



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117715942 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 15

(21) 申请号 202280032791.9	(74) 专利代理机构 深圳永慧知识产权代理事务所(普通合伙) 44378
(22) 申请日 2022.03.04	专利代理师 黄鑫
(30) 优先权数据 63/156,869 2021.03.04 US	(51) Int.Cl. C07K 16/44 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01) A61K 45/00 (2006.01) A61K 51/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2023.11.02	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2022/018855 2022.03.04	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02022/187586 EN 2022.09.09	
(71) 申请人 代码生物疗法公司 地址 美国宾夕法尼亚州 申请人 马里兰大学帕克分校	
(72) 发明人 S·穆罗 N·罗基 R·盖茨	权利要求书11页 说明书32页 序列表1页 附图10页

(54) 发明名称
使用抗体-寡核苷酸缀合物的增强的靶向

(57) 摘要
本公开提供了缀合至寡核苷酸的抗体及其片段,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,包含所述抗体及其片段的组合物,及其在检测方法、细胞分离方法、耗竭方法、诊断方法和治疗方法中的用途。

1. 一种缀合至寡核苷酸的抗体或其抗原结合片段,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中:

所述抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度比未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段更大或更快,并且其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体;或者

在将生理学上可接受量的所述抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段在静脉内施用后的一段时间以较小程度存在于所述受试者的血液中,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

2. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含IgA抗体或其抗原结合片段、IgD抗体或其抗原结合片段、IgE抗体或其抗原结合片段、IgG抗体或其抗原结合片段、或IgM抗体或其抗原结合片段。

3. 如权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgA抗体或其抗原结合片段包含IgA1抗体或其抗原结合片段、或IgA2抗体或其抗原结合片段。

4. 如权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG抗体或其抗原结合片段包含IgG1抗体或其抗原结合片段、IgG2抗体或其抗原结合片段、IgG3抗体或其抗原结合片段、或IgG4抗体或其抗原结合片段。

5. 如权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG1抗体或其抗原结合片段包含IgG1 G1m1同种异型抗体或其抗原结合片段、IgG1 G1m2同种异型抗体或其抗原结合片段、IgG1 G1m3同种异型抗体或其抗原结合片段、或IgG1 G1m17同种异型抗体或其抗原结合片段。

6. 如权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG1抗体或其抗原结合片段包含变体IgG1重链。

7. 如权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述变体IgG1抗体或其抗原结合片段包含 κ 轻链。

8. 如权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述 κ 轻链具有同种异型Km1、Km2或Km3。

9. 如权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述变体IgG1抗体或其抗原结合片段包含 λ 轻链。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含衍生化抗体或其抗原结合片段。

11. 如权利要求10所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述衍生化包括糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过保护/阻断基团的衍生化、蛋白水解切割的结果、与细胞配体或其他蛋白质的连接、或甲酰化。

12. 如权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述糖基化包含具有两个N-乙酰葡萄糖胺(G1cNAc)残基、三个甘露糖残基和两个G1cNAc残基的核心结构,所述两个G1cNAc残基 β -1,2连接至 α -6甘露糖和 α -3甘露糖。

13. 如权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,其中一个或多个岩藻糖残基、一个或多个半乳糖残基、一个或多个高甘露糖聚糖残基、一个或多个二等分G1cNAc残基或一个或多个唾液酸残基连接至所述核心结构。

14. 如权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述一个或多个高甘露糖聚糖残基包含Man-5或Man-9。

15. 如权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述一个或多个唾液酸残基包含N-乙酰神经氨酸残基(NANA)或N-羟乙酰神经氨酸残基(NGNA)。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段共价连接至效应物部分,并且其中所述共价连接不影响所述抗体或其抗原结合片段与抗原的结合。

17. 如权利要求16所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述效应物部分包括可检测标记、细胞毒性剂、化学治疗剂、核酸分子、抗肿瘤剂、药物、毒素、生物活性蛋白、另一种抗体或其抗原结合片段、合成的或天然存在的聚合物、放射性核素、放射性同位素、螯合金属、纳米颗粒、报告基团、药物部分、多肽、信号传导分子、血栓形成剂或抗血管生成剂、生物反应调节剂或化学治疗剂。

18. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述生物活性蛋白包括酶。

19. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述放射性核素包括放射性碘化物。

20. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述报告基团是荧光化合物或能够通过NMR或ESR谱检测的化合物。

21. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述毒素包括相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、皂草素、假单胞菌外毒素、白喉毒素、溴化乙锭、PE40、PE38、白树毒素、RNA酶、肽核酸(PNA)、1型或2型核糖体灭活蛋白(RIP)、商陆抗病毒蛋白(PAP)、异株泻根毒蛋白、苦瓜蛋白、化学治疗剂或三角梅核糖体失活蛋白。

22. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述信号传导分子包括 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子或组织型纤溶酶原活化剂。

23. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述血栓形成剂或抗血管生成剂包括血管抑素或内皮抑素。

24. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述生物反应调节剂包括细胞因子或生长因子。

25. 如权利要求24所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述细胞因子包括白介素-1(IL-1)、白介素-2(IL-2)或白介素-6(IL-6)。

26. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述生长因子包括粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或神经生长因子(NGF)。

27. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述细胞毒性剂包括小分子、前药、类美登素或毒素。

28. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述细胞毒性剂包括泰素、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔或嘌呤霉素。

29. 如权利要求1至27中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含3至5个类美登素分子。

30. 如权利要求29所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述3至5个类美登素分子中的一个类美登素分子通过化学接头缀合至所述抗体或其抗原结合片段。

31. 如权利要求30所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述化学接头包括N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)或琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯。

32. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测标记包括放射性化合物、荧光化合物、发色团、酶、显像剂、金属离子、底物、荧光部分或酶标记。

33. 如权利要求32所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述荧光部分包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯或藻红蛋白。

34. 如权利要求32所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述酶标记包括碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或葡萄糖氧化酶。

35. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述效应物部分包括抗代谢物、烷化剂、蒽环类药物、抗生素或抗有丝分裂剂。

36. 如权利要求35所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗代谢物包括甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷或5-氟尿嘧啶达卡巴嗪。

37. 如权利要求35所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述烷化剂包括氮芥、噻替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C5或顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂。

38. 如权利要求35所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述蒽环类药物包括柔红霉素或多柔比星。

39. 如权利要求35所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗生素包括放线菌素D、博来霉素、光辉霉素、氨基霉素(AMC)、卡奇霉素或倍癌霉素。

40. 如权利要求35所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗有丝分裂剂包括长春新碱或长春碱。

41. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述放射性核素包括 ^{13}N 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{67}Cu 、 ^{77}Br 、 $^{80\text{m}}\text{Br}$ 、 ^{82}Rb 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{113}Sn 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{126}I 、 ^{131}I 、 ^{133}I 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 $^{195\text{m}}\text{Hg}$ 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 或 ^{225}Ac 。

42. 如权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述化学治疗剂包括顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、四硝酸三铂、菲铂、吡铂、赛特铂、甲氨蝶呤、长春新碱、多柔比星、衣霉素、寡霉素、硼替佐米、MG132、5-氟尿嘧啶、索拉非尼、夫拉平度、吉西他滨、泰素、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、羟基脲、阿糖胞苷、丝裂霉素、环磷酰胺、异环磷酰胺、亚硝基脲、达卡巴嗪、丙卡巴肼、依托泊苷、喜树碱、博来霉素、伊达比星、柔红霉素、放线菌素D、偏端霉素A、依替丁、纺锤霉素、澳瑞他汀、安吡啶、灵菌红素、硼替佐米、匹苯济醇、托马霉素、倍癌霉素SA、普卡霉素、米托蒽醌、天冬酰胺酶、长春碱、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛、CPT-11、格列卫、厄洛替尼、吉非替尼、伊布替尼、克唑替尼、塞瑞替尼、拉帕替尼、纳维替克或瑞戈非尼。

43. 如权利要求1至42中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段通过共价键融合至另一种蛋白质或其部分的氨基酸序列。

44. 如权利要求43所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述共价键是肽键。

45. 如权利要求43所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述融合是通过所述抗体或抗原结合片段的N末端或C末端进行的。

46. 如权利要求43所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述融合是通过所述抗体或其抗原结合片段的内部部分进行的。

47. 如权利要求43所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述另一种蛋白质或其部分与所述抗体或其抗原结合片段的恒定结构域的N末端连接。

48. 如权利要求43所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述蛋白质或其部分的长度为至少10个、20个或50个氨基酸。

49. 如权利要求16所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述效应物部分增加组合物在体内的半衰期或增强所述抗体或抗原结合片段穿过上皮屏障的递送。

50. 如权利要求16所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述效应物部分包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物。

51. 如权利要求1至50中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段缀合至小分子毒素。

52. 如权利要求51所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述小分子毒素包括dolostatin或dolostatin肽类似物或衍生物。

53. 如权利要求52所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述多拉司他汀肽类似物或衍生物包括澳瑞他汀。

54. 如权利要求52所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述dolostatin或多拉司他汀肽类似物或衍生物通过所述抗体或其抗原结合片段的N末端或C末端与所述抗体或其抗原结合片段连接。

55. 如权利要求52所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述dolostatin或多拉司他汀肽类似物或衍生物通过所述抗体或其抗原结合片段的内部部分进行连接。

56. 如权利要求52所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述dolostatin或多拉司他汀肽类似物或衍生物是N末端连接的单甲基澳瑞他汀药物部分DE或DF。

57. 如权利要求1至56中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段缀合至脂质体。

58. 如权利要求1至57中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段连接至聚(乙二醇) (PEG) 部分。

59. 如权利要求58所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述PEG部分连接至氨基酸侧链或末端氨基酸官能团。

60. 如权利要求59所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述氨基酸侧链或末端氨基酸官能团包括氨基、亚氨基、硫醇基、羟基或羧基。

61. 如权利要求60所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述硫醇基是所述抗体或其抗原结合片段的至少一个半胱氨酸残基。

62. 如权利要求1至61中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含修饰。

63. 如权利要求62所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述修饰包括生物素化或添加辣根过氧化物酶。

64. 如权利要求1至63中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段偶联至可检测物质。

65. 如权利要求64所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测物质包括酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、光学剂、放射性材料、正电子发射金属或非放射性顺磁性金属离子。

66. 如权利要求65所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述荧光材料包括荧光素、罗丹明或其衍生物。

67. 如权利要求65所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述光学剂包括卟啉、蒽醌、蒽吡啶、茈醌、咕吨、花青、吡啶、吩噻嗪或吩噻嗪的衍生物。

68. 如权利要求65所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述非放射性顺磁性金属离子包括Gd(III)离子、Eu(III)离子、Dy(III)离子、Pr(III)离子、Pa(IV)离子、Mn(II)离子、Cr(III)离子、Co(III)离子、Fe(III)离子、Cu(II)离子、Ni(II)离子、Ti(III)离子或V(IV)离子。

69. 如权利要求64所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测物质直接缀合至所述抗体或其抗原结合片段。

70. 如权利要求64所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测物质间接缀合至所述抗体或其抗原结合片段。

71. 如权利要求70所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述缀合包含中间体。

72. 如权利要求32所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述酶标记包括萤光素酶、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶、杂环氧化酶、乳过氧化物酶或微过氧化物酶。

73. 如权利要求72所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述萤光素酶包括萤火虫萤光素酶或细菌萤光素酶。

74. 如权利要求72所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述过氧化物酶包括辣根过氧化物酶(HRPO)。

75. 如权利要求72所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述糖氧化酶包括葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

76. 如权利要求72所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述杂环氧化酶包括尿酸酶或黄嘌呤氧化酶。

77. 如权利要求65所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述辅基包括链霉亲和素/生物素或亲和素/生物素。

78. 如权利要求65所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述荧光材料包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白。

79. 如权利要求65所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述发光材料包括鲁米诺。

80. 如权利要求65所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述生物发光材料包括萤光素酶、萤光素或水母发光蛋白。

81. 如权利要求65所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述放射性材料包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc 。

82. 如权利要求1至81中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原

结合片段包括多克隆抗体或其抗原结合片段、单克隆抗体或其抗原结合片段、或基因工程化或以其他方式修饰的抗体或其抗原结合片段。

83. 如权利要求1至82中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括嵌合抗体、人源化抗体、灵长类源化抗体或异源缀合抗体。

84. 如权利要求83所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述异源缀合抗体包括双特异性抗体、二抗体、三抗体或四抗体。

85. 如权利要求1至84中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、scFv-Fc、二抗体、双特异性二抗体、三特异性三抗体、微型抗体、单特异性Fab₂、双特异性Fab₂、三特异性Fab₃、纳米抗体、IgNAR、V-NAR、hcIgG或VhH片段。

86. 如权利要求1至85中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是治疗性抗体。

87. 如权利要求86所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述治疗性抗体包括3F8、8H9、阿巴伏单抗、阿昔单抗、阿比妥珠单抗、阿泽奇单抗、阿利鲁单抗、阿克托舒单抗、阿达木单抗、阿德木单抗、阿杜那单抗、阿伐斯单抗、阿非莫单抗、培戈-阿拉赛珠单抗、阿仑单抗、阿利库单抗、喷替酸阿妥莫单抗、阿麦妥单抗、埃万妥单抗、马安那莫单抗、安德利昔单抗、雷星-阿奈妥单抗、阿尼鲁单抗、安苏维单抗、安芦珠单抗、阿泊珠单抗、伊汀-阿普卢妥单抗、阿西莫单抗、阿伐苏单抗、阿塞珠单抗、阿特殊单抗、阿度尤单抗、阿替奴单抗、阿替韦单抗、玛替韦单抗、奥西韦单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、维汀-阿妥昔单抗、巴姆拉尼单抗、巴匹珠单抗、巴利昔单抗、巴维昔单抗、BCD-100、贝妥莫单抗、贝戈洛单抗、贝兰他单抗莫福汀、贝利木单抗、贝玛妥珠单抗、贝那利珠单抗、贝度尤单抗、贝迈奇单抗、伯萨利单抗、柏替木单抗、贝索单抗、贝伐珠单抗、贝洛托舒单抗、比西单抗、比玛卢单抗、比美吉珠单抗、泊特埃单抗、比伐珠单抗、布来鲁单抗、博纳吐单抗、布隆妥维单抗、布索组单抗、伯考赛珠单抗、布雷库单抗、本妥昔单抗、布雷奴单抗、布罗达单抗、布洛赛珠单抗、布隆妥珠单抗、布罗舒单抗、卡比利珠单抗、替卡利尤单抗、卡瑞利珠单抗、卡那奴单抗、莫坎妥珠单抗、雷坎妥珠单抗、卡帕珠单抗、卡西瑞单抗、卡罗单抗、卡芦单抗、卡罗妥昔单抗、卡妥索单抗、cBR96-多柔比星免疫缀合物、西利珠单抗、西米普利单抗、阿姆白介素-2-瑟妥珠单抗、赛妥珠单抗、西利单抗、西妥昔单抗、赛必妥单抗、西妥珠单抗、泊西他单抗、西妥木单抗、克拉扎珠单抗、克立昔单抗、泰坦-克利妥单抗、考曲妥单抗、培汀-考非妥单抗、雷星-考妥昔单抗、可那木单抗、康赛珠单抗、考韦昔单抗、克瑞珠单抗、立赞利珠单抗、克罗特度单抗、CR6261、古妥珠单抗、达西珠单抗、达克珠单抗、达洛珠单抗、培戈-达匹利单抗、达雷木单抗、德屈库单抗、登赛珠单抗、玛汀-地宁妥单抗、地诺单抗、玛汀-迪妥昔单抗、地洛妥单抗生物素、地莫单抗、迪扎米单抗、迪妥昔单抗、迪妥昔单抗β、地利伏单抗、多玛洛珠单抗、阿托度单抗、多塔利单抗、曲齐妥单抗、DS-8201、度戈妥单抗、度匹鲁单抗、度伐利尤单抗、度司妥单抗、度妥昔单抗、依美昔单抗、依库单抗、埃巴单抗、依决洛单抗、依法利珠单抗、依芬古单抗、埃迪鲁单抗、依来努单抗、依更妥单抗、埃罗妥单抗、艾西莫单抗、依米妥单抗、依帕伐单抗、依玛妥单抗、艾美赛单抗、纬恩泊妥单抗、依那妥单抗、维汀-恩氟妥单抗、培戈赖莫单抗、依诺妥单抗、依诺凯组单抗、依诺苏单抗、恩妥昔单抗、艾可瑞妥单抗、西依匹莫单抗、依帕珠单抗、依普奈单抗、厄瑞努单抗、厄利珠单抗、厄妥索

单抗、埃达珠单抗、埃特司韦单抗、艾替利单抗、依曲利组单抗、依维苏单抗、依洛尤单抗、艾韦单抗、法索单抗、法拉莫单抗、法瑞西单抗、法妥组单抗、法司努单抗、FBTA05、泛维珠单抗、非扎奴单抗、菲巴珠单抗、非拉妥组单抗、芬妥木单抗、非利伏单抗、法兰妥单抗、夫来库单抗、伏妥珠单抗、芳妥珠单抗、福雷芦单抗、福拉韦单抗、瑞玛奈珠单抗、非苏木单抗、弗洛西单抗、夫卢维单抗、福拉奴单抗、伏妥昔单抗、伽奈珠单抗、加利昔单抗、甘妥单抗、加尼妥单抗、更汀芦单抗、伽妥珠单抗、加维莫单抗、格迪伏单抗、吉妥单抗、吉伏组单抗、吉维单抗、瑾司鲁单抗、吉妥昔单抗、维汀-格巴妥木单抗、戈利木单抗、戈利昔单抗、戈奈单抗、古塞库单抗、伊利尤单抗、伊巴珠单抗、IBI308、替伊莫单抗、艾芦库单抗、依达赛珠单抗、伊波妥组单抗、伊戈伏单抗、维汀伊达珠单抗、IMAB362、伊玛鲁单抗、伊普利单抗、英西单抗、伊德维单抗、伊马曲单抗、英克勒库单抗、雷英妥昔单抗、维汀-英度妥单抗、伊奈利珠单抗、英夫利西单抗、英妥木单抗、伊诺莫单抗、奥英妥珠单抗、伊匹单抗、Iomab-B、伊妥木单抗、艾沙妥昔单抗、伊卡利单抗、艾司妥单抗、伊利组单抗、依克珠单抗、凯利昔单抗、拉贝珠单抗、拉妥珠单抗、维拉妥珠单抗、兰帕珠单抗、拉那芦单抗、兰洛珠单抗、恩星-拉妥昔单抗、拉卡维西单抗、来瑞组单抗、来马索单抗、拉那利尤单抗、伦韦单抗、仑兹鲁单抗、乐德木单抗、乐利单抗、来索伏单抗、来利珠单抗、来沙木单抗、利韦单抗、维汀-利法妥珠单抗、利格利珠单抗、替朗妥昔单抗、维汀-罗妥昔珠单抗、沙泰坦-利洛托单抗、林妥珠单抗、利鲁单抗、洛迪赛珠单抗、洛吉维单抗、莫星-洛沃妥珠单抗、卢卡木单抗、培戈-鲁利珠单抗、鲁昔单抗、鲁妥珠单抗、鲁帕妥单抗、阿汀-鲁帕妥单抗、鲁吉珠单抗、玛替韦单抗、马帕木单抗、玛格妥昔单抗、马塔西单抗、马司莫单抗、玛弗利木单抗、马妥珠单抗、美泊利单抗、美替木单抗、米拉组单抗、明瑞莫单抗、米吉珠单抗、索星-米妥昔单抗、米妥莫单抗、莫多妥昔单抗、莫格利珠单抗、莫那利珠单抗、莫罗木单抗、莫舒内珠单抗、莫维组单抗、帕西妥莫单抗、莫罗单抗-CD3、他那可单抗、那美芦单抗、埃托-那普妥莫单抗、恩星-那妥昔单抗、纳奈妥单抗、那他珠单抗、那赛昔珠单抗、那韦伏单抗、那昔妥单抗、奈巴库单抗、耐昔妥珠单抗、奈莫利珠单抗、NEOD001、奈瑞莫单抗、奈伐苏单抗、尼塔奇单抗、尼妥珠单抗、尼塞韦单抗、纳武单抗、疏诺莫单抗、奥托萨昔单抗、奥比妥珠单抗、奥卡妥珠单抗、奥瑞珠单抗、奥西韦单抗、奥度莫单抗、奥法木单抗、奥拉单抗、奥来鲁单抗、奥仑达利珠单抗、奥洛组单抗、奥马珠单抗、奥博妥单抗、OMS721、奥那妥组单抗、昂妥昔珠单抗、奥瓦利单抗、奥匹努单抗、莫妥组单抗、奥戈伏单抗、奥替苏单抗、奥昔组单抗、奥替利单抗、奥乐妥珠单抗、奥塞芦单抗、奥扎奈珠单抗、奥利组单抗、帕昔单抗、帕利珠单抗、潘瑞鲁单抗、帕尼单抗、潘科曼单抗、帕巴库单抗、帕萨妥珠单抗、帕考珠单抗、帕妥昔珠单抗、帕替组单抗、帕曲妥单抗、PDR001、派姆单抗、帕尼单抗、培拉凯珠单抗、帕妥珠单抗、培克珠单抗、匹地利珠单抗、维汀-匹那妥珠单抗、平妥莫单抗、普拉鲁单抗、普瑞鲁单抗、洛扎利珠单抗、泊咖丽珠单抗、维泊妥珠单抗、泊奈组单抗、珀韦昔单抗、普尼珠单抗、普利扎丽珠单抗、普立昔单抗、瑞托萨昔单抗、普托木单抗、PRO140、奎利珠单抗、雷妥莫单抗、雷曲妥单抗、雷韦单抗、雷泮赛珠单抗、雷莫芦单抗、雷奈维单抗、雷珠单抗、雷昔库单抗、雷韦加利单抗、雷夫利珠单抗、瑞法奈珠单抗、瑞加韦单抗、瑞格丹维单抗、瑞拉利单抗、王托鲁单抗、瑞利珠单抗、利妥木单抗、利努苏单抗、瑞莎珠单抗、利妥昔单抗、培戈-利伐巴珠单抗、罗妥木单抗、SII RMAb、罗来度单抗、若奇单抗、罗莫单抗、隆利组单抗、洛曼妥珠单抗、特司林-洛伐妥珠单抗、罗维珠单抗、洛利昔珠单抗、卢利珠单抗、SA237、戈沙妥组单抗、沙马组单抗、维汀-沙马妥单抗、萨瑞鲁单抗、沙利珠单抗、沙妥

莫单抗喷地肽、苏金单抗、塞鲁单抗、瑟瑞妥单抗、瑟托萨昔单抗、赛图苏单抗、司韦单抗、西罗珠单抗、SGN-CD19A、SHP647、西法木单抗、司妥昔单抗、辛妥珠单抗、西利珠单抗、韦斯妥尤单抗、西鲁库单抗、维汀-索非妥珠单抗、苏兰珠单抗、索利托单抗、索耐珠单抗、松妥珠单抗、斯巴达珠单抗、司他芦单抗、硫索单抗、舒他伏单抗、苏替莫单抗、舒维组单抗、苏托舒单抗、他贝芦单抗、替他珠单抗、他度珠单抗、他法西他单抗、塔妥珠单抗、他利珠单抗、他克他单抗、坦妥维单抗、他尼组单抗、帕他莫单抗、他瑞妥单抗、他利昔单抗、特立妥单抗、替非组单抗、阿替莫单抗、特立妥珠单抗、维汀-特立妥珠单抗、替妥莫单抗、替奈昔单抗、替利组单抗、替泊地塔单抗、替妥木单抗、特度鲁单抗、特土罗单抗、特折鲁单抗、TGN1412、替布利珠单抗、替拉珠单抗、替加组单抗、替米妥珠单抗、替莫鲁单抗、替瑞利尤单抗、替古妥单抗、替雷利珠单抗、维汀-替索妥单抗、TNX-650、托珠单抗、托木妥昔单抗、托利珠单抗、托萨托舒单抗、托西莫单抗、托维妥单抗、曲罗芦单抗、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗双卡马嗪、恩美曲妥珠单抗、TRBS07、曲丽珠单抗、替西木单抗、曲弗单抗、西莫白介素单抗、妥韦单抗、乌妥昔单抗、乌洛鲁单抗、乌瑞芦单抗、乌珠单抗、乌司奴单抗、乌托鲁单抗、他立林-伐达妥昔单抗、瓦纳利单抗、维汀-万多妥珠单抗、万替妥单抗、伐努赛珠单抗、伐利昔单抗、伐利苏单抗、伐立鲁单抗、伐利组单抗、维多珠单抗、维妥组单抗、维帕莫单抗、维森库单抗、维西珠单抗、沃巴利珠单抗、伏洛昔单抗、珀伽利珠单抗、伏派利单抗、玛汀-沃索妥珠单抗、伏妥莫单抗、伏那吉珠单抗、珍妥珠单抗、XMAB-5574、扎芦木单抗、扎木单抗、扎妥昔单抗、泽妥珠单抗、齐拉木单抗、佐妥昔单抗或阿佐莫单抗。

88. 如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述治疗性抗体包括伊匹单抗、纳武单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗、斯巴达珠单抗或阿特珠单抗。

89. 如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述治疗性抗体包括派姆单抗。

90. 如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述治疗性抗体包括伯萨利单抗或培戈赖莫单抗。

91. 如权利要求1至90中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述寡核苷酸包含非天然核苷酸、经修饰的核苷酸、核苷酸类似物或核苷酸替代物。

92. 如权利要求91所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述非天然核苷酸、所述经修饰的核苷酸、所述核苷酸类似物或所述核苷酸替代物包含经修饰的碱基、经修饰的糖或经修饰的磷酸基团。

93. 如权利要求1至92中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述寡核苷酸的结构中纳入了非天然部分。

94. 如权利要求91所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述非天然核苷酸包括双脱氧核苷酸、生物素化核苷酸、胺化核苷酸、脱胺化核苷酸、烷基化核苷酸、苄基化核苷酸或荧光团标记的核苷酸。

95. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的碱基包含A、C、G、T或U的天然或合成修饰。

96. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的碱基包括与A、C、G、T或U不同的嘌呤或嘧啶碱基。

97. 如权利要求96所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述不同的嘌呤或嘧啶包括假

尿苷、尿嘧啶-5-基、次黄嘌呤-9-基(I)或2-氨基腺嘌呤-9-基。

98. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的碱基包括5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤或鸟嘌呤的6-甲基、烷基衍生物、腺嘌呤或鸟嘌呤的2-丙基衍生物、腺嘌呤或鸟嘌呤的烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶、5-卤代胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶或6-偶氮胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代腺嘌呤或鸟嘌呤、8-氨基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-硫醇腺嘌呤或鸟嘌呤、8-硫代烷基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-羟基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-取代的腺嘌呤或鸟嘌呤、5-卤代尿嘧啶或胞嘧啶、5-溴代尿嘧啶或胞嘧啶、5-三氟甲基尿嘧啶或胞嘧啶、5-取代的尿嘧啶或胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤或3-脱氮腺嘌呤。

99. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的糖包含核糖的天然修饰、脱氧核糖的天然修饰、核糖的合成修饰或脱氧核糖的合成修饰。

100. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的糖包含2'位处的修饰、3'位处的修饰、3'末端核苷酸处的修饰、2'-5'连接的寡核苷酸内的修饰或5'末端核苷酸的5'位的修饰。

101. 如权利要求100所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述2'位处的修饰包含OH基团、F基团、O-烷基、S-烷基、N-烷基、O-烯基、S-烯基、N-烯基、O-炔基、S-炔基、N-炔基或O-烷基-O-烷基。

102. 如权利要求101所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述O-烷基、所述S-烷基、所述N-烷基、所述O-烯基、所述S-烯基、所述N-烯基、所述O-炔基、所述S-炔基或所述N-炔基包含经取代或未经取代的 C_{1-10} 烷基、经取代或未经取代的 C_{2-10} 烯基或经取代或未经取代的 C_{2-10} 炔基。

103. 如权利要求100所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述2'位处的修饰包含 $-O((CH_2)_nO)_mCH_3$ 基团、 $-O(CH_2)_nOCH_3$ 基团、 $-O(CH_2)_nNH_2$ 基团、 $-O(CH_2)_nCH_3$ 基团、 $-O(CH_2)_nONH_2$ 基团或 $-O(CH_2)_nON((CH_2)_nCH_3)_2$,并且其中n和m独立地为1至约10的整数。

104. 如权利要求100所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述2'位处的修饰、所述3'位处的修饰、所述3'末端核苷酸处的修饰、所述2'-5'连接的寡核苷酸内的修饰或所述5'末端核苷酸的5'位的修饰包含 C_{1-10} 烷基、经取代的低级烷基、经取代的低级烷芳基、经取代的低级芳烷基、O-烷芳基、O-芳烷基、SH基团、SCH₃基团、OCN基团、Cl、Br、CN基团、CF₃基团、OCF₃基团、SOCH₃基团、SO₂CH₃基团、ONO₂基团、NO₂基团、N₃基团、NH₂基团、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、经取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入子、用于改善寡核苷酸的药动力学性质的基团或用于改善寡核苷酸的药效动力学性质的基团。

105. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的糖包含桥接环氧处的修饰。

106. 如权利要求105所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述桥接环氧处的修饰包含CH₂基团或S。

107. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的糖包括糖模拟物。

108. 如权利要求107所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述糖模拟物包含环丁基部分来代替呋喃戊糖基糖。

109. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的磷酸基团包含使得第一核苷酸与第二核苷酸之间的连接包含硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基膦酸酯、烷基膦酸酯、次膦酸酯、氨基磷酸酯、硫羰基氨基磷酸酯、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯或硼烷磷酸酯的修饰。

110. 如权利要求109所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述甲基膦酸酯或所述烷基膦酸酯包括3'-亚烷基膦酸酯或手性膦酸酯。

111. 如权利要求109所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述氨基磷酸酯包括3'-氨基氨基磷酸酯或氨基烷基氨基磷酸酯。

112. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的磷酸基团包含3'-5'连接或2'-5'连接的修饰。

113. 如权利要求92所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述经修饰的磷酸基团包含具有反向极性的连接。

114. 如权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述反向极性是3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。

115. 如权利要求91所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述核苷酸替代物包括肽核酸(PNA)。

116. 如权利要求1至115中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述更大程度包括亲和力增加。

117. 如权利要求116所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述亲和力增加包括结合常数的增加。

118. 如权利要求117所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述结合常数包括 $K_A (k_{on}/k_{off})$ 。

119. 如权利要求1至118中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述更大程度包括增加0.1倍、增加0.2倍、增加0.3倍、增加0.4倍、增加0.5倍、增加0.6倍、增加0.7倍、增加0.8倍、增加0.9倍、增加1.0倍、增加1.1倍、增加1.2倍、增加1.3倍、增加1.4倍、增加1.5倍、增加1.6倍、增加1.7倍、增加1.8倍、增加1.9倍、增加2.0倍、增加2.5倍、增加3.0倍、增加3.5倍、增加4.0倍、增加4.5倍、增加5.0倍、增加6.0倍、增加7.0倍、增加8.0倍、增加9.0倍、增加10.0倍、增加20倍、增加30倍、增加40倍、增加50倍、增加60倍、增加70倍、增加80倍、增加90倍、增加100倍、增加250倍、增加500倍、增加750倍或增加1000倍。

120. 如权利要求1至119中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述更大程度包括亲合力增加。

121. 如权利要求120所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述亲合力增加包括结合常数的增加。

122. 如权利要求121所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述结合常数包括 $K_A (k_{on}/k_{off})$ 。

123. 如权利要求1至118中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述更大程度包括增加0.1倍、增加0.2倍、增加0.3倍、增加0.4倍、增加0.5倍、增加0.6倍、增加0.7倍、增加

0.8倍、增加0.9倍、增加1.0倍、增加1.1倍、增加1.2倍、增加1.3倍、增加1.4倍、增加1.5倍、增加1.6倍、增加1.7倍、增加1.8倍、增加1.9倍、增加2.0倍、增加2.5倍、增加3.0倍、增加3.5倍、增加4.0倍、增加4.5倍、增加5.0倍、增加6.0倍、增加7.0倍、增加8.0倍、增加9.0倍、增加10.0倍、增加20倍、增加30倍、增加40倍、增加50倍、增加60倍、增加70倍、增加80倍、增加90倍、增加100倍、增加250倍、增加500倍、增加750倍或增加1000倍。

124. 如权利要求1至123中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述更大程度或更快能够在体外进行评估。

125. 如权利要求1至124中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述更大程度或更快能够在体内进行评估。

126. 如权利要求1至125中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述时间段包括1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟或60分钟。

127. 一种组合物,所述组合物包含如权利要求1至126中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

128. 一种增加抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度的方法,所述方法包括将有需要的抗体或其抗原结合片段缀合至寡核苷酸,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中所述抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度比未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段更大或更快,并且其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

129. 一种降低抗体或其抗原结合片段的非特异性结合的方法,所述方法包括将有需要的抗体或其抗原结合片段缀合至寡核苷酸,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中,在将生理学上可接受量的所述抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段在静脉内施用后的一段时间以较小程度存在于所述受试者的血液中,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

130. 一种治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用生理学上可接受量的缀合至寡核苷酸的抗体或其抗原结合片段,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中:

所述抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度比未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段更大或更快,并且其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体;或者

在将生理学上可接受量的所述抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段在静脉内施用后的一段时间以较小程度存在于所述受试者的血液中,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

使用抗体-寡核苷酸缀合物的增强的靶向

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请包括创建于2022年3月2日并且大小为1千字节的作为命名为19128800602SEQ的文本文件以电子方式提交的序列表。序列表通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及缀合至寡核苷酸的抗体及其片段,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体(dendrimer),包含所述抗体及其片段的组合物,及其在检测方法、细胞分离方法、耗竭方法、诊断方法 and 治疗方法中的用途。

背景技术

[0004] 抗体已被广泛用作治疗多种疾病和病状(例如,癌症、自身免疫性和炎症疾病)的治疗性化合物。此外,抗体也已被用于向靶抗原进行药物递送。治疗性抗体识别并结合至抗原受体,以活化或抑制一系列用于阻断癌细胞生长或触发免疫系统的生物过程。治疗性抗体具有高亲和力、高特异性和低免疫原性的特征性质。早期单克隆抗体(mab)是通过融合骨髓瘤细胞和脾细胞以获得分泌mab的杂交瘤而生成的。早期治疗性抗体通常在鼠宿主中产生,从而导致严重的人抗小鼠抗体表达,这可能干扰期望的治疗效果。随着基因工程化、体外细胞培养技术的发展,以及对抗体功能的更好理解,半衰期短、异种性(xenogenicity)和活性有限等缺点逐渐得到改善。在过去的四十年中,治疗性抗体已经通过抗体工程化得到了改善。仍然需要抗体功能和/或活性的额外改善。

发明内容

[0005] 本公开提供了一种缀合至寡核苷酸的抗体或其抗原结合片段,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中:所述抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度比未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段更大或更快,并且其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体;或者在将生理学上可接受量的抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段在静脉内施用后的一段时间以较小程度存在于所述受试者的血液中,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

[0006] 本公开还提供了包含所述抗体或其抗原结合片段的组合物。

[0007] 本公开还提供了增加抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度的方法,所述方法包括将有需要的抗体或其抗原结合片段缀合至寡核苷酸,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中所述抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度比未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段更大或更快,并且其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

[0008] 本公开还提供了降低抗体或其抗原结合片段的非特异性结合的方法,所述方法包括将有需要的抗体或其抗原结合片段缀合至寡核苷酸,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树

状聚体,其中,在将生理学上可接受量的抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段在静脉内施用后的一段时间以较小程度存在于所述受试者的血液中,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

[0009] 本公开还提供了治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用生理学上可接受量的缀合至寡核苷酸的抗体或其抗原结合片段,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中:所述抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度比未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段更大或更快,并且其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体;或者在将生理学上可接受量的抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段在静脉内施用后的一段时间以较小程度存在于所述受试者的血液中,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

附图说明

[0010] 应理解,前述一般描述和下述详细描述两者均仅为示例性和说明性的,并且并不限制本文所要求保护的实施方案。

[0011] 本专利或申请文件含有至少一幅彩色绘制的附图。在请求并支付必要的费用后,官方将会提供带有彩色附图的本专利或专利申请公布的副本。

[0012] 图1示出了IgG-oligo增强从血流中的清除。与IgG相比,观察到非特异性IgG-oligo从循环中更快地清除,这可以帮助减少与使用抗体相关的可能的全身性副作用。

[0013] 图2示出了IgG-oligo增强脾和肝清除率。与IgG相比,观察到非特异性IgG-oligo的肝和脾积累增加,这可能是由于从循环中更快地清除,如图1所示,进入这些负责清除的器官,这进而可以帮助减弱在非清除器官上使用抗体可能产生的副作用。此外,膀胱、肾和胃中的IgG-oligo水平降低。这可能是由于在水平较高的脾和肝中发生的清除,或由于通过肾和胃途径的排泄可能较快并且IgG-oligo不再存在于这些器官中,这也足以从身体中清除抗体并避免副作用。

[0014] 图3示出了抗ICAM-oligo从血流中快速清除。与非oligo抗ICAM相比,当缀合至oligo时,特异性抗ICAM抗体显示出从循环中更快的清除,如上所述,这还应有助于防止全身性副作用。此外,与IgG-oligo相比,抗ICAM-oligo的清除更快,这表明这种保护作用对于识别特定抗原的抗体更为明显。这是相关的,因为特异性抗体是识别抗原的抗体,因此,是旨在用于研究、诊断、预防或治疗背景的抗体。

[0015] 图4示出了抗ICAM-oligo增强肺靶向。特异性抗ICAM抗体靶向肺(ICAM-1表达的主要位点),与抗ICAM对照相比显著更好,并且比非特异性IgG(缀合或不缀合至oligo)大得多,这表明增强的绝对靶向和特异性。

[0016] 图5示出了抗ICAM-oligo的肺靶向与其他配制品相比是高度特异性的,并且在淋巴结中提供最小的积累。与注射的所有其他种类相比,示出了抗ICAM-oligo提供的对ICAM-1表达的主要位点(肺)的增强的特异性。

具体实施方式

[0017] 可以将DNA寡核苷酸偶联至抗体以用于若干目的和应用,这些目的和应用可涉及分析性体外系统、离体组织、细胞培养物或体内生物体,诸如:a)寡核苷酸可用作抗体与诊断性或治疗性货物(抗体-探针或抗体-药物缀合物)之间的接头;b)寡核苷酸可用作抗体与药物递送媒介物(例如,脂质体、聚合物、树状聚体、无机纳米颗粒等)之间的接头,所述药物递送媒介物负载有诊断性或治疗性货物;c)寡核苷酸可以(完全或部分地)退火至互补寡核苷酸,并且所得双链DNA部分可以负载有DNA嵌入药物(例如,多柔比星(doxorubicin));d)寡核苷酸可以与互补寡核苷酸退火,其中所得双链DNA或DNA/RNA嵌合体可以表达或阻断表达一个/一组基因或信使RNA(例如,siRNA、微RNA效应等);e)可以将寡核苷酸设计成具有这样的序列,其本身提供d)中所述的功能;f)可以将寡核苷酸设计成具有这样的序列,其折叠成适体并提供与不同于寡核苷酸所连接的抗体的抗原或与所述抗体相同的抗原的特异性结合,以增加其亲和力或活化/阻断相同/不同结构域处的抗原。因此,这些设计可以用作研究中的工具或者可以应用于诊断和/或治疗领域。

[0018] 观察到识别ICAM-1的单克隆抗体与DNA寡核苷酸的偶联显著增加了小鼠静脉内注射后抗体与体内ICAM-1靶位点(主要是肺)的结合,所述ICAM-1是一种细胞表面蛋白,其主要在肺中过表达,但在涉及炎症的疾病中也在其他器官中过表达。此外,抗体-寡核苷酸缀合物比常规抗体更快地从小鼠循环中清除,并且分布更丰富,这可以有助于避免施用于人体的抗体的全身性副作用。这一观察结果是令人惊讶的,因为预期与寡核苷酸偶联会降低抗体的结合和/或靶向能力,原因如下:a)空间位阻;b)对识别抗原的可变区的可能的修饰或干扰;c)其他抗体区的物理化学性质的改变;和/或d)由寡核苷酸提供的负电荷(核酸是带负电荷的种类),其将排斥存在于体内细胞表面上的负电荷(由糖基化蛋白质的糖部分和细胞膜中的脂质提供)。这一意外发现的机制尚不清楚;然而,这一发现具有重大的转化潜力。

[0019] 本文所用的术语仅是出于描述特定实施方案的目的而并不旨在限制。在整个说明书和权利要求书中使用了与公开的各方面有关的各种术语。除非另外指明,否则此类术语将被赋予其在本领域中的普通含义。其他具体定义的术语将以与本文提供的定义一致的方式进行解释。

[0020] 除非另有明确说明,否则不旨在将本文中所阐述的任何方法或方面解释为要求以任何特定顺序执行其步骤。在方法权利要求在权利要求书或说明书中未具体陈述步骤被限制为具体顺序的情况下,在任何方面,绝不旨在推断顺序。这适用于任何可能的用于解释的非表达基础,包含关于步骤安排或操作流程的逻辑的事项、从语法组织或标点得到的普通含义或在说明书中描述的方面的数量或类型。

[0021] 如本文所用,除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包括复数指示物。

[0022] 如本文所用,术语“约”意味着所述数值是近似的,并且小的变化不会明显影响所公开的实施方案的实践。在使用数值的情况下,除非上下文另外指出,否则“约”意味着数值可以变化 $\pm 10\%$ 并且保持处于所公开的实施方案的范围内。

[0023] 如本文所用,术语“抗体”是指与特定抗原特异性结合或具有免疫反应性的免疫球蛋白分子,并且包括其多克隆、单克隆、基因工程化和以其他方式修饰的形式,包括但不限

于纳米抗体、嵌合抗体、人源化抗体、异源缀合抗体(例如,双特异性抗体、二抗体、三抗体和四抗体)。

[0024] 如本文所用,短语“其抗原结合片段”意指能够结合抗原的抗体片段。抗原结合片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、scFv-Fc、二抗体、双特异性二抗体、三特异性三抗体、微型抗体、单特异性Fab₂、双特异性Fab₂、三特异性Fab₃、纳米抗体、IgNAR、V-NAR、hcIgG和VhH片段。

[0025] 如本文所用,短语“嵌合抗体”是指具有衍生自非人免疫球蛋白(诸如大鼠或小鼠抗体)的可变序列和人免疫球蛋白恒定区(通常选自人免疫球蛋白模板)的抗体。

[0026] 如本文所用,术语“Fv”片段是含有完整的靶识别和结合位点的最小抗体片段。此区域由非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体(V_H-V_L二聚体)组成。正是在此构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以限定V_H-V_L聚体的表面上的靶结合位点。

[0027] 如本文所用,短语“人抗体”是指具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白文库或从针对一种或多种人免疫球蛋白转基因且不表达内源性免疫球蛋白的动物中分离的抗体。

[0028] 如本文所用,短语“人源化抗体”是指嵌合抗体或其抗原结合片段,其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。通常,人源化抗体将包含至少一个并且典型地两个可变结构域中的基本上所有可变结构域,其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些区,并且所有或基本上所有框架(FR)区是人免疫球蛋白序列的那些区。人源化抗体还可以包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白共有序列的至少一部分。

[0029] 如本文所用,短语“有需要”意指“受试者”或“患者”已被鉴定为需要特定方法、预防或治疗。在一些实施方案中,可以通过任何诊断手段进行鉴定。在本文所述的任何方法、预防和治疗中,“受试者”或“患者”都可以是有需要的。

[0030] 如本文所用,“核酸分子”是任何长度的核苷酸的聚合形式,可以包括DNA和/或RNA,并且可以是单链的、双链的或多链的。核酸的一条链也指其互补链。

[0031] 如本文所用,短语“灵长类源化抗体”是指包含猴可变区和人恒定区的抗体。

[0032] 如本文所用,短语“调节序列”旨在包括启动子、增强子和其他表达控制元件,诸如多聚腺苷酸化信号,其控制抗体链基因的转录或翻译。

[0033] 如本文所用,术语“单链Fv”或“scFv”是指单链Fv抗体,其中来自传统抗体的重链和轻链的可变结构域(V_H和V_L结构域)已经连接形成一条链。通常,Fv多肽进一步包括位于V_H结构域与V_L结构域之间的多肽接头,所述多肽接头使scFv能够形成用于靶结合的所需结构。

[0034] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”可互换使用。受试者包括任何动物,包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于农场动物(例如,马、牛、猪)、伴侣动物(例如,狗、猫)、实验室动物(例如,小鼠、大鼠、兔)和非人灵长类动物(例如,猴)。在一些实施方案中,受试者或患者是人。

[0035] 如本文所用,术语“V_H”是指抗体的免疫球蛋白重链的可变区,包括例如Fv、scFv或Fab片段的重链。

[0036] 如本文所用,术语“ V_L ”是指抗体的免疫球蛋白轻链的可变区,包括例如Fv、scFv、dsFv或Fab片段的轻链。

[0037] 如本文所用,术语“核酸”、“核酸分子”、“核酸序列”、“多核苷酸”或“寡核苷酸”可以包括任何长度的核苷酸的聚合形式,可以包括DNA和/或RNA,并且可以是单链的、双链的或多链的。核酸的一条链也指其互补链。

[0038] 如本文所用,术语抗体或其抗原结合片段的“内部部分”分别指除抗体或其抗原结合片段的N末端和C末端处的氨基酸以外的氨基酸。

[0039] 如本文所用,术语“治疗性抗体”是指适合施用于受试者以治疗和/或预防疾病或病症的抗体或其抗原结合片段。

[0040] 如本文所用,“DNA树状聚体”是具有至少三条DNA链的高度有序的支化聚合物分子。其中一条链至少有十个连续的核苷酸与另一条链部分地互补。

[0041] 如本文所用,当第一寡核苷酸中有至少十个连续的核苷酸通过克里克-沃森(Crick-Watson)碱基配对与第二核苷酸中的至少十个连续的互补核苷酸结合时,第一寡核苷酸“杂交”至第二寡核苷酸。

[0042] 如本文所用,当第一抗体或其抗原结合片段与第二抗体或其抗原结合片段相比具有增加的亲和力、增加的结合常数、增加的 K_A (k_{on}/k_{off}) 或增加的对抗原的亲合力时,第一抗体或其抗原结合片段与第二抗体或其抗原结合片段相比“以更大程度或更快地”结合抗原。

[0043] 如本文所用,当第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段:(i) 具有相同的氨基酸序列;(ii) 相同种类的衍生化,如果有的话;(iii) 具有到相同种类的效应物部分的相同种类的共价连接,如果有的话;(iv) 通过相同种类的共价键融合至相同种类的另一种蛋白质或其部分的相同种类的氨基酸序列,如果有的话;(v) 缀合至相同种类的小分子毒素,如果有的话;(vi) 缀合至相同种类的脂质体,如果有的话;(vii) 连接至相同种类的聚乙二醇(PEG) 部分,如果有的话;(viii) 具有相同种类的修饰,如果有的话;和/或(ix) 偶联至相同种类的可检测物质时,第一抗体或其抗原结合片段与第二抗体或其抗原结合片段“相同”。然而,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段可以是相同的,但具有至少一个特定的差异。作为非限制性实例,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段可以是相同的,但在氨基酸序列中具有特定的差异。

[0044] 如本文所用,当第一寡核苷酸和第二寡核苷酸:(i) 具有相同的核苷酸序列;和/或(ii) 寡核苷酸在相同位置包含相同种类的非天然核苷酸、经修饰的核苷酸、核苷酸类似物或核苷酸替代物时,第一寡核苷酸与第二寡核苷酸“相同”。然而,第一寡核苷酸和第二寡核苷酸可以是相同的,但具有特定的差异。作为非限制性实例,第一寡核苷酸和第二寡核苷酸可以是相同的,但在核苷酸序列中具有特定的差异。

[0045] 例如,将寡核苷酸连接至治疗性抗体(诸如检查点抑制剂、EGFR、Her2、赫赛汀(Herceptin))或抗体-探针或抗体-药物缀合物可以显著改善抗体的定位和与靶标的结合或溶解度,从而改善药剂的诊断或治疗指数,同时降低毒性,因为可以施用较低剂量,或因为更有效地清除和避免脱靶效应。当抗体片段或scFv与诊断探针和/或治疗剂一起使用时,可以观察到相同的结果。在某些实施方案中,还考虑了抗体样分子,包括但不限于微型抗体、纳米抗体、二抗体、三抗体和四抗体。在某些实施方案中,还考虑了基于抗体的分子,包括但不限于双特异性抗体、三特异性抗体或四特异性抗体。

[0046] 本公开提供了一种缀合至寡核苷酸的抗体或其抗原结合片段,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中:所述抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度比未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段更大或更快,并且其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体;或者在将生理学上可接受量的抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段在静脉内施用后的一段时间以较小程度存在于所述受试者的血液中,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

[0047] 本公开还提供了增加抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度或速度的方法,所述方法包括将有需要的抗体或其抗原结合片段缀合至寡核苷酸,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中所述抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度比未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段更大或更快,并且其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

[0048] 本公开还提供了降低抗体或其抗原结合片段的非特异性结合的方法,所述方法包括将有需要的抗体或其抗原结合片段缀合至寡核苷酸,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中,在将生理学上可接受量的抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段在静脉内施用后的一段时间以较小程度存在于所述受试者的血液中,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

[0049] 本公开还提供了降低抗体或其抗原结合片段的非特异性结合的方法,所述方法包括将有需要的抗体或其抗原结合片段缀合至寡核苷酸,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中,在将生理学上可接受量的抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段以更大程度或更快地结合其靶标,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

[0050] 本公开还提供了诊断、治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用生理学上可接受量的缀合至寡核苷酸的抗体或其抗原结合片段,其中所述寡核苷酸不杂交至DNA树状聚体,其中:所述抗体或其抗原结合片段结合抗原的程度比未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段更大或更快,并且其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体;或者在将生理学上可接受量的抗体或其抗原结合片段静脉内施用于受试者后,与未缀合至相同寡核苷酸的相同抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体或其抗原结合片段在静脉内施用后的一段时间以较小程度存在于所述受试者的血液中,其中所述相同寡核苷酸不杂交至相同DNA树状聚体。

[0051] 抗体或其抗原结合片段可以是任何同种型。在一些实施方案中,抗体是IgM、IgA、IgD、IgE或IgG抗体。在一些实施方案中,抗体是IgM抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中,IgG1抗体是IgG1 G1m1、G1m2、G1m3、G1m17、nG1m1、nG1m2或nG1m17同种异型抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG1G1m17同种异型抗体。在一些实施方案中,IgA抗体是IgA1或IgA2抗体。在一些实施方案中,抗体具有可变重链。

[0052] 在一些实施方案中,变体IgG1重链与同种异型Km1、Km2或Km3的κ轻链配对。在一些实施方案中,变体IgG1重链与λ轻链配对。

[0053] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是人源化的和IgG。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是人源化的和IgG1。

[0054] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体或其抗原结合片段。用于产生嵌合抗体的方法是本领域已知的(参见Morrison, Science, 1985, 229, 1202-1207; Oi等人, BioTechniques, 1986, 4, 214-221; Gillies等人, J. Immunol. Methods, 1985, 125, 191-202; 和美国专利第5,807,715号、第4,816,567号和第4,816,397号)。

[0055] 在一些实施方案中,嵌合抗体或其抗原结合片段是灵长类源化嵌合抗体或其抗原结合片段。用于产生灵长类源化抗体的方法是本领域已知的(参见美国专利第5,658,570号、第5,681,722号和第5,693,780号)。

[0056] 在一些实施方案中,嵌合抗体或其抗原结合片段是人源化嵌合抗体或其抗原结合片段。用于产生人源化抗体的方法是本领域已知的(参见Riechmann等人, Nature, 1988, 332, 323-327; Padlan, Mol. Immunol., 1991, 28, 489-498; Studnicka等人, Prot. Eng., 1994, 7, 805-814; Roguska等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91, 969-973; 欧洲专利第EP239400号、第EP592106号和第EP519596号; PCT公布WO 91/09967; 以及美国专利第5,225,539号、第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,761号、第5,693,762号、第6,180,370号和第5,565,332号)。

[0057] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是完全人源化的。完全“人”抗体对于人类患者的治疗性治疗可能是理想的。用于产生完全人抗体的方法是本领域已知的,包括使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法(参见美国专利第4,444,887号和第4,716,111号; 以及PCT公布WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO 91/10741)。人抗体也可以使用不能够表达功能性内源性免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生(参见PCT公布WO 98/24893、WO 92/01047、WO 96/34096和WO 96/33735; 以及美国专利第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号、第5,885,793号、第5,916,771号和第5,939,598号)。识别选定表位的完全人抗体也可以使用被称为“指导选择”的技术生成(参见Jespersen等人, Biotechnology, 1988, 12, 899-903)。

[0058] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是双特异性抗体。双特异性抗体对至少两种不同的抗原具有结合特异性(即,一种结合特异性针对一种抗原,并且另一种结合特异性针对任何其他抗原,诸如细胞表面蛋白、受体、受体亚基、组织特异性抗原、病毒衍生的蛋白、病毒编码的包膜蛋白、细菌衍生的蛋白或细菌表面蛋白等)。

[0059] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是衍生化抗体。例如,衍生化抗体可以通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白质连接等方式修饰的抗体。众多化学修饰中的任何一种都可以通过已知技术进行,包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,衍生物可以含有一个或多个非天然氨基酸,诸如使用ambrx技术(参见Wolfson, Chem. Biol., 2006, 13, 1011-1012)。

[0060] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段通过糖基化衍生化。合适的双触角复合物可以由具有两个N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、三个甘露糖和两个GlcNAc残基的核心结构组成,所述两个GlcNAc残基与 α -6甘露糖和 α -3甘露糖 β -1,2连接以形成两个触角。一个或多个

岩藻糖 (Fuc)、半乳糖 (Gal)、高甘露糖聚糖Man-5或Man-9、二等分GlcNAc和包括N-乙酰神经氨酸 (NANA) 或N-羟乙酰神经氨酸 (NGNA) 残基的唾液酸可以连接到核心。N-连接的糖形可以包括G0 (具有核心双触角糖基化结构的蛋白质)、G0F (岩藻糖基化的G0)、G0F GlcNAc、G1 (具有带有一个半乳糖残基的核心糖基化结构的蛋白质)、G1F (岩藻糖基化的G1)、G2 (具有带有两个半乳糖残基的核心糖基化结构的蛋白质) 和/或G2F (岩藻糖基化的G2)。在一些实施方案中,抗体具有G0F聚糖。

[0061] 抗体或其抗原结合片段可通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备。为了重组表达抗体,用一种或多种携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的DNA片段的重组表达载体转染宿主细胞,使得轻链和重链在宿主细胞中表达,并任选地分泌到培养宿主细胞的培养基中,从所述培养基中回收抗体。标准重组DNA方法可用于获得抗体重链和轻链基因,将这些基因纳入重组表达载体中,并将载体引入宿主细胞中(参见Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 第二版, Sambrook, Fritsch和Maniatis (编辑), Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等人编辑, Greene Publishing Associates, 1989; 以及美国专利第4,816,397号)。

[0062] 在一些实施方案中,为了生成编码本文所述的抗体或其抗原结合片段的核酸分子,首先获得编码轻链和重链可变区的DNA片段。这些DNA可通过扩增和修饰编码轻链和重链可变序列的种系DNA或cDNA获得,例如,使用聚合酶链式反应 (PCR)。人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列是本领域已知的(参见“VBASE”人种系序列数据库; Kabat等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 美国卫生与公共服务部, NIH出版号91-3242; Tomlinson等人, J. Mol. Biol., 1992, 22T, 116-198; 以及Cox等人, Eur. J. Immunol., 1994, 24, 827-836)。可以合成编码重链或轻链可变区的DNA片段并将其用作诱变的模板,以使用常规诱变技术生成如本文所述的变体;可替代地,可以直接合成编码变体的DNA片段。

[0063] 这些DNA片段可通过标准重组DNA技术进一步操作,例如,以将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,编码 V_H 或 V_L 的DNA片段可操作地连接至编码另一种蛋白质的另一个DNA片段,诸如抗体恒定区或柔性接头。如在此上下文中所使用的,短语“可操作地连接”旨在意指将这两个DNA片段连接,使得由这两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在读码框内。

[0064] 通过将编码 V_H 的DNA可操作地连接至编码重链恒定区(CH_1 、 CH_2 、 CH_3 , 以及任选地, CH_4)的另一个DNA分子,可以将编码 V_H 区的分离的DNA分子转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见Kabat等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 美国卫生与公共服务部, NIH出版号91-3242), 并且涵盖这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区。在一些实施方案中,重链恒定区是IgG₁或IgG₄恒定区。对于Fab片段重链基因,编码 V_H 的DNA可以可操作地连接至仅编码重链 CH_1 恒定区的另一个DNA分子。

[0065] 通过将编码 V_L 的DNA可操作地连接至仅编码轻链恒定区 C_L 的另一个DNA分子,可以将编码 V_L 区的分离的DNA转化为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见Kabat等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版(美国卫生与公共服务部, NIH出版号91-3242)), 并且涵盖这些区域的DNA

片段可通过标准PCR扩增获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区。在一些实施方案中,轻链恒定区是 κ 恒定区。为了创建scFv基因,将编码 V_H 和 V_L 的DNA片段可操作地连接至编码柔性接头,例如编码氨基酸序列 $(Gly_4Ser)_3$ 的另一个片段,使得 V_H 和 V_L 序列可以表达为连续的单链蛋白质,其中 V_L 和 V_H 区通过柔性接头连接(参见Bird等人,Science,1988,242,423-426;Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1988,85,5879-5883;以及McCafferty等人,Nature,1990,348,552-554)。

[0066] 为了表达本文所述的抗体或其抗原结合片段,可将如本文所述获得的编码部分或全长轻链和重链的DNA分子插入表达载体中,使得基因可操作地连接至转录和翻译控制序列。在此上下文中,短语“可操作地连接”旨在意指将抗体基因连接到载体中,使得载体内的转录控制序列和翻译控制序列发挥其调节抗体基因转录和翻译的预期功能。可以选择要与所使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入单独的载体中,或者更典型地,将两种基因插入相同的表达载体中。

[0067] 可以通过标准方法将抗体基因插入表达载体中,例如,连接抗体基因片段和载体上的互补限制性位点,或者如果不存在限制性位点则进行平端连接。在插入轻链或重链序列之前,表达载体可能已经携带抗体恒定区序列。例如,一种将 V_H 和 V_L 序列转化为全长抗体基因的方法是将它们分别插入已经编码重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使得 V_H 片段可操作地连接至载体内的 C_H 片段,并且 V_L 片段可操作地连接至载体内的 C_L 片段。另外地或可替代地,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可以将抗体链基因克隆到载体中,使得信号肽框内连接至抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽,诸如来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽。

[0068] 除了抗体链基因外,重组表达载体可以携带控制宿主细胞中抗体链基因表达的调节序列。此类调节序列描述于例如Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, Calif., 1990)。本领域技术人员应当理解,表达载体的设计,包括调节序列的选择,可取决于诸如待转化宿主细胞的选择、所需的蛋白质表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的合适的调节序列包括指导哺乳动物细胞中高水平蛋白质表达的病毒元件,诸如衍生自巨细胞病毒(CMV)的启动子和/或增强子(诸如CMV启动子/增强子)、衍生自猿猴病毒40(SV40)的启动子和/或增强子(诸如SV40启动子/增强子)、衍生自腺病毒的启动子和/或增强子(诸如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和衍生自多瘤病毒的启动子和/或增强子。病毒调节元件及其序列是本领域已知的(参见例如美国专利第5,168,062号、第4,510,245号和第4,968,615号)。

[0069] 本公开的重组表达载体还可以携带额外的序列,诸如调节载体在宿主细胞中的复制的序列(诸如复制起点)和可选择标记基因。可选择标记基因有助于选择引入了载体的宿主细胞(参见美国专利第4,399,216号、第4,634,665号和第5,179,017号)。例如,典型地,可选择标记基因赋予引入了载体的宿主细胞对药物(诸如G418、嘌呤霉素、杀稻瘟菌素、潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性。合适的可选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于具有甲氨蝶呤选择/扩增的DHFR⁻宿主细胞)和neo基因(用于G418选择)。为了表达轻链和重链,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。术语“转染”的各种形式旨在涵盖通常用于将外源性DNA引入原核或真核宿主细胞的各种技术,诸如电穿孔、脂质转染、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。

[0070] 抗体或其抗原结合片段可在原核或真核宿主细胞中表达。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段的表达可在真核细胞(诸如哺乳动物宿主细胞)中进行,以分泌正确折叠且具有免疫活性的抗体。用于表达本公开的重组抗体或其抗原结合片段的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括DHFR CHO细胞(参见Urlaub, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1980,77,4216-4220),其与DHFR可选择标记一起使用(参见Kaufman,Mol.Biol.,1982,159,601-621))、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞、293细胞和SP2/0细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一定时间段来产生抗体,所述时间段足以允许抗体在宿主细胞中表达或将抗体分泌到宿主细胞在其中生长的培养基中。可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体或其抗原结合片段。宿主细胞也可用于产生完整抗体的部分,诸如Fab片段或scFv分子。应当理解,上述程序的变化在本公开的范围。例如,可能需要用编码本文所述的抗体或其抗原结合片段的轻链或重链(但不是两者)的DNA转染宿主细胞。

[0071] 重组DNA技术也可用于去除编码轻链和重链之一或两者的一些或全部DNA,这些DNA对于结合至抗原不是必需的。由这种截短的DNA分子表达的分子也涵盖在本文所述的抗体或其抗原结合片段中。

[0072] 此外,通过标准化学交联方法将本公开的抗体交联至第二抗体,可以产生双功能抗体或其抗原结合片段,其中一条重链和一条轻链是能够结合至第一抗原的本公开的抗体,并且另一条重链和轻链对除第一抗原以外的抗原具有特异性。双功能抗体也可以通过表达被工程化为编码双功能抗体的核酸来制造。

[0073] 为了重组表达本文所述的抗体或其抗原结合片段,可将宿主细胞用本公开的两个表达载体共转染,第一载体编码重链衍生的多肽并且第二载体编码轻链衍生的多肽。典型地,这两个载体各自含有单独的可选择标记。可替代地,可以使用编码重链和轻链多肽两者的单一载体。

[0074] 一旦生成了编码具有所需CDR序列的抗体或其抗原结合片段的一个或多个部分的核酸,就可以将进一步的改变引入编码序列中,例如,以生成编码具有不同CDR序列的抗体、对Fc受体亲和力降低的抗体或不同亚类的抗体的核酸。

[0075] 本文所述的抗体或其抗原结合片段也可通过化学合成(诸如通过Solid Phase Peptide Synthesis,第2版,1984The Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.中所述的方法)产生。变体抗体或其抗原结合片段也可使用无细胞平台生成(参见Chu等人,Biochemia,2001,2)。

[0076] 一旦通过重组表达产生了本文所述的抗体或其抗原结合片段,就可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法来纯化它们,例如,通过色谱法(诸如离子交换、亲和力(特别是通过对蛋白A、蛋白G或蛋白L选择的亲和力)以及分级柱色谱法)、离心法、差溶法或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。此外,本文所述的抗体或其抗原结合片段可融合至本文所述的或本领域已知的异源性多肽序列,以促进纯化。

[0077] 一旦分离,如果需要的话,可以进一步纯化抗体或其抗原结合片段,诸如通过高效液相色谱法(参见Fisher,Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work和Burdon编辑,Elsevier,1980)),或通过Superdex™ 75柱(Pharmacia Biotech AB,Uppsala,Sweden)上的凝胶过滤色谱法。

[0078] 本公开提供了包含本文所述的核酸分子的载体。本公开还提供了用所述载体转化的原核宿主细胞。本公开还提供了用所述载体转化的真核宿主细胞。在一些实施方案中,真核宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。

[0079] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段缀合至效应物部分。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段通过以下方式进行修饰:将任何类型的分子共价连接至抗体或其抗原结合片段,使得共价连接不干扰与抗原的结合。在一些实施方案中,效应物部分是可检测标记、细胞毒性剂、化学治疗剂或核酸分子。效应物部分还可以是抗肿瘤剂、药物、毒素、生物活性蛋白(诸如酶)、另一种抗体或抗体片段、合成的或天然存在的聚合物、核酸分子、放射性核素(诸如放射性碘化物)、放射性同位素、螯合金属、纳米颗粒或报告基团(诸如荧光化合物或可通过NMR或ESR谱检测的化合物)。

[0080] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可缀合至细胞毒性剂、放射性核素或药物部分,以修饰特定生物反应。效应物部分可以是蛋白质或多肽,诸如例如毒素(诸如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、皂草素、假单胞菌外毒素、白喉毒素、溴化乙锭或PE40、PE38、白树毒素、RNA酶、肽核酸(PNA)、1型或2型核糖体灭活蛋白(RIP)、商陆抗病毒蛋白(PAP)、异株泻根毒蛋白、苦瓜蛋白、化学治疗剂和三角梅核糖体失活蛋白(bouganin))、信号传导分子(诸如 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子或组织型纤溶酶原活化剂)、血栓形成剂或抗血管生成剂(诸如,血管抑素或内皮抑素)或生物反应调节剂诸如细胞因子或生长因子(诸如白介素-1(IL-1)、白介素-2(IL-2)、白介素-6(IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或神经生长因子(NGF))。

[0081] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是小分子、前药、类美登素(maytansinoid)或毒素。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段中每个抗体或其抗原结合片段包含3至5个类美登素分子。在一些实施方案中,类美登素通过化学接头缀合至抗体或其抗原结合片段,所述化学接头选自N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)和琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯。在一些实施方案中,细胞毒性剂是泰素(taxol)、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔或嘌呤霉素。

[0082] 在一些实施方案中,可检测标记是放射性化合物、荧光化合物、发色团、酶、显像剂、金属离子或底物。在一些实施方案中,荧光部分包括但不限于荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白等。有用的酶标记包括但不限于碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等。

[0083] 在一些实施方案中,效应物部分是抗代谢物(诸如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷和5-氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷化剂(诸如氮芥、噻替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C5和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类药物(诸如柔红霉素(以前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(诸如放线菌素D(以前称为新福菌素)、博来霉素、光辉霉素、氨基霉素(AMC)、卡奇霉素或倍癌霉素)或抗有丝分裂剂(诸如,长春新碱和长春碱)。

[0084] 在一些实施方案中,放射性核素是但不限于 ^{13}N 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{67}Cu

⁷⁷Br、^{80m}Br、⁸²Rb、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁹⁵Ru、⁹⁷Ru、^{99m}Tc、¹⁰³Ru、¹⁰⁵Ru、¹¹¹In、^{113m}In、¹¹³Sn、^{121m}Te、^{122m}Te、^{125m}Te、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹²⁶I、¹³¹I、¹³³I、¹⁶⁵Tm、¹⁶⁷Tm、¹⁶⁸Tm、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、^{195m}Hg、²¹¹At、²¹²Bi、²¹³Bi和²²⁵Ac。

[0085] 在一些实施方案中,化学治疗剂是顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、四硝酸三铂、菲铂、吡铂、赛特铂、甲氨蝶呤、长春新碱、多柔比星、衣霉素、寡霉素、硼替佐米、MG132、5-氟尿嘧啶、索拉非尼、夫拉平度、吉西他滨、泰素、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、羟基脲、阿糖胞苷、丝裂霉素、环磷酰胺、异环磷酰胺、亚硝基脲、达卡巴嗪、丙卡巴肼、依托泊苷、喜树碱、博来霉素、伊达比星、柔红霉素、放线菌素D、偏端霉素A、依替丁(etidium)、纺锤霉素、澳瑞他汀(auristatin)、安吡啶、灵菌红素、硼替佐米、匹苯济醇(pibenzimol)、托马霉素、倍癌霉素SA、普卡霉素、米托蒽醌、天冬酰胺酶、长春碱、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛、CPT-11、格列卫、厄洛替尼、吉非替尼、伊布替尼、克唑替尼、塞瑞替尼、拉帕替尼、纳维替克或瑞戈非尼。

[0086] 在一些实施方案中,核酸分子是单层核酸载体、1.5层核酸载体、两层核酸载体、2.5层核酸载体或三层核酸载体(诸如PCT公布W0 17/143156和W0 17/143171中公开的那些)。

[0087] 用于将此类效应物部分缀合至抗体的技术是本领域熟知的(参见Hellstrom等人, Controlled Drug Delivery, 第2版, 第623-53页(Robinson等人编辑, 1987); Thorpe等人, Immunol. Rev., 1982, 62, 119-58; 和Dubowchik等人, Pharmacology and Therapeutics, 1999, 83, 67-123)。

[0088] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可经由共价键(诸如,肽键)、通过抗体的N末端或C末端或内部融合至另一种蛋白质的氨基酸序列(或其部分;例如,蛋白质的至少10个、20个或50个氨基酸部分)。抗体或其抗原结合片段可以在抗体恒定结构域的N末端与其他蛋白质连接。重组DNA程序可用于创建这种融合体,例如,如PCT公布W0 86/01533和欧洲专利EP0392745中所述。在一些实施方案中,效应物部分可以增加体内半衰期,和/或增强抗体穿过上皮屏障向免疫系统的递送。这类合适的效应物部分的实例包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物,诸如PCT公布W0 2005/117984中描述的那些。

[0089] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以缀合至小分子毒素。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以缀合至dolostatin或dolostatin肽类似物或衍生物,诸如澳瑞他汀(参见美国专利第5,635,483号和第5,780,588号)。多拉司他汀(dolastatin)或澳瑞他汀药物部分可以通过抗体的N末端、C末端或内部连接至抗体(参见PCT公布W0 02/088172)。示例性的澳瑞他汀实施方案包括N末端连接的单甲基澳瑞他汀药物部分DE和DF,如美国专利第7,498,298号(公开了接头和制备缀合至接头的单甲基缬氨酸化合物诸如MMAE和MMAF的方法)中所公开的。

[0090] 抗体或其抗原结合片段也可缀合至脂质体,用于靶向递送(参见Park等人, Adv. Pharmacol., 1997, 40, 399-435; 和Marty等人, Methods Molec. Med., 2004, 109, 389-401)。

[0091] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以连接至PEG部分。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段和PEG部分可通过位于抗体或其抗原结合片段中的任何可用氨基酸侧链或末端氨基酸官能团(例如,任何游离氨基、亚氨基、硫醇基、羟基或羧基)连接。此类氨基酸可以天然存在于抗体或其抗原结合片段中,或者可以使用重组DNA方法工程化到

片段中(参见美国专利第5,219,996号)。可使用多个位点连接两个或更多个PEG部分。PEG部分可以通过位于抗体或其抗原结合片段中的至少一个半胱氨酸残基的硫醇基团共价连接。当硫醇基团用作连接点时,可以使用适当活化的效应物部分,例如,硫醇选择性衍生物,诸如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物。

[0092] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包含PEG化的经修饰的Fab'片段。PEG部分可连接至铰链区中的半胱氨酸。在一些实施方案中,PEG修饰的Fab'片段具有共价连接至经修饰铰链区中的单个硫醇基团的马来酰亚胺基团。赖氨酸残基可以共价连接至马来酰亚胺基团,并且赖氨酸残基上的胺基团中的每一个可以连接至分子量为约20,000Da的甲氧基聚(乙二醇)聚合物。因此,连接至Fab'片段的PEG的总分子量可以为约40,000Da。

[0093] 在一些实施方案中,抗原结合片段可以是Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、scFv-Fc、二抗体或微型抗体片段。在一些实施方案中,抗原结合片段可以是Fab片段。在一些实施方案中,抗原结合片段可以是F(ab')₂片段。在一些实施方案中,抗原结合片段可以是Fv片段。在一些实施方案中,抗原结合片段可以是scFv片段。在一些实施方案中,抗原结合片段可以是scFv-Fc片段。在一些实施方案中,抗原结合片段可以是二抗体片段。在一些实施方案中,抗原结合片段可以是微型抗体片段。

[0094] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是治疗性抗体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包括3F8、8H9、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿昔单抗(abciximab)、阿比妥珠单抗(abituzumab)、阿泽奇单抗(abrezekimab)、阿利鲁单抗(abrilumab)、阿克托舒单抗(actoxumab)、阿达木单抗(adalimumab)、阿德木单抗(adecatumumab)、阿杜那单抗(aducanumab)、阿伐斯单抗(afasevikumab)、阿非莫单抗(afelimomab)、培戈-阿拉赛珠单抗(alacizumab pegol)、阿仑单抗(alemtuzumab)、阿利库单抗(alirocumab)、喷替酸阿妥莫单抗(alutetate)、阿麦妥单抗(amatuximab)、埃万妥单抗(amivantamab)、马安那莫单抗(anatumomab mafenatox)、安德利昔单抗(andeliximab)、雷星-阿奈妥单抗(anetumab ravtansine)、阿尼鲁单抗(anifrolumab)、安苏维单抗(ansuvimab)、安芦珠单抗(anrakinumab)、阿泊珠单抗(apolizumab)、伊汀-阿普卢妥单抗(aprutumab ixadotin)、阿西莫单抗(arcitumomab)、阿伐苏单抗(ascrinvacumab)、阿塞珠单抗(aselizumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)、阿度尤单抗(atidortoxumab)、阿替奴单抗(atinumab)、阿替韦单抗(atoltivimab)、玛替韦单抗(maftivimab)、奥西韦单抗(odesivimab)、阿替利珠单抗(atorolimumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、维汀-阿妥昔珠单抗(azintuxizumab vedotin)、巴姆拉尼单抗(bamlanivimab)、巴匹珠单抗(bapineuzumab)、巴利昔单抗(basiliximab)、巴维昔单抗(bavituximab)、BCD-100、贝妥莫单抗(bectumomab)、贝戈洛单抗(begelomab)、贝兰他单抗莫福汀(belantamab mafodotin)、贝利木单抗(belimumab)、贝玛妥珠单抗(bemarituzumab)、贝那利珠单抗(benralizumab)、贝度尤单抗(berlimatoxumab)、贝迈奇单抗(bermekimab)、伯萨利单抗(bersanlimab)、柏替木单抗(bertilimumab)、贝索单抗(besilesomab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、贝洛托舒单抗(bezlotoxumab)、比西单抗(biciromab)、比玛卢单抗(bimagrumab)、比美吉珠单抗(bimekizumab)、泊特埃单抗(birtamimab)、比伐珠单抗(bivatuzumab)、布来鲁单抗(bleelumab)、博纳吐单抗(blinatumomab)、布隆妥维单抗(blontuvetmab)、布索组单抗(blosozumab)、伯考赛珠单抗(bococizumab)、布雷库单抗

(brazikumab)、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、布雷奴单抗(briakinumab)、布罗达单抗(brodalumab)、布洛赛珠单抗(brolucizumab)、布隆妥珠单抗(brontictuzumab)、布罗舒单抗(burosumab)、卡比利珠单抗(cabiralizumab)、替卡利尤单抗(camidanlumab tesirine)、卡瑞利珠单抗(camrelizumab)、卡那奴单抗(canakinumab)、莫坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)、雷坎妥珠单抗(cantuzumab ravtansine)、卡帕珠单抗(caplacizumab)、卡西瑞单抗(casirivimab)、卡罗单抗(capromab)、卡芦单抗(carlumab)、卡罗妥昔单抗(carotuximab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、cBR96-多柔比星免疫缀合物、西利珠单抗(cedelizumab)、西米普利单抗(cemiplimab)、阿姆白介素-2-瑟妥珠单抗(cergutuzumab amunaleukin)、赛妥珠单抗(certolizumab pegol)、西利单抗(cetrelimab)、西妥昔单抗(cetuximab)、赛必妥单抗(cibisatamab)、西妥珠单抗(cirmtuzumab)、泊西他珠单抗(citatumab bogatox)、西妥木单抗(cixutumumab)、克拉扎珠单抗(clazakizumab)、克立昔单抗(clenoliximab)、泰坦-克利妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan)、考曲妥珠单抗(codrituzumab)、培汀-考非妥珠单抗(cofetuzumab pelidotin)、雷星-考妥昔单抗(coltuximab ravtansine)、可那木单抗(conatumumab)、康赛珠单抗(concizumab)、考韦昔单抗(cosfroviximab)、克瑞珠单抗(crenezumab)、立赞利珠单抗(crizanlizumab)、克罗特度单抗(crotedumab)、CR6261、古妥珠单抗(cusatuzumab)、达西珠单抗(dacetuzumab)、达克珠单抗(daclizumab)、达洛珠单抗(dalotuzumab)、培戈-达匹利珠单抗(dapirolizumab pegol)、达雷木单抗(daratumumab)、德屈库单抗(dectrekumab)、登赛珠单抗(demcizumab)、玛汀-地宁妥珠单抗(denintuzumab mafodotin)、地诺单抗(denosumab)、玛汀-迪妥昔珠单抗(depatuxizumab mafodotin)、地洛妥单抗生物素(derlotuximab biotin)、地莫单抗(detumomab)、迪扎米珠单抗(dezamizumab)、迪妥昔单抗(dinutuximab)、迪妥昔单抗 β (dinutuximab beta)、地利伏单抗(diridavumab)、多玛洛珠单抗(domagrozumab)、阿托度单抗(dorlimomab aritox)、多塔利单抗(dostarlimab)、曲齐妥单抗(droxitumab)、DS-8201、度戈妥珠单抗(duligotuzumab)、度匹鲁单抗(dupilumab)、度伐利尤单抗(durvalumab)、度司妥单抗(dusigitumab)、度妥昔珠单抗(duvortuxizumab)、依美昔单抗(ecromeximab)、依库珠单抗(eculizumab)、埃巴单抗(edobacomab)、依决洛单抗(edrecolomab)、依法利珠单抗(efalizumab)、依芬古单抗(efungumab)、埃迪鲁单抗(eldelumab)、依来努单抗(elezanumab)、依更妥单抗(elgemtumab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)、艾西莫单抗(elsilimomab)、依米妥珠单抗(emactuzumab)、依帕伐单抗(emapalumab)、依玛妥珠单抗(emibetuzumab)、艾美赛珠单抗(emicizumab)、纬恩泊妥单抗(enapotamab vedotin)、依那妥珠单抗(enavatuzumab)、维汀-恩氟妥单抗(enfortumab vedotin)、培戈赖莫单抗(enlimomab pegol)、依诺妥珠单抗(enoblituzumab)、依诺凯组单抗(enokizumab)、依诺苏单抗(enoticumab)、恩妥昔单抗(ensituximab)、艾可瑞妥单抗(epcoritamab)、西依匹莫单抗(epitumomab cituxetan)、依帕珠单抗(epratuzumab)、依普奈珠单抗(eptinezumab)、厄瑞努单抗(erenumab)、厄利珠单抗(erlizumab)、厄妥索单抗(ertumaxomab)、埃达珠单抗(etaracizumab)、埃特司韦单抗(etesevimab)、艾替利单抗(etigilimab)、依曲利组单抗(etrolizumab)、依维苏单抗(evinacumab)、依洛尤单抗(evolocumab)、艾韦单抗(exbivirumab)、法索单抗(fanolesomab)、法拉莫单抗(faralimomab)、法瑞西单抗

(faricimab)、法妥组单抗(farletuzumab)、法司努单抗(fasinumab)、FBTA05、泛维珠单抗(felvizumab)、非扎奴单抗(fezakinumab)、菲巴珠单抗(fibatuzumab)、非拉妥组单抗(ficlatuzumab)、芬妥木单抗(figitumumab)、非利伏单抗(firivumab)、法兰妥单抗(flanvotumab)、夫来库单抗(fletikumab)、伏妥珠单抗(flotetuzumab)、芳妥珠单抗(fontolizumab)、福雷芦单抗(foralumab)、福拉韦单抗(foravirumab)、瑞玛奈珠单抗(fremanezumab)、非苏木单抗(fresolimumab)、弗洛西单抗(frovocimab)、夫卢维单抗(frunevetmab)、福拉奴单抗(fulranumab)、伏妥昔单抗(futuximab)、伽奈珠单抗(galcanezumab)、加利昔单抗(galiximab)、甘妥单抗(gancotamab)、加尼妥单抗(ganitumab)、更汀芦单抗(gantenerumab)、伽妥珠单抗(gatipotuzumab)、加维莫单抗(gavilimomab)、格迪伏单抗(gedivumab)、吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)、吉伏组单抗(gevokizumab)、吉维单抗(gilvetmab)、瑾司鲁单抗(gimsilumab)、吉妥昔单抗(girentuximab)、维汀-格巴妥木单抗(glembatumumab vedotin)、戈利木单抗(golimumab)、戈利昔单抗(gomiliximab)、戈奈单抗(gosuranemab)、古塞库单抗(guselkumab)、伊利尤单抗(ianalumab)、伊巴珠单抗(ibalizumab)、IBI308、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、艾芦库单抗(icrucumab)、依达赛珠单抗(idarucizumab)、伊波妥组单抗(ifabotuzumab)、伊戈伏单抗(igovomab)、维汀伊达珠单抗(iladatuzumab vedotin)、IMAB362、伊玛鲁单抗(imalumab)、伊普利单抗(imaprelimab)、英西单抗(imciromab)、伊德维单抗(imdevimab)、伊马曲单抗(imgatuzumab)、英克勒库单抗(inclacumab)、雷英妥昔单抗(indatuximab ravtansine)、维汀-英度妥单抗(indusatumab vedotin)、伊奈利珠单抗(inebilizumab)、英夫利西单抗(infliximab)、英妥木单抗(intetumumab)、伊诺莫单抗(inolimomab)、奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、伊匹单抗(ipilimumab)、Iomab-B、伊妥木单抗(iratumumab)、艾沙妥昔单抗(isatuximab)、伊卡利单抗(iscalimab)、艾司妥单抗(istiratumab)、伊利组单抗(itolizumab)、依克珠单抗(ixekizumab)、凯利昔单抗(keliximab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、拉妥珠单抗(lacnotuzumab)、维拉妥珠单抗(ladiratuzumab vedotin)、兰帕珠单抗(lampalizumab)、拉那芦单抗(lanadelumab)、兰洛珠单抗(landogrozumab)、恩星-拉妥昔单抗(laprituximab emtansinee)、拉卡维西单抗(llarcaviximab)、来瑞组单抗(lebrikizumab)、来马索单抗(lemalesomab)、拉那利尤单抗(lendalizumab)、伦韦单抗(lenervimab)、仑兹鲁单抗(lenzilumab)、乐德木单抗(lerdelimumab)、乐利单抗(leronlimab)、来索伏单抗(lesofavumab)、来利珠单抗(letolizumab)、来沙木单抗(lexatumumab)、利韦单抗(libivirumab)、维汀-利法妥珠单抗(lifastuzumab vedotin)、利格利珠单抗(ligelizumab)、替朗妥昔单抗(loncastuximab tesirine)、维汀-罗妥昔珠单抗(losatuxizumab vedotin)、沙泰坦-利洛托单抗(lilotomab satetraxetan)、林妥珠单抗(lintuzumab)、利鲁单抗(lirilumab)、洛迪赛珠单抗(lodelcizumab)、洛吉维单抗(lokiivetmab)、莫星-洛沃妥珠单抗(lorvotuzumab mertansine)、卢卡木单抗(lucatumumab)、培戈-鲁利珠单抗(lulizumab pegol)、鲁昔单抗(lumiliximab)、鲁妥珠单抗(lumretuzumab)、鲁帕妥单抗(lupartumab)、阿汀-鲁帕妥单抗(lupartumab amadotin)、鲁吉珠单抗(lutikizumab)、玛替韦单抗(maftivimab)、马帕木单抗(mapatumumab)、玛格妥昔单抗(margetuximab)、马塔西单抗(marstacimab)、马司莫单抗(maslimomab)、玛弗利木

单抗(mavrilimumab)、马妥珠单抗(matuzumab)、美泊利单抗(mepolizumab)、美替木单抗(metelimumab)、米拉组单抗(milatuzumab)、明瑞莫单抗(minretumomab)、米吉珠单抗(mirikizumab)、索星-米妥昔单抗(mirvetuximab soravtansine)、米妥莫单抗(mitumomab)、莫多妥昔单抗(modotuximab)、莫格利珠单抗(mogamulizumab)、莫那利珠单抗(monalizumab)、莫罗木单抗(morolimumab)、莫舒内珠单抗(mosunetuzumab)、莫维组单抗(motavizumab)、帕西妥莫单抗(moxetumomab pasudotox)、莫罗单抗-CD3(muromonab-CD3)、他那可单抗(nacolomab tafenatox)、那美芦单抗(namilumab)、埃托-那普妥莫单抗(naptumomab estafenatox)、恩星-那妥昔单抗(naratuximab emtansinee)、纳奈妥单抗(narnatumab)、那他珠单抗(natalizumab)、那赛昔珠单抗(navicixizumab)、那韦伏单抗(navivumab)、那昔妥单抗(naxitamab)、奈巴库单抗(nebacumab)、耐昔妥珠单抗(necitumumab)、奈莫利珠单抗(nemolizumab)、NEOD001、奈瑞莫单抗(nerelimomab)、奈伐苏单抗(nesvacumab)、尼塔奇单抗(netakimab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、尼塞韦单抗(nirsevimab)、纳武单抗(nivolumab)、疏诺莫单抗(nofetumomab merpentan)、奥托萨昔单抗(obiltoxaximab)、奥比妥珠单抗(obinutuzumab)、奥卡妥珠单抗(ocaratuzumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥西韦单抗(odesivimab)、奥度莫单抗(odulimomab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥拉单抗(olaratumab)、奥来鲁单抗(oleclumab)、奥仑达利珠单抗(olendalizumab)、奥洛组单抗(olokizumab)、奥马珠单抗(omalizumab)、奥博妥单抗(omburtamab)、OMS721、奥那妥组单抗(onartuzumab)、昂妥昔珠单抗(ontuxizumab)、奥瓦利单抗(onvatilimab)、奥匹努单抗(opicinumab)、莫妥组单抗(oportuzumab monatox)、奥戈伏单抗(oregovomab)、奥替苏单抗(orticumab)、奥昔组单抗(otelixizumab)、奥替利单抗(otilimab)、奥乐妥珠单抗(otlertuzumab)、奥塞芦单抗(oxelumab)、奥扎奈珠单抗(ozanezumab)、奥利组单抗(ozoralizumab)、帕昔单抗(pagibaximab)、帕利珠单抗(palivizumab)、潘瑞鲁单抗(pamrevlumab)、帕尼单抗(panitumumab)、潘科曼单抗(pankomab)、帕巴库单抗(panobacumab)、帕萨妥珠单抗(parsatuzumab)、帕考珠单抗(pascolizumab)、帕妥昔珠单抗(pasotuxizumab)、帕替组单抗(pateclizumab)、帕曲妥单抗(patritumab)、PDR001、派姆单抗(pembrolizumab)、帕尼单抗(pemtumomab)、培拉凯珠单抗(perakizumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、培克珠单抗(pexelizumab)、匹地利珠单抗(pidilizumab)、维汀-匹那妥珠单抗(pinatuzumab vedotin)、平妥莫单抗(pintumomab)、普拉鲁单抗(placulumab)、普瑞鲁单抗(prezalumab)、洛扎利珠单抗(plozalizumab)、泊咖丽珠单抗(pogalizumab)、维泊妥珠单抗(polatuzumab vedotin)、泊奈组单抗(ponezumab)、珀韦昔单抗(porgaviximab)、普尼珠单抗(prasinezumab)、普利扎丽珠单抗(prezalizumab)、普立昔单抗(priliximab)、瑞托萨昔单抗(pritoxaximab)、普托木单抗(pritumumab)、PRO 140、奎利珠单抗(quilizumab)、雷妥莫单抗(racotumomab)、雷曲妥单抗(radretumab)、雷韦单抗(rafivirumab)、雷泮赛珠单抗(ralpancizumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、雷奈维单抗(ranevetmab)、雷珠单抗(ranibizumab)、雷昔库单抗(raxibacumab)、雷韦加利单抗(ravagalimab)、雷夫利珠单抗(ravulizumab)、瑞法奈珠单抗(refanezumab)、瑞加韦单抗(regavirumab)、瑞格丹维单抗(regdanvimab)、瑞拉利单抗(relatlimab)、壬托鲁单抗(remtolumab)、瑞利珠单抗(reslizumab)、利妥木单抗(rilotumumab)、利努苏单抗(rinucumab)、瑞莎珠单抗(risankizumab)、利妥昔单抗

(rituximab)、培戈-利伐巴珠单抗(rivabazumab pegol)、罗妥木单抗(robatumumab)、SII RMAb、罗来度单抗(roledumab)、若奇单抗(romilkimab)、罗莫单抗(romosozumab)、隆利组单抗(rontalizumab)、洛曼妥珠单抗(rosmantuzumab)、特司林-洛伐妥珠单抗(rovalpituzumab tesirine)、罗维珠单抗(rovelizumab)、洛利昔珠单抗(rozanolixizumab)、卢利珠单抗(ruplizumab)、SA237、戈沙妥组单抗(sacituzumab govitecan)、沙马组单抗(samalizumab)、维汀-沙马妥单抗(samrotamab vedotin)、萨瑞鲁单抗(sarilumab)、沙利珠单抗(satralizumab)、沙妥莫单抗喷地肽(satumomab pendetide)、苏金单抗(secukinumab)、塞鲁单抗(selicrelumab)、瑟瑞妥单抗(seribantumab)、瑟托萨昔单抗(setoxaximab)、赛图苏单抗(setrusumab)、司韦单抗(sevirumab)、西罗珠单抗(sibrotuzumab)、SGN-CD19A、SHP647、西法木单抗(sifalimumab)、司妥昔单抗(siltuximab)、辛妥珠单抗(simtuzumab)、西利珠单抗(siplizumab)、韦斯妥尤单抗(sirtratumab vedotin)、西鲁库单抗(sirukumab)、维汀-索非妥珠单抗(sofituzumab vedotin)、苏兰珠单抗(solanezumab)、索利托单抗(solitomab)、索耐珠单抗(sonepcizumab)、松妥珠单抗(sontuzumab)、斯巴达珠单抗(spartalizumab)、司他芦单抗(stamulumab)、硫索单抗(sulesomab)、舒他伏单抗(suptavumab)、苏替莫单抗(sutimlimab)、舒维组单抗(suvizumab)、苏托舒单抗(suvratoxumab)、他贝芦单抗(tabalumab)、替他珠单抗(tacatuzumab tetraxetan)、他度珠单抗(tadocizumab)、他法西他单抗(tafasitamab)、塔妥珠单抗(talacotuzumab)、他利珠单抗(talizumab)、他克他单抗(talquetamab)、坦妥维单抗(tamtuvetmab)、他尼组单抗(tanezumab)、帕他莫单抗(taplutumomab paptox)、他瑞妥单抗(tarextumab)、他利昔珠单抗(tavolimab)、特立妥单抗(teclistamab)、替非组单抗(tefibazumab)、阿替莫单抗(telimomab aritox)、特立妥珠单抗(telisotuzumab)、维汀-特立妥珠单抗(telisotuzumab vedotin)、替妥莫单抗(tenatumomab)、替奈昔单抗(teneliximab)、替利组单抗(teplizumab)、替泊地塔单抗(tepoditamab)、替妥木单抗(teprotumumab)、特度鲁单抗(tesidolumab)、特土罗单抗(tetulomab)、特折鲁单抗(tezepelumab)、TGN1412、替布利珠单抗(tibulizumab)、替拉珠单抗(tildrakizumab)、替加组单抗(tigatuzumab)、替米妥珠单抗(timigutuzumab)、替莫鲁单抗(timolumab)、替瑞利尤单抗(tiragotumab)、替古妥单抗(tiragotumab)、替雷利珠单抗(tislelizumab)、维汀-替索妥单抗(tisotumab vedotin)、TNX-650、托珠单抗(tocilizumab)、托木妥昔单抗(tomuzotuximab)、托利珠单抗(toralizumab)、托萨托舒单抗(tosatouxumab)、托西莫单抗(tositumomab)、托维妥单抗(tovetumab)、曲罗芦单抗(tralokinumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、曲妥珠单抗双卡马嗪(trastuzumab duocarmazine)、恩美曲妥珠单抗(trastuzumab emtansinee)、TRBS07、曲丽珠单抗(tregalizumab)、替西木单抗(tremelimumab)、曲弗单抗(trevogrumab)、西莫白介素单抗(tucotuzumab celmoleukin)、妥韦单抗(tuvirumab)、乌妥昔单抗(ublituximab)、乌洛鲁单抗(ulocuplumab)、乌瑞芦单抗(urelumab)、乌珠单抗(urtoxazumab)、乌司奴单抗(ustekinumab)、乌托鲁单抗(utomilumab)、他立林-伐达妥昔单抗(vadastuximab talirine)、瓦纳利单抗(vanalimab)、维汀-万多妥珠单抗(vandortuzumab vedotin)、万替妥单抗(vantictumab)、伐努赛珠单抗(vanucizumab)、伐利昔单抗(vapaliximab)、伐利苏单抗(varisacumab)、伐立鲁单抗(varlilumab)、伐利组单

抗(vatelizumab)、维多珠单抗(vedolizumab)、维妥组单抗(veltuzumab)、维帕莫单抗(vepalimomab)、维森库单抗(vesencumab)、维西珠单抗(visilizumab)、沃巴利珠单抗(vobarilizumab)、伏洛昔单抗(volociximab)、珀伽利珠单抗(vonlerolizumab)、伏派利单抗(vopratelimab)、玛汀-沃索妥珠单抗(vorsetuzumab mafodotin)、伏妥莫单抗(votumumab)、伏那吉珠单抗(vunakizumab)、珍妥珠单抗(xentuzumab)、XMAB-5574、扎芦木单抗(zalutumumab)、扎木单抗(zanolimumab)、扎妥昔单抗(zatuximab)、泽妥珠单抗(zenocutuzumab)、齐拉木单抗(ziralimumab)、佐妥昔单抗(zolbetuximab)、或阿佐莫单抗(zolimomab aritox)。在一些特别优选的实施方案中,治疗性抗体包括伊匹单抗、纳武单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗、斯巴达珠单抗或阿特珠单抗。在一些实施方案中,治疗性抗体包括派姆单抗。在一些实施方案中,治疗性抗体包括伯萨利单抗或培戈赖莫单抗。

[0095] 本公开还提供了包含本文所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物进一步包含张力剂、表面活性剂、防腐剂和/或pH为约4.0至约8.0的缓冲系统。在一些实施方案中,药物组合物进一步包含一种或多种额外的治疗剂,诸如本文所述的组合治疗剂。在一些实施方案中,药物组合物是液体药物组合物。

[0096] 在一些实施方案中,药物组合物可以以单位剂量形式呈现,每剂量含有预定量的本文所述的抗体或其抗原结合片段。用于药物组合物的药学上可接受的载体可以采取多种形式,这取决于待治疗的病状或施用途径。

[0097] 包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的药物组合物可以通过将具有所需纯度的抗体或其抗原结合片段与本领域通常使用的任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(所有这些在本文中被称作“载体”)诸如例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子去污剂、抗氧化剂和其他杂项添加剂混合来制备,以作为冻干配制品或水溶液储存。

[0098] 缓冲剂有助于将pH维持在接近生理条件的范围内。它们可以以约2mM至约50mM范围内的浓度存在。用于本文所述的药物组合物的合适的缓冲剂可以包括有机酸和无机酸及其盐,诸如柠檬酸盐缓冲剂(诸如,柠檬酸一钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸一钠混合物等)、琥珀酸盐缓冲剂(诸如,琥珀酸-琥珀酸一钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等)、酒石酸盐缓冲剂(诸如,酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等)、富马酸盐缓冲剂(诸如,富马酸-富马酸一钠混合物、富马酸-富马酸二钠混合物、富马酸一钠-富马酸二钠混合物等)、葡萄糖酸盐缓冲剂(诸如,葡萄糖酸-葡萄糖酸钠混合物、葡萄糖酸-氢氧化钠混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物等)、草酸盐缓冲剂(诸如,草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等)、乳酸盐缓冲剂(诸如,乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)和乙酸盐缓冲剂(诸如,乙酸-乙酸钠混合物、乙酸-氢氧化钠混合物等)。另外,可以使用磷酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂和三甲胺盐,诸如Tris。

[0099] 防腐剂可以添加到药物组合物中以减少微生物生长,并且可以以约0.2%至约1%(w/v)范围内的量添加。适用于本文所述的药物组合物的防腐剂包括但不限于苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、苯扎氯铵(诸如,氯化物、溴化物和碘化物)、六甲基氯化铵和对羟基苯甲酸烷基酯(诸如对羟基苯甲

酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。

[0100] 可以添加有时被称为“稳定剂”的等渗剂以确保液体组合物的等渗性,并且所述等渗剂包括多元糖醇,例如三元或更高级糖醇,诸如甘油、赤藓糖醇、阿糖醇、木糖醇、山梨醇和甘露醇。稳定剂是指广泛类别的赋形剂,在功能上,其范围可以从填充剂到溶解治疗剂或有助于防止变性或粘附到容器壁的添加剂。典型的稳定剂可以是多元糖醇(上面列举的);氨基酸(诸如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等);有机糖或糖醇(诸如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、核糖醇、肌醇、半乳糖醇、甘油等),包括环醇,诸如肌醇;聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫还原剂,诸如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(诸如,10个残基或更少的肽);蛋白质,诸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮单糖,诸如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖,诸如乳糖、麦芽糖、蔗糖;和三糖,诸如棉子糖;以及多糖,诸如葡聚糖。稳定剂可以以每重量份活性蛋白质约0.1至约10,000重量份的范围存在。

[0101] 也可将非离子表面活性剂或去污剂(也被称为“润湿剂”)添加到药物组合物中以帮助溶解本文所述的抗体或其抗原结合片段,以及保护本文所述的抗体或其抗原结合片段免受搅动诱导的聚集,这也允许将配制品暴露于剪切表面应力而不引起蛋白质的变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80等)、泊洛沙姆(184、188等)、Pluronic多元醇、聚氧乙烯脱水山梨醇单醚(TWEENTM-20、TWEENTM-80等)。非离子表面活性剂可以以约0.05mg/mL至约1.0mg/mL,例如,约0.07mg/mL至约0.2mg/mL的范围存在。

[0102] 也可以将额外的赋形剂,诸如填充剂(诸如淀粉)、螯合剂(诸如EDTA)、抗氧化剂(诸如抗坏血酸、蛋氨酸和维生素E)和助溶剂添加到药物组合物中。

[0103] 本公开还提供了含有本文所述的抗体或其抗原结合片段(包括抗体缀合物)的药物试剂盒。药物试剂盒可以是一种包装,其包含本文所述的抗体或其抗原结合片段(诸如,呈冻干形式或作为水溶液)和以下中的一者或多者:组合治疗剂;用于施用抗体或其抗原结合片段的装置,诸如笔、针和/或注射器;和用于重新悬浮抗体或其抗原结合片段的药用级水或缓冲液(如果抗体呈冻干形式)。

[0104] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段的每个单位剂量被分开包装,并且试剂盒可以含有一个或多个单位剂量(诸如,两个单位剂量、三个单位剂量、四个单位剂量、五个单位剂量、八个单位剂量、十个单位剂量或更多)。在一些实施方案中,一个或多个单位剂量各自容纳在注射器或笔中。

[0105] 本文还涵盖了含有本文所述的抗体或其抗原结合片段(包括抗体缀合物)的诊断试剂盒。诊断试剂盒可以是包含本文所述的抗体或其抗原结合片段(诸如,呈冻干形式或作为水溶液)和一种或多种用于进行诊断测定的试剂的包装。在用酶标记抗体或其抗原结合片段的情况下,试剂盒可以包含酶所需的底物和辅助因子(诸如,提供可检测发色团或荧光团的底物前体)。此外,可以包括其他添加剂,诸如稳定剂、缓冲液(诸如,封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。在一些实施方案中,诊断试剂盒中包括的抗体或其抗原结合片段可以固定在固体表面上,或者试剂盒中包括其上可以固定抗体或其抗原结合片段的固体表面(诸如,载玻片或平板)。可以改变各种试剂的相对量,以使试剂溶液中的浓度大幅优化测定的灵敏度。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段和一种或多种试剂可以作为干粉(通常是冻干

的)提供(单独或组合),包括在溶解时将提供具有适当浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0106] 本公开还提供了检测表达抗原的细胞的方法,所述方法包括使细胞与本文所述的抗体或其抗原结合片段接触,并检测所述抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,细胞存在于从人获得的生物样品中,并且细胞在体外与抗体或其抗原结合片段接触。在一些实施方案中,细胞存在于人中,并且细胞在体内与抗体或其抗原结合片段接触。

[0107] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段对抗原具有高结合亲和力。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有特定的缔合速率常数(k_{on} 或 k_A 值)、解离速率常数(k_{off} 或 k_D 值)、亲和常数(K_A 值)、解离常数(K_D 值)和/或 IC_{50} 值。

[0108] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以至少约 $10^{10}M^{-1}$ 、至少约 $4 \times 10^{11}M^{-1}$ 、至少约 $10^{11}M^{-1}$ 、至少约 $4 \times 10^{12}M^{-1}$ 、至少约 $10^{12}M^{-1}$ 、至少约 $4 \times 10^{13}M^{-1}$ 、至少约 $10^{13}M^{-1}$ 、至少约 $4 \times 10^{14}M^{-1}$ 、至少约 $10^{14}M^{-1}$ 、至少约 $4 \times 10^{15}M^{-1}$ 或至少约 $10^{15}M^{-1}$ 的 K_A (k_{on}/k_{off}),或以两端为前述值中任何一对值的任何范围(诸如,从约 $4 \times 10^{11}M^{-1}$ 至约 $4 \times 10^{13}M^{-1}$ 或从约 $4 \times 10^{12}M^{-1}$ 至约 $4 \times 10^{15}M^{-1}$)的 K_A 结合至抗原。

[0109] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以约 10^{-10} 或更小、约 $4 \times 10^{-11}M$ 或更小、约 $10^{-11}M$ 或更小、约 $4 \times 10^{-12}M$ 或更小、约 $10^{-12}M$ 或更小、约 $4 \times 10^{-13}M$ 或更小、约 $10^{-13}M$ 或更小、约 $4 \times 10^{-14}M$ 或更小、约 $10^{-14}M$ 或更小、约 $4 \times 10^{-15}M$ 或更小或约 $10^{-15}M$ 或更小的 K_D (k_{off}/k_{on}),或以两端为前述值中任何一对值的任何范围(诸如,从约 $4 \times 10^{-11}M$ 至约 $4 \times 10^{-13}M$ 或从约 $4 \times 10^{-12}M$ 至约 $4 \times 10^{-15}M$)的 K_D 结合至抗原。

[0110] 在一些实施方案中, K_D (k_{off}/k_{on})值通过本领域熟知的测定法确定,诸如ELISA、等温滴定量热法(ITC)、荧光偏振测定法或任何其他生物传感器诸如BIAcore。

[0111] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以小于约0.02nM、小于约0.01nM、小于约0.005nM、小于约0.002nM、小于约0.001nM、小于约 $5 \times 10^{-4}nM$ 、小于约 $2 \times 10^{-4}nM$ 、小于约 $1 \times 10^{-4}nM$ 、小于约 $5 \times 10^{-5}nM$ 、小于约 $2 \times 10^{-5}nM$ 、小于约 $1 \times 10^{-4}nM$ 、小于约 $5 \times 10^{-6}nM$ 、小于约 $2 \times 10^{-6}nM$ 、小于约 $1 \times 10^{-6}nM$ 、小于约 $5 \times 10^{-7}nM$ 、小于约 $2 \times 10^{-7}nM$ 或小于约 $1 \times 10^{-7}nM$ 的 IC_{50} ,或以两端为前述值中任何一对值的任何范围(诸如,从约0.02nM至约 $2 \times 10^{-5}nM$ 或从约 $5 \times 10^{-5}nM$ 至约 $1 \times 10^{-7}nM$)的 IC_{50} 结合至抗原并抑制抗原配体的结合。 IC_{50} 可根据本领域熟知的方法测量,诸如ELISA。

[0112] 抗体或其抗原结合片段,包括诸如通过生物素化、辣根过氧化物酶或任何其他可检测部分(包括上述那些)修饰的抗体或其抗原结合片段,可用于诊断目的。

[0113] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可用于纯化或检测抗原,包括体外和体内诊断方法。例如,抗体或其抗原结合片段可用于免疫测定,以定性和定量测量生物样品中抗原的水平,或鉴定动物中抗原的位置、数量、行为等。例如,使用本文所述的抗体或其抗原结合片段测量抗原水平可用于,例如:1)诊断或确定患者罹患癌症的增加风险;2)确定患者的预后,包括肿瘤的阶段和等级(特别是癌症是否转移或可能转移)和/或其对抗体疗法的潜在敏感性;3)确定肿瘤的起源;和/或4)确定患者治疗的功效。

[0114] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以例如与化合物筛选测定联合用于评价药剂对抗原的表达和/或活性的作用。另外,抗体或其抗原结合片段可以与基因疗法技术联合使用,例如,以评价正常和/或工程化抗原表达的转染成功。

[0115] 本公开还提供了诊断神经疾病的方法,所述方法包括检测在神经组织中或在与非

CNS靶器官诸如肺、肝、肾、脾等相关的任何组织中表达的抗原的量或活性。诊断方法可以采用缀合至诊断剂的抗体或其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段可诊断性地用于例如检测抗原在特定细胞、组织或血清中的表达；或作为临床试验程序的一部分监测免疫反应的发展或进展，以例如确定特定治疗方案的功效。通过将抗体或其抗原结合片段偶联至可检测物质，可促进检测。可检测物质的实例包括但不限于各种酶、辅基、荧光材料（诸如荧光素和罗丹明及其衍生物）、发光材料、生物发光材料、光学剂（诸如卟啉、蒽醌、蒽吡啶、花醌、咕吨、花青、吡啶、吩噻嗪和吩噻嗪的衍生物）、放射性材料、使用各种正电子发射断层摄影术的正电子发射金属，以及非放射性顺磁性金属离子（诸如，Gd (III)、Eu (III)、Dy (III)、Pr (III)、Pa (IV)、Mn (II)、Cr (III)、Co (III)、Fe (III)、Cu (II)、Ni (II)、Ti (III) 和V (IV)）。可检测物质可直接偶联或缀合至抗体或其抗原结合片段，或使用本领域已知的技术通过中间体（诸如例如本领域已知的接头）间接偶联或缀合至抗体或其抗原结合片段。酶标记的实例包括萤光素酶（诸如，萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶；参见美国专利第4,737,456号）、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶（HRPO）、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶（诸如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶）、杂环氧化酶（诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶）、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。合适的辅基复合物的实例包括但不限于链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素；合适的荧光材料的实例包括但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光材料的实例包括鲁米诺；生物发光材料的实例包括但不限于萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白；并且合适的放射性材料的实例包括但不限于 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc 。

[0116] 本公开还提供了用于检测抗原在细胞上的表达的方法，所述方法包括使用本文所述的一种或多种抗体或其抗原结合片段（任选地缀合至可检测部分）接触来自患者的生物样品，并检测样品是否对抗原表达呈阳性，或与对照样品相比样品是否具有改变的（例如，降低的或增加的）表达。生物样品可以包括各种组织的活组织检查，包括但不限于：皮肤、肌肉、乳腺、前列腺、子宫颈、卵巢、脑、睾丸、胃肠、眼、肝、肾和肺。生物样品的细胞实例包括肿瘤细胞、皮肤细胞、肌肉细胞、血细胞、卵巢细胞、脑细胞、前列腺细胞、乳腺细胞、睾丸细胞、胃肠细胞、眼细胞、肝细胞、肾细胞、宫颈细胞和肺细胞。生物样品也可以是生物流体。

[0117] 生物样品中抗原表达细胞的存在可以指示癌症的存在并且可以指示转移，特别是当以大于正常健康受试者的量存在时。患者（特别是正在接受治疗的患者）中抗原表达细胞随时间推移的丧失可指示缓解（即，成功治疗），而正在接受治疗的患者中抗原表达细胞水平缺乏变化可指示对疗法的抗性，并且指示可采用不同的治疗策略。类似地，患者体内抗原表达细胞随时间推移的增加可指示复发。另外，本文所述的成像技术可用于监测肿瘤的大小以确定治疗的功效。在一些实施方案中，可进行其他癌症诊断测定以确认用本文所述的方法获得的结果。

[0118] 在一些实施方案中，可以从受试者获得生物样品（诸如，肿瘤样品）并确定抗原表达细胞的存在。抗原表达细胞的数目可以与肿瘤等级相关。在一些实施方案中，将所述生物样品中抗原表达细胞的数目与来自健康个体的对应生物样品中抗原表达细胞的数目进行比较，以确定肿瘤中抗原表达细胞的调节。可以用药剂治疗包含肿瘤的受试者，以将抗原表达细胞的活性调节至正常、健康水平。

[0119] 可使用本发明方法诊断的疾病包括但不限于神经癌症,诸如原发性脑肿瘤,包括神经胶质瘤(胶质母细胞瘤)、脑膜瘤、神经鞘瘤、垂体腺瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、血管瘤、表皮样瘤、肉瘤和来自其他肿瘤来源的颅内转移瘤。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可用于诊断多形性胶质母细胞瘤(GBM)。

[0120] 本公开还提供了治疗表达抗原的癌症的方法,所述方法包括向有需要的人类患者施用本文所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述方法涉及向患有实体瘤的人类患者施用一定量的本文所述的抗体或其抗原结合片段以提供治疗益处。

[0121] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可以通过多种途径施用于患者,诸如口服、透皮、皮下、鼻内、静脉内、动脉内、肌肉内、眼内、局部(topically/locally)、鞘内、脑室内、椎管内和颅内。在任何给定情况下,最合适的施用途径将取决于特定的抗体、受试者、疾病的性质和严重程度以及受试者的身体状况。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以配制成水溶液。在一些实施方案中,静脉内或颅内施用抗体或其抗原结合片段。

[0122] 本文所述的抗体或其抗原结合片段可用于治疗各种表达抗原的肿瘤。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可用于治疗表达抗原的癌症,诸如具有骨骼肌特性的肉瘤和皮肤肿瘤。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可用于治疗患者中表达抗原的神经癌症,诸如脑肿瘤或小脑病变,诸如微转移。在一些实施方案中,表达抗原的癌症是神经癌症。在一些实施方案中,神经癌症是原发性脑肿瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、脑膜瘤、神经鞘瘤、垂体腺瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、血管瘤、表皮样瘤、肉瘤或来自其他肿瘤来源的颅内转移瘤。在一些实施方案中,神经癌症是胶质母细胞瘤。在一些实施方案中,胶质母细胞瘤是多形性胶质母细胞瘤(GBM)。

[0123] 在一些实施方案中,表达抗原的脑肿瘤是含有GBM肿瘤引发细胞的GBM肿瘤。在一些实施方案中,用本文所述的抗体或其抗原结合片段治疗导致对GBM肿瘤引发细胞的增殖的抑制。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段进一步抑制GBM肿瘤引发细胞的自我更新。细胞增殖和/或自我更新的抑制可导致疾病体征或症状的改善。例如,这种疗法可以导致生存期(总生存期和/或无进展生存期)的改善和/或可以导致客观的临床反应(部分或完全)。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段被GBM肿瘤细胞内化,从而导致抗体或其抗原结合片段在杀死与其结合的GBM肿瘤细胞方面的治疗功效增加。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段充当抗原生物活性的拮抗剂,并且可以另外用作用于抑制异常抗原活性的方法。

[0124] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可用于治疗非神经性抗原表达肿瘤,包括癌症和良性肿瘤。适合用本文所述的抗体或其抗原结合片段治疗的癌症包括过表达抗原的癌症。在一些实施方案中,适合用本文所述的抗体或其抗原结合片段治疗的癌症包括上皮细胞癌。在一些实施方案中,适合用本文所述的抗体或其抗原结合片段治疗的癌症包括但不限于乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠直肠癌、肛门癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、卵巢癌、胰腺癌、皮肤癌、口腔癌、食道癌、阴道癌、宫颈癌、脾癌、睾丸癌、胸腺癌、头颈癌和结肠直肠癌。癌症可以是新诊断的和未治疗的,或者可以是复发性的、难治性的,或复发性和难治性的,或转移性形式的实体瘤。

[0125] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可用于治疗表达抗原的血

液恶性肿瘤,包括但不限于骨髓瘤(诸如,多发性骨髓瘤)、淋巴瘤(诸如,霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和套细胞淋巴瘤)、白血病(诸如慢性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病和急性淋巴细胞性白血病)和骨髓增生异常综合征。在一些实施方案中,所述方法包括向患有血液恶性肿瘤的人类患者施用本文所述的抗体或其抗原结合片段以提供治疗益处。

[0126] 在一些实施方案中,在一天、两天、三天、五天、一周、两周、三周、一个月、五周、六周、七周、八周、两个月或三个月后重复本文所述的抗体或其抗原结合片段的施用。重复施用可以是相同剂量或不同剂量。施用可以重复一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或更多次。例如,根据某些给药方案,患者可以长期接受抗体疗法,诸如6个月、1年或更长时间。施用于患者的本文所述的抗体或其抗原结合片段的量是治疗有效量。如本文所用,“治疗有效”量的本文所述的抗体或其抗原结合片段可以作为单剂量施用或在治疗方案的过程中施用,诸如在一周、两周、三周、一个月、三个月、六个月、一年或更长时间的过程中施用。本文进一步描述了示例性的治疗方案。疾病的治疗包括治疗已经被诊断为具有任何临床阶段或表现下的任何形式的疾病的患者;延缓疾病症状或体征的发作或演变或加重或恶化;和/或预防疾病和/或降低疾病的严重程度。

[0127] 本文所述的抗体或其抗原结合片段用于治疗患者的癌症的用途可导致与无疗法(适当时)相比或与已知护理标准相比任何经证实的临床益处。临床益处可通过本领域普通技术人员已知的任何方法评估。在一些实施方案中,基于客观反应率(ORR)(使用RECIST版本1.1确定)、反应持续时间(DOR)、无进展生存期(PFS)和/或总生存期(OS)评估临床益处。在一些实施方案中,完全反应指示治疗益处。在一些实施方案中,部分反应指示治疗益处。在一些实施方案中,稳定的疾病指示治疗益处。在一些实施方案中,总生存期的增加指示治疗益处。在一些实施方案中,治疗益处可构成疾病进展时间的改善和/或症状或生活质量的改善。在一些实施方案中,治疗益处可以并不意味着疾病控制期的延长,而是症状负担的明显减轻,从而改善生活质量。对于本领域技术人员显而易见的是,使用本文所述的抗体或其抗原结合片段可以观察到治疗益处,所述抗体或其抗原结合片段单独使用(单一疗法)或与其他抗癌疗法和/或靶向或非靶向抗癌剂联合或一起使用。

[0128] 在一些实施方案中,可以使用被设计用于测量对癌症的新治疗的反应的标准临床试验来评估治疗益处。为了评估本文所述的抗体或其抗原结合片段的治疗益处,可以使用以下测试中的一种或组合:1)实体瘤的反应评价标准(RECIST)版本1.1;2)免疫相关RECIST(irRECIST);3)东部肿瘤协作组(ECOG)表现状态;4)免疫相关反应标准(irRC);5)能够通过评估肿瘤抗原进行评价的疾病;6)有效的患者报告的结果量表;和/或7)总生存期和无进展生存期的卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)估计。

[0129] 本公开还提供了组合疗法方法,其包括向患者施用至少两种药剂,其中第一种是本文所述的抗体或其抗原结合片段,并且其中第二种是组合治疗剂。本文所述的抗体或其抗原结合片段和组合治疗剂可同时、依序或分开施用。组合疗法方法可产生累加效应或大于累加的效应。

[0130] 在本发明的方法中,本文所述的抗体或其抗原结合片段和组合治疗剂可并行施用,同时地或相继地。如果将本文所述的抗体或其抗原结合片段和组合治疗剂在同一天(例如,在同一患者就诊期间)施用于患者,则它们是相继施用的。相继施用可以间隔1、2、3、4、

5、6、7或8小时进行。相反,如果将本文所述的抗体或其抗原结合片段和组合治疗剂在不同的日期施用于患者,则它们被分开施用,例如,抗体或其抗原结合片段和组合治疗剂可以间隔1天、2天或3天、一周、2周或每月进行施用。在本公开的方法中,本文所述的抗体或其抗原结合片段的施用可以在组合治疗剂的施用之前或之后。在一些实施方案中,可将本文所述的抗体或其抗原结合片段和组合治疗剂并行施用一段时间,随后是第二段时间,在所述第二段时间中,交替施用抗体或其抗原结合片段和组合治疗剂。

[0131] 在一些实施方案中,组合治疗剂是化学治疗剂、抗血管生成剂、抗风湿药、抗炎剂、放射治疗剂、免疫抑制剂或细胞毒性药物。本文所述的抗体或其抗原结合片段可与常规癌症疗法(诸如手术、放射疗法、化学疗法或其组合)组合使用。

[0132] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括手术切除肿瘤细胞和/或施用放射疗法中的一者或两者。在一些实施方案中,可用于与本文所述的抗体或其抗原结合片段的组合肿瘤疗法的其他治疗剂包括参与肿瘤生长的其他因子(诸如HER2、HER3、HER4、VEGF或TNF- α)的拮抗剂,诸如抗体。在一些实施方案中,为了治疗癌症,可能是有益的是,还向患者施用一种或多种细胞因子。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段与生长抑制剂共同施用。

[0133] 对于癌症的治疗,抗炎剂可适当地与本文所述的抗体或其抗原结合片段组合使用。抗炎剂包括但不限于对乙酰氨基酚(acetaminophen)、苯海拉明(diphenhydramine)、哌替啶(meperidine)、地塞米松(dexamethasone)、喷他萨(pentasa)、美沙拉嗪(mesalazine)、安萨科(asacol)、磷酸可待因(codeine phosphate)、贝诺酯(benorylate)、芬布芬(fenbufen)、萘普生(naprosyn)、双氯芬酸(diclofenac)、依托度酸(etodolac)和吲哚美辛(indomethacin)、阿司匹林(aspirin)和布洛芬(ibuprofen)。

[0134] 对于癌症的治疗,化学治疗剂可与本文所述的抗体或其抗原结合片段组合使用。化学治疗剂包括但不限于放射性分子、毒素(诸如细胞毒素或细胞毒性剂),包括对细胞的活力有害的任何药剂、药剂和含有化学治疗化合物的脂质体或其他囊泡。合适的化学治疗剂的实例包括但不限于1-去氢睾酮、5-氟尿嘧啶氨烯咪胺、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、放线菌素D、阿霉素、阿地白介素、抗- $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白抗体、烷化剂、别嘌呤钠、六甲蜜胺、氨磷汀、阿那曲唑、氨茴霉素(AMC)、抗有丝分裂剂、顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂、二氨基-二氯铂、葱环类药物、抗生素、抗代谢药、天冬酰胺酶、BCG活(膀胱内)、倍他米松磷酸钠(betamethasone sodium phosphate)和乙酸倍他米松(betamethasone acetate)、比卡鲁胺(bicalutamide)、硫酸博来霉素(bleomycin sulfate)、白消安(busulfan)、甲酰四氢叶酸钙(calcium leucovorin)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡培他滨(capecitabine)、卡铂(carboplatin)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂(cisplatin)、克拉屈滨(cladribine)、秋水仙碱(colchicin)、结合雌激素、环磷酰胺(cyclophosphamide)、环磷酰胺、阿糖胞苷、阿糖胞苷、细胞松弛素B、环磷酰胺(cytosan)、达卡巴嗪(dacarbazine)、放线菌素D(dactinomycin)、放线菌素D(以前称为新福菌素(actinomycin))、柔红霉素、柠檬酸柔红霉素、地尼白介素(denileukin diftitox)、右雷佐生(dexrazoxane)、二溴甘露醇、二羟基炭疽菌素二酮、多西他赛(docetaxel)、甲磺酸多拉司琼(dolasetron mesylate)、多柔比星、屈大麻酚(dronabinol)、大肠杆菌L-天冬酰胺酶、依洛西单抗(eolociximab)、吐根碱(emetine)、红

细胞生成素- α (epoetin- α)、欧文氏菌L-天冬酰胺酶 (Erwinia L-asparaginase)、酯化雌激素 (esterified estrogen)、雌二醇 (estradiol)、雌莫司汀磷酸钠 (estramustine phosphate sodium)、溴化乙锭 (ethidium bromide)、乙炔雌二醇 (ethinyl estradiol)、依替磷酸钠 (etidronate)、依托泊苷亚叶酸因子 (etoposide citrovorum factor)、磷酸依托泊苷 (etoposide phosphate)、非格司亭 (filgrastim)、氟尿苷 (floxuridine)、氟康唑 (fluconazole)、磷酸氟达拉滨 (fludarabine phosphate)、氟尿嘧啶、氟他胺 (fiutamide)、叶酸、吉西他滨、糖皮质激素 (glucocorticoid)、乙酸戈舍瑞林 (goserelin acetate)、短杆菌肽D、格拉司琼、羟基脲 (hydroxyurea)、伊达比星 (idarubicin)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、干扰素 α -2b、伊立替康 (irinotecan)、来曲唑、亚叶酸钙 (leucovorin calcium)、乙酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate)、左旋咪唑 (levamisole)、利多卡因 (lidocaine)、洛莫司汀、类美登素 (maytansinoid)、氮芥、乙酸甲羟孕酮、乙酸甲地孕酮、美法兰、巯基嘌呤、美司钠 (mesna)、甲氨蝶呤、甲基睾酮、光辉霉素 (mithramycin)、丝裂霉素C、米托坦 (mitotane)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、尼鲁米特 (nilutamide)、乙酸奥曲肽 (octreotide acetate)、昂丹司琼 (ondansetron)、紫杉醇 (paclitaxel)、帕米膦酸二钠 (pamidronate disodium)、喷司他丁 (pentostatin)、匹罗卡品 (pilocarpine)、普利霉素 (plimycin)、具有卡莫司汀植入物的聚苯丙生20、卟吩姆钠 (porfimer sodium)、普鲁卡因 (procaine)、丙卡巴肼 (procarbazine)、普萘洛尔 (propranolol)、利妥昔单抗 (rituximab)、沙格司亭 (sargramostim)、链脲佐菌素 (streptozotocin)、他莫昔芬、泰素 (taxol)、替尼泊苷 (teniposide)、替诺泊苷 (tenoposide)、睾内酯 (testolactone)、丁卡因 (tetracaine)、噻替派苯丁酸氮芥 (thioepa chlorambucil)、硫鸟嘌呤、噻替哌 (thiotepa)、拓扑替康 (topotecan)、柠檬酸托瑞米芬 (toremifene citrate)、曲妥珠单抗、维甲酸 (tretinoin)、戊柔比星 (valrubicin)、硫酸长春碱 (vinblastine sulfate)、硫酸长春新碱 (vincristine sulfate) 和酒石酸长春瑞滨 (vinorelbine tartrate), 或其任何盐。在一些实施方案中, 所述方法包括向患者施用至少一种化学治疗剂。

[0135] 任何抗血管生成剂可与本文所述的抗体或其抗原结合片段联合使用。在一些实施方案中, 抗血管生成剂是VEGF拮抗剂或另一种VEGF受体拮抗剂, 诸如VEGF变体、可溶性VEGF受体片段、能够阻断VEGF或VEGFR的适体、中和抗VEGFR抗体、VEGFR酪氨酸激酶的低分子量抑制剂, 及其任何组合。可替代地, 或另外地, 抗VEGF抗体可以共同施用于患者。

[0136] 施用于患者的治疗方案可以根据患者的年龄、体重和疾病状况而变化。治疗方案可持续2周至无限期。在一些实施方案中, 治疗方案持续约2周至约6个月、约3个月至约5年、约6个月至约1年或约2年、约8个月至约18个月等。治疗方案可以是非可变剂量方案或多变剂量方案。

[0137] 本文所述的抗体或其抗原结合片段的施用量可取决于多种因素, 包括但不限于所治疗的实体瘤的特定类型、所治疗的实体瘤的阶段、施用模式、施用频率、所需的治疗益处和其他参数, 诸如患者的年龄、体重和其他特性。确定对于特定施用模式和频率有效提供治疗益处的剂量在本领域技术人员的能力范围内。最初可以从体内动物模型或临床试验中估计有效提供治疗益处的剂量。用于多种疾病的合适动物模型是本领域已知的。本文所述的抗体或其抗原结合片段可通过适于待治疗病状的任何途径施用。

[0138] 在一些实施方案中, 本文所述的抗体或其抗原结合片段作为小瓶中的冻干粉末提

供。小瓶可含有约100mg、约125mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg或约400mg抗体或其抗原结合片段。在施用之前,可将冻干粉末用无菌注射用水(SWFI)或其他合适的介质重构,以提供含有本文所述的抗体或其抗原结合片段的溶液。在一些实施方案中,将所得重构溶液进一步用盐水或其他适合输注的介质稀释,并通过例如每7天两次、每7天一次、每14天一次、每21天一次、每28天一次、每35天一次、每42天一次、每49天一次或每56天一次的IV输注进行施用。在一些实施方案中,对于第一循环,输注在90分钟内发生。在一些实施方案中,随后的输注在60分钟内。

[0139] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段以约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1.0mg/kg、约2.0mg/kg、约3.0mg/kg、约4.0mg/kg、约5.0mg/kg、约6.0mg/kg、约8.0mg/kg或约10.0mg/kg每7天一次IV输注进行施用。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段以约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1.0mg/kg、约2.0mg/kg、约3.0mg/kg、约4.0mg/kg、约5.0mg/kg、约6.0mg/kg、约8.0mg/kg或约10.0mg/kg每14天一次IV输注进行施用。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段以约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1.0mg/kg、约2.0mg/kg、约3.0mg/kg、约4.0mg/kg、约5.0mg/kg、约6.0mg/kg、约8.0mg/kg或约10.0mg/kg每21天一次IV输注进行施用。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段以约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1.0mg/kg、约2.0mg/kg、约3.0mg/kg、约4.0mg/kg、约5.0mg/kg、约6.0mg/kg、约8.0mg/kg或约10.0mg/kg每28天一次IV输注进行施用。

[0140] 当与其他药剂(诸如其他化学治疗剂)联合或一起施用时,本文所述的抗体或其抗原结合片段可按与其他药剂相同的时间表或按不同的时间表施用。当按相同的时间表施用时,本文所述的抗体或其抗原结合片段可在其他药剂之前、之后或并行施用。在一些实施方案中,当本文所述的抗体或其抗原结合片段与护理标准联合或一起施用时,所述抗体或其抗原结合片段可在标准疗法开始之前(例如在标准护理疗法开始之前的一天、几天、一周、几周、一个月或甚至几个月)启动。在一些实施方案中,当本文所述的抗体或其抗原结合片段与护理标准联合或一起施用时,本文所述的抗体或其抗原结合片段可在标准疗法开始之后(例如在标准护理疗法开始之后的一天、几天、一周、几周、一个月或甚至几个月)启动。

[0141] 用于皮下施用的给药时间表可以从每六个月一次到每天一次变化,这取决于许多临床因素,包括疾病的类型、疾病的严重程度和患者对本文所述的抗体或其抗原结合片段的敏感性。

[0142] 本公开还提供了治疗后发性白内障(Posterior Capsule Opacification,PCO)的方法,所述方法包括向有需要的人类患者施用本文所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,将抗体或其抗原结合片段施用于眼部。

[0143] 本公开还提供了治疗纤维化的方法,所述方法包括向有需要的人类患者施用本文所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,将抗体或其抗原结合片段施用于器官。在一些实施方案中,器官是肾或肺。

[0144] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可用于通过分选与其结合的细胞来分离和/或纯化细胞(诸如例如成肌纤维细胞祖细胞)的方法中。此类细胞可快速迁移至皮肤、晶状体、视网膜和脑中的伤口处,从而有助于伤口愈合。此类细胞具有发展成收缩性成肌纤维细胞的潜力。可以将分离出的抗原阳性细胞施用于人或植入缓慢愈合或非愈合的伤口,诸如糖尿病性和褥疮性溃疡以及严重的手术切除,以促进伤口闭合。

[0145] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可用于通过分选与其结合的细胞来分离神经保护性细胞的方法中。表达抗原的细胞可响应于损伤而增加数量。此类细胞可施用于视网膜和脑,以减少神经元的死亡。抗原阳性细胞和/或它们产生的分子可在损伤后注射或以其他方式引入受试者。

[0146] 本文公开的寡核苷酸可以包含例如核苷酸或非天然的、或经修饰的核苷酸,诸如核苷酸类似物或核苷酸替代物。此类核苷酸包括含有经修饰的碱基、糖或磷酸基团的核苷酸,或在其结构中纳入非天然部分的核苷酸。非天然核苷酸的实例包括但不限于双脱氧核苷酸、生物素化、胺化、脱胺化、烷基化、苄基化和荧光团标记的核苷酸。本文公开的寡核苷酸可以包含DNA、RNA或DNA和RNA两者。

[0147] 本文公开的寡核苷酸还可以包含一个或多个核苷酸类似物或替代物。核苷酸类似物是含有对碱基、糖或磷酸部分的修饰的核苷酸。对碱基部分的修饰包括但不限于A、C、G和T/U的天然和合成修饰,以及不同的嘌呤或嘧啶碱基,诸如例如假尿苷、尿嘧啶-5-基、次黄嘌呤-9-基(I)和2-氨基腺嘌呤-9-基。经修饰的碱基包括但不限于5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(诸如例如5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0148] 核苷酸类似物还可以包括对糖部分的修饰。对糖部分的修饰包括但不限于核糖和脱氧核糖的天然修饰以及合成修饰。糖修饰包括但不限于在2'位的以下修饰:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代的或未经取代的C₁₋₁₀烷基或C₂₋₁₀烯基和C₂₋₁₀炔基。示例性的2'糖修饰还包括但不限于-O[(CH₂)_nO]_mCH₃、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、-O(CH₂)_nCH₃、-O(CH₂)_n-ONH₂和-O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n和m独立地为1至约10。在2'位的其他修饰包括但不限于:C₁₋₁₀烷基、经取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、经取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入子、用于改善寡核苷酸的药物动力学性质的基团或用于改善寡核苷酸的药效动力学性质的基团以及具有相似性质的其他取代基。类似修饰也可以在糖上的其他位置处进行,具体地,3'末端核苷酸上或2'-5'连接的寡核苷酸中糖的3'位置处以及5'末端核苷酸的5'位置处。经修饰的糖还可以包括那些在桥接环氧处含有修饰的糖,诸如CH₂和S。核苷酸糖类似物也可以具有糖模拟物,诸如环丁基部分来代替呋喃戊糖基糖。

[0149] 核苷酸类似物也可以在磷酸部分被修饰。经修饰的磷酸部分包括(但不限于)可经修饰以使得两个核苷酸之间的连接含有硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫羰基氨基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯以及硼烷磷酸酯的那些部分。两个核苷酸之间

的这些磷酸或经修饰的磷酸连接可以通过3'-5'连接或2'-5'连接,并且所述连接可以含有反向极性,诸如3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。核苷酸替代物还包括肽核酸(PNA)。

[0150] 不同长度的寡核苷酸、不同的碱基组成、不同的核苷酸排列和/或抗体上不同的寡核苷酸密度可能具有不同的效果,从而允许调节分子性质,并最终调节生物制剂的治疗功效或治疗指数。

[0151] 寡核苷酸的连接化学也可以提供独特的调节性质或灵活性,以适应新颖治疗实体的设计,所述新颖治疗实体的性质与生物分布以及清除率有关。

[0152] 所公开的核酸分子可以包含例如核苷酸或非天然的、或经修饰的核苷酸,诸如核苷酸类似物或核苷酸替代物。此类核苷酸包括含有经修饰的碱基、糖或磷酸基团的核苷酸,或在其结构中纳入非天然部分的核苷酸。非天然核苷酸的实例包括但不限于双脱氧核苷酸、生物素化、胺化、脱胺化、烷基化、苄基化和荧光团标记的核苷酸。

[0153] 本文公开的核酸分子还可以包含一个或多个核苷酸类似物或替代物。核苷酸类似物是含有对碱基、糖或磷酸部分的修饰的核苷酸。对碱基部分的修饰包括但不限于A、C、G和T/U的天然和合成修饰,以及不同的嘌呤或嘧啶碱基,诸如例如假尿苷、尿嘧啶-5-基、次黄嘌呤-9-基(I)和2-氨基腺嘌呤-9-基。经修饰的碱基包括但不限于:5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(诸如例如5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0154] 核苷酸类似物还可以包括对糖部分的修饰。对糖部分的修饰包括但不限于核糖和脱氧核糖的天然修饰以及合成修饰。糖修饰包括但不限于在2'位的以下修饰:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代或未经取代的C₁₋₁₀烷基或C₂₋₁₀烯基和C₂₋₁₀炔基。示例性的2'糖修饰还包括但不限于-O[(CH₂)_nO]_mCH₃、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、-O(CH₂)_nCH₃、-O(CH₂)_n-ONH₂和-O(CH₂)_nNN[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n和m独立地为1至约10。在2'位的其他修饰包括但不限于:C₁₋₁₀烷基、经取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、经取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入子、用于改善寡核苷酸的药物动力学性质的基团或用于改善寡核苷酸的药效动力学性质的基团以及具有相似性质的其他取代基。类似修饰也可以在糖上的其他位置处进行,具体地,3'末端核苷酸上或2'-5'连接的寡核苷酸中糖的3'位置处以及5'末端核苷酸的5'位置处。经修饰的糖还可以包括那些在桥接环氧处含有修饰的糖,诸如CH₂和S。核苷酸糖类似物也可以具有糖模拟物,诸如环丁基部分来代替呋喃戊糖基糖。

[0155] 核苷酸类似物也可以在磷酸部分被修饰。经修饰的磷酸部分包括(但不限于)可经修饰以使得两个核苷酸之间的连接含有硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸

三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫烷基氨基磷酸酯、硫烷基烷基磷酸酯、硫烷基烷基磷酸三酯以及硼烷磷酸酯的那些部分。两个核苷酸之间的这些磷酸或经修饰的磷酸连接可以通过3'-5'连接或2'-5'连接,并且所述连接可以含有反向极性,诸如3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。核苷酸替代物还包括肽核酸(PNA)。

[0156] 在一些实施方案中,寡核苷酸具有SEQ ID NO:1所列的核苷酸序列。

[0157] 为了可以更有效地理解本文公开的主题,以下提供了实施例。应理解,这些实施例仅仅是出于说明性的目的,并且不应被解释为以任何方式限制所要求保护的主题。在这些实施例中,除非另有说明,否则根据Maniatis等人,Molecular Cloning-A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Press(1989)中所述的方法,使用市售试剂进行分子克隆反应和其他标准重组DNA技术。如本文所用,除非另有说明,否则免疫球蛋白氨基酸残基的编号是根据Kabat等人的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统进行的。

[0158] 为了研究抗ICAM/3DNA在体内的循环和生物分布,将抗ICAM抗体偶联至3DNA外部分支。因为3DNA的外部分支是单链DNA,所以将抗ICAM偶联至3DNA的手段是首先将抗ICAM缀合至其序列与3DNA外部分支的序列互补的寡核苷酸,使得抗体-oligo缀合物可以简单地通过将它们混合在一起退火而偶联至3DNA。由于必须证实ICAM-1的特异性靶向,还比较研究了使用非特异性抗体(IgG对照)的类似构建体。然而,在将抗ICAM-oligo或IgG-oligo偶联至3DNA用于随后在小鼠中注射相应的抗ICAM/3DNA或抗ICAM/3DNA之前,有必要证明缀合的种类(抗ICAM-oligo或IgG-oligo)仍然能够表现为原始的抗ICAM和IgG,即它们将分别靶向主要在肺中表达的ICAM-1,或充当非特异性对照抗体。为此,向小鼠注射IgG、IgG-oligo、抗ICAM或抗ICAM-oligo,然后对它们的循环和生物分布进行寻址和比较。令人惊讶的是,结果表明抗体-oligo种类的表现不同于原始抗体种类,其中oligo的存在增加了抗ICAM的靶向特异性。

[0159] 所公开的研究表明,抗体与DNA寡核苷酸的偶联以意想不到的方式改变抗体行为。对于特异性抗体的实例,其中识别ICAM-1的单克隆抗体是说明性的,与寡核苷酸的缀合显著增加了对抗体的相应抗原(ICAM-1)的绝对结合和结合特异性,这在体内得到证实。此外,与原始的非缀合抗体相比,抗体-oligo缀合物(特异性和非特异性)更快地从循环中清除,并且分布更广泛,这可能有助于避免体内应用的抗体的全身性副作用。这一意外发现具有显著的转化潜力以增强抗体对其抗原的识别/靶向能力,这可以用作增强所述抗体的研究、治疗和/或诊断潜力的手段,无论是单独使用还是与药物、示踪剂、载体、装置、材料或细胞组合用于若干目的和应用,这些目的和应用可涉及分析性体外系统、离体组织、细胞培养物或体内生物体。

[0160] 实施例

[0161] 实施例1:非特异性IgG抗体、IgG抗体-寡核苷酸、特异性抗ICAM抗体和抗ICAM抗体-寡核苷酸的体内生物分布

[0162] 试剂:

[0163] 针对小鼠ICAM-1(抗ICAM)的大鼠单克隆免疫球蛋白G Ab(IgG)是克隆YN1,其在来自美国典型培养物保藏中心(Manassas, VA)的相应杂交瘤中产生。非特异性大鼠IgG Ab(下

文被称为IgG) 获自Jackson ImmunoResearch(Pike West Grove, PA)。在5'末端用硫醇修饰的DNA寡核苷酸(72聚体) 获自Oligo Factory(Holliston, MA)。Pierce键断裂剂TCEP溶液、Pierce LC-SMCC交联剂、Pierce Zeba旋转柱(7k截留分子量, MWC0)、Pierce嗜硫吸附树脂、Amicon旋转过滤器(10kMWC0)、Pierce BCA蛋白质测定试剂盒和异双功能Pierce交联试剂盒、牛血清白蛋白(BSA) 和TCA获自Fisher Scientific(Kerrville, TX)。Iodogen碘化管获自Pierce(Rockford, IL), 并且BioSpin Tris柱获自BioRad(Hercules, CA)。Na¹²⁵I获自Perkin-Elmer(Waltham, MA)。所有其他试剂获自Sigma Chemical(St. Louis, MO)。

[0164] 抗体-寡核苷酸缀合物:

[0165] 使用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)-马来酰亚胺化学进行抗ICAM或非特异性对照IgG Ab的抗体-寡核苷酸(Ab-oligo) 缀合。简而言之, 首先通过添加50mM三(2-羧乙基) 膦(TCEP) 并在25℃下温育1小时来还原具有5'-硫醇修饰的72聚体DNA寡核苷酸。通过乙醇沉淀去除过量的TCEP, 并将寡核苷酸重悬于磷酸盐缓冲盐水(PBS)+5mM乙二胺四乙酸(EDTA), pH 7.2中。平行地, 将Ab与过量的LC-SMCC交联剂(琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧基-(6-氨基己酸酯)) 在25℃下反应1小时。按照供应商的说明, 使用在PBS+5mM EDTA pH 7.2中平衡的Zeba旋转柱从Ab-LC-SMCC反应中去除未反应的LC-SMCC交联剂。然后将还原的寡核苷酸添加到Ab-LC-SMCC中, 并将缀合反应在25℃下温育12小时。用嗜硫吸附色谱法从Ab-寡核苷酸缀合物中去除过量的未反应的硫醇寡核苷酸, 汇集含有缀合物的级分, 并使用Amicon 10kDa MWC0旋转过滤器浓缩。用具有牛γ球蛋白标准品的(二喹啉甲酸)BCA蛋白质测定试剂盒确定Ab-寡核苷酸缀合物的最终蛋白质浓度。

[0166] 对抗体和抗体-oligo缀合物进行放射性标记:

[0167] 使用Na¹²⁵I和Iodogen包被的碘化管对Ab(无寡核苷酸) 或Ab-寡核苷酸缀合物进行¹²⁵I-放射性标记。将20μCi的Na¹²⁵I在4℃下在碘化管中温育5分钟, 所述碘化管含有100μL的PBS中的1μg/μL Ab。然后将样品在6kDa截断的Tris柱中进行尺寸排阻色谱法, 并在1000x g下离心4分钟以去除未反应的游离¹²⁵I。使用Bradford蛋白质测定法和BSA标准曲线测量所得¹²⁵I-Ab或¹²⁵I-Ab-寡核苷酸缀合物的最终浓度。然后在γ-计数器(2470 Wizard²™, Perkin Elmer, Waltham, MA) 中测量样品的放射性(每分钟检测到的放射性事件的计数, CPM), 表示为CPM/μg蛋白质, 以及游离¹²⁵I残余物的存在。为此, 将2μL的¹²⁵I-Ab或¹²⁵I-Ab-寡核苷酸稀释在PBS中的3% BSA中, 从而得到1mL总体积, 然后在γ-计数器中测量。接着, 添加200μL TCA(最终TCA浓度=17%, v/v), 将样品涡旋并在室温下温育15分钟。然后, 将样品以2418x g离心5分钟以沉淀出¹²⁵I-Ab-寡核苷酸, 并分离上清液中的游离¹²⁵I。然后在γ-计数器中测量上清液的600μL等分试样(总反应体积的一半), 以使用以下等式估计待注射到小鼠中的样品中游离¹²⁵I的存在: 游离碘CPM=总CPM-(2×上清液CPM)。

[0168] 小鼠模型:

[0169] 八周龄C57BL/6野生型雄性小鼠获自Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)。小鼠被随意提供食物和水, 并按原样以约25g体重(BW) 用于实验。对于每个体内实验, 用100mg/kg BW氯胺酮和10mg/kg BW赛拉嗪的混合物对小鼠进行腹膜内麻醉。所有动物实验均按照法规和机构批准的方案进行。

[0170] 循环和生物分布:

[0171] 用¹²⁵I-标记的抗体或抗体-寡核苷酸缀合物对麻醉的C57BL/6小鼠进行注射。在指

定的时间点和在注射后60分钟处死时收集血液样品,如图所示,随后收集和称重主要器官(例如,脑、心脏、肾、肝、肺和脾),将器官匀浆,并用三氯乙酸(TCA)沉淀样品,以去除样品中任何潜在的游离¹²⁵I。然后将使用 γ -计数器获得的放射性测量结果用于计算注射剂量百分比(ID%),其中注射剂量是注射前测量的剂量减去注射后注射器中剩余的剂量。还计算了每克器官的注射剂量百分比(ID%/g),其比较了在具有不同重量的器官中的相对积累,并且,因此反映了器官浓度。将表示器官与血液分布的定位比($LR = \text{器官中的ID\%/g} : \text{血液中的ID\%/g}$);和特异性指数(SI),计算为一个种类的ID%/g除以另一个种类的ID%/g,进行比较。

[0172] 图1示出了IgG-寡核苷酸增强从血流中的清除。向小鼠静脉内注射非特异性IgG对照抗体或与寡核苷酸缀合的相同抗体(IgG-oligo)。在施用后长达60分钟,将实体也用碘¹²⁵进行放射性标记,以追踪其循环。将数据计算为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。显示的参数是注射剂量的百分比(ID%),其指示循环中的绝对生物分布值。图1表明,与IgG相比,非特异性IgG-oligo从循环中更快地清除,这可以帮助减少与使用抗体相关的可能的全身性副作用。

[0173] 图2示出了IgG-寡核苷酸增强脾和肝清除率。向小鼠静脉内注射非特异性IgG对照抗体或与寡核苷酸缀合的相同抗体(IgG-oligo)。在施用后60分钟,将实体用碘¹²⁵进行放射性标记,以追踪其体内分布。将数据计算为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。显示的参数是每克器官的注射剂量的百分比(ID%/g),其反映器官中的浓度(图片A),和定位比(LR),其是器官中的ID%/g除以血液中的ID%/g(图片B),其反映组织与血液的比率。图2表明,与IgG相比,非特异性IgG-oligo的肝和脾积累增加,这有助于通过这些清除器官从体内清除抗体-oligo,并减弱其他器官中可能的副作用。此外,膀胱、肾和胃中的IgG-oligo水平有一些降低。这可能是由于肝和脾中的清除率增强或通过肾和胃途径的排泄更快,使得此时在这些器官中发现更少量,这足以从体内去除抗体并避免副作用。

[0174] 图3示出了抗ICAM-寡核苷酸从血流中快速清除。向小鼠静脉内注射非特异性IgG对照抗体、ICAM-1特异性抗ICAM抗体或抗ICAM-oligo缀合物(图片A),或抗ICAM-oligo或IgG-oligo缀合物(图片B)。在两种情况下,在施用后长达60分钟,将实体用碘¹²⁵进行放射性标记,以追踪其循环。将数据计算为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。显示的参数是注射剂量的百分比(ID%),其反映循环中的绝对生物分布值。图3表明,与无寡核苷酸抗ICAM相比,当缀合至寡核苷酸时,特异性抗ICAM抗体从循环中更快地清除,如上所述,这还应有防止全身性副作用。此外,与IgG-寡核苷酸相比,抗ICAM-寡核苷酸的清除更快,这表明这种保护作用对于识别特定抗原的抗体更为明显。这是相关的,因为特异性抗体是识别抗原的抗体,因此,是旨在用于研究、诊断或治疗背景的抗体。

[0175] 图4示出了抗ICAM-oligo增强肺靶向。向小鼠静脉内注射非特异性IgG对照抗体、ICAM-1特异性抗ICAM抗体或抗ICAM-oligo缀合物(图片A和图片B),或抗ICAM-oligo或IgG-oligo缀合物(图片C和图片D)。在所有情况下,在施用后60分钟,将实体用碘¹²⁵进行放射性标记,以追踪其体内分布。将数据计算为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。显示的参数是每克器官的注射剂量的百分比(ID%/g),其反映器官中的浓度(图片A和图片C),和定位比(LR),其是器官中的ID%/g除以血液中的ID%/g,其反映组织与血液的比率(图片B和图片D)。图4表明,特异性抗ICAM抗体靶向肺(ICAM-1表达的主要位点),与抗ICAM对照相比显著更好,并且

比非特异性IgG(缀合或不缀合至寡核苷酸)大得多,这表明增强的绝对靶向和特异性。

[0176] 图5示出了与其他配制品相比,抗ICAM-寡核苷酸的肺靶向对肺是高度特异性的,并且在淋巴结中提供最小的积累。向小鼠静脉内注射非特异性IgG对照抗体、ICAM-1特异性抗ICAM抗体或与寡核苷酸(oligo)缀合的相应抗体,其中将这些实体在施用后60分钟用碘¹²⁵进行放射性标记,以追踪其体内分布。将数据计算为平均值±平均值的标准误差。显示的参数是特异性指数(SI),其比较了图中所示的两个种类的生物分布,计算为一个种类的ID%/g除以另一个种类的ID%/g,其指示特异性。图5表明,与注射的所有其他种类相比,抗ICAM-oligo提供对ICAM-1表达的主要位点(肺)的增强的特异性。

[0177] 除了本文所述的那些之外,所述主题的各种修改将因前述说明而对本领域的技术人员变得清楚。这种修改也旨在落入所附权利要求的范围内。本申请中引用的每篇参考文献(包括但不限于期刊论文、美国和非美国专利、专利申请公布、国际专利申请公布、基因库登录号等)通过引用整体并入本文。

序列表

<110>	马里兰大学 (University of Maryland)	
	代码生物疗法公司 (Code Biotherapeutics, Inc.)	
	S • 穆罗 (Muro, Silvia)	
	N • 罗基 (Roki, Niksa)	
	R • 盖茨 (Getts, Robert)	
<120>	使用抗体-寡核苷酸缀合物的增强的靶向	
<130>	191288.00602 (3027)	
<150>	63/156,869	
<151>	2021-03-04	
<160>	1	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	寡核苷酸序列	
<400>	1	
	ttttttccac cttagagtac aaacggaaca cgagaatttt taccctacag agtaacctag	60
	attgatcaaa ca	72

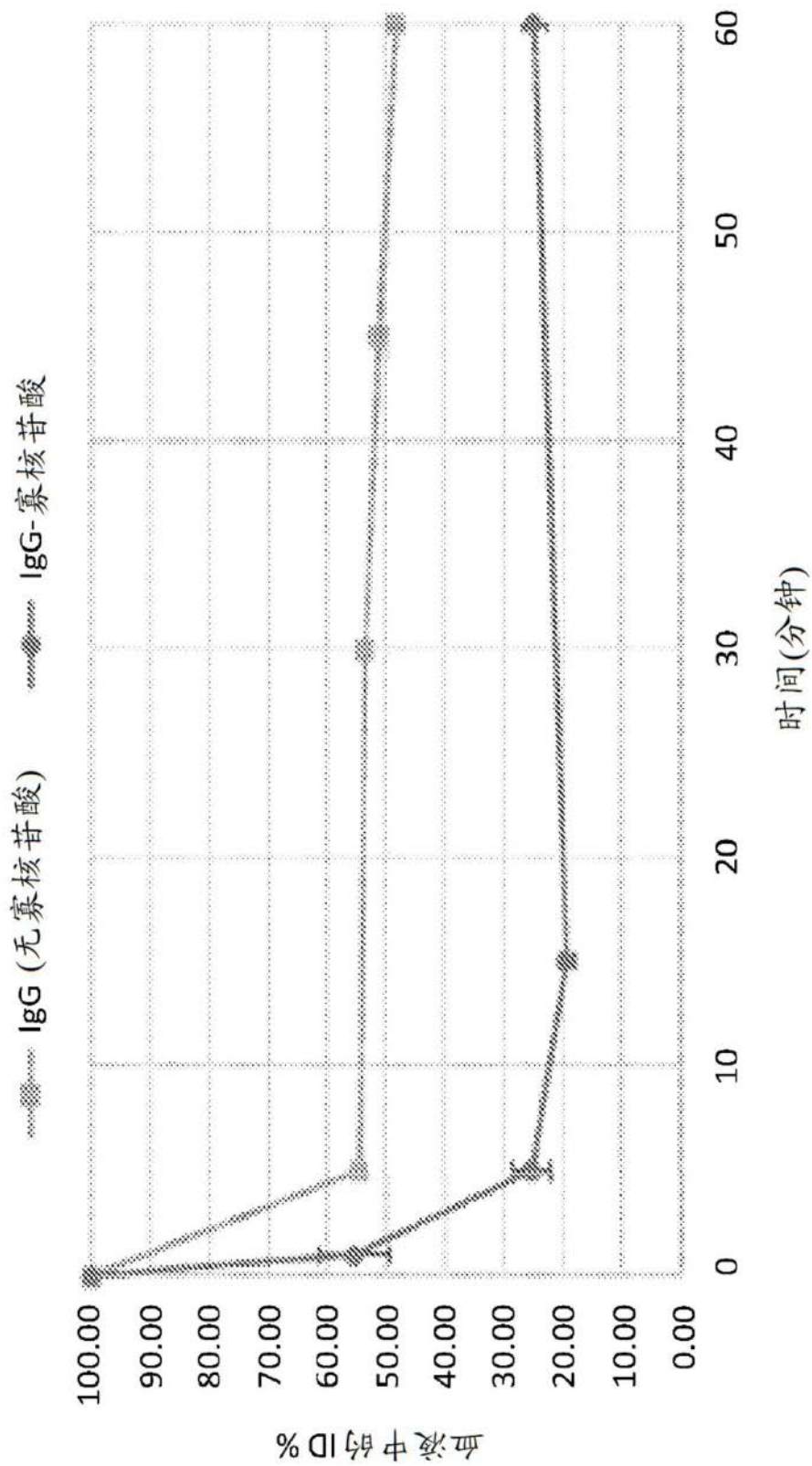


图1

A)

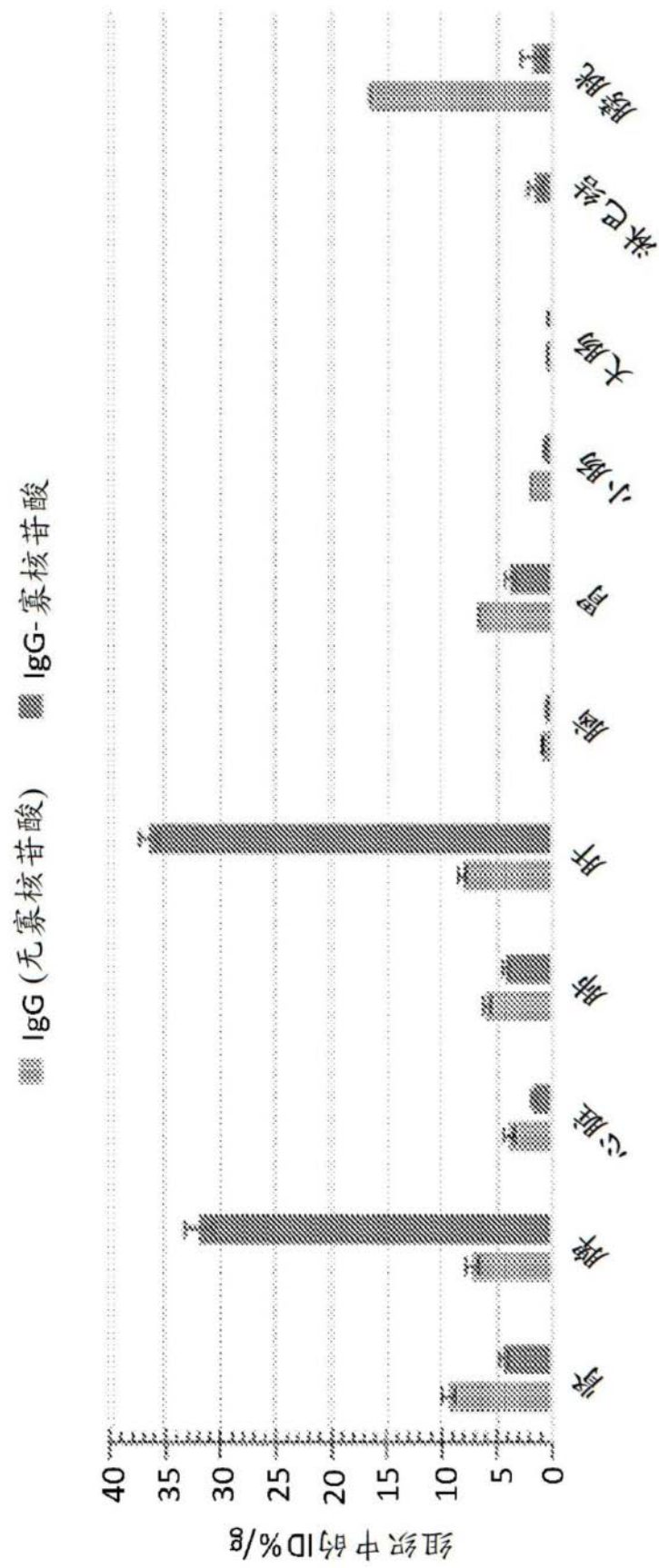


图2

B)

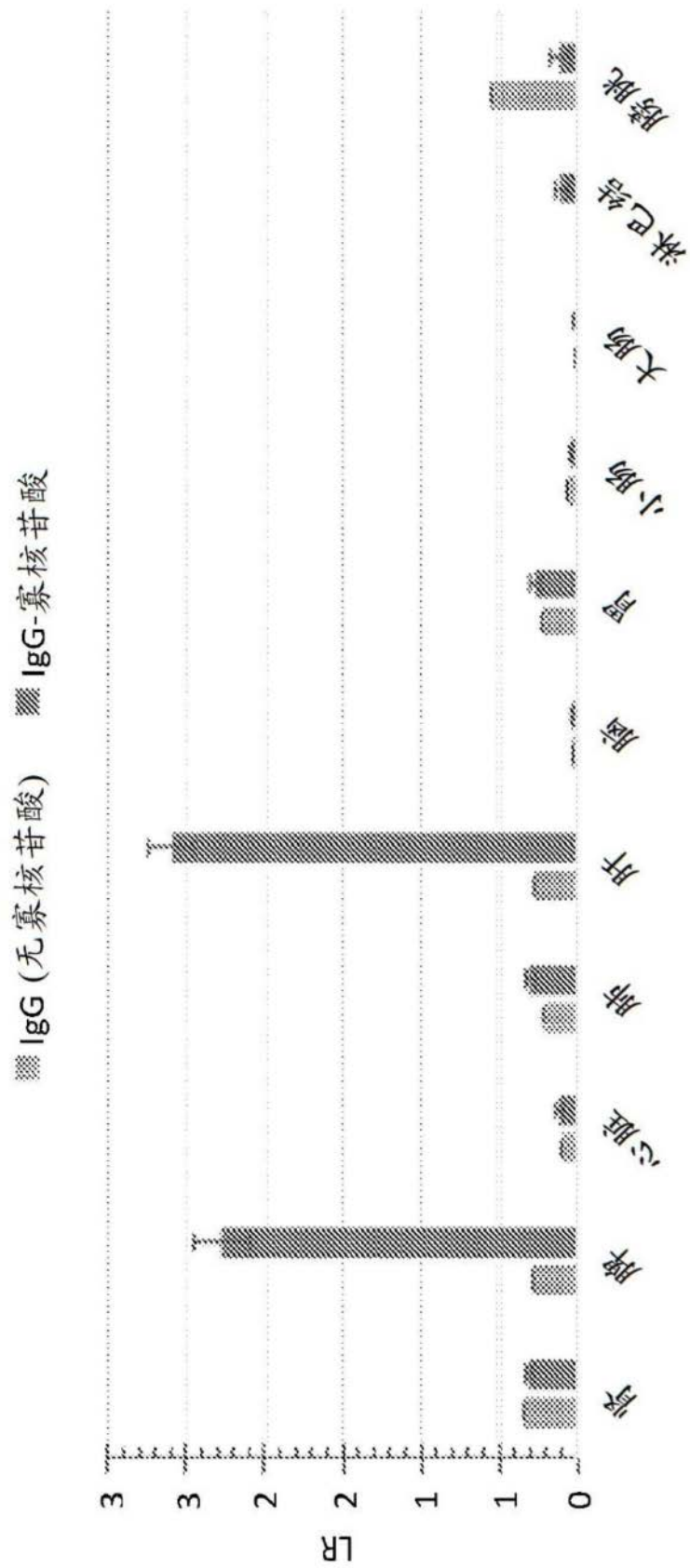


图2(续)

A)

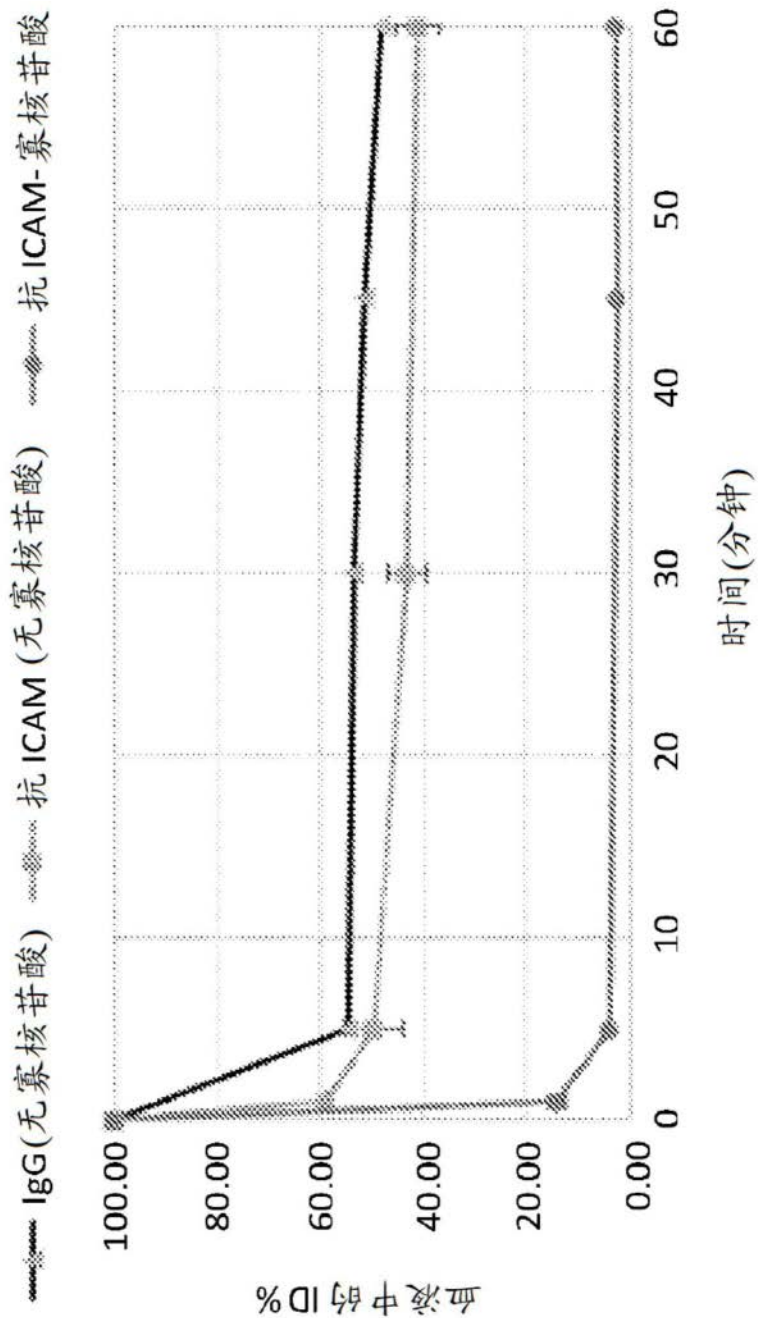


图3

B)

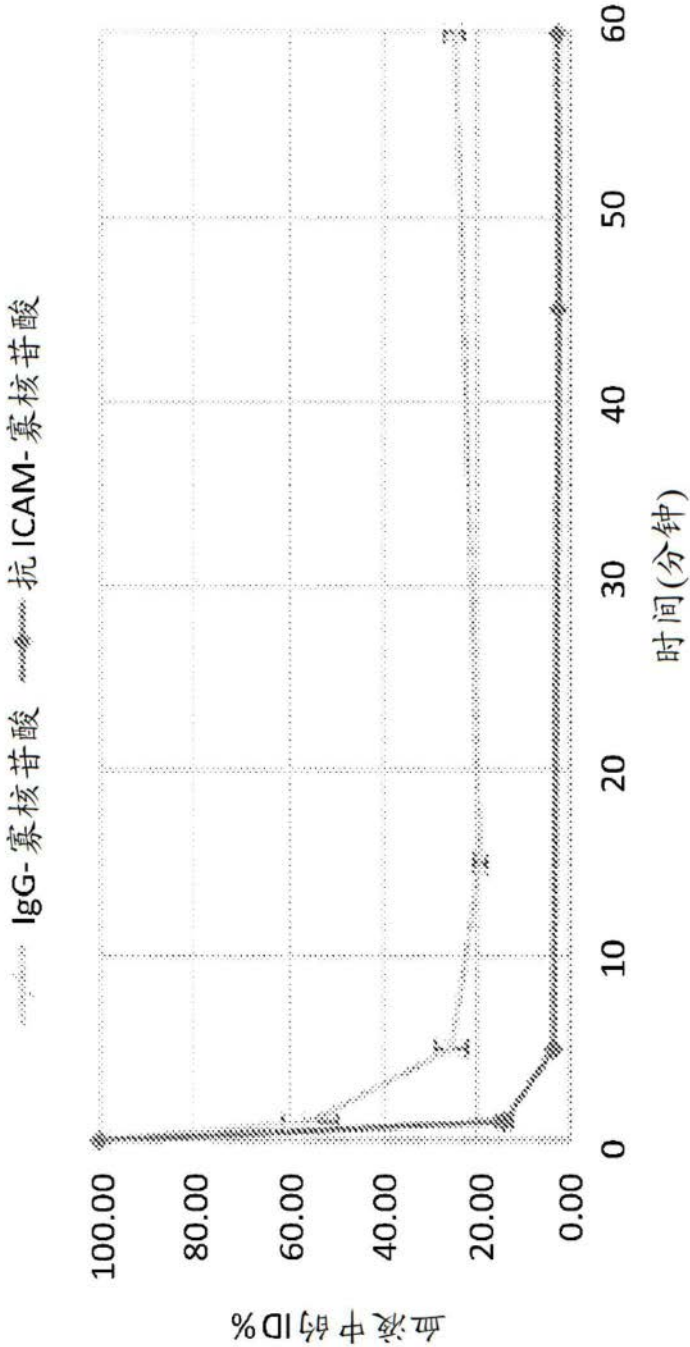


图3 (续)

A)

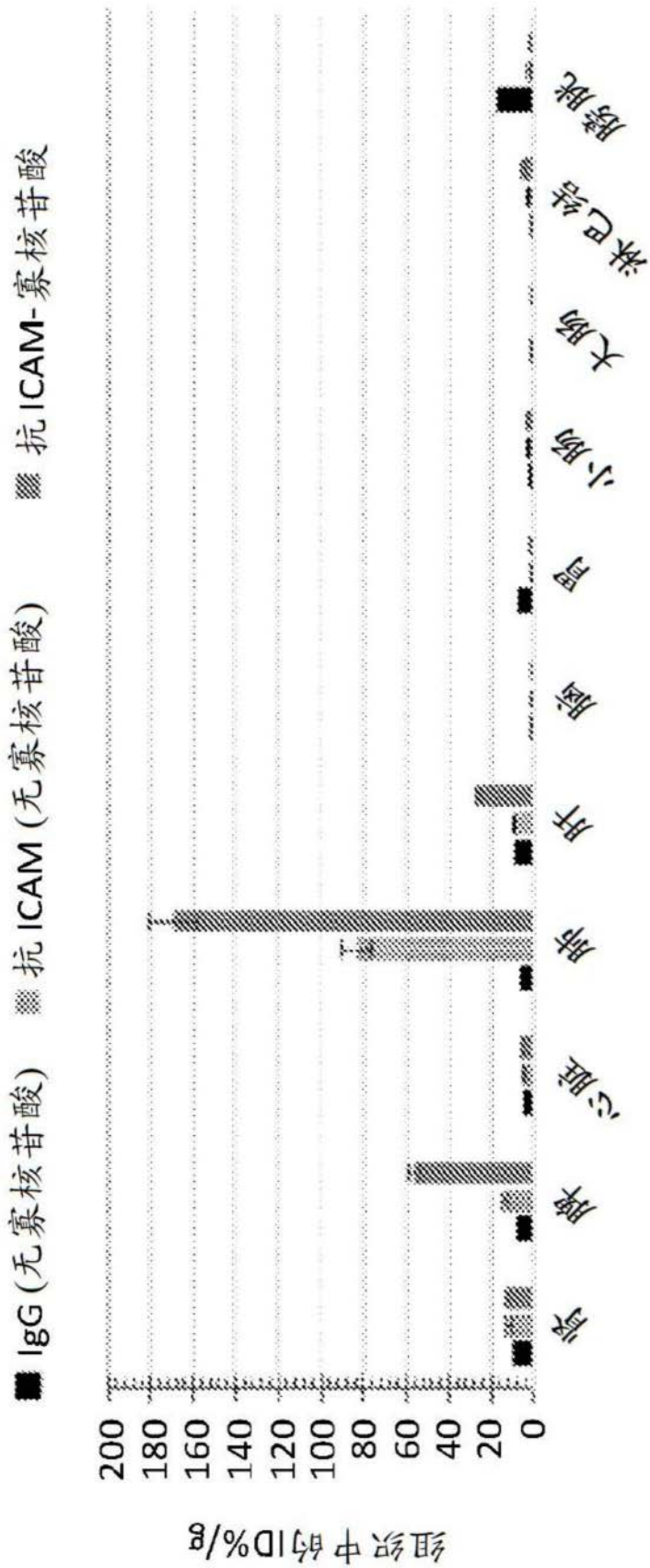


图4

B)

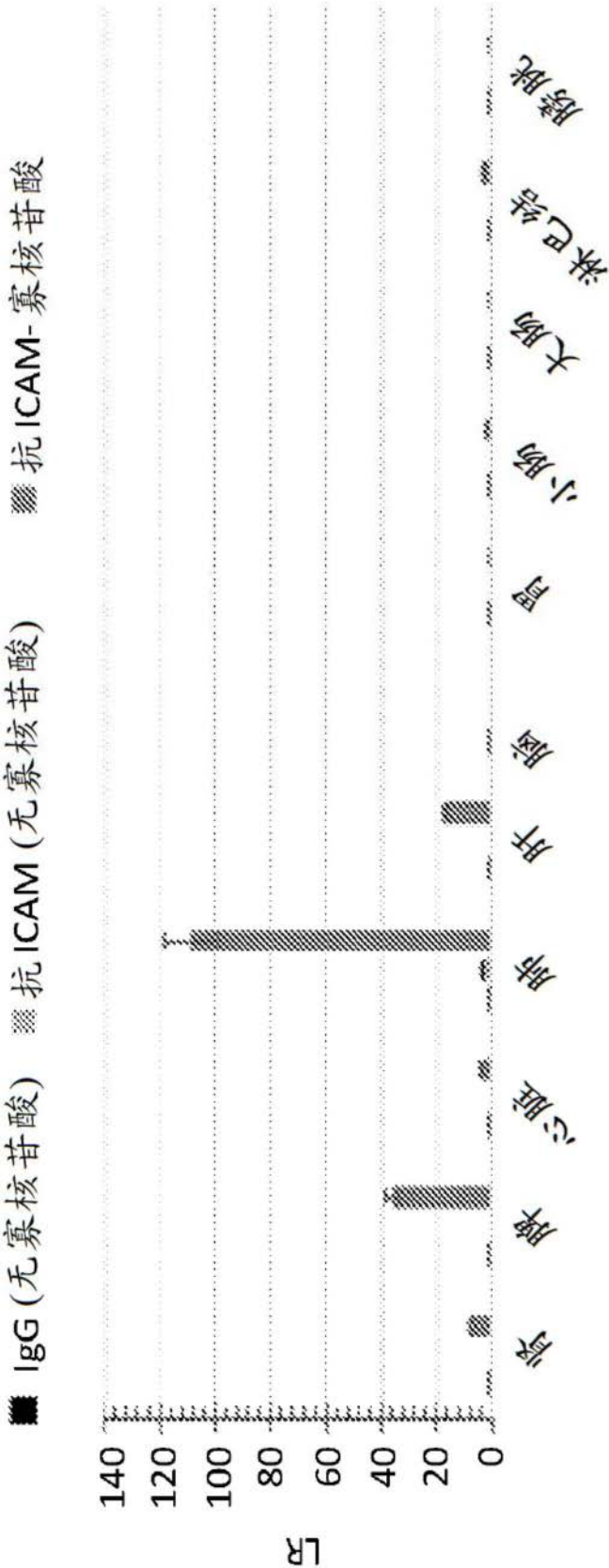


图4(续)

C)

■ IgG-寡核苷酸 ■ 抗ICAM-1寡核苷酸

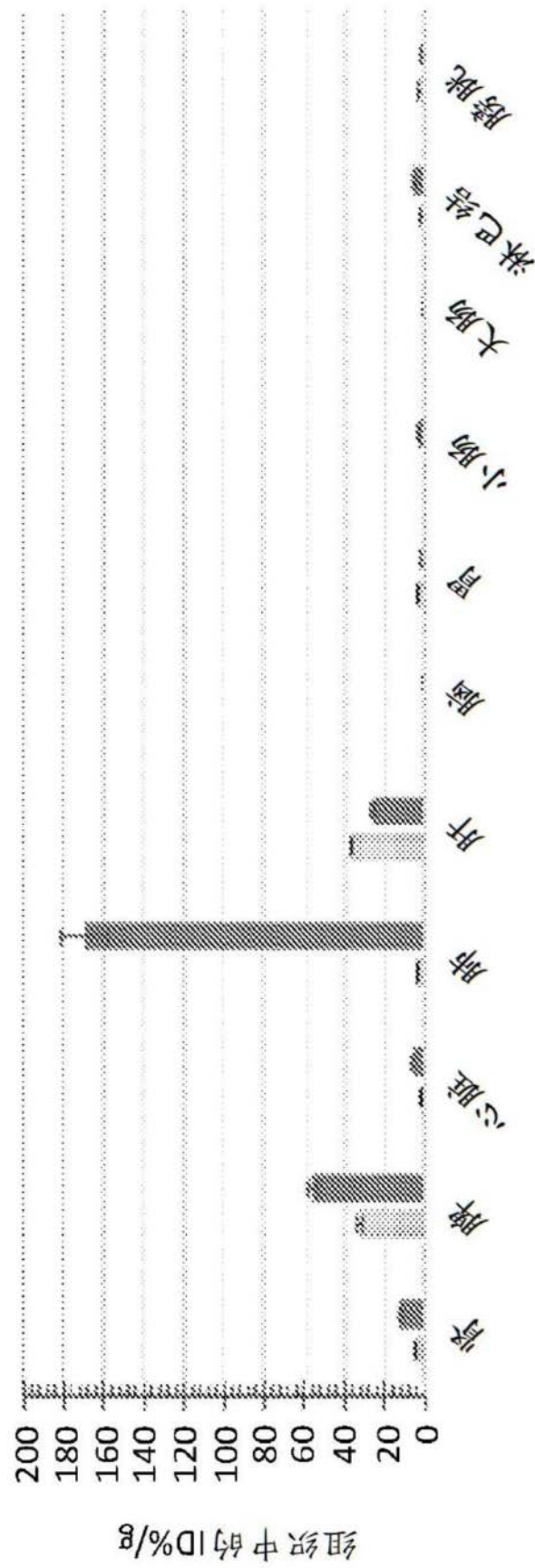


图4(续)

D)

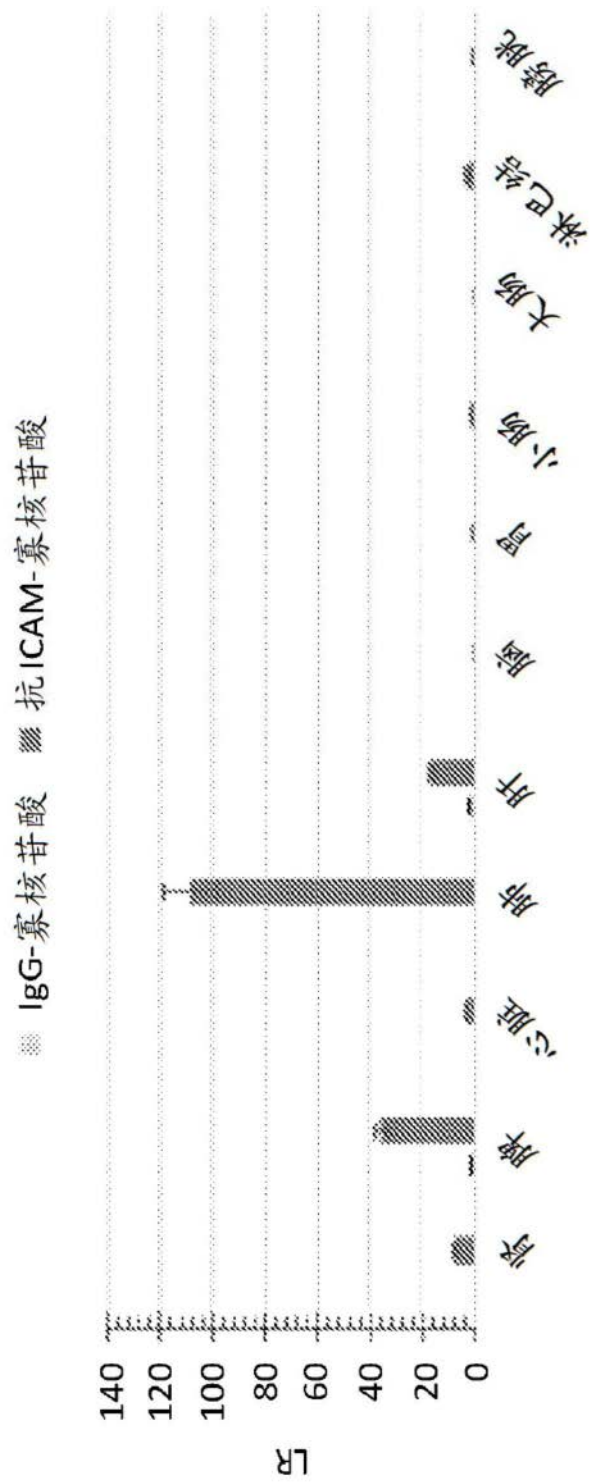


图4(续)

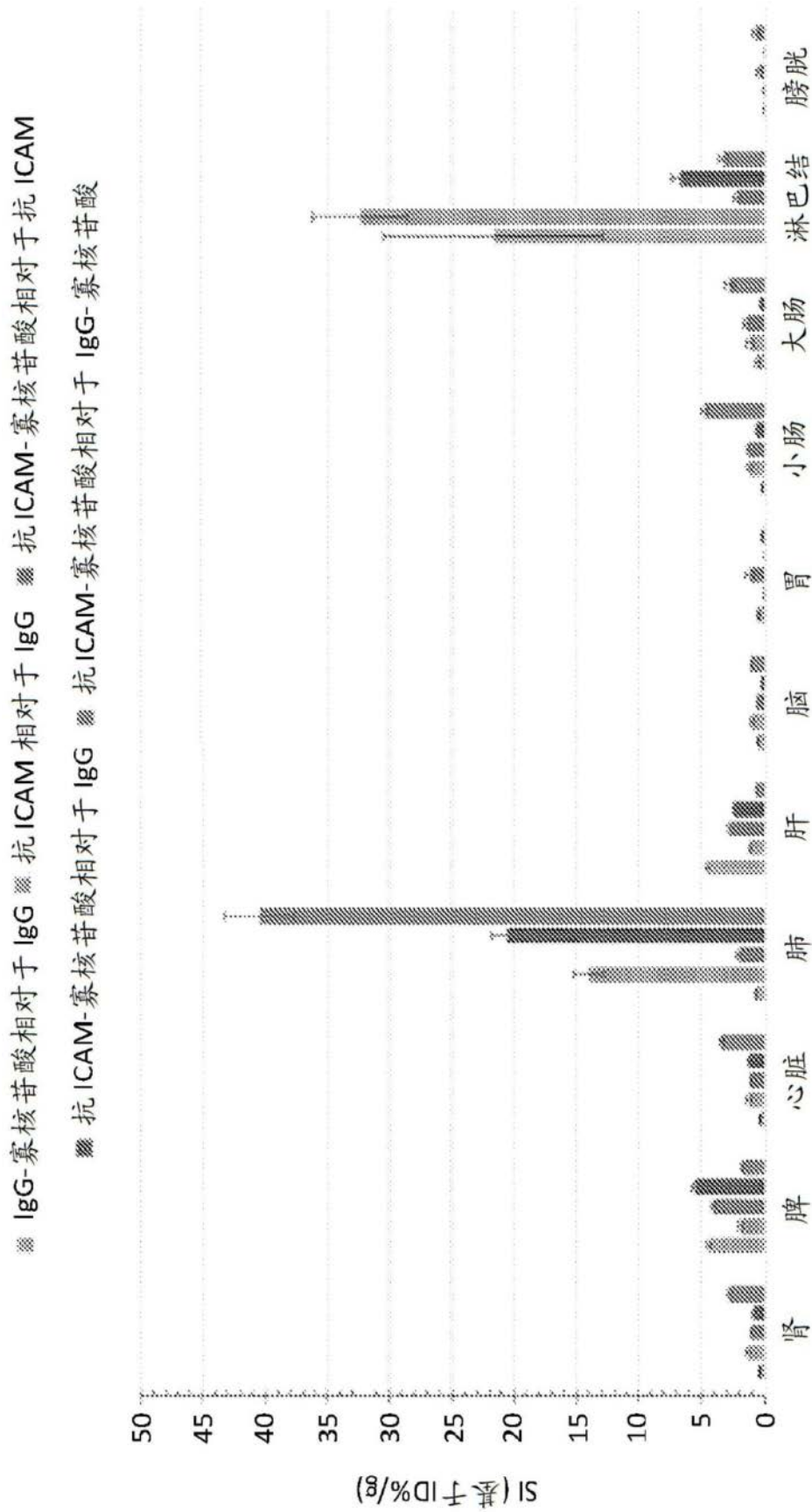


图5