



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118302447 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 05

(21) 申请号 202280074530.3

(22) 申请日 2022.11.08

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/129380 2021.11.08 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/079442 2022.11.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/091865 EN 2023.05.25

(71) 申请人 塞尔德克斯医疗公司

地址 美国新泽西州汉普顿前沿街道53号
220室

申请人 博奥信生物技术(南京)有限公司

(72) 发明人 蒂伯·凯勒 乔而·戈登斯坦

迈克尔·墨菲 汤姆斯·奥尼尔

劳拉·A·维塔利 陈明久

(74) 专利代理机构 上海段和段律师事务所

31334

专利代理师 夏思秋

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书40页

序列表(电子公布) 附图24页

(54) 发明名称

抗ILT4和抗PD-1双特异性构建体

(57) 摘要

本文提供新的抗ILT4和抗PD-1的双特异性构建体,及其相应的组合物。本文还述及通过施用该构建体或组合物来诱导或增强免疫应答的方法以及治疗癌症的方法。

1. 一种双特异性构建体,其包含与PD-1结合域连接的ILT4结合域,其中:
 - (a) 所述ILT4结合域包含:
 - (i) 重链可变区CDR1氨基酸序列,其选自共有序列GYT(I,M)H(SEQ ID NO:21)或其保守序列改动;
 - (ii) 重链可变区CDR2氨基酸序列,其如SEQ ID NO:3或其保守序列改动所示;
 - (iii) 重链可变区CDR3氨基酸序列,其选自共有序列E R P G G S Q F I Y Y Y(P,A)(M,L)D Y(SEQ ID NO:22)或其保守序列改动;
 - (iv) 轻链可变区CDR1氨基酸序列,其选自共有序列R A S(A,E)N I Y S Y L A(SEQ ID NO:23)或其保守序列改动;
 - (v) 轻链可变区CDR2氨基酸序列,其选自共有序列N A(I,D)T L A E(SEQ ID NO:24)或其保守序列改动;
 - (vi) 轻链可变区CDR3氨基酸序列,其如SEQ ID NO:8或其保守序列改动所示;以及
 - (b) 所述PD-1结合域包含:
 - (i) 分别如SEQ ID NOs:31、36和41或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:46、51和56或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;或
 - (ii) 分别如SEQ ID NOs:69、74和79或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:84、89和94或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3。
2. 如权利要求1所述的双特异性构建体,其中:
 - (a) 所述ILT4结合域包含:
 - (i) 分别如SEQ ID NOs:11、13和15或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:16、17和18或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;或
 - (ii) 分别如SEQ ID NOs:1、3和5或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:10、11和12或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;以及分别如SEQ ID NOs:6、7和8或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;以及
 - (b) 所述PD-1结合域包含:
 - (i) 分别如SEQ ID NOs:31、36和41或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:46、51和56或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;或
 - (ii) 分别如SEQ ID NOs:69、74和79或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:84、89和94或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3。
3. 如权利要求1或2所述的双特异性构建体,其中:
 - (a) 所述ILT4结合域包含分别如SEQ ID NOs:11、13和15所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:16、17和18所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;以及
 - (b) 所述PD-1结合域包含分别如SEQ ID NOs:31、36和41所示的重链可变区CDR1、CDR2

和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:46、51和56所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3。

4.如权利要求1-3中任一项所述的双特异性构建体,其中:

(a)所述ILT4结合域包含:

(i)如SEQ ID NO:19所示的重链可变区氨基酸序列或与其至少95%同一性的序列,以及如SEQ ID NO:20所示的轻链可变区氨基酸序列或与其至少95%同一性的序列;或

(ii)如SEQ ID NO:9所示的重链可变区氨基酸序列或与其至少95%同一性的序列,以及如SEQ ID NO:10所示的轻链可变区氨基酸序列或与其至少95%同一性的序列;以及

(b)所述PD-1结合域包含:

(i)如SEQ ID NO:59所示的重链可变区氨基酸序列或与其至少95%同一性的序列,以及如SEQ ID NO:60所示的轻链可变区氨基酸序列或与其至少95%同一性的序列;或

(ii)如SEQ ID NO:61所示的重链可变区氨基酸序列或与其至少95%同一性的序列,以及如SEQ ID NO:62所示的轻链可变区氨基酸序列或与其至少95%同一性的序列。

5.如权利要求1-4中任一项所述的双特异性构建体,其中所述ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:19的重链可变区,和含有SEQ ID NO:20的轻链可变区。

6.如权利要求1-4中任一项所述的双特异性构建体,其中所述ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区,和含有SEQ ID NO:10的轻链可变区。

7.如权利要求1-6中任一项所述的双特异性构建体,其中所述PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:59的重链可变区,和含有SEQ ID NO:60的轻链可变区。

8.一种双特异性构建体,其包含与PD-1结合域连接的ILT4结合域,其中:

(a)所述ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:19的重链可变区,和含有SEQ ID NO:20的轻链可变区;以及

(b)所述PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:59的重链可变区,和含有SEQ ID NO:60的轻链可变区。

9.一种双特异性构建体,其包含与PD-1结合域连接的ILT4结合域,其中:

(a)所述ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区,和含有SEQ ID NO:10的轻链可变区;以及

(b)所述PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:59的重链可变区,和含有SEQ ID NO:60的轻链可变区。

10.一种双特异性构建体,其包含与PD-1结合域连接的ILT4结合域,其中:

(a)所述ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:19的重链可变区,和含有SEQ ID NO:20的轻链可变区;以及

(b)所述PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:61的重链可变区,和含有SEQ ID NO:62的轻链可变区。

11.一种双特异性构建体,其包含与PD-1结合域连接的ILT4结合域,其中:

(a)所述ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区,和含有SEQ ID NO:10的轻链可变区;以及

(b)所述PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:61的重链可变区,和含有SEQ ID NO:62的轻链可变区。

12.如前述权利要求中任一项所述的双特异性构建体,其中所述PD-1结合域还包含人

IgG1恒定结构域。

13. 如前述权利要求中任一项所述的双特异性构建体,其中所述ILT4结合域与所述PD-1结合域的重链的C端连接。

14. 如前述权利要求中任一项所述的双特异性构建体,其中所述ILT4结合域是scFv。

15. 如前述权利要求中任一项所述的双特异性构建体,其中所述ILT4结合域与所述PD-1结合域是基因融合的。

16. 如权利要求1-14中任一项所述的双特异性构建体,其中所述ILT4结合域与所述PD-1结合域是化学结合的。

17. 一种双特异性构建体,其包含与ILT4 scFv连接的PD-1结合域,其中:

(a) 所述ILT4 scFv包含分别如SEQ ID NOs:11、13和15所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:16、17和18所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;以及

(b) 所述PD-1结合域包含分别如SEQ ID NOs:31、36和41所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,和分别如SEQ ID NOs:46、51和56所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及人IgG1恒定结构域。

18. 如权利要求17所述的双特异性构建体,其中:

(a) 所述ILT4 scFv包含含有SEQ ID NO:19的重链可变区,和含有SEQ ID NO:20的轻链可变区;以及

(b) 所述PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:59的重链可变区,和含有SEQ ID NO:60的轻链可变区。

19. 一种双特异性构建体,其包含与ILT4 scFv连接的PD-1结合域,其中:

(a) 所述ILT4 scFv包含分别如SEQ ID NOs:11、13和15所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:16、17和18所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;以及

(b) 所述PD-1结合域包含分别如SEQ ID NOs:69、74和79所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,和分别如SEQ ID NOs:84、89和94所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及人IgG1恒定结构域。

20. 如权利要求17所述的双特异性构建体,其中:

(a) 所述ILT4 scFv包含含有SEQ ID NO:19的重链可变区,和含有SEQ ID NO:20的轻链可变区;以及

(b) 所述PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:61的重链可变区,和含有SEQ ID NO:62的轻链可变区。

21. 一种双特异性构建体,其包含与ILT4 scFv连接的PD-1结合域,其中:

(a) 所述ILT4 scFv包含分别如SEQ ID NOs:1、3和5所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:6、7和8所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;以及

(b) 所述PD-1结合域包含分别如SEQ ID NOs:31、36和41所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,和分别如SEQ ID NOs:46、51和56所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及人IgG1恒定结构域。

22. 如权利要求21所述的双特异性构建体,其中:

(a) 所述ILT4 scFv包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区,和含有SEQ ID NO:10的轻链可变区;以及

(b)所述PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:59的重链可变区,和含有SEQ ID NO:60的轻链可变区。

23.一种双特异性构建体,其包含与ILT4 scFv连接的PD-1结合域,其中:

(a)所述ILT4 scFv包含分别如SEQ ID NOs:1、3和5所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:6、7和8所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3;以及

(b)所述PD-1结合域包含分别如SEQ ID NOs:69、74和79所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,和分别如SEQ ID NOs:84、89和94所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及人IgG1恒定结构域。

24.如权利要求23所述的双特异性构建体,其中:

(a)所述ILT4 scFv包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区,和含有SEQ ID NO:10的轻链可变区;以及

(b)所述PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:61的重链可变区,和含有SEQ ID NO:62的轻链可变区。

25.如权利要求19所述的双特异性构建体,其中所述PD-1结合域和所述ILT4 scFv包含分别如SEQ ID NOs:64和63所示序列的重链和轻链序列。

26.如权利要求19所述的双特异性构建体,其中所述PD-1结合域和所述ILT4 scFv的重链和轻链分别由SEQ ID NOs:66和65所示的核苷酸序列所编码。

27.一种组合物,其包含权利要求1-26中任一项所述的双特异性构建体和药学上可接受的载体。

28.如权利要求27所述的组合物,还包含一种或多种治疗剂。

29.如权利要求27或28所述的组合物,其中所述治疗剂是另一种抗体。

30.如权利要求27-29中任一项所述的组合物,其中所述抗体是PD-L1抗体和/或CTLA-4抗体。

31.一种试剂盒,其包含权利要求1-26中任一项所述的双特异性构建体、或权利要求27-30中任一项所述的组合物,以及使用说明。

32.一种激活巨噬细胞的方法,其包括使巨噬细胞与权利要求1-26中任一项所述的双特异性构建体、或权利要求27-30中任一项所述的组合物接触。

33.一种用于在受试者中诱导或增强免疫应答的方法,其包括以有效诱导或增强受试者中免疫应答的量向受试者施用权利要求1-26中任一项所述的双特异性构建体、或权利要求27-30中任一项所述的组合物。

34.一种用于在受试者中治疗病症或疾病的方法,所述方法包括以有效治疗所述病症或疾病的量向受试者施用权利要求1-26中任一项所述的双特异性构建体、或权利要求27-30中任一项所述的组合物。

35.如权利要求34所述的方法,其中受试者患有需要刺激免疫应答的病症或疾病。

36.如权利要求34或35所述的方法,其中病症或疾病是癌症。

37.如权利要求36所述的方法,其中癌症是皮肤癌、结直肠癌、卵巢癌、肾细胞癌、头颈部鳞状细胞癌、乳癌、肺癌、膀胱癌、前列腺癌、黑色素瘤、妇科癌、肉瘤、淋巴瘤、或胶质母细胞瘤。

38.一种在受试者中治疗肿瘤的方法,所述方法包括以有效治疗所述肿瘤的量向受试

者施用权利要求1-26中任一项所述的双特异性构建体、或权利要求27-30中任一项所述的组合物。

39.如权利要求38所述的方法,其中所述肿瘤表达ILT4、HLA-G、HLA I类、血管生成素样蛋白2、Nogo、ILT4配体、PD-L1或PD-L2。

40.如权利要求33-39中任一项所述的方法,还包括向受试者施用一种或多种治疗剂。

41.如权利要求40所述的方法,其中所述治疗剂是另一种抗体。

42.如权利要求41所述的方法,其中所述抗体是PD-L1抗体和/或CTLA-4抗体。

43.如权利要求40-42中任一项所述的方法,其中所述双特异性构建体和所述一种或多种治疗剂同时施用。

44.如权利要求40-42中任一项所述的方法,其中所述双特异性构建体和所述一种或多种治疗剂按序施用。

45.如权利要求1-26中任一项所述的双特异性构建体、或权利要求27-30中任一项所述的组合物,在制备一种用于治疗癌症的药物中的用途。

抗ILT4和抗PD-1双特异性构建体

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119要求2021年11月8日提交的国际申请PCT/CN2021/129380的优先权。前述申请的内容通过引用的方式并入。

背景技术

[0003] 抑制性免疫检查点受体“免疫球蛋白样转录子4”(ILT4)是非催化酪氨酸磷酸化受体家族的成员,其表达于免疫细胞(例如T细胞、B细胞、NK细胞、树突状细胞、巨噬细胞和肥大细胞)。与此家族的其他受体一样,ILT4在胞质域中包含称为基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序(ITIM)的保守氨基酸序列(Veillette et al. (2002) Annual Review of Immunology 20(1):669-707)。ILT4经其相关配体(髓系细胞中的HLA-G和HLA I类)结合和激活,通过多种机制发挥免疫抑制作用。ILT4也存在于多种癌症肿瘤微环境的肿瘤细胞和基质细胞中,已被证明可以调节肿瘤细胞的生物学行为,从而促进其免疫逃逸(Gao et al. (2018) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on 20 Cancer 1869(2):278-285)。因此,ILT4在多种肿瘤类型中的表达与不良结果相关。

[0004] 程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)是细胞表面受体,属于免疫球蛋白超家族,表达于T细胞和祖B细胞。PD-1结合两种配体,PD-L1和PD-L2。PD-1通过抑制T细胞炎症活性而下调免疫系统和促进自身耐受,从而调节免疫系统对人体细胞的应答。这防止了自身免疫性疾病,但也可以阻止免疫系统杀死癌细胞。PD-1是免疫检查点,通过两种机制防止自身免疫:(a)其促进淋巴结中抗原特异性T细胞的细胞凋亡(程序性细胞死亡),以及(b)其减少调节性T细胞(抗炎、抑制性T细胞)的细胞凋亡。通过抑制PD-1可逆转免疫抑制。

[0005] 尽管有着抗体疗法相关的进展,在本领域内仍需要新的和改进的治疗剂来治疗例如需要刺激免疫应答的病症或疾病。因此,本发明的目的是提供改进的用于治疗患有此类病症或疾病(例如癌症)的受试者的方法。

发明内容

[0006] 本申请提供新的双特异性构建体,其包含与PD-1结合域连接的ILT4结合域。如本文进一步所述的,本发明的双特异性构建体可用于诱导或增强免疫应答的方法以及治疗疾病或病症(例如,癌症)的方法。

[0007] 在一个实施方式中,双特异性构建体包含与PD-1结合域连接的ILT4结合域,其中,

[0008] (a) ILT4结合域包含重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域,其具有下列序列:

[0009] (i) 重链可变区CDR1氨基酸序列,其选自共有序列G Y T(I,M)H(SEQ ID NO:21)或其保守序列改动;

[0010] (ii) 重链可变区CDR2氨基酸序列,其如SEQ ID NO:3或其保守序列改动所示;

[0011] (iii) 重链可变区CDR3氨基酸序列,其选自共有序列E R P G G S Q F I Y Y Y(P,A)(M,L)D Y(SEQ ID NO:22)或其保守序列改动;

[0012] (iv) 轻链可变区CDR1氨基酸序列,其选自共有序列R A S(A,E)N I Y S Y L A

(SEQ ID NO:23)或其保守序列改动;

[0013] (v)轻链可变区CDR2氨基酸序列,其选自共有序列NA(I,D)T L A E(SEQ ID NO:24)或其保守序列改动;

[0014] (vi)轻链可变区CDR3氨基酸序列,其如SEQ ID NO:8或其保守序列改动所示;

[0015] (b)PD-1结合域包含:

[0016] (i)分别如SEQ ID NOs:31、36和41或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别如SEQ ID NOs:46、51和56或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;或

[0017] (ii)PD-1结合域包含分别如SEQ ID NOs:69、74和79或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,和分别如SEQ ID NOs:84、89和94或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及人IgG1恒定结构域。

[0018] 在另一个实施方式中,ILT4结合域包含:

[0019] (a)分别如SEQ ID NOs:11、13和15或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,以及分别如SEQ ID NOs:16、17和18或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,或

[0020] (b)分别如SEQ ID NOs:1、3和5或其保守序列改动所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,以及分别如SEQ ID NOs:10、11和12或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;以及分别如SEQ ID NOs:6、7和8或其保守序列改动所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

[0021] 在另一个实施方式中,双特异性构建体包含与PD-1结合域连接的ILT4结合域,其中:

[0022] (a)ILT4结合域包含分别如SEQ ID NOs:11、13和15所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,以及分别如SEQ ID NOs:16、17和18所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;以及

[0023] (b)PD1结合域包含分别如SEQ ID NOs:31、36和41所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,以及分别如SEQ ID NOs:46、51和56所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

[0024] 在另一个实施方式中,双特异性构建体的ILT4结合域包含:

[0025] (a)如SEQ ID NO:19或与其至少95%同一性的序列所示的重链可变区氨基酸序列,以及如SEQ ID NO:20或与其至少95%同一性的序列所示的轻链可变区氨基酸序列;或

[0026] (b)如SEQ ID NO:9或与其至少95%同一性的序列所示的重链可变区氨基酸序列,和如SEQ ID NO:10或与其至少95%同一性的序列所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0027] 在另一个实施方式中,双特异性构建体的PD-1结合域包含:

[0028] (a)如SEQ ID NO:59或与其至少95%同一性的序列所示的重链可变区氨基酸序列,以及如SEQ ID NO:60或与其至少95%同一性的序列所示的轻链可变区氨基酸序列;或

[0029] (b)如SEQ ID NO:61或与其至少95%同一性的序列所示的重链可变区氨基酸序列,以及如SEQ ID NO:62或与其至少95%同一性的序列所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0030] 在另一个实施方式中,双特异性构建体的ILT4结合域包含如SEQ ID NO:19所示的重链可变区氨基酸序列以及如SEQ ID NO:20所示的轻链可变区氨基酸序列。或者,双特异

性构建体的ILT4结合域包含如SEQ ID NO:9所示的重链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:10所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0031] 在另一个实施方式中,双特异性构建体的PD-1结合域包含如SEQ ID NO:59所示的重链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:60所示的轻链可变区氨基酸序列。或者,双特异性构建体的PD-1结合域包含如SEQ ID NO:61所示的重链可变区氨基酸序列以及如SEQ ID NO:62所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0032] 在另一个实施方式中,双特异性构建体的ILT4结合域包含如SEQ ID NO:19所示的重链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:20所示的轻链可变区氨基酸序列;以及PD-1结合域包含如SEQ ID NO:59所示的重链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:60所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0033] 双特异性构建体可以是化学结合物,其可以通过ILT4结合域和PD-1结合域的化学结合来制备。在一个实施方式中,PD-1结合域还包含人IgG1恒定结构域。在另一个实施方式中,ILT4结合域与PD-1结合域的重链C端连接。在另一个实施方式中,ILT4结合域是scFv。

[0034] 在特定实施方式中,双特异性构建体包含与ILT4 scFv连接的PD-1结合域,其中:

[0035] (a) PDv1结合域包含分别如SEQ ID NOs:31、36和41所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别如SEQ ID NOs:46、51和56所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,以及IgG1恒定结构域;和

[0036] (b) ILT4 scFv包含分别如SEQ ID NOs:11、13和15所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,以及分别如SEQ ID NOs:16、17和18所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

[0037] 例如,双特异性构建体包含分别如SEQ ID NOs:64和63所示的重链和轻链序列,或分别由SEQ ID NOs:66和65所示的核苷酸序列编码。

[0038] 本发明还提供包含本文所述的任意双特异性构建体和药学上可接受的载体的组合物,以及包含本文所述的任意双特异性构建体和使用说明书的试剂盒。

[0039] 在另一个方面,还提供编码本文所述双特异性构建体(或其部分)的分离的核酸分子,以及包含该核酸的表达载体、和包含该表达载体的宿主细胞。在另一个实施方式中,提供编码本文所述任意双特异性构建体的核酸分子。在另一个实施方式中,核酸分子为表达载体的形式。在另一个实施方式中,当在体内施用于受试者时,核酸分子为表达ILT4结合域、PD-1结合域、或这两种结合域的表达载体的形式。在另一个实施方式中,当在体内施用于受试者时,核酸分子为表达双特异性构建体的重链、轻链、或重链和轻链两者的表达载体的形式。

[0040] 例如,核酸分子包含编码含有SEQ ID NO:64所示氨基酸序列的重链、含有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的轻链、SEQ ID NOs:64和63所示的重链和轻链两者、或与其至少90%同一性(例如,与一种或多种前述序列为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0041] 在另一个实施方式中,核酸分子包含编码重链的如SEQ ID NO:66所示的核苷酸序列、编码轻链的如SEQ ID NO:65所示的核苷酸序列、编码重链和轻链两者的核苷酸序列、或与其至少90%同一性(例如,与上述一种或多种序列为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的核苷酸序列。

[0042] 在另一个实施方式中,用于在受试者中诱导或增强免疫应答(例如,针对抗原)的方法,其包括,以有效诱导或增强受试者免疫应答(例如,针对抗原)的量,向受试者施用本文所述任一双特异性构建体或组合物。

[0043] 在另一个实施方式中,提供用于治疗受试者的病症或疾病(例如,癌症)的方法,该方法包括,以有效治疗病症或疾病的量,向受试者施用本文所述的任一双特异性构建体或组合物。

[0044] 在另一个实施方式中,提供用于治疗受试者的肿瘤(例如,表达ILT4、HLA-G、HLA-I型、血管生成素样蛋白2、Nogo、或ILT4配体的肿瘤)的方法,该方法包括,将本文所述任一双特异性构建体或组合物,以有效治疗肿瘤的量,施用于受试者。

[0045] 受试者可以是,例如,患有需要刺激免疫应答的病症或疾病的受试者。在一个实施方式中,需要刺激免疫应答的病症或疾病是癌症。这种方法包括向受试者施用一种或多种治疗剂,例如,其中治疗剂是其他抗体,例如CD40抗体、PD-L1抗体和/或CTLA-4抗体。双特异性构建体(或其组合物)与一种或多种治疗剂可以同时、按序施用。

[0046] 在受试者中诱导或增强免疫应答(例如,针对抗原)的方法还可以包括向受试者施用抗原。与本文所述的双特异性构建体或组合物一起施用的优选抗原是肿瘤抗原。

附图说明

[0047] 图1示出双特异性构建体CDX-585与IgG1相比的SDS凝胶电泳图。

[0048] 图2示出双特异性构建体CDX-585与IgG1相比的HPLC痕量图。

[0049] 图3示出本发明双特异性构建体的示意图。

[0050] 图4是示出使用ELISA的双特异性构建体CDX-585与人PD-1的代表性结合曲线的图表。

[0051] 图5A和5B是示出双特异性构建体CDX-585与表达人PD-1的细胞(图2A)以及表达人ILT4的细胞(图2B)的代表性结合曲线的图表。

[0052] 图6A和6B是示出双特异性构建体CDX-585与细胞表达的人ILT4(图3A)以及人PD-1(图3B)的结合曲线的图表。

[0053] 图7是示出经由生物膜层干涉测量法(BLI)的双特异性构建体CDX-585的亲合力和速率常数的表格。

[0054] 图8是示出双特异性构建体CDX-585对PD1/PD-L1相互作用的阻断的图表。

[0055] 图9A和9B是示出双特异性构建体CDX-585诱导树突状细胞(图6A)和巨噬细胞(图6B)产生TNF- α 的图表。

[0056] 图10是示出双特异性构建体CDX-585对HLA-G结合ILT4的代表性阻断曲线的图表。

[0057] 图11是示出双特异性构建体CDX-585下调PD-L1表达的图表。

[0058] 图12A和12B是示出双特异性构建体CDX-585增加TNF- α 生成(图9A)和下调IL-10分泌(图9B)的图表。

[0059] 图13A和13B是示出双特异性构建体CDX-585诱导经IFN- γ 生成而测量的混合淋巴细胞反应(图10A)以及经IL-2生成测定的混合淋巴细胞反应(图10B)的图表。

[0060] 图14是示出双特异性构建体CDX-585增加IFN- γ 产生的图表,表明抗ILT4和抗PD-1结合域的组合的协同作用。

[0061] 图15是示出在小鼠肿瘤模型中的体内抗肿瘤活性的图表。

[0062] 图16A-16D是示出在小鼠肿瘤模型中(A)人IgG1 AQQ(0.5mg/小鼠)、(B)7B1(0.375mg/小鼠)、(C)E1A9(0.375mg/小鼠)和7B1(0.375mg/小鼠)、以及(D)CDX-585(0.5mg/小鼠)的体内抗肿瘤活性的图表。

[0063] 图17A-17C是示出食蟹猴在单次i.v.注射(10mg/kg)CDX-585后细胞因子/趋化因子(A)MCP-1(CCL2)、(B)MIP-1 β (CCL4)、和(C)MDC(CCL22)的血清浓度的图表。

[0064] 图18是示出食蟹猴在单次i.v.注射(10mg/kg)CDX-585后CDX-585血清浓度的图表。

[0065] 图19是示出抗体7B1、E1A9、7B1与E1A9的组合、以及CDX-585在与LPS或CD40抗体(CDX-1140)孵育的树突状细胞(DC)中所产生的IFN- γ 的图表。

[0066] 图20是示出小鼠肿瘤模型中体内抗肿瘤活性的图表。

具体实施方式

[0067] 为确保更容易地理解本发明,首先定义一些术语。其他的定义贯穿具体描述而给出。

[0068] 定义

[0069] 本文所用的术语“免疫球蛋白样转录子4”或“ILT4”是指抑制性免疫检查点受体,是非催化酪氨酸磷酸化受体家族的成员。ILT4又称白细胞免疫球蛋白样受体B2(LILRB2)、LIR2、MIR10、和CD85d。ILT4表达于免疫细胞,与抗原递呈细胞上的MHC I类分子结合,转导负信号,例如通过控制炎症反应和细胞毒性以集中免疫反应并限制自身反应性,从而抑制免疫反应的刺激。已鉴定出多种人ILT4亚型。亚型1(收录号为Q8N423-1)表示标准序列,由598个氨基酸残基构成。本发明的ILT4结合域(或其部分)可以与来自非人物种的ILT4交叉反应。或者,ILT4结合域可以对人ILT4特异,而可以不对其他物种表现出任何交叉反应性。ILT4或其任何变体和亚型,可以从天然表达它们的细胞或组织中分离得到,或使用本领域公知的技术和/或本文所述的那些重组产生。

[0070] 结合ILT4的配体在本领域内已知,其中包括HLA-G、HLA I类、血管生成素样蛋白2、b-淀粉样蛋白、SEMA4A、CD1c/d、CSP、以及髓磷脂抑制剂例如Nogo66、MAG、OMgp。

[0071] 术语“人类白细胞抗原G”或“HLA-G”(又称“组织相容性抗原,I类,G”),是指ILT4的配体。HLA-G属于HLA非经典I类重链旁系同源物。这种I类分子是由重链和轻链(β -2微球蛋白)组成的异二聚体。重链锚定在膜中。HLA-G在胎儿来源的胎盘细胞上表达。重链约为45kDa,其基因包含8个外显子。

[0072] 如本文所用的,术语“程序性死亡1”、“程序性细胞死亡1”、“蛋白PD-1”、“PD-1”、“PD1”、“PDCD1”、“hPD-1”和“hPD-I”可以互换使用,包括变体、亚型、人PD-1的物种同系物、和与PD-1具有至少一个相同表位的类似物。完整的PD-1序列可以在GenBank登录号NP_005009中找到。

[0073] 如本文所用的,术语“程序性细胞死亡1配体1”、“PD-L1”、“PDCD1配体1”、“程序性死亡配体1”、“B7同源物1”、“B7-H1”和“ILT44”互换使用,包括变体、亚型、人PD-L1的物种同系物、和与PD-L1具有至少一个相同表位的类似物。完整的PD-L1序列可以在GenBank登录号NP_001254635中找到。PD-L1与PD-1的结合传导抑制性信号,其降低这些T细胞的增殖,也可

以诱导细胞凋亡,这还由基因Bcl-2的低调控而介导。

[0074] 如本文所用的,术语“受试者”包括任何人或非人动物。例如,本发明的方法和组合物可以用于治疗免疫紊乱的受试者。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、羊、狗、牛、鸡、两栖类、爬行类等。

[0075] 本文所用的术语“抗体”是指经二硫键而内部连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的蛋白,或其抗原结合部位。各重链可以由重链可变区(缩写成 V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区可以由CH1、CH2和CH3三个结构域组成。各轻链可以由轻链可变区(本文中缩写成 V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区可以由CL这一个结构域组成。 V_H 和 V_L 区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间穿插着更加保守的称为骨架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 可以由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端以FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q),的结合。

[0076] 如本文所用的,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”),是指抗体上保留有特异性结合抗原(例如,人ILT4)能力的一个或多个片段。这些“片段”例如长度为约8到约1500个氨基酸,适宜地长度为约8到约745个氨基酸,适宜地为约8到约300,例如约8到约200个氨基酸,或长度为约10到约50或100个氨基酸。已示出,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实施。包括在术语抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的例子,包括(i) Fab片段,由 V_L 、 V_H 、CL和CH1结构域构成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,包含由铰链区二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 V_H 和CH1结构域构成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域构成的Fv片段;(v) 由 V_H 结构域构成的dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546);和(vi) 分离的互补决定区(CDR);或(vii) 两个或多个分离的CDR的组合,任选地通过合成接头而连接。此外,尽管Fv片段的两个结构域, V_L 和 V_H ,由不同的基因编码,它们可以使用重组的方法经合成接头而连接,其中合成的接头使得它们可以制备为单个蛋白链,其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子(称为单链Fv(sFv);参见例如Bird et al., (1988) Science 242:423-426;和Huston et al., (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也意在包括在术语抗体的“抗原结合部分”中。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常用技术而得到,且片段经与完整抗体相同的方式进行筛选以供使用。抗原结合片段可以通过重组DNA技术,或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学切割而制备。

[0077] 如本文所用的,术语“结合域”是指蛋白或抗体的包含与抗原相互作用的氨基酸残基的部分。结合域包括,但不限于,抗体(例如,全长抗体)及其抗原结合部分。结合域赋予结合剂其对抗原的特异性和亲和力。该术语也涵盖具有与免疫球蛋白结合域同源或大部分同源的结合域的任何蛋白。这样的蛋白可以源自天然来源,或部分或全部地合成产生。

[0078] 如本文所用的,术语“双特异性构建体”、“双特异性抗体”和“bsAb”是指具有可同时结合两种不同抗原的已连接结合域的构建物和抗体。对两种不同表位具有亲和力的双特异性构建体,根据构建体的不同,单价地或二价地与两种靶点结合。双特异性构建体可以通过多种方法产生,例如结合两种现有的结合域,融合两种杂交瘤细胞系形成四源杂交瘤(Jain et al. (2007) Trends in Biotechnology 25(7), 307-316)或使用基因改造的重组蛋

白 (Kontermann(2012) Dual targeting strategies with bispecific antibodies.mAbs 4(2),182-197)。

[0079] 如本文所用的,术语“连接的”是指两个或更多个分子的结合。连接可以是共价的或非共价的。连接也可以是基因层面的(即,重组融合)。可以使用多种本领域公认的技术,例如化学结合和重组蛋白生产,来实现这样的连接。

[0080] 如本文所用的,术语“单克隆抗体”是指对特定表位表现出单一结合特异性和亲和力的抗体。因此,术语“人单克隆抗体”是指表现出单一结合特异性并且具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和任选的恒定区的抗体。在一个实施方式中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,杂交瘤包括与永生化细胞融合的获自转基因非人动物(例如,转基因小鼠)的具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的B细胞。

[0081] 如本文所用,术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、创造或分离的所有人抗体,例如(a)从转基因或转染色体有人免疫球蛋白基因的动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体,(b)从经转化成表达抗体的宿主细胞(例如从转染瘤)中分离的抗体,(c)从重组的组合的人抗体文库中分离的抗体,和(d)通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他手段制备、表达、创造或分离的抗体。这样的重组人抗体包含可变区和恒定区,其利用由种系基因编码的特定的人种系免疫球蛋白序列,但是包括随后的在例如抗体成熟期间发生的重排和突变。如本领域中已知的(参见,例如,Lonberg (2005) Nature Biotech.23(9):1117-1125),可变区包含抗原结合域,其由多种基因所编码,所述基因重排以形成对外源抗原特异的抗体。除重排外,可以通过多个单氨基酸变化(称为体细胞突变或超突变)进一步修饰可变区,以增加抗体与外源抗原的亲和力。恒定区将在对抗原的进一步应答中发生改变(即同种型转换)。因此,在应答抗原中时编码轻链和重链免疫球蛋白多肽的重排和体细胞突变的核酸分子可以不与原始核酸分子具有序列同一性,而相反地会是基本上相同或相似(即,具有至少80%的同一性)。

[0082] 术语“人源抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如有的话)的抗体。本发明的人源抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,由体外随机或定点诱变或由体内体细胞突变引入的突变)(参见,Lonberg,N.et al. (1994) Nature 368(6474):856-859);Lonberg,N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg,N.and Huszar,D. (1995) Intern.Rev.Immunol.Vol.13:65-93;以及Harding,F.and Lonberg,N. (1995) Ann.N.Y.Acad.Sci 764:536-546)。然而,术语“人源抗体”不包括将源自其他哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的CDR序列嫁接到人框架序列的抗体(即,嵌合的和人源化的抗体)。

[0083] “人源化的”抗体是指将非人源抗体CDR结构域外的一些、大多数、或所有氨基酸替换成人免疫球蛋白来源的对应氨基酸的抗体。在抗体的人源化形式的一个实施方式中,CDR结构域外的一些、大多数、或所有氨基酸已替换成人免疫球蛋白来源的氨基酸,而在一个或多个CDR结构域内的一些、大多数、或所有氨基酸不变。只要不破坏抗体对特定抗原的结合能力,对氨基酸进行小的添加、删除、插入、替换或修饰是允许的。“人源化的”抗体保留有与原始抗体相似的抗原特异性。

[0084] 如本文所用,“分离的抗体”意指基本上不含其他具有不同抗原特异性的抗体的抗体(例如,特异性结合人ILT4的分离的抗体基本上不含与除人ILT4以外的抗原特异性结合

的抗体;特异性结合人PD-1的分离的抗体基本上不含与除人PD-1以外的抗原的特异性结合抗体)。然而,特异性结合表位的分离的抗体可以对来自不同物种的相同抗原有交叉反应性。另外,分离的抗体通常基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0085] 术语“表位”或“抗原决定簇”指抗原上由免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。表位可以由连续氨基酸或由通过蛋白质三级折叠而并在一起的不连续氨基酸形成。当暴露于变性溶剂时,由连续氨基酸形成的表位通常会保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时会丢失。表位通常包括以独特空间构型存在的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。确定给定抗体结合哪些表位的方法(即表位作图)是本领域周知的,并且包括,例如免疫印迹和免疫沉淀测定法,其中检测抗原(例如ILT4或PD-1)上重叠或连续的肽与给定抗体(例如,ILT4或抗PD-1抗体)的反应性。用于确定表位的空间构象的方法包括本领域的技术和本文中所述的那些,例如X射线晶体学和2-维核磁共振(参见,例如, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol.66, G.E.Morris, Ed. (1996))。

[0086] 术语作为另一抗体的“结合相同表位的抗体”旨在涵盖与参照ILT4抗体相互作用于,即结合于人ILT4上相同的结构区域的抗体。抗体结合的“相同表位”可以是线性表位或通过抗原三级折叠形成的构象表位。

[0087] 术语“竞争性抗体”是指与参照ILT4抗体竞争结合人ILT4的抗体,即竞争性地抑制参照ILT4抗体与ILT4结合的抗体。“竞争性抗体”可以与参照ILT4抗体结合在ILT4的相同表位上,可以结合于重叠表位或在空间上阻碍参照ILT4抗体与ILT4的结合。

[0088] 可以使用常规技术鉴定出识别相同表位或竞争结合的抗体。这样的技术包括例如免疫测定,其显示出一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力,即竞争性结合测定。在测定中确定竞争性结合,其中测试中的免疫球蛋白抑制参照抗体与共同抗原(例如ILT4)的特异性结合。已知多种类型的竞争性结合测定,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983));固相直接生物素-亲和素EIA(参见Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986));固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988));使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988));固相直接生物素-亲和素EIA(Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990));以及直接标记RIA(Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990))。通常地,这些测定涉及使用纯化的与带有未标记的测试免疫球蛋白以及标记的参照免疫球蛋白中的任一固体表面或细胞结合的抗原。在测试免疫球蛋白的存在下,通过确定结合至固体表面或细胞的标记物的量来测量竞争抑制。通常而言,测试免疫球蛋白过量存在。一般而言,当竞争性抗体过量存在时,会对参照抗体与共同抗原的特异性结合抑制至少50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或更多。

[0089] 其他技术包括,例如,表位作图法,例如对抗原:抗体复合物的晶体的X射线分析,其提供表位的原子级分辨率。其他方法监测抗体与抗原片段或突变抗原变体的结合,其中由于抗原序列内氨基酸残基的变化而导致的结合丧失,通常被认为是对表位组成部分的指示。另外,也可以使用用于表位作图的计算组合方法。这些方法依赖于目标抗体从组合噬菌

体展示肽文库中亲和分离出特定短肽的能力。然后将此肽视为对应于用于肽文库筛选的抗体定义表位的先导物。对于表位作图,还开发了计算机算法,其已显示出可定位构象不连续表位。

[0090] 如本文所用,术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体与预定抗原上的表位结合。一般而言,当在BIAcore 2000仪器中通过表面等离子体共振 (SPR) 技术确定 (例如,使用重组人ILT4作为分析物且抗体作为配体) 时,抗体以约低于 10^{-7} M,例如约低于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的平衡解离常数 (K_D) 结合,并以至少比结合除预定抗原外的非特定抗原 (例如,BSA、酪蛋白) 或紧密相关的抗原高出至少两倍的亲和力与预定抗原结合。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特定的抗体”在本文中与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0091] 如本文所用,术语“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。一般而言,当在BIAcore 2000仪器中通过表面等离子体共振 (SPR) 技术确定 (例如,使用重组人ILT4作为分析物且抗体作为配体) 时,本发明的人源抗体以约 10^{-8} M或更低,例如低于 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的解离平衡常数 (K_D) 结合ILT4。

[0092] 如本文所用,术语“ k_d ”意指抗体从抗体/抗原复合物上解离的脱离速率常数。

[0093] 如本文所用,术语“ k_a ”意指抗体与抗原结合的结合速率常数。

[0094] 如本文所用,术语“ EC_{50} ”是指在体外或体内测定中诱导最大应答50%,即最大应答与基线的中间,的应答的抗体或其抗原结合部分的浓度。

[0095] 如本文所用,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别 (例如,IgM或IgG1)。在一个实施方式中,本发明的人源单克隆抗体是IgG1同种型。在另一个实施方式中,本发明的人源单克隆抗体是IgG2同种型。

[0096] 如本文所用,术语“抑制”或“阻断” (例如,指抑制/阻断HLA-G配体与ILT4和/或PD1与PD-L1配体的结合) 可互换使用,并且涵盖部分和完全的抑制/阻断两者。抑制/阻断优选地降低或改变当结合发生而没有抑制或阻断时产生的正常的活性水平或类型。抑制和阻断还意在包括,与不接触ILT4结合域、抗体或其部分的HLA-G相比,与ILT4结合域、抗体或其部分接触时的HLA-G的结合亲和力的任何可测的降低,例如,将HLA-G结合至少抑制约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一个实施方式中,ILT4结合域将HLA-G结合抑制至少约70%。在另一个实施方式中,ILT4结合域将HLA-G结合抑制至少80%。抑制和阻断还意在包括,与不接触PD-L1结合域、抗体或其部分的PD-1相比,与PD-L1结合域、抗体或其部分接触时PD-1的结合亲和力的任何可测的降低,例如,将PD-1结合抑制至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一个实施方式中,PD-1结合域将PD1结合抑制至少约70%。在另一个实施方式中,PD-1结合域将PD1结合抑制至少80%。

[0097] 如本文所用,术语“交叉反应”是指本发明的ILT4结合域、抗体或其部分,或PD-1结合域、抗体或其部分,分别结合来自不同物种的ILT4或PD-1的能力。例如,结合人ILT4的本发明的ILT4结合域也可以结合另一物种的ILT4。类似地,结合人PDv1的本发明的PD-1结合域也可以结合另一物种的PD-1。如本文所用,交叉反应性通过在结合测定 (例如,SPR、ELISA) 中检测与纯化抗原的特异性反应性,或通过检测与生理上表达ILT4的细胞结合、或

功能性相互作用,来测量。用于确定交叉反应性的方法包括本文所述的标准结合测定,例如,通过使用Biacore™ 2000 SPR仪器(Biacore AB,Uppsala,Sweden)的Biacore™表面等离子体共振(SPR)分析、或流式细胞计数技术。

[0098] 如本文所用,术语“天然存在”,当用于一种目标物时,是指该目标物可以在自然界中找到的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中、可从天然的来源中分离、且未被人在实验室中故意修饰的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0099] 如本文所用,术语“核酸分子”意在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。

[0100] 如本文所用,术语“分离的核酸分子”,当与编码结合ILT4和/或PD-1的结合域、抗体或其部分(例如, V_H 、 V_L 、CDR3)的核酸分子相关时,意指编码结合域、抗体、或部分的核苷酸序列不含编码结合除ILT4和/或PD-1以外的抗原的结合域、抗体、或部分的其他核苷酸序列的核酸分子,其中该其他序列可以天然地位于人基因组DNA中核酸的侧翼。

[0101] 核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解物,或以部分纯化或基本纯的形式存在。当通过标准技术,包括碱/SDS处理、CsCl显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域公知的其他技术,从其他细胞成分或其他污染物(例如,其他细胞核酸或蛋白)中纯化出时,核酸为“分离的”或“成为基本纯的”。参见F.Ausubel,et al.,ed.Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York(1987)。

[0102] 本发明的核酸分子,尽管通常为来自于cDNA、基因组或其混合物的天然序列(除修饰的限制性酶切位点等以外),可以根据提供基因序列的标准技术进行突变。对于编码序列,这些突变可以按照所希望地影响氨基酸序列。具体地,考虑与如本文所述的天然V、D、J、恒定、交换序列和其他此类序列基本上相同或来源于此的DNA序列(其中“来源于”表示序列与另一序列相同或由另一序列修饰而来)。

[0103] 当核酸与另一核酸序列处于功能关系时,该核酸是“可操作地连接”的。例如,启动子或增强子可操作地连接至编码序列,如果其影响序列的转录。关于转录调节序列,可操作地连接意指被连接的DNA序列是连续的,并且必须连续地且在阅读框内连接两个蛋白质编码区。对于开关序列,可操作地连接表示序列能够影响交换重组。

[0104] 本发明还涵盖对本文所述的任何序列的“保守序列改动”,即核苷酸和氨基酸序列的不消除由该核苷酸序列编码的或包含该氨基酸序列的 V_H 和 V_L 序列与抗原的结合的改变。这样的保守序列改动包括保守的核苷酸和氨基酸取代,以及核苷酸和氨基酸的添加和缺失。例如,可以通过本领域已知的标准技术(例如,定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入到序列。保守氨基酸取代包括氨基酸残基由具有相似侧链的氨基酸残基所替代的取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域中已经明确。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸)、 β 支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,ILT4结合域中预测的非必需氨基酸残基优选由来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸的保守取代的方法是本领域公知的(参见,例如,Brummell et al.,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi et al.ProteinEng.12

(10):879-884(1999);和Burks et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。

[0105] 在某些实施方式中,保守氨基酸序列改变是指对本文所述CDR序列的最多1、2、3、4或5个保守氨基酸取代。例如,每个这样的CDR可包含最多5个保守氨基酸取代,例如,最多(即不多于)4个保守氨基酸取代,例如最多(即不多于)3个保守氨基酸取代,例如,最多(即不多于)2个保守氨基酸取代,或不多于1个保守氨基酸取代。

[0106] 或者,在另一个实施方式中,可以,例如通过饱和诱变,沿着ILT4或PD-1结合域、抗体或其部分的编码序列的全部或部分随机引入突变,可以对所得的改变的ILT4或PD-1结合域、抗体或部分筛选结合活性。

[0107] 对于核酸,术语“基本同源性”表示在最佳比对和比较时,使用合适的核苷酸插入或缺失,两个核酸或其指定的序列的至少约80%核苷酸,通常至少约90%至95%,更优选至少约98%至99.5%核苷酸是相同的。或者,当片段在选择性杂交条件下与互补链杂交时,存在基本同源性。

[0108] 对于氨基酸,术语“基本同源性”表示在最佳比对和比较时,使用合适的氨基酸插入或缺失,两个氨基酸序列或其指定序列的至少约80%氨基酸,通常至少约90%至95%,更优选地至少约98%至99%或99.5%氨基酸是相同的。

[0109] 两个序列间的百分比同一性是由序列共享的相同位置的数量的函数(即,%同源性=相同位置的#/位置的总#x 100),将空位的数量和各空位的长度考虑在内,需要引入空位以实现两个序列的最佳比对。序列的比较和两个序列之间百分比同一性的确定可以使用数学算法来完成,如在以下非限制性实施例中所所述的。

[0110] 两个核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用GCG软件包(可在<http://www.gcg.com>获得)的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、60、70或80的空位权重以及1、2、3、4、5或6的长度权重来确定。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性也可以使用已并入ALIGN程序(2.0版)的E.Meyers和W.Miller(CABIOS,4:11-17(1989))的算法,使用PAM120权重残基表,空位长度罚分12和空位罚分4来确定。此外,两个氨基酸序列序列之间的百分比同一性可以使用已并入GCG软件包(可在www.gcg.com获得)的GAP程序的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及16、14、12、10、8、6或4的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重来确定。

[0111] 本发明的核酸和蛋白质序列可进一步用作“查询序列”,以针对公共数据库进行搜索,以例如鉴定相关序列。这样的搜索可以使用Altschul,et al.(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行。BLAST核苷酸搜索可以使用NBLAST程序(分值=100,字长=12)进行以获得与本发明的核酸分子相同的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可使用XBLAST程序进行(分值=50,字长=3),以获得与本发明的蛋白分子相同的氨基酸序列。为获得有空位的比对,以用于比较的目的,可使用如Altschul et al.,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402所述的空位BLAST。当使用BLAST和空位BLAST程序时,可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST)的缺省参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0112] ILT4结合域

[0113] 本文提供新的双特异性构建体,其包含ILT4结合域,例如源自抗体(例如人源化抗体)的结合域,其特征为特定的功能特征或特性。例如,本发明的该结合域呈现出一种或多种下述特性:

- [0114] a. 阻断ILT4配体(例如,HLA-G配体)与人ILT4的结合;
- [0115] b. 增强或增加人巨噬细胞的细胞因子或趋化因子释放;
- [0116] c. 增强LPS和IFN γ 对巨噬细胞的活化作用;
- [0117] d. 促进M1巨噬细胞极化;
- [0118] e. 以 10^{-9} M或更低的平衡解离常数 K_d ,或者,以 10^{+9} M $^{-1}$ 或更高的平衡结合常数 K_a 与人ILT4结合;
- [0119] f. 没有与其他ILT家族成员的交叉反应;
- [0120] g. 与猴ILT4的交叉反应;和/或
- [0121] h. 抑制表达ILT4的肿瘤细胞。
- [0122] 在一个实施方式中,ILT4结合域源自本文所述的抗体7A3。例如,ILT4结合域包含抗体7A3的重链和轻链CDR或可变区。在另一个实施方式中,结合域包含具有SEQ ID NO:9所示序列的抗体7A3重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:10所示序列的抗体7A3轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方式中,结合域包含分别具有SEQ ID NOs:1、3和5所示序列或其保守序列改动的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NOs:6、7和8所示序列或其保守序列改动的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。或者,结合域包含分别具有SEQ ID NOs:2、4和5所示序列或其保守序列改动的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有如SEQ ID NOs:6、7和8所示序列或其保守序列改动的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方式中,结合域包含具有SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的重链可变区。在另一个实施方式中,结合域包含具有SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的轻链可变区。例如,ILT4结合域包含具有如SEQ ID NO:9和10所示氨基酸序列的重链和轻链可变区。
- [0123] 另一示例性ILT4结合域源自本文所述的抗体7B1。在一个实施方式中,ILT4结合域包含抗体7B1的重链和轻链CDR或可变区。在另一个实施方式中,结合域包含具有SEQ ID NO:19所示序列的抗体7B1重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:20所示序列的抗体7B1轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方式中,结合域包含分别具有SEQ ID NOs:11、13和15所示序列或其保守序列改动的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NOs:16、17和18所示序列或其保守序列改动的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。或者,结合域包含分别具有SEQ ID NOs:12、14和15所示序列或其保守序列改动的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NOs:16、17和18所示序列或其保守序列改动的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方式中,结合域包含具有SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的重链可变区。在另一个实施方式中,结合域包含具有SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的轻链可变区。例如,结合域包含具有如SEQ ID NO:19和20所示氨基酸序列的重链和轻链可变区。
- [0124] ILT4结合域也可以是抗体7B1和7A3的共有序列。例如,在一个实施方式中,ILT4结合域包含含有选自共有序列G Y T(I,M)H(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链可变区CDR1。在另一个实施方式中,ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:3的重链可变区CDR2。在另一个实施方式中,ILT4结合域包含含有选自共有序列E R P G G S Q F I Y Y Y(P,A)(M,L)D Y(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的重链可变区CDR3。在另一个实施方式中,ILT4结合域包含含有选自共有序列R A S(A,E)N I Y S Y L A(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列的轻链可变区

CDR1。在另一个实施方式中,ILT4结合域包含含有选自共有序列N A(I,D) T L A E(SEQ ID NO:24)的氨基酸序列的轻链可变区CDR2。在另一个实施方式中,ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:8的轻链可变区CDR3。

[0125] 鉴于每种所述抗体均可与人ILT4结合,因此可以“混合和匹配”本文所述的 V_H 和 V_L 序列,以创建多种ILT4结合域。这些“混合和匹配”的结合域与人ILT4的结合可使用本领域已知并且在实施例中描述(例如,ELISA)的结合测定法测试。例如,本发明的ILT4结合域包括本文所述的7B1和7A3抗体重链和轻链可变区序列的组合。

[0126] 还提供与本文所述的ILT4结合域基本上相同的序列(例如,与前述序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列)。例如,在一个实施方式中,ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:9、19或与其至少80%同一性(例如,与前述序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列的重链可变区。在另一个实施方式中,ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:10、20或与其至少80%同一性(例如,与前述序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列的轻链可变区。在另一个实施方式中,ILT4结合域包含(a)含有SEQ ID NO:9、19或与其至少80%同一性(例如,与前述序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列的重链可变区;以及(b)含有SEQ ID NO:10、20或与其至少80%同一性(例如,与前述序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列的轻链可变区。例如,ILT4结合域包含SEQ ID NO:9或与其至少80%同一性(例如,与其至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列,以及SEQ ID NO:19或与其至少80%同一性(例如,与其至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列。或者,ILT4结合域包含SEQ ID NO:10或与其至少80%同一性(例如,与其至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列,以及SEQ ID NO:20或与其至少80%同一性(例如,与其至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列。

[0127] 在一个实施方式中,ILT4结合域包含分别如SEQ ID NOs:1、3和5所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:6、7和8所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3。或者,ILT4结合域包含分别如SEQ ID NOs:2、4和5所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:6、7和8所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3。在另一个实施方式中,ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区和含有SEQ ID NO:19的轻链可变区,或与其至少80%同一性(例如,至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列。

[0128] 在另一个实施方式中,ILT4结合域包含分别如SEQ ID NOs:11、13和15所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:16、17和18所示的轻链可变区CDR1、CDR2

和CDR3。或者,ILT4结合域包含分别如SEQ ID NOs:12、14和15所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:16、17和18所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3。在另一个实施方式中,ILT4结合域包含含有SEQ ID NO:10的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的轻链可变区,或与前述序列至少80%同一性(例如,至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列。

[0129] PD-1结合域

[0130] 本文提供与本发明的ILT4结合域一起使用(例如,在双特异性构建体中)的PD-1结合域,以及治疗方法。这些PD-1结合域源自抗体,例如人源化抗体。示例性PD-1抗体包括抗体E1A9C8A7-V8-3(本文又称抗体“E1A9”)和抗体E1A9C8A7-V8,如本文所述的。

[0131] 在一个实施方式中,PD-1结合域包含抗体E1A9的重链和轻链CDR或可变区。在另一个实施方式中,结合域包含具有SEQ ID NO:59或61所示序列的抗体E1A9重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:60或62所示序列的抗体E1A9轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方式中,结合域包含分别具有SEQ ID NOs:31、36和41所示序列或其保守序列改动的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NOs:46、51和56所示序列或其保守序列改动的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。或者,结合域包含分别具有SEQ ID NOs:69、74和79所示序列或其保守序列改动的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NOs:84、89和94所示序列或其保守序列改动的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[0132] 在另一个实施方式中,结合域包含具有SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:61所示氨基酸序列的重链可变区。在另一个实施方式中,结合域包含具有SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:62所示氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方式中,结合域包含分别具有SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:60所示氨基酸序列的重链和轻链可变区。或者,结合域包含分别具有SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62所示氨基酸序列的重链和轻链可变区。

[0133] 本发明还包含与本文所述的PD-1结合域基本上相同(例如,与前述序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列。在一个实施方式中,PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61或与其至少90%同一性(例如,与前述序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列的重链可变区。在另一个实施方式中,PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62或与其至少90%同一性(例如,与前述序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列的轻链可变区。在另一个实施方式中,PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:59的重链可变区和SEQ ID NO:60的轻链可变区,或与其至少90%同一性(例如,与前述序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列。

[0134] 在另一个实施方式中,PD-1结合域包含分别如SEQ ID NOs:31、36和41所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别如SEQ ID NOs:46、51和56所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3。在另一个实施方式中,PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:59的重链可变区和含有SEQ ID NO:60的轻链可变区,或与其至少90%同一性(例如,与前述序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列)的序列。

[0135] 在另一个实施方式中,PD-1结合域包含分别如SEQ ID NOs:69、74和79所示的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,和分别如SEQ ID NOs:84、89和94所示的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3。在另一个实施方式中,PD-1结合域包含含有SEQ ID NO:61的重链可变区和含有SEQ ID NO:62的轻链可变区,或与其至少90%同一性(例如,与前述序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的序列。

[0136] 在另一个实施方式中,PD-1结合域具有一种或多种下述功能特征:(a)阻断PD-1与PD-L1结合(例如,部分地或完全地)(b)诱导NFAT通路激活,和/或(c)诱导混合淋巴细胞反应。

[0137] 双特异性构建体

[0138] 双特异性构建体可以根据多种方法制备,如结合两个现有的结合域,融合两个杂交瘤细胞系形成一个四源杂交瘤(Jain et al.(2007)*Trends in Biotechnology* 25(7), 307-316)或使用基因改造的重组蛋白(Kontermann(2012)*Dual targeting strategies with bispecific antibodies*.mAbs 4(2),182-197)。

[0139] 就化学结合而言,用于将两个或更多个结合域(例如,两个或更多个抗体或其片段)结合在一起的适宜试剂和方法是本领域所已知的。多种结合或交联试剂是市售可得,可用于结合ILT4结合域和PD-1结合域。非限制性实例包括Sulfo-SMC、蛋白A、碳二亚胺、二马来酰亚胺、二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)和N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸盐(SPDP)。Sulfo-SMCC、SPDP和DTNB是优选试剂,最优选Sulfo-SMCC。用交联剂交联组分(例如,抗体或其抗原结合片段)的其他合适程序是本领域已知的。参见例如,Karpovsky,B.et al.,(1984)*J.Exp.Med.*160:1686;Liu,M.A.et al.,(1985)*Proc.Natl.Acad.Sci USA* 82: 8648;Segal,D.M.and Perez,P.,U.S.Pat.No.4,676,980;以及Brennan,M.(1986)*Biotechniques* 4:424。

[0140] 对于基因工程化,可以使用标准重组DNA技术将编码ILT4结合域的核酸分子插入适当的表达载体中。也可以将编码PD-1结合域的核酸分子插入到相同的表达载体,从而使其与ILT4结合域可操作地连接(例如,框内克隆),从而产生编码为双特异性构建体的融合蛋白的表达载体。优选地,ILT4结合域可操作地连接至PD-1结合域的重链的C端区域。在另一个实施方式中,PD-1结合域可操作地连接至ILT4结合域的重链的C端区域。用于制备本文所述双特异性构建体的其他合适的表达载体和克隆策略是本领域已知的。

[0141] 为在宿主细胞中表达双特异性构建体,将结合域的编码区与克隆的启动子、前导序列、翻译起始序列、前导序列、恒定区、3'非翻译、聚腺苷酸化、和转录终止序列组合,以形成表达载体构建体。这些构建体可用于表达例如全长人IgG₁κ或IgG₄κ抗体。用在本文所述双特异性构建体中的全人、人源化和嵌合抗体,还包括IgG2、IgG3、IgE、IgA、IgM和IgD抗体。可以构建相似的质粒用于其他重链同种型的表达,或用于含λ轻链抗体的表达。

[0142] 在制备编码双特异性构建体的表达载体后,双特异性构建体可使用标准转染方法,在宿主细胞中重组表达。例如,在一个实施方式中,编码双特异性构建体的核酸可以连入表达载体例如真核表达质粒中,例如在W087/04462、W089/01036和EP338841中公开的GS基因表达系统或本领域公知的其他表达系统所使用的。可以将具有克隆的双特异性构建体基因的纯化质粒导入真核宿主细胞,例如CHO细胞或NS0细胞,或者导入其他真核细胞,如植物来源的细胞、真菌或酵母细胞。用于导入这些基因的方法可以是本领域中描述的方法,例

如电穿孔、脂转染(lipofectin),脂质体转染(lipofectamine)或其他。将表达载体导入宿主细胞后,可以识别并选择表达双特异性构建体的细胞。这些细胞表示转染瘤,其在之后可以对其表达水平进行扩大并放大规模以产生双特异性构建体。或者,这些克隆的双特异性构建体可以在其他表达系统中表达,例如大肠杆菌或在完整的生物体中,或者可以合成表达。可以从这些培养上清液和/或细胞中分离和纯化重组双特异性构建体。

[0143] 本发明的双特异性构建体,无论是通过化学结合还是遗传工程化制备的,都可以使用本领域中已良好建立的用于蛋白质纯化的一种或多种方法学来分离和纯化。用于分离和纯化的优选方法包括,但不限于,凝胶过滤色谱法、亲和色谱法、阴离子交换色谱法等。特别优选的方法是凝胶过滤色谱法,例如使用Superdex 200柱。分离的和纯化的双特异性构建体可以使用标准方法如SDS-PAGE分析进行评价。

[0144] 因此,在一个实施方式中,ILT4结合域和PD-1结合域是基因融合的。在另一个实施方式中,ILT4结合域和PD-1结合域是化学结合的。在一个实施方式中,PD-1结合域还包含人IgG1恒定结构域。在另一个实施方式中,ILT4结合域与PD-1结合域的重链的C端连接。在另一个实施方式中,ILT4结合域是scFv。在另一个实施方式中,ILT4结合域还包含人IgG1恒定结构域。在另一个实施方式中,PD-1结合域与ILT4结合域的重链的C端连接。在另一个实施方式中,PD-1结合域是scFv。

[0145] 本文还提供包含与前述ILT4和PD-1结合域序列(即,CDR和可变区序列)基本相同的序列(例如,具有保守序列改动的序列和/或与前述序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列)的双特异性构建体。例如,在一个实施方式中,PD-1结合域和ILT4 scFv包含分别如SEQ ID NOs:64和63所示的重链和轻链序列。在另一个实施方式中,PD-1结合域和ILT4 scFv重链及轻链分别由SEQ ID NOs:66和65所示的核苷酸序列编码。

[0146] 在另一个实施方式中,双特异性构建体展现出下述一种或多种特性:

[0147] a. 阻断ILT4配体(例如,HLA-G配体)与人ILT4结合;

[0148] b. 增强或增加人巨噬细胞的细胞因子或趋化因子释放;

[0149] c. 增强LPS和IFN γ 对巨噬细胞的活化作用;

[0150] d. 促进M1巨噬细胞极化;

[0151] e. 以 10^{-9} M或更低的平衡解离常数 K_d ,或者,以 10^{+9} M $^{-1}$ 或更高的平衡结合常数 K_a 与人ILT4结合;

[0152] f. 没有与其他ILT家族成员的交叉反应;

[0153] g. 与猴ILT4的交叉反应;

[0154] h. 抑制表达ILT4的肿瘤细胞;和/或

[0155] i. 与分开的抗体的组合相比,增强MLR活性。

[0156] 组合物

[0157] 本文还提供组合物,例如包含本文所述双特异性构建体的组合物,其与载体(例如,药学上可接受的载体)配制在一起。

[0158] 如本文所用,术语“载体”和“药学上可接受的载体”包括任何和所有生理上相容的溶剂、盐、分散介质、包被剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂。优选地,载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如,通过注射或输注)。根据施用途径的不

同,活性化合物(即,本文所述的任何双特异性构建体或组合物)可包被在材料中以保护化合物免受酸和其他可使化合物失活的自然条件的作用。

[0159] 可与此处所述的双特异性构建体以及组合物一起使用的佐剂的实例包括,但不限于:弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Difco Laboratories,Detroit,Mich.);默克佐剂65(Merck and Company,Inc.,Rahway,NJ);AS-2(SmithKline Beecham,Philadelphia,Pa.);铝盐,例如氢氧化铝凝胶(铝)或磷酸铝;钙、铁或锌的盐;酰化酪氨酸的不溶性悬液;酰化糖;阳离子或阴离子衍生的多糖;聚磷腈;可生物降解的微球;细胞因子,例如GM-CSF、白介素-2、-7、-12,和其他类似因子;3D-MPL;CpG寡核苷酸;和单磷酸基脂质A,例如3-脱-O-酰化单磷酸基脂质A。

[0160] MPL佐剂可从Corixa公司(Seattle,Wash;参见,例如,美国专利号4,436,727;4,877,611;4,866,034和4,912,094)获得。含CpS的寡核苷酸(其中CpG二核苷酸是未甲基化的)是公知的,并且描述于例如W096/02555,W099/33488和美国专利号6,008,200和5,856,462。免疫刺激性DNA序列也描述于例如Sato et al.,Science 273:352,1996。

[0161] 其他可选的佐剂包括,例如,皂苷(例如QuilA)或其衍生物,包括QS21和QS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc.,Framingham,MA);七叶素(Escin);洋地黄皂苷;或满天星或藜麦皂苷;Montanide ISA 720(Seppic,France);SAF((Chiron,California,United States);ISCOMS(CSL)、MF-59(Chiron);SBAS系列佐剂(例如SBAS-2或SBAS-4,可获自SmithKline Beecham,Rixensart,Belgium);Detox(Enhancyn™)(Corixa,Hamilton, Mont.);RC-529(Corixa,Hamilton, Mont.)和其他氨基烷基氨基葡萄糖苷4磷酸酯(AGP);聚氧乙烯醚佐剂,例如W099/52549A1中所述的那些;合成的咪唑喹啉,例如咪唑莫特[S-26308,R-837](Harrison,et al.,Vaccine 19:1820-1826,2001);和瑞喹莫德(Resiquimod)[S-28463,R-848](Vasilakos,et al.,Cellular immunology 204:64-74,2000);在抗原提呈细胞和T细胞表面上组成性表达的羧基和胺的希夫碱,例如妥卡雷琐(Rhodes,J.et al.,Nature 377:71-75,1995);细胞因子、趋化因子和共刺激分子,作为蛋白质或肽,包括例如促炎性细胞因子(例如干扰素、GM-CSF、IL-1 α 、IL-1 β 、TGF- α 和TGF- β),Th1诱导剂(例如干扰素 γ 、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21),Th2诱导剂(例如IL-4、IL-5、IL-6、IL-10和IL-13)以及其他趋化因子和共刺激基因(例如MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TCA-3、CD80、CD86和CD40L);靶向配体(例如CTLA-4和L-选择素)的免疫刺激剂,细胞凋亡刺激蛋白和多肽(例如Fas);基于合成脂质的佐剂(例如vaxfectin(Reyes et al.,Vaccine 19:3778-3786,2001)、角鲨烯、 α -生育酚、聚山梨醇酯80、DOPC和胆固醇);内毒素、[LPS]、(Beutler,B.,Current Opinion in Microbiology 3:23-30,2000);触发Toll受体产生Th1诱导细胞因子的配体(例如合成的分枝杆菌脂蛋白、分枝杆菌蛋白p19、肽聚糖、磷壁酸和脂质A);和CT(霍乱毒素,亚基A和B)和LT(来自大肠杆菌的热不稳定肠毒素,亚基A和B),热休克蛋白家族(HSP)和LL0(李斯特菌溶血素O;W001/72329)。这些和多种其他的Toll样受体(TLR)激动剂描述于例如Kanzler et al,Nature Medicine,May2007,Vol 13,No 5。

[0162] “药学上可接受的盐”是指保留有亲本化合物的所希望生物活性并且不赋予任何不希望的毒理学作用的盐(参见例如,Berge,S.M.,et al.(1977)J.Pharm.Sci.66:1-19)。这样的盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸,例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等的那些,以及衍生自无毒有机酸,例如脂肪一元和

二元羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香酸、脂肪族和芳香族磺酸等的那些。碱加成盐包括衍生自碱土金属(例如钠、钾、镁、钙等),以及无毒有机胺(例如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等)的那些。

[0163] 本发明的组合物可以通过本领域已知的多种方法施用。本领域技术人员会意识到,施用的途径和/或模式会根据所希望的结果而变化。可以用保护化合物免于快速释放的载体来制备活性化合物,例如控释制剂,包括植入物、经皮贴剂和微囊递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容性聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的许多方法已获得专利或通常为本领域技术人员所知。参见,例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0164] 为通过某些施用途施用本发明的化合物,有可能有必要用防止其失活的材料包被该化合物或与该化合物共同施用。例如,可以将化合物在合适的载体例如脂质体或稀释剂中施用于受试者。可接受的稀释剂包括盐溶液和水性缓冲液。脂质体包括水包油包水型CGF乳剂以及常规脂质体(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

[0165] 载体包括无菌水溶液或分散液以及用于即刻制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。这种介质和试剂在药物活性物质中的使用是本领域已知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则可考虑将其用于本发明的药物组合物中。补充的活性化合物也可并入组合物中。

[0166] 治疗组合物通常必须是无菌的且在制造和储存条件下是稳定的。可以将组合物配制成溶液、微乳剂、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用包衣例如卵磷脂,通过在分散液的情况下维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,会优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇,山梨糖醇)或氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶,可以给可注射组合物带来延长吸收。

[0167] 无菌注射液可通过将所需量的活性化合物并入含有上述成分的一种或组合(所需)的适当溶剂中,然后进行灭菌微滤来制备。通常,通过将活性化合物并入包含基本分散介质和来自上文列举的那些的其他所需成分的无菌载体,来制备分散体。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其从其先前无菌过滤的溶液中得到得到活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0168] 调整剂量方案以提供最佳期望应答(例如治疗应答)。例如,可以施用单次剂量,可以随时施用几个分开的剂量,或者如治疗情况的紧急程度所指示的,可以按比例减少或增加剂量。例如,本发明的双特异性构建体(以及组合物)可以皮下或肌肉注射,每周一次或两次,或者皮下或肌肉注射,每月一次或两次。

[0169] 为方便施用和剂量均一,以剂量单位形式配制肠胃外组合物是特别有利的。如本文所用,剂量单位形式是指适合作为对于待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定量的活性化合物,经计算可与所需的药物载体一起产生所希望的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格受到以下因素的支配或取决于以下因素:(a) 活性化合物的独特特征和要实现的特定治疗效果、以及(b) 将活性化合物制成用于个体敏感性治疗的

固有局限性。

[0170] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括：(1) 水溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等；(2) 油溶性抗氧化剂，例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚 (BHA)、丁羟甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等；(3) 金属螯合剂，例如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0171] 对于治疗组合物，本发明的制剂包括适用于经口、经鼻、局部 (包括颊部和舌下)、经直肠、经阴道和/或肠胃外施用的那些。制剂可以方便地以单位剂型存在并且可以通过药学领域中已知的任何方法制备。可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的受试者和特定的施用方式而变化。可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常会为产生治疗效果的组合物的量。通常，在百分之一百中，该量将是约 0.001% 至约 90%，优选为约 0.005% 至约 70%，最优选为约 0.01% 至约 30% 的活性化合物。

[0172] 适用于阴道施用的本发明的制剂还包括含有本领域已知合适的载体的阴道栓剂、棉条、膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂。用于本发明的组合物的局部或经皮施用的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。可以在无菌条件下将活性化合物与药学上可接受的载体以及可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0173] 本文所用的短语“肠胃外施用”和“经肠胃外施用”是指除肠内和局部施用以外的施用方式，通常通过注射，并且包括，但不限于，静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0174] 可以在本发明的药物组合物中使用的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇 (例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等) 及其合适的混合物，植物油例如橄榄油，和可注射的有机酯，例如油酸乙酯。例如可以通过使用包衣材料，例如卵磷脂，通过在分散液的情况下保持所需的粒径，以及通过使用表面活性剂，来保持适当的流动性。

[0175] 这些组合物还可包含佐剂，例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可以通过灭菌程序 (参照前文) 以及通过包含多种抗菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等，来确保防止微生物的存在。还可能需要在组合物中包括等渗剂，例如糖、氯化钠等。另外，可通过包含延迟吸收的试剂 (例如单硬脂酸铝和明胶) 而给注射药物形式带来延长的吸收。

[0176] 当本发明的化合物作为药物施用于人和动物时，它们可以单独给药，或作为含有例如 0.001 至 90% (更优选 0.005 至 70%，例如 0.01 至 30%) 的活性成分以及药学上可接受的载体的药物组合物而给药。

[0177] 不管选择的施用途径如何，可以以合适的水合形式使用的本发明化合物和/或本发明的药物组合物，可以通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。

[0178] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以变动，以获得相对于特定患者、组合物和施用方式有效实现所期望的治疗应答，而不对患者存在毒性的活性成分的量。所选的剂量水平将取决于多个药代动力学因素，包括本发明所用的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性，施用途径，施用时间，所用的特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与所

用的特定组合物结合使用的其他药物、化合物和/或材料,年龄,性别,体重,病况,一般健康状况和所治疗患者的既往病史等医学领域公知的因素。具有本领域普通技术的医师或兽医可以容易地确定和开出所需药物组合物的有效量。例如,医师或兽医可以在药物组合物中以低于获得所希望的治疗效果的水平开始施用本发明的化合物,并逐渐增加剂量直至获得所希望的效果。一般地,本发明的组合物的合适日剂量会是作为有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。这样的有效剂量通常取决于上述因素。优选以静脉内、肌内、腹膜内或皮下施用,优选在靶标部位附近施用。如果需要的话,治疗组合物的有效日剂量可以在一天中以适当的间隔,以两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量分开施用,任选地以单位剂型施用。尽管可以单独施用本发明的化合物,但是优选以药物制剂(组合物)的形式施用化合物。

[0179] 可以用本领域已知的医疗装置施用治疗组合物。例如,在优选实施方式中,本发明的治疗组合物可以用无针皮下注射装置施用,例如在美国专利号5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556中公开的装置。可用于本发明的公知的植入体和模块的实例包括:美国专利号4,487,603,其公开了用于以受控的速率分配药物的可植入微输液泵;美国专利号4,486,194,其公开了用于通过皮肤施用药物的治疗装置;美国专利号4,447,233,其公开了用于以精确的输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利号4,447,224,其公开了用于连续药物递送的流量可变可植入输注仪器;美国专利号4,439,196,其公开了具有多腔室的渗透药物递送系统;和美国专利号4,475,196,其公开了渗透药物递送系统。许多其他此类植入体、递送系统和模块是本领域技术人员已知的。

[0180] 在某些实施方式中,本发明的双特异性构建体可以配制成确保体内适当分布。例如,血脑屏障(BBB)排除了许多高度亲水的化合物。为确保本发明的治疗化合物穿过BBB(如所希望的),可以将它们配制在例如脂质体中。用于制造脂质体的方法,参见,例如,美国专利4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可以包含,选择性地运输到特定细胞或器官中从而增强靶向药物递送的一个或多个组成部分(参见,例如V.v.Ranade(1989) J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性的靶向部分包括叶酸或生物素(参见,例如Low et al.的美国专利5,416,016);甘露糖醇(Umezawa et al.,(1988) Biochem.Biophys.Res.Comm.153:1038);抗体(P.G.Bloeman et al.(1995) FEBS Lett.357:140;M.Owais et al.(1995) Antimicrob.Agents Chemother.39:180);表面活性剂蛋白A受体(Briscoe et al.(1995) Am.J.Physiol.1233:134),其不同种类可以包括本发明的制剂,以及本发明分子的组分;p120(Schreier et al.(1994) J.Biol.Chem.269:9090);还可参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994) FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994) Immunomethods4:273。在本发明的一个实施方式中,将本发明的治疗性化合物配制在脂质体中;在一个更优选的实施方式中,脂质体包括靶向部分。在最优选的实施方式中,脂质体中的治疗化合物通过团注而递送至接近肿瘤或感染的部位。组合物必须具有一定程度的流动性,以使其易于注射。其必须在制造和储存条件下稳定,并且必须防止微生物(如细菌和真菌)的污染行为。

[0181] 化合物抑制癌症的能力可以在预测人类肿瘤中功效的动物模型系统中进行评价。或者,可以通过检查化合物抑制的能力来评价化合物的这种特性,这种体外抑制测定是本领域技术人员已知的。治疗有效量的治疗化合物可以减小肿瘤的大小,或改善受试者的症

状。本领域普通技术人员能够基于例如受试者的身材、受试者症状的严重程度以及所选择的特定组合物或施用途径等因素来确定量。

[0182] 组合物必须是无菌的,并且具有一定程度的流动性,使组合物可通过注射器递送。除水以外,载体可以是等渗缓冲盐溶液、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用例如卵磷脂的包衣,在分散液的情况下通过维持所需的粒径,以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖,多元醇(例如甘露醇或山梨醇)和氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝或明胶而给可注射组合物带来长期的吸收。

[0183] 如上所述,当适当地保护性化合物时,化合物可以例如与惰性稀释剂或可吸收的可食用载体一起经口施用。

[0184] 核酸

[0185] 本文还提供编码双特异性构建体、或其结合域的分离的核酸分子,以及包含此类核酸的表达载体和包含此类表达载体的宿主细胞。在一个实施方式中,提供编码本文所述的任何双特异性构建体的核酸分子。在另一个实施方式中,核酸分子处于表达载体的形式。在另一个实施方式中,核酸分子处于表达载体的形式,当施用于受试者体内时,其表达双特异性构建体(或其部分)。

[0186] 在一个实施方式中,核酸分子包含编码本文所述双特异性构建体的ILT4结合域(或其部分)、PD-1结合域(或其部分)、或这两个结合域的核苷酸序列。在另一个实施方式中,核酸分子包含编码双特异性构建体的分别如SEQ ID N0s:64和63或与其至少90%同一性(例如,与一个或多个前述序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的氨基酸序列所示的重链和轻链序列的核苷酸序列。在另一个实施方式中,重链和轻链分别由SEQ ID N0s:66和65所示的核酸序列或与其至少90%同一性(例如,与一个或多个前述序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的核苷酸序列所编码。

[0187] 如本文所用,术语“载体”意指能够转运已经与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指环状双链DNA环,其中可以连接入其他DNA段。另一种类型的载体是病毒载体,其中可以将其他DNA段连接入病毒基因组中。某些载体能够在它们所导入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非游离哺乳动物载体)可以在导入宿主细胞时整合到宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其可操作连接的基因的表达。这样的载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般地,在重组DNA技术中使用的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明意在包括其他形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其具有等同的功能。

[0188] 如本文所用,术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意指已导入重组表达载体的细胞。应当理解,这些术语不仅意指特定的目标细胞,而且还指该细胞的后代。因为由于突变或环境影响,某些修饰可能在后代中发生,这些后代实际上可能与亲本细胞不同,但是仍然包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0189] 联合疗法

[0190] 本文所述的双特异性构建体,可以与其他疗法联合,即与其他药物结合,施用。本文所用的术语“共同施用”包括本文所述的双特异性构建体与佐剂和其他药物的任何或全部同时、分开或贯序施用,包括作为给药方案的一部分来施用。例如,组合疗法可包括将本文所述的任何双特异性构建体与至少一种或多种其他治疗剂,例如抗炎剂、DMARD(改变疾病的抗风湿药物)、免疫抑制剂、化疗剂、放疗、其他抗体、细胞毒素和/或药物、以及佐剂、免疫刺激剂和/或免疫抑制剂一起施用。

[0191] 在肿瘤的治疗中,适合与本文所述的双特异性构建体共同施用的化学治疗剂包括,例如:紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱(emetine)、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟蒽二酮、米托蒽醌、普卡霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔(propranolol)、以及嘌呤霉素及其类似物或同系物。其他药剂包括,例如,抗代谢物(例如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷基化剂(例如氮芥、噻替哌苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)、顺铂)、蒽环类(例如柔红霉素(旧称道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(例如,更生霉素(旧称放线菌素)、博来霉素、普卡霉素和安曲霉素(AMC))、和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)和替莫唑胺。

[0192] 消除或抑制例如通过免疫细胞(例如调节性T细胞、NKT细胞、巨噬细胞、髓系来源的抑制细胞、不成熟或抑制性树突状细胞)或由肿瘤局部微环境中肿瘤或宿主细胞产生的抑制因子(例如TGF β 、吡啶胺2,3-加双氧酶-IDO)的免疫抑制活性的药物,也可与本文所述的双特异性构建体一起施用。这样的试剂包括抗体和小分子药物,例如IDO抑制剂(例如1-甲基色氨酸或衍生物)。

[0193] 与本文所述双特异性构建体共同施用的用于治疗免疫疾病的合适药剂包括,例如,免疫抑制剂(例如雷帕霉素、环孢菌素和FK506);抗TNF剂(例如依那西普、阿达木单抗和英夫利昔单抗);和类固醇。特定的天然和合成类固醇的实例包括,例如:醛固酮、倍氯米松、倍他米松、布地奈德、氯泼尼醇、可的松、可的伐唑、脱氧皮质酮(deoxycortone)、地奈德(desonide)、去羟米松、地塞米松、二氟皮质酮四醇(Difluorocortolone)、氟氯缩松(flucorolone)、氟米松(flumethasone)、氟尼缩松、氟轻松、醋酸氟轻松(flucinonide)、氟考丁酯、氟可的松、氟皮质酮四醇(flucortolone)、氟米龙(flucrometholone)、氟氢缩松、氟替卡松、哈西奈德(halcinonide)、氢化可的松、艾可米松(icomethasone)、甲泼尼龙、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)、帕拉米松、泼尼松龙、强的松、替可的松(tixocortol)和去炎松(triamcinolone)。

[0194] 用于与本文所述双特异性构建体共同施用的用于诱导或增强免疫应答的合适药物包括,例如,佐剂和/或免疫刺激剂,其非限制性实例已在上文公开。在一个实施方式中,免疫刺激剂是TLR3激动剂,例如聚肌胞。

[0195] 如本文所用,术语“免疫刺激剂”包括,但不限于,能够刺激抗原提呈细胞(APC),例如树突细胞(DC)和巨噬细胞的化合物。例如,用于本发明的合适的免疫刺激剂能够刺激APC,从而加速APC的成熟过程,增加APC的增殖,和/或上调共刺激分子(例如CD80、CD86、ICAM-1、MHC分子和CCR7)和促炎性细胞因子(例如IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-15和IFN- γ)的募

集或释放。合适的免疫刺激剂也能够增加T细胞增殖。这类免疫刺激剂包括,但不限于,CD40配体;FLT3配体;细胞因子(例如IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 和IL-2);集落刺激因子(例如G-CSF(粒细胞集落刺激因子)和GM-CSF(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子));激动型CD40抗体、CTLA-4抗体、PD-1抗体(即,第二种PD-1抗体)、41BB抗体、或OX-40抗体;LPS(内毒素);ssRNA;dsRNA;卡介苗(BCG);盐酸左旋咪唑;和静脉免疫球蛋白。

[0196] 在一个实施方式中,免疫刺激剂可以是具有激动特征的CD40抗体。这类特征包括,例如,T细胞活性的增加和/或B细胞活化的增加,通过例如选自HLA-DR V450、CD54PE、CD86 APC、CD83 BV510、CD19 V500、CD54 PE、HLA-DR V450、CD23 PerCP-Cy5.5、CD69 APC、CD86 APC、CD38和CD71 PE的细胞表面标志物的表达增加而测定的。在另一个实施方式中,CD40抗体阻断CD40表达细胞上CD40与CD40L(CD154)的结合和/或诱导细胞凋亡,如通过CD95表达增加而测定的。本发明的特定激动型CD40抗体包括W02017/184619中所述的抗体,例如激动型CD40抗体3C3(CDX-1140)。

[0197] 在另一实施方式中,免疫刺激剂可以是Toll样受体(TLR)激动剂。例如,免疫刺激剂可以是TLR3激动剂(例如双链肌苷:胞嘧啶多核苷酸(聚I:C,例如可获自Hemisphere/Bipharma,PA,US的AmpligenTM,或获自Oncovir的聚IC:LC)或聚A:U;TLR4激动剂(例如单磷酸脂质A(MPL)或RC-529(例如,可获自GSK,UK);TLR5激动剂(例如鞭毛蛋白);TLR7或TLR8激动剂(例如咪唑并喹啉);TLR7或TLR8激动剂(例如咪唑莫特(例如AldaraTM)或瑞喹莫德和相关的咪唑并喹啉剂(例如可获自3M公司));或TLR9激动剂(例如具有未甲基化的CpG基序的脱氧核苷酸(所谓的“CpG”,例如可获自Coley Pharmaceutical))。这些免疫刺激剂可以与本文所述的双特异性构建体同时、分开或贯序施用。

[0198] 本发明的用途和方法

[0199] 本文还提供通过向有需要的患者施用本文所述的双特异性构建体或组合物以诱导或增强免疫应答的方法、以及治疗癌症的方法。

[0200] 术语“诱导免疫应答”和“增强免疫应答”互换使用,是指刺激对特定抗原的免疫应答(即,被动的或适应性的)。

[0201] 如本文所用,术语“处理”和“治疗”是指本文所述的治疗措施。“治疗”的方法对需要该治疗的受试者,例如需要对特定抗原具有增强免疫应答的受试者或最终可能患上这种病症的受试者,采取本文所述的双特异性构建体或组合物的施用,从而治愈、延迟、减轻病症或复发病症的严重程度,或改善疾病或复发疾病的一个或多个症状,或将受试者的存活延长至超出在没有这些治疗的情况下的预期。

[0202] 术语“有效剂量”或“有效量”定义为足以达到或至少部分达到所希望的效果的量。术语“治疗有效剂量”定义为足以在已经患有疾病的患者中治愈或至少部分地中止该疾病及其并发症的量。对于该种用途的有效量将取决于所治疗病症的严重程度以及患者自身免疫系统的总体状态。

[0203] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性处理的人和其他哺乳动物受试者。

[0204] 如本文所用,术语“抑制生长”(例如,提及细胞时)意在包括任何可测量的细胞的生长的减少,例如,使细胞生长抑制至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

[0205] 在另一方面,用于在受试者中诱导或增强免疫应答(例如,针对抗原)的方法,包

括,以有效诱导或增强受试者的免疫应答(例如,针对抗原)的量,向受试者施用本文所述的任一种双特异性构建体或组合物。

[0206] 在另一方面,提供用于治疗受试者癌症的方法,该方法包括以有效治疗病况或疾病的量,向受试者施用本文所述的双特异性构建体或组合物。

[0207] 该受试者可以是,例如,患有需要刺激免疫应答的病况或疾病的受试者。在一个实施方式中,病况或疾病是癌症。癌症的类型包括,但不限于,白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、幼粒细胞早幼粒单核细胞单核红白血病、慢性白血病、慢性粒细胞白血病、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、伯基特氏淋巴瘤和边缘区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、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链疾病、实体瘤、肉瘤和癌、纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、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、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠肉瘤、结直肠癌、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、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilm's瘤、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、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、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、鼻咽癌、食管癌、基底细胞癌、胆道肿瘤、膀胱癌、骨肿瘤、脑和中枢神经系统(CNS)癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌、子宫内膜癌、食管癌、眼癌、头颈部癌、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(如唇、舌、口、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症。特定的癌包括表达ILT4的肿瘤,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、伯基特氏淋巴瘤和边缘区B细胞淋巴瘤。其他疾病适应症包括细菌、真菌、病毒和寄生虫感染疾病。

[0208] 在本文中所述的受试者中诱导或增强免疫应答(例如,针对抗原)的方法还可以包括向受试者施用抗原。如本文所用,术语“抗原”是指任何天然或合成的免疫原性物质,例如蛋白、肽、半抗原、多糖和/或脂质。本文所述的双特异性构建体或组合物和抗原可以同时施用,或者,双特异性构建体或组合物可以在施用抗原之前或之后施用。

[0209] 在一个实施方式中,将本文所述的双特异性构建体或组合物与疫苗组合施用,以增强针对疫苗抗原例如肿瘤抗原(由此增强对肿瘤的免疫应答)或来自传染病病原体的抗原(由此增强对传染病病原体的免疫应答)的免疫应答。因此,在一个实施方式中,疫苗抗原可以包含,例如,能够引发针对肿瘤或针对传染病病原体(例如病毒、细菌、寄生虫或真菌)的免疫应答的抗原或抗原组合物。抗原可以源自肿瘤,例如本文先前公开的多种肿瘤抗原。或者,抗原可以源自病原体,例如病毒、细菌、寄生虫和/或真菌。

[0210] 与本文所述的双特异性构建体或组合物共同施用的优选的抗原包括肿瘤抗原和疫苗抗原(例如细菌、病毒或其他病原体抗原,出于疫苗接种的目的,希望在受试者中提高针对它们的保护性免疫)。其他合适病原体抗原的实例包括肿瘤相关抗原(TAA),包括但不限于,包含EGFR、EGFRvIII、gp100或Pmel17、HER2/neu、间皮素、CEA、MART1、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MUC-1、GPNMB、HMW-MAA、TIM1、ROR1、CD19和生殖细胞源性肿瘤抗原的

全部或部分序列的序列。

[0211] 其他合适的抗原包括,用于预防或治疗病毒性疾病的病毒抗原。病毒抗原的实例包括,但不限于,HIV-1env、HBsAg、HPV、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、ORF2和ORF3抗原。另外,病毒抗原或抗原决定簇可以源自例如:巨细胞病毒(尤其是人,例如gB或其衍生物);爱泼斯坦巴尔病毒(例如gp350);黄病毒(例如黄热病毒、登革热病毒、蜱传脑炎病毒、日本脑炎病毒);肝炎病毒例如乙型肝炎病毒(例如乙型肝炎表面抗原,例如EP-A-414374、EP-A-0304578和EP-A-198474中所述的PreS1、PreS2和S抗原)、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和戊型肝炎病毒;HIV-1(例如tat、nef、gp120或gp160);人疱疹病毒,例如IgD或其衍生物,或即早蛋白,例如来自HSV1或HSV2的ICP27;人乳头瘤病毒(例如HPV6、11、16、18);流感病毒(全活或灭活的病毒、裂解性流感病毒,其生长于卵或MDCK细胞,或Vero细胞或整个流感病毒体(如Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920所述),或其纯化或重组蛋白,例如NP、NA、HA或M蛋白);麻疹病毒;腮腺炎病毒;副流感病毒;狂犬病毒;呼吸道合胞病毒(例如F和G蛋白);轮状病毒(包括减毒活病毒);天花病毒;水痘带状疱疹病毒(例如gpI、II和IE63);和造成宫颈癌的HPV病毒(例如,与蛋白D载体融合形成来自HPV 16的蛋白D-E6或E7融合体的早期蛋白E6或E7,或其组合;或E6或E7与L2的组合(参见例如W096/26277))。

[0212] 细菌抗原的例子包括,但不限于,弓形虫(*Toxoplasma gondii*)或梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)。细菌抗原可用于治疗或预防多种细菌性疾病,如炭疽、肉毒杆菌中毒、破伤风、衣原体病、霍乱、白喉、莱姆病、梅毒和结核病。细菌抗原或抗原决定簇可以源自,例如芽孢杆菌(*Bacillus* spp.),包括炭疽杆菌(*B.anthraxis*) (例如,肉毒杆菌毒素);博德特菌(*Bordetella* spp.),包括百日咳博德特菌(*B.pertussis*) (例如百日咳杆菌粘附素、百日咳毒素、丝状血凝素、腺苷酸环化酶、菌毛);疏螺旋体(*Borrelia* spp.),包括博氏疏螺旋体(*B.burgdorferi*) (例如OspA、OspC、DbpA、DbpB)、伽氏疏螺旋体(*B.garinii*) (例如OspA、OspC、DbpA、DbpB)、阿弗西尼疏螺旋体(*B.afzelii*) (例如OspA、OspC、DbpA、DbpB)、安德森疏螺旋体(*B.andersonii*) (例如OspA、OspC、DbpA、DbpB)、赫姆斯氏疏螺旋体(*B.hermsii*);弯曲杆菌(*Campylobacter*spp),包括空肠弯曲杆菌(*C.jejuni*) (例如毒素、粘附素和侵染素)和大肠弯曲杆菌(*C.coli*);衣原体(*Chlamydia* spp),包括沙眼衣原体(*C.trachomatis*) (例如MOMP、肝素结合蛋白)、肺炎衣原体(*C.pneumoniae*) (例如MOMP、肝素结合蛋白)、鹦鹉热衣原体(*C.psittaci*);梭菌(*Clostridium*spp),包括破伤风梭菌(*C.tetani*) (例如破伤风毒素)、肉毒梭菌(*C.botulinum*) (例如肉毒杆菌毒素)、难辨梭菌(*C.difficile*) (例如梭菌毒素A或B);棒杆菌(*Corynebacterium* spp.),包括白喉棒杆菌(*C.diphtheriae*) (例如白喉毒素);埃里希体(*Ehrlichia* spp.),包括马埃里希体(*E.equi*)和人粒细胞埃里希体病的致病剂;立克次氏体(*Rickettsia* spp),包括立氏立克次体(*R.rickettsii*);肠球菌(*Enterococcus* spp.),包括粪肠球菌(*E.faecalis*)、屎肠球菌(*E.faecium*);埃希氏菌(*Escherichia* spp),包括肠毒素大肠杆菌(例如定居因子、不耐热毒素或其衍生物、或热稳定毒素)、肠出血性大肠杆菌、肠致病性大肠杆菌(例如志贺毒素样毒素);嗜血杆菌(*Haemophilus* spp.),包括B型流感嗜血杆菌(*H.influenzae* typeB) (例如PRP)、不可分型的流感嗜血杆菌,例如OMP26、高分子量粘附素、P5、P6、蛋白质D和脂蛋白D,以及丝束蛋白和丝束蛋白衍生的肽(参见例如US5,843,464);螺杆菌(*Helicobacter*spp),包括幽门螺杆菌(*H.pylori*) (例如脲酶、过氧化氢酶、空泡毒素);假单胞菌(*Pseudomonas*

spp), 包括铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa*); 军团菌 (*Legionella* spp), 包括嗜肺军团菌 (*L.pneumophila*); 钩端螺旋体菌 (*Leptospira* spp), 包括问号钩端螺旋体 (*L.interrogans*); 李斯特菌 (*Listeria* spp.), 包括单核细胞增多性李斯特菌 (*L.monocytogenes*); 摩拉克氏菌 (*Moraxella* spp), 包括卡他莫拉菌 (*Mcatarrhalis*), 也称为粘膜炎布兰汉氏球菌 (*Branhamella catarrhalis*) (例如高和低分子量粘附素和浸染素); 卡他莫拉菌 (*Morexella Catarrhalis*) (包括其外膜囊泡和OMP106 (参见例如W097/41731)); 分枝杆菌 (*Mycobacterium* spp.), 包括结核分枝杆菌 (*Mtuberculosis*) (例如ESAT6、抗原85A、-B或-C)、牛分枝杆菌 (*Mbovis*)、麻风分枝杆菌 (*M.leprae*)、鸟分枝杆菌 (*M.avium*)、副结核分枝杆菌 (*M.paratuberculosis*)、耻垢分枝杆菌 (*M.smegmatis*); 奈瑟球菌 (*Neisseria* spp), 包括淋病奈瑟球菌 (*N.gonorrhea*) 和脑膜炎奈瑟球菌 (*N.meningitidis*) (例如荚膜多糖及其缀合物、转铁蛋白结合蛋白、乳铁蛋白结合蛋白、PilC、粘附素); 脑膜炎奈瑟球菌B (*Neisseria meningitidis* B) (包括其外膜囊泡和NspA (参见例如W096/29412)); 沙门氏菌 (*Salmonella* spp), 包括伤寒沙门氏菌 (*S.typhi*)、副伤寒沙门氏菌 (*S.paratyphi*)、猪霍乱沙门氏菌 (*S.choleraesuis*)、肠炎沙门氏菌 (*S.enteritidis*); 志贺氏菌 (*Shigella* spp), 包括宋氏志贺菌 (*S.sonnei*)、痢疾志贺菌 (*S.dysenteriae*)、福氏志贺菌 (*S.flexnerii*); 葡萄球菌 (*Staphylococcus* spp), 包括金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*)、表皮葡萄球菌 (*S.epidermidis*); 链球菌 (*Streptococcus* spp), 包括肺炎链球菌 (*S.pneumonie*) (例如荚膜多糖及其缀合物、PsaA、PspA、链球菌溶血素、胆碱结合蛋白) 和蛋白抗原肺炎球菌溶血素 (*Biochem Biophys Acta*, 1989, 67, 1007; Rubins et al., *Microbial Pathogenesis*, 25, 337-342) 及其突变体脱毒衍生物 (参见例如W090/06951; W099/03884); 密螺旋体 (*Treponema* spp.), 包括苍白密螺旋体 (*T.pallidum*) (例如外膜蛋白)、齿垢密螺旋体 (*T.denticola*)、猪痢疾密螺旋体 (*T.hyodysenteriae*); 弧菌 (*Vibrio* spp), 包括霍乱弧菌 (*V.cholera*) (例如霍乱毒素); 和耶尔森菌 (*Yersinia* spp), 包括小肠结肠炎耶尔森菌 (*Y.enterocolitica*) (例如, Yop蛋白)、鼠疫耶尔森菌 (*Y.pestis*)、假结核耶尔森菌 (*Y.pseudotuberculosis*)。

[0213] 寄生虫/真菌抗原或抗原决定簇可以源自, 例如: 巴贝虫菌 (*Babesia* spp.), 包括微小巴贝虫菌 (*B.microti*); 念珠菌 (*Candida* spp.), 包括白色念珠菌 (*C.albicans*); 隐球菌 (*Cryptococcus* spp.), 包括新型隐球菌 (*C.neoformans*); 内阿米巴 (*Entamoeba* spp.), 包括溶组织内阿米巴 (*E.histolytica*); 贾第虫 (*Giardia* spp.), 包括蓝氏贾第虫 (*G.lamblia*); 利什曼原虫 (*Leshmania* spp.), 包括大型利什曼原虫 (*L.major*); 恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) (MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、锚合蛋白、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230 及其在疟原虫中的类似物); 肺囊虫 (*Pneumocystis* spp.), 包括卡氏肺囊虫 (*P.carinii*); 血吸虫 (*Schistosoma* spp.), 包括曼氏血吸虫 (*S.mansoni*); 毛滴虫 (*Trichomonas* spp.), 包括阴道毛滴虫 (*T.vaginalis*); 弓形虫 (*Toxoplasma* spp.), 包括刚地弓形虫 (*T.gondii*) (例如SAG2、SAG3、Tg34); 锥虫 (*Trypanosoma* spp.), 包括克鲁斯锥虫 (*T.cruzi*)。

[0214] 应当理解, 根据本发明的这个方面, 抗原和抗原决定簇可以以许多不同形式使用。例如, 抗原或抗原决定簇可以作为分离的蛋白或肽存在 (例如, 在所谓的“亚基疫苗”中), 或者例如作为细胞相关或病毒相关的抗原或抗原决定簇 (例如在活的或杀死的病原体株中)

存在。活的病原体优选以已知方式减毒。或者,抗原或抗原决定簇可以通过使用编码抗原或抗原决定簇的多核苷酸在受试者中原位生成(如在所谓的“DNA疫苗接种”中),尽管应当意识到,可以用于这种方法的多核苷酸不限于DNA,也可以包括如上文讨论的RNA和改变的多核苷酸。

[0215] 在一个实施方式中,疫苗抗原也可以靶向,例如特定的细胞类型或特定的组织。例如,疫苗抗原可以靶向抗原提呈细胞(APC),例如通过使用药物,例如靶向APC表面受体(例如DEC-205)(例如在W02009/061996(Celldex Therapeutics)中所讨论的)、或甘露糖受体(CD206)(例如在W003040169(Medarex, Inc.)中讨论的)的抗体。

[0216] 试剂盒

[0217] 还提供试剂盒(例如,诊断试剂盒),其包含一种或多种本文所述的双特异性构建体或组合物,任选地包含使用说明书。试剂盒还可以包括信息手册,例如,告知如何使用试剂来实践本文公开的方法的手册。术语“手册”包括在试剂盒上或随试剂盒提供的,或另外随附试剂盒的,任何书面文字、营销材料或记录材料。

[0218] 本申请通过以下实施例进一步阐明,实施例不应当解读为进一步的限制。附图和贯穿本申请引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容通过引用的方式明确地并入本文。

[0219] 实施例

[0220] 实施例1:双特异性构建体的生成

[0221] 用靶向ILT4和PD-1的抗体(例如,结合域)生成双特异性构建体,形成双特异性构建体CDX-585。使用对于PD1抗体的全人源IgG1 AQQYTEK骨架和ILT4抗体的单链Fv片段(scFv)开发出四价形式(各靶点为双价),其中scFv以VL-VH的方向基因连接于PD1抗体重链的C端。重链的Fc区(HC)含有6个额外的氨基酸修饰:L234A、L235Q、K322Q(AQQ),以消除所有与Fc受体的Fc相互作用,以及M252Y、S254T、T256(YTE),以延长血清半衰期。为稳定CDX-585的scFv部分,通过将成熟重链558位(根据Kabat编号系统,VL100位)的Gly突变成Cys,以及将成熟重链629位(根据Kabat编号系统,VH44位)的Gly突变成Cys,在VL和VH之间引入二硫键。

[0222] 将编码CDX-585的轻链和重链的DNA序列插入到含pH2535-HDP谷氨酰胺合成酶(GS)的表达载体(HorizonDiscovery)中,以构建表达CDX-585的质粒。然后将线性化质粒转染至Horizon Discovery HD-BIOP3细胞系中,其内源性谷氨酰胺合成酶(GS)基因已使用重组腺相关病毒(rAAV)技术而敲除。通过无谷氨酰胺和无动物成分的培养基中生长来选择转染池,用蛋白A柱色谱从池中纯化出双特异性构建体产物。

[0223] 使用VIPS(原位验证铺板)设备,对表达量最高的池进行单细胞克隆(SCC)。对于最高产出克隆生成研究细胞库(RCB),再次使用蛋白A柱色谱纯化所得的双特异性构建体产物。

[0224] 双特异性构建体(CDX-585)的示意图如图3所示。用还原性SDS-PAGE在4-15%的Tris-HCL凝胶上分析纯化的构建体,所得凝胶的图像如图1所示,IgG1为比较物。还在TSK3000柱上用PBS中的20μg注射物,经SEC-HPLC分析构建体,所得痕量示于图2,IgG1为比较物。

[0225] 实施例2:使用ELISA的CDX-585与人PD-1的结合

[0226] 用PBS中的重组人PD-1-msFc包被微量滴定板,然后用PBS中的5%牛血清白蛋白进行封闭。以不同的浓度加入蛋白A纯化的PD-1单克隆抗体E1A9、双特异性构建体CDX-585(来自实施例1)和亚型对照,于37°C孵育。板用PBS/吐温冲洗,然后与结合辣根过氧化物酶的山羊抗人IgGFc特异的多克隆试剂于37°C孵育。冲洗后,用HRP底物显色,用酶标仪分析OD 450。代表性结合曲线如图4所示。

[0227] 实施例3:CDX-585与表达人PD-1的细胞的结合

[0228] 蛋白A纯化的单克隆抗体7B1和E1A9、双特异性构建体CDX-585(来自实施例1)和亚型对照,与表达人PD-1的HEK293细胞,在孔板振荡器上室温孵育。20分钟后,用含有0.1%BSA和0.05%NaN₃的PBS(PBA)冲洗细胞,通过用PE标记的山羊抗人IgG Fc特异性探针来孵育细胞,以检测结合的抗体。用PBA将多余的探针从细胞上洗去,并使用FACSCanto II™仪器(BD Biosciences,NJ,USA),根据制造商的指示,确定细胞相关荧光。代表性结合曲线如图5A所示。

[0229] 实施例4:CDX-585与表达人ILT4的细胞的结合

[0230] 蛋白A纯化的单克隆抗体7B1和E1A9、双特异性构建体CDX-585(来自实施例1)和亚型对照与表达人ILT4的HEK293细胞在孔板振荡器上室温孵育。20分钟后,用含有0.1%BSA和0.05%NaN₃的PBS(PBA)冲洗细胞,通过用PE标记的山羊抗人IgG Fc特异性探针孵育细胞,以检测结合的抗体。用PBA将多余的探针从细胞中清去,使用FACSCanto IITM仪器(BDBiosciences,NJ,USA),根据制造商的指导,分析细胞相关的荧光。代表性结合曲线如图5B所示。

[0231] 实施例5:CDX-585与细胞表达的人ILT4以及人PD-1的双功能结合

[0232] 使用表达人ILT4的HEK293细胞,检测CDX-585与ILT4以及PD-1的结合。简单地说,在加入可用PE标记的山羊抗小鼠IgG Fc特异性探针检测的人PD-1-msFc前,使CDX-585稀释液与ILT4表达细胞结合。CDX-585的代表性结合曲线如图6A所示,其表明与ILT4以及PD-1的显著结合。

[0233] 实施例6:CDX-585与人单核细胞的双功能结合

[0234] 使用人单核细胞来评估CDX-585与ILT4以及PD-1的结合。简单地说,在用APC标记的CD14抗体对单核细胞染色之前,使CDX-585稀释液与人PBMC孵育。加入人PD-1-msFc,并用PE标记的山羊抗小鼠IgGFc特异性探针进行检测。CDX-585的代表性结合曲线如图6B所示,其显示了与ILT4以及PD-1的显著结合。

[0235] 实施例7:用生物膜层干涉法(BLI)测定人bsAbs的亲力和速率常数

[0236] 使用Octet™ QK^e设备(Sartorius BioAnalytical Instruments),根据制造商的指南,通过生物膜层干涉法(BLI)分析CDX-585的结合亲和力和结合动力学。将CDX-585捕获在抗人Fc捕获(AHC)生物传感器(Sartorius)上。各抗体制备在pH 7.2动力学检测稀释缓冲液中,于30°C和1000rpm平板振荡速度,以0.5μg/mL加载在新鲜吸满水并预处理的AHC生物传感器上,持续300秒。对于一次检测,8个生物传感器加载相同的抗体。通过将7个加载抗体的生物传感器暴露于分析物:可溶人ILT4-HIS(Celldex内部试剂)或人PD-1-HIS(R&D Systems),来确定结合。于30°C和1000rpm平板振荡速度,使用2倍梯度稀释(从50nM到0.4nM,于稀释缓冲液中)的分析物,进行亲和力测定。通过实验确定各抗体-抗原检测的适当稀释范围。将加载有抗体的生物传感器在分析物孔中进行300秒结合,然后将生物传感器

移动到稀释缓冲液孔中1500秒,用于解离测量。在各种情况下,通过将含有捕获抗体的剩余生物传感器置于稀释缓冲液孔中进行结合和解离步骤,来进行对应对照的操作。对照生物传感器的数据用于扣减背景,用于解释生物传感器漂移以及抗体从生物传感器上解离。在各种情况下,使用Octet BLI分析软件12.2.0.2版本(Sartorius BioAnalytical Instruments),从于稀释缓冲液中的与捕获抗体结合的分析物的浓度梯度获得动力学参数。使用数据分析软件,根据制造商的指南,将结合和解离曲线拟合到1:1结合模型中。

[0237] 所测定的亲和力和动力学参数(扣减背景)如图7所示,其中 k_{on} =结合速率, k_{dis} =解离速率,以及 K_D =亲和力常数,由 k_{dis}/k_{on} 比值确定。

[0238] 实施例8:CDX-585与人Fc γ 以及FcRn受体结合的动力学分析

[0239] 使用Octet™ QK^e设备(Sartorius BioAnalytical Instruments),根据制造商的指南,进行亲和力测定。将生物素化的人Fc γ R和FcRn(Acro Biosystems)捕获在链霉亲和素(SA)生物传感器(Sartorius)上。各huFc γ 受体在pH 7.2动力学检测稀释缓冲液中制备成0.2 μ g/ml,并加载于4个SA生物传感器,持续300秒。通过将2个加载huFc γ 受体的生物传感器暴露于CDX-585来确定结合。使用于pH 7.2动力学检测稀释缓冲液中的800nM和400nM稀释液,测定亲和力。通过实验确定各抗体-huFc γ R检测的适当稀释范围。对于各检测的huFc γ R,将含有100nM未修饰HuIgG1的阳性对照孔暴露于1个加载有huFc γ R的传感器。在各种情况下,通过使含有捕获huFc γ 的剩余生物传感器于稀释缓冲液中进行结合和解离步骤,进行相应对照的操作。在pH6.0和pH7.2,确定动力学检测稀释缓冲液中的抗体与huFcRn的结合。在一个检测中,对8个生物传感器加载在pH 7.2动力学检测稀释缓冲液中稀释成0.3 μ g/ml的生物素化huFcRn(Acro Biosystems)。通过将7个加载有huFcRn的生物传感器暴露于CDX-585,来测定结合。于30°C和1000rpm平板振荡速度,使用2倍梯度稀释(从200nM到0.8nM,于合适的PH稀释缓冲液中)的分析物,进行亲和力测定。通过实验确定各缓冲液pH的适当稀释范围。将加载有抗体的生物传感器在分析物孔中进行120秒结合,然后将生物传感器移动到对应的pH稀释缓冲液孔中180秒,用于解离测量。在各种情况下,通过将含有捕获huFcRn的剩余生物传感器置于对应pH稀释缓冲液孔中进行结合和解离步骤,来进行对应对照的操作。缓冲液对照生物传感器的数据用于扣减背景,用于解释huFc γ R和huFcRn检测中生物传感器的漂移以及抗体从生物传感器的解离。在各种情况下,使用Octet BLI分析软件12.2.0.2版本(Sartorius BioAnalytical Instruments),从于稀释缓冲液中的与捕获huFc γ R或FcRn结合的分析物的浓度梯度获得动力学参数。使用数据分析软件,根据制造商的指南,将结合和解离曲线拟合到1:1结合模型中。

[0240] 所测定的亲和力和动力学参数(扣减背景)如图7所示,其中 k_{on} =结合速率, k_{dis} =解离速率,以及 K_D =亲和力常数,由 k_{dis}/k_{on} 比值确定。

[0241] 实施例9:T细胞PD1/PD-L1阻断生物测定

[0242] 使用Promega的市售可得的PD-1/PD-L1阻断检测,测定CDX-585对PD1/PD-L1相互作用的阻断作用。在抗体存在下,将两种工程化的细胞系(PD1效应细胞和PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞)共培养6小时。PD1/PD-L1相互作用的阻断引起TCR激活,并且通过NFAT通路诱导发光。通过添加Bio-Glo试剂来检测发光,并在Perkin Elmer VictorX4光度计上定量。如图8所示,PD-1抗体E1A9和CDX-585有效地阻断细胞间的PD1/PD-L1相互作用,引起NFAT通路的

激活。

[0243] 实施例10:CDX-585诱导TNF- α 的产生

[0244] 巨噬细胞和树突状细胞如下所述得自人单核细胞:将PMBC添加到T175cm²烧瓶中,使单核细胞于37°C、6%CO₂贴壁约2小时。去除未贴壁的细胞,将单核细胞在含10%FBS和50ng/mL M-CSF(R&D Systems)的RPMI中培养7天,制备巨噬细胞。通过将单核细胞在含10%FBS、100ng/mL GM-CSF和10ng/mL IL-4(R&D Systems)的RPMI中培养7天,制备树突状细胞。

[0245] 然后,在CDX-585和合适抗体对照的存在下,使细胞与50ng/mL LPS(Invivogen)于37°C、6%CO₂孵育。24小时后,收获细胞,收集上清液,并存储用于细胞因子分析。用ELISA(R&D Systems)评估所收集的上清液中的TNF- α 诱导。TNF- α 生成的增加,如图9A和9B所示。

[0246] 实施例11:CDX-585抑制HLA-G与ILT4结合

[0247] 在孔板振荡器上,使CDX-585和抗体对照的稀释液与表达人ILT4的HEK293细胞室温孵育。30分钟后,冲洗细胞,加入PE标记的HLA-G四聚物(FredHutch)。再过30分钟后,用PBA冲洗细胞,使用FACSCanto II™设备(BD Biosciences,NJ,USA),根据制造商的指导,分析确定细胞相关荧光。代表性的阻断曲线如图10所示。

[0248] 实施例12:CDX-585对M1型巨噬细胞的极化

[0249] 如实施例10中所述制备巨噬细胞。在M-CSF的存在下,将巨噬细胞与6.7nM的CDX-585以及抗体对照培养6天。加入50ng/mL的LPS(Invitrogen),过夜,收获细胞用于分析。收获上清液用于细胞因子分析。

[0250] 细胞用PE标记的PD-L1抗体染色,然后用PBA冲洗,并使用FACSCanto II™仪器(BD Biosciences,NJ,USA),根据制造商的指导,分析确定细胞相关荧光。PD-L1表达的下调如图11所示。另外,用ELISA(R&D Systems)评估所收集上清液的TNF- α 和IL-10诱导。图12A示出CDX-585增加TNF- α 的生成,图12B表明IL-10分泌的下调。

[0251] 实施例13:经混合淋巴细胞反应的T细胞活化

[0252] 用Ficoll分离法,从血沉棕黄层中分离出人外周血单核细胞,并使用来自Miltenyi Biotec的磁珠分离技术从PBMC中进一步分离出CD4⁺细胞。同种异体树突状细胞的产生如下:将PMBC添加到T175cm²烧瓶中,使单核细胞于37°C、6%CO₂贴壁约2小时。去除未贴壁的细胞,将单核细胞在含10%FBS、10ng/mL IL-4(R&D Systems)和100ng/mL GM-CSF(R&D Systems)的RPMI中培养7天。在抗体稀释液的存在下,CD4⁺细胞与DC以10:1的比率共培养4天。收获上清液,用ELISA(R&D Systems)分析IFN- γ 和IL-2的产生。如图13A和13B所示,CDX-585能够诱导明显的混合淋巴细胞反应。

[0253] 实施例14:CDX-585经ILT4和PD-1双重抑制而活化T细胞

[0254] 将人PBMC与33nM的CDX-585和抗体对照孵育过夜。加入次优剂量的CD3抗体(OKT3,eBioscience),并将细胞再孵育3日。收获上清液,评估IFN-g诱导。如图14所示,CDX-585双特异性分子以及单个抗体的组合均增加了IFN-g,表明ILT4和PD-1抗体组合的协同性作用。

[0255] 实施例15:小鼠肿瘤模型中的体内抗肿瘤活性

[0256] 将来自两个捐献者的20只HuCD34-NCG小鼠(Charles River Laboratories)分成4组,每组5只小鼠。将2×10⁷SKMEL-5细胞皮下植入至小鼠。从植入后的那天开始,对小鼠进行如下处理:组1:人IgG1 AQQ(0.5mg/小鼠),组2:CDX-585(0.5mg/小鼠),组3:7B1(0.375mg/小鼠),和组4:E1A9(0.375mg/小鼠)和7B1(0.375mg/小鼠)。小鼠一周给药1次,连

续5周。定期测量肿瘤体积。采用student's T检验,测定与huIgG1对照相比较的统计学显著性。结果如图15和16所示,其中,*= $p<0.05$,**= $p<0.01$ 。

[0257] 实施例16:在食蟹猴中的试验性研究

[0258] 向食蟹猴给与单次i.v.CDX-585给药(10mg/kg)。CDX-585的血清浓度经ELISA检测,细胞因子/趋化因子的血清浓度经MesoScale Discovery (MSD)分析。没有明显的不良实验室或临床发现。结果如图17和18所示。

[0259] 实施例17:通过混合淋巴细胞反应的T细胞活化

[0260] 用Ficoll分离法从血沉棕黄层中分离出人外周血单核细胞,并使用来自Miltenyi Biotec的磁珠分离技术从PBMC中进一步分离出CD4⁺细胞。同种异体树突状细胞(DC)的制备如下:将PMBC添加到T175cm²烧瓶中,使单核细胞于37°C、6%CO₂贴壁约2小时。去除未贴壁的细胞,将单核细胞在含10%FBS、10ng/mL IL-4 (R&D Systems)和100ng/mL GM-CSF (R&D Systems)的RPMI中培养7天。DC于与50ng/mL LPS或0.5mg/mL的W02017/184619中所述的CD40抗体(CDX-1140)孵育过夜。冲洗预处理的DC,并在5mg/mL抗体的存在下,以10:1的比率与CD4⁺细胞共孵育4天。收获上清液,用ELISA (R&D Systems)分析IFN- γ 的生成。结果如图19所示。

[0261] 实施例18:小鼠肿瘤模型的体内抗肿瘤活性

[0262] 重复实施例15的小鼠肿瘤模型,并加额外对照。结果显示在图20中。

[0263] 序列表的汇总

[0264] 表1:7A3和7B1人源化序列

[0265]

SEQ ID NO:1 7A3 V _H CDR1 (Kabat)	GYTIH
SEQ ID NO:2 7A3 V _H CDR1 (Chothia)	GYSFTGY
SEQ ID NO:3 7A3 V _H CDR2 (Kabat)	LINPYTGGTDYNQKFKG
SEQ ID NO:4 7A3 V _H CDR2 (Chothia)	NPYTGG
SEQ ID NO:5 7A3 V _H CDR3	ERPGGSQFIYYYPMDY
SEQ ID NO:6 7A3 V _L CDR1	RASANIYSYLA
SEQ ID NO:7 7A3 V _L CDR2	NAITLAE
SEQ ID NO:8 7A3 V _L CDR3	QHGYGTPFT
SEQ ID NO:9 7A3 V _H Hu-VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMHWVRQ APGQGLEWMGLINPYTGGTDYNQKFQGRVTMTVDKSTSTA YMELSSLRSEDTA VYYCARERPGGSQFIYYYPMDYWGQGT TVTVSS
SEQ ID NO:10 7A3 V _L Hu-VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASANIYSYLAWYQQKPGK APKFLVYNAILAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQHGYGTPFTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:11 7B1 V _H CDR1 (Kabat)	GYTMH
SEQ ID NO:12	GYSFTGY

[0266]

7B1 V _H CDR1 (Chothia)	
SEQ ID NO:13 7B1 V _H CDR2 (Kabat)	LINPYTGGTDYNQKFKG
SEQ ID NO:14 7B1 V _H CDR2 (Chothia)	NPYTGG
SEQ ID NO:15 7B1 V _H CDR3	ERP GGSQFIYYALDY
SEQ ID NO:16 7B1 V _L CDR1	RASENIYSYLA
SEQ ID NO:17 7B1 V _L CDR2	NADTLAE
SEQ ID NO:18 7B1 V _L CDR3	QH HYGTPFT
SEQ ID NO:19 7B1 V _H Hu-VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTGYTMHWVRQ APGQGLEWMGLINPYTGGTDYNQKFQGRVTMTVDRSTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARERP GGSQFIYYALDYWGQGT TVTVSS
SEQ ID NO:20 7B1 V _L Hu-VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLA WYQQKPGK APKFLVYNADTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQH HYGTPFTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:21 VH CDR1 共有	G Y T (I, M) H
SEQ ID NO:22 VH CDR3 共有	E R P G G S Q F I Y Y Y (P, A) (M, L) D Y
SEQ ID NO:23 VL CDR1 共有	R A S (A, E) N I Y S Y L A
SEQ ID NO:24 VL CDR2 共有	N A (I, D) T L A E
SEQ ID NO:25 7A3 AQQ HC 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTGYTMHWVR QAPGQGLEWMGLINPYTGGTDYNQKFQGRVTMTVDKS TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARERP GGSQFIYYYPMDY WGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY

[0267]

	<i>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAQQGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKQVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>
SEQ ID NO:26 7A3 LC氨基 酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASANIYSYLAWYQQK PKAPKFLVYNAILAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQHHYGTPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE
SEQ ID NO:27 7B1 AQQ HC 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMHWVR QAPGQGLEWMGLINPYTGTDYNQKFQGRVTMTVDRS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARERPGGSGQFIYYALDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAQQGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKQVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:28 7B1 LC氨基 酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK PKAPKFLVYNADTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ EDFATYYCQHHYGTPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGE

[0268] PD-1抗体序列

[0269] 表2A: VH CDR-PD1-HuAb-E1A9C8A7-V8-3

[0270]

区域	定义	氨基酸序列
CDR-H1		
SEQ ID NO:29	Chothia	GYTFTDY---
SEQ ID NO:30	AbM	GYTFTDYVMH
SEQ ID NO:31	Kabat	-----DYVMH

[0271]

SEQ ID NO:32	Contact	-----TDYVMH
SEQ ID NO:33	IMGT	GYTFTDYV--
CDR-H2		
SEQ ID NO:34	Chothia	-----STYHIP-----
SEQ ID NO:35	AbM	-----VISTYHIPAV-----
SEQ ID NO:36	Kabat	----- VISTYHIPAVYNQKFKG
SEQ ID NO:37	Contact	WMGVISTYHIPAV-----
SEQ ID NO:38	IMGT	-----ISTYHIPA-----
CDR-H3		
SEQ ID NO:39	Chothia	----EVYGESYYFDV
SEQ ID NO:40	AbM	----EVYGESYYFDV
SEQ ID NO:41	Kabat	----EVYGESYYFDV
SEQ ID NO:42	Contact	AREVYGESYYFD-
SEQ ID NO:43	IMGT	AREVYGESYYFDV

[0272] 表2B: VL CDR-PD1-HuAb-E1A9C8A7-V8-3

[0273]

区域	定义	氨基酸序列
CDR-L1		
SEQ ID NO:44	Chothia	RSSQSIVHSAGNTYLE--
SEQ ID NO:45	AbM	RSSQSIVHSAGNTYLE--
SEQ ID NO:46	Kabat	RSSQSIVHSAGNTYLE--
SEQ ID NO:47	Contact	-----VHSAGNTYLEWY
SEQ ID NO:48	IMGT	----QSIVHSAGNTY----
CDR-L2		
SEQ ID NO:49	Chothia	----KVSNRFS
SEQ ID NO:50	AbM	----KVSNRFS
SEQ ID NO:51	Kabat	----KVSNRFS
SEQ ID NO:52	Contact	LLIYKVSNRF-
SEQ ID NO:53	IMGT	-----KV-----
CDR-L3		
SEQ ID NO:54	Chothia	FQGSHVPYT
SEQ ID NO:55	AbM	FQGSHVPYT
SEQ ID NO:56	Kabat	FQGSHVPYT

[0274]

SEQ ID NO:57	Contact	FQGSHVPY-
SEQ ID NO:58	IMGT	FQGSHVPYT

[0275] 表2C:VH CDR-PD1-HuAb-E1A9C8A7-V8

[0276]

区域	定义	氨基酸序列
CDR-H1		
SEQ ID NO:67	Chothia	GYTFTDY---
SEQ ID NO:68	AbM	GYTFTDYVMH
SEQ ID NO:69	Kabat	-----DYVMH
SEQ ID NO:70	Contact	-----TDYVMH
SEQ ID NO:71	IMGT	GYTFTDYV--
CDR-H2		
SEQ ID NO:72	Chothia	-----STYHIP-----
SEQ ID NO:73	AbM	-----VISTYHIPAV-----
SEQ ID NO:74	Kabat	----- VISTYHIPAVYNQKFKG
SEQ ID NO:75	Contact	WMGVISTYHIPAV-----
SEQ ID NO:76	IMGT	-----ISTYHIPA-----
CDR-H3		
SEQ ID NO:77	Chothia	---EVYGDSYYFDV
SEQ ID NO:78	AbM	---EVYGDSYYFDV
SEQ ID NO:79	Kabat	---EVYGDSYYFDV
SEQ ID NO:80	Contact	AREVYGDSYYFD-
SEQ ID NO:81	IMGT	AREVYGDSYYFDV

[0277] 表2D:VL CDR-PD1-HuAb-E1A9C8A7-V8

[0278]

区域	定义	氨基酸序列
CDR-L1		
SEQ ID NO:82	Chothia	RSSQSIVHSNGNTYLE--
SEQ ID NO:83	AbM	RSSQSIVHSNGNTYLE--
SEQ ID NO:84	Kabat	RSSQSIVHSNGNTYLE--
SEQ ID NO:85	Contact	-----VHSNGNTYLEWY
SEQ ID NO:86	IMGT	-----QSIVHSNGNTY----
CDR-L2		

[0279]

SEQ ID NO:87	Chothia	---KVSNRFS
SEQ ID NO:88	AbM	---KVSNRFS
SEQ ID NO:89	Kabat	---KVSNRFS
SEQ ID NO:90	Contact	LLIYKVSNRF-
SEQ ID NO:91	IMGT	-----KV-----
CDR-L3		
SEQ ID NO:92	Chothia	FQGSHVPYT
SEQ ID NO:93	AbM	FQGSHVPYT
SEQ ID NO:94	Kabat	FQGSHVPYT
SEQ ID NO:95	Contact	FQGSHVPY-
SEQ ID NO:96	IMGT	FQGSHVPYT

[0280] 表2E:VH/VL序列

[0281]

VH	氨基酸序列 (PD1-HuAb-E1A9C8A7-V8-3)
SEQ ID NO:59	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYVMHWVRQA PGQSLEWMGVISTYHIPAVYNQKFKGKATMTVDTSTSTVYL ELSSLRSEDVAVYYCAREVYGESYYFDVWGQGTTTVTVSS
VL	氨基酸序列 (PD1-HuAb-E1A9C8A7-V8-3)
SEQ ID NO:60	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSAGNTYLEWYLQ KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCFQGSHPVPTFGGGTKVEIK
VH	氨基酸序列 (PD1-HuAb-E1A9C8A7-V8)
SEQ ID NO:61	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYVMHWVRQA PGQSLEWMGVISTYHIPAVYNQKFKGKATMTVDTSTSTVYL ELSSLRSEDVAVYYCAREVYGDVSYFDVWGQGTTTVTVSS
VL	氨基酸序列 (PD1-HuAb-E1A9C8A7-V8)
SEQ ID NO:62	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQ KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCFQGSHPVPTFGGGTKVEIK

[0282] 表3:双特异性构建体序列

[0283]

区域	氨基酸序列
SEQ ID NO:63	可变区 (下划线)
CDX-585	恒定结构域 (双下划线)
LC氨基酸	<u>DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSAGNTYLEWYLQ</u> <u>KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE</u>

[0284]

	<u>DVGVYYCFQGSHPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFFPSDE</u> <u>QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV</u> <u>TEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSP</u> <u>VTKSFNRGEC*</u>
SEQ ID NO:64 CDX-585 HC氨基酸	可变区（下划线） 恒定结构域（双下划线） scFv（下划虚线） 下划线：接头（粗斜体） 修饰碱基（粗体） <u>QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYVMHWVRQ</u> <u>APGQSLEWMGVISTYHIPAVYNQKFKGKATMTVDTSTSTV</u> <u>YLELSSLRSED</u> <u>AVYYCAREVYGESYYFDVWGQGT</u> <u>TVTVS</u> <u>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>TVSW</u> <u>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC</u> <u>NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>QGGPSVF</u> <u>LEPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</u> <u>QVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV</u> <u>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFF</u> <u>LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u> <u>GSSGGGGSDIOMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSY</u> <u>LAWYQOKPGKAPKFLVYNADTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> <u>TISSLOPEDFATYYCQHHYGTPFTFGCGTKLEIK</u> <u>GGGGSGGG</u> <u>GSGGGSGGGGSOVOLVOSGAEVKKPGASVKVSKCASGYS</u> <u>FTGYTMHWVRQAPGQCLEWMGLINPYTGGTDYNQKFOGR</u> <u>VTMTVDRSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARERPGGSQFIY</u> <u>YYALDYWGOGTTTVTVSS*</u>
区域	氨基酸序列
SEQ ID NO:65 E1A9-7B1 (CDX-585) LC核酸	可变区（下划线） 恒定结构域（双下划线） <u>GACATCGTGATGACCCAGACACCATTGTCGTTGCCTGT</u> <u>T</u> <u>CTCCAGGAGAACCCGCATCAATTAGCTGCAGAAGCAGCC</u> <u>AGTCCATTGTGCATAGTGCCGGTAACACCTATCTGGAGTG</u> <u>GTACCTACAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTTCTTATC</u> <u>TACAAAGTGAGCAATAGGTTTTCTGGGGTGCCTGATCGGT</u> <u>TTAGCGGTAGCGGCTCCGGCACCGACTTTACACTGAAGA</u> <u>TCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGACGTTGGAGTGTACTACT</u> <u>GTTTTCAGGGCAGCCACGTGCCTTATACATTTGGTGGCGG</u> <u>CACAAAGGTCGAGATCAAACGTACGGTGGCCGCTCCAAG</u>

[0285]

	<u>CGTGTTTCATCTTTCCCCCTTCTGACGAGCAGCTGAAGTCT</u> <u>GGCACAGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACC</u> <u>CCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCTC</u> <u>TGCAGTCTGGCAATTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGG</u> <u>ACTCTAAGGATTCCACATATAGCCTGAGCTCTACCTGAC</u> <u>ACTGTCTAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTGTATGC</u> <u>TTGCGAGGTGACCCATCAGGGCCTGTCCAGCCCAGTGAC</u> <u>AAAGTCCTTCAATCGCGGCGAGTGT</u> tga
SEQ ID NO:66 E1A9-7B1 (CDX-585) HC核酸	可变区（下划线） 恒定结构域（双下划线） scFv（下划虚线） 下划线：接头（粗斜体） 修饰碱基（粗体） <u>CAAGTACAGCTCGTGCAATCTGGCGCCGAGGTAGTTAAA</u> <u>CCTGGAGCATCCGTCAAAATTAGCTGTAAGGCAAGTGGC</u> <u>TACACTTTCACCGATTACGTCATGCACTGGGTGCGGCAGG</u> <u>CCCCCGGACAGAGTCTGGAGTGGATGGGCGTAATATCAA</u> <u>CCTACCATATACCCGCCGTGTACAATCAGAAATTTAAGG</u> <u>GTAAGGCAACCATGACCGTTGACACCTCCACCTCTACAGT</u> <u>CTATCTGGAATTGTCTTCCCTAAGATCAGAGGACACTGCC</u> <u>GTCTACTACTGTGCCCCGCGAAGTTTATGGAGAGTCATATT</u> <u>ACTTCGATGTTTGGGGTCAGGGAACCTACAGTAACTGTGA</u> <u>GCAGCGCTAGCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTTCCACTGGC</u> <u>TCCCAGCTCTAAGTCCACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCT</u> <u>GGGCTGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCAGAGCCCGTGAC</u> <u>CGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCA</u> <u>TACATTTCTGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACTCT</u> <u>CTGTCTTCCGTGGTGACCGTGCCAAGCTCTTCCCTGGGCA</u> <u>CCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCA</u> <u>ATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGT</u> <u>GATAAGACCCATACATGCCCCCCTTGTCTGCTCCAGAGG</u> <u>CTCAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGC</u> <u>CTAAGGACACCCTGTACATCACAAGGGAGCCAGAGGTG</u> <u>ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGATCCCGAG</u> <u>GTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT</u> <u>AATGCCAAGACAAAGCCAAGGGAGGAGCAGTACAATAG</u> <u>CACCTATCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAG</u> <u>GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCCAGGTGTCT</u> <u>AATAAGGCCCTGCCCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCC</u>

[0286]

AAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTACACA
CTGCCTCCAAGCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTG
TCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCCTCTGATA
TCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCTGAGAACA
ATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCA
GCTTCTTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGATAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCTTGTTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAATCATTACACACAGAAGAGCCTGTCT
CTGTCCCCTGGCAAAGGC**TCGAGCGGGGGAGGAGGTAGC**
GACATCCAGATGACACAGAGCCCAAGCTCTCTGAGCGCC
AGCGTGGGAGATAGGGTGACAATCACTTGTAGGGCCAGC
GAGAACATCTACAGCTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAG
CCCGGCAAGGCCCCAAAGTTTCTGGTGTACAACGCCGAC
ACTCTCGCTGAGGGCGTCCCTTCTAGGTTTTCCGGCAGCG
GCTCCGGCACTGACTTCACACTGACTATCAGCTCTCTGCA
GCCAGAGGATTTTCGCCACATACTACTGCCAGCACCACTA
CGGCACTCCTTTACATTTCGGCTGCGGCACTAAGCTGGA
GATCAAGGGAGGGGGCGGTTCCGGAGGAGGCGGCAGCGG
GGGAGGAGGTAGCGGCGGAGGTGGGTCTCAAGTGCAGCT
GGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCA
GCGTGAAAGTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACAGCTTCA
CTGGCTACACTATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCCGGCC
AATGCCTGGAGTGGATGGGACTGATCAACCCTTACACTG
GCGGCACTGACTACAACCAGAAGTTCCAAGGAAGGGTGA
CTATGACTGTGGATAGGTCCACAAGCACAGCCTACATGG
AGCTGTCCTCTCTGAGATCCGAGGACACTGCCGTGTACTA
CTGTGCTAGGGAGAGACCCGGCGGCAGCCAGTTCATCTA
CTACTACGCTCTGGACTACTGGGGCCAAGGCACAACAGT
CACAGTGAGCAGCga

[0287] 等同方式

[0288] 本领域技术人员将意识到,或能够通过不多于常规的实验确定,本文描述的本发明的具体实施方式的许多等同方式。这些等同方式旨在包括在以下权利要求中。

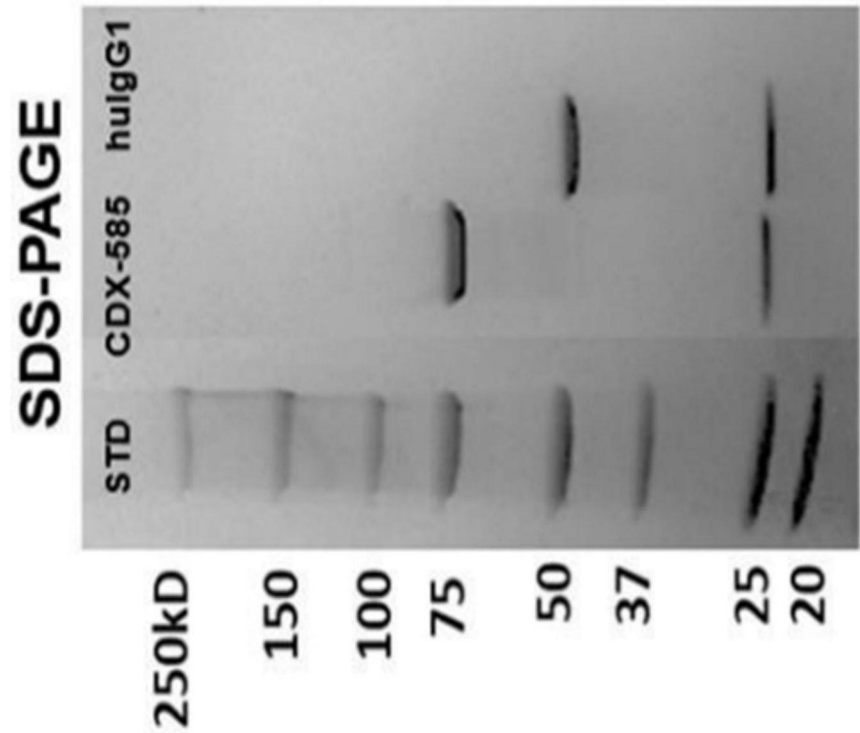


图1

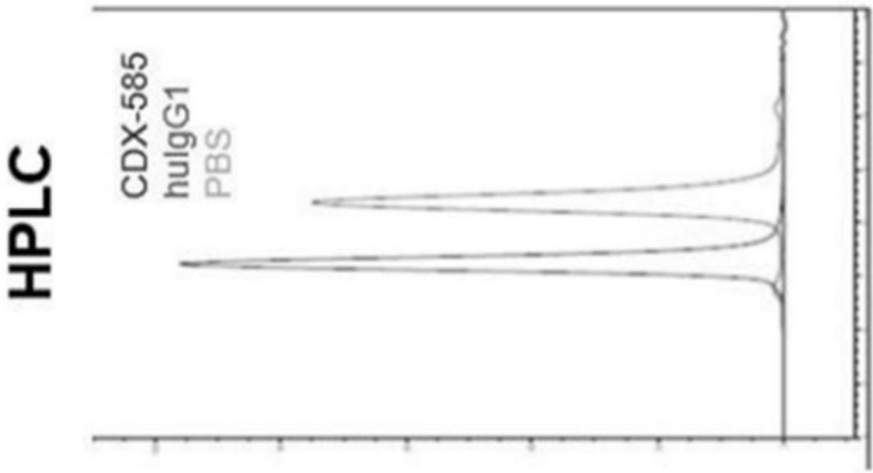


图2

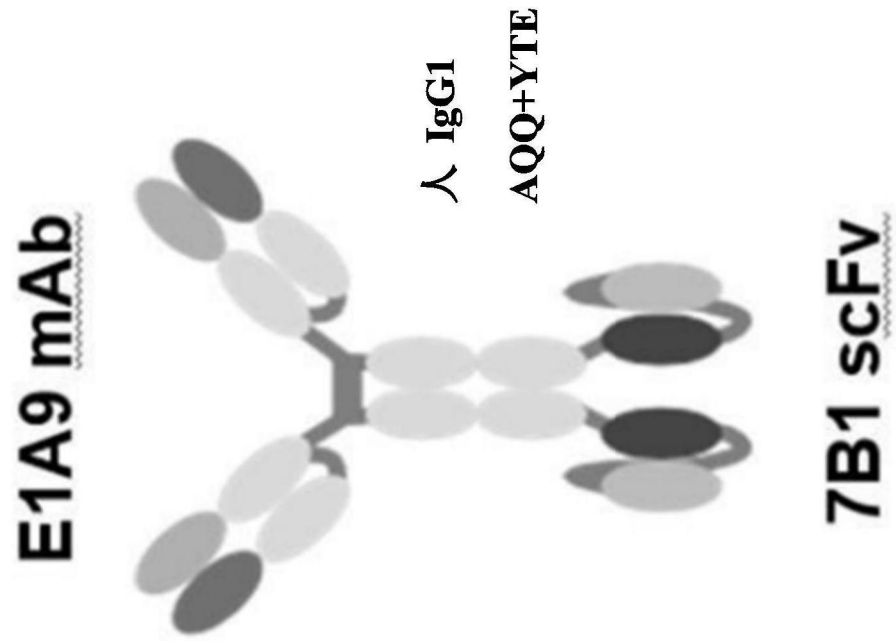


图3

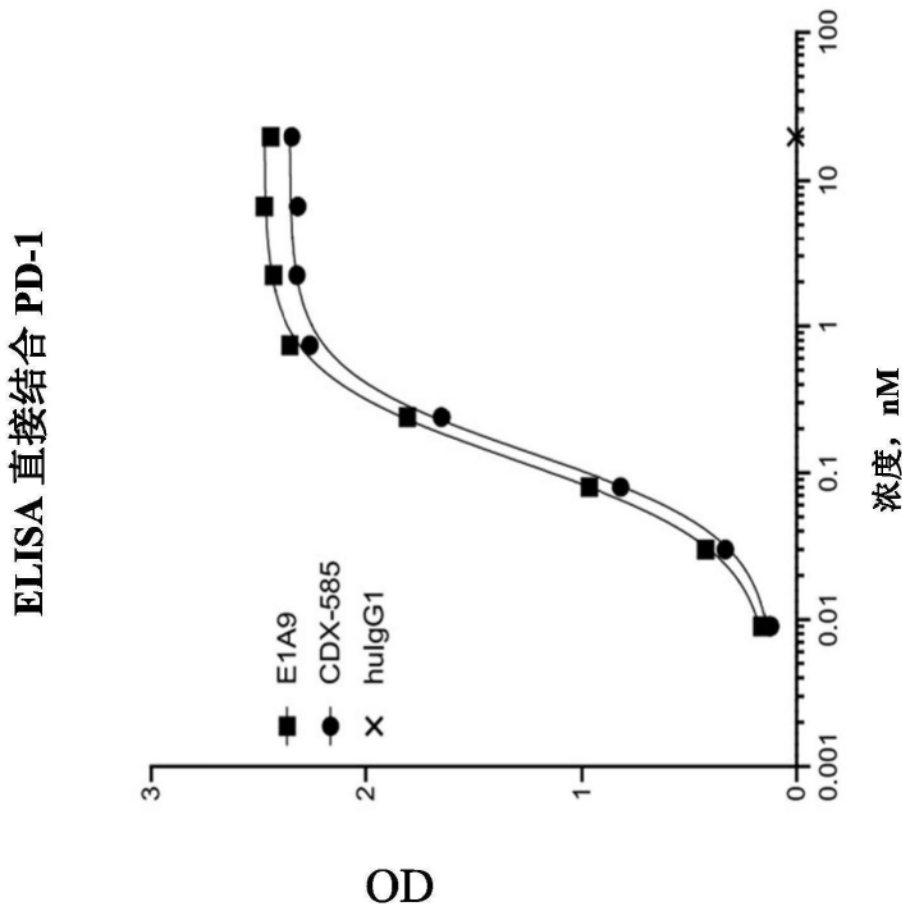


图4

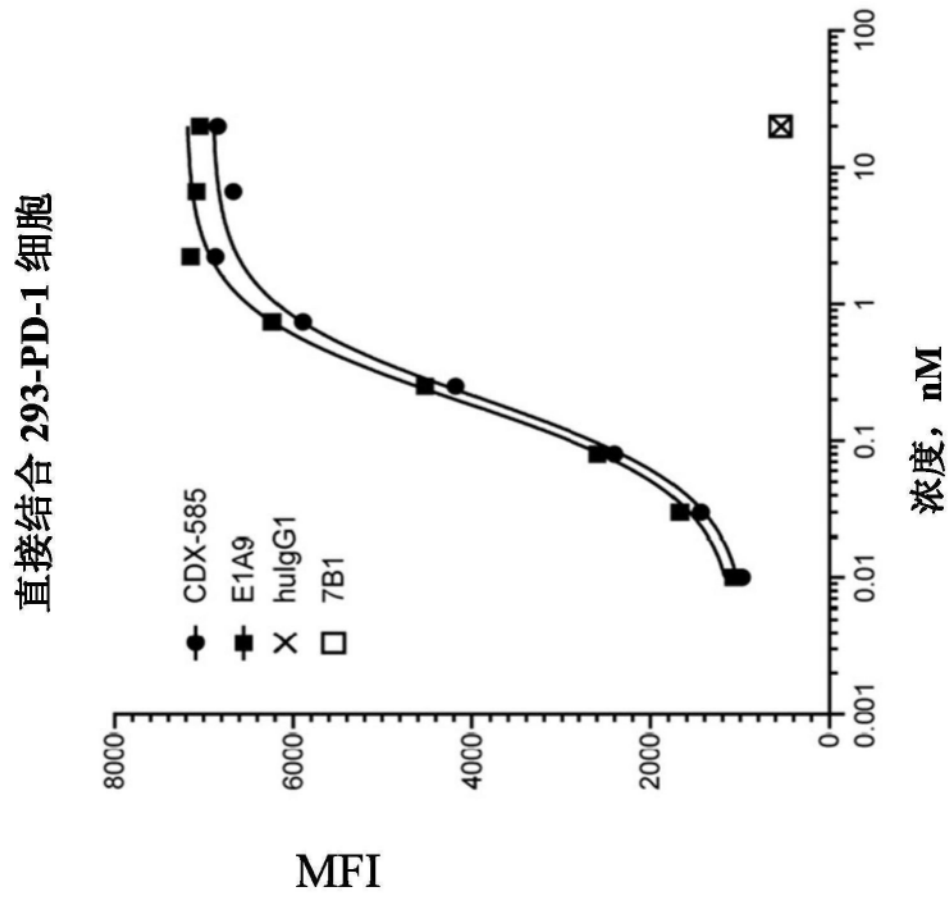


图5A

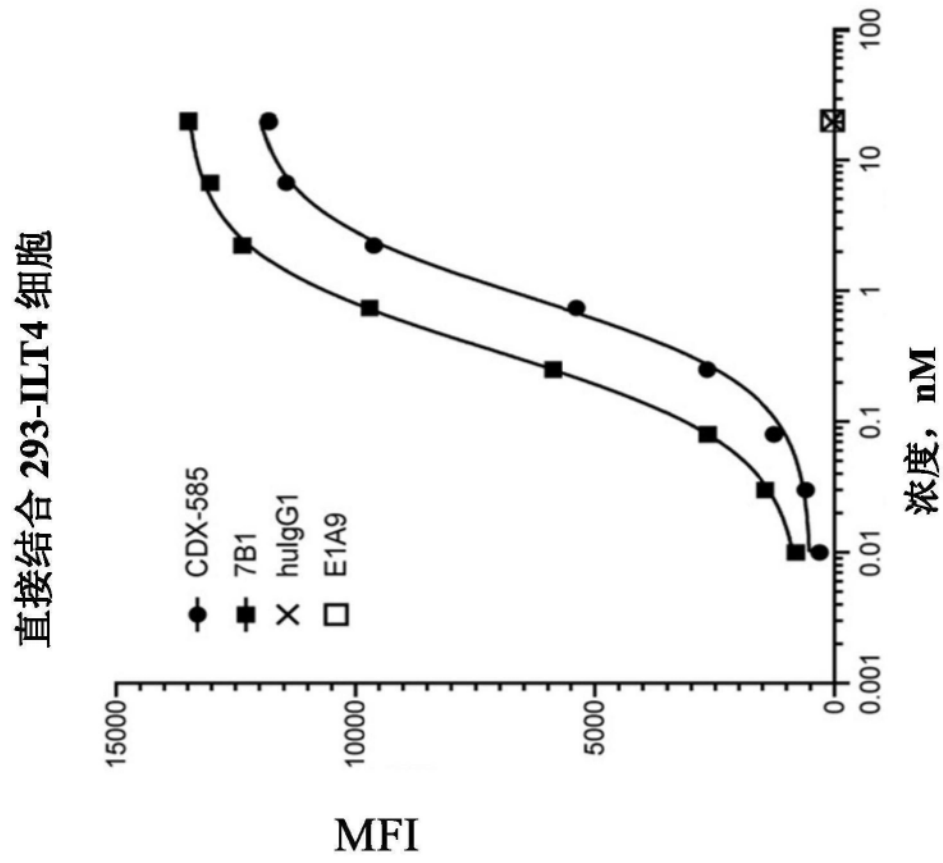


图5B

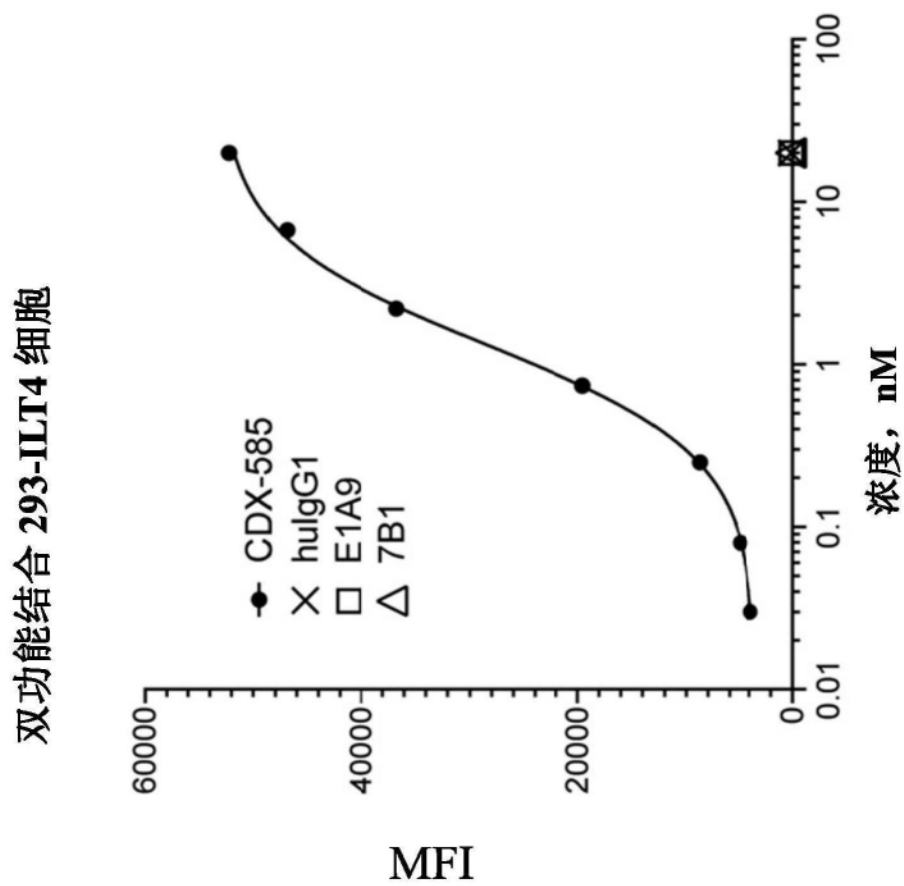


图6A

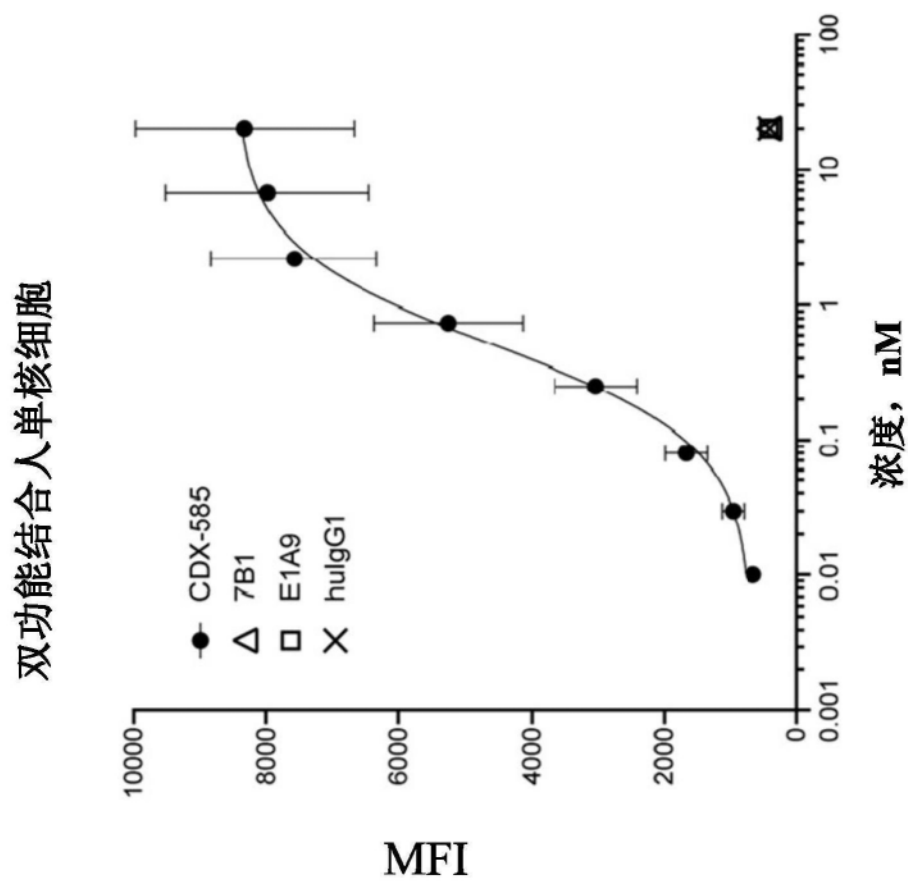


图6B

Octet 测定的抗原动力学 (CDX-585)

抗原	K_D (pM)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
ILT4 HIS	305	6.83E+05	2.09E-04
PD-1 HIS	63	7.66E+05	4.79E-05

Octet 测定的 CDX-585 人 FcγR 结合

FcγR	K_D (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
FcγRI	1378	5.28E+04	7.27E-02
FcγRIIa	n/a	n/a	n/a
FcγRIIb	n/a	n/a	n/a
FcγRIIIa	4909	1.41E+04	6.90E-02
FcγRIIIb	n/a	n/a	n/a

Octet 测定的 CDX-585 人 FcRn 结合

pH	K_D (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
6.0	2.99	9.42E+05	2.81E-03
7.2	113.5	3.05E+05	3.47E-02

图7

PD-1 信号通路阻断

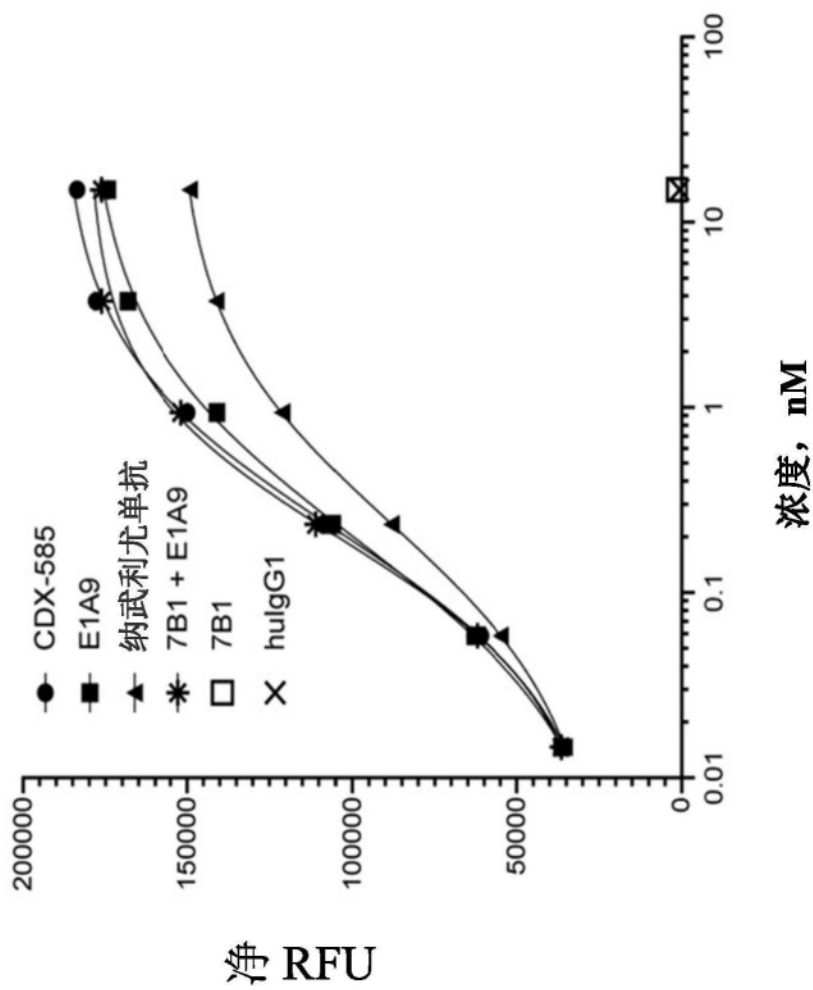


图8

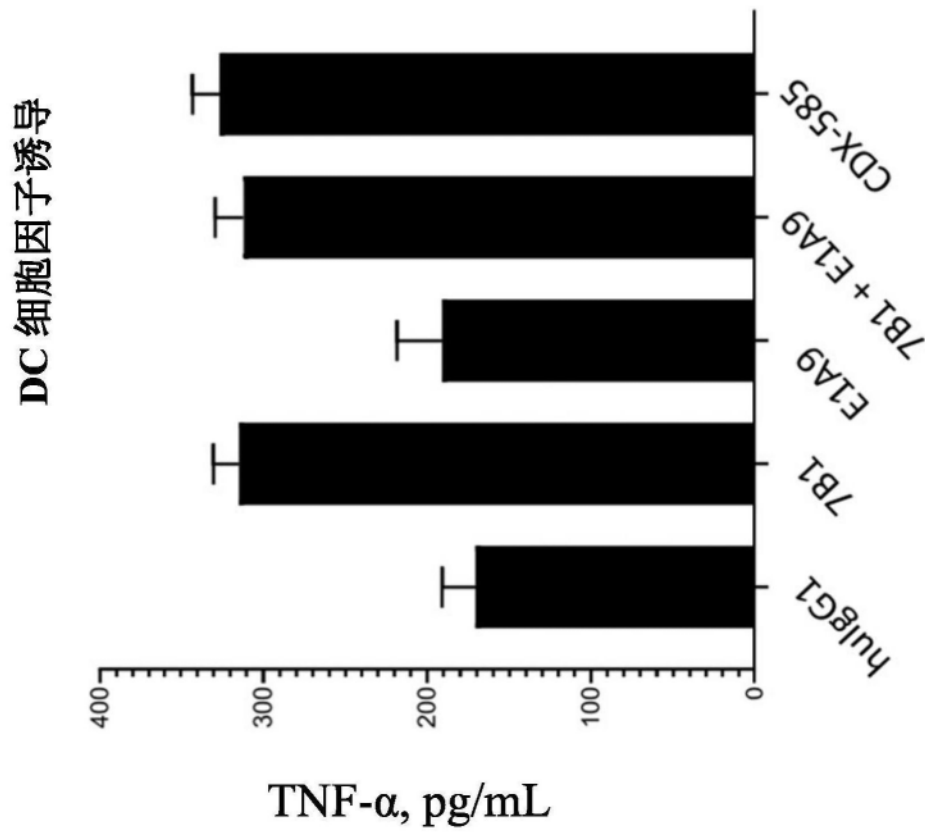


图9A

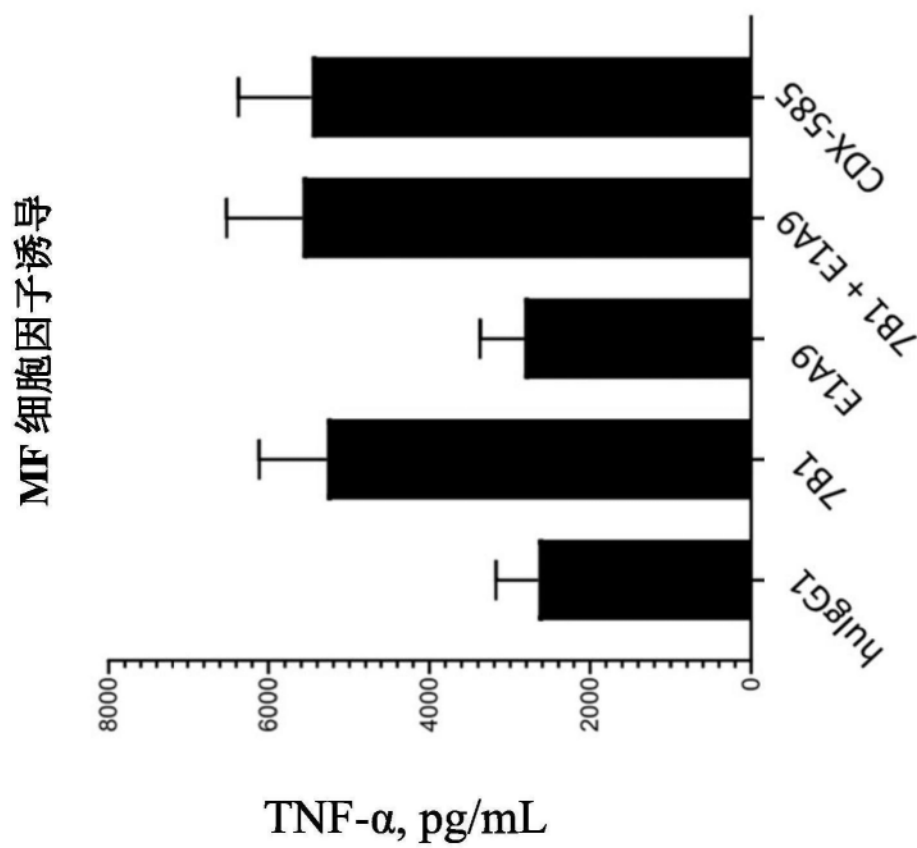


图9B

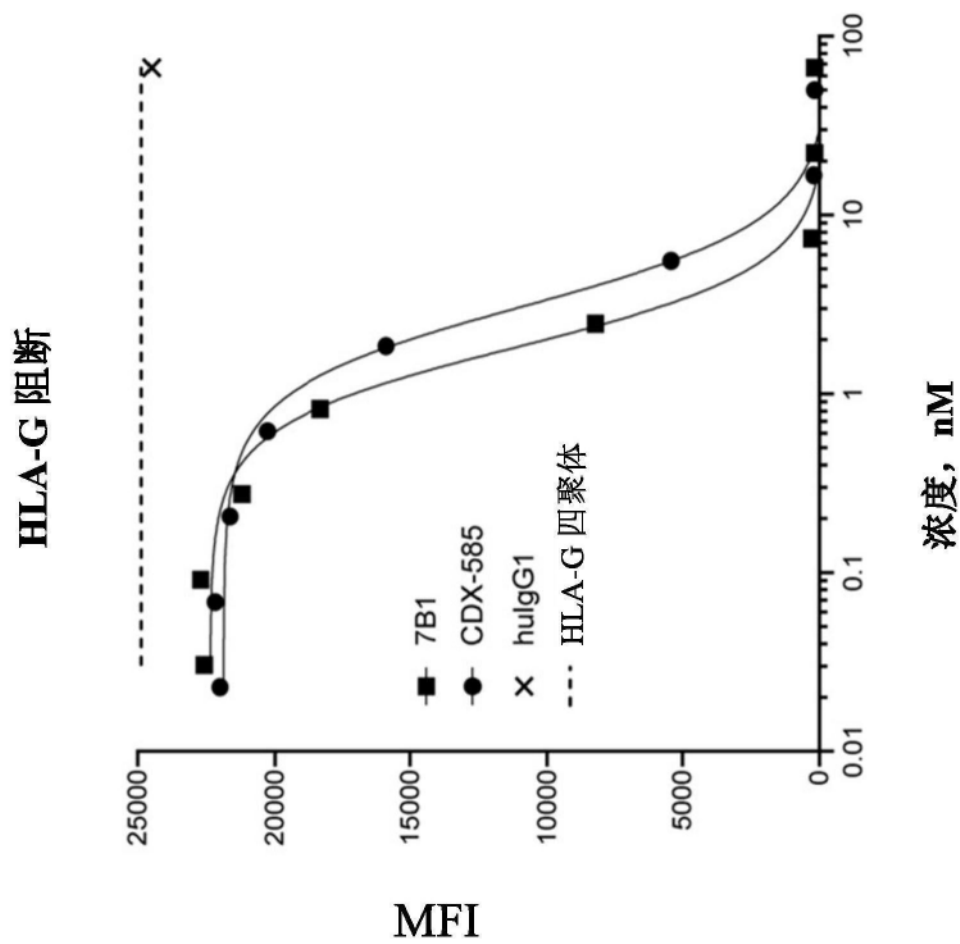


图10

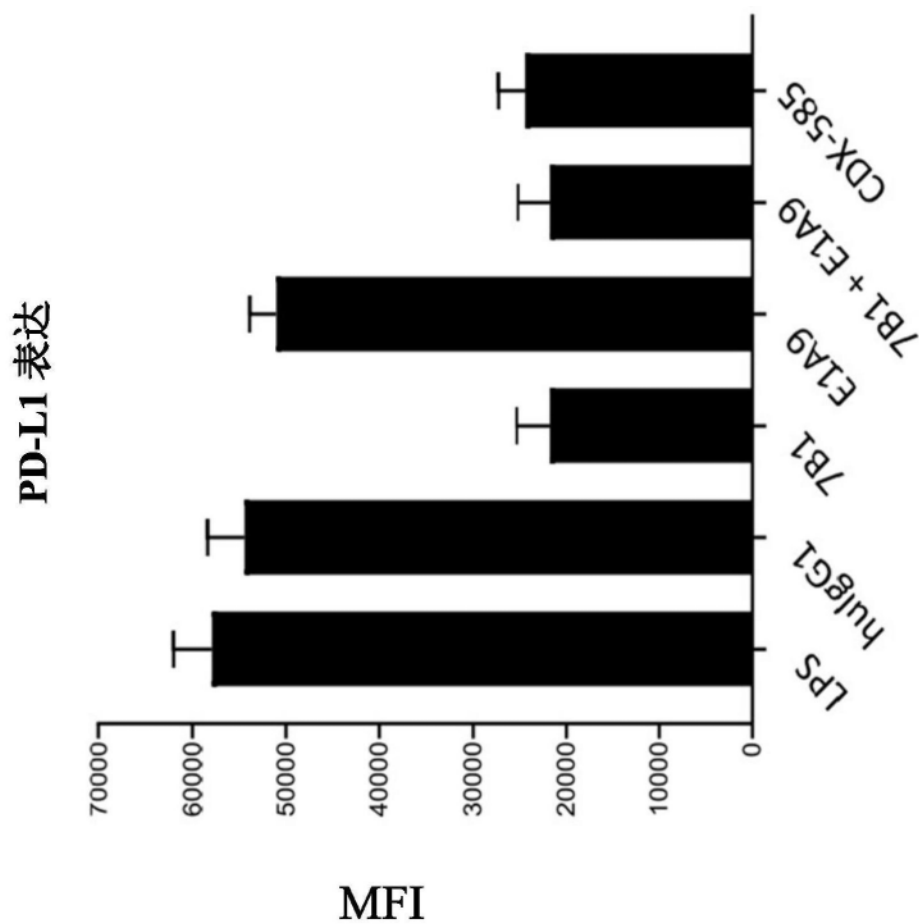


图11

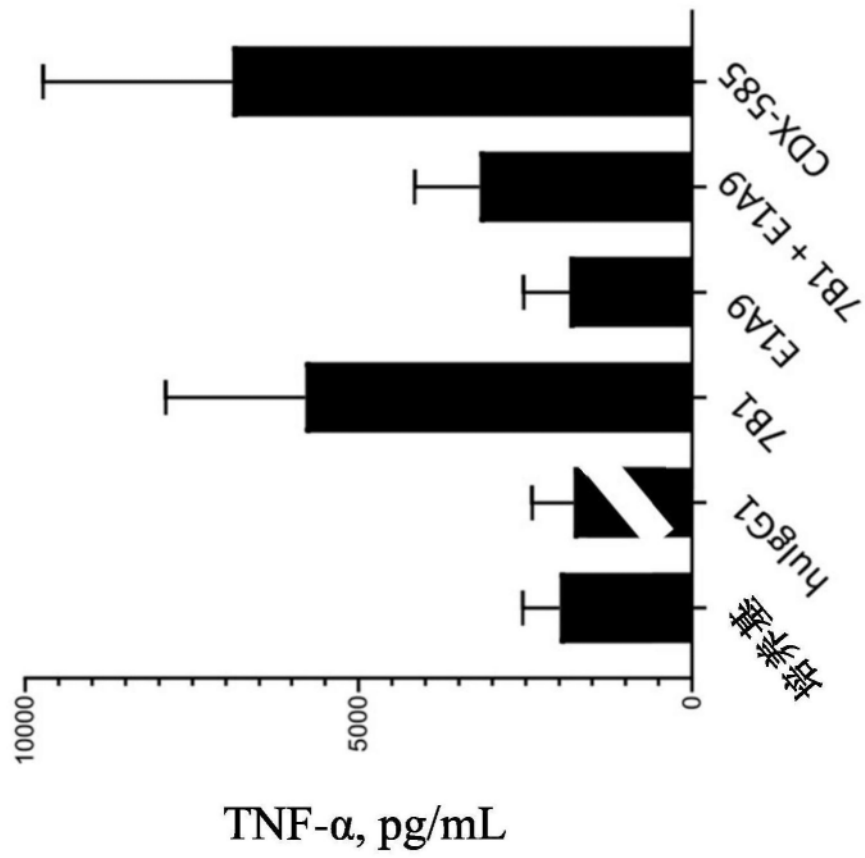


图12A

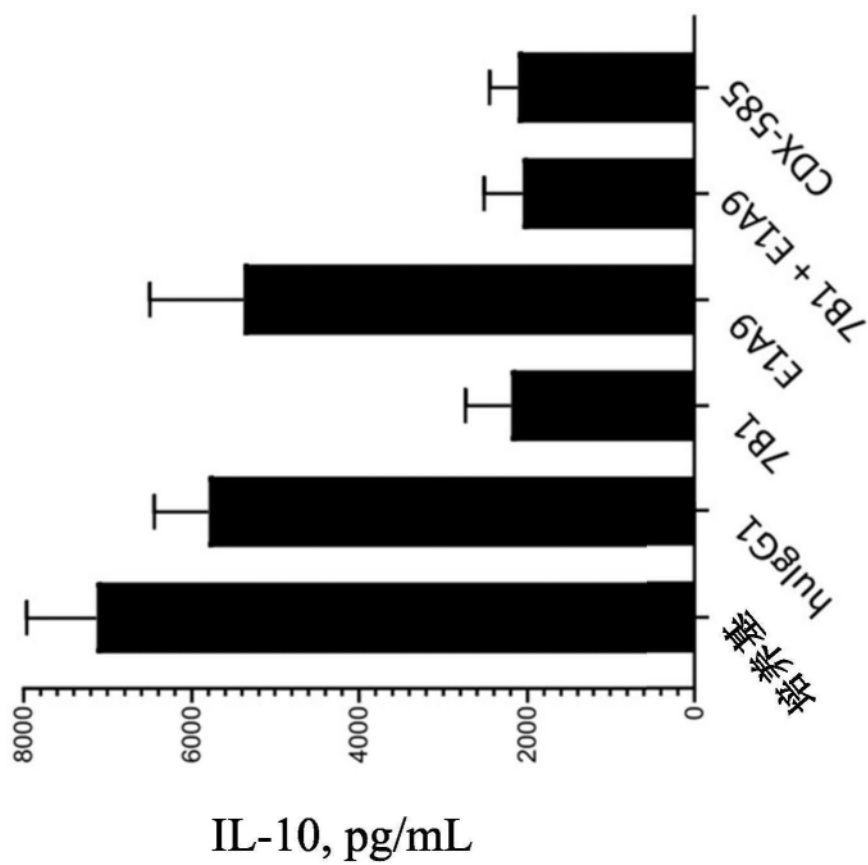


图12B

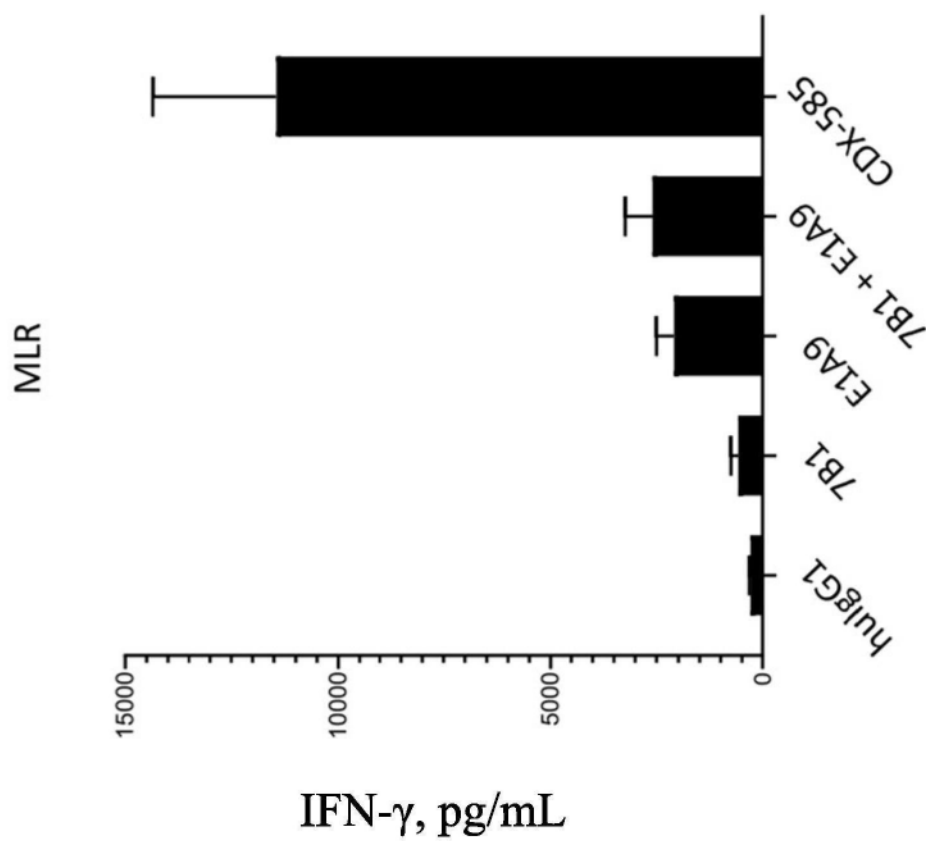


图13A

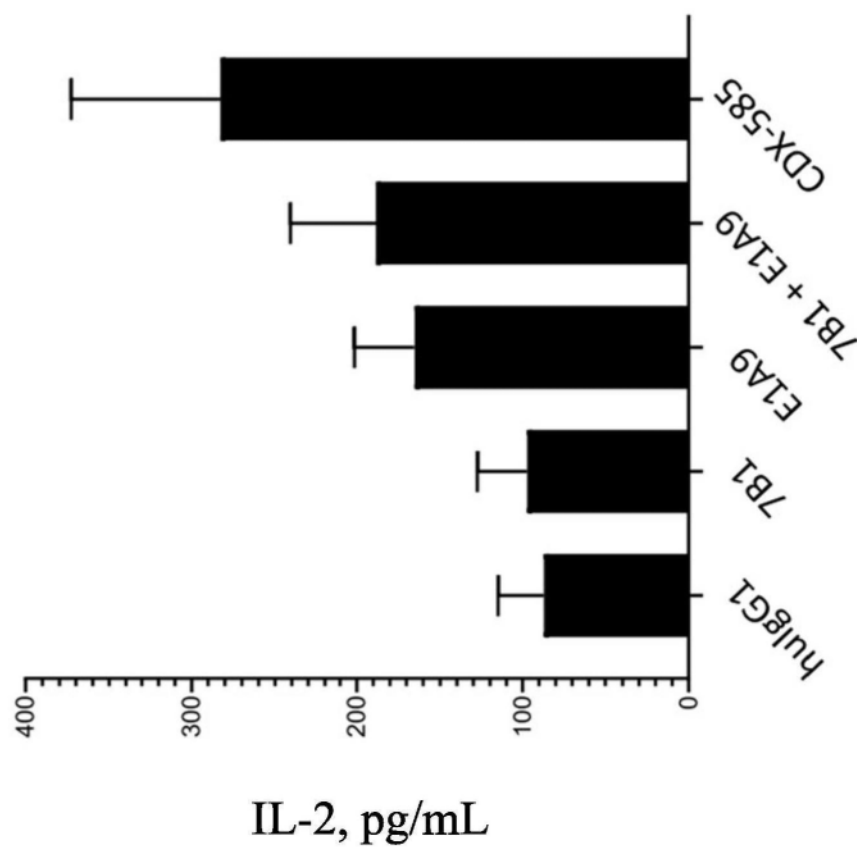


图13B

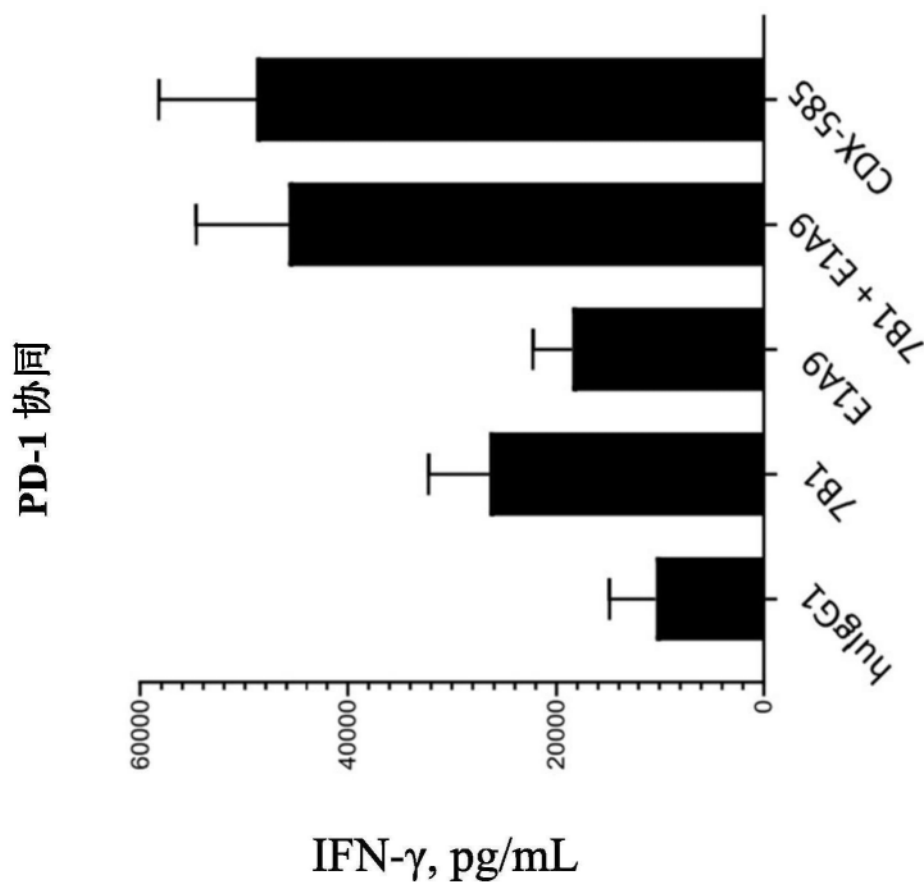


图14

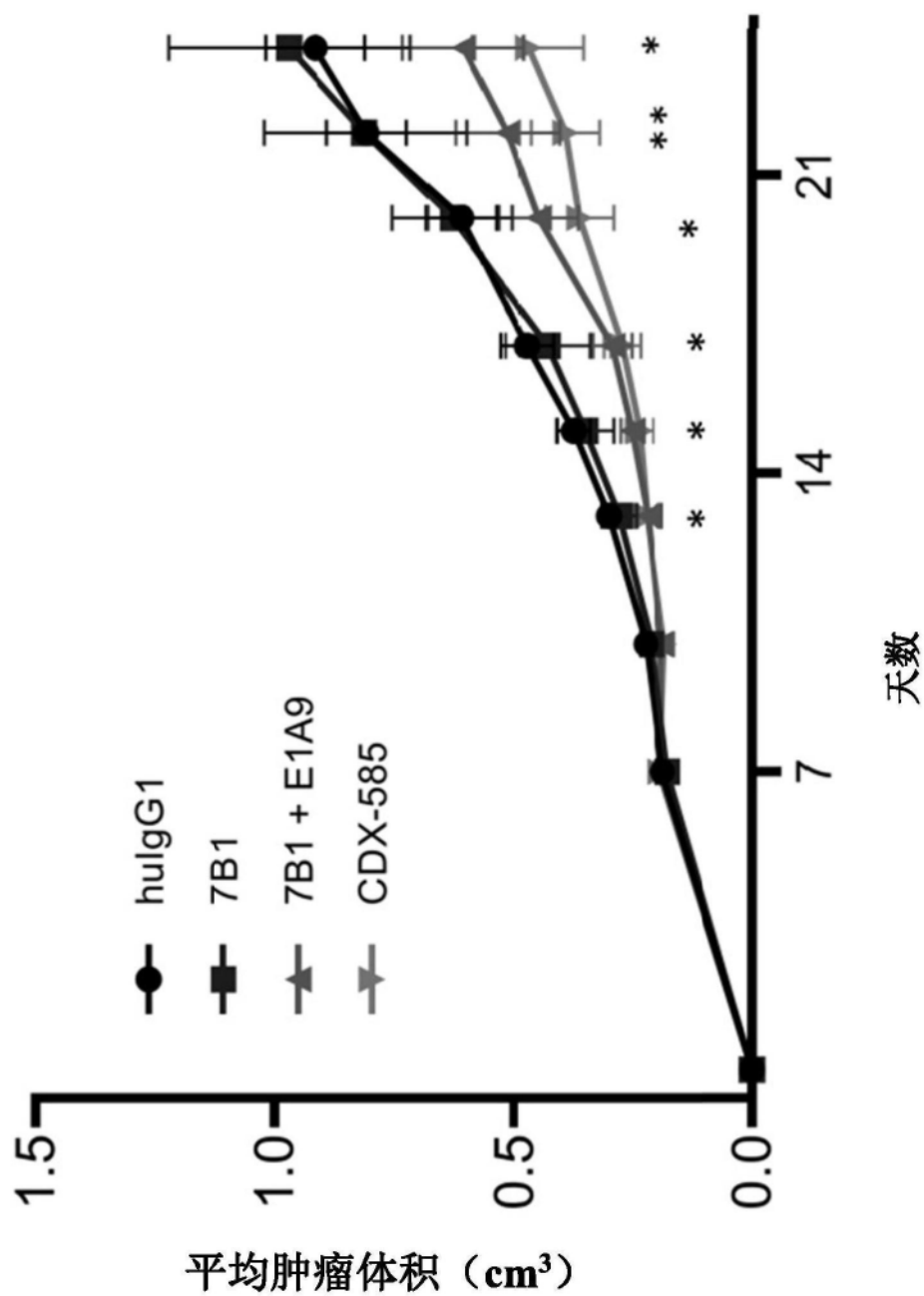


图15

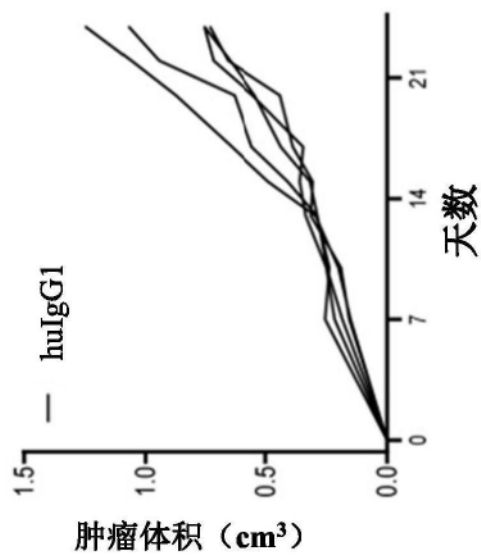


图16A

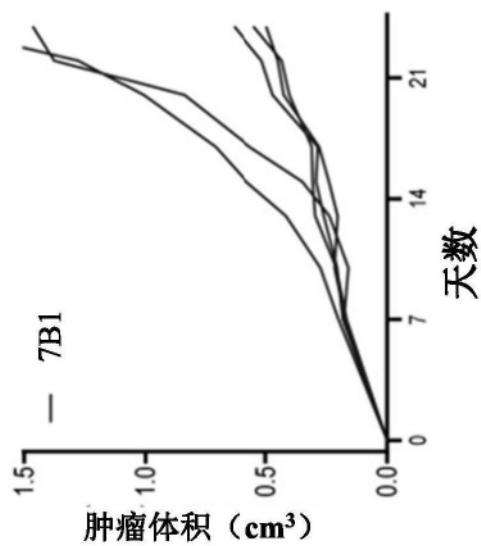


图16B

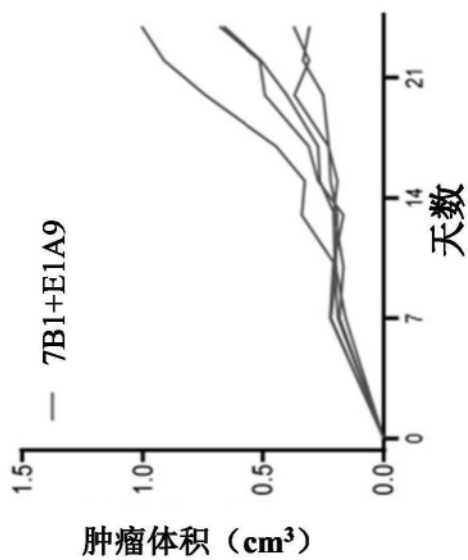


图16C

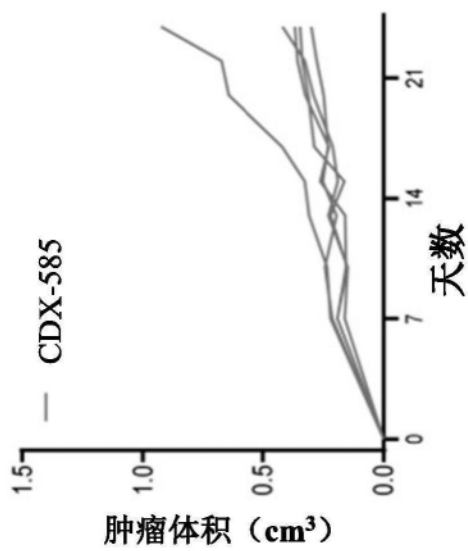


图16D

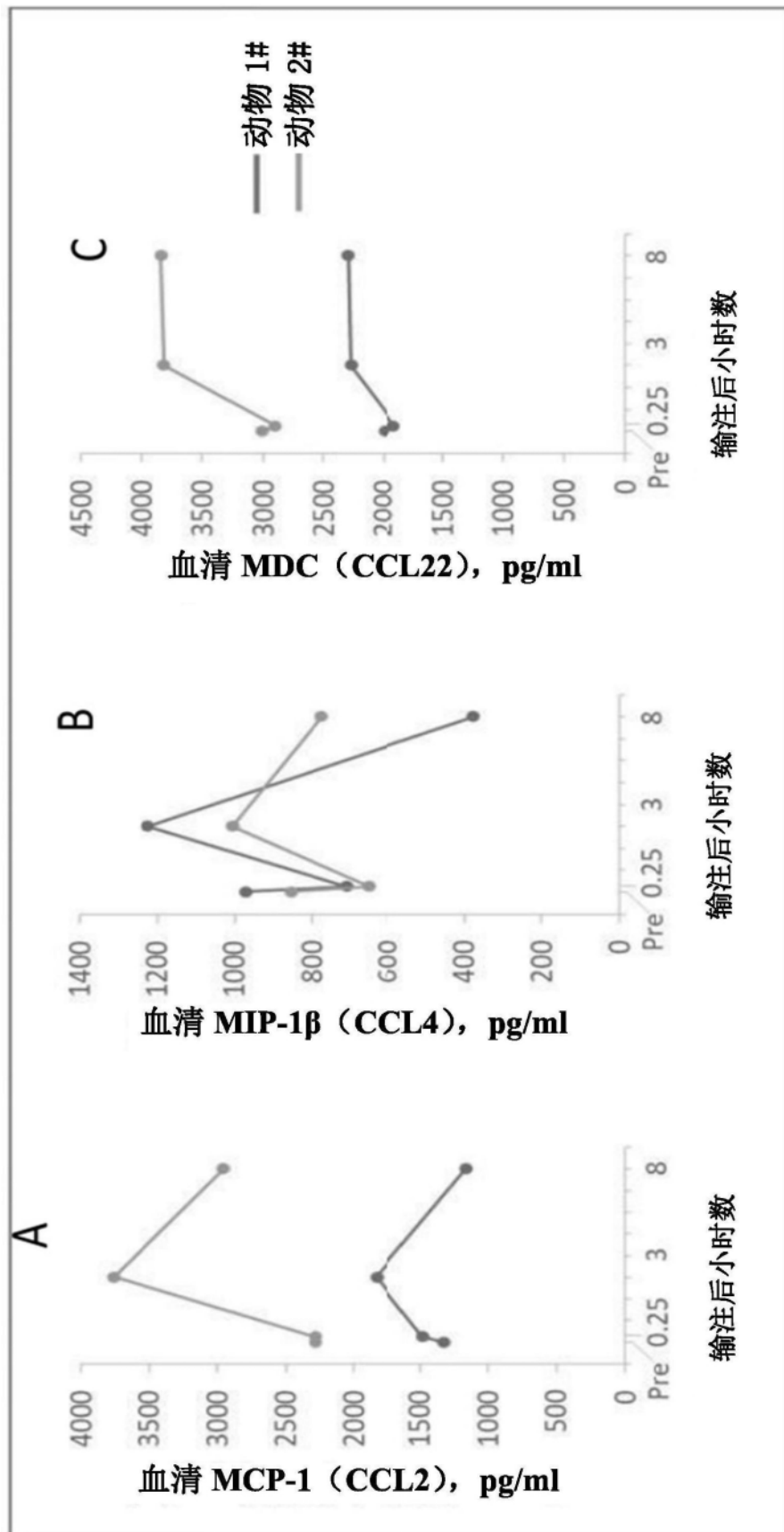


图17

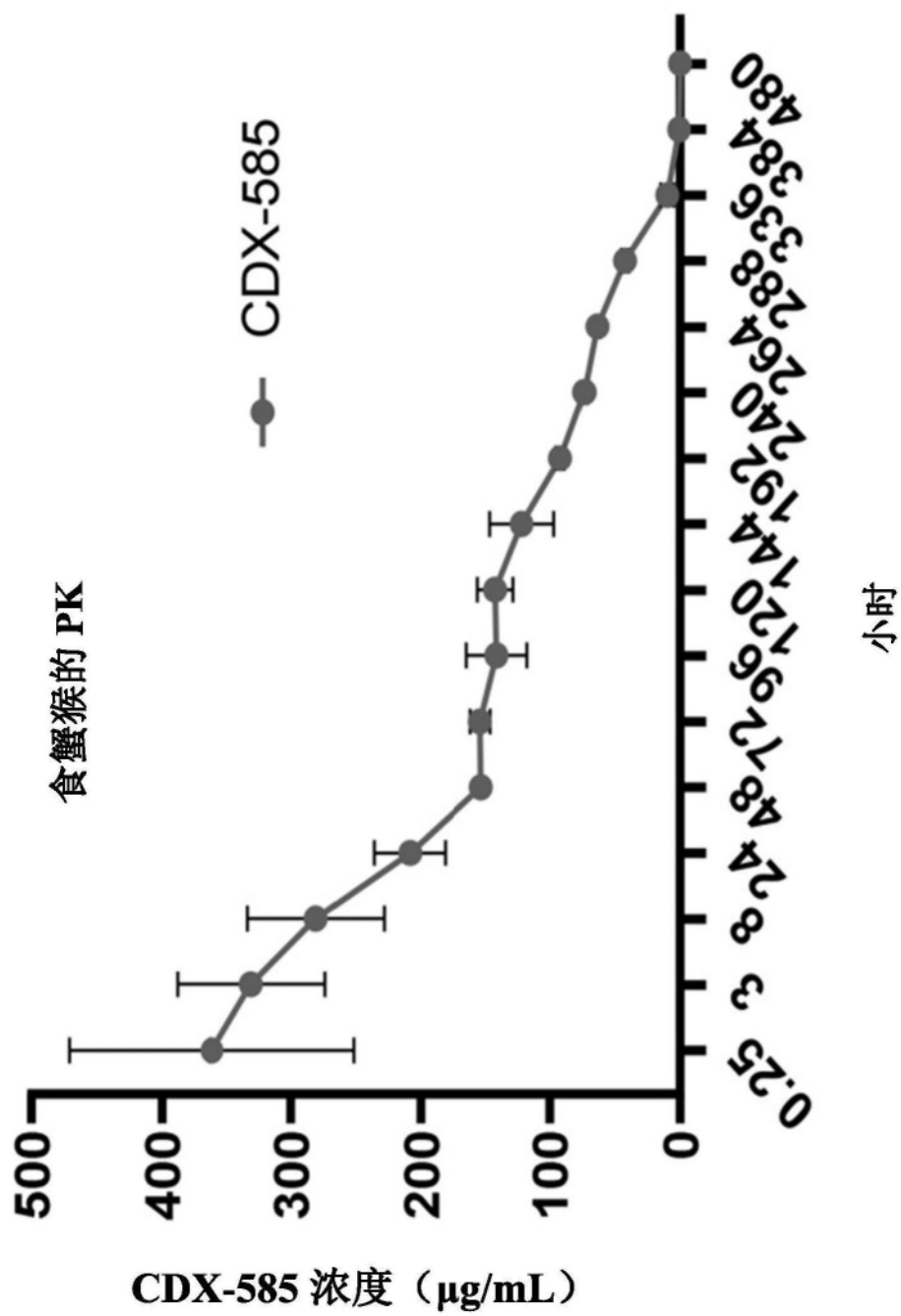


图18

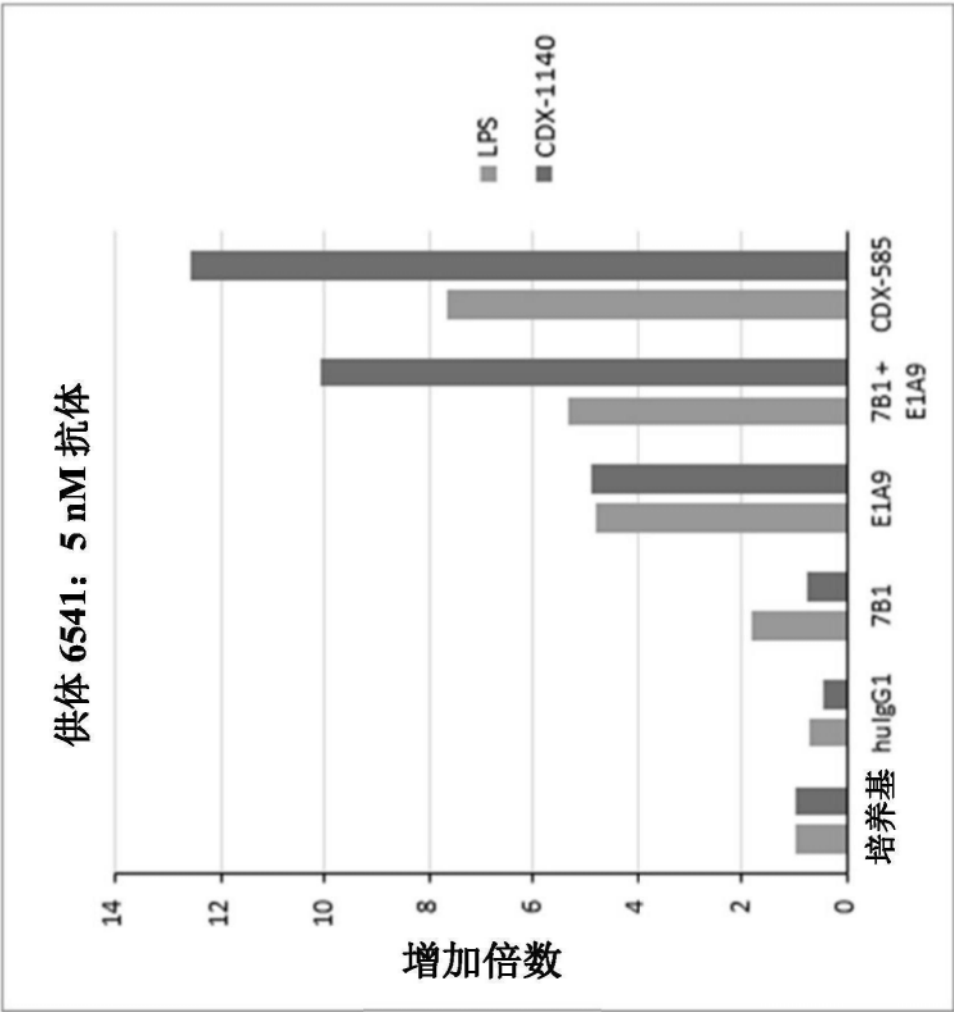


图19

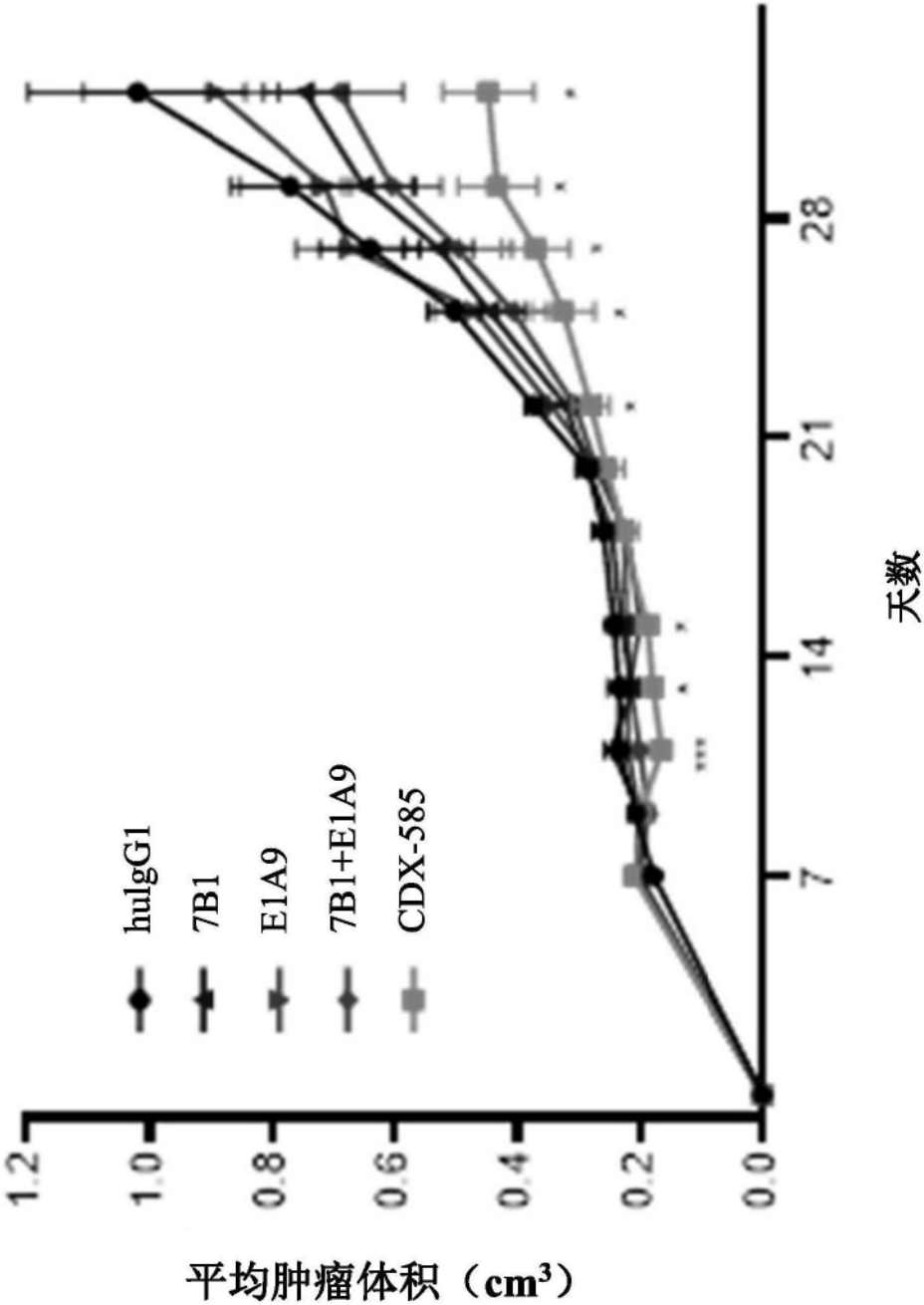


图20