



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105682683 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 15

(21) 申请号 201480043800. X

C07K 16/28(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 08. 02

(30) 优先权数据

2011262 2013. 08. 02 NL

2012361 2014. 03. 04 NL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 02. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2014/050543 2014. 08. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/016718 EN 2015. 02. 05

(71) 申请人 阿杜罗生物科技控股有限公司

地址 荷兰奥斯克劳斯特大街 9 号 1101 室

(72) 发明人 汉斯·范·伊奈南姆

安德鲁·范·埃尔萨斯

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 郭婧婧 程玲

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书2页 说明书29页

序列表21页 附图7页

(54) 发明名称

结合 CD27 激动剂以及免疫检查点抑制以用于免疫刺激

(57) 摘要

本发明涉及由免疫应答的刺激,尤其是抗原特异性 T 淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗。根据本发明的此类病症的治疗受抗人 CD27 激动性抗体与多个免疫检查点抑制剂组合的影响。

1. 抗人CD27激动性抗体,如hCD27.15或1F5,或其抗体类似物,其在由免疫应答的刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗中使用,其中在所述治疗中施用多个免疫检查点蛋白抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的抗人CD27激动性抗体,其中免疫检查点蛋白抑制剂选自CTLA-4、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3或KIR的抑制剂。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的抗人CD27激动性抗体,其中所述由免疫刺激,尤其是由抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症选自感染性疾病,如细菌、真菌、病毒和寄生虫感染性疾病,针对病原体的免疫,如选自细菌、真菌、病毒或寄生虫的病原体,或抗毒素或自身抗原的疫苗接种,所述自身抗原包括在良性或诸如癌症的恶性肿瘤上表达的抗原,或与细胞的不受控制增殖有关的病症如癌症。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗人CD27激动性抗体,其中所述治疗为疫苗接种,并且在所述治疗中施用疫苗。

5. 免疫检查点抑制剂,其在由免疫应答的刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗中使用,其中在所述治疗中施用抗人CD27激动性抗体,如hCD27.15或1F5,或其抗体类似物。

6. 根据权利要求5所述的免疫检查点抑制剂,其中所述免疫检查点抑制剂选自CTLA-4、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3或KIR的抑制剂。

7. 根据权利要求5至6中任一项所述的免疫检查点抑制剂,其中所述由免疫刺激改善的病症选自感染性疾病,如细菌、真菌、病毒和寄生虫感染性疾病,针对病原体的免疫,如选自细菌、真菌、病毒或寄生虫的病原体,或抗毒素或自身抗原的疫苗接种,所述自身抗原包括在良性或诸如癌症的恶性肿瘤上表达的抗原,或与细胞的不受控制增殖有关的病症如癌症。

8. 根据权利要求5至7中任一项所述的免疫检查点抑制剂,其中所述治疗为疫苗接种,并且其中在所述治疗中施用疫苗。

9. 抗人CD27激动性抗体如hCD27.15或1F5或其抗体类似物与多个免疫检查点抑制剂的组合,其在由免疫应答的刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗中使用。

10. 根据权利要求9所述的组合,其中免疫检查点抑制剂选自CTLA-4、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3或KIR的抑制剂。

11. 根据权利要求9至10中任一项所述的组合,其中所述由免疫刺激改善的病症选自感染性疾病,如细菌、真菌、病毒和寄生虫感染性疾病,针对病原体的免疫,如选自细菌、真菌、病毒或寄生虫的病原体,或抗毒素或自身抗原的疫苗接种,所述自身抗原包括在良性或诸如癌症的恶性肿瘤上表达的抗原,或与细胞的不受控制增殖有关的病症如癌症。

12. 根据权利要求9至11中任一项所述的组合,其中所述治疗为疫苗接种,并且其中在所述治疗中施用疫苗。

13. 一种治疗由免疫应答的刺激改善的病症的方法,包括对需要其的受试者施用治疗学上有效量的抗人CD27激动性抗体以及另外的免疫检查点蛋白抑制剂。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述抗人CD27激动性抗体选自:包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6的CDR氨基酸序列

或变异序列的抗人CD27激动性抗体;抗体HCD27.15的人源化类似物;结合到与hCD27.15相同表位的抗体hCD27.15的类似物;抗体1F5;不需要交联的抗人CD27激动性抗体。

15.根据权利要求13至14中任一项所述的方法,其中所述另外的免疫检查点抑制剂蛋白选自CTLA-4抗体、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗BTLA抗体、抗B7H3抗体、抗B7H4抗体、抗TIM3抗体和抗KIR抗体。

16.根据权利要求13至15中任一项所述的方法,其中所述另外的免疫检查点抑制剂蛋白为抗PD1抗体。

17.根据权利要求13至16中任一项所述的方法,其中所述抗PD-1抗体为pembrolizumab。

18.根据权利要求13至17中任一项所述的方法,其中所述抗PD-1抗体为nivolumab。

19.根据权利要求13至18中任一项所述的方法,其中所述另外的免疫检查点抑制剂蛋白为抗LAG3抗体。

20.根据权利要求19所述的方法,其中所述抗LAG3抗体包含分别为SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的重链和轻链氨基酸序列。

21.根据权利要求13至20中任一项所述的方法,其中所述需要治疗的受试者患有癌症。

22.根据权利要求13至20中任一项所述的方法,其中所述需要治疗的受试者患有感染性疾病(如细菌、真菌、病毒和寄生虫的感染性疾病)。

23.一种疫苗,其包含抗人CD27激动性抗体,并且还包含免疫检查点蛋白抑制剂。

24.根据权利要求23所述的疫苗,其中所述另外的免疫检查点蛋白抑制剂选自CTLA-4抗体、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗BTLA抗体、抗B7H3抗体、抗B7H4抗体、抗TIM3抗体和抗KIR抗体。

25.根据权利要求23至24中任一项所述的疫苗,其中所述另外的免疫检查点抑制剂蛋白为抗PD1抗体。

26.根据权利要求23至25中任一项所述的疫苗,其中所述抗PD-1抗体为pembrolizumab。

27.根据权利要求23至26中任一项所述的疫苗,其中所述抗PD-1抗体为nivolumab。

28.根据权利要求23至27中任一项所述的疫苗,其中所述另外的免疫检查点抑制剂蛋白为抗LAG3抗体。

29.根据权利要求23至28中任一项所述的疫苗,其中所述抗LAG3抗体包含分别为SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的重链和轻链氨基酸序列。

结合CD27激动剂以及免疫检查点抑制以用于免疫刺激

技术领域

[0001] 本发明涉及人用和兽用药品,包括医疗/兽医诊断和医疗/兽医研究领域。更具体地,本发明涉及由免疫应答的刺激,尤其是由抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗。本发明的各方面适于任何已知的病症或期望由CD27+免疫细胞的刺激或由一种或多种免疫检查点蛋白质的抑制改善的病症的治疗。适于由本发明治疗的病症为通过免疫刺激改善的那些(诸如感染性疾病和癌症),通过使用CD27激动剂以及一种或多种免疫检查点阻断剂的组合改善的那些传染疾病和癌症。

背景技术

[0002] CD27(TNF受体家族成员)被鉴定为在人T细胞上的膜分子(van Lier等人,1987,J Immunol 139:1589-1596)。根据现有证据,CD27具有单个配体CD70,其也为TNF家族成员(Goodwin等人,1993,Cell 73:447-56)。

[0003] CD27由造血细胞特异表达,尤其是那些淋巴细胞系,即T细胞、B细胞和NK细胞。CD27最初被定义为递增对TCR刺激的增殖反应的人T细胞共刺激分子(van Lier等人,1987,J Immunol 139:1589-1596)。CD70(即CD27的配体)的存在规定了CD27介导的共刺激的定时和持续。

[0004] 在未成熟树状细胞中CD70的转基因表达足以将对病毒或肿瘤的免疫耐受转换成CD8⁺T细胞反应。同样,激动可溶性的CD70推动对此类多肽免疫的CD8⁺T细胞应答(Rowley等人,2004,J Immunol 172:6039-6046),并且在CD70转基因小鼠中,大大促进响应于TCR刺激的CD4⁺和CD8⁺效应细胞的形成(Arens等人,2001,Immunity15:801-12;Tesselaar等人,2003,Nat Immunol 4:49-54;Keller等人,2008,Immunity29:334-346)。在小鼠淋巴瘤模型中,肿瘤排斥在CD70转基因或抗小鼠CD27抗体的注射时改善(Arens等人,2003,J Exp Med 199:1595-1605;French等人,2007,Blood 109:4810-15;Sakanishi和Yagita,2010,Biochem.Biophys.Res.Comm.393:829-835;WO 2008/051424;WO 2012/004367)。

[0005] 在WO2012/004367中,描述了第一个抗人激动性抗体(命名为HCD 27.15),其不需要交联以激活免疫应答的CD27介导的共刺激。此外,抗人CD27抗体(命名为1F5)被公开在交联时激活CD27(WO2011/130434以及Vitale等人,Clin.Cancer Res,2012,18(14):3812-3821)。

[0006] 最近,调节癌免疫的试剂的第一个临床成功已经验证了癌症免疫疗法作为一种新途径,以在癌症患者中获得持久和长期的临床反应(Mellman等人,Nature,2011,480:480-489)。获得上市批准用于治疗转移性黑色素瘤的第一种此类试剂,依匹木单抗(ipilimumab)(Yervoy,BMS)是抗体阻断的CTLA4受体,免疫检查点蛋白。正在开发的另外的免疫检查点抑制剂是阻断PD-1受体及其配体PD-L1和PD-L2之间的相互作用的抗体(Mullard,Nat.Rev.Drug Disc.,2013,12:489-492)。针对PD-1途径的几个抗体目前在临床开发中用于治疗黑色素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤和其他肿瘤。虽然这些药物尚未申请上市批准,但是在早期临床研究中已经获得令人印象深刻的结果,例

如在黑色素瘤中使用Lambrolizumab(抗PD1)(Hamid等人,2013,New.Eng.J.Med.,369:134-44)。

[0007] 本领域的当前状态不表明CD27受体的激动剂将理性地与诸如抗PD1、抗PDL1或抗CTLA4抗体的免疫检查点抑制剂结合,以提高癌症免疫。事实上,现有数据表明CD27至少部分经由否决的PD-1和CTLA-4的信号或经由这些免疫检查点的下调起作用。首先,在基于被证明高度依赖于PD-1和CTLA4受体的LCMV衍生表位的T细胞耐受性模型中,CD70配体的强制表达足以将T细胞耐受转化成T细胞免疫的活化。显然,这些数据有力地表明,CD27活化对经由PD-1和CTLA4介导的耐受施加影响(Keller等人,Immunity,2008,29:934-946。在第二个模型中,使用大鼠抗鼠CD27激动性抗体的CD27的激活表明支持CD8⁺T细胞的维持,以减少肿瘤内的FoxP3表达的CD4⁺T细胞的频率,并以增强NK1.1⁺和CD8⁺的肿瘤浸润细胞与肿瘤细胞共培养分泌IFN- γ 的能力。这增强了与在CD8⁺T细胞上的PD-1表达的降低水平相关的功能(Roberts等人,J Immunother.,2010,33:769-79)。

发明内容

[0008] 因此本领域的当前状况是,CD27的刺激对PD-1和CTLA-4介导的免疫耐受施加影响,并且使用抗CD27抗体的活化导致这些免疫检查点受体的下调。因此,根据现有技术的状况,激活CD27受体的药剂与一种或多种免疫检查点抑制剂的组合会产生等于或类似于单独的CD27活化或免疫检查点抑制的功效。

[0009] 然而,本发明的发明人意外地发现,相比于单独的CD27激动性抗体或免疫检查点抑制剂,CD27激动性抗体与免疫检查点抑制剂的组合确实对T细胞刺激具有附加效果。具体地,CD27激动性抗体与免疫检查点抑制剂的组合的附加效果已在建立的测定中进行了测试,该测定已被临床验证预测抗癌免疫响应。在这些测定中,免疫检查点抑制性抗体被证明在人外周血单核细胞或人全血中用葡萄球菌肠毒素B刺激时诱导T细胞的细胞因子IL-2升高的水平(Dulos等人,J. Immunother,2012,35:169-78)。随后在阶段I/II临床研究中建立这个测定的临床验证和预测价值(Patnaik等人,ASCO,Chicago,2012;Ribas等人,PEGS Summit,Boston,2013;Hamid等人,N.Engl.J.Med.,2013,369:134-144)。

[0010] 因此,本发明是基于意外发现,即抗人CD27激动性抗体与免疫检查点抑制剂的组合使免疫刺激达到意想不到的水平。根据CD27和免疫检查点抑制剂之间迄今已知的关系,由组合造成的较高水平免疫刺激是令人意外的。根据其意外的发现,本发明涉及由免疫应答的刺激或增强而改善的病症的治疗,尤其是导致抗原特异性T淋巴细胞的刺激或增强的病征(如癌症和感染性疾病)的治疗。更具体地说,本发明旨在任何已知的病症或期望由CD27+免疫细胞的刺激或由一种或多种免疫检查点蛋白质的抑制改善的病症的治疗。这些病征的治疗可进一步通过使用CD27激动剂和一种或多种免疫检查点阻断剂的组合而改善。

[0011] 根据第一方面,本发明涉及抗人CD27激动性抗体,如hCD27.15或1F5,或从其衍生的抗体,其在由免疫应答的刺激改善的病症的治疗中,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗中使用,其中在所述治疗中施用大量免疫检查点蛋白抑制剂。通过抗人CD27激动性抗体与多个免疫检查点蛋白抑制剂的这种共施用,获得意想不到的效果。

[0012] 根据另一方面,本发明涉及免疫检查点蛋白抑制剂,其在由免疫应答的刺激改善的病症的治疗中,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗中使用,其中在所

述治疗中施用抗人CD27激动性抗体,如hCD27.15或1F5,或从其衍生的抗体。通过免疫检查点蛋白抑制剂与抗人CD27激动性抗体的这种共施用,获得意想不到的效果。

[0013] 本发明的又一方面涉及抗人CD27激动性抗体如hCD27.15或1F5或从其衍生的抗体与多个免疫检查点蛋白抑制剂的组合,其在由免疫应答的刺激改善的病症的治疗中,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗中使用。

[0014] 本发明的再一方面涉及一种用于治疗由免疫应答的刺激改善的病症,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗方法,所述方法包括施用抗人CD27激动性抗体(如hCD27.15或1F5或从其衍生的抗体)与多个免疫检查点抑制剂的结合。

[0015] 本发明的抗人CD27抗体可选自hCD27.15或其类似物,尤其是包含hCD27.15的CDR的类似物、(交叉)阻断hCD27.15与人CD27结合的类似物、结合到hCD27.15相同表位的类似物或hCD27.15的人源化类似物。

[0016] 在另一个实施方案中,抗人CD27抗体与抗PD1抗体结合施用。在一个实施方案中,抗人CD27抗体与nivolumab结合施用。在另一个实施方案中,抗人CD27抗体与pembrolizumab结合施用。在另一个实施方案中,抗人CD27抗体与抗CTLA4抗体结合施用。在另一个实施方案中,抗人CD27抗体与抗LAG3抗体结合施用。在另一个实施方案中,抗人CD27抗体与包含SEQ ID NO:23的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:24的轻链氨基酸序列的抗LAG3抗体结合施用。

[0017] 本领域技术人员将会知道对于nivolumab和pembrolizumab的重链和轻链的公布序列分别为如在SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20中所表示。

[0018] 表1:序列表

[0019]

SEQ ID NO:	说明
1	hCD27.15 重链 CDR1 (AA)
2	hCD27.15 重链 CDR2 (AA)
3	hCD27.15 重链 CDR3 (AA)
4	hCD27.15 轻链 CDR1 (AA)
5	hCD27.15 轻链 CDR2 (AA)

[0020]

6	hCD27.15 轻链 CDR3 (AA)
7	hCD27.15 重链可变区 (DNA)
8	hCD27.15 重链可变区 (AA)
9	hCD27.15 轻链可变区 (DNA)
10	hCD27.15 轻链可变区 (AA)
11	1F5 重链 CDR1 (AA)
12	1F5 重链 CDR2 (AA)
13	1F5 重链 CDR3 (AA)
14	1F5 轻链 CDR1 (AA)
15	1F5 轻链 CDR2 (AA)
16	1F5 轻链 CDR3 (AA)
17	1F5 重链可变区 (AA)
18	1F5 轻链可变区 (AA)
19	Pembrolizumab 重链 (AA)
20	Pembrolizumab 轻链 (AA)
21	Nivolumab 重链 (AA)
22	Nivolumab 轻链 (AA)
23	抗人 LAG3 成熟重链 (AA)
24	抗人 LAG3 成熟轻链 (AA)

附图说明

[0021] 图1与单独的CD27激动性抗体和免疫检查点抑制剂相比,CD27激动性抗体与免疫检查点阻断剂的结合出乎意料地增强了在人PBMC中SEB诱导的T细胞活化。图1ACD27激动性抗体与抗PD1抗体的结合增强了在人PBMC中SEB诱导的T细胞活化。添加等量的诱导抗体,终浓度如在X轴上所示。人IgG4用作同种型匹配的对照。图1BCD27激动性抗体与抗PDL1抗体的结合增强了在人PBMC中SEB诱导的T细胞活化。添加等量的诱导抗体,终浓度如在X轴上所示。人IgG4和/或鼠IgG1用作同种型匹配的对照。

[0022] 图2与单独的CD27激动性抗体和免疫检查点抑制剂相比,CD27激动性抗体与免疫检查点阻断剂的结合出乎意料地增强了在人全血中SEB诱导的T细胞活化。图2ACD27激动性抗体与抗PD1抗体的结合增强了在人全血中SEB诱导的T细胞活化。添加等量的诱导抗体,终浓度如在X轴上所示。人IgG4用作同种型匹配的对照。图2BCD27激动性抗体与抗PDL1抗体的

结合增强了在人全血中SEB诱导的T细胞活化。添加等量的诱导抗体,终浓度如在X轴上所示。人IgG4和/或鼠IgG1用作同种型匹配的对照。图2CCD27激动性抗体与抗CTLA-4抗体的结合增强了在人全血中SEB诱导的T细胞活化。添加等量的诱导抗体,终浓度如在X轴上所示。人IgG4和/或鼠IgG2A用作同种型匹配的对照。

[0023] 图3与单独的CD27激动性抗体和免疫检查点抑制剂相比,CD27激动性抗体与免疫检查点阻断剂的结合增强了在人全血中SEB诱导的T细胞活化。图3A-3D示出对于hCD27.15类似物与抗LAG3(左版)和抗PD1(右版)结合的效果的数据。抗体的组合增强了在不同供体的人全血中SEB诱导的T细胞活化。

具体实施方式

[0024] 第一方面,本发明涉及抗人CD27激动性抗体,其在由免疫应答的刺激改善的病症的治疗中,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗中使用,其中在所述治疗中施用大量免疫检查点蛋白抑制剂。

[0025] 抗人CD27激动性抗体应被理解为意思是显示在CD27⁺免疫细胞上活化CD27受体的抗体。抗人CD27抗体的激动性特征可通过CD27受体活化来测定,使用例如在W02012/004367中所描述的NF- κ B荧光素酶报告分析。使用激活的抗人CD27抗体的CD27受体的活化已被示出诱导人CD27⁺免疫细胞的活化、增殖和/或存活。通过显示它的CD27受体-刺激效应,CD27激动剂能够诱导和/或增强免疫应答(例如,抗原特异性T细胞介导的免疫应答)。在本发明中使用的抗人CD27抗体当以可溶形式时可对它的激动性活性施以影响。另选地,在本发明中使用的抗人CD27抗体当交联时可对它的激动性活性施以影响。对于交联,可关于它的Fc功能调整抗人CD27抗体。当以可溶形式时,使用对激动性活性施以影响的抗人CD27抗体是优选的。

[0026] 抗人CD27激动性抗体在本领域中是已知的。例如,hCD27.15在W02012/004367中公开,并且1F5在W02011/130434以及Vitale等人,Clin.Cancer Res,2012,18(14):3812-3821)中公开。使用1F5或hCD27.15或从这些已知的抗体中的一个中衍生的抗体是优选的。当以可溶形式(不存在任何进一步的交联)时根据有益的结合特性和它显示出良好的激动性活性的能力,使用hCD27.15或从其的抗体类似物是最优选的。在本发明内,从某一抗体衍生的抗体可被认为类似物。本领域技术人员将会理解,对于在本发明的上下文中的抗体类似物的适当运作,根据某一实施方案,衍生抗体(或抗体类似物)将包括结合它的原始抗体区的抗原,或将至少结合到相同的表位上。抗体类似物可(交叉-)阻断抗CD27抗体(例如hCD27.15或1F5)结合到人CD27。抗体类似物尤其包含抗体片段、具有改性的效应子功能的抗体、如下所限定的嵌和抗体和人源化抗体。根据本发明的抗体类似物保留CD27激动性功能。

[0027] 识别这个抗体的抗原结合区的hCD27.15的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列已经在W02012/004367中公开。这些序列也已在本书的序列表的SEQ ID NO:1-6中示出,连同重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:10)。包含这些CDR序列的hCD27.15的抗体类似物尤其被认为在本发明中使用。

[0028] 识别这个抗体的抗原结合区的1F5的重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列以及轻链

CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列已经在W02011/130434中公开。这些序列也已在本说明书的序列表的SEQ ID NO:11-16中示出,连同重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18)。包含这些CDR序列的1F5的抗体类似物尤其被认为在本发明中使用。

[0029] 另选地,也可选择结合到这些抗体的相同表位但具有不同CDR的hCD27.15或1F5的类似物。为了筛选出结合到在人CD27上的hCD27.15或1F5表位的抗体,可进行如在“Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow和David Lane(1988)”中描述的常规交叉阻断测定。结合到相同表位的抗体在此类测定中有可能交叉-阻断,但是由于交叉-阻断可源自通过在重叠表位或甚至接近非重叠表位处结合的抗体结合的抗体的位阻,并不是所有交叉-阻断抗体将必定在精确相同的表位处结合。保留CD27激动性功能的此类交叉-阻断抗体也在本发明的范围内。

[0030] 另选地,表位定位的已知技术(例如在Champe等人,1995,J. Biol. Chem. 270:1388-1394中所描述的)可被执行以确定抗体是否结合感兴趣的表位。“丙氨酸扫描诱变”(如由Cunningham和Wells,1989,Science 244:1081-1085所描述的)或在人CD27中氨基酸残基的一些其它形式的点诱变也可用于确定对于本发明的抗CD27抗体的功能表位。

[0031] 用于定位抗体表位的另一种已知的方法为研究抗体对合成直链和CLIPS多肽的结合,所述表位可使用如Slootstra等人(Slootstra等人,1996,Mol. Diversity 1:87-96)以及Timmerman等人(Timmerman等人,2007,J. Mol. Recognit. 20:283-299)所描述的信用卡格式小肽扫描卡来筛选。在基于肽扫描的酶联免疫测定中(ELISA)确定抗体对每个多肽的结合。

[0032] 另外的结合到与hCD27.15相同表位的抗体可以用公知的技术获得,例如,通过针对用于结合表位的CD27而产生的抗体的筛选,或通过用包含表位序列的人CD27片段的多肽免疫动物。结合到相同功能表位的抗体可以预期表现出相似的生物活性,如CD27激动性活性,并且这种活性可通过抗体的功能测定来确认。对于结合到该抗体的相同表位的1F5的类似物,也可类比使用这些技术。

[0033] 根据一个实施方案,结合到该抗体的相同表位但具有不同CDR的hCD27.15的类似物可以用约50nM或更低的 IC_{50} 阻断hCD27.15结合人CD27。另选地,结合到该抗体的相同表位但具有不同CDR的hCD27.15的类似物可以通过hCD27.15用约50nM或更低的 IC_{50} 在其结合人CD27时被阻断。类似地,结合到该抗体的相同表位但具有不同CDR的1F5的类似物可以用约50nM或更低的 IC_{50} 阻断1F5结合人CD27,或者可通过1F5用约50nM或更低的 IC_{50} 在其结合人CD27时被阻断。约50nM或更低被理解为包括 50×10^{-9} 至 0.1×10^{-12} M,如 20×10^{-9} 至 1.0×10^{-11} M、 10×10^{-9} 至 1.0×10^{-10} M或 10×10^{-9} 至 1.0×10^{-19} 。

[0034] 不同CDR可以是在本发明中使用的人CD27结合抗体的已知CDR的序列变体,例如hCD27.15或1F5。如本文所用的序列“变体”是指不同于在一个或多个氨基酸残基处所公开序列的序列,但其保留了所得分子的生物活性。本发明包括由各种序列明确公开的抗体的变体,例如hCD27.15或1F5。对于 V_H 结构域CDR1、CDR2和CDR3序列,根据一些实施方案,变体序列可包含至多6个氨基酸取代,如1、2、3、4、5或6个氨基酸取代,对于CDR1、CDR2和CDR3序列合在一起。类似地,对于 V_L 结构域CDR1、CDR2和CDR3序列,根据一些实施方案,变体序列可包含至多6个氨基酸取代,如1、2、3、4、5或6个氨基酸取代,对于CDR1、CDR2和CDR3序列合在

一起。本领域技术人员将会理解,尤其是保守氨基酸取代可能会导致维持生物活性。对公开的所有氨基酸和DNA序列,序列变体也可被设想本发明的范围内。

[0035] “保守修饰的变体”或“保守氨基酸取代”是指氨基酸的取代是本领域技术人员已知的,并且通常可在不改变所得分子的生物活性的情况下做出。本领域技术人员认识到,在一般情况下,在多肽的非必需区中的单个氨基酸取代基本上不改变生物学活性(参见,例如,Watson等人,《基因分子生物学(Molecular Biology of the Gene)》,Benjamin/Cummings出版公司,第224页(1987年第4版))。此类示例性取代优选根据在表2中列出的那些做出。

[0036] 表2:示例性保守氨基酸取代

[0037]

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr

[0038]

Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

[0039] 本发明的抗人CD27激动性抗体旨在用于由免疫应答的刺激改善的病状的治疗中,尤其是由抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗中。这种治疗的特点是,施用多个免疫检查点蛋白抑制剂。因此,CD27激动性抗体与多个免疫检查点蛋白抑制剂共施用。在本发明中,术语“多个”应理解为意思是至少一个或另选地一个或多个,如1、2、3、4、5或6个。

[0040] 术语“免疫检查点蛋白”是本领域已知的。在此类术语的已知意义内,本领域技术人员将清楚关于“免疫检查点蛋白”的水平,免疫系统提供了抑制信号到它的部分以平衡免疫反应。已知的免疫检查点蛋白包括CTLA-4、PD1及其配体PD-L1和PD-L2,此外LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR。涉及LAG3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3和KIR的途径在本领域中公认构成类似于CTLA-4和PD-1依赖性途径的免疫检查点途径(参见例如,Pardoll, 2012. *Nature Rev Cancer* 12:252-264; Mellman等人, 2011. *Nature* 480:480-489)。

[0041] 在本发明中,免疫检查点蛋白抑制剂是抑制免疫检查点蛋白的功能的任何化合物。抑制包括功能减少和完全阻滞。具体地,免疫检查点蛋白是人免疫检查点蛋白。因此,免疫检查点蛋白抑制剂优选为人免疫检查点蛋白抑制剂。免疫检查点蛋白在本领域中有所描述(参见例如Pardoll, 2012. *Nature Rev. cancer* 12:252-264)。指定免疫检查点包括通过在体外或体内免疫检查点蛋白质的抑制引发T淋巴细胞反应的抗原-受体刺激的实验示范,例如小鼠在免疫检查点蛋白质的表达上的缺陷显示增强的抗原特异性T淋巴细胞应答或自身免疫的迹象(如在Waterhouse等人, 1995. *Science* 270:985-988; Nishimura等人, 1999. *Immunity* 11:141-151所公开的)。这也包括由于在体外或体内免疫检查点蛋白的有意刺激引发的CD4+或CD8+T细胞应答的抗原-受体的抑制的展示(例如, Zhu等人, 2005. *Nature Immunol.* 6:1245-1252)。

[0042] 优选的免疫检查点蛋白抑制剂为特异性识别免疫检查点蛋白的抗体。大量CTLA-4、PD1、PDL-1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3和KIR抑制剂是已知的,并且在这些已知的免疫检查点蛋白抑制剂的类似物中,在(不久的)将来可研发出替代的免疫检查点抑制剂。例如,易普利姆玛(ipilimumab)为完全人CTLA-4阻断抗体,目前以名称Yervoy(百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))在市场上销售。第二个CTLA-4抑制剂为曲美母单抗(tremelimumab)(参考Ribas等人, 2013, *J. Clin. Oncol.* 31:616-22)。PD-1抑制剂的例子非限制性地包括阻断人PD-1的人源化抗体,如lambrolizumab(例如,如在W02008/156712; Hamid等人, *N. Engl. J. Med.* 369:134-144 2013中公开的hPD109A以及其人源化衍生物h409A11、h409A16和h409A17)或pidilizumab(如在Rosenblatt等人, 2011. *J Immunother.* 34:409-18中所公开的),以及完全人抗体,如nivolumab(先前已知为MDX-1106或BMS-936558, Topalian等人, 2012. *N. Eng. J. Med.* 366:2443-2454, 在US8008449B2中所公开的)。其它PD-1抑制剂可包括可溶PD-1配体的演示,非限制性地包括PD-L2Fc融合蛋白(也被称为B7-DC-Ig或AMP-2440)(在Mkrtichyan M等人, *J Immunol.* 189:2338-47 2012中公开),并且其它PD-1抑制剂目前正在探索和/或开发用于治疗中。此外,免疫检查点抑制剂可包括但不限于阻断PD-L1的人源化抗体和完全人抗体,如MEDI-4736(在W02011066389 A1中公开)、MPDL3280A(在US8217149B2中公开)和MIH1(通由eBioscience公司获得的Affymetrix(16.5983.82)),并且其它PD-L1抑制剂目前正在探索中。根据本发明,免疫检查点抑制剂优选选自CTLA-4、PD-1或PD-L1抑制剂,如选自上面提到的已知的CTLA-4、PD-1或PD-L1(ipilimumab、tremelimumab、labrolizumab、nivolumab、pidilizumab、AMP-244、

MEDI4736、MPDL3280A、MIH1)。这些免疫检查点蛋白的已知抑制剂可用作这样,或可以使用类似物,尤其是嵌合、人源化或人形式的抗体。

[0043] 本领域技术人员将会知道,替代和/或等效的名称可用于上面提到的某些抗体。此类替代和/或等效的名称在本发明的上下文中可互换。例如,已知lambrolizumab也以替代和等效名称MK-3475和pembrolizumab被知道。

[0044] 从PD1和PD-L1抑制剂(如上面提到的已知的PD-1或PD-L1抑制剂)中选择免疫检查点抑制剂是更优选的,并且最优选地从PD-1抑制剂(如上面提到的已知的PD1抑制剂)中做出选择。在优选的实施方案中,PD1抑制剂为nivolumab或pembrolizumab或另一抗人PD1的激动性抗体。

[0045] 本发明还包括本领域中已知刺激免疫应答的其它免疫检查点抑制剂的选择。这诱导了直接或间接刺激或增强抗原特异性T淋巴细胞的抑制剂。这些其它免疫检查点抑制剂包括但不限于靶向免疫检查点蛋白以及涉及PD-L2、LAG3、BTLA、B7H4和TIM3途径的药剂。例如,本领域已知的人PD-L2抑制剂包括MIH18(在(Pfistershammer等人,2006.Eur J Immunol.36:1104-13)中公开)。另一个例子,本领域已知的LAG3抑制剂包括可溶LAG3(在W02009044273 A2中和在Brignon等人,2009.Clin.Cancer Res.15:6225-6231中所公开的IMP321或LAG3-Ig),以及阻断人LAG3的鼠或人源化抗体(例如在W02008132601 A1中公开并且从其衍生的IMP701),或阻断人LAG3的完全人抗体(如在EP 2320940 A2中所公开的)。另一实例提供使用对BTLA的阻断剂,包括但不限于阻断人BTLA与其配体相互作用的抗体(如在W02011014438中公开的4C7)。又一实例提供使用中和B7H4的药剂,包括但不限于对人B7H4的抗体(在W0 2013025779 A1中和在W0 2013067492 A1中公开)或可溶性重组形式的B7H4(如在US20120177645 A1中公开的或抗人B7H4克隆H74:eBiocience#14-5948)。又一实例提供中和B7-H3的试剂,包括但不限于中和人B7-H3的抗体(例如,MGA271在US 20120294796 A1中公开为BRCA84D和衍生物)。又一实例提供靶定TIM3的药剂,包括但不限于靶定人TIM3的抗体(例如,如在W0 2013006490 A2中所公开的,或抗人TIM3,由Jones等人,J Exp Med.2008 Nov 24;205(12):2763-79所公开的阻断抗体F38-2E2)。免疫检查点蛋白的已知抑制剂可以它们已知的形式使用,或可使用类似物,尤其是嵌合形式的抗体,最优选为人源化形式。

[0046] 本发明还包括在本发明的各方面内用于与抗人CD27激动性抗体结合的选自CTLA-4、PD-1或PDL1抑制剂的多于一种免疫检查点抑制剂的选择。例如,ipilimumab(抗CTLA4)与Nivolumab(抗PD1)的并行同步治疗已经证明,临床活性看起来不同于在单一疗法中获得的(Wolchok等人,2013,N.Eng.J.Med.,369:122-33)。还包括的组合已被证实可以改善检查点抑制剂的功效的药剂如Lirilumab(也称为抗KIR、BMS-986015或IPH2102,如在US8119775 B2中和Benson等人,Blood 120:4324-4333(2012)中所公开)与ipilimumab(Rizvi等人,ASCO 2013,和clinicaltrials.gov NCT01750580)结合或与nivolumab(Sanborn等人,ASCO 2013,和clinicaltrials.gov NCT01714739)结合的组合,靶定LAG3的药剂与抗PD-1(Woo等人,2012Cancer Res.72:917-27)或抗PD-L1(Butler NS等人,Nat Immunol.201113:188-95)组合,靶定ICOS的药剂与抗CTLA-4组合(Fu等人,Cancer Res.201171:5445-54),或靶向4-1BB的药剂与抗CTLA-4组合(Curran等人,20116(4):e19499)。

[0047] 在本发明的各种实施方案内设想的抗人CD27激动性抗体与免疫检查点抑制剂的

[0050]

hCD27.15						1													
hCD27.15							1												
hCD27.15								1											
hCD27.15									1										
hCD27.15										1									
hCD27.15											1								
hCD27.15	2			2															
hCD27.15		2		2															
hCD27.15			2	2															
hCD27.15	2				2														
hCD27.15		2			2														
hCD27.15			2		2														
hCD27.15	2					2													
hCD27.15		2				2													
hCD27.15			2			2													
hCD27.15	2						2												
hCD27.15		2					2												
hCD27.15			2				2												
hCD27.15	2							2											
hCD27.15		2						2											
hCD27.15			2					2											
hCD27.15	2								2										
hCD27.15		2							2										
hCD27.15			2						2										
hCD27.15	2									2									
hCD27.15		2								2									
hCD27.15			2							2									
hCD27.15	2										2								
hCD27.15		2									2								
hCD27.15			2								2								
hCD27.15	2											2							
hCD27.15		2										2							
hCD27.15			2									2							
hCD27.15													1						
hCD27.15														1					
hCD27.15															1				
hCD27.15																1			
hCD27.15																	1		
hCD27.15	2																		
hCD27.15		2																	

[0051]

hCD27.15		2																
hCD27.15			2											2				
hCD27.15				2										2				
hCD27.15					2									2				
hCD27.15						2								2				
hCD27.15							2							2				
hCD27.15								2						2				
hCD27.15									2					2				
hCD27.15										2				2				
hCD27.15											2			2				
hCD27.15	2													2				
hCD27.15		2												2				
hCD27.15			2											2				
hCD27.15				2										2				
hCD27.15					2									2				
hCD27.15						2								2				
hCD27.15							2							2				
hCD27.15								2						2				
hCD27.15									2					2				
hCD27.15										2				2				
hCD27.15											2			2				
hCD27.15												2		2				
hCD27.15																		
1F5	1																	
1F5		1																
1F5			1															
1F5				1														
1F5					1													
1F5						1												
1F5							1											
1F5								1										
1F5									1									
1F5										1								
1F5											1							
1F5												1						
1F5	2			2														
1F5		2		2														
1F5			2	2														
1F5	2				2													
1F5		2			2													
1F5			2		2													
1F5	2					2												

[0052]

1F5		2			2													
1F5			2		2													
1F5	2					2												
1F5		2				2												
1F5			2			2												
1F5	2						2											
1F5		2					2											
1F5			2				2											
1F5	2							2										
1F5		2						2										
1F5			2					2										
1F5	2								2									
1F5		2							2									
1F5			2						2									
1F5	2									2								
1F5		2								2								
1F5			2							2								
1F5	2										2							
1F5		2									2							
1F5			2								2							
1F5												1						
1F5												1						
1F5													1					
1F5														1				
1F5															1			
1F5																1		
1F5	2																	
1F5		2																
1F5			2															
1F5				2											2			
1F5					2										2			
1F5						2									2			
1F5							2								2			
1F5								2							2			
1F5									2						2			
1F5										2					2			
1F5											2				2			
1F5	2													2				
1F5		2												2				
1F5			2											2				
1F5				2										2				

[0053]

1F5				2										2					
1F5					2									2					
1F5						2								2					
1F5							2							2					
1F5								2						2					
1F5									2					2					
1F5										2				2					
1F5											2			2					
CD27 激动剂	1																		
CD27 激动剂		1																	
CD27 激动剂			1																
CD27 激动剂				1															
CD27 激动剂					1														
CD27 激动剂						1													
CD27 激动剂							1												
CD27 激动剂								1											
CD27 激动剂									1										
CD27 激动剂										1									
CD27 激动剂											1								
CD27 激动剂												1							
CD27 激动剂													1						
CD27 激动剂	2			2															
CD27 激动剂		2		2															
CD27 激动剂			2	2															
CD27 激动剂	2				2														
CD27 激动剂		2			2														

[0054]

CD27 激动剂		2	2															
CD27 激动剂	2			2														
CD27 激动剂		2		2														
CD27 激动剂		2		2														
CD27 激动剂	2				2													
CD27 激动剂		2			2													
CD27 激动剂		2			2													
CD27 激动剂	2					2												
CD27 激动剂		2				2												
CD27 激动剂		2				2												
CD27 激动剂	2						2											
CD27 激动剂		2					2											
CD27 激动剂		2					2											
CD27 激动剂	2							2										
CD27 激动剂		2						2										
CD27 激动剂		2						2										
CD27 激动剂	2								2									
CD27 激动剂		2							2									
CD27 激动剂		2							2									
CD27 激动剂	2									2								
CD27 激动剂		2								2								

[0055]

CD27 激动剂		2								2							
CD27 激动剂												1					
CD27 激动剂												1					
CD27 激动剂													1				
CD27 激动剂														1			
CD27 激动剂															1		
CD27 激动剂																1	
CD27 激动剂																	
CD27 激动剂	2																
CD27 激动剂		2															
CD27 激动剂			2														
CD27 激动剂				2									2				
CD27 激动剂					2								2				
CD27 激动剂						2							2				
CD27 激动剂							2						2				
CD27 激动剂								2					2				
CD27 激动剂									2				2				
CD27 激动剂										2			2				
CD27 激动剂											2		2				
CD27 激动剂	2											2					

[0056]

CD27 激动剂	2												2						
CD27 激动剂		2											2						
CD27 激动剂			2										2						
CD27 激动剂				2									2						
CD27 激动剂					2								2						
CD27 激动剂						2							2						
CD27 激动剂							2						2						
CD27 激动剂								2					2						
CD27 激动剂									2				2						
CD27 激动剂										2			2						
CD27 激动剂											2		2						
CD27 激动剂												2	2						

[0057] 在本发明的上述呈现抗人CD27抗体与免疫检查点抑制剂的组合的表中,指示(N)的数字是指与抗人CD27激动性抗体结合的免疫检查点抑制剂的数量(N=1或N=2)。当一个数字给出包括在数字的位置所在的列中被列出的免疫检查点抑制剂的组合。

[0058] 目前已知的大部分免疫检查点蛋白抑制剂是抗体。鉴于抗体技术的进步,使用抗体作为免疫检查点蛋白抑制剂在本发明中是优选的。然而,在另选实施方案中也设想使用基于其他技术的另选的免疫检查点抑制剂。

[0059] 本领域技术人员将会知道,其它技术可用于开发干扰蛋白(如免疫检查点蛋白)的功能的结合化合物,因此作为抑制剂。例如,如本领域技术人员将理解的是,在非免疫球蛋白蛋白支架上改造的结合肽的文库可以用于选择抑制免疫检查点蛋白的结合肽。此类蛋白支架的例子包括但不限于Adnectin、Affibodie、Anticalin和DARPin(Gebauer和Skerra, Current opinion Chem.Biol.,2009,13:245-255以及Caravella和Lugovskoy,Current opinion Chem.Biol.,2010,14:520-528)。选择方法例如包括噬菌体展示,以识别表达结合免疫检查点蛋白的肽的蛋白支架。此外,包含潜在表现出免疫检查点蛋白抑制功能的组合肽文库可以筛选合适的免疫检查点蛋白抑制剂。从此文库中,例如,可使用在珠上表达一组广泛的肽的一珠一肽化合物组合文库,其中一个珠子结合一个肽。在筛选程序之后,回收珠子并且识别该肽(Lam等人,Methods,1996,9:482-93;Xiao等人,Comb.Chem.High Throughput Screen,201316:441-8)。例如使用质谱方法。

[0060] 在本发明中,术语“抗体”以最广泛的意义使用,具体包括但不限于单克隆抗体(包

括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和其结合片段。

[0061] “抗体片段”和“抗体结合片段”意思是抗体的抗原结合片段,通常包括亲本抗体的至少一部分的抗原结合或可变区(例如,一个或多个CDR)。抗体片段保留至少一些亲本抗体的结合特异性。通常,当活性在摩尔基础上表达时,抗体片段保留至少10%的亲本结合活性。优选地,亲本抗体保留至少20%、50%、70%、80%、90%、95%或100%或更多的亲本抗体对靶标的亲和力。因此,技术人员清楚的是,在许多申请中“抗体片段”可替代抗体,并且当此类替代适合时,术语“抗体”应被理解为包括“抗体片段”。抗体片段的例子包括但不限于:Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双特异抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,sc-Fv、unibodies或duobodies(来自Genmab的技术));纳米抗体(来自Ablynx的技术);结构域抗体(来自Domantis的技术);和由抗体片段形成的多特异性抗体。工程抗体变体在Holliger和Hudson,2005,Nat.Biotechnol.23:1126-1136中综述。

[0062] “Fab片段”由一条轻链和一条重链的CH1和可变区组成。Fab分子的重链不能与另一重链分子形成二硫键。

[0063] “Fc”区包含两个重链片段,其包含抗体的CH1和CH2结构域。这两个重链片段通过两个或多个二硫键以及通过CH3结构域的疏水相互作用结合在一起。

[0064] “Fab”片段包含一条轻链和一条重链的一部分,所述重链包含V_H结构域CH1结构域以及在CH1和CH2结构域之间的区域,使得可在两个Fab'片段的两个轻链之间形成链间二硫键以形成F(ab')₂分子。

[0065] “F(ab')₂片段”包含两条轻链和含有在CH1和CH2结构域之间的恒定区的一部分的两条重链,使得在两条重链之间形成链间二硫键。F(ab')₂片段从而由通过两条重链之间的二硫键结合在一起的两个Fab'片段组成。

[0066] “Fv片段”包含来自重链和轻链两者的可变区,但缺乏恒定区。

[0067] “单链Fv抗体”(或“scFv抗体”)是指包含抗体的V_H和V_L结构域的抗体片段,其中这些结构域出现在单多肽链中。通常,Fv多肽还包含在V_H和V_L结构域之间的多肽接头,其能够使scFv形成能与抗原结合的期望结构。对于scFv的综述,参见Pluckthun,1994,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg和Moore eds.Springer-Verlag,New York,pp.269-315。还参见国际专利申请公开号W088/01649和美国专利号4,946,778和5,260,203。

[0068] “双特异抗体”是具有两个抗原结合位点的小抗体片段。该片段包含在同一多肽链(V_H-V_L或V_L-V_H)中与轻链可变区(V_L)连接的重链可变区(V_H)。通过使用接头,其太短而不能使两个结构域之间在相同链上配对,该结构域迫使与另一条链的互补结构域配对,并创建两个抗原结合位点。双特异抗体在例如EP 404,097;W0 93/11161;和Holliger等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448中被更充分地描述。

[0069] “结构域抗体片段”是仅包含重链可变区或轻链可变区的免疫功能性免疫球蛋白片段。在某些情况下,两个或多个V_H区与肽接头共价结合以建立二价结构域抗体片段。二价结构域抗体片段的两个V_H区可靶定相同的或不同的抗原。

[0070] 本发明的抗体片段可包含足够部分的恒定区,以允许具有减少二硫键能力的重链二聚化(或多聚),例如其中用本领域技术人员可获得的已知方法改变通常参与重链间二硫键的铰链半胱氨酸中的至少一个。在另一个实施方案中,抗体片段(例如包含Fc区的抗体)

当存在于完整抗体中时保留通常与Fc区相关的生物学功能中的至少一个,如FcRn结合、抗体半衰期调控、ADCC(抗体依赖性细胞毒性)功能,和/或补体结合(例如,其中抗体具有对ADCC功能或补体结合所需的糖基化)。

[0071] 该抗体针对人CD27,并因此包含与人CD27结合和/或相互作用的结合结构域。该抗体可在来自适合用于引发对人抗原的抗体的非人物种的动物中升高。或者,所述抗体可从使用在McCafferty等人,1990,自然,348:552-554.Clarkson等人,1990,Nature,348:552-554;Clarkson等人,1991,Nature,352:624-628和Marks等人,1991,J.Mol.Biol.222:581-597中描述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离。本领域技术人员将能够选择合适的非人物种用于引发对人抗原的抗体。例如,可以从非人类哺乳动物,如包括鼠(大鼠或小鼠)或仓鼠物种的啮齿动物,或者另选的骆驼科动物中做出选择。

[0072] 在非人物种中升高的抗体优选与本领域中已知的方法和技术嵌合以形成“嵌合抗体”。术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分与在衍生自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中对应的序列相同或同源,而一条或多条链的其余部分与在衍生自另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中对应的序列以及此类抗体的片段相同或同源,这样它们展现出期望的生物学活性(参见例如,美国专利号4,816,567和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855)。在本发明中,“嵌合抗体”优选为“人源化抗体”。

[0073] 如本文所用术语“人源化抗体”是指包含来自非人(例如鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。此类抗体包含衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。通常,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个、通常两个可变域,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,并且全部或基本上全部的FR区为人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选还将包含通常为人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分。啮齿动物抗体的人源化形式基本上会包含亲本啮齿动物抗体的相同CDR序列,尽管可包括某些氨基酸取代以增加亲和力,增加人源化抗体的稳定性或为了其他原因。然而,如CDR环的交换不均匀地导致具有与源抗体相同的结合特性的抗体,框架残基群(FR)、参与CDR环支持的残基的改变也可能被引入到人源化抗体中,以保留抗原结合亲和力(Kabat等人,1991,J.Immunol.147:1709)。

[0074] 术语“抗体”还包含“完全人”抗体,即仅包含人免疫球蛋白序列的抗体。完全人抗体如果在非人类细胞(例如小鼠或仓鼠),或在衍生自鼠细胞的杂种细胞中产生,可包含非人类如鼠(大鼠或小鼠)的糖链。类似地,“小鼠抗体”或“大鼠抗体”是指分别仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白序列的抗体。

[0075] 完全人抗体可通过噬菌体展示或其他分子生物学方法,在人类、在具有人免疫球蛋白种系序列的非人类动物中产生。另外,在转基因鼠中也可形成重组免疫球蛋白。参见Mendez等人,1997,Nature Genetics 15:146-156。还可参见Abgenix、Medarex、MeMo和Kymab的技术。

[0076] 本发明的抗体好包括具有修饰(或阻断的)Fc区以提供改变的效应子功能的抗体。参见例如,美国专利号5,624,821;W02003/086310;W02005/120571;W02006/0057702;Presta,2006,Adv.Drug Delivery Rev.58:640-656;Vincent和Zurini,Biotechnol.J.,2012,7:1444-50;Kaneko和Niwa,Biodrugs,2011,25:1-11。此类修饰可用于增强或抑制免

疫系统的各种反应,在诊断和治疗中具有可能有益的效果。Fc区的变化包括氨基酸变化(取代、缺失和插入)、糖基化或去糖基化,以及增加多个Fc。优选地,使用显示降低的Fc效应子功能的Fc区。本发明的抗体还包括具有含Fc区的人IgG4的抗体。和/或使用携带N297Q糖基化缺失突变体的Fc区。

[0077] Fc的变化也可改变在治疗性抗体中的抗体的半衰期,并且较长的半衰期将导致更少频率的给药,具有增加的方便性和降低的材料使用。参见Presta,2005,J.Allergy Clin.Immunol.116:731 at 734-35。

[0078] 本发明的抗体,虽然次优选,但是还包括具有提供充分的效应子功能的完整Fc区的抗体,例如同种型IgG1的抗体,其在与对于抗体的靶标相关的细胞中诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0079] 在体内存储或增加抗体半衰期期间,该抗体也可与提高抗体稳定性的分子缀合(例如,共价连接)。增加半衰期的分子的例子是白蛋白(例如,人血清白蛋白)和聚乙二醇(PEG)。抗体的白蛋白联和聚乙二醇化衍生物可以使用本领域中公知的技术制备。参见例如,Chapman,2002,Adv.Drug Deliv.Rev.54:531-545;Anderson和Tomasi,1988,J.Immunol.Methods 109:37-42;Suzuki等人,1984,Biochim.Biophys.Acta788:248-255;以及Brekke和Sandlie,2003,Nature Rev.2:52-62。

[0080] 如本文所用术语“约”是指由本领域的普通技术人员来确定的对于特定值在可接受误差范围内的值,这将部分地取决于如何测量或确定该值,即测量系统的局限性。例如,“约”可意为在本领域中每次实践在1或大于1个标准差内。或者,“约”或“基本上由……组成”可以指多至20%的范围。此外,特别是对于生物系统或过程,术语可意味着多至数量级或多至5倍的值。当在专利申请和权利要求书中提供了特定值时,除非另有说明,“约”或“基本上由……组成”的意思应该被认为是对于该特定值的可接受误差范围内。

[0081] 抗体可选自任何类型的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE。优选地,抗体是IgG抗体。可以使用IgG的任何同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。也可以考虑IgG同种型的变体。人源化抗体可以包含来自多于一个类型或同种型的序列。在实例中所描述的生物测定中通过筛选抗体容易实现必要的恒定区序列的优化,以产生所希望的生物学活性。

[0082] 同样,在本文的组合物和方法中可以使用任一类型的轻链。具体而言, κ 、 λ 或其变体在本发明的组合物和方法中是有用的。

[0083] 如本文所用的术语“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群中获得的抗体,即包含该群的各个抗体,除可少量存在的可能的自然发生的突变之外,是相同的。单克隆抗体针对单一抗原位点是高度特异性的。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制备相比,每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”表明从抗体的基本上同质群获得的抗体的特征,而不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以首先由Kohler等人,1975,Nature 256:495所描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组DNA方法(参见例如,美国专利号4,816,567)来制备。“单克隆抗体”也可使用例如在Clackson等人,1991,Nature 352:624-628和Marks等人,1991,J.Mol.Biol.222:581-597中所描述的技术从噬菌体抗体文库中分离。本文的单克隆抗体尤其包括“嵌合”抗体。

[0084] 单克隆抗体可以根据本领域的用人抗原注射测试对象,然后生成表达具有所需序

列或功能特性的抗体的杂交瘤的知识和技能来制备。使用常规方法(例如,通过使用寡核苷酸探针,其能够特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链的基因)很容易地对DNA编码的单克隆抗体进行分离和测序。杂交瘤细胞充当此类DNA的优选来源。

[0085] 对于治疗应用,抗体可以直接使用,或作为治疗缀合物。如本文所使用的治疗“缀合物”是指缀合至治疗性部分(如细菌毒素、细胞毒性药物或放射性毒素)的抗体或其片段。毒性部分可以使用本领域中可用的方法缀合到本发明的抗体上。

[0086] 根据本发明存在抗人CD27激动性抗体与免疫检查点抑制剂的组合的令人惊讶的免疫刺激效应的事实,在其各种实施方案中,本发明适用于已知或预期由免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激而改善的病症的治疗中。在本发明中,术语抗原特异性T淋巴细胞尤其包括CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。

[0087] 免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激,可由CD27+免疫细胞的刺激或由免疫检查点蛋白(如CTLA-4、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3和KIR)的抑制来实现。因此,根据某些实施方案,本发明适用于已知或预期由CD27+免疫细胞的刺激而改善的病症的治疗。根据某些可选实施方案,本发明适用于已知或预期由免疫检查点蛋白(如CTLA-4、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3或KIR)的抑制而改善的病症的治疗。

[0088] 在上下文中免疫应答的刺激,术语刺激的意思是本领域技术人员已知的。将清楚的是,该术语包括增强,并且因此涉及现有的免疫应答的增强和免疫应答的诱导或重新产生。

[0089] 本领域技术人员将会知道哪些细胞与CD27、CTLA-4、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3和KIR相关联。尤其已知CD27阳性细胞可以在或可以不在其细胞表面CTLA-4、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3和KIR上表达(反之亦然)。因此,本发明可治疗的病症当然不局限于涉及表达CD27和免疫检查点蛋白(如CTLA-4、PD-1或PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3或KIR)两者的细胞的病症。

[0090] 本发明的各个方面旨在“由免疫应答的刺激,尤其是由抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗”。“由免疫应答的刺激,尤其是由抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗”可以另选地被定义为“其中免疫应答的刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激是有益的治疗”。在治疗中的术语“改善”和“有益”是指临床意义充分改善,如可以由医师预测和/或确定。

[0091] 本发明中,“病症”的治疗包括任何治疗用途,包括抗人CD27激动性抗体和多个免疫检查点抑制剂的预防性和治疗性用途。因此,术语“病症”可以指疾病状态,也指在预防性情况中的生理状态,在预防性情况中生理机能不被改变到有害状态。在预防性使用抗人CD27激动性抗体和多个免疫检查点抑制剂的情况中的病症包括,例如,接种后的免疫(诱导和/或产生针对抗原的免疫记忆的生理过程)。在本发明的范围内,治疗因此可旨在支持预防性诱导的生理过程。

[0092] 由免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症包括感染性疾病,如细菌、真菌、病毒和寄生虫感染性疾病。除接种后免疫之外,也可以由免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激而改善。疫苗接种可以针对病原体,如选自细菌、真菌、病毒或寄生虫的病原体,或针对毒素或自身抗原,所述自身抗原包括在良性或诸如癌症的恶性肿瘤上

表达的抗原。另外,与细胞的不受控制增殖有关的病症如癌症可由免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激而改善。这些病症可以通过CD27⁺免疫细胞的刺激和/或通过免疫检查点蛋白(如CTLA-4、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3或KIR)的抑制而改善。

[0093] 本发明范围内的癌症包括但不限于:白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、成髓细胞早幼粒细胞、骨髓单核细胞性白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性(粒细胞)白血病、慢性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和边缘区B细胞淋巴瘤、真性红细胞增多症淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金病、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、实体瘤、肉瘤和癌、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌肉瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑(脊)膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、鼻咽癌、食管癌、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统(CNS)癌、子宫颈癌、绒毛膜癌、结肠直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌、子宫内膜癌、食管癌、眼癌、头颈癌、胃癌、上皮内瘤变、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌(小细胞,大细胞)、黑色素瘤、神经母细胞瘤;口腔癌(例如唇、舌、口和咽)、卵巢癌、胰腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌;呼吸系统癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌和泌尿系统癌。

[0094] 次优选的癌症包括CD27表达的肿瘤,如选自慢性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和边缘区B细胞淋巴瘤的那些。

[0095] 引发由免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激而改善的感染的病原病毒的一些例子包括HIV、肝炎(甲、乙、丙、丁或戊)、疱疹病毒(例如VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II和CMV、EB病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、JC病毒和虫媒病毒性脑炎病毒。

[0096] 引起由免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激而改善的感染的病原菌的一些例子包括衣原体、立克次体细菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和conococci、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白菌、沙门氏菌、杆菌、霍乱菌、破伤风菌、肉毒菌、炭疽菌、鼠疫菌、钩端螺旋体菌、和莱姆病菌。

[0097] 引起由免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激而改善的感染的病原真菌的一些例子包括念珠菌(白色念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌等)、新型隐球菌、曲霉菌(烟曲霉、黑曲霉等)、毛霉目属(毛霉、犁头霉、如根霉)、申克氏胞丝菌、皮炎芽生菌、巴西芽生菌、粗球孢子菌和组织胞浆菌。

[0098] 引起由免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激而改善的感染的致病寄生虫的一些例子包括痢疾变形虫、结肠小袋纤毛虫、福氏纳格里阿米巴原虫、棘阿米巴虫、肠

兰伯式鞭毛虫、隐孢子虫、卡式肺孢子虫、间日疟原虫、田鼠巴贝虫、布氏锥虫、克氏锥虫、杜氏利什曼原虫、刚地弓形虫和巴西日圆线虫。

[0099] 如果由免疫刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症对抗原免疫,那么抗人CD27激动性抗体和多个免疫检查点抑制剂通常与疫苗结合施用。该疫苗可包括对病原体(如选自细菌、真菌、病毒或寄生虫或毒素或自身抗原的病原体)特异的多个抗原或抗原决定簇,所述自身抗原包括在良性或诸如癌症的恶性肿瘤上表达的抗原。针对疫苗接种的病原体和癌症可以选择如上所述的。

[0100] 根据某些实施方案,疫苗接种针对HIV、肝炎(甲、乙、丙、丁、戊)、流感、疱疹、贾第虫、疟疾、利什曼原虫、金黄色葡萄球菌或绿脓杆菌,优选为HIV。对于这些病原体,目前还没有有效的疫苗,或现有的疫苗不是完全有效的。

[0101] 本发明的发明人已经发现当结合抗人CD27激动性抗体和多个免疫检查点蛋白抑制剂(尤其是CTLA4或PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3或KIR的抑制剂)时的意外的免疫刺激效应。测试表明组合的协同和/或增强效应。因此,根据某些实施方案,抗人CD27激动性抗体与多个免疫检查点抑制剂一起用于免疫反应的协同和/或增强刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的协同和/或增强刺激。

[0102] 本发明的抗人CD27激动性抗体优选呈现在包含抗体的组合物中。该组合物包含抗体或与载体一起的抗体。根据某些实施方案的组合物优选为药物组合物。

[0103] 为了制备药物组合物或无菌组合物,将所述抗体(抗体或其片段)与药学上可接受的载体和/或赋形剂混合,例如参见Remington的药物科学和美国药典:1984年巴拿马马里兰州的Mack出版公司的国家处方集(Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S.Pharmacopeia:National Formulary,Mack Publishing Company,Easton,PA(1984))。治疗和诊断剂的制剂可以通过与生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂以例如冻干粉末、浆液、水溶液或悬浮液的形式混合来制备(参见例如,Hardman等人,2001,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,McGraw-Hill,New York,NY;Gennaro,,2000,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott,Williams,and Wilkins,New York,NY;Avis等人(作者),1993,Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications,Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(作者),1990,Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets,Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(作者),1990,Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems,Marcel Dekker,NY;Weiner和Kotkoskie,2000,Excipient Toxicity and Safety,Marcel Dekker,Inc.,New York,NY)。

[0104] 结合化合物尤其是抗体、单独施用或与另一种药剂(如平常的抗癌药物)组合施用的组合物的毒性和治疗功效可以通过在细胞培养或实验动物中例如用于确定LD₅₀(致死群体的50%的剂量)和ED₅₀(在50%的群体中治疗上有效的剂量)的标准药学方法来确定。毒性和治疗功效之间的剂量比为治疗指数,并且它可以表示为LD₅₀与ED₅₀之间的比率。从这些细胞培养试验和动物研究中获得的数据可用于配制用于人类的剂量范围。此类化合物的剂量优选处于包括具有很少或无毒性的ED₅₀的循环浓度范围内。剂量可以在此范围内根据所使用的剂型和使用的给药途径而变化。

[0105] 合适的给药途径包括肠胃外给药,如肌内、静脉内或皮下给药和口服给药。在该药物组合物中使用的或实施本发明的方法的抗体施用可以以各种常规方法进行,例如口服

法,吸入法,局部施用或皮肤、皮下、腹膜内、肠胃外、动脉内或静脉内注射。在一个实施方案中,本发明的结合化合物是静脉内给药。在另一个实施方案中,本发明的结合化合物是皮下给药。

[0106] 或者,可以以局部而非全身方式经由抗体注射或抗体直接进入作用部位施用例如抗体,通常以药效持久的或缓释制剂。此外,可以在靶向药物递送系统中施用抗体。

[0107] 可获得在选择合适剂量的抗体、细胞因子和小分子方面的指导(参见例如, Wawrzynczak,1996, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub.Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina(作者.),1991, *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach(作者),1993, *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert等人,2003, *New Engl.J.Med.*348:601-608; Milgrom等人,1999, *New Engl.J.Med.*341:1966-1973; Slamon等人,2001, *New Engl.J.Med.*344:783-792; Beniaminovitz等人,2000, *New Engl.J.Med.*342:613-619; Ghosh等人,2003, *New Engl.J.Med.*348:24-32; Lipsky等人,2000, *New Engl.J.Med.*343:1594-1602)。

[0108] 适当剂量的确定是由临床医生进行,例如使用本领域已知或疑似影响治疗或预测影响治疗的参数或因素。通常,所述剂量以稍低于最佳剂量的量开始,并且此后它以小增量增加直到相对于任何负面副作用达到期望或最佳效果。重要的诊断方法包括例如炎症或产生的炎性细胞因子水平的症状的那些。

[0109] 优选的剂量方案是涉及避免显著不良反应的最大剂量或给药频率的方案。周总剂量一般为至少0.05 μ g/kg体重,更一般为至少0.2 μ g/kg,最一般为至少0.5 μ g/kg,通常为至少1 μ g/kg,更通常为至少10 μ g/kg,最通常为至少100 μ g/kg,优选为至少0.2mg/kg,更优选为至少1.0mg/kg,最优选为至少2.0mg/kg,最佳为至少10mg/kg,更最佳为至少25mg/kg,并且最最佳为至少50mg/kg(参见例如, Yang等人,2003, *New Engl.J.Med.*349:427-434; Herold等人,2002, *New Engl.J.Med.*346:1692-1698; Liu等人,1999, *J.Neurol.Neurosurg.Psych.*67:451-456; Portielji等人,2003, *Cancer Immunol.Immunother.*52:133-144)。所需剂量的小分子治疗剂(例如肽模拟物、天然产物或有机化学物质)大致与对于抗体或多肽在摩尔/kg的基础上是相同的。

[0110] “给药”、“疗法”和“治疗”,当它适用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源药物、治疗剂、诊断剂或对动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的组合物的接触。“给药”、“疗法”和“治疗”可以指例如治疗、药物动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的治疗包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中流体与细胞接触。“给药”、“疗法”和“治疗”还指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一细胞的例如细胞的体外和离体治疗方法。

[0111] 如本文所用的“抑制(inhibit)”或“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”包括与疾病相关的症状发展的推迟和/或将或预期与所述疾病发展的此类症状严重性的降低。术语还包括改善现有症状、预防额外的症状、改善或预防这些症状的潜在原因。因此,所述术语表示对患有疾病的脊椎动物受试者已赋予有益效果。

[0112] 如本文所用术语“治疗有效量”或“有效量”是指抗体的量,或当单独施用或与其它治疗剂结合施用到细胞、组织或受试者的抗体时,对防止或改善待治疗的疾病或病症有效

的抗体量。治疗有效剂量还指足以导致症状改善(例如相关医学病症的治疗、治愈、预防或改善)或增加此类病症的治疗、治愈、预防或改善的比率的化合物的量。当施加单独施用的个体活性成分时,治疗有效剂量是指该单独的成分。当施加组合时,无论连续还是同时组合给药,治疗有效剂量是指导致治疗效果的活性成分的组合物。治疗有效剂量将通常以至少10%;通常至少20%;优选至少约30%;更优选至少40%;最优选至少50%降低症状。

[0113] 用于共施用或用第二种治疗剂治疗的方法是本领域公知的技术,参见例如Hardman等人(作者),2001,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,10th ed.,McGraw-Hill,New York,NY;Poole和Peterson(作者),2001,Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA;Chabner和Longo(作者),2001,Cancer Chemotherapy and Biotherapy,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA。

[0114] 在本发明中,术语‘共施用’应被理解为意指多个的单个活性成分(本文为抗人CD27激动性抗体和多个免疫检查点抑制剂)被施用在相同的受试者中。鉴于大多数抗体治疗剂(包括靶向免疫检查点抑制剂和CD27的那些)在人受试者中显示2-4的终末周半衰期的事实,这种给药可为同时或替代地,活性成分可在多至3个月的时间内施用。因此,对这种抗体的药效反应可在给药后几个月被检测。

[0115] 本发明的药物组合物还可以包含其它药剂,包括但不限于细胞毒性剂,化学治疗剂,细胞生长抑制剂,抗血管生成剂或抗代谢剂,肿瘤靶向剂,免疫刺激或免疫调节剂或偶联至细胞毒性剂、细胞抑制剂、或以其它毒剂的抗体。该药物组合物也可以采用与其它治疗方式,如手术、化疗和放射。

[0116] 根据一个优选的实施方案,提供抗人CD27激动性抗体,在包含抗人CD27激动性抗体的药物组合物连同药学上可接受的载体中,所述药物组合物被包装在容器中,并且所述容器与信息载体相关联,其中所述信息载体包括指示所述抗人CD27激动性抗体优选在药物组合物中连同用于由免疫应答的刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗的免疫检查点抑制剂的结合使用的信息。所述容器可以是适合于保持药物组合物,优选无菌药物组合物,更优选可注射药物组合物的任何容器。根据一个优选实施方案,所述容器包含单位剂量的抗人CD27激动性抗体。

[0117] 所述信息载体可以是任何合适的信息载体,例如具有适合于携带信息的表面的对象,例如纸或纸板。另选地,可使用包含机器可读信息的数据载体。所述信息可以以视觉形式(例如以书面信息的形式或以多张图片的形式)呈现。另选地,信息可以以通过触摸“可读”的形式(如以盲文的形式)呈现。在信息在包含机器可读信息的数据载体上的情况下,所述信息可被存储为机器代码或类似的信号,其可以被转换为视觉和/或音频信息。

[0118] 包括药物组合物的信息载体和容器是相关联的,使得它们可以在单个产品中被呈现在一起。例如,它们可以通过被封闭在外壳(诸如容器,包括盒子)中而结合在一起。

[0119] 本发明的另一方面涉及在由免疫应答的刺激改善的病状治疗中,尤其是得益于抗原特异性T淋巴细胞的刺激的病症的治疗中使用的免疫检查点抑制剂,其中在所述治疗中施用抗人CD27激动性抗体。这种免疫检查点抑制剂与抗人CD27激动性抗体一起形成导致意外免疫刺激的治疗结合。根据某些实施方案,免疫检查点抑制剂与抗人CD27激动性抗体一起用于免疫反应的协同和/或增强刺激,尤其是抗原特异性T淋巴细胞的协同和/或增强刺

激。本发明的免疫检验点抑制剂的各種技术特征和优选实施方案的细节是类似于已经关于本发明的抗人CD27激动性抗体讨论的。

[0120] 类似于抗人CD27激动性抗体,可以提供本发明的免疫检验点抑制剂,在包含免疫检验点抑制剂的药物组合物连同药学上可接受的载体中,所述药物组合物被包装在容器中,并且所述容器与信息载体相关联,其中所述信息载体包括指示所述免疫检验点抑制剂优选在药物组合物中连同用于由免疫应答的刺激,尤其是得益于抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症的治疗的抗人CD27激动性抗体的结合使用的信息。所述容器可以是适合于保持药物组合物,优选无菌药物组合物,更优选可注射药物组合物的任何容器。根据一个优选实施方案,所述容器包含单位剂量的抗人CD27激动性抗体。另外,对于本发明的这个实施方案,各种技术特征和优选实施方案的细节将从关于抗人CD27激动性抗体的说明部分中明确。

[0121] 然而,本发明的另一个方面涉及在由免疫应答的刺激改善的病状治疗中,尤其是得益于抗原特异性T淋巴细胞的刺激的病症的治疗中使用的抗人CD27激动性抗体与多个免疫检查点抑制剂的组合。根据本发明的这种组合是主要的功能性组合,并且被认为适于本领域技术人员做出这种功能组合的任何物理组合被认为在本发明的范围内。例如,在所述组合中,抗人CD27激动性抗体可以与多个免疫检查点抑制剂共施用于受试者。另选地,该组合可为部分的试剂盒,包含:

[0122] (i)保持第一药物组合物的第一容器,所述第一药物组合物包含抗人CD27激动性抗体连同药学上可接受的载体;

[0123] (ii)保持第二药物组合物的第二容器,所述第二药物组合物包含免疫检查点抑制剂连同药学上可接受的载体;

[0124] (iii)任选的信息载体,其包括表示抗人CD27激动性抗体优选在第一种药物组合物中与免疫检查点抑制剂的结合使用,优选在第二药物组合物中用于免疫应答的刺激改善的病症的治疗中,尤其是得益于抗原特异性T淋巴细胞的刺激或增强的病症中的信息。

[0125] 根据一个另选的实施方案,第一和第二容器和第一和第二药物组合物同时由此呈现部分的试剂盒,包含:

[0126] (A)保持药物组合物的容器,所述药物组合物包含抗人CD27激动性抗体和免疫检查点抑制剂连同药学上可接受的载体;

[0127] (B)任选的信息载体,其包括表示抗人CD27激动性抗体优选在种药物组合物中与免疫检查点抑制剂的结合使用,优选在药物组合物中用于免疫应答的刺激改善的病症的治疗中,尤其是得益于抗原特异性T淋巴细胞的刺激的病症中的信息。

[0128] 另外,对于本发明的组合,各种技术特征和优选实施方案的细节类似于已经关于抗人CD27激动性抗体的说明部分中所讨论的。

[0129] 本发明的另一个方面涉及一种用于治疗由免疫应答的刺激改善的病症,尤其是导致抗原特异性T淋巴细胞的刺激的病症治疗的方法,所述方法包括施用CD27激动剂,优选为抗人CD27激动性抗体,与多个免疫检查点抑制剂的组合。

[0130] 同样,对于本发明的治疗方法,各种技术特征和优选实施方案的细节类似于上面关于抗人CD27激动性抗体中所讨论的。

[0131] 现在将进一步参照以下非限制性实施例说明本发明及其效果。

[0132] 实施利

[0133] 实施例1

[0134] CD27激动结合检查点蛋白阻断导致意想不到的免疫刺激

[0135] 为了研究CD27激动剂与PD-1或PD-L1阻断抗体结合的效果,将人外周血单核细胞(PBMNC)从血沉棕黄层分离。首先,将血沉棕黄层在RT下用补充有肝素溶液(Leo Pharma, DB6132, 5000U/ml)的DMEM/F12培养基(Gibco, 11320)稀释至300ml的总体积。在混合细胞悬浮液之后,在锥形管中将等分装载在Ficoll-Paque Plus梯度上且在20℃下不间断地以450g离心30分钟。接下来,通过抽吸除去等离子体,并且将PBMC从plasma/Ficoll界面上恢复。用DMEM/F12培养基将PBMC洗涤两次,并在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中重悬(Gibco, 52400)。将PBMC在96孔平底板中以 2×10^5 细胞/孔铺板(Nunc)。将抗体(抗PD1(hPD1.09A的hIgG4嵌合体,参见下文WO/2008/156712)、抗hCD27(hCD27.15的hIgG4嵌合体)对于嵌合参见下文)、抗PDL1(MIH1, eBioscience 16.5983.82)、人IgG4同种型对照(Sigma, 14639)和小鼠IgG1同种型对照(eBioscience, 16.4714.85))和其稀释物在PBS中稀释,并添加到PBMC中。hPD1.09A和hCD27.15的人IgG4嵌合形式分别由人IgG4上游的VH和VL基因的和人 κ 恒定区编码的cDNA的克隆来构建。将全cDNA在pcDNA3.1(Invitrogen)中亚克隆,并使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)按照制造商的说明在293T/17细胞(ATCC)中瞬时转染。5-7天后,收获上清,并且使用标准蛋白A纯化法纯化抗体。最后,将在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中稀释的葡萄球菌肠毒素B(Sigma S4881)以25ng/ml的终浓度添加到孔中。将细胞在37℃、5%CO₂和95%湿度下孵育两天。为了评估免疫活化的水平,根据在Dulos等人, J. Immunother, 2012, 35:169-78中描述的方法确定IL-2的分泌水平。为了达到那个目的,将上清液吸出,并通过离心分离从任何细胞的物质中清除。接下来,在PBS中将上清液添加到已涂有2 μ g/ml抗hIL-2抗体(BD Pharmingen, 555051)的Nunc maxisorp ELISA板中4℃温育过夜。加入上清液之前,将孔倒空并用200 μ l/孔PBS/1%BSA在室温(RT)下封闭一小时。将上清液于室温下孵育1小时,用PBST(含0.01%吐温20的PBS)洗涤三次。随后,将100 μ l的0.5 μ g/ml抗hIL2生物素(BD Pharmingen 555040)加入PBS/PBS-1%BSA(1:1)中,并在RT下温育1小时。在用PBST洗涤三次之后,将1:5000倍稀释的链霉亲和素-HRP(BD Pharmingen公司, 554066)加入100 μ l的PBS/PBS-1%BSA(1:1)中。经用PBST洗涤三次和用水洗涤一次之后,通过加入100 μ l/孔TMB稳定色原(Invitrogen, SB02)检测IL-2。用100 μ l的0.5M H₂SO₄停止反应,并且在450nm和620nm处读取吸光度。在这个试验中,重组人IL-2(Sigma, H7041)用于定量在上清液中的IL-2蛋白水平。在图1A中示出CD27激动性抗体和PD-1阻断抗体之间的协同动作,且在图1B中示出CD27激动性抗体和PD-L1阻断抗体之间的协同动作。

[0136] 为了研究CD27激动剂与PD-1或PD-L1阻断抗体结合在人全血中的效果,将血液在补充有10%胎牛血清(Hyclone)的RPMI 1640培养基(Gibco, 52400)中稀释10倍。将稀释的血液在96孔Nunc增量表面平底板中铺板(100 μ l/孔)。将抗体(抗hCD27(hCD27.15的hIgG4嵌合体,参见上文)、抗PD-1(hPD1.09A的hIgG4嵌合体,参见上文)、抗PDL1(MIH1, eBioscience 16.5983.82)、人IgG4同种型对照(Sigma, 14639)和小鼠IgG1同种型对照(eBioscience, 16.4714.85))和其稀释物在PBS中稀释,并添加到稀释的血液中。最后,将在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中稀释的葡萄球菌肠毒素B(Sigma S4881)以

25ng/ml的终浓度添加到孔中。将细胞在37℃、5%CO₂和95%湿度下孵育两天。为了评估免疫活化的水平,在上清液中确定IL-2的分泌水平。为了达到那个目的,将上清液吸出,并通过离心分离从任何细胞的物质中清除。接下来,在PBS中将上清液添加到已涂有2μg/ml抗hIL-2抗体(BD Pharmingen, 555051)的Nunc maxisorp ELISA板中4℃温育过夜。加入上清液之前,将孔倒空并用200μl/孔PBS/1%BSA在室温(RT)下封闭一小时。将上清液于室温下孵育1小时,用PBST(含0.01%吐温20的PBS)洗涤三次。随后,将100μl的0.5μg/ml抗hIL2生物素(BD Pharmingen 555040)加入PBS/PBS-1%BSA(1:1)中,并在RT下温育1小时。在用PBST洗涤三次之后,将1:5000倍稀释的链霉亲和素-HRP(BD Pharmingen公司, 554066)加入100μl的PBS/PBS-1%BSA(1:1)中。经用PBST洗涤三次和用水洗涤一次之后,通过加入100μl/孔TMB稳定色原(Invitrogen, SB02)检测IL-2。用100μl的0.5M H₂SO₄停止反应,并且在450nm和620nm处读取吸光度。在这个试验中,重组人IL-2(Sigma, H7041)用于定量在上清液中的IL-2蛋白水平。同样,在这个实验中,与单独的抗体相比,通过CD27激动性抗体与PD-1或PDL-1抑制性抗体的组合将IL-2的水平提高到意想不到的水平。

[0137] 由这些结果展示的预期,即CD27激动性抗体与其他免疫检查点抑制剂的组合将得到类似效果,在用相同的全血测试方案进行的另外的实验中证实,其包括CD27激动剂(hCD27.15的hIgG4嵌合体进,参见上文)与抗CTLA4(14D3, eBioscience 16.1529.82)的组合。这些实验的结果(参见图2A-2C)显示与单独的各个抗体(如上IgG4同种型对照; IgG2A同种型对照; BD Pharmingen 554126)相比,由CD27激动性抗体与CTLA4抑制性抗体的组合显示类似的协同作用。

[0138] 根据这些结果,可以预期抗人CD27激动性抗体与至少一种免疫检查点抑制剂的组合将在由免疫应答刺激改善的病症(如由抗原特异性T淋巴细胞的刺激改善的病症)中具有有益效果。

[0139] 实施例2

[0140] 评估在人PBMC SEB超抗原诱导的IL2分泌中抗CD27、抗LAG-3以及抗PD1抗体在的活性

[0141] 进行附加的验证性实验以进一步显示抗人CD27激动性抗体与免疫检查点蛋白抑制剂组合的效果。

[0142] 在此实验中,将hCD27.15类似物与抗LAG3抗体和抗PD1抗体结合使用。所使用的类似物包含hCD27.15的功能性重链CDR1、CDR2、CDR3(分别为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3)和轻链CDR1、CDR2、CDR3(分别为SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6)。此外,它包含功能性连接的功能性人IgG4恒定区(CH1-CH3, GenBank登录#K01316)。hCD27.15类似物的功能在对应于在W02012/004367的实施例2(第49-50页)中所公开的CD27结合测定中和对应于在W02012/004367的实施例3(第54-55页)中所公开的NF-κB测试的CD27信号测试中建立。

[0143] 所用的人抗LAG3抗体包括根据SEQ ID NO:23的重链氨基酸序列和根据SEQ ID NO:24的轻链氨基酸序列。使用的人抗PD1抗体包括根据SEQ ID NO:21的重链氨基酸序列和根据SEQ ID NO:22的轻链氨基酸序列。为了研究抗人CD27激动性抗体与免疫检查点蛋白抑制剂组合的效果,使用 SepMate®管(干细胞)将人PBMC从来自健康供体的肝素化人血中分离。将15ml聚蔗糖-1077(Ficoll-1077)添加到 SepMate®管中,用25ml人血将其小心地重叠

并在RT下以轻微阻碍(用10-10为最大阻碍的5)以1250g离心12分钟。在聚蔗糖的界面处分离白细胞,并在RT下稀释成40ml的Hanks平衡盐溶液(HBSS)。接下来,将细胞以300g在4℃下离心10分钟,在50ml HBSS中重悬沉淀物。最后,以250g将细胞悬浮液离心10分钟以除去血小板,并且将沉淀物再悬浮于12ml完全培养基(含有HEPES和宾Penn/Step和10%人A+B+血清的RPMI 1640))中。通过Vi细胞量化细胞。接下来,将50μl的PBMC细胞悬浮液(1×10^7 细胞/ml(最终 5×10^5 细胞/孔)铺于96孔圆底板上。50μl抗体(每次抗体治疗,使对于组合条件加入100μl总抗体)以10μg/ml的终浓度在37℃下30分钟。接下来,以0.5、1、8、16、32、64和80ng/ml终浓度添加4倍浓度的50μl葡萄球菌肠毒素B(SEB)超抗原(Toxin Technology, Sarasota, FL),并在37℃下培育72小时。收集上清液,并通过离心分离从任何细胞的物质中清除。使用人IL-2的V-PLEX试剂盒(来自美国马里兰州罗克维尔市中尺度发现中心的目录号K151QQD-4))根据制造商的说明检测IL-2分泌水平作为用于免疫活化的量度。作为阴性对照,使用(亚)同种型匹配的抗体。

[0144] 图3A-3D示出使用上述实验方法从四个单独的供体中获得的结果。对于每个供体,抗CD27/抗LAG3组合的结果示于左版,并且抗CD27/抗PD1组合的结果示于右版。对于每个SEB浓度,柱条从左到右表示:同种型对照;免疫检查点抑制剂(抗LAG3或抗PD1);抗CD27;免疫检查点抑制剂(抗LAG3或抗PD1)+抗CD27。抗CD27抗体表明作为单独药剂时超过同种型对照约1.5-2倍的IL-2增加。抗CD27抗体显示与抗LAG-3抗体和与抗PD1抗体的结合活性。对于抗人CD27激动性抗体(包括类似物)与其他免疫检查点蛋白抑制剂的组合可以预期到类似的效果。

序列表

<110> BioNovion

<120> 结合 CD27 激动剂以及免疫检查点抑制以用于免疫刺激

<160> 24

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

[0001]

<400> 1

Gly Phe Ile Ile Lys Ala Thr Tyr Met His

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Glu Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Val

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Tyr Ala Trp Tyr Phe Asp Val

1 5

[0002] <210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

[0003]

<400> 5

His Ala Lys Thr Leu Ala Glu

1

5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln His Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Thr Phe

1

5

10

<210> 7

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> source

<222> 1..348

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/organism="Mus musculus"

<400> 7

gaggttcggc tgcagcagtc tggggcagac cttgtgaagc caggggcctc agteaagttg 60

tctgcacag cttctggctt catcattaaa gccacctata tgcactgggt gaggcagagg 120

[0004]

cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatgggtga gactaaatat 180

gacccgaagt tccaggteaa ggccactata acagcagaca catcctccag cacagcctac 240

ctgcagctca acagcctgac atctgacgac actgcccgtct attactgtgc tagatacgcc 300

tggctactteg atgtctgggg cgcaggggacc acggtcaccg tctcctca 348

<210> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ile Ile Lys Ala Thr
 20 25 30

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

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

Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

[0005]

Ala Arg Tyr Ala Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> source

<222> 1..321

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/organism="Mus musculus"

<400> 9

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cactgtcact 60

atcacatgtc gggcaagtga gaatatattac agtttttttag catggtatca tcagaaacag 120

ggaaggtctc cgcaactcct ggtctatcat gcaaaaaccc tagcagaagg tgtgccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagget 240

gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat tattatggta gtccgctcac gttcggtget 300

gggaccaage tggaggtgaa a 321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr His Gln Lys Gln Gly Arg Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

[0006]

Tyr His Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys

100 105

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met His

1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

[0007]

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Gly Ser Gly Asn Trp Gly Phe Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

[0008] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Arg Thr Phe

1 5 10

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0009] 65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Gly Asn Trp Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

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

[0010]

<210> 19

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized

<400> 19

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Val	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	Asn	Tyr
				20						25				30	
Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met

	35	40	45	
	Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe			
	50	55	60	
	Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr			
	65	70	75	80
	Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
	Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110	
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	115	120	125	
	Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala			
	130	135	140	
	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
[0011]	145	150	155	160
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175	
	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190	
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys			
	195	200	205	
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro			
	210	215	220	
	Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val			
	225	230	235	240
	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	245	250	255	
	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu			
	260	265	270	

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

[0012] Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser			
20	25	30	
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro			
35	40	45	
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala			
50	55	60	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg			
[0013]	85	90	95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100	105	110	
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln			
115	120	125	
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr			
130	135	140	
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser			
145	150	155	160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
165	170	175	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
180	185	190	
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
195	200	205	

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 21

<211> 440

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20

25

30

[0014] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100

105

110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser

115

120

125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130

135

140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145	150	155	160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
	165	170	175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys			
	180	185	190
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
	195	200	205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
	210	215	220
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
225	230	235	240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
	245	250	255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val			
[0015]	260	265	270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
	275	280	285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
	290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly			
305	310	315	320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr			
	340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
	370	375	380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 22

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0016]

<400> 22

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

	100	105	110
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115	120	125
	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
	130	135	140
	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
	145	150	155
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170	175
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185	190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0017]	210		

<210> 23

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

	260	265	270
	Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
	275	280	285
	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
	290	295	300
	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
	305	310	315
	Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
	325	330	335
	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
	340	345	350
	Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
	355	360	365
[0019]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
	370	375	380
	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
	385	390	395
	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
	405	410	415
	Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
	420	425	430
	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	435	440	445

<210> 24

<211> 214

<212> PRT

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 24

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

[0020] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

	195	200	205
[0021]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		

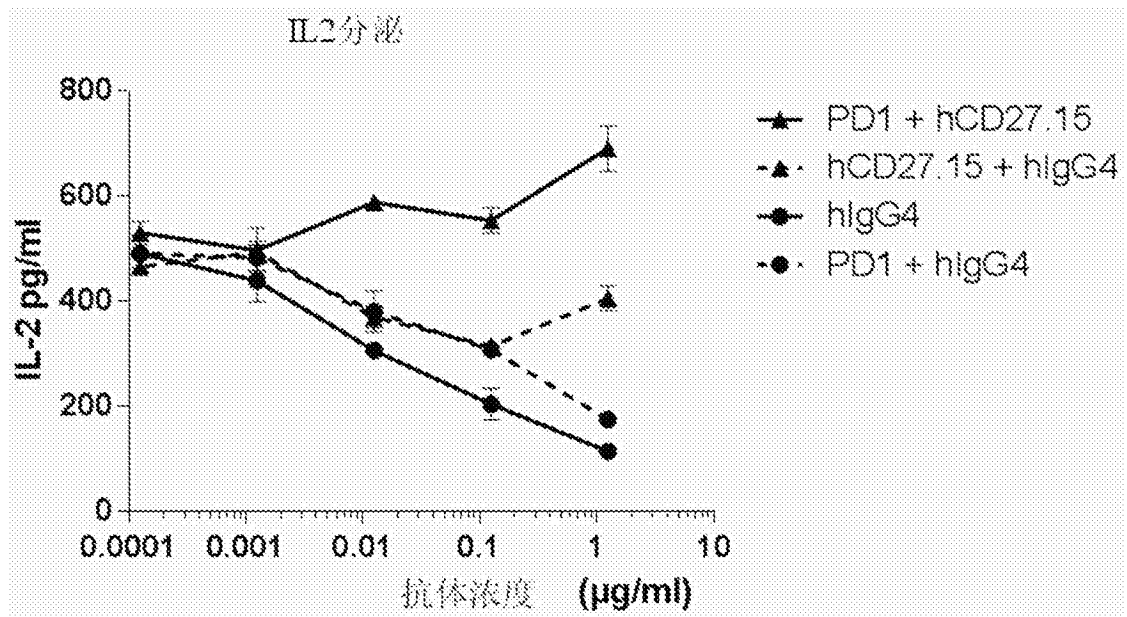


图1A

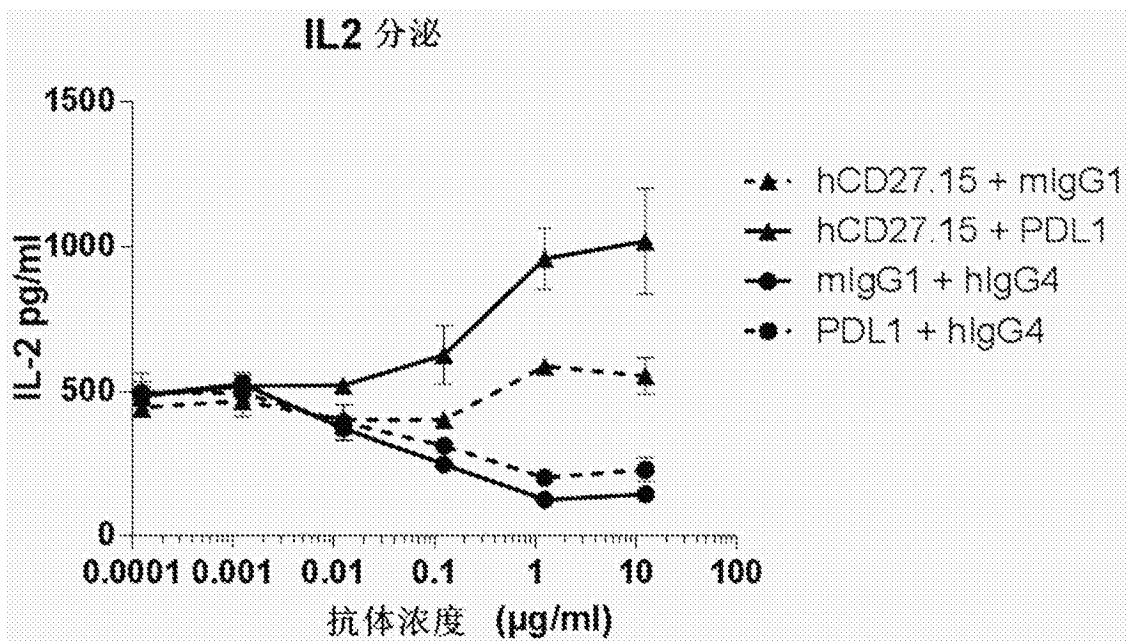


图1B

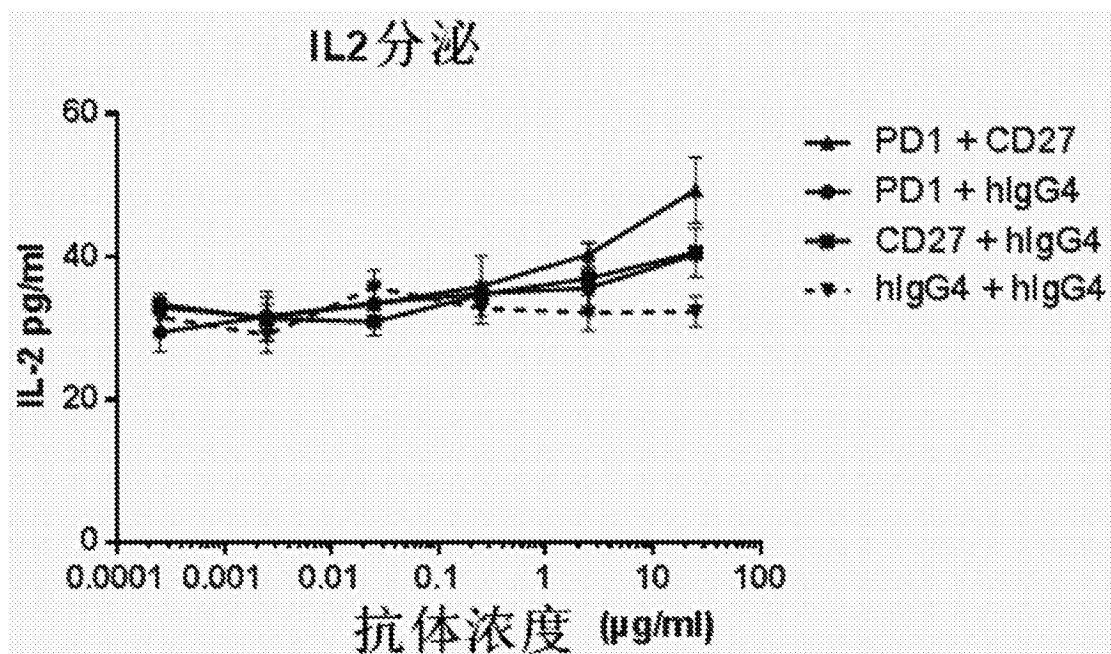


图2A

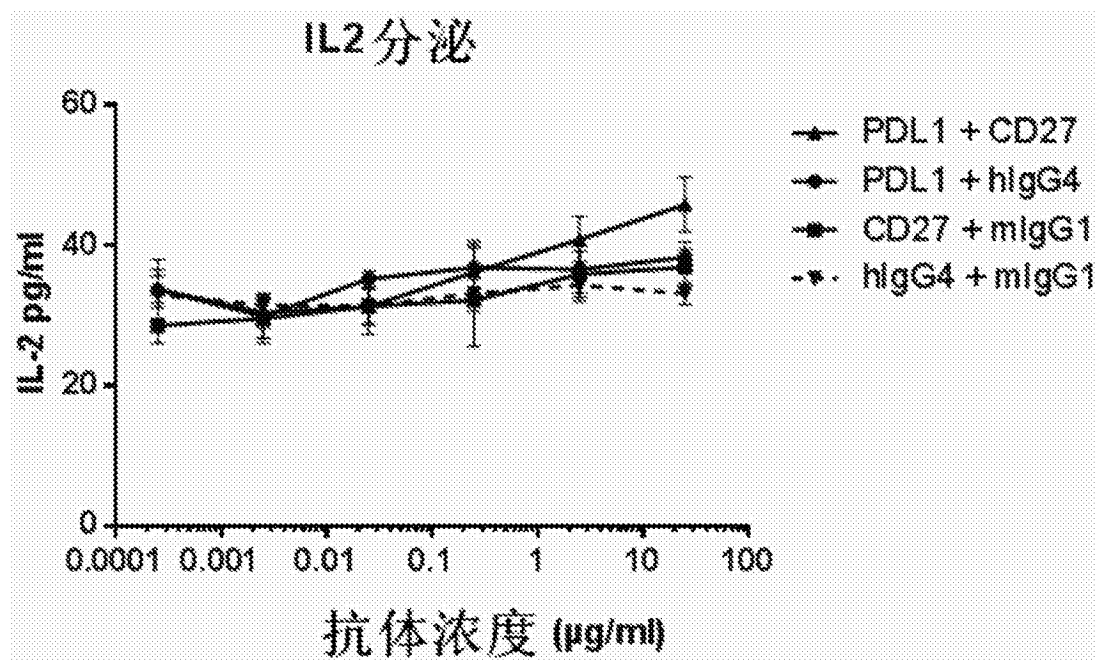


图2B

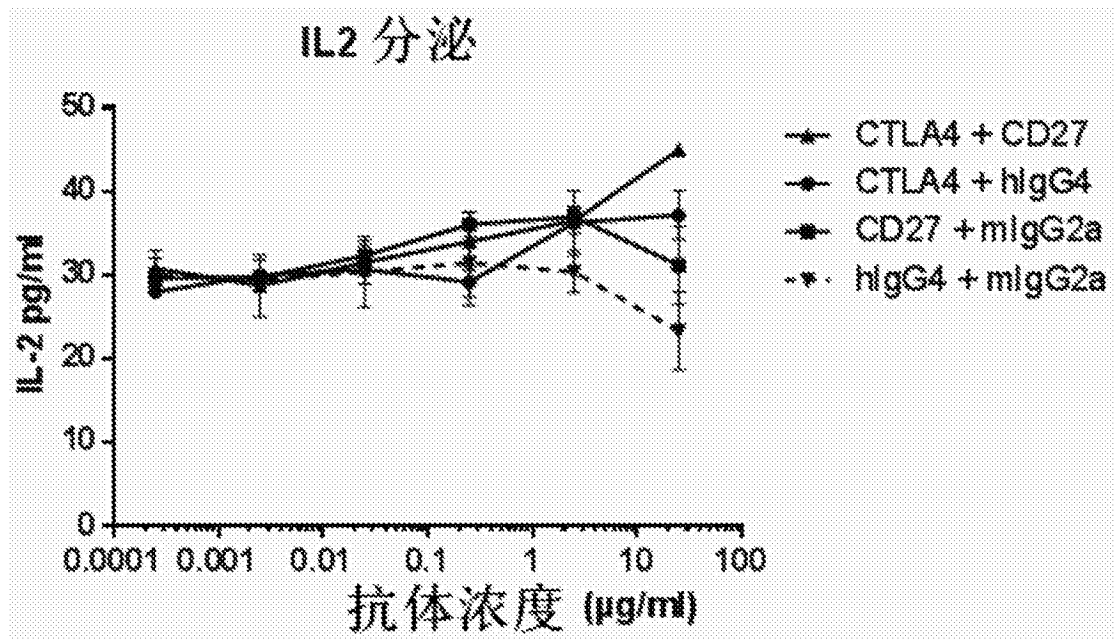


图2C

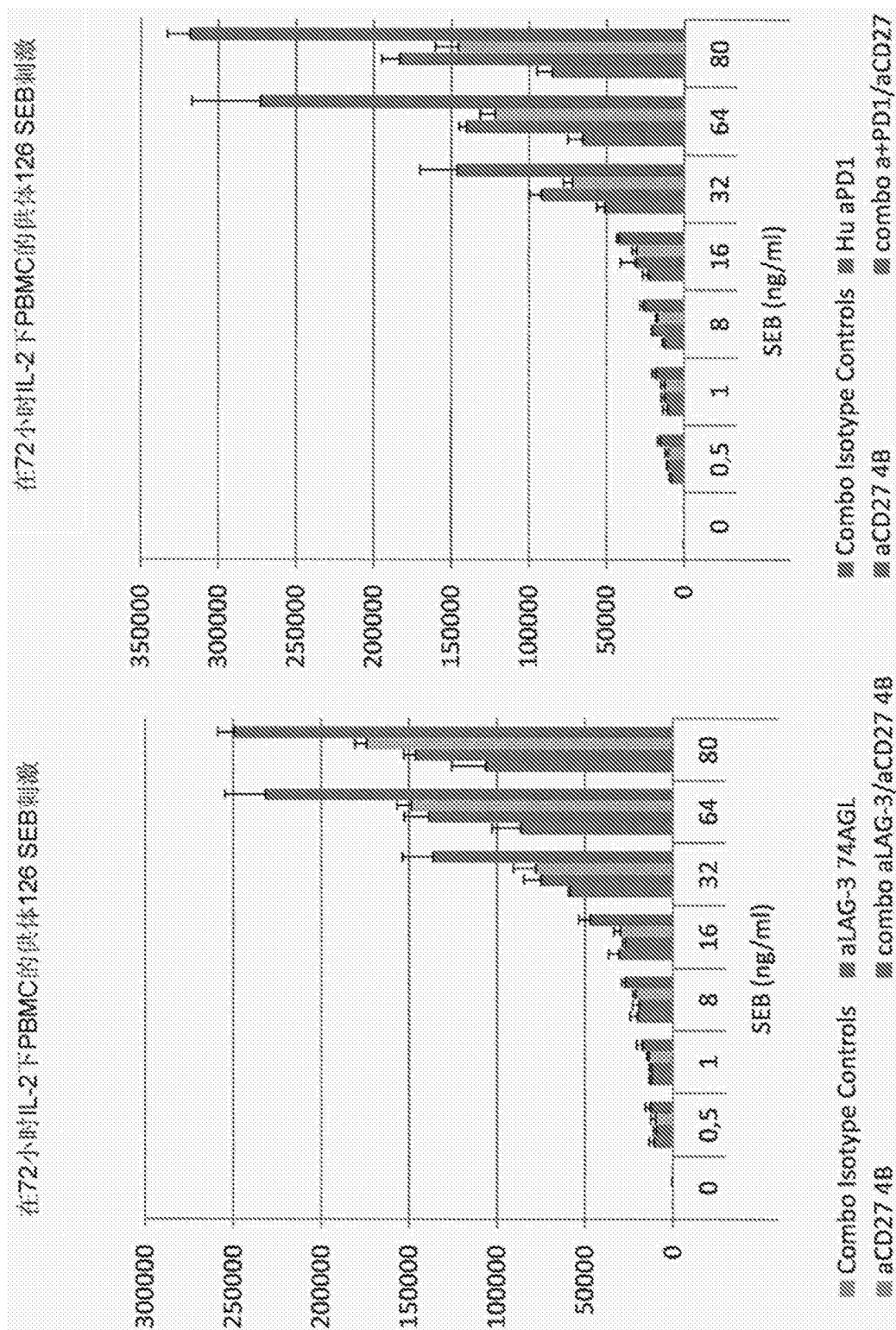


图3A

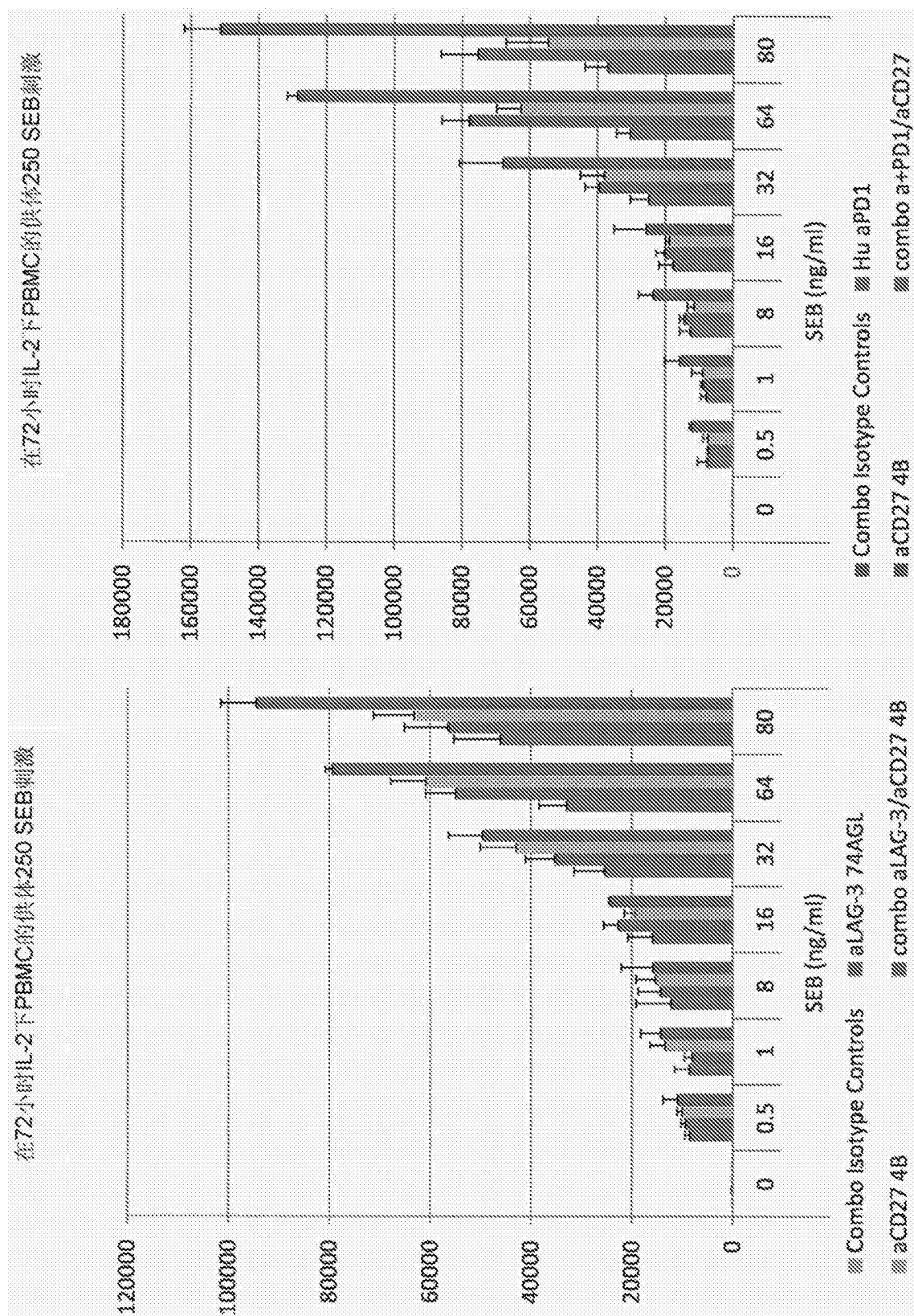


图3B

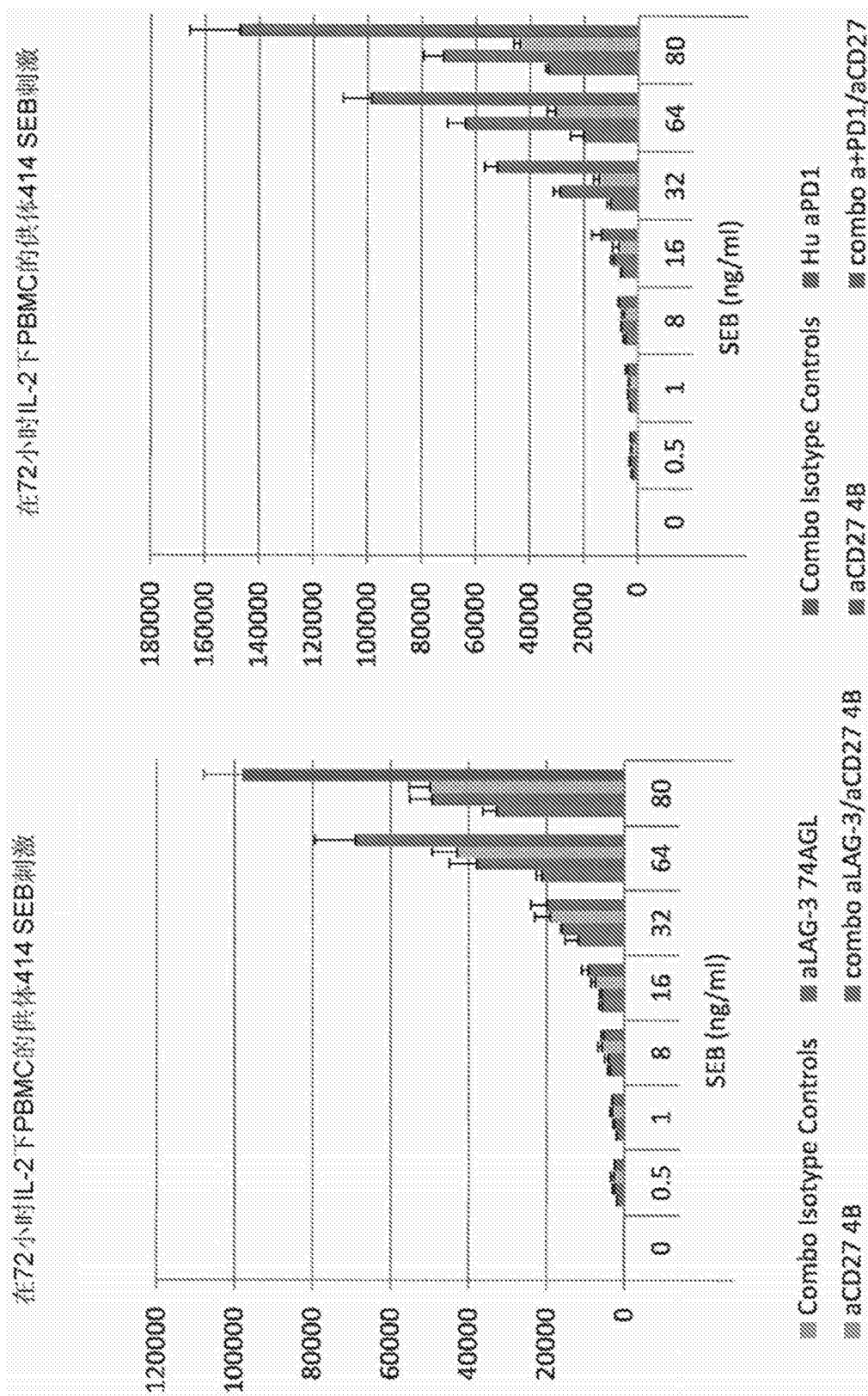


图3C

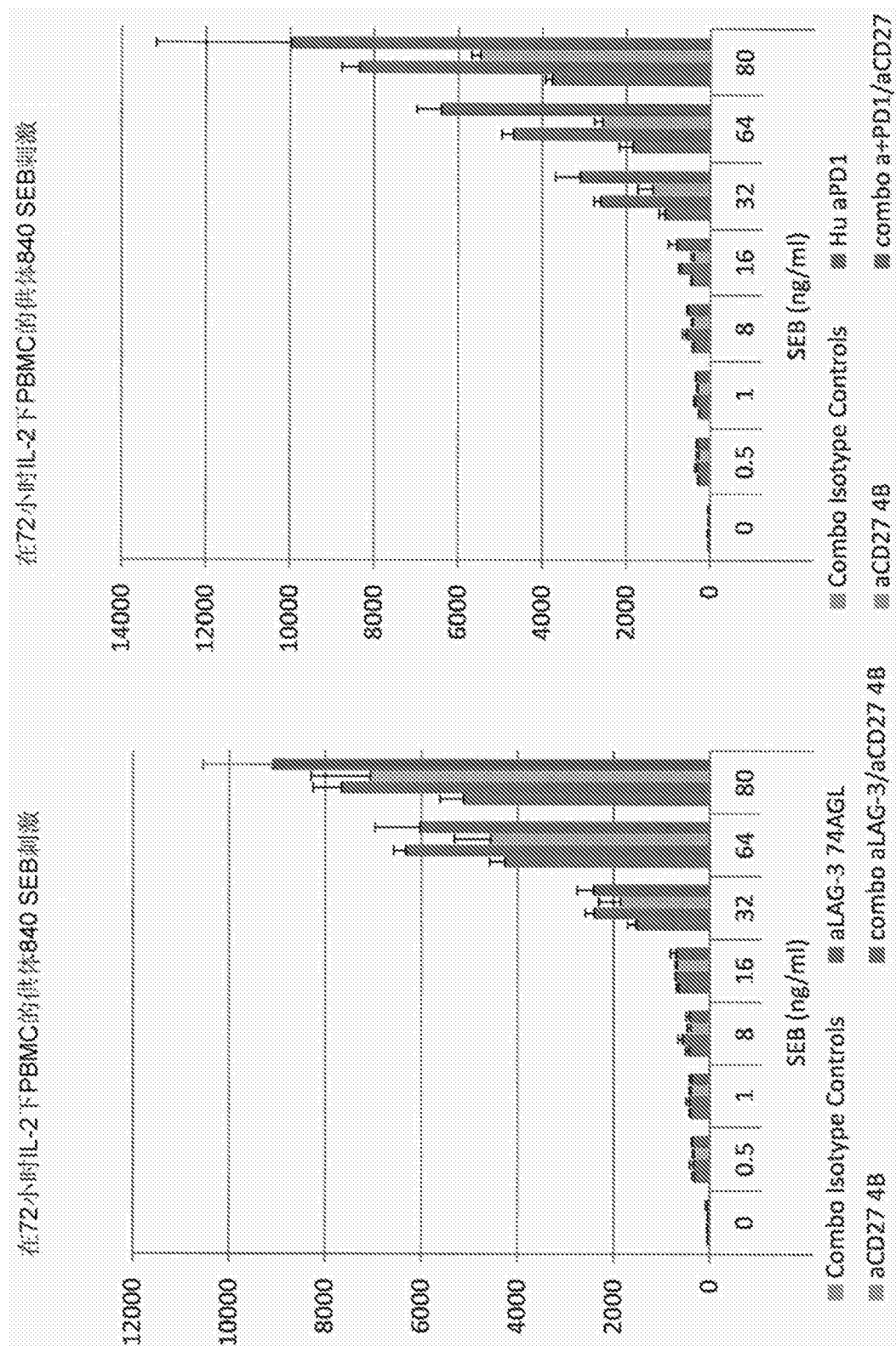


图3D