



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109922836 A

(43)申请公布日 2019.06.21

(21)申请号 201780062131.4

(74)专利代理机构 南京苏创专利代理事务所

(22)申请日 2017.08.04

(普通合伙) 32273

(30)优先权数据

代理人 杨勇

62/371,668 2016.08.05 US

(51)Int.Cl.

62/409,830 2016.10.18 US

A61K 47/69(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/38(2006.01)

2019.04.08

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/045643 2017.08.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/027205 EN 2018.02.08

(71)申请人 梅奥医学教育和研究基金会

权利要求书3页 说明书31页 附图22页

地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 S·N·马尔科维奇 W·K·内华拉

J·T·巴特菲尔德 D·J·柯纳尔

(54)发明名称

用于癌症治疗的经修饰抗体-白蛋白纳米颗粒复合物



(57)摘要

本文描述了经修饰的结合剂和经修饰的载体蛋白的组合物,以及包含经修饰的结合剂和经修饰的载体蛋白与任选的至少一种治疗剂的纳米颗粒复合物,及所述组合物和复合物的制备方法和用途,特别是作为癌症治疗剂的用途。

1. 包含纳米颗粒复合物的组合物,其中每个纳米颗粒复合物包含:  
具有经修饰多肽序列的载体蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序;  
抗体,每种抗体具有抗原结合结构域;和  
任选的治疗剂;  
其中所述纳米颗粒复合物在体内对抗原具有结合特异性。
2. 包含纳米颗粒复合物的组合物,其中每个纳米颗粒复合物包含:  
白蛋白;  
具有经修饰多肽序列的抗体或融合蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序,所述抗体或融合蛋白具有抗原结合结构域;和  
任选的治疗剂;  
其中所述纳米颗粒复合物在体内对抗原具有结合特异性。
3. 包含纳米颗粒复合物的组合物,其中每个纳米颗粒复合物包含:  
具有经修饰多肽序列的载体蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序;  
具有经修饰多肽序列的抗体或融合蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序,所述抗体或融合蛋白具有抗原结合结构域;和  
任选的治疗剂;  
其中所述纳米颗粒复合物在体内对抗原具有结合特异性。
4. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。
5. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。
6. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。
7. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。
8. 根据权利要求1或3所述的组合物,其中所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少约80%序列同一性的氨基酸序列。
9. 根据权利要求2或3所述的组合物,其中所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少约80%序列同一性的氨基酸序列。
10. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂为紫杉醇。
11. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述复合物的平均尺寸小于1μm。
12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约100nm至约800nm之间。
13. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中白蛋白-治疗剂与抗体的比例为10:

1至10:30之间。

14. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中每种纳米颗粒复合物包含约100至约1000个抗体。

15. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述白蛋白是人血清白蛋白。

16. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述组合物是冻干的。

17. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述载体蛋白是白蛋白、卵清蛋白、明胶、弹性蛋白、弹性蛋白衍生的多肽、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米蛋白、大豆蛋白、乳蛋白或乳清蛋白。

18. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述抗体或融合蛋白通过非共价键与载体蛋白结合。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其中所述抗体或融合蛋白通过抗体结合基序和/或白蛋白结合基序与载体蛋白结合。

20. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述紫杉醇通过非共价键与载体蛋白结合。

21. 根据权利要求1、3-5或7中任一项所述的组合物,其中所述抗体或融合蛋白通过抗体结合基序与载体蛋白非共价结合。

22. 根据权利要求2、3或5-7中任一项所述的组合物,其中所述抗体或融合蛋白通过白蛋白结合基序与载体蛋白非共价结合。

23. 根据权利要求1、3-5或7中任一项所述的组合物,其中所述经修饰载体蛋白的至少一个亚组包含一个以上抗体结合基序。

24. 根据权利要求2、3或5-7中任一项所述的组合物,其中所述经修饰抗体或融合蛋白的至少一个亚组包含一个以上的白蛋白结合基序。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的组合物,进一步包含药学上可接受的赋形剂。

26. 一种制备纳米颗粒复合物的方法,该方法包括将白蛋白与具有经修饰多肽序列的抗体组合,所述经修饰多肽序列在形成纳米颗粒复合物的条件下经修饰包含至少一种白蛋白结合基序。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述载体蛋白或纳米颗粒复合物与治疗剂组合。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述治疗剂是紫杉醇。

29. 一种制备纳米颗粒复合物的方法,该方法包括将具有经修饰多肽序列的载体蛋白与抗体一起孵育,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述载体蛋白是白蛋白。

31. 根据权利要求29所述的方法,其中所述载体蛋白或纳米颗粒复合物与治疗剂组合。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述治疗剂是紫杉醇。

33. 根据权利要求29所述的方法,所述抗体具有经修饰多肽序列,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序。

34. 根据权利要求29-33中任一项所述的方法,其中所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的多肽序列。

35. 根据权利要求26-33中任一项所述的方法,其中所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID

NO:12的氨基酸序列。

36. 一种治疗患者癌症的方法,该方法包括给患者施用治疗有效量的权利要求1-7中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述癌症表达所述抗原。

37. 一种抗体,该抗体具有经修饰多肽序列,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序。

38. 根据权利要求37所述的抗体,其中所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的多肽序列。

39. 根据权利要求37或38所述的抗体,所述抗体对白蛋白的亲和力高于具有未修饰多肽序列的抗体。

40. 一种载体蛋白,其具有经修饰多肽序列,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序。

41. 根据权利要求40所述的载体蛋白,其中所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的多肽序列。

42. 根据权利要求40或41所述的载体蛋白,所述载体蛋白对抗体的亲和力高于具有未修饰多肽序列的载体蛋白。

43. 一种制备经修饰抗体的方法,所述方法包括提供具有多肽序列并且所述多肽序列经修饰包含白蛋白结合基序的抗体,其中所述经修饰抗体对结合白蛋白的亲和力高于修饰前的抗体。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

45. 根据权利要求43或44所述的方法,其中所述多肽序列在修饰之前不包含白蛋白结合基序。

46. 一种制备经修饰载体蛋白的方法,所述方法包括提供具有多肽序列并且所述多肽序列经修饰包含抗体结合基序的载体蛋白,其中所述经修饰载体蛋白对结合抗体的亲和力高于修饰前的载体蛋白。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

48. 根据权利要求46或47所述的方法,其中所述载体蛋白是白蛋白、卵清蛋白、明胶、弹性蛋白、弹性蛋白衍生的多肽、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米蛋白、大豆蛋白、乳蛋白或乳清蛋白。

49. 根据权利要求46或47所述的方法,其中所述多肽序列在修饰之前不包含抗体结合基序。

## 用于癌症治疗的经修饰抗体-白蛋白纳米颗粒复合物

### 相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2016年8月5日提交的美国临时专利申请62/371,668和2016年10月18日提交的美国临时专利申请62/409,830的优先权日权益,所述申请全文以引用方式并入本文。

### 背景技术

[0002] 化疗仍然是各种类型的癌症(包括黑色素瘤)全身治疗的主要方法。大多数化学疗法对肿瘤细胞只有较低的选择性,但对健康增殖细胞的毒性很高(Allen TM. (2002) Cancer 2:750-763),通常需要减少剂量甚至停止治疗。理论上,克服化疗毒性问题以及提高药物疗效的一种方法是使用对肿瘤细胞选择性表达(或过表达)的蛋白质具有特异性的抗体将化疗药物靶向肿瘤,从而改变化疗的生物分布并使更多的药物进入肿瘤同时对健康组织的影响较小。然而,尽管进行了30年的研究,但在治疗方面很少有特定目标取得成功。

[0003] 常规的抗体依赖性化学疗法(ADC)设计含有通过合成蛋白酶可切割接头与靶向抗体连接的毒性剂。这种ADC疗法的功效取决于靶细胞与抗体、待切割的接头结合的能力以及将毒性剂摄入靶细胞的能力。Schrama,D.et al. (2006) Nature reviews.Drug discovery 5:147-159.

[0004] 抗体靶向化学疗法具有优于常规疗法的优势,因为它综合具有靶向能力、多种细胞毒性剂以及改善的治疗能力和潜在的更低毒性。尽管进行了广泛的研究,临幊上有效的抗体靶向化疗仍然难以捉摸:主要困难包括抗体和化疗药物之间的接头不稳定、与抗体结合时化学治疗剂的肿瘤毒性降低以及缀合物不能结合和进入肿瘤细胞。另外,这些疗法能实现在超过抗体-药物缀合物的粒径时进行控制。

[0005] 本领域仍然需要基于抗体的癌症治疗剂,其对靶向药物递送保留细胞毒性作用,以提供优于现有治疗剂的可靠和改善的抗肿瘤效果。

### 发明内容

[0006] 由于治疗性抗体和白蛋白结合的紫杉醇纳米颗粒(也称为白蛋白结合的紫杉醇;例如ABRAXANE®,ABX)的制造的独特方式,人源化治疗性单克隆抗体(包括贝伐单抗、曲妥珠单抗和利妥昔单抗)具有与ABX结合的高亲和力,从而使其在ABX、紫杉醇内的化学治疗剂具有特异性靶向肿瘤的能力。此外,在人黑素瘤小鼠模型中,贝伐单抗包被的ABX(AB160)比单独的ABX更有效。

[0007] 然而,需要考虑的是并非所有抗体都能以期望程度结合白蛋白(或ABX)形成纳米颗粒。因此,本公开的一个方面涉及不含有白蛋白结合基序(例如,不与白蛋白和/或白蛋白结合的紫杉醇纳米颗粒复合或者没有复合到期望程度)的抗体,该抗体经修饰含有一种或多种本文所述的白蛋白结合基序。另一方面,本发明涉及实际含有白蛋白结合基序并经修饰含有一种或多种本文所述的其他白蛋白结合基序的抗体。此类抗体包括但不限于利妥昔单抗、曲妥珠单抗、贝伐单抗和莫罗单抗。在一个实施方案中,本发明涉及制备经修饰以含

有一种或多种白蛋白结合基序的经修饰抗体的方法。

[0008] 在另一个方面,本公开涉及不含抗体结合基序(例如,不与抗体复合形成纳米颗粒复合物或者没有复合到期望程度)的载体蛋白,其经修饰含有一种或多种本文所述的抗体结合基序。在一个方面,本公开涉及实际含有抗体结合基序并经修饰含有一种或多种本文所述的其他抗体结合基序的载体蛋白。在一个实施方案中,本发明涉及制备经修饰以含有一种或多种抗体结合基序的经修饰载体蛋白的方法。

[0009] 本公开还涉及含有本文所述的经修饰抗体和/或载体蛋白,优选包含紫杉醇,的纳米颗粒复合物。在一个实施方案中,本发明的各个方面涉及制备所述纳米颗粒复合物的方法。在另一个实施方案中,本发明涉及使用所述纳米颗粒复合物的方法,例如,用于治疗癌症。

[0010] 不受理论束缚,我们认为紫杉醇与白蛋白的相互作用增加了抗体对白蛋白的亲和力并实现了纳米颗粒复合物的形成。不含紫杉醇的载体蛋白和抗体的纳米颗粒可能有益于治疗癌症和其他疾病。因此,本说明书涉及不含紫杉醇,含有或不含其他治疗剂的包含经修饰载体蛋白和/或抗体(或其他抗原结合剂,例如融合蛋白)的复合物。不希望受任何理论束缚,我们认为将抗体结合基序添加到载体蛋白中和/或将白蛋白结合基序添加到抗体(或结合剂)中将提高载体蛋白-抗体的结合,以在没有紫杉醇的情况下实现纳米颗粒形成。

[0011] 在一个实施方案中,本发明涉及纳米颗粒复合物,其包含具有经修饰多肽序列的载体蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序;抗体,每种抗体具有抗原结合结构域;和任选的治疗剂;其中所述纳米颗粒复合物在体内对抗原具有结合特异性。

[0012] 在一个实施方案中,本发明涉及纳米颗粒复合物,其包含白蛋白;具有经修饰多肽序列的抗体或融合蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序,所述抗体或融合蛋白具有抗原结合结构域;和任选的治疗剂;其中所述纳米颗粒复合物在体内对抗原具有结合特异性。

[0013] 在一个实施方案中,本发明涉及纳米颗粒复合物,其包含具有经修饰多肽序列的载体蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序;具有经修饰多肽序列的抗体或融合蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序,所述抗体或融合蛋白具有抗原结合结构域;和任选的治疗剂;其中所述纳米颗粒复合物在体内对抗原具有结合特异性。

[0014] 在一个实施方案中,本发明涉及包含本文所述的纳米颗粒复合物的组合物。

[0015] 在一个实施方案中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO.:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0016] 在一个实施方案中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0017] 在一个实施方案中,所述治疗剂是紫杉醇。

[0018] 在一个实施方案中,所述复合物的平均尺寸小于1μm。在一个实施方案中,所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约90nm至约800nm。在一个实施方案中,所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约90nm至约400nm。在一个实施方案中,所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约90nm至约200nm。在一个实施方案中,所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约100nm至约800nm。在一个实施方案中,所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约100nm至约400nm。在一个

实施方案中,所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约100nm至约200nm。

[0019] 在一个实施方案中,白蛋白-治疗剂与抗体的比为10:1至10:30之间。在一个实施方案中,每个纳米颗粒复合物包含约100至约1000个抗体。在一个实施方案中,每个纳米颗粒复合物包含约100至约800个抗体。

[0020] 在一个实施方案中,所述白蛋白是人血清白蛋白。在一个实施方案中,所述人血清白蛋白是重组人血清白蛋白。

[0021] 在一个实施方案中,所述纳米颗粒复合物是冻干的。在一个实施方案中,所述包含纳米颗粒复合物的组合物是冻干的。在一个实施方案中,所述冻干的纳米颗粒复合物或组合物在水溶液中重构时包含仍然能够在体内结合(识别)抗原的纳米颗粒复合物。

[0022] 在一个实施方案中,所述载体蛋白是白蛋白、卵清蛋白、明胶、弹性蛋白、弹性蛋白衍生的多肽、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米蛋白、大豆蛋白、乳蛋白或乳清蛋白。在一个实施方案中,所述载体蛋白是白蛋白。在一个实施方案中,所述白蛋白经修饰包含其他抗体结合基序。

[0023] 在一个实施方案中,所述抗体或融合蛋白通过非共价键与载体蛋白结合。在一个实施方案中,所述抗体或融合蛋白通过抗体结合基序和/或白蛋白结合基序与载体蛋白结合。在一个实施方案中,所述紫杉醇通过非共价键与载体蛋白结合。在一个实施方案中,其中抗体或融合蛋白通过抗体结合基序与载体蛋白非共价结合。在一个实施方案中,所述抗体或融合蛋白通过白蛋白结合基序与载体蛋白非共价结合。

[0024] 在一个实施方案中,所述经修饰载体蛋白的至少一个亚组包含一个以上抗体结合基序。在一个实施方案中,所述经修饰抗体或融合蛋白的至少一个亚组包含一个以上白蛋白结合基序。

[0025] 在一个实施方案中,所述组合物进一步包含药学上可接受的载体。

[0026] 在一个方面,本发明涉及具有经修饰多肽序列的经修饰抗体,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序。在一个实施方案中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的多肽序列。在一个实施方案中,所述经修饰抗体对白蛋白的亲和力高于具有未修饰多肽序列的抗体。

[0027] 在一个方面,本发明涉及具有经修饰多肽序列的经修饰载体蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序。在一个实施方案中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO.:4或SEQ ID NO:5的多肽序列。在一个实施方案中,所述经修饰载体蛋白对载体蛋白的亲和力高于具有未修饰多肽序列的载体蛋白。

[0028] 在一个方面,本发明涉及制备纳米颗粒复合物的方法,该方法包括将白蛋白与具有经修饰多肽序列的抗体组合,所述经修饰多肽序列在形成纳米颗粒复合物的条件下经修饰包含至少一种白蛋白结合基序。在一个实施方案中,所述载体蛋白或纳米颗粒复合物与治疗剂组合。在一个实施方案中,所述治疗剂是紫杉醇。

[0029] 在一个方面,公开了一种制备纳米颗粒复合物的方法,该方法包括将具有经修饰多肽序列的载体蛋白与抗体一起孵育,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序。在一个实施方案中,所述载体蛋白是白蛋白。在一个实施方案中,所述载体蛋白或纳米颗粒复合物与治疗剂组合。在一个实施方案中,所述治疗剂是紫杉醇。在一个方面,所

述抗体是具有经修饰多肽序列的经修饰抗体,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序。

[0030] 在一个实施方案中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO.:4或SEQ ID NO:5的多肽序列。在一个实施方案中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0031] 在一个方面,公开了一种制备经修饰抗体的方法,所述方法包括提供具有多肽序列并且所述多肽序列经修饰包含白蛋白结合基序的抗体,其中所述经修饰抗体对结合白蛋白的亲和力高于修饰前的抗体。在一个实施方案中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述多肽序列在修饰之前不包含白蛋白结合基序。

[0032] 在一个方面,公开了一种制备经修饰载体蛋白的方法,所述方法包括提供具有多肽序列并且所述多肽序列经修饰包含抗体结合基序的载体蛋白,其中所述经修饰载体蛋白对结合抗体的亲和力高于修饰前的载体蛋白。在一个实施方案中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO.:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述载体蛋白是白蛋白、卵清蛋白、明胶、弹性蛋白、弹性蛋白衍生的多肽、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米蛋白、大豆蛋白、乳蛋白或乳清蛋白。在一个实施方案中,所述多肽序列在修饰之前不包含抗体结合基序。

[0033] 在一个方面,公开了一种治疗患者癌症的方法,该方法包括给患者施用治疗有效量的纳米颗粒复合物,该纳米颗粒复合物包含本文所述的经修饰抗体和/或经修饰载体蛋白,其中所述癌症表达所述抗原。在一个实施方案中,所述组合物静脉内施用。在一个实施方案中,所述组合物通过直接注射或灌注到肿瘤中来施用。

#### 附图的简要说明

[0034] 图1A示出了在荧光标记的利妥昔单抗(绿色)与ABRAXANE®共孵育后形成的纳米颗粒的ImageStream®图像。

[0035] 图1B示出了用未标记的利妥昔单抗和未标记的ABRAXANE®(ABX)制备(左图);荧光标记的(\*)利妥昔单抗和未标记的ABX(中图);或荧光标记的利妥昔单抗和荧光标记的ABX(右图)的AR160的流式细胞术分析。

[0036] 图1C是分离成颗粒组分后每一组份AR160中存在的紫杉醇的量(AR160;蓝色),大于100千道尔顿(KD)的蛋白质的量(>100KD;红色)和小于100KD的蛋白质的量(<100KD;绿色)的图示。通过HPLC测定每个组分中的紫杉醇浓度,显示有大约69.2%的紫杉醇存在于颗粒组分中,剩余的紫杉醇存在于大于100KD的蛋白质中(30.5%)。对共定位于约200KD的条带中的大于100KD的组分、利妥昔单抗、紫杉醇和白蛋白进行蛋白质印迹。

[0037] 图2A示出了用PE抗人CD19(左图)、荧光AR160(中图)或两者(右图)孵育的Daudi细胞的流式细胞术分析。Daudi细胞对CD19、AR160或两者均为约75%阳性。图2B示出了来自与图2A相同的实验,同时用CD19(红色)和荧光AR160(绿色)标记的Daudi细胞的ImageStream图像。

[0038] 图2C是当10mg ABX与指定量的利妥昔单抗(RIT)一起孵育并通过NanoSight(Malvern Instruments Ltd,乌斯特郡,UK)分析粒径分布时每种尺寸的颗粒浓度的图示。

该表显示了粒径分布(平均值,第10百分位数,第50百分位数和第90百分位数)。

[0039] 图3是AR160在用于静脉内输注的生理盐水中的体外稳定性的图示。将AR160临床制剂在室温下暴露于生理盐水中持续不同时间(0h、1h、2h、4h、6h和24h)。在每次孵育结束时,对颗粒进行NanoSight分析,评估颗粒数量及其粒径分布(平均值,第10百分位数,第50百分位数和第90百分位数)。在每个时间点单独分析ABX作为对照。

[0040] 图4A是在人AB血清中ABX的稳定性的图示。向人AB血清中加入 $30 \times 10^8$ 个颗粒并孵育60分钟。在加入AB血清后5、15、30和60分钟测定粒径和数量。使用盐水中的ABX作为对照。

[0041] 图4B是人AB血清中AR160稳定性的图示。向人AB血清中加入 $30 \times 10^8$ 个颗粒并孵育60分钟。在加入AB血清后5、15、30和60分钟测定粒径和数量。使用盐水中的ABX作为对照。

[0042] 图4C是在AB血清中孵育后ABX(虚线)相对于AR160(实线)的颗粒数的图示。

[0043] 图5A-5F表示用同种型对照抗体进行预处理(图5A)、未处理(图5B)、利妥昔单抗(图5C)处理、ABRAXANE®处理(图5D)、AR160处理(图5E)或在盐水中孵育24小时的AR160处理(图5F),然后用荧光标记的抗人CD20抗体标记的Daudi细胞的流式细胞术分析。

[0044] 图6是在指定的紫杉醇浓度下用EdU和ABX、AR160、在盐水中孵育24小时的AR160(AR160 24小时)或利妥昔单抗过夜处理的Daudi细胞增殖水平的图示。通过对未处理的阳性对照进行归一化来计算增殖指数。

[0045] 图7A-7G表示用盐水(图7A)、12mg/kg(图7B)或18mg/kg(图7C)的利妥昔单抗、30mg/kg(图7D)或45mg/kg(图7E)的ABRAXANE®或者30mg/kg(图7F)或45mg/kg(图7G)的AR160处理的小鼠肿瘤体积随时间的变化。基于紫杉醇用于ABX和AR160的剂量。图7H表示基于来自图7A-7G的数据的基线肿瘤体积的百分比变化。

[0046] 图8表示卡普兰-梅尔(Kaplan-Meier)曲线,其示出了来自图7A-7H中所示实验的小鼠的存活率。该表提供了每组中小鼠的中位存活时间(天)。

[0047] 图9A是带有IVIS光谱荧光覆盖图的照片,其示出了单独使用荧光标记的ABX处理、使用带有对照抗体(AB IgG)的ABX处理,或使用AR160的处理的小鼠肿瘤中的药物沉积。ABX用AlexaFluor 750标记,然后或者与IVIG结合作为阴性对照或者与利妥昔单抗(AR160)和IVIS光谱(Perkin Elmer)结合用于荧光定量测量每个肿瘤中ABX的浓度。图9B是图9A所示动物的肿瘤荧光的图示。将肿瘤(图9A中的不规则限定区域)和每只小鼠背部的远端区域(图9A中的圆圈)作为背景制成目标区域(ROI)。从肿瘤ROI中减去每只小鼠的背景ROI,并对所得的辐射效率绘图。

[0048] 图9C是带有IVIS光谱荧光覆盖图的照片,其示出了在用AR160处理前24小时用1%、10%或100%剂量的利妥昔单抗预处理的小鼠肿瘤中的药物沉积。图9D是图9C中所示的动物肿瘤的荧光图示。将肿瘤(图9C中的不规则限定区域)和每只小鼠背部的远端区域(图9A中的圆圈)作为背景制成目标区域(ROI)。从肿瘤ROI中减去每只小鼠的背景ROI,并对所得的辐射效率绘图。

[0049] 图10是在实验室中制备的AR160(AR160)与在药房中制备的三批AR160(AR160 p1、p2或p3)的尺寸分析的图示。粒径(以nm为单位的直径)用平均尺寸、第10百分位数,d(0.1);第50百分位数,d(0.5);和第90百分位数,d(0.9)表示。还测定了每种制剂中的颗粒数( $\times 10^8/mL$ )。

[0050] 图11A-11H表示用同种型对照抗体进行预处理(图11A)、未进行预处理(图11B)、用ABRAXANE®预处理(图11C)、用利妥昔单抗预处理(图11D)、用实验室制备的AR160预处理(图11E)或用在盐水中孵育24小时的AR160预处理(图5F)，然后用荧光标记的抗人CD20抗体标记的Daudi细胞的流式细胞术分析。

[0051] 图11I是在指定的紫杉醇浓度下用EdU和ABX、AR160或三种药房制备的AR160批次中的每种过夜处理的Daudi细胞增殖水平的图示。通过对未处理的阳性对照进行归一化来计算增殖指数。

[0052] 图12A表示曲妥珠单抗(HERCEPTIN®)与HSA肽4(SEQ ID NO:3)的结合。图12B表示莫罗单抗(也称为莫罗单抗-CD3或AKT3;ORTHOCLONE OKT3®)与HSA肽4的结合。图12C表示利妥昔单抗(RITUXAN®)与HSA肽4的结合。

[0053] 图12D表示贝伐单抗(AVASTIN®)与HSA肽13(SEQ ID NO:4)的结合。图12E表示曲妥珠单抗与HSA肽13的结合。图12F表示利妥昔单抗与HSA肽13的结合。

[0054] 图12G表示贝伐单抗与HSA肽40(HSA氨基酸455-472;SEQ ID NO:5)的结合。图12H表示曲妥珠单抗与HSA肽40的结合。图12I表示莫罗单抗与HSA肽40的结合。图12J表示利妥昔单抗与HSA肽40的结合。

[0055] 图12K提供了每种HSA肽的氨基酸序列以及每种抗体对每种HSA肽的亲和力。

[0056] 图13A表示贝伐单抗肽(BEV肽1;氨基酸111-125;SEQ ID NO:7)与HSA肽40的结合。图13B表示贝伐单抗可变肽1(SEQ ID NO:7)与HSA的结合。图13C表示贝伐单抗可变肽2(SEQ ID NO:6)与HSA的结合。图13D表示利妥昔单抗可变肽1(SEQ ID NO:9)与HSA的结合。图13E表示曲妥珠单抗可变肽1(SEQ ID NO:11)与HSA的结合。

[0057] 图13F是描述抗体的图。小蓝框表示贝伐单抗和利妥昔单抗与白蛋白-紫杉醇复合物中的白蛋白结合形成纳米颗粒的大致位置。大方框提供了贝伐单抗(SEQ ID NO:1)和利妥昔单抗(SEQ ID NO:2)的可变序列。每种白蛋白结合序列加下划线并以蓝色(贝伐单抗;SEQ ID NO:8)和红色(利妥昔单抗;SEQ ID NO:10)表示。图13G提供了图13A-13E中使用的几种肽的序列，包括与贝伐单抗(红色)和预测的β片层结构(下划线)相比的单个氨基酸变化的分析。

[0058] 图14A表示利用利妥昔单抗形成纳米颗粒时HSA肽40竞争的影响。将ABX(5mg/mL)与利妥昔单抗(2mg/mL)以及未添加肽(红色条)、添加对照肽(HSA肽10;绿色条)或添加HSA肽40(紫色条)一起孵育。与抗体相比，添加过量10倍摩尔的肽。使用Malvern Nanosizer以1:200稀释度测量直径。

[0059] 图14B表示利用贝伐单抗形成纳米颗粒时HSA肽40竞争的影响。将ABX(10mg/mL)与贝伐单抗(4mg/mL)以及未添加肽(红色条)、添加对照肽(HSA肽10;绿色条)、HSA肽13(紫色条)、HSA肽40(蓝色条)或BEV肽12(橙色条)一起孵育。与抗体相比，添加过量10倍摩尔的肽。使用Malvern Nanosizer以1:200稀释度测量直径。

[0060] 图14C示出了利用利妥昔单抗和ABX形成纳米颗粒时HSA肽4竞争的影响。得到的平均粒径为96nm(+/-23nm)。图14D示出了利用利妥昔单抗和ABX形成纳米颗粒时HSA肽13竞争的影响。得到的平均粒径为180nm(+/-26nm)。

## 具体实施方式

[0061] 在阅读本说明书之后,对于本领域技术人员来说,如何通过各种替代实施方案和替代应用实现本发明将变得显而易见。然而,本文将不描述本发明的所有各种实施方案。应当理解,这里给出的实施例仅作为示例而非进行限制。因此,各种替代实施方案的详细描述不应被解释为对如下所述的本发明的范围或广度的限制。

[0062] 在对本发明进行公开和描述之前,应理解下面描述的方面不限于具体的组合物、制备这种组合物的方法或其用途,这些当然都可以改变。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定内容的目的,而不是意图进行限制。

[0063] 本发明的详细描述仅为了方便读者而分成各个部分,并且在任何部分中找到的公开内容可以与另一部分中的内容组合。为了方便读者,可以在说明书中使用标题或副标题,这些标题或副标题不旨在影响本发明的范围。

### 定义

[0064] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。在本说明书和之后的权利要求中,将参考许多术语,这些术语应被定义为具有以下含义:

[0065] 本发明中使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不旨在限制本发明。如本文使用的,单数形式的“一”和“一个”也包括复数形式,除非上下文另有明确说明。

[0066] “任选的”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可能发生或者可能不发生,并且该描述包括事件或情况发生的例子以及事件或情况不发生的例子。

[0067] 术语“约”用在数字名称之前时,例如温度、时间、数量、浓度等,包括范围在内,表示近似值可能会有(+)或(-)10%、5%、1%或其间的任何子范围或子值的变化。优选地,当关于剂量使用术语“约”时指剂量可以变化+/-10%。

[0068] “包含”或“包括”旨在表示组合物和方法包括所列举的要素,但不排除其他要素。当用于定义组合物和方法时,“基本上由……组成”表示排除对于所述目的的组合具有任何实质意义的其他元素。因此,基本上由本文定义的要素组成的组合物不排除不会实质上影响要求保护的发明的基本和新颖特征的其他材料或步骤。“由……组成”是指排除其他成分的微量元素和实质性方法步骤。由这些过渡术语中的每一个定义的实施例都在本发明的范围内。

[0069] 本文所用的术语“纳米颗粒”是指至少一个尺寸小于5微米的颗粒。在优选实施例中,例如对于静脉内给药,所述纳米颗粒小于1微米。对于直接给药,所述纳米颗粒更大。本发明甚至专门考察了更大的颗粒。

[0070] 在一群颗粒中,单个颗粒的粒径分布在平均值附近。因此,所述颗粒群的粒度可以用平均值表示,也可以用百分位数表示。D50是50%的颗粒落在小于该粒径范围的粒径。10%的颗粒小于D10值,90%的颗粒小于D90。如果未清楚说明,“平均”粒径相当于D50。

[0071] 本文所用的术语“载体蛋白”是指用于转运抗体或融合蛋白的蛋白质。本公开的抗体或融合蛋白可以可逆地结合载体蛋白。载体蛋白的非限制性实例在下文进行更详细地讨论。

[0072] 本文所用的术语“核”是指纳米颗粒的中心或内部部分,其可以包含载体蛋白、载体蛋白和治疗剂,或者其他试剂或试剂组合。

[0073] 术语“缓冲液”包括在冻干前将溶液pH保持在可接受范围内的那些试剂，并且可包括琥珀酸盐(钠或钾)、组氨酸、磷酸盐(钠或钾)、三(三(羟甲基)氨基甲烷)、二乙醇胺、柠檬酸盐(钠)等。在一个实施例中，本发明的缓冲液的pH范围为约5.5至约6.5；优选地，pH为约6.0。将pH控制在该范围内的缓冲液的实例包括琥珀酸盐(例如琥珀酸钠)、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐和其他有机酸缓冲液。

[0074] 术语“药物制剂”是指以下这样的制剂，其形式能使活性成分有效并且不含对制剂所施用的对象有毒的其它成分。

[0075] “药学上可接受的”赋形剂(载体、添加剂)是指可以合理地施用给受试哺乳动物以提供有效剂量的所用活性成分的那些赋形剂。

[0076] 本文所用的术语“治疗剂”是指治疗上有用的药剂，例如用于治疗的药剂，其能缓解或减轻疾病状态、生理状况、症状或病因，或者用于对上述这些进行评估或诊断的药剂。作为非限制性实例，治疗剂可包括用于可视化的放射性同位素或其他分子；或抗癌剂，例如化疗剂或放疗剂。在一些实施例中，可明确地从组合物中排除一种或多种治疗剂或者一种或多种类型的药剂。

[0077] 本文所用的术语“抗体”或“多种抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分(即，含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子)。该术语还指包含两种免疫球蛋白重链和两种免疫球蛋白轻链的抗体以及包括全长抗体及其部分在内的多种形式；包括，例如，免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体(dAb)、双体抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体、它们的功能活性表位结合片段、双功能杂合抗体(例如，Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))和单链(例如，Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) 和 Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)，它们通过引用并入本文)。(大体上参见Hood et al., Immunology, Benjamin, N.Y., 2ND ed. (1984); Harlow and Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Hunkapiller and Hood, Nature, 323, 15-16 (1986)，其通过引用并入本文)。抗体可以是任何类型(例如，IgG、IgA、IgM、IgE或IgD)。优选地，所述抗体是IgG。抗体可以是非人的(例如，来自小鼠、山羊或任何其他动物)、全人的、人源化的或嵌合的。

[0078] 本文所用的术语“融合蛋白”是指含有至少两个结构域的蛋白质，其中一个结构域衍生自一种蛋白质而另一个结构域衍生自不同的蛋白质。阿柏西普(ZALTRAP®)是融合蛋白，已被FDA批准用于治疗结直肠癌。用于治疗癌症的其他融合蛋白是已知的，包括trebanabib(AMG386, Amgen)和APG 101(APOCEPT, Apogenix)。在一些实施例中，所述融合蛋白是Fc-融合蛋白。

[0079] 本文所用的术语“冻干的”、“冻干”等是指首先将待干燥的材料(例如，纳米颗粒)冷冻起来然后通过在真空环境中升华除去冰或冷冻溶剂的方法。赋形剂可以包含在预冻干制剂中，以增强冻干产品在储存时的稳定性。在一些实施例中，将载体蛋白、抗体或融合蛋白和/或治疗剂分别冻干。在其他实施例中，首先将载体蛋白、抗体或融合蛋白和/或治疗剂组合，然后冻干。冻干样品可进一步含有其他赋形剂。在US 9,446,148中描述了例如抗体-白蛋白-紫杉醇纳米颗粒复合物的冻干，该专利通过引用整体并入本文。

[0080] 术语“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”包括治疗受试者(例如人)的疾病或病症(例如癌症),包括:(i)抑制疾病或病症,即阻止其发展;(ii)缓解疾病或病症,即使疾病或病症消退;(iii)减缓疾病或病症的发展;和/或(iv)抑制、缓解或减缓疾病或病症的一种或多种症状的发展。

[0081] 关于细胞/细胞群的术语“杀死”涉及包括将会导致细胞/细胞群死亡的任何类型的操作。

[0082] 在提及纳米颗粒核时本文所用的术语“外表面”是指位于所述核外侧的该核的一部分。在一些实施例中,所述结合剂(例如抗体或融合蛋白)与所述外表面结合。

[0083] 本文所用的短语“同时保留抗体特异性”表示与白蛋白结合的抗体能继续识别(结合)被靶向的表位。可以在大纳米颗粒的情况下和/或纳米颗粒在体内解离或部分解离后保留抗体特异性。

[0084] 本文所用的术语“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。相对于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在序列比对和引入缺口后,如果有必要的话,以实现最大百分比的序列同一性,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性,在候选序列中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员能够确定比对序列的合适参数,包括为待比较序列的全长实现最大对齐所需的任何算法。

[0085] 多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)与另一个序列具有一定百分比(例如,60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)的“序列同一性”或“相似性”表示当比对时,在比较的两个序列中所述百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。这种比对和序列同一性百分比可以使用本领域已知的软件程序确定,例如Ausubel et al.eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology中描述的。生物学上等同的多核苷酸是具有上述特定百分比序列同一性并编码具有相同或相似生物活性的多肽的多核苷酸。

[0086] 当提及本文所述的经修饰载体蛋白或经修饰结合剂(例如,抗体)时,术语“经修饰的”是指所指出的多肽序列被添加至蛋白质(或其他分子)。例如,经修饰抗体可以是经过修饰(工程设计、改变、突变)以含有在未修饰的抗体中不存在的白蛋白结合基序的抗体,或者经过修饰以含有已存在的白蛋白结合基序之外的白蛋白结合基序的抗体。在一个实施例中,可以通过改变(突变)蛋白质中存在的氨基酸来添加基序。在一个实施例中,可以通过将基序序列插入蛋白质(或其他分子)中来添加基序。在一个实施例中,可以通过将基序序列与蛋白质(或其他分子)共价结合来添加基序。

[0087] 另外,本说明书中使用的一些术语会在下问更具体地定义。

### 经修饰的结合剂

[0088] 在一个方面,本发明涉及具有经修饰多肽序列的经修饰抗体,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序。在一个实施方案中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的多肽序列。在一个实施例中,所述经修饰抗体结合白蛋白(能够结合白蛋白)。在一个实施例中,所述经修饰抗体对白蛋白的亲和力高于具有未修饰多肽序列的抗体。

[0089] 在一个方面,公开了一种制备经修饰抗体的方法,所述方法包括提供具有多肽序列并且所述多肽序列经修饰包含白蛋白结合基序的抗体。在一个实施例中,所述经修饰抗体与修饰前的抗体相比具有更高的与白蛋白结合的亲和力。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一个实施例中,所述多肽序列在修饰之前不包含白蛋白结合基序。

[0090] 在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:6的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:6的多肽序列具有至少80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:6的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:6的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:6的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6的截短的多肽序列,其包含至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸残基。

[0091] 在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:7的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:7的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:7的多肽序列具有至少80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:7的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:7的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:7的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:7的截短的多肽序列,其包含至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸残基。

[0092] 在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:8的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:8的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:8的多肽序列具有至少80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:8的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:8的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:8的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:8的截短的多肽序列,其包含至少10、11、12、13、14、15、16、17或18个氨基酸残基。

[0093] 在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:9的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:9的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:9的多肽序列具有至少

80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:9的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:9的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:9的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含SEQ ID N0:9的截短的多肽序列，其包含至少10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸残基。

[0094] 在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含SEQ ID N0:10的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:10的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:10的多肽序列具有至少80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:10的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:10的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:10的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含SEQ ID N0:10的截短的多肽序列，其包含至少10、11、12、13、14、15、16、17或18个氨基酸残基。

[0095] 在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含SEQ ID N0:11的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:11的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:11的多肽序列具有至少80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:11的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:11的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:11的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含SEQ ID N0:11的截短的多肽序列，其包含至少10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸残基。

[0096] 在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含SEQ ID N0:12的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:12的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:12的多肽序列具有至少80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:12的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:12的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID N0:12的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含SEQ ID N0:12的截短的多肽序列，其包含至少10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸残基。

[0097] 在一个方面，与SEQ ID N0:6、SEQ ID N0:7、SEQ ID N0:8、SEQ ID N0:9、SEQ ID N0:10、SEQ ID N0:11或SEQ ID N0:12的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的白蛋白结合基序相对于参考序列包含取代(例如,保守取代)、插入或缺失。在一些实施例中,包含该序列的白蛋白结合基序保留结合白蛋白的能力。在一些实施例中,当所述基序插入结合剂(例如,抗体或融合蛋白)时,包含该序列的白蛋白结合基序保留结合白蛋白的能力。

[0098] 可以将所述白蛋白结合基序添加到抗体的任何区域。在一些实施例中,将所述白蛋白结合基序添加到抗体的Fc部分中。在一些实施例中,将所述白蛋白结合基序添加到抗体的Fab部分中。在一些实施例中,将所述白蛋白结合基序添加到抗体的一条或两条重链中。在一些实施例中,将所述白蛋白结合基序添加到抗体的一个或两个可变区中。在一些实施例中,将所述白蛋白结合基序添加到抗体的一条或两条轻链中。优选地,将所述白蛋白结合基序添加到不会显著影响抗体的三级或四级结构的抗体区域。更优选地,将所述白蛋白结合基序添加到不会显著影响抗体的抗原结合能力的抗体区域。在一个实施例中,将所述白蛋白结合基序添加到抗体的氨基末端区域。在一个实施例中,将所述白蛋白结合基序添加到抗体的羧基末端区域。

[0099] 在一个实施例中,在结合剂的相同区域(例如,彼此相邻或在彼此的约1至约30个氨基酸范围内)添加多个白蛋白结合基序。在一个实施例中,在结合剂的不同区域(例如,彼此之间距离大于约30个氨基酸和/或在不同多肽上)添加多个白蛋白结合基序。

[0100] 优选地,所述结合剂是抗体。在一些实施例中,所述抗体是非治疗性和非内源性人抗体。在一些实施例中,所述抗体是嵌合抗体、非内源性人抗体、人源化抗体或非人抗体。本文进一步定义了抗体。

[0101] 在一个实施例中,所述抗体是已知的治疗性抗体。在本发明中考虑对其进行修饰并使用的抗体包括但不限于利妥昔单抗、曲妥珠单抗、贝伐单抗、阿仑单抗、博纳吐单抗、本妥昔单抗、西妥昔单抗、狄诺塞麦、达妥昔单抗(dinutuximab)、替伊莫单抗(ibritumomab)、易普利姆玛、纳武单抗、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、帕尼单抗、帕博利珠单抗(pembrolizumab)、帕妥珠单抗、吉妥珠单抗、托西莫单抗、莫罗单抗或它们的任何生物仿制药。对于含有白蛋白结合位点的抗体,可以加入一种或多种其他白蛋白结合基序以形成经修饰抗体。

[0102] 在一个方面,本发明涉及分离的白蛋白结合基序。在一个实施例中,所述分离的白蛋白结合基序与SEQ ID N0:6、SEQ ID N0:7、SEQ ID N0:8、SEQ ID N0:9、SEQ ID N0:10、SEQ ID N0:11或SEQ ID N0:12的多肽序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一个实施例中,所述分离的白蛋白结合基序保留结合白蛋白的能力。在一个实施例中,所述分离的白蛋白结合基序保留结合抗体结合基序的能力。在一个实施例中,所述分离的白蛋白结合基序保留结合具有SEQ ID N0:3、SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:5的多肽序列或其变体的肽的能力。在一个方面,本发明涉及分离的白蛋白结合基序或其变体的用途,例如用于制备结合白蛋白的结合剂或其他分子。

[0103] 肽序列(包括抗体)的修饰和制备可以采用任何合适的方法进行,包括现在已知的或将来开发的那些方法。本公开进一步涉及编码本文所述经修饰抗体的多肽序列的多核苷酸序列,以及包含那些多核苷酸序列的细胞(例如CHO或HEK细胞)或非人动物(例如小鼠)。

### 经修饰的载体蛋白

[0104] 在一个方面,本发明涉及具有经修饰多肽序列的经修饰载体蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO.:4或SEQ ID NO:5的多肽序列。在一个实施例中,所述经修饰载体蛋白对载体蛋白的亲和力高于具有未修饰多肽序列的载体蛋白。

[0105] 在一个方面,公开了一种制备经修饰载体蛋白的方法,所述方法包括提供具有多肽序列并且所述多肽序列经修饰包含抗体结合基序的载体蛋白。在一个实施例中,所述经修饰载体蛋白与修饰前的载体蛋白相比具有更高的与抗体结合的亲和力。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO.:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一个实施例中,所述载体蛋白是白蛋白、卵清蛋白、明胶、弹性蛋白、弹性蛋白衍生的多肽、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米蛋白、大豆蛋白、乳蛋白或乳清蛋白。在一个实施例中,所述多肽序列在修饰之前不包含抗体结合基序。

[0106] 在一些实施例中,所述载体蛋白可以是白蛋白、明胶、弹性蛋白(包括原弹性蛋白(*topoelastin*))或弹性蛋白衍生的多肽(例如, $\alpha$ -弹性蛋白和弹性蛋白样多肽(ELP))、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米蛋白大豆蛋白(例如,大豆分离蛋白(SPI))、乳蛋白(例如, $\beta$ -乳球蛋白(BLG)和酪蛋白)或乳清蛋白(例如,乳清蛋白浓缩物(WPC)和乳清蛋白分离物(WPI))。在优选的实施例中,所述载体蛋白是白蛋白。在优选的实施例中,所述白蛋白是蛋清(卵清蛋白)、牛血清白蛋白(BSA)等。在甚至更优选的实施例中,所述载体蛋白是人血清白蛋白(HSA)。在一些实施例中,所述载体蛋白是重组蛋白(例如,重组HSA)。在一些实施例中,所述载体蛋白通常被认为是由美国食品和药物管理局(FDA)批准的安全(GRAS)赋形剂。

[0107] 在一个实施例中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:3的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:3的多肽序列具有至少80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:3的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:3的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:3的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3的截短的多肽序列,其包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个氨基酸残基。

[0108] 在一个实施例中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:4的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:4的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:4的多肽序列具有至少80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:4的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:4的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:4的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:4的截短的多肽序列,其包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个氨基酸残基。

[0109] 在一个实施例中,所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:5的多肽序列。在一个实施例中,所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:5的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序

列。在一个实施例中，所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:5的多肽序列具有至少80%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:5的多肽序列具有至少85%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:5的多肽序列具有至少90%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:5的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽序列。在一个实施例中，所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:5的截短的多肽序列，其包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个氨基酸残基。

[0110] 在一个方面，与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的抗体结合基序相对于参考序列包含取代(例如，保守取代)、插入或缺失。在一些实施例中，包含该序列的抗体结合基序保留结合抗体的能力。在一些实施例中，当基序插入载体蛋白中时，包含该序列的抗体结合基序保留结合抗体的能力。

[0111] 可以将抗体结合基序添加到载体蛋白的任何区域。优选地，所述抗体结合基序不显著影响载体蛋白的三级或四级结构。在一个实施例中，将抗体结合基序添加到载体蛋白的氨基末端区域。在一个实施例中，将抗体结合基序添加到载体蛋白的羧基末端区域。

[0112] 在一个实施例中，在载体蛋白的相同区域(例如，彼此相邻或在彼此的约1至约30个氨基酸范围内)添加多个抗体结合基序。在一个实施例中，在载体蛋白的不同区域(例如，彼此之间距离大于约30个氨基酸)添加多个抗体结合基序。

[0113] 在一个实施例中，本发明涉及分离的抗体结合基序。在一个实施例中，所述分离的抗体结合基序与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的多肽序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一个实施例中，所述分离的抗体结合基序保留结合抗体的能力。在一个实施例中，所述分离的抗体结合基序保留结合白蛋白结合基序的能力。在一个实施例中，所述分离的抗体结合基序保留了结合肽的能力，所述肽具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12或它们的变体的多肽序列。在一个方面，本发明涉及分离的抗体结合基序或其变体的用途，例如用于制备结合抗体的载体蛋白或其他分子。

[0114] 肽序列(包括载体蛋白)的修饰和制备可以采用任何合适的方法进行，包括现在已知或将来开发的那些方法。本公开进一步涉及编码本文所述经修饰载体蛋白的多肽序列的多核苷酸序列，以及包含那些多核苷酸序列的细胞(例如CHO或HEK细胞)或非人动物(例如小鼠)。

### 肽变体

[0115] 在某些实施例中，考察了本文提供的抗体结合基序和白蛋白结合基序的氨基酸序列变体。例如，可能需要改善基序(或含有基序的蛋白质)的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过将合适的修饰引入编码基序的核苷酸序列中或通过肽合成来制备基序的氨基酸序列变体。此类修饰包括，例如，基序的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。在一些实施例中，可以任意组合缺失、插入和取代以得到最终构建体，只要最终构建体具有所需特征，例如抗体结合或白蛋白结合。

[0116] 在某些实施例中，提供了具有一种或多种氨基酸取代的抗体变体。表1中示出了保

守取代,标题为“优选的取代”。如下文参考氨基酸侧链类别进一步描述的,表1中在“示例取代”的标题下列举了更多实质的变化。可以将氨基酸取代引入目标抗体中,并筛选具有所需活性的产物,例如保留/改善的抗原结合性能,降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC。

表1

原始 残基	示例 取代	优选的 取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0117] 氨基酸可根据常见的侧链特性进行分组:

- (1) 疏水性:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) 中性亲水性: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) 酸性: Asp, Glu;
- (4) 碱性: His, Lys, Arg;
- (5) 影响链取向的残基: Gly, Pro;
- (6) 芳香性: Trp, Tyr, Phe。

[0118] 非保守取代需要将这些类别中的一类的成员替换成另一个类别。

[0119] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可以在基序内发生,只要这种改变不会显著降低基序结合抗体(对于抗体结合基序来说)或白蛋白(对于白蛋白结合基序来说)的能力。例

如,可以进行基本上不会显著降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文提供的保守取代)。

[0120] 在一个实施例中,变体在给定位置具有1至5个氨基酸取代。在一个实施例中,变体在给定位置具有1至5个氨基酸缺失。在一个实施例中,变体在给定位置具有1至10个氨基酸插入。在一个实施例中,所述变体具有添加到羧基末端区域和/或氨基末端区域的至少一个,例如1至200个,氨基酸。

[0121] 在一个实施例中,白蛋白结合基序变体保留结合白蛋白的能力。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序变体保留结合抗体结合基序的能力。在一个实施例中,所述白蛋白结合基序变体保留结合具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的多肽序列或其变体的肽的能力。

[0122] 在一个实施例中,抗体结合基序变体保留结合抗体的能力。在一个实施例中,所述抗体结合基序变体保留结合白蛋白结合基序的能力。在一个实施例中,所述抗体结合基序变体保留了结合肽的能力,所述肽具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12或它们的变体的多肽序列。

[0123] 如Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085所描述的,用于识别可以靶向诱变的抗体的残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在该方法中,识别残基或靶残基组(例如带电残基,比如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电荷的氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)将其取代,以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在已证明对初始取代具有功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的取代。作为替换方式,或者另外地,采用抗原-抗体复合物的晶体结构来识别抗体和抗原之间的接触点。白蛋白-抗体复合物的晶体结构可以类似地用于识别抗体和白蛋白之间的接触点。这些接触残基和邻近残基可以作为取代的候选物而被靶向或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有所需的性质。

[0124] 氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端融合(长度范围从一个残基到含有上百个或更多个残基的多肽)以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。

#### 经修饰的纳米颗粒复合物

[0125] 本公开涉及纳米颗粒复合物和纳米颗粒组合物,其包含含有抗体结合基序的载体蛋白、含有白蛋白结合基序的抗体或其他蛋白质以及任选的治疗剂。所述载体蛋白和抗体中的一种或两种经修饰以包含一种或多种抗体结合基序和/或白蛋白结合基序。

[0126] 在一个实施例中,本发明涉及纳米颗粒复合物,其包含具有经修饰多肽序列的载体蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序;抗体,每种抗体具有抗原结合结构域;和任选的治疗剂;其中所述纳米颗粒复合物在体内对抗原具有结合特异性。

[0127] 在一个实施例中,本发明涉及纳米颗粒复合物,其包含白蛋白;具有经修饰多肽序列的抗体或融合蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序,所述抗体或融合蛋白具有抗原结合结构域;和任选的治疗剂;其中所述纳米颗粒复合物在体内对抗原具有结合特异性。

[0128] 在一个实施例中,本发明涉及纳米颗粒复合物,其包含具有经修饰多肽序列的载体蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序;具有经修饰多肽序列的抗体或融合蛋白,所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序,所述抗体或融合蛋白具有抗原结合结构域;和任选的治疗剂;其中所述纳米颗粒复合物在体内对抗原

具有结合特异性。

[0129] 在一个实施例中，本发明涉及包含本文所述的纳米颗粒复合物的组合物。

[0130] 在一个实施例中，所述抗体结合基序包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO.:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一个实施例中，所述抗体结合基序包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽。

[0131] 在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一个实施例中，所述白蛋白结合基序包含与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽。

[0132] 在一个实施例中，所述治疗剂是紫杉醇。

[0133] 在一个实施例中，所述复合物的平均尺寸小于1μm。在一个实施例中，所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约90nm至约800nm。在一个实施例中，所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约90nm至约400nm。在一个实施例中，所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约90nm至约200nm。在一个实施例中，所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约100nm至约800nm。在一个实施例中，所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约100nm至约400nm。在一个实施例中，所述纳米颗粒复合物的平均尺寸为约100nm至约200nm。所述大小可以是这些范围内的任何值或其子范围，包括端点。

[0134] 在一个实施例中，白蛋白-治疗剂与抗体的比为10:1至10:30之间。该比值可以是该范围内的任何值或其子范围，包括端点。在一个实施例中，每个纳米颗粒复合物包含约100至约1000个抗体。在一个实施例中，每个纳米颗粒复合物包含约100至约800个抗体。抗体的数量可以是这些范围内的任何值或其子范围，包括端点。

[0135] 在一个实施例中，所述白蛋白是人血清白蛋白。在一个实施例中，所述人血清白蛋白是重组人血清白蛋白。

[0136] 在一个实施例中，所述纳米颗粒复合物是冻干的。在一个实施例中，所述包含纳米颗粒复合物的组合物是冻干的。在一个实施例中，冻干的复合物或组合物在水溶液中重构后，包含仍然能够在体内结合(识别/结合)抗原的纳米颗粒复合物。

[0137] 在一个实施例中，所述载体蛋白是白蛋白、卵清蛋白、明胶、弹性蛋白、弹性蛋白衍生的多肽、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米蛋白、大豆蛋白、乳蛋白或乳清蛋白。在一个实施例中，所述载体蛋白是白蛋白。在一个实施例中，所述白蛋白经修饰包含其他抗体结合基序。

[0138] 在一个实施例中，所述抗体或融合蛋白通过非共价键与载体蛋白结合。在一个实施例中，所述抗体或融合蛋白通过抗体结合基序和/或白蛋白结合基序与载体蛋白结合。在一个实施例中，所述紫杉醇通过非共价键与载体蛋白结合。在一个实施例中，其中抗体或融合蛋白通过抗体结合基序与载体蛋白非共价结合。在一个实施例中，所述抗体或融合蛋白通过白蛋白结合基序与载体蛋白非共价结合。

[0139] 在一个实施例中，所述经修饰载体蛋白的至少一个亚组包含一个以上抗体结合基序。在一个实施例中，所述经修饰抗体或融合蛋白的至少一个亚组包含一个以上白蛋白结合基序。

[0140] 在一个实施例中,所述组合物进一步包含药学上可接受的载体。

[0141] 在一些实施例中,化学治疗剂与载体蛋白结合。在一些实施例中,所述复合物还包含亚治疗量的紫杉醇。

[0142] 在一些实施例中,所述化学治疗剂的有效量选自由约100mg/m<sup>2</sup>、约105mg/m<sup>2</sup>、约110mg/m<sup>2</sup>、约115mg/m<sup>2</sup>、约120mg/m<sup>2</sup>、约125mg/m<sup>2</sup>、约130mg/m<sup>2</sup>、约135mg/m<sup>2</sup>、约140mg/m<sup>2</sup>、约145mg/m<sup>2</sup>、约150mg/m<sup>2</sup>、约155mg/m<sup>2</sup>、约160mg/m<sup>2</sup>、约165mg/m<sup>2</sup>、约170mg/m<sup>2</sup>、约175mg/m<sup>2</sup>、约180mg/m<sup>2</sup>、约185mg/m<sup>2</sup>、约190mg/m<sup>2</sup>、约195mg/m<sup>2</sup>或约200mg/m<sup>2</sup>组成的量。

[0143] 应当理解的,所述治疗剂(即,化学治疗剂)可位于纳米颗粒内部、纳米颗粒的外表面上或两者上。所述纳米颗粒可含有一种以上不同的治疗剂,例如,两种治疗剂、三种治疗剂、四种治疗剂、五种治疗剂或更多种。此外,纳米颗粒可以在纳米颗粒内部和外部包含相同或不同的治疗剂。

[0144] 在一个方面,纳米颗粒中化学治疗剂(例如紫杉醇)的量足以形成纳米颗粒。亚治疗量的紫杉醇用于形成抗体-白蛋白纳米颗粒复合物的用途描述于例如2016年9月6日提交的美国临时申请专利申请No. 62/384,119,其全部内容通过引用并入本文。

[0145] 在一个实施例中,所述纳米颗粒复合物中存在的紫杉醇的量大于或等于能够为纳米颗粒复合物提供稳定性的最小量。在一个实施例中,所述纳米颗粒复合物中存在的紫杉醇的量大于或等于能够为至少一种治疗剂结合载体蛋白提供亲和力的最小量。在一个实施例中,所述纳米颗粒复合物中存在的紫杉醇的量大于或等于能够促进至少一种治疗剂和载体蛋白的复合物形成的最小量。在一个实施例中,所述纳米颗粒复合物的载体蛋白和紫杉醇的重量比大于约9:1。在一个实施例中,所述重量比大于约10:1,或11:1,或12:1,或13:1,或14:1,或15:1,或约16:1,或约17:1,或约18:1,或约19:1,或约20:1,或约21:1,或约22:1,或约23:1,或约24:1,或约25:1,或约26:1,或约27:1,或约28:1,或约29:1,或约30:1。在一个实施例中,紫杉醇的量等于能够为纳米颗粒复合物提供稳定性的最小量。在一个实施例中,紫杉醇的量大于或等于能够为至少一种治疗剂结合载体蛋白提供亲和力的最小量。在一个实施例中,紫杉醇的量大于或等于能够促进至少一种治疗剂和载体蛋白的复合物形成的最小量。在任何这些实施例中,紫杉醇的量可小于紫杉醇的治疗量。换句话说,该量可以小于提供或预期用于提供治疗益处的量,例如有效治疗癌症的化学治疗量。

[0146] 在一个实施例中,所述纳米颗粒组合物中存在的紫杉醇的量在用水溶液重构时小于约5mg/mL。在一个实施例中,所述纳米颗粒组合物中存在的紫杉醇的量在用水溶液重构时小于约4.54mg/mL,或约4.16mg/mL,或约3.57mg/mL,或约3.33mg/mL,或约3.12mg/mL,或约2.94mg/mL,或约2.78mg/mL,或约2.63mg/mL,或约2.5mg/mL,或约2.38mg/mL,或约2.27mg/mL,或约2.17mg/mL,或约2.08mg/mL,或约2mg/mL,或约1.92mg/mL,或约1.85mg/mL,或约1.78mg/mL,或约1.72mg/mL,或约1.67mg/mL。

[0147] 在一些实施例中,明确排除任何抗体、适体、治疗剂或其任意组合。

[0148] 在一些情况下,本文所述的复合物可以设计为具有小于1μm的平均粒径。例如,可以使用适当浓度的载体蛋白和抗体(或其他结合剂),使得形成平均粒径小于1μm的复合物。在一些情况下,本文提供的复合物的平均粒径可以在0.1μm至1μm之间(例如,在0.1μm至0.95μm之间,在0.1μm至0.9μm之间,在0.1μm至0.8μm之间,在0.1μm至0.7μm之间,在0.1μm至0.6μm之间,在0.1μm至0.5μm之间,在0.1μm至0.4μm之间,在0.1μm至0.3μm之间,在0.1μm至

0.2μm之间，在0.2μm至1μm之间，在0.3μm至1μm之间，在0.4μm至1μm之间，在0.5μm至1μm之间，在0.2μm至0.6μm之间，在0.3μm至0.6μm之间，在0.2μm至0.5μm之间，或在0.3μm至0.5μm之间)。本文提供的平均粒径在0.1μm至0.9μm之间的复合物可以全身施用(例如，静脉内)，以治疗位于哺乳动物体内的癌症或其他疾病。

[0149] 在一些情况下，本文提供的复合物中大于60% (例如，大于65%、70%、75%、80%、90%、95%或99%) 的复合物的平均粒径在0.1μm至0.9μm之间 (例如，在0.1μm至0.95μm之间，在0.1μm至0.9μm之间，在0.1μm至0.8μm之间，在0.1μm至0.7μm之间，在0.1μm至0.6μm之间，在0.1μm至0.5μm之间，在0.1μm至0.4μm之间，在0.1μm至0.3μm之间，在0.1μm至0.2μm之间，在0.2μm至1μm之间，在0.3μm至1μm之间，在0.4μm至1μm之间，在0.5μm至1μm之间，在0.2μm至0.6μm之间，在0.3μm至0.6μm之间，在0.2μm至0.5μm之间，或在0.3μm至0.5μm之间)。本文提供的复合物中大于60% (例如，大于65%、70%、75%、80%、90%、95%或99%) 的复合物的粒径在0.1μm和0.9μm之间的复合物可以全身施用(例如，静脉内)，以治疗表达哺乳动物体内相关抗原的癌症或其他疾病。

[0150] 在一个方面，所述纳米颗粒组合物的平均粒径小于约1μm。在一个方面，所述纳米颗粒组合物的平均粒径在约90nm至约1μm之间，例如在约90nm至约800nm之间，在约90nm至约700nm之间，在约90nm至约600nm之间，在约90nm和约500nm之间，在约90nm和约400nm之间，在约90nm和约300nm之间，在约90nm和约200nm之间，或者在约90nm和约180nm之间。适用值包括任何所述范围内的任何值、任何子范围或任何范围，包括端点。

[0151] 在一个优选的方面，本文所述的尺寸和尺寸范围涉及重构的冻干纳米颗粒组合物的粒径。即，在将冻干的纳米颗粒重悬浮于水溶液(例如，水、PBS、其他药学上可接受的赋形剂、缓冲液等)中之后，粒径或平均粒径在本文所述的范围内。

[0152] 在一个方面，至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%的纳米颗粒在重构的组合物以单个纳米颗粒形式存在。也就是说，少于约50%、40%、30%等的纳米颗粒出现二聚化或寡聚化。在一些实施例中，所述组合物中的纳米颗粒的二聚化数目少于20%，且少于10%，优选地二聚化数目少于5%。

[0153] 在一些实施例中，可以通过调节载体蛋白与结合剂的量(例如，比例)来控制纳米颗粒的大小。纳米颗粒的尺寸和尺寸分布也很重要。本发明的纳米颗粒根据其尺寸会有不同表现。当尺寸大时，团聚可能阻塞血管。因此，纳米颗粒的团聚会影响组合物的性能和安全性。另一方面，较大的颗粒在某些条件下可能更具有治疗效果(例如，当不静脉内施用时)。

[0154] 在一个方面，所述纳米颗粒复合物包含约100至约1000个非共价结合至纳米颗粒表面的结合剂。在一个方面，所述纳米颗粒复合物包含约200至约1000个非共价结合至纳米颗粒表面的结合剂。在一个方面，所述纳米颗粒复合物包含约300至约1000个非共价结合至纳米颗粒表面的结合剂。在一个方面，所述纳米颗粒复合物包含约400至约1000个非共价结合至纳米颗粒表面的结合剂。在一个方面，所述纳米颗粒复合物包含约500至约1000个非共价结合至纳米颗粒表面的结合剂。在一个方面，所述纳米颗粒复合物包含约600至约1000个非共价结合至纳米颗粒表面的结合剂。在一个方面，所述纳米颗粒复合物包含约200至约800个非共价结合至纳米颗粒表面的结合剂。在一个方面，所述纳米颗粒复合物包含约300至约800个非共价结合至纳米颗粒表面的结合剂。在优选的实施例中，所述纳米颗粒复合物

包含约400至约800个非共价结合至纳米颗粒表面的结合剂。适用值包括任何所述范围内的任何值或任何子范围，包括端点。

[0155] 在一个实施例中，所述结合剂与肿瘤抗原结合（对肿瘤抗原有特异性）。在一个实施例中，所述结合剂结合甲胎蛋白（AFP）、癌胚抗原（CEA）、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原（ETA）、黑素瘤相关抗原（MAGE）、酪氨酸酶、HER2、HER3、CD3、CD19、CD20、CD33、CD47、CD274、CD279、CD30、CD52、PD-1、PD-L1、CTLA4、GD2、VEGF、BCR-ABL、NY-ESO-1、MAGE-1、MAGE-3、SSX2、Melan-A、EGFR、CD38或RANK配体。这些仅是抗原的实例，并非用于对其进行限制。

#### 制备经修饰纳米粒子复合物的方法

[0156] 在一个方面，本发明涉及制备纳米颗粒复合物的方法，该方法包括将白蛋白与具有经修饰多肽序列的抗体组合，所述经修饰多肽序列在形成纳米颗粒复合物的条件下经修饰包含至少一种白蛋白结合基序。在一个实施例中，所述载体蛋白或纳米颗粒复合物与治疗剂组合。在一个实施例中，所述治疗剂是紫杉醇。

[0157] 在一个方面，公开了一种制备纳米颗粒复合物的方法，该方法包括将具有经修饰多肽序列的载体蛋白质与抗体一起孵育，所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种抗体结合基序。在一个实施例中，所述载体蛋白是白蛋白。在一个实施例中，所述载体蛋白或纳米颗粒复合物与治疗剂组合。在一个实施例中，所述治疗剂是紫杉醇。在一个方面，所述抗体是具有经修饰多肽序列的经修饰抗体，所述经修饰多肽序列经修饰包含至少一种白蛋白结合基序。

[0158] 在一个方面，通过使载体蛋白或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂以约10:1至约10:30的载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂的比例接触来形成纳米颗粒复合物。在一个实施例中，所述比例为约10:2至约10:25。在一个实施例中，所述比例为约10:2至约1:1。在优选的实施例中，所述比例为约10:2至约10:6。在特别优选的实施例中，所述比例为约10:4。适用的比例包括任何所述范围内的任何值、任何子范围或任何范围，包括端点。

[0159] 在一个实施例中，用于形成纳米颗粒的溶液或其他液体介质的量是特别重要的。在载体蛋白（或载体蛋白-治疗剂）和抗体的过稀溶液中没有纳米颗粒形成。过度浓缩的溶液将导致生成非结构化的聚集体。在一些实施例中，使用的溶液（例如，无菌水、盐水、磷酸盐缓冲盐水）的量为约0.5mL溶液至约20mL溶液之间。在一些实施例中，载体蛋白的量为约1mg/mL至约100mg/mL之间。在一些实施例中，结合剂的量为约1mg/mL至约30mg/mL之间。例如，在一些实施例中，载体蛋白：结合剂：溶液的比例为在1mL溶液（例如，盐水）中约9mg载体蛋白（例如，白蛋白）：4mg结合剂（例如抗体（例如，BEV））。还可以将一定量的治疗剂（例如紫杉醇）添加到载体蛋白中。例如，可以在1mL溶液中加入1mg紫杉醇、9mg载体蛋白（10mg载体蛋白-治疗剂）和4mg结合剂（例如，抗体、Fc融合分子或适体）。当使用常规的静脉注射袋时，例如，使用约1升的溶液，与使用1mL相比，我们将需要使用1000倍量的载体蛋白/载体蛋白-治疗剂和抗体。因此，我们不能在标准静脉注射袋中形成本发明的纳米颗粒。此外，当以本发明的治疗量将组分加入到标准静脉注射袋中时，各组分不会自组装形成纳米颗粒。

[0160] 在一个实施例中，所述载体蛋白或载体蛋白-治疗剂颗粒在pH为约4至约8之间的溶液中与结合剂接触。在一个实施例中，所述载体蛋白或载体蛋白-治疗剂颗粒在pH约为4的溶液中与结合剂接触。在一个实施例中，所述载体蛋白或载体蛋白-治疗剂颗粒在pH约为5的溶液中与结合剂接触。在一个实施例中，所述载体蛋白或载体蛋白-治疗剂颗粒在pH约

为6的溶液中与结合剂接触。在一个实施例中，所述载体蛋白或载体蛋白-治疗剂颗粒在pH约为7的溶液中与结合剂接触。在一个实施例中，所述载体蛋白或载体蛋白-治疗剂颗粒在pH约为8的溶液中与结合剂接触。在优选的实施例中，所述载体蛋白或载体蛋白-治疗剂颗粒在pH为约5至约7之间的溶液中与结合剂接触。

[0161] 在一个实施例中，所述载体蛋白质颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在约5°C至约60°C的温度下一起孵育，或在该范围内的任何范围、任何子范围或任何值，包括端点，的温度下一起孵育。在优选的实施例中，所述载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在约23°C至约60°C的温度下一起孵育。在一个实施例中，所述载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在室温下一起孵育。

[0162] 不受理论束缚，人们认为纳米颗粒复合物的稳定性取决于，至少部分取决于，形成纳米颗粒复合物的温度和/或pH，以及溶液中组分(即，载体蛋白、结合剂和任选的治疗剂)的浓度。

[0163] 通常，可以如本文所述使用载体蛋白、化学治疗剂和结合剂的任何适当组合。例如，适当量的载体蛋白(例如，含有化学治疗剂)和适量的结合剂可以在同一容器中混合在一起。在给患有癌症的患者施用之前，所述混合物可以在合适温度下(例如，室温、在5°C至60°C之间、在23°C至60°C之间、在15°C至30°C之间、在15°C至25°C之间、在20°C至30°C之间，或在20°C至25°C之间)孵育一段时间(例如，约30分钟，或在约5分钟至约60分钟之间、在约5分钟至约45分钟之间、在约15分钟至约60分钟之间、在约15分钟至约45分钟之间、在约20分钟至约400分钟之间，或在约25分钟至约35分钟之间)。

[0164] 在一些情况下，可以使包含化学治疗剂的载体蛋白纳米颗粒与结合剂接触以形成复合物，该复合物在施用给患者之前储存起来。例如，可以如本文所述形成组合物并在施用给患者之前储存一段时间(例如，数天或数周)。

[0165] 在一些实施例中，所述化学治疗药物选自由阿比特龙、苯达莫司汀、硼替佐米、卡铂、卡巴他赛、顺铂、苯丁酸氮芥、达沙替尼、多西他赛、多柔比星、表柔比星、厄洛替尼、依托泊苷、依维莫司、吉非替尼、伊达比星、伊马替尼、羟基脲、伊马替尼、拉帕替尼、亮丙瑞林、美法仑、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奈达铂、尼罗替尼、奥沙利铂、紫杉醇、帕唑帕尼、培美曲塞、吡铂、罗米地辛、沙铂、索拉非尼、维罗非尼、舒尼替尼、替尼泊昔、*triplatin*、长春碱、长春瑞滨、长春新碱和环磷酰胺组成的组。

[0166] 包含其他化学治疗剂的ABRAXANE®和白蛋白颗粒在美国专利7,758,891; 7,820,788; 7,923,536; 8,034,375; 8,138,229; 8,268,348; 8,314,156; 8,853,260和9,101,543中进行了描述，每个专利通过引用整体并入本文。另外，PCT/US2015/054295和美国公开号2014/0178486公开了载体蛋白、化学治疗药物、抗体偶联物或其组合，每个专利通过引用整体并入本文。

### 冻干

[0167] 本发明的冻干组合物在存在或不存在稳定剂、缓冲剂等的条件下采用标准冻干技术制备。令人惊奇的是，这些条件不会改变纳米颗粒的相对脆弱的结构。此外，在最佳情况下，这些纳米颗粒在冻干时保持其粒度分布，并且更重要的是，可以以与新鲜制备时基本相同的形式和比例进行重构以用于体内施用(例如，静脉内递送)。

### 配方

[0168] 在一个方面,所述纳米颗粒组合物配制用于全身递送,例如静脉内施用。

[0169] 在一个方面,所述纳米颗粒组合物配制用于直接注射到肿瘤中。直接注射包括注射到肿瘤部位或靠近肿瘤部位、灌注到肿瘤中等。因为纳米颗粒组合物不是全身施用的,所以配制用于直接注射到肿瘤中的纳米颗粒组合物可包含任何大小的平均粒径。不受理论束缚,人们认为较大的颗粒(例如,大于500nm,大于1μm等)更有可能被固定在肿瘤内,从而提供我们所认为的更好的有益效果。

[0170] 在另一方面,本文提供了包含本文提供的化合物和至少一种药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0171] 通常,本文提供的化合物可以配制用于通过任何可接受的给药方式施用给患者。本领域具有各种制剂和药物递送系统。参见,例如,Gennaro,A.R.,ed.(1995)Remington's Pharmaceutical Sciences,18th ed.,Mack Publishing Co.

[0172] 通常,本文提供的化合物可以作为药物组合物通过以下途径中的任一种施用:口服给药、全身(例如,透皮、鼻内或采用栓剂)给药,或肠胃外(例如,肌肉内、静脉内或皮下)给药。

[0173] 该组合物通常包含本发明化合物与至少一种药学上可接受的赋形剂的组合。可接受的赋形剂是无毒的,有助于施用,并且不会对所要求保护的化合物的治疗益处有不利影响。这种赋形剂可以是任何固体、液体、半固体,或者采用气溶胶组合物的情况下,可以是本领域技术人员通常使用的气态赋形剂。

[0174] 固体药物赋形剂包括淀粉、纤维素、滑石粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽粉、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、干脱脂乳等。液体和半固体赋形剂可选自甘油、丙二醇、水、乙醇和各种油,包括石油、动物来源、植物来源或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。优选的液体载体,特别是用于可注射溶液的载体包括水、盐水、葡萄糖水溶液和乙二醇类。其他合适的药物赋形剂及其制剂在E.W.Martin(Mack Publishing Company,18th ed.,1990)编辑的Remington's Pharmaceutical Sciences中有描述。

[0175] 如果需要,本发明的组合物可以在包含含有活性成分的一种或多种单位剂型的包装或分配器装置中提供。这种包装或装置可以例如包括金属箔或塑料箔,例如泡罩包装或玻璃,以及橡胶塞,例如小瓶。所述包装或分配器装置可附有给药说明。还可以制备包含配制在相容的药物载体中的本发明化合物的组合物,将其置于合适的容器中,并标记用于治疗指定的病症。

#### 使用经修饰纳米粒子复合物的方法

[0176] 本文所述的纳米颗粒复合物可用于治疗哺乳动物中的癌细胞和/或肿瘤。在优选的实施例中,所述哺乳动物是人(即人类患者)。优选地,在施用之前将冻干的纳米颗粒组合物重构(悬浮在水性赋形剂中)。

[0177] 在一个方面,提供了治疗癌细胞的方法,该方法包括使细胞与有效量的纳米颗粒复合物接触,以及如本文所述的免疫疗法,以治疗癌细胞。癌细胞的治疗包括但不限于增殖减少、杀死细胞、防止细胞转移等。

[0178] 可以使用任何合适的方法来获得本文所述的复合物。可以使用任何合适的方法将本文提供的复合物施用给哺乳动物。例如,含有载体蛋白/结合剂/化学治疗剂复合物的组

合物可以通过注射给药(例如,皮下注射、肌内注射、静脉内注射或鞘内注射)。

[0179] 可通过本文所述的纳米颗粒复合物、组合物和方法治疗的癌症或肿瘤包括但不限于胆道癌;脑癌,包括胶质母细胞瘤和成神经管细胞瘤;乳腺癌;子宫癌;输卵管癌;宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌;膀胱癌;子宫内膜癌;阴道癌;外阴癌;食道癌;口腔癌;胃癌;肾癌;血液肿瘤,包括急性淋巴细胞和白血病;多发性骨髓瘤;艾滋病相关白血病和成人T细胞白血病淋巴瘤;上皮内肿瘤,包括Bowen病和佩吉特病;肝癌(肝肿瘤);肺癌;头颈部癌症或口腔癌(口腔、咽喉、食管、鼻咽、下颌、扁桃体、鼻、唇、唾液腺、舌等);淋巴瘤,包括霍奇金病和淋巴细胞淋巴瘤;成神经细胞瘤;神经内分泌肿瘤;口腔癌,包括鳞状细胞癌;肾上腺癌;肛门癌;血管肉瘤;阑尾癌;胆管癌;骨癌;类癌瘤;软组织肉瘤;横纹肌肉瘤;眼癌;卵巢癌,包括由上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间充质细胞以及输卵管癌引起的卵巢癌;胆囊癌;胰腺癌;前列腺癌;直肠癌;肉瘤,包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤;皮肤癌,包括黑色素瘤、卡波西氏肉瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌;睾丸癌,包括生发肿瘤(精原细胞瘤、非精原细胞瘤[畸胎瘤、绒毛膜癌])、间质瘤和生殖细胞肿瘤;阴茎癌;血管内皮瘤;胃肠癌;输尿管癌;尿道癌;脊髓癌;垂体腺癌;原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤;甲状腺癌,包括甲状腺腺癌和髓样癌;和肾癌,包括腺癌和肾母细胞瘤。在重要的实施例中,癌症或肿瘤包括乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和黑素瘤。

[0180] 在向哺乳动物施用含有本文提供的复合物的组合物之前,可以对哺乳动物进行评估,以确定哺乳动物是否患有表达相关抗原的癌症或疾病。可以使用任何适当的方法来确定哺乳动物是否患有表达相关抗原的癌症或疾病。例如,可以使用标准诊断技术鉴定哺乳动物(例如人)。在一些情况下,可以收集和分析组织活检,以确定哺乳动物是否患有表达抗原的癌症或疾病。

[0181] 在鉴定哺乳动物患有疾病或癌症后,可以给哺乳动物施用含有本文提供的复合物的组合物。例如,含有复合物的组合物可以在手术切除肿瘤之前施用或代替手术切除肿瘤。在一些情况下,可以在切除肿瘤后施用含有本文提供的复合物的组合物。

[0182] 如果特定哺乳动物对特定的量没有响应,则该可以增加所述量,例如增加两倍。在接受该较高浓度后,可以同时监测哺乳动物对治疗的响应性和毒性症状,并相应地进行调整。有效量可以保持恒定,或者可以根据哺乳动物对治疗的反应按滑动标度或可变剂量进行调整。各种因素可以影响用于特定应用的实际有效量。例如,给药频率、治疗持续时间、多种治疗剂的使用、给药途径和癌症或疾病的严重程度可能需要增加或减少给药的实际有效量。

[0183] 含有本文提供的复合物的组合物可以任何适当的量、以任何适当的频率施用给哺乳动物,并且持续能有效达到所需结果的任何适当持续时间(例如,以增加无进展存活)。在一些情况下,本文提供的组合物可以施用给患有癌症或疾病的哺乳动物,以使癌症或疾病的进展速度降低5%、10%、25%、50%、75%、100%或更多。例如,可以降低进展速度,从而不会检测到其他癌症进展。

[0184] 可以使用任何适当的方法来确定癌症的进展速度是否降低。例如,可以通过在不同时间点对组织成像并确定存在的癌细胞的量来评估癌症的进展速度。可以比较在不同时间在组织内测得的癌细胞的量以确定进展速度。在本文所述的治疗之后,可以在另一个时间间隔上再次确定进展速度。在一些情况下,可以确定治疗后的癌症阶段并与治疗前阶段

进行比较,以确定进展速度是否降低。

[0185] 在一些情况下,与未治疗癌症的相应哺乳动物的中位无进展存活率或在施用前采用未形成复合物的载体蛋白、化学治疗剂和结合剂治疗癌症的相应哺乳动物的中位无进展存活率相比,本文提供的组合物可以在无进展存活率增加(例如,5%、10%、25%、50%、75%、100%或更高百分比)的条件下施用给患有癌症的哺乳动物。在一些情况下,与患有癌症并已经服用载体蛋白、化学治疗剂、载体蛋白/化学治疗剂纳米颗粒(不含结合剂)或者单独服用结合剂的相应哺乳动物的中位无进展存活率相比,本文提供的组合物可以施用给患有癌症的哺乳动物,使无进展存活率与增加5%、10%、25%、50%、75%、100%或更多。可以以任何时间长度(例如,一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或更长)测量无进展存活率。

[0186] 在一些情况下,在哺乳动物群体的8周无进展存活率比未施用含有本文提供的复合物的组合物的对比哺乳动物群体高65%或更高(例如,66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%或更高)的条件下给哺乳动物施用含有本文提供的复合物的组合物。在一些情况下,在哺乳动物群体的中位进展时间为至少的至少150天(例如,至少155、160、163、165或170天)条件下将所述组合物施用给患有癌症的哺乳动物。

[0187] 含有本文提供的复合物的组合物的有效量可以是能降低表达结合剂识别的抗原的癌症或疾病的进展速度、增加无进展存活率或增加进展的中位时间且不会对哺乳动物产生显著毒性的任何量。如果特定哺乳动物对特定的量没有响应,则该可以增加所述量,例如增加两倍。在接受该较高浓度后,可以同时监测哺乳动物对治疗的响应性和毒性症状,并相应地进行调整。有效量可以保持恒定,或者可以根据哺乳动物对治疗的反应按滑动标度或可变剂量进行调整。各种因素可以影响用于特定应用的实际有效量。例如,给药频率、治疗持续时间、多种治疗剂的使用、给药途径和癌症或疾病的严重程度可能需要增加或减少给药的实际有效量。

[0188] 给药频率可以是降低癌症或疾病的进展速度、增加无进展存活率或增加中位进展时间且不会对哺乳动物产生显著毒性的任何频率。例如,给药频率可以是大约每月一次至大约每月三次,或者大约每月两次至大约每月六次,或者大约每两个月一次至大约每两个月三次。在治疗期间给药频率可以保持不变或者可以变化。采用本文提供的组合物治疗的过程可包括休息期。例如,组合物可以在两周的时间内给药,然后是两周的休息期,并且这种方案可以重复多次。与有效量一样,各种因素会影响用于特定应用的实际给药频率。例如,有效量、治疗持续时间、多种治疗剂的使用、给药途径和癌症或疾病的严重程度可能需要增加或减少给药频率。

[0189] 施用本文提供的组合物的有效持续时间可以是降低癌症或疾病的进展速度、增加无进展存活率或增加中位进展时间且不会对哺乳动物产生显著毒性的任何持续时间。因此,有效持续时间可以从几天到几周、几个月或几年不等。通常,治疗癌症或疾病的有效持续时间可以为数周至数月。在一些情况下,只要个体哺乳动物存活,就能计入有效持续时间。多种因素可影响用于特定治疗的实际有效持续时间。例如,有效持续时间可根据给药频率、有效量、多种治疗剂的使用、给药途径和癌症或疾病的严重程度而变化。

[0190] 含有本文提供的载体蛋白/化学治疗剂/结合剂复合物的组合物可以是任何合适

的形式。例如，本文提供的组合物可以是含有或不含有用于制备成可注射悬浮液的稀释剂的溶液或粉末的形式。组合物还可以含有其他成分，包括但不限于药学上可接受的载体。药学上可接受的载体可以是例如盐水、水、乳酸、甘露糖醇或其组合。

[0191] 在向哺乳动物施用本文提供的组合物后，可以监测哺乳动物以确定癌症或疾病是否得到治疗。例如，可以在治疗后对哺乳动物进行评估以确定癌症或疾病的进展速度是否降低(例如，停止)。如本文所述，可采用任何方法评估进展和存活率。

#### 其他实施例

[0001] 应当理解，虽然已经结合本发明的详细描述描述了本发明，但是前面的描述旨在说明而不是限制本发明的范围，本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在下文权利要求的范围内。

#### 实施例

[0192] 本领域技术人员将理解，制备和使用本文描述的颗粒的描述仅用于说明的目的，并且本公开不受该说明的限制。

[0193] 本文使用的任何缩写都具有标准的科学含义。除非另有说明，否则所有温度均为°C。在本文中，除非另有定义，否则以下术语具有以下含义：

ABX	=	ABRAXANE®/(白蛋白结合紫杉醇)
ADC	=	抗体依赖性化疗
BSA	=	牛血清白蛋白
nM	=	纳摩尔
nm	=	纳米
EdU	=	5-乙炔基-2'-脱氧尿苷
FITC	=	荧光素
kD	=	千道尔顿
Kd	=	解离常数
kg	=	公斤
M	=	摩尔
mg	=	毫克
ml 或 mL	=	毫升
m <sup>2</sup>	=	平方米
mm <sup>3</sup>	=	立方毫米
μg	=	微克
μl 或 μL	=	微升
μm	=	微米 (micrometer) /微米 (micron)
PBS	=	磷酸盐缓冲盐水
rpm	=	每分钟转数

实施例1利妥昔单抗-白蛋白-紫杉醇纳米颗粒复合物的制备与表征

[0194] 为了制备AR160纳米颗粒复合物,将ABRAXANE® (ABX; Celgene, Summit, NJ) 和利妥昔单抗(Genentech,旧金山,CA) 分别以10mg/mL和4mg/mL混合(除非另有说明),并在室温下孵育30分钟。

[0195] 利妥昔单抗和ABRAXANE® (ABX) 以高亲和力结合,解离常数在皮摩尔范围内。当4mg/mL利妥昔单抗与10mg/mL ABX混合时,形成160nm纳米颗粒,AR160。为了使AR160纳米颗粒可见,利妥昔单抗用AlexaFluor 488标记并与10mg/mL ABX一起孵育。使用Amnis ImageStream流式细胞仪观察含有标记的利妥昔单抗的AR160纳米颗粒(图1A)。

[0196] 为了确定利妥昔单抗与ABX的结合,对AR160分子进行流式细胞术分析。根据制造商的方案,用Alexa-fluor 488 (Thermo Scientific, 罗克福德, IL) 标记ABX和利妥昔单抗。将Alexa-fluor 488与1mg蛋白质在室温下孵育60分钟,并通过尺寸排阻柱将未结合的标记与标记的蛋白质分离。根据上文所述,采用未标记的ABX和利妥昔单抗、未标记的ABX和标记的利妥昔单抗,或标记的ABX和利妥昔单抗制备AR160复合物。图1B示出了流式细胞术数据并示出了ABX和利妥昔单抗之间的相互作用。

[0197] 对包含离心颗粒、大于100kD的蛋白质和小于100kD的蛋白质的AR160级分中的紫杉醇含量进行定量。根据上述描述制备AR160。以10,000rpm通过两个离心步骤将所述颗粒离心下来。大约70%的紫杉醇残留在AR160颗粒中,剩下的30%大部分在大于100kD的蛋白质中;在小于100kD的蛋白质级分中存在非常小百分比(0.3%)的紫杉醇(图1C,左图)。

[0198] 为了确定大于100kD蛋白质级分的含量,通过对紫杉醇、利妥昔单抗和人白蛋白染色进行蛋白质印迹分析。将上清液中的蛋白质复合物变性,然后通过SDS-PAGE凝胶色谱法分离。然后将蛋白质转移到PVDF膜上并进行蛋白质印迹分析,对于白蛋白,采用1:10,000稀释度的兔抗人白蛋白(Cell Signaling, 丹佛市, MA);对于紫杉醇,采用1:10,000稀释度的兔抗紫杉醇(AbCam, 剑桥, MA);以及对于利妥昔单抗,采用1:500稀释度的大鼠抗利妥昔单抗HRP(Bio-rad, Hercules, CA)。将稀释度为1:2000的山羊抗兔IgG HRP(Cell Signaling, 丹佛市, MA)用作白蛋白和紫杉醇的二抗。采用ECL底物(Thermo Scientific, 罗克福德, IL)使蛋白质可见。

[0199] 白蛋白、抗体和紫杉醇共同定位在约200kD的条带中(图1C,右图),这表明160nm颗粒解离成具有肿瘤靶向能力的单元和抗体并且将细胞毒剂保留在200kD的大分子物种中。

#### 实施例2利妥昔单抗-白蛋白-紫杉醇纳米颗粒复合物与膜结合的CD20的结合

[0200] 为了确定AR160是否结合膜结合的CD20,用PE-抗人CD19和AR160对Daudi细胞进行染色,其中AR160中的ABX用Alexa fluor 488标记并用利妥昔单抗包被。散点图显示:在用PE抗人CD19染色时,Daudi细胞群体为75%阳性;当用荧光标记的AR160染色时,Daudi细胞群体为75%阳性;当用PE抗人CD19和Alexa fluor 488标记的AR160染色时,Daudi细胞群体为约74%双阳性,这表明AR160结合了Daudi细胞(图2A)。通过用Amnis ImageStream成像流式细胞仪也可以看到染色的Daudi细胞(图2B)。

[0201] PE抗人CD19和CD20购自BD Pharmingen(Franklin Lakes, NJ)。将Daudi细胞与Alexa-fluor 488AR160、PE抗人CD19和PE抗人CD20在4°C孵育30分钟。将细胞在FACS缓冲液(1x PBS和0.5% BSA以及0.1% NaAzide)中洗涤2次。在Guava流式细胞仪(Millipore, 比勒利卡, MA)上运行细胞并收集数据。使用GuavaSoft软件(Millipore, 比勒利卡, MA)分析流式细胞术数据,并计算AR160+、CD19+和CD20+细胞的百分比。对于Alexa-fluor 488标记的ABX

和PE抗人CD19/Alexa-fluor 488AR160标记的Daudi细胞的共聚焦图片,使用Amnis ImageStream (Millipore,比勒利卡,MA)。使用Inspire软件 (Millipore,比勒利卡,MA) 分析数据和收集图片。

#### 实施例3利妥昔单抗-白蛋白-紫杉醇纳米颗粒复合物的大小和稳定性

[0202] 为了确定使用不同量的利妥昔单抗形成的纳米颗粒复合物的大小,将10mg ABX与0、2、4、6、8或10mg利妥昔单抗一起孵育。使用Malvern Nanosight (Malvern,Worcestershire, UK) 测定大小。将颗粒以1:200稀释,相机水平为9,捕获检测阈值为16,以确定颗粒大小和数量。Nanosight使用光散射和布朗运动来获得粒径和浓度。得到的尺寸列于图2C中。

[0203] 为了确定孵育期间pH水平对颗粒形成的影响,在孵育pH为3,7或9下按实施例1中所示方法形成AR160纳米颗粒,并测定解离常数 (Kd)。在pH 3下形成的纳米颗粒复合物的Kd为 $4.4 \times 10^{-10}$ ;在pH 7下形成的纳米颗粒复合物的Kd为 $3.9 \times 10^{-9}$ ;在pH 9下形成的纳米颗粒复合物的Kd为 $2.5 \times 10^{-8}$ 。这些数据表明改变混合条件的pH会影响ABX/利妥昔单抗结合的强度。

[0204] 使用Nanosight技术评估AR160相对于单独ABX的稳定性。如上文所述制备ABX和AR160,并使其在室温下在盐水中静置0至6小时和24小时,并在每个时间点测量颗粒数量和大小(图3)。与AR160相比,单独的ABX的颗粒数为 $4.23 \times 10^8$ ,AR160在0–24小时的颗粒数范围为19.1至 $23.5 \times 10^8$ 个颗粒。ABX的平均尺寸为90nm并且远小于AR160,AR160在0–24小时的平均尺寸为127–133nm。此外,AR160的大小在24小时内是稳定的,这与在整个孵育时间内颗粒的数量和大小保持不变所表明的一致。ABX在孵育期间变得不稳定;由于难以测量ABX的粒径和数量,仅显示时间0时的数据(图3)。

[0205] 为了评估在血清中AR160相对于ABX的稳定性,将ABX和AR160的当量数( $30 \times 10^8$ )加入人AB血清中。在室温下孵育5、15、30和60分钟时对颗粒数(图4A和4B)进行定量。在每个时间点,分别在5、15、30和60分钟,相对于单独的ABX( $11.6, 6.4, 2.2$ 和 $5.2 \times 10^8$ ),测得的AR160颗粒更多( $19, 16, 11$ 和 $10 \times 10^8$ )(图4C)。此外,ABX颗粒数在仅孵育15分钟后相对于血清返回基线,而AR160颗粒数在整个60分钟孵育期间比仅在血清中一直更高(图4C)。

#### 实施例4利妥昔单抗-白蛋白-紫杉醇纳米粒复合物可阻止抗CD20抗体与Daudi细胞结合

[0206] 评估了AR160复合物中的利妥昔单抗的配体结合能力。将CD20+Daudi细胞与利妥昔单抗(图5C)、ABX(图5D)、AR160(图5E)或24小时AR160(图5F)一起孵育。孵育后,洗涤细胞并用PE-小鼠抗人CD20染色,并采用流式细胞术计数。分别使用同种型对照(6.2%阳性;图5A)和PE-小鼠抗人CD20(83.6%阳性;图5B)作为阴性和阳性对照。结果显示利妥昔单抗和AR160阻止了随后抗人CD20抗体的结合,这表明单独的利妥昔单抗和在AR160的情况下复合物结合CD20,从而抑制抗CD20抗体的结合。单独的ABX不会抑制抗体的结合,这表明AR160颗粒中的利妥昔单抗以特定方式保留其配体结合特性。

#### 实施例5利妥昔单抗-白蛋白-紫杉醇纳米颗粒复合物的毒性

[0207] 为了确保AR160中的紫杉醇保持其抗增殖能力,采用CD20+Daudi细胞对单独的ABX和单独的利妥昔单抗、AR160和在测试前24小时制备的AR160在体外毒性测定中进行测试。用EdU(一种胸苷类似物)测量细胞增殖,其用FITC缀合的抗-EdU检测并通过流式细胞术计数。所有含紫杉醇的药物的IC50为约25 $\mu$ g/mL,而单独的利妥昔单抗无毒(图6);因此,在

AR160的背景下,紫杉醇的毒性不会受到影响。

[0208] 将人B细胞淋巴瘤系Daudi (ATCC Manassa, VA) 在含有1%青霉素、链霉素和谷氨酰胺(PSG)以及10%FBS的RPMI中培养。收获细胞并以每孔 $0.2 \times 10^6$ 个细胞接种于24孔板中。细胞暴露于单独的ABX中或AR160中在紫杉醇浓度从0到200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 过夜,或者在37°C和5% CO<sub>2</sub>下暴露于利妥昔单抗(0–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。为了测量增殖,使用Click-iT Edu (Molecular Probes, Eugene, OR) 试剂盒。简而言之,向孔中加入10mM EdU并与细胞和ABX、利妥昔单抗或AR160一起孵育过夜。用1%胰酶使细胞透化,并用FITC-缀合的抗体标记插入的EdU。通过将来自每种处理的FITC阳性细胞数除以未处理的EdU标记细胞的最大增殖数来确定增殖指数。

#### 实施例6利妥昔单抗-白蛋白-紫杉醇纳米颗粒复合物的体内测试

[0209] 为了测试肿瘤功效,将 $5 \times 10^6$ 个Daudi人淋巴瘤细胞植入无胸腺裸鼠(Harlan Sprague Dawley,印第安纳波利斯,IN)的右胁腹。当肿瘤达到约800mm<sup>3</sup>的大小时,将小鼠随机分组并用盐水、RIT (12mg/kg; Rit 12)、RIT (18mg/kg; Rit 18)、ABX (30mg/kg; ABX 30)、ABX (45mg/kg; ABX 45) 或者AR160,含有12mg/kg RIT和30mg/kg ABX (AR160 30) 或18mg/kg RIT和45mg/kg ABX (AR160 45) 在小鼠背尾静脉中静脉注射100 $\mu\text{l}$ 。以2-3次/周监测肿瘤大小,并使用以下等式计算肿瘤体积:(长\*宽<sup>2</sup>) / 2。当肿瘤大小等于小鼠体重的10%或约2500mm<sup>3</sup>时,处死小鼠。按照下式计算第10天距离基线的变化百分比:[(治疗日的肿瘤大小-第10天的肿瘤大小)/治疗日的肿瘤大小]\*100。生成Kaplan Meier曲线并使用GraphPad Prism软件(GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA) 计算中位存活率。

[0210] 到第10天,AR160 45治疗组(17/17)中的所有小鼠都有肿瘤反应,而在AR160 30、ABX 45、ABX 30、RIT 18、RIT 12和盐水组中分别为,94.1% (16/17) 有完全肿瘤反应,相比之下7/14(50%)、3/7(42.8%)、1/4(25%)、0/7(0%) 和0/5(0%)的小鼠有反应(图7A-7G)。对于盐水、RIT 12、RIT 18、ABX 30、ABX 45、AR160 30和AR160 45组,每组第10天存活的小鼠百分比分别为0%、12%、38%、43%、71%、92% 和100% (图7H)。与所有其他组相比,AR160 45组中基线肿瘤大小的变化百分比是显著的:盐水和RIT 12的p<0.0001,RIT 18的p=0.0003,ABX 30的p=0.0054,ABX 45的p=0.0098和AB160 30的p=0.003。分别用盐水、RIT 12、RIT 18、ABX 30、ABX 45和AB160 30处理的小鼠在第9、8、10.5、12、16和53.5天所有小鼠被处死,而用AR160 45处理的小鼠的中位生存时间在第90天仍未确定(图8)。AR160 45组的中位生存时间显著高于生理盐水、RIT 12、RIT 18、ABX 30、ABX 45(p<0.0001)组的小鼠,而两个AR160组之间的差异不显著(p=0.0715))。

[0211] 对于体内成像,根据SAIVI抗体标记试剂盒(Thermo Scientific, 罗克福德, IL) 的方案,用AlexaFluor 750染料标记Abraxane颗粒。将染料和颗粒溶液在室温下孵育60分钟,然后通过纯化柱除去未结合的标记物。使用Amicon Ultra离心过滤器(Millipore, 比勒利卡, MA) 将标记颗粒浓缩至浓度为14.54mg紫杉醇/mL。将Abraxane与IVIG (CSL Berhing, 普鲁士王村, PA) 或利妥昔单抗(Genentech, 旧金山, CA) 分别以10mg/mL和4mg/mL的浓度孵育30分钟。用Malvern Nanosight (Malvern, 伍斯特郡, UK) 检查粒径,确认AR160形成。给小鼠注射100 $\mu\text{L}$  2mg/mL标记的Abraxane、与IgG一起孵育的Abraxane (ABIgG) 或AR160。在注射后6、24、48和72小时使用Perkin Elmer IVIS Spectrum (Perkin Elmer, 沃尔瑟姆, MA) 对小鼠成像。在710/760的激发/发射光谱下进行荧光成像并使用活体图像软件(Perkin Elmer, 沃尔瑟姆, MA) 分析。

尔瑟姆,MA) 分析目标区域(ROI)。肿瘤递送通过测量肿瘤区域内的平均辐射效率来确定,通过设定的ROI确定。与Abraxane、Abx+IgG和AR160相比,背景ROI用于减去增加的颗粒稳定性对测量的任何影响。使用小鼠背部上的目标区域(ROI)测量背景荧光,并从肿瘤ROI中的荧光测量值中减去背景荧光。

[0212] 在减去每只小鼠的背景后,相对于单独的ABX和ABX结合的IgG,在施用AR160的小鼠中检测到19.1%的增加(图9A和9B),这表明添加淋巴瘤靶向抗体利妥昔单抗增加了肿瘤部位的化疗沉积。此外,为了证明在AR160处理的小鼠中增加的ABX肿瘤沉积是抗体-配体介导的,在注射荧光标记AR160之前24小时,小鼠用1% (0.12mg/kg)、10% (1.2mg/kg) 和100% (12mg/kg) 的在AR160中的利妥昔单抗剂量预处理。在AR160注射24小时后对小鼠成像(图9C)。单独注射AR160的小鼠肿瘤中具有高水平的荧光标记的AR160,而用增加量的利妥昔单抗预处理的小鼠肿瘤中显示标记的AR160的量减少(图9D)。综合考虑,这些数据表明,相对于单独的ABX,肿瘤部位的标记的AR160水平增加,并且肿瘤中药物沉积的这种增加是由利妥昔单抗的CD20配体特异性介导的。

实施例7药房制备的利妥昔单抗-白蛋白-紫杉醇纳米颗粒复合物与实验室制备的复合物的比较

[0213] 根据实验室确定的条件,药房制备三批AR160 (AR160p1、p2和p3)。将这些与单独的ABX和实验室制备的AR160 (AR160) 进行比较,并通过NanoSight分析尺寸分布,以及每种制剂中的颗粒数(图10)。无论如何制备,AR160的尺寸和颗粒数都相似。

[0214] 按照实施例4中所述方法评估AR160复合物中利妥昔单抗的配体结合能力。每种药房制备的批次以与实验室制备的AR160类似的方式阻止抗CD20抗体与Daudi细胞结合(图11A-I)。

#### 实施例8人血清白蛋白抗体结合基序的测定

[0215] 利用Biacore表面等离子体共振技术确定各种抗体(利妥昔单抗、曲妥珠单抗、贝伐单抗和莫罗单抗)和白蛋白之间的结合位点的位置。用18个氨基酸肽构建白蛋白肽文库,每个肽含有6个氨基酸重叠,并且每个白蛋白肽针对固定在CM5芯片上的利妥昔单抗运行。将肽在HBS-EP加运行缓冲液中悬浮至5-10mg/mL。将水不溶性肽溶于10%DMSO (Sigma-Aldrich, 圣路易, MO) 中。将利妥昔单抗通过胺偶联固定在Biacore CM5 (GE Healthcare, 芝加哥, IL) 芯片上。使用Biacore X-100 (GE Healthcare, 芝加哥, IL) 筛选固定化利妥昔单抗上的白蛋白肽文库。从1-50μg/mL筛选肽,暴露时间为120秒。使用Biacore X100软件测定结合动力学。

[0216] 将肽以50、25、10、5、2.5、1.25μg/mL在HBS运行缓冲液中运行。利用Biacore Evaluation Software确定解离常数。发现三种结合抗体的白蛋白肽:HSA肽4 (SEQ ID NO: 3)、HSA肽13 (SEQ ID NO: 4) 和HSA肽40 (SEQ ID NO: 5) (图12A-12J)。图12K中列举了解离常数(Kd)。有趣的是,肽40的位置位于已被充分表征的Sudlow II位点,这是一个已知的结合许多药物的疏水结合位点。Diana, F. J., Veronich, K. & Kapoor, A. L. Binding of nonsteroidal anti-inflammatory agents and their effect on binding of racemic warfarin and its enantiomers to human serum albumin (非甾体类抗炎药剂的结合以及其对外消旋华法林及其对映体与人血清白蛋白结合的影响)。J Pharm Sci 78, 195-199 (1989); Sudlow, G., Birkett, D. J. & Wade, D. N. The characterization of two specific

drug binding sites on human serum albumin(人血清白蛋白上两个特异性药物结合位点的表征)。Mol Pharmacol 11,824-832 (1975)。

### 实施例9多种抗体白蛋白结合基序的测定

[0217] 还是利用Biacore表面等离子体共振技术确定与HSA肽4、13或40结合的利妥昔单抗、曲妥珠单抗、贝伐单抗或莫罗单抗上的位点(图13A-13E)。图13F中提供了贝伐单抗(SEQ ID NO:1)和利妥昔单抗(SEQ ID NO:2)上结合位点所在的重链可变区的序列。贝伐单抗(SEQ ID NO:8-WYFDVWGQGTLTVSSAST)和利妥昔单抗(SEQ ID NO:10-WYFNWGAGTTVTVSAAST)的19-AA目标区域标有下划线,并且具有约80%的同一性。图13G提供了结合HSA的每种抗体的序列。有趣的是,虽然莫罗单抗与HSA肽4和40结合,但是莫罗单抗肽不与完整的HSA蛋白结合。

[0218] 如上所述,当通过NanoSight测定时,当利妥昔单抗与ABX结合时,4mg/mL利妥昔单抗与10mg/mL ABX的共孵育导致单独的80nm ABX的大小变为大约110nM。在竞争测定中使用白蛋白结合肽以观察它们是否会干扰AR160的形成。简而言之,将10mg/ml的ABX与4mg/mL利妥昔单抗以及10摩尔过量的对照肽(HSA 10)、HSA肽40或无肽(AR160对照)一起孵育30分钟。在孵育得到所有颗粒尺寸和计数后,使用Malvern Nanosight (Malvern, 伍斯特郡, UK)。将颗粒以1:200稀释,相机水平为9,捕获检测阈值为16,以确定颗粒大小和数量。

[0219] 单独的ABX具有77nm的大小,而利妥昔单抗与ABX的结合产生100nm的颗粒。当将白蛋白结合肽(肽40)加入到孵育的ABX和利妥昔单抗中时,所得纳米颗粒为70nm,仅ABX的大小,而非结合对照肽产生100nm颗粒,在该实验中为AR160的大小(109nm)(图14A)。这些数据表明HSA肽40有效抑制AR160的形成。结合肽4和13的结果证明了更多异质的纳米颗粒群,表明这些对利妥昔单抗具有较低亲和力的2种白蛋白肽不能完全阻断AR160的形成(图14C和14D)。

[0220] 使用贝伐单抗进行类似的实验(图14B)。结果显示添加HSA肽40或Bev肽1(SEQ ID NO.:7)抑制了粒径增加30nm,指示了抗体与ABX结合,表明这两种肽都会干扰抗体-白蛋白结合。

## 序列表

SEQ ID NO: 1 - 贝伐单抗可变序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYT  
GEPTYAADFKRRFTSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFD  
VWGQGTLTVSSAST

SEQ ID NO: 2 - 利妥昔单抗可变序列

QVQLQQPGAEVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGN  
GDTSYNQKFKKGATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNV  
WGAGTTVTVSAAST

SEQ ID NO: 3 - HSA 肽 4

DLGEENFKALVLIAFAQY

SEQ ID NO: 4 - HSA 肽 13

DVMCTAFHDNEETFLKKY

SEQ ID NO: 5 - HSA 肽 40

VVLNQLCVLHEKTPVSDR

SEQ ID NO: 6 - 贝伐单抗可变肽 2

SHWYFDVWGQGTLTVSSAST

SEQ ID NO: 7 - 贝伐单抗可变肽 1

DTAVYYCAKYPHYYGSSHWYF

SEQ ID NO: 8 - 贝伐单抗白蛋白结合序列

WYFDVWGQGTLTVSSAST

SEQ ID NO: 9 - 利妥昔单抗白蛋白结合序列

YCARSTYYGGDWYFNVWGAG

SEQ ID NO: 10 - 利妥昔单抗可变肽 2

WYFNVWGAGTTVTVSAAST

SEQ ID NO: 11 - 曲妥珠单抗可变肽 1

YYCSRWGGDGFYAMDYWGQG

SEQ ID NO: 12 - 莫罗单抗可变肽 1

DDHYCLDYWGQGTTLVSSA



图 1A

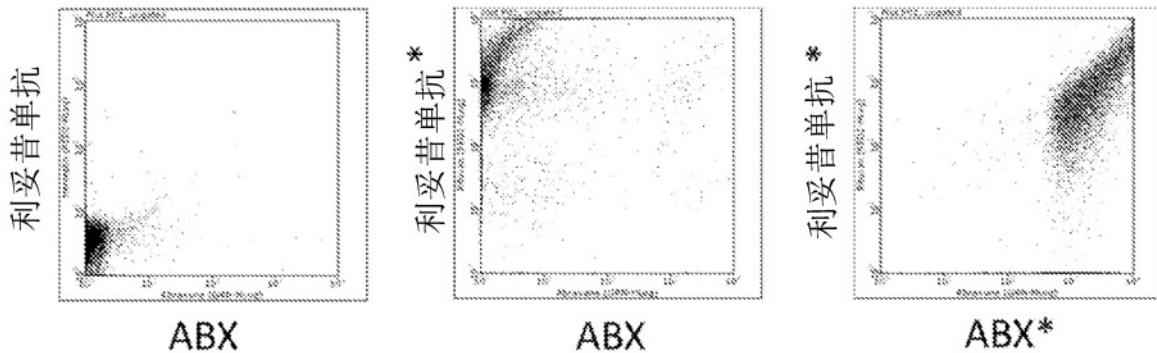


图 1B

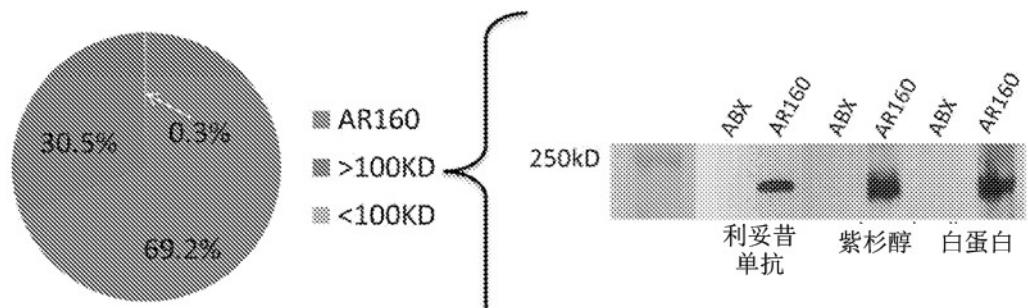


图 1C

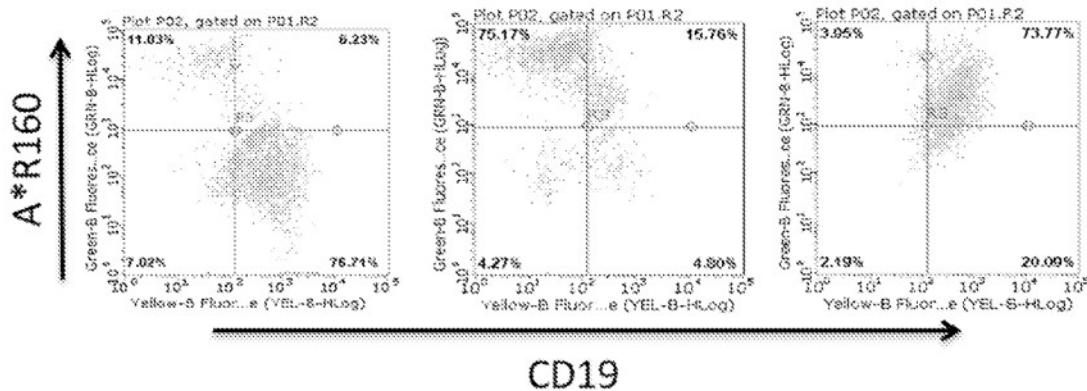


图 2A

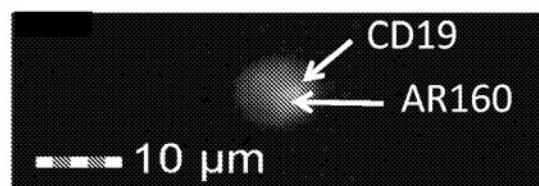
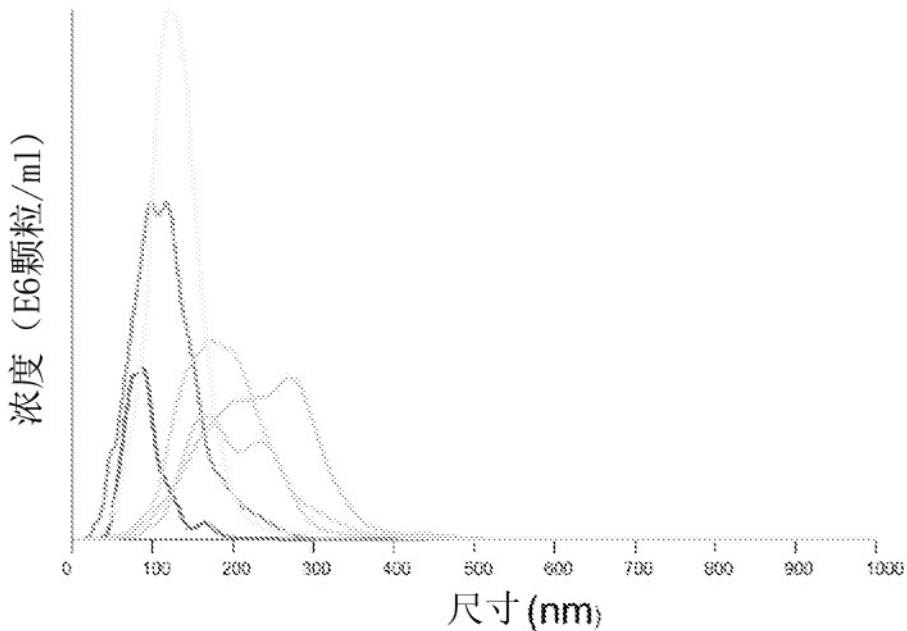
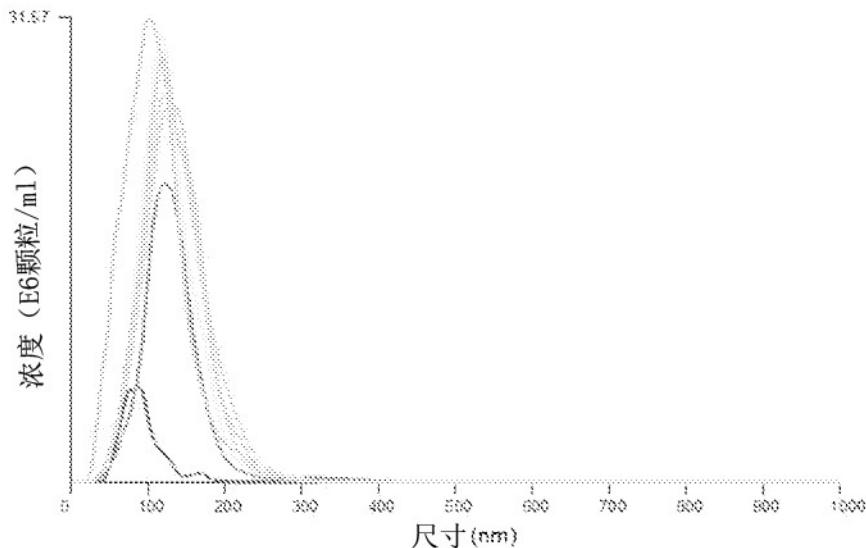


图 2B



ABX (mg)	RIT (mg)	平均尺寸 ( $\mu\text{M}$ )	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
10	0	90	60	84	122
10	2	113	59	107	171
10	4	127	82	122	170
10	6	189	120	182	267
10	8	229	138	231	310
10	10	204	132	195	280

图2C



AR160 孵育时间	颗粒数 × 10(8)/ml	平均尺寸	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
0	19.1	127	82	122	170
1	19.7	130	85	124	175
2	21.5	132	85	127	181
4	29.2	122	77	117	169
6	25.8	133	86	128	180
24	23.5	133	85	130	181
ABX 0h	4.23	90	60	84	122

图3

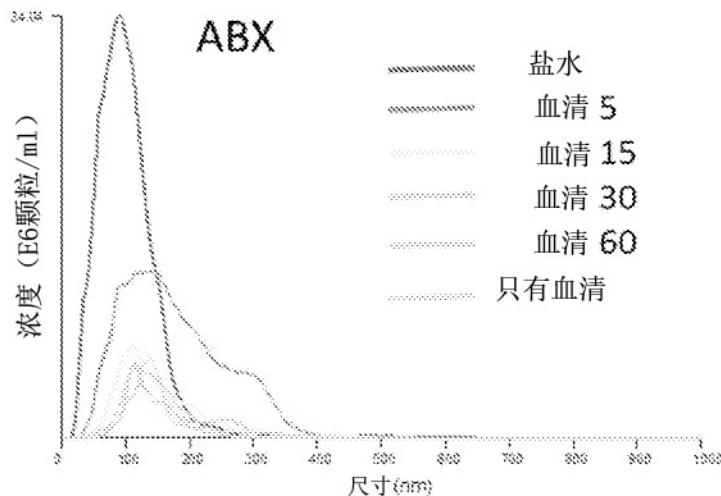


图 4A

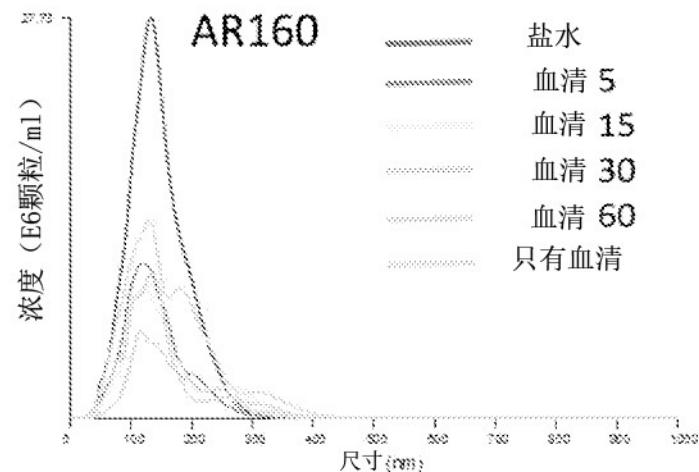


图 4B

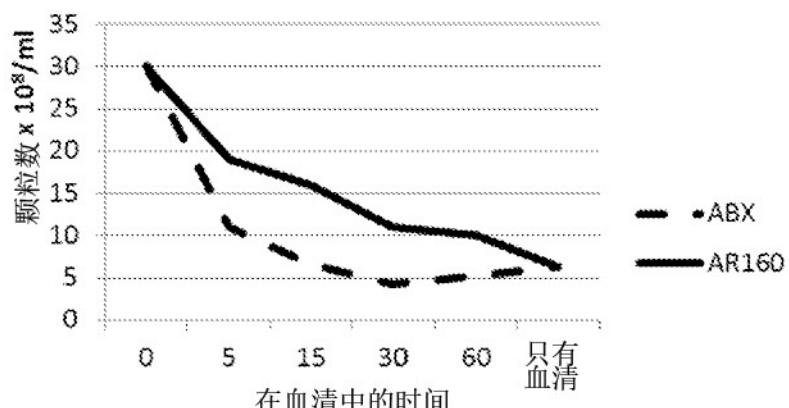
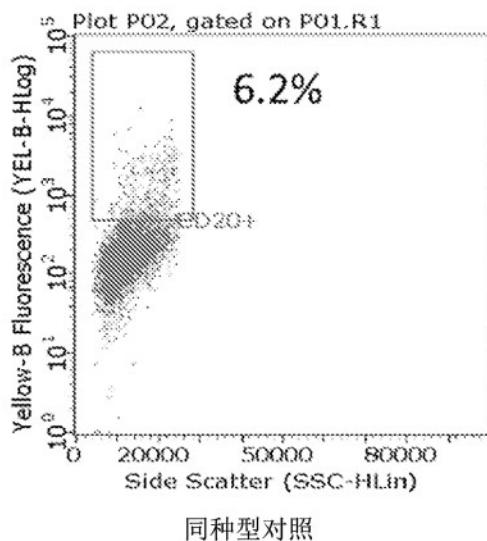


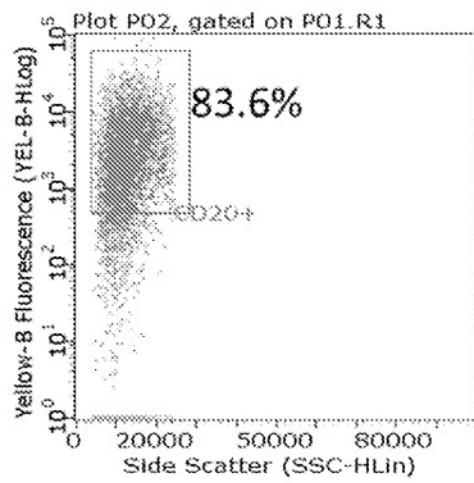
图 4C

图 5A



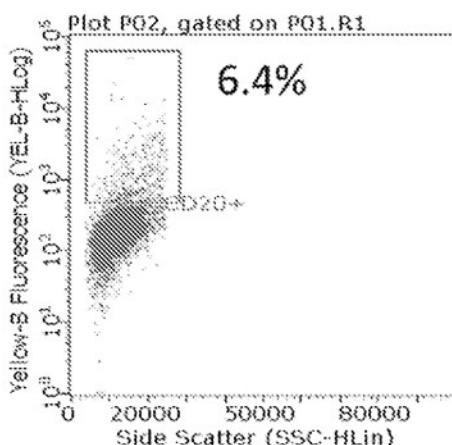
同种型对照

图 5B



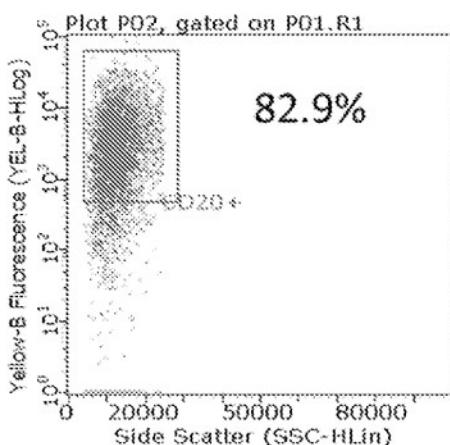
仅抗CD20

图 5C



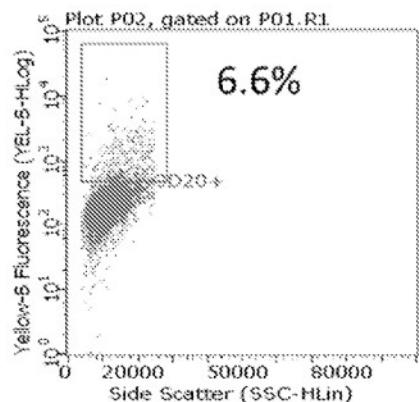
利妥昔单抗

图 5D



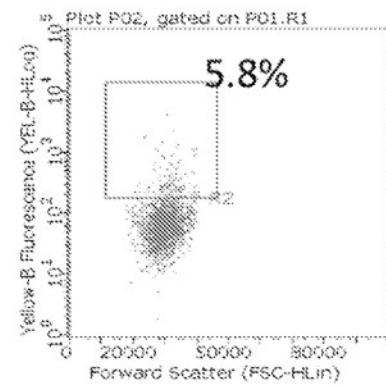
ABX

图 5E



AR160

图 5F



AR160(24h)

图 6

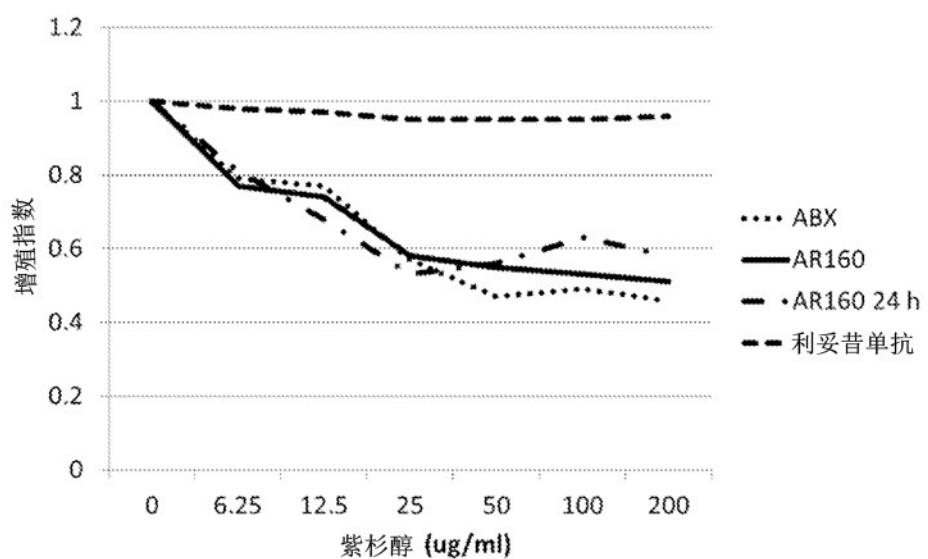


图 7A

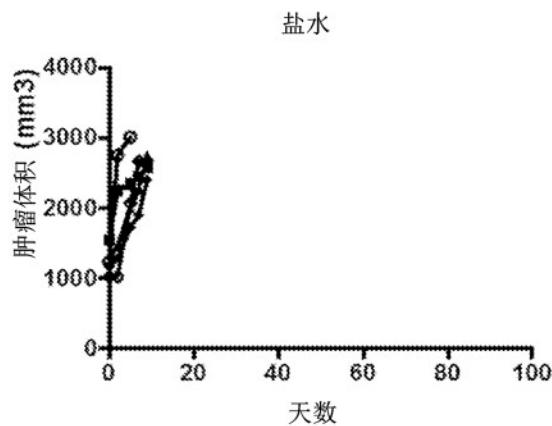


图 7B

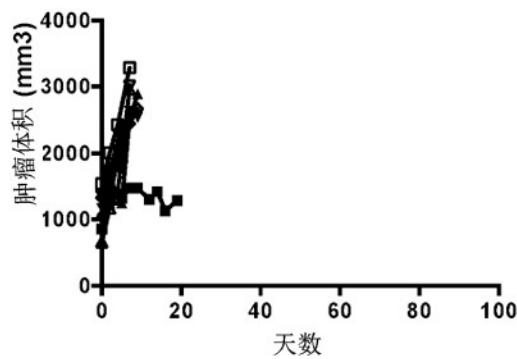
**Rit 12**

图 7C

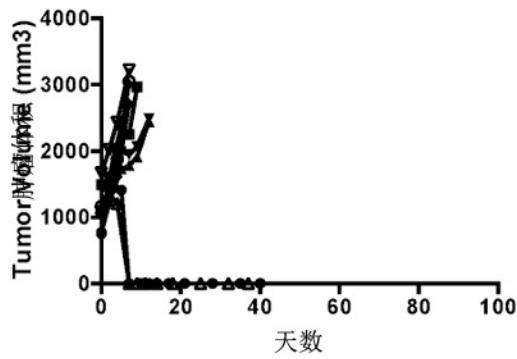
**Rit 18**

图 7D

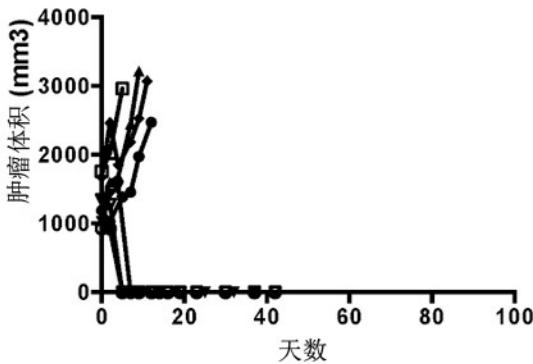
**ABX 30**

图 7E

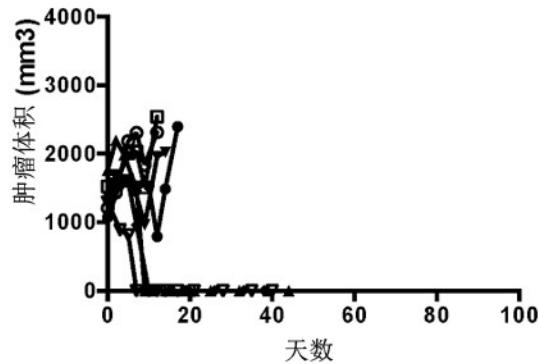
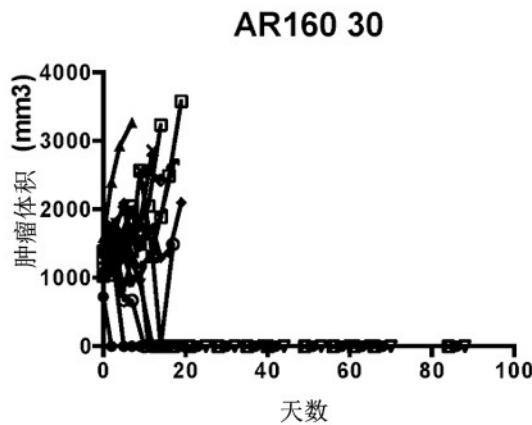
**ABX 45**

图 7F



TU 7G

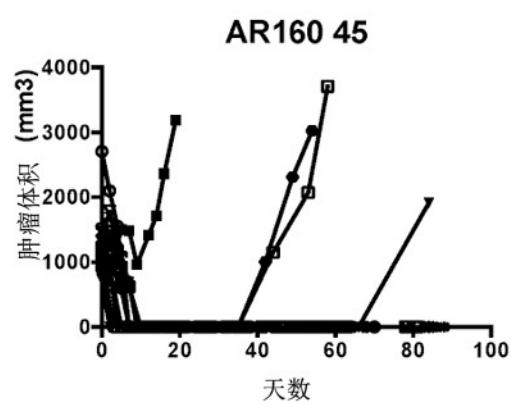
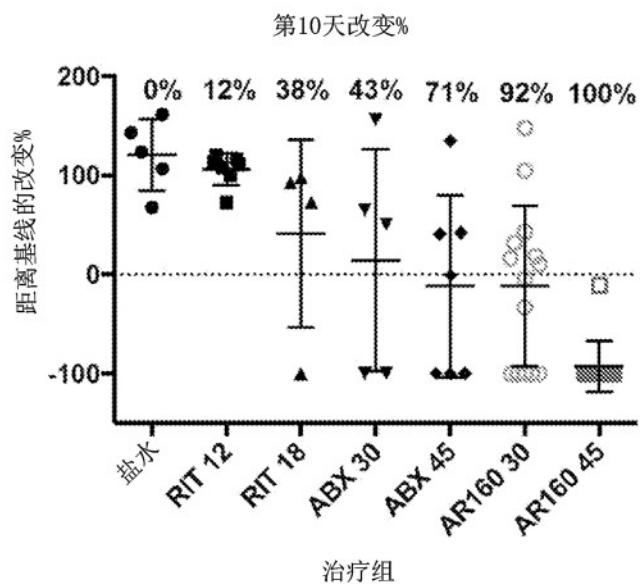
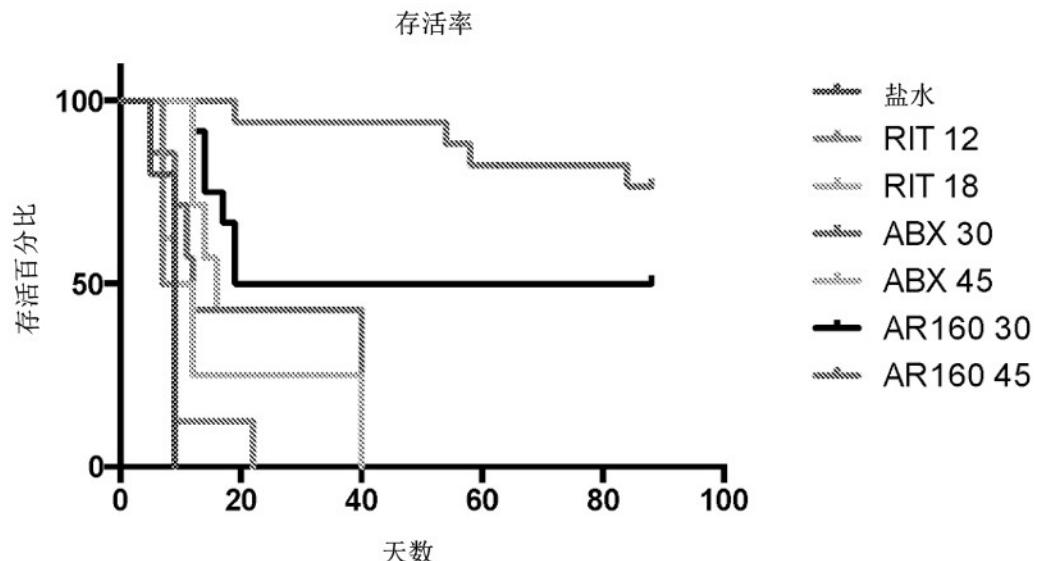


图 7H





盐水	RIT 12	RIT 18	ABX 30	ABX 45	AR160 30	AR160 45
9	8	10.5	12	16	53.5	未确定

图8

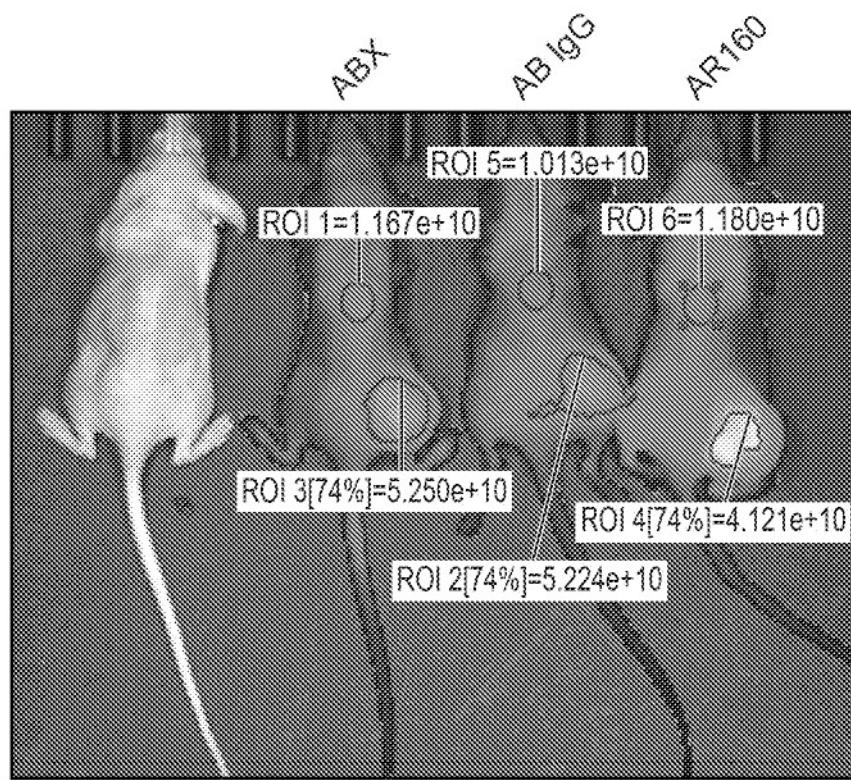


图 9A

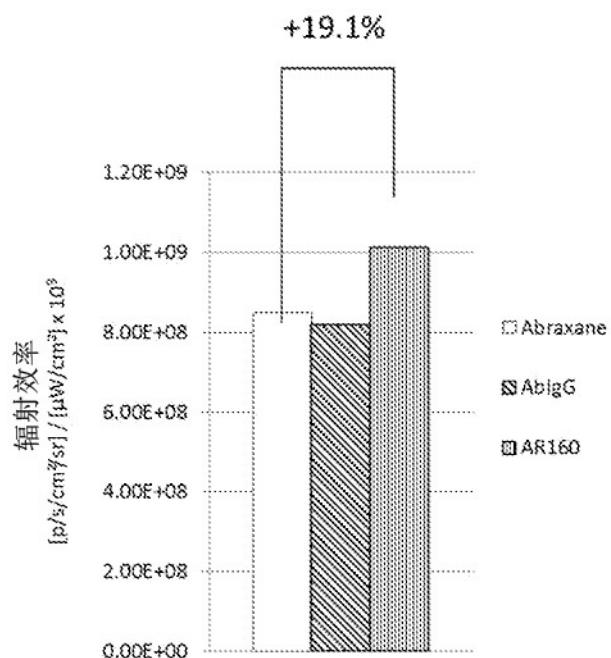


图 9B

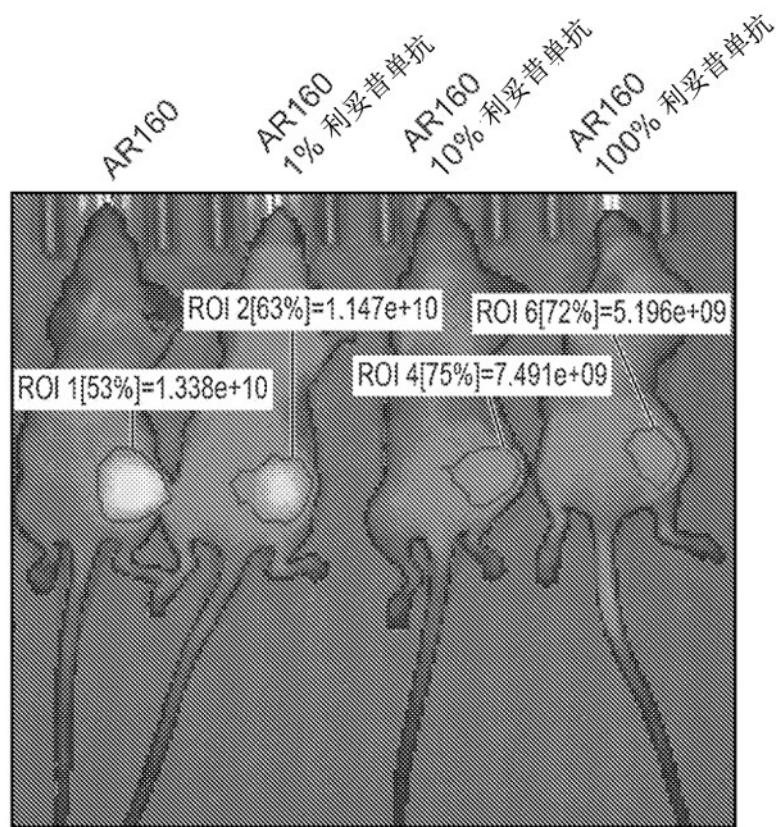


图 9C

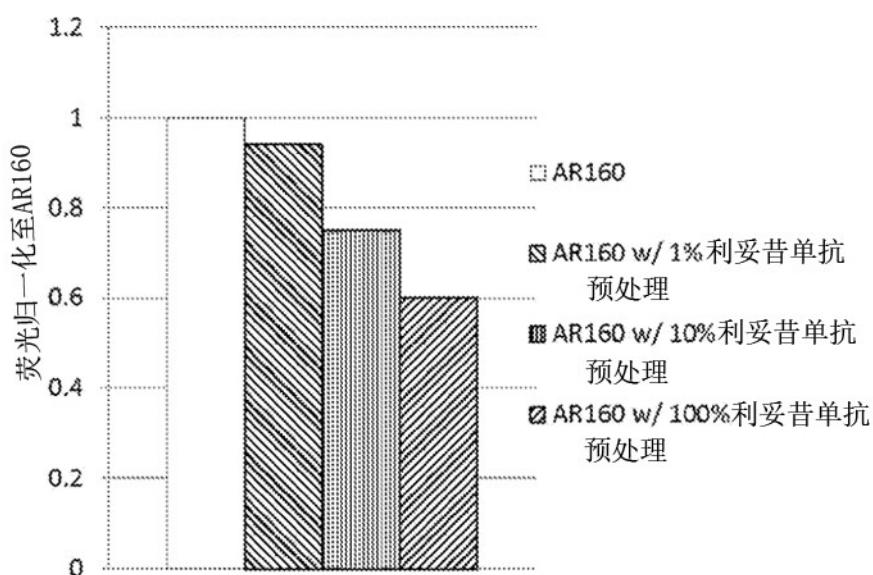
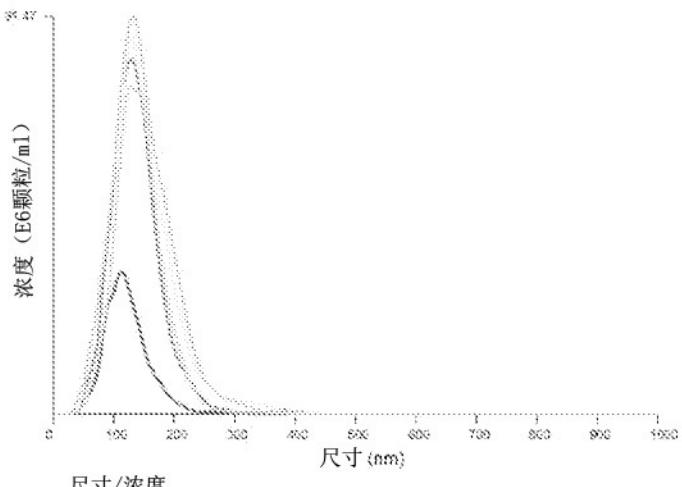


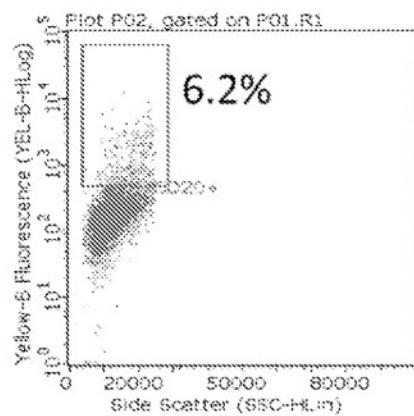
图 9D



药物	颗粒# × 10(8)	平均尺寸(nm)	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
ABX	8.62	112	80	116	168
AR160	25.17	138	88	132	188
AR160 p1	30.67	147	88	138	211
AR160 p2	23.46	142	95	138	191
AR160 p3	33.25	147	88	141	211

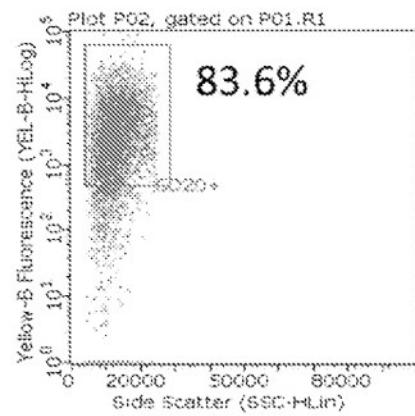
图10

图 11A



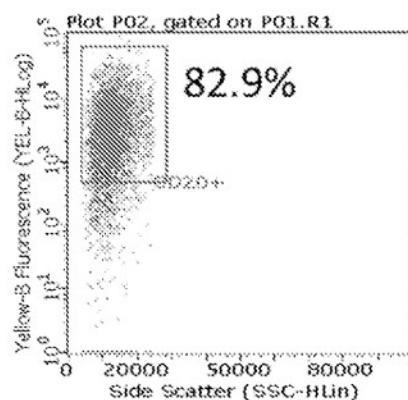
同种型对照

图 11B



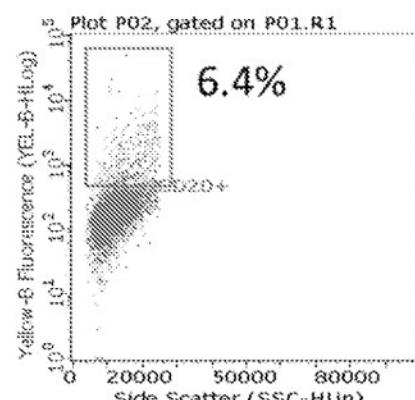
仅抗CD20\*

图 11C



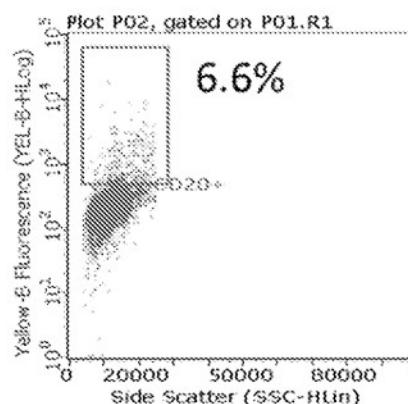
ABX

图 11D



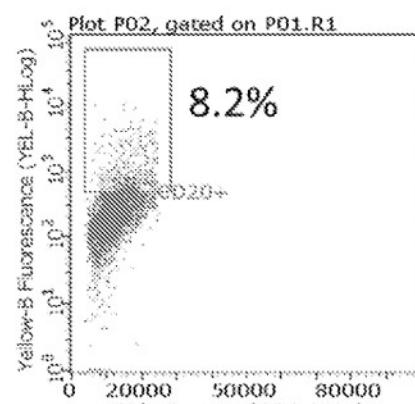
利妥昔单抗

图 11E



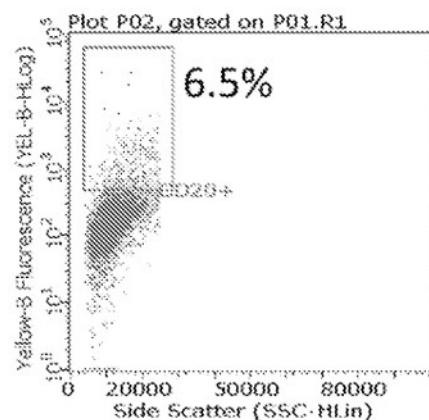
AR160

图 11F



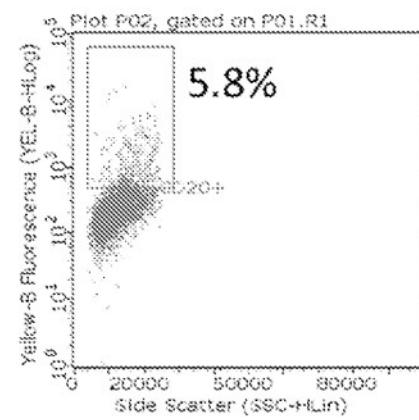
AR160 药房-批次1

图 11G



AR160 药房-批次2

图 11H



AR160 药房-批次3

图 11I

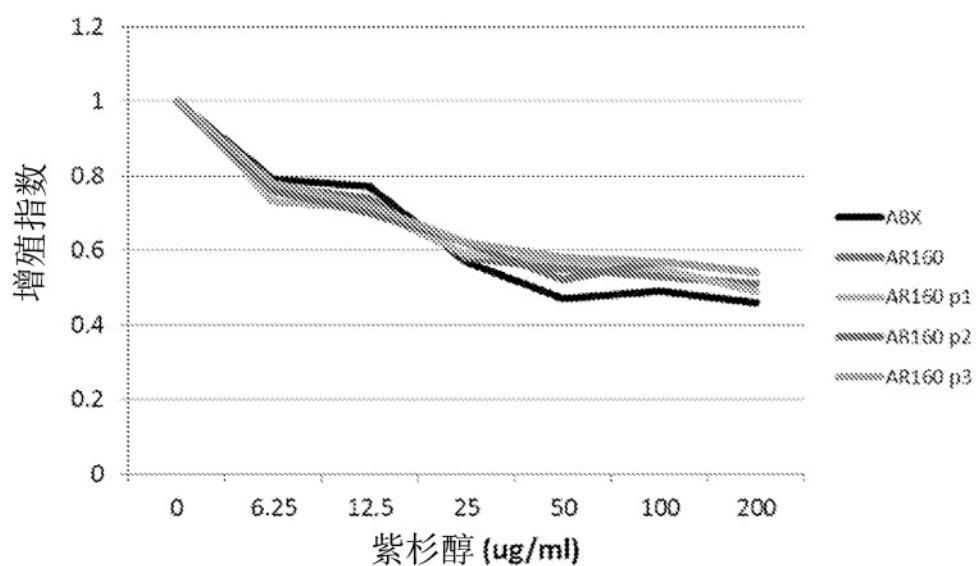


图 12A

HSA肽4/曲妥珠单抗

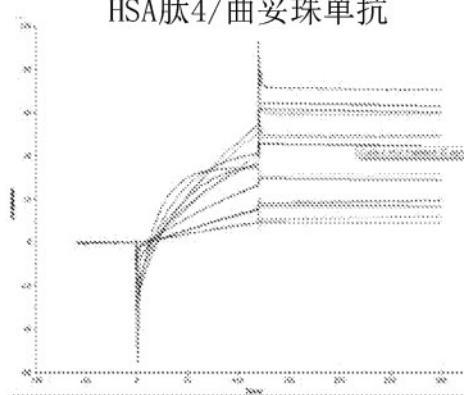


图 12B

HSA肽4/莫罗单抗

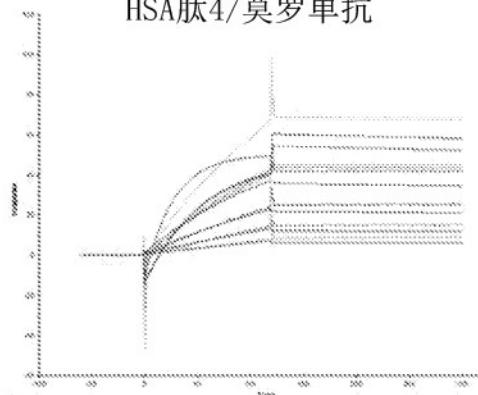


图 12C

HSA肽4/利妥昔单抗

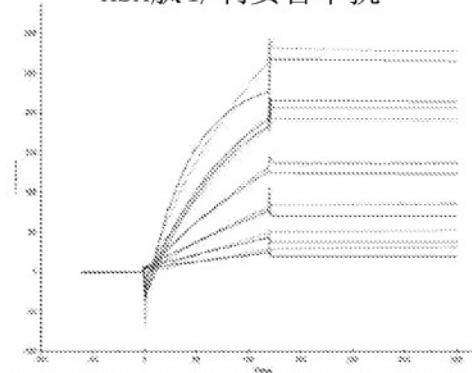


图 12D

HSA肽13/贝伐单抗

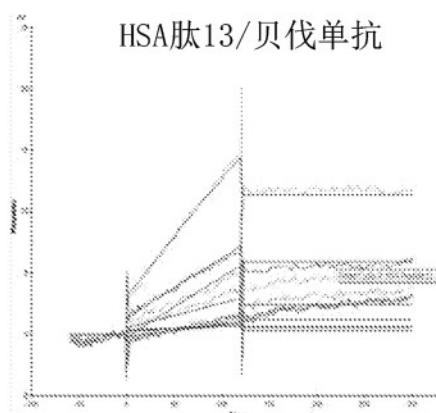


图 12E

HSA肽13/曲妥珠单抗

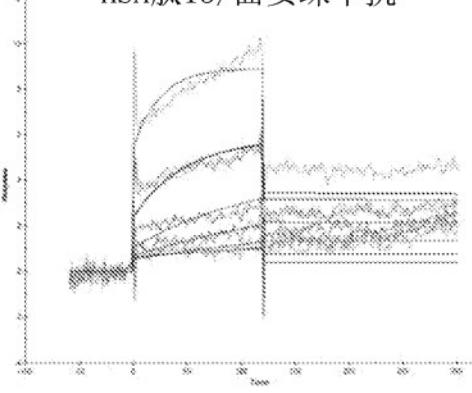


图 12F

HSA肽13/利妥昔单抗

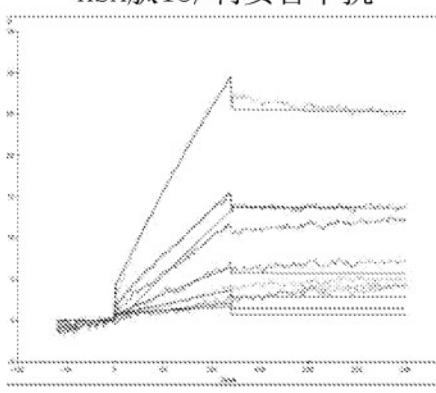


图 12G  
HSA肽40/贝伐单抗

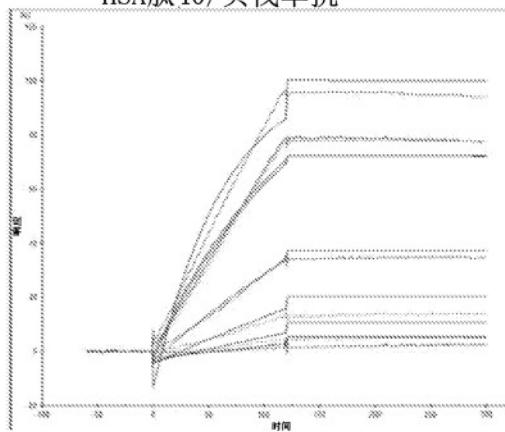


图 12H  
HSA肽40/曲妥珠单抗

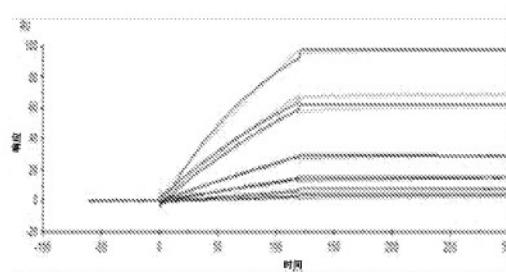


图 12I  
HSA肽40/莫罗单抗

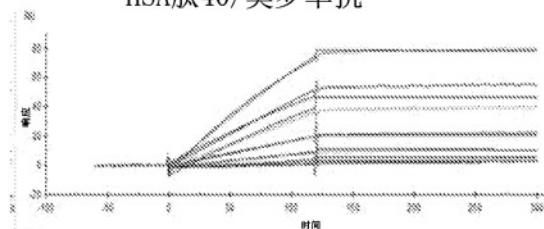


图 12J  
HSA肽40/利妥昔单抗

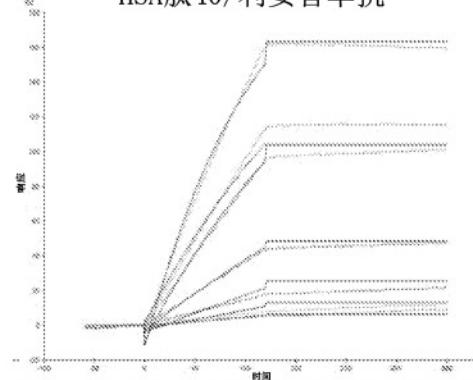


图 12K

HSA肽	AA序列	对Bev的亲和力 $K_D$ (M)	对Rit的亲和力 $K_D$ (M)	对Herceptin的亲和力 $K_D$ (M)	对抗CD30克隆的亲和力 $K_D$ (M)
4	DLGEENFKA LVLIAFAY	无结合	$5.7 \times 10^{-8}$	$6.31 \times 10^{-8}$	$1.44 \times 10^{-7}$
13	DVMCTAII DNEETFLKKV	$3.58 \times 10^{-8}$	$4.04 \times 10^{-8}$	$4.17 \times 10^{-8}$	无结合
40	VVINOQCVL HEKTPVSDR	$1.62 \times 10^{-8}$	$5.2 \times 10^{-8}$	$2.54 \times 10^{-8}$	$5.77 \times 10^{-8}$

图 13A

BEV肽1/HSA肽40

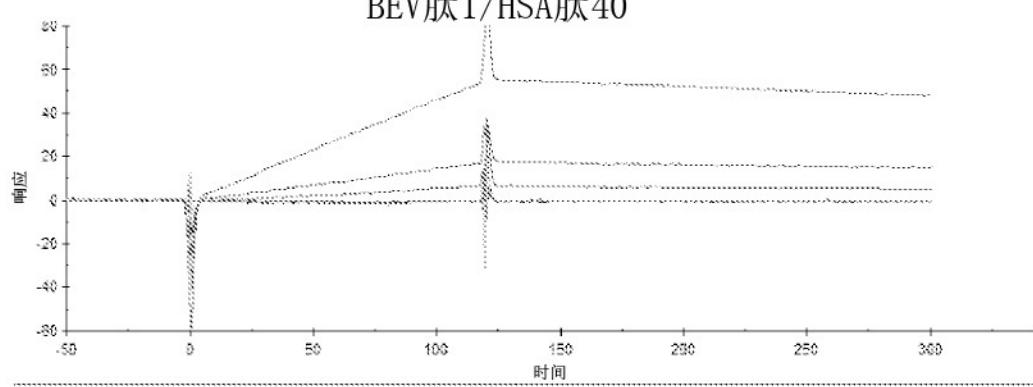


图 13B

BEV肽1/HSA

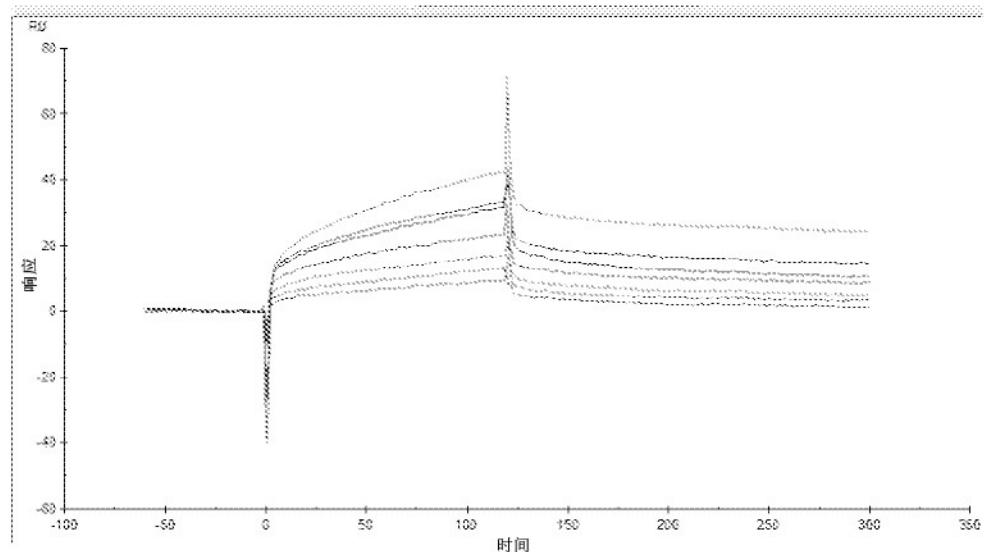


图 13C  
BEV肽2/HSA

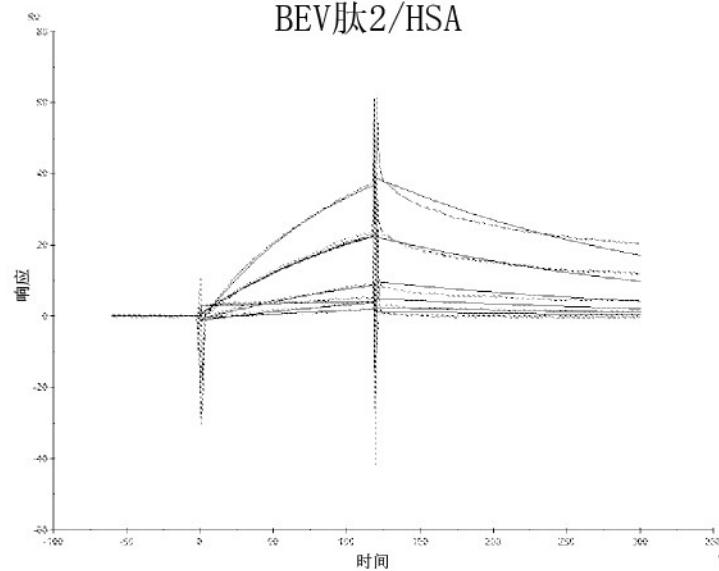


图13D

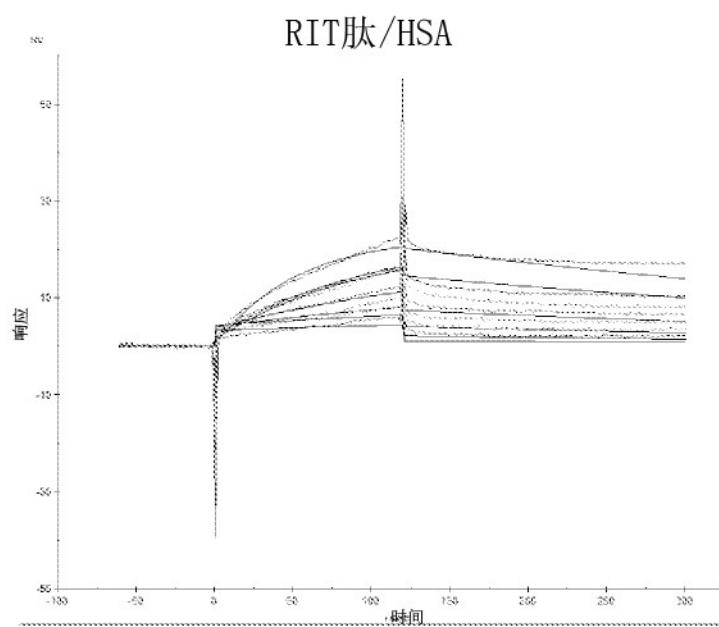


图 13E

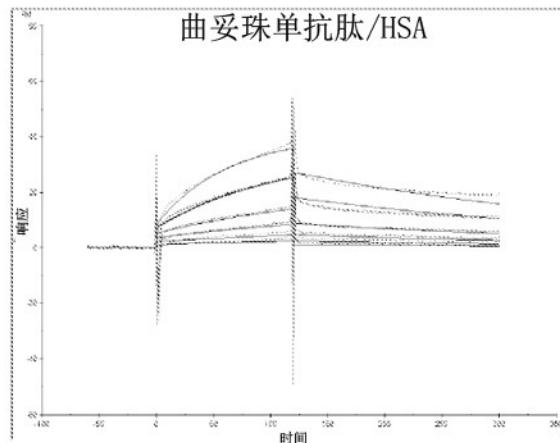


图 13F

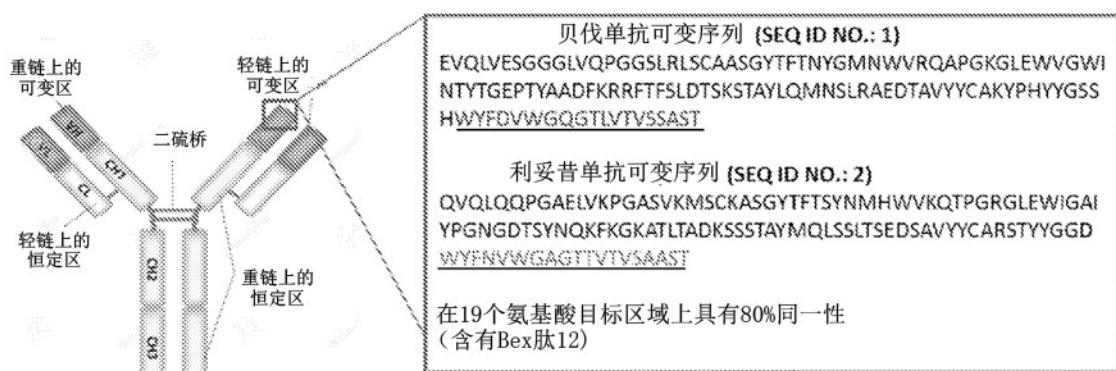


图 13G

<b>(结合的完整HSA)</b> Bev可变肽1 Bev可变肽2 Rit可变肽1 Tras可变肽1	<u>DTAVYYCAKYPHYYGSSHWYF</u> <u>SHWYFDVWGGQGTIVTVSSAST</u> YCARS-TYYG-GDWYENWAGAG YYCSRWG-GDGSPYAMDWGGQ
<b>(未结合)</b> Mur可变肽1	<u>DDHYCOLDYWGGQTIIIVSSA</u>

红色是与Bev相比单个的氨基酸变化

下划线表示二级结构上预测的 $\beta$ 折叠……由于其长度更有可能是 $\beta$ 发夹

图 14A

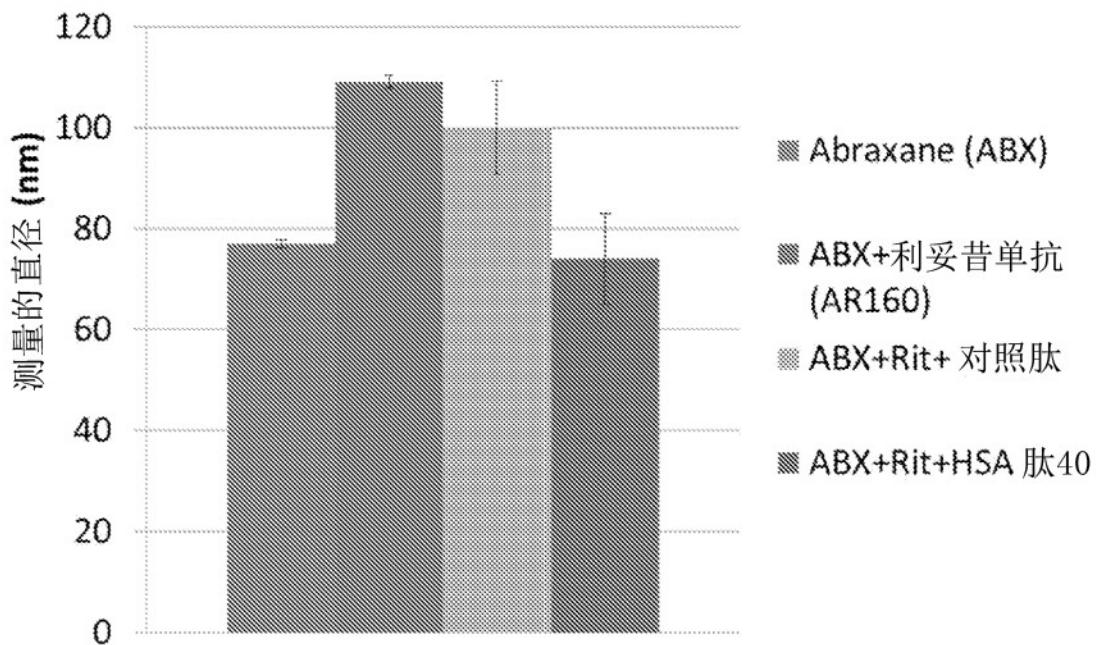


图 14B

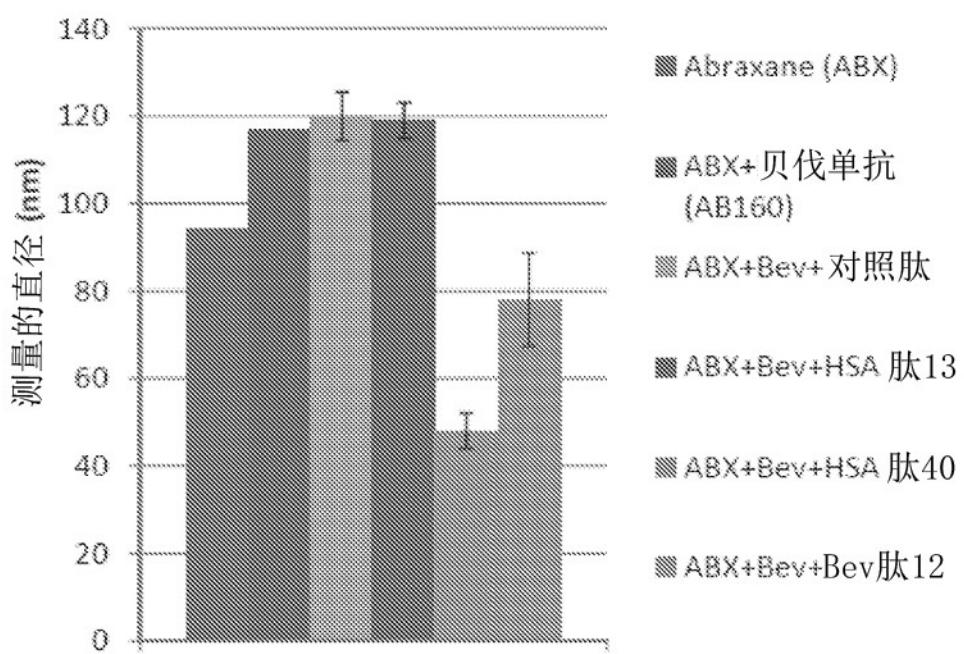


图 14C

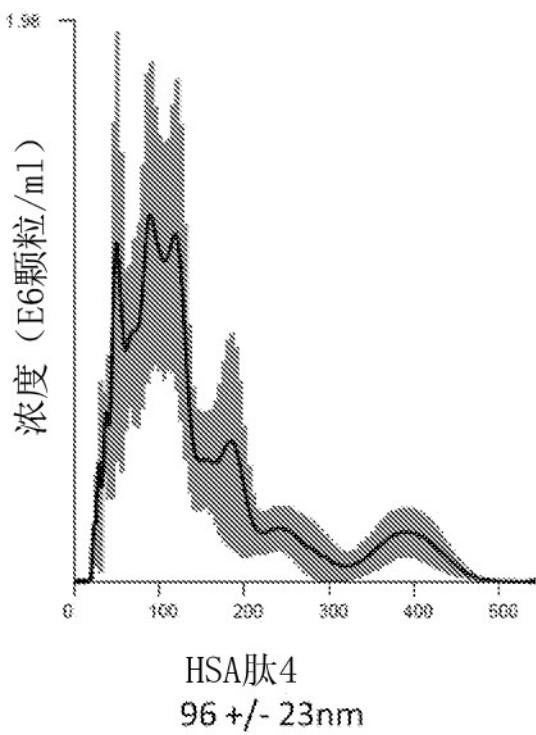


图 14D

