(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114401991 A
(43)申请公布日 2022.04.26

(21)申请号 202080056075.5

(22)申请日 2020.06.02

(30)优先权数据
62/857194 2019.06.04 US
62/867577 2019.06.27 US
63/032292 2020.05.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/035703 2020.06.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/247372 EN 2020.12.10

(71)申请人 维西欧制药公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 T·I·诺沃布兰塞瓦
I·费尔德曼 S·L·萨金斯基
J·A·瓦勒 R·芬尼西

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李进 彭昶

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 5/00(2006.01)

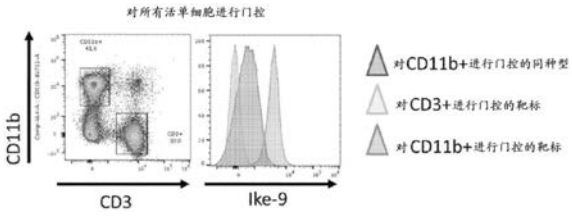
权利要求书11页 说明书139页 附图12页

(54)发明名称

用于调节髓系细胞炎性表型的抗SIGLEC-9组合物和方法及其用途

(57)摘要

本发明部分地基于以下发现:抗SIGLEC-9组合物(例如单克隆抗体及其抗原结合片段),其调控髓系细胞炎性表型,例如抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞,包括极化、活化和/或功能,以及使用此类抗SIGLEC-9组合物用于治疗、诊断、预后和筛选目的的方法。



CN 114401991 A

1.一种单克隆抗体或其抗原结合片段,所述单克隆抗体或其抗原结合片段结合表达SIGLEC-9多肽的髓系细胞并增加所述髓系细胞的炎性表型,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

2.如权利要求1所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段具有下列特性中的一者或多者:

a)通过在与所述单克隆抗体或其抗原结合片段接触后导致下列各项中的一者或多者而增加所述髓系细胞的所述炎性表型:

i)分化簇80(CD80)、CD86、MHCII、MHCI、白介素1-β(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF和/或肿瘤坏死因子α(TNF-α)的表达和/或分泌增加;

ii)CD206、CD163、CD16、CD53、VSIG4、PSGL-1、TGFb和/或IL-10的表达和/或分泌减少;

iii)至少一种选自由IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18、GM-CSF、CCL3、CCL4和IL-23组成的组的细胞因子或趋化因子的分泌增加;

iv)IL-1β、IL-6和/或TNF-α的表达对IL-10表达的比率增加;

v)CD8+细胞毒性T细胞活化增加;

vi)CD8+细胞毒性T细胞活化的募集增加;

vii)CD4+辅助T细胞活性增加;

viii)CD4+辅助T细胞活性的募集增加;

ix)NK细胞活性增加;

x)NK细胞的募集增加;

xi)嗜中性粒细胞活性增加;

xii)巨噬细胞和/或树突状细胞活性增加;和/或

xiii)纺锤形形态、外观平坦性和/或树突数量增加,如通过显微术所评价;

b)与其他SIGLEC-9家族成员相比,特异性结合SIGLEC-9;

c)与一种或多种SIGLEC-9家族成员发生交叉反应,任选地其中所述SIGLEC-9家族成员选自由SIGLEC-1、SIGLEC-2、SIGLEC-3、SIGLEC-4、SIGLEC-5、SIGLEC-6、SIGLEC-7、SIGLEC-8、SIGLEC-10、SIGLEC-11和SIGLEC-12组成的组;

d)相比于一种或多种其他SIGLEC-9家族成员以至少1.1倍选择性结合人类SIGLEC-9多肽,其中所述一种或多种SIGLEC-9家族成员在细胞上或体外表达;

e)以介于约0.00001纳摩尔浓度(nM)和1000nM之间的kD结合于所述人类SIGLEC-9多肽,任选地如在ELISA或生物层干涉测定法中所测量;

f)结合于人类SIGLEC-9多肽的N末端IgV结构域;

g)竞争、抑制或阻断SIGLEC-9与SIGLEC-9配体的结合;

h)与食蟹猴SIGLEC-9多肽发生交叉反应;

i)与表2中列出的结合SIGLEC-9多肽或其抗原结合片段的抗体竞争或交叉竞争;

j)可作为本文所述的在ATCC保藏的单克隆抗体获得;

k)不激活未受刺激的单核细胞;

l)对表达SIGLEC-9的细胞不具有ADCC活性;

m)对表达SIGLEC-9的细胞不具有CDC活性;

n)在与表达SIGLEC-9的细胞结合和/或被表达SIGLEC-9的细胞内化后不杀伤所述表达

SIGLEC-9的细胞；

o)不与另一治疗部分缀合，任选地其中所述另一治疗部分是细胞毒性剂；和/或

p)具有体内抗肿瘤活性。

3.如权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含：

a)与选自由表2中列出的序列组成的组的重链CDR序列具有至少约90％同一性的重链CDR序列；和/或

b)与选自由表2中列出的序列组成的组的轻链CDR序列具有至少约90％同一性的轻链CDR序列。

4.如权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含：

a)与选自由表2中列出的重链序列组成的组的重链序列具有至少约90％同一性的重链序列；和/或

b)与选自由表2中列出的轻链序列组成的组的轻链序列具有至少约90％同一性的轻链序列。

5.如权利要求1-4中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含：

a)选自由表2中列出的重链序列组成的组的重链CDR序列；和/或

b)选自由表2中列出的轻链序列组成的组的轻链CDR序列。

6.如权利要求1-5中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含：

a)选自由表2中列出的重链序列组成的组的重链序列；和/或

b)选自由表2中列出的轻链序列组成的组的轻链序列。

7.如权利要求1-6中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、鼠类的或人类的。

8.如权利要求1-7中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段被可检测地标记，包含效应结构域，和/或包含Fc结构域。

9.如权利要求1-7中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，所述单克隆抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组：Fv、Fav、F(ab')2、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)2、Fde、sdFv、单结构域抗体(dAb)和双价抗体片段。

10.如权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含选自由以下组成的组的免疫球蛋白恒定结构域：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM。

11.如权利要求1-10中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含源自人类免疫球蛋白的恒定结构域。

12.如权利要求1-11中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段与一种药剂缀合，任选地其中所述药剂选自由以下组成的组：结合蛋白、酶、药物、化学治疗剂、生物制剂、毒素、放射性核素、免疫调节剂、可检测部分和标签。

13.一种药物组合物，所述药物组合物包含治疗有效量的至少一种权利要求1-12中任

一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的载体或赋形剂。

14.如权利要求13所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的载体或赋形剂选自由稀释剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂和佐剂组成的组。

15.如权利要求13或14所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有小于约20EU内毒素/mg蛋白质。

16.如权利要求13-15中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有小于约1EU内毒素/mg蛋白质。

17.一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子i)在严格条件下与编码权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽的核酸的互补序列杂交;ii)具有与编码权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽的核酸在其全长上具有至少约90%同一性的序列;或iii)编码选自由表2中列出的多肽序列组成的组的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽。

18.一种分离的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽,所述多肽由权利要求17所述的核酸编码。

19.一种载体,所述载体包含权利要求17所述的分离的核酸,任选地其中所述载体是表达载体。

20.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求17所述的分离的核酸,所述宿主细胞:

a)表达权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段;

b)包含权利要求18所述的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽;

c)包含权利要求19所述的载体;和/或

d)以ATCC保藏登记号保藏的单克隆抗体形式获得。

21.一种装置或试剂盒,所述装置或试剂盒包含至少一种权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述装置或试剂盒任选地包含用于检测所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段的标记,或包含所述单克隆抗体或其抗原结合片段的复合物。

22.一种装置或试剂盒,所述装置或试剂盒包含权利要求13-20中任一项所述的药物组合物、分离的核酸分子、分离的非球蛋白重链和/或轻链多肽、载体和/或宿主细胞。

23.一种产生至少一种权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括以下步骤:(i)在适合于允许根据权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段表达的条件下,培养已被包含编码所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段的序列的核酸转化的经转化宿主细胞;以及(ii)回收所表达的单克隆抗体或其抗原结合片段。

24.一种检测SIGLEC-9多肽的存在或水平的方法,所述方法包括获得样品并通过使用至少一种根据权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段来检测所述样品中的所述多肽。

25.如权利要求24所述的方法,其中所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段与所述SIGLEC-9多肽形成复合物并且所述复合物以酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫化学测定、蛋白质印迹、质谱测定、核磁共振测定的形式或使用细胞内流动测定来检测。

26.一种在与权利要求1-20中任一项所述的药剂接触后生成具有增加的炎性表型的髓

系细胞的方法，所述方法包括使髓系细胞与有效量的所述药剂接触，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

27.如权利要求25所述的方法，其中具有增加的炎性表型的所述髓系细胞在与所述单克隆抗体或其抗原结合片段接触后表现出下列各项中的一者或多者：

a)分化簇80(CD80)、CD86、MHCII、MHCI、白介素1-β(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF和/或肿瘤坏死因子α(TNF-α)的表达和/或分泌增加；

b)CD206、CD163、CD16、CD53、VSIG4、PSGL-1、TGFb和/或IL-10的表达和/或分泌减少；

c)至少一种选自由IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18、GM-CSF、CCL3、CCL4和IL-23组成的组的细胞因子或趋化因子的分泌增加；

d)IL-1β、IL-6和/或TNF-α的表达对IL-10表达的比率增加；

e)CD8+细胞毒性T细胞活化增加；

f)CD8+细胞毒性T细胞活化的募集增加；

g)CD4+辅助T细胞活性增加；

h)CD4+辅助T细胞活性的募集增加；

i)NK细胞活性增加；

j)NK细胞的募集增加；

k)嗜中性粒细胞活性增加；

l)巨噬细胞和/或树突状细胞活性增加;和/或

m)纺锤形形态、外观平坦性和/或树突数量增加，如通过显微术所评价。

28.如权利要求26或27所述的方法，其中与所述单克隆抗体或其抗原结合片段接触的所述髓系细胞包含在细胞群体中，并且所述单克隆抗体或其抗原结合片段在所述细胞群体中增加1型和/或M1巨噬细胞的数量，和/或减少2型和/或M2巨噬细胞的数量。

29.如权利要求26-28中任一项所述的方法，其中与所述单克隆抗体或其抗原结合片段接触的所述髓系细胞包含在细胞群体中并且所述单克隆抗体或其抗原结合片段在所述细胞群体中增加i)与ii)的比率，其中i)是1型和/或M1巨噬细胞并且ii)是2型和/或M2巨噬细胞。

30.如权利要求26-29中任一项所述的方法，其中所述髓系细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞。

31.如权利要求26-30中任一项所述的方法，其中在体外或离体接触所述髓系细胞。

32.如权利要求31所述的方法，其中所述髓系细胞是原代髓系细胞。

33.如权利要求31或32所述的方法，其中所述髓系细胞在与所述药剂接触之前被纯化和/或培养。

34.如权利要求26-33中任一项所述的方法，其中在体内接触所述髓系细胞。

35.如权利要求34所述的方法，其中通过全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用所述药剂来体内接触所述髓系细胞。

36.如权利要求34或35所述的方法，其中所述髓系细胞在组织微环境中接触。

37.如权利要求26-36中任一项所述的方法，所述方法还包括使所述髓系细胞与至少一种调节所述炎性表型的免疫治疗剂接触，任选地其中所述免疫治疗剂包括免疫检查点抑制

剂、免疫刺激性激动剂、炎症剂、细胞、癌症疫苗和/或病毒。

38.一种组合物，所述组合物包含根据权利要求26-37中任一项所述的方法生成的髓系细胞，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

39.一种在与权利要求1-20中任一项所述的药剂接触后增加受试者中髓系细胞的炎性表型的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的所述药剂。

40.如权利要求39所述的方法，其中所述具有增加的炎性表型的髓系细胞在与所述药剂接触后表现出下列各项中的一者或多者：

a)分化簇80(CD80)、CD86、MHCII、MHCI、白介素1-β(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF和/或肿瘤坏死因子α(TNF-α)的表达和/或分泌增加；

b)CD206、CD163、CD16、CD53、VSIG4、PSGL-1和/或IL-10的表达和/或分泌减少；

c)至少一种选自由IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18和IL-23组成的组的细胞因子的分泌增加；

d)IL-1β、IL-6和/或TNF-α的表达对IL-10表达的比率增加；

e)CD8+细胞毒性T细胞活化增加；

f)CD4+辅助T细胞活性增加；

g)NK细胞活性增加；

h)嗜中性粒细胞活性增加；

i)巨噬细胞和/或树突状细胞活性增加；和/或

j)纺锤形形态、外观平坦性和/或树突数量增加，如通过显微术所评价。

41.如权利要求39或40所述的方法，其中所述一种或多种药剂在所述受试者中增加1型和/或M1巨噬细胞的数量，减少2型和/或M2巨噬细胞的数量，和/或增加i)与ii)的比率，其中i)是1型和/或M1巨噬细胞并且ii)是2型和/或M2巨噬细胞。

42.如权利要求39-41中任一项所述的方法，其中在施用所述药剂后，所述受试者中的细胞毒性CD8+T细胞的数量和/或活性增加。

43.如权利要求39-42中任一项所述的方法，其中所述髓系细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞。

44.如权利要求39-43中任一项所述的方法，其中所述药剂通过所述药剂的全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用在体内施用。

45.如权利要求44所述的方法，其中所述药剂接触组织微环境中的髓系细胞。

46.如权利要求39-45中任一项所述的方法，所述方法还包括使所述髓系细胞与至少一种调节所述炎性表型的免疫治疗剂接触，任选地其中所述免疫治疗剂包括免疫检查点抑制剂、免疫刺激性激动剂、炎症剂、细胞、癌症疫苗和/或病毒。

47.一种增加受试者的炎症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的与权利要求1-20中任一项所述的药剂接触的髓系细胞，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

48.如权利要求47所述的方法，其中所述髓系细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、

CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞。

49.如权利要求47或48所述的方法，其中相对于所述受试者的髓系细胞，所述髓系细胞是基因工程化的、自体的、同基因的或同种异体的。

50.如权利要求47-49中任一项所述的方法，其中所述药剂被全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用。

51.一种使受试者的癌细胞对细胞毒性CD8+T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-20中任一项所述的药剂。

52.一种使患有癌症的受试者的癌细胞对细胞毒性CD8+T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的与权利要求1-20中任一项所述的药剂接触的髓系细胞，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

53.如权利要求52所述的方法，其中所述髓系细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞。

54.如权利要求52或53所述的方法，其中相对于所述受试者的髓系细胞，所述髓系细胞是基因工程化的、自体的、同基因的或同种异体的。

55.如权利要求51-54中任一项所述的方法，其中所述药剂被全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用。

56.如权利要求51-55中任一项所述的方法，所述方法还包括通过向所述受试者施用至少一种免疫疗法来治疗所述受试者的所述癌症，任选地其中所述免疫疗法包括免疫检查点抑制剂、免疫刺激性激动剂、炎症剂、细胞、癌症疫苗和/或病毒。

57.如权利要求56所述的方法，其中所述免疫检查点选自由PD-1、PD-L1、PD-L2和CTLA-4组成的组。

58.如权利要求57所述的方法，其中所述免疫检查点是PD-1。

59.如权利要求51-58中任一项所述的方法，所述方法还包括通过向所述受试者施用用于治疗癌症的额外治疗剂或方案来治疗所述受试者的所述癌症，任选地，其中所述额外治疗剂或方案选自由嵌合抗原受体、化学疗法、放射、靶向疗法和手术组成的组。

60.如权利要求51-59中任一项所述的方法，其中所述药剂减少所述癌症中增殖细胞的数量和/或缩减包含所述癌细胞的肿瘤的体积或大小。

61.如权利要求51-60中任一项所述的方法，其中所述药剂增加浸润包含所述癌细胞的肿瘤的CD8+T细胞的量和/或活性。

62.如权利要求51-61中任一项所述的方法，其中所述药剂a)增加浸润包含所述癌细胞的肿瘤的M1巨噬细胞的量和/或活性和/或b)降低浸润包含所述癌细胞的肿瘤的M2巨噬细胞的量和/或活性。

63.如权利要求51-62中任一项所述的方法，所述方法还包括向所述受试者施用至少一种用于治疗所述癌症的额外疗法或方案。

64.如权利要求51-63中任一项所述的方法，其中在所述药剂之前、同时或之后施用所述疗法。

65.一种鉴定可通过调节至少一种靶标来增加炎性表型的髓系细胞的方法，所述方法包括：

a)使用药剂从所述髓系细胞中测定表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性，其中所述药剂是至少一种权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段；

b)使用所述药剂测定对照中所述至少一种靶标的量和/或活性；以及

c)比较在步骤a)和b)中所检测的所述至少一种靶标的所述量和/或活性；

其中相对于所述至少一种靶标的对照量和/或活性，所述髓系细胞中表1中列出的所述至少一种靶标的所述量和/或活性的存在或增加指示，所述髓系细胞可通过调节所述至少一种靶标来增加其炎性表型，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

66.如权利要求65所述的方法，所述方法还包括使所述细胞与调节表1中列出的所述至少一种靶标的药剂接触，推荐、开具或施用所述药剂。

67.如权利要求65所述的方法，所述方法还包括如果确定所述受试者不能获益于通过调节所述至少一种靶标来增加炎性表型，则使所述细胞与除调节表1中列出的所述至少一种靶标的药剂之外的癌症疗法接触，推荐、开具或施用所述癌症疗法。

68.如权利要求67所述的方法，其中所述癌症疗法是免疫疗法。

69.如权利要求65-68中任一项所述的方法，所述方法还包括使所述细胞与至少一种增加免疫反应的额外药剂接触和/或施用所述至少一种额外药剂。

70.如权利要求69所述的方法，其中所述额外药剂选自由靶向疗法、化学疗法、放射疗法和/或激素疗法组成的组。

71.如权利要求65-70中任一项所述的方法，其中所述对照来自所述受试者所属的相同物种的成员。

72.如权利要求65-71中任一项所述的方法，其中所述对照是包含细胞的样品。

73.如权利要求65-72中任一项所述的方法，其中所述受试者患有癌症。

74.如权利要求65-73中任一项所述的方法，其中所述对照是来自所述受试者的癌症样品。

75.如权利要求65-73中任一项所述的方法，其中所述对照是来自所述受试者的非癌症样品。

76.一种用于预测患有癌症的受试者的临床结果的方法，所述方法包括：

a)使用药剂从所述受试者的髓系细胞中测定表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性，其中所述药剂是至少一种权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段；

b)使用所述药剂从具有不良临床结果的对照中测定所述至少一种靶标的量和/或活性；以及

c)比较所述受试者样品和来自对照受试者的样品中所述至少一种靶标的所述量和/或活性；

其中与所述对照中的量和/或活性相比，来自所述受试者的所述髓系细胞的表1中列出的所述至少一种靶标的所述量和/或活性的存在或增加指示，所述受试者不具有不良临床结果，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞

和/或树突状细胞。

77.一种用于监测受试者中的髓系细胞的炎性表型的方法,所述方法包括:

a)使用药剂检测第一受试者样品中在第一时间点来自所述受试者的髓系细胞的表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性,其中所述药剂是至少一种权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段;

b)使用包含在后续时间点获得的髓系细胞的后续样品重复步骤a);以及

c)比较步骤a)和b)中所检测的表1中列出的所述至少一种靶标的所述量或活性,

其中与来自所述第一样品的所述髓系细胞的所述量和/或活性相比,来自所述后续样品的所述髓系细胞的表1中列出的所述至少一种靶标的所述量和/或活性的不存在或降低指示,所述受试者的髓系细胞具有上调的炎性表型;或者

其中与来自所述第一样品的所述髓系细胞的所述量和/或活性相比,来自所述后续样品的所述髓系细胞的表1中列出的所述至少一种靶标的所述量和/或活性的存在或增加指示,所述受试者的髓系细胞具有下调的炎性表型,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

78.如权利要求77所述的方法,其中所述第一样品和/或至少一个后续样品包含体外培养的髓系细胞。

79.如权利要求77所述的方法,其中所述第一样品和/或至少一个后续样品包含未在体外培养的髓系细胞。

80.如权利要求77-79中任一项所述的方法,其中所述第一样品和/或至少一个后续样品是从所述受试者获得的单个样品或合并样品的一部分。

81.如权利要求77-80中任一项所述的方法,其中所述样品包括从所述受试者获得的血液、血清、肿瘤周围组织和/或肿瘤内组织。

82.一种评价测试药剂增加受试者中的髓系细胞的炎性表型的功效的方法,所述方法包括:

a)使用药剂在第一时间点检测包含髓系细胞的受试者样品中的i)所述髓系细胞中或其上在表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性,其中所述药剂是至少一种权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,和/或ii)所述髓系细胞的炎性表型;

b)在所述髓系细胞与所述测试药剂接触之后的至少一个后续时间点期间重复步骤a);以及

c)比较步骤a)和b)中所检测的i)和/或ii)的值,其中与在所述第一时间点所述样品中的所述量和/或活性相比,所述后续样品中表1中列出的所述至少一种靶标的所述量和/或活性的不存在或降低和/或ii)的增加指示,所述测试药剂增加了所述受试者中的髓系细胞的所述炎性表型,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

83.如权利要求82所述的方法,其中与所述药剂接触的所述髓系细胞包含在细胞群体中并且所述药剂增加所述细胞群体中1型和/或M1巨噬细胞的数量。

84.如权利要求82或83所述的方法,其中与所述药剂接触的所述髓系细胞包含在细胞群体中并且所述药剂减少所述细胞群体中2型和/或M2巨噬细胞的数量。

85.如权利要求82-84中任一项所述的方法,其中在体外或离体接触所述髓系细胞。

86.如权利要求85所述的方法,其中所述髓系细胞是原代髓系细胞。

87.如权利要求85或86所述的方法,其中所述髓系细胞在与所述药剂接触之前被纯化和/或培养。

88.如权利要求82-87中任一项所述的方法,其中在体内接触所述髓系细胞。

89.如权利要求88所述的方法,其中通过全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用所述药剂在体内接触所述髓系细胞。

90.如权利要求88或89所述的方法,其中所述髓系细胞在组织微环境中接触。

91.如权利要求82-90中任一项所述的方法,所述方法还包括使所述髓系细胞与至少一种调节所述炎性表型的免疫治疗剂接触,任选地其中所述免疫治疗剂包括免疫检查点抑制剂、免疫刺激性激动剂、炎症剂、细胞、癌症疫苗和/或病毒。

92.如权利要求82-91中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

93.如权利要求92所述的方法,其中所述哺乳动物是非人类动物模型或人类。

94.一种评价测试药剂在受试者中治疗癌症的功效的方法,所述方法包括:

a)使用药剂在第一时间点检测包含髓系细胞的受试者样品中的i)髓系细胞中或其上在表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性,其中所述药剂是至少一种权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,和/或ii)所述髓系细胞的炎性表型;

b)在施用所述药剂之后的至少一个后续时间点期间重复步骤a);以及

c)比较步骤a)和b)中所检测的i)和/或ii)的值,其中与在所述第一时间点所述受试者样品的所述髓系细胞中或其上的所述量和/或活性相比,在所述后续时间点所述受试者样品的所述髓系细胞中或其上在表1中列出的所述至少一种靶标的所述量和/或活性的不存在或降低和/或ii)的增加指示,所述测试药剂治疗所述受试者的所述癌症,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

95.如权利要求94所述的方法,其中在所述第一时间点与所述后续时间点之间,所述受试者已经针对所述癌症进行治疗、完成治疗和/或处于缓解期。

96.如权利要求94或95所述的方法,其中所述第一样品和/或至少一个后续样品选自由离体样品和体内样品组成的组。

97.如权利要求94-96中任一项所述的方法,其中所述第一样品和/或至少一个后续样品获自所述癌症的非人类动物模型。

98.如权利要求94-97中任一项所述的方法,其中所述第一样品和/或至少一个后续样品是从所述受试者获得的单个样品或合并样品的一部分。

99.如权利要求94-98中任一项所述的方法,其中所述样品包括从所述受试者获得的细胞、血清、肿瘤周围组织和/或肿瘤内组织。

100.一种用于筛选使癌细胞对细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的测试药剂的方法,所述方法包括:

a)使癌细胞与细胞毒性T细胞和/或免疫检查点疗法在与所述测试药剂接触的髓系细胞存在下接触,其中所述测试药剂调节如使用药剂测定的髓系细胞剂中或其上在表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性,其中所述药剂是至少一种权利要求1-12中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段;

b)使癌细胞与细胞毒性T细胞和/或免疫检查点疗法在未与所述测试药剂接触的对照

髓系细胞存在下接触;以及

c)通过鉴定与b)相比增加a)中的细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法功效的药剂来鉴定使癌细胞对细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的测试药剂,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

101.如权利要求100所述的方法,其中所述接触步骤在体内、离体或体外发生。

102.如权利要求100或101所述的方法,所述方法还包括测定i)所述癌症中增殖细胞数量的减少和/或ii)包含所述癌细胞的肿瘤的体积或大小的缩减。

103.如权利要求100-102中任一项所述的方法,所述方法还包括测定i)CD8+T细胞的数量增加和/或ii)浸润包含所述癌细胞的肿瘤的1型和/或M1巨噬细胞的数量增加。

104.如权利要求100-103中任一项所述的方法,所述方法还包括测定对调节表1中列出的所述至少一种靶标的测试药剂的反应性,所述反应性是通过至少一种选自由以下组成的组的标准来测量:临床受益率、直至死亡的存活率、病理完全反应、病理反应的半定量测量、临床完全缓解、临床部分缓解、临床稳定疾病、无复发存活、无转移存活、无疾病存活、循环肿瘤细胞减少、循环标志物反应和RECIST标准。

105.如权利要求100-104中任一项所述的方法,所述方法还包括使所述癌细胞与至少一种额外的癌症治疗剂或方案接触。

106.如权利要求1-105中任一项所述的组合物或方法,其中具有调节的炎性表型的所述髓系细胞表现出下列各项中的一者或多者:

a)经调节的分化簇80(CD80)、CD86、MHCII、MHCI、白介素1-β(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF和/或肿瘤坏死因子α(TNF-α)的表达;

b)经调节的CD206、CD163、CD16、CD53、VSIG4、PSGL-1和/或IL-10的表达;

c)经调节的至少一种选自由IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18和IL-23组成的组的细胞因子的分泌;

d)经调节的IL-1β、IL-6和/或TNF-α的表达对IL-10表达的比率;

e)经调节的CD8+细胞毒性T细胞活化;

f)经调节的CD4+辅助T细胞活性;

g)经调节的NK细胞活性;

h)经调节的嗜中性粒细胞活性;

i)经调节的巨噬细胞和/或树突状细胞活性;和/或

j)经调节的纺锤形形态、外观平坦性和/或树突数量,如通过显微术所评价。

107.如权利要求1-106中任一项所述的组合物或方法,其中所述细胞和/或髓系细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞,任选地其中所述细胞和/或髓系细胞表达或被测定为表达SIGLEC-9。

108.如权利要求1-107中任一项所述的组合物或方法,其中所述人类SIGLEC-9多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2和/或所述食蟹猴SIGLEC-9多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:7。

109.如权利要求1-108中任一项所述的组合物或方法,其中所述癌症是被巨噬细胞浸润的实体肿瘤,其中浸润性巨噬细胞占所述肿瘤或所述肿瘤微环境中的细胞的质量、体积

和/或数量的至少约5%，和/或其中所述癌症选自由以下组成的组：间皮瘤、肾透明细胞癌、神经胶母细胞瘤、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、胰腺腺癌、乳腺浸润癌、急性髓系白血病、肾上腺皮质癌、膀胱尿路上皮癌、脑低级别神经胶质瘤、乳腺浸润癌、宫颈鳞状细胞癌和宫颈内腺癌、胆管癌、结肠腺癌、食道癌、多形性神经胶母细胞瘤、头颈鳞状细胞癌、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、肝细胞癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、淋巴样赘瘤弥漫性大B细胞淋巴瘤、间皮瘤、卵巢浆液性囊腺癌、胰腺腺癌、嗜铬细胞瘤、副神经节瘤、前列腺腺癌、直肠腺癌、肉瘤、皮肤黑色素瘤、胃腺癌、睾丸生殖细胞肿瘤、胸腺瘤、甲状腺癌、子宫癌肉瘤、子宫体内膜癌和葡萄膜黑色素瘤。

110.如权利要求109所述的组合物或方法，其中所述髓系细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞，任选地其中所述髓系细胞是TAM和/或M2巨噬细胞。

111.如权利要求109或110所述的组合物或方法，其中所述髓系细胞表达或被测定为表达SIGLEC-9。

112.如权利要求1-111中任一项所述的组合物或方法，其中所述髓系细胞是原代髓系细胞。

113.如权利要求1-112中任一项所述的组合物或方法，其中所述髓系细胞包含在组织微环境中。

114.如权利要求1-113中任一项所述的组合物或方法，其中所述髓系细胞包含在人类肿瘤模型或癌症动物模型中。

115.如权利要求1-114中任一项所述的组合物或方法，其中所述受试者是哺乳动物。

116.如权利要求115所述的组合物或方法，其中所述哺乳动物是人类。

117.如权利要求116所述的组合物或方法，其中所述人类患有癌症。

用于调节髓系细胞炎性表型的抗SIGLEC-9组合物和方法及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年6月04日提交的美国临时申请第62/857,194号、2019年6月27日提交的美国临时申请第62/867,577号和2020年5月29日提交的美国临时申请第63/032,292号的权益;所述申请各自的全部内容通过引用整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 单核细胞和巨噬细胞是吞噬细胞的类型,它们是通过摄取有害外来粒子、细菌和死亡细胞或濒死细胞来保护身体的细胞。除单核细胞和巨噬细胞外,吞噬细胞还包括嗜中性粒细胞、树突状细胞和肥大细胞。

[0005] 巨噬细胞传统上被称为大型白细胞,其巡查身体并且通过称为吞噬作用的过程来吞食并消化细胞碎片和外来物质(例如病原体、微生物和癌细胞)。另外,巨噬细胞(包括组织巨噬细胞和循环单核细胞源巨噬细胞)是先天性免疫系统和适应性免疫系统的重要介体。

[0006] 巨噬细胞表型取决于经由经典或替代途径的激活(参见例如Classen等人(2009)Methods Mol.Biol.,531:29-43)。经典激活的巨噬细胞是由干扰素γ(IFNγ)或脂多糖(LPS)激活并显示M1表型。这种促炎表型与增加的炎症和免疫系统刺激相关。替代性激活的巨噬细胞是由细胞因子如IL-4、IL-10和IL-13激活,并显示M2表型。这种抗炎表型与降低的免疫反应、增加的伤口愈合、增加的组织修复和胚胎发育相关。

[0007] 在非病理学条件下,在免疫系统中存在免疫刺激性巨噬细胞和免疫调控性巨噬细胞的平衡群体。平衡的扰动可引起各种疾病状况。在一些癌症中,例如,肿瘤分泌免疫因子(例如细胞因子和白介素),它们使巨噬细胞群体极化,有利于抗炎、促肿瘤生成M2表型,这会激活伤口愈合途径,促进新血管生长(即血管生成),并且向肿瘤提供营养物和生长信号。这些M2巨噬细胞被称为肿瘤相关巨噬细胞(TAM)或肿瘤浸润性巨噬细胞。肿瘤微环境中的TAM是癌症进展和转移的重要调控因子(Pollard(2004)Nat.Rev.Cancer 4:71-78)。已经研究了设计用于抑制巨噬细胞基因靶标(例如CSF1R和CCR2)的小分子和单克隆抗体作为巨噬细胞表型的调节剂,例如通过调节促肿瘤生成巨噬细胞(例如TAM)和可抑制肿瘤生成的促炎巨噬细胞的平衡。

[0008] 调节单核细胞和巨噬细胞的募集、极化、活化和/或功能以调节巨噬细胞群体的平衡的疗法被称为巨噬细胞免疫疗法。尽管巨噬细胞生物学的领域已取得进展,然而,仍需要用于调节巨噬细胞炎性表型的新靶标(例如基因和/或基因产物)以及用于巨噬细胞免疫疗法中的药剂。

发明内容

[0009] 本发明至少部分地基于以下发现:抗SIGLEC-9组合物和用于调节髓系细胞炎性表型(例如在抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞中)的方法及其用途,例如用于治疗、诊断、预后和筛选目的。例如,本文已确定SIGLEC-9表达在髓系

细胞类型激活时增加，并且抗SIGLEC-9抗体(包括其抗原结合片段)可用于增加髓系细胞炎性表型。

[0010] 例如，在一个方面，提供了一种单克隆抗体或其抗原结合片段，其结合表达SIGLEC-9多肽的髓系细胞并增加所述髓系细胞的炎性表型，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0011] 还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如，在一个实施方案中，所述单克隆抗体或其抗原结合片段具有下列特性中的一者或多者：a)通过在与所述单克隆抗体或其抗原结合片段接触后导致下列各项中的一者或多者而增加髓系细胞的炎性表型：i)分化簇80(CD80)、CD86、MHCII、MHCI、白介素1-β(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF和/或肿瘤坏死因子α(TNF-α)的表达和/或分泌增加；ii)CD206、CD163、CD16、CD53、VSIG4、PSGL-1、TGFb和/或IL-10的表达和/或分泌减少；iii)至少一种选自由IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18、GM-CSF、CCL3、CCL4和IL-23组成的组的细胞因子或趋化因子的分泌增加；iv)IL-1β、IL-6和/或TNF-α的表达对IL-10表达的比率增加；v)CD8+细胞毒性T细胞活化增加；vi)CD8+细胞毒性T细胞活化的募集增加；vii)CD4+辅助T细胞活性增加；viii)CD4+辅助T细胞活性的募集增加；ix)NK细胞活性增加；x)NK细胞的募集增加；xi)嗜中性粒细胞活性增加；xii)巨噬细胞和/或树突状细胞活性增加；和/或xiii)纺锤形形态、外观平坦性和/或树突数量增加，如通过显微术所评价；b)与其他SIGLEC-9家族成员相比，特异性结合SIGLEC-9；c)与一种或多种SIGLEC-9家族成员发生交叉反应，任选地其中所述SIGLEC-9家族成员选自由SIGLEC-1、SIGLEC-2、SIGLEC-3、SIGLEC-4、SIGLEC-5、SIGLEC-6、SIGLEC-7、SIGLEC-8、SIGLEC-10、SIGLEC-11和SIGLEC-12组成的组；d)相比于一种或多种其他SIGLEC-9家族成员以至少1.1倍选择性结合人类SIGLEC-9多肽，其中所述一种或多种SIGLEC-9家族成员在细胞上或体外表达；e)以介于约0.00001纳摩尔浓度(nM)和1000nM之间的kD结合于人类SIGLEC-9多肽，任选地如在ELISA或生物层干涉测定法中所测量；f)结合于人类SIGLEC-9多肽的N末端IgV结构域；g)竞争、抑制或阻断SIGLEC-9与SIGLEC-9配体的结合；h)与食蟹猴SIGLEC-9多肽发生交叉反应；i)与表2中列出的结合SIGLEC-9多肽或其抗原结合片段的抗体竞争或交叉竞争；j)可作为本文所述的在ATCC保藏的单克隆抗体获得；k)不激活未受刺激的单核细胞；l)对表达SIGLEC-9的细胞不具有ADCC活性；m)对表达SIGLEC-9的细胞不具有CDC活性；n)在与表达SIGLEC-9的细胞结合和/或被表达SIGLEC-9的细胞内化后不杀伤所述表达SIGLEC-9的细胞；o)不与另一治疗部分缀合，任选地其中所述另一治疗部分是细胞毒性剂；和/或p)具有体内抗肿瘤活性。在另一个实施方案中，所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含：a)与选自由表2中列出的序列组成的组的重链CDR序列具有至少约90％同一性的重链CDR序列；和/或b)与选自由表2中列出的序列组成的组的轻链CDR序列具有至少约90％同一性的轻链CDR序列。在再一个实施方案中，所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含：a)与选自由表2中列出的重链序列组成的组的重链序列具有至少约90％同一性的重链序列；和/或b)与选自由表2中列出的轻链序列组成的组的轻链序列具有至少约90％同一性的轻链序列。在又一个实施方案中，所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含：a)选自由表2中列出的重链序列组成的组的重链CDR序列；和/或b)选自由表2中列出的轻链序列组成的组的轻链CDR序列。在另一个实施方案中，所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含：a)选自由表2中列出的重链序列组成的组的重链序列；和/

或b)选自由表2中列出的轻链序列组成的组的轻链序列。在再一个实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、鼠类的或人类的。在又一个实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段被可检测地标记,包含效应结构域,和/或包含Fc结构域。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组:Fv、Fav、F(ab')2、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)2、Fde、sdFv、单结构域抗体(dAb)和双价抗体片段。在再一个实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含选自由以下组成的组的免疫球蛋白恒定结构域:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM。在又一个实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含源自人类免疫球蛋白的恒定结构域。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段与药剂缀合,任选地其中所述药剂选自由以下组成的组:结合蛋白、酶、药物、化学治疗剂、生物制剂、毒素、放射性核素、免疫调节剂、可检测部分和标签。

[0012] 在另一方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0013] 如上文所述,还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如,在一个实施方案中,所述药学上可接受的载体或赋形剂选自由稀释剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂和佐剂组成的组。在另一个实施方案中,所述药物组合物具有小于约20EU内毒素/mg蛋白质。在再一个实施方案中,所述药物组合物具有小于约1EU内毒素/mg蛋白质。

[0014] 在再一方面,提供了一种分离的核酸分子,其i)在严格条件下与编码本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽的核酸的互补序列杂交;ii)具有与编码本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽的核酸在其全长上具有至少约90%同一性的序列;或iii)编码选自由表2中列出的多肽序列组成的组的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽。

[0015] 在又一方面,提供了一种经分离的由本发明所涵盖的核酸编码的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽。

[0016] 在另一方面,提供了一种包含本发明所涵盖的分离核酸的载体,任选地其中所述载体是表达载体。

[0017] 在再一方面,提供了一种包含本发明所涵盖的分离核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞a)表达本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段;b)包含本发明所涵盖的免疫球蛋白重链和/或轻链多肽;c)包含本发明所涵盖的载体;和/或d)可作为以本文所述的ATCC保藏登记号保藏的单克隆抗体获得。

[0018] 在又一方面,提供了一种包含至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段的装置或试剂盒,所述装置或试剂盒任选地包含用于检测所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段的标记,或包含所述单克隆抗体或其抗原结合片段的复合物。

[0019] 在另一方面,提供了一种装置或试剂盒,所述装置或试剂盒包含本发明所涵盖的药物组合物、分离的核酸分子、分离的非球蛋白重链和/或轻链多肽、载体和/或宿主细胞。

[0020] 在再一方面,提供了一种产生至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括以下步骤:(i)在适合于允许所述单克隆抗体或其抗原结合片段表达的条件下,培养已被包含编码所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段的序列的核

酸转化的经转化宿主细胞;以及(ii)回收所表达的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0021] 在又一方面,提供了一种检测SIGLEC-9多肽的存在或水平的方法,所述方法包括获得样品并通过使用至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段来检测所述样品中的所述多肽。在一个实施方案中,所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段与SIGLEC-9多肽形成复合物并且所述复合物以酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫化学测定、蛋白质印迹(Western blot)、质谱测定、核磁共振测定的形式或使用细胞内流动测定来检测。

[0022] 在另一方面,提供了一种在与本发明所涵盖的药剂接触后生成具有增加的炎性表型的髓系细胞的方法,所述方法包括使髓系细胞与有效量的药剂接触,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0023] 如上文所述,还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如,在一个实施方案中,具有增加的炎性表型的髓系细胞在与单克隆抗体或其抗原结合片段接触后表现出下列各项中的一者或多者:a)分化簇80(CD80)、CD86、MHCII、MHCI、白介素1-β(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF和/或肿瘤坏死因子α(TNF-α)的表达和/或分泌增加;b)CD206、CD163、CD16、CD53、VSIG4、PSGL-1和/或IL-10的表达和/或分泌减少;c)至少一种选自由IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18、GM-CSF、CCL3、CCL4和IL-23组成的组的细胞因子或趋化因子的分泌增加;d)IL-1β、IL-6和/或TNF-α的表达对IL-10表达的比率增加;e)CD8+细胞毒性T细胞活化增加;f)CD8+细胞毒性T细胞活化的募集增加;g)CD4+辅助T细胞活性增加;h)CD4+辅助T细胞活性的募集增加;i)NK细胞活性增加;j)NK细胞的募集增加;k)嗜中性粒细胞活性增加;l)巨噬细胞和/或树突状细胞活性增加;和/或m)纺锤形形态、外观平坦性和/或树突数量增加,如通过显微术所评价。在另一个实施方案中,与所述单克隆抗体或其抗原结合片段接触的髓系细胞包含在细胞群体中,并且所述单克隆抗体或其抗原结合片段在所述细胞群体中增加1型和/或M1巨噬细胞的数量和/或减少2型和/或M2巨噬细胞的数量。在再一个实施方案中,与所述单克隆抗体或其抗原结合片段接触的髓系细胞包含在细胞群体中,并且所述单克隆抗体或其抗原结合片段在所述细胞群体中增加i)与ii)的比率,其中i)是1型和/或M1巨噬细胞并且ii)是2型和/或M2巨噬细胞。在又一个实施方案中,所述巨噬细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞。在另一个实施方案中,在体外或离体接触所述髓系细胞。在再一个实施方案中,所述髓系细胞是原代髓系细胞。在又一个实施方案中,所述髓系细胞在与药剂接触之前被纯化和/或培养。在另一个实施方案中,在体内接触所述髓系细胞(例如,通过全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用药剂)。在再一个实施方案中,所述髓系细胞在组织微环境中接触。在又一个实施方案中,所述方法还包括使所述髓系细胞与至少一种调节炎性表型的免疫治疗剂接触,任选地其中所述免疫治疗剂包括免疫检查点抑制剂、免疫刺激性激动剂、炎症剂、细胞、癌症疫苗和/或病毒。

[0024] 在另一方面,提供了一种包含根据本发明所涵盖的方法生成的髓系细胞的组合物,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0025] 在又一方面,提供了一种在与本发明所涵盖的药剂接触后增加受试者中的髓系细

胞的炎性表型的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的所述药剂。

[0026] 如上文所述,还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如,在一个实施方案中,具有增加的炎性表型的髓系细胞在与所述药剂接触后表现出下列各项中的一者或多者:a)分化簇80(CD80)、CD86、MHCII、MHCI、白介素1-β(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF和/或肿瘤坏死因子α(TNF-α)的表达和/或分泌增加;b)CD206、CD163、CD16、CD53、VSIG4、PSGL-1和/或IL-10的表达和/或分泌减少;c)至少一种选自由IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18和IL-23组成的组的细胞因子的分泌增加;d)IL-1β、IL-6和/或TNF-α的表达对IL-10表达的比率增加;e)CD8+细胞毒性T细胞活化增加;f)CD4+辅助T细胞活性增加;g)NK细胞活性增加;h)嗜中性粒细胞活性增加;i)巨噬细胞和/或树突状细胞活性增加;和/或j)纺锤形形态、外观平坦性和/或树突数量增加,如通过显微术所评价。在另一个实施方案中,所述一种或多种药剂在受试者中增加1型和/或M1巨噬细胞的数量,减少2型和/或M2巨噬细胞的数量,和/或增加i)与ii)的比率,其中i)是1型和/或M1巨噬细胞并且ii)是2型和/或M2巨噬细胞。在再一个实施方案中,所述受试者体内细胞毒性CD8+T细胞的数量和/或活性在施用所述药剂后增加。在又一个实施方案中,所述巨噬细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞。在另一个实施方案中,通过全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用药剂来体内施用所述药剂。在再一个实施方案中,所述药剂接触组织微环境中的所述髓系细胞。在又一个实施方案中,所述方法还包括使所述髓系细胞与至少一种调节炎性表型的免疫治疗剂接触,任选地其中所述免疫治疗剂包括免疫检查点抑制剂、免疫刺激性激动剂、炎症剂、细胞、癌症疫苗和/或病毒。

[0027] 在另一方面,提供了一种增加受试者的炎症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的与本发明所涵盖的药剂接触的髓系细胞,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0028] 如上文所述,还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如,在一个实施方案中,所述巨噬细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞。在另一个实施方案中,相对于受试者的髓系细胞,所述髓系细胞是基因工程化的、自体的、同基因的或同种异体的。在再一个实施方案中,所述药剂被全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用。

[0029] 在再一方面,提供了一种使受试者的癌细胞对细胞毒性CD8+T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明所涵盖的药剂。

[0030] 在又一方面,提供了一种使患有癌症的受试者的癌细胞对细胞毒性CD8+T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的与本发明所涵盖的药剂接触的单核细胞和/或巨噬细胞,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0031] 如上文所述,还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如,在一个实施方案中,所述巨噬细胞包括1型巨噬细胞、

M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞。在另一个实施方案中，相对于受试者的髓系细胞，所述髓系细胞是基因工程化的、自体的、同基因的或同种异体的。在再一个实施方案中，所述药剂被全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用。在又一个实施方案中，所述方法还包括通过向所述受试者施用至少一种免疫疗法来治疗所述受试者的癌症，任选地其中所述免疫疗法包括免疫检查点抑制剂、免疫刺激性激动剂、炎症剂、细胞、癌症疫苗和/或病毒。在另一个实施方案中，所述免疫检查点选自由PD-1、PD-L1、PD-L2和CTLA-4组成的组。在再一个实施方案中，所述免疫检查点是PD-1。在又一个实施方案中，所述方法还包括通过向所述受试者施用用于治疗癌症的额外治疗剂或方案来治疗所述受试者的癌症，任选地，其中所述额外治疗剂或方案选自由嵌合抗原受体、化学疗法、放射、靶向疗法和手术组成的组。在另一个实施方案中，所述药剂减少癌症中增殖细胞的数量和/或缩减包含癌细胞的肿瘤的体积或大小。在再一个实施方案中，所述药剂增加浸润包含癌细胞的肿瘤的CD8+T细胞的量和/或活性。在又一个实施方案中，所述药剂a)增加浸润包含癌细胞的肿瘤的M1巨噬细胞的量和/或活性和/或b)降低浸润包含癌细胞的肿瘤的M2巨噬细胞的量和/或活性。在另一个实施方案中，所述方法还包括向所述受试者施用至少一种用于治疗癌症的额外疗法或方案。在再一个实施方案中，所述疗法在所述药剂之前、同时或之后施用。

[0032] 在另一方面，提供了一种鉴定可通过调节至少一种靶标来增加炎性表型的髓系细胞的方法，所述方法包括：a)使用药剂从所述髓系细胞测定表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性，其中所述药剂是至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段；b)使用所述药剂测定对照中所述至少一种靶标的量和/或活性；以及c)比较在步骤a)和b)中所检测的所述至少一种靶标的量和/或活性；其中所述髓系细胞中在表1中列出的所述至少一种靶标的量和/或活性相对于所述至少一种靶标的对照量和/或活性的存在或增加指示所述髓系细胞可通过调节所述至少一种靶标来增加其炎性表型，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0033] 如上文所述，还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如，在一个实施方案中，所述方法还包括将所述细胞与调节表1中列出的至少一种靶标的药剂接触，推荐、开具或施用所述药剂。在另一个实施方案中，如果测得受试者未受益于通过调节一种或多种靶标(例如免疫疗法)来增加炎性表型，则所述方法还包括使所述细胞与除调节表1中列出的至少一种靶标的药剂外的癌症疗法接触，推荐、开具或施用所述癌症疗法。在再一个实施方案中，所述方法还包括使所述细胞与至少一种增加免疫反应的额外药剂接触和/或施用所述至少一种额外药剂。在又一个实施方案中，所述额外药剂选自由以下组成的组：靶向疗法、化学疗法、放射疗法和/或激素疗法。在另一个实施方案中，所述对照是来自受试者所属相同物种的成员。在再一个实施方案中，所述对照是包含细胞的样品。在又一个实施方案中，所述受试者患有癌症。在另一个实施方案中，所述对照是来自所述受试者的癌症样品。在再一个实施方案中，所述对照是来自所述受试者的非癌症样品。

[0034] 在再一方面，提供了一种用于预测患有癌症的受试者的临床结果的方法，所述方法包括：a)使用药剂测定来自所述受试者的髓系细胞的表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性，其中所述药剂是至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段；b)使用

所述药剂测定来自具有不良临床结果的对照的所述至少一种靶标的量和/或活性;以及c)比较受试者样品和对照受试者样品中的所述至少一种靶标的量和/或活性;其中与所述对照中的量和/或活性相比,所述受试者的所述髓系细胞中的表1中列出的所述至少一种靶标的量和/或活性的存在或增加指示,所述受试者不具有不良临床结果,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0035] 在又一方面,提供了一种用于监测受试者中的髓系细胞的炎性表型的方法,所述方法包括:a)使用药剂检测第一受试者样品中在第一时间点来自所述受试者的所述髓系细胞的表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性,其中所述药剂是至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段;b)使用包含在后续时间点获得的髓系细胞的后续样品重复步骤a);以及c)比较步骤a)和b)中所检测的表1中列出的所述至少一种靶标的量或活性,其中与来自第一样品的所述髓系细胞的量和/或活性相比,来自后续样品的所述髓系细胞的表1中列出的所述至少一种靶标的量和/或活性的不存在或降低指示,所述受试者的髓系细胞具有上调的炎性表型;或者其中与来自第一样品的所述髓系细胞的量和/或活性相比,来自后续样品的所述髓系细胞的表1中列出的所述至少一种靶标的量和/或活性的存在或增加指示,所述受试者的髓系细胞具有下调的炎性表型,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0036] 如上文所述,还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如,在一个实施方案中,所述第一样品和/或至少一个后续样品包含在体外培养的髓系细胞。在另一个实施方案中,所述第一样品和/或至少一个后续样品包含未在体外培养的髓系细胞。在再一个实施方案中,所述第一样品和/或至少一个后续样品是从所述受试者获得的单个样品或合并样品的一部分。在另一个实施方案中,所述样品包括从所述受试者获得的血液、血清、肿瘤周围组织和/或肿瘤内组织。

[0037] 在另一个方面,提供了一种评价测试药剂增加受试者中的髓系细胞的炎性表型的功效的方法,所述方法包括:a)使用药剂在第一时间点检测包含髓系细胞的受试者样品中的i)所述髓系细胞中或其上在表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性,其中所述药剂是至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段,和/或ii)所述髓系细胞的炎性表型;b)在所述髓系细胞与所述测试药剂接触之后的至少一个后续时间点期间重复步骤a);以及c)比较步骤a)和b)中所检测的i)和/或ii)的值,其中与在所述第一时间点所述样品中的量和/或活性相比,所述后续样品中表1中列出的所述至少一种靶标的量和/或活性的不存在或降低和/或ii)的增加指示,所述测试药剂增加所述受试者中的髓系细胞的炎性表型,任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0038] 如上文所述,还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如,在一个实施方案中,与所述药剂接触的所述髓系细胞包含在细胞群体中并且所述药剂在所述细胞群体中增加1型和/或M1巨噬细胞的数量。在另一个实施方案中,与所述药剂接触的所述髓系细胞包含在细胞群体中并且所述药剂在所述细胞群体中减少2型和/或M2巨噬细胞的数量。在再一个实施方案中,在体外或离体接触所述髓系细胞。在又一个实施方案中,所述髓系细胞是原代髓系细胞。在另一个实施方案中,所述髓系细胞在与所述药剂接触之前被纯化和/或培养。在再一个实施方案中,在体内接触

所述髓系细胞。在又一个实施方案中，通过全身性、肿瘤周围或肿瘤内施用所述药剂在体内接触所述髓系细胞。在另一个实施方案中，所述髓系细胞在组织微环境中接触。在再一个实施方案中，所述方法还包括使所述髓系细胞与至少一种调节炎性表型的免疫治疗剂接触，任选地其中所述免疫治疗剂包括免疫检查点抑制剂、免疫刺激性激动剂、炎症剂、细胞、癌症疫苗和/或病毒。在又一个实施方案中，所述受试者是哺乳动物(例如，非人类动物模型或人类)。

[0039] 在再一个方面，提供了一种评价测试药剂在受试者中治疗癌症的功效的方法，所述方法包括：a)使用药剂在第一时间点检测包含髓系细胞的受试者样品中的i)髓系细胞中或其上在表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性，其中所述药剂是至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段，和/或ii)所述髓系细胞的炎性表型；b)在施用所述药剂之后的至少一个后续时间点期间重复步骤a)；以及c)比较步骤a)和b)中所检测的i)和/或ii)的值，其中与在所述第一时间点所述受试者样品的所述髓系细胞中或其上的量和/或活性相比，在所述后续时间点所述受试者样品的所述髓系细胞中或其上在表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性的不存在或降低和/或ii)的增加指示，所述测试药剂治疗所述受试者的癌症，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0040] 如上文所述，还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如，在一个实施方案中，在所述第一时间点与所述后续时间点之间，所述受试者已经针对所述癌症进行治疗、完成治疗和/或处于缓解期。在另一个实施方案中，所述第一样品和/或至少一个后续样品是选自由离体和体内样品组成的组。在再一个实施方案中，所述第一样品和/或至少一个后续样品是从非人类动物癌症模型获得的。在又一个实施方案中，所述第一样品和/或至少一个后续样品是从所述受试者获得的单个样品或合并样品的一部分。在另一个实施方案中，所述样品包括从所述受试者获得的细胞、血清、肿瘤周围组织和/或肿瘤内组织。

[0041] 在另一方面，提供了一种用于筛选使癌细胞对细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的测试药剂的方法，所述方法包括：a)使癌细胞与细胞毒性T细胞和/或免疫检查点疗法在与所述测试药剂接触的髓系细胞存在下接触，其中所述测试药剂调节如使用药剂测定的髓系细胞剂中或其上在表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性，其中所述药剂是至少一种本发明所涵盖的单克隆抗体或其抗原结合片段；b)使癌细胞与细胞毒性T细胞和/或免疫检查点疗法在未与所述测试药剂接触的对照髓系细胞存在下接触；以及c)通过鉴定与b)相比增加a)中的细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法功效的药剂来鉴定使癌细胞对细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的测试药剂，任选地其中所述髓系细胞包括抑制性髓系细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突状细胞。

[0042] 如上文所述，还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如，在一个实施方案中，体内、离体或体外发生接触步骤。在另一个实施方案中，所述方法还包括测定i)癌症中的增殖性细胞数量的减少和/或ii)包含癌细胞的肿瘤的体积或大小的缩减。在再一个实施方案中，所述方法还包括测定i)增加的CD8+T细胞数量和/或ii)增加的浸润包含癌细胞的肿瘤的1型和/或M1巨噬细胞的数量。

在又一个实施方案中，所述方法还包括测定对调节表1中列出的至少一种靶标的测试药剂的反应性，所述反应性是通过至少一种选自由以下组成的组的标准来测量：临床受益率、直至死亡的存活率、病理完全反应、病理反应的半定量测量、临床完全缓解、临床部分缓解、临床稳定疾病、无复发存活、无转移存活、无疾病存活、循环肿瘤细胞减少、循环标志物反应和RECIST标准。在另一个实施方案中，所述方法还包括使所述癌细胞与至少一种额外癌症治疗剂或方案接触。

[0043] 如上文所述，还提供了可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合的众多实施方案。例如，在一个实施方案中，具有经调节炎性表型的髓系细胞表现出下列各项中的一者或多者：a)经调节的分化簇80(CD80)、CD86、MHCII、MHCI、白介素1-β(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF和/或肿瘤坏死因子α(TNF-α)的表达；b)经调节的CD206、CD163、CD16、CD53、VSIG4、PSGL-1和/或IL-10的表达；c)经调节的至少一种选自由IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18和IL-23组成的组的细胞因子的分泌；d)经调节的IL-1β、IL-6和/或TNF-α的表达对IL-10表达的比率；e)经调节的CD8+细胞毒性T细胞活化；f)经调节的CD4+辅助T细胞活性；g)经调节的NK细胞活性；h)经调节的嗜中性粒细胞活性；i)经调节的巨噬细胞和/或树突状细胞活性；和/或j)经调节的纺锤形形态、外观平坦性和/或树突数量，如通过显微术所评价。在另一个实施方案中，所述细胞和/或巨噬细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞，任选地其中所述细胞和/或巨噬细胞表达或被测定为表达SIGLEC-9。在再一个实施方案中，人类SIGLEC-9多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2和/或食蟹猴SIGLEC-9多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:7。在又一个实施方案中，所述癌症是被巨噬细胞浸润的实体肿瘤，其中所述浸润性巨噬细胞占肿瘤或肿瘤微环境中的细胞的质量、体积和/或数量的至少约5％，和/或其中所述癌症选自由以下组成的组：间皮瘤、肾透明细胞癌、神经胶母细胞瘤、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、胰腺腺癌、乳腺浸润癌、急性髓系白血病、肾上腺皮质癌、膀胱尿路上皮癌、脑低级别神经胶质瘤、乳腺浸润癌、宫颈鳞状细胞癌和宫颈内腺癌、胆管癌、结肠腺癌、食道癌、多形性神经胶母细胞瘤、头颈鳞状细胞癌、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、肝细胞癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、淋巴样赘瘤弥漫性大B细胞淋巴瘤、间皮瘤、卵巢浆液性囊腺癌、胰腺腺癌、嗜铬细胞瘤、副神经节瘤、前列腺腺癌、直肠腺癌、肉瘤、皮肤黑色素瘤、胃腺癌、睾丸生殖细胞肿瘤、胸腺瘤、甲状腺癌、子宫癌肉瘤、子宫体内膜癌和葡萄膜黑色素瘤。在另一个实施方案中，所述巨噬细胞包括1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、2型巨噬细胞、M2巨噬细胞、M2c巨噬细胞、M2d巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD11b+细胞、CD14+细胞和/或CD11b+/CD14+细胞，任选地其中所述巨噬细胞是TAM和/或M2巨噬细胞。在另一个实施方案中，所述巨噬细胞表达或被测定为表达SIGLEC-9。在又一个实施方案中，所述髓系细胞是原代髓系细胞。在另一个实施方案中，所述髓系细胞包含在组织微环境中。在再一个实施方案中，所述髓系细胞包含在人类肿瘤模型或动物癌症模型中。在又一个实施方案中，所述受试者是哺乳动物。在另一个实施方案中，所述哺乳动物是人类(例如，患有癌症的人类)。

附图说明

[0044] 专利或申请文件包含至少一张彩色绘图。本专利或专利申请出版物的带有彩色附

图的副本将在请求和支付必要费用后由专利局提供。

[0045] 图1显示了SIGLEC-9表达在人类髓系细胞中占主导地位,而T细胞表达SIGLEC-9的子集有限。

[0046] 图2显示了构成从妇科癌症获得的腹水样品中大部分细胞的TAM(例如,表达CD16和CD163的M2 TAM)也在其细胞表面上高度表达SIGLEC-9蛋白。

[0047] 图3显示了从被解离成单细胞悬液并经由流式细胞术进行免疫表型分析的乳腺、结肠和肾脏肿瘤中获得的TAM(例如CD11b+/CD14+巨噬细胞)在其细胞表面上高度表达SIGLEC-9蛋白。

[0048] 图4显示了巨噬细胞浸润肿瘤基于其SIGLEC-9表达在人类癌症大型公共数据集(TCGA,癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas),2017版,由OmicSoft/Qiagen处理和发布)的癌症类型中的等级次序分布,最高SIGLEC-9表达在顶部。

[0049] 图5显示了在巨噬细胞功能测定中验证抗SIGLEC-9抗体的结果。在原代人类巨噬细胞中抑制SIGLEC-9后,抗SIGLEC-9抗体证实调节M2偏斜条件下的巨噬细胞炎性表型,包括M2标志物的减少和M1促炎细胞因子的增加。

[0050] 图6显示了葡萄球菌肠毒素B(SEB)测定实验的结果。

[0051] 图7显示了抗SIGLEC-9抗体的结合特性的结果。

[0052] 对于任何显示条形直方图、曲线或与图例相关的其他数据的附图来说,每个指示从左至右所呈现的条、曲线或其他数据直接并依序对应于从图例的顶部至底部的方框。

[0053] 图8显示了抗SIGLEC-9抗体对巨噬细胞炎性活化(例如,TNFα的分泌增加)的结果,对分析的所有肿瘤取平均值。

[0054] 图9显示了抗SIGLEC-9抗体对趋化因子特征(例如,CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9和CXCL10的分泌增加)的结果,对分析的所有肿瘤取平均值。

[0055] 图10显示了抗SIGLEC-9抗体对T细胞活化特征(例如,IFNγ的分泌增加)的结果,对分析的所有肿瘤取平均值。

[0056] 图11显示了抗SIGLEC-9抗体对增加个别肿瘤中TNFα分泌的结果。

[0057] 图12显示了抗SIGLEC-9抗体对增加个别肿瘤中CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9和/或CXCL10分泌的结果。

[0058] 图13显示了抗SIGLEC-9抗体对增加个别肿瘤中IFNγ分泌的结果。

具体实施方式

[0059] 本发明至少部分地基于调控髓系细胞炎性表型(包括极化、活化和/或功能)的抗SIGLEC-9组合物(例如,单克隆抗体)的发现。因此,本发明提供了抗SIGLEC-9组合物以及其方法和用途,包括但不限于用于治疗、诊断、预后和筛选的髓系细胞炎性表型的调节。

[0060] I.定义

[0061] 在一些实施方案中,术语“约”涵盖在所测量值的1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%(包括所述值)或任何中间范围(例如±2%-6%)内的值。在一些实施方案中,术语“约”是指方法、测定或测量值的固有误差变化,例如存在于实验中的变化。

[0062] 术语“活化受体”包括结合抗原、复合抗原(例如在主要组织相容性复合物(MHC)多肽的情形中)或结合至抗体的免疫细胞受体。此类活化受体包括T细胞受体(TCR)、B细胞受

体(BCR)、细胞因子受体、LPS受体、补体受体、Fc受体和其他含ITAM受体。例如,T细胞受体存在于T细胞上并与CD3多肽缔合。T细胞受体是由MHC多肽情形中的抗原(以及由多克隆T细胞活化试剂)刺激。经由TCR活化T细胞导致众多变化,例如蛋白质磷酸化、膜脂质变化、离子通量、环状核苷酸改变、RNA转录变化、蛋白质合成变化和细胞体积变化。类似于T细胞,经由活化受体(例如细胞因子受体或模式相关分子模式(PAMP)受体)活化巨噬细胞导致例如以下变化:蛋白质磷酸化、表面受体表型改变、蛋白质合成和释放以及形态变化。

[0063] 术语“活性”在关于多肽使用时,包括蛋白质结构中固有的活性。例如,关于髓系细胞蛋白,术语“活性”包括通过调节细胞的天然结合蛋白结合或细胞信号传导(例如,通过接合免疫细胞上的天然受体或配体)来调节髓系细胞蛋白的炎性表型的能力。

[0064] 术语“施用”涉及将药剂实际性物理引入目标生物靶标(例如宿主和/或受试者)中或其上(在适当时)。可在体外或体内将组合物施用于细胞(例如“接触”)。可在体内经由适当施用途径将组合物施用于受试者。根据本发明涵盖将组合物引入宿主中的任何和所有方法。所述方法并不依赖于任何特定引入方式并且不应如此解释。引入方式是本领域技术人员众所周知的,并且也示例于本文中。所述术语包括容许药剂实施其预期功能的施用途径。可使用的用于治疗身体的施用途径的实例包括注射(皮下、静脉内、肠胃外、腹膜内、鞘内等)、口服、吸入和透皮途径。注射可为团注或可为连续输注。取决于施用途径,药剂可用所选材料包覆或布置于其中以保护其免受可有害地影响其实施其预期功能的能力的天然条件影响。可单独或联合药学上可接受的载体来施用药剂。药剂也可作为前药施用,前药在体内转化成其活性形式。

[0065] 术语“药剂”是指化合物、超分子复合物、材料和/或它们的组合或混合物。化合物(例如分子)可由化学式、化学结构或序列代表。药剂的代表性非限制性实例包括例如抗体、小分子、多肽、多核苷酸(例如RNAi剂、siRNA、miRNA、piRNA、mRNA、反义多核苷酸、适体等)、脂质和多糖。一般来说,药剂可使用本领域已知的任何合适方法获得。在一些实施方案中,药剂可为用于治疗受试者(例如人类)的疾病或病症(例如癌症)的“治疗剂”。

[0066] 术语“激动剂”是指结合至靶标(例如受体)并且激活或增加靶标的生物活性的药剂。例如,“激动剂”抗体是激活或增加其所结合抗原的生物活性的抗体。

[0067] 术语“改变量”或“改变水平”涵盖与对照样品中的拷贝数或表达水平相比,生物标志物核酸的增加或降低的拷贝数(例如种系和/或体细胞)或目标样品中的增加或降低的表达水平。术语生物标志物的“改变量”还包括与正常和/或对照样品中的相应蛋白质水平相比,样品(例如癌症样品)中生物标志物蛋白的增加或降低的蛋白质水平。此外,可通过检测可影响生物标志物蛋白的表达或活性的翻译后修饰(例如标志物的甲基化状态)来测定生物标志物蛋白的改变量。在一些实施方案中,“改变量”是指生物标志物的存在或不存在,这是因为参考基线可分别为生物标志物的不存在或存在。可根据用于测量生物标志物的给定测定的敏感性的阈值来确定生物标志物的不存在或存在。

[0068] 如果受试者中的生物标志物的量相比于正常水平分别大于或小于比用于评价量的测定的标准误差更大的量并且优选地大于或小于所述量至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多,则所述生物标志物的量“显著”高于或低于生物标志物的正常量。或者,如果受试者中的生物标

志物的量分别高于或低于生物标志物的正常量至少约两倍并且优选地至少约三倍、四倍或五倍，则所述量可视为“显著”高于或低于正常量。这种“显著性”还可适用于例如用于表达、抑制、细胞毒性、细胞生长等的本文所述的任何其他测量参数。

[0069] 术语生物标志物的“改变的表达水平”是指测试样品(例如源自患有癌症的患者的样品)中生物标志物的表达水平或拷贝数大于或小于用于评价表达或拷贝数的测定的标准误差并且优选地为对照样品(例如来自未患有相关疾病的健康受试者的样品)中的生物标志物的表达水平或拷贝数和优选地若干对照样品中的生物标志物的平均表达水平或拷贝数的至少两倍和更优选地三倍、四倍、五倍或十倍或更大倍数。在一些实施方案中，生物标志物的水平是指生物标志物本身的水平、经修饰生物标志物(例如磷酸化生物标志物)的水平或生物标志物相对于另一测量变量(例如对照)的水平(例如相对于未磷酸化生物标志物的磷酸化生物标志物)。术语“表达”涵盖核酸(例如DNA)被转录以产生RNA的过程，并且还可以指处理RNA转录物并翻译成多肽的过程。核酸及其多肽对应体(如果存在)的表达总和有助于生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标)的量。

[0070] 术语生物标志物的“改变的活性”是指与正常对照样品中生物标志物的活性相比，疾病状态(例如在癌症样品中)或经处理状态中的生物标志物的活性有所增加或降低。生物标志物的改变的活性可能是由于例如改变的生物标志物表达、改变的生物标志物蛋白水平、改变的生物标志物结构或例如改变的与生物标志物相同或不同途径中所涉及的其他蛋白质的相互作用或改变的与转录活化剂或抑制剂的相互作用。

[0071] 术语生物标志物的“改变的结构”是指与正常或野生型基因或蛋白质相比在生物标志物核酸或蛋白质内存在突变或等位基因变体，例如影响生物标志物核酸或蛋白质的表达或活性的突变。例如，突变包括但不限于取代、缺失或添加突变。突变可存在于生物标志物核酸的编码区或非编码区中。

[0072] 术语生物标志物的“改变的亚细胞定位”是指相对于细胞内(例如健康和/或野生型细胞内)的正常定位，生物标志物错误定位于细胞内。可通过分析由生物标志物多肽所携带的本领域已知的亚细胞定位基序来确定标志物正常定位的指示。

[0073] 术语“拮抗剂”或“阻断剂”是指结合至靶标(例如受体)并抑制或减小靶标的生物活性的药剂。例如，“拮抗剂”抗体是显著抑制或减小其所结合抗原的生物活性的抗体。

[0074] 除非在本文内另外说明，否则术语“抗体”广泛涵盖天然存在形式的抗体(例如IgG、IgA、IgM、IgE)和重组抗体(例如单链抗体、嵌合和人源化抗体以及多特异性抗体)以及所有前述物的片段、融合蛋白和衍生物，所述片段和衍生物具有至少一个抗原性结合位点。抗体衍生物可包含与抗体缀合的蛋白质或化学部分。

[0075] 术语“生物标志物”是指基因或基因产物，其是用于调节一种或多种目标表型(例如髓系细胞中的目标表型)的靶标。在这种情形下，术语“生物标志物”与“靶标”同义。然而，在一些实施方案中，所述术语还涵盖已被确定为指示目标输出例如一种或多种诊断、预后和/或治疗输出(例如，用于调节炎性表型、癌症状态等)的靶标的可测量实体。在其他实施方案中，所述术语还涵盖调节基因或基因产物的组合物，包括抗基因产物抗体及其抗原结合片段。因此，生物标志物可包括但不限于核酸(例如，基因组核酸和/或转录的核酸)、蛋白质和抗体(以及其抗原结合片段)，特别是表1中列出的那些。

[0076] 术语“癌症”或“肿瘤”或“过度增殖性”是指存在拥有致癌细胞典型特性(例如不受

控增殖、不死性、侵袭性或转移性潜力、快速生长和某些特征性形态特征)的细胞。在一些实施方案中,此类细胞表现出部分地或完全由免疫检查点蛋白(例如PD-1、PD-L1、PD-L2和/或CTLA-4)的表达和活性所致的此类特性。

[0077] 癌细胞通常呈肿瘤形式,但此类细胞可单独存在于动物内,或者可为非致瘤癌细胞如白血病细胞。如本文所用,术语"癌症"包括恶变前癌症以及恶性癌症。癌症包括但不限于各种癌症/癌瘤,包括膀胱癌(包括加速膀胱癌和转移性膀胱癌)、乳腺癌、结肠癌(包括结直肠癌)、肾癌、肝癌、肺癌(包括小细胞和非小细胞肺癌和肺腺癌)、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、泌尿生殖道癌、淋巴系统癌、直肠癌、喉癌、胰腺癌(包括外分泌胰腺癌)、食道癌、胃癌、胆囊癌、宫颈癌、甲状腺癌和皮肤癌(包括鳞状细胞癌);淋巴样谱系的造血性肿瘤,包括白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(Hodgkins lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma)、毛细胞淋巴瘤、组织细胞性淋巴瘤和伯基特淋巴瘤(Burketts lymphoma);骨髓样谱系的造血性肿瘤,包括急性和慢性骨髓性白血病、骨髓发育不良综合征、髓系白血病和前髓细胞性白血病;中枢和周围神经系统的肿瘤,包括星形细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤;间充质源肿瘤,包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤;其他肿瘤,包括黑色素瘤、着色性干皮症、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡性癌症和畸胎癌;黑色素瘤、不可切除性阶段III或IV恶性黑色素瘤、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、胃肠道癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性神经胶母细胞瘤、宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌和头颈癌、胃癌、生殖细胞肿瘤、骨癌、骨肿瘤、成人骨恶性纤维性组织细胞瘤;儿童期骨恶性纤维性组织细胞瘤、肉瘤、儿科肉瘤、鼻窦自然杀伤肿瘤、赘瘤、浆细胞赘瘤;骨髓发育不良综合征;神经母细胞瘤;睾丸生殖细胞肿瘤、眼内黑色素瘤、骨髓发育不良综合征;骨髓发育不良/骨髓增殖性疾病、滑膜肉瘤、慢性髓系白血病、急性淋巴母细胞性白血病、费城染色体(Philadelphia chromosome)阳性急性淋巴母细胞性白血病(Ph+ALL)、多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、肥大细胞增多症和与肥大细胞增多症相关的任何症状及其任何转移。另外,病症包括色素性荨麻疹、肥大细胞增多症(例如弥漫性皮肤肥大细胞增多症、人类孤立性肥大细胞瘤以及狗肥大细胞瘤和一些稀有亚型如大疱性肥大细胞增多症、红皮性肥大细胞增多症和毛细管扩张性肥大细胞增多症)、伴有相关血液学病症(例如骨髓增殖性或骨髓发育不良综合征或急性白血病)的肥大细胞增多症、与肥大细胞增多症相关的骨髓增殖性病症、肥大细胞白血病以及其他癌症。其他癌症也包括在病症范围内,包括但不限于下列:癌瘤,包括膀胱癌、尿路上皮癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌、睾丸癌,特别是睾丸精原细胞瘤和皮肤癌(包括鳞状细胞癌);胃肠道基质肿瘤("GIST");淋巴样谱系的造血性肿瘤,包括白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤;骨髓样谱系的造血性肿瘤,包括急性和慢性骨髓性白血病和前髓细胞性白血病;间充质源肿瘤,包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤;其他肿瘤,包括黑色素瘤、精原细胞瘤、畸胎癌、神经母细胞瘤和神经胶质瘤;中枢和周围神经系统的肿瘤,包括星形细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤;间充质源肿瘤,包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤;和其他肿瘤,包括黑色素瘤、着色性干皮症、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡性

癌症、畸胎癌、化学疗法难治性非精原性生殖细胞肿瘤和卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)及其任何转移。适用于本发明所涵盖方法的癌症类型的其他非限制性实例包括人类肉瘤和癌瘤,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肿瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓质癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、威尔姆斯瘤(Wilms'tumor)、骨癌、脑肿瘤、肺癌(包括肺腺癌)、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、寡树突神经胶细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤;白血病,例如急性淋巴细胞性白血病和急性髓系细胞性白血病(骨髓母细胞性、前髓细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病);慢性白血病(慢性髓系细胞性(粒细胞性)白血病和慢性淋巴细胞性白血病);和真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金病(Hodgkin's disease)和非霍奇金病(non-Hodgkin's disease))、多发性骨髓瘤、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)和重链病。在一些实施方案中,癌症是上皮性并且包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、妇科癌、肾癌、喉癌、肺癌、口腔癌、头颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或皮肤癌。在一些实施方案中,上皮癌是非小细胞肺癌、非乳头状肾细胞癌、宫颈癌、卵巢癌(例如浆液性卵巢癌)或乳腺癌。上皮癌可以各种其他方式来表征,包括但不限于浆液性、子宫内膜样、粘液性、透明细胞性、布伦纳氏(Brenner)或未分化性。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:(晚期)非小细胞肺癌、黑色素瘤、头颈鳞状细胞癌、(晚期)尿道上皮膀胱癌、(晚期)肾癌(RCC)、高微卫星不稳定性癌症、经典霍奇金淋巴瘤、(晚期)胃癌、(晚期)宫颈癌、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、(晚期)肝细胞癌和(晚期)默克尔细胞(merkel cell)癌。

[0078] 术语"分类"包括"关联"或"归类"样品与疾病状态。在某些情况下,"分类"是基于统计证据、经验证据或两者。在某些实施方案中,所述分类方法和系统使用具有已知疾病状态的样品的所谓的训练集。一旦建立,训练数据集将作为一个基础、模型或模板,与未知样品的特征进行比较,以对样品的未知疾病状态进行分类。在某些情况下,对样品进行分类类似于诊断样品的疾病状态。在某些其他情况下,对样品进行分类类似于将样品的疾病状态与另一种疾病状态区分开来。

[0079] 术语"编码区"是指核苷酸序列中包含翻译成氨基酸残基的密码子的区域,而术语"非编码区"是指核苷酸序列中未翻译成氨基酸的区域(例如5'和3'非翻译区)。

[0080] 关于抗体或其抗原结合片段的术语"竞争"是指如下情形:其中第一抗体或其抗原结合片段以与第二抗体或其抗原结合部分的结合充分相似的方式结合于表位,使得与不存在第二抗体的情况下第一抗体的结合相比,在第二抗体存在下第一抗体与其同源表位的结合结果可检测地降低。其中第二抗体与其表位的结合在第一抗体存在下也可检测地降低的替代方案可以但未必如此。也就是说,第一抗体可抑制第二抗体与其表位的结合,而该第二抗体不抑制第一抗体与其相应表位的结合。然而,当每种抗体可检测地抑制另一种抗体与其同源表位或配体的结合时,无论是在相同、更大还是更小程度上,所述抗体被称为相互"交叉竞争"以结合它们的相应表位。本发明涵盖竞争性和交叉竞争性抗体及其抗原结合片段(例如,与本文中阐述和/或本领域已知的其他抗体和抗原结合片段竞争或交叉竞争的本

文所述的抗体和抗原结合片段)。无论这种竞争或交叉竞争发生的机制如何(例如,空间位阻、构象变化或与共同表位或其部分的结合),技术人员基于本文提供的公开内容和目前技术水平理解,涵盖此类竞争性和/或交叉竞争性抗体并且其可用于本文公开的方法。

[0081] 术语“互补”是指两个核酸链的区域之间或同一核酸链的两个区域之间的序列互补性的广义概念。已知的是,如果与第一区域反向平行的第二核酸区域中的残基是胸腺嘧啶或尿嘧啶,则第一核酸区域的腺嘌呤残基能够与第二核酸区域中的所述残基形成特定氢键(“碱基配对”)。类似地已知,如果与第一链反向平行的第二核酸链中的残基是鸟嘌呤,则第一核酸链的胞嘧啶残基能够与第二核酸链中的所述残基碱基配对。如果在核酸的第一区域与相同或不同核酸的第二区域以反向平行方式排列时,第一区域的至少一个核苷酸残基能够与第二区域的残基碱基配对,则所述两个区域互补。优选地,第一区域包含第一部分并且第二区域包含第二部分,其中,在第一部分和第二部分以反向平行方式布置时,第一部分中至少约50%和优选地至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%或更多的核苷酸残基能够与第二部分中的核苷酸残基碱基配对。更优选地,第一部分的所有核苷酸残基能够与第二部分中的核苷酸残基碱基配对。在一些实施方案中,互补多核苷酸可为“充分互补”或者可具有“充分互补性”,即互补性足以维持双链体和/或具有期望活性。例如,在RNAi剂的情况下,所述互补性是药剂与靶标mRNA之间的互补性,其足以部分地或完全地防止mRNA翻译。例如,具有“与靶标mRNA序列充分互补以引导靶标特异性RNA干扰(RNAi)的序列”的siRNA意指,siRNA具有足以触发通过RNAi机制或过程来破坏靶标mRNA的序列。

[0082] 术语“基本上互补”是指两个核酸之间的碱基配对、双链区域并且并非任何单链区域(例如两个双链区域之间的末端悬突或间隙区域)中的互补性。互补性未必是完全的;可存在任何数量的碱基对错配。在一些实施方案中,当两个序列在本文中称为“基本上互补”时,其意指所述序列彼此充分互补以在所选反应条件下杂交。因此,基本上互补的序列可指在双链区域中碱基对互补性为至少100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%或更低或其间的任何数值的序列。

[0083] 如本文所用的术语“联合疗法”和“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂,例如表1中列出的一种以上靶标的调节剂的组合、表1中列出的至少一种靶标的至少一种调节剂和额外治疗剂(例如免疫检查点疗法)的组合、表1中列出的一种或多种靶标的一种以上调节剂等的组合,和它们的组合。构成组合疗法的不同剂可与施用另一剂或其他剂同时、在其之前或在其之后施用。组合疗法旨在从这些治疗剂的共同作用来提供有益(加和或协同)效应。这些治疗剂的组合施用可在限定时间段(取决于所选组合,通常数分钟、数小时、数天或数周)内实施。在组合疗法中,组合治疗剂可以依序方式或通过基本上同时施加来施加。

[0084] 术语“对照”是指任何适于提供与测试样品中的表达产物进行比较的参考标准物。在一个实施方案中,对照包括获得检测表达产物水平的“对照样品”并且与来自测试样品的表达产物水平进行比较。这种对照样品可包含任何合适样品,包括但不限于来自受试者(例如具有髓系细胞的受试者和/或具有已知结果的对照癌症患者(可为储存样品或先前样品测量))的样品;从受试者(例如正常患者或癌症患者)分离的正常组织或细胞,从受试者(例如正常受试者或癌症患者)分离的经培养原代细胞/组织,从癌症患者的相同器官或身体位置获得的毗邻正常细胞/组织,从正常受试者分离的组织或细胞样品,或从保藏机构获得的

原代细胞/组织。在另一个优选的实施方案中，对照可包含来自任何合适来源(包括但不限于管家基因)的参考标准表达产物水平，来自正常组织(或其他先前分析的对照样品)的表达产物水平范围，先前在来自具有某一结果(例如存活一、二、三、四年等)或接受某一治疗(例如标准护理癌症疗法)的患者群或患者组的测试样品内所测定的表达产物水平范围。本领域技术人员应理解，此类对照样品和参考标准表达产物水平可组合用作本发明所涵盖方法中的对照。在一个实施方案中，对照可包含正常或非癌性细胞/组织样品。在另一个优选的实施方案中，对照可包含患者组(例如癌症患者组或接受某一治疗的癌症患者组或具有一种结果对另一结果的患者组)的表达水平。在前者的情况下，可将每个患者的具体表达产物水平指派为表达水平百分位数，或表示为高于或低于参考标准表达水平的平均数或平均值。在另一个优选的实施方案中，对照可包含正常细胞、来自用组合化学疗法治疗的患者的细胞和来自患有良性癌症的患者的细胞。在另一个实施方案中，对照还可包含测量值，例如与某一群体中的管家基因的表达水平相比相同群体中的特定基因的平均表达水平。这个群体可包含正常受试者、未经受任何治疗(即未治疗)的癌症患者、经受标准护理疗法的癌症患者或患有良性癌症的患者。在另一个优选的实施方案中，对照包含表达产物水平的转变比率，包括但不限于测定测试样品中两种基因的表达产物水平的比率并将其与参考标准物中的相同两种基因的任何合适比率进行比较；测定测试样品中的两种或更多种基因的表达产物水平并测定任何合适对照中的表达产物水平之差；以及测定测试样品中的两种或更多种基因的表达产物水平，将其表达相对于测试样品中的管家基因的表达归一化，以及与任何合适对照进行比较。在特别优选的实施方案中，对照包含与测试样品为相同谱系和/或类型的对照样品。在另一个实施方案中，对照可包含根据患者样品(例如所有癌症患者)内或基于其的百分位数分组的表达产物水平。在一个实施方案中，确立对照表达产物水平，其中使用相对于例如特定百分位数的较高或较低表达产物水平作为预测结果的基础。在另一个优选的实施方案中，使用来自具有已知结果的癌症对照患者的表达产物水平来确立对照表达产物水平，并且将来自测试样品的表达产物水平与作为预测结果的基础的对照表达产物水平进行比较。本发明所涵盖的方法并不限于使用特定截止点来比较测试样品与对照中的表达产物水平。

[0085] 生物标志物核酸的“拷贝数”是指细胞(例如种系和/或体细胞)中编码特定基因产物的DNA序列的数量。通常，对于给定基因来说，哺乳动物具有每一基因的两个拷贝。然而，拷贝数可通过基因扩增或复制来增加，或通过缺失来减小。例如，种系拷贝数变化包括一个或多个基因座处的变化，其中所述一个或多个基因座并不计及对照中的种系拷贝的正常补体中的拷贝数(例如，测定特定种系DNA和相应拷贝数的物种的相同物种的种系DNA中的正常拷贝数)。体细胞拷贝数变化包括一个或多个基因座处的变化，其中所述一个或多个基因座并不计及对照的种系DNA中的拷贝数(例如，测定体细胞DNA和相应拷贝数的受试者的相同受试者的种系DNA中的拷贝数)。

[0086] 如关于激活的免疫细胞使用的术语“共刺激”包括共刺激多肽提供诱导增殖或效应功能的第二非激活受体介导的信号(“共刺激信号”)的能力。例如，共刺激信号可导致细胞因子分泌，例如，在已接收T细胞受体介导的信号的T细胞中。已接收细胞受体介导的信号(例如，经由激活受体)的免疫细胞在本文中被称为“激活的免疫细胞”。

[0087] 术语“共刺激受体”包括将共刺激信号传递给免疫细胞(例如CD28)的受体。如本文

所用，术语“抑制性受体”包括将阴性信号传递至免疫细胞(例如，PD-1、CTLA-4等)的受体。即使免疫细胞上不存在共刺激受体(例如CD28)，通过抑制性受体转导的抑制信号也可能发生，因此，这不仅仅是抑制性受体和共刺激性受体之间竞争结合共刺激多肽的功能(Fallarino等人(1998)J.Exp.Med.188:205)。向免疫细胞传递抑制信号可导致免疫细胞无反应性或无变应性或程序性细胞死亡。优选地，抑制信号的传递通过不涉及细胞凋亡的机制起作用。如本文所用，术语“细胞凋亡”包括程序性细胞死亡，其可使用本领域已知的技术表征。凋亡细胞死亡的特征可以是例如细胞收缩、膜起泡和染色质凝聚，最终导致细胞碎裂。经历细胞凋亡的细胞也显示出核小体间DNA切割的特征模式。根据与受体结合的多肽的形式，信号可被传递(例如，通过多价形式的抑制性受体配体)或者信号可被抑制(例如，通过可溶性单价形式的抑制性受体配体)，例如通过与配体的活化形式竞争结合一种或多种天然结合伴侣。然而，存在可溶性多肽可能具有刺激性的情况。使用如本文所述的常规筛选测定可容易地证明调节剂的作用。

[0088] 术语“细胞因子”是指由免疫系统的某些细胞分泌并且对其他细胞具有生物效应的物质。细胞因子可为多种不同物质，例如干扰素、白介素和生长因子。

[0089] 术语“确定适用于受试者的治疗方案”被认为意指，确定用于受试者的基于或基本上基于或至少部分地基于本发明所涵盖生物标志物介导的分析的结果来开始、修改和/或结束的治疗方案(即用于预防和/或治疗受试者癌症的单一疗法或不同疗法的组合)。一个实例是确定是否提供针对癌症的靶向疗法，以提供使用本发明所涵盖调节一种或多种生物标志物的药剂的疗法。另一个实例是在手术之后开始辅助疗法，其目的在于降低复发风险。再一个实例是修改特定化学疗法的剂量。除根据本发明的分析结果外，所述确定可基于待治疗受试者的个人特性。在大部分情况下，由主治医师或医生来实际确定适用于受试者的治疗方案。

[0090] 术语“无内毒素”或“基本上无内毒素”是指含有至多痕量(例如对受试者无临床不良生理学效应的量)的内毒素和优选地不可检测量的内毒素的组合物、溶剂和/或器皿。内毒素是与某些细菌、通常革兰氏阴性(gram-negative)细菌相关的毒素，但内毒素可发现于革兰氏阳性(gram-positive bacteria)细菌(例如单核细胞增多性李斯特菌(Listeria monocytogene))中。最盛行内毒素是发现于各种革兰氏阴性细菌的外膜中的脂多糖(LPS)或脂寡糖(LOS)，其代表这些细菌致病能力中的主要病原性特征。少量内毒素在人类中即可产生发热、降低血压以及激活炎症和凝血以及其他不良生理学效应。因此，在药物生产中，通常期望从药品和/或药物容器去除大部分或所有痕量内毒素，这是因为极小量即可在人类中引起不良效应。除热原烘箱可用于此目的，这是因为通常需要超过300℃的温度来分解大部分内毒素。例如，基于主要包装材料(例如注射器或小瓶)，250℃玻璃温度和30分钟保持时间的组合通常足以实现内毒素水平的3log减小。涵盖去除内毒素的其他方法，包括例如如本文所述和本领域已知的色谱法和过滤方法。可使用本领域已知的常规技术来检测内毒素。例如，鲎变形细胞溶解物测定(其利用来自鲎的血液)是用于检测内毒素的存在的极敏感测定。在该测试中，极低水平的LPS即可引起鲎溶解物的可检测凝结，这是因为存在扩大该反应的强力酶促级联。还可通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来量化内毒素。为实现基本上无内毒素，内毒素水平可小于约0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.08、0.09、0.1、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9或10EU/ml或其间的任何范围(包括端值)，

例如0.05至10EU/ml。通常，1ng脂多糖(LPS)对应于约1-10EU。

[0091] 术语“表位”是指抗原结合蛋白(例如，免疫球蛋白、抗体或抗原结合片段)结合的抗原上的决定子或位点。蛋白质抗原的表位可以是线性表位或构象表位。线性表位是指由连接的氨基酸的连续线性序列形成的表位。蛋白质抗原的线性表位在暴露于化学变性剂(例如酸、碱、溶剂、交联剂、离液剂、二硫键还原剂)或物理变性剂(例如热量、放射性或机械剪切或应力)后通常会保留。相比之下，构象表位是指由通过多肽的三级折叠并置的非连续氨基酸形成的表位。用变性剂处理后，构象表位通常会丢失。表位通常包括呈独特空间构象的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个氨基酸。在一些实施方案中，表位包括呈独特空间构象的少于25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸。通常，对特定靶分子具有特异性的抗体或其抗原结合片段将优先识别并结合于蛋白质和/或大分子的复杂混合物中靶分子上的特定表位。在一些实施方案中，表位不包括生物标志物蛋白的胞外结构域的所有氨基酸。

[0092] 术语“表达特征”或“特征”是指一种或多种指示目标状态的经表达生物标志物的组。例如，构成该特征的基因、蛋白质等可表达于特定细胞谱系、分化阶段或特定生物反应期间。生物标志物可反映表达其的肿瘤的生物方面，例如细胞的炎性状态、癌症的源细胞、活检中的非恶性细胞性质和负责癌症的致癌机制。表达数据和基因表达水平可存储于计算机可读媒体(例如与微阵列或芯片读取装置联合使用的计算机可读媒体)上。可操纵这些表达数据以生成表达特征。

[0093] 术语“固定的”或“附着的”是指与底物共价或非共价缔合的物质，所述底物可用流体(例如标准柠檬酸盐水，pH 7.4)冲洗，而大部分分子不会从底物解离。

[0094] 术语“基因”涵盖编码具有一定功能的分子(例如RNA、蛋白质等)的核苷酸(例如DNA)序列。基因通常包含两条互补核苷酸链(即dsDNA)，即编码链和非编码链。在提及DNA转录时，编码链是碱基序列对应于所产生RNA转录物的碱基序列(但胸腺嘧啶由尿嘧啶代替)的DNA链。编码链含有密码子，而非编码链含有反密码子。在转录期间，RNA Pol II结合非编码链，读取反密码子，并且转录其序列以合成具有互补碱基的RNA转录物。在一些实施方案中，所列出的基因序列(即DNA序列)是编码链的序列。

[0095] “功能保守变体”是蛋白质或酶中的给定氨基酸残基已发生变化而不改变多肽的整体构象和功能的变体，包括但不限于用具有相似性质(例如，极性、氢键势、酸性、碱性、疏水性、芳香性等)的氨基酸代替所述氨基酸。除了被指出为保守的氨基酸之外的氨基酸在蛋白质中可能不同，因此具有相似功能的任何两种蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列相似性百分比可能会有所不同，并且可以是例如70％至99％，如根据比对方案，例如通过聚类方法(Cluster Method)所测定，其中相似性是基于MEGALIGN算法。在一些实施方案中，“功能保守变体”还包括具有至少80％、81％、82％、83％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高氨基酸同一性(如通过BLAST或FASTA算法确定)的多肽，并且其与和其相比较的原生或亲本蛋白质的性质或功能相同或基本相似。

[0096] 术语“基因产物”(在本文中也称为“基因表达产物”或“表达产物”)涵盖由基因表达产生的产物，例如从基因转录的核酸(例如mRNA)和源自所述mRNA的翻译的多肽或蛋白质。应了解，某些基因产物可例如在细胞中经受处理或修饰。例如，可在翻译之前剪接mRNA

转录物,实施多聚腺苷酸化等,和/或多肽可经受共翻译或翻译后处理(例如去除分泌信号序列、去除细胞器靶向序列或例如磷酸化、糖基化、甲基化、脂肪酰化等修饰,等等)。术语“基因产物”涵盖此类经处理或修饰形式。来自各种物种(包括人类)的基因组mRNA和多肽序列在本领域中是已知的并且可在可公开访问的数据库中获得(例如可在国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(ncbi.nih.gov)或通用蛋白质资源(Universal Protein Resource)(uniprot.org)处获得者)。其他数据库包括例如GenBank、RefSeq、Gene、UniProtKB/SwissProt、UniProtKB/Trembl等。一般来说,可使用NCBI参考序列数据库中的序列作为目标基因的基因产物序列。应了解,某一基因的多个等位基因可存在于相同物种的个体中。某些蛋白质可例如因替代性RNA剪接或编辑而存在多个同工型。一般来说,在本公开的方面涉及基因或基因产物的情形下,除非另外指示,否则如果适用的话涵盖涉及等位基因变体或同工型的实施方案。某些实施方案可涉及特定序列,例如特定等位基因或同工型。

[0097] 术语“生成”涵盖实现期望结果的任何方式,例如通过直接或间接作用。例如,可通过直接作用(例如通过与至少一种调节本文所述一种或多种生物标志物的药剂接触)和/或通过间接作用(例如通过繁殖具有期望物理、基因和/或表型属性的细胞)来生成具有本文所述的调节表型的细胞。

[0098] 术语“糖基化模式”是共价连接至蛋白质,更具体地连接至免疫球蛋白蛋白质的碳水化合物单元的模式。当本领域普通技术人员认识到异源抗体的糖基化模式与非人类转基因动物物种中的所述糖基化模式比与转基因的CH基因来源的物种更相似时,异源抗体的糖基化模式可表征为与天然存在于由非人类转基因动物物种产生的抗体上的糖基化模式基本相似。

[0099] 关于细胞生物标志物表达的术语“高”、“低”、“中等”和“阴性”是指所表达生物标志物相对于生物标志物在一种或多种参考细胞中的细胞表达的量。可根据本文所述的任何方法来测定生物标志物表达,包括但不限于分析一种或多种生物标志物基因组核酸、核糖核酸和/或多肽的细胞水平、活性、结构等。在一个实施方案中,所述术语是指分别以最高、中等或最低水平表达生物标志物的细胞群体的限定百分比。这样的百分比可定义为最高0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或更多或其间的任何范围(包括端值)的高度表达或较弱表达生物标志物的细胞群体。术语“低”不包括不可检测地表达生物标志物的细胞,因为所述细胞对于生物标志物表达来说是“阴性”。术语“中等”包括表达生物标志物但表达水平低于以“高”水平表达其的群体的细胞。在另一个实施方案中,所述术语还可指或替代地指通过定性或统计学图区鉴定的生物标志物表达的细胞群体。例如,可基于生物标志物表达水平通过基于可检测部分分析(例如基于平均荧光强度等)根据本领域中众所周知的方法鉴定不同绘图来区分使用流式细胞术分选的细胞群体。可根据数量、形状、重叠等基于本领域用于目标生物标志物的众所周知的方法来细化这些图区。在再一个实施方案中,所述术语还可根据额外生物标志物的表达的存在或不存在来确定。

[0100] 术语“基本上同一”是指核酸或氨基酸序列在例如使用下述方法最佳地比对时与第二核酸或氨基酸序列共有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、

97％、98％、99％或100％的序列同一性。“基本上同一性”可用于指各种类型和长度的序列，例如全长序列、功能结构域、编码和/或调控序列、外显子、内含子、启动子和基因组序列。以本领域技术范围内的各种方式来测定两个多肽或核酸序列之间的序列同一性百分比，例如使用可公开获得的计算机软件，例如BLAST程序(Basic Local Alignment Search Tool;(Altschul等人(1995)J.Mol.Biol.215:403-410)、BLAST-2、BLAST-P、BLAST-N、BLAST-X、WU-BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、CLUSTAL或Megalign(DNASTAR)软件。另外，本领域技术人员可测定用于测量比对的适当参数，包括在所比较序列的长度范围内实现最大比对所需的任何算法。应理解，出于测定序列同一性的目的，在比较DNA序列与RNA序列时，胸腺嘧啶核苷酸等效于尿嘧啶核苷酸。保守取代通常包括下列组内的取代：甘氨酸、丙氨酸；缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；天冬氨酸、谷氨酸；天冬酰胺、谷氨酰胺；丝氨酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸；和苯丙氨酸、酪氨酸。

[0101] 术语“免疫细胞”是指能够直接或间接参与免疫反应的细胞。免疫细胞包括但不限于T细胞、B细胞、抗原呈递细胞、树突状细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NK)细胞、淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、颗粒细胞、肥大细胞、血小板、朗格汉斯细胞(Langerhan'scell)、干细胞、外周血单核细胞、细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)等。“抗原呈递细胞”(APC)是能够活化T细胞的细胞，并且包括但不限于单核细胞/巨噬细胞、B细胞和树突状细胞(DC)。术语“树突状细胞”或“DC”是指发现于淋巴样或非淋巴样组织中的形态上类似的细胞类型的不同群体的任何成员。这些细胞的特征在于其独特形态和高表面II类MHC表达水平。DC可分离自多种组织来源。DC能够高度敏化MHC限制性T细胞并且极有效地将抗原原位呈递至T细胞。抗原可为表达于T细胞发育和耐受期间的自身抗原和存在于正常免疫过程期间的外来抗原。术语“嗜中性粒细胞”通常是指构成先天性免疫系统的一部分的白细胞。嗜中性粒细胞通常具有含有约2-5个叶片的分段细胞核。嗜中性粒细胞通常在创伤后几分钟内迁移至损伤部位。嗜中性粒细胞通过在损伤或感染部位处释放细胞毒性化合物(包括氧化剂、蛋白酶和细胞因子)来发挥作用。术语“活化DC”是用抗原脉冲化并且能够活化免疫细胞的DC。术语“NK细胞”具有其本领域中的一般含义并且是指自然杀伤(NK)细胞。本领域技术人员可容易地通过测定例如特定表型标志物(例如CD56)的表达来鉴定NK细胞并且基于例如表达不同种类细胞因子的能力或诱导细胞毒性的能力来鉴定其功能。术语“B细胞”是指源自骨髓和/或脾的免疫细胞。B细胞可发育成产生抗体的浆细胞。术语“T细胞”是指参与各种细胞介导的免疫反应的胸腺源免疫细胞，包括CD8+T细胞和CD4+T细胞。常规T细胞(也称为Tconv或Teff)具有效应功能(例如细胞因子分泌、细胞毒性活性、抗自我识别等)以借助于表达一种或多种T细胞受体来增加免疫反应。Tconv或Teff通常定义为任何非Treg的T细胞群体并包括例如初始T细胞、活化T细胞、记忆T细胞、静息Tconv或分化成例如Th1或Th2谱系的Tconv。在一些实施方案中，Teff是非调控性T细胞(Treg)的子集。在一些实施方案中，Teff是CD4+Teff或CD8+Teff，例如CD4+辅助T淋巴细胞(例如Th0、Th1、Tfh或Th17)和CD8+细胞毒性T细胞(淋巴细胞)。如本文进一步所述，细胞毒性T细胞是CD8+T淋巴细胞。“初始Tconv”是已在骨髓中分化并且成功地在胸腺中经受正向和负向主要选择过程但尚未通过暴露于抗原而活化的$CD4^+$T细胞。初始Tconv的特征通常在于L-选择蛋白(CD62L)的表面表达，活化标志物如CD25、CD44或CD69的不存在，和记忆标志物如CD45RO的不存在。初始Tconv因此被认为是静止和非分裂

性的,从而需要白介素-7(IL-7)和白介素-15(IL-15)来实现稳态存活(参见至少WO 2010/101870)。在抑制免疫反应的情形下,此类细胞的存在和活性是不期望的。不同于Treg,Tconv是无变应性的并因此响应于基于抗原的T细胞受体活化而增殖(Lechler等人(2001)Philos.Trans.R.Soc.Lond.Biol.Sci.356:625-637)。在肿瘤中,耗竭细胞可呈现无变应性的标志。

[0102] 术语“免疫病症”包括免疫疾病、疾患和以下患病倾向,包括但不限于癌症、慢性炎性疾病和病症(包括例如克罗恩病(Crohn's disease)、炎症性肠病、反应性关节炎和莱姆病(Lyme disease))、胰岛素依赖型糖尿病、器官特异性自身免疫(包括例如多发性硬化、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、自身免疫性葡萄膜炎和格雷夫氏病(Grave's disease)))、接触性皮炎、牛皮癣、移植排斥、移植物抗宿主病、结节病、特应性疾患(包括例如哮喘和过敏症,包括但不限于过敏性鼻炎和胃肠道过敏症如食物过敏)、嗜酸性粒细胞增多症、结膜炎、肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、某些病原体易感性如蠕虫病(包括例如利什曼病)和某些病毒感染(包括例如HIV和细菌感染如肺结核和瘤型麻风病)和疟疾。

[0103] 术语“免疫反应”意指身体针对“外来物”(例如细菌、病毒和病原体)以及针对可能未必源自身体外部的靶标所产生的防御反应,包括但不限于针对天然存在于身体中的物质(例如针对自身抗原的自身免疫性)或针对经转化(例如癌症)细胞的防御反应。免疫反应特别是免疫系统的细胞(例如T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞和嗜中性粒细胞)和由这些细胞中的任一者或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体(体液反应)、细胞因子和补体)的活化和/或作用,其导致选择性靶向、结合至、损害、破坏和/或从脊椎动物身体消除侵袭性病原体、感染病原体的细胞或组织、癌性或其他异常细胞,或在自身免疫性或病理性炎症的情况下的正常人类细胞或组织。抗癌免疫反应是指一种免疫监督机制,身体通过所述机制来识别异常肿瘤细胞并引发免疫系统的先天性和适应性免疫性以消除危险癌细胞。

[0104] 术语“免疫调控剂”是指调控免疫反应的物质、药剂、信号通路或其组分。关于免疫反应的术语“调控”、“修饰”或“调节”是指免疫系统细胞或这种细胞的活性的任何改变。这种调控包括免疫系统(或其不同部分)的刺激或抑制,其可表现为各种细胞类型的数量的增加或减少,这些细胞的活性的增加或减少,或可在免疫系统内发生的任何其他变化。已鉴定抑制性和刺激性免疫调控剂,其中的一些在癌症微环境中可具有增强的功能。

[0105] 术语“免疫治疗剂”可包括可刺激受试者中的宿主免疫系统以针对肿瘤或癌症生成免疫反应的任何分子、肽、抗体或其他药剂。各种免疫治疗剂可用于本文所述的组合物和方法中。

[0106] 术语“抑制”或“下调”包括降低、限制或阻断例如特定作用、功能或相互作用。在一些实施方案中,如果至少一种癌症症状得以缓解、终止、减缓或预防,则癌症受到“抑制”。如本文所用,如果癌症的复发或转移有所减少、减缓、延迟或预防,则癌症也受到“抑制”。类似地,如果与参考状态(例如对照,如野生型状态)相比有所降低,则生物功能(例如蛋白质功能)受到抑制。这种抑制或缺陷可例如通过在特定时间和/或地点施加药剂来诱导,或者可为组成型,例如通过可遗传突变。这种抑制或缺陷也可为部分的或完全的(例如与参考状态(例如对照,如野生型状态)相比基本上无可测量活性)。在一些实施方案中,基本上完全的抑制或缺陷被称为“阻断”。在一个实施方案中,所述术语是指将给定输出或参数的水平降

低到比相应对照中的量低至少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％或更多的量(例如,背景染色、生物标志物信号传导、生物标志物免疫抑制功能等)。给定输出或参数的降低水平未必但有可能意味着输出或参数的绝对缺失。本发明不需要也不限于完全消除输出或参数的方法。可使用本领域众所周知的方法确定给定的输出或参数,包括但不限于免疫组织化学、分子生物学、细胞生物学、临床和生化测定,如本文和实施例中所论述的。术语“促进”或“上调”具有相反含义。

[0107] 术语“抑制性信号”是指经由免疫细胞上的多肽的抑制性受体(例如,CTLA4、PD-1等)传递的信号。这种信号经由激活受体(例如,经由TCR、CD3、BCR、TMIGD2或Fc多肽)拮抗信号,并且可能导致例如第二信使生成的抑制;增殖的抑制;免疫细胞中效应功能的抑制,例如吞噬作用减少、抗体产生减少、细胞毒性减少、免疫细胞不能产生介体(例如细胞因子(例如IL-2)和/或过敏反应介体);或无变应性的发展。

[0108] “先天性免疫系统”是一种非特异性免疫系统,其包含保护宿主免于由其他生物体感染的细胞(例如自然杀伤细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞;和吞噬细胞,包括巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突状细胞)和机制。先天性免疫反应可引发细胞因子产生以及活性补体级联和适应性免疫反应。适应性免疫系统是高度特殊性全身性细胞活化和过程(例如通过抗原呈递细胞的抗原呈递;抗原特异性T细胞活化和细胞毒性效应)所需要和涉及的特异性免疫系统。

[0109] 在提及两个分子之间的相互作用时,术语“相互作用”是指分子彼此的物理接触(例如结合)。通常,这种相互作用产生所述分子中的一者或两者的活性(其产生生物效应)。活性可为一个或两个分子的直接活性(例如信号转导)。或者,可防止相互作用中的一个或两个分子结合其配体,并因此关于配体结合活性(例如结合其配体并触发或抑制共刺激)保持非活性。抑制这种相互作用可导致破坏涉及所述相互作用的一个或多个分子的活性。为了增强这种相互作用,可延长所述物理接触或增加其可能性,以及延长所述活性或增加其可能性。

[0110] “经分离蛋白质”是指基本上不含其他蛋白质、细胞材料、分离介质和培养基(在从细胞分离或通过重组DNA技术产生时)或化学前体或其他化学物质(在以化学方式合成时)的蛋白质。“经分离”或“经纯化”蛋白质或其生物活性部分基本上不含来自细胞或组织来源(从其衍生抗体、多肽、肽或融合蛋白)的细胞材料或其他污染蛋白或基本上不含化学前体或其他化学物质(在以化学方式合成时)。术语“基本上不含细胞材料”包括生物标志物多肽或其片段的制剂,其中蛋白质与从其分离或以重组方式产生的细胞的细胞组分分离。在一个实施方案中,术语“基本上不含细胞材料”包括生物标志物蛋白或其片段的制剂,其具有小于约30％(以干重计)非生物标志物蛋白(在本文中也称为“污染蛋白质”)、更优选小于约20％非生物标志物蛋白、仍更优选小于约10％非生物标志物蛋白并且最优选小于约5％非生物标志物蛋白。在抗体、多肽、肽或融合蛋白或其片段(例如其生物活性片段)是以重组方式产生时,其还优选地基本上不含培养基,即,培养基占蛋白质制剂的体积的小于约20％、更优选小于约10％并且最优选小于约5％。

[0111] 术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如IgM、IgG1、IgG2C等)。

[0112] 术语“K_D”旨在是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。可通过标准抗体-抗

原测定(例如竞争性测定、饱和测定或标准免疫测定如ELISA或RIA)来测量或测定所公开发明的抗体的结合亲和力。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段对目标生物标志物(例如表1中列出的一种或多种生物标志物)的K_D可以是约0.002至约200nM。在一些实施方案中,结合亲和力为约250nM、200nM、约100nM、约50nM、约45nM、约40nM、约35nM、约30nM、约25nM、约20nM、约15nM、约10nM、约8nM、约7.5nM、约7nM、约6.5nM、约6nM、约5.5nM、约5nM、约4nM、约3nM、约2nM、约1nM、约500pM、约100pM、约60pM、约50pM、约20pM、约15pM、约10pM、约5pM、约2pM或更小中的任一者。在一些实施方案中,结合亲和力小于约250nM、约200nM、约100nM、约50nM、约30nM、约20nM、约10nM、约7.5nM、约7nM、约6.5nM、约6nM、约5nM、约4.5nM、约4nM、约3.5nM、约3nM、约2.5nM、约2nM、约1.5nM、约1nM、约500pM、约100pM、约50pM、约20pM、约10pM、约5pM或约2pM或更小中的任一者,或其间的任何范围,例如约5nM至约35nM。

[0113] 术语"kd"或"k_{off}"是指抗体从抗体/抗原复合物解离的脱离速率常数。kd值是每秒衰变或解离的复合物分数的数字表示,并且以单位sec^{-1}表示。

[0114] 术语"ka"或"k_{on}"是指抗体与抗原缔合的结合速率常数。ka值是1摩尔浓度(1M)的抗体和抗原溶液中每秒形成的抗体/抗原复合物数量的数字表示,并且以单位$M^{-1}sec^{-1}$表示。

[0115] 术语"微环境"通常是指目标组织区域中的局部区域并且可例如是指"肿瘤微环境"。术语"肿瘤微环境"或"TME"是指始终与肿瘤细胞相互作用的周围微环境,其有助于容许肿瘤细胞与其环境之间的串扰。肿瘤微环境可包括肿瘤、周围血管、免疫细胞、纤维母细胞、骨髓源炎性细胞、淋巴细胞、信号传导分子和细胞外基质的细胞环境。肿瘤环境可包括由肿瘤微环境辅助和影响以确保生长和存活的肿瘤细胞或恶性细胞。肿瘤微环境还可包括肿瘤浸润性免疫细胞如淋巴样细胞和髓系细胞,其可刺激或抑制抗肿瘤免疫反应,和基质细胞如肿瘤相关性纤维母细胞和内皮细胞,其有助于肿瘤的结构完整性。基质细胞可包括构成肿瘤相关性血管的细胞,例如内皮细胞和外周细胞,它们是有助于结构完整性的细胞(纤维母细胞),以及肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和浸润性免疫细胞,包括单核细胞、嗜中性粒细胞(PMN)、树突状细胞(DC)、T细胞和B细胞、肥大细胞和自然杀伤(NK)细胞。基质细胞构成肿瘤细胞的主体,而实体肿瘤中的主要细胞类型是巨噬细胞。

[0116] 术语"调节"及其语法等效形式是指增加或降低(例如沉默),换句话说上调或下调。

[0117] 生物标志物的"正常"表达水平是生物标志物在未患有癌症的受试者(例如人类患者)的细胞中的表达水平。

[0118] 生物标志物的"过表达"或"显著较高表达水平"是指测试样品中的表达水平大于用于评价表达的测定的标准误差,并且优选地高于对照样品(例如来自未患有生物标志物相关疾病的健康受试者的样品)中生物标志物的表达活性或水平并且优选地若干对照样品中的平均生物标志物表达水平至少10%并且更优选地1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更多倍。生物标志物的"显著较低表达水平"是指测试样品中的表达水平低于对照样品(例如来自未患有生物标志物相关疾病的健康受试者的样品)中生物标志物的表达水平并且优选地若干对照样品中的

平均生物标志物表达水平至少10％并且更优选地1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更多倍。

[0119] 这样的“显著性”水平还可适用于本文所述的任何其他测量参数，例如表达、抑制、细胞毒性、细胞生长等。

[0120] 术语“外周血细胞亚型”是指通常发现于外周血中的细胞类型，包括但不限于嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、颗粒细胞和B细胞。

[0121] 术语“多肽片段”或“片段”，当关于参考多肽使用时，是指其中氨基酸残基与参考多肽本身相比缺失但其中剩余的氨基酸序列通常与参考多肽中的相应位置相同的多肽。此类缺失可发生在参考多肽的氨基末端、内部或羧基末端，或两者皆有。片段通常为至少5、6、8或10个氨基酸长，至少14个氨基酸长，至少20、30、40或50个氨基酸长，至少75个氨基酸长，或者至少100、150、200、300、500或更多个氨基酸长。它们可以是例如至少和/或包括10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、520、540、560、580、600、620、640、660、680、700、720、740、760、780、800、820、840、860、880、900、920、940、960、980、1000、1020、1040、1060、1080、1100、1120、1140、1160、1180、1200、1220、1240、1260、1280、1300、1320、1340或更多个氨基酸长，只要它们小于全长多肽的长度即可。或者，它们可以不长于和/或排除这样的范围，只要它们小于全长多肽的长度即可。

[0122] 术语“预定”生物标志物量和/或活性测量可为用于(仅举例来说)以下用途的生物标志物量和/或活性测量：评估可选择用于特定治疗的受试者，评估对治疗(例如本文所述的一种或多种生物标志物的一种或多种调节剂)的反应，和/或评估疾病状态。预定生物标志物量和/或活性测量可在患者群体(例如患有或未患癌症者)中确定。预定生物标志物量和/或活性测量可为同等适用于每一患者的单一数值，或预定生物标志物量和/或活性测量可根据患者的特定亚群而有所变化。受试者的年龄、体重、身高和其他因素可影响个体的预定生物标志物量和/或活性测量。此外，可个别地测定每个受试者的预定生物标志物量和/或活性。在一个实施方案中，在本文所述方法中所测定和/或比较的量是基于绝对测量。在另一个实施方案中，本文所述方法中所测定和/或比较的量是基于相对测量，例如比率(例如，细胞比率或相对于管家生物标志物或另外通常恒定的生物标志物的表达归一化的血清生物标志物)。预定生物标志物量和/或活性测量可为任何合适标准。例如，可从评价患者选择的相同或不同人类获得预定生物标志物量和/或活性测量。在一个实施方案中，可从同一患者的先前评价获得预定生物标志物量和/或活性测量。以这种方式，可随时间监测患者选择的进展。另外，如果受试者是人类，则可从另一人或多人(例如所选人类组)的评价获得对照。以这种方式，可将评价选择的人类选择程度与合适的其他人(例如与目标人类处于类似情况下的其他人，例如患有类似或相同疾患和/或属相同种族者)进行比较。

[0123] 术语“预测”包括使用生物标志物核酸和/或蛋白质状态(例如肿瘤在疗法之前、期间或之后的过度活性或活性不足、出现、表达、生长、缓解、复发或抗性)来测定期望情形的可能性。生物标志物的这种预测用途可通过例如以下各项来证实：(1)增加或降低的拷贝数(例如通过FISH、FISH+SKY、单分子测序(例如如本领域至少在J.Biotechnol.,86:289-301中所述)或qPCR)，生物标志物核酸的过表达或表达不足(例如通过ISH、Northern印迹或

qPCR)，增加或降低的生物标志物蛋白(例如通过IHC)，或例如在大于约5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、20％、25％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、100％或更多的所测定人类癌症类型或癌症样品中的增加或降低的活性；(2)生物样品(例如来自患有癌症的受试者(例如人类)的含有组织、全血、血清、血浆、颊部刮片、唾液、脑脊髓液、尿液、粪便或骨髓的样品)中的其绝对或相对经调节存在或不存在；(3)癌症患者(例如对T细胞介导的细胞毒性的特定调节剂(单独或与免疫疗法组合)具有反应者或对其产生抗性者)的临床子集中的其绝对或相对经调节存在或不存在。

[0124] 术语“预防”、“预防性治疗”等是指降低未患但具有患上疾病、病症或疾患的风险或易患疾病、病症或疾患的受试者患上疾病、病症或疾患的可能性。

[0125] 术语“探针”是指任何能够选择性结合至特定预期靶分子(例如由生物标志物核酸编码或对应于其的核苷酸转录物或蛋白质)的分子。探针可由本领域技术人员合成，或衍生自适当生物制剂。出于检测靶分子的目的，探针可被特定设计以进行标记，如本文所述。可用作探针的分子的实例包括但不限于RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0126] 术语“预后”包括对癌症可能的病程和结果或从疾病中恢复的可能性的预测。在一些实施方案中，统计算法的使用提供了个体癌症的预后。例如，预后可以是手术、癌症(例如实体肿瘤，例如肺癌、黑色素瘤和肾细胞癌)的临床亚型的发展、一种或多种临床因素的发展、肠癌的发展或从疾病恢复。

[0127] 术语“比率”是指两个数值(例如评分、总和等)之间的关系。尽管比率可以特定顺序来表示(例如a对b或a:b)，但本领域普通技术人员将认识到，数值之间的潜在关系可以任何顺序来表示而不损失潜在关系的显著性，但是基于所述比率的观测和趋势关联可逆转。

[0128] 术语“重排的”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型，其中V区段在基本上分别编码完整V_H和V_L结构域的构象中紧邻D-J或J区段定位。可通过与种系DNA比较来鉴定重排的免疫球蛋白基因座；重排的基因座将具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源元件。相比之下，关于V区段的术语“未重排”或“种系构型”是指其中V区段没有重组以与D或J区段直接相邻的构型。

[0129] 术语“受体”是指通常存在于靶器官、组织或细胞类型的细胞表面上的天然存在的分子或分子复合物。

[0130] 术语“癌症反应”、“对免疫疗法的反应”或“对T细胞介导的细胞毒性的调节剂/免疫疗法组合疗法的反应”涉及过度增殖性病症(例如癌症)对癌症药剂(例如T细胞介导的细胞毒性的调节剂和免疫疗法)的任何反应，优选地涉及在开始新辅助或辅助疗法之后肿瘤质量和/或体积的变化。术语“新辅助疗法”是指在主要治疗之前给予的治疗。新辅助疗法的实例可包括化学疗法、放射疗法和激素疗法。可例如针对功效或在新辅助或辅助情况下来评价过度增殖性病症反应，其中可将全身性干预后的肿瘤大小与初始大小和尺寸进行比较，如通过CT、PET、乳房X光摄影片、超声波或触诊所测量。还可通过在活检或手术切除术之后肿瘤的测径器测量或病理学检查来评价反应。反应可以定量方式(如肿瘤体积的变化百分比)或以定性方式(如“病理完全反应”(pCR)、“临床完全缓解”(cCR)、“临床部分缓解”(cPR)、“临床稳定疾病”(cSD)、“临床进展性疾病”(cPD)或其他定性标准)来记录。可在开始新辅助或辅助疗法之后早期(例如在数小时、数天、数周之后或优选地在数月之后)评价过度增殖性病症反应。反应评价的典型终点是在终止新辅助化学疗法时或在手术去除残余肿

瘤细胞和/或肿瘤床时。这通常是在开始新辅助疗法之后三个月。在一些实施方案中，可通过测量临床受益率(CBR)来测定本文所述治疗性治疗的临床功效。通过测定在从结束疗法起至少6个月的时间点完全缓解(CR)的患者百分比、部分缓解(PR)的患者数和患有稳定疾病(SD)的患者数的总和来测量临床受益率。该式简写为CBR＝超过6个月的CR+PR+SD。在一些实施方案中，特定癌症治疗方案的CBR为至少25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％或更高。用于评估对癌症疗法的反应的其他标准与“存活”相关，其包括所有下列各项：直至死亡的存活率，也称为总体存活率(其中所述死亡可不论何原因或与肿瘤有关)；“无复发存活”(其中术语复发应包括局部复发和远端复发)；无转移存活；无疾病存活(其中术语疾病应包括癌症和与其相关的疾病)。可通过参照所定义起点(例如诊断或开始治疗的时间)和端点(例如死亡、复发或转移)来计算所述存活的持续时间。另外，治疗功效的标准可扩展至包括对化学疗法的反应、存活机率、给定时间段内的转移机率和肿瘤复发机率。例如，为测定适当阈值，可向受试者群体施用特定癌症治疗方案并且结果可与在施用任何癌症疗法之前测得的生物标志物测量相关。结果测量可为对在新辅助设置中给予的疗法的病理学反应。或者，可在已知生物标志物测量值的癌症疗法后一定时间段内监测受试者的结果测量(例如整体存活率和无疾病存活)。在某些实施方案中，所施用剂量是本领域已知用于癌症治疗剂的标准剂量。监测受试者的时间段可有所变化。例如，可监测受试者至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。可使用本领域众所周知的方法(例如实施例部分中所述者)来测定与癌症疗法结果相关的生物标志物测量阈值。

[0131] 如所示，所述术语还可指改善的预后，例如，如通过增加的复发时间(其为至第一次复发的时段，其针对作为第一事件的第二原发性癌症或无复发迹象的死亡设限)或增加的总体存活率(其为从治疗至因任何原因死亡的时段)所反映。作出反应或具有反应意指，在暴露于刺激物时达到有益终点。或者，在暴露于刺激物时，最小化、减轻或减弱阴性或有害症状。应了解，评估肿瘤或受试者表现出有益反应的可能性等效于评估肿瘤或受试者不表现出有益反应(即表现出反应缺乏或为无反应性)的可能性。

[0132] 术语“抗性”是指癌症样品或哺乳动物对癌症疗法的获得性或天然抗性(即对治疗性治疗无反应或具有降低或有限的反应)，例如对治疗性治疗的反应降低5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、100％或更高(例如2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或更高)或其间的任何范围(包括端值)。可通过以下方式来测量反应降低：与在获得抗性之前的相同癌症样品或哺乳动物进行比较，或与已知对治疗性治疗无抗性的不同癌症样品或哺乳动物进行比较。对于化学疗法的典型获得性抗性被称为“多药耐药性”。多药耐药性可由P-糖蛋白介导或可由其他机制介导，或者其可出现于在哺乳动物感染多药耐药性微生物或微生物组合时。治疗性治疗抗性的测定在本领域中是常规的并且在普通技术临床医师的技能范围内，例如可通过细胞增殖性测定和细胞死亡测定(如在本文中阐述为“敏化”)来测量。在一些实施方案中，术语“逆转抗性”意指，与仅一级癌症疗法(例如化学治疗或放射疗法)不能统计学显著性减小肿瘤体积(与未治疗肿瘤的肿瘤体积相比)的情况中未治疗肿瘤的肿瘤体积相比，使用第二剂与一级癌症疗法(例如化学治疗或放射疗法)的组合能够以统计学显著水平(例如$p<0.05$)显著减小肿瘤体积。这通常适用于在未治疗肿瘤以对数节奏生长时进行的肿瘤体积测量。

[0133] 术语用于检测或测定至少一种生物标志物的存在或水平的“样品”通常是脑组织、脑脊髓液、全血、血浆、血清、唾液、尿液、粪便(例如大便)、眼泪和任何其他体液(例如如上文在“体液”的定义下所述)或组织样品(例如活检)如小肠、结肠样品或手术切除术组织。在某些情况下,本发明所涵盖的方法还包括从个体获得样品,然后检测或测定样品中的至少一种标志物的存在或水平。

[0134] 术语“敏化”意指改变癌细胞或肿瘤细胞以容许更有效地使用癌症疗法(例如抗免疫检查点疗法、化学治疗疗法和/或放射疗法)治疗相关癌症。在一些实施方案中,正常细胞并不受影响至导致正常细胞由疗法过度损伤的程度。根据本领域已知用于特定治疗的方法和下文所述方法来测量关于治疗性治疗的增加的敏感性或降低的敏感性,所述方法包括但不限于细胞增殖性测定(Tanigawa等人(1982)Cancer Res.42:2159-2164)和细胞死亡测定(Weisenthal等人(1984)Cancer Res.94:161-173;Weisenthal等人(1985)Cancer Treat Rep.69:615-632;Weisenthal等人,Kaspers G J L,Pieters R,Twentyman P R,Weisenthal LM,Veerman A J P编辑,Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma.Langhorne,P A:Harwood Academic Publishers,1993:415-432;Weisenthal(1994)Contrib.Gynecol.Obstet.19:82-90)。还可在动物中通过测量一定时间段(例如对于人类为6个月并且对于小鼠为4-6周)内的肿瘤大小减小来测量敏感性或抗性。如果与在不存在组合物或方法下的治疗敏感性或抗性相比治疗敏感性增加或抗性减小5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更高(例如2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或更高)或其间的任何范围(包括端值),则所述组合物或方法使治疗性治疗反应敏化。关于治疗性治疗的敏感性或抗性的测定在本领域中是常规的并且在普通技术临床医师的技能范围内。应理解,本文所述的增强癌症疗法的功效的任何方法可同样适用于使过度增殖性或另外癌性细胞(例如抗性细胞)对癌症疗法敏感的方法。

[0135] 如应用于生物活性剂的术语“选择性调节剂”或“选择性调节”是指与脱靶细胞群体、信号传导活性等相比,所述药剂能够经由与靶标直接或间接相互作用来调节靶标(例如细胞群体、信号传导活性等)。例如,相较于蛋白质与另一结合伴侣间的另一相互作用和/或目标细胞群体上的这种相互作用,选择性抑制蛋白质与一种天然结合伴侣间的相互作用的药剂将所述相互作用抑制至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、105倍、110倍、120倍、125倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍、5000倍、5500倍、6000倍、6500倍、7000倍、7500倍、8000倍、8500倍、9000倍、9500倍、10000倍或更大或其间的任何范围(包括端值)(针对至少一种其他结合伴侣)。这些量度通常是以将相互作用/活性减半所需药剂的相对量的形式来表示。这些量度适用于任何其他选择性布置,例如核酸分子与一个或多个靶序列的结合。

[0136] 更通常来说,术语“选择性”是指优先作用或功能。术语“选择性”可针对相对于其他靶标在目标特定靶标中的优先效应来量化。例如,所测量变量(例如调节期望细胞中相对

于其他细胞的生物标志物表达、期望细胞相对于其他细胞的富集和/或缺失等)可在目标靶标中与非预期或不期望靶标相差10％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更大或其间的任何范围(包括端值)(例如50％至16倍)。可使用相同倍数分析来证实给定组织、细胞群体中的效应、所测量变量和/或所测量效应等(例如细胞比率、过度增殖性细胞生长速率或体积、细胞增殖速率等、细胞数量等)的量值。

[0137] 与之相比,术语“特异性”是指排他性作用或功能。例如,特异性调节蛋白质与一种结合伴侣之间的相互作用是指排他性调节所述相互作用,并且并不以任何显著性调节蛋白质与另一结合伴侣之间的相互作用。在另一实例中,抗体特异性结合预定抗原是指抗体能够结合至目标抗原而不结合至其他抗原。通常,当使用适当测定法,例如使用表面等离子体共振(SPR)技术在BIACORE®测定仪器中使用目标抗原作为分析物并且使用抗体作为配体测定时,抗体以大约小于1×10^{-7}M(例如大约小于10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M或甚至更低)的亲和力(K_D)结合。短语“识别抗原的抗体”和“特异性针对抗原的抗体”在本文中可与术语“特异性结合至抗原的抗体”互换使用。

[0138] 确定交叉反应性的方法包括如本文所述的标准结合测定法,例如使用表面等离子体共振(SPR)分析、流式细胞术分析等。

[0139] 术语“小分子”是本领域的术语并且包括小于约1000分子量或小于约500分子量的分子。在一个实施方案中,小分子不排他性地包含肽键。在另一个实施方案中,小分子并非寡聚的。可针对活性筛选的示例性小分子化合物包括但不限于肽、肽模拟物、核酸、碳水化合物、小有机分子(例如多聚乙酰)(Cane等人(1998)Science 282:63)和天然产物提取物文库。在另一个实施方案中,化合物是小有机非肽化合物。除非另外指示,否则所述术语旨在涵盖目标化学结构的所有立体异构体、几何异构体、互变异构体和同位素。

[0140] 术语“受试者”是指动物、脊椎动物、哺乳动物或人类,尤其是施用药剂以例如用于实验、诊断和/或治疗目的或获得样品或实施程序者。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人类、非人类灵长类动物、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、家养动物(例如牛、绵羊、猫、狗和马)或其他动物(例如骆马和骆驼)。在一些实施方案中,受试者是人类。在一些实施方案中,受试者是患有癌症的人类受试者。术语“受试者”与“患者”可互换。

[0141] 术语“存活”包括所有下列各项:直至死亡的存活率,也称为总体存活率(其中所述死亡可不论何原因或与肿瘤相关);“无复发存活”(其中术语复发应包括局部复发和远端复发);无转移存活;无疾病存活(其中术语疾病应包括癌症和与其相关的疾病)。可通过参照所定义起点(例如诊断或开始治疗的时间)和端点(例如死亡、复发或转移)来计算所述存活的持续时间。另外,治疗功效的标准可扩展至包括对化学疗法的反应、存活机率、给定时间段内的转移机率和肿瘤复发机率。

[0142] 术语“协同效应”是指两种或更多种药剂(例如表1中列出的生物标志物的调节剂和免疫疗法组合疗法)的组合效应,所述效应大于仅癌症药剂/疗法的单独效应的总和。

[0143] 术语“靶标”是指通过本文所述的药剂、组合物和/或制剂调节、抑制或沉默的基因或基因产物。靶标基因或基因产物包括野生型形式和突变形式。本发明所涵盖靶标的非限

制性、代表性列表提供于表1中。类似地，用作动词的术语“靶向”是指调节靶标基因或基因产物的活性。靶向可指上调或下调靶标基因或基因产物的活性。

[0144] 术语“治疗性作用”涵盖动物、特别是哺乳动物和更特别是人类中由药理学活性物质引起的局部或全身性作用。该术语由此意指旨在用于诊断、治愈、减轻、治疗或预防动物或人类的疾病或增强期望身体或精神发育和状况的任何物质。由该术语涵盖的预防性作用涵盖延迟或消除疾病或疾患的出现，延迟或消除疾病或疾患的症状的发作，减缓、终止或逆转疾病或疾患的进展，或它们的任何组合。

[0145] 术语药剂(包括包含这种药剂的组合物和/或制剂)的“有效量”或“有效剂量”是指例如在根据所选施用形式、途径和/或时间表递送至细胞或生物体时足以实现期望生物和/或药理学作用的量。如本领域技术人员所了解，特定药剂或组合物的绝对有效量可取决于例如以下因素而变化：期望生物或药理学终点、待递送的药剂、靶标组织等。本领域技术人员进一步应理解，在各个实施方案中，可以“有效量”与细胞接触或以单一剂量或经由使用多个剂量施用于受试者。术语“有效量”可为“治疗有效量”。

[0146] 术语“治疗有效量”是指在适用于任何医学治疗的合理益处/风险比下在动物中的至少细胞亚群中有效产生一些期望治疗作用的药剂量。可通过标准制药程序在例如用于测定LD_{50}和ED_{50}的细胞培养物或实验动物中来测定主题化合物的毒性和治疗功效。表现出大治疗指数的组合物是优选的。在一些实施方案中，可测量LD_{50}(致死剂量)并且其可为例如相对于不施用药剂使药剂减少至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％或更高。类似地，可测量ED_{50}(即实现半最大症状抑制的浓度)并且其可为例如相对于不施用药剂使药剂增加至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％或更高。同样，类似地，可测量IC_{50}(即对癌细胞实现半最大细胞毒性或细胞生长抑制作用的浓度)并且其可为例如相对于不施用药剂使药剂增加至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％或更高。在一些实施方案中，可将测定中的癌细胞生长抑制至少约10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或甚至100％。在另一个实施方案中，可实现实体恶性肿瘤减少至少约10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或甚至100％。

[0147] 更一般来说，术语“EC_{50}”是指药剂如抗体或其抗原结合片段诱导最大反应的50％的反应(例如体外和/或体内测定中的最大反应与基线反应之间的通道)的浓度。

[0148] 术语“耐受性”或“无反应性”包括细胞(例如免疫细胞)对刺激(例如经由活化受体或细胞因子的刺激)的抵抗性。无反应性可例如因暴露于免疫抑制剂或暴露于高剂量抗原而出现。若干独立方法可诱导耐受性。一种机制称为“无变应性”，其定义为细胞作为无反应性细胞留存于体内而非分化成具有效应功能的细胞的状态。这种抵抗性通常是抗原特异性的并且在停止暴露于耐受性抗原之后得以留存。例如，T细胞中的无变应性的特征在于缺乏细胞因子产生(例如IL-2)。T细胞无变应性出现于使T细胞暴露于抗原并且在不存在第二信号(共刺激信号)下接收第一信号(T细胞受体或CD-3介导的信号)时。在这些条件下，将细胞再暴露于相同抗原(即使再暴露发生于在共刺激多肽存在下)不能产生细胞因子并且因此

不能增殖。然而，如果与细胞因子(例如IL-2)一起培养，则无变应性T细胞可发生增殖。例如，还可通过缺乏T淋巴细胞的IL-2产生来观察T细胞无变应性，如通过ELISA或通过增殖测定使用指示细胞系所测量。或者，可使用报告基因构建体。例如，无变应性T细胞不能引发通过异源启动子在5'IL-2基因增强子的控制下或通过可发现于增强子内的AP1序列多聚体诱导的IL-2基因转录(Kang等人(1992)Science 257:1134)。另一机制被称为"耗竭"。T细胞耗竭是在许多慢性感染和癌症期间产生的T细胞功能障碍状态。它通过不良效应功能、抑制性受体的持续表达和不同于功能性效应或记忆T细胞的转录状态来定义。

[0149] "经转录多核苷酸"或"核苷酸转录物"是与全部或一部分成熟mRNA互补或同源的多核苷酸(例如mRNA、hnRNA、cDNA或所述RNA或cDNA的类似物)，其是通过转录生物标志物核酸和正常转录后处理(例如剪接，如果存在)RNA转录物和逆转录RNA转录物而制得。

[0150] 术语"治疗"是指目标疾患(例如疾病或病症)的治疗性管控或改善。治疗可包括但不限于向受试者施用药剂或组合物(例如药物组合物)。通常实施治疗以试图以有益于受试者的方式改变疾病(该术语用于指示需要或可能需要疗法的任何疾病、病症、综合征或不期望疾患)的过程。治疗作用可包括逆转、缓解疾病或所述疾病的一种或多种症状或表现，降低其严重程度，延迟其发作，治愈其，抑制其进展和/或减小其发生或复发的可能性。期望治疗作用包括但不限于预防疾病发生或复发，减轻症状，减弱疾病的任何直接或间接病理结果，预防转移，降低疾病进展速率，改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。可将治疗剂施用于患有疾病或相对于一般群体成员处于增加的发生疾病的风险下的受试者。在一些实施方案中，可将治疗剂施用于已患有疾病但不再显示疾病迹象的受试者。可施用药剂以例如减小明显疾病的复发可能性。可预防性施用治疗剂，即在发生疾病的任何症状或表现之前施用。"预防性治疗"是指向未发生疾病或未显示疾病迹象的受试者提供医学和/或手术管控以例如降低发生疾病的可能性或降低所发生疾病的严重程度。受试者可能已鉴定为处于发生疾病的风险下(例如相对于一般群体处于增加的风险下)或具有增加疾病发生可能性的风险因子。

[0151] 术语"无反应性"包括癌细胞对疗法的抵抗性或治疗性细胞(例如免疫细胞)对刺激(例如经由活化受体或细胞因子的刺激)的抵抗性。无反应性可例如因暴露于免疫抑制剂或暴露于高剂量抗原而出现。如本文所用，术语"无变应性"或"耐受性"包括对活化受体介导的刺激的抵抗性。这种抵抗性通常是抗原特异性的并且在停止暴露于耐受性抗原之后得以留存。例如，T细胞中的无变应性(与无反应性不同)的特征在于缺乏细胞因子产生(例如IL-2)。T细胞无变应性出现于使T细胞暴露于抗原并且在不存在第二信号(共刺激信号)下接收第一信号(T细胞受体或CD-3介导的信号)时。在这些条件下，将细胞再暴露于相同抗原(即使再暴露发生于在共刺激多肽存在下)不能产生细胞因子并且因此不能增殖。然而，如果与细胞因子(例如IL-2)一起培养，则无变应性T细胞可发生增殖。例如，还可通过缺乏通过T淋巴细胞的IL-2产生来观察T细胞无变应性，如通过ELISA或通过增殖测定使用指示细胞系所测量。或者，可使用报告基因构建体。例如，无变应性T细胞不能引发通过异源启动子在5'IL-2基因增强子的控制下或通过可发现于增强子内的AP1序列多聚体诱导的IL-2基因转录(Kang等人(1992)Science 257:1134)。

[0152] 术语"疫苗"是指用以生成用于预防和/或治疗疾病的免疫性的组合物。

[0153] 另外，在特定蛋白质的氨基酸序列与可编码所述蛋白质的核苷酸序列(如由遗传

密码(示于下文)所定义)之间存在已知并且确定的对应性。同样,在特定核酸的核苷酸序列与由所述核酸编码的氨基酸序列(如由遗传密码所定义)之间存在已知并且确定的对应性。

[0154] 遗传密码

[0155]	丙氨酸(Ala,A)	GCA,GCC,GCG,GCT
[0156]	精氨酸(Arg,R)	AGA,ACG,CGA,CGC,CGG,CGT
[0157]	天冬酰胺(Asn,N)	AAC,AAT
[0158]	天冬氨酸(Asp,D)	GAC,GAT
[0159]	半胱氨酸(Cys,C)	TGC,TGT
[0160]	谷氨酸(Glu,E)	GAA,GAG
[0161]	谷氨酰胺(Gln,Q)	CAA,CAG
[0162]	甘氨酸(Gly,G)	GGA,GGC,GGG,GGT
[0163]	组氨酸(His,H)	CAC,CAT
[0164]	异亮氨酸(Ile,I)	ATA,ATC,ATT
[0165]	亮氨酸(Leu,L)	CTA,CTC,CTG,CTT,TTA,TTG
[0166]	赖氨酸(Lys,K)	AAA,AAG
[0167]	甲硫氨酸(Met,M)	ATG
[0168]	苯丙氨酸(Phe,F)	TTC,TTT
[0169]	脯氨酸(Pro,P)	CCA,CCC,CCG,CCT
[0170]	丝氨酸(Ser,S)	AGC,AGT,TCA,TCC,TCG,TCT
[0171]	苏氨酸(Thr,T)	ACA,ACC,ACG,ACT
[0172]	色氨酸(Trp,W)	TGG
[0173]	酪氨酸(Tyr,Y)	TAC,TAT
[0174]	缬氨酸(Val,V)	GTA,GTC,GTG,GTT
[0175]	终止信号(末端)	TAA,TAG,TGA

[0176] 遗传密码的重要且众所周知的特征是其冗余性,由此,对于用于制备蛋白质的大部分氨基酸来说,可采用一种以上的编码核苷酸三联体(阐释于上文)。因此,许多不同核苷酸序列可编码给定氨基酸序列。这些核苷酸序列视为在功能上等效,这是因为它们在所有生物体中产生相同氨基酸序列(但某些生物体可相较于其他序列更有效地翻译一些序列)。此外,不时地,嘌呤或嘧啶的甲基化变体可发现于给定核苷酸序列中。这类甲基化不影响三核苷酸密码子与相应氨基酸之间的编码关系。

[0177] 鉴于前述内容,可使用编码生物标志物核酸(或其任何部分)的DNA或RNA的核苷酸序列通过使用遗传密码将DNA或RNA翻译成氨基酸序列以导出多肽氨基酸序列。同样,对于多肽氨基酸序列来说,可编码多肽的相应核苷酸序列可从遗传密码推断出(由于遗传密码的冗余性,这将产生用于任何给定氨基酸序列的多个核酸序列)。因此,在本文中描述和/或公开编码多肽的核苷酸序列应视为还包括描述和/或公开由核苷酸序列编码的氨基酸序列。类似地,在本文中描述和/或公开多肽氨基酸序列应视为还包括描述和/或公开可编码氨基酸序列的所有可能核苷酸序列。

[0178] II.单核细胞和巨噬细胞

[0179] 单核细胞是骨髓源免疫效应细胞,其循环于血液、骨髓和脾脏中并且在稳态条件

中具有有限的增殖。术语“髓系细胞”可指骨髓或脊髓中的颗粒细胞或单核细胞前体细胞，或类似于发现于骨髓或脊髓中的细胞者。所述髓系细胞谱系包括外周血中的循环单核细胞以及它们在成熟、分化和/或活化后所变成的细胞群体。这些群体包括非最终分化性髓系细胞、骨髓源抑制细胞和经分化巨噬细胞。经分化巨噬细胞包括非极化和极化巨噬细胞、静息和活化巨噬细胞。并非限制，骨髓样谱系还可包括粒细胞性前体、多形核源抑制细胞、经分化多形核白细胞、嗜中性粒细胞、颗粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、小神经胶质细胞、骨髓源抑制细胞、树突状细胞和红细胞。单核细胞发现于外周血单核细胞(PBMC)中，所述外周血单核细胞还包含其他造血细胞和免疫细胞(例如B细胞、T细胞、NK细胞等)。通过来自称为单核母细胞的造血干细胞前体的骨髓来产生单核细胞。单核细胞在免疫系统中具有两种主要功能：(1)它们可离开血流以在正常状态下补充驻留型巨噬细胞和树突状细胞(DC)，并且(2)它们可迅速迁移至组织中的感染部位并分裂/分化成巨噬细胞和炎性树突状细胞以响应于炎症信号诱发免疫反应。通常在染色涂片中通过大双叶核来鉴定单核细胞。单核细胞还表达在感染期间介导从血液至组织的迁移的趋化因子受体和病原体识别受体。它们产生炎性细胞因子并吞噬细胞。在一些实施方案中，根据CD11b+表达和/或CD14+表达来鉴定目标髓系细胞。

[0180] 如下文所详细阐述，单核细胞可分化成巨噬细胞。单核细胞还可例如经由细胞因子颗粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素4(IL-4)的作用分化成树突状细胞。一般来说，术语“单核细胞”涵盖未分化单核细胞以及由其分化的细胞类型(包括巨噬细胞和树突状细胞)。在一些实施方案中，术语“单核细胞”可指未分化单核细胞。

[0181] 巨噬细胞是炎症和先天性免疫反应的关键免疫效应物和调控因子。巨噬细胞是异质、组织驻留型、最终分化的先天性髓系细胞，其具有显著可塑性并且可响应于来自微环境的局部因子而改变其生理学，并且可承担从宿主防御至组织稳态的多种功能需求(Ginhoux等人(2016)Nat.Immunol.17:34-40)。巨噬细胞存在于身体中的实际上所有组织中。它们是组织驻留型巨噬细胞(例如驻留于肝中的库弗氏细胞(Kupffer cell))，或源自循环单核细胞前体(即单核细胞)，所述前体主要源自骨髓和脾储集器并且在稳态下或响应于炎症或其他刺激因子而迁移至组织中。例如，可将单核细胞从血液募集至组织以补充骨、肺泡(肺)、中枢神经系统、结缔组织、胃肠道、肝脏、脾脏和腹膜的组织特异性巨噬细胞。

[0182] 术语“组织驻留型巨噬细胞”是指实施组织特异性和/或显微解剖生态区位特异性功能(例如组织免疫监督、感染反应和炎症消退)和专用稳态功能的免疫细胞的异质群体。组织驻留型巨噬细胞源于胚胎的卵黄囊中并且成熟于发育中胎儿中的一个特定组织中，在此它们获得组织特异性作用并改变其基因表达概况。维持集落形成能力的组织驻留型巨噬细胞的局部增殖可直接在组织中产生成熟巨噬细胞的群体。还可根据其占据组织来鉴定组织驻留型巨噬细胞并加以命名。例如，脂肪组织巨噬细胞占据脂肪组织，库弗氏细胞占据肝组织，窦组织细胞占据淋巴结，肺泡巨噬细胞(尘细胞)占据肺泡，朗格汉斯细胞(Langerhans cell)占据皮肤和粘膜组织，产生巨细胞的组织细胞占据结缔组织，小神经胶质细胞占据中枢神经系统(CNS)组织，霍夫鲍尔细胞(Hofbauer cell)占据胎盘组织，肾小球内系膜细胞占据肾组织，破骨细胞占据骨组织，上皮样细胞占据肉芽肿，红髓巨噬细胞(窦内衬细胞)占据脾组织的红髓，腹膜腔巨噬细胞占据腹膜腔组织，lysomac细胞占据派伊尔斑(Peyer’s patch)组织，并且胰腺巨噬细胞占据胰腺组织。

[0183] 除在宿主中防御传染原和其他炎症反应外,巨噬细胞还可实施不同稳态功能,包括但不限于发育、伤口愈合和组织修复以及免疫反应调控。巨噬细胞首先识别为身体中经由吞噬作用来防御感染的吞噬细胞,它们是先天性免疫性的基本组分。响应于病原体和其他炎症刺激物,经活化巨噬细胞可吞食所感染细菌和其他微生物;刺激炎症并且将促炎分子的混合剂释放至这些细胞内微生物。在吞食病原体之后,巨噬细胞将病原性抗原呈递至T细胞以进一步激活用于防御的适应性免疫反应。示例性促炎分子包括细胞因子IL-1β、IL-6和TNF-α、趋化因子MCP-1、CXC-5和CXC-6以及CD40L。

[0184] 除有助于针对感染的宿主防御外,巨噬细胞还独立于其免疫反应关联性而发挥重要稳态作用。巨噬细胞是清除红细胞的巨大吞噬细胞并且所释放物质如铁和血红蛋白可再循环以供宿主再利用。这种清除过程是一种重要的代谢贡献,宿主离开其将不能生存。

[0185] 巨噬细胞还涉及去除生成于组织重塑期间的细胞碎片,并且快速且有效地清除发生细胞凋亡的细胞。据认为,巨噬细胞涉及经由清除凋亡细胞来实现稳态组织动态平衡。这些稳态清除过程通常是由巨噬细胞上的表面受体(包括清除剂受体、磷脂酰丝氨酸受体、凝血酶敏感蛋白受体、整联蛋白和补体受体)来介导。介导吞噬作用的这些受体不能转导诱导细胞因子-基因转录的信号或有效产生抑制信号和/或细胞因子。巨噬细胞的稳态功能独立于其他免疫细胞。

[0186] 巨噬细胞还可清除源自细胞创伤或其他细胞损害的细胞碎片/坏死细胞。巨噬细胞经由toll样受体(TLR)、细胞内模式识别受体和白介素-1受体(IL-1R)来检测存在于坏死细胞碎片中的内源性危险信号,大部分所述信号是经由衔接分子髓系分化一级反应基因88(MyD88)来传导。清除细胞碎片可显著改变巨噬细胞的生理学。清除坏死的巨噬细胞可发生显著生理学变化,包括改变表面蛋白的表达和产生细胞因子和促炎介体。巨噬细胞表面蛋白表达响应于这些刺激物的改变可潜在地用于鉴定这些经改变细胞的独特生物化学标志物。

[0187] 巨噬细胞在维持许多组织(例如白色脂肪组织、褐色脂肪组织、肝脏和胰腺)中的稳态方面具有重要功能。通过释放触发使组织细胞适应的变化级联的细胞信号传导分子,组织巨噬细胞可对组织中的条件变化迅速作出反应。例如,脂肪组织中的巨噬细胞响应于饮食变化(例如白色脂肪组织中的巨噬细胞)或暴露于冷温度(例如褐色脂肪组织中的巨噬细胞)来调控新脂肪细胞的产生。肝脏中的巨噬细胞(称为库弗氏细胞)响应于饮食变化来调控葡萄糖和脂质的分解。胰腺中的巨噬细胞可响应于高脂肪饮食来调控胰岛素产生。

[0188] 巨噬细胞还可有助于伤口愈合和组织修复。例如,巨噬细胞可响应于源自经损伤组织和细胞的信号而活化并且诱导组织修复反应以修复经损害组织(Minutti等人(2017)Science 356:1076-1080)。

[0189] 在胚胎发育期间,巨噬细胞还在组织重塑和器官发育中发挥关键作用。例如,驻留型巨噬细胞使新生小鼠心脏中的血管发育有效成形(Leid等人(2016)Circ.Res.118:1498-1511)。脑中的小神经胶质细胞可产生在胚胎发育期间引导发育中脑中的神经元和血管的生长因子。类似地,CD95L(一种由巨噬细胞产生的蛋白质)结合至小鼠胚胎的脑中神经元和发育中血管的表面上的CD95受体并且增加神经元和血管发育(Chen等人(2017)Cell Rep.19:1378-1393)。在无配体下,神经元以较小频率分支,并且所得成人脑表现出较小电活性。称为破骨细胞的单核细胞源细胞涉及骨发育,并且缺乏这些细胞的小鼠产生致密硬

化骨,这是被称为骨硬化症的罕见疾患。巨噬细胞也主导乳腺的发育并有助于早期产后期中的视网膜发育(Wynn等人(2013)Nature 49 6:445-455)。

[0190] 如上文所述,巨噬细胞调控免疫系统。除将抗原呈递至T细胞外,巨噬细胞还可在一些条件中向免疫细胞提供免疫抑制/抑制信号。例如,在睾丸中,巨噬细胞帮助产生保护性精子环境以免受免疫系统攻击。睾丸中的组织驻留型巨噬细胞产生防止针对精子的免疫细胞反应的免疫抑制分子(Mossadegh-Keller等人(2017)J.Exp.Med.214:10.1084/jem.20170829)。

[0191] 响应于不同环境信号并且与功能需求一致的巨噬细胞可塑性已产生多种巨噬细胞活化状态,包括连续功能状态的两个极端,即“经典活化”M1和“替代活化”M2巨噬细胞。

[0192] 术语“活化”是指髓系细胞已被充分刺激以诱导可检测细胞增殖和/或已被刺激以施加其效应功能的状态,所述效应功能例如经诱导的细胞因子表达和分泌、吞噬作用、细胞信号传导、抗原处理和呈递、靶细胞杀伤和促炎功能。

[0193] 术语“M1巨噬细胞”或“经典活化的巨噬细胞”是指具有促炎表型的巨噬细胞。术语“巨噬细胞活化”(也称为“经典活化”)由Mackaness在1960年代引入感染情形中以阐述在二次暴露于病原体后巨噬细胞针对BCG(卡介苗(bacillus Calmette-Guerin))和李斯特菌的抗原依赖性但非特异性增强的杀微生物活性(Mackaness(1962)J.Exp.Med.116:381-406)。后来,使所述增强与通过抗原激活免疫细胞的Th1反应和IFN-γ产生建立联系(Nathan等人(1983)J.Exp.Med.158:670-689)并且扩展至细胞毒性和抗肿瘤性质(Pace等人(1983)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.80:3782-3786;Celada等人(1984)J.Exp.Med.160:55-74)。因此,通过细胞因子分泌、抗原呈递、吞噬作用、细胞-细胞相互作用、迁移等增强炎症的任何巨噬细胞功能性可视为促炎性。体外和体内测定可测量不同终点:一般体外测量包括促炎细胞刺激,如通过增殖、迁移、促炎Th1细胞因子/趋化因子分泌和/或迁移所测量;而一般体内测量还包括分析病原体防治、组织损伤立即反应者、其他细胞活化剂、迁移诱导剂等。对于体外和体内二者,可评价促炎抗原呈递。细菌部分如脂多糖(LPS)、某些Toll样受体(TLR)激动剂、Th1细胞因子干扰素-γ(IFNγ)(例如由响应于应激和感染的NK细胞和具有持续产生的T辅助细胞产生的IFNγ)和TNF沿M1途径极化巨噬细胞。经活化M1巨噬细胞吞噬并破坏微生物,消除经损害细胞(例如肿瘤细胞和凋亡细胞),将抗原呈递至T细胞以用于增加适应性免疫反应,并产生高水平的促炎细胞因子(例如IL-1、IL-6和IL-23)、活性氧物质(ROS)和一氧化氮(NO),以及活化其他免疫和非免疫细胞。以表达可诱导一氧化氮合酶(iNOS)、活性氧物质(ROS)并产生Th1相关细胞因子IL-12为特征,M1巨噬细胞极适于促进强免疫反应。M1巨噬细胞代谢的特征在于增强的好氧性糖解,使葡萄糖转化成乳酸盐,增加的通过磷酸戊糖途径(PPP)的通量、脂肪酸合成和截短的三羧酸(TCA)循环,导致琥珀酸盐和柠檬酸盐的累积。

[0194] “1型”或“M1样”髓系细胞是能够有助于促炎反应的髓系细胞,其特征在于下列各项中的至少一者:通过分泌至少一种促炎细胞因子来产生炎性刺激物,在其表面上表达至少一种细胞表面活化分子/活化分子配体,募集/引导至少一种其他细胞(包括其他巨噬细胞和/或T细胞)/与其相互作用以刺激促炎反应,呈递促炎情形中的抗原,迁移至容许促炎反应开始的部位,或开始表达至少一种预计产生促炎功能性的基因。在一些实施方案中,所述术语包括活化细胞毒性CD8+T细胞,介导癌细胞对免疫疗法(例如免疫检查点疗法)的增

加的敏感性，和/或介导癌细胞的抗性逆转。在某些实施方案中，可以多种众所周知的方式来测量朝向促炎状态的这种调节，包括但不限于下列各项中的一者或多者：a)分化簇80(CD80)、CD86、MHCII、MHCI、白介素1-β(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF和/或肿瘤坏死因子α(TNF-α)增加；b)CD206、CD163、CD16、CD53、VSIG4、PSGL-1、TGFb和/或IL-10的表达和/或分泌减少；c)至少一种选自由IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18、GM-CSF、CCL3、CCL4和IL-23组成的组的细胞因子或趋化因子的分泌增加；d)IL-1β、IL-6和/或TNF-α的表达对IL-10表达的比率增加；e)CD8+细胞毒性T细胞活化增加；f)CD8+细胞毒性T细胞活化的募集增加；g)CD4+辅助T细胞活性增加；h)CD4+辅助T细胞活性的募集增加；i)NK细胞活性增加；j)NK细胞的募集增加；k)嗜中性粒细胞活性增加；l)巨噬细胞活性增加；和/或m)纺锤形形态、外观平坦性和/或树突数量增加，如通过显微术所评价。

[0195] 在已为促炎性的细胞中，增加的炎性表型是指更强的促炎状态。

[0196] 与之相比，术语“M2巨噬细胞”是指具有抗炎表型的巨噬细胞。Th2-和肿瘤源细胞因子(例如IL-4、IL-10、IL-13、转化生长因子β(TGF-β)或前列腺素E2(PGE2))可促进M2极化。M2巨噬细胞的代谢概况由OXPHOS、FAO、降低的糖解和PPP来定义。甘露糖受体由鼠类巨噬细胞中的Th2 IL-4和IL-13选择性增强并且诱导甘露糖基化配体的胞吞清除，增加主要组织相容性复合物(MHC)II类抗原表达并减少促炎细胞因子分泌的发现促使Stein、Doyle和同事提出，IL-4和IL-13诱导替代活化表型，所述替代活化表型是完全不同于IFN-γ活化但远未去活化的状态(Martinez和Gordon(2014)F1000 Prime Reports 6:13)。体外和体内定义/测定可测量不同终点：一般体外终点包括抗炎细胞刺激(通过增殖、迁移、抗炎Th2细胞因子/趋化因子分泌和/或迁移测量)；而一般体内M2终点还包括分析病原体防治、组织损伤延迟/促纤维化反应、其他细胞Th2极化、迁移诱导剂等。对于体外和体内二者，可评价促致耐受性抗原呈递。

[0197] “2型”或“M2样”髓系细胞是能够有助于抗炎反应的髓系细胞，其特征在于下列各项中的至少一者：通过分泌至少一种抗炎细胞因子来产生抗炎刺激物，在其表面上表达至少一种细胞表面抑制分子/抑制分子配体，募集/引导至少一种其他细胞/与其相互作用以刺激抗炎反应，呈递促致耐受性情形中的抗原，迁移至容许致耐受性反应开始的部位，或开始表达至少一种预计产生促致耐受性/抗炎功能性的基因。在某些实施方案中，可以多种众所周知的方式(包括但不限于与上述1型促炎状态测量相反者)来测量朝向促炎状态的这种调节。

[0198] 具有“增加的炎性表型”的细胞是在调节本发明所涵盖的至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)之后具有与以下相关的较大促炎反应能力者：a)所列出1型标准中的一者或多者的增加；和/或b)所列出2型标准中的一者或多者的降低，所述调节是例如接触调节本发明所涵盖的至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)的药剂。

[0199] 具有“降低的炎性表型”的细胞是在调节本发明所涵盖的至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)之后具有与以下相关的较大抗炎反应能力者：a)所列出1型标准中的一者或多者的降低；和/或b)所列出2型标准中的一者或多者的增加，所述调节是例如接触调节本发明所涵盖的至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)的药剂。

[0200] 因此,巨噬细胞可采用具有介于1型状态与2型状态之间的中间表型的替代活化状态的连续功能状态(参见例如Biswas等人(2010)Nat.Immunol.11:889-896;Mosser和Edwards(2008)Nat.Rev.Imm unol.8:958-969;Mantovani等人(2009)Hum.Immunol.70:325-330),并且可如上文所述来测定所述增加或降低的炎性表型。

[0201] 如本文所用,术语“替代活化的巨噬细胞”或“替代活化状态”是指除经典活化的M1促炎巨噬细胞外的基本上所有类型的巨噬细胞群体。最初,替代活化状态仅指定为M2型抗炎巨噬细胞。所述术语扩展至包括所有其他替代活化状态的巨噬细胞,其生物化学、生理学和功能性具有显著差异。

[0202] 例如,一类替代活化的巨噬细胞是涉及伤口愈合的巨噬细胞。响应于在组织损伤(例如手术伤口)期间释放的先天性和适应性信号(例如由嗜碱性粒细胞和肥大细胞产生的IL-4),可激活组织驻留型巨噬细胞以促进伤口愈合。伤口愈合巨噬细胞并不产生高水平的促炎细胞因子,而分泌大量细胞外基质组分(例如几丁质酶和几丁质酶样蛋白YM1/CHI3L3、YM2、AMCase和Stabilin),所有组分都表现出碳水化合物和基质结合活性并且涉及组织修复。

[0203] 替代活化的巨噬细胞的另一实例涉及调控性巨噬细胞,其可通过先天性免疫反应和适应性免疫反应诱导。调控性巨噬细胞可有助于免疫调控功能。例如,巨噬细胞可对来自下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的激素(例如糖皮质激素)作出反应以采用具有经抑制宿主防御和炎性功能(例如抑制促炎细胞因子的转录)的状态。调控性巨噬细胞可产生调控性细胞因子TGF-β以减弱某些条件中(例如在适应性免疫反应晚期)的免疫反应。许多调控性巨噬细胞可表达高水平的共刺激分子(例如CD80和CD86)并因此增强至T细胞的抗原呈递。

[0204] 许多刺激物/因子可诱导调控性巨噬细胞的极化。所述因子可包括但不限于TLR激动剂和免疫复合物、凋亡细胞、IL-10、前列腺素、GPcR配体、腺苷、多巴胺(dopamine)、组胺、神经鞘胺醇1-磷酸盐、黑皮质素、血管作用肠肽和Siglec-9的组合。一些病原体(例如寄生虫、病毒和细菌)可特异性诱导调控性巨噬细胞的分化,从而产生缺陷性病原体杀伤以及经感染微生物的增强的存活和传播。

[0205] 调控性巨噬细胞具有一些共有特征。例如,调控性巨噬细胞需要两种刺激物来诱导其抗炎活性。还观察到由不同因子/刺激物诱导的调控性巨噬细胞亚群具有差异,从而反映了其异质性。

[0206] 调控性巨噬细胞也是巨噬细胞的异质群体,包括发现于代谢中、发育期间、稳态维持中的各种亚群。在一个实例中,替代活化的巨噬细胞的亚群是具有独特免疫调控性质的免疫调控性巨噬细胞,其可在M-CSF/GM-CSF、CD16配体(例如免疫球蛋白)和IFN-γ存在下诱导(PCT申请公开第WO2017/153607号)。

[0207] 组织中的巨噬细胞可在体内随时间改变其活化状态。这种动态性反映了迁移中巨噬细胞至组织的恒定流入、活化巨噬细胞的动态变化和切换回静止状态的巨噬细胞。在一些条件中,环境中的不同信号可诱导巨噬细胞变成不同活化状态的混合物。例如,在具有慢性伤口的条件中,巨噬细胞可随时间包括促炎活化亚群、促伤口愈合性巨噬细胞和表现出一定促消退活性的巨噬细胞。在非病理学条件下,免疫刺激性巨噬细胞和免疫调控性巨噬细胞的平衡群体存在于免疫系统中。在一些疾病条件中,平衡被打破并且不平衡引起许多临床疾患。

[0208] 巨噬细胞的表观可塑性还使得其易于对其接收于疾病条件中的环境因子具有反应。巨噬细胞可响应于各种疾病条件发生再极化，从而显示不同特性。一个实例是被吸引并且从外周血单核细胞滤液浸入肿瘤组织中的巨噬细胞，其通常称为“肿瘤相关巨噬细胞”(“TAM”)或“肿瘤浸润性巨噬细胞”(“TIM”)。肿瘤相关巨噬细胞是肿瘤中的最丰富的炎性细胞并且对于大部分癌症来说在高TAM密度与较差预后之间存在显著关联(Zhang等人(2012)PloS One 7:e50946.10.1371/journ al.pone.0050946)。

[0209] TAM是M1样促炎亚群和M2样抗炎亚群的混合群体。在赘瘤形成的最早期，具有促炎表型的经典活化的巨噬细胞存在于常氧肿瘤区域中，并且被认为有助于经转化肿瘤细胞的早期清除。然而，随着肿瘤生长和进展，晚期肿瘤中的大部分TAM是驻留于肿瘤的低氧区域中的M2样调控性巨噬细胞。巨噬细胞的这种表型变化受肿瘤微环境刺激物(例如肿瘤细胞外基质、缺氧环境和由肿瘤细胞分泌的细胞因子)显著影响。M2样TAM显示伤口愈合性巨噬细胞和调控性巨噬细胞的混合活化状态，从而证实具有各种独特特性，包括产生高水平IL-10但几乎不产生IL-12，产生缺陷性TNF，抑制抗原呈递细胞和有助于肿瘤血管生成。

[0210] 通常，TAM的特征在于M2表型并且经由IL-10和IL-1β产生来抑制M1巨噬细胞介导的炎症。因此，TAM经由活化伤口愈合(即抗炎)途径(其提供用于增殖和侵袭的营养物和生长信号)来促进肿瘤生长和转移并且促进产生新血管(即血管生成)。另外，TAM通过分泌抗炎信号来有助于免疫抑制性肿瘤微环境，所述抗炎信号可防止免疫系统的其他组分识别并攻击肿瘤。已报道，在许多类型的癌症(例如乳腺癌、星形细胞瘤、头颈鳞状细胞癌、II型乳头状肾细胞癌、肺癌、胰腺癌、胆囊癌、直肠癌、神经胶质瘤、经典霍奇金淋巴瘤、卵巢癌和结直肠癌)中，TAM在促进癌症生长、增殖和转移方面发挥关键作用。一般来说，特征在于大群体TAM的癌症产生较差疾病预后。

[0211] 如果不适当调控，则各种功能和活化状态可具有危险后果。例如，如果过度活化，则经典活化的巨噬细胞可对宿主组织引起损害，易于损害周围组织并影响葡萄糖代谢。

[0212] 在许多疾病状况中，巨噬细胞活化状态的平衡动力学被打破并且不平衡会引起疾病。例如，肿瘤大量聚集巨噬细胞。巨噬细胞可发现于75％的癌症中。侵袭型癌症通常与巨噬细胞和其他免疫细胞的较高浸润相关。在大部分恶性肿瘤中，TAM施加若干肿瘤促进功能，包括促进癌细胞存活、增殖、侵袭、外渗和转移，刺激血管生成，重塑细胞外基质，以及抑制抗肿瘤免疫性(Qian和Pollard,2010,Cell,141(1):39-51)。它们还可产生生长促进分子，例如鸟氨酸、VEGF、EGF和TGF-β。

[0213] TAM响应于肿瘤微环境中所遇到的CSF1和IL4/IL13而刺激肿瘤生长和存活。TAM还可经由表达蛋白酶(例如MMP、组织蛋白酶和uPA)和基质重塑酶(例如赖氨酰基氧化酶和SPARC)来重塑肿瘤微环境。

[0214] TAM在调控肿瘤组织中的显著血管增加的肿瘤血管生成中发挥重要作用，肿瘤血管生成是肿瘤的恶性状态转变所需的。这些血管生成性TAM表达血管生成素受体TIE2并且分泌许多血管生成分子(包括VEGF家族成员、TNFα、IL1β、IL8、PDGF和FGF)。

[0215] 各种巨噬细胞亚群实施这些个别促肿瘤功能。这些TAM在不同肿瘤类型中具有不同的巨噬细胞浸润程度以及表型。例如，人类肝细胞癌的详细剖析显示根据解剖位置以及促肿瘤和抗肿瘤性质来定义的各种巨噬细胞亚型。已显示，M2样巨噬细胞是TAM的促肿瘤功能的主要资源。M2样TAM已显示可影响抗癌治疗功效，有助于疗法抗性，并且在常规癌症疗

法后介导肿瘤复发。

[0216] III.可用于调节髓系细胞炎性表型的靶标和生物标志物

[0217] 本发明涵盖生物标志物如SIGLEC-9,其可用于调节髓系细胞的炎性表型,以及相应的免疫反应(例如,增加抗癌巨噬细胞免疫疗法)。

[0218] SIGLEC-9的下调与炎性表型(例如,1型表型)的增加相关并导致炎性表型(例如,1型表型)的增加,而上调与炎性表型(例如,2型表型)的减少相关并导致炎性表型(例如,2型表型)的减少。

[0219] 本发明所涵盖的基因座和生物标志物(例如表1中列出的生物标志物)的核酸和氨基酸序列信息是本领域众所周知的并且易于在可公开获得的数据库(例如国家生物技术信息中心(NCBI))中获得。例如,下文提供源自可公开获得的序列数据库的示例性核酸和氨基酸序列。

[0220] 如下文进一步所论述,调节髓系细胞中的本发明所涵盖生物标志物的表达、翻译、降解、量、亚细胞定位和其他活性的药剂可用于调节这些细胞的炎性表型以及调节由这些细胞介导的免疫反应。

[0221] 尽管下文提供了人类序列的众多代表性直系同源物,但在一些实施方案中,人类生物标志物(包括其调节和调节剂)是优选的。对于一些生物标志物,据认为,人类中由此类生物标志物介导的免疫反应特别可用于考虑人类免疫系统与其他脊椎动物的免疫系统之间的差异。

[0222] 术语“SIGLEC9”是指唾液酸结合Ig样凝集素9,一种假定的粘附分子,其介导唾液酸依赖性的与细胞的结合。SIGLEC9优先结合于α-2,3-或α-2,6-连接的唾液酸。唾液酸识别位点可能被同一细胞表面上与唾液酸的顺式相互作用所掩盖。其相关途径包括先天免疫系统和I类MHC介导的抗原加工和呈递。在一些实施方案中,位于人类染色体19q上的SIGLEC9基因由12个外显子组成。来自黑猩猩、恒河猴和小鼠的直系同源物是已知的。生成了称为$Siglec^{tm1Croc}$的敲除小鼠系(McMillan等人,(2013)Blood 121(11):2084-2094)。在一些实施方案中,人类SIGLEC9蛋白具有463个氨基酸和/或具有50082Da的分子质量。在一些实施方案中,SIGLEC9蛋白含有一个拷贝的细胞质基序,其称为基于免疫受体酪氨酸的抑制剂基序(ITIM)。该基序涉及细胞反应的调节。磷酸化的ITIM基序可结合几种含SH2的磷酸酶的SH2结构域。

[0223] 术语“SIGLEC9”旨在包括其片段、变体(例如等位基因变体)和衍生物。代表性人类SIGLEC9 cDNA和人类SIGLEC9蛋白序列是本领域众所周知的并且可从国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得(参见例如ncbi.nlm.nih.gov/gene/27180)。例如,已知至少两种不同人类SI GLEC9同工型。人类SIGLEC9同工型1(NP_001185487.1)可由转录物变体1(NM_001198558.1,其为较长转录物)编码。人类SIGLEC9同工型2(NP_055256.1)可由转录物变体2(NM_014441.2)编码,所述转录物变体与同工型1相比的区别在于3’UTR和3’编码区。所编码同工型2相比于同工型1较短并且具有不同的C末端。除人类外的生物体中的SIGLEC9直系同源物的核酸和多肽序列是众所周知的并且包括例如黑猩猩SIGLEC9(XM_024351618.1和XP_024207386.1,以及XM_003316566.5和XP_003316614.2)、恒河猴SIGLEC9(XM_015124691.1和XP_014980177.1、XM_001114560v.3和XP_001114560.2、XM_015124692.1和XP_014980178.1)以及小鼠SIGLEC9(NM_031181.2和NP_112458.2)。SIGLEC9直系同源物的

代表性序列呈现于下文的表1中。

[0224] 适于检测SIGLEC9蛋白的抗SIGLEC9抗体是本领域众所周知的，并且包括例如抗体MAB1139和AF1139(R&D systems,Minneapolis,MN)，抗体MAB1139、NBP1-47969、AF1139、NBP2-27070和NBP1-85755(Novus Biologicals,Littleton,CO)，抗体ab89484、ab96545和ab197981(AbCam,Cambridge,MA)，抗体目录#:CF500382和TA500382(Origene,Rockville,MD)等。另外，用于检测SIGLEC9表达的试剂是众所周知的。多个SIGLEC9临床测试可在NIH Genetic Testing Registry(GTR®)中获得(例如GTR测试ID:GTR000547533.2，由Fulgent Clinical Diagnostics Lab(Temple City,CA)提供)。此外，用于减少SIGLEC9表达的多种siRNA、shRNA、CRISPR构建体可见于上文所提及公司的商业产品列表中，例如来自Origene Technologies(Rockville,MD)的siRNA产品#SR309022、shRNA产品#TG309443、TL309443和CRISPR产品#KN206674，来自Santa Cruz的CRISPR gRNA产品(sc-406675和sc-406675-KO-2)，以及来自Santa Cruz的RNAi产品(目录#sc-106550和sc-153462)。应注意，所述术语还可用于指本文关于SIGLEC9分子所述特征的任何组合。例如，可使用序列组成、同一性百分比、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合来阐述本发明所涵盖的SIGLEC9分子。

[0225] 表1

[0226] SIGLEC-9

[0227] 人类和/或食蟹猴SIGLEC-9

[0228] SEQ ID NO:1人类SIGLEC9转录物变体1cDNA序列(NM_001198558.1;CDS:96-1535)

[0229]
```
   1 tagggcctcc tctaagtctt gagcccgcag ttcctgagag aagaaccctg aggaacagac
  61 gttccctcgc ggccctggca cctctaaccc cagacatgct gctgctgctg ctgccctgc
 121 tctgggggag ggagagggcg gaaggacaga caagtaaact gctgacgatg cagagttccg
 181 tgacggtgca ggaaggcctg tgtgtccatg tgccctgctc cttctcctac ccctcgcatg
 241 gctggattta ccctggccca gtagttcatg gctactggtt ccgggaaggg gccaatacag
 301 accaggatgc tccagtggcc acaaacaacc cagctcgggc agtgtgggag gagactcggg
 361 accgattcca cctccttggg gacccacata ccaagaattg caccctgagc atcagagatg
 421 ccagaagaag tgatgcgggg agatacttct ttcgtatgga gaaaggaagt ataaaatgga
 481 attataaaca tcaccggctc tctgtgaatg tgacagcctt gacccacagg cccaacatcc
 541 tcatcccagg caccctggag tccggctgcc cccagaatct gacctgctct gtgccctggg
 601 cctgtgagca ggggacaccc cctatgatct cctggatagg gacctccgtg tccccctgg
 661 acccctccac cacccgctcc tcggtgctca ccctcatccc acagccccag gaccatggca
 721 ccagcctcac ctgtcaggtg accttccctg gggccagcgt gaccacgaac aagaccgtcc
 781 atctcaacgt gtcctacccg cctcagaact tgaccatgac tgtcttccaa ggagacggca
 841 cagtatccac agtcttggga aatggctcat ctctgtcact cccagagggc cagtctctgc
 901 gcctggtctg tgcagttgat gcagttgaca gcaatccccc tgccaggctg agcctgagct
 961 ggagaggcct gaccctgtgc ccctcacagc cctcaaaccc gggggtgctg gagctgcctt
1021 gggtgcacct gagggatgca gctgaattca cctgcagagc tcagaaccct ctcggctctc
1081 agcaggtcta cctgaacgtc tccctgcaga gcaaagccac atcaggagtg actcaggggg
1141 tggtcggggg agctggagcc acagccctgg tcttcctgtc cttctgcgtc atcttcgttg
1201 tagtgaggtc ctgcaggaag aaatcggcaa ggccagcagc gggcgtggga gatacgggca
1261 tagaggatgc aaacgctgtc aggggttcag cctctcagat cttgaatcat tttattggat
1321 ttcctacatt ccttggactg ggtttcgagt ttctcctgaa tctccgtgat ctttgttgcc
1381 atccagattc tgaattctat gtctatcatt tcagtcattt cagactcatt aagaacattg
1441 ctggggagat agtgtggtca cttgaaggta aaatactctg gcttttggat gtgtcagatt
1501 tctttcactg gttcttcctc atctgtgtgg gctgatgttc ctttaatctt tgaagttgct
1561 gttctttgga tagggctctt tgcttttata ttctctgatg
```

[0230] SEQ ID NO:2人类SIGLEC9同工型1氨基酸序列(NP_001185487.1)

[0231]

```
  1 mllllllpllw greraegqts klltmqssvt vqeglcvhvp csfsypshgw iypgpvvhgy
 61 wfregantdq dapvatnnpa ravweetrdr fhllgdphtk nctlsirdar rsdagryffr
121 mekgsikwny khhrlsvnvt althrpnili pgtlesgcpq nltcsvpwac eqgtppmisw
181 igtsvspldp sttrssvltl ipqpqdhgts ltcqvtfpga svttnktvhl nvsyppqnlt
241 mtvfqgdgtv stvlgngssl slpegqslrl vcavdavdsn pparlslswr gltlcpsqps
301 npgvlelpwv hlrdaaeftc raqnplgsqq vylnvslqsk atsgvtqgvv ggagatalvf
361 lsfcvifvvv rscrkksarp aagvgdtgie danavrgsas qilnhfigfp tflglgfefl
421 lnlrdlcchp dsefyvyhfs hfrlikniag eivwslegki lwlldvsdff hwfflicvg
```

[0232] SEQ ID NO:3人类SIGLEC9转录物变体2 cDNA序列(NM_014441.2;CDS:96-1487)

[0233]

```
   1 tagggcctcc tctaagtctt gagcccgcag ttcctgagag aagaaccctg aggaacagac
  61 gttccctcgc ggccctggca cctctaaccc cagacatgct gctgctgctg ctgcccctgc
 121 tctgggggag ggagagggcg gaaggacaga caagtaaact gctgacgatg cagagttccg
 181 tgacggtgca ggaaggcctg tgtgtccatg tgccctgctc cttctcctac ccctcgcatg

 241 gctggattta ccctggccca gtagttcatg gctactggtt ccgggaaggg gccaatacag
 301 accaggatgc tccagtggcc acaaacaacc cagctcgggc agtgtgggag gagactcggg
 361 accgattcca cctccttggg gacccacata ccaagaattg caccctgagc atcagagatg
 421 ccagaagaag tgatgcgggg agatacttct ttcgtatgga gaaaggaagt ataaaatgga
 481 attataaaca tcaccggctc tctgtgaatg tgacagcctt gacccacagg cccaacatcc
 541 tcatcccagg caccctggag tccggctgcc cccagaatct gacctgctct gtgccctggg
 601 cctgtgagca ggggacaccc cctatgatct cctggatagg gacctccgtg tccccctgg
 661 acccctccac cacccgctcc tcggtgctca ccctcatccc acagccccag gaccatggca
 721 ccagcctcac ctgtcaggtg accttccctg gggccagcgt gaccacgaac aagaccgtcc
 781 atctcaacgt gtcctacccg cctcagaact tgaccatgac tgtcttccaa ggagacggca
 841 cagtatccac agtcttggga aatggctcat ctctgtcact cccagagggc cagtctctgc
 901 gcctggtctg tgcagttgat gcagttgaca gcaatccccc tgccaggctg agcctgagct
 961 ggagaggcct gaccctgtgc ccctcacagc cctcaaaccc gggggtgctg gagctgcctt
1021 gggtgcacct gagggatgca gctgaattca cctgcagagc tcagaaccct ctcggctctc
1081 agcaggtcta cctgaacgtc tccctgcaga gcaaagccac atcaggagtg actcaggggg
1141 tggtcggggg agctggagcc acagccctgg tcttcctgtc cttctgcgtc atcttcgttg
1201 tagtgaggtc ctgcaggaag aaatcggcaa ggccagcagc gggcgtggga gatacgggca
1261 tagaggatgc aaacgctgtc aggggttcag cctctcaggg gcccctgact gaaccttggg
1321 cagaagacag tcccccagac cagcctcccc cagcttctgc ccgctcctca gtgggggaag
1381 gagagctcca gtatgcatcc ctcagcttcc agatggtgaa gccttgggac tcgcggggac
1441 aggaggccac tgacaccgag tactcggaga tcaagatcca cagatgagaa actgcagaga
1501 ctcaccctga ttgagggatc acagcccctc caggcaaggg agaagtcaga ggctgattct
1561 tgtagaatta acagccctca acgtgatgag ctatgataac actatgaatt atgtgcagag
1621 tgaaaagcac acaggcttta gagtcaaagt atctcaaacc tgaatccaca ctgtgccctc
1681 ccttttattt ttttaactaa aagacagaca aattcctaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
```

[0234] SEQ ID NO:4人类SIGLEC9同工型2氨基酸序列(NP_055256.1)

[0235]

```
  1 mllllllpllw greraegqts klltmqssvt vqeglcvhvp csfsypshgw iypgpvvhgy
 61 wfregantdq dapvatnnpa ravweetrdr fhllgdphtk nctlsirdar rsdagryffr
121 mekgsikwny khhrlsvnvt althrpnili pgtlesgcpq nltcsvpwac eqgtppmisw
181 igtsvspldp sttrssvltl ipqpqdhgts ltcqvtfpga svttnktvhl nvsyppqnlt
241 mtvfqgdgtv stvlgngssl slpegqslrl vcavdavdsn pparlslswr gltlcpsqps
301 npgvlelpwv hlrdaaeftc raqnplgsqq vylnvslqsk atsgvtqgvv ggagatalvf
361 lsfcvifvvv rscrkksarp aagvgdtgie danavrgsas qgpltepwae dsppdqpppa
421 sarssvgege lqyaslsfqm vkpwdsrgqe atdteyseik ihr
```

[0236] SEQ ID NO:5小鼠SIGLEC9 cDNA序列(NM_031181.2;CDS:30-1433)

[0237]

```
   1 agagcctgga gagacagttt tagctggaca tgctgctgtt gctgctgctg ctgctgctct
  61 gggggataaa gggtgtggag ggtcagaacc cccaagaggt tttcaccctg aatgtggaaa
 121 ggaaggtggt ggtgcaggag ggcctgtgtg tccttgtgcc ctgtaacttc tcctatctca
 181 agaagaggtt gactgactgg actgactcag acccagttca tggattctgg tacagggaag
 241 gaaccgacag acgcaaagat tccatcgtgg ccacaaataa cccaattcgt aaagcagtga
 301 aggaaacccg gaatcgattc ttcctgctcg gagacccttg gaggaatgac tgctccctga
 361 acatcagaga gatcagaaag aaggatgcgg ggttatactt ctttcgcctg gagcgtggaa
 421 aaacaaagta taattacatg tgggacaaga tgactctggt tgtaacagcc ctcactaaca
 481 ccccccaaat tcttctcccg gagacgcttg aagctggcca tcccagcaac ctgacctgct
 541 ctgtgccttg ggactgtggg tggacggcac ctcccatctt ctcctggact ggtacctctg
 601 tgtcattttt gagcaccaac actacgggtt cctcagtgct aaccatcacc cctcagcctc
 661 aggaccatgg caccaacctc acttgtcagg tgaccctgcc tggaactaat gtgtccacaa
 721 gaatgaccat ccgtctcaac gtgtcatatg ctccaaagaa tctgactgtg accatctatc
 781 aaggagctga ctcagtttcc acaatcctga agaatggctc atctcttcct atctctgagg
 841 gccagtcact gcgtctcatc tgcagcaccg acagctatcc ccctgcgaac ctaagctggt
 901 cctgggataa cctgaccctg tgcccatcaa agttgtccaa gcccgggctc ctggagctgt
 961 ttccagtgca tcttaagcac ggaggagtgt atacctgcca agctcaacat gccctgggct
1021 cccaacacat ttccttgagc ctgtctccac agagcagtgc aactttatct gaaatgatga
1081 tggggacctt tgtgggttca ggagtcacag ccctcctttt cctgtctgtc tgcatcctcc
1141 tcctggcagt aagatcctac aggaggaaac cagccaggcc agctgtggta gctccgcacc
1201 cagatgccct caaggtctca gtttctcaga atcccctggt tgaatcccag gcagatgaca
1261 gctctgagcc cctgccttcc atacttgagg cggccccctc ctccacagag gaagagatac
1321 attatgcgac cctcagcttt cacgagatga agcccatgaa cctgtggggg caacaggaca

1381 ctaccacgga gtactcagag ataaagtttc cacaaaggac cgcatggcca tgaccgtggc
1441 tggagaaagc atggtggccc caggaggctg gctctggaga aggaaagagt cacctaggtt
1501 gacatgtgat acacagggct tcagagccat tccttctgtg acacaggcgt tctgtgctgc
1561 ccatgccccc gtgctgcccc gtccacacaa ctgctattgt gccctgggaa tcataagctt
1621 gacctttta ctcctcttct ccccttcccc tccttccccg ccccctcttc tcctcctcct
1681 ctctcccctc tcctcccctc ttccttttgt tttttccaag acagggtttc tctgtgtagc
1741 cttggctgtc ctagaacttg ctctgcagac cagactgccc ttgaactctt ctttccaagt
1801 gctgggatta aagatgtgca ccaccaccca gcacttgact ttattgtaa
```

[0238] SEQ ID NO:6小鼠SIGLEC9氨基酸序列(NP_112458.2)

[0239]

```
  1 mlllllllll wgikgvegqn pqevftlnve rkvvvqeglc vlvpcnfsyl kkrltdwtds
 61 dpvhgfwyre gtdrrkdsiv atnnpirkav ketrnrffll gdpwrndcsl nireirkkda
121 glyffrlerg ktkynymwdk mtlvvtaltn tpqillpetl eaghpsnltc svpwdcgwta
181 ppifswtgts vsflstnttg ssvltitpqp qdhgtnltcq vtlpgtnvst rmtirlnvsy
241 apknltvtiy qgadsvstil kngsslpise gqslrlicst dsyppanlsw swdnltlcps
301 klskpgllel fpvhlkhggv ytcqaqhalg sqhislslsp qssatlsemm mgtfvgsgvt
361 allflsvcil llavrsyrrk parpavvaph pdalkvsvsq nplvesqadd sseplpsile
421 aapssteeei hyatlsfhem kpmnlwgqqd ttteyseikf pqrtawp
```

[0240] SEQ ID NO:7食蟹猴SIGLEC9氨基酸序列(XP_005590140.1)

[0241] MLLLLLLLPLLWGRERVEGQRNNQKNYPLTMQESVTVQQGLCVHVLCSFSYPWYGWISSDPVHGYWFRA GAHTDRDAPVATNNPARAVREDTRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARSSDAGTYFFRVETGKTKWNYKYVPLSVHVTA LTHRPNILIPGTLESGCPRNLTCSVPWACEQGTAPMISWMGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTFP GASVTTNKTIHLNVSYPPQNLTMTVFQGNDTVSIVLGNGSSVSVPEGPSLRLVCAVDSNPPARLSLSWGGLTLCPSQ PSNPGVLELPRVHLRDEEEFTCRAQNLLGSQRVSLNVSLQSKATSGLTQGAVGAGATALVFLSFCVIFVVVRSCRKK SARPVAGVGDVGIEDANAVRGSASQGSLTEPWAEDSPPDQPPPASARSSVGEEELQYASLSFQTVKPRDLQGQEATN TEYSEIKIHK

[0242] SEQ ID NO:8人类SIGLEC9-Fc氨基酸序列

[0243] QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFSYPSHGWIYPGPVVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARAVWEE TRDRFHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNYKHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCPQNLT CSVPWACEQGTPPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTVHLNVSYPPQNLT MTVFQGDGTVSTVLGNGSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGVLELPWVHLRDAAE

FTCRAQNPLGSQQVYLNVSLQSKATSGVTQGGSGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0244] SEQ ID NO:9食蟹猴SIGLEC9-Fc氨基酸序列

[0245] QRNNQKNYPLTMQESVTVQQGLCVHVLCSFSYPWYGWISSDPVHGYWFRAGAHTDRDAPVATNNPARAV
REDTRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARSSDAGTYFFRVETGKTKWNYKYVPLSVHVTALTHRPNILIPGTLESGCPR
NLTCSVPWACEQGTAPMISWMGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTIHLNVSYPPQ
NLTMTVFQGNDTVSIVLGNGSSVSVPEGPSLRLVCAVDSNPPARLSLSWGGLTLCPSQPSNPGVLELPRVHLRDEEE
FTCRAQNLLGSQRVSLNVSLQSKATSGLTGSGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0246] SEQ ID NO:10人类SIGLEC9-CHO氨基酸序列

[0247] MLLLLLPLLWGRERAEGQTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFSYPSHGWIYPGPVVHGYWFREGANTD
QDAPVATNNPARAVWEETRDRFHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNYKHHRLSVNVTALTHRP
NILIPGTLESGCPQNLTCSVPWACEQGTPPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVT
TNKTVHLNVSYPPQNLTMTVFQGDGTVSTVLGNGSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPS
NPGVLELPWVHLRDAAEFTCRAQNPLGSQQVYLNVSLQSKATSGVTQGVVGGAGATALVFLSFCVIFVVVRSCRKKS
ARPAAGVGDTGIEDANAVRGSASQGPLTEPWAEDSPPDQPPPASARSSVGEGELQYASLSFQMVKPWDSRGQEATDT
EYSEIKIHR

[0248] SEQ ID NO:11人类SIGLEC9-HIS氨基酸序列

[0249] QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFSYPSHGWIYPGPVVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARAVWEE
TRDRFHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNYKHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCPQNLT
CSVPWACEQGTPPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTVHLNVSYPPQNLT
MTVFQGDGTVSTVLGNGSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGVLELPWVHLRDAAE
FTCRAQNPLGSQQVYLNVSLQSKATSGVTQGGSGHHHHHHHHHH

[0250] SEQ ID NO:12食蟹猴SIGLEC9-HIS氨基酸序列

[0251] QRNNQKNYPLTMQESVTVQQGLCVHVLCSFSYPWYGWISSDPVHGYWFRAGAHTDRDAPVATNNPARAV
REDTRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARSSDAGTYFFRVETGKTKWNYKYVPLSVHVTALTHRPNILIPGTLESGCPR
NLTCSVPWACEQGTAPMISWMGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTIHLNVSYPPQ
NLTMTVFQGNDTVSIVLGNGSSVSVPEGPSLRLVCAVDSNPPARLSLSWGGLTLCPSQPSNPGVLELPRVHLRDEEE
FTCRAQNLLGSQRVSLNVSLQSKATSGLTGSGHHHHHH

[0252] *表1中列出的本发明所涵盖生物标志物的核酸和多肽序列已以本文所提供的独特识别符提交至GenBank,并且提交至GenBank的每个这种独特识别的序列特此通过引用整体并入。

[0253] *表1包括RNA核酸分子(例如胸苷被尿苷代替)、编码所编码蛋白质的直系同源物的核酸分子以及包含在全长上与表1中列出的任何可公开获得的序列的核酸序列(参见例如下文)具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、

92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或更高同一性的核酸序列的DNA或RNA核酸序列或其部分。此类核酸分子可具有全长核酸的功能，如本文进一步所阐述。

[0254] *表1包括蛋白质的直系同源物以及包含在全长上与表1中列出的任何可公开获得的序列的氨基酸序列(参见例如下文)具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或更高同一性的氨基酸序列的多肽分子或其部分。此类多肽可具有全长多肽的功能，如本文进一步所阐述。

[0255] *表1包括所列出生物标志物的其他已知核酸和氨基酸序列。

[0256] IV.抗体及其抗原结合片段

[0257] 髓系细胞的炎性表型可通过调节某些生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)的量和/或活性来调控，并且这种炎性表型调节还调节免疫反应。

[0258] 本发明提供了调节表1中列出的靶标的抗体及其抗原结合片段。此类组合物可用于上调或下调单核细胞和/或巨噬细胞炎性表型，从而分别上调或下调免疫反应。此类组合物还可用于检测表1中列出的靶标的量和/或活性，从而使所述药剂可用于诊断、预后和筛选由此类靶标介导的效应。

[0259] 代表性的、示例性的、非限制性的抗体呈现在下表2中。

[0260] 表2:本发明所涵盖的代表性示例性抗体

[0261] 2F15

[0262] 轻链

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC**KASQNVGSNVA**WYQQKP

[0263] GQSPKALIY**SASFRYS**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEY FC**QQYNNYV**FTFSAGTKLELK

[0264] 重链

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTEY**EMHWVKQT

[0265] PVHGLEWIGAI**DPETGG**TVYNQKFKGKARLTADKSSSTGYMELR SLTSEDSAVYYCTS**LYYGNR**WGQGTTLTVSS

[0266] 3L02

[0267] 轻链

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC**KASQTVGTNVA**WYQQKP

[0268] GQSPKPLIY**SASYRYS**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF CQQYDSFPLTFGSGTKLEIK

[0269] 重链

DVQLQESGPGMVKPSQSLSLTCTVT**GYSITSGY**DWHWIRHFP

[0270] GNKLEWMGY**ISYSAG**TNYNPSLKSRISITHDTSKNHFFLKLNSVTT EDTATYYCAR**EGLTAYWYFDV**WGTGTTVTVSS

[0271] 9C15

[0272] 轻链

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC**RASQDISNYLN**WYQQKPDG

[0273] TVKLLIY**YKSGLHS**GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC **QQGNTLPFT**FGGGTKLEIK

[0274] 重链

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKAS**GYTFTSY**WIT WLNQR

[0275] PGQGLEWIGD**IYPGSGG**TNYNERFKS KATLTVDTSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCAR**SGGWAMDY**WGQGTSVTVSS

[0276] 9D21

[0277] 轻链

SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITC**KASQSVSNAVA**WYQQKPGQ

[0278] SPKMLIY**YASNRYT**GVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFC **QQDYSSPYT**FGGGTKLEIK

[0279] 重链

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS**GFSLTRY**GVS WVRQPPG

[0280] KGLEWLGV**IWGDGS**TNYHSALIS RLSISKDNSKSQVFLKLNSLQT DDTATYYCAR**PYYGFFDY**WGQGTTLTVSS

[0281] 12G23

[0282] 轻链

DIVLTQSPASLAVSLGQRVTISC**RGSESVEYYGTSLMQ**WYQQ

[0283] KPGQPPKLLIY**AASNVES**GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIA MYFC**QQDRKVPYT**FGGGTKLEIK

[0284] 重链

EVQLQQSGPELVRPGASVKMSCKAS**GYTFTDY**NMH WVKQS

[0285] HGKSLEWIG**YINPNNGG**TSYNQKFKG KATLTVNKSSSTAYMELRS LTSDDSAVYYCAR**EGYGNYPFY**WGQGTTLTVSS

[0286] 12L19

[0287] 轻链

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC**RSSQSLVHSNGNTYLH**WY

[0288] LQKPGQSPKLLVY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFC**SQNTHIPYT**FGGGTKLEIK

[0289] 重链

QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFS**GFSLNTFGM**AVGWIRQPS

[0290] GKGLEWLA**HIWWDDS**YYFNPALRSRLTISKDTSKNQVFLTIANVD TADTATYYCTR**IPDDYDDYAMDY**WGQGTSVTVSS

[0291] 12P18

[0292] 轻链

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSC**KSSQSLLYSSTQKNYLA**W

[0293] YQQKPGQSPKRLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAE DLAVYYC**QQYYSYWT**FGGGTKLEIK

[0294] 重链

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDY**EMHWVKQT

[0295] PVHGLEWIGA**IDPEAGG**TAYNRKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSL TSEDSAVYYCTN**LGRDY**WGQGTTLTVSS

[0296] 13H10

[0297] 轻链

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSC**RASQSIGTSIH**WYQQRTNGSP

[0298] RLLIK**YASESIS**GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC**QQSN SWPLT**FGAGTKLELK

[0299] 重链

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS**GYTFTSY**WMYWVKQ

[0300] RPGQGLDLIGE**INPSNGG**TNYNEKFKSKATLTVDKSSGTAYMQLS SLTSEDSAVYYCAI**WKDYYGISYEDWYFDV**WGTGTTVTVSS

[0301] 13J19

[0302] 轻链

SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTVTC**KASQSVSNAVA**WYQQKPG

[0303] QSPKLLIY**YASNRYT**GVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYF C**QQNYNSPYT**FGGGTKLEIK

[0304] 重链QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS**GFSLTSY**GVSWVRQPPGK

[0305] GLEWLG**VV WRDGT**TNYHSALISRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQT DDTATYYCAR**PYYGFFDY**WGQGTTLTVSS

[0306] 13018

[0307] 轻链

DIVLTQSPASLAVSLGQRVTISC**RASESVEYYGTSLMQ**WYQQ

[0308] KPGQPPKLLIY**AASNVES**GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIA MFFC**QQDRKVPYT**FGGGTKLEIK

[0309] 重链

EVQLQQSGPELVRPGASVKMSCKAS**GYTFTDY**NMHWVKQS

[0310] HGKSLEWIGY**INPNNGG**TTYNQNFKGKATLTVNKSSSTAYMELRS LTSEDSAVYYCAR**EGYGNYPFY**WGQGTTLTVSS

[0311] 11B22

[0312] 轻链

DIVMTQSQRFMSTTVGDRVSITC**KASQNVDTAVA**WYQQKPG

[0313] QSPKLLIY**SASSRYT**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYF C**QQYNIYPLT**FGGGTKLEIK

[0314] 重链

QVQLQQSGTELVRPGSSVRLSCKAS**GYTFTDY**EIHWVKQTP

[0315] VHGLEWIGP**IDPETGG**TAYNQKFRGKATLTADKSSNTAYMELRSL TSDDSAVYFCTR**EGIFDY**WGQGTTLTVSS

[0316] 10J22

[0317] 轻链

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITC**RASENIYSNLA**WYQQKQGK

[0318] SPQLLVY**AATNLTD**GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC **QHFWGTPWT**FGGGTKLEIK

[0319] 重链

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS**GYTFTNY**WMYWVKQ

[0320] RPGQGLEWIGE**INPSNGG**TNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCTI**WMGAMDY**WGQGTSVTVSS

[0321] 13L14

[0322] 轻链

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC**RSSQSLVHSNGNTYLH**WY

[0323] LQKPGQSPKLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFC**SQSTHVPYT**FGGGTKLEIK

[0324] 重链

QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFS**GFSLSTFGMGVG**WIRQPS

[0325] GKGLEWLAHI**WWDDDKYYNPALKS**RLTISKDTSKNQVFLKIANV

DTADTATYYCAR**IPDDYDDYAMDY**WGQGTSVTVSS

[0326] 2E23

[0327] 轻链

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTC**SASSSVSSSYLY**WYQQKPGS

[0328] SPKLWIY**STSNLAS**GVPTRFSGSGSGTSYCLTISSMETEDAASYFC

HQYSSYPFTFGSGTKLEIK

[0329] 重链

[0330] QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS**GYTFTSY**WMHWVKQ

RPGQGLEWIGE**INPSNGGTNYNEKFKS**KATLTVDKSSSTAYMQLS

[0331] SLTSEDSAVYYCTI**YYGDYSYPIDY**WGQGTSVTVSS

[0332] *表2将下划线序列列为根据Kabat命名法的CDR序列并且将粗体序列列为根据Chothia命名法的CDR序列。CDR1、CDR2和CDR3以从左(N末端)至右(C末端)的标准出现顺序显示。

[0333] *表2提供了抗体和抗原结合片段的代表性CDR序列,包括但不限于Chothia CDR、Kabat CDR、AbM、CDR接触区和/或构象定义。在一些实施方案中,CDR是Kabat CDR。在其他实施方案中,CDR是Chothia CDR。在一些实施方案中,CDR是扩展CDR,其是指根据Kabat和Chothia命名法鉴定的所有氨基酸残基。因此,在具有多于一个CDR的一些实施方案中,一个或多个CDR可以是Kabat、Chothia、扩展CDR或其组合中的任一种。

[0334] *表2提供了轻链和重链序列的代表性序列。在一些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含表2所示轻链的CDRL1、CDRL2和CDRL3。在一些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含表2所示重链的CDRH1、CDRH2和CDRH3。在一些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含表2所示的一对轻链和重链的CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2和CDRH3。在一些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含来自表2所示的相同代表性抗体的一对轻链和重链的CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2和CDRH3。

[0335] a.抗体及其抗原结合片段的组合物

[0336] 一般来说,本发明所涵盖的抗体及其抗原结合片段的特征在于它们表现出结合表达SIGLEC-9多肽的髓系细胞并增加所述髓系细胞的炎性表型的能力。

[0337] 提供了针对SIGLEC-9的抗体(例如,分离的单克隆抗体)以及其抗原结合片段。在一些实施方案中,根据下文进一步描述的布达佩斯条约的条款,mAb已保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)。

[0338] 由于本领域众所周知,抗体重链和轻链CDR3结构域在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中起着特别重要的作用,因此本发明所涵盖的抗体,例如表2中所示的那些,优选地包含本发明所涵盖的可变区的重链和轻链CDR3(例如,包括表2的序列或其部分)。所述抗体还可包含本发明所涵盖的可变区的CDR2(例如,包括表2的序列或其部分)。所述抗体还可包

含本发明所涵盖的可变区的CDR1(例如,包括表2的序列或其部分)。在其他实施方案中,所述抗体可包含CDR的任何组合。在一些实施方案中,CDR1、CDR2和/或CDR3可选自本发明所涵盖的相同重链或轻链序列(例如,包括表2的序列或其部分)。在其他实施方案中,CDR1、CDR2和/或CDR3可选自本发明所涵盖的相同重链和轻链序列对(例如,包括表2的序列或其部分)。

[0339] 上述抗体及其抗原结合片段的CDR1、CDR2和/或CDR3区可包含本文公开的与本发明所涵盖的可变区的那些的确切氨基酸序列(例如,包括表2的序列或其部分)。然而,普通技术人员应理解,在仍然保留抗体有效结合SIGLEC-9的能力(例如,保守序列修饰)的同时,与确切CDR序列的一些偏差是可能的。因此,在另一个实施方案中,工程化抗体可由一个或多个CDR组成,所述CDR与本发明所涵盖的一个或多个CDR(例如,包括表2的序列或其部分)具有例如50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性。

[0340] 已知的非人类或人类抗体(例如,小鼠或非啮齿动物抗人类SIGLEC-9抗体)的结构特征可用于产生结构相关的人类抗人类SIGLEC-9抗体,所述抗体保留本发明所涵盖的抗体的至少一个功能特性,例如与SIGLEC-9的结合。另一个功能特性包括在竞争ELISA测定中抑制原始已知的非人类或人类抗体的结合。

[0341] 在一些实施方案中,提供了能够结合人类SIGLEC-9的抗体及其抗原结合片段,其包含重链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与表2所呈现的重链可变结构域CDR组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[0342] 类似地,还提供了能够结合人类SIGLEC-9的抗体及其抗原结合片段,其包含轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与表2所呈现的轻链可变结构域CDR组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[0343] 还提供了能够结合人类SIGLEC-9的抗体及其抗原结合片段,其包含重链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与表2所呈现的重链可变结构域CDR组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列;并且包含轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与表2所呈现的轻链可变结构域CDR组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[0344] 技术人员应注意到,这种百分比同源性等同于或代替本发明所涵盖的变化,可通过在给定目标CDR内引入1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸取代(例如保守取代)来实现。

[0345] 本发明所涵盖的抗体及其抗原结合片段可包含重链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有选自由表2中所呈现的重链可变结构域CDR组成的组的序列;和轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有选自由表2中所呈现的轻链可变结构域CDR组成的组的序列。

[0346] 此类抗体及其抗原结合片段可包含轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有选自由如本文所述的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3组成的组的序列;和/或重链,其中可

变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有选自由如本文所述的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3组成的组的序列。在一些实施方案中,能够结合人类SIGLEC-9的抗体及其抗原结合片段包含如本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3或由如本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3组成。

[0347] 本发明所涵盖的抗体及其抗原结合片段的重链可变结构域可包含表2中所示的vH氨基酸序列或由表2中所示的vH氨基酸序列组成,和/或本发明所涵盖的抗体及其抗原结合片段的轻链可变结构域可包含表2中所示的vκ氨基酸序列或由表2中所示的vκ氨基酸序列组成。

[0348] 本发明所涵盖的抗体及其抗原结合片段可通过本领域众所周知的任何技术产生和修饰。例如,此类抗体及其抗原结合片段可以是鼠类抗体或非啮齿动物抗体。类似地,此类抗体及其抗原结合片段可以是嵌合的,优选嵌合的小鼠/人类抗体。在一些实施方案中,抗体及其抗原结合片段是人源化抗体,使得可变结构域包含人类受体框架区,和任选存在的人类恒定结构域,以及非人类供体CDR,例如如上文所定义的小鼠或非啮齿动物CDR。

[0349] 在其他实施方案中,根据本发明的免疫球蛋白重链和/或轻链分别包含表2中提供的vH或vκ可变结构域序列或由表2中提供的vH或vκ可变结构域序列组成。

[0350] 本发明还提供了具有选自由本文所述的vH可变结构域、vκ可变结构域、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列组成的组的序列的多肽。本发明的抗体、免疫球蛋白和多肽可以分离的(例如纯化的)形式使用或包含在载体如膜或脂质囊泡(例如脂质体)中。

[0351] 进一步考虑了许多修饰、片段等。

[0352] 通常,术语“抗体”或“Ab”是以最广泛意义使用并且具体来说包括但不限于全抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如由至少两种完整抗体形成的双特异性抗体、三特异性抗体或具有更大多特异性的抗体)、天然存在形式的抗体(例如IgG、IgA、IgM、IgE)和重组抗体、抗体片段、双价抗体、抗体变体和抗体源结合结构域(其为其他肽的一部分或与其缔合)。抗体主要是基于氨基酸的分子,但还可包含一种或多种修饰(包括但不限于添加糖部分、荧光部分、化学标签等)。在一些情况下,抗体可包括基于非氨基酸的分子。本发明所涵盖的抗体可为天然存在的或通过生物工程化产生。

[0353] 抗体及其抗原结合片段可被分离。如本文所用,术语“分离的抗体”旨在是指基本上不含其他抗体(例如具有不同抗原特异性的那些)的抗体组合物(例如具有期望的抗原特异性)(例如,结合于SIGLEC-9并且基本上不含不结合SIGLEC-9的抗体的分离抗体)。然而,在一些实施方案中,与SIGLEC-9特异性结合的分离抗体可能与其他目标蛋白质(例如来自不同家族成员、物种等的蛋白质)具有交叉反应性。例如,在一些实施方案中,抗体对至少两个物种保持特异性结合亲和力,所述物种例如人类和其他动物,例如非啮齿动物,或其他哺乳动物或非哺乳动物物种。然而,在一些实施方案中,抗体保持对人类SIGLEC-9的更高或实际上特异性的亲和力和/或选择性。另外,分离的抗体通常基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。在一个实施方案中,对人类SIGLEC-9具有不同特异性的“分离的”单克隆抗体的组合被组合在明确定义的组合物中。

[0354] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗SIGLEC-9抗体结合于人类SIGLEC-9,以及结合于一种或多种人类SIGLEC家族成员。此类人类SIGLEC家族成员包括SIGLEC-1(例如NP_

075556.1)、SIGLEC-2(例如NP_001762.2)、SIGLEC-3(例如NP_001763.3)、SIGLEC-4(例如NP_002352.1)、SIGLEC-5(例如NP_003821.1)、SIGLEC-6(例如NP_001236.4)、SIGLEC-7(例如NP_055200.1)、SIGLEC-8(例如NP_055257.2)、SIGLEC-10(例如NP_149121.2)、SIGLEC-11(例如NP_443116.2)、SIGLEC-12(例如NP_443729.1)、SIGLEC-14(例如NP_001092082.1)、SIGLEC-15(例如NP_998767.1)和SIGLEC-16(例如NP_001335293.2)。在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗SIGLEC-9抗体结合于人类SIGLEC-9,以及结合于一种或多种人类抑制型SIGLEC家族成员,其包括SIGLEC-1、SIGLEC-2、SIGLEC-3、SIGLEC-4、SIGLEC-5、SIGLEC-6、SIGLEC-7、SIGLEC-8、SIGLEC-9、SIGLEC-10、SIGLEC-11和SIGLEC-12及其组合,例如人类SIGLEC-9、人类SIGLEC-7和/或人类SIGLEC-3。在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗SIGLEC-9抗体结合于人类SIGLEC-9、SIGLEC-和SIGLEC-7。此类结合可发生在胞外结构域上,例如当被细胞表达时。如上文所述,这种差异或交叉结合可测量为相对于对照的倍数差异,例如相对于对照相差约1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍或更多倍,或其间的任何范围(包括端值),例如约1.5倍至约100倍。

[0355] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包含重链可变结构域和轻链可变结构域以及Fc区。通常,术语"Fc区"用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域,包括原生序列Fc区和变异Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能会有所不同,但人类IgG重链Fc区通常定义为从位置Cys226或Pro230的氨基酸残基延伸至其羧基末端。用于本发明所涵盖的抗体的合适的原生序列Fc区包括人类IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B等)、IgG3和IgG4。

[0356] 术语"原生抗体"是指约150,000道尔顿(dalton)的通常异源四聚体糖蛋白,其由两条相同轻(L)链和两条相同重(H)链构成。每条轻链通过一个共价二硫键连接至重链,而在不同免疫球蛋白同种型的重链中二硫键的数量各不相同(例如IgG、IgA、IgE和IgM)。每条重链和轻链还具有规则间隔开的链内二硫桥。每条重链在一端具有可变结构域(VH),后接多个恒定结构域。每条轻链在一端均具有可变结构域(VL)并且在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准,并且轻链可变结构域与重链可变结构域对准。抗体的两条重链的其余重链恒定结构域构成抗体的片段可结晶(Fc)区。

[0357] 抗体的尾部区域中的Fc区与细胞表面受体(称为Fc受体)和补体系统的一些蛋白质相互作用。通常,术语"Fc受体"或"FcR"描述与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是原生序列人类FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体(γ受体)并包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体的FcR,包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式,FcγRII受体包括FcγRIIA(一种"激活性受体")和FcγRIIB(一种"抑制性受体"),它们具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其细胞质结构域。激活性受体FcγRIIA在其细胞质结构域中含有一个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制性受体FcγRIIB在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见M. Daëron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。FcR综述于Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991);Capel等人,Immunomethods 4:25-34(1994);和de Haas等人,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)。其他FcR,包括有待未来鉴定的那些,都涵盖于本文的术语"FcR"中。

[0358] 术语“轻链”是指来自任何脊椎动物物种的抗体的组分，基于恒定结构域的氨基酸序列，被归到两种明显不同的类型之一，称为κ和λ。根据其重链恒定结构域的氨基酸序列，抗体可被归为不同的类别。完整抗体有五个主要类别：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，并且其中一些可进一步分为亚类(同种型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。抗体(例如人类或人类嵌合抗体)的CL可以是属于Ig的任何区域，例如κ类或λ类。

[0359] 术语“可变结构域”是指抗体重链和轻链上的特定抗体结构域，其序列在抗体中广泛不同并且用于每个特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。例如，术语“VH”是指“重链可变结构域”并且术语“VL”是指“轻链可变链”。可变结构域包含高变区。术语“高变区”是指可变结构域内包含负责抗原结合的氨基酸残基的区域。这些区域具有高变序列和/或形成结构限定的环。存在于高变区内的氨基酸决定了成为抗体中抗原结合位点的一部分的互补决定区(CDR)的结构。通常，抗体包含六个HVR；三个位于VH中(H1、H2、H3)，并且三个位于VL中(L1、L2、L3)。在原生抗体中，H3和L3显示六个HVR的大部分多样性，并且特定来说据认为H3在赋予抗体良好特异性方面发挥独特作用(参见例如Xu等人(2000)Immunity 13,37-45；Johnson和Wu(2003)Meth.Mol.Biol.248:1-25)。术语“CDR”是指抗体中包含与其靶抗原或表位互补的结构的区域。

[0360] 可变结构域中不与抗原相互作用的其他部分被称为框架(FW)区。抗原结合位点(也称为抗原组合位点或互补位)包含与特定抗原相互作用所需的氨基酸残基。通常通过共晶体学使用结合抗原来阐明构成抗原结合位点的确切残基，然而，还可使用基于与其他抗体的比较的计算评价(Strohl,W.R.Therapeutic Antibody Engineering.Woodhead Publishing,Philadelphia PA.2012.第3章,第47-54页)。构成CDR的残基的测定可包括使用编号方案，包括但不限于由以下所教导者：Kabat(Wu等人(1970)JEM 132:211-250;Kabat等人(1992),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,U.S.Department of Health and Human Services;Johnson等人(2000)Nucl.Acids Res.28:214-218)、Chothia(Chothia和Lesk(1987)J.Mol.Biol.196:901;Chothia等人(1989)Nature 342:877;Al-Lazikani等人(1997)J.Mol.Biol.273:927-948)、Lefranc(Lefranc等人(1995)Immunome Res.1:3)、Honegger(Honegger和Pluckthun(2001)J.Mol.Biol.309:657-670)和MacCallum(MacCallum等人(1996)J.Mol.Biol.262:732)。因此，根据这些系统的CDR定义在长度和边界区域方面可能与相邻框架区不同。参见例如Kabat,Chothia和/或MacCallum等人(Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版,U.S.Department of Health and Human Services,1992;Chothia等人(1987)J.Mol.Biol.196,901;和MacCallum等人,J.Mol.Biol.(1996)262,732,其各自通过引用整体并入)。

[0361] VH和VL结构域各自具有三个CDR。VL CDR在本文中称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3，其出现顺序是沿可变结构域多肽从N末端移动至C末端。VH CDR在本文中称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，其出现顺序是沿可变结构域多肽从N末端移动至C末端。每个CDR具有有利的规范结构，CDR-H3除外，其包含在抗体之间序列和长度可高度变化的氨基酸序列，从而在抗原结合结构域中产生各种三维结构(Nikoloudis等人(2014)Peer J.2:e456)。在一些情况下，可在一组相关抗体中分析CDR-H3以评价抗体多样性。本领域已知测定CDR序列的各种方法并且可应用于已知抗体序列(Strohl,W.R.Therapeutic Antibody Engineering.Woodhead

Publishing,Philadelphia PA.2012.第3章,第47-54页)。

[0362] 本文所述的抗体及其抗原结合片段包括但不限于包含根据Chothia CDR、Kabat CDR、AbM、CDR接触区和/或构象定义进行定义的CDR的那些。CDR区的确定在本领域技术范围内。应理解,在一些实施方案中,CDR可以是Kabat和Chothia CDR的组合(也称为"组合CR"或"扩展CDR")。在一些实施方案中,CDR是Kabat CDR。在其他实施方案中,CDR是Chothia CDR。在一些实施方案中,CDR是扩展CDR,其是指根据Kabat和Chothia命名法鉴定的所有氨基酸残基。因此,在具有多于一个CDR的一些实施方案中,一个或多个CDR可以是Kabat、Chothia、扩展CDR或其组合中的任一种。

[0363] 在一些实施方案中,抗体片段和变体可包含完整抗体的任何部分。术语"抗体片段"和"抗体变体"还包括如同抗体一般通过结合至特异性抗原以形成复合物来发挥作用的任何合成或基因工程化的蛋白质/多肽。在一些实施方案中,抗体片段和变体包含来自完整抗体的抗原结合区域。抗体片段的实例可包括但不限于Fab、Fab'、$F(ab')_2$和Fv片段;Fd、双价抗体;细胞内抗体、线性抗体;单链抗体分子,例如单链可变片段(scFv);由抗体片段形成的多特异性抗体;等等。不论结构如何,抗体片段或变体结合由亲本全长抗体识别的相同抗原。

[0364] 通过野生型抗体的限制性蛋白水解产生的抗体片段被称为蛋白水解性抗体片段。这些片段包括但不限于Fab片段、Fab'片段和$F(ab')_2$片段。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同抗原结合片段,称为"Fab"片段,其各自具有单一抗原结合位点。还产生残余"Fc"片段,其名称反映了其易于结晶的能力。胃蛋白酶或无花果蛋白酶处理可产生$F(ab')_2$片段,所述片段具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原。一般来说,F(ab')2片段包含两个"臂",每个臂包含针对并且特异性结合共同抗原的可变区。两个Fab'分子由重链的铰链区中的链间二硫键接合;Fab'分子可针对相同(二价)或不同(双特异性)表位。如本文所用,"Fab'片段"含有单一抗结合结构域(包括Fab)和重链中直至铰链区的另一部分。本发明所涵盖的化合物和/或组合物可包含这些片段中的一者或多者。

[0365] 术语"Fv"是指包含完整抗原识别和抗原结合位点的抗体片段。这些区域由一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域呈紧密非共价缔合形式的二聚体组成。Fv片段可通过蛋白水解切割生成,但极其不稳定。本领域已知生成稳定Fv片段的重组方法,其通常经由在轻链可变结构域与重链可变结构域之间插入柔性接头(以形成单链Fv(scFv)或经由在重链可变结构域与轻链可变结构域之间引入二硫桥来实现(Strohl,W.R.Therapeutic Antibody Engineering.Woodhead Publishing,Philadelphia PA.2012.第3章,第46-47页)。

[0366] 术语"单链Fv"或"scFv"是指VH抗体结构域和VL抗体结构域的融合蛋白,其中这些结构域由柔性肽接头一起连接成单一多肽链。在一些实施方案中,Fv多肽接头使得scFv能够形成用于抗原结合的期望结构。在一些实施方案中,可通过10至30个氨基酸残基的肽连接VH结构域和VL结构域。在一些实施方案中,使scFv与噬菌体展示、酵母展示或其他展示方法联合利用,其中它们可与表面成员(例如噬菌体外壳蛋白)相关联地表达并用于鉴定给定抗原的高亲和力肽。在一些实施方案中,术语"单链抗体"还可包括但不限于二硫化物连接的Fv(dsFv),其中两种单链抗体(各自可针对不同表位)通过二硫键连接至一起。使用分子基因学,可将两个scFv串联工程化为由接头结构域间隔开的单一多肽,称为"串联scFv"

(tascFv)。使用具有两个不同scFv的基因构建tascFv会产生“双特异性单链可变片段”(双scFv)(Nelson(2010)Mabs 2:77-83)。还可包括巨抗体(融合至IgG的Fc(CH2-CH3结构域)的氨基末端的二价scFv)。

[0367] 在一些实施方案中,抗体可包含经修饰Fc区。作为一个非限制性实例,经修饰Fc区可通过所述方法来制备或者可为美国专利公开第US 2015-0065690号中所述的任何区域。

[0368] 本发明所涵盖的抗体和抗原结合片段可以是“重组的”,所述术语包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的抗体及其抗原结合片段,例如(a)从针对人类免疫球蛋白基因的转基因或转染色体的动物(例如小鼠)中分离的抗体或由其制备的杂交瘤(下文进一步描述),(b)从经转化以表达抗体的宿主细胞(例如,从转染瘤)中分离的抗体,(c)从重组、组合人类抗体文库中分离的抗体,以及(d)通过涉及将人类免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人类抗体具有源自人类种系和/或非种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,此类重组人类抗体可进行体外诱变(或者,当使用人类Ig序列转基因动物时,进行体内体细胞诱变),因此重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列是虽然源自人类种系V_H和V_L序列并与其相关,但在体内可能不天然存在于人类抗体种系库中的序列。

[0369] 术语“重组人类抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人类抗体,例如(a)从针对人类免疫球蛋白基因的转基因或转染色体的动物(例如小鼠)中分离的抗体或由其制备的杂交瘤(下文进一步描述),(b)从经转化以表达抗体的宿主细胞(例如,从转染瘤)中分离的抗体,(c)从重组、组合人类抗体文库中分离的抗体,以及(d)通过涉及将人类免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人类抗体具有源自人类种系和/或非种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,此类重组人类抗体可进行体外诱变(或者,当使用人类Ig序列转基因动物时,进行体内体细胞诱变),因此重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列是虽然源自人类种系V_H和V_L序列并与其相关,但在体内可能不天然存在于人类抗体种系库中的序列。

[0370] 术语“多克隆抗体”包括在针对具有许多表位的蛋白质的免疫原性反应中生成的抗体。多克隆抗体的组合物(例如血清)由此包括多种针对蛋白质内的相同和不同表位的不同抗体。本领域已知产生多克隆抗体的方法(参见例如Cooper等人,Short Protocols in Molecular Biology,第2版,第11章第III部分;Ausubel等人编辑,John Wiley and Sons,New York,1992,第11-37页至第11-41页)。

[0371] 与之相比,术语“单克隆抗体”是指从基本上均质细胞(或克隆)的群体获得的抗体,即,构成群体的个别抗体相同和/或结合抗原的相同特异性表位,可在产生单克隆抗体期间出现的可能变体除外,这些变体通常是以极少量存在。与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。修饰词“单克隆”指示抗体的特征在于从基本上均质的抗体群体获得,并且不应理解为需要通过任何特定方法来产生所述抗体。单克隆抗体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体的对应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体的对应序列相同或同源;以及此类抗体的片段。

[0372] 术语“抗体变体”是指经修饰抗体(相对于原生或起始抗体)或在结构和/或功能上

类似于原生或起始抗体的生物分子，所述生物分子与原生或起始抗体(例如抗体模拟物)相比在氨基酸序列、组成或结构方面包括一定差异。与原生抗体相比，抗体变体的氨基酸序列、组成或结构可有所改变。抗体变体可包括但不限于具有改变的同种型的抗体(例如IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM)、人源化变体、优化变体、多特异性抗体变体(例如双特异性变体)和抗体片段。例如，涵盖突变恒定链区，例如在Ser 228处具有取代的突变IgG4，如S228P。

[0373] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体可包含抗体融合蛋白。如本文所用，术语“抗体融合蛋白”是重组产生的抗原结合分子，其中两种或更多种具有相同或不同特异性的相同或不同天然抗体、单链抗体或抗体片段区段连接至一起。融合蛋白的价态指示融合蛋白针对抗原或表位所具有的结合臂或位点的总数；即单价、二价、三价或多价。抗体融合蛋白的多价性意指，其可利用多种相互作用结合至抗原，由此增加与抗原的结合亲合力。特异性指示抗体融合蛋白能够结合多少不同抗原或表位，即单特异性、双特异性、三特异性、多特异性等。使用这些定义，天然抗体(例如IgG)是二价的，因为它具有两个结合臂，但是为单特异性的，因为其结合至一种抗原。单特异性多价融合蛋白具有针对一个表位的一个以上的结合位点，但仅结合相同抗原上的相同表位，例如具有两个与相同抗原具有反应性的结合位点的双价抗体。融合蛋白可包括不同抗体组分或多个拷贝的相同抗体组分的多价或多特异性组合。融合蛋白可另外包括治疗剂。适用于这些融合蛋白的治疗剂的实例包括免疫调节剂(“抗体-免疫调节剂融合蛋白”)和毒素(“抗体-毒素融合蛋白”)。一种优选的毒素包含核糖核酸酶(RNase)，优选是重组RNase。

[0374] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体可包括多特异性抗体。如本文所用，术语“多特异性抗体”是指结合一个以上表位的抗体。如本文所用，术语“多体”或“多特异性抗体”是指其中两个或更多个可变区结合至不同表位的抗体。表位可位于相同或不同靶标上。在一个实施方案中，可通过PCT公开第WO 2011/109726号以及美国专利公开第2015-0252119号中所述的方法来生成多特异性抗体并优化。这些抗体能够以高特异性和高亲和力结合至多个抗原。在一些实施方案中，多特异性抗体是“双特异性抗体”。如本文所用，术语“双特异性抗体”是指能够结合相同或不同抗原上的两个不同表位的抗体。在一个方面，双特异性抗体能够结合两种不同抗原。这些抗体通常包含来自至少两种不同抗体的抗原结合区域。例如，双特异性单克隆抗体(BsMAb、BsAb)是由两种不同单克隆抗体的片段构成的人工蛋白质，由此容许BsAb结合至两种不同类型的抗原。双特异性抗体可包括Riethmuller(2012)Cancer Immun.12:12-18;Marvin等人(2005)Acta Pharmacol.Sinica 26:649-658;和Schaefer等人(2011)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.108:11187-11192中所述的任一者。已开发新一代BsMAb，称为“三功能双特异性”抗体。这些抗体由两条重链和两条轻链组成，每一者来自两种不同抗体，其中两个Fab区(臂)针对两种抗原，并且Fc区(足)包含两条重链并形成第三结合位点。

[0375] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的组合物可包括抗肽抗体。如本文所用，术语“抗肽抗体”是指在针对短(通常5至20个氨基酸)免疫原性多肽的体液反应中生成的“单特异性抗体”，所述免疫原性多肽对应于衍生其的蛋白质(例如本发明所涵盖的靶蛋白)的较少(优选地一个)经分离表位。多个抗肽抗体包括各种针对蛋白质的特定部分(即针对含有至少一个、优选地仅一个表位的氨基酸序列)的不同抗体。本领域已知产生抗肽抗体的方法

(参见例如Cooper等人,Short Protocols in Molecular Biology,第2版,第11章第III部分;Ausubel等人编辑,John Wiley and Sons,New York,1992,第11-42页至第11-46页)。

[0376] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗体可包括双价抗体。如本文所用,术语"双价抗体"是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段。双价抗体在同一多肽链中包含连接至轻链可变结构域VL的重链可变结构域VH。通过使用过短而不容许在同一链上的两个结构域之间配对的接头,迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双价抗体更全面地阐述于例如以下文献中:EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448。

[0377] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗体可包括细胞内抗体。术语"细胞内抗体"是指并非从产生其的细胞分泌而是靶向一种或多种细胞内蛋白质的抗体形式。细胞内抗体是一类具有抗体特性的众所周知的抗原结合分子,但其能够表达于细胞内以结合和/或抑制目标细胞内靶标(Chen等人(1994)Human Gene Ther.5:595-601)。改适抗体以靶向(例如抑制)细胞内部分的方法在本领域中是众所周知的,例如使用单链抗体(scFv),修饰免疫球蛋白VL结构域以实现超稳定性,修饰抗体以抵抗还原性细胞内环境,生成增加细胞内稳定性和/或调节细胞内定位的融合蛋白等。细胞内抗体还可被引入和表达于多细胞生物体的一个或多个细胞、组织或器官中以例如用于预防和/或治疗目的(例如作为基因疗法)(至少参见PCT公开第WO 08/020079号、第WO 94/02610号、第WO 95/22618号和第WO 03/014960号;美国专利第7,004,940号;Cattaneo和Biocca(1997)Intracellular Antibodies:Development and Applications(Landes and Springer-Verlag publs.);Kontermann(2004)Methods 34:163-170;Cohen等人(1998)Oncogene 17:2445-2456;Auf der Maur等人(2001)FEBS Lett.508:407-412;Shaki-Loewenstein等人(2005)J.Immunol.Meth.303:19-39)。

[0378] 可使用细胞内抗体来影响多种细胞过程,包括但不限于细胞内输送、转录、翻译、代谢过程、增殖性信号传导和细胞分裂。在一些实施方案中,本发明所涵盖的方法可包括基于细胞内抗体的疗法。在一些这样的实施方案中,可将本文所公开的可变结构域序列和/或CDR序列并入一种或多种用于基于细胞内抗体的疗法的构建体中。例如,细胞内抗体可靶向一种或多种糖化细胞内蛋白质或者可调节一种或多种糖化细胞内蛋白质与替代蛋白质之间的相互作用。细胞内抗体在哺乳动物细胞的不同腔室中的细胞内表达容许阻断或调节内源性分子的功能(Biocca等人(1990)EMBO J.9:101-108;Colby等人(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101:17616-17621)。细胞内抗体可改变蛋白质折叠、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-DNA相互作用、蛋白质-RNA相互作用和蛋白质修饰。它们可诱导表型敲除并通过直接结合至靶抗原、通过使其细胞内输送转向或通过抑制其与结合伴侣的缔合而用作中和剂。鉴于对靶抗原的高特异性和亲和力,细胞内抗体可有利地阻断特定靶分子的某些结合相互作用,同时保留其他相互作用。可使用来自供体抗体的序列来产生细胞内抗体。细胞内抗体通常在细胞内重组表达为单一结构域片段(例如经分离VH和VL结构域)或单链可变片段(scFv)抗体。例如,细胞内抗体通常表达为单一多肽以形成包含由柔性接头多肽接合的重链和轻链的可变结构域的单链抗体。细胞内抗体通常缺乏二硫键并且能够经由其特异性结合活性来调节靶标基因的表达或活性。单链细胞内抗体通常表达自重组核酸分子并且被工程化以保留于细胞内(例如保留于细胞质、内质网或周质中)。可使用本领

域已知方法来产生细胞内抗体，例如公开并综述于例如以下文献中的方法：Marasco等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:7889-7893;Chen等人(1994)Hum.Gene Ther.5:595-601;Chen等人(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.91:5932-5936;Maciej ewski等人(1995)Nat.Med.1:667-673;Marasco(1995)Immunotech.1:1-19;Mhashilkar等人(1995)EMBO J.14:542-1451;Chen等人(1996)Hum.Gene Therap.7:1515-1525;Marasco(1997)Gene Ther.4:11-15;Rondon和Marasco(1997)Annu.Rev.Microbiol.51:257-283;Cohen等人(1998)Oncogene 17:2445-2456;Proba等人(1998)J.Mol.Biol.275:245-253;Cohen等人(1998)Oncogene 17:2445-2456;Hassanzadeh等人(1998)FEBS Lett.437:81-86;Richardson等人(1998)Gene Ther.5:635-644;Ohage和Steipe(1999)J.Mol.Biol.291:1119-1128;Ohage等人(1999)J.Mol.Biol.291:1129-1134;Wirtz和Steipe(1999)Protein Sci.8:2245-2250;Zhu等人(1999)J.Immunol.Methods 231:207-222;Arafat等人(2000)Cancer Gene Ther.7:1250-1256;der Maur等人(2002)J.Biol.Chem.277:45075-45085;Mha shilkar等人(2002)Gene Ther.9:307-319;和Wheeler等人(2003)FA SEB J.17:1733-1735)。

[0379] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体可包括嵌合抗体。如本文所用，术语“嵌合抗体”是指重组抗体，其中重链和轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体的相应序列相同或同源，而链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体的相应序列相同或同源；以及此类抗体的片段，只要它们表现出期望的生物活性即可(参见例如美国专利第4,816,567号；Morrison等人(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.81:6851-6855)。例如，本文的目标嵌合抗体可包括包含源自非人类灵长类动物(例如旧大陆猴(Old World Monkey)，例如狒狒、恒河猴或食蟹猴)的可变结构域抗原结合序列和人类恒定区序列的“灵长类化”抗体。

[0380] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体可以是复合抗体。如本文所用，术语“复合抗体”是指具有包含来自两个或更多个不相关可变区的种系或非种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。另外，术语“复合人类抗体”是指具有源自人类种系或非种系免疫球蛋白序列的恒定区和包含来自两个或更多个不相关人类可变区的人类种系或非种系序列的可变区的抗体。由于复合人类抗体在人体内的抗原性降低，因此复合人类抗体可用作根据本发明的治疗剂中的有效组分。

[0381] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体可包括异源抗体。术语“异源抗体”是关于产生这种抗体的转基因非人类生物体定义的。该术语是指具有与在并非由转基因非人类动物组成的生物体中发现者相对应的氨基酸序列或编码核酸序列的抗体，并且通常来自非转基因非人类动物的物种。

[0382] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体可为人源化抗体。如本文所用，术语“人源化抗体”是指包含来自一种或多种非人类(例如鼠类)抗体来源的最小部分并且其余部分源自一种或多种人类免疫球蛋白来源的嵌合抗体。在大多数情况下，人源化抗体是如下人类免疫球蛋白(接受者抗体)：其中来自接受者抗体的高变区的残基由来自非人类物种(例如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物)的抗体(供体抗体)的高变区中具有期望特异性、亲和力和/或能力的残基代替。在一个实施方案中，抗体可为人源化全长抗体。可使用蛋白质工程化技术来生成人源化抗体(例如Gussow和Seemann(1991)Meth.Enzymol.203:99-121)。

作为一个非限制性实例，可使用美国专利公开第2013/0303399号中所教导的方法使抗体人源化。如本文所用，术语“人源化抗体”还包括其中源自另一哺乳动物物种如小鼠的种系的CDR序列已移植到人框架序列上的抗体。

[0383] 如本文所用，人源化小鼠是携带有功能性人类基因、细胞、组织和/或器官的小鼠。人源化小鼠通常用作人类治疗剂的生物学和医学研究中的小动物模型。裸小鼠和严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠可用于此目的。NCG小鼠、NOG小鼠和NSG小鼠可用于比其他模型更有效地移植人类细胞和组织。此类人源化小鼠模型可用于在健康和病理情况下模拟人类免疫系统，并且可能够在与人类生理学相关的体内环境中评估治疗候选者。

[0384] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体可包括经半胱氨酸修饰的抗体。在“经半胱氨酸修饰的抗体”中，通过基因操纵将半胱氨酸氨基酸插入或取代于抗体表面上并用于经由例如二硫桥使抗体缀合至另一分子。已阐述抗体的半胱氨酸取代或插入(参见例如美国专利第5,219,996号)。将半胱氨酸残基引入用于位点特异性缀合抗体的IgG抗体的恒定区中的方法阐述于Stimmel等人(2000)J.Biol.Chem.275:330445-30450)中。

[0385] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体变体可为抗体模拟物。如本文所用，术语“抗体模拟物”是指模拟抗体的功能或效应并且以高亲和力特异性结合至其分子靶标的任何分子。在一些实施方案中，抗体模拟物可为单抗体，其经设计以并入纤连蛋白类型III结构域(Fn3)作为蛋白质支架(参见美国专利第6,673,901号和第6,348,584号)。在一些实施方案中，抗体模拟物可包括本领域已知那些中的任一者，包括但不限于亲和体分子、亲和素、阿非丁(affitin)、抗运载蛋白、高亲和性多聚物、Centyrin、DARPINS™、Fynomer和Kunitz以及结构域肽。在其他实施方案中，抗体模拟物可包括一个或多个非肽区域。

[0386] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体可包含单一抗原结合结构域。这些分子极小，其中分子量大约为针对全尺寸mAb所观测者的十分之一。其他抗体可包括源自骆驼和骆马中所发现缺乏轻链的重链抗体的抗原结合可变重链区域(VHH)的“纳米抗体”(参见例如Nelson(2010)Mabs 2:77-83)。

[0387] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体可为“小型化”的。mAb小型化的一个实例是小模块免疫药物(SMIP)。这些分子可为单价或二价的，其为含有一个VL、一个VH抗原结合结构域和一个或两个恒定“效应”结构域的重组单链分子，所述结构域都由接头结构域连接。(参见例如Nelson(2010)Mabs 2:77-83)。据认为，这种分子可提供以下优点：增加了由片段所要求的组织或肿瘤渗透，同时保留由恒定结构域赋予的免疫效应功能。小型化抗体的另一个实例称为“单抗体”，其中已从IgG4分子去除铰链区。尽管IgG4分子不稳定并且可彼此交换轻-重链异二聚体，但缺失铰链区可完全防止重链-重链配对，从而留下高度特异性的单价轻/重异二聚体，同时保留Fc区以确保稳定性和体内半衰期。这种构型可最小化免疫活化或致癌生长的风险，这是因为IgG4很少与FcR相互作用并且单价单抗体不能促进细胞内信号传导复合物形成(参见例如Nelson(2010)Mabs 2:77-83)。

[0388] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的抗体变体可为单结构域抗体(sdAb或纳米抗体)。如本文所用，术语“sdAb”或“纳米抗体”是指由单一单体可变抗体结构域组成的抗体片段。如同完整抗体，其能够选择性结合至特异性抗原。在一个方面，sdAb可为“骆驼Ig”或“骆驼科VHH”。如本文所用，术语“骆驼Ig”是指重链抗体的最小已知抗原结合单元(Koch-Nolte等人(2007)FASEB J.21:3490-3498)。“重链抗体”或“骆驼科抗体”是指含有两个VH结构

域并且不含轻链的抗体(Hamers-Casterman等人(1993)Nature 363:446-448(1993);Sheriff等人(1996)Nat.Struct.Biol.3:733-736;Riechmann等人(1999)J.Immunol.Meth.231:25-38;PCT公开第WO1994/04678号和第WO 1994/025591号;以及美国专利第6,005,079号)。在另一方面,sdAb可为“免疫球蛋白新抗原受体”(IgNAR)。术语“免疫球蛋白新抗原受体”是指来自鲨鱼免疫谱的抗体类别,其由一个可变新抗原受体(VNAR)结构域和五个恒定新抗原受体(CNAR)结构域的同源二聚体组成。IgNAR代表一些最小已知免疫球蛋白基蛋白质支架,并且高度稳定并具有有效结合特性。固有稳定性可归因于以下两个因素:(i)基础Ig支架,其与发现于鼠类抗体中的常规抗体VH和VL结构域相比呈现大量带电和亲水性表面暴露残基;和(ii)互补决定区(CDR)环中的稳定结构特征,包括环间二硫桥和环内氢键模式。其他小型化抗体片段可包括“互补决定区肽”或“CDR肽”。CDR肽(也称为“最小识别单元”)是对应于单一互补决定区(CDR)的肽,并且可通过构建编码目标抗体的CDR的基因来制备。例如,通过使用聚合酶链反应从抗体产生细胞的RNA合成可变区来制备此类基因(参见例如Larrick等人(1991)Methods Enzymol.2:106)。

[0389] 包含抗体的抗原结合片段的其他变体可包括但不限于二硫化物连接的Fv(sdFv)、V_L、V_H、骆驼Ig、V-NAR、VHH、三特异性变体(Fab_3)、双特异性变体(Fab_2)、三价抗体(三价)、四价抗体(四价)、微小抗体($(scFv\text{-}CH3)_2$)、双特异性单链Fv(双scFv)、IgGδCH2、scFv-Fc、$(scFv)_2$-Fc、亲和体、肽适体、高亲和性多聚物或纳米抗体,或完整免疫球蛋白的其他抗原结合子序列。

[0390] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗体可为如美国专利第5,091,513号中所述的抗体。这种抗体可包括一个或多个构成表现为生物合成抗体结合位点(BABS)的区域的氨基酸序列。所述位点包含1)非共价缔合或二硫化物键结的合成VH和VL二聚体;2)VH-VL或VL-VH单链,其中VH和VL由多肽接头连接;或3)个别VH或VL结构域。结合结构域包含可源自单独免疫球蛋白的连接的CDR和FR区域。生物合成抗体还可包括用作例如酶、毒素、结合位点或至固定介质或放射性原子的连接位点的其他多肽序列。公开了用于产生生物合成抗体,用于设计具有任何可通过体内生成抗体来诱发的特异性的BABS,和用于产生其类似物的方法。

[0391] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗体可为具有美国专利第8,399,625号中所教导的抗体受体框架的抗体。这些抗体受体框架可特别充分适于接受来自目标抗体的CDR。

[0392] 在一个实施方案中,抗体可为条件性活性生物蛋白。可使用抗体来生成在野生型正常生理学条件下可逆地或不可逆地不活化的条件性活性生物蛋白,以及提供所述条件性活性生物蛋白和所述条件性活性生物蛋白的用途。此类方法和条件性活性蛋白教导于例如PCT公开第WO 2015/175375号和第WO 2016/036916号以及美国专利公开第2014/0378660号中。

[0393] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗体是治疗性抗体。如本文所用,术语“治疗性抗体”意指有效治疗患有或易患疾病或病症的哺乳动物的疾病或病症的抗体。抗体可为细胞渗透抗体、中和抗体、激动剂抗体、部分激动剂、反激动剂、部分拮抗剂或拮抗剂抗体。

[0394] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗体可为裸抗体。如本文所用,术语“裸抗体”是不含其他修饰的完整抗体分子,所述其他修饰是例如与毒素或用于结合至放射性核素的螯合物缀合。裸抗体的Fc部分可提供效应功能,例如补体固定和ADCC(抗体依赖性细胞毒

性),所述效应功能开启了可导致细胞裂解的机制(参见例如Markrides(1998) Pharmacol.Rev.50:59-87)。

[0395] 众所周知,抗体会导致细胞外携带被抗体特异性识别的抗原的细胞消耗。这种消耗可能通过至少三种机制介导:抗体介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性裂解和通过经由抗体靶向抗原给出的信号直接抗肿瘤抑制肿瘤生长。

[0396] "补体依赖性细胞毒性"或"CDC"是指在补体存在下靶细胞的裂解。经典补体途径的激活是通过补体系统的第一组分与同其同源抗原结合的抗体的结合而启动的。为了评价补体激活,可进行CDC测定,例如如Gazzano-Santoro等人(1997)中所述。

[0397] "抗体依赖性细胞介导的细胞毒性"或"ADCC"是指一种细胞毒性形式,其中结合在某些细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)的分泌抗体使得这些细胞毒性效应细胞能够与携带抗原的靶细胞特异性结合并随后杀伤靶细胞。为了评价目标分子的ADCC活性,可进行体外ADCC测定,例如美国专利第5,500,362号或第5,821,337号中所述者。如本领域中众所周知的,Fc部分可被工程化以实现与Fc受体的期望相互作用或缺乏相互作用。

[0398] Fc受体存在于许多参与免疫反应的细胞上。Fc受体(FcR)是免疫球蛋白多肽(Ig)的Fc部分的细胞表面受体。迄今为止已鉴定的人类FcR包括识别IgG(称为FcγR)、IgE(FcεR1)、IgA(Fcα)和聚合IgM/A(FcμαR)的那些。FcR存在于以下细胞类型中:FcεR I(肥大细胞)、FcεR.II(许多白细胞)、FcαR(嗜中性粒细胞)和FcμαR(腺上皮、肝细胞)(Hogg,N.(1988)Immunol.Today 9:185-86)。广泛研究的FcγR是细胞免疫防御的核心,并且负责刺激炎症介体和参与自身免疫性疾病发病机制的水解酶的释放(Unkeless,J.C.等人(1988) Annu.Rev.Immunol.6:251-81)。FcγR提供了效应细胞和分泌Ig的淋巴细胞之间的关键联系,因为巨噬细胞/单核细胞、多形核白细胞和自然杀伤(NK)细胞FcγR赋予了一种由IgG介导的特异性识别元件。人类白细胞具有至少三种不同的IgG受体:h FcγRI(在单核细胞/巨噬细胞上发现)、hFcγRII(在单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、可能的B细胞和K562细胞系上)和FcγIII(在NK细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞上)。

[0399] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的抗体可与一种或多种可检测标记缀合,用于根据本领域众所周知的方法进行检测。标记可以是放射性同位素、荧光化合物、化学发光化合物、酶或酶辅因子,或本领域已知的任何其他标记。在一些实施方案中,结合所需靶标的抗体(本文也称为"初级抗体")未被标记,但可通过与初级抗体特异性结合的第二抗体(本文称为"二级抗体")的结合来检测。根据这样的方法,二级抗体可包括可检测标记的二级抗体。

[0400] 在一些实施方案中,可连接至抗体的酶可包括但不限于辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶(GOx)。荧光化合物可包括但不限于溴化乙锭(ethidium bromide);荧光素和其衍生物(例如FITC);花青和其衍生物(例如吲哚羰花青、氧杂羰花青、硫杂羰花青和部花青);罗丹明;俄勒冈绿(oregon green);曙红(eosin);得克萨斯红(texas red);尼罗红(nile red);尼罗蓝(nile blue);甲酚紫;噁嗪170;原黄素(proflavin);吖啶橙;吖啶黄;金胺;结晶紫;孔雀绿;卟吩;酞菁;胆红素;别藻蓝蛋白(APC);绿色荧光蛋白(GFP)和其变体(例如黄色荧光蛋白YFP、蓝色荧光蛋白BFP和青色荧光蛋白CFP);ALEXIFLOUR®化合物(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA);和量子

点。可用于标记抗体的其他缀合物可包括生物素、抗生物素蛋白和链霉亲和素。

[0401] 例如，本发明所涵盖的抗体或其他蛋白质与异源剂的缀合可使用多种双功能蛋白质偶联剂进行，所述偶联剂包括但不限于(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、酰亚胺酯的双功能衍生物(例如己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(例如双(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，碳标记的1-异硫氰基苄基甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂(WO 94/11026)。

[0402] 在另一方面，本发明的特征在于特异性结合目标生物标志物的抗体，所述抗体缀合至治疗部分，例如细胞毒素、药物和/或放射性同位素。当缀合至细胞毒素时，这些抗体缀合物被称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害(例如，杀伤细胞)的任何剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米汀(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替诺泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙素(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽二酮、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素(puromycin)及其类似物或同源物。治疗剂包括但不限于抗代谢药(例如甲氨蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(dacarbazine))、烷化剂(例如，二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、塞替派(thioepa)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)和洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类药物(例如，柔红霉素(以前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如，更生霉素(dactinomycin)(以前称为放线菌素)、博来霉素(bleomycin)、光神霉素和蒽霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)。本发明所涵盖的抗体可与放射性同位素例如放射性碘缀合，以生成用于治疗相关病症如癌症的细胞毒性放射性药物。

[0403] 缀合的抗生物标志物抗体可以诊断方式或预后方式用于监测组织中的多肽水平，作为临床测试程序的一部分，例如，以确定给定治疗方案的功效或选择最有可能对免疫疗法有反应的患者。例如，可在流式细胞术测定中透化细胞以允许结合目标生物标志物的抗体靶向其识别的细胞内表位并允许通过分析从缀合分子发出的信号来检测结合。可通过将抗体偶联(即物理连接)至可检测物质来促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶；合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素；合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白(PE)；发光材料的实例包括鲁米诺；生物发光材料的实例包括荧光素酶、虫荧光素和水母发光蛋白，并且合适的放射性材料的实例包括^{125}I、^{131}I、^{35}S或^{3}H。如本文所用，关于抗体的术语“标记的”旨在涵盖通过将可检测物质如放射性剂或荧光团(例如异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红蛋白(PE)或吲哚菁(Cy5))偶联

(即,物理连接)至抗体来直接标记抗体,以及通过与可检测物质的反应性来间接标记抗体。

[0404] 本发明所涵盖的抗体缀合物可用于改变给定的生物反应。治疗部分不应被解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有所需生物活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可包括例如酶活性毒素或其活性片段,例如相思豆蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,例如肿瘤坏死因子或干扰素-γ;或者,生物反应调节剂,例如淋巴因子、白介素-1("IL-1")、白介素-2("IL-2")、白介素-6("IL-6")、颗粒细胞巨噬细胞集落刺激因子("GM-CSF")、颗粒细胞集落刺激因子("G-CSF")或其他细胞因子或生长因子。

[0405] 将此类治疗部分与抗体缀合的技术是众所周知的,参见例如Arnon等人,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy",Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编辑),第243 56页(Alan R.Liss,Inc.1985);Hellstrom等人,"Antibodies For Drug Delivery",Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等人(编辑),第623 53页(Marcel Dekker,Inc.1987);Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review",Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编辑),第475 506页(1985);"Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use OfRadiolabeled Antibody In Cancer Therapy",Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(编辑),第303 16页(Academic Press 1985);以及Thorpe等人,"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates",Immunol.Rev.,62:119 58(1982)。

[0406] 在一些实施方案中,可使用促进细胞毒性剂或生长抑制剂在细胞中释放的"可切割接头"进行缀合。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物的接头(参见例如美国专利第5,208,020号)。或者,可通过重组技术或肽合成制备包含抗体和细胞毒性剂或生长抑制剂的融合蛋白。DNA的长度可包含编码缀合物的两个部分的相应区域,所述两个部分彼此相邻或者被编码不破坏缀合物的期望特性的接头肽的区域隔开。

[0407] 在一些实施方案中,本发明涵盖抗体-药物缀合物(ADC)剂。ADC是抗体与另一部分的缀合物,因此该剂具有所述抗体赋予的靶向能力和所述部分赋予的额外效应。例如,细胞毒性药物可与抗体或其抗原结合片段系连,其将所述药物靶向促进疾病进展(例如,肿瘤进展)的目标细胞,并在内化后释放其毒性有效载荷至细胞。基于如上所述的缀合部分实现了不同的效应。

[0408] 在一些实施方案中,可在抗体(及其抗原结合片段)的结构和编码它们的DNA序列中进行额外的修饰和改变,并且仍然获得编码具有所需特征的抗体和多肽的功能分子。例如,某些氨基酸可被蛋白质结构中的其他氨基酸取代而没有明显的活性损失。由于蛋白质的相互作用能力和性质决定了蛋白质的生物学功能活性,因此可在蛋白质序列中进行某些氨基酸取代,当然,在其DNA编码序列中进行某些氨基酸取代,同时仍然获得具有类似特性的蛋白质。因此预期可在本发明的抗体序列或编码所述多肽的相应DNA序列中进行各种改变,而不会明显损失它们的生物活性。

[0409] 在一个实施方案中,可通过改变DNA序列中的密码子以编码基于遗传密码保守性的保守取代来实现氨基酸改变。具体来说,特定蛋白质的氨基酸序列与可编码蛋白质的核

苷酸序列之间存在已知且明确的对应关系，如遗传密码所定义(如下所示)。同样，特定核酸的核苷酸序列与由该核酸编码的氨基酸序列之间存在已知且明确的对应关系，如遗传密码所定义(参见上文的遗传密码表)。

[0410] 如上文所述，遗传密码的一个重要且众所周知的特征是其冗余性，由此，对于用于制造蛋白质的大多数氨基酸，可使用多于一个编码核苷酸三联体(上文示出)。因此，许多不同的核苷酸序列可编码给定的氨基酸序列。此类核苷酸序列被认为在功能上是等效的，因为它们导致在所有生物体中产生相同的氨基酸序列(尽管某些生物体可能比其他生物体更有效地翻译某些序列)。此外，有时可在给定的核苷酸序列中发现嘌呤或嘧啶的甲基化变体。这种甲基化不影响三核苷酸密码子和相应氨基酸之间的编码关系。

[0411] 在对多肽的氨基酸序列进行改变时，可考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用性生物功能方面的重要性是本领域普遍理解的。公认氨基酸的相对亲水特性有助于所得蛋白质的二级结构，这反过来又限定了蛋白质与其他分子例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等的相互作用。每个氨基酸都根据其疏水性和电荷特征分配了亲水指数，它们是：异亮氨酸(+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸/胱氨酸(+2.5)；蛋氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(<RTI 3.5)；天冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)；和精氨酸(-4.5)。

[0412] 本领域已知某些氨基酸可被具有相似亲水指数或分数的其他氨基酸取代，并且仍然产生具有相似生物学活性的蛋白质，即仍然获得生物学功能等效的蛋白质。

[0413] 如上文所概述，氨基酸取代因此通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性，例如，它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑到各种前述特征的示例性取代是本领域技术人员众所周知的并且包括：精氨酸和赖氨酸；谷氨酸和天冬氨酸；丝氨酸和苏氨酸；谷氨酰胺和天冬酰胺；以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0414] 本发明抗体的另一类氨基酸修饰可用于改变抗体的原始糖基化模式以例如增加稳定性。“改变”是指删除抗体中发现的一个或多个碳水化合物部分，和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。抗体的糖基化通常是N-连接的。“N-连接的”是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基侧链的连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸，其中X是除脯氨酸之外的任何氨基酸，是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链的酶促连接的识别序列。因此，多肽中这些三肽序列中任一者的存在产生潜在的糖基化位点。将糖基化位点添加到抗体可方便地通过改变氨基酸序列来实现，以使其含有一个或多个上述三肽序列(对于N-连接的糖基化位点)。另一种类型的共价修饰涉及将糖苷化学或酶促偶联到抗体上。这些程序的优点在于它们不需要在具有用于N-或O-连接糖基化的糖基化能力的宿主细胞中产生抗体。根据所使用的偶联模式，糖可以连接到(a)精氨酸和组氨酸，(b)游离羧基，(c)游离巯基，例如半胱氨酸的游离巯基，(d)游离羟基，例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基，(e)芳族残基，例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基，或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。例如，WO87/05330中描述了此类方法。

[0415] 类似地，可通过化学或酶促方式去除抗体上存在的任何碳水化合物部分。化学去糖基化需要将抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物。这种处理导致除连接糖(N-乙酰葡糖胺或N-乙酰半乳糖胺)之外的大部分或所有糖裂解，同时保持抗体完整。化学去糖基

化描述于Sojahr H.等人(1987)和Edge,A S.等人(1981)。如Thotakura,N R.等人(1987)所述,可通过使用多种内切糖苷酶和外切糖苷酶来实现抗体上碳水化合物部分的酶促切割。

[0416] 其他修饰可能涉及免疫缀合物的形成。例如,在一种类型的共价修饰中,抗体或蛋白质以美国专利第4,640,835号、第4,496,689号、第4,301,144号、第4,670,417号、第4,791,192号或第4,179,337号中阐述的方式共价连接到多种非蛋白质聚合物中的一种,例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯。

[0417] b.抗体工程化

[0418] 如上文所述,可用于产生抗体和抗体片段(例如Fab和scFv)的技术是本领域众所周知的并且包括阐述于以下文献中者:美国专利第4,946,778号和第5,258,498号;Miersch等人(2012)Methods 57:486-498;Chao等人(2006)Nat.Protoc.1:755-768);Huston等人(1991)Methods Enzymol.203:46-88;Shu等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:7995-7999;以及Skerra等人(1988)Science 240:1038-1041)。

[0419] 在分离或选择靶抗原特异性抗体之后,可使用抗体序列来重组产生和/或优化此类抗体。在从展示文库分离抗体片段的情况下,可使用来自所分离片段的编码区来生成全抗体(包括人类抗体)或任何其他期望靶标结合片段,并且表达于任何期望宿主(包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌)中,例如如下文详细所述。如果期望,则可从根据本文所述方法产生或选择的可变结构域片段来合成IgG抗体(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)以用于进一步测试和/或产品开发。可通过将一个或多个编码期望氨基酸序列的cDNA区段插入适于IgG产生的表达载体中来产生此类抗体。表达载体可包含适用于哺乳动物细胞中的IgG表达的哺乳动物表达载体。可进行哺乳动物IgG表达以确保所产生抗体包含哺乳动物蛋白的修饰(例如糖基化)特性,和/或确保抗体制剂并无可存在于来自细菌表达系统的蛋白质制剂中的内毒素和/或其他污染物。

[0420] 在一些实施方案中,实施亲和力成熟。术语“亲和力成熟”是指经由连续数轮突变和选择编码抗体或抗体片段的cDNA序列来产生对给定靶标具有增加的亲和力的抗体的方法。在一些情况下,在体外实施该方法。为实现该方法,可使用易错PCR扩增可变结构域序列(在一些情况下限于CDR编码序列)以产生数百万个含有突变(包括但不限于点突变、区域突变、插入突变和缺失突变)的拷贝。如本文所用,术语“点突变”是指其中核苷酸序列内的一个核苷酸变为不同核苷酸的核酸突变。如本文所用,术语“区域突变”是指其中两个或更多个连续核苷酸变为不同核苷酸的核酸突变。如本文所用,术语“插入突变”是指其中将一个或多个核苷酸插入核苷酸序列中的核酸突变。如本文所用,术语“缺失突变”是指其中从核苷酸序列去除一个或多个核苷酸的核酸突变。插入或缺失突变可包括完全代替整个密码子或通过改变起始密码子的一个或两个核苷酸来将一个密码子变为另一密码子。

[0421] 可在编码CDR的cDNA序列上实施诱变以产生数百万个在重链和轻链CDR区中具有单一突变的突变体。在另一种方法中,仅在最可能改进亲和力的CDR残基处引入随机突变。可使用这些新生诱变文库重复所述过程以筛选编码对靶标肽具有极高亲和力的抗体片段的克隆。连续数轮突变和选择可促进具有越来越大亲和力的克隆的合成(参见例如Chao等人(2006)Nat.Protoc.1:755-768)。

[0422] 可基于如通过结合测定(例如FACS、ELISA、表面等离子体共振等)所测定的亲和力来选择亲和力成熟的克隆。然后可将所选克隆转变成IgG并且进一步测试亲和力和功能活

性。在一些情况下，亲和力优化的目标是与原始抗体的亲和力相比将亲和力增加至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍或至少1,000倍或更高倍。在优化亲和力小于期望值的情况下，可重复所述过程。

[0423] 在一些实施方案中，生成嵌合和/或人源化抗体是有用的。例如，对于一些应用(包括抗体在人类中的体内应用和体外检测测定)来说，可优选使用嵌合、人源化或人类抗体。嵌合抗体是其中不同抗体部分源自不同动物物种的分子，例如具有源自鼠类单克隆免疫球蛋白的可变区和人类免疫球蛋白恒定区的抗体。产生嵌合抗体的方法是本领域众所周知的(参见例如Morrison(1985)Science 229:1202-1207;Gillies等人(1989)J.Immunol.Meth.125:191-202;以及美国专利第5,807,715号、第4,816,567号和第4,816,397号)。

[0424] 人源化抗体是来自非人类物种的抗体分子，其结合至期望靶标并且具有一个或多个来自非人类物种的互补决定区(CDR)和来自人类免疫球蛋白分子的框架区。通常，人类框架区中的框架残基被来自供体抗体的CDR和框架区的相应残基取代以改变、优选地改进靶标结合。这些框架取代是通过本领域众所周知的方法来鉴定，例如通过对CDR与框架残基的相互作用建模以鉴定对靶标结合至关重要的框架残基，以及通过序列比较来鉴定特定位置的不寻常框架残基(参见例如美国专利第5,693,762号和第5,585,089号;Riechmann等人(1988)Nature 332:323-327)。

[0425] 可使用本领域已知的各种技术使抗体人源化，所述技术包括例如CDR移植(参见例如欧洲专利公开第239,400号;PCT公开第WO 91/09967号;美国专利第5,225,539号、第5,530,101号和第5,585,089号);饰面或表面重整(参见例如欧洲专利公开第592,106号;欧洲专利公开第519,596号;Padlan(1991)Mol.Immunol.28:489-498;Studnicka等人(1994)Protein Eng.7:805-814;Roguska等人(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.91:969-973);以及链改组(参见例如美国专利第5,565,332号)。

[0426] 完全人类抗体特别期望用于治疗性治疗人类患者，以避免或缓解对外来蛋白质的免疫反应。人类抗体可通过本领域已知的各种方法制得，包括使用源自人类免疫球蛋白序列的抗体文库的上述抗体展示方法(参见例如美国专利第4,444,887号和第4,716,111号;以及PCT公开第WO 98/46645号、第WO 98/50433号、第WO 98/24893号、第WO 98/16654号、第WO 96/34096号、第WO 96/33735号和第WO 91/10741号)。还可使用不能表达功能内源性免疫球蛋白但可表达人类免疫球蛋白多核苷酸的转基因小鼠来产生人类抗体。例如，可随机或通过同源重组将人类重链和轻链免疫球蛋白多核苷酸复合物引入小鼠胚胎干细胞中。或者，除人类重链和轻链多核苷酸外，还可将人类可变区、恒定区和多样化区引入小鼠胚胎干细胞中。可分别地或与通过同源重组引入人类免疫球蛋白基因座同时使小鼠重链和轻链免疫球蛋白多核苷酸变为非功能性。特别是，JH区的纯合缺失可防止内源性抗体产生。将经修饰的胚胎干细胞扩增并微注射至胚泡中以产生嵌合小鼠。然后将嵌合小鼠繁育以产生表达人类抗体的纯合后代。以常用方式使用所选免疫原(例如靶抗原)对转基因小鼠进行免疫。使用这种技术，可产生有用人类IgG、IgA、IgM、IgD和IgE抗体。如上文所阐释，产生人类抗体和人类单克隆抗体的方法以及产生此类抗体的方案是本领域众所周知的(还参见例如PCT公开第WO 98/24893号、第WO 92/01047号、第WO 96/34096号和第WO 96/33735号;以及美国

专利第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号、第5,885,793号、第5,916,771号、第5,939,598号、第6,075,181号和第6,114,598号)。

[0427] 一旦已通过动物、细胞系产生本发明所涵盖的抗体分子,以化学方式合成或以重组方式表达,就可通过本领域已知的任何方法纯化(即分离)以纯化免疫球蛋白或多肽分子,所述方法是例如通过色谱法(例如离子交换色谱法、亲和色谱法,特别是用于特定靶标的亲和色谱法、蛋白质A色谱法和粒度分级柱色谱法)、离心、差别溶解性或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术。另外,本发明所涵盖的抗体或其片段可与本文所述或以其他方式为本领域已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0428] 根据本发明,特异性结合至抗原的抗体可存在于溶液中或结合至底物。在一些实施方案中,抗体结合至纤维素纳米珠粒并限制于检测装置的基板的一个或多个检测区域中。

[0429] c.抗体生成

[0430] 本发明所涵盖的抗体及其抗原结合片段可为天然存在的或经由本领域已知的任何方法人工制得,例如通过常规杂交瘤技术、重组技术、突变或优化已知抗体、从抗体文库或抗体片段文库进行选择和免疫化产生的单克隆抗体(mAb)。本领域众所周知抗体(不论单克隆或多克隆)的生成。本领域众所周知的产生抗体的技术并阐述于例如以下文献中:Harlow和Lane“Antibodies,A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988;Harlow和Lane“Using Antibodies:A Laboratory Manual”Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999;和“Therapeutic Antibody Engineering:Current and Future Advances Driving the Strongest Growth Area in the Pharmaceutical Industry”Woodhead Publishing,2012。

[0431] 可使用重组多核苷酸来产生如本文所述的抗体以及其变体和/或片段。在一个实施方案中,多核苷酸具有模块设计以编码抗体、其片段或变体中的至少一者。作为一个非限制性实例,多核苷酸构建体可编码下列设计中的任一者:(1)抗体的重链,(2)抗体的轻链,(3)抗体的重链和轻链,(4)通过接头间隔开的重链和轻链,(5)VH1、CH1、CH2、CH3结构域、接头和轻链,或(6)VH1、CH1、CH2、CH3结构域、VL区和轻链。这些设计中的任一者还可包含任何结构域和/或区域之间的任选接头。可使用本文所述的抗体或任何其组分部分作为起始分子来工程化本发明所涵盖的多核苷酸以产生任何标准类别的免疫球蛋白。

[0432] 抗体开发的方法通常依赖于使用靶分子进行选择、免疫和/或抗体亲和力和/或特异性的确认。在一些实施方案中,可使用本领域技术人员已知的成熟方法,通过用一种或多种靶抗原使宿主免疫来制备抗体,所述靶抗原充当免疫原以引发免疫学反应。

[0433] d.抗体表征和效应

[0434] 可通过一种或多种选自由以下组成的组的特性来表征本发明所涵盖的抗体及其抗原结合片段:结构、同种型、结合(例如亲和力和特异性)、缀合、糖基化和其他区分特征。

[0435] 本发明所涵盖的此类药剂可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,此类抗体是人类、鼠类(例如小鼠和大鼠)、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡来源的抗体。本发明所涵盖的抗体可为单特异性或多特异性。多特异性抗体可对本发明所涵盖肽的不同表位具有特异性,或者可对本发明所涵盖的肽和异源表位(例如异源肽或固体载体材料)具

有特异性(参见例如PCT公开第WO 93/17715号、第WO 92/08802号、第WO 91/00360号和第WO 92/05793号;Tutt等人(1991)J.Immunol.147:60-69;美国专利第4,474,893号、第4,714,681号、第4,925,648号、第5,573,920号和第5,601,819号;以及Kostelny等人(1992)J.Immunol.148:1547-1553)。例如,可针对含有本发明所涵盖肽序列的重复单元的肽产生抗体,或者它们可针对含有两个或更多个本发明所涵盖的肽序列的肽产生,或它们的组合。作为一个非限制性实例,已设计异源二价配体(HBL)系统,其竞争性抑制抗原结合至肥大细胞结合的IgE抗体,由此抑制肥大细胞脱粒(Handlogten等人(2011)Chem.Biol.18:1179-1188)。

[0436] 可相对于标准物在正常生理学条件下在体外或体内测定抗体特性。还可相对于抗体的存在或不存在来进行测量。此类测量方法包括组织或流体(例如血清或血液)中的标准测量,例如蛋白质印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、活性测定、报告基因测定、荧光素酶测定、聚合酶链反应(PCR)阵列、基因阵列、实时逆转录酶(RT)PCR等。

[0437] 抗体可结合靶蛋白上或沿靶蛋白的任何数量的位置或与其相互作用。所涵盖抗体靶位点包括靶蛋白上的任何和所有可能的位点。可针对结合(可逆地或不可逆地)至特定靶标上的一个或多个表位的能力来选择抗体。靶标上的表位可包括但不限于一个或多个特征、区域、结构域、化学基团、官能团或部分。此类表位可由一个或多个原子、原子团、原子结构、分子结构、环状结构、疏水性结构、亲水性结构、糖、脂质、氨基酸、肽、糖肽、核酸分子或任何其他抗原结构构成。

[0438] 表位映射方法是本领域众所周知的,并且包括但不限于结构、功能和计算方法。X射线晶体学是一种众所周知的结构方法,其中键合的抗体-抗原对的晶体结构能够非常准确地确定来自抗原表位和抗体互补位中的侧链和主链原子的单个氨基酸之间的关键相互作用。彼此相距在4埃以内的氨基酸通常被认为是接触残基。所述方法通常涉及抗体和抗原的纯化、复合物的形成和纯化,然后连续几轮的结晶筛选和优化以获得衍射质量的晶体。在同步加速器源处常常按照x射线晶体学获得结构解决方案。表位映射的其他结构方法包括但不限于氢-氘交换耦合质谱法、交联耦合质谱法和核磁共振(NMR)(Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris编辑(1996);Abbott等人(2014)Immunol.142:526-535)。

[0439] 表位映射的功能方法也是本领域众所周知的,并且通常涉及抗体与完整蛋白质、蛋白质片段或肽的结合的评价或量化。表位映射的功能方法可用于例如鉴定线性或构象表位和/或可用于推断何时两种或更多种不同的抗体结合相同或相似的表位。表位映射的功能方法包括例如免疫印迹和免疫沉淀测定,其中测试来自目标生物标志物的重叠或连续肽与抗生物标志物抗体如本文所述那些的反应性。表位映射的其他功能方法包括基于阵列的寡肽扫描(或者称为“重叠肽扫描”或“pepscan分析”)、定点诱变(例如,丙氨酸扫描诱变)和高通量诱变映射(例如,鸟枪诱变映射)。

[0440] 众多类型的竞争性结合测定是已知的,其包括以下非限制性实例:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(Stahli等人(1983)Meth.Enzymol.9:242);固相直接生物素-亲和素EIA(Kirkland等人(1986)J.Immunol.137:3614);固相直接标记测定或固相直接标记夹心测定(Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press(1988));使用I^{125}标记的

固相直接标记RIA(Morel等人(1988)Mol.Immunol.25:7);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung等人(1990)Virol.176:546);和直接标记的RIA(Moldenhauer等人(1990)Scand.J.Immunol.32:77)。通常,此类测定涉及使用与固体表面或细胞结合的纯化抗原以及1)未标记的测试抗原结合蛋白和标记的参考抗原结合蛋白,或2)标记的测试抗原结合蛋白和未标记的抗原结合蛋白参考抗原结合蛋白。在测试抗原结合蛋白的存在下,通过确定结合到固体表面或细胞上的标记的量来测量竞争性抑制。通常测试抗原结合蛋白过量存在。通过竞争测定法鉴定的抗原结合蛋白(竞争性抗原结合蛋白)包括结合至与参考抗原结合蛋白相同表位的抗原结合蛋白和结合至与参考抗原结合蛋白所结合的表位足够接近的相邻表位以允许位阻发生的抗原结合蛋白。在本文的实施例中提供了关于用于确定竞争性结合的方法的额外细节。通常,当竞争性抗原结合蛋白过量存在(例如,过量约1倍、约5倍、约10倍、约20倍、约50倍或约100倍)时,它将参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合抑制或阻断至少约40-45%、约45-50%、约50-55%、约55-60%、约60-65%、约65-70%、约70-75%或约75%或更多。在一些情况下,结合被抑制至少约80-85%、约85-90%、约90-95%、约95-97%、或约97%或更多。

[0441] 可使用普通技术人员众所周知的试剂、方法和测定法来评价本文所述的药剂例如抗体、其抗原结合片段、细胞等的作用,尤其是考虑到实施例。在一些实施方案中,对照用于比较,例如在上文定义中描述的那些。例如,测定法可涉及将生物标志物靶标(例如在细胞或底物上)与目标试剂接触,确定所需的测量值(例如,量、活性、细胞因子产生、细胞增殖、细胞死亡等),以及将测量值与来自参考或对照的测量值进行比较,例如通过与对照药剂如不特异性结合目标抗原的对照抗体或其抗原结合片段接触而产生的测量值。可使用任何已知的测量或测定法,尤其是实施例中提出的那些,例如常规细胞因子产生测定测定法、细胞活化测定法、细胞增殖测定法、细胞死亡测定法、细胞迁移测定法、细胞信号传导测定法等。

[0442] 同样如上文定义中所述,期望测量的“显著”调制可进行数字量化,例如高于某个数值(例如,百分比)、低于某个数值(例如,百分比)或在某个数值范围(例如,百分比范围)内。定量测量的代表性非限制性实例包括亲和力(K_D)、k_d、k_a、生物标志物表达的增加或减少百分比、细胞(例如,期望细胞、非期望细胞、期望细胞与非期望细胞的比率、期望细胞与总细胞的比率、非期望细胞与总细胞的比率等,在一个时间点或与不同时间点进行比较等)的增加或减少百分比。

[0443] V.核酸、载体和细胞,包括宿主细胞

[0444] 本发明的另一个目的涉及编码本文所述的抗体及其抗原结合片段(及其片段)的核酸序列,以及多肽、载体和细胞,包括宿主细胞。

[0445] a.核酸剂

[0446] 本发明所涵盖的一个方面涉及使用核酸分子。核酸分子可为脱氧核糖核酸(DNA)分子(例如cDNA、基因组DNA等)、核糖核酸(RNA)分子(例如mRNA、长非编码RNA、小RNA物质等)、DNA/RNA杂合体,以及使用核苷酸类似物生成的DNA或RNA的类似物。RNA剂可包括RNAi(RNA干扰)剂(例如小干扰RNA(siRNA))、单链RNA(ssRNA)分子(例如反义寡核苷酸)或双链RNA(dsRNA)分子。dsRNA分子包含第一链和第二链,其中第二链与第一链基本上互补,并且第一链和第二链形成至少一个双链体区域。dsRNA分子可具有钝端或具有至少一个末端悬突。在用作结合靶核酸序列的剂时,本发明所涵盖的核酸剂可杂交至靶序列(例如基因组序

列和/或mRNA序列)的任何区域,包括但不限于增强子区域、启动子区域、转录起始和/或终止区域、剪接位点、编码区、3'-非翻译区(3'-UTR)、5'-非翻译区(5'-UTR)、5'帽、3'聚腺苷酰基尾部或其任何组合。

[0447] "经分离"核酸分子是与存在于核酸分子天然来源中的其他核酸分子所分离者。优选地,"经分离"核酸分子不含天然侧接于衍生核酸的生物体的基因组DNA中的核酸的序列(优选地蛋白质编码序列,即位于核酸的5'端和3'端的序列)。例如,在各个实施方案中,经分离核酸分子可含有小于约5kB、4kB、3kB、2kB、1kB、0.5kB或0.1kB的天然侧接于衍生核酸的细胞的基因组DNA中的核酸分子的核苷酸序列。此外,"经分离"核酸分子(例如cDNA分子)可在通过重组技术产生时基本上不含其他细胞材料或培养基,或在以化学方式合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。

[0448] 可使用标准分子生物学技术和本文所述数据库记录中的序列信息来分离本发明所涵盖的核酸分子。使用这些核酸序列的全部或一部分,可使用标准杂交和克隆技术来分离本发明所涵盖的核酸分子(例如如Sambrook等人编辑,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,2012中所述)。

[0449] 可使用cDNA、mRNA或基因组DNA(作为模板)和适当寡核苷酸引物根据标准PCR扩增技术来扩增本发明所涵盖的核酸分子。可将如此扩增的核酸分子克隆至适当载体中并通过DNA序列分析进行表征。此外,可通过标准合成技术例如使用自动化核酸合成器来制备对应于本发明所涵盖核酸分子的全部或一部分的核酸分子。或者,可以生物方式使用亚克隆核酸的表达载体来产生核酸分子。例如,可以反义定向克隆反义核酸分子(即,从插入核酸转录的RNA与目标靶核酸具有反义定向,如下文进一步所述)。

[0450] 此外,本发明所涵盖的核酸分子可仅包含核酸序列的一部分,其中全长核酸序列包含本发明所涵盖的标志物或编码对应于本发明所涵盖的标志物的多肽。可使用这些核酸分子作为例如探针或引物。探针/引物通常是以一种或多种基本上纯化的寡核苷酸形式来使用。寡核苷酸通常包含在严格条件下杂交至生物标志物核酸序列的至少约7、优选地约15、更优选地约25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350或400或更多个连续核苷酸的核苷酸序列区域。可使用基于生物标志物核酸分子的序列的探针来检测对应于本发明所涵盖一个或多个标志物的转录物或基因组序列。探针包含连接至其的标记基团,例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。

[0451] 还涵盖由于遗传密码简并性而与编码对应于生物标志物的蛋白质的核酸分子的核苷酸序列不同并且由此编码相同蛋白质的生物标志物核酸分子。

[0452] 另外,本领域技术人员将了解,在群体(例如人类群体)内可存在引起氨基酸序列变化的DNA序列多态性。在群体内的个体之间可由于天然等位基因变异而存在这样的基因多态性。等位基因是在给定遗传基因座替代性存在的一组基因中的一者。另外,应了解,还可存在影响RNA表达水平的DNA多态性,其可影响所述基因的总体表达水平(例如通过影响调节或降解)。

[0453] 术语"等位基因"可在本文中与"等位基因变体"互换使用,其是指替代形式的基因或其部分。等位基因占据同源染色体上的相同基因座或位置。在受试者具有基因的两个相同等位基因时,所述受试者可称为对于所述基因或等位基因为纯合性。在受试者具有基因

的两个不同等位基因时，所述受试者被称为对于所述基因或等位基因为杂合性。例如，生物标志物等位基因可在单一核苷酸或若干核苷酸中彼此不同，并且可包括核苷酸的取代、缺失和插入。基因的等位基因还可呈含有一种或多种突变的基因形式。

[0454] 术语“基因的多态区域的等位基因变体”或“等位基因变体”可在本文中互换使用并且是指替代形式的具有发现于群体中的所述基因区域中的若干可能核苷酸序列之一的基因。如本文所用，等位基因变体意在涵盖功能性等位基因变体、非功能性等位基因变体、SNP、突变和多态性。

[0455] 术语“单一核苷酸多态性”(SNP)是指由单一核苷酸占据的多态位点，其是等位基因序列之间的变化位点。所述位点的前后通常具有高度保守的等位基因序列(例如在群体的小于1/100或1/1000成员中有所变化的序列)。SNP通常源自使用一种核苷酸取代多态位点处的另一者。SNP还可源自相对于参考等位基因缺失核苷酸或插入核苷酸。通常，多态位点由除参考碱基外的碱基占据。例如，在参考等位基因在多态位点处含有碱基“T”(胸苷)的情形下，改变的等位基因可在所述多态位点处含有“C”(胞苷)、“G”(鸟嘌呤)或“A”(腺嘌呤)。SNP可出现于编码蛋白质的核酸序列中，在这种情况下其可产生缺陷性蛋白质或另外变体蛋白或基因疾病。这种SNP可改变基因的编码序列并且因此指定另一氨基酸(“误义”SNP)或SNP可引入终止密码子(“无义”SNP)。在SNP不改变蛋白质的氨基酸序列时，SNP被称为“沉默的”。SNP还可出现于核苷酸序列的非编码区域中。这可例如因交替剪接而产生缺陷性蛋白质表达，或者其可对蛋白质功能无影响。

[0456] 如本文所用，术语“基因”和“重组基因”是指包含编码对应于本发明所涵盖标志物的多肽的开放阅读框的核酸分子。这些天然等位基因变化通常可引起给定基因的核苷酸序列中的1-5％变化。可通过对许多不同个体中的目标基因测序来鉴定替代等位基因。这可通过使用杂交探针鉴定多个个体中的相同遗传基因座容易地实施。任何和所有这些核苷酸变化和因天然等位基因变化产生并且不改变功能活性的所得氨基酸多态性或变化意在处于本发明所涵盖的范围内。

[0457] 在另一个实施方案中，生物标志物核酸分子的长度可为至少7、15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3500、4000、4500或更多个核苷酸并且在严格条件下杂交至对应于本发明所涵盖标志物的核酸分子或杂交至编码对应于本发明所涵盖标志物的蛋白质的核酸分子。术语“在严格条件下杂交”旨在阐述彼此至少60％(65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或更高)同一的核苷酸序列通常保持彼此杂交的杂交和洗涤条件。这些严格条件是本领域技术人员已知的并且可见于Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,N.Y.(1989)的部分6.3.1-6.3.6中。严格杂交条件的优选的非限制性实例是在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中在约45℃下杂交，接着在0.2X SSC、0.1％SDS中在50-65℃下洗涤一次或多次。

[0458] 除可存在于群体中的本发明所涵盖的核酸分子的天然存在等位基因变体外，本领域技术人员还应了解，可通过突变引入序列变化，由此改变所编码蛋白质的氨基酸序列并且并不改变由此编码的蛋白质的生物活性。例如，可进行核苷酸取代以在“非必需”氨基酸残基处产生氨基酸取代。“非必需”氨基酸残基是可从野生型序列改变而不改变生物活性的残基，而“必需”氨基酸残基为生物活性所需。例如，在各种物质的同源物中并不保守或仅半

保守的氨基酸残基可对于活性来说是非必需的并且由此将是用于改变的可能靶标。或者，在各种物种(例如鼠类和人类)的同源物中保守的氨基酸残基可对于活性来说是必需的并且由此将不是用于改变的可能靶标。

[0459] 因此，本发明所涵盖的另一方面涵盖编码本发明所涵盖多肽的核酸分子，所述核酸分子含有对于活性来说非必需的氨基酸残基的变化。此类多肽的氨基酸序列不同于对应于本发明所涵盖标志物的天然存在蛋白质，但保留生物活性。在一个实施方案中，生物标志物蛋白具有与本文所述生物标志物蛋白的氨基酸序列具有至少约60％、65％、70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％同一性或更高同一性(或其间的任何范围，例如90％-95％同一性)的氨基酸序列。类似地，涵盖具有编码此类生物标志物蛋白的序列的核酸分子。

[0460] 可通过以下方式来产生编码变体蛋白的经分离核酸分子：将一个或多个核苷酸取代、添加或缺失引入本发明所涵盖核酸的核苷酸序列中，从而将一个或多个氨基酸残基取代、添加或缺失引入所编码蛋白质中。可通过标准技术(例如定点诱变和PCR介导的诱变)引入突变。优选地，在一个或多个所预测非必需氨基酸残基处实现保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基代替的取代。本领域已定义具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸：碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。或者，可沿编码序列的全部或一部分例如通过饱和诱变来随机引入突变，并且可针对生物活性来筛选所得突变体以鉴定保留活性的突变体。在诱变后，可以重组方式表达所编码蛋白质并且可测定蛋白质的活性。

[0461] 在一些实施方案中，基因组中的核酸是有用的并且可用作靶标和/或药剂。例如，可使用本领域众所周知的方法来操纵基因组中的靶标DNA。可通过缺失、插入和/或突变如逆转录病毒插入、人工染色体技术、基因插入、使用组织特异性启动子的随机插入、基因靶向、可转座元件和/或用于引入外来DNA或产生经修饰DNA/经修饰核DNA的任何其他方法来操纵基因组中的靶标DNA。其他修饰技术包括从基因组缺失DNA序列和/或改变核DNA序列。例如，可通过定点诱变来改变核DNA序列。

[0462] b.载体和其他核酸媒介物

[0463] 根据本发明，可通过本领域已知的任何方法(例如直接合成和基因重组技术)来产生核酸分子和其变体。核酸分子可以任何形式存在，例如纯核酸分子、质粒、DNA载体、RNA载体、病毒载体和粒子。术语“载体”是指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。本发明所涵盖的载体还可用于将经包装多核苷酸递送至细胞、局部组织位点或受试者。

[0464] 一类载体为“质粒”，其是指额外核酸区段可连接至其中的环形双链DNA环。另一类载体为“病毒载体”，其中额外DNA区段可连接至病毒基因组中。病毒核酸递送载体可为任何种类，包括逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、单纯疱疹病毒和其变体。病毒载体技术是众所周知的并且阐述于Sambrook等人(2012,Molecular Cloning:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(第4版),New York)中。

[0465] 某些载体能够在已引入其的宿主细胞中进行自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞中时整合至宿主细胞的基因组中,并由此随宿主基因组一同复制。此外,某些载体即表达载体能够引导与其可操作连接的基因的表达。一般来说,在重组DNA技术中可用的表达载体通常呈质粒(载体)形式。然而,本发明旨在包括提供等效功能的此类其他形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0466] 本发明所涵盖的重组表达载体包含本发明所涵盖的核酸,所述核酸呈适于在宿主细胞中表达核酸的形式。这意味着,重组表达载体包括一个或多个基于有待用于表达的宿主细胞所选择的调控序列,所述调控序列可操作地连接至待表达的核酸序列。在重组表达载体内,"可操作地连接"旨在是指目标核苷酸序列以容许表达核苷酸序列(例如在体外转录/翻译系统中或在宿主细胞中(在将载体引入宿主细胞中时))的方式连接至调控序列。术语"调控序列"旨在包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如多聚腺苷酸化信号)。所述调控序列阐述于例如Goeddel,Methods in Enzymology:Gene Expression Technology,第185卷,Academic Press,San Diego,CA(1991)中。调控序列包括在许多类型的宿主细胞中引导核苷酸序列的组成型表达者和仅在某些宿主细胞中引导核苷酸序列的表达者(例如组织特异性调控序列)。本领域技术人员应了解,表达载体的设计可取决于例如以下因素:待转化宿主细胞的选择、期望蛋白质表达水平等。可将本发明所涵盖的表达载体引入宿主细胞中以由此产生由如本文所述的核酸编码的蛋白质或肽(包括融合蛋白或肽)。例如,一般来说,载体含有在至少一种生物体中发挥作用的复制起点、启动子序列和合适的限制性核酸内切酶位点和一种或多种可选标志物(例如耐药基因)。载体可包含可操作地连接至本发明所涵盖的多核苷酸的原生或非原生启动子。所选启动子可为强、弱、组成型、诱导型、组织特异性、发育阶段特异性和/或生物体特异性的。在一些实施方案中,载体可包含对引入载体的宿主细胞类型具有特异性的调控序列,例如增强子、转录和翻译起始和终止密码子。

[0467] 用于本发明的重组表达载体可被设计用于在原核细胞(例如大肠杆菌(E.coli))或真核细胞(例如昆虫细胞(例如使用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞)中表达对应于本发明所涵盖生物标志物的多肽。合适的宿主细胞进一步由Goeddel论述(同上)。或者,可在体外例如使用T7启动子调控序列和T7聚合酶来转录和翻译重组表达载体。

[0468] 原核生物中的蛋白质表达最通常是在大肠杆菌中使用含有引导表达融合蛋白或非融合蛋白的组成型或诱导型启动子的载体来实施。融合载体向其中所编码的蛋白质、通常向重组蛋白的氨基末端添加了众多氨基酸。这些融合载体通常用于以下三个目的:1)增加重组蛋白的表达;2)增加重组蛋白的溶解性;和3)通过用作亲和力纯化中的配体来帮助纯化重组蛋白。通常,在融合表达载体中,将蛋白水解切割位点引入融合部分与重组蛋白的接点处以使得能够在纯化融合蛋白后分离重组蛋白与融合部分。此类酶和其同源识别序列包括因子Xa、凝血酶和肠激酶。典型的融合表达载体包括pGEX(Pharmacia Biotech Inc;Smith和Johnson(1988)Gene 67:31-40)、pMAL(New England Biolabs,Beverly,MA)和pRIT5(Pharmacia,Piscataway,NJ),其分别使谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋白质A融合至靶标重组蛋白。

[0469] 合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的代表性、非限制性实例包括pTrc(Amann等人(1988)Gene 69:301-315)和pET 11d(Studier等人(1991)Meth.Enzymol.185:60-89)。

来自pTrc载体的靶标生物标志物核酸表达依赖于来自杂合trp-lac融合启动子的宿主RNA聚合酶转录。来自pET 11d载体的靶标生物标志物核酸表达依赖于由共表达的病毒RNA聚合酶(T7 gn1)介导的来自T7 gn10-lac融合启动子的转录。这种病毒聚合酶是由来自驻留型原噬菌体的宿主菌株BL21(DE3)或HMS174(DE3)所供应,所述驻留型原噬菌体含有在lacUV5启动子的转录控制下的T7 gn1基因。

[0470] 最大化大肠杆菌中的重组蛋白表达的一种策略是在以蛋白水解方式切割重组蛋白的能力受损的宿主细菌中表达蛋白质(Gottesman(1990)Meth.Enzymol.185:119-128)。另一种策略是改变待插入表达载体中的核酸的核酸序列,从而每一氨基酸的个别密码子是优先用于大肠杆菌中者(Wada等人(1992)Nucleic Acids Res.20:2111-2118)。本发明所涵盖核酸序列的这种改变可通过标准DNA合成技术来实施。

[0471] 在一些实施方案中,表达载体是酵母表达载体。用于酿酒酵母(S.cerevisiae)表达的载体的实例包括pYepSec1(Baldari等人(1987)EMBO J.6:229-234)、pMFa(Kurjan和Herskowitz(1982)Cell 30:933-943)、pJRY88(Schultz等人(1987)Gene 54:113-123)、pYES2(Invitrogen Corporation,San Diego,CA)和pPicZ(Invitrogen Corp,San Diego,CA)。

[0472] 或者,表达载体是杆状病毒表达载体。可用于在经培养昆虫细胞(例如Sf 9细胞)中表达蛋白质的杆状病毒载体包括pAc系列(Smith等人(1983)Mol.Cell Biol.3:2156-2165)和pVL系列(Lucklow和Summers(1989)Virology 170:31-39)。

[0473] 在一些实施方案中,使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达本发明所涵盖的核酸。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8(Seed(1987)Nature 329:840)和pMT2PC(Kaufman等人(1987)EMBO J.6:187-195)。在用于哺乳动物细胞中时,表达载体的控制功能通常是由病毒调控元件来提供。例如,常用启动子是源自多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒和猿病毒40。关于用于原核细胞和真核细胞的其他合适的表达系统,参见Sambrook等人,同上的第16章和第17章。

[0474] 在一些实施方案中,重组哺乳动物表达载体能够引导核酸优先表达于特定细胞类型中(例如,使用组织特异性调控元件来表达核酸)。本领域已知组织特异性调控元件。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝特异性;Pinkert等人(1987)Genes Dev.1:268-277),淋巴样特异性启动子(Calame和Eaton(1988)Adv.Immunol.43:235-275),特别是T细胞受体启动子(Winoto和Baltimore(1989)EMBO J.8:729-733)和免疫球蛋白启动子(Banerji等人(1983)Cell 33:729-740;Queen和Baltimore(1983)Cell 33:741-748),神经元特异性启动子(例如神经丝启动子;Byrne和Ruddle(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:5473-5477),胰腺特异性启动子(Edlund等人(1985)Science 230:912-916)和乳腺特异性启动子(例如乳清启动子;美国专利第4,873,316号和欧洲申请公开第264,166号)。还涵盖发育调控性启动子,例如鼠类hox启动子(Kessel和Gruss(1990)Science 249:374-379)和甲胎蛋白启动子(Camper和Tilghman(1989)Genes Dev.3:537-546)。

[0475] 本发明还提供用于表达反义核酸的重组表达载体,如下文进一步所述。例如,可以容许表达(通过转录DNA分子)RNA分子的方式使DNA分子可操作地连接至调控序列,所述RNA分子针对编码本发明所涵盖的多肽的mRNA是反义的。可选择可操作地连接至以反义定向克

隆的核酸的调控序列来引导各种细胞类型中反义RNA分子的连续表达，例如，可选择引导反义RNA的组成型、组织特异性或细胞类型特异性表达的病毒启动子和/或增强子或调控序列。反义表达载体可呈重组质粒、噬菌粒或减毒病毒的形式，其中反义核酸是在高效调控区的控制下产生的，所述高效调控区的活性可由引入载体的细胞类型来决定。关于使用反义基因的基因表达的调控的论述(参见Weintraub等人(1986)Trends Genet.1(1))。

[0476] 在一些实施方案中，逆转录病毒载体可用于本发明中。逆转录病毒的命名是因为在整合至宿主细胞基因组中之前需要将病毒RNA基因组逆转录成DNA。因此，逆转录病毒载体的最重要特征是将其基因物质永久性整合至靶标/宿主细胞的基因组中。用于核酸递送的最常用逆转录病毒载体是慢病毒媒介物/粒子。慢病毒的一些实例包括人类免疫缺陷病毒:HIV-1和HIV-2、猿免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、珍布拉那病病毒(Jembrana Disease Virus，JDV)、马感染性贫血病毒(EIAV)、马感染性贫血病毒、维斯那-梅迪病毒(visna-maedi)和山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)。

[0477] 通常，构成基因递送媒介物的慢病毒粒子自身是复制缺陷性，从而其不能复制于宿主细胞中并且可感染仅一种细胞(也称为“自我不活化”)。慢病毒能够通过经由完整宿主核包膜的进入机制感染分裂细胞和非分裂细胞(Naldini等人(1998)Curr.Opin.Biotechnol.9:457-463)。通过多次减毒HIV致病性基因来生成重组慢病毒媒介物/粒子，例如，缺失基因Env、Vif、Vpr、Vpu、Nef和Tat，从而使得载体在生物学上安全。相应地，源自例如HIV-1/HIV-2的慢病毒媒介物可介导转基因至非分裂细胞的有效递送、整合和长期表达。术语“重组”是指含有慢病毒序列和非慢病毒逆转录病毒序列的载体或其他核酸。可通过在产生细胞(例如HEK293T细胞、293G细胞、STAR细胞和其他病毒表达细胞系)中共表达病毒包装元件和载体基因组本身来生成慢病毒粒子。这些元件通常提供于三个(在第二代慢病毒系统中)或4个单独质粒(在第三代慢病毒系统中)中。使用编码慢病毒组分(包括病毒的核心(即结构蛋白)和酶促组分以及包膜蛋白(称为包装系统))的质粒和编码待转移至靶细胞、媒介物本身(也称为转移载体)中的基因组(包括外来转基因)的质粒来共转染生产细胞。

[0478] 重组慢病毒载体的包膜蛋白可为来自其他病毒的异源包膜蛋白，例如水疱性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus)的G蛋白(VSV G)或杆状病毒gp64包膜蛋白。VSV-G糖蛋白可尤其选自归类于水疱病毒属中的物种:卡拉加斯病毒(Carajas virus)(CJSV)、金迪普拉病毒(Chandipura virus)(CHPV)、科卡尔病毒(Cocal virus)(COCV)、伊斯法罕病毒(Isfahan virus)(ISFV)、马拉巴病毒(Maraba virus)(MARAV)、帛黎病毒(Piry virus)(PIRYV)、阿拉戈斯水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis Alagoas virus)(VSAV)、印第安纳水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis Indiana virus)(VSIV)和新泽西水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis New Jersey virus)(VSNJV)；和/或临时性分类于水疱病毒属中的菌株，如草鱼弹状病毒(Grass carp rhabdovirus)、比安157575弹状病毒(BeAn 157575virus)(BeAn 157575)、博特克病毒(Boteke virus)(BTKV)、卡尔查基病毒(Calchaqui virus)(CQIV)、美洲鳗病毒(Eel virus Amerimay)(EVA)、格雷洛奇病毒(Gray Lodge virus)(GLOV)、朱罗讷病毒(Jurona virus)(JURY)、克拉马斯病毒(Klamath virus)(KLAV)、克瓦塔病毒(Kwatta virus)(KWAV)、拉霍亚病毒(La Joya virus)(LJV)、马尔佩斯泉病毒(Malpais Spring virus)(MSPV)、埃尔岗蝙蝠病毒(Mount Elgon bat virus)

(MEBV)、佩里内特病毒(Perinet virus)(PERV)、梭子鱼鱼苗弹状病毒(Pike fry rhabdovirus)(PFRV)、波登病毒(Porton virus)(PORV)、拉迪病毒(Radi virus)(RADIV)、鲤春病毒血症病毒(Spring viremia of carp virus)(SVCV)、图帕伊阿病毒(Tupaia virus)(TUPV)、溃疡病弹状病毒(Ulcerative disease rhabdovirus)(UDRV)和尤格波格丹诺夫奇病毒(Yug Bogdanovac virus)(YBV)。gp64或其他杆状病毒包膜蛋白可源自苜蓿银纹夜蛾(Autographa californica)核型多角体病毒(AcMNPV)、芹菜夜蛾(Anagrapha falcifera)核型多角体病毒、家蚕(Bombyx mori)核型多角体病毒、云杉卷叶蛾(Choristoneura fumiferana)核型多角体病毒、黄杉毒蛾(Orgyia pseudotsugata)单核衣壳核型多角体病毒、苹浅褐卷蛾(Epiphyas postvittana)核型多角体病毒、美国白蛾(Hyphantria cunea)核型多角体病毒、大蜡螟(Galleria mellonella)核型多角体病毒、佐立病毒(Dhori virus)、索戈托病毒(Thogoto virus)、柞蚕(Antheraea pemyi)核型多角体病毒或贝特肯病毒(Batken virus)。

[0479] 生成重组慢病毒粒子的方法在本领域已论述于例如美国专利第8,846,385号、第7,745,179号、第7,629,153号、第7,575,924号、第7,179,903号和第6,808,905号中。

[0480] 所用慢病毒载体可选自(但不限于)pLVX、pLenti、pLenti6、pLJM1、FUGW、pWPXL、pWPI、pLenti CMV puro DEST、pLJM1-EGFP、pULTRA、pInducer20、pHIV-EGFP、pCW57.1、pTRPE、pELPS、pRRL和pLionII。还可使用本领域已知的慢病毒媒介物(参见美国专利第9,260,725号、第9,068,199号、第9,023,646号、第8,900,858号、第8,748,169号、第8,709,799号、第8,420,104号、第8,329,462号、第8,076,106号、第6,013,516号和第5,994,136号;PCT公开第WO 2012079000号)。

[0481] 额外元件可包括于重组慢病毒粒子中,包括在5'或3'末端的逆转录病毒LTR(长末端重复序列)、逆转录病毒输出元件、任选地慢病毒逆向反应元件(RRE)、启动子或其活性部分和基因座控制区(LCR)或其活性部分。其他元件包括中央多聚嘌呤区(cPPT)序列(用以改进非分裂细胞中的转导效率)、旱獭肝炎病毒(Woodchuck Hepatitis Virus,WHP)转录后调控元件(WPRE)(其增强转基因表达并增加效价)。效应模块连接至载体。除基于复杂HIV-1/2的慢病毒载体外,基于简单γ-逆转录病毒的逆转录病毒载体已广泛用于递送治疗性核酸并且在临床上证实为能够转导宽范围细胞类型的最有效且强力的核酸递送系统之一。γ逆转录病毒的示例性物种包括鼠类白血病病毒(MLV)和猫白血病病毒(FeLV)。源自哺乳动物γ-逆转录病毒(例如鼠类白血病病毒(MLV))的γ-逆转录病毒载体可为重组的。γ逆转录病毒的MLV家族包括嗜亲性、双嗜性、嗜异性和多嗜性亚家族。嗜亲性病毒仅能够使用mCAT-1受体感染鼠类细胞。嗜亲性病毒的实例是莫罗尼(Moloney)MLV和AKV。双嗜性病毒经由Pit-2受体感染鼠类、人类和其他物种。双嗜性病毒的一个实例是4070A病毒。嗜异性和多嗜性病毒利用相同(Xpr1)受体,但其物种嗜性有所不同。嗜异性病毒(例如NZB-9-1)感染人类和其他物种,但不感染鼠类物种,而多嗜性病毒(例如病灶形成病毒(MCF))感染鼠类、人类和其他物种。

[0482] 可在包装细胞中通过使用若干质粒共转染细胞来产生γ-逆转录病毒载体,所述质粒包括编码逆转录病毒结构和酶促(gag-pol)聚蛋白者、编码包膜(env)蛋白者和编码包含多核苷酸(其编码本发明所涵盖的组合物并且待包装至新形成病毒粒子中)的载体mRNA者。可使用来自其他病毒的包膜蛋白使重组γ-逆转录病毒载体变为假型。将包膜糖蛋白并

入病毒粒子的外脂质层中，这可增加/改变细胞嗜性。示例性包膜蛋白包括长臂猿白血病病毒包膜蛋白(GALV)或水泡性口炎病毒G蛋白(VSV-G)，或猿内源性逆转录病毒包膜蛋白，或麻疹病毒H和F蛋白质，或人类免疫缺陷病毒gp120包膜蛋白，或科卡尔水泡病毒包膜蛋白(参见例如美国公开第2012/164118号)。在其他实施方案中，包膜糖蛋白可经基因修饰以将靶向/结合配体并入γ-逆转录病毒载体中，结合配体包括但不限于肽配体、单链抗体和生长因子(Waehler等人(2007)Nat.Rev.Genet.8:573-587)。这些工程化的糖蛋白可使载体再靶向表达其相应靶标部分的细胞。在其他方面，可引入“分子桥”以将载体引入特异性细胞中。分子桥具有双重特异性：一端可识别病毒糖蛋白，并且另一端可结合至靶细胞上的分子决定子。这样的分子桥(例如配体-受体、抗生物素蛋白-生物素、化学缀合物、单克隆抗体和工程化融合蛋白)可引导病毒载体连接至用于转导的靶细胞(Yang等人(2008)Biotechnol.Bioeng.101:357-368;Maetzig等人(2011)Viruses 3:677-713)。重组γ-逆转录病毒载体可为自我不活化(SIN)γ逆转录病毒载体。所述载体是复制缺陷性。SIN载体可在最初包含增强子/启动子活性的3'U3区域内带有缺失。此外，5'U3区域可用源自巨细胞病毒或RSV的强启动子(在包装细胞系时需要)或所选内部启动子和/或增强子元件代替。可根据本发明所涵盖的特定目的所需的基因表达的具体需求来选择内部启动子。

[0483] 类似地，可使用重组腺相关病毒(rAAV)载体来包装和递送本发明所涵盖的核酸分子。此类载体或病毒粒子可被设计以利用任何已知血清型衣壳或血清型衣壳的组合。血清型衣壳可包括来自任何所鉴定AAV血清型和其变体的衣壳，例如AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAVrh10(参见例如美国专利公开20030138772)或其变体。AAV载体不仅包括单链载体，并且还包括自我互补性AAV载体(scAAV)。scAAV载体含有一起退火以形成双链载体基因组的DNA。通过跳过第二链合成，scAAV容许快速表达于细胞中。可通过本领域标准方法(例如通过三重转染)在sf9昆虫细胞中或在人类细胞(例如HEK293细胞)的细胞培养悬浮液中来制造rAAV载体。本发明所涵盖的核酸分子可编码于一个或多个待包装于AAV衣壳中的病毒基因组中。除至少一个或两个ITR(倒转末端重复序列)外，此类载体或病毒基因组还可包括从载体或病毒基因组表达所需的某些调控元件。此类调控元件是本领域众所周知的并且包括例如启动子、内含子、间隔子、填充序列等。

[0484] 另外，核酸分子的非病毒递送系统是本领域众所周知的。术语“非病毒载体”共同地是指在不使用病毒粒子的情况下将本发明所涵盖的核酸分子转移至目标细胞中的任何媒介物。此类非病毒递送载体的代表性实例是涂覆核酸的载体，所述涂覆基于载体上的阳离子位点与带负电核酸构成基因上的阴离子位点之间的电相互作用。用于递送的一些示例性非病毒载体可包括裸核酸递送系统、聚合递送系统和脂质体递送系统。阳离子聚合物和阳离子脂质可用于核酸递送，这是因为它们可容易地与阴离子核苷酸复合。常用聚合物可包括但不限于聚乙烯亚胺、聚-L-赖氨酸、壳聚糖和树枝状聚合物。阳离子脂质可包括但不限于单价阳离子脂质、多价阳离子脂质、含胍脂质、胆固醇衍生物化合物、阳离子聚合物:聚(乙烯亚胺)(PEI)、聚-l-赖氨酸)(PLL)、鱼精蛋白(protamine)、其他阳离子聚合物和脂质-聚合物杂合体。

[0485] 可经由常规转化或转染技术将载体DNA引入原核或真核细胞中。如本文所用，术语“转化”和“转染”意在是指用于将外来核酸引入宿主细胞中的各种本领域公认技术，包括磷

酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-右旋糖酐介导的转染、脂转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适方法可见于Sambrook等人(同上)和其他实验室手册中。

[0486] 对于哺乳动物细胞的稳定转染来说,众所周知,取决于所用的表达载体和转染技术,仅小部分的细胞可将外来DNA整合至其基因组中。为鉴定和选择这些整合体,通常将编码可选标志物(例如对于抗生素抗性来说,如neo、DHFR、Gln合酶、ADA等)的基因与目标基因一起引入宿主细胞中。优选的可选标志物包括赋予药物(例如G418、潮霉素(hygromycin)和甲氨蝶呤)抗性者。可通过药物选择来鉴定用所引入核酸稳定转染的细胞(例如,并入可选标志物基因的细胞将存活,而其他细胞会死亡)。

[0487] 因此,本发明涵盖已引入本发明所涵盖的核酸和/或重组表达载体的宿主细胞,其在下文进一步阐述。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”可在本文中互换使用。应理解,此类术语不仅是指特定受试者细胞,而且还指这种细胞的子代或潜在子代。由于突变或环境影响可使后续各代发生某些改变,因此,这种子代实际上可能与母细胞不同但却仍包括于本文所用术语的范围内。宿主细胞可为任何原核细胞(例如大肠杆菌细胞)或真核细胞(例如昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞)。

[0488] c.蛋白质剂

[0489] 本发明所涵盖的另一方面涉及基于氨基酸的药剂的用途。所述药剂可包括但不限于融合蛋白、合成多肽和肽以及其片段(例如生物活性片段)。还提供了编码此类基于氨基酸的化合物的多核苷酸。

[0490] 本发明所涵盖的基于氨基酸的药剂(例如抗体和重组蛋白)可以以下形式存在:全多肽、多个多肽或多肽片段(其可独立地由一个或多个核酸编码)、多个核酸、核酸片段或上文所提及物质中的任一者的变体。

[0491] 术语“多肽”是指最通常由肽键连接至一起的氨基酸残基(天然或非天然)的聚合物。如本文所用,所述术语是指具有任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。因此,术语多肽相互性包括术语“肽”和“蛋白质”。术语“融合蛋白”是指包含至少两个来自不同来源的氨基酸序列的融合多肽分子,其中组分氨基酸序列通过肽键直接或经由一个或多个肽接头彼此连接。在一些情况下,所编码多肽小于约50个氨基酸并且多肽则称为“肽”。如果多肽是肽,则其长度为至少约2、3、4或至少5个氨基酸残基。因此,多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段和前述物质的其他等效物、变体和类似物。多肽可为单一分子或可为多分子复合物(例如二聚体、三聚体或四聚体)。其还可包含单链或多链多肽并且可进行缔合或连接。术语多肽还可适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在氨基酸的人工化学类似物。

[0492] 在一些实施方案中,可通过适当纯化方案使用标准蛋白质纯化技术从细胞或组织来源分离对应于标志物的原生多肽。在另一个实施方案中,通过重组DNA技术产生对应于本发明所涵盖标志物的多肽。作为重组表达的替代方式,可以化学方式使用标准肽合成技术来合成对应于本发明所涵盖标志物的多肽。

[0493] 多肽片段包括含有与目标氨基酸序列充分同一或衍生自目标氨基酸序列的氨基酸序列的多肽,但所述多肽包括少于全长蛋白质的氨基酸。它们还可表现出相应全长蛋白质的至少一种活性。通常,生物活性部分包含具有相应蛋白质的至少一种活性的结构域或基序。本发明所涵盖蛋白质的生物活性部分可为长度为例如10、25、50、100或更多个氨基酸

的多肽。此外，可通过重组技术制备缺失其他蛋白质区域的其他生物活性部分，并且评估本发明所涵盖多肽的原生形式的一种或多种功能活性。

[0494] 优选多肽具有目标多肽(例如由本文所述的核酸分子编码的多肽)的氨基酸序列。其他有用蛋白质与这些序列中的一者基本上同一(例如至少约40％、优选地50％、60％、70％、75％、80％、83％、85％、88％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％)并且保留相应天然存在蛋白质的蛋白质功能活性，但氨基酸序列因天然等位基因变化或诱变而有所不同。

[0495] 如应用于氨基酸序列的术语“同一性”定义为在比对序列并且视需要引入空位以实现最大同一性百分比之后，候选氨基酸序列中与第二序列的氨基酸序列中的残基同一的残基的百分比。用于比对的方法和计算机程序是本领域众所周知的。应理解，同源性取决于同一性百分比的计算，但其值可因引入计算中的空位和罚分而有所不同。

[0496] 为测定两个氨基酸序列或两个核酸的同一性百分比，出于最佳比较目的来比对序列(例如，可将空位引入第一氨基酸或核酸的序列中以用于与第二氨基酸或核酸序列进行最优选比对)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。在第一序列中的位置由与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则所述分子在所述位置同一。两个序列之间的同一性百分比是所述序列所共有的同一位置数的函数(即，同一性％＝同一位置数/总位置(例如重叠位置)数×100)。在一个实施方案中，两个序列具有相同长度。

[0497] 可使用数学算法来测定两个序列之间的同一性百分比。用于比较两个序列的数学算法的优选的非限制性实例是Karlin和Altschul的算法(1990，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:2264-2268)，其根据Karlin和Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:5873-5877加以修改。这种算法已并入Altschul等人的NBLAST和XBLAST程序中(1990,J.Mol.Biol.215:403-410)。可使用NBLAST程序(评分＝100，字长＝12)来实施BLAST核苷酸搜索以获得与本发明所涵盖的核酸分子同源的核苷酸序列。可使用XBLAST程序(评分＝50,字长＝3)来实施BLAST蛋白质搜索以获得与本发明所涵盖的蛋白质分子同源的氨基酸序列。出于比较目的，为获得加空位比对，可如Altschul等人(1997)Nucl.Acids Res.25:3389-3402中所述来利用加空位BLAST。或者，可使用PSI-Blast来实施迭代搜索以检测分子之间的远距离联系。在利用BLAST、加空位BLAST和PSI-Blast程序时，可使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的预设参数(参见例如ncbi.nlm.nih.gov)。用于比较序列的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers和Miller的算法(1988，Comput.Appl.Biosci.4:11-17)。这种算法已并入ALIGN程序(2.0版)中，后者是GCG序列比对软件包的一部分。在利用ALIGN程序来比较氨基酸序列时，可使用PAM120加权残差表、等于12的空位长度罚分和等于4的空位罚分。用于鉴定具有局部序列类似性和比对的区域的另一种有用算法是FASTA算法，如Pearson和Lipman(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444-2448中所述。在使用FASTA算法来比较核苷酸或氨基酸序列时，可例如使用PAM120加权残差表以及k-元组值2。可使用类似于上述技术的技术使用或不使用容许空位来测定两个序列之间的同一性百分比。在计算同一性百分比时，仅计数精确匹配。

[0498] 术语“多肽变体”或“氨基酸序列变体”是指氨基酸序列与原生或参考序列不同的分子。与原生或参考序列相比，氨基酸序列变体可在氨基酸序列内的某些位置具有取代、缺

失和/或插入。在提及序列时，术语“原生”或“参考”是提及可进行比较的原始分子的相对术语。原生或参考序列不应与野生型序列混淆。原生序列或分子可代表野生型(所述序列发现于自然界中)，但不与野生型序列相同。变体可与原生或参考序列具有至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％、至少约99.5％或至少约99.9％的氨基酸序列同一性(同源性)。

[0499] 多肽变体具有改变的氨基酸序列并且在一些实施方案中可用作激动剂或拮抗剂。可通过诱变(例如离散点突变)或截短来生成变体。激动剂可保留天然存在形式的蛋白质的基本上相同的生物活性或生物活性子集。蛋白质拮抗剂可通过例如竞争性结合至细胞信号级联的下游或上游成员(其包括目标蛋白质)来抑制天然存在形式的蛋白质的一种或多种活性。因此，可通过使用具有有限功能的变体进行处理来诱发特定生物效应。相对于使用天然存在形式的蛋白质的治疗，使用具有天然形式的蛋白质的生物活性子集的变体治疗受试者可在受试者中具有较少副作用。

[0500] 在一些实施方案中，提供“变体模拟物”。如本文所用，术语“变体模拟物”是指含有一个或多个模拟活化序列的氨基酸的变体。例如，谷氨酸盐可用作磷酸-苏氨酸和/或磷酸-丝氨酸的模拟物。或者，变体模拟物可产生含有模拟物的去活化或不活化产物，例如，苯丙氨酸可用作酪氨酸的不活化替代物；或者丙氨酸可用作丝氨酸的不活化替代物。氨基酸序列可包含天然存在的氨基酸并且由此可视为蛋白质、肽、多肽或其片段。或者，本发明所涵盖的药剂可包含天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸。非天然存在的氨基酸可包括但不限于包含羰基或氨基氧基或酰肼基团或氨基脲基团或叠氮化物基团的氨基酸。

[0501] 如应用于氨基酸序列的术语“同源物”意指与第二物种的第二序列基本上同一的另一物种的相应序列。

[0502] 术语“类似物”意在包括因一个或多个氨基酸改变(例如氨基酸残基的取代、添加或缺失)而有所不同并且仍维持亲本多肽的性质的多肽变体。

[0503] 术语“衍生物”与术语“变体”同义使用并且是指相对于参考分子或起始分子以任何方式进行修饰或改变的分子。本发明涵盖若干类型的基于氨基酸的化合物和/或组合物(包括变体和衍生物)。这些物质包括取代、插入、缺失和共价变体和衍生物。因此，包含取代、插入、添加、缺失和/或共价修饰的药剂包括在本发明所涵盖的范围内。位于肽或蛋白质的氨基酸序列的羧基末端和氨基末端区域的氨基酸残基可任选地缺失，从而提供截短序列。取决于序列的用途(如例如使序列表达为可溶性或连接至固体载体的较大序列的一部分)，某些氨基酸(例如C末端或N末端残基)可替代地缺失。

[0504] 在提及蛋白质时，“取代变体”是去除原生或参考序列中的至少一个氨基酸残基并且在相同位置插入不同氨基酸者。取代可为单一取代，其中仅取代分子中的一个氨基酸，或者其可为多取代，其中取代相同分子中的两个或更多个氨基酸。在一个实例中，本发明所涵盖多肽中的氨基酸被另一个具有类似结构和/或化学性质的氨基酸取代，例如保守氨基酸取代。如本文所用，术语“保守氨基酸取代”是指通常存在于序列中的氨基酸被具有所涉及残基的类似大小、电荷、极性、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性性质的不同氨基酸取代。保守取代的实例包括使用非极性(疏水性)残基(例如丙氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、异

亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸和甲硫氨酸)取代另一非极性残基。同样,保守取代的实例包括使用一种极性(亲水性)残基取代另一残基,例如精氨酸与赖氨酸之间、谷氨酰胺与天冬酰胺之间,以及甘氨酸与丝氨酸之间。另外,使用碱性残基(例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)取代另一碱性残基或使用一种酸性残基(例如天冬氨酸或谷氨酸)取代另一酸性残基是保守取代的额外实例。"非保守取代"必须将这些种类中的一者的成员交换为另一种类。非保守取代的实例包括使用非极性(疏水性)氨基酸残基(例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸)取代极性(亲水性)残基(例如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸)和/或使用极性残基取代非极性残基。可使用本领域众所周知的基因或化学方法生成氨基酸突变。基因方法可包括定点诱变、PCR、基因合成等。预计还可使用通过除基因工程化外的方法来改变氨基酸的侧链基团的方法,例如化学修饰。

[0505] 在提及蛋白质时,术语"插入变体"是紧邻原生或起始序列中的特定位置的氨基酸插入一个或多个氨基酸者。如本文所用,术语"紧邻"是指连结至起始或参考氨基酸的α-羧基或α-氨基官能团的毗邻氨基酸。与之相比,在提及蛋白质时,术语"缺失变体"是去除原生或起始氨基酸序列中的一个或多个氨基酸者。通常,缺失变体在特定分子区域中缺失一个或多个氨基酸。

[0506] 术语"衍生物"包括含有一个或多个使用有机蛋白质性或非蛋白质性衍生剂的修饰和翻译后修饰的原生或参考蛋白质的变体。通常通过以下方式来引入共价修饰:使蛋白质的靶向氨基酸残基与能够与所选侧链或末端残基反应的有机衍生剂进行反应,或者利用在所选重组宿主细胞中发挥作用的翻译后修饰机制。所得共价衍生物可用于旨在鉴定对于生物活性、免疫测定或制备免疫亲和力纯化重组糖蛋白的抗蛋白质抗体较为重要的残基的程序。此类修饰在本领域的普通技能范围内并且无需过多实验即可实施。

[0507] 某些翻译后修饰是重组宿主细胞对所表达多肽的作用的结果。通常使谷氨酰基和天冬氨酰基残基经翻译后脱酰胺成相应谷氨酰基和天冬氨酰基残基。或者,在弱酸条件下使这些残基脱酰胺。任一形式的这些残基可存在于根据本发明所用的蛋白质中。其他翻译后修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的α-氨基的甲基化(T.E.Creighton,Proteins:Structure and Molecular Properties,W.H.Freeman&Co.,San Francisco,第79-86页(1983))。

[0508] 在一些实施方案中,提供经共价修饰的多肽(例如融合蛋白),例如用异源多肽和/或非多肽修饰进行修饰的多肽。例如,共价衍生物具体来说包括融合分子,其中本发明所涵盖的蛋白质共价键结至非蛋白质性聚合物。所述非蛋白质性聚合物通常是亲水性合成聚合物(即未另外发现于自然界中的聚合物)。然而,存在于自然界中并且通过重组或体外方法产生的聚合物是有用的,如从自然界分离的聚合物。亲水性聚乙烯基聚合物落在本发明的范围内,例如聚乙烯醇和聚乙烯基吡咯烷酮。特别有用的是聚乙烯基亚烷基醚,例如聚乙二醇、聚丙二醇(PEG)。蛋白质可以陈述于美国专利第4,640,835号、第4,496,689号、第4,301,144号、第4,670,417号、第4,791,192号或第4,179,337号中的方式连接至各种非蛋白质性聚合物(例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯)。融合分子还可包含共价键结至其他生物活性分子或接头的本发明所涵盖的蛋白质。

[0509] 术语"嵌合蛋白"或"融合蛋白"是指包含全部或一部分(优选地生物活性部分)对应于可操作地连接至异源多肽(例如除生物标志物多肽外的多肽)的本发明所涵盖多肽的

多肽的多肽。就融合蛋白来说，术语“可操作地连接”旨在指示，本发明所涵盖的多肽和异源多肽在框内彼此融合。异源多肽可融合至本发明所涵盖多肽的氨基末端或羧基末端。

[0510] 一种有用的融合蛋白是GST融合蛋白，其中对应于本发明所涵盖标志物的多肽融合至GST序列的羧基末端。此类融合蛋白可促进本发明所涵盖的重组多肽的纯化。在另一个实施方案中，融合蛋白含有异源信号序列、免疫球蛋白融合蛋白、毒素或其他有用的蛋白质序列。可通过标准重组DNA技术来产生本发明所涵盖的嵌合蛋白和融合蛋白。在另一个实施方案中，融合基因可通过常规技术(包括自动化DNA合成器)来合成。或者，基因片段的PCR扩增可使用锚定引物来实施，所述锚定引物在两个邻接基因片段之间产生互补悬突，其随后可退火并且再扩增以生成嵌合基因序列(参见例如Ausubel等人，同上)。此外，许多已编码融合部分(例如GST多肽)的表达载体可购得。可将编码本发明所涵盖多肽的核酸克隆至这种表达载体中，从而融合部分框内连接至本发明所涵盖的多肽。

[0511] 可使用信号序列来促进经分泌蛋白质或其他目标蛋白质的分泌和分离。信号序列的特征通常在于疏水性氨基酸的核心，所述疏水性氨基酸通常是在分泌期间于一个或多个切割事件中从成熟蛋白质所切割。此类信号肽含有处理位点，所述处理位点容许在成熟蛋白质通过分泌途径时从成熟蛋白质切割信号序列。因此，本发明涵盖具有信号序列的所述多肽以及信号序列已以蛋白水解方式发生切割的多肽(即切割产物)。在一个实施方案中，编码信号序列的核酸序列可在表达载体中可操作地连接至目标蛋白质(例如通常未分泌或另外难以分离的蛋白质)。信号序列引导例如从转化表达载体的真核宿主分泌蛋白质，并且信号序列随后或同时被切割。然后可通过本领域公认方法从细胞外介质容易地纯化蛋白质。或者，可使用促进纯化的序列(例如具有GST结构域)使信号序列连接至目标蛋白质。

[0512] 在提及蛋白质时，术语“特征”定义为分子的基于氨基酸序列的不同组分。本发明所涵盖蛋白质的特征包括表面表现、局部构形形状、折叠、环、半环、结构域、半结构域、位点、末端或其任何组合。例如，在提及蛋白质时，术语“表面表现”是指出现于最外表面上的蛋白质的基于多肽的组分。在提及蛋白质时，术语“局部构形形状”是指位于可确定蛋白质空间内的蛋白质的基于多肽的结构表现。在提及蛋白质时，术语“折叠”是指在能量最小化时氨基酸序列的所得构形。折叠可出现于折叠过程的二级或三级层面上。二级层面折叠的实例包括β折叠和α螺旋。三级折叠的实例包括因能量力的聚集或分离而形成的结构域和区域。以这种方式形成的区域包括疏水性和亲水性袋等。关于蛋白质构形的术语“转角”是指改变肽或多肽的主链方向的弯部并且可涉及一个、两个、三个或更多个氨基酸残基。关于蛋白质的术语“环”是指肽或多肽中逆转肽或多肽的主链方向的结构特征并且包含4个或更多个氨基酸残基(Oliva等人(1997)J.Mol.Biol.266:814-830)。在提及蛋白质时，术语“半环”是指所鉴定环中与衍生其的环相比具有至少一半数量的氨基酸残基的部分。应理解，环并不总是含有偶数个氨基酸残基。因此，在环含有或经鉴定包含奇数个氨基酸的那些情形下，奇数环的半环将包含环的整数部分或下一整数部分(环的氨基酸数/2+/-0.5个氨基酸)。例如，鉴定为7氨基酸环的环可产生具有3个氨基酸或4个氨基酸的半环(7/2＝3.5+/-0.5为3或4)。在提及蛋白质时，术语“结构域”是指多肽中具有一种或多种可鉴定结构或功能特征或特性(例如结合能力和/或用作蛋白质-蛋白质相互作用的位点)的基序。在提及蛋白质时，术语“半结构域”是指所鉴定结构域中与衍生其的结构域相比具有至少一半数量的氨基酸残基的部分。应理解，结构域并不总是含有偶数个氨基酸残基。因此，在结构域含有或经

鉴定包含奇数个氨基酸的那些情形下，奇数结构域的半结构域将包含结构域的整数部分或下一整数部分(结构域的氨基酸数/2+/-0.5个氨基酸)。例如，鉴定为7氨基酸结构域的结构域可产生具有3个氨基酸或4个氨基酸的半结构域(7/2＝3.5+/-0.5为3或4)。还应理解，可在结构域或半结构域内鉴定子结构域，所述子结构域具有衍生其的结构域或半结构域中所鉴定的非全部的结构或功能性质。还应理解，包含本文的任何结构域类型的氨基酸未必沿多肽主链是邻接的(即，非毗邻氨基酸可在结构上发生折叠以产生结构域、半结构域或子结构域)。关于基于氨基酸的实施方案的术语“位点”与“氨基酸残基”和“氨基酸侧链”同义使用。位点代表肽或多肽内可在本发明所涵盖的基于氨基酸的分子内加以修饰、操纵、改变、衍生或变化的位置。在提及蛋白质时，术语“末端(termini/terminus)”是指肽或多肽的端部。此类端部并不仅限于肽或多肽的第一或最终位点，并且还可包括末端区域中的额外氨基酸。本发明所涵盖基于多肽的分子可表征为具有N末端(即终止于具有游离氨基(NH2)的氨基酸)和C末端(即终止于具有游离羧基(COOH)的氨基酸)。在一些情形下，本发明所涵盖的蛋白质是由通过二硫键或通过非共价力结合至一起的多个多肽链(例如多聚体或寡聚物)构成。这些蛋白质具有多个N末端和C末端。或者，可修饰多肽的末端，使得它们可根据情形始于或止于基于非多肽的部分(例如有机缀合物)。

[0513] 在任何特征已鉴定或定义为本发明所涵盖分子的组分后，可通过移动、交换、倒转、缺失、随机化或复制来实施这些特征的若干操纵和/或修饰中的任一者。此外，应理解，操纵特征可与修饰本发明所涵盖的分子产生相同结果。例如，涉及缺失结构域的操纵将改变分子的长度，这正如修饰核酸以编码小于全长的分子所实现一般。可通过本领域已知方法(例如定点诱变)来实现修饰和操纵。

[0514] 在一些实施方案中，本文所述的药剂可包含一个或多个同位素原子。如本文所用，术语“同位素”是指具有一个或多个额外中子的化学元素，例如氘同位素。

[0515] d.基于细胞的药剂，包括宿主细胞

[0516] 在另一方面，涵盖基于细胞的药剂。

[0517] 在一些实施方案中，本发明涵盖已被根据本发明的核酸和/或载体转染、感染或转化的细胞。术语“转化”是指将“外来”(即外源性或细胞外)基因、DNA或RNA序列引入至宿主细胞，以便所述宿主细胞将表达所引入的基因或序列以产生所需物质，通常是由所引入的基因或序列编码的蛋白质或酶。接收并表达所引入的DNA或RNA的宿主细胞已被“转化”。

[0518] 本发明所涵盖的核酸可用于在合适的表达系统中产生本发明的重组多肽。术语“表达系统”是指在例如用于表达由载体携带并引入至宿主细胞的外来DNA编码的蛋白质的合适条件下的宿主细胞和相容载体。

[0519] 常见的表达系统包括大肠杆菌宿主细胞和质粒载体、昆虫宿主细胞和杆状病毒载体，以及哺乳动物宿主细胞和载体。宿主细胞的其他实例包括但不限于原核细胞(例如细菌)和真核细胞(例如酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等)。具体实例包括大肠杆菌、克鲁维酵母(Kluyveromyces)或酵母菌(Saccharomyces)、哺乳动物细胞系(例如，Vero细胞、CHO细胞、3T3细胞、COS细胞等)以及原代或已建立的哺乳动物细胞培养物(例如，由淋巴母细胞、成纤维细胞、胚胎细胞、上皮细胞、神经细胞、脂肪细胞等产生)。实例还包括小鼠SP2/0-Ag14细胞(ATCC CRL1581)、小鼠P3X63-Ag8.653细胞(ATCC CRL1580)、二氢叶酸还原酶基因(下文称为“DHFR基因”)有缺陷的CHO细胞(Urlaub G等人;1980)、大鼠YB2/

3HL.P2.G11.16Ag.20细胞(ATCC CRL 1662,下文称为“YB2/0细胞”)等。YB2/0细胞是优选的,因为嵌合或人源化抗体的ADCC活性在该细胞中表达时增强。

[0520] 在另一方面,提供了与本发明所涵盖的药剂接触的细胞。例如,在一些实施方案中,操纵髓系细胞,例如与一种或多种药剂接触以调节本发明所涵盖的一种或多种生物标志物(例如,表1中列出的一种或多种靶标)。例如,经培养的细胞和/或原代细胞可与药剂接触、处理并引入测定法、受试者等中。此类细胞的子代由本文所述的基于细胞的药剂所涵盖。

[0521] 在一些实施方案中,以重组方式工程化髓系细胞以调节本发明所涵盖的一种或多种生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标)。例如,如上文所述,可使用基因组编辑来调节目标生物标志物的拷贝数或基因序列,例如目标生物标志物的组成型或诱导型敲除或突变。例如,可使用CRISPR-Cas系统来精确编辑基因组核酸(例如用于产生非功能或无效突变)。在此类实施方案中,可表达CRISPR向导RNA和/或Cas酶。例如,可将仅含向导RNA的载体施用于Cas9酶转基因动物或细胞。可使用类似策略(例如锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应核酸酶(TALEN)或归巢大范围核酸酶(HE),例如MegaTAL、MegaTev、Tev-mTALEN、CPF1等)。此类系统是本领域众所周知的(参见例如美国专利第8,697,359号;Sander和Joung(2014)Nat.Biotech.32:347-355;Hale等人(2009)Cell 139:945-956;Karginov和Hannon(2010)Mol.Cell 37:7;美国专利公开第2014/0087426号和第2012/0178169号;Boch等人(2011)Nat.Biotech.29:135-136;Boch等人(2009)Science 326:1509-1512;Moscou和Bogdanove(2009)Science326:1501;Weber等人(2011)PLoS One 6:e19722;Li等人(2011)Nucl.Acids Res.39:6315-6325;Zhang等人(2011)Nat.Biotech.29:149-153;Miller等人(2011)Nat.Biotech.29:143-148;Lin等人(2014)Nucl.Acids Res.42:e47)。此类基因策略可根据本领域众所周知的方法使用组成型表达系统或诱导型表达系统。

[0522] 基于细胞的药剂与受试者宿主具有免疫相容性关系并且任何这种关系涵盖用于本发明中。例如,细胞(例如过继性髓系细胞、T细胞等)可为同基因的。术语“同基因”可指衍生自、源于或为相同物种的成员的状态,所述成员在基因上相同,特别是在抗原或免疫学反应方面。这些情形包括具有匹配MHC类型的同卵双胞胎。因此,“同基因移植”是指将供体细胞转移至在与供体在基因上相同或足够免疫学相容以容许移植而无不期望不良免疫原性反应(例如不利于诠释本文所述的免疫学筛选结果)的接受者。

[0523] 如果所转移细胞是获自并移植至同一受试者,则同基因移植可为“自体”的。“自体移植”是指收获并再输注或移植受试者的自身细胞或器官。排他性或补充性使用自体细胞可消除或减少将细胞施用回宿主的许多不良作用,特别是移植物抗宿主反应。

[0524] 如果所转移细胞是获自并移植至相同物种的不同成员,但具有足够匹配的主要组织相容性复合物(MHC)抗原以避免不良免疫原性反应,则同基因移植可为“匹配同种异体”的。可根据本领域已知和使用的标准测试来测定MHC错配程度。例如,在人类中存在至少6大类鉴定为在移植生物学中较为重要的MHC基因。HLA-A、HLA-B、HLA-C编码I类HLA蛋白质,而HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP编码II类HLA蛋白质。这些组中的每一者内的基因高度多型,如在发现于人类群体中的众多HLA等位基因或变体中所反映,并且这些组的个体间差异与针对移植细胞的免疫反应的强度相关。测定MHC匹配程度的标准方法可检查HLA-B和HLA-DR、或HLA-A、HLA-B和HLA-DR组内的等位基因。因此,可分别测试两个或三个HLA组内的至少4种和

甚至5或6种MHC抗原。在血清学MHC测试中，使针对每一HLA抗原类型的抗体与来自一个受试者(例如供体)的细胞进行反应以测定与抗体反应的某些MHC抗原的存在或不存在。将这个结果与另一受试者(例如接受者)的反应性概况进行比较。通常通过以下方式来测定抗体与MHC抗原的反应：使抗体与细胞一起培育，并且然后添加补体以诱导细胞裂解(即淋巴细胞毒性测试)。检查反应并根据反应中所裂解的细胞量来分级(参见例如Mickelson和Petersdorf(1999)Hematopoietic Cell Transplantation,Thomas,E.D.等人编辑，第28-37页,Blackwell Scientific,Malden,Mass.)。其他基于细胞的测定包括使用经标记抗体的流式细胞术或酶联免疫测定(ELISA)。测定MHC类型的分子方法是众所周知的并且通常采用合成探针和/或引物来检测编码HLA蛋白的特异性基因序列。可使用合成寡核苷酸作为杂交探针来检测与特定HLA类型相关的限制片段长度多态性(Vaughn(2002)Method.Mol.Biol.MHC Protocol.210:45-60)。或者，可使用引物来扩增HLA序列(例如通过聚合酶链反应或连接链反应)，其产物可进一步通过直接DNA测序、限制片段多态性分析(RFLP)或与一系列序列特异性寡核苷酸引物(SSOP)杂交进行检查(Petersdorf等人(1998)Blood 92:3515-3520;Morishima等人(2002)Blood 99:4200-4206;以及Middleton和Williams(2002)Method.Mol.Biol.MHC Protocol.210:67-112)。

[0525] 如果所转移细胞和受试者细胞通常因近亲交配而在限定基因座(例如单一基因座)中有所不同，则同基因移植可为“同基因型”。术语“同基因型”是指衍生自、源于或为相同物种的成员，其中所述成员除小基因区域(通常是单一遗传基因座，即单一基因)外在基因上相同。“同基因型移植”是指将细胞或器官从供体转移至接受者并且其中接受者与供体除单一遗传基因座外在基因上相同。例如，CD45是以若干等位基因形式存在，并且存在同基因型小鼠系，其中所述小鼠系在是否表达CD45.1或CD45.2等位基因方面有所不同。

[0526] 与之相比，“错配同种异体”是指衍生自、源于或为相同物种中具有足以诱发不良免疫原性反应的不同主要组织相容性复合物(MHC)抗原(即蛋白质)的成员，如通常通过本领域所用的标准测定(例如限定数量的MHC抗原的血清学或分子分析)所测定。“部分错配”是指在成员之间、通常在供体与接受者之间测得的MHC抗原的部分匹配。例如，“半错配”是指50％的MHC抗原测试为在两个成员之间显示不同MHC抗原类型。“全”或“完全”错配是指所有MHC抗原都测试为在两个成员之间不同。

[0527] 类似地，与之相比，“异基因”是指衍生自、源于或为不同物种(例如人类和啮齿动物、人类和猪、人类和黑猩猩等)的成员。“异基因移植”是指将细胞或器官从供体转移至接受者并且其中接受者是不同于供体的物种。

[0528] 另外，可从单一来源或多个来源(例如单一受试者或多个受试者)获得细胞。多个是指至少两个(例如一个以上)。在再一个实施方案中，非人类哺乳动物是小鼠。获得目标细胞类型的动物可为成人、新生(例如小于48小时)、不成熟或子宫内动物。目标细胞类型可为原代癌细胞、癌症干细胞、确立癌细胞系、永生化原代癌细胞等。在某些实施方案中，宿主受试者的免疫系统可经工程化或另外选择以与所移植癌细胞免疫学相容。例如，在一个实施方案中，可使受试者“人源化”以与人类癌细胞相容。术语“免疫系统人源化”是指包含人类HSC谱系细胞和人类获得性和先天性免疫细胞的动物(例如小鼠)，所述细胞可存活而不从宿主动物排斥，由此容许人类造血作用以及获得性和先天性免疫性重构于宿主动物中。获得性免疫细胞包括T细胞和B细胞。先天性免疫细胞包括巨噬细胞、颗粒细胞(嗜碱性粒细

胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞)、DC、NK细胞和肥大细胞。代表性、非限制性实例包括SCID-hu、Hu-PBL-SCID、Hu-SRC-SCID、NSG(NOD-SCID IL2r-γ(无效)缺乏先天性免疫系统、B细胞、T细胞和细胞因子信号传导)、NOG(NOD-SCID IL2r-γ(截短))、BRG(BALB/c-Rag2(无效)IL2r-γ(无效))和H2dRG(Stock-H2d-Rag2(无效)IL2r-γ(无效))小鼠(参见例如Shultz等人(2007)Nat.Rev.Immunol.7:118;Pearson等人(2008)Curr.Protocol.Immunol.15:21;Brehm等人(2010)Clin.Immunol.135:84-98;McCune等人(1988)Science 241:1632-1639;美国专利7,960,175以及美国专利公开第2006/0161996号)以及免疫相关基因的相关无效突变体如Rag1(缺乏B和T细胞)、Rag2(缺乏B和T细胞)、TCRα(缺乏T细胞)、穿孔素(cD8+T细胞缺乏细胞毒性功能)、FoxP3(缺乏功能性CD4+T调控细胞)、IL2rg或Prf1,以及PD-1、PD-L1、Tim3和/或2B4的突变体或敲除物,其容许有效植入人类免疫细胞和/或提供免疫受损动物如小鼠的腔室特异性模型(参见例如PCT公开第WO 2013/062134号)。另外,NSG-CD34+(NOD-SCID IL2r-γ(无效)CD34+)人源化小鼠可用于研究动物模型如小鼠中的人类基因和肿瘤活性。

[0529] 如本文所用,从生物材料来源"获得"意指从供体收获或分配生物材料来源的任何常规方法。例如,生物材料可从实体肿瘤、血样(例如外周血或脐带血样品)获得,或从另一体液(例如骨髓液或羊水)收获。用于获得这类样品的方法的本领域技术人员众所周知的。在本发明中,样品可为新鲜样品(即从供体获得并且未冷冻)。此外,可在扩增之前进一步操纵样品以去除外源性或不期望组分。还可从保存储备液获得样品。例如,在细胞系或流体(例如外周血或脐带血)的情形下,可从此类细胞系或流体的低温或其他方式保存库提取样品。可从任何合适供体获得此类样品。

[0530] 所获得细胞群体可直接使用或经冷冻以待以后使用。本领域已知用于冷冻保存的各种介质和方案。通常,冷冻介质包含约5-10%DMSO、10-90%血清白蛋白和50-90%培养基。可用于保存细胞的其他添加剂包括(例如但不限于)二糖(例如海藻糖)(Scheinkoniger等人(2004)Bone Marrow Transplant.34:531-536)或血浆增容剂(例如羟乙基淀粉(hetastarch))(即羟乙基淀粉)。在一些实施方案中,可使用等渗缓冲溶液,例如磷酸盐缓冲盐水。示例性冷冻保存组合物具有含有4%HSA、7.5%二甲基亚砜(DMSO)和2%羟乙基淀粉的细胞培养基。用于冷冻保存的其他组合物和方法是众所周知的并且在本领域中有所阐述(参见例如Broxmeyer等人(2003)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.100:645-650)。在小于约-135℃的最终温度下保存细胞。

[0531] 在一些实施方案中,免疫疗法可为CAR(嵌合抗原受体)-T疗法,其中T细胞经工程化以表达包含对目标肿瘤细胞上的抗原具有特异性的抗原结合结构域的CAR。术语"嵌合抗原受体"或"CAR"是指具有期望抗原特异性和信号传导结构域以在抗原结合时传播细胞内信号的受体。例如,T淋巴细胞经由T细胞受体(TCR)与由I类或II类主要组织相容性复合物(MHC)分子呈递的短肽的相互作用来识别特异性抗原。对于初始活化和克隆扩增来说,初始T细胞依赖于提供额外共刺激信号的专职性抗原呈递细胞(APC)。在不存在共刺激下的TCR活化可产生无反应性和克隆无变应性。为绕过免疫化,已开发用于衍生具有移植识别特异性的细胞毒性效应细胞的不同方法。已构建由源自对TCR相关CD3复合物的细胞表面组分具有特异性的天然配体或抗体的结合结构域组成的CAR。在抗原结合时,此类嵌合抗原受体连接至效应细胞中的内源性信号通路并生成类似于由TCR复合物所引发信号的活化信号。自

关于嵌合抗原受体的首次报告开始，这种概念已逐步完善并已优化嵌合受体的分子设计，并且通常使用任何数量的众所周知的结合结构域(例如scFV、Fav和本文所述的另一蛋白质结合片段)。

[0532] 在一些实施方案中，可将单核细胞和巨噬细胞工程化以例如表达嵌合抗原受体(CAR)。经修饰细胞可募集至肿瘤微环境，在此其通过浸润肿瘤并杀伤靶标癌细胞而用作强力免疫效应物。CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。抗原结合结构域结合至靶细胞上的抗原。可用作结合至CAR的抗原结合结构域的抗原的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌、寄生虫感染、自身免疫疾病和癌细胞相关者(例如肿瘤抗原)。

[0533] 在一个实施方案中，抗原结合结构域结合至肿瘤抗原(例如对目标肿瘤或癌症具有特异性的抗原)。肿瘤相关抗原的非限制性实例包括BCMA、CD19、CD24、CD33、CD38；CD44v6、CD123、CD22、CD30、CD117、CD171、CEA、CS-1、CLL-1、EGFR、ERBB2、EGFRvIII、FLT3、GD2、NY-BR-1、NY-ESO-1、p53、PRSS21、PSMA、ROR1、TAG72、Tn Ag、VEGFR2。

[0534] 在一个实施方案中，跨膜结构域与CAR中的一个或多个结构域天然缔合。跨膜结构域可源自天然或合成来源。特定用于本发明中的跨膜区可源自(即包含至少其跨膜区)T细胞受体、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、Toll样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8和TLR9的α、β或ζ链。在一些情况下，还可采用各种人类铰链，包括人类Ig(免疫球蛋白)铰链。

[0535] 在一个实施方案中，CAR的细胞内结构域包括负责信号活化和/或转导的结构域。细胞内结构域的实例包括来自一种或多种包括但不限于以下的分子或受体的片段或结构域：TCR、CD3ζ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD86、共有FcRγ、FcRβ(FcεRib)、CD79a、CD79b、FcγRIIa、DAP10、DAP 12、T细胞受体(TCR)、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、特异性结合CD83的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD 1 id、ITGAE、CD103、ITGAL、CDl la、LFA-1、ITGAM、CDl lb、ITGAX、CDl lc、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SIGLEC-9(CD 162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、Toll样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、本文所述的其他共刺激分子，其任何衍生物、变体或片段，具有相同功能能力的共刺激分子的任何合成序列，和其任何组合。

[0536] 在一些实施方案中，可使用本发明所涵盖的药剂、组合物和方法来再工程化单核细胞和巨噬细胞以增加其将抗原呈递至其他免疫效应细胞(例如T细胞)的能力。作为抗原呈递细胞(APC)的工程化单核细胞和巨噬细胞将处理肿瘤抗原并且将抗原性表位呈递至T细胞以刺激攻击肿瘤细胞的适应性免疫反应。

[0537] VI.用途和方法

[0538] 本文所述的组合物和药剂可用于关于本文所述的生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标)的各种调节、治疗、筛选、诊断、预后和治疗应用中。在本文所述的任何方

法(例如调节方法、治疗方法、筛选方法、诊断方法、预后方法或它们的组合)中,所述方法的所有步骤可由单一行动者或替代地由一个以上行动者来实施。例如,可由提供治疗性治疗的行动者直接实施诊断。或者,提供治疗剂者可要求实施诊断测定。诊断医师或治疗干预者可诠释诊断测定结果以确定治疗策略。类似地,此类替代过程可应用于其他测定(例如预后测定)。

[0539] 另外,本文所述的本发明所涵盖的任何方面可单独实施,或与本发明所涵盖的任何其他方面(包括其一个、一个以上或所有实施方案)组合实施。例如,可单独或与治疗步骤组合实施诊断和/或筛选方法,从而例如在确定适当诊断和/或筛选结果后提供适当的疗法。

[0540] 尽管本文描述了某些优选的组合物,包括抗体及其抗原结合片段,但预期此类药剂可单独使用或与其他有用药剂组合使用,例如调节至少一种生物标志物(例如,表1中列出的至少一种靶标)的量和/或活性以便上调或下调炎性表型并且从而分别上调或下调免疫反应的药剂。这些药剂也可用于检测至少一种生物标志物(例如,表1中列出的至少一种靶标)的量和/或活性,使得所述药剂可用于由至少一种生物标志物(例如,表1中列出的至少一种靶标)介导的诊断、预后和筛选效应。

[0541] 下调表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性的药剂增加髓系细胞的炎性表型。

[0542] 类似地,上调表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性的药剂降低髓系细胞的炎性表型。

[0543] 调节至少一种生物标志物(例如,表1中列出的至少一种靶标)的药剂,包括抗体及其抗原结合片段、与casme接触的细胞等,可单独使用或与其他药剂组合使用。此类药剂可调节基因序列、拷贝数、基因表达、翻译、翻译后修饰、亚细胞定位、降解、构象、稳定性、分泌、酶活性、转录因子、受体激活、信号转导和由至少一种生物标志物介导的其他生物化学功能。此类药剂可结合任何细胞部分,例如受体、细胞膜、抗原决定子或存在于靶分子或靶细胞上的其他结合位点。在一些实施方案中,所述药剂可扩散或转运到细胞中,在那里它可以在细胞内起作用。在一些实施方案中,所述药剂是基于细胞的。代表性药剂包括但不限于核酸(DNA和RNA如cDNA和mRNA)、寡核苷酸、多肽、肽、抗体、融合蛋白、抗生素、小分子、脂质/脂肪、糖、载体、缀合物、疫苗、基因疗法药剂、细胞疗法药剂等,例如小分子、编码多肽的mRNA、CRISPR向导RNA(gRNA)、RNA干扰剂、小干扰RNA(siRNA)、CRISPR RNA(crRNA和tracrRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、piwi相互作用RNA(piRNA)、反义寡核苷酸、肽或肽模拟物抑制剂、适体、结合并活化或抑制蛋白质生物标志物的天然配体和其衍生物、抗体、细胞内抗体或细胞,所述药剂单独使用或与其他药剂组合使用。

[0544] 本发明所涵盖的此类药剂可包括任何数量、类型和模态。例如,药剂可包含1、2、3、4、5种或更多种或介于其间的任何范围(包括端值)数目的药剂,所述药剂调节一种生物标志物或多于一种生物标志物(例如,2种调节表1中列出的相同靶标的药剂,一种调节表1中列出的靶标的药剂和另一种也调节表1中列出的靶标的药剂,一种调节表1中列出的靶标的药剂和另一种调节表1中列出的另一种靶标的药剂,等等)。

[0545] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的调节剂还包含一种或多种靶向吞噬细胞(例如髓系细胞)的额外药剂。此类单核细胞/巨噬细胞靶向剂包括但不限于靶向CD11b的罗维珠单抗(rovelizumab),小分子,包括MNRP1685A(其靶向神经菌毛素(Neurophilin)-1),靶

向ANG2的奈斯库单抗(nesvcumab),对IL-4具有特异性的帕考珠单抗(pascolizumab),对IL4Rα具有特异性的杜匹鲁单抗(dupilumab),对IL-6R具有特异性的托珠单抗(tocilizumab)和萨利鲁单抗(sarilumab),对TNF-α具有特异性的阿达木单抗(adalimumab)、赛妥珠单抗(certolizumab)、他奈西普(tanercept)、戈利木单抗(golimumab)和英夫利昔单抗(infliximab),以及靶向CD40的CP-870和CP-893。

[0546] 与本发明所涵盖的抗体及其抗原结合片段一起使用的示例性药剂在本文和本领域中进一步描述(参见例如2018年6月29日提交的U.S.S.N.62/692,463,2019年2月26日提交的U.S.S.N.62/810,683,2019年6月4日提交的U.S.S.N.62/857,199,以及2019年6月27日由Novobrantseva等人(Verseau Therapeutics,Inc.)提交的标题为"Compositions and Methods for Modulating Monocyte and Macrophage Inflammatory Phenotypes and Immunotherapy Uses Thereof"的共同未决申请;所述申请各自的全部内容通过引用整体并入本文)。

[0547] 1.调节和治疗方法

[0548] 本发明所涵盖的一个方面涉及调节本文所述的至少一种生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标、实施例等)的量(例如表达)和/或活性(例如调节信号传导、抑制与结合伴侣的结合等)以例如用于治疗目的的方法。此类药剂可用于操纵髓系细胞的特定亚群并调控生理学条件中的其数量和/或活性,并且用于治疗巨噬细胞相关疾病和其他临床疾患。例如,本发明所涵盖的药剂(包括组合物和药物制剂)可调节生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标、实施例等)的量和/或活性以由此调节髓系细胞的炎性表型并且进一步调节免疫反应。在一些实施方案中,调节细胞活性(例如细胞因子分泌、细胞群体比率等),而非调节免疫反应本身。提供使用本文所公开的药剂、组合物和制剂来调节单核细胞和巨噬细胞炎性表型的方法。因此,所述药剂、组合物和方法可用于通过以下方式来调节免疫反应:调节生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标、实施例等)的量和/或活性,消耗或富集某些类型的细胞,和/或调节细胞类型的比率。例如,表1中列出的某些靶标是细胞存活所需的,因此抑制所述靶标可引起细胞死亡。这种调节可用于调节免疫反应,因为介导免疫反应的细胞类型的比率(例如促炎细胞对抗炎细胞)得以调节。在一些实施方案中,使用所述药剂来治疗患有癌症的受试者的癌症。

[0549] 本公开证实,下调巨噬细胞中的这些基因的量和/或活性可再极化巨噬细胞(例如改变其表型)。在一些实施方案中,改变M2巨噬细胞的表型以产生具有1型(M2样)或M1表型的巨噬细胞,或关于M1巨噬细胞和2型(M2样)或M2表型反之亦然。在一些实施方案中,使用本发明所涵盖的药剂来调节(例如抑制)具有M2表型的单核细胞和巨噬细胞的输送、极化和/或活化,或关于1型和M1巨噬细胞反之亦然。本发明另外提供减少目标髓系细胞(例如M1巨噬细胞、M2巨噬细胞(例如肿瘤中的TAM)等)的群体的方法。

[0550] 在一些实施方案中,本发明提供改变髓系细胞(包括其亚型,例如促肿瘤巨噬细胞和抗肿瘤巨噬细胞)的分布的方法。在一个实例中,本发明提供将巨噬细胞从抗炎免疫反应驱向促炎免疫反应以及将巨噬细胞从促炎免疫反应驱向抗炎免疫反应的方法。细胞类型可消耗和/或富集5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更高或其间的任何范围(包括端值,例如45-55%)。

[0551] 在一些实施方案中，调节发生于细胞(例如单核细胞、巨噬细胞或其他吞噬细胞如树突状细胞)中。在一些实施方案中，细胞是巨噬细胞亚型，例如本文所述的巨噬细胞亚型。例如，巨噬细胞可为组织驻留型巨噬细胞(TAM)或衍生自血流中的循环单核细胞的巨噬细胞。

[0552] 在一些实施方案中，调节髓系细胞炎性表型可产生期望的经调节免疫反应，例如异常单核细胞迁移和增殖的调节、组织驻留型巨噬细胞的未调控增殖、未调控促炎巨噬细胞、未调控抗炎巨噬细胞、组织中的促炎和抗炎巨噬细胞亚群的不平衡分布、疾病疾患中异常采用的单核细胞和巨噬细胞的活化状态、经调节细胞毒性T细胞活化和功能、克服癌细胞对疗法的抗性和癌细胞对免疫疗法(例如免疫检查点疗法)的敏感性。在一些实施方案中，逆转此类表型。

[0553] 治疗和/或预防与单核细胞和巨噬细胞相关的疾病的方法包括使细胞与本发明所涵盖的药剂和组合物体外、离体或体内(例如施用于受试者)接触，其中所述药剂和组合物操纵单核细胞和巨噬细胞的迁移、募集、分化和极化、活化、功能和/或存活。在一些实施方案中，调节本发明所涵盖的一种或多种生物标志物可用于调节(例如抑制或消耗)组织微环境(例如肿瘤组织)中的单核细胞和巨噬细胞的增殖、募集、极化和/或活化。

[0554] 在本发明所涵盖的一个方面，提供减小髓系细胞的抗炎活性的方法。

[0555] 在本发明所涵盖的另一方面，提供增加髓系细胞的促炎活性的方法。

[0556] 在本发明所涵盖的另一方面，提供平衡组织中的促炎单核细胞和巨噬细胞和抗炎单核细胞和巨噬细胞的方法。

[0557] 本发明所涵盖的调节方法涉及使细胞与一种或多种本发明所涵盖的生物标志物(包括本发明所涵盖的至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)，包括至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)和实施例或其片段)的调节剂或调节与细胞相关的生物标志物活性中的一种或多种活性的药剂接触。调节生物标志物活性的药剂可为如本文所述的药剂，例如抗体或其抗原结合片段。另外，其他药剂可与如上所述的此类抗体或其抗原结合片段(例如，核酸或多肽、生物标志物的天然存在的结合伴侣、针对生物标志物的抗体和针对其他免疫相关靶标的抗体的组合、至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)激动剂或拮抗剂、至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)激动剂或拮抗剂的肽模拟物、至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)肽模拟物、其他小分子或针对至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)核酸基因表达产物的小RNA或其模拟物等)组合使用。

[0558] a.受试者

[0559] 本发明提供了治疗患有疾患或病症的受试者的方法，所述疾患或病症将受益于上调或下调本发明所涵盖的至少一种生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)和实施例或其片段，例如特征在于生物标志物或其片段的不期望、不充分或异常表达或活性的病症。在一个实施方案中，所述方法涉及施用调节(例如上调或下调)生物标志物表达或活性的药剂(例如通过本文所述的筛选测定鉴定的药剂)或药剂组合。需要治疗的受试者可根据本文所述的方法进行治疗并且额外方法(例如也阐述于本文中者)可与此类治疗方法(例如用以诊断、预后、监测等的方法)进行组合(例如调节经证实以表达目标生物标志物的髓系细胞的群体，和包含此类髓系细胞的受试者)。

[0560] 在生物标志物异常下调和/或增加的生物标志物活性很可能具有有益作用的情形下，期望刺激生物标志物活性。同样，在生物标志物异常上调和/或降低的生物标志物活性很可能具有有益作用的情形下，期望抑制生物标志物活性。

[0561] 在一些实施方案中，受试者是动物。动物可为任一性别并且可处于任何发育阶段。在一些实施方案中，动物是脊椎动物，例如哺乳动物。在一些实施方案中，受试者是非人类哺乳动物。在一些实施方案中，受试者是家养动物，例如狗、猫、牛、猪、马、绵羊或山羊。在一些实施方案中，受试者是伴侣动物，例如狗或猫。在一些实施方案中，受试者是家畜动物，例如牛、猪、马、绵羊或山羊。在一些实施方案中，受试者是动物园动物。在一些实施方案中，受试者是研究动物，例如啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、狗、猪或非人类灵长类动物。在一些实施方案中，动物是经基因工程化的动物。在一些实施方案中，动物是转基因动物(例如转基因小鼠和转基因猪)。在一些实施方案中，受试者是鱼或爬行动物。在一些实施方案中，受试者是人类。在一些实施方案中，受试者是癌症动物模型。例如，动物模型可以是人类源癌症的同位异种移植物动物模型。

[0562] 在本发明所涵盖方法的一些实施方案中，受试者尚未经受治疗(例如化学疗法、放射疗法、靶向疗法和/或免疫疗法)。在一些实施方案中，受试者已经受治疗(例如化学疗法、放射疗法、靶向疗法和/或免疫疗法)。

[0563] 在一些实施方案中，受试者已进行手术以去除癌性或癌症前期组织。在一些实施方案中，癌性组织尚未去除，例如，癌性组织可位于不宜手术的身体区域(例如生命必需组织)或手术程序将向患者引起重大危害风险的区域中。

[0564] 在一些实施方案中，受试者或其细胞抵抗相关疗法，例如抵抗免疫检查点抑制剂疗法。例如，调节本发明所涵盖的一种或多种生物标志物可克服免疫检查点抑制剂疗法抗性。

[0565] 在一些实施方案中，受试者需要根据本文所述的组合物和方法的调节，例如已鉴定为具有本文所述的一种或多种生物标志物的不期望不存在、存在或异常表达和/或活性。

[0566] 在一些实施方案中，受试者具有经巨噬细胞浸润的实体肿瘤，所述巨噬细胞占肿瘤或肿瘤微环境中的细胞的质量、体积和/或数量的至少约5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％、25％、26％、27％、28％、29％、30％、31％、32％、33％、34％、35％、36％、37％、38％、39％、40％、41％、42％、43％、44％、45％、46％、47％、48％、49％、50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、57％、58％、59％、60％或更多或其间的任何范围(包括端值)(例如至少约5％至至少约20％)。此类细胞可为任何阐述为可用于本文中的其他实施方案者，例如表达CD11b或CD14或CD11和CD14二者的1型巨噬细胞、M1巨噬细胞、TAM、髓系细胞等。

[0567] 可使用本发明所涵盖的方法来测定受试者的许多不同癌症(例如本文所述者)的癌症疗法(例如表1中所列出生物标志物的至少一种调节剂)的反应性。

[0568] 另外，这些调节剂还可以组合疗法施用以进一步调节期望活性。例如，可使用靶向IL-4、IL-4Rα、IL-13和CD40的药剂和组合物来调节髓系细胞分化和/或极化。可使用靶向CD11b、CSF-1R、CCL2、奈罗利姆(neurophilim)-1和ANG-2的药剂和组合物来调节巨噬细胞至组织的募集。可使用靶向IL-6、IL-6R和TNF-α的药剂和组合物来调节巨噬细胞功能。额外药剂包括但不限于化学治疗剂、激素、抗血管生成剂、经放射性标记的化合物，或使用手术、

冷冻疗法和/或放射疗法。前述治疗方法可与其他形式的常规疗法(例如本领域技术人员众所周知的癌症标准护理治疗)联合施用,其是与常规疗法连续、在其之前或之后施用。例如,这些调节剂可与治疗有效剂量的化学治疗剂一起施用。在另一个实施方案中,联合施用这些调节剂与化学疗法以增强化学治疗剂的活性和功效。医师案头参考(Physicians'Desk Reference,PDR)公开了已用于治疗各种癌症的化学治疗剂的剂量。这些上文所提及的治疗有效性化学治疗药物的给药方案和剂量将取决于所治疗的特定黑色素瘤、疾病程度和其他为本领域熟练医师所熟知并且可由医师确定的因素。

[0569] b.癌症疗法

[0570] 在一些实施方案中,使用本发明所涵盖的药剂来治疗癌症。例如,本发明提供降低髓系细胞的促肿瘤功能(即致瘤性)和/或增加髓系细胞的抗肿瘤功能的方法。在一些特定实施方案中,本发明所涵盖的方法可降低巨噬细胞的至少一种促肿瘤功能,包括1)肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的募集和极化、2)肿瘤血管生成、3)肿瘤生长、4)肿瘤细胞分化、5)肿瘤细胞存活、6)肿瘤侵袭和转移、7)免疫抑制和8)免疫抑制性肿瘤微环境。

[0571] 可使用癌症疗法(例如表1中列出的一种或多种靶标的至少一种调节剂)或疗法组合(例如表1中列出的一种或多种靶标的至少一种调节剂与至少一种免疫疗法的组合)来接触癌细胞和/或施用于期望受试者(例如指示为癌症疗法(例如表1中列出的一种或多种靶标的至少一种调节剂)的可能反应者的受试者)。在另一个实施方案中,在受试者指示为并非癌症疗法(例如表1中列出的一种或多种靶标的至少一种调节剂)的可能反应者后,可避免使用这种癌症疗法(例如表1中列出的一种或多种靶标的至少一种调节剂)并且可施用替代治疗方案(例如靶向和/或非靶向癌症疗法)。也涵盖组合疗法并且其可包含例如一种或多种化学治疗剂和放射、一种或多种化学治疗剂和免疫疗法、或一种或多种化学治疗剂、放射和化学疗法,其中每个组合可使用或不使用癌症疗法(例如表1中列出的一种或多种靶标的至少一种调节剂)。

[0572] 可用于调节本发明所涵盖的生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标)的代表性示例性药剂阐述于上文中。如下文进一步所述,抗癌剂涵盖生物治疗性抗癌剂(例如干扰素、细胞因子(例如肿瘤坏死因子、干扰素α、干扰素γ等)、疫苗、造血生长因子、单克隆血清疗法、免疫刺激剂和/或免疫调节剂(例如IL-1、2、4、6和/或12)、免疫细胞生长因子(例如GM-CSF)和抗体(例如曲妥珠单抗(trastuzumab)、T-DM1、贝伐珠单抗(bevacizumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、帕尼单抗(panitumumab)、利妥昔单抗(rituximab)、托西莫单抗(tositumomab)等)以及化学治疗剂。

[0573] 术语"靶向疗法"是指施用选择性地与所选生物分子相互作用以由此治疗癌症的药剂。例如,关于免疫检查点抑制剂的抑制的靶向疗法可与本发明所涵盖的方法组合使用。

[0574] 术语"免疫疗法"通常是指以有益方式调节免疫反应的任何策略,并且涵盖通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式调节免疫反应的方法来治疗患有疾病或处于染上或经受疾病复发的风险下的受试者,以及使用某些部分的受试者免疫系统来抵抗疾病(例如癌症)的任何治疗。在施用或不施用一种或多种用于所述目的的药剂的情况下,刺激(或抑制)受试者的自身免疫系统。经设计以诱发或扩增免疫反应的免疫疗法称为"活化免疫疗法"。经设计以降低或抑制免疫反应的免疫疗法称为"抑制免疫疗法"。在一些实施方案中,免疫疗法对目标细胞(例如癌细胞)具有特异性。在一些实施方案中,免疫疗法可为"非靶向",其是

指施用不选择性地与免疫系统细胞相互作用但调节免疫系统功能的药剂。非靶向疗法的代表性实例包括但不限于化学疗法、基因疗法和放射疗法。

[0575] 一些形式的免疫疗法是可包含例如使用癌症疫苗和/或敏化抗原呈递细胞的靶向疗法。例如，溶瘤病毒是能够感染并裂解癌细胞的病毒，但其使正常细胞不受损害，从而使得它们可用于癌症疗法中。溶瘤病毒的复制促进了肿瘤细胞破坏并且也在肿瘤位点处产生剂量扩增。它们也可用作抗癌基因的载体，容许所述抗癌基因特异性递送至肿瘤位点。免疫疗法可涉及用于宿主短期保护的被动免疫性，所述被动免疫性是通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预形成抗体(例如施用针对肿瘤抗原的任选地连接至化学治疗剂或毒素的单克隆抗体)来实现。例如，抗VEGF和mTOR抑制剂已知可有效治疗肾细胞癌。免疫疗法也可着眼于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别表位。或者，可使用反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三重螺旋多核苷酸等来选择性调节与肿瘤或癌症的开始、进展和/或病理学有关的生物分子。类似地，免疫疗法可采用基于细胞的疗法的形式。例如，过继性细胞免疫疗法是一类使用对患者癌症具有天然或基因工程化的反应性的免疫细胞(例如T细胞)的免疫疗法，其中生成所述免疫细胞并且然后转移回癌症患者中。注射大量经活化肿瘤特异性T细胞可诱导癌症的完全和持久性消退。

[0576] 免疫疗法可涉及用于宿主短期保护的被动免疫性，所述被动免疫性是通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预形成抗体(例如施用针对肿瘤抗原的任选地连接至化学治疗剂或毒素的单克隆抗体)来实现。免疫疗法还可着眼于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别表位。或者，可使用反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三重螺旋多核苷酸等来选择性调节与肿瘤或癌症的开始、进展和/或病理学有关的生物分子。

[0577] 在一些实施方案中，免疫治疗剂是免疫刺激分子的激动剂；免疫抑制分子的拮抗剂；趋化因子的拮抗剂；刺激T细胞活化的细胞因子的激动剂；拮抗或抑制可抑制T细胞活化的细胞因子的药剂；和/或结合至B7家族的膜结合蛋白的药剂。在一些实施方案中，免疫治疗剂是免疫抑制分子的拮抗剂。在一些实施方案中，免疫治疗剂可为针对细胞因子、趋化因子和生长因子的药剂，例如，中和肿瘤相关细胞因子、趋化因子、生长因子和其他可溶性因子(包括IL-10、TGF-β和VEGF)的抑制作用的中和抗体。

[0578] 在一些实施方案中，免疫疗法包含一种或多种免疫检查点的抑制剂。术语“免疫检查点”是指CD4+和/或CD8+T细胞的细胞表面上通过调节抗癌免疫反应(例如下调或抑制抗肿瘤免疫反应)来微调免疫反应的分子的组。免疫检查点蛋白是本领域众所周知的并且包括但不限于CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD200R、CD160、gp49B、PIR-B、KRLG-1、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3(CD223)、IDO、GITR、4-IBB、OX-40、BTLA、SIRPα(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、嗜乳脂蛋白(butyrophilin)和A2aR(参见例如WO 2012/177624)。所述术语还涵盖生物活性蛋白片段，以及编码全长免疫检查点蛋白及其生物活性蛋白片段的核酸。在一些实施方案中，所述术语还涵盖根据本文提供的同源性描述的任何片段。

[0579] 一些免疫检查点是“免疫抑制性免疫检查点”，其涵盖抑制、下调或压制免疫系统的功能(例如免疫反应)的分子(例如蛋白质)。例如，PD-L1(程序性死亡配体1)也称为CD274或B7-H1，其是传输减小T细胞增殖以抑制免疫系统的抑制信号的蛋白质。CTLA-4(细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4)也称为CD152，其是抗原呈递细胞表面上用作下调免疫反应的免疫

检查点(“关断”开关)的蛋白质受体。TIM-3(含有T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的蛋白质3)也称为HAVCR2,其是用作调控巨噬细胞活化的免疫检查点的细胞表面蛋白。VISTA(T细胞活化的V-结构域Ig抑制因子)是用作抑制T细胞效应功能并且维持外周耐受性的免疫检查点的I型跨膜蛋白。LAG-3(淋巴细胞活化基因3)是负性调控T细胞的增殖、活化和稳态的免疫检查点受体。BTLA(B-和T-淋巴细胞衰减蛋白)是经由与肿瘤坏死家族受体(TNF-R)的相互作用来显示T细胞抑制的蛋白质。KIR(杀伤细胞免疫球蛋白样受体)是表达于NK细胞和少数T细胞上的抑制NK细胞的细胞毒性活性的蛋白质的家族。在一些实施方案中,免疫治疗剂可为对免疫抑制酶具有特异性的药剂,例如可阻断精氨酸酶(ARG)和吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)(一种抑制T细胞和NK细胞的免疫检查点蛋白)的活性的抑制剂,所述抑制剂改变氨基酸精氨酸和色氨酸在免疫抑制性肿瘤微环境中的分解代谢。所述抑制剂可包括但不限于N-羟基-L-Arg(NOHA),其靶向表达ARG的M2巨噬细胞;硝基阿司匹林(nitroaspirin)或西地那非(sildenafil)(Viagra®),其同时阻断ARG和一氧化氮合酶(NOS);和IDO抑制剂,例如1-甲基-色氨酸。所述术语还涵盖生物活性蛋白片段以及编码全长免疫检查点蛋白的核酸和其生物活性蛋白片段。在一些实施方案中,所述术语还涵盖根据本文所提供的同源性阐述的任何片段。

[0580] 与之相比,其他免疫检查点是涵盖“免疫刺激性”的分子(例如蛋白质),其活化、刺激或促进免疫系统的功能(例如免疫反应)。在一些实施方案中,免疫刺激分子是CD28、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、CD27、CD70、CD40、CD40L、CD122、CD226、CD30、CD30L、OX40、OX40L、HVEM、BTLA、GITR和其配体GITRL、LIGHT、LTβR、LTαβ、ICOS(CD278)、ICOSL(B7-H2)和NKG2D。CD40(分化簇40)是发现于抗原呈递细胞上的为所述细胞的活化所需的共刺激蛋白。OX40也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4)或CD134,其在活化之后通过防止T细胞死亡并且随后增加细胞因子产生来参与维持免疫反应。CD137是肿瘤坏死因子受体(TNF-R)家族中共刺激活化T细胞以增强增殖和T细胞存活的成员。CD122是白介素-2受体(IL-2)蛋白的亚基,其促进不成熟T细胞分化成调控性T细胞、效应T细胞或记忆T细胞。CD27是肿瘤坏死因子受体超家族的成员并且用作共刺激免疫检查点分子。CD28(分化簇28)是表达于T细胞上的提供T细胞活化和存活所需的共刺激信号的蛋白质。GITR(糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白)也称为TNFRSF18和AITR,其是在通过调控性T细胞维持的显性免疫学自我耐受性来发挥关键作用的蛋白质。ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)也称为CD278,其是表达于活化T细胞上并且在T细胞信号传导和免疫反应中发挥作用的CD28超家族共刺激分子。

[0581] 免疫检查点和其序列是本领域众所周知的并且代表性实施方案进一步阐述于下文中。免疫检查点通常涉及抑制受体和天然结合伴侣(例如配体)的对。例如,PD-1多肽是能够将抑制信号传输至免疫细胞以由此抑制免疫细胞效应功能的抑制受体,或者能够例如在以可溶性单体形式存在时促进免疫细胞的共刺激(例如通过竞争性抑制)。优选的PD-1家族成员与PD-1共有序列同一性并且结合至一种或多种B7家族成员(例如B7-1、B7-2)、PD-1配体和/或抗原呈递细胞上的其他多肽。术语“PD-1活性”包括PD-1多肽例如通过接合抗原呈递细胞上的天然PD-1配体来调节活化免疫细胞中的抑制信号的能力。调节免疫细胞中的抑制信号使得可调节免疫细胞的增殖和/或免疫细胞的细胞因子分泌。因此,术语“PD-1活性”包括PD-1多肽结合其天然配体的能力,调节免疫细胞抑制信号的能力,和调节免疫反应的

能力。术语“PD-1配体”是指PD-1受体的结合伴侣并且包括PD-L1(Freeman等人(2000)J.Exp.Med.192:1027-1034)和PD-L2(Latchman等人(2001)Nat.Immunol.2:261)。术语“PD-1配体活性”包括PD-1配体多肽结合其天然受体(例如PD-1或B7-1)的能力,调节免疫细胞抑制信号的能力,和调节免疫反应的能力。

[0582] 如本文所用,术语“免疫检查点疗法”是指抑制免疫抑制性免疫检查点(例如抑制其核酸和/或蛋白质)的药剂的应用。抑制一种或多种所述免疫检查点可阻断或另外中和抑制性信号传导以由此上调免疫反应,从而更有效地治疗癌症。可用于抑制免疫检查点的示例性药剂包括可结合和/或不活化或抑制免疫检查点蛋白或其片段的抗体、小分子、肽、肽模拟物、天然配体和天然配体衍生物;以及可下调免疫检查点核酸或其片段的表达和/或活性的RNA干扰剂、反义物、核酸适体等。上调免疫反应的示例性药剂包括针对一种或多种免疫检查点蛋白的阻断所述蛋白质与其天然受体之间的相互作用的抗体;非活化形式的一种或多种免疫检查点蛋白(例如显性阴性多肽);阻断一种或多种免疫检查点蛋白与其天然受体之间的相互作用的小分子或肽;结合至其天然受体的融合蛋白(例如融合至抗体或免疫球蛋白的Fc部分的免疫检查点抑制蛋白的细胞外部分);阻断免疫检查点核酸转录或翻译的核酸分子;等等。此类药剂可直接阻断一种或多种免疫检查点与其天然受体(例如抗体)之间的相互作用以防止抑制性信号传导并上调免疫反应。或者,药剂可间接阻断一种或多种免疫检查点蛋白与其天然受体之间的相互作用以防止抑制性信号传导并上调免疫反应。例如,可溶性形式的免疫检查点蛋白配体(例如稳定化胞外结构域)可结合至其受体以间接减小结合至适当配体的受体的有效浓度。在一个实施方案中,单独或组合使用抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和/或抗PD-L2抗体来抑制免疫检查点。用于阻断PD-1途径的治疗剂包括拮抗性抗体和可溶性PD-L1配体。针对PD-1和PD-L1/2抑制途径的拮抗剂可包括但不限于针对PD-1或PD-L1/2的拮抗性抗体(例如17D8、2D3、4H1、5C4(也称为尼沃鲁单抗(nivolumab)或BMS-936558)、4A11、7D3和5F4,其公开于美国专利第8,008,449号中;AMP-224、匹利珠单抗(pidilizumab)(CT-011)、派姆单抗(pembrolizumab)以及美国专利第8,779,105号、第8,552,154号、第8,217,149号、第8,168,757号、第8,008,449号、第7,488,802号、第7,943,743号、第7,635,757号和第6,808,710号中所公开的抗体。类似地,额外代表性检查点抑制剂可为(但不限于)针对抑制性调控因子CTLA-4(抗细胞毒性T-淋巴细胞抗原4)的抗体,例如伊匹单抗(ipilimumab)、曲美目单抗(tremelimumab)(完全人源化)、抗CD28抗体、抗CTLA-4阿德奈汀(adnectin)、抗CTLA-4结构域抗体、单链抗CTLA-4抗体片段、重链抗CTLA-4片段、轻链抗CTLA-4片段和其他抗体(例如公开于以下文献中者:美国专利第8,748,815号、第8,529,902号、第8,318,916号、第8,017,114号、第7,744,875号、第7,605,238号、第7,465,446号、第7,109,003号、第7,132,281号、第6,984,720号、第6,682,736号、第6,207,156号和第5,977,318号以及欧洲专利第1212422号、美国专利公开第2002/0039581号和第2002/086014号和Hurwitz等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.95:10067-10071)。

[0583] 针对PD-1、PD-L1、PD-L2和CTLA-4示例的免疫检查点的活性、配体、阻断等的代表性定义通常适用于其他免疫检查点。

[0584] 术语“非靶向疗法”是指施用不与所选生物分子选择性相互作用但仍治疗癌症的药剂。非靶向疗法的代表性实例包括但不限于化学疗法、基因疗法和放射疗法。

[0585] 在一个实施方案中,使用化学疗法。化学疗法包括施用化学治疗剂。这种化学治疗

剂可为(但不限于)选自下组化合物的那些:铂化合物、细胞毒性抗生素、抗代谢物、抗有丝分裂剂、烷基化剂、砷化合物、DNA拓扑异构酶抑制剂、紫杉烷(taxane)、核苷类似物、植物生物碱和毒素;和其合成衍生物。示例性药剂包括但不限于烷基化剂:氮芥(nitrogen mustard)(例如环磷酰胺、异环磷酰胺(ifosfamide)、曲磷胺(trofosfamide)、氮芥苯丁酸、雌氮芥(estramustine)和美法仑)、亚硝基脲(例如卡莫司汀(BCNU)和洛莫司汀(CCNU))、烷基磺酸盐(例如白消安和曲奥舒凡(treosulfan))、三氮烯(例如达卡巴嗪、替莫唑胺(temozolomide))、顺铂、曲奥舒凡和曲磷胺;植物生物碱:长春碱、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多西紫杉醇(docetaxol);DNA拓扑异构酶抑制剂:替尼泊苷(teniposide)、克立那托(crisnatol)和丝裂霉素;抗叶酸剂:甲氨蝶呤、霉酚酸(mycophenolic acid)和羟基脲;嘧啶类似物:5-氟尿嘧啶、脱氧氟尿苷(doxifluridine)和胞嘧啶阿糖核苷(cytosine arabinoside);嘌呤类似物:巯基嘌呤和硫基鸟嘌呤;DNA抗代谢物:2'-脱氧-5-氟尿苷、甘氨酸阿非迪霉素(aphidicolin glycinate)和吡唑并咪唑;和抗有丝分裂剂:软海绵素(halichondrin)、秋水仙碱(colchicine)和利索新(rhizoxin)。类似地,额外示例性药剂包括含铂化合物(例如顺铂、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin))、长春花生物碱(vinca alkaloid)(例如长春新碱、长春碱、长春地辛(vindesine)和长春瑞滨(vinorelbine))、类紫杉醇(taxoid)(例如太平洋紫杉醇或太平洋紫杉醇等效物,例如纳米粒子白蛋白结合太平洋紫杉醇(ABRAXANE)、二十二碳六烯酸结合-太平洋紫杉醇(DHA-太平洋紫杉醇,Taxoprexin)、聚谷氨酸盐结合-太平洋紫杉醇(PG-太平洋紫杉醇、聚谷氨酸太平洋紫杉醇(paclitaxel poliglumex)、CT-2103、XYOTAX)、肿瘤活化前药(TAP)ANG1005(结合三个太平洋紫杉醇分子的Angiopep-2)、太平洋紫杉醇-EC-1(结合至erbB2识别肽EC-1的太平洋紫杉醇)和葡萄糖缀合的太平洋紫杉醇(例如2'-太平洋紫杉醇琥珀酸甲酯2-吡喃葡萄糖基酯);多西紫杉醇(docetaxel)、紫杉醇)、表鬼白毒素(epipodophyllin)(例如依托泊苷、磷酸依托泊苷(etoposide phosphate)、替尼泊苷、托泊替康(topotecan)、9-氨基喜树碱(9-aminocamptothecin)、伊立替康注射液(camptoirinotecan)、伊立替康(irinotecan)、克立那托、丝裂霉素C)、抗代谢物、DHFR抑制剂(例如甲氨蝶呤、二氯甲氨蝶呤(dichloromethotrexate)、三甲曲沙(trimetrexate)、依达曲沙(edatrexate))、IMP脱氢酶抑制剂(例如霉酚酸、噻唑羧胺核苷(tiazofurin)、利巴韦林(ribavirin)和EICAR)、核糖核苷酸还原酶抑制剂(例如羟基脲和去铁胺(deferoxamine))、尿嘧啶类似物(例如5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷(floxuridine)、脱氧氟尿苷、雷替曲塞(ratitrexed)、替加氟-尿嘧啶(tegafur-uracil)、卡培他滨(capecitabine))、胞嘧啶类似物(例如阿糖胞苷(ara C)、胞嘧啶阿糖胞苷和氟达拉滨(fludarabine))、嘌呤类似物(例如巯基嘌呤和硫鸟嘌呤)、维生素D3类似物(例如EB 1089、CB 1093和KH 1060)、异戊烯化抑制剂(例如洛伐他汀(lovastatin))、多巴胺能神经毒素(例如1-甲基-4-苯基吡啶鎓离子)、细胞周期抑制剂(例如星状孢子素(staurosporine))、放线菌素(例如放线菌素D、更生霉素)、博来霉素(例如博来霉素A2、博来霉素B2、培洛霉素(peplomycin))、蒽环类抗生素(例如柔红霉素、多柔比星、聚乙二醇化脂质多柔比星、埃达霉素(idarubicin)、泛艾霉素(epirubicin)、吡柔比星(pirarubicin)、佐柔比星(zorubicin)、米托蒽醌)、MDR抑制剂(例如维拉帕米(verapamil))、Ca^{2+}ATP酶抑制剂(例如毒胡萝卜内酯(thapsigargin))、伊马替尼(imatinib)、沙立度胺(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)、酪氨酸激酶抑制剂(例如

阿昔替尼(axitinib)(AG013736)、博舒替尼(bosutinib)(SKI-606)、西地尼布(cediranib)(RECENTIN™,AZD2171)、达沙替尼(dasatinib)(SPRYCEL®,BMS-354825)、埃罗替尼(erlotinib)(TARCEVA®)、吉非替尼(gefitinib)(IRESSA®)、伊马替尼(Gleevec®,CGP57148B,STI-571)、拉帕替尼(TYKERB®,TYVERB®)、来他替尼(lestaurtinib)(CEP-701)、来那替尼(neratinib)(HKI-272)、尼罗替尼(nilotinib)(TASIGNA®)、司马沙尼(semaxanib)(司马西尼(semaxinib),SU5416)、舒尼替尼(sunitinib)(SUTENT®,SU11248)、托西尼布(toceranib)(PALLADIA®)、凡德他尼(vandetanib)(ZACTIMA®,ZD6474)、瓦他拉尼(vatalanib)(PTK787,PTK/ZK)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN®)、贝伐珠单抗(AVASTIN®)、利妥昔单抗(RITUXAN®)、西妥昔单抗(ERBITUX®)、帕尼单抗(VECTIBIX®)、兰尼单抗(ranibizumab)(Lucentis®)、尼罗替尼(TASIGNA®)、索拉非尼(sorafenib)(NEXAVAR®)、依维莫司(everolimus)(AFINITOR®)、阿来组单抗(CAMPATH®)、吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)(MYLOTARG®)、西罗莫司(temsirolimus)(TORISEL®)、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、乳酸多韦替尼(dovitinib lactate)(TKI258、CHIR-258)、BIBW 2992(TOVOK™)、SGX523、PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、BIBF 1120(VARGATEF®)、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、BMS-690154、CEP-11981、替沃扎尼(tivozanib)(AV-951)、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647和/或XL228)、蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米(bortezomib)(VELCADE))、mTOR抑制剂(例如雷帕霉素(rapamycin)、特姆莫司(temsirolimus)(CCI-779)、依维莫司(everolimus)(RAD-001)、地磷莫司(ridaforolimus)、AP23573(Ariad)、AZD8055(AstraZeneca)、BEZ235(Novartis)、BGT226(Norvartis)、XL765(Sanofi Aventis)、PF-4691502(Pfizer)、GDC0980(Genetech)、SF1126(Semafoe)和OSI-027(OSI))、奥利默森(oblimersen)、吉西他滨(gemcitabine)、洋红霉素(carminomycin)、甲酰四氢叶酸(leucovorin)、培美曲塞(pemetrexed)、环磷酰胺、达卡巴嗪、丙卡巴肼(procarbizine)、泼尼松龙(prednisolone)、地塞米松(dexamethasone)、喜树碱(campathecin)、普利霉素(plicamycin)、天冬酰胺酶、氨基蝶呤(aminopterin)、甲蝶呤(methopterin)、泊非霉素(porfiromycin)、美法仑、异长春碱(leurosidine)、长春罗新(leurosine)、氮芥苯丁酸、曲贝替定(trabectedin)、丙卡巴肼(procarbazine)、圆皮海绵内酯(discodermolide)、洋红霉素、氨基蝶呤和六甲基密胺(hexamethyl melamine)。还可使用包含一种或多种化学治疗剂的组合(例如FLAG、CHOP)。FLAG包含氟达拉滨、胞嘧啶阿糖核苷(Ara-C)和G-CSF。CHOP包含环磷酰胺、长春新碱、多柔比星和泼尼松(prednisone)。在另一个实施方案中,使用PARP(例如PARP-1和/或PARP-2)抑制剂并且此类抑制剂是本领域众所周知的(例如奥拉帕尼(olaparib)、ABT-888、BSI-201、BGP-15(N-Gene Research Laboratories,Inc.);INO-1001(Inotek Pharmaceuticals Inc.);PJ34(Soriano等人,2001;Pacher等人,2002b);3-氨基苯甲酰胺(Trevigen);4-氨基-1,8-萘二甲酰亚胺;(Trevigen);6(5H)-菲啶酮(Trevigen);苯甲酰胺(美国专利再审36,397);和NU1025

(Bowman等人)。作用机制通常与PARP抑制剂结合PARP并且降低其活性的能力相关。PARP催化β-烟碱酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD+)至烟碱酰胺和聚-ADP-核糖(PAR)的转化。聚(ADP-核糖)和PARP与转录、细胞增殖、基因组稳定性和癌发生的调控相关(Bouchard等人(2003)Exp.Hematol.31:446-454);Herceg(2001)Mut.Res.477:97-110)。聚(ADP-核糖)聚合酶1(PARP1)是修复DNA单链断裂(SSB)的关键分子(de Murcia J.等人(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.94:7303-7307;Schreiber等人(2006)Nat.Rev.Mol.Cell Biol.7:517-528;Wang等人(1997)Genes Dev.11:2347-2358)。通过抑制PARP1功能来敲除SSB修复可诱导DNA双链断裂(DSB),所述DNA双链断裂可触发具有缺陷同源性定向DSB修复的癌细胞中的协同致死性(Bryant等人(2005)Nature 434:913-917;Farmer等人(2005)Nature 434:917-921)。化学治疗剂的前述实例是阐释性的并且不旨在进行限制。

[0586] 在另一个实施方案中,使用放射疗法。放射疗法中使用的放射线可为离子化放射线。放射疗法还可为γ射线、X射线或质子光束。放射疗法的实例包括但不限于外部光束放射疗法、间质植入放射性同位素(I-125、钯、铱)、放射性同位素(例如锶-89)、胸腔放射疗法、腹膜内P-32放射疗法和/或总腹盆放射疗法(total abdominal and pelvic radiation therapy)。关于放射疗法的一般概述,参见Hellman,第16章:Principles of Cancer Management:Radiation Therapy,第6版,2001,DeVita等人编辑,J.B.Lippencott Company,Philadelphia。放射疗法可作为外部光束放射或远距离放射疗法来施用,其中放射是从远程来源引入。放射治疗还可作为内部疗法或近距离放射疗法来施用,其中将放射源置于身体内部靠近癌细胞或肿瘤团块处。也涵盖使用光动力学疗法,其包括施用光敏剂(例如血紫质和其衍生物、维替泊芬(Vertoporfin)(BPD-MA)、酞青素、光敏剂Pc4、脱甲氧基-竹红菌甲素A;和2BA-2-DMHA)。

[0587] 在另一个实施方案中,使用激素疗法。激素治疗性治疗剂可包括例如激素激动剂、激素拮抗剂(例如氟他胺(flutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)(LUPRON)、LH-RH拮抗剂)、激素生物合成和处理的抑制剂和类固醇(例如地塞米松、类视色素、类维生素D(deltoid)、倍他米松(betamethasone)、皮质醇、可的松(cortisone)、泼尼松、脱氢睾固酮(dehydrotestosterone)、糖皮质激素、盐皮质激素、雌激素、睾固酮、助孕素)、维生素A衍生物(例如全反视黄酸(ATRA));维生素D3类似物;抗孕激素(例如米非司酮(mifepristone)、奥那司酮(onapristone))或抗雄激素(例如乙酸环丙孕酮(cyproterone acetate))。

[0588] 在另一个实施方案中,使用热疗,这是其中使身体组织暴露于高温(高达106℉)的程序。热量可通过损害细胞或剥夺其存活所需物质来帮助缩小肿瘤。热疗疗法可为局部热疗、区域热疗和全身热疗,其使用外部和内部加热装置。热疗几乎总是与其他形式的疗法(例如放射疗法、化学疗法和生物疗法)一起使用以试图增加其有效性。局部热疗是指将热量施加至极小区域(例如肿瘤)。可使用来自身体外部装置的针对肿瘤的高频波外部加热所述区域。为实现内部加热,可使用若干类型的无菌探针中的一者,包括细加热丝或填充有温水的空心管;植入微波天线;和射频电极。在区域热疗中,加热器官或肢体。将产生高能量的磁体和装置置于待加热区域上方。在称为灌注的另一种方法中,取出一些患者的血液,加热,并且然后抽吸(灌注)至待内部加热的区域中。使用全身加热来治疗已扩散至全身的转移性癌症。其可使用温水毯、热蜡、感应线圈(如电毯中者)或热室(类似于大培育器)来实

现。热疗不引起辐射副作用或并发症的任何显著增加。然而，直接施加至皮肤的热量可在约一半所治疗患者中引起不适或甚至显著局部疼痛。其还可引起通常快速愈合的水泡。

[0589] 在再一个实施方案中，使用光动力学疗法(也称为PDT、光放射疗法、光疗法或光化学疗法)来治疗一些类型的癌症。它是基于如下发现：在将单细胞生物体暴露于特定类型的光时，某些称为光敏剂的化学物质可杀伤所述生物体。PDT经由使用固定频率激光与光敏剂的组合来破坏癌细胞。在PDT中，将光敏剂注射至血流中并由全身的细胞吸收。所述药剂在癌细胞中的保留时间长于正常细胞。在将所治疗癌细胞暴露于激光时，光敏剂吸收光并且产生破坏所治疗癌细胞的活性氧形式。曝光必须严格定时，使得其发生于大部分光敏剂已离开健康细胞但仍存在于癌细胞中时。可引导PDT中所用的激光穿过光纤(极细玻璃原丝)。将光纤置于靠近癌症处以递送适当量的光。可引导光纤穿过支气管视镜进入肺中以用于治疗肺癌或穿过内视镜进入食管中以用于治疗食道癌。PDT的优点在于其对健康组织引起最小损害。然而，因为当前使用的激光不能穿过大于约3厘米(略大于1.125英寸)的组织，PDT主要用于治疗皮肤上或皮肤正下方或内部器官衬层上的肿瘤。光动力学疗法使皮肤和眼睛在治疗之后对光敏感6周或更长。建议患者避免直射日光和明亮室内光至少6周。如果患者必须去户外，则其需要穿戴防护服(包括太阳镜)。PDT的其他暂时性副作用与特定区域的治疗相关并且可包括咳嗽、吞咽困难、腹痛和呼吸疼痛或呼吸短促。在1995年12月，美国食品药物监督管理局(U.S.Food and Drug Administration,FDA)批准称为卟吩姆钠(porfimer sodium)或Photofrin®的光敏剂来减轻引起堵塞的食道癌和不能单独使用激光进行令人满意的治疗的食道癌的症状。在1998年1月，FDA批准卟吩姆钠用于治疗常用肺癌治疗不适用的患者的早期非小细胞肺癌。国家癌症研究院(National Cancer Institute)和其他机构正支持临床试验(研究性学习)来评估光动力学疗法用于若干类型的癌症(包括膀胱癌、脑癌、喉癌和口腔癌)的应用。

[0590] 在又一个实施方案中，使用激光疗法来提供高强度光以破坏癌细胞。这种技术通常用于减轻癌症症状(例如出血或堵塞)，尤其在癌症不能通过其他治疗治愈时。它还可用于通过缩小或破坏肿瘤来治疗癌症。术语“激光”代表通过刺激辐射发射来放大光。普通光(例如来自电灯泡者)具有许多波长并且在所有方向上扩散。另一方面，激光具有特定波长并聚焦于窄光束中。这类高强度光含有许多能量。激光极为强大并且可用于切割钢或使金刚石成型。激光还可用于极精确手术工作，例如修复眼睛中的经损害视网膜或切割组织(代替解剖刀)。尽管存在若干不同种类的激光，但仅以下三类广泛用于医学中：二氧化碳(CO_2)激光，这类激光可从皮肤表面去除薄层并且不渗透较深层。这种技术特别可用于治疗尚未扩散至皮肤深处的肿瘤和某些癌症前期疾患。作为传统解剖刀手术的替代者，CO_2激光还能够切割皮肤。以这种方式使用激光以去除皮肤癌。钕:钇铝石榴石(Nd:YAG)激光，来自这种激光的光可相较于来自其他类型激光的光渗透至组织较深处，并且其可使得血液迅速凝结。其可经由光学纤维携载至身体的较小可及部分。有时使用这类激光来治疗喉癌。氩激光，这种激光可仅通过组织浅层并且由此可用于皮肤病学和眼睛手术中。在称为光动力学疗法(PDT)的程序中，其也与光敏性染料一起使用以治疗肿瘤。激光相较于标准手术工具具有若干优点，包括：激光比解剖刀更为精确。靠近切口的组织得以保护，这是因为与周围皮肤或其他组织的接触较少。由激光产生的热量使手术部位灭菌，由此减小感染风险。可能需要较少操作时间，这是因为激光精确度容许较小切口。愈合时间通常缩短；这是因为激光热

量会密封血管，从而存在较少出血、肿胀或结瘢。激光手术可较不复杂。例如，可使用光纤在不形成大切口下将激光引导至身体部分中。可针对门诊病人进行更多程序。激光可以以下两种方式来使用以治疗癌症：通过使用热量来缩小或破坏肿瘤，或通过活化破坏癌细胞的称为光敏剂的化学物质。在PDT中，光敏剂保留于癌细胞中并且可由光刺激以引起杀伤癌细胞的反应。使用CO_2和Nd:YAG激光来缩小或破坏肿瘤。它们可与内视镜一起使用，内视镜是容许医师看到身体的某些区域(例如膀胱)的管子。来自一些激光的光可传输穿过配备有光纤的柔性内视镜。这容许医师看到和处理除手术外不能以其他方式到达的身体部分并且由此容许极精确的激光束瞄准。激光也可与低倍显微镜一起使用，从而赋予医生所治疗部位的清晰视图。与其他仪器一起使用，激光系统可产生直径小至200微米的切割区域，所述尺寸小于极细线的宽度。使用激光来治疗许多类型的癌症。激光手术是某些阶段的声门(声带)癌、宫颈癌、皮肤癌、肺癌、阴道癌、外阴癌和阴茎癌的标准治疗。除用于破坏癌症外，激光手术还可用于帮助减轻由癌症引起的症状(姑息性护理)。例如，可使用激光来缩小或破坏阻塞患者气管(嗓门)的肿瘤，从而使得其较易于呼吸。其也有时用于缓解结直肠癌和肛门癌。激光诱导性间质热疗(LITT)是激光疗法中的最新进展之一。LITT与称为热疗的癌症治疗使用相同理念；即，热量可通过损害细胞或剥夺其存活所需物质来帮助缩小肿瘤。在这种治疗中，激光是针对身体中的间质区域(器官之间的区域)。激光然后升高肿瘤温度，这会损害或破坏癌细胞。

[0591] 使用癌症疗法(例如表1中列出的生物标志物的至少一种调节剂)的治疗的持续时间和/或剂量可根据表1中列出的生物标志物的特定调节剂或它们的组合而有所变化。本领域技术人员应了解用于特定癌症治疗剂的适当治疗时间。本发明涵盖持续评价每一癌症治疗剂的最佳治疗时间表，其中如由本发明所涵盖方法测定的受试者的癌症表型是决定最佳治疗剂量和时间表的因素。

[0592] 2.筛选方法

[0593] 本发明所涵盖的另一方面涵盖筛选测定。

[0594] 在一些实施方案中，提供用于选择调节髓系细胞中本发明所涵盖的一种或多种生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标)的量和/或活性的药剂(例如抗体、融合蛋白、肽或小分子)的方法。在一些实施方案中，所选药剂也调节由此类髓系细胞介导的免疫反应(例如调节CD8+细胞毒性T细胞杀伤；调节癌细胞对免疫检查点疗法的敏感性；调节抗癌疗法如免疫检查点疗法的抗性；调节癌症疗法；调节例如NK、嗜中性粒细胞和巨噬细胞的免疫细胞迁移、募集、分化和/或存活；等等)。因此，本文所述的任何诊断、预后或筛选方法可使用本文所述的生物标志物作为期望表型(例如经调节免疫表型)的读出，以及使用调节本文所述一种或多种生物标志物的量和/或活性的药剂来证实一种或多种生物标志物的调节和/或证实所述药剂对期望表型的读出的效应(例如经调节免疫反应、对免疫检查点阻断的敏感性等)。此类方法可利用筛选测定，包括基于细胞的测定和基于非细胞的测定。

[0595] 例如，提供了一种筛选使癌细胞对细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的药剂的方法，所述方法包括：a)使癌细胞与细胞毒性T细胞和/或免疫检查点疗法在髓系细胞存在下接触，所述髓系细胞与至少一种降低表格中列出的至少一种靶标的量和/或活性的药剂接触；b)使癌细胞与细胞毒性T细胞和/或免疫检查点疗法在未与所述至少一种药剂或多种药剂接触的对照髓系细胞存在下接触；以及c)通过鉴定与b)相比在a)中

增加细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法功效(例如细胞杀伤)的药剂来鉴定使癌细胞对细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的药剂。

[0596] 在一些实施方案中,所述测定涉及通过测定一种或多种生物标志物的相反调节效应来鉴定抑制免疫细胞增殖和/或效应功能或诱导无变应性、克隆缺失和/或耗竭的药剂。本发明还涵盖经由这种调节来抑制免疫细胞增殖和/或效应功能或诱导无变应性、克隆缺失和/或耗竭的方法。

[0597] 在另一个实例中,提供了一种筛选使癌细胞对细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法敏感的药剂的方法,所述方法包括a)使癌细胞与细胞毒性T细胞和/或免疫检查点疗法在髓系细胞存在下接触,所述髓系细胞被工程化以降低表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性;b)使癌细胞与细胞毒性T细胞和/或免疫检查点疗法在对照髓系细胞存在下接触;以及c)鉴定与b)相比在a)中使癌细胞对细胞毒性T细胞介导的杀伤和/或免疫检查点疗法功效(例如细胞杀伤)敏感的药剂。

[0598] 通常,本发明涵盖用于筛选结合至本发明所涵盖的一种或多种生物标志物(例如表1中列出的靶标、实施例等)或调节其活性的药剂(例如测试化合物)的测定。在一个实施方案中,鉴定调节免疫反应的药剂的方法需要测定药剂抑制表1中列出的一种或多种靶标的能力。此类药剂包括但不限于抗体、蛋白质、融合蛋白、小分子和核酸。

[0599] 在一些实施方案中,鉴定增强免疫反应的药剂的方法需要测定候选药剂调节一种或多种生物标志物和进一步调节目标免疫反应(例如经调节炎性表型、细胞毒性T细胞活化和/或活性、癌细胞对免疫检查点疗法的敏感性等)的能力。

[0600] 在一些实施方案中,测定是无细胞或基于细胞的测定,其包括使一种或多种生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标)与测试药剂接触,以及例如通过测量如下文所述的直接或间接参数来测定测试药剂调节(例如上调或下调)生物标志物的量和/或活性的能力。

[0601] 在一些实施方案中,测定是基于细胞的测定,例如包括以下步骤者:使(a)目标细胞(例如髓系细胞)与测试药剂接触,以及测定测试药剂调节(例如上调或下调)一种或多种生物标志物的量和/或活性(例如一种或多种生物标志物与一种或多种天然结合伴侣之间的结合)的能力。可例如通过测量直接结合或通过测量免疫细胞活化的参数来测定多肽彼此结合或相互作用的能力。

[0602] 在另一个实施方案中,测定是基于细胞的测定,其包括使癌细胞与细胞毒性T细胞、单核细胞和/或巨噬细胞和测试药剂接触,以及例如通过测量如下文所述的直接或间接参数来测定测试药剂调节表1中列出的至少一种靶标的量和/或活性和/或调节免疫反应的能力。

[0603] 上文和本文所述的方法还可适于测试一种或多种已知调节本文所述的一种或多种生物标志物的量和/或活性的药剂,从而证实一种或多种生物标志物的调节和/或证实所述药剂对期望表型的读出的效应(例如经调节免疫反应、对免疫检查点阻断的敏感性等)。

[0604] 在直接结合测定中,可使生物标志物蛋白(或其相应靶标多肽或分子)与放射性同位素或酶促标记偶联,从而可通过检测复合物中的经标记蛋白质或分子来测定结合。例如,可使用^{125}I、^{35}S、^{14}C或^{3}H来直接或间接标记靶标,并且通过放射性发射的直接计数或通过闪烁计数来检测放射性同位素。或者,可以酶促方式使用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或

荧光素酶来标记靶标，并且通过测定适当底物至产物的转化来检测酶促标记。还可使用标准结合或酶促分析测定来测定生物标志物与底物之间的相互作用。在上述测定方法的一个或多个实施方案中，可期望固定多肽或分子以促进一种或两种蛋白质或分子的复合形式与未复合形式的分离以及适应测定自动化。

[0605] 可在任何适于含有反应物的器皿中使测试药剂结合至靶标。此类器皿的非限制性实例包括微量滴定板、试管和微型离心管。固定形式的本发明所涵盖的抗体还可包括结合至固相的抗体，所述固相如多孔、微孔(平均孔隙直径小于约一微米)或大孔(平均孔隙直径大于约10微米)材料，例如膜、纤维素、硝基纤维素或玻璃纤维；珠粒，例如由琼脂糖或聚丙烯酰胺或乳胶制得者；或盘、板或孔的表面，例如由聚苯乙烯制得者。

[0606] 例如，在直接结合测定中，可使多肽与放射性同位素或酶促标记偶联，从而可通过检测复合物中的经标记蛋白质来测定多肽相互作用和/或活性(例如结合事件)。例如，可使用^{125}I、^{35}S、^{14}C或^{3}H来直接或间接标记多肽，并且通过放射性发射的直接计数或通过闪烁计数来检测放射性同位素。或者，可以酶促方式使用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶来标记多肽，并且通过测定适当底物至产物的转化来检测酶促标记。

[0607] 在不标记任何相互作用物下测定药剂调节目标参数的能力也在本发明的范围内。例如，可在不标记待监测多肽下使用微生理记录仪来检测多肽之间的相互作用(McConnell等人(1992)Science257:1906-1912)。如本文所用，“微生理记录仪”(例如细胞传感器)是使用光寻址电位传感器(LAPS)来测量细胞酸化其环境的速率的分析仪器。这种酸化速率的变化可用于指示化合物与受体之间的相互作用。

[0608] 在一些实施方案中，可通过测定给定组多肽中一种或多种成员的活性来测定阻断剂(例如抗体、融合蛋白、肽或小分子)拮抗所述组多肽之间的相互作用的能力。例如，可通过以下方式来测定蛋白质和/或一种或多种天然结合伴侣的活性：检测细胞第二信使的诱导(例如细胞内信号传导)，检测适当底物的催化/酶促活性，检测报告基因(包含可操作地连接至编码可检测标志物(例如氯霉素(chloramphenicol)乙酰基转移酶)的核酸的靶标反应性调控元件)的诱导，或检测由蛋白质和/或一种或多种天然结合伴侣调控的细胞反应。可例如通过以下方式来测定阻断剂结合至所述多肽或与其相互作用的能力：在增殖测定中测量化合物调节免疫细胞共刺激或抑制的能力，或干扰所述多肽结合至识别其部分的抗体的能力。

[0609] 可通过在添加至体外测定中时抑制免疫细胞增殖和/或效应功能或诱导无变应性、克隆缺失和/或耗竭的能力来鉴定调节生物标志物量和/或活性(例如与一种或多种天然结合伴侣的相互作用)的药剂。例如，可在刺激经由活化受体的信号转导的药剂存在下培养细胞。可采用细胞活化的许多识别读出在活化剂存在下来测量细胞增殖或效应功能(例如抗体产生、细胞因子产生、吞噬作用)。通过使用本领域已知的技术来测量药剂降低所测量增殖或效应功能的能力，可容易地测定测试药剂阻断这种活化的能力。

[0610] 例如，可在T细胞测定中测试本发明所涵盖的药剂抑制或增强共刺激的能力，如Freeman等人(2000)J.Exp.Med.192:1027和Latchman等人(2001)Nat.Immunol.2:261中所述。可从人类PBMC分离CD4+T细胞并用活化抗CD3抗体进行刺激。可通过^{3}H胸苷并入来测量T细胞增殖。可在测定中使用或不使用CD28共刺激下来实施测定。可使用来自PBMC的Jurkat T细胞和PHA-母细胞来实施类似测定。

[0611] 或者,可测试本发明所涵盖的药剂调节细胞因子的细胞产生的能力,所述细胞因子是通过调节一种或多种生物标志物所产生或所述产生可在免疫细胞中响应于调节一种或多种生物标志物而得以增强或抑制。由目标免疫细胞释放的指示性细胞因子可通过ELISA来鉴定,或通过抗体阻断细胞因子以抑制免疫细胞增殖或由所述细胞因子诱导的其他细胞类型的增殖的能力来鉴定。例如,可从Genzyme(Cambridge MA)获得IL-4ELISA试剂盒以及IL-7阻断抗体。可从Genetics Institute(Cambridge,MA)获得针对IL-9和IL-12的阻断抗体。体外免疫细胞共刺激测定也可用于鉴定可通过调节一种或多种生物标志物来调节的细胞因子的方法中。例如,如果在共刺激时诱导的特定活性(例如免疫细胞增殖)不能通过添加已知细胞因子的阻断抗体来抑制,则所述活性可源自未知细胞因子的作用。在共刺激后,可通过常规方法从培养基纯化这种细胞因子并且通过其诱导免疫细胞增殖的能力来测量其活性。为鉴定可用于诱导耐受性的细胞因子,可使用如上文所述的体外T细胞共刺激测定。在这种情况下,给予T细胞一级活化信号并且使其与所选细胞因子接触,但并不给予共刺激信号。在洗涤并静置免疫细胞之后,使用一级活化信号和共刺激信号再攻击细胞。如果免疫细胞不具有反应(例如增殖或产生细胞因子),则其已变得耐受并且细胞因子尚未防止耐受性诱导。然而,如果免疫细胞具有反应,则耐受性诱导已由细胞因子防止。能够防止耐受性诱导的那些细胞因子可联合阻断B淋巴细胞抗原的试剂靶向体内阻断,这可作为诱导患有自身免疫疾病的移植接受者或受试者中的耐受性的更有效方式。

[0612] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的测定是用于筛选调节生物标志物和/或一种或多种天然结合伴侣间的相互作用的药剂的无细胞测定,其包括使多肽和一种或多种天然结合伴侣或其生物活性部分与测试药剂接触,以及测定测试化合物调节多肽与一种或多种天然结合伴侣或其生物活性部分之间的相互作用的能力。可如上文所述来直接或间接测定测试化合物的结合。在一个实施方案中,所述测定包括使多肽或其生物活性部分与其结合伴侣接触以形成测定混合物,使测定混合物与测试化合物接触,以及测定测试化合物与测定混合物中的多肽相互作用的能力,其中测定测试化合物与多肽相互作用的能力包括测定与结合伴侣相比测试化合物优先结合至多肽或其生物活性部分的能力。

[0613] 在一些实施方案中,不论是基于细胞的测试或是无细胞测定,可利用其他结合伴侣进一步测定测试药剂以确定其是否影响多肽与一种或多种天然结合伴侣之间的结合和/或相互作用活性。其他有用结合分析方法包括使用实时生物分子相互作用分析(BIA)(Sjolander和Urbaniczky(1991)Anal.Chem.63:2338-2345和Szabo等人(1995)Curr.Opin.Struct.Biol.5:699-705)。如本文所用,"BIA"是用于在不标记任何相互作用物的情况下实时研究生物特异性相互作用的技术(例如BIAcore)。可使用表面等离子体共振(SPR)的光学现象变化来指示生物多肽之间的实时反应。可将目标多肽固定于BIAcore芯片上并且可测试多种药剂(阻断抗体、融合蛋白、肽或小分子)与目标多肽的结合。使用BIA技术的一个实例阐述于Fitz等人(1997)Oncogene 15:613中。

[0614] 本发明所涵盖的无细胞测定适于使用可溶性和/或膜结合形式的蛋白质。在使用膜结合形式蛋白质的无细胞测定的情形下,可期望利用增溶剂,从而使膜结合形式的蛋白质维持于溶液中。这类增溶剂的实例包括非离子型洗涤剂,例如正辛基葡萄糖苷、正十二烷基葡萄糖苷、正十二烷基麦芽糖苷、辛酰基-N-甲基葡糖酰胺、癸酰基-N-甲基葡糖酰胺、Triton®X-100、Triton®X-114、Thesit®、异十三烷基聚(乙二醇醚)$_n$、3-[(3-胆酰胺基丙

基)二甲基胺合(amminio)]-1-丙烷磺酸酯(CHAPS)、3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基胺合]-2-羟基-1-丙烷磺酸酯(CHAPSO)或N-十二烷基＝N,N-二甲基-3-铵基-1-丙烷磺酸酯。

[0615] 在上述测定方法的一个或多个实施方案中,可期望固定任一多肽以促进一种或两种蛋白质的复合形式与未复合形式的分离以及适应测定自动化。可在任何适于含有反应物的器皿中使测试化合物结合至多肽。这类器皿的实例包括微量滴定板、试管和微型离心管。在一个实施方案中,可提供增加容许一种或两种蛋白质结合至基质的结构域的融合蛋白。例如,可使基于谷胱甘肽-S-转移酶的多肽融合蛋白或谷胱甘肽-S-转移酶/靶标融合蛋白吸附于谷胱甘肽琼脂糖珠粒(Sigma Chemical,St.Louis,MO)或谷胱甘肽衍生化微量滴定板上,然后与测试化合物组合,并且在有助于复合物形成的条件下(例如在关于盐和pH的生理学条件下)培育混合物。在培育后,洗涤珠粒或微量滴定板孔以去除任何未结合组分,在珠粒的情形下固定基质,直接或间接例如如上文所述来测定复合物。或者,可使复合物与基质解离,并且使用标准技术测定多肽结合或活性的水平。

[0616] 在一个替代实施方案中,可如上文针对基于细胞的测定所述来测定测试化合物调节目标生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标)的活性的能力,例如通过测定测试化合物调节在多肽下游发挥作用的多肽活性的能力来实现。例如,可测定第二信使的水平,可测定相互作用剂多肽在适当靶标上的活性,或可如先前所述来测定相互作用剂与适当靶标的结合。

[0617] 本发明还涉及通过上述筛选测定鉴定的新颖药剂。因此,将如本文所述鉴定的药剂进一步用于适当动物模型中在本发明的范围内。例如,如本文所述鉴定的药剂可用于动物模型中以测定使用这种药剂的治疗的功效、毒性或副作用。或者,如本文所述鉴定的药剂可用于动物模型中以测定这种药剂的作用机制。此外,本发明涉及通过上述筛选测定鉴定的新颖药剂用于如本文所述的治疗的用途。

[0618] 3.诊断用途和测定

[0619] 本发明部分地提供用于精确分类生物样品是否与目标输出相关的方法、系统和代码,所述目标输出是例如目标生物标志物(例如,表1中列出的靶标)的表达,根据本文所述的一种或多种生物标志物的调节能够具有经调节表型的髓系细胞,可能对癌症疗法(例如表1中列出的一种或多种靶标的至少一种调节剂)具有反应的癌症,等等。在一些实施方案中,本发明可用于使用统计学算法和/或经验数据(例如表1中列出的至少一种靶标的量或活性)来分类涉及对癌症疗法(例如表1中列出的生物标志物的至少一种调节剂)具有反应或不具有反应或处于所述风险下的样品(例如来自受试者)。在一些实施方案中,本发明涵盖基于检测本文所述的生物标志物(例如表1中所列出者、实施例等)的存在、不存在和/或经调节表达来检测髓系细胞的免疫表型状态(例如单核细胞、巨噬细胞、M1、1型、M2、2型等)的方法。

[0620] 检测生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标)的量或活性并且由此可用于针对样品很可能或不可能对炎性表型调节、癌症疗法等具有反应进行分类的示例性方法涉及使生物样品与能够检测生物样品中生物标志物的量或活性的药剂(例如蛋白质结合剂,如抗体或其抗原结合片段;和/或核酸结合剂,如寡核苷酸)接触。在一些实施方案中,所述方法还包括例如从测试受试者获得生物样品。在一些实施方案中,使用至少一种药剂,其中可组合(例如在夹心式ELISA)或连续使用2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种所述药剂。在某些

情况下,统计学算法是单一学习统计学分类系统。例如,可使用单一学习统计学分类系统基于预测或机率值和生物标志物的存在或水平来使样品分类。使用单一学习统计学分类系统通常以至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和/或整体准确度来将样品分类。

[0621] 其他合适统计学算法是本领域技术人员众所周知的。例如,学习统计学分类系统包括能够适用于复杂数据集(目标标志物组)并且基于所述数据集作出决策的机器学习算法技术。在一些实施方案中,使用单一学习统计学分类系统,例如分类树(例如随机森林)。在其他实施方案中,优选地串联使用2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个学习统计学分类系统的组合。学习统计学分类系统的实例包括但不限于使用以下各项者:归纳学习(例如决策/分类树,例如随机森林、分类和回归树(C&RT)、提升树等)、大概近似正确(PAC)学习、连接学习(例如神经网络(NN)、人工神经网络(ANN)、神经模糊网络(NFN)、网络结构、感知器(例如多层感知器)、多层前馈网络、神经网络应用、信任网络中的贝叶斯学习(Bayesian learning in belief network)等)、强化学习(例如已知环境中的被动学习(例如初始学习、适应性动态学习和时间差分学习)、未知环境中的被动学习、未知环境中的主动学习、学习动作值函数、强化学习应用等)和基因算法和演化规划。其他学习统计学分类系统包括支持向量机(例如核方法(Kernel method))、多元适应性回归样条法(MARS)、李文博格-马夸特算法(Levenberg-Marquardt algorithm)、高斯-牛顿算法(Gauss-Newton algorithm)、混合高斯模型(mixtures of Gaussians)、梯度下降算法和学习矢量量化(LVQ)。在某些实施方案中,本发明所涵盖的方法还包括将样品分类结果发送给临床医师(例如肿瘤学家)。

[0622] 在一些实施方案中,在诊断受试者后向个体施用治疗有效量的基于所述诊断的限定治疗。

[0623] 在一些实施方案中,所述方法还涉及获得对照生物样品,例如来自并不患有癌症或其癌症对癌症疗法易感的受试者的生物样品,来自缓解期间受试者的生物样品,或来自针对不管使用何种癌症疗法发生癌症进展进行治疗期间的受试者的生物样品。

[0624] 4.预测医学

[0625] 本发明还涉及预测医学领域,其中使用诊断测定、预后测定和监测临床试验来实现预后(预测)目的以由此预防性治疗个体。因此,本发明所涵盖的一个方面涵盖诊断测定,其用于测定(例如检测)在生物样品(例如血液、血清、细胞或组织)的情形中本文所述生物标志物(例如表1中所列出者)的存在、不存在、量和/或活性水平,由此测定患有癌症的个体是否可能对癌症疗法(例如表1中列出的生物标志物的至少一种调节剂)具有反应,不论在原始癌症还是复发性癌症中。此类测定可用于预后或预测目的以由此在特征在于生物标志物多肽、核酸表达或活性或与其相关的病症发作之前或在复发之后预防性治疗个体。本领域技术人员应了解,任何方法可使用一种或多种(例如组合)本文所述的生物标志物(例如表1中所列出者)。

[0626] 此外,本文所述的诊断方法可用于鉴定患有或有风险患上与目标生物标志物的表达或其缺乏相关的病症的受试者。如本文所用,术语“异常”包括偏离正常水平的目标生物标志物的上调或下调。异常表达或活性包括增加或降低的表达或活性,以及不遵循正常发育表达模式或亚细胞表达模式的表达或活性。例如,异常水平旨在包括生物标志物基因或

调控序列中的突变或其染色体基因的扩增导致目标生物标志物的上调或下调的情况。如本文所用，术语“非所需”包括涉及生物反应(例如免疫细胞活化)的非所需现象。

[0627] 与目标生物标志物相关的许多病症是技术人员已知的，如本文中和至少在实施例中进一步解释的。

[0628] 本文所述的测定，例如前述诊断测定或以下测定，可用于鉴定患有或有风险患上与目标生物标志物的错误调节相关的病症的受试者。因此，本发明提供了一种用于鉴定与异常或非所需生物标志物调节相关的病症的方法，其中从受试者获得测试样品并检测生物标志物，其中所述生物标志物多肽的存在对于患有或有风险患上与异常或非所需生物标志物表达和/或活性相关的病症的受试者具有诊断性。如本文所用，“测试样品”是指从目标受试者获得的生物样品。例如，测试样品可以是生物流体(例如，脑脊液或血清)、细胞样品或组织，例如肿瘤微环境、肿瘤周围区域和/或肿瘤内区域的组织病理学切片。

[0629] 此外，本文所述的预后测定可用于确定是否可向受试者施用药剂(例如，抗体、激动剂、拮抗剂、肽模拟物、多肽、肽、核酸、小分子或其他候选药物)以治疗这种与异常或非所需生物标志物表达和/或活性相关的病症。例如，此类方法可用于确定受试者是否可用一种药剂或药剂组合进行有效治疗。因此，本发明提供了用于确定受试者是否可用一种或多种用于治疗与异常或非所需生物标志物表达和/或活性相关的病症的药剂有效治疗的方法，其中获得测试样品并检测生物标志物(例如，其中生物标志物多肽的丰度对于可施用抗体或抗原结合片段以治疗病症的受试者具有诊断性)。

[0630] 本文所述的方法可例如通过利用包含至少一种本文所述的抗体试剂的预包装诊断试剂盒来进行，所述试剂盒可以方便地用于例如临床环境中以诊断表现出涉及目标生物标志物的疾病或疾患的症状或家族史的患者。

[0631] 此外，在其中表达目标生物标志物的任何细胞类型或组织都可用于本文所述的预后测定。

[0632] 本发明的另一方面包括本文所述的组合物和方法用于关联和/或分层分析的用途，其中对来自患有与异常或非所需生物标志物表达和/或活性相关的病症的个体的生物样品中的目标生物标志物(例如，单独的生物标志物、单独的其他目标分层指标如CD11b+状态、CD14+状态等，或其组合)进行分析，并将信息与优选具有类似年龄和种族的对照(例如，不具有所述病症的个体；对照可能也称为“健康”或“正常”个体或处于给定时间推移研究中的早期时间点)进行比较。患者和对照的适当选择对关联和/或分层研究的成功很重要。因此，非常需要一组具有充分表征的表型的个体。本文描述了疾病诊断、疾病易感性筛选、疾病预后、确定药物反应性(药物基因组学)、药物毒性筛选等的标准。

[0633] 不同的研究设计可用于遗传关联和/或分层研究(Modern Epidemiology，Lippincott Williams&Wilkins(1998)，609-622)。最常进行观察性研究，其中患者的反应不受干扰。第一类观察性研究鉴定存在疑似病因的人的样品和不存在疑似病因的人的样品，然后比较两个样品中疾病的发生频率。这些抽样人群称为组别，并且所述研究是一项前瞻性研究。另一种类型的观察性研究是病例对照研究或回顾性研究。在典型的病例对照研究中，样品收集自具有目标表型(病例)例如疾病的某些表现的个体，以及收集自要得出结论的人群(目标人群)中不具有该表型的个体(对照)。然后回顾性调查所述疾病的可能原因。由于病例对照研究中收集样品的时间和成本远低于前瞻性研究，因此病例对照研究是

遗传关联研究中更常用的研究设计,至少在探索和发现阶段期间是这样。

[0634] 在获得所有相关的表型和/或基因型信息后,进行统计分析以确定等位基因或基因型的存在与个体的表型特征之间是否存在任何显著相关性。优选地,在进行遗传关联的统计测试之前,首先进行数据检查和清理。样品的流行病学和临床数据可通过描述性统计用本领域公知的表格和图表来概括。优选地执行数据验证以检查数据完整性、不一致的条目和异常值。然后可以使用卡方检验和t检验(如果分布不正常,则使用Wilcoxon秩和检验)分别检查离散变量和连续变量的病例和对照之间的显著差异。

[0635] 执行遗传关联测试的一个可能决定是确定显著性水平,当检验的p值达到该水平时,可宣布显著性关联。在其中在后续验证性测试中将对阳性命中进行跟踪的探索性分析中,例如,未调整的p值<0.2(宽松侧的显著性水平)可用于生成目标生物标志物的水平与病症的某些表型特征之间具有显著性关联的假设。优选达到p值<0.05(本领域传统使用的显著性水平)以便认为所述水平与疾病相关。当对同一来源的更多样品或来自不同来源的不同样品进行的验证性分析中跟踪命中时,将对多次测试进行调整,以避免命中数过多,同时将逐实验误差率保持在0.05。虽然有不同的方法来调整多重测试以控制不同种类的误差率,但一种常用但相当保守的方法是Bonferroni校正,以控制逐实验或逐系列误差率(多重比较和多重测试,Westfall等人,SAS Institute(1999))。用于控制错误发现率FDR的排列测试可能更强大((Benjamini和Hochberg,Journal of the Royal Statistical Society,B系列57,1289-1300,1995,Resampling-based Multiple Testing,Westfall和Young,Wiley(1993))。当测试是依赖性的并且控制错误发现率足够而不是控制逐实验误差率时,此类控制多重性的方法将是优选的。

[0636] 一旦发现个体风险因素(遗传或非遗传)导致疾病易感性,就可以建立分类/预测方案来根据其表型和/或基因型以及其他非遗传风险因素预测个体将属于的类别(例如,疾病或无疾病)。离散性状的逻辑回归和连续性状的线性回归是此类任务的标准技术(Applied Regression Analysis,Draper和Smith,Wiley(1998))。此外,还可以使用其他技术来设置分类。此类技术包括但不限于MART、CART、神经网络和适用于比较不同方法性能的判别分析(The Elements of Statistical Learning,Hastie,Tibshirani和Friedman,Springer(2002))。

[0637] 本发明所涵盖的另一方面涵盖监测药剂(例如药物、化合物和基于小核酸的分子)对表1中列出的靶标的表达或活性和/或目标细胞的炎性表型的影响。这些和其他药剂进一步详细阐述于下列部分中。

[0638] 5.临床试验期间的效应监测

[0639] 监测药剂(例如,抗体、化合物、药物、小分子等)对目标生物标志物多肽(例如,单核细胞和/或巨噬细胞炎性表型的调节)的影响不仅可应用于基础药物筛选,而且可应用于临床试验中。例如,可在表现出调节的生物标志物多肽水平或活性的受试者的临床试验中,例如使用本文所述的抗体或片段,监测通过如本文所述的筛选测定确定的药剂调节生物标志物多肽水平或活性的有效性。在此类临床试验中,目标生物标志物和/或目标病症的症状或标志物的表达或活性可用作特定细胞、组织或系统的表型的“读出”或标志物。

[0640] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了一种监测用药剂(例如,抗体、激动剂、拮抗剂、肽模拟物、多肽、肽、核酸、小分子或其他通过本文所述的筛选测定法鉴定的候选药

物)治疗受试者的有效性的方法,所述方法包括以下步骤:(i)在施用药剂之前从受试者获得施用前样品;(ii)检测所述施用前样品中生物标志物多肽的水平和/或活性;(iii)从受试者获得一个或多个施用后样品;(iv)检测所述施用后样品中生物标志物多肽的水平和/或活性;(v)将所述施用前样品中的生物标志物多肽水平和/或活性与所述一个或多个施用后样品中的生物标志物多肽水平和/或活性进行比较;以及(vi)相应地改变对受试者的药剂施用。生物标志物多肽分析,例如通过免疫组织化学(IHC),也可用于选择将接受疗法(例如免疫疗法)的患者。

[0641] 本领域技术人员还应了解,在某些实施方案中,本发明所涵盖的方法实施计算机程序和计算机系统。例如,可使用计算机程序来实施本文所述的算法。计算机系统还可存储和操纵由本发明所涵盖方法生成的数据,所述数据包括可由计算机系统用于实施本发明方法的多个生物标志物信号变化/配置文件。在某些实施方案中,计算机系统接收生物标志物表达数据;(ii)存储所述数据;以及(iii)比较本文所述任何数量方式中的数据(例如相对于适当对照的分析)以测定来自癌性或癌前期组织的信息性生物标志物的状态。在其他实施方案中,计算机系统(i)比较所测定表达生物标志物水平与阈值;以及(ii)输出所述生物标志物水平是否显著调节(例如高于或低于)阈值的指示或基于所述指示的表型。

[0642] 在某些实施方案中,所述计算机系统也视为本发明所涵盖的部分。可使用众多类型的计算机系统根据通过生物信息和/或计算机领域的熟练技术人员所拥有的知识来实施本发明的分析方法。在操作这种计算机系统期间,可将若干软件组件加载至内存中。所述软件组件可包括本领域的标准软件组件和本发明的特殊组件(例如Lin等人(2004)Bioinformatics 20,1233-1240中所述的dCHIP软件;本领域已知的径向基础机器学习算法(RBM))。

[0643] 本发明所涵盖的方法也可程序化或建模于数学软件包中,所述数学软件包容许方程式的符号式输入和处理的高级规范(包括待使用的具体算法),由此使得用户无需程序性程序化个别方程式和算法。此类软件包包括例如来自Mathworks(Natick,Mass.)的Matlab,来自Wolfram Research(Champaign,Ill.)的Mathematica或来自MathSoft(Seattle,Wash.)的S-Plus。

[0644] 在某些实施方案中,计算机包括用于存储生物标志物数据的数据库。可访问此类存储配置文件并用于在稍后时间点实施目标比较。例如,可存储源自受试者非癌性组织的样品的生物标志物表达配置文件和/或从相同物种的相关群体中目标信息性基因座的群体基分布生成的配置文件,并且稍后与源自受试者的癌性组织或受试者的疑似癌性组织的样品进行比较。

[0645] 除本文所述的示例性程序结构和计算机系统外,其他替代程序结构和计算机系统对于本领域技术人员也是显而易见的。此类替代系统并不在精神或范围上偏离上述计算机系统和程序结构,并且因此旨在涵盖于所附权利要求内。

[0646] 此外,可使用本文所述的预后测定来确定是否可向受试者施用药剂(例如激动剂、拮抗剂、肽模拟物、多肽、肽、核酸、小分子或其他候选药物)以治疗与异常生物标志物表达或活性相关的疾病或病症。

[0647] 6.临床功效

[0648] 可通过本领域已知的任何方法来测量临床功效。例如,对癌症疗法(例如表1中列

出的生物标志物的至少一种调节剂)的反应涉及例如在开始新辅助或辅助化学疗法之后癌症(例如肿瘤)对疗法的任何反应,优选地涉及癌细胞数量、肿瘤质量和/或肿瘤体积的变化。可在新辅助或辅助情况下评价肿瘤反应,其中可比较全身性干预后的肿瘤大小与初始大小和尺寸(如通过CT、PET、乳房X光摄影片、超声波或触诊所测量),并且可以组织学方式估计肿瘤的细胞性并与在开始治疗之前获取的肿瘤活检的细胞性进行比较。还可通过在活检或手术切除术之后肿瘤的测径器测量或病理学检查来评价反应。可以定量方式如肿瘤体积或细胞性的变化百分比来记录反应,或使用半定量评分系统如残余癌症负荷(Symmans等人,J.Clin.Oncol.(2007)25:4414-4422)或米勒-佩恩评分(Miller-Payne score)(Ogston等人(2003)Brea st(Edinburgh,Scotland)12:320-327)以定性方式如“病理完全反应”(pCR)、“临床完全缓解”(cCR)、“临床部分缓解”(cPR)、“临床稳定疾病”(cSD)、“临床进展性疾病”(cPD)或其他定性标准来记录。可在开始新辅助或辅助疗法之后早期(例如在数小时、数天、数周之后或优选地在数月之后)来评价肿瘤反应。反应评价的典型终点是在终止新辅助化学疗法后或在手术去除残余肿瘤细胞和/或肿瘤床后。

[0649] 在一些实施方案中,可通过测量临床受益率(CBR)来测定本文所述的治疗性治疗的临床功效。通过测定在从疗法结束至少6个月的时间点完全缓解(CR)的患者百分比、部分缓解(PR)的患者数和患有稳定疾病(SD)的患者数的总和来测量临床受益率。该式简写为CBR=超过6个月的CR+PR+SD。在一些实施方案中,表1中列出的生物标志物的特定调节剂治疗方案的CBR为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更高。

[0650] 用于评估对癌症疗法(例如表1中列出的生物标志物的至少一种调节剂)的反应的额外标准与“存活”相关,其包括所有下列标准:直至死亡的存活率,也称为总体存活率(其中所述死亡率可为任何病因或与肿瘤相关);“无复发存活”(其中术语复发应包括局部复发和远端复发);无转移存活;无疾病存活(其中术语疾病应包括癌症和与其相关的疾病)。可通过参照限定起点(例如诊断或开始治疗的时间)和端点(例如死亡、复发或转移)来计算所述存活的持续时间。另外,治疗功效的标准可扩展至包括对化学疗法的反应、存活机率、给定时间段内的转移机率和肿瘤复发机率。

[0651] 例如,为测定适当阈值,可将一种或多种生物标志物(例如表1中列出的靶标)的特定调节剂施用于受试者群体,并且结果可与在施用任何癌症疗法(例如表1中列出的生物标志物的至少一种调节剂)之前测得的生物标志物测量相关。结果测量可为对在新辅助设置中给予的疗法的病理学反应。或者,可在已知生物标志物测量值的癌症疗法(例如表1中列出的生物标志物的至少一种调节剂)后一定时间段内监测受试者的结果测量(例如总体存活率和无疾病存活)。在某些实施方案中,向每个受试者施用相同剂量的调节表1中列出的至少一种生物标志物的药剂。在相关实施方案中,所施用剂量是本领域已知用于调节本发明所涵盖的至少一种生物标志物(例如表1中列出的一种或多种靶标)的药剂的标准剂量。监测受试者的时间段可有所变化。例如,可监测受试者至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。可使用例如实施例部分中所述的方法来测定与癌症疗法(例如表1中列出的生物标志物的至少一种调节剂)的结果相关的生物标志物测量阈值。

[0652] 7.分析生物标志物

[0653] a.样品收集和制备

[0654] 在一些实施方案中，将来自受试者的样品中的生物标志物量和/或活性测量与预定对照(标准)样品进行比较。来自受试者的样品通常是来自患病组织(例如癌细胞或组织)。对照样品可来自相同受试者或来自不同受试者。对照样品通常是正常非患病样品。然而，在一些实施方案中，例如，为对疾病分期或评估治疗功效，对照样品可来自患病组织。对照样品可为来自若干不同受试者的样品的组合。在一些实施方案中，对来自受试者的生物标志物量和/或活性测量与预定水平进行比较。该预定值通常是从正常样品获得。如本文所述，“预定”生物标志物量和/或活性测量可为用于(仅举例来说)以下各项的生物标志物量和/或活性测量：评估可经选择用于治疗的受试者，评估对癌症疗法(例如表1中列出的一种或多种生物标志物的至少一种调节剂)的反应，和/或评估对组合癌症疗法(例如表1中列出的一种或多种生物标志物的至少一种调节剂与至少一种免疫疗法的组合)的反应。可在患有或未患癌症的患者群体中测定预定生物标志物量和/或活性测量。预定生物标志物量和/或活性测量可为同等适用于每一患者的单一数值，或预定生物标志物量和/或活性测量可根据患者的特定亚群有所变化。受试者的年龄、体重、身高和其他因素可影响个体的预定生物标志物量和/或活性测量。此外，可个别地测定每个受试者的预定生物标志物量和/或活性。在一个实施方案中，在本文所述的方法中所测定和/或比较的量是基于绝对测量。

[0655] 在另一个实施方案中，在本文所述的方法中所测定和/或比较的量是基于相对测量，例如比率(例如治疗前的生物标志物拷贝数、水平和/或活性对治疗后的生物标志物拷贝数、水平和/或活性，此类生物标志物测量相对于内参或人工制得的对照，此类生物标志物测量相对于管家基因的表达等)。例如，相对分析可基于治疗前生物标志物测量与治疗后生物标志物测量相比的比率。治疗前生物标志物测量可在开始癌症疗法之前的任何时间进行。治疗后生物标志物测量可在开始癌症疗法之后的任何时间进行。在一些实施方案中，治疗后生物标志物测量是在开始癌症疗法之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20周或更长时间进行，并且甚至朝向无限期更长时间以继续监测。治疗可包括癌症疗法，例如包含表1中列出的至少一种靶标的一种或多种调节剂的治疗方案，所述治疗方案单独使用或与其他癌症药剂(例如免疫检查点抑制剂)组合使用。

[0656] 预定生物标志物量和/或活性测量可为任何合适标准。例如，可从评价患者选择的相同或不同人类获得预定生物标志物量和/或活性测量。在一个实施方案中，可从同一患者的先前评价获得预定生物标志物量和/或活性测量。以这种方式，可随时间监测患者选择的进展。另外，如果受试者是人类，则可从另一人或多人(例如所选人类组)的评价获得对照。以这种方式，可将评价选择的人类选择程度与合适的其他人(例如与目标人类处于类似情况下的其他人，例如患有类似或相同疾患和/或属相同种族者)进行比较。

[0657] 在本发明所涵盖的一些实施方案中，生物标志物量和/或活性测量相比于预定水平的变化为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0倍或更大或其间的任何范围(包括端值)。此类截止值同样适用于在测量是基于相对变化(例如基于治疗前生物标志物测量与治疗后生物标志物测量相比的比率)时。

[0658] 生物样品可收集自来自患者的各种来源，包括体液样品、细胞样品或包含核酸和/或蛋白质的组织样品。“体液”是指从身体排泄或分泌的流体以及通常并非从身体排泄或分泌的流体(例如羊水、眼房水、胆汁、血液和血浆、脑脊髓液、耳垢和耵聍、考珀液(cowper's fluid)或预射精液、乳糜、食糜、粪便、女性射液、间质液、细胞内液、淋巴液、经血、乳液、粘

液、胸膜液、脓液、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、泪液、尿液、阴道润滑液、玻璃体液、呕吐物等)。在一个优选的实施方案中,受试者和/或对照样品选自由以下组成的组:细胞、细胞系、组织学切片、石蜡包埋组织、活检、全血、乳头抽吸液、血清、血浆、颊部刮片、唾液、脑脊髓液、尿液、粪便和骨髓。在一个实施方案中,样品是血清、血浆或尿液。在另一个实施方案中,样品是血清。

[0659] 可经一定纵向时间段(例如在约数天、数周、数月、每年、每半年等一次或多次)从个体重复收集样品。经一定时间段从个体获得众多样品可用于验证来自先前检测的结果和/或鉴定由于例如疾病进展、药物治疗等引起的生物模式变化。例如,可获取受试者样品并且根据本发明每月、每两月或以一个月、两个月或三个月间隔的组合进行监测。另外,随时间获得的受试者的生物标志物量和/或活性测量可便利地彼此比较以及与在监测时段期间的正常对照进行比较,由此提供受试者的自身值作为用于长期监测的内部或个人对照。

[0660] 样品可含有活细胞/组织、新鲜冷冻细胞、新鲜组织、活检、固定细胞/组织、包埋在培养基中的细胞/组织,例如石蜡、组织切片或其任何组合。

[0661] 取决于所收集样品类型和/或生物标志物测量的分析,样品制备和分离可涉及任何程序。此类程序包括(通过仅举例来说)浓缩,稀释,调节pH,去除高丰度多肽(例如白蛋白、γ球蛋白和转铁蛋白等),添加防腐剂和校准剂,添加蛋白酶抑制剂,添加变性剂,使样品脱盐,浓缩样品蛋白,提取和纯化脂质。

[0662] 样品制备还可分离以非共价复合物形式结合至其他蛋白质(例如载体蛋白)的分子。该过程可分离那些结合至特定载体蛋白(例如白蛋白)的分子,或使用更一般过程,例如经由蛋白质变性(例如使用酸)从所有载体蛋白释放结合分子,接着去除载体蛋白。

[0663] 可使用高亲和力试剂、高分子量过滤器、超离心和/或电渗析从样品去除不期望蛋白质(例如高丰度、非信息性或不可检测的蛋白质)。高亲和力试剂包括选择性结合至高丰度蛋白质的抗体或其他试剂(例如适体)。样品制备还可包括离子交换色谱法、金属离子亲和色谱法、凝胶过滤、疏水性色谱法、色谱聚焦、吸附色谱法、等电聚焦和相关技术。分子量过滤器包括基于大小和分子量分离分子的膜。此类过滤器可进一步采用反渗透、纳米过滤、超滤和微过滤。

[0664] 超离心是从样品去除不期望多肽的方法。超离心是在约15,000-60,000rpm下离心样品,同时使用光学系统监测粒子的沉降(或其缺乏)。电渗析是使用电膜或半渗透膜的程序,在该过程中,使离子在潜在梯度的影响下从一种溶液传输穿过半渗透膜进入另一溶液中。由于电渗析中所使用的膜可能能够选择性传输具有正电荷或负电荷的离子、排斥具有相反电荷的离子或基于大小和电荷容许物质迁移穿过半渗透膜,因此其使得电渗析可用于浓缩、去除或分离电解质。

[0665] 本发明中的分离和纯化可包括本领域已知的任何程序,例如毛细管电泳(例如在毛细管中或在芯片上)或色谱法(例如在毛细管、柱中或在芯片上)。电泳是可用于在电场影响下分离离子型分子的方法。电泳可实施于凝胶、毛细管或芯片上的微通道中。用于电泳的凝胶的实例包括淀粉、丙烯酰胺、聚环氧乙烷、琼脂糖或它们的组合。可通过交联、添加洗涤剂或变性剂、固定酶或抗体(亲和力电泳)或底物(酶色谱法)和并入pH梯度来对凝胶改性。用于电泳的毛细管的实例包括与电喷雾界接的毛细管。

[0666] 毛细管电泳(CE)优选用于分离复杂亲水性分子和高度带电溶质。CE技术还可实施

于微流体芯片上。取决于所用毛细管和缓冲液的类型,CE可进一步分成例如以下分离技术:毛细管区带电泳(CZE)、毛细管等电聚焦(CIEF)、毛细管等速电泳(cITP)和毛细管电色谱法(CEC)。使CE技术与电喷雾离子化耦合的一个实施方案涉及使用挥发性溶液,例如含有挥发性酸和/或碱和有机物(例如醇或乙腈)的水性混合物。

[0667] 毛细管等速电泳(cITP)是其中分析物以恒定速度移动通过毛细管但根据其相应迁移率分离的技术。毛细管区带电泳(CZE)也称为自由溶液CE(FSCE),它是基于物质的电泳迁移率差,所述电泳迁移率差是根据分子上电荷和分子在迁移期间遇到的摩擦阻力(其通常与分子大小成正比)所测定。毛细管等电聚焦(CIEF)容许弱离子化两性分子通过电泳在pH梯度中分离。CEC是传统高效液相色谱法(HPLC)与CE之间的混合技术。

[0668] 本发明中所使用的分离和纯化技术包括本领域已知的任何色谱法程序。色谱法可基于微分吸附和某些分析物的洗脱或分析物在移动相与固定相之间的分配。色谱法的不同实例包括但不限于液相色谱法(LC)、气体色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)等。

[0669] b.分析生物标志物多肽

[0670] 可通过检测或量化所表达多肽,例如通过使用本文所阐述的抗体或其抗原结合片段,来检测和/或量化生物标志物蛋白的活性或水平。可通过本领域技术人员众所周知的众多方式中的任一者来检测和量化多肽。由生物标志物核酸和其功能类似同源物(包括其片段或基因改变,例如在其调控或启动子区域中)所编码多肽的多肽表达的异常水平与癌症对T细胞介导的细胞毒性调节剂(单独或与免疫疗法治疗组合)的反应可能性相关。可使用本领域已知用于检测多肽的任何方法。此类方法包括但不限于免疫扩散、免疫电泳、放射性免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定、蛋白质印迹、结合剂-配体测定、免疫组织化学技术、凝集、补体测定、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、超扩散色谱法等(例如Basic and Clinical Immunology,Sites和Terr编辑,Appleton and Lange,Norwalk,Conn.第217-262页,1991)。优选的是结合剂-配体免疫测定方法,其包括使抗体与一个或多个表位进行反应并且竞争性置换经标记多肽或其衍生物。

[0671] 在一些实施方案中,本文所述的抗体及其抗原结合片段可以任何一种众所周知的免疫测定形式使用,包括但不限于放射免疫测定、蛋白质印迹测定、免疫荧光测定、酶免疫测定、免疫沉淀测定、化学发光测定、免疫组织化学测定、斑点印迹测定或狭缝印迹测定。用于执行上述各种免疫测定的通用技术和所述技术的其他变体,例如原位邻近连接测定(PLA)、荧光偏振免疫测定(FPIA)、荧光免疫测定(FIA)、酶免疫测定(EIA)、比浊抑制免疫测定(NIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)、ELISA等,单独或与NMR、MALDI-TOF、LC-MS/MS组合或代替所述技术,是本领域的普通技术人员已知的。

[0672] 此类试剂还可用于监测细胞或组织(例如白细胞或淋巴细胞)中的蛋白质水平,作为临床测试程序的一部分,例如,以监测抑制剂的最佳剂量。可通过将抗体偶联(例如,物理连接)至可检测物质来促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、虫荧光素和水母发光蛋白,并且合适的放射性材料的实例包括^{125}I、^{131}I、^{35}S或^{3}H。

[0673] 例如,可实施ELISA和RIA程序,从而标记(使用放射性同位素(例如^{125}I或^{35}S)或可测定酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶))期望生物标志物蛋白标准物,并且与未标记样品一起与相应抗体接触,其中使用第二抗体结合第一抗体,并且测定放射性或经固定酶(竞争性测定)。或者,使样品中的生物标志物蛋白与相应经固定抗体进行反应,使经放射性同位素或酶标记的抗生物标志物蛋白抗体与所述系统进行反应,并且测定放射性或酶(ELISA-夹心式测定)。还可视需要采用其他常规方法。

[0674] 上述技术可基本上实施为“单步骤”或“两步骤”测定。“单步骤”测定涉及使抗原与经固定抗体接触并且在不洗涤下使混合物与经标记抗体接触。“两步骤”测定涉及在使混合物与经标记抗体接触之前进行洗涤。还可在适当时采用其他常规方法。

[0675] 在一个实施方案中,测量生物标志物蛋白水平的方法包括以下步骤:使生物样本与选择性结合生物标志物蛋白的抗体或其变体(例如片段)接触,以及检测所述抗体或其变体是否结合至所述样品并且由此测量生物标志物蛋白的水平。

[0676] 可通过常规方式来酶促和放射性标记生物标志物蛋白和/或抗体。此类方式通常包括例如通过戊二醛使酶特异性共价连接至所论述抗原或抗体以致不会不利地影响酶活性,这意指酶必须仍能够与其底物相互作用,但无需所有酶都具有活性,条件是足够酶保持活性以允许实现测定。实际上,用于结合酶的一些技术是非特异性的(例如使用甲醛),并且仅产生一部分活性酶。

[0677] 通常期望将测定系统的一种组分固定于载体上,由此容许系统的其他组分与所述组分接触并且易于无需费力和耗时的工作即可去除。可远离第一相固定第二相,但一种相通常是足够的。

[0678] 可使酶本身固定至载体上,但如果需要固相酶,则然后这通常是通过结合至抗体并且使抗体附着至载体来最佳地实现,其模型和系统是本领域众所周知的。简单聚乙烯可提供合适的载体。

[0679] 可用于标记的酶并无特定限制,但可选自例如氧化酶组的成员。这些酶通过与其底物进行反应来催化产生过氧化氢,并且因良好稳定性、便利可用性和廉价性以及其底物(葡萄糖)的随时可用性而通常使用葡萄糖氧化酶。可通过测量在使酶标记抗体与底物在本领域众所周知的受控条件下反应之后形成的过氧化氢的浓度来测定氧化酶活性。

[0680] 可使用其他技术根据专业人员的偏好基于本公开来检测生物标志物蛋白。一种这样的技术是蛋白质印迹(Towbin等人(1979)Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A 76:4350),其中在SDS-PAGE凝胶上操作经合适处理的样品,然后转移至固体载体(例如硝基纤维素滤膜)上。然后使抗生物标志物蛋白抗体(未标记)与载体接触并通过二级免疫学试剂(例如经标记蛋白质A或抗免疫球蛋白,合适标记包括^{125}I、辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶)进行测定。也可使用色谱法检测。

[0681] 可使用免疫组织化学来检测例如活检样品中的生物标志物蛋白的表达。使合适抗体与例如细胞薄层接触,洗涤,并且然后与第二经标记抗体接触。可通过荧光标志物、酶(例如过氧化物酶)、抗生物素蛋白或放射性标记进行标记。使用显微术对测定进行目测评分。

[0682] 抗生物标志物蛋白抗体(例如细胞内抗体)也可用于成像目的以例如检测受试者细胞和组织中的生物标志物蛋白的存在。合适的标记包括放射性同位素即碘(^{125}I、^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^{3}H)、铟(^{112}In)和锝(^{99}mTc),荧光标记如荧光素和罗丹明,和生物素。

[0683] 对于体内成像目的来说，抗体本身不可从身体外部检测到，并且由此必须进行标记或以其他方式修饰以允许检测。用于此目的的标志物可为任何不基本上干扰抗体结合但容许外部检测者合适标志物可包括可通过X射线摄影术、NMR或MRI检测者。对于X射线摄影术技术来说，例如，合适标志物包括任何发射可检测辐射但并不明显危害受试者的放射性同位素(例如钡或铯)。用于NMR和MRI的合适标志物通常包括具有可检测特征性自旋者(例如氘)，其可例如通过合适地标记相关杂交瘤的营养物来并入抗体中。

[0684] 受试者体型和所用成像系统将决定产生诊断影像所需的成像部分的量。在放射性同位素部分的情形下，对于人类受试者来说，所注入放射性的量通常介于约5毫居里镓-99至20毫居里镓-99之间。经标记抗体或抗体片段然后优先累积于含有生物标志物蛋白的细胞位置。然后可使用已知技术检测经标记抗体或抗体片段。

[0685] 可用于检测生物标志物蛋白的抗体包括足够强烈并且特异性地结合至待检测生物标志物蛋白的任何抗体，不论是天然或合成、全长或其片段、单克隆或多克隆。抗体可具有至多约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M或10^{-12}M的K_d。短语“特异性结合”是指例如抗体以如下方式结合至表位或抗原或抗原决定子：所述结合可被具有相同或类似表位、抗原或抗原决定子的第二制剂代替或与其竞争。抗体可相对于其他蛋白质(例如相关蛋白质)优先结合至生物标志物蛋白。

[0686] 抗体可购得或者可根据本领域已知方法来制备。

[0687] 在一些实施方案中，使用除抗体外的特异性结合至生物标志物蛋白的药剂，例如肽。可通过本领域已知的任何方式来鉴定特异性结合至生物标志物蛋白的肽。例如，可使用肽噬菌体展示文库来筛选生物标志物蛋白的特异性肽结合剂。

[0688] VII.组合物，包括制剂和药物组合物

[0689] 涵盖(但不限于)包含本发明所涵盖的药剂(例如抗体、其抗原结合片段、细胞等)的组合物。例如，药剂可单独使用或与其他药剂组合使用，涵盖例如基于核酸的组合物(例如信使RNA(mRNA)、cDNA、siRNA、反义核酸、寡核苷酸、核酶、DNA酶、适体、核酸诱饵、核酸嵌合体、三重螺旋结构等)，基于蛋白质的组合物，基于细胞的组合物，以及其变体、修饰和工程化形式，以用于本文所述的方法，并且涵盖组合物本身。在一些实施方案中，本发明涵盖具有有义链核酸序列和反义链核酸序列(其各自选自本文所述的序列以及其序列变体和/或化学修饰形式)的siRNA分子并且详细阐述于上文中。在一些实施方案中，如本文所述修饰的细胞(例如髓系细胞)具有经调节炎性表型。

[0690] 此类组合物可包含于药物组合物和/或制剂内。可通过已知或将来开发于药理学领域中的任何方法来制备此类组合物。一般来说，此类制备方法包括以下步骤：使药剂(例如活性成分)与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分混合，并且然后视需要和/或在期望时使产物成型和/或包装为期望单一或多剂量单元。如本文所用，术语“活性成分”是指在暴露时于人类或动物中具有生理学效应的任何化学和生物物质。在本发明所涵盖的情形中，制剂中的活性成分可为任何调节本发明所涵盖的生物标志物(例如表1中列出的至少一种靶标)的药剂。

[0691] 1.组合物制备

[0692] 根据本发明的组合物可以散装、作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量来制备、包装和/或出售。如本文所用，“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物

的离散量。活性成分的量通常等于将向受试者施用的活性成分的剂量和/或这种剂量的适宜分率(例如这种剂量的二分之一或三分之一)。

[0693] 术语“药学上可接受”是指那些在合理医学判断范围内适于与人类和动物的组织接触使用而无过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症并且与合理益处/风险比相称的药剂、材料、组合物和/或剂型。

[0694] 本发明所涵盖的药物组合物可呈现为无水药物制剂和剂型、液体药物制剂、固体药物制剂、疫苗等。合适的液体制剂可包括但不限于缓冲至所选pH的等渗水溶液、悬浮液、乳液或粘性组合物。

[0695] 如下文所详述,可以特别方式配制本发明所涵盖的药剂和其他组合物以供以固体或液体形式施用,所述施用形式包括适于例如以下各种施用途径者:(1)经口施用,例如兽用顿服药(水性或非水性溶液或悬浮液)、片剂、大丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂;(2)肠胃外施用,例如皮下、肌内或静脉内注射,以例如无菌溶液或悬浮液形式;(3)局部施加,例如以乳膏、软膏或喷雾剂形式施加至皮肤;(4)经阴道内或经直肠内施用,例如以阴道栓剂、乳膏或发泡剂形式;或(5)含有化合物的气雾剂(例如呈水性气雾剂形式)、脂质体制剂或固体粒子。涵盖用于本文所述的药剂或组合物的任何适当形状因子,例如但不限于片剂、胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。

[0696] 本发明所涵盖的药物组合物可呈现为离散剂型如胶囊、药袋或片剂,或液体或气雾剂喷雾剂(各自含有预定量的呈粉剂或颗粒剂形式的活性成分),溶液或悬浮液(于水性或非水性液体中),水包油乳液,油包水液体乳液,重构用粉剂,口服粉剂,瓶(包括粉剂或液体瓶),经口溶解膜,糖锭,糊剂,管,胶状物和包装。此类剂型可通过任何制药方法来制备。

[0697] 可通过压缩或模制来制备片剂,其任选地含有一种或多种辅助成分。压缩片剂可使用粘合剂(例如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如羟乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂来制备。模制片剂可通过在合适机器中模制经惰性液体稀释剂润湿的粉末状肽或肽模拟物的混合物来制得。

[0698] 可任选地使用包衣和包壳(例如肠溶包衣和医药配制领域中众所周知的其他包衣)刻痕或制备片剂和其他固体剂型(例如糖衣药丸、胶囊、丸剂和颗粒剂)。以不同比例使用例如提供期望释放概况的羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、脂质体和/或微球体,它们也可经配制以提供其中活性成分的缓慢或受控释放。它们可通过例如经由细菌截留过滤器过滤或通过并入灭菌剂来灭菌,所述灭菌剂呈无菌固体组合物形式,可在即将使用前将其溶于无菌水或一些其他无菌可注射介质中。这些组合物还可任选地含有遮光剂并且还可为任选地以延迟方式仅仅或优先在胃肠道的某一部分中释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。在适当时,活性成分也可呈含有一种或多种赋形剂的微囊封形式。

[0699] 在用于经口施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣药丸、粉剂、颗粒剂等)中,可将活性成分与一种或多种药学上可接受的载体(例如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或以下中的任一者混合:(1)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)保湿剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)缓溶剂,例如石蜡;(6)吸收加速剂,例如季铵化合物;(7)润湿剂,例如乙酰醇

和甘油单硬脂酸酯;(8)吸收剂,例如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠和它们的混合物;和(10)着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情形下,药物组合物还可包含缓冲剂。在使用例如乳糖(lactose/milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软质和硬质填充明胶胶囊中,还可使用类似类型的固体组合物作为填充剂。

[0700] 用于经口施用的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除活性成分外,所述液体剂型还可含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特定来说,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯和它们的混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物还可包括佐剂,例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。除活性剂外,悬浮液还可含有悬浮剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶和它们的混合物。

[0701] 用于直肠或阴道施用的制剂可作为栓剂呈现,所述栓剂可通过将一种或多种药剂与一种或多种合适的非刺激性赋形剂或载体(包含例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸盐)混合来制备,并且所述栓剂在室温下为固体,但在体温下为液体,并且因此将在直肠或阴道腔中融化并释放活性剂。

[0702] 适于阴道施用的制剂还包括含有本领域已知适当的载体的子宫托、阴道塞(tampon)、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾剂制剂。

[0703] 用于局部或透皮施用调节(例如抑制)生物标志物表达和/或活性的药剂的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。可在无菌条件下将所述活性组分与药学上可接受的载体并且与任何可需要的防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0704] 除药剂外,软膏、糊剂、乳膏和凝胶可含有赋形剂,例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌或它们的混合物。

[0705] 除调节(例如抑制)生物标志物表达和/或活性的药剂外,粉剂和喷雾剂还可含有赋形剂,例如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉剂或这些物质的混合物。喷雾剂可另外含有常规推进剂,例如氯氟烃类和未被取代的挥发性烃类,例如丁烷和丙烷。

[0706] 可通过气雾剂施用药剂。这可通过制备含有所述化合物的水性气雾剂、脂质体制剂或固体粒子来实现。可使用非水性(例如氟碳推进剂)悬浮液。声波雾化器是优选的,因为它们使药剂在可使得化合物降解的剪切中的暴露降至最低。

[0707] 通常,通过将药剂的水溶液或悬浮液与常规药学上可接受的载体和稳定剂配制在一起来制得水性气雾剂。载体和稳定剂随特定化合物的需要而变,但通常包括非离子型表面活性剂(吐温(Tween)、普朗尼克(Pluronic)或聚乙二醇)、无害蛋白质(如血清白蛋白)、脱水山梨糖醇酯、油酸、卵磷脂、氨基酸(例如甘氨酸)、缓冲剂、盐、糖或糖醇。气雾剂通常是从等渗溶液制备。

[0708] 透皮贴剂的额外优点是将药剂受控递送至身体中。这类剂型可通过将所述药剂溶解或分散于适当介质中来制得。还可使用吸收增强剂来增加肽模拟物的跨皮肤通量。这种通量的速率可通过提供速率控制膜或将肽模拟物分散于聚合物基质或凝胶中来控制。

[0709] 眼部制剂、眼用软膏、粉剂、溶液等也涵盖于本发明的范围内。

[0710] 在一些实施方案中，将本发明所涵盖的药物组合物配制成肠胃外剂型。肠胃外制剂可为含有载体或赋形剂(例如盐、碳水化合物和缓冲剂(例如在3至9的pH下))的水溶液；或无菌非水性溶液，或干燥形式，其可与合适媒介物(例如无菌无热原水)联合使用。例如，本发明所涵盖治疗剂的水溶液包含等渗盐水、5％葡萄糖或其他药学上可接受的液体载体(例如液体醇、二醇、酯和酰胺)，例如如美国专利第7,910,594号中所公开。在另一实例中，本发明所涵盖治疗剂的水溶液包含用于静脉内施用的磷酸盐缓冲制剂(pH 7.4)，如PCT公开第WO 2011/014821号中所公开。肠胃外剂型可呈包含本发明所涵盖治疗剂的剂量的可重构冻干物的形式。可利用本领域已知的任何延长释放剂型(例如美国专利第4,713,249号、第5,266,333号和第5,417,982号中所述的生物可降解碳水化合物基质)，或替代地可使用慢泵(例如渗透泵)。可容易地使用本领域技术人员众所周知的标准医药技术在无菌条件下例如通过在无菌条件下冻干来制备肠胃外制剂。可通过使用适当配制技术(例如并入溶解性增强剂)来增加用于制备肠胃外制剂的本发明所涵盖的治疗剂的溶解性。用于肠胃外施用的制剂可包含一种或多种药剂与以下物质的组合：一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液；或无菌粉末，其可在即将使用前重构为无菌可注射溶液或分散液，所述物质可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、可使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。

[0711] 这些组合物还可含有佐剂，例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。微生物作用的防止可通过包括各种抗细菌和抗真菌剂来确保，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等。所述组合物中也可期望包括等渗剂，例如糖、氯化钠等。另外，可通过并入吸收延迟剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来延长可注射药物形式的吸收。

[0712] 在一些情况下，为延长药物作用，期望减缓来自皮下或肌内注射的药物的吸收。这可通过使用具有不良水溶性的结晶或非晶材料的液体悬浮液来实现。因而，药物吸收速率取决于其溶解速率，而溶解速率又可取决于晶体大小和结晶形式。或者，通过将肠胃外施用的药物形式溶解或悬浮于油媒介物中来实现所述药物的延迟吸收。

[0713] 通过在生物可降解聚合物(例如聚丙交酯-聚乙交酯)中形成调节(例如抑制)生物标志物表达和/或活性的药剂的微胶囊基质来制备可注射储积形式。取决于药物对聚合物的比率和所用特定聚合物的性质，可控制药物释放速率。其他生物可降解聚合物的实例包括聚原酸酯和聚酸酐。储积可注射制剂也可通过将药物包裹于与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备。

[0714] 在本发明所涵盖的药剂作为药物施用于人类和动物时，其可以原样或作为含有例如0.1％至99.5％(更优选地0.5％至90％)活性成分与药学上可接受的载体的组合的药物组合物给予。

[0715] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可取决于本发明所涵盖的方法，以获得可有效地实现特定受试者、组合物和施用模式的期望治疗反应而对受试者无毒的活性成分量。

[0716] 在一些实施方案中，本发明所涵盖的药物组合物可被配制用于受控释放和/或靶向递送。如本文所用，“受控释放”是指符合特定释放模式以实现治疗结果的药物组合物或化合物释放概况。在一个实施方案中，可将本发明所涵盖的组合物囊封至本文所述和/或本

领域已知的递送剂中以用于受控释放和/或靶向递送。如本文所用，术语“囊封”意指包封、环绕或包壳。在涉及本发明所涵盖的制剂时，囊封可为基本上、完全或部分的。术语“基本上囊封”意指，至少大于50％、60％、70％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.9％、99.9％或大于99.999％的本发明所涵盖的治疗剂可包封、环绕或包壳于粒子内。术语“部分地囊封”意指，小于10％、10％、20％、30％、40％、50％或更少的本发明所涵盖的缀合物可包封、环绕或包壳于粒子内。例如，至少1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.9％、99.99％或大于99.99％的本发明所涵盖的药物组合物或化合物囊封于制剂中。

[0717] 在一些实施方案中，也可构建此类制剂或改变组成，从而将其被动或主动地引导至不同体内细胞类型(包括但不限于单核细胞、巨噬细胞和其他免疫细胞(例如树突状细胞、抗原呈递细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞和自然杀伤细胞)、癌细胞等)中。也可经由在细胞表面上表达不同配体来选择性靶向制剂，如通过(但不限于)叶酸盐、转铁蛋白、N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)和抗体靶向方法所示例。

[0718] 2.额外组分

[0719] 可使用一种或多种赋形剂来配制本发明所涵盖的药物组合物以实现以下用途：(1)增加稳定性；(2)允许持续或延迟释放(例如从储积制剂)；(3)改变生物分布(例如使药剂靶向特定组织或细胞类型)；(4)改变药剂的体内释放概况。赋形剂的非限制性实例包括任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂和防腐剂。本发明所涵盖的赋形剂也可包括但不限于类脂质、脂质体、脂质纳米粒子、聚合物、脂质复合物(lipoplex)、核-壳纳米粒子、肽、蛋白质、透明质酸酶、纳米粒子模拟物和它们的组合。

[0720] 术语“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”旨在包括适于特定期望剂型的任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体媒介物、分散剂或悬浮剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、崩解剂、防腐剂、缓冲剂、固体粘合剂、润滑剂、油、涂层、抗细菌剂和抗真菌剂、吸收延迟剂等。Remington’s The Science and Practice of Pharmacy，第21版，A.R.Gennaro(Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2006)公开了用于配制药物组合物的各种赋形剂和其已知制备技术。除非任何常规赋形剂介质都因例如产生任何不期望生物效应或以有害方式与药物组合物中的任何其他组分相互作用而与某一物质或其衍生物不相容，否则其使用涵盖于本发明范围内。也可将补充活性成分并入所述组合物中。

[0721] 在一些实施方案中，药学上可接受的赋形剂是至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或至少99.9％或100％纯。在一些实施方案中，批准赋形剂用于人类和兽医学用途中。在一些实施方案中，赋形剂是由美国食品药物监督管理局批准。在一些实施方案中，赋形剂是医药级。在一些实施方案中，赋形剂满足美国药典(United States Pharmacopoeia,USP)、欧洲药典(European Pharmacopoeia,EP)、英国药典(British Pharmacopoeia)和/或国际药典(International Pharmacopoeia)的标准。

[0722] 示例性稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉等和/或它们的组合。

[0723] 示例性造粒和/或分散剂包括但不限于马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、羟基乙酸淀粉钠、粘土、海藻酸、瓜尔胶、柑橘果肉、琼脂、膨润土、纤维素和木质产品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚(乙烯基-吡咯烷酮)(交聚维酮(crospovidone))、羧甲基淀粉钠(羟基乙酸淀粉钠)、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素)、甲基纤维素、预胶凝淀粉(starch 1500)、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、硅酸镁铝(VEEGUM®)、月桂基硫酸钠、季铵化合物等和/或它们的组合。

[0724] 示例性表面活性剂和/或乳化剂包括但不限于天然乳化剂(例如阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、海藻酸钠、黄蓍胶、克罗珠克(chondrux)、胆固醇、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、羊毛脂、胆固醇、蜡和卵磷脂),胶质粘土(例如膨润土[硅酸铝]和VEEGUM®[硅酸镁铝]),长链氨基酸衍生物,高分子量醇(例如硬脂醇、鲸蜡醇、油醇、单硬脂酸三醋精、乙二醇二硬脂酸酯、单硬脂酸甘油酯和丙二醇单硬脂酸酯、聚乙烯醇),卡波姆(carbomer)(例如羧基聚亚甲基、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物和羧基乙烯基聚合物),角叉菜胶,纤维素衍生物(例如羧甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素),脱水山梨糖醇脂肪酸酯(例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯[TWEEN®20]、聚氧乙烯脱水山梨糖醇[TWEENn®60]、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯[TWEEN®80]、脱水山梨糖醇单棕榈酸酯[SPAN®40]、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯[SPAN®60]、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯[SPAN®65]、单油酸甘油酯、脱水山梨糖醇单油酸酯[SPAN®80]),聚氧乙烯酯(例如聚氧乙烯单硬脂酸酯[MYRJ®45]、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚氧基亚甲基硬脂酸酯和SOLUTOL®),蔗糖脂肪酸酯,聚乙二醇脂肪酸酯(例如CREMOPHOR®),聚氧乙烯醚(例如聚氧乙烯月桂基醚[BRIJ®30]),聚(乙烯基-吡咯烷酮),二乙二醇单月桂酸酯,三乙醇胺油酸酯,油酸钠,油酸钾,油酸乙酯,油酸,月桂酸乙酯,月桂基硫酸钠,PLUORINC®F 68,POLOXAMER®188,西曲溴铵(cetrimonium bromide),鲸蜡基吡啶鎓氯化物,苯扎氯铵(benzalkonium chloride),多库酯钠(docusate sodium)等和/或它们的组合。

[0725] 示例性粘合剂包括但不限于淀粉(例如玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露糖醇);天然和合成胶(例如阿拉伯胶、海藻酸钠、角叉菜提取物、潘瓦尔胶(panwar gum)、印度胶(ghatti gum)、伊沙波果壳(isapol husk)的粘液、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、聚(乙烯基-吡咯烷酮)、硅酸镁铝(Veegum®)和落叶松阿拉伯半乳聚糖);海藻酸盐;聚环氧乙烷;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇;等等;和它们的组合。

[0726] 示例性防腐剂可包括但不限于抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和/或其他防腐剂。示例性抗氧化剂包括但不限于α生育酚、抗坏血酸、棕榈酸抗坏血酸基酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、单硫基甘油、偏亚硫酸氢钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠和/或亚硫酸钠。示例性螯

合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、单水合柠檬酸、依地酸二钠、依地酸二钾、依地酸、富马酸、苹果酸、磷酸、依地酸钠、酒石酸和/或依地酸三钠。示例性抗微生物防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、苄索氯铵(benzethonium chloride)、苄基醇、溴硝丙二醇、十六烷基三甲基溴化铵(cetrimide)、鲸蜡基吡啶鎓氯化物、氯己定(chlorhexidine)、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶(hexetidine)、咪脲、酚、苯氧基乙醇、苯基乙基醇、硝酸苯汞、丙二醇和/或硫柳汞(thimerosal)。示例性抗真菌防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠和/或山梨酸。示例性醇防腐剂包括但不限于乙醇、聚乙二醇、酚、酚系化合物、双酚、氯丁醇、羟基苯甲酸酯和/或苯基乙基醇。示例性酸性防腐剂包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、β-胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢乙酸、抗坏血酸、山梨酸和/或植酸。其他防腐剂包括但不限于生育酚、生育酚乙酸酯、甲磺酸去铁胺、十六烷基三甲基溴化铵、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、乙二胺、月桂基硫酸钠(SLS)、月桂基醚硫酸钠(SLES)、亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钾、偏亚硫酸氢钾、GLYDANT PLUS®、PHENONIP®、对羟基苯甲酸甲酯、GERMALL®115、GERMABEN® II、NEOLONE™、KATHON™和/或EUXYL®。

[0727] 示例性缓冲剂包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、D-葡萄糖酸、甘油基磷酸钙、乳酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊烷酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、羟基磷灰石(calcium hydroxide phosphate)、乙酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨丁三醇、氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、乙醇等和/或它们的组合。

[0728] 示例性润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石粉、麦芽、山嵛酸甘油酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、月桂基硫酸镁、月桂基硫酸钠等和它们的组合。

[0729] 示例性油包括但不限于杏仁油、苦杏仁油、鳄梨油、巴巴苏(babassu)油、佛手柑油、黑加仑籽油、玻璃苣油、刺桧油、甘菊油、芥花油、香菜油、巴西棕榈油、蓖麻油、肉桂油、可可油、椰子油、鱼肝油、咖啡油、玉米油、棉籽油、鸸鹋油、桉树油、月见草油、鱼油、亚麻籽油、香叶醇油、葫芦油、葡萄籽油、榛子油、牛膝草油、肉豆蔻酸异丙基酯油、荷荷巴(jojoba)油、夏威夷果油、杂熏衣草油、熏衣草油、柠檬油、荜澄茄油、火山豆油、锦葵油、芒果籽油、白芒花籽油、水貂油、肉豆蔻油、橄榄油、橙油、深海鱼油、棕榈油、棕榈仁油、桃仁油、花生油、罂粟籽油、南瓜籽油、油菜籽油、米糠油、迷叠香油、红花油、檀香油、山茶花油、开胃香油、沙棘油、芝麻油、雪亚脂油、硅油、大豆油、向日葵油、茶树油、蓟油、山茶油、岩石草油、胡桃油和小麦胚油。示例性油包括但不限于硬脂酸丁酯、辛酸三甘油酯、癸酸三甘油酯、环甲基聚硅氧烷、癸二酸二乙基酯、二甲基聚硅氧烷360、肉豆蔻酸异丙基酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、硅油和/或它们的组合。

[0730] 根据配制者的判断,可在组合物中存在赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡、着色剂、涂覆剂、甜味剂、调味剂和/或香味剂。

[0731] 药物制剂还可包含药学上可接受的盐。术语"药学上可接受的盐"是指衍生自本领

域已知的各种有机和无机抗衡离子的盐(参见例如Berge等人(1977)J.Pharm.Sci.66:1-19)。这些盐可在药剂最后分离和纯化期间原位制备,或通过使呈游离碱形式的经纯化药剂与合适有机或无机酸单独反应并分离由此形成的盐来制备。可使用无机酸和有机酸来形成药学上可接受的酸加成盐。可从其衍生盐的无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸。可从其衍生盐的有机酸包括例如乙酸、丙酸、羟乙酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、苯乙醇酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸和水杨酸。药学上可接受的碱加成盐可使用无机碱和有机碱来形成。可从其衍生盐的无机碱包括例如钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰和铝。可从其衍生盐的有机碱包括例如伯胺、仲胺和叔胺,包括天然存在的被取代胺的被取代胺,环胺和碱性离子交换树脂。具体实例包括异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺和乙醇胺。在一些实施方案中,药学上可接受的碱加成盐是选自铵、钾、钠、钙和镁的盐。

[0732] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的药剂可含有一种或多种酸性官能团并且因此能够与药学上可接受的碱形成药学上可接受的盐。在这些情形下,术语“药学上可接受的盐”是指调节(例如抑制)生物标志物表达的药剂的相对无毒性的无机和有机碱加成盐。同样,这些盐可在药剂的最终分离和纯化期间原位制备,或通过使经纯化药剂以其游离酸形式与合适碱(例如药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)、与氨或与药学上可接受的有机伯胺、仲胺或叔胺单独反应而制备。代表性碱金属盐或碱土金属盐包括锂、钠、钾、钙、镁和铝的盐等。可用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(参见例如Berge等人,同上)。

[0733] 术语“共晶体”是指衍生自本领域已知的多种共晶体形成剂的分子复合物。不同于盐,共晶体通常不涉及共晶体与药物之间的氢转移,而是涉及共晶体形成剂与晶体结构中的药物之间的分子间相互作用(例如氢键结、芳族环堆叠或分散力)。

[0734] 可用于形成本发明所涵盖的药物组合物和剂型的示例性表面活性剂包括但不限于亲水性表面活性剂、亲脂性表面活性剂和它们的混合物。也就是说,可采用亲水性表面活性剂的混合物,可采用亲脂性表面活性剂的混合物,或可采用至少一种亲水性表面活性剂和至少一种亲脂性表面活性剂的混合物。亲水性表面活性剂可为离子型或非离子型。合适的离子型表面活性剂包括但不限于烷基铵盐;夫西地酸(fusidic acid)盐;氨基酸、寡肽和多肽的脂肪酸衍生物;氨基酸、寡肽和多肽的甘油酯衍生物;卵磷脂和氢化卵磷脂;溶血卵磷脂和氢化溶血卵磷脂;磷脂和其衍生物;溶血磷脂和其衍生物;肉毒碱脂肪酸酯盐;烷基硫酸盐;脂肪酸盐;多库酯钠;酰基乳酸盐;单甘油酯和二甘油酯的单乙酰化和二乙酰化酒石酸酯;琥珀酰化单甘油酯和二甘油酯;单甘油酯和二甘油酯的柠檬酸酯;和它们的混合物。离子型表面活性剂可包括例如:卵磷脂、溶血卵磷脂、磷脂、溶血磷脂和其衍生物;肉毒碱脂肪酸酯盐;烷基硫酸盐;脂肪酸盐;多库酯钠;酰基乳酸盐;单甘油酯和二甘油酯的单乙酰化和二乙酰化酒石酸酯;琥珀酰化单甘油酯和二甘油酯;单甘油酯和二甘油酯的柠檬酸酯;和它们的混合物。

[0735] 离子型表面活性剂可为离子化形式的卵磷脂、溶血卵磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰甘油、溶血磷脂酸、溶血磷脂酰丝氨酸、PEG-磷脂酰乙醇胺、PVP-磷脂酰乙醇胺、脂肪酸的乳酸酯、硬脂酰基-2-乳酸酯、乳酸硬脂酰基酯、琥珀酰化单甘油酯、单/二甘油酯的单/二乙

酰化酒石酸酯、单/二甘油酯的柠檬酸酯、胆酰肌氨酸、己酸盐、辛酸盐、癸酸盐、月桂酸盐、肉豆蔻酸盐、棕榈酸盐、油酸盐、蓖麻油酸盐、蓖麻油酸盐、亚麻酸盐、硬脂酸盐、月桂基硫酸盐、十四烷基硫酸盐(teracecyl sulfate)、多库酯盐、月桂酰基肉毒碱、棕榈酰基肉毒碱、肉豆蔻酰基肉毒碱,以及其盐和混合物。

[0736] 亲水性非离子型表面活性剂可包括但不限于烷基葡萄糖苷;烷基麦芽糖苷;烷硫基葡萄糖苷;月桂基聚乙二醇甘油酯;聚氧基亚烷基烷基醚,例如聚乙二醇烷基醚;聚氧基亚烷基烷基酚,例如聚乙二醇烷基酚;聚氧基亚烷基烷基酚脂肪酸酯,例如聚乙二醇脂肪酸单酯和聚乙二醇脂肪酸二酯;聚乙二醇甘油脂肪酸酯;聚甘油脂肪酸酯;聚氧基亚烷基脱水山梨糖醇脂肪酸酯,例如聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯;多元醇与至少一种由甘油酯、植物油、氢化植物油、脂肪酸和固醇组成的组的成员的亲水性酯基转移产物;聚氧乙烯固醇、其衍生物和类似物;聚氧基乙基化维生素和其衍生物;聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物;和它们的混合物;聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯以及多元醇与至少一种由三甘油酯、植物油和氢化植物油组成的组的成员的亲水性酯基转移产物。多元醇可为甘油、乙二醇、聚乙二醇、山梨糖醇、丙二醇、异戊四醇或糖。

[0737] 其他亲水性非离子型表面活性剂包括但不限于PEG-10月桂酸酯、PEG-12月桂酸酯、PEG-20月桂酸酯、PEG-32月桂酸酯、PEG-32二月桂酸酯、PEG-12油酸酯、PEG-15油酸酯、PEG-20油酸酯、PEG-20二油酸酯、PEG-32油酸酯、PEG-200油酸酯、PEG-400油酸酯、PEG-15硬脂酸酯、PEG-32二硬脂酸酯、PEG-40硬脂酸酯、PEG-100硬脂酸酯、PEG-20二月桂酸酯、PEG-25甘油基三油酸酯、PEG-32二油酸酯、PEG-20甘油基月桂酸酯、PEG-30甘油基月桂酸酯、PEG-20甘油基硬脂酸酯、PEG-20甘油基油酸酯、PEG-30甘油基油酸酯、PEG-30甘油基月桂酸酯、PEG-40甘油基月桂酸酯、PEG-40棕榈仁油、PEG-50氢化蓖麻油、PEG-40蓖麻油、PEG-35蓖麻油、PEG-60蓖麻油、PEG-40氢化蓖麻油、PEG-60氢化蓖麻油、PEG-60玉米油、PEG-6癸酸盐/辛酸盐甘油酯、PEG-8癸酸盐/辛酸盐甘油酯、聚甘油基-10月桂酸酯、PEG-30胆固醇、PEG-25植物固醇、PEG-30大豆固醇、PEG-20三油酸酯、PEG-40脱水山梨糖醇油酸酯、PEG-80脱水山梨糖醇月桂酸酯、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、POE-9月桂基醚、POE-23月桂基醚、POE-10油基醚、POE-20油基醚、POE-20硬脂基醚、生育酚基PEG-100琥珀酸酯、PEG-24胆固醇、聚甘油基-10油酸酯、Tween 40、Tween 60、蔗糖单硬脂酸酯、蔗糖单月桂酸酯、蔗糖单棕榈酸酯、PEG 10-100壬基酚系列、PEG 15-100辛基酚系列和泊洛沙姆(poloxamer)。

[0738] 合适的亲脂性表面活性剂可包括但不限于脂肪醇;甘油脂肪酸酯;乙酰化甘油脂肪酸酯;低级醇脂肪酸酯;丙二醇脂肪酸酯;脱水山梨糖醇脂肪酸酯;聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯;固醇和固醇衍生物;聚氧基乙基化固醇和固醇衍生物;聚乙二醇烷基醚;糖酯;糖醚;单甘油酯和二甘油酯的乳酸衍生物;多元醇与至少一种由甘油酯、植物油、氢化植物油、脂肪酸和固醇组成的组的成员的疏水性酯基转移产物;油溶性维生素/维生素衍生物;和它们的混合物。在该组内,优选的亲脂性表面活性剂包括甘油脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯和它们的混合物,或者是多元醇与至少一种由植物油、氢化植物油和三甘油酯组成的组的成员的疏水性酯基转移产物。

[0739] 可在本发明制剂中包括增溶剂以确保本发明所涵盖药剂(例如化学化合物)的良好增溶和/或溶解并且最小化本发明所涵盖药物模态的沉淀。对于用于口服使用的组合物(例如注射用组合物),这可尤其重要。也可添加增溶剂以增加亲水性药物和/或其他组分

(例如表面活性剂)的溶解性,或使组合物维持为稳定或均质溶液或分散液。合适的增溶剂的实例包括但不限于下列试剂:醇和多元醇,例如乙醇、异丙醇、丁醇、苄基醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇和其异构体、甘油、异戊四醇、山梨糖醇、甘露糖醇、二乙二醇单乙基醚(transcutol)、二甲基异山梨醇、聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、羟丙基甲基纤维素和其他纤维素衍生物、环糊精和环糊精衍生物;平均分子量为约200至约6000的聚乙二醇的醚,例如四氢糠基醇PEG醚(糖糠醇)或甲氧基PEG;酰胺和其他含氮化合物,例如2-吡咯烷酮、2-哌啶酮、ε-己内酰胺、N-烷基吡咯烷酮、N-羟基烷基吡咯烷酮、N-烷基哌啶酮、N-烷基己内酰胺、二甲基乙酰胺和聚乙烯基吡咯烷酮;酯,例如丙酸乙酯、柠檬酸三丁基酯、乙酰基柠檬酸三乙基酯、乙酰基柠檬酸三丁基酯、柠檬酸三乙基酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、丁酸乙酯、三醋精、丙二醇单乙酸酯、丙二醇二乙酸酯、ε-己内酯和其异构体、δ-戊内酯和其异构体、γ-丁内酯和其异构体;以及本领域已知的其他增溶剂,例如二甲基乙酰胺、二甲基异山梨醇、N-甲基吡咯烷酮、单辛精、二乙二醇单乙基醚和水。

[0740] 还可使用增溶剂的混合物。实例包括但不限于三醋精、柠檬酸三乙基酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、N-羟乙基吡咯烷酮、聚乙烯基吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基环糊精、乙醇、聚乙二醇200-100、糖糠醇、二乙二醇单乙基醚、丙二醇和二甲基异山梨醇。特别优选的增溶剂包括山梨糖醇、甘油、三醋精、乙醇、PEG-400、糖糠醇和丙二醇。

[0741] 药学上可接受的添加剂可视需要包括于制剂中。此类添加剂和赋形剂包括但不限于防粘剂、抗发泡剂、缓冲剂、聚合物、抗氧化剂、防腐剂、螯合剂、粘度调节剂、张力剂、调味剂、着色剂、芳香剂、遮光剂、悬浮剂、粘合剂、填充剂、增塑剂、润滑剂和它们的混合物。

[0742] 另外,可将酸或碱并入组合物中以促进处理,增强稳定性或用于其他原因。药学上可接受的碱的实例包括氨基酸、氨基酸酯、氢氧化铵、氢氧化钾、氢氧化钠、碳酸氢钠、氢氧化铝、碳酸钙、氢氧化镁、硅酸镁铝、合成硅酸铝、合成水滑石、氢氧化镁铝、二异丙基乙基胺、乙醇胺、乙二胺、三乙醇胺、三乙胺、三异丙醇胺、三甲胺、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)等。此外合适的是呈药学上可接受的酸的盐形式的碱,所述酸例如乙酸、丙烯酸、己二酸、海藻酸、烷烃磺酸、氨基酸、抗坏血酸、苯甲酸、硼酸、丁酸、碳酸、柠檬酸、脂肪酸、甲酸、富马酸、葡萄糖酸、氢醌磺酸、异抗坏血酸、乳酸、马来酸、草酸、对溴苯基磺酸、丙酸、对甲苯磺酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、鞣酸、酒石酸、硫基乙醇酸、甲苯磺酸、尿酸等。也可使用多元酸的盐,例如磷酸钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠。当碱为盐时,阳离子可为任何适宜的药学上可接受的阳离子,例如铵、碱金属和碱土金属。实例可包括但不限于钠、钾、锂、镁、钙和铵。

[0743] 合适的酸是药学上可接受的有机酸或无机酸。合适的无机酸的实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、硼酸、磷酸等。合适的有机酸的实例包括乙酸、丙烯酸、己二酸、海藻酸、烷烃磺酸、氨基酸、抗坏血酸、苯甲酸、硼酸、丁酸、碳酸、柠檬酸、脂肪酸、甲酸、富马酸、葡萄糖酸、氢醌磺酸、异抗坏血酸、乳酸、马来酸、甲烷磺酸、草酸、对溴苯基磺酸、丙酸、对甲苯磺酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、鞣酸、酒石酸、硫基乙醇酸、甲苯磺酸和尿酸。

[0744] IX.施用和给药

[0745] 使用本领域众所周知的方法使本文所述的药剂(例如组合物、制剂、细胞等)可接触期望目标(例如细胞、无细胞结合伴侣等)和/或施用于生物体。例如,可经由化学方法(例如阳离子脂质体和聚合物)或物理方法(例如基因枪、电穿孔、粒子轰击、超声波利用和磁转

染)将药剂递送至细胞中。

[0746] 用于接触巨噬细胞的施用方法是本领域众所周知的,这特别是因为巨噬细胞通常存在于各组织类型中(参见Ries等人(2014)Cancer Cell 25:846-859;Perry等人(2018)J.Exp.Med.215:877-893;Novobrantseva等人(2012)Mol.Ther.Nucl.Acids 1:e4;Majmudar等人(2013)Circulation 127:2038-2046;Leuschner等人(2011)Nat.Biotechnol.29:11)。另外,可调整施用方法以靶向目标巨噬细胞群体,例如通过使用药剂的局部施用来靶向巨噬细胞的空间受限群体(例如,肿瘤内施用于靶标TAM)(参见Shirota等人(2012)J.Immunol.188:1592-1599;Wang等人(Oct.2016)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.113:11525-11530)。此类不同施用方法可选择性靶向目标巨噬细胞群体,同时减小或消除与其他巨噬细胞群体的接触(例如,肿瘤内施用以选择性靶向来自循环巨噬细胞的TAM)。

[0747] 还可通过任何产生治疗有效结果的途径以有效量来施用药剂。施用途径可包括但不限于经肠(进入肠中)、经胃肠道、硬膜上(进入硬脑膜中)、口服(通过口腔)、透皮、硬膜外、大脑内(进入大脑中)、脑心室内(进入脑心室中)、皮上(施加于皮肤上)、真皮内(进入皮肤本身中)、皮下(在皮肤下面)、经鼻施用(穿过鼻子)、静脉内(进入静脉中)、静脉内浓注、静脉内滴注、动脉内(进入动脉中)、肌内(进入肌肉中)、心脏内(进入心脏中)、骨内输注(进入骨髓中)、鞘内(进入脊椎管中)、腹膜内(输注或注射至腹膜中)、膀胱内输注、玻璃体内(穿过眼睛)、海绵窦内注射(进入病理腔中)、腔内(进入阴茎根部中)、阴道内施用、子宫内、羊膜外施用、透皮(扩散穿过完整皮肤以实现全身性分布)、经粘膜(扩散穿过粘膜)、经阴道、吹入(嗅吸)、舌下、唇下、灌肠剂、滴眼剂(于结膜上)、滴耳剂、经耳(在耳朵中或通过耳)、经颊(指向面颊)、结膜、皮肤、经牙齿(施加至一个或多个牙齿)、电渗透、子宫颈内、窦内、气管内、体外、血液渗析、浸润、经间质、腹内、羊膜内、关节内、胆管内、支气管内、粘液囊内、软骨内(在软骨内)、尾部内(在马尾内)、脑池内(在小脑延髓池内)、角膜内(在角膜内)、牙冠内、冠状动脉内(在冠状动脉内)、阴茎海绵体内(在阴茎海绵体的可扩张空间内)、椎间盘内(在椎间盘内)、导管内(在腺导管内)、十二指肠内(在十二指肠内)、硬膜内(在硬膜内或之下)、表皮内(施加至表皮)、食管内(施加至食管)、胃内(在胃内)、牙龈内(在牙龈内)、回肠内(在小肠的远端部分内)、病灶内(在局部病灶内或直接引入局部病灶中)、管腔内(在管腔内)、淋巴管内(在淋巴内)、骨髓内(在骨的骨髓腔内)、脑膜内(在脑膜内)、心肌内(在心肌内)、眼内(在眼内)、卵巢内(在卵巢内)、心包内(在心包内)、胸膜内(在胸膜内)、前列腺内(在前列腺内)、肺内(在肺或其支气管内)、窦内(在鼻或眼窝窦内)、脊柱内(在脊柱内)、滑膜内(在关节的滑液腔内)、腱内(在肌腱内)、睾丸内(在睾丸内)、鞘内(在脑脊髓轴的任何层面上的脑脊髓液内)、胸腔内(在胸腔内)、小管内(在器官的管内)、肿瘤内(在肿瘤内)、鼓室内(在中耳内)、血管内(在一个或多个血管内)、心室内(在心室内)、离子透入法(利用电流,其中可溶性盐的离子迁移至身体组织中)、冲洗(浸泡或冲洗开放性创伤或体腔)、喉(直接在喉上)、鼻胃(穿过鼻并进入胃中)、封闭敷裹技术(局部途径施用,其然后由封闭所述区域的敷料覆盖)、眼部(施加至外眼)、口咽(直接施加至口腔和咽)、肠胃外、透皮、关节周、硬膜外、神经周、牙周、直肠、呼吸(在呼吸道内,通过经口或经鼻吸入用于局部或全身性作用)、眼球后(脑桥后或眼球后)、心肌内(进入心肌中)、软组织、蛛网膜下、结膜下、粘膜下、局部、经胎盘(通过或穿过胎盘)、经气管(穿过气管壁)、经鼓膜(穿过或通过鼓

室)、输尿管(施加至输尿管)、尿道(施加至尿道)、阴道、骶管阻断、诊断、神经阻断、胆灌注、心脏灌注、体外光化学疗法或脊柱。

[0748] 通常以剂量单位形式配制药剂以便于施用并且实现剂量均匀性。然而,应理解,本发明所涵盖的药剂的总日用量可由主治医生在合理医学判断范围内确定。任何特定患者的具体治疗有效、预防有效或适当成像剂量水平取决于多种因素,包括所治疗病症和所述病症的严重程度;所采用具体药剂的活性;所采用的具体组合物;患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;所采用具体药剂的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗持续时间;与所采用具体化合物组合或同时使用的药物;和医学领域中众所周知的类似因素。

[0749] 在一些实施方案中,可以足以递送约0.0001mg/kg至约1000mg/kg、约0.001mg/kg至约0.05mg/kg、约0.005mg/kg至约0.05mg/kg、约0.001mg/kg至约0.005mg/kg、约0.05mg/kg至约0.5mg/kg、约0.01mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、或约1mg/kg至约25mg/kg、或约10mg/kg至约100mg/kg、或约100mg/kg至约500mg/kg受试者体重/天(每天一次或多次)的剂量水平来施用本发明药剂,以获得期望治疗、诊断、预防或成像作用。期望剂量可以如下频率来递送:每天三次、每天两次、每天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周或每四周或每两个月。在一些实施方案中,可使用多个施用(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14个或更多个施用)来递送期望剂量。在采用多次施用时,可使用分开给药方案(例如本文所述者)。

[0750] 在一些实施方案中,本发明所涵盖的药剂是抗体。如本文所定义,抗体的治疗有效量(即有效剂量)在以下范围内:约0.001mg/kg体重至30mg/kg体重,优选地约0.01mg/kg体重至25mg/kg体重,更优选地约0.1mg/kg体重至20mg/kg体重,和甚至更优选地约1mg/kg体重至10mg/kg体重、2mg/kg体重至9mg/kg体重、3mg/kg体重至8mg/kg体重、4mg/kg体重至7mg/kg体重、或5mg/kg体重至6mg/kg体重。本领域技术人员应了解,某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量,所述因素包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前治疗、受试者的总体健康状况和/或年龄以及存在的其他疾病。此外,使用治疗有效量的抗体治疗受试者可包括单一治疗或优选地可包括一系列治疗。在一个优选实例中,使用在约0.1mg/kg体重至20mg/kg体重范围内的抗体来治疗受试者,每周一次并且持续约1至10周、优选地2至8周、更优选地约3至7周和甚至更优选地约4、5或6周。还应了解,可在特定治疗过程中增加或降低用于治疗的抗体的有效剂量。剂量变化可源自诊断测定的结果。

[0751] 如本文所用,“分开剂量”是将单一单位剂量或总日剂量分成两个或更多个剂量,例如单一单位剂量的两次或更多次施用。如本文所用,“单一单位剂量”是在一个剂量/一次/单一途径/单一接触点(即单一施用事件)中所施用任何治疗剂的剂量。如本文所用,“总日剂量”是在24小时时段内所给予或开具的量。其可以单一单位剂量形式来施用。

[0752] 在一些实施方案中,剂型可为液体剂型。用于肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和/或酏剂。除活性成分外,液体剂型可包含本领域通常使用的惰性稀释剂(包括但不限于水或其他溶剂)、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄基酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯和它们的混合物。在用于肠胃外施用的某些实施

方案中，可混合组合物与增溶剂(例如CREMOPHOR®、醇、油、改性油、二醇、聚山梨醇酯、环糊精、聚合物和/或它们的组合)。

[0753] 在某些实施方案中，剂型可为可注射的。可根据已知技术来配制可注射制剂(例如无菌可注射水性或油性悬浮液)并且可包括合适的分散剂、润湿剂和/或悬浮剂。无菌可注射制剂可为于肠胃外可接受的无毒稀释剂和/或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液和/或乳液，例如于1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受的媒介物和溶剂尤其包括但不限于水、林格氏溶液、U.S.P.和等渗氯化钠溶液。通常采用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。出于该目的，可采用包括合成单甘油酯或二甘油酯的任何温和不挥发性油。在可注射制剂中可使用例如油酸的脂肪酸。可注射制剂可通过例如经由细菌截留过滤器过滤和/或通过并入灭菌剂来灭菌，所述灭菌剂呈无菌固体组合物形式并且可在使用前溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0754] 在一些实施方案中，片剂、糖衣药丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可制成具有包衣和外壳，例如肠溶包衣和药物配制领域中众所周知的其他包衣。它们可任选地包含遮光剂并且可为任选地以延迟方式仅仅或优先在肠道的某一部分中释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。在使用例如乳糖(lactose/milk sugar)以及高分子量聚乙二醇的赋形剂的软质和硬质填充明胶胶囊中，可采用相似类型的固体组合物作为填充剂。

[0755] 可以0.1×10^6、0.2×10^6、0.3×10^6、0.4×10^6、0.5×10^6、0.6×10^6、0.7×10^6、0.8×10^6、0.9×10^6、1.0×10^6、5.0×10^6、1.0×10^7、5.0×10^7、1.0×10^8、5.0×10^8个或更多或其间的任何范围或其间的任何值的细胞/公斤受试者体重来施用细胞。可基于给定量时间内的期望植入程度来调节移植细胞数。通常，可视需要移植1×10^5至约1×10^9个细胞/kg体重、约1×10^6至约1×10^8个细胞/kg体重、或约1×10^7个细胞/kg体重或更多个细胞。在一些实施方案中，相对于平均大小的小鼠移植至少约0.1×10^6、0.5×10^6、1.0×10^6、2.0×10^6、3.0×10^6、4.0×10^6或5.0×10^6个总细胞是有效的。

[0756] 可以如本文所述的任何合适途径(例如通过输注)来施用细胞。还可在其他抗癌剂之前、同时或之后施用细胞。

[0757] 可使用本领域通常已知的方法来实现施用。可通过直接注射或通过本领域所用的任何其他方式(包括但不限于血管内、大脑内、肠胃外、腹膜内、静脉内、硬膜外、脊柱内、胸骨内、关节内、滑膜内、鞘内、动脉内、心脏内或肌内施用)来将药剂(包括细胞)引入期望部位。例如，可通过各种途径向目标受试者植入移植细胞。此类途径包括但不限于静脉内施用、皮下施用、施用于特定组织(例如病灶移植)、注射至股骨骨髓腔中、注射至脾中、施用在胎儿肝的肾囊下方等。在某些实施方案中，将本发明所涵盖的癌症疫苗经肿瘤内或经皮下注射至受试者中。可以一次输注来施用细胞，或经由连续输注在足以生成期望效应的限定时间段内来施用。用于移植细胞的移植、植入评价和标志物表型分型分析的示例性方法是本领域众所周知的(参见例如Pearson等人(2008)Curr.Protoc.Immunol.81:15.21.1-15.21.21;Ito等人(2002)Blood 100:3175-3182;Traggiai等人(2004)Science304:104-107;Ishikawa等人,Blood(2005)106:1565-1573;Shultz等人(2005)J.Immunol.174:6477-6489;和Holyoake等人(1999)Exp.Hematol.27:1418-1427)。

[0758] 可组合并施用两种或更多种细胞类型，例如基于细胞的疗法和干细胞过继性细胞

转移、癌症疫苗和基于细胞的疗法等。例如，基于细胞的过继性免疫疗法可与本发明所涵盖的基于细胞的疗法进行组合。在一些实施方案中，基于细胞的药剂可单独使用或与其他基于细胞的药剂(例如免疫疗法，如过继性T细胞疗法(ACT))组合使用。例如，使用经基因工程化以识别CD19的T细胞来治疗滤泡性B细胞淋巴瘤。用于ACT的免疫细胞可为树突状细胞、T细胞(例如$CD8^+$T细胞和$CD4^+$T细胞)、自然杀伤(NK)细胞、NK T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子活化杀伤(LAK)细胞、记忆T细胞、调控性T细胞(Treg)、辅助T细胞、细胞因子诱导性杀伤(CIK)细胞和它们的任何组合。基于细胞的众所周知的过继性免疫治疗方式包括但不限于经辐照自体或同种异体肿瘤细胞、肿瘤溶解物或细胞凋亡肿瘤细胞、基于抗原呈递细胞的免疫疗法、基于树突状细胞的免疫疗法、过继性T细胞转移、过继性CAR T细胞疗法、自身免疫增强疗法(AIET)、癌症疫苗和/或抗原呈递细胞。可进一步改进此类基于细胞的免疫疗法以表达一种或多种基因产物，从而进一步调节免疫反应，例如表达细胞因子(如GM-CSF)和/或表达肿瘤相关抗原(TAA)(例如Mage-1、gp-100等)。本发明所涵盖的药剂(例如癌细胞)对本发明所涵盖的另一药剂或另一组合物的比率可相对于彼此为1:1(例如等量的2种药剂、3种药剂、4种药剂等)，但可以任何期望量进行调节(例如1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1或更大)。

[0759] 可通过各种方法中的任一者来评价移植细胞的植入，例如但不限于肿瘤体积、细胞因子水平、施用时间、在移植后一个或多个时间点从受试者获得的目标细胞的流式细胞术分析等。例如，等待1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28天的基于时间的分析或者可发送肿瘤收获的时间信号。任何这类量度是可根据众所周知的参数进行调节以测定变量对抗癌免疫疗法反应的影响的变量。另外，移植细胞可与其他试剂(例如细胞因子、细胞外基质、细胞培养载体等)共移植。

[0760] X.试剂盒和装置

[0761] 本发明还涵盖用于检测和/或调节本文所述的生物标志物的试剂盒。“试剂盒”是包含至少一种用于特异性检测和/或影响本发明所涵盖的标志物的表达的试剂(例如抗体或其抗原结合片段)的任何制品(例如包装或容器)。试剂盒可以用于实施本发明所涵盖方法的单元形式进行推销、分配或出售。试剂盒可包含一种或多种可用于本发明所涵盖方法中的药剂的检测、表达、筛选等所需的一种或多种试剂。例如，可在试剂盒中提供可用于检测本发明所涵盖的生物标志物(例如表1中列出的靶标)的药剂组合以检测其生物标志物和调节，这可用于鉴定髓系细胞炎性表型、免疫反应、抗癌功能、对免疫检查点疗法的敏感性等。此类组合可包括一种或多种用以检测1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种生物标志物(包括所述值，例如至多并且包括本发明所涵盖的所有生物标志物)的药剂。

[0762] 在一些实施方案中，试剂盒还可包含参考标准物(例如编码不影响或调控控制细胞生长、分裂、迁移、存活或细胞凋亡的信号通路的蛋白质的核酸)。本领域技术人员可设想许多这样的对照蛋白质，包括但不限于常用分子标签(例如绿色荧光蛋白和β-半乳糖苷酶)，未通过GeneOntology参照分类为涵盖细胞生长、分裂、迁移、存活或细胞凋亡的任何途径的蛋白质，或普遍性管家蛋白。试剂盒中的试剂可提供于个别容器中或作为两种或更多种试剂的混合物提供于单一容器中。另外，可包括阐述试剂盒内组合物的使用的说明材料。本发明所涵盖的试剂盒还可包括公开或阐述试剂盒或所公开发明的抗体在如本文所提供

的所公开发明的方法中的使用的说明材料。试剂盒还可包括额外组分以促进设计试剂盒的特定应用。例如，试剂盒可另外含有检测标记的构件(例如用于酶促标记的酶底物、用以检测荧光标记的过滤器组、适当二级标记(例如绵羊抗小鼠-HRP)等)和对照所需试剂(例如对照生物样品或标准物)。试剂盒可另外包括公认用于所公开发明的方法中的缓冲液和其他试剂。非限制性实例包括用以减少非特异性结合的试剂，例如载体蛋白或洗涤剂。

[0763] 在其他实施方案中，本发明所涵盖的组合物，例如抗体及其抗原结合片段，可与组件或装置缔合，例如用于诊断应用。非限制性实例包括固定在固体表面上用于这些测定的抗体(例如，连接和/或缀合至如上所述的基于发光或辐射发射的可检测标记)。在其他实施方案中，抗体与用于通过使用免疫色谱或免疫化学测定法检测目标生物标志物的装置或条带相关联，例如在“夹心”或竞争性测定法、免疫组织化学、免疫荧光显微术等中。此类装置或条带的额外实例是设计用于家庭测试或快速护理点测试的装置或条带。其他实例包括那些设计用于同时分析单个样品中的多种分析物的实例。例如，本发明的未标记抗体可用于“捕获”生物样品中的生物标志物多肽，并且捕获的(或固定的)生物标志物多肽可与本发明的抗生物标志物抗体的标记形式结合用于检测。免疫测定法的其他标准实施方案是技术人员众所周知的，包括基于例如免疫扩散、免疫电泳、免疫组织病理学、免疫组织化学和组织病理学的测定法。

[0764] 本发明所涵盖的其他实施方案阐述于下列实施例中。通过下列实施例来进一步阐释本发明，所述实施例不应理解为进一步限制本发明。

[0765] 实施例

[0766] 实施例1:SIGLEC-9主要在人类髓系细胞以及有限的T细胞子集中表达

[0767] 为了表征SIGLEC-9(在一些图中也称为参考名称Ike-9)在外周免疫细胞群体上的表达，使用流式细胞术分析了从PBMC群体获得的活单细胞在细胞表面的SIGLEC-9蛋白表达。对于流式细胞术，收集细胞并重悬于50ul FACS缓冲液(含2.5％FBS和0.5％叠氮化钠的PBS)中，并在冰上用TruStain FcX™(Biolegend目录号422302)封闭15分钟。根据制造商的说明在FACS缓冲液中稀释抗体，并在冰上加入到细胞中持续15分钟。经标记的细胞用FACS缓冲液洗涤两次并用PBS加2％多聚甲醛固定，用于在Attune™流式细胞仪(ThermoFisher)上进行流式细胞术分析。经由FlowJo软件分析数据。用作对照和/或流式细胞术的试剂抗体显示在下表3中。

[0768] 表3:试剂/流式细胞术抗体

[0769]

抗原	克隆	来源
CD163	215927	RnD Systems
CD16	3a8	BioLegend
CD206	15-2	BioLegend
SIGLEC-9	191240	RnD Systems
CD45	2D1	BioLegend
CD3	OKT3	BioLegend
CD4	A161A1	BioLegend
CD19	HIB19	BioLegend
CD11b	ICRF44	BioLegend
CD8a	RPA-T8	BioLegend
CD14	M5E2	BioLegend
CD56	5.1H11	BioLegend
PD-1	KEYTRUDA®	Merck

[0770] 图1显示了SIGLEC-9表达在人类髓系细胞中占主导地位,而表达SIGLEC-9的T细胞子集有限。

[0771] 除了分析健康的PBMC之外,重要的是确定SIGLEC-9在疾病部位的表达。为此,利用了两个细胞源;即来自妇科肿瘤和实体肿瘤的腹水。在这两种情况下都发现,TAM表达SIGLEC-9,而T细胞不表达SIGLEC-9。例如,图2表明构成从妇科癌症获得的腹水样品中大部分细胞的TAM(例如,表达CD16和CD163的M2 TAM)也在其细胞表面上高度表达SIGLEC-9蛋白。类似地,图3显示从被解离成单细胞悬液并经由流式细胞术进行免疫表型分析的乳腺、结肠和肾脏肿瘤获得的TAM(例如,CD11b+/CD14+巨噬细胞)在其细胞表面上高度表达SIGLEC-9蛋白。为了进行肿瘤分析,首先将每个肿瘤制成单细胞悬液。将肿瘤切成2-4mm^3的小块。根据制造商的方案制备肿瘤解离试剂盒酶混合物(MACS Miltenyi Biotec)。将肿瘤块和解离酶转移至5ml Snaplock微量离心管中,并使用一把直剪刀将组织切碎。将管置于200-250rpm的37℃振荡器中持续45分钟至1小时。在温育时间结束时,消化的肿瘤通过40uM细胞过滤器过滤到50mL Falcon™锥形离心管中。每个管都充满冷的2%至5%FBS/PBS混合物以停止消化。所有剩余步骤均在冰上进行。具体来说,将每个管以300xg离心5分钟,弃去上清液,并用冷的2%至5%FBS/PBS混合物洗涤细胞两次。最后一次洗涤后,将细胞重悬于1至5ml冷的2%至5%FBS/PBS混合物中,并进行细胞计数。如上所述进行流式细胞术。图2和图3都表明,与T细胞相比,SIGLEC-9主要在疾病部位的TAM上表达。

[0772] 图4显示了巨噬细胞浸润肿瘤基于其SIGLEC-9表达在人类癌症大型公共数据集(TCGA,癌症基因组图谱,2017版,由OmicSoft/Qiagen处理和发布)的癌症类型中的等级次序分布,最高SIGLEC-9表达在顶部。肿瘤浸润是通过截止值上方的典型髓系标志物CD11b的存在来测量的。截止值定义为数据集中所有原发性肿瘤的CD11b mRNA表达分布的第一个四分位数。这些SIGLEC-9阳性巨噬细胞浸润肿瘤据认为对于根据本文所述的组合物和方法进行调节特别有用。

[0773] 实施例2:针对人类SIGLEC-9的鼠类抗体的生成

[0774] 通过对小鼠进行免疫来生成鼠类抗人类SIGLEC-9抗体。两个组别的小鼠,各自由

CD-1、B6;129、B6;SJL和NZB/w品系组成，用不同形式的Siglec-9抗原进行免疫(免疫和融合在LakePharma;Belmont,CA进行)。在一个组别中，小鼠用由作为人类IgG1 Fc的N末端融合物(人类Siglec-9-Fc)(SEQ ID NO:8)的人类Siglec-9的氨基酸Q18-G348组成的重组人类Siglec-9胞外结构域进行免疫。在第二组别中，小鼠用人类Siglec-9-Fc和重组食蟹猴(cyno)Siglec-9胞外结构域共同免疫，所述胞外结构域由作为人类IgG1 Fc的N末端融合物(食蟹猴Siglec-9-Fc)(SEQ ID NO:9)的食蟹猴Siglec-9的氨基酸Q20-T348组成。

[0775] 将来自具有足够血清滴度的小鼠的B细胞富集的淋巴细胞融合以生成杂交瘤，并将融合的细胞接种到384孔板中。在初步筛选中，结合Siglec-9的杂交瘤通过多重流式细胞术鉴定杂交瘤上清液与表达全长人类Siglec-9(SEQ ID NO:10)的Siglec-9过表达CHO细胞(Siglec-9-CHO)和亲本CHO-K1细胞的结合。Siglec-9细胞结合杂交瘤被扩增，并且在二次筛选中，利用流式细胞术通过杂交瘤上清液与Siglec-9-CHO的结合来确认Siglec-9结合。通过ELISA针对板包被的人类Siglec-9-Fc、人类Siglec-7-Fc(SEQ ID NO:13)、人类Siglec-6-Fc(R&D Systems,2859-S)和人类Siglec-8-Fc(R&D Systems,9045-SL)评估与Siglec-9的结合特异性。将人类Siglec-9特异性杂交瘤或人类Siglec-9和人类Siglec-7交叉反应性杂交瘤扩增，并且收集饱和上清液并冷冻保存。通过流式细胞术筛选饱和上清液与人类Siglec-9过表达293T细胞(Siglec-9-293)(SEQ ID NO:10)和亲本293T细胞的结合，以及通过ELISA筛选饱和上清液与板包被的人类Siglec-9-Fc(SEQ ID NO:8)、人类Siglec-7-Fc(SEQ ID NO:13)和食蟹猴Siglec-9-Fc(SEQ ID NO:9)的结合。

[0776] 将目标杂交瘤亚克隆并通过ELISA或流式细胞术确认Siglec-9结合。取决于抗体同种型，通过蛋白G或蛋白A树脂从亚克隆杂交瘤的上清液中纯化抗体。纯化的抗体在200mM HEPES、100mM NaCl、50mM乙酸钠(pH 7.0)中配制。所有抗体的内毒素水平都低于1EU/mg。对杂交瘤的子集进行测序以确定它们的可变重(VH)和可变轻(VL)结构域序列。

[0777] 抗体生成过程中使用的肽和多肽的序列在下表4中描述。

[0778] 表4:试剂多肽

[0779]

SEQ ID NO	描述	序列
SEQ ID NO: 8	人类 Siglec-9-Fc	QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFSYPSHGWIYP GPVVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARAVWEETR DRFHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKG SIKWNYKHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCPQN LTCSVPWACEQGTPPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLT LIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTVHLNVSYPP QNLTMTVFQGDGTVSTVLGNGSSLSLPEGQSLRLVC AVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGVLELPW VHLRDAAEFTCRAQNPLGSQQVYLNVSLQSKATSG VTQGGSGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 9	食蟹猴Siglec-9-Fc	QRNNQKNYPLTMQESVTVQQGLCVHVLCSFSYPWY GWISSDPVHGYWFRAGAHTDRDAPVATNNPARAVR EDTRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARSSDAGTYFFRV ETGKTKWNYKYVPLSVHVTALTHRPNILIPGTLESGC PRNLTCSVPWACEQGTAPMISWMGTSVSPLDPSTTR SSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTIHLNV SYPPQNLTMTVFQGNDTVSIVLGNGSSVSVPEGPSLR LVCAVDSNPPARLSLSWGGLTLCPSQPSNPGVLELPR VHLRDEEEFTCRAQNLLGSQRVSLNVSLQSKATSGL TGSGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 10	人类 Siglec-9-CHO,人类 Siglec-9-293	MLLLLLPLLWGRERAEGQTSKLLTMQSSVTVQEGLC VHVPCSFSYPSHGWIYPGPVVHGYWFREGANTDQD APVATNNPARAVWEETRDRFHLLGDPHTKNCTLSIR DARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNYKHHRLSVNVTAL THRPNILIPGTLESGCPQNLTCSVPWACEQGTPPMIS WIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTF PGASVTTNKTVHLNVSYPPQNLTMTVFQGDGTVST VLGNGSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSW RGLTLCPSQPSNPGVLELPWVHLRDAAEFTCRAQNP LGSQQVYLNVSLQSKATSGVTQGVVGGAGATALVF LSFCVIFVVVRSCRKKSARPAAGVGDTGIEDANAVR GSASQGPLTEPWAEDSPPDQPPPASARSSVGEGELQY ASLSFQMVKPWDSRGQEATDTEYSEIKIHR

[0780]

SEQ ID NO: 11	人类 Siglec-9-His	QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFSYPSHGWIYP GPVVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARAVWEETR DRFHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKG SIKWNYKHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCPQN LTCSVPWACEQGTPPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLT LIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTVHLNVSYPP QNLTMTVFQGDGTVSTVLGNGSSLSLPEGQSLRLVC AVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGVLELPW VHLRDAAEFTCRAQNPLGSQQVYLNVSLQSKATSG VTQGGSGHHHHHHHHHH
SEQ ID NO: 12	食蟹猴Siglec-9-His	QRNNQKNYPLTMQESVTVQQGLCVHVLCSFSYPWY GWISSDPVHGYWFRAGAHTDRDAPVATNNPARAVR EDTRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARSSDAGTYFFRV ETGKTKWNYKYVPLSVHVTALTHRPNILIPGTLESGC PRNLTCSVPWACEQGTAPMISWMGTSVSPLDPSTTR SSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTIHLNV SYPPQNLTMTVFQGNDTVSIVLGNGSSVSVPEGPSLR LVCAVDSNPPARLSLSWGGLTLCPSQPSNPGVLELPR VHLRDEEEFTCRAQNLLGSQRVSLNVSLQSKATSGL TGSGHHHHHH
SEQ ID NO: 13	人类 Siglec-7-Fc	QKSNRKDYSLTMQSSVTVQEGMCVHVRCSFSYPVD SQTDSDPVHGYWFRAGNDISWKAPVATNNPAWAVQ EETRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARMSDAGRYFFR MEKGNIKWNYKYDQLSVNVTALTHRPNILIPGTLES GCFQNLTCSVPWACEQGTPPMISWMGTSVSPLHPST TRSSVLTLIPQPQHHGTSLTCQVTLPGAGVTTNRTIQL NVSYPPQNLTVTVFQGEGTASTALGNSSSLSVLEGQS LRLVCAVDSNPPARLSWTWRSLTLYPSQPSNPLVLEL QVHLGDEGEFTCRAQNSLGSQHVSLNLSLQQEYTG KMRPVSGVLLGSGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 14	人类 Siglec-7-His	QKSNRKDYSLTMQSSVTVQEGMCVHVRCSFSYPVD SQTDSDPVHGYWFRAGNDISWKAPVATNNPAWAVQ EETRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARMSDAGRYFFR MEKGNIKWNYKYDQLSVNVTALTHRPNILIPGTLES GCFQNLTCSVPWACEQGTPPMISWMGTSVSPLHPST TRSSVLTLIPQPQHHGTSLTCQVTLPGAGVTTNRTIQL NVSYPPQNLTVTVFQGEGTASTALGNSSSLSVLEGQS LRLVCAVDSNPPARLSWTWRSLTLYPSQPSNPLVLEL QVHLGDEGEFTCRAQNSLGSQHVSLNLSLQQEYTG KMRPVSGVLLGSGHHHHHHHHH

[0781] 一些抗体表达为小鼠/人类嵌合体,其中小鼠可变区和人类IgG4主链包含与κ轻链配对的S228P重链突变。将可变重链(HC)和轻链(LC)序列克隆到含有表5所示的抗体恒定区序列的载体中。表5还列出了如果与λ轻链配对有用时可使用的代表性人类λ轻链区。

[0782] 表5:抗体恒定区序列

[0783]

区域	序列
hIgG4 (S228P)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK
hκ LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hλ LC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0784] 蛋白质表达和纯化由LakePharma(Belmont,CA)和ATUM(Newark,CA)进行,通过将含有重链和轻链的专有载体瞬时转染到悬浮适应的HEK293细胞中。通过蛋白A亲和色谱法纯化细胞培养上清液。将洗脱的、中和的蛋白质缓冲液交换到PBS(pH 7.4)或200mM HEPES、100mM NaCl、50mM乙酸钠(pH 7.0)中并过滤灭菌。使用从初级氨基酸序列计算的消光系数,通过OD280对纯化的抗体进行量化。纯化的抗体通过毛细管凝胶电泳、HPLC-SEC和内毒素水平进行表征。

[0785] 实施例3:使用单核细胞和巨噬细胞测定验证抗SIGLEC-9抗体增加单核细胞和/或巨噬细胞炎性表型

[0786] 人类巨噬细胞沿着从促炎性(M1样,在本文中也称为1型)到促肿瘤生成/抗炎(M2样,在本文中也称为2型)的分化谱存在(参见例如Biswas等人(2010)Nat.Immunol.11:889-896;Mosser和Edwards(2008)Nat.Rev.Immunol.8:958-969;Mantovani等人(2009)Hum.Immunol.70:325-330)。沿着这一功能谱,巨噬细胞除了改变多种其他特性外,还会改变它们的表面标志物表达和形态。了解这些标志物在原代人类巨噬细胞中如何沿该谱变化对于了解在给定的免疫环境中存在哪些细胞非常重要,例如在肿瘤(肿瘤相关巨噬细胞)和/或发炎组织内,以及了解这些巨噬细胞如何影响这些组织内的免疫反应。某些细胞表面标志物,包括CD163、CD16和CD206,传统上已被用于对巨噬细胞亚型进行分类。

[0787] 与这些分化状态一致,巨噬细胞经过生物学优化以诱导或抑制免疫反应。因此,经由抗体靶向巨噬细胞表面上的SIGLEC-9将允许改变免疫反应的启动、抑制和/或持续存在。

[0788] 对于本文所述的每个基于单核细胞/巨噬细胞的实验,使用原代人类单核细胞、巨噬细胞和/或PBMC,而不是使用细胞系,以便以任何具有分离细胞类型的体外实验系统都允许的最接近的可能方式概括模拟体内现有细胞的生物学特性。特别是,所述系统提供了研究原代细胞的自然生物学特性的途径,并提供了对来自具有不同遗传和环境暴露的不同供体的自然多样性的途径。因此,在解释测定结果时,考虑人类群体中的自然遗传和免疫变异性非常重要。

[0789] 实施例2中描述的抗体已用于功能测定法中。这些抗体对巨噬细胞分化状态的影

响是通过读出来测量的,包括细胞因子分泌和其他功能特征,例如在复杂的多细胞测定中维持协同免疫反应的能力。

[0790] 例如,图5显示了在巨噬细胞功能测定中利用的表2中列出的抗体的结果。单核细胞在体外分化为M1样(1型)和/或M2样(2型)表型(Ries等人(2014)Cancer Cell 25:846-859;Vogel等人(2014)Immunobiol.219:695-703)。为了将单核细胞分化为M2巨噬细胞,根据制造商的说明,使用RosetteSep™人类单核细胞富集混合剂(Stemcell Technologies,Vancouver,Canada)通过Ficoll分离从健康供体的全血中分离出单核细胞。分离的单核细胞在含有10%胎牛血清的IMDM培养基中在24或96孔板中排列过夜,并且在24小时后洗掉非贴壁细胞。对于M2巨噬细胞,通过在IMDM 10%FBS加50ng/ml人类M-CSF中培养6天,单核细胞分化为巨噬细胞。6天后,M2巨噬细胞用20ng/ml IL-10极化并在第7天用100ng/ml LPS激活。

[0791] 在培养的第7天,以10ug/ml的终浓度施用表3和表4中列出的单克隆抗体。一些市售抗体以及选自表3和表5中列出者的单克隆抗体,所述抗体如上文实施例2中对生成的抗体所述进行克隆和表达,类似地作为对照施用。

[0792] 在第8天,测量细胞细胞因子和趋化因子以评价特定mAb改变巨噬细胞促炎或抗炎性质的能力。根据制造商的方案,使用Luminex panel(Thermo Fisher,Waltham,MA)测量来自上清液的细胞因子。使用CytationTM5成像读取器(Biotek,Winooski,VT)检测发光。数据代表至少3-4名健康供体。

[0793] 巨噬细胞产生不同的细胞因子和趋化因子。例如,M1巨噬细胞产生更多的促炎细胞因子,包括但不限于GM-CSF、IL-12和TNF-α,而M2巨噬细胞产生更多的促肿瘤生成和免疫抑制细胞因子,如VEGF、IL-10和TGFb。在整个这些测定中,巨噬细胞经由强效细胞因子IL-10和M-CSF的存在被强烈驱动至M2表型。多种mAb,例如2F15和13H10等,能够将这些M2巨噬细胞驱动至更加M1样状态,如通过表型变化(包括CD163表达降低和HLA-DR表达增加)以及功能变化(包括IL-12和TNFa增加以及其他)所证明。所述图还显示了所分析的其他细胞因子之间变化的一致性。这些图进一步证明了抗SIGLEC-9抗体能够将M2巨噬细胞的功能特征改变为更加M1样状态。重要的是,在这些测定中进行分化的细胞在整个测定过程中仍处于有效的偏斜条件存在下。此外,所述抗体仅在培养物中存在24小时。这更能代表疾病环境,例如肿瘤,其中已知细胞已经沿M2谱在一定程度上分化,如上所示。即使在这个有限的窗口中,mAb也能够显著影响M2巨噬细胞极化到更加M1样状态,如促炎细胞因子的增加所证明的那样。即使考虑到该测定具有挑战性的极化条件,如果该测定中的mAb能够诱导一种或多种细胞因子(包括GM-CSF、IL-12、TNFa、IL-10、CXCL9、CCL-4和IL-1b)发生50%或更大的变化和/或IL-10减少50%,则它被认为在功能上能够将M2样巨噬细胞转换为M1样巨噬细胞。从图5中可以看出,大多数mAb不仅实现细胞因子或趋化因子之一的变化,而且还实现多种变化。此外,这些图证明了抗SIGLEC-9抗体能够逆转M2巨噬细胞的功能特征,以使它们更加M1样。

[0794] 实施例4:使用复杂的免疫细胞测定验证抗SIGLEC-9抗体增加单核细胞和/或巨噬细胞炎性表型

[0795] 为了使巨噬细胞诱导肿瘤免疫原性或逆转自身免疫性和炎性病症的进程,它们通常应该能够诱导或阻断协同免疫反应。这将包括对髓系细胞和淋巴细胞具有直接和下游影

响。需要由来自淋巴样和骨髓样谱系的原代细胞组成的复杂多细胞测定来分析此类影响。

[0796] 葡萄球菌肠毒素B(SEB)测定系统已被用于证明本文所述的经验证靶标导致协同免疫反应的能力。该测定利用原代人类细胞,这些细胞是最适合研究的天然细胞并且对体内疾病(例如人类疾病)具有最佳预测能力。该测定在背景活性和响应的幅度方面天然具有从供体到供体的高度可变性。

[0797] 对于SEB测定,外周血单核细胞(PBMC)通过Ficoll®分离从新鲜供体的血液中分离出来,并冷冻在90%胎牛血清(FBS)、10%DMSO中在-150℃下长期储存。PBMC被解冻到含有10%FBS、50nM 2-巯基乙醇、非必需氨基酸、1mM丙酮酸钠和10mM HEPES的完全RPMI培养基中。接下来,在完全RPMI中将200,000个细胞接种在96孔板的每个孔中。以5μg/ml添加抗人类PD-1派姆单抗(Merck,KEYTRUDA®,MK-3475),并以指定浓度添加实施例1中描述的其他抗体。细胞和mAb在37℃温育30分钟,并以0.1μg/ml的终浓度添加葡萄球菌肠毒素B(SEB)(EMD Millipore,Billerica,MA)。激活4天后,收集上清液并在-20℃下冷冻。使用多参数ProcartaPlexTM测定(ThermoFisher Scientific)测量细胞因子浓度。数据代表至少4-6名健康供体。重要的是,SEB测定含有单核细胞,并且SEB测定中细胞的抗体处理将对单核细胞产生影响,从而影响测定结果,特别是在测定的早期阶段,因为在测定开始时几乎没有巨噬细胞存在。

[0798] 在该测定中,SIGLEC-9的特异性抗体被证明能够影响协同的多细胞免疫反应。这种协同的多细胞反应不仅包括如前所述改变髓系细胞的功能,而且还包括淋巴细胞、特别是T细胞的功能输出。在该测定中,如果mAb能够诱导一种或多种细胞因子(包括GM-CSF、IL-12、TNFa、IL-10、CXCL9、CCL-4、IL-1b和/或IFNg)中的50%或更大的变化,则它们被视为功能性的。图6展示了来自SEB测定的分泌细胞因子水平。用mAb治疗导致骨髓源性细胞因子和趋化因子(例如,IL-1B、GM-CSF和CCL4)和T细胞源性细胞因子(例如,IL-2、IFNγ和IL-10)的产生发生变化。重要的是,将这些抗SIGLEC-9mAb的能力与KEYTRUDA®进行了比较,KEYTRUDA®是免疫肿瘤学中的一种批准疗法并且是SEB测定中的强激活剂。图6表明抗SIGLEC-9mAb能够等于或超过KEYTRUDA®处理样品的效应。

[0799] 正如在上面实施例3中阐述的仅巨噬细胞测定中一样,结果清楚地表明mAb如13H10和2E23等将巨噬细胞驱动到更促炎的M1样状态并在复杂的多细胞免疫细胞测定中具有一致的效应并增加促炎细胞因子。

[0800] 实施例6:抗SIGLEC-9抗体在SIGLEC特异性方面的生物物理表征

[0801] 某些抗体(例如那些在SEB测定中被鉴定为有功能的抗体)的结合特性和特异性,通过ELISA测定它们结合板结合的人类Siglec-9-Fc、食蟹猴Siglec-9-Fc、人类Siglec-7-Fc、人类Siglec6-Fc和人类Siglec-8-Fc的能力(图7)。在室温下用1ug/mL指示的SIGLEC蛋白包被ELISA板(384孔)。用含0.1% Tween®20的PBS(pH 7.4)洗涤板,并用含3%BSA的TBS封闭。洗涤板并与稀释至100nM的抗SIGLEC9抗体一起温育。洗涤板并与HRP偶联的抗小鼠Fc二级抗体一起温育。将板进行最后一次洗涤并与HRP底物一起温育。使用POLARstar Omega酶标仪(BMG LAPTECH)进行读出。

[0802] 功能性抗体通常分为三大类:i)人类SIGLEC-9特异性,ii)与食蟹猴SIGLEC-9的弱交叉反应性,以及iii)与食蟹猴SIGLEC-9和人类SIGLEC-7的交叉反应性。

[0803] 使用ForteBio Octet Red384系统通过生物层干涉法(BLI)测定嵌合抗体的结合亲和力。所有样品均在动力学缓冲液(含有0.1％牛血清白蛋白、0.05％叠氮化钠和0.02％Tween®20的1x DPBS(Gibco,目录#LS14190250))中稀释的黑色96孔平底板(Greiner,目录#655209)中制备。将抗SIGLEC-9抗体(配体)稀释至10ug/mL的最终浓度,并在抗人类IgG Fc捕获(AHC)生物传感器(ForteBio,目录#18-5060)上捕获。将重组人类Siglec-9-His、食蟹猴Siglec-9-His和人类Siglec-7-His从100nM以2倍滴定至1.56nM。生物传感器在测定前在动力学缓冲液中再水合10分钟,然后在动力学缓冲液中平衡60秒。然后将抗体固定300秒,接着在新鲜动力学缓冲液中进行120秒基线洗涤,在与所述基线洗涤步骤相同的缓冲液孔中进行300秒分析物缔合和300秒解离。所有测定步骤均在30℃下进行,采集速率为5.0Hz。

[0804] 使用ForteBio数据分析HT软件计算拟合并且结果示于下表6中。处理参数包括双重参考扣除,其中人类IgG4用作参考传感器扣除的同种型对照并且在无分析物的动力学缓冲液中的固定配体用于参考样品扣除。Y轴数据与最后5秒的平均基线步骤对齐,并且所有步骤都被跨步校正到解离步骤的开始。使用Savitzky-Golay过滤去除高频噪声,并且最终拟合为缔合和解离的1:1全局结合模型。

[0805] 表6:抗Siglec-9嵌合抗体的代表性亲和力(K_D;所有值均以M计)

[0806]

抗体	人类 SIGLEC9	食蟹猴 SIGLEC9	人类 SIGLEC7
2F15	3.6E-09	3.0E-09	2.4E-09
3L02	4.4E-12	无结合	无结合
13H10	2.6E-12	无结合	无结合
13J19	2.1E-12	6.8E-12	2.0E-08

[0807] 实施例7:抗SIGLEC-9抗体的表位分箱

[0808] 通过在ForteBio Octet Red384系统上进行的抗体交叉阻断实验进一步评价了功能性抗体的表位多样性。所有样品均在黑色384孔平底板(Greiner,目录#781209)中制备,工作体积为120uL,并在动力学缓冲液(含有0.1％牛血清白蛋白、0.05％叠氮化钠和0.02％Tween®20的1x DPBS)中稀释。将抗SIGLEC-9抗体和人类Siglec-9-Fc蛋白在动力学缓冲液中稀释至终浓度为10ug/mL。抗人类IgG Fc捕获(AHC)生物传感器(ForteBio,目录#18-5060)在测定前在动力学缓冲液中再水合10分钟,然后在动力学缓冲液中平衡60秒。然后将重组人类Siglec-9-Fc固定120秒,接着在新鲜动力学缓冲液中进行30秒基线洗涤,120秒第一抗体(抗体“a”)缔合,30秒洗涤,然后120秒竞争抗体(抗体“b”)缔合。所有测定步骤均在30℃下进行,采集速率为5.0Hz。

[0809] 分箱结果使用ForteBio数据分析HT软件计算。定义抗体“a”和抗体“b”步骤,并在步骤持续时间的最后10％处将最大结合计算取平均值。一旦生成矩阵,就减去自身相互作用,并使用Pearson和Lingang标准的相似性度量来设置层次聚类,并且最大结合nm偏移报告在下表7中。在抗体“a”(行)存在的情况下,抗体“b”(列)与SIGLEC9的结合水平不同,表明不同抗体覆盖了多种表位。

[0810] 表7显示了抗体交叉阻断谱的不同模式,这与对食蟹猴SIGLEC-9和人类SIGLEC-7

具有不同结合特异性的抗体一致。

[0811] 表7:代表性表位分箱数据

[0812]

mAb	3L02	12L19	13H10	9C15	12P18	9D21	13J19	12G23	13O18	2F15
3L02	0.000	0.090	0.118	0.472	0.463	0.745	0.846	0.277	0.271	0.272
12L19	-0.053	0.000	0.042	0.392	0.518	0.730	0.887	0.263	0.251	0.277
13H10	-0.064	-0.020	0.000	0.336	0.336	0.686	0.838	0.242	0.224	0.232
9C15	0.140	0.231	0.228	0.000	0.030	0.561	0.744	0.233	0.232	0.189
12P18	0.214	0.379	0.200	0.003	0.000	0.658	0.835	0.231	0.228	0.230
9D21	0.188	0.263	0.275	0.395	0.349	0.000	0.047	0.162	0.163	0.161
13J19	0.085	0.175	0.207	0.282	0.324	-0.022	0.000	0.139	0.135	0.153
12G23	0.031	0.185	0.220	0.352	0.439	0.524	0.732	0.000	-0.016	-0.013
13O18	0.091	0.202	0.225	0.392	0.358	0.495	0.648	0.011	0.000	0.005
2F15	0.099	0.198	0.224	0.399	0.352	0.619	0.716	0.001	0.003	0.000

[0813] 实施例8:抗SIGLEC-9抗体导致肿瘤炎症增加

[0814] 上述体外系统清楚地显示了这些经过验证的巨噬细胞相关靶标改变巨噬细胞功能的能力,以及复杂的多细胞测定,包括T细胞。在离体培养系统中使用患者肿瘤材料进一步证实了这些数据。这种类型的系统代表了人类体内研究的接近和普遍接受的替代物,因此提供了治疗益处的有力证据。

[0815] 使用解离培养物进一步测试巨噬细胞相关靶标对组织环境中巨噬细胞生物学的调控。解离的肿瘤含有存在于肿瘤微环境中的所有各种细胞群体,例如肿瘤、免疫和支持细胞。这些可行的单细胞悬液可用于许多应用,并允许在实验的每个重复中对细胞数量和组成进行归一化。为了在获取新鲜肿瘤组织(小于24h)周围的脂肪后进行解离肿瘤实验,使用剪刀和手术刀从肿瘤样品中去除纤维和坏死区域。肿瘤被切成2-4mm的小块。根据制造商方案制备肿瘤解离试剂盒酶混合物(MACS Miltenyi Biotec)。将肿瘤块和解离酶转移到5mL Snaplock微量离心机中,并使用直剪刀切碎组织。将管置于200-250rpm的37℃振荡器中持续45分钟至1小时。在温育时间结束时,将消化的肿瘤用40uM细胞过滤器过滤到50mL Falcon™锥形离心管中。每个管充满冷的2%-5%FBS/PBS混合物以停止消化(所有剩余步骤在冰上进行),以300x g离心5分钟,丢弃上清液,并用冷的2%至5%FBS/PBS混合物洗涤细胞两次。最后一次洗涤后,将细胞重悬于1至5mL冷培养基中并进行细胞计数。将300k至400k细胞接种在两个含有1mL培养基的6孔培养板的每个孔中。将板在细胞培养温育箱中在37℃和5%CO_2下温育24和48小时。在研究结束时,根据制造商的说明,使用Invitrogen™ Luminex™细胞因子人类磁性25-Plex Panel测量培养物上清液中的细胞因子/趋化因子。在该同一范围内,多种细胞因子和趋化因子的上调表现出令人难以置信的有效反应。

[0816] 所述研究证明了所选抗体对多种肿瘤类型和供体的功能。总的来说,肿瘤集由3种肿瘤类型的8个原发性人类肿瘤(例如,6个肾脏肿瘤样品、1个肺肿瘤样品和1个脑肿瘤样品)组成。

[0817] 这些离体培养物维持原生肿瘤和肿瘤微环境(TME)条件,包括浸润、配体、肿瘤抗原、原生抑制性和炎性刺激、生长因子、天然突变状态等。因此,离体肿瘤培养忠实地捕捉了患者体内实际肿瘤的多个方面。特别是,保留了肿瘤微环境,保留了主要免疫组分之间的关系,并捕获了对PD-1抑制剂的临床反应的多个方面。据认为,靶向巨噬细胞和本文所述的抗SIGLEC-9抗体具有泛癌概况。实际上,图8中显示的数据表示为用特定mAb治疗的所有个别肿瘤和肿瘤类型的相对值(同种型对照的百分比)的平均值,并且已分为三个单独的趋化因

子/细胞因子组。这三组由以髓系为重点的细胞因子(例如TNFa、GM-CSF和IL-1b)、趋化因子(例如CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9和CXCL10)和T细胞活化(IFNg)组成。这三组代表了基于巨噬细胞的抗肿瘤免疫反应的三个重要方面。首先,以髓系为重点的细胞因子表明抗体诱导了巨噬细胞的复极化,导致产生促炎细胞因子并开始启动免疫反应。其次,关键T细胞细胞因子干扰素γ(IFNg)的产生表明TAM的这种复极化和免疫反应的启动转化为肿瘤微环境中的T细胞,从而产生更有效的抗肿瘤免疫反应。第三,大量趋化因子的产生表明初始免疫细胞将开始被募集到肿瘤中,并导致抗肿瘤免疫反应的持续存在。

[0818] 在离体肿瘤模型中,在该领域建立了至少30%的单个关键细胞因子(例如干扰素γ)上调的反应,以指示临床反应(Jacquelot等人(2017)Nat.Commun.8:592;Jenkins等人(2018)Cancer Disc.8:196)。在这个系统中,多种细胞因子和趋化因子的平均诱导是一个很高的标准,因为它需要在抗肿瘤免疫反应的多个方面发挥作用。数据始终表明,与上述体外数据一致,抗SIGLEC-9mAb增加了髓系和T细胞来源的细胞因子。如上文所述,单个细胞因子的30%变化表明临床反应。因此,在该同一范围内,多种细胞因子和趋化因子的一致上调表明难以置信地有效的抗SIGLEC-9介导的抗肿瘤反应。图8至图13展示了多种肿瘤中满足这些标准的SIGLEC-9抗体,并且还提供了众多代表性的实例,它们导致细胞因子和趋化因子增加超过100%。

[0819] 一种这样的细胞因子是IFNg。如上文所论述,SIGLEC-9在抑制性髓系细胞(巨噬细胞和DC)上表达,但SIGLEC-9介导的这些抑制性髓系细胞的复极化可导致T细胞活化增加。为此,测量了IFNg的产生,并且证明了许多mAb可诱导T细胞增加IFNg水平。这种效应可直接与Keytruda®进行比较,Keytruda®具有不同的作用机制,其直接导致T细胞产生更多IFNg。多种抗SIGLEC-9mAb的可见效应与Keytruda®处理非常相似。

[0820] 在更多的髓系来源细胞因子如TNFa、IL1b和GM-CSF中也证明了一致的变化。许多抗SIGLEC-9mAb诱导这些细胞因子增加超过30%。这种效应可与抗LILRb2 mAb进行比较。提出LILRB2在髓系细胞中具有独特但相关的机制(Chen等人(2018)J.Clin.Invest.128:5647-45662)。两种抗SIGLEC-9mAb的表现与抗LILRB2 mAb一样好或更好。

[0821] 如上文所述,抗SIGLEC-9抗体介导的对SIGLEC-9靶标抑制的反应是部分地使用多重系统测量的,所述系统测量在每次实验结束时每个治疗组孔的培养基中的一组细胞因子和趋化因子,并且效应可由三种相互关联但不同的机制中的一种或多种表示:巨噬细胞炎性活化;将新鲜免疫细胞吸引到肿瘤部位并促进针对肿瘤的炎性反应的趋化因子;和T细胞活化。在下面描述的数据中(例如,图8至图13),每个个别抗体的平均值对应于测试该特定抗体的个别肿瘤的代表性数量。

[0822] 更具体来说,通过测量一种最公认的炎性细胞因子TNFα,进一步模拟了巨噬细胞炎性活化特征。图8显示了每种抗SIGLEC-9抗体如何在所有肿瘤中平均诱导这两种细胞因子的分泌。与下面描述的类似图一样,Y轴显示相比于同种型对照组的诱导变化,作为同种型对照组的百分比,代表给定肿瘤的无治疗背景值。此外,然后对所有肿瘤的百分比变化取平均值,以显示对多种肿瘤和肿瘤类型的总体影响。

[0823] 还通过组合在“热”T细胞浸润肿瘤中观察到内源性表达并且在本领域中被认为指示对T细胞检查点抑制剂的反应的几种趋化因子(CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9和CXCL10)的效应,对化学吸引特征进行建模(Dangaj等人(2019)Cancer Cell 885-900;House等人(2020)

Transl.Cancer Mech.Ther.26:487-504;Lapteva等人(2010)Exp Opin Biol Ther.10:725-733)。图9显示了每种抗SIGLEC-9抗体如何在所有肿瘤中平均诱导趋化因子特征内趋化因子的分泌。

[0824] 另外,通过测量一种最广为接受的T细胞细胞因子IFNγ,对T细胞活化特征进行建模。图10显示了每种抗SIGLEC-9抗体如何在所有肿瘤中平均诱导这两种细胞因子的分泌。

[0825] 虽然平均值便于汇总大量数据,但图11至图13显示了特定代表性抗SIGLEC-9抗体对个别肿瘤的影响。在给定的肿瘤中,至少30%的诱导作用被认为是显著的。这些图清楚地表明,代表多种肿瘤类型的显著大量肿瘤对所有三种反应机制组(例如巨噬细胞炎性活化、化学吸引和T细胞活化)中测试的所有代表性抗SIGLEC-9抗体均显示出显著反应。

[0826] 值得注意的是,与彼此相比,这三种测量机制中没有一个必然具有更高程度的生理重要性,尤其是因为不同的抗体可诱导具有不同动力学动态的不同机制,从而导致生理上重要的结果。本领域众所周知,随着时间的推移,每种机制都会馈入其他机制,以协调针对患者体内活肿瘤的完全免疫反应。此类影响未必会在该测定的特定格式中被捕获,其中在给定的时间点进行测量。尽管如此,所提供的平均和个别结果清楚地证明了对临床可转化原发性肿瘤中各种代表性抗SIGLEC-9抗体的体外功能验证的有力证实。例如,图11至图13显示,虽然2F15在诱导TNFα方面的平均效力相对较低,但它是诱导化学吸引的最强者之一。

[0827] 表8提供了基于图11至图13中显示的个体化结果测试的所有代表性抗SIGLEC-9抗体的数据的综合总结。对于给定机制,个别肿瘤中的反应被认为是高于30%的诱导。例如,假设对于给定的细胞因子,在给定的肿瘤中,同种型对照组的读数为“I”,而抗SIGLEC-9抗体治疗组的读数为“S”。然后,如果:((S-I)/I)*100>=30,则给定的SIGLEC-9治疗组将被视为反应者。表X清楚地表明,所有抗SIGLEC-9抗体的功效通常可与Keytruda®相当,Keytruda®是目前一般免疫肿瘤学并且特别是PD-1抑制剂的金标准。对于巨噬细胞炎性活化,所有抗SIGLEC-9抗体都展示出与Keytruda®一样好或更好的结果。类似地,对于趋化因子特征的诱导,几乎所有抗SIGLEC-9抗体都在与Keytruda®相同或更大比例的肿瘤中产生反应,并且抗SIGLEC-9抗体在不同肿瘤类型中产生更广泛的反应。由Keytruda®直接诱导而仅由抗SIGLEC-9抗体间接诱导的T细胞活化,在测定范围内对后者产生动力学劣势,但仍证明抗SIGLEC-9抗体具有非常强的性能,即使在该机制中,3H10也与Keytruda®同样有效。

[0828] 表8:来自代表性抗SIGLEC-9抗体的原发性肿瘤结果总结

[0829]

	巨噬细胞活化反应(TNFα)		巨噬细胞化学吸引反应(趋化因子特征)		T细胞活化反应(IFNγ)	
抗体名称	肿瘤%	肿瘤类型%	肿瘤%	肿瘤类型%	肿瘤%	肿瘤类型%

[0830]

Keytruda®	38	67	38	67	25	67
3H10	75	100	38	67	25	67
2F15	63	67	38	67	13	33

[0831] 因此,本文中呈现的结果表明,在该测定中,一组代表性的抗SIGLEC-9抗体的表现与Keytruda®相当或更好。这个结论很重要,因为抗SIGLEC-9抗体的临床效用不仅在于它们的整体效应强度,而且在于所述效应不同于Keytruda®和其他检查点抑制剂(例如PD-1通路阻滞剂,如PD-1、PD-L1和PD-L2)。事实上,有一些肿瘤和肿瘤类型在Keytruda®后没有产生任何影响,并且对一些测试的抗SIGLEC-9抗体显示出反应。这些肿瘤和肿瘤类型代表了临床中目前可用治疗无法很好地服务并需要新的机械治疗的患者群体。例如,Keytruda®在脑癌样品中没有产生任何反应。

[0832] 生物保藏

[0833] 由Verseau Therapeutics,Inc在2019年6月4日将本发明的代表性材料保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)。特定来说,将以具有下列名称“13H10”(PTA-125944)和“13J19”(PTA-125945)的个别保藏物保藏并且具有表2和实施例中所示的鉴定特性的单克隆抗体在2019年6月4日由Verseau Therapeutics,Inc.在国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约(Budapest Treaty on International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure)和其细则(布达佩斯条约)的规定下保藏于ATCC中。这确保从保藏日期开始维持有效保藏30年。所述保藏物可根据布达佩斯条约的条款从ATCC获得,并且受限于Verseau Therapeutics,Inc.与ATCC之间的协议,所述协议确保在相关美国专利颁布时或在任何美国或外国专利申请向公众公开时(以先发生者为准),所述保藏物可永久并且不受限制地供公众使用,并且确保由美国专利和商标事务专员(U.S.Commissioner of Patents and Trademarks)根据35U.S.C.第122节和依照其的事务专员规则(包括37C.F.R.第1.14节,特别参照8860G638)确定有权获得者对保藏物的可获得性。

[0834] 本申请的受让人已同意,如果保藏物丢失或被破坏,则所述材料应在通知后立即用另一相同材料替换。这些保藏物将保存在授权的保藏处,并在保藏处收到最近一次样品发布请求后至少五年的时期,在保藏日期后至少三十年的时期,或在相关专利的可执行期限内,以最长的期限为准,在发生突变、无法生存或破坏的情况下更换。从申请获得专利后,所有对公众可获得这些细胞系的限制将不可撤销地取消。所保藏材料的可获得性不应解释为在违反任何政府当局根据其专利法所授予权利的情形下实践本发明的许可。

[0835] 通过引用并入

[0836] 本文所提及的所有出版物、专利和专利申请的全部内容都通过引用并入本文,如同将每一个别出版物、专利或专利申请明确地且个别地指示通过引用并入本文一般。如果出现冲突,则以本申请(包括其中的任何定义)为准。

[0837] 也通过引用整体引入任何多核苷酸和多肽序列,其可参照与公共数据库中的条目相关的登记号,例如由万维网上的基因组研究所(The Institute for Genomic Research,TIGR)和/或万维网上的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology

Information,NCBI)所维护者。

[0838] 等效物和范围

[0839] 本发明所涵盖的一个或多个实施方案的细节陈述于上述说明中。尽管上文已阐述优选的材料和方法,但任何类似或等效于本文所述者的材料和方法可用于实践或测试本发明所涵盖的实施方案。与本发明相关的其他特征、目标和优点根据本说明书是显而易见的。除非另外定义,否则本文所用的全部技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。在冲突的情形下,以上文所提供的本发明书为准。

[0840] 本领域技术人员仅使用常规实验即可认识到或能够确定本文所述的本发明所涵盖的具体实施方案的许多等效形式。本发明范围并不旨在限于本文所提供的说明书并且这些等效物旨在由所附权利要求书涵盖。

[0841] 除非指示相反情形或另外从上下文显而易见,否则本文使用冠词“一个”和“一种”来指代该冠词的语法对象中的一个/种或一个/种以上(即指至少一个/种)。举例来说,“一个元件”意指一个元件或一个以上元件。除非指示相反情形或另外从上下文显而易见,否则如果一个、一个以上或所有组成员存在、采用或另外相关于给定产物或过程中,则在一个或多个组成员之间包括“或”的权利要求或说明被视为满足的。本发明包括恰好一个组成员存在、采用或另外相关于给定产物或过程中的实施方案。本发明还包括一个以上或全部组成员存在、采用或另外相关于给定产物或过程中的实施方案。

[0842] 还注意,术语“包含”旨在是开放性的并且允许但未必并入其他要素或步骤。在术语“包含”用于本文中时,由此还涵盖并公开术语“由……组成”。

[0843] 在给出范围的情形下,包括端值。此外,应理解,除非另外指示或另外根据上下文和本领域技术人员的理解显而易见,否则表示为范围的值可在本发明所涵盖的不同实施方案中假设表示所陈述范围内的任何具体值或子范围,直至所述范围的下限单位的十分之一,除非上下文另外明确指示。

[0844] 另外,应理解,本发明所涵盖的在现有技术内的任何特定实施方案可从权利要求中的任何一项或多项明确排除。由于这些实施方案被视为是本领域技术人员已知的,因此它们可排除,即使所述排除未明确陈述于本文中。本发明所涵盖组合物的任何特定实施方案(例如,任何抗生素、治疗或活性成分;任何产生方法;任何使用方法;等等)可出于任何原因从任何一个或多个权利要求排除,不论是否与现有技术的存在相关。

[0845] 应理解,已经使用的词语是描述性的词语,而不是限制性的词语,并且可以在所附权利要求的范围内进行改变,而不脱离本发明在其更宽泛方面所涵盖的真实范围和精神。

[0846] 尽管已经相对于若干所描述的实施方案以一定篇幅并使用一定特定性描述了本发明,但是本发明并不旨在限于任何这样的细节或实施方案或任何特定实施方案,但应参照所附权利要求来解释以鉴于现有技术提供对这些权利要求的最广泛的可能解释,因此有效地涵盖了本发明所涵盖的预期范围。

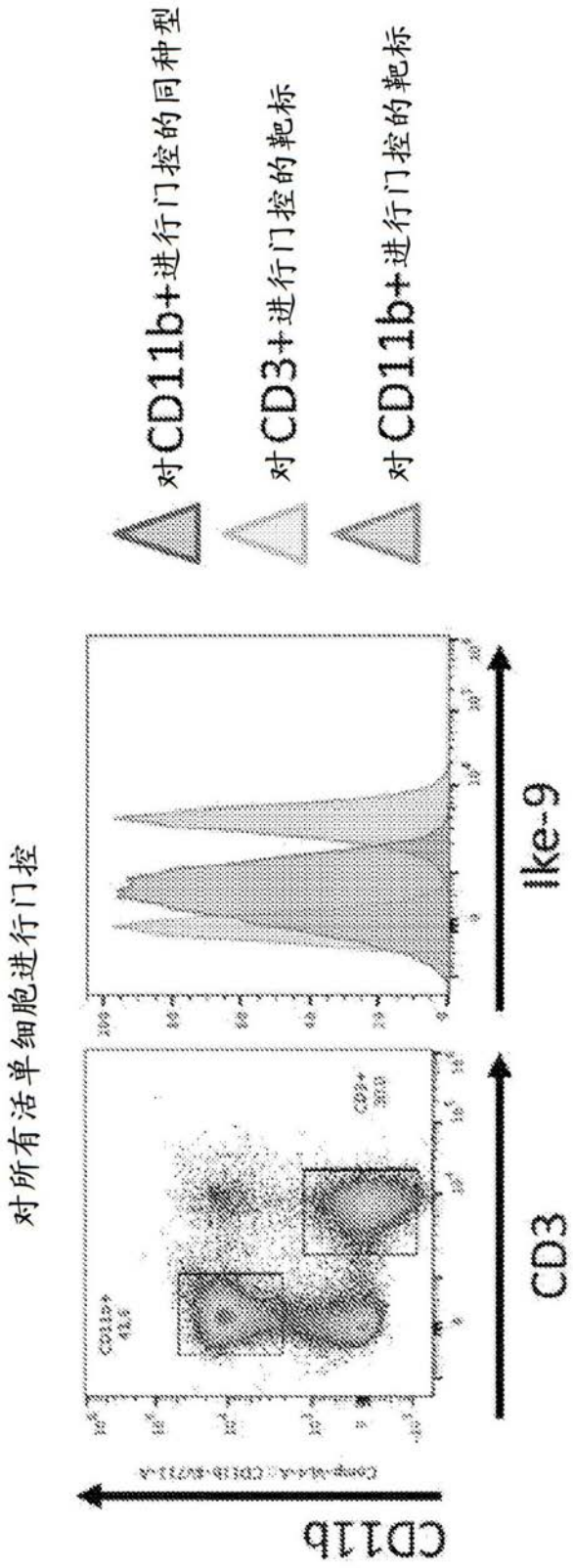

对CD11b+进行门控的同种型
对CD3+进行门控的靶标
对CD11b+进行门控的靶标
对所有活单细胞进行门控
CD11b
CD3
Ike-9

图1

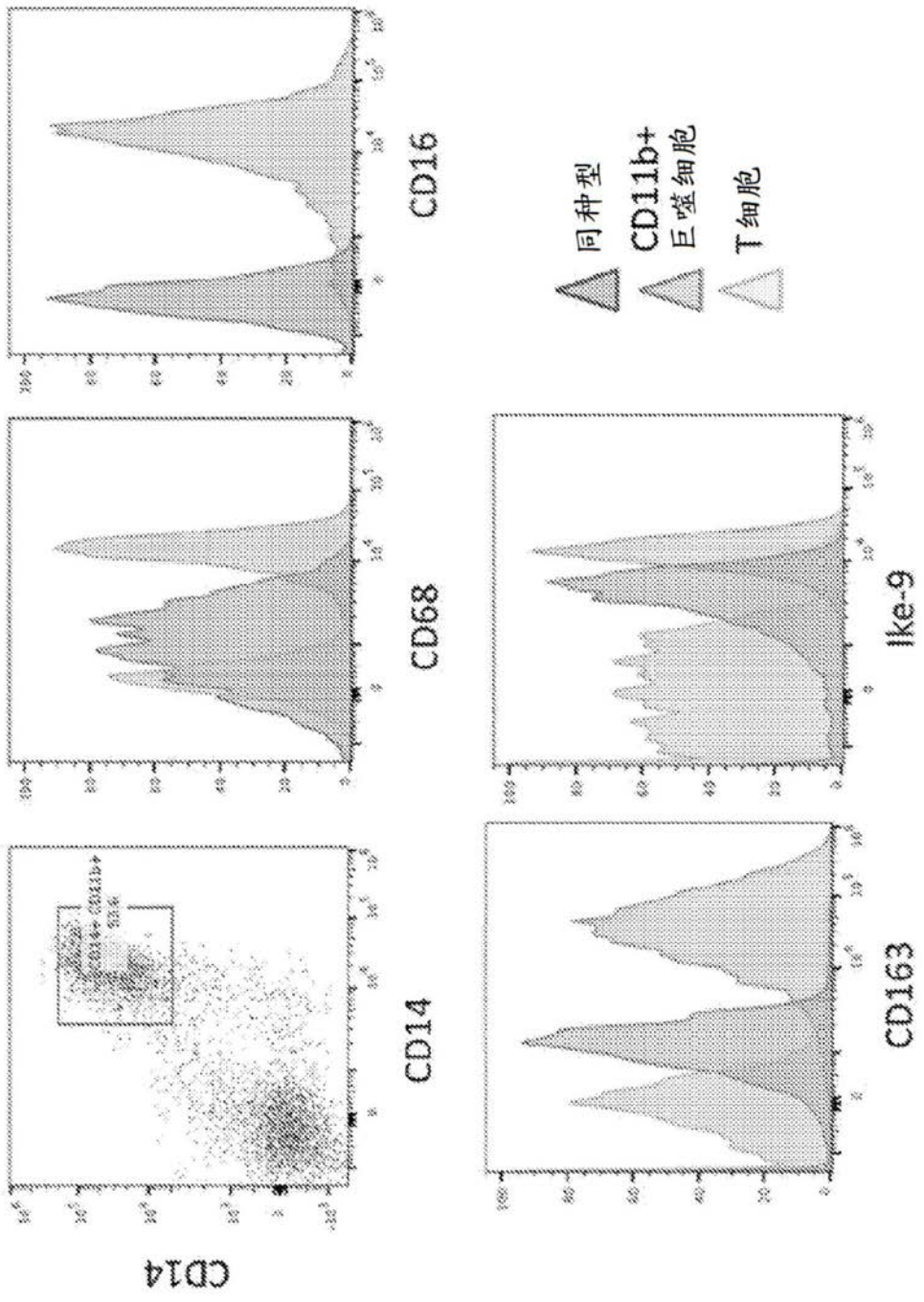


图2

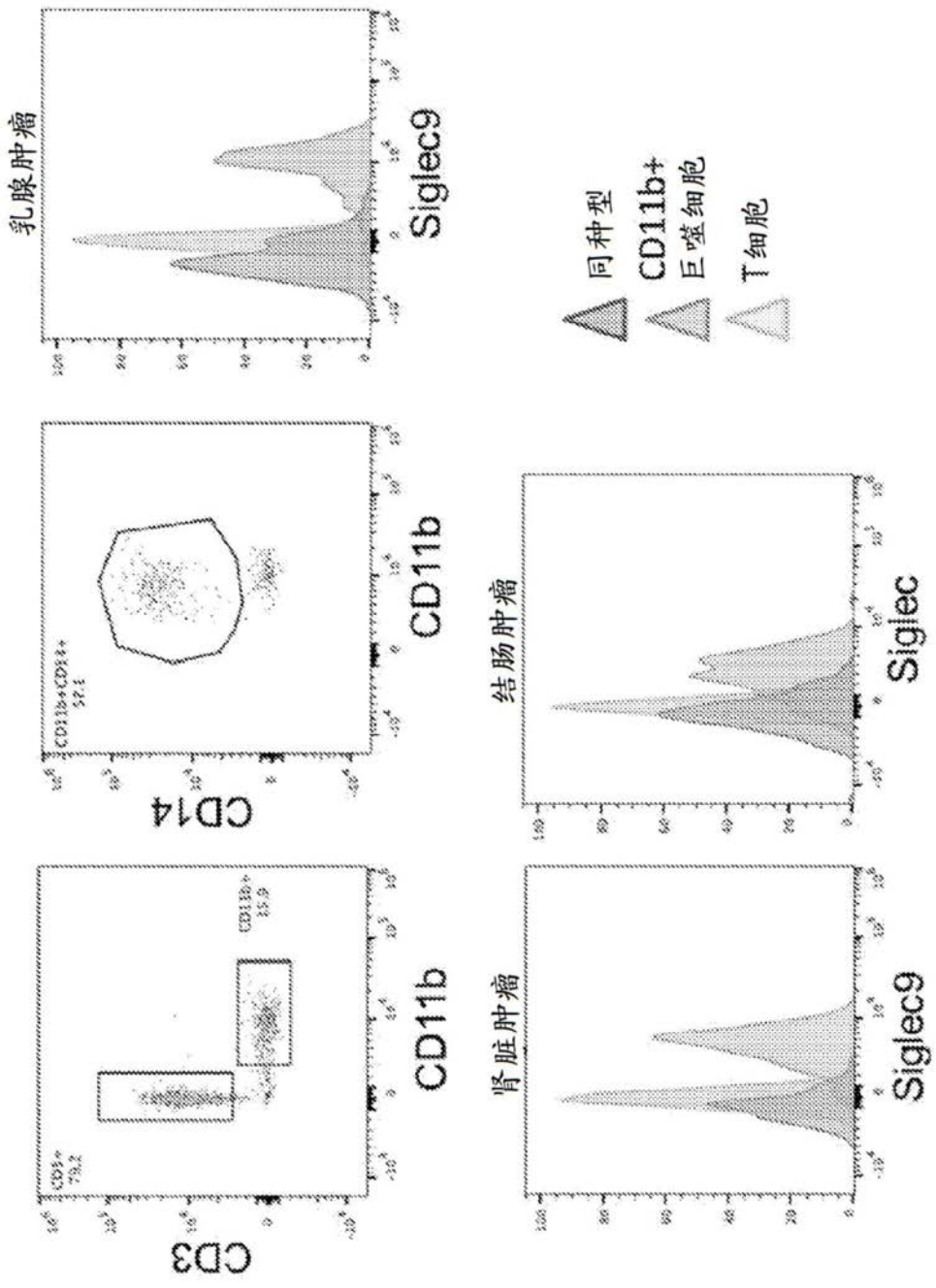

乳腺肿瘤
Siglec9
CD14
CD11b
CD3
CD11b
结肠肿瘤
Siglec
肾脏肿瘤
Siglec9
同种型
CD11b+
巨噬细胞
T细胞

图3

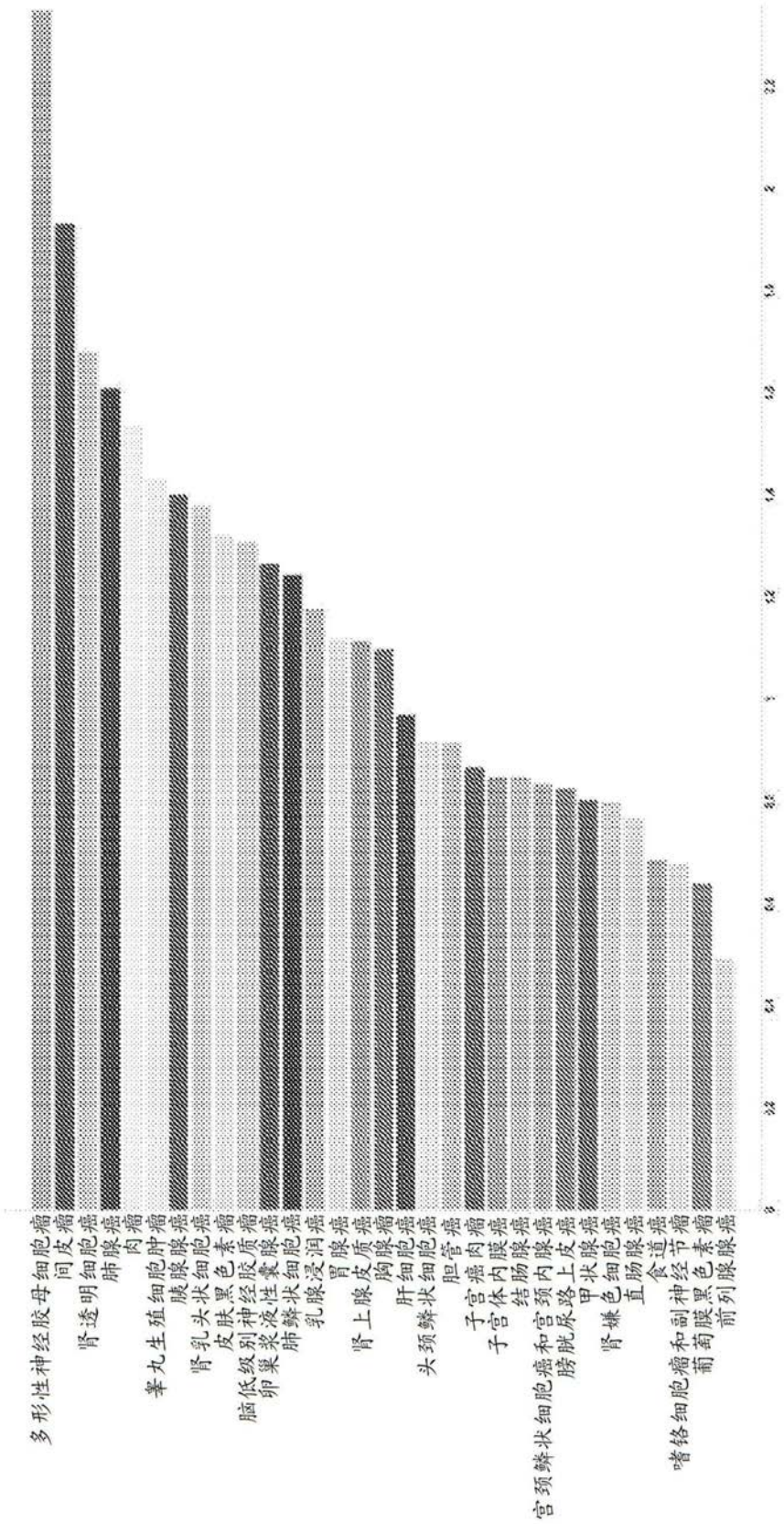

多形性神经胶母细胞瘤
间皮瘤
肾透明细胞癌
肺腺癌
肉瘤
睾丸生殖细胞肿瘤
胰腺腺癌
肾乳头状细胞癌
皮肤黑色素瘤
脑低级别神经胶质瘤
卵巢浆液性囊腺癌
肺鳞状细胞癌
乳腺浸润癌
胃腺癌
肾上腺皮质癌
胸腺瘤
肝细胞癌
头颈鳞状细胞癌
胆管癌
子宫癌肉瘤
子宫体内膜癌
结肠腺癌
宫颈鳞状细胞癌和宫颈内腺癌
膀胱尿路上皮癌
甲状腺癌
肾嫌色细胞癌
直肠腺癌
食道癌
嗜铬细胞瘤和副神经节瘤
葡萄膜黑色素瘤
前列腺腺癌

图4

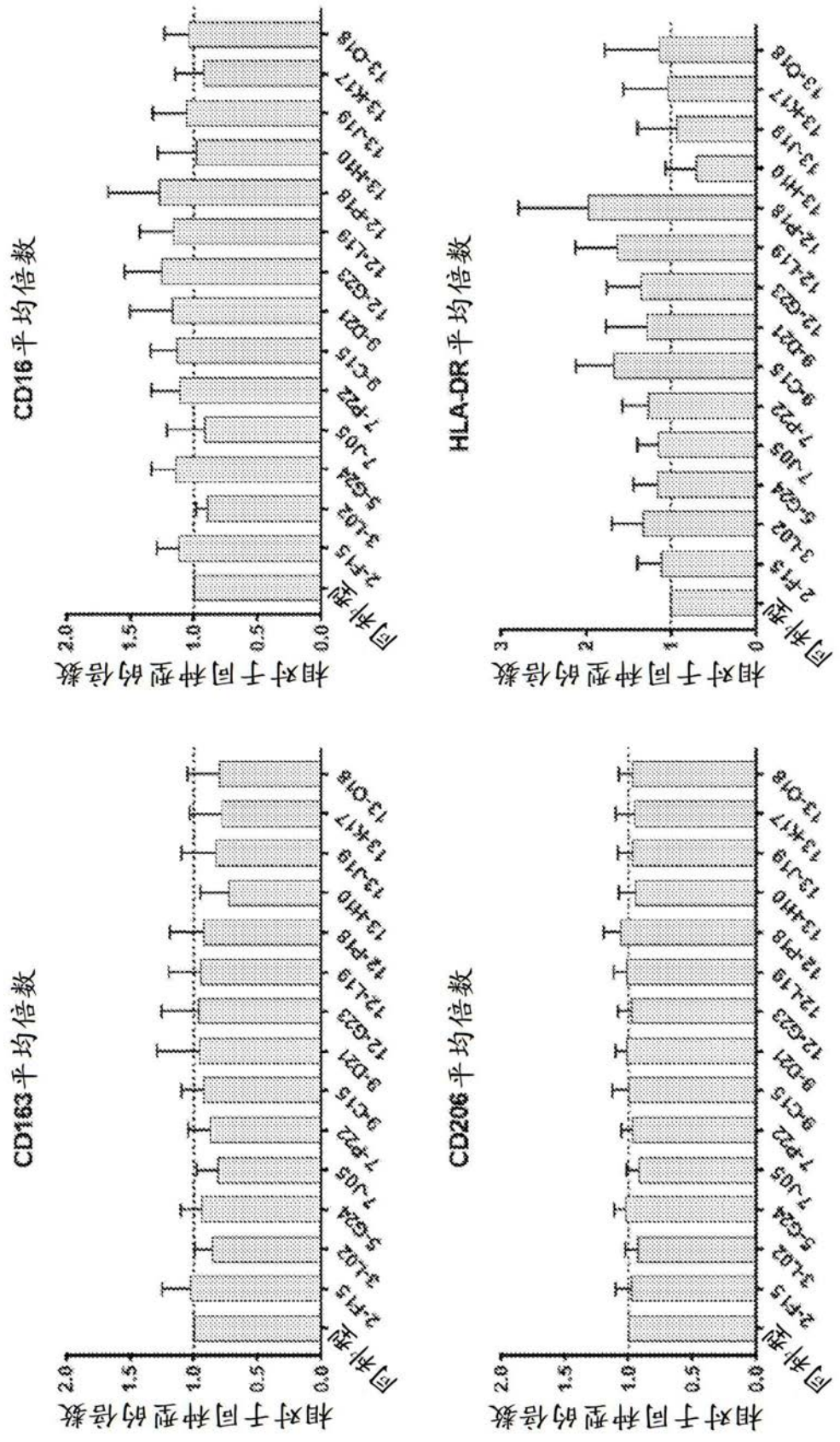

CD16平均倍数
HLA-DR平均倍数
CD163平均倍数
CD206平均倍数
相对于同种型的倍数
同种型
2-F15
3-L02
5-G24
7-J05
7-P22
9-C15
9-D21
12-G23
12-L19
12-P18
13-H10
13-J19
13-K17
13-O18

图5

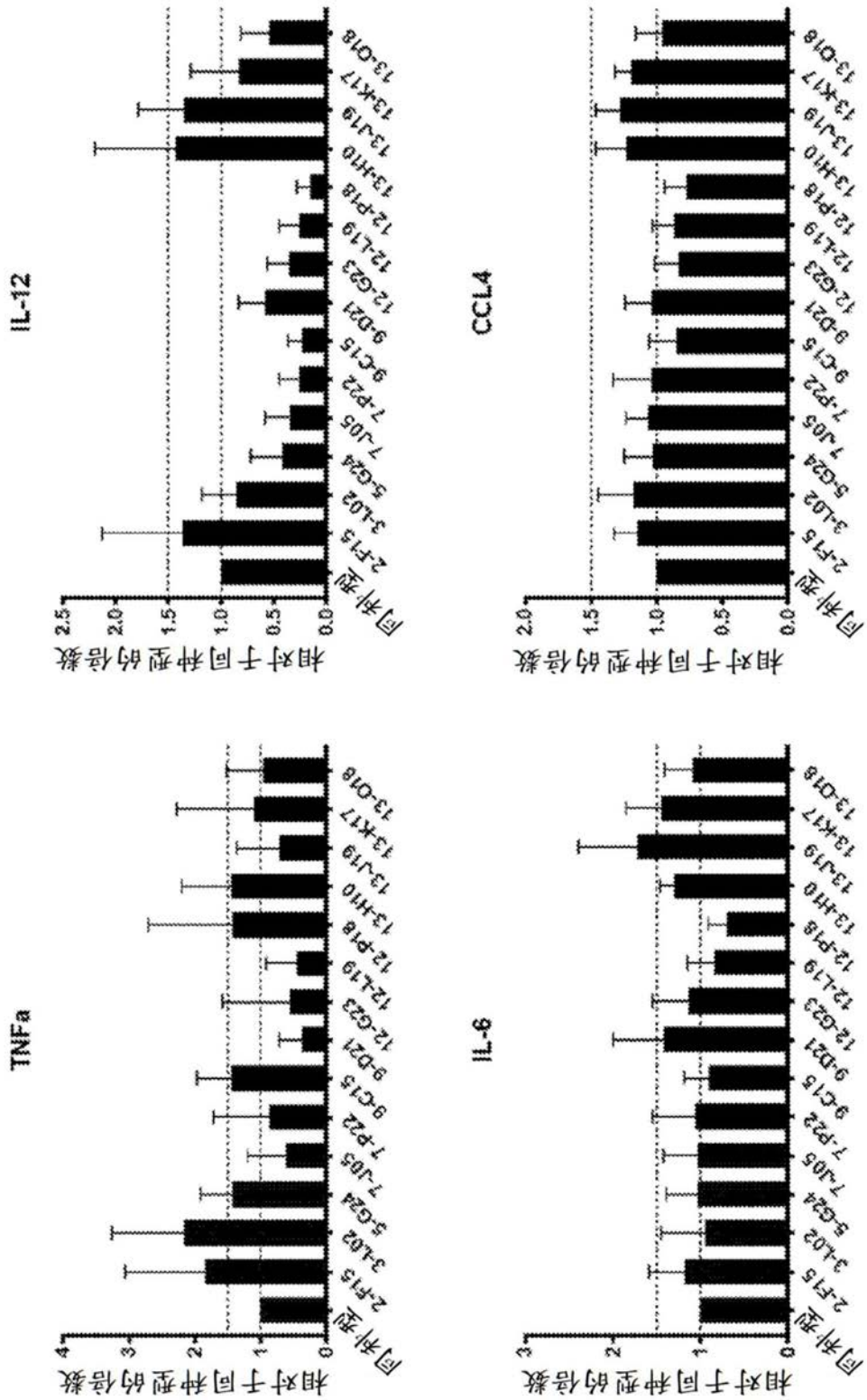

IL-12
CCL4
TNFa
IL-6
相对于同种型的倍数
同种型
2-F15
3-L02
5-G24
7-L05
7-P22
9-C15
9-D21
12-G23
12-L19
12-P18
13-H10
13-J19
13-K17
13-O18

图5(续)

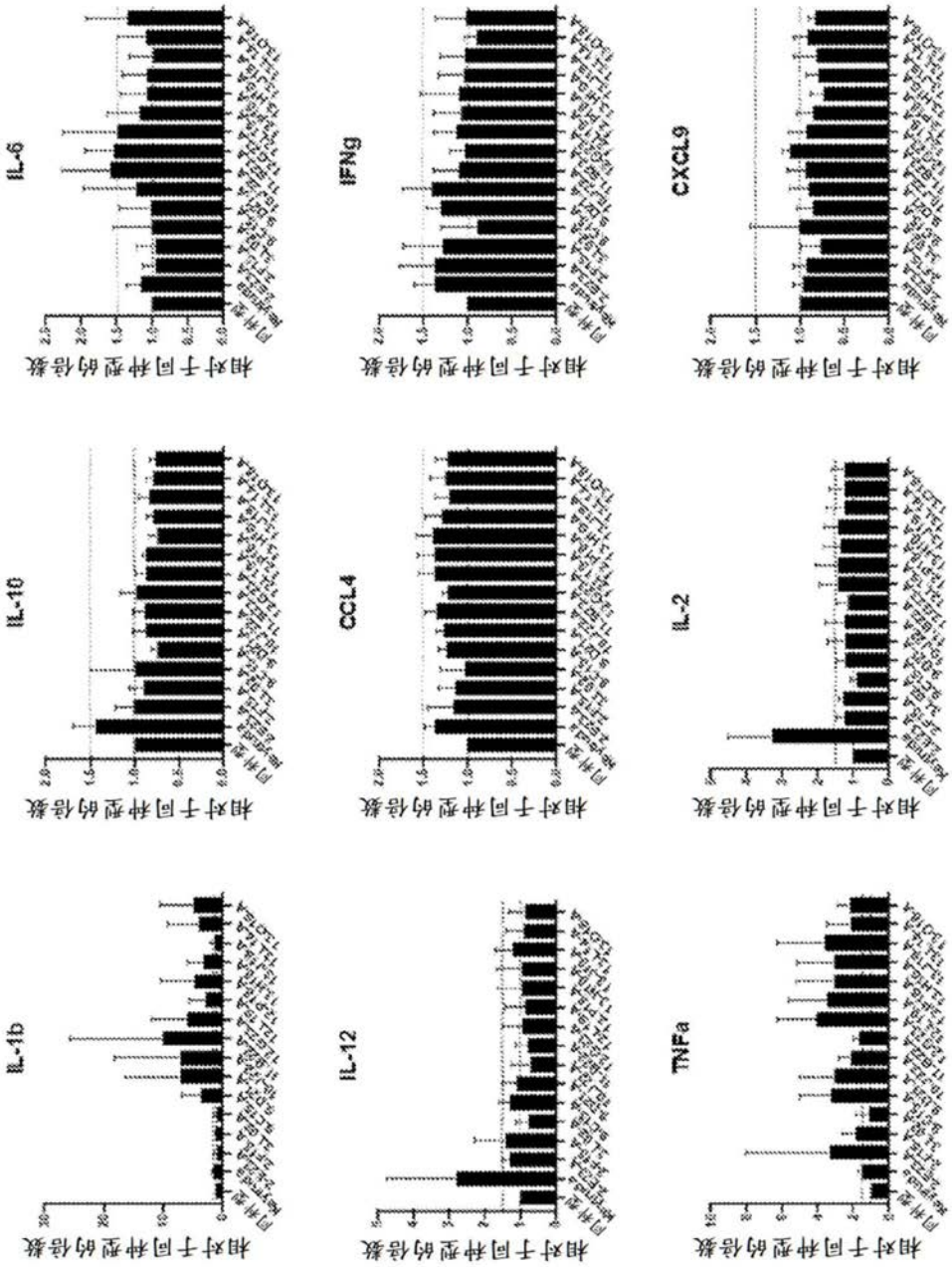


图6

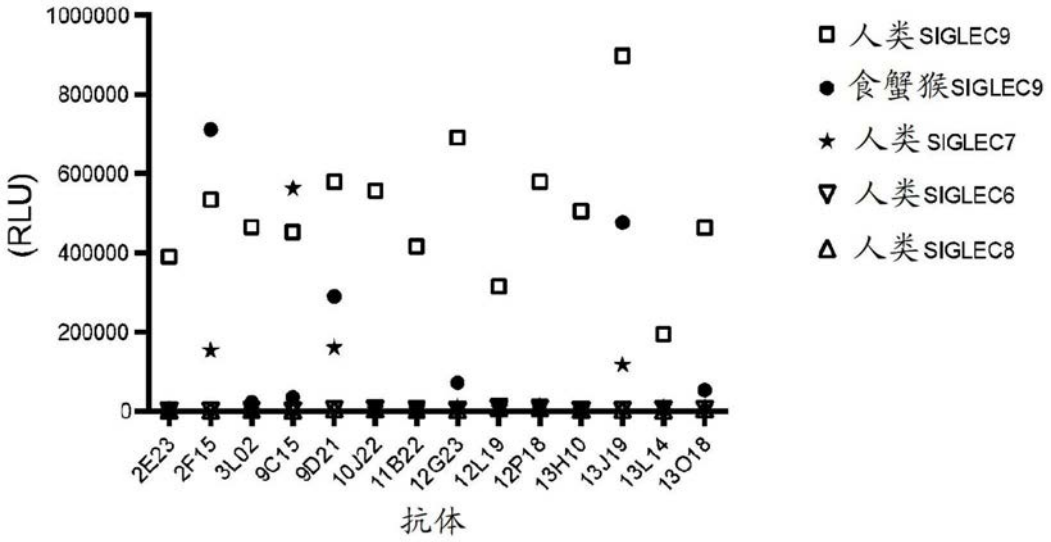

1000000
800000
600000
400000
200000
0
(RLU)
2E23
2F15
3L02
9C15
9D21
10J22
11B22
12G23
12L19
12P18
13H10
13J19
13L14
13O18
抗体
人类SIGLEC9
食蟹猴SIGLEC9
人类SIGLEC7
人类SIGLEC6
人类SIGLEC8

图7

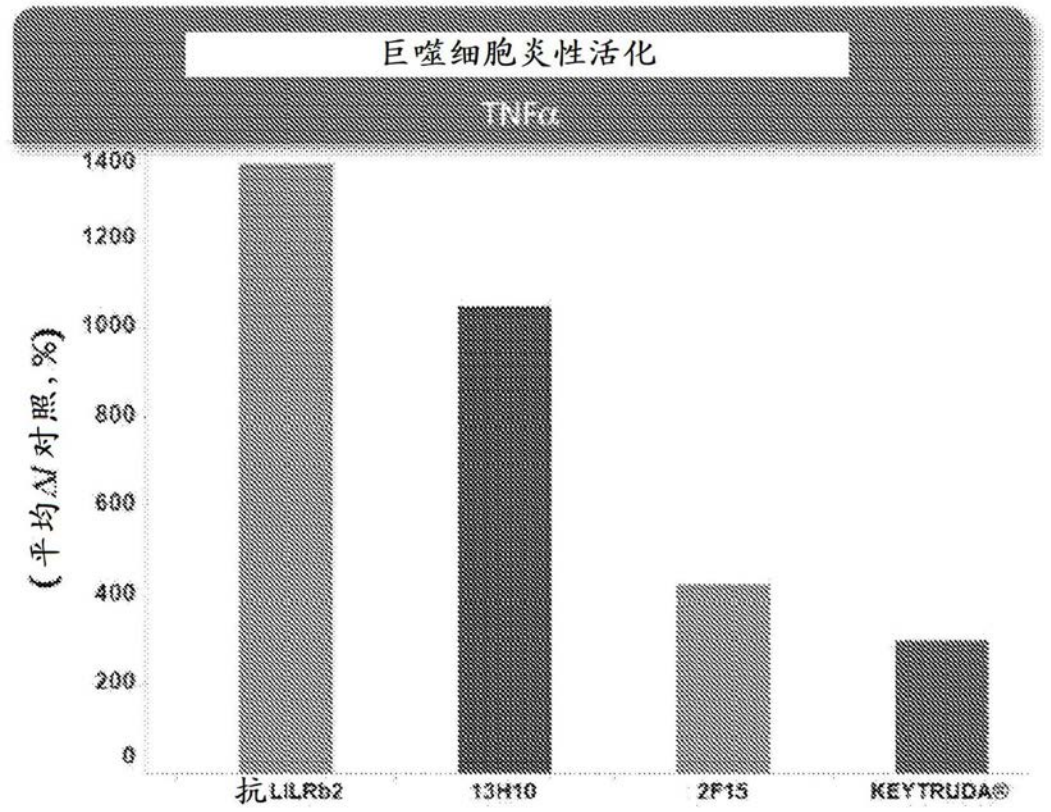

巨噬细胞炎性活化
TNFα
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
(平均ΔM对照，%)
抗LILRb2
13H10
2F15
KEYTRUDA®

图8

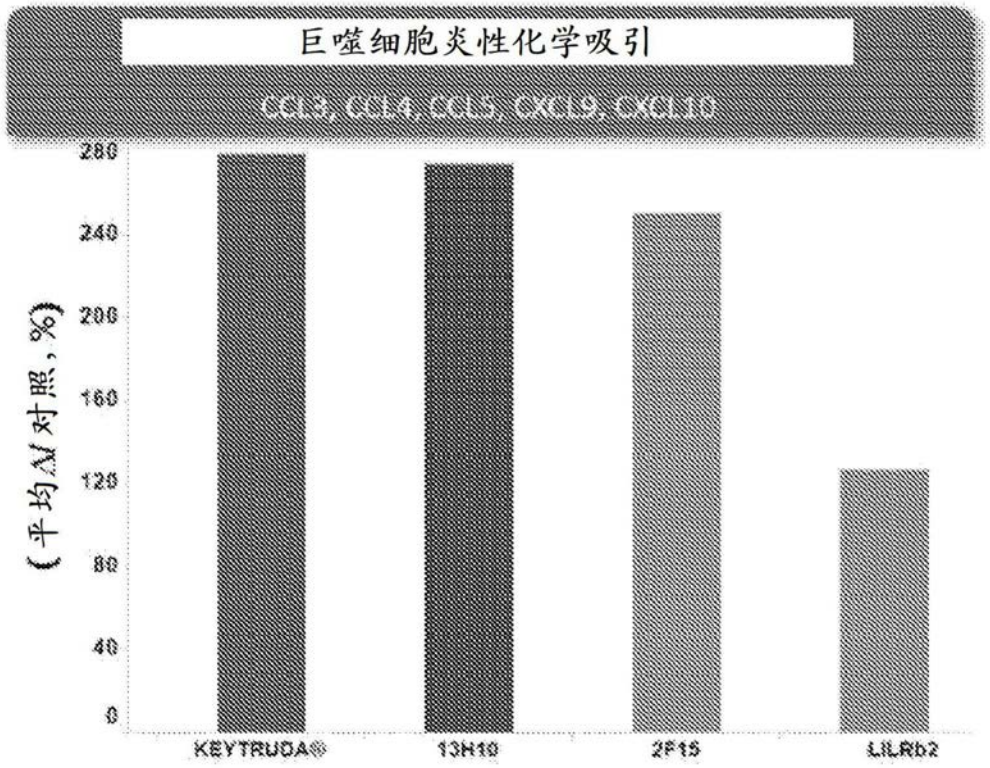

巨噬细胞炎性化学吸引
CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10
(平均ΔM对照，%)
280
240
200
160
120
80
40
0
KEYTRUDA®
13H10
2F15
LILRb2

图9

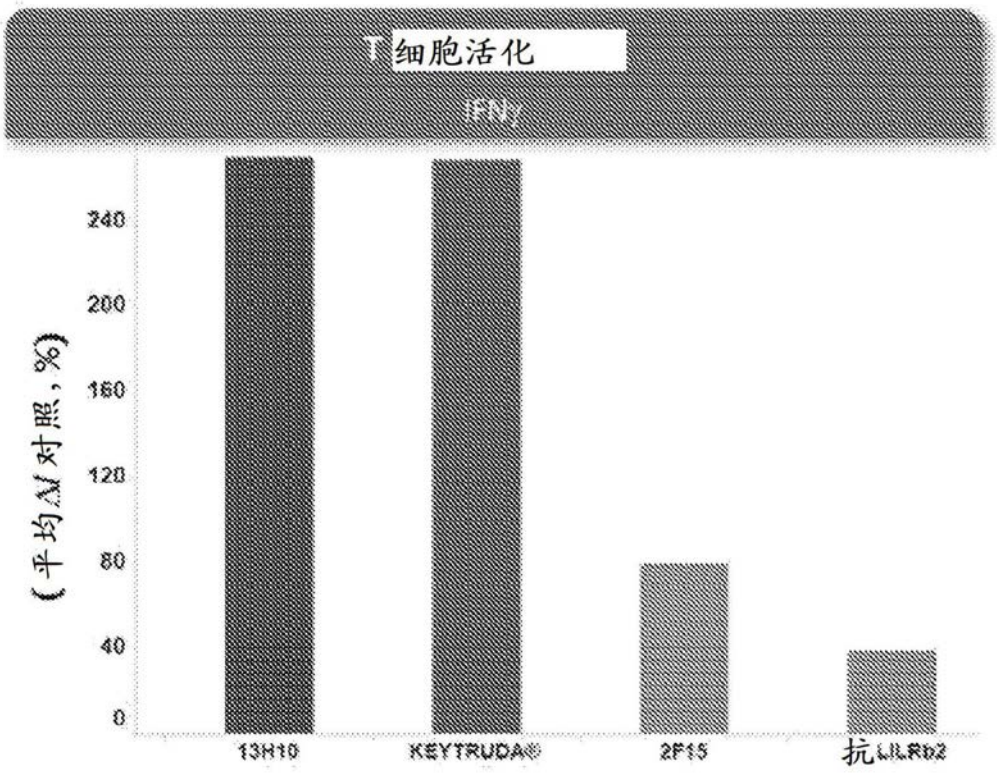

T细胞活化
IFNγ
(平均ΔM对照，%)
240
200
160
120
80
40
0
13H10
KEYTRUDA®
2F15
抗LILRb2

图10

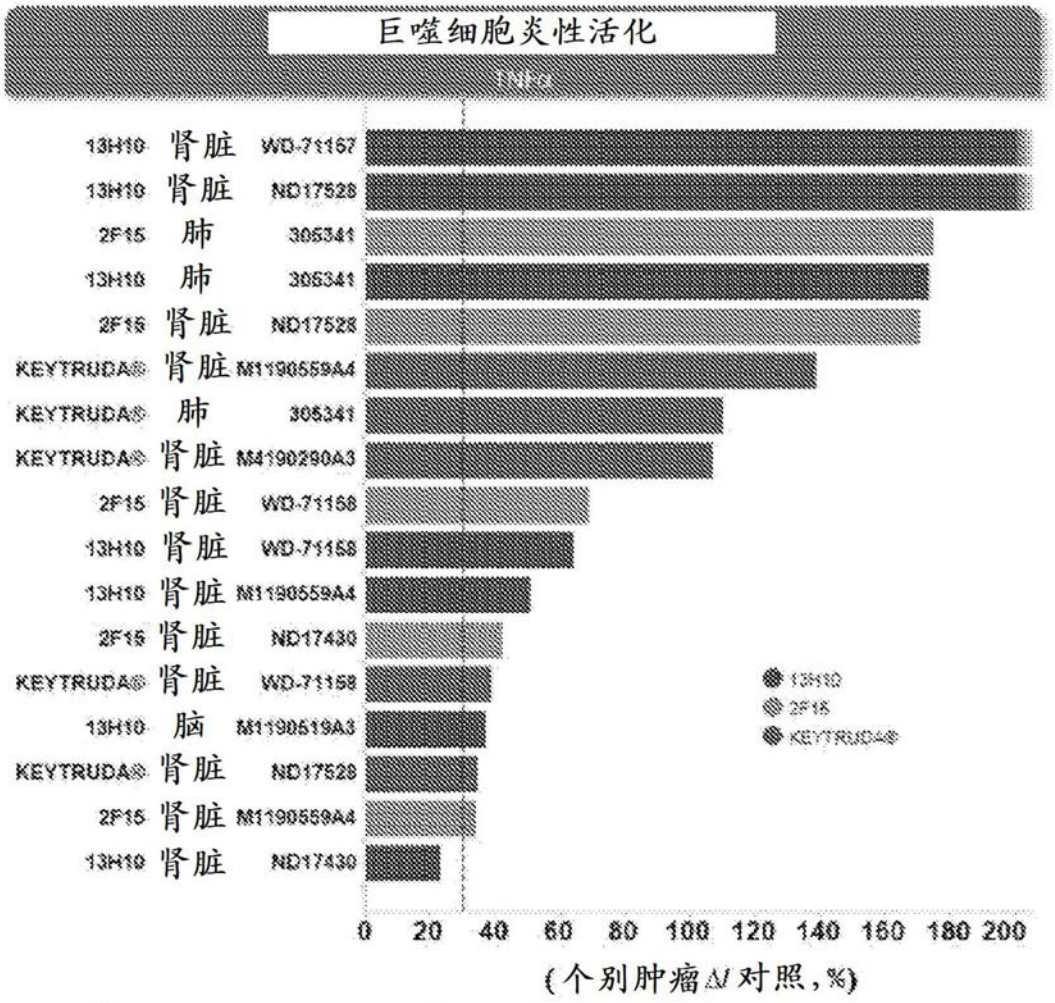

巨噬细胞炎性活化
TNFα
13H10 肾脏 WD-71167
13H10 肾脏 ND17528
2F15 肺 305341
13H10 肺 305341
2F15 肾脏 ND17528
KEYTRUDA® 肾脏 M1190559A4
KEYTRUDA® 肺 305341
KEYTRUDA® 肾脏 M4190290A3
2F15 肾脏 WD-71158
13H10 肾脏 WD-71158
13H10 肾脏 M1190559A4
2F15 肾脏 ND17430
KEYTRUDA® 肾脏 WD-71158
13H10 脑 M1190519A3
KEYTRUDA® 肾脏 ND17528
2F15 肾脏 M1190559A4
13H10 肾脏 ND17430
13H10
2F15
KEYTRUDA®
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200
(个别肿瘤Δ/对照,%)
*反应被测量为给定细胞因子或趋化因子的至少30%上调

图11

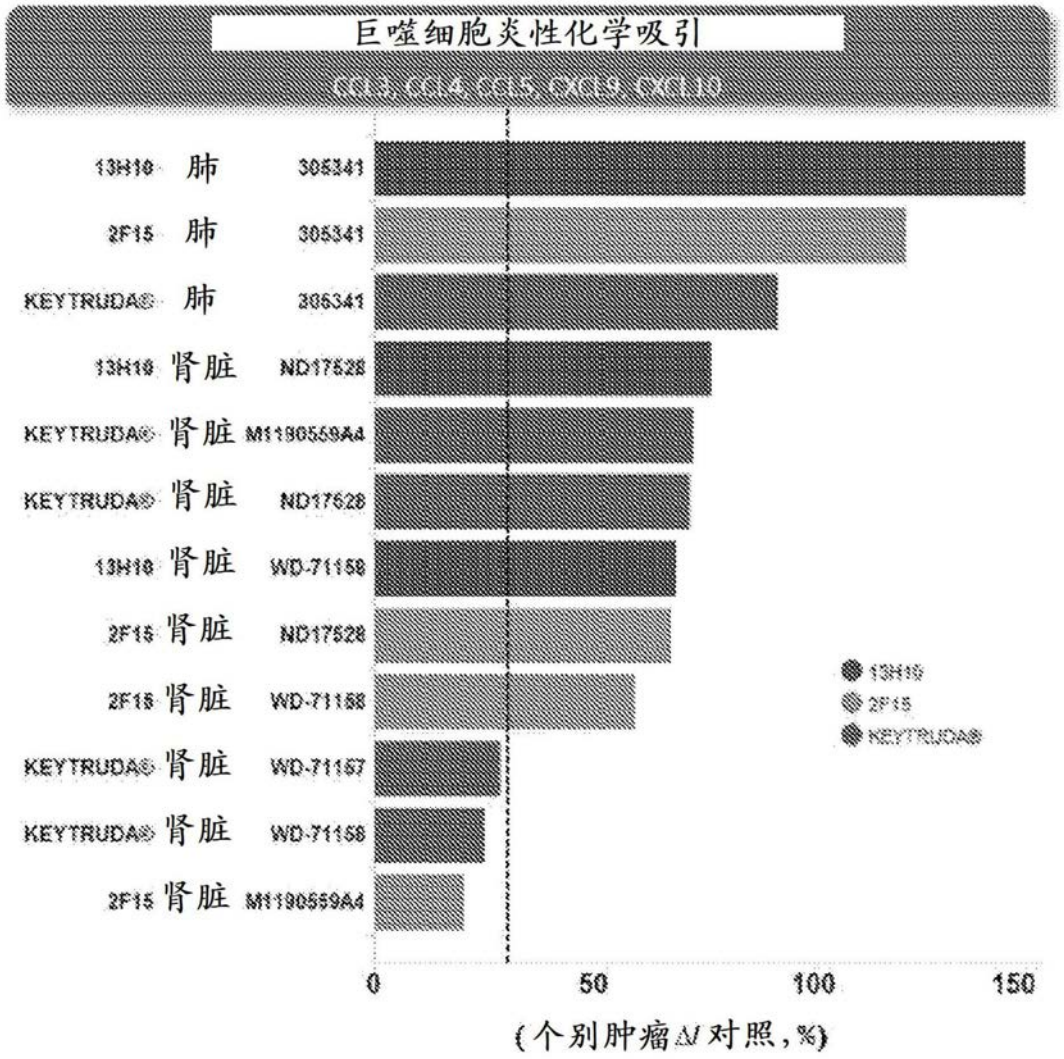

巨噬细胞炎性化学吸引
CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10
13H10 肺 305341
2F15 肺 305341
KEYTRUDA® 肺 305341
13H10 肾脏 ND17528
KEYTRUDA® 肾脏 M1190559A4
KEYTRUDA® 肾脏 ND17528
13H10 肾脏 WD-71158
2F15 肾脏 ND17528
2F15 肾脏 WD-71158
KEYTRUDA® 肾脏 WD-71157
KEYTRUDA® 肾脏 WD-71158
2F15 肾脏 M1190559A4
13H10
2F15
KEYTRUDA®
0
50
100
150
(个别肿瘤Δ/对照,%)
*反应被测量为给定细胞因子或趋化因子的至少30%上调

图12

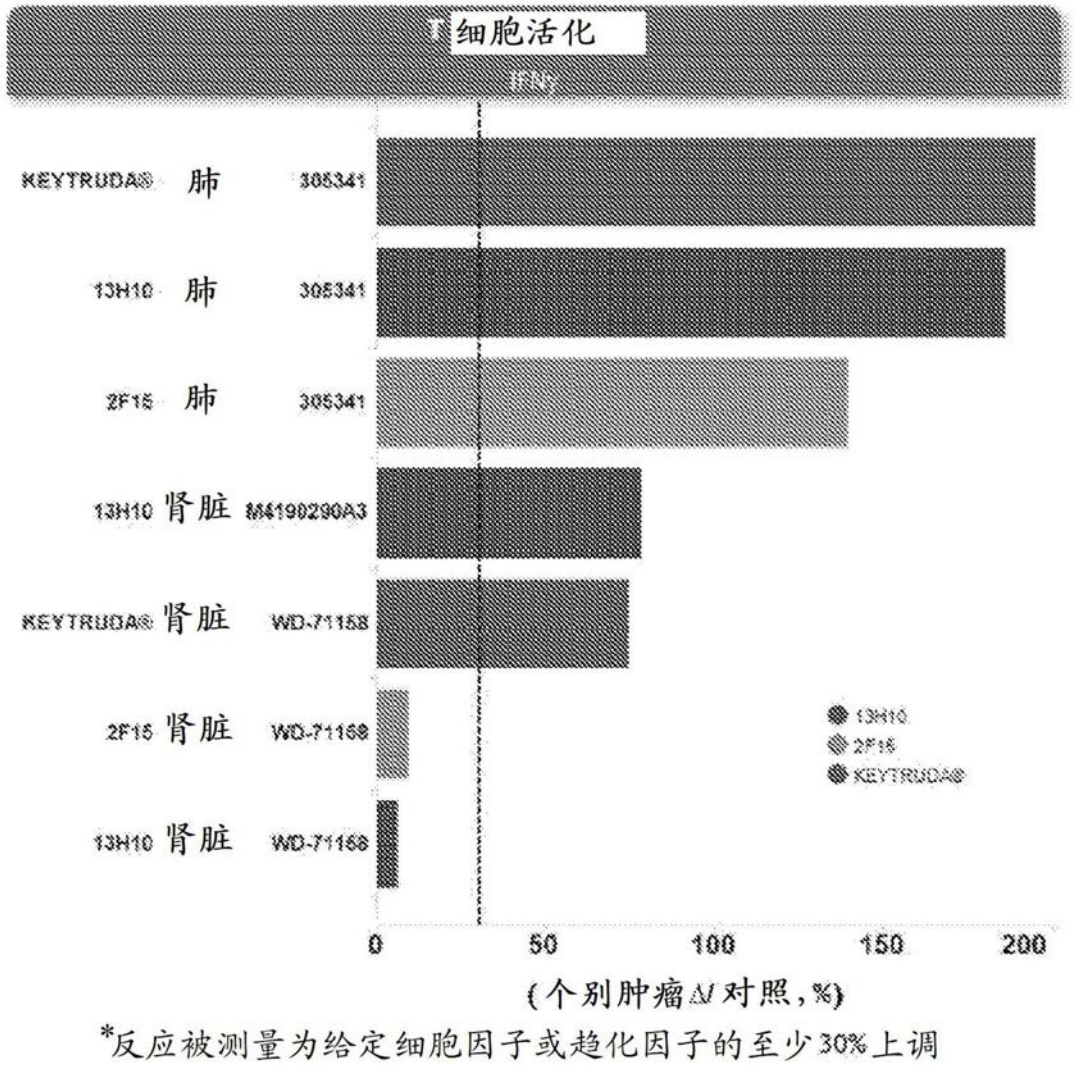

T细胞活化
IFNγ
KEYTRUDA® 肺 305341
13H10 肺 305341
2F15 肺 305341
13H10 肾脏 M4190290A3
KEYTRUDA® 肾脏 WD-71158
2F15 肾脏 WD-71158
13H10 肾脏 WD-71158
13H10
2F15
KEYTRUDA®
0
50
100
150
200
(个别肿瘤Δ/对照,%)
*反应被测量为给定细胞因子或趋化因子的至少30%上调

图13