



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110997013 B

(45) 授权公告日 2022. 09. 20

(21) 申请号 201880053140.1

(22) 申请日 2018.07.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110997013 A

(43) 申请公布日 2020.04.10

(30) 优先权数据
62/536,239 2017.07.24 US
62/660,902 2018.04.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/043343 2018.07.23

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/023148 EN 2019.01.31

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州

(72) 发明人 J·T·吉尔莱奥 D·马
W·奥尔森 R·塔瓦莱
G·瑟斯顿

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
11517

专利代理师 吴瑜 顾云峰

(51) Int.Cl.
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 49/16 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105163765 A,2015.12.16
CN 105163765 A,2015.12.16
CN 106103482 A,2016.11.09
CN 106068275 A,2016.11.02
James C. Knight等.Scaling-down
antibody radiolabeling reactions with
zirconium-89.《Dalton Trans.》.2016,第45卷
(续)

审查员 辛铁钢

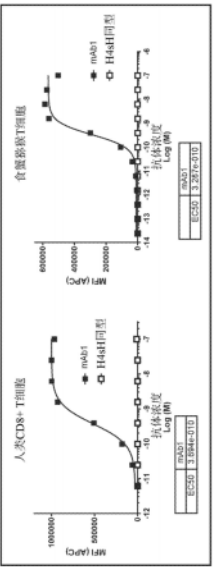
权利要求书6页 说明书52页
序列表8页 附图12页

(54) 发明名称

抗CD8抗体和其用途

(57) 摘要

本文提供抗CD8抗体、放射性标记的抗CD8抗体、荧光标记的抗CD8抗体以及其在成像中的用途。包括检测个体或样品中CD8蛋白的存在的的方法。



[接上页]

(56) 对比文件

Maria J W D Vosjan等.Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine.《nature protocols》.2010,第5卷(第4期),

Richard Tavaré等.Engineered antibody fragments for immuno-PET imaging of endogenous CD8⁺ T cells in vivo.《PNAS》

.2014,第111卷(第3期),

Richard Tavaré等.An Effective Immuno-PET Imaging Method to Monitor CD8-Dependent Responses to Immunotherapy.《Cancer Res》.2015,第76卷

Danielle J. Vugts等.Comparison of the octadentate bifunctional chelator DF0-pPhe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DF0-pPhe-NCS for ⁸⁹Zr-immuno-PET.《Eur J Nucl Med Mol Imaging》.2016,第44卷

1. 一种结合到CD8的分离单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段包含重链可变区HCVR和轻链可变区LCVR,所述HCVR包含:SEQ ID NO:4的重链互补决定区HCDR1氨基酸序列,SEQ ID NO:6的HCDR2氨基酸序列,以及SEQ ID NO:8的HCDR3氨基酸序列;并且所述LCVR包含:SEQ ID NO:12的轻链互补决定区LCDR1氨基酸序列,SEQ ID NO:14的LCDR2氨基酸序列,以及SEQ ID NO:16的LCDR3氨基酸序列。

2. 根据权利要求1的分离单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段展现以下特征中的一种或多种:

- (a) 是完全人类单克隆抗体;
- (b) 如通过表面等离子体共振测量,以等于或低于 3.5×10^{-8} M的 K_D 结合到CD8;
- (c) 结合到人类CD8 α ;
- (d) 抑制活化CD8 T细胞中的IFN γ 产生;
- (e) 抑制活化T细胞中的转录因子活化子蛋白AP-1;以及
- (f) 与人类和猴CD8交叉反应。

3. 根据权利要求1或2所述的分离抗体,其包含SEQ ID NO:2的HCVR氨基酸序列。

4. 根据权利要求1或2所述的分离抗体,其包含SEQ ID NO:10的LCVR氨基酸序列。

5. 根据权利要求1或2所述的分离抗体,其包含SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

6. 一种医药组合物,其包含治疗有效量的一种或多种根据权利要求1至5中任一项所述的分离单克隆抗体或其抗原结合片段,以及一种或多种医药学上可接受的赋形剂。

7. 一种核酸分子,其编码根据权利要求1至5中任一项所述的结合到CD8的人类单克隆抗体或其片段。

8. 一种表达载体,其包含根据权利要求7所述的编码结合到CD8的人类单克隆抗体或其片段的核酸分子。

9. 一种宿主细胞,其含有根据权利要求8所述的表达载体。

10. 一种放射性标记的抗体缀合物,其包含根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段和正电子发射体。

11. 一种放射性标记的抗体缀合物,其包含根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段、螯合部分和正电子发射体。

12. 根据权利要求11所述的缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段共价键结到所述螯合部分L,所述螯合部分L具有式(A):

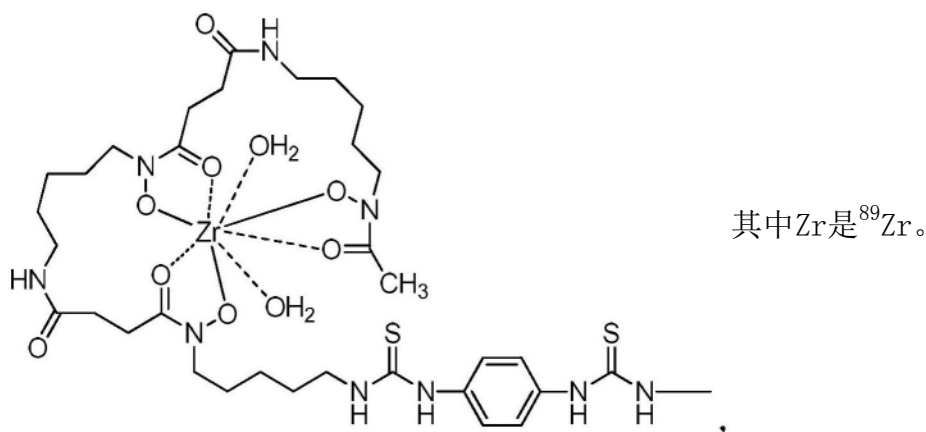


其中M是所述正电子发射体;并且z在每次出现时独立地是0或1;并且其中z中的至少一个是1。

13. 根据权利要求11或12所述的缀合物,其中所述螯合部分包含去铁敏。

14. 根据权利要求10至12中任一项所述的缀合物,其中所述正电子发射体是 ^{89}Zr 。

15. 根据权利要求12所述的缀合物,其中-L-M是



16. 根据权利要求10至12中任一项所述的缀合物, 其中抗体或其抗原结合片段共价键结到一个、两个或三个式(A)的部分。

17. 根据权利要求10至12中任一项所述的缀合物, 其中所述抗体具有选自由以下组成的组的一种或多种特性:

(a) 如通过表面等离子体共振测量, 以低于 3.5×10^{-8} M的结合解离平衡常数 K_D 结合人类CD8;

(b) 结合到人类CD8 α ;

(c) 抑制活化CD8 T细胞中的IFN γ 产生;

(d) 抑制活化T细胞中的转录因子活化子蛋白AP-1; 以及

(e) 与人类和猴CD8交叉反应。

18. 根据权利要求10至12中任一项所述的缀合物, 其中所述抗体包含SEQ ID NO: 2/10的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

19. 根据权利要求10至18中任一项所述的缀合物在制备用于对表达CD8的组织进行成像的试剂中的用途, 所述成像包含向所述组织施用根据权利要求10至18中任一项所述的放射性标记的抗体缀合物; 和通过正电子发射断层扫描PET成像使CD8表达可视化。

20. 根据权利要求10至18中任一项所述的缀合物在制备用于用检查点抑制剂疗法治疗实体肿瘤的药物中的用途, 所述治疗包含:

(a) 判定所述实体肿瘤包含CD8阳性T细胞; 和

(b) 如果所述肿瘤包含CD8阳性T细胞, 则向个体施用一个或多个剂量的所述检查点抑制剂疗法。

21. 根据权利要求20所述的用途, 其中步骤(a)包含:

(i) 向所述个体施用根据权利要求10至18中任一项所述的放射性标记的抗体缀合物; 和

(ii) 通过正电子发射断层扫描PET成像对所述肿瘤中所述放射性标记的抗体缀合物的定位进行成像, 其中所述肿瘤中所述放射性标记的抗体缀合物的存在指示所述肿瘤包含CD8阳性细胞。

22. 根据权利要求21所述的用途, 其中所述个体施用0.1到10mg/kg的所述放射性标记的抗体缀合物。

23. 根据权利要求21所述的用途, 其中T细胞功能不因所述放射性标记的抗体缀合物的施用而受损害。

24. 根据权利要求21或23所述的用途,其中所述放射性标记的抗体缀合物皮下或静脉内施用到所述个体。

25. 根据权利要求21所述的用途,其中PET成像在施用所述放射性标记的抗体缀合物后2到7天进行。

26. 根据权利要求20所述的用途,其中步骤(a)在步骤(b)之前进行。

27. 根据权利要求20所述的用途,其进一步包含:

(c) 在用至少一个剂量的抗肿瘤疗法治疗所述个体后重复步骤(a);并且其中所述肿瘤中所述放射性标记的抗体缀合物的定位的面积从基线增加指示所述抗肿瘤疗法的功效。

28. 根据权利要求21所述的用途,其中在施用所述抗肿瘤疗法后1到20周,所述个体施用所述放射性标记的抗体缀合物。

29. 根据权利要求20所述的用途,其进一步包含通过以下确定所述实体肿瘤是PD-1阳性的步骤:向有需要的个体施用放射性标记的抗PD-1缀合物,和通过PET成像对所述肿瘤中所述放射性标记的抗PD-1缀合物的定位进行成像,其中所述肿瘤中所述放射性标记的抗PD-1缀合物的存在指示所述肿瘤是PD-1阳性的。

30. 根据权利要求20所述的用途,其中所述抗肿瘤疗法选自由以下组成的组:PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂、CTLA-4抑制剂、TIM3抑制剂、BTLA抑制剂、TIGIT抑制剂、CD47抑制剂、GITR抑制剂、另一T细胞共抑制剂或配体的拮抗剂、吡咯啉-2,3-双加氧酶IDO抑制剂、血管内皮生长因子VEGF拮抗剂、Ang2抑制剂、转化生长因子 β TGF β 抑制剂、表皮生长因子受体EGFR抑制剂、CD20抑制剂、针对肿瘤特异性抗原的抗体、癌症疫苗、双特异性抗体、细胞毒素、化疗剂、环磷酰胺、放疗、IL-6R抑制剂、IL-4R抑制剂、IL-10抑制剂、IL-2、IL-7、IL-21、IL-15以及抗体-药物缀合物ADC。

31. 根据权利要求20所述的用途,其中所述抗肿瘤疗法选自由以下组成的组: REGN2810、BGB-A317、纳武单抗、匹立珠单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、MDX-1105、REGN3504、伊匹单抗、抗CD-28抗体、抗2B4抗体、抗LY108抗体、抗LAIR1抗体、抗ICOS抗体、抗CD160抗体、抗VISTA抗体、阿柏西普、贝伐单抗、兰尼单抗、舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼、内瓦单抗、埃罗替尼、西妥昔单抗、利妥昔单抗、抗CA9抗体、抗CA125抗体、抗黑素瘤相关抗原3MAGE3抗体、抗癌胚抗原CEA抗体、抗波形蛋白抗体、抗肿瘤-M2-PK抗体、抗前列腺特异性抗原PSA抗体、抗粘蛋白-1抗体、抗MART-1抗体、抗CA19-9抗体、卡介苗、CD3 \times CD20双特异性抗体、PSMA \times CD3双特异性抗体、达卡巴嗪、替莫唑胺、环磷酰胺、多西他赛、小红莓、道诺霉素、顺铂、卡铂、吉西他滨、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、太平洋紫杉醇、长春新碱、放疗、沙瑞卢单抗、杜匹鲁单抗、抗CD19-DM4 ADC以及抗DS6-DM4 ADC。

32. 根据权利要求20所述的用途,其中所述抗肿瘤疗法选自由抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组。

33. 根据权利要求30所述的用途,其中所述PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂是抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中所述抗PD-1抗体或其抗原结合片段是REGN2810、纳武单抗或派姆单抗。

35. 根据权利要求33所述的用途,其中所述抗PD-1抗体或其抗原结合片段是REGN2810。

36. 根据权利要求30所述的用途,其中所述PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂是抗PD-L1

抗体或其抗原结合片段。

37. 根据权利要求36所述的用途,其中所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是阿特殊单抗、阿维鲁单抗或度伐单抗。

38. 根据权利要求20所述的用途,其中所述肿瘤选自以下组成的组:血癌、脑癌、肾细胞癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、肝细胞癌、骨癌、结肠癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、结肠直肠癌、间皮瘤、B细胞淋巴瘤以及黑素瘤。

39. 根据权利要求10至18中任一项所述的缀合物在制备药物中用途,所述药物用于预测患有实体肿瘤的个体中对抗肿瘤疗法的阳性反应的方法,所述方法包含:

向所述个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,确定所述实体肿瘤中CD8阳性细胞的存在;

其中CD8阳性细胞的存在预测对抗肿瘤疗法的阳性反应。

40. 根据权利要求10至18中任一项所述的缀合物在制备药物中用途,所述药物用于监测个体中肿瘤对抗肿瘤疗法的反应的方法,所述方法包含:

(a) 向所述个体施用一个或多个剂量的抗肿瘤疗法;和

(b) 在施用所述抗肿瘤疗法后1到20周向所述个体施用至少一个剂量的放射性标记的抗CD8抗体缀合物,以确定实体肿瘤中CD8阳性细胞的存在;

其中CD8阳性细胞的存在指示对所述抗肿瘤疗法的阳性反应。

41. 根据权利要求10至18中任一项所述的缀合物在制备药物中用途,所述药物用于预测或监测患有肿瘤的个体中抗肿瘤疗法的功效的方法,所述方法包含:

(a) 确定所述肿瘤中CD8阳性T细胞的水平;和

(b) 使CD8阳性T细胞的水平与成功的抗肿瘤疗法相关联;

其中超过某一阈值的升高水平预测或指示成功的抗肿瘤疗法。

42. 根据权利要求10至18中任一项所述的缀合物在制备药物中用途,所述药物用于监测随时间推移肿瘤中T细胞存在的方法,所述方法包含:

(a) 在第一时间点向患有所述肿瘤的个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,并且确定所述肿瘤中CD8阳性T细胞的存在;

(b) 向所述个体施用一个或多个剂量的抗肿瘤疗法;以及

(c) 在施用所述抗肿瘤疗法后1到20周,在第二时间点向所述个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,并且确定所述肿瘤中CD8阳性T细胞的存在;

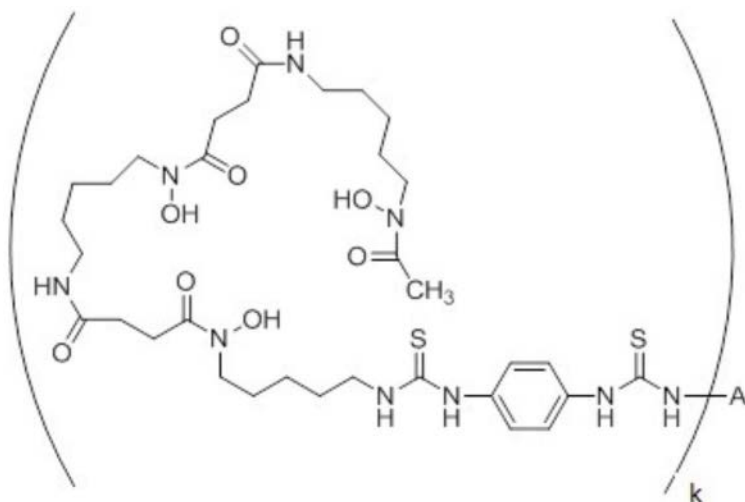
其中所述肿瘤中T细胞的存在指示对所述抗肿瘤疗法的阳性反应。

43. 根据权利要求42所述的用途,其中步骤(c)在用所述抗肿瘤疗法进行的治疗过程中重复。

44. 根据权利要求42所述的用途,其中所述第一时间点在(b)之前出现。

45. 根据权利要求42所述的用途,其中将根据(a)的所述CD8阳性T细胞与根据(c)的所述CD8阳性T细胞进行比较,并且随时间推移CD8阳性T细胞的增加指示对所述抗肿瘤疗法的阳性反应。

46. 一种式(III)化合物,

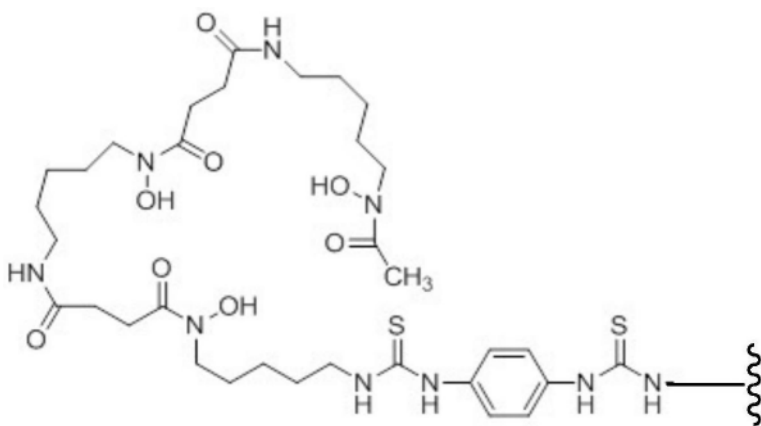


其中A是结合CD8的抗体或其抗原结合片段,并且k是1到30的整数,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区HCVR和轻链可变区LCVR,所述HCVR包含:SEQ ID NO:4的重链互补决定区HCDR1氨基酸序列,SEQ ID NO:6的HCDR2氨基酸序列,以及SEQ ID NO:8的HCDR3氨基酸序列;并且所述LCVR包含:SEQ ID NO:12的轻链互补决定区LCDR1氨基酸序列,SEQ ID NO:14的LCDR2氨基酸序列,以及SEQ ID NO:16的LCDR3氨基酸序列。

47. 根据权利要求46所述的化合物,其中k是1或2。

48. 一种抗体缀合物,其包含(i)结合CD8的抗体或其抗原结合片段和(ii)一种或多种螯合部分,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区HCVR和轻链可变区LCVR,所述HCVR包含:SEQ ID NO:4的重链互补决定区HCDR1氨基酸序列,SEQ ID NO:6的HCDR2氨基酸序列,以及SEQ ID NO:8的HCDR3氨基酸序列;并且所述LCVR包含:SEQ ID NO:12的轻链互补决定区LCDR1氨基酸序列,SEQ ID NO:14的LCDR2氨基酸序列,以及SEQ ID NO:16的LCDR3氨基酸序列。

49. 根据权利要求48所述的抗体缀合物,其中所述螯合部分是



其中  是与所述抗体或其抗原结合片段的共价键。

50. 根据权利要求48所述的抗体缀合物,其中所述缀合物的螯合部分与抗体的比率是1.0到2.0。

51. 根据权利要求48所述的抗体缀合物,其中螯合部分与抗体的比率是约1.7。

52. 一种抗体缀合物, 其包含 (i) 结合CD8的抗体或其抗原结合片段和 (ii) 荧光染料, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区HCVR和轻链可变区LCVR, 所述HCVR包含: SEQ ID NO: 4的重链互补决定区HCDR1氨基酸序列, SEQ ID NO: 6的HCDR2氨基酸序列, 以及SEQ ID NO: 8的HCDR3氨基酸序列; 并且所述LCVR包含: SEQ ID NO: 12的轻链互补决定区LCDR1氨基酸序列, SEQ ID NO: 14的LCDR2氨基酸序列, 以及SEQ ID NO: 16的LCDR3氨基酸序列。

53. 根据权利要求52所述的抗体缀合物, 其中所述荧光染料是近红外染料。

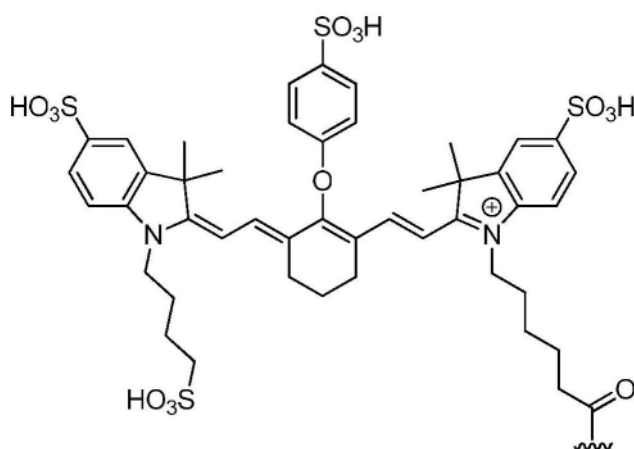
54. 根据权利要求53所述的抗体缀合物, 其中所述染料是IRDye800CW或VivoTag680XL。

55. 根据权利要求52所述的抗体缀合物, 其中所述抗体缀合物具有以下结构:

$\text{Ab} - [\text{D}]_n$,

其中Ab是抗CD8抗体或其抗原结合片段, D是荧光染料, 并且n是1到4的整数。

56. 根据权利要求55所述的抗体缀合物, 其中D是:



或其医药学上可接受的盐。

57. 根据权利要求10-18中任一项所述的缀合物在制备用于对表达CD8的组织进行成像的试剂中的用途, 所述成像包含:

(a) 使抗体缀合物与所述组织接触, 所述抗体缀合物包含: (i) 结合CD8的抗体或其抗原结合片段和 (ii) 荧光染料; 和

(b) 通过使用荧光成像对所述组织进行成像, 使CD8表达可视化, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区HCVR和轻链可变区LCVR, 所述HCVR包含: SEQ ID NO: 4的重链互补决定区HCDR1氨基酸序列, SEQ ID NO: 6的HCDR2氨基酸序列, 以及SEQ ID NO: 8的HCDR3氨基酸序列; 并且所述LCVR包含: SEQ ID NO: 12的轻链互补决定区LCDR1氨基酸序列, SEQ ID NO: 14的LCDR2氨基酸序列, 以及SEQ ID NO: 16的LCDR3氨基酸序列。

抗CD8抗体和其用途

技术领域

[0001] 本公开涉及特异性结合到糖蛋白CD8的抗体和抗体的抗原结合片段、使用这些抗体的治疗和诊断方法、放射性标记的抗CD8抗体、荧光标记的抗CD8抗体以及其在成像中的用途。

[0002] 序列表

[0003] 序列表的正式副本通过EFS-Web以电子方式与说明书同时提交,序列表呈ASCII格式化序列表,文件名为10357W001_SEQ_LIST_ST25.txt,创建日期为2018年7月23日,并且大小是约12千字节。这一ASCII格式化文件中所含的序列表是说明书的一部分并且以全文引用的方式并入本文中。

背景技术

[0004] T细胞共刺激和共抑制分子(统称为共信号传导分子)在调节T细胞活化、亚群分化、效应功能和存活中发挥关键作用(Chen等人2013, Nature Rev.Immunol.13:227-242)。在T细胞受体识别抗原呈递细胞上的同源肽-MHC复合物之后,共信号传导受体与T细胞受体在免疫突触处共定位,在免疫突触中其与TCR信号传导协同作用以促进或抑制T细胞活化和功能(Flies等人2011,Yale J.Biol.Med.84:409-421)。最终免疫反应由共刺激和共抑制信号(“免疫检查点”)之间的平衡调节(Pardoll 2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。CD8,一种细胞表面糖蛋白,使T细胞受体-MHC-I相互作用稳定,并且通过对CD3相关免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(Lck)磷酸化而引发胞内信号传导,以便活化。

[0005] 在人类中,CD8主要在细胞毒性T淋巴细胞上表达,但也在树突状细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞的亚群上表达。糖蛋白由两种同种型 α 和 β (其由不同基因编码)组成,并且表达为 $\alpha\alpha$ 同二聚体或 $\alpha\beta$ 异二聚体。 $\alpha\beta$ 异二聚体更普遍。

[0006] 免疫正电子发射断层扫描(PET)是一种诊断成像工具,其利用用正电子发射体标记的单克隆抗体,将抗体的靶向特性与正电子发射断层扫描摄像机的灵敏度组合。参见例如The Oncologist,12:1379(2007); Journal of Nuclear Medicine,52(8):1171(2011)。免疫PET使得能够可视化显示和定量体内抗原和抗体积聚,并且因此可以充当用于诊断和补充疗法的重要工具。举例来说,免疫PET可以帮助选择针对特定疗法的潜在个体候选人,以及对治疗的监测。

[0007] 需要用于预测和监测个体对特定抗肿瘤疗法的适合性或反应性的诊断工具。

发明内容

[0008] 本文提供了结合CD8的单克隆抗体和其抗原结合片段。抗体可以尤其适用于靶向表达CD8的免疫细胞,并且适用于调节CD8阳性T细胞活性。在某些实施例中,抗体适用于抑制或中和CD8阳性T细胞活性,例如抑制CD8阳性T细胞中的IFN γ 产生和/或抑制活化T细胞中的转录因子活化蛋白1(AP-1)。在一些实施例中,抗体和抗原结合片段适用于在体内结

合CD8。抗体适用于治疗与CD8阳性T细胞活化相关的疾病或病状。

[0009] 本文提供的抗体可以是全长的(例如,IgG1或IgG4抗体),或可以仅包含抗原结合部分(例如,Fab、F(ab')₂或scFv片段),并且可以经修饰以影响功能性,例如消除残余效应功能(Reddy等人,2000,J. Immunol.164:1925-1933)。

[0010] 在第一方面,本文提供了特异性结合到CD8的分离重组单克隆抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,抗体是完全人类的。

[0011] 示例性抗CD8抗体列于表1中,所述表提供重链和轻链互补决定区序列和重链和轻链可变区序列的氨基酸序列标识符和核酸序列标识符。

[0012] 还提供了包含HCVR的抗体或其抗原结合片段,所述HCVR包含 SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或其与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0013] 还提供了包含LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述LCVR包含 SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或其与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0014] 还提供了包含重链CDR1(HCDR1)的抗体或其抗原结合片段,所述重链CDR1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0015] 还提供了包含重链CDR2(HCDR2)的抗体或其抗原结合片段,所述重链CDR2包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0016] 还提供了包含重链CDR3(HCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述重链CDR3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0017] 还提供了包含轻链CDR1(LCDR1)的抗体或其抗原结合片段,所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0018] 还提供了包含轻链CDR2(LCDR2)的抗体或其抗原结合片段,所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0019] 还提供了包含轻链CDR3(LCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0020] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含HCDR3/LCDR3氨基酸序列对,其包含SEQ ID NO:8/16。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含在SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR氨基酸序列对内的CDR氨基酸序列。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含六个CDR氨基酸序列组合(HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3),其具有SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16。

[0021] 用于鉴别HCVR和LCVR氨基酸序列内的CDR的方法和技术是本领域众所周知的,并

且可以用于鉴别本文所公开的指定HCVR和/或 LCVR氨基酸序列内的CDR。可以用于鉴别CDR边界的示例性惯例包括例如Kabat定义、Chothia定义和AbM定义。一般来说,Kabat定义基于序列变异性,Chothia定义基于结构环区域的位置,并且AbM定义是Kabat和Chothia方法之间的折衷。参见例如Kabat,"Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani等人, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); 和Martin等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)。公共数据库也可用于鉴别抗体内的CDR序列。

[0022] 本文提供了具有修饰的糖基化模式的抗CD8抗体。在一些实施例中,去除不期望的糖基化位点的修饰可能是有用的,或缺少寡糖链上存在的岩藻糖部分的抗体,例如以增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(参见Shields等人(2002) JBC 277:26733)。在其它应用中,可以进行半乳糖基化的修饰,以便修饰补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0023] 本文提供了特异性结合到来自人类或其它物种的CD8的抗体和其抗原结合片段。在某些实施例中,抗体可以结合到人类CD8和/或猴 CD8。在某些实施例中,抗体结合到人类CD8 α 。

[0024] 在第二方面,本文提供了编码抗CD8抗体或其部分的核酸分子。举例来说,本文提供了编码SEQ ID NO:2的HCVR氨基酸序列的核酸分子;在某些实施例中,核酸分子包含SEQ ID NO:1的多核苷酸序列,或其与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。本文提供了编码SEQ ID NO:10的LCVR氨基酸序列的核酸分子;在某些实施例中,核酸分子包含SEQ ID NO:9的多核苷酸序列,或其与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。本文提供了编码表1中列出的 CDR氨基酸序列中的任一个的核酸分子;在某些实施例中,核酸分子包含选自表1中列出的CDR核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或其与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0025] 在相关方面,本文提供了重组表达载体,其能够表达包含抗CD8 抗体的重链或轻链可变区的多肽。举例来说,本文提供了重组表达载体,其包含上文所提及的核酸分子中的任一个,即编码如表1中所列举的HCVR、LCVR和/或CDR序列中的任一个的核酸分子。还提供了重组表达载体,其能够表达包含抗CD8抗体的重链或轻链的多肽。举例来说,本文涵盖重组表达载体,其包含上文所提及的核酸分子中的任一个,即编码如表1中所列举的重链或轻链序列中的任一个的核酸分子。在本公开的范围内还包括的是引入了此类载体的宿主细胞,以及通过在允许抗体或抗体片段产生的条件下培养宿主细胞,并且回收如此产生的抗体和抗体片段,来产生抗体或其部分的方法。

[0026] 在第三方面,本文提供了医药组合物,其包含特异性结合CD8的重组人类抗体或其片段,和医药学上可接受的载剂。在相关方面,组合物是抗CD8抗体与第二治疗剂的组合。在一个实施例中,第二治疗剂是有效地与抗CD8抗体组合的任何药剂。可有效地与抗CD8抗体组合的示例性药剂包括但不限于结合和/或调节活化T细胞信号传导的其它药剂(包括其它抗体或其抗原结合片段等)和/或不直接结合CD8但仍然调节免疫细胞活化的药剂。本公开其它地方提供了涉及本文提供的抗CD8抗体的另外组合疗法和共配制物。

[0027] 在第四方面,提供了调节个体的免疫反应的方法,所述方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的抗CD8抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,所述方法减弱个体的免

疫反应,例如减少IFN γ 在活化 CD8阳性T细胞中的产生和/或抑制活化T细胞中的转录因子活化子蛋白(AP-1)。所述方法包含向个体施用有效量的结合CD8的抗体或其片段。在一个实施例中,本文提供了减少个体的T细胞活化的方法,所述方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的抗CD8抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,有需要的个体可能罹患疾病或病症,如感染或自身免疫疾病。

[0028] 在第五方面,本文提供了使用本文提供的抗CD8抗体或抗体的抗原结合部分,用于治疗个体的治疗疾病或病症,如感染或自身免疫疾病的治疗方法,其中所述治疗方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的包含本文提供的抗体或抗体片段的医药组合物。所治疗的病症是通过抑制CD8阳性T细胞活性或信号传导而得到改善、缓解、抑制或预防的任何疾病或病状。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段与第二治疗剂组合施用给有需要的个体。第二治疗剂可以选自由以下组成的组:针对另一T细胞共抑制剂的抗体、针对肿瘤细胞抗原的抗体、针对T细胞受体的抗体、针对病毒感染细胞上的表位的抗体、细胞毒性剂、抗癌药物、抗病毒药物、抗炎药物(例如,皮质类固醇)、化疗剂、放疗疗法、免疫抑制剂和本领域中已知的任何其它药物或疗法。在某些实施例中,如果可能发生与本文提供的抗体或其抗原结合片段相关的任何可能副作用,则所述第二治疗剂可以是有助于抵消或减轻此类副作用的药剂。

[0029] 抗体或其片段可以皮下、静脉内、皮内、腹膜内、口服、肌肉内或颅内施用。抗体或其片段可以以约0.1mg/kg个体体重到约100mg/kg 个体体重的剂量施用。

[0030] 本文还提供了抗CD8抗体或其抗原结合片段的用途,其用于制造用于治疗疾病或病症的药剂,所述疾病或病症受益于CD8结合和/或信号传导的阻断,或受益于CD8阳性T细胞活化减低。

[0031] 在另一方面,本文提供了放射性标记的抗CD8抗体缀合物,以用于免疫PET成像。缀合物包含抗CD8抗体或其抗原结合片段、螯合部分和正电子发射体。

[0032] 本文提供了用于合成所述缀合物的方法和适用于其的合成中间体。

[0033] 本文提供了对表达CD8的组织进行成像的方法,所述方法包含将本文所描述的放射性标记的抗CD8抗体缀合物施用于组织;和通过正电子发射断层扫描(PET)成像来使CD8表达可视化。

[0034] 本文提供了对包含表达CD8的细胞(例如,表达CD8的瘤内淋巴细胞)或CD8阳性T细胞的组织进行成像的方法,所述方法包含将本文所描述的放射性标记的抗CD8抗体缀合物施用于组织,和通过PET 成像使CD8表达可视化。

[0035] 本文提供了用于检测组织中的CD8的方法,所述方法包含将本文所描述的放射性标记的抗CD8抗体缀合物施用于组织;和通过PET成像使CD8表达可视化。在一个实施例中,组织存在于人类个体中。在某些实施例中,个体是非人类哺乳动物。在某些实施例中,个体患有疾病或病症,如癌症、炎性疾病或感染。

[0036] 本文提供了用于检测组织中的CD8的方法,所述方法包含使组织与本文所描述的与荧光分子缀合的抗CD8抗体接触;和通过荧光成像使CD8表达可视化。

[0037] 本文提供了用于鉴别个体适合于抗肿瘤疗法的个体的方法,所述方法包含选择患有实体肿瘤的个体,施用本文所描述的放射性标记的抗CD8抗体缀合物,和通过PET成像使肿瘤中所施用的放射性标记的抗体缀合物可视化,其中肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的

存在将个体鉴别为适合于抗肿瘤疗法。

[0038] 本文提供了治疗肿瘤的方法,所述方法包含选择患有实体肿瘤的个体;确定所述实体肿瘤是CD8阳性的;和向有需要的个体施用抗肿瘤疗法。在某些实施例中,所述抗肿瘤疗法包含PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂(例如,抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体),所述抗体是检查点抑制剂疗法的实例。在某些实施例中,个体施用本文所描述的放射性标记的抗CD8抗体缀合物,并且通过正电子发射断层扫描(PET)成像对放射性标记的抗体缀合物的定位进行成像,以确定肿瘤是否是CD8阳性的。在某些实施例中,进一步施用放射性标记的抗PD-1抗体缀合物,并且通过正电子发射断层扫描(PET)成像对放射性标记的抗体缀合物的定位进行成像,以确定肿瘤是否为PD-1阳性。

[0039] 本文提供了监测个体中抗肿瘤疗法的功效的方法,其中所述方法包含选择患有实体肿瘤的个体,其中个体经抗肿瘤疗法治疗;向个体施用本文所描述的放射性标记抗CD8缀合物;通过PET成像对肿瘤中所施用的放射性标记的缀合物的定位进行成像;和确定肿瘤生长,其中缀合物或放射性标记信号的摄取从基线降低指示抗肿瘤疗法的功效。在某些实施例中,抗肿瘤疗法包含PD-1抑制剂(例如,REGN2810、BGB- A317、纳武单抗(nivolumab)、匹立珠单抗(pidilizumab)和派姆单抗(pembrolizumab))、PD-L1抑制剂(例如,阿特殊单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、度伐单抗(durvalumab)、MDX-1105和 REGN3504以及专利公开第US 2015-0203580号中公开的那些)、CTLA-4抑制剂(例如,伊匹单抗(ipilimumab))、TIM3抑制剂、BTLA抑制剂、TIGIT抑制剂、CD47抑制剂、GITR抑制剂、另一T细胞共抑制剂或配体的拮抗剂(例如,针对LAG3、CD-28、2B4、LY108、LAIR1、ICOS、CD160或VISTA的抗体)、吡哆胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂[例如,“VEGF捕获剂”,如阿柏西普(afibercept)或如US 7,087,411中所列举的其它VEGF抑制性融合蛋白,或抗VEGF抗体或其抗原结合片段(例如,贝伐单抗(bevacizumab)或兰尼单抗(ranibizumab))或VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼(sunitinib)、索拉非尼(sorafenib)或帕唑帕尼(pazopanib))、Ang2抑制剂(例如,内瓦单抗(nesvacumab))、转化生长因子 β (TGF β)抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂(例如,埃罗替尼(erlotinib)、西妥昔单抗(cetuximab))、CD20抑制剂(例如,抗CD20抗体,如利妥昔单抗(rituximab))、针对肿瘤特异性抗原[例如,CA9、CA125、黑素瘤相关抗原3(MAGE3)、癌胚抗原(CEA)、波形蛋白、肿瘤-M2-PK、前列腺特异性抗原(PSA)、粘蛋白-1、MART-1和CA19-9]的抗体、疫苗(例如,卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin)、癌症疫苗)、增加抗原呈递的佐剂(例如,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、双特异性抗体(例如,CD3 \times CD20双特异性抗体或PSMA \times CD3双特异性抗体)、细胞毒素、化疗剂(例如,达卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、环磷酰胺、多西他赛(docetaxel)、小红莓(doxorubicin)、道诺霉素(daunorubicin)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、吉西他滨(gemcitabine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、米托蒽醌(mitoxantrone)、奥沙利铂(oxaliplatin)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)和长春新碱(vincristine))、环磷酰胺、放疗、IL-6R抑制剂(例如,沙瑞卢单抗(sarilumab))、IL-4R抑制剂(例如,杜匹鲁单抗(dupilumab))、IL-10抑制剂、细胞因子(如IL-2、IL-7、IL-21和IL-15)以及抗体-药物缀合物(ADC)(例如,抗CD19-DM4 ADC和抗DS6-DM4ADC)。

[0040] 本文提供了用于预测个体对抗肿瘤疗法的反应的方法,所述方法包含选择患有实

体肿瘤的个体;和判定肿瘤是否是CD8阳性的,其中如果肿瘤是CD8阳性的,则其预测个体对抗肿瘤疗法的阳性反应。在某些实施例中,通过施用本公开的放射性标记的抗CD8抗体缀合物并且通过PET成像将放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中定位确定肿瘤为阳性,其中肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在指示肿瘤是CD8阳性的。在一些实施例中,抗肿瘤疗法选自PD-1抑制剂(例如, REGN2810、BGB-A317、纳武单抗、匹立珠单抗和派姆单抗)、PD-L1 抑制剂(例如,阿特殊单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、MDX-1105和 REGN3504)、CTLA-4抑制剂(例如,伊匹单抗)、TIM3抑制剂、BTLA 抑制剂、TIGIT抑制剂、CD47抑制剂、GITR抑制剂、LAG3抑制剂、另一T细胞共抑制剂或配体的拮抗剂(例如,针对CD-28、2B4、LY108、LAIR1、ICOS、CD160或VISTA的抗体)、吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO) 抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂[例如,“VEGF捕获剂”,如阿柏西普或如US 7,087,411中所列举的其它VEGF抑制性融合蛋白,或抗VEGF抗体或其抗原结合片段(例如,贝伐单抗或兰尼单抗)或 VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼)]、Ang2抑制剂(例如,内瓦单抗)、转化生长因子 β (TGF β) 抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR) 抑制剂(例如,埃罗替尼、西妥昔单抗)、CD20抑制剂(例如,抗CD20抗体,如利妥昔单抗)、针对肿瘤特异性抗原[例如,CA9、CA125、黑素瘤相关抗原3 (MAGE3)、癌胚抗原(CEA)、波形蛋白、肿瘤-M2-PK、前列腺特异性抗原(PSA)、粘蛋白-1、MART-1和CA19-9]的抗体、疫苗(例如,卡介苗、癌症疫苗)、增加抗原呈递的佐剂(例如,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、双特异性抗体(例如,CD3 \times CD20双特异性抗体或PSMA \times CD3双特异性抗体)、细胞毒素、化疗剂(例如,达卡巴嗪、替莫唑胺、环磷酰胺、多西他赛、小红莓、道诺霉素、顺铂、卡铂、吉西他滨、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、太平洋紫杉醇和长春新碱)、环磷酰胺、放疗、IL-6R抑制剂(例如,沙瑞卢单抗)、IL-4R抑制剂(例如,杜匹鲁单抗)、IL-10抑制剂、细胞因子(如IL-2、IL-7、IL-21和IL-15)以及抗体-药物缀合物(ADC)(例如,抗CD19-DM4ADC和抗DS6-DM4ADC)。

[0041] 本文提供了用于预测患有实体肿瘤的个体中对抗肿瘤疗法的阳性反应的方法。所述方法包含向个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,以确定实体肿瘤中CD8阳性细胞的存在;其中CD8阳性细胞的存在预测对抗肿瘤疗法的阳性反应。

[0042] 本文提供了用于监测患有实体肿瘤的个体中对抗肿瘤疗法的阳性反应的方法。所述方法包含(a)向个体施用一个或多个剂量的抗肿瘤疗法;和(b)在施用抗肿瘤疗法后1到20周向个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,以确定实体肿瘤中CD8阳性细胞的存在。CD8 阳性细胞的存在指示对抗肿瘤疗法的阳性反应。

[0043] 本文提供了用于预测或监测患有实体肿瘤的个体中的抗肿瘤疗法的成功或功效的方法,所述方法包含:(a)确定肿瘤中CD8阳性细胞的水平;和(b)使CD8阳性细胞水平与成功的抗肿瘤疗法相关联。高于某一阈值的升高的CD8水平预测或指示成功的抗肿瘤疗法。

[0044] 本文提供了用于监测随时间推移肿瘤中的T细胞存在或T细胞浸润的方法,所述方法包含:(a)在第一时间点向患有肿瘤的个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,并且确定肿瘤中CD8阳性T细胞的存在;(b)向个体施用一个或多个剂量的抗肿瘤疗法;以及(c)在施用抗肿瘤疗法后1到20周,在第二时间点向个体施用放射性标记的抗 CD8抗体缀合物,并且确定肿瘤中CD8阳性T细胞的存在。肿瘤中T 细胞的存在指示对抗肿瘤疗法的阳性反应。

附图说明

- [0045] 图1描绘结合到人类CD8+和食蟹猕猴T细胞的mAb1。
- [0046] 图2描绘通过由mAb1抑制IFN γ 产生来调节人类CD8 T细胞活性。
- [0047] 图3描绘来自CD8 T细胞/APC荧光素酶分析的数据,所述数据证明mAb1抑制CD8转录活性。
- [0048] 图4描绘DF0-mAb1缀合物的UV/VIS光谱。
- [0049] 图5描绘在UV 280nm吸光度检测的情况下,25 μ g DF0-mAb1缀合物注射液在Superdex 200增加柱上的HPLC-SEC。指示单体(97.5%)和高分子量(HMW)物种(2.5%)。
- [0050] 图6描绘DF0-mAb1缀合物的电泳图。图6A)表示非还原缀合物并且图B)表示还原缀合物。
- [0051] 图7描绘在 γ 发射检测的情况下,Superdex 200增加柱上的mAb1-L2-111016放射性免疫缀合物的SEC-HPLC色谱图。未标记 ^{89}Zr 占总积分活性的小于0.1%。
- [0052] 图8描绘在 γ 发射检测的情况下,Superdex 200增加柱上的mAb1-L2-111516放射性免疫缀合物的SEC-HPLC色谱图。未标记 ^{89}Zr 占总积分活性的小于0.1%。
- [0053] 图9描绘在UV 280nm吸光度检测的情况下,Superdex 200增加柱上的mAb1-L2-111016放射性免疫缀合物的SEC-HPLC色谱图。指示单体(98.5%)和高分子量(HMW)物种(1.5%)。
- [0054] 图10描绘在UV 280nm吸光度检测的情况下,Superdex 200增加柱上的mAb1-L2-111516放射性免疫缀合物的SEC-HPLC色谱图。指示单体(98.6%)和高分子量(HMW)物种(1.4%)。
- [0055] 图11提供在表达hCD8的小鼠中,以0.5或1.5mg/kg的蛋白质剂量注射的 ^{89}Zr -DF0-mAb1的代表性PET图像。在施用的两个剂量下,在表达hCD8的小鼠的脾脏和淋巴结中检测到 ^{89}Zr -DF0-mAb1特异性摄取。在1.5mg/kg的较高蛋白质剂量下,在脾脏和淋巴结中检测到摄取减少,指示对淋巴器官的靶向特异性。缩写:Cerv LN--颈部淋巴结;Axil LN--腋下淋巴结;Brach LN--臂淋巴结;Mes LN--肠系膜淋巴结;Ing LN--腹股沟淋巴结。
- [0056] 图12展示在携带Raji和Raji/hPBMC肿瘤的小鼠中,以0.1mg/kg的蛋白质剂量注射的 ^{89}Zr -DF0-mAb1的代表性PET图像。在携带Raji/hPBMC肿瘤的小鼠的脾脏和肿瘤中检测到 ^{89}Zr -DF0-mAb1的特异性摄取。
- [0057] 图13比较对感染LCMV的小鼠的抗体治疗,并且证明相对于用强CD8阻断抗体治疗的小鼠,用mAb1治疗的小鼠保留清除LCMV的能力。

具体实施方式

- [0058] I. 定义
- [0059] 除非本文中另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与所公开的主题所属领域的一般技术人员通常所理解相同的含义。
- [0060] 术语“CD8”(分化簇8)是指主要在细胞毒性T淋巴细胞上表达,但也树突状细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞的亚群上表达的细胞表面糖蛋白。糖蛋白由两种同种型 α 和 β (其由不同基因编码)组成,并且表达为 $\alpha\alpha$ 同二聚体或 $\alpha\beta$ 异二聚体,其中后者占主导。CD8共受体使T细胞受体MHC-1相互作用稳定,并且通过CD3 相关免疫受体酪氨酸活化基

序 (ITAM) 的淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (Lck) 磷酸化引发胞内信号传导, 以便活化。

[0061] 全长CD8 α 的氨基酸序列在UniProt中提供为寄存编号P01732, 并且在本文中也称为SEQ ID NO: 18。全长CD8 β 的氨基酸序列在 UniProt中提供为寄存编号10966, 并且在本文中也称为SEQ ID NO: 20。术语“CD8”包括全长CD8 α 或CD8 β 、重组CD8、其片段和其融合体。术语还涵盖偶联到例如组氨酸标签、小鼠或人类Fc或信号序列 (如ROR1的信号序列) 的CD8 α 或CD8 β 或其片段。举例来说, 术语包括由SEQ ID NO: 18或20例示的序列, 所述序列在C端处包含小鼠 Fc (MiGg2a), 其偶联到CD8 α 或CD8 β 的片段。其它蛋白质变体在C 端处包含组氨酸标签, 其偶联到CD8或其片段。除非指定为来自非人类物种, 否则术语“CD8”意指人类CD8。

[0062] CD8是免疫球蛋白 (Ig) 超家族成员, 其具有由思考茎连接到膜的免疫球蛋白可变 (IgV) 样胞外域, 和胞内尾。

[0063] 如本文所用, 术语“T细胞共抑制剂”是指通过T细胞活化或抑制调节免疫反应的配体和/或受体。术语“T细胞共抑制剂” (也称为T细胞共信号转导分子) 包括但不限于淋巴细胞活化基因3蛋白 (LAG-3, 也称为CD223)、程序性死亡-1 (PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、B和T淋巴细胞衰减子 (BTLA)、CD-28、2B4、LY108、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白-3 (TIM3)、具有免疫球蛋白和ITIM域的 T细胞免疫受体 (TIGIT; 也称为VSIG9)、白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1; 也称为CD305)、诱导型T细胞共刺激分子 (ICOS; 也称为CD278)、B7-1 (CD80) 以及CD160。

[0064] 如本文所用, 术语“抗体”意图指免疫球蛋白分子, 其包含四条多肽链, 两条重 (H) 链与两条轻 (L) 链通过二硫键互连 (即, “完全抗体分子”); 以及其多聚体 (例如IgM), 或其抗原结合片段。每条重链包含重链可变区 (“HCVR”或“V_H”) 和重链恒定区 (包含域C_H1、C_H2 和 C_H3)。每条轻链包含轻链可变区 (“LCVR”或“V_L”) 和轻链恒定区 (C_L)。V_H和V_L区可以进一步细分成称为互补决定区 (CDR) 的高变区, 其间穿插有称为框架区 (FR) 的更保守的区。每个V_H和 V_L包含三个CDR和四个FR, 其从氨基端到羧基端按照以下顺序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在某些实施例中, 抗体 (或其抗原结合片段) 的FR可以与人类生殖系序列相同, 或可以经天然或人工修饰。可以基于并排分析两个或更多个CDR限定氨基酸共有序列。

[0065] 取代一个或多个CDR残基或省略一个或多个CDR也是可能的。抗体已在科学文献中描述, 其中一个或两个CDR可以被分配用于结合。Padlan等人 (1995FASEB J. 9:133-139) 基于公开的晶体结构分析了抗体其抗原之间的接触区, 并且得出结论, 仅约五分之一至三分之一的CDR残基实际接触抗原。Padlan还发现许多抗体, 所述抗体中一个或两个CDR没有与抗原接触的氨基酸 (另参见Vajdos等人2002J Mol Biol 320:415-428)。

[0066] 基于先前的研究, 通过分子建模和/或凭经验可以从位于Chothia CDR外部的 Kabat CDR区域鉴别出不接触抗原的CDR残基 (例如 CDRH2中的残基H60-H65通常是不需要的)。如果省略其CDR或残基, 则其通常由氨基酸取代, 所述氨基酸占据另一人类抗体序列或此类序列的共有序列中的对应位置。CDR内取代的位置和用于取代的氨基酸也可以凭经验选择。经验取代可以是保守或非保守性取代。

[0067] 本文所公开的完全人类抗CD8单克隆抗体可以包含与对应生殖系序列相比, 重链和轻链可变域的框架和/或CDR区中的一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。此类突变可以通过将本文所公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库得到的生殖系序列进行比较而容易地确定。本公开包括来源于本文所公开的氨基酸序列中的任一个的抗体和其

抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变成得到所述抗体的生殖系序列的对应残基,或另一人类生殖系序列的对应残基,或对应生殖系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“生殖系突变”)。本领域的普通技术人员从本文所公开的重链和轻链可变区序列开始,可以容易地产生多种抗体和抗原结合片段,其包含一个或多个个别生殖系突变或其组合。在某些实施例中, V_H 和/或 V_L 域内的所有框架和/或CDR残基突变回在衍生抗体的原始生殖系序列中所发现的残基。在其它实施例中,只有某些残基突变回原始生殖系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4 的后8个氨基酸内发现的突变残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3内发现的突变残基。在其它实施例中,框架和/或CDR残基中的一个或多个突变为不同生殖系序列(即,不同于最初衍生抗体的生殖系序列的生殖系序列)的对应残基。此外,本公开的抗体可以含有框架和/或CDR 区内的两个或更多个生殖系突变的任何组合,例如,其中某些个别残基突变为特定生殖系序列的对应残基,而不同于原始生殖系序列的某些其它残基得以保持或突变为不同生殖系序列中的相应残基。在得到含有一个或多个生殖系突变的抗体和抗原结合片段后,可以容易地测试所述抗体和抗原结合片段的一种或多种所需特性,如结合特异性的改善、结合亲和力的增加、拮抗性或激动性生物特性(视具体情况而定) 的改善或增强、免疫原性降低等。以这种通用方式获得的抗体和抗原结合片段涵盖在本公开内。

[0068] 本公开还包括完全人类抗CD8单克隆抗体,其包含本文所公开的 HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一个的变体,所述变体具有一个或多个保守性取代。举例来说,本公开包括抗CD8抗体,其具有相对于本文所公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一个有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等保守氨基酸取代的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列。

[0069] 如本文所用,术语“人类抗体”意图包括非天然存在的人类抗体。所述术语包括在非人类哺乳动物中或在非人类哺乳动物的细胞中以重组方式产生的抗体。所述术语不意图包括从人类个体中分离或在人类个体中产生的抗体。

[0070] 术语“特异性结合”或“特异性结合到”等意指抗体或其抗原结合片段与抗原形成在生理条件下相对较稳定的复合物。特异性结合的特征可在于至少约 $5 \times 10^{-8}M$ 或更低的平衡解离常数(例如,更小的 K_D 指示更紧密的结合)。用于确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域众所周知的,并且包括例如平衡透析、表面等离子体共振等。如本文所描述,已通过表面等离子体共振,例如BIAcore™鉴别出特异性结合到CD8的抗体。

[0071] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成或基因工程化的多肽或糖蛋白。如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”或“抗体片段”是指保留结合到CD8的能力的抗体的一个或多个片段。

[0072] 如本文所用,“分离抗体”意图指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体(Ab)的抗体(例如,特异性结合CD8的分离抗体或其片段基本上不含特异性结合除CD8以外的抗原的Ab)。

[0073] 如本文所用,术语“表面等离子体共振”是指一种光学现象,其允许通过例如使用BIAcore™系统(瑞典乌普萨拉(Uppsala, Sweden) 和新泽西州皮斯卡塔威(Piscataway, N.J.)的Pharmacia Biosensor AB) 检测生物传感器基质内蛋白质浓度的变化分析实时生

物分子相互作用。

[0074] 如本文所用,术语“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0075] 术语“表位”是指与抗体分子可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定子,称为互补位。单个抗原可以具有多于一个表位。因此,不同抗体可以结合到抗原上的不同区域并且可以具有不同的生物效应。术语“表位”还指B细胞和/或T细胞起反应的抗原上的位点。其还指抗体所结合的抗原区域。表位可以定义为结构性或功能性的。功能性表位一般是结构性表位的子集并且具有直接促成相互作用的亲和力的那些残基。表位还可以是构形性的,即,由非线性氨基酸构成。在某些实施例中,表位可以包括作为分子的化学活性表面基团的决定子,所述基团例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且在某些实施例中,可以具有特定三维结构特征和/或特定电荷特征。

[0076] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本相同”指示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)最佳对齐时,如通过如FASTA、BLAST或GAP等任何众所周知的序列同一性算法所测量的至少约90%,并且更优选地至少约95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基的核苷酸序列同一性。

[0077] 当应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本上相似”意指两个肽序列使用默认空位权重,如通过程序GAP或BESTFIT最佳地对准时共有至少90%序列同一性,甚至更优选地至少95%、98%或99%序列同一性。优选地,不同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有相似化学特性(例如,电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一氨基酸残基取代的氨基酸取代。一般来说,保守氨基酸置换基本上不会改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守性取代而彼此不同的情况下,可以上调相似性百分比或程度以校正取代的保守性质。用于进行这种调整的手段是本领域技术人员所熟知的。参见例如Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307- 331,其以引用的方式并入本文中。具有相似化学特性的侧链的氨基酸组的实例包括1) 脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2) 脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3) 含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5) 碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6) 酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;以及7) 含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。或者,保守替代是PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化,所述对数似然矩阵公开于Gonnet等人 (1992) *Science* 256:1443-45中,其以引用的方式并入本文中。“中等保守”替代是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。典型地使用序列分析软件测量多肽的序列相似性。蛋白质分析软件使用关于指定到包括保守氨基酸取代的各种取代、缺失和其它修饰的相似性量度来匹配相似序列。例如,GCG软件含有如GAP 和BESTFIT的程序,其可以在默认参数下使用以确定密切相关的多肽之间,如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如GCG 6.1版。多肽序列也可以使用默认或推荐参数,使用FASTA进行比较;FASTA是 GCG 6.1版中的程序。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询与搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比(Pearson (2000) 前述)。当将本公开的序列与含有来自不同生物体的大量序列的数据库进行比较时,另一优选的算法是使用默认参数的计算机程序 BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如Altschul等人 (1990)

J.Mol.Biol.215:403-410和(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-3402,其各自以引用方式并入本文。

[0078] 短语“治疗有效量”意指产生施用其所希望达成的作用的量。确切量将取决于治疗目的,并且可由本领域的技术人员使用已知技术确定(参见例如Lloyd(1999)The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)。

[0079] 如本文所用,术语“个体”是指动物,优选哺乳动物,其需要改善、预防和/或治疗疾病或病症,如慢性感染、癌症或自身免疫疾病。

[0080] II.一般说明

[0081] CD8在胸腺中产生并且表达T细胞受体的细胞毒性T细胞上表达。CD8表达为二聚共受体,典型地包含一个CD8 α 蛋白和一个CD8 β 蛋白。CD8⁺ T细胞识别由MHC I呈递的肽,并且CD8异二聚体在抗原呈递期间结合到MHC I α 3。活化CD8⁺ T细胞涉及消除感染或恶性细胞,并且还牵涉自身免疫疾病。

[0082] 本文所描述的完全人类抗CD8抗体展现与CD8 α 和/或CD8 β 的特异性结合。此类抗体可以用于治疗慢性感染、癌症或自身免疫疾病。

[0083] 在某些实施例中,本文提供的抗体从用可以商购或可以重组方式产生的初级免疫原(如人类CD8 α 蛋白和/或人类CD8 β 蛋白)免疫的小鼠获得。人类CD8 α 和人类CD8 β 的全长氨基酸序列分别展示为SEQ ID NO:18和20。在某些实施例中,本文提供的抗体从用初级免疫原(如人类CD8 α DNA和/或人类CD8 β DNA)免疫的小鼠获得。人类CD8 α 的全长核酸序列可见于SEQ ID NO:17。全长人类CD8 β 核酸序列可见于SEQ ID NO:19。

[0084] 免疫原可以是以重组方式产生的CD8的生物活性和/或免疫原性片段、融合蛋白、编码其活性片段的DNA或编码整个CD8 α 蛋白或CD8 β 蛋白的DNA。片段可以来源于人类CD8 α 和人类CD8 β 的N端或C端,或人类CD8 α 和人类CD8 β 氨基酸序列内的任何位点。

[0085] 人类抗体的制备

[0086] 用于在转基因小鼠中产生人类抗体的方法是本领域中已知的。可以在本公开的上下文中使用任何此类已知方法来制造特异性结合到CD8的人类抗体。

[0087] 使用VELOCIMMUNE™技术(参见例如US 6,596,541,再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals),**VELOCIMMUNE®**)或用于产生单克隆抗体的任何其它已知方法,最初分离出具有人类可变区和小鼠恒定区的针对CD8的高亲和力嵌合抗体。**VELOCIMMUNE®**技术涉及产生转基因小鼠,所述转基因小鼠具有包含可操作地连接至内源性小鼠恒定区基因座的人类重链和轻链可变区的基因组,使得所述小鼠响应于抗原刺激产生包含人类可变区和小鼠恒定区的抗体。分离出编码抗体重链和轻链可变区的DNA并且将其可操作地连接至编码人类重链和轻链恒定区的DNA。接着,在能够表达完全人类抗体的细胞中表达所述DNA。

[0088] 一般来说,利用所关注抗原攻击**VELOCIMMUNE®**小鼠,并且从表达抗体的小鼠回收淋巴细胞(如B细胞)。淋巴细胞可以与骨髓瘤细胞系融合以制备无限增殖杂交瘤细胞系,并且对此类杂交瘤细胞系进行筛选和选择以鉴别出产生对所关注抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。可以将编码重链和轻链可变区的DNA分离并且连接到重链和轻链的期望同型恒定区。这种抗体蛋白可以在细胞(如CHO细胞)中产生。或者,可以直接从抗原特异性淋巴细胞中分离出编码抗原特异性嵌合抗体或轻链和重链可变域的DNA。

[0089] 首先,分离出具有人类可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。如在下文实验

章节中,针对期望特征,包括亲和力、选择性、表位等,表征并且选择抗体。小鼠恒定区被所需人类恒定区替换以产生本文提供的完全人类抗体,例如野生型或修饰的IgG1或IgG4。虽然选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特征存在于可变区中。

[0090] 一般来说,本文提供的抗体具有非常高的亲和力,当通过结合到固定于固相或溶液相中的抗原而测量时,典型地具有约 10^{-12} 到约 10^{-8} M 的 K_D 。用所需人类恒定区替换小鼠恒定区以产生完全人类抗体。虽然选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特征存在于可变区中。

[0091] 生物等效物

[0092] 本文提供的抗CD8抗体和抗体片段涵盖氨基酸序列与所描述的抗体的氨基酸序列不同,但保留结合CD8的能力的蛋白质。当与亲本序列相比较时,此类变体抗体和抗体片段包含一个或多个氨基酸添加、缺失或取代,但展现基本上等效于所述抗体的生物活性的生物活性。同样,本文提供的抗体编码DNA序列涵盖当与所公开的序列相比较时包含一个或多个核苷酸添加、缺失或取代,但编码与本文所公开的抗体或抗体片段基本上生物等效的抗体或抗体片段的序列。

[0093] 如果例如两种抗原结合蛋白或抗体是当在类似实验条件下以单次剂量或多次剂量施用相同摩尔剂量时,吸收速率和程度不显示显著差异的药物等效物或药物替代物,则将其视为生物等效的。如果一些抗体的吸收程度相同但吸收速率不同,则认为这些抗体是等效物或药物替代物,并且由于这种吸收速率的差异是有意产生的并以标记反映,不必在例如长期使用中达到有效的身体药物浓度并且被视为对于特定药品研究无医学意义,则又可以将其视为生物等效的。

[0094] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度和效力无临床上有意义的差异,则这两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0095] 在一个实施例中,如果个体可以在参照产品与生物产品之间切换一次或多次,但不良作用风险相较于无此类切换的持续疗法无预期增加,包括临床上显著的免疫原性变化或有效性降低,则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0096] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白都是通过对于一种或多种使用条件常见的一种或多种作用机制起作用,使得此类机制是已知的,则这两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0097] 生物等效性可以由体内和/或体外方法证明。生物等效性测量包括例如(a)在人体或其它哺乳动物中进行的体内测试,其中在血液、血浆、血清或其它生物流体中随时间测量抗体或其代谢物的浓度;(b)与人体内生物利用率数据相关并且合理地预测这些数据的体外测试;(c)在人体或其它哺乳动物中进行的体内测试,其中随时间测量抗体(或其靶)的适当急性药理学作用;以及(d)确定抗体的安全性、功效或生物利用率或生物等效性的良好对照的临床试验。

[0098] 本文提供的抗体的生物等效变体可以通过例如进行残基或序列的各种取代,或使生物活性不需要的末端或内部残基或序列缺失来构建。举例来说,可以缺失不是生物活性必需的半胱氨酸残基或用其他氨基酸替换,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫桥键。在其它情况下,生物等效抗体可以包括包含氨基酸变化的抗体变体,这些变化

改变抗体的糖基化特征,例如消除或去除糖基化的突变。

[0099] 治疗性施用和配制物

[0100] 本文提供治疗性组合物,其包含本公开的抗CD8抗体或其抗原结合片段。根据本公开的治疗性组合物的施用将通过适合途径施用,包括但不限于静脉内、皮下、肌肉内、鼻内、用适合载体、赋形剂以及并入配制物中以提供改善的转移、递送、耐受性等的其它试剂。众多的适当配制物可见于所有医药化学家已知的处方集中:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 宾夕法尼亚州伊斯顿 (Easton, PA)。这些配制物包括例如散剂、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子脂质)的囊泡(如 LIPOFECTIN™)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳液卡波蜡(carbowax)(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶及含有卡波蜡的半固体混合物。还参见Powell等人“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0101] 抗体剂量可视待施用的个体的年龄和体格、目标疾病、状况、施用途等而变化。

[0102] 各种递送系统是已知的并且可以用于施用本文提供的医药组合物,例如在脂质体、微粒、微胶囊内包封、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见例如Wu等人,1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432)。引入方法包括但不限于皮内、透皮、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外以及口服途径。所述组合物可以通过任何便利的途径,例如通过输注或快速注射、通过经上皮或粘膜皮肤内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收施用,并且可以与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身性或局部的。

[0103] 医药组合物也可以在囊泡,尤其脂质体中递送(参见例如Langer, 1990, Science 249:1527-1533)。

[0104] 在某些情形下,医药组合物可以在控制释放系统中递送。在一个实施例中,可以使用泵。在另一实施例中,可以使用聚合材料。在又一个实施例中,可以将控制释放系统放入组合物的目标附近,由此仅需要一部分全身剂量。

[0105] 可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌肉内注射、滴液输注等的剂型。这些可注射制剂可以通过众所周知的方法制备。举例来说,可注射制剂可以例如将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化于常规地用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备。作为用于注射的水性介质,存在例如生理盐水、含有葡萄糖和其它助剂等的等渗溶液,其可与适当的增溶剂组合使用,所述增溶剂如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油聚氧乙烯(50mol)加合物)]等。作为油性介质,采用例如芝麻油、大豆油等,其可以与增溶剂,如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等组合使用。由此制备的注射剂优选地填充于适当安瓿中。

[0106] 本公开的医药组合物可以用标准针和注射器皮下或静脉内递送。此外,对于皮下递送,笔式递送装置易于应用于递送公开明的医药组合物。这种笔式递送装置可重复使用或是一次性的。可重复使用的笔式递送装置一般利用含有医药组合物的可更换的筒。一旦筒内的所有医药组合物都已施用并且筒变空时,就可以容易地丢弃空筒并且更换为含有医药组合物的新筒。随后可以再使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,没有可更换的筒。实际上,一次性笔式递送装置在装置内的储集器中预填充有医药组合物。一旦排空储集器中的医药组合物,就丢弃整个装置。

[0107] 多种可重复使用的笔式递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本公开的医药组合物。实例包括但不限于AUTOPENTM (英国伍德斯托克 (Woodstock, UK) 的Owen Mumford, Inc.)、DISETRONICTM笔 (瑞士布格多夫 (Burghdorf, Switzerland) 的Disetronic Medical Systems)、HUMALOG MIX 75/25TM笔、HUMALOGTM笔、HUMALIN 70/30TM笔 (印第安纳州印第安纳波利斯 (Indianapolis, IN) 的Eli Lilly and Co.)、NOVOPENTMI、II和III (丹麦哥本哈根 (Copenhagen, Denmark) 的Novo Nordisk)、NOVOPEN JUNIORTM (丹麦哥本哈根的Novo Nordisk)、BDTM笔 (新泽西州富兰克林湖 (Franklin Lakes, NJ) 的Becton Dickinson)、OPTIPENTM、OPTIPEN PROTM、OPTIPEN STARLETTM以及OPTICLIKTM (德国法兰克福 (Frankfurt, Germany) 的 sanofi-aventis) 等。可用于皮下递送本公开的医药组合物的一次性笔式递送装置的实例包括但不限于SOLOSTARTM笔 (Sanofi-Aventis)、FLEXPENTM (Novo Nordisk) 和KWIKPENTM (Eli Lilly)、SURECLICKTM自动注射器 (加利福尼亚州千橡树市 (Thousand Oaks, CA) 的Amgen)、PENLETTM (德国斯图加特 (Stuttgart, Germany) 的Haselmeier)、EPIPEN (Dey, L.P.) 以及HUMIRATM笔 (伊利诺伊州阿博特帕克 (Abbott Park IL) 的Abbott Labs) 等。

[0108] 有利地, 用于上述口服或不经肠使用的医药组合物制备成适合于符合活性成分剂量的单位剂量的剂型。这类呈单位剂量的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射液 (安瓿)、栓剂等。

[0109] III. 用于免疫PET成像的CD8抗体的放射性标记免疫缀合物

[0110] 本文提供了结合CD8的放射性标记抗原结合蛋白。在一些实施例中, 放射性标记抗原结合蛋白包含共价键联到正电子发射体的抗原结合蛋白。在一些实施例中, 放射性标记抗原结合蛋白包含共价键联到一种或多种螯合部分的抗原结合蛋白, 所述螯合部分是能够螯合正电子发射体的化学部分。

[0111] 合适的放射性标记抗原结合蛋白, 例如放射性标记抗体, 包括在暴露于放射性标记抗原结合蛋白后不损害或基本上不损害T细胞功能的那些。在一些实施例中, 结合CD8的放射性标记抗原结合蛋白是CD8 T细胞功能的弱阻断剂, 即在暴露于放射性标记抗体后, T细胞功能不受损或基本上不受损。根据本文提供的方法使用对CD8介导的T细胞功能具有最小影响的放射性标记抗CD8结合蛋白, 确保用所述分子治疗的个体不因其T细胞无法清除感染而不利。

[0112] 在一些实施例中, 提供结合CD8的抗原结合蛋白, 例如抗体, 其中结合CD8的所述抗原结合蛋白共价键结到具有以下结构的一个或多个部分:

[0113] $-L-M_z$

[0114] 其中L是螯合部分; M是正电子发射体; 并且z在每次出现时独立地是0或1; 并且其中z中的至少一个是1。

[0115] 在一些实施例中, 放射性标记抗原结合蛋白是式 (I) 化合物:

[0116] $M-L-A-[L-M_z]_k$

[0117] (I)

[0118] A是结合CD8的蛋白质; L是螯合部分; M是正电子发射体; z是 0或1; 并且k是0到30的整数。在一些实施例中, k是1。在一些实施例中, k是2。

[0119] 在某些实施例中, 放射性标记抗原结合蛋白是式 (II) 化合物:

[0120] $A-[L-M]_k$

[0121] (II)

[0122] 其中A是结合CD8的蛋白质;L是螯合部分;M是正电子发射体;并且k是1到30的整数。

[0123] 在一些实施例中,本文提供了包含具有以下结构的缀合物的组合物:

[0124] $A-L_k$

[0125] 其中A是结合CD8的蛋白质;L是螯合部分;并且k是1到30 的整数;其中所述缀合物与正电子发射体以足以提供适于临床PET成像的比活度的量螯合。

[0126] 下文提供合适的结合蛋白、螯合部分和正电子发射体。

[0127] A.CD8结合蛋白

[0128] 合适的CD8结合蛋白特异性结合到CD8,并且包括WO 2014/164553中所描述的那些,所述专利以全文引用的方式并入本文中。本文提供的示例性抗CD8结合蛋白是在下文中称为mAb1的单克隆抗体,其包含如表1中所列举的核酸和氨基酸序列特征。

[0129] 表1:核酸和氨基酸序列标识符

mAb1	SEQ ID NO							
	HCV R	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
核酸序列 标识符	1	3	5	7	9	11	13	15
氨基酸序 列标识符	2	4	6	8	10	12	14	16

[0131] 表1列举示例性抗CD8抗体的重链可变区 (HCVR)、轻链可变区 (LCVR)、重链互补决定区 (HCDR1、HCDR2和HCDR3) 和轻链互补决定区 (LCDR1、LCDR2和LCDR3) 的核酸序列标识符和氨基酸序列标识符。

[0132] 在一些实施例中,结合蛋白是包含HCVR的抗体或抗原结合片段,所述HCVR包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或其与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0133] 在一些实施例中,结合蛋白是包含LCVR的抗体或抗原结合片段,所述LCVR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或其与之具有至少 90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0134] 在一些实施例中,结合蛋白是包含SEQ ID NO:2/10的HCVR和 LCVR氨基酸序列对 (HCVR/LCVR) 的抗体或抗原结合片段,例如 mAb1。

[0135] 在一些实施例中,结合蛋白是包含SEQ ID NO:4的重链CDR1 (HCDR1)氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列的抗体或抗原结合片段。

[0136] 在一些实施例中,结合蛋白是包含SEQ ID NO:6的重链CDR2 (HCDR2)氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列的抗体或抗原结合片段。

[0137] 在一些实施例中,结合蛋白是包含SEQ ID NO:8的重链CDR3 (HCDR3)氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列的抗

体或抗原结合片段。

[0138] 在一些实施例中,结合蛋白是包含SEQ ID NO:12的轻链CDR1 (LCDR1)氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列的抗体或抗原结合片段。

[0139] 在一些实施例中,结合蛋白是包含SEQ ID NO:14的轻链CDR2 (LCDR2)氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列的抗体或抗原结合片段。

[0140] 在一些实施例中,结合蛋白是包含SEQ ID NO:16的轻链CDR3 (LCDR3)氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列的抗体或抗原结合片段。

[0141] 在一些实施例中,结合蛋白是包含HCDR3和LCDR3氨基酸序列对 (HCDR3/LCDR3) 的抗体或抗原结合片段,所述氨基酸序列对包含 SEQ ID NO:8/16。

[0142] 在一些实施例中,结合蛋白是抗体或抗原结合片段,其包含表1中所提供的示例性抗CD8抗体内含的一组六个CDR(即,HCDR1- HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。在某些实施例中,HCDR1- HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组合包含SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16。

[0143] 在一些实施例中,结合蛋白是抗体或抗原结合片段,其包含 HCVR/LCVR氨基酸序列对内含的一组六个CDR(即,HCDR1-HCDR2- HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3),所述HCVR/LCVR氨基酸序列对具有SEQ ID NO:2/10。用于鉴别HCVR和LCVR氨基酸序列内的CDR 的方法和技术是本领域众所周知的,并且可以用于鉴别本文所公开的指定HCVR和/或LCVR氨基酸序列内的CDR。可以用于鉴别CDR边界的示例性惯例包括例如Kabat定义、Chothia定义和AbM定义。一般来说,Kabat定义基于序列变异性,Chothia定义基于结构环区域的位置,并且AbM定义是Kabat和Chothia方法之间的折衷。参见例如 Kabat,"Sequences of Proteins of Immunological Interest,"National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991);Al-Lazikani等人,J.Mol.Biol. 273:927-948(1997);和Martin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:9268-9272(1989)。公共数据库也可用于鉴别抗体内的CDR序列。

[0144] 在一些实施例中,结合蛋白是与包含HCVR的CDR和LCVR的CDR的抗体或其抗原结合片段竞争与CD8的特异性结合的抗体和其抗原结合片段,其中HCVR和LCVR氨基酸序列对包含SEQ ID NO: 2/10。

[0145] 本文还提供了结合CD8并且抑制活化CD8阳性T细胞中IFN γ 产生的分离抗体和其抗原结合片段。在某些实施例中,结合CD8并且抑制活化CD8阳性T细胞中IFN γ 产生的本公开的抗体包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCVR的CDR;和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCVR的CDR。

[0146] 本文还提供了结合CD8并且抑制活化T细胞中的转录因子活化子蛋白(AP-1)的分离抗体和其抗原结合片段。在某些实施例中,结合 CD8并且抑制活化T细胞中的AP-1的本公开的抗体包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCVR的CDR;和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCVR的CDR。

[0147] 在一些实施例中,结合蛋白是特异性结合到来自人类或其它物种的CD8的抗体和

其抗原结合片段。在某些实施例中,抗体可以结合到人类CD8和/或食蟹猕猴CD8。

[0148] 在一些实施例中,结合蛋白是与包含HCVR的CDR和LCVR的 CDR的参考抗体或其抗原结合片段交叉竞争与CD8结合的抗体和其抗原结合片段,其中HCVR和LCVR各自具有SEQ ID NO:2/10的氨基酸序列对。

[0149] 在一个实施例中,结合蛋白是具有以下特征中的一个或多个的分离抗体或抗原结合片段:(a)是完全人类单克隆抗体;(b)如通过表面等离子体共振测量,以等于或低于 3.5×10^{-8} M的 K_D 结合到CD8;(c)结合到人类CD8 α ;(d)抑制活化CD8 T细胞中的IFN γ 产生;(e)抑制活化T细胞中的转录因子活化子蛋白(AP-1);(f)与人类和猴CD8交叉反应;(g)包含SEQ ID NO:2的重链可变区(HCVR)氨基酸序列内含有的三个重链CDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及(h)包含轻链可变区(LCVR)氨基酸序列内含有的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述轻链可变区氨基酸序列具有SEQ ID NO:10。

[0150] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可以以激动剂方式特异性结合到CD8,即,其可以增强或刺激CD8结合和/或活性;在其它实施例中,抗体可以以拮抗剂方式特异性结合到CD8,即,其可以阻断CD8结合到天然CD8结合搭配物。

[0151] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可以以中性方式结合CD8,即,其结合但不阻断或增强或刺激CD8结合和/或活性。

[0152] 在一些实施例中,抗体和其抗原结合片段结合CD8,例如CD8 α 或CD8 β ,如例如使用如实例2中所定义的分析格式或基本上类似的分析,在25℃或37℃下通过表面等离子体共振测量,解离半衰期($t_{1/2}$)大于约2.0分钟。在某些实施例中,抗体或抗原结合片段结合CD8,如例如使用如实例2中所定义的分析格式(例如,mAb捕获或抗原捕获格式)或基本上类似的分析,在25℃或37℃下通过表面等离子体共振测量, $t_{1/2}$ 大于约5分钟、大于约10分钟、大于约30分钟、大于约50分钟、大于约60分钟、大于约70分钟、大于约80分钟、大于约90分钟、大于约100分钟、大于约200分钟、大于约300分钟、大于约400分钟、大于约500分钟、大于约600分钟、大于约700分钟、大于约800分钟、大于约900分钟、大于约1000分钟或大于约1100分钟。

[0153] 在一些实施例中,如实例6中所定义的流式细胞术分析或基本上类似的分析所测量,抗体或其抗原结合片段以低于约1nM的 EC_{50} 结合到表达人类CD8的细胞。在某些实施例中,如通过流式细胞术分析,例如使用实例6中的分析格式,或基本上类似的分析所测量,抗体或其抗原结合片段以低于约0.9nM、低于约0.8nM、低于约0.7nM、低于约0.6nM、低于约0.5nM或低于约0.4nM的 EC_{50} 结合到表达hCD8的细胞。

[0154] 在一些实施例中,如实例6中所定义的流式细胞术分析或基本上类似的分析所测量,抗体或其抗原结合片段以低于约1nM的 EC_{50} 结合到表达食蟹猕猴CD8的细胞。在某些实施例中,如通过流式细胞术分析,例如使用实例6中的分析格式,或基本上类似的分析所测量,抗体或其抗原结合片段以低于约0.9nM、低于约0.8nM、低于约0.7nM、低于约0.6nM、低于约0.5nM或低于约0.4nM的 EC_{50} 结合到表达猴CD8的细胞。

[0155] 在一些实施例中,如实例8中所定义的T细胞/APC荧光素酶报告分析,或基本上类似的分析所测量,抗体或其抗原结合片段以低于 $1.2E^{-09}$ M的 EC_{50} 减少或阻断CD8阳性T细胞活化。在某些实施例中,如通过T细胞/APC荧光素酶报告分析,例如使用如实例8中所定义的分析格式,或基本上类似的分析所测量,抗体或其抗原结合片段以至少约85%或约89%的

EC₅₀阻断CD8阳性T细胞活化。

[0156] 在一个实施例中,抗体或其片段是结合到CD8的完全人类单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段展现以下特征中的一个或多个:(i)包含SEQ ID NO:2的HCVR氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列;(ii)包含SEQ ID NO:10的所选LCVR氨基酸序列,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列;(iii)包含SEQ ID NO:8/16的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列;(iv)包含SEQ ID NO:4/12的HCDR1/LCDR1氨基酸序列对,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列;包含SEQ ID NO:6/14的HCDR2/LCDR2 氨基酸序列对,或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列;包含SEQ ID NO:8/16的 HCDR3/LCDR3氨基酸序列对,或其具有至少90%、至少95%、至少 98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列;(v)如表面等离子体共振分析中所测量,以低于约 3.5×10^{-8} M的结合解离平衡常数(K_D) 结合人类CD8;(vi)抑制活化CD8阳性T细胞中的IFN γ 产生;以及 (vii)抑制活化T细胞中的转录因子活化子蛋白(AP-1)。

[0157] 在某些实施例中,抗体可以通过结合到全长蛋白的任何区或片段,阻断或抑制与CD8 α 相关的MHC I类结合活性而起作用,所述全长蛋白的氨基酸序列展示于SEQ ID NO:18。在某些实施例中,抗体可以通过结合到全长蛋白的任何区或片段,阻断或抑制与CD8 β 相关的MHC I类结合活性而起作用,所述全长蛋白的氨基酸序列展示于SEQ ID NO: 20。

[0158] 在某些实施例中,抗CD8抗体或其抗原结合片段结合呈如SEQ ID NO:18中所例示的天然形式,或以重组方式产生的CD8 α ,或其片段中所例示的区域中的一个或多个内的表位。在一些实施例中,抗体结合到包含选自由CD8 α 的氨基酸残基22到182组成的组的一个或多个氨基酸的胞外区。在某些实施例中,抗CD8抗体或其抗原结合片段结合呈如SEQ ID NO: 20中所例示的天然形式,或以重组方式产生的CD8 β ,或其片段中所例示的区域中的一个或多个内的表位。在一些实施例中,抗体结合到包含选自由CD8 β 的氨基酸残基22到170组成的组的一个或多个氨基酸的胞外区。

[0159] 在某些实施例中,抗CD8抗体和其抗原结合片段与在CD8 α (SEQ ID NO:18)的细胞外区内发现的一个或多个表位或CD8 β (SEQ ID NO: 20) 相互作用。表位可以由3个或更多个(例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)位于 CD8 α 或CD8 β 的胞外区内的氨基酸的一个或多个连续序列组成。或者,表位可以由位于CD8 α 或CD8 β 的胞外区内的多个不连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。

[0160] 本公开包括与本文表1中所描述的特定示例性抗体,或具有表1 中所描述的示例性抗体的CDR序列的抗体结合到同一表位或表位的一部分的抗CD8抗体。同样,还包括与本文表1中所描述特定示例性抗体,或具有表1中所描述的示例性抗体的CDR序列的抗体竞争与CD8 或CD8片段结合的抗CD8抗体。举例来说,本公开包括与本文提供的一种或多种抗体(例如,mAb1)交叉竞争与CD8结合的抗CD8抗体。

[0161] 本文所描述的抗体和抗原结合片段特异性结合到CD8,并且调节 CD8与MHC I类的相互作用。抗CD8抗体可以以高亲和力或以低亲和力结合到CD8。在某些实施例中,抗体是阻断抗体,其中抗体结合到CD8并且阻断CD8与MHC I类的相互作用。在一些实施例中,本公开

的阻断抗体阻断CD8与MHC I类的结合和/或减少T细胞活化。在一些实施例中,阻断抗体适用于抑制免疫反应和/或治疗感染或自身免疫疾病或病症。

[0162] 在一些实施例中,抗体结合到CD8并且抑制活化CD8阳性T细胞中的IFN γ 产生。在某些实施例中,抗体结合到CD8并且抑制调节性T细胞活性,例如抑制CD8阳性T细胞中的转录因子AP-1。

[0163] 某些抗CD8抗体能够结合到CD8并且中和其活性,如由体外或体内分析所确定。可以使用本领域技术人员已知的任何标准方法,包括如本文所描述的结合分析或活性分析,测量抗体结合到CD8并且中和其活性的能力。

[0164] 用于测量结合活性的非限制性示例性体外分析在本文提供的实例中说明:在实例2中,通过表面等离子体共振测定示例性人类抗CD8 抗体对人类CD8的结合亲和力和动力学常数,并且测量在Biacore 4000 或T200仪器上进行;在实例6中,使用荧光分析来确定抗CD8抗体结合到CD8阳性T细胞和食蟹猕猴T细胞的能力;在实例7中,使用结合分析来确定抗CD8抗体减少CD8阳性T细胞中IFN γ 产生的能力;以及在实例8中,使用结合分析来确定抗CD8抗体改变T细胞转录活性的能力。

[0165] 除非另外具体指示,否则如本文所用,术语“抗体”应理解为涵盖包含两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的抗体分子(即,“完全抗体分子”)以及其抗原结合片段。如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成或基因工程化的多肽或糖蛋白。如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”或“抗体片段”是指保留特异性结合到CD8的能力的抗体的一个或多个片段。抗体片段可以包括Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、dAb片段、含有CDR的片段或分离CDR。在某些实施例中,术语“抗原结合片段”是指多特异性抗原结合分子的多肽或其片段。在此类实施例中,术语“抗原结合片段”包括例如特异性结合到CD8的MHC II类分子。可以使用任何合适的标准技术,如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变域和(任选地)恒定域的DNA的重组基因工程技术,例如,从完整抗体分子衍生抗体的抗原结合片段。此类DNA是已知的和/或可从例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)容易地获得或可以合成。可以以化学方式或通过使用分子生物学技术对所述DNA测序和操纵,例如以将一个或多个可变域和/或恒定域排列成合适构型,或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0166] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb 片段;和(vii) 由模拟抗体高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如,独立的互补性决定区(CDR),如CDR3肽),或受约束的FR3-CDR3-FR4肽。如本文所用,表述“抗原结合片段”内也涵盖其它工程化分子,如域特异性抗体、单域抗体、域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、微型抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小型模块化免疫药物(SMIP) 和鲨鱼可变IgNAR域。

[0167] 抗体的抗原结合片段典型地包含至少一个可变域。可变域可以具有任何尺寸或氨基酸组成并且一般包含邻近一个或多个框架序列或与一个或多个框架序列同框的至少一个CDR。在具有与V_L域缔合的V_H域的抗原结合片段中,V_H和V_L域可以按任何合适的排列彼此相对定位。举例来说,可变区可以是二聚的并且含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。或者,抗体

的抗原结合片段可以含有单体 V_H 或 V_L 域。

[0168] 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段可以含有共价键联到至少一个恒定域的至少一个可变域。可以在本公开的抗体的抗原结合片段内发现的可变域和恒定域的非限制性示例性构型包括:(i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; 以及 (xiv) V_L-C_L 。在可变域和恒定域的任何构型,包括上文所列的示例性构型中的任一个中,可变域和恒定域可以彼此直接连接或可以由完全或部分铰链或接头区连接。铰链区可以由在单一多肽分子中相邻可变域和/或恒定域之间产生柔性连接或半柔性键联的至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成。此外,本公开的抗体的抗原结合片段可以包含具有上文所列的可变域和恒定域构型中的任一个的彼此和/或与一个或多个单体 V_H 或 V_L 域(例如,通过二硫键)呈非共价缔合的同二聚体或异二聚体(或其它多聚体)。

[0169] 本公开的抗CD8抗体和抗体片段涵盖氨基酸序列与所描述的抗体的氨基酸序列不同,但保留结合CD8的能力的蛋白质。当与亲本序列相比较时,此类变体抗体和抗体片段包含一个或多个氨基酸添加、缺失或取代,但展现基本上等效于所述抗体的生物活性的生物活性。同样,本公开的抗体编码DNA序列涵盖当与所公开的序列相比较时包含一个或多个核苷酸添加、缺失或取代,但编码与本公开的抗体或抗体片段基本上生物等效的抗体或抗体片段的序列。

[0170] 如果例如两种抗原结合蛋白或抗体是当在类似实验条件下以单次剂量或多次剂量施用相同摩尔剂量时,吸收速率和程度不显示显著差异的药物等效物或药物替代物,则将其视为生物等效的。如果一些抗体的吸收程度相同但吸收速率不同,则认为这些抗体是等效物或药物替代物,并且由于这种吸收速率的差异是有意产生的并以标记反映,不必在例如长期使用中达到有效的身体药物浓度并且被视为对于特定药品研究无医学意义,则又可以将其视为生物等效的。

[0171] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度或效力无临床上有意义的差异,则这两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0172] 在一个实施例中,如果个体可以在参照产品与生物产品之间切换一次或多次,但不良作用风险相较于无此类切换的持续疗法无预期增加,包括临床上显著的免疫原性变化或有效性降低,则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0173] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白都是通过对于一种或多种使用条件常见的一种或多种作用机制起作用,使得此类机制是已知的,则这两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0174] 生物等效性可以由体内和/或体外方法证明。生物等效性测量包括例如(a)在人体或其它哺乳动物中进行的体内测试,其中在血液、血浆、血清或其它生物流体中随时间测量抗体或其代谢物的浓度;(b)与人体内生物利用率数据相关并且合理地预测这些数据的体外测试;(c)在人体或其它哺乳动物中进行的体内测试,其中随时间测量抗体(或其靶)的适当急性药理学作用;以及(d)确定抗体的安全性、功效或生物利用率或生物等效性的良好对照的临床试验。

[0175] 本公开的抗体的生物等效变体可以通过例如进行残基或序列的各种取代,或使生

物活性不需要的末端或内部残基或序列缺失来构建。举例来说,可以缺失不是生物活性必需的半胱氨酸残基或用其他氨基酸替换,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫桥键。在其它情况下,生物等效抗体可以包括包含氨基酸变化的抗体变体,这些变化改变抗体的糖基化特征,例如消除或去除糖基化的突变。

[0176] 包含Fc变体的抗CD8抗体

[0177] 根据本公开的某些实施例,抗CD8抗体包含Fc域,所述Fc域包含例如相比于中性pH,在酸性pH下增强或减弱抗体与FcRn受体结合的一个或多个突变。举例来说,本公开包括抗CD8抗体,其包含Fc域的C_H2或C_H3区中的突变,其中所述突变提高酸性环境中(例如,在体内中,其中pH在约5.5到约6.0的范围内)Fc域对FcRn的亲和力。在将抗体施用给动物时,此类突变可以使所述抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如位置250(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,S或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或434处的修饰(例如,A、W、H、F或Y[N434A、N434W、N434H、N434F或N434Y]);或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308处的修饰(例如,308F、V308F)以及位置434处的修饰。在一个实施例中,修饰包含428L(例如,M428L)和434S(例如,N434S)修饰;428L、259I(例如,V259I)和308F(例如,V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如,T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如,308F或308P)。在又一实施例中,修饰包含265A(例如,D265A)和/或297A(例如,N297A)修饰。

[0178] 举例来说,本公开包括包含Fc域的抗CD8抗体,所述Fc域包含一对或多对或一组或多组选自以下组成的组的突变:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如,M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);257I和311I(例如,P257I和Q311I);257I和434H(例如,P257I和N434H);376V和434H(例如,D376V和N434H);307A、380A和434A(例如,T307A、E380A和N434A);以及433K和434F(例如,H433K和N434F)。在一个实施例中,本公开包括包含Fc域的抗CD8抗体,所述Fc域包含IgG4的铰链区中的S108P突变,以促进二聚体稳定化。前述Fc域突变的所有可能组合和本文所公开的抗体可变域内的其它突变都涵盖在本公开的范围。

[0179] 本公开还包括包含嵌合重链恒定(C_H)区的抗CD8抗体,其中嵌合C_H区包含来源于多于一种免疫球蛋白同型的C_H区的区段。举例来说,本公开的抗体可以包含嵌合C_H区,所述区包含来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4分子的C_H2域的部分或全部,其与来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4分子的C_H3域的部分或全部组合。根据某些实施例,本公开的抗体包含具有嵌合铰链区的C_H区。举例来说,嵌合铰链可以包含来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“上铰链”氨基酸序列(根据EU编号,位置216到227的氨基酸残基),其与来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“下铰链”序列(根据EU编号,位置228到236的氨基酸残基)组合。根据某些实施例,嵌合铰链区包含来源于人类IgG1或人类IgG4上铰链的氨基酸残基,和来源于人类IgG2下铰链的氨基酸残基。包含如本文所描述的嵌合C_H区的抗体可以在某些实施例中展现修饰的Fc效应功能,而不会不利地影响抗体的治疗或药物动力学特性。(参见例如美国专利公开第20140243504号,其公开内容以全文引用的方式并入本文中)。

[0180] B. 正电子发射体和螯合部分

[0181] 合适的正电子发射体包括但不限于与螯合部分形成稳定复合物,并且具有适于免疫PET成像目的的物理半衰期的正电子发射体。说明性正电子发射体包括但不限于⁸⁹Zr、⁶⁸Ga、⁶⁴Cu、⁴⁴Sc和⁸⁶Y。合适的正电子发射体还包括与CD8结合蛋白直接键结的正电子发射体,包括但不限于⁷⁶Br和¹²⁴I,和通过辅基引入的正电子发射体,例如¹⁸F。

[0182] 本文所描述的螯合部分是是与CD8结合蛋白(例如,抗CD8抗体)共价键联的化学部分,并且包含能够螯合正电子发射体的部分,即,能够与正电子发射体反应以形成配位螯合复合物。合适部分包括允许高效负载特定金属,并且形成对于诊断用途(例如,免疫PET成像)来说在体内足够稳定的金属-螯合剂复合物的部分。说明性螯合部分包括使正电子发射体的解离和在矿物骨、血浆蛋白和/或骨髓沉积中的累积减到最少,直到适于诊断用途的程度的螯合部分。

[0183] 螯合部分的实例包括但不限于与正电子发射体⁸⁹Zr、⁶⁸Ga、⁶⁴Cu、⁴⁴Sc和/或⁸⁶Y形成稳定复合物的螯合部分。说明性螯合部分包括但不限于以下中所描述的螯合部分:Nature Protocols,5(4):739,2010; Bioconjugate Chem.,26(12):2579(2015);Chem Commun (Camb),51(12):2301(2015);Mol.Pharmaceutics,12:2142(2015);Mol.Imaging Biol.,18:344(2015);Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging,37:250(2010);Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging(2016).doi:10.1007/s00259-016-3499-x; Bioconjugate Chem.,26(12):2579(2015);WO 2015/140212A1;以及US 5,639,879,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0184] 说明性螯合部分还包括但不限于包含以下的部分:去铁敏(desferrioxamine; DFO)、1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦)酸(DOTP)、1R,4R,7R,10R)- $\alpha'\alpha''\alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮化十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTMA)、1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四乙酸(TETA)、H₄octapa、H₆phospa、H₂dedpa、H₅decapa、H₂azapa、HOPO、DO2A、1,4,7,10-四(氨甲酰基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(DOTAM)、1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N''-三乙酸(NOTA)、1,4,7,10-四(氨甲酰基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(DOTAM)、1,4,8,11-四氮杂二环[6.6.2]十六烷-4,11-二乙酸(CB-TE2A)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷(轮环藤宁(Cyclen))、1,4,8,11-四氮杂环十四烷(环拉胺(Cyclam))、八齿螯合剂、六齿螯合剂、膦酸盐类螯合剂、大环螯合剂、包含大环对苯二甲酰胺配体的螯合剂、双官能螯合剂、镰刀霉氨酸(fusarentin)C和镰刀霉氨酸C衍生物螯合剂、三乙酰镰刀霉氨酸C(TAFC)、铁草铵E(FOX E)、铁草铵B(FOX B)、铁色素A(FCHA)等等。

[0185] 在一些实施例中,螯合部分通过接头部分共价键结到CD8结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段),所述接头部分将螯合部分的螯合部与结合蛋白共价连接。在一些实施例中,这些接头部分由以下之间的反应形成:CD8结合蛋白的反应部分(例如,抗体的半胱氨酸或赖氨酸),和连接到螯合剂的反应性部分,包括例如对异硫氰酸根合苯甲基和下文缀合方法中提供的反应部分。此外,此类接头部分任选地包含用于调节极性、溶解度、空间相互作用、刚度和/或螯合部分与CD8结合蛋白之间的长度的目的的化学基团。

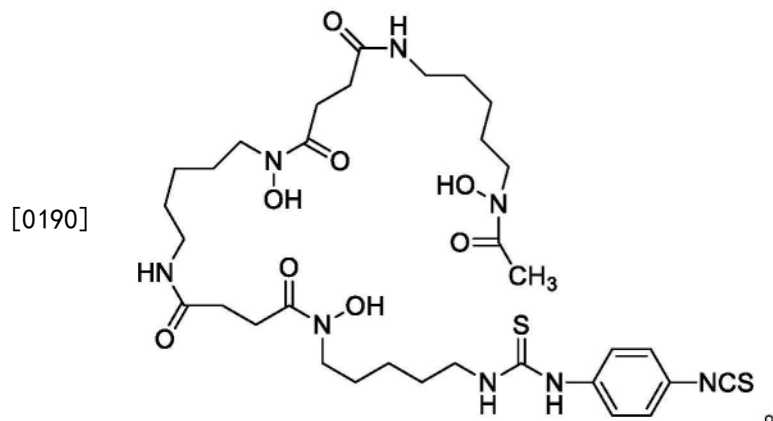
[0186] C. 放射性标记的抗CD8缀合物的制备

[0187] 放射性标记的抗CD8蛋白缀合物可以通过(1)使CD8结合蛋白(例如,抗体)与包含

正电子发射体螯合剂和对CD8结合蛋白的期望缀合位点具有反应性的部分的分子反应,和(2)负载期望正电子发射体来制备。

[0188] 合适的缀合位点包括但不限于赖氨酸和半胱氨酸,其两者可以是例如天然或工程化的,并且可以例如存在于抗体的重链或轻链上。半胱氨酸缀合位点包括但不限于从抗体二硫键突变、插入或减少获得的位点。用于制造半胱氨酸工程化抗体的方法包括但不限于W02011/056983中所公开的方法。位点特异性缀合方法也可以用于将缀合反应引导到抗体的特定位置、达成期望的化学计量和/或达成期望的螯合剂与抗体的比率。此类缀合方法是本领域普通技术人员已知的,并且包括但不限于半胱氨酸工程化和酶促和化学酶促方法,包括但不限于谷氨酰胺缀合、Q295缀合和谷氨酰胺转氨酶介导的缀合,以及描述于J.Clin.Immunol.,36:100 (2016) 中的方法,所述文献以全文引用的方式并入本文中。对期望缀合位点具有反应性的合适部分一般能够实现CD8结合蛋白(例如,抗体)与正电子发射体螯合剂的高效和便捷偶联。对赖氨酸和半胱氨酸位点具有反应性的部分包括普通技术人员已知的亲电子基团。在某些方面,当所需的缀合位点是赖氨酸时,反应性部分是异硫氰酸酯,例如对异硫氰酸根合苯甲基或反应性酯。在某些方面,当所需缀合位点是半胱氨酸时,反应部分是马来酰亚胺。

[0189] 当螯合剂是去铁敏(DFO)时,合适的反应部分包括但不限于对异硫氰酸根合苯甲基、正羟基琥珀酰亚胺酯、2,3,5,6四氟苯酚酯、正琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯,以及描述于BioMed Research International,第2014卷,文章编号203601中的部分,所述文献以全文引用的方式并入本文中。在某些实施例中,CD8结合蛋白是抗体,并且包含正电子发射体螯合剂和对缀合位点具有反应性的部分的分子是对异硫氰酸根合苯甲基-去铁敏(p-SCN-Bn-DFO):



[0191] 正电子发射体负载通过以下实现:将CD8结合蛋白螯合剂缀合物与正电子发射体一起培育,持续足以允许所述正电子发射体与螯合剂配位的时间,例如通过进行本文提供的实例中所描述的方法或基本上类似的方法。

[0192] D. 缀合物的说明性实施例

[0193] 本公开包括放射性标记的抗体缀合物,其包含结合人类CD8的抗体或其抗原结合片段和正电子发射体。本公开还包括放射性标记的抗体缀合物,其包含结合人类CD8的抗体或其抗原结合片段、螯合部分和正电子发射体。

[0194] 在一些实施例中,螯合部分包含能够与⁸⁹Zr形成复合物的螯合剂。在某些实施例中,螯合部分包含去铁敏。在某些实施例中,螯合部分是对异硫氰酸根合苯甲基-去铁敏。

[0195] 在一些实施例中,正电子发射体是 ^{89}Zr 。在一些实施例中,少于1.0%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合,少于0.9%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合,少于0.8%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合,少于0.7%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合,少于0.6%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合,少于0.5%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合,少于0.4%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合,少于0.3%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合,少于0.2%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合或少于0.1%的抗CD8抗体与正电子发射体缀合。

[0196] 在一些实施例中,缀合物的螯合部分与抗体的比率是1.0到2.0。如本文所用,“螯合部分与抗体的比率”是螯合剂部分与抗体的平均比率并且是每抗体螯合剂负载的量度。这种比率类似于由本领域技术人员使用以测量抗体-药物缀合物(ADC)的每抗体药物负载的“DAR”,即药物-抗体比率;在本文针对iPET成像所描述的缀合物的情形下,可以使用本文所描述的方法和本领域中已知用于测定DAR的其它方法,例如Wang等人, *Antibody-Drug Conjugates, The 21st Century Magic Bullets for Cancer* (2015)中所描述的方法确定螯合部分与抗体的比率。在一些实施例中,螯合部分与抗体的比率是约1.7。在一些实施例中,螯合部分与抗体的比率是1.0到2.0。在一些实施例中,螯合部分与抗体的比率是约1.7。

[0197] 在一特定实施例中,螯合部分是对异硫氰酸根合苯甲基-去铁敏,并且正电子发射体是 ^{89}Zr 。在另一特定实施例中,螯合部分是对异硫氰酸根合苯甲基-去铁敏,并且正电子发射体是 ^{89}Zr ,并且缀合物的螯合部分与抗体的比率是1到2。

[0198] 在一些实施例中,本文提供了结合CD8的抗原结合蛋白,其中结合CD8的所述抗原结合蛋白共价键结到具有以下结构的一个或多个部分:

[0199] $-\text{L}-\text{M}_z$

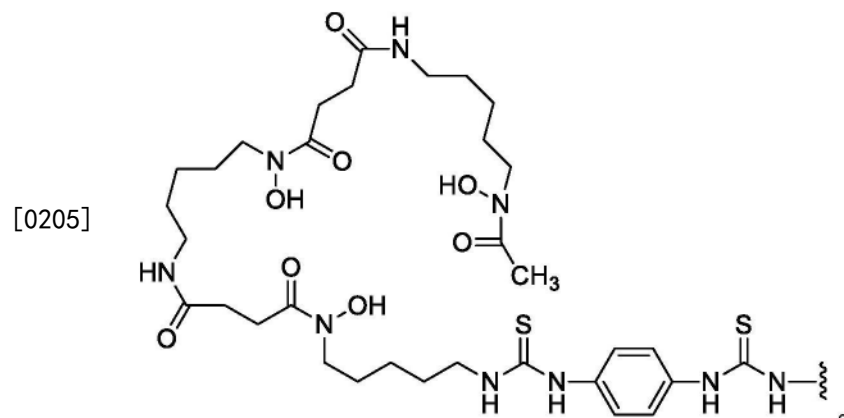
[0200] 其中L是螯合部分;M是正电子发射体;并且z在每次出现时独立地是0或1;并且其中z中的至少一个是1。在某些实施例中,放射性标记的抗原结合蛋白是式(I)化合物:

[0201] $\text{M}-\text{L}-\text{A}-[\text{L}-\text{M}_z]_k$

[0202] (I)

[0203] A是结合CD8的蛋白质;L是螯合部分;M是正电子发射体;z是0或1;并且k是0到30的整数。在一些实施例中,k是1。在一些实施例中,k是2。

[0204] 在一些实施例中,L是:

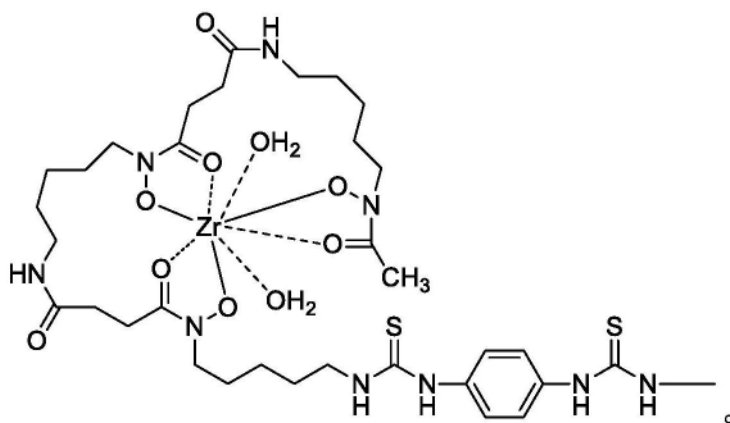


[0206] 在一些实施例中,M是 ^{89}Zr 。

[0207] 在一些实施例中,k是1到2的整数。在一些实施例中,k是1。在一些实施例中,k是2。

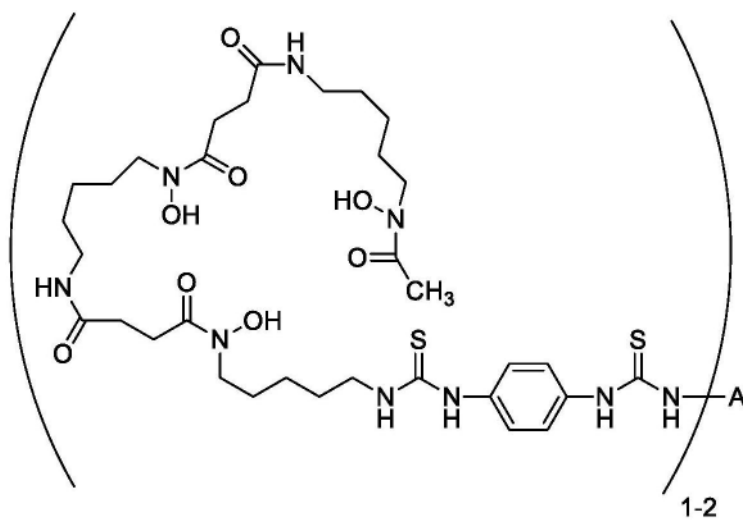
[0208] 在一些实施例中, $-\text{L}-\text{M}$ 是

[0209]



[0210] 本公开中还包括合成放射性标记的抗体缀合物的方法,所述方法包含使式 (III) 化合物:

[0211]



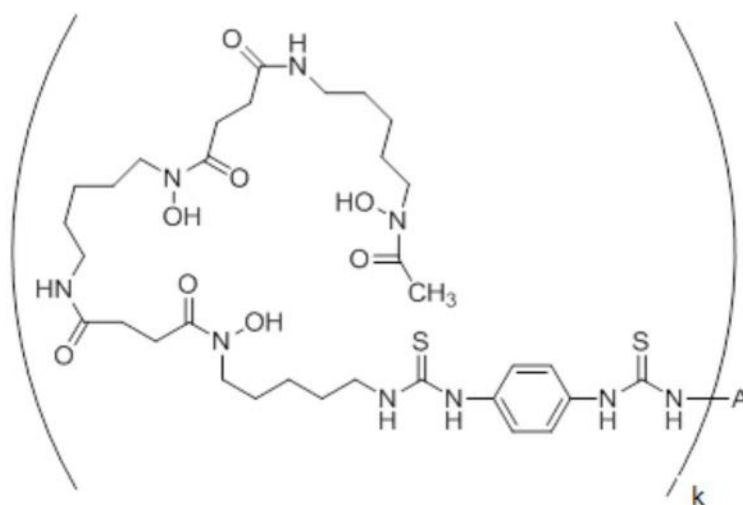
(III)

[0212] 与⁸⁹Zr接触,其中A是结合CD8的抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,式 (III) 化合物通过使结合CD8的抗体或其抗原结合片段与p-SCN-Bn-DF0接触而合成。

[0213] 本文还提供了式 (III) 化合物与⁸⁹Zr之间反应的产物。

[0214] 本文提供了式 (III) 化合物:

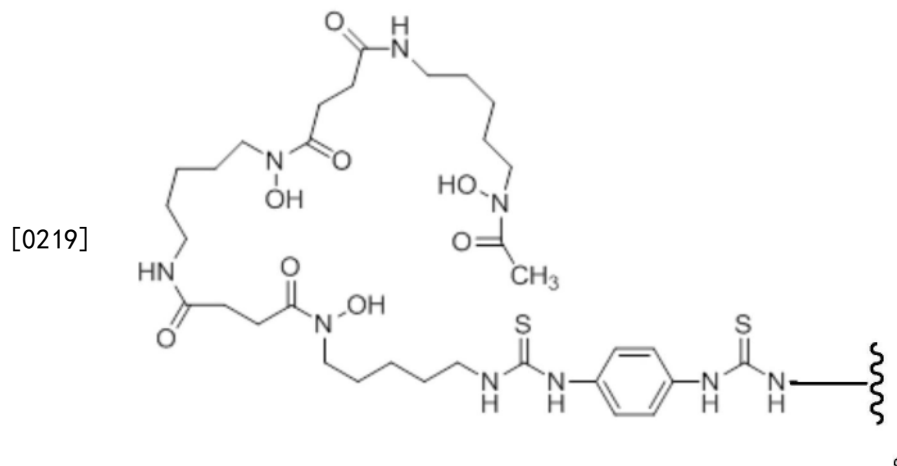
[0215]




[0216] 其中A是结合CD8的抗体或其抗原结合片段,并且k是1到30 的整数。在一些实施例中,k是1或2。

[0217] 本文提供了抗体缀合物,其包含 (i) 结合CD8的抗体或其抗原结合片段和 (ii) 一种或多种螯合部分。

[0218] 在一些实施例中,螯合部分包含:



[0220]  是与抗体或其抗原结合片段的共价键。

[0221] 在一些方面,抗体缀合物的螯合部分与抗体的比率是约1.0到约 2.0。在一些方面,抗体缀合物的螯合部分与抗体的比率是约1.7。

[0222] 在一些实施例中,本文提供了包含具有以下结构的缀合物的组合物:

[0223] $A-L_k$

[0224] 其中A是结合CD8的蛋白质;L是螯合部分;并且k是1到30 的整数;所述缀合物以足以提供适于临床PET成像的比活度的量与正电子发射体螯合。在一些实施例中,螯合正电子发射体的量是足以提供每1到50mg结合CD8的蛋白质约1到约50mCi的比活度的量。

[0225] 在一些实施例中,螯合正电子发射体的量是一种量,其足以提供每 1到50mg结合CD8的蛋白质至多50mCi、至多45mCi、至多40mCi、至多35mCi、至多30mCi、至多25mCi或至多10mCi的比活度,例如在约5到约50mCi、约10到约40mCi、约15到约30mCi、约7到约25mCi、约20到约50mCi或约5到约10mCi范围内。

[0226] 在一些实施例中,如表面等离子体共振分析中所测量,抗体或其抗原结合片段以低于约 $3.5 \times 10^{-8}M$ 的结合解离平衡常数(K_D)结合人类 CD8。

[0227] 在一些实施例中,在表面等离子体共振分析中,抗体或其抗原结合片段以低于约 $3.5 \times 10^{-8}M$ 的 K_D 结合人类CD8 α 。

[0228] 在一些实施例中,如表面等离子体共振分析中所测量,抗体或其抗原结合片段以低于约 $3.3 \times 10^{-8}M$ 的 K_D 结合人类CD8。

[0229] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段与参考抗体竞争与人类 CD8的结合,所述参考抗体包含HCVR的互补决定区(CDR),其中 HCVR具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和LCVR的CDR,其中LCVR 具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施例中,参考抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

[0230] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段抑制CD8结合到MHC I 类。在一些实施例

中,抗体或其抗原结合片段抑制活化CD8 T细胞中的IFN γ 产生。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段抑制活化T细胞中的转录因子活化子蛋白(AP-1)。

[0231] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含HCVR的互补决定区(CDR),其中HCVR具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和LCVR的CDR,其中LCVR具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在某些实施例中,分离抗体包含SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

[0232] 在一些实施例中,抗体是特异性结合到人类CD8的人类单克隆抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)。

[0233] 在一些实施例中,抗体是特异性结合到人类CD8的人类单克隆抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)。

[0234] 在一些实施例中,抗体是特异性结合到人类CD8的人类单克隆抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(a)具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCVR;和(b)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCVR。

[0235] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含含于SEQ ID NO:2的重链可变区(HCVR)内的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3);和含于SEQ ID NO:10的轻链可变区(LCVR)内的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0236] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16的六个CDR氨基酸序列组合。

[0237] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:2/10的 HCVR/LCVR氨基酸序列对。

[0238] IV.使用放射性标记的免疫缀合物的方法

[0239] 在某些方面,本公开提供了本公开的放射性标记的抗体缀合物的诊断和治疗使用方法。

[0240] 根据一个方面,本公开提供了检测组织中的CD8的方法,所述方法包含将本文提供的放射性标记的抗CD8抗体缀合物施用于组织;和通过正电子发射断层扫描(PET)成像来使CD8表达可视化。在某些实施例中,组织包含细胞或细胞系。在某些实施例中,组织存在于个体中,其中个体是哺乳动物。在某些实施例中,个体是人类个体。在某些实施例中,个体患有选自癌症、感染性疾病、自身免疫疾病和炎症疾病组成的组的疾病或病症。在一个实施例中,个体患有癌症。在某些实施例中,感染性疾病是由例如以下引起的细菌感染:立克次体细菌(rickettsial bacteria)、杆菌属(bacilli)、克雷伯氏菌属(klebsiella)、脑膜炎球菌(meningococci)和淋球菌(gonococci)、变形杆菌属(proteus)、肺炎球菌(pneumococci)、假单胞菌属(pseudomonas)、链球菌属(streptococci)、葡萄球菌属(staphylococci)、沙雷氏菌属(serratia)、疏螺旋体属(Borriella)、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)、衣原体属(Chlamydia)、梭菌属(Clostridium)、白喉杆菌(Corynebacterium diphtheriae)、军团菌属(Legionella)、麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)、弥漫型麻风分枝杆菌(Mycobacterium lepromatosis)、沙门菌属(Salmonella)、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)以及鼠疫耶尔森菌(Yersinia pestis)。在某些实施例中,感染性疾病是由例如以下引起的病毒感染:人类免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)、乙

型肝炎病毒 (HBV)、疱疹病毒 (例如, VZV、HSV-I、HAV-6、HSV-II、CMV 和埃 - 巴二氏病毒 (Epstein Barr virus))、人类乳头瘤病毒 (HPV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 以及猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)。在某些实施例中, 感染性疾病是由例如以下引起的寄生虫感染: 内阿米巴属 (*Entamoeba* spp.)、蛲虫 (*Enterobius vermicularis*)、利什曼原虫属 (*Leishmania* spp.)、弓蛔虫属 (*Toxocara* spp.)、疟原虫属 (*Plasmodium* spp.)、裂体吸虫属 (*Schistosoma* spp.)、猪带绦虫 (*Taenia solium*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 以及克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)。在某些实施例中, 感染性疾病是由例如以下引起的真菌感染: 曲霉菌属 (*Aspergillus*) (烟曲霉 (*fumigatus*)、黑曲霉 (*niger*) 等)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、念珠菌属 (*Candida*) (白色念珠菌 (*albicans*)、克柔念珠菌 (*krusei*)、光滑念珠菌 (*glabrata*)、热带念珠菌 (*tropicalis*) 等)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、毛霉目菌属 (Genus *Mucorales*) (白霉菌属 (*mucor*)、犁头霉属 (*absidia*)、根霉菌属 (*rhizopus*) 等)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、巴西芽生菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*) 以及申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)。

[0241] 根据一个方面, 本公开提供了对表达 CD8 的组织进行成像的方法, 所述方法包含将本公开的放射性标记的抗 CD8 抗体缀合物施用于组织; 和通过正电子发射断层扫描 (PET) 成像来使 CD8 表达可视化。在一个实施例中, 组织包含在肿瘤中。在一个实施例中, 组织包含在肿瘤细胞培养物或肿瘤细胞系中。在一个实施例中, 组织包含在个体中的肿瘤病灶中。在一个实施例中, 组织是组织中的瘤内淋巴细胞。在一个实施例中, 组织包含表达 CD8 的细胞。

[0242] 根据一个方面, 本公开提供了用于测量对疗法的反应的方法, 其中对疗法的反应与 CD8 阳性 T 细胞相对于基线水平的增加相关。根据这一方面, 方法包含向有需要的个体施用本文提供的放射性标记的抗体缀合物, 和通过正电子发射断层扫描 (PET) 成像来使 CD8 表达可视化。在某些实施例中, CD8 阳性 T 细胞存在于个体中的肿瘤中。在某些实施例中, CD8 表达的增加与肿瘤中的炎症增加相关。在某些实施例中, 炎症存在于个体中的感染组织中。在某些实施例中, CD8 表达的降低与感染组织中的炎症减少相关。

[0243] 根据一个方面, 本公开提供了用于测量对疗法的反应的方法, 其中对疗法的反应与相对于基线水平增加的 CD8 阳性 T 细胞相关。根据这一方面, 方法包含 (i) 向有需要的个体施用本文提供的放射性标记的抗体缀合物, 并且通过正电子发射断层扫描 (PET) 成像来使 CD8 表达可视化, 和 (ii) 在疗法起始后重复步骤 (i) 一次或多次。在某些实施例中, CD8 阳性 T 细胞存在于个体的组织中。在某些实施例中, CD8 表达的增加与组织中的炎症增加相关。在某些实施例中, CD8 表达的降低与组织中的炎症减少相关。在某些实施例中, 将步骤 (i) 中可视化的 CD8 表达与步骤 (ii) 中可视化的 CD8 表达相比较。

[0244] 根据一个方面, 本公开提供了用于预测对抗肿瘤疗法的反应的方法。所述方法包含向有需要的个体施用放射性标记的抗 CD8 抗体缀合物, 和确定个体的实体肿瘤包含 CD8 阳性 T 细胞。如果个体的肿瘤由 CD8 阳性 T 细胞浸润, 或免疫学 ‘热 (hot)’ , 则个体可能对抗肿瘤疗法起反应。CD8 阳性 T 细胞的存在可以是反应的预测标记或存活的预后标记。举例来说, 基线 CD8 阳性细胞肿瘤浸润指示乳腺癌、头/颈癌和卵巢癌的存活的预后。另外, 在抗 PD-1 疗法或抗 PDL-1 疗法期间检测到的 CD8 阳性细胞的肿瘤浸润是对治疗反应的预测标记。

[0245] 根据一个方面, 本公开提供了用于确定患有肿瘤的个体是否适于抗肿瘤疗法的方法

法,所述方法包含施用本公开的放射性标记的抗体缀合物,和通过PET成像将所施用的放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中定位,其中肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在将个体鉴别为适于抗肿瘤疗法。

[0246] 根据一个方面,本公开提供了用于鉴别患有用于抗肿瘤疗法的肿瘤的个体的方法,所述抗肿瘤疗法包含PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂,所述方法包含向个体施用本公开的放射性标记的抗体缀合物,和通过PET成像将所施用的放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中定位,其中肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在将个体鉴别为适于抗肿瘤疗法。在一些实施例中,个体进一步施用放射性标记的抗PD-1缀合物,并且通过PET成像将所施用的放射性标记的抗PD-1缀合物在肿瘤中定位,其中肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在将个体鉴别为适于包含PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂的抗肿瘤疗法。

[0247] 本公开的另一方面提供了用于监测随时间推移肿瘤中的T细胞存在和/或浸润的方法。在一些实施例中,所述方法包含(a)在第一时间点向患有肿瘤的个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,并且确定肿瘤中CD8阳性T细胞的存在;(b)向个体施用一个或多个剂量的抗肿瘤疗法;以及(c)在施用抗肿瘤疗法后1到20周,在第二时间点向个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,并且确定肿瘤中CD8阳性T细胞的存在。肿瘤中T细胞的存在指示对抗肿瘤疗法的阳性反应。可以在用抗肿瘤疗法进行的治疗过程中重复步骤(c)。第一时间点可以在(b)之前出现,或可以在(b)之后出现。

[0248] 确定肿瘤中T细胞的存在可以涉及通过本领域技术人员已知的方法定量T细胞水平。在一些方面,将CD8阳性T细胞的基线水平与在抗肿瘤疗法过程之后或期间测量的CD8阳性T细胞水平进行比较。相对于基线维持CD8阳性T细胞水平,或随时间推移CD8阳性T细胞的增加指示对抗肿瘤疗法的阳性反应。

[0249] 确定肿瘤中T细胞的存在可以涉及简单判定--肿瘤是T细胞阳性的或肿瘤是T细胞阴性的。

[0250] 本文还提供了用于预测个体对抗肿瘤疗法的反应的方法,所述方法包含判定肿瘤是否是CD8阳性的,其中如果肿瘤是CD8阳性的,即肿瘤含有T细胞,则其预测个体对抗肿瘤疗法的阳性反应。在某些实施例中,通过施用本公开的放射性标记的抗CD8抗体缀合物并且通过PET成像将放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中定位确定肿瘤为阳性,其中肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在指示肿瘤是CD8阳性的。在一些实施例中,抗肿瘤疗法是检查点抑制剂疗法。在一些实施例中,抗肿瘤疗法选自PD-1抑制剂(例如,REGN2810、BGB-A317、纳武单抗、匹立珠单抗和派姆单抗)、PD-L1抑制剂(例如,阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、MDX-1105和REGN3504以及专利公开第US 2015-0203580号中公开的那些)、CTLA-4抑制剂(例如,伊匹单抗)、TIM3抑制剂、BTLA抑制剂、TIGIT抑制剂、CD47抑制剂、GITR抑制剂、LAG3抑制剂、另一T细胞共抑制剂或配体的拮抗剂(例如,针对CD-28、2B4、LY108、LAIR1、ICOS、CD160或VISTA的抗体)、吡哆胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂[例如,“VEGF捕获剂”,如阿柏西普或如US 7,087,411中所列举的其它VEGF抑制性融合蛋白,或抗VEGF抗体或其抗原结合片段(例如,贝伐单抗或兰尼单抗)或VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼)]、Ang2抑制剂(例如,内瓦单抗)、转化生长因子 β (TGF β) 抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂(例如,埃罗替尼、西妥昔单抗)、CD20抑制剂(例如,抗CD20抗体,如利妥昔单抗)、针对肿瘤特异性抗原[例如,CA9、CA125、黑

素瘤相关抗原3 (MAGE3)、癌胚抗原 (CEA)、波形蛋白、肿瘤-M2-PK、前列腺特异性抗原 (PSA)、粘蛋白-1、MART-1和CA19-9]的抗体、疫苗 (例如,卡介苗、癌症疫苗)、增加抗原呈递的佐剂 (例如,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、双特异性抗体 (例如,CD3×CD20双特异性抗体或PSMA×CD3双特异性抗体)、细胞毒素、化疗剂 (例如,达卡巴嗪、替莫唑胺、环磷酰胺、多西他赛、小红莓、道诺霉素、顺铂、卡铂、吉西他滨、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、太平洋紫杉醇和长春新碱)、环磷酰胺、放疗、IL-6R抑制剂 (例如,沙瑞单抗)、IL-4R抑制剂 (例如,杜匹鲁单抗)、IL-10抑制剂、细胞因子 (如IL-2、IL-7、IL-21和IL-15) 以及抗体-药物缀合物 (ADC) (例如,抗CD19-DM4 ADC和抗DS6-DM4 ADC)。

[0251] 根据一个方面,本公开提供了用于预测患有实体肿瘤的个体对抗肿瘤疗法的反应的方法,所述方法包含判定肿瘤是否是CD8阳性的,其中如果肿瘤是CD8阳性的,则预测个体的阳性反应。在某些实施例中,通过施用本公开的放射性标记的抗体缀合物并且通过PET成像将放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中定位确定肿瘤为阳性,其中肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在指示肿瘤是CD8阳性的。

[0252] 根据一个方面,本公开提供了用于检测个体的CD8阳性肿瘤的方法。根据这一方面,方法包含向个体施用本公开的放射性标记的抗体缀合物;和通过PET成像确定放射性标记的抗体缀合物的定位,其中在肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在指示肿瘤是CD8阳性的。

[0253] 本文提供了预测对抗肿瘤疗法的阳性反应的方法,所述方法包含:向个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,确定实体肿瘤中CD8阳性T细胞的存在。CD8阳性T细胞的存在预测对抗肿瘤疗法的阳性反应。

[0254] 本文提供了用于监测个体中对抗肿瘤疗法的阳性反应的方法,所述方法包含:(a) 向个体施用一个或多个剂量的抗肿瘤疗法;和(b) 在施用抗肿瘤疗法后1到20周,向个体施用放射性标记的抗CD8抗体缀合物,以确定实体肿瘤中CD8阳性T细胞的存在。CD8阳性T细胞的存在指示对抗肿瘤疗法的阳性反应。

[0255] 本文提供了用于预测或监测患有实体肿瘤的个体中的抗肿瘤疗法的成功或功效的方法,所述方法包含:(a) 确定肿瘤中的CD8阳性细胞水平;和(b) 使CD8阳性细胞水平与成功的抗肿瘤疗法相关联。超过某一阈值的升高水平预测或指示成功的抗肿瘤疗法。

[0256] 如本文所用,表述“有需要的个体”意指展现癌症的一种或多种症状或指征,和/或已诊断患有癌症 (包括实体肿瘤) 以及需要对所述癌症进行治疗的人类或非人类哺乳动物。在许多实施例中,术语“个体”可以与术语“患者”互换使用。举例来说,人类个体可以诊断患有原发性或转移性肿瘤和/或具有一种或多种症状或指征,包括但不限于不可解释的重量减轻、全身虚弱、持续疲劳、食欲不振、发热、盗汗、骨疼痛、呼吸急促、腹部肿胀、胸痛/胸闷、脾脏肿大以及癌症相关生物标记物 (例如,CA125) 水平升高。所述表述包括患有原发性肿瘤或已建立肿瘤的个体。在具体实施例中,所述表述包括患有实体肿瘤和/或需要对实体肿瘤进行治疗的人类个体,所述实体肿瘤例如结肠癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、皮肤癌、肝癌、骨癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、头颈癌以及脑癌。所述术语包括患有原发性或转移性肿瘤 (晚期恶性肿瘤) 的个体。在某些实施例中,表述“有需要的个体”包括患有实体肿瘤的个体,所述实体肿瘤对先前疗法 (例如,用抗癌剂进行的治疗) 具有抗性 or 难以用先前疗法治疗,或不能由先前疗法充分控制。举例来说,所述表述包括已用一线或多线先前疗法治疗的个体,

所述先前疗法如用利用化疗(例如,卡铂或多西他赛)的治疗。在某些实施例中,表述“有需要的个体”包括患有实体肿瘤的个体,所述实体肿瘤已用一线或多线先前疗法治疗,但其随后复发或转移。在某些实施例中,所述术语包括患有炎性疾病或病症的个体,所述炎性疾病或病症包括但不限于癌症、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、牙周炎、花粉热、心脏病、冠状动脉疾病、感染性疾病、支气管炎、皮炎、脑膜炎、哮喘、肺结核、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病(Crohn's disease)、炎性肠病、肝炎、鼻窦炎、牛皮癣、过敏、纤维化、狼疮、血管炎、强直性脊柱炎、格雷夫斯病(Graves' disease)、乳糜泻、纤维肌痛以及移植排斥反应。

[0257] 在某些实施例中,本公开的方法用于患有实体肿瘤的个体。术语“肿瘤”、“癌症”和“恶性肿瘤”在本文中可互换使用。如本文所用,术语“实体肿瘤”是指通常不含囊肿或液体区域的异常组织块。实体肿瘤可以是良性(非癌症)或恶性的(癌症)。出于本公开的目的,术语“实体肿瘤”意指恶性实体肿瘤。所述术语包括以形成实体肿瘤的细胞类型命名的不同类型的实体肿瘤,即肉瘤、癌瘤和淋巴瘤。在某些实施例中,术语“实体肿瘤”包括癌症,包括但不限于结肠直肠癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、膀胱癌、肛门癌、子宫癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、子宫内膜癌、骨癌、睾丸癌、皮肤癌、肾癌、胃癌、食管癌、头颈癌、唾液腺癌以及骨髓瘤。

[0258] 根据一个方面,本公开提供了治疗个体的实体肿瘤的方法。根据这一方面,方法包含确定肿瘤是CD8阳性的,即肿瘤包含CD8阳性T细胞;和施用一个或多个剂量的抗肿瘤疗法。抗肿瘤疗法可以是检查点抑制剂疗法。在某些实施例中,通过向个体施用本公开的放射性标记的抗体缀合物;和通过PET成像使肿瘤中的放射性标记的抗体缀合物可视化,确定肿瘤是CD8阳性的。肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在指示肿瘤是CD8阳性的。

[0259] 本文所公开的放射性标记的抗CD8抗体可以用于评定个体是否适于检查点抑制剂疗法。在一些方面,可以使用放射性标记的CD8抗体监测肿瘤中的T细胞浸润,包括例如在不需要进行肿瘤活检的情况下监测。在某些实施例中,足够的T细胞浸润指示肿瘤将对检查点抑制剂疗法起反应。本文所公开的放射性标记的抗CD8抗体也可以用于监测在检查点抑制剂治疗过程中或之后的T细胞浸润,例如通过在治疗之前和/或过程中的时间点测量T细胞浸润程度的变化来进行。

[0260] 肿瘤中CD8阳性T细胞的存在指示肿瘤将对治疗,例如用检查点抑制剂疗法进行的治疗更好地起反应。另外,在用抗肿瘤疗法治疗后肿瘤中CD8阳性T细胞的存在指示疗法起作用,并且T细胞增加越多,治疗越有效。

[0261] 在另一方面,治疗方法还可以包含施用一个或多个剂量的CTLA-4抑制剂(例如,伊匹单抗)、TIM3抑制剂、BTLA抑制剂、TIGIT抑制剂、CD47抑制剂、GITR抑制剂、另一T细胞共抑制剂或配体的拮抗剂(例如,针对CD-28、2B4、LY108、LAIR1、ICOS、CD160或VISTA的抗体)、吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂[例如,“VEGF捕获剂”,如阿柏西普或如US 7,087,411中所列举的其它VEGF抑制性融合蛋白,或抗VEGF抗体或其抗原结合片段(例如,贝伐单抗或兰尼单抗)或VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼)]、Ang2抑制剂(例如,内瓦单抗)、转化生长因子 β (TGF β)抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂(例如,埃罗替尼、西妥昔单抗)、CD20抑制剂(例如,抗CD20抗体,如利妥昔单抗)、针对肿瘤特异性抗原[例如,CA9、CA125、黑素瘤相关抗原3(MAGE3)、癌胚抗原(CEA)、波形蛋白、肿瘤-M2-PK、前列腺特异性抗原(PSA)、粘蛋白-1、

MART-1和CA19-9]的抗体、疫苗(例如,卡介苗、癌症疫苗)、增加抗原呈递的佐剂(例如,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、双特异性抗体(例如,CD3×CD20双特异性抗体或PSMA×CD3双特异性抗体)、细胞毒素、化疗剂(例如,达卡巴嗪、替莫唑胺、环磷酰胺、多西他赛、小红莓、道诺霉素、顺铂、卡铂、吉西他滨、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、太平洋紫杉醇和长春新碱)、环磷酰胺、放疗、IL-6R抑制剂(例如,沙瑞卢单抗)、IL-4R 抑制剂(例如,杜匹鲁单抗)、IL-10抑制剂、细胞因子(如IL-2、IL-7、IL-21和IL-15)、抗体-药物缀合物(ADC)(例如,抗CD19-DM4 ADC和抗DS6-DM4ADC)、抗炎药物(例如,皮质类固醇和非类固醇抗炎药物)、膳食补充剂(如抗氧化剂)或治疗癌症的任何其它疗法护理。在某些实施例中,抗肿瘤疗法可以与癌症疫苗组合使用以增强抗肿瘤反应,所述癌症疫苗包括树突状细胞疫苗、溶瘤病毒、肿瘤细胞疫苗等。可以与抗肿瘤疗法组合使用的癌症疫苗的实例包括针对黑素瘤和膀胱癌的MAGE3疫苗、针对乳腺癌的MUC1疫苗、针对脑癌(包括多形性成胶质细胞瘤)的EGFRv3(例如,林多匹特(Rindopepimut))或ALVAC-CEA(针对CEA+癌症)。

[0262] 在某些实施例中,抗肿瘤疗法可以与放射疗法组合使用,以产生长期持久的抗肿瘤反应和/或增强患有癌症的个体的存活。在一些实施例中,PD-1或PDL-1的抑制剂(例如抗PD-1抗体)可以在向癌症个体施用放射疗法之前、同时或之后施用。举例来说,可以将放射疗法以一个或多个剂量施用至肿瘤病灶,接着施用一个或多个剂量的抗PD-1抗体。在一些实施例中,放射疗法可以局部施用至肿瘤病灶以增强个体肿瘤的局部免疫原性(辅助性(adjuvinating)放射)和/或杀灭肿瘤细胞(消融性放射),接着全身施用抗PD-1抗体。举例来说,向患有脑癌(例如,多形性成胶质细胞瘤)的个体施用颅内辐射可以与全身施用与抗PD-1抗体组合。在某些实施例中,抗PD-1抗体可以与放射疗法和化疗剂(例如,替莫唑胺)或VEGF拮抗剂(例如,阿柏西普)组合施用。

[0263] 在某些实施例中,可以向有需要的个体施用抗病毒药物以治疗由例如LCMV、HIV、HPV、HBV、HCV引起的病毒感染。抗病毒药物的实例包括但不限于齐多夫定(zidovudine)、拉米夫定(lamivudine)、阿巴卡韦(abacavir)、利巴韦林(ribavirin)、洛匹那韦(lopinavir)、依法韦仑(efavirenz)、考比斯他(cobicistat)、替诺福韦(tenofovir)、利匹韦林(rilpivirine)以及皮质类固醇。

[0264] 在某些实施例中,有需要的个体可以施用一种或多种抗菌药物以治疗由例如以下引起的细菌感染:立克次体细菌、杆菌属、克雷伯氏菌属、脑膜炎球菌和淋球菌、变形杆菌属、肺炎球菌、假单胞菌属、链球菌属、葡萄球菌属、沙雷氏菌属、疏螺旋体属、炭疽芽孢杆菌、衣原体属、梭菌属、白喉杆菌、军团菌属、麻风分枝杆菌、弥漫型麻风分枝杆菌、沙门菌属、霍乱弧菌以及鼠疫耶尔森菌。抗细菌药物的实例包括但不限于青霉素、四环素、头孢菌素、喹诺酮、林可霉素(lincomycin)、大环内酯、酮内酯、磺酰胺、糖肽、氨基糖苷以及碳青霉烯。

[0265] 在某些实施例中,有需要的个体可以施用一种或多种抗真菌药物以治疗由例如以下引起的真菌感染:曲霉菌属(烟曲霉、黑曲霉等)、皮炎芽生菌、念珠菌属(白色念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌等)、粗球孢子菌、新型隐球菌、毛霉目菌属(白霉菌属、犁头霉属、根霉菌属等)、荚膜组织胞浆菌、巴西芽生菌以及申克孢子丝菌。抗真菌药物的实例包括但不限于两性霉素B、氟康唑(fluconazole)、伏立康唑(voriconazole)、泊沙康唑(posaconazole)、伊曲康唑(itraconazole)、伏立康唑(voriconazole)、阿尼芬净

(anidulafungin)、卡泊芬净(caspofungin)、米卡芬净(micafungin)以及氟胞嘧啶(flucytosine)。

[0266] 在某些实施例中,有需要的个体可以施用一种或多种抗寄生虫药物以治疗由例如以下引起的寄生虫感染:内阿米巴属、蛲虫、利什曼原虫属、弓蛔虫属、疟原虫属、裂体吸虫属、猪带绦虫、刚地弓形虫以及克氏锥虫。抗寄生虫药物的实例包括但不限于吡喹酮(praziquantel)、奥沙尼喹(oxamniquine)、甲硝唑(metronidazole)、替硝唑(tinidazole)、硝唑尼特(nitazoxanide)、去氢依米丁(dehydroemetine)或氯奎(chloroquine)、糠酸二氯尼特(diloxanide furoate)、碘喹啉(iodoquinoline)、氯奎、巴龙霉素(paromomycin)、双羟萘酸噻嘧啶(pyrantel pamoate)、阿苯达唑(albendazole)、硝呋莫司(nifurtimox)以及苄硝唑(benznidazole)。

[0267] 另外的治疗活性剂/组分可以在施用CD8抑制剂之前、同时或之后施用。出于本公开的目的,此类施用方案视为CD8抑制剂“与”第二治疗活性组分的“组合”施用。

[0268] 在一些方面,治疗方法包含选择患有细菌感染、病毒感染、真菌感染或寄生虫感染的个体;确定个体中受影响的组织是CD8阳性的;和施用一个或多个剂量的适合于感染的治疗剂。在某些实施例中,通过向个体施用本公开的放射性标记的抗CD8缀合物;和通过PET成像将放射性标记的抗体缀合物在个体中可视化将受影响的组织确定为CD8阳性,其中组织中放射性标记的抗体缀合物的存在指示组织是CD8阳性的。在某些实施例中,施用和可视化的步骤进行一次或多次,以便监测治疗剂治疗感染的有效性。

[0269] 在一些方面,治疗方法包含选择患有实体肿瘤的个体;确定肿瘤是CD8阳性和PD-1阳性的;和施用一个或多个剂量的PD-1/PD-L1信号传导轴抑制剂(例如,抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)。在某些实施例中,通过向个体施用本公开的放射性标记的抗CD8缀合物;和通过PET成像将肿瘤中的放射性标记的抗体缀合物可视化将肿瘤确定为CD8阳性,其中肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在指示肿瘤是CD8阳性的。在某些实施例中,通过向个体施用本公开的放射性标记的抗PD-1缀合物;和通过PET成像将肿瘤中的放射性标记的抗PD-1缀合物可视化将肿瘤确定为PD-1阳性,其中肿瘤中放射性标记的抗PD-1缀合物的存在指示肿瘤是PD-1阳性的。

[0270] 示例性抗PD-1抗体包括REGN2810、BGB-A317、纳武单抗、匹立珠单抗和派姆单抗。

[0271] 示例性抗PD-L1抗体包括阿特殊单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、MDX-1105和REGN3504,以及专利公开第US 2015-0203580号中所公开的抗体。

[0272] 如本文所用,术语“治疗(treat/treating)”等意指缓解症状;暂时或永久消除症状的起因;延迟或抑制肿瘤生长;减少肿瘤细胞负载或肿瘤负荷;促进肿瘤消退;引起肿瘤收缩、坏死和/或消失;预防肿瘤复发;预防或抑制癌转移;抑制转移瘤生长;和/或延长个体的存活持续时间。

[0273] 根据一个方面,本公开提供了用于监测抗肿瘤疗法在个体中的功效的方法,其中所述方法包含选择患有实体肿瘤的个体,其中所述个体用抗肿瘤疗法治疗;向个体施用本公开的放射性标记的抗CD8缀合物;通过PET成像对肿瘤中所施用的放射性标记的缀合物的定位进行成像;和确定肿瘤生长,其中放射性标记信号从基线降低指示抗肿瘤疗法的功效。在某些实施例中,抗肿瘤疗法包含PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂(例如,抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)。

[0274] 在某些实施例中,本公开提供了评定肿瘤的炎症状态变化的方法,所述方法包含选择患有实体肿瘤的个体,其中所述个体用抗肿瘤疗法治疗;向个体施用本文提供的放射性标记的抗CD8缀合物;和通过PET 成像对肿瘤中所施用的放射性标记的缀合物的定位进行成像,其中放射性标记信号从基线增加指示炎症和抗肿瘤疗法的功效增加。在某些实施例中,抗肿瘤疗法包含PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂(例如,抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)。在某些实施例中,抗肿瘤疗法包含PD-1抑制剂(例如,REGN2810、BGB-A317、纳武单抗、匹立珠单抗和派姆单抗)、PD-L1抑制剂(例如,阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、MDX-1105和REGN3504)、CTLA-4抑制剂(例如,伊匹单抗)、TIM3 抑制剂、BTLA抑制剂、TIGIT抑制剂、CD47抑制剂、GITR抑制剂、另一T细胞共抑制剂或配体的拮抗剂(例如,针对CD-28、2B4、LY108、LAIR1、ICOS、CD160或VISTA的抗体)、吡哆胺-2,3-双加氧酶(IDO) 抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂[例如,“VEGF捕获剂”,如阿柏西普或如US 7,087,411中所列举的其它VEGF抑制性融合蛋白,或抗VEGF抗体或其抗原结合片段(例如,贝伐单抗或兰尼单抗)或 VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼)]、Ang2抑制剂(例如,内瓦单抗)、转化生长因子 β (TGF β) 抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR) 抑制剂(例如,埃罗替尼、西妥昔单抗)、CD20抑制剂(例如,抗CD20抗体,如利妥昔单抗)、针对肿瘤特异性抗原[例如,CA9、CA125、黑素瘤相关抗原3(MAGE3)、癌胚抗原(CEA)、波形蛋白、肿瘤-M2-PK、前列腺特异性抗原(PSA)、粘蛋白-1、MART-1和CA19-9]的抗体、疫苗(例如,卡介苗、癌症疫苗)、增加抗原呈递的佐剂(例如,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、双特异性抗体(例如,CD3 \times CD20双特异性抗体或PSMA \times CD3双特异性抗体)、细胞毒素、化疗剂(例如,达卡巴嗪、替莫唑胺、环磷酰胺、多西他赛、小红莓、道诺霉素、顺铂、卡铂、吉西他滨、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、太平洋紫杉醇和长春新碱)、环磷酰胺、放疗、IL-6R抑制剂(例如,沙瑞卢单抗)、IL-4R抑制剂(例如,杜匹鲁单抗)、IL-10抑制剂、细胞因子(如IL-2、IL-7、IL-21和IL-15)以及抗体-药物缀合物(ADC)(例如,抗CD19-DM4ADC和抗DS6-DM4ADC)。

[0275] 如本文所用,就肿瘤中的CD8表达来说,术语“基线”意指在施用抗肿瘤疗法的剂量之前或施用时个体的放射性标记的缀合物的摄取数值。使用本领域中已知的方法(参见例如Oosting等人2015,J.Nucl. Med.56:63-69)测定放射性标记的缀合物的摄取。在某些实施例中,抗肿瘤疗法包含PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂。

[0276] 为了确定抗肿瘤疗法中是否存在功效,在基线和施用CD8抑制剂之后的一个或多个时间点定量放射性标记的缀合物的摄取。举例来说,所施用的放射性标记的抗体缀合物(例如,放射性标记的抗CD8抗体缀合物)的摄取可以在用PD-1/PD-L1信号传导轴(例如,抗PD-1抗体)进行的初始治疗后第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第14天、第15天、第22天、第25天、第29天、第36天、第43天、第50天、第57天、第64天、第71天、第85天;或第1周、第2周、第3周、第4周、第5周、第6周、第7周、第8周、第9周、第10周、第11周、第12周、第13周、第14周、第15周、第16周、第17周、第18周、第19周、第20周、第21周、第22周、第23周、第24周结束时或更长的时间测量。在治疗起始后特定时间点的摄取值与基线处摄取值之间的差异用于确定抗肿瘤疗法是否有效(肿瘤消退或进展)。

[0277] 在某些实施例中,放射性标记的抗体缀合物静脉内或皮下施用于个体。在某些实施例中,放射性标记的抗体缀合物瘤内施用。施用后,放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中定位。通过PET成像对定位的放射性标记的抗体缀合物进行成像,并且通过本领域中已知的方法

法测量肿瘤对放射性标记的抗体缀合物的摄取。在某些实施例中,在施用放射性标记缀合物后1、2、3、4、5、6或7天进行成像。在某些实施例中,在施用放射性标记的抗体缀合物后,在同一天进行成像。

[0278] 在某些实施例中,放射性标记的抗CD8缀合物可以以约0.1mg/kg 个体体重到约100mg/kg个体体重,例如约0.1mg/kg到约50mg/kg,或约0.5mg/kg到约25mg/kg,或约0.1mg/kg到约1.0mg/kg体重的剂量施用。

[0279] 在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段特异性结合到CD8。在某些实施例中,抗CD8抗体包含HCVR的CDR,其中HCVR具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和LCVR的CDR,其中LCVR具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0280] V. 抗体的诊断用途

[0281] 本公开的抗CD8抗体还可以用于检测和/或测量样品中的CD8或表达CD8的细胞,例如出于诊断目的。举例来说,抗CD8抗体或其片段可以用于诊断特征在于CD8异常表达(例如,过度表达、表达不足、缺乏表达等)的病状或疾病。CD8的示例性诊断分析可以包含例如使从个体获得的样品与抗CD8抗体接触,其中所述抗体用可检测标记或报告分子标记。或者,未标记的抗CD8抗体可以与本身被可检测标记的二级抗体组合用于诊断应用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素,如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I;荧光或化学发光部分,如荧光素或罗丹明(rhodamine);或酶,如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可以用于检测或测量样品中的CD8的具体示例性分析包括酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、免疫 PET(例如,⁸⁹Zr、⁶⁴Cu等)和荧光活化细胞分选(FACS)。

[0282] 可以用于根据本公开的CD8诊断分析的样品包括可从个体获得的任何组织或流体样品。一般来说,将测量从健康个体(例如,未患有与异常CD8水平或活性相关的疾病或病状的个体)获得的特定样品中的 CD8水平,以初步建立CD8的基线或标准水平。随后可以将这一CD8 基线水平与从疑似患有CD8相关疾病或病状的个体获得的样品中测量的CD8水平进行比较。

[0283] 在一些实施例中,抗CD8抗体用放射性同位素、荧光部分、化学发光部分或酶标记。放射性同位素可以选自由³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I 组成的组。荧光或化学发光部分可以选自由荧光素或罗丹明组成的组。酶可以选自由碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶组成的组。

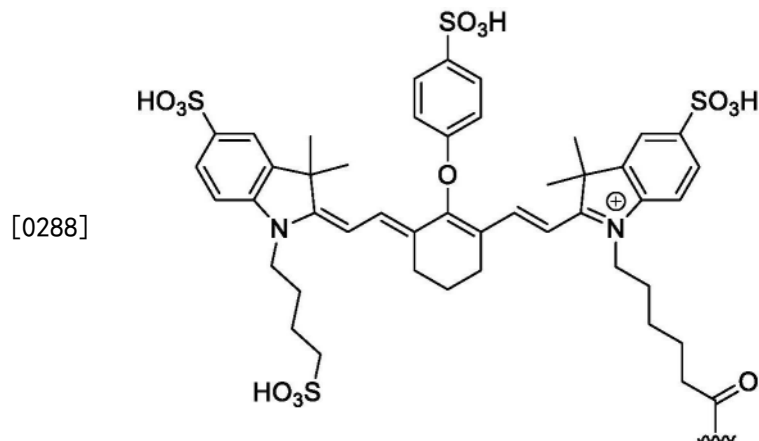
[0284] 在一些实施例中,分析包含本文所描述的抗CD8抗体,其用荧光部分或化学发光部分可检测地标记。

[0285] 在一些实施例中,抗CD8抗体与荧光染料缀合。在一些实施例中,抗CD8抗体缀合到近红外(NIR)荧光染料。合适的染料包括在荧光分子断层扫描应用下对低表达靶提供高灵敏度的染料。在一些实施例中,染料是BODIPY-X630/650[®]、VivoTag[®]645、Alexa Fluor[®]647、VivoTag680[®]、AlexaFluor680[®]、AlexaFluor750[®]、IRDye800CW[®]、DyLight800、CF[®]660C、CF[®]660R、CF[®]790以及CF[®]800。在一些实施例中,染料是IRDye 800CW。在一些实施例中,染料是Vivotag680XL。在一些实施例中,染料是IRDye 800CW并且DAR是0.10到1.00。在一些实施例中,染料是Vivotag680XL并且DAR是1到2。在一些实施例中,染料是IRDye 800CW或Vivotag680XL,并且如基于实例13 中所描述的方法通过SE-HPLC

测定,单体纯度>90、95、96或97%。

[0286] 本文还提供了具有以下式的化合物:

[0287] $Ab-[D]_n$, 其中Ab是本文所描述的抗CD8抗体或其抗原结合片段,并且D是荧光染料,并且n是1到4的整数。在一些实施例中,n是1到2。在一些实施例中,n是1。在一些实施例中,D是:



[0289] 或其医药学上可接受的盐。

[0290] VI. 实例

[0291] 通过以下非限制性实例说明本公开的某些实施例。

[0292] 实例1: 针对CD8的人类抗体的产生

[0293] 可以使用包含CD8 α DNA和/或CD8 β DNA的免疫原来产生针对CD8的抗体。同样,可以使用包含CD8 α 蛋白和/或CD8 β 蛋白的免疫原来产生针对CD8的抗体。在某些实施例中,所述抗体从用全长CD8 α DNA (例如,SEQ ID NO:17) 和/或CD8 β DNA (例如,SEQ ID NO:19)、全长CD8 α 蛋白 (例如,SEQ ID NO:18) 和/或CD8 β 蛋白 (例如,SEQ ID NO:20) 或CD8 α 蛋白和/或CD8 β 蛋白的片段免疫的小鼠获得。在一些实施例中,所述抗体从用含有全长CD8 α 和CD8 β 的融合肽,或含有CD8 α 和CD8 β 两者的片段的融合肽免疫的小鼠获得。

[0294] 通过用全长CD8 α DNA (SEQ ID NO:17) 和全长CD8 β DNA (SEQ ID NO:19) 注射

VELOCIMMUNE®小鼠 (即,包含编码人类免疫球蛋白重链和 κ 轻链可变区的DNA的工程化小鼠) 来获得示例性抗CD8 抗体。DNA序列引起小鼠中CD8蛋白的表达,并且可以在体内产生更多结构准确的蛋白质靶,针对所述蛋白质靶产生抗体。通过CD8特异性免疫分析监测抗体免疫反应。当达成所需免疫反应时,收获脾细胞并且与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并且形成杂交瘤细胞系。筛选并且选择杂交瘤细胞系,以鉴别产生CD8特异性抗体的细胞系。使用这种技术,获得抗CD8嵌合抗体 (即,具有人类可变域和小鼠恒定域的抗体)。可以通过用人类恒定区替换小鼠恒定区来制造完全人类形式的抗体。示例性抗体的可变区核酸和氨基酸序列在以上表1中提供。根据上文所描述的方法产生的示例性抗CD8抗体是命名为“mAb1”的抗体。

[0295] 根据本实例的方法产生的示例性抗体的生物特性详细地描述于以下阐述的实例中。

[0296] 实例2: 如通过表面等离子体共振测定的抗体与CD8的结合

[0297] hCD8 α .mmh与纯化抗CD8mAb结合的平衡解离常数 (K_D 值) 使用实时表面等离子体共

振生物传感器,用Sierra Sensors MASS-1大容量胺传感器表面来测定,所述传感器表面使用多克隆山羊抗小鼠Fc抗体(GE, #BR-1008-38)衍生化以捕获纯化抗CD8mAb。在由0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05% v/v表面活性剂P20 构成的缓冲液(HBS-ET操作缓冲液)中进行SPR结合研究。在抗CD8 mAb捕获表面上以50微升/分钟的流动速率注射在HBS-ET操作缓冲液中制备的不同浓度的具有C端myc-myc-多组氨酸标签(hCD8 α .mmh, REGN3940)的hCD8 α (300nM到3.7nM范围内,3倍稀释)。监测 hCD8 α .mmh与所捕获的单克隆抗体的缔合4分钟,并且监测HBS-ET 操作缓冲液中hCD8 α .mmh的解离10分钟。所有结合动力学实验在 25℃下进行。动力学缔合(k_a)和解离(k_d)速率常数通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时传感图拟合到1:1结合模型来确定。结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期($t_{1/2}$)由动力学速率常数按以下计算:

$$[0298] \quad K_D = \frac{k_d}{k_a}, \text{ 并且 } t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d}$$

[0299] 表2中展示在25℃下hCD8 α .mmh与纯化抗CD8单克隆抗体结合的结合动力学参数。

[0300] 表2. 抗体结合特征

[0301]	REGN #/Ab PID #	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
	H2aM25428N	1.59E+05	5.19E-03	3.26E-08	2.2

[0302] 实例3:由FACS分析测定的细胞结合

[0303] 进行流式细胞术以便评估CD8抗体或同型对照抗体与原代人类 CD8阳性T细胞和食蟹猕猴T细胞的结合。

[0304] 对结合到人类和猴T细胞的CD8抗体的表征:

[0305] 将PBMC从人类白细胞包或食蟹猕猴全血中分离。随后将CD8阳性T细胞从人类PBMC和食蟹猕猴PBMC中分离,CD4和CD8阳性的T细胞被分离。

[0306] a) 从人类白细胞包分离人类CD8阳性T细胞:

[0307] 将人类CD8阳性T细胞来自一个健康供体的外周血的白细胞包 (leukopak) 分离以便测试mAb1的结合。人类白细胞包从纽约血液中心 (NY Blood Center) 获得。PBMC分离通过使用50ml SepMate™管并且遵循制造商建议方案进行密度梯度离心实现。简单来说,将15ml Ficoll-Paque PLUS分层到50ml SepMate™管中,接着添加用PBS 1:2 稀释的30ml白细胞。根据SepMate's™制造商方案,遵循后续步骤。在PBMC分离之后,使用来自Miltenyi Biotec的人类CD8微珠粒试剂盒,遵循制造商的方案富集CD8阳性T细胞。通过将细胞与人类T活化子CD3/CD28 Dynabeads®在人类原代培养基(补充有10%胎牛血清和0.01mM β -巯基乙醇的X-Vivo 15培养基)中一起培育来扩增CD8 阳性T细胞。在CD3/CD28Dynabead培育后72小时,将重组人类IL- 2 (50IU/ml) 补充到培养基中。当细胞已扩增到对于流式细胞术分析必需的细胞数量时,通过磁性分离去除Dynabead,并且立即使用细胞来测定CD8抗体或同型对照的结合。

[0308] b) 食蟹猕猴T细胞分离

[0309] 来自BioreclamationIVT的食蟹猕猴全血用于分离猴T细胞以便进行抗体结合分析。使用SepMate™15管和密度梯度离心,遵循制造商的方案分离PBMC。随后,使用用于非人类灵长类动物的泛T分离试剂盒 (Miltenyi Biotec),遵循制造商推荐的方案富集T细胞。

随后在猴原代培养基(补充有10%胎牛血清和0.01mMβ-巯基乙醇的X-Vivo 15培养基)中使用用于非人类灵长类动物的T细胞活化/扩增试剂盒(Miltenyi Biotec)活化并且扩增富集的T细胞。72小时之后,将重组人类IL-2(100IU/ml)补充到原代培养基中,并且扩增T细胞持续一周。用于T细胞活化和扩增的磁珠紧接在用CD8或同型对照抗体染色细胞之前被磁性去除。

[0310] c) 结合到人类CD8阳性和食蟹猕猴T细胞的mAb1抗体的流式细胞术分析。

[0311] 以200nM的浓度开始,对于人类CD8阳性T细胞以8点滴定,或对于食蟹猕猴T细胞以11点滴定,在染色剂缓冲液(含有2%FBS的PBS)中4倍连续稀释mAb1和同型对照抗体。包括不含一级抗体的样品,仅染色剂缓冲液作为对照。抗体滴定50微升/孔铺板到V型底微量培养板中。将原代人类和食蟹猕猴T细胞用在PBS中1:1000稀释的LIVE/DEAD™可固定紫色死细胞染色剂(Invitrogen)染色15分钟。将细胞洗涤两次,并且再悬浮于含2%FBS的PBS中。为了圈选出CD4+猴T细胞,将与食蟹猕猴CD4+ T细胞反应的来自BD Biosciences的CD4抗体与猴T细胞一起在冰上培育30分钟,并且随后用染色剂缓冲液洗涤细胞。将染色剂缓冲液中的人类CD8阳性T细胞和猴T细胞铺板,使得含有大致150,000个T细胞的50u1细胞悬浮液添加到含有滴定抗体的96孔V型底微量培养板的孔中。抗体因此稀释2倍,相应地,对于与人类CD8阳性T细胞一起培育的抗体,最终浓度在100nM到24pM的范围内,或对于与猴T细胞一起培育的抗体,最终浓度在100nM到0.10pM的范围内。将细胞在冰上与一级抗体一起培育30分钟,用染色缓冲液(补充有2%FBS的PBS)洗涤两次,并且二级别藻蓝蛋白(allophycocyanin;APC)山羊抗小鼠IgG抗体以2μg/mL的浓度添加到所有孔中,并且在冰上培育30分钟。随后将样品用染色剂缓冲液洗涤一次并且随后固定在用染色缓冲液1:1稀释的BD Cytofix中。在去除固定缓冲液后,将细胞再悬浮于染色缓冲液中,并且在分析之前在Beckman Coulter Cytotflex流式细胞术仪器上进行过滤。用FlowJo10软件分析样品,使得仅有活力、CD8阳性的单细胞针对抗体结合进行评估。确定APC的几何MFI并且相对于抗体浓度绘制,并且基于人类CD8阳性T细胞的8个数据点或猴T细胞的12个数据点,使用GraphPad Prism™中的四参数逻辑斯蒂方程(logistic equation)以100nM开始确定EC50值。

[0312] 结果:

[0313] 结合到人类CD8阳性T细胞和食蟹猕猴T细胞的mAb1抗体的流式细胞术分析。

[0314] 通过流式细胞术评定mAb1结合人类和猴CD8的能力(图1)。在这些实验中,不相关的同型匹配抗体用作阴性对照。在人类和猴CD8阳性T细胞上都观察到mAb1的剂量依赖性结合。对于人类CD8阳性T细胞,mAb1显示0.37nM的EC50值,与在25nM下的同型对照抗体相比,MFI增加大致2,778倍。mAb1以0.33nM的EC50值结合食蟹猕猴T细胞,并且与25nM下的同型对照相比,MFI增加大致1,475倍。参见表3。同型对照未展现与人类或猴T细胞的剂量依赖性结合。这些结果表明mAb1与人类和猴CD8交叉反应,并且以类似EC50值结合两种物种的CD8。

[0315] 变化倍数=25nM mAb1下的几何MFI

[0316] 25nM同型下的几何MFI

[0317] 表3. 结合到人类CD8阳性T细胞和食蟹猕猴T细胞的mAb1的流式细胞术分析。

[0318]	mAb1 细胞结合	
	人类	猴

[0319]	EC50 [nM]	0.37	0.33
	变化倍数	2778	1475

[0320] 实例4:在mAb1存在下改变IFN由活化T细胞的产生

[0321] 当T细胞的T细胞受体 (TCR) 特异性识别靶细胞上由MHC分子呈递的外来抗原时,T细胞活化。这种相互作用可以由在分别结合相互作用靶细胞上MHCII或MHCI的非可变区的T细胞上共受体(如 CD4和CD8)的存在加强。另外,这些共受体通过其细胞质域与酪氨酸蛋白激酶Lck的缔合在调节T细胞活性方面具有直接作用。干扰共受体与MHC分子之间的相互作用可以影响T细胞活性。为了辨别CD8 特异性抗体是否改变T细胞活性,采用混合淋巴细胞反应 (MLR) 分析。MLR分析是活化T细胞的体外生理学相关手段。在单向MLR中,将来自一个个体的白细胞与另一遗传上相异的个体的增殖阻止的白细胞共培养。同种异基因决定子的不相容性引起T细胞活化,其可以通过细胞因子产生和/或增殖来评估。细胞因子IFN γ 和IL-2以及增殖通常用作CD4⁺ T细胞活性的读数。然而,已观察到,CD8阳性效应T细胞活性由其产生IFN γ 最佳反映,而IL-2和增殖可能是旁观者效应的结果,并且不与活化CD8阳性T细胞的比例直接相关(Anthony等人. 2012-Dissecting the T Cell Response:Proliferation Assays vs.Cytokine Signatures by ELISPOT-Cells,1,127-140)。

[0322] 人类CD8阳性T细胞MLR分析:

[0323] 将PBMC从人类白细胞包中分离并且随后通过阴性分离加工以获得没有接触的CD8阳性T细胞。使用CD8阳性T细胞进行单向MLR 分析,以评估mAb1是否影响T细胞活性,T细胞活性由IFN γ 产生指示。

[0324] PBMC和人类CD8阳性T细胞从人类白细胞包中分离:

[0325] 将人类PBMC从获自纽约血液中心的健康供体的外周血液的四个白细胞包中分离。PBMC分离通过使用50ml SepMate™管并且遵循制造商建议方案进行密度梯度离心实现。简单来说,将15ml Ficoll-Paque PLUS分层到50ml SepMate™管中,接着添加用PBS 1:2稀释的30ml 白细胞。根据SepMate's™制造商方案,遵循后续步骤。将一部分分离的PBMC(>300×10⁶个)以每小瓶5000万个细胞的浓度在含10% DMSO的FBS中冷冻。在PBMC的其余部分的情况下,使用来自 Miltenyi Biotec的人类CD8 T细胞分离试剂盒,遵循制造商的方案富集CD8阳性细胞。随后将分离的CD8阳性T细胞以每小瓶5000万个细胞的浓度在含10%DMSO的FBS中冷冻。PBMC和CD8阳性T细胞在MLR分析建立当天在含有全能核酸酶 (Benzonase Nuclease) 的原代培养基(补充有10%胎牛血清和0.01mM β -巯基乙醇的X-Vivo 15培养基)中解冻,浓度是每10ml含500U全能核酸酶的培养基5000万个细胞。

[0326] MLR分析建立

[0327] 将原代细胞培养基(125微升/孔)铺板到圆底微量滴定板的每个孔中。在原代培养基中以400nM的浓度开始进行mAb1和同型对照抗体的三点、10倍连续稀释。由此将25ul抗体一式三份地铺板到圆底微量培养板的孔中。在每个孔中抗体是总体积的1/8,使得最终抗体浓度为50nM、5nM和0.5nM。还包括不含抗体,仅原代培养基的孔作为对照。来自3种供体的负分离CD8阳性T细胞和来自这些相同的3种供体以及另一供体的PBMC用于MLR分析。在原代刺激培养基中用稀释到50ug/mL的丝裂霉素C处理PBMC,浓度是12×10⁶个细胞/毫升。在37℃/5%CO₂下培育1小时后,将PBMC收集到50ml锥形管中,并且用原代细胞培养基洗涤总共3次。将这些细胞在原代培养基中再悬浮到12×10⁶个细胞/毫升的最终浓度,并且将25ul添

加到圆底微量滴定板的孔中,产生每孔的300,000个PBMC的最终浓度。另外,还包括不含PBMC,仅培养基和T细胞的孔作为对照,以确定单独的T细胞是否可以产生IFN γ 。在原代培养基中以 7×10^6 个细胞/毫升的浓度制备T细胞,并且将25 μ l铺板到圆底微量滴定板的孔中,因此每个孔中T细胞的最终浓度为175,000。还包括不含T细胞,仅培养基的孔来充当对照,以验证单独的PBMC不促成IFN γ 产生。每孔仅包括一种供体的T细胞和一种供体的丝裂霉素C处理的PBMC。三种供体T细胞中的每一种与其自身或不同供体PBMC配对。在37 $^{\circ}$ C/5% CO $_2$ 下72小时培育后,将微量滴定板离心以沉淀细胞,并且收集20 μ l 培养基上清液。根据制造商的方案,在人类IFN γ alpha1isa分析中测试来自收集上清液的5 μ l。在多标签板读取器Envision (PerkinElmer) 上获取测量结果。将原始RLU值在GraphPad PrismTM中以条形图绘制,并且将含抗体的孔中IFN γ 产生的量与仅含PBMC和T细胞的孔进行比较,并且按IFN γ 产生抑制百分比计算。

[0328] 结果:

[0329] mAb1影响CD8 T细胞活性的能力在单向MLR中由IFN γ 产生测量(图2)。不相关的同型匹配抗体用作这些实验中的对照。针对两种不同T细胞/PBMC对的以下结果和代表性图像,指示mAb1能够剂量依赖性地减少IFN γ 产生。这种抑制的程度似乎是供体依赖性的,因为一个供体/PBMC对(MLR反应1)在5nM mAb1处理下展现<10% IFN γ 抑制,而另一供体/PBMC对(MLR反应2)展现>50% IFN γ 抑制。在两个反应中,同型对照在5nM下对IFN γ 产生具有极小影响。参见表4。

[0330] IFN γ 抑制%的计算:

$$[0331] \quad \text{IFN}\gamma\text{抑制} = 1 - \left(\frac{\text{与5 nM抗体一起培育的PBMC/T细胞混合物的RLU信号}}{\text{不含抗体的PBMC/T细胞混合物的RLU信号}} \right) \times 100$$

[0332] 表4. IFN γ 产生抑制百分比

	MLR 反应 1			MLR 反应 2	
	抗体浓度	mAb1	同型	mAb1	同型
[0333]	0.5 nM	-11.4	0.5	29.8	2.3
	5 nM	7.6	3.9	51.6	3.4
	50 nM	21.4	-6.6	74.1	25.4

[0334] 实例5:在mAb1存在下改变的T细胞活性

[0335] 当T细胞受体(TCR)特异性识别出由主要组织相容性复合物(MHC)分子(还称为人白细胞抗原(HLA))在抗原呈递细胞(APC)上呈递的外源抗原时,激活T细胞。这种相互作用可以由在分别结合相互作用APC上MHCII或MHCI的非可变区的T细胞上共受体(如CD4和CD8)的存在加强。另外,这些共受体通过其细胞质域与酪氨酸蛋白激酶Lck的缔合在调节T细胞活性方面具有直接作用(Goldrath 等人,Selecting and maintaining a diverse T cell repertoire,Nature 402:255- 262,1999;Denkberg等人Critical Role for CD8in Binding of MHC Tetramers to TCR:CD8Antibodies Block Specific Binding of Human Tumor-Specific MHC-Peptide Tetramers to TCR,The Journal of Immunology,2001, 167:270-276;Cantrell等人,T cell Antigen Receptor Signal Transduction, Immunology,2002,105.4:369--374;和Wang等人 2009)。

[0336] CD8分子在免疫系统细胞亚群的表面上以同二聚体(CD8 $\alpha\alpha$)或异二聚体(CD8 $\alpha\beta$)的

形式存在。在TCR $\alpha\beta$ T细胞中,表达CD8 $\alpha\beta$ 异聚(heteromeric)形式。干扰共受体与MHC分子之间的相互作用可以影响T细胞活性。

[0337] 为了辨别CD8特异性抗体是否改变T细胞活性,采用基于T细胞/APC的生物分析。

[0338] 报告T细胞工程化:

[0339] TCR信号传导事件可以由报告基因监测,所述报告基因由各种转录因子,如活化子蛋白1(AP-1)、活化T细胞的核因子(NFAT)或核因子活化B细胞 κ 轻链增强子(NF κ B)驱动(Shapiro等人Cutting Edge:Nuclear Factor of Activated T Cells and AP-1Are Insufficient for IL-2Promoter Activation:Requirement for CD28Up-Regulation of RE/AP, The Journal of Immunology,1998,161(12):6455-6458)。

[0340] 将人类T细胞克隆JRT3.T3.5工程化,以在转录因子AP-1控制下表达报告基因萤火虫荧光素酶。抗生素抗性细胞通过用人类CD28(NP_006130.1)、1G4TCR α 和 β 亚基(Chen等人2000)和人类CD8 α 和 β 亚基(α 寄存器NP_001759.3并且 β 寄存器NP_004922.1)转导进一步操纵。产生单克隆(JRT3.T3/AP1-Luc/CD28/CD8 A B/1G4AB克隆18)并且将其用于T细胞/APC报告生物分析实验。将已建立的T细胞报告细胞系维持在补充有100ug/mL潮霉素+500ug/mL G418+1 ug/mL嘌呤霉素的RPMI+10%FBS+青霉素/链霉素/谷氨酰胺(P/S/G)中。

[0341] APC工程化:

[0342] 将小鼠成纤维细胞3T3细胞系工程化,以稳定过度表达HLA-A*02 等位基因(寄存器P01892-1)和人类 β 2-微球蛋白(h β 2M;寄存器NP_004039.1)以及NY-ESO-1 157-165,一种来源于癌症-睾丸抗原NY-ESO-1(寄存器NP_001318.1)的HLA-A2*02限制肽。

[0343] 将已建立的APC细胞系维持在补充有100ug/mL潮霉素+500 ug/mL G418+1ug/mL嘌呤霉素的DME+10%BCS+P/S/G中。

[0344] T细胞/APC刺激:

[0345] 在所开发的生物分析中,工程化APC上的HLA-A2/NYES01(157-165)MHCI/肽复合物结合并且刺激1G4TCR(Robbins等人,Single and Dual Amino Acid Substitutions in TCR CDRs Can Enhance Antigen-Specific T Cell Functions,J.Immunol.2008;180(9):6116--6131),并且引起工程化的报告T细胞系中AP-1的转录活性提高。AP-1继而活化用作分析的读数的荧光素酶报告基因转录。在这一生物分析中,测试CD8 单克隆抗体以评估其阻断活性。

[0346] 荧光素酶分析建立:

[0347] 在实验当天使用补充有10%FBS和P/S/G的RPMI1640作为分析培养基来制备细胞悬浮液和抗体稀释液,以进行抗CD8抗体筛选。

[0348] 实验前一天,将工程化的报告T细胞以 5×10^5 个细胞/毫升在选择培养基中培养。制备抗CD8单克隆抗体和同型匹配阴性对照的10点 1:3连续稀释液。单克隆抗体的稀释液在15pM到100nM之间的范围内。最后一个稀释点不含抗体。将隔夜培养的报告T细胞和APC细胞分别以 2×10^6 个/毫升和 4×10^5 个/毫升再悬浮于分析培养基中。将试剂按以下顺序添加到96孔白色平底培养板中:单克隆抗体的连续稀释液用移液管移取到对应孔中,接着是 1×10^4 个细胞/孔的APC细胞。培养板在室温下培育15到30分钟。随后将 5×10^4 个报告T细胞添加在APC上面,并且将样品在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下再培育4到6小时,随后添加100uL ONE-GloTM(Promega)试剂以检测AP1-Luc活性。在多标签板读取器Enviosion(PerkinElmer)上以

相对光单位 (RLU) 捕获发射光。所有连续稀释液都一式两份测试。

[0349] CD8单克隆抗体的 EC_{50} 值使用GraphPad Prism软件由四参数逻辑斯蒂方程在10点剂量-反应曲线上确定。如下所示计算生物分析中T 细胞反应的减少百分比：

[0350] 减少% = $100\% - [\text{在}100\text{nM下mAb的平均RLU} \times 100 / \text{在}0\text{nM下的平均RLU}]$

[0351] 结果：

[0352] 表5和图3展示mAb1和市售克隆RPA-T8以分别1.2nM和161 pM的 IC_{50} 减少工程化的T细胞中的荧光素酶活性。同型1和同型2未展示如预期的剂量依赖性抑制。在100nM下，mAb1使T细胞活性降低大约89.7%，而克隆RPA-T8阻断97.9%。与克隆RPA-T8相比，mAb1 阻断较弱CD8/MHCI相互作用。在Biacore和ELISA实验中，两种抗体都展示结合到人类CD8 α 亚基。

[0353] 表5. CD8 T细胞/APC荧光素酶分析中CD8单克隆抗体的 IC_{50} 和 T细胞反应抑制%

[0354]

抗体	IC_{50} [M]	在100nM下的T细胞反应减少 [%]
同型1	-	7.4
同型2	-	6.2
克隆RPA-T8	1.61E-10	97.9
mAb1	1.2E-09	89.7

[0355] 实例6: Raji/PBMC异种移植物和临床样品中CD8的LC-MS定量

[0356] 将冷冻组织样品 (Raji/PBMC肿瘤、小鼠脾脏和黑素瘤组织) 在具有蛋白酶抑制剂的1×RIPA裂解缓冲液 (Thermo Fisher Scientific) 中裂解。将组织切成小片并且在紧密配合的杜恩斯均质器 (dounce homogenizer) 中用1mL裂解缓冲液均质化。将裂解物在冰上培育30 分钟，伴随每10分钟声波处理30秒，以达成完全蛋白质提取。将裂解物在14,000g下离心10分钟。通过BCA分析测量蛋白质浓度。将每个样品稀释成1mg/mL，在14,000g下离心10分钟，并在-80℃下储存在等分试样中。

[0357] 将一百μL生物素标记抗CD8 α 结合蛋白 (2μg/mL) 添加到链霉亲和素涂布的96孔培养板 (Thermo Fisher Scientific) 的每个孔中。随后将培养板在室温下培育2小时，接着用PBST (pH 7.4, 0.05% Tween- 20) 洗涤3次。将小鼠脾脏裂解物用作替代基质以产生CD8定量的标准曲线。将重组CD8 α .mmh以在0.39到100ng/mg蛋白质范围内的最终浓度 (1:2连续稀释) 添加到100μg小鼠脾脏裂解物中的每一个中。将一百μL测试样品施加到每个孔并且在R.T. 下培育2小时。随后将每个孔用200μL PBST洗涤3次并且用200μL ddH₂O洗涤一次。捕获的 CD8用100μL洗脱缓冲液 (50% ACN中的3% 甲酸) 洗脱，并且在转移到新的96孔培养板中后完全干燥。

[0358] 将每种样品在37℃下在10μL的8M脲/TCEP缓冲液中变性1小时。选择性监测来自CD8 α 的特征肽 (AAEGLDTQR)，并且将对应的重同位素标记的肽 (具有Arg-¹³C₆¹⁵N⁴/Lys-¹³C₆¹⁵N₂的相同AA序列) 添加到每个样品中作为内标。将标准品和测试样品在R.T. 下用5μM的 IAA烷基化30分钟，并且在37℃下由lys-C (1:100w/w) 消化4小时，随后由胰蛋白酶 (1:20w/w) 消化隔夜。通过向每种样品添加10% 甲酸猝灭消化。

[0359] 将每种加工的样品 (15μL) 注射到预平衡的纳米C18陷阱柱上，并且通过简单纳米C18分离柱分离肽，接着使用Q Exactive plus质谱仪进行平行反应监测 (PRM) 分析。通过相对于添加的肽的浓度绘制 L/H峰值面积比率建立每种蛋白质的校准曲线。基于校准曲线计算每种组织样品中内源性CD8 α 的丰度。CD8 α .mmh参考标准的最低浓度 (等效于0.96ng/mg

的内源性CD8α) 在分析的动态范围内, 并且被定义为分析的LL0Q (定量下限)。

[0360] 结果:

[0361] 在来自PBMC/Raji植入小鼠的5个肿瘤和脾脏、仅Raji植入小鼠的2个肿瘤和脾脏、10个黑素瘤临床样品和5个黑素瘤正常邻近组织 (NAT) 中分析CD8α表达。组织重量、蛋白量、提取产率和CD8表达列于表6中。B_{max}基于以下方程计算, 其中肿瘤密度估计为1g/mL。

$$[0362] \quad B_{\max} \text{ (nM)} = \frac{\text{CD8 (ng/mg 蛋白)} \times \text{总蛋白量 (mg)} \times 10E6}{2.57 \times 10E4 \times \text{肿瘤重量 (mg)}}$$

[0363] 表6. 组织重量、蛋白量、提取产率和CD8表达

[0364]

组织类型	样品	肿瘤重量 (mg)	蛋白质 (mg)	蛋白质 产率 (%)	CD8α (ng/mg 蛋白)	CD8_Bmax (nM)
黑素瘤	131778T2(5)	250	24.1	9.6	29.4	55.2
黑素瘤	13841T2(1)	220	20.1	9.1	37.2	66.1
黑素瘤	13765T2(2)	250	19.4	7.8	4.5	6.8
黑素瘤	13524T2(7)	200	13.0	6.5	36.9	46.6
黑素瘤	13547T2(1)	220	16.1	7.3	32.9	46.8
黑素瘤	131086T6(1)	180	9.3	5.2	11.1	11.2
黑素瘤	131719T2(3)	230	17.6	7.7	9.3	13.9
黑素瘤	131291T2(1)	240	17.4	7.3	30.5	43.1
黑素瘤	131815T2(3)	290	9.1	3.1	29.0	17.7
黑素瘤	131778T2(5)	180	9.2	5.1	2.5	2.5
NAT	131291T1(1)	270	8.9	3.3	1.6	1.1
NAT	131086T1(1)	280	5.9	2.1	1.5	0.6
NAT	131719T1(2)	250	4.1	1.6	2.3	0.7
NAT	13841T1(1)	250	6.6	2.6	1.9	1.0
NAT	13788T1(2)	170	10.9	6.4	1.9	2.4
Raji 仅肿瘤	M6T	140	7.2	5.2	0.1	0.1
Raji 仅肿瘤	M7T	290	13.1	4.5	0.1	0.1
Raji/PBMC 肿瘤	M13T	320	12.7	4.0	15.0	11.6
Raji/PBMC 肿瘤	M14T	310	14.4	4.7	10.6	9.6
Raji/PBMC 肿瘤	M19T	370	17.0	4.6	6.1	5.5
Raji 仅脾脏	M6S	31	2.1	6.7	0.0	0.0
Raji 仅脾脏	M7S	28	2.0	7.2	0.0	0.0
Raji/PBMC 脾脏	M13S	20	1.3	6.7	6.2	8.0
Raji/PBMC 脾脏	M14S	16	1.3	7.9	0.6	0.9
Raji/PBMC 脾脏	M19S	27	1.9	7.0	1.8	2.5

[0365]

Raji/PBMC 脾脏	M21S	29	1.8	6.3	2.0	2.5
--------------	------	----	-----	-----	-----	-----

[0366] 实例7:抗CD8抗体mAb1与p-SCN-Bn-DF0的缀合

[0367] 为了修饰亲本抗CD8抗体、mAb1 (具有SEQ ID NO:2/10的 HCVR/LCVR序列对) 和同型对照抗体以适于用放射性标记进行的 ImmunoPET研究,将螯合剂和p-SCN-bn-去铁胺(DF0;Macrocylics,目录号:B-705)连接到抗体。

[0368] 对于修饰,将mAb1用10K MWC0自旋浓缩机(Amicon Ultra-15 离心过滤器单元,

EMD Millipore, 目录号:UFC901024) 在PBS+5%甘油中浓缩到大致29mg/mL。使用基于MacVector序列的消光系数 $212,400\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 和分子量145,654g/mol, 通过Nanodrop 2000UV/VIS 光谱仪(Thermo Scientific)测定浓度。将五毫克的浓缩抗体用100mM NaCO_3 , pH 9.0稀释到10mg/mL (最终pH确认为9.0)。

[0369] 在单独的小瓶中,DF0以50mM DF0浓度在纯二甲亚砜(DMSO) 中制备。将这一DF0溶液以1/4增量添加到抗体溶液中,使得最终溶液溶液组成是缀合缓冲液中10mg/mL mAb1、2%DMSO以及3倍摩尔/ 摩尔过量DF0。使这一溶液在不进行额外搅拌的情况下在37℃水浴中培育。在37℃下30分钟后,将溶液及时通过NAP-5脱盐柱(GE Healthcare, 目录号17-0853-02),脱盐柱用含10mM组氨酸pH 5.5缓冲液(配制缓冲液)预平衡。将最终溶液通过针筒过滤器(Acrodisc 13 mm针筒过滤器,Pall Corporation, 目录号:4602) 无菌过滤。

[0370] 随后通过UV/VIS光谱法测量抗体浓度和DF0与抗体的比率(螯合部分与抗体的比率)。参见图4。对于吸光度测量,在252nm (A_{252})、280nm (A_{280}) 和600nm (A_{600}) 下相对于配制缓冲液测量DF0缀合抗体。对于计算,使用以下方程在每个吸光度值处校正背景:

[0371] $A'_{\lambda} = A_{\lambda} - A_{000}$

[0372] 使用以下方程计算抗体浓度、缀合物浓度和螯合部分与抗体的比率:

[0373] 抗体浓度计算

[0374]
$$\text{mAb浓度 (mg/mL)} = \frac{A'_{280}}{\epsilon_{280}} * MW$$

[0375] Conc mAb (mg/mL)

[0376] 缀合物浓度计算

[0377]
$$\text{缀合物浓度 (mg/mL)} = \frac{A'_{252} - 1.53A'_{280}}{\epsilon_{252} - 1.53\epsilon_{280}} * MW$$

[0378] 螯合部分与抗体的比率计算

[0379]
$$\text{DAR} = \frac{\epsilon_{252}A'_{280} - \epsilon_{280}A'_{252}}{18800A'_{252} - 28700A'_{280}}$$

[0380] 使用尺寸排阻高效液相色谱法(SE-HPLC) 测试抗体缀合物的聚集,其中25ug样品用PBS流动相(0.75mL/min) 注射到在280nm处监测的Superdex 200Increase 10/300GL柱(GE Healthcare, 目录号 28990944) 上。参见图5。抗体完整性通过GXII微流体电泳图(Caliper, 芯片ID:P099P-0563N-03) 评估,并且根据制造商的说明书建立。参见图6。

[0381] 结果:

[0382] mAb1通过赖氨酸与DF0成功缀合,如UV/VIS光谱所示。计算出的螯合部分与抗体的比率1.7在1.0到2.0的预期范围内。SEC迹线展示97.5%单体产物,其中不具有可检测的较低分子量物种。这一结果由还原态和非还原态两者的电泳图证实。

[0383] 表7. 裸抗体的消光系数和分子量。

[0384]

亲本mAb批次	MW (g mol^{-1})	ϵ_{280} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	ϵ_{252} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
mAb1-L1	145654	212400	80493

[0385] 表8. 缀合物的螯合部分与抗体的比率、浓度和单体纯度。

[0386]	缀合物批次	UV 整合部分与抗体的比率	浓度 (mg/mL)	单体%
	mAb1-L2	1.68	5.57	97.5%

[0387] 实例8:DF0缀合单克隆抗体的⁸⁹Zr整合

[0388] 对于免疫PET体内研究中的使用,将DF0缀合的抗CD8抗体 mAb1-L2用⁸⁹Zr放射性标记。

[0389] 对于研究编号1和2两者,在整合之前以相同方式配制DF0-Ab 免疫缀合物溶液。配制组合物列于表9中。简单来说,首先使DF0-Ab 免疫缀合物(212ug)在1M HEPES,pH 7.2中达到1.06mg/mL。单独地,使用表10中所示的用于每个对应研究的组合物制备⁸⁹Zr溶液。从3D Imaging获得储备⁸⁹Zr-草酸溶液。首先使用Capintec CRC-25R剂量校验仪(Capintec#502)确认溶液的最终放射性活度,随后立即与 DF0-Ab免疫缀合物溶液组合,轻轻混合(上下移液),并且随后在室温下培育45分钟。总反应体积是1200uL。

[0390] 在培育后,将混合物转移到脱盐柱PD-10 (GE Healthcare,目录号: 17-0851-01)用250mM乙酸钠pH 5.4下预平衡,以便进行重力进料脱盐。在反应内容物进入柱床之后,丢弃流穿液(flow through)。将产物用250mM乙酸钠pH 5.4(配制缓冲液)下洗脱,并且按照制造商的说明书收集洗脱液。随后通过UV/VIS光谱法测量产物(现称为DF0-Ab 放射性免疫缀合物)的浓度,并且使用以下方程在使用280nm处适当的消光系数和吸收计算:

[0391] 以mg/mL为单位的浓度=280nm处的吸收÷280nm处的消光系数参见表11。

[0392] 以克为单位测量的最终质量记录于表12中。随后使用剂量校准器 (Capintec, CRC-25R) 测量放射性活度并且在表12中报告。使用具有串联连接的UV 280和放射性同位素检测器(γ发射)的SEC-HPLC(带有Lablogic放射性TLC/HPLC检测器SCAN-RAM的Agilent 1260),使用Superdex 200Increase 10/300GL柱(GE Healthcare,目录号 28990944)用PBS流动相以0.75mL/min的流动速率分析最终材料(5 ug)。放射性示踪(radiotracer)通过将总蛋白质峰(约10到约18分钟)与未标记的⁸⁹Zr峰(约25分钟)的积分进行比较,用于确定放射化学纯度(100%-未标记⁸⁹Zr百分比)。通过将高分子量(HMW)物种峰(约10分钟到约15分钟)与单体(约15到约18分钟)的积分进行比较,通过UV 280迹线测定单体纯度百分比。

[0393] 使用以下方程确定每种DF0-Ab放射性免疫缀合物的比活度和蛋白回收率(%):

[0394] a.以mg为单位的缀合物质量=以mg/mL为单位的浓度×以克为单位的溶液质量

[0395] b.以mCi/mg为单位的比活度=以mCi为单位的小瓶的活度÷以 mg为单位的缀合物质量

[0396] c.蛋白回收率=起始缀合物质量(mg)÷以mg为单位的缀合物质量

[0397] 最后,注意到外观并且记录在表12中。结果在表12中加以整合。图7和8中所示的放射性SEC-HPLC色谱图证实至少99.9%放射化学纯度。图9和10中所示的UV280-HPLC SEC色谱图证实高度单体产物(>90%)。

[0398] 数据证明DF0-放射性免疫缀合物在两个研究中成功并且一致地用⁸⁹Zr放射性标记。

[0399] 表9.用于放射性标记的DF0-抗体缀合物制剂

[0400]

放射性标记编号	研究编号	DFO-Ab 免疫缀合物批号	浓度 (mg/mL)	螯合部分与抗体的比率	缀合物质量 (mg)	总体积 (uL)	最终浓度 (mg/mL)
1 和 2	1 和 2	mAb1-L2	5.57	1.68	212	200	1.06

[0401] 表10. 用于放射性标记的⁸⁹Zr反应溶液制剂

[0402]

放射性标记	研究编号	⁸⁹ Zr 草酸盐 (uL)	1 M HEPES, pH 7.2 (uL)	最终体积 (uL)	最终活度 (uCi)	比活度 (uCi/uL)
1	1	8.0	992.0	1000	5220	5.220
2	2	6.8	993.2	1000	1607	1.607

[0403] 表11: 缀合物批次的消光系数

[0404]

DFO-Ab缀合物	ϵ_{280} (AU ml mg ⁻¹ cm ⁻¹)
mAb1-L2	1.68

[0405] 表12: 用于体内成像和生物分布研究的⁸⁹Zr标记的DFO-Ab免疫缀合物的概述

[0406]

放射性标记	研究编号	放射性免疫缀合物批次	外观	放射化学纯度* (%)	单体纯度** (%)	蛋白回收率 (%)	浓度 (mg/mL)	比活度 (mCi / mg)
1	1	mAb1-L2-111016	澄清	>99.9	98.5	71	0.085	24.8
2	2	mAb1-L2-111516	澄清	>99.9	98.6	72	0.087	7.19

[0407] *通过放射性SEC-HPLC测得,**通过UV-SEC-HPLC测得

[0408] 实例9: 免疫反应性

[0409] 根据实例7和8制备的放射性标记的抗CD8抗体的免疫反应性 (IR) 如下测定。所有溶液缓冲液/冲洗液由PBS和10%胎牛血清 (Seradigm, 目录号1500-500) 组成。表13提供了用于每个IR分析的细胞数量。对于每个分析, 使约 10^7 个JRT3.T3/AP1-luc/hCD28/hCD8 A B 1G4细胞达到0.5mL的最终体积。将二十ng相应的DFO-Ab放射性免疫缀合物添加到这一溶液中, 并且伴随在管旋转器上连续混合在 37°C, 5%CO₂下在培育箱 (ThermoScientific, Forma Steri-Cycle C02) 中培育45分钟。随后使细胞以1500rpm自旋5分钟, 产生“细胞沉淀 A”。将上清液 (约0.5mL) 移出并且引入到被称为“细胞沉淀B”的另一初始细胞沉淀中, 并且允许在37°C, 5%CO₂下再次培养45分钟。在细胞沉淀B培育时, 将细胞沉淀A用1mL新鲜培养基冲洗三次, 以1500rpm自旋5分钟。收集并且保存每个冲洗液以用于后续分析。在45分钟细胞沉淀B培育时间后, 其随后用1mL新鲜培养基冲洗三次, 以1500rpm自旋5分钟。同样, 收集每个冲洗液以用于分析。

[0410] 对于每种免疫放射性免疫缀合物, 将细胞沉淀、所有冲洗液和上清液的放射性活度在自动 γ 计数器 (2470Wizard2, Perkin Elmer) 中进行计数。IR百分比由方程1确定并且记录在表14中:

$$IR (\%)$$

$$[0411] \quad = \frac{\text{细胞沉淀A} + \text{细胞沉淀B} [CPM]}{\text{细胞沉淀A} + \text{细胞沉淀B} + \text{冲洗液1} + \text{冲洗液2} + \text{冲洗液3} + \text{上清液} [CPM]}$$

[0412] 如表14中所见, 抗体放射性免疫缀合物在缀合和放射性标记后保留至少55%免疫反应性。

[0413] 表13. 每一放射性免疫缀合物批次每沉淀使用的细胞数量

放射性免疫缀合物批号	沉淀A细胞数量	沉淀B细胞数量
mAb1-L2-111016	2.25×10^7 个细胞	2.25×10^7 个细胞
mAb1-L2-111516	1.5×10^7 个细胞	1.5×10^7 个细胞

[0415] 表14. ^{89}Zr 整合DF0-缀合物的免疫反应性

样品	mAb1-L2-111016	mAb1-L2-111516
免疫反应性	57%	55%

[0417] 实例10: 放射性标记的抗CD8抗体在表达hCD8的小鼠中的体内选择性定位

[0418] ^{89}Zr -DF0-mAb1的给药和PET/CT成像:

[0419] 表达hCD8的16周龄小鼠以0.5或1.5mg/kg的蛋白质剂量用 ^{89}Zr -DF0-mAb1注射。用0.5mg/kg剂量注射的小鼠接受7 μg 放射性标记的mAb1-L2-20161115 (约48 μCi), 和作为补充剂的额外8 μg 非DF0 缀合mAb1 (L1), 得到最终总注射蛋白质剂量。用1.5mg/kg剂量注射的小鼠接受7 μg 放射性标记的mAb1-L2-20161115 (约48 μCi), 和作为补充剂的额外38 μg 非DF0缀合mAb1 (L1), 得到最终总注射蛋白质剂量。

[0420] 在施用 ^{89}Zr -DF0-mAb1后6天评定抗体定位的PET成像。使用Sofie Biosciences G8PET/CT来采集PET/CT图像 (Sofie Biosciences和 Perkin Elmer)。在图像采集之前, 将仪器针对 ^{89}Zr 检测进行预校准。能量窗在150到650keV的范围内, 视野中心处的重建分辨率为1.4mm。小鼠经历使用异氟醚进行的诱导麻醉, 并且在成像期间保持在异氟醚的连续流下。静态10分钟图像使用G8采集软件采集, 并且随后使用预配置设置重建。针对衰变和其它参数校正图像数据。CT图像在PET 采集之后采集, 并且随后与PET图像融合 (co-registered)。使用 VivoQuant后处理软件 (inviCRO Imaging Services) 制备图像。

[0421] ^{89}Zr -DF0-mAb1的生物分布:

[0422] 对于生物分布研究, 在最终时间点 (^{89}Zr -DF0-mAb1施用后6天) 将小鼠安乐死并且通过心脏穿刺收集血液。切下组织, 置于计数管中并且称重。使用自动 γ 计数器 (Wizard 2470, Perkin Elmer) 获取以每分钟计数 (CPM) 为单位的 ^{89}Zr 的计数数据。使用由注射材料制备的标准品对每个样品计算每克注射剂量百分比 (ID%/g)。

[0423] 结果:

[0424] 这一实验证明 ^{89}Zr -DF0-mAb1结合表达hCD8的小鼠的脾脏和淋巴结中的内源性T细胞上表达的人类CD8的能力。在放射后示踪剂注射后第6天时, 与施用1.5mg/kg的更高施用蛋白质 ($10.32 \pm 1.54 \text{ ID\%/g}$) 相比, 0.5mg/kg的较低施用的蛋白剂量显示出从血液中的抗原介导的清除更快 ($3.57 \pm 1.50 \text{ ID\%/g}$)。用较低施用蛋白质剂量注射的小鼠中这种较快的从血液中清除可以归因于与用较高施用蛋白质剂量注射的小鼠相比, 次级淋巴器官中的较高摄取, 证明对脾脏和淋巴结中表达的 CD8的抗原特异性靶向。来自表达hCD8的小鼠中

^{89}Zr -DF0-mAb1注射后第6天时的生物分布的ID%/g值示于表15中。表达hCD8的小鼠中注射后第6天时0.5和1.5mg/kg ^{89}Zr -DF0-mAb1的代表性iPET图像示于图11中。

[0425] 表15. 向表达hCD8的小鼠施用以0.5或1.5mg/kg的蛋白质剂量注射的 ^{89}Zr -DF0-mAb1后第6天时的体外生物分布。

	0.5 mg/kg (n = 3)		1.5 mg/kg (n = 3)	
	ID%/g 平均值	ID%/g 标准差	ID%/g 平均值	ID%/g 标准差
[0426]	样品			
	血液	3.57	1.50	10.32
	Ing LN	85.30	24.35	71.00
	Axil LN	103.56	7.00	65.71
	脾脏	105.51	18.60	37.07
	胸腺	9.63	0.93	13.83
	心脏	1.28	0.23	2.81
[0427]	肺	4.11	2.68	6.63
	胃	0.64	0.17	0.70
	S 肠	6.28	2.42	4.78
	肝脏	5.05	1.92	3.97
	肾脏	10.00	0.96	6.44
	肌肉	0.47	0.21	0.84
	骨	3.73	0.55	4.16
	Axil LN 与血液的比率	32.67	14.15	6.35
	脾脏与血液的比率	31.93	8.72	3.6

[0428] 值展示为每克组织注射剂量百分比 (ID%/g) 和组织与血液的比率的平均值和标准差。(对于0.5和1.5mg/kg蛋白质剂量两者, n=3)。缩写: Ing LN--腹股沟淋巴结; Axil LN--腋下淋巴结; S肠--小肠。

[0429] 实例11: 放射性标记的抗CD8抗体向小鼠中Raji/PBMC肿瘤的选择性定位

[0430] 本实例描述锆 89 标记的DF0-抗CD8抗体缀合物在用Raji细胞和人类PBMC共植入的雌性NSG小鼠中的体内成像和体外生物分布。

[0431] 肿瘤植入和给药组分配:

[0432] 为了证明放射性标记抗体对CD8靶向的特异性, 2×10^6 个Raji细胞单独植入, 或与 5×10^5 个人类PBMC (批次0160614, ReachBio Research Labs) 共植入到雌性NSG小鼠 (8到10周龄; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ; Jackson Labs) 的右胁腹中。监测肿瘤生长, 并且肿瘤植入后13到14天将小鼠随机分入4只小鼠的组, 以便进行 ^{89}Zr -DF0-mAb1给药。当用 ^{89}Zr -DF0-mAb1施用时, Raji和Raji/hPBMC肿瘤分别是约 $335 \pm 68\text{mm}^3$ 和约 $371 \pm 40\text{mm}^3$ 。

[0433] ^{89}Zr -DF0-mAb1的给药和PET/CT成像:

[0434] 将携带皮下Raji或Raji/hPBMC肿瘤的小鼠用0.1mg/kg剂量的 ^{89}Zr -DF0-mAb1 (约66 μCi 和2.8 μg 蛋白质) 注射。

[0435] 在施用 ^{89}Zr -DF0-mAb1后6天评定抗体定位的PET成像。使用 Sofie Biosciences G8PET/CT来采集PET/CT图像 (Sofie Biosciences和 Perkin Elmer)。在图像采集之前, 将

仪器针对 ^{89}Zr 检测进行预校准。能量窗在150到650keV的范围内,视野中心处的重建分辨率为1.4mm。小鼠经历使用异氟醚进行的诱导麻醉,并且在成像期间保持在异氟醚的连续流下。静态10分钟图像使用G8采集软件采集,并且随后使用预配置设置重建。针对衰变和其它参数校正图像数据。CT图像在PET 采集之后采集,并且随后与PET图像融合。使用VivoQuant后处理软件(inviCRO Imaging Services)制备图像。

[0436] ^{89}Zr -DF0-mAb1的生物分布:

[0437] 对于生物分布研究,在 ^{89}Zr -DF0-mAb1施用后6天时最终PET扫描后通过心脏穿刺收集血液。将小鼠安乐死,并且随后将Raji或 Raji/hPBMC肿瘤连同其它正常组织一起切除,放置在计数管中并且称重。使用自动 γ 计数器(Wizard 2470,Perkin Elmer)获取以每分钟计数(CPM)为单位的 ^{89}Zr 的计数数据。使用由注射的材料制备的标准品对每个样品计算每克注射剂量百分比(ID%/g)。

[0438] 结果:

[0439] 本研究证明 ^{89}Zr -DF0-mAb1相较于NSG小鼠中生长的仅Raji肿瘤($6.39 \pm 0.93\text{ID\%/g}$),对皮下Raji/hPBMC肿瘤中瘤内人类淋巴细胞上表达的CD8的抗原特异性靶向($31.11 \pm 8.82\text{ID\%/g}$)。Raji/hPBMC 和仅Raji肿瘤的肿瘤与血液的比率分别是 3.32 ± 0.11 和 0.43 ± 0.07 。此外,已共植入Raji/hPBMC肿瘤的小鼠的脾脏中的摄取存在增加。 ^{89}Zr -DF0-mAb1注射第6天时后携带Raji和Raji/hPBMC肿瘤的小鼠的代表性iPET图像(图12)证明 ^{89}Zr -DF0-mAb1相较于携带Raji肿瘤的小鼠,对携带Raji/hPBMC肿瘤小鼠的肿瘤和脾脏的更高靶向。来自 ^{89}Zr -DF0-mAb1注射后第6天时的生物分布(表16)的ID%/g值证实iPET成像数据。

[0440] 表16.向携带Raji或Raji/hPBMC肿瘤的NSG小鼠施用以0.1 mg/kg的蛋白质剂量注射的 ^{89}Zr -DF0-mAb1后第6天时的体外生物分布。

	携带 Raji 肿瘤的小鼠		携带 Raji/hPBMC 肿瘤的小鼠	
	ID%/g 平均值	ID%/g 标准差	ID%/g 平均值	ID%/g 标准差
血液	14.81	0.96	10.14	2.79
肿瘤	6.39	0.93	31.11	8.82
脾脏	4.75	0.35	56.35	36.45
胸腺	6.56	1.70	3.96	0.76
心脏	3.42	0.65	2.41	0.57
肺	11.22	1.76	9.02	0.40
胃	0.57	0.08	0.56	0.19
S 肠	1.18	0.26	1.01	0.23
肝脏	2.62	0.13	8.64	3.04
肾脏	4.00	0.59	4.31	0.78
肌肉	1.08	0.17	0.84	0.20
骨	2.81	0.55	5.36	1.29
肿瘤与血液的比率	0.43	0.07	3.32	0.11

[0443] 值展示为每克组织注射剂量百分比(ID%/g)和肿瘤与血液的比率的平均值和标准差。

[0444] 实例12:用弱CD8功能阻断剂Mab1处理小鼠不会对人源化小鼠中急性LCMV感染的清除产生负面影响。

[0445] 来自本实例的实验数据基于先前公开的模型:用淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒阿姆斯特朗株系(Armstrong strain) (LCMV阿姆斯特朗株系或LCMV Arm)感染C57B1/6小鼠,引起急性感染,其消退取决于功能性CD8+CTL反应的产生(PNAS.第91卷,第10854-10858页;J Virol.1987年6月;61(6):1867-74)。在本实例中,小鼠经基因工程化以表达人类TCR、HLA、CD4和CD8共受体,称为人源化小鼠。用LCMV Arm攻击人源化小鼠(2×10^5 ffu(病灶形成单位),腹膜内注射(i.p.))并且其展现类似于对照C57B1/6小鼠的急性感染消退,不过动力学稍微延迟(相对于对照中第8到10天,在感染后第12到21天)(数据未示出)。

[0446] 在本实例中,使用人源化小鼠中的LCMV急性感染模型来评定具有差异性阻断活性的抗人类CD8抗体对病毒清除的效果。组由用以下处理的小鼠组成:A) CD8 T细胞耗乏抗体(OKT8),其被视为阳性对照,B) CD8活性强阻断抗体,C) 弱阻断抗体CD8活性(Mab1)和 D) 非CD8结合蛋白对照。使用实例5中所描述的工程化生物分析评定B和C的阻断活性。

[0447] 耗乏OKT8抗体在感染前2天、感染前1天和感染后1天以100 微克/剂量i.p.施用,而其它处理条件在注射前一天按0.5mg/kg i.p.的单剂量递送。小鼠用LCMV Arm感染(2×10^5 ffu i.p.)并且在感染后第5、14和21天从小鼠的组收获脾脏。使用标准空斑测定(plaque assay)方法由均质化脾组织评估病毒滴度。

[0448] 在感染后第5天,如图13中所示,所有处理组具有LCMV的高滴度($>1 \times 10^5$ ffu/ml),证明在遗传修饰的小鼠中正确建立病毒感染。如在C57B1/6小鼠中,LCMV在人源化小鼠中的清除是CD8依赖性的,因为使用OKT8抗人类CD8抗体进行的CD8 T细胞耗乏导致在感染后第一个月内LCMV感染的清除延迟。用OKT8CD8耗乏抗体处理的小鼠未能清除病毒并且在感染后第14天和第21天时都维持高病毒滴度($>1 \times 10^5$ ffu/ml),而对照组逐渐清除所述病毒到检测限(LOD 100 ffu/ml)。用单剂量CD8 T细胞功能的弱CD8阻断剂Mab1处理的小鼠,展现与非结合对照类似的病毒清除,不存在统计差异(n.s.)。用单剂量的强烈阻断CD8功能的抗体处理小鼠展现中等病毒清除表型,所述表型在第21天时与弱阻断剂和非结合蛋白对照组两者在统计学上不同($p < 0.05$)。在第21天时所有处理组与OKT8耗乏组在统计学上不同($p < 0.01$)。参见图13。

[0449] 共同地,数据展现在治疗相关剂量下,针对CD8的较弱阻断抗体(mAb 1)不损害人源化小鼠清除LCMV感染的能力,并且因此当与阳性对照(CD8耗乏抗体)和阴性对照(非结合蛋白对照)两者相比时,T细胞功能不受损。

[0450] 实例13:mAb1与NIR荧光化合物的缀合

[0451] 根据制造商的说明书,通过预调节Nap-5柱(GE Healthcare,目录号:17085302),将大致10mg抗体mAb1从配制缓冲液(基于组氨酸)交换到50mM碳酸盐,pH 8.4中。这一过程一式四份进行;收集每个洗脱液(400 μ L)并且组合以得到总共1600 μ L。通过UV/VIS光谱法(Nanodrop 2000UV/VIS光谱仪,Thermo Scientific,目录号ND-2000c-US-CAN)将组合洗脱液浓度确定为18.1mg/mL。

[0452] 对于IRDye 800CW(Li-Cor,目录号:929-70020)缀合,将DMSO中2、4或6倍摩尔/摩尔过量10mM of IRDye 800CW NHS酯引入到7.2mg(400 μ L)缓冲液交换mAb1中。在通过移液管轻缓混合后,使反应在室温下在暗处静止继续进行2小时。

[0453] 对于基于花青的Vivotag680XL (Perkin-Elmer, 目录号:NEV11120) 缀合,将DMSO中2倍摩尔/摩尔过量10mM VivoTag680XL引入到 7.2mg (400 μ L) 缓冲液交换mAb1中。在通过移液管轻缓混合后,使反应在室温下在暗处静止继续进行2小时。

[0454] 将每个缀合反应物通过用PBS外加5%甘油,pH 7.4预调节的Nap- 5柱进行缓冲液交换,以去除反应染料。简单来说,对于每个缀合反应,将1000 μ L的总洗脱液分级,并且通过UV/VIS光谱仪分析每个级分的蛋白质存在。组合具有高蛋白质含量的级分。遵循制造商的说明书,通过UV/VIS光谱法测定每种反应的最终蛋白质浓度和染料与抗体的比率(DAR)。结果汇总在表17中。

[0455] 在所有缀合条件下,如通过尺寸排阻高效液相色谱法SE-HPLC分析,在吸光度280nm处监测(柱:Superdex 200 10/300GL SEC柱, GE Lifesciences, 目录号:28990944),单体纯度被确定为大于或等于 95.0%。结果汇总在表17中。在还原条件和非还原条件两者下,通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,Novex 4--20%Tris- 甘氨酸凝胶,ThermoFisher Scientific, 目录号:EC6026BOX) 分析抗体完整性。相比于非缀合抗体,未观察到缀合物的片段化。

[0456] 表17. IR染料缀合物的DAR、浓度和单体纯度。

	染料	缀合条件 (染料与抗体)	DAR	最终浓度 (mg/mL)	通过 SE-HPLC 测得的单体 纯度 (%)
[0457]	IRDye 800CW	2:1	0.16	12.7	97.4
	IRDye 800CW	4:1	0.34	12.5	97.5
	IRDye 800CW	6:1	0.57	11.1	95.0
	VivoTag680 XL	2:1	1.51	14.6	96.3

[0458] 上文所描述的实施例和实例意图仅仅是说明性并且非限制性的。本领域技术人员顶多使用常规实验即可认识到或能够确定特定化合物、材料和程序的许多等同物。所有此类等同物都被视为处于范围内,并且由所附权利要求书涵盖。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 瑞泽恩制药公司
- [0003] J·T·吉尔莱奥
- [0004] D·马
- [0005] W·奥尔森
- [0006] R·塔瓦莱
- [0007] G·瑟斯顿
- [0008] <120> 抗CD8抗体和其用途
- [0009] <130> 9774.357W01/10357W001
- [0010] <140> TBA
- [0011] <141> 2018-07-23
- [0012] <150> 62/536,239
- [0013] <151> 2017-07-24
- [0014] <150> 62/660,902
- [0015] <151> 2018-04-20
- [0016] <160> 20
- [0017] <170> PatentIn version 3.5
- [0018] <210> 1
- [0019] <211> 375
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <220>
- [0023] <223> 1 VH
- [0024] <400> 1
- [0025] caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggaccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
- [0026] tcctgtgcag cgtctggatt catcttcagt aactatggta ttcactgggt ccgtcaggct 120
- [0027] ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatacttt 180
- [0028] gaagactccg tgaagggccg attcaacatc tccagagaca attccaagaa catagtgtat 240
- [0029] ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt atttctgtgc gagaagttac 300
- [0030] gatatgttga ctgggtcggg tgactactac ggtttggacg tctggggcca agggaccacg 360
- [0031] gtcaccgtct cctca 375
- [0032] <210> 2
- [0033] <211> 125
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 人工序列
- [0036] <220>
- [0037] <223> 2 VH
- [0038] <400> 2

[0039]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Asp Gln Pro Gly Arg
[0040]	1 5 10 15
[0041]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
[0042]	20 25 30
[0043]	Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0044]	35 40 45
[0045]	Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Glu Asp Ser Val
[0046]	50 55 60
[0047]	Lys Gly Arg Phe Asn Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Val Tyr
[0048]	65 70 75 80
[0049]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[0050]	85 90 95
[0051]	Ala Arg Ser Tyr Asp Met Leu Thr Gly Ser Gly Asp Tyr Tyr Gly Leu
[0052]	100 105 110
[0053]	Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0054]	115 120 125
[0055]	<210> 3
[0056]	<211> 24
[0057]	<212> DNA
[0058]	<213> 人工序列
[0059]	<220>
[0060]	<223> 3 CDR1
[0061]	<400> 3
[0062]	ggattcatct tcagtaacta tggt 24
[0063]	<210> 4
[0064]	<211> 8
[0065]	<212> PRT
[0066]	<213> 人工序列
[0067]	<220>
[0068]	<223> 4 CDR1
[0069]	<400> 4
[0070]	Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr Gly
[0071]	1 5
[0072]	<210> 5
[0073]	<211> 24
[0074]	<212> DNA
[0075]	<213> 人工序列
[0076]	<220>
[0077]	<223> 5 CDR2

[0078]	<400> 5
[0079]	atatggtatg atggaagtaa taaa 24
[0080]	<210> 6
[0081]	<211> 8
[0082]	<212> PRT
[0083]	<213> 人工序列
[0084]	<220>
[0085]	<223> 6 CDR2
[0086]	<400> 6
[0087]	Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
[0088]	1 5
[0089]	<210> 7
[0090]	<211> 54
[0091]	<212> DNA
[0092]	<213> 人工序列
[0093]	<220>
[0094]	<223> 7 CDR3
[0095]	<400> 7
[0096]	gcgagaagtt acgatatgtt gactgggtcg ggtgactact acggtttgga cgtc 54
[0097]	<210> 8
[0098]	<211> 18
[0099]	<212> PRT
[0100]	<213> 人工序列
[0101]	<220>
[0102]	<223> 8 CDR3
[0103]	<400> 8
[0104]	Ala Arg Ser Tyr Asp Met Leu Thr Gly Ser Gly Asp Tyr Tyr Gly Leu
[0105]	1 5 10 15
[0106]	Asp Val
[0107]	<210> 9
[0108]	<211> 321
[0109]	<212> DNA
[0110]	<213> 人工序列
[0111]	<220>
[0112]	<223> 9 VK
[0113]	<400> 9
[0114]	gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
[0115]	atcacttgtc gggcgagtca ggacattacc aattatttag cttggtttca gcagaaacca 120
[0116]	gggaaagccc ctaagtcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

[0117] aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 [0118] gaagattttg caacttatta ttgtcaacag tataacaatt atcctctcac tttcggcgga 300
 [0119] gggaccaagg tggagatcaa a 321
 [0120] <210> 10
 [0121] <211> 107
 [0122] <212> PRT
 [0123] <213> 人工序列
 [0124] <220>
 [0125] <223> 10 VK
 [0126] <400> 10
 [0127] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0128] 1 5 10 15
 [0129] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
 [0130] 20 25 30
 [0131] Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 [0132] 35 40 45
 [0133] Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 [0134] 50 55 60
 [0135] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0136] 65 70 75 80
 [0137] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
 [0138] 85 90 95
 [0139] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0140] 100 105
 [0141] <210> 11
 [0142] <211> 18
 [0143] <212> DNA
 [0144] <213> 人工序列
 [0145] <220>
 [0146] <223> 11 CDR1
 [0147] <400> 11
 [0148] caggacatta ccaattat 18
 [0149] <210> 12
 [0150] <211> 6
 [0151] <212> PRT
 [0152] <213> 人工序列
 [0153] <220>
 [0154] <223> 12 CDR1
 [0155] <400> 12

[0156] Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
[0157] 1 5
[0158] <210> 13
[0159] <211> 9
[0160] <212> DNA
[0161] <213> 人工序列
[0162] <220>
[0163] <223> 13 CDR2
[0164] <400> 13
[0165] ggtgcatcc 9
[0166] <210> 14
[0167] <211> 3
[0168] <212> PRT
[0169] <213> 人工序列
[0170] <220>
[0171] <223> 14 CDR2
[0172] <400> 14
[0173] Gly Ala Ser
[0174] 1
[0175] <210> 15
[0176] <211> 27
[0177] <212> DNA
[0178] <213> 人工序列
[0179] <220>
[0180] <223> 15 CDR3
[0181] <400> 15
[0182] caacagtata acaattatcc tctcact 27
[0183] <210> 16
[0184] <211> 9
[0185] <212> PRT
[0186] <213> 人工序列
[0187] <220>
[0188] <223> 16 CDR3
[0189] <400> 16
[0190] Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr
[0191] 1 5
[0192] <210> 17
[0193] <211> 732
[0194] <212> DNA

[0195]	<213> 智人
[0196]	<400> 17
[0197]	atgcatagac ctagacgccg gggtacaaga cctccccac tcgcccttct cgccgccctc 60
[0198]	cttcttgctg cccgcggagc cgatgcatca caatttcgcg tgtccccct tgatcgaacc 120
[0199]	tggaaccttg gcgagacagt tgaactcaaa tgccaggtgc tgctttccaa tcccacatca 180
[0200]	ggatgttcat ggcttttcca accacgaggc gctgctgcta gccccacttt tctcctttac 240
[0201]	ctttcccaaa acaaacctaa agccgccgaa ggactcgaca cacaacgctt ttcaggaaaa 300
[0202]	cgactcggcg atacctttgt actcactctc tcagatttta gacgcgaaaa tgaaggatat 360
[0203]	tattttctgt cgcctctc aaattcaatc atgtatttct ctcatTTTgt tcctgtattc 420
[0204]	cttcccgcta aaccaactac cactcctgct ccccgcccc caacacctgc tccaactatt 480
[0205]	gcateccaac cactctccct cagaccgaa gcttgctgcc ccgcccgg aggtgctgtt 540
[0206]	cacactagag gactcgattt tgcttgcgac atttatactt gggccccact tgcaggtact 600
[0207]	tgccgagtat tgcctctc acttggtatt actctttatt gcaaccatag aaaccgacgc 660
[0208]	agagtttgca aatgtccacg accagttgtc aagtcaggcg ataaaccttc acttagtgca 720
[0209]	cgatacgtct ga 732
[0210]	<210> 18
[0211]	<211> 214
[0212]	<212> PRT
[0213]	<213> 智人
[0214]	<400> 18
[0215]	Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
[0216]	1 5 10 15
[0217]	Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
[0218]	20 25 30
[0219]	Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
[0220]	35 40 45
[0221]	Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
[0222]	50 55 60
[0223]	Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr
[0224]	65 70 75 80
[0225]	Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
[0226]	85 90 95
[0227]	Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu
[0228]	100 105 110
[0229]	Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
[0230]	115 120 125
[0231]	Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
[0232]	130 135 140
[0233]	Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

[0234]	145	150	155	160
[0235]	Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu			
[0236]		165	170	175
[0237]	Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg			
[0238]		180	185	190
[0239]	Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser			
[0240]		195	200	205
[0241]	Leu Ser Ala Arg Tyr Val			
[0242]	210			
[0243]	<210> 19			
[0244]	<211> 657			
[0245]	<212> DNA			
[0246]	<213> 智人			
[0247]	<400> 19			
[0248]	atgcatcgcc cccgaagacg cggtagtaga cccccacccc tcgcccttct ggcagccctt	60		
[0249]	ctgctcgccg cccgaggcgc tgacgccctt caacaaacac ccgcctacat taaagtccaa	120		
[0250]	acaaacaaaa tggtaatgct gtcctgtgaa gctaagatat ccctttcaaa tatgcgcatt	180		
[0251]	tactggctta gacaaagaca agcaccacgc tcagactcac accatgaatt tctcgccctc	240		
[0252]	tgggattccg caaaaggtac catccatgga gaagaagtag aacaagaaaa aattgcagta	300		
[0253]	ttccgagatg ccagtcgatt catcctcaat ctgacttcag ttaaaccgga agatagcgg	360		
[0254]	atctactttt gcatgatcgt tggctcacca gaactcacct tcggtaaagg aaccaattg	420		
[0255]	tccgtcgctg atttctgcc cactacagcc caacctacca aaaagtcaac ccttaagaag	480		
[0256]	agagtttgca gactgcccag acccgaaaca cagaaaggac ccctctgctc tcctattaca	540		
[0257]	cttggcttgc tcgtcgctgg agtcctcgctc cttcttgtat cccttggagt tgccattcac	600		
[0258]	ctgtgttgta gacgccgccc cgccagactc cggtttatga agcagtttta caaatga	657		
[0259]	<210> 20			
[0260]	<211> 189			
[0261]	<212> PRT			
[0262]	<213> 智人			
[0263]	<400> 20			
[0264]	Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val			
[0265]	1	5	10	15
[0266]	Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr			
[0267]		20	25	30
[0268]	Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe			
[0269]		35	40	45
[0270]	Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val			
[0271]		50	55	60
[0272]	Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu			

[0273]	65					70						75				80
[0274]	Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Lys	Pro	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Phe	Cys	Met
[0275]						85						90				95
[0276]	Ile	Val	Gly	Ser	Pro	Glu	Leu	Thr	Phe	Gly	Lys	Gly	Thr	Gln	Leu	Ser
[0277]						100						105				110
[0278]	Val	Val	Asp	Phe	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Gln	Pro	Thr	Lys	Lys	Ser	Thr
[0279]						115						120				125
[0280]	Leu	Lys	Lys	Arg	Val	Cys	Arg	Leu	Pro	Arg	Pro	Glu	Thr	Gln	Lys	Gly
[0281]						130						135				140
[0282]	Pro	Leu	Cys	Ser	Pro	Ile	Thr	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Val	Leu
[0283]						145						150				155
[0284]	Val	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Ala	Ile	His	Leu	Cys	Cys	Arg	Arg
[0285]						165						170				175
[0286]	Arg	Arg	Ala	Arg	Leu	Arg	Phe	Met	Lys	Gln	Phe	Tyr	Lys			
[0287]						180						185				

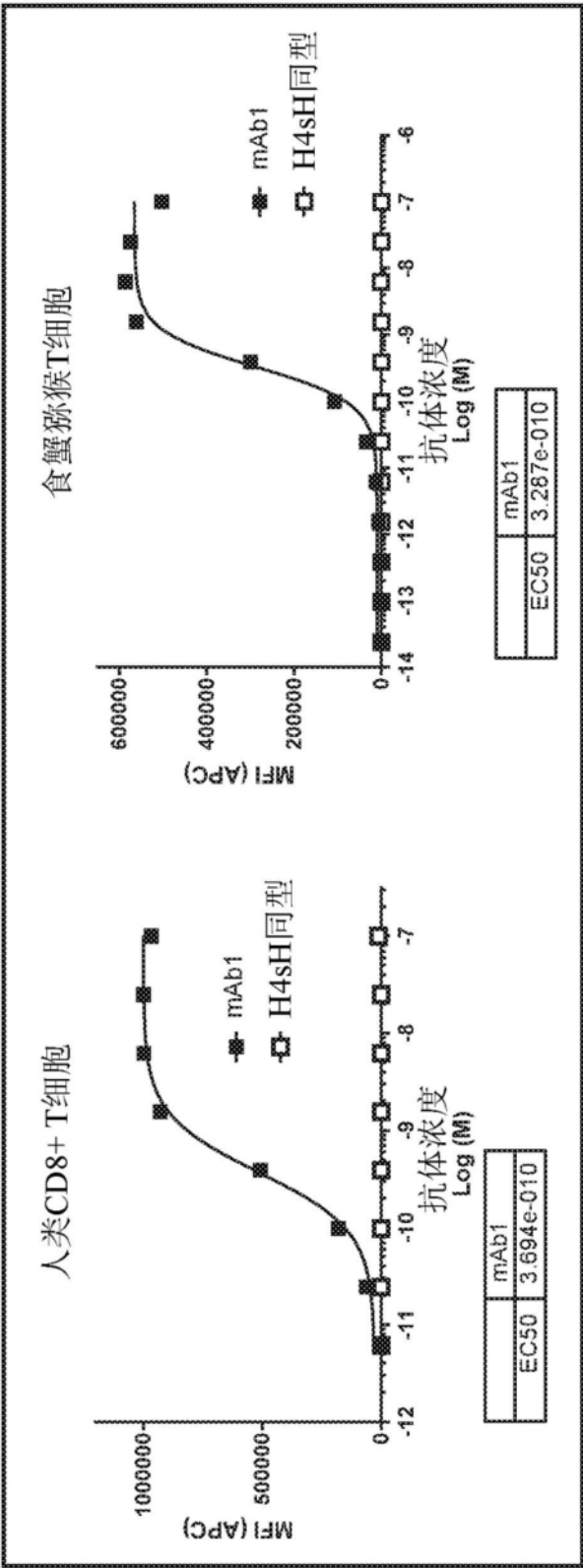


图1

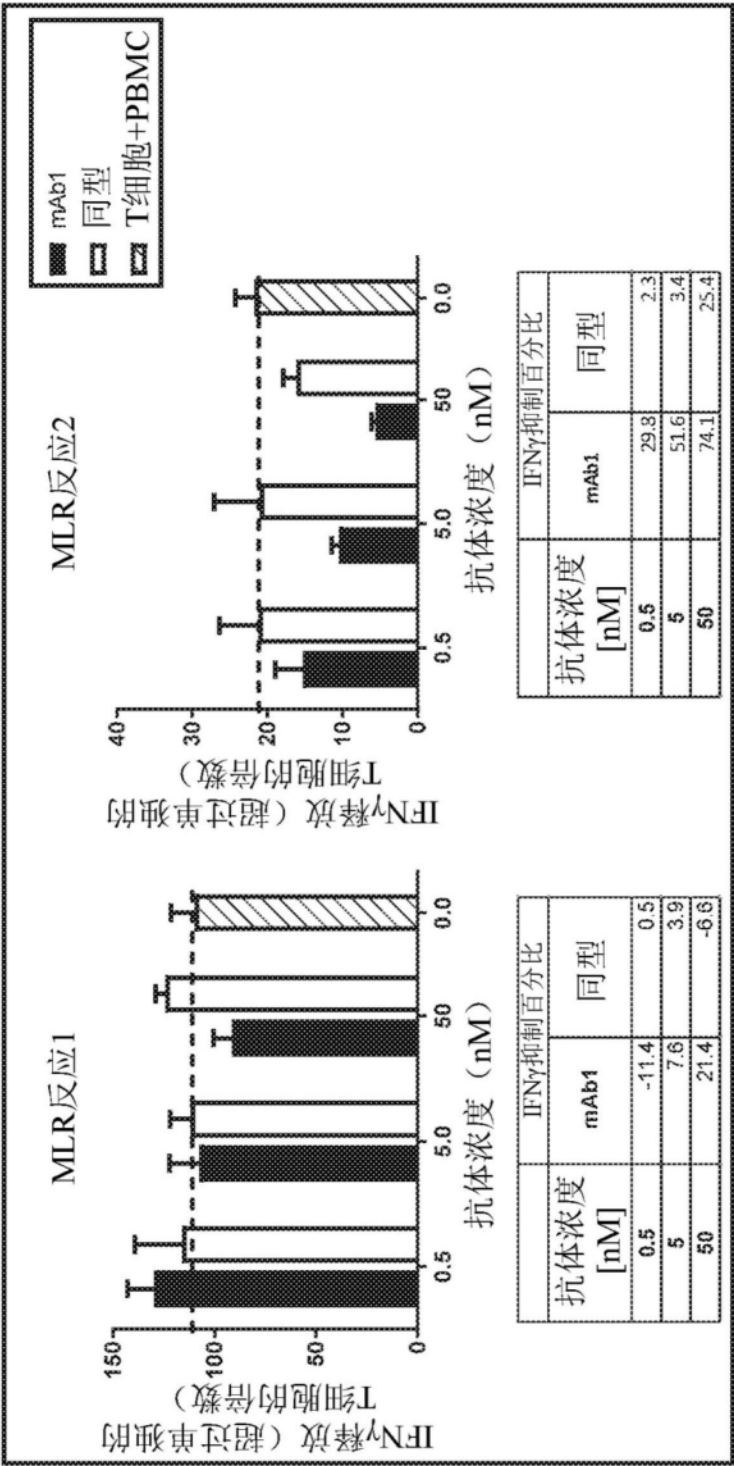


图2

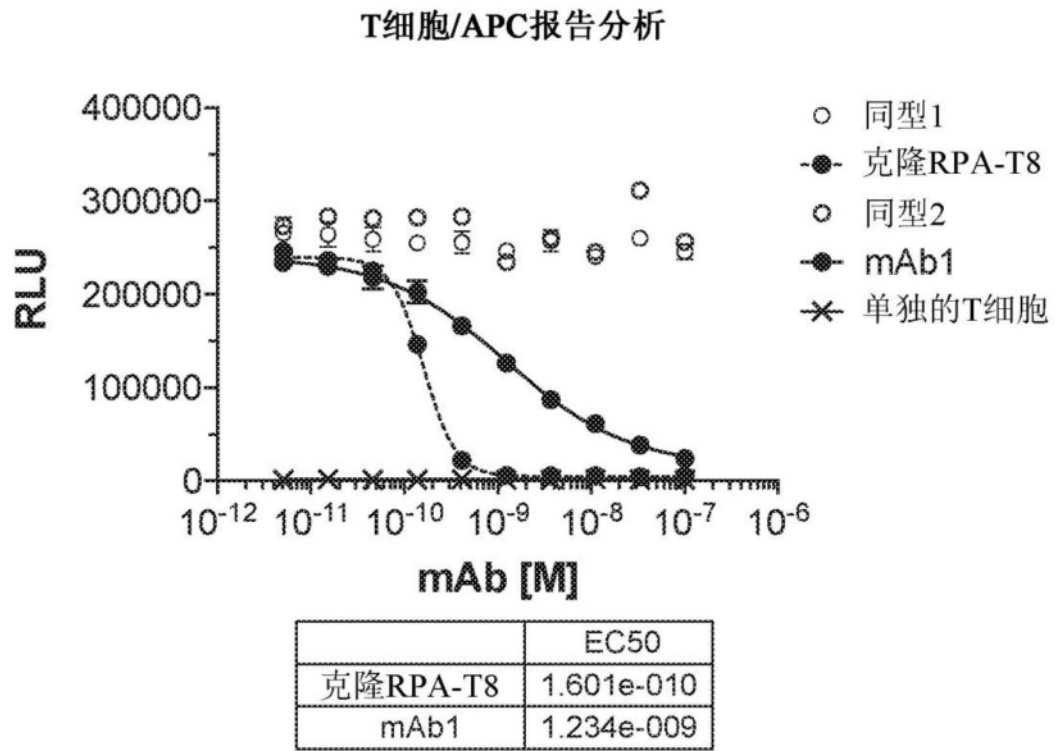


图3

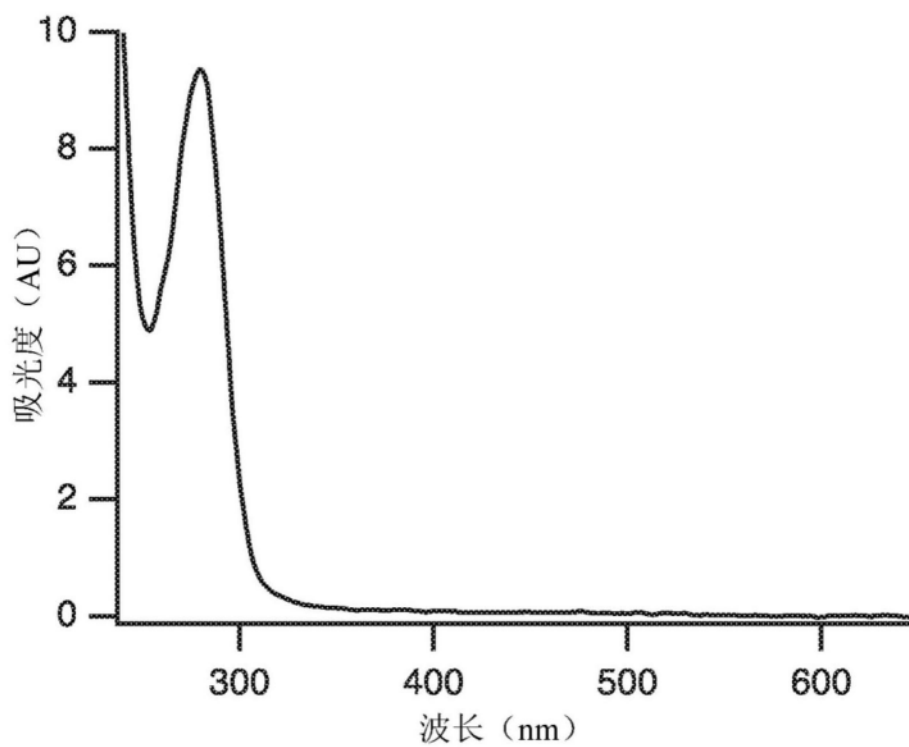


图4

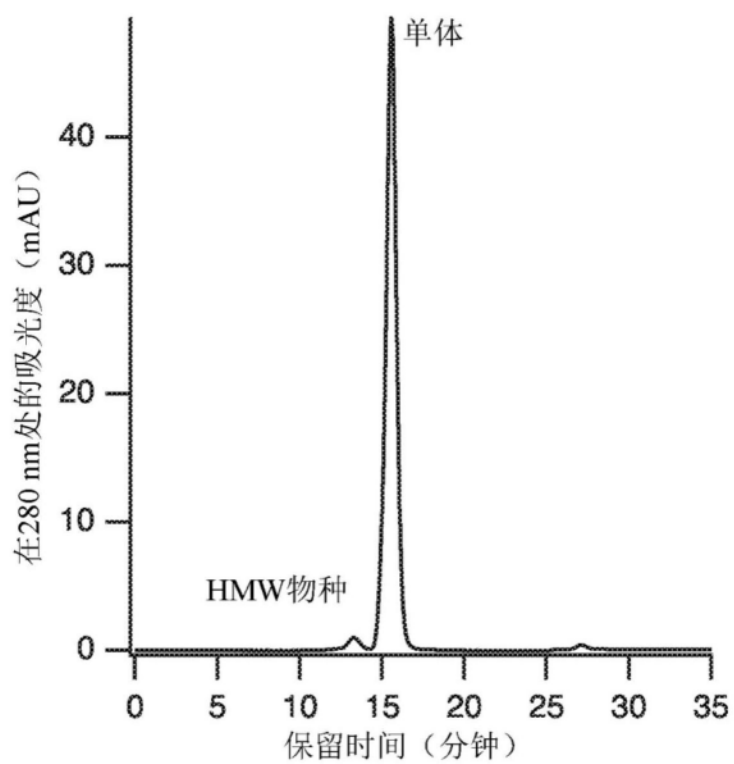


图5

图6A

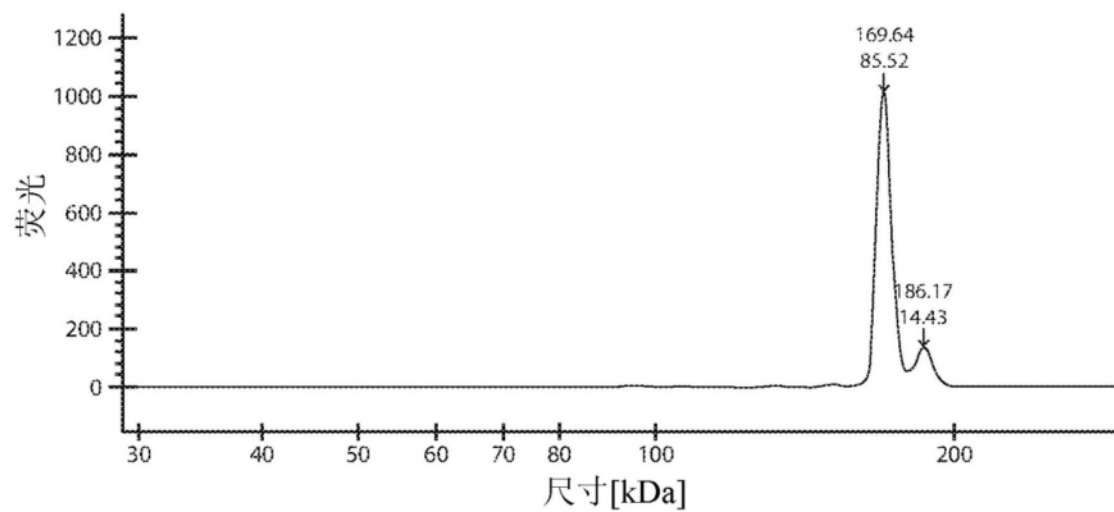


图6B

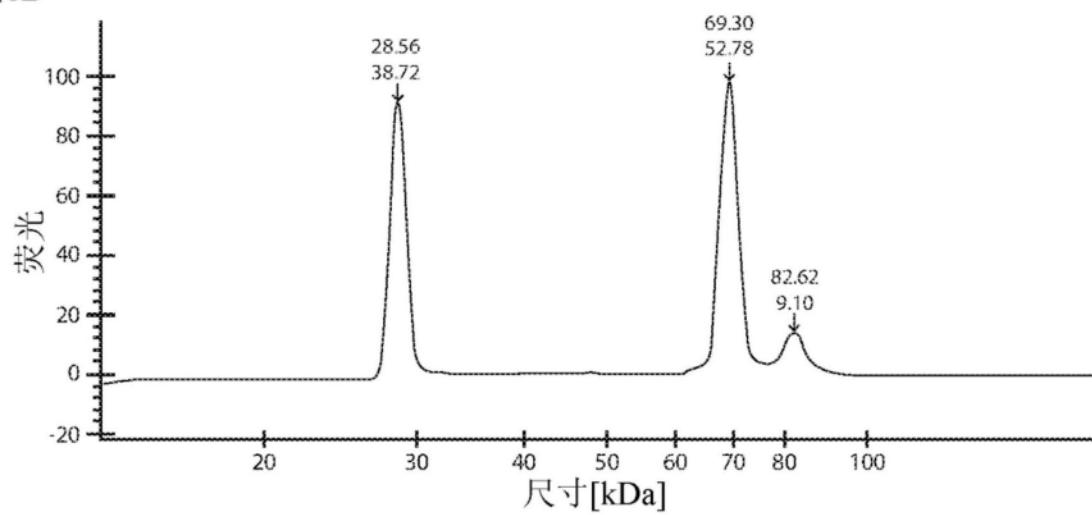


图6

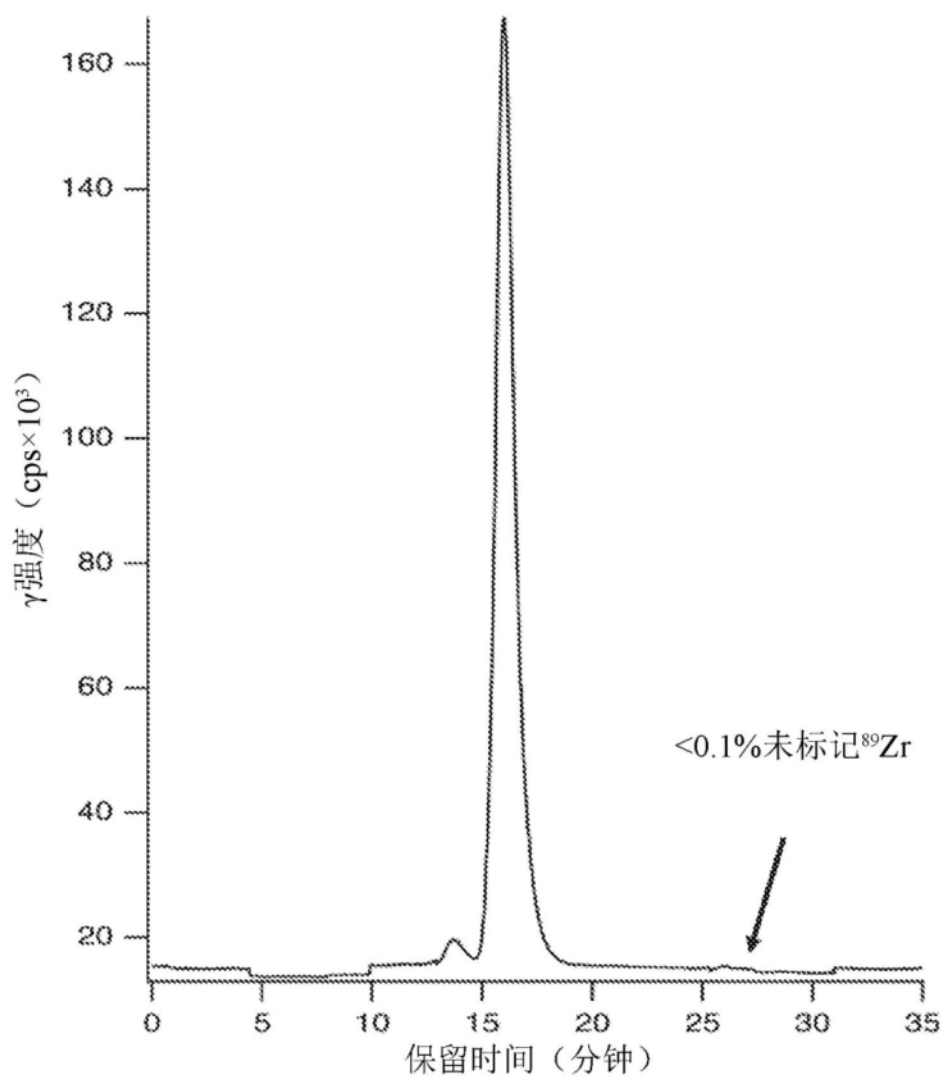


图7

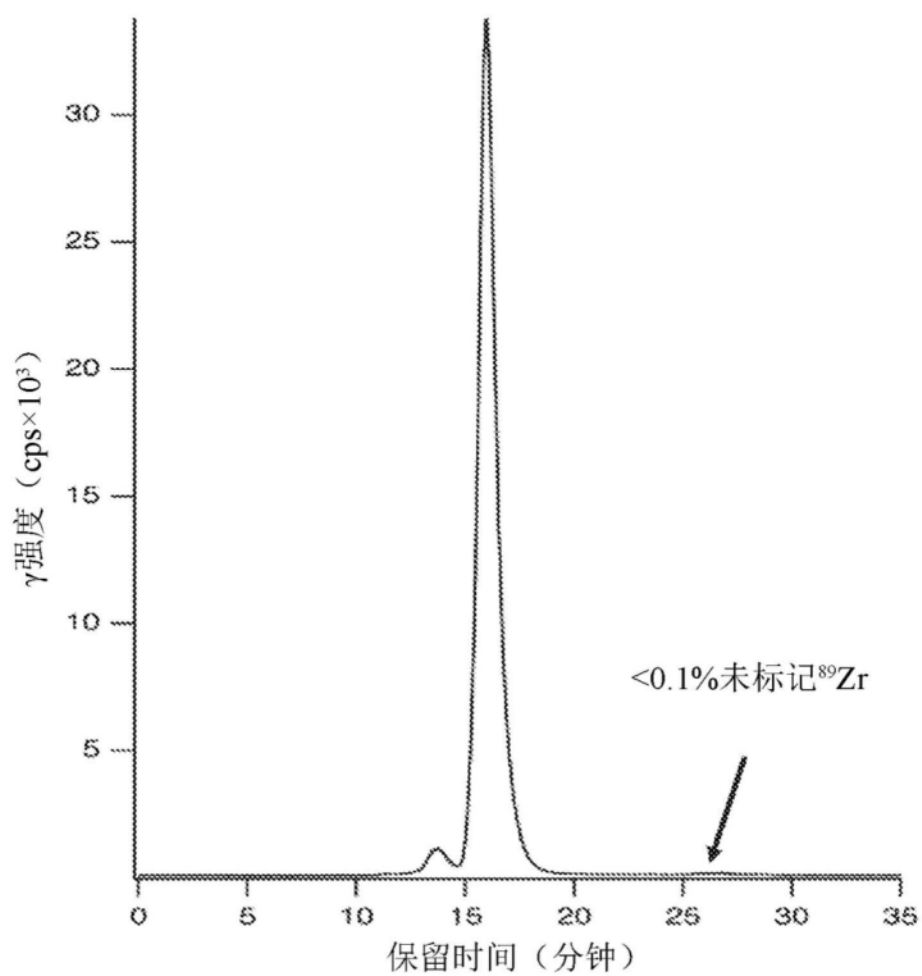


图8

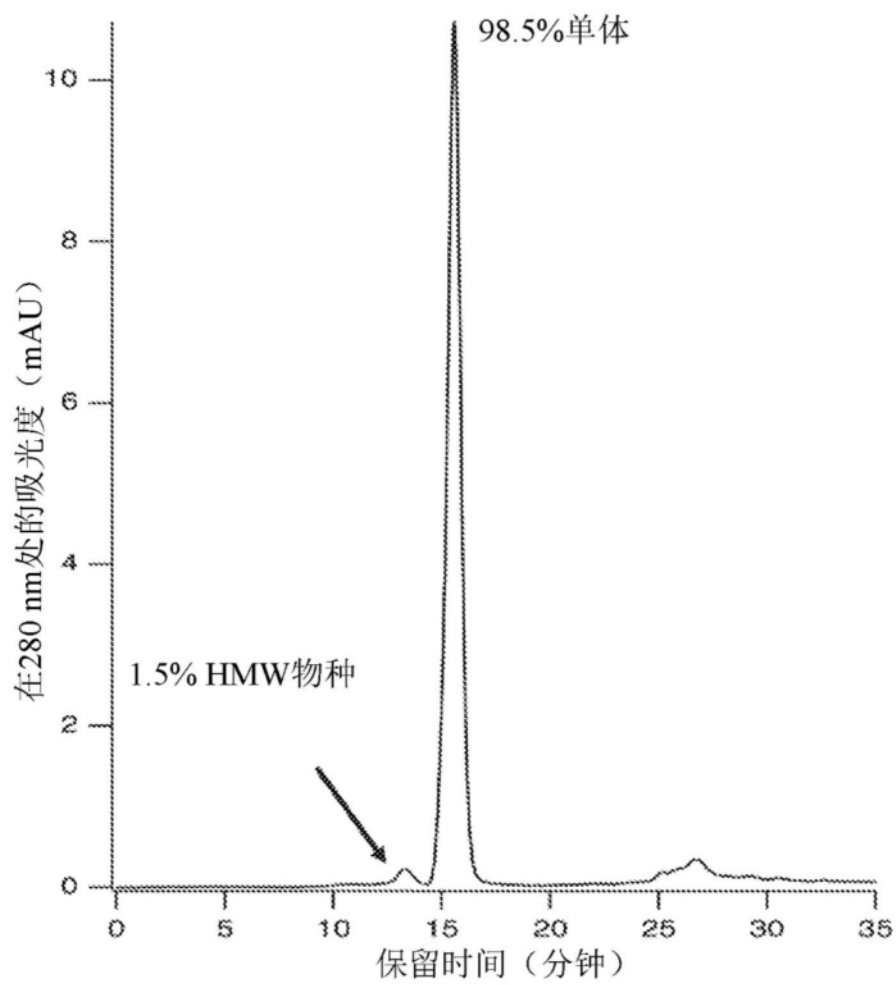


图9

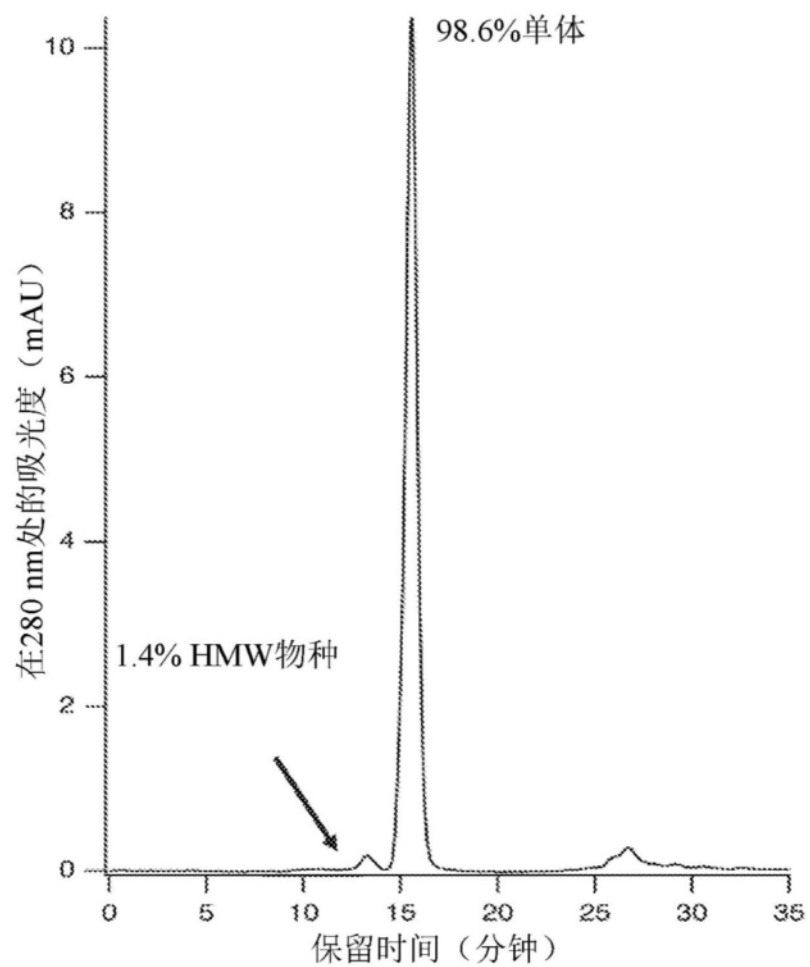


图10

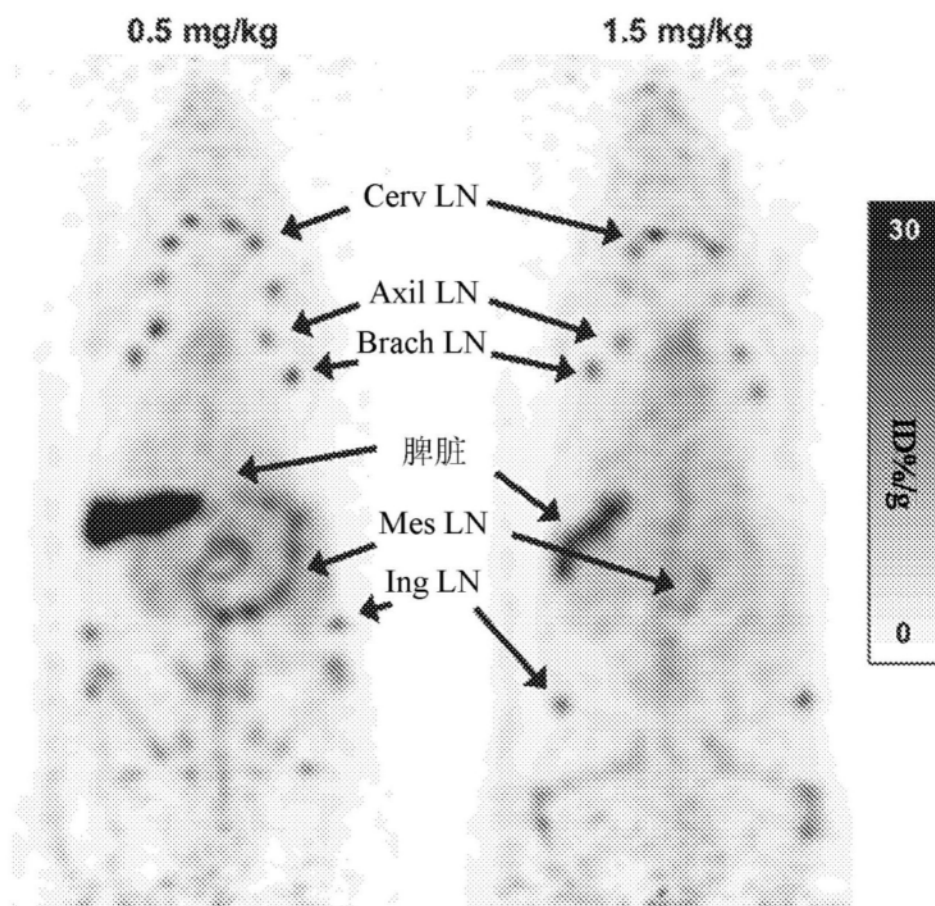


图11

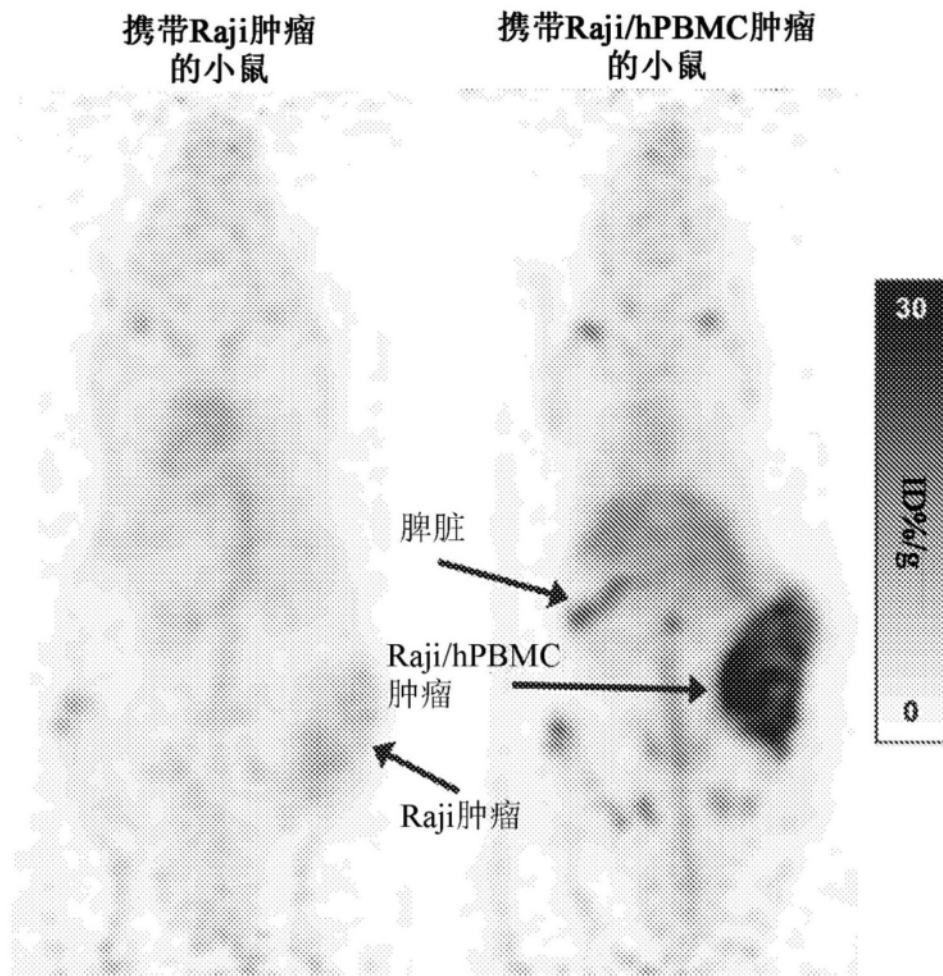


图12

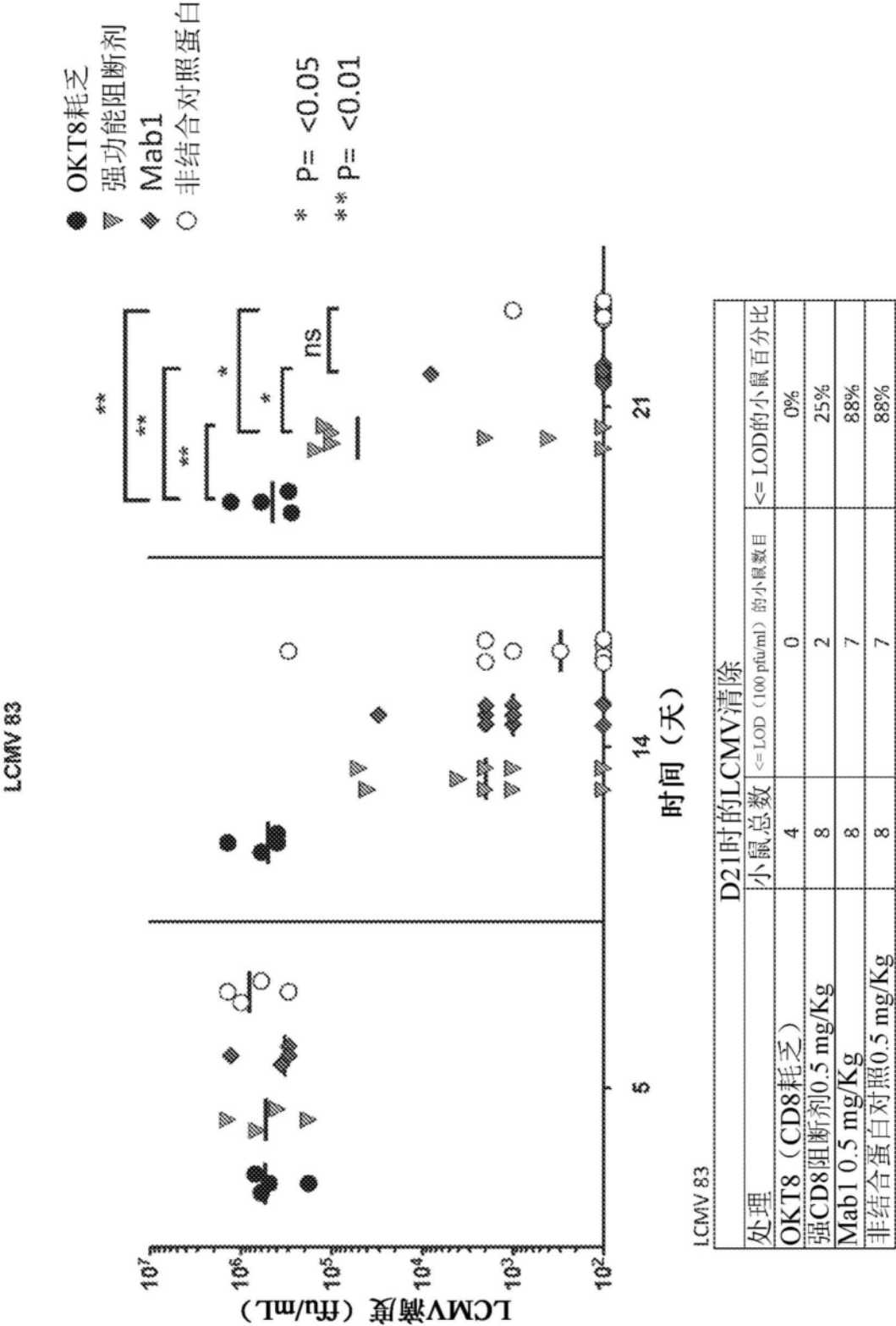


图13