



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118355033 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 16

(21) 申请号 202280080506.0

(22) 申请日 2022.10.27

(30) 优先权数据

63/272,374 2021.10.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/078780 2022.10.27

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/076998 EN 2023.05.04

(71) 申请人 ATYR 医药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 卢克·G·博尔曼 张宇婷

凯特琳·劳奇

莱斯利·A·南格尔

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

专利代理师 洪欣 伊硕

(51) Int.Cl.

G07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书11页 说明书100页

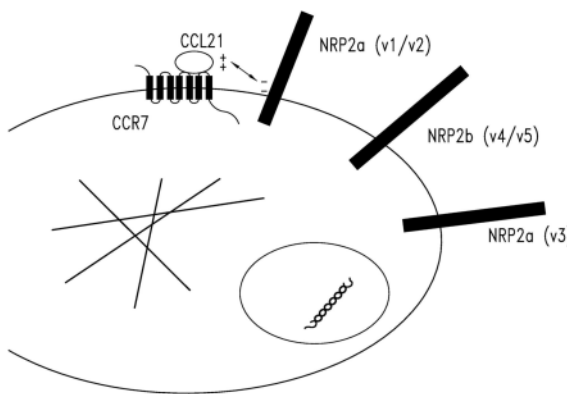
序列表(电子公布) 附图18页

(54) 发明名称

包含抗NRP2a抗体的组合物和方法

(57) 摘要

提供了抗体及其抗原结合片段,所述抗体及其抗原结合片段相对于其它NRP2a同种型或NRP2b同种型优先地或选择性地结合至人神经纤毛蛋白-2a (NRP2a) 变体1 (v1) 和/或变体2 (v2), 并且调节NRP2a v1/v2配体与下游信号传导事件之间的结合相互作用。还包括用于治疗疾病如癌症以及炎症疾病和自身免疫性疾病的相关治疗组合物和方法。



1. 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段在表位处结合至神经纤毛蛋白-2A(NRP2a)变体1(v1)或变体2(v2)多肽,所述表位包含选自表N2的序列、由其组成或基本上由其组成,包括选自表N2的序列的约或至少约8、9、10、11或12或更多个连续氨基酸。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含选自SEQ ID NO:96-104的序列、由其组成或基本上由其组成,包括选自SEQ ID NO:96-104的序列的约或至少约8、9、10、11或12个连续氨基酸。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含SEQ ID NO:100、或SEQ ID NO:100的约或至少约8、9、10、11或12个连续氨基酸、由其组成或基本上由其组成。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)序列和轻链可变区(VL)序列,所述VH序列包含互补决定区VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列,所述VL序列包含互补决定区VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列,其中:

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:13、127和GX₁X₂X₃X₄X₅(其中X₁是G、A或S,X₂是Y、F、K、L或R,X₃是T、A、G、I、L、Q或V,X₄是D、A、G、K、N、Q、R或S并且X₅是Y、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T或V),并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃(其中X₆是S、A、G、I、L、P、T或V,X₇是Q、A、G、R或S,X₈是S、A、H、K、L、Q或T,X₉是T、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、V或Y,X₁₀是H、A、D、E、F、G、I、K、L、N、Q、R、S、T或Y,X₁₁是V、A、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T或Y,X₁₂是L、A、E、H、I、N、P、Q、S、T或V并且X₁₃是T、A、D、E、F、G、I、K、L、N、Q、R、S或V)(还参见表E6和表E7);

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:130-132,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:133-135,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:136-138,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:139-141,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:142-144,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:145-147,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:148-150,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:151-153,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:154-156,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:157-159,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:1-3,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:4-6,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:7-9,并且所述VLCDR1、VLCDR2

和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:10-12,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:13-15,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16-18,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:19-21,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:22-24,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:25-27,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:28-30,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:31-33,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:34-36,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:37-39,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:40-42,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:43-45,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:46-48,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:49-51,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:52-54,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:55-57,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:58-60,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;或者

所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:61-63,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64-66,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变。

5. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH序列包含SEQ ID NO:170,并且所述VL序列包含SEQ ID NO:171;

所述VH序列与SEQ ID NO:160至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:161至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:162至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:163至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:164至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:165至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%

相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:166至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:167至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:168至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:169至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:67至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:68至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:69至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:70至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:71至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:72至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:73至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:74至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:75至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:76至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:77至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:78至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:79至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:80至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:81至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:82至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:83至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:84至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

所述VH序列与SEQ ID NO:85至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:86至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;或

所述VH序列与SEQ ID NO:87至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:88至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%

相同。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其基本上不结合至人神经纤毛蛋白-2B(NRP2b)变体4(v4)多肽和/或人NRP2b变体5(v5)多肽。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其以约10pM至约500pM或至约50nM,或约、至少约或不大于约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900pM、1nM、10nM、25nM或50nM的亲合力,或者任选地以在约10pM至约500pM、约10pM至约400pM、约10pM至约300pM、约10pM至约200pM、约10pM至约100pM、约10pM至约50pM或约20pM至约500pM、约20pM至约400pM、约20pM至约300pM、约20pM至约200pM、约20pM至约100pM、约20pM至约50pM或约30pM至约500pM、约30pM至约400pM、约30pM至约300pM、约30pM至约200pM、约30pM至约100pM、约30pM至约50pM或约20pM至约200pM、约30pM至约300pM、约40pM至约400pM、约50pM至约500pM、约60pM至约600pM、约70pM至约700pM、约80pM至约800pM、约90pM至约900pM、约100pM至约1nM、约1nM至约5nM、约5nM至约10nM、约10nM至25nM或约25nM至约50nM范围内的亲合力结合至所述NRP2a v1或v2多肽或所述表位。

8. 根据权利要求1至7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对所述NRP2a v1或v2多肽的结合亲合力比其对NRP2a v3多肽、NRP2b v4多肽和/或NRP2b v5多肽的结合亲合力强至少约1.5、2、4、6、8、10、20、40、60、80、100、200、400、600、800或1000倍。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其阻断或以其它方式减少所述NRP2a v1或v2多肽与其配体之间的结合,任选地其中所述配体选自表L1或表L2。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其阻断或以其它方式减少所述NRP2a v1或v2多肽与趋化因子(C-C基序)配体21(CCL21)多肽之间的结合,任选地在体外结合测定中、体外或离体基于细胞的测定中或在体内。

11. 根据权利要求10所述的抗体或其抗原结合片段,相对于对照或参考,所述抗体或其抗原结合片段阻断或以其它方式减少所述NRP2a v1或v2多肽与所述CCL21多肽之间的结合约或至少约20-100%或更多(任选地约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或100%或更多)。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其阻断或以其它方式减少所述NRP2a v1或v2多肽与C-C趋化因子受体7型(CCR7)多肽之间的结合,包括二聚化,任选地在体外结合测定中、体外或离体基于细胞的测定中或在体内。

13. 根据权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,相对于对照或参考,所述抗体或其抗原结合片段阻断或以其它方式减少所述NRP2a v1或v2多肽与所述CCR7多肽之间的结合,包括二聚化,约或至少约20-100%或更多(任选地约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或100%或更多)。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,相对于对照或参考,所述抗体或其抗原结合片段调节(任选地拮抗)所述NRP2av1或v2多肽与CCL21和/或CCR7多肽之间的信号传导活性任选地约或至少约20-100%或更多(任选地约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或100%或更多)。

15. 根据权利要求14所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述信号传导活性包括免疫

细胞迁移的诱导,任选地树突状细胞或成熟T细胞,并且其中所述抗体或其抗原结合片段降低所述信号传导活性;和/或其中所述信号传导活性包括肿瘤细胞迁移的诱导,并且其中所述抗体或其抗原结合片段降低所述信号传导活性。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含IgA(包括亚类IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(包括亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)或IgM Fc结构域,任选地人Fc结构域或其杂合体和/或变体。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含在人类中具有高效应子功能的IgG Fc结构域,任选地IgG1或IgG3 Fc结构域;或者其包含在人类中具有低效应子功能的IgG Fc结构域,任选地IgG2或IgG4 Fc结构域。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含任选地选自表F1的IgG1或IgG4 Fc结构域。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其为单克隆抗体。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其为人源化抗体。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其为Fv片段、单链Fv(scFv)多肽、连接蛋白、抗运载蛋白(anticalin)、适体、高亲合性多聚体(avimer)、骆驼科动物抗体、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、微型抗体、纳米抗体或单抗体。

22. 一种治疗组合物,其包含药学上可接受的载剂和根据权利要求1至21中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

23. 根据权利要求22所述的治疗组合物,其中所述组合物对于所述至少一种抗体或其抗原结合片段具有至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%的蛋白质纯度,并且基本上不含聚集体。

24. 根据权利要求22或23所述的治疗组合物,其中所述治疗组合物基本上不含内毒素。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗组合物是无菌的可注射溶液,其任选地适合于静脉内、肌内、皮下或腹膜内施用。

26. 根据权利要求22至25中任一项所述的治疗组合物,其进一步包含选自癌症免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和激酶抑制剂中的一种或多种的至少一种另外的药剂。

27. 一种治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求22至26中任一项所述的治疗组合物。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述疾病或病状是神经纤毛蛋白2(NRP2)相关疾病或病状,任选地NRP2a相关疾病或病状。

29. 根据权利要求27或28所述的方法,其中所述疾病或病状选自癌症、炎性疾病、自身免疫性疾病、淋巴疾病或相关病状、纤维化疾病和与平滑肌收缩性降低相关的疾病。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述疾病是癌症,任选地其中所述癌症表达或过表达NRP2,任选地其中所述癌症显示出NRP2依赖性生长、NRP2依赖性粘附、NRP2依赖性迁移和/或NRP2依赖性入侵。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述癌症表达或过表达NRP2,但基本上不表达神经纤毛蛋白-1(NRP1)。

32. 根据权利要求30或31所述的方法,其用于减少或防止有需要的受试者的癌症的再出现,其中所述治疗组合物的施用使得能够生成对所述癌症的免疫记忆。

33. 根据权利要求30至32中任一项所述的方法,其中所述受试者患有淋巴水肿。

34. 根据权利要求30至33中任一项所述的方法,其包括向所述受试者施用选自癌症免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和激酶抑制剂中的一种或多种的至少一种另外的药剂。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述至少一种抗NRP2抗体或其抗原结合片段和所述至少一种药剂作为单独的组合物单独施用。

36. 根据权利要求34所述的方法,其中所述至少一种抗NRP2抗体和所述至少一种药剂一起作为同一治疗组合物的一部分施用,任选地作为根据权利要求46至64中任一项所述的治疗组合物施用。

37. 根据权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述癌症免疫治疗剂选自免疫检查点调节剂、癌症疫苗、溶瘤病毒、细胞因子和基于细胞的免疫疗法中的一种或多种。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述免疫检查点调节剂是多肽,任选地抗体或其抗原结合片段或配体或小分子。

39. 根据权利要求37或38所述的方法,其中所述免疫检查点调节剂包含:

(a) 抑制性免疫检查点分子的拮抗剂;或

(b) 刺激性免疫检查点分子的激动剂,

任选地,其中所述免疫检查点调节剂特异性地结合至所述免疫检查点分子。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述抑制性免疫检查点分子选自以下中的一种或多种:程序性死亡配体1(PD-L1)、程序性死亡1(PD-1)、程序性死亡配体2(PD-L2)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)、吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)、色氨酸2,3-双加氧酶(TDO)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3(TIM-3)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)、T细胞活化的V结构域Ig抑制剂(VISTA)、B和T淋巴细胞弱化因子(BTLA)、CD160、疱疹病毒进入介导子(HVEM)以及具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中:

所述拮抗剂是PD-L1和/或PD-L2拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、阿特殊单抗(MPDL3280A)、阿维鲁单抗(MSB0010718C)和德瓦鲁单抗(MEDI4736)中的一种或多种,任选地其中所述癌症选自结肠直肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌和肾细胞癌中的一种或多种;

所述拮抗剂是PD-1拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、纳武单抗、帕博利珠单抗、MK-3475、AMP-224、AMP-514PDR001和匹地利珠单抗中的一种或多种,任选地其中所述PD-1拮抗剂是纳武单抗,并且所述癌症任选地选自霍奇金氏淋巴瘤、黑色素瘤、非小细胞肺癌、肝细胞癌、肾细胞癌和卵巢癌中的一种或多种;

所述PD-1拮抗剂是帕博利珠单抗,并且所述癌症任选地选自黑色素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、头颈癌和尿路上皮癌中的一种或多种;

所述拮抗剂是CTLA-4拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、伊匹单抗、曲美木单抗中的一种或多种,任选地其中所述癌症选自黑色素瘤、前列腺癌、肺癌和膀胱癌中的一种或多种;

所述拮抗剂是IDO拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、吡啶莫德(NLG-8189)、1-甲基-色氨酸(1MT)、 β -吡啶(壬烷;9H-吡啶并[3,4-b]吡啶)、迷迭香酸和艾卡噪司他中的一种或多种,并且其中所述癌症任选地选自转移性乳腺癌和脑

癌中的一种或多种,所述脑癌任选地是多形性胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、神经胶质肉瘤或恶性脑肿瘤;

所述拮抗剂是TDO拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、680C91和LM10中的一种或多种;

所述拮抗剂是TIM-3拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子中的一种或多种;

所述拮抗剂是LAG-3拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子和BMS-986016中的一种或多种;

所述拮抗剂是VISTA拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子中的一种或多种;

所述拮抗剂是BTLA、CD160和/或HVEM拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子中的一种或多种;

所述拮抗剂是TIGIT拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子中的一种或多种。

42. 根据权利要求39所述的方法,其中所述刺激性免疫检查点分子选自OX40、CD40、糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因(GITR)、CD137(4-1BB)、CD27、CD28、CD226和疱疹病毒进入介导子(HVEM)中的一种或多种。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中:

所述激动剂是OX40激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体、OX86、Fc-OX40L和GSK3174998中的一种或多种;

所述激动剂是CD40激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体、CP-870,893、达西组单抗、Chi Lob 7/4、ADC-1013和rhCD40L中的一种或多种,并且其中所述癌症任选地选自黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤和血液癌症中的一种或多种,任选地淋巴瘤如非霍奇金氏淋巴瘤;

所述激动剂是GITR激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体、INCAGN01876、DTA-1和MEDI1873中的一种或多种;

所述激动剂是CD137激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体、乌托鲁单抗和4-1BB配体中的一种或多种;

所述激动剂是CD27激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体、伐立鲁单抗和CDX-1127(1F5)中的一种或多种;

所述激动剂是CD28激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体和TAB08中的一种或多种;和/或

所述激动剂是HVEM激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体中的一种或多种。

44. 根据权利要求37所述的方法,其中所述癌症疫苗选自以下中的一种或多种: Oncophage; 人乳头瘤病毒HPV疫苗,任选地加德西(Gardasil)或希瑞适(Cervarix); 乙肝疫苗,任选地Engerix-B、Recombivax HB,或Twinrix; 以及西普鲁塞-T(sipuleucel-T, 普罗文奇(Provence)), 或者所述癌症疫苗包含选自以下中的一种或多种的癌症抗原: 人Her2/neu、Her1/EGF受体(EGFR)、Her3、A33抗原、B7H3、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23(IgE受体)、

MAGE-3、C242抗原、5T4、IL-6、IL-13、血管内皮生长因子VEGF(例如, VEGF-A) VEGFR-1、VEGFR-2、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CD152、CD200、CD221、CCR4、HLA-DR、CTLA-4、NPC-1C、生腱蛋白、波形蛋白、胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)、 α -甲胎蛋白、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、碳酸酐酶9(CA-IX)、癌胚抗原(CEA)、鸟苷酰环化酶C、NY-ES0-1、p53、存活素、整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 、叶酸受体1、跨膜糖蛋白NMB、成纤维细胞活化蛋白 α (FAP)、糖蛋白75、TAG-72、MUC1、MUC16(或CA-125)、磷脂酰丝氨酸、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、NR-LU-13抗原、TRAIL-R1、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B或TRAIL-R2)、SLAM家族成员7(SLAMF7)、EGP40泛癌抗原、B细胞活化因子(BAFF)、血小板衍生的生长因子受体、糖蛋白EpCAM(17-1A)、程序性死亡-1、蛋白质二硫化物异构酶(PDI)、肝再生磷酸酶3(PRL-3)、前列腺酸性磷酸酶、Lewis-Y抗原、GD2(在神经外胚层起源的肿瘤上表达的二唾液神经节苷酯)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)和间皮素,任选地其中所述受试者患有包含相应的癌症抗原的癌症或处于患有包含相应的癌症抗原的癌症的风险中。

45. 根据权利要求37所述的方法,其中所述溶瘤病毒选自talimogene laherparepvec(T-VEC)、柯萨奇病毒A21(CAVATAKTM)、Oncorine(H101)、pelareorep(REOLYSIN[®])、塞内卡谷病毒(NTX-010)、塞内卡病毒SVV-001、CoLoAd1、SEPREHVIR(HSV-1716)、CGTG-102(Ad5/3-D24-GMCSF)、GL-ONC1、MV-NIS和DNX-2401中的一种或多种。

46. 根据权利要求37所述的方法,其中所述细胞因子选自干扰素(IFN)- α 、IL-2、IL-12、IL-7、IL-21和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)中的一种或多种。

47. 根据权利要求37所述的方法,其中所述基于细胞的免疫治疗剂包含癌症抗原特异性T细胞,任选地离体衍生的T细胞。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述癌症抗原特异性T细胞选自嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞和T细胞受体(TCR)修饰的T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)和肽诱导的T细胞中的一种或多种。

49. 根据权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述至少一种化学治疗剂选自烷化剂、抗代谢物、细胞毒性抗生素、拓扑异构酶抑制剂(I型或II型)和抗微管剂中的一种或多种。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中:

所述烷化剂选自以下中的一种或多种:氮芥(任选地二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、氮芥(mustine)、美法仑、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、异环磷酰胺和白消安)、亚硝基脲(任选N-亚硝基-N-甲基脲(MNU)、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、赛莫司汀(MeCCNU)、福莫司汀和链脲佐菌素)、四嗪类(任选地达卡巴嗪、米托唑胺和替莫唑胺)、氮丙啶类(任选地噻替派、丝裂霉素C和地吡醌(AZQ))、顺铂及其衍生物(任选地卡铂和奥沙利铂)和非经典烷化剂(任选地甲基苄胍和六甲基密胺);

所述抗代谢物选自以下中的一种或多种:抗叶酸(任选地甲氨喋呤和培美曲塞)、氟嘧啶(任选地5-氟尿嘧啶和卡培他滨)、脱氧核苷类似物(任选地安西他滨、依诺他滨、阿糖胞苷、吉西他滨、地西他滨、阿扎胞苷、氟达拉滨、奈拉滨、克拉屈滨、氯法拉滨、氟达拉滨和喷司他丁)和硫嘌呤(任选地硫鸟嘌呤和巯嘌呤);

所述细胞毒性抗生素选自蒽环类(任选地多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、吡

柔比星、阿柔比星和米托蒽醌)、博莱霉素、丝裂霉素C、米托蒽醌和放线菌素中的一种或多种;

所述拓扑异构酶抑制剂选自喜树碱、伊立替康、拓扑替康、依托泊苷、多柔比星、米托蒽醌、替尼泊苷、新生霉素、美巴龙和阿柔比星中的一种或多种;和/或

所述抗微管剂选自紫杉烷(任选地紫杉醇和多西他赛)和长春花生物碱(任选地长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨)中的一种或多种。

51. 根据权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述至少一种激素治疗剂是激素激动剂或激素拮抗剂。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述激素激动剂选自孕激素(孕酮)、皮质类固醇(任选地泼尼松龙、甲基强的松龙或地塞米松)、胰岛素样生长因子、VEGF衍生的血管生成和淋巴生成因子(任选地VEGF-A、VEGF-A145、VEGF-A165、VEGF-C、VEGF-D、PIGF-2)、成纤维细胞生长因子(FGF)、半乳凝素、肝细胞生长因子(HGF)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)- β 、雄激素、雌激素和生长抑素类似物中的一种或多种。

53. 根据权利要求51所述的方法,其中所述激素拮抗剂选自以下中的一种或多种:激素合成抑制剂,任选地芳香酶抑制剂或促性腺激素释放激素(GnRH)或其类似物,和激素受体拮抗剂,任选地选择性雌激素受体调节剂(SERM)或抗雄激素,或针对激素受体的抗体,任选地西妥木单抗、达罗托组单抗、芬妥木单抗、加尼妥单抗、艾司妥单抗、罗妥木单抗、培戈-阿拉赛珠单抗、贝伐珠单抗、艾芦库单抗、雷莫芦单抗、非苏木单抗、美替木单抗、那昔妥单抗、西妥昔单抗、玛汀-迪妥昔单抗、伏妥昔单抗、伊马曲单抗、恩星-拉妥昔单抗、马妥珠单抗、扎妥昔单抗、耐昔妥单抗、尼妥单抗、帕尼单抗、托木妥昔单抗、扎芦木单抗、伊汀-阿普卢妥单抗、贝马里妥单抗、奥拉单抗或托维妥单抗。

54. 根据权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述激酶抑制剂选自以下中的一种或多种:阿达索替尼(adavosertib)、阿法替尼(afanitib)、阿柏西普(aflibercept)、阿昔替尼(axitinib)、贝伐单抗、博舒替尼(bosutinib)、卡博替尼(cabozantinib)、西妥昔单抗、考比替尼(cobimetinib)、克唑替尼(crizotinib)、达沙替尼(dasatinib)、恩曲替尼(entrelectinib)、厄达替尼(erdafitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、福坦替尼(fostamitinib)、吉非替尼(gefitinib)、依鲁替尼(ibrutinib)、伊马替尼(imatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、乐伐替尼(lenvatinib)、木利替尼(mubritinib)、尼罗替尼(nilotinib)、帕尼单抗、帕唑帕尼(pazopanib)、哌加他尼(pegaptanib)、帕纳替尼(ponatinib)、兰尼单抗(ranibizumab)、瑞戈非尼(regorafenib)、鲁索替尼(ruxolitinib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、SU6656、托法替尼(tofacitinib)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、凡德他尼(vandetanib)和威罗菲尼(vemurafenib)。

55. 根据权利要求30至54中任一项所述的方法,其中所述癌症是原发性癌症。

56. 根据权利要求30至55中任一项所述的方法,其中所述癌症是转移性癌症,任选地表达NRP2a和/或NRP2b的转移性癌症。

57. 根据权利要求30至56中任一项所述的方法,其中所述癌症选自以下中的一种或多种:黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤)、胰腺癌、骨癌、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、间皮瘤、白血病(例如,淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性骨髓性白血

病、复发性急性骨髓性白血病)、淋巴瘤、肝癌(肝细胞癌)、肉瘤、B细胞恶性肿瘤、乳腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、脑膜瘤、垂体腺瘤、前庭神经鞘瘤、原发性CNS淋巴瘤、原始神经外胚层瘤(成神经管细胞瘤)、肾癌(例如,肾细胞癌)、膀胱癌、子宫癌、食管癌、脑癌、头颈癌、宫颈癌、睾丸癌、甲状腺癌和胃癌。

58. 根据权利要求56或57所述的方法,其中所述转移性癌症选自以下中的一种或多种:

- (a) 已经转移到骨、肝和/或肺的膀胱癌;
- (b) 已经转移到骨、脑、肝和/或肺的乳腺癌;
- (c) 已经转移到肝、肺和/或腹膜的结肠直肠癌;
- (d) 已经转移到肾上腺、骨、脑、肝和/或肺的肾癌;
- (e) 已经转移到肾上腺、骨、脑、肝和/或其它肺部位的肺癌;
- (f) 已经转移到骨、脑、肝、肺和/或皮肤/肌肉的黑色素瘤;
- (g) 已经转移到肝、肺和/或腹膜的卵巢癌;
- (h) 已经转移到肝、肺和/或腹膜的胰腺癌;
- (i) 已经转移到肾上腺、骨、肝和/或肺的前列腺癌;
- (j) 已经转移到肝、肺和/或腹膜的胃癌;
- (l) 已经转移到骨、肝和/或肺的甲状腺癌;以及
- (m) 已经转移到骨、肝、肺、腹膜和/或阴道的子宫癌。

59. 一种患者护理试剂盒,其包括:

- (a) 根据权利要求1至21中任一项所述的抗体或其抗原结合片段;以及任选地
- (b) 选自癌症免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和激酶抑制剂的至少一种另外的药剂。

60. 根据权利要求59所述的患者护理试剂盒,其中(a)和(b)在单独的治疗组合中。

61. 根据权利要求59所述的患者护理试剂盒,其中(a)和(b)在同一治疗组合中。

62. 根据权利要求59至61中任一项所述的患者护理试剂盒,其中所述至少一种化学治疗剂选自烷化剂、抗代谢物、细胞毒性抗生素、拓扑异构酶抑制剂(I型或II型)和抗微管剂中的一种或多种。

63. 一种生物测定系统,其包含根据权利要求1至21中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,以及在所述细胞表面上表达人NRP2多肽的宿主细胞系。

64. 根据权利要求63所述的生物测定系统,其中所述NRP2多肽用可检测的标记物标记。

65. 根据权利要求63或64所述的生物测定系统,其中所述抗体或其抗原结合片段用可检测的标记物标记。

66. 根据权利要求63至65中任一项所述的生物测定系统,其中所述NRP2多肽功能性地偶联至读出物或指示剂,如NRP2多肽的生物活性的荧光或发光指示剂。

67. 根据权利要求63至66中任一项所述的生物测定系统,其中所述NRP2多肽选自表N1,任选地NRP2a v1和/或v2多肽。

68. 根据权利要求63至67中任一项所述的生物测定系统,其包含至少一种NRP2a配体,任选地选自表L1或表L2的NRP2a配体,任选地其中所述宿主细胞表达所述至少一种NRP2a配体。

69. 一种检测系统,其包括表达人神经纤毛蛋白2a(NRP2a)多肽的细胞、至少一种NRP2a

配体和根据权利要求1至21中任一项所述的人或人源化抗NRP2a抗体或其抗原结合片段,所述检测系统调节所述NRP2a多肽与所述至少一种NRP2a配体之间的相互作用。

70. 根据权利要求69所述的检测系统,其中用可检测的标记物标记所述抗NRP2a抗体或其抗原结合片段。

71. 根据权利要求69或70所述的检测系统,其中所述NRP2a多肽是选自表N1的NRP2a变体1和/或变体2多肽。

72. 根据权利要求69至71中任一项所述的检测系统,其中所述至少一种NRP2a配体选自表L1或表L2。

73. 根据权利要求69至72中任一项所述的检测系统,其中所述NRP2a多肽和/或所述至少一种NRP2a配体功能性上偶联至读出物或指示剂,例如所述NRP2a多肽或所述至少一种NRP2a配体的生物活性的荧光或发光指示剂。

74. 一种细胞组合物,其包含工程化的细胞群体,其中至少一种细胞包含编码根据权利要求1至21中任一项所述的人或人源化抗NRP2a抗体或其抗原结合片段的一种或多种多核苷酸,其中所述细胞能够在无血清培养基中生长。

75. 一种细胞生长装置,其包含根据权利要求1至21中任一项所述的人或人源化抗NRP2a抗体或其抗原结合片段、工程化的细胞群体、至少约10升的无血清生长培养基和无菌容器,在所述工程化的细胞群体中至少一种细胞包含编码所述抗NRP2a抗体或其抗原结合片段的一种或多种多核苷酸。

包含抗NRP2a抗体的组合物和方法

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119 (e) 要求2021年10月27日提交的美国临时申请第63/272,374号的权益,所述美国临时申请通过引用以其整体并入本文。

[0003] 关于序列表的陈述

[0004] 与本申请相关联的序列表XML以XML文件格式提供,并且据此通过引用并入说明书中。包含序列表XML的XML文件的名称是ATYR_137_01W0_ST26.xml。所述XML文件为约222,086字节,创建于2022年10月26日,并且经由USPTO专利中心以电子方式提交。

背景技术

技术领域

[0005] 本公开涉及抗体及其抗原结合片段,所述抗体及其抗原结合片段相对于NRP2b同种型优先地或选择性地结合至人神经纤毛蛋白-2a (NRP2a) 变体1(v1) 和/或变体2(v2) 同种型,并且选择性地调节人NRP2a v1/v2配体与下游信号传导事件之间的结合相互作用。还包括用于治疗疾病如癌症以及炎症疾病和自身免疫性疾病的相关治疗组合物和方法。

[0006] 相关技术的描述

[0007] NRP2是与大量其它质膜受体形成异源二聚体复合物的单程跨膜蛋白,所述质膜受体包括生长因子受体,如FLT-4、KDR和cMET (Narre等人,(2014)《肿瘤靶点与疗法(OncoTargets and Therapy)》doi:10.2147/OTT.S377744),以及整合素和其它信号传导系统(Goel等人,《细胞科学杂志(J. Cell Sci)》125 597-506、2012)。NRP2的胞外结构域结合VEGF和脑信号蛋白家族的配体,而其短胞内结构域参与各种蛋白质-蛋白质相互作用。这些相互作用似乎增强或调节生长因子受体、整联蛋白和其它共受体的胞内运输和信号传导输出,以促进细胞可塑性 (Favier等人,《血液(Blood)》doi:10.1182/blood-2005-11-4447),以及使细胞能够快速响应和适应变化的环境和细胞应激的其它过程。

[0008] NRP2通常在体内表达为各种紧密相关的剪接变体的混合物,所述剪接变体通常被分组在一起为NRP2a以及NRP2b,所述NRP2a包括变体v1、v2和v3,所述NRP2b包括变体v4和v5。变体v6是存在于循环内的NRP2的可溶性形式。虽然NRP2a和NRP2b在其表面暴露的结构域的大部分(但不是全部)上共享序列同一性,但NRP2a和NRP2b变体在其近膜、跨膜和胞内C末端区方面显著不同。在NRP2a的所有三个剪接变体中,独特的c末端结构域包含42个氨基酸和具有C末端SEA氨基酸序列基序的胞内PDZ结合结构域。相比之下,NRP2b的两个剪接变体包含缺乏C末端SEA的46个氨基酸胞质结构域区。NRP2a和NRP2b在其胞内、近膜和跨膜序列之间仅共享约11%的序列同源性。

[0009] 越来越多的证据表明,NRP2的NRP2a和NRP2b剪接变体在指导胞内定位和信号转导的差异模式以调节细胞功能方面发挥不同作用。新出现的数据表明,在正常状态和病理生理学状态两者下,NRP2a和NRP2b的表达的比率在特定组织中基于细胞应激和激活状态随时间变化。因此,NRP2a和NRP2b选择性抗体的开发提供了开发新一代更具选择性和更有效的

治疗剂和诊断剂的机会。

[0010] 然而,开发同种型特异性治疗剂和诊断试剂的主要限制是缺乏合适的同种型选择性、高亲和力和功能封闭抗体。此限制已经通过本文所述的NRP2a特异性抗体的开发和验证来克服。

发明内容

[0011] 本公开的实施方案包括抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段在表位处结合至神经纤毛蛋白-2A(NRP2a)变体1(v1)或变体2(v2)多肽,所述表位包含选自表N2的序列、由其组成或基本上由其组成,包括选自表N2的序列的约或至少约8、9、10、11或12或更多个连续氨基酸。在一些实施方案中,表位包含选自SEQ ID NO:96-104的序列、由其组成或基本上由其组成,包括选自SEQ ID NO:96-104的序列的约或至少约8、9、10、11或12个连续氨基酸。在具体实施方案中,表位包含SEQ ID NO:100、或SEQ ID NO:100的约或至少约8、9、10、11或12个连续氨基酸、由其组成或基本上由其组成。

[0012] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)序列和轻链可变区(VL)序列,所述VH序列包含互补决定区VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列,所述VL序列包含互补决定区VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列,其中:

[0013] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:13、127和GX₁X₂X₃X₄X₅(其中X₁是G、A、或S,X₂是Y、F、K、L、或R,X₃是T、A、G、I、L、Q或V,X₄是D、A、G、K、N、Q、R或S并且X₅是Y、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T或V),并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃(其中X₆是S、A、G、I、L、P、T或V,X₇是Q、A、G、R或S,X₈是S、A、H、K、L、Q或T,X₉是T、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、V或Y,X₁₀是H、A、D、E、F、G、I、K、L、N、Q、R、S、T或Y,X₁₁是V、A、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T或Y,X₁₂是L、A、E、H、I、N、P、Q、S、T或V并且X₁₃是T、A、D、E、F、G、I、K、L、N、Q、R、S或V);

[0014] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:130-132,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:133-135,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0015] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:136-138,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:139-141,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0016] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:142-144,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:145-147,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0017] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:148-150,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:151-153,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0018] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:154-156,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:157-159,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0019] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:1-3,并且所述VLCDR1、

VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:4-6,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0020] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:7-9,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:10-12,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0021] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:13-15,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16-18,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0022] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:19-21,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:22-24,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0023] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:25-27,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:28-30,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0024] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:31-33,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:34-36,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0025] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:37-39,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:40-42,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0026] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:43-45,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:46-48,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0027] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:49-51,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:52-54,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;

[0028] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:55-57,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:58-60,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变;或者

[0029] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:61-63,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64-66,包括其变体,所述变体在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变。

[0030] 在特定实施方案中:

[0031] 所述VH序列包含SEQ ID NO:170,并且所述VL序列包含SEQ ID NO:171;

[0032] 所述VH序列与SEQ ID NO:160至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:161至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0033] 所述VH序列与SEQ ID NO:162至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:163至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%

或100%相同；

[0034] 所述VH序列与SEQ ID NO:164至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:165至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0035] 所述VH序列与SEQ ID NO:166至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:167至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0036] 所述VH序列与SEQ ID NO:168至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:169至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0037] 所述VH序列与SEQ ID NO:67至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:68至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0038] 所述VH序列与SEQ ID NO:69至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:70至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0039] 所述VH序列与SEQ ID NO:71至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:72至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0040] 所述VH序列与SEQ ID NO:73至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:74至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0041] 所述VH序列与SEQ ID NO:75至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:76至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0042] 所述VH序列与SEQ ID NO:77至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:78至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0043] 所述VH序列与SEQ ID NO:79至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:80至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0044] 所述VH序列与SEQ ID NO:81至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:82至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0045] 所述VH序列与SEQ ID NO:83至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:84至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同；

[0046] 所述VH序列与SEQ ID NO:85至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:86至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或

100%相同;或

[0047] 所述VH序列与SEQ ID NO:87至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:88至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同。

[0048] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段基本上不结合至人神经纤毛蛋白-2B (NRP2b) 变体4(v4) 多肽和/或人NRP2b变体5(v5) 多肽。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以约10pM至约500pM或至约50nM,或约、至少约或不大于约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900pM、1nM、10nM、25nM或50nM的亲和力,或者任选地以在约10pM至约500pM、约10pM至约400pM、约10pM至约300pM、约10pM至约200pM、约10pM至约100pM、约10pM至约50pM或约20pM至约500pM、约20pM至约400pM、约20pM至约300pM、约20pM至约200pM、约20pM至约100pM、约20pM至约50pM或约30pM至约500pM、约30pM至约400pM、约30pM至约300pM、约30pM至约200pM、约30pM至约100pM、约30pM至约50pM或约20pM至约200pM、约30pM至约300pM、约40pM至约400pM、约50pM至约500pM、约60pM至约600pM、约70pM至约700pM、约80pM至约800pM、约90pM至约900pM、约100pM至约1nM、约1nM至约5nM、约5nM至约10nM、约10nM至25nM或约25nM至约50nM范围内的亲和力结合至NRP2a v1或v2多肽或表位。

[0049] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段对NRP2a v1或v2多肽的结合亲和力比其对NRP2b v4多肽和/或NRP2b v5多肽的结合亲和力强至少约1.5、2、4、6、8、10、20、40、60、80、100、200、400、600、800或1000倍。

[0050] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段阻断或以其它方式减少NRP2a v1或v2多肽与其配体之间的结合,任选地其中所述配体选自表L1或表L2。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段阻断或以其它方式减少NRP2a v1或v2多肽与趋化因子(C-C基序)配体21 (CCL21) 多肽之间的结合,任选地在体外结合测定中、体外或离体基于细胞的测定中或在体内。在一些实施方案中,相对于对照或参考,抗体或其抗原结合片段阻断或以其它方式减少NRP2a v1或v2多肽与CCL21多肽之间的结合约或至少约20-100%或更多(任选地约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或100%或更多)。在具体实施方案中,抗体或其抗原结合片段阻断或以其它方式减少NRP2a v1或v2多肽与C-C趋化因子受体7型(CCR7) 多肽之间的结合,包括二聚化,任选地在体外结合测定中、体外或离体基于细胞的测定中或在体内。在特定实施方案中,相对于对照或参考,抗体或其抗原结合片段阻断或以其它方式减少NRP2a v1或v2多肽与CCR7多肽之间的结合,包括二聚化,约或至少约20-100%或更多(任选地约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或100%或更多)。

[0051] 在一些实施方案中,相对于对照或参考,抗体或其抗原结合片段调节(任选地拮抗)NRP2a v1或v2多肽与CCL21和/或CCR7多肽之间的信号传导活性约或至少约20-100%或更多(任选地约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或100%或更多)。在某些实施方案中,信号传导活性包括免疫细胞迁移的诱导,任选地树突状细胞或成熟T细胞,并且其中所述抗体或其抗原结合片段降低信号传导活性;和/或其中所述信号传导活性包括肿瘤细胞迁移的诱导,并且其中所述抗体或其抗原结合片段降低信号传导活性。

[0052] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含IgA(包括亚类IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(包括亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)或IgM Fc结构域,任选地人Fc结构域或其杂合体和/或变体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含在人类中具有高效应子功能的IgG Fc结构域,任选地IgG1或IgG3 Fc结构域;或者其包含在人类中具有低效应子功能的IgG Fc结构域,任选地IgG2或IgG4 Fc结构域。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含任选地选自表F1的IgG1或IgG4 Fc结构域。

[0053] 某些实施方案包括单克隆抗体、人源化抗体、Fv片段、单链Fv(scFv)多肽、连接蛋白、抗运载蛋白(anticalin)、适体、高亲合性多聚体(avimer)、骆驼科动物抗体、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、微型抗体、纳米抗体和/或单抗体(unibody)。

[0054] 还包括治疗组合物,其包含如本文所述的药学上可接受的载剂和抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,组合物对于至少一种抗体或其抗原结合片段具有至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%的蛋白质纯度,并且基本上不含聚集体。在一些实施方案中,治疗组合物基本上不含内毒素。在一些实施方案中,治疗组合物是无菌的可注射溶液,其任选地适合于静脉内、肌内、皮下或腹膜内施用。某些治疗组合物和方法进一步包含选自癌症免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和激酶抑制剂中的一种或多种的至少一种另外的药剂。

[0055] 还包括治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的治疗组合物。在一些实施方案中,所述疾病或病状是神经纤毛蛋白2(NRP2)相关疾病或病状,任选地NRP2a相关疾病或病状。在一些实施方案中,所述疾病或病状选自癌症、炎性疾病、自身免疫性疾病、淋巴疾病或相关病状、纤维化疾病和与平滑肌收缩性降低相关的疾病。

[0056] 在某些实施方案中,所述疾病是癌症,任选地其中所述癌症表达或过表达NRP2,任选地其中所述癌症显示出NRP2依赖性生长、NRP2依赖性粘附、NRP2依赖性迁移和/或NRP2依赖性入侵。在具体实施方案中,癌症表达或过表达NRP2,但基本上不表达神经纤毛蛋白-1(NRP1)。某些方法是用于减少或预防有需要的受试者的癌症的再出现,其中治疗组合物的施用使得能够生成对癌症的免疫记忆。在一些实施方案中,受试者患有淋巴水肿。

[0057] 某些实施方案包括向受试者施用选自癌症免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和激酶抑制剂中的一种或多种的至少一种另外的药剂。在一些实施方案中,所述至少一种抗NRP2抗体或其抗原结合片段和所述至少一种药剂作为单独的组合物单独施用。在一些实施方案中,所述至少一种抗NRP2抗体和所述至少一种药剂一起作为同一治疗组合物的一部分施用,任选地作为本文所述的治疗组合物施用。

[0058] 在一些实施方案中,癌症免疫治疗剂选自免疫检查点调节剂、癌症疫苗、溶瘤病毒、细胞因子和基于细胞的免疫疗法中的一种或多种。在某些实施方案中,免疫检查点调节剂是多肽,任选地抗体或其抗原结合片段或配体或小分子。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂包含:

[0059] (a) 抑制性免疫检查点分子的拮抗剂;或

[0060] (b) 刺激性免疫检查点分子的激动剂,

[0061] 任选地,其中所述免疫检查点调节剂特异性地结合至所述免疫检查点分子。

[0062] 在一些实施方案中,所述抑制性免疫检查点分子选自以下中的一种或多种:程序

性死亡配体1 (PD-L1)、程序性死亡1 (PD-1)、程序性死亡配体2 (PD-L2)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4)、吡啶胺2,3-双加氧酶 (IDO)、色氨酸2,3-双加氧酶 (TDO)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3 (TIM-3)、淋巴细胞活化基因-3 (LAG-3)、T细胞活化的V结构域Ig抑制剂 (VISTA)、B和T淋巴细胞弱化因子 (BTLA)、CD160、疱疹病毒进入介导子 (HVEM) 以及具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT)。在特定实施方案中:

[0063] 所述拮抗剂是PD-L1和/或PD-L2拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、阿特珠单抗 (MPDL3280A)、阿维鲁单抗 (MSB0010718C) 和德瓦鲁单抗 (MEDI4736) 中的一种或多种,任选地其中所述癌症选自结肠直肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌和肾细胞癌中的一种或多种;

[0064] 所述拮抗剂是PD-1拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、纳武单抗、帕博利珠单抗、MK-3475、AMP-224、AMP-514PDR001和匹地利珠单抗中的一种或多种,任选地其中所述PD-1拮抗剂是纳武单抗,并且所述癌症任选地选自霍奇金氏淋巴瘤、黑色素瘤、非小细胞肺癌、肝细胞癌、肾细胞癌和卵巢癌中的一种或多种;

[0065] 所述PD-1拮抗剂是帕博利珠单抗,并且所述癌症任选地选自黑色素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、头颈癌和尿路上皮癌中的一种或多种;

[0066] 所述拮抗剂是CTLA-4拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、伊匹单抗、曲美木单抗中的一种或多种,任选地其中所述癌症选自黑色素瘤、前列腺癌、肺癌和膀胱癌中的一种或多种;

[0067] 所述拮抗剂是IDO拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、吡啶莫德 (NLG-8189)、1-甲基-色氨酸 (1MT)、 β -吡啶 (壬烷;9H-吡啶并[3,4-b]吡啶)、迷迭香酸和艾卡噪司他中的一种或多种,并且其中所述癌症任选地选自转移性乳腺癌和脑癌中的一种或多种,所述脑癌任选地是多形性胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、神经胶质肉瘤或恶性脑肿瘤;

[0068] 所述拮抗剂是TDO拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子、680C91和LM10中的一种或多种;

[0069] 所述拮抗剂是TIM-3拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子中的一种或多种;

[0070] 所述拮抗剂是LAG-3拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子和BMS-986016中的一种或多种;

[0071] 所述拮抗剂是VISTA拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子中的一种或多种;

[0072] 所述拮抗剂是BTLA、CD160和/或HVEM拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子中的一种或多种;

[0073] 所述拮抗剂是TIGIT拮抗剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子中的一种或多种。

[0074] 在一些实施方案中,刺激性免疫检查点分子选自OX40、CD40、糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因 (GITR)、CD137 (4-1BB)、CD27、CD28、CD226和疱疹病毒进入介导子 (HVEM) 中的一种或多种。在某些实施方案中:

[0075] 所述激动剂是OX40激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段

或小分子或配体、OX86、Fc-OX40L和GSK3174998中的一种或多种；

[0076] 所述激动剂是CD40激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体、CP-870,893、达西组单抗、Chi Lob 7/4、ADC-1013和rhCD40L中的一种或多种,并且其中所述癌症任选地选自黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤和血液癌症中的一种或多种,任选地淋巴瘤如非霍奇金氏淋巴瘤；

[0077] 所述激动剂是GITR激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体、INCAGN01876、DTA-1和MEDI1873中的一种或多种；

[0078] 所述激动剂是CD137激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体、乌托鲁单抗和4-1BB配体中的一种或多种；

[0079] 所述激动剂是CD27激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体、伐立鲁单抗和CDX-1127(1F5)中的一种或多种；

[0080] 所述激动剂是CD28激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体和TAB08中的一种或多种；和/或

[0081] 所述激动剂是HVEM激动剂,其任选地选自与其特异性结合的抗体或抗原结合片段或小分子或配体中的一种或多种。

[0082] 在一些实施方案中,所述癌症疫苗选自以下中的一种或多种:Oncophage;人乳头瘤病毒HPV疫苗,任选地加德西(Gardasil)或希瑞适(Cervarix);乙肝疫苗,任选地Engerix-B、Recombivax HB,或Twinrix;以及西普鲁塞-T(sipuleucel-T,普罗文奇(Provenge)),或者所述癌症疫苗包含选自以下中的一种或多种的癌症抗原:人Her2/neu、Her1/EGF受体(EGFR)、Her3、A33抗原、B7H3、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23(IgE受体)、MAGE-3、C242抗原、5T4、IL-6、IL-13、血管内皮生长因子VEGF(例如,VEGF-A) VEGFR-1、VEGFR-2、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CD152、CD200、CD221、CCR4、HLA-DR、CTLA-4、NPC-1C、生腱蛋白、波形蛋白、胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)、 α -甲胎蛋白、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、碳酸酐酶9(CA-IX)、癌胚抗原(CEA)、鸟苷酰环化酶C、NY-ESO-1、p53、存活素、整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 、叶酸受体1、跨膜糖蛋白NMB、成纤维细胞活化蛋白 α (FAP)、糖蛋白75、TAG-72、MUC1、MUC16(或CA-125)、磷脂酰丝氨酸、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、NR-LU-13抗原、TRAIL-R1、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B或TRAIL-R2)、SLAM家族成员7(SLAMF7)、EGP40泛癌抗原、B细胞活化因子(BAFF)、血小板衍生的生长因子受体、糖蛋白EpCAM(17-1A)、程序性死亡-1、蛋白质二硫化物异构酶(PDI)、肝再生磷酸酶3(PRL-3)、前列腺酸性磷酸酶、Lewis-Y抗原、GD2(在神经外胚层起源的肿瘤上表达的二唾液神经节苷酯)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)和间皮素,任选地其中所述受试者患有包含相应的癌症抗原的癌症或处于患有包含相应的癌症抗原的癌症的风险中。

[0083] 在一些实施方案中,溶瘤病毒选自talimogene laherparepvec(T-VEC)、柯萨奇病毒A21(CAVATAKTM)、Oncorine(H101)、pelareorep(**REOLYSIN**[®])、塞内卡谷病毒(NTX-010)、塞内卡病毒SVV-001、CoLoAd1、SEPREHVIR(HSV-1716)、CGTG-102(Ad5/3-D24-GMCSF)、GL-ONC1、MV-NIS和DNX-2401中的一种或多种。在一些实施方案中,细胞因子选自干扰素(IFN)- α 、IL-2、IL-12、IL-7、IL-21和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)中的一种或多种。在一些实施方案中,基于细胞的免疫治疗剂包含癌症抗原特异性T细胞,任选地离体衍生的T细胞。在一些实施方案中,癌症抗原特异性T细胞选自嵌合抗原受体(CAR)修饰的T

细胞和T细胞受体 (TCR) 修饰的T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 和肽诱导的T细胞中的一种或多种。

[0084] 在特定实施方案中,所述至少一种化学治疗剂选自烷化剂、抗代谢物、细胞毒性抗生素、拓扑异构酶抑制剂(I型或II型)和抗微管剂中的一种或多种。在一些实施方案中:

[0085] 所述烷化剂选自以下中的一种或多种:氮芥(任选地二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、氮芥(mustine)、美法仑、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、异环磷酰胺和白消安)、亚硝基脲(任选N-亚硝基-N-甲基脲(MNU)、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、赛莫司汀(MeCCNU)、福莫司汀和链脲佐菌素)、四嗪类(任选地达卡巴嗪、米托唑胺和替莫唑胺)、氮丙啶类(任选地噻替派、丝裂霉素C和地吡醌(AZQ))、顺铂及其衍生物(任选地卡铂和奥沙利铂)和非经典烷化剂(任选地甲基苄胍和六甲基密胺);

[0086] 所述抗代谢物选自以下中的一种或多种:抗叶酸(任选地甲氨喋呤和培美曲塞)、氟嘧啶(任选地5-氟尿嘧啶和卡培他滨)、脱氧核苷类似物(任选地安西他滨、依诺他滨、阿糖胞苷、吉西他滨、地西他滨、阿扎胞苷、氟达拉滨、奈拉滨、克拉屈滨、氯法拉滨、氟达拉滨和喷司他丁)和硫嘌呤(任选地硫鸟嘌呤和巯嘌呤);

[0087] 所述细胞毒性抗生素选自蒽环类(任选地多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、吡柔比星、阿柔比星和米托蒽醌)、博莱霉素、丝裂霉素C、米托蒽醌和放线菌素中的一种或多种;

[0088] 所述拓扑异构酶抑制剂选自喜树碱、伊立替康、拓扑替康、依托泊苷、多柔比星、米托蒽醌、替尼泊苷、新生霉素、美巴龙和阿柔比星中的一种或多种;和/或

[0089] 所述抗微管剂选自紫杉烷(任选地紫杉醇和多西他赛)和长春花生物碱(任选地长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨)中的一种或多种。

[0090] 在一些实施方案中,至少一种激素治疗剂是激素激动剂或激素拮抗剂。在某些实施方案中,激素激动剂选自孕激素(孕酮)、皮质类固醇(任选地泼尼松龙、甲基强的松龙或地塞米松)、胰岛素样生长因子、VEGF衍生的血管生成和淋巴生成因子(任选地VEGF-A、VEGF-A145、VEGF-A165、VEGF-C、VEGF-D、PlGF-2)、成纤维细胞生长因子(FGF)、半乳凝素、肝细胞生长因子(HGF)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)- β 、雄激素、雌激素和生长抑素类似物中的一种或多种。在一些实施方案中,激素拮抗剂选自以下中的一种或多种:激素合成抑制剂,任选地芳香酶抑制剂或促性腺激素释放激素(GnRH)或其类似物,和激素受体拮抗剂,任选地选择性雌激素受体调节剂(SERM)或抗雄激素,或针对激素受体的抗体,任选地西妥木单抗、达罗托组单抗、芬妥木单抗、加尼妥单抗、艾司妥单抗、罗妥木单抗、培戈-阿拉赛珠单抗、贝伐珠单抗、艾芦库单抗、雷莫芦单抗、非苏木单抗、美替木单抗、那昔妥单抗、西妥昔单抗、玛汀-迪妥昔单抗、伏妥昔单抗、伊马曲单抗、恩星-拉妥昔单抗、马妥珠单抗、扎妥昔单抗、耐昔妥单抗、尼妥珠单抗、帕尼单抗、托木妥昔单抗、扎芦木单抗、伊汀-阿普卢妥单抗、贝马里妥单抗、奥拉单抗或托维妥单抗。

[0091] 在一些实施方案中,激酶抑制剂选自以下中的一种或多种:阿达索替尼(adavosertib)、阿法替尼(afanitinib)、阿柏西普(aflibercept)、阿昔替尼(axitinib)、贝伐单抗、博舒替尼(bosutinib)、卡博替尼(cabozantinib)、西妥昔单抗、考比替尼(cobimetinib)、克唑替尼(crizotinib)、达沙替尼(dasatinib)、恩曲替尼(entrectinib)、厄达替尼(erdafitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、福坦替尼(fostamitinib)、吉非替尼

(gefitinib)、依鲁替尼(ibrutinib)、伊马替尼(imatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、乐伐替尼(lenvatinib)、木利替尼(mubritinib)、尼罗替尼(nilotinib)、帕尼单抗、帕唑帕尼(pazopanib)、哌加他尼(pegaptanib)、帕纳替尼(ponatinib)、兰尼单抗(ranibizumab)、瑞戈非尼(regorafenib)、鲁索替尼(ruxolitinib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、SU6656、托法替尼(tofacitinib)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、凡德他尼(vandetanib)和威罗菲尼(vemurafenib)。

[0092] 在一些实施方案中,癌症是原发性癌症。在某些实施方案中,癌症是转移性癌症,任选地表达NRP2a和/或NRP2b的转移性癌症。

[0093] 在一些实施方案中,所述癌症选自以下中的一种或多种:黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤)、胰腺癌、骨癌、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、间皮瘤、白血病(例如,淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性骨髓性白血病、复发性急性骨髓性白血病)、淋巴瘤、肝癌(肝细胞癌)、肉瘤、B细胞恶性肿瘤、乳腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、脑膜瘤、垂体腺瘤、前庭神经鞘瘤、原发性CNS淋巴瘤、原始神经外胚层瘤(成神经管细胞瘤)、肾癌(例如,肾细胞癌)、膀胱癌、子宫癌、食管癌、脑癌、头颈癌、宫颈癌、睾丸癌、甲状腺癌和胃癌。

[0094] 在一些实施方案中,转移性癌症选自以下中的一种或多种:

[0095] (a) 已经转移到骨、肝和/或肺的膀胱癌;

[0096] (b) 已经转移到骨、脑、肝和/或肺的乳腺癌;

[0097] (c) 已经转移到肝、肺和/或腹膜的结肠直肠癌;

[0098] (d) 已经转移到肾上腺、骨、脑、肝和/或肺的肾癌;

[0099] (e) 已经转移到肾上腺、骨、脑、肝和/或其它肺部位的肺癌;

[0100] (f) 已经转移到骨、脑、肝、肺和/或皮肤/肌肉的黑色素瘤;

[0101] (g) 已经转移到肝、肺和/或腹膜的卵巢癌;

[0102] (h) 已经转移到肝、肺和/或腹膜的胰腺癌;

[0103] (i) 已经转移到肾上腺、骨、肝和/或肺的前列腺癌;

[0104] (j) 已经转移到肝、肺和/或腹膜的胃癌;

[0105] (l) 已经转移到骨、肝和/或肺的甲状腺癌;以及

[0106] (m) 已经转移到骨、肝、肺、腹膜和/或阴道的子宫癌。

[0107] 还包括患者护理试剂盒,所述患者护理试剂盒包括:

[0108] (a) 如本文所述的抗体或其抗原结合片段;以及任选地

[0109] (b) 选自癌症免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和激酶抑制剂的至少一种另外的药剂。

[0110] 在一些实施方案中,(a)和(b)在单独的治疗组合物中。在一些实施方案中,(a)和(b)在同一治疗组合物中。在一些实施方案中,所述至少一种化学治疗剂选自烷化剂、抗代谢物、细胞毒性抗生素、拓扑异构酶抑制剂(I型或II型)和抗微管剂中的一种或多种。

[0111] 某些实施方案包括生物测定系统,所述生物测定系统包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段,以及在细胞表面上表达人NRP2多肽的宿主细胞系。在一些实施方案中,NRP2多肽用可检测的标记物标记。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段用可检测的标记物标记。在一些实施方案中,NRP2多肽功能性地偶联至读出物或指示剂,例如NRP2多肽的生

物活性的荧光或发光指示剂。在某些实施方案中,NRP2多肽选自表N1,任选地NRP2a v1和/或v2多肽。特定的生物测定系统包含至少一种NRP2a配体,任选地选自表L1或表L2的NRP2a配体,任选地其中所述宿主细胞表达所述至少一种NRP2a配体。

[0112] 特定实施方案包括检测系统,所述检测系统包含表达人神经纤毛蛋白2a (NRP2a)多肽的细胞、至少一种NRP2a配体和人或人源化抗NRP2a抗体或其抗原结合片段,如本文所述,所述检测系统调节NRP2a多肽与至少一种NRP2a配体之间的相互作用。在一些实施方案中,用可检测的标记物标记抗NRP2a抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,NRP2a多肽是选自表N1的NRP2a变体1和/或变体2多肽。在一些实施方案中,至少一种NRP2a配体选自表L1或表L2。在一些实施方案中,NRP2a多肽和/或至少一种NRP2a配体功能性地偶联至读出物或指示剂,例如NRP2a多肽或至少一种NRP2a配体的生物活性的荧光或发光指示剂。

[0113] 还包括细胞组合物,所述细胞组合物包含工程化的细胞群体,其中至少一种细胞包含编码如本文所述的人或人源化抗NRP2a抗体或其抗原结合片段的一种或多种多核苷酸,其中所述细胞能够在无血清培养基中生长。

[0114] 一些实施方案包括细胞生长装置,所述细胞生长装置包含如本文所述的人或人源化抗NRP2a抗体或其抗原结合片段、工程化的细胞群体、至少约10升的无血清生长培养基和无菌容器,在工程化的细胞群体中至少一种细胞包含编码所述抗NRP2a抗体或其抗原结合片段的一种或多种多核苷酸。

附图说明

[0115] 图1示出了NRP2a v1/v2与CCL21和CCR7的相互作用的模型。NRP2a v3和NRP2b v4/v5不与CCL21或CCR7显著相互作用,这部分地是因为这些NRP2同种型在近膜结构域内缺乏CCL21相互作用序列。

[0116] 图2A-2E示出了在CCL21或CCL19的存在下NRP2a v1/v2同种型与CCR7之间的缔合。

[0117] 图3A-3E示出了NRP2a的CCL21结合位点中的突变对于配体诱导的NRP2a和CCR7的二聚化的影响。

[0118] 图4A-4C示出了抗体与人和小鼠NRP2A (4A)、人NRP2a和NRP2b (4B) 以及人NRP2a v2和NRP2a v3 (4C) 的相对结合。

[0119] 图5A-5D示出了抗体阻断NRP2a/CCR7-CCL21诱导的受体二聚化的能力。

[0120] 图6示出了示例性的抗NRP2a抗体表位 (SEQ ID NO:95 (NRP2a) 和对应的同源小鼠序列SEQ ID NO:124 (mNRP2a) 的序列分析。

[0121] 图7A-7B示出了体内树突状细胞迁移测定的工作流程 (7A) 和门控策略 (7B)。图7C示出了相对于野生型小鼠,NRP2 KO小鼠的淋巴结中的FITC+树突状细胞的结果。

具体实施方式

[0122] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解相同含义。尽管与本文所述的那些相似或等同的任何方法、材料、组合物、试剂、细胞可以用于实践或测试本公开的主题,但描述了优选的方法和材料。本说明书中引用的所有出版物和参考文献,包括但不限于专利和专利申请通过引用以其整体并入本文,如同每个单独的出版物或参考文献被具体地和单独地指示如完全阐述一样通过

引用并入本文。本申请要求优先权的任何专利申请也以上文针对出版物和参考文献描述的方式通过引用以其整体并入本文。

[0123] 标准技术可以用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书或者如本领域中通常实现那样或如本文所述进行。这些技术和程序以及相关技术和程序通常可以根据本领域熟知的常规方法执行,并且如在整个本说明书中引用和讨论的各种一般和更具体参考文献中所述那样执行。除非提供具体的定义,否则与本文所述的分子生物学、分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学结合使用的命名法以及所述分子生物学、分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学的实验室程序和技术是本领域中熟知和常用的命名法以及实验室程序和技术。标准技术可以用于重组技术、分子生物学、微生物学、化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0124] 出于本公开的目的,以下术语定义如下。

[0125] 冠词“一”和“一个”在本文中用于指代所述冠词的一个或多个(即至少一个)语法对象。举例来说,“元件”包括“一个元件”、“一个或多个元件”和/或“至少一个元件”。

[0126] “约”意指相对于参考量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度变化多达20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。

[0127] 术语“抗原”是指能够与选择性结合剂如抗体结合并且另外能够用于动物中以产生能够与所述抗原的表位结合的抗体的分子或分子的一部分。抗原可以具有一个或多个表位。如本文所用,术语“抗原”包括能够在适当条件下诱导对物质的免疫应答并能够与免疫应答的产物反应的物质。例如,抗原可以被抗体(体液免疫应答)或敏化的T淋巴细胞(辅助T细胞或细胞介导的免疫应答)或两者识别。抗原可以是可溶性物质(如毒素和外来蛋白)或颗粒(如细菌和组织细胞);然而,只有蛋白质或多糖分子的被称为抗原决定子(表位)的部分与抗体或淋巴细胞上的特异性受体组合。更广义地说,术语“抗原”包括抗体与其结合或需要抗体的任何物质,无论该物质是否具有免疫原性。对于此类抗原,抗体可以通过重组方法来鉴定,而与任何免疫应答无关。

[0128] “拮抗剂”是指干扰或以其它方式降低另一种药剂或分子的生理作用的生物结构或化学药剂。在一些情况下,拮抗剂特异性地结合到另一种药剂或分子。包括完全拮抗剂和部分拮抗剂。

[0129] “激动剂”是指增加或增强另一种药剂或分子的生理作用的生物结构或化学药剂。在一些情况下,激动剂特异性地结合到另一种药剂或分子。包括完全激动剂和部分激动剂。

[0130] 术语“无能”是指T细胞或B细胞对通过抗原的再刺激的应答的功能性失活。

[0131] 如本文所用,术语“氨基酸”旨在意指天然存在的和非天然存在的氨基酸以及氨基酸类似物和模拟物。天然存在的氨基酸包括在蛋白质生物合成期间使用的20种(L)-氨基酸以及其它氨基酸,例如4-羟脯氨酸、羟赖氨酸、锁链素、异锁链素、同半胱氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸。非天然存在的氨基酸包括例如本领域技术人员已知的(D)-氨基酸、正亮氨酸、正缬氨酸、对氟苯丙氨酸、乙硫氨酸等。氨基酸类似物包括天然和非天然存在的氨基酸的经修饰的形式。此类修饰可以包括例如氨基酸上的化学基团和部分的取代或替换或通过氨基酸的衍生化。氨基酸模拟物包括例如有机结构,所述有机结构表现出参考氨基酸的功能上相似的

性质例如电荷和电荷间隔特性。例如,模拟精氨酸(Arg或R)的有机结构将具有定位于类似分子空间中并且具有与天然存在的Arg氨基酸的侧链的 ϵ -氨基相同的迁移率的正电荷部分。模拟物还包括受约束的结构,以便维持氨基酸或氨基酸官能团的最佳间隔和电荷相互作用。本领域技术人员已知或可以确定哪些结构构成功能上等同的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。

[0132] 如本文所使用,术语“抗体”不仅涵盖完整的多克隆或单克隆抗体,而且还涵盖其片段(例如dAb、Fab、Fab', F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)、其合成变体、天然存在的变体、包含有所需特异性的抗原结合片段的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体以及免疫球蛋白分子的包含所需特异性的抗原结合位点或片段(表位识别位点)的任何其它经修饰的构型。本文更详细地描述了抗体(及其抗原结合片段)的某些特征和特性。

[0133] 抗体或抗原结合片段可以是基本上任何类型的。如本领域所熟知的,抗体是能够通过定位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个表位识别位点与如免疫检查点分子的靶标特异性结合的免疫球蛋白分子。

[0134] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指含有结合至目标抗原的免疫球蛋白重链和/或轻链的至少一个CDR的多肽片段。在这方面,本文所述的抗体的抗原结合片段可以包含来自结合至靶分子的抗体的V_H和V_L序列的1个、2个、3个、4个、5个或所有6个CDR。

[0135] 抗体及其抗原结合片段的结合性质可以使用本领域熟知的方法定量(参见Davies等人,《生物化学年度评论(Annual Rev. Biochem.)》59:439-473,1990)。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性以约或范围为约 $\leq 10^{-7}$ M至约 10^{-8} M的平衡解离常数与靶分子(例如,NRP2a v1和/或v2多肽或其表位或复合物)特异性结合。在一些实施方案中,所述平衡解离常数为约或范围为约 $\leq 10^{-9}$ M至约 $\leq 10^{-10}$ M。在某些说明性实施方案中,抗体或其抗原结合片段对靶分子(与其特异性结合的靶分子)具有约、至少约、或小于约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40或50nM的亲和力(Kd或EC₅₀)。

[0136] 如果相比如多肽或抗体的分子与特定细胞、物质或特定表位与替代性细胞或物质或表位反应或缔合,所述分子更频繁地、更快速地、以更长的持续时间和/或以更高的亲和力与替代性细胞或物质或表位反应或缔合,则所述分子被称为表现“特异性结合”或“优先结合”。如果相比抗体与其它物质或表位结合,所述抗体以更高的亲和力、更高的亲合力、更容易和/或以更长的持续时间进行结合,例如,以统计学显著的量结合,则所述抗体与靶分子或表位“特异性结合”或“优先结合”。通常,表现出特异性结合的一个成员具有位于其表面上的区或具有腔,所述区域或腔与分子对的另一成员的特定空间和/或极性组织特异性结合并因此与其互补。因此,对的成员具有彼此特异性结合的性质。例如,特异性地或优先地结合至特定表位的抗体是以比结合至其它表位更大的亲和力、亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合该特定表位的抗体。通过阅读此定义还应当理解,例如,特异性地或优先地结合至第一靶标的抗体(或部分或表位)可以特异性地或优先地结合至第二靶标或不特异性地或优先地结合至第二靶标。所述术语还适用于例如抗体对由多种抗原携带的特定表位具有特异性的情况,在这种情况下,携带抗原结合片段或结构域的特定结合成员将能够与携带表位的各种抗原结合;例如,其可以对来自共享共同表位的多种物种的靶抗原的多种不同形式具有交叉反应性。

[0137] 免疫结合通常是指在免疫球蛋白分子与免疫球蛋白对其具有特异性的抗原之间例如举例来说但不限于由于静电、离子、亲水和/或疏水吸引或排斥、位阻力、氢键结合、范德华力和其它相互作用而发生的类型的非共价相互作用。可以用相互作用的解离常数(Kd)来表示免疫结合相互作用的强度或亲和力,其中较小的Kd表示较大的亲和力。所选多肽的免疫结合性质可以使用本领域中熟知的方法来定量。一种此类方法需要测量抗原结合位点/抗原结合复合物形成和解离的速率,其中这些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力和在两个方向上同样影响速率的几何参数。因此,可以通过计算缔合和解离的浓度和实际速率来确定“缔合速率常数”(Kon)和“解离速率常数”(Koff)Koff/Kon的比率使得能够实现与亲和力无关的所有参数的消除,并且因此等于解离常数Kd。如本文所用,术语“亲和力”包括两种药剂的可逆结合的平衡常数,并且表示为Kd或 EC_{50} 。结合蛋白对配体的亲和力,如抗体对表位的亲和力,可以是例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM、约100nM至约1皮摩尔(pM)、或约100nM至约1飞摩尔(fM)。如本文所用,术语“亲合力”是指两种或更多种药剂的复合物在稀释后对解离的抗性。在一些实施方案中,亲和力以半最大有效浓度(EC_{50})表示,该半最大有效浓度是指如本文所公开的药剂(如抗NRP2a抗体)的浓度,其在指定暴露时间之后诱导基线与最大值之间的中间应答。 EC_{50} 通常用作抗体的效力的量度。

[0138] 抗体可以通过本领域普通技术人员已知的多种技术中的任一种来制备。参见例如Harlow和Lane《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),1988。例如,可以使用Kohler和Milstein,《欧洲免疫学杂志(Eur.J.Immunol.)》6:511-519,1976的技术以及对其的改进来制备对所关注的多肽具有特异性的单克隆抗体。还包括利用转基因动物如小鼠来表达人抗体的方法。参见例如Neuberger等人,《自然-生物技术(Nature Biotechnology)》,14:826,1996;Lonberg等人,《实验药理学手册(Handbook of Experimental Pharmacology)》113:49-101,1994;以及Lonberg等人,《国际免疫学评论(Internal Review of Immunology)》13:65-93,1995。特定的实例包括REGENEREX®的VELOCIMMUNE®平台(参见例如美国专利第6,596,541号)。

[0139] 抗体也可以通过使用噬菌体展示文库或酵母展示文库来产生或鉴定(参见例如美国专利第7,244,592号;Chao等人,《自然-实验室指南(Nature Protocols)》1:755-768,2006)。可用文库的非限制性实例包括克隆或合成文库,例如人组合抗体文库(HuCAL),其中人抗体库的结构多样性由七个重链可变区基因和七个轻链可变区基因表示。这些基因的组合在主文库中产生49个框架。通过将高度可变的基因盒(CDR=互补决定区)叠加在这些框架上,可以复制庞大的人抗体组库。还包括人文库,所述人文库设计有编码轻链可变区的人类供体来源的片段、重链CDR-3、编码重链CDR-1中的多样性的合成DNA以及编码重链CDR-2中的多样性的合成DNA。适合使用的其它文库对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0140] 在某些实施方案中,如本文所述的抗体及其抗原结合片段包括重链和轻链CDR组,所述重链和轻链CDR组分别插置在重链和轻链框架区(FR)组之间,所述FR为CDR提供支持并且限定CDR相对于彼此的空间关系。如本文所用,术语“CDR组”是指重链或轻链V区的三个高变区。从重链或轻链的N末端开始,这些区域分别被表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此,抗原结合位点包括六个CDR,所述六个CDR包含来自重链和轻链V区中的每一个的CDR组。包含单个CDR(例如,CDR1、CDR2或CDR3)的多肽在本文中被称为“分子识别单元”。对许多抗原-

抗体复合物的结晶学分析已经证实,CDR的氨基酸残基与结合的抗原形成广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3的抗原接触。因此,分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0141] 如本文所用,术语“FR组”是指框住重链或轻链V区的CDR组中的CDR的四个侧翼氨基酸序列。一些FR残基可以接触结合的抗原;然而,FR主要负责将V区折叠成抗原结合位点,特别是直接邻近CDR的FR残基。在FR内,某些氨基残基和某些结构特征非常保守。在这方面,所有V区序列都含有约90个氨基酸残基的内部二硫环。当V区被折叠成结合位点时,CDR显示为形成抗原结合表面的突出环基序。通常认为存在FR的保守结构区,所述保守结构区影响CDR环折叠成某些“典型”结构的折叠形状——无论精确的CDR氨基酸序列如何。此外,已知某些FR残基参与使抗体重链和轻链的相互作用稳定的非共价结构域间接触。

[0142] 免疫球蛋白可变结构域的结构和位置可以通过参考Kabat,E.A.等人,《免疫学关注的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》第4版美国卫生与公众服务部(US Department of Health and Human Services)1987以及其更新来确定。

[0143] 还包括“单克隆”抗体,其是指同质抗体群体,其中单克隆抗体由参与表位的选择性结合的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)组成。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个表位。术语“单克隆抗体”不仅涵盖完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,而且还涵盖其片段(例如Fab、Fab',F(ab')₂,Fv)、单链(scFv)、其变体、包含抗原结合部分的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体以及免疫球蛋白分子的任何其它修饰的构型,所述免疫球蛋白分子包含具有所需特异性和结合至表位的能力的抗原结合片段(表位识别位点)。不旨在限制抗体的来源或其形成方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物),该术语包括全部免疫球蛋白以及上文在“抗体”的定义下描述的片段等。

[0144] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割IgG分子以产生若干片段,F(ab)片段中的两个各自包含共价异源二聚体,所述共价异源二聚体包含完整的抗原结合位点。酶胃蛋白酶能够切割IgG分子以提供若干片段,包括包含两个抗原结合位点的F(ab')₂片段。根据某些实施方案使用的Fv片段可以通过IgM的优先蛋白水解切割来产生,并且在极少情况下可以通过IgG或IgA免疫球蛋白分子的优先蛋白水解切割来产生。然而,更通常地使用本领域已知的重组技术来衍生Fv片段。Fv片段包括非共价VH::VL异源二聚体,所述非共价VH::VL异源二聚体包括抗原结合位点,所述抗原结合位点保留天然抗体分子的大部分抗原识别和结合能力。参见Inbar等人,《美国国家科学院院刊(PNAS USA)》69:2659-2662,1972;Hochman等人,《生物化学(Biochem.)》15:2706-2710,1976;以及Ehrlich等人,《生物化学》19:4091-4096,1980。

[0145] 在某些实施方案中,设想了单链Fv(scFV)抗体。例如,κ体(I11等人,《蛋白质工程(Prot.Eng.)》10:949-57,1997);微型抗体(Martin等人,《欧洲分子生物学组织杂志(EMBOJ)》13:5305-9,1994);双抗体(Holliger等人,《美国国家科学院院刊》90:6444-8,1993);或Janusins(Traunecker等人,《欧洲分子生物学组织杂志》10:3655-59,1991);以及Traunecker等人,《国际癌症杂志增刊(Int.J.Cancer Suppl.)》7:51-52,1992)可以使用标准分子生物学技术根据本申请中关于选择具有期望的特异性的抗体的教导来制备。

[0146] 单链Fv(scFv)多肽是共价连接的VH::VL异源二聚体,所述共价连接的VH::VL异源二聚体从包含由肽编码性连接子连接的VH和VL编码基因的基因融合物表达。Huston等人

《美国国家科学院院刊》85(16):5879-5883,1988)。已经描述了用于辨别用于将来自抗体V区的天然聚集的但是化学分离的轻多肽链和重多肽链转换成scFv分子的化学结构的多种方法,所述scFv分子将折叠成与抗原结合位点的结构基本上类似的三维结构。参见例如授权给Huston等人的美国专利第5,091,513号和第5,132,405号;以及授权给Ladner等人的美国专利第4,946,778号。

[0147] 在某些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段呈“双抗体”的形式。双抗体是多肽的多聚体,每个多肽包括第一结构域和第二结构域,所述第一结构域包括免疫球蛋白轻链的结合结构域,所述第二结构域包括免疫球蛋白重链的结合结构域,所述两个结构域(例如,通过肽接头)连接但是不能彼此缔合以形成抗原结合位点:抗原结合位点通过多聚体内的一个多肽的第一结构域与多聚体内的另一个多肽的第二结构域缔合来形成(W094/13804)。抗体的dAb片段由VH结构域组成(Ward等人,《自然(Nature)》341:544-546,1989)。双抗体和其它多价或多特异性片段可以例如通过基因融合来构建(参见W094/13804;以及Holliger等人,《美国国家科学院院刊》90:6444-6448,1993)。

[0148] 还包含包括与CH3结构域连接的scFv的微型抗体(参见Hu等人,《癌症研究(CancerRes.)》,56:3055-3061,1996)。还参见Ward等人,《自然》341:544-546,1989;Bird等人,《科学(Science)》242:423-426,1988;Huston等人,《美国国家科学院院刊》85:5879-5883,1988);PCT/US92/09965;W0 94/13804;以及Reiter等人,《自然-生物技术(NatureBiotech.)》14:1239-1245,1996。

[0149] 在使用双特异性抗体的情况下,这些双特异性抗体可以是以各种方式(Holliger和Winter,《生物技术新见(Current Opinion Biotechnol.)》4:446-449,1993)制造,例如以化学方法制备或由杂交瘤制备的常规双特异性抗体,或者可以是上文提到的双特异性抗体片段中的任何双特异性抗体片段。可以仅使用可变结构域来构建没有Fc区的双抗体和scFv,从而潜在地减少抗独特型反应的影响。

[0150] 与双特异性完整抗体相反,双特异性双抗体还可能特别有用,因为它们可以容易地构建并且在大肠杆菌中表达。可以使用噬菌体展示(W094/13804)从文库中容易地选择具有合适结合特异性的双抗体(和许多其它多肽,如抗体片段)。如果双抗体的一个臂保持恒定,例如,具有针对抗原X的特异性,则可以制备文库,其中改变另一个臂并选择具有适当特异性的抗体。双特异性完整抗体可以通过杵臼(knobs-into-holes)工程来制备(Ridgeway等人,《蛋白质工程》,9:616-621,1996)。

[0151] 在某些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段呈UniBody®的形式。

UniBody®是铰链区被去除的IgG4抗体(参见荷兰乌德勒支GenMab(GenMab Utrecht,The Netherlands);还参见例如US20090226421)。这种抗体技术产生预期的治疗窗口长于当前的小抗体形式的治疗窗口的稳定的更小的抗体形式。IgG4抗体被认为是惰性的,因此不与免疫系统相互作用。可以通过消除抗体的铰链区来修饰完全人IgG4抗体,以获得相对于对应的完整IgG4具有不同稳定性性质的半分子片段(GenMab,Utrecht)。将IgG4分子二等分使得仅在UniBody®上留下一个可以与同源抗原(例如,疾病靶标)结合的区域,因此UniBody®仅与靶细胞上的一个位点单价结合。对于某些癌细胞表面抗原,这种单价结合可能不会刺激癌细胞生长,如使用具有相同抗原特异性的二价抗体所看到的,并且因此

UniBody®技术可以为某些类型的癌症提供治疗选项,所述癌症可能对用常规抗体治疗是难治的。当治疗某些形式的癌症时,UniBody®的小尺寸可能是很大的益处,从而允许分子在较大的实体瘤上更好地分布并潜在地增加功效。

[0152] 在某些实施方案中,本文所述的抗体和抗原结合片段呈纳米抗体的形式。微型抗体由单个基因编码,并且在几乎所有原核和真核宿主中有效地产生,所述宿主例如大肠杆菌(参见美国专利第6,765,087号)、霉菌(例如曲霉属(*Aspergillus*)或木霉属(*Trichoderma*))和酵母(例如酵母属(*Saccharomyces*)、克鲁维酵母属(*Kluyvermyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)或毕赤酵母属(*Pichia*)(参见美国专利第6,838,254号)。生产过程是可扩展的,并且已经生产了多千克量的纳米抗体。纳米抗体可以配制成具有长保质期的即用型溶液。纳米克隆方法(Nanoclone method)(参见W0 06/079372)是一种用于基于B细胞的自动化高通量选择来产生针对期望靶标的纳米抗体的专有方法。

[0153] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段呈适体的形式(参见例如Ellington等人,《自然》346,818-22,1990;以及Tuerk等人,《科学》249:505-10,1990,所述文献通过引用并入)。适体的实例包括核酸适体(例如,DNA适体、RNA适体)和肽适体。核酸适体通常是指已经通过重复轮次的体外选择或等效方法(如SELEX(通过指数增强的配体的系统进化技术))工程化以与如小分子、蛋白质、核酸,并且甚至细胞、组织和生物体等各种分子靶标结合的核酸物种。参见例如美国专利第6,376,190号;和第6,387,620号,所述文献通过引用并入。

[0154] 肽适体通常包括在两端处附接到蛋白质支架的可变肽环,所述蛋白质支架是通常将肽适体的结合亲和力增加到与抗体的结合亲和力相当的水平(例如,在纳摩尔范围内)的双重结构约束。在某些实施方案中,可变环长度可以由约10-20个氨基酸(包括其间的所有整数)构成,并且支架可以包括具有良好溶解性和相容性的任何蛋白质。某些示例性的实施方案利用细菌蛋白硫氧还蛋白-A(Thioredoxin-A)作为支架蛋白,可变环插入到还原活性位点内(野生型蛋白中的-Cys-Gly-Pro-Cys-环),其中两个半胱氨酸侧链能够形成二硫桥。用于鉴定肽适体的方法描述于例如通过引用并入的美国申请号2003/0108532中。肽适体选择可以使用本领域中已知的不同系统(包括酵母双杂交系统)执行。

[0155] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段呈高亲合性多聚体的形式。高亲合性多聚体是指使用体外外显子改组和噬菌体展示工程化的多聚体结合蛋白或肽。多个结合结构域相连,从而与单表位免疫球蛋白结构域相比导致更大的亲和力和特异性。参见例如Silverman等人,《自然-生物技术》。23:1556-1561,2005;美国专利第7,166,697号;以及美国申请第2004/0175756号、第2005/0048512号、第2005/0053973号、第2005/0089932号和第2005/0221384号,所述文献通过引用并入。

[0156] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段呈adnectin的形式。adnectin是指源自人纤连蛋白的一类靶向生物制剂,所述人纤连蛋白是一种天然地结合至其它蛋白质的丰富的细胞外蛋白。参见例如通过引用并入的美国申请号2007/0082365、2008/0139791和2008/0220049。adnectin通常由天然纤连蛋白主链以及人纤连蛋白的特定部分的多个靶向结构域组成。靶向结构域可以被工程化以使得adnectin能够特异性地识别NRP2多肽或其表位。

[0157] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段呈抗运载蛋白的形式。抗运载蛋白是指通常由人脂质运载蛋白合成的一类抗体模拟物,所述人脂质运载蛋白是具有由结构刚性框架支撑的高变环区的结合蛋白家族。参见例如美国申请号2006/0058510。抗运载蛋白通常具有约20kDa的大小。抗运载蛋白可以以由八个反平行 β 链(稳定的 β 桶支架)形成的桶结构为特征,所述八个反平行 β 链由四个肽环和一个所连接的 α 螺旋成对连接。在某些方面,在高变环区域中产生实现特异性结合的构象偏差。参见例如Skerra,《欧洲生物化学联合会杂志(FEBS J.)》275:2677-83,2008,其通过引用并入。

[0158] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段呈设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)的形式。DARPin包括一类非免疫球蛋白蛋白,其在药物发现和药物开发中可以提供优于抗体的靶结合优势。在其它用途中,DARPin由于其有利的分子性质(包括小尺寸和高稳定性)非常适合于毒素或其它治疗性有效载荷的体内成像或递送。低成本的细菌产生和许多靶特异性DARPin的快速生成使得DARPin方法可用于药物发现。另外,DARPin可以容易地以多特异性形式生成,从而有可能将效应子DARPin靶向特定器官或用由若干DARPin组成的一个分子靶向多个受体。参见例如Sumppe等人,《药物发现与开发新见(Curr Opin Drug Discov Devel.)》10:153-159,2007;美国申请第2009/0082274号;和PCT/EP2001/10454,所述文献通过引用并入

[0159] 还包括重链二聚体,如来自骆驼科动物和鲨鱼的抗体。骆驼科动物抗体和鲨鱼抗体包含由V样和C样结构域的两条链(两者都没有轻链)构成的同源二聚体对。由于骆驼科动物中的重链二聚体IgG的VH区不必与轻链进行疏水相互作用,因此重链中通常接触轻链的区域在骆驼科动物中变成亲水性氨基酸残基。重链二聚体IgG的VH结构域被称为VHH结构域。鲨鱼Ig-NAR包含一个可变结构域(称为V-NAR结构域)和五个C样恒定结构域(C-NAR结构域)的同源二聚体。

[0160] 在骆驼科动物中,抗体组库的多样性由VH或VHH区中的互补决定区(CDR)1、2和3决定。骆驼VHH区中的CDR3以其相对较长的平均为16个氨基酸的长度为特征(Muyldermans等人,1994,《蛋白质工程》7(9):1129)。这与许多其它物种的抗体的CDR3区形成对比。例如,小鼠VH的CDR3平均具有9个氨基酸。可以通过例如在于2005年2月17日公开的美国专利申请序列号20050037421中公开的方法来产生维持骆驼科动物的可变区的体内多样性的由骆驼科动物衍生的抗体可变区构成的文库。

[0161] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是人源化的。这些实施例涉及通常使用重组技术制备的嵌合分子,所述嵌合分子具有源自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点,并且分子的剩余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可以包含融合到恒定结构域上的完整可变结构域,或者仅植入到可变结构域中的适当框架区上的CDR。表位结合位点可以是野生型的或者可以被一个或多个氨基酸取代修饰。这消除了作为人个体中的免疫原的恒定区,但是仍然存在对外源可变区产生的免疫应答的可能性(LoBuglio等人,《美国国家科学院院刊》86:4220-4224,1989;Queen等人,《美国国家科学院院刊》86:10029-10033,1988;Riechmann等人,《自然》332:323-327,1988)。用于使抗体人源化的说明性方法包括在美国专利第7,462,697号中描述的方法。

[0162] 另一种方法不仅着重于提供人衍生的恒定区,而且还着重于修饰可变区,以尽可能地将其重塑为人形式。已知重链和轻链两者的可变区包含侧翼是四个框架区(FR)的三个

互补决定区 (CDR), 所述三个CDR响应于所讨论的表位而变化并且决定结合能力, 所述四个FR区在给定的物种中相对保守并且推定地为CDR提供支架。当对于特定表位制备非人抗体时, 可以通过将源自非人抗体的CDR移植到存在于待修饰的人抗体中的FR上来对可变区进行“重塑”或“人源化”。已在以下文献中报道这种方法在各种抗体中的应用: Sato等人, 《癌症研究》53:851-856, 1993; Riechmann等人, 《自然》332:323-327, 1988; Verhoeyen等人, 《科学》239:1534-1536, 1988; Kettleborough等人, 《蛋白质工程》4:773-3783, 1991; Maeda等人, 《人抗体与杂交瘤 (Human Antibodies Hybridoma)》2:124-134, 1991; Gorman等人, 《美国国家科学院院刊》88:4181-4185, 1991; Tempest等人, 《生物技术 (Bio/Technology)》9:266-271, 1991; Co等人, 《美国国家科学院院刊》88:2869-2873, 1991; Carter等人, 《美国国家科学院院刊》89:4285-4289, 1992; 以及Co等人, 《免疫学杂志 (J Immunol.)》148:1149-1154, 1992。在一些实施方案中, 人源化抗体保留所有CDR序列 (例如, 含有来自小鼠抗体的所有六个CDR的人源化小鼠抗体)。在其它实施方案中, 人源化抗体具有相对于原始抗体改变的一个或多个CDR (一个、两个、三个、四个、五个、六个), 所述一个或多个CDR也称为“源自”来自原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0163] 在某些实施方案中, 抗体是“嵌合”抗体。在这方面, 嵌合抗体由可操作地连接或以其它方式融合至不同抗体的异源Fc部分的抗体的抗原结合片段组成。在某些实施方案中, Fc结构域或异源Fc结构域是人来源的。在某些实施方案中, Fc结构域或异源Fc结构域是小鼠来源的。在其它实施方案中, 异源Fc结构域可以来自与亲本抗体不同的Ig类别, 包括IgA (包括亚类IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG (包括亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4) 和IgM。在另外的实施方案中, 异源Fc结构域可以由来自不同Ig类别的一个或多个的CH2和CH3结构域组成。如上文关于人源化抗体所述, 嵌合抗体的抗原结合片段可以仅包含本文所述的抗体的CDR中的一个或多个 (例如, 本文所述的抗体的1、2、3、4、5或6个CDR), 或者可以包含整个可变结构域 (VL、VH或两者)。

[0164] 如本文所用, “处于发展疾病或不良反应的风险中”的受试者可能患有或可能不患有可检测的疾病或疾病的症状, 并且可能在本文所述的治疗方法之前可能表现出或可能没有表现出可检测的疾病或疾病的症状。“有风险”表示受试者具有一个或多个风险因素, 所述风险因素是如本文所述并且本领域已知的与疾病的发展相关的可测量参数。具有这些风险因素中的一个或多个风险因素的受试者比没有这些风险因素中的一个或多个风险因素的受试者具有更高的发展疾病或不良反应的概率。

[0165] “生物相容的”是指通常不损害细胞或受试者的生物功能并且不会导致任何程度的不可接受的毒性 (包括过敏原和疾病状态) 的材料或化合物。

[0166] 术语“结合”是指由于例如共价、静电、疏水和离子和/或氢键相互作用 (包括如盐桥和水桥的相互作用) 引起的两个分子之间的直接缔合。

[0167] 术语“耐化学性”是指癌细胞群体在暴露于化学疗法后随时间推移的治疗敏感性的变化, 包括对癌症免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和/或激酶抑制剂中的至少一种的抗性。最终, 化学抗性导致癌症的复发和/或转移, 并且挑战癌症患者的临床结果的改善。它仍然是长期成功的癌症疗法的主要障碍。例如, 约30%的被诊断患有早期乳腺癌的女性最终发展出抗性并最终进展为转移性乳腺癌。化学抗性的分子机制包括转运泵、癌基因、肿瘤抑制基因、线粒体改变、DNA修复、自噬、上皮-间充质转变 (EMT)、癌症干细胞和外泌体产

生的诱导。这些过程可以单独地或彼此组合地经由不同的机制操作,但最终协调以防止响应于特定靶向化学治疗剂的细胞死亡。例如,此类过程提供替代的促生长信号和/或消除或以其它方式减少凋亡途径。因此,减少耐化学性的药物可以在治疗或减少耐化学性癌症中找到应用。

[0168] “编码序列”意指有助于基因的多肽产物的编码的任何核酸序列。相比之下,术语“非编码序列”是指不直接有助于基因的多肽产物的编码的任何核酸序列。

[0169] 在整个本公开中,除非上下文另有要求,否则词语“包括(comprise)”、“包括(comprises)”和“包括(comprising)”将被理解为暗示包含所陈述的步骤或要素或步骤或要素组,但不排除任何其它步骤或要素或步骤或要素的组。

[0170] “由……组成”意指包括且限于短语“由……组成”之后的任何内容。因此,短语“由……组成”指示所列出的要素是必需的或强制性的,并且可以不存在其它要素。“基本上由……组成”意指包括短语之后列出的任何要素,并且限于不干扰或不有助于本公开中针对列出的要素指定的活动或动作的其它要素。因此,短语“基本上由……组成”指示所列出的要素是必需的或强制性的,但其它要素是任选的,并且可以存在或可以不存在,这取决于它们是否实质上影响所列出的要素的活动或动作。

[0171] 在抗体的上下文中,术语“效应子功能”或“ADCC效应子功能”是指该抗体与免疫系统的其它臂接合的能力,包括例如经典补体途径的激活或通过Fc受体的接合。补体依赖性途径主要由C1q与具有聚集的抗体Fc结构域的C1复合物的相互作用驱动。抗体依赖性细胞毒性(ADCC)主要由效应细胞(自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞)的表面的Fc受体(FcR)的相互作用驱动,所述Fc受体与自身结合至靶细胞的IgG的Fc区结合。Fc受体(FcR)是将抗体介导的(体液)免疫应答与细胞效应子功能连接的关键免疫调节受体。已经鉴定了所有类别的免疫球蛋白的受体,包括Fc γ R(IgG)、Fc ϵ RI(IgE)、Fc α RI(IgA)、Fc μ R(IgM)和Fc δ R(IgD)。在白细胞上发现至少三类人IgG的受体:CD64(Fc γ RI)、CD32(Fc γ RIIa、Fc γ RIIb和Fc γ RIIc)和CD16(Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb)。Fc γ RI被归类为高亲和力受体(纳摩尔范围KD),而Fc γ RII和Fc γ RIII是低至中等亲和力(微摩尔范围KD)。在Fc结合时,信号传导途径被触发,这导致介导靶细胞的破坏的各种物质如裂解酶、穿孔素、颗粒酶和肿瘤坏死因子的分泌。ADCC效应子的水平对于人IgG亚型具有不同的功能。尽管这取决于同种型和特异性Fc γ R,但简单地说,ADCC效应子功能对于人IgG1和IgG3是“高”的,并且对于IgG2和IgG4是“低”的。

[0172] 术语“不含内毒素”或“基本上不含内毒素”总体上是指组合物、溶剂和/或容器含有至多痕量(例如,对受试者没有临床不良生理影响的量)的内毒素并且优选地不可检测量的内毒素。内毒素是与某些微生物例如细菌(通常是革兰氏阴性细菌)相关的毒素,但内毒素可以在革兰氏阳性细菌,例如单核细胞增多性李斯特菌中发现。最普遍的内毒素是在各种革兰氏阴性细菌的外膜中发现的脂多糖(LPS)或脂寡糖(LOS),并且其代表这些细菌引起疾病的能力中的中心致病特征。人体中的少量内毒素可能产生发热、血压降低以及炎症和凝血的激活,以及其它不良生理效应。

[0173] 因此,在药物生产中,通常期望的是,从药物产品和/或药物容器中去掉大部分或全部痕量的内毒素,因为即使少量也可能对人产生不良作用。去热原烘箱可以用于此目的,因为通常需要超过300°C的温度来使大多数内毒分解。例如,基于如注射器或小瓶的初级包

装材料,250℃的玻璃温度和30分钟的保持时间的组合通常足以实现内毒素水平的3对数减少。设想了去除内毒素的其它方法,包括例如如本文所述并且本领域中已知的色谱法和过滤方法。

[0174] 可以使用本领域中已知的常规技术来检测内毒素。例如,利用来自马蹄蟹的血液的鲎鱼羊骨细胞裂解物测定是用于检测内毒素的存在的非常灵敏的测定。在该测试中,非常低的LPS水平可能引起鲎裂解物的可检测凝结,这是由于强大的酶促级联反应放大了这一反应。内毒素也可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)进行定量。为了基本上不含内毒素,内毒素水平可以低于约0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.08、0.09、0.1、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9或10EU/mg活性化合物。通常,1ng脂多糖(LPS)对应于约1-10EU。

[0175] 术语“表位”包括能够特异性结合至免疫球蛋白或T细胞受体的任何决定子,优选地多肽决定子。表位包括由抗体结合的抗原的区域。在某些实施方案中,表位决定子包括分子的化学活性表面分组,如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且在某些实施方案中可以具有特定的三维结构特性和/或特定的电荷特性。关于抗原的一级结构(例如,NRP2多肽),表位可以是连续的或非连续的。在特定实施方案中,表位包含本文所述的参考序列(参见例如表N1、表N2)或靶分子的约、至少约、或不超过约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续氨基酸(即,线性表位)或非连续氨基酸(即,构象表位)、由其组成或基本上由其组成。

[0176] “表位”包括能够形成与结合蛋白的可变区结合口袋相互作用的结合相互作用的抗原或其它大分子的部分。此类结合相互作用可以表现为与CDR的一个或多个氨基酸残基的分子间接触。抗原结合可以涉及CDR3或CDR3对。表位可以是线性肽序列(即,“连续”)或可以由非连续氨基酸序列(即,“构象”或“不连续”)组成。结合蛋白可以识别一个或多个氨基酸序列;因此表位可以限定多于一个不同的氨基酸序列。由结合蛋白识别的表位可以通过本领域技术人员熟知的肽图谱和序列分析技术来确定。“隐蔽表位”或“隐蔽结合位点”是蛋白质序列的表位或结合位点,所述表位或结合位点未暴露或基本上受保护以免识别未经修饰的多肽内,但能够被变性或蛋白水解的多肽的结合蛋白识别。在未修饰的多肽结构中未暴露或仅部分暴露的氨基酸序列是潜在的隐蔽表位。如果表位未暴露或仅部分暴露,则表位可能埋入多肽的内部。候选隐蔽表位可以例如通过检查未经修饰的多肽的三维结构来鉴定。

[0177] 术语“半最大有效浓度”或“EC₅₀”是指如本文所述的药剂(例如,抗体)在其下在一些指定的暴露时间之后在基线与最大值之间中途诱导应答的浓度;因此,分级剂量应答曲线(graded dose response curve)的EC₅₀表示化合物的在其下观察到其最大效应的50%的浓度。EC₅₀还表示在体内获得最大效应的50%所需的血浆浓度。类似地,“EC₉₀”是指药剂或组合物的在其下观察到其最大效应的90%的浓度。“EC₉₀”可以从“EC₅₀”和希尔斜率计算,或者可以使用本领域的常规知识直接从数据确定。在一些实施方案中,药剂(例如抗体)的EC₅₀小于约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200或500nM。在一些实施方案中,药剂将具有约1nM或更小的EC₅₀值。

[0178] “免疫应答”意指源自免疫系统的任何免疫学应答,包括来自细胞和肱骨、先天和

适应性免疫系统的应答。示例性的细胞免疫细胞包括例如淋巴细胞、巨噬细胞、T细胞、B细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞、单核细胞及其所有子集。细胞应答包括例如效应子功能、细胞因子释放、吞噬作用、胞葬作用、易位、运输、增殖、分化、激活、抑制、细胞间相互作用、细胞凋亡等。肱骨应答包括例如IgG、IgM、IgA、IgE应答及其对应的效应子功能。

[0179] 如抗体的药剂的“半衰期”可以指药剂相对于其在施用到生物体的血清或组织中时的此类活性或相对于任何其它限定的时间点失去其药理、生理或其它活性的一半所花费的时间。“半衰期”还可以指相对于施用到生物体的血清或组织中时此类量或浓度,或相对于任何其它限定的时间点,药剂的量或浓度减少施用到生物体的血清或组织中的起始量的一半所花费的时间。半衰期可以在血清和/或任何一个或多个选定的组织中测量。

[0180] 术语“调节”和“改变”包括相对于对照通常以统计学上显著或生理学上显著的量或程度“增加”、“增强”或“刺激”以及“降低”或“减少”。“增加的”、“刺激的”或“增强的”量通常是“统计学上显著的”量,并且可以包含相对于通过无组合物(例如,不存在药剂)的情况下或在对照组合物的情况下产生的量增加1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包含所有整数和其之间的范围,例如,1.5、1.6、1.7、1.8等)。“降低的”或“减少的”量通常是“统计学上显著的”量,并且可以包含相对于无组合物(例如,不存在药剂)的情况下或在对照组合物的情况下产生的量减少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含所有整数和其之间的范围)。本文描述了比较和“统计学上显著的”量的实例。

[0181] 术语“迁移细胞”是指能够响应于刺激而从一个位置移动到另一个位置的细胞。示例性的迁移细胞包括免疫细胞,如单核细胞;自然杀伤(NK)细胞;树突状细胞(未成熟或成熟);树突状细胞亚群,包括髓样细胞、浆细胞样细胞(也称为淋巴样细胞)和朗格汉斯细胞(Langerhans cell);巨噬细胞,如组织细胞、如库弗氏细胞(Kupffer's cell)的组织驻留巨噬细胞、CNS中的小胶质细胞、肺泡巨噬细胞和腹膜巨噬细胞;巨噬细胞亚型,如M0、M1、Mox、M2a、M2b和M2c巨噬细胞;嗜中性粒细胞;嗜酸性粒细胞;肥大细胞;嗜碱性粒细胞;B细胞,包括血浆B细胞、记忆B细胞、B-1细胞和B-2细胞;CD45RO(自然T)细胞;CD45RA(记忆T)细胞;CD4辅助性T细胞,包括Th1、Th2和Tr1/Th3细胞;CD8细胞毒性T细胞;调节性T细胞; γ δ T细胞;和胸腺细胞。迁移细胞的其它实例包括成纤维细胞、纤维细胞、肿瘤细胞和干细胞。术语“细胞迁移”是指迁移细胞的移动,并且术语“细胞迁移的调节”是指任何此类迁移细胞的移动的调节。

[0182] 术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”可互换使用,并且意指不限于任何特定长度的氨基酸的聚合物。术语“酶”包括多肽或蛋白质催化剂。术语包括修饰,如肉豆蔻酰化、硫酸化、糖基化、磷酸化和信号序列的添加或缺失。术语“多肽”或“蛋白质”意指氨基酸的一条或多条链,其中每条链包括通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白质可以包括通过肽键非共价和/或共价连接在一起具有由天然蛋白质(即,由天然存在的细胞,特别是非重组细胞、或基因工程化的细胞或重组细胞产生的蛋白质)构成的序列的多条链,并且包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加

和/或取代的分子。在某些实施方案中,多肽是由重组细胞产生的“重组”多肽,所述重组细胞包括一个或多个重组DNA分子,所述重组DNA分子通常由在细胞中无法以其它方式找到的异源多核苷酸序列或多核苷酸序列的组合制成。

[0183] 术语“多核苷酸”和“核酸”包括mRNA、RNA、cRNA、cDNA和DNA。该术语通常是指长度为至少10个碱基的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任一类型的核苷酸的经修饰的形式。该术语包括DNA的单链和双链形式。术语“分离的DNA”和“分离的多核苷酸”和“分离的核酸”是指已经被分离成不含特定物种的总基因组DNA的分子。因此,编码多肽的分离的DNA区段是指含有一个或多个编码序列但基本上从获得所述DNA区段的物种的总基因组DNA分离出去或被纯化成为不含所述总基因组DNA的DNA区段。还包括不对多肽进行编码的非编码多核苷酸(例如,引物、探针、寡核苷酸)。还包括重组载体,包括例如表达载体、病毒载体、质粒、粘粒、噬菌粒、噬菌体、病毒等。

[0184] 另外的编码序列或非编码序列可以但不必存在于本文所述的多核苷酸内,并且多核苷酸可以但不必连接至其它分子和/或支撑材料。因此,多核苷酸或可表达的多核苷酸,无论编码序列本身的长度如何,都可以与其它序列(例如表达控制序列)组合。

[0185] “表达控制序列”包括核酸或相应氨基酸的调节序列,例如启动子、前导子、增强子、内含子、RNA或DNA结合蛋白的识别基序、聚腺苷酸化信号、终止子、内部核糖体进入位点(IRES)、分泌信号、亚细胞定位信号等,其能够影响宿主细胞中的编码序列的转录或翻译或亚细胞或细胞定位。示例性的表达控制序列描述于《基因表达技术:酶学方法(Gene Expression Technology:Methods in Enzymology)》185,加利福尼亚州圣地亚哥学术出版社(Academic Press,San Diego,Calif.), (1990)。

[0186] “启动子”是能够结合细胞中的RNA聚合酶并启动下游(3'方向)编码序列的转录的DNA调节区。如本文所用,启动子序列在其3'末端处由转录起始位点界定,并且向上游(5'方向)延伸,以包括在高于背景时可检测的水平下启动转录所需的最小数量的碱基或元件。转录起始位点(通过用核酸酶S1作图方便地定义)可以在启动子序列以及负责RNA聚合酶的结合的蛋白质结合结构域(共有序列)内找到。真核启动子通常但并不总是含有“TATA”盒和“CAT”盒。除了-10和-35共有序列之外,原核启动子还含有Shine-Dalgarno序列。

[0187] 来自各种不同来源的大量启动子(包括组成型、诱导型和阻遏型启动子)是本领域中熟知的。代表性的来源包括例如病毒、哺乳动物、昆虫、植物、酵母和细菌细胞类型,并且来自这些来源的合适的启动子是容易获得的,或者可以基于在线可公开获得的序列或例如来自如ATCC的保藏机构以及其它商业或个人来源以合成方式制备。启动子可以是单向的(即,在一个方向上启动转录)或双向的(即,在3'或5'方向上启动转录)。启动子的非限制性实例包括例如T7细菌表达系统、pBAD(araA)细菌表达系统、巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子。诱导型启动子包括Tet系统(美国专利5,464,758和5,814,618)、蜕皮激素诱导型系统(No等人,《美国国家科学院院刊》(1996)93(8):3346-3351);T-RExTM系统(加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司(Invitrogen Carlsbad,CA))、LacSwitch[®](加利福尼亚州圣地亚哥Stratagene公司(Stratagene,San Diego,CA))和Cre-ERT三苯氧胺诱导型重组酶系统(Indra等人,《核酸研究(Nuc.Acid.Res.)》(1999)27(22):4324-4327;《核酸研究》(2000)28(23):e99;美国专利第7,112,715号;以及Kramer和Fussenegger,《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》(2005)308:123-144)或本领域已知的适于在期望的细胞中表达的

任何启动子。

[0188] “可表达的多核苷酸”包括cDNA、RNA、mRNA或其它多核苷酸,其包含至少一个编码序列和任选地至少一个表达控制序列(例如转录和/或翻译调节元件)并且可以在引入到细胞(例如,受试者的细胞)中时表达经编码的多肽。

[0189] 可以用于递送可表达的多核苷酸的各种病毒载体包括腺病毒载体、疱疹病毒载体、痘苗病毒体、腺相关病毒(AAV)载体和逆转录病毒载体。在一些情况下,逆转录病毒载体是鼠或禽逆转录病毒的衍生物,或者是慢病毒载体。可以插入单个外源基因的逆转录病毒载体的实例包括但不限于:莫洛尼鼠白血病毒(MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、SIV、BIV、HIV和劳斯肉瘤病毒(RSV)。许多另外的逆转录病毒载体可以并入多个基因。所有这些载体都可以转移或并入选择性标志物的基因,使得可以鉴定和生成经转导的细胞。通过例如将所关注的多肽序列连同对特定靶细胞上的受体的配体进行编码的另一个基因一起插入到病毒载体中,可以使载体具有靶特异性。可以通过插入例如对蛋白质进行编码的多核苷酸来使逆转录病毒载体成为靶特异性的。说明性的靶向可以通过使用抗体靶向逆转录病毒载体来实现。本领域技术人员将已知或可以在没有过度实验的情况下容易地确定可以插入到逆转录病毒基因组中以允许逆转录病毒载体的靶特异性递送的特定多核苷酸序列。

[0190] 在特定实施方案中,可表达的多核苷酸是经修饰的RNA或经修饰的mRNA多核苷酸,例如非天然存在的RNA类似物。在某些实施方案中,经修饰的RNA或mRNA多肽包含一种或多种经修饰的或非天然碱基,例如除腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和/或尿嘧啶(U)之外的核苷酸碱基。在一些实施方案中,经修饰的mRNA包含一个或多个经修饰的或非天然的核苷酸间键。用于递送经编码的治疗性多肽的可表达的RNA多核苷酸描述于例如Kormann等人,《自然-生物技术》29:154-7,2011;以及美国申请第2015/0111248号;第2014/0243399号;第2014/0147454号;和第2013/0245104号,所述文献通过引用以其整体并入。

[0191] 本文提及的术语“分离的”多肽或蛋白质意指主题蛋白质:(1)不含所述主题蛋白质在自然界通常与其一起被发现的至少一些其它蛋白质;(2)基本上不含来自相同来源,例如来自相同物种的其它蛋白质;(3)由来自不同物种的细胞表达;(4)已经与所述主题蛋白质在自然界中与其缔合的多核苷酸、脂质、碳水化合物或其它材料中至少约50%分离;(5)不与“分离的蛋白质”在自然界中与其缔合的蛋白质部分缔合(通过共价或非共价相互作用);(6)与所述主题蛋白质在自然界中不与其缔合的多肽可操作地缔合(通过共价或非共价相互作用);或(7)在自然界中不存在。这种分离的蛋白质可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其它RNA编码,或者可以是合成来源的,或其任何组合。在某些实施方案中,分离的蛋白质基本上不含在其天然环境中发现的会干扰其用途(治疗、诊断、预防、研究或其它)的蛋白质或多肽或其它污染物。

[0192] 在某些实施方案中,可以定义组合物中任何给定药剂(例如,多肽,如抗体)的“纯度”。例如,某些组合物可以包括如多肽药剂的药剂,以蛋白质或重量-重量计,如例如但不限于通过高效液相色谱法(HPLC)所测量的,所述药剂的纯度为至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,包括所有小数和介于其之间的范围,所述HPLC是生物化学和分析化学中常用于分离、鉴定和定量化合物的柱色谱法的熟知形式。

[0193] “脂质纳米颗粒”或“固体脂质纳米颗粒”是指平均直径在约10纳米与约1000纳米之间并且包括可以增溶亲脂性分子的固体脂质核基质的一种或多种球形纳米颗粒。脂质核由表面活性剂(例如,乳化剂)稳定,并且可以包括三甘油酯(例如,三硬脂酸甘油酯)、二甘油酯(例如,山嵛酸甘油酯)、单甘油酯(例如,单硬脂酸甘油酯)、脂肪酸(例如,硬脂酸)、类固醇(例如,胆固醇)和蜡(例如,棕榈酸鲸蜡酯)中的一种或多种,包括其组合。脂质纳米颗粒描述于例如Petriilli等人,《当代药物生物技术(Curr PharmBiotechnol.)》15:847-55, 2014;以及美国专利第6,217,912号;第6,881,421号;第7,402,573号;第7,404,969号;第7,550,441号;第7,727,969号;第8,003,621号;第8,691,750号;第8,871,509号;第9,017,726号;第9,173,853号;第9,220,779号;第9,227,917号;和第9,278,130号,所述文献通过引用以其整体并入。本文所述的某些组合物用一种或多种脂质纳米颗粒配制。

[0194] 术语或“神经纤毛蛋白2相关疾病”或“NRP2相关疾病”是指这样的疾病和病状,其中NRP2活性、表达和/或空间分布在该疾病或病状的病理生理学中起作用。在一些情况下,由本公开的抗NRP2抗体通过改变NRP2与至少一种NRP2配体的相互作用从而影响NRP2活性、信号传导、表达和/或空间分布,来调节NRP2相关疾病。在特定实施方案中,NRP2是NRP2a变体1或变体2,并且NRP2配体是CCL21和/或CCR7。因此,在某些实施方案中,NRP2相关疾病或病状是“NRP2a相关疾病或病状”。示例性的NRP2相关疾病和病状包括但不限于癌症和与癌症相关的疾病或病状,包括癌细胞生长、癌症起始、癌症迁移、癌细胞粘附、侵入、耐化学性和转移。还包括与炎症和自身免疫相关的疾病,以及相关的炎症性疾病,包括与不适当的免疫细胞活化或迁移相关的疾病,如移植物抗宿主病(GVHD)。某些实施方案包括与淋巴发育、淋巴管生成和淋巴损伤相关的疾病,包括例如水肿、淋巴水肿、继发性淋巴水肿、不适当的脂肪吸收和沉积、过量脂肪沉积和血管通透性;与感染(包括潜伏感染)相关的疾病;与过敏性病症/疾病、过敏反应相关的疾病,包括例如慢性阻塞性肺病症(COPD)、嗜中性粒细胞性哮喘、抗嗜中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关的全身性血管炎、全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎性小体相关的疾病和皮肤相关的嗜中性粒细胞介导的疾病,如坏疽性脓皮病;与肉芽肿性炎性疾病相关的疾病,包括结节病和肉芽肿;与纤维化相关的疾病,包括子宫内膜异位症、纤维化、内皮-间充质转化(EMT)和伤口愈合;与不适当的平滑肌收缩性、平滑肌补偿与失代偿、以及不适当的血管平滑肌细胞迁移和/或粘附相关的疾病,与不适当的自噬、吞噬作用和胞葬作用相关的疾病;与神经元疾病、外周神经系统重塑和疼痛感知相关的疾病;与骨骼发育和骨骼重塑相关的疾病。通常,术语“不适当的”是指与病理或疾病状态相关联或引起病理或疾病状态的活动或特性。

[0195] 术语“参考序列”通常是指另一个序列正在与之比较的核酸编码序列或氨基酸序列。本文所述的所有多肽和多核苷酸序列均作为参考序列包括,包括通过名称描述的那些以及在表和序列列表中描述的那些序列。

[0196] 某些实施方案包括本文所述的多肽(例如,抗体)的生物活性“变体”和“片段”,以及对其进行编码的多核苷酸。“变体”含有相对于参考多肽或多核苷酸(参见例如表和序列表)的一个或多个取代、添加、缺失和/或插入。变体多肽或多核苷酸包含与参考序列具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性或相似性或同源性的氨基酸或核苷酸序列,如本文所述,并且基本上保留所述参考序列的活性。还包括由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150或更多个氨基酸或核苷酸组成或与参考序列的不同之处在所述氨基酸或核苷酸的添加、缺失、插入或取代并且基本上保留所述参考序列的活性的序列。在某些实施方案中,添加或缺失包括C末端和/或N末端添加和/或缺失。

[0197] 如本文所使用的,术语“序列同一性”或例如包括“与……50%相同的序列”指代序列在比较窗口内在逐核苷酸的基础上或在逐氨基酸的基础上相同的程度。因此,“序列同一性百分比”可以通过以下来计算:在比较窗口内比较两个最佳比对的序列,确定相同的核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同的氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)出现在这两个序列中的位置的数量以产生匹配位置的数量,用匹配位置的数量除以比较窗口中的位置的总数(即,窗口大小),以及将结果乘以100以产生序列同一性百分比。用于比对比较窗口的序列的最佳比对可以通过算法的计算机化的实施方案(美国威斯康星州麦迪逊科学大道575号遗传学计算机集团(Genetics Computer Group,575Science Drive Madison,Wis.,USA)的威斯康星州遗传学软件包7.0版本中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或者通过检验和通过各种所选的方法中的任何方法产生的最佳比对(即,产生比较窗口内的最高百分比同源性)来进行。还可以参考如例如Altschul等人,《核酸研究》25:3389,1997所公开的BLAST程序家族。

[0198] 术语“溶解度”是指本文提供的药剂(例如,抗体)溶解在液体溶剂中并形成均匀溶液的性质。溶解度通常表示为浓度,或者溶质质量/单位体积溶剂(g溶质/kg溶剂、g/dL(100mL)、mg/ml等)、摩尔浓度、质量摩尔浓度、摩尔分数或者其它类似的浓度描述。单位量的溶剂可以溶解的溶质的最大均衡量是所述溶质在包括温度、压力、pH和溶剂性质在内的指定条件下在所述溶剂中的溶解度。在某些实施方案中,在生理pH或其它pH下,例如在pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、pH 7.4、pH 7.6、pH 7.8或pH 8.0(例如,约pH 5-8)下测量溶解度。在某些实施方案中,在水或生理缓冲液如PBS或NaCl(具有或不具有 NaPO_4)中测量溶解度。在具体实施方案中,在相对较低的pH(例如,pH 6.0)和相对较高的盐(例如,500mM NaCl和10mM NaPO_4)下测量溶解度。在某些实施方案中,在生物流体(溶剂)如血液或血清中测量溶解度。在某些实施方案中,温度可以为约室温(例如,约20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C)或约体温(37°C)。在某些实施方案中,试剂在室温下或在37°C下的溶解度为至少约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90或100mg/ml。

[0199] “受试者”或“有需要的受试者”或“患者”或“有需要的患者”包括哺乳动物受试者,例如人类受试者。

[0200] “基本上”或“实质上”意指几乎完全或完全,例如某一给定量的95%、96%、97%、98%、99%或更多。

[0201] “统计学上显著的”意指结果不太可能偶然发生。统计学显著性可以通过本领域已知的任何方法来确定。常用的显著性度量包括p-值,如果零假设为真,则p值是将发生所观察到的事件的频率或概率。如果获得的p值小于显著性水平,则零假设被否定。在简单的情况下,显著性水平以0.05或更小的p值定义。

[0202] “治疗应答”是指基于一种或多种治疗剂的施用来改善症状(无论是否持续)。

[0203] 如本文所用,术语“治疗有效量”、“治疗剂量”、“预防有效量”或“诊断有效量”是在

施用后引起所需的生物反应所需的药剂(例如,抗NRP2a抗体、免疫疗法药剂)的量。

[0204] 如本文所用,受试者(例如哺乳动物,如人类)或细胞的“治疗”是用于试图改变个体或细胞的自然过程的任何类型的干预。治疗包括但不限于药物组合物的施用,并且可以预防性地或在病理事件开始或与病原体接触之后进行。还包括“预防性”治疗,其可以旨在降低所治疗的疾病或病状的进展速率、延迟所述疾病或病状的发作或降低其发作的严重程度。“治疗”或“预防”不一定指示疾病或病状或其相关症状的完全根除、治愈或预防。

[0205] 术语“野生型”是指在群体中最频繁观察到并且因此任意设计为基因的“正常”或“野生型”形式的基因或基因产物(例如多肽)。

[0206] 除非另外明确说明,否则本说明书中的每个实施方案将适用于任何其它实施方案。

[0207] 抗NRP2a抗体

[0208] 某些实施方案包括结合至人神经纤毛蛋白2a(NRP2a)多肽,特别是人NRP2a变体1(v1)和/或变体2(v2)多肽的抗体及其抗原结合片段。在特定实施方案中,抗体及其抗原结合片段特异性地结合至人NRP2a v1和v2多肽,并且还结合至人NRP2a变体3(v3)多肽。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段选择性地调节(例如,直接或间接干扰、抑制、减少、刺激、增加)人NRP2a v1和/或v2多肽与至少一种NRP2a配体的结合,所述配体如质膜受体、生长因子、信号传导分子、整联蛋白、神经丛或其它配体。NRP2a配体的具体实例包括趋化因子(C-C基序)配体21(CCL21)多肽和/或C-C趋化因子受体7型(CCR7)多肽。

[0209] NRP2是单个跨膜受体,其具有主要胞外区,所述胞外区含有两个CUB结构域(a1/a2组合结构域)、两个因子V/VIII同源结构域(b1/b2组合结构域)、MAM结构域(c结构域)(参见图1A-1B)和将c结构域连接到跨膜结构域(其横穿质膜)的短的近膜区。NRP2通常在体内表达为各种紧密相关的剪接变体的混合物,这些剪接变体通常被分组在一起为NRP2a以及NRP2b,所述NRP2a包括变体v1、v2和v3,所述NRP2b包括变体v4和v5。变体v6是存在于循环中的NRP2的可溶性形式。

[0210] NRP2a和NRP2b剪接变体在a1、a2、b1、b2和c结构域上具有相同的氨基酸序列,但在序列上在近膜区、跨膜区和细胞质区上不同。NRP2a变体v1、v2和v3也基于其选择性剪接模式在这些区上在氨基酸序列上不同,其中与相对较小的NRP2a变体3(909a)相比,NRP2a v1(931aa)和NRP2a v2(926aa)具有更大的插入片段。NRP2a的这些替代剪接形式的不同大小反映在从v1至v2的近膜序列的N末端处的5个氨基酸延伸段的损失,然后进一步损失紧邻v3变体中的5个氨基酸缺失的C末端的17个氨基酸。近膜区、跨膜螺旋和胞质结构域的C末端半部在所有三种NRP2a变体中保持相同。

[0211] 在NRP2a和NRP2b两者中,NRP2的a1a2组合结构域与脑信号蛋白的sema区相互作用,并且b1结构域与脑信号蛋白PSI和Ig样结构域相互作用。NRP2对SEMA3F和3G具有更高的亲和力;相比之下,SEMA 3A、3B和3E优先与NRP1相互作用。NRP1和NRP2对SEMA 3C具有相似的亲和力。NRP2的b1b2组合结构域与含有肝素结合结构域的若干生长因子相互作用,所述生长因子包括VEGF C&D、胎盘生长因子(PIGF)-2、成纤维细胞生长因子(FGF)、半乳凝素、肝细胞生长因子(HGF)、血小板衍生的生长因子(PDGF)和转化生长因子(TGF)- β (参见例如Prud'homme等人,《肿瘤靶标》3:921-939,2012)。NRP2还与各种生长因子特异性受体相互作用,并且与这些受体的相互作用可以独立于与SEMA的结合而发生。在这种情况下,整合素和

生长因子受体如VEGFR2和VEGFR3、TGF- β 受体、c-Met、EGFR、FGFR、PDGFR已显示出与NRP相互作用,并且通常似乎增加每个配体对其受体的亲和力并调节下游信号传导。c结构域(Mam)结构域似乎不是配体结合直接必需的,但可能影响配体特异性、受体信号传导和NRP2二聚化。

[0212] 神经纤毛蛋白-2通过其作为必需的细胞表面受体和各种配体的共受体的作用来调节大范围的细胞功能(参见例如Guo和Vander Kooi,《细胞生物学杂志(J.Cell.Biol.)》290第49期:29120-29126,2015)。另外,最近的数据表明,NRP2a和NRP2b在正常组织中和在某些病理条件下差异表达,表明NRP2剪接变体的相对表达在多种NRP2相关疾病中以上下文相关方式驱动受体串扰方面起关键作用。NRP2a和NRP2b似乎还在广泛的细胞功能中发挥不同且有时相反的作用。因此,同种型特异性抗体的开发具有选择性调节NRP2a变体的活性的前景,并且提供了创造新一代治疗剂的机会,与不能区分这些同种型的其它抗NRP2抗体相比,所述治疗剂具有显著增强的细胞类型选择性、同种型特异性、更高的效力和降低的毒性。

[0213] 神经纤毛蛋白-2表达与正常细胞和癌细胞两者中的细胞可塑性和上皮-间充质转变(EMT)增加相关,从而增加在癌症治疗期间的细胞存活和化学抗性发展(参见例如,Grandclement等人,PLoS ONE 6(7)e20444,2011)。另外,NRP2表达通过TGF- β 暴露而增加,从而导致成纤维细胞和内皮细胞中的EMT和纤维化发展。(参见例如,Pardali等人,《国际分子科学杂志(Int.J.Mol.Sci.)》18:2157,2017)。因此,NRP2a特异性抗体的开发提供了选择性地调节细胞可塑性和存活、耐化学性和纤维化发展的可能性。

[0214] 神经纤毛蛋白-2表达促进淋巴管生成(参见例如Docì等人,《癌症研究》75:2937-2948,2015),并且NRP2中的单核苷酸多态性(SNP)与淋巴管瘤相关(参见例如Miaskowski等人,PLoS ONE 8(4)e60164,2013)。因此,NRP2a特异性抗体的开发提供了选择性地调节这些同种型的功能以调节淋巴管生成和治疗淋巴水肿的可能性。NRP2还调节平滑肌收缩性和平滑肌张力(参见例如Bielenberg等人,《美国病理学杂志(Amer.J.Path.)》181:548-559,2012),因此,NRP2a特异性抗体的开发提供了选择性地调节这些同种型的功能以调节平滑肌收缩性和肌张力的可能性。

[0215] NRP2直接有助于癌症干细胞维持和存活,从而导致肿瘤起始、存活、化学抗性和放射性抗性发展和转移增加(参见例如Goel等人,《EMBO分子医学(EMBO Mol.Med.)》5:488-508,2013;和Samuel等人,PLoS ONE 6(10)e23208,2011),Prud'homme等人,《肿瘤靶标(Oncotarget)》3:921-939,2012)。因此,NRP2a特异性抗体的开发提供了选择性地调节这些同种型的功能以调节癌症干细胞生长、存活、化学抗性和放射性抗性发展和转移的可能性。

[0216] 神经纤毛蛋白-2在免疫系统的各种细胞中表达,所述细胞包括淋巴细胞,如B细胞和T细胞;以及髓样细胞,如嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、树突状细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞,包括组织特异性巨噬细胞,例如,肺泡巨噬细胞。它还在肺和其它组织中的内皮和上皮细胞中以及肌肉细胞中表达(参见例如Bielenberg等人,《美国病理学杂志》181:548-559,2012;Aung等人,PLoS ONE 11(2)e0147358,2016;Schellenburg等人,《分子免疫学(Mol.Imm)》,90:239-244,2017;和Wild等人,《国际实验病理学杂志(Int.J.Exp.Path.)》93:81-103,2012)。NRP2调节免疫细胞活化和迁移(参见例如Mendes-da-Cruz等人,PLoS ONE 9(7)e103405,2014)。因此,NRP2a特异性抗体的开发提供了选择性

地调节这些同种型的功能以调节免疫细胞活化和迁移的可能性,从而提供或开发抗炎剂和免疫调节剂以对抗炎症和自身免疫。

[0217] 神经纤毛蛋白-2还在自噬、内体发育中例如通过调节晚期内体成熟发挥关键作用,所述晚期内体成熟是分别促进感染和凋亡细胞的清除的吞噬作用和胞吞作用的重要方面(参见例如Diaz-Vera等人,《细胞科学杂志(J.Cell.Sci.)》130:697-711,2017;Dutta等人,《癌症研究》76:418-428,2016)。因此,NRP2a特异性抗体的开发提供了选择性地调节这些同种型的功能以调节内体发育、吞噬作用、胞葬作用和自噬的可能性。

[0218] 已知神经纤毛蛋白-2是许多疾病(例如,如本文所描述的“NRP2相关疾病”)的病理生理学中的关键参与者,并且与广泛范围的可溶性配体以及一系列细胞受体和辅因子相互作用,所述可溶性配体包括脑信号蛋白3F、VEGF-C和D以及TGF- β (参见例如表L1和表L2)。NRP2还在树突状细胞上多唾液酸化,并且与趋化因子CCL21及其受体CCR7主动相互作用以介导免疫细胞迁移,并且已经描述了与ILD和RA相关的单核苷酸多态性(参见例如,Rey-Gallardo等人,《糖生物学(Glycobiology)》20:1139-1146,2010;Stahl等人,《自然-遗传学(Nat.Genet.)》42:508-514,2013;和Miller等人,《关节炎与风湿病学(Arthritis Rheum.)》65:3239-3247)。另外,NRP-2的可溶性循环形式是已知的(参见例如,Parker等人,《结构(Structure)》23(4)677-687,2015)。因此,鉴于NRP2在广泛范围的疾病中的病理生理学中发挥的核心作用,显而易见的是,NRP2与NRP2配体(例如,来自表L1和表L2的NRP2配体)之间的相互作用以及调节与针对NRP2的抗体的这些相互作用以选择性地改变相应的生物活性为疾病的治疗提供了广泛的潜力,所述疾病包括NRP2相关疾病。

[0219] 在特定实施方案中,相对于其它NRP2同种型多肽,包括相对于人神经纤毛蛋白-2B(NRP2b)变体4(v4)多肽和/或人NRP2b变体5(V5)多肽,抗体或其抗原结合片段选择性地或优先结合至人NRP2a v1和/或v2多肽。也就是说,在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段基本上不结合至人NRP2b v4多肽或NRP2b v5多肽。某些抗体或其抗原结合片段还结合至人NRP2a v3多肽,并且特定抗体及其抗原结合片段基本上不结合至人NRP2a v3多肽(参见例如图4C)。NRP2多肽的示例性氨基酸序列在下表N1中提供。

[0220]

表 N1. 示例性的人 NRP2 多肽			
名称	残基	序列	SEQ ID NO:
人 NRP2a 变体 1	23-931	QDPDPCGGRLNSKDAGYITSPGYDYPHQNCEWI VYAPEPNQKIVLNFNPHFEIEKHDCYDFIEIRDGDS ESADLLGKHCGNIAPPTIISGSMYIKFTSDYARQG AGFSLRYEIFKTGSEDCSKNFTSPNGTIESPGFPEKYP HNLDCFTILAKPKMEIILQFLIFDLEHDPLQVGEGD CKYDWLDIWDGIPHVGPLIGKYCGTKTPSELRSSSTGI LSLTFHTDMAVAKDGFSARYYLHVHQEPLNFQCNVP LGMESGRIANEQISASSTYS DGRWTPQQSRLHGDDN GWTPNLDNKEYLQVDLRFLTMLTAIATQGAISRET QNGYYVKSYKLEVSTNGEDWMVYRHHGKNHKVFQ ANNDATEVVNLKLHAPLLTRFVRIRPQTWHSIALR LELFGCRVTDAPCSNMLGMLSGLIADSQISASSTQEY LWSPSAARLVSSRSGWFPRIPQAQPGEEWLQVDLGT PKTVKGVIIQGARGGDSITAVEARAFVRKFKVSYSL NGKDWEYIQDPRTPQPCLFEGNMHYDTPDIRRFDPI PAQYVRVYPERWSPAGIGMRLEVLGCDWTDKPTV ETLGPTVKSEETTPYPTTEEATECGENC SFEDDKDL QLPSGFNCNFDLEPCGWMYDHAKWLRTTWASSS SPNDRTFPDDRNFRLRLQSDSQREGQYARLISPPVHLP RSPVCMEFQYQATGGRGVALQVVREASQESKLLWV IREDQGGWVKHGRIILPSYDMEYQIVFEGVIGKGRS GEIAIDDIRISTDVPLENCMEPISAFAGENFKVDIPEIH EREGYEDEIDDEYEVDWSNSSSATSGSGAPSTDKEK SWLYTLDPILITHIAMSSLGVLLGATCAGLLLYCTCSY	89

[0221]

		SGLSSRSCTTLENYNFELYDGLKHKVKMNHQKCCS EA	
人 NRP2a 变体 2	23-926	QDP PPCGRLNSKDAGYITSPGY PQDYPSHQNCEWI VYAPEPNQKIVLNFNPHFEIEKHDCKYDFIEIRDGDS ESADLLGKHCGNIAPPTIISGSM LYIKFTSDYARQG AGFSLRYEIFKTGSEDCSKNFTSPNGTIESPGFPEKYP HNLDCFTILAKPKMEIILQFLIFDLEHDPLQVGE GD CKYDWLDIWDGIPHVGPLIGKYCGTKTPSELRSSTGI LSLTFHTDMAVAKDGFSARYLVHQEPLNFQCNVP LGMESGRIANEQISASSTYS DGRWTPQQSRLHGDDN GWTPNLDSNKEYLQVDLRFLTMLTAIATQGAISRET QNGYYVKSYKLEVSTNGEDWMVYRHGKNHKVFQ ANNDATEVVLNKLHAPLLTRFVRIRPQTWHS GIALR LELFGCRVTDAPCSNMLGMLSGLIADSQISASSTQ EY LWSPSAARLVSSRSGWFPRIPQAQPGEEWLQVDLGT PKTVKGVIIQGARGGDSITAVEARAFVRKFKVSYSL NGKDWEYIQDPRTQQPKLFEGNMHYDTPDIRRFDPI PAQYVRVYPERWSPAGIGMRLEVLGCDWTDSKPTV ETLGPTVKSEETTPYPTEEEATECGENCSFEDDKDL QLPSGFNCNFDLEPCGW MYDHAKWLRTTWASSS SPNDRTFPDDRNFRLRLQSDSQREGQYARLISPPVHLP RSPVCMEFQYQATGGRGVALQVVREASQESKLLWV IREDQGG EWKHGRIILPSYDMEYQIVFEGVIGGRS GEIAIDDIRISTDVPLENCMEPISAFAVDIPEIHEREGY EDEIDDEYEVDWSNSSSATSGSGAPSTDKEKSWLYT LDPILITIIAMSSLG VLLGATCAGLLLYCTCSY SGLSS RSCTTLENYNFELYDGLKHKVKMNHQKCCSEA	90
人 NRP2a 变体 3	23-909	QDP PPCGRLNSKDAGYITSPGY PQDYPSHQNCEWI VYAPEPNQKIVLNFNPHFEIEKHDCKYDFIEIRDGDS ESADLLGKHCGNIAPPTIISGSM LYIKFTSDYARQG AGFSLRYEIFKTGSEDCSKNFTSPNGTIESPGFPEKYP HNLDCFTILAKPKMEIILQFLIFDLEHDPLQVGE GD CKYDWLDIWDGIPHVGPLIGKYCGTKTPSELRSSTGI LSLTFHTDMAVAKDGFSARYLVHQEPLNFQCNVP LGMESGRIANEQISASSTYS DGRWTPQQSRLHGDDN GWTPNLDSNKEYLQVDLRFLTMLTAIATQGAISRET QNGYYVKSYKLEVSTNGEDWMVYRHGKNHKVFQ ANNDATEVVLNKLHAPLLTRFVRIRPQTWHS GIALR LELFGCRVTDAPCSNMLGMLSGLIADSQISASSTQ EY LWSPSAARLVSSRSGWFPRIPQAQPGEEWLQVDLGT PKTVKGVIIQGARGGDSITAVEARAFVRKFKVSYSL NGKDWEYIQDPRTQQPKLFEGNMHYDTPDIRRFDPI PAQYVRVYPERWSPAGIGMRLEVLGCDWTDSKPTV ETLGPTVKSEETTPYPTEEEATECGENCSFEDDKDL QLPSGFNCNFDLEPCGW MYDHAKWLRTTWASSS SPNDRTFPDDRNFRLRLQSDSQREGQYARLISPPVHLP RSPVCMEFQYQATGGRGVALQVVREASQESKLLWV IREDQGG EWKHGRIILPSYDMEYQIVFEGVIGGRS GEIAIDDIRISTDVPLENCMEPISAFAD EYEVDWSNSS SATSGSGAPSTDKEKSWLYTLDPILITIIAMSSLG VLL GATCAGLLLYCTCSY SGLSSRSCTTLENYNFELYDGL	91

<p>[0222]</p> <p>人 NRP2b 变体 4</p>	<p>23-906</p>	<p>KHKVKMNHQKCCSEA</p> <p>QDP PPCGRLNSKDAGYITSPGY PQDYPSHQNCEWI VYAPEPNQKIVLNFNPHFEIEKHDCKYDFIEIRDGDS ESADLLGKHCGNIAPPTIISGSM LYIKFTSDYARQG AGFSLRYEIFKTGSEDCSKNFTSPNGTIESPGFPEKYP HNLDCFTILAKPKMEIILQFLIFDLEHDPLQVGE GD CKYDWLDIWDGIPHVGPLIGKYCGTKTPSELRSSTGI LSLTFHTDMAVAKDGFSARYYL VHQEPLNFQCNVP LGMESGRIANEQISASSTYS DGRWTPQQSRLHGDDN GWTPNLDSNKEYLQVDLRFLTMLTAIATQGAISRET QNGYYVKS YKLEVSTNGEDWMVYRHGKNHKVFQ ANNDATEVVLNKLHAPLLTRFVRIRPQTWHS GIALR LELFGCRVTDAPCSNMLGMLSGLIADSQISASSTQ EY LWSPSAARLVSSRSGWFPRIPQAQPGEEWLQVDLGT PKTVKGVIIQGARGGDSITAVEARAFVRKFKVSYSL NGKDWEYIQDPRTQQPKLFEGNMHYDTPDIRRFDPI PAQYVRVYPERWSPAGIGMRLEVLGCDWTD SKPTV ETLGPTVKSEETTPYPTEEEATECGENCSFEDDKDL QLPSGFNCNFDLEEPCGW MYDHAKWLRTTWASSS SPNDRTFPDDRNFRLRLQSDSQREGQYARLISPPVHLP RSPVCMEFQYQATGGRGVALQVVREASQESKLLWV IREDQGG EWKHGRIILPSYDMEYQIVFEGVIGKGRS GEIAIDDIRISTDVPLENCMEPISAFAGENFKGGTLLP GTEPTVDTVPMQIPAYWYYVMAAGGAVLVLVSV A LALVLHYHRFRYA AKKTDHSITYKTSHYTNGAPLAV EPTLTIKLEQDRGSHC</p>	<p>92</p>
<p>人 NRP2b 变体 5</p>	<p>23-901</p>	<p>QDP PPCGRLNSKDAGYITSPGY PQDYPSHQNCEWI VYAPEPNQKIVLNFNPHFEIEKHDCKYDFIEIRDGDS ESADLLGKHCGNIAPPTIISGSM LYIKFTSDYARQG AGFSLRYEIFKTGSEDCSKNFTSPNGTIESPGFPEKYP HNLDCFTILAKPKMEIILQFLIFDLEHDPLQVGE GD CKYDWLDIWDGIPHVGPLIGKYCGTKTPSELRSSTGI LSLTFHTDMAVAKDGFSARYYL VHQEPLNFQCNVP LGMESGRIANEQISASSTYS DGRWTPQQSRLHGDDN GWTPNLDSNKEYLQVDLRFLTMLTAIATQGAISRET QNGYYVKS YKLEVSTNGEDWMVYRHGKNHKVFQ ANNDATEVVLNKLHAPLLTRFVRIRPQTWHS GIALR LELFGCRVTDAPCSNMLGMLSGLIADSQISASSTQ EY LWSPSAARLVSSRSGWFPRIPQAQPGEEWLQVDLGT PKTVKGVIIQGARGGDSITAVEARAFVRKFKVSYSL NGKDWEYIQDPRTQQPKLFEGNMHYDTPDIRRFDPI PAQYVRVYPERWSPAGIGMRLEVLGCDWTD SKPTV ETLGPTVKSEETTPYPTEEEATECGENCSFEDDKDL QLPSGFNCNFDLEEPCGW MYDHAKWLRTTWASSS SPNDRTFPDDRNFRLRLQSDSQREGQYARLISPPVHLP RSPVCMEFQYQATGGRGVALQVVREASQESKLLWV IREDQGG EWKHGRIILPSYDMEYQIVFEGVIGKGRS GEIAIDDIRISTDVPLENCMEPISAFAGGTLLPGTEPT VDTVPMQIPAYWYYVMAAGGAVLVLVSV ALALVL HYHRFRYA AKKTDHSITYKTSHYTNGAPLAVEPTLTI KLEQDRGSHC</p>	<p>93</p>

[0223] 因此,在特定实施方案中,抗体或其抗原结合片段选择性地或优先结合至来自表 N1 的人 NRP2a v1 和/或 v2 多肽,并且基本上不结合至人 NRP2b v4 多肽或人 NRP2b v5 多肽,例如来自表 N1。某些抗体或其抗原结合片段还结合至来自表 N1 的人 NRP2a v3 多肽,并且一些

抗体及其抗原结合片段基本上不结合至来自表N1的人NRP2a v3多肽。

[0224] 在特定实施方案中,抗体或其抗原结合片段在近膜结构域中的独特表位处结合至人NRP2a v1和/或v2多肽,所述独特表位即存在于人NRP2a v1和/或v2中但不存在于人NRP2b v4或NRP2b v5中的表位。在一些情况下,独特表位存在于人NRP2a v3中,并且在一些情况下,独特表位不存在于人NRP2a v3中。在下表N2中提供了示例性的独特的近膜表位。

表 N2. NRP2a v1 和 v2 的示例性近膜表位			
名称	残基	序列	SEQ ID NO:
NRP2a 近膜变体 1	803-864	PISAFAGENFKVDIPEIHEREGYEDEIDDEYEVD WSNSSSATSGSGAPSTDKEKSWLYTLDP	94
NRP2a 近膜变体 2	803-859	PISAFVDIPEIHEREGYEDEIDDEYEVDWSNSSS ATSGSGAPSTDKEKSWLYTLDP	95
NRP2a v1/v2 独特表位	803-832	PISAFVDIPEIHEREGYEDEIDDEYEVDW	96
NRP2a v1/v2 独特表位	810-832	DIPEIHEREGYEDEIDDEYEVDW	97
[0225] NRP2a v1/v2 独特表位	803-820	PISAFVDIPEIHEREGY	98
NRP2a v1/v2 独特表位	810-820	DIPEIHEREGY	99
NRP2a v1/v2 独特表位	818-832	EGYEDEIDDEYEVDW	100
NRP2a v1/v2 独特表位	803-811	PISAFAVDI	101
NRP2a v1/v2 独特表位	840-859	SGSGAPSTDKEKSWLYTLDP	102
NRP2a v1/v2 独特表位	848-859	DKEKSWLYTLDP	103
NRP2a v1/v2 独特表位	840-851	SGSGAPSTDKEK	104

[0226] 因此,在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段在来自表N2的序列或表位处结合至NRP2a v1或v2多肽。在一些实施方案中,表位包含来自表N2的序列或表位的至少约8、9、10、11或12个连续氨基酸,例如SEQ ID NO:94-104中的任一个,包括其组合。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段结合至连续表位,所述连续表位包含来自表N2的表位。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段结合至不连续表位,所述不连续表位包含来自表N2的一个或多个表位。在具体实施方案中,抗体或其抗原结合片段结合至SEQ ID NO:100,或SEQ ID NO:100的约或至少约8、9、10、11或12个连续氨基酸。

[0227] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段结合至NRP2a v1的神经纤毛蛋白近膜结构域中的表位,例如如SEQ ID NO:94中所定义的残基803-864、813-864、823-864、833-864、843-864、853-864;803-854、803-844、803-834、803-824和/或803-814。在一些实施方案中,至少一种抗体或其抗原结合片段特异性地结合至NRP2a v2的神经纤毛蛋白近膜结构域中的至少一个表位,例如如SEQ ID NO:95中所定义的残基803-859、813-859、823-859、833-859、843-859、853-859;803-849、803-839、803-829、803-819和/或803-809。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段结合至NRP2a v1/v2的神经纤毛蛋白近膜结构域中的至少一个表位,例如如SEQ ID NO:95中所定义的残基818-832、820-832、822-832、824-832、

826-832、818-830、818-828、818-826和/或818-824。

[0228] 在一些实施方案中,所述至少一种抗体或其抗原结合片段特异性地结合NRP2a v1/v2的神经纤毛蛋白近膜结构域中的至少一个表位,例如如SEQ ID NO:95中所定义的残基818-832、820-832、822-832、824-832、826-832或818-830、818-828、818-826和/或818-824。在具体实施方案中,抗体或其抗原结合片段结合至SEQ ID NO:100。

[0229] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以约10pM至约500pM或至约50nM,或约、至少约或不大于约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900pM、1nM、10nM、25nM或50nM的亲和力,或任选地以在约10pM至约500pM、约10pM至约400pM、约10pM至约300pM、约10pM至约200pM、约10pM至约100pM、约10pM至约50pM或约20pM至约500pM、约20pM至约400pM、约20pM至约300pM、约20pM至约200pM、约20pM至约100pM、约20pM至约50pM或约30pM至约500pM、约30pM至约400pM、约30pM至约300pM、约30pM至约200pM、约30pM至约100pM、约30pM至约50pM或约20pM至约200pM、约30pM至约300pM、约40pM至约400pM、约50pM至约500pM、约60pM至约600pM、约70pM至约700pM、约80pM至约800pM、约90pM至约900pM、约100pM至约1nM、约1nM至约5nM、约5nM至约10nM、约10nM至25nM或约25nM至约50nM的范围内的亲和力结合至NRP2a v1和/或v2多肽,以及任选地NRP2a v3多肽,例如,来自表N1的序列和/或来自表N2的表位。

[0230] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段对人NRP2a v1或v2多肽(参见表N1)的结合亲和力比其对NRP2a v3多肽、NRP2b v4多肽和/或NRP2b v5多肽(参见表N1)的结合亲和力强至少约1.5、2、4、6、8、10、20、40、60、80、100、200、400、600、800或1000倍。

[0231] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性地结合至人NRP2a多肽的区域内的至少一个表位,所述人NRP2a多肽结合到至少一种“NRP2a配体”或与至少一种“NRP2a配体”相互作用,包括与人NRP2a v1和/或v2相互作用或可逆地结合至NRP2a v1和/或v2但基本上不与NRP2b v4或NRP2b v5相互作用或基本上不结合至NRP2b v4或NRP2b v5的任何分子。NRP2配体的一般实例在表L1中提供。

表 L1. 示例性的神经纤毛蛋白配体		
配体	NRP1	NRP2
CCL21		+
CCR7		+
VEGF-A121	+	
VEGF-A145		+
VEGF-A165	+	+
VEGF-B167	+	
VEGF-C	+	+
VEGF-D	+	+
VEGF-E	+	
PIGF-2	+	+
VEGFR	+R1 和 R2	+R1、R2、R3
肝素	+	+
Sema3A	+	
Sema3B、C、D、F 和 G	+	+
Plexins A1、A2、A3、A4、D1	+	+
GIPC1、2 和 3	+	+
TGF- β 1、 β 2 和 β 3 受体以及 LAP	+	+
TbRI 和 TbRII	+	+
FGF-1、2、4 和 7	+	+
FGF 受体 1	+	+
肝细胞生长因子受体 (c-Met)		+
整联蛋白 (参见表 N3)	+	+
纤连蛋白	+	
半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素受体	+	+
Li-CAM	+	+
Glat-1	+	
HRS 多肽		+

[0234] 因此,在某些实施方案中,至少一种NRP2a配体选自表L1。“NRP2a配体”的具体实例包括趋化因子(C-C基序)配体21(CCL21)多肽和C-C趋化因子受体7型(CCR7)多肽。示例性的NRP2a配体的氨基酸序列在下表L2中提供。

名称	序列	SEQ ID NO:
人 CCL21 全长	MAQSLALSLLILVLAFGIPRTQGS DGGGAQDCCLKYSQRKIPA KVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKELWVQ QLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKDRGASKTGKKGKSGKCKR TERSQTPKGP	105
人 CCL21 成熟	SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLP RKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKD RGASKTGKKGKSGKCKRTERSQTPKGP	106
人 CCR7 全长	MDLGKPMKSVLVVALLVIFQVCLCQDEV TDDYIGDNTTVDY TLFESLCSKKDVRNFKAWFLPIMYSIICFVGLLGNGLVLT YIFKRLKTM TD TYLLNLAVADILFLLTLPFWAYSAAKSWVFG VHFCKLIFAIYKMSFFSGM LLLLCISIDRYVAIVQAVSAHRHR ARVLLISKLSCVGIWILATVLSIPELLYSDLQRSSEQAMRCSL ITEHVEAFITIQVAQM VIGFLVPLLAMSFCYLVIIRTLQARNF ERNKAIKVIIAVVVVFIVFQLPYN GVVLAQTVANFNITSSTCE LSKQLNIAYDVTYSLACVRCCVNPFLYAFIVGKFRNDLFLKLF KDLGCLSQEQLRQWSSCRHIRRSSMSVEAETTTTFSP	107
人 CCR7 成熟	QDEV TDDYIGDNTTVDYTLFESLCSKKDVRNFKAWFLPIMY SIICFVGLLGNGLVLT YIYFKRLKTM TD TYLLNLAVADILFL LTLPFWAYSAAKSWVFGVHFCKLIFAIYKMSFFSGM LLLLCI SIDRYVAIVQAVSAHRHRARVLLISKLSCVGIWILATVLSIPEL LYSDLQRSSEQAMRCSLITEHVEAFITIQVAQM VIGFLVPLL AMSFCYLVIIRTLQARNFERNKAIKVIIAVVVVFIVFQLPYN GVVLAQTVANFNITSSTCELSKQLNIAYDVTYSLACVRCCVN PFLYAFIVGKFRNDLFLKLFKDLGCLSQEQLRQWSSCRHIRRS SMSVEAETTTTFSP	108

[0236] 因此,在某些实施方案中,至少一种NRP2a配体选自表L2,并且抗NRP2a抗体或其抗原结合片段调节(例如,干扰、抑制、减少)人NRP2a v1和/或v2多肽(例如,选自表N1)与来自表L1或表L2的NRP2a配体或其生物活性片段或变体的结合。

[0237] 在一些方面,至少一种NRP2配体选自CCL21及其受体CCR7。CCR7活性已经涉及多种疾病状态,包括慢性炎症性疾病(Moschovakis等人,2012,《欧洲免疫学杂志》,42:1949-55)、动脉粥样硬化(Luchtefeld等人,2010,《循环(Circulation)》122:1621-28)、HIV感染(Evans等人,2012,《细胞因子和生长因子评论(Cytokine Growth Factor Rev.)》23:151-57)和癌症(Ben-Baruch,2009,《细胞粘附迁移(Cell Adhesion Migration)》3:328-33)。CCR7活性涉及炎症病症,包括炎症肠病(IBD),如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎、组织或器官移植排斥、哮喘、过敏性气道炎症、气道平滑肌增生和纤维化肺病(Gomperts等人,2007,《白细胞生物学杂志(J Leukoc Biol.)》82:449-56;Kawakami等人,2012,《细胞免疫学(Cell Immunol)》2575:24-32;Saunders等人,2009,《临床和实验过敏(Clin Exp Allergy)》39:1684-92)。CCR7活性也与类风湿性关节炎有关(Moschovakis等人,2012,《欧洲免疫学杂志》42:1949-55)。CCR7活性与多发性硬化有关(Aung等人,2010,《神经免疫学杂志(J Neuroimmunol.)》226:158-64)、银屑病(Fan等人,2008,《印度皮肤病学家、性病学家和麻风学家协会(Indian J Dermatol Venereol Leprol.)》74(5):550;Bose等人,2013,《美国病理学杂志(Am J Pathol)》,183(2):413-421)和动脉粥样硬化(Luchtefeld等人,2010,《循环》,10122:1621-28)。CCR7活性与HIV感染和其它感染有关(Evans等人,2012,《细胞因子和

生长因子评论》23:151-57),包括慢性和潜在感染,包括杜氏利什曼原虫感染。

[0238] 各种研究已经揭示CCR7在多种多样的肿瘤细胞中表达,所述肿瘤细胞包括例如套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤、AIDS相关的淋巴瘤、淋巴浆淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、B细胞急性淋巴细胞性白血病、霍奇金病、成人T细胞白血病/淋巴瘤、蕈样肉芽肿、慢性骨髓增生综合征的急变、骨髓增生异常综合征的急变、癌症如乳腺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、胃癌或头颈部鳞状细胞癌和结肠癌作为B细胞慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤、乳腺癌细胞和恶性乳腺肿瘤(参见例如WO 2007/003426)。CCR7还在各种癌症的淋巴结转移中起作用(参见例如,Viola和Lulster,2008,《药理学和毒理学年度评论(Annu Rev Pharmacol Toxicol.)》,48:171-97)。

[0239] 因此,直接调节CCL21结合或CCR7受体信号传导的抗NRP2a抗体将被预期在调节这些疾病和病症中的一种或多种发现用途,包括用于治疗炎性疾病、癌症、组织或器官移植排斥、气道炎症、RA,以及用于治疗和预防潜在和持久感染。

[0240] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是“封闭抗体”,其完全或基本上抑制人NRP2a v1和/或v2多肽与NRP2a配体如人CCL21和/或CCR7之间的结合。在一些实施方案中,在“封闭抗体”与NRP2多肽以基本上化学计量当量预温育后,“封闭抗体”抑制NRP2a v1和/或v2多肽与NRP2配体之间的理论最大结合的约或至少约80-100%(例如,80%、85%、90%、95%或100%)。如本文所使用的,“化学计量当量”是指在给定方程式或反应中一种物质(例如,抗NRP2a抗体)的摩尔数等于或基本上等于至少一种其它物质(例如,NRP2a多肽)的摩尔数的情况。

[0241] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是“部分封闭抗体”,其至少部分地但不完全抑制人NRP2a v1和/或v2多肽与NRP2a配体如人CCL21和/或CCR7之间的结合。在一些实施方案中,在“部分封闭抗体”与NRP2a多肽以基本上化学计量当量预温育后,“部分封闭抗体”抑制NRP2a多肽与NRP2a配体之间的理论最大结合的约或至少约20-80%(例如,20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%)。

[0242] 在具体实施方案中,抗体或其抗原结合片段抑制、阻断或以其它方式减少NRP2a v1或v2多肽与人CCL21多肽之间的结合,例如在体外结合测定中、体外或离体基于细胞的测定中或在体内。在一些实施方案中,例如在抗NRP2a抗体与NRP2a多肽以基本上化学计量当量预温育之后,抗体或其抗原结合片段拮抗或减少人NRP2a v1和/或v2多肽与人CCL21多肽之间的理论最大结合约或至少约20-100%(例如,约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或100%)。

[0243] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性地抑制、阻断或以其它方式减少NRP2a v1或v2多肽与人CCR7多肽之间的结合(例如二聚化),例如在体外结合测定中、体外或离体基于细胞的测定中或在体内。在一些实施方案中,例如在抗NRP2a抗体与NRP2a多肽以基本上化学计量当量预温育之后,抗体或其抗原结合片段拮抗或减少人NRP2a v1和/或v2多肽与人CCR7多肽之间的理论最大结合约或至少约20-100%(例如,约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或100%)。

[0244] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段相对于对照调节CCL21/CCR7介导的信号传导,例如约或至少约20-100%(例如,约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或100%)。CCL21/CCR7介导的信号传导活性的实例包括

但不限于免疫细胞迁移的诱导,包括树突状细胞或成熟T细胞、未成熟T细胞的抑制以及肿瘤或癌细胞迁移的诱导。本文描述了示例性的免疫细胞和肿瘤/癌细胞。

[0245] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段对(i)人NRP2a v1和/或v2多肽和(ii)食蟹猴NRP2多肽的相应区域中的每一个具有亲和力(K_d 或 EC_{50}) (参见例如UniProt G7PL91)、其中对(i)和(ii)的亲和力在约20pM至约200pM、约30pM至约300pM、约40pM至约400pM、约50pM至约500pM、约60pM至约600pM、约70pM至约700pM、约80pM至约800pM、约90pM至约900pM、约100pM至约1nM、约0.4至约1.2nM、约0.9至约5.5nM、约0.9至约5nM或约1nM至约10nM的范围内。

[0246] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段对(i)人NRP2a v1和/或v2多肽和(ii)鼠类NRP2多肽的相应区域中的每一个具有亲和力(K_d 或 EC_{50}),其中对(i)和(ii)的亲和力在约20pM至约200pM、约30pM至约300pM、约40pM至约400pM、约50pM至约500pM、约60pM至约600pM、约70pM至约700pM、约80pM至约800pM、约90pM至约900pM、约100pM至约1nM或约1nM至约10nM的范围内。

[0247] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段相对于对应的鼠类NRP2多肽选择性地结合至人NRP2a v1和/或vNRP2多肽(参见表N1),例如其中其对人NRP2a v1和/或v2多肽的亲和力显著强于其对对应的鼠类NRP2多肽的亲和力,例如约或至少约2、5、10、20、30、40、50、100、500或1000倍或更多。在特定实施方案中,抗体或其抗原结合片段选择性地结合至人NRP2a v1和/或v2多肽,并且基本上不结合至对应的鼠类NRP2多肽。某些示例性的鼠类NRP2多肽包括小家鼠NRP2多肽(参见例如UniProt 035375)。

[0248] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段的特征在于或包含重链可变区(VH)序列和轻链可变区(VL)序列,所述VH序列包含互补决定区VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列,所述VL序列包含互补决定区VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列。示例性的VH、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VL、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列在下表A1和表A2中提供。

[0249]

表 A1: 示例性的 CDR 序列		
描述	序列	SEQ ID NO:
aNRP2-37v2		
V _H CDR1	GFTFSDYALS	1
V _H CDR2	YISSGGDYIYYADTVRG	2
V _H CDR3	GGQDDY	3
V _L CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLQ	4
V _L CDR2	KVSNRFS	5
V _L CDR3	SQSTHVPFT	6
aNRP2-400v2		
V _H CDR1	GYTFRSYGIS	7
V _H CDR2	EIYPRSGNTYYDENFKG	8
V _H CDR3	SSITAVVAIPYYYAMDY	9
V _L CDR1	SASQGISNYLN	10
V _L CDR2	YTSSLHS	11
V _L CDR3	QQYSKLPHT	12
aNRP2-401v2		
V _H CDR1	GFTFSDYGMH	13
V _H CDR2	TISRDINTVYYADTVKG	14
V _H CDR3	GGYTDY	15
V _L CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLY	16
V _L CDR2	KVSNRFS	17
V _L CDR3	SQSTHVLVLT	18
aNRP2-402v2		
V _H CDR1	GFTFSNYAMS	19
V _H CDR2	SISDGGSYTYYPDNVKG	20
V _H CDR3	DGGPREGYFDV	21
V _L CDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE	22
V _L CDR2	KVSNRFS	23
V _L CDR3	FQGSHVPYT	24
aNRP2-403v2		
V _H CDR1	GYTFTSYWMH	25
V _H CDR2	RIDPNSGDTKYNEKFKS	26
V _H CDR3	SYDYALEY	27
V _L CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	28
V _L CDR2	KVSNRFS	29
V _L CDR3	SQNTRVPRT	30
aNRP2-404v2		
V _H CDR1	GYTFTDYNMH	31
V _H CDR2	YIYPYNGDSGYNQRFKS	32
V _H CDR3	LGRGY	33
V _L CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLH	34
V _L CDR2	LVSKLDS	35
V _L CDR3	WQGTHFPWT	36
aNRP2-405v2		
V _H CDR1	GFTFRRYAMS	37
V _H CDR2	TITSGGSYTYYLDSVKG	38
V _H CDR3	HGIYGGFDY	39

[0250]

V _L CDR1	RSSQSIVHSDGNTYLE	40
V _L CDR2	KVSNRFS	41
V _L CDR3	FQGSHPFT	42
aNRP2-406v2		
V _H CDR1	GYSFTGYFMN	43
V _H CDR2	RINPYNGDTFYNQKFKG	44
V _H CDR3	EVAEVPFDY	45
V _L CDR1	KSSQSLLYRSNQKNYLA	46
V _L CDR2	WASTRES	47
V _L CDR3	QYYSYPPT	48
aNRP2-407v2		
V _H CDR1	GYSFTGYMH	49
V _H CDR2	RINPYNGATSYSQNFKD	50
V _H CDR3	EETTAPFTY	51
V _L CDR1	KSSQSLLYSSNQKNYLA	52
V _L CDR2	WASTRES	53
V _L CDR3	QHYYSPPT	54
aNRP2-408v2		
V _H CDR1	GFTFSSYAMS	55
V _H CDR2	SISRGSIYYPDSVKG	56
V _H CDR3	EYYYAMDY	57
V _L CDR1	RASQDIGSRLN	58
V _L CDR2	ATSSLDS	59
V _L CDR3	LQYASSPYT	60
aNRP2-409v3		
V _H CDR1	GFTFNTNAMN	61
V _H CDR2	RIRTKSNNYATYYADSVKD	62
V _H CDR3	LDSSGYVWFAY	63
V _L CDR1	RASQDIGSRLN	64
V _L CDR2	ATSSLDS	65
V _L CDR3	LQYASSPYT	66
aNRP2-401v5		
V _H CDR1	GFTFSDYGMH	130
V _H CDR2	TISRDINTVYYADTVKG	131
V _H CDR3	GGYTDY	132
V _L CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLY	133
V _L CDR2	KVSNRFS	134
V _L CDR3	SQSTHVLV	135
aNRP2-401v6		
V _H CDR1	GFTFSDYGMH	136
V _H CDR2	TISRDINTVYYADTVKG	137
V _H CDR3	GGYTDY	138
V _L CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLY	139
V _L CDR2	KVSNRFS	140
V _L CDR3	AQSTHPLT	141
aNRP2-401v7		
V _H CDR1	GFTFSDYGMH	142
V _H CDR2	TISRSINTVYYADTVKG	143
V _H CDR3	GGYTDY	144

[0251]

V _L CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLY	145
V _L CDR2	KVSNRFS	146
V _L CDR3	AQSTHPLT	147
aNRP2-401v8		
V _H CDR1	GFTFSDYGMH	148
V _H CDR2	TISRDIQTVYYADTVKG	149
V _H CDR3	GGYTDY	150
V _L CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLY	151
V _L CDR2	KVSNRFS	152
V _L CDR3	AQSTHPLT	153
aNRP2-402v9		
V _H CDR1	GFTFSNYAMS	154
V _H CDR2	SISDGGSYTYYPDNVKG	155
V _H CDR3	DGGPREGYFDV	156
V _L CDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE	157
V _L CDR2	KVSNRFS	158
V _L CDR3	FQGSHPVYT	159
aNRP2-401 变体共有序列		
V _H CDR1	GFTFSDYGMH	13
V _H CDR2	X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ ADTVKG	127
V _H CDR3	GX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅	--
V _L CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLY	16
V _L CDR2	KVSNRFS	17
V _L CDR3	X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃	--
关于“X”残基的定义，参见表 E7		

[0252]

表 A2：示例性的多肽序列		
描述	序列	SEQ ID NO:
aNRP2-37v2		
重链可变区 (V _H)	DVKLVESGEGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYALSWVRQT PEKRLEWVAYISSGGDIYYADTVRGRFTISRDNARNTLYL QMSSLQSEDTAIYYCTRGGQDDYWGQGTTLTVSS	67
轻链可变区 (V _L)	DVVMTQTPLSLPVILGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLQW YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVIYFCSQSTHVPFTFGSGTNLEIK	68
aNRP2-400v2		
重链可变区 (V _H)	EVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFRSYGISWVKQ RTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYDENFKGRATLTADKSSSTAF MELRSLTSEDSAVYFCARSSITAVVAIPYYYAMDYWGQGT SVTVSS	69
轻链可变区 (V _L)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKP DGSVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPED IATYYCQQYSKLPHTFGGGTKLELK	70
aNRP2-401v2		
重链可变区 (V _H)	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGMHWVRQ APEKGLEWVATISRDIQTVYYADTVKGRFTISRDNANTL FLQVTSLRSEDTAMYYCTRGGYTDYWGQGTTLTVSS	71

[0253]

轻链可变区 (V _L)	DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLYW YLQRPQGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYFCSQSTHVLTFGGGKLEIK	72
aNRP2-402v2		
重链可变区 (V _H)	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQ TPEKRLEWVASISDGGSYTYYPDNVKGRFTISRDSAKKSL YLQMSHLKSEDTAMYYCTKDGGPREGYFDVWGTGTTVT VSS	73
轻链可变区 (V _L)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGKLEIK	74
aNRP2-403v2		
重链可变区 (V _H)	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVK QRPGRGLEWIGRIDPNSGDTKYNEKFKSKATLTVDKPSST AYMQVSSLTSEDSAVYYCARSYDYALEYWGQGTSVTVSS	75
轻链可变区 (V _L)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHW FLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYFCSQNTRVPRTFGGGKLEIK	76
aNRP2-404v2		
重链可变区 (V _H)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVKQ SHGKSLEWIGYIYPYNGDSGYNQRFKSEATLTVDISSTAY MELRSLTSDSAVYYCARLGRGYWGQGTTLTVSS	77
轻链可变区 (V _L)	DVVMTQTPLTSLVTVGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLHW LFQRPQGQSPRLLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYYCWQGTTHFPWTFGGGKLEIK	78
aNRP2-405v2		
重链可变区 (V _H)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFRRYAMSWVRQ TPEKGLEWVATITSGGSYTYLDSVKGRITISRDNAKNTLY LQMSSLRSEDAMYYCARHGIYGGFDYWGQGTTLTVSS	79
轻链可变区 (V _L)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSDGNTYLEW YLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGIYYCFQGSHPVPTFGSGTKLEIK	80
aNRP2-406v2		
重链可变区 (V _H)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWVKQ SHGKSLEWIGRINPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSSTA HMALLSLTSEDSAVYYCGREVAEVPFDYWGQGTTLTVSS	81
轻链可变区 (V _L)	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYRSNQKNYLA WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPPTFGAGTKLEIK	82
aNRP2-407v2		
重链可变区 (V _H)	EVQLQQSGPELVKPGASVTISCKASGYSFTGYMHWVKQ SHVKSLEWIGRINPYNGATSYSQNFKDKASLTIDKSSSTAY MELHSLTSEDSAVYYCARETTAPFTYWGQGLTVTSA	83
轻链可变区 (V _L)	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLA WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYFCQHYYSYPTFGGGKLEIK	84
aNRP2-408v2		
重链可变区 (V _H)	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQ TPEKRLEWVASISIRGSITYYPDSVKGRFTISRDNAGNLYL QMSSLRSEDAMYYCAREYYYAMDYWGQGTSVTVSS	85

轻链可变区 (V _L)	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSRLNWLQQEPD GTIKRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSEDFV DYYCLQYASSPYTFGGGKLEIK	86
aNRP2-409v3		
重链可变区 (V _H)	EVQFVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTNAMNWVR QAPGKGLEWVARIRTKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQ NILYLQMNNLKTEDTAMYYCVTLDSGGYVWFAYWGQGT LTVSA	87
轻链可变区 (V _L)	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSRLNWLQQEPD GTIKRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSEDFV DYYCLQYASSPYTFGGGKLEIK	88
aNRP2-401v5		
重链可变区 (V _H)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQ APGKGLEWVSTISRDIINTVYYADTVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYTDYWGQGTITVTVSS	160
轻链可变区 (V _L)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLYWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCSQSTHVLTFGGGKLEIK	161
aNRP2-401v6		
重链可变区 (V _H)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQ APGKGLEWVSTISRDIINTVYYADTVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYTDYWGQGTITVTVSS	162
轻链可变区 (V _L)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLYWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCAQSTHPLTFGGGKLEIK	163
aNRP2-401v7		
重链可变区 (V _H)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQ APGKGLEWVSTISRDIINTVYYADTVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYTDYWGQGTITVTVSS	164
轻链可变区 (V _L)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLYWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCAQSTHPLTFGGGKLEIK	165
aNRP2-401v8		
重链可变区 (V _H)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQ APGKGLEWVSTISRDIQTVYYADTVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYTDYWGQGTITVTVSS	166
轻链可变区 (V _L)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLYWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCAQSTHPLTFGGGKLEIK	167
aNRP2-402v9		
重链可变区 (V _H)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQ APGKGLEWVSSISDGGSYTYYPDNVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGPREGYFDVWGKGTITV VSS	168
轻链可变区 (V _L)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW YQQRPGQSPRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCFQGSHPYTFGGGKLEIK	169
aNRP2-401 人源化变体共有序列		
重链可变区 (V _H)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVR QAPGKGLEWVSX ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ ADTV	170

[0254]

	KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ WGQGTTVTVSS	
[0255]	轻链可变区 (V _L) DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHNSGNTYLYWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCX ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ FGGGTKVEIK	171
关于“X”残基的定义，参见表 E7		

[0256] 因此，在某些实施方案中，抗体或其抗原结合片段包含：

[0257] 重链可变区 (VH) 序列，所述 VH 序列包含选自表 A1 的互补决定区 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列以及其特异性地结合至人 NRP2a 多肽或其表位的变体 (例如选自表 N1、表 N2)；以及

[0258] 轻链可变区 (VL) 序列，所述 VL 序列包含选自表 A1 的互补决定区的 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列以及其特异性地结合至人 NRP2 多肽或其表位的变体 (例如选自表 N1、表 N2)。

[0259] 在某些实施方案中，CDR 序列如下：

[0260] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:130-132，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:133-135，包括其变体，所述变体在所有 CDR 区中具有 1、2、3、4、5 或 6 个总改变；

[0261] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:136-138，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:139-141，包括其变体，所述变体在所有 CDR 区中具有 1、2、3、4、5 或 6 个总改变；

[0262] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:142-144，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:145-147，包括其变体，所述变体在所有 CDR 区中具有 1、2、3、4、5 或 6 个总改变；

[0263] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:148-150，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:151-153，包括其变体，所述变体在所有 CDR 区中具有 1、2、3、4、5 或 6 个总改变；

[0264] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:154-156，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:157-159，包括其变体，所述变体在所有 CDR 区中具有 1、2、3、4、5 或 6 个总改变；

[0265] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:1-3，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:4-6，包括其变体；

[0266] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:7-9，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:10-12，包括其变体；

[0267] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:13-15，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:16-18，包括其变体；

[0268] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:19-21，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:22-24，包括其变体；

[0269] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:25-27，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:28-30，包括其变体；

[0270] 所述 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:31-33，并且所述 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 序列分别包含 SEQ ID NO:34-36，包括其变体；

[0271] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:37-39,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:40-42,包括其变体;

[0272] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:43-45,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:46-48,包括其变体;

[0273] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:49-51,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:52-54,包括其变体;

[0274] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:55-57,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:58-60,包括其变体;或者

[0275] 所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:61-63,并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:64-66,包括其变体。

[0276] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段(例如,401抗体或其抗原结合片段的变体)包含CDR共有序列,例如其中所述VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3序列分别包含SEQ ID NO:13、127和GX₁X₂X₃X₄X₅(其中X₁是G、A或S,X₂是Y、F、K、L或R,X₃是T、A、G、I、L、Q或V,X₄是D、A、G、K、N、Q、R或S并且X₅是Y、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T或V),并且所述VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列分别包含SEQ ID NO:16、17和X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃(其中X₆是S、A、G、I、L、P、T或V,X₇是Q、A、G、R或S,X₈是S、A、H、K、L、Q或T,X₉是T、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、V或Y,X₁₀是H、A、D、E、F、G、I、K、L、N、Q、R、S、T或Y,X₁₁是V、A、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T或Y,X₁₂是L、A、E、H、I、N、P、Q、S、T或V并且X₁₃是T、A、D、E、F、G、I、K、L、N、Q、R、S或V)(关于“X”残基的定义,参见表E7)。

[0277] 还包括其变体,包括结合至人NRP2a多肽或其表位的亲和力成熟变体(参见例如表N1、表N2),例如在所有CDR区中具有1、2、3、4、5或6个总改变的变体,例如本文所述的一个或多个V_HCDR1、V_HCDR2、V_HCDR3、V_LCDR1、V_LCDR2和/或V_LCDR3序列。示例性的“改变”包括氨基酸取代、添加和缺失。

[0278] 在某些实施方案中,VH序列与选自表A2的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%的同一性,包括例如其中VH序列在一个或多个框架区域中具有1%、2%、3%、4%或5个改变。

[0279] 在一些实施方案中,VL序列与选自表A2的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%的同一性,包括例如其中VL序列在一个或多个框架区域中具有1个、2个、3个、4个或5个改变。

[0280] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段的VH和VL序列如下:

[0281] 所述VH序列与SEQ ID NO:160至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:161至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0282] 所述VH序列与SEQ ID NO:162至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:163至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0283] 所述VH序列与SEQ ID NO:164至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:165至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0284] 所述VH序列与SEQ ID NO:166至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或

100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:167至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0285] 所述VH序列与SEQ ID NO:168至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:169至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0286] 所述VH序列与SEQ ID NO:67至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:68至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0287] 所述VH序列与SEQ ID NO:69至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:70至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0288] 所述VH序列与SEQ ID NO:71至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:72至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0289] 所述VH序列与SEQ ID NO:73至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:74至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0290] 所述VH序列与SEQ ID NO:75至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:76至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0291] 所述VH序列与SEQ ID NO:77至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:78至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0292] 所述VH序列与SEQ ID NO:79至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:80至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0293] 所述VH序列与SEQ ID NO:81至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:82至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0294] 所述VH序列与SEQ ID NO:83至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:84至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;

[0295] 所述VH序列与SEQ ID NO:85至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:86至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;或

[0296] 所述VH序列与SEQ ID NO:87至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同,并且所述VL序列与SEQ ID NO:88至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同。

[0297] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段的V_H和V_L序列如下:

[0298] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:170,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:171(关于“X”残基的定义,参见表E7);

[0299] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:160,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:161;

[0300] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:162,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:163;

[0301] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:164,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:165;

[0302] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:166,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:167;

[0303] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:168,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:169;

[0304] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:67,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:68;

[0305] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:69,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:70;

[0306] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:71,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:72;

[0307] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:73,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:74;

[0308] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:75,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:76;

[0309] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:77,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:78;

[0310] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:79,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:80;

[0311] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:81,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:82;

[0312] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:83,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:84;

[0313] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:85,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:86;或

[0314] 所述 V_H 序列包括SEQ ID NO:87,并且所述 V_L 序列包括SEQ ID NO:88.

[0315] 还包括其变体,例如在结合至人NRP2a多肽或其表位的一个或多个框架区中具有1、2、3、4或5个改变的变体(参见例如表N1、表N2)。示例性的“改变”包括氨基酸取代、添加和缺失。

[0316] 仅出于说明性目的,抗体或其抗原结合片段、人NRP2a多肽(例如,NRP2a v1和/或v2)和/或NRP2配体(例如,CCL21、CCR7)之间的结合相互作用可以使用各种常规方法检测和定量,所述常规方法包括八位位组(octet)和Biacore测定(例如,用与传感器芯片结合的适当标记的可溶性试剂),用在细胞表面上表达NRP2a多肽的细胞(天然的或重组的)进行的FACS分析、免疫测定、荧光染色测定、ELISA测定和微量量热法,如ITC(等温滴定量热法)。还参见实施例。

[0317] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含变体或以其它方式修饰的Fc区,包括相对于野生型Fc区具有改变的性质或生物活性的那些。经修饰的Fc区的实例包括:例如通过相对于野生型序列取代、插入、缺失或截短一个或多个氨基酸而具有突变的序列的Fc区;由来自不同免疫球蛋白类/亚类的结构域构成的杂交Fc多肽;具有改变的糖基化/唾液酸化模式的Fc多肽;以及例如通过生物素化(参见例如美国申请第2010/0209424号)、磷酸化、硫酸化等修饰或衍生化的Fc多肽;或前述各项的任何组合。相对于抗体或其抗原结合片段的相应野生型Fc序列,此类修饰可以用于改变(例如,增加、减少)Fc区与一个或多个特定FcR(例如,Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、FcRn)的结合性质、其药代动力学性质(例如,稳定性或半衰期、生物利用度、组织分布、分布体积、浓度、消除速率常数、消除速率、曲线下面积(AUC)、清除率、 C_{max} 、 t_{max} 、 C_{min} 、波动)、其免疫原性、其补体固定或活化和/或Fc区的CDC/ADCC/ADCP相关活性,以及本文所述的其它性质。包括人和/或小鼠来源的经修饰的Fc区。

[0318] 还包括包含杂交Fc区的抗体或其抗原结合片段,所述杂交Fc区例如包括来自不同物种(例如,人、小鼠)、不同Ig类和/或不同Ig亚类的免疫球蛋白的Fc结构域(例如,铰链、CH₂、CH₃、CH₄)的组别的Fc区。一般实例包括包含CH₂/CH₃结构域的以下组合、由CH[g4]2[/g4]/CH[g5]3[/g5]结构域的以下组合组成或基本上由CH[g4]2[/g4]/CH[g5]3[/g5]结构域的以下组合组成的杂交Fc区: IgA1/IgA1、IgA1/IgA2、IgA1/IgD、IgA1/IgE、IgA1/IgG1、IgA1/IgG2、IgA1/IgG3、IgA1/IgG4、IgA1/IgM、IgA2/IgA1、IgA2/IgA2、IgA2/IgD、IgA2/IgE、IgA2/IgG1、IgA2/IgG2、IgA2/IgG3、IgA2/IgG4、IgA2/IgM、IgD/IgA1、IgD/IgA2、IgD/IgD、IgD/IgE、IgD/IgG1、IgD/IgG2、IgD/IgG3、IgD/IgG4、IgD/IgM、IgE/IgA1、IgE/IgA2、IgE/IgD、IgE/IgE、IgE/IgG1、IgE/IgG2、IgE/IgG3、IgE/IgG4、IgE/IgM、IgG1/IgA1、IgG1/IgA2、IgG1/IgD、IgG1/IgE、IgG1/IgG1、IgG1/IgG2、IgG1/IgG3、IgG1/IgG4、IgG1/IgM、IgG2/IgA1、IgG2/IgA2、IgG2/IgD、IgG2/IgE、IgG2/IgG1、IgG2/IgG2、IgG2/IgG3、IgG2/IgG4、IgG2/IgM、IgG3/IgA1、IgG3/IgA2、IgG3/IgD、IgG3/IgE、IgG3/IgG1、IgG3/IgG2、IgG3/IgG3、IgG3/IgG4、IgG3/IgM、IgG4/IgA1、IgG4/IgA2、IgG4/IgD、IgG4/IgE、IgG4/IgG1、IgG4/IgG2、IgG4/IgG3、IgG4/IgG4、IgG4/IgM、IgM/IgA1、IgM/IgA2、IgM/IgD、IgM/IgE、IgM/IgG1、IgM/IgG2、IgM/IgG3、IgM/IgG4、IgM/IgM(或其片段或变体),并且任选地包括来自IgA1、IgA2、IgD、IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的一种或多种的铰链和/或来自IgE和/或IgM的CH₄结构域。在具体实施方案中,铰链、CH₂、CH₃和CH₄结构域来自人Ig。

[0319] 另外的实例包括包含CH₂/CH₄结构域的以下组合、由CH[g1]2[/g1]/CH[g2]4[/g2]结构域的以下组合组成或基本上由CH[g1]2[/g1]/CH[g2]4[/g2]结构域的以下组合组成的杂交Fc区: IgA1/IgE、IgA2/IgE、IgD/IgE、IgE/IgE、IgG1/IgE、IgG2/IgE、IgG3/IgE、IgG4/IgE、IgM/IgE、IgA1/IgM、IgA2/IgM、IgD/IgM、IgE/IgM、IgG1/IgM、IgG2/IgM、IgG3/IgM、IgG4/IgM、IgM/IgM(或其片段或变体),并且任选地包含来自IgA1、IgA2、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4中的一种或多种的铰链和/或来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM中的一种或多种的CH₃结构域。在具体实施方案中,铰链、CH₂、CH₃和CH₄结构域来自人Ig。

[0320] 某些实例包括包含CH₃/CH₄结构域的以下组合、由CH[g1]3[/g1]/CH[g2]4[/g2]结构域的以下组合组成或基本上由CH[g1]3[/g1]/CH[g2]4[/g2]结构域的以下组合组成的杂交Fc区: IgA1/IgE、IgA2/IgE、IgD/IgE、IgE/IgE、IgG1/IgE、IgG2/IgE、IgG3/IgE、IgG4/IgE、IgM/IgE、IgA1/IgM、IgA2/IgM、IgD/IgM、IgE/IgM、IgG1/IgM、IgG2/IgM、IgG3/IgM、IgG4/IgM、IgM/IgM(或其片段或变体),并且任选地包含来自IgA1、IgA2、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4中的一种或多种的铰链和/或来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM中的一种或多种的CH₂结构域。在具体实施方案中,铰链、CH₂、CH₃和CH₄结构域来自人Ig。

[0321] 特定实例包括包含铰链/CH₂结构域的以下组合、由铰链/CH[g1]2[/g1]结构域的以下组合组成或基本上由铰链/CH[g1]2[/g1]结构域的以下组合组成的杂交Fc区: IgA1/IgA1、IgA1/IgA2、IgA1/IgD、IgA1/IgE、IgA1/IgG1、IgA1/IgG2、IgA1/IgG3、IgA1/IgG4、IgA1/IgM、IgA2/IgA1、IgA2/IgA2、IgA2/IgD、IgA2/IgE、IgA2/IgG1、IgA2/IgG2、IgA2/IgG3、IgA2/IgG4、IgA2/IgM、IgD/IgA1、IgD/IgA2、IgD/IgD、IgD/IgE、IgD/IgG1、IgD/IgG2、IgD/IgG3、IgD/IgG4、IgD/IgM、IgG1/IgA1、IgG1/IgA2、IgG1/IgD、IgG1/IgE、IgG1/IgG1、IgG1/IgG2、IgG1/IgG3、IgG1/IgG4、IgG1/IgM、IgG2/IgA1、IgG2/IgA2、IgG2/IgD、IgG2/IgE、IgG2/IgG1、IgG2/IgG2、IgG2/IgG3、IgG2/IgG4、IgG2/IgM、IgG3/IgA1、IgG3/IgA2、IgG3/IgD、

IgG3/IgE、IgG3/IgG1、IgG3/IgG2、IgG3/IgG3、IgG3/IgG4、IgG3/IgM、IgG4/IgA1、IgG4/IgA2、IgG4/IgD、IgG4/IgE、IgG4/IgG1、IgG4/IgG2、IgG4/IgG3、IgG4/IgG4、IgG4/IgM(或其片段或变体),并且任选地包含来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM中的一种或多种的CH₃结构域和/或来自IgE和/或IgM的CH₄结构域。在具体实施方案中,铰链、CH₂、CH₃和CH₄结构域来自人Ig。

[0322] 某些实例包括包含铰链/CH₃结构域的以下组合、由铰链/CH[g1]3[/g1]结构域的以下组合组成或基本上由铰链/CH[g1]3[/g1]结构域的以下组合组成的杂交Fc区: IgA1/IgA1、IgA1/IgA2、IgA1/IgD、IgA1/IgE、IgA1/IgG1、IgA1/IgG2、IgA1/IgG3、IgA1/IgG4、IgA1/IgM、IgA2/IgA1、IgA2/IgA2、IgA2/IgD、IgA2/IgE、IgA2/IgG1、IgA2/IgG2、IgA2/IgG3、IgA2/IgG4、IgA2/IgM、IgD/IgA1、IgD/IgA2、IgD/IgD、IgD/IgE、IgD/IgG1、IgD/IgG2、IgD/IgG3、IgD/IgG4、IgD/IgM、IgG1/IgA1、IgG1/IgA2、IgG1/IgD、IgG1/IgE、IgG1/IgG1、IgG1/IgG2、IgG1/IgG3、IgG1/IgG4、IgG1/IgM、IgG2/IgA1、IgG2/IgA2、IgG2/IgD、IgG2/IgE、IgG2/IgG1、IgG2/IgG2、IgG2/IgG3、IgG2/IgG4、IgG2/IgM、IgG3/IgA1、IgG3/IgA2、IgG3/IgD、IgG3/IgE、IgG3/IgG1、IgG3/IgG2、IgG3/IgG3、IgG3/IgG4、IgG3/IgM、IgG4/IgA1、IgG4/IgA2、IgG4/IgD、IgG4/IgE、IgG4/IgG1、IgG4/IgG2、IgG4/IgG3、IgG4/IgG4、IgG4/IgM(或其片段或变体),并且任选地包含来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM中的一种或多种的CH₂结构域和/或来自IgE和/或IgM的CH₄结构域。在具体实施方案中,铰链、CH₂、CH₃和CH₄结构域来自人Ig。

[0323] 一些实例包括包含铰链/CH₄结构域的以下组合、由铰链/CH[g1]4[/g1]结构域的以下组合组成或基本上由铰链/CH[g1]4[/g1]结构域的以下组合组成的杂交Fc区: IgA1/IgE、IgA1/IgM、IgA2/IgE、IgA2/IgM、IgD/IgE、IgD/IgM、IgG1/IgE、IgG1/IgM、IgG2/IgE、IgG2/IgM、IgG3/IgE、IgG3/IgM、IgG4/IgE、IgG4/IgM(或其片段或变体),并且任选地包含来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM中的一种或多种的CH₂结构域和/或来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM中的一种或多种的CH₃结构域。

[0324] 杂交Fc区的具体实例可以在例如WO 2008/147143中找到,其源自IgG亚类的组合或人IgD和IgG的组合。

[0325] 还包括具有衍生化的Fc区或以其它方式修饰的Fc区的抗体或其抗原结合片段。在某些方面,Fc区可以通过例如相对于野生型或天然存在的Fc区的磷酸化、硫酸化、丙烯基化、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等来修饰。在某些实施方案中,Fc区可以包括野生型或天然糖基化模式,或者可替代地,它可以包括相对于天然形式的增加的糖基化、相对于天然形式的减少的糖基化,或者它可以完全去糖基化。作为经修饰的Fc糖型的一个实例,Fc区的减少的糖基化降低了与第一补体组分C1的C1q区的结合、ADCC相关活性的降低和/或CDC相关活性的降低。因此,某些实施方案采用去糖基化的Fc区或无糖基化的Fc区。关于示例性的无糖基化的Fc区的产生,参见例如WO 2005/047337。根据Kabat等人的编号系统,Fc区糖型的另一个实例可以通过用半胱氨酸残基取代Q295位置来产生(参见例如美国申请第2010/0080794号)。某些实施方案可以包括Fc区,其中Fc区中约80-100%的糖蛋白包含缺乏果糖的成熟的核心碳水化合物结构(参见例如美国申请第2010/0255013号)。一些实施方案包括Fc区,所述Fc区通过置换或缺失进行优化以降低岩藻糖基化水平,例如,以增加对Fc γ RI、Fc γ RIa或Fc γ RIIIa的亲合力和/或改善表达Fc γ RIIIa的细胞的吞噬作用(参见美国申

请第2010/0249382号和第2007/0148170号)。

[0326] 作为经修饰的Fc糖型的另一实例,抗体或其抗原结合片段的Fc区可以包含寡甘露糖型N-聚糖,并且相对于含有复合型N-聚糖的对应Fc区任选地具有以下中的一种或多种:ADCC效应子活性增加、对Fc γ RIIIA(和某些其它FcR)的结合亲和力增加、对NRP2a多肽的靶标的结合特异性类似或增加、对NRP2a多肽的靶标的结合亲和力类似或更高和/或对甘露糖受体的结合亲和力类似或更低(参见例如美国申请第2007/0092521号和美国专利第7,700,321号)。作为另一个实例,已经使用通过在经工程化的或变体细胞系中表达抗体而产生的经工程化的糖型实现Fc区对Fc γ R的增强的亲和力(参见例如Umaña等人,《自然-生物技术》17:176-180,1999;Davies等人,《生物技术与生物工程(Biotechnol.Bioeng.)》74:288-294,2001;Shields等人,《生物化学杂志(J Biol Chem.)》277:26733-26740,2002;Shinkawa等人,2003《生物化学杂志》278:3466-3473,2003;以及美国申请第2007/0111281号)。某些Fc区糖型包括增加比例的N-糖苷键型复合糖链,所述N-糖苷键型复合糖链在糖链的还原端处不具有岩藻糖的与N-乙酰氨基葡萄糖的第6位置结合的第1位置(参见例如美国申请第2010/0092997号)。特定实施方案可以包括IgG Fc区,所述IgG Fc区用至少一个半乳糖部分进行糖基化,所述至少一个半乳糖部分通过 α -2,6键连接到相应的末端唾液酸部分,任选地其中Fc区相对于对应的野生型Fc区具有更高的抗炎活性(参见美国申请第2008/0206246号)。这些和相关的改变的糖基化方法中的某些方法已经产生了Fc区选择性地结合FCR(如Fc γ RIII)、介导ADCC和改变Fc区的其它性质的能力的显著增强,如本文所述。

[0327] 相对于对应的野生型Fc序列(例如,同一物种、同一Ig类、同一Ig亚类),抗体或其抗原结合片段的某些变体Fc区、片段Fc区、杂交Fc区或以其它方式修饰的Fc区可能改变与一种或多种FcR的结合和/或效应子功能的相应变化。例如,相对于对应的野生型Fc序列,此类Fc区可以具有增加的与Fc γ 受体、Fc α 受体、Fc ϵ 受体和/或新生儿Fc受体中的一种或多种的结合。在其它实施方案中,相对于对应的野生型Fc序列,变体Fc区、片段Fc区、杂交Fc区或经修饰的Fc区可以具有减少的与Fc γ 受体、Fc α 受体、Fc ϵ 受体和/或新生儿Fc受体中的一种或多种的结合。本文别处描述了特异性FcR。

[0328] 在一些实施方案中,抗体包含Fc结构域,相对于对应的野生型Fc序列,所述Fc结构域包括增加与Fc γ 受体、Fc α 受体、Fc ϵ 受体和/或新生儿Fc受体中的一种或多种的结合的一种或多种突变。在一些实施方案中,抗体包含IgG1或IgG3 Fc结构域,所述IgG1或IgG3 Fc结构域包括相对于对应的野生型Fc序列增加与Fc γ 受体、Fc α 受体、Fc ϵ 受体和/或新生儿Fc受体中的一种或多种的结合的一种或多种突变。在一些实施方案中,抗体包含Fc结构域,所述Fc结构域包含增加效应子功能的一种或多种突变。在一些实施方案中,至少一种抗体包含选自人IgG1和IgG3的Fc结构域,所述Fc结构域包含增加效应子功能的一种或多种突变。

[0329] 在一些实施方案中,抗体是包括具有高效应子活性的Fc结构域的封闭抗体。在一些实施方案中,所述封闭抗体包含选自人IgG1和IgG3的Fc结构域,所述Fc结构域包括增加效应子功能的一种或多种突变。在一些实施方案中,抗体是包括具有高效应子活性的Fc结构域的部分封闭抗体。在一些实施方案中,所述部分封闭抗体包括选自人IgG1和IgG3的Fc结构域,所述Fc结构域包括增加效应子功能的一种或多种突变。在一些实施方案中,抗体是包含具有高效应子活性的Fc结构域的非封闭抗体。在一些实施方案中,非封闭抗体包含选自人IgG1或IgG3的Fc结构域,所述Fc结构域包含增加效应子功能的一种或多种突变。

[0330] 在一些实施方案中,抗体包含Fc结构域,所述Fc结构域包含相对于对应的野生型Fc序列减少与Fc γ 受体、Fc α 受体、Fc ϵ 受体和/或新生儿Fc受体中的一种或多种的结合的一种或多种突变。在一些实施方案中,抗体包含IgG1或IgG3 Fc结构域,所述IgG1或IgG3 Fc结构域包含相对于对应的野生型Fc序列降低与Fc γ 受体、Fc α 受体、Fc ϵ 受体和/或新生儿Fc受体中的一种或多种的结合的一种或多种突变。在一些实施方案中,抗体包含Fc结构域,所述Fc结构域包含降低效应子功能的一种或多种突变。在一些实施方案中,抗体包含选自人IgG2和IgG4的Fc结构域,所述Fc结构域包含降低效应子功能的一种或多种突变。

[0331] 在一些实施方案中,抗体是包含具有低效应子活性的Fc结构域的封闭抗体。在一些实施方案中,封闭抗体包含选自人IgG2和IgG4的Fc结构域,所述Fc结构域包含降低效应子功能的一种或多种突变。在一些实施方案中,抗体是包含具有低效应子活性的Fc结构域的部分封闭抗体。在一些实施方案中,部分封闭抗体包含选自人IgG2和IgG4的Fc结构域,所述Fc结构域包含降低效应子功能的一种或多种突变。在一些实施方案中,抗体是包含具有低效应子活性的Fc结构域的非封闭抗体。在一些实施方案中,非封闭抗体包含选自人IgG2和IgG4的Fc结构域,所述Fc结构域包含降低效应子功能的一种或多种突变。

[0332] 具有改变的(例如,增加的、减少的)效应子功能/FcR结合的Fc变体的具体实例可以在例如美国专利第5,624,821号和第7,425,619号;美国申请第2009/0017023号、第2009/0010921号和第2010/0203046号;以及WO2000/42072和WO 2004/016750中找到。某些实例包含在位置298、333和/或334处具有一种或多种取代,例如S298A、E333A和/或K334A(基于Kabat等人的EU索引的编号)的人Fc区,所述一种或多种取代已经显示出增加与活化受体Fc γ RIIIa的结合并减少与抑制性受体Fc γ RIIb的结合。可以组合这些突变以获得在与FcR结合方面具有进一步改善的双突变变体和三突变变体。某些实施方案包括S298A/E333A/K334A三突变体,所述三突变体具有与Fc γ RIIIa的增加了的结合,与Fc γ RIIb的降低的结合以及增加的ADCC(参见例如Shields等人,《生物化学杂志》276:6591-6604,2001;和Presta等人,《生物化学学会学报(Biochem Soc Trans.)》30:487-490,2002)。还参见具有增加的与FcR的结合的工程化的Fc糖型,如Umana等人,同上;美国专利第7,662,925号中公开的。一些实施方案包括Fc区,所述Fc区包括选自基于Kabat等人的EU索引的434S、252Y/428L、252Y/434S和428L/434S(参见美国申请第2009/0163699号和第20060173170号)的一种或多种取代。

[0333] 相对于对应的野生型Fc序列,某些变体Fc区、片段Fc区、杂交Fc区或经修饰的Fc区可能具有改变的效应子功能。例如,相对于对应的野生型Fc序列,此类Fc区可以具有增加的补体固定或活化、增加的C1q结合亲和力、增加的CDC相关活性、增加的ADCC相关活性和/或增加的ADCP相关活性。在其它实施方案中,相对于对应的野生型Fc序列,此类Fc区可以具有降低的补体固定或活化、降低的C1q结合亲和力、降低的CDC相关活性、降低的ADCC相关活性和/或降低的ADCP相关活性。作为仅一个说明性实例,Fc区可以包括补体结合位点(例如C1q结合位点)中的缺失或取代,和/或ADCC位点中的缺失或取代。此类缺失/取代的实例描述于例如美国专利第7,030,226号中。许多Fc效应子功能,如ADCC,可以根据本领域的常规技术来测定(参见例如Zuckerman等人,《CRC微生物学关键评论(CRC Crit Rev Microbiol.)》7:1-26,1978)。用于此类测定的有用效应细胞包括但不限于天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和其它外周血单核细胞(PBMC)。可替代地或另外地,某些Fc效应子功能可以例如通过采用

Clynes等人《美国国家科学院院刊》95:652-656,1998中描述的动物模型在体内评估。

[0334] 相对于对应的野生型Fc序列,某些变体Fc区、杂交Fc区或经修饰的Fc区可以具有改变的稳定性或半衰期。在某些实施方案中,相对于对应的野生型Fc序列,此类Fc区可以具有增加的半衰期。在其它实施方案中,相对于对应的野生型Fc序列,变体杂交区或经修饰的Fc区可以具有降低的半衰期。根据本领域的常规技术例如放射性标记、ELISA或其它方法,可以在体外(例如,在生理条件下)或体内测量半衰期。稳定性或半衰期的体内测量可以在一种或多种体液或给定组织中测量,所述体液包括血液、血清、血浆、尿液或脑脊液,所述给定组织例如肝脏、肾脏、肌肉、中枢神经系统组织、骨骼等。作为一个实例,改变Fc区结合FcRn能力的对Fc区的修饰可以改变其体内半衰期。用于测量体内药代动力学性质(例如,体内平均消除半衰期)的测定和改变其与FcRn的结合的Fc修饰的非限制性实例描述于例如美国专利第7,217,797号和第7,732,570号;以及美国申请第US2010/0143254号和第2010/0143254号。

[0335] 根据Kabat等人的编号系统,改变稳定性或半衰期的修饰的另外非限制性实例包括在选自CH₂结构域中的251-256、285-290和308-314以及CH₃结构域中的385-389和428-436的氨基酸残基中的一个或多个处的取代/缺失。参见美国申请第2003/0190311号。具体实例包括在位置251处用亮氨酸进行取代,在位置252处用酪氨酸、色氨酸或苯丙氨酸进行取代,在位置254处用苏氨酸或丝氨酸进行取代,在位置255处用精氨酸进行取代,在位置256处用谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸或谷氨酸进行取代,在位置308处用苏氨酸进行取代,在位置309处用脯氨酸进行取代,在位置311处用丝氨酸进行取代,在位置312处用天冬氨酸进行取代,在位置314处用亮氨酸进行取代,在位置385处用精氨酸、天冬氨酸或丝氨酸进行取代,在位置386处用苏氨酸或脯氨酸进行取代,在位置387处用精氨酸或脯氨酸进行取代,在位置389处用脯氨酸、天冬酰胺或丝氨酸进行取代,在位置428处用蛋氨酸或苏氨酸进行取代,在位置434处用酪氨酸或苯丙氨酸进行取代,在位置433处用组氨酸、精氨酸、赖氨酸或丝氨酸进行取代和/或在位置436处用组氨酸、酪氨酸、精氨酸或苏氨酸进行取代,包括其任何组合。相对于对应的野生型Fc区,此类修饰任选地增加Fc区对FcRn的亲合力,并且由此增加半衰期。

[0336] 相对于对应的野生型Fc序列,某些变体Fc区、杂交Fc区或经修饰的Fc区具有改变的溶解度。在某些实施方案中,相对于对应的野生型Fc序列,此类Fc区可以具有增加的溶解度。在其它实施方案中,相对于对应的野生型Fc序列,变体Fc区、杂交Fc区或经修饰的Fc区可以具有降低的溶解度。溶解度可以根据本领域的常规技术例如在体外(例如,在生理条件下)测量。本文别处描述了示例性的溶解度测量。

[0337] 变体的另外的实例包括在重链的位置250、314或428中的一个或多个位置处或其任何组合中(如在位置250和428处,或在位置250和314处,或在位置314和428处,或在位置250、314和428处)具有保守取代或非保守取代(如本文其它地方所述)的IgG Fc区(参见例如美国申请第2011/0183412号)。在具体实施方案中,在位置250处的残基被谷氨酸或谷氨酰胺取代,和/或在位置428处的残基被亮氨酸或苯丙氨酸取代。作为IgG Fc变体的另一个说明性实例,在位置214到238、297到299、318到322和/或327到331处的氨基酸残基中的任何一个或多个氨基酸残基可以用作供修饰(例如,保守或非保守取代、缺失)的合适靶标。在特定实施方案中,IgG Fc变体CH₂结构域在位置228、234、235和/或331处含有氨基酸取代

(例如,具有Ser228Pro和Leu235Ala突变的人IgG4),以减弱Fc区的效应子功能(参见美国专利第7,030,226号)。此处,重链中的残基的编号是EU索引的编号(参见Kabat等人,“免疫学上关注的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”,第5版,马里兰州贝塞斯达国立卫生研究院(National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1991))这些和相关实施方案中的某些实施方案具有改变的(例如,增加的、减少的)FcRn结合和/或血清半衰期,而任选地如ADCC或CDC相关活性等效应子功能未降低。

[0338] 另外的实例包括变体Fc区,所述变体Fc区在野生型Fc区的位置279、341、343或373处包括一种或多种氨基酸取代或其任何组合(参见例如美国申请第2007/0224188号)。人IgG的这些位置处的野生型氨基酸残基是缬氨酸(279)、甘氨酸(341)、脯氨酸(343)和酪氨酸(373)。取代可以是保守的或非保守的,或者可以包括如本文所描述的非天然存在的氨基酸或模拟物。单独地或与这些取代组合,某些实施方案还可以采用变体Fc区,所述变体Fc区包括选自以下的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种氨基酸取代:235G、235R、236F、236R、236Y、237K、237N、237R、238E、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、244L、245R、247A、247D、247E、247F、247M、247N、247Q、247R、247S、247T、247W、247Y、248F、248P、248Q、248W、249L、249M、249N、249P、249Y、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254L、254M、254N、254P、254Q、254R、254V、254W、254Y、255K、255N、256H、256I、256K、256L、256V、256W、256Y、257A、257I、257M、257N、257S、258D、260S、262L、264S、265K、265S、267H、267I、267K、268K、269N、269Q、271T、272H、272K、272L、272R、279A、279D、279F、279G、279H、279I、279K、279L、279M、279N、279Q、279R、279S、279T、279W、279Y、280T、283F、283G、283H、283I、283K、283L、283M、283P、283R、283T、283W、283Y、285N、286F、288N、288P、292E、292F、292G、292I、292L、293S、293V、301W、304E、307E、307M、312P、315F、315K、315L、315P、315R、316F、316K、317P、317T、318N、318P、318T、332F、332G、332L、332M、332S、332V、332W、339D、339E、339F、339G、339H、339I、339K、339L、339M、339N、339Q、339R、339S、339W、339Y、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343A、343D、343E、343F、343G、343H、343I、343K、343L、343M、343N、343Q、343R、343S、343T、343V、343W、343Y、373D、373E、373F、373G、373H、373I、373K、373L、373M、373N、373Q、373R、373S、373T、373V、373W、375R、376E、376F、376G、376H、376I、376L、376M、376N、376P、376Q、376R、376S、376T、376V、376W、376Y、377G、377K、377P、378N、379N、379Q、379S、379T、380D、380N、380S、380T、382D、382F、382H、382I、382K、382L、382M、382N、382P、382Q、382R、382S、382T、382V、382W、382Y、385E、385P、386K、423N、424H、424M、424V、426D、426L、427N、429A、429F、429M、430A、430D、430F、430G、430H、430I、430K、430L、430M、430N、430P、430Q、430R、430S、430T、430V、430W、430Y、431H、431K、431P、432R、432S、438G、438K、438L、438T、438W、439E、439H、439Q、440D、440E、440F、440G、440H、440I、440K、440L、440M、440Q、440T、440V或442K。如上所述,重链中残基的编号是EU索引的编号(参见Kabat等人,同上)。此类变体Fc区通常赋予变体Fc区可操作地附接至其的抗体改变的效应子功能或改变的血清半衰期。优选地,改变的效应子功能是与缺乏此类氨基酸取代的对应Fc区相比,ADCC的增加、ADCC的降低、CDC的增加、CDC的降低、C1q结合亲和力的增加、C1q结合亲和力的降低、FcR(优选地FcRn)结合亲和力的增加或FcR(优选地FcRn)结合亲和力的降低。

[0339] 另外的实例包括变体Fc区,所述变体Fc区在以下位置中的一个或多个位置处包括

氨基酸取代: 221、222、224、227、228、230、231、223、233、234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、246、247、249、250、258、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、278、280、281、283、285、286、288、290、291、293、294、295、296、297、298、299、300、302、313、317、318、320、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335 336和/或428(参见例如,美国专利第7,662,925号)。在具体实施方案中,变体Fc区包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:P230A、E233D、L234E、L234Y、L234I、L235D、L235S、L235Y、L235I、S239D、S239E、S239N、S239Q、S239T、V240I、V240M、F243L、V264I、V264T、V264Y、V266I、E272Y、K274T、K274E、K274R、K274L、K274Y、F275W、N276L、Y278T、V302I、E318R、S324D、S324I、S324V、N325T、K326I、K326T、L328M、L328I、L328Q、L328D、L328V、L328T、A330Y、A330L、A330I、I332D、I332E、I332N、I332Q、T335D、T335R和T335Y。在其它具体实施方案中,变体Fc区包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:V264I、F243L/V264I、L328M、I332E、L328M/I332E、V264I/I332E、S298A/I332E、S239E/I332E、S239Q/I332E、S239E、A330Y、I332D、L328I/I332E、L328Q/I332E、V264T、V240I、V266I、S239D、S239D/I332D、S239D/I332E、S239D/I332N、S239D/I332Q、S239E/I332D、S239E/I332N、S239E/I332Q、S239N/I332D、S239N/I332E、S239Q/I332D、A330Y/I332E、V264I/A330Y/I332E、A330L/I332E、V264I/A330L/I332E、L234E、L234Y、L234I、L235D、L235S、L235Y、L235I、S239T、V240M、V264Y、A330I、N325T、L328D/I332E、L328V/I332E、L328T/I332E、L328I/I332E、S239E/V264I/I332E、S239Q/V264I/I332E、S239E/V264I/A330Y/I332E、S239D/A330Y/I332E、S239N/A330Y/I332E、S239D/A330L/I332E、S239N/A330L/I332E、V264I/S298A/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/S298A/I332E、S239D/V264I/I332E、S239D/V264I/S298A/I332E、S239D/V264I/A330L/I332E、S239D/I332E/A330I、P230A、P230A/E233D/I332E、E272Y、K274T、K274E、K274R、K274L、K274Y、F275W、N276L、Y278T、V302I、E318R、S324D、S324I、S324V、K326I、K326T、T335D、T335R、T335Y、V240I/V266I、S239D/A330Y/I332E/L234I、S239D/A330Y/I332E/L235D、S239D/A330Y/I332E/V240I、S239D/A330Y/I332E/V264T、S239D/A330Y/I332E/K326E和S239D/A330Y/I332E/K326T。在更具体的实施方案中,所述变体Fc区包含选自由以下组成的组的一系列取代:N297D/I332E、F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E、S239D/N297D/I332E、S239E/N297D/I332E、S239D/D265Y/N297D/I332E、S239D/D265H/N297D/I332E、V264E/N297D/I332E、Y296N/N297D/I332E、N297D/A330Y/I332E、S239D/D265V/N297D/I332E、S239D/D265I/N297D/I332E和N297D/S298A/A330Y/I332E。在具体实施方案中,变体Fc区在位置332处(使用EU索引的编号,Kabat等人,同上)包括氨基酸取代。取代的实例包括332A、332D、332E、332F、332G、332H、332K、332L、332M、332N、332P、332Q、332R、332S、332T、332V、332W和332Y。Fc区中的残基的编号是Kabat等人的EU索引的编号。在本文所述的其它性质中,相对于对应的野生型Fc区,此类变体Fc区可以具有对Fc γ R的增加的亲合力、增加的稳定性和/或增加的溶解度。

[0340] 其它实例包括变体Fc区,所述变体Fc区包含以下氨基酸取代中的一种或多种: 224N/Y、225A、228L、230S、239P、240A、241L、243S/L/G/H/I、244L、246E、247L/A、252T、254T/P、258K、261Y、265V、266A、267G/N、268N、269K/G、273A、276D、278H、279M、280N、283G、285R、288R、289A、290E、291L、292Q、297D、299A、300H、301C、304G、305A、306I/F、311R、312N、315D/

K/S、320R、322E、323A、324T、325S、326E/R、332T、333D/G、335I、338R、339T、340Q、341E、342R、344Q、347R、351S、352A、354A、355W、356G、358T、361D/Y、362L、364C、365Q/P、370R、372L、377V、378T、383N、389S、390D、391C、393A、394A、399G、404S、408G、409R、411I、412A、414M、421S、422I、426F/P、428T、430K、431S、432P、433P、438L、439E/R、440G、441F、442T、445R、446A、447E, 任选地其中与亲本Fc多肽相比, 变体具有改变的对Fc配体的识别和/或改变的效应子功能, 并且其中残基的编号是如Kabat等人中的EU索引的编号。这些和相关实施方案的具体实例包括变体Fc区, 所述变体Fc区包括以下取代组或由其组成: (1) N276D、R292Q、V305A、I377V、T394A、V412A和K439E; (2) P244L、K246E、D399G和K409R; (3) S304G、K320R、S324T、K326E和M358T; (4) F243S、P247L、D265V、V266A、S383N和T411I; (5) H224N、F243L、T393A和H433P; (6) V240A、S267G、G341E和E356G; (7) M252T、P291L、P352A、R355W、N390D、S408G、S426F和A431S; (8) P228L、T289A、L365Q、N389S和5440G; (9) F241L、V273A、K340Q和L441F; (10) F241L、T299A、I332T和M428T; (11) E269K、Y300H、Q342R、V422I和G446A; (12) T225A、R301c、S304G、D312N、N315D、L351S和N421S; (13) S254T、L306I、K326R和Q362L; (14) H224Y、P230S、V323A、E333D、K338R和S364C; (15) T335I、K414M和P445R; (16) T335I和K414M; (17) P247A、E258K、D280N、K288R、N297D、T299A、K322E、Q342R、S354A和L365P; (18) H268N、V279M、A339T、N361D和S426P; (19) C261Y、K290E、L306F、Q311R、E333G和Q438L; (20) E283G、N315K、E333G、R344Q、L365P和S442T; (21) Q347R、N361Y和K439R; (22) S239P、S254P、S267N、H285R、N315S、F372L、A378T、N390D、Y391C、F404S、E430K、L432P和K447E; 以及 (23) E269G、Y278H、N325S和K370R, 其中残基的编号是如Kabat等人中的EU索引的编号 (参见例如美国申请第2010/0184959号)。

[0341] 变体Fc区还可以具有如例如在美国申请第2003/0118592号中描述的一个或多个突变的铰链区。例如, 铰链区中的一个或多个半胱氨酸可以缺失或被不同的氨基酸取代。突变的铰链区可以不包括半胱氨酸残基, 或者它可以包含比对应的野生型铰链区少1个、2个或3个的半胱氨酸残基。在一些实施方案中, 相对于野生型Ig铰链区, 具有这种类型的突变的铰链区的Fc区表现出二聚化能力降低。

[0342] 在特定实施方案中, Fc区包括以下、由以下组成或基本上由以下组成: 来自人IgG1或IgG4的Fc (参见例如Allberse和Schuurman, 《免疫学 (Immunology)》105:9-19, 2002), 或其片段或变体。下表F1提供了来自人IgG1和IgG4的示例性序列 (CH1、铰链 (加下划线)、CH2和CH3区)。例如在Peters等人, 《生物化学杂志》287:24525-24533, 2012中描述了可以采用的变体IgG4序列的实例, 并且其包括在以下位置处的取代: C227、C230、C127 (例如, C127S) 和C131 (例如, C131S)。可以使用的其它变体包括IgG4中的L445P取代 (表示为IgG4-2) 或IgG1中的D356E和L358M取代 (表示为IgG1m(zf))。

表 F1.示例性的 IgG4 Fc 序列		
名称	序列	SEQ ID NO:
[0343] 野生型 IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK	109
[0344] S241P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK	110
[0344] IgG1m (za) GenBank: AH007035.2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	111
[0344] κ Km3	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	112

[0345] 如上所述,相对于对应的野生型Fc区,具有改变的Fc区的抗体通常具有改变的(例如,改善的、增加的、减少的)药代动力学性质。药代动力学性质的实例包括稳定性或半衰期、生物利用度(被吸收的药物的分数)、组织分布、分布体积(药物紧接着在被静脉注射且在血浆与周围组织之间达到平衡之后分布的表观体积)、浓度(药物在血浆中的初始或稳态浓度)、消除速率常数(药物从体内去除的速率)、消除速率常数(平衡消除所需的输注速率)、曲线下面积(AUC或暴露;在单次给药后或在稳定状态下,浓度-时间曲线的积分)、清除率(在单位时间内清除药物的血浆体积)、 C_{max} (在口服施用后药物的峰值血浆浓度)、 t_{max} (达到 C_{max} 的时间)、 C_{min} (药物在下一次剂量施用之后达到的最低浓度)和波动(在稳定状态下一次给药间隔内的峰谷波动)。

[0346] 在特定实施方案中,抗体或其抗原结合片段在约pH 7.4、在约生理pH、在约25°C或室温和/或在约37°C或人体温度(例如,体内、在血清中、在给定组织中、在如大鼠、小鼠、猴或人的给定物种中)下具有约或至少约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约12小时、约18小时、约20小时、约24小时、约30小时、约36小时、约40小时、约48小时、约50小时、约60小时、约70小时、约72小时、约80小时、约84小时、约90小时、约96小

时、约120小时或约144小时或更长时间或约1周或约2周或约3周或约4周或约5周或约6周或更长时间的生物半衰期,或包括其间所有范围的任何中间半衰期。

[0347] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有约或至少约60°C、62°C、64°C、66°C、68°C、70°C、72°C、74°C或75°C的 T_m 。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有约60°C或更高的 T_m 。

[0348] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与一种或多种细胞毒性剂或化学治疗剂缀合。细胞毒性剂或化学治疗剂的一般实例包括但不限于烷化剂、抗代谢物、萘环类药物、抗肿瘤抗生素、铂、I型拓扑异构酶抑制剂、II型拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱和紫杉烷。细胞毒性剂或化学治疗剂的具体实例包括但不限于:环磷酰胺、西仑吉肽(cilengitide)、洛莫司汀(CCNU)、美法仑、丙卡巴肼、卡莫斯汀(BCNU)、恩扎妥林(enzastaurin)、白消安、柔红霉素、阿霉素、吉非替尼、厄洛替尼、伊达比星、替莫唑胺、表柔比星、米托蒽醌、博莱霉素、顺铂、卡铂、奥沙利铂、喜树碱、伊立替康、拓扑替康、安吡啶(amsacrine)、依托泊苷、磷酸依托泊苷(etoposide phosphate)、替尼泊苷(teniposide)、替西罗莫司(temsirolimus)、依维莫司(everolimus)、长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛、CT52923、紫杉醇、伊马替尼、达沙替尼、索拉非尼、帕唑帕尼、舒尼替尼、瓦他拉尼(vatalanib)、吉非替尼、厄洛替尼、AEE-788、二氯乙酸盐(dichloroacetate)、泰莫昔芬(tamoxifen)、法舒地尔(fasudil)、SB-681323、司马沙尼(semaxanib)、多奈哌齐(donepezil)、加兰他敏(galantamine)、美金刚(memantine)、卡巴拉汀(rivastigmine)、他克林(tacrine)、雷沙吉兰(rasagiline)、纳曲酮(naltrexone)、鲁比前列酮(lubiprostone)、沙芬酰胺(safinamide)、伊曲茶碱(istradefylline)、匹莫范色林(pimavanserin)、pitolisant、依拉地平(isradipine)、普利多匹定(pridopidine,ACR16)、丁苯那嗪(tetrabenazine)、蓓萨罗丁(bexarotene)、醋酸格拉替雷(glatirimer acetate)、芬戈莫德(fingolimod)和米托蒽醌,包括其药学上可接受的盐和酸。细胞毒性剂或化学治疗剂的另外的实例包括:烷化剂,如噻替派、环磷酰胺(CYTOXANTM);烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮杂环丙烷,如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺(methylamelamine),包含六甲蜜胺(altretamine)、三亚乙基密胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲密胺(trimethylolomelamine);氮芥,如瘤可宁、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲基二乙胺、盐酸甲氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀(uracil mustard);亚硝基脲,如卡莫司汀、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素,如阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素、放线菌素(cactinomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡拉比星(carabycin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧代-L-正亮氨酸(6-

diazo-5-oxo-L-norleucine)、阿霉素、表柔比星、依索比星(esorubicin)、伊达比星、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素、菌酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲菌素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、二脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨、氟尿苷(floxuridine)、5-FU;雄激素,如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺,如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,如亚叶酸(frolic acid);醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;百垂布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吡醌;依氟鸟氨酸(elformithine);依利醋铵(elliptiniumacetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓(gallium nitrate);羟基脲(hydroxyurea);香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidamine);米托胍脘(mitoguanine);米托蒽醌;莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吡啶(nitracrine);喷司他丁;蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星;鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide);丙卡巴肼;PSK;雷佐生(razoxane);西佐喃(sizofiran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;尿烷;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);盖克托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷,如紫杉醇(TAXOL®),新泽西州普林斯顿市百时美施贵宝公司肿瘤学部门(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)和多西紫杉醇(TAXOTERE®),法国安东尼罗纳普朗克乐安公司(Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯嘌呤;氨甲喋呤;铂类似物,如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维本(avelbine);诺安托(novantrone);替尼泊苷;道诺霉素(daunomycin);氨蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸衍生物,如Targretin™(蓓萨罗丁)、Panretin™(阿利维A酸(alitretinoin));ONTAK™(地尼白介素(denileukin diftitox));埃斯波霉素(esperamicin);卡培他滨;以及上述各项中的任一项的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0349] 抗体或其抗原结合片段可以用于本文所描述的组合物、方法和/或试剂盒中的任一种中并且可以与本文所描述的免疫治疗剂中的一种或多种免疫治疗剂组合。

[0350] 另外的治疗剂和组合物

[0351] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与一种或多种另外的治疗剂组合使

用,所述另外的治疗剂包括免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和激酶抑制剂。

[0352] 免疫治疗剂。某些实施方案采用一种或多种癌症免疫治疗剂。在某些情况下,免疫治疗剂调节受试者的免疫应答,例如以增加或维持癌症相关或癌症特异性免疫应答,并且由此导致增加的免疫细胞抑制或癌细胞的减少。示例性的免疫治疗剂包括多肽,例如抗体及其抗原结合片段、配体和小肽以及它们的混合物。还包括作为小分子、细胞(例如,免疫细胞如T细胞)、各种癌症疫苗、基因疗法或其它基于多核苷酸的药剂的免疫治疗剂,包括病毒剂如溶瘤病毒,以及本领域已知的其它药剂。因此,在某些实施方案中,癌症免疫治疗剂选自免疫检查点调节剂、癌症疫苗、溶瘤病毒、细胞因子和基于细胞的免疫疗法中的一种或多种。

[0353] 在某些实施方案中,癌症免疫治疗剂是免疫检查点调节剂。特定实例包括一种或多种抑制性免疫检查点分子的“拮抗剂”和一种或多种刺激性免疫检查点分子的“激动剂”。通常,免疫检查点分子是免疫系统的组分,其增强信号(共刺激分子)或减弱信号,所述组分的靶向在癌症中具有治疗潜力,因为癌细胞可以扰乱免疫检查点分子的自然功能(参见例如Sharma和Allison,《科学》348:56-61,2015;Topalian等人,《癌细胞(Cancer Cell)》27:450-461,2015;Pardoll,《自然癌症综述(Nature Reviews Cancer)》12:252-264,2012)。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂(例如拮抗剂、激动剂)“结合”或“特异性地结合”至一个或多个免疫检查点分子,如本文所述。

[0354] 在特定实施方案中,免疫检查点调节剂是多肽或肽。术语“肽”和“多肽”在本文中可互换使用,然而,在某些情况下,术语“肽”可以指较短的多肽,例如由约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸组成的多肽,包括其间的所有整数和范围(例如,5-10、8-12、10-15)。多肽和肽可以由如本文所述的天然存在的氨基酸和/或非天然存在的氨基酸组成。

[0355] 抗体还作为多肽被包括。因此,在一些实施方案中,免疫检查点调节性多肽药剂是如本文其它地方所描述的抗体或其“抗原结合片段”。

[0356] 在一些实施方案中,药剂是或包含免疫检查点分子的“配体”,例如天然配体。“配体”通常是指与靶分子(例如,生物分子)形成复合物以用作生物学目的的物质或分子,并且包括“蛋白质配体”,其通常通过结合至靶分子或靶蛋白上的位点来产生信号。因此,某些药剂是蛋白质配体,其在自然界中结合至免疫检查点分子并产生信号。还包括“经修饰的配体”,例如与药代动力学调节剂(例如源自免疫球蛋白的Fc区)融合的蛋白质配体。

[0357] 多肽的结合性质可以使用本领域熟知的方法定量(参见Davies等人,《生物化学年度评论》59:439-473,1990)。在一些实施方案中,多肽以约或范围为约 $\leq 10^{-7}$ 至约 10^{-8} M的平衡解离常数与靶分子(例如,免疫检查点分子或其表位)特异性结合。在一些实施方案中,平衡解离常数为约或范围为约 $\leq 10^{-9}$ M至约 $\leq 10^{-10}$ M。在某些说明性实施方案中,多肽对本文所述的靶标(所述多肽与其特异性结合)的亲和力(Kd或 EC_{50})为约、至少约或小于约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40或50nM。

[0358] 在一些实施方案中,药剂是“小分子”,其是指具有合成或生物来源(生物分子)的有机化合物,但通常不是聚合物。有机化合物是指一大类化合物,其分子含有碳,通常不包括仅含有碳酸盐、简单的碳氧化物或氰化物的化合物。“生物分子”通常指由活生物体产生

的有机分子,包括如肽、多糖以及核酸的大聚合物分子(生物聚合物)以及如初级次级代谢产物、脂质、磷脂、糖脂、固醇、甘油酯、维生素和激素的小分子。“聚合物”通常是指由重复结构单元组成的大分子或高分子,所述重复结构单元通常通过共价化学键连接。

[0359] 在某些实施方案中,小分子的分子量为约或小于约1000-2000道尔顿,通常在约300与700道尔顿之间,并且包括约或小于约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000或2000道尔顿。

[0360] 某些小分子可以具有针对本文的多肽如抗体描述的“特异性结合”特性。例如,在一些实施方案中,小分子以约、至少约或小于约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40或50nM的结合亲和力(K_d或EC₅₀)特异性地结合至靶标,例如免疫检查点分子。

[0361] 在一些实施方案中,免疫检查点调节剂是一种或多种抑制性免疫检查点分子的拮抗剂或抑制剂。示例性的抑制性免疫检查点分子包括程序性死亡-配体1(PD-L1)、程序性死亡-配体2(PD-L2)、程序性死亡受体1(PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)、吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)、色氨酸2,3-双加氧酶(TDO)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3(TIM-3)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)、T细胞活化V结构域Ig抑制剂(VISTA)、B和T淋巴细胞弱化子(BTLA)、CD160以及具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)。

[0362] 在某些实施方案中,药剂是PD-1(受体)拮抗剂或抑制剂,已经显示其靶向在肿瘤环境中恢复免疫功能(参见,例如Phillips等人,《国际免疫学杂志(Int Immunol.)》27:39-46,2015)。PD-1是属于免疫球蛋白超家族并在T细胞和祖B细胞上表达的细胞表面受体。PD-1与两种配体PD-L1和PD-L2相互作用。PD-1例如通过减少或防止T细胞的活化来充当抑制性免疫检查点分子,所述减少或防止进而降低自身免疫并且促进自身耐受。PD-1的抑制效应至少部分地通过促进淋巴结中的抗原特异性T细胞的细胞凋亡,同时还减少调节性T细胞(抑制性T细胞)中的细胞凋亡的双重机制来实现。PD-1拮抗剂或抑制剂的一些实例包括与PD-1特异性结合并且减少其免疫抑制活性(例如,其下游信号传导或与其与PD-L1的相互作用)中的一种或多种免疫抑制活性的抗体或抗原结合片段或小分子。PD-1拮抗剂或抑制剂的具体实例包括抗体纳武单抗、帕博利珠单抗、PDR001、MK-3475、AMP-224、AMP-514和匹地利珠单抗和其抗原结合片段(参见例如美国专利第8,008,449号、第8,993,731号、第9,073,994号、第9,084,776号、第9,102,727号、第9,102,728号、第9,181,342号、第9,217,034号、第9,387,247号、第9,492,539号、第9,492,540号和美国申请第2012/0039906号、第2015/0203579号)。

[0363] 在一些实施方案中,药剂是PD-L1拮抗剂或抑制剂。如上所述,PD-L1是PD-1受体的天然配体之一。PD-L1拮抗剂或抑制剂的一般实例包括与PD-L1特异性结合并且减少其免疫抑制活性(例如,其与PD-1受体的结合)中的一种或多种免疫抑制活性的抗体或抗原结合片段或小分子。PD-L1拮抗剂的具体实例包括抗体阿特朱单抗(MPDL3280A)、阿维鲁单抗(MSB0010718C)和度伐单抗(MEDI4736)和其抗原结合片段(参见例如美国专利第9,102,725号;第9,393,301号;第9,402,899号;第9,439,962号)。

[0364] 在一些实施方案中,药剂是PD-L2拮抗剂或抑制剂。如上所述,PD-L2是PD-1受体的天然配体之一。PD-L2拮抗剂或抑制剂的一般实例包含与PD-L2特异性结合并且减少其免疫

抑制活性(例如,其与PD-1受体的结合)中的一种或多种免疫抑制活性的抗体或抗原结合片段或小分子。

[0365] 在一些实施方案中,所述药剂是CTLA-4拮抗剂或抑制剂。CTLA4或CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4),也被称为CD152(分化簇152),是例如通过在与抗原呈递细胞表面上的CD80或CD86结合时向T细胞传递抑制信号来充当抑制性免疫检查点分子的蛋白质受体。CTLA-4拮抗剂或抑制剂的一般实例包括特异性地结合至CTLA-4的抗体或抗原结合片段或小分子。特定实例包括抗体伊匹单抗和曲美木单抗和其抗原结合片段。据信,伊匹单抗的活性中的至少一些活性由表达CTLA-4的抑制因子Treg的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)杀伤介导。

[0366] 在一些实施方案中,药剂是IDO拮抗剂或抑制剂,或TDO拮抗剂或抑制剂。IDO和TDO是具有免疫抑制性质的色氨酸分解代谢酶。例如,已知IDO抑制T细胞和NK细胞,生成并激活Treg和髓源性抑制细胞,并且促进肿瘤血管生成。IDO和TDO拮抗剂或抑制剂的一般实例包括与IDO或TDO特异性结合(参见,例如,Platten等人,《免疫学前沿(Front Immunol.)》5:673,2014)并且降低或抑制一种或多种免疫抑制活性的抗体或抗原结合片段或小分子。IDO拮抗剂或抑制剂的具体实例包括吲哚莫德(NLG-8189)、1-甲基-色氨酸(1MT)、 β -咪啉(去甲哈尔满、9H-吡啶并[3,4-b]吲哚)、迷迭香酸和艾卡噪司他(参见例如Sheridan,《自然-生物技术》33:321-322,2015)。TDO拮抗剂或抑制剂的具体实例包括680C91和LM10(参见例如Pilotte等人,《美国国家科学院院刊》109:2497-2502,2012)。

[0367] 在一些实施方案中,药剂是TIM-3拮抗剂或抑制剂。T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3(TIM-3)在经活化的人CD4+T细胞上表达并且调节Th1和Th17细胞因子。TIM-3还通过在与配体一半乳糖凝集素-9相互作用时触发细胞死亡充当Th1/Tc1功能的负调节剂。TIM-3有助于抑制性肿瘤微环境,并且其过表达与各种癌症的不良预后相关(参见例如Li等人,《肿瘤学报(Acta Oncol.)》54:1706-13,2015)。TIM-3拮抗剂或抑制剂的一般实例包含与TIM-3特异性结合并且减少或抑制其免疫抑制活性中的一种或多种免疫抑制活性的抗体或抗原结合片段或小分子。

[0368] 在一些实施方案中,药剂是LAG-3拮抗剂或抑制剂。淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)在经活化的T细胞、天然杀伤细胞、B细胞和浆细胞样树突状细胞上表达。它以与CTLA-4和PD-1类似的方式负调节T细胞的细胞增殖、活化和稳态(参见例如Workman和Vignali,《欧洲免疫学杂志》33:970-9,2003;以及Workman等人,《欧洲免疫学杂志》172:5450-5,2004),并且已报道在Treg抑制功能中发挥作用(参见例如Huang等人,《免疫(Immunity)》21:503-13,2004)。LAG3还维持CD8+T细胞处于耐受状态,并且与PD-1组合以维持CD8 T细胞耗竭。LAG-3拮抗剂或抑制剂的一般实例包括与LAG-3特异性结合并且抑制其免疫抑制活性中的一种或多种免疫抑制活性的抗体或抗原结合片段或小分子。具体实例包括抗体BMS-986016和其抗原结合片段。

[0369] 在一些实施方案中,所述药剂是VISTA拮抗剂或抑制剂。T细胞活化的V结构域Ig抑制剂(VISTA)主要在造血细胞上表达并且是抑制性免疫检查点调节剂,所述抑制性免疫检查点调节剂抑制T细胞活化,诱导Foxp3表达并且在肿瘤微环境内高度表达,在所述肿瘤微环境内,其抑制抗肿瘤T细胞应答(参见例如Lines等人,《癌症研究》74:1924-32,2014)。VISTA拮抗剂或抑制剂的一般实例包括与VISTA特异性结合并减少其免疫抑制活性中的一

种或多种的抗体或抗原结合片段或小分子。

[0370] 在一些实施方案中,药剂是BTLA拮抗剂或抑制剂。B和T淋巴细胞弱化子(BTLA; CD272)表达在T细胞活化期间诱导,并且其通过与肿瘤坏死家族受体(TNF-R)和B7细胞表面受体家族相互作用来抑制T细胞。BTLA是肿瘤坏死因子(受体)超家族成员14(TNFRSF14),也称为疱疹病毒进入介导子(HVEM)的配体。BTLA-HVEM复合物例如通过抑制人CD8+癌症特异性T细胞的功能来负调节T细胞免疫应答(参见例如Derré等人,《临床研究杂志(J Clin Invest)》120:157-67,2009)。BTLA拮抗剂或抑制剂的一般实例包括与BTLA-4特异性结合并且减少其免疫抑制活性中的一种或多种免疫抑制活性的抗体或抗原结合片段或小分子。

[0371] 在一些实施方案中,药剂是HVEM拮抗剂或抑制剂,例如与HVEM特异性结合并且干扰其与BTLA或CD160的相互作用的拮抗剂或抑制剂。HVEM拮抗剂或抑制剂的一般实例包含与HVEM特异性结合,任选地减少HVEM/BTLA和/或HVEM/CD160相互作用并且由此减少HVEM的免疫抑制活性中的一种或多种免疫抑制活性的抗体或抗原结合片段或小分子。

[0372] 在一些实施方案中,药剂是CD160拮抗剂或抑制剂,例如与CD160特异性结合并且干扰其与HVEM的相互作用的拮抗剂或抑制剂。CD160拮抗剂或抑制剂的一般实例包括与CD160特异性结合,任选地减少CD160/HVEM相互作用并且由此减少或抑制其免疫抑制活性中的一种或多种免疫抑制活性的抗体或抗原结合片段或小分子。

[0373] 在一些实施方案中,药剂是TIGIT拮抗剂或抑制剂。T细胞Ig和ITIM结构域(TIGIT)是在各种淋巴细胞的表面上发现并且例如通过Treg抑制抗肿瘤免疫的共抑制性受体(Kurtulus等人,《临床研究杂志》125:4053-4062,2015)。TIGIT拮抗剂或抑制剂的一般实例包含与TIGIT特异性结合并减少其免疫抑制活性中的一种或多种的抗体或抗原结合片段或小分子(参见例如Johnston等人,《癌细胞》26:923-37,2014)。

[0374] 在某些实施方案中,免疫检查点调节剂是一种或多种刺激性免疫检查点分子的激动剂。示例性的刺激性免疫检查点分子包括OX40、CD40、糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因(GITR)、CD137(4-1BB)、CD27、CD28、CD226和疱疹病毒进入介导子(HVEM)。

[0375] 在一些实施方案中,药剂是OX40激动剂。OX40(CD134)促进效应T细胞和记忆T细胞的扩增并且抑制T调节性细胞的分化和活性(参见例如Croft等人,《免疫学评论(Immunol Rev.)》229:173-91,2009)。其配体是OX40L(CD252)。由于OX40信号传导影响T细胞活化和存活两者,因此其在启动淋巴结中的抗肿瘤免疫应答以及维持肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫应答方面起重要作用。OX40激动剂的一般实例包括与OX40特异性结合并且增加其免疫刺激活性中的一种或多种免疫刺激活性的抗体或抗原结合片段或小分子或配体。具体实例包括OX86、OX-40L、Fc-OX40L、GSK3174998、MEDI0562(人源化OX40激动剂)、MEDI6469(鼠OX4激动剂)和MEDI6383(OX40激动剂)和其抗原结合片段。

[0376] 在一些实施方案中,药剂是CD40激动剂。CD40在抗原呈递细胞(APC)和一些恶性肿瘤上表达。其配体是CD40L(CD154)。在APC上,连接导致共刺激分子的上调,从而潜在地绕过抗肿瘤免疫应答中对T细胞辅助的需要。CD40激动剂疗法在APC成熟及其从肿瘤到淋巴结的迁移中起重要作用,导致抗原呈递和T细胞活化升高。抗CD40激动剂抗体在动物模型中产生实质应答和持久的抗癌免疫,这是至少部分地由细胞毒性T细胞介导的效应(参见例如Johnson等人,《临床癌症研究(Clin Cancer Res.)》21:1321-1328,2015;以及Vonderheide

和Glennie,《临床癌症研究》19:1035-43,2013)。CD40激动剂的一般实例包括与CD40特异性结合并且增加其免疫刺激活性中的一种或多种免疫刺激活性的抗体或抗原结合片段或小分子或配体。具体实例包括CP-870,893、达西珠单抗、Chi Lob 7/4、ADC-1013、CD40L、rhCD40L和其抗原结合片段。

[0377] 在一些实施方案中,药剂是GITR激动剂。糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因(GITR)增加T细胞扩增,抑制Tregs的抑制活性并且延长T效应细胞的存活。已经显示,GITR激动剂通过Treg谱系稳定性的丧失来促进抗肿瘤应答(参见例如Schaer等人,《癌症免疫学研究(Cancer Immunol Res.)》1:320-31,2013)。这些不同的机制表明,GITR在淋巴结中启动免疫应答和维持肿瘤组织中的免疫应答方面起重要作用。其配体是GITRL。GITR激动剂的一般实例包括与GITR特异性结合并且增加其免疫刺激活性中的一种或多种免疫刺激活性的抗体或抗原结合片段或小分子或配体。具体实例包括GITRL、INCAGN01876、DTA-1、MEDI1873及其抗原结合片段。

[0378] 在一些实施方案中,药剂是CD137激动剂。CD137(4-1BB)是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员,并且CD137的交联会增强T细胞增殖、IL-2分泌、存活和溶细胞活性。CD137介导的信号传导还保护如CD8+T细胞等T细胞免于活化诱导的细胞死亡。CD137激动剂的一般实例包括与CD137特异性结合并且增加其免疫刺激活性中的一种或多种免疫刺激活性的抗体或抗原结合片段或小分子或配体。具体实例包括CD137(或4-1BB)配体(参见例如Shao和Schwarz,《白细胞生物学杂志(J Leukoc Biol.)》89:21-9,2011)和抗体乌托米卢单抗,包括其抗原结合片段。

[0379] 在一些实施方案中,药剂是CD27激动剂。CD27的刺激增加了初始T细胞的抗原特异性扩增,并且有助于T细胞记忆和T细胞免疫的长期维持。其配体是CD70。用激动剂抗体靶向人CD27会刺激T细胞活化和抗肿瘤免疫(参见例如Thomas等人,《肿瘤免疫学(Oncoimmunology)》2014;3:e27255.doi:10.4161/onci.27255;以及He等人,《免疫学杂志》191:4174-83,2013)。CD27激动剂的一般实例包括与CD27特异性结合并且增加其免疫刺激活性中的一种或多种免疫刺激活性的抗体或抗原结合片段或小分子或配体。具体实例包括CD70和抗体万利鲁单抗和CDX-1127(1F5),包括其抗原结合片段。

[0380] 在一些实施方案中,药剂是CD28激动剂。CD28是组成性表达的CD4+T细胞、一些CD8+T细胞。其配体包括CD80和CD86,并且其刺激增加T细胞扩增。CD28激动剂的一般实例包括与CD28特异性结合并且增加其免疫刺激活性中的一种或多种免疫刺激活性的抗体或抗原结合片段或小分子或配体。具体实例包括CD80、CD86、抗体TAB08及其抗原结合片段。

[0381] 在一些实施方案中,药剂是CD226激动剂。CD226是与TIGIT共享配体并且与TIGIT相反的刺激受体,CD226的接合增强T细胞活化(参见例如Kurtulus等人,《临床研究杂志》125:4053-4062,2015;Bottino等人,《实验医学杂志(J Exp Med.)》1984:557-567,2003;以及Tahara-Hanaoka等人,《国际免疫学杂志》16:533-538,2004)。CD226激动剂的一般实例包括与CD226特异性结合并且增加其免疫刺激活性中的一种或多种免疫刺激活性的抗体或抗原结合片段或小分子或配体(例如,CD112、CD155)。

[0382] 在一些实施方案中,药剂是HVEM激动剂。疱疹病毒进入介导子(HVEM),也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员14(TNFRSF14),是TNF受体超家族的人细胞表面受体。HVEM存在于多种细胞(包括T细胞、APC和其它免疫细胞)上。与其它受体不同,HVEM在静息T细胞上以

高水平表达,并且在活化时下调。已显示HVEM信号传导在T细胞活化的早期阶段中以及在淋巴结中的肿瘤特异性淋巴细胞群体的扩增期间起关键作用。HVEM激动剂的一般实例包括与HVEM特异性结合并且增加其免疫刺激活性中的一种或多种免疫刺激活性的抗体或抗原结合片段或小分子或配体。

[0383] 在某些实施方案中,癌症免疫治疗剂是癌症疫苗。示例性的癌症疫苗包括Oncophage、人乳头瘤病毒HPV(如Gardasil或Cervarix)、乙型肝炎疫苗(如Engerix-B、Recombivax HB或Twinrix)以及西普鲁塞-T(Provence)。在一些实施方案中,癌症疫苗包含或利用一种或多种癌症抗原或癌症相关抗原。示例性的癌症抗原包括但不限于人Her2/neu、Her1/EGF受体(EGFR)、Her3、A33抗原、B7H3、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23(IgE受体)、MAGE-3、C242抗原、5T4、IL-6、IL-13、血管内皮生长因子VEGF(例如,VEGF-A)、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGR-3、NRP2、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CD152、CD200、CD221、CCR4、HLA-DR、CTLA-4、NPC-1C、生腱蛋白、波形蛋白、胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)、 α -胎儿蛋白、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、碳酸酐酶9(CA-IX)、癌胚抗原(CEA)、鸟苷酸环化酶C、NY-ESO-1、p53、生存素、整合素 $\alpha v \beta 3$ 、整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 、叶酸受体1、跨膜糖蛋白NMB、成纤维细胞活化蛋白 α (FAP)、糖蛋白75、TAG-72、MUC1、MUC16(或CA-125)、磷脂酰丝氨酸、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、NR-LU-13抗原、TRAIL-R1、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B或TRAIL-R2)、SLAM家族成员7(SLAMF7)、EGP40泛癌症抗原、B细胞活化因子(BAFF)、血小板源性生长因子受体、糖蛋白EpCAM(17-1A)、程序性死亡受体-1、蛋白质二硫键异构酶(PDI)、肝再生磷酸酶3(PRL-3)、前列腺酸性磷酸酶、Lewis-Y抗原、GD2(在神经外胚层来源的肿瘤上表达的二唾液酸神经节苷酯)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)以及间皮素。

[0384] 在某些实施方案中,癌症免疫治疗剂是溶瘤病毒。溶瘤病毒是优先感染和杀死癌细胞的病毒。包括天然存在的和人造的或工程化的溶瘤病毒。大多数溶瘤病毒都针对肿瘤选择性被工程化,但是存在如呼肠孤病毒(Reovirus)和SVV-001塞内加谷病毒的天然存在的实例。溶瘤病毒的一般实例包括VSV、脊髓灰质炎病毒(Poliovirus)、呼肠孤病毒、塞尼卡病毒(Senecavirus)和RIGVIR以及其工程化的版本。溶瘤病毒的非限制性实例包括单纯疱疹病毒(HSV)和其经过工程化的版本、塔利拉赫(T-VEC)、柯萨奇病毒A21(CAVATAK™)、安柯瑞(H101)、佩拉雷奥雷普(REOLYSIN®)、塞内加谷病毒(NTX-010)、塞尼卡病毒SVV-001、ColoAd1、SEPREHVIR(HSV-1716)、CGTG-102(Ad5/3-D24-GMCSF)、GL-ONC1、MV-NIS和DNX-2401以及其它。

[0385] 在某些实施方案中,癌症免疫治疗剂是细胞因子。示例性的细胞因子包括干扰(IFN)- α 、IL-2、IL-12、IL-7、IL-21和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

[0386] 在某些实施方案中,癌症免疫治疗剂是基于细胞的免疫疗法,例如基于T细胞的过继免疫疗法。在一些实施方案中,基于细胞的免疫疗法包括癌症抗原特异性T细胞,任选地离体衍生的T细胞。在一些实施方案中,癌症抗原特异性T细胞选自嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞和T细胞受体(TCR)修饰的T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)和肽诱导的T细胞中的一种或多种。在具体实施方案中,CAR修饰的T细胞靶向CD-19(参见例如Maude等人,《血液(Blood)》125:4017-4023,2015))。

[0387] 在某些情况下,待治疗的癌症与癌症抗原相关,即,癌症抗原特异性T细胞靶向已

知与待治疗的癌症相关的至少一种抗原或针对所述至少一种抗原而富集。在一些实施方案中,所述癌症抗原选自以下中的一种或多种:CD19、人Her2/neu、Her1/EGF受体(EGFR)、Her3、A33抗原、B7H3、CD5、CD20、CD22、CD23(IgE受体)、MAGE-3、C242抗原、5T4、IL-6、IL-13、血管内皮生长因子VEGF(例如,VEGF-A)、VEGFR-1、VEGFR-2、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CD152、CD200、CD221、CCR4、HLA-DR、CTLA-4、NPC-1C、生腱蛋白、波形蛋白、胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)、 α -胎儿蛋白、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、碳酸酐酶9(CA-IX)、癌胚抗原(CEA)、鸟苷酸环化酶C、NY-ESO-1、p53、生存素、整合素 $\alpha\beta$ 3、整合素 $\alpha5\beta1$ 、叶酸受体1、跨膜糖蛋白NMB、成纤维细胞活化蛋白 α (FAP)、糖蛋白75、TAG-72、MUC1、MUC16(或CA-125)、磷脂酰丝氨酸、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、NR-LU-13抗原、TRAIL-R1、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B或TRAIL-R2)、SLAM家族成员7(SLAMF7)、EGP40泛癌症抗原、B细胞活化因子(BAFF)、血小板源性生长因子受体、糖蛋白EpCAM(17-1A)、程序性死亡受体-1、蛋白质二硫键异构酶(PDI)、肝再生磷酸酶3(PRL-3)、前列腺酸性磷酸酶、Lewis-Y抗原、GD2(在神经外胚层来源的肿瘤上表达的二唾液酸神经节苷酯)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)以及间皮素。

[0388] 另外的示例性癌症抗原包括5T4、707-AP、9D7、AFP、A1bZIP HPG1、 α -5- β -1-整合素、 α -5- β -6-整合素、 α -辅肌动蛋白-4/m、 α -甲基酰基-辅酶A消旋酶、ART-4、ARTC1/m、B7H4、BAGE-1、BCL-2、bcr/abl、 β -连环蛋白/m、BING-4、BRCA1/m、BRCA2/m、CA 15-3/CA 27-29、CA19-9、CA72-4、CA125、钙网蛋白、CAMEL、CASP-8/m、组织蛋白酶B、组织蛋白酶L、CDC27/m、CDK4/m、CDKN2A/m、CEA、CLCA2、CML28、CML66、COA-1/m、毛状蛋白样蛋白、胶原蛋白XXIII、COX-2、CT-9/BRD6、Cten、周期素B1、周期素D1、cyp-B、CYPB1、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EFTUD2/m、EGFR、ELF2/m、EMMPRIN、EpCam、EphA2、EphA3、ErbB3、ETV6-AML1、EZH2、FGF-5、FN、Frau-1、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE7b、GAGE-8、GDEP、GnT-V、gp100、GPC3、GPNMB/m、HAGE、HAST-2、hepsin、Her2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A*0201-R1 7I、HLA-A1 1/m、HLA-A2/m、HNE、同源盒NKX3.1、HOM-TE5-14/SCP-1、HOM-TE5-85、HPV-E6、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT、iCE、IGF-1R、IL-13Ra2、IL-2R、IL-5、不成熟层粘连蛋白受体、激肽释放酶-2、激肽释放酶-4、Ki67、KIAA0205、KIAA0205/m、KK-LC-1、K-Ras/m、LAGE-A1、LDLR-FUT、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-B10、MAGE-B16、MAGE-B17、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-D1、MAGE-D2、MAGE-D4、MAGE-E1、MAGE-E2、MAGE-F1、MAGE-H1、MAGEL2、乳腺珠蛋白A、MART-1/melan-A、MART-2、MART-2/m、基质蛋白22、MCI R、M-CSF、ME1/m、间皮素、MG50/PXDN、MMP11、MN/CA IX-抗原、MRP-3、MUC-1、MUC-2、MUM-1/m、MUM-2/m、MUM-3/m、I类肌凝蛋白/m、NA88-A、N-乙酰葡萄糖氨基转移酶-V、新-PAP、新-PAP/m、NFYC/m、NGEP、NMP22、NPM/ALK、N-Ras/m、NSE、NY-ESO-B、NY-ESO-1、OA1、OFA-iLRP、OGT、OGT/m、OS-9、OS-9/m、骨钙蛋白、骨桥蛋白、pi 5、p190小bcr-abl、p53、p53/m、PAGE-4、PAI-1、PAI-2、PAP、PART-1、PATE、PDEF、Pim-1激酶、Pin-1、Pml/PAR α 、POTE、PRAME、PRDX5/m、prostelin、蛋白酶-3、PSA、PSCA、PSGR、PSM、PSMA、PTPRK/m、RAGE-1、RBAF600/m、RHAMM/CD1 68、RU1、RU2、S-100、SAGE、SART-1、SART-2、SART-3、SCC、SIRT2/m、Sp1 7、SSX-1、SSX-2/HOM-MEL-40、SSX-4、STAMP-1、STEAP-1、存活素、存活素-2B、SYT-SSX-1、SYT-SSX-2、TA-90、TAG-72、TARP、TEL-AML1、TGF- β 、TGF β RII、TGM-4、TPI/m、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2/6b、TRP/INT2、TRP-p8、酪氨

酸酶、UPA、VEGFR1、VEGFR-2/FLK-1和WT1。某些优选的抗原包括p53、CA125、EGFR、Her2/neu、hTERT、PAP、MAGE-A1、MAGE-A3、间皮素、MUC-1、GP100、MART-1、酪氨酸酶、PSA、PSCA、PSMA、STEAP-1、Ras、CEA和WT1，并且更优选地PAP、MAGE-A3、WT1和MUC-1。

[0389] 在一些实施方案中，抗原选自MAGE-A1（例如，根据登录号M77481的MAGE-A1）、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6（例如，根据登录号NM_005363的MAGE-A6）、MAGE-C1、MAGE-C2、melan-A（例如，根据登录号NM_005511的melan-A）、GP100（例如，根据登录号M77348的GP100）、酪氨酸酶（例如，根据登录号NM_000372的酪氨酸酶）、存活素（例如，根据登录号AF077350的存活素）、CEA（例如，根据登录号NM_004363的CEA）、Her-2/neu（例如，根据登录号M11730的Her-2/neu）、WT1（例如，根据登录号NM_000378的WT1）、PRAME（例如，根据登录号NM_006115的PRAME）、EGFRI（表皮生长因子受体1）（例如，根据登录号AF288738的EGFRI（表皮生长因子受体1））、MUC1、粘蛋白-1（例如，根据登录号NM_002456的粘蛋白-1）、SEC61 G（例如，根据登录号NM_014302的SEC61G）、hTERT（例如，hTERT登录号NM_198253）、5T4（例如，根据登录号NM_006670的5T4）、TRP-2（例如，根据登录号NM_001922的TRP-2）、STEAP1（前列腺六次跨膜上皮抗原1）、PSCA、PSA、PSMA等。

[0390] 在一些实施方案中，癌症抗原选自PCA、PSA、PSMA、STEAP和任选地MUC-1，包括其片段、变体和衍生物。在一些实施方案中，癌症抗原选自NY-ESO-1、MAGE-C1、MAGE-C2、存活素、5T4和任选地MUC-1，包括其片段、变体和衍生物。

[0391] 在一些情况下，癌症抗原涵盖与癌症或肿瘤疾病，特别是例如淋巴瘤或淋巴瘤相关疾病相关的独特型抗原，其中独特型抗原是淋巴血细胞的免疫球蛋白独特型或淋巴血细胞的T细胞受体独特型。

[0392] 在一些情况下，癌症抗原特异性T细胞选自以下中的一种或多种：嵌合抗原受体（CAR）修饰的T细胞（例如，靶向癌症抗原）和T细胞受体（TCR）修饰的T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞（TIL）和肽诱导的T细胞。

[0393] 技术人员将理解，本文所描述的各种癌症免疫治疗剂可以与本文所描述的各种抗NRP2抗体（包含其抗原结合片段）中的任何一种或多种组合，并且根据本文所描述的方法或组合物的任何一种或多种方法或组合物使用。

[0394] 化学治疗剂。某些实施方案采用一种或多种化学治疗剂，例如小分子化学治疗剂。化学治疗剂的非限制性实例包括烷化剂、抗代谢物、细胞毒性抗生素、拓扑异构酶抑制剂（I型或II型）、抗微管剂以及其它。

[0395] 烷化剂的实例包括氮芥（例如，二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺和白消安）、亚硝基脲（例如，N-亚硝基-N-甲基脲（MNU）、卡莫司汀（BCNU）、洛莫司汀（CCNU）、司莫司汀（MeCCNU）、福莫司汀和链脲佐菌素）、四嗪（例如，达卡巴嗪、米托唑胺和替莫唑胺）、氮丙啶（例如，噻替派、丝裂霉素和地吡啶（AZQ））、顺铂和其衍生物（例如，卡铂和奥沙利铂）以及非典型烷化剂（任选地丙卡巴肼和六甲密胺）。

[0396] 抗代谢物的实例包括：抗叶酸剂（例如，甲氨蝶呤和培美曲塞）、氟嘧啶（例如，5-氟尿嘧啶和卡培他滨）、脱氧核苷类似物（例如，安西他滨、依诺他滨、阿糖胞苷、吉西他滨、地西他滨、阿扎胞苷、氟达拉滨、奈拉滨、克拉屈滨、氯法拉滨、氟达拉滨和喷司他丁）以及硫嘌呤（例如，硫鸟嘌呤和巯嘌呤）；

[0397] 细胞毒性抗生素的实例包括蒽环类药物（例如，阿霉素、柔红霉素、表柔比星、伊达

比星、吡柔比星、阿柔比星和米托蒽醌)、博莱霉素、丝裂霉素C、米托蒽醌和放线菌素。拓扑异构酶抑制剂的实例包括喜树碱、伊立替康、拓扑替康、依托泊苷、阿霉素、米托蒽醌、替尼泊苷、新生霉素、美巴龙和阿柔比星。

[0398] 抗微管剂的实例包括紫杉烷(例如,紫杉醇和多西他赛)和长春花生物碱(例如,长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨)。

[0399] 技术人员将理解,本文所描述的各种化学治疗剂可以与本文所描述的各种抗NRP2a抗体(包含其抗原结合片段)中的任何一种或多种组合,并且根据本文所描述的方法或组合物的任何一种或多种方法或组合物使用。

[0400] 激素治疗剂。某些实施方案采用至少一种激素治疗剂。激素治疗剂的一般实例包括激素激动剂和激素拮抗剂。激素激动剂的特定实例包括孕激素(孕酮)、皮质类固醇(例如,泼尼松龙、甲基泼尼松龙、地塞米松)、胰岛素样生长因子、VEGF源性血管生成和淋巴管生成因子(例如,VEGF-A、VEGF-A145、VEGF-A165、VEGF-C、VEGF-D、PlGF-2)、成纤维细胞生长因子(FGF)、半乳凝素、肝细胞生长因子(HGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)- β 、雄激素、雌激素、CCL21和生长抑素类似物。激素拮抗剂的实例包括激素合成抑制剂,如芳香酶抑制剂和促性腺激素释放激素(GnRH)激动剂(例如,亮丙瑞林(leuprolide)、戈舍瑞林(goserelin)、曲普瑞林(triptorelin)、组氨瑞林(histrelin)),包括其类似物。还包括激素受体拮抗剂,如选择性雌激素受体调节剂(SERM,例如,它莫西芬、雷洛昔芬(raloxifene)、托瑞米芬(toremifene))和抗雄激素(例如,氟他胺(flutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、尼鲁米特(nilutamide))。

[0401] 还包括激素途径抑制剂,如针对激素受体的抗体。实例包括IGF受体的抑制剂(例如,IGF-IR1),如西妥木单抗、多妥珠单抗、芬妥木单抗、加尼妥单抗、异妥单抗和罗妥木单抗;血管内皮生长因子受体1、2或3(VEGFR1、VEGFR2或VEGFR3)或其配体的抑制剂,如培阿赛珠单抗、贝伐单抗、伊鲁库单抗、雷莫芦单抗;TGF- β 受体R1、R2和R3的抑制剂,如夫苏木单抗和美替木单抗;c-Met的抑制剂,如那昔妥单抗;EGF受体的抑制剂,如西妥昔单抗、莫福汀德帕妥昔单抗、伏妥昔单抗、伊马曲单抗、恩星拉妥昔单抗、马妥珠单抗、莫妥昔单抗、奈昔木单抗、尼妥珠单抗、帕尼单抗、托木妥昔单抗和扎芦木单抗;FGF受体的抑制剂,如aprutumabixadotin和贝马里妥珠单抗;CCR7的抑制剂;以及PDGF受体的抑制剂,如奥拉单抗和托维单抗。

[0402] 技术人员将理解,本文所描述的各种各种激素治疗剂可以与本文所描述的各种抗NRP2a抗体(包含其抗原结合片段)中的任何一种或多种组合,并且根据本文所描述的方法或组合物的任何一种或多种方法或组合物使用。

[0403] 激酶抑制剂。某些实施方案采用至少一种激酶抑制剂,包括酪氨酸激酶抑制剂。激酶抑制剂的实例包括但不限于阿达索替尼、阿法替尼、阿柏西普、阿昔替尼、贝伐单抗、博舒替尼、卡博替尼、西妥昔单抗、考比替尼、克唑替尼、达沙替尼、恩曲替尼、厄达替尼、厄洛替尼、福坦替尼、吉非替尼、依鲁替尼、伊马替尼、拉帕替尼、乐伐替尼、木利替尼、尼罗替尼、帕尼单抗、帕唑帕尼、哌加他尼、帕纳替尼、兰尼单抗、瑞戈非尼、鲁索替尼、索拉非尼、舒尼替尼、SU6656、托法替尼、曲妥珠单抗、凡德他尼和威罗菲尼。示例性的PI3激酶抑制剂包括阿培利司、布帕尼西、库潘尼西、CUDC-907、达克利司、度维利塞、GNE-477、伊德拉西尼、IPI-549、LY294002、ME-401、哌立福新、PI-103、皮克立西、PWT33597、RP6503、他塞利西、厄布利

塞、伏他利塞、渥曼青霉素和XL147。

[0404] 技术人员将理解,本文所描述的各种激酶抑制剂可以与本文所描述的各种抗NRP2a抗体(包含其抗原结合片段)中的任何一种或多种组合,并且根据本文所描述的方法或组合物的任何一种或多种方法或组合物使用。

[0405] 使用方法和治疗组合物

[0406] 本公开的实施方案部分地涉及以下发现:某些人神经纤毛蛋白2(NRP2)多肽,特别是NRP2a v1和v2,含有介导与NRP2a v1/v2配体如CCL21和/或CCR7的结合相互作用的独特近膜结构域序列。此类CCL21/CCR7相互作用结构域未在人NRP2b v4和NRP2b v5多肽中发现,并且仅部分存在于人NRP2a v3中。因此,相对于NRP2a v4和NRP2b v5选择性地结合人NRP2a v1和/或vNRP2b,并且抑制或以其它方式干扰NRP2a v1/v2和CCL21/CCR7之间的结合的抗体可以用于调节这些途径的下游信号传导事件。此类抗体可以用作治疗疾病的独立疗法,包括NRP2相关疾病,或与如本文所述的其它治疗剂组合。

[0407] 因此,某些实施方案包括治疗、改善有需要的受试者的疾病或病状的症状和/或减少其进展的方法,所述方法包括向受试者施用至少一种结合至人NRP2a v1和/或v2多肽的抗体或其抗原结合片段,如本文所述。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段调节(例如拮抗)NRP2a v1和/或v2多肽与CCL21和/或CCR7之间的结合。在一些实施方案中,抗NRP2a抗体或其抗原结合片段选择性地结合至NRP2a变体1和/或2同种型,并且基本上不结合至NRP2b v4和v5同种型。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段调节由NRP2a v1和/或v2多肽与NRP2a配体如CCL21/CCR7之间的相互作用引起的信号传导活性。

[0408] 一些实施方案包括以足够的量和频率施用抗NRP2a抗体或其抗原结合片段,所述量和频率足以实现抗NRP2a抗体或其抗原结合片段的在约1nM和约1 μ M之间、在约1nM和约100nM之间、在约1nM和约10nM之间或在约1nM和约3 μ M之间的稳定状态浓度或平均循环浓度。

[0409] 在某些实施方案中,疾病或病状是NRP2相关疾病或病状。在一些实施方案中,NRP2相关疾病或病状选自以下中的一种或多种:癌症和与癌症相关的疾病和途径,包含癌细胞生长、起始、迁移、粘附、侵袭、化学抗性和/或转移;与炎症、自身免疫和相关炎症性疾病相关的疾病,包含与不适当的免疫细胞活化或迁移相关的疾病,如移植物抗宿主病(GVHD);与淋巴发育、淋巴管生成和淋巴损伤相关的疾病,包含例如水肿、淋巴水肿、继发性淋巴水肿、不适当的脂肪吸收和沉积、过量脂肪沉积和血管通透性;与感染相关的疾病,包含潜伏感染;与过敏性病症/疾病、过敏反应相关的疾病,包含例如慢性阻塞性肺病症(COPD)、中性粒细胞性哮喘、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关的全身性血管炎、全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎性小体相关疾病和皮肤相关中性粒细胞介导的疾病,如坏疽性脓皮病;与肉芽肿性炎性疾病相关的疾病,包含结节病和肉芽肿;与纤维化相关的疾病,包含纤维化疾病、纤维化、内皮-间充质转化(EMT)和伤口愈合;与不适当的平滑肌收缩性、平滑肌补偿与失代偿以及不适当的血管平滑肌细胞迁移和粘附相关的疾病;与不适当的自噬、吞噬作用和胞葬作用相关的疾病;与神经元疾病、周围神经系统重塑和疼痛感知相关的疾病;以及与骨骼发育和骨骼重塑相关的疾病。

[0410] 在一些实施方案中,疾病是癌症。因此,某些实施方案包括治疗有需要的受试者的癌症、改善其症状或抑制其进展的方法,所述方法包括向受试者施用与人NRP2a v1和/或v2

多肽特异性结合(抗NRP2a抗体)并且调节(例如,干扰)人NRP2a多肽与人NRP2a配体(例如,来自表N2的NRP2a配体,如CCL21和/或CCR7)的结合的至少一种抗体或其抗原结合片段。某些实施方案包括减少或预防有需要的受试者的癌症的再出现,例如转移性癌症和/或耐化学性癌症,其中治疗组合物的施用使得能够生成对癌症的免疫记忆。

[0411] 在一些实例中,相对于未经处理的对照物,抗NRP2a抗体或其抗原结合片段使癌症起始、癌细胞迁移、粘附或癌细胞转移减少约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%或更多。在一些例子中,相对于未处理的对照,抗NRP2a抗体或其抗原结合片段将癌症介导的淋巴管生成减少约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%或更多。在一些实施方案中,相对于未处理的对照,抗NRP2a抗体或其抗原结合片段抑制或降低癌症或迁移细胞(例如,从活检或体外生长的其它样品分离的癌症或免疫细胞)的迁移或运动速率约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%或更多。在一些实施方案中,相对于未处理的对照,抗NRP2a抗体或其抗原结合片段将癌症(例如,从活检或体外生长的其它样品分离的癌细胞)的侵入性降低约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%或更多。

[0412] 在一些实施方案中,相对于单独的另外的药剂,抗NRP2a抗体或其抗原结合片段将癌症对另外的药剂(例如,化学治疗剂、激素治疗剂和或激酶抑制剂)的敏感性增强约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%或更多。在一些实施方案中,相对于单独的癌症免疫疗法剂,抗NRP2a抗体或其抗原结合片段将癌症免疫治疗剂的抗肿瘤和/或免疫刺激活性增强约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%或更多。

[0413] 还包括用于治疗癌症的组合法,包含治疗有需要的受试者的癌症、改善其症状或抑制其进展的方法,所述方法包括向受试者施用与人NRP2a v1和/或v2多肽(抗NRP2a抗体)特异性结合的至少一种抗体或其抗原结合片段与至少一种另外的药剂的组合,所述至少一种另外的药剂例如癌症免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和/或激酶抑制剂。本文别处描述了示例性的癌症免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂和激酶抑制剂。

[0414] 在一些情况下,抗NRP2a抗体或其抗原结合片段和至少一种另外的药剂分开施用,例如在单独的治疗组合物中并且在相同或不同的时间施用。在一些实施方案中,抗NRP2a抗体或其抗原结合片段和至少一种另外的药剂作为同一治疗组合物的一部分同时施用。

[0415] 特定方法采用一种或多种抗NRP2a抗体或其抗原结合片段作为组合治疗方案的一部分(即,除组合治疗方案之外还采用一种或多种抗NRP2a抗体或其抗原结合片段)。示例性的组合方案在下表M1中提供。

癌症类型	药剂	缩略语
乳腺癌	环磷酰胺、甲氨喋呤、5-氟尿嘧啶、长春瑞滨	CMF
	多柔比星、环磷酰胺	AC
霍奇金氏淋巴瘤	多西他赛、多柔比星、环磷酰胺	TAC
	多柔比星、博来霉素、长春碱、达卡巴嗪	ABVD
	犬科动物、长春新碱、丙卡巴嗪、强的松龙	MOPP
非霍奇金氏淋巴瘤	环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、强的松龙	CHOP
[0416] 生殖细胞肿瘤	博来霉素、依托泊苷、顺铂	BEP
胃癌	表柔比星、顺铂、5-氟尿嘧啶	ECF
	表柔比星、顺铂、卡培他滨	ECX
膀胱癌	甲氨喋呤、长春新碱、多柔比星、顺铂	MVAC
肺癌	环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、长春瑞滨	CAV
结直肠癌	5-氟尿嘧啶、亚叶酸、奥沙利铂	FOLFOX
胰腺癌	亚叶酸、氟尿嘧啶、伊立替康 (Camptosar)、奥沙利铂	FOLFIRINOX
	吉西他滨、白蛋白结合紫杉醇	ABRAXANE

[0417] 在一些实施方案中,本文所述的方法和治疗组合物(例如,单独的或与至少一种另外的药剂组合的抗NRP2a抗体)将受试者的中值存活时间增加4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、15周、20周、25周、30周、40周或更长时间。在某些实施方案中,本文所述的方法和治疗组合物(例如,单独的或与至少一种另外的药剂组合的抗NRP2a抗体)将受试者的中值存活时间增加1年、2年、3年或更长时间。在一些实施方案中,本文所述的方法和治疗组合物(例如,单独的或与癌症免疫治疗剂组合的抗NRP2a抗体)将无进展生存期增加2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间。在某些实施方案中,本文所述的方法或治疗组合物将无进展生存期增加1年、2年、3年或更长时间。

[0418] 在某些实施方案中,本文所述的方法和治疗组合物(例如,单独的或与至少一种另外的药剂组合的抗NRP2a抗体)足以导致肿瘤消退,如由活肿瘤的量的统计上显著的减少所指示的,例如肿瘤质量的至少10%、20%、30%、40%、50%或更多的减少,或通过改变的(例如,具有统计显著性的减小的)扫描尺寸所指示的。在某些实施方案中,本文所述的方法和治疗组合物(例如,单独的或与至少一种另外的药剂组合的抗NRP2a抗体)足以导致疾病稳定。在某些实施方案中,本文所述的方法和治疗组合物(例如,单独的或与癌症免疫治疗剂组合的抗NRP2a抗体)足以导致熟练临床医生已知的特定疾病适应症的临床症状的临床相关减轻。

[0419] 在一些实施方案中,相对于单独的癌症免疫治疗剂,抗NRP2a抗体增加、补充或以其它方式增强癌症免疫治疗剂的抗肿瘤和/或免疫刺激活性。在一些实施方案中,相对于单独的癌症免疫治疗剂,抗NRP2a抗体将癌症免疫治疗剂的抗肿瘤和/或免疫刺激活性增强约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%或更多。

[0420] 本文所述的方法和治疗组合物可以用于治疗任何种类的癌症或肿瘤。在一些实施方案中,癌症是原发性癌症,即,在肿瘤进展开始并产生癌性团块的解剖部位处生长的癌症。在一些实施方案中,癌症是继发性癌症或转移性癌症,即,已经从起源的原发部位或组织扩散到一个或多个不同部位或组织中的癌症。在一些实施方案中,癌症表达或过表达

NRP2。在一些实施方案中,受试者或患者患有选自以下中的一种或多种的癌症:黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤)、上皮或上皮源性肿瘤、胰腺癌、骨癌、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、间皮瘤、白血病(例如,淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性骨髓性白血病、复发性急性骨髓性白血病)、淋巴瘤、肝癌(肝细胞癌或HCC)、肉瘤、B细胞恶性肿瘤、乳腺癌(例如,雌激素受体阳性(ER+)、雌激素受体阴性(ER-)、Her2阳性(Her2+)、Her2阴性(Her2-)或其组合,例如,ER+/Her2+、ER+/Her2-、ER-/Her2+或ER-/Her2-;或“三阴性”乳腺癌,所述“三阴性”乳腺癌是雌激素受体阴性、黄体酮受体阴性和HER2阴性)、卵巢癌、结直肠癌、神经胶质瘤(例如,星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤或脉络丛乳头状瘤)、多形性胶质母细胞瘤(例如,巨细胞胶质母细胞瘤或神经胶质肉瘤)、脑膜瘤、垂体腺瘤、前庭神经鞘瘤、原发性CNS淋巴瘤、原始神经外胚层肿瘤(成神经管细胞瘤)、肾癌(例如,肾细胞癌)、膀胱癌、子宫癌、食管癌、脑癌、头颈癌、宫颈癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、病毒诱导性肿瘤,例如,乳头状瘤病毒诱导性肿瘤(例如,宫颈肿瘤、宫颈癌)、腺癌、疱疹病毒诱导性肿瘤(例如,伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、EBV诱导性B细胞淋巴瘤)、乙型肝炎诱导性肿瘤(肝细胞癌)、HTLV-1诱导性淋巴瘤和HTLV-2诱导性淋巴瘤、听神经瘤、肺癌(例如,肺肿瘤、支气管肿瘤)、小细胞肺肿瘤、咽喉癌、肛管癌、胶质母细胞瘤、直肠肿瘤、淋巴管瘤、星形细胞瘤、脑肿瘤、视网膜母细胞瘤、基底细胞瘤、脑转移瘤、成神经管细胞瘤、阴道癌、胰腺癌、睾丸癌、霍奇金氏综合征(Hodgkin's syndrome)、脑膜瘤、施耐德伯格病(Schneeberger disease)、垂体肿瘤、蕈样肉芽肿、类癌瘤、神经鞘瘤、脊柱瘤(spinalioma)、伯基特淋巴瘤、喉癌、肾癌、胸腺瘤、子宫体肿瘤、骨癌、非霍奇金氏淋巴瘤、尿道癌、CUP综合征、头/颈肿瘤、少突胶质母细胞瘤、外阴癌、肠癌、结肠直肠肿瘤、食管癌(例如,食管肿瘤)、疣损害(wart involvement)、小肠肿瘤、颅咽管瘤、卵巢肿瘤、生殖系统肿瘤、卵巢癌(例如,卵巢肿瘤)、胰腺癌(例如,胰腺肿瘤)、子宫内膜肿瘤、肝转移瘤、阴茎癌、舌癌、胆囊癌、白血病、浆细胞瘤和眼睑肿瘤。

[0421] 在一些实施方案中,如上所述,癌症或肿瘤是转移性癌症,例如表达NRP2a v1和/或v2的转移性癌症。除了上述癌症之外,示例性的转移性癌症包括但不限于已经转移到骨、肝和/或肺的膀胱癌;已经转移到骨、脑、肝和/或肺的乳腺癌;已经转移到肝、肺和/或腹膜的结肠直肠癌;已经转移到肾上腺、骨、脑、肝和/或肺的肾癌;已经转移到肾上腺、骨、脑、肝和/或其它肺部位的肺癌;已经转移到骨、脑、肝、肺和/或皮肤/肌肉的黑色素瘤;已经转移到肝、肺和/或腹膜的卵巢癌;已经转移到肝、肺和/或腹膜的胰腺癌;已经转移到肾上腺、骨、肝和/或肺的前列腺癌;已经转移到肝、肺和/或腹膜的胃癌;已经转移到骨、肝和/或肺的甲状腺癌;以及已经转移到骨、肝、肺、腹膜和/或阴道的子宫癌;等等。

[0422] 在一些实施方案中,例如,在癌症免疫治疗剂是PD-1或PD-L1拮抗剂或抑制剂的情况下,受试者具有一种或多种生物标志物(例如,细胞如癌细胞PD-1或癌症特异性CTL中的PD-L1或PD-L1水平增加),其适于PD-1或PD-L1抑制剂疗法。例如,在一些实施方案中,受试者具有增加的肿瘤浸润性CD8⁺T细胞亚群内的程序性细胞死亡1高/细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4高(例如,PD-1^{hi} CTLA-4^{hi})细胞分数(参见例如,Daud等人,《临床研究杂志》126:3447-3452,2016)。作为另一实例,在一些实施方案中,受试者具有增加的循环肿瘤反应性(例如,PD-1⁺CD11a^{hi} CD8⁺)T细胞中的Bim(B细胞淋巴瘤2相互作用(Bcl2相互作用)介导子)的水平,并且任选地具有转移性黑色素瘤(参见例如,Dronca等人,《临床调查洞察杂志

(JCI Insight)》5月5日;1(6):e86014,2016)。

[0423] 某些具体的组合包括抗NRP2a抗体和PD-L1拮抗剂或抑制剂,例如阿特殊单抗(MPDL3280A)、阿维鲁单抗(MSB0010718C)和度伐鲁单抗(MEDI4736),其用于治疗选自结肠直肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌和肾细胞癌中的一种或多种的癌症。

[0424] 一些具体的组合包括抗NRP2a抗体和PD-1拮抗剂,例如纳武单抗,其用于治疗选自霍奇金氏淋巴瘤、黑色素瘤、非小细胞肺癌、肝细胞癌、肾细胞癌和卵巢癌中的一种或多种的癌症。

[0425] 特定的具体组合包括抗NRP2a抗体和PD-1拮抗剂,例如帕博利珠单抗,其用于治疗选自黑色素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、头颈癌和尿路上皮癌中的一种或多种的癌症。

[0426] 某些具体组合包括抗NRP2a抗体和CTLA-4拮抗剂,例如伊匹单抗和曲美木单抗,其用于治疗选自黑色素瘤、前列腺癌、肺癌和膀胱癌中的一种或多种的癌症。

[0427] 一些具体组合包括抗NRP2a抗体和IDO拮抗剂,例如,吡啶莫德(NLG-8189)、1-甲基-色氨酸(1MT)、 β -吡啶(去甲哈尔满、9H-吡啶并[3,4-b]吡啶)、迷迭香酸或艾卡噪司他,其用于治疗选自转移性乳腺癌和脑癌中的一种或多种的癌症,所述脑癌任选地是多形性胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、神经胶质肉瘤或恶性脑肿瘤。

[0428] 某些具体组合包括用于治疗黑色素瘤、卡波西肉瘤和血液癌的抗NRP2a抗体和细胞因子INF- α 。还包括用于治疗转移性肾癌或转移性黑色素瘤的抗NRP2a抗体和IL-2(例如,阿地白介素)的组合。

[0429] 一些具体组合包括用于治疗如急性淋巴性白血病(ALL)、慢性淋巴性白血病(CLL)和B细胞肿瘤的血细胞癌的抗NRP2a抗体和基于T细胞的过继性免疫疗法,例如,包括靶向CD-19的CAR修饰的T细胞(参见例如Maude等人,2015,同上;Lorentzen和Straten,《斯堪的纳维亚免疫学杂志(Scand J Immunol.)》82:307-19,2015;以及Ramos等人,《癌症杂志(Cancer J.)》20:112-118,2014)。

[0430] 用于治疗癌症的方法可以与其它治疗方式组合。例如,本文所述的组合疗法可以在其它治疗干预之前、期间或之后施用于受试者,所述其它治疗干预包括对症护理、放射疗法、手术、移植、激素疗法、光动力疗法、抗生素疗法或其任何组合。对症护理包括施用皮质类固醇,以减轻脑水肿、头痛、认知功能障碍和呕吐,以及施用抗惊厥剂,以减少癫痫发作。放射疗法包括全脑照射、分级放射疗法和放射外科手术(例如立体定向放射外科手术),其可以进一步与传统外科手术组合。

[0431] 某些实施方案包括使用本文所述的抗NRP2a抗体来调节淋巴管生成,并且治疗相关的淋巴疾病或相关病状,如淋巴管瘤或肿瘤转移。淋巴系统由相互连接的毛细血管网络、收集血管和淋巴结组成,它们吸收、收集和运输从血管系统中过滤出的液体和蛋白质。该系统提供关键稳态功能:在人类中,淋巴管每天将>4升流体和大量蛋白质返回到颈部的大静脉中。

[0432] 淋巴管功能障碍(淋巴水肿)导致间质中过量流体的积聚(水肿)。尽管淋巴水肿通常不会危及生命,但它具有严重的健康后果,包括疼痛、无法动弹、纤维化、炎症、脂肪组织堆积和组织损伤。由于淋巴系统也是免疫应答的关键组成部分,因此淋巴水肿通常伴有增加的感染和其它免疫系统问题的风险。

[0433] 淋巴管生成是从预先存在的淋巴管形成新的淋巴管,并且与各种病理病状相关,

所述病理病状包括转移性播散、移植物排斥(例如,角膜、肾脏和心脏)、2型糖尿病、肥胖、高血压和淋巴管瘤(参见例如Alitalo等人,《自然》438:946-953,2005;Karaman等人,《临床研究杂志(J Clin Invest)》124:922-928,2014;Kim等人,《临床研究杂志》124:936-942,2014;Maby-El Hajjami等人,《组织化学和细胞生物学(Histochem Cell Biol)》130:1063-107,2008;Machnik等人,《自然医学(Nat Med)》15:545-552;Mortimer等人,2014.《临床研究杂志》124:915-921;Skobe等人,2009.《自然医学》15:993-994)。

[0434] 与血管侵入相比,原发性肿瘤中和周围的淋巴管侵入是各种类型的癌症的侵袭性的预后标志物。淋巴管的生长也参与移植物排斥(Dietrich,T.等人,《免疫学杂志(J Immunol)》184:535-539,2010,Hall等人,Arch Otolaryngol Head Neck Surg 129:716-719,2003.;Maula等人,《癌症研究(Cancer Res)》63:1920-1926,2003;Miyata等人,J Urol 176:348-353,2006;Saad等人,Mod Pathol 19:1317-1323,2006;Schoppmann等人,Ann Surg 240:306-312,2004;Zeng等人,《前列腺(Prostate)》65:222-230,2005)。

[0435] 抗淋巴管生成剂可用于例如治疗眼睛的衰弱性疾病,其中淋巴管的生长是角膜移植物排斥的主要原因,并且是与年龄相关的黄斑变性相关的新生血管形成的主要促成因素(Dietrich,T.等人,《免疫学杂志》184:535-539,2010)。特别地,穿透性角膜移植术是最常见的实体组织移植形式,其中在美国每年进行约40,000次角膜移植。对于在无血管低风险病床上进行的无并发症首次移植,穿透性角膜移植术的成功率高达90%。然而,放置在高危血管化的宿主床中的角膜移植物的排斥率极高(70%至90%)。因此,某些实施方案包括用于抑制淋巴管生成并且由此促进移植物存活和抑制新生血管化的抗NRP2a抗体。

[0436] 抗淋巴管生成药物还可用于治疗干眼病。在患有干眼病的角膜中已经证实了促淋巴管生成因子(例如,VEGF-C、VEGF-D和VEGFR-3)的显著上调和淋巴管的选择性生长,而没有血管的同时生长(Goyal等人,Arch Ophthalmol 128:819-824,2010)。干眼病是影响约500万美国人的免疫介导的病症。它严重地影响视力相关的生活质量,并且症状可能会使人衰弱。用于干眼病的当前治疗选项是有限的,大多是治标不治本,而且昂贵。因此,一些实施方案包括抗NRP2a抗体作为用于治疗干眼病的淋巴管生成抑制剂。

[0437] 转移是绝大多数(90%)由实体瘤引起的死亡的原因(Gupta和Massague,《细胞(Cell)》127,679-695,2006)。转移的复杂过程涉及一系列不同的步骤,包括将肿瘤细胞从原发肿瘤分离、将肿瘤细胞内渗到淋巴管或血管中,以及将肿瘤细胞外渗和生长在次级位点中。对许多肿瘤类型中的区域淋巴结的分析表明淋巴管系统是人类癌症传播的重要途径。此外,在几乎所有癌症中,淋巴结中肿瘤细胞的存在是最重要的不良预后因素。虽然先前认为此类转移仅涉及恶性细胞沿着肿瘤附近的预先存在的淋巴管的通过,但最近的实验研究和临床病理学报告(参见例如Achen等人,《英国癌症杂志(Br J Cancer)》94,1355-1360,2006和Nathanson,《癌症(Cancer)》98,413-423,2003)表明淋巴管生成可以由实体瘤诱导并且可以促进肿瘤扩散。因此,一些实施方案包括使用抗NRP2a抗体用于靶向淋巴管和淋巴管生成作为限制癌症转移的发展的治疗策略。

[0438] 因此,本文所述的方法和组合物可以用于抑制促淋巴管生成因子的活性,并且由此治疗移植物排斥、干眼病、肿瘤转移、淋巴水肿和相关炎性病状。

[0439] 一些实施方案包括使用本文所述的抗NRP2抗体来调节平滑肌收缩,并治疗相关病状。膀胱平滑肌(SM)收缩性降低可以由多种病因引起,包括继发于良性前列腺增生(BPH)的

部分梗阻、后尿道瓣膜、糖尿病、多发性硬化、脊髓损伤或特发性原因。(参见例如Drake等人, *Nat Rev Urol.* 11 (8) :454-464, 2014)。在如BPH或后尿道瓣膜条件下,膀胱抵靠受阻出口收缩。初始应答是适应性的,包括SM肥大的代偿期,其使力量产生增加以克服增加的出口阻力。当需求超过膀胱的适应能力时,收缩性能变得效率较低,残余体积增加,并且膀胱重塑,最终导致逼尿肌收缩力丧失,因为膀胱代偿失调。(参见例如Zderic等人,《细胞与分子医学杂志(*J Cell Mol Med.*)》16 (2) :203-217, 2012)。据报道,在成人中不活跃的逼尿功能的发生率高达48% (Osman等人, *Eur Urol*; 65 (2) :389-398, 2014)。此外,用于恢复SM收缩的现有药物治疗,如毒蕈碱激动剂或胆碱酯酶抑制剂,已经显示出有限的功效和不良作用 (Barendrecht等人, *BJU Int.* 99 (4) :749-752, 2007)。

[0440] 最近的研究已经将膀胱平滑肌鉴定为NRP2表达的主要位点,证实了RhoA和细胞骨架僵硬度的抑制,并且当与来自NRP2完整同窝仔对照的组织相比时,观察到来自在体内具有NRP2的普遍或平滑肌特异性缺失的小鼠的膀胱SM条的收缩性增加(参见例如Bielenberg等人,《美国病理学杂志(*Am. J. Pathol.*)》181 548-559, 2012;和Vasquez等人, *JCI Insight* 2 (3) e90617, 2017)。

[0441] 此外,最近的研究表明,尽管持续阻塞,但在经历失代偿的膀胱中靶向NRP2仍具有恢复收缩力的潜力。(Vasquez等人, *JCI Insight* 2 (3) e90617, 2017)。这些发现认为,NRP2轴代表了用于恢复部分膀胱出口阻塞综合征中的SM收缩性的潜在新颖的药理学靶标,并且为开发NRP2功能的基于抗体的调节剂提供了重要的治疗机会。

[0442] 迄今为止,对减少的逼尿肌收缩性的药理学管理集中在副交感神经活动的刺激上,以增强膀胱收缩性和减少流出阻力以促进膀胱排空 (Chancellor等人, *Urology* 72 (5) 966-967, 2008)。然而,对在具有不良收缩的膀胱的患者中的副拟交感神经药物的10项随机临床试验的分析揭示了症状的恶化或缺乏显著改善 (Barendrecht等人, *BJU Int.* 99 (4) 749-752, 2007)。在失代偿膀胱中NRP2缺失后的收缩力增加表明NRP2可能是在缓解慢性梗阻的条件下逼尿肌收缩力降低的有用靶标。

[0443] 鉴于NRP2在此过程中的作用,某些实施方案包括使用本文所述的抗NRP2抗体来调节平滑肌收缩性,包括例如治疗膀胱的平滑肌 (SM) 收缩性降低,更具体地说是与部分膀胱出口梗阻综合征相关的综合征。因此,一些实施方案包括在有需要的受试者中治疗、改善部分膀胱出口梗阻综合征的症状或抑制其进展的方法,包括向受试者使用如本文所述的至少一种抗体或其抗原结合片段,其特异性地结合至人NRP2a多肽。某些实施方案包括调节(例如,增加、减少)有需要的受试者的平滑肌收缩性的方法,所述方法包括向受试者施用如本文所述的抗NRP2a抗体或其抗原结合片段。某些实施方案包括治疗有需要的受试者的平滑肌收缩性降低、改善其症状和/或减少其进展,包括向受试者施用如本文所述的抗NRP2a抗体或其抗原结合片段。

[0444] NRP2表达已经与纤维化发展相关。因此,一些实施方案包括使用本文所述的抗NRP2a抗体来治疗纤维化,例如组织纤维化。组织纤维化的实例包括选自肝纤维化、肾纤维化、肺纤维化、皮肤纤维化、心血管纤维化和胃肠纤维化以及其它纤维性疾病组成的组的纤维化。肝纤维化的实例包括肝硬化、缺血性再灌注、肝移植后病症、坏死性肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎。在一些方面,肝硬化与通过酒精、药物和/或其它化学物质的诱导有关。肾纤维化的实例包括增生性肾小球肾炎、硬化性

肾小球肾炎、肾源性纤维化真皮病、糖尿病性肾病、肾小管间质纤维化和局灶性节段性肾小球硬化。肺纤维化的实例包括肺间质纤维化、药物诱导的结节病、肺纤维化、特发性肺纤维化、哮喘、慢性阻塞性肺病、弥漫性肺泡损伤疾病、肺动脉高压和新生儿支气管肺发育不良。皮肤纤维化的实例包括硬皮病、瘢痕疙瘩、银屑病、肥厚性瘢痕疙瘩和假硬皮病。心血管纤维化的实例包括动脉粥样硬化、冠状动脉再狭窄、充血性心肌病、心力衰竭、心脏移植和心肌纤维化。胃肠纤维化的实例包括胶原性结肠炎、绒毛萎缩、隐窝增生、多普形成、克罗恩氏病的纤维化、胃溃疡愈合和腹粘连后手术瘢痕。还包括由骨相关纤维化疾病和类风湿泛核形成引起的纤维化病状。

[0445] 用于鉴定患有本文所述的疾病或病状中的一种或多种的受试者的方法是本领域已知的。在一些实施方案中,相对于健康对照,受试者患有与至少一种NRP2a配体如CCL21和/或CCR7和/或其编码mRNA的水平或表达增加相关的疾病,和/或基于患有与至少一种NRP2a配体如CCL21和/或CCR7和/或其编码mRNA的水平或表达增加相关的疾病而被选择用于治疗。例如,在一些实施方案中,患病受试者、细胞或组织中的至少一种NRP2a配体的水平是健康对照中的至少一种NRP2a配体的水平的约或至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、1000或更多倍。在一些实施方案中,受试者患有癌症和/或基于患有癌症而被选择用于治疗,所述癌症具有相对于非癌性对照细胞或组织增加的至少一种NRP2a配体和/或其编码mRNA的水平或表达。例如,在一些实施方案中,癌细胞或组织中至少一种NRP2a配体的水平是非癌性对照或标准中NRP2a配体的水平的约或至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、1000或更多倍。因此,某些实施方案包括选择受试者进行治疗的方法,所述方法包括(i)检测受试者中至少一种NRP2a配体和/或编码mRNA相对于对照或参考增加的表达水平,以及(ii)向受试者施用包含至少一种如本文所述的抗NRP2a抗体或其抗原结合片段的治疗组合物。在特定实施方案中,NRP2a配体是CCL21和/或CCR7。

[0446] 在一些实施方案中,相对于健康或匹配的受试者对照群体的水平,受试者具有增加的NRP2a多肽的循环或血清水平和/或基于具有增加的NRP2a多肽的循环或血清水平而被选择用于治疗,所述NRP2a多肽例如可溶性NRP2a肽(例如,选自表N1)。例如,在某些实施方案中,循环或血清水平为约或至少约10、20、30、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、3000、4000、5000pM的可溶性NRP2a多肽,或者循环或血清水平为约30-50、50-100、100-2000、200-2000、300-2000、400-2000、500-2000、600-2000、700-2000、800-2000、900-2000、1000-2000、2000-3000、3000-4000、4000-5000pM的可溶性NRP2a多肽。

[0447] 在某些实施方案中,相对于健康对照(例如,NRP2相关疾病),受试者患有与NRP2a多肽(任选地选自表N1)和/或其编码mRNA的水平或表达增加相关的疾病,和/或基于患有与NRP2a多肽(任选地选自表N1)和/或其编码mRNA的水平或表达增加相关的疾病而被选择用于治疗。在一些实施方案中,NRP2a多肽是NRP2a变体1或变体2同种型或其片段。例如,在某些实施方案中,患病受试者、细胞或组织中的NRP2a多肽的水平是健康对照中NRP2a多肽的水平的约或至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100倍或更多倍。在一些实施方案中,受试者患有癌症和/或基于患有癌症而被选择用于治疗,所述癌症相对于对照细胞或组织,任选地相对于与癌症相同类型的非癌细胞或组织,具有增加的

NRP2a多肽(例如选自表N1)和/或其编码mRNA的水平或表达。例如,在一些实施方案中,癌细胞或组织中的NRP2a多肽的水平是非癌性对照或标准中NRP2a多肽的水平的约或至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100倍或更多倍。因此,一些实施方案包括选择受试者进行治疗的方法,所述方法包括(i)检测受试者中的NRP2a多肽和/或其编码mRNA相对于对照或参考的表达水平增加,以及(ii)向受试者施用包含至少一种如本文所述的抗NRP2a抗体或其抗原结合片段的治疗组合物。

[0448] 在一些实施方案中,相对于健康对照或匹配的对照标准或受试者群体,受试者具有与NRP2a(例如,表N1的变体1和/或2)的增加了的水平或表达或NRP2a:NRP2b表达的改变的比率相关的疾病,和/或基于具有与NRP2a(例如,表N1的变体1和/或2)的增加了的水平或表达或NRP2a:NRP2b表达的改变的比率相关的疾病而被选择用于治疗。在一些实施方案中,相对于健康对照或匹配的对照标准或受试者群体,受试者具有显著更高的NRP2a的表达或水平。在一些实施方案中,与健康对照或匹配的对照标准或受试者群体相比,NRP2a的水平增加约或至少约10%、20%、30%、40%、50%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%。因此,某些实施方案包括选择受试者进行癌症治疗的方法,所述方法包括(i)检测受试者中相对于对照或参考增加的NRP2a表达水平,以及(ii)向受试者施用包含如本文所述的抗NRP2a抗体或其抗原结合片段的治疗组合物。

[0449] 在一些实施方案中,健康对照或匹配的对照标准或受试者群体包括相同类型的患病或非患病细胞或组织的年龄匹配样本的平均范围,其包括特定特征,例如耐药性、转移潜能、侵袭性、遗传特征(例如p53突变、PTEN缺失、IGFR表达)和/或表达模式。

[0450] 如上所述,对于用于治疗人或非人哺乳动物疾病或测试的体内用途,本文所述的药剂通常在施用之前被并入到一种或多种治疗组合物或药物组合物中,包括兽医治疗组合物。

[0451] 因此,某些实施方案涉及包含至少一种抗体或其抗原结合片段的治疗组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合至人NRP2a v1和/或v2多肽,如本文所述。在一些情况下,治疗组合物或药物组合物包含与药学上可接受的或生理学上可接受的载剂或赋形剂组合的本文所述的药剂中的一种或多种。某些治疗组合物还包含至少一种癌症免疫治疗剂,如本文所述。

[0452] 一些治疗组合物仅包含(并且某些方法仅利用)一种抗NRP2a抗体或其抗原结合片段所述抗体或其抗原结合片段。某些治疗组合物包含(并且某些方法利用)至少两种、三种、四种或五种不同的抗NRP2a抗体或其抗原结合片段的混合物。

[0453] 例如,某些治疗组合物包含至少两种抗NRP2抗体,包括特异性地结合至人NRP2a多肽的至少一个第一表位的第一抗体或其抗原结合片段,以及特异性地结合至相同或不同人NRP2多肽的至少一个第二表位的第二抗体或其抗原结合片段,其中所述至少一个第一表位不同于所述至少一个第二表位。在一些实施方案中,第一抗体和第二抗体或其抗原结合片段特异性地并且非竞争性地结合至NRP2多肽的相同结构域。在一些实施方案中,第一抗NRP2抗体或其抗原结合片段选择性地结合至对所述NRP2a同种型(例如,表N1的变体1和/或2)具有特异性的第一表位,并且第二抗NRP2抗体或其抗原结合片段选择性地结合至对NRP2b同种型(例如,表N1的变体4和/或5)具有特异性的第二表位,或对NRP2a和NRP2b同种型共同的第二表位(即,位于由全长NRP2a和NRP2b共享的共同的、表面暴露的a1、a2、b1、b2

或c结构域中)。

[0454] 在一些实施方案中,第一抗体和第二抗体或其抗原结合片段特异性地和非竞争性地结合至NRP2多肽的不同结构域。在一些实施方案中,第一抗体调节NRP2a多肽与至少一种NRP2a配体(例如CCL21和/或CCR7)之间的信号传导活性。

[0455] 在一些实施方案中,第一抗体和第二抗体或其抗原结合片段都是封闭抗体,例如,针对至少两种不同的NRP2配体。在一些实施方案中,第一抗体和第二抗体或其抗原结合片段都是部分封闭抗体,例如,针对至少两种不同的NRP2配体。在一些情况下,第一抗体和第二抗体或其抗原结合片段都是非封闭抗体,例如,对于至少两种不同的NRP2配体。

[0456] 在一些情况下,第一抗体或其抗原结合片段是封闭抗体,并且第二抗体或其抗原结合片段是部分封闭抗体。在某些情况下,第一抗体或其抗原结合片段是封闭抗体,并且第二抗体或其抗原结合片段是非封闭抗体。

[0457] 在一些实施方案中,第一抗体和第二抗体或其抗原结合片段均包含在人类中具有高效应子功能的IgG Fc结构域,例如IgG1或IgG3 Fc结构域。在一些实施方案中,第一抗体和第二抗体或其抗原结合片段包含在人类中具有低效应子功能的IgG Fc结构域,例如IgG2或IgG4 Fc结构域。

[0458] 在一些情况下,第一抗体或其抗原结合片段包含在人类中具有高效应子功能的IgG Fc结构域,例如IgG1或IgG3 Fc结构域,并且第二抗体或其抗原结合片段包含在人类中具有低效应子功能的IgG Fc结构域,例如IgG2或IgG4 Fc结构域。

[0459] 在特定实施方案中,包含药剂如抗NRP2a抗体或其它多肽药剂的治疗组合物基于蛋白质或基于重量-重量为基本上纯的,例如,组合物具有基于蛋白质或基于重量-重量为至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%的纯度。

[0460] 在一些实施方案中,本文提供的抗体(例如,抗NRP2a抗体)或其它多肽药剂不形成聚集体,具有期望的溶解度和/或具有适合于在人类中使用的免疫原性概况,如本文所述和本领域已知的。因此,在一些实施方案中,包含多肽药剂(例如抗NRP2a抗体)的治疗组合物基本上不含聚集体。例如,某些组合物包含小于约10%(基于蛋白质)的高分子量聚集蛋白,或小于约5%的高分子量聚集蛋白,或小于约4%的高分子量聚集蛋白,或小于约3%的高分子量聚集蛋白,或小于约2%的高分子量聚集蛋白,或小于约1%的高分子量聚集蛋白。一些组合物包含在其表观分子量方面至少约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约95%单分散的多肽药剂(例如,抗体,如抗NRP2a抗体)。

[0461] 在一些实施方案中,将多肽药剂如抗体(例如抗NRP2a抗体)浓缩至约或至少约0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6、0.7、0.8、0.9、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11、12、13、14或15mg/ml,并且被配制用于生物治疗用途。

[0462] 为了制备治疗组合物或药物组合物,将有效或所需量的一种或多种药剂与本领域技术人员已知的适合于特定药剂和/或施用模式的任何药物载剂或赋形剂混合。药物载剂可以是液体、半液体或固体。用于肠外、皮内、眼内、皮下、直接滴入到膀胱或局部应用中的溶液或悬浮液可以包括,例如,无菌稀释剂(如水)、盐水溶液(,例如磷酸盐缓冲盐水;PBS)、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗微生物剂(如苯甲醇和对羟基苯甲酸甲酯);抗氧化剂(如抗坏血酸和亚硫酸氢钠)和螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));缓冲剂(如

醋酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐)。如果静脉内施用(例如,通过IV输注),则合适的载剂包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS),以及含有如葡萄糖、聚乙二醇、聚丙二醇和其混合物的增稠剂和增溶剂的溶液。

[0463] 本文所述的呈纯形式或适当的治疗或药物组合物的药剂的施用可以经由用于服务于类似效用的药剂的任何可接受的施用模式来进行。治疗组合物或药物组合物可以通过将含有药剂的组合物与适当的生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂混合来制备,并且可以调配成固体、半-固体、液体或气体形式的制剂,如片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球剂和气雾剂。另外,组合物内可以但不必存在其它药学活性成分(包括如本文其它地方描述的其它小分子)和/或合适的赋形剂(如盐、缓冲剂和稳定剂)。

[0464] 施用可以通过多种不同的途径来实现,包括口服、肠胃外、鼻腔、静脉内、眼内、皮内、肌内、皮下、滴注到膀胱中或局部施用。优选的施用模式取决于待治疗或预防的病状的性质。具体实施方案包括通过IV输注施用。

[0465] 载剂可以包含例如药学上可接受的或生物学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂,其对于暴露于其中的细胞或哺乳动物来说在所采用的剂量和浓度下是无毒的。通常,生理学上可接受的载剂是pH缓冲水溶液。生理学上可接受的载剂的实例包含如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸等缓冲剂;抗氧化剂,包含抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包含葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露醇或山梨醇;成盐平衡离子,如钠;和/或非离子型表面活性剂,如聚山梨醇酯20(TWEENTM)、聚乙二醇(PEG)和泊洛沙姆(poloxamer, PLURONICSTM)等。

[0466] 在一些实施方案中,一种或多种药剂可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如,分别地,羟甲基纤维素或明胶-微胶囊以及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒以及纳米胶囊)中或在粗乳液中。在《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第16版,Oslo A.编辑,(1980)中公开了此类技术。所述一种或多种颗粒或脂质体可以进一步包括其它治疗剂或诊断剂。

[0467] 精确的剂量和治疗持续时间随所治疗疾病而变化,并且可以使用已知的测试方案凭经验测定或者可以通过在本领域中已知的模型系统中测试组合物并从中进行推断来确定。也可以进行对照临床试验。剂量还可以随着待缓解的病状的严重程度而变化。药物组合物通常被配制和施用以发挥治疗上有用的效果,同时使不期望的副作用最小化。组合物可以一次施用,或者可以分成多个较小的剂量以一定时间间隔施用。对于任何特定受试者,可以根据个体需要随时间推移来调整具体剂量方案。

[0468] 因此,施用这些和相关治疗组合物或药物组合物的典型途径包括但不限于口服、局部、透皮、吸入、肠胃外、舌下、经颊、眼、直肠、阴道和鼻内。如本文所用,术语肠胃外注射包括皮下注射、静脉内、灌注到膀胱中、肌内、胸骨内注射或输注技术。根据本公开的某些实施方案的治疗组合物或药物组合物被配制或配制成以便在向受试者或患者施用组合物时允许其中包含的活性成分是生物可利用的。将施用于受试者或患者的组合物可以采取一个或多个

剂量单元的形式,其中例如,片剂可以是单剂量单元,并且本文所描述的呈气雾剂形式的药剂的容器可以容纳多个剂量单位。制备此类剂型的实际方法对于本领域的技术人员来说是已知的或者将是显而易见的;例如,参见《雷明顿:药学科学与实践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)》,第20版(费城医药科学学院(Philadelphia College of Pharmacy and Science),2000)。待施用的组合物通常将含有用于治疗有效量的本文所述的药剂,以用于治疗所关注的疾病或病状。

[0469] 治疗组合物或药物组合物可以呈固体或液体的形式。在一个实施方案中,载体是颗粒,使得组合物例如呈片剂或粉末形式。载体可以是液体,其中组合物是例如口服油、可注射液体或气溶胶,其可用于例如吸入施用。当预期用于口服施用时,药物组合物优选地呈固体或液体形式,其中半固体、半液体、悬浮液和凝胶形式包括在本文视为固体或液体的形式内。某些实施方案包括无菌、可注射溶液。

[0470] 作为用于口服施用的固体组合物,药物组合物可以被配制成粉末、颗粒、凝胶、压缩片剂、丸剂、胶囊、口香糖、圆片等。此类固体组合物通常将含有一种或多种惰性稀释剂或可食用载体。此外,可以存在以下中的一种或多种:粘合剂,如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄耆胶或明胶;赋形剂,如淀粉、乳糖或糊精;崩解剂,如海藻酸、海藻酸钠、Primogel、玉米淀粉等;润滑剂,如硬脂酸镁或Sterotex;助流剂,如胶体二氧化硅;甜味剂,如蔗糖或糖精;调味剂,如薄荷、水杨酸甲酯、或橙味调味剂;以及着色剂。当药物组合物呈胶囊例如明胶胶囊的形式时,除了上述类型的材料之外,它还可以含有液体载体如聚乙二醇或油。

[0471] 治疗组合物或药物组合物可以呈液体例如酞剂、糖浆、溶液、凝胶、乳液或悬浮液的形式。作为两个实例,液体可以用于口服施用或通过注射递送。当旨在用于口服施用时,除了本发明的化合物之外,优选的组合物还含有甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和风味增强剂中的一种或多种。在旨在通过注射施用的组合物中,可以包括表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0472] 液体治疗组合物或药物组合物,无论其是溶液、悬浮液还是其它类似形式,都可以包含以下佐剂中的一种或多种佐剂:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液,优选地生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、固定油,如可以充当溶剂或悬浮介质的合成单酸甘油酯或二酸甘油酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或对羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的药剂,如氯化钠或右旋糖。肠胃外制剂可以封闭在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。生理盐水是优选的佐剂。可注射的药物组合物优选地是无菌的。

[0473] 旨在用于肠胃外、眼内或口服施用的液体治疗组合物或药物组合物应当含有一定量的药剂,使得将获得合适的剂量。通常,该量为组合物中所关注的药剂的至少0.01%。当预期用于口服施用时,该量可以变化为在组合物的重量的0.1%至约70%之间。某些口服治疗组合物或药物组合物含有约4%至约75%的所关注的药剂。在某些实施方案中,制备治疗组合物或药物组合物和制剂,使得肠胃外剂量单元在稀释之前含有0.01重量%至10重量%的所关注的药剂。

[0474] 治疗组合物或药物组合物可以旨在用于局部施用,在这种情况下,载体可以适当

地包含溶液、乳液、软膏或凝胶基质。例如,基质可以包括以下中的一种或多种:凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、如水和醇的稀释剂以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可以存在于治疗组合物或药物组合物中以用于局部施用。如果旨在用于透皮施用,则组合物可以包括透皮贴剂或离子导入装置。

[0475] 治疗组合物或药物组合物可以旨在用于以例如栓剂的形式进行直肠施用,所述栓剂将在直肠中融化并释放药物。用于直肠施用的组合物可以含有油性基质作为适合的无刺激性赋形剂。此类基质包括但不限于羊毛脂、可可脂和聚乙二醇。

[0476] 治疗组合物或药物组合物可以包括各种材料,其改变固体或液体剂量单元的物理形式。例如,组合物可以包括在活性成分周围形成包衣壳的材料。形成包衣壳的材料通常是惰性的,并且可以选自例如糖、虫胶和其它肠溶包衣剂。可替代地,活性成分可以包封在明胶胶囊中。呈固体或液体形式的治疗组合物或药物组合物可以包括与药剂结合并由此有助于递送化合物的组分。可以以这种能力起作用的合适的组分包括单克隆抗体或多克隆抗体、一种或多种蛋白质或脂质体。

[0477] 治疗组合物或药物组合物可以基本上由可以作为气溶胶施用的剂量单位组成。术语气溶胶用于表示从胶体性质的系统到由加压包装组成的系统的各种系统。递送可以通过液化的气体或压缩的气体或通过分配活性成分的合适泵系统进行。气溶胶可以在单相、双相或三相系统中递送,以便递送活性成分。气溶胶的递送包含必要的容器、激活器、阀、子容器等,这些可以一起形成试剂盒。在没有过度实验的情况下,本领域普通技术人员可以确定优选的气溶胶。

[0478] 本文所述的组合物可以用防止药剂从体内快速消除的载剂制备,例如缓释制剂或包衣。此类载剂包含受控释放的制剂,如但不限于植入物和微囊化递送系统,以及可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、聚原酸酯、聚乳酸以及本领域的普通技术人员已知的其它聚合物。

[0479] 治疗组合物或药物组合物可以通过药物领域熟知的方法制备。例如,旨在通过注射施用的治疗组合物或药物组合物可以包含盐、缓冲液和/或稳定剂中的一种或多种,其与无菌蒸馏水一起形成溶液。可以添加表面活性剂以促进均匀溶液或悬浮液的形成。表面活性剂是与药剂非共价相互作用以便促进药剂在水性递送系统中的溶解或均匀悬浮的化合物。

[0480] 治疗组合物或药物组合物可以以治疗有效量施用,所述治疗有效量将根据各种因素而变化,所述因素包含所采用的特定化合物的活性;化合物的代谢稳定性和作用时间;受试者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;施用方式和时间;排泄率;药物组合;特定病症或病状的严重程度;以及经历治疗的受试者。在一些情况下,治疗有效日剂量(对于70kg哺乳动物)为约0.001mg/kg(即,约0.07mg)到约100mg/kg(即,约7.0g);优选地,治疗有效剂量(对于70kg哺乳动物)为约0.01mg/kg(即,约0.7mg)到约50mg/kg(即,约3.5g);更优选地,治疗有效剂量(对于70kg哺乳动物)为约1mg/kg(即,约70mg)到约25mg/kg(即,约1.75g)。在一些实施方案中,治疗有效剂量每周、每两周或每月施用。在具体实施方案中,治疗有效剂量例如以约1-10mg/kg或1-5mg/kg,或约1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg的剂量每周、每两周或每月施用。

[0481] 本文所描述的组合疗法可以包含施用含有抗NRP2a抗体和另外的治疗剂(例如,免

疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂、激酶抑制剂)的单个药物剂量调配物,以及施用包括呈自身的单独的药物剂量调配物的形式的抗NRP2a抗体和另外的治疗剂的组合物。例如,如本文所述的抗NRP2a抗体和另外的治疗剂可以以单一口服剂量组合物如片剂或胶囊一起施用于受试者,或者每种药剂以单独的口服剂量制剂施用。类似地,本文所描述的抗NRP2a抗体和另外的治疗剂可以以单个胃肠外剂量组合物的形式,如以盐水溶液或其它生理上可接受的溶液的形式一起施用于受试者,或者每种药剂可以以单独的胃肠外剂量调配物的形式施用。作为另一个实例,对于基于细胞的治疗,抗NRP2a抗体可以在施用之前与细胞混合,作为单独组合物的一部分施用,或两者。当使用单独的剂量调配物时,组合物可以在基本上相同时间(即,同时)施用,或在单独的交错时间(即,依次)并且以任何顺序施用;组合治疗应被理解为包括所有这些方案。

[0482] 还包括患者护理试剂盒,所述患者护理试剂盒包括:(a)如本文所描述的与人NRP2a变体1和/或变体2多肽(抗NRP2a抗体)特异性结合的至少一种抗体或其抗原结合片段;和任选地(b)至少一种另外的治疗剂(例如,免疫治疗剂、化学治疗剂、激素治疗剂、激酶抑制剂)。在某些试剂盒中,(a)和(b)在单独的治疗组合物中。在一些试剂盒中,(a)和(b)在同一治疗组合物中。

[0483] 本文的试剂盒还可以包含适合于或期望用于所治疗的适应症或用于期望的诊断应用的一种或多种另外的治疗剂或其它组分。本文的试剂盒还可以包含促进预期的递送模式所需或期望的一个或多个注射器或其它部件(例如,支架、可植入的贮库等)。

[0484] 在一些实施方案中,患者护理试剂盒含有用于一或多种组合物和一种或多种信息材料的单独容器、分隔物或隔室。例如,组合物可以包含在瓶子、小瓶或注射器中,并且所述信息材料可以与容器相关联地包含。在一些实施方案中,试剂盒的单独元件包含在单个未分隔的容器内。例如,组合物包含在其上贴有标签形式的信息材料的瓶子、小瓶或注射器中。在一些实施方案中,试剂盒包含各自含有抗NRP2a抗体和任选地至少一种另外的治疗剂的一种或多种单位剂型(例如,本文所描述的剂型)的多个(例如,一包)单独的容器。例如,试剂盒包含各自含有抗NRP2a抗体和任选地至少一种另外的治疗剂的单个单位剂量的多个注射器、安瓿、箔袋或泡罩包装。试剂盒的容器可以是气密的、防水的(例如,不渗透水分变化或蒸发)和/或不透光的。

[0485] 患者护理试剂盒任选地包含适于施用组合物的装置,例如,注射器、吸入器、滴管(例如,眼滴管)、药签(例如,棉签或木签)或任何此类递送装置。在一些实施方案中,所述装置是分配计量剂量的药剂的可植入装置。还包括例如通过组合本文所述的组分来提供试剂盒的方法。

[0486] 药物的生物测定和分析测定、释放测定和产品规格、诊断和试剂

[0487] 还包括与抗NRP2a抗体相关的生物测定和相关药剂,如治疗试剂和诊断试剂。实例包括测量纯度、生物活性、亲和力、溶解度、pH、内毒素水平的生物测定和分析测定,本文中所述特性中的许多特性进行了描述。还包括建立剂量应答曲线和/或为不同批次的抗体之间的比较提供一个或多个基础的测定。批次比较可以基于化学表征、生物学表征和临床表征中的任何一种或多种。还包括评估所选抗体的效力、稳定性、药代动力学和免疫原性的方法。在其它用途中,这些和其它方法可以用于本文所描述的生物或化学剂(包括抗NRP2a抗体)的批次释放测试。

[0488] 某些实施方案包括生物亲和力测定的使用。此类测定可以用于评估例如抗NRP2a抗体与至少一种NRP2配体(例如,NRP2a配体如CCL21和/或CCR7)之间的结合亲和力,包括其干扰人NRP2a多肽与至少一种NRP2配体或其它细胞结合配偶体之间的相互作用的能力。某些示例性的结合亲和力测定可以利用ELISA测定或蛋白质-蛋白质相互作用测定,如**NanoBiT®**蛋白质:蛋白质相互作用系统(Promega),以及如本文所述和本领域已知的其它蛋白质互补测定和方法。某些测定利用高效受体结合色谱法(参见例如Roswall等人,《生物制剂(Biologicals)》24:25-39,1996)。其它示例性的结合亲和力测定可以利用基于表面等离子体共振(SPR)的技术。实例包括BIACore技术,其中某些技术将SPR技术与微流体系统整合,以实时监测范围从pM到mM的浓度下的分子相互作用。还包括KINEXA™测定,其提供结合特异性、结合亲和力和结合动力学/速率常数的准确测量结果。

[0489] 某些实施方案涉及用于评估或优化抗NRP2a抗体的免疫原性的免疫测定。实例包括离体人细胞测定和体外免疫酶促测定,以提供关于治疗性蛋白质的免疫原性潜力的有用信息。离体细胞应答测定可以用于例如再现抗原呈递细胞(APC)与T细胞之间的细胞协作,从而测量在与所关注的蛋白质接触后的T细胞活化。某些体外酶促测定可以利用覆盖相关人类群体的大部分的重组HLA-DR分子的集合,并且可以包括用于测试肽(源于治疗性蛋白质的片段化)与HLA-DR分子的结合的自动化免疫酶促测定。还包括例如通过使用这些方法和相关方法从抗NRP2a抗体鉴定一个或多个T细胞表位并且然后去除或改变所述一个或多个T细胞表位来降低所选蛋白质的免疫原性的方法。

[0490] 还包括用于测量参数的生物释放测定(例如,基于细胞的测定),所述参数例如如特异性生物活性、结合特性、NRP2受体二聚化和异二聚化,或NRP2多肽的信号转导、受体定位、内化或时空动力学的变化,和/或其它参数如可塑性、生长和/或细胞毒性。某些具体生物测定包括例如基于细胞的测定,所述基于细胞的测定利用细胞结合配偶体(例如,细胞表面受体(例如,存在于细胞表面上的NRP2a v1和/或v2多肽、不同的NRP2多肽(参见表N1)和/或至少一种NRP2配体(例如,CCL21和/或CCR7)),其在细胞表面上内源地或重组性地表达),所述细胞结合配偶体与读出物,如本文所描述的NRP2或NRP2配体结合或功能活性的荧光或发光指示剂功能性地偶联。

[0491] 例如,具体实施方案包括内源地或重组地表达人NRP2多肽(例如,在细胞表面上的NRP2a v1和/或v2多肽,或其它NRP2多肽)的细胞,其允许评估抗NRP2a抗体结合本文所述的一种或多种NRP2多肽的能力。在一些实施方案中,抗NRP2a抗体和/或NRP2多肽功能上偶联至读出物或指示剂(如荧光或发光指示剂),以测量NRP2多肽的结合和/或生物活性。能够响应于抗NRP2a抗体监测NRP2a多肽与NRP2a配体的相互作用的示例性的蛋白质-蛋白质相互作用测定包括分离传感器系统,如**NanoBiT®**蛋白质:蛋白质相互作用系统(Promega)。在一些实施方案中,细胞还表达至少一种NRP2配体(例如,来自表N2的NRP2a配体,如CCR7),其中至少一种NRP2配体偶联至读出物或指示剂,如至少一种NRP2配体与NRP2a多肽的结合和/或生物活性的荧光或发光指示剂。

[0492] 还包括用于通常利用经过工程化的或野生型小鼠、大鼠、猴或其它哺乳动物来表征抗NRP2a抗体的药代动力学的体内生物测定(参见例如Lee等人,《药理学杂志(The Journal of Pharmacology)》281:1431-1439,1997)。基于细胞毒性的生物测定的实例包括释放测定(例如,用于测量细胞凋亡的铬或铈释放测定;参见例如,von Zons等人,《临

床及诊断实验室免疫学(Clin Diagn Lab Immunol.)》4:202-207,1997)等,其可以评估抗NRP2抗体的细胞毒性,以便建立剂量应答曲线、进行批量测试或测量与各种监管机构(如食品和药物管理局(FDA))的批准相关的其它性质。还包括用于评估抗NRP2a抗体对免疫细胞(例如树突状细胞)的影响的测定。

[0493] 某些实施方案包括测定系统,所述测定系统包含单个单克隆抗NRP2a抗体和至少一种人NRP2a v1/和/或v2多肽,其中所述抗NRP2a抗体结合至所述NRP2a多肽。在一些情况下,至少一种抗体包含IgG4 Fc结构域。

[0494] 还包含测试材料,所述测试材料包括经纯化的NRP2多肽(例如,NRP2a v1和/或v2多肽),其中所述经纯化的NRP2多肽以能够实现抗体结合检测的方式与固体底物结合。

[0495] 此类测定和材料可以用于例如形成所选的抗NRP2a抗体的剂量应答曲线,和/或比较不同批次的蛋白质或其它药剂的剂量应答曲线。剂量应答曲线是使应激源的大小与受体的应答相关的X-Y图,所述受体的应答如NRP2-NRP2配体(例如,来自表N2NRP2a配体)相互作用;应答可以是生理应答或生化应答,如体外细胞或体内细胞或组织中的非典型生物活性、如在体内测量的(例如,如通过 EC_{50} 测量的)治疗有效量或死亡,无论是在体外还是在体内测量的死亡(例如,细胞死亡、生物体死亡)。死亡通常表示为 LD_{50} ,即对于模拟群体的50%是致死的统计上推导的剂量,但其可以由 LC_{01} (对于动物测试群体的1%的致死剂量)、 LC_{100} (对于动物测试群体的100%的致死剂量)或 LC_{10} (导致致死的最低剂量)指示。几乎任何期望的效果或终点可以以这种方式来表征。

[0496] 应答曲线的测量的剂量通常绘制在X轴上,并且应答绘制在Y轴上。更通常地,剂量的对数绘制在X轴上,最常见的是生成最陡部分位于中间的S形曲线。不可观察的效应水平(NOEL)是指未观察到可测量效应的最低实验剂量,并且阈值剂量是指沿着图的第一点,其指示高于零的应答。一般来说,更强的药物产生更陡峭的剂量应答曲线。对于许多药物,在略大于阈值剂量的剂量下发现期望的效果,这通常是因为较低的剂量相对无效,并且较高的剂量导致不期望的副作用。对于体内生成的剂量应答曲线,如果需要,曲线可以通过如 μ g/kg、mg/kg或g/kg体重的值来表征。

[0497] 对于批次比较,计算不同批次的不同剂量应答曲线(例如,不同批次的抗NRP2a抗体之间)之间的变异系数(CV)可能是有用的,部分地是因为CV允许用不同单位或不同手段比较数据集。例如,在某些示例性的实施方案中,对于4、5、6、7或8点剂量曲线,两个或三个或更多不同批次的抗NRP2抗体或其它药剂之间的CV小于约30%、20%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。在某些实施方案中,在基于细胞的测定中测量剂量应答曲线,并且其读出与抗NRP2a抗体的选定活性的增加或减少相关。在某些实施方案中,在细胞释放测定或动物模型(例如,小鼠模型)中测量剂量应答曲线,并且其读出与细胞死亡或动物死亡相关。其它变型对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0498] 表达和纯化系统

[0499] 某些实施方案包括用于表达和纯化本文所述的抗NRP2a抗体或其它基于多肽的药剂的方法和相关组合物。此类重组抗NRP2a抗体可以使用如在以下文献中所描述的标准方案方便地制备:例如,Sambrook等人(1989,同上),特别是第16节和第17节;Ausubel等人,(1994,同上),特别是第10章和第16章;以及Coligan等人,《蛋白质科学实验室指南(Current Protocols in Protein Science)》(约翰·威利父子出版公司(John Wiley&

Sons, Inc.), 1995-1997), 特别是第1章、第5章和第6章。作为一个一般实例, 抗NRP2a抗体可以通过包括以下步骤中的一个或多个步骤的程序制备: (a) 制备包含编码抗NRP2a抗体重链和轻链并且可操作地连接至调节元素的多核苷酸序列的构建体; (b) 将所述构建体引入到宿主细胞中; (c) 培养宿主细胞以表达抗NRP2a抗体; 以及 (d) 从宿主细胞中分离抗NRP2a抗体。

[0500] 本文别处描述了抗NRP2a抗体多核苷酸。为了表达所需的多肽, 可以将编码抗NRP2a抗体的核苷酸序列或功能等效物插入到适当的表达载体中, 即含有用于转录和翻译所插入的编码序列的必要元件的载体。可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建含有对所关注的多肽进行编码的序列和适当的转录和翻译控制元件的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。此类技术描述于Sambrook等人, 《分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)》(1989) 和Ausubel等人, 《分子生物学实验室指南 (Current Protocols in Molecular Biology)》(1989) 中。

[0501] 多种表达载体/宿主系统是已知的, 并且可以用于容纳和表达多核苷酸序列。这些包括: 但不限于微生物, 如用重组噬菌体、质粒或粘粒DNA表达载体转化的细菌; 用酵母表达载体转化的酵母; 用病毒表达载体 (例如, 杆状病毒) 感染的昆虫细胞系统; 用病毒表达载体 (例如, 花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV) 或用细菌表达载体 (例如, Ti或pBR322质粒) 转化的植物细胞系统; 或动物细胞系统, 包含哺乳动物细胞, 并且更具体地, 人类细胞系统。

[0502] 表达载体中存在的“控制元件”或“调控序列”是载体的那些非翻译区—增强子、启动子、5'和3'未翻译区, 其与宿主细胞蛋白质相互作用以进行转录和翻译。此类元件的强度和特异性可以变化。取决于所使用的载体系统和宿主, 可以使用任何数量的合适的转录和翻译元件, 包括组成型启动子和诱导型启动子。例如, 当在细菌系统中克隆时, 可以使用诱导型启动子, 如PBLUESCRIPT噬菌粒 (加利福利亚州拉荷亚Stratagene公司 (Stratagene, LaJolla, Calif.)) 或PSPORT1质粒 (马里兰州盖瑟斯堡Gibco BRL公司 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.)) 等的杂交lacZ启动子。在哺乳动物细胞系统中, 通常优选来自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子。如果需要产生含有对多肽进行编码的序列的多个拷贝的细胞系, 则可以有利地将基于SV40或EBV的载体与适当的可选择标志物一起使用。

[0503] 在细菌系统中, 可以根据预期用于表达的多肽的用途来选择许多表达载体。例如, 当需要大量时, 可以使用引导易于纯化的融合蛋白的高水平表达的载体。此类载体包括但不限于多功能大肠杆菌克隆和表达载体, 如BLUESCRIPT (Stratagene公司), 其中对所关注的多肽进行编码的序列可以与 β -半乳糖苷酶的氨基端Met和随后的7个残基 β 的序列同框连接到载体中, 从而产生杂交蛋白; pIN载体 (Van Heeke和Schuster, 《生物化学杂志》264: 55035509 (1989)); 等等。还可以使用pGEX载体 (威斯康星州麦迪逊普洛麦格公司 (Promega, Madison, Wis.)) 来将外源多肽表达为与谷胱甘肽S-转移酶 (GST) 形成的融合蛋白。通常, 此类融合蛋白是可溶性的, 并且可以通过吸附到谷胱甘肽-琼脂糖珠上, 随后在游离谷胱甘肽的存在下进行洗脱来容易地从裂解的细胞中纯化。在此类系统中制备的蛋白质可以被设计成包括肝素、凝血酶或因子XA蛋白酶切割位点, 使得所关注的克隆多肽可以随意从GST部分释放。

[0504] 某些实施方案可以采用基于大肠杆菌的表达系统 (参见例如, 结构基因组学联盟

(Structural Genomics Consortium)等,《自然方法(Nature Methods)》5:135-146,2008)。这些和相关实施方案可以部分或完全依赖于独立于连接的克隆(ligation-independent cloning,LIC)以产生合适的表达载体。在具体实施方案中,蛋白质表达可由T7 RNA聚合酶(例如,pET载体系列)控制。这些和相关实施方案可以利用表达宿主菌株BL21(λ DE3),其是BL21的支持T7介导的表达并且缺乏用于改善靶蛋白稳定性的lon和ompT蛋白酶的 λ DE3溶原体。还包含携带大肠杆菌中很少使用的对tRNA进行编码的质粒的表达宿主菌株,如ROSETTA™(DE3)和Rosetta 2(DE3)菌株。也可以使用以商标BENZONASE®核酸酶和BUGBUSTER®蛋白提取试剂出售的试剂来改善细胞裂解和样品处理。对于细胞培养,自诱导培养基可以提高许多表达系统(包括高通量表达系统)的效率。这种类型的培养基(例如,OVERNIGHT EXPRESS™自诱导系统)在不添加人工诱导剂如IPTG的情况下通过代谢移位逐渐引发蛋白质表达。具体实施方案采用六组氨酸标签(如以商标HIS•TAG®融合物出售的那些),随后采用固定化金属亲和色谱法(IMAC)纯化或相关技术。然而,在某些方面,临床级蛋白质可以在没有或不使用亲和标签的情况下从大肠杆菌包涵体分离(参见例如Shimp等人,《蛋白质表达与纯化(Protein Expr Purif.)》50:58-67,2006)。作为另一实例,某些实施方案可以采用冷休克诱导的大肠杆菌高产率生产系统,因为在低温下大肠杆菌中蛋白质的过表达改善了其溶解度和稳定性(参见例如,Qing等人,《自然生物技术》22:877-882,2004)。

[0505] 还包括高密度细菌发酵系统。例如,真氧雷尔氏菌(*Ralstonia eutropha*)的高细胞密度培养允许以超过150g/L的细胞密度产生蛋白质,以及以超过10g/L的滴度表达重组蛋白。

[0506] 在酿酒酵母中,可以使用多种含有组成型启动子或诱导型启动子(如 α 因子、醇氧化酶和PHH)的载体。有关综述,参见Ausubel等人(同上)和Grant等人,《酶学方法(Methods Enzymol.)》153:516-544(1987)。还包括巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统(参见例如Li等人,《自然-生物技术》24,210-215,2006;以及Hamilton等人,《科学》,301:1244,2003)。某些实施方案包括被工程化以选择性地糖基化蛋白质的酵母系统,包含具有人源化N-糖基化途径的酵母等(参见例如Hamilton等人,《科学》313:1441-1443,2006;Wildt等人,《自然综述-微生物学(Nature Reviews Microbiol.)》3:119-28,2005;以及Gerngross等人,《自然生物技术》22:1409-1414,2004;美国专利第7,629,163号;第7,326,681号;和第7,029,872号)。仅作为实例,重组酵母培养物可以在Fernbach烧瓶中或15L、50L、100L和200L发酵罐等中生长。

[0507] 在使用植物表达载体的情况下,编码多肽的序列的表达可以由许多启动子中的任何一个启动子驱动。例如,如CaMV的35S和19S启动子等病毒启动子可以单独使用或与来自TMV的 ω 前导序列组合使用(Takamatsu,《欧洲分子生物学组织杂志》6:307-311(1987))。可替代地,可以使用如RUBISCO的小亚基或热休克启动子等植物启动子(Coruzzi等人,《欧洲分子生物学组织杂志》3:1671-1680(1984);Broglie等人,《科学》224:838-843(1984);以及Winter等人,《细胞分化的结果与问题(Results Probl.Cell Differ.)》17:85-105(1991))。这些构建体可以通过直接DNA转化或病原体介导的转染被引入到植物细胞中。此类技术在许多一般可用的综述中描述(参见例如McGraw Hill的Hobbs,《科学与技术年鉴(Yearbook of Science and Technology)》第191-196页(1992))。

[0508] 昆虫系统还可以用于表达所关注的多肽。例如,在一个此类系统中,使用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcNPV)作为载体在草地贪夜蛾细胞(*Spodoptera frugiperda* cell)或粉纹夜蛾细胞(*Trichoplusia cell*)中表达外源基因。可以将编码多肽的序列克隆到病毒的非必需区,如多角体蛋白基因中,并且使其受多角体蛋白启动子的控制。编码多肽的序列的成功插入将使多角体蛋白基因失活并产生缺乏包衣蛋白的重组病毒。重组病毒然后可以用于感染例如其中可以表达所关注的多肽的草地贪夜蛾细胞或粉纹夜蛾细胞(Engelhard等人,《美国科学院院刊》91:3224-3227(1994))。还包括杆状病毒表达系统,包含利用SF9、SF21和T.ni细胞的杆状病毒表达系统(参见例如Murphy和Piwnica-Worms,《蛋白质科学实验室指南(Curr Protoc Protein Sci.)》,第5章:第5.4单元,2001)。昆虫系统可以提供类似于哺乳动物系统的翻译后修饰的翻译后修饰。

[0509] 在哺乳动物宿主细胞中,许多基于病毒的表达系统通常是可用的。例如,在腺病毒用作表达载体的情况下,编码所关注的多肽的序列可以连接到由晚期启动子和三联前导序列组成的腺病毒转录/翻译复合物中。插入到病毒基因组的非必需E1或E3区中可以用于获得活病毒,所述活病毒能够在感染的宿主细胞中表达多肽(Logan和Shenk,《美国国家科学院院刊》81:3655-3659(1984))。另外,可以使用如劳斯肉瘤病毒(RSV)增强子等转录增强子来增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0510] 有用的哺乳动物宿主细胞系的实例包括由SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1细胞系;人胚肾细胞系(被亚克隆以在悬浮培养基中生长的293或293细胞, Graham等人,《普通病毒学期刊(J.Gen.Virol.)》36/59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);小鼠塞托利细胞(sertoli cell)(TM4, Mather,《生殖生物学(Biol.Reprod.)》23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);布法罗大鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TR1细胞(Mather等人,《纽约科学院年报(Annals N.Y.Acad.Sci.)》383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝癌细胞系(Hep G2)。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包含中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞,包含DHFR-CHO细胞(Urlaub等人,《美国国家科学院院刊》77:4216(1980));以及如NS0和Sp2/0等骨髓瘤细胞系。对于适于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的评论,参见例如Yazaki和Wu,《分子生物学方法》,第248卷(B.K.C Lo, 编辑,新泽西州托托瓦瑚玛娜出版社(Humana Press, Totowa, N.J.), 2003),第255-268页。某些优选的哺乳动物细胞表达系统包括基于CHO和HEK293细胞的表达系统。哺乳动物表达系统可以利用本领域中已知的附着的细胞系,例如,在T-烧瓶、滚瓶或细胞工厂中的附着的细胞系,或悬浮培养基,例如,1L和5L旋转瓶,5L、14L、40L、100L和200L搅拌槽生物反应器中,或20/50L和100/200L WAVE生物反应器中的悬浮培养基等。

[0511] 还包括蛋白质的无细胞表达。这些和相关实施方案通常利用纯化的RNA聚合酶、核糖体、tRNA和核糖核苷酸;这些试剂可以通过从细胞或从基于细胞的表达系统提取来产生。

[0512] 特定起始信号还可以用于实现编码所关注的多肽的序列的更高效翻译。此类信号包括ATG起始密码子和相邻序列。在将编码多肽的序列、其起始密码子和上游序列插入到适

当的表达载体中的情况下,可能不需要另外的转录或翻译控制信号。然而,在仅插入编码序列或其一部分的情况下,应当提供包括ATG起始密码子的外源翻译控制信号。此外,起始密码子应处于正确的阅读框中,以确保整个插入物的翻译。外源翻译元件和起始密码子可以具有天然和合成的各种来源。表达效率可以通过包括适合于所使用的特定细胞系统的增强子来提高,所述增强子例如文献(Scharf.等人,《细胞分化的结果与问题》20:125-162(1994))中描述的那些。

[0513] 另外,可以针对调节所插入序列的表达或以所期望方式加工经过表达的蛋白质的能力选择宿主细胞株。多肽的此类修饰包括但不限于翻译后修饰,如乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰化。还可以使用切割蛋白质的“前原(prepro)”形式的翻译后加工来促进正确的插入、折叠和/或功能。除了细菌细胞以外,还可以选择如酵母、CHO、HeLa、MDCK、HEK293和W138等具有或甚至缺乏用于此类翻译后活动的特定细胞机器和特有机制的不同宿主细胞,以确保正确修饰和加工外来蛋白质。

[0514] 对于重组蛋白的长期高产率产生,稳定表达通常是优选的。例如,可以使用表达载体来转化稳定地表达所关注的多核苷酸的细胞系,所述表达载体可以含有病毒复制起点和/或内源性表达元件以及同一载体或不同载体上的可选择标志物基因。在引入载体之后,可以允许细胞在富集培养基中生长约1-2天,然后将其转化为选择性培养基。选择性标志物的目的是赋予对选择的抗性,并且其存在允许成功表达所引入的序列的细胞的生长和回收。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来使稳定转化细胞的抗性克隆增殖。也可以采用例如通过瞬时转染或感染进行的瞬时产生。适合于瞬时产生的示例性的哺乳动物表达系统包括HEK293和基于CHO的系统。

[0515] 任何数目的选择系统可以用于回收经转化或经转导的细胞系。这些包括但不限于可以分别在tk细胞或aprt细胞中使用的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,《细胞(Cell)》11:223-232(1977))和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等人,《细胞》22:817-823(1990))基因。另外,抗代谢物、抗生素或除草剂抗性可以用作选择基础;例如,dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等人,《美国国家科学院院刊》77:3567-70(1980));npt,其赋予对氨基糖苷类抗生素、新霉素和G-418的抗性(Colbere-Garapin等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.》150:1-14(1981));以及als或pat,其分别赋予对氯磺隆和膦丝菌素乙酰转移酶的抗性(Murry,同上)。已经描述了另外的可选择基因,例如,trpB,其允许细胞用吡啶代替色氨酸,或hisD,其允许细胞利用组氨酸代替组氨酸(Hartman和Mulligan,《美国国家科学院院刊》85:8047-51(1988))。可见标志物的使用得到了广泛的应用,其中如绿色荧光蛋白(GFP)和其它荧光蛋白(例如,RFP、YFP)、花青素、 β -葡萄糖醛酸酶和其基质GUS以及荧光素酶和其基质荧光素等标志物不但广泛用于鉴定转化子,而且用于量化属于特定载体系统的瞬时或稳定蛋白质表达的量(参见例如,Rhodes等人,《分子生物学方法》55:121-131(1995))。

[0516] 还包括高通量蛋白质生产系统或微生产系统。某些方面可以利用例如六组氨酸融合标签在金属螯合物修饰的载玻片表面或MagneHis镍颗粒上进行蛋白质表达和纯化(参见例如Kwon等人,《BMC生物技术(BMC Biotechnol.》9:72,2009;和Lin等人,《分子生物学方法》498:129-41,2009)。还包括高通量无细胞蛋白质表达系统(参见例如Sitaraman等人,《分子生物学方法》498:229-44,2009)。这些和相关实施方案可以用于例如产生抗NRP2a抗

体的微阵列,然后所述微阵列可以用于筛选文库以鉴定与所关注的一种或多种NRP2多肽相互作用的抗体和抗原结合结构域。

[0517] 用于使用结合剂或抗体(如对产物具有特异性的多克隆或单克隆抗体)检测和测量多核苷酸编码的产物的表达的多种方案在本领域中是已知的。实例包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质免疫印迹、放射免疫测定(RIA)和荧光活化细胞分选(FACS)。这些和其它测定尤其描述于在Hampton等人,《血清学方法:实验室手册(Serological Methods, a Laboratory Manual)》(1990)和Maddox等人,《实验医学杂志》158:1211-1216(1983)中。

[0518] 多种标记和缀合技术是本领域技术人员已知的,并且可以用于各种核酸和氨基酸测定。用于产生用于检测与多核苷酸相关的序列的经标记的杂交或PCR探针的手段包括寡标记(oligo labeling)、切口平移、末端标记或使用经标记的核苷酸进行的PCR扩增。可替代地,序列或其任何部分可以被克隆到载体中以用于产生mRNA探针。此类载体是本领域已知的,是可商购获得的,并且可以用于通过添加适当的RNA聚合酶(如T7、T3或SP6和经标记的核苷酸)来体外合成RNA探针。这些程序可以使用各种可商购获得的试剂盒进行。可以使用的合适的报告分子或标记包括放射性核素、酶、荧光剂、化学发光剂或显色剂以及底物、辅因子、抑制剂、磁性颗粒等。

[0519] 用所关注的多核苷酸序列转化的宿主细胞可以在适合于从细胞培养物表达和回收蛋白质的条件下培养。某些具体实施方案利用无血清细胞表达系统。实例包括可以在无血清培养基上生长的HEK293细胞和CHO细胞(参见例如Rosser等人,《蛋白质表达与纯化》40:237-43,2005;和美国专利第6,210,922号)。

[0520] 取决于所使用的序列和/或载体,由重组细胞产生的抗体或其抗原结合片段可以在细胞内分泌或包含。如本领域技术人员将理解的,含有多核苷酸的表达载体可以被设计成含有信号序列,所述信号序列引导经编码的多肽通过原核或真核细胞膜分泌。其它重组构造可以用于将编码所关注的多肽的序列与编码多肽结构域的核苷酸序列连接,这将促进可溶性蛋白的纯化和/或检测。此类结构域的实例包括可切割和不可切割的亲纯化和表位标签,例如亲和素、FLAG标签、聚组氨酸标签(例如,6xHis)、cMyc标签、V5标签、谷胱甘肽S转移酶(GST)标签等。

[0521] 由重组细胞产生的蛋白质可以根据本领域已知的多种技术来纯化和表征。用于执行蛋白质纯化和分析蛋白质纯度的示例性系统包括快速蛋白质液相色谱法(FPLC)(例如,AKTA和Bio-Rad FPLC系统)、高压液相色谱法(HPLC)(例如,Beckman和Waters HPLC)。用于纯化的示例性化学包括离子交换色谱法(例如,Q、S)、尺寸排阻色谱法、盐梯度、亲和纯化(例如,Ni、Co、FLAG、麦芽糖、谷胱甘肽、蛋白质A/G)、凝胶过滤、反相、陶瓷HYPERD®离子交换色谱法和疏水相互作用柱(HIC),以及本领域已知的其它方法。还包括分析方法,如SDS-PAGE(例如,考马斯、银染色)、免疫印迹、布拉德福(Bradford)和ELISA,所述分析方法可以在生产或纯化过程的任何步骤期间使用,通常用于测量蛋白质组合物的纯度。

[0522] 还包括浓缩抗NRP2a抗体和其抗原结合片段以及包括浓缩可溶性蛋白质的组合物的方法。在不同的方面,抗NRP2a抗体的此类浓缩溶液可以包含浓度为约5mg/mL、或约8mg/mL、或约10mg/mL、约15mg/mL、或约20mg/mL的蛋白质。

[0523] 在一些方面,此类组合物可以是基本上单分散的,这意味着当例如通过尺寸排阻色谱法、动态光散射或分析超离心进行评估时,至少一种抗NRP2a抗体主要(即,至少约90%

或更高)以一种表观分子量形式存在。

[0524] 在一些方面,此类组合物的纯度(基于蛋白质)为至少约90%,或在一些方面,至少约95%纯度,或在一些实施方案中,至少约98%纯度。纯度可以通过本领域已知的任何常规分析方法来确定。

[0525] 在一些方面,与存在的蛋白质的总量相比,此类组合物具有小于约10%的高分子量聚集体含量,或在一些实施方案中,此类组合物具有小于约5%的高分子量聚集体含量,或在一些方面,此类组合物具有小于约3%的高分子量聚集体含量,或在一些实施方案中具有小于约1%的高分子量聚集体含量。高分子量聚集体含量可以通过多种分析技术来测量,包括例如通过尺寸排阻色谱法、动态光散射或分析超离心。

[0526] 本文所涵盖的浓度方法的实例包括冻干,所述冻干通常在溶液中除了所关注的蛋白质之外几乎不含可溶性组分时采用。冻干通常在HPLC运行后进行,并且可以从混合物中去除大部分或所有挥发性组分。还包括超滤技术,其通常采用一个或多个选择性可渗透膜来浓缩蛋白质溶液。膜允许水和小分子穿过并保持蛋白质;溶液可以通过机械泵、气体压力或离心等技术被迫抵靠膜。

[0527] 在某些实施方案中,试剂、抗NRP2a抗体或相关试剂具有至少约90%的纯度,如根据本领域中的常规技术所测量的。在某些实施方案中,如诊断组合物或某些治疗组合物,抗NRP2a抗体组合物具有至少约95%的纯度。在具体实施方案中,如治疗组合物或药物组合物,抗NRP2a抗体组合物具有至少约97%或98%或99%的纯度。在其它实施方案中,如当用作参考或研究试剂时,抗NRP2a抗体可以具有较低的纯度,并且可以具有至少约50%、60%、70%或80%的纯度。纯度可以总体地或相对于所选组分(例如其它蛋白质)来测量,例如基于蛋白质的纯度。

[0528] 纯化的抗NRP2a抗体也可以根据其生物学特性来表征。结合亲和力和结合动力学可以根据本领域中已知的各种技术来测量,如Biacore®和利用表面等离子体共振(SPR)的相关技术,SPR是一种能够实时检测未标记的相互作用物的光学现象。可以使用基于SPR的生物传感器来确定活性浓度、进行筛选和在亲和力和动力学两者方面进行表征。可以根据基于细胞的测定,包括利用所选抗NRP2a抗体的细胞结合配偶体的测定来确定一种或多种典型或非典型生物活性的存在或水平,所述细胞结合配偶体与读出物或指示剂,如本文所描述的生物活性的荧光或发光指示剂功能性地偶联。

[0529] 在某些实施方案中,如上所述,抗NRP2a抗体组合物基本上不含内毒素,包括例如约95%不含内毒素,优选地约99%不含内毒素,并且更优选地约99.99%不含内毒素。内毒素的存在可以根据如本文所述的本领域中的常规技术进行检测。在具体实施方案中,抗NRP2a抗体组合物由真核细胞如哺乳动物或人细胞在基本上无血清的培养基中制成。在某些实施方案中,如本文所述,抗NRP2a抗体组合物具有小于约10EU/mg的抗NRP2a抗体、或小于约5EU/mg的抗NRP2a抗体、小于约3EU/mg的抗NRP2a抗体、或小于约1EU/mg的抗NRP2a抗体的内毒素含量。

[0530] 在某些实施方案中,抗NRP2a抗体组合物包含少于约10%wt/wt的高分子量聚集体、或少于约5%wt/wt的高分子量聚集体、或少于约2%wt/wt的高分子量聚集体、或少于约1%wt/wt的高分子量聚集体。

[0531] 还包括基于蛋白质的分析测定和方法,其可以用于评估例如蛋白质纯度、大小、溶

解度和聚集程度以及其它特性。蛋白质纯度可以通过多种方式来评估。例如,可以基于一级结构、高级结构、大小、电荷、疏水性和糖基化来评估纯度。用于评估一级结构的方法的实例包括N端和C端测序和肽映射(参见例如Allen等人,《生物制剂》24:255-275,1996)。用于评估高级结构的方法的实例包括圆二色性(参见例如Kelly等人,《生物化学与生物物理学报(Biochim Biophys Acta.)》1751:119-139,2005)、荧光光谱法(参见例如Meagher等人,《生物化学杂志》273:23283-89,1998)、FT-IR、酰胺氢-氘交换动力学、差示扫描量热法、NMR波谱法、与构象敏感抗体的免疫反应性。高级结构还可以根据各种参数(如pH、温度或添加的盐)来评估。用于评估如大小等蛋白质特性的方法的实例包含分析超速离心和大小排阻HPLC(SEC-HPLC),并且用于测量电荷的示例性方法包含离子交换色谱法和等电聚焦。疏水性可例如通过反相HPLC和疏水相互作用色谱法HPLC来评估。糖基化可能影响药代动力学(例如,清除率)、构象或稳定性、受体结合和蛋白质功能,并且可以例如通过质谱法和核磁共振(NMR)波谱法来评估。

[0532] 如上所述,某些实施方案包括使用SEC-HPLC来评估如纯度、大小(例如,大小均匀性)或聚集程度等蛋白质特性和/或纯化蛋白质以及其它用途。SEC,还包括凝胶过滤色谱法(GFC)和凝胶渗透色谱法(GPC),是指一种色谱方法,在所述色谱方法中,溶液中的分子在多孔材料中基于其大小,或更具体地,基于其流体动力学体积、扩散系数和/或表面性质进行分离。所述方法通常用于分离生物分子,并且用于确定聚合物的分子量和分子量分布。通常,将生物或蛋白质样品(如根据本文提供的和本领域中已知的蛋白质表达方法产生的蛋白质提取物)装载到具有限定的固定相(多孔材料),优选地不与样品中的蛋白质相互作用的相的所选尺寸排阻柱中。在某些方面,固定相由填充到玻璃或钢柱内的密集三维基质中的惰性颗粒构成。流动相可以是纯水、水性缓冲液、有机溶剂或其混合物。固定相颗粒通常具有仅允许低于某一大小的分子进入的小孔和/或通道。因此,大颗粒从这些孔和通道中排除,并且它们与固定相的有限相互作用导致它们在实验开始时作为“完全排除”的峰洗脱。可以装入孔中的较小分子从流动的流动相中去除,并且其在固定相孔中固定的时间部分取决于其渗透到孔中的程度。将它们从流动相流中去除导致它们花费更长的时间从柱中洗脱,并且基于颗粒的大小差异导致颗粒之间的分离。给定大小的排除柱具有可以分离的一系列分子量。总的来说,大于上限的分子不会被固定相捕获,小于下限的分子将完全进入固相并作为单个条带洗脱,并且该范围内的分子将以不同的速率洗脱,所述速率由其性质如流体动力学体积限定。关于这些方法与药用蛋白质的实践的实例,参见Bruner等人,《药物与生物医学分析杂志(Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis)》15:1929-1935,1997。

[0533] 临床应用的蛋白质纯度也例如由Anicetti等人(《生物技术趋势(Trends in Biotechnology)》7:342-349,1989)讨论。用于分析蛋白质纯度的最新技术包括但不限于LabChip GXII,其是用于蛋白质和核酸的快速分析的自动化平台,其提供蛋白质的滴度、大小和纯度分析的高通量分析。在某些非限制性实施方案中,可以通过在至少两个正交步骤中利用色谱材料的组合以及其它方法来获得临床级蛋白质,例如蛋白质片段和抗体(参见例如《治疗性蛋白质:方法和方案(Therapeutic Proteins:Methods and Protocols)》第308卷,编辑,Smales和James,瑚玛娜出版社公司,2005)。通常,蛋白质药剂(例如,抗NRP2a抗体和抗原结合片段)基本上不含内毒素,如根据本领域已知的和本文所述的技术所测量

的。

[0534] 还包括蛋白质溶解度测定。此类测定可以用于例如确定重组生产的最佳生长和纯化条件,优化缓冲液的选择,并且优化抗NRP2a抗体或其变体的选择。可以根据各种参数来评估溶解度或聚集度,所述参数包括温度、pH、盐以及其它添加剂的存在或不存在。溶解度筛选测定的实例包括但不限于使用浊度或其它度量作为终点来测量蛋白质溶解度的基于微孔板的方法、用于分析经过纯化的重组蛋白质的溶解度的高吞吐量测定(例如参见Stenvall等人,《生物化学与生物物理学报》1752:6-10,2005)、使用遗传标记蛋白的结构互补来监测和测量体内蛋白质折叠和溶解度的测定(例如参见Wigley等人,《自然-生物技术》19:131-136,2001)以及使用扫描电化学显微术(SECM)对大肠杆菌中的重组蛋白溶解度进行电化学筛选(参见例如Nagamine等人,《生物技术与生物工程(Biotechnology and Bioengineering)》96:1008-1013,2006)等。可以根据本领域中的常规技术来鉴定或选择溶解度增加(或聚集度降低)的抗NRP2a抗体,所述技术包含蛋白质溶解度的简单体内测定(参见例如Maxwell等人,《蛋白质科学(Protein Sci.)》8:1908-11,1999)。

[0535] 蛋白质溶解度和聚集度还可以通过动态光散射技术来测量。聚集是涵盖若干类型的相互作用或特性的一般术语,所述相互作用或特性包括可溶性/不溶性、共价/非共价、可逆/不可逆以及天然/变性相互作用和特性。对于蛋白质治疗剂,聚集体的存在通常被认为是不期望的,因为担心聚集体可能导致免疫原性反应(例如,小聚集体),或者可能导致施用时的不良事件(例如,颗粒)。动态光散射是指可以用于确定悬浮液或聚合物中的小颗粒(如溶液中的蛋白质)的大小分布的技术。还被称为光子相关光谱法(PCS)或准弹性光散射(QELS)的这项技术使用散射光来测量蛋白质颗粒的扩散速率。由于分子和颗粒在溶液中的布朗运动,可以观察到散射强度的波动。可以常规地处理该运动数据以得出样品的尺寸分布,其中该尺寸由蛋白质颗粒的斯托克斯半径或流体动力学半径给出。流体动力学尺寸取决于质量和形状(构象)。动态散射可以检测极少量的聚集蛋白(按重量计<0.01%)的存在,即使在含有大量范围的质量的样品中也是如此。它还可以用于比较不同制剂的稳定性,包括例如依赖于在高温下实时监测变化的应用。因此,某些实施方案包括使用动态光散射来分析含有本公开的抗NRP2a抗体的样品中的聚集体的溶解度和/或存在。

[0536] 尽管已经出于理解的清楚的目的通过说明和实例对前述实施方案进行了一些详细描述,但是鉴于本公开的教导,本领域的普通技术人员将显而易见的是,在不脱离所附权利要求书的精神或范围的情况下,可以对其进行某些改变和修改。仅通过说明的方式而不是通过限制的方式提供以下实施例。本领域的技术人员将容易地认识到可以改变或修改以产生基本上类似结果的各种非关键参数。

[0537] 实施例

[0538] 实施例1

[0539] 结合亲和力

[0540] 如下所述测试表A1/A2中列出的抗体的同种型特异性、结合亲和力和物种反应性以表征其功能性质。通过生物膜干涉测量(BLI)在Octet RED96e仪器(Sartorius)上进行结合实验。将所有抗体、肽和蛋白质在1×PBS、0.1%BSA和0.02%吐温20,pH 7.4中稀释。对于同种型特异性和小鼠反应性,对应于NRP2同种型a和b以及小鼠NRP2同种型a的独特序列的生物素化肽(参见表E2)购自中国肽和Genscript。将肽以20μg/mL固定在Octet链霉亲和素

生物传感器 (Sartorius, 18-5019) 上。然后将生物传感器浸入到每种抗体的50nM溶液中并读取持续300秒。

[0541] 为了测量结合亲和力,将生物素化的抗小鼠抗体 (CaptureSelect生物素抗LC- κ 鼠, ThermoFisher) 以8 μ g/mL固定在Octet链霉素亲和素生物传感器 (Sartorius, 18-5019) 上。然后将生物传感器浸入到每种抗体的1 μ g/mL溶液中,随后滴定450、150、50、16.67、5.56、1.85、0.62nM重组NRP2同种型a。结合的缔合阶段为300s,并且解离阶段为1200s。在不同抗体的循环之间,在pH为1.5的10mM甘氨酸中再生生物传感器。通过将数据拟合到Octet数据分析软件中的1:1结合模型来获得结合亲和力。

[0542] 结果汇总于下表E1中。

抗体	NRP2 同种型特异性	人 NRP2a 结合亲和力 (nM)	人 NRP2b 结合亲和力	小鼠反应性
aNRP2-37v2	a	0.767	无	差
aNRP2-400v2	a	0.453	无	无
aNRP2-401v2	a	0.136	无	良好的
aNRP2-402v2	a	3.35	无	良好的
aNRP2-403v2	a	1.40	无	差
aNRP2-404v2	a	0.552	无	差
aNRP2-405v2	a	0.480	无	良好的
aNRP2-406v2	a 和 b	5.69	差	良好的
aNRP2-407v2	a 和 b	0.352	差	良好的
aNRP2-408v2	a	2.10	无	良好的
aNRP2-409v3	a	2.23	无	良好的

[0543] 这些结果首次证实了高亲和力抗体的产生,所述高亲和力抗体显示出对NRP2a的特异性选择性并且与NRP2b的结合很少或没有。此类抗体表现出对NRP2a的高(亚纳摩尔)亲和力,具有很少的非特异性反应性或没有非特异性反应性,证明鉴定的表位能够实现高特异性,并且提供具有独特功能和诊断特性的NRP2a抗体。

[0544] 实施例2

[0545] 由CCL21诱导的NRP2同种型和CCR7的二聚化

[0546] 为了确定NRP2a和NRP2b与CCR7的缔合的特异性,评估NRP2的不同蛋白质同种型在趋化因子配体CCL21和CCL19的存在下与CCR7形成异源二聚体的能力。

[0547] 简言之,含有分裂NanoLuc的小 (pBiT2.1-C) 和大 (pBiT1.1-C) 片段的载体从Promega公司获得。编码人NRP2a (RCC220706, 同种型2) 和人NRP2b (RC210928, 同种型5) 的cDNA从Origene Technologies获得。编码CCR7 (OHu24012) 的cDNA从Genscript获得。在载体编码的间隔序列和NanoLuc标签的N末端,将NRP2的完整编码序列克隆到pBiT1.1-C中,而将CCR7的完整编码序列克隆到pBiT1.1-C中。NRP2的其余蛋白质同种型在标准诱变技术之后由先前描述的载体构建。

[0548] 然后将载体通过Expifectamine转染试剂 (Fisher Scientific) 以1 μ g/mL在100万个细胞/mL的密度下转染到Expi293F细胞中。在转染后大约16-20小时,洗涤细胞,以100,000个细胞/孔铺板在光度计板中,然后添加细胞可渗透荧光素酶底物,并在GloMax96 (Promega) 上监测发光,直到达到发光信号的稳定。添加100nM的CCL19 (R&D系统, 361-MI/

CF)或CCL21(R&D系统,366-6C/CF),并且计算与对照孔相比具有添加配体的孔的发光变化。

[0550] 如图2A-2E中所示,与在存在CCL19的情况下相比,NRP2a的两种同种型NRP2a v1(931aa)和NRP2a v2(926aa)在存在CCL21的情况下显示出与CCR7的增强的缔合,而NRP2b的‘b’同种型NRP2b v4(906a)和NRP2b v5(901aa)均显示出对趋化因子配体没有应答。该数据表明在NRP2a v1和v2同种型而非NRP2b同种型的近膜序列中存在CCL21特异性结合位点。虽然所有的NRP2a变体(例如v1/v2/v3)都被认为是NRP2的‘a’同种型,但NRP2v3(909aa)对CCL21没有显示出额外的应答,表明结合位点被该变体中的近膜区的17aa的缺失破坏。

[0551] 该数据首次证明NRP2a(而不是NRP2b)与CCR7在其配体CCL21存在下的特定相互作用的数据。鉴于CCR7/CCL21轴在免疫细胞迁移激活、组织炎症、自身免疫和癌症进展的调节中的核心作用,这些数据提供了直接证据,即NRP2a特异性抗体将对CCR7/CCL21信号传导以及这些途径相关的病理生理学具有高度选择性和特异性作用。

[0552] 实施例3

[0553] CCL21结合位点对NRP2a的诱变以及对NRP2a和CCR7的配体诱导的二聚化的影响

[0554] 为了鉴定负责CCL21与NRP2a相互作用的残基,通过预期在NRP2v3缺失中被破坏的NRP2a的近膜区域进行丙氨酸扫描诱变。然后,进行受体二聚化实验以鉴定参与产生结合相互作用的特定氨基酸。

[0555] 遵循标准位点定向诱变方案,在NanoBiT载体pBiT2.1-C-NRP2v2(同种型2)中进行突变。在这种情况下,pBiT1.1-C中的CCR7蛋白被截短以去除最后一个(第7个跨膜螺旋)C端的胞质序列(在aa331之后),从而去除可能是由于受体运输引起的信号应答,这在具有NRP2v3的CCL19和CCL21中可见。

[0556] 使用Expifectamine(Fisher Scientific)将载体转染到Expi293细胞中。在转染后约16-20小时,洗涤细胞,以100,000个细胞/孔铺在光度计板中,然后添加细胞可渗透荧光素酶底物,并在GloMax96(Promega)上监测发光。添加100nM配体,并且相对于无配体的对照集来计算对配体的应答。

[0557] 如图3A-3E中所示,突变显示出随着整个结合位点的带负电荷的残基的取代而降低的各种程度的结合,并且强调了在NRP2a同种型v2的位置828处的酪氨酸残基的至关重要性。另外,来自残基816-818的3个氨基酸取代和来自残基834-849的缺失显示出对受体二聚化的标称效应,在这种情况下,具有完整CCR7序列,表明这些序列对于受体相互作用不重要。这些区域限定结合位点的N末端和C末端边界。因此,FL NRP2a的残基819-833限定独特的最小表位,其参与NRP2a与CCL21的相互作用。

[0558] 实施例4

[0559] 抗体对NRP2肽的ELISA特异性

[0560] 为了确定由每种NRP2a反应性抗体识别的近似表位,经由免疫测定针对由Genscript和China肽产生的NRP2肽测试所有抗体,如下所述。还测试了所有抗体的人/小鼠保留和与NRP2b的交叉反应性。用于作图的NRP2肽示于表E2中,并且包括一系列12个氨基酸肽序列,其系统性跨越实施例3中定义的NRP2a上的最小CCL21相互作用结构域。在这些肽序列中,肽NRP2a-扫描4、5和6表示最完全覆盖CCL21相互作用结构域的序列。

表 E2		
肽	序列	SEQ ID NO:
NRP2A	PISAFAVDIPEIHEREGYEDEIDDEYEVDWSNSSSATS GSGAPSTDKEKSWLYTLDP	113
短 NRP2A	DIPEIHEREGYEDEIDDEYEVDW	114
NRP2a_扫描 1	VDIPEIHEREGY	115
NRP2a_扫描 2	PEIHEREGYEDE	116
NRP2a_扫描 3	HEREGYEDEIDD	117
NRP2a_扫描 4	EGYEDEIDDEYE	118
NRP2a_扫描 5	EDEIDDEYEVDW	119
NRP2a_扫描 6	IDDEYEVDWSNS	120
NRP2a_扫描 7	EYEVDWSNSSSA	121
Mid-NRP2A	EGYEDEIDDEYEVDWSNSSSATS	122
Mid-mNRP2A	EGYEDEIDDEYEGDWSNSSSSTS	123
mNRP2A	PISAFAVDIPETHGGEGYEDEIDDEYEGDWSNSSSST SGAGDPSSGKEKSWLYTLDP	124
NRP2b	PISAFAGGTLLPGTEPTVDTVPMQPIPAYW	125
mNRP2b	PISAFAGGTLPPTGTEPTVDTVPVQPIPAYW	126

[0561]

[0562] 肽与生物素缀合。链霉亲和素板用每种肽以2ug/mL包被,在酪蛋白中稀释。将板用板密封器密封,并在4°C下温育过夜(无振荡)。在过夜包被后,将板用PBST洗涤三次。将每种感兴趣的NRP2a特异性抗体稀释至1ug/mL、0.5ug/mL,并将0.25ug/mL和50uL/孔添加到测定板中。将板在室温下在振荡(400rpm)下温育1小时。将板再次用PBST洗涤三次,并且以50uL/孔以1:5000稀释度添加HRP缀合的山羊抗小鼠IgG(Jackson Immuno Research,115-035-071)。将板在室温下在振荡(400rpm)下温育1小时。将板用PBST洗涤三次,并通过添加50uL孔的1-Step Ultra TMB底物(Thermo Scientific,34029)来开发。

[0563] 将板与底物一起温育10分钟,并用终止溶液(Biolegend,423001)停止反应。在Biotek板读取器上在450nm下读取比色信号。如果信号<3倍平均空白,则将抗体标记为不与肽结合。>3X空白但<10X空白的信号被标记为阳性但低信号。>10X空白的信号是肽的阳性结合剂。结果示于表E3中。

肽	400 v2	401 v2	402 v2	403 v2	404 v2	405 v2	406 v2	407 v2	408 v2	409 v2	37 v2
NRP2A	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y
NRP2a _扫描 1	y	n	n	n	y	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 2	n	n	n	n	y	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 4	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
[0564] NRP2a _扫描 5	n	y	y	y	n	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 6	n	y	y	y	n	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Mid-N RP2A	n	y	低	y	n	n	n	n	n	n	n
Mid-m NRP2A	n	y	低	y	n	n	n	n	n	n	n
mNRP 2A	n	y	y	y	低	y	y	y	y	y	y
NRP2b	n	n	n	n	n	n	y	y	n	n	n

[0565] 结果表明,抗体aNRP2-406v2和aNRP2-407v2显示出与NRP2a和NRP2b两者的交叉反应性,但不结合至表示最小CCL21相互作用区的肽。相比之下,抗体aNRP2-401v2、aNRP2-402v2和aNRP2-403v2显示出对NRP2a肽扫描5和6以及较长的NRP2a近膜序列的选择性,但不结合至NRP2b。抗体aNRP2-400v2和aNRP2-404v2可能在近膜区中进一步结合N末端,但也可以足够接近结合位点以阻断,而其余抗体可能结合近膜区的C末端。

[0566] 实施例5

[0567] 抗体对NRP2肽的生物膜干涉法特异性

[0568] 生物膜干涉法(BLI)实验在Octet RED96e仪器(Sartorius)上进行,以进一步表征抗体对上文筛选的NRP2肽的亲合力。使用跨越NRP2a同种型特异性区的肽对抗体进行表位作图;还测试了抗体与NRP2b同种型特异性肽的反应性以及mNRP2a和mNRP2b肽的交叉反应性(关于肽序列,参见表E2)。

[0569] 在Genscript和China肽处合成肽,并且进行生物素缀合。将抗体和肽在1x PBS、0.1% BSA、0.02%吐温20,pH 7.4中稀释。将肽以20 μ g/mL固定在Octet链霉亲和素生物传感器(Sartorius,18-5019)上。然后将生物传感器浸入到每种抗体的50nM溶液中并读取持续300秒。在不同抗体的循环之间,在pH为1.5的10mM甘氨酸中再生生物传感器。结果示于表E4中,并确认上文呈现的数据。

表 E4											
肽	400 v2	401 v2	402 v2	403 v2	404 v2	405 v2	406 v2	407 v2	408 v2	409 v3	37 v2
NRP2A	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y
NRP2a _扫描 1	y	n	n	n	y	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 2	n	n	n	n	y	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 4	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 5	n	y	y	y	n	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 6	n	y	y	y	n	n	n	n	n	n	n
NRP2a _扫描 7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Mid-N RP2A	n	y	y	y	n	n	n	n	n	n	n
短 NRP2A	y	n	n	n	y	n	n	n	n	n	n
Mid-m NRP2A	n	y	y	y	n	n	n	n	n	n	n
mNRP 2A	n	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y
NRP2b	n	n	n	n	n	n	y	y	n	n	n
mNRP 2b	n	n	n	n	n	n	y	y	n	n	n

[0572] 结果证实抗体aNRP2-406v2和aNRP2-407v2显示出与NRP2a和NRP2b两者的交叉反应性,但未能结合表示最小CCL21相互作用区的肽,并且抗体aNRP2-401v2、aNRP2-402v2和aNRP2-403v2显示出对与NRP2a上的CCL21相互作用的最小表位的选择性。这些结果还证实,抗体aNRP2-404v2、aNRP2-405v2、aNRP2-408v2、aNRP2-409v2和aNRP2-37v2显示出对NRP2a的强特异性,即使它们不结合至CCL21相互作用最小结构域。

[0573] 实施例6

[0574] 抗体对NRP2的细胞表面识别

[0575] 评价所选择的NRP2a反应性抗体识别人或小鼠NRP2a受体的能力,以及它们对NRP2a相对于NRP2b的特异性。编码人NRP2a v2 (RCC220706)、小鼠NRP2a (MR224748) 或人NRP2b (RC210928) 的cDNA从Origene technologies获得。然后通过经由诱变修饰编码NRP2 v2的载体以去除NRP2v3中缺失的17个氨基酸来构建NRP2 v3表达载体。用每种载体转染Expi293F细胞,并且在转染后约48小时计数,并用每种重组抗体和荧光次级抗体染色 (Jackson Immuno Research, 115-175-146)。信噪比被计算为与未转染的‘模拟’群体相比转染的细胞的染色强度。将结合与NRP2小鼠/人反应性a1结构域结合抗体 (aNRP2-17v2) 和非结合同种型对照 (NBIC) 进行比较。

[0576] 结果在图4A-4C中示出。所测试的抗体显示出与表达全长NRP2a或NRP2b的细胞的

不同的结合。基于这些研究,抗体aNRP2-403显示出与在Expi293F细胞上重组表达的人NRP2a的最佳结合。抗体aNRP2-403v2也显示出与NRP2a的强结合,并且另外具有显示出一些小鼠交叉反应性的优点。抗体aNRP2-402显示出对NRP2a的良好结合特异性,但也显示出与所测试的其它抗体相比较低的亲和力。基于这些研究,抗体aNRP2-403v2可以具有结合至NRP2的其它区域的能力,超出其NRP2a肽特异性结合,因为它对NRP2b特异性肽无反应性,但似乎显示出与在该模型中的活细胞中重组表达的全长NRP2b的一些结合。

[0577] 另外,在显示结合CCL21最小相互作用结构域的抗体中,aNRP2-401显示出良好的结合、mNRP2a结合的保留以及对NRP2a的良好特异性。与NRP2 v3相比,NRP2 v2的细胞表面结合显示,虽然缺失的氨基酸足以防止CCL21相关的NRP2v3/CCR7缔合(参见实施例2),但由于整个结合位点未被去除,因此靶向该区域的抗体可能对NRP2 v2相对于NRP2 v3不具有特异性。

[0578] 实施例7

[0579] NRP2a/CCR7受体二聚化的抗体竞争

[0580] 为了确认抗体阻断NRP2a/CCR7-CCL21诱导的受体二聚化的能力,进行了抗体阻断实验。pBiT1.1-C-CCR7(不具有其C末端细胞质序列)和pBiT2.1-C-NRP2v2(同种型2)在Expi293细胞中与Expifectamine转染试剂共转染。在转染后16-20小时,对细胞进行计数并铺板并添加荧光素酶底物。在100nM下添加每种指示的抗体,并且建立新的基线发光信号,然后在EC80处添加CCL21,并且随时间推移观察到对配体的归一化的应答。然后计算曲线下面积并进行比较。

[0581] 结果在图5A-5D中示出。抗体aNRP2-400v2、aNRP2-401v2、aNRP2-402v2、aNRP2-403v2和aNRP2-404v2均显示出一定程度的阻断,其中抗体aNRP2-401v2和aNRP2-403v2是最有效的。其它抗体似乎对受体二聚化具有可忽略的作用,类似于用非合同种型对照(NBIC)观察到的。抗体aNRP2-401v2和aNRP2-403v2针对配体的EC80的滴定得到0.339nM和12.72nM的相应IC50。该数据证实抗体aNRP2-401v2和aNRP2-403v2在旨在破坏NRP2a和CCL21的相互作用的治疗方法中具有实用性。

[0582] 实施例8

[0583] 抗体到CCL21的假定结合位点的表位作图

[0584] 基于肽结合边界和NRP2a的人/小鼠保守性的作图用图6中所示的所选抗体进行;此处,相对于mNRP2a中的人序列的取代在小鼠序列(mNRP2a)中加下划线,并且CCL21结合位点在人序列中以粗体示出。在人类序列中加下划线的是实施例3(图3E)中描述的缺失,其在防止CCL21诱导的二聚化方面无效,因此用作结合位点的近似C末端边界。N末端边界未被标记,但从实施例3(图3D)中的NRP2 v2(816-818)中所描述的突变证明,所述突变对CCL21诱导的二聚化显示出最小影响。

[0585] 具有与CCL21的结合位点重叠的表位的抗体(即,aNRP2-401v2、aNRP2-402v2和aNRP2-403v2)是与CCR7的受体二聚化的高效阻断剂。类似于上文,这些抗体在旨在破坏NRP2a和CCL21的相互作用的治疗方法中表现出实用性。

[0586] 另外,结合至NRP2a特异性肽本身(例如,如由抗体aNRP2-400v2、aNRP2-404v2、aNRP2-405v2、aNRP2-408v2、aNRP2-409v2和aNRP2-37v2所示)不足以以高效率阻断受体二聚化。这些抗体显示出用作诊断试剂,例如用作开发靶标接合的试剂,并且测量细胞上和组

织中的受体密度。

[0587] 实施例9

[0588] 人源化抗体

[0589] 人源化抗体由抗体aNRP2-401v2和aNRP2-402v2制备。CDR通过如表A1中定义的其Kabat定义(其中使用IMGT边界的CDR-H1除外)来鉴定。将小鼠单克隆轻链和重链的完整V基因与人类V基因比对以鉴定最相似的框架序列,并且鉴定合适的人类框架用于转移。将小鼠CDR转移到人框架上,并且通过在Octet RED96e上通过生物层干涉法(BLI)结合到一系列NRP2配体浓度来确定亲和力。必要时,在人框架中进行反向突变,考虑对 V_{LH} 界面、CDR环接触和其它结构考虑很重要的残基。再次测量结合,并且选择关键的反向突变。另外,通过CDR经由NNK饱和诱变使抗体亲和力成熟,以改善对配体的亲和力。

[0590] 人源化变体的结合亲和力示于下表E5中。

样品 ID	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)
[0591] aNRP2-401v5	3.91E-10	7.48E+05	2.93E-04
aNRP2-401v6	1.62E-10	9.99E+05	1.62E-04
aNRP2-401v7	1.41E-10	1.23E+06	1.73E-04
aNRP2-401v8	9.89E-11	1.21E+06	1.20E-04

[0592] 实施例10

[0593] aNRP2-401的变体

[0594] 通过标准方案通过定点诱变来产生人源化aNRP2-401的抗体变体。将整个轻链CDR3、重链CDR3和重链CDR2的前11个氨基酸随机突变。对于每个位置,筛选70-100个单独的克隆,在省略半胱氨酸、色氨酸和甲硫氨酸之后,每个克隆产生15-16个氨基酸变体。然后将变体连同未修饰的同源轻链或重链一起作为单个取代转染到Expi293细胞(ThermoFisher, A14527)中。然后在Octet RED96e上确定溶液中每种变体的浓度,然后将变体用于在竞争ELISA中与对照抗体竞争。

[0595] 使用EZ-link NSH-PEG₄-生物素(ThermoFisher, 21363)对人源化aNRP2-401进行生物素化,其中生物素相对于IgG的摩尔过量为20倍。经由间接ELISA,将生物素化的抗体针对在1xPBS pH 7.4中以2ug/mL包被的NRP2(转录物变体2的氨基酸23-855)滴定,以确定适当的EC₅₀。在EC₅₀用生物素化的对照抗体将竞争抗体通过3倍或2倍稀释度稀释。将所有板用Casein Blocker(ThermoFisher, 37528)封闭,用PBST pH 7.4洗涤,用链霉亲和素-HRP(ThermoFisher, SA10001)检测,并用TMB Ultra(ThermoFisher, 37574)显影。使用GraphPad Prism进行分析。

[0596] 根据竞争曲线计算每种变体的IC₅₀值。表达并且被判定为充分保持与抗原的结合的变体具有不大于对照的2倍的IC₅₀和相似的希尔斜率。活性结合变体汇总于表E6和表E7中,其示出了它们在CDR和保留结合的每种氨基酸变体内的相对位置。

表 E6: 来自变体测试的抗体 aNRP2-401 CDR 共有序列

链	序列	SEQ ID NO:
V _H CDR1	GFTFSDYGMH	13
[0597] V _H CDR2	X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ ADTVKG	127
V _H CDR3	GX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅	--
V _L CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLY	16
V _L CDR2	KVSNRFS	17
V _L CDR3	X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃	--

表 E7:关于 CDR 共有序列的氨基酸定义

[0598] X ₁	G、A 或 S	X ₁₃	T、A、D、E、F、G、I、K、L、N、Q、R、S、或 V
X ₂	Y、F、K、L 或 R	X ₁₄	T、A、F、I、K、L、Q、R、或 S
X ₃	T、A、G、I、L、Q、或 V	X ₁₅	I、A、F、G、L、N、Q、R、S、T、V 或 Y
[0598] X ₄	D、A、G、K、N、Q、R 或 S	X ₁₆	S、A、F、G、H、I、K、L、P、Q、R、V 或 Y
X ₅	Y、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T 或 V	X ₁₇	R、A、G、K、L、N、P、Q、S、T、V 或 Y
X ₆	S、A、G、I、L、P、T 或 V	X ₁₈	D、A、G、Q、R、S、V 或 Y
X ₇	Q、A、G、R、或 S	X ₁₉	I、A、E、G、H、K、L、N、P、R、S、T 或 V
X ₈	S、A、H、K、L、Q、或 T	X ₂₀	N、A、D、I、L、P、Q、R、S、T、

			V 或 Y
[0599] X ₉	T、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、V、或 Y	X ₂₁	T、A、G、H、L、N、P、R、S 或 V
X ₁₀	H、A、D、E、F、G、I、K、L、N、Q、R、S、T、或 Y	X ₂₂	V、F、G、I、L、N、P、Q、S、T 或 Y
X ₁₁	V、A、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T 或 Y	X ₂₃	Y、F、H、I、K、N 或 R
X ₁₂	L、A、E、H、I、N、P、Q、S、T 或 V	X ₂₄	Y、A、D、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T 或 V

[0600] 实施例11

[0601] 树突状细胞迁移的体内模型

[0602] 开发了树突状细胞迁移的体内模型,以测试NRP2在从皮肤到引流淋巴结的树突状细胞迁移中的作用。在第0天,用50μl Hamilton注射器和22号针(Becton Dickinson)将10μl的1:1比率的完全弗氏佐剂(CFA)(Sigma-Aldrich):磷酸盐缓冲盐水(PBS)皮下注射到野生型和NRP2敲除小鼠的每个耳中。在48小时后,将每个耳用20μl具有含有5mg/ml异硫氰酸荧光素(FITC)(Fisher Scientific)的丙酮(DPA)(Sigma-Aldrich)的邻苯二甲酸二丁酯在每侧上涂漆。

[0603] DPA/FITC涂漆后24小时,对小鼠实施安乐死,去除引流淋巴结,并处理用于进行流式细胞术分析(图7A)。简言之,通过切割淋巴结并穿过70um滤网(Fisher Scientific)来制备单细胞悬浮液。在用抗小鼠CD3、CD11c和MHC-II抗体(Biolegend)进行表面标志物染色之前,用Zombie Aqua活力染料(Biolegend)对细胞进行染色。然后在CytoFlex S(Becton

Dickinson) 流式细胞仪上分析细胞以确定细胞表面标志物表达。使用FlowJo软件来确定FITC阳性树突状细胞 ($CD3^-CD11c^+MHC-II^+$) 的比例 (图7B)。如图7C所示,与NRP2野生型小鼠相比,在NRP2敲除小鼠的引流淋巴结中观察到FITC⁺树突状细胞的比例显著降低约42%,表明NRP2在体内树突状细胞的迁移中起作用。相同的模型用于测试本文所述的抗NRP2抗体的活性,这同样预期会减少从皮肤到引流淋巴结的树突状细胞迁移。

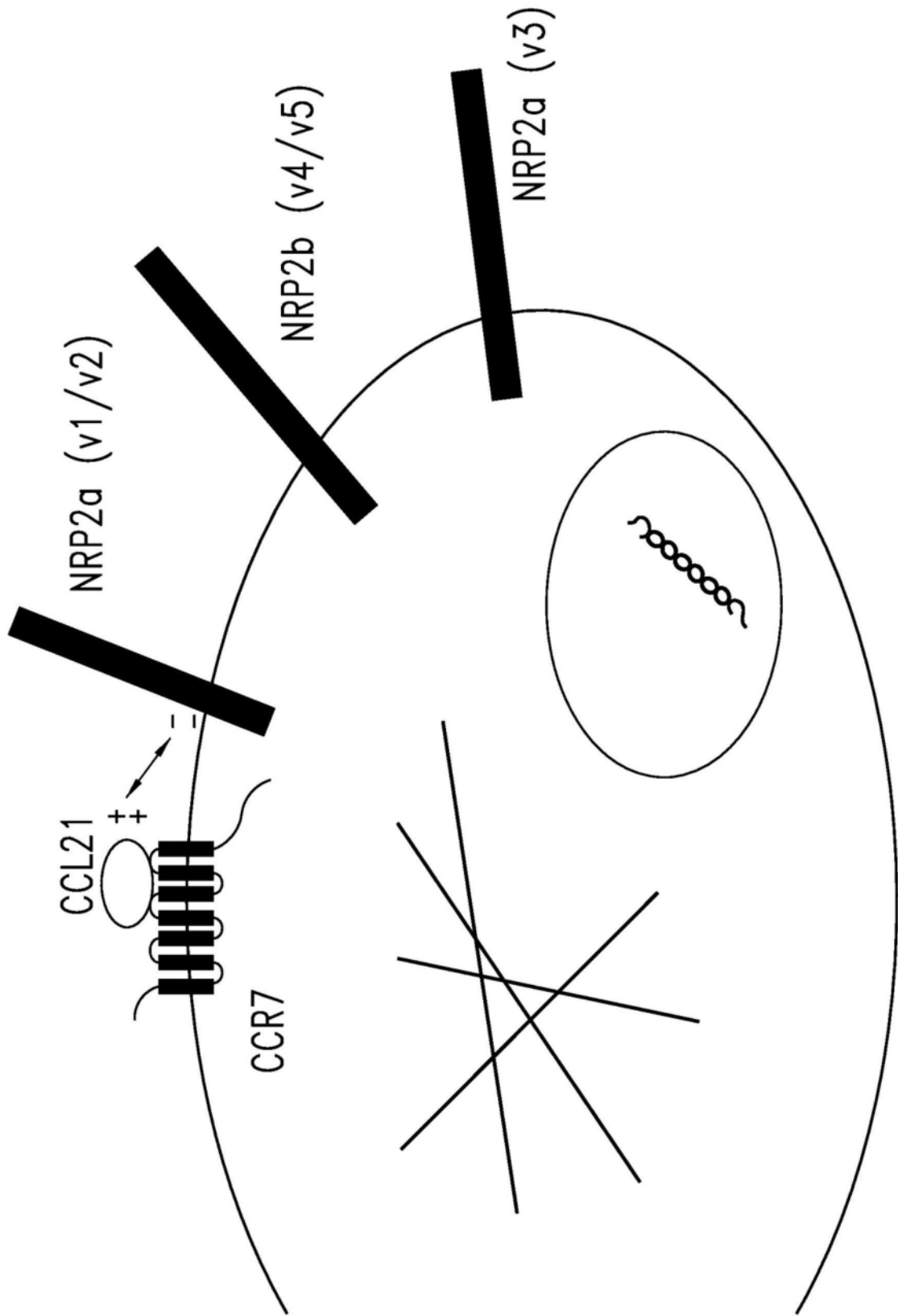


图1

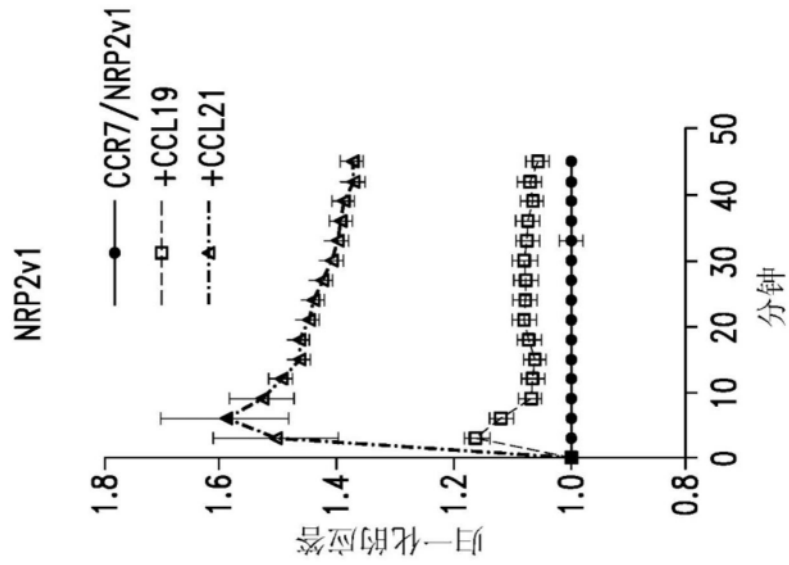


图2A

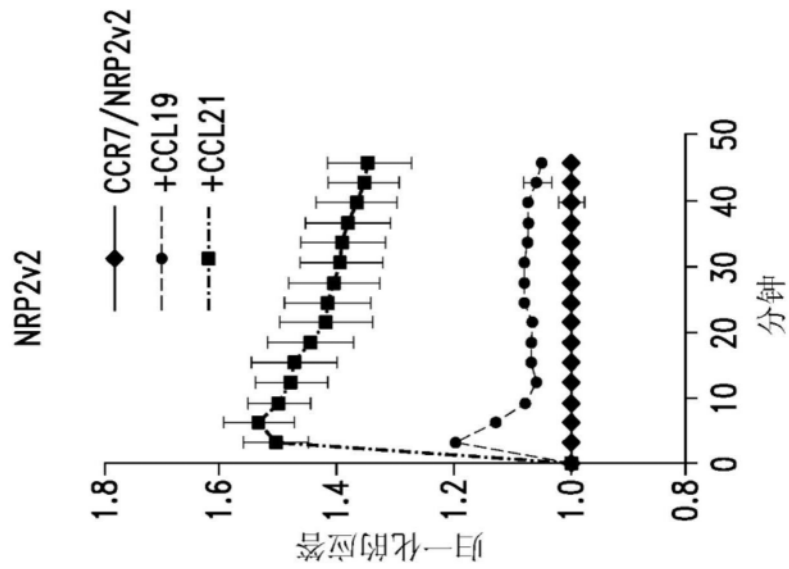


图2B

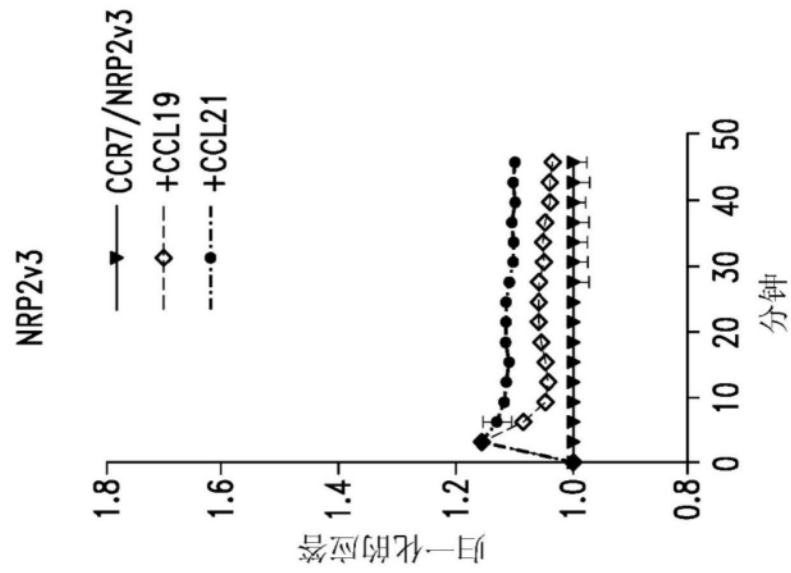


图2C

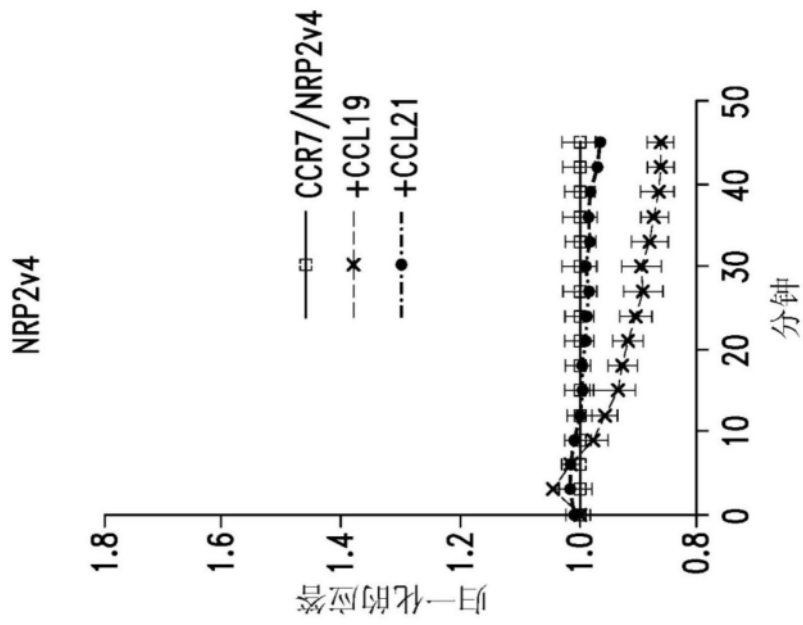


图2D

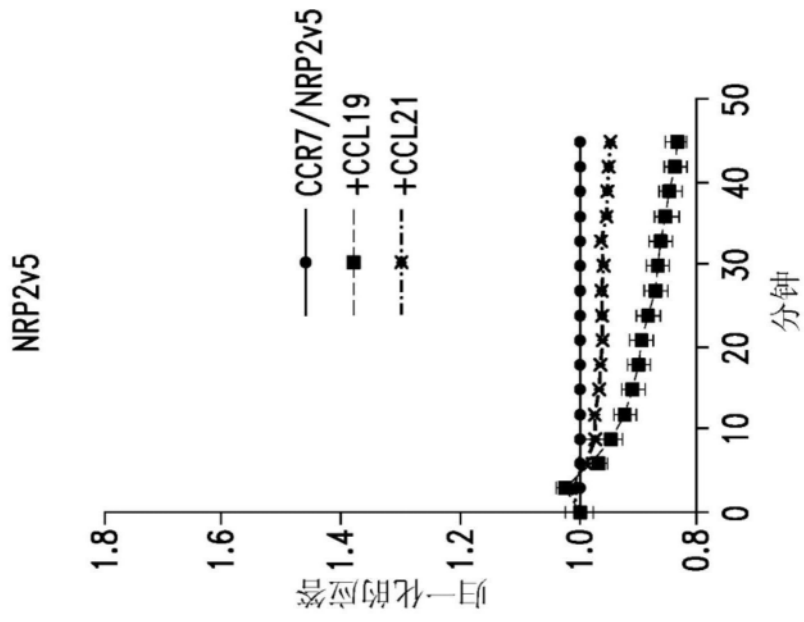


图2E

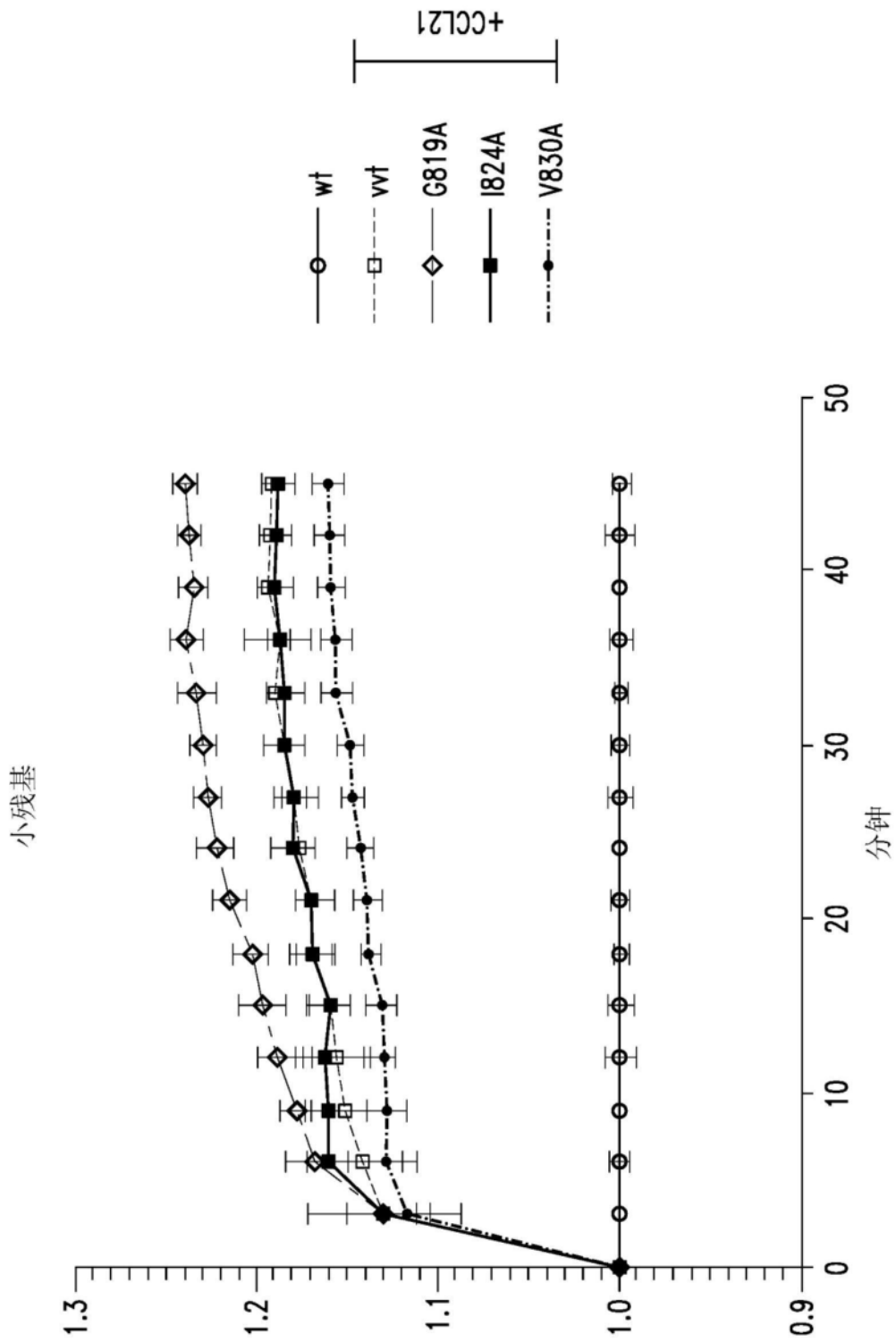


图3A

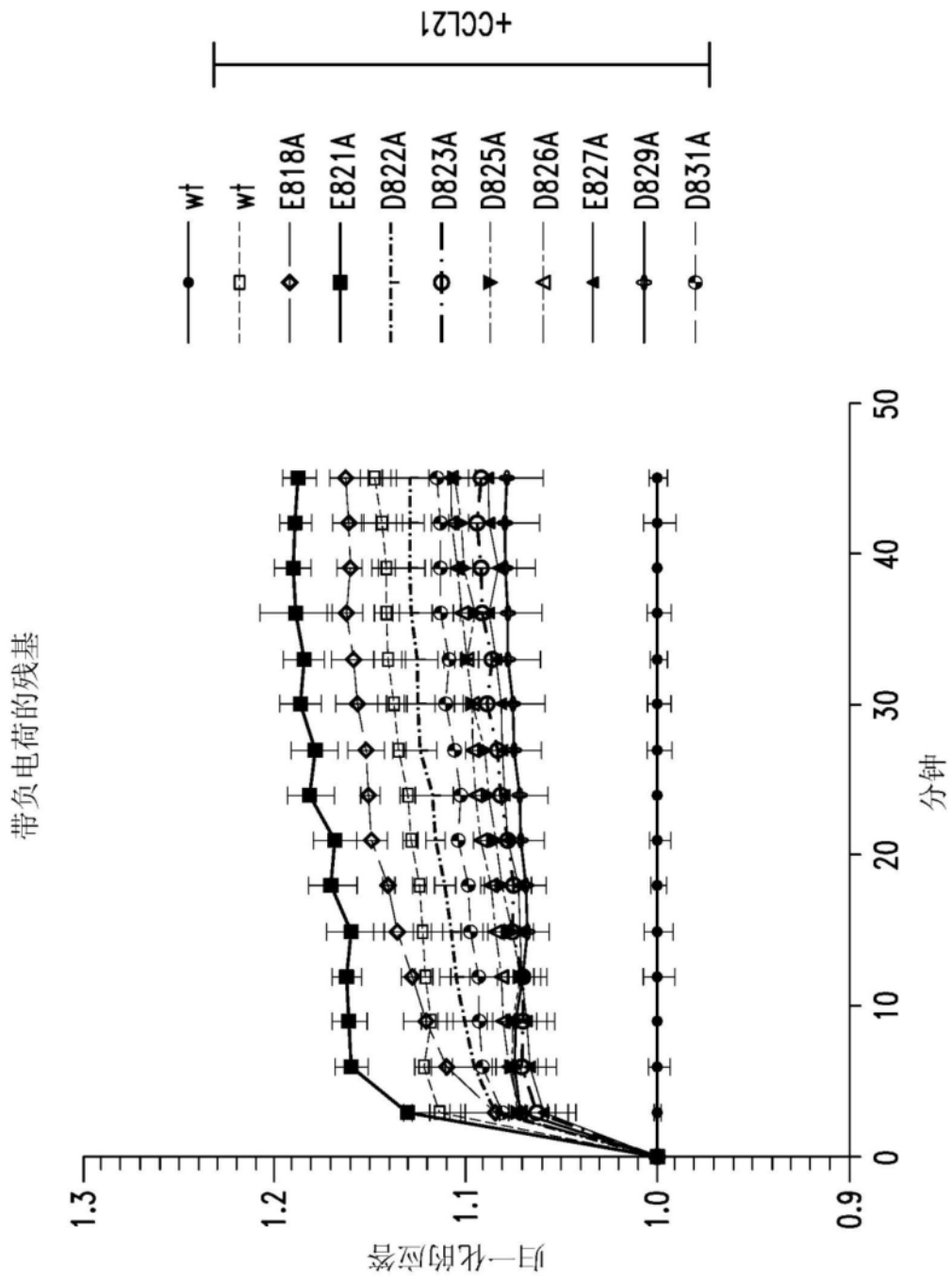


图3B

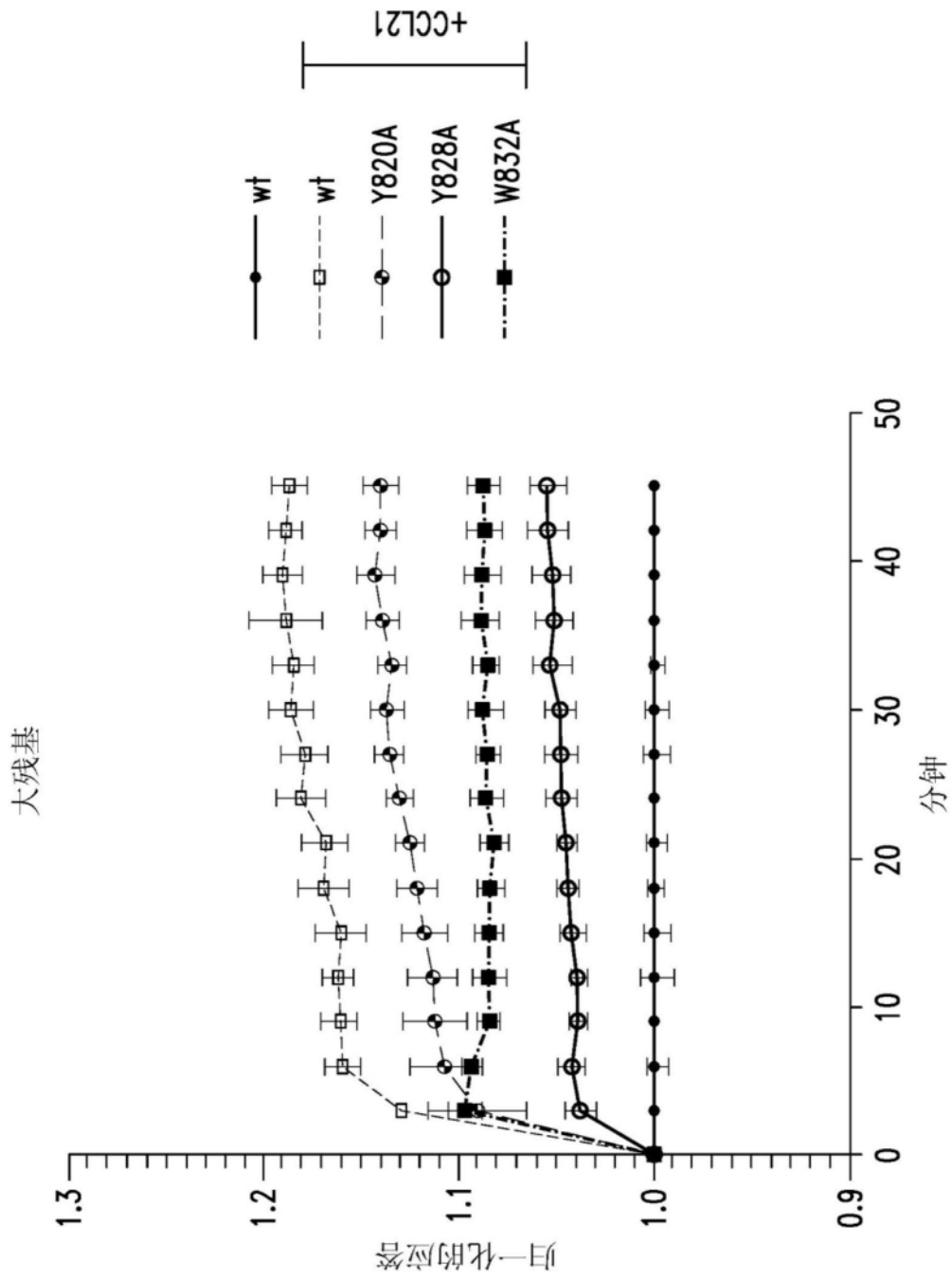


图3C

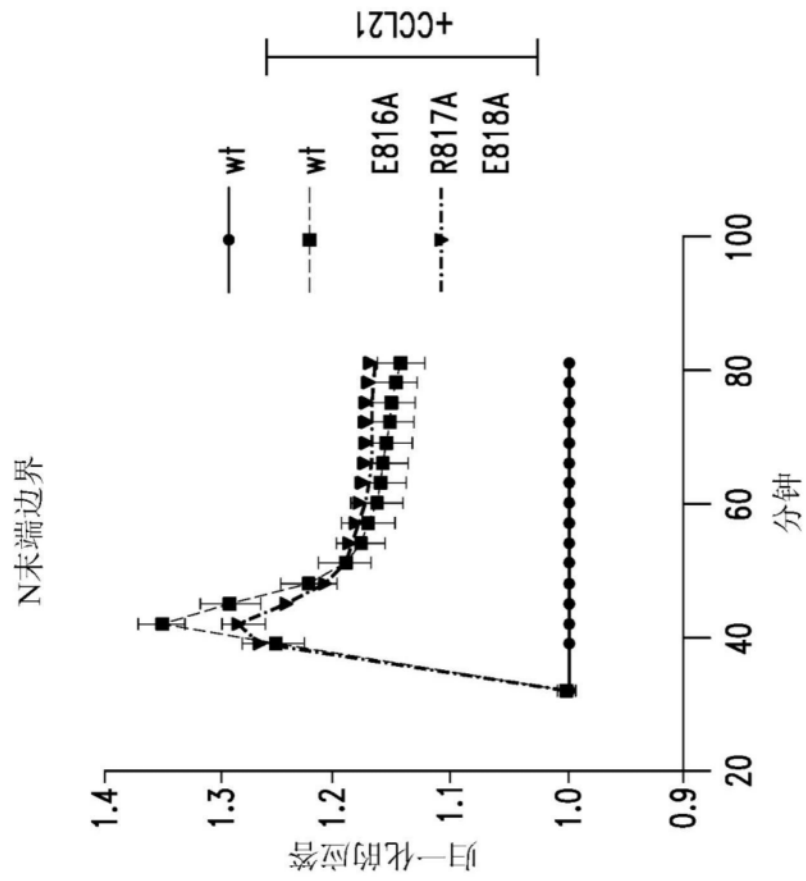


图3D

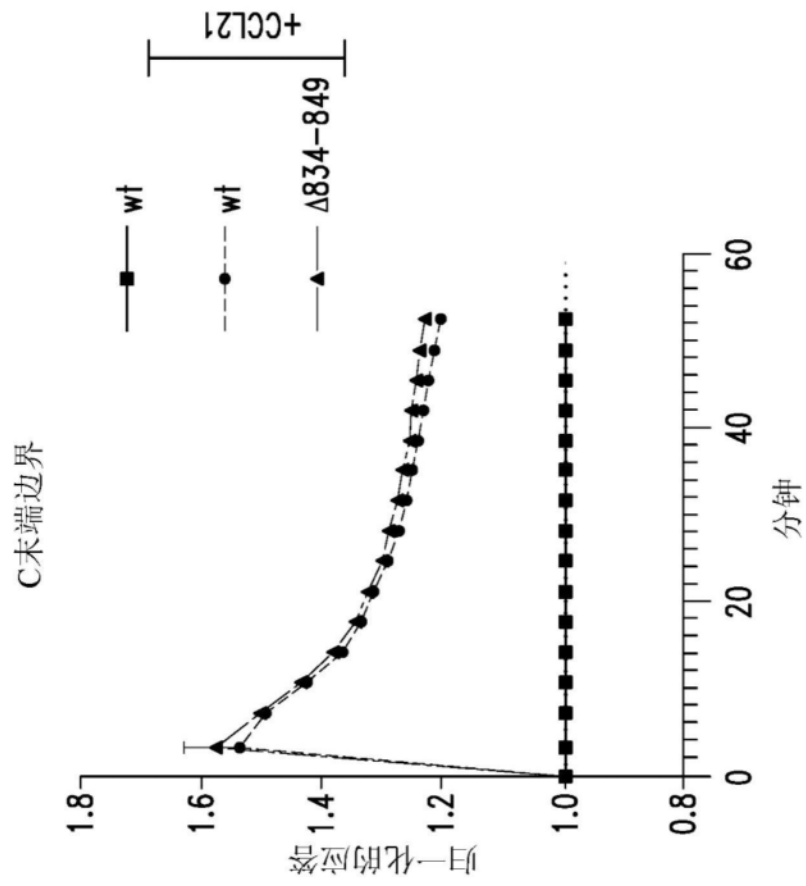


图3E

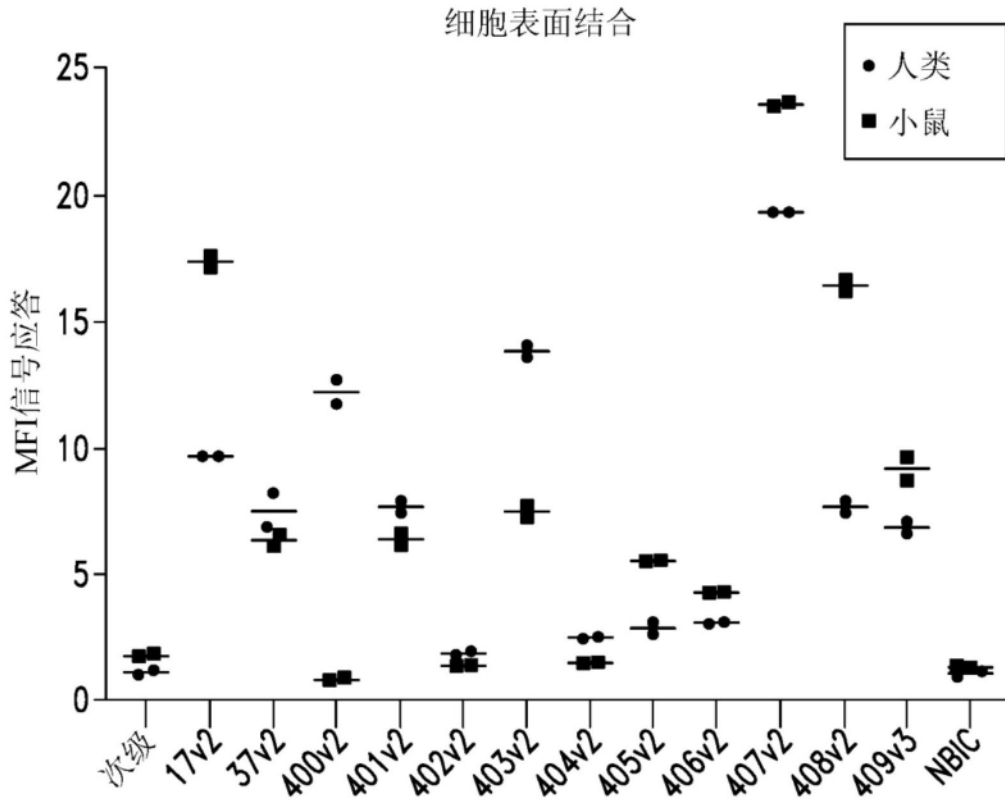


图4A

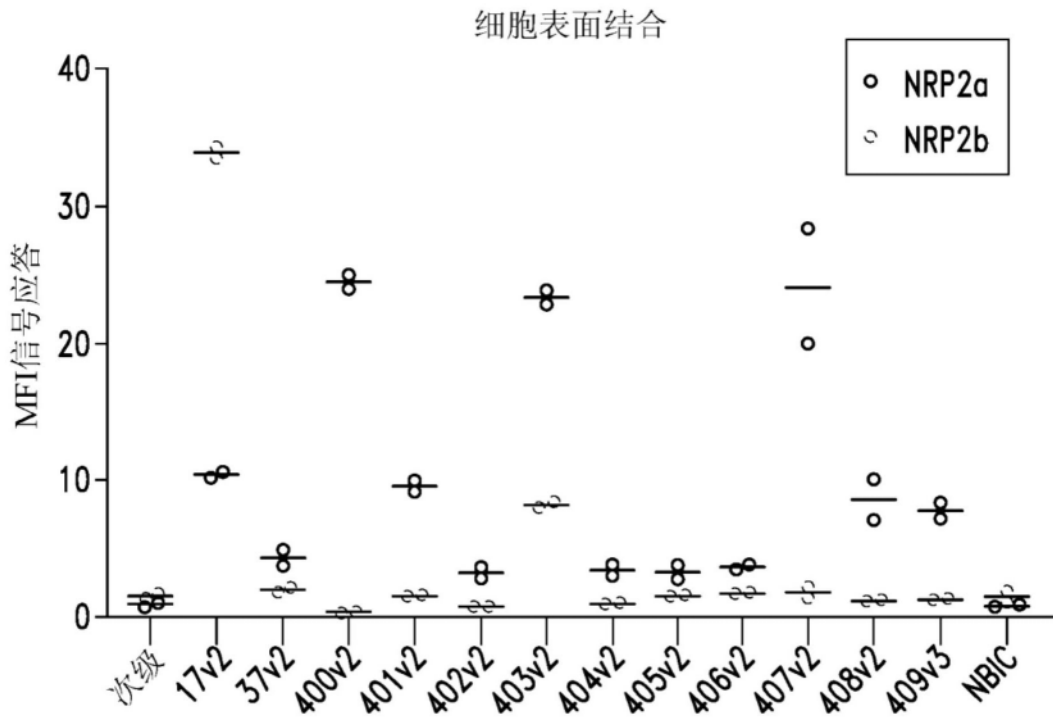


图4B

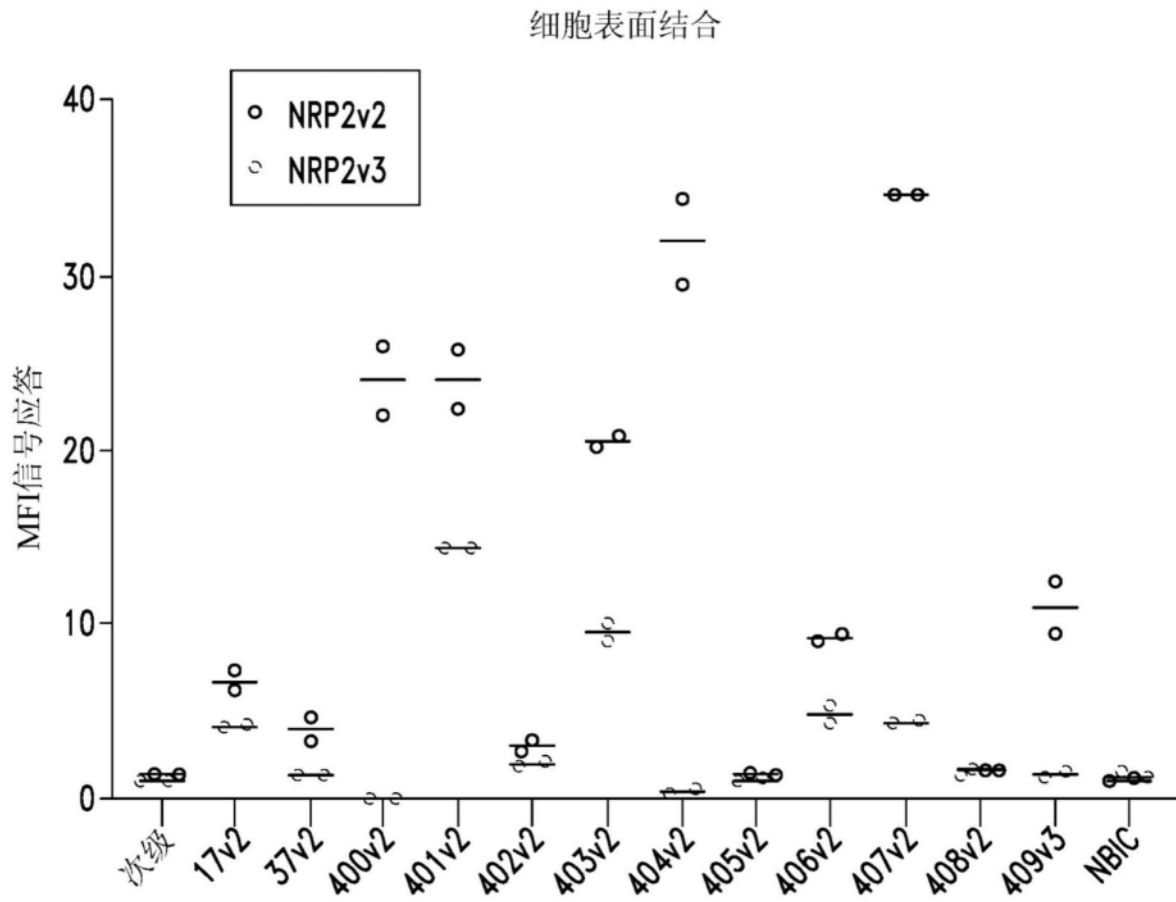


图4C

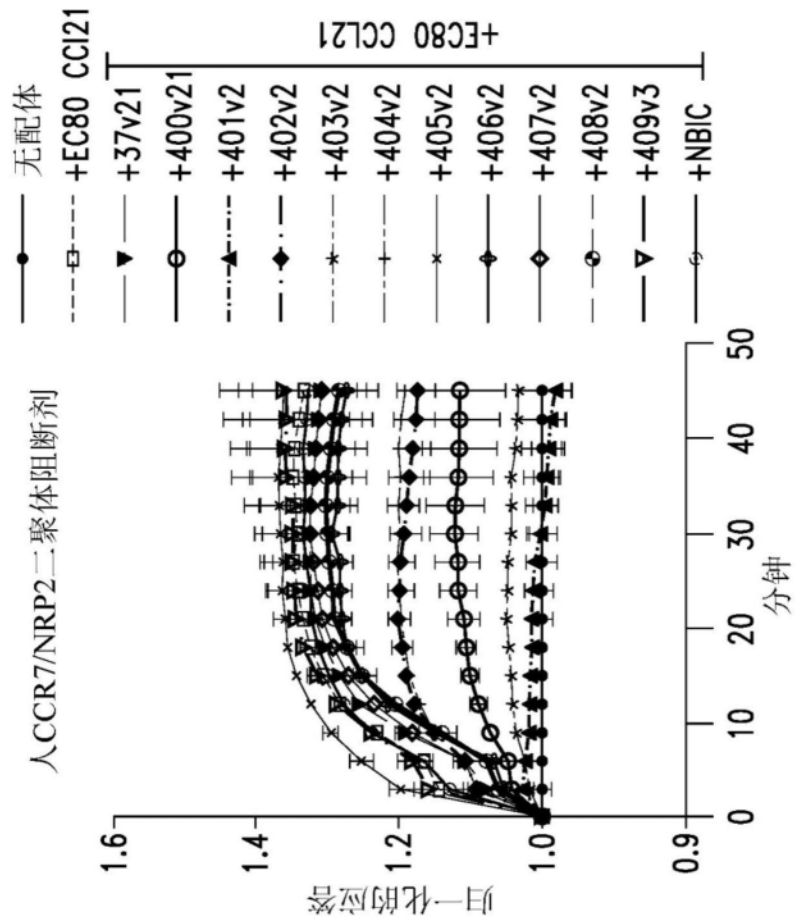


图5A

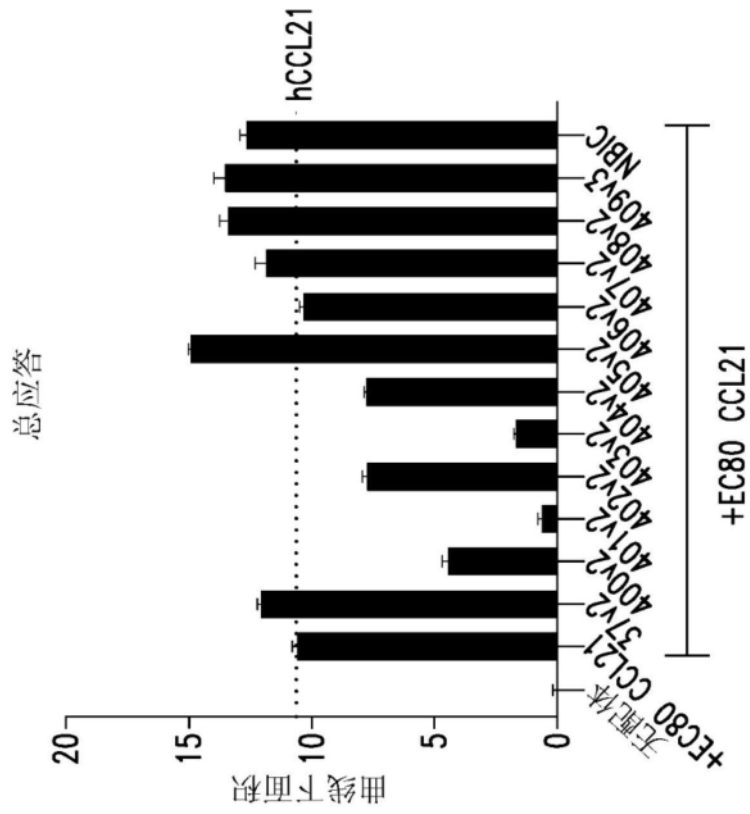


图5B

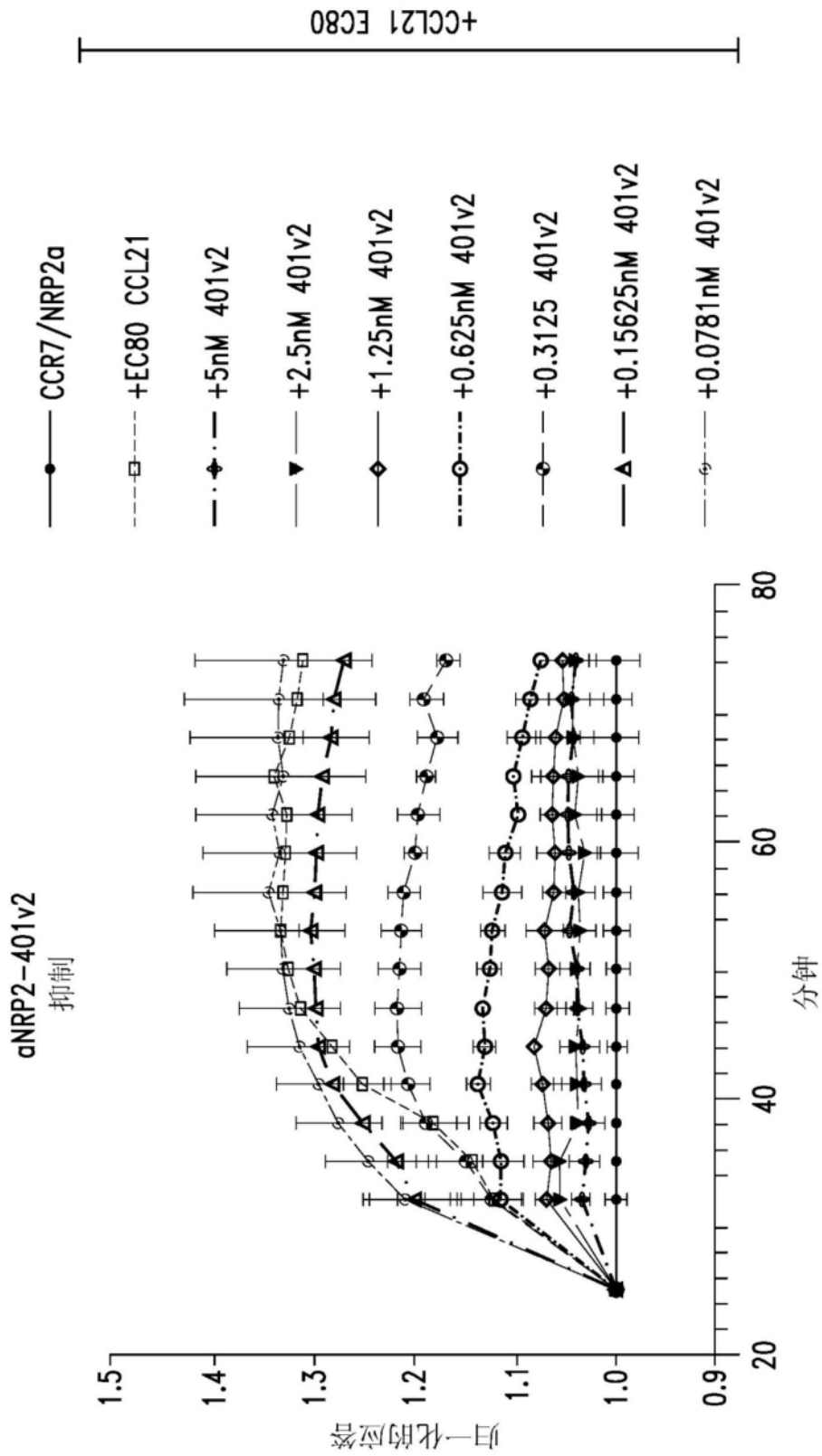


图5C

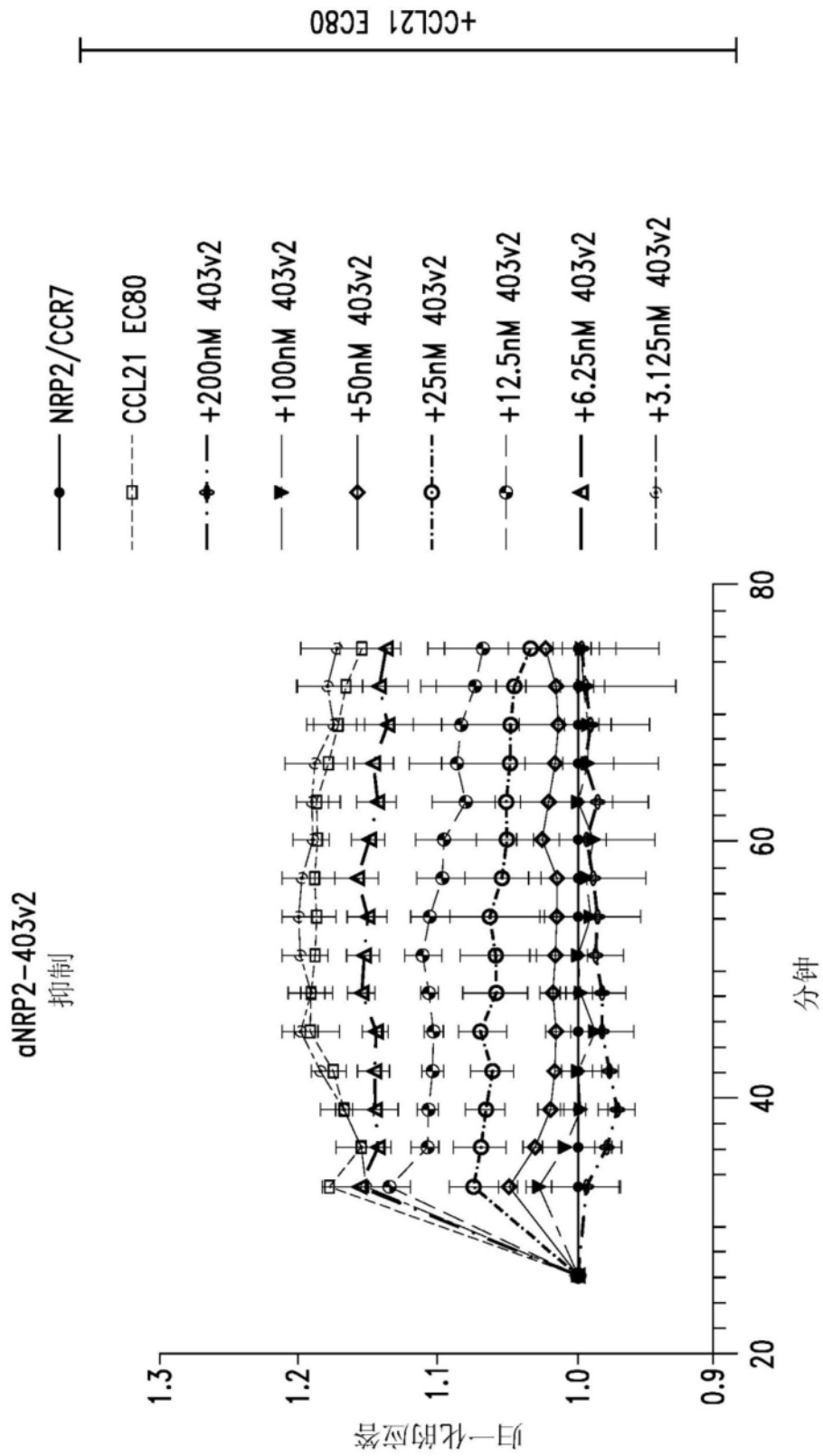


图5D



- * 阻断受体二聚化<50%
- ** 阻断受体二聚化>50%

图6

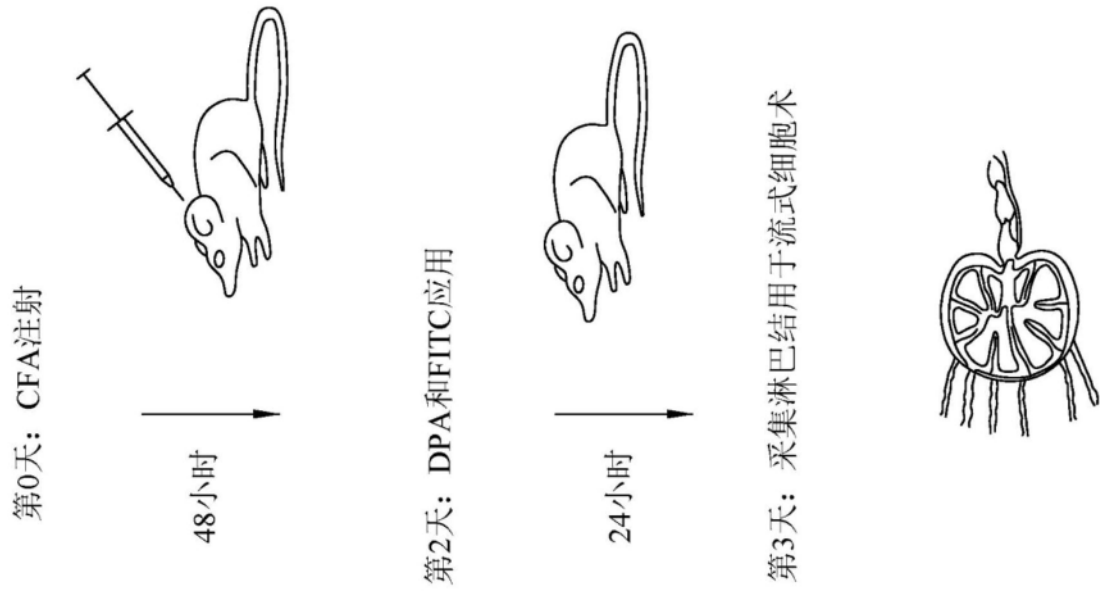


图7A

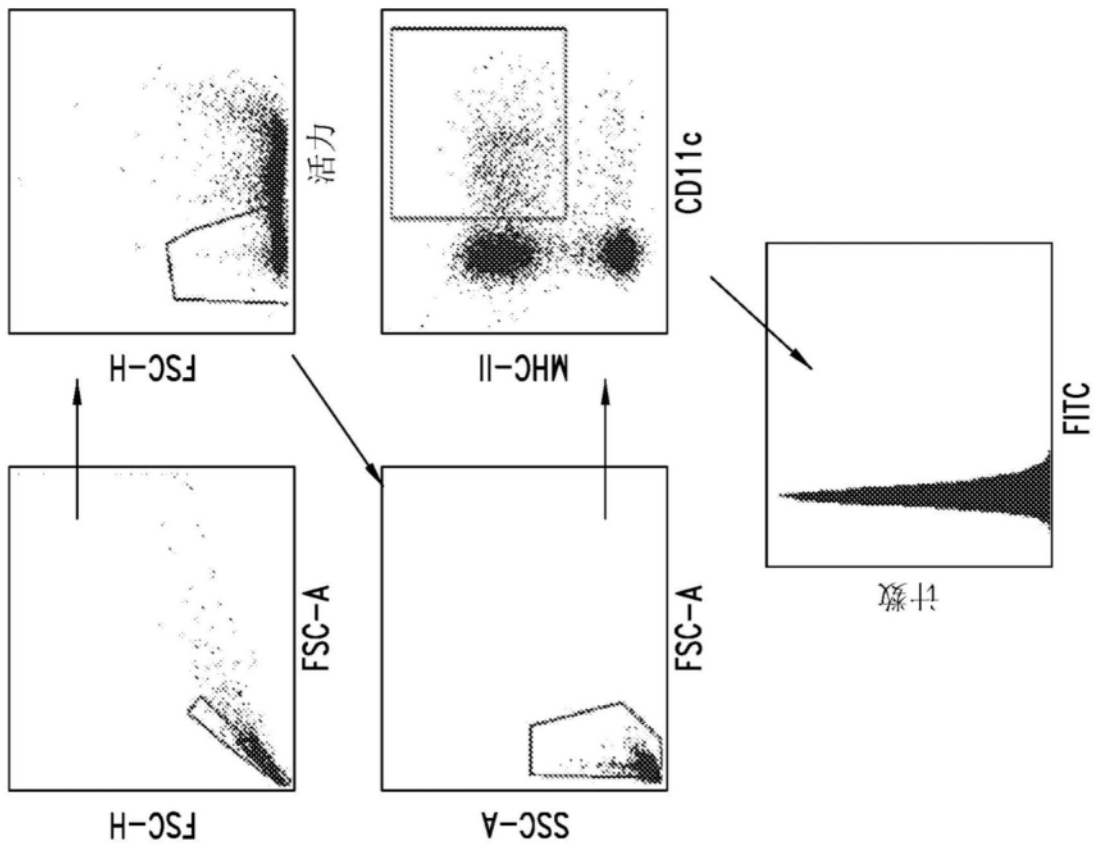


图7B

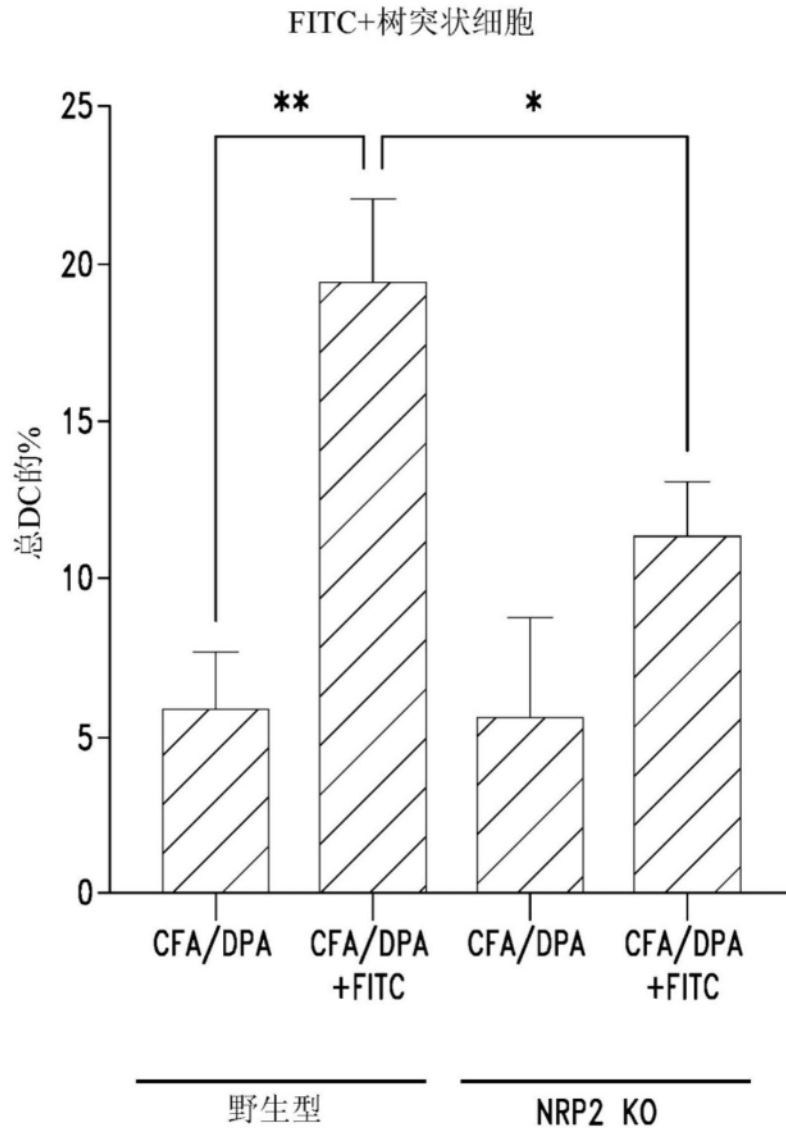


图7C