 等, 1993, J. Immunology 151 :6954-61; Carter 等, 1992, Bio/Technology 10 :163-67; Carter 等, 1995, J. Hematotherapy 4 :463-70; Merchant 等, 1998, Nature Biotechnology 16 :677-81。利用此类技术, 如本文所述, 可制备用于治疗或预防疾病的双特异性抗体。

[0141] 欧洲专利公开号 EPA 0105360 也描述了双功能抗体。如该参考文献所公开, 杂交或双功能抗体可衍生自生物学方法即细胞融和技术, 或者化学方法, 特别是利用交联剂或二硫桥形成试剂, 这种抗体还可包含整个抗体或其片段。例如国际公开 WO83/03679 和欧洲

专利公开号 EPA 0 217 577 均公开了获得这种杂交抗体的方法,两者作为参考文献纳入本文。

[0142] 在一些实施方式中,人构架区的构架残基将被 CDR 供体抗体的对应残基取代,从而改变,优选提高抗原结合。鉴别此类构架取代的方法为本领域所熟知,如建立 CDR 和构架残基的相互作用的模型以鉴定抗原结合的重要构架残基,并建立序列比较的模型以鉴定在特定位置上的特殊构架残基(参见例如,美国专利号 5,585,089;Riechmann 等,1988, *Nature* 332:323.)。可利用本领域熟知的多种技术进行抗体的人源化,例如,CDR-嫁接(参见例如,EP 0239400;PCT 公开 WO 91/09967;美国专利 5,225,539、5,530,101 和 5,585,089)、镶面或表面重建(参见例如,EP 0 592 106;EP 0 519 596;Padlan,1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498;Studnicka 等,1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814;Roguska 等,1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973)和链改组(参见例如,美国专利号 5,565,332)(将所有这些参考文献纳入本文作参考)。

[0143] 人源化单克隆抗体可通过本领域熟知的 DNA 重组技术进行生产,例如利用国际公开号 WO 87/02671;欧洲专利公开号 0 184 187;欧洲专利公开号 0 171 496;欧洲专利公开号 0 173 494;国际专利公开号 WO 86/01533;美国专利号 4,816,567;欧洲专利公开号 0 012 023;Berter 等,1988, *Science* 240:1041-43;Liu 等,1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43;Liu 等,1987, *J. Immunol.* 139:3521-26;Sun 等,1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-18;Nishimura 等,1987, *Cancer Res.* 47:999-1005;Wood 等,1985, *Nature* 314:446-449;Shaw 等,1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-59;Morrison,1985, *Science* 229:1202-07;Oi 等,1986, *BioTechniques* 4:214;美国专利号 5,225,539;Jones 等,1986, *Nature* 321:552-25;Verhoeyan 等,1988, *Science* 239:1534;和 Beidler 等,1988, *J. Immunol.* 141:4053-60 所述的方法;将上述各文献以全文纳入本文作参考。

[0144] 如上所述,CD70 结合物可以是抗-CD70 抗体的衍生物。通常,抗-CD70 抗体衍生物包含抗-CD70 抗体(包括例如,抗原结合片段或保守取代多肽)和与抗-CD70 抗体异源的至少一个多肽区或其它部分。例如,抗-CD70 抗体可通过与任何类型的分子共价连接加以修饰。典型的修饰包括例如:糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封端基团衍生化、蛋白水解切割、连接至细胞配体(如清蛋白-结合分子)或其它蛋白等。可通过已知技术,包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化和衣霉素代谢合成等进行多种化学修饰。

[0145] 在一些实施方式中,这些共价连接不干扰效应物功能,如阻止抗体衍生物通过抗原结合区或其衍生区特异性结合于 CD70,或阻止效应物结构域特异性结合于 Fc 受体。

[0146] 在一些实施方式中,抗体衍生物为包含一个或多个单体的多聚体,如二聚体,其中各单体包括(i)抗-CD70 抗体的抗原结合区或其衍生的多肽区(如用一个或多个氨基酸保守取代)和(ii)多聚化(如二聚化)多肽区,从而使该抗体衍生物形成特异性结合于 CD70 的多聚体(如同源二聚体)。在典型的实施方式中,通过重组或化学方法使抗-CD70 抗体的抗原结合区或其衍生的多肽区与异源蛋白融合,其中所述异源蛋白包含二聚或多聚结构域。在将抗体衍生物给予对象用于治疗或者预防疫病或表达 CD70 的癌症之前,将衍生物置于可形成同源二聚体或异源二聚体的条件下。本文所用的异源二聚体可包含相同的二聚化结构域而不包含不同的 CD70 抗原结合区,包含相同的 CD70 抗原结合区而不包含不同的

二聚化结构域,或者包含不同的 CD70 抗原结合区和二聚化结构域。

[0147] 典型的二聚化结构域是起源于转录因子的二聚化结构域。在一个实施方式中,二聚化结构域是碱性区亮氨酸拉链 (“bZIP”) 的二聚化结构域 (参见 Vinson 等,1989, Science 246 :911-916)。有用的亮氨酸拉链结构域包括例如,酵母转录因子 GCN4、哺乳动物转录因子 CCAAT/ 增强子结合蛋白 C/EBP 和癌基因产物的核转化物 Fos 和 Jun 的亮氨酸拉链结构域。(参见例如, Landschultz 等,1988, Science 240 :1759-64 ;Baxeavanis 和 Vinson,1993, Curr. Op. Gen. Devel. 3 :278-285 ;O’Shea 等,1989, Science 243 :538-542)。在另一实施方式中,二聚化结构域为碱性区螺旋-环-螺旋 (“bHLH”) 蛋白的二聚化结构域。(参见例如, Murre 等,1989, Cell 56 :777-783。也参见 Davis 等,1990, Cell 60 :733-746 ;Voronova 和 Baltimore,1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :4722-26)。尤其有用的 hHLH 蛋白是 myc、max 和 mac。

[0148] 在另一实施方式中,二聚化结构域为免疫球蛋白恒定区,如重链恒定区或其结构域 (如 C_H1 结构域、C_H2 结构域和 / 或 C_H3 结构域)。(参见例如,美国专利 5,155,027、5,336,603、5,359,046 和 5,349,053 ;EP 0367166 ;和 WO 96/04388。)。

[0149] 已知 Fos 和 Jun 之间 (Bohmann 等,1987, Science 238 :1386-1392)、ATF/CREB 家族成员之间 (Hai 等,1989, Genes Dev. 3 :2083-2090)、C/EBP 家族成员之间 (Cao 等,1991, Genes Dev. 5 :1538-52 ;Williams 等,1991, Genes Dev. 5 :1553-67 ;Roman 等,1990, Genes Dev. 4 :1404-15) 以及 ATF/CREB 和 Fos/Jun 家族成员之间 (Hai 和 Curran,1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :3720-24) 形成异源二聚体。因此,当 CD70- 结合蛋白作为含有不同二聚化结构域的异源二聚体给予对象时,可采用上述任何组合。

[0150] 在其它实施方式中,抗 -CD70 抗体衍生物是偶联于第二抗体的抗 -CD70 抗体 (“抗体异源偶联物”) (参见例如美国专利号 4,676,980)。用于实施本发明方法的异源偶联物包含结合于 CD70 的抗体 (如含有单克隆抗体 2F2 或 1F6 的 CDR 和 / 或重链的抗体) 和结合于介导 ADCC、吞噬作用和 / 或 CDC 的表面受体或受体复合物,如 CD16/FcγRIII、CD64/FcγRI、杀伤细胞活化或抑制受体或者补体控制蛋白 CD59 的抗体。在典型的实施方式中,多特异性抗体部分与第二种细胞表面分子或受体复合物的结合能提高抗 -CD70 抗体的效应物功能。在其它实施方式中,所述抗体可以是治疗剂。本文描述了合适的抗体治疗剂。

[0151] 在一些实施方式中,经过本领域已知的任何竞争性结合测定法 (如本文所述的免疫试验) 测定,抗 -CD70 抗体或其衍生物竞争性抑制 mAb 1F6 或 2F2 与 CD70 的结合。在典型的实施方式中,该抗体将 1F6 或 2F2 与 CD70 的结合竞争性抑制了至少 50%、至少 60%、至少 70% 或至少 75%。在其它实施方式中,该抗体将 1F6 或 2F2 与 CD70 的结合竞争性抑制了至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95%。

[0152] 可用任何已知方法测定抗体与 CD70 的特异性结合。可以采用的免疫测定包括例如:采用以下技术的竞争性和非竞争性测定系统:如 Western 印迹、放射性免疫试验、ELISA (酶联免疫吸附实验)、“夹心”免疫试验、免疫沉淀试验、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散试验、凝集试验、补体结合试验、免疫放射试验、荧光免疫试验和蛋白 A 免疫试验。这些试验是本领域的常规和熟知试验。(参见例如, Ausubel 等编, Short Protocols in Molecular Biology (分子生物学小方法) (John Wiley & Sons, Inc., 纽约, 第四版, 1999) ;Harlow 和 Lane, Using Antibodies :A Laboratory Manual (使用抗体:实验室手册)

(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约, 1999.)

[0153] 另外,可采用竞争性结合试验测定抗体与 CD70 的结合亲和力和抗体 CD70 相互作用的解离速率。竞争性结合试验的一个例子是放射性免疫试验,其包括在递增量的未标记 CD70 存在下用感兴趣抗体培育标记(如 ^3H 或 ^{125}I) 的 CD70,并检测结合于标记 CD70 的抗体。然后,可由 Scatchard 作图分析的数据测定抗体与 CD70 的亲合力和结合解离速率。也可采用放射性免疫试验测定与第二抗体(如 mAb 1F6 或 2F2)的竞争。在这种情况下,在递增量的未标记第二抗体存在下用偶联于标记(如 ^3H 或 ^{125}I) 化合物的感兴趣抗体培育 CD70。或者,可通过表面等离子共振法测定抗体与 CD70 的结合亲和力以及抗体-CD70 相互作用的结合速率和解离速率。在一些实施方式中,抗-CD70 抗体或其衍生物可靶向或累积在表达 CD70 的细胞的细胞膜上。

[0154] 可用本领域已知的蛋白合成方法,一般是(例如)重组表达技术产生抗-CD70 抗体和其衍生物。结合于 CD70 的抗体或其衍生物的重组表达一般包括构建含有编码该抗体或其衍生物的核酸的表达载体。可通过重组 DNA 技术用本领域已知技术产生用于生产蛋白质分子的载体。可采用标准技术,例如下述文献所述的技术进行核酸重组、核酸合成、细胞培养、转基因掺入和重组蛋白表达: Sambrook 和 Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆: 实验室手册) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约, 第 3 版, 2001); Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆: 实验室手册) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约, 第 2 版, 1989); Short Protocols in Molecular Biology (分子生物学小方法) (Ausubel 等, John Wiley & Sons, 纽约, 第 4 版, 1999); 和 Glick 和 Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* (分子生物技术: 重组 DNA 的原理和应用) (ASM Press, 华盛顿特区, 第 2 版, 1998)。

[0155] 例如,在抗-CD70 抗体的重组表达中,表达载体可编码操作性连接于启动子的重链或轻链,或重链或轻链可变区。表达载体可包括例如,编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见例如 PCT 公开 WO 86/05807; PCT 公开 WO 89/01036; 和美国专利号 5,122,464),可将抗体的可变区克隆入这种载体中用于表达完整的重链或轻链。用常规技术将表达载体转移到宿主细胞中,然后用常规技术培养转染细胞以产生抗-CD70 抗体。在用于表达双链抗体的典型实施方式中,编码重链和轻链的载体可以在宿主细胞中共同表达,以表达出完整的免疫球蛋白分子。

[0156] 可利用多种原核和真核宿主-表达载体系统表达抗-CD70 抗体或其衍生物。一般地,真核细胞(特别是就完整重组抗-CD70 抗体分子而言)可用于表达重组蛋白。例如,哺乳动物细胞如中华仓鼠卵巢细胞(CHO)与载体如人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件组合时,是有效产生抗-CD70 抗体和其衍生物的表达系统(参见例如, Foecking 等, 1986, *Gene* 45:101; Cockett 等, 1990, *Bio/Technology* 8:2)。

[0157] 其它宿主-表达系统包括例如:细菌细胞中基于质粒的表达系统(参见例如, Ruther 等, 1983, *EMBO* 1,2:1791; Inouye 和 Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke 和 Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509);昆虫系统如在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中采用苜蓿夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)表达载体;以及哺乳动物细胞中基于病毒的表达系统,如基于腺病毒的

系统（参见例如 Logan 和 Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :355-359 ;Bittner 等, 1987, Methods in Enzymol. 153 :51-544）。

[0158] 此外,可选择以所需的特定方式调节插入序列的表达、或者修饰和加工基因产物的宿主细胞系。可选择合适的细胞系或宿主系统以保证正确地修饰和加工（如糖基化、磷酸化和切割）所表达的蛋白质。为此,可采用含有能够适当加工初级转录物和基因产物的细胞机器的真核宿主细胞。这种哺乳动物宿主细胞包括例如:CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3 和 W138。

[0159] 一般用稳定的表达系统进行重组抗-CD70 抗体或其衍生物或其它 CD70 结合物的长期、高产率生产。例如,可通过用合适表达控制元件（如启动子和增强子序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点）控制的 DNA 和选择性标记转化宿主细胞,然后在选择性培养基中培养转化细胞,从而工程改造稳定表达抗-CD70 抗体或其衍生物的细胞系。选择性标记对选择产生抗性,并允许细胞将其 DNA 稳定地整合到其染色体中,生长形成细胞灶,进而可被克隆和扩增成细胞系。可采用许多选择系统,包括例如:单纯疱疹病毒胸苷激酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶基因,可将它们分别用于 tk⁻、hgp⁻ 或 aprt⁻ 细胞。抗代谢剂抗性也可用作以下基因的选择基础:产生甲氨蝶呤抗性的 dhfr ;产生霉酚酸抗性的 gpt ;产生氨基葡萄糖苷 G-418 抗性的 neo ;和产生潮霉素抗性的 hyg^r。通常,可采用本领域通常已知的重组 DNA 技术方法选择所需的重组克隆,这种方法参见例如, Current Protocols in Molecular Biology(新编分子生物学方法)(Ausubel 等编, John Wiley & Sons, 纽约, 1993) ;Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual(基因转移和表达, 实验室手册)(Stockton Press, 纽约, 1990) ;Current Protocols in Human Genetics(新编人类基因组方法)(Dracopoli 等编, John Wiley & Sons, 纽约, 1994, 第 12 和 13 章) ;和 Colberre-Garapin 等, 1981, J. Mol. Biol. 150 :1。

[0160] 可通过载体扩增提高抗体或其衍生物的表达水平。（通常参见例如:Bebbington 和 Hentschel, The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning(将基于哺乳动物细胞中表达克隆基因所用的基因扩增的载体用于 DNA 克隆), 第 3 卷(Academic Press, 纽约, 1987)）。当表达抗-CD70 抗体或其衍生物的载体系统中的标记物可扩增时,提高宿主细胞培养基中存在的抑制剂水平能选择具有高拷贝数的标记物基因、从而对该抑制剂产生抗性的宿主细胞。相关抗体基因的拷贝数也会增加,从而提高了抗体或其衍生物的表达（参见 Crouse 等, 1983, Mol. Cell. Biol. 3 :257）。

[0161] 当抗-CD70 抗体包含重链和轻链或其衍生物时,可用两种表达载体共同转染宿主细胞,其中第一种载体编码重链蛋白,第二种载体编码轻链蛋白。这两种载体可含有相同的选择性标记物,它们能够使重链和轻链蛋白的表达量相等。或者,可采用编码并能表达重链和轻链蛋白的一种载体。在这种情况下,轻链一般位于重链之前,以避免毒性游离重链过多（参见 Proudfoot, 1986, Nature 322 :52 ;Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :2197）。重链和轻链的编码序列可包含 cDNA 或基因组 DNA。

[0162] 一旦抗-CD70 抗体或其衍生物产生（如由动物、化学合成或重组表达产生）后,可用任何合适的蛋白质纯化方法进行纯化,包括例如层析（例如,离子交换或亲和层析（如用于纯化具有完整 Fc 区的抗体的蛋白 A 层析））、离心、差异溶解性或任何其它蛋白质纯化标

准技术。抗-CD70 抗体或其衍生物可以（例如）融合于标记物序列如肽，以帮助用亲和层析进行纯化。合适的标记物氨基酸序列包括例如：六-组氨酸肽（如 pQE 载体（凯杰公司（QIAGEN, Inc.）, Chatsworth, CA, 91311）中提供的标签）和“HA”标签（对应于衍生自流感血凝素蛋白的表位）（Wilson 等, 1984, Cell 37 :767）和“flag”标签。

[0163] 一旦抗-CD70 抗体或其衍生物产生后, 可用下述或本领域已知的方法测定它对表达 CD70 的癌细胞的细胞抑制或细胞毒作用或者对表达 CD70 的免疫细胞的免疫调节作用。

[0164] 为了最大程度降低抗-CD70 抗体对活化的免疫细胞或表达 CD70 的癌细胞之外细胞的活性, 可采用特异性结合于细胞膜结合性 CD70、而非溶解态 CD70 的抗体, 以便使该抗-CD70 抗体在活化的免疫细胞或表达 CD70 的癌细胞的细胞表面上浓缩。

[0165] 一般地, 抗-CD70 抗体或其衍生物是基本纯化的（如基本不含限制其作用或产生不良副作用的物质）。在一些实施方式中, 抗-CD70 抗体或其衍生物的纯度为至少约 40%, 至少约 50%, 或至少约 60%。在一些实施方式中, 抗-CD70 抗体或其衍生物的纯度为至少约 60-65%、65-70%、70-75%、75-80%、80-85%、85-90%、90-95% 或 95-98%。在一些实施方式中, 抗-CD70 抗体或其衍生物的纯度约为 99%。

[0166] III. 其它 CD70 结合物

[0167] 其它 CD70 结合物包括与异源蛋白（一般为至少 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或至少 100 个氨基酸）的融合蛋白（即通过重组方法融合或化学方法偶联, 包括共价和非共价偶联的蛋白质）。这种 CD70 结合物可包括结合于 CD70 和免疫球蛋白效应物结构域或其功能等同物的部分。本文所用的免疫球蛋白效应物结构域的功能等同物结合于具有吞噬细胞或裂解细胞活性的免疫细胞上的 Fc 受体, 或者使 Fc 效应物结构域结合于补体系统的成分。该融合蛋白不一定需要是直接连接, 可通过接头序列连接。

[0168] 例如, 可通过将抗-CD70 抗体的一个或多个 CDR 或可变区的编码区框内融合于编码异源蛋白的序列而重组产生 CD70 结合物。异源蛋白可包括例如：效应物结构域、其功能等同物或其它功能结构域, 以提供以下一种或多种特征：促进稳定表达；提供有助于高产率重组表达的方式；提供细胞抑制、细胞毒或免疫调节活性；和 / 或提供多聚化结构域。

[0169] 在一些实施方式中, CD70 结合物可包括来自结合于 CD70 并且无需偶联于细胞毒剂即能单独消耗表达 CD70 的细胞或抑制其增殖的抗体的一个或多个 CDR。

[0170] IV. 改进抗-CD70 靶向剂的效应物功能的方法

[0171] 在一些实施方式中, 可采用本领域已知的一种或多种抗体工程方法改进其效应物功能, 从而增强 CD70 结合物的效应物功能。下面提供这类方法的说明性、非限制性例子。

[0172] ADCC 和 ADCP 是由细胞-结合抗体与效应物细胞上表达的 Fc γ 受体 (Fc γ R) 相互作用介导的。IgG Fc 区的糖基化状态和一级氨基酸序列对 Fc γ -Fc γ R 相互作用有功能性影响。Fc γ -Fc γ R 相互作用较强与效应物细胞杀伤靶细胞的能力更高相关联。

[0173] 共价连接于保守性 Asn297 的寡糖参与了 IgG Fc 区与 Fc γ R 的结合 (Lund 等, 1996, J. Immunol. 157 :4963-69; Wright 和 Morrison, 1997, Trends Biotechnol. 15 :26-31)。工程改造 IgG 上的此种糖形式可显著提高 IgG 介导的 ADCC。将等分 N-乙酰基葡萄糖胺修饰 (Umaña 等, 1999, Nat. Biotechnol. 17 :176-180; Davies 等, 2001, Biotech. Bioeng. 74 :288-94) 加入此糖形式或从此糖形式中去除岩藻糖 (Shields 等, 2002, J. Biol. Chem. 277 :26733-40; Shinkawa 等, 2003, J. Biol. Chem. 278 :6591-604; Niwa 等, 2004,

Cancer Res. 64 :2127-33) 是能改善 IgG Fc 和 Fc γ R 的结合,从而提高 Ig- 介导的 ADCC 活性的 IgG Fc 工程改造的两个例子。

[0174] 系统取代人 IgG1Fc 区接触溶剂的氨基酸会产生 Fc γ R 结合亲和力改变的 IgG 变体 (Shields 等,2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604)。与母体 IgG1 相比,在 Thr256/Ser298、Ser298/Glu333、Ser298/Lys334 或 Ser298/Glu333/Lys334 上用 Ala 取代的这些变体的亚组显示出与 Fc γ R 的结合亲和力和 ADCC 活性升高 (Shields 等,2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604 ;Okazaki 等,2004, J. Mol. Biol. 336 :1239-49)。

[0175] 抗体 - 介导的 CDC 从 Clq 结合于细胞结合性 IgG 分子开始。已经报道了人 IgG1 上负责 Clq 结合的特定氨基酸残基和 Clq 结合的物种特异性差别 (Idusogie 等,2000, J. Immunol. 164 :4178-4184)。在 Lys326 和 Glu333 上的取代能改进抗体的补体结合活性;例如,这种取代可改进人 IgG1 抗体利妥昔单抗的 Clq 结合和 CDC 活性 (Idusogie 等,2001, J. Immunol. 166 :2571-2575)。在人 IgG2 主链上的相同取代可将与 Clq 结合性能差和补体活化活性严重缺陷的抗体同种型转变为可同时结合 Clq 和介导 CDC 的同种型 (Idusogie 等,2001, J. Immunol. 166 :2571-75)。也利用几种其它方法改进抗体的补体结合活性。例如,将 IgM 的 18- 氨基酸羧基 - 末端尾部分嫁接于 IgG 的羧基端能显著提高其 CDC 活性。即使采用通常检测不到 CDC 活性的 IgG4 也能观察到这种现象 (Smith 等,1995, J. Immunol. 154 :2226-36)。同时,用 Cys 取代接近 IgG1 重链羧基端的 Ser444 能诱导 IgG1 发生尾对尾二聚化,其 CDC 活性比单体 IgG1 高 200 倍 (Shopes 等,1992, J. Immunol. 148 :2918-22)。此外,具有 Clq 特异性的双特异性双抗体构建物也产生 CDC 活性 (Kontermann 等,1997, Nat. Biotech. 15 :629-31)。

[0176] 抗体的体内半衰期也可能影响其效应物功能。在一些实施方式中,需要延长或缩短抗体的半衰期,以改变其治疗活性。FcRn 是结构上类似于非共价结合于 β 2- 微球蛋白的 MHC I 类抗原的受体。FcRn 调节 IgG 的异化作用和其跨组织胞运作用 (Ghetie 和 Ward, 2000, Annu. Rev. Immunol. 18 :739-766 ;Ghetie 和 Ward,2002, Immunol. Res. 25 :97-113)。IgG-FcRn 相互作用在 pH 6.0 (胞内小泡的 pH) 时发生,但在 pH 7.4 (血液 pH) 时不发生;这种相互作用使 IgG 能够循环回循环系统 (Ghetie 和 Ward,2000, Ann. Rev. Immunol. 18 :739-766 ;Ghetie 和 Ward,2002, Immunol. Res. 25 :97-113)。对参与 FcRn 结合的人 IgG₁ 上的区域作图 (Shields 等,2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604)。人 IgG₁ 的位置 Pro238、Thr256、Thr307、Gln311、Asp312、Glu380、Glu382 或 Asn434 上发生的丙氨酸取代能增强 FcRn 结合 (Shields 等,2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604)。预计带有这些取代的 IgG₁ 分子具有较长的血清半衰期。因此,与未修饰 IgG₁ 相比,这些修饰的 IgG₁ 分子可能在长时间内进行其效应物功能,从而行使其治疗功效。

[0177] V. 细胞毒、细胞抑制和免疫调节活性的试验

[0178] 测定抗体是否介导对抗靶细胞的效应物功能的方法是已知的。这种方法的说明性例子如下所述。

[0179] 为了测定抗 -CD70 抗体或其衍生物是否介导对抗活化免疫细胞或表达 CD70 的癌细胞的抗体依赖性细胞毒作用,可采用在抗体和效应物免疫细胞的存在下测定靶细胞死亡的试验。用于测定此类细胞毒作用的试验可基于在效应物细胞和靶点特异性抗体存在下培育后测定代谢标记的靶细胞释放的 ⁵¹Cr (参见例如, Perussia 和 Loza,2000, Methods

in Molecular Biology 121:179-92; 和“⁵¹Cr Release Assay of Antibody-dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) (抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的 ⁵¹Cr 释放试验)”, Current Potocols in Immunology (新编免疫学方法), Coligan 等编, Wiley and Sons, 1993)。例如, 可用不同浓度的抗 -CD70 抗体处理用 Na₂⁵¹CrO₄ 标记并以 5,000 个细胞 / 孔接种于 96 孔板的活化的免疫细胞 (如活化的淋巴细胞) 或表达 CD70 的癌细胞 30 分钟, 然后与正常人外周血单核细胞 (PBMC) 混合 4 小时。伴随靶细胞死亡的膜破坏会将 ⁵¹Cr 释放到培养物上清液中, 可收集这些上清液并测定其放射性, 从而确定其细胞毒活性。测定 ADCC 的其它试验可包括非放射性标记或基于诱导释放特定酶。例如, 基于时间分辨的荧光测定术的非放射性试验是市售的 (Delphia, Perkin Elmer)。此试验基于在靶细胞上加载荧光增强配体的乙酸基甲酯 (BATDA), 其能透过细胞膜、然后水解形成不能透过膜的亲水性配体 (TDA)。与靶点特异性抗体和 PBMC 效应物细胞混合时, 裂解细胞释放 TDA, 并与钨混合时可形成发强荧光的螯合物。经过时间分辨的荧光测定法测定, 该信号与细胞裂解量相关联。

[0180] 为了确定抗 -CD70 抗体或其衍生物是否介导对抗活化免疫细胞或表达 CD70 的癌细胞的抗体依赖性细胞吞噬作用, 可采用测定效应物免疫细胞 (如新鲜培养的巨噬细胞或已建立的巨噬细胞 - 样细胞系) 内化靶细胞的实验 (参见例如, Munn 和 Cheung, 1990, J. Exp. Med. 172:231-37; Keler 等, 2000, J. Immunol. 164:5746-52; Akewanlop 等, 2001, Cancer Res. 61:4061-65)。例如, 靶细胞可用亲脂性膜染料如 PKH67 (Sigma) 标记, 用靶点特异性抗体包被, 并与效应物免疫细胞混合 4-24 小时。然后, 可采用吞噬细胞表面标记物 (如 CD14) 的特异性荧光染料标记抗体复染、并用双色流式细胞术或荧光显微术分析细胞, 从而鉴定效应物细胞。双阳性细胞代表含有内化的靶细胞的效应物细胞。在这些实验中, 效应物细胞可以是衍生自用 M-CSF 或 GM-CSF 培养 5-10 天分化为巨噬细胞的 PBMC 的单核细胞 (参见例如, Munn 和 Cheung, 同上)。获自 ATCC 的人巨噬细胞样细胞系 U937 (Larrick 等, 1980, J. Immunology 125:6-12) 或 THP-1 (Tsuchiya 等, 1980, Int. J. Cancer 26:171-76) 可用作另一种吞噬细胞来源。

[0181] 也知道确定抗体结合于靶细胞后是否介导补体依赖性细胞毒作用的方法。可用相同的方法确定 CD70 结合物是否介导对活化免疫细胞或表达 CD70 的癌细胞的 CDC。这类方法的说明性例子如下所述。

[0182] 有效补体的来源可以是正常人血清或纯化自实验室动物, 包括兔。在标准测定中, 在补体存在下 CD70 结合物与表达 CD70 的活化免疫细胞 (如活化淋巴细胞) 或表达 CD70 的癌细胞一起培育。可以用几种读数测定这类 CD70 结合物介导细胞裂解的能力。在一个实施例中, 采用 Na⁵¹CrO₄ 释放实验。在此实验中, 用 Na⁵¹CrO₄ 标记靶细胞。洗掉未掺入的 Na⁵¹CrO₄, 以合适密度, 一般是 5,000-50,000 个细胞 / 孔将细胞接种于 96 孔板。一般在正常血清或纯化补体的存在下用 CD70 结合物 37°C、5% CO₂ 气氛下培育 2-6 小时。用 γ 射线计数法测定等份的培养物上清液中释放的放射性, 表明细胞裂解程度。通过释放掺入的 Na⁵¹CrO₄ 确定去污剂 (0.5-1% NP-40 或 Triton X-100) 处理引起的细胞裂解最大值。在仅有补体而没有任何 CD70 结合物的孔中测定自发性背景细胞裂解。按照下式计算细胞裂解百分数: (CD70 结合物诱导的裂解 - 自发性裂解) / 细胞裂解最大值。第二个读数是活细胞的代谢染料如 Alamar Blue 减少。在此实验中, 用 CD70 结合物和补体培育靶细胞, 培育方

法如上所述。培育结束时,加入 1/10 体积的 Alamar Blue (Biosource International, 加利福尼亚州卡马里奥)。继续在 37℃、5% CO₂ 气氛下培育 16 小时。用激发光 530nm 和发射光 590nm 的荧光分析测定 Alamar Blue (代表有代谢活性的活细胞) 减少。第三个读数是细胞膜对碘化丙啶 (PI) 的通透性。由于补体激活在质膜上形成孔洞有利于 PI 进入细胞中, PI 在细胞中会扩散至核并结合 DNA。结合于 DNA 后, 600nm 处的 PI 荧光显著增强。用 CD70 结合物和补体处理靶细胞的过程如上所述。培育结束时, 加入 PI, 使其终浓度为 5 μg/ml。接着用流式细胞术检测细胞悬液, 采用 488nm 氩气激光器进行激发。用 600nm 处的荧光发射检测裂解细胞。

[0183] VI. 免疫病或表达 CD 70 的癌症的动物模型

[0184] 可在免疫病或表达 CD70 的癌症的动物模型中检测或评价抗 -CD70 结合物, 如抗体或其衍生物。本领域技术人员已知许多已经建立的免疫病或表达 CD70 的癌症的动物模型, 其中任何一种均可用于测定抗 -CD70 抗体或其衍生物的效能。这类模型的非限制性例子如下所述。

[0185] 下述文献描述了系统性和器官特异性自身免疫病、包括糖尿病、狼疮、全身性硬化、舍格伦综合征、实验性自身免疫脑脊髓炎 (多发性硬化)、甲状腺炎、重症肌无力、关节炎、葡萄膜炎和炎性肠病的动物模型的例子: Bigazzi, "Animal Models of Autoimmunity: Spontaneous and Induced (自身免疫的动物模型: 自发性和诱导性)", The Autoimmune Diseases (自身免疫病) (Rose 和 Mackay 编, Academic Press, 1998) 和 "Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease (自身免疫和炎症性疾病的动物模型)", Current Protocols in Immunology (新编免疫学方法) (Coligan 等编, Wiley 和 Sons, 1997)。

[0186] 也可用啮齿动物建立变应性疾病如哮喘和皮炎的模型。可以用卵清蛋白 (Tomkinson 等, 2001, J. Immunol. 166 : 5792-800) 或曼氏裂头吸虫 (*Schistosoma mansoni*) 卵抗原 (Tesciuba 等, 2001, J. Immunol. 167 : 1996-2003) 在小鼠中诱导呼吸道超敏反应。Nc/Nga 小鼠品系显示出血清 IgE 显著增加并自发性发生特应性皮炎样损伤 (Vestergaard 等, 2000, Mol. Med. Today 6 : 209-10; Watanabe 等, 1997, Int. Immunol. 9 : 461-66; Saskawa 等, 2001, Int. Arch. Allergy Immunol. 126 : 239-47)。

[0187] 将免疫健全供体的淋巴细胞注射到致死性辐射的组织不相容性宿主中是在小鼠中诱导 GVHD 的经典方法。或者, 亲本 B6D2F1 鼠模型提供了诱导急性和慢性 GVHD 的系统。在此模型中, B6D2F1 小鼠是亲本 C57BL/6 和 DBA/2 小鼠品系杂交的 F1 后代。将 DBA/2 淋巴细胞转移到未辐射 B6D2F1 小鼠中会引起慢性 GVHD, 而转移 C57BL/6、C57BL/10 或 B10. D2 淋巴细胞会引起急性 GVHD (Slayback 等, 2000, Bone Marrow Transpl. 26 : 931-938; Kataoka 等, 2001, Immunology 103 : 310-318)。

[0188] 此外, 人造造血干细胞和成熟的外周血淋巴细胞可移植给 SCID 小鼠, 这些人淋巴 - 造血细胞在 SCID 小鼠中仍有功能 (McCune 等, 1988, Science 241 : 1632-1639; Kamel-Reid 和 Dick, 1988, Science 242 : 1706-1709; Mosier 等, 1988, Nature 335 : 256-259)。这为直接检测人淋巴细胞的潜在治疗剂提供了小动物模型系统。(参见例如, Tournoy 等, 2001, J. Immunol. 166 : 6982-6991)。

[0189] 而且, 可通过将表达 CD70 的人肿瘤细胞系植入合适的免疫缺陷型啮齿动物品系, 如无胸腺裸小鼠或 SCID 小鼠中, 建立检测抗 -CD70 抗体或其衍生物的体内效能的小动物模

型。表达 CD70 的人淋巴瘤细胞系的例子包括例如, Daudi 细胞 (Ghetie 等, 1994, Blood 83 : 1329-36 ; Ghetie 等, 1990, Int. J. Cancer 15 : 481-85 ; de Mont 等, 2001, Cancer Res. 61 : 7654-59)、HS-Sultan 细胞 (Cattan 和 Maung, 1996, Cancer Chemother. Pharmacol. 38 : 548-52 ; Cattan 和 Douglas, 1994, Leuk. Res. 18 : 513-22)、Raji 细胞 (Ochakovskaya 等, 2001, Clin. Cancer Res. 7 : 1505-10 ; Breisto 等, 1999, Cancer Res. 59 : 2944-49) 和 CA46 细胞 (Kreitman 等, 1999, Int. J. Cancer 81 : 148-55)。表达 CD70 的霍奇金淋巴瘤细胞系的非限制性例子是 L428 细胞 (Drexler, 1993, Leuk. Lymphoma 9 : 1-25 ; Dewan 等, 2005, Cancer Sci. 96 : 466-473)。表达 CD70 的人肾细胞癌细胞系的非限制性例子包括 786-0 细胞 (Ananth 等, 1999, Cancer Res. 59 : 2210-16 ; Datta 等, 2001, Cancer Res. 61 : 1768-75)、ACHN 细胞 (Hara 等, 2001, J. Urol. 166 : 2491-94 ; Miyake 等, 2002, J. Urol. 167 : 2203-08)、Caki-1 细胞 (Prewett 等, 1998, Clin. Cancer Res. 4 : 2957-66 ; Shi 和 Siemann, 2002, Br. J. Cancer 87 : 119-26) 和 Caki-2 细胞 (Zellweger 等, 2001, Neoplasia 3 : 360-67)。表达 CD70 的鼻咽癌细胞系的非限制性例子包括 C15 和 C17 (Busson 等, 1988, Int. J. Cancer 42 : 599-606 ; Bernheim 等, 1993, Cancer Genet. Cytogenet. 66 : 11-5)。表达 CD70 的人胶质瘤细胞系的非限制性例子包括 U373 细胞 (Palma 等, 2000, Br. J. Cancer 82 : 480-7) 和 U87MG 细胞 (Johns 等, 2002, Int. J. Cancer 98 : 398-408)。多发性骨髓瘤细胞系的非限制性例子包括 MM. 1S 细胞 (Greenstein 等, 2003, Experimental Hematology 31 : 271-282) 和 L363 细胞 (Diehl 等, 1978, Blut 36 : 331-338)。(也参见 Drexler 和 Matsuo, 2000, Leukemia Research 24 : 681-703)。可以在免疫缺陷型啮齿动物宿主中建立这些肿瘤细胞系, 具体是皮下注射形成实体瘤或静脉内注射形成弥散性肿瘤。一旦在宿主中建立后, 可用这些肿瘤模型评价抗 -CD70 抗体或其衍生物对调节体内肿瘤生长的疗效 (如本文所述)。

[0190] VII. CD 70- 相关性疾病

[0191] 本文所述的抗 -CD70 结合物 (如抗体和衍生物) 可用于治疗或预防特征是通过不适当地激活免疫细胞 (如淋巴细胞或树突细胞) 表达 CD70 的癌症或免疫病。这种 CD70 表达可能是由于 (例如) 细胞表面上 CD70 蛋白水平提高和 / 或表达的 CD70 抗原性改变。通过给予需要治疗或预防的对象有效量的抗 -CD70 抗体或其衍生物按照本文所述方法治疗或预防免疫病, 其中所述抗体或其衍生物 (i) 结合于表达 CD70 并与疾病状态有关的活化免疫细胞和 (ii) 对活化免疫细胞产生细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用。在一些实施方式中, 在不偶联于细胞毒剂、细胞抑制剂或免疫调节剂的情况下产生细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用。在一些实施方式中, 通过偶联于细胞毒剂、细胞抑制剂或免疫调节剂产生细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用。

[0192] 特征是不不适当地激活免疫细胞并且可用本文所述方法治疗或预防的免疫病可根据引起该疾病的超敏反应类型分类。这些反应一般分为四种类型: 过敏反应、细胞毒 (细胞溶解) 反应、免疫复合物反应或细胞介导的免疫 (CMI) 反应 (也称为延迟型超敏 (DTH) 反应)。(参见例如, Fundamental Immunology (基础免疫学) (William E. Paul 编, Raven Press, 纽约, 第三版, 1993).)

[0193] 这类免疫病的具体例子包括: 类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、自身免疫性脱髓鞘病 (如多发性硬化、变应性脑脊髓炎)、内分泌性眼病、葡萄膜视网膜炎、系统性红斑狼疮、重症肌无力、格拉夫斯病、肾小球肾炎、自身免疫性肝病、炎性肠病 (如, 克罗恩氏病)、

过敏反应、变态反应、舍格伦综合征、I 型糖尿病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、纤维肌痛、多肌炎、皮炎、多发性内分泌衰竭、Schmidt 综合征、自身免疫性葡萄膜炎、艾迪生病、肾上腺炎、甲状腺炎、桥本甲状腺炎、自身免疫性甲状腺病、恶性贫血、胃萎缩、慢性肝炎、狼疮样肝炎、动脉粥样硬化、亚急性皮肤红斑狼疮、甲状旁腺功能减退症、Dressler 综合征、自身免疫性血小板减少、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常性天疱疮、天疱疮、疱疹样皮炎、斑秃、类天疱疮、硬皮病、进行性系统性硬化病、CREST 综合征（钙质沉着、雷诺现象、食管张力减低、指趾硬化和毛细血管扩张）、男性和女性自身免疫性不育、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、混合型结缔组织病、结节性多动脉炎、全身坏死性血管炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、肺出血 - 肾炎综合征、查加斯病、结节病、风湿热、哮喘、习惯性流产、抗磷脂抗体综合征、农夫肺、多形性红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征、自身免疫性慢性活动性肝炎、鸟商肺、中毒性表皮坏死松解症、Alport 综合征、肺泡炎、变应性肺泡炎、纤维性肺泡炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、高安动脉炎、风湿性多肌痛、暂时性动脉炎、血吸虫病、巨细胞性动脉炎、蛔虫病、曲霉病、Sampter 综合征、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、Behcet 病、Caplan 综合征、川崎病、登革热、脑脊髓炎、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑、牛皮癣、骨髓成红血细胞增多症、嗜酸性筋膜炎、Shulman 综合征、费尔蒂综合征、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、Fuch 睫状体炎、IgA 肾病、Henoch-Schonlein 紫癜、移植物抗宿主病、移植排斥、心肌病、Eaton-Lambert 综合征、复发性多软骨炎、冷球蛋白血症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、伊文综合征和自身免疫性性腺衰竭。

[0194] 因此，本文所述方法包括治疗 B 淋巴细胞病（如系统性红斑狼疮、肺出血 - 肾炎综合征、类风湿性关节炎和 I 型糖尿病）、Th₁- 淋巴细胞病（如类风湿性关节炎、多发性硬化、牛皮癣、舍格伦综合征、桥本甲状腺炎、格拉夫斯病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、结核病或移植物抗宿主病）或者 Th₂- 淋巴细胞病（如特应性皮炎、系统性红斑狼疮、特应性哮喘、鼻结膜炎、过敏性鼻炎、Omenn 综合征、全身性硬化或慢性移植物抗宿主病）。通常，涉及树突细胞的疾病包括 Th₁- 淋巴细胞病或 Th₂- 淋巴细胞病。

[0195] 在一些实施方式中，所述免疫病是 T 细胞 - 介导的免疫病，如 T 细胞病，其中与疾病相关的活化 T 细胞表达 CD70。可给予抗 -CD70 结合物（如抗体或衍生物），以消耗这种表达 CD70 的活化 T 细胞。在一个具体实施方式中，给予抗 -CD70 抗体或衍生物可消耗表达 CD70 的活化 T 细胞，而所述抗 -CD70 或衍生物基本不消耗静息 T 细胞。在本文中，“基本不消耗”指少于约 60%、或少于约 70%或少于约 80%的静息 T 细胞未被消耗。

[0196] 抗 -CD70 结合物（如抗体和衍生物）也可用于治疗或预防表达 CD70 的癌症。通过给予需要治疗或预防的对象有效量的抗 -CD70 抗体或其衍生物按照本文所述方法治疗或预防表达 CD70 的癌症，其中所述抗体或其衍生物 (i) 结合于表达 CD70 的癌细胞和 (ii) 产生细胞毒或细胞抑制作用以消耗或抑制表达 CD70 的癌细胞增殖。在一些实施方式中，在不偶联于细胞毒剂、细胞抑制剂或免疫调节剂的情况下产生细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用。在一些实施方式中，通过偶联于细胞毒剂、细胞抑制剂或免疫调节剂产生细胞毒、细胞抑制或免疫调节作用。

[0197] 可用本文所述方法治疗或预防的表达 CD70 的癌症包括例如：非霍奇金淋巴瘤的不同亚型（缓和性 (indolent) NHL、滤泡性 NHL、小淋巴细胞性淋巴瘤、淋巴浆细胞性 NHL 或

边缘区 NHL) ;霍奇金病 (如里 - 施细胞) ;B- 细胞谱系的癌症,包括例如弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、B- 细胞淋巴瘤细胞性白血病 (如急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病) ;EB 病毒阳性 B 细胞淋巴瘤 ;肾细胞癌 (如透明细胞和乳头细胞) ;鼻咽癌 ;胸腺癌 ;胶质瘤 ;成胶质细胞瘤 ;成神经细胞瘤 ;星形细胞瘤 ;脑膜瘤 ;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 ;多发性骨髓瘤 ;以及结肠、胃和直肠癌。所述癌症可以是 (例如) 新诊断的、预先治疗的癌症,或者是不应性或复发性癌症。在一些实施方式中,表达 CD70 的癌症的每个细胞含有至少约 15,000、至少约 10,000 或至少约 5,000 个 CD70 分子。

[0198] VIII. 含有抗 -CD70 抗体和衍生物的药物组合物及其给药

[0199] 将含有 CD70 结合物 (如抗 -CD70 抗体或衍生物) 的组合物给予患有免疫病或表达 CD70 的癌症或处于患免疫病或表达 CD70 的癌症的风险中的对象。本发明还提供了将 CD70 结合物 (如抗 -CD70 抗体或衍生物) 用于制备预防或治疗表达 CD70 的癌症或免疫病的药物中的应用。本文所用术语“对象”指可给予 CD70 结合物的任何哺乳动物患者,包括例如人和非人哺乳动物,如灵长动物、啮齿动物和犬。特别考虑用本文所述方法治疗的对象包括人。抗体或衍生物可单独给药或与其它组合物联合给药,以预防或治疗免疫病或表达 CD70 的癌症。

[0200] 已知各种递送系统,可用于给予 CD70 结合物。引入方法包括但不限于:皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可通过 (例如) 输注或推注 (如静脉内或皮下)、通过上皮或粘膜表层吸收 (如口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等) 给予 CD70 结合物,并可与其它生物活性剂如化疗药一起给药。给药可以是全身给药或局部给药。

[0201] 在特定实施方式中,通过注射、导管、栓剂或植入物给予 CD70 结合物组合物,所述植入物是多孔性、非多孔性或明胶状材料,包括膜如硅橡胶膜或纤维。一般地,给予该组合物时,采用抗 -CD70 结合物不吸附的材料。

[0202] 在其它实施方式中,用控释系统递送抗 -CD70 结合物。在一个实施方式中,可采用泵 (参见 Langer,1990, Science 249 :1527-1533 ;Sefton,1989, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 :201 ;Buchwald 等,1980, Surgery 88 :507 ;Saudek 等,1989, N. Engl. J. Med. 321 :574)。在另一实施方式中,可采用聚合材料。(参见 Medical Applications of Controlled Release (控释的医学应用) (Langer 和 Wise 编, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974) ; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (控制的药物生物利用度、药物产品设计和性能) (Smolen 和 Ball 编, Wiley, 纽约, 1984) ; Ranger 和 Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23 :61。也参见 Levy 等, 1985, Science 228 :190 ;During 等, 1989, Ann. Neurol. 25 :351 ;Howard 等, 1989, J. Neurosurg. 71 :105。)。其它控释系统参见例如 Langer, 同上。

[0203] CD70 结合物 (如抗 -CD70 抗体或衍生物) 可作为含有治疗有效量的结合物 and 一种或多种药学相容性成分的药物组合物进行给药。例如,该药物组合物一般含有一种或多种药物载体 (例如无菌液体如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的无菌液体,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)。静脉内给药时,水是更一般的载体。也可将盐水溶液以及右旋糖和甘油水溶液用作液体载体,具体用于注射液。合适的药物赋形剂包括例如:淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑

石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。如果需要,该组合物也可含有少量湿润剂或乳化剂,或 pH 缓冲剂。这些组合物可以取溶液剂、悬液剂、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等形式。也可用传统的粘合剂和载体如甘油三酯将该组合物配制成栓剂。口服制剂可包含标准载体如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的例子参见 E. W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”(雷明顿药物科学)。这种组合物含有治疗有效量的蛋白质(一般是纯化形式)和合适量的载体,以便提供适于给予患者的形式。该制剂对应于给药方式。

[0204] 在典型的实施方式中,按照常规方法将药物组合物配制成适合静脉内给予人的药物组合物。一般地,静脉内给药的组合物是用无菌等渗水性缓冲液配制的溶液。需要时,该药物也可包含增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因,以减轻注射部位的疼痛。通常,这些成分分别提供或者混合在单位剂型中,例如,以冻干粉末或无水浓缩物的形式在标明活性物质的量的密封容器如安瓿或药囊(sachette)中提供。准备通过输注给药时,可用含有无菌药物级水或盐水的输注瓶配制药剂。准备注射给药时,可提供含有无菌注射用水或盐水的安瓿,以便在注射前混合成分。

[0205] 另外,可以药盒的形式提供药物组合物,所述药盒包含(a)含有冻干形式的 CD70 结合物(如抗-CD70 抗体或衍生物)的容器和(b)含有药学上可接受的注射用稀释剂(如无菌水)的第二容器。药学上可接受的稀释剂可用于重建或稀释冻干的抗-CD70 抗体或衍生物。所述容器可任选地与一告知单结合,该告知单的形式由管理药品和生物制品的生产、使用 and 销售的政府部门指定,该告知单应反映出制造、使用或销售管理部门批准该药品用于给予人类的信息。

[0206] 可利用标准临床技术确定能有效治疗或预防免疫病或表达 CD70 的癌症的 CD70 结合物(如抗-CD70 抗体或衍生物)的用量。此外,可任选地利用体外试验帮助确定最优剂量范围。用于制剂的准确剂量也取决于给药途径和免疫病或表达 CD70 的癌症的状况,应依照医师的判断和各患者的情况来确定。可由获自体外或动物模型测试系统的剂量反应曲线外推得到有效剂量。

[0207] 例如,可用测定 LD_{50} (使 50% 群体死亡的剂量)和 ED_{50} (在 50% 群体中有效治疗的剂量)的标准药理学方法测定抗-CD70 抗体或其衍生物在细胞培养物或实验动物中的毒性和疗效。毒性和疗效的剂量比为治疗指数,可表示为 LD_{50}/ED_{50} 。优选治疗指数大的 CD70 结合物(如抗-CD70 抗体或衍生物)。CD70 结合物具有毒性副作用时,可采用使 CD70 结合物靶向患病组织位点的递送系统,以最大程度降低对不表达 CD70 的细胞的潜在损伤,从而减小副作用。

[0208] 可将获自细胞培养试验和动物研究的数据用于形成人用剂量范围。CD70 结合物的剂量一般在包括 ED_{50} 但毒性很小或无毒性的循环浓度范围内。在此范围内,剂量可取决于所用剂型和所用的给药途径。就用于此方法的 CD70 结合物而言,最初可通过细胞培养试验估计治疗有效剂量。可在动物模型中确定一个剂量,以使循环血浆浓度范围包含细胞培养中测定的 IC_{50} (即对症状实现半数最大抑制的测试化合物浓度)。可用此信息更准确地确定人用剂量。可采用(例如)高效液相色谱测定血浆中的浓度。

[0209] 通常,给予患有免疫病或表达 CD70 的癌症的患者的抗-CD70 抗体或衍生物的剂量约为 0.1mg/kg 体重-100mg/kg 体重。更一般地,给予对象的剂量为 0.1mg/kg 体重-50mg/

kg 体重,更一般为 1mg/kg-30mg/kg、1mg/kg-20mg/kg、1mg/kg-15mg/kg、1mg/kg-12mg/kg、1mg/kg-10mg/kg、or 1mg/kg-7.5mg/kg 体重。通常,由于对外来蛋白的免疫应答,人抗体在人体内的半衰期长于其它物种来源的抗体。因此,常常可能采用较低剂量的含有人源化或嵌合抗体的抗-CD70 抗体或衍生物和较低的给药频率。

[0210] 抗-CD70 结合物的剂量可以(例如)每天、每周一次(每周)、每周两次、每周三次、每周四次、每周五次、每两周、每月或其它需要的频率给药。

[0211] 在一些实施方式中,抗-CD70 结合物的剂量对应于次优剂量(即低于抗-CD70 结合物(如抗体药物偶联物)的 EC_{50})。例如,抗-CD70 结合物的剂量可包括选自治疗窗口的最低 25%、最低 15%、最低 10% 或最低 5% 的剂量。本文所用术语“治疗窗口”指提供安全有效治疗的药物剂量范围或其在身体系统中的浓度范围。

[0212] 在一些实施方式中,抗-CD70 结合物(如抗体药物偶联物)的剂量为约 0.05mg/kg-1mg/kg,或约 0.1mg/kg-0.9mg/kg,或约 0.15-0.75mg/kg 体重。此剂量可每周给药 1-约 15 次。各剂量可以相同或不同。例如,约 0.15mg/kg 抗-CD70 结合物的剂量可每四天、每五天、每六天或每七天给予 1-10 次。

[0213] 在一些实施方式中,含有 CD70 结合物的药物组合物还可包含治疗剂(如非偶联的细胞毒剂或免疫调节剂,例如,本文所述的那些)。抗-CD70 结合物也可与一种或多种治疗剂联合给药,以治疗或预防免疫病或表达 CD70 的癌症。例如,联合治疗可包括治疗剂(如细胞抑制剂、细胞毒剂或免疫调节剂,如未偶联的细胞抑制剂、细胞毒剂或免疫调节剂,如通常用于治疗癌症或免疫病的药物)。联合治疗也可包括例如,给予靶向活化淋巴细胞、树突细胞或表达 CD70 的癌细胞的表面上除 CD70 以外的受体或受体复合物的药物。这种药物的例子包括结合于活化淋巴细胞、树突细胞或表达 CD70 的癌细胞的表面分子的第二种非-CD70 抗体。另一个例子包括靶向此种受体或受体复合物的配体。一般地,这种抗体或配体结合于活化淋巴细胞、树突细胞或表达 CD70 的癌细胞上的细胞表面受体,并通过将细胞抑制或细胞毒性信号递送给活化的淋巴细胞、树突细胞或表达 CD70 的癌细胞而提高抗-CD70 抗体的细胞毒或细胞抑制作用。这种联合给药可以对疾病参数(如症状严重程度、症状数量或复发频率)产生加成或协同作用。

[0214] 提到联合给药的治疗方案,在一个具体实施方式中,抗-CD70 结合物与治疗剂同时给药。在另一具体实施方式中,在给予抗-CD70 抗体或衍生物之前或之后至少 1 小时、至多数月,例如在给予抗-CD70 抗体或衍生物之前或之后至少 1 小时、5 小时、12 小时、1 天、1 周、1 个月或 3 个月给予该治疗剂。在一些实施方式中,在给予抗-CD70 结合物、任选给予该治疗剂后监测对象。

[0215] 该治疗剂可以是(例如)对癌细胞或活化免疫细胞产生疗效的任何物质。一般地,该治疗剂是细胞毒剂或免疫调节剂。这种联合给药可对疾病参数(如症状严重程度、症状数量或复发频率)产生加成或协同作用。

[0216] 细胞毒或免疫调节剂的有用种类包括,例如:抗微管剂、其他汀、DNA 小沟结合剂、DNA 复制抑制剂、烷化剂(如,铂复合物如顺铂、单(铂)、双(铂)和三环铂复合物以及卡铂)、蒽环类抗生素、抗生素、抗叶酸、抗代谢剂、化疗增敏剂、多卡霉素(duocarmycin)、依托泊甙、氟嘧啶、离子载体、lexitropsins、亚硝基脲、顺铂顺氯氨铂、预成化合物(pre-forming compound)、嘌呤抗代谢剂、嘌呤霉素、放疗增敏剂、类固醇、紫杉烷,拓扑异

构酶抑制剂,长春花属生物碱等。

[0217] 单独的细胞毒或免疫调节剂包括,例如:雄激素、氨基霉素(AMC)、天冬酰胺酶、5-氮杂胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、白消安、丁硫氨酸硫酸亚胺、喜树碱、卡铂、卡莫司汀(BSNU)、CC-1065、苯丁酸氮芥、顺铂、秋水仙素、环磷酰胺、阿糖胞苷、胞苷阿糖胞苷、松胞菌素B、达卡巴嗪、放线菌素d(放线菌素)、道诺霉素、德卡巴嗪(decarbazine)、多西他赛、多柔比星、雌激素、5-氟脱氧尿苷、5-氟尿嘧啶、短杆菌肽D、羟基脲、黄胆素、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀(CCNU)、双氯乙基甲胺、美法仑、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、光神霉素、丝裂霉素C、米托蒽醌、硝基咪唑、紫杉醇、普卡霉素、丙卡巴肼、雷帕霉素(西罗莫司)、链脲霉素、替诺泊甙(tenoposide)、6-巯鸟嘌呤、硫替派、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春瑞滨、VP-16和VM-26。

[0218] 在典型的实施例中,治疗剂为细胞毒剂。合适的细胞毒剂包括,例如:多拉司他汀(如耳他汀E、AFP、MMAF、MMAE)、DNA小沟粘合剂(如烯二炔和lexitropsin)、多卡霉素、紫杉烷(如紫杉醇和多西他赛)、嘌呤霉素、长春花属生物碱、CC-1065、SN-38、拓扑替康、吗啉代-多柔比星、根霉素、氰基吗啉代-多柔比星、棘霉素、考布他汀、纺锤菌素、大环内酯A和B、雌莫司汀、隐花素(cryptophysin)、西马多丁、类美坦西醇、discodermolide、五加素(eleutherobin)和米托蒽醌。

[0219] 在一些实施方式中,细胞毒剂为常规化疗药,如:多柔比星、紫杉醇、美法仑、长春花属生物碱、甲氨蝶呤、丝裂霉素C或依托泊甙。在一些实施方式中,治疗剂可为组合疗法,如:CHOP(环磷酰胺、多柔比星、泼尼松龙和长春新碱)、CHOP-R(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、泼尼松龙和利妥昔单抗)或ABVD(多柔比星、博来霉素、长春碱和达卡巴嗪)。试剂如CC-1065同系物、卡奇霉素、美登素、多拉司他汀10的同系物、根霉素和水螅毒素可与抗-CD70抗体或其衍生物连接。

[0220] 在特定实施方式中,细胞毒或细胞抑制剂为耳他汀E(本领域也称为多拉司他汀-10)或其衍生物。一般地,耳他汀E衍生物为,如耳他汀E与酮酸形成的酯。例如,耳他汀E可与对乙酰苯甲酸或苯甲酰戊酸反应分别产生AEB和AEVB。其它典型耳他汀衍生物包括AFP、MMAF和MMAE。耳他汀E及其衍生物的合成和结构参见美国专利申请公开号20030083263和20050009751),国际专利申请号PCT/US03/24209,国际专利申请号PCT/US02/13435和美国专利号6,323,315;6,239,104;6,034,065;5,780,588;5,665,860;5,663,149;5,635,483;5,599,902;5,554,725;5,530,097;5,521,284;5,504,191;5,410,024;5,138,036;5,076,973;4,986,988;4,978,744;4,879,278;4,816,444;和4,486,414中。

[0221] 在特定实施方式中,细胞毒剂为DNA小沟结合物(参见例如,美国专利号6,130,237)。例如,在一些实施方式中,小沟结合物为CBI化合物。在其它实施方式中,小沟结合物为烯二炔(如卡奇霉素)。

[0222] 抗微管剂包括但不限于:紫杉烷(如泰素®(紫杉醇)、泰索帝®(多西他赛))、T67(Tularik)、长春碱(如长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨)和多拉司他汀(如耳他汀E、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB)。其它抗微管剂包括,例如:浆果赤霉素衍生物、紫杉烷类似物(如大环内酯A和B)、诺考达唑、秋水仙素和秋水仙胺、雌莫司汀、隐花素、西马多丁、类美坦西醇、考布他汀、discodermolide和五加素。

[0223] 在一些实施方式中,细胞毒剂为类美坦西醇,它是另一类抗微管剂。例如,在特定实施方式中,类美坦西醇为美登素或 DM-1 (ImmunoGen, Inc.; 参见 Chari 等,1992, CancerRes. 52 :127-131)。

[0224] 在一些实施方式中,治疗剂不是放射性同位素。在一些实施方式中,治疗剂不是蓖麻毒蛋白或皂草毒蛋白。

[0225] 在某些实施方式中,治疗剂为抗 VEGF 试剂,如阿瓦斯汀(贝伐单抗)或多吉美(索拉非尼);PDGF 阻断剂,如 SUTENT(苹果酸舒尼替尼);或激酶抑制剂,如多吉美(甲苯磺酸索拉非尼)。

[0226] 在一些实施方式中,细胞毒或免疫调节剂为抗代谢剂。抗代谢剂可以是(例如)嘌呤拮抗剂(如氮杂硫代嘌呤(azothioprine)或麦考酚酸吗乙酯)、二氢叶酸还原酶抑制剂(如,甲氨蝶呤)、阿昔洛韦、更昔洛韦、齐多夫定、阿糖腺苷、利巴韦林、叠氮胸苷、胞苷阿糖胞苷、金刚烷胺、脱氧尿苷、二氯脱氧尿苷、poscarnet 或三氟尿苷。

[0227] 在其它实施方式中,细胞毒或免疫调节剂为他克莫司、环孢霉素或雷帕霉素。在另一实施方式中,细胞毒剂为阿地白介素、阿来组单抗、阿利维 A 酸、别嘌醇、六甲蜜胺、氨磷汀、阿那曲唑、三氧化二砷、蓓萨罗丁、蓓萨罗丁、卡普睾酮、卡培他滨、塞来考昔、克拉屈滨、Darbepoetin alfa、地尼白介素-毒素连接物、右雷佐生、丙酸屈他雄酮、表柔比星、阿法依伯汀、雌莫司汀、依西美坦、非格司亭、氟尿苷、氟达拉滨、氟维司群、吉西他滨、吉妥单抗、戈舍瑞林、黄胆素、异环磷酰胺、甲磺酰伊马替尼、干扰素 α -2a、伊立替康、来曲唑、甲酰四氢叶酸、左咪唑、meclorothamine 或氮芥、甲地孕酮、巯乙磺酸钠、甲氨蝶呤、甲氧沙林、丝裂霉素 C、米托坦、苯丙酸诺龙、奥普瑞白介素、奥沙利铂、帕米膦酸二钠、培加酶、培门冬酶、pegfilgrastim、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、吡芬姆钠、丙卡巴肼、奎吡因、拉布立酶、沙莫司亭、链佐星、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥珠单抗、维 A 酸、乌拉莫司汀、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春瑞滨或唑来膦酸盐。

[0228] 在其它实施方式中,治疗剂为抗体,如人源化抗 HER2 单克隆抗体,美罗华(利妥昔单抗;基因泰克公司(Genentech);嵌合抗 CD20 单克隆抗体);OVAREX(阿尔他雷克斯公司(AltaRex Corporation), MA);PANOREX(葛兰素卫康公司(GlaxoWellcome), NC;鼠 IgG2a 抗体);西妥昔单抗爱必妥(依克隆系统公司(ImcloneSystems Inc.), NY;抗 EGFR IgG 嵌合抗体);Vitaxin(药物免疫公司(MedImmune, Inc.), MD;Campath 1/H(瘤克斯公司(Leukosite), MA;人源化 IgG1 抗体);SmartMI95(蛋白设计实验室公司(Protein Design Labs, Inc.), CA;人源化抗 CD33IgG 抗体);LymphoCide(免疫医学公司(Immunomedics, Inc.), NJ;人源化抗 CD22IgG 抗体);Smart ID10(蛋白设计实验室公司(Protein Design Labs, Inc.), CA;人源化抗 HLA-DR 抗体);Oncolym(替尼克隆公司(Techniclone, Inc.), CA;放射性标记的鼠抗 HLA-Dr10 抗体);Allomune(生物移植物公司(BioTransplant), CA;人源化抗 CD2mAb);阿瓦斯汀(基因泰克公司(Genentech, Inc.), CA;抗 VEGF 人源化抗体);依帕珠单抗(免疫医学公司(Immunomedics, Inc.), NJ 和 Amgen, CA;抗 CD22 抗体);CEAcide(免疫医学公司(Immunomedics), NJ;人源化抗 CEA 抗体);或抗 CD40 抗体(如美国专利号 6,838,261 所公开)。

[0229] 其它合适的抗体包括但不限于:抗下列抗原的抗体:CA125、CA15-3、CA19-9、L6、Lewis Y、Lewis X、甲胎蛋白、CA 242、胎盘碱性磷酸酶、前列腺特异性膜抗原、前列腺酸性

磷酸酶、表皮生长因子、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、抗转铁蛋白受体、p97、MUC1-KLH、CEA、gp100、MART1、前列腺特异性抗原、IL-2 受体、CD20、CD52、CD30、CD33、CD22、人绒毛膜促性腺素、CD38、CD40、粘液素、P21、MPG 和 Neu 癌基因产物。

[0230] 在一些实施方式中,治疗剂为免疫调节剂。免疫调节剂可为(例如)更昔洛韦、依那西普、他克莫司、环孢霉素、雷帕霉素、REVLIMID(来那度胺)、环磷酰胺、硫唑嘌呤、麦考酚酸吗乙酯或甲氨蝶呤。或者,免疫调节剂可为(例如)糖皮质激素(如氢化可的松或醛固酮)或糖皮质激素同系物(如氯泼尼松或地塞米松)。

[0231] 在通常的实施方式中,免疫抑制剂为消炎剂,如芳基羧基衍生物、含吡唑的衍生物、奥昔康衍生物和烟碱酸衍生物。消炎剂类包括例如,环加氧酶抑制剂、5-脂肪氧合酶抑制剂和白三烯受体拮抗剂。在一些实施方式中,免疫调节剂为细胞因子,如 G-CSF、GM-CSF 或 IL-2。

[0232] 合适的环加氧酶抑制剂包括甲氯芬那酸、甲芬那酸、卡洛芬、双氯芬酸、二氟尼柳、芬布芬、非诺洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、萘丁美酮、萘普生、舒林酸、替诺昔康、托美丁和乙酰基水杨酸。

[0233] 合适的脂肪氧合酶抑制剂包括氧化还原抑制剂(如邻苯二酚丁烷衍生物、去甲二氢愈创木酸(NDGA)、马索罗酚、菲尼酮、Ionopalen、吲唑啉酮、那法扎琼、呋喃酚、烷基羟胺)和非氧化还原抑制剂(如羟基噻唑、甲氧基烷基噻唑、苯并吡喃及其衍生物、甲氧基四氢吡喃、乳香酸和乳香酸乙酰基化衍生物和环烷基取代的喹啉甲氧基苯基乙酸)和氧化还原抑制剂前体。

[0234] 其它合适的脂肪氧合酶抑制剂包括抗氧化剂(如苯酚、没食子酸丙酯、类黄酮和/或天然产生的含类黄酮底物、黄酮羟基化衍生物、黄酮醇、二氢五羟黄酮、毛地黄黄酮、毛地黄黄酮、二羟四氢黄酮、查耳酮衍生物、4,2',4'-三羟基查耳酮、邻氨基苯酚、N-羟基脲、呋喃酚、依布硒以及提高还原含硒酶活性的物质)、离子螯合剂(如氧肟酸及其衍生物、N-羟基脲、2-苄基-1-萘酚、邻苯二酚、羟胺、camosol trolox C、邻苯二酚、萘酚、柳氮磺吡啶、zyleuton、5-羟基邻氨基苯甲酸和 4-(ω -芳基烷基)苯基链烷酸)、含咪唑化合物(如酮康唑和伊曲康唑)、吩噻嗪和苯并吡喃衍生物。

[0235] 其它合适的脂肪氧合酶抑制剂还可包括二十酸抑制剂(如十八碳四烯酸、二十碳四烯酸、二十二碳五烯酸、二十碳六烯酸和二十二碳六烯酸及其酯、PGE1(前列腺素 E1)、PGA2(前列腺素 A2)、维前列醇、15-单羟基二十碳四烯酸、15-单羟基-二十碳三烯酸和 15-单羟基二十碳五烯酸和白三烯 B5、C5 和 D5)、干扰钙流的化合物、吩噻嗪、二苯基丁基胺、维拉帕米、fuscoide、姜黄素、氯原酸、咖啡酸、5,8,11,14-二十碳四烯酸(ETYA)、羟基苯基维胺脂、Ionapalen、七叶苷、二乙基乙胺嗪、菲咯啉(phenantroline)、黄芩素、普昔罗米、硫醚、二烯丙基一硫醚和二-(1-丙烯基)硫。

[0236] 白三烯受体拮抗剂包括骨化三醇、昂唑司特、Bayer Bay-x-1005、Ciba-Geigy CGS-25019C、依布硒、Leo Denmark ETH-615、Lilly LY-293111、Ono ONO-4057、Terumo TMK-688、Boehringer Ingelheim BI-RM-270、Lilly LY 213024、Lilly LY264086、Lilly LY 292728、Ono ONO LB457、Pfizer 105696、Perdue Frederick PF10042、Rhone-Poulenc Rorer RP 66153、SmithKline Beecham SB-201146、SmithKline Beecham SB-201993、SmithKline Beecham SB-209247、Searle SC-53228、Sumitomo SM 15178、

American Home Products Way 121006、BayerBay-o-8276、Warner-Lambert CI-987、Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982、Lilly LY 233569、Lilly LY-255283、MacroNex MNX-160、Merck and Co.MK-591、Merck and Co.MK-886、Ono ONO-LB-448、Purdue Frederick PF-5901、Rhone-Poulenc Rorer RG 14893、Rhone-Poulenc Rorer RP 66364、Rhone-PoulencRorer RP 69698、Shionoogi S-2474、Searle SC-41930、Searle SC-50505、SearleSC-51146、Searle SC-52798、SmithKline Beecham SKandF-104493、Leo DenmarkSR-2566、Tanabe T-757 和 Teijin TEI-1338。

[0237] 通过下述实施例进一步描述本发明，它们不应限制本发明的范围。下述实施例中所述细胞系培养于美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 或德国不伦瑞克的德国生物材料资源中心有限公司 (Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) (DMSZ) 所限定的条件或其它已知培养条件下。细胞培养试剂获自加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司 (Invitrogen Corp.)。

[0238] 实施例 1 : 人源化抗 -CD70 抗体变体的生产

[0239] SEQ ID NO :1、2、21 和 22 分别列举了抗 CD70 鼠单克隆抗体 1F6 及其嵌合变体 c1F6 的核苷酸和氨基酸序列。(另参见 2005 年 1 月 19 日提交的美国专利申请号 60/645, 355)。人源化 c1F6 的人接受体序列选自人种系外显子 V_H 、 J_H 、 V_K 和 J_K 序列。c1F6 V_H 结构域人源化的接受体序列选自种系 V_H 外显子 V_H1-18 (Matsuda 等, 1993, Nature Genetics 3 :88-94) 或 V_H1-2 (Shin 等, 1991, EMBO J. 10 :3641-3645) 和 J_H 外显子 J_H-6 (Mattila 等, 1995, Eur. J. Immunol. 25 :2578-2582)。种系 V_K 外显子 B3 (Cox 等, 1994, Eur. J. Immunol. 24 :827-836) 和 J_K 外显子 J_K-1 (Hieter 等, 1982, J. Biol. Chem. 257 :1516-1522) 选作 c1F6 V_L 结构域人源化的接受体序列。将根据 Kabat 定义确定的 1F6 鼠 CDR 移植到所选人种系模板中。简要说, 产生跨越人源化 V_H 或 V_L 结构域的合成重叠寡核苷酸并利用 PCR 重叠延伸来组装各结构域。利用掺入 PCR 产物的限制性位点将 V_H 和 V_L 结构域定向克隆到 pCMV 表达载体中, 分别与人 IgG1 恒定区或 κ 恒定区处于同一阅读框中。

[0240] 选择数个框架位置以重新引入小鼠供体残基。根据 Kabat 编号规则, 它们是 V_H 结构域中的 H46、H67、H68、H69、H70、H71、H80、H81、H82、H82A 和 H91 位置。尽管选择小鼠 L25 和 L33 位置上 CDR1 残基用来引入该位置的人接受体残基, 但没有改变 V_L 结构域中的框架位置。

[0241] 可通过在 V_H 结构域中掺入小鼠框架供体残基或在 V_L 结构域中掺入人 CDR 残基的不同组合产生数种人源化 1F6 变体。下表 2 和表 3 中小结了些变体。

[0242] 表 2

[0243]

V_H 变体	V_H 外显子接受体序列	供体构架残基
h V_H A	VH1-18	H71、H91
h V_H B	VH1-18	H71
h V_H C	VH1-18	H91

hV _H D	VH1-18	无
hV _H E	VH1-2	无
hV _H F	VH1-18	H67、H68、H69、H70、H71
hV _H G	VH1-18	H80、H81、H82、H82A
hV _H H	VH1-18	H67、H68、H69、H70、H71、H80、 H81、H82、H82A
hV _H I	VH1-18	H46、H71、H91
hV _H J	VH1-2	H46
hV _H K	VH1-2	H71
hV _H L	VH1-2	H46、H71
hV _H M	VH1-18	H46、H67、H68、H69、H70、H71
hV _H N	VH1-18	H69、H70、H71、H80

[0244] 表 3

[0245]

V _L 变体	接受体 CDR 残基
hV _L A	无
hV _L B	L25
hV _L C	L33
hV _L D	L25, L33

[0246] 图 1 和图 2 显示具有鼠和人 V_H 序列的一些人源化变体间的差别。图 1 显示人源化 1F6 V_H 变体 hV_HE 和 hV_HJ 与 1F6mV_H 和人种系 V_H 外显子 V_H1-2 和 J_H 外显子 JH6 间的比对。图 2 显示人源化 1F6V_H 变体 hV_HH 和 hV_HM 与 1F6mV_H 和人种系 V_H 外显子 VH1-18 和 J_H 外显子 JH6 间的比对。图 3 显示人源化 1F6V_L 变体 hV_LA 与 1F6mV_L 和人种系 V_K 外显子 B3 和 J_K 外显子 J_K-1 间的比对。

[0247] 实施例 2 :人源化 1F6 变体的结合亲和力

[0248] 选择人源化 1F6 变体 HDLA (hV_HD 和 hV_LA)、HHLA (hV_HH 和 hV_LA) 和 HJLA (hV_HJ 和 hV_LA) 进行结合亲和力分析。在 293 细胞中瞬时表达人源化抗体和 c1F6 各 1mg, 采用 Eu-N1 碘代乙酰胺基螯合物 (Perkin Elmer) 以铕标记。评估各标记抗体与一系列 CD70 阳性细胞系的饱和结合。选择的细胞系是 ACHN、Caki-2、Caki-1 和 786-0, 经定量流式细胞术 (或荧光活化

的细胞分选即 FACS) 测定, 抗原拷贝数 / 细胞分别为 30, 000、99, 000、235, 000 和 252, 000。

[0249] 在 96 孔板中将不同浓度的铈 - 标记抗体与细胞一起 4℃ 培育 1 小时。培育后, 通过将细胞重悬于增强缓冲液 (Perkin Elmer) 释放铈。用 Fusion HT 平板阅读器以顶部检测器形式以及 335nm 的激发光和 620nm 的发射光读出荧光。用 GraphPad Prism 4 将数据拟合至单结合位点双曲线。结果见下表 4。

[0250] 表 4

[0251]

细胞系	抗原 / 细胞	表观结合亲和力 K_D (nM)			
		c1F6	h1F6 HDLA	h1F6 HHLA	h1F6 HJLA
ACHN	30, 000	0. 30	1. 44	0. 29	0. 68
Caki-1	235, 000	1. 28	1. 29	1. 22	1. 36
Caki-2	99, 000	0. 26	0. 86	0. 15	0. 37
786-0	252, 000	0. 56	0. 55	0. 28	0. 46

[0252] 人源化变体的 K_D 值与 c1F6 对所有测试细胞系的 K_D 值非常类似, 这验证了该人源化方法不显著降低抗原结合活性。

[0253] 实施例 3 : 人源化 1F6 的 ADCC 活性

[0254] 采用标准 ^{51}Cr 释放试验测定人源化 1F6 抗体变体介导对抗 CD70^+ 细胞系 WIL2-S、786-0 和 769-P 的 ADCC 的能力。人源化 1F6 的 HHLA、HJLA 和 HELA 变体以剂量依赖性方式等同地裂解了 WIL-2S 靶细胞。相反, 用 CD70 结合性鼠 1F6 (m1F6) 或非结合性对照人 Ig (hIg) 处理的肿瘤细胞未被杀死 (图 4A)。相似地, 人源化 1F6 以与嵌合 1F6 相当的方式介导两种肾细胞癌靶点的裂解 (图 4B)。

[0255] 实施例 4 : 人源化 1F6 的 CDC 活性

[0256] 用多发性骨髓瘤细胞系 (LP-1) 和两种淋巴瘤细胞系 (MHH PreB-1 和 WIL2-S) 检测人源化 1F6 介导 CDC 的能力。在正常人血清存在下用梯度剂量的嵌合 1F6、人源化 1F6HJLA 或非结合性人 Ig 对照处理靶细胞。37℃ 培育 2 小时后, 加入碘化丙锭 ($5\text{ }\mu\text{g/mL}$) 后用流式细胞术鉴定裂解的细胞。认为被碘化丙锭染色的细胞由于抗体介导的补体活化和膜攻击复合物的形成, 已失去膜完整性。用此试验, 嵌合 1F6 和人源化 1F6 以等同方式介导各靶点的剂量依赖性裂解 (图 5)。

[0257] 实施例 5 : 人源化 1F6 的 ADCP 活性

[0258] 用红色荧光膜染料预标记的 CD70^+ 肾细胞癌细胞系 786-0 检测人源化 1F6 介导细胞吞噬的能力。用梯度剂量的嵌合 1F6、人源化 1F6HJLA 或非结合性人 Ig 对照处理靶细胞, 然后将靶细胞与获自 GM-CSF 中培养的贴壁外周血单核细胞的巨噬细胞混合。37℃ 培育 1 小时后, 用巨噬细胞细胞表面标记物 CD11b 的绿色荧光抗体检测巨噬细胞。经流式细胞术检测, 通过红色和绿色荧光双染来鉴定吞噬了肿瘤细胞的巨噬细胞。用荧光显微镜术验证了双阳性群体中巨噬细胞内存在肿瘤细胞的情况。如图 6 所示, 嵌合和人源化 1F6 有助于

以抗体－剂量依赖性方式吞噬靶细胞,并达到相同程度。相反,用非结合性对照抗体培育的靶细胞很少被巨噬细胞吞噬。

[0259] 实施例 6 :人源化 1F6 变体药物偶联物的体外细胞毒活性

[0260] 人源化 1F6 变体 HELA(hV_HE 和 hV_LA)、HHLA、HJLA 和 HMLA(hV_HM 和 hV_LA) 和 c1F6 在 293 细胞中瞬时表达,将它们偶联于 vcMMAF(参见美国序列号 10/983, 340 ;作为美国专利公开号 2005-0238649 于 2005 年 10 月 27 日公开),加样水平为每个抗体平均对应 8 个药物单位。检测得到的偶联物 h1F6HELA-F8、h1F6HHLA-F8、h1F6HJLA-F8、h1F6HMLA-F8 和 c1F6-F8 对两种表达 CD70 的细胞系 786-0 和 Caki-1 的细胞毒作用。将该偶联物与细胞一起培育 92 小时,然后加入 50 μ M 刃天青。培育 4 小时后,用 Fusion HT 荧光平板阅读器(Packard Instruments,康涅狄格州梅里登)检测染料还原。三复孔的结果见下表 5。在两种测试细胞系上,所有四种人源化变体的 IC₅₀ 值在 c1F6 的 IC₅₀ 值的两倍以内,强度排序为 c1F6-F8 > h1F6HHLA-F8 > h1F6HMLA-F8 > h1F6HJLA-F8 > h1F6HELA-F8。

[0261] 表 5

[0262]

h1F6-vcMMAF	小鼠 FR 残基数目	Caki-1 IC50[ng/ml]	786-0 IC50[ng/ml]
h1F6HELA-F8	0	3.4 (平均值 = 2.87, n = 3)	5.2 (平均值 = 3.9, n = 3)
h1F6HHLA-F8	9	1.4 (平均值 = 1.87, n = 3)	2.3 (平均值 = 1.93, n = 3)
h1F6HJLA-F8	1	2.2 (平均值 = 2.3, n = 3)	3.4 (平均值 = 3.03, n = 3)
h1F6HMLA-F8	6	1.8 (平均值 = 2.07, n = 3)	2.8 (平均值 = 2.03, n = 3)
c1F6(293)-F8	0	1.8 (平均值 = 2.17, n = 3)	2.4 (平均值 = 1.45, n = 3)

[0263] 实施例 7 :人源化 1F6 药物偶联物的体内筛选

[0264] 人源化 1F6 变体 HDLA、HHLA、HJLA 和 HELA 在 293 细胞中瞬时表达,将它们偶联于 mcMMAF(参见美国序列号 10/983, 340 ;作为美国专利公开号 2005-0238649 于 2005 年 10 月 27 日公开),加样水平为每个抗体对应 8 个药物单位。在裸小鼠的 786-0 肾细胞癌实体瘤模型中进行了单一剂量 3mg/kg 或 10mg/kg 的效能研究。在肿瘤植入后 80 天中定期测定肿瘤体积。结果表明,与未治疗小鼠相比,所有治疗小鼠的肿瘤体积显著减小,偶联于 mcMMAF 的所有人源化 1F6 变体与 c1F6mcMMAF 的效能相当。

[0265] 实施例 8 :在弥散性淋巴瘤和多发性骨髓瘤的 SCID 小鼠异种移植瘤模型中人源化 1F6 的体内活性

[0266] 在弥散性淋巴瘤和多发性骨髓瘤异种移植瘤小鼠模型中检测了人源化 1F6(HJLA)

的体内抗肿瘤活性。为了建立弥散性疾病,将 1×10^6 Raji 或 1×10^7 MM1.S 或 L363 细胞注射到 C. B. -17SCID 小鼠的尾静脉中。将人源化 1F6 (HJLA) 或对照非结合性抗体通过腹膜内 (i. p.) 注射给予小鼠 (Raji), 每四天给药一次, 共给药 6 次, 或者通过静脉内注射到侧尾静脉中给予小鼠 (MM. 1S 和 L363), 从植入细胞 1 天后开始每周给药一次, 共给药 4 周。需要处死的疾病表现为弓状体态以及缺少理毛行为、体重下降、颅肿胀和后肢瘫痪, 或者在 L363 荷瘤小鼠中发生可触知的淋巴组织相关肿瘤。

[0267] 结果显示, 各肿瘤模型中 (图 7A、7B 和 7C), 与未治疗的小鼠或接受非结合性对照抗体的小鼠相比, 用人源化 1F6 治疗的小鼠的存活期显著延长。通过测定单个小鼠血清中肿瘤衍生的单克隆蛋白 (λ 轻链) 的水平在多发性骨髓瘤异种移植瘤 (L363 和 MM. 1S 细胞) 中进一步评估了人源化 1F6 治疗的作用。如图 7B 和 7C (右侧) 所示, 与未治疗的小鼠相比, 用人源化 1F6 治疗的小鼠的循环 λ 轻链浓度显著较低。用人源化 1F6 治疗的 L363 荷瘤小鼠的 λ 轻链的平均血清浓度为 $0.006 \mu\text{g/mL}$, 而未治疗小鼠的血清浓度为 $0.10 \mu\text{g/mL}$ 。相似地, 人源化 1F6 治疗的 MM. 1S 荷瘤小鼠的 λ 轻链浓度为 $0.03 \mu\text{g/mL}$, 而未治疗小鼠为 $1.25 \mu\text{g/mL}$ 。这些结果与小鼠存活率提高相符 (图 7B 和 7C, 右侧)。

[0268] 实施例 9 : 人源化 1F6 抗体体外消耗 CD70^+ 抗原 - 特异性 T 细胞

[0269] 为了检验人源化 1F6 抗体消耗抗原特异性活化 T 细胞的能力, 在存在或不存在不同浓度的人源化抗 - CD70 抗体的情况下, 用 M1 肽刺激表达 HLA-A0201 的正常供体的 PBMC。如上所述制备人源化 1F6 抗体 (HJLA)。以 0.5×10^6 个细胞 / ml 的浓度将 PBMC 接种于 24 孔板, 所用培养基为含有 $5 \mu\text{g/mL}$ M1 肽的补充有 IL-2 和 IL-15 的 2ml 培养基。第 5 天, 用含细胞因子的新鲜培养基替代一半培养物上清液。第 9 天, 用流式细胞术分析用 FITC- 偶联的抗 $\text{V}\beta 17^-$ 和 PE-Cy5- 偶联的抗 - CD8 抗体染色的细胞, 从而确定抗原反应性细胞 ($\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ 群体) 的百分数。

[0270] 图 8A 显示, 在没有抗体的情况下, 抗原特异性 $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ 细胞扩增至占培养的所有活细胞的 33%。相反, 在第 0 天向培养物中加入人源化 1F6 能以抗体 - 剂量依赖性方式显著限制抗原反应性群体的扩增。这些结果显示, 人源化 1F6 能选择性靶向抗原活化的 T 细胞并防止其扩增。

[0271] 在第二项研究中 (图 8B), 在不存在或存在特异性阻断 $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ (CD16) 的抗体的情况下, 不用或用人源化 1F6 处理 M1- 肽刺激的培养物。在未处理的培养物中, 抗原特异性 $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ 群体扩增至占培养物中所有活细胞的 39%。加入人源化 1F6 能显著降低反应性群体的扩增。用抗 CD16 特异性抗体阻断 $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 受体时, 很大程度上逆转了这种活性, 这表明肽 - 反应性细胞的缺失是通过人源化 1F6 与携带 $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 的效应物细胞的相互作用介导的。

[0272] 实施例 10 : 抗 - CD70 抗体不影响抗原 - 阴性旁观细胞

[0273] 为了确定 1F6- 介导的消耗对抗原阴性旁观 T 细胞的影响, 在用或不用 1F6 嵌合变体 (c1F6) (人 IgG1 同种型) 处理的 M1 活化培养物上检测 CD4 和 CD8 淋巴细胞的 TCR $\text{V}\beta$ 家族代表 (representation), 并与静息的非抗原刺激的 PBMC 作比较。嵌合和人源化 1F6 变体的结合亲和力、介导效应物功能的能力和消耗活化 CD8^+ T 细胞亚组的能力相当。

[0274] 如图 9 所示, 用 M1 肽刺激 HLA-A0201^+ PBMC 会引起携带 $\text{V}\beta 17$ TCR 的 CD8^+ 细胞扩增约 30 倍, 而 CD8^+ 细胞中检测的所有其它 $\text{V}\beta$ TCR 家族和 CD4 细胞群体中检测的所有家族的

改变很小。在对照群体中,细胞扩增仅限于 Vβ 17⁺CD8⁺T 细胞亚组,它从< 1% CD8⁺ 细胞增加至 27% ;此观察结果验证了 M1- 肽免疫应答的特异性。与在不存在 CD 70- 特异性抗体的情况下刺激的 T 细胞不同,将 c1F6 抗体加入培养物能防止 M1- 肽特异性 CD8⁺ 细胞扩增。在 c1F6 抗体的存在下,Vβ 17⁺CD8⁺ 细胞的百分数与静息的未经肽刺激的细胞相当。c1F6 抗体处理不能显著破坏其它 CD8⁺ 或 CD4⁺Vβ TCR 家族的相对值 ;没有观察到一组被清除。这些数据表明,接触 c1F6 抗体能选择性消耗 CD70⁺ 活化的 T 细胞,而不对旁观 T 细胞群体产生可检测的并行损伤。

[0275] 实施例 11 :肾细胞癌的小鼠异种移植瘤模型

[0276] 用 786-0 皮下异种植物模型评价以不同剂量和方案给药的抗 -CD70ADC 的抗肿瘤活性。通过植入约 30mm³ 的肿瘤片段 (N = 5 或 6 只 / 组) 在裸小鼠中种入皮下 786-0 肿瘤。使肿瘤建立生长,当平均肿瘤体积约为 100mm³ 时开始治疗。用游标卡尺测定肿瘤大小以监测其生长。用下式计算肿瘤大小 : (长 × 宽²) / 2。在不进行任何治疗的情况下,肿瘤植入后 40-50 天平均肿瘤体积增加到约 600mm³ (参见图 10A)。在接受人源化 1F6-mcMMAF4 (HJLA, 加载水平为每个抗体平均 4 个药物单元) 或人源化 1F6-vcMMAF4 (HJLA, 加载水平为每个抗体平均 4 个药物单元) 的小鼠中观察到肿瘤生长抑制的剂量 - 依赖性作用。甚至在 0.5 和 0.17mg/kg h1F6-mcMMAF4 和 h1F6-vcMMAF4 中,都分别检测到肿瘤生长的延迟。

[0277] 也通过肿瘤大小增大为 4 倍所需的时间来评估肿瘤生长 (参见图 10B)。用 0.17mg/kg 的 h1F6-mcMMAF4 或 h1F6-vcMMAF4 治疗显著延迟了肿瘤生长。以 q4d×4 或 q4d×10 方案给予 ADC 时观察到这种延迟。然而,与 q4d×4 方案相比,q4d×10 方案所列的增加的给药似乎具有更强的生长抑制活性。

[0278] 实施例 12 :CD70 在多发性骨髓瘤细胞系上表达

[0279] 在一系列多发性骨髓瘤细胞系上评估细胞表面的 CD70 表达 (表 6)。通过定量流式细胞术,采用 QIFIKit[®] (大科公司 (Dako), Carpinteria, CA) 确定各细胞系表达的 CD70 分子拷贝数。测定这些细胞对抗 -CD70ADC- 介导的细胞毒性的反应。在此模型中,嵌合抗 -CD70 ADC 的活性是人抗 -CD70ADC 的活性的替代者 (proxy)。嵌合 1F6(c1F6)-vcMMAF4 和 c1F6-mcMMAF4 都对表达 CD70 的多发性骨髓瘤细胞有细胞毒作用。用 c1F6-vcMMAF4 获得的 IC₅₀ 值的范围是 1.2-160ng/mL,而用 c1F6-mcMMAF4 获得的 IC₅₀ 值的范围是 1.7-500ng/mL。

[0280]

表 6

[0281] 嵌合性抗 -CD70ADC 对多发性骨髓瘤细胞系的细胞毒活性

	IC ₅₀ (ng/mL)		
	CD70 个拷贝 / 细胞	c1F6-vcMMAF4	c1F6-mcMMAF4
MM. 1S	14, 000	20	22
MM. 1R	25, 000	13	20
AMO-1	92, 000	16	38

JJN-3	19, 000	46	61
L363	13, 000	78	210
LB	45, 000	80	500
U266	155, 000	1. 2	1. 7
LP-1	34, 000	160	155
MOLP-8	9, 000	73	33

[0282] 实施例 13 :多发性骨髓瘤的小鼠异种移植瘤模型

[0283] 还检测了抗 -CD70ADC 在多发性骨髓瘤异种移植瘤模型中的体内活性。将人多发性骨髓瘤细胞系 MM-1S(图 11A 和 11B) 或 L363(图 12A 和 12B) 重悬于 RPMI-1640 培养基中, 浓度为 10×10^6 个细胞 /300 μ L。为了建立肿瘤, 通过 SCID 小鼠尾静脉内注射 300 μ L 细胞悬液。在 MM-1S 模型中, 未治疗的小鼠在肿瘤植入约 40 天后屈服于肿瘤细胞, 并表现出症状, 包括后肢瘫痪、弓状体态、颅肿胀和 / 或皮毛不整洁。当小鼠显示出一种或多种上述症状时处死小鼠。与对照未结合的 IgG-vcMMAF4 和 IgG-mcMMAF4 相比, h1F6(HJLA) -vcMMAF4 和 h1F6(HJLA) -mcMMAF4 对荷瘤小鼠提供了显著的存活益处(参见图 11A)。也通过对表达 CD138(MM-1S 细胞表达的浆细胞标记物) 的骨髓细胞计数评估 MM-1S 模型的肿瘤负担。回收由于出现症状或于第 122 天试验结束时处死的小鼠的骨髓细胞, 用流式细胞术测定表达 CD138 的 MM-1S 细胞。与未治疗小鼠相比, 对照 IgG-vcMMAF4 和 IgG-mcMMAF4 不能显著降低骨髓中表达 CD138 的 MM-1S 细胞的数量。另一方面, 由于与对照 ADC 相比, 骨髓中表达 CD138 的细胞数量少得多, 说明 h1F6-vcMMAF4 和 h1F6-mcMMAF4 显著降低了肿瘤负担(参见图 11B)。

[0284] 在 L363 模型中, 不接受治疗的小鼠中多个部位发生弥散性肿瘤, 注射肿瘤约 40 天后, 可以触摸到肿瘤, 此时处死荷瘤小鼠。与 MM-1S 模型类似, 对照 IgG-vcMMAF4 没有提供任何存活优势, 而 h1F6-vcMMAF4 显著延长了存活期(参见图 12A)。由于 L363 细胞分泌免疫球蛋白 λ 轻链 (λ LC), 所以可通过监测荷瘤小鼠血浆中人 λ LC 的浓度来确定肿瘤负担。用 ELISA 检测分泌的 λ LC。用 100 μ L/ 孔以 0. 1M 碳酸钠 / 碳酸氢钠配制的 2 μ g/mL 山羊抗人 Ig(南方生物科技 (SouthernBiotech) #2010-01, Birmingham, AL) 包被 96 孔平底免疫板 (Nunc Maxisorp, #442404, 那格国际 (Nalge Nunc International), Rochester, NY), 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 1X PBST(PBS, 0. 05% 吐温 -20) 将孔洗涤五次, 用 200 μ L/ 孔的 1% BSA/PBST(0. 05% 吐温 -20) 室温封闭 1 小时。用 1X PBST 洗涤 5 次后, 加入连续稀释的含有人 λ LC 的小鼠血清样品。纯化的人 λ LC(贝西实验室 (Bethyl labs) #P80-127, Montgomery, TX) 用作标准品。室温培育 1 小时后, 用 1X PBST 洗孔 5 次。加入用 1% BSA/PBST 1 : 4000 稀释的 HRP- 山羊抗人 λ 链特异性 F(ab')₂(南方生物科技 (Southern Biotech) #2072-05)。再于室温下培育 1 小时后, 用 1X PBST 洗孔 5 次。用 TMB 底物 100 μ L/ 孔 (西格马公司 (Sigma) #T8665, St. Louis, MO) 检测捕获的 λ LC。图 12B 显示了 L363 细胞植入血清后 40 天的结果。未治疗小鼠和 IgG-vcMMAF4- 治疗的小鼠的 λ LC 水平相当。相反, h1F6-vcMMAF4 治疗小鼠的血

清 λ LC 水平明显较低,这确证了抗 -CD70 ADC 能够降低荷有多发性骨髓瘤异种移植瘤的小鼠的肿瘤负担。

[0285] 实施例 14 :霍奇金病细胞系和成胶质细胞瘤细胞系表达 CD70

[0286] 也在一系列霍奇金病 (表 7) 和成胶质细胞瘤细胞系上评估了细胞表面的 CD70 表达 (表 8)。用 QIFIKit ® (大科公司 (Dako), Carpinteria, CA) 以定量流式细胞术分析测定各细胞系表达的 CD70 分子拷贝数。测定了这些细胞对嵌合抗 -CD70ADC- 介导的细胞毒作用的应答。在此模型中,嵌合抗 -CD70ADC 的活性是人抗 -CD70ADC 的活性的替代者。嵌合 1F6(c1F6)-vcMMAF4 和 c1F6-mcMMAF4 都对这些表达 CD70 的细胞系有细胞毒性。在霍奇金病板块中,用 c1F6-vcMMAF4 获得的 IC₅₀ 值的范围是 0.41-42ng/mL,而用 c1F6-mcMMAF4 获得的 IC₅₀ 值的范围是 5.2-310ng/mL(表 7)。在成胶质细胞瘤板块中,用 h1F6-vcMMAF4 获得的 IC₅₀ 值的范围是 2.3-27ng/mL,而用 h1F6-mcMMAF4 获得的 IC₅₀ 值的范围是 15-110ng/mL(表 8)。

[0287] 表 7

[0288] 抗 -CD70ADC 对霍奇金病细胞系的细胞毒活性

[0289]

	IC ₅₀ (ng/mL)		
	CD70 拷贝 / 细胞	c1F6-vcMMAF4	c1F6-mcMMAF4
RPMI-6666	21, 000	42	230
Hs445	64, 000	7. 3	310
L428	105, 000	1. 4	35
KMH2	160, 000	0. 41	5. 2
SUP-HD-1	221, 000	6. 3	53

[0290] 表 8

[0291] 嵌合抗 -CD70ADC 对成胶质细胞瘤细胞系的细胞毒活性

[0292]

	IC ₅₀ (ng/mL)		
	CD70 拷贝 / 细胞	h1F6-vcMMAF4	h1F6-mcMMAF4
U251	117, 000	5. 3	15
SNB-19	90, 000	12	27
U373MG	70, 000	16	35
GMS-10	64, 000	27	110
DBTRG-05MG	59, 000	2. 3	20

[0293] 本发明的范围不受本文所述的具体实施方式的限制。实际上,除本文所述的修改以外,本领域技术人员通过理解上述说明书和附图可以对本发明进行各种修改。这类修改应落入所附权利要求的范围内。

[0294] 本文引用了各种参考文献,包括专利申请、专利和科学文献,将其全部内容纳入本文作参考。

46
|

1F6 mV _H	(1)	QIQLVQSGPEVKKPGETVKISCKASGYTET <u>NYGMN</u> WVKQAPGKGLKWMGW
1F6 hV _H E	(1)	.V.....A.....AS..V..... <u> </u>R...Q..E....
1F6 hV _H J	(1)	.V.....A.....AS..V..... <u> </u>R...Q.. <u>K</u>
V _H 1-2	(1)	.V.....A.....AS..V..... <u> </u> <u>G</u> .. <u>Y</u> .. <u>H</u>R...Q..E....

^ ^ ^ ^

1F6 mV _H	(51)	<u>INTYTGEPTYADAFKGR</u> FAFSLETSASTAYLQINNLIKNE DTATYFC <u>CARDY</u>
1F6 hV _H E	(51)	VTMTRD..I...MELSR.RSD...V.Y.....
1F6 hV _H J	(51)	VTMTRD..I...MELSR.RSD...V.Y.....
V _H 1-2	(51)	.. <u>PNS</u> .. <u>GTN</u> .. <u>OKFO</u> ..VTMTRD..I...MELSR.RSD...V.Y...Y.

^ ^

1F6 mV _H	(1)1)	<u>GDYGM</u> DYWGQGTSVTVSS
1F6 hV _H E	(1)1)	T.....
1F6 hV _H J	(1)1)	T.....

J_H6 YY....V.....T.....

图 1

46
|

1F6 mV_H (1) QIQLVQSGPEVKKPGETVKISKASGYTFTNYGMNVVKQAPGKGLKWMGW
1F6 hV_HH (1) .V.....A.....AS..V.....R...Q..E..
1F6 hV_HM (1) .V.....A.....AS..V.....R...Q..K..
V_H1-18 (1) .V.....A.....AS..V.....S..IS..R...Q..E..
^ ^ ^ ^

67 71 80 82A
| | | |

1F6 mV_H (51) INTYTGEEPTYADAFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARDY
1F6 hV_HH (51)FAPSDD..T....LOINS.RSD...V.Y.....
1F6 hV_HM (51)FAPSDD..T....MELRS.RSD...V.Y.....
V_H1-18 (51) ..SA.N.NTN.OKLQ..VTMTTD..T....MELRS.RSD...V.Y...Y.
^ ^

1F6 mV_H (101) GDIYGDYWGQGTSTVTVSS
1F6 hV_HH (101)T.....
1F6 hV_HM (101)T.....
JH6 YY....V....T.....

冬 2

```

1F6 mVL (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSG--YSEFMHWYQQKPGQPP
1F6 hVLA (1) ...M....D.....E....N.....
B3 (1) ...M....D.....E....N.KS.Q..LY.SNNKNYLA.....
                                     ^ ^ ^

1F6 mVL (49) KLLIYLASNLESGVPA1RFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSREV
1F6 hVLA (49) .....D.....T.SSLQA..V.V.....
B3 (51) .....W..TR.....D.....T.SSLQA..V.V...QYYST
      ^

```

图 3

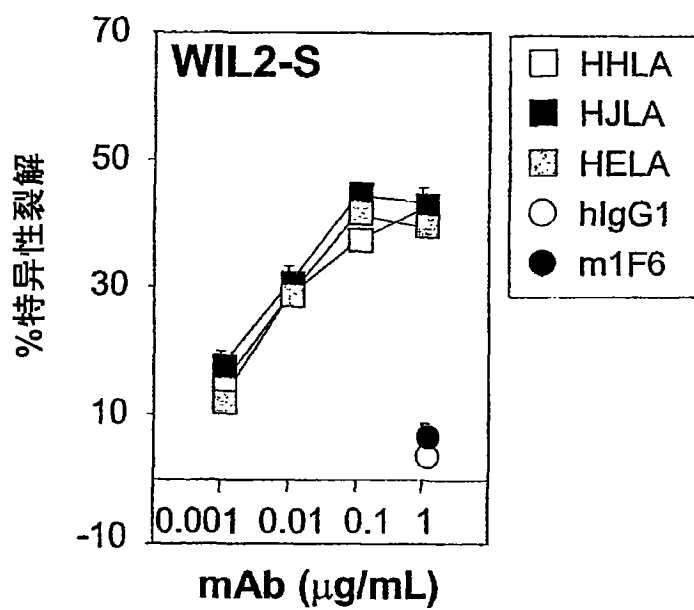


图 4A

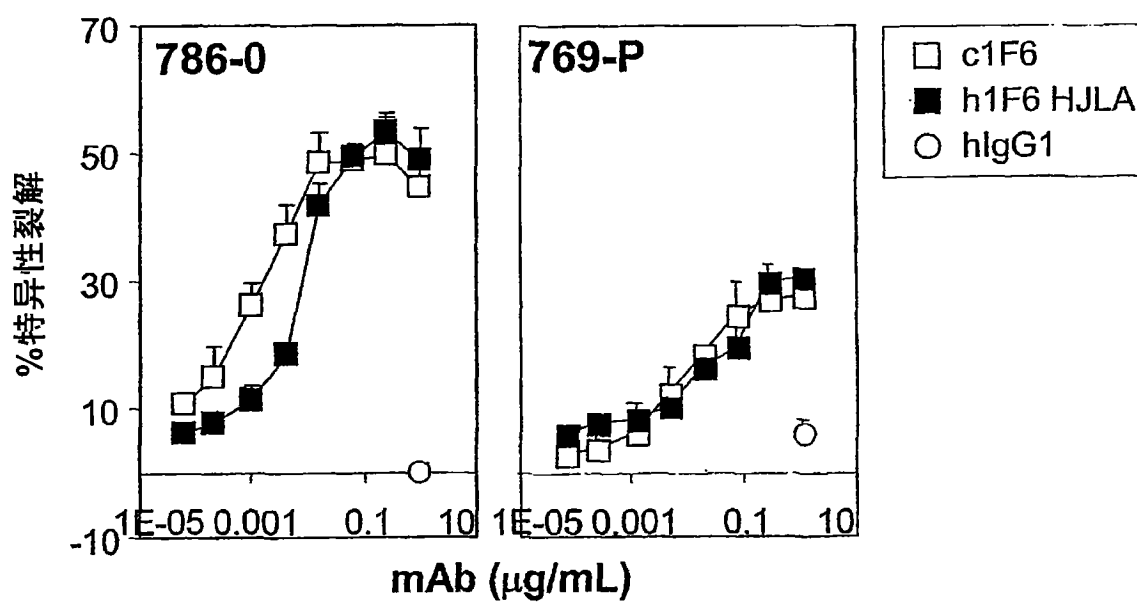


图 4B

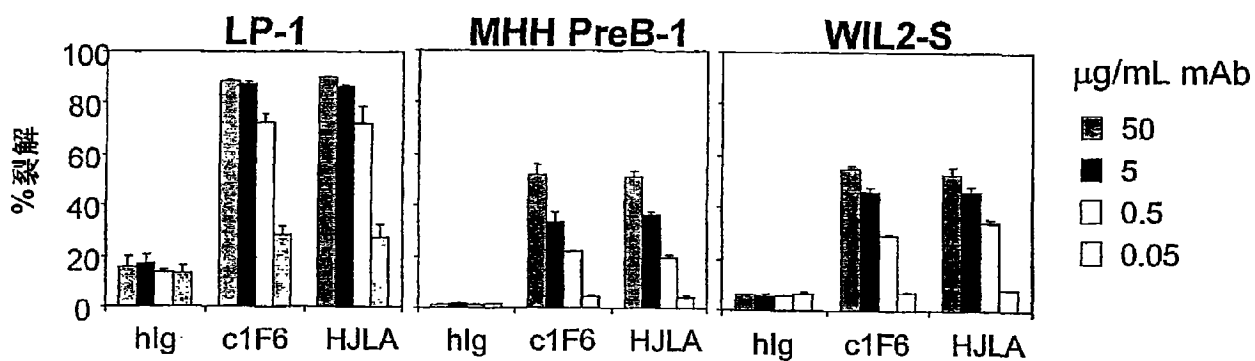


图 5

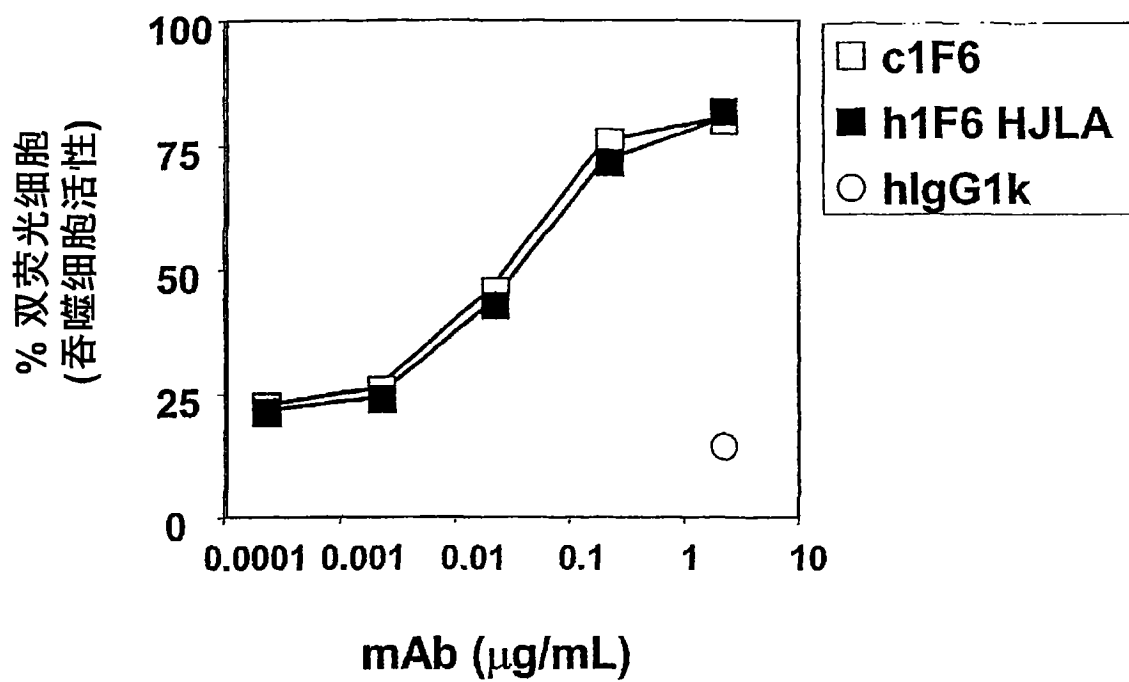


图 6

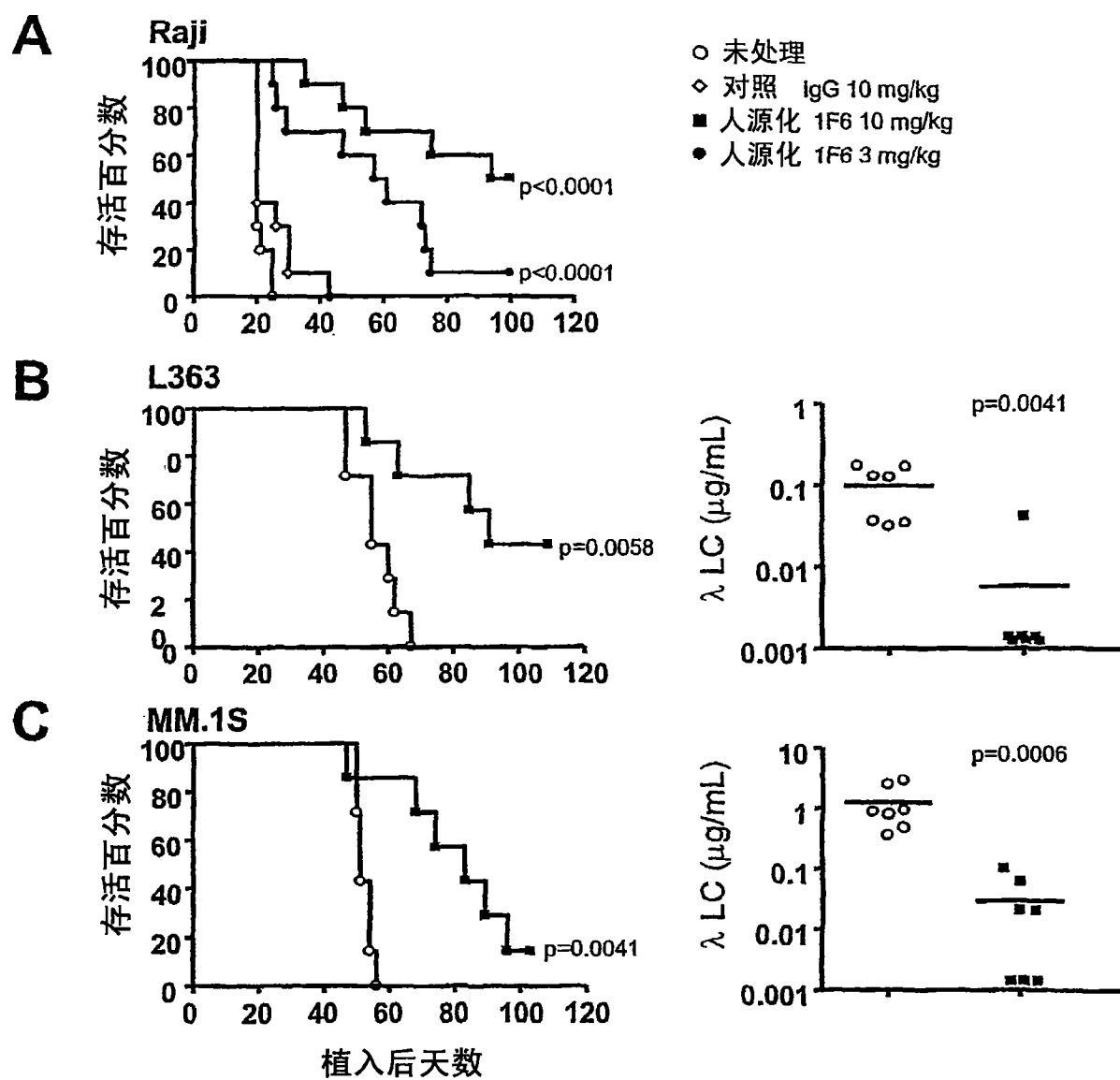


图 7

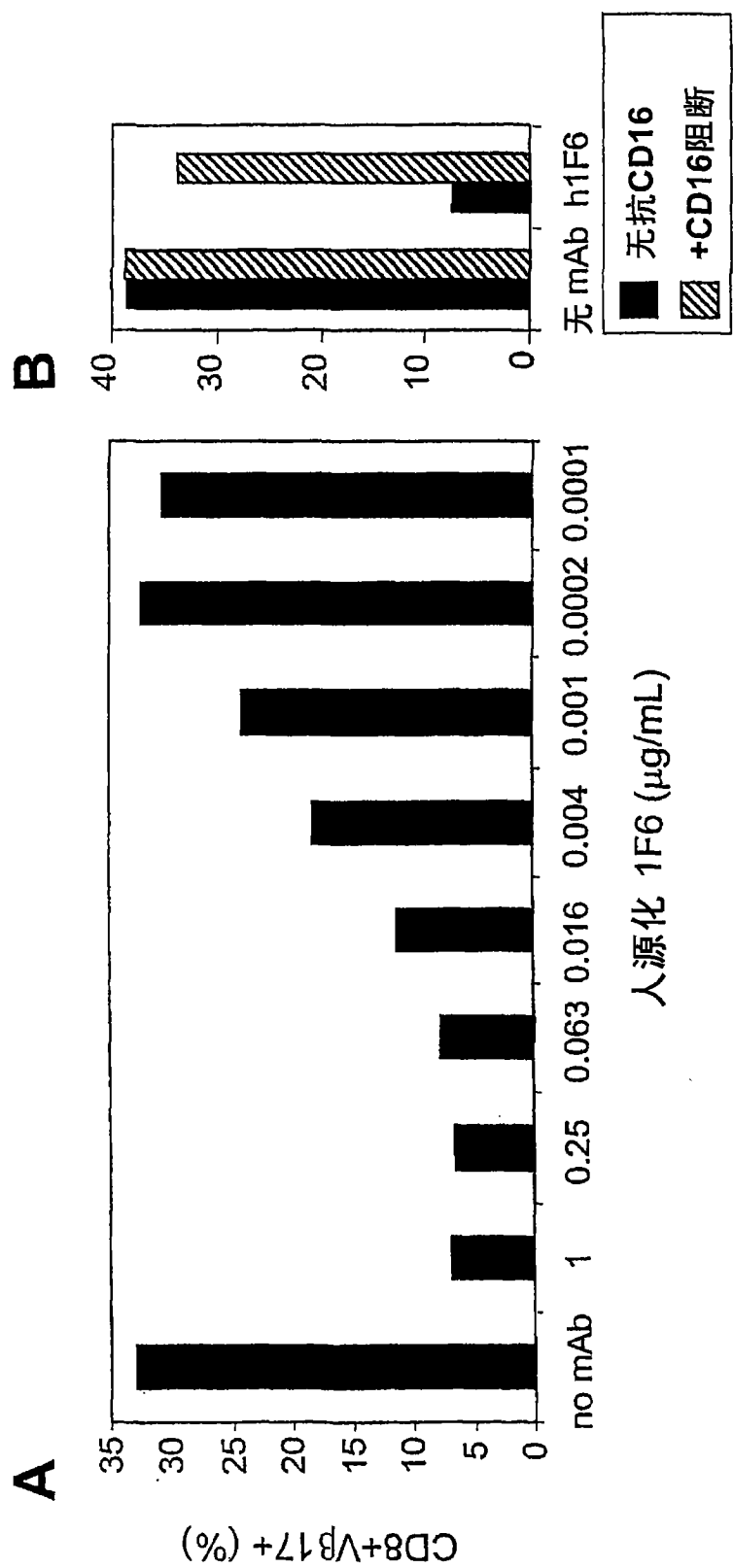


图 8

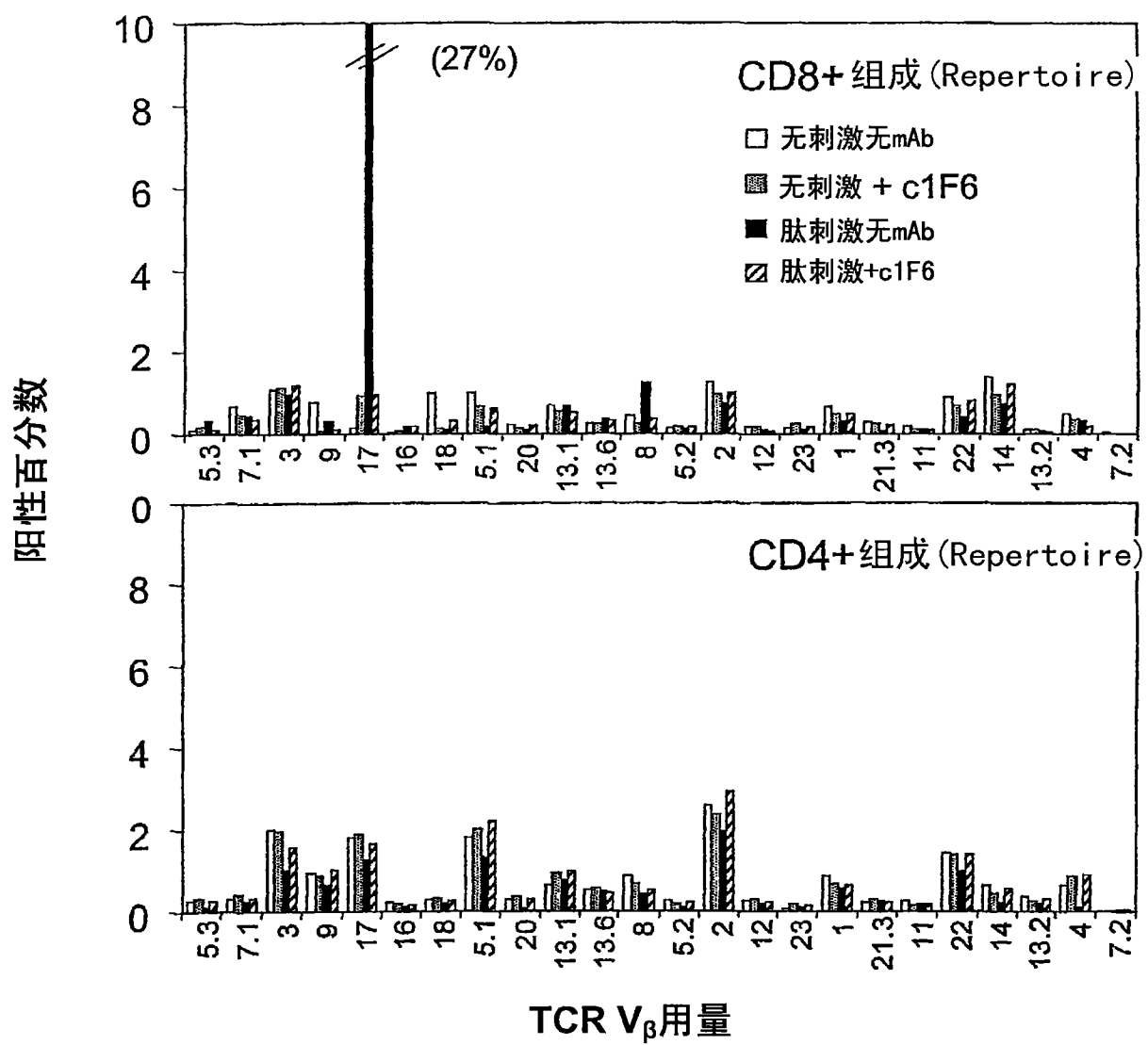


图 9

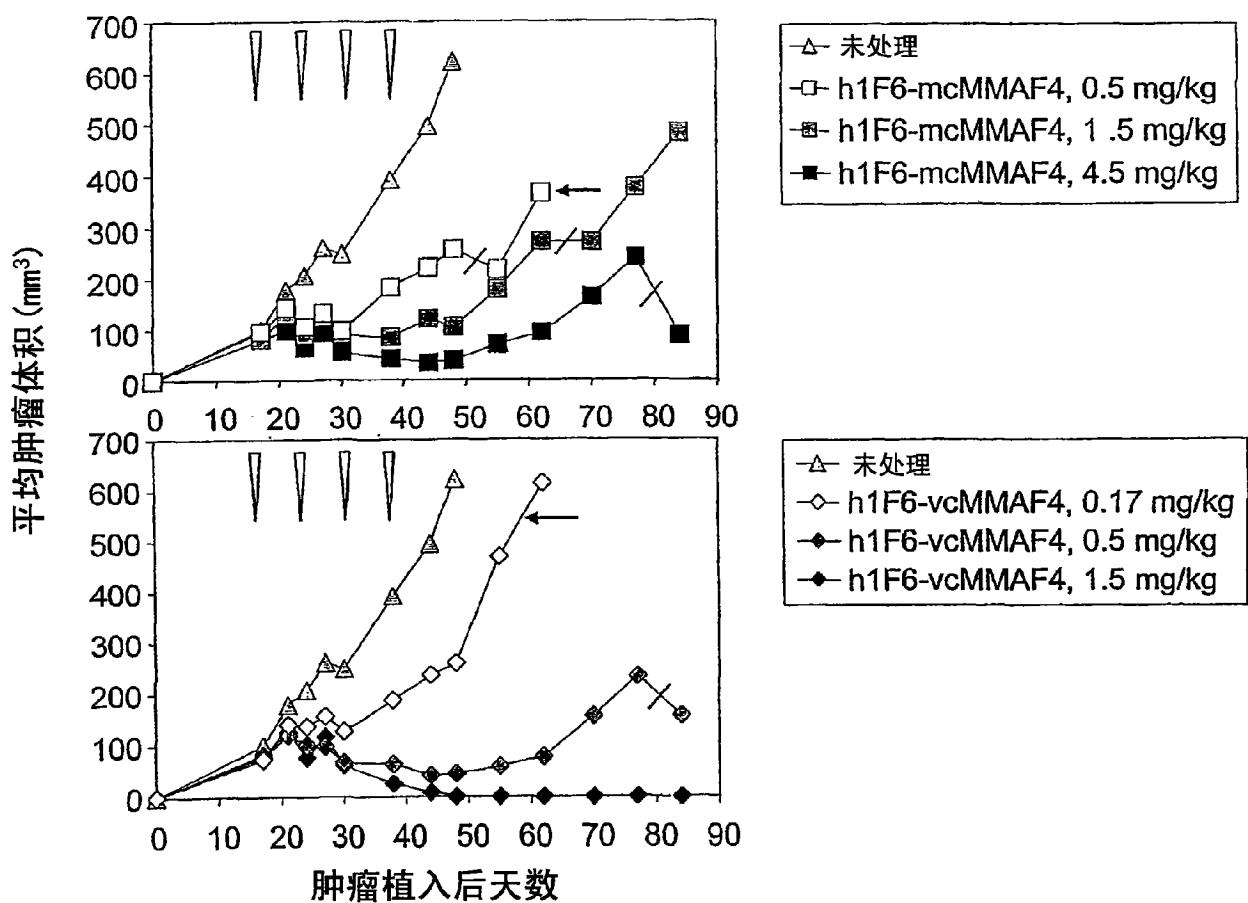


图 10A

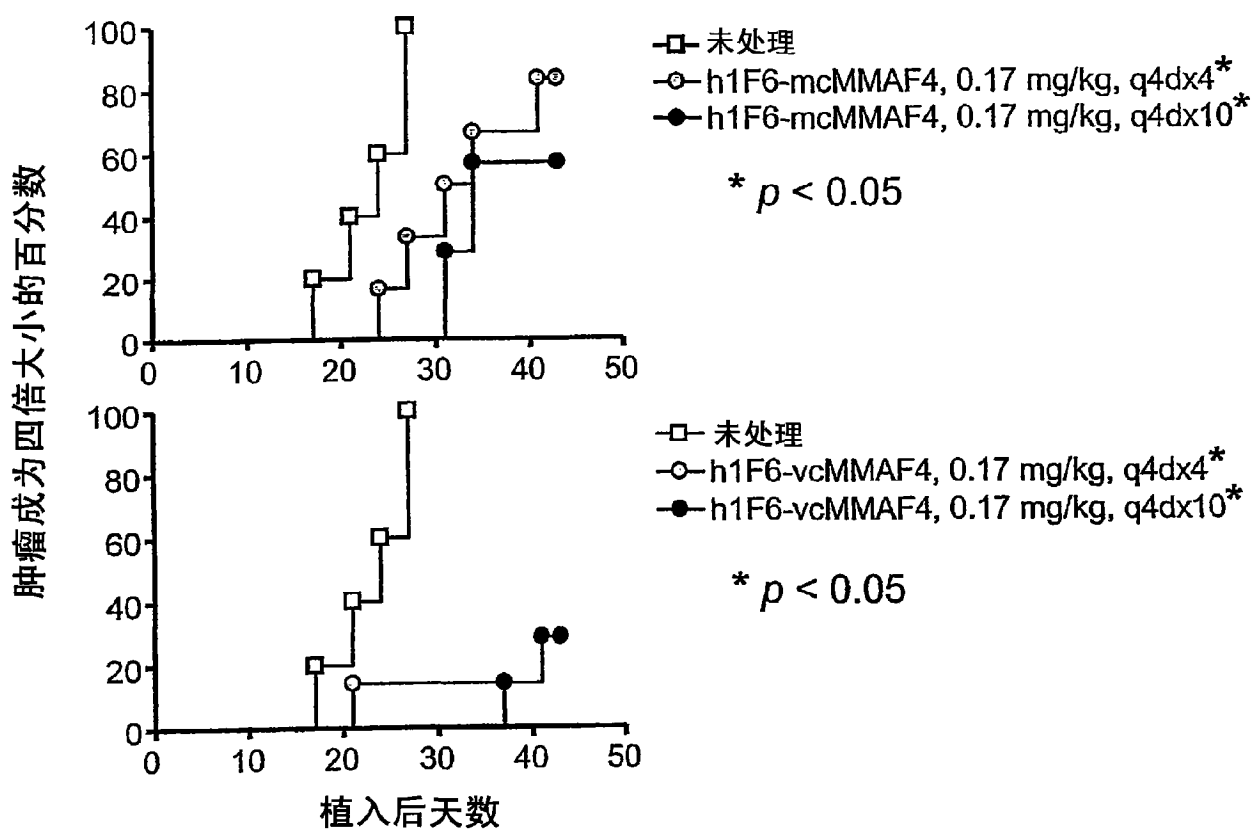


图 10B

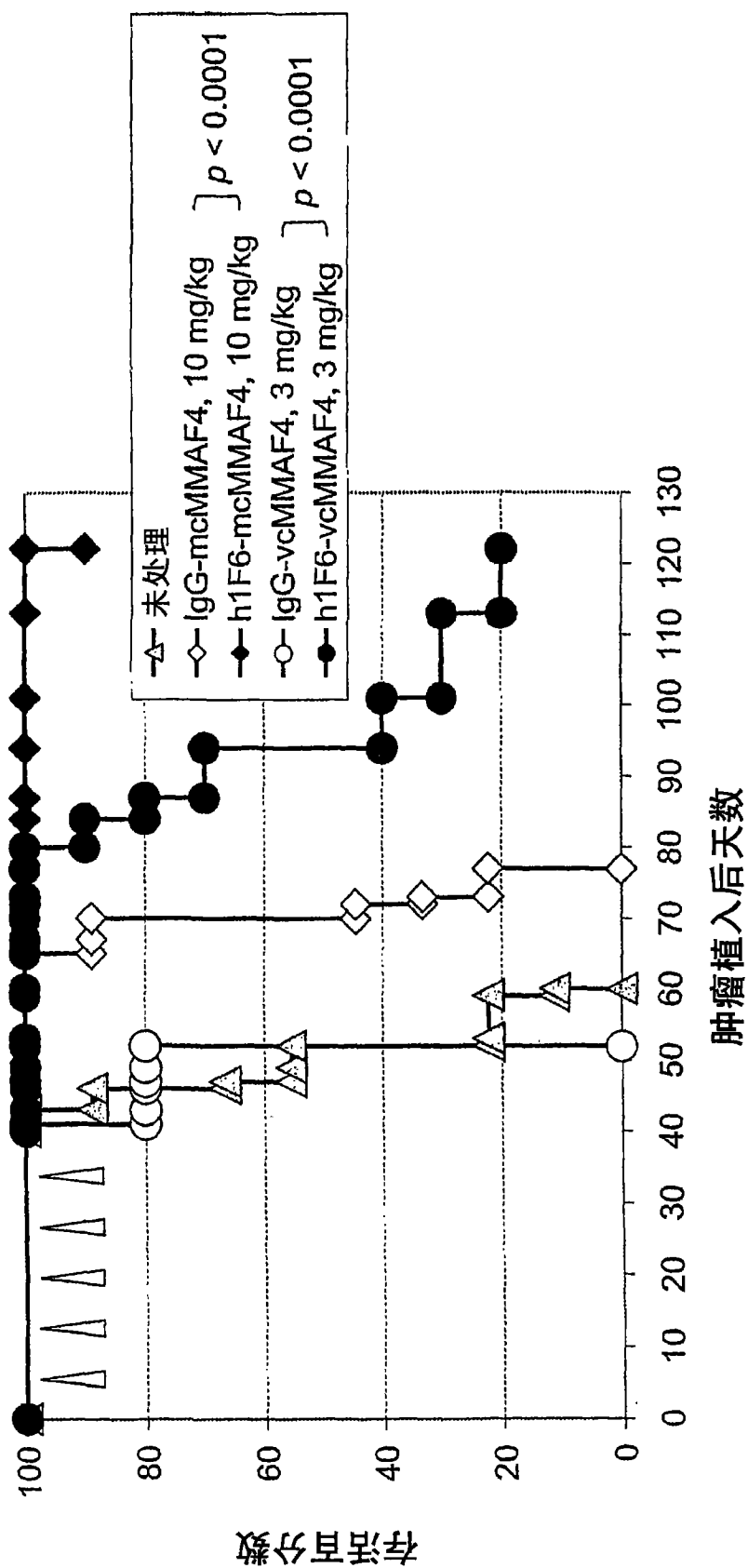


图 11A

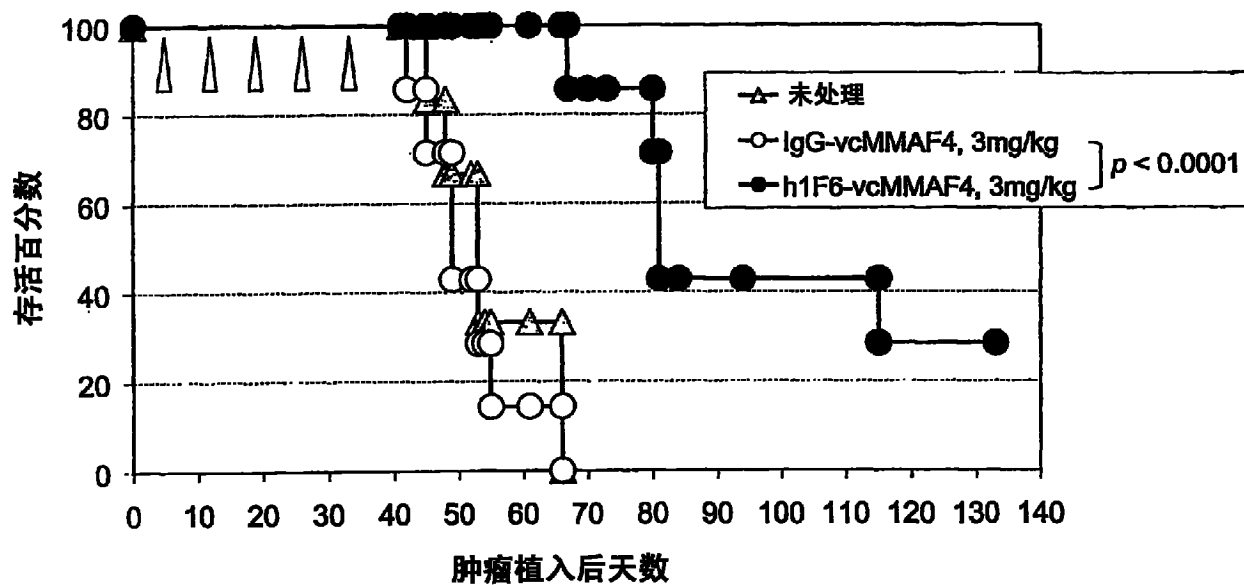


图 12A

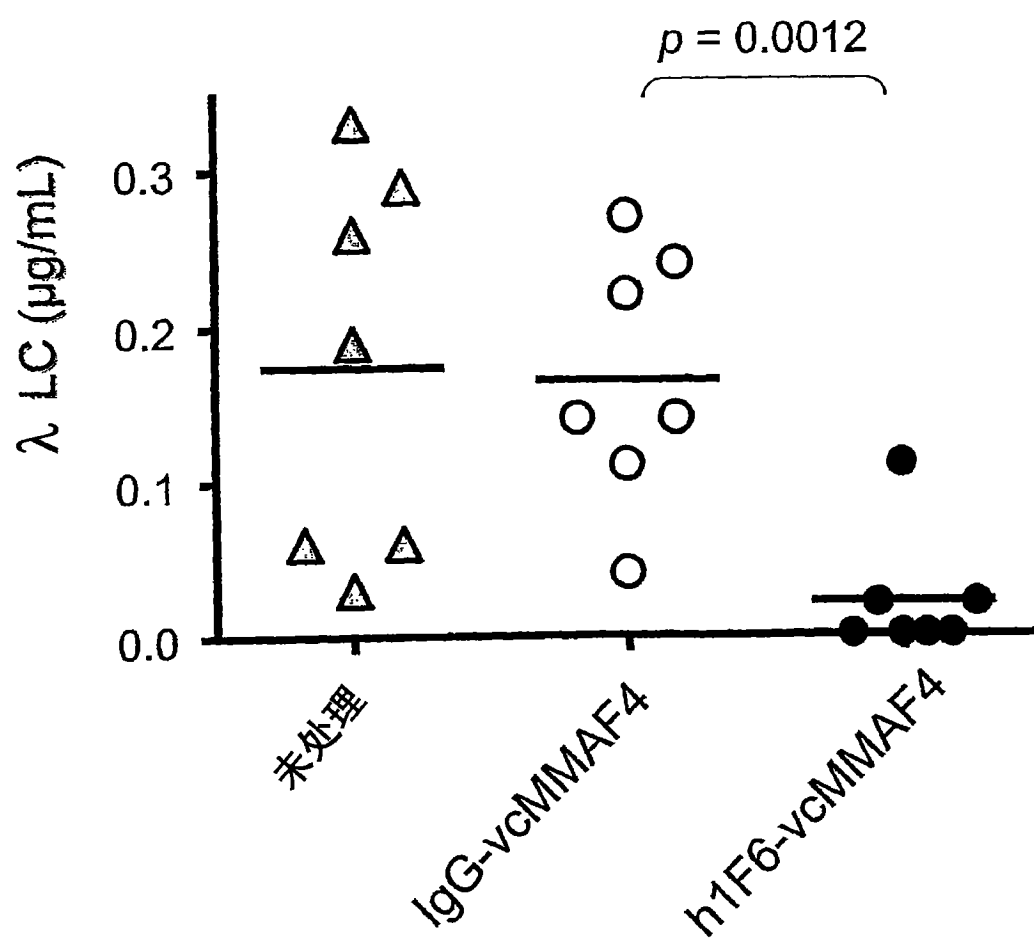


图 12B