



(21) 申请号 201880018976.8
(22) 申请日 2018.03.13
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110869388 A

(43) 申请公布日 2020.03.06
(30) 优先权数据
17161717.8 2017.03.17 EP
1710879.6 2017.07.06 GB
1714429.6 2017.09.07 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/056312 2018.03.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/167104 EN 2018.09.20

(73) 专利权人 塔斯克疗法有限公司
地址 英国赫特福德郡
专利权人 癌症研究技术有限公司

(72) 发明人 安妮·古比耶 帕斯卡·梅希尔
约瑟芬·萨利姆
贝特里兹·古耶内切亚·科尔佐
凯文·莫尔德 塞尔吉奥·克萨达
卡尔·佩格斯
弗雷德·阿尔斯·瓦尔加斯
伊莎贝尔·索罗蒙

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司
公司 44224
专利代理师 刘培培 黄爱娇

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2014145907 A1, 2014.09.18
John H.Sampson et al.A Pilot Study of
IL-2Ra Blockade during Lymphopenia
Depletes Regulatory T-cells and
Correlates with Enhanced Immunity in
Patients with Glioblastoma.《Plos One》
.2012,
John H.Sampson et al.A Pilot Study of
IL-2Ra Blockade during Lymphopenia
Depletes Regulatory T-cells and
Correlates with Enhanced Immunity in
Patients with Glioblastoma.《Plos One》
.2012,
Nicolas Goudin et al.Depletion of
Regulatory T Cells Induces High Numbers
of Dendritic Cells and Unmasks a Subset
of Anti-Tumour CD8+CD11C+ PD-1 lo
Effector T Cells.《PLOS ONE》.2016, (续)

审查员 杨添淇

权利要求书4页 说明书56页
序列表23页 附图69页

(54) 发明名称
用于肿瘤特异性细胞消耗的Fc优化的抗
CD25

(57) 摘要
本发明涉及抗CD25抗体的用途,所述抗CD25
抗体不抑制IL-2-CD25相互作用,同时增强结合
以活化Fc γ R,引起肿瘤浸润性Treg细胞的有效

消耗和改善对已形成的肿瘤的控制。与抗程序性
细胞死亡蛋白-1抗体组合进一步改善肿瘤抑制。

CN 110869388 B

[接上页]

(56) 对比文件

Meili Zhang et al. Preclinical evaluation of an anti-CD25 monoclonal antibody, 7G7/B6, armed with the beta-

emitter, yttrium-90, as a radioimmunotherapeutic agent for treating lymphoma. Cancer Biother Radiopharm. 2009, 第24卷(第3期), 303-309.

1. 人IgG1抗CD25抗体在制备用于治疗患有癌症的人类对象的药物上的用途,其中所述对象患有实体瘤,其中所述抗体抑制的IL-2信号传导相比不存在所述抗体下的IL-2信号传导小于25%,其中,IL-2信号传导通过根据STAT5磷酸化测定所确定的细胞中磷酸化STAT5蛋白的水平来测量,其中所述STAT5磷酸化测定包括:

- 在浓度为10ug/ml的抗CD 25抗体存在下培养PMBC细胞30分钟,然后加入不同浓度的IL2,持续10分钟;
- 使细胞透化;和
- 用针对通过流式细胞术得到的磷酸化STAT5肽的荧光标记的抗体测量STAT5蛋白水平。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与抗体7G7B6竞争结合人CD25;和/或

与抗体MA251竞争结合人CD25。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与抗体7G7B6识别的相同表位和/或抗体MA251识别的表位结合。

4. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与人CD25的表位特异性结合,其中所述表位包含包括在选自SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)、SEQ ID NO:1的第166至186个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQPQLICTG)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTMLNCECKRGFR)、SEQ ID NO:1的第70至88个氨基酸(NSSHSSWDNQCQCTSSATR)的氨基酸区段中的一个或多个中的一个或多个氨基酸残基。

5. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与人CD25的表位特异性结合,其中所述表位包含选自以下的至少一个序列:SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)、SEQ ID NO:1的第176至180个氨基酸(RWTQP)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTMLNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸(SSWDNQCQCTS)。

6. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与人CD25的表位特异性结合,其中所述表位包含选自以下的至少一个序列:SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)、SEQ ID NO:1的第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)、SEQ ID NO:1的第176至186个氨基酸(RWTQPQLICTG)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTMLNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸(SSWDNQCQCTS)。

7. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与人CD25的表位特异性结合,其中所述表位包含选自以下的至少一个序列:SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTMLNCECKRGFR)、SEQ ID NO:1的第70至84个氨基酸(NSSHSSWDNQCQCTS)和SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)。

8. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTMLNCECKRGFR)的序列的表位结合。

9. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1(KEGTMLNCECKRGFR)的第42至56个氨基酸和SEQ ID NO:1的第150至160个氨基酸(YQCVQGYRALH)的序列的表位结合。

10. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTMLNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸

(SSWDNQCQCTSSATR)的序列的表位结合。

11. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)、SEQ ID NO:1的第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸(SSWDNQCQCTSSATR)的序列的表位结合。

12. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)和第176至180个氨基酸(RWTQP)的序列的表位结合。

13. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)和SEQ ID NO:1的第176至186个氨基酸(RWTQPQLICTG)的序列的表位结合。

14. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)和SEQ ID NO:1的第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)的序列的表位结合。

15. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸(SSWDNQCQCTSSATR)的序列的表位结合。

16. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第70至84个氨基酸(NSSHSSWDNQCQCTS)的序列的表位结合。

17. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第176至180个氨基酸(RWTQP)的序列的表位结合。

18. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)的序列的表位结合。

19. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第176至186个氨基酸(RWTQPQLICTG)的序列的表位结合。

20. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体是以高亲和力与选自Fc γ RI、Fc γ RIIc和/或Fc γ RIIIa中的至少一种活化性Fc γ 受体结合并消耗肿瘤浸润性调节性T细胞的IgG1抗体。

21. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗CD25抗体:

- (a) 以优于1的活化抑制率(A/I)结合Fc γ 受体;和/或
- (b) 以比结合Fc γ RI、Fc γ RIIc和/或Fc γ RIIb更高的亲和力结合Fc γ RIIIa。

22. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗体选自:

(a) 包含含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链的抗体;

(b) 包含含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链的抗体;

(c) 包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链的抗体;

(d) 包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链的抗体;

(e) 包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的

轻链的抗体；

(f) 包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链的抗体；

(g) 包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链的抗体；

(h) 包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链的抗体；(i) 包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链的抗体；(j) 包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链的抗体；(k) 包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链的抗体；

(l) 包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链的抗体；

(m) 包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链的抗体；

(n) 包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链的抗体；

(o) 包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链的抗体；

(p) 包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链的抗体；

(q) 包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链的抗体；

(r) 包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链的抗体；

(s) 包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链的抗体；和

(t) 包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链的抗体。

23. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述抗CD25抗体对CD25的解离常数(Kd)小于 10^{-7} M。

24. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述抗CD25抗体是单克隆抗体。

25. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述抗CD25抗体是人抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

26. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述抗体是所述抗体的亲和力成熟的变体。

27. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述抗体是7G7B6或MA251的人源化变体和/或亲和力成熟的变体。

28. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述抗CD25抗体引发增强的CDC、ADCC和/或ADCP反应。

29. 根据权利要求28所述的用途, 其特征在于, 所述抗CD25抗体引发增加的ADCC和/或ADCP反应。

30. 根据权利要求29所述的用途, 其特征在于, 所述抗CD25抗体引发增加的ADCC反应。

31. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于, 抗CD25抗体用于给药至患有已确立肿瘤的对象。

32. 根据权利要求1所定义的抗CD25抗体与另外的治疗剂的组合在制备用于治疗人类对象的癌症的药物上的用途, 其特征在于, 所述对象患有有实体瘤, 所述抗CD25抗体和另外的治疗剂同时、分开或顺序给药。

33. 根据权利要求32所述的用途, 其特征在于, 所述另外的治疗剂是免疫检查点抑制剂。

34. 根据权利要求33所述的用途, 其特征在于, 所述免疫检查点抑制剂是PD-1拮抗剂。

35. 根据权利要求32所述的用途, 其特征在于, 所述另外的治疗剂是癌症疫苗。

36. 根据权利要求35所述的用途, 其特征在于, 所述癌症疫苗是GVAX癌症疫苗。

用于肿瘤特异性细胞消耗的Fc优化的抗CD25

技术领域

[0001] 本发明属于癌症免疫疗法领域,并且涉及治疗癌症的方法,包括治疗实体瘤的方法,其中所述方法涉及抗CD25的抗体的使用。

背景技术

[0002] 癌症免疫疗法涉及使用对象自身的免疫系统来治疗或预防癌症。免疫疗法利用了这样一个事实,即癌细胞通常在其表面上具有可被免疫系统检测到的略微不同的分子。这些分子或癌抗原最常见的是蛋白质,但也包括诸如碳水化合物分子的分子。因此,免疫疗法涉及通过这些靶抗原激发免疫系统攻击肿瘤细胞。然而,恶性肿瘤,特别是实体瘤或血液学癌症可以通过肿瘤细胞固有的和肿瘤微环境组分介导的各种机制逃避免疫监视。在后者中,通过调节性T细胞(Treg细胞或Treg),更具体地效应T细胞(Teff)对比Treg的不利平衡(即低比例的Teff与Treg)的肿瘤浸润已经被提议为关键因素(Smyth M et al.,2014,Immunol Cell Biol.92,473-4)。

[0003] 自从他们被发现以来,已经发现Treg在介导免疫稳态和促进外周耐受的建立和维持方面是至关重要的。然而,在癌症的背景下,他们的作用更加复杂。由于癌细胞表达自身相关抗原和肿瘤相关抗原,力图抑制效应细胞反应的Treg的存在可以促进肿瘤进展。因此,已形成的肿瘤中Treg的浸润通常代表了有效的抗肿瘤反应和癌症治疗的主要障碍之一。Treg采用的抑制机制被认为显著地促成了当前疗法,尤其是依赖于抗肿瘤反应的诱导或增强的免疫疗法的限制或甚至失败(Onishi H et al,2012Anticanc.Res.32,997-1003)。

[0004] 消耗Treg作为治疗癌症的治疗方法是由显示Treg对小鼠模型中肿瘤形成和进展的贡献的研究支持的方法。此外,通过Treg的肿瘤浸润也与几种人类癌症预后较差相关(Shang B et al.,2015,Sci Rep.5:15179)。已经证明Treg细胞有助于肿瘤在小鼠模型中的形成和进展,并且它们的缺失导致肿瘤进展延迟(Elpek et al.,2007J Immunol.178(11):6840-8;Golgher et al.,2002;Eur J Immunol.32(11):3267-75,Jones et al.,2002Cancer Immun.22;2:1;Onizuka et al.,1999Cancer Res.59(13):3128-33.;Shimizu et al.,1999,JImmunol.163(10):5211-8)。在人类中,通过Treg细胞(更重要地,比例低的效应T(Teff)细胞与Treg细胞)的高肿瘤浸润,与多种人类癌症的不良结果相关(Shang et al.,2015)。相反,Teff/Treg细胞比高与免疫疗法在人类和小鼠中的有利反应相关(Hodi et al.,2008,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,105,3005-3010;Quezada et al.,2006,J Clin Invest.116(7):1935-45)。然而,肿瘤中的Treg消耗是复杂的,并且该领域的研究结果存在差异。

[0005] CD25是实现Treg消耗的潜在分子靶标之一。CD25也被称为白细胞介素-2高亲和力受体 α 链(IL-2Ra),其以高水平组成型表达于Treg细胞上,并且在T效应细胞上不存在或以低水平表达,因此是Treg消耗的有希望的靶标。IL-2/CD25相互作用已成为几项鼠模型研究的目标,其中大多数涉及大鼠抗鼠CD25小鼠抗体PC61的使用(Setiady Y et al.,2010.Eur J Immunol.40:780-6),已将该抗体的CD25结合和功能活性与由不同作者产生的一组单克

隆抗体的CD25结合和功能活性 (Lowenthal J.W et al., 1985. J. Immunol., 135, 3988-3994; Moreau, J.-L et al., 1987. Eur. J. Immunol. 17, 929-935; Volk HD et al., 1989 Clin. exp. Immunol. 76, 121-5; Dantal J et al., 1991, Transplantation 52:110-5) 进行比较。虽然最初的研究证实了PC61的预防性活性而非治疗性活性,但最近的一项研究表明,这种抗CD25抗体的Fc优化版本导致肿瘤内Treg消耗,并在几种鼠肿瘤模型中提供显著的治疗益处 (Vargas A et al., 2017, Immunity 48(6), 577-586)。可用的抗CD25抗体 (例如PC61) 阻断或抑制IL-2与CD25的结合,许多其他抗小鼠CD25抗体也是如此,并且大多数作为抗人CD25抗体而公开;参见例如W02004/045512、W0 2006/108670、W01993/011238、W01990/007861和W02017/174331。例如,巴利昔单抗和达利珠单抗是抑制IL-2与CD25的结合并且已经被开发用于减少T效应细胞的活化的抗人CD25抗体。巴利昔单抗是一种嵌合小鼠-人CD25抗体,其目前被批准用于移植物抗宿主疾病,而达利珠单抗是一种人源化CD25抗体,其被批准用于治疗多发性硬化症。然而,其他抗CD25抗体仍允许IL-2与CD25结合,如克隆7D4 (抗小鼠CD25)、克隆MA251 (抗人CD25) 或7G7B6 (抗人CD25) (Rubin et al, 1985, Hybridoma 4(2)91-102, Tanaka et al, 1986, Microbiol. Immunol 30(4), 373-388)。7G7B6已被用作研究抗体,并且被建议作为使放射性核素靶向表达CD25的淋巴瘤的靶向部分 (Zhang et al, 2009, Cancer Biother Radiopharm 24(3), 303-309)。

[0006] 例如,7D4是大鼠IgM抗小鼠CD25抗体,在PC61存在下或用PC61治疗后或具有相似结合特性的抗体存在下,7D4已被广泛用于检测CD25阳性细胞 (Onizuka S et al., 1999. Canc Res. 59, 3128-3133)。极少的文献公开7D4-IgM抗体单独或与PC61相比的任何功能特性 (Kohm A et al., 2006, J Immunol. 176:3301-5; Hallett W et al., 2008. Biol Blood Marrow Transplant 14:1088-1099; Fecci P et al., 2006 Clin Cancer Res. 12: 4294-4305; McNeill A et al., 2007. Scand J Immunol 65:63-9; Setiady Y et al., 2010. Eur. J. Immunol. 40:780-6; Couper K et al., 2007. J Immunol. 178:4136-4146)。实际上,现有技术没有教导适应或以某种方式修改7D4的同种型或其他结构特征以便获得用于癌症治疗的改进的抗体的可能性。

[0007] 然而,在关于单独或其他抗体或其它抗癌化合物组合而优化地消耗肿瘤内Treg细胞的方面,已经详细评估了7D4-IgM抗体 (本身或作为工程化抗体) 或设计或表征为具与7D4对小鼠CD25的那种类似的CD25结合特征的任何抗人CD25抗体 (例如7G7B6或M-A251) 的能力。如上讨论的,Treg细胞在肿瘤中的浸润,特别是比例低的Teff细胞比Treg细胞,可导致不良的临床结果。CD25已被鉴定为Treg标记物,因此可能是旨在消耗Treg的治疗性抗体的感兴趣的靶标。重要的是,CD25是IL-2受体的 α 亚基,IL-2是Teff反应的关键细胞因子。到目前为止已经过临床测试的抗CD25抗体,在消耗Treg细胞的同时也通过CD25阻断IL-2信号传导。本发明人现已发现IL-2信号传导的这种阻断限制了Teff反应,并且不阻断IL2信号传导的抗CD25抗体可有效消耗Treg细胞,同时仍允许IL-2刺激Teff细胞,从而提供表现出很强的抗癌作用的抗体。因此,本领域需要一种涉及消耗Treg的治疗癌症的方法,特别是同时还仍允许IL-2刺激Teff细胞的治疗癌症的方法,特别是通过使用合适的抗CD25抗体治疗癌症的方法。

发明内容

[0008] 本发明提供抗CD25抗体和抗CD25抗体的用途,所述抗CD25抗体的特征在于这样的结构元件:所述结构元件允许结合CD25而基本上不阻断白细胞介素2(IL-2)与CD25的结合或IL-2通过CD25进行信号传导,并且允许有效地消耗Treg,尤其是有效地消耗肿瘤内的Treg。已修饰7D4-IgM的结构和功能特征(如相对于小鼠CD25而描述的),以便提供在单独或与其他抗癌药物组合使用时在消耗Treg和抗肿瘤功效方面存在令人惊讶的改进特征的抗体。还已经表征了不阻断白细胞介素2与CD25的结合(并且不阻断IL-2通过CD25进行信号传导)并且有效地消耗Treg的另外的抗CD25抗体的结构和功能特征。这些发现可用于定义和产生在人类对象中提供相当的抗肿瘤作用的另外的抗人CD25抗体。除非上下文另有所指,否则本文提及的“抗CD25抗体”等包括其抗原结合片段,以及变体(包括亲和力成熟的变体)。

[0009] 在主要的方面,本发明提供治疗患有癌症的人类对象的方法,所述方法包括将抗CD25抗体给药至对象的步骤,其中所述对象患有肿瘤(优选实体瘤),其中所述抗体不抑制白细胞介素-2(IL-2)与CD25的结合。

[0010] 本文提及“不阻断”、“非阻断性”、“非IL-2阻断性”、“无阻断”和类似术语(关于在抗CD25抗体存在下不阻断IL-2与CD25的结合)包括其中抗CD25抗体不阻断IL-2通过CD25进行信号传导的实施方式。也就是说,与不存在抗体的情况下的IL-2信号传导相比,本发明的抗CD25抗体抑制少于50%的通过CD25的IL-2信号传导。优选地,与不存在抗体的情况下的IL-2信号传导相比,抗CD25抗体抑制小于约40%、35%、30%,优选小于约25%的IL-2信号传导。

[0011] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与抗体7G7B6竞争结合人CD25;和/或与抗体MA251竞争结合人CD25。

[0012] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与由抗体7G7B6识别的相同表位结合和/或与由抗体MA251识别的相同表位结合。

[0013] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与人CD25的表位特异性结合,其中所述表位包含包括在选自SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)、SEQ ID NO:1的第166至186个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQPQLICTG)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)、SEQ ID NO:1的第70至88个氨基酸(NSSHSSWDNQCQCTSSATR)的氨基酸区段中的一个或多个中的一个或多个氨基酸残基。优选地,所述表位包含包括在选自SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)、SEQ ID NO:1的第166至186个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQPQLICTG)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)、和/或SEQ ID NO:1的第70至88个氨基酸(NSSHSSWDNQCQCTSSATR)的氨基酸区段中的一个或多个中的至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个或更多个氨基酸残基。

[0014] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与人CD25的表位特异性结合,其中所述表位包含选自以下的至少一个序列:SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)、SEQ ID NO:1的第176至180个氨基酸(RWTQP)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸(SSWDNQCQCTS)。

[0015] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与人CD25的表位特异性结合,其中所述表位包含选自氨基酸的至少一个序列,其中所述表位包括选自以下的至少一个序列:SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)、SEQ ID NO:1的第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)、SEQ ID NO:1的第176至186个氨基酸(RWTQPQLICTG)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸(SSWDNQCQCTS)。

[0016] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与人CD25的表位特异性结合,其中所述表位包含选自以下的至少一个序列:SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)、SEQ ID NO:1的第70至84个氨基酸(NSSHSSWDNQCQCTS)和SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)。

[0017] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)的序列的表位结合。在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1(KEGTM LNCECKRGFR)的第42至56个氨基酸和SEQ ID NO:1的第150至160个氨基酸(YQCVQGYRALH)的序列的表位结合。在另一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至88个氨基酸(SSWDNQCQCTSSATR)的序列的表位结合。在另一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)、SEQ ID NO:1的第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至88个氨基酸(SSWDNQCQCTSSATR)的序列的表位结合。

[0018] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第176至180个氨基酸(RWTQP)的序列的表位结合。在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)的序列的表位结合。在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第176至186个氨基酸(RWTQPQLICTG)的序列的表位结合。

[0019] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)和SEQ ID NO:1的第176至180个氨基酸(RWTQP)的序列的表位特异性结合。在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA)和SEQ ID NO:1的第176至186个氨基酸(RWTQPQLICTG)的序列的表位特异性结合。在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)和SEQ ID NO:1的第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)的序列的表位特异性结合。

[0020] 在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸(SSWDNQCQCTSSATR)的序列的表位结合。在一种实施方式中,抗CD25抗体与包含SEQ ID NO:1的第70至84个氨基酸(NSSHSSWDNQCQCTS)的序列的表位结合。

[0021] 本发明人惊奇地发现,结合CD25的特定表位的抗体(包括与7G7B6和/或MA251竞争结合CD25的抗体)可用于治疗癌症,特别是实体瘤。此类抗体仍然允许IL-2通过抗体结合的CD25进行信号传导,并且本发明人首次发现除了消耗Treg细胞之外,本发明中使用的抗体允许Teff细胞最佳地发挥其抗癌作用,至少部分是通过允许IL-2与Teff细胞上表达的CD25结合并通过Teff细胞上表达的CD25进行信号传导来发挥的。

[0022] 这类抗体优选对CD25的解离常数(K_d)小于 10^{-7} M和/或对至少一种活化性Fc γ 受体的解离常数约小于 10^{-6} M。优选地,该抗体对CD25的解离常数(K_d)在 10^{-8} 或 10^{-9} 或 10^{-10} 或 10^{-11}

或 10^{-12} 或 10^{-13} 范围内或以下。最优选地,该抗体是以高亲和力结合至少一种活化性Fc γ 受体并且消耗肿瘤浸润性调节性T细胞的人类IgG1抗体。最优选地,抗CD25的特征在于与Fc γ 受体相关的其他特征,特别是:

[0023] (a) 以优于1的活化抑制率(A/I)结合Fc γ 受体;和/或

[0024] (b) 以比结合Fc γ RIIb更高的亲和力结合Fc γ RIIa。

[0025] 考虑到在治疗方法中使用抗CD25抗体,该抗CD25抗体可以呈现进一步优选的特征。抗CD25抗体优选是单克隆抗体,特别是人、嵌合或人源化抗体。抗体可以是其亲和力成熟的变体,任选地是7G7B6或MA251的人源化或亲和力成熟的变体。此外,鉴于抗CD25抗体与免疫细胞和/或免疫系统的其他组分相互作用以发挥其活性,与现有的抗人CD25临床抗体达利珠单抗和巴利昔单抗相比,抗CD25抗体可进一步引发增强的CDC、ADCC和/或ADCP反应,优选引发增加的ADCC和/或ADCP反应,更优选引发增加的ADCC反应。在一些实施方式中,与现有的抗人CD25临床抗体达利珠单抗和巴利昔单抗相比,抗CD25抗体可引起降低的CDC反应,更优选地,抗CD25抗体不引发CDC反应。

[0026] 本发明的抗CD25抗体(如上文一般性定义并且在具体实施方式中进一步详述的)可用于将所述抗CD25抗体给药至对象的治疗人类对象的方法。在一种实施方式中,对象患有癌症。优选地,对象患有确定的实体瘤(优选地,在进一步包括鉴定患有实体瘤的对象的步骤的方法中)。此类方法可以进一步包括将另外的治疗剂给药至所述对象。在一种实施方式中,所述另外的药剂可以是针对所述对象的免疫检查点抑制剂,例如以结合和抑制免疫检查点蛋白的抗体的形式。优选的免疫检查点抑制剂是PD-1拮抗剂,其可以是抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。更一般地,抗CD25抗体可用于消耗对象实体瘤中的调节性T细胞的方法,所述方法包括将所述抗CD25抗体给药至所述对象的步骤。

[0027] 在另一方面,本发明的抗CD25抗体可用于制备用于治疗人类对象的癌症的药物,优选其中所述对象患有肿瘤,优选实体瘤。所述抗体可以与另外的治疗剂,优选另外的癌症治疗剂组合给药,例如与免疫检查点抑制剂(优选PD-1/PD-L1途径拮抗剂)、癌症疫苗组合给药,和/或与标准的护理疗法(例如化疗或放疗)组合使用。

[0028] 在另一方面,本发明提供了用于治疗人类对象的癌症的如上定义的抗CD25抗体与另外的抗癌化合物(优选免疫检查点抑制剂或如具体实施方式中所示的其他化合物)的组合,优选其中所述对象患有实体瘤,并且所述抗癌化合物(例如,免疫检查点抑制剂(例如PD-1拮抗剂)或细胞因子(例如白细胞介素2))可以同时、分开或依次给药。在该范围内,本发明还提供了用于治疗癌症的试剂盒,所述试剂盒包含如上定义的抗CD25抗体和抗癌化合物(例如,免疫检查点抑制剂(例如PD-1拮抗剂))。

[0029] 在另一方面,本发明还提供了药物组合物,其包含在药学上可接受的介质中的如上定义的抗CD25抗体。此类组合物还可包含抗癌化合物(例如,免疫检查点抑制剂(例如PD-1拮抗剂))。

[0030] 在又一方面,本发明还提供了双特异性抗体,所述双特异性抗体包含:

[0031] (a) 与CD25结合的第一抗原结合部分;和

[0032] (b) 与另一种抗原结合的第二抗原结合部分;

[0033] 其中所述抗CD25抗体不抑制白细胞介素-2(IL-2)与CD25的结合,并且优选地,双特异性抗体是以高亲和力与至少一种活化性Fc γ 受体结合并且消耗肿瘤浸润性调节性T细

胞。优选地,这种第二抗原结合部分结合选自免疫检查点蛋白或肿瘤相关抗原的抗原,或者可以是或基于抗人活化Fc受体抗体(抗FcγRI、抗FcγRIIa、抗FcγRIII)或拮抗性抗人FcγRIIb抗体。因此,第二抗原结合部分可以结合FcγRIIb。它可以可供选择地与具有拮抗活性的FcγRI、FcγRIIa和/或FcγRIII结合。

[0034] 优选地,这种双特异性抗体包含结合免疫检查点蛋白的第二抗原结合部分,所述免疫检查点蛋白选自PD-1、CTLA-4、BTLA、KIR、LAG3、VISTA、TIGIT、TIM3、PD-L1、B7H3、B7H4、PD-L2、CD80、CD86、HVEM、LLT1、GAL9、GITR、OX40、CD137和ICOS。这种免疫检查点蛋白优选在肿瘤细胞上表达。优选地,免疫检查点蛋白选自PD-1、PD-L1和CTLA-4。结合免疫检查点蛋白的第二抗原结合部分可以被包含在作为免疫检查点抑制剂的市售抗体中,例如:

[0035] (a) 在PD-1的情况下,抗PD-1抗体可以是纳武单抗或派姆单抗。

[0036] (b) 在PD-L1的情况下,抗PD-L1是阿特珠单抗;

[0037] (c) 在CTLA-4的情况下,抗-CTLA-4是伊匹单抗。

[0038] 这种双特异性抗体可以任何商业上可获得的形式提供,包括Duobody、BiTE DART、CrossMab、Knobs-in-holes、Triomab、或其他合适的双特异性抗体及其片段的分子形式。

[0039] 可供选择地,此类双特异性抗体包含结合肿瘤相关抗原的第二抗原结合部分。在该可供选择的实施方式中,这些抗原和相应的抗体包括但不限于CD22(博纳吐单抗)、CD20(利妥昔单抗、托西莫单抗)、CD56(Lorvotuzumab)、CD66e/CEA(拉贝珠单抗)、CD152/CTLA-4(伊匹单抗)、CD221/IGF1R(MK-0646)、CD326/Epcam(依决洛单抗)、CD340/HER2(曲妥珠单抗、帕妥珠单抗)和EGFR(西妥昔单抗、帕尼单抗)。

[0040] 本发明的抗CD25抗体与另一种抗癌化合物以及如上定义的双特异性抗体的组合可用于治疗癌症的方法,所述方法包括将所述组合或所述双特异性抗体给药至对象的步骤,特别是当对象患有实体瘤时,并且用于治疗对象的癌症。

[0041] 具体实施方式和实施例中提供了本发明的进一步目的,包括本发明的抗人CD25抗体的进一步定义及其在治疗癌症的方法中、在药物组合物中、与其他抗癌化合物组合、在双特异性抗体中的用途。

具体实施方式

[0042] 本发明提供一种(优选当对象患有实体瘤时)治疗或预防对象的癌症的方法,该方法包括将结合CD25的抗体给药至所述对象,其中抗CD25抗体的特征在于这样的结构元件:所述结构元件允许结合CD25而不干扰白细胞介素2结合或通过CD25的信号传导并且有效地消耗Treg,特别是有效消耗肿瘤内的Treg。如本发明中所定义的结合CD25的抗体可用于治疗或预防癌症,优选实体瘤。可供选择地,本发明提供了结合CD25以及允许结合CD25而不干扰白细胞介素2与CD25的结合并有效地消耗Treg的抗体用于制备用于治疗或预防癌症(优选实体瘤)的药物的用途。本发明还提供了结合CD25以及允许结合CD25而实质上干扰白细胞介素2与CD25的结合并消耗Treg的抗体在治疗或预防癌症(优选实体瘤)中的用途。

[0043] 本发明人已经发现,可以使用抗CD25抗体靶向CD25,所述抗CD25抗体不抑制(或基本上不抑制)白细胞介素2与CD25的结合或IL-2通过CD25进行信号传导以在治疗环境中(例如在已形成的实体瘤中)消耗调节性T细胞。本发明人已经发现了,具有增强其与活化性Fcγ受体结合的同种型的非IL-2阻断性抗CD25抗体导致有效地消耗肿瘤浸润性调节性T细

胞,同时仍然允许最佳的Teff反应,即发现了一种例如可以与其他癌症靶向化合物(例如靶向免疫检查点蛋白质、肿瘤相关抗原、或抑制性Fc γ 受体的那些癌症靶向化合物)相关联(相组合或在双特异性抗体内相组合)的治疗方法。这些发现还使得可以将抗CD25抗体与白细胞介素-2以适当剂量的组合用于治疗癌症。

[0044] CD25是IL-2受体的 α 链,并且存在于活化的T细胞、调节性T细胞、活化的B细胞、一些NK T细胞、一些胸腺细胞、髓细胞前体和少突胶质细胞中。CD25与CD122和CD132结合形成异源三聚体复合物,其充当IL-2的高亲和力受体。人CD25的共有序列如下文SEQ ID NO:1所示(Uniprot登录号P01589;与第22至240个氨基酸对应的成熟人CD25的胞外域加下划线并以SEQ ID NO:2表示):

[0045]

10	20	30	40	50
MDSYLLMWGL	LTFIMVPGCQ	<u>AELCDDDPPE</u>	<u>IPHATFKAMA</u>	<u>YKEGTM LNCE</u>
60	70	80	90	100
<u>CKRGFFRIKS</u>	<u>GSLYMLCTGN</u>	<u>SSHSSWDNQC</u>	<u>QCTSSATRNT</u>	<u>TKQVTPQPEE</u>
110	120	130	140	150
<u>QKERKTTEMQ</u>	<u>SPMQPVDQAS</u>	<u>LPGHCREPPP</u>	<u>WENEATERIY</u>	<u>HFVVGQMVYY</u>
160	170	180	190	200
<u>QCVOGYRALH</u>	<u>RGPAESVCKM</u>	<u>THGKTRWTQP</u>	<u>QLICTGEMET</u>	<u>SQFPGEKPKQ</u>
210	220	230	240	250
<u>ASPEGRPESE</u>	<u>TSCLVTTTDF</u>	<u>QIQTEMAATM</u>	<u>ETSIFTTEYQ</u>	<u>VAVAGCVFLL</u>
260	270			
ISVLLLSGLT	WQRRQRKSRR	TI		

[0046] 如本文所用,“结合CD25的抗体”是指能够结合IL-2受体的CD25亚基的抗体。该亚基也称为IL-2受体的 α 亚基。这种抗体在本文中也称为“抗CD25抗体”。

[0047] 抗CD25抗体是能够特异性结合IL-2受体的CD25亚基(抗原)的抗体。“特异性结合(Specific binding/bind specifically/specifically bind)”应理解为意指抗体对于感兴趣的抗原的解离常数小于约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或 10^{-13} M。在优选的实施方式中,解离常数小于 10^{-8} M,例如在 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或 10^{-13} M的范围内。

[0048] 如本文所用,术语“抗体”是指完整的免疫球蛋白分子及其包含抗原结合位点的片段,并且包括多克隆、单克隆、基因工程化和其他修饰形式的抗体,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、异源偶联物和/或多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)和抗体的抗原结合片段,包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rlgG、多肽-Fc融合体、单链变体(scFv片段、VHH、**Trans-bodies®**、**Affibodies®**、鲨鱼单域抗体(shark single domain antibodies)、单链或串联双抗体(**TandAb®**)、VHH、**Anticalins®**、**Nanobodies®**、微抗体、**BiTE®**、双环肽和其他可供选择的免疫球蛋白支架)。在一些实施方式中,抗体可能缺乏如果抗体是天然产生的则会具有的共价修饰(例如,聚糖连接)。在一些实施方式中,抗体可以含有共价修饰(例如,聚糖连接、可检测部分、治疗性部分、催化性部分或提供改善的稳定性或抗体给药的其他化学基团,例如聚乙二醇)。在一些实施方式

中,抗体可以是掩蔽抗体(masked antibody)(例如,Probodies®)的形式。掩蔽抗体可包含阻断或“掩蔽”肽,所述阻断或“掩蔽”肽特异性结合抗体的抗原结合表面并干扰抗体的抗原结合。掩蔽肽通过可切割的接头(例如通过蛋白酶)与抗体连接。在所需的环境中(即在肿瘤环境中)选择性切割接头允许掩蔽/阻断肽解离,使得抗原结合在肿瘤中发生,从而限制潜在的毒性问题。“抗体”也可以指骆驼抗体(仅重链抗体)和抗体样分子(例如anticalins (Skerra (2008) FEBS J 275,2677-83))。在一些实施方式中,抗体是多克隆的或寡克隆的,其作为一组抗体产生,每个抗体与单个抗体序列相关并且结合抗原内的或多或少的不同的表位(例如与不同的参照抗人CD25抗体相关的人CD25胞外域内的不同表位)。如文献(Kearns JD et al.,2015.Mol Cancer Ther.14:1625-36)中所述,多克隆或寡克隆抗体可以提供于用于医学用途的单一制剂中。

[0049] 在本发明的一个方面,抗体是单克隆的。抗体可以另外地或可供选择地是人源化的或人的。在另一方面,抗体是人的,或在任何情况下是具有允许其在人类对象中使用和给药的形式和特征的抗体。在本发明的方面,抗体可以是亲和力成熟的7G7B6或MA251的人源化变体。亲和力成熟的抗体对CD25具有至少10%的亲和力和/或CDR序列与亲本序列(跨所有序列)的CDR至少80%相同,优选90%相同。亲和力成熟的抗体是在一个或多个CDR中具有一个或多个改变的氨基酸的抗体,其导致抗体与不具有改变的氨基酸的亲本株相比对CD25的亲和力改善。

[0050] 抗体(Abs)和免疫球蛋白(Igs)是具有相同结构特征的糖蛋白。免疫球蛋白可以来自任何类别,例如IgA、IgD、IgG、IgE或IgM。免疫球蛋白可以是诸如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄的任何亚类。在本发明的优选方面,抗CD25抗体来自IgG类,优选IgG1亚类。在一个方面,抗CD25抗体来自人IgG1亚类。可供选择地,在一个方面,抗CD25抗体来自人IgG2亚类。

[0051] IgG抗体的Fc区与几种细胞Fc γ 受体(Fc γ R)相互作用以刺激和调节下游效应子机制。有五种活化受体,即Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32a)、Fc γ RIIc (CD32c)、Fc γ RIIIA (CD16a)和Fc γ RIIb (CD16b),以及一种抑制性受体Fc γ RIIb (CD32b)。IgG抗体与免疫系统的通讯由Fc γ R控制和介导,Fc γ R将抗体感知和收集的信息传递给免疫系统,从而提供先天和适应性免疫系统之间的联系,尤其是在生物治疗的背景下(Hayes J et al., 2016.JInflamm Res 9:209-219)。

[0052] IgG亚类结合Fc γ R的能力不同,这种差异结合决定了它们引发一系列功能性反应的能力。例如,在人类中,Fc γ RIIIA是参与抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)活化的主要受体,IgG1紧接着IgG3显示出对该受体的最高亲和力,反映出它们有效诱导ADCC的能力。虽然已显示IgG2对该受体具有弱结合,但已发现具有人IgG2同种型的抗CD25抗体有效消耗Treg。

[0053] 在本发明的优选实施方式中,抗体以高亲和力结合Fc γ R,优选以高亲和力结合活化受体。优选地,抗体以高亲和力结合Fc γ RI和/或Fc γ RIIa和/或Fc γ RIIIA。在具体的实施方式中,抗体与至少一种活化性Fc γ 受体以小于约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M的解离常数结合。

[0054] 在一个方面,抗体是IgG1抗体,优选人IgG1抗体,其能够与至少一种Fc活化受体结合。例如,该抗体可与选自Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIA和Fc γ RIIb中的一种或多种受体结合。在一个方面,抗体能够与Fc γ RIIIA结合。在一个方面,抗体能够与Fc γ

RIIIA和Fc γ RIIA和任选的Fc γ RI结合。在一个方面,抗体能够以高亲和力与这些受体结合,例如以小于约 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M的解离常数结合。

[0055] 在一个方面,抗体以低亲和力结合抑制性受体Fc γ RIIb。在一个方面,抗体以高于约 10^{-7} M、高于约 10^{-6} M或高于约 10^{-5} M的解离常数结合Fc γ RIIb。

[0056] 在本发明的优选实施方式中,抗CD25抗体来自IgG1亚类,并且优选具有ADCC和/或ADCP活性,如本文所讨论的,特别是对于人源细胞具有ADCC和/或ADCP活性。如前所述(Nimmerjahn F et al., 2005. Science, 310:1510-2), mIgG2a同种型(其对应于人IgG1同种型)以高活化抑制率(A/I) (至少高于1) 与所有Fc γ R亚型结合。相比之下,其他同种型(例如rIgG1同种型) 仅以相似的亲和力与单一活化性Fc γ R (Fc γ RIII) 结合以及与抑制性Fc γ RIIb结合,导致A/I比低(<1)。这种较低的A/I比可以与较低的肿瘤内Treg消耗和较低的同种型抗肿瘤治疗活性相关。尽管已知人IgG2同种型抗体的Fc γ R结合谱,但用抗CD25抗体的人IgG2同种型也可实现显著的Treg消耗。因此,在一种实施方式中,抗CD25抗体来自IgG2亚类。

[0057] 在优选的实施方式中,如本文所述的抗CD25抗体结合人CD25,优选以高亲和力结合。仍优选地,抗CD25抗体与人CD25的胞外区结合,如上所示。在一个方面,本发明提供如本文所述的抗CD25抗体。特别地,实施例提供了由7D4杂交瘤分泌的抗体产生的实验数据。如本发明的背景技术所示,抗体对小鼠CD25具有特异性,如通过比较单克隆抗体组(包括PC61)所示,抗体与小鼠CD25中不同于IL-2结合位点的三个表位之一结合,并且不阻断IL-2与CD25的结合。例如,当相应的同种型相关联,已经显示7D4与小鼠CD25在[Uniprot序列P01590]中的包含氨基酸184至194(REHHRFLASEE)的表位上结合。文献(例如Setiady Y et al., 2010. Eur. J. Immunol. 40:780-6; McNeill A et al., 2007. Scand J Immunol. 65:63-9; Teege S et al., 2015, Sci Rep 5:8959)中涉及7D4和小鼠CD25的测定以及实施例中公开的那些测定包括包含7D4的CD25结合域的重组抗体或名为MA-251和7G7B6的非IL-2阻断性抗人CD25抗体,所述测定可以适用于表征那些识别人CD25的人抗体,所述人抗体在与CD25(特别是通过不阻断IL-2结合)和与Fc γ 受体(特别是通过优选结合人活化性Fc γ 受体的一种或多种以及有效消耗Treg)的相互作用水平上具有相同的7D4功能特征,如在实施例中所描述。

[0058] 在本发明的一个方面,抗体与抗体7G7B6竞争结合人CD25;和/或与抗体7G7B6识别的相同表位或表位结合。7G7B6是具有识别人CD25的小鼠IgG2a同种型的单克隆抗体。7G7B6包含具有以下序列的重链可变区:

[0059] EVQLVESGGDLVQPRGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVATINGYGDTTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYFCARDRDYGNSSYYYALDYWGQGTSVTVSS

[0060] (SEQ ID NO:3),

[0061] 以及具有以下序列的轻链可变区:

[0062] QIVLSQSPAILSASPGERVTMTCRASSSVSFMHWLQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVSARFSGSGSGTSYSLTITRVEAEDAATYYCQQWSSNPPAFGGGKLEIK

[0063] (SEQ ID NO:4)。

[0064] 在一种实施方式中,抗体包含重链和轻链,所述重链包含:氨基酸序列GFTLDSYGVS (SEQ ID NO:7)作为可变重链CDR1,氨基酸序列GVTSSGGSAYYADSV (SEQ ID NO:8)作为可变

重链CDR2,氨基酸序列DRYVYTGGYLYHYGMDL (SEQ ID NO:9) 作为可变重链CDR3;所述轻链包含:氨基酸序列RASQSISDYL (SEQ ID NO:11) 作为可变轻链CDR1,氨基酸序列YAASTLPF (SEQ ID NO:12) 作为可变轻链CDR2,氨基酸序列QGTYDSSDWYWA (SEQ ID NO:13) 作为可变轻链CDR3。抗体可以与7G7B6竞争结合人CD25。优选地,抗体包含重链和轻链,所述重链包含重链可变区,所述重链可变区包含以下序列:

[0065] EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTLDSYGVS~~WVRQAPGKGLEWVGVTSSGGSAYYADSVKGRFTI~~
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRYVYTGGYLYHYGMDLWGQGT~~LVTVSS~~

[0066] (SEQ ID NO:10),

[0067] 所述轻链包含轻链可变区,所述轻链可变区包含以下序列:

[0068] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISDYLAWYQQKPGKVPKLLIYA~~ASTLPFGVPSRFS~~SGSGSGT
DFTLTIS~~SLQPEDVATYYCQGT~~YDSSDWYWAFFGGGTKVEI

[0069] (SEQ ID NO:14)。

[0070] 在另一种实施方式中,抗体包含重链和轻链,所述重链包含:氨基酸序列SGFSVDIYDMS (SEQ ID NO:15) 作为可变重链CDR1,氨基酸序列YISSSLGATYYADSV (SEQ ID NO:16) 作为可变重链CDR2,氨基酸序列ERIYSVYTLDYAMD (SEQ ID NO:17) 作为可变重链CDR3,所述轻链包含:氨基酸序列QASQGITNNLN (SEQ ID NO:19) 作为可变轻链CDR1;氨基酸序列YAASTLQS (SEQ ID NO:20) 作为可变轻链CDR2,氨基酸序列QQGYTTSNVDNA (SEQ ID NO:21) 作为可变轻链CDR3。抗体可以与7G7B6竞争结合人CD25。优选地,抗体包含重链和轻链,所述重链包含重链可变区,所述重链可变区包含以下序列:

[0071] EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFSVDIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSSLGATYYADSVKGRFT
ISRDN~~SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR~~ERIYSVYTLDYAMD~~LWGQGT~~LVTVSS

[0072] (SEQ ID NO:18),

[0073] 所述轻链包含轻链可变区,所述轻链可变区包含以下序列:

[0074] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGITNNLNWYQQKPGKVPKLLIYA~~ASTLQSGVPSRFS~~SGSGSGT
DFTLTIS~~SLQPEDVATYYCQ~~QGYTTSNVDNAFFGGGTKVEIK

[0075] (SEQ ID NO:22)。

[0076] 在一种实施方式中,可以与7G7B6竞争结合人CD25的抗体包含重链和轻链,所述重链包含以下氨基酸序列:

[0077] EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEL VSTINGYGD~~TTYYPDSVKGR~~
FTISRDN~~SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA~~ RDRDYGNSY~~YYALDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO:23),或

[0078] EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEL VSTINGYGD~~TTYYPDSVKGR~~
FTISRDN~~AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCA~~ RDRDYGNSY~~YYALDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO:24);

[0079] 所述轻链包含以下氨基酸序列:

[0080] EIVLTQSPG~~TLSLSPGERATLS~~CRASSSV~~SFMHWLQQKPGQAPRPLIYA~~ TSNLASGIPDRFSGSGSG
TDYTLTISRLEPEDFAVYYCQ~~QWSSNPPAFGQGT~~ KLEIK (SEQ ID NO:25),或

[0081] QIVLTQSPG~~TLSLSPGERATLS~~CRASSSV~~SFMHWLQQKPGQSPRPLIYA~~ TSNLASGIPDRFSGSGSG
TDYTLTISRLEPEDFAVYYCQ~~QWSSNPPAFGQGT~~ KLEIK (SEQ ID NO:26)。

[0082] 在本发明的一个方面,抗体与抗体MA251竞争结合人CD25;和/或与抗体MA251识别的相同表位或表位结合。MA251是具有识别人CD25的小鼠同种型的单克隆抗体。MA251包含:

具有以下序列的重链可变区：

[0083] QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGIQWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNYNSALMSRLSI
SKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARAYGYDGSWLAYWGQGLTVTVSS

[0084] (SEQ ID NO:5)

[0085] 以及具有以下序列的轻链可变区：

[0086] QIVLSQSPAILASAPGEKVTMTCRASSSVSYMHYQQKPGSSPKPWIFATSNLASGVPARFSGSGSGTS
YSLTINRVEAEDADTYQCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK

[0087] (SEQ ID NO:6)。

[0088] 在一种实施方式中,可以与MA251竞争结合人CD25的抗体包含重链和轻链,所述重链包含重链可变区,所述重链可变区包含以下氨基酸序列：

[0089] QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFSLTSYGIQWVRQAPGKGLE WVSVIWAGGSTNYNSALMSRF
TISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARAYGYDGSWLAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:27)；

[0090] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGIQWVRQPPGKGLEWI GVIWAGGSTNYNSALMSRV
TISKDNSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA YGYDGSWLAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:28)；或

[0091] QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFSLTSYGIQWVRQAPGKGLE WVSVIWAGGSTNYNSALMSRF
TISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARAYGYDGSWLAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:29)；

[0092] 所述轻链包含轻链可变区,所述轻链可变区包含以下氨基酸序列：

[0093] QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHYQQKPGQAPRPLIF ATSNLASGIPARFSGSGSG
TDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:30)；

[0094] QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHYQQKPGQAPRPLIF ATSNLASGIPARFSGSGSG
TDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:31)；

[0095] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIF ATSNLASGVPSRFSGSGSG
TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:32)；或

[0096] QIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKSPKPLIFA TSNLASGVPSRFSGSGSG
TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO:33)。

[0097] 在一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区；在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:28的氨基

酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区。在另一种实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:33。

[0098] 在一个方面,抗体与抗体7G7B6和抗体MA251竞争结合人CD25。在一个方面,抗体结合被7G7B6识别并被MA251识别的相同表位。

[0099] 可以测量7G7B6抗体或MA251抗体与另外的抗体之间的竞争,例如如实施例中所讨论和本领域已知的。在一些实施方式中,通过将另外的抗体添加至测定中并测量7G7B6或MA251抗体与人CD25之间的相互作用来确定两种抗体(例如7G7B6或MA251与另外的抗体)之间的竞争。一种这样的测定是基于Octet的测定,在该测定中确定7G7B6或MA251抗体、另外的抗体与重组人CD25的同时结合。如果检测到两种抗体与重组人CD25的结合,则抗体是非竞争性的。可供选择地,一种这样的测定是酶联免疫吸附测定(ELISA),在该测定中检测7G7B6或MA251抗体与重组人CD25的结合。如果观察到的信号在加入另外的抗体后降低(例如降低至少75%),则后一种抗体是7G7B6或MA251抗体的竞争者。还可以使用流式细胞术检测7G7B6或MA251抗体和另外的抗体与人CD25表达细胞的同时结合。

[0100] 在一个方面,本发明提供了与人CD25表位特异性结合的抗CD25抗体,其中该表位包含来自选自SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)、SEQ ID NO:1的第166至186个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQPQLICTG)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)、SEQ ID NO:1的第70至88个氨基酸(NSSHSSWDNQCQCTSSATR)的氨基酸区段的一个或多个中的一个或多个氨基酸残基。优选地,该表位包含来自选择的氨基酸区段的至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或更多个残基。更优选地,该表位包含选自以下的序列:SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA),SEQ ID NO:1的第176至180个氨基酸(RWTQP),SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTM LNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸(SSWDNQCQCTS)及其组合。这些表位不同于人CD25中的IL-2结合位点,并且如实施例中所述,与这种表位结合的抗体不阻断IL-2与CD25的结合。

[0101] 在优选的实施方式中,治疗患有癌症的人类对象的方法包括将本发明的抗CD25抗体给药至对象的步骤,其中所述对象优选患有实体瘤,并且其中抗CD25抗体优选是不抑制白细胞介素2与CD25的结合并且以高亲和力与选自Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIc (CD32c)和Fc γ RIIIa (CD16a)中的至少一种结合并且消耗肿瘤浸润性调节性T细胞的人IgG1抗体。优选地,抗CD25抗体对CD25的解离常数(K_d)小于 10^{-7} M,优选小于 10^{-8} M。更优选地,抗CD25抗体结合人CD25,提供对IL-2结合和Treg消耗的影响,类似于7D4对小鼠CD25的作用或7G7B6和MA251对人CD25的影响。在进一步的实施方式中,抗CD25抗体与Fc γ 受体以高于1的活化抑制率(A/

I) 结合和/或以比与Fc γ RIIb (CD32b) 结合更高的亲和力与Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIC (CD32c)、Fc γ RIIC (CD32c)、Fc γ RIIC (CD16a) 和/或Fc γ RIIC (CD32a) 结合。

[0102] 7D4抗体的CD25结合域已被克隆并表达为与适当恒定区融合的重组蛋白。7D4抗体的CD25结合域的序列、以及其对CD25的胞外域内的不同表位的特异性和/或其它功能活性可用于比较通过任何适当技术产生和筛选的候选抗CD25抗体(通过从CD25免疫的啮齿动物培养杂交瘤组或产生重组抗体文库,然后用CD25片段筛选这些抗体库以如本文所述地在功能上表征)。由此鉴定的抗CD25抗体也可以作为重组抗体产生,特别是作为完整抗体或作为本文所述的片段或变体产生。

[0103] 天然抗体和免疫球蛋白通常是约150000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成。每条重链在氨基末端具有可变域(V_H),随后是多个恒定域。每条轻链在氨基末端具有可变域(V_L),在羧基末端具有恒定域。

[0104] 可变区能够与结构互补的抗原靶标相互作用,并且其特征在于来自不同抗原特异性的抗体的氨基酸序列的差异。H链或L链的可变区含有能够与抗原靶标特异性结合的氨基酸序列。在这些序列中是被称为“高变”的较小的序列,这是因为它们在不同特异性的抗体之间具有极大的可变性。这种高变区也称为“互补决定区”或“CDR”区。

[0105] 这些CDR区解释了抗体的特定抗原决定簇结构的基本特异性。CDR代表可变区内不连续的氨基酸区段,但是,无论何种种类,已发现可变重链和轻链区内这些关键氨基酸序列的位置性定位在可变链的氨基酸序列内具有相似的定位。所有抗体的可变重链和轻链各自具有3个CDR区,对于轻链(L)和重链(H),每个CDR区不连续(称为L1、L2、L3、H1、H2、H3)。先前已经描述了接受的CDR区(Kabat et al., 1977. J Biol Chem 252, 6609-6616)。

[0106] 本发明的抗体可通过补体依赖性细胞毒作用(CDC)和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)以及允许靶向、阻断增殖和/或消耗Treg细胞的任何其他机制起作用。

[0107] “补体依赖性细胞毒作用”(CDC)是指在补体存在下本发明抗体对表达抗原的细胞的裂解。

[0108] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用”(ADCC)是指一种细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体从而导致靶细胞裂解。

[0109] “抗体依赖性细胞介导的吞噬作用”(ADCP)是指一种细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的吞噬细胞(例如巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体从而导致对靶细胞的吞噬作用。

[0110] CDC、ADCC和ADCP可以使用本领域已知并可用的测定方法(Clynes et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-6)来测量,如实施例中所讨论的。抗体的恒定区在抗体固定补体和介导细胞依赖性细胞毒作用和吞噬作用的能力中是重要的。因此,如本文所讨论的,可以基于抗体是否需要介导细胞毒作用/吞噬作用来选择抗体的同种型。

[0111] 如本文所讨论的,在本发明的一种实施方式中,使用不抑制白细胞介素2结合并导致Treg细胞消耗的抗CD25抗体。例如,可以使用不抑制白细胞介素2与CD25结合并且引发强CDC应答和/或强ADCC和/或强ADCP应答的抗CD25抗体。增加CDC、ADCC和/或ADCP的方法是本领域已知的。例如,CDC应答可以伴随抗体中增加C1q结合亲和力的突变而增加(Idusogie

et al. (2001) J Immunol 166,2571-5)。

[0112] 本文中提及的“不抑制白细胞介素-2与CD25的结合”也可表达为抗CD25抗体是非IL-2阻断性抗体或“非阻断性”抗体(关于在抗CD25抗体存在下不阻断IL-2与CD25的结合),即抗体不阻断白细胞介素-2与CD25的结合,特别是不抑制表达CD25的细胞中的白细胞介素-2信号传导。提及“非阻断性”“非IL2阻断性”、“不阻断”或“无阻断”等(关于抗CD25抗体存在下IL-2与CD25结合的非阻断性)包括其中本发明的抗CD25抗体不通过CD25阻断IL-2信号传导的实施方式。也就是说,与不存在抗体时的IL-2信号传导相比,抗CD25抗体抑制小于50%的IL-2信号传导。在如本文所述的本发明的具体实施方式中,与不存在抗体时的IL-2信号传导相比,抗CD25抗体抑制IL-2信号传导少于约40%、35%、30%,优选少于约25%。抗CD25非IL-2阻断性抗体允许与CD25结合而不干扰IL-2与CD25的结合,或基本上不干扰IL-2与CD25的结合。本文提及的非IL-2阻断性抗体也可表达为“不抑制白细胞介素-2与CD25的结合”的抗CD25抗体或表达为“不抑制IL-2的信号传导”的抗CD25抗体。

[0113] 一些抗CD25抗体可以允许IL-2与CD25结合,但仍然阻断通过CD25受体的信号传导。这种抗CD25抗体不在本发明的范围内。相反,与不存在抗CD25抗体时的信号传导相比,非IL-2阻断性抗CD25抗体允许IL-2与CD25结合以促进至少50%的通过CD25受体信号传导水平。

[0114] 通过CD25的IL-2信号传导可以通过实施例中讨论的和本领域已知的方法测量。在存在和不存在抗CD25抗体剂的情况下IL-2信号传导的比较可以在相同或基本相同的条件下进行。

[0115] 在一些实施方式中,可以通过使用标准Stat-5磷酸化测定来测量细胞中磷酸化STAT5蛋白的水平以确定IL-2信号传导。例如,用于测量IL-2信号传导的Stat-5磷酸化测定可以包括在10ug/ml的浓度的抗CD25抗体存在下培养PMBC细胞30分钟,然后添加不同浓度的IL-2(例如10U/ml或不同的浓度0.25U/ml、0.74U/ml、2.22U/ml、6.66U/ml或20U/ml)10分钟。然后可以使细胞透化,然后可以用抗磷酸化STAT5肽的荧光标记抗体来测量STAT5蛋白的水平,所述磷酸化STAT5肽通过流式细胞术分析。阻断IL-2信号传导的百分比可以如下计算: $\% \text{阻断} = 100 \times [(\% \text{Stat5}^+ \text{细胞无抗体组} - \% \text{Stat5}^+ \text{细胞10ug/ml抗体组}) / (\% \text{Stat5}^+ \text{细胞无抗体组})]$ 。

[0116] ADCC可以通过从抗体聚糖中消除岩藻糖部分的方法来增加,例如通过在YB2/0细胞系中产生抗体,或者通过在人IgG1的Fc部分上引入特定突变(例如S298A/E333A/K334A、S239D/I332E/A330L/G236A/S239D/A330L/I332E)(Lazar et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103,2005-2010;Smith et al. (2012) Proc Natl Acad Sci USA 109,6181-6)。ADCP也可以通过在人IgG1的Fc部分上引入特定突变来增加(Richards et al. (2008) Mol Cancer Ther 7,2517-27)。

[0117] 在本发明的优选实施方式中,抗体被优化以引发ADCC应答,也就是说相对于其它抗CD25抗体,包括不抑制白细胞介素2与CD25结合的那些抗体,例如未修饰的抗CD25单克隆抗体,ADCC反应增强、增加或改善。

[0118] 在本发明的优选实施方式中,抗体被优化以引发ADCP反应,也就是说相对于其他抗CD25抗体,包括不抑制白细胞介素2与CD25结合的那些抗体,例如未修饰的抗CD25单克隆抗体,ADCP反应增强、增加或改善。

[0119] 如本文所用,“嵌合抗体”可以指具有衍生自来自一种物种(例如大鼠或小鼠抗体)的免疫球蛋白的可变序列和来自另一物种(例如来自人抗体)的免疫球蛋白恒定区的抗体。在一些实施方式中,嵌合抗体可以具有被增强以用于诱导ADCC的恒定区。

[0120] 根据本发明的抗体也可以是部分或全部合成的,其中抗体的至少部分多肽链是合成的,并且可能被优化以用于与其同源抗原结合。此类抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体,并且可以是完整的四聚体结构,或可以是二聚体并且仅包含单个重链和单个轻链。

[0121] 本发明的抗体也可以是单克隆抗体。如本文所用,“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指衍生自单个克隆的抗体,包括任何真核、原核或噬菌体克隆,而不是产生它的方法。

[0122] 本发明的抗体也可以是人抗体。如本文所用,“人抗体”是指具有可变区域的抗体,其中框架区和CDR区均源自人种系免疫球蛋白序列。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区也衍生自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变)。

[0123] 具有本文所述特征的抗CD25抗体代表本发明的另一个目的。抗CD25抗体可用于医学中。在另一种实施方式中,本发明提供了治疗对象的疾病的方法,包括给药不抑制白细胞介素-2(IL-2)与CD25的结合或通过CD25的IL-2信号传导的抗CD25抗体。优选地,该疾病是癌症,特别是用于治疗实体瘤。

[0124] 在另一种实施方式中,本发明提供了编码如本文所定义的抗CD25抗体的核酸分子。在一些实施方式中,此类提供的核酸分子可含有密码子优化的核酸序列和/或可被包含在用于在宿主细胞(例如细菌、酵母、昆虫、鱼、鼠、猿猴或人细胞)中表达的适当核酸载体内的表达盒中。在一些实施方式中,本发明提供了包含表达所需抗体的异源核酸分子(例如DNA载体)的宿主细胞。

[0125] 在一些实施方式中,本发明提供了制备如上定义的分选的抗CD25抗体的方法。在一些实施方式中,此类方法可包括培养包含核酸的宿主细胞(例如,可通过载体被包含在和/或递送至宿主细胞的异源核酸)。优选地,准备和构建宿主细胞(和/或异源核酸序列),使得抗体或其抗原结合片段或变体从宿主细胞分泌并从细胞培养物上清液中分离。

[0126] 本发明的抗体可以是单特异性的、双特异性的或多特异性的。“多特异性抗体”可以对一种靶抗原或多肽的不同表位具有特异性,或者可以含有对多于一种靶抗原或多肽特异的抗原结合域(Kufer et al. (2004) Trends Biotechnol 22,238-44)。

[0127] 在本发明的一个方面,抗体是单特异性抗体。如下文进一步讨论的,在另一个方面,抗体是双特异性抗体。

[0128] 如本文所用,“双特异性抗体”是指具有与单个抗原或多肽上或两个不同抗原或多肽上的两个不同表位结合的能力的抗体。

[0129] 如本文所讨论的本发明的双特异性抗体可以通过以下方法产生:生物学方法,例如体细胞杂交;或遗传方法,例如在细胞系或生物体中表达编码所需抗体结构的非天然DNA序列;化学方法(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或以其他方式与一种或多种分子实体,例如另一种抗体或抗体片段结合);或其组合。

[0130] 允许产生单特异性或双特异性的技术和产品是本领域已知的,如文献中广泛综述

的,还涉及可供选择的形式、抗体-药物缀合物、抗体设计方法、体外筛选方法、恒定区、翻译后修饰和化学修饰、用于触发癌细胞死亡的改进特征,如Fc工程化(Tiller K and Tessier P,2015Annu Rev Biomed Eng.17:191-216;Speiss C et al.,2015.Molecular Immunology 67 95-106;Weiner G,2015.Nat Rev Cancer,15:361-370;Fan G et al.,2015.J Hematol Oncol 8:130)。这种双特异性抗体可以任何商业上可获得的形式提供,包括Duobody、BiTE DART、CrossMab、Knobs-in-holes、Triomab、或其他合适的分子形式及其片段。

[0131] 如本文所用,“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上抗体所结合的位点。如本领域众所周知的,表位可以由连续氨基酸(线性表位)或由蛋白质的三级折叠并列的非连续氨基酸(构象表位)形成。由连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时通常保持,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丧失。表位通常包含独特空间构象中的至少3个,更通常至少5个或8至10个氨基酸。确定表位空间构象的方法是本领域熟知的,包括例如x射线晶体学和2-D核磁共振。参见,例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,Vol.66,Glenn E.Morris,Ed(1996)。例如,本发明的抗体可以识别抗体7G7B6或MA251所结合的构象表位。在一种实施方式中,构象表位包含选自SEQ ID NO:1的第150至158个氨基酸(YQCVQGYRA),SEQ ID NO:1的第176至180个氨基酸(RWTQP)、SEQ ID NO:1的第42至56个氨基酸(KEGTMLNCECKRGFR)和SEQ ID NO:1的第74至84个氨基酸(SSWDNQCQCTS)中的至少两个序列。

[0132] 在一些实施方式中,抗CD25抗体可以被包含在药剂中,所述药剂还包含缀合的有效负载(例如治疗剂或诊断剂),所述有效负载特别用于癌症治疗或诊断。可以使用具有放射性核素或毒素的抗CD25抗体缀合物。常用的放射性核素的实例是,例如⁹⁰Y、¹³¹I和⁶⁷Cu等,常用的毒素的实例是多柔比星和加利车霉素。在进一步的实施方式中,可以修饰抗CD25抗体以具有改变的半衰期。实现改变的半衰期的方法是本领域已知的。在一些实施方式中,抗CD25抗体不与另一种治疗剂或诊断剂缀合。特别地,在一些实施方式中,抗CD25抗体不与放射性核素缀合,即在一些实施方式中,抗CD25抗体未进行放射性标记。

[0133] 在本发明的一个优选实施方式中,如本文所述的本发明任何方面的对象是哺乳动物,优选猫、狗、马、驴、绵羊、猪、山羊、牛、仓鼠、小鼠、大鼠、兔或豚鼠,但对象最优选是人。因此,在本文所述的本发明的所有方面中,对象优选是人。

[0134] 如本文所用,术语“癌症”、“癌性”或“恶性”是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。

[0135] 癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、白血病、胚细胞瘤和肉瘤。这类癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、肝细胞癌(HCC)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性髓性白血病(AML)、多种骨髓瘤、胃肠(道)癌、肾癌、卵巢癌、肝脏癌、淋巴母细胞白血病、淋巴细胞白血病、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑色素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌和头颈癌。

[0136] 在一个方面,癌症涉及实体瘤。实体瘤的实例是肉瘤(包括由组织(例如松质骨、软骨、脂肪、肌肉、血管、造血细胞或纤维结缔组织)中的间充质来源的转化细胞产生的癌症)、癌(包括由上皮细胞产生的肿瘤)、间皮瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤等。涉及实体瘤

的癌症包括但不限于,脑癌、肺癌、胃癌、十二指肠癌、食道癌、乳腺癌、结肠和直肠癌、肾癌、膀胱癌、肾脏癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、口腔癌、肉瘤、眼癌、甲状腺癌、尿道癌、阴道癌、颈癌、淋巴瘤等。

[0137] 在一个方面,癌症涉及表达CD25的肿瘤,包括但不限于淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤和淋巴细胞性白血病,例如慢性淋巴细胞白血病 (CLL)。

[0138] 在本发明的一个方面,癌症通过特定肿瘤相关标志物和抗原 (例如CD20、HER2、PD-1、PD-L1、SLAMF7、CD47、CD137、CD134、TIM3、CD25、GITR、CD25、EGFR等) 的存在来鉴定,或癌症是已被鉴定为具有被称为微卫星不稳定性高 (MSI-H) 或错配修复缺陷 (dMMR) 的生物标志物的癌症。此外,当特定肿瘤相关标志物、抗原或生物标志物的鉴定被用于定义患者的上述癌症 (例如原位癌、阴燃骨髓瘤、意义不明的单克隆丙种球蛋白病、宫颈上皮内瘤变、MAL Tomas/GALTomes和各种淋巴组织增生性疾病) 的癌前、非侵入状态时,可以使用抗体。优选地,在一些实施方式中,所治疗的对象患有实体瘤。

[0139] 在本发明的一个方面,癌症选自黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾癌、卵巢癌、膀胱癌、肉瘤和结肠癌。在本发明的优选方面,癌症选自黑色素瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌和肾癌。在一种实施方式中,癌症不是黑色素瘤、卵巢癌或乳腺癌。在优选的方面,癌症是肉瘤、结肠癌、黑色素瘤或结肠直肠癌,或更一般地,是其中4T1、MCA205、B16、CT26或MC38细胞系可代表用于验证可用于其治疗管理的化合物的临床前模型的任何人类癌症。

[0140] 如本文所用,术语“肿瘤”适用于被诊断出或被怀疑患有肿瘤的对象,癌症是指任何大小的恶性或潜在恶性赘生物或组织肿块,并且包括原发性肿瘤和继发性赘生物。术语“癌症”、“恶性肿瘤”、“赘生物”、“肿瘤”和“癌症”在本文中也可互换使用,指的是表现出相对异常、不受控制和/或自主生长的肿瘤和肿瘤细胞,因此它们表现出以显著丧失对细胞增殖的控制为特征的异常生长表型。通常,用于检测或治疗的目的细胞包括癌前 (例如良性)、恶性、转移前、转移和非转移细胞。

[0141] 如本文所用,“实体瘤”是组织的异常生长或肿块,其通常不包含囊肿或液体区域,特别是除白血病或非实体淋巴瘤之外的肿瘤和/或转移 (无论位于何处)。实体瘤可以是良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型和/或它们所在的组织或器官命名。实体瘤的实例是肉瘤 (包括从组织 (例如松质骨、软骨、脂肪、肌肉、血管、造血细胞或纤维结缔组织) 中的间充质来源的转化细胞产生的癌症,)、癌 (包括来自上皮细胞的肿瘤)、黑色素瘤、淋巴瘤、间皮瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0142] 根据本发明的特别优选的癌症包括以实体瘤的存在为特征的癌症,即对象不患有非实体瘤。在如本文所讨论的本发明的所有方面中,优选癌症是实体瘤,即对象患有实体瘤 (并且不患有非实体瘤)。

[0143] 本文所用的“治疗 (treat/treating)”癌症的定义限定了实现至少一种阳性治疗效果,例如癌细胞数量减少、肿瘤尺寸减小、癌细胞浸润到外周器官中的速度降低或肿瘤转移或肿瘤生长的速度减少。

[0144] 癌症的积极治疗效果可以以许多方式测量 (例如Weber (2009) J Nucl Med 50, 1S-10S)。举例来说,就肿瘤生长抑制而言,根据美国国家癌症研究所 (NCI) 标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$ 被认为是高抗肿瘤活性水平,其中 $T/C (\%) = \text{治疗组中位肿瘤体积} / \text{对照组中位肿瘤体积} \times 100$ 。在一些实施方式中,治疗有效量所实现的治疗是无

进展存活 (PFS)、无病存活 (DFS) 或总存活 (OS) 中的任何一种。PFS, 也称为“到肿瘤进展的时间”表示治疗期间和之后癌症不生长的时间长度, 包括患者经历完全反应或部分反应的时间量, 以及患者经历稳定疾病的时间量。DFS是指治疗期间和之后患者保持无疾病的时间长度。OS是指与原始的或未经治疗的个体或患者相比预期寿命的延长。

[0145] 本文所用的“预防”(或预防法)是指延迟或预防癌症症状的发作。预防可能是绝对的(由此不会发生疾病)或仅在某些个体中或有限的时间内有效。

[0146] 在本发明的优选方面, 对象患有已形成的肿瘤, 即为已经患有肿瘤(例如被分类为实体瘤的肿瘤)的对象。因此, 当对象已经患有肿瘤(例如实体瘤)时, 可以使用如本文所述的发明。因此, 本发明提供了可用于治疗现存肿瘤的治疗选择。在本发明的一个方面, 对象具有现存实体瘤。本发明可用作对已经患有实体瘤的对象的预防, 或优选用作对已经患有实体瘤的对象的的治疗。在一个方面, 本发明不用作预防或预防法。

[0147] 在一个方面, 使用如本文所述的本发明, 例如与其他癌症治疗相比(例如对给定癌症的标准护理治疗), 肿瘤消退可以增强, 肿瘤增长可以受损或减少, 和/或存活时间可以增加。

[0148] 在本发明的一个方面, 如本文所述的治疗或预防癌症的方法还包括鉴定患有癌症的对象的步骤, 优选鉴定患有肿瘤(例如实体瘤)的对象的步骤。在一种实施方式中, 该方法可包括鉴定患有血液学癌症的对象。

[0149] 本文所述的有效治疗癌症患者的疗法的剂量方案可根据诸如疾病状态、年龄和患者体重等因素以及治疗引起对象的抗癌反应的能力而变化。适当剂量的选择在本领域技术人员的能力范围内。例如0.01、0.1、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50mg/kg。在一些实施方式中, 这样的量是适合于根据已被确定为当给药至相关群体时与期望的或有益的结果相关的给药方案(即治疗给药方案)来给药的单位剂量(或其整个部分)。

[0150] 如本文所述的根据本发明任一方面的抗体可以是药物组合物的形式, 其另外包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。这些组合物包括例如液体、半固体和固体剂型, 例如液体溶液(例如可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮液、片剂、丸剂或脂质体。在一些实施方式中, 优选形式可取决于预期的给药方式和/或治疗应用。含有抗体的药物组合物可以通过本领域已知的任何适当方法给药, 包括但不限于口服、粘膜、吸入、局部、口腔、鼻腔、直肠或肠胃外(例如静脉内、输注、肿瘤内、结内、皮下、腹膜内、肌肉内、皮内、透皮或其他种类的涉及物理突破对象组织的给药和通过组织中突破用药物组合物给药)。这种制剂可以是, 例如, 适用于皮内、肿瘤内或皮下给药或用于静脉内输注的可注射或可输注溶液的形式。给药可以涉及间歇给药。或者, 给药可以涉及连续给药(例如灌注)至少选定的一段时间, 与给药其他化合物同时或在给药其他化合物之间。

[0151] 在一些实施方式中, 抗体可以用保护其免于快速释放和/或降解的载体制备, 例如控释制剂, 例如植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。可以使用可生物可降解的、生物可相容的聚合物。

[0152] 例如, 本领域技术人员将理解, 递送途径(例如, 口服相比静脉内相比皮下相比肿瘤内等)可影响剂量和/或所需剂量可影响递送途径。例如, 在关注具体部位或位置(例如, 肿瘤内)中的特定高浓度的药剂的情况下, 聚焦递送可能是需要的和/或有用的(例如, 在该实例中为肿瘤内递送)。在优化给定治疗方案的途径和/或给药方案时要考虑的其他因素可

包括,例如,待治疗的具体癌症(例如类型、阶段、位置等)、对象的临床状况(例如年龄、整体健康等)、是否存在组合治疗、以及医生所知的其他因素。

[0153] 药物组合物通常应在制造和储存条件下无菌且稳定。该组合物可以配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或适于高药物浓度的其他有序结构。无菌可注射溶液可以通过将所需量的抗体与上文列举的成分中的一种或组合掺入适当的溶剂中,然后根据需要过滤灭菌来制备。用于肠胃外给药的制剂包括但不限于本文所述的悬浮液、溶液、油性或水性载体中的乳液、糊剂和可植入的缓释或生物可降解的制剂。可以使用无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂制备无菌可注射制剂。根据本发明使用的每种药物组合物可包括药学上可接受的分散剂、润湿剂、悬浮剂、等渗剂、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂,载体、赋形剂、盐或稳定剂在使用的剂量和浓度下对对象无毒。优选地,这样的组合物可以进一步包含用于治疗癌症的药学上可接受的载体或赋形剂,所述载体或赋形剂与给定的方法和/或给药部位相容,例如用于肠胃外(例如皮下、皮内或静脉内)、肿瘤内或肿瘤周围给药。

[0154] 虽然根据本发明使用的治疗方法或组合物的实施方式可能不能有效地在每个对象中获得积极的治疗效果,但是它应该在使用如下的药物组合物和给药方案中获得积极的治疗效果,所述药物组合物和给药方案与良好的医疗实践和如通过本领域已知的任何统计学检验确定的统计学显著的对象数量相一致,所述统计学检验例如Student's t检验、 χ^2 -test、根据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验。

[0155] 在上文中以及随后提及肿瘤、肿瘤疾病、癌或癌症的情况下,无论肿瘤和/或转移的位置如何,也可以替代地或另外地暗示原始器官或组织中和/或任何其他位置中的转移。

[0156] 如本文所讨论的,本发明涉及消耗调节性T细胞(Treg)。因此,在本发明的一个方面,不抑制白细胞介素2与CD25的结合的抗CD25抗体也消耗或减少肿瘤浸润性调节性T细胞。在一个方面,消耗是通过ADCC。在另一方面,消耗是通过ADCP。

[0157] 这样,本发明提供用于消耗对象肿瘤中的调节性T细胞的方法,包括将不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体给药至对象。在优选的实施方式中,Treg消耗实体瘤。“消耗”是指相对于不给药不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体时,Treg的比例或百分比降低。在如本文所述的本发明的特定实施方式中,超过肿瘤浸润性调节性T细胞的约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或99%被消耗。

[0158] 如本文所用,“调节性T细胞”(“Treg/Treg细胞/Treg”)是指专门控制自身免疫、变态反应和感染的CD4⁺T淋巴细胞谱系。通常,它们调节T细胞群的活性,但它们也可以影响某些先天免疫系统细胞类型。通常通过生物标志物CD4、CD25和Foxp3的表达来鉴定Treg。天然存在的Treg细胞通常占外周CD4⁺T淋巴细胞的约5至10%。然而,在肿瘤微环境(即肿瘤浸润性Treg细胞)内,它们可占总CD4⁺T淋巴细胞群的20至30%。

[0159] 活化的人Treg细胞可通过穿孔因子或颗粒酶B依赖性途径直接杀死靶细胞,如效应T细胞和APC;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4⁺) Treg细胞通过APC来诱导吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)表达,这些转通过减少色氨酸抑制T细胞活化;Treg细胞可以在体内释放白细胞介素-10(IL-10)和转化生长因子(TGF β),从而通过抑制MHC分子、CD80、CD86和IL-12的表达来直接抑制T细胞活化并抑制APC功能。Treg细胞还可以通过表达高水平的CTLA4来抑制免疫,CTLA4可以与抗原呈递细胞上的CD80和CD86结合并阻止效应T细胞的正确活

化。

[0160] 在本发明的优选实施方式中,实体瘤中效应T细胞与调节性T细胞的比例增加。在一些实施方式中,实体肿瘤中效应T细胞与调节性T细胞的比例增加至超过5、10、15、20、40或80。

[0161] 免疫效应细胞是指参与免疫应答的效应阶段的免疫细胞。示例性免疫细胞包括髓样或淋巴样细胞,例如淋巴细胞(例如,B细胞和包括细胞溶解性T细胞(CTL)的T细胞)、杀伤细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。

[0162] 参与免疫应答的效应阶段的免疫效应细胞表达特异性Fc受体并实现特异性免疫功能。效应细胞可以诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC),例如能够诱导ADCC的嗜中性粒细胞。例如,表达Fc α R的单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞参与靶细胞的特异性杀伤并将抗原呈递给免疫系统的其他组分或与呈递抗原的细胞结合。效应细胞还可以吞噬靶抗原、靶细胞或微生物。如本文所讨论的,可以针对诱导ADCC的能力优化根据本发明的抗体。

[0163] 在一些实施方式中,抗癌的不同药剂可以通过相同或不同的递送途径和/或根据不同的方案与抗体组合给药。可供选择的或另外的,在一些实施方式中,一种或多种剂量的第一活性剂与一种或多种其它活性剂基本上同时给药,并且在一些实施方式中,通过共同途径和/或作为单一组合物的一部分与一种或多种其它活性剂基本上同时给药。本领域技术人员将进一步理解,根据本发明提供的组合疗法的一些实施方式实现协同效应;在—些这样的实施方式中,组合中使用的一种或多种药剂的剂量可以实质地不同(例如,更低)和/或在药剂用于不同的治疗方案时(例如,作为单一疗法和/或作为不同组合疗法的一部分),可以通过替代的而不是标准的、优选的或必需的途径递送。

[0164] 在一些实施方式中,当根据本发明使用两种或更多种活性剂时,这些活性剂可以同时或顺序给药。在一些实施方式中,一种药剂的给药相对于另一种药剂的给药特别是定时的。例如,在一些实施方式中,给药第一药剂以便观察到特定效果(或预期观察到特定效果,例如基于显示给定给药方案与感兴趣的特定效应之间的相关性的群体研究)。在—些实施方式中,组合给药的药剂的所需相对给药方案可以例如使用离体、体内和/或体外模型凭经验评估或确定;在—些实施方式中,此类评估或经验确定在体内,在患者群体中进行(例如,以便建立相关性),或在特定的感兴趣患者中进行。

[0165] 在本发明的另一个方面,当与免疫检查点抑制剂组合时,不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体具有改善的治疗效果。使用不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和免疫检查点抑制剂的组合疗法可以在治疗已形成的肿瘤中具有协同效应。本实施例关于PD-1/PD-L1的数据涉及干扰PD-1/PD-L1相互作用。因此,PD-1受体和PD-L1配体之间的相互作用可能被阻断,导致“PD-1阻断”。在一个方面,例如与抗CD25抗体或PD-1/PD-L1阻断(直接使用抗PD1抗体,或间接使用抗PD-L1抗体)相比,使用本文所述的本发明,该组合可以导致增强的肿瘤消退,肿瘤生长受损或减少,和/或可以使存活时间延长。当由于抗CD25抗体不抑制白细胞介素2与CD25的结合时,与抗CD25抗体和免疫检查点抑制剂的组合疗法还可以进一步包括以适合于治疗癌症的剂量给药白细胞介素-2。

[0166] 如本文所用,“免疫检查点”或“免疫检查点蛋白”是指属于免疫系统中抑制性途径

的蛋白质,特别是用于调节T细胞应答的蛋白质。在正常生理条件下,免疫检查点对于预防自身免疫至关重要,特别是在对病原体的反应期间。癌细胞可以改变免疫检查点蛋白表达的调节,以避免免疫监视。

[0167] 免疫检查点蛋白的实例包括但不限于PD-1、CTLA-4、BTLA、KIR、LAG3、TIGIT、CD155、B7H3、B7H4、VISTA和TIM3、以及OX40、GITR、ICOS、4-1BB和HVEM。免疫检查点蛋白质也可以指与其他免疫检查点蛋白质结合的蛋白质。这些蛋白质包括PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、HVEM、LLT1和GAL9。

[0168] “免疫检查点蛋白质抑制剂”是指可以干扰免疫检查点蛋白介导的信号传导和/或蛋白质-蛋白质相互作用的任何蛋白质。在本发明的一个方面,免疫检查点蛋白是PD-1或PD-L1。在如本文所述的本发明优选方面,免疫检查点抑制剂通过抗PD-1或抗PD-L1抗体干扰PD-1/PD-L1相互作用。

[0169] 因此,本发明还提供了治疗癌症的方法,包括将不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和另外的治疗剂给药至对象,所述另外的治疗剂优选为检查点抑制剂。本发明还提供了用于治疗癌症的不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和另外的治疗剂,所述另外的治疗剂优选为免疫检查点抑制剂。

[0170] 此外,本发明提供了不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和另外的治疗剂用于癌症的治疗的药物中的用途,所述另外的治疗剂优选为免疫检查点抑制剂。不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和另外的治疗剂(例如免疫检查点抑制剂)的给药可以是同时的、单独的或顺序的。

[0171] 本发明提供了用于治疗对象的癌症的不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和另外的治疗剂的组合,所述另外的治疗剂优选为免疫检查点抑制剂,其中不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和另外的治疗剂(例如免疫检查点抑制剂)同时、单独或顺序给药。这样的不抑制白细胞介素2与CD25结合并且呈现人IgG1同种型的抗CD25抗体可以特别地与靶向免疫抑制点但缺少允许ADCC、ADCP和/或CDC的序列的抗体组合。

[0172] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗癌症的不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体,其中所述抗体用于与另外的治疗剂组合给药,所述另外的治疗剂优选为免疫检查点抑制剂。本发明还提供了不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体在制备治疗癌症的药物中的用途,其中所述药物用于与另外的治疗剂组合给药,所述另外的治疗剂优选为免疫检查点抑制剂。

[0173] 本发明提供了药物组合物,其包含在药学上可接受的介质中的不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和任选的另外的治疗剂,所述另外的治疗剂优选为免疫检查点抑制剂。如上所述,免疫检查点抑制剂可以是PD-1的抑制剂,即PD-1拮抗剂。

[0174] PD-1(程序性细胞死亡蛋白1),也称为CD279,是在活化的T细胞和B细胞上表达的细胞表面受体。已显示与其配体的相互作用在体外和体内均减弱T细胞应答。PD-1结合两个配体PD-L1和PD-L2。PD-1属于免疫球蛋白超家族。PD-1信号传导要求靠近由主要组织相容性复合体(MHC)呈递的肽抗原而与PD-1配体结合(Freeman(2008)Proc Natl Acad Sci USA 105,10275-6)。因此,阻止T细胞膜上PD-1和TCR共连接的蛋白质、抗体或小分子是有用的PD-1拮抗剂。

[0175] 在一种实施方式中,PD-1受体拮抗剂是与PD-1特异性结合并阻断PD-L1与PD-1的

结合的抗PD-1抗体或其抗原结合片段。抗PD-1抗体可以是单克隆抗体。抗PD-1抗体可以是人抗体或人源化抗体。抗PD-1抗体是能够与PD-1受体特异性结合的抗体。本领域已知的抗PD-1抗体包括纳武单抗和派姆单抗。

[0176] 本发明的PD-1拮抗剂还包括结合和/或阻断PD-1配体以干扰或抑制配体与PD-1受体结合或直接结合并阻断PD-1受体而不通过PD-1受体诱导抑制性信号转导的化合物或试剂。特别地,PD-1拮抗剂包括PD-1/PD-L1信号传导途径的小分子抑制剂。可供选择地,PD-1受体拮抗剂可以直接与PD-1受体结合而不引发抑制性信号转导,并且还与PD-1受体的配体结合以减少或抑制配体通过PD-1受体触发信号转导。通过减少与PD-1受体结合并触发抑制性信号转导的配体的数量和/或量,较少细胞被通过PD-1信号转导递送的负信号减弱,并且可以实现更强的免疫应答。

[0177] 在一种实施方式中,PD-1受体拮抗剂是抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其与PD-L1特异性结合并阻断PD-L1与PD-1的结合。抗PD-L1抗体可以是单克隆抗体。抗PD-L1抗体可以是人抗体或人源化抗体,例如阿特殊单抗(MPDL3280A)。

[0178] 本发明还提供了治疗癌症的方法,包括将不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和作为T细胞活化共刺激途径的激动剂的抗体给药至对象。T细胞活化共刺激途径的抗体激动剂包括但不限于针对ICOS、GITR、OX40、CD40、LIGHT和4-1BB的激动剂抗体。

[0179] 另外的治疗癌症的方法包括给药不抑制白细胞介素2与CD25结合的抗CD25抗体和降低、阻断、抑制和/或拮抗Fc γ RIIb(CD32b)的化合物。此类Fc γ RIIb拮抗剂可以是干扰对Fc γ RIIb诱导的细胞内信号传导的小分子,不接合抑制性Fc γ RIIb受体的修饰抗体或抗人Fc γ RIIb(抗CD32b抗体)。例如,拮抗性抗人Fc γ RIIb抗体也已针对其抗肿瘤性质而被表征(Roghanian A et al.,2015,Cancer Cell.27,473-488;Rozan C et al.,2013,Mol Cancer Ther.12:1481-91;WO2015173384;WO2008002933)。

[0180] 在另一方面,本发明提供了一种双特异性抗体,其包含:

[0181] (a) 与CD25结合的第一抗原结合部分;和

[0182] (b) 与免疫检查点蛋白、肿瘤相关抗原、抗人活化性Fc受体抗体(Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIII)或拮抗性抗人Fc γ RIIb抗体结合的第二抗原结合部分;

[0183] 其中,所述抗CD25抗体不抑制白细胞介素-2(IL-2)与CD25结合,并且优选地是以高亲和力与至少一种活化性Fc γ 受体结合并且消耗肿瘤浸润性调节性T细胞的IgG1双特异性抗体。在优选的实施方式中,第二抗原结合部分与PD-L1结合。

[0184] 如本文所用,“肿瘤相关抗原”是指在肿瘤细胞上表达的使得它们与邻近它们的非癌细胞区分开的抗原,并且包括但不限于CD20、CD38、PD-L1、EGFR、EGFRV3、CEA、TYRP1和HER2。已经出版了描述相关的肿瘤相关抗原和相应的治疗上有用的抗肿瘤抗体药物的各种评论文章(参见例如,Sliwkowski&Mellman(2013)Science 341,192-8)。此类抗原和相应的抗体包括但不限于CD22(博纳吐单抗)、CD20(利妥昔单抗、托西莫单抗)、CD56(洛妥珠单抗(Lorvotuzumab))、CD66e/CEA(拉贝珠单抗(Labetuzumab))、CD152/CTLA-4(伊匹单抗(Ipilimumab))、CD221/IGF1R(MK-0646)、CD326/Epcam(依决洛单抗(Edrecolomab))、CD340/HER2(曲妥珠单抗、帕妥珠单抗)和EGFR(西妥昔单抗、帕尼单抗)。

[0185] 在一个方面,如本文所述的根据本发明的双特异性抗体导致ADCC,或在一个方面,导致增强的ADCC。

[0186] 双特异性抗体可与CD25上的不影响IL-2与CD25的结合的特异性表位以及如本文所定义的免疫检查点蛋白或肿瘤相关抗原上的特异性表位结合。在优选的实施方式中,第二抗原结合部分与PD-L1结合。在优选的方面,本发明提供了一种双特异性抗体,其包含:

[0187] (a) 与CD25结合并且不影响IL-2与CD25结合的第一抗原结合部分;和

[0188] (b) 与肿瘤细胞上表达的免疫检查点蛋白结合的第二抗原结合部分。

[0189] 在具体实施方式中,在肿瘤细胞上表达的免疫检查点蛋白是PD-L1、VISTA、GAL9、B7H3或B7H4。仍然优选地,抗CD25抗体是不影响IL-2与CD25的结合并且以高亲和力与至少一种活化性Fc γ 受体结合并消耗肿瘤浸润性调节性T细胞的IgG1抗体。可供选择地,抗CD25抗体是消耗肿瘤浸润性调节性T细胞的人IgG2抗体。在一种具体实施方式中,抗CD25抗体是以高亲和力与至少一种活化性Fc γ 受体、优选Fc γ RIIa结合的人IgG2抗体。

[0190] 本领域技术人员将能够使用已知方法产生双特异性抗体。根据本发明的双特异性抗体可用于本文所述的本发明的任何方面。优选地,根据本发明的双特异性抗体内的第二抗原结合部分与人PD-1、人PD-L1或人CTLA-4结合。

[0191] 在一个方面,双特异性抗体可以结合与CD25结合以及与肿瘤浸润性Treg上高水平表达的免疫调节性受体(例如CTLA4、ICOS、GITR、4-1BB或OX40)结合。

[0192] 本发明还提供了试剂盒,所述试剂盒包含如本文所述的抗CD25抗体和和另外的治疗剂,所述另外的治疗剂优选为免疫检查点抑制剂,优选如本文讨论的PD-1拮抗剂(直接地使用抗PD1抗体,或间接地使用抗PD-L1抗体)。在一个方面,免疫检查点抑制剂是抗PD-L1。在另一种实施方式中,试剂盒包含如本文所述的抗CD25抗体和作为T细胞激活共刺激途径的激动剂的抗体。试剂盒可包含使用说明书。

[0193] 如本文所述的本发明的任何方面可以与另外的治疗剂,特别是其他癌症疗法组合进行。特别地,根据本发明的抗CD25抗体和任选的免疫检查点抑制剂可以与共刺激抗体、化学疗法和/或放射疗法(通过在体外施加辐射或通过给药放射缀合的化合物)、基于细胞因子的疗法、靶向疗法、单克隆抗体疗法、疫苗或佐剂、或其任何组合组合给药。

[0194] 如本文所用的化学治疗实体是指对细胞具有破坏性的实体,即该实体降低细胞的活力。化学治疗实体可以是细胞毒性药物。预期的化学治疗剂包括但不限于烷化剂、蒽环霉素、埃坡霉素、亚硝基脲、乙烯亚胺/甲基三聚氰胺、烷基磺酸盐、烷化剂、抗代谢物、嘧啶类似物、表鬼臼毒素、酶(例如L-天冬酰胺酶);生物反应调节剂,例如IFN α 、IFN- γ 、IL-2、IL-12、G-CSF和GM-CSF;铂配位配合物,例如顺铂、奥沙利铂和卡铂、蒽醌、取代的脲(例如羟基脲)、包括N-甲基胍(MIH)和丙卡巴胍的甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂(例如米托坦(o, p'-DDD)和氨基乙酰亚胺);激素和拮抗剂,包括肾上腺皮质类固醇拮抗剂,例如泼尼松和等同物、地塞米松和氨基乙酰亚胺;孕激素,例如己酸羟孕酮、醋酸甲羟孕酮和醋酸甲地孕酮;雌激素,例如己烯雌酚和乙炔雌二醇等同物;抗雌激素,例如他莫昔芬;雄激素包括丙酸睾酮和氟甲睾酮/等同物;抗雄激素,例如氟他胺、促性腺激素释放激素类似物和亮丙瑞林;和非甾体抗雄激素,例如氟他胺。

[0195] 另外的癌症疗法还可包括给药癌症疫苗。如本文所用的“癌症疫苗”是指对癌症患者给药的治疗性癌症疫苗,并且旨在通过加强患者自身的免疫应答来根除癌细胞。癌症疫苗包括肿瘤细胞疫苗(自体 and 同种异体的)、树突细胞疫苗(离体产生和肽激活的)、基于蛋白质/肽的癌症疫苗和基因疫苗(DNA、RNA和基于病毒的疫苗)。因此,原则上,治疗性癌症疫

苗可用于抑制对常规疗法(例如外科手术、放射疗法和化学疗法)难以治疗的晚期癌症和/或复发性肿瘤的进一步生长。基于肿瘤细胞的疫苗(自体 and 同种异体)包括经遗传修饰分泌可溶性免疫刺激剂例如细胞因子(IL-2、IFN- γ 、IL12、GM-CSF、FLT3L)、抗免疫调节受体的单链Fv抗体(PD-1、CTLA-4、GITR、ICOS、OX40、4-1BB)和/或在其肿瘤细胞膜上表达免疫刺激受体的配体(例如ICOS配体、4-1BB配体、GITR配体和/或OX40配体)等。在一种实施方式中,癌症疫苗可以是GVAX抗肿瘤疫苗。

[0196] 另外的癌症疗法可以是减少外周和肿瘤微环境内的免疫调节的其他抗体或小分子试剂,例如靶向TGF β 途径的分子、IDO(吡啶胺脱氢酶)、精氨酸酶和/或CSF1R。

[0197] “组合”可以指在给药根据本发明的任何方面之前、同时或之后给药另外的疗法。

[0198] 现在将参考附图通过以下实施例进一步描述本发明,这些实施例旨在用于帮助本领域普通技术人员实施本发明,并且无意以任何方式限制本发明的范围。

附图说明

[0199] 图1示出了实施例中使用的7D4和PC61抗小鼠CD25抗体的表征。使用串联式交叉阻断测定(tandem format cross-blocking assay)进行对IL-2结合的影响。将生物素化的小鼠CD25加样到SA传感器上。然后将传感器暴露于100nM小鼠IL-2,接着在150秒时暴露于抗小鼠CD25抗体。IL-2缔合后抗体的额外结合表明抗小鼠CD25不阻断IL-2结合,而没有进一步的结合表明配体阻断。与7D4(A)相比,PC-61mIgG2a显示小鼠IL-2与小鼠CD25相互作用的干扰。使用标准夹心式交叉阻断测定评估在重组抗小鼠CD25 7D4(mIgG1)存在下小鼠IL-2/小鼠CD25相互作用。将7D4(mIgG1)加样到AHQ传感器上,并用不相关的人IgG1抗体阻断传感器上未被占据的Fc结合位点。然后将传感器暴露于100nM重组小鼠CD25(R&D Systems;目录号2438-RM-050),接着是重组小鼠IL-2(Peprotech;目录号212-12)。7D4(mIgG1)小鼠CD25缔合后由小鼠IL-2的额外结合表明未占用的表位,其中7D4(mIgG1)和小鼠IL-2都不竞争小鼠CD25中的表位,这是因为与小鼠CD25同时结合。(B)使用表达小鼠CD25的CHO细胞针对抗人CD25结合抗体达利珠单抗(DAC)、PC61(mIgG2a)抗体(从克隆PC-61获得的原始抗CD25,其具有与ADCC相关的鼠IgG2a和 κ 恒定区)和7D4(mIgG1)抗体(从克隆7D4获得的抗CD25,其具有鼠IgG1和 κ 恒定区)确定与小鼠CD25的结合。抗小鼠CD25 IgG与细胞表达的mCD25结合。将CHO-mCD25等分到96孔测定板(50000个细胞/孔)中,并与含有0.1mL抗体的溶液(PBS中的浓度为100nM的抗体+0.1%牛血清白蛋白)在25℃下孵育15分钟。用冰冷的PBS+0.1%牛血清白蛋白洗涤细胞三次,然后用山羊抗人IgG(γ 链特异性)R-PE(Southern Biotech,目录号2040-09)标记并使用流式细胞术分析(碘化丙啶用于区分死细胞)。未检测到DAC的结合,而PC61(mIgG2a)和7D4(mIgG1)均显示与这些细胞的明显结合(C)。

[0200] 图2示出了用抗CD3和抗CD28刺激后,抗小鼠CD25抗体对CD4 T细胞诱导颗粒酶B表达的影响,使用CD4 MicroBeads从小鼠淋巴结和脾脏分离总CD4阳性T细胞,并用CellTraceTM紫色染料(ThermoFisher)标记以用于测量细胞增殖。在96孔板中接种标记的T细胞(105)与饲养细胞(105;CD90.2阴性部分,使用小鼠pan T Dynabeads试剂盒)。将抗CD3(克隆145-2C11,BioXcell目录号BE0001-1;1 μ g/ml)和抗CD28(克隆37.51目录号BioXcell BE0015-1;0.5 μ g/ml)添加至孔中(除了未刺激的标记的T细胞的对照样品)以活化CD4 T细胞并诱导增殖和颗粒酶B产生。然后将下列抗体(以25 μ g/mL)进一步添加到含有标记的CD4

T细胞和抗CD3和抗CD28抗体的孔中(仅含有标记的T细胞和抗CD3和抗CD28抗体的孔用作阴性对照):PC61(mIgG2a)、7D4(mIgG1)或中和抗小鼠IL-2抗体(克隆Jes6-1A12,BioXcell 6032988564)用作阳性对照,以显示阻断IL-2与其受体之间的相互作用对T细胞活化的影响。然后将标记的T细胞的样品孵育约84小时。然后将细胞固定并透化,然后用抗小鼠颗粒酶B抗体(克隆GB11,Invitrogen)染色。然后通过流式细胞术分析细胞的颗粒酶B表达和CellTrace紫色染料稀释液(BV450)。增殖和表达颗粒酶B(GnzB)的标记的T细胞的百分比在每个治疗特异性图(Q9)的左上象限示出,而增殖但不表达GnzB的标记的T细胞的百分比在每个治疗特异性图的左下象限(Q12)示出。

[0201] 图3示出了在存在或不存在抗小鼠PD1(aPD1;克隆RMP1-14)的情况下给药时,阻断或不阻断CD25与IL-2之间的相互作用的具有相同同种型的抗小鼠CD25抗体(小鼠IgG2a)对免疫细胞的体内作用。在第0天,用MCA205肿瘤细胞(5×10^5 15)皮下注射六组小鼠,并如图中所示分别处理。在四组中,在第五天腹膜内注射抗小鼠CD25抗体(aPC61 mIgG2a或a7D4mIgG2a;200 μ g)。在三组中,APD1(100 μ 克)在第六天和第九天腹膜内注射aPD1(100 μ g)。肿瘤和淋巴结在第12天收获,然后根据所需类型进行处理以使细胞染色,并如各图中指出的使用以下抗体通过流式细胞术来分析:抗CD3(克隆17A2,Biolegend)、抗CD4(克隆RM4-5,BD biosciences)、抗CD8(克隆53-6.7,Biolegend)和抗FoxP3(克隆FJK-16s,eBiosciences)。使用FoxP3转录因子染色缓冲液组(eBioscience)进行FoxP3的核内染色。示出了LN和TIL中CD4阳性/Foxp3阳性调节性T细胞和CD4阳性/FoxP3阴性效应CD4 T细胞(CD4 Teff)的百分比以及效应CD8阳性T细胞/Treg细胞和CD4 Teff/Treg的比率。在Flowjo 10.0.8版(Tree Star Inc.)中进行数据分析。在Prism 6(GraphPad Software, Inc.)中进行统计分析;使用Kruskall-Wallis方差分析和Dunn's事后检验计算p值($ns=p>0.05$;****= $p<0.0001$)。

[0202] 图4示出了在存在或不存在抗小鼠PD1(aPD1;克隆RMP1-14)的情况下,阻断或不阻断CD25与IL-2之间的相互作用的具有相同同种型的抗小鼠CD25抗体(IgG2a)对体内通过增殖T细胞产生颗粒酶B的作用。使用基于MCA205的模型在如图3所示的六个处理组中产生细胞样品。然后根据所需类型使细胞染色,并如各图中指出的使用以下抗体通过流式细胞术来分析:抗CD3(PeCy7,克隆145-2C11,Ebioscience,25003182)、抗CD4(V500,克隆RM4-5,BD biosciences,560782)、抗CD8(BV785,克隆53-6.7,Biolegend,100750)、抗颗粒酶B(APC,克隆GB11;Invitrogen,grb05)和Ki67(V450,克隆SolA15;eBiosciences,48569882)。使用FoxP3转录因子染色缓冲液套件(eBioscience,00-5523-00)进行Ki67和颗粒酶B的核内染色。将GnzB阳性的百分比与GnzB阳性增殖的总数(如Ki67阳性指出的)CD4阳性或CD8阳性T细胞的总数进行比较。如图3进行统计学分析($ns=p>0.05$;*= $p<0.05$;**= $p<0.01$;***= $p<0.001$;****= $p<0.0001$)。

[0203] 图5示出了与或不与抗-PD-1(克隆RMP1-14)组合给药的抗小鼠CD25(IgG2a同种型)对根除CT26小鼠模型中已形成的肿瘤的作用。7D4m2a和PC61m2a均为抗小鼠CD25且消除Treg的抗体,但是一者是非IL-2阻断的(7D4m2a)而另一者是IL-2阻断的(PC61m2)。对每个治疗组形成随着时间的推移的个体小鼠的生长曲线。每个图中指示50天后无肿瘤存活者的数量。在对数期生长期间收获用于植入的CT26细胞,并重悬于冷PBS中。在研究的第1天(D1),在每只小鼠的右侧腹皮下注射 3×10^5 个细胞(0.1mL细胞悬浮液)。在第6天腹腔注射

抗小鼠CD25 (10mg/kg) (当检测到可触知肿瘤时)。在第7天、第10天、第14天和第14天腹腔注射抗小鼠PD1。每周两次用卡尺在两个维度上测量肿瘤以检测生长。肿瘤大小(mm^3)由下式计算:肿瘤体积 $= (w^2 \times l) / 2$, 其中 w =肿瘤的宽度, l =肿瘤的长度(mm)。研究终点是肿瘤体积为 4000mm^3 或50天, 以先到者为准(在不同的较早日期停止的数据点是由于小鼠死亡;在各图中指示实验结束时存活的动物数量)。

[0204] 图6示出了个体小鼠的CT26肿瘤生长曲线, 所述个体小鼠未处理(PBS, 仅溶媒), 用均消耗Treg但一者是非IL-2阻断(7D4m2a)而另一者是IL-2阻断(PC61m2)的抗小鼠CD25 IgG2a抗体处理, 或进一步与或不与抗小鼠PD-L1克隆10F.9G2(aPDL1; 克隆10F.9G2)组合处理。模型、方案和数据分析与图5的相同。

[0205] 图7示出了与或不与抗-PD-1(克隆RMP1-14)组合给药的抗小鼠CD25(IgG2a同种型)对根除MC38小鼠模型中已形成的肿瘤的作用。测试的抗体是图5中描述的那些。对每个治疗组建立随着时间的推移的个体小鼠的生长曲线。在每个图中指示35天后无肿瘤存活者的数量。在对数期生长期间收获用于植入的MC38结肠癌细胞并重悬于冷PBS中。在每只小鼠的右侧腹皮下注射 5×10^5 个肿瘤细胞(0.1mL细胞悬浮液)。当肿瘤体积接近100至 150mm^3 的目标范围时监测肿瘤。肿瘤植入后22天, 在研究的第1天, 将个体肿瘤体积在75至 126mm^3 的范围内的动物分成9组($n=10$), 组平均肿瘤体积为约 106mm^3 。第1天, 在具有已建立的MC38肿瘤的小鼠中开始治疗。在第1天、第2天、第5天、第9天和第12天, 与腹腔内接受PBS的溶媒处理对照组比较每次处理的效果。从第2天开始, 每周两次以 $100\mu\text{g}$ /动物给药抗PD1持续两周(biweek $\times 2$)。在第1天以 $200\mu\text{g}$ /动物腹腔内给药7D4m2a和PC61m2a一次。每周两次进行肿瘤测量。研究终点是肿瘤体积为 4000mm^3 或35天, 以先到者为准(在不同的较早日期停止的数据点是由于小鼠死亡;在各图中指示实验结束时存活的动物数量)。

[0206] 图8示出了个体小鼠的MC38肿瘤生长曲线, 所述个体小鼠未处理(PBS, 仅溶媒), 用均消耗Treg但一者是非IL-2阻断(7D4m2a)而另一者是IL-2阻断(PC61m2)的抗小鼠CD25 IgG2a抗体处理, 或进一步与或不与抗小鼠PD-L1克隆10F.9G2(aPDL1; 克隆10F.9G2)组合处理。模型、方案和数据分析与图7的相同。

[0207] 图9: 在携带雌性BALB/c小鼠中的CT26同系结肠肿瘤的小鼠中, 评估作为非IL-2阻断且消耗Treg的抗小鼠CD25抗体的7D4 mIgG2a单独(D)和与IL-2中和抗体组合(E)的治疗活性, 或小鼠IgG1同种型的IL-2阻断且非消耗性的抗小鼠CD25抗体(PC61小鼠IgG1)的治疗活性。测试小鼠IgG2s对照(A)、单独的IL-2中和抗体(B)和单独的IL-2阻断性抗CD25抗体(C)的活性进行比较。

[0208] 图10: 示出了人CD25的共有序列(Uniprot代码P01589), 在本文中称为SEQ ID NO: 1。对应于第22至240个氨基酸的成熟CD25的胞外域标有下划线。来自非IL阻断性抗CD25抗体的表位位置如下初步鉴定: 表位1(完整和短表位), 表位2(完整和短表位), 表位3和表位4(完整和短表位)。还鉴定了巴利昔单抗和达利珠单抗表位(表示为DAC)的位置。

[0209] 图11: 在增加的抗体浓度以及与小鼠IgG2a同种型对照的比较下, 与表达CD25的CHO细胞上的CD25结合的(A)7D4、(B)PC61和(C)2E4的表征。

[0210] 图12: 在Biacore 2000上进行的对his标签标记的抗rmCD25抗体的基于SPR的分析, (A)7D4, (B)2E4上。

[0211] 图13: 在Octet96上进行的对his标签标记的抗rmCD25抗体的竞争分析。显示在传

感器和抗原缔合步骤上捕获7D4后由二抗结合。在7D4和2E4 (A) 之间观察到与mCD25的竞争性结合,但在7D4和PC61 (B) 之间没有观察到。

[0212] 图14:使用从C57BL/6脾细胞分离的T细胞,在STAT5磷酸化测定中,与小鼠IgG2a同种型对照或不存在一抗下相比,关于阻断IL-2信号传导而对7D4,PC61和2E4的表征。将细胞与50 μ g/ml抗体一起孵育,然后与50U/ml IL-2一起孵育。分析限于磷酸化STAT5的Treg细胞的百分比。

[0213] 图15:在用小鼠抗小鼠CD25 (7D4) 抗体给药后,携带4T1肿瘤的balb/c小鼠中Treg的体内消耗。(A) 至 (C):给药后第3天全血中的非CD4、CD4+和CD25+FoxP3+细胞%。(D) 至 (F):给药后第3天肿瘤中的非CD4、CD4+和CD25+FoxP3+细胞%。(G) 至 (I):给药后第9天全血中的非CD4、CD4+和CD25+FoxP3+细胞%。(J) 至 (L):在给药后第9天肿瘤中的非CD4、CD4+和CD25+FoxP3+细胞%。

[0214] 图16:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照进行比较下,与Karpas 299细胞 (A)、人体外分化的Treg细胞 (B)、SU-DHL-1细胞 (C) 或SR-786细胞 (D) 上表达的CD25结合的小鼠 (B) 或嵌合 (A、C和D) 抗人CD25克隆7G7B6的表征,。

[0215] 图17:使用人来源的PBMC,在STAT5磷酸化测定中,与小鼠IgG2a同种型对照、人IgG1同种型对照、达利珠单抗或不存在一抗下相比,关于阻断IL-2信号传导而对7G7B6的表征。将细胞与10 μ g/ml抗体一起孵育,然后增加IL-2的浓度(如图所示)。分析限于磷酸化STAT5的CD3阳性细胞的百分比。

[0216] 图18:使用泛性T细胞,与人IgG1同种型对照、达利珠单抗或作为阳性对照的市售小鼠抗人IL-2中和抗体(克隆:AB12-3G4) 相比,对嵌合7G7B6功能表征。将细胞与10 μ g/ml抗体一起孵育,然后用CD3/CD28珠子活化72小时,然后进行流式细胞术分析。结果显示颗粒酶B阳性的增殖CD4 T细胞的百分比。

[0217] 图19:在ADCC测定中,与人IgG1同种型对照相比,关于对CD25阳性细胞系的杀伤而对嵌合7G7B6功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将CD25高或低表达的细胞SU-DHL-1 (A) 或SR-786细胞 (B) 分别与纯化的NK细胞共培养(如图所示)。在将钙黄绿素添加至NK细胞后4小时,通过钙黄绿素释放到上清液中测量靶细胞裂解。将数据标准化为皂苷处理的对照。

[0218] 图20:在ADCP测定中,与人IgG1同种型相比,关于对体外分化的Treg细胞的吞噬作用而对嵌合7G7B6功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将Treg与MCSF分化的巨噬细胞共培养(如图所示)。用CD14+染色的巨噬细胞和eFluor450染料标记的Treg进行双色流式细胞术分析。残余靶细胞定义为是eFluor450-染料⁺/CD14⁻细胞。双标记细胞(eFluor450-染料⁺/CD14⁺) 被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细胞的吞噬作用: %吞噬作用 = $100 \times [(\text{双阳性}\%) / (\text{双阳性}\% + \text{残留靶百分比})]$ 。

[0219] 图21:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照进行比较下,对与Karpas 299细胞上表达的CD25结合的MA-251表征。

[0220] 图22:与小鼠IgG1同种型对照、人IgG1同种型对照、达利珠单抗或不存在一抗下相比,对MA-251的表征。使用人源PBMC评估STAT5磷酸化测定中IL-2信号传导的阻断。将细胞与10 μ g/ml抗体一起孵育,然后增加IL-2的浓度(如图所示)。分析限于磷酸化STAT5的CD3阳性细胞的百分比。

[0221] 图23:对MA-251和与CD25结合的IL2表征。使用标准夹心分组测定在Forte Bio

Octet Red384系统 (Pall Forte Bio Corp., USA) 上进行对IL2配体与CD25结合的干扰。将MA251抗体加载到AHQ传感器上,并用非相关的人IgG1抗体阻断传感器上未被占据的Fc结合位点。将传感器暴露于100nM人CD25,然后暴露于100nM人IL-2。使用Forte Bio Data Analysis Software 7.0处理数据。抗原缔合后人IL2的额外结合表明未占据的表位(非竞争者),而没有结合表明表位阻断(竞争者)。

[0222] 图24:在Octet中对抗CD25抗体的竞争分析。使第一Ab与固定化的rhCD25结合,然后再与第一Ab(作为对照)或第二Ab结合。作为IL-2信号的非阻断剂的mAb彼此竞争或与7G7B6和MA251竞争,并且不与研究达利珠单抗或研究巴利昔单抗竞争(图24(A)至(N))。(A)至(C)7G7B6的竞争分析;(D)至(F)MA251的竞争分析;(G)至(I)和(N)抗体3的竞争分析;(J)至(M)抗体1的竞争分析。作为IL-2信号传导阻断剂(TSK031)的mAb确实与研究达利珠单抗竞争并研究巴利昔单抗竞争,并且不与7G7B6竞争(图24(O)至(Q))。

[0223] 图25:示出给药后抑制肿瘤生长的体内模型:载体(A)和(C);或抗体1(B)、(D)和(E)。

[0224] 图26:通过在Biacore 2000上进行的对his标签标记的抗rhCD25抗体的基于SPR的分析确定亲和力。A) 7g7B6ch、B) MA251ch、C) 抗体1、D) 抗体3和E) 达利珠单抗(对照)或在Octet Red 96仪器上通过生物层干涉测量法(F)。

[0225] 图27:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下,对与体外分化的Treg细胞(A)、SU-DHL-1细胞(B)或SR-786细胞(C)上表达的CD25结合的抗体1的表征。

[0226] 图28:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下,对与CD3/CD28珠活化的人(A)和(B)泛性T细胞(Pan T cell)上表达的CD25结合然后在CD4⁺和CD8⁺上表达的抗体1的表征。

[0227] 图29:通过使用标准夹心形式分组测定在Octet Red384上进行生物层干涉测定,示出抗体1和IL-2的非竞争性结合(A)和IL-2竞争抗体与IL-2(B)的竞争性结合。将抗人CD25抗体抗体1加样到AHQ传感器上。然后使传感器暴露于100nM人CD25,接着暴露于人IL-2。抗原缔合后人IL2的额外结合表明未占据的表位(非竞争者),而没有结合表明表位阻断(竞争者)。

[0228] 图30:通过使用标准夹心形式分组测定在Octet Red384上进行生物层干涉测定,示出抗体1和达利珠单抗与CD25的非竞争性结合。将参考单克隆抗人CD25抗体达利珠单抗加样到AHQ传感器上。然后使传感器暴露于100nM人CD25抗原,接着暴露于抗人CD25抗体(抗体1)。抗原缔合后二抗的额外结合表明未占据的表位(非竞争者),而没有结合表明表位阻断(竞争者)。

[0229] 图31:使用人来源的PBMC,在STAT5磷酸化测定中,与人IgG1同种型对照、达利珠单抗或在不存在一抗下相比,关于阻断IL-2信号传导而对抗体1表征。将细胞与10 μ g/ml抗体一起孵育,然后增加IL-2的浓度(如图所示)。分析限于磷酸化STAT5的CD3阳性细胞的百分比。

[0230] 图32:使用泛性T细胞,与人IgG1同种型对照、达利珠单抗或作为阳性对照的市售小鼠抗人IL-2中和抗体(克隆:AB12-3G4)相比,对抗体1功能表征。将细胞与10 μ g/ml抗体一起孵育,然后用CD3/CD28珠子活化72小时,然后进行流式细胞术分析。结果显示颗粒酶B阳性增殖CD4(A)或CD8(B)T细胞的百分比。

[0231] 图33:在ADCC测定中,与人IgG1同种型对照相比,关于对CD25阳性细胞系的杀伤而对抗体1功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将CD25高或低表达细胞SU-DHL-1 (A) 或SR-786细胞 (B) 分别与纯化的NK细胞共培养(如图所示)。在将钙黄绿素添加至NK细胞后4小时,通过钙黄绿素释放到上清液中测量靶细胞裂解。将数据标准化为皂苷处理的对照。

[0232] 图34:在ADCP测定中,与人IgG1同种型对照相比,关于对体外分化的Treg细胞的吞噬作用而对抗体1功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将Treg与MCSF分化的巨噬细胞共培养(如图所示)。用CD14⁺染色的巨噬细胞和eFluor450染料标记的Treg进行双色流式细胞术分析。残余靶细胞定义为是eFluor450-染料⁺/CD14⁻细胞。双标记细胞(eFluor450-染料⁺/CD14⁺)被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细胞的吞噬作用:%吞噬作用=100×[(双阳性%)/(双阳性%+残留靶百分比)]。

[0233] 图35:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下,对与体外分化的Treg细胞 (A)、SU-DHL-1细胞 (B) 或SR-786细胞 (C) 上表达的CD25结合的抗体3的表征。

[0234] 图36:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下,对与CD3/CD28珠活化的人 (A) 和 (B) 或食蟹猴 (C) 和 (D) 泛性T细胞上表达的CD25结合然后在CD4⁺和CD8⁺上同控的抗体3的表征。

[0235] 图37:通过使用标准夹心形式分组测定在Octet Red384上进行生物层干涉测定,示出抗体3和IL-2的非竞争性结合。将抗人CD25抗体抗体3加样到AHQ传感器上。然后使传感器暴露于100nM人CD25,接着暴露于人IL-2。抗原缔合后人IL2的额外结合表明未占据的表位(非竞争者)。

[0236] 图38:通过使用标准夹心形式分组测定在Octet Red384上进行生物层干涉测定,示出抗体3和达利珠单抗与CD25的非竞争性结合。将参考单克隆抗人CD25抗体达利珠单抗加样到AHQ传感器上。然后使传感器暴露于100nM人CD25抗原,接着暴露于抗人CD25抗体(抗体3)。抗原缔合后二抗的额外结合表明未占据的表位(非竞争者),而没有结合表明表位阻断(竞争者)。

[0237] 图39:使用人来源的PBMC,在STAT5磷酸化测定中,与人IgG1同种型对照、达利珠单抗或在不存在一抗下相比,关于阻断IL-2信号传导而对抗体3表征。将细胞与10μg/ml抗体一起孵育,然后增加IL-2的浓度(如图所示)。分析限于磷酸化STAT5的CD3阳性细胞的百分比。

[0238] 图40:使用泛性T细胞,与人IgG1同种型对照、达利珠单抗或作为阳性对照的市售小鼠抗人IL-2中和抗体(克隆:AB12-3G4)相比,对抗体3功能表征。将细胞与10ug/ml抗体一起孵育,然后用CD3/CD28珠子活化72小时,然后进行流式细胞术分析。结果显示颗粒酶B阳性增殖CD4 (A) 或CD8 (B) T细胞的百分比。

[0239] 图41:与人IgG1同种型对照相比,抗体3在ADCC测定中杀死CD25阳性细胞系的功能表征。在不同浓度的抗体存在下,分别将CD25高或低表达细胞,SU-DHL-1 (A) 或SR-786细胞 (B) 与纯化的NK细胞共培养(如图所示)。在加入NK细胞后4小时,通过钙黄绿素释放到上清液中测量靶细胞裂解。将数据标准化为皂苷处理的对照。

[0240] 图42:在ADCP测定中,与人IgG1同种型对照相比,关于对体外分化的Treg细胞的吞噬作用而对抗体3功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将Treg与MCSF分化的巨噬细胞共培养(如图所示)。用CD14⁺染色的巨噬细胞和eFluor450染料标记的Treg进行双色流式细胞术

分析。残余靶细胞定义为是eFluor450-染料⁺/CD14⁻细胞。双标记细胞(eFluor450-染料⁺/CD14⁺)被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细胞的吞噬作用：%吞噬作用=100×[(双阳性%)/(双阳性%+残留靶百分比)]。

[0241] 图43:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下,对与体外分化的Treg细胞(A)、SU-DHL-1细胞(B)或SR-786细胞(C)上表达的CD25结合的抗体4的表征。

[0242] 图44:在100nM抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下,对与未修饰的CHO-S细胞(阴性对照)(A)或猕猴-CD25-CHO-S细胞(B)结合的抗体4的表征。

[0243] 图45:通过使用标准夹心形式分组测定在Octet Red384上进行生物层干涉测定,示出抗体4和IL-2的非竞争性结合。将抗人CD25抗体抗体4加样到AHQ传感器上。然后使传感器暴露于100nM人CD25,接着暴露于人IL-2。抗原缔合后人IL2的额外结合表明未占据的表位(非竞争者)。

[0244] 图46:通过使用标准夹心形式分组测定在Octet Red384上进行生物层干涉测定,示出抗体4和达利珠单抗与CD25的非竞争性结合。将参考单克隆抗人CD25抗体达利珠单抗加样到AHQ传感器上。然后使传感器暴露于100nM人CD25抗原,接着暴露于抗人CD25抗体(抗体4)。抗原缔合后二抗的额外结合表明未占据的表位(非竞争者),而没有结合表明表位阻断(竞争者)。

[0245] 图47:使用人来源的PBMC,在STAT5磷酸化测定中,与人IgG1同种型对照、达利珠单抗或在不存在一抗下相比,关于阻断IL-2信号传导而对抗体4表征。将细胞与10μg/ml抗体一起孵育,然后增加IL-2的浓度(如图所示)。分析限于磷酸化STAT5的CD3阳性细胞的百分比。

[0246] 图48:使用泛性T细胞,与人IgG1同种型对照、达利珠单抗或作为阳性对照的市售小鼠抗人IL-2中和抗体(克隆:AB12-3G4)相比,对抗体4功能表征。将细胞与10ug/ml抗体一起孵育,然后用CD3/CD28珠子活化72小时,然后进行流式细胞术分析。结果显示颗粒酶B阳性增殖CD4(A)或CD8(B)T细胞的百分比。

[0247] 图49:在ADCC测定中,与人IgG1同种型对照相比,关于对CD25阳性细胞系的杀伤而对抗体4功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将CD25高或低表达细胞SU-DHL-1(A)或SR-786细胞(B)分别与纯化的NK细胞共培养(如图所示)。在将钙黄绿素添加至NK细胞后4小时,通过钙黄绿素释放到上清液中测量靶细胞裂解。将数据标准化为皂苷处理的对照。

[0248] 图50:与报告物生物测定中,与人IgG1同种型对照相比,关于诱导ADCP而对抗体4表征。在各种浓度的抗体存在下,将表达CD25的SU-DHL-1细胞与经遗传工程化以表达FcγRIIA和驱动荧光素酶表达的NFAT响应元件(NFAT-RE-luc2)的Jurkat T细胞共培养(如图所示)。

[0249] 图51:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下,对与体外分化的Treg细胞(A)、SU-DHL-1细胞(B)或SR-786细胞(C)上表达的CD25结合的抗体2的表征。

[0250] 图52:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下,对与CD3/CD28珠活化的人(A)和(B)或食蟹猴(C)和(D)泛性T细胞上表达的CD25结合然后在CD4⁺和CD8⁺上同控的抗体2的表征。

[0251] 图53:通过使用标准夹心形式分组测定在Octet Red384上进行生物层干涉测定,示出抗体2和IL-2的非竞争性结合(A)和IL-2竞争抗体与IL-2(B)的竞争性结合。将抗人

CD25抗体抗体2加样到AHQ传感器上。然后使传感器暴露于100nM人CD25,接着暴露于人IL-2。抗原缔合后人IL2的额外结合表明未占据的表位(非竞争者)。

[0252] 图54:通过使用标准夹心形式分组测定在Octet Red384上进行生物层干涉测定,示出抗体2和达利珠单抗与CD25的非竞争性结合。将参考单克隆抗人CD25抗体达利珠单抗加样到AHQ传感器上。然后使传感器暴露于100nM人CD25抗原,接着暴露于抗人CD25抗体(抗体2)。抗原缔合后二抗的额外结合表明未占据的表位(非竞争者),而没有结合表明表位阻断(竞争者)。

[0253] 图55:使用人来源的PBMC,在STAT5磷酸化测定中,与人IgG1同种型对照、达利珠单抗或在不存在一抗下相比,关于阻断IL-2信号传导而对抗体2表征。将细胞与10 μ g/ml抗体一起孵育,然后增加IL-2的浓度(如图所示)。分析限于磷酸化STAT5的CD3阳性细胞的百分比。

[0254] 图56:在ADCC测定中,与人IgG1同种型对照相比,关于对CD25阳性细胞系的杀伤而对抗体2功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将CD25高或低表达细胞SU-DHL-1(A)或SR-786细胞(B)分别与纯化的NK细胞共培养(如图所示)。在将钙黄绿素添加至NK细胞后4小时,通过钙黄绿素释放到上清液中测量靶细胞裂解。将数据标准化为皂苷处理的对照。

[0255] 图57:在ADCP测定中,与人IgG1同种型对照相比,关于对体外分化的Treg细胞的吞噬作用而对抗体2功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将Treg与MCSF分化的巨噬细胞共培养(如图所示)。用CD14⁺染色的巨噬细胞和eFluor450染料标记的Treg进行双色流式细胞术分析。残余靶细胞定义为是eFluor450-染料⁺/CD14⁻细胞。双标记细胞(eFluor450-染料⁺/CD14⁺)被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细胞的吞噬作用: %吞噬作用 = $100 \times [(\text{双阳性} \%) / (\text{双阳性} \% + \text{残留靶百分比})]$ 。

[0256] 图58:在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下,对与Karpas 299细胞上表达的CD25结合的抗体5的表征。

[0257] 图59:使用人源PBMC在STAT5磷酸化测定中阻断IL-2信号传导的抗体5的表征。小鼠抗人抗体MA-251用作非阻断对照,而临床达利珠单抗高产量方法(DAC HYP)用作阻断对照,与小鼠IgG1同种型对照,人IgG1同种型对照或不存在一抗分别。将细胞与10 μ g/ml抗体一起孵育,然后与10U/ml IL-2一起孵育。分析限于磷酸化STAT5的CD3阳性细胞的百分比。

[0258] 图60:在Octet中的竞争测定。使抗体1与固定化的rhCD25结合,然后再与第一Ab(作为对照)或第二Ab结合,与IL-2竞争剂(例如达利珠单抗和巴利昔单抗研究)或IL-2非竞争剂(例如7G7B6)结合。抗体1不与IL-2信号阻断剂研究巴利昔单抗(A)达利珠单抗(B)竞争,而它确实与7G7B6(非IL-2阻断剂)竞争(C)。

[0259] 图61:与报告物生物测定中,与抗人CD25 Fc沉默对照抗体,关于诱导ADCC而对抗体5表征。在各种浓度的抗体存在下,将表达CD25的SR-786细胞与经遗传工程化以表达Fc γ RIIA和驱动荧光素酶表达的NFAT响应元件(NFAT-RE-luc2)的Jurkat T细胞共培养(如图所示)。

[0260] 图62:在ADCP测定中,与人IgG1同种型对照相比,关于对体外分化的Treg细胞的吞噬作用而对抗体5功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将Treg与MCSF分化的巨噬细胞共培养(如图所示)。用CD14⁺染色的巨噬细胞和eFluor450染料标记的Treg进行双色流式细胞术分析。残余靶细胞定义为是eFluor450-染料⁺/CD14⁻细胞。双标记细胞(eFluor450-染料⁺/

CD14⁺) 被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细胞的吞噬作用: %吞噬作用 = $100 \times [(\text{双阳性} \%) / (\text{双阳性} \% + \text{残留靶百分比})]$ 。

[0261] 图63: 在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下, 对与Karpas 299细胞上表达的CD25结合的抗体6、抗体7、抗体8和抗体9的表征。

[0262] 图64: 在Octet中的竞争测定。使第一Ab (抗体7) 与固定化的rhCD25结合, 然后再与第一Ab (作为对照) 或第二Ab达利珠单抗 (A) 或巴利昔单抗 (B) 结合。

[0263] 图65: 使用人来源的PBMC, 在STAT5磷酸化测定中, 与人IgG1同种型对照、达利珠单抗-Hyp或不存在一抗下相比, 关于阻断IL-2信号传导而对抗体7的表征。将细胞与10 μ g/ml 抗体一起孵育, 然后与10U/ml IL-2一起孵育。分析限于磷酸化STAT5的CD3阳性细胞的百分比。

[0264] 图66: 与报告物生物测定中, 与抗人CD25 Fc沉默对照抗体, 关于诱导ADCC而对抗体7功能表征。在各种浓度的抗体存在下, 将表达CD25的SR-786细胞与经遗传工程化以表达Fc γ RIIIA和驱动荧光素酶表达的NFAT响应元件 (NFAT-RE-luc2) 的Jurkat T细胞共培养 (如图所示)。

[0265] 图67: 在ADCP测定中, 与抗人CD 25Fc沉默对照抗体相比, 关于对体外分化的Treg细胞的吞噬作用而对抗体7功能表征。在不同浓度的抗体存在下, 将Treg与MCSF分化的巨噬细胞共培养 (如图所示)。用CD14⁺染色的巨噬细胞和eFluor450染料标记的Treg进行双色流式细胞术分析。残余靶细胞定义为是eFluor450-染料⁺/CD14⁻细胞。双标记细胞 (eFluor450-染料⁺/CD14⁺) 被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细胞的吞噬作用: %吞噬作用 = $100 \times [(\text{双阳性} \%) / (\text{双阳性} \% + \text{残留靶百分比})]$ 。

[0266] 图68: 在增加的抗体浓度以及与人IgG1同种型对照比较下, 对与Karpas 299细胞上表达的CD25结合的抗体10、抗体11、抗体12、抗体12、抗体13、抗体14、抗体15、抗体16、抗体17、抗体18、抗体19、抗体20和抗体21的表征。

[0267] 图69: 在Octet中的竞争测定。将第一Ab (抗体19) 与固定化的rhCD25结合, 然后再与第一Ab (作为对照) 或第二Ab达利珠单抗 (A) 或巴利昔单抗 (B) 结合。

[0268] 图70: 使用人来源的PBMC, 在STAT5磷酸化测定中, 与人IgG1同种型对照、达利珠单抗-Hyp或不存在一抗下相比, 关于阻断IL-2信号传导而对抗体10、抗体11、抗体12、抗体12、抗体13、抗体14、抗体15、抗体16、抗体17、抗体18、抗体19、抗体20和抗体21的表征。将细胞与10 μ g/ml 抗体一起孵育, 然后与10U/ml IL-2一起孵育。分析限于磷酸化STAT5的CD3阳性细胞的百分比。

[0269] 图71: 与报告物生物测定中, 与抗人CD25 Fc沉默对照抗体, 关于诱导ADCC而对抗体19功能表征。在各种浓度的抗体存在下, 将表达CD25的SR-786细胞与经遗传工程化以表达Fc γ RIIIA和驱动荧光素酶表达的NFAT响应元件 (NFAT-RE-luc2) 的Jurkat T细胞共培养 (如图所示)。

[0270] 图72: 在ADCP测定中, 与抗人CD 25Fc沉默对照抗体相比, 关于对体外分化的Treg细胞的吞噬作用而对抗体19功能表征。在不同浓度的抗体存在下, 将Treg与MCSF分化的巨噬细胞共培养 (如图所示)。用CD14⁺染色的巨噬细胞和eFluor450染料标记的Treg进行双色流式细胞术分析。残余靶细胞定义为是eFluor450-染料⁺/CD14⁻细胞。双标记细胞 (eFluor450-染料⁺/CD14⁺) 被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细

胞的吞噬作用： $\% \text{吞噬作用} = 100 \times [(\text{双阳性}\%) / (\text{双阳性}\% + \text{残留靶百分比})]$ 。

[0271] 图73:在ADCP测定中,与抗人CD 25Fc沉默对照抗体相比,关于对体外分化的Treg细胞的吞噬作用而对抗体19、抗体12和抗体20功能表征。在不同浓度的抗体存在下,将Treg与MCSF分化的巨噬细胞共培养(如图所示)。用CD14⁺染色的巨噬细胞和eFluor450染料标记的Treg进行双色流式细胞术分析。残余靶细胞定义为是eFluor450-染料⁺/CD14⁻细胞。双标记细胞(eFluor450-染料⁺/CD14⁺)被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细胞的吞噬作用： $\% \text{吞噬作用} = 100 \times [(\text{双阳性}\%) / (\text{双阳性}\% + \text{残留靶百分比})]$ 。

[0272] 图74:在BVAB16免疫治疗抗性模型中,与BVAB16免疫疗法组合的非IL-2阻断性抗CD25抗体7D4小鼠IgG2a的治疗活性。用Gvax单独或与7D4组合处理个体小鼠。

[0273] 图75:在使用雌性BALB/c小鼠的CT26肿瘤模型中,与IL-2阻断性抗体(PC61)相比,非IL-2阻断性抗CD25抗体(7D4和2E4)的治疗活性。抗CD25非阻断性抗体7D4和2E4对实体瘤发挥有效的治疗活性。7D4和2E4均比IL-2阻断性抗体PC61更有效。

[0274] 图76:在与抗小鼠PD-L1组合地单次和重复注射下,评估在MCA205模型中非IL-2阻断性抗CD25抗体7D4 mIgG2a的治疗活性。*表示在实验结束时存活的小鼠。

[0275] 具体实施例

[0276] 实施例1非IL-2阻断性或IL-2阻断性的重组抗小鼠CD25且消耗Treg的抗体的体外表征和制备

[0277] 材料与方法

[0278] 抗体的起源及其重组产生

[0279] 通过快速扩增cDNA末端(RACE)从PC-61.5.3杂交瘤(ATCC目录号TIB-222)中解析大鼠抗鼠CD25抗体PC61的重链和轻链可变区的序列,然后克隆到鼠IgG2a的恒定区和κ链(或从商业质粒(Invivogen)分离的相应小鼠IgG1序列)中。

[0280] 然后将每个抗体链亚克隆到鼠白血病病毒(MLV)衍生的逆转录病毒载体中。对于初步实验,使用用编码重链和轻链的载体转导的K562细胞产生抗体。使用蛋白G HiTrap MabSelect柱(GE医疗)从上清液中纯化抗体,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中透析,浓缩,并过滤灭菌。

[0281] 来自PC-61.5.3抗体(小鼠IgG2a)的重新克隆的抗小鼠CD25重链可变链DNA编码以下蛋白质序列:

[0282] METDTLLLVLLLWVPGSTGEVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKVSGDTITAYYIHFKVRPGQGLEWIGRIDPEDDSTEYAEKFKNKATITANTSSNTAHLKYSRLTSEDATY FCTTDNMGATEFVYWGQGLTVTVSS

[0283] 来自PC-61.5.3抗体(小鼠IgG2a)的重新克隆的抗小鼠CD25轻链可变链DNA编码以下蛋白质序列:

[0284] METDTLLLVLLLWVPGSTGQVVLTPKSVSASLESTVKLSCKLNSGNIGSYMHYQQREGRSPTNLIIYRDDKRDPDGAPDRFSGSIDISSNSAFLTINNVTQTEDEAMYFCHSYDGRMYIFGGGTLTV

[0285] 对7D4杂交瘤(ECACC,88111402)进行7D4-IgM测序。提取总RNA或mRNA并进行逆转录以获得抗体重链和轻链的cDNA。使用结合信号肽或框架区1的简并正向引物以及结合抗体恒定区的反向引物来扩增可变重链和可变轻链。按照标准方法克隆并测序扩增的基因。通过逆转录产生cDNA,并将同聚物尾添加到cDNA的3'末端。然后使用基因特异性引物扩增抗体可变域基因,然后进行标准克隆和测序方法。通过常规Sanger测序对DNA进行测序,并

使用DNASTAR Lasergene软件分析数据。通过与IMGT数据库中的已知序列比较来鉴定信号肽和可变域序列。

[0286] 编码可变重链域和可变轻链域的基因经密码子优化以在人细胞系中表达,并在基因的5'和3'的NheI和AvaI限制性位点合成。进行限制性消化克隆以将7D4可变重链域基因插入到含有小鼠IgG1和IgG2a恒定域的单独表达载体中。进行限制性消化克隆以将7F4可变轻链基因插入含有小鼠 κ 恒定域的表达载体中。将无血清培养基中培养的悬浮的HEK293细胞用重链和轻链表达载体共转染,并在37℃下在5%CO₂环境下并伴随140rpm下摇动再培养6天。将培养物通过以4000rpm离心收获,并通过进一步经0.22 μ m滤器过滤净化。将上清液上样到用pH 7.2的PBS预平衡的蛋白A柱上,用pH 3.5的柠檬酸钠洗脱,并用10% (v/v) 0.5M Tris pH9.0平衡。使用脱盐柱将中和的抗体溶液缓冲液交换到pH7.2的PBS中,并根据需要使用截留分子量为30kDa的离心浓缩器浓缩。通过测量280nm处的吸光度确定蛋白质浓度,并通过SDS-PAGE测定纯度。

[0287] 来自7D4抗体(小鼠IgG1)的重新克隆的抗小鼠CD25重链DNA序列编码以下蛋白质序列:

[0288] EVQLQQSGAALVKPGASVKMSCKASGYSPDSWVTWVKQSHGKSLEWIGDIFPNSGATNFNEKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSRLTSEDSAIYYCTRLDYGWGGQVMVTSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLMLISLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTFRSVSELPILHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGSYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

[0289] 来自7D4抗体(小鼠IgG2a)的重新克隆的抗小鼠CD25重链可变链DNA序列编码以下蛋白质序列:

[0290] EVQLQQSGAALVKPGASVKMSCKASGYSPDSWVTWVKQSHGKSLEWIGDIFPNSGATNFNEKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSRLTSEDSAIYYCTRLDYGWGGQVMVTSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTTLWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

[0291] 7D4 (mIg1) 和7D4 (mIg2a) 抗体(小鼠IgG2a)的重新克隆的抗小鼠CD25 κ 轻链DNA序列编码以下蛋白质序列:

[0292] DVVLTQTPTLSATIGQSVSISCRSSQSLHNSNGNTYLNWLLQRPQGPPQLLIYLASRLESGVPNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGYYCVQSSHFPNTFGVGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKWIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

[0293] 2E4由2E4杂交瘤(由美国国立卫生研究院Ethan M. Shevach博士馈赠)产生。通过基于专有的下一代测序(NGS)技术进行杂交瘤测序。RNA样品用于产生cDNA文库。在Illumina平台上对文库测序。从头拼接(De novo assembly)用于从原始数据重建样品转录组。通过与已知序列比较来鉴定可变域序列。

[0294] 抗小鼠CD25 2E4抗体(小鼠IgG1)的可变重链域蛋白质序列具有以下蛋白质序列:

[0295] EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSAASGFTFSDYGMWVRQAPTKGLEWVASITNGGLNTYYRDSVKGRFT

ISRDNAKCTLYLQMDSLRSEDTATYYCATGGFSFWGQGTLVTVSS

[0296] 抗小鼠CD25 2E4(mIg1)的可变轻链域蛋白质序列具有以下蛋白质序列:

[0297] DIVMTQSPTSMSISVGDRVTMNCASQNVDSNVDWYQQKTGQSPKLLIYKASNRYTGVPDRFTGSGSGT
DFTFTIRNMQAEDLAVYYCMQSNZYPLTFGSGTKLEIK

[0298] 评估重组抗体对小鼠CD25的亲合力

[0299] 通常如前所述在Octet RED384上进行ForteBio亲和力测量(参见,例如,Estep P et al.,2013.Mabs.5(2),270-8)。简而言之,通过将IgG在线加样到AHQ传感器上来进行ForteBio亲和力测量。将传感器在测定缓冲液中离线平衡30分钟,然后在线监测60秒以建立基线。将加有IgG的传感器暴露于100nM抗原3分钟,然后转移至测定缓冲液3分钟以进行解离速率测量。使用1:1结合模型分析所有动力学。

[0300] 结果

[0301] 已选择两种小鼠杂交瘤作为参考抗体,用于评估非IL-2阻断或IL-2阻断的抗小鼠CD25(分别是7D4(小鼠IgM同种型)和PC61(小鼠IgG1同种型))的CD25结合和Treg消耗特性。已经使用原始的非重组抗体和重组小鼠IL-2初步证实了文献中描述的IL-2结合相关特性(图1A)。已经产生了这种抗体的重组变体用于测试抗体,其中同种型更具活性并且与功能研究相关(例如Treg消耗或对其他免疫细胞的影响)。而且,在7D4的情况下,需要改变同种型,这是因为IgM抗体的抗体聚集特性可能影响测定的结果。作为原始非重组IgM同种型抗体的重组7D4(mIgG1)仍允许使小鼠IL-2与小鼠CD25结合(图1B)。7D4(mIgG1)也与细胞表面上的小鼠CD25结合,类似于重组PC61(IgG2a),而参考抗人CD25抗体则不结合(图1C)。

[0302] 编码7D4重链可变域(以及PC61重链可变域)的DNA序列也已被克隆到载体中,该载体允许表达具有小鼠IgG2a同种型的小鼠CD25结合域(功能上对应于人IgG1)。以这种方式,可以比较具有优化的ADCC活性的两种重组抗小鼠CD25抗体,该重组抗小鼠CD25抗体可以有效地消耗肿瘤内Treg,但是在小鼠IL-2与小鼠CD25的结合方面具有独特的性质。已经测试了所得重组抗小鼠CD25抗体的CD25亲和力。不同的同种型(小鼠IgG2a或小鼠IgG1)不影响这种性质,因为基于7D4的重组体之间的Kd相似(约1nM)并且与PC61(mIgG2a)中的一种相当,测量为4.6nM。

[0303] 还在体外测定中比较了这些重组抗体的功能特性,以确定它们响应抗CD3和抗CD28刺激对颗粒酶B产生的影响(图2)。颗粒酶B(GnzB)是由记忆T细胞和NK细胞以及在免疫反应期间强烈表达和分泌GnzB的活化的CD4和CD8T细胞表达的丝氨酸蛋白酶。该酶是细胞死亡、组织病理学和疾病的重要介质。用抗CD3和抗CD28抗体对T细胞(>80%为增殖和表达Gnz的CD4 T细胞B)的体外刺激和增殖可受细胞因子和抗体的影响。当这种刺激与中和抗IL-2抗体组合进行时,颗粒酶B的产生,但不是增殖,将被抑制:增殖和产生GnzB的细胞的频率从>80%下降到<1%,而增殖细胞的频率保持>90%。这表明颗粒酶B的产生依赖于IL-2信号传导,而细胞增殖不依赖于IL-2信号传导。当将PC61(mIgG1)添加到刺激的T细胞中时,观察到产生颗粒酶B的T细胞的类似下降。然而,7D4(mIgG1)大部分地通过产生GnzB(>65%为仍然产生GnzB的细胞并增殖)保留CD4 T细胞响应于抗CD3和抗CD28刺激能力。这些结果证实基于PC61的抗体阻断IL-2信号传导,而7D4对该信号传导仅有很小的影响,因此可用作替代抗体来评估不会影响IL-2信号的抗人CD25抗体的治疗潜力,特别是在Treg消耗和肿瘤特异性方面。

[0304] 实施例2非IL-2阻断性或IL-2阻断性的重组抗小鼠CD25且消耗Treg的抗体的Treg消耗和抗肿瘤特性

[0305] 材料与方法

[0306] 小鼠

[0307] 通过Charles River Discovery Services北卡罗来纳州(CR Discovery Services)进行体内研究。在研究开始时,雌性BALB/c小鼠(BALB/cAnNcr1,Charles River)和雌性C57BL/6小鼠(C57BL/6Ncr1,Charles River)在7至9周龄之间。CR Discovery Services特别遵守“实验动物护理和使用指南”中关于限制、饲养、外科手术、饲料和液体调节以及兽医护理的建议。CR Discovery Services的动物护理和使用计划获得了确保符合公认的实验室动物护理和使用标准的国际实验动物管理评估和认证协会的认可。

[0308] 细胞系和组织培养

[0309] MCA205肿瘤细胞(3-甲基胆蒽诱导的弱免疫原性纤维肉瘤细胞;来自G.Kroemer, Gustave Roussy癌症研究所)在补充有10%胎牛血清(FCS, Sigma)、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素和2mM L-谷氨酰胺(均来自Gibco)的杜氏改良伊格尔培养基(DMEM, Sigma)中培养。MC38小鼠结肠癌细胞(CR discovery services)在含有10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺、100单位/mL青霉素G、100μg/mL硫酸链霉素和25μg/mL庆大霉素的杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)中生长至对数中期。CT26鼠结肠癌细胞(CR discovery services)在含有10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺、100单位/mL青霉素G钠、100μg/mL硫酸链霉素和25μg/mL庆大霉素的RPMI-1640培养基中生长。将所有肿瘤细胞在组织培养瓶中在37℃的潮湿培养箱中,在5% CO₂和95%空气的气氛中培养。用于抗体生产的K562细胞在补充有10%无IgG的FCS(Life Technologies)的无酚红伊思柯夫改良杜氏培养基(Iscove modified Dulbecco medium, IMDM)中培养。

[0310] 体内肿瘤实验

[0311] 将培养的肿瘤细胞用胰蛋白酶消化(MCA205)或不用胰蛋白酶消化(MC38和CT26),洗涤并重悬浮于PBS中并在侧腹皮下注射(s.c.) (对于C57BL/6小鼠的MCA205和MC38模型,注射 5×10^5 个细胞;对于BALB/c小鼠的CT26模型,注射 3×10^5 个细胞)。在图例中描述的时间点腹膜内(i.p.)注射抗体。对于功能性实验,在肿瘤植入后12天,收获肿瘤和引流淋巴结,并如所述地通过流式细胞术处理以进行分析(Simpson et al. (2013) J Exp Med 210, 1695-710)。对于治疗实验,每周两次测量肿瘤,三个正交直径的乘积计算为体积。

[0312] 流式细胞术

[0313] 采集是使用BD LSR II Fortessa(BD Biosciences)进行的。使用以下抗体:抗CD3(克隆145-2C11,ebioscience,25003182)、抗CD4(克隆RM4-5,BD biosciences,560782)、抗CD8(克隆53-6.7,Biolegend,100750)、抗-颗粒酶B(克隆GB11,Invitrogen),抗FoxP3(克隆FJK-16s,eBiosciences)和Ki67(克隆SolA15,eBiosciences,48569882)。将来自小鼠的淋巴结(腹股沟、腋窝和肱)和肿瘤切下置于无血清RPMI。将淋巴结经70μm滤器分散,然后使用gentleMACS(Miltenyl Biotech)机械破坏肿瘤,并在37℃下在无血清RPMI中用0.33mg/ml DNase(Sigma-Aldrich)和0.27mg/ml Liberase TL(Roche)的混合物消化30分钟。肿瘤经70μm滤器过滤,所得到的肿瘤单细胞悬浮液通过经Ficoll-paque(GE医疗)梯度传代富集白细胞。将肿瘤和LN在完全RPMI中洗涤,重悬于FACS缓冲液(500mL PBS,2%FCS,2mM EDTA)中并

置于圆底96孔板中。以生产商推荐的稀释法制备表面抗体的混合试剂(mastermix):抗CD3(克隆145-2C11,ebioscience,25003182)、抗CD4(克隆RM4-5,BD biosciences,560782)、抗CD8(克隆53-6.7,Biolegend,100750)。可固定的活力染料(eFlour780,eBioscience)也包括在表面混合试剂中。使用细胞内固定和透化缓冲液套件(eBioscience)透化20分钟之后,应用胞内染色组件,该胞内染色组件由用于生产商推荐的稀释法的以下抗体组成:抗颗粒酶B(克隆GB11,Invitrogen)、抗FoxP3(克隆FJK-16s,eBiosciences)和Ki67(Clone SolA15,eBiosciences,48569882)抗体。

[0314] 结果

[0315] MCA205肉瘤小鼠模型使得产生可以在短时间内对一组免疫调节化合物评价针对实体瘤的免疫应答和总体功效的小鼠。特别地,测试了基于小鼠IgG2a的重组抗小鼠CD25抗体以评估作为肿瘤浸润性淋巴细胞或在外周淋巴结中存在的T细胞亚群的变化,以及小鼠暴露于MCA205的肿瘤生长和存活率。研究中包括另一种抗体(抗小鼠PD1)作为对Treg的免疫学作用的阴性对照。

[0316] 免疫学分析表明,7D4抗体在克隆到小鼠IgG2a骨架中时,显示出与PC61(小鼠IgG2a)相似的消耗Treg的能力,并且随后在肿瘤和外周中增加Teff与Treg之比,而抗PD1无论单独或组合使用均无效(图3)。因此,使用7D4(mIgG2a)作为非IL-2阻断性抗人CD25抗体的替代抗体测量的任何进一步效应似乎不与Treg消耗特性的改变有关。

[0317] 用7D4处理的MCA205模型小鼠也显示出更高百分比的GnzB阳性细胞,例如增殖CD4阳性和CD8阳性T细胞,不仅涉及抗PD1治疗,而且还涉及阻断PC61的IL-2(mIg2a)。在这样的治疗的小鼠中,不仅7D4(mIg2a),比如PC61(mIg2a),并不影响Teff细胞,但与PC61(mIg2a)相比,它也增加了Teff细胞的频率,表明不会阻断IL-2/CD25相互作用的抗人CD25抗体的甚至更高的抗肿瘤活性(图4)。

[0318] 可以在MCA205鼠模型中以及其他模型(例如CT26和MC38(结肠癌)或B16(黑色素瘤)模型)中测试将功能上等同于7D4(mIg2a)的抗人CD25用于癌症特别是实体瘤的免疫疗法。当与抗PD1抗体组合给药时,IgG2a、抗小鼠CD25抗体均显示针对已建立的CT26肿瘤的治疗活性。有趣的是,当用作单一疗法时,非IL-2阻断7D4(mIg2a)抗体显示出比具有相同同种型的基于PC61的抗体明显更高的治疗活性。在实验结束时,用7D4(mIg2a)处理的所有小鼠仅显示肿瘤生长控制在体积低于 50mm^3 ,而用PC61(mIg2a)处理的小鼠中没有显示肿瘤小于 50mm^3 ,其中10只小鼠中的8只甚至达到了 2000mm^3 的终止点。这也通过存活率的差异来说明,所有用7D4(mIg2a)处理的小鼠在第50天仍然存活,而用PC61(mIg2a)处理的10只小鼠中只有2只存活。实际上,至少以该浓度使用该抗体时,如果PC61(mIg2a)效力通过与抗PD1的组合大大改善,则7D4(mIg2a)的功效没有进一步改善。

[0319] 由于这些基于7D4和PC61的抗体显示出类似的消耗Treg的能力(参见图3),因此至少部分地可以通过7D4(mIg2a)对IL-2与其受体之间相互作用较低的影响来解释这种效力差异。这表明不仅缺乏IL-2/IL-2受体阻断活性对治疗活性是无害的,而且它也可提供治疗优势。因此,该数据支持选择阻断CD25靶向抗体的非IL-2/IL-2受体用于癌症治疗。当在相同的CT26鼠模型中使用抗小鼠PD-L1时(图6)或当与抗体的相同组合使用MC38鼠模型时(图7和图8),也确认了7D4(mIg2a)抗体的这些有利特性。

[0320] 这些数据表明,基于7D4特性并且具有适当同种型的抗体的Treg消耗、CD25结合特

性可以与其他抗癌化合物(例如靶向免疫检查点蛋白的抗体(例如针对PD-1和抗PD-L1的抗体)或抗其它癌症相关靶标的抗体)组合使用。该方法可以通过产生和给药作为单特异性抗体的新型混合物或作为新的双特异性抗体的两种产物来实现。这种涉及构建结合两种抗原结合特性和治疗相关同种型(例如人IgG1)的双特异性抗体的方法可以通过使用允许来自两种不同单特异性抗体的单链重链和轻链的有效结合的Duobody技术来验证,所述两种不同单特异性抗体是分别产生的并在CH3域中含有单个匹配点突变,因此允许在单个异聚蛋白内进行Fab交换(Labrijn AF et al., Nat Protoc. 2014, 9:2450-63)。这种基于7D4的Duobody产品(例如包括抗PD1或抗PD-L1)的功能特性可以通过使用用于验证如上所述的基于7D4的抗体和抗体组合的细胞相互作用和消耗的模式来评估。

[0321] 这些结果还表明,7D4对于小鼠CD25的不干扰IL-2与其受体的相互作用和表达CD25的细胞中的IL-2信号传导的结合特性可以在选择与这种作用机制一致的同种型(例如人IgG1)的抗人CD25中利用。实际上,可以考虑几种其他性质用于筛选在制备、使用和/或给药以治疗癌症、特别是实体瘤方面具有进一步改善的性质的抗人CD25抗体候选物。

[0322] 这些性质也可以根据已知的抗人CD25的特征来定义,例如Humax-TAC、巴利昔单抗或达利珠单抗,它们对人CD25都具有的纳摩尔范围的K_d,但都阻断人IL-2与人CD25的结合(使用克隆M-A251作为将被包括在本发明的抗人CD25的选择中的潜在的参考非IL-2阻断性抗人CD25抗体)。

[0323] 这些功能可以是以下一个或多个:

[0324] -对重组、分离的单体人CD25的亲合力,其中K_d低于25nM,优选低于10nM,甚至更优选低于1nM(如使用诸如Octet、Kinexa、ELISA或其他技术建立的);

[0325] -对重组、分离的单体食蟹猴CD25的交叉反应性,其中K_d低于75nM,优选低于30nM,甚至更优选低于3nM(如使用Octet、Kinexa、ELISA等技术建立的);

[0326] -对CHO或MJ细胞表面上的重组单体人CD25的亲合力,其中K_d低于100nM,优选低于10nM,甚至更优选低于1nM(使用诸如流式细胞术、基于细胞的ELISA等技术建立);

[0327] -对CHO细胞表面上重组单体恒河猴CD25的亲合力,其中K_d低于300nM,优选低于30nM,甚至更优选低于3nM(使用诸如流式细胞术、基于细胞的ELISA等技术建立);

[0328] -人Treg细胞以低于100nM,优选低于10nM,甚至更优选低于1nM的KD结合(使用诸如流式细胞术,基于细胞的ELISA等技术建立);

[0329] -食蟹猴Treg细胞以低于300nM,优选低于30nM,甚至更优选低于3nM的KD结合(使用诸如流式细胞术,基于细胞的ELISA等技术建立);

[0330] -在生物化学测定中缺乏对人重组IL-2和人重组CD25之间相互作用的抑制(如实施例1所述,在筛选中小于25%的IL-2与CD25的结合被阻断);

[0331] -在基于细胞的测定中缺乏IL-2诱导的信号传导,所述测定例如在活化的CD8阳性或CD4阳性T细胞或CD25表达细胞系中的STAT5磷酸化测定,或CD4阳性T细胞测定激活后颗粒酶B上调(如实施例1所述,小于25%的基线信号被抑制);和/或

[0332] -在基于细胞的测定中的相关效力评估,所述测定例如在表达人CD25或原代Treg细胞的细胞系中的ADCC,ADCP和/或CDC测定(EC₅₀低于10nM,优选低于1nM,甚至更优选低于0.1nM)。

[0333] 实施例3用非IL2阻断性抗小鼠CD25抗体进行的进一步体内小鼠模型实验

[0334] 材料和方法

[0335] 非IL-2阻断性抗体的治疗活性:在获得自Charles River的雌性BALB/c小鼠的侧腹皮下注射0%基质胶(Matrigel)中的 3×10^5 CT26肿瘤细胞,每组n=15。基于第1天体重将动物随机分成治疗组。在第6天开始治疗,并且每次以200 μ g/动物注射每种抗体(小鼠IgG2a同种型、IL-2中和抗体、PC61mIgG1(阻断小鼠IgG1同种型的IL-2信号传导阻断性抗小鼠CD25抗体)和7D4 mIgG2a(小鼠IgG2a同种型的IL-2信号传导阻断性抗小鼠CD25抗体)。动物接受每种抗体注射一组的单一疗法治疗,或接受7D4 mIgG2a和IL-2中和抗体或7D4 mIgG2a和PC61 mIgG1抗体的组合治疗。当肿瘤体积达到2000mm³或50天时,以先到者为准,处死小鼠。

[0336] 非IL-2阻断性抗体与阻断性抗体相比的治疗活性

[0337] 将 3×10^5 个CT26细胞皮下植入侧腹。在第0天进行配对匹配,此时肿瘤达到30至60mm³并开始治疗。在第1天和之后每两周一次,腹膜内给药10mg/kg的治疗。群组用IL-2中和抗体PC61-m2a、非IL-2阻断性抗体7D4,非IL-2阻断性抗体2E4治疗或不进行治疗。

[0338] 非IL-2阻断性抗体与aPDL1疗法组合的治疗活性

[0339] 如图所示,小鼠皮下注射50000个MCA205肿瘤细胞,每组n=10或n=5。将动物随机分入治疗组。动物接受7D4 mIgG2a或aPD-L1(克隆10F.9G2)的单一疗法治疗,7D4 mIgG2a与PD-L1(克隆10F.9G2)的组合治疗或未接受治疗。群组接受:a7D4 mIgG2a单独-第10天(200ug),aPD-L1 rIgG2b(10F.9G2)-第6、9和12天(200ug),aPD-L1+a7D4组合(aPDL-1在第6、9和12天接受,a7D4在第10天接受),或aPD-L1+a7D4组合(aPDL-1在第6、9和12天接受和a7D4在第10天接受),-额外注射a7D4第15天+aPD-L1在第18天(仅5只小鼠)。

[0340] 结果

[0341] 抗CD25消耗性非IL-2阻断性抗体7D4 mIgG2a在处理的小鼠中诱导肿瘤排斥,而与同种型对照小鼠IgG2a相比,其他抗体显示作为单一疗法没有效果。与IL2阻断性抗体(PC61mIgG1或IL2nAb)的组合消除了非IL-2阻断性抗体7D4 mIgG2a的治疗活性(图13)。这表明7D4 mIgG2a的非IL-2阻断特征是治疗活性的关键。它还表明该抗体的治疗活性依赖于由依赖于IL-2信号传导以获得最佳活性的T效应细胞介导的抗肿瘤免疫应答。这些结果表明,CD25靶向抗体的最佳治疗活性不需要IL-2/CD25阻断活性,并且支持在癌症治疗中使用如本文所述的抗CD25非IL-2阻断性抗体。

[0342] 这些结果进一步表明,缺乏IL-2/CD25阻断活性对抗体治疗活性是无害性,并且支持在癌症治疗中使用如本文所述的抗CD25非IL-2阻断性抗体。

[0343] 这些结果进一步表明,非IL-2阻断性抗体7D4和2E4比IL-2阻断性抗体PC61更有效。抗CD25非阻断性抗体7D4和2E4对实体瘤发挥有效的治疗活性(图75)。

[0344] 结果显示在开始aPDL1疗法后单次或重复注射非IL2阻断性aCD25抗体7D4可增强抗肿瘤反应。通过aCD25抗体避免了在aPDL1处理后Teff细胞活化(图76)。

[0345] 实施例4抗CD25非IL-2阻断性抗体的表位表征

[0346] 表位分组(Epitopebinning)

[0347] 使用标准夹心格式分组测定在Forte Bio Octet Red384系统(Pall Forte Bio Corporation, Menlo Park, CA)上进行抗体的表位分组。将抗小鼠CD25PC61抗体加样到AMC传感器上,并用非相关小鼠IgG1抗体阻断传感器上未被占据的Fc结合位点。然后将传感器

暴露于15nM靶抗原,接着暴露于7D4抗体。使用ForteBio的数据分析软件7.0处理数据。抗原结合后二抗的额外结合表明未被占据的表位(非竞争者),而没有结合表明表位阻断(竞争者)。

[0348] 抗CD25非IL-2阻断性抗体的表位绘图

[0349] 使用固相Fmoc合成法来合成代表人CD25序列(Uniprot记录号P01589)的不同组的线性、单环、 β -转角模拟物、二硫键模拟物、不连续二硫键、不连续表位模拟物肽(Pepscan BV, The Netherlands; Timmermann P et al., 2007 J. Mol. Recognit., 20, 283-99; Langedijk JP et al., 2011, Analytical Biochemistry. 417:149-155)。在ELISA (Pepscan, The Netherlands)中测试抗体与每种合成肽的结合。将肽阵列与一抗溶液一起孵育(在4℃过夜)。洗涤后,将肽阵列与1/1000稀释的合适的抗体过氧化物酶缀合物(2010-05; Southern Biotech)在25℃下孵育1小时。洗涤后,添加过氧化物酶底物2,2'-连氨基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐(ABTS)和20 μ l/ml的3% H_2O_2 。1小时后,测量显色。用电荷耦合器件(CCD)相机和图像处理系统量化显色。从CCD相机获得的值范围为0至3000mAU,类似于标准96孔板ELISA读取器。为了验证合成肽的质量,平行合成一组单独的阳性和阴性对照肽,并用不相关的对照抗体筛选。

[0350] 结果

[0351] 进行表位分组以确定抗体是否与市售小鼠抗人非IL-2阻断性CD25抗体7G7B6的表位重叠的表位结合。进一步表征抗体以确定非IL-2阻断性抗体的表位。测定抗小鼠CD25的阻断性抗体PC61的表位以进行对照比较。抗人CD25抗体的表1所示表位绘图结果如表1所示,抗小鼠CD25抗体表2所示结果如下:

[0352] 表1-抗人CD25抗体:

[0353]

抗体	表位 1	表位 2	表位 3	表位 4
7G7B6 和抗体 6 至 9	¹⁵⁰ YQCVQGY RALHRGP ₁₆₃	¹⁶⁶ SVCKMTHG KTRWTQP ₁₈₀	⁴² KEGTMLNCE CKRGFR ₅₆ *	⁷⁴ SSWDN QCQCTSS ATR ₈₈ *
MA251 和 抗 体 10 至 21	¹⁵⁰ YQCVQGY RALHRGP ₁₆₃	¹⁶⁶ SVCKMTHG KTRWTQP ₁₈₀	⁴² KEGTMLNCE CKRGFR ₅₆ *	⁷⁴ SSWDN QCQCTSS ATR ₈₈ *
抗体 1				⁷⁰ NSSHSS WDNQCQ CTS ₈₄
抗体 2	¹⁵⁰ YQCVQGY RA ₁₅₈	¹⁷⁶ RWTQPQLIC TG ₁₈₆		
抗体 3			⁴² KEGTMLNCE CKRGFR ₅₆ *	
抗体 4	¹⁵⁰ YQCVQGY RALH ₁₆₀		⁴² KEGTMLNCE CKRGFR ₅₆ *	

[0354] *次要表位

[0355] 氨基酸(aa)序列编号基于取自Uniprot登录号P01589下公布的序列的人CD25。

[0356] 表2-抗小鼠CD25抗体:

[0357]

抗体	表位	
2E4	¹⁴⁶ YECIPGYKA ₁₅₄	¹⁷⁸ LTCVDER ₁₈₄
7D4	¹⁸⁴ REHHRFLASEE ₁₉ 4	
PC61	⁴⁷ LNCECKRGFR ₅₇	⁷⁸ TSNSHDKSRKQ ₈₈

[0358] 氨基酸(aa)序列编号基于取自Uniprot登录号P01590下公布的序列的小鼠CD25。

[0359] 使用Pepscan技术进行的表位绘图研究表明,抗人抗体在不与CD25上的IL-2结合位点重叠的表位上结合人CD25。抗人抗体结合的表位与巴利昔单抗和达珠单抗不同。巴利昔单抗和达利珠单抗结合的表位包含(SEQ ID NO:1的)第137至143个氨基酸区域中的残基,其与CD25与IL-2的相互作用侧重叠(Binder M et al, Cancer Res 2007vol 67(8): 3518-23)。抗小鼠CD25非阻断性抗体2E4和7D4识别与PC61不同的表位。

[0360] 实施例5:小鼠抗CD25抗体的表征

[0361] 抗体与表达小鼠CD25的CHO细胞结合

[0362] 与表达CD25的CHO细胞的结合通过以下来检查,用30mg/ml抗体对测试品染色(抗CD25一抗、7D1、PC61和2E4),然后半对数系列稀释(7个点)在冰上放置30分钟。然后在冰上用浓度为1mg/ml二抗(Alexa Fluor647-AffiniPure Fab片段山羊抗人IgG(H+L) - (Jackson ImmunoResearch))染色30分钟。所有样品一式两份地染色。在样品采集期间通过流式细胞术使用FSC对SSC参数来门控活细胞。将染色细胞的平均荧光强度(MFI)绘制在XY图上,将MFI相对于浓度对数绘图,并将数据拟合成非线性回归曲线,从该曲线计算EC50。结果如图11所示,证实了抗小鼠CD25抗体与表达小鼠CD25的CHO细胞结合。

[0363] 抗mCD 25抗体的亲和力测量

[0364] 在25℃的环境实验温度下,使用CM-5传感器芯片,在Biacore 2000中,通过SPR测量抗小鼠CD 25抗体7D4、PC61和2E4的 K_D 来确定对抗小鼠CD 25抗体7D4、PC61和2E4的亲和力。最初,将抗小鼠抗体在分析缓冲液(pH 7.4, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% 吐温20)中跨过所有流动细胞而固定到RU为16000至18000保持10分钟。将配体(抗体测试物品)依次加样至119至163RU之间的捕获水平。然后将分析物(his标记的重组小鼠CD25)与从800nM开始的两倍稀释的分析缓冲液(最低浓度为3.13nM)缔合持续6分钟。在10分钟内在分析缓冲液中进行解离。样品浓度之间的再生步骤在10mM甘氨酸pH 1.7中进行10分钟。在25 μ l/分钟的流速下保持整个过程。使用具有参考差集(reference subtraction)的由Biacore提供的全局模型二价分析物分析软件拟合动力学数据。基于SPR分析示于图12中。该测定中针对抗小鼠CD25抗体建立的 K_D 值如下:对7D4,为 2.6×10^{-9} M;对2E4,为 114×10^{-9} M;对PC61,为 3.6×10^{-9} M(结果未显示)。

[0365] Octet中的抗小鼠抗体竞争

[0366] 使用标准夹心分组测定在Forte Bio Octet Red96系统(Pall Forte Bio Corp., USA)上进行抗体竞争。10nM的抗小鼠CD 25抗体被加样到MC传感器上持续900秒,用非相关小鼠IgG2a抗体封闭传感器上的未被占据的Fc结合位点。传感器被暴露于15nM的靶抗原(his标签标记的小鼠CD25)600秒,然后暴露于二抗抗CD 25抗体(也是10nM)。使用Forte Bio数据分析软件9.0处理数据。抗原结合后第二抗体的额外结合表明表位未被占据,而没有结合表明表位被阻断。

[0367] 在7D4和2E4之间观察到与mCD25的竞争性结合(图13(A)),但在7D4和PC61之间没有观察到(图13(B))。

[0368] 通过STAT5磷酸化测定的体外IL-2信号传导:

[0369] 使用来自Invitrogen的**Dynabeads®** FlowComp™小鼠泛性T(CD90.2)试剂盒(Cat:11465D)从脾细胞中分离泛性T细胞。铺板200000个细胞并在37℃下静置2小时。添加50ug/ml抗体,并在37℃下与细胞孵育30分钟,然后在37℃下用IL-2(50U/ml)刺激细胞10分钟。

[0370] 当将细胞固定并用eBioscience™ Foxp3/转录因子染色缓冲液套件(Invitrogen)透化并用BD Phosflow Perm缓冲液III(BD Biosciences)处理时,停止IL-2诱导的STAT5磷酸化。然后用表面和细胞内荧光染料标记的抗体同时对细胞染色(STAT5-Alexa Fluor 647clone 47/stat5/pY694 BD Bioscience、CD3-PerCP-Cy5.5 clone 17A2

Biolegend、CD4-PE clone RM4-5Biolegend、FoxP3-AF488 clone FJK-16s Ebioscience), 在Fortessa LSR X20流式细胞仪(BD Bioscience)上获得样品,并使用BD FACSDIVA软件分析该样品。使用FCS-H对比FCS-A排除双峰,并且使用SSC-A对比FCS-A参数定义淋巴细胞。使用CD3 PerCP-Cy5.5-A对比FCS-A图定义CD3⁺T细胞,并且在直方图上绘制门,该直方图显示对比STAT5 Alexa Fluor 647-A的计数以确定STAT5⁺CD3⁺T细胞群。如下计算IL-2信号传导的阻断百分比: %阻断 = $100 \times [(无Ab组的 \% Stat5^{+} 细胞 - 50ug/ml Ab组的 \% Stat5^{+} 细胞) / (无Ab组的 \% Stat5^{+} 细胞)]$ 。通过不同细胞亚集(CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺FoxP3⁻)对STAT5磷酸化的进一步分析也通过门控相应的亚集评估并如上所述地分析。使用GraphPad Prism v7进行图像和统计分析(结果未显示)。结果如图14所示。

[0371] 结果:

[0372] 针对抗小鼠抗体7D4和2E4结合CD25并不干扰表达CD25的靶细胞的IL-2信号传导的能力,进一步评估抗小鼠抗体7D4和2E4。非IL-2阻断剂7D4和2E4竞争结合CD25,而PC61(IL-2信号传导阻断剂)不与2E4或7D4竞争结合CD25(图12)。

[0373] STAT5测定证实7D4和2E4不阻断IL-2信号传导,而IL-2信号传导被“阻断性”抗体PC61阻断(图14)。

[0374] 实施例6:Treg的体内消耗

[0375] 将200 μ l RPMI1640培养基中的 1×10^5 个4T1细胞植入Balb/c小鼠的第二胸脂肪垫组织中。当肿瘤达到50至100mm³时,将小鼠随机分配,并且以2 μ g、20 μ g或200 μ g小鼠抗小鼠CD25(7D4)抗体的单次腹膜内平缓剂量给药至每只小鼠给药。在第3天和第9天,分离肿瘤组织和全血用于免疫表型分型。

[0376] 结果:

[0377] 基于通过免疫表型分析进行第3天和第9天的给药后分析,抗体7D4在全血和肿瘤组织中表现出Treg消耗活性(图15)。

[0378] 实施例7:抗CD25抗体7G76B的表征

[0379] 抗CD25抗体与人表达CD25的细胞的结合:

[0380] 通过与淋巴瘤人细胞系Karpas 299、SU-DHL-1和SR-786以及体外分化的Treg细胞结合来评估7G76B。与表达CD25的人细胞系(SU-DHL-1和SR-786)的结合通过以下检测,首先用Trustain(Biolegend)阻断细胞,然后与从20 μ g/ml最高浓度以半对数稀释系列滴定的抗CD25抗体在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后洗涤并与PE缀合的抗人IgG Fc抗体(Biolegend)孵育。再次洗涤细胞并将细胞重悬于含有DAPI的FACS缓冲液中,并在Intellicyt iQue上采集。在样品采集期间通过流式细胞术使用FSC对SSC参数来门控活细胞。将染色细胞的Geo平均强度绘制在XY图上,将Geo平均强度相对于浓度对数绘图,并将数据拟合到非线性回归曲线,从该曲线计算EC50。

[0381] 与表达CD25的Karpas 299细胞和体外分化的Treg的结合通过以下检测:用30mg/ml抗体染色测试品(抗CD25一抗),然后半对数系列稀释(7个点)在冰上放置30分钟。然后在冰上用浓度为1mg/ml二抗(Alexa Fluor 647-AffiniPure Fab片段山羊抗人IgG(H+L) - (Jackson ImmunoResearch))染色30分钟。所有样品一式两份地染色。在样品采集期间通过流式细胞术使用FSC对SSC参数来门控活细胞。将染色细胞的平均荧光强度(MFI)绘制在XY图上,将MFI相对于浓度对数绘图,并将数据拟合成非线性回归曲线,从该曲线计算EC50。如

图16和图21所示的结果证实抗CD25抗体结合表达CD25的细胞。

[0382] 通过STAT5磷酸化测定的体外IL-2信号传导:

[0383] 使用其中检查IL-2信号传导的STAT5磷酸化测定表征IL-2阻断。先前冷冻的PBMC (Stemcell Technologies) 在10U/ml抗CD25抗体存在下在96-U底孔板中培养30分钟,然后在含有10%FBS (Sigma)、2mM L-谷氨酰胺 (Life Technologies) 和10000U/ml Pen-Strep (Sigma) 的RPMI 1640 (Life Technologies) 中添加0.1U/ml、1U/ml或10U/ml的不同浓度的IL-2 (Peprotech)。当将细胞固定并用eBioscience™ Foxp3/转录因子染色缓冲液套件 (Invitrogen) 透化并用BD Phosflow Perm缓冲液III (BD Biosciences) 处理时,停止IL-2诱导的STAT5磷酸化。当细胞固定并用eBioscience™ Foxp3/转录因子染色缓冲液组 (Invitrogen) 透化并用BD Phosflow Perm缓冲液III (BD Biosciences) 处理时,停止IL-2诱导的STAT5磷酸化。然后用表面和细胞内荧光染料标记的抗体同时对细胞染色 (STAT5-Alexa Fluor 647 clone 47/stat5/pY694 BD Bioscience、CD3-PerCP-Cy5.5 clone UCHT1 Biolegend、CD4-BV510 clone SK3 BD Bioscience、CD8-Alexa Fluor 700 clone RPA-T8 Invitrogen、CD45RA-PE-Cy7 clone HI100 Invitrogen、FoxP3-Alexa Fluor 488 clone 236A/E7 Invitrogen), 在Fortessa LSR X20流式细胞仪 (BD Bioscience) 上获得样品,并使用BD FACSDIVA软件分析该样品。使用FCS-H对比FCS-A排除双峰,并且使用SSC-A对比FCS-A参数定义淋巴细胞。使用CD3 PerCP-Cy5.5-A对比FCS-A图定义CD3⁺T细胞,并且在直方图上绘制门,该直方图显示对比STAT5 Alexa Fluor 647-A的计数以确定STAT5⁺CD3⁺T细胞群。如下计算IL-2信号传导的阻断百分比: %阻断 = 100 × [(无Ab组的%Stat5⁺细胞 - 10ug/ml Ab组的%Stat5⁺细胞) / (无Ab组的%Stat5⁺细胞)]。通过不同细胞亚集 (CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺FoxP3⁺、初始和记忆T细胞) 对STAT5磷酸化的进一步分析也通过门控相应的亚集评估并如上所述地分析。使用GraphPad Prism v7进行图像和统计分析 (结果未显示)。结果如图17和图22所示。

[0384] 体外T细胞活化测定:

[0385] 在其中检查细胞内颗粒酶B (GrB) 上调和增殖的T细胞活化测定中表征IL-2信号传导对Teff反应的影响。根据制造商的推荐,将先前冷冻的原代人泛性T细胞 (Stemcell Technologies) 用eFluor450细胞增殖染料 (Invitrogen) 标记,并以1 × 10⁵细胞/孔添加到96-U底孔板中的含有10%FBS (Sigma)、2mM L-谷氨酰胺 (Life Technologies) 和10000U/ml Pen-Strep (Sigma) 的RPMI 1640 (Life Technologies) 中。然后,用10μg/ml抗CD25抗体或对照抗体,随后用人T活化剂CD3/CD28 (细胞与珠子之比为20:1; Gibco) 处理细胞,在37℃下在5% CO₂ 加湿培养箱中孵育72小时。为了评估T细胞活化,用eBioscience Fixable Viability Dye efluor780 (Invitrogen), 随后用针对表面T细胞标记物的荧光染料标记的抗体 (CD3-PerCP-Cy5.5 clone UCHT1 Biolegend, CD4-BV510 clone SK3 BD Bioscience, CD8-Alexa Fluor 700 clone RPA-T8 Invitrogen, CD45RA-PE-Cy7 clone HI100 Invitrogen, CD25-BUV737 clone 2A3 BD Bioscience) 对细胞染色,然后将细胞用eBioscience™ Foxp3/转录因子染色缓冲液套件 (Invitrogen) 固定和透化,然后针对胞内GrB和核内FoxP3 (颗粒酶B-PE克隆GB11 BD Bioscience, FoxP3-APC克隆236A/E7) 染色。在Fortessa LSR X20流式细胞仪 (BD Bioscience) 上获得样品,并使用BD FACSDIVA软件分析该样品。使用FCS-H对比FCS-A排除双峰,并且使用SSC-A对比FCS-A参数定义淋巴细胞。在

Fortessa LSR X20流式细胞仪(BD Bioscience)上获得样品,并使用BD FACSDIVA软件进行分析。使用FCS-H与FCS-A排除双峰,并且使用SSC-A与FCS-A参数定义淋巴细胞。使用GrB-PE-A与增殖eFluor450-A图评估从活CD3⁺淋巴细胞门控的CD4⁺和CD8⁺T细胞亚群。结果以增殖GrB阳性细胞占全CD4⁺T细胞群的百分比表示。使用GraphPad Prism v7进行图和统计分析。结果如图18所示。

[0386] 体外ADCC测定:

[0387] 使用SU-DHL-1或SR-786 (CD25阳性) 人细胞系作为靶细胞,用人NK细胞作为效应细胞来源,进行抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用测定 (ADCC测定) 以表征抗人CD25抗体。使用NK细胞阴性分离试剂盒 (Stemcell Technologies) 从健康供体的PBMC分离NK细胞。将NK细胞在2ng/mL IL-2 (Peprotech) 存在下培养过夜。在抗CD25或同种型抗体存在下, SU-DHL-1或SR-786靶细胞伴随钙黄绿素-AM (Thermofisher) 而加样并铺板,每种条件4个重复,在37℃下5%CO₂下孵育30分钟。孵育后,NK细胞以1:10的靶效(T:E)比(10000靶细胞和100000个效应细胞)添加,并在37℃下5%CO₂下孵育4小时。在BMG Fluostar读板器上进行上清液中钙黄绿素荧光的读数。相对于靶细胞单独(0%裂解)和用0.1%皂苷处理的靶细胞(100%裂解),计算特异性裂解的百分比。使用Graphpad Prism v7产生原始数据图,生成剂量响应曲线。将靶细胞裂解百分比绘制在XY图上,将标准化的钙黄绿素AM百分比释放相对于浓度对数绘图,并将数据拟合至非线性回归曲线,从该曲线计算EC50。结果如图19所示。

[0388] 体外ADCP测定:

[0389] 使用的体外分化的Treg作为靶细胞,单核细胞源性巨噬细胞作为效应细胞进行抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)测定。通过Ficoll梯度离心从白细胞锥(leucocyte cone)分离PBMC。使用CD14微珠(Miltenyi Biotec)来分离单核细胞(CD14⁺细胞)。在含有10%FBS (Sigma), 2mM L-谷氨酰胺 (Life Technologies) 和10000U/ml青霉素-链霉素 (Sigma)的RPMI 1640 (Life Technologies) 中的50ng/ml M-CSF的存在下,培养单核细胞5天,3天后添加含有M-CSF的新鲜培养基。使用人Treg细胞分化试剂盒(R&D Systems)分离调节性T细胞(Treg)。这些细胞在37℃下5%CO₂加湿培养箱中培养5天,并按照制造商的建议用eFluor450染料(Invitrogen)标记。在第5天,在抗CD25抗体或对照的存在下巨噬细胞和标记有eFluor450染料的Treg以10:1的效靶比共培养4小时,如下文所描述。以1×10⁴个细胞/孔添加靶细胞(Treg),同时以1×10⁵个细胞/孔添加效应细胞(巨噬细胞),即效靶比为10:1。然后以1μg/ml的最高浓度加入抗CD25抗体,接着一式两份地对数系列稀释(7个点)。将细胞和抗体在37℃下5%CO₂下孵育4小时。为了评估ADCP,将细胞置于冰上,用细胞表面标志物CD14(CD14-PerCP-Cy5.5的克隆MFP9 BD Biosciences公司)染色,并用eBioscience固定缓冲液固定。使用Fortessa LSR X20进行双色流式细胞术分析。将残余靶细胞定义为eFluor450-dye⁺/CD14⁻的细胞。巨噬细胞定义为CD14⁺。双标记细胞(eFluor450-染料⁺/CD14⁺)被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细胞的吞噬作用: %吞噬作用=100×[(双阳性%)/(双阳性%+残留靶百分比)]。结果如图20所示。

[0390] 统计:

[0391] 使用Prism软件(GraphPad)进行曲线拟合以确定EC 50值和最大活性。

[0392] 人抗体不阻断IL2-CD25相互作用

[0393] 使用标准夹心分组测定在Forte Bio Octet Red384系统(Pall Forte Bio

Corp., USA) 上进行对IL2配体与CD25结合的干扰。将MA251抗体加载到AHQ传感器上,并用非相关的人IgG1抗体阻断传感器上未被占据的Fc结合位点。将传感器暴露于100nM人CD25,然后暴露于100nM人IL-2。使用Forte Bio Data Analysis Software 7.0处理数据。抗原缔合后人IL2的额外结合表明未占据的表位(非竞争者),而没有结合表明表位阻断(竞争者)。

[0394] 结果:

[0395] 针对7G7B6抗体不干扰IL-2信号传导的能力和杀伤表达CD25的靶细胞的能力,进一步评价7G7B6抗体。在STAT5测定中,无论测试的IL-2浓度如何,7G7B6都不阻断IL-2信号传导,而IL-2信号传导被参考抗体达利珠单抗完全阻断(图17)。已被证明通过所谓的“Tac”表位阻断CD25与IL-2的相互作用(Queen C et al,1989,PNAS.86(24):10029-10033,and Bielekova B,2013,Neurotherapeutics,10(1):55-67)的达利珠单抗结合不同于7G7B6的表位(图10和图24B),这可以解释为什么在STAT5磷酸化测定中达珠单抗阻断IL-2信号传导而7G7B6不阻断IL-2信号传导(图17)。另外,达利珠单抗降低活化T细胞的效应应答,可能是由于达利珠单抗阻断IL-2信号传导,而不阻断IL-2信号传导的7G7B6则对T细胞应答没有负面影响(图18)。最后,当与IgG1同种型抗体比较时,7G7B6嵌合抗体通过ADCC(图19)和ADCP(图20)杀伤表达CD25的细胞,即肿瘤细胞或调节性T细胞。

[0396] 总之,已经表征了作为嵌合抗体的7G7B6并且证明了对CD25阳性细胞(Treg或癌细胞系)的有效杀伤,并且不干扰IL-2信号传导,因此不抑制T效应应答。因此,7G7B6是消耗Treg的抗体,其可以作为单一疗法或组合用于治疗癌症。

[0397] 针对MA-251抗体不干扰IL-2信号传导的能力,进一步评估MA-251抗体。在IL2-CD25 Octet竞争测定中评估MA251抗体。观察到同时IL2结合和MA251与CD25的结合(图23),表明MA251以非竞争性方式结合。在STAT5测定中,无论测试的IL-2浓度如何,MA-251都不阻断IL-2信号传导,而IL-2信号传导被参考抗体达利珠单抗完全阻断(图22)。已被证明通过所谓的“Tac”表位阻断CD25与IL-2的相互作用(Queen C et al,1989and Bielekova B,2013)的达利珠单抗结合不同于MA-251的表位(图10和图24(E)),这可以解释为什么在STAT5磷酸化测定中达珠单抗阻断IL-2信号传导而MA251不阻断IL-2信号传导(图22)。

[0398] 实施例8:抗人CD25 Ab竞争测定

[0399] 使用标准夹心分组测定在Forte Bio Octet Red96系统(Pall Forte Bio Corp., USA)上进行抗体竞争。26.8nM his标记的重组人CD 25被加样到Ni-NTA传感器上持续200秒。在基线步骤后,将动力学缓冲液传感器暴露于66.6nM的第一抗体600秒或1800秒,然后暴露于第二抗CD25抗体(也为66.6nM,暴露600秒或1800秒)。使用Forte Bio数据分析软件9.0处理数据。二抗的额外结合表明未占据的表位(无表位竞争),而没有结合表明表位阻断(表位竞争)。

[0400] 结果

[0401] 非IL-2信号阻断剂的mAb(抗体1和抗体3)彼此竞争或与7G7B6和MA251竞争,而它们不与研究达利珠单抗或研究巴利昔单抗竞争(实施例(A)至(N),图24)。IL-2信号传导阻断剂(即TSK031)确实与研究达利珠单抗和研究巴利昔单抗竞争,并且不与7G7B6竞争(实施例(O)至(Q),图24)。

[0402] 实施例9:非阻断性抗体的治疗分析

[0403] 在第0天,将200 μ l RPMI1640中的 1×10^7 个SU-DHL-1细胞植入右侧腹。在第12天,

将具有可触知肿瘤的小鼠随机分配为用溶媒处理或用抗体1每周两次以2mg/kg处理。在第15天,将肿瘤大小为100至200mm³的小鼠随机分配,并给药溶媒、每周两次2mg/kg抗体1或单剂量的10mg/kg抗体1。

[0404] 结果

[0405] 每周两次以2mg/kg给药的抗体1阻止具有可触知肿瘤的9/10小鼠的生长(图25(A) - (B))。在肿瘤大小为100至200mm³的小鼠中,每周两次以2mg/kg给药以及10mg/kg单剂量给药也阻止肿瘤生长(图25(C) - (E))。

[0406] 实施例10:抗人CD 25抗体的亲和力测量

[0407] 在25℃的环境实验温度下,使用CM-5传感器芯片,在Biacore 2000中,通过SPR测量抗人CD25抗体的K_D来确定抗人CD25抗体的亲和力。最初,将抗人抗体在分析缓冲液(pH7.4, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05%吐温20)中跨过所有流动细胞而固定到RU为12000至14000保持10分钟。将配体(抗体测试物品)依次加样至145至190RU之间的捕获水平。然后将分析物(his标记的重组人CD25)与从400nM开始的两倍稀释的分析缓冲液(最低浓度为3.13nM)缔合持续6分钟。在10分钟内在分析缓冲液中进行解离。样品浓度之间的再生步骤在10mM甘氨酸pH 1.7中进行10分钟。在25μl/分钟的流速下保持整个过程。图26(C)和图26(D)使用具有参考差集的由Biacore提供的全局二态反应构象变化分析软件拟合动力学数据。图26(A)、图26(B)和图26(E)使用具有参考差集的1:1朗缪尔模型。

[0408] 通常如之前所述地在Octet RED384上进行ForteBio亲和力测量(参见,例如, Estep P et al., 2013. Mabs. 5(2), 270-8)。

[0409] 可供选择地,通过在Octet Red 96系统(Pall Forte Bio Corp., USA)上通过生物层干涉测量法测量抗人CD25抗体的K_D来确定抗人CD25抗体的亲和力。将传感器在动力学缓冲液中离线平衡10分钟,然后在线监测60秒以建立基线。将13.32nM抗体加载到AHC生物传感器中200秒,然后添加不同浓度的his标记的rhCD25(1:3连续稀释, 50nM至0.54nM)持续600秒,并使它们在动力学缓冲液中解离400s。使用具有参考差集的由Pall Forte Bio提供的全局1:1分析软件拟合动力学数据。结果显示在图26(F)中。

[0410] 结果:

[0411] 结果示于图26中。该测定中针对抗CD25抗体建立的K_D值如下:对抗体1, 为 3.2×10^{-9} M;对抗体3, 为 3.8×10^{-9} M, 对达利珠单抗, 为 0.61×10^{-9} M。

[0412] 实施例11:抗CD25抗体的表征-抗体1至抗体21

[0413] 抗CD25抗体与表达CD25的细胞的结合:

[0414] 通过与淋巴瘤人细胞系结合来评估候选者,所述淋巴瘤人细胞系例如Karpas 299、SU-DHL-1和SR-786细胞、体外分化的Treg细胞、活化的人或食蟹猴PBMC、HSC-F食蟹猴T细胞系和CHO细胞。

[0415] 与表达CD25的人细胞系(SU-DHL-1和SR-786)的结合通过以下检测:首先用Trustain (Biolegend)阻断细胞,然后与从20μg/ml最高浓度以半对数稀释系列滴定的抗CD25抗体在4℃下孵育30分钟,然后洗涤并与PE缀合的抗人IgG Fc抗体(Biolegend)孵育。再次洗涤细胞并将细胞重悬于含有DAPI的FACS缓冲液中,并在Intellicyt iQue上采集。在样品采集期间通过流式细胞术使用FSC对SSC参数来门控活细胞。将染色细胞的Geo平均强度绘制在XY图上,将Geo平均强度相对于浓度对数绘图,并将数据拟合到非线性回归曲线,

从该曲线计算EC50。

[0416] 与表达CD25的Karpas 299细胞和体外分化的Treg的结合通过以下检测:用30mg/ml抗体染色测试品(抗CD25一抗),然后半对数系列稀释(7个点)在冰上放置30分钟。然后在冰上用浓度为1mg/ml二抗(Alexa Fluor647-AffiniPure Fab片段山羊抗人IgG(H+L)或Alexa Fluor 647-AffiniPure F(ab')₂片段兔抗人IgG Fc γ 片段-(Jackson ImmunoResearch))染色30分钟。所有样品一式两份地染色。在样品采集期间通过流式细胞术使用FSC对SSC参数来门控活细胞。将染色细胞的平均荧光强度(MFI)绘制在XY图上,将MFI相对于浓度对数绘图,并将数据拟合成非线性回归曲线,从该曲线计算EC50。

[0417] 与表达CD25的活化人或食蟹猴PMBC的结合通过以下检测:用20mg/ml抗体染色测试品(抗CD25一抗),然后半对数系列稀释(7个点)在冰上放置30分钟。然后在冰上用浓度为1mg/ml二抗(兔抗人Fc γ F(ab')₂-(Jackson ImmunoResearch))染色30分钟。所有样品一式三份地染色。为了使由第二抗体结合介导的交联诱导的细胞死亡最小化,一次在4个测试物品的染色组群中检查细胞系。在样品采集期间通过流式细胞术使用FSC对SSC参数来门控活淋巴细胞。将门控的CD4⁺和CD8⁺T细胞亚集的平均荧光强度(MFI)绘制在XY图上,将MFI相对于浓度对数绘图,并将数据拟合成非线性回归曲线,从该曲线计算EC50。

[0418] 与表达CD25的HSC-F的食蟹猴T细胞系的结合通过以下检测:用20mg/ml抗体染色测试物(抗CD25一抗),然后半对数系列稀释(7个点)在冰上放置30分钟。所有样品一式三份地染色。为了使由第二抗体结合介导的交联诱导的细胞死亡最小化,一次在4个测试物品的染色组群中检查细胞系。在样品采集期间通过流式细胞术使用FSC对SSC参数来门控活淋巴细胞。将活细胞的平均荧光强度(MFI)绘制在XY图上,将MFI相对于浓度对数绘图,并将数据拟合成非线性回归曲线,从该曲线计算EC50。

[0419] 还检测了与表达CD25的CHO细胞的结合。用洗涤缓冲液洗涤大约100000个过表达抗原的细胞,并在室温下用100 μ l 100nM IgG孵育15分钟。然后用洗涤缓冲液洗涤细胞两次,并与100 μ l 1:100人PE在冰上孵育15分钟。然后用洗涤缓冲液洗涤细胞两次,并在FACS Canto II分析仪(BD Biosciences)上分析。未修饰的CHO细胞系也用作阴性对照。

[0420] 通过STAT5磷酸化测定的体外IL-2信号传导:

[0421] 使用其中检查IL-2信号传导的STAT5磷酸化测定表征IL-2阻断。先前冷冻的PBMC(Stemcell Technologies)在10U/ml抗CD25抗体存在下在96-U底孔板中培养30分钟,然后在含有10%FBS(Sigma)、2mM L-谷氨酰胺(Life Technologies)和10000U/ml Pen-Strep(Sigma)的RPMI 1640(Life Technologies)中添加10U/ml或0.25U/ml、0.74U/ml、2.22U/ml、6.66U/ml或20U/ml的不同浓度的IL-2(Peprotech)。当将细胞固定并用eBioscience™ Foxp3/转录因子染色缓冲液套件(Invitrogen)透化并用BD Phosflow Perm缓冲液III(BD Biosciences)处理时,停止IL-2诱导的STAT5磷酸化。当细胞固定并用eBioscience™ Foxp3/转录因子染色缓冲液组(Invitrogen)透化并用BD Phosflow Perm缓冲液III(BD Biosciences)处理时,停止IL-2诱导的STAT5磷酸化。然后用表面和细胞内荧光染料标记的抗体同时对细胞染色(STAT5-Alexa Fluor 647clone 47/stat5/pY694 BD Bioscience、CD3-PerCP-Cy5.5 clone UCHT1 Biolegend、CD4-BV510 clone SK3 BD Bioscience、CD8-Alexa Fluor 700clone RPA-T8 Invitrogen、CD45RA-PE-Cy7 clone HI100Invitrogen、FoxP3-Alexa Fluor 488clone 236A/E7 Invitrogen),在Fortessa LSR X20流式细胞仪

(BD Bioscience) 上获得样品,并使用BD FACSDIVA软件分析该样品。使用FCS-H对比FCS-A排除双峰,并且使用SSC-A对比FCS-A参数定义淋巴细胞。使用CD3 PerCP-Cy5.5-A对比FCS-A图定义CD3⁺T细胞,并且在直方图上绘制门,该直方图显示对比STAT5 Alexa Fluor 647-A的计数以确定STAT5⁺CD3⁺T细胞群。如下计算IL-2信号传导的阻断百分比: %阻断 = $100 \times [(\text{无Ab组的}\% \text{Stat5}^+ \text{细胞} - 10\mu\text{g/ml Ab组的}\% \text{Stat5}^+ \text{细胞}) / (\text{无Ab组的}\% \text{Stat5}^+ \text{细胞})]$ 。通过不同细胞亚集(CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺FoxP3⁺、初始和记忆T细胞)对STAT5磷酸化的进一步分析也通过门控相应的亚集评估并如上所述地分析。使用GraphPad Prism v7进行图像和统计分析。

[0422] 体外T细胞活化测定:

[0423] 在其中检查细胞内颗粒酶B(GrB)上调和增殖的T细胞活化测定中表征IL-2信号传导对Teff反应的影响。根据制造商的推荐,将先前冷冻的原代人泛性T细胞(Stemcell Technologies)用eFluor450细胞增殖染料(Invitrogen)标记,并以 1×10^5 细胞/孔添加到96-U底孔板中的含有10%FBS(Sigma)、2mM L-谷氨酰胺(Life Technologies)和10000U/ml Pen-Strep(Sigma)的RPMI 1640(Life Technologies)中。然后,用10 $\mu\text{g/ml}$ 抗CD25抗体或对照抗体,随后用人T活化剂CD3/CD28(细胞与珠子之比为20:1;Gibco)处理细胞,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在5%CO₂加湿培养箱中孵育72小时。为了评估T细胞活化,用eBioscience Fixable Viability Dye efluor780(Invitrogen),随后用针对表面T细胞标记物的荧光染料标记的抗体(CD3-PerCP-Cy5.5 clone UCHT1 Biolegend,CD4-BV510 clone SK3 BD Bioscience, CD8-Alexa Fluor 700clone RPA-T8 Invitrogen,CD45RA-PE-Cy7clone HI100 Invitrogen,CD25-BUV737 clone 2A3 BD Bioscience)对细胞染色,然后将细胞用eBioscience TM Foxp3/转录因子染色缓冲液套件(Invitrogen)固定和透化,然后针对胞内GrB和核内FoxP3(颗粒酶B-PE克隆GB11 BD Bioscience,FoxP3-APC克隆236A/E7)染色。在Fortessa LSR X20流式细胞仪(BD Bioscience)上获得样品,并使用BD FACSDIVA软件分析该样品。使用FCS-H对比FCS-A排除双峰,并且使用SSC-A对比FCS-A参数定义淋巴细胞。在Fortessa LSR X20流式细胞仪(BD Bioscience)上获得样品,并使用BD FACSDIVA软件进行分析。使用FCS-H与FCS-A排除双峰,并且使用SSC-A与FCS-A参数定义淋巴细胞。使用GrB-PE-A与增殖eFluor450-A图评估从活CD3⁺淋巴细胞门控的CD4⁺和CD8⁺T细胞亚群。结果表示为增殖GrB阳性细胞占全CD4⁺或CD8⁺T细胞群的百分比。使用GraphPad Prism v7进行图和统计分析。

[0424] 体外ADCC测定:

[0425] 使用SU-DHL-1或SR-786(CD25阳性)人细胞系作为靶细胞,用人NK细胞作为效应细胞来源,进行抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用测定(ADCC测定)以表征抗人CD25抗体。使用NK细胞阴性分离试剂盒(Stemcell Technologies)从健康供体的PBMC分离NK细胞。将NK细胞在2ng/mL IL-2(Peprotech)存在下培养过夜。在抗CD25或同种型抗体存在下,SU-DHL-1或SR-786靶细胞伴随钙黄绿素-AM(Thermofisher)而加样并铺板,每种条件4个重复,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下5%CO₂下孵育30分钟。孵育后,NK细胞以1:10的靶效(T:E)比(10000靶细胞和100000个效应细胞)添加,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下5%CO₂下孵育4小时。在BMG Fluostar读板器上进行上清液中钙黄绿素荧光的读数。相对于靶细胞单独(0%裂解)和用0.1%皂苷处理的靶细胞(100%裂解),计算特异性裂解的百分比。使用Graphpad Prism v7产生原始数据图,生成剂量响应曲

线。将靶细胞裂解百分比绘制在XY图上,将标准化的钙黄绿素AM百分比释放相对于浓度对数绘图,并将数据拟合至非线性回归曲线,从该曲线计算EC50。

[0426] 还在荧光素酶报告系统测定中确定ADDC。将表达CD25的SR786细胞(本文称为靶(T)细胞)在37℃下与不同浓度的抗CD25mAb(或对照IgG)在低IgG的补充FBS的培养基(含4%FBS的RPMI)中孵育20分钟。然后将ADCC效应细胞(E)以1:1的E:T比添加至细胞-mAb混合物中。效应细胞是用荧光素酶报告系统稳定转染并且过表达CD16/Fc γ RIIIA (Promega)的Jurkat细胞。在37℃下过夜孵育后,裂解细胞,并按照制造商的说明(Promega Bio-Glow方案),通过水解特定荧光素酶底物的发光释放来测量荧光素酶活性。

[0427] 使用体外分化的巨噬细胞和Treg细胞的体外ADCP测定:

[0428] 使用的体外分化的Treg作为靶细胞,单核细胞源性巨噬细胞作为效应细胞进行抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)测定。通过Ficoll梯度离心从白细胞锥(leucocyte cone)分离PBMC。使用CD14微珠(Miltenyi Biotec)来分离单核细胞(CD14⁺细胞)。在含有10%FBS(Sigma),2mM L-谷氨酰胺(Life Technologies)和10000U/ml青霉素-链霉素(Sigma)的RPMI 1640(Life Technologies)中的50ng/ml M-CSF的寻在下,培养单核细胞5天,3天后添加含有M-CSF的新鲜培养基。使用人Treg细胞分化试剂盒(R&D Systems)分离调节性T细胞(Treg)。这些细胞在37℃下5%CO₂加湿培养箱中培养5天,并按照制造商的建议用eFluor450染料(Invitrogen)标记。在第5天,在抗CD25抗体或对照的存在下巨噬细胞和标记有eFluor450染料的Treg以10:1的效靶比共培养4小时,如下文所描述。以 1×10^4 个细胞/孔添加靶细胞(Treg),同时以 1×10^5 个细胞/孔添加效应细胞(巨噬细胞),即效靶比为10:1。然后以1 μ g/ml的最高浓度加入抗CD25抗体,接着一式两份地对数系列稀释(7个点)。将细胞和抗体在37℃下5%CO₂下孵育4小时。为了评估ADCP,将细胞置于冰上,用细胞表面标志物CD14(CD14-PerCP-Cy5.5的克隆MFP9 BD Biosciences公司)染色,并用eBioscience固定缓冲液固定。使用Fortessa LSR X20进行双色流式细胞术分析。将残余靶细胞定义为eFluor450-dye⁺/CD14⁻的细胞。巨噬细胞定义为CD14⁺。双标记细胞(eFluor450-染料⁺/CD14⁺)被认为代表巨噬细胞对靶标的吞噬作用。用下列等式计算靶细胞的吞噬作用: %吞噬作用 = $100 \times [(\text{双阳性} \%) / (\text{双阳性} \% + \text{残留靶百分比})]$ 。

[0429] 使用Fc γ RIIa-H Reporter测定的体外ADCP测定

[0430] ADCP生物测定效应细胞(Fc γ RIIa-H)获自Promega (Cat#G9881/5; Lot#0000261099)。使用96孔白色聚苯乙烯板(Costar; Cat#3917)以5000个细胞/孔铺板SUDHL-1靶细胞(25 μ l/孔)。使用3倍稀释液连续稀释测试抗体,并将25 μ l添加至细胞中。每孔添加50,000 μ l效应细胞,25 μ l体积,得到效应细胞和靶细胞的比例为10:1。使用细胞培养基铺板所有靶细胞、抗体和效应细胞。将板在37℃下孵育18小时。然后将平板从培养箱中取出并在室温下保持20分钟。将60 μ l Bio-Glo荧光素酶测定底物缓冲液添加到每个孔中,然后孵育30分钟,并使用GloMax Multi检测系统(Promega)测量发光。

[0431] 统计:

[0432] 使用Prism软件(GraphPad)进行曲线拟合,确定EC 50值和最大活性。

[0433] 结果

[0434] 针对抗体1抗体不干扰IL-2信号传导的能力和杀伤表达CD25的靶细胞的能力,评价抗体1抗体。与rhCD25结合的结果和IL-2竞争性结合分析示于图27和图28中。使用Octet

的配体结合测定显示了,抗体1不影响IL-2与CD25的结合(图29)。这在STAT5测定中得到证实,其中无论测试的IL-2浓度如何,抗体1不阻断IL-2信号传导,而IL-2信号传导则被参照抗体达利珠单抗完全阻断(图31)。已被证明通过所谓的“Tac”表位阻断CD25与IL-2的相互作用(Queen C et al,1989and Bielekova B,2013)的达利珠单抗结合不同于抗体1的表位(图30),这可以解释为什么达珠单抗阻断IL-2信号传导而抗体1不阻断IL-2信号传导(图31)。此外,达利珠单抗可降低活化T细胞的效应应答,可能是由于其阻断IL-2信号传导,而不阻断IL-2信号传导的抗体1对T细胞应答没有负面影响(图32)。最后,当与IgG1同种型抗体比较时,抗体1通过ADCC(图33)和ADCP(图34)杀伤表达CD25的细胞,即肿瘤细胞或调节性T细胞。

[0435] 总之,已表征了抗体1并证明了对CD25阳性细胞(Treg或癌细胞系)的有效杀伤,并且不干扰IL-2信号传导,因此不抑制T效应应答。因此,抗体1是消耗Treg的抗体,其可以作为单一疗法或组合用于治疗癌症。

[0436] 针对抗体3抗体不干扰IL-2信号传导的能力和杀伤表达CD25的靶细胞的能力,评价抗体3抗体。与rhCD25结合的结果和IL-2竞争性结合分析示于图35和图36中。使用Octet的配体结合测定显示了,抗体3不影响IL-2与CD25的结合(图37)。这在STAT5测定中得到证实,其中无论测试的IL-2浓度如何,抗体3不阻断IL-2信号传导,而IL-2信号传导被参照抗体达利珠单抗完全阻断(图39)。已被证明通过所谓的“Tac”表位阻断CD25与IL-2的相互作用的达利珠单抗结合不同于抗体3的表位(图38),这可以解释为什么达珠单抗阻断IL-2信号传导而抗体3不阻断IL-2信号传导(图39)。此外,达利珠单抗可降低活化T细胞的效应应答,可能是由于其阻断IL-2信号传导,而当与在没有抗体或具有同种型对照的情况比较时,不阻断IL-2信号传导的抗体3仅有对T细胞反应最小的影响(如果有的话)(图40)。最后,当与IgG1同种型抗体比较时,抗体3通过ADCC(图41)和ADCP(图42)杀伤表达CD25的细胞,即肿瘤细胞或调节性T细胞。

[0437] 总之,已表征了抗体3并证明了对CD25阳性细胞(Treg或癌细胞系)的有效杀伤,并且不干扰IL-2信号传导,因此不抑制T效应应答。因此,抗体3是消耗Treg的抗体,其可以作为单一疗法或组合用于治疗癌症。

[0438] 针对抗体4抗体不干扰IL-2信号传导的能力和杀伤表达CD25的靶细胞的能力,评价抗体4抗体。与rhCD25结合的结果和IL-2竞争性结合分析示于图43和图44中。使用Octet的配体结合测定显示了,抗体4不影响IL-2与CD25的结合(图45)。这在STAT5测定中得到证实,其中无论测试的IL-2浓度如何,抗体4不阻断IL-2信号传导,而IL-2信号传导被参照抗体达利珠单抗完全阻断(图47)。已被证明通过所谓的“Tac”表位阻断CD25与IL-2的相互作用的达利珠单抗结合不同于抗体4的表位(图46),这可以解释为什么达珠单抗阻断IL-2信号传导而抗体4不阻断IL-2信号传导(图47)。此外,达利珠单抗可降低活化T细胞的效应应答,可能是由于其阻断IL-2信号传导,而不阻断IL-2信号传导的抗体4对T细胞应答没有负面影响(图48)。最后,当与IgG1同种型抗体比较时,抗体4通过ADCC(图49)和ADCP(图50)杀伤表达CD25的细胞,即肿瘤细胞或调节性T细胞。

[0439] 总之,已表征了抗体4并证明了对CD25阳性细胞(Treg或癌细胞系)的有效杀伤,并且不干扰IL-2信号传导,因此不抑制T效应应答。因此,抗体4是消耗Treg的抗体,其可以作为单一疗法或组合用于治疗癌症。

[0440] 针对抗体2抗体不干扰IL-2信号传导的能力和杀伤表达CD25的靶细胞的能力,评价抗体2抗体。与rhCD25结合的结果和IL-2竞争性结合分析示于图51和图52中。使用Octet的配体结合测定显示了,抗体2不影响IL-2与CD25的结合(图53)。这在STAT5测定中得到证实,其中无论测试的IL-2浓度如何,抗体2不阻断IL-2信号传导,而IL-2信号传导被参照抗体达利珠单抗完全阻断(图55)。已被证明通过所谓的“Tac”表位阻断CD25与IL-2的相互作用的达利珠单抗结合不同于抗体2的表位(图54),这可以解释为什么达珠单抗阻断IL-2信号传导而抗体2不阻断IL-2信号传导(图55)。最后,当与IgG1同种型抗体比较时,抗体2通过ADCC(图56)和ADCP(图57)杀伤表达CD25的细胞,即肿瘤细胞或调节性T细胞。

[0441] 总之,已表征了抗体2并证明了对CD25阳性细胞(Treg或癌细胞系)的有效杀伤,并且不干扰IL-2信号传导,因此不抑制T效应应答。因此,抗体2是Treg消耗抗体,其可以作为单一疗法或组合用于治疗癌症。

[0442] 抗体5抗体的特征在于包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含以下序列:

[0443] EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTLDSYGVSWVRQAPGKGLEW VGVTS SGG S AYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRYVYTG GYLYHYGMDLWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:10);

[0444] 所述轻链可变区包含以下序列:

[0445] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISDYLA WYQQKPGKVPKLLI YAASTLPFGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDVATYYCQGT YDSSDWYW AFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14)。

[0446] 如上所述,互补决定区(CDR,即CDR1、CDR2和CDR3)的序列和框架区(FR)根据Kabat编号方案定义。

[0447] 针对抗体5抗体不干扰IL-2信号传导的能力和杀伤表达CD25的靶细胞的能力,评价抗体5抗体。与rhCD25结合的结果示于图58中。STAT5测定显示抗体5不阻断测试的IL-2信号传导,而IL-2信号传导被抗体达利珠单抗完全阻断(图59)。竞争测定显示抗体5不与IL-2信号阻断剂达利珠单抗或巴利昔单抗竞争(图60(A)和(B)),而它确实与7G7B6(非IL-2阻断剂)竞争(图60(C))。最后,当与抗人CD25 Fc沉默对照抗体比较时,抗体5通过ADCC(图61)和ADCP(图61)杀伤表达CD25的细胞,即肿瘤细胞或调节性T细胞。

[0448] 总之,已表征了抗体5并证明了对CD25阳性细胞(Treg或癌细胞系)的有效杀伤,并且不干扰IL-2信号传导,因此不抑制T效应应答。因此,抗体5是消耗Treg的抗体,其可以作为单一疗法或组合用于治疗癌症。

[0449] 抗体6、抗体7、抗体8和抗体9抗体的特征在于包含以下序列:

[0450] 抗体6包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含以下序列:

[0451] EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEL VSTINGYGD TTYYPDSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDRDYGNS YYYALDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:23);

[0452] 所述轻链可变区包含以下序列:

[0453] EIVLTQSPGTL S LSPGERATLSCRASSSV S FMHWLQQKPGQAPRPLIYA TSNLASGIPDRFSGSGS GTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNP PAFGQGT KLEIK (SEQ ID NO:25)。

[0454] 抗体7包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含以下序列:

[0455] EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEL VSTINGYGD TTYYPDSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDRDYGNS YYYALDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:23);

[0456] 所述轻链可变区包含以下序列:

[0457] QIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASSSVSFMHWLQQKPGQSPRPLIYA TSNLASGIPDRFSGSGSG
TDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPPAFGQGT KLEIK(SEQ ID NO:26)。

[0458] 抗体8包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含以下序列:

[0459] EVQLLESGGGLVQP~~GGSLRLS~~CAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEL VSTINGYGDTTYYPDSVKGR
FTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCA RDRDYGNSYYYALDYWGQGLTVTVSS(SEQ ID NO:24);

[0460] 所述轻链可变区包含以下序列:

[0461] EIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASSSVSFMHWLQQKPGQAPRPLIYA TSNLASGIPDRFSGSGSG
TDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPPAFGQGT KLEIK(SEQ ID NO:25)。

[0462] 抗体9包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含以下序列:

[0463] EVQLLESGGGLVQP~~GGSLRLS~~CAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEL VSTINGYGDTTYYPDSVKGR
FTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCA RDRDYGNSYYYALDYWGQGLTVTVSS(SEQ ID NO:24);

[0464] 所述轻链可变区包含以下序列:

[0465] QIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASSSVSFMHWLQQKPGQSPRPLIYA TSNLASGIPDRFSGSGSG
TDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPPAFGQGT KLEIK(SEQ ID NO:26)。

[0466] 如上所述,互补决定区(CDR,即CDR1、CDR2和CDR3)的序列和框架区(FR)根据Kabat编号方案定义。

[0467] 表位绘图的结果表明,抗体6、抗体7、抗体8和抗体9与人CD25在SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)和第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)的区域中结合,并且与人CD25细胞外蛋白序列以 10^{-8} M至 10^{-10} M的Kd值结合。

[0468] 针对抗体6、抗体7、抗体8和抗体9不干扰IL-2信号传导的能力和杀伤表达CD25的靶细胞的能力,评价抗体6、抗体7、抗体8和抗体9。与rhCD25结合的结果示于图63中。STAT5测定显示抗体不阻断测试的IL-2信号传导,而IL-2信号传导被抗体达利珠单抗完全阻断(图65)。竞争测定显示抗体7不与IL-2信号阻断剂达利珠单抗或巴利昔单抗竞争(图64(A)和(B))。最后,当与抗人CD25 Fc沉默对照抗体比较时,抗体7通过ADCC(图66)和ADCP(图67)杀伤表达CD25的细胞,即肿瘤细胞或调节性T细胞。

[0469] 总之,已表征了抗体6、抗体7、抗体8和抗体9,并证明了对CD25阳性细胞(Treg或癌细胞系)的有效杀伤,并且不干扰IL-2信号传导,因此不抑制T效应应答。因此,抗体是消耗Treg的抗体,其可以用于单一疗法或组合用于治疗癌症。

[0470] 抗体10、抗体11、抗体12、抗体12、抗体13、抗体14、抗体15、抗体16、抗体17、抗体18、抗体19、抗体20、抗体21,抗体的特征在于包含有包含以下顺序的重链可变区:

[0471]

	VH 蛋白	VL 蛋白
Ab10	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WIRQPPGKGLEWIG <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RVTISKDNSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:27)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASSSV</u> <u>SYMH</u> WYQQKPGQAPRPLIF <u>ATSNLAS</u> GIP ARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYC <u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:30)
Ab11	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WIRQPPGKGLEWIG <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RVTISKDNSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:27)	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASSSV</u> <u>SYMH</u> WYQQKPGQAPRPLIF <u>ATSNLAS</u> GIP ARFSGSGSGTDYTLTSSLEPEDFAVYYC <u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:31)
Ab12	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WIRQPPGKGLEWIG <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RVTISKDNSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:27)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>RASSSV</u> <u>SYMH</u> WYQQKPGKAPKPLIF <u>ATSNLAS</u> GVP SRFSGSGSGTDYTLTSSLPEDFATYYC <u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:32)
Ab13	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WIRQPPGKGLEWIG <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RVTISKDNSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTLLTVSS SEQ ID NO:27)	QIQLTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>RASSSV</u> <u>SYMH</u> WYQQKPGKSPKPLIF <u>ATSNLAS</u> GVP SRFSGSGSGTDYTLTSSLPEDFATYYC <u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:33)
AB14	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WVRQPPGKGLEWIG <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RVTISKDNSKSQFSLKLSSVTAADT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:28)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASSSV</u> <u>SYMH</u> WYQQKPGQAPRPLIF <u>ATSNLAS</u> GIP ARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYC <u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:30)
Ab15	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS <u>GFSLT</u>	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASSSV</u>

[0472]

	<u>SYGIQ</u> WVRQPPGKGLEWIG <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RVTISKDNSKSKQFSLKLSSVTAADT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:28)	<u>SYMHWYQQKPGQAPRPLIF</u> <u>ATSNLAS</u> GIP ARFSGSGSGTDYTLTISLLEPEDFAVYYC <u>QOWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:31)
Ab16	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WVRQPPGKGLEWIG <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RVTISKDNSKSKQFSLKLSSVTAADT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:28)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>RASSSV</u> <u>SYMHWYQQKPGKAPKPLIF</u> <u>ATSNLAS</u> GVP SRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC <u>QOWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:32)
Ab17	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WVRQPPGKGLEWIG <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RVTISKDNSKSKQFSLKLSSVTAADT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:28)	QIQLTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>RASSSV</u> <u>SYMHWYQQKPGKSPKPLIF</u> <u>ATSNLAS</u> GVP SRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC <u>QOWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:33)
Ab18	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RFTISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:29)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASSSV</u> <u>SYMHWYQQKPGQAPRPLIF</u> <u>ATSNLAS</u> GIP ARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC QOWSSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:30)
Ab19	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RFTISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:29)	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASSSV</u> <u>SYMHWYQQKPGQAPRPLIF</u> <u>ATSNLAS</u> GIP ARFSGSGSGTDYTLTISLLEPEDFAVYYC <u>QOWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:31)
Ab20	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RFTISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:29)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>RASSSV</u> <u>SYMHWYQQKPGKAPKPLIF</u> <u>ATSNLAS</u> GVP SRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC <u>QOWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:32)
Ab21	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVS <u>GFSLT</u> <u>SYGIQ</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>VIWAGGSTNYN</u> <u>SALMS</u> RFTISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDT AVYYCA <u>RAYGYDGSWLAY</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:29)	QIQLTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>RASSSV</u> <u>SYMHWYQQKPGKSPKPLIF</u> <u>ATSNLAS</u> GVP SRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC <u>QOWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:33)

[0473] 如上所述,互补决定区(CDR,即CDR1、CDR2和CDR3)的序列和框架区(FR)根据Kabat编号方案定义。

[0474] 表位绘图的结果表明,抗体10、抗体11、抗体12、抗体12、抗体13、抗体14、抗体15、抗体16、抗体17、抗体18、抗体19、抗体20、抗体21于人CD25在SEQ ID NO:1的第150至163个氨基酸(YQCVQGYRALHRGP)和第166至180个氨基酸(SVCKMTHGKTRWTQP)的区域中结合,并且与人CD25细胞外蛋白序列以 10^{-8} M至 10^{-10} M的Kd值结合。

[0475] 针对抗体不干扰IL-2信号传导的能力和杀伤表达CD25的靶细胞的能力,评价抗体。与rhCD25结合的结果示于图68中。STAT5测定显示抗体不阻断测试的IL-2信号传导,而IL-2信号传导被抗体达利珠单抗完全阻断(图70)。竞争测定显示抗体19不与IL-2信号阻断剂达利珠单抗或巴利昔单抗竞争(图69(A)和(B))。最后,当与抗人CD25 Fc沉默对照抗体比较时,抗体12、抗体19和抗体20通过ADCC(图71)和ADCP(图72和73)杀伤表达CD25的细胞,肿瘤细胞或调节性T细胞。

[0476] 总之,已表征了抗体10、抗体11、抗体12、抗体12、抗体13、抗体14、抗体15、抗体16、抗体17、抗体18、抗体19、抗体20、抗体21,并证明了对CD25阳性细胞(Treg或癌细胞系)的有效杀伤,并且不干扰IL-2信号传导,因此不抑制T效应应答。因此,抗体是消耗Treg的抗体,其可以作为单一疗法或组合用于治疗癌症。

[0477] 实施例12:与癌症疫苗组合的治疗分析

[0478] 测定了在BVAB16免疫治疗抗性小鼠模型中,非IL-2阻断性抗CD25抗体7D4小鼠IgG2a与GVAX组合的治疗活性。在第0天,皮内植入 50×10^3 个B16BL6细胞。在第5天,腹腔内给药200 μ g非IL-2阻断性抗CD25抗体,或不给药。在第6、9和12天,小鼠用 1×10^6 个经照射的(150Gy)B16B16细胞佐有GM-CSF(GVAX)处理或不处理。监测肿瘤生长和小鼠存活直至第33天。结果示于图74中。

[0479] 在B16B16模型中观察到GVAX和7D4非阻断性抗CD25抗体的组合的协同效应。因此,伴随癌症疫苗给药7D4增强了疫苗诱导的抗肿瘤反应。这些结果表明,非IL2阻断性消耗性抗CD25抗体可与癌症疫苗组合用于治疗人类癌症。此外,该数据显示非IL2阻断型消耗性抗体能够增强疫苗诱导的免疫应答,具有比癌症更广泛的应用。

[0480] 上述说明书中提及的所有出版物均通过引用结合到本文中。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明所述方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员来说是显而易见的。尽管已经结合特定的优选实施方式描述了本发明,但是应该理解,要求保护的本发明不应该不适当地限于这些特定的实施方式。实际上,对于分子生物学、细胞免疫学或相关领域的技术人员显而易见的,用于实施本发明的所述模式的各种修改旨在落入所附权利要求的范围内。

序列表

<110> 塔斯克疗法有限公司

<120> 用于肿瘤特异性细胞消耗的化合物和方法

<130> P115692WO

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 272

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val

1 5 10 15

Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro

20 25 30

His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn

35 40 45

Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr

50 55 60

Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys

65 70 75 80

Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro

85 90 95

Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro

100 105 110

Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro

115 120 125

Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val

130 135 140

Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His

145 150 155 160

Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg

165 170 175

Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln

[0001]

180 185 190

Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu

195 200 205

Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr

210 215 220

Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln

225 230 235 240

Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu

245 250 255

Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile

260 265 270

<210> 2

<211> 219

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

[0002]

Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys

1 5 10 15

Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg

20 25 30

Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly

35 40 45

Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser

50 55 60

Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln

65 70 75 80

Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp

85 90 95

Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn

100 105 110

Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr

115 120 125

Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu

130 135 140

[0003]

Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln
145 150 155 160

Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln Phe Pro Gly Glu Glu
165 170 175

Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu Ser Glu Thr Ser Cys
180 185 190

Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr Glu Met Ala Ala Thr
195 200 205

Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln
210 215

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 3

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp Tyr Gly Asn Ser Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 4

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met

20 25 30

His Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Ala

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

[0004]

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 5

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

20 25 30

Gly Ile Gln Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 6
<211> 106
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 6
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
35 40 45
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu
[0005] 65 70 75 80
Asp Ala Asp Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 7
Gly Phe Thr Leu Asp Ser Tyr Gly Val Ser
1 5 10
<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 8

Gly Val Thr Ser Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 9

Asp Arg Tyr Val Tyr Thr Gly Gly Tyr Leu Tyr His Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Leu

<210> 10

<211> 125

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

[0006]

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

20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Val Thr Ser Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Arg Tyr Val Tyr Thr Gly Gly Tyr Leu Tyr His Tyr Gly Met

100 105 110

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 鼠
<400> 11
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 12
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Pro Phe
1 5
<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 13
[0007] Gln Gly Thr Tyr Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Trp Ala
1 5 10
<210> 14
<211> 109
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 14
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Pro Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Thr Tyr Asp Ser Ser Asp

[0008]

85 90 95

Trp Tyr Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 15

Ser Gly Phe Ser Val Asp Ile Tyr Asp Met Ser

1 5 10

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 16

Tyr Ile Ser Ser Ser Leu Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 17

Glu Arg Ile Tyr Ser Val Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Leu

1 5 10 15

<210> 18

<211> 125

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Val Asp Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Leu Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Ile Tyr Ser Val Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Met

100 105 110

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 19

Gln Ala Ser Gln Gly Ile Thr Asn Asn Leu Asn

[0009]

1 5 10

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 20

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 21

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

1 5 10

<210> 22

<211> 110

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Ile Thr Asn Asn
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Val Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

[0010]

<210> 23

<211> 123

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 23

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Asn Gly Tyr Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

[0011]

Ala Arg Asp Arg Asp Tyr Gly Asn Ser Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24

<211> 123

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 24

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Asn Gly Tyr Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp Tyr Gly Asn Ser Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 106

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 25

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 26

<211> 106

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 26

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

[0012]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 27

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Gln Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

[0013]

<210> 28
<211> 119
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 28

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

100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 29
<211> 119
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 29
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60
[0014] Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 30
<211> 106
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 30
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Phe

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 31

<211> 106

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 31

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

1 5 10 15

[0015]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Phe

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 32

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

[0016]

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Phe

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 33

<211> 106

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 33

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Leu Ile Phe

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 34

<211> 139

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 34

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val

20 25 30

Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Asp Thr

35 40 45

Ile Thr Ala Tyr Tyr Ile His Phe Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Asp Ser Thr Glu Tyr

65 70 75 80

Ala Glu Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asn Thr Ser Ser

85 90 95

Asn Thr Ala His Leu Lys Tyr Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala

100 105 110

[0017]

Thr Tyr Phe Cys Thr Thr Asp Asn Met Gly Ala Thr Glu Phe Val Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 35

<211> 129

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 35

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Val Leu Thr Gln Pro Lys Ser Val Ser Ala

20 25 30

Ser Leu Glu Ser Thr Val Lys Leu Ser Cys Lys Leu Asn Ser Gly Asn

35 40 45

Ile Gly Ser Tyr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Glu Gly Arg Ser

50 55 60

Pro Thr Asn Leu Ile Tyr Arg Asp Asp Lys Arg Pro Asp Gly Ala Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Ile Ser Ser Asn Ser Ala Phe Leu
85 90 95

Thr Ile Asn Asn Val Gln Thr Glu Asp Glu Ala Met Tyr Phe Cys His
100 105 110

Ser Tyr Asp Gly Arg Met Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
115 120 125

Val

<210> 36

<211> 438

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 36

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

[0018] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Ser
20 25 30

Trp Val Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly
115 120 125

Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
145 150 155 160

[0019]

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
165 170 175

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln
180 185 190

Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
210 215 220

Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
225 230 235 240

Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp
245 250 255

Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
260 265 270

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn
275 280 285

Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp
290 295 300

Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro
305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala
325 330 335

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp
340 345 350

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile
355 360 365

Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn
370 375 380

Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys
385 390 395 400

Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
405 410 415

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
420 425 430

Ser His Ser Pro Gly Lys
435
<210> 37
<211> 444
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 37
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Ser
20 25 30
Trp Val Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Ile Phe Pro Asn Ser Gly Ala Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
[0020] Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val
115 120 125
Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140
Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
145 150 155 160
Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
165 170 175
Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln
180 185 190
Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys

210 215 220
Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe
225 230 235 240
Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val
245 250 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile
260 265 270
Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr
275 280 285
His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro
290 295 300
Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro
325 330 335
Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu
340 345 350
[0021] Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp
355 360 365
Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr
370 375 380
Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu
405 410 415
Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His
420 425 430
His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440
<210> 38
<211> 219
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 38

[0022]

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Pro Thr Leu Ser Ala Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Ser
85 90 95
Ser His Phe Pro Asn Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215
<210> 39
<211> 114
<212> PRT
<213> 鼠
<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Thr Asn Gly Gly Leu Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Cys Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Gly Gly Phe Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 40
<211> 107
[0023] <212> PRT
<213> 鼠
<400> 40
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Met Ser Ile Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Ser Asn
20 25 30
Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Arg Asn Met Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

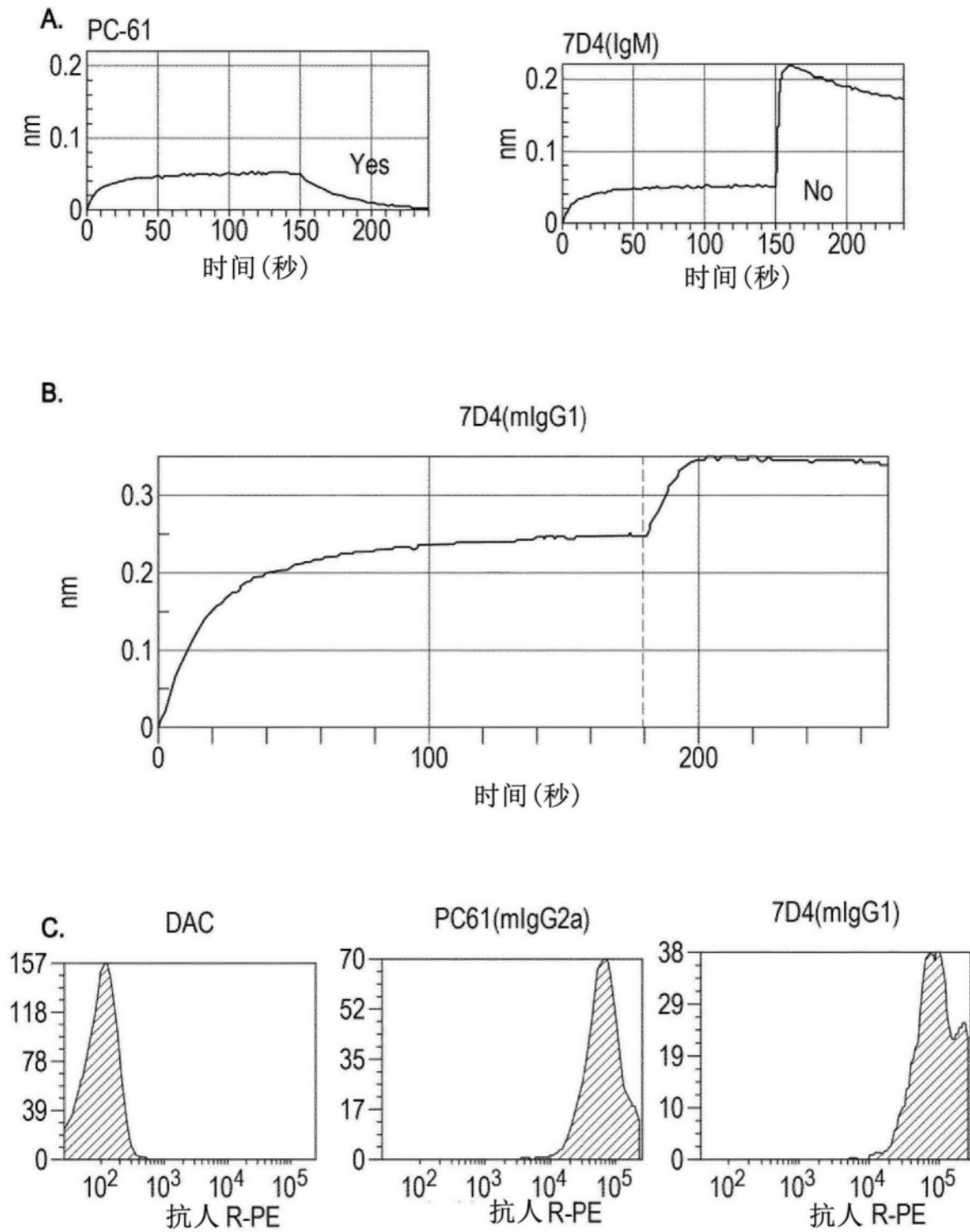


图1

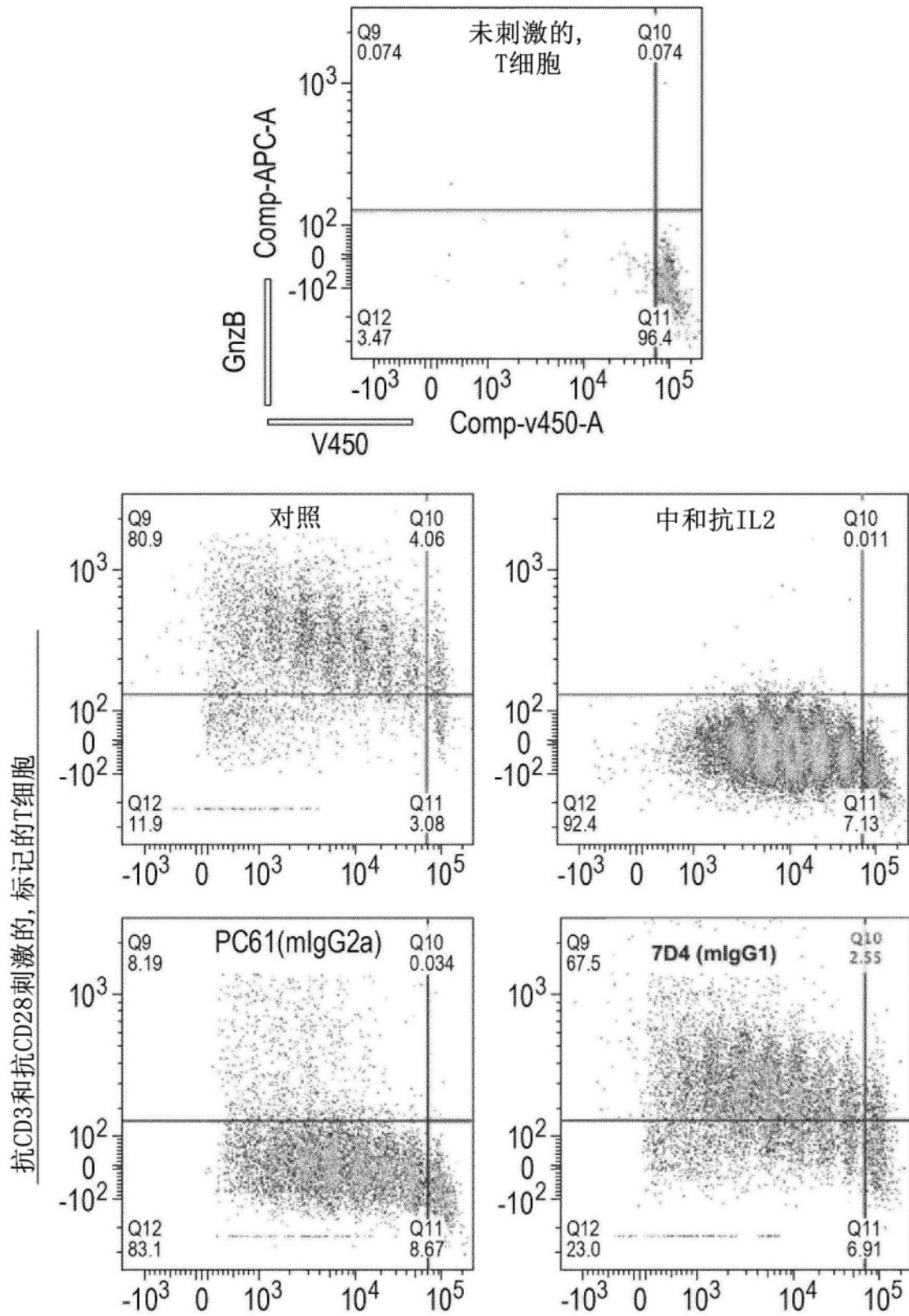


图2

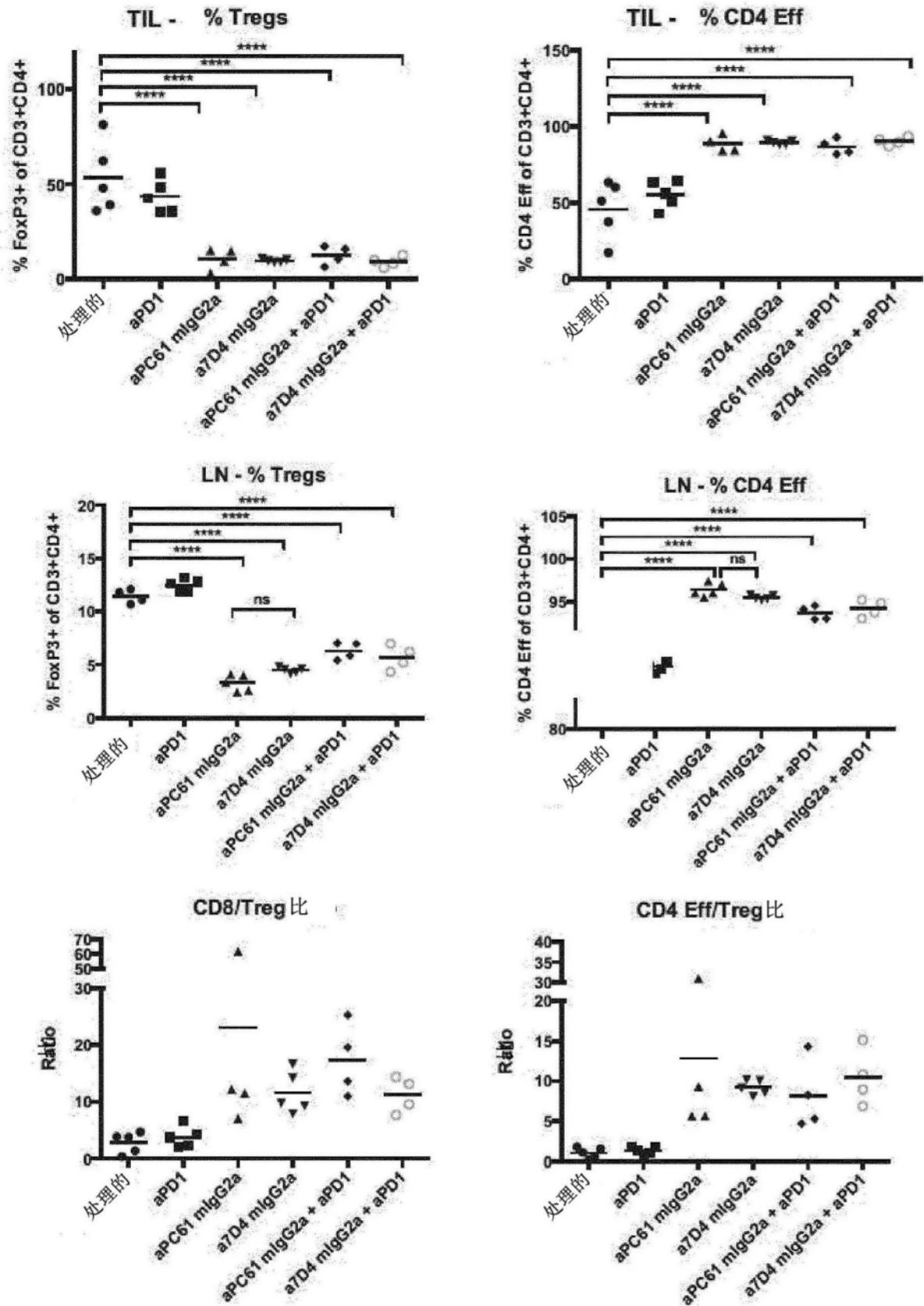


图3

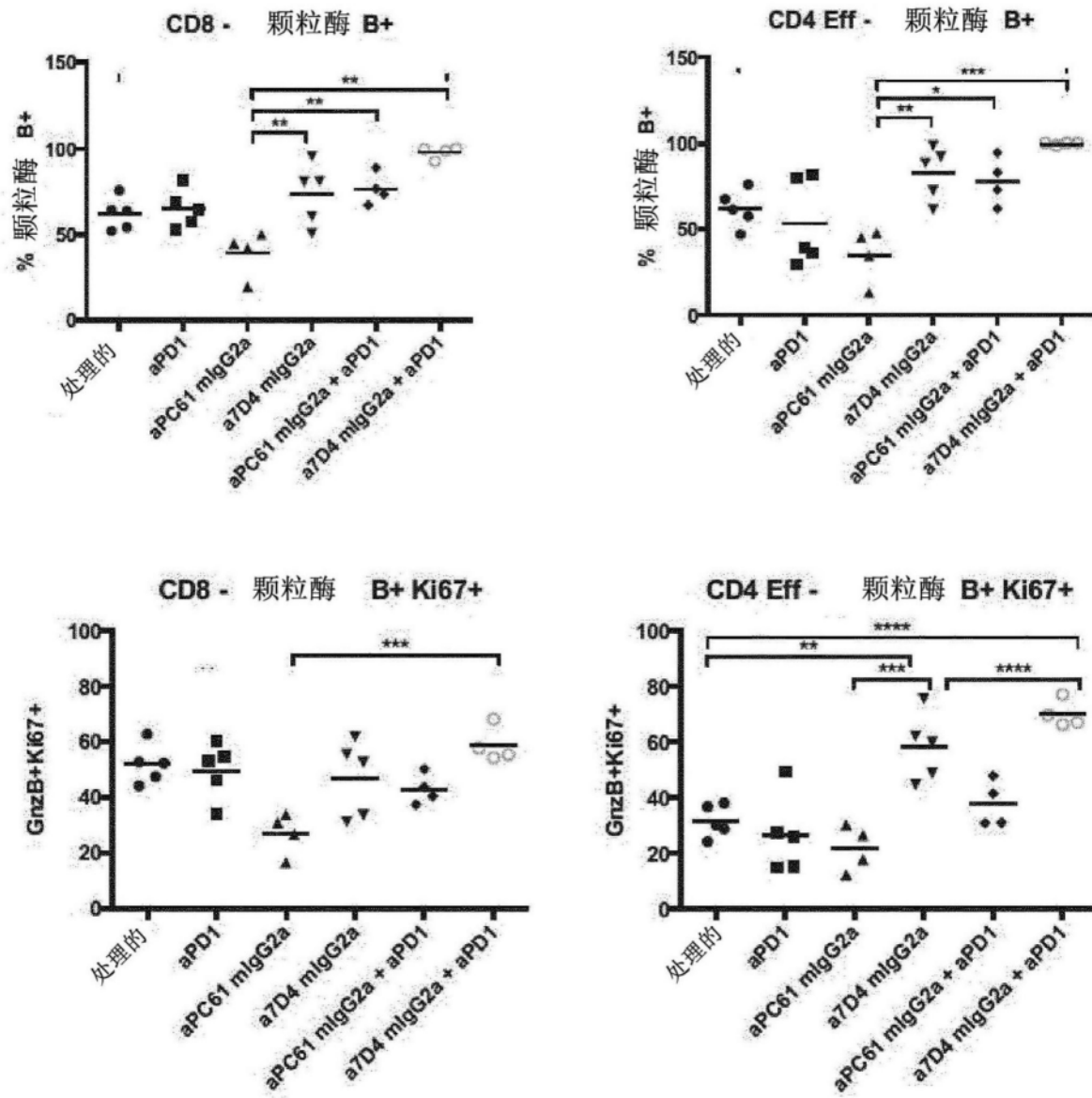


图4

CT26模型

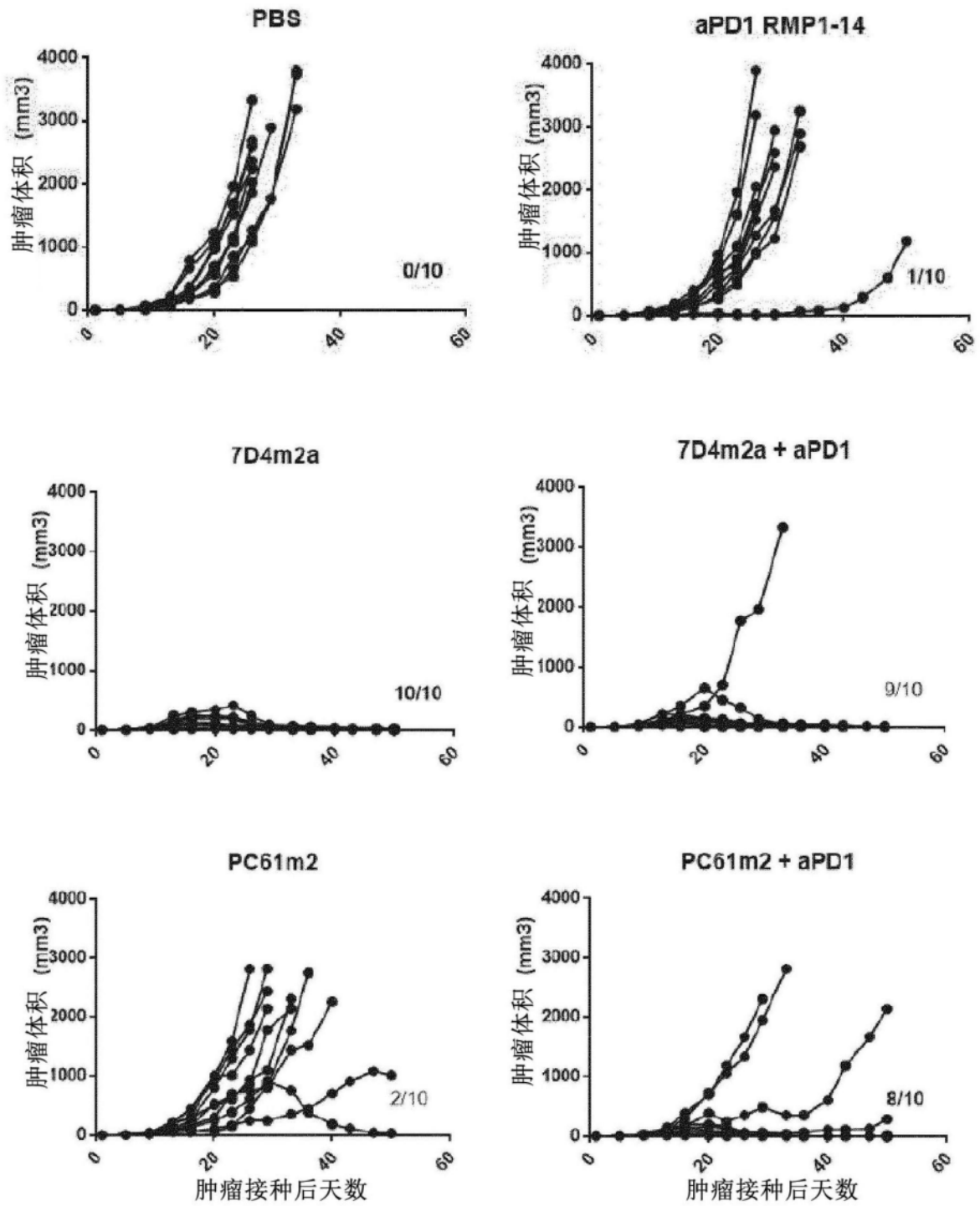


图5

CT26 模型

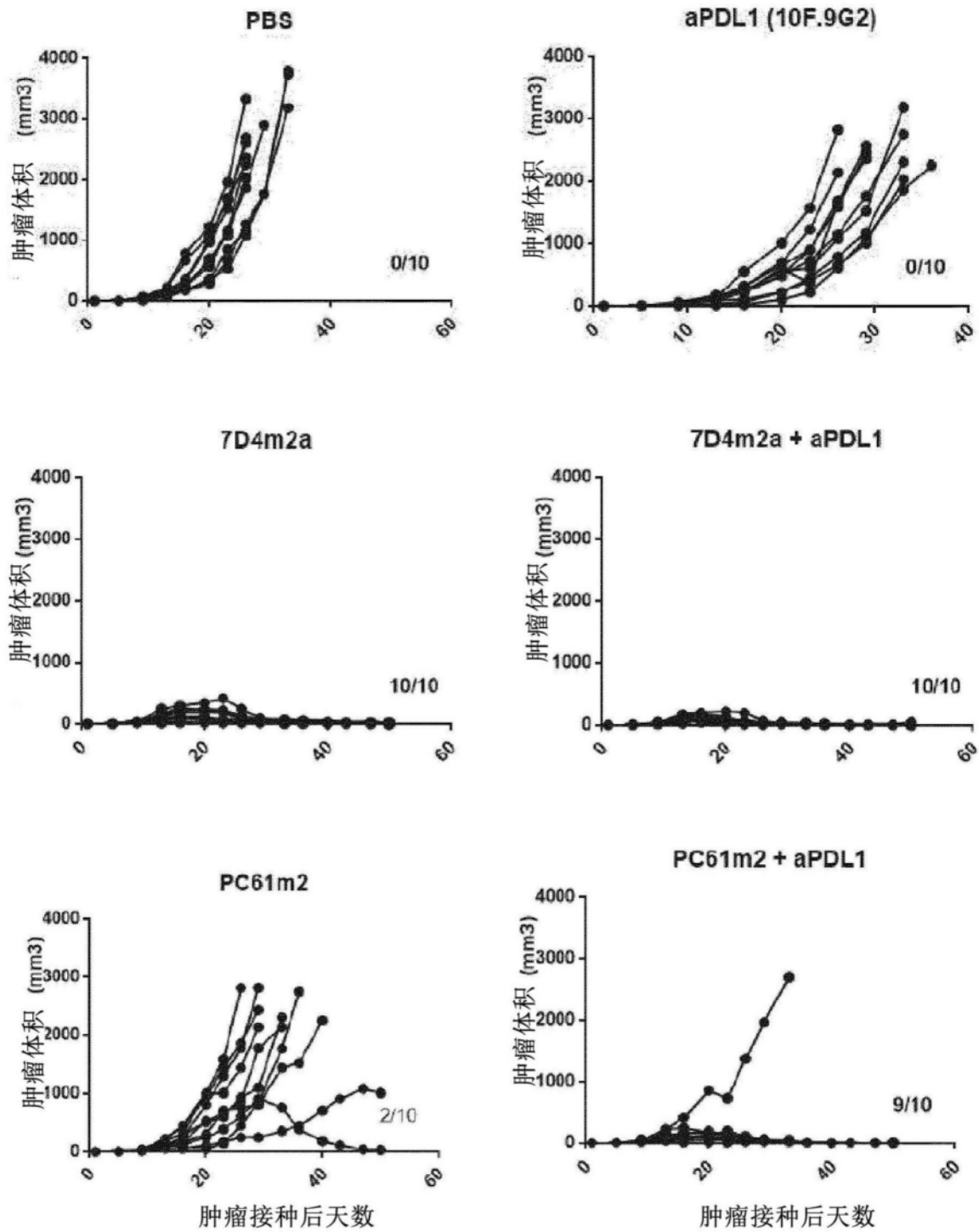


图6

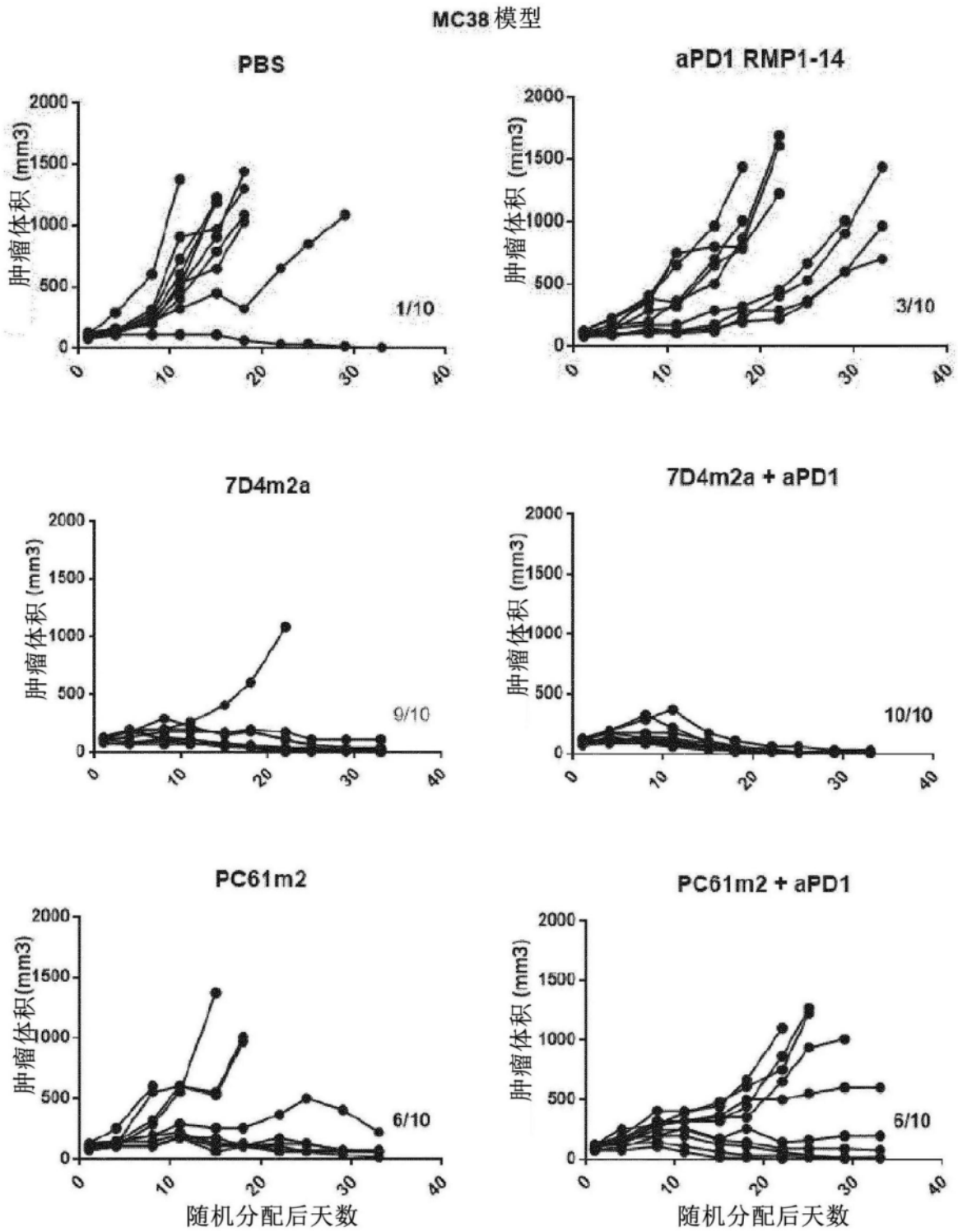


图7

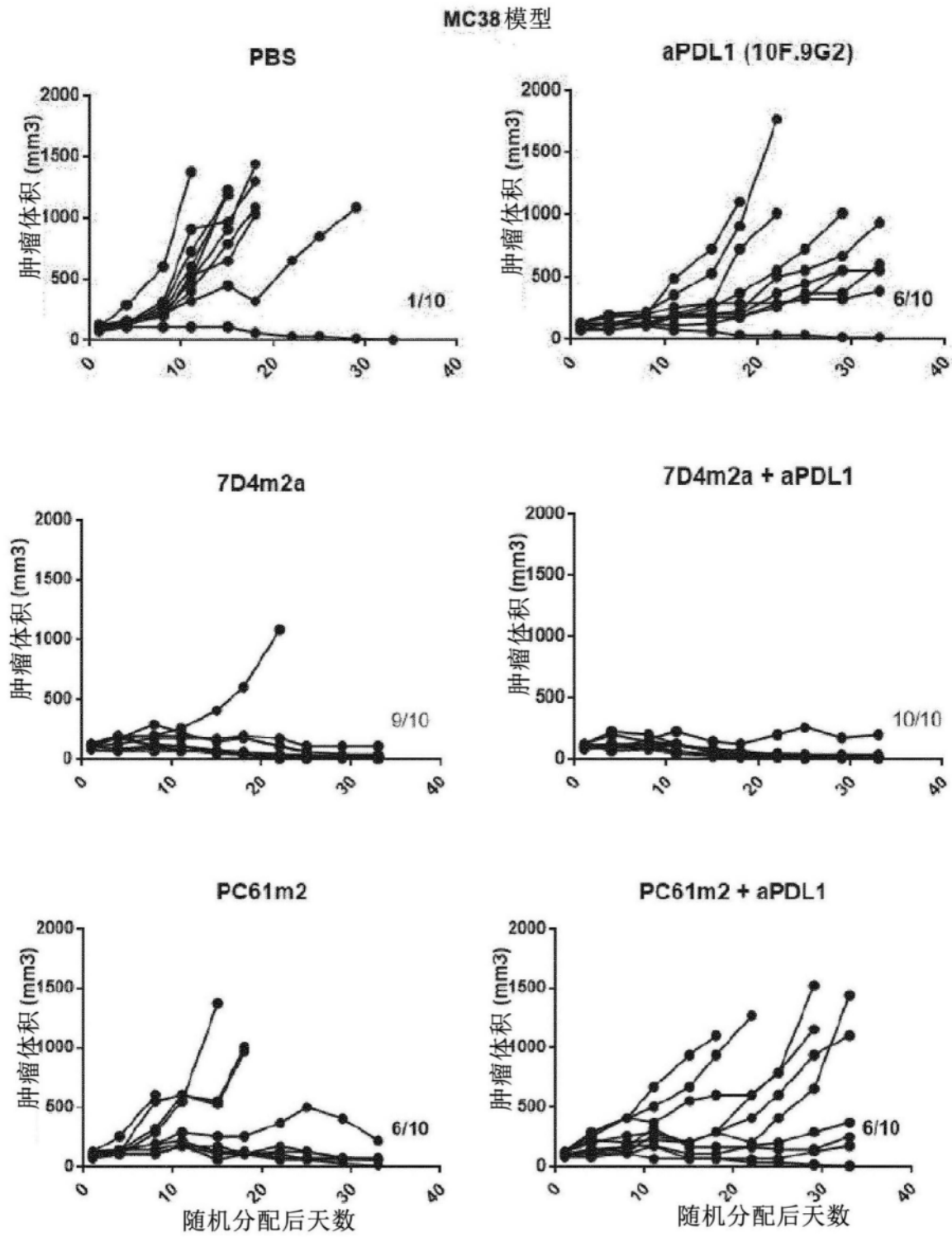


图8

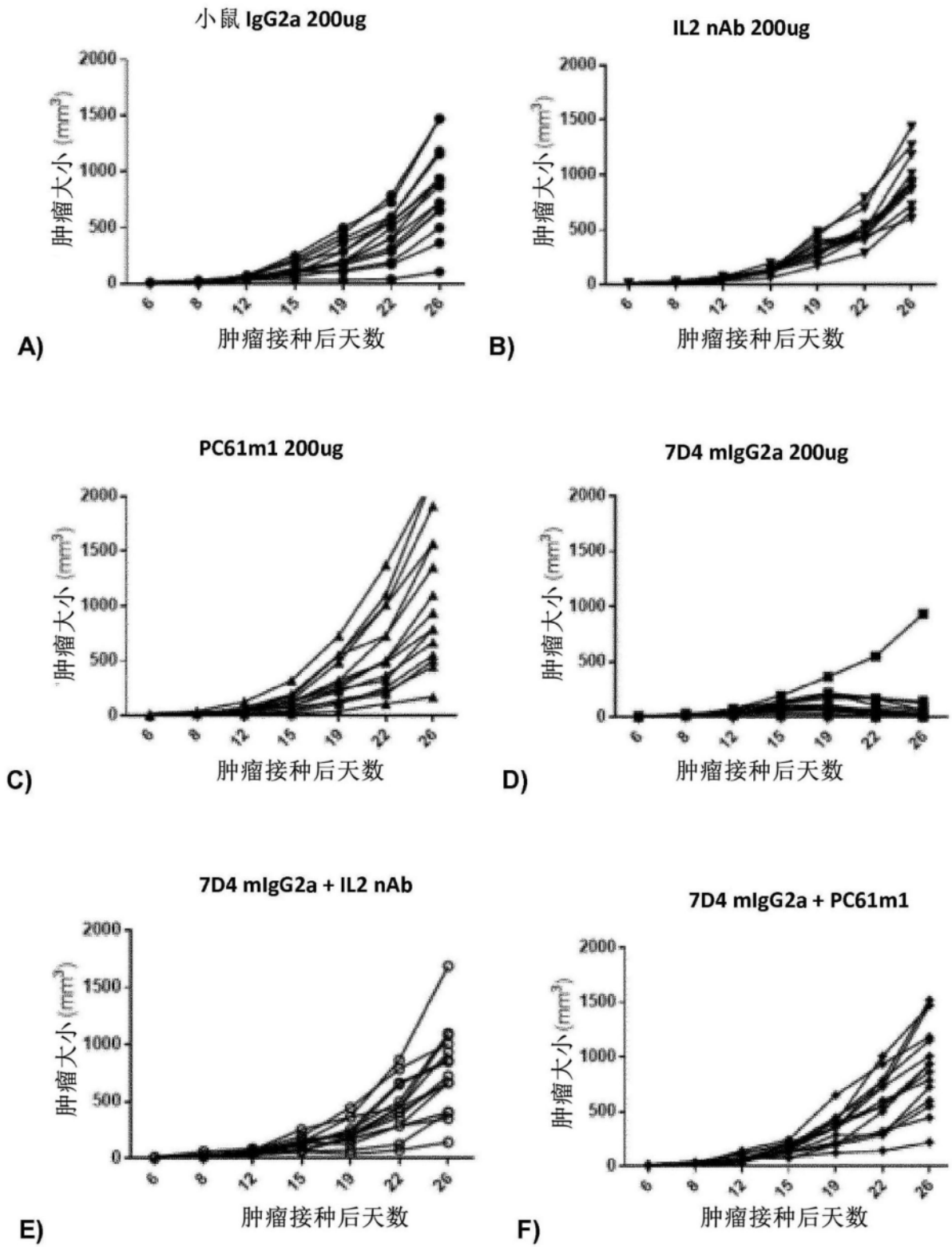


图9

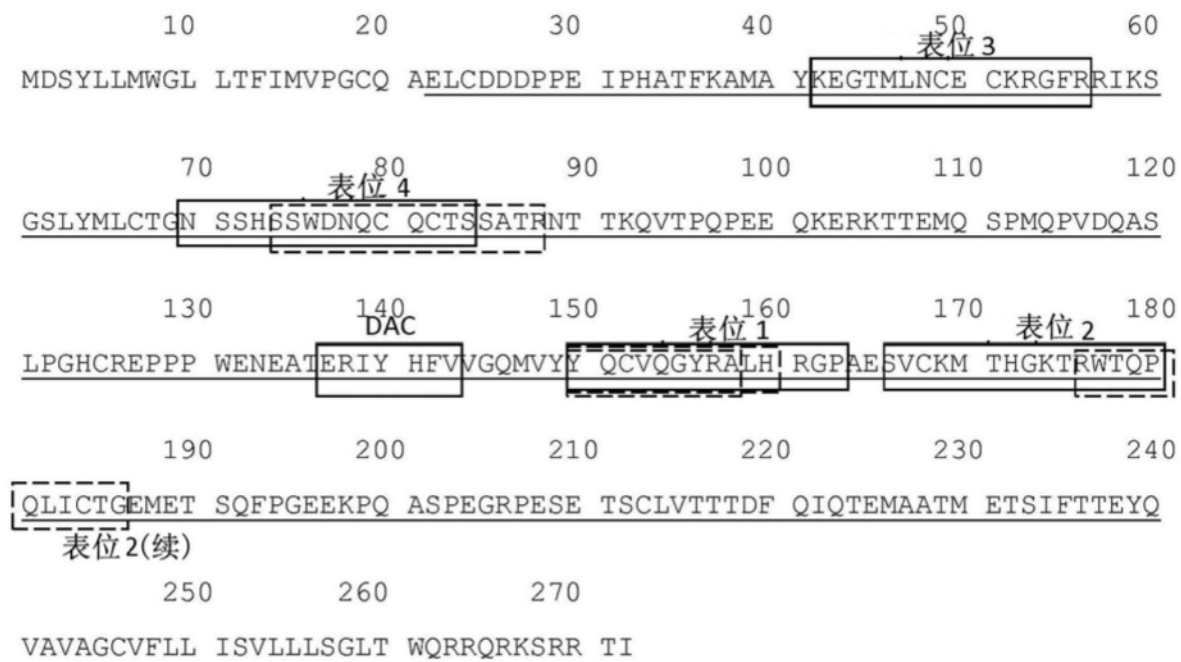
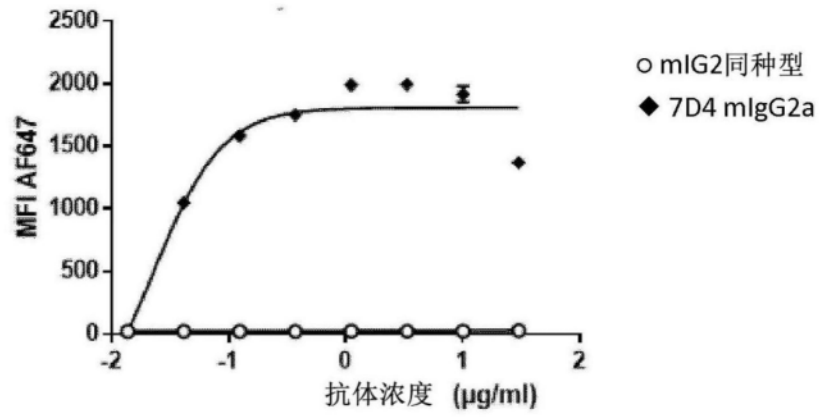
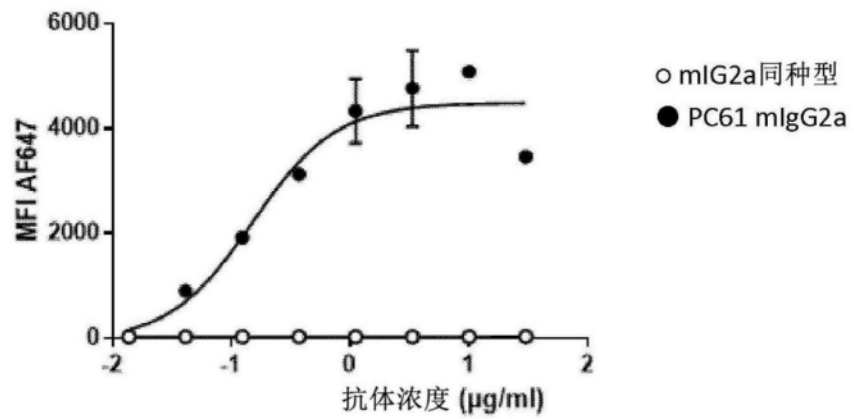


图10

A)



B)



C)

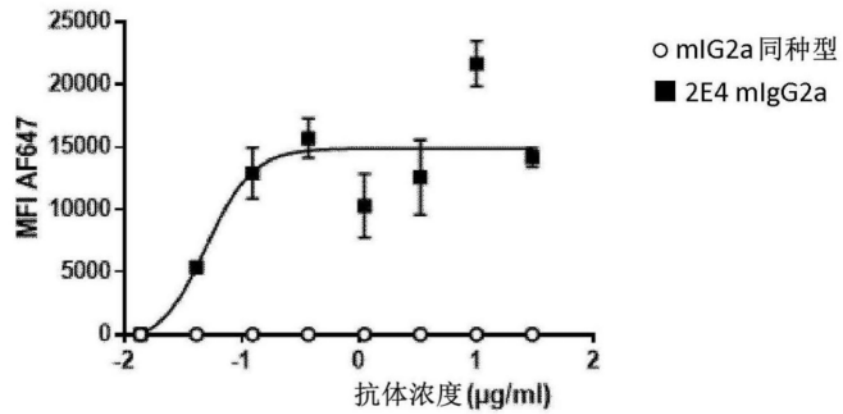


图11

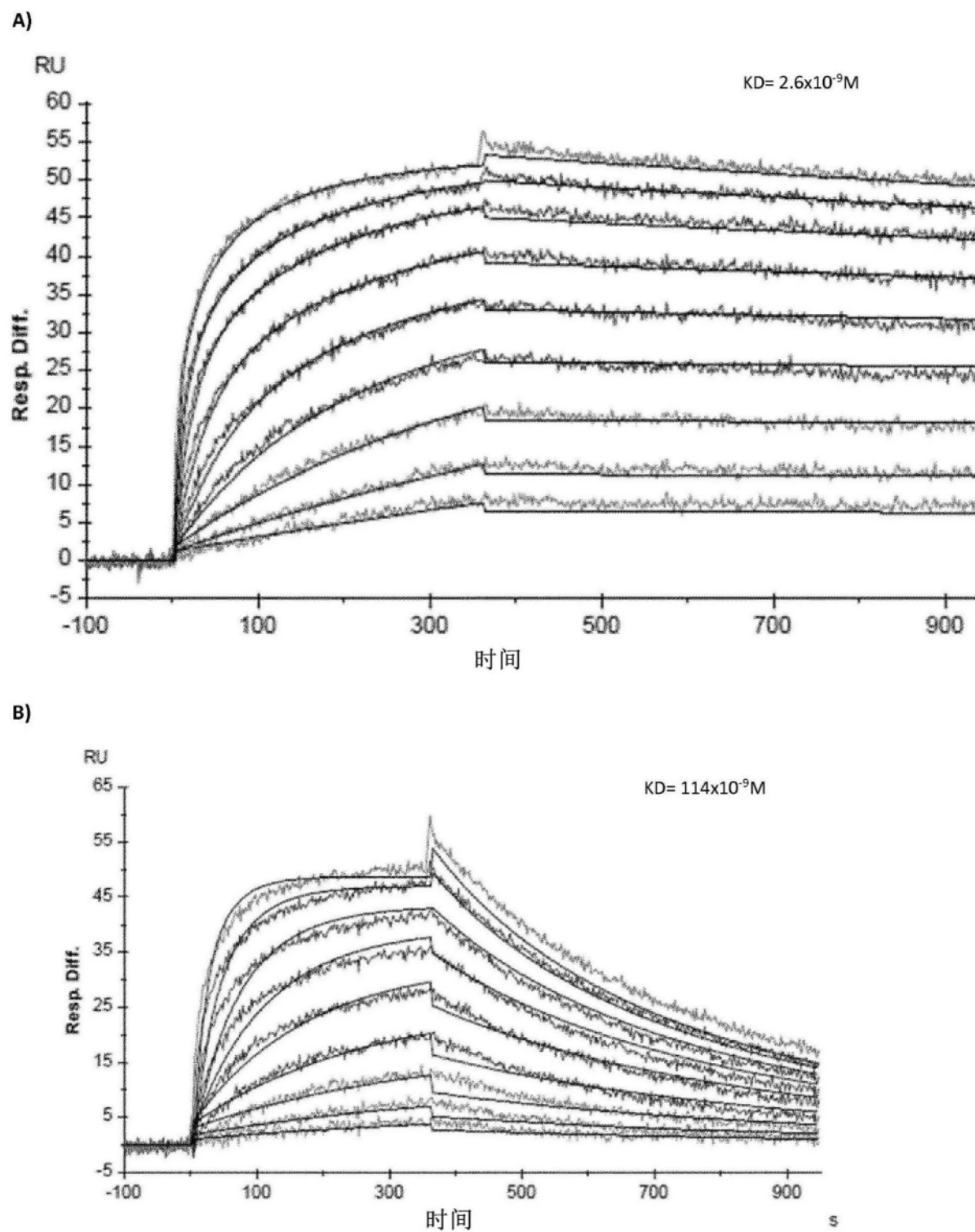


图12

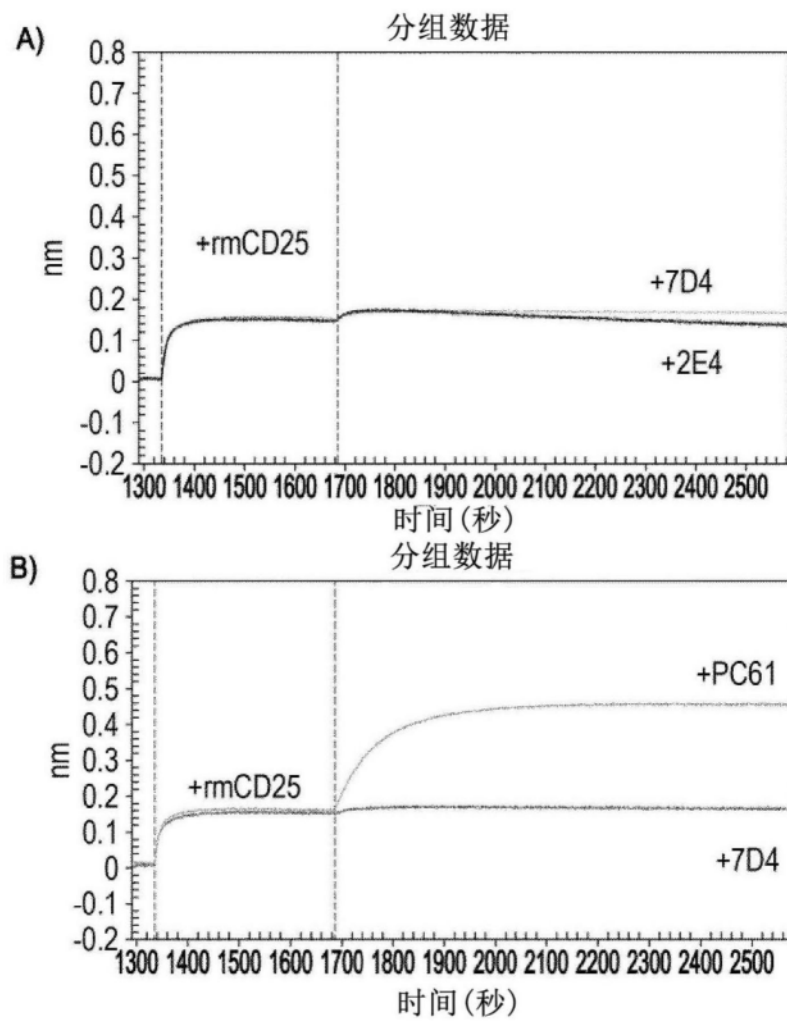


图13

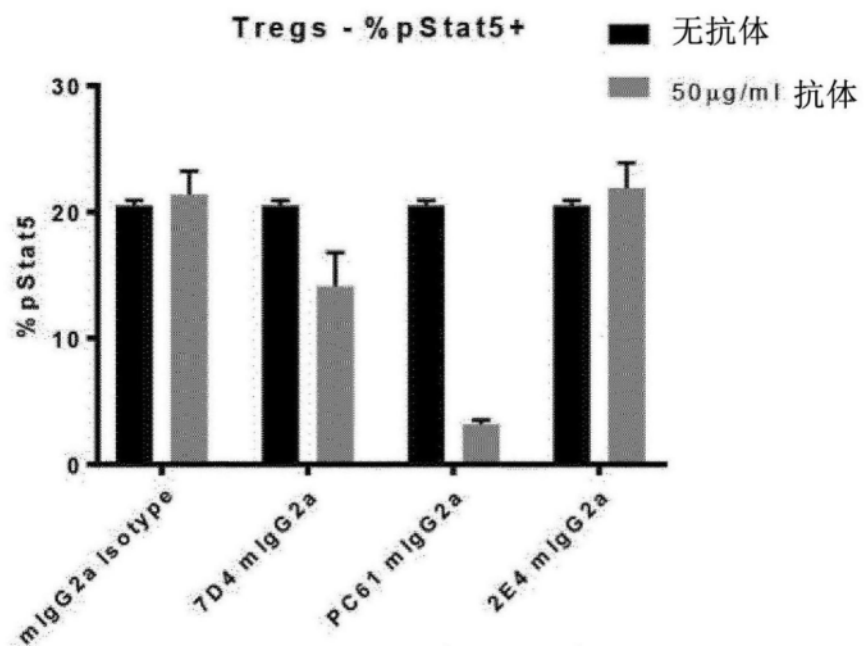


图14

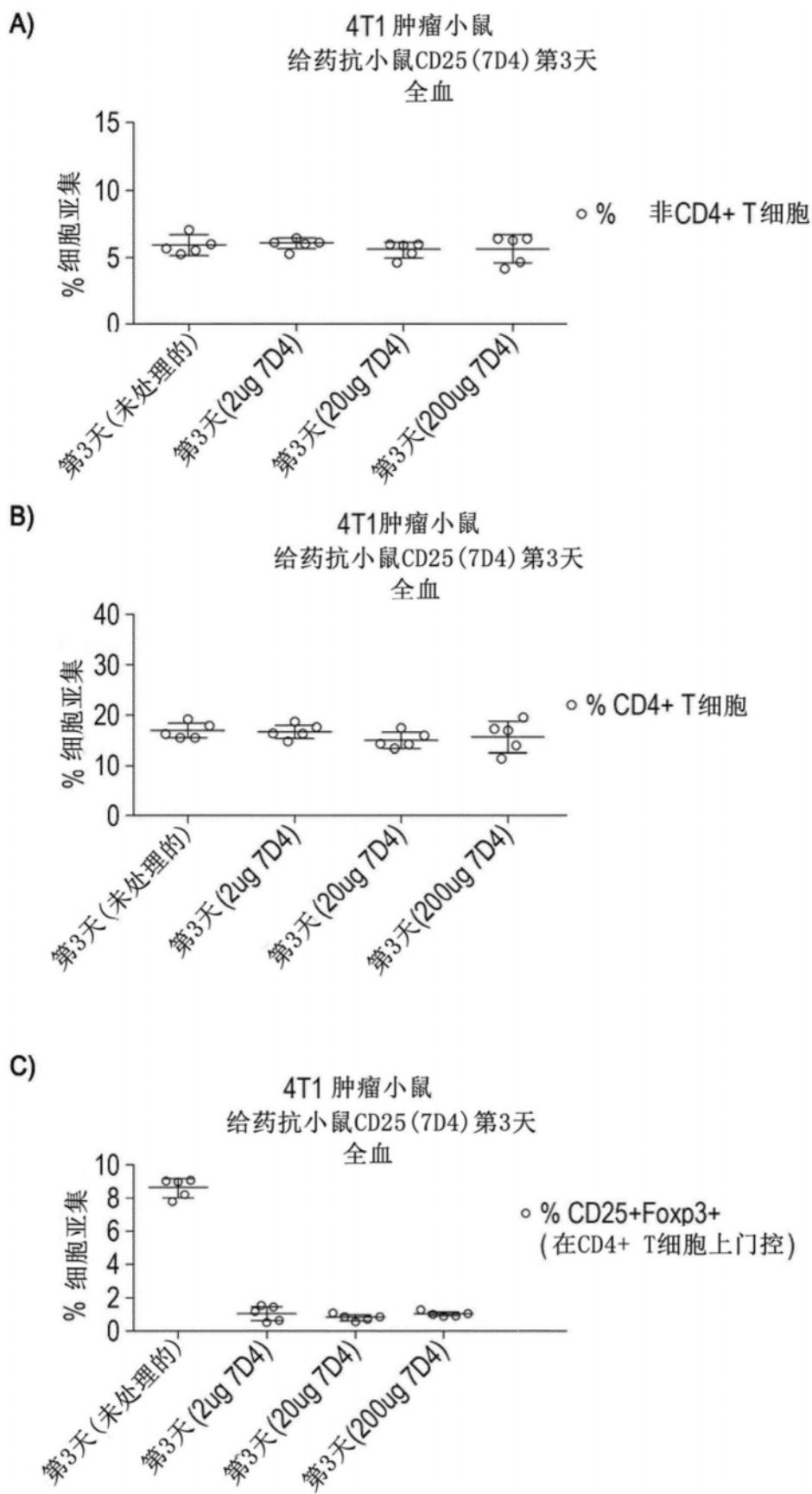


图15

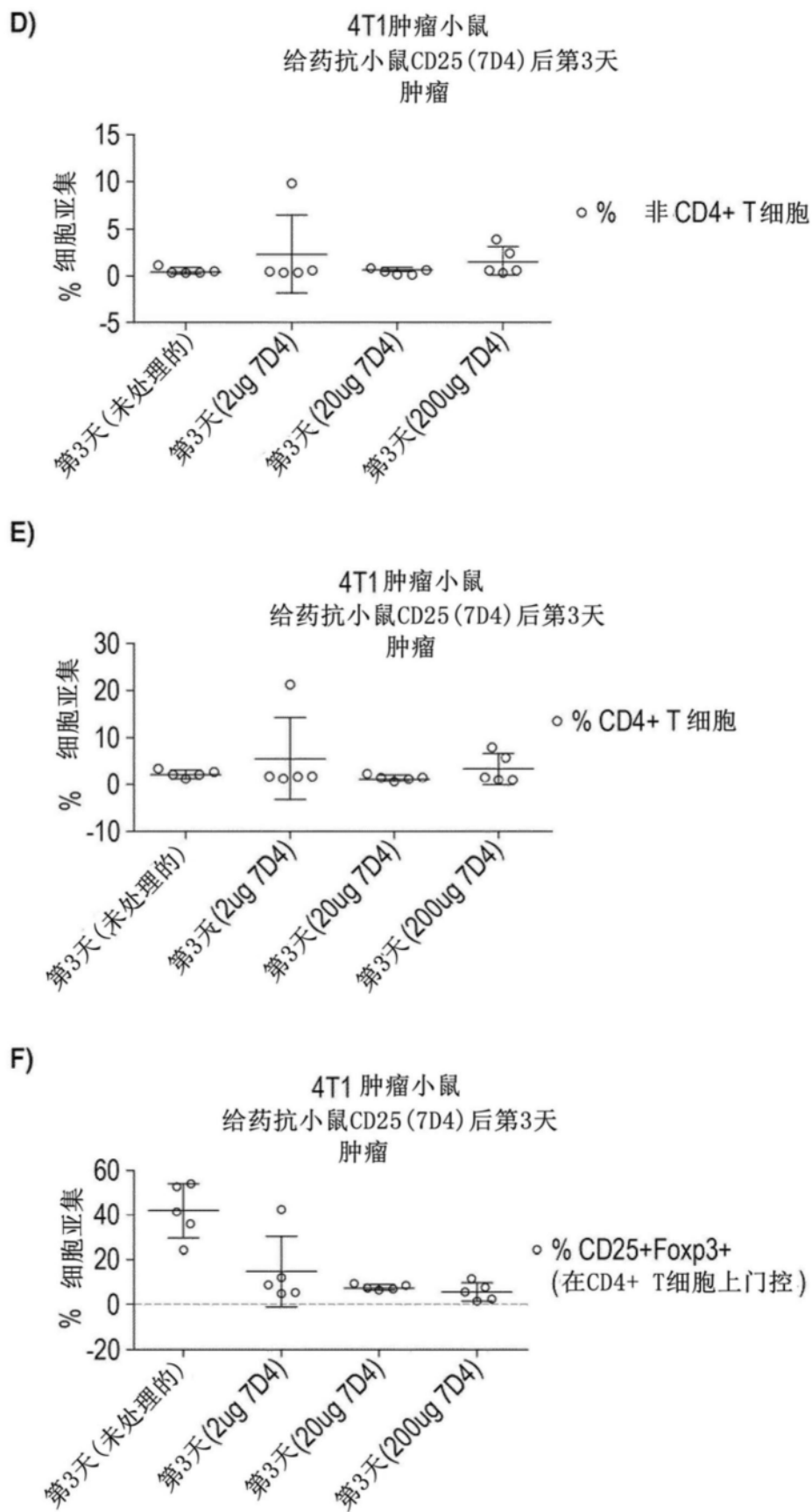


图15(续)

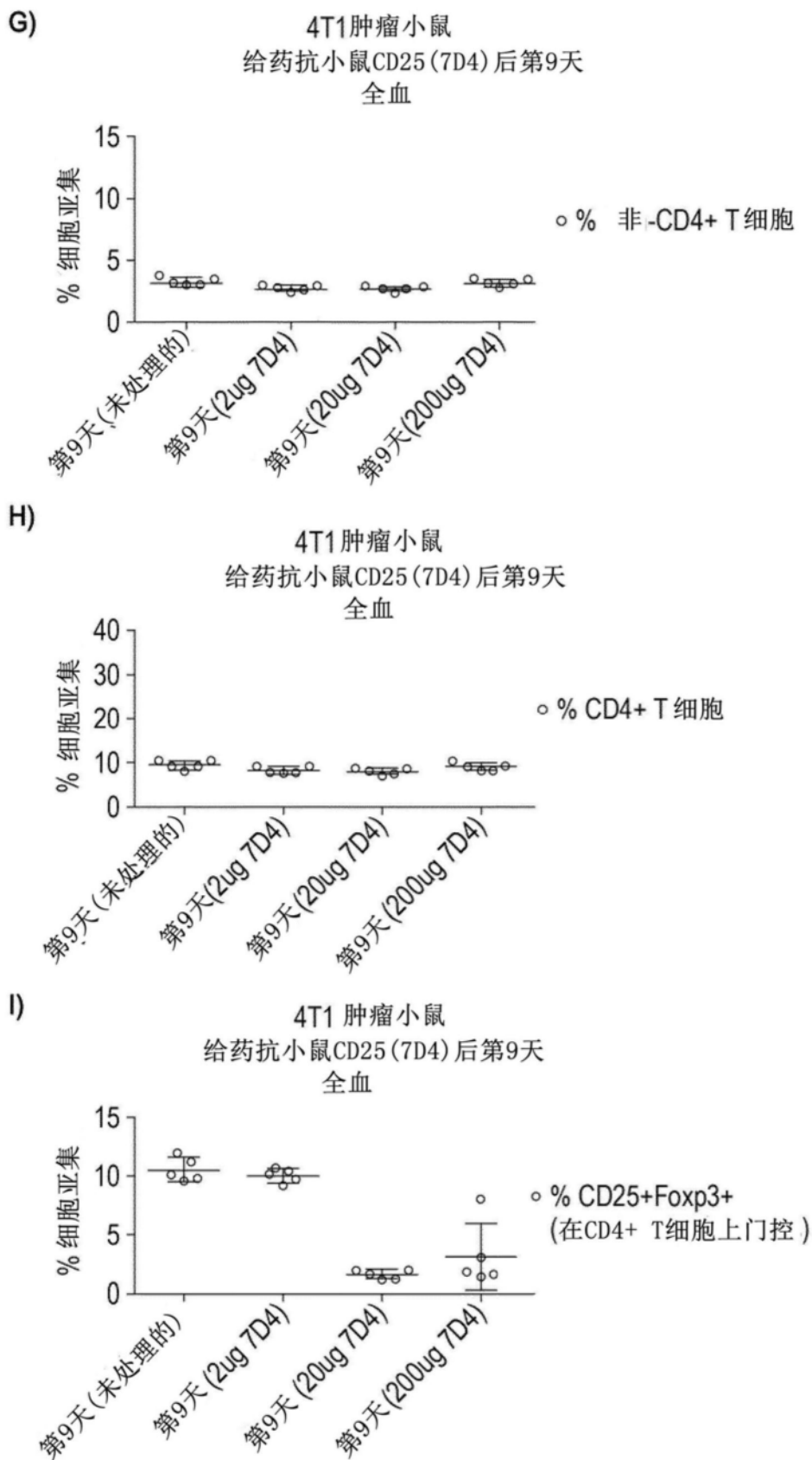


图15(续)

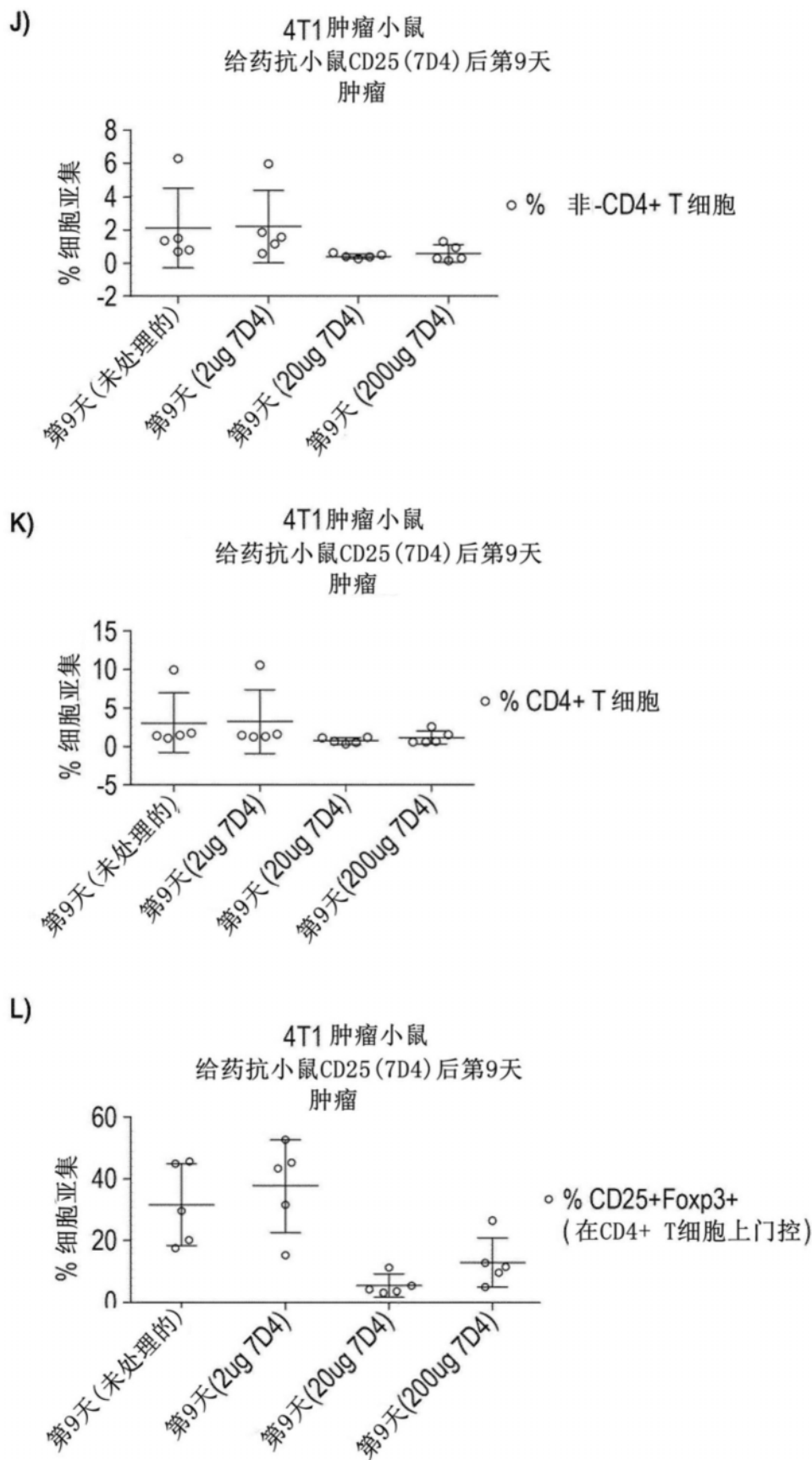


图15(续)

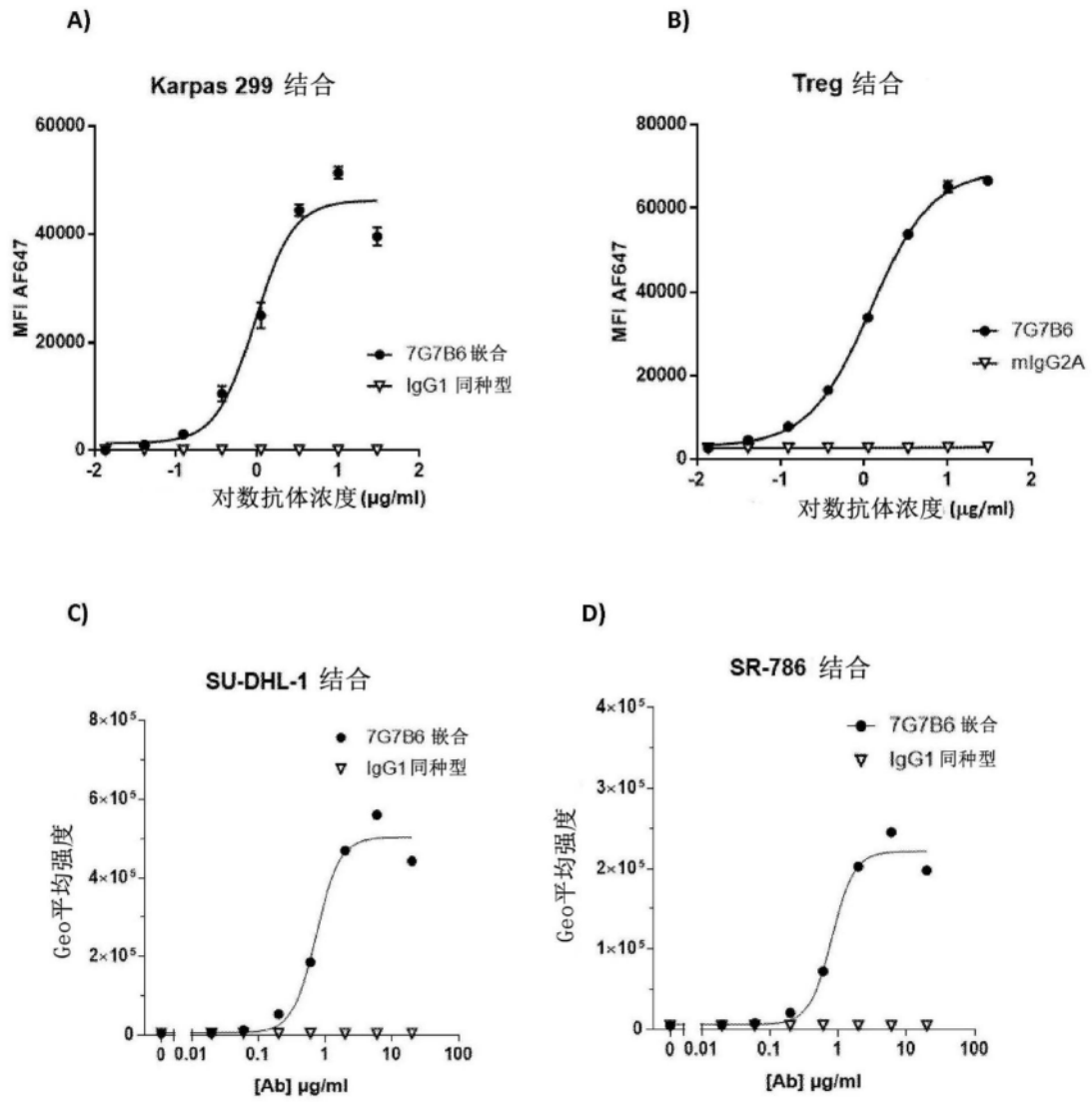


图16

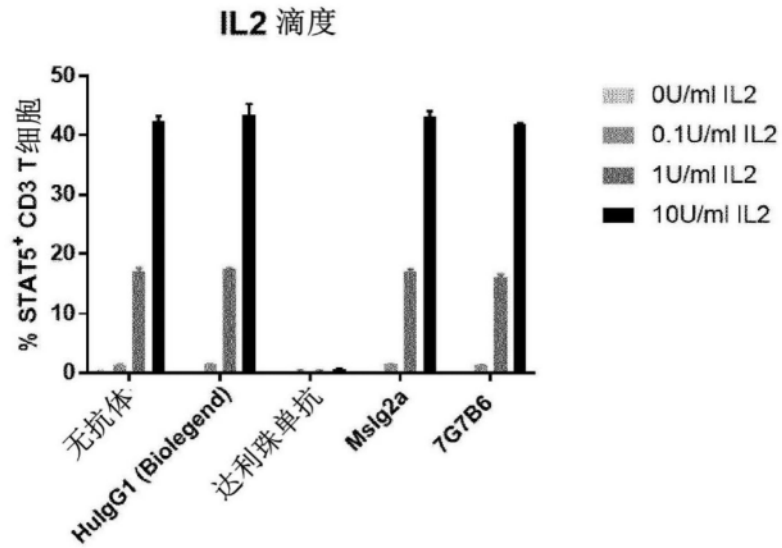


图17

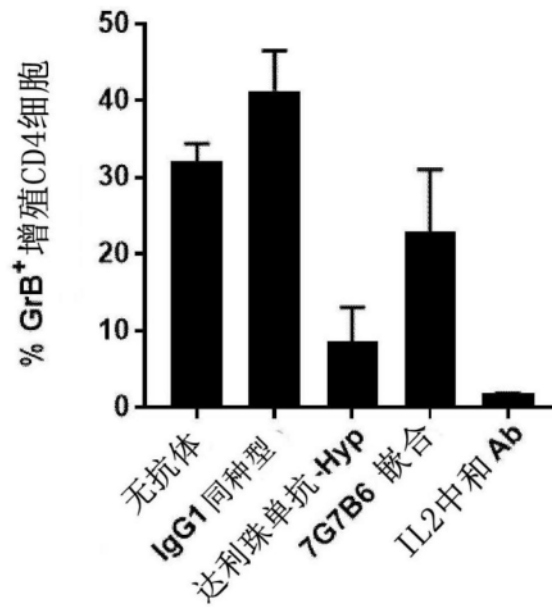
泛性T细胞 - GrB⁺增殖CD4细胞

图18

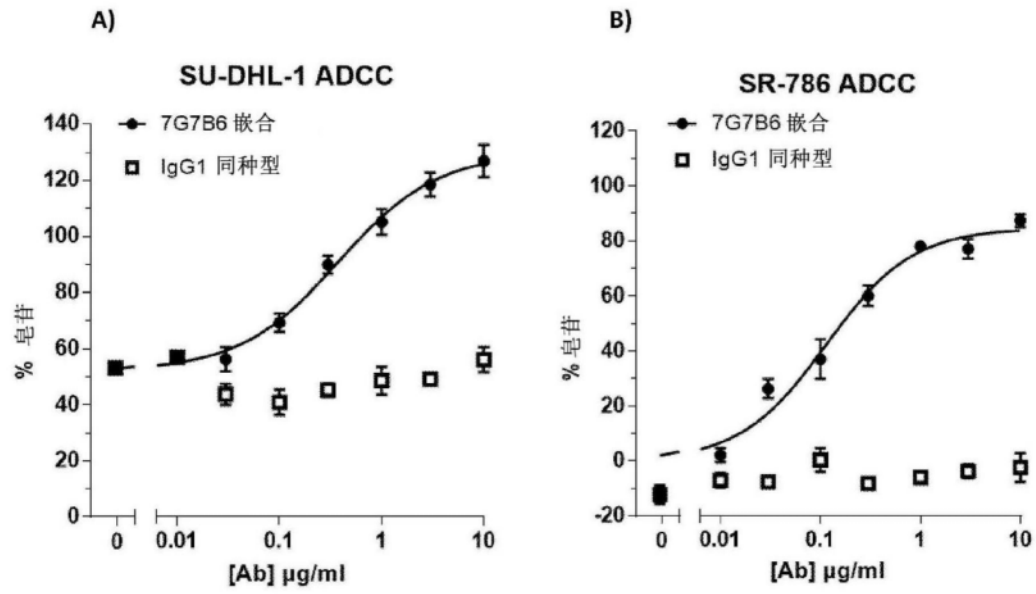


图19

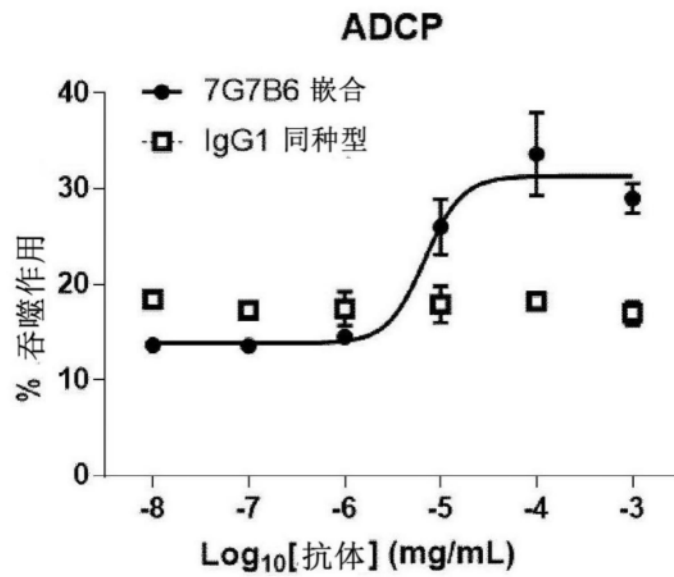


图20

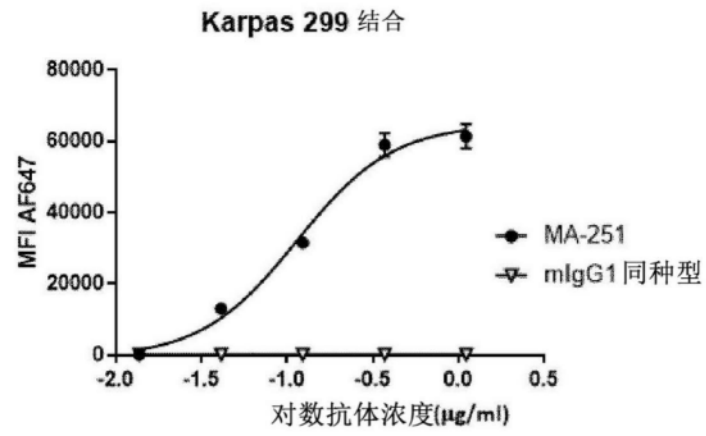


图21

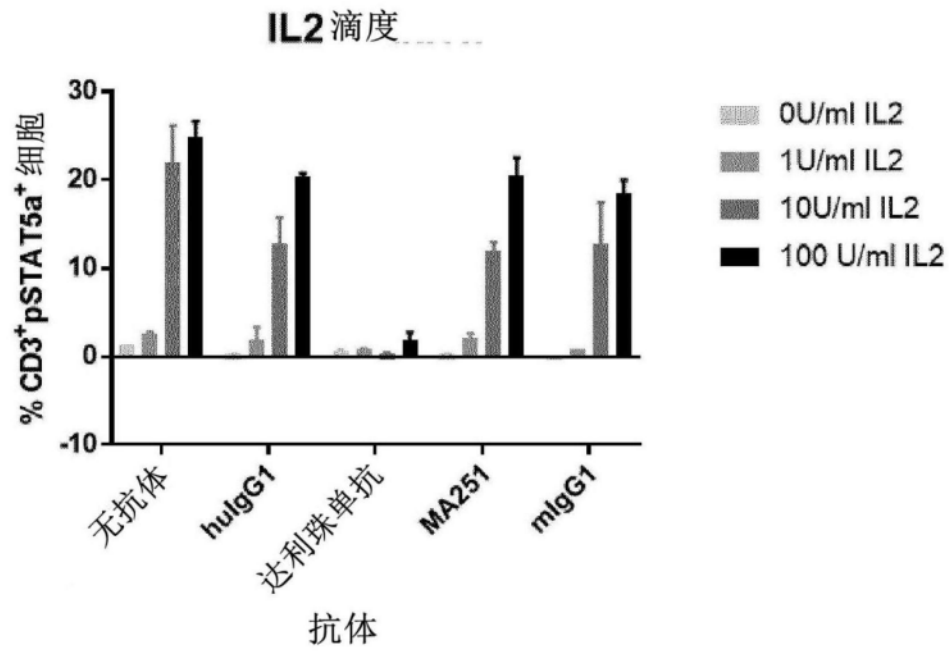


图22

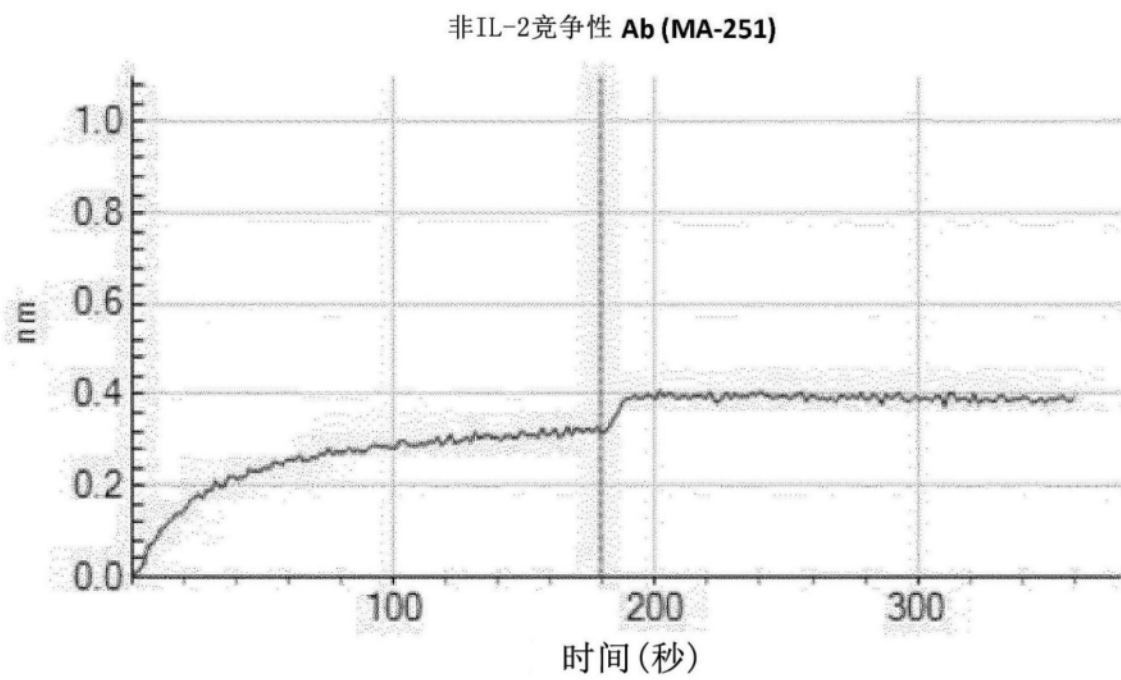


图23

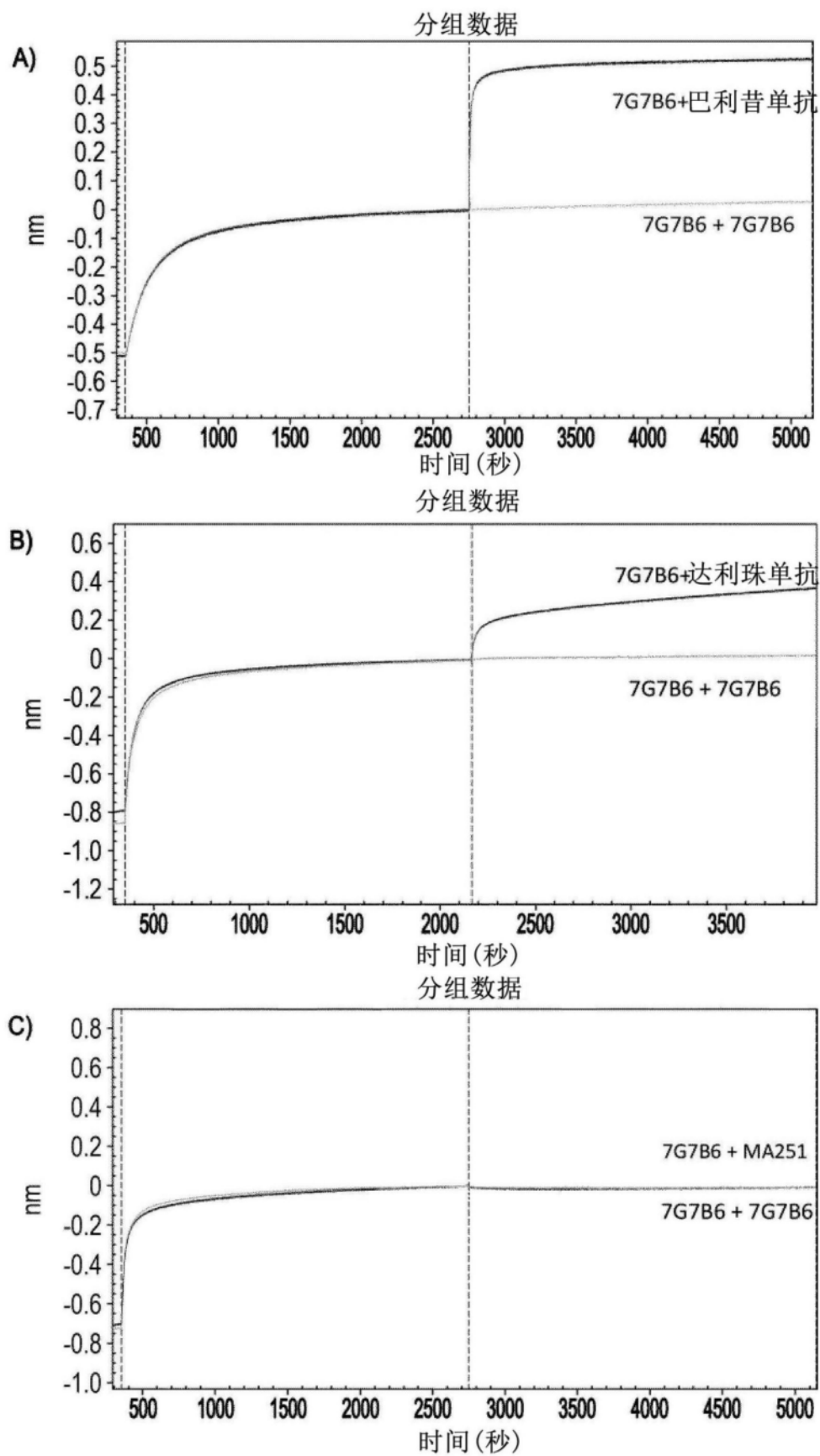


图24

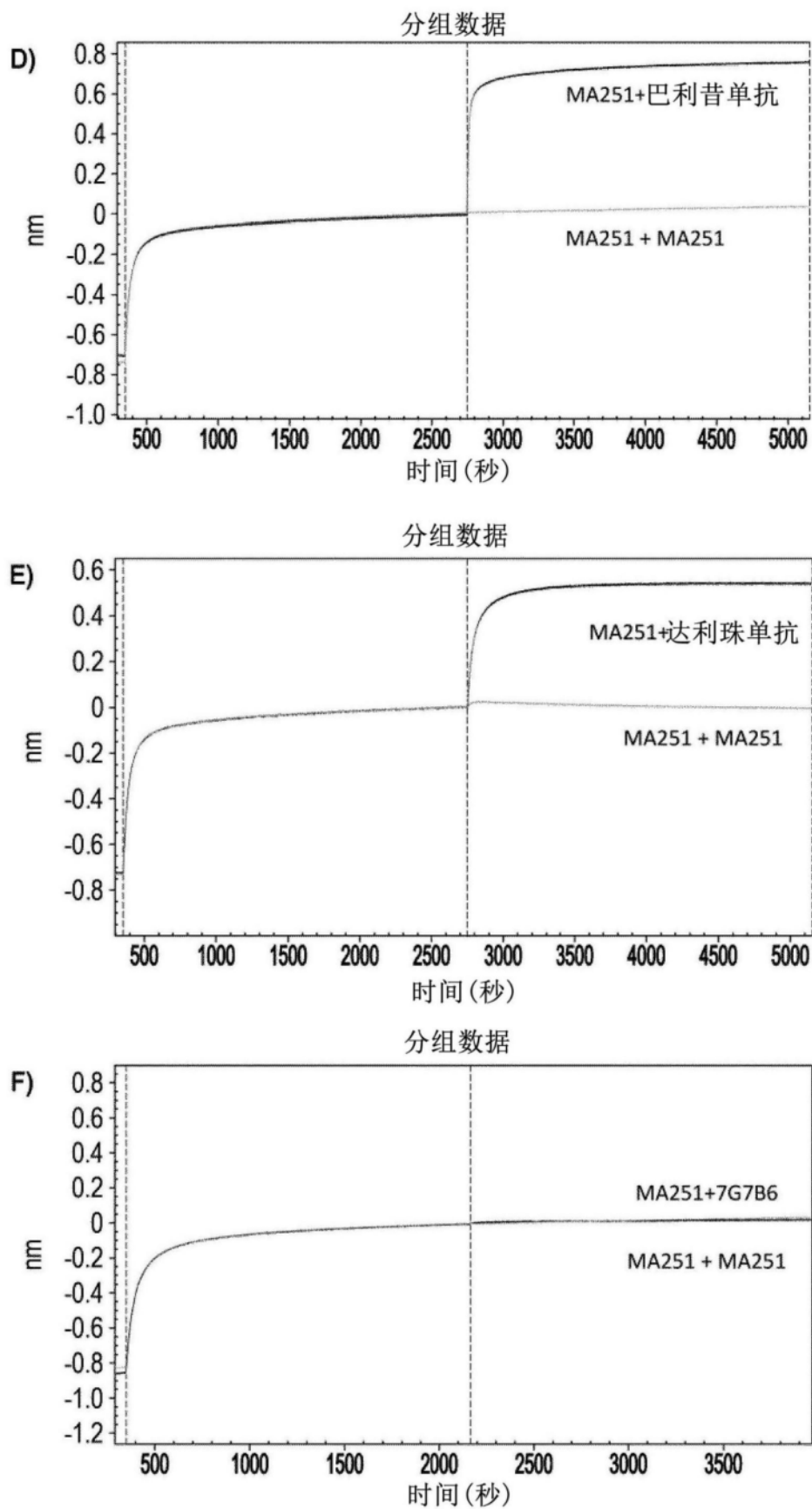


图24(续)

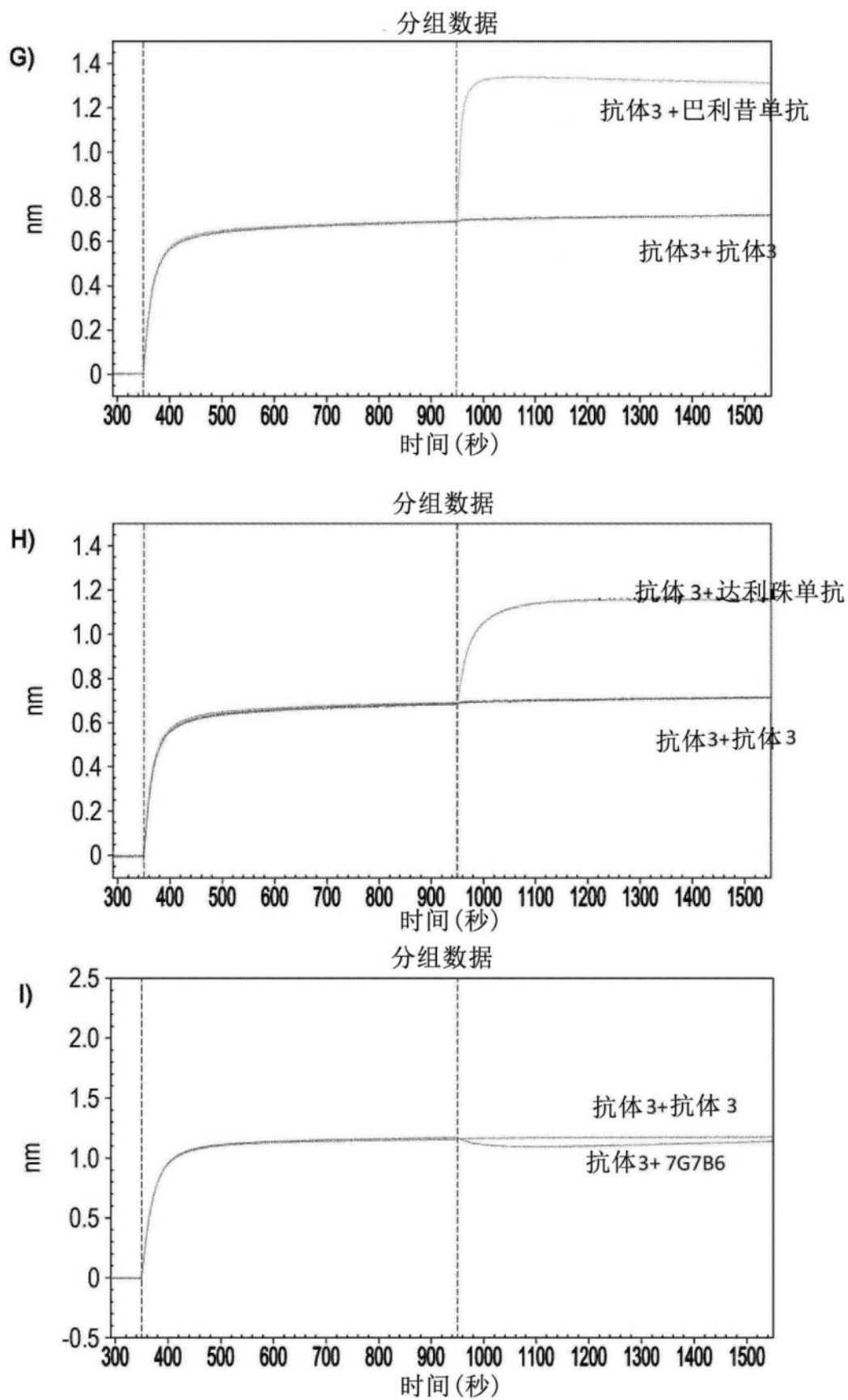


图24(续)

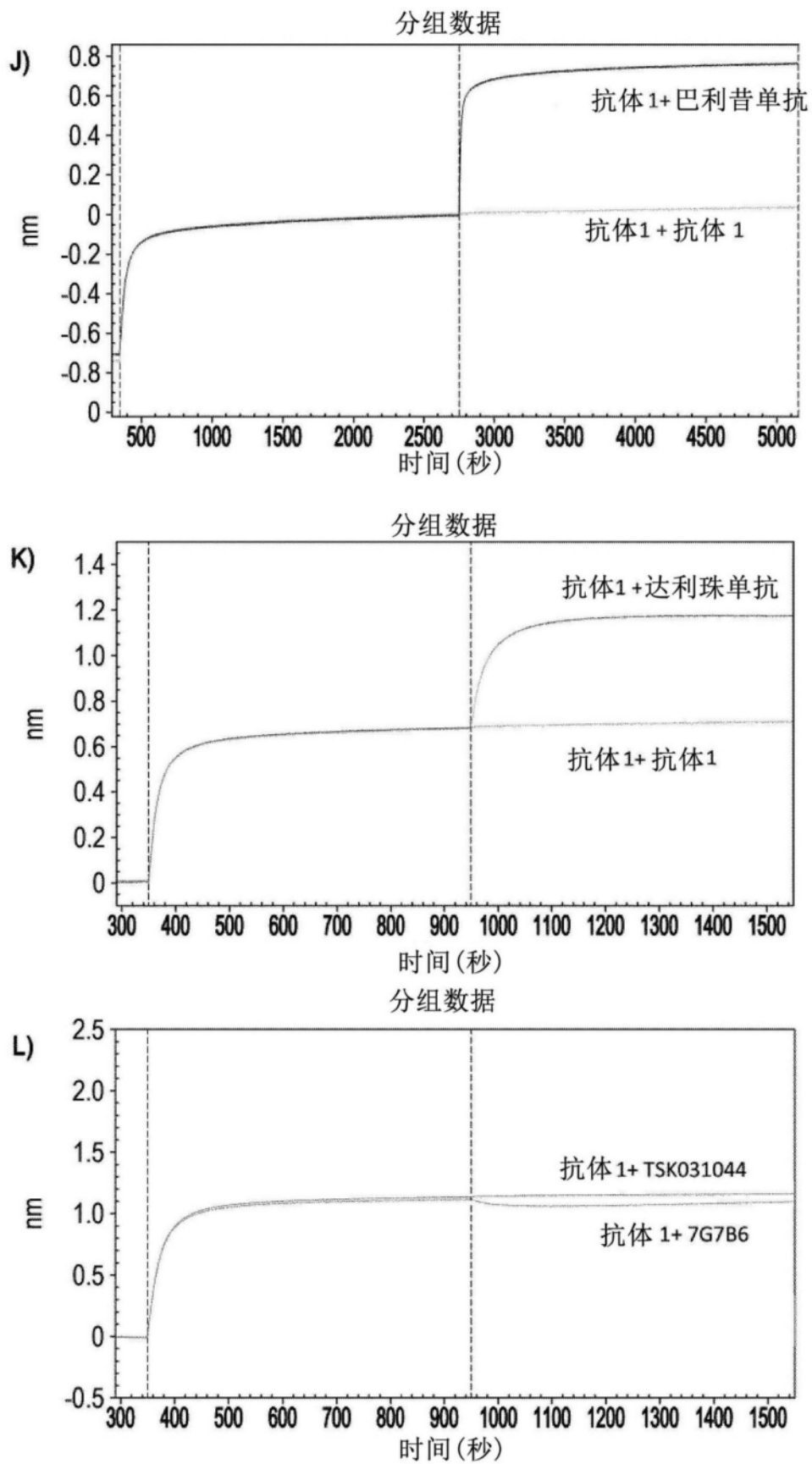


图24(续)

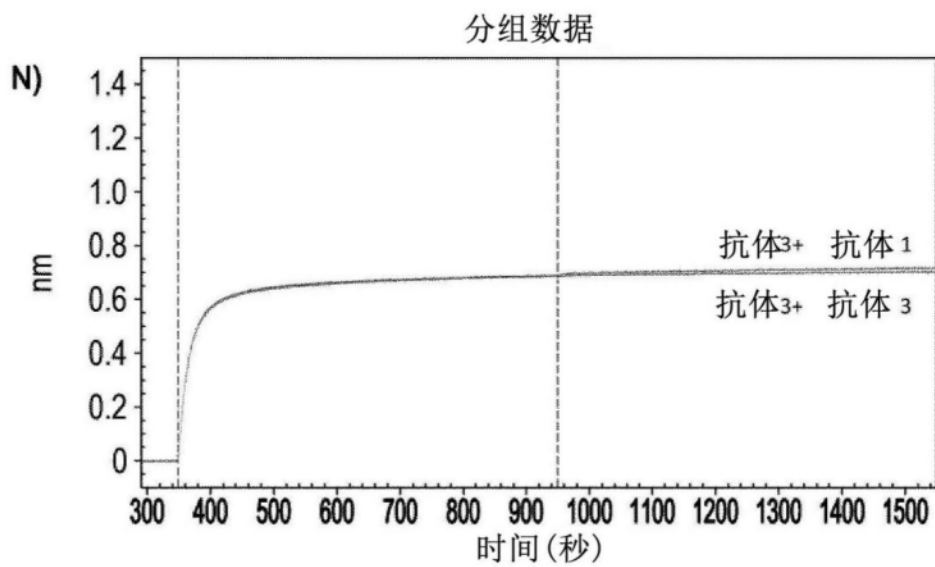
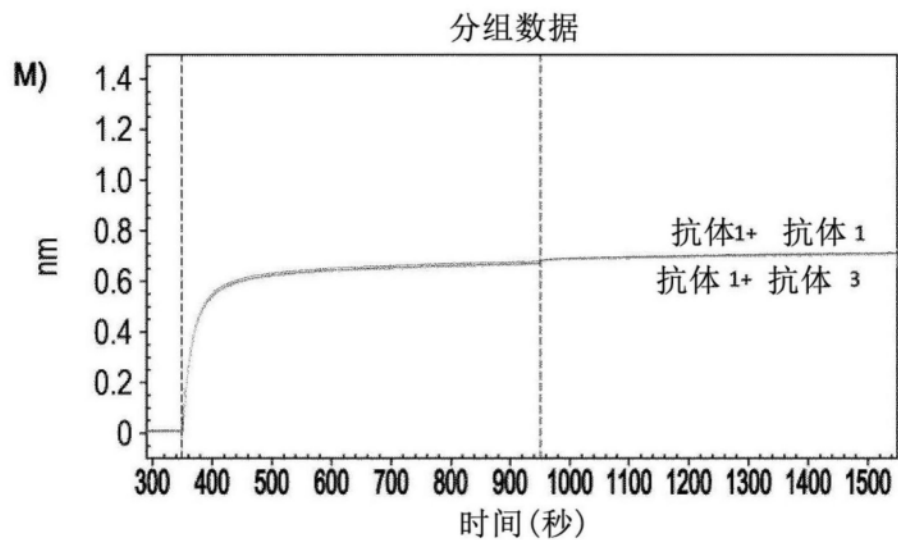


图24(续)

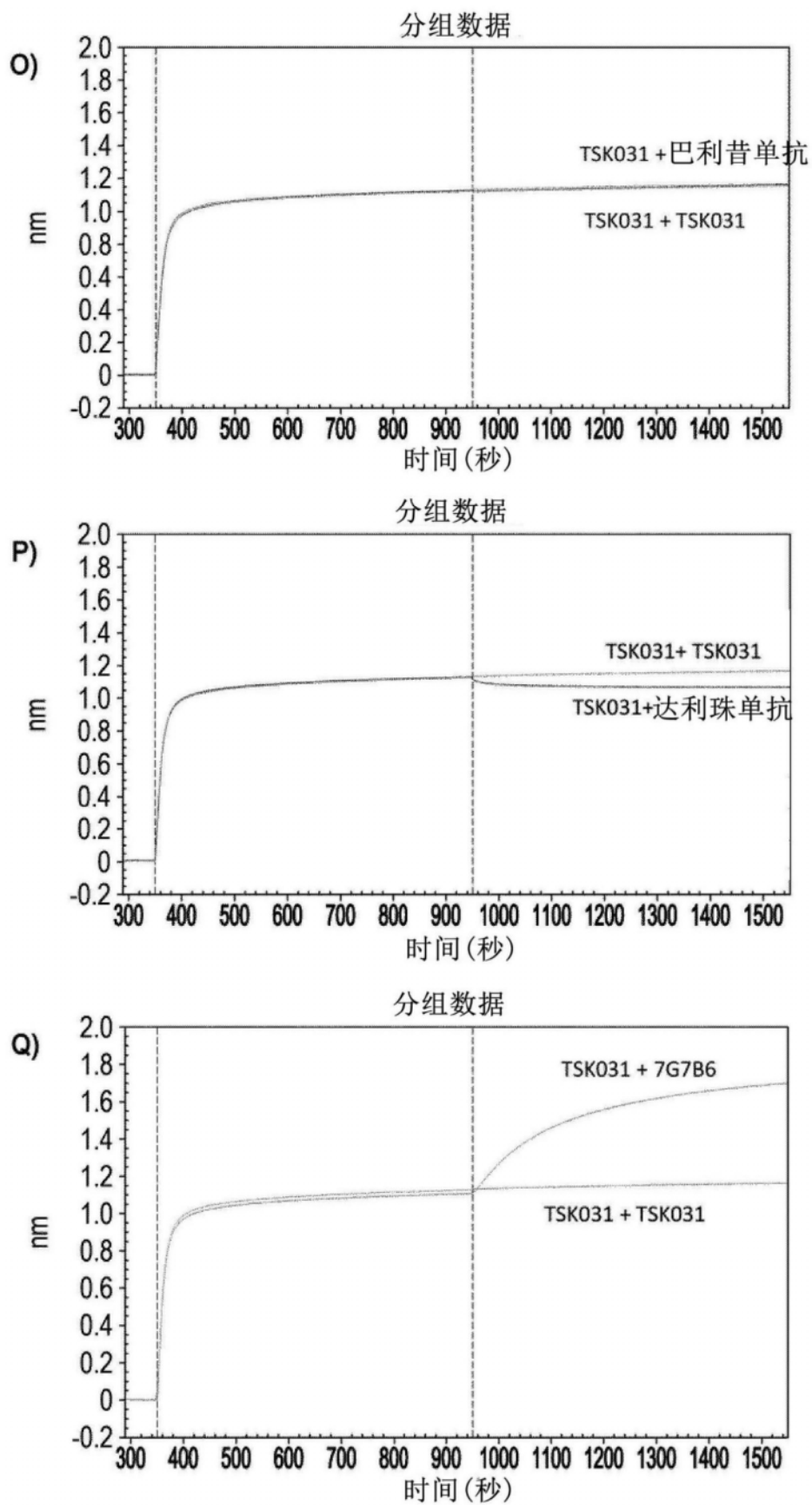


图24(续)

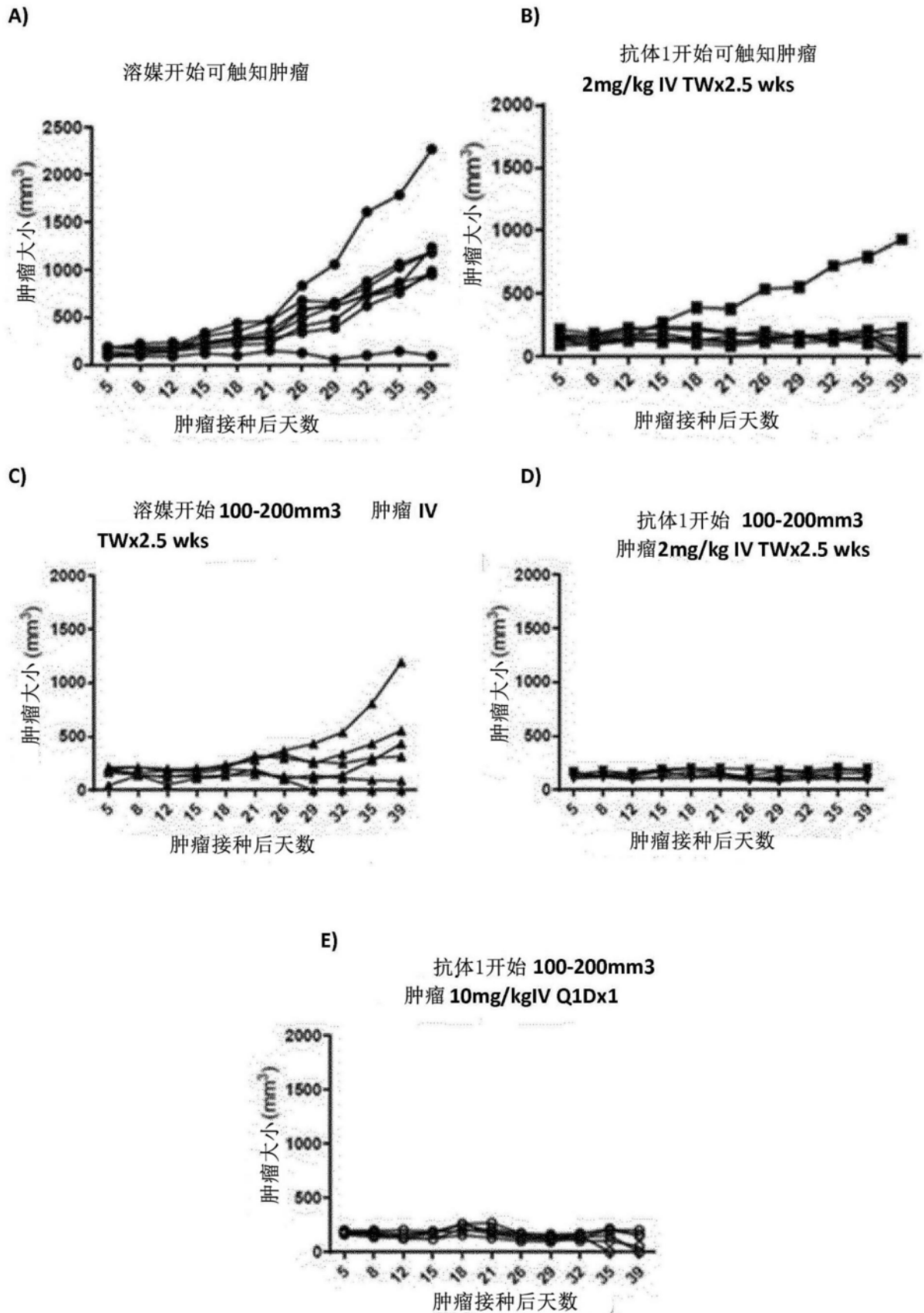


图25

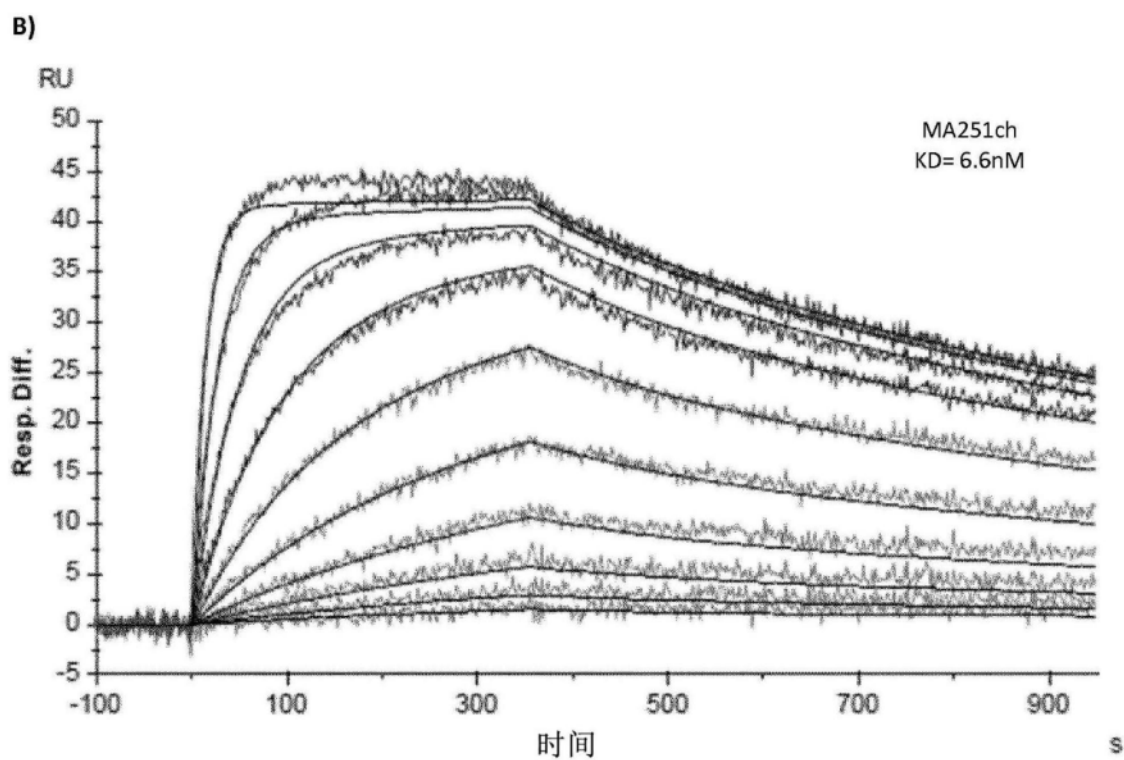
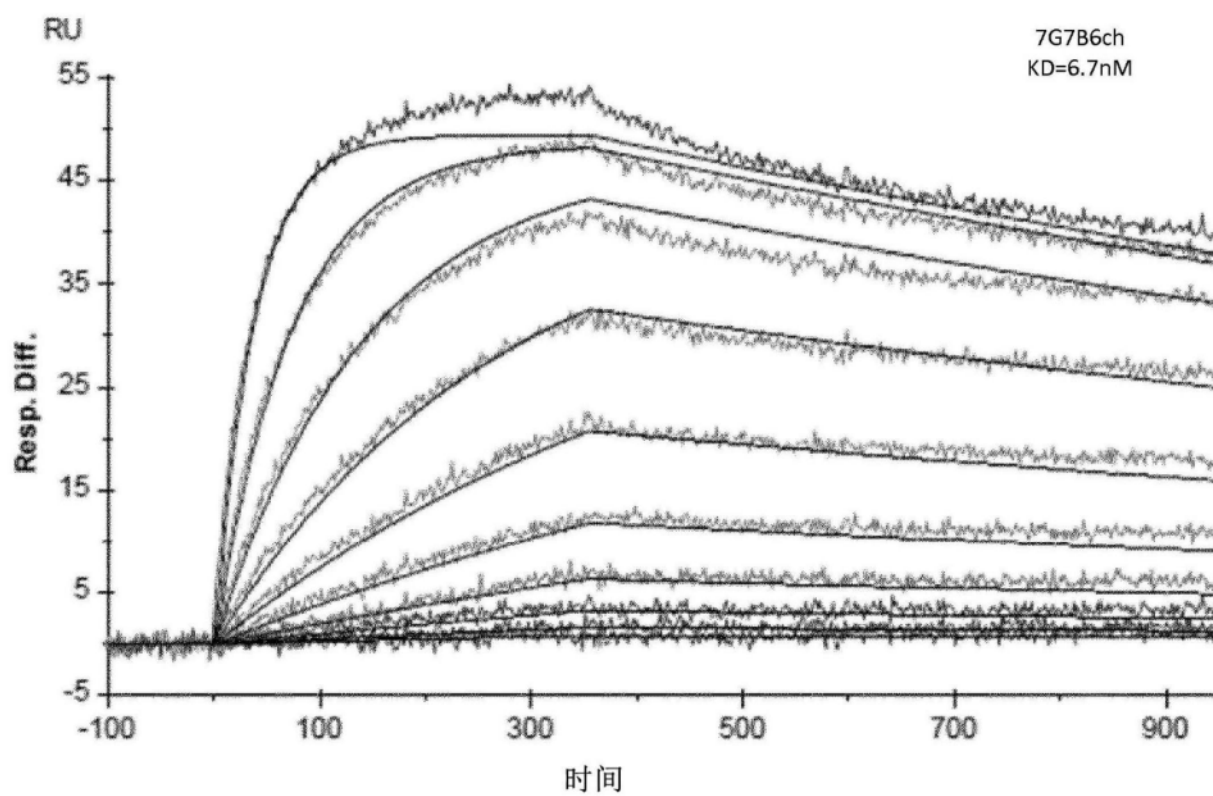
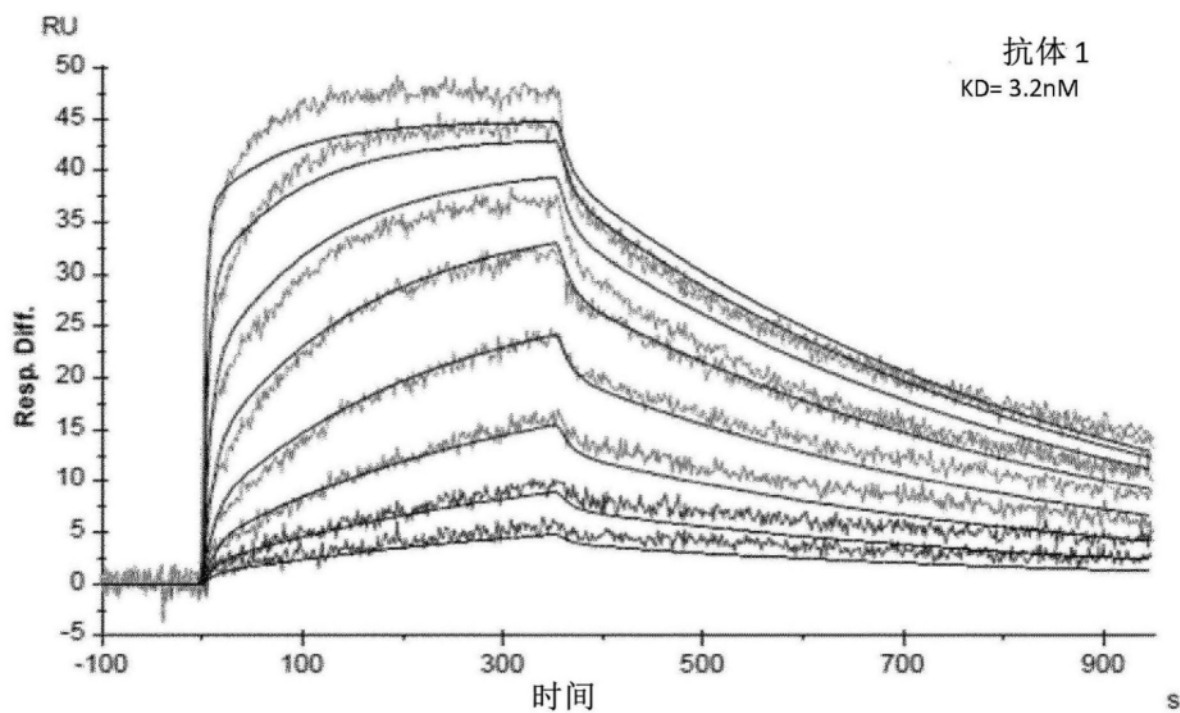


图26

c)



d)

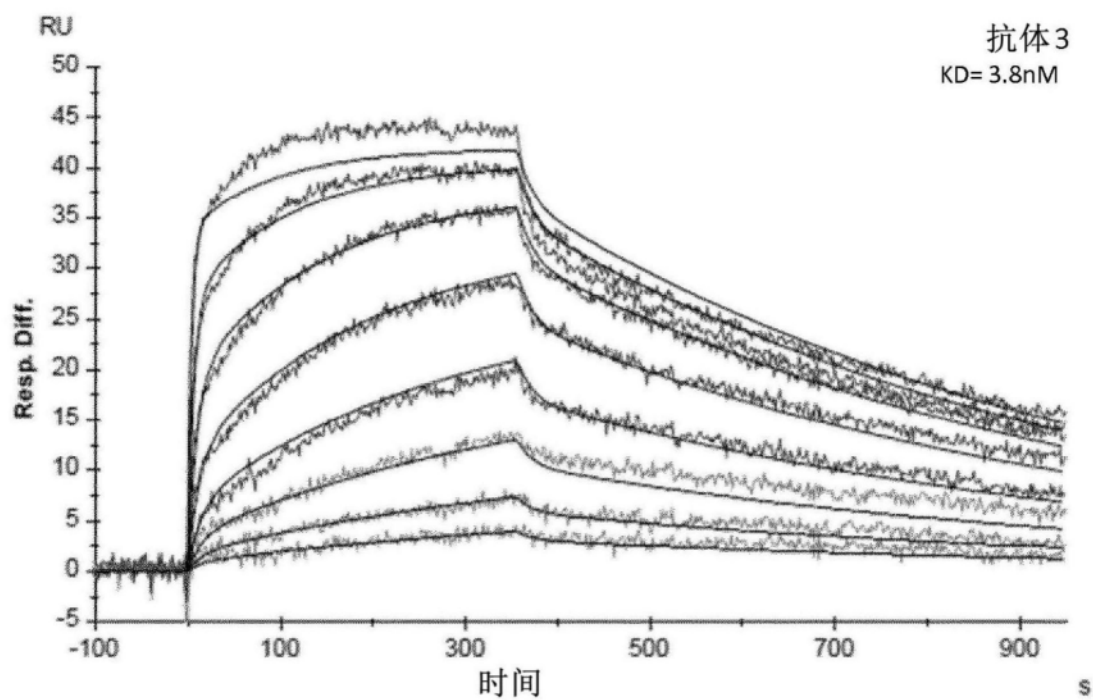


图26(续)

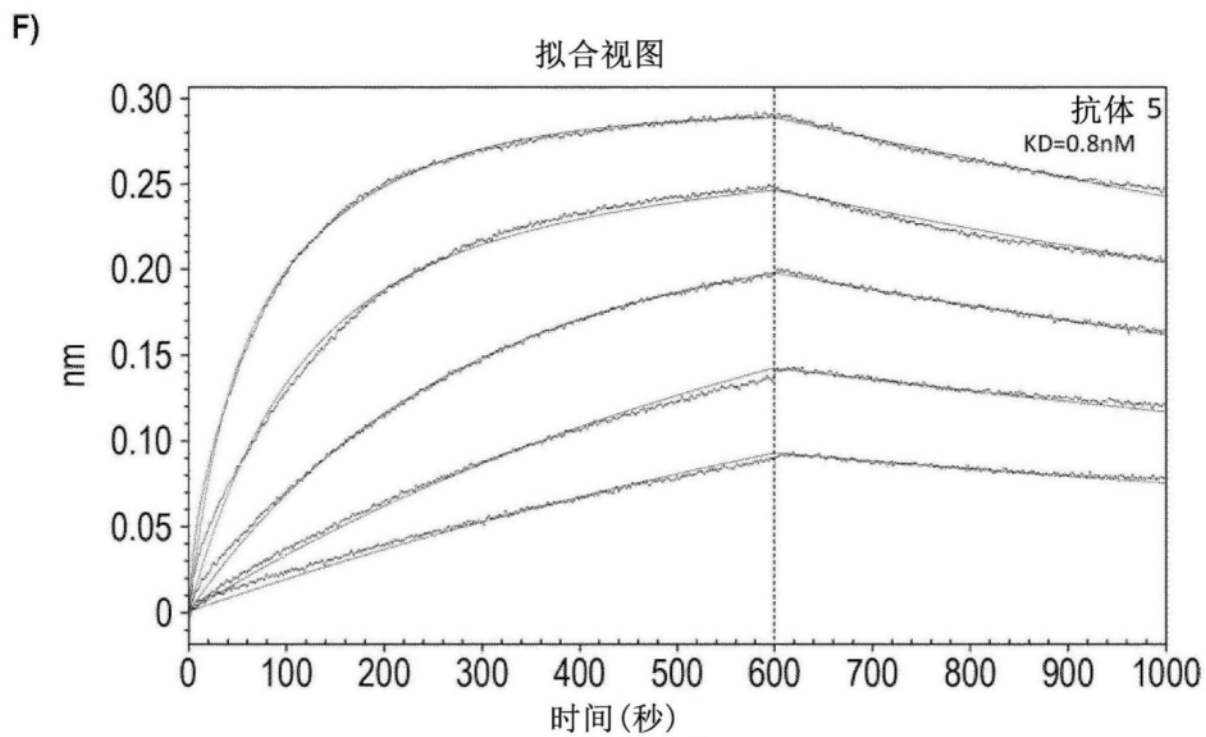
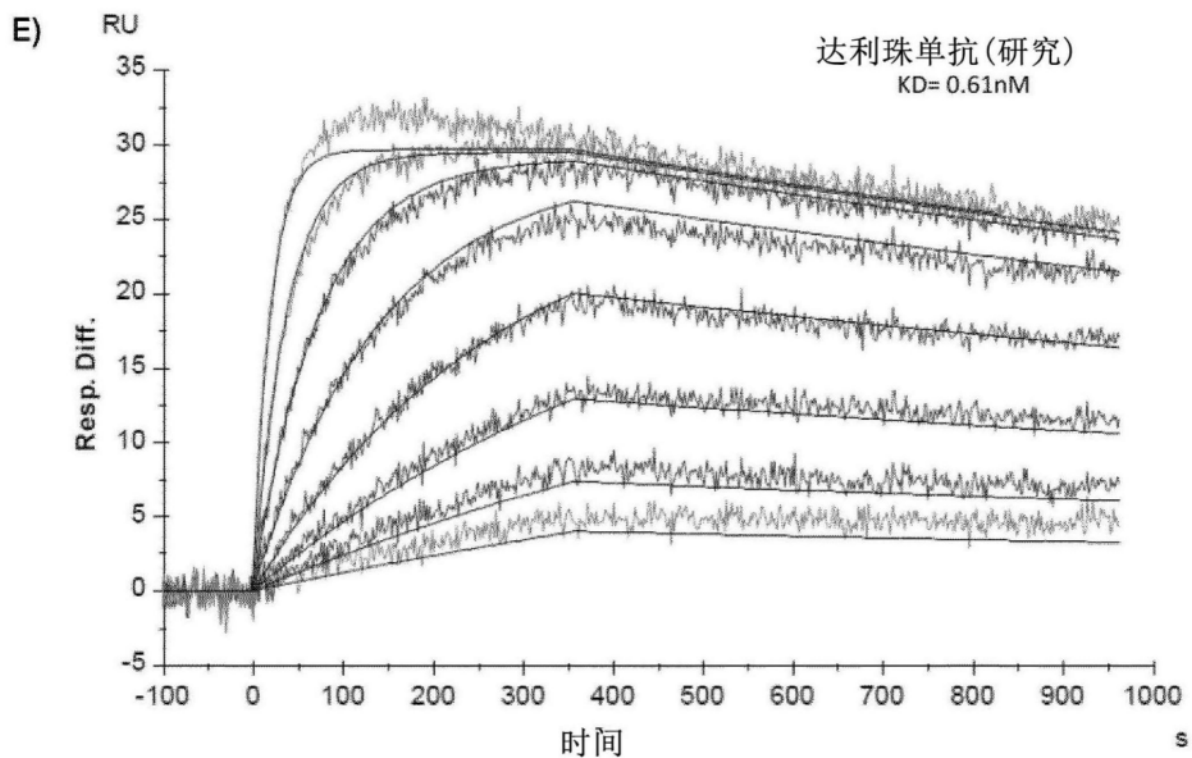


图26(续)

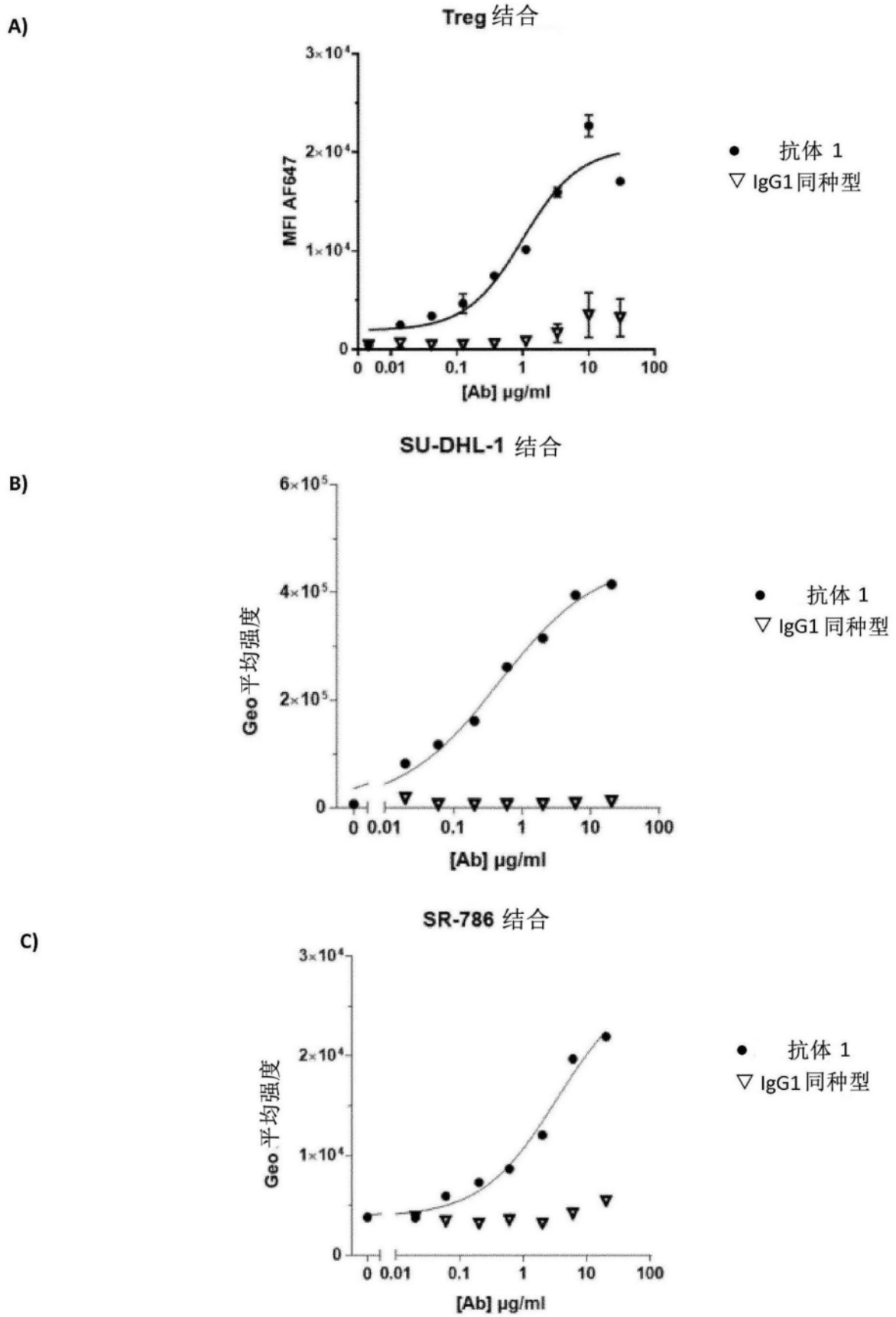
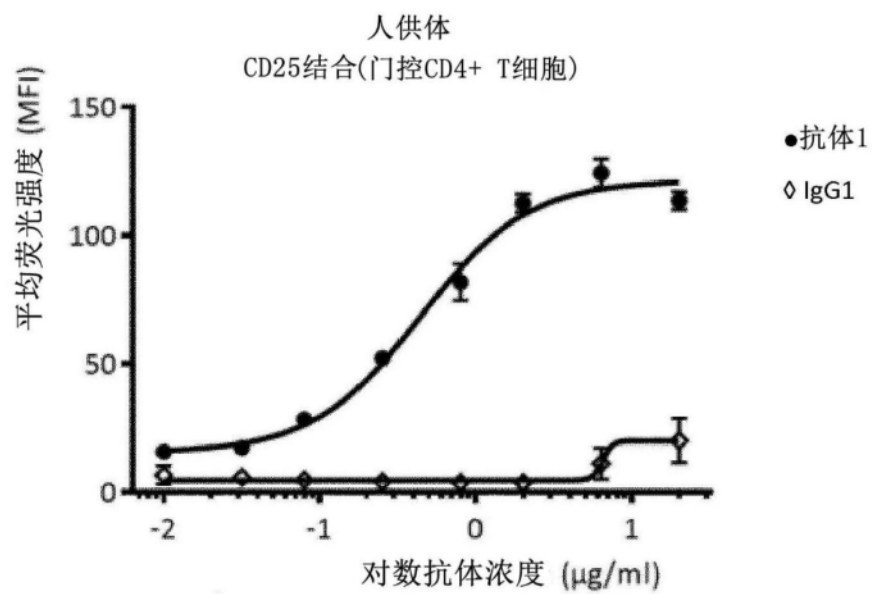


图27

A)



B)

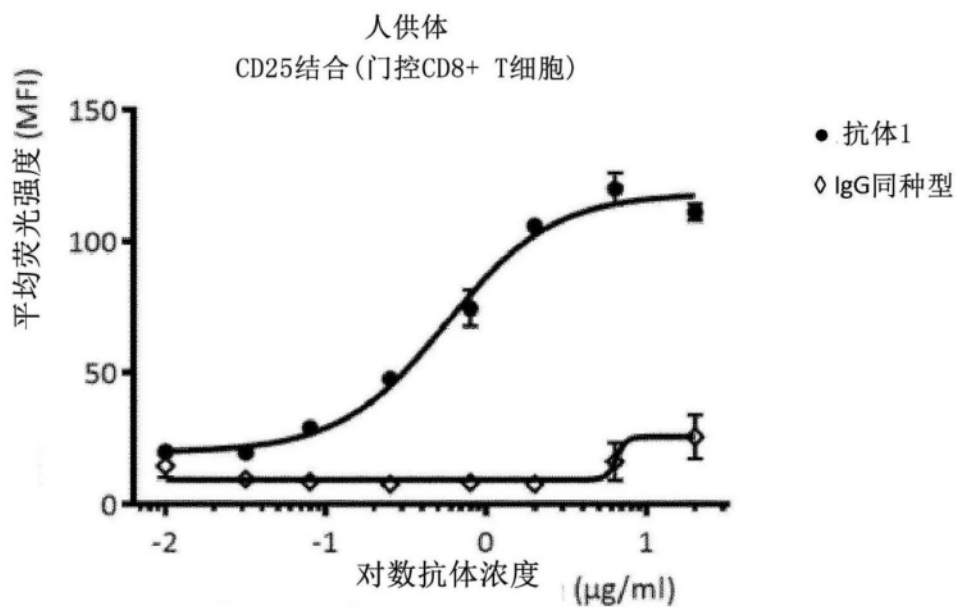


图28

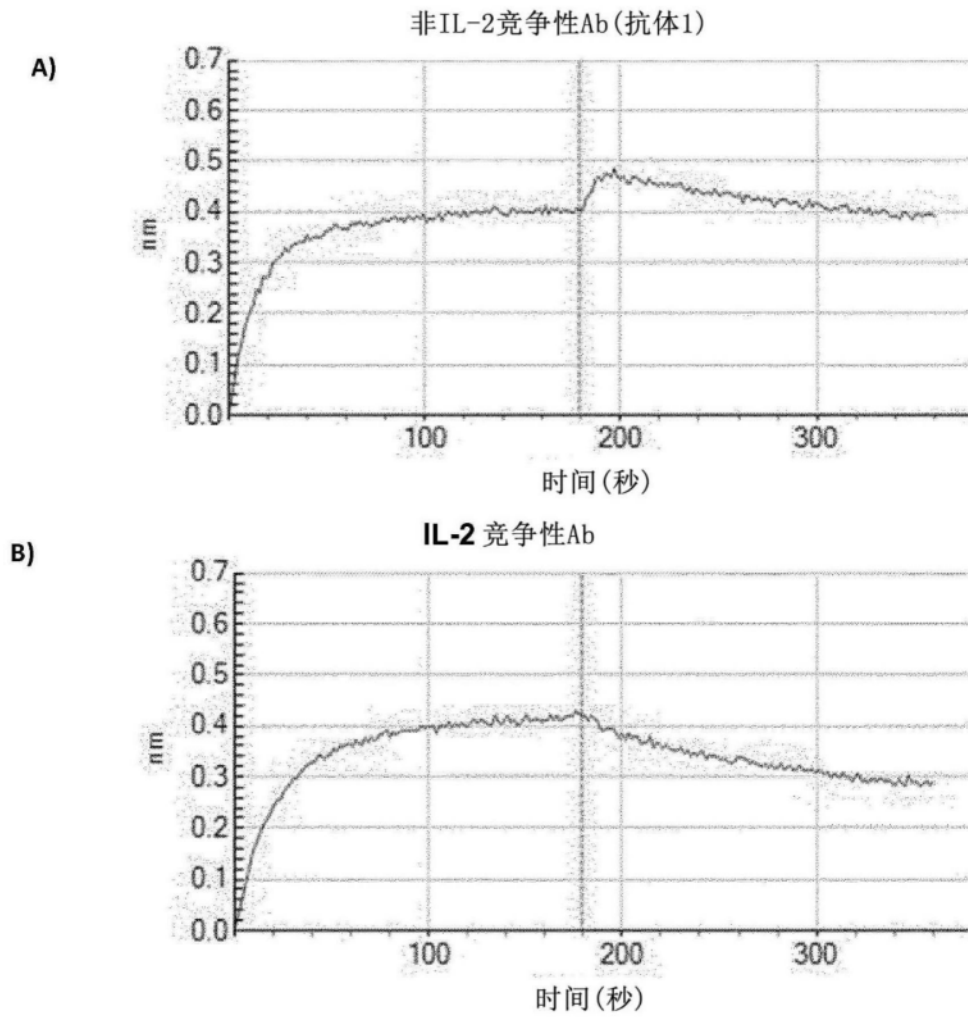


图29

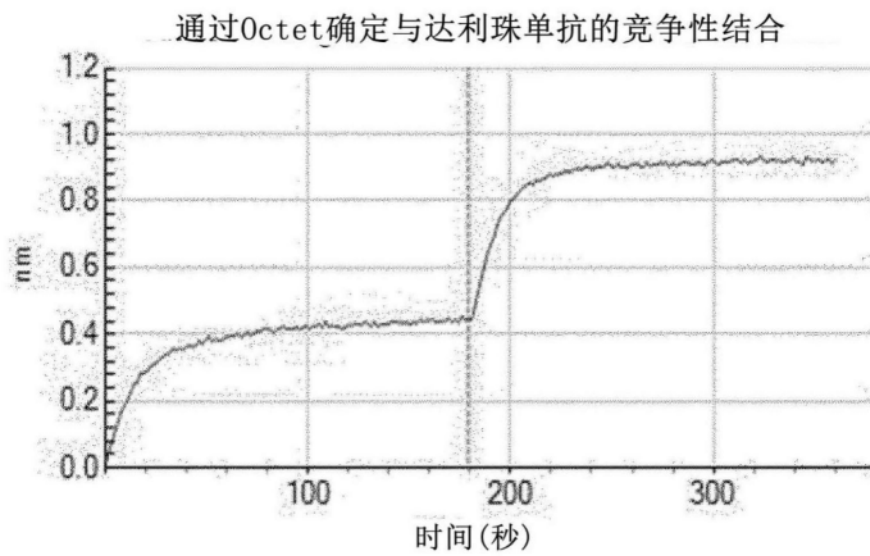


图30

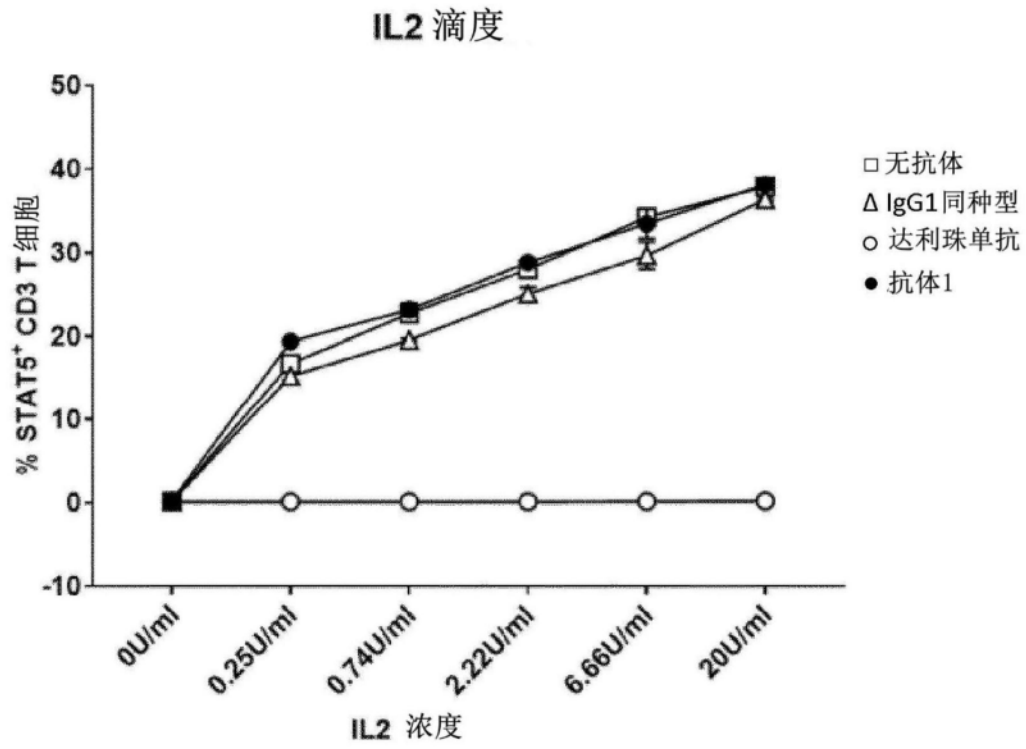


图31

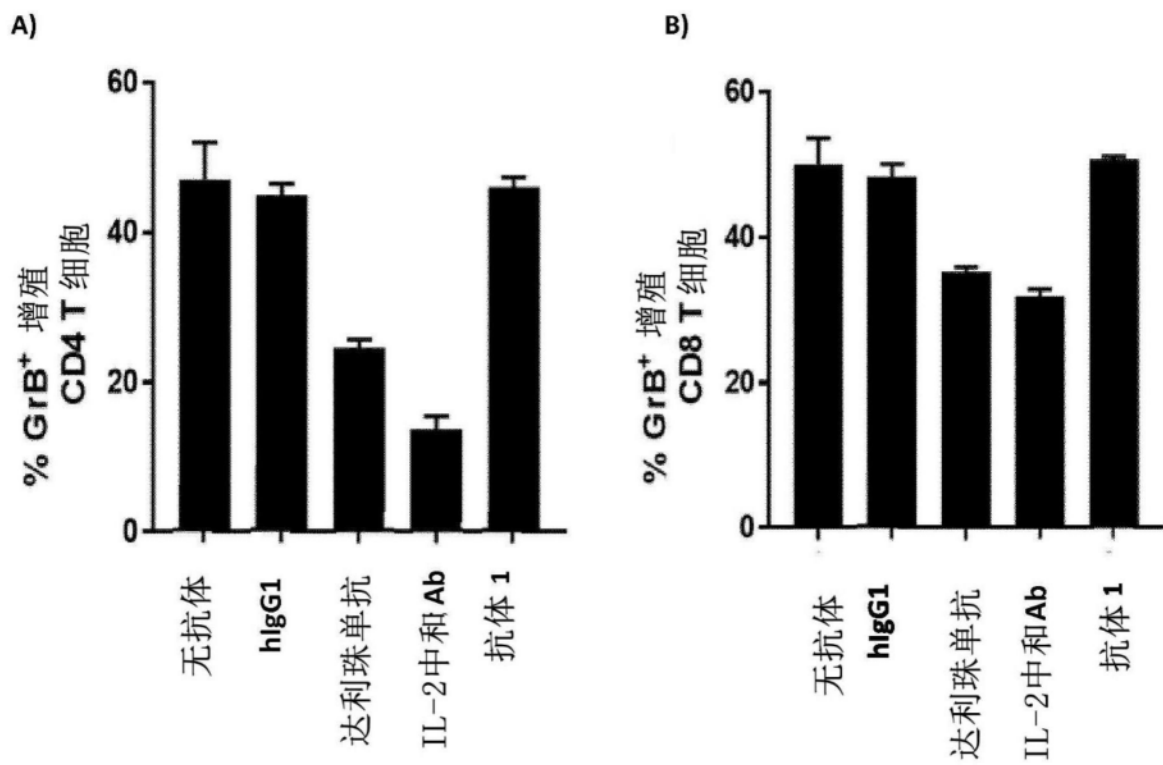


图32

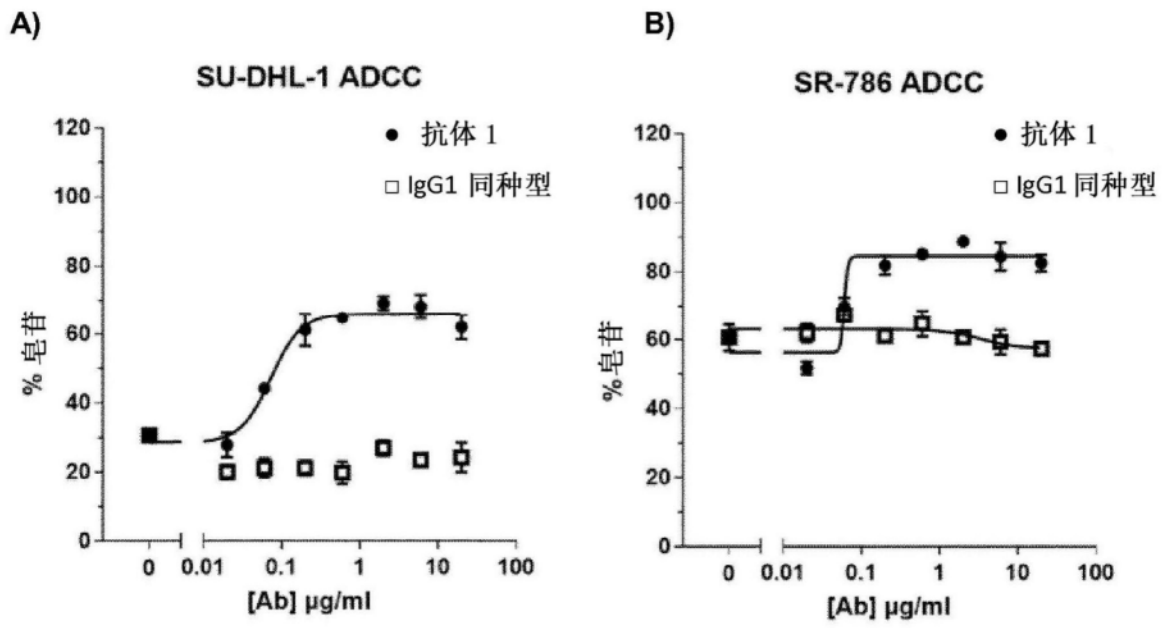


图33

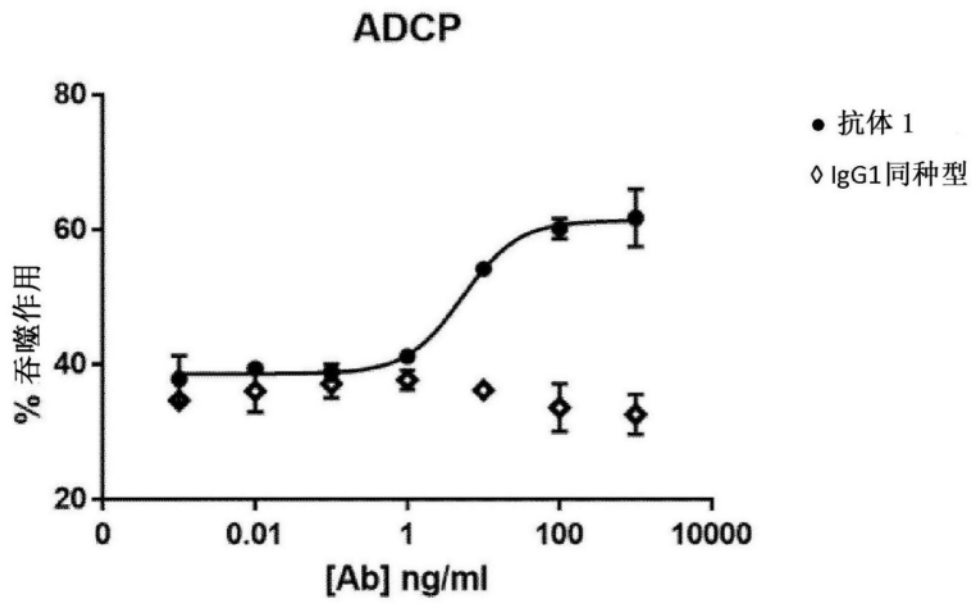


图34

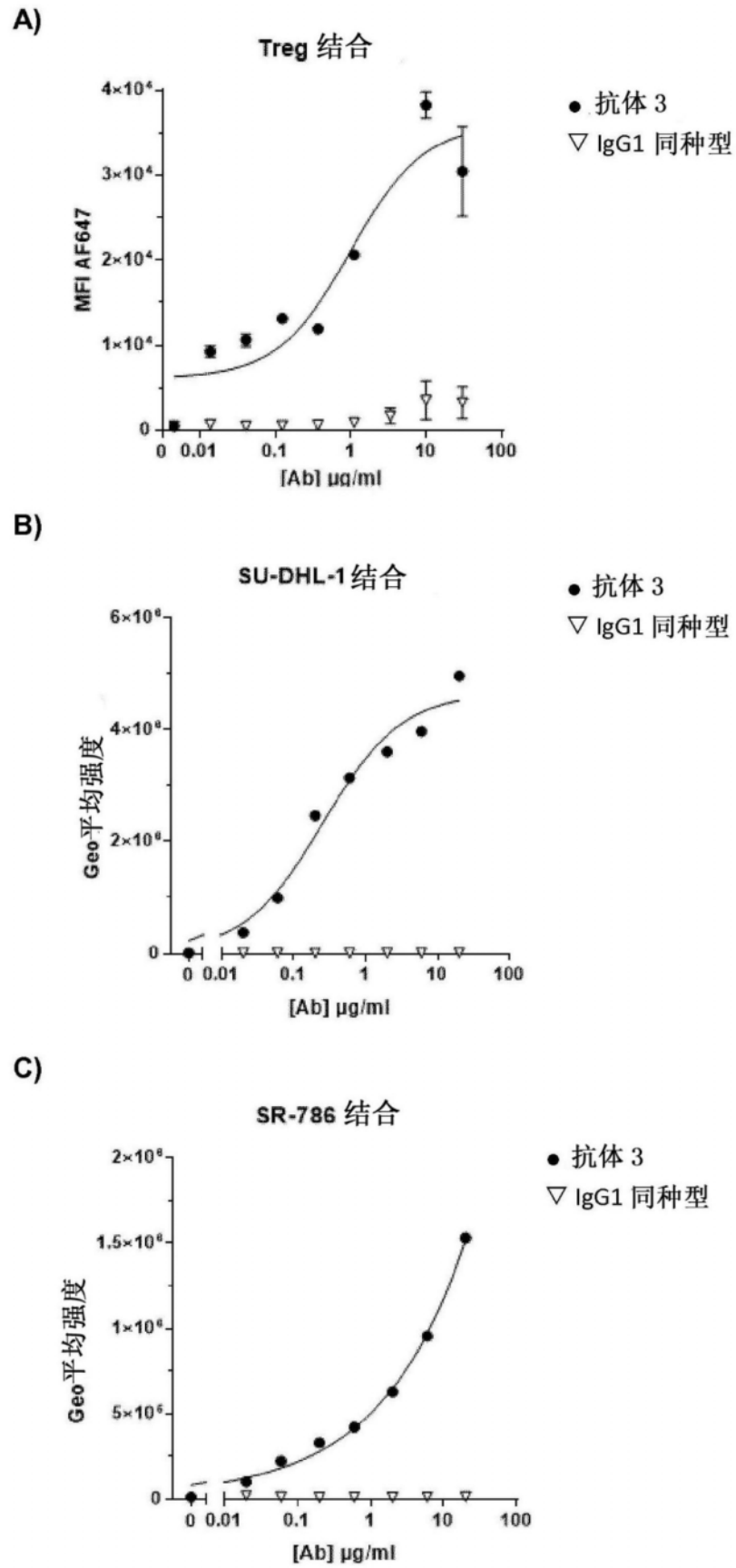


图35

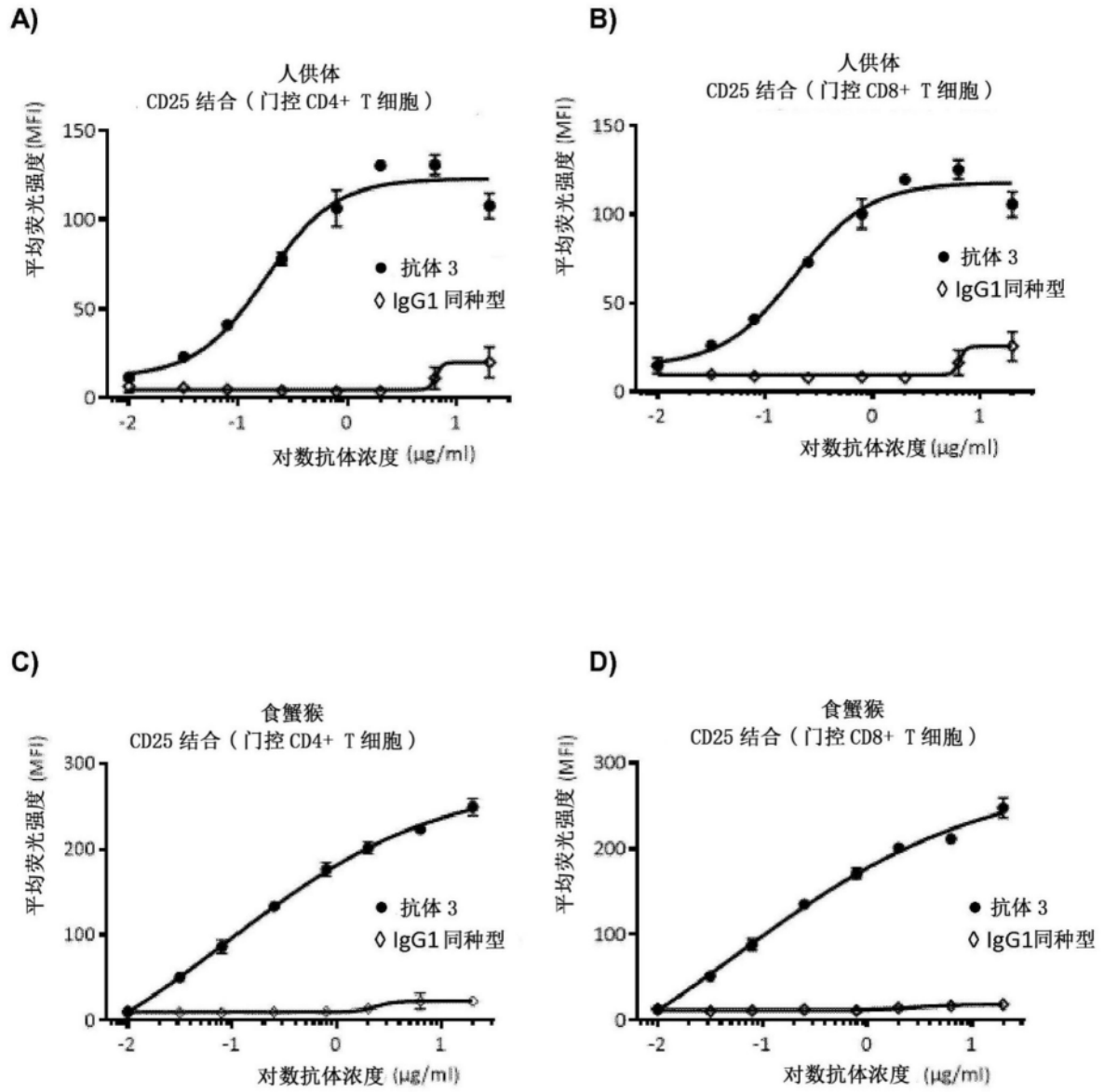


图36

非 IL-2 竞争性 Ab(抗体 3)

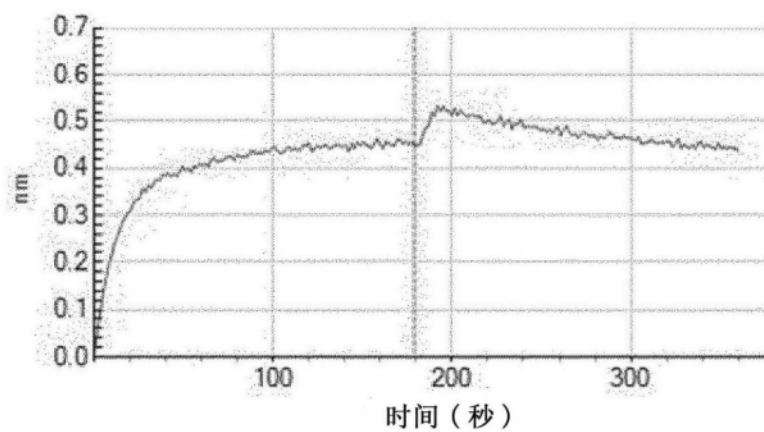


图37

通过 Octet 确定与达利珠单抗的竞争性结合

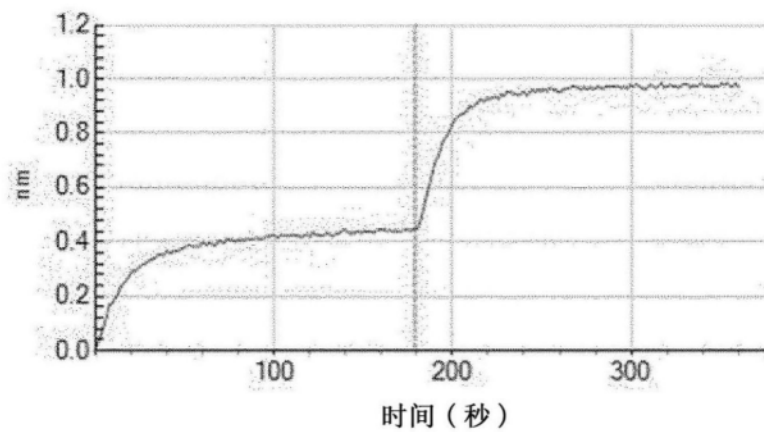


图38

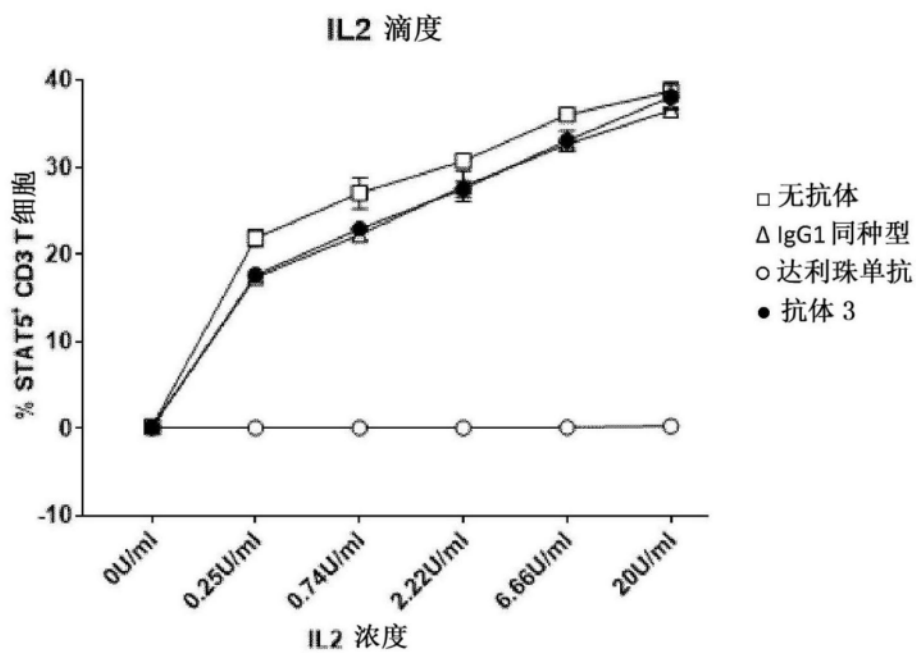
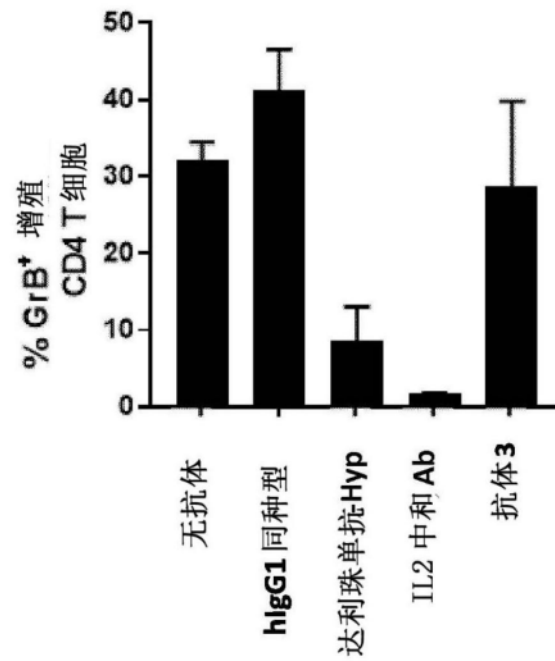


图39

A)

泛性 T 细胞 - GrB⁺ 增殖 CD4 细胞

B)

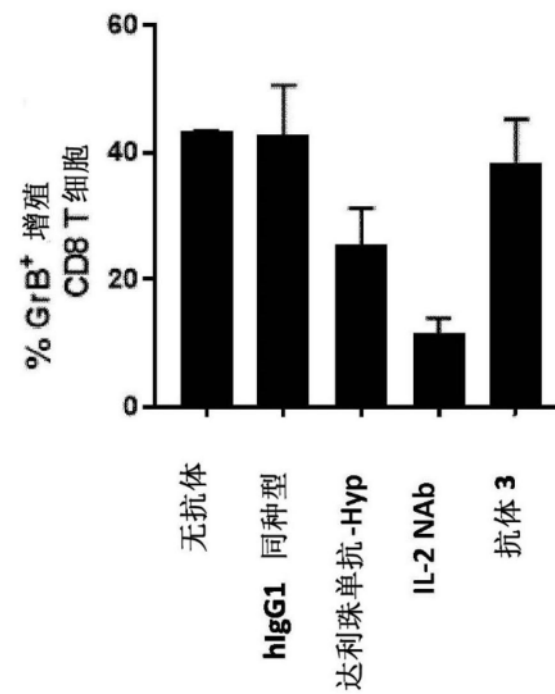
泛性 T 细胞 - GrB⁺ 增殖 CD8 细胞

图40

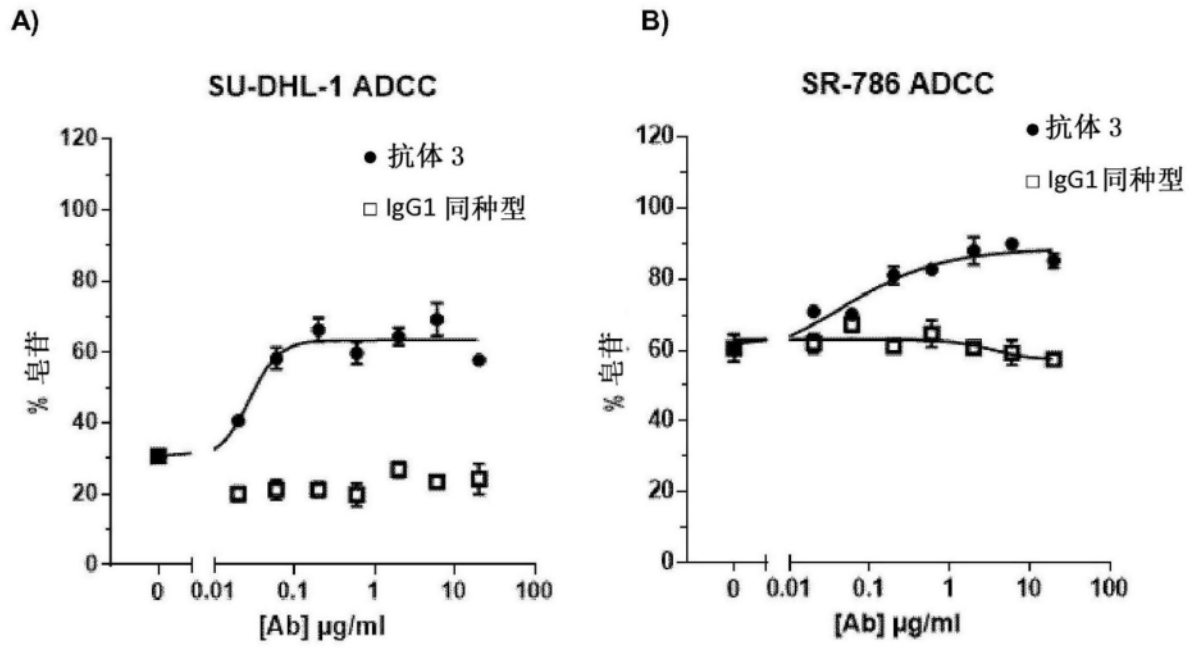


图41

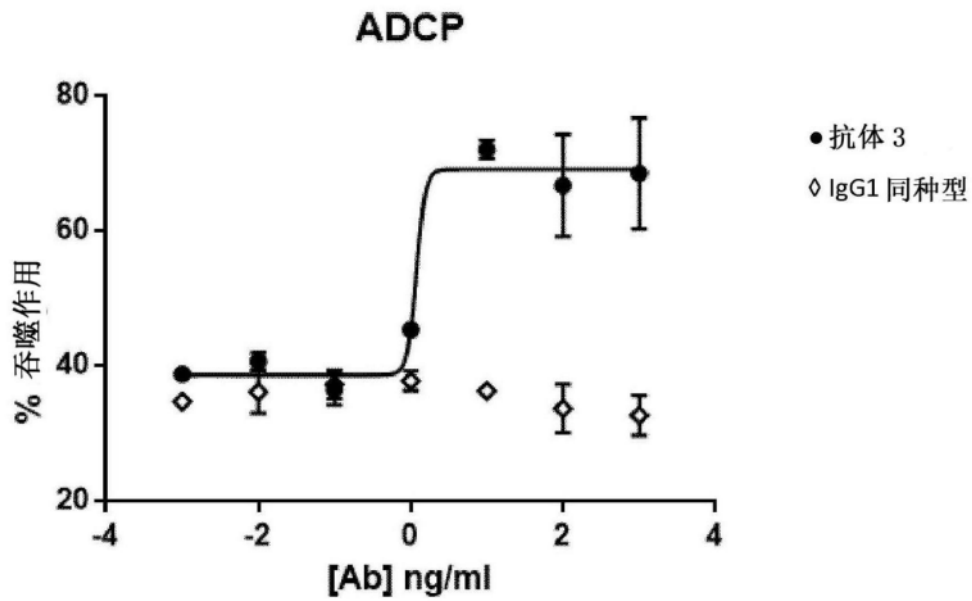
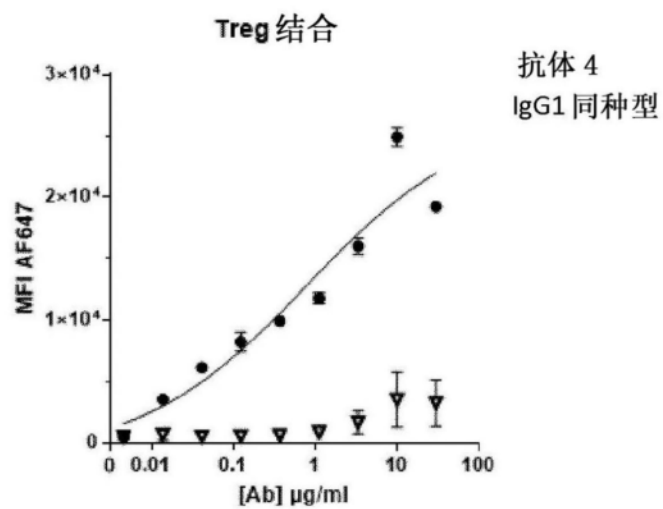
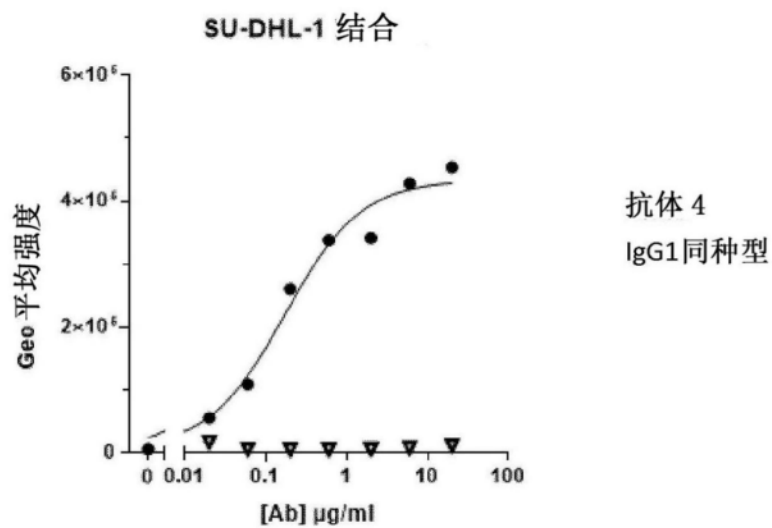


图42

A)



B)



C)

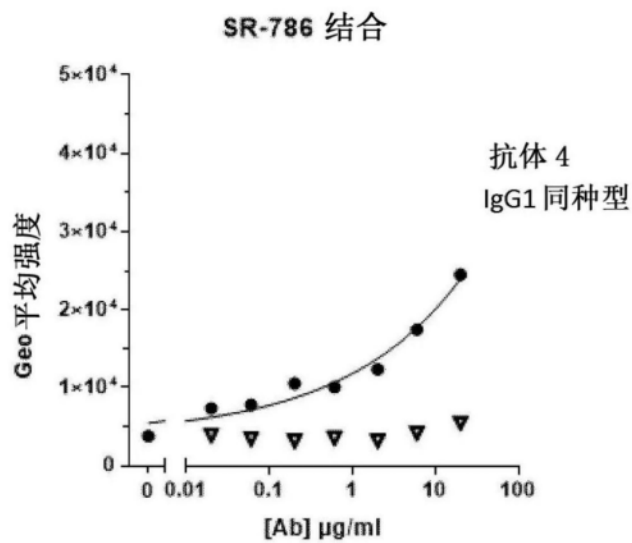


图43

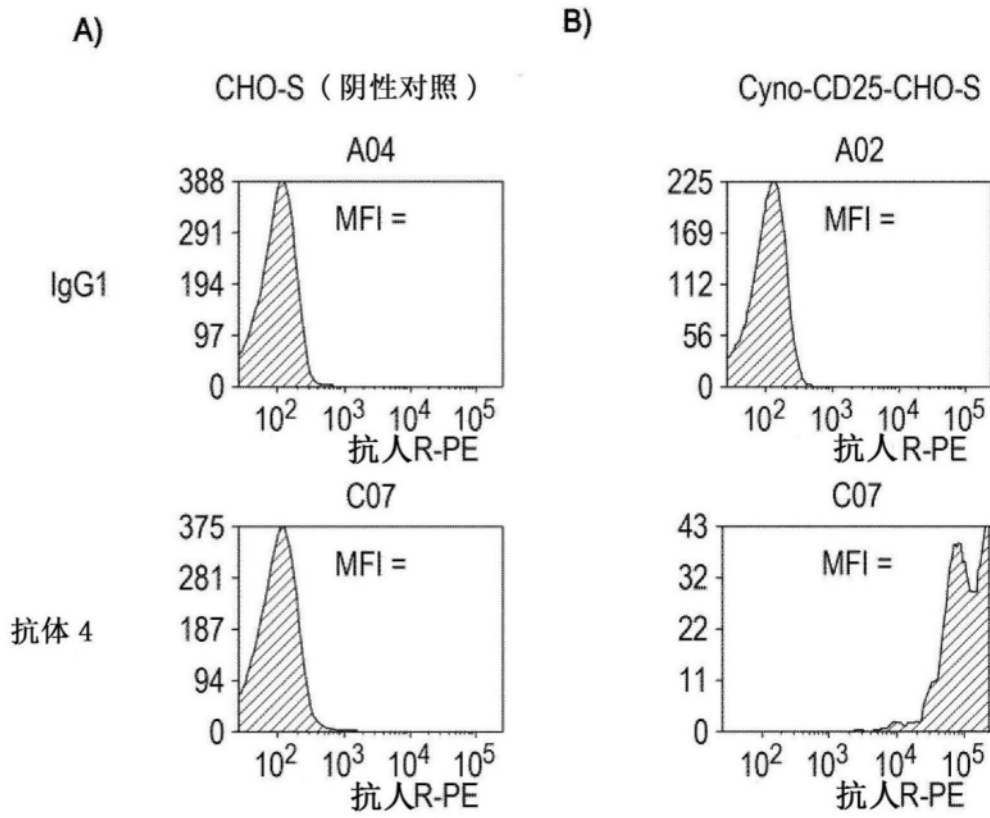


图44

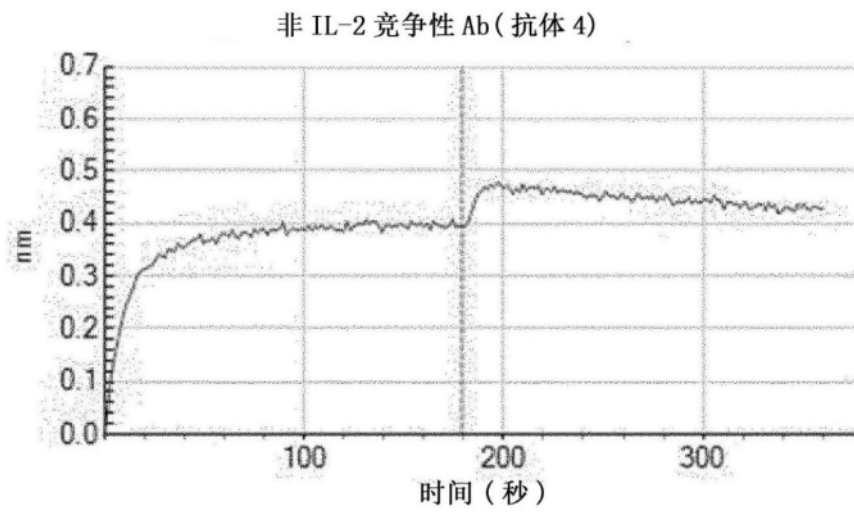


图45

通过 Octet 确定与达利珠单抗的竞争性结合

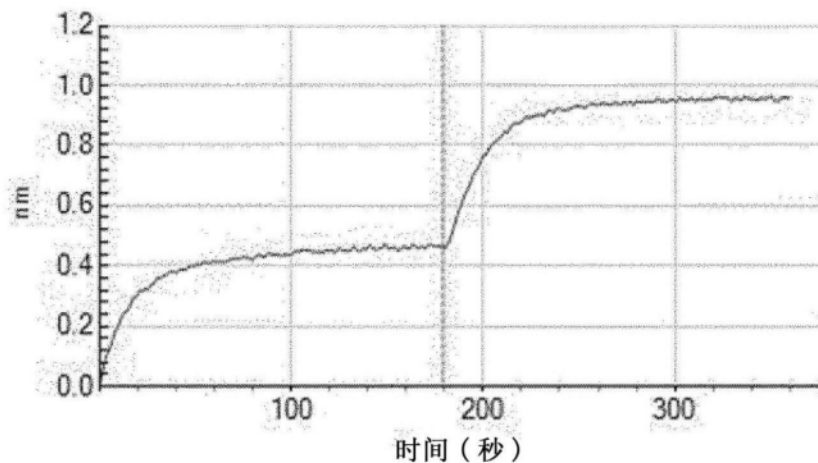


图46

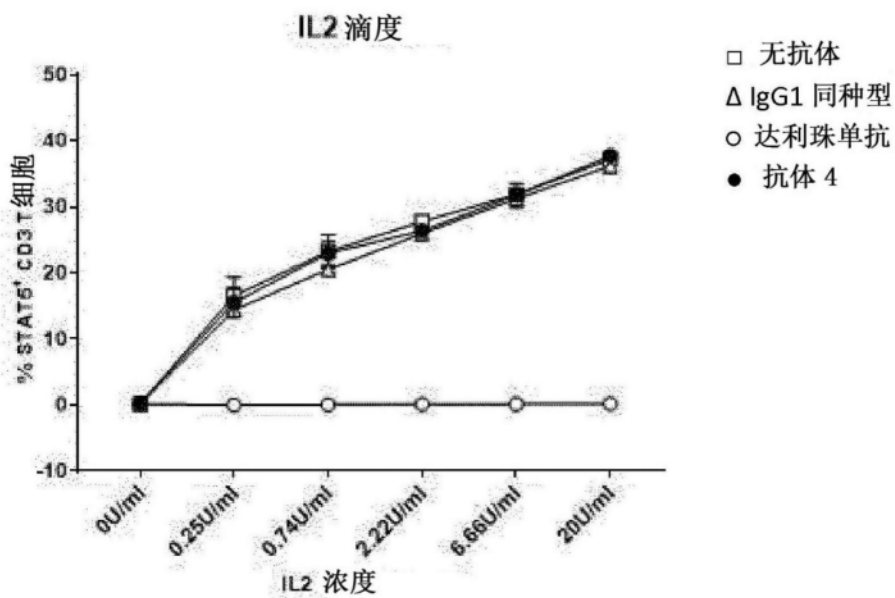
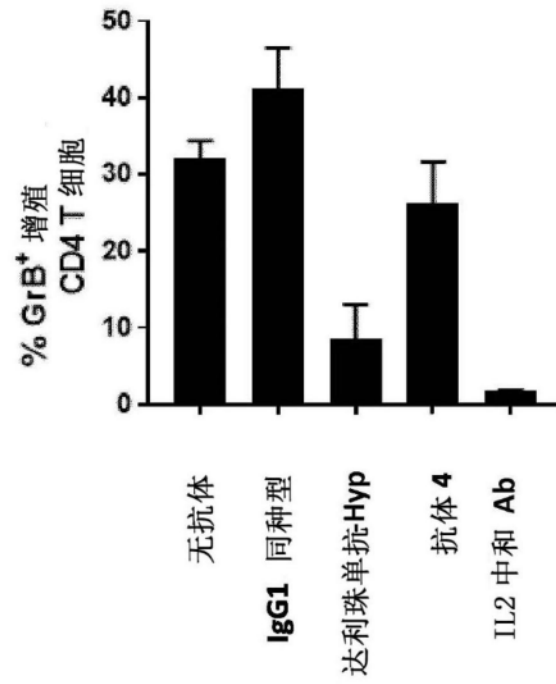


图47

A)

泛性T 细胞 - GrB⁺ 增殖 CD4 细胞

B)

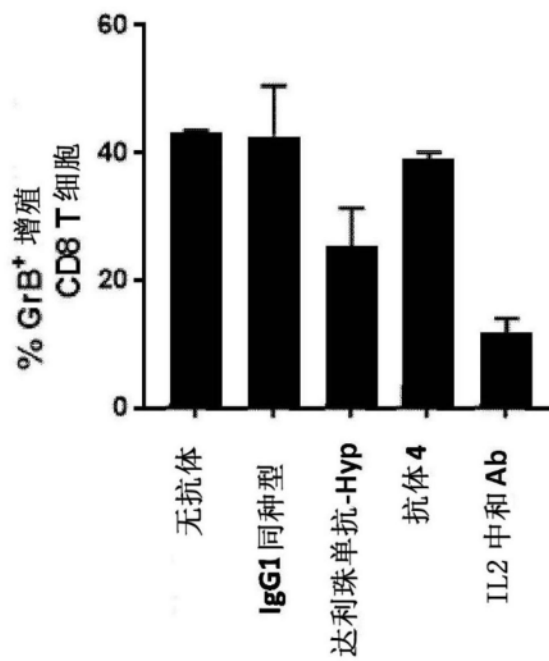
泛性T 细胞 - GrB⁺ 增殖 CD8 细胞

图48

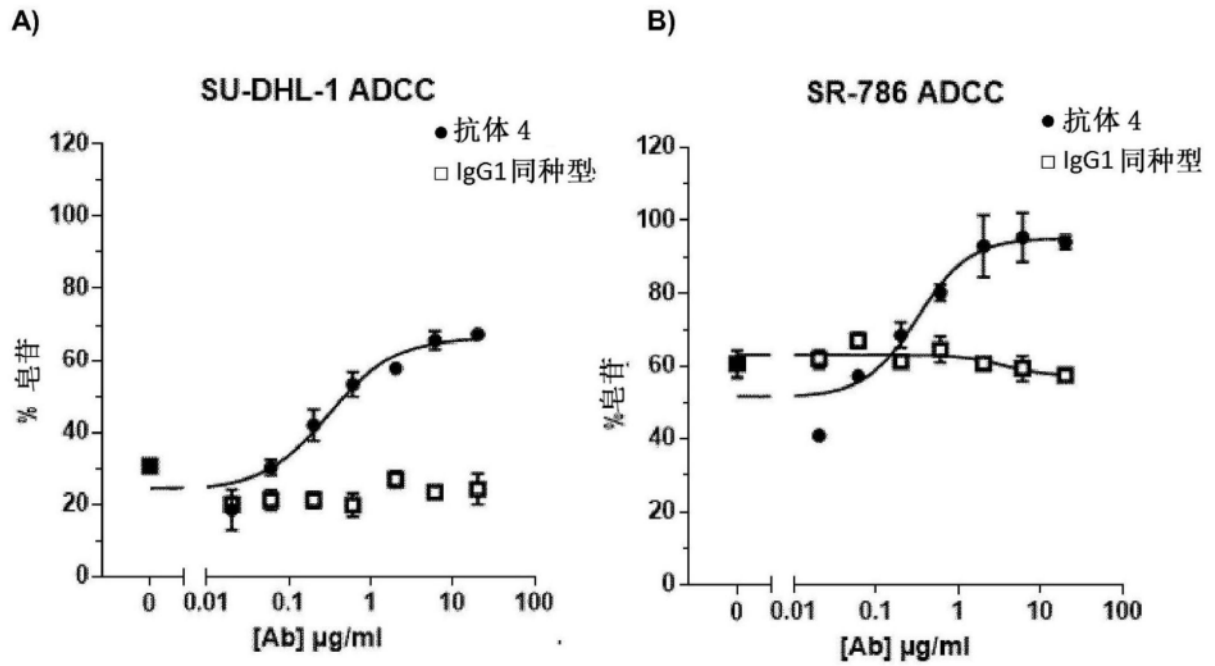


图49

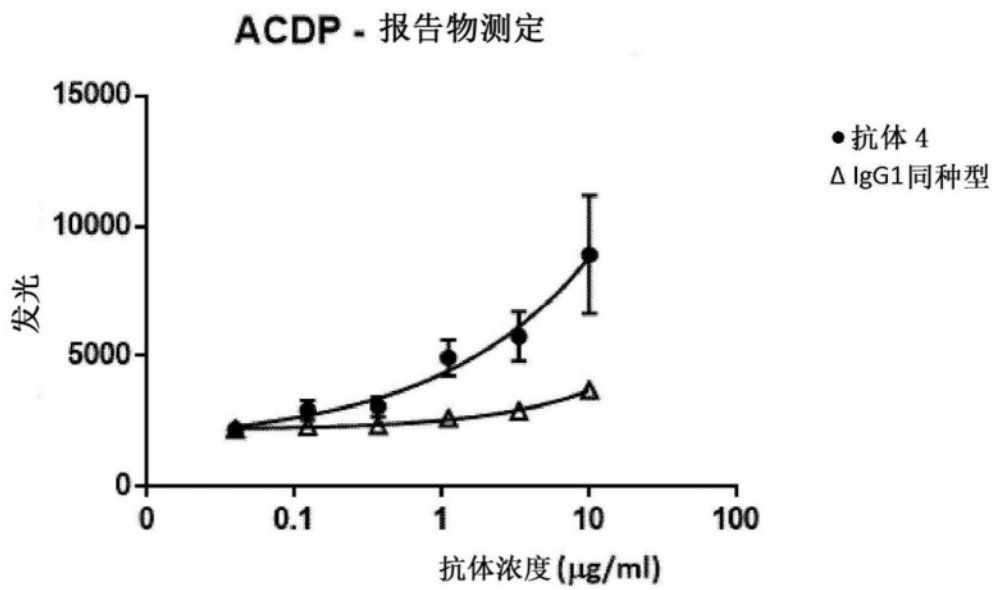


图50

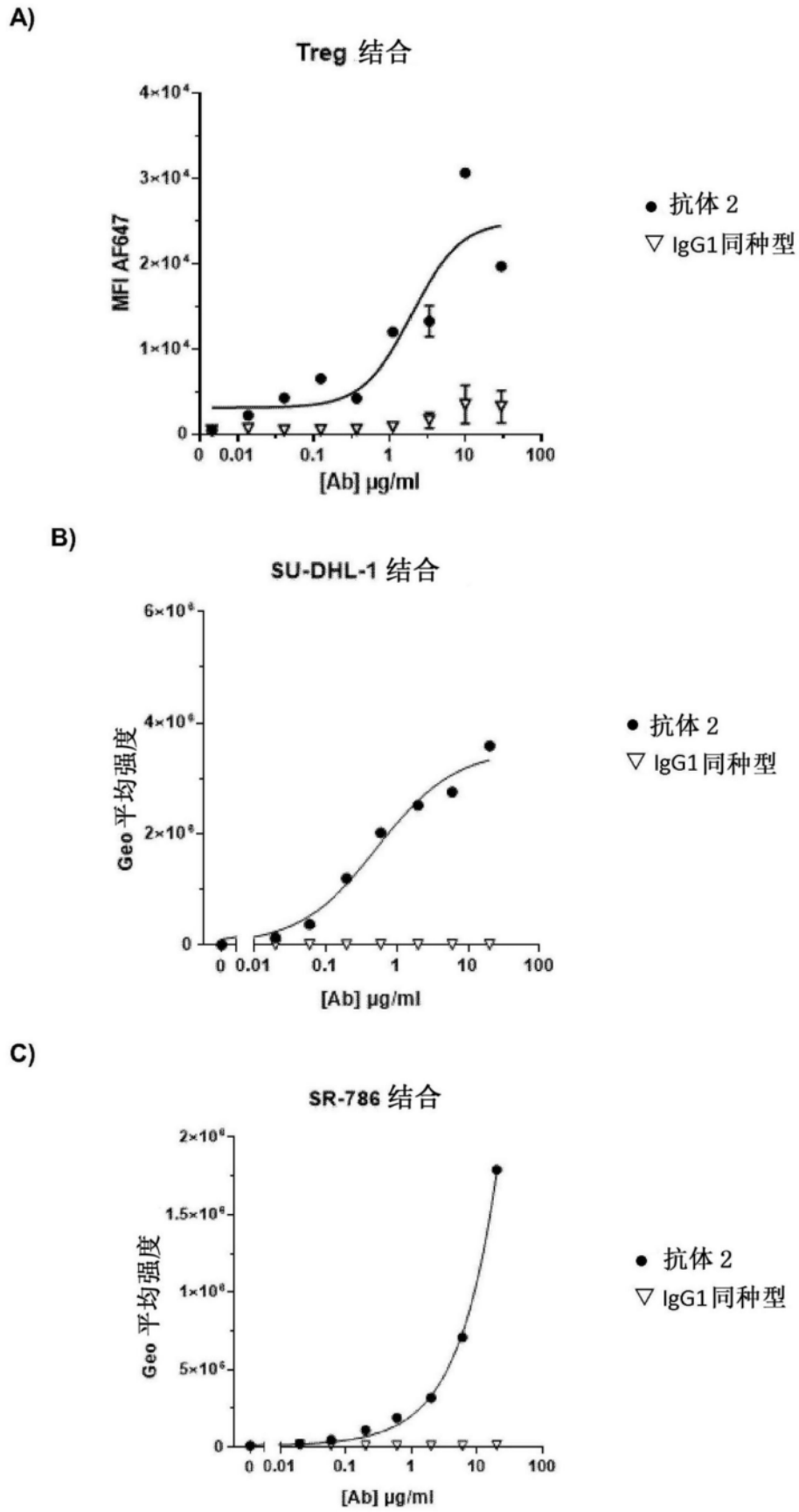


图51

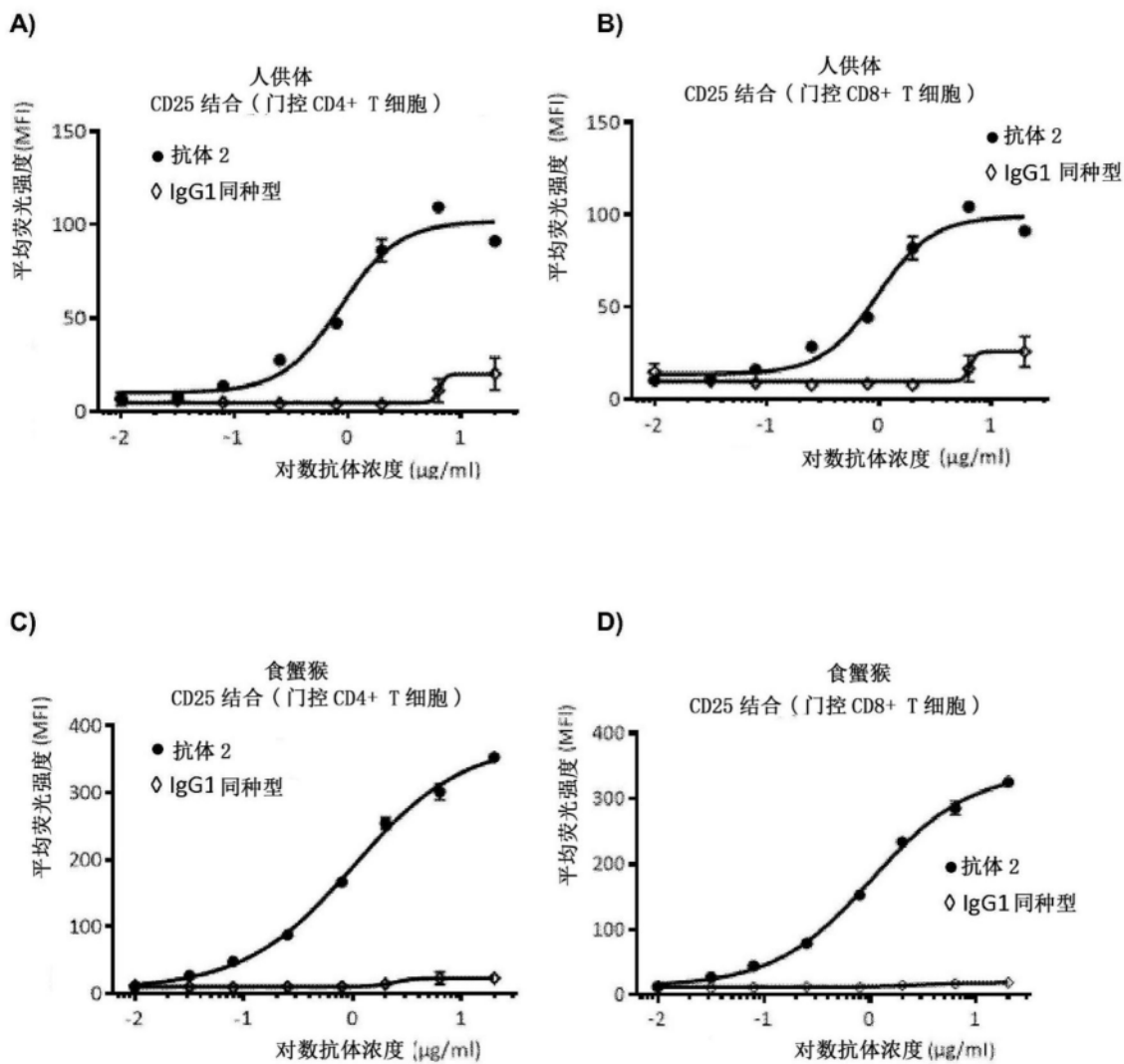


图52

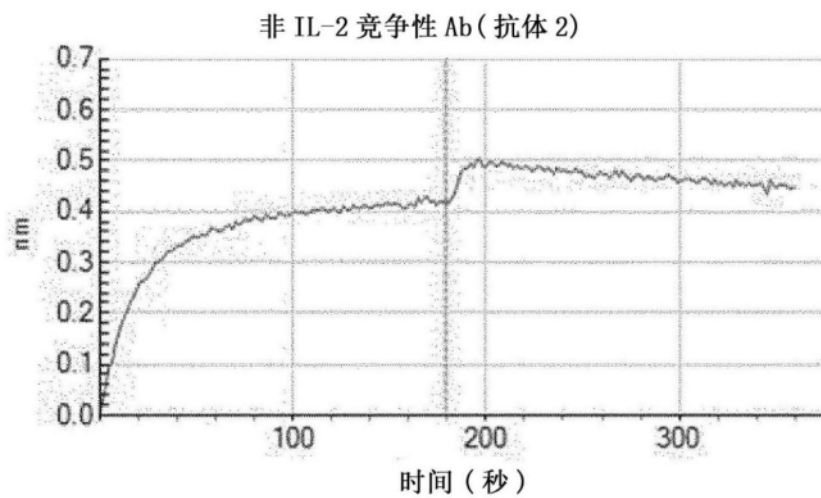


图53

通过 Octet 确定与达利珠单抗的竞争性结合

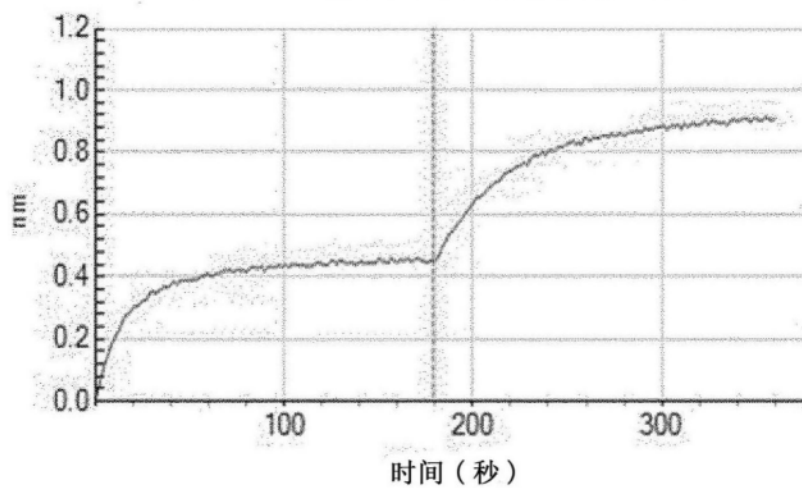


图54

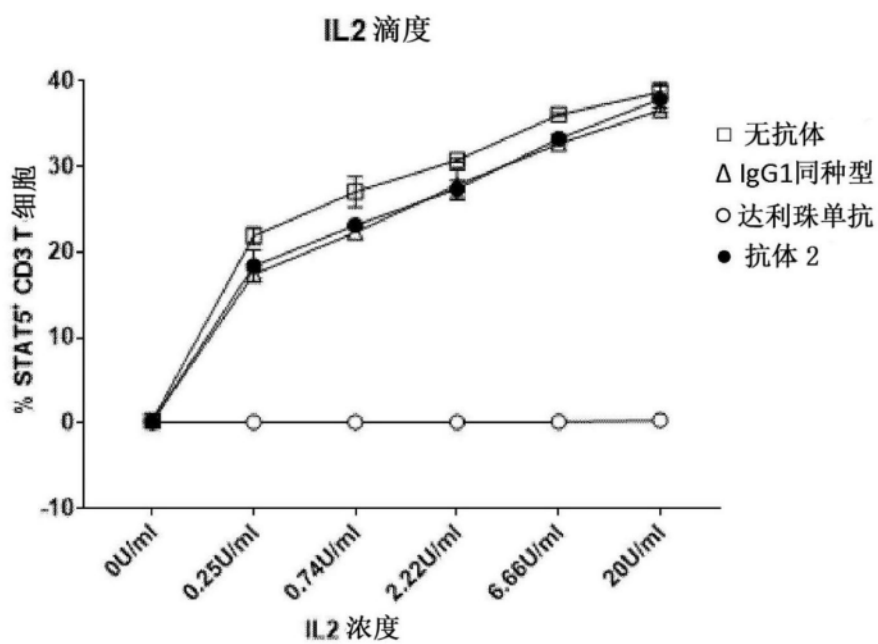


图55

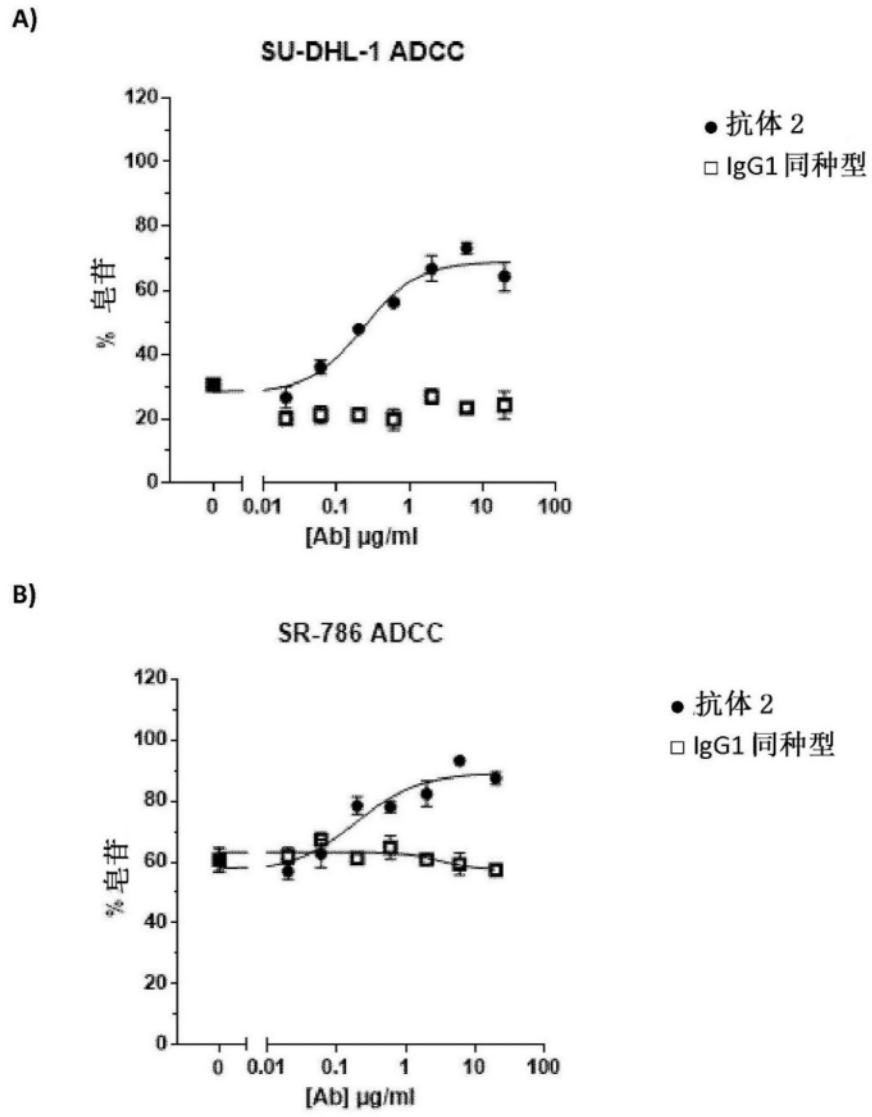


图56

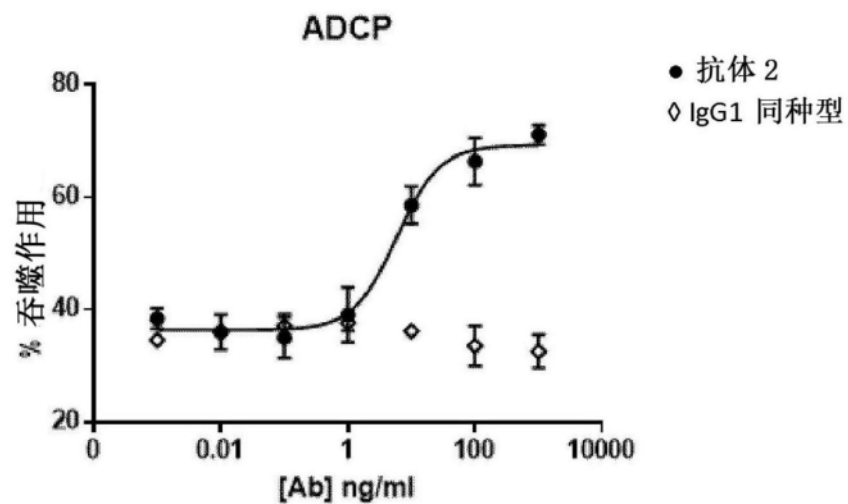


图57

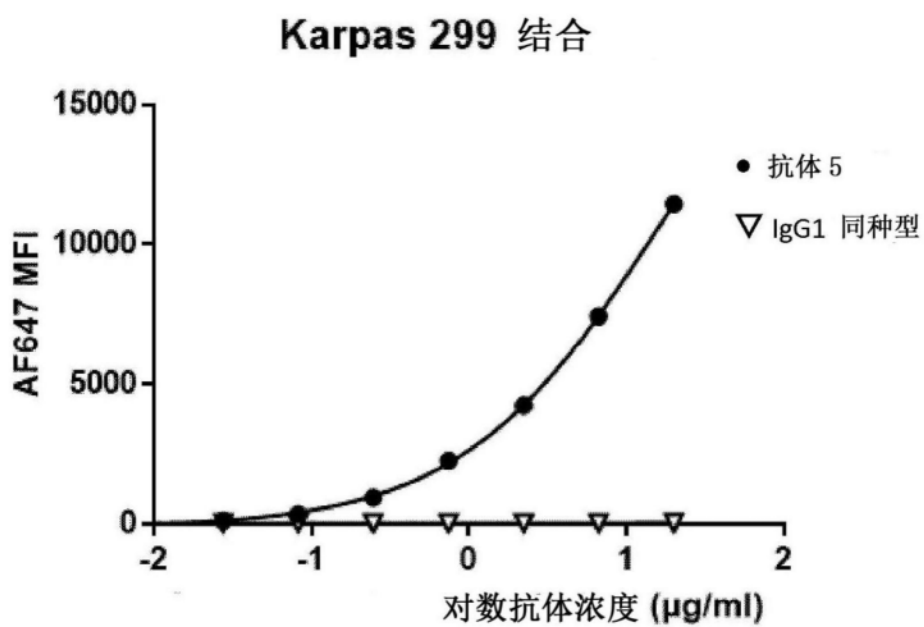


图58

阻断性与非阻断性抗 CD25 Ab 对比

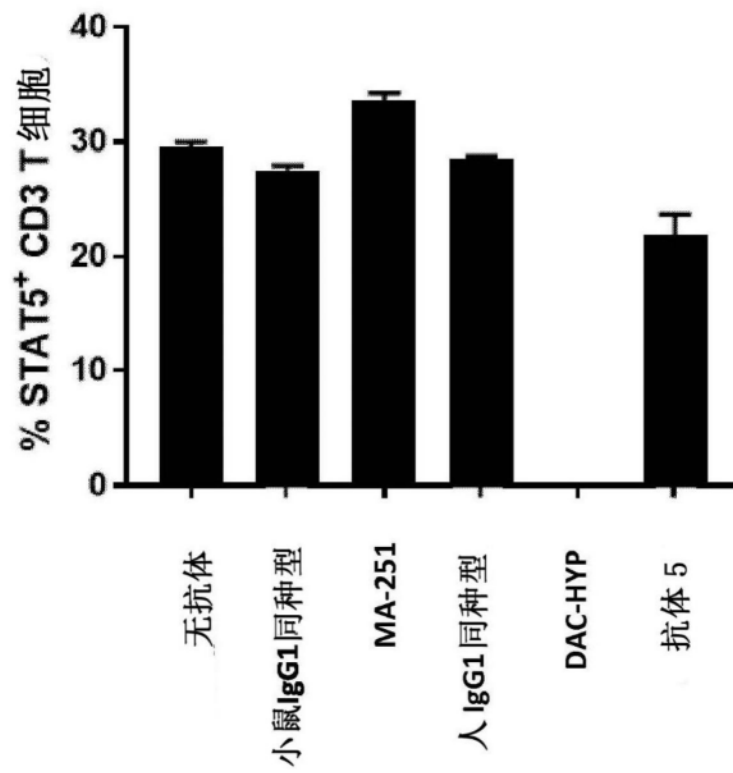


图59

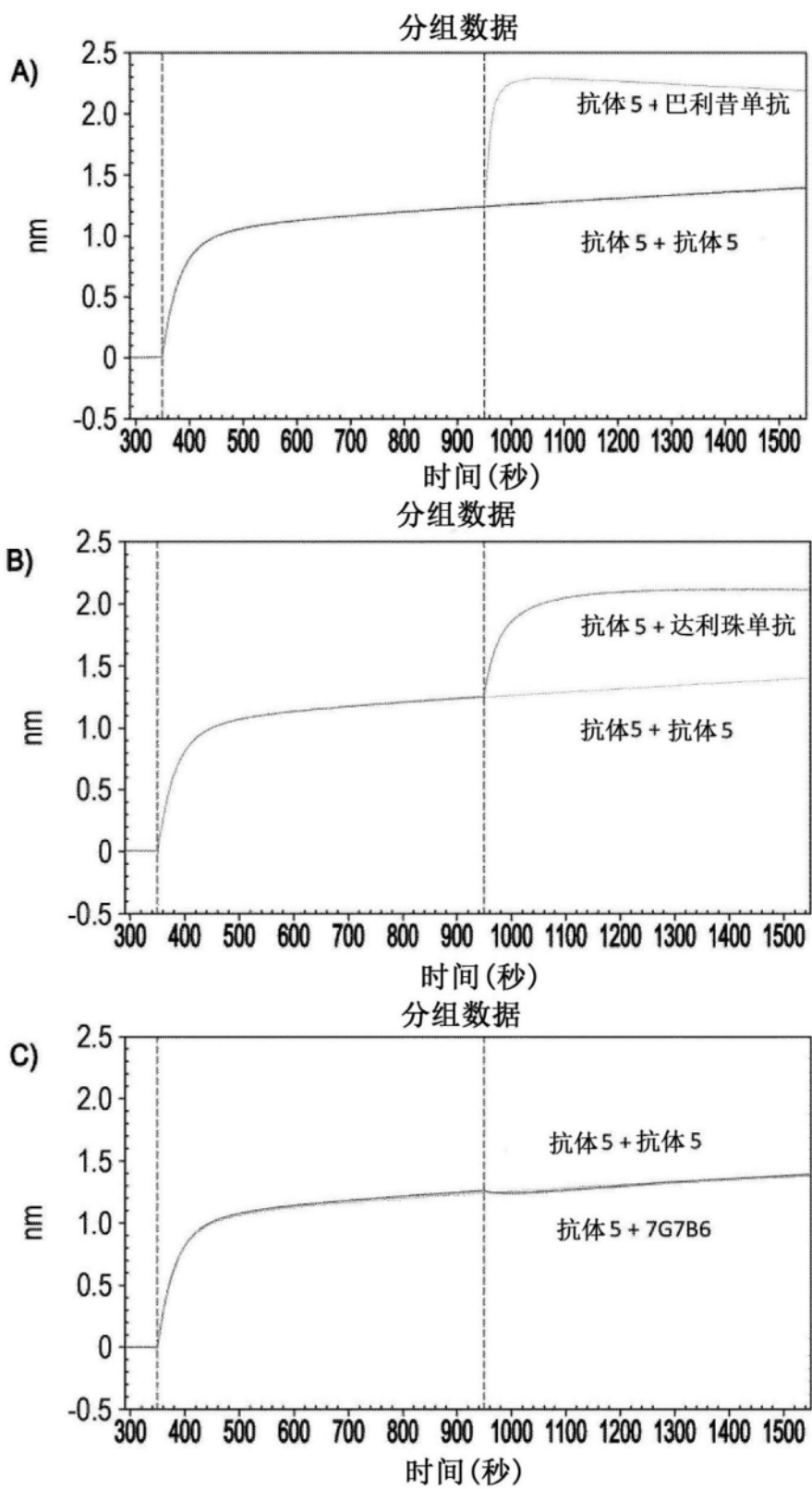


图60

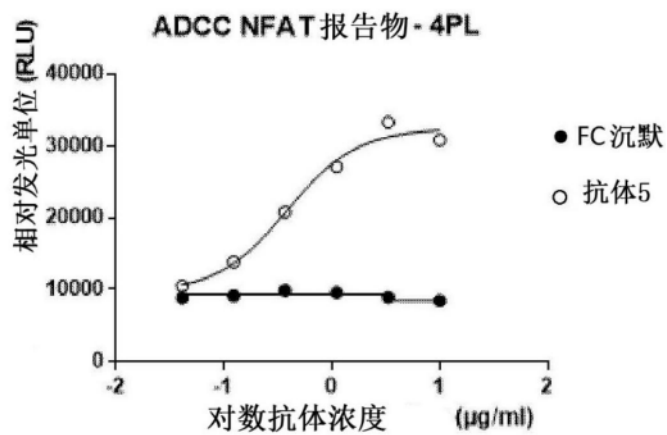


图61

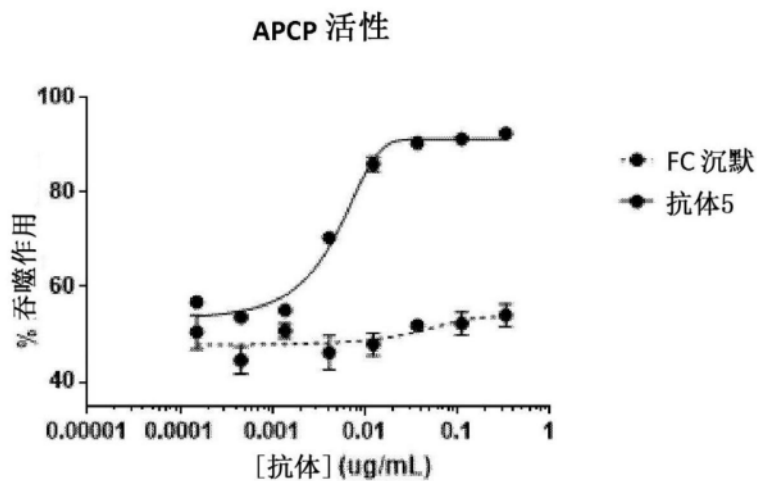


图62

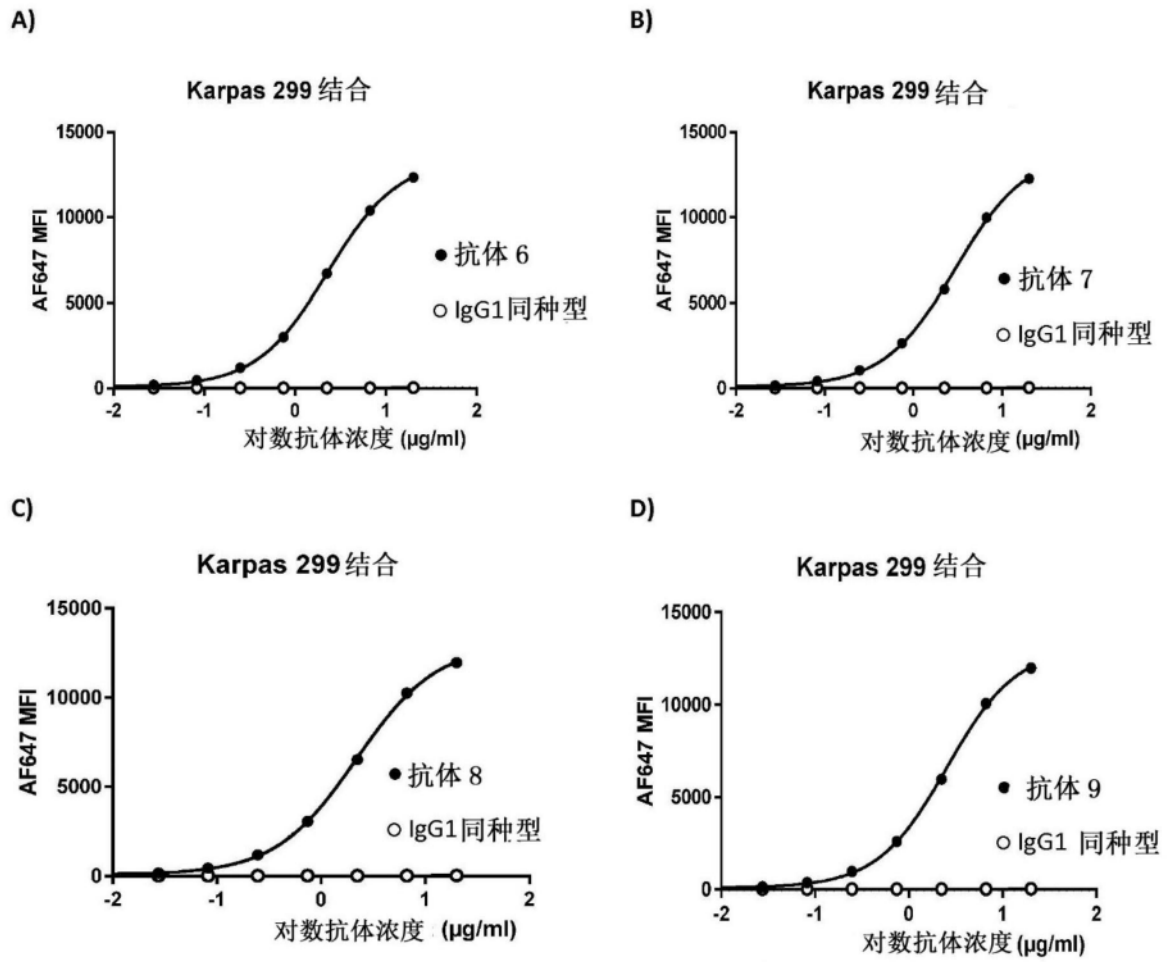


图63

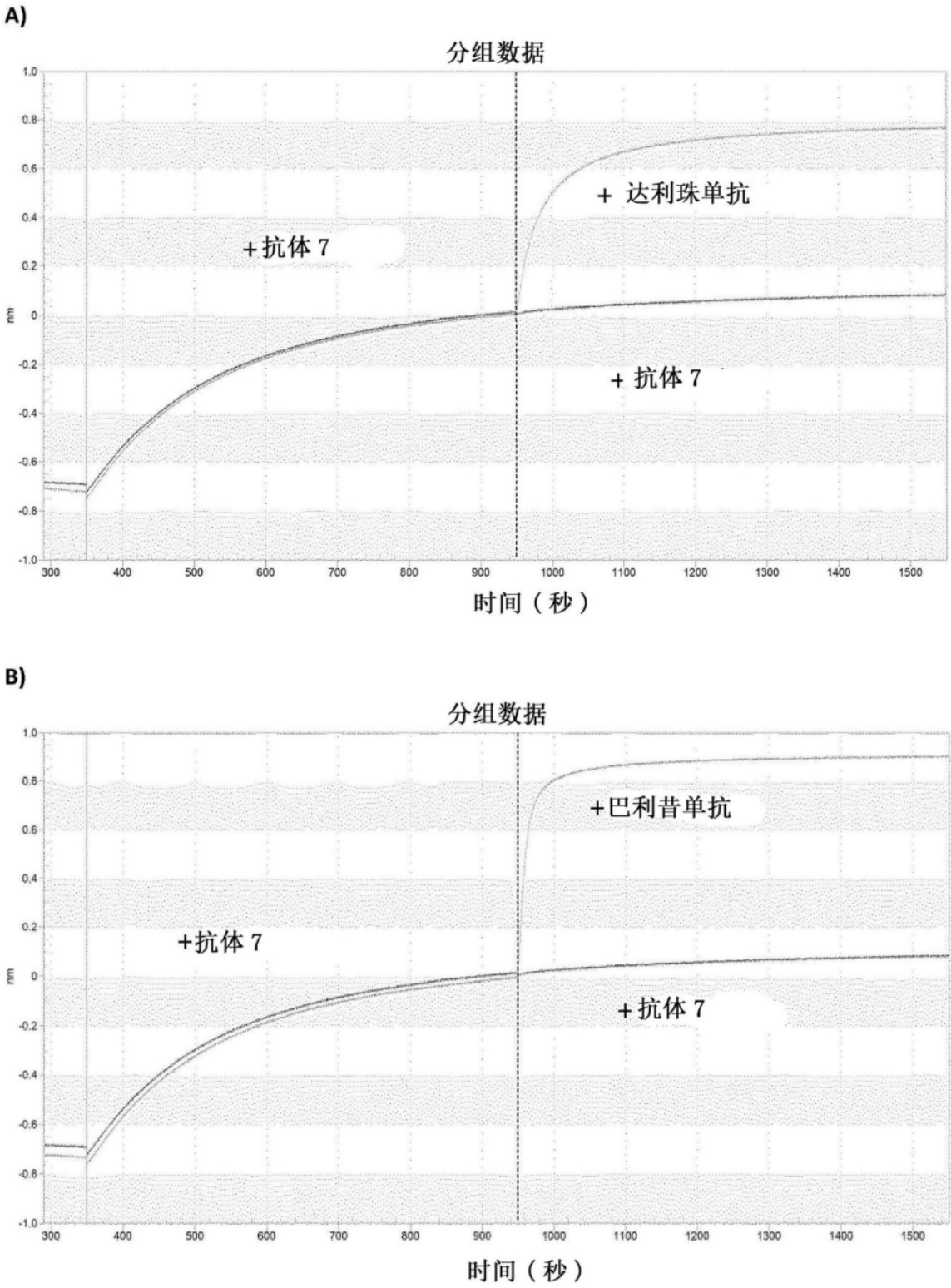


图64

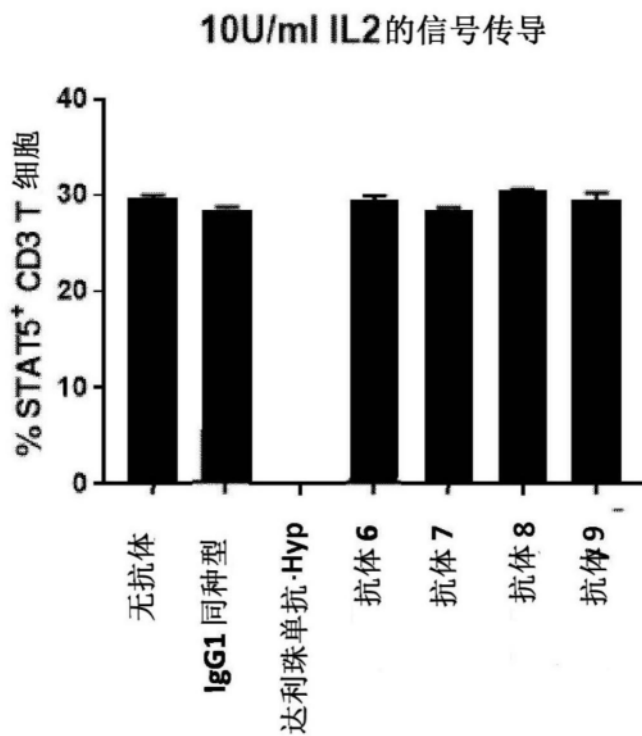


图65

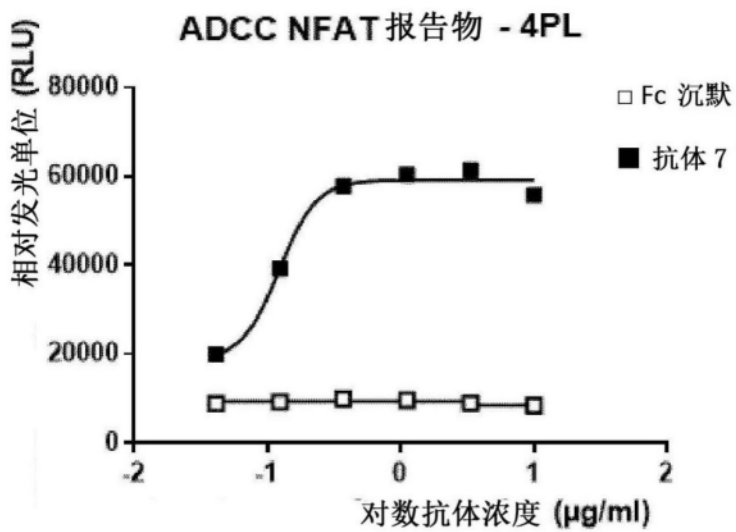


图66

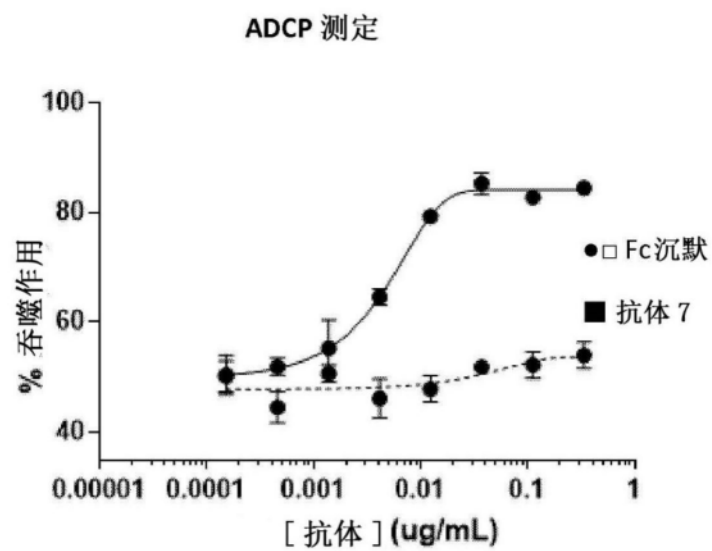
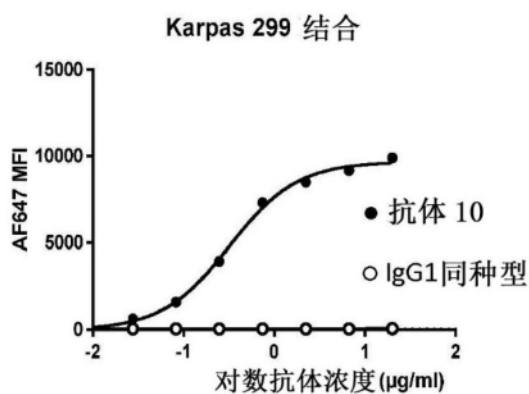
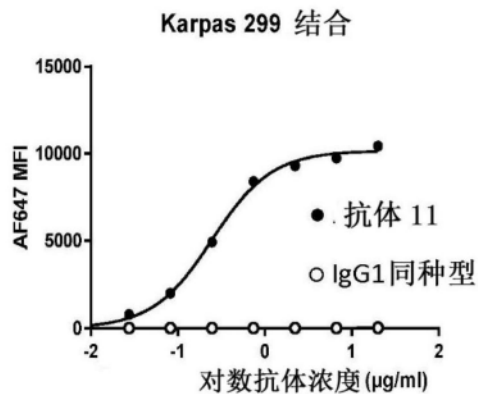


图67

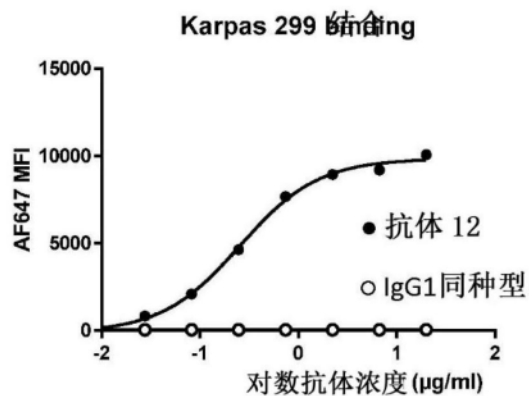
A)



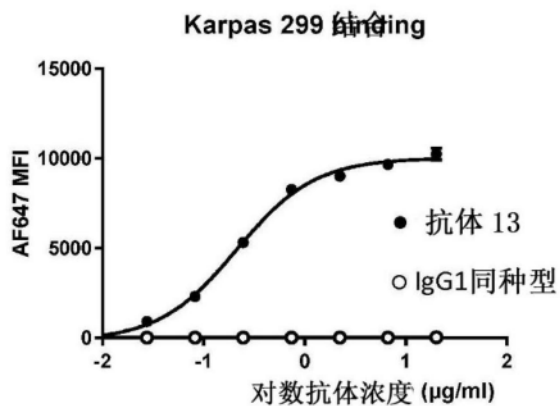
B)



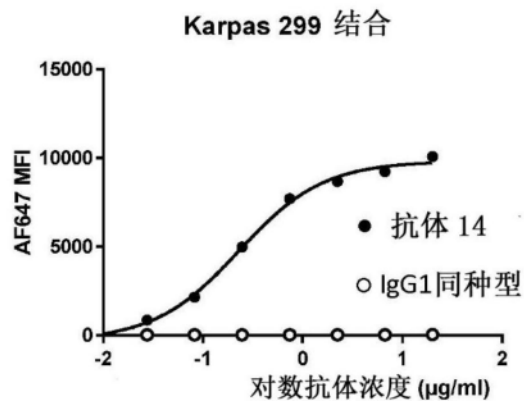
C)



D)



E)



F)

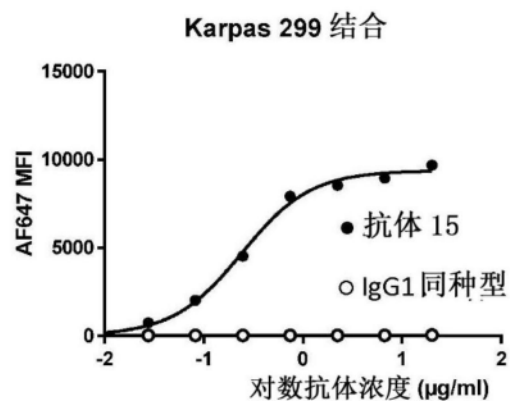
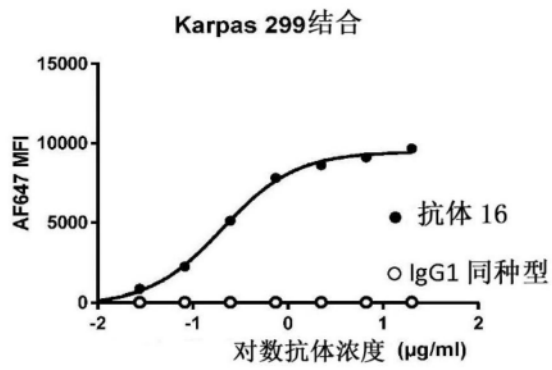
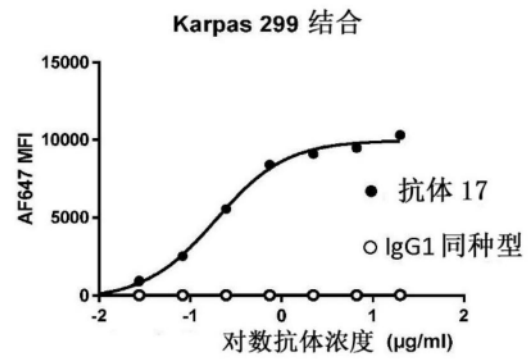


图68

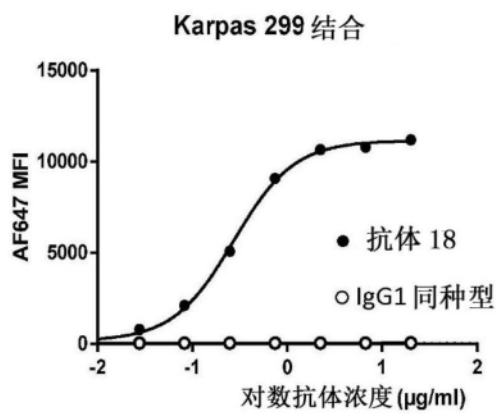
G)



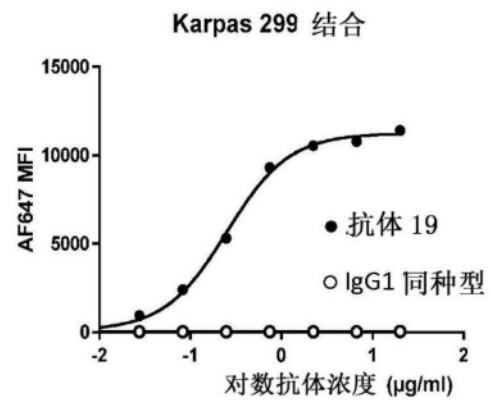
H)



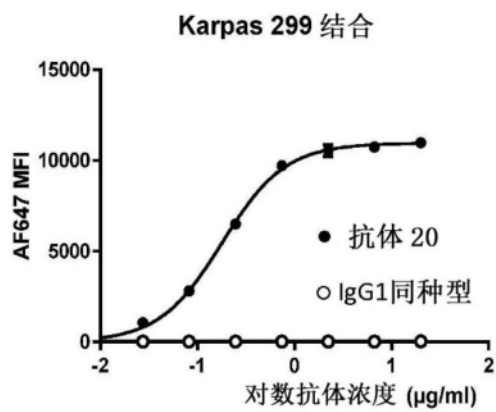
I)



J)



K)



L)

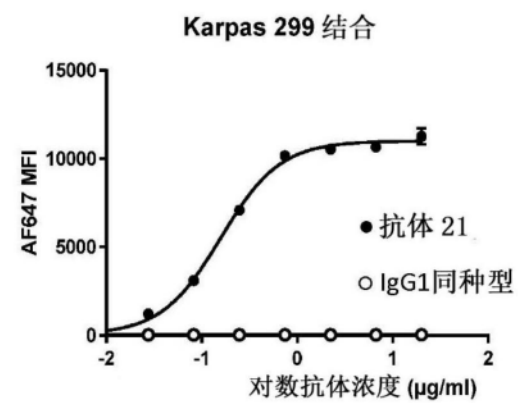


图68(续)

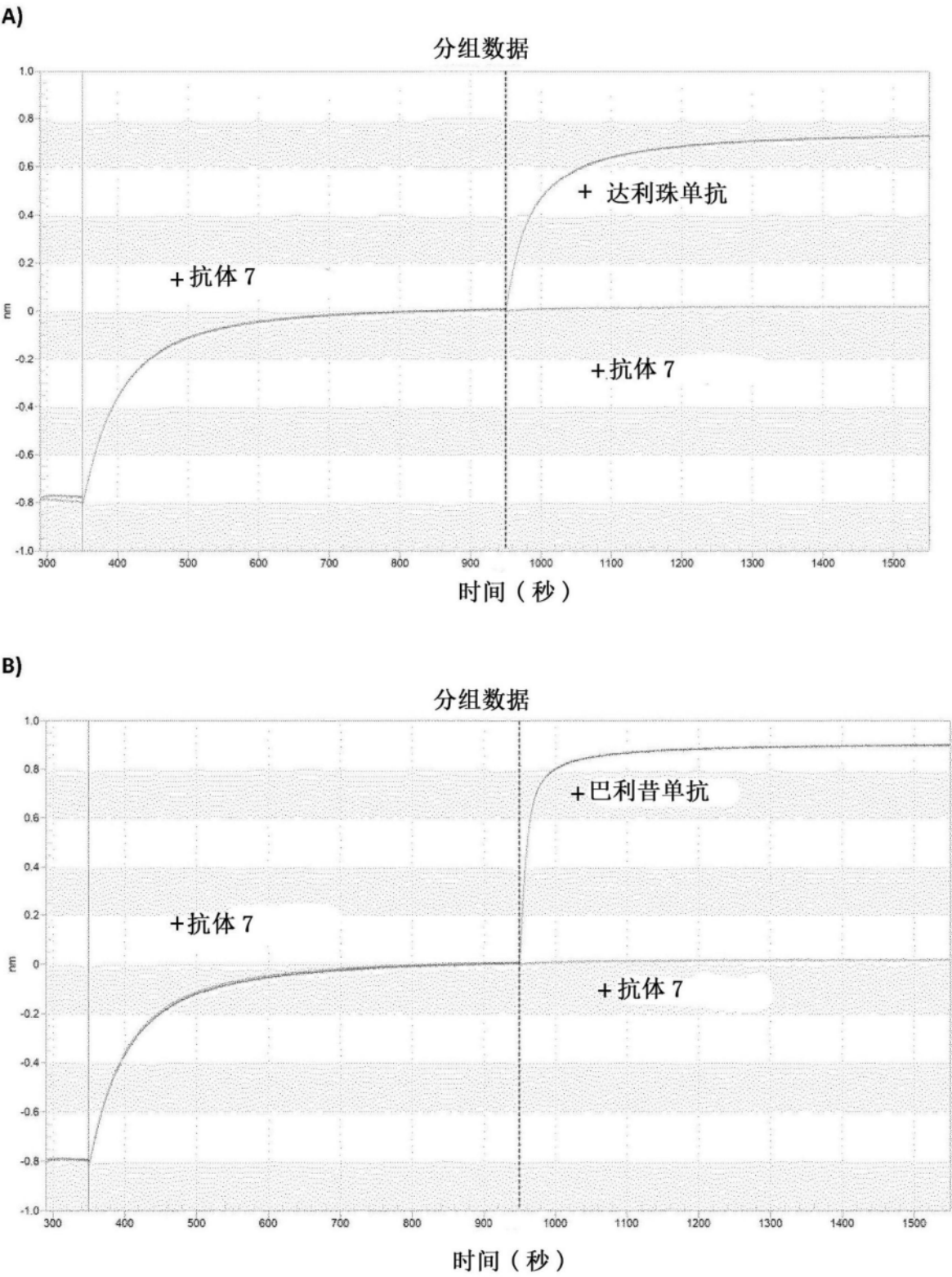


图69

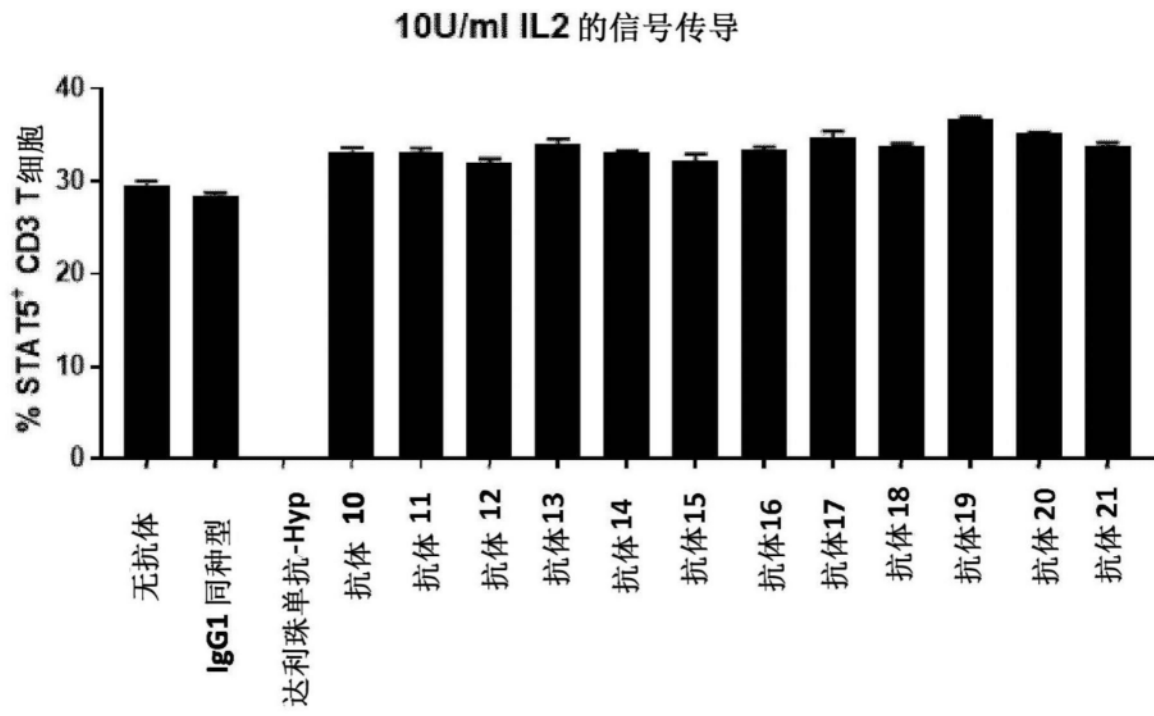


图70

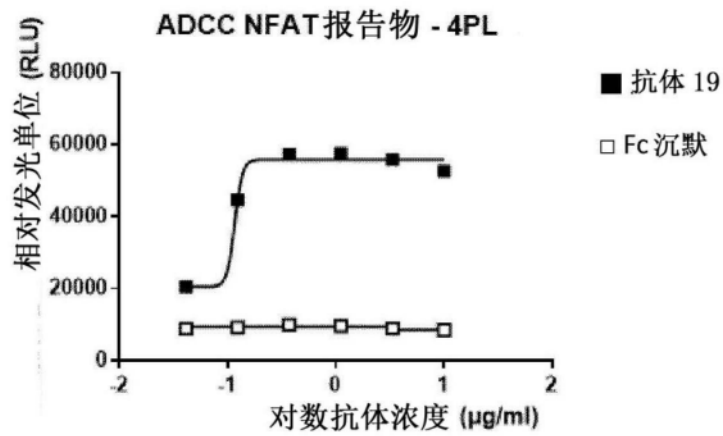


图71

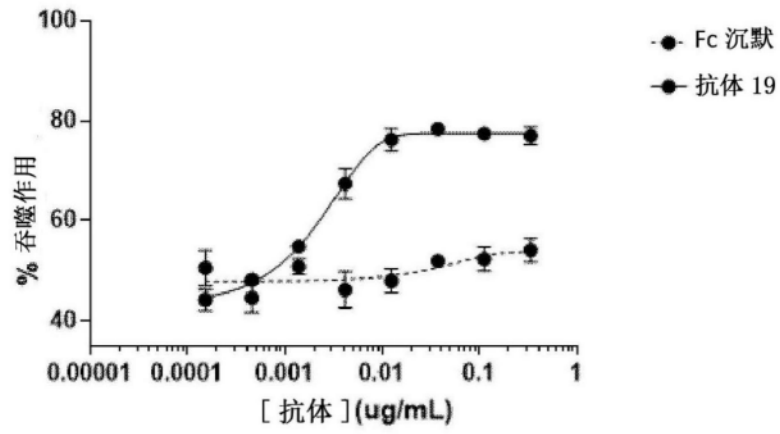


图72

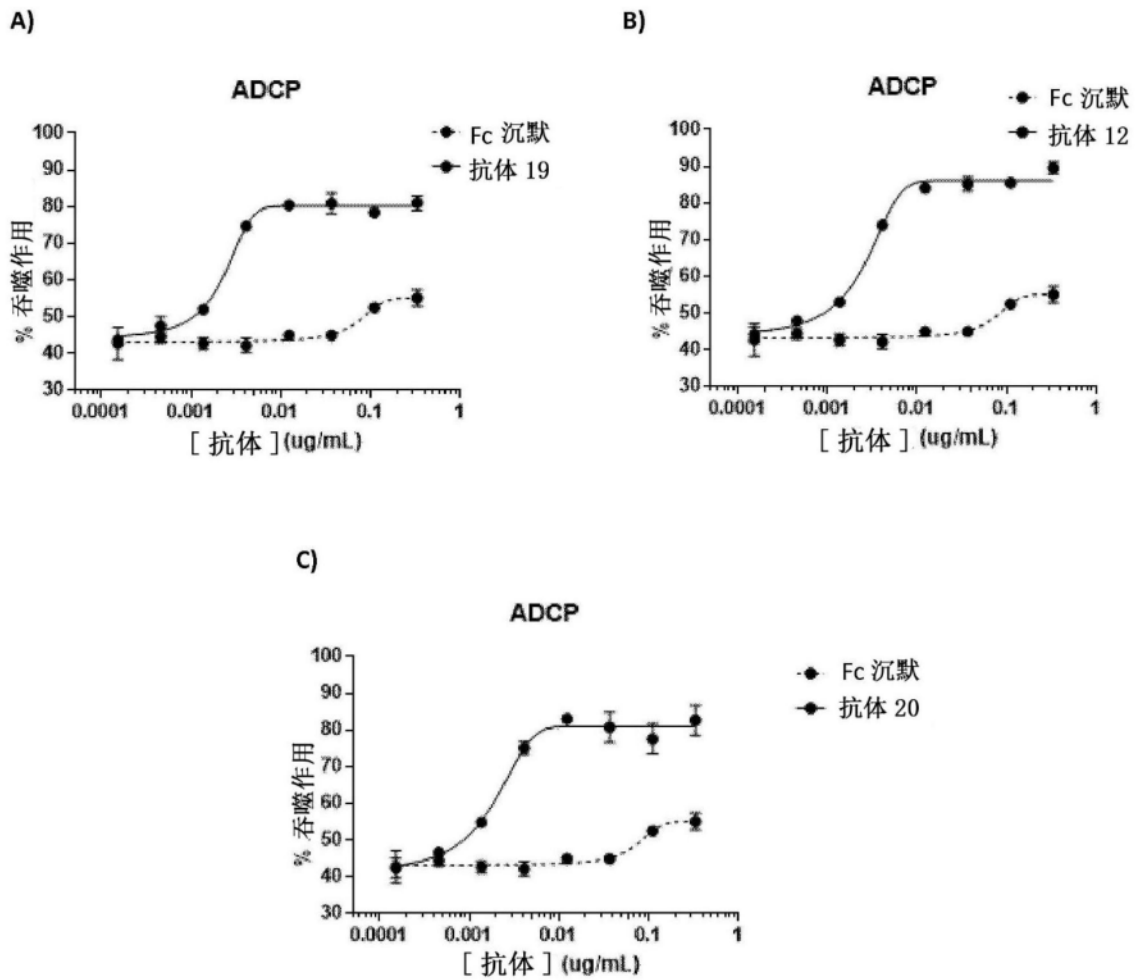
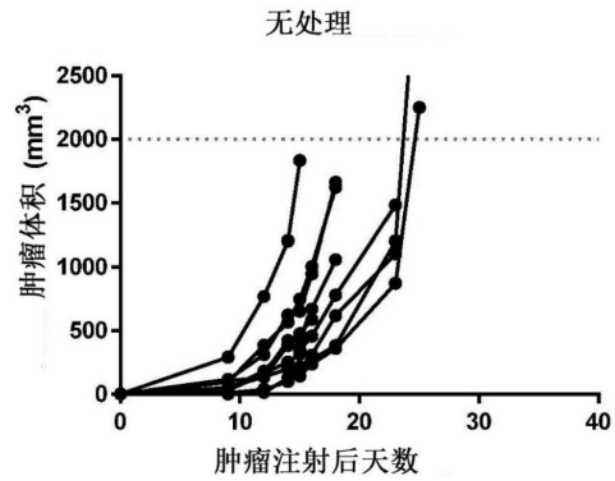
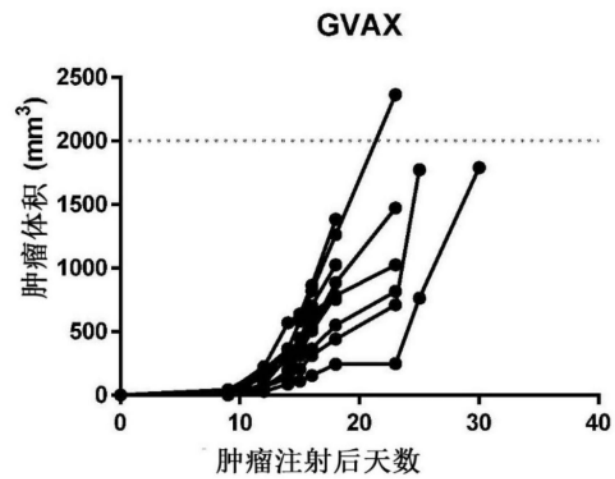


图73

A)



B)



C)

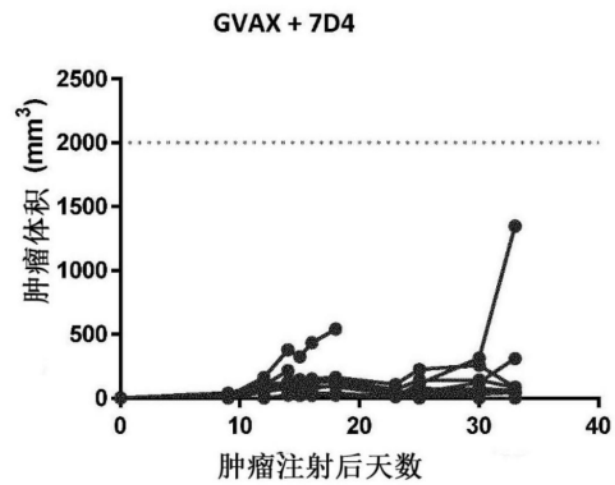


图74

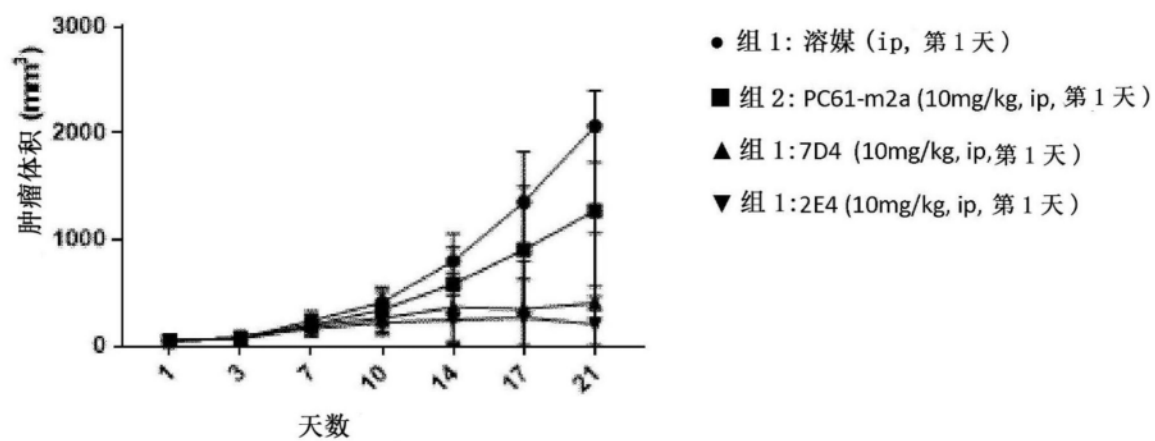


图75

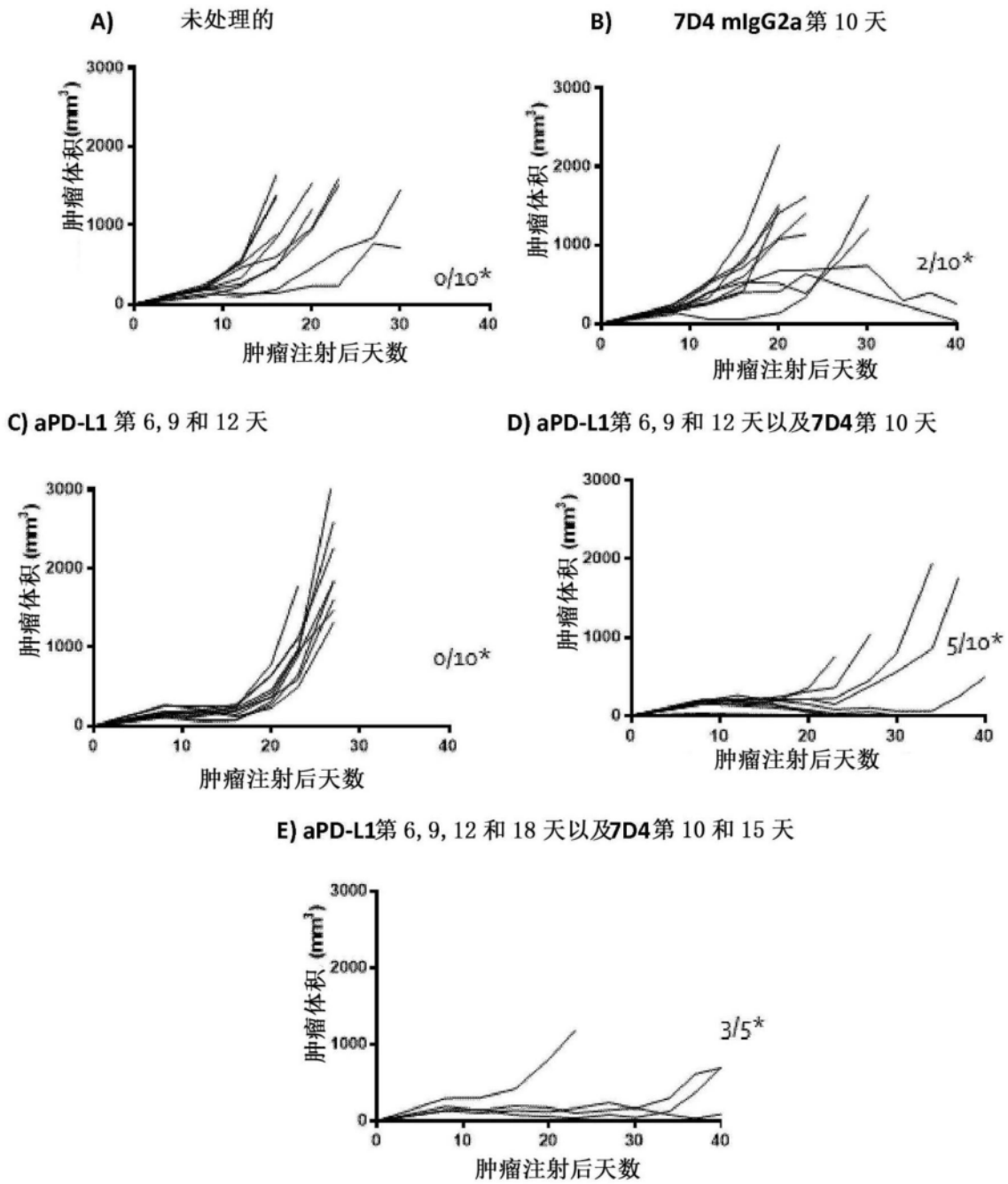


图76