



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202003034 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：108108467

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 13 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/03/13

美國

62/642,248

2018/03/13

世界智慧財產權組織

PCT/EP2018/056312

2018/03/13

美國

62/642,218

2018/03/13

美國

62/642,230

2018/03/13

美國

62/642,232

2018/03/13

美國

62/642,243

2018/03/13

英國

1804027.9

2018/03/13

英國

1804028.7

2018/03/13

英國

1804029.5

(71)申請人：英商塔斯克療法有限公司 (英國) TUSK THERAPEUTICS LTD (GB)

英國

英商癌症研究科技股份有限公司 (英國) CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED (GB)

英國

(72)發明人：高畢爾 安 GOUBIER, ANNE (FR)；薩勒穆 喬瑟芬 SALIMU, JOSEPHINE

(GB)；默德 凱文 MOULDER, KEVIN (GB)；葛彥琪 寇瑞 碧翠絲

GOYENECHEA CORZO, BEATRIZ (GB)；布朗 馬克 BROWN, MARK (GB)；馬

契斯 佩斯卡爾 MERCHIER, PASCAL (BE)；奎沙達 瑟吉歐 QUEZADA,

SERGIO (IT)；普利茲 拜恩卡 PRINZ, BIANKA (DE)；喬格根 詹姆斯

GEOGHEGAN, JAMES (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：46 項 圖式數：27 共 140 頁

(54)名稱

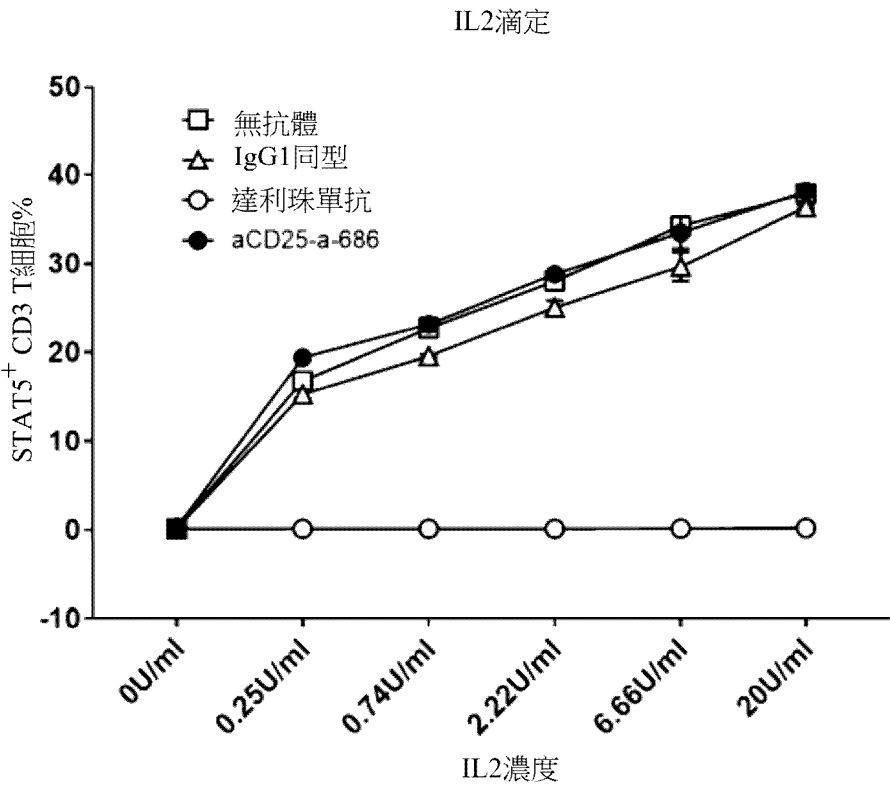
抗-CD25 抗體藥劑

(57)摘要

本發明提供在結合於人類 CD25 之抗體中發現的抗體序列。特別地，本發明提供抗人類 CD25 抗體之序列，其不阻斷 CD25 與 IL-2 之結合或 IL-2 信號傳導。包括此序列之抗體及其抗原結合部分可用於醫藥組合物及治療方法中，特別是用於治療癌症。

The present disclosure provides antibody sequences found in antibodies that bind to human CD25. In particular, the present disclosure provides sequences of anti-human CD25 antibodies, which do not block the binding of CD25 to IL-2 or IL-2 signalling. Antibodies and antigen-binding portions thereof including such sequences can be used in pharmaceutical composition and methods of treatment, in particular for treating cancer.

指定代表圖：



【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗-CD25抗體藥劑

【英文發明名稱】

ANTI-CD25 ANTIBODY AGENTS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於抗CD25抗體、包含抗CD25抗體之醫藥組合物及此類抗體之治療性用途。

【先前技術】

【0002】 癌症免疫療法涉及使用個體之自身免疫系統來治療或預防癌症。免疫療法利用癌細胞在其表面上通常具有可由免疫系統偵測之細微不同的分子之事實。此等分子或癌症抗原為最常見蛋白，但亦包括諸如碳水化合物之分子。因此免疫療法涉及誘導免疫系統經由此等靶抗原攻擊腫瘤細胞。然而，惡性腫瘤(尤其實體腫瘤)可藉助於腫瘤細胞本身及由腫瘤微環境之組分介導之各種機制逃脫免疫監視。在後者中，藉由調節性T細胞(Treg細胞或Treg)穿透腫瘤，且更特定言之，效應子T細胞(Teff)對比Treg之不利平衡(亦即，Teff與Treg之較低比率)已經提議作為關鍵因數(Smyth M等人, 2014)。

【0003】 由於其之發現，因此已發現Treg在介導免疫穩態且促進周邊耐受之建立及維持中至關重要。然而，在癌症的情形下，其作用更複雜。由於癌細胞表現自相關抗原及腫瘤相關抗原兩者，因此Treg之存在(其試圖衰減效應子細胞反應)可有助於腫瘤發展。因此，大體而言，已形成腫瘤中之Treg之穿透表示有效抗腫瘤反應及治療癌症之主要障礙中之一

者。Treg採用之抑止機制被認為顯著促進限制或甚至破壞當前療法，尤其依賴於誘導或增強抗腫瘤反應之免疫療法(Onishi H等人; 2012)。

【0004】 已不斷地證實Treg細胞促進鼠類模型中腫瘤之建立及發展且證實其之不存在使得延遲腫瘤進展(Elpek等人, 2007; Golgher等人, 2002; Jones等人, 2002; Onizuka等人, 1999; Shimizu等人, 1999)。在人體內，藉由Treg細胞之較高腫瘤穿透，且更重要地效應子T (Teff)細胞與Treg細胞之較低比率係與多種癌症中之較差結果相關聯(Shang等人, 2015)。相反地,較高Teff/Treg細胞比率係與對人類及小鼠兩者體之免疫療法之有利反應相關聯(Hodi等人, 2008; Quezada等人, 2006)。儘管如此，腫瘤中Treg之清除係複雜的，且此領域中之臨床前及臨床研究之結果係不一致的，主要由於難以鑑別對Treg具有特異性之靶標。

【0005】 CD25為用於實現Treg之清除的可能存在之分子靶標中之一者。實際上，CD25 (亦稱為介白素-2高親和力受體 α 鏈(IL-2R α))以較高含量組成性地表現於Treg細胞上，且其不存在於T效應細胞上或以較低含量表現於T效應細胞上且因此係Treg清除之有前景的目標。IL-2/CD25相互作用已為鼠類模型中之數種研究之目標，其中大多數涉及使用PC61 (大鼠抗鼠類CD25抗體) (Setiady Y等人, 2010.)。此抗體之CD25結合及功能性活性已與由不同作者產生之單株抗體之組之彼等活性相比較(Lowenthal J.W等人, 1985.; Moreau, J.-L等人; Volk HD等人, 1989; Dantal J等人, 1991,)。雖然原始研究證實PC61之防治性但非治療活性，但當前研究展示此抗CD25抗體之Fc最佳化型式引起腫瘤內Treg清除且在數種鼠類腫瘤模型中提供明顯的治療效益(Vargas A等人, 2017)。

【0006】 可利用的抗CD25抗體(諸如PC61)阻斷或抑制IL-2與CD25

之結合，如同許多其他抗小鼠CD25抗體及大多數抗體經揭示為抗人類CD25抗體；參見例如WO2004/045512、WO 2006/108670、WO1993/011238、WO1990/007861及WO2017/174331。舉例而言，巴利昔單抗(Basiliximab)及達利珠單抗(Daclizumab)為抑制IL-2與CD25之結合的抗人類CD25抗體，且已經研發以減少T-效應子細胞之活化(Queen C等人, 1989及Bielekova B, 2013)。巴利昔單抗為當前針對移植相比於抗宿主疾病批准之嵌合小鼠-人類CD25抗體且達利珠單抗為針對治療多發性硬化批准之人類化CD25抗體。

【0007】 少數其他抗CD25抗體仍允許IL-2與CD25之結合，諸如純系7D4 (抗小鼠CD25)、純系2E4 (抗小鼠CD25)、純系MA251 (抗人類CD25)或7G7B6 (抗人類CD25) (亦即非阻斷抗體)。伊諾莫單抗(Inolimomab)/BT536儘管經傳說不阻斷IL-2與CD25之結合，但的確阻斷經由CD25之IL-2信號傳導。7D4為在PC61或具有類似結合特性之抗體之存在下或在用其治療後已充分用於偵測CD25-陽性細胞的大鼠IgM抗小鼠CD25抗體(Onizuka S等人, 1999)。極少文獻揭示7D4-IgM抗體之任何功能性特性，單獨或相較於PC61 (Kohm A等人, 2006; Hallett W等人, 2008; Fecci P等人, 2006; McNeill A等人, 2007; Setiady Y等人, 2010; Couper K等人, 2007.)。實際上，先前技術並未教示調適或在某種程度上修飾7D4之同型或其他結構特徵以便獲得經改良抗體，尤其可用於癌症療法中之彼等抗體的可能性。7D4-IgM (本身或作為經工程改造抗體)或設計或表徵為具有類似於小鼠CD25之7D4之CD25結合特徵的任何抗人類CD25之能力尚未相對於最佳化之Treg細胞清除而詳細評估。

【0008】 如上文所論述，腫瘤中Treg細胞之穿透，且尤其效應Teff

細胞與Treg細胞之較低比率可產生較差臨床結果。CD25已經鑑別為Treg標記物且可因此為旨在清除Treg的治療性抗體之所關注目標。重要地，CD25為IL-2之受體之 α 子單元且IL-2為Teff反應之關鍵細胞介素。目前為止已進行臨床測試之抗CD25抗體儘管清除Treg細胞，但亦阻斷經由CD25 (特定言之CD25/CD122/CD132複合物)之IL-2信號傳導。本發明人目前已發現IL-2信號傳導之此阻斷限制Teff反應且並未阻斷IL2信號傳導之抗CD25抗體可有效地清除Treg細胞，同時仍允許IL-2刺激Teff細胞，從而提供展現較強抗癌作用之抗體。

【0009】 因此，此項技術中需要經改良抗CD25抗體，尤其不阻斷CD25與IL-2之結合或IL-2信號傳導且清除Treg (尤其在腫瘤中)且可用於治療癌症之方法中的彼等抗體。

【發明內容】

【0010】 本發明提供新的抗CD25抗體藥劑。在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑為特異性結合於CD25 (尤其人類CD25)而不阻斷介白素2 (IL-2)與CD25之結合或經由CD25之IL-2信號傳導且高效地清除Treg (尤其在腫瘤內)的抗體或抗原結合片段。相較於在不存在抗CD25抗體藥劑的情況下之信號傳導水準，抗CD25抗體藥劑允許響應於IL-2結合於CD25之至少50%之IL-2信號傳導。因此，抗CD25抗體藥劑被稱為非阻斷或非IL-2阻斷抗CD25抗體藥劑。

【0011】 在一些實施例中，抗CD25抗體藥劑或抗原結合片段結合CD25而不阻斷IL-2與CD25之結合或經由CD25之IL-2信號傳導。亦即，在一些實施例中，相較於在不存在抗體之情況下的IL-2信號傳導，抗CD25抗體抑制小於50%之IL-2信號傳導。抗CD25抗體之特徵為允許結合

CD25而不阻斷IL-2與CD25之結合或其信號傳導兩者的結構元件。

【0012】 已出乎意料地發現，不阻斷IL-2結合或經由CD25之信號傳導且清除Treg的抗CD25抗體具有較強抗腫瘤效果，尤其具有比清除Treg但阻斷IL-2信號傳導之抗CD25抗體更強的抗腫瘤效果。抗體增大CD4+Teff/Treg及CD8+Teff/Treg比率。有效清除腫瘤浸潤性Treg細胞同時保持Teff細胞上之IL-2信號傳導產生用於單獨或與其他抗癌劑組合治療癌症之治療性方法。

【0013】 然而，熟習此項技術者將瞭解本發明之教示不受所提供抗體或其抗原結合片段之特定作用機制限制。本文中描述所提供之抗體之相關結構性及/或功能性特徵且不言自明。

【0014】 在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑藉由與結合於人類CD25胞外域中之特異性抗原決定基相關聯及/或使其尤其適合於醫藥用途及/或製造的一或多個特徵表徵。

【0015】 所提供之技術(包括所提供之抗CD25抗體藥劑(例如，所提供抗體或其抗原結合片段)、包括其之組分及/或其用途)適用於藥物。在一些實施例中，此類提供之技術適用於癌症療法及/或防治。

【0016】 在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑藉由具有aCD25-a-686序列之抗體，且更大體而言包含一或多個抗原結合片段或其部分(例如，包含aCD25-a-686-HCDR3胺基酸序列作為可變重鏈互補決定區3，及/或在一些實施例中，包含aCD25-a-686 HCDR1及HCDR2序列中之一或兩者)之抗體或藥劑來例示。除非上下文另外暗示，否則對本文中之抗CD25抗體藥劑(諸如aCD25-a-686)之提及包括其變體，包括親和力成熟之變體aCD25-a-686-m1、aCD25-a-686-m2、aCD25-a-686-m3、

aCD25-a-686-m4及aCD25-a-686-m5。

【0017】 在一個實施例中，提供一種抗CD25抗體藥劑，其包含aCD25-a-686之HCDR1、HCDR2及HCDR3胺基酸序列。在另一實施例中，提供一種抗CD25抗體藥劑，其包含aCD25-a-686之HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3胺基酸序列。在另一實施例中，提供一種抗CD25抗體藥劑，其包含aCD25-a-686之可變重鏈胺基酸序列。在另一實施例中，提供一種抗CD25抗體藥劑，其包含aCD25-a-686或其變體之可變重鏈及可變輕鏈胺基酸序列。亦特定地涵蓋基於親和力成熟之變體aCD25-a-686-m1、aCD25-a-686-m2、aCD25-a-686-m3、aCD25-a-686-m4及aCD25-a-686-m5的等效抗CD25抗體藥劑。

【0018】 在一些實施例中，提供一種抗CD25抗體藥劑，其與aCD25-a-686 (或其抗原結合片段或衍生物或變體，包括親和力成熟之變體)競爭以用於結合於人類CD25胞外域。

【0019】 在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑(例如，所提供之抗體或其抗原結合片段，包括其變體及衍生物，諸如親和力成熟之變體)以 10^{-7} M或更低的範圍(例如， 10^{-8} 、或 10^{-9} 、或 10^{-10} 、或 10^{-11} 、或 10^{-12} 、或 10^{-13} 範圍)之Kd結合於人類CD25。在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑(例如，所提供之抗體或其抗原結合片段，包括其變體及衍生物，諸如親和力成熟之變體)以 10^{-7} 至 10^{-10} 或 10^{-7} 至 10^{-9} 之Kd值結合於人類CD25。

【0020】 在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑(例如，所提供之抗體或其抗原結合片段，包括其變體及衍生物)結合於與aCD25-a-686 (或其抗原結合片段或衍生物或變體)結合的人類CD25上之抗原決定

基。在一些實施例中，此類所提供之抗CD25抗體藥劑可結合於人類CD25胞外域。在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑可結合於CD25之抗原決定基(例如，當使用如本文所描述之一或多種分析或以此項技術中已知之他方式評估時)，尤其鑑別為aCD25ep-a (SEQ ID NO: 23)之抗原決定基。在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑抗體或其抗原結合片段，根據本發明特異性地結合於稱為aCD25ep-a (SEQ ID NO: 23)；或aCD25ep-b (SEQ ID NO: 24)；或aCD25ep-c (SEQ ID NO: 25) (參見圖2)或其組合的抗原決定基，諸如(例如) (但不限於)稱為aCD25ep-b及aCD25ep-c之抗原決定基或所有三個抗原決定基。在本發明之一個實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑抗體或抗原結合片段特異性結合於aCD25ep-b及/或aCD25ep-c。

【0021】 在一些實施例中，所提供之抗體或其抗原結合片段可以在 10^{-7} M範圍或更低，例如 10^{-8} 、或 10^{-9} 、或 10^{-10} 、或 10^{-11} 、或 10^{-12} 、或 10^{-13} 範圍中之Kd值結合於人類及非人類靈長類(例如，食蟹獼猴) CD25 (例如，結合於人類及/或食蟹獼猴CD25上之胞外抗原決定基)。在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑(例如，所提供之抗體或其抗原結合片段，包括其變體及衍生物，諸如親和力成熟之變體)以 10^{-7} 至 10^{-10} 或 10^{-7} 至 10^{-9} 之Kd值結合於人類CD25。

【0022】 此外，本發明提供一種可利用於鑑別及/或特定言之表徵如本文所描述之適用抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)的程序(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段表徵為某些結構性及/或功能性特徵，諸如特異性結合於人類CD25 (例如，結合於其胞外抗原決定基)，包括如本文所描述之一或多種CDR序列元件(且特定言之包括

HCDR3序列元件，視需要與HCDR1及/或HCDR2元件組合)、對如本文所描述之IL-2信號傳導活性之影響、如本文所描述之細胞毒活性(例如，關於CD25-陽性細胞，諸如免疫調節細胞或表現CD25之癌細胞)，及其組合)。在一些實施例中，尤其適用之如本文所描述之抗CD25抗體表徵為複數個此類特徵。在一些實施例中，本文所描述之一或多種抗體可表徵為抗CD25抗體藥劑。

【0023】 因此，如本文中所例示，包含aCD25-a686序列(尤其aCD25-a-686-HCDR3及/或aCD25-a-686-LCDR3)之某些抗體及/或抗原結合片段表徵為此類所需結構性及/或功能性特徵；此類抗體及/或其抗原結合片段在本文中可被稱作抗CD25抗體藥劑。另外，根據本發明，與aCD25-a-686競爭之抗體及其抗原結合片段可為尤其適用之抗體；此類抗體及/或其抗原結合片段在本文中亦可被稱作抗CD25抗體藥劑。

【0024】 本文所描述之抗體(及/或其抗原結合片段)可尤其適用於藥物(例如，療法及/或防治，例如治療癌症)，及/或關於需要或涉及靶向抗原決定基之方法來使用，該抗原決定基諸如鑑別為人類CD25胞外域中之aCD25ep-a、aCD25ep-b及/或aCD25ep-c (例如aCD25ep-b及/或aCD25ep-c)之抗原決定基。所提供之抗體或其抗原結合片段可製備為呈現最適當同型，尤其來自由以下組成之群的人類同型：IgG1、IgG2、IgG3及IgG4同型抗體，更特定言之人類IgG1或人類IgG2，較佳人類IgG1。

【0025】 在一個態樣中，本發明提供aCD25-a-686-HCDR3胺基酸序列及包括其之多肽，諸如(例如)包含aCD25-a-686-HCDR3胺基酸序列(SEQ ID NO: 4)作為可變重鏈互補決定區3的抗體或抗原結合片段。在一

些實施例中，此類抗體或抗原結合片段可進一步表徵為包含其他aCD25-a-胺基酸序列元件，諸如：

- a) aCD25-a-686-HCDR1胺基酸序列(SEQ ID NO: 2)，作為可變重鏈互補決定區1；及/或
- b) aCD25-a-686-HCDR2胺基酸序列(SEQ ID NO: 3)，作為可變重鏈互補決定區2。

【0026】 在一些實施例中，所提供之抗體或其抗原結合片段可包含進一步呈校正順序(特定言之由抗體框序列分離)的如上文所定義之可變重鏈互補決定區(亦即，aCD25-a-686胺基酸序列元件)，諸如包括於aCD25-a-686-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 5)中之互補決定區，尤其用於正確地發揮其結合及功能性特性。舉例而言，在一些實施例中，所提供之抗體或其抗原結合片段可包含aCD25-a-686-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 5)，且視需要：

- a) aCD25-a-686-LCDR1胺基酸序列(SEQ ID NO: 6)，作為可變輕鏈互補決定區1；
- b) aCD25-a-686-LCDR2胺基酸序列(SEQ ID NO: 7)，作為可變輕鏈互補決定區2；及
- c) aCD25-a-686-LCDR3胺基酸序列(SEQ ID NO: 8)，作為可變輕鏈互補決定區3。

【0027】 因此，在一些實施例中，本發明提供一種包含可變重鏈之經分離抗體或其抗原結合片段，該可變重鏈包含aCD25-a-686-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 5)。較佳地，此類經分離抗體或其抗原結合片段進一步包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含aCD25-a-686-LCDR123胺基酸序

列(SEQ ID NO: 9)，如實例中所描述。此外，aCD25-a-686胺基酸序列亦指由關於上文所定義之aCD25-a-686胺基酸序列元件之數個取代基定義的抗體序列。舉例而言，此類序列可包含在aCD25-a-686-HCDR3 (SEQ ID NO: 4)內含有1個、2個、3個、4個或更多個胺基酸取代之序列作為可變重鏈互補決定區3 (HCDR3)。在另一實施例中，aCD25-a-686胺基酸序列亦指包含以下序列作為可變重鏈互補決定區1、2及3 (HCDR1、HCDR2及HCDR3)之抗體序列：在aCD25-a-686-HCDR1 (SEQ ID NO: 2)、aCD25-a-686-HCDR2 (SEQ ID NO: 3)及aCD25-a-686-HCDR3 (SEQ ID NO: 4)內含有1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個胺基酸取代之序列，且更佳地在aCD25-a-686-HCDR123 (SEQ ID NO: 5)內含有1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個胺基酸取代之序列。大體而言，呈現此類aCD25-a-686胺基酸序列元件及此類取代基之抗體可仍呈現aCD25-a-686及抗CD25抗體藥劑之結合及/或功能性特性。

【0028】 因此，在一個實施例中，本發明提供一種抗CD25抗體藥劑(亦即，抗體或其抗原結合片段)，其包含：

a. aCD25-a-686 (SEQ ID NO: 5) (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變重鏈區序列或相較於aCD25-a-686 (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變重鏈區序列而具有至多5個胺基酸取代的可變重鏈區序列；及/或

b. aCD25-a-686 (SEQ ID NO: 9) (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變輕鏈區序列或相較於aCD25-a-686 (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變輕鏈區序列而具有至多5個胺基酸取代的可變輕鏈區序

列。

【0029】 在一些實施例中，胺基酸取代並未出現在CDR序列中。

【0030】 在一些實施例中，本發明提供一種抗CD25抗體藥劑(亦即抗體或其抗原結合片段)，其包含：

a. aCD25-a-686 (SEQ ID NO: 5) (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變重鏈區序列或與aCD25-a-686 (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變重鏈區序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的可變重鏈區序列；及/或

b. aCD25-a-686 (SEQ ID NO: 9) (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變輕鏈區序列或與aCD25-a-686 (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變輕鏈區序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的可變輕鏈區序列。

【0031】 在一些實施例中，在無aCD25-a-686 (或其變體，諸如其親和力成熟之變體，如本文中所揭示)之全部6個CDR之序列的情況下計算序列一致性%。舉例而言，抗CD25抗體藥劑可包含與aCD25-a-686 (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變重鏈區序列具有至少95%一致性的可變重鏈區序列及/或與aCD25-a-686 (或其變體，諸如其親和力成熟之變體)之可變輕鏈區序列具有至少95%一致性的可變輕鏈區序列，其中任何胺基酸變體僅出現在可變重鏈及輕鏈區序列之構架區中。在此類實施例中，具有某些序列一致性之抗CD25抗體藥劑包含自其衍生之抗CD25抗體藥劑之完整重鏈及輕鏈CDR1、CDR2及CDR3序列。

【0032】 本發明亦提供本文所描述之抗體之變異抗體或其抗原結合片段。本發明提供抗體或其抗原結合片段，其中抗體之輕鏈或重鏈中之任何DG基元可經更改(例如)以減少天冬胺酸異構化及/或其中抗體之輕鏈或重鏈中之任何NG基元可經更改(例如)以減少天冬醯胺去醯胺化及/或其中抗體之輕鏈或重鏈中之任何甲硫胺酸可經更改(例如)以減少甲硫胺酸氧化。舉例而言，DG基元可經更改以用不同胺基酸取代基元中之胺基酸中之一或兩者。NG基元可經更改以用不同胺基酸替代基元中之胺基酸中之一或兩者。舉例而言，此類基元可突變為EG、DQ或DA。甲硫胺酸殘基可經更改以經不同胺基酸，例如白胺酸或苯丙胺酸置換。

【0033】 在此類實施例中，抗CD25抗體或其抗原結合片段可為或可衍生自例如aCD25-a-686。變體抗CD25抗體提供具有aCD25-a-686之任一(且可能全部)結合及功能性特性的其他抗體。舉例而言，變體抗CD25抗體為非IL-2阻斷抗體。

【0034】 因此，在一些實施例中，本文所提供之抗體或其片段可經突變以移除或修飾DG基元或NG基元，特定言之呈現於CDR區中之DG或NG基元，此為在此項技術中減少對化學修飾之敏感性的標準。已以此可能方式經修飾之此類抗體需要在到達最終序列前經受其他修飾(例如，親和力成熟)。

【0035】 在本發明之一個實施例中，提供一種具有如本文所揭示之抗體之CDR1、CDR2及CDR3序列(例如，aCD25-a-686之CDR1、CDR2及CDR3序列)的變異抗體，或如本文所揭示之任何抗體之可變重鏈及可變輕鏈(例如，aCD25-a-686中之任一者之可變重鏈及可變輕鏈)，但與指定序列不同之處在於CDR中之至少一個或至少兩個DG或NG基元(若存在)已

變為不同基元。所揭示之變體可如針對aCD25-a-686所描述使用及調配。

【0036】 在一個實施例中，抗CD25抗體或其抗原結合片段包含aCD25-a-686之胺基酸序列，其中框架4區中之甲硫胺酸較佳地經白胺酸或丙胺酸取代，亦即aCD25-a-686-HCDR123 (如圖1中所展示)之胺基酸殘基117M經白胺酸或丙胺酸置換。

本發明亦提供親和力成熟之抗體，例如衍生自本文中所揭示之抗體中之任一者的親和力成熟之變體。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段包含：

- HCDR2區，其選自由以下組成之群：aCD25-a-686-m1-HCDR2胺基酸序列(SEQ ID NO: 13)、aCD25-a-686-m2-HCDR2胺基酸序列(SEQ ID NO: 14)、aCD25-a-686-m3-HCDR2胺基酸序列(SEQ ID NO: 15)及aCD25-a-686-m4-HCDR2胺基酸序列(SEQ ID NO: 16)及aCD25-a-686-m5-HCDR2胺基酸序列(SEQ ID NO: 17)及/或

- HCDR1區，其選自由以下組成之群：aCD25-a-686-m2- HCDR1胺基酸序列(SEQ ID NO: 10)、aCD25-a-686-m3- HCDR1胺基酸序列(SEQ ID NO: 2)、aCD25-a-686-m4-HCDR1胺基酸序列(SEQ ID NO: 11)及aCD25-a-686-m5-HCDR1胺基酸序列(SEQ ID NO: 12)。

在本發明之一些實施例中，變體抗體或其抗原結合片段具有如表2所提供之重鏈CDR序列(例如，aCD25-a-686-m1、aCD25-a-686-m2、aCD25-a-686-m3、aCD25-a-686-m4或aCD25-a-686-m5之序列)。在一些實施例中，變異抗體或其抗體結合片段可具有如表3所提供之輕鏈CDR序列(例如，aCD25-a-686-m1、aCD25-a-686-m2、aCD25-a-686-m3、aCD25-a-686-m4或aCD25-a-686-m5之序列)。本發明特定言之提供在本

文中被稱作aCD25-a-686-m1、aCD25-a-686-m2、aCD25-a-686-m3、aCD25-a-686-m4及aCD25-a-686-m5的aCD25-a-686之親和力成熟之變體以及其片段。所揭示之親和力成熟之變體可如針對aCD25-a-686所描述使用及調配。

【0037】 在一個實施例中，變異抗體或其抗體結合片段可包含可變重鏈，該可變重鏈包含選自以下之序列：aCD25-a-686-m1-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 18)、aCD25-a-686-m2-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 19)、aCD25-a-686-m3-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 20)、aCD25-a-686-m4-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 21)及aCD25-a-686-m5-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 22)。在一個實施例中，變異抗體或其抗體結合片段可包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含選自以下之序列：aCD25-a-686-m1-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)、aCD25-a-686-m2-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)、aCD25-a-686-m3-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)、aCD25-a-686-m4-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)及aCD25-a-686-m5-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)。亦提供具有如針對aCD25-a-686所描述之胺基酸取代的變體(例如，在重鏈及輕鏈可變區中之每一者中具有長達5個胺基酸取代之變體)。在一個實施例中，親和力成熟之抗體為具有經更改DG基元及/或NG基元及/或經更改以移除或突變任何甲硫胺酸殘基的親和力成熟之抗體。

【0038】 在一些實施例中，抗CD25抗體或其抗原結合片段包含aCD25-a-686m1、aCD25-a-686m2、aCD25-a-686m3、aCD25-a-686m4或aCD25-a-686m5之胺基酸序列，其中框架4區中之甲硫胺酸較佳地經白胺酸或丙胺酸取代，亦即aCD25-a-686m1-HCDR123 (如圖14中所展示

(SEQ ID NO: 18))之胺基酸殘基117M、aCD25-a-686m2-HCDR123 (如圖15中所展示(SEQ ID NO: 19))之胺基酸殘基117M、aCD25-a-686m3-HCDR123 (如圖16中所展示(SEQ ID NO: 20))之胺基酸殘基117M、aCD25-a-686m4-HCDR123 (如圖17中所展示(SEQ ID NO: 21))之胺基酸殘基117M或aCD25-a-686m5-HCDR123 (如圖18中所展示(SEQ ID NO: 22))之胺基酸殘基117M經白胺酸或丙胺酸置換。

【0039】 在一些實施例中，本發明提供一種製備抗CD25抗體之方法，其包含提供如本文所描述之抗體(例如，aCD25-a-686或其抗原結合片段或變體)，且使抗體經歷親和力成熟，其中所產生之抗體以比親本抗體更大的親和力結合於CD25。較佳地，所產生之抗體以比親本抗體結合於CD25大至少20%、至少30%、至少40%、更佳至少50%的親和力結合於CD25，例如如藉由K_d所量測。用於量測親和力之方法為此項技術中已知的且描述於下文實例中。藉由此類方法產生之親和力成熟之抗體可針對另一種抗CD25抗體藥劑如本文所描述來調配及使用。

【0040】 可根據熟習此項技術者已知之任何適合方法進行親和力成熟。舉例而言，活體外抗體呈現系統廣泛用於產生具有高親和力之特異性抗體。在此等系統中，表現型(亦即，抗體片段)偶合至允許直接測定抗體之序列的基因型(亦即，抗體基因)。已研發出若干系統以實現抗體譜系之呈現以允許結合子之後續選擇且藉由提高選擇嚴格度允許選擇愈來愈高的親和力變體。抗體片段可以酵母、核糖體、噬菌體展示顆粒形式或藉由直接偶合至DNA來表現。

【0041】 當前抗體親和力成熟方法屬於兩種突變誘導類別：隨機及非隨機。易錯聚合酶鏈反應(PCR)、突變菌株及飽和突變誘導為隨機突變

誘導方法之典型實例。非隨機技術通常使用丙胺酸掃描或定點突變誘導以產生有限的特異性變體集合。此外，用以獲得親本抗體之改組變體之改組方法亦可用於進一步改良抗體親和力。

【0042】 因此，在本發明之一個實施例中，親和力成熟之方法選自由以下組成之群：隨機突變誘導(例如，易錯聚合酶鏈反應(PCR)、突變菌株或飽和突變誘導)、非隨機突變誘導(例如，丙胺酸掃描或定點突變誘導)、改組(例如，DNA改組、鏈改組或CDR改組)及使用CRISPR-Cas9系統以引入修飾。

【0043】 親和力成熟方法描述於例如Rajpal等人, Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(24):8466-71, Steinwand等 人, MAbs, 2014, 6(1):204-18, 以及in Handbook of Therapeutic Antibodies, Wiley, 2014, 第6章, Antibody Affinity (第115-140頁)中。

【0044】 在一些實施例中，提供一種製備醫藥組合物之方法，其包含提供根據上述方法製備之抗體(亦即，藉由親和力成熟產生抗體)，且將抗體與至少一或多種醫藥學上可接受之賦形劑共調配。用於製備醫藥組合物之抗體可為aCD25-a-686之親和力成熟變體。藉由此類方法產生之醫藥組合物可針對另一種抗CD25抗體藥劑用於如本文所描述之本發明之治療方法中。

【0045】 特異性結合如本文所描述之CD25的抗體及/或抗原結合片段(例如，可包括一或多個aCD25-a-686胺基酸序列元件，如aCD25-a-686-HCDR3或aCD25-a-686-HCDR123及/或可與aCD25-a-686競爭以用於結合於人類CD25及非人類靈長類CD25，例如食蟹獼猴CD25等的抗CD25抗體藥劑)可以多種型式中之任一者提供。舉例而言，在一些實施例

中，適當型式可為或包含單株抗體、單域抗體、單鏈抗體、Fab片段、F(ab')₂片段、單鏈可變片段(scFv)、scFv-Fc片段、單鏈抗體(scAb)、適體或奈米抗體。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段(且特定言之單株抗體)可為兔、小鼠、嵌合、人類化或完全人類抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，所提供之抗體或其抗原結合片段可屬於IgG、IgA、IgE或IgM同型(較佳地人類)，如其可最適合於給定用途。在一些實施例中，所提供之抗體或其抗原結合片段為IgG同型，更特定言之IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型。(在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段來自人類IgG1子類。在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段來自人類IgG2子類)。在一些實施例中，所提供之抗體或其抗原結合片段例如提供作為多特異性結合劑之部分，諸如在期望使其他結合及/或官能性部分與抗CD25抗體藥劑(諸如aCD25-a-686胺基酸序列)締合時，經分離抗體或抗原結合可包含於雙特異性抗體、多特異性抗體或此項技術中可利用的其他多特異性型式中。

【0046】 在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑包含CD25結合實體(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)及共軛負載，諸如治療劑或診斷劑。在諸多此類實施例中，將藥劑視為及/或被稱為「免疫共軛物」。可用於產生特定免疫共軛物(諸如抗體-藥物)的技術及化合物之實例揭示於文獻(Beck A等人, 2017)中且經描述為適用於若干已知抗CD25抗體(O'Mahony D等人, 2008; Oh等人, 2017; Kreitman RJ等人, 2016; Flynn MJ等人 2016)。

【0047】 在一些實施例中，本發明提供鑑別所提供之抗體或其抗原結合片段的aCD25-a-686胺基酸序列(或其變體，包括所提供之親和力成

熟之變體)。在一些實施例中，此類序列鑑別所提供之抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段結合人類CD25中之抗原決定基(諸如aCD25ep-a、aCD25ep-b及/或aCD25ep-c [例 如aCD25ep-b及/或aCD25ep-c])，及視情況亦結合非人類靈長類CD25，例如食蟹獼猴及/或鼠類CD25之對應抗原決定基，如經分離蛋白或表現CD25之細胞(諸如免疫細胞或細胞株，例如SU-DHL1細胞)之表面上。

【0048】 在一些實施例中，本發明提供特異性結合人類CD25之抗原決定基之抗CD25抗體或抗原結合片段，其中抗原決定基包含一或多個胺基酸殘基，該一或多個胺基酸殘基包含於SEQ ID NO: 1之胺基酸70-84中。較佳地，抗原決定基包含至少4個胺基酸，其中抗原決定基包含一或多個胺基酸，該一或多個胺基酸包含於SEQ ID NO: 1之胺基酸70-84中。較佳地，抗原決定基包含至少五個胺基酸、至少六個胺基酸、至少七個胺基酸、至少八個胺基酸、至少九個胺基酸、至少十個胺基酸、至少十一個胺基酸、至少十二個胺基酸、至少十三個胺基酸或至少十四個或更多個胺基酸，其中抗原決定基包含一或多個胺基酸，該一或多個胺基酸包含於SEQ ID NO: 1之胺基酸70-84中。抗原決定基可為直鏈或構形的，亦即非連續的。在一些實施例中，抗CD25抗體或抗原結合片段特異性結合於人類CD25之抗原決定基，其中抗原決定基包含至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個、至少十個、至少十一個、至少十二個、至少十三個或至少十四個或更多個胺基酸殘基，該等胺基酸殘基包含於SEQ ID NO: 1之胺基酸70-84中。在一些實施例中，抗CD25抗體或抗原結合片段結合於包含SEQ ID NO: 1之胺基酸70-84之抗原決定基。

【0049】 在一些實施例中，本發明提供用於篩選及/或表徵抗體或抗原結合片段之程序，該等抗體或抗原結合片段包含aCD25-a-686胺基酸序列及/或呈現與包含一或多種aCD25-a-686胺基酸序列元件(例如，包括aCD25-a-686-HCDR3胺基酸序列及/或與aCD25-a-686競爭)之抗體或其抗原結合片段相當的結合特徵，該等胺基酸序列元件允許結合於CD25胞外域作為經分離蛋白質及在表現人類CD25之細胞之表面上，從而競爭相同抗原決定基，特定言之實例中鑑別為aCD25ep-a之抗原決定基(蛋白質序列NSSHSSWDNQCQCTS (SEQ ID NO: 23)；Uniprot序列P01589中之胺基酸70-84)、實例中鑑別為aCD25ep-b之抗原決定基(蛋白質序列KAMAYKEGTMLNCECKRGFR (SEQ ID NO: 24))及/或實例中鑑別為CD25ep-c之抗原決定基(蛋白序列ATERIYHF (SEQ ID NO: 25))。

【0050】 另外，本發明亦提供用於篩選抗體或其抗原結合片段之程序，該等抗體或其抗原結合片段呈現與包含一或多個aCD25-a-686胺基酸序列元件之抗體或其抗原結合片段相當的功能性特徵，此類特徵包括缺乏抑制IL-2與CD25之間的相互作用、缺乏抑制IL-2信號傳導及細胞毒素活性且充當抗CD25抗體藥劑。在此等範疇下，候選抗體可在實例中所描述的分析中或此項技術中已知之其他分析中測試以用於確定此類特徵中之任一者之存在，但當在活體外/活體內分析、基於細胞之分析及/或動物模型中評估時可能的全部此類特徵之存在。

【0051】 在一些實施例中，本發明提供編碼經分離抗體或其抗原結合片段之核酸分子，該經分離抗體或其抗原結合片段包含抗CD25抗體藥劑，諸如aCD25-a-686胺基酸序列(或其變體，包括所提供之親和力成熟之變體)。在一些實施例中，此類所提供之核酸分子可含有經密碼子最佳

化之核酸序列，及/或可包括於適當的核酸載體內之表現卡匣中以用於表現於宿主細胞，諸如(例如)細菌、酵母、昆蟲、魚類、鼠類、猴或人類細胞中。

【0052】 在一些實施例中，本發明提供包含異源核酸分子(例如，DNA載體)之宿主細胞，其表現具有例如如本文所描述的抗CD25抗體藥劑(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列)之一或多個特性的所提供之抗CD25抗體藥劑(例如，抗體或其抗原結合片段)。在一些實施例中，本發明提供製備具有例如如本文所描述的抗CD25抗體藥劑(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列)之一或多個特性的抗CD25抗體藥劑(例如，抗體或其抗原結合片段)的方法。在一些實施例中，此類方法可包含培養宿主細胞，該宿主細胞包含核酸(例如，可包含及/或經由載體遞送至宿主細胞之異源核酸)。在一些實施例中，此宿主細胞(及/或異源核酸序列)經配置及建構以使得抗CD25抗體藥劑(例如，抗體或其抗原結合片段)自宿主細胞分泌(例如，使得其可自細胞培養上清液分離)及/或暴露於細胞表面上(例如，在此類aCD25-a-686胺基酸序列及序列元件意欲用於此類細胞之情形中或與此類細胞一起使用，如在人工T細胞受體中將單株抗體之特異性移植至T細胞上)。

【0053】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段可經無岩藻糖基化。熟知抗體糖基化可能對抗體(例如，單株抗體、重組抗體及/或以其他方式經工程改造或分離之抗體)及Fc融合蛋白之活性、藥代動力學及藥力學具有影響且可利用特定技術以獲得具有所需糖基化特徵之抗體(Liu L, 2015)。可使用降低抗體海藻糖基化水準之方法來增強支持根據本發明使用之抗體(例如，如本文所描述之抗CD25抗體，包括(例如)可為或經描述

為抗CD25抗體藥劑之抗體)的細胞毒性之效應子功能。可例如藉由使用用於基因工程改造缺乏或降低海藻糖基化能力之細胞株之技術表現aCD25-a-686序列，其中之一些可商購，諸如Potelligent (Lonza)、GlyMAXX (ProBiogen) (由Evitria提供之彼等)，或藉由操控製造方法，例如藉由控制容積滲透濃度及/或使用酶抑制劑(亦參見例如描述於EP2480671中之方法)來產生呈現此類特性的包含特定aCD25-a-686序列元件之抗體。

【0054】 在一些實施例中，本發明提供組合物(例如，醫藥組合物)，其包含具有如本文所描述之所需特性的所提供之抗體或其抗原結合片段(例如，如針對本文中稱為抗CD25抗體藥劑之抗體所描述，尤其包括(例如) aCD25-a-686抗體或其抗原結合片段或與aCD25-a-686抗體競爭以用於結合CD25的抗體或其抗原結合片段)。在一些實施例中，此類所提供之組合物意欲用於及/或用於醫療用途，諸如治療性、診斷性或防治性用途。在一些實施例中，此所提供之組分可進一步包含醫藥學上可接受之載劑或賦形劑及/或可用於治療癌症。在一些實施例中，可用一或多種載劑、賦形劑、鹽、緩衝劑等來調配醫藥組合物，如此項技術中所已知。熟習此項技術者將意識到且易於能夠利用多種調配技術，包括如可特別期望及/或適用於給定方法及/或投與部位，例如用於非經腸(例如，皮下、肌肉內或靜脈內注射)、黏膜、瘤內、瘤周、經口或局部投與。在許多實施例中，所提供之醫藥組合物(包含如本文所描述之抗CD25抗體藥劑(例如抗CD25抗體或其抗原結合部分))經調配以用於非經腸遞送(例如藉由注射及/或輸注)。在一些實施例中，此所提供之醫藥組合物可例如以預裝藥型注射器或瓶型式提供。在一些實施例中，此所提供之醫藥組合物可例如以乾燥(例如，凍乾)形式提供及/或利用；可替代地，在一些實施例中，此所提

供之醫藥組合物可以液態形式(例如，如溶液、懸浮液、分散體乳液等)、以凝膠形式等提供及/或利用。

【0055】 在一些實施例中，本發明提供如本文所描述之抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列元件)及/或包含其之組合物在治療癌症及/或製造用於治療癌症之藥物中之用途，該癌症諸如B細胞惡性腫瘤、淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkins Lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病、急性淋巴母細胞白血病、骨髓瘤)、骨髓增生病症、實體腫瘤(諸如乳癌、鱗狀細胞癌、結腸癌、頭頸癌、肺癌、泌尿生殖癌、直腸癌、胃癌(gastric cancer)、肉瘤、黑素瘤、食道癌、肝癌、睪丸癌、宮頸癌、肥胖細胞瘤、血管瘤、眼癌、喉癌、口腔癌、間皮瘤、皮膚癌、直腸癌、咽喉癌、膀胱癌、乳癌、子宮癌、前列腺癌、肺癌、胰臟癌、腎癌(renal cancer)、胃癌(stomach cancer)、非小細胞肺癌、腎癌(kidney cancer)、腦癌及卵巢癌)。亦可基於特定腫瘤相關標記物及抗原之存在來定義癌症，該等標記物及抗原諸如CD20、HER2、PD-1、PD-L1、SLAMF7、CD47、CD137、CD134、TIM3、CD25、GITR、CD25、EGFR等，或已鑑別為具有被稱為微隨體高不穩定性(MSI-H)或不匹配修復缺陷(dMMR)之生物標記物的癌症。另外，當定義上述癌症，諸如原位癌症、鬱結性骨髓瘤、未確定顯著性之單株球蛋白症、頸部上皮內贅瘤、MALTomas/GALTomas及各種淋巴增生病症之癌前、非侵入狀態時，亦可考慮此類條件。較佳地，在一些實施例中，經治療個體具有實體腫瘤。

【0056】 因此，在一些實施例中，本發明提供治療個體之癌症之方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含如本文所描述的

所提供之抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列)或與包含aCD25-a-686胺基酸序列之抗體競爭以用於結合CD25之抗體或其抗原結合片段。較佳地，在一些實施例中，個體具有實體腫瘤。

【0057】 因此，在一些實施例中，本發明提供一種清除個體之調節性T細胞的方法，其包含以下步驟：向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含如本文所描述的所提供之抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列)或與包含aCD25-a-686胺基酸序列之抗體競爭以用於結合CD25之抗體或抗原結合片段。在一個實施例中，個體具有實體腫瘤。在一個實施例中，個體患有血液癌。

【0058】 在一些實施例中，所提供之方法可進一步包含同時或以任何順序依序向個體投與至少一種額外藥劑或療法(亦即，使得個體接受組合療法)。在一些實施例中，此至少一種額外藥劑或療法可為或包含抗癌藥物(例如，化學治療劑)、放射療法(藉由將輻射外部地應用於身體或藉由投與放射共軛之化合物)、抗腫瘤抗原或標記物抗體(抗原或標記物為例如CD4、CD38、CA125、PSMA、c-MET、VEGF、CD137、VEGFR2、CD20、HER2、HER3、SLAMF7、CD326、CAIX、CD40、CD47或EGF受體)、檢查點抑制劑或免疫調節抗體(例如，靶向PD-1、PD-L1、TIM3、CD38、GITR、CD134、CD134L、CD137、CD137L、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、B7RP1、LAG3、ICOS、TIM3、GAL9、CD28、AP2M1、SHP-2、OX-40、VISTA、TIGIT、BTLA、HVEM、CD160等之抗體)、痘苗(特定言之，癌症疫苗，例如GVAX)、輔助使用標

準協議、靶向癌細胞或刺激對癌細胞之免疫反應的一或多種其他化合物，或其任何組合。較佳地，該額外藥劑為免疫檢查點抑制劑，諸如PD-1拮抗劑，例如抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體。在某些特定實施例中，當此至少一種額外藥劑或療法為或包含抗體時，此類抗體之型式及/或由此類抗體靶向之抗原可選自文獻中列出之彼等且可能適用於給定癌症(Sliwowski M & Mellman I, 2013; Redman JM等人, 2015; Kijanka M等人, 2015)。此類抗原及對應抗體包括(但不限於) CD22 (布林莫單抗(Blinatumomab))、CD20 (利妥昔單抗(Rituximab)、托西莫單抗(Tositumomab))、CD56 (洛瓦土珠單抗(Lorvotuzumab))、CD66e/CEA (拉貝珠單抗(Labetuzumab))、CD152/CTLA-4 (伊派利單抗(Ipilimumab))、CD221/IGF1R (MK-0646)、CD326/Epcam (依決洛單抗(Edrecolomab))、CD340/HER2 (曲妥珠單抗(Trastuzumab)、帕妥珠單抗(Pertuzumab))及EGFR (西妥昔單抗(Cetuximab)、帕尼單抗(Panitumumab))。在實施例中，當至少一種額外藥劑或療法為化學治療劑時，該化學治療劑可為用於癌症療法之此項技術中已知的彼等化學治療劑。此類化學治療劑包括(但不限於)烷基化劑、蒽環黴素、埃博黴素、亞硝基脲、伸乙亞胺/甲基三聚氰胺、烷基磺酸鹽、抗代謝物、嘧啶類似物、表鬼臼毒素(epipodophylotoxins)、酶，諸如L-天冬醯胺酶；生物反應調節劑，諸如IFN α 、IFN- γ 、IL-2、IL-12、G-CSF及GM-CSF；鉑配位複合物，諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)、蒽二酮(anthracediones)、諸如羥基尿素(hydroxyurea)的經取代之脲、甲基胍衍生物，包括N-甲基胍(MIH)及丙卡巴胍(procarbazine)；腎上腺皮質抑制劑，諸如米托坦(mitotane) (o,p'-DDD)

及胺麩精(aminoglutethimide)；荷爾蒙及拮抗劑，包括腎上腺皮質類固醇拮抗劑，諸如強的松(prednisone)及等效物、地塞米松(dexamethasone)及胺麩精；孕激素，諸如己酸羥基孕酮、乙酸甲羥孕酮及乙酸甲地孕酮；雌激素，諸如己烯雌酚及乙炔基雌二醇等效物；抗雌激素，諸如他莫昔芬(tamoxifen)；雄性激素，包括丙酸睪固酮及氟甲睪酮/等效物；抗雄激素，諸如氟他胺、促性腺激素釋放荷爾蒙類似物及亮丙立德(leuprolide)；非類固醇抗雄激素，諸如氟他胺；靶向TGFβ途徑之分子、吲哚胺脫氧酶(indoleamine deoxygenase, IDO)、精胺酸酶及/或CSF1R；PARP抑制劑，諸如奧拉帕尼(olaparib)、維利帕尼(Veliparib)、依尼帕瑞(Iniparib)、如卡帕瑞(Rucaparib)；及MET抑制劑，諸如提瓦替尼(tivantinib)、弗雷替尼(foretinib)、格瓦替尼(golvatinib)、卡博替尼(cabozantinib)及克卓替尼(crizotinib)。

【0059】 再另外，本發明提供含有如本文所描述的所提供之抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列)或相關組合物之多種套組或製品，其允許投與、儲存或另外使用此經分離抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，所提供之套組包含含有此類組合物，視需要連同一或多種製品、稀釋劑、試劑、固相及/或用於正確使用套組之說明書的器皿、注射器、瓶或其他容器。

【0060】 在一些實施例中，可藉由使用如本文所描述的一或多種分析或系統執行如本文所描述之特定抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列)之鑑別、表徵及/或驗證以用於特定用途，諸如醫療用途，且特定言之用於治療癌症。

在一些實施例中，此類鑑別、表徵及/或驗證可能涉及在一或多種基於細胞之分析中分析活性，例如使用不同的實驗性組配及/或所選組(例如，癌症衍生之細胞株)。在一些實施例中，特別給出所提議免疫機制相關之某些所需如本文所描述的抗CD25抗體藥劑活性，所需鑑別、表徵及/或驗證可涉及收集動物模型中產生的相關資料，其中癌症經誘導或其中癌細胞經移植作為異種移植或作為同基因型/同種異體癌症衍生之細胞。可替代地或另外，在一些實施例中，可利用動物模型，其涉及傳送人類細胞，諸如PBMC (亦即人類化PBMC小鼠模型)或CD34+造血幹細胞單獨(亦即CD34+人類化小鼠)或CD34+造血幹細胞連同肝及胸腺(例如，NSG-BLT小鼠)以允許評估模型系統內之人類免疫細胞上之抗CD25抗體藥劑之活性。

【0061】 在一些實施例中，可將如本文所描述之抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列或以其他方式包括本文中描述為抗CD25抗體藥劑的藥劑之結構性及/或功能性特性)之相關序列選殖至抗體框架之背景中及/或表現於抗體框架之背景中，出於醫藥學及/或技術原因，該抗體框架為更適當或所需的。舉例而言，此類序列(可能如經密碼子最佳化之VH及VL編碼序列)可與人類IgG1恆定區(hIgG1)一起選殖且使用適當的抗體表現載體及細胞株(諸如CHO衍生細胞株，例如CHO-S)表現。在一些特定實施例中，可在細胞裂解物中之還原條件及上清液中之非還原性條件下轉染後分析人類IgG1型式抗體中之所提供抗體序列之表現及分泌，該上清液將稍後用於純化抗體(藉由親和性層析法、凝膠過濾及/或其他適當的技術)。可例如藉由使用下文實例中所描述之一或多種分析來分析呈人類IgG1型式之所提供抗CD25

抗體序列(例如，抗CD25抗體藥劑-hIgG1)之結合及/或其他功能性特性。舉例而言，可例如使用流式細胞量測術針對結合於人類及食蟹獼猴PBMC或經純化Treg或活體外衍生之Treg或CD25陽性細胞株(諸如SU-DHL-1或Karpas299)來評估此類hIgG1-型式之所提供抗體。

【0062】 另外，可評定如本文所描述之一或多種抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列或以其他方式包括本文中描述為抗CD25抗體藥劑-諸如抗CD25抗體藥劑-hIgG1的藥劑之結構性及/或功能性特性)對自人類健康供體及/或患者分離之人類初始腫瘤細胞及/或免疫細胞(包括調節性T細胞)之效果。為研究抗CD25抗體藥劑之潛在效果，抗體可用於治療PBMC及/或自腫瘤(及/或器官，諸如淋巴結)及/或腫瘤外植體或其他3D類器官分離的細胞，及/或經純化或活體外產生之調節性T細胞或其他CD25陽性細胞，諸如一些NK細胞或樹突狀細胞。潛在讀出包含CD25陽性細胞存活率、抵消及/或細胞凋亡、腫瘤細胞殺滅、效應子免疫細胞增殖及功能(例如，顆粒酶B產生、細胞毒活性、去顆粒)、抗原特異性反應(如例如藉由響應於抗原之增殖、去顆粒或細胞介素產生所量測)。可替代地或另外，小鼠或非人類靈長類動物可經治療且可在血液樣本(如全血或經分離PBMC所分析)中或在自動物分離各種器官及/或細胞之後藉由例如流式細胞量測術或免疫組織化學來追蹤細胞狀態。

【0063】 可替代地或另外，可藉由研究此類抗CD25抗體藥劑對表現CD25之細胞(例如，Treg或表現CD25之癌細胞)之效果單獨的或以組合評估如本文所描述之抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25抗體或其抗原結合片段)(例如，包含aCD25-a-686胺基酸序列或以其他方式包括本文中描述

為抗CD25抗體藥劑-諸如抗CD25抗體藥劑-hIgG1的藥劑之結構性及/或功能性特性)之一或多個特性。讀出可包括細胞殺滅、細胞凋亡、細胞內信號傳導監測(例如，Stat-5磷酸化)、對IL-2結合於CD25及信號傳導(例如，Stat-5磷酸化或IL-2受體下游之其他信號傳導)之影響及IL-2依賴性功能活性(例如，增殖及細胞介素產生)。當向食蟹獼猴或相關小鼠模型投與aCD25抗體藥劑-hIgG1抗體時，可接著活體內追蹤抗體之細胞效果。

【0064】 為獲得對於所提供之抗CD25抗體藥劑與人類CD25之間的分子相互作用之其他見解，可測定抗CD25抗體藥劑(例如，給出一個特定實例，aCD25-a-686-hIgG1抗體)及人類CD25蛋白質之晶體結構。可經由可溶性研究、加速壓力研究、冷凍解凍研究及縮甲醛穩定性研究來評定所提供之抗CD25抗體藥劑(尤其包括(例如) aCD25-a-686-hIgG1抗體)之可溶性及/或穩定性。可藉由目視檢查、尺寸排外層析及動態光散射以及OD_{280/320}吸收度來追蹤抗體之聚集。

【圖式簡單說明】

【0065】 圖1：aCD25-a-686之相關蛋白序列。重鏈之各CDR(aCD25-a-686-HCDR1 (SEQ ID NO: 2)、aCD25-a-686-HCDR2 (SEQ ID NO: 3)及aCD25-a-686-HCDR3 (SEQ ID NO: 4))及輕鏈之各CDR(aCD25-a-686-LCDR1 (SEQ ID NO: 6)、aCD25-a-686-LCDR2 (SEQ ID NO: 7)及aCD25-a-686-LCDR3 (SEQ ID NO: 8))分別指示且劃線在如篩選程序最初鑑別之重鏈及輕鏈抗體之框架序列內(分別為aCD25-a-686-HCDR123 (SEQ ID NO: 5)及aCD25-a-686-LCDR123 (SEQ ID NO: 9))。

【0066】 圖2：人類CD25之共同序列(Uniprot代碼P01589) (SEQ

ID NO: 1)。對應於胺基酸22-240之成熟CD25之胞外域為劃下線。指示預先地鑑別之aCD25-a-686抗原決定基(aCD25ep-a、aCD25ep-b及aCD25ep-c)之位置。

【0067】 圖3：aCD25-a-686以漸增之抗體濃度結合於表現於人類活體外分化之Treg細胞(A)、SU-DHL-1細胞(B)或SR-786細胞(C)上之CD25且與人類IgG1同型對照比較之特徵。

【0068】 圖4：aCD25-a-686以漸增之抗體濃度結合於表現於CD3/CD28珠粒活化之人類(A)及(B)或食蟹獼猴(C)及(D) Pan T細胞上之CD25，接著在CD4⁺及CD8⁺ T細胞上閘控，且與人類IgG1同型對照比較之特徵。

【0069】 圖5：藉由兩種方法(A) Octet Red 96儀器上之生物層干擾量測術及(B) SPR Biacore 2000儀器量測aCD25-a-686與重組人類CD25 his標記之結合及KD測定值。

【0070】 圖6：使用標準包夾型式分組分析藉由Octet Red384上之生物層干擾量測術展示aCD25-a-686與IL-2之非競爭性結合(A)及IL-2競爭抗體與IL-2之競爭性結合(B)。將抗人類CD25抗體(aCD25-a-686)裝載至AHQ感測器上。接著使感測器暴露於100 nM人類CD25，隨後暴露於人類IL-2。抗原締合後之人類IL2之額外結合指示未佔用抗原決定基(非競爭者)，而無結合指示抗原決定基阻斷(競爭者)。

【0071】 圖7：使用標準包夾型式分組分析藉由Octet Red384系統上之生物層干擾量測術展示aCD25-a-686及達利珠單抗與CD25之非競爭性結合。將參考單株抗人類CD25抗體達利珠單抗裝載至AHQ感測器上。接著使感測器暴露於100 nM人類CD25抗原，隨後暴露於抗人類CD25抗

體(aCD25-a-686)。抗原締合後之第二抗體之額外結合指示未佔用抗原決定基(非競爭者)，而無結合指示抗原決定基阻斷(競爭者)。

【0072】 圖8：使用人源之PBMC，aCD25-a-686與人類IgG1同型對照達利珠單抗或在不存在初級抗體相比關於阻斷IL-2信號傳導在STAT5磷酸化分析中之特徵。將細胞與10 µg/ml抗體一起培育，隨後逐漸增大IL-2之濃度(如圖式中所展示)。分析限於CD3-陽性細胞磷酸化STAT5之百分比。

【0073】 圖9：使用Pan T細胞，aCD25-a-686與人類IgG1同型對照、達利珠單抗或可商購小鼠抗人類IL-2中和抗體作為陽性對照(純系：AB12-3G4)相比較的功能性特徵。在流式細胞量測術分析之前，細胞與10 ug/ml抗體一起培育，接著經CD3/CD28珠粒活化72小時。結果展示顆粒酶B陽性增殖CD4 (A)或CD8 (B) T細胞之百分比。

【0074】 圖10：aCD25-a-686與人類IgG1同型對照相比較關於CD25-陽性細胞株之殺滅在ADCC分析中之功能性特徵。在不同濃度抗體之存在下，分別將CD25高表現細胞SU-DHL-1細胞(A)或CD25低表現細胞SR-786細胞(B)與經純化NK細胞一起共培養(如圖式中展示)。在添加至NK細胞後四個小時藉由將鈣黃綠素釋放至上清液中來量測靶細胞裂解。資料標準化為經皂素治療之對照物。

【0075】 圖11：a-海藻糖基化的aCD25-a-686與未修飾之aCD25-a-686及人類IgG1同型對照相比較關於CD25-陽性細胞株之殺滅在ADCC分析中之功能性特徵。在不同濃度抗體之存在下，分別將CD25高表現細胞SU-DHL-1細胞(A)或CD25低表現細胞SR-786細胞(B)與經純化NK細胞一起共培養(如圖式中展示)。在添加至NK細胞後四個小時藉由將鈣黃綠素

釋放至上清液中來量測靶細胞裂解。資料標準化為經皂素治療之對照物。

【0076】 圖12：aCD25-a-686與人類IgG1同型對照相比較關於活體外分化之Treg細胞之噬菌作用在ADCP分析中之功能性特徵。在不同濃度抗體之存在下將Treg與MCSF分化之巨噬細胞一起共培養(如圖式中展示)。用CD14⁺染色巨噬細胞及eFluor450染料標記之Treg執行兩種顏色流式細胞量測分析。殘餘靶細胞定義為作為eFluor450-染料⁺/CD14⁻之細胞。將雙重標記之細胞(eFluor450-染料⁺/CD14⁺)視為藉由巨噬細胞表示標靶之噬菌作用。靶細胞之噬菌作用係藉由以下等式計算：噬菌作用% = $100 \times [(\text{雙陽性}\%)/(\text{雙陽性}\% + \text{殘餘標靶}\%)]$ 。

【0077】 圖13：Octet中之競爭分析。將aCD25-a-686結合於經固定rhCD25，隨後再次結合aCD25-a-686 (作為對照)或第二Ab巴利昔單抗(A)、達利珠單抗(B)、參考非阻斷劑aCD25-a-646 (C)或7G7B6 (D)。IL-2信號mAb之非阻斷劑與彼此(C)或7G7B6(亦參考非阻斷劑mAb) (D)競爭，同時其不與IL-2信號傳導阻斷劑(諸如達利珠單抗或巴利昔單抗) (A及B)競爭。

【0078】 圖14：aCD25-a-686-m1之相關蛋白序列。用於重鏈(aCD25-a-686-m1-HCDR1 (SEQ ID NO: 2)、aCD25-a-686-m1-HCDR2 (SEQ ID NO: 13)及aCD25-a-686-m1-HCDR3 (SEQ ID NO: 4))及輕鏈(aCD25-a-686-m1-LCDR1 (SEQ ID NO: 6)、aCD25-a-686-m1-LCDR2 (SEQ ID NO: 7)及aCD25-a-686-m1-LCDR3 (SEQ ID NO: 8))之各CDR在如藉由篩選程序最初鑑別之重鏈及輕鏈抗體之框架序列內單獨地且帶下劃線的指示(分別為aCD25-a-686-m1-HCDR123 (SEQ ID NO: 18)及aCD25-a-686-m1-LCDR123 (SEQ ID NO: 9))。

【0079】 圖15：aCD25-a-686-m2之相關蛋白序列。用於重鏈(aCD25-a-686-m2-HCDR1 (SEQ ID NO: 10)、aCD25-a-686-m2-HCDR2 (SEQ ID NO: 14)及aCD25-a-686-m2-HCDR3 (SEQ ID NO: 4))及輕鏈(aCD25-a-686-m2-LCDR1 (SEQ ID NO: 6)、aCD25-a-686-m2-LCDR2 (SEQ ID NO: 7)及aCD25-a-686-m2-LCDR3 (SEQ ID NO: 8))之各CDR在如藉由篩選程序最初鑑別之重鏈及輕鏈抗體之框架序列內單獨地且帶下劃線的指示(分別為aCD25-a-686-m2-HCDR123 (SEQ ID NO: 19)及aCD25-a-686-m2-LCDR123 (SEQ ID NO: 9))。

【0080】 圖16：aCD25-a-686-m3之相關蛋白序列。重鏈之各CDR(aCD25-a-686-m3-HCDR1 (SEQ ID NO: 2)、aCD25-a-686-m3-HCDR2 (SEQ ID NO: 15)及aCD25-a-686-m3-HCDR3 (SEQ ID NO: 4))及輕鏈之各CDR(aCD25-a-686-m3-LCDR1 (SEQ ID NO: 6)、aCD25-a-686-m3-LCDR2 (SEQ ID NO: 7)及aCD25-a-686-m3-LCDR3 (SEQ ID NO: 8))分別指示且劃線在如篩選程序最初鑑別之重鏈及輕鏈抗體之框架序列內(分別為aCD25-a-686-m3-HCDR123 (SEQ ID NO: 20)及aCD25-a-686-m3-LCDR123 (SEQ ID NO: 9))。

【0081】 圖17：aCD25-a-686-m4之相關蛋白序列。重鏈之各CDR(aCD25-a-686-m4-HCDR1 (SEQ ID NO: 11)、aCD25-a-686-m4-HCDR2 (SEQ ID NO: 16)及aCD25-a-686-m4-HCDR3 (SEQ ID NO: 4))及輕鏈之各CDR(aCD25-a-686-m4-LCDR1 (SEQ ID NO: 6)、aCD25-a-686-m4-LCDR2 (SEQ ID NO: 7)及aCD25-a-686-m4-LCDR3 (SEQ ID NO: 8))分別指示且劃線在如篩選程序最初鑑別之重鏈及輕鏈抗體之框架序列內(分別為aCD25-a-686-m4-HCDR123 (SEQ ID NO: 21)及aCD25-a-686-m4-

LCDR123 (SEQ ID NO: 9))。

【0082】 圖18：aCD25-a-686-m5之相關蛋白序列。重鏈之各CDR (aCD25-a-686-m5-HCDR1 (SEQ ID NO: 12)、aCD25-a-686-m5-HCDR2 (SEQ ID NO: 17)及aCD25-a-686-m5-HCDR3 (SEQ ID NO: 4))及輕鏈之各CDR (aCD25-a-686-m5-LCDR1 (SEQ ID NO: 6)、aCD25-a-686-m5-LCDR2 (SEQ ID NO: 7)及aCD25-a-686-m5-LCDR3 (SEQ ID NO: 8))分別指示且劃線在如篩選程序最初鑑別之重鏈及輕鏈抗體之框架序列內(分別為(aCD25-a-686-m5-HCDR123 (SEQ ID NO: 22)及aCD25-a-686-m5-LCDR123 (SEQ ID NO: 9))。

【0083】 圖19：藉由Biacore 2000儀器上之SPR執行的純化親和力成熟之抗體(IgG1)對rhCD25-his標籤之KD測定。(A) aCD25-a-686m1、(B) aCD25-a-686m2、(C) aCD25-a-686m3、(D) aCD25-a-686m4及(E) aCD25-a-686m5。

【0084】 圖20：Octet中之競爭分析。將aCD25-a-686-m1結合於固定之rhCD25，隨後再次結合於aCD25-a-686-m1 (作為對照)或第二Ab，巴利昔單抗(A)、達利珠單抗(B)，參考非阻斷劑aCD25-a-075 (C)或7G7B6 (D)。IL-2信號mAb之非阻斷劑與彼此(C)或與7G7B6 (參考非阻斷劑mAb) (D)競爭，而其不與IL-2信號傳導阻斷劑(諸如達利珠單抗或巴利昔單抗) (A及B)競爭。

【0085】 圖21：親和力成熟抗體與親本aCD25-a-686或人類IgG1同型對照相比較關於以逐漸增加之抗體濃度結合於Karpas 299細胞上表現之CD25且與人類IgG1同型對照相比較的特徵。(A) aCD25-a-686m1、(B) aCD25-a-686m2、(C) aCD25-a-686m3、(D) aCD25-a-686m4及(E)

aCD25-a-686m5。

【0086】 圖22：使用人源之PBMC，親和力成熟之抗體與與親本aCD25-a-686、人類IgG1同型對照、達利珠單抗-Hyp或不存在初級抗體相比較關於阻斷IL-2信號傳導在STAT5磷酸化分析中之之特徵。細胞與10μg/ml抗體，隨後10 U/ml IL-2一起培育。分析限於CD3-陽性細胞磷酸化STAT5之百分比。

【0087】 圖23：展示在給藥媒劑(A)及(C)；或aCD25-a-686 (B)、(D)及(E)後之腫瘤生長之抑制的活體內模型。

【0088】 圖24：評估僅7D4 mIgG2a (抗小鼠CD25非-IL-2阻斷、清除Treg之抗體單獨) (D)及與IL-2中和抗體(E)或IL-2阻斷抗體(F)組合在性BALB/c小鼠中在攜帶CT26同基因型結腸腫瘤之小鼠中的治療活性。測試小鼠IgG2a對照(A)、僅IL-2中和抗體單獨(B)及僅IL-2阻斷抗體(C)之活性以用於比較。

【0089】 圖25：使用人源之PBMC，未修飾aCD25-a-686與無岩藻糖基化aCD25-a-686、人類IgG1同型對照、達利珠單抗、IL-2中和抗體相比較關於阻斷IL-2信號傳導在STAT5磷酸化分析中之特徵。細胞與10 μg/ml抗體及10 IU/mL IL-2一起培育。分析限於CD3-陽性細胞磷酸化STAT5之百分比。展示在存在及不存在低劑量IL-2活化下CD3+CD8+ T細胞上之PhosphoStat5之中值螢光強度之差值。

【0090】 圖26：a-海藻糖基化aCD25-a-686之經由IL-2活化NK細胞的iTreg之ADCC與未修飾aCD25-a-686、達利珠單抗及人類IgG1同型對照相比較之特徵。與aCD25-a-686相比較之低海藻糖基化aCD25-a-686 GlyMAXX增加其ADCC潛能且以低濃度實現強效活性。在具有活體外誘

導之iTreg之IL-2活化人類NK細胞之共培養分析中針對達利珠單抗、aCD25-a-686 GlyMAXX及aCD25-a-686監測清除Treg之能力。6小時後藉由流式細胞量測分析來量化iTreg之死亡。在共培養之前，iTreg經螢光染料Pkh-26標記。在FACS量測之前，細胞使用LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell染料染色以自分析排除死亡細胞。活iTreg細胞經閘控(Aqua-，Pkh-26+)且陽性細胞百分比用於計算比裂解。關於個別條件針對所使用抗體濃度繪製特異性裂解。量測複製品。針對重複量測展示SEM。

【0091】 圖27：在向注射有含BxPC-3前列腺腺癌細胞之基質膠的幹細胞人類化NOG小鼠投與a-海藻糖基化aCD25-a-686 (aCD25 Mab GLyMAXX)、MOXRO0916或伊派利單抗後72小時藉由FACS分析進行的瘤內T細胞計數。腫瘤浸潤性淋巴球經分離並藉由流式細胞測量術評估T細胞之存在。活人類活化CD8 T細胞(huCD45+、huCD3+、huCD8+ huCTLA-4+)及Tregs (huCD45+、huCD3+、huCD4+、huCD25+ huFoxP3+)經閘控，標準化計數(每微克腫瘤)計算且針對個別治療組繪製值。盒鬚圖(box and whisker plot)經展示為5隻動物/組。

【實施方式】

【0092】 下文提供本文中所使用之術語、技術方式及實施例之一些定義，其中之多數或大部分證實熟習此項技術者之共有理解。

【0093】 投與：如本文中所使用，術語「投與」係指向個體投與組合物。可藉由任何適當途徑向動物個體(例如，人類)投與。舉例而言，在一些實施例中，投與可為支氣管(包括藉由支氣管滴入法)、經頰、經腸、經動脈內、真皮內、胃內、髓內、肌肉內、鼻內、腹膜內、膜內、靜脈

內、心室內、在特定器官或組織內(例如，肝內、腫瘤內、瘤周等)、經黏膜、經鼻、經口、經直腸、皮下、舌下、局部、氣管(包括氣管內滴入法)、經皮、經陰道及玻璃體。投與可能涉及間斷的給藥。可替代地，投與可能涉及連續給藥(例如，灌注)持續至少選定的時段。如此項技術中已知，抗體療法通常非經腸，例如藉由靜脈內、皮下或瘤內注射投與(例如，尤其當腫瘤內需要高劑量時)。

【0094】藥劑：如本文中所使用，術語「藥劑」可指任何化學品類別之化合物或實體，包括(例如)多肽、核酸、醣類、小分子、金屬或其組合。可根據本發明利用的藥劑之特定實施例包括小分子、藥物、荷爾蒙、抗體、抗體片段、適體、核酸(例如，siRNA、shRNA、反股寡核苷酸、核酶)、肽、肽模擬物等等。藥劑可為或包含聚合物。

【0095】抗體：如本文中所使用，術語「抗體」係指包括典型免疫球蛋白序列元件之多肽，該等元件足以賦予特異性結合於特定靶抗原，諸如CD25，特定言之人類CD25及人類CD25胞外域。如此項技術中已知，天然產生之完整抗體為大致150 kD之四聚藥劑，其包含彼此締合為常稱為「Y形」結構之結構的兩個相同重鏈多肽(各自約50 kD)及兩個相同輕鏈多肽(各自約25 kD)。各重鏈包含至少四個域(各自約110個胺基酸長)：胺基末端可變(VH)域(位於Y結構之頂端處)，隨後三個恆定域：CH1、CH2及羧基末端CH3 (位於Y之主幹之底部處)。稱為「轉換」之短區連接重鏈可變區及恆定區。「鉸鏈」將CH2及CH3域連接至抗體之其餘部分。此鉸鏈區中之兩個二硫鍵使完整抗體中之兩個重鏈多肽彼此連接。各輕鏈包含兩個域，一個胺基末端可變(VL)域，隨後一個羧基末端恆定(CL)域，其彼此由另一個「轉換」分離。完整抗體四聚體包含兩個重鏈-輕鏈

二聚體，其中該等重鏈及輕鏈藉由單個二硫鍵彼此連接；另外兩個二硫鍵使重鏈鉸鏈區彼此連接，使得二聚體彼此連接且形成四聚體。天然產生之抗體亦經糖基化，典型地在CH2域上，且各域具有表徵為「免疫球蛋白摺疊」之結構，該免疫球蛋白摺疊由針對彼此以壓縮的反平行 β 筒形式封裝之兩個 β 片層(例如，3股、4股或5股片層)形成。各可變域含有被稱為「補體測定區」(CDR1、CDR2及CDR3；如此項技術中瞭解，例如根據Kabat編號流程測定)之三個高變環及四個在某種程度上恆定之「構架」區(FR1、FR2、FR3及FR4)。當天然抗體摺疊時，FR區形成為域提供結構構架之 β 片層，且使來自重鏈及輕鏈兩者之CDR環區在三維空間中結合在一起以使得其產生位於Y結構頂端處之單個高變抗原結合位點。天然存在之抗體之Fc區結合於補體系統之元件，且亦結合於效應子細胞，包括(例如)介導細胞毒性之效應子細胞上的受體。如此項技術中已知，Fc受體之Fc區之親和力及/或其他結合屬性可經由糖基化或可改良抗體之可發展性的其他修飾來調節(Jarasch A等人, 2015)。

【0096】 在一些實施例中，根據本發明產生及/或利用之抗體包括經糖基化之域，包括具有經修飾或工程改造之此類糖基化的Fc域。出於本發明之目的，在某些實施例中，包括如在天然抗體中發現之足夠免疫球蛋白域序列的任何多肽或多肽複合物可指代及/或用作「抗體」，無論此類多肽係天然產生(例如，由生物與抗原反應產生)或藉由重組工程改造、化學合成或其他人工系統或方法產生。在一些實施例中，抗體為多株或寡株，其經產生為一組抗體，各自與單一抗體序列相關聯且結合抗原內之或多或少的獨立抗原決定基(諸如與不同參考抗CD25抗體相關聯的人類CD25胞外域內之不同抗原決定基)。

【0097】 可以單一製劑形式提供多株或寡株抗體以用於如文獻中所描述之醫用用途(Kearns JD等人, 2015)。在一些實施例中，抗體為單株的。在一些實施例中，抗體具有恆定區序列，其為小鼠、兔、靈長類動物或人類抗體之特徵。在一些實施例中，如此項技術中所已知，抗體序列元件經人類化、靈長類化、嵌合等。另外，如本文中所使用之術語「抗體」在適當的實施例中(除非另外說明，否則根據上下文明顯可見)可指用於在替代性展示中利用抗體結構性及功能性特徵的此項技術已知或產生之構築體或型式，例如作為如下所定義之抗原結合片段。舉例而言，根據本發明利用之抗體呈選自(但不限於)以下之型式：完整IgG、IgE及IgM、雙特異性或多特異性抗體(例如，Zybodies®等)、單鏈可變域(scFv)、多肽-Fc融合體、Fabs、駝樣抗體、重鏈鯊魚抗體(IgNAR)、遮蔽抗體(例如，Probodies®)或具有多肽之融合蛋白，其允許表現及暴露於細胞表面上(作為用於獲得用於將單株抗體之特異性移植至T細胞上之人工T細胞受體的構築體內之scFv)。遮蔽抗體可包含特異性結合於抗體之抗原結合表面且干擾抗體之抗原結合的阻斷或「遮蔽」肽。遮蔽肽藉由可裂解連接子(例如，藉由蛋白酶)連接至抗體。在所需環境下，例如在腫瘤環境下，連接子之選擇性裂解允許遮蔽/阻斷肽解離，使得抗原結合能夠在腫瘤中出現且因此限制潛在的毒性問題。在一些實施例中，抗體可能缺少在其天然產生的情況下將具有的共價修飾(例如，聚糖之附接)。可替代地，抗體可含有共價修飾(例如，聚糖之附接、負載[例如，可偵測部分、治療部分、催化性部分等]或其他側基[例如，聚-乙二醇等])。

【0098】 被稱為「無岩藻糖基化aCD25-a-686」之抗CD25抗體亦可被稱為aCD25 Mab GlyMAXX。本文中所使用之此等不同名稱係指同一

抗體。

【0099】 **非IL-2阻斷抗體藥劑**：本發明之抗CD25抗體藥劑及抗原結合片段為非IL-2阻斷抗體藥劑。本文中所使用之術語「非IL-2阻斷抗體藥劑」係指能夠特異性結合於IL-2受體之CD25子單元而不阻斷IL-2與CD25之結合或經由CD25之IL-2信號傳導的彼等抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25非IL-2阻斷抗體)。相較於在不存在抗CD25抗體藥劑之情況下的信號傳導水準，抗CD25抗體藥劑允許響應於IL-2結合於CD25的至少50%之IL-2信號傳導。較佳地，相較於在不存在抗CD25抗體藥劑之情況下的信號傳導水準，抗CD25抗體藥劑允許響應於CD25的至少75%之IL-2信號傳導。

【0100】 IL-2受體之CD25子單元亦稱為IL-2受體之 α 子單元且發現於活化T細胞、調節性T細胞、活化B細胞、一些胸腺細胞、骨髓前驅體及寡樹突神經膠質細胞上。CD25與CD122及CD132締合以形成充當IL-2之高親和力受體的異源三聚複合物。人類CD25之共同序列展示於圖2中。

【0101】 「特異性結合(Specific binding/bind specifically/specifically bind)」應理解為意謂抗體或抗原結合片段對於所關注抗原具有小於約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M之解離常數(K_d)。在一較佳實施例中，解離常數小於 10^{-8} M，例如在 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M之範圍內。根據本發明之一些實施例，「特異性結合(Specific binding/bind specifically/specifically bind)」可指親和力(affinity)及/或親合力(avidity)。在一些實施例中，抗CD25抗體藥劑之親和力為 10^{-8} 至 10^{-6} (例如，約 10^{-7})。在本發明之一些實施例中，抗CD25抗體藥劑之親合力為約 10^{-10} 至 10^{-8} (例如，約 10^{-9})。在本發明之一些

實施例中，抗CD25抗體藥劑之親和力及/或親合力為約1 nM至700 nM、或約1至600 nM、或約1至500 nM、或約1至400 nM、或約1至300 nM。

【0102】如本文中所使用且參考「非阻斷」、「並未阻斷」及其類似物，相較於在不存在抗體之情況下的IL-2信號傳導，「非IL-2阻斷」(相對於在存在抗CD25抗體的情況下，IL-2結合於CD25之非阻斷)包括其中抗CD25抗體或抗原結合片段抑制小於50%之IL-2信號傳導的實施例。在如本文所描述的本發明之特定實施例中，相較於在不存在抗體之情況下的IL-2信號傳導，抗CD25抗體或抗原結合片段抑制小於約40%、35%、30%，較佳地小於約25%之IL-2信號傳導。抗CD25非-IL-2阻斷抗體允許結合於CD25而不干擾IL-2結合於CD25，或不實質上干擾IL-2結合於CD25。對於非IL-2阻斷抗體的本文中之參考可替代地表現為「並未抑制介白素2與CD25結合」之抗CD25抗體或表現為「並未抑制IL-2之信號傳導」之抗CD25抗體。

【0103】一些抗CD25抗體藥劑可允許IL-2結合於CD25，但仍阻斷經由CD25受體之信號傳導。此類抗體藥劑並不在本發明之範疇內。替代地，相較於在不存在抗CD25抗體藥劑之情況下的信號傳導，非IL-2阻斷抗CD25抗體藥劑允許IL-2結合於CD25以促進經由CD25受體的至少50%之信號傳導水準。

【0104】可藉由如實例所論述及如此項技術中已知的方法來量測經由CD25之IL-2信號傳導。可在相同或大體上相同條件下在存在及不存在抗CD25抗體藥劑之情況下進行IL-2信號傳導之比較。

【0105】在一些實施例中，可使用標準Stat-5磷酸化分析藉由量測細胞中之磷酸化STAT5蛋白質之水準來測定IL-2信號傳導。舉例而言，量

測IL-2信號傳導之Stat-5磷酸化分析可涉及在存在抗CD25抗體的情況下以10 ug/ml之濃度培養PMBC細胞30分鐘且接著添加不同濃度之IL-2 (例如, 呈10 U/ml下或呈0.25 U/ml、0.74 U/ml、2.22 U/ml、6.66 U/ml或20 U/ml之不同濃度)持續10分鐘。接著細胞可經滲透且接著可藉由利用流式細胞量測術分析之磷酸化STAT5肽的螢光標記抗體來量測STAT5蛋白質之水準。IL-2信號傳導之阻斷百分比可如下計算：阻斷%=100×[(Stat5⁺細胞無抗體組%-Stat5⁺細胞10 ug/ml抗體組%)/(Stat5⁺細胞無Ab組%)]。

【0106】 在一些實施例中, 如本文所描述之抗CD25抗體藥劑的特徵在於其高效地清除腫瘤浸潤性調節性T細胞, 尤其在腫瘤內。

【0107】 在一些實施例中, 抗CD25抗體藥劑的特徵在於其以高親和力結合Fcγ受體, 較佳地以高親和力結合至少一個活化Fcγ受體。較佳地, 抗體以小於約10⁻⁶M、10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M或10⁻¹⁰M之解離常數結合於至少一個活化Fcγ受體。在一些實施例中, 抗CD25抗體藥劑表徵為關於Fcγ受體之其他特徵, 特定言之:

(a)以大於1之活化抑制比(A/I)結合於Fcγ受體; 及/或

(b)以比其結合於FcγRIIb更高的親和力結合於至少一種FcγRI、FcγRIIc及FcγRIIIa。

【0108】 在一些實施例中, CD25抗體藥劑為IgG1抗體, 較佳人類IgG1抗體, 其能夠結合於至少一個Fc活化受體。舉例而言, 抗體可結合於選自以下之一或多個受體: FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIc、FcγRIIIa及FcγRIIIb。在一些實施例中, 抗體能夠結合於FcγRIIIa。在一些實施例中, 抗體能夠結合於FcγRIIIa及FcγRIIa及視情況選用之FcγRI。在一些實

施例中，抗體能夠以高親和力，例如以小於約 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 之解離常數結合於此等受體。在一些實施例中，抗體以較低親和力結合抑制性受體FcγRIIb。在一個態樣中，抗體以高於 10^{-7}M 、高於 10^{-6}M 或高於 10^{-5}M 之解離常數結合FcγRIIb。

【0109】 在一些實施例中，如本文所描述之所需抗CD25抗體藥劑的特徵在於其對表現CD25之細胞(例如，表現較高水準之CD25)，諸如免疫抑制細胞或腫瘤細胞(例如，在各情況下，在其表面上表現CD25)具有細胞毒性或誘導其之噬菌作用。在一些實施例中，抗CD25抗體藥劑之特徵在於相對於免疫細胞(例如，當與免疫細胞，且特定言之與表現CD25之免疫細胞接觸時)及腫瘤細胞與aCD25-a-686之活性合理相當的活性(例如，水準及/或類型)。在一些實施例中，相關活性為或包含藉由ADCP、ADCC或CDC清除Treg細胞(例如在實體腫瘤中)或某些表現CD25之細胞(例如高表現細胞)、促進T細胞、B細胞或NK細胞擴增、使T細胞庫偏斜等，及其組合。在在在一些實施例中，相對於在不存在實體或部分情況下之另外相當條件下觀測到的水準及/或活性來評定或測定增加的水準及/或活性,或減小的水準及/或增加或無變化的水準或活性。可替代地或另外，在一些實施例中，當存在參考抗CD25抗體藥劑(例如，適當的參考抗CD25抗體，其在多個實施例中為阻斷IL-2結合於CD25之CD25抗體，諸如達利珠單抗或巴利昔單抗)時，增加的水準及/或活性類似於或大於在相當條件下觀測到的水準及/或活性。在多個實施例中，根據本發明使用之抗CD25抗體藥劑為或包含直接地或間接地結合於CD25 (通常結合於其胞外域)的實體或部分。在一些實施例中，抗CD25抗體藥劑為以下各者、包含以下各者或與以下各者競爭以供結合於CD25：本文中例示之抗CD25抗體、其

抗原結合片段(例如，包含一或多個CDR、所有重鏈CDR、所有輕鏈CDR、所有CDR、重鏈可變區、輕鏈可變區或重鏈可變區及輕鏈可變區兩者)、其親和力成熟之變體(或其抗原結合片段)或前述任一者之任何替代性型式(例如，嵌合、人類化、多特異性、替代同型等)。可替代地或另外，在一些實施例中，如本文所描述之抗CD25抗體藥劑可由一或多個特徵表徵，該一或多個特徵可為有利於篩選、製造、臨床前測試，及/或用於鑑別人類CD25內之相關抗原決定基，諸如鑑別為aCD25ep-a、aCD25ep-b及/或aCD25ep-c (例如aCD25ep-b及/或aCD25ep-c)及/或用於調配、投與及/或在特定情形中有效(例如，用於癌症療法)的特徵，如本文中所揭示。

【0110】 抗原：如本文中所使用，術語「抗原」係指引起免疫反應及/或結合於T細胞受體(例如，當由MHC分子表示時)及/或B細胞受體的藥劑。引起體液反應之抗原涉及產生抗原特異性抗體或如在針對CD25胞外域之實例中所展示，可用於篩選抗體庫且鑑別待進一步表徵之候選抗體序列。

【0111】 抗原結合片段：如本文中所使用，術語「抗原結合片段」涵蓋包括或包含足以賦予抗原結合片段上及特異性結合於由抗體靶向之抗原之能力的如本文所描述的抗體之一或多個部分的藥劑。舉例而言，在一些實施例中，術語涵蓋包括足以賦予特異性結合之免疫球蛋白結構元件的任何多肽或多肽複合物。例示性抗原結合片段包括(但不限於)小模組免疫藥物(Small Modular ImmunoPharmaceuticals，「SMIPs™」)、單鏈抗體、駝樣抗體、單域抗體(例如，鯊魚單域抗體)、單鏈或串疊型雙功能抗體(TandAb體能、VHH、Anticalins®、Nanobodies®、微型抗體、

BiTE®、錨蛋白重複蛋白或DARPINs®、Avimers®、DART、TCR樣抗體、Adnectins®、Affilins®、Trans-bodies®、Affibodies®、TrimerX®、微型蛋白質、Centyrins®、CoVX抗體、雙環肽、孔尼茲(Kunitz)域衍生之抗體構築體或只要展現所需生物活性之任何其他抗體片段。在一些實施例中，術語涵蓋其他蛋白質結構，諸如鉚合肽、抗體樣結合肽模擬物、抗體樣結合架構蛋白、單功能抗體及/或其他非抗體蛋白架構，例如如文獻中所綜述(Vazquez-Lombardi R等人, 2015)。在一些實施例中，抗原結合片段為或包含多肽，該多肽之胺基酸序列包括由熟習此項技術者識別為互補決定區(CDR)的一或多個結構元件素。在一些實施例中，抗原結合片段為或包含多肽，該多肽之胺基酸序列包括與如本文所描述之抗CD25抗體中(例如，在aCD25-a-686胺基酸序列元件中)發現的CDR大體上相同的至少一個參考CDR (例如，至少一個重鏈CDR及/或至少一個輕鏈CDR)，且特定言之至少一個重鏈CDR，諸如HCDR3 (例如，aCD25-a-686-HCDR3序列)。在一些實施例中，抗原結合片段為或包含多肽，該多肽之胺基酸序列包括依序相同或相對於此參考CDR含有小數目(例如，1、2、3、或4)的更多胺基酸更改(例如，取代、添加或刪除；在多數情況下為取代)的至少一個CDR (例如，至少一個重鏈CDR及/或至少一個輕鏈CDR)，同時保持結合於衍生參考CDR的抗體之標靶(例如，aCD25-a-686)。在一些實施例中，抗原結合片段為或包含多肽或其複合物，該多肽包括來自參考抗體(例如，來自aCD25-a-686)之重鏈或輕鏈的所有三個CDR (或在一些實施例中，與其基本上一致之序列)；在一些實施例中，抗原結合片段為或包含多肽或其複合物，該多肽包括來自參考抗體(例如，來自aCD25-a-686)之所有六個CDR (或在一些實施例中，與其

基本上一致之序列)。在一些實施例中，抗原結合片段為或包含多肽或其複合物，包括參考抗體(例如，aCD25-a-686)之重鏈及/或輕鏈可變域(或在一些實施例中，與其基本上一致之序列)。在一些實施例中，術語「抗原結合片段」涵蓋非肽及非蛋白質結構，諸如核酸適體，例如RNA適體及DNA適體。適體為結合於特定標靶，諸如多肽之寡核苷酸(例如，DNA、RNA或其類似物或衍生物)。適體為特異性結合於各種分子標靶，諸如小分子、蛋白質、核酸且甚至細胞及組織的較短合成單股寡核苷酸。此等小核酸分子可形成能夠特異性結合蛋白質或其他細胞標靶之二元及三元結構且實質上為抗體之化學等效物。適體為高度特定的，大小相對較小及非免疫原性的。適體通常選自被稱為指數富集配位體系統性演進(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment, SELEX)之生物淘選方法(參見例如Ellington等人, 1990; Tuerk等人, 1990; Ni等人, 2011)。產生用於任一給定標靶之適體的方法為此項技術中所熟知的。亦涵蓋包括親和體(affimer)之肽適體。親和體為經工程改造以顯示肽環之較小、高度穩定的蛋白質，該等肽環為特定靶蛋白提供高親和力結合表面。其為衍生自胱抑素(cystatins)之半胱胺酸蛋白酶抑制劑家族的低分子量(12-14 kDa)蛋白質。親和體蛋白質由架構(其為基於胱抑素蛋白質摺疊的穩定蛋白質)構成。其顯示可以類似於抗體之高親和力及特異性隨機結合不同靶蛋白之兩種肽環及N端序列。在蛋白質架構限制肽可能採用之可能構形後使肽穩定，因此相較於無肽庫逐漸增加結合親和力及特異性。

【0112】 生物樣品：如本文中所使用，術語「生物樣品」或「樣品」通常係指獲自或衍生自所關注生物源(例如，組織或生物或細胞培養物)之樣品，如本文所描述。所關注源可為生物，諸如動物或人類。生物

樣品可包含生物組織或流體。

【0113】 癌症：術語「癌症」、「惡性腫瘤」、「贅瘤」、「腫瘤(tumor/tumour)」及「癌瘤」在本文中可互換地使用以指代展現相對異常、不可控及/或自發生長之細胞，使得其展現表徵為細胞增殖之控制之明顯損耗的異常生長表現型。大體而言，在本申請案中用於偵測或治療之所關注細胞包括癌變前(例如，良性)、惡性、轉移前、轉移性及非轉移性細胞。本發明之教示可與任何及所有癌症有關。得到少數非限制性實例，在一些實施例中，本發明之教示應用於一或多種癌症，諸如(例如)造血癌症，包括白血病、淋巴瘤(霍奇金氏及非霍奇金氏)、骨髓瘤及骨髓增生病、肉瘤、黑色素瘤、腺瘤、固體組織癌瘤、口、咽喉、喉及肺之鱗狀細胞癌、肝癌、泌尿生殖癌，諸如前列腺、宮頸、膀胱、子宮及子宮內膜癌及腎細胞癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、皮膚或眼內黑素瘤、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、頭頸癌、乳癌、胃腸癌及神經系統癌症、良性病變，諸如乳頭狀瘤及類似者。本發明之抗體可用於治療表現CD25+之腫瘤。治療涉及表現CD25之腫瘤之癌症可包括(但不限於)淋巴瘤，諸如霍奇金氏淋巴瘤及淋巴球性白血病，諸如慢性淋巴球性白血病(CLL)。

【0114】 組合療法：如本文中所使用，術語「組合療法」係指個體同時暴露於兩種或更多種治療方案(例如，兩種或更多種治療劑)的彼等情況。在一些實施例中，可同時投與兩種或更多種藥劑。可替代地，可依序投與此類藥劑；否則，以重疊給藥方案投與此類藥劑。

【0115】 相當的：如本文中所使用，術語「相當的」係指可並非彼此相同但足夠類似以准許在其之間進行比較(例如，水準及/或活性)以使得可基於觀測到之差異或類似性合理地得出結論的兩種或更多種藥劑、實

體、情況、效果、條件組等。此類相當條件組、效果、情形、個體或群體表徵為複數個實質上相同的特徵及一個或少數不同特徵。在上下文中，一般熟習此項技術者將理解在針對視為相當的兩種或更多種此類藥劑、實體、情況、條件組、效果或群體等之任何給定情況下何種程度之一致性為必需的。

【0116】 包含：組合物或方法在本文中描述為「包含」一或多種指定元件或步驟係開放的，意謂指定元件或步驟為必需的，但在組合物或方法內之範疇可添加其他元件或步驟。亦應理解，描述為「包含」(或其「包含」)一或多種指定元件或步驟之任何組合物或方法亦描述「基本上由」(或其「基本上由.....組成」)相同的指定元件或步驟「組成」之對應、更有限之組合物或方法，意謂該組合物或方法包括指定必需元件或步驟，且亦可包括不會實質上影響組合物或方法之基本及新穎特徵的額外元件或步驟。

【0117】 清除：如本文中所使用，參考「清除(depleted/depleting)」(相對於藉由抗CD25抗體藥劑清除調節性T細胞)，其意謂Treg之數量、比率或百分比在相對於未投與並不抑制介白素2與CD25之結合的抗CD25抗體時減小。在如本文所描述之本發明之特定實施例中，清除超過約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或99%之腫瘤浸潤性調節性T細胞。

【0118】 劑型：如本文中所使用，術語「劑型」係指用於投與至個體之活性藥劑(例如，治療或診斷劑)之物理離散單位。各單元含有預定量之活性藥劑。在一些實施例中，此類量為當向相關群體投與(亦即利用治療給藥方案)時適合於根據經測定與所需或有益結果相關的給藥方案投與

之單位劑量(或其整個部分)。一般熟習此項技術者瞭解，向特定個體投與之治療組合物或治療劑之總量由一或多名主治醫師判定且可涉及投與多個劑型。

【0119】給藥方案：如本文中所使用，術語「給藥方案」係指獨立地向個體投與，通常由時段間隔之一組單位劑量(通常超過一個)。在一些實施例中，既定治療劑具有推薦的給藥方案，其可涉及一或多個劑量。在一些實施例中，給藥方案包含複數個劑量，其中之每一者彼此間隔相同長度之時間段。可替代地，給藥方案包含複數個劑量及間隔個別劑量之至少兩個不同時段。在一些實施例中，給藥方案內之所有劑量具有相同單位劑量的量。可替代地，給藥方案內之不同劑量具有不同的量。在一些實施例中，給藥方案包含以第一給藥量第一次給藥，隨後為不同於第一給藥量之第二給藥量的一或多次額外給藥。給藥方案可包含以第一給藥量第一次給藥，隨後為與第一給藥量相同的第二給藥量的一或多次額外給藥。在一些實施例中，給藥方案在跨相關群體投與(亦即為治療方案)時與所期望或有益結果相關。

【0120】抗原決定基：如本文中所使用，術語「抗原決定基」係指與抗體或抗原結合片段結合的抗原之一部分。在一些實施例中，其中抗原為多肽，當抗原呈相關構形時，抗原決定基為包含在抗原中並不共價連續但在三維空間中接近彼此的抗原之多個部分的構形。舉例而言，對於CD25，構形抗原決定基為由在CD25胞外域中並不連續之胺基酸殘基構成之彼等，直鏈抗原決定基為由在CD25胞外域中連續的胺基酸殘基構成之彼等。在一些實施例中，根據本發明利用之抗原決定基係藉助於參考與本文提供之抗CD25抗體藥劑(例如，aCD25-a-686且定義為aCD25ep-a、

aCD25ep-b及/或aCD25ep-c [例如aCD25ep-b及/或aCD25ep-c])結合的抗原決定基提供。用於判定aCD25-a-686之抗原決定基之確切序列及/或特定胺基酸殘基的方式在文獻及實例中已知，包括與肽競爭、來自抗原序列、結合於來自不同物種之CD25序列、截斷及/或誘變(例如，藉由丙胺酸掃描或其他定點誘變)、基於噬菌體顯示之篩選、酵母呈現技術或(共)結晶技術。

【0121】 一致性：此項技術中已知之一致性百分比(%)為兩個或更多個多肽序列或兩個或更多個聚核苷酸序列之間的關係，如藉由將該等序列進行比較所判定。在此項技術中，一致性亦意謂多肽或聚核苷酸序列之間的序列相關性程度，視具體情況而定，如藉由此類序列串之間的匹配所判定。當存在多種方法量測兩種多肽或兩種聚核苷酸序列之間的一致性時，通常用於判定一致性之方法經電腦程式編碼。測定兩個序列之間的一致性的較佳電腦程式包括(但不限於) GCG套裝程式(Devereux,等人, Nucleic Acids Research, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN, 及FASTA (Atschul等人, J. Molec. Biol. 215, 403 (1990))。兩種胺基酸序列或兩種核酸序列之一致性百分比係藉由出於最佳比較目的將序列配向(例如，可將間隙引入第一序列中以供與序列最佳配向)且將對應位置處之胺基酸殘基或核苷酸進行比較來判定。「最佳配向」為產生最高一致性百分比的兩個序列之配向。一致性百分比係藉由將序列中之相同胺基酸殘基或核苷酸之數目進行比較來判定 (亦即，一致性%=相同位置數/總位置數×100)。一般而言，除非上下文指定或另外暗示，否則本文中提及一致性%係指沿分子之整體長度的一致性%。

【0122】 免疫效應子細胞：免疫效應子細胞係指涉及免疫反應之效

應子階段的免疫細胞。例示性免疫細胞包括骨髓或淋巴源之細胞，例如淋巴球(例如，包括溶胞T細胞(CTL)之B細胞及T細胞)、殺手細胞、自然殺手細胞、巨噬細胞、單核球、嗜伊紅白血球、嗜中性白細胞、多形核細胞、粒細胞、肥大細胞及嗜鹼性球。

【0123】 涉及免疫反應之效應子階段中之免疫效應子細胞可表現特異性Fc受體且進行特定免疫功能。效應子細胞可誘導抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)，例如能夠誘導ADCC之嗜中性白血球。效應子細胞亦可誘導抗體依賴性細胞介導之噬菌作用(ADCP)，其包括吞噬靶抗原、靶細胞或微生物，例如能夠ADCP之巨噬細胞。舉例而言，表現FcγR之單核球、巨噬細胞、嗜中性白細胞、嗜伊紅白血球及淋巴球涉及特異性殺滅靶細胞且向免疫系統之其他組分呈現抗原，或結合於呈現抗原之細胞。如所論述，根據本發明之抗體可經最佳化以供能夠誘導ADCC及/或ADCP。

【0124】 調節性T細胞：如本文中所使用，「調節性T細胞」(「Treg」、「Treg細胞」或「Tregs」)係指專用於控制自體免疫、過敏症及感染的CD4+ T淋巴球之譜系。典型地，其調節T細胞群體之活性，但其亦可影響某些先天免疫系統細胞類型。Treg通常藉由生物標記CD4、CD25及Foxp3之表現及CD127之較低表現來鑑別。天然產生之Treg細胞通常構成約5-10%之周邊CD4+ T淋巴球。然而，在腫瘤微環境(亦即腫瘤浸潤性Treg細胞)內，其可構成多達20-30%之總CD4+ T淋巴球群體。

【0125】 經活化人類Treg細胞可經由穿孔蛋白或顆粒酶B-依賴性途徑直接地殺滅靶細胞，諸如效應子T細胞及APC；細胞毒性T淋巴球相關抗原4 (CTLA4+) Treg細胞藉由APC誘導吲哚胺2,3-二氧酶(IDO)表現且此等轉而藉由減少色胺酸來抑止T細胞活化；Treg細胞可活體內釋放介白素-

10 (IL-10)且轉化生長因子(TGFβ)且因此藉由抑制MHC分子、CD80 CD86及IL-12之表現來直接地抑制T細胞活化且抑止APC功能。Treg細胞亦可藉由表現高水準CTLA4來抑止免疫性，該CTLA4可結合於抗原呈現細胞上之CD80及CD86且防止效應子T細胞之適當活化。

【0126】 患者：如本文中所使用，術語「患者」或「個體」係指可投與所提供之組合物，例如以用於實驗性、診斷性、防治性、美觀性及/或治療目的的任何生物。典型患者包括動物(例如，哺乳動物，諸如小鼠、大鼠、兔、非人類靈長類及人類)。在一些實施例中，患者為人類。在一些實施例中，患者患有或易患一或多種病症或病況。患者可顯示病症或病況之一或多種症狀，或可經診斷患有一或多種病症或病況(諸如癌症，或存在一或多種腫瘤)。在一些實施例中，患者正接受或已接受某些療法以診斷及/或治療此類疾病、病症或病況。

【0127】 醫藥學上可接受：如本文中所使用，應用於用以調配如本文所揭示之組合物的載劑、稀釋劑或賦形劑的術語「醫藥學上可接受」意謂載劑、稀釋劑或賦形劑必須與組合物之其他成分相容且對其接受者無毒。

【0128】 醫藥組合物：如本文中所使用，術語「醫藥組合物」係指將活性藥劑與一或多種醫藥學上可接受之載劑一起調配的組合物。在一些實施例中，活性藥劑以適合投與之單位劑量的量存在於治療方案中，其在向相關群體投與時展示出統計學上顯著之實現預定治療作用的概率。醫藥組合物可經調配以用於以固體或液體形式投與，包括適合於以下之形式：經口投與，例如頓服藥(drench) (水性或非水性溶液或懸浮液)、錠劑(例如，靶向經頰、舌下及全身吸收之錠劑)、大丸劑、粉劑、粒劑、用於施

用於舌之膏劑；非經腸投與，例如藉由以無菌溶液或懸浮液或持續釋放調配物形式皮下、肌肉內、靜脈內或硬膜外注射；局部施用，例如作為乳膏、軟膏或控制釋放貼片或噴霧劑施用於皮膚、肺或口腔；陰道內、直腸內、舌下、經眼、經皮、經鼻、經肺及至其他黏膜表面。

【0129】實體腫瘤：如本文中所使用，術語「實體腫瘤」係指通常不含有胞囊或液體區域之異常組織塊。實體腫瘤可為良性或惡性的。不同類型之實體腫瘤係針對形成其之細胞類型而命名。實體腫瘤之實例為肉瘤(包括由諸如鬆質骨、軟骨、脂肪、肌肉、血管、造血或纖維結締組織之組織中之間葉細胞源之經轉化細胞引起的癌症)、癌瘤(包括由上皮細胞引起之腫瘤)、黑色素瘤、淋巴瘤、間皮瘤、神經母細胞瘤、視網膜母細胞瘤等等。涉及實體腫瘤之癌症包括(但不限於)腦癌、肺癌、胃癌、十二指腸癌、食道癌、乳癌、結腸及直腸癌、腎癌(renal cancer)、膀胱癌、腎癌(kidney cancer)、胰臟癌、前列腺癌、卵巢癌、黑素瘤、口腔癌、肉瘤、眼癌、甲狀腺癌、尿道癌、陰道癌、頸癌、淋巴瘤及類似者。

【0130】治療有效量：如本文中所使用，術語「治療有效量」意謂當根據治療性給藥方案向患有或易患疾病及/或病況之群體投與時足以治療此類疾病及/或病況的量(例如，藥劑或醫藥組合物之量)。治療有效量為降低疾病、病症及/或病況之發病率及/或嚴重度，使疾病、病症及/或病況穩定及/或延遲疾病、病症及/或病況之一或多個症狀之發作的量。一般熟習此項技術者將瞭解術語「治療有效量」不實際上需要在特定個體中實現成功治療。

【0131】治療：如本文中所使用之術語「治療(treatment)」(以及「治療(treat/treating)」)係指部分或完全緩解、改善、減輕、抑制一或多

種症狀、延遲其發作、降低其嚴重程度及/或降低其發生率的物質(例如，所提供之抗CD25抗體藥劑，例示為aCD25-a-686或任何其他藥劑)之任何投與。在一些實施例中，治療可涉及直接投與抗CD25抗體藥劑(諸如aCD25-a-686) (例如，以可注射水性組合物形式，視需要包含醫藥學上可接受之載劑、賦形劑及/或佐劑，以用於靜脈內、瘤內或瘤周注射)或使用方案投與，包含自個體(例如，自血液、組織或腫瘤，基於存在或不存在標記物表現之情況下進行或不進行選擇)獲得細胞，使該等細胞與抗CD25抗體藥劑(諸如aCD25-a-686)活體外接觸且向個體投與此類細胞(基於存在或不存在標記物表現之情況下進行或不進行選擇)。

【0132】 給藥及投與：根據本發明使用的包含如本文所描述之抗CD25抗體藥劑(例如，抗CD25或其抗原結合片段，例如包含aCD25-a-686-HCDR3胺基酸序列)之醫藥組合物可使用各種技術及/或熟習此項技術者已知及/或可用的技術中之任一者來製備以用於儲存及/或遞送。在一些實施例中，根據由管理機構，諸如美國食品和藥物管理局(Food and Drug Administration, FDA)及/或歐洲藥物管理局(European Medicines Agency, EMEA)審批通過之給藥方案，例如針對相關指示來投與所提供之抗CD25抗體藥劑。在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑與一或多種其他藥劑或療法組合投與，該等一或多種其他藥劑或療法自身可根據由管理機構，諸如美國食品和藥物管理局(FDA)及/或歐洲藥物管理局(EMA)審批通過之給藥方案，例如針對相關指示來投與。然而，在一些實施例中，所提供之抗CD25抗體藥劑之使用可准許與抗CD25抗體藥劑療法組合使用的審批通過之藥劑或療法之減少的給藥(例如，一或多個劑量中之低活性量、較少量之劑量及/或減少的給藥頻率)。在一些實施例中，

給藥及/或投與可適用於亦投與之其他藥物、患者狀態及/或抗CD25抗體藥劑之型式(例如，修飾為免疫共軛物、單域抗體或雙特異性抗體)。

【0133】 此外，在一些實施例中，可能需要基於CD25之時序及/或臨限值表現量來調適給藥方案，且特定言之設計連續給藥方案，無論針對特定細胞類型、特定腫瘤或其類型或特定患者群體(例如，攜帶遺傳標記物)。在一些此類實施例中，治療性給藥方案可與在治療之前及/或期間評定一或多種誘導性標記物之表現的偵測方法或其他準則組合或依據該偵測方法或其他準則進行調整。

【0134】 在一些實施例中，根據本發明之給藥及投與利用具有所需純度之活性藥劑以及呈任何或多種形式之一或多種生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑。此等形式包括(例如)液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如，可注射溶液及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、粉劑、脂質體及栓劑。較佳的形式可視既定投與模式及/或治療應用而定，典型地呈可注射或可輸注溶液形式，諸如類似於用於用抗體治療人類個體之組合物。

【0135】 在一些實施例中，成分可用保護藥劑以免快速釋放及/或降解之載劑來製備，諸如控制釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微囊封遞送系統。可使用可生物降解的生物相容性聚合物，諸如聚酸酐、聚乙醇酸、聚原酸酯及聚乳酸。大體而言，使用與良好醫學實踐一致且適合於相關藥劑(例如，用於諸如抗體之藥劑)的醫藥組合物及給藥方案以治療有效量調配、給藥及投與各活性藥劑。含有活性藥劑之醫藥組合物可藉由此項技術中已知之任何適當方法投與，包括(但不限於)經口、經黏膜、藉由吸入、局部、經頰、經鼻、經直腸或非經腸(例如，靜脈內、輸注、瘤內、

結節內、皮下、腹膜內、肌肉內、皮內、經皮或涉及物理破壞個體之組織且經由此類裂口投與醫藥組合物的其他類型之投與)。

【0136】 在一些實施例中，針對特定活性藥劑之給藥方案可涉及間斷的或連續的(例如，藉由灌注或緩慢釋放系統)投與，例如以在個體之一或多個所關注組織或體液中實現特定所需藥物動力學曲線或其他模式之暴露。在一些實施例中，以組合投與之不同藥劑可經由不同遞送途徑及/或根據不同排程投與。可替代地或另外，在一些實施例中，第一活性藥劑之一或多個劑量大致上與一或多種其他活性藥劑同時投與，且在一些實施例中，第一活性藥劑之一或多種劑量經由常見途徑及/或作為單一組合物之部分與一或多種其他活性藥劑一起投與。

【0137】 在最佳化用於給定治療方案之途徑及/或給藥排程時待考慮之因素可包括例如經治療之特定癌症(例如，類型、階段、位置等等)、個體之臨床病況(例如，年齡、總體健康狀況、重量等等)、遞送藥劑之部位、藥劑之性質(例如，基於抗體或其他蛋白質之化合物)、藥劑之投與模式及/或途徑、組合療法之存在或不存在及醫用從業者已知之其他因素。

【0138】 熟習此項技術者將瞭解例如特定遞送途徑可影響劑量及/或所需劑量可影響遞送途徑。舉例而言，當特定部位或位置內(例如，組織或器官內)之特定高濃度藥劑為所關注時，集中遞送(例如，瘤內遞送)可為所需及/或有用的。在一些實施例中，特定醫藥組合物及/或所利用給藥方案之一或多個特徵可隨時間推移而修改(例如，增加或減小任何單獨劑量之活性量，增加或減小劑量之間的時間間隔等等)，例如以最佳化所需療效或反應(例如，關於如本文所描述之抗CD25抗體藥劑之功能性特徵的治療或生物反應)。大體而言，根據本發明之活性藥劑之給藥類型、

給藥量及給藥頻率由在向哺乳動物(較佳人類)投與一或多種相關藥劑時應用的安全及療效要求來控制。大體而言，與未觀測到治療相比，此類給藥特徵經選擇以提供特定且通常可偵測之治療反應。在本發明之上下文中，例示性所需治療反應可涉及(但不限於)抑制及/或減小腫瘤生長、腫瘤大小、癌轉移、與腫瘤相關聯之症狀及副作用中之一或多者以及增加的癌細胞之細胞凋亡、一或多個細胞標記物或循環標記物之治療學上相關減小或增加及類似者。此類準則可藉由各種免疫學、細胞學及揭示於文獻中之其他方法中之任一者來容易地評定。舉例而言，單獨或與另一藥劑組合的治療有效量之抗CD25抗體藥劑可經測定為足以增強如實例中所描述的癌細胞之殺滅。

【0139】 作為包含此藥劑之活性藥劑或組合物的治療有效量之抗CD25抗體藥劑可使用此項技術中可獲得的技術容易地測定，包括(例如)考慮一或多個因素，諸如經治療之疾病或病況、疾病之階段、經治療之哺乳動物之年齡及健康狀況及身體病況、疾病之嚴重度、經投與之特定化合物及類似者。

【0140】 在一些實施例中，治療有效量為活性藥劑之有效劑量(及/或單位劑量)，其可為至少約0.01mg/kg體重、至少約0.05 mg/kg體重、至少約0.1 mg/kg體重、至少約1 mg/kg體重、至少約5 mg/kg體重、至少約10 mg/kg體重、或更大(例如，0.01、0.1、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50 mg/kg體重)。熟習此項技術者應理解，在一些實施例中可針對活性藥劑之分子量來調整此類指導原則。劑量亦可針對投與途徑、治療週期或因此劑量遞增協議變化，該劑量遞增協議可用於判定與在增加劑量下投與包含aCD25-a-686-HCDR3胺基酸序列之

經分離抗體或其抗原結合片段有關的最大耐受劑量及劑量限制毒性(若存在)。

【0141】 治療組合物通常應在製造及儲存條件下為無菌及穩定的。組合物可調配為溶液、微乳液、分散液、脂質體或適合於高藥物濃度的其他有序結構。可藉由在具有一種或上述列舉之成分之組合的合適溶劑中併入呈所需量之抗體，隨後過濾殺菌來製備無菌可注射溶液。通常，藉由將活性化合物併入含有鹼性分散介質及來自上述列舉之其他所需成分的無菌媒劑中來製備分散液。在用於製備無菌可注射溶液之散劑的情況下，較佳的製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥，其自先前經無菌過濾之溶液產生活性成分加任何其他所需成分的粉劑。可例如藉由使用包衣，藉由在分散液之情況下維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來保持溶液之適當流動性。可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中包括延遲吸收的藥劑(例如，單硬脂酸鹽及明膠)來實現。

【0142】 各藥劑之調配物理理想上應為無菌的，如可藉由經由無菌過濾膜過濾來實現，且接著以適用於藥團投與或連續投與之形式封裝或出售。可注射調配物可以單位劑型製備、封裝或出售，諸如存於含有防腐劑的安瓿或多劑量容器中。用於非經腸投與的調配物包括(但不限於)油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液、乳液；糊劑；及可植入持續釋放型或可生物降解型調配物，如下文所論述。可使用無毒非經腸可接受之稀釋劑或溶劑(諸如水或1,3丁二醇)來製備無菌可注射調配物。適用的其他非經腸可投與調配物包括包含呈微晶形式、在脂質體製劑中或作為可生物降解聚合物系統之組分的活性成分的調配物。用於持續釋放或植入之組合物可包含醫藥學上可接受之聚合性或疏水性材料，諸如乳液、離子交換樹脂、微溶性聚

合物或鹽。

【0143】 根據本發明使用之各醫藥組合物可包括醫藥學上可接受之分散劑、潤濕劑、懸浮劑、等張劑、包衣、抗菌及抗真菌劑、載劑、賦形劑、鹽或穩定劑，其在所採用之劑量及濃度下對個體係無毒的。此類額外醫藥學上可接受之化合物的非詳盡清單包括緩衝劑，諸如磷酸、檸檬酸及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；含有藥理學上可接受之陰離子之鹽(諸如醋酸鹽、苯甲酸鹽、碳酸氫鹽、硫酸氫鹽、羥乙磺酸鹽、乳酸鹽、乳糖酸鹽、月桂酸鹽、蘋果酸鹽、順丁烯二酸鹽、水楊酸鹽、硬脂酸鹽、次乙酸鹽、丁二酸鹽、丹寧酸鹽、酒石酸鹽、茶氨酸鹽、甲苯磺酸鹽、西奧西多(thiethiodode)及戊酸鹽)；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苄基銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲烴銨；氯化苯索銨；氯化鈉；酚、丁基或苄醇；對羥苯甲酸烷酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、麩胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽反離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如，Zn蛋白質複合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

【0144】 在一些實施例中，當根據本發明利用兩種或更多種活性藥劑時，可同時或依序投與此等藥劑。在一些實施例中，一種藥劑之投與係特定相對於另一藥劑之投與定時。在一些實施例中，組合投與之藥劑的所

需相對給藥方案可評估或實驗測定，例如使用離體、活體內及/或活體外模型；在一些實施例中，此評估或實驗測定係在活體內，在特定患者或患者群體中進行(例如使得產生相關性)。

【0145】 在一些實施例中，用於本發明之實踐中的一或多種活性藥劑係根據包含至少兩個週期之間斷給藥方案投與。當以組合投與兩種或更多種藥劑且各自藉由此間斷的循環方案時，個別劑量之不同藥劑可彼此互相交叉。在一些實施例中，在如本文所描述之抗CD25抗體藥劑之劑量後的一段時間投與一或多個劑量之第二藥劑。在一些實施例中，在如本文所描述之抗CD25抗體藥劑之劑量後的一段時間投與各劑量之第二藥劑。在一些實施例中，在抗CD25抗體藥劑之劑量前的一段時間投與一或多個劑量之第二藥劑。在一些實施例中，視患者反應而定，亦可以涉及不僅藉由相同途徑之後續投與且亦藉由交替投與途徑(諸如藉由皮下(或肌肉內)投與及腫瘤內投與)，在超過一週、兩週、四週或更多週之一或多個治療週期內，以相同方案重複此週期(或藉由延長投與之間的間隔)之方案來投與如本文所描述之抗CD25抗體藥劑。同樣，在一些實施例中，相較於一或多個其他週期，隨後的精確方案(例如，劑量次數、劑量間隔(例如，相對於彼此或相對於另一事件，諸如投與另一療法))、劑量之量等可針對一或多個週期而不同。

【0146】 藉由使用如本文所描述之投與途徑、劑量及/或方案中之任一者，如本文所描述之抗CD25抗體藥劑可經鑑別、表徵及/或驗證，例如考慮使用活檢體、血液樣本在患者體內量測之一或多種準則及/或其他臨床準則。在一些實施例中，作為替代方案或除直接評估腫瘤大小及/或癌轉移之外，如本文所描述之抗CD25抗體藥劑之治療功效可在其中評估一

或多個不同通用準則之以下方法中測定：循環、腫瘤及/或淋巴器官中之調節性T細胞之減少、對癌細胞之直接細胞毒性(癌細胞之細胞凋亡及壞死)，腫瘤浸潤性免疫細胞(諸如CD4陽性及/或CD8-陽性腫瘤浸潤性T細胞)之增加、血液中循環的免疫細胞(總群體或特定亞群之淋巴球、NK細胞、單核球、樹突狀細胞、巨噬細胞、B細胞等等)之增加，及/或僅在反應或非反應患者中在治療前對比治療後呈現一些不同的表現(如藉由RNA定序、質量流式細胞量測術及/或其他質量定序方法所測定)。可替代地或另外，在一些實施例中，此類鑑別、表徵及/或驗證可涉及藉由篩選一或多種特定蛋白質或蛋白質集合之mRNA及/或蛋白質表現在分子水準下追蹤。在一些實施例中，一或多種此類技術可允許用於評估對如本文所描述之抗CD25抗體藥劑之反應的鑑別或相關資訊，例如其可與腫瘤內(或附近)及/或血液中循環的特定細胞群之組織分佈及/或標記物有關。

【0147】 此類方法及免疫生物資料可允許不僅測定一或多種功效及/或安全性參數或特性，且在一些實施例中可提供用於選擇特定劑量、途徑或給藥方案之基本原理，例如其可單獨及/或與其他藥物、護理標準協議或可提供其他治療性益處之免疫療法組合用於給定適應症之一或多種臨床試驗中。因此，在本發明之一系列其他實施例中，在用此調配物治療後或治療前，在測定表現患者之細胞或組織(諸如腫瘤、血液樣本、血液分離物)中之一或多種基因在RNA及/或蛋白質水準下之表現之組合存在(及/或不存在)後，如本文所描述之抗CD25抗體藥劑用於治療患有疾病(諸如癌症)之患者或預防疾病(諸如癌症)之方法中。因此，此類方法可允許定義一或多種生物標記物或與治療有效量之所需抗CD25抗體藥劑相關聯的更複雜基因表現標記物(或細胞群分佈)、預測個體可在用如本文所描述之抗

CD25抗體藥劑進行治療後具有抗腫瘤或抗感染反應的治療學上相關生物標記物，或預測個體可在用抗CD25抗體藥劑進行治療後對用化合物進行治療起反應的治療學上相關生物標記物。

【0148】可替代地或另外，在一些實施例中，對於如本文中所揭示之特定抗CD25抗體藥劑之給藥及投與可鑒於人類癌症及/或其他人類組織中之CD25表現，例如藉由聚集關於各種癌症、組織及/或患者中之基質及/或免疫亞群中的CD25分佈的資料而預先地確定及/或稍後評估。此類資料可藉由使用常見癌症類型及/或組織(中樞神經系統、食道、胃部、肝、結腸、直腸、肺、膀胱、心臟、腎臟、甲狀腺、胰、子宮、皮膚、乳、卵巢、前列腺及睪丸)中之普遍技術(諸如流式細胞量測術、質量細胞量測術、免疫組織化學或mRNA表現庫)來產生以用於鑑別各種免疫及非免疫亞群中之CD25表現之間的關係及/或其與細胞浸潤量測值及/或與癌細胞或免疫細胞(諸如Foxp3及PD-1/PD-L1)之亞群相關聯之癌症相關標記物的關係。CD25表現可受限(或未受限)於腫瘤組織中(諸如NK細胞及其他效應子或調節免疫細胞中)之免疫亞群，且可測定CD25表現與免疫檢查點抑制劑之間的相關性是否為陽性，因此建議與靶向此類免疫檢查點抑制劑之化合物，例如PD-1拮抗劑，諸如抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體組合來適當使用抗CD25抗體藥劑。

【0149】製品及套組；在本發明的一些實施例中，如本文所描述之抗CD25抗體藥劑以單獨製品提供。在本發明之一些實施例中，含有抗CD25抗體藥劑之製品以或藉由具有標籤之容器提供。適合容器可包括例如瓶子、小瓶、注射器及試管。在一些實施例中，容器可由各種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。在一些實施例中，容器容納能有效治療特定疾病、

病症或病況或其階段或類型的組合物。在一些實施例中，容器可具有無菌進入孔(例如，容器可為靜脈內溶液袋或具有可藉由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。舉例而言，在一些實施例中，包含如本文所描述之抗CD25抗體藥劑之組合物封裝於具有橡膠塞及鋁封口之透明玻璃小瓶中。容器上或與容器相關聯之標籤指示該組合物用於治療所選病況。

【0150】 在一些實施例中，製品可進一步包含單獨容器，包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液，及/或可進一步包括根據商業及使用者觀點所需之其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針、注射器、及具有使用說明書之封裝插頁。舉例而言，在一些實施例中，製品可允許以含有總計2 mg、5 mg、10 mg、20 mg、50 mg或更多之無菌水溶液形式提供靜脈內調配物中之藥劑中之每一者，該無菌水溶液以0.1 mg/ml、1 mg/ml、10 mg/ml之最終濃度或以更高濃度用適當稀釋劑及緩衝液調配。

【0151】 在一些實施例中，如本文所描述之抗CD25抗體藥劑可以凍乾形式或使用任何相容性醫藥載劑之其他類型之劑量單位提供於套組部分內，該凍乾藥劑待藉由套組提供或未提供之任何適當的水溶液復水。一或多種單位劑型之抗CD25抗體藥劑可提供於包裝或分配裝置中。舉例而言，此包裝或裝置可包含金屬或塑膠箔，諸如泡殼包裝。為正確地使用此類套組部分，其可進一步包含緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器及具有用於治療癌症之說明書之封裝插頁。

【0152】 在一些實施例中，與如本文所描述之製品或套組相關聯之說明書可呈標籤、小冊、出版物、錄音、圖式或任何其他方式形式，其可用於告知藥劑、調配物及製品及/或套組中之其他材料之正確用途及/或監

測藥劑、調配物及製品及/或套組中之其他材料之可能效果。說明書可與製品及/或套組一起提供。

實例

【0153】 實例1：產生活體外結合CD25之抗體

材料及方法

【0154】 CD25抗原製備

小鼠CD25-HIS、人類CD25-Fc及未標記重組蛋白係購自R&D Systems Biotechne。食蟹獼猴CD25-Fc及CD25-HIS重組蛋白係購自Sino Biological。蛋白質試劑生物素標記係使用EZ-Link Sulfo-NHS生物素標記套組, Thermo Scientific, 目錄號21425完成。在添加1:7.5莫耳比生物素化試劑(EZ-Link Sulfo-NHS-生物素化套組, Thermo Scientific, 目錄號21425)之前, 將CD25抗原濃縮至約1 mg/mL且將緩衝液更換成PBS。在進行另一次緩衝液更換之前使混合物在4°C下保持隔夜以移除溶液中之游離生物素。生物素化係經由ForteBio上經標記蛋白質之抗生蛋白鏈菌素感測器結合來確認。

【0155】 用於分離抗CD25抗體之庫詢問及選擇方法：

八個初始人類合成酵母庫(各約 10^9 種多樣性)經設計、產生及傳播, 如先前所述(參見例如: Xu等人, 2013; WO2009036379; WO2010105256; WO2012009568)。針對單體人類CD25選擇使用八個初始庫來執行八個平行選擇。

【0156】 對於首先兩回合選擇, 執行利用Miltenyi MACs系統之磁珠分類技術, 基本上如(Siegel等人, 2004)所述。簡言之, 將酵母細胞(約 10^{10} 個細胞/庫)與3 ml之10nM生物素標記之二聚人類CD25抗原在30°C在

FACS洗滌緩衝液(具有0.1% BSA之PBS)中培育15 min。在用50 ml冰冷的洗滌緩衝液洗一次後，將細胞球粒再懸浮於40 mL洗滌緩衝液中，且將500 µl抗生蛋白鏈菌素微珠(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany. 目錄號130-048-101)添加至酵母中並在4°C培育15 min。接著，使酵母球粒化，再懸浮於5 mL洗滌緩衝液中，且裝載至MACS LS管柱(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany. 目錄號130-042-401)上。裝載5 mL後，用3 ml FACS洗滌緩衝液洗管柱3次。接著自磁場移除管柱，用5 mL生長培養基溶離酵母且接著生長隔夜。

【0157】 在兩回合之MACS之後，使用流式細胞量測術(FACS)進行四個回合之分類，其描述於以下三段中。

【0158】 對於第一回合之FACS選擇，使大約 4×10^7 個酵母球粒化，用洗滌緩衝液洗三次，並在30°C與10 nM各生物素標記之二聚人類CD25抗原或200 nM生物素標記之單體小鼠CD25抗原培育15 min。接著將酵母洗兩次且用1:100稀釋之山羊抗人類F(ab')₂ κ-FITC (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, 目錄號2062-02)及1:500稀釋之抗生蛋白鏈菌素-Alexa Fluor 633 (Life Technologies, Grand Island, NY, 目錄號S21375)或1:50稀釋之Extravidin-藻紅蛋白(Sigma-Aldrich, St Louis, 目錄號E4011)、二級試劑在4°C染色15 min。在用冰冷洗滌緩衝液洗兩次後，將細胞球粒再懸浮於0.4 mL洗滌緩衝液中且轉移至過濾器加蓋之分類管中。使用FACS ARIA分類儀(BD Biosciences)執行分類，且決定分類閘控以僅選擇CD25結合。來自第一回合之FACS的鼠類選定群體組合為一組。此組接著針對人類CD25結合分類以增加或鑑別第三回合之FACS (下文描述)中之交叉反應結合子。

【0159】 針對人類選定群體之第二及第三回合之FACS涉及對於CD25結合子之陽性分類或減小試劑多特異性結合子之陰性分類(Xu等人, 2013)。視特定選擇輸出之多特異性結合或靶結合之量而定，陽性分類在陰性分類之後或反之亦然，以富集具有有限量之多特異性結合的完全結合群體。來自第三回合選擇的輸出之樣品經塗覆及定序。

【0160】 第四回合之FACS主要由陽性選擇構成，使用10 nM生物素標記之二聚食蟹獼猴D25作為抗原。接著，此等選擇之樣品經塗覆及定序，類似於第三回合選擇輸出來進行。

【0161】 *在初始選擇中鑑別的純系之親和力成熟*

來自多特異性結合子陰性分類輸出之重鏈係用於製備用於四個額外選擇回合之輕鏈多樣化庫。此等選擇回合中之第一個利用Miltenyi MAC珠粒與10nM生物素標記之二聚人類CD25共軛作為抗原或與100nM生物素標記之單體鼠類CD25共軛作為抗原。

【0162】 在MAC珠粒選擇之後，進行三個回合之FACS分類。此等回合中之第一個使用100 nM單體人類CD25、10 nM二聚食蟹獼猴CD25或200 nM單體鼠類CD25。第二FACS回合為藉由多特異性試劑之陰性選擇，以富集具有有限量之多特異性結合的完整結合群體。第三FACS回合包括降至1 nM之人類CD25抗原之滴定以及使用100或10 nM鼠類CD25之平行選擇。

【0163】 平行於緊接先前段落中所描述之第三FACS回合，執行競爭選擇。對於競爭選擇，將200 nM競爭者IgG (來自用人類CD25上之已知分組進行初始選擇(上文所描述)以選擇確實或並未與該分組競爭之抗體)在與酵母一起培育30分鐘之前與10 nM生物素標記之二聚人類CD25一

起培育30分鐘。

【0164】塗覆並挑選來自上述各FACS選擇回合之個別菌落以用於定序表徵。

【0165】*IgG及Fab產生及純化：*

使酵母純系生長至飽和且接著在30℃下，在振盪下誘導48 h。誘導後，使酵母細胞球粒化且收穫清液層以用於純化。IgG係使用蛋白A管柱純化且用乙酸pH 2.0溶離。Fab片段係藉由番木瓜酶消化產生且在CaptureSelect IgG-CH1親和力基質(LifeTechnologies, 目錄號1943200250)上純化。

【0166】*產生表現於哺乳動物細胞的 α -海藻糖基化 α CD25- α -686人類IgG1：*

執行抗體之密碼子最佳化VH及VL編碼序列之合成且使用習知(基於非PCR)選殖技術將可變區之cDNA選殖至抗體表現載體(Evitria, Switzerland)中。將氧化還原酶GDP-6-去氧-d-來蘇糖-4-己酮糖還原酶(RMD)酶之cDNA選殖至表現載體(Evitria, Switzerland)中。質體DNA係基於陰離子交換層析在低內毒素條件下製備。Evitria使用適應懸浮之CHO K1細胞(原先來源於ATCC，且在evitria處適應在懸浮培養物中無血清生長)來產生。使種粒在eviGrow介質中生長，該eviGrow介質為化學成分確定的無動物組分之無血清介質。使用eviFect (Evitria訂製專有轉染試劑)用IgG1及RMD酶之表現載體轉染細胞。細胞在eviMake2中後轉染後，該eviMake2為無動物組分之無血清介質。上清液藉由離心及後續過濾(0.2 μ m過濾器)收集。抗體係使用MabSelect™ SuRe™純化。抗體之糖基化模式係使用LC/MS表徵且展示為>99%之 α -海藻糖基化。

【0167】 抗CD25抗體之親和力量測：

如先前描述藉由量測Octet Red96上之KD來執行ForteBio親和力量測(參見例如Estep等人, (2013))。使感測器在分析緩衝液離線平衡10 min且接著在線監測60秒以用於建立基線。將32 nM之IgG在線裝載至AHC感測器上持續5 min。接著, 使1:3連續稀釋(1 μ M比4 nM)之重組人類CD25 HIS標記與所裝載IgG締合10min。然後將其轉移至分析緩衝液中持續6.6 min以進行解離速率量測。在具有參考減法之情況下, 使用ForteBio資料分析軟體9.0中之全局1:1結合模型來擬合動力學資料(參見圖5A)。

【0168】 抗人類CD25抗體之親和力亦藉由使用CM-5感測器晶片伴隨25°C之環境實驗溫度在Biacore 2000中利用SPR (參見圖5B)量測其KD來測定。歷經10分鐘將抗人類抗體在分析緩衝液(pH 7.4, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Tween 20)中之所有流槽上初始地固定至12,000-14,000之間的RU。將配位體(抗體測試物品)子依序裝載至145-190 RU之間的捕獲量。接著使分析物(重組人類CD25 his標記)以3.13 nM之最低濃度自400 nM開始2倍稀釋締合於分析緩衝液中6分鐘。歷經10分鐘在分析緩衝液中執行解離。歷經10分鐘在10 mM甘胺酸pH 1.7中執行樣品濃度之間的再生步驟。在整個製程中維持25 μ l/min之流動速率。在具有參考減法之情況下, 使用由Biacore提供之全球兩種狀態反應構形變化分析軟體擬合動力學資料。

【0169】 配位體結合：

在Forte Bio Octet Red384系統(Pall Forte Bio Corp., USA)上使用標準包夾分組分析來執行抗體之配位體結合。將抗人類CD25抗體(aCD25-a-686)裝載至AHQ感測器上且藉由非相關人類IgG1抗體阻斷感測器上之未

佔用Fc結合位點。使感測器暴露於100 nM人類CD25，隨後暴露於100 nM人類IL-2。使用Forte Bio資料分析軟體7.0處理資料。抗原締合後之人類IL2之額外結合指示未佔用抗原決定基(非競爭者)，而無結合指示抗原決定基阻斷(競爭者)。

【0170】 抗原決定基分組：

在Forte Bio Octet Red384系統(Pall Forte Bio Corporation, Menlo Park, CA)上使用標準包夾型式分組分析來執行抗體之抗原決定基分組。將抗人類CD25抗體IgG裝載至AHQ感測器上且藉由非相關人類IgG1抗體阻斷感測器上之未佔用Fc結合位點。接著使感測器暴露於100 nM靶抗原，隨後暴露於達利珠單抗或巴利昔單抗。使用ForteBio之資料分析軟體7.0處理資料。抗原締合後之第二抗體之額外結合指示未佔用抗原決定基(非競爭者)，而無結合指示抗原決定基阻斷(競爭者)。

【0171】 抗CD25抗體與CD25-表現細胞之結合：

藉由結合於淋巴瘤人類細胞株SU-DHL-1及SR-786、Karpas299、活體外分化之Treg細胞及HSC-F食蟹獼猴T細胞株來評估候選命中者。在4℃下與自最高濃度20 µg/ml以半對數稀釋系列滴定的抗CD25抗體一起培育30分鐘之前，在用PE共軛之抗人類IgG Fc抗體(Biolegend)洗滌且與其一起培育之前，藉由用Trustain (Biolegend)首先阻斷細胞來檢測與表現CD25之人類細胞株(SU-DHL-1及SR-786)的結合。細胞經再次洗滌且再懸浮於含有DAPI之FACS緩衝液中且在Intellicyt iQue上獲得。在樣品獲取期間使用FSC對比SSC參數藉由流式細胞量測術閘控活細胞。將染色細胞之幾何平均強度繪製於XY圖表上，針對濃度對數對幾何平均值強度進行繪圖，且資料擬合至非線性回歸曲線，根據該曲線計算EC50。

【0172】 藉由用30 $\mu\text{g/ml}$ 抗體染色測試物品(抗CD25初級抗體)，隨後在冰上進行半對數稀釋系列(7點)持續30分鐘來檢測與表現CD25之活體外分化之Treg的結合。此隨後在冰上用濃度為1 $\mu\text{g/ml}$ 之二級抗體(Alexa Fluor 647-AffiniPure Fab片段山羊抗人類IgG (H+L) - (Jackson ImmunoResearch))染色30分鐘。一式兩份地染色所有樣品。在樣品獲取期間使用FSC對比SSC參數藉由流式細胞量測術閘控活細胞。將染色細胞之平均螢光強度(MFI)繪製於XY圖表上，針對濃度對數對MFI進行繪圖，且資料擬合至非線性回歸曲線，根據該曲線計算EC50。

【0173】 藉由用20 $\mu\text{g/ml}$ 抗體染色測試物品(抗CD25初級抗體)，隨後在冰上進行半對數稀釋系列(7點)持續30分鐘來檢測與表現CD25之經活化人類及食蟹獼猴PMBC的結合。此隨後在冰上用5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度之二級抗體(兔抗人類Fc γ F(ab')₂-(Jackson ImmunoResearch))染色30分鐘。一式三份地染色所有樣品。為最小化由二級抗體之結合介導的交聯誘導之細胞死亡，同時在4個測試物品之染色群組中檢測細胞株。在樣品獲取期間使用FSC對比SSC參數藉由流式細胞量測術閘化閘控活淋巴球。將閘控CD4⁺及CD8⁺ T細胞亞群之平均螢光強度(MFI)繪製於XY圖表上，針對濃度之對數對MFI進行繪圖，且資料擬合為非線性回歸曲線，根據該曲線計算EC50。

【0174】 藉由用20 $\mu\text{g/ml}$ 抗體染色測試物品(抗CD25初級抗體)，隨後在冰上進行半對數稀釋系列(7點)持續30分鐘來檢測與表現CD25之Karpas299細胞的結合。此隨後在冰上用濃度為1 $\mu\text{g/ml}$ 之二級抗體(Alexa Fluor 647-AffiniPure F(ab')₂片段兔抗人類IgG Fc γ 片段 - (Jackson ImmunoResearch))染色30分鐘。一式兩份地染色所有樣品。在樣品獲取

期間使用FSC對比SSC參數藉由流式細胞量測術閘控活細胞。將染色細胞之平均螢光強度(MFI)繪製於XY圖表上，針對濃度對數對MFI進行繪圖，且資料擬合至非線性回歸曲線，根據該曲線計算EC50。

【0175】 再選殖、產生及表徵*aCD25-a 686*作為哺乳動物細胞中表現之人類IgG1：藉由Genewiz執行抗體之密碼子最佳化VH及VL編碼序列之合成。將可變區之cDNA選殖至含有人類IgG1重鏈及κ輕鏈恆定區(分別為P01857及P01834)之抗體表現載體(Icosagen, EST)中。藉由在最終載體中定序且接著使用QMCF技術(Icosagen)再選殖以供表現該等載體來驗證全長重鏈及輕鏈cDNA，該技術為使用基於CHO之細胞(CHOEBNALT85)及適當的載劑以用於產生重組蛋白、抗體的穩定附加型表現系統，CHOEBNALT85細胞經1 μg表現質粒轉染以用於抗體產生。轉染後48 h，添加700 μg/ml G418以選擇含有質體之細胞群。出於生產，將溫度轉換為30℃且另外饋入培養物。在生產結束時，培養上清液藉由離心(1000 g，30 min及15℃)澄清，添加PMSF且處理或冷凍上清液直到純化。hIgG1抗體係藉由MabSelect SuRe親和性層析，隨後為Superdex 200凝膠過濾來純化成PBS或PBS 100 mM L-Arg。產生於CHOEBNALT85細胞中之人類IgG1抗體之表徵在於對重組人類CD25之親和力，對鼠類之交叉反應性，以及相比於所選CD25結合抗體的食蟹獼猴CD25及抗原決定基分組。

【0176】 *aCD25-a-686*抗原決定基定位：

使用固相Fmoc合成來合成表示人類CD25序列(Uniprot記錄號P01589)之直鏈、單環、β-轉向模仿、二硫橋鍵模仿、非連續二硫橋鍵、非連續抗原決定基模仿肽之不同集合(Pepscan BV, The Netherlands; Timmermann P等人, 2007; Langedijk J等人, 2011)。在ELISA (Pepscan,

The Netherlands)中測試a-686抗體與合成肽中之每一者的結合。將肽陣列與初級抗體溶液一起培育(在4°C下隔夜)。洗滌後，在25°C下將肽陣列與1/1000稀釋之適當抗體過氧化酶共軛物(2010-05; Southern Biotech)一起培育一小時。洗滌後，添加過氧化酶受質2,2'-次偶氮基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸鹽(ABTS)及20 µl/ml 3% H₂O₂。一小時後，量測顏色顯現。藉由電荷耦接裝置(charge coupled device, CCD)-攝像機及影像處理系統來量化顏色顯現。自CCD攝像機獲得之值範圍介於0至3000 mAU，類似於標準96孔培養盤ELISA讀數器。為驗證所合成肽之質量，平行合成陽性及陰性對照肽之單獨集合且用不相關的對照抗體進行篩選。

【0177】亦執行氫/氘交換(HDx)質譜分析。在抗體aCD25-a-686之Fab片段不存在(蛋白質狀態1)及存在(蛋白質狀態2)之情況下藉由在經緩衝氘化水(D₂O)中培育用氘標記CD25抗原多次。在各種標記時間後，藉由添加淬滅緩衝液來淬滅氘化水。對於對照，平行製備無需氘化(在經緩衝普通水中培育)及90%氘化(在經緩衝氘化水中培育[參見下文])之樣品。

【0178】隨後，所有樣品用胃蛋白酶/FXVIII蛋白酶消化，所得肽由反相HPLC分離並藉由MS/MS偵測使用Thermo Orbitrap Fusion Lumos質譜儀鑑別。對於資料評估以鑑別分別呈蛋白質狀態1及蛋白質狀態2之CD25抗原中的不同氘化水準之肽，使用來自Bioinformatics Solutions Inc.(BSI)之可商購軟體工具Peaks Studio及來自Sierra Analytics之HDExaminer。

實驗細節為：

【0179】(A)工具、試劑及溶液：

抗原：抗原huCD25 (IL2R α)購自R&D systems #223-2A/CF, 在50

mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.5 中 $c = 52.9 \text{ pmol}/\mu\text{l}$, 批號 KY051509A。

抗CD25-Fab : aCD25-a-686 之經純化 Fab 片段係藉由在 37°C 下用 GingisKhan® (Genovis, B0-GKH-020) 消化隔夜且在 Mab 選擇管柱(流動穿過)上依序純化, 在 κ 選擇管柱(GE Healthcare)及製備型 SEC 上親和純化而內部產生。Fab 片段在 20 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.5 中濃度為 51.3 pmol/ μl 。

H₂O-緩衝液: 含 20 mM 參(羥基甲基)胺基甲烷、150 mM NaCl, pH 7.5 之 H₂O。

D₂O-緩衝液: 含 20 mM 參(羥基甲基)胺基甲烷、150 mM NaCl, pH 7.5 之 D₂O。

淬滅緩衝液: 4 M 脲, 0.17 M KH₂PO₄, 0.3 M TCEP, pH 2.8

吸移且標記自動機: Leap technologies, PAL HTC 自動取樣器

蛋白質狀態1 (僅抗原): 8.23 μl 抗原用 102.27 μl H₂O 緩衝液稀釋且提供於自動機之 0°C 溫和樣品機架中。

蛋白質狀態2 (抗原加結合子): 將 7.4 μl 抗原添加至 19.59 μl 抗 CD25-Fab 中且在 70.51 μl H₂O 緩衝液中稀釋, 亦提供於 0°C 溫和樣品機架中。

標記時間: 0、1、10、60、300 min

【0180】 (B) 用氬標記未結合(蛋白質狀態1)及結合(蛋白質狀態2) CD25

B1) 肽鑑別及 0 min 標記時間(無氬化對照): 自動機在 20°C 下在樣品機架中將 5.2 μl 蛋白質狀態1 稀釋至 46.8 μl H₂O 緩衝液中。在 0°C 回火的樣品機架中將其 39 μl 轉移並混合至 39 μl 淬滅緩衝液中。300 s 淬滅時間後, 將

50 μ l (9.85 pmol 抗原)此樣品注射至量測系統中。

*B2) 完全氙化樣品(90%氙化對照)：*將6.7 μ l 抗原稀釋於11.3 μ l H₂O 緩衝液中且以90%之最終D₂O含量與162 μ l 6 M 氙化胍-鹽酸鹽混合。在室溫下培育5 h。在0℃下將其39 μ l轉移至淬滅緩衝液中。在300 s淬滅時間後，將50 μ l (49.23 pmol 抗原)此樣品注射至量測系統中。

*B3) 在後續淬滅之情況下的不同標記時間(1、10、60及300 min)：*自動機在20℃下在樣品機架中將5.2 μ l 蛋白質狀態1稀釋成46.8 μ l D₂O 緩衝液。在個別標記時間後，在0℃回火的樣品機架中將其39 μ l轉移且混合至39 μ l 淬滅緩衝液中。在300 s淬滅時間後，將50 μ l (9.85 pmol CD25 抗原及23.08 pmol Fab)此樣品注射至量測系統中。

亦對蛋白質狀態2執行相同程序。

一式三份執行所有標記樣品(0、1、10、60及300 min標記)及完全氙化樣品。

【0181】 (C) 分析氙標記樣品及對照樣品：

將來之B)之樣品裝載至冷卻(0℃) Waters NanoAcquity UPLC系統 (Waters Corp., Milford, MA)上。在20℃下執行線上胃蛋白酶/FXVIII消化(NovaBioAssays, #NBA2018209)。在0℃下，3 min去鹽 (Waters VanGuard C18, 1.7 μ m, 2.1×5 mm)且在7 min中對於所有標記樣品使用8-35%梯度藉由含0.23%甲酸之乙腈(pH 2.5)進行反相分離(Waters BEH C18, 1.7 μ m, 1×100 mm)，且在25 min中以40 μ l/min之流動速率進行肽鑑別。

藉由Thermo Orbitrap Fusion Lumos質譜儀使用陽性離子電噴射執行質量分析。

對於使用0min標記時間樣品(B1)之肽鑑別，更高能量碰撞解離(HCD)係與資料依賴性獲取(DDA)模式下之電子傳送/更高能量碰撞解離(ET_hcD)平行使用。

對於所有標記量測，全掃描模式係足夠的。

【0182】 (D) 資料評估：

Peaks Studio, Bioinformatics Solutions Inc. (BSI)用於根據供應器之說明書進行肽鑑別。

HDExaminer, Sierra分析用於根據提供商之說明書根據不同的標記時間且與非氙化對照(0 min標記時間)相比較之完全氙化對照來測定肽中之氙併入。

兩種額外抗原決定基經鑑別：aCD25_{ep-b} (₃₇KAMAYKEGTMLNCECKRGFR₅₆ - SEQ ID NO: 24)及aCD25_{ep-c} (₁₃₅ATERIYHF₁₄₂ - SEQ ID NO: 25)

【0183】 抗人類CD25 Ab競爭分析：

在Forte Bio Octet Red96系統(Pall Forte Bio Corp., USA)上使用標準依序結合分析執行抗體競爭。將26.8 nM重組人類CD25_{his}標記裝載至Ni-NTA生物感測器上持續200 s。基線步驟後，使動力緩衝感測器暴露於66.6 nM之第一抗體持續600 s或1800 s，隨後暴露於第二抗CD25抗體(亦在66.6 nM下持續600 s或1800 s)。使用Forte Bio Data分析軟體9.0處理資料。第二抗體之額外結合指示未佔用抗原決定基(對於抗原決定基而言無競爭)，而無結合指示抗原決定基阻斷(對於抗原決定基而言有競爭)。

結果

【0184】 使用如材料及方法中所描述之基於酵母菌之抗體呈現庫來

分離結合於重組人類CD25胞外蛋白質序列(rhCD25)之單株抗體(mAb)。此等抗體經定序且在酵母細胞中產生特有純系(Barnard GC等人, 2010)。用於表現特有抗體序列之各酵母純系之細胞培養物上清液經篩選以用於rhCD25結合。

【0185】 基於與rhCD25之結合、序列獨特性及表現量，鑑別一組mAb。此等抗體進一步表徵為結合於重組食蟹獼猴及小鼠CD25胞外域蛋白質序列。純系經表徵展示單價rhCD25及/或重組食蟹獼猴CD25胞外蛋白質序列之IgG結合值包含於 10^{-8} M與 10^{-10} M之間。此外，各抗體表徵為與IL-2配位體或參考抗CD25抗體達利珠單抗競爭或不競爭。亦以結合於表現不同水準之CD25 (諸如淋巴瘤細胞株、SU-DHL-1及活體外分化之Treg細胞)的人類細胞之水準藉由流式細胞量測術評估抗體純系。

【0186】 結合於rhCD25、交叉分組及IL-2競爭性結合分析之結果展示於表1中(圖3-7)。

表1：

抗體	與表現人類及食蟹獼猴CD25之細胞的結合	抗原決定基交叉分組群	結合於CD25之IL-2之競爭者	重組人類CD25-His IgG之親和力	
				ForteBio KD (M)	Biacore KD (M)
aCD25-a-686	是	3	否	2.33E-09	3.2E-09
達利珠單抗	是	1	是	6.00E-10	6.10E-10

抗CD25抗體之結合展示於圖3至圖7中。

【0187】 最後，為消除將易於聚集且非特異性相互作用之抗體序列，在多特異性試劑(PSR)分析及親和力捕獲自身相互作用奈米顆粒波譜學(AC-SINS)中篩選抗體，該波譜學為允許高輸送量篩選早期抗體產生之方法(Liu Y等人, 2014)。所選抗體中無一者在後者分析中評估為陽性的且因而未自組中移除。

【0188】 在如上文所描述之經定序且表徵之所選命中者中，純系 aCD25-a-686 為呈現並不與達利珠單抗或巴利昔單抗競爭以用於結合人類 CD25 (圖13A及圖13B)，但的確與非阻斷抗體7G7B6及參考非阻斷劑 aCD25-a-646 (圖13及圖13D)競爭以用於結合之新穎互補決定區(CDR；圖1)的抗體。已使用Pepscan技術進行之抗原決定基定位研究將指示 aCD25-a-686 以 10^{-8} M至 10^{-10} M範圍中之Kd值結合自胺基酸70-84之區中之人類CD25 (圖2)且結合人類CD25胞外蛋白質序列。

【0189】 使用親和力及/或親合力之CD25動力學量測-結合強度

【0190】 執行關於親和力及親合力之以下額外研究。使用 BIACORE T200儀器(GE Healthcare)藉由表面電漿子共振研究CD25抗體與人類CD25抗原之結合。藉由使用由GE Healthcare供應之胺偶合套組 (BR-1000-50)在pH 5.0下在CM5晶片(GE Healthcare BR-1005-30)上偶合捕獲系統(20 μ g/ml抗人類Fab；人類Fab捕獲套組之指令碼：28-9583-25；GE Healthcare)之約8000個共振單位(RU)。

【0191】 操作及稀釋緩衝液為PBS-P pH 7.4 (20 mM磷酸鹽緩衝液，2.7 mM KCl，137 mM NaCl，0.05%界面活性劑P20；GE Healthcare，指令碼28-9950-84)。將流動槽設置為25°C且將樣品腔室設置為12°C。藉由以10 μ l/min之流動速率注射3 μ g/ml溶液持續60秒來捕獲CD25抗體。藉由以30 μ l/min之流動速率在1:10稀釋步驟中以1000 nM之濃度開始降至1 nM來注射人類CD25溶液持續180秒來量測CD25抗原之締合。藉由自樣本溶液注射切換為操作緩衝液來觸發解離階段且監測長達600秒。表面係藉由以10 μ l/min之流動速率利用兩次連續1分鐘注射10 mM甘胺酸pH 2.1 (由套組提供)進行洗滌來再生。藉由減去自抗人類Fab

參考表面獲得之反應；亦減去坯料注射來校正整體折射率差異(=雙重參考)。

【0192】 藉由使用各種CD25抗原變體，亦即內部產生之單體抗原(P1AA5872)及兩種可商購之CD25抗原(Sino Biologicals，目錄號 10165-H08H；R&D Systems，目錄號223-2A/CF)來評估CD25-抗體之結合特性。

【0193】 為計算KD及動力學參數，使用Biacore所提供之擬合模型獲得最佳曲線擬合結果。1:1朗格繆爾(Langmuir)擬合用於P1AA5872及來自Sino Biologicals及R&D Systems之CD25的兩種狀態動力學擬合。

表4：

CD25形式	結合強度	擬合模型
Sino biological (約20%二聚體)	2.5 nM	二態反應
R&D Systems (約10%二聚體)	5.8 nM	二態反應
Inhouse (0%二聚體)	244 nM	1:1朗格繆爾

【0194】 因此，aCD25-a-686序列(圖1)鑑別特異性結合CD25的抗體，且其與定義抗CD25抗體藥劑之功能係特徵相關聯的活性(如本文中所使用之彼術語)可藉由基於細胞之分析或動物模型進行功能評估。

【0195】 實例2：用於驗證CD25調節抗體藥劑的基於細胞之模型
材料及方法

【0196】 由STAT5磷酸化分析進行活體外IL-2信號傳導

使用STAT5磷酸化分析表徵IL-2阻斷，其中檢測IL-2信號傳導。在含有10% FBS (Sigma)、2 mM L-麩醯胺酸(Life Technologies)及10,000 U/ml Pen-Strep (Sigma)之RPMI 1640 (Life Technologies)中添加呈10 U/ml或0.25 U/ml、0.74 U/ml、2.22 U/ml、6.66 U/ml或20 U/ml之不同濃度的IL-2 (Peprotech)持續10分鐘之前，在10 µg/ml抗CD25抗體之存在

下在96-U形底孔培養盤中將先前冷凍PBMC (Stemcell Technologies)培養30分鐘。當細胞經固定且經eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set(Invitrogen)滲透且用BD Phosflow Perm緩衝液III (BD Biosciences)處理時，停止經IL-2誘導之STAT5磷酸化。接著，細胞同時經表面及胞內螢光染料標記之抗體(STAT5-Alexa Fluor 647純系47/stat5/pY694 BD Bioscience、CD3-PerCP-Cy5.5純系UCHT1 Biolegend、CD4-BV510純系SK3 BD Bioscience、CD8-Alexa Fluor 700純系RPA-T8 Invitrogen、CD45RA-PE-Cy7純系HI100 Invitrogen、FoxP3-Alexa Fluor 488純系236A/E7 Invitrogen)染色且在Fortessa LSR X20流式細胞儀(BD Bioscience)上獲得樣品並使用BD FACSDIVA軟體分析。使用FCS-H對比於FCS-A排除二重峰且使用SSC-A對比於FCS-A參數定義淋巴球。使用CD3 PerCP-Cy5.5-A對比於FCS-A曲線定義CD3⁺ T細胞且閘極繪製於展示計數對比於STAT5 Alexa Fluor 647-A的直方圖上以測定STAT5⁺CD3⁺ T細胞群。如下計算IL-2信號傳導之阻斷百分比：阻斷% = 100 × [(Stat5⁺細胞無Ab基團% - Stat5⁺細胞10 ug/ml Ab基團%) / (Stat5⁺細胞無Ab基團%)]。藉由不同T細胞亞群(CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺FoxP3⁺、初始及記憶T細胞)進一步分析STAT5磷酸化亦藉由在個別亞群上進行閘控來評估且如上進行分析。使用GraphPad Prism v7執行圖式及統計分析(未展示結果)。

【0197】 使用如上文所描述之STAT5磷酸化分析來表徵海藻糖基化及無岩藻糖基化抗體之IL-2阻斷。人類PBMC在冰上與IgG1同型對照抗體、IL-2中和抗體、達利珠單抗、aCD25-a-686及以10 ug/mL無岩藻糖基化之aCD25-a-686一起培育30分鐘。用IL-2 (Proleukine, Novartis 10

U/mL)刺激10分鐘。細胞使用eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen)、BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences)及螢光染料標記抗體(CD3-PerCP-Cy5.5純系UCHT1 - Biolegend、CD4 BUV397純系RPA-T4 - Biolegend、CD8 PE/Cy7純系SK1 - Biolegend, FoxP3+ - PE純系206D - Biolegend、STAT5-Alexa Fluor 647純系47/stat5/pY694 BD Bioscience)染色並經歷流式細胞量測術。獲得樣品並如上分析。計算在具有及不具有低劑量IL-2活化之情況下CD3+、CD8+ T細胞上之PhosphoStat5之中值螢光強度之差值。量測複製品。

【0198】 活體外T細胞活化分析：

IL-2信號傳導對於Teff反應之影響表徵於T細胞活化分析中，其中檢測胞內顆粒酶B (GrB)上調及增殖。先前冷凍初始人類Pan T細胞 (Stemcell Technologies)係根據製造商的建議用eFluor450細胞增殖染料 (Invitrogen)標記，且在含有10% FBS (Sigma)、2 mM L-麩醯胺酸(Life Technologies)及10,000 U/ml Pen-Strep (Sigma)之RPMI 1640 (Life Technologies)中以 1×10^5 個細胞/孔添加至96U形底孔培養盤。接著細胞用10 μ g/ml抗CD25抗體或對照抗體，隨後人類T-活化子CD3/CD28 (20:1細胞與珠粒比率；Gibco)處理且在37°C，5% CO₂之潮濕培育箱中培育72小時。為評定T細胞活化，在染色胞內GrB及核內FoxP3 (顆粒酶B-PE純系GB11 BD Bioscience、FoxP3-APC純系236A/E7)之前，細胞經eBioscienceFixable Viability Dye efluor780 (Invitrogen)染色，隨後為表面T細胞標記物之經螢光染料標記之抗體(CD3-PerCP-Cy5.5純系UCHT1 Biolegend、CD4-BV510純系SK3 BD Bioscience、CD8-Alexa Fluor 700

純系RPA-T8 Invitrogen、CD45RA-PE-Cy7純系HI100 Invitrogen、CD25-BUV737純系2A3 BD Bioscience)且接著固定並經eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set(Invitrogen)滲透。在Fortessa LSR X20流式細胞儀(BD Bioscience)上獲得樣品且使用BD FACSDIVA軟體分析。使用FCS-H對比於FCS-A排除二重峰，且使用SSC-A對比於FCS-A參數定義淋巴球。使用GrB-PE-A對比於增殖eFluor450-A曲線來評定由活CD3⁺淋巴球閘控之CD4⁺及CD8⁺ T細胞亞群。結果呈現為根據全部CD4⁺或CD8⁺ T細胞群體的增殖GrB陽性細胞之百分比。使用GraphPad Prism v7執行圖式及統計分析。

【0199】 活體外ADCC分析：

抗體依賴性細胞介導之細胞毒性分析(ADCC分析)經執行以用於使用SU-DHL-1或SR-786 (CD25陽性)人類細胞株作為靶細胞以及人類NK細胞作為效應子細胞源來表徵抗人類CD25抗體。使用NK細胞陰性分離套組(Stemcell Technologies)將NK細胞自健康供體之PBMC分離。NK細胞在2 ng/mL IL-2 (Peprotech)的存在下培養隔夜。SU-DHL-1或SR-786靶細胞裝載有鈣黃綠素-AM (Thermofisher)且在抗CD25或同型抗體的存在下，在37°C 5% CO₂下每種情況塗覆4個複本持續30分鐘。在培育後，將NK細胞以1:10之標靶:效應子(T:E)比率(10,000個靶細胞及100,000個效應細胞)添加至孔中且在37°C 5% CO₂下培育4小時。在BMG Fluostar盤式讀取器上執行鈣黃綠素螢光在上清液中之讀數。相對於單獨靶細胞(0%裂解)及經0.1%皂素處理之靶細胞(100%裂解)來計算比裂解百分比。使用Graphpad Prism v7產生原始資料之圖以產生劑量反應曲線。將靶細胞裂解百分比繪製於XY圖表上，針對濃度之對數對標準化鈣黃綠素AM釋放百

分比進行繪圖，且資料擬合至非線性回歸曲線，根據該曲線計算EC50。

【0200】 介導ADCC且清除CD25陽性細胞之能力亦針對達利珠單抗、aCD25-a-686及無岩藻糖基化aCD25-a-686IL-2活化人類NK細胞之共培養分析中在具有活體外誘導iTreg之情況下表徵。6小時後藉由流式細胞量測分析來量化iTreg之死亡。

【0201】 如下製備IL-2活化人類NK細胞。藉由菲科爾(ficoll)密度梯度離心分離人類PBMC。自Zürich血液供給中心獲得白血球層。為分離新鮮的周邊血液單核細胞(PBMC)，用相同體積之DPBS (Gibco, Life Technologies, 目錄號14190 326)稀釋白血球層。50 mL聚丙稀離心管(TPP, 目錄號91050)與15 mL Histopaque 1077 (SIGMA Life Science, 目錄號10771, 聚蔗糖及泛影酸鈉，調節至1.077 g/mL之密度)一起提供且白血球層溶液在Histopaque 1077上分層。試管在400×g、室溫下且在低加速度及不破裂情況下離心30分鐘。然後，自介面收集PBMC，用DPBS洗滌三次且再懸浮於由供應有10 %胎牛血清(FBS, Gibco by Life Technology, 目錄號16000-044, 批號941273, γ 照射，無黴漿菌且在56°C下加熱不活化35 min)及1 % (v/v) GlutaMAX I (GIBCO by Life Technologies, 目錄號35050 038)之RPMI 1640=介質(Gibco by Life Technology, 目錄號42401-042)組成之培養基中。使用MACS人類NK細胞分離套組(Miltenyi Biotech, 目錄號130-092-657)根據製造商說明書自此等靜置人類PBMC純化NK細胞。NK細胞在37°C下在5% CO₂之水飽和大氣下在補充有IL-2 (Preprotech, 目錄號200-02, [100 U/mL])之介質中活化隔夜。

【0202】 如下製備iTreg。如上文所描述分離人類PBMC。使用人類

初始CD4 T細胞分離套組 II (Miltenyi Biotech, 目錄號130-094-131)根據製造商說明書分離初始CD4 T細胞。在由補充有加熱失活AB血清(Sigma, 目錄號H3667, [v/w 10%])、N-乙醯半胱胺酸(Sigma, 目錄號A9165, [2 mg/mL])、Glutamax (Gibco, 目錄號35050-038, 1x)、丙酮酸鈉(Gibco, 目錄號11360-070, 1x)、Hepes (Gibco, 目錄號15630-056, 1x)、非必需胺基酸(Gibco, 目錄號11140-035 Stock, 1x)、Pen/Strep (Gibco, 目錄號15070-063, 1x)、B-巰基乙醇(Gibco, 目錄號31350-010, [50 uM])、普留淨(Proleukin)/阿地介白素(aldesleukin) (Novartis, [300 U/mL])、雷帕黴素(Rapamycin) (Sigma, 目錄號R8781, [109 nM])及rhTGFb1 (Miltenyi Biotec, 目錄號130-095-066, [10 ng/mL])之X-Vivo 15 (Lonza,目錄號BE04-744Q)組成的Treg分化介質中將初始CD4 T細胞調節至 1×10^6 個細胞/毫升之細胞密度。對於T細胞活化，以1珠粒比1細胞之比率添加人類T活化CD3/CD28戴諾磁珠(dynabeads) (Gibco, 目錄號11131D)。在添加之前，珠粒用PBS洗滌一次。在37°C下在5% CO₂之水飽和大氣中以 $0.5-2 \times 10^6$ 個細胞/毫升之細胞密度分化iTreg持續6天。在過度生長的情況下，每日添加新製iTreg分化介質。在分化階段後，根據製造商說明書使用DynaMagnet移除戴諾磁珠。冷凍細胞直到進一步使用。在ADCC分析前一天，將iTreg解凍並使用Pkh-26紅光螢光細胞連接子套組(Sigma, 目錄號PKH26GL-1KT)根據製造商指令標記。簡言之，藉由在400×g、室溫下離心5分鐘來球粒化細胞並用RPMI-1640介質(不具有任何添加劑)洗滌兩次。在室溫下在所提供的含有Pkh-26染料之稀釋劑C (最終濃度 [1×10^{-6} M])中將細胞染色5分鐘。過量染料藉由添加FBS結合且此後在如上文所描述之介質中藉由3個洗滌步驟移除。

【0203】 將 0.2×10^5 個經PcH-26標記之iTreg細胞/孔接種於培養介質中之96孔U底部細胞培養盤中且在37°C及5% CO₂下在培育箱(Hera Cell 150)中儲存隔夜。如上文所描述製備IL-2活化NK細胞且以 1×10^5 個細胞/孔之密度添加。分別地將連續稀釋列之同型對照抗體、達利珠單抗、aCD25-a-686 GlyMAXX及aCD25-a-686添加至200 uL/孔之總體積。使細胞在37°C及5% CO₂下在培育箱(Hera Cell 150)中共培養6小時。

【0204】 此後，藉由在400×g、4°C下離心來球粒化全部細胞。球粒化粒用冰冷FACS緩衝液(DPBS (Gibco by Life Technologies, 目錄號14190 326) w/ BSA (0.1 % v/w, Sigma-Aldrich, 目錄號A9418)洗滌且在4°C下用LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell染料(ThermoFischer Scientific, 目錄號L34957, PBS中1:500稀釋)染色20分鐘。使用5-雷射LSR-Fortessa (具有DIVA軟體之BD Bioscience)使細胞經歷流式細胞量測術。活iTreg細胞經閘控(Aqua- , PcH-26+)且陽性細胞百分比用於計算比裂解。對於個別情況針對所使用抗體濃度繪製比裂解以分析所測試抗體之ADCC效能。

【0205】 活體外ADCP分析：

使用活體外分化之Treg作為靶細胞及單核球衍生之巨噬細胞作為效應子細胞來執行抗體依賴性細胞介導之噬菌作用(ADCP)分析。藉由Ficoll梯度離心將PBMC自白血球錐體分離。使用CD14微珠(Miltenyi Biotec)分離單核球(CD14+細胞)。單核球在50 ng/ml M-CSF的存在下在含有10% FBS (Sigma)、2 mM L-麩醯胺酸(Life Technologies)及10,000 U/ml Pen-Strep (Sigma)之RPMI 1640 (Life Technologies)中培養5天，3天後添加含有M-CSF之新製介質。使用人類Treg細胞分化套組(R&D Systems)分離調

節性T細胞(Treg)。根據製造商建議，此等細胞在37°C，5% CO₂潮濕培育箱中培育5天且標記有eFluor450染料(Invitrogen)。第5天，巨噬細胞及eFluor450-染料標記之Treg以10比1之效應子比標靶比率在抗CD25抗體或對照物的存在下共培養4小時，如隨後所描述。以1×10⁴個細胞/孔添加靶細胞(Treg)，同時以1×10⁵個細胞/孔添加效應子細胞(巨噬細胞)以實現10比1之效應子比標靶比率。接著以最高濃度1 µg/ml，隨後對數系列(7點)一式兩份添加抗CD25抗體。將細胞及抗體在37°C 5% CO₂下培育4小時。為評定ADCP，將細胞置放於冰上，經細胞表面標記物CD14 (CD14-PerCP-Cy5.5純系MfP9 BD Biosciences)染色且經eBioscience固定緩衝液固定。使用Fortessa LSR X20執行兩種顏色流式細胞量測分析。殘餘靶細胞定義為作為eFluor450-染料⁺/CD14⁻之細胞。巨噬細胞經定義為CD14⁺。將雙重標記之細胞(eFluor450-染料⁺/CD14⁺)視為藉由巨噬細胞表示標靶之噬菌作用。靶細胞之噬菌作用係藉由以下等式計算：噬菌作用% = 100 × [(雙陽性%)/(雙陽性%+殘餘標靶%)]。

【0206】統計數據：

Prism軟體(GraphPad)用於執行曲線擬合以測定EC50值及最大活性。

結果

【0207】 aCD25-a-686抗體(如已經鑑別且表徵於實例1中之其他CD25抗體)相對於其不干擾IL-2信號傳導之能力且其殺滅CD25表現靶細胞之能力而進行進一步評估。使用Octet之配位體結合分析展示aCD25-a-686並不影響IL-2結合於CD25 (圖6)。此確認，在STAT5分析中，無論所測試之IL-2濃度如何，aCD25-a-686及無岩藻糖基化aCD25-a-686不阻斷

IL-2信號傳導，而IL-2信號傳導由參考抗體達利珠單抗完全阻斷(圖8及圖25)。經展示以經由所謂的「Tac」抗原決定基(Queen C等人, 1989及Bielekova B, 2013)阻斷CD25與IL-2之相互作用的達利珠單抗結合於不同的抗原決定基而非aCD25-a-686 (圖7)，其可解釋為何在STAT5磷酸化分析中為何達利珠單抗阻斷IL-2信號傳導且aCD25-a-686及無岩藻糖基化aCD25-a-686不阻斷IL-2信號傳導(圖8及圖25)。另外，達利珠單抗降低活化T細胞之效應子反應(很可能由於其阻斷IL-2信號傳導)，同時aCD25-a-686不阻斷IL-2信號傳導)對於T細胞反應不具有負面影響(圖9)。最後，當與IgG1同種型抗體相比較時，aCD25-a-686經由ADCC (圖10)及ADCP (圖12)殺滅表現CD25之細胞、腫瘤細胞或調節性T細胞。與經由ADCC之未修飾CD25抗體相比較，a-海藻糖基化aCD25-a-686抗體進一步增強CD25陽性細胞之殺滅(圖11)。

【0208】如圖26中所展示，未修飾aCD25-a-686、無岩藻糖基化aCD25-a-686及達利珠單抗能夠介導ADCC且清除CD25陽性細胞。干擾IL-2結合於CD25之抗體達利珠單抗為最不強效的。干擾IL-2結合於CD25增加CD25陽性細胞上之IL-2信號傳導所需的IL-2濃度，此係由於僅低親和力IL-2受體為功能性的。與aCD25-a-686相比較之無岩藻糖基化aCD25-a-686之低無岩藻糖基化狀態增加具有相比於80%之97%更高最大裂解及[0.21 uG/mL]至[0.01 uG/mL]之更低EC₅₀值之的ADCC潛能。

【0209】總之，aCD25-a-686已表徵並展現CD25陽性細胞(Treg或癌細胞株)之強效殺滅且不干擾IL-2信號傳導且因此並未抑制第三效應反應。因此，aCD25-a-686為可作為單藥療法或以組合應用於治療癌症的清除Treg之抗體。

【0210】 實例3：產生CD25調節抗體藥劑之變體

【0211】 aCD25-a-686經歷進一步親和力成熟。藉由將多樣性引入至重鏈可變區中來執行最佳化。將抗體之CDRH3以及 1×10^8 種多樣性之CDRH1及CDRH2變體重組至預製庫中且藉由如初始發現中所描述的一個回合之MACS及四個回合之FACS執行選擇。在FACS回合中，該等庫查看PSR結合、物種交叉反應性、抗原交叉反應性及親和力壓力，且執行分類以便獲得具有具有所需特性之群體。對於此等選擇，藉由滴定生物素標記之單體抗原或藉由將生物素標記之抗原與親本Fab或IgG一起預培育30 min且接著將預複合混合物施加至酵母庫持續允許選擇達到均衡之時長來施加親和力壓力。接著能夠分類更高親和力抗體。

【0212】 針對哺乳動物產生選擇展示最佳親和力之變體且使用如上文實例1及2所描述之分析進一步表徵。

【0213】 結果

【0214】 針對進一步表徵選擇之變體抗體之序列(包括其互補決定區)展示於圖14至圖18及表2及表3中。

【0215】 表2：

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
aCD25-a-686	GTFSSLAIS (SEQ ID NO: 2)	GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 3)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m1	GTFSSLAIS (SEQ ID NO: 2)	AIIPVFGTASYAQKFQG (SEQ ID NO: 13)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m2	GTFSSLAIT (SEQ ID NO: 10)	GIPIFGDASYAQKFQG (SEQ ID NO: 14)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m3	GTFSSLAIS (SEQ ID NO: 2)	GIPIFGDANYAQKLQG (SEQ ID NO: 15)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m4	GTFSALAIS (SEQ ID NO: 11)	GIIPLFGRANYAQKFQG (SEQ ID NO: 16)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m5	GTFSSLAIF (SEQ ID NO: 12)	GIIPVFGQANYAQKFQG (SEQ ID NO: 17)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)

【0216】 表3：

	LCDR1	LCDR2	LCDR3
aCD25-a-686	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m1	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m2	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m3	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m4	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m5	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)

【0217】 Karpas 299細胞結合實驗確認變體抗體與CD25之結合相對於2倍與10倍之間的親本純系改良(圖21)。變體抗體以 10^{-8} M至 10^{-10} M範圍中之Kd值結合人類CD25胞外蛋白質序列且與親本純系相比較改良大約2至7倍(圖19)。

競爭分析展示變異抗體aCD25-a-686m1不與達利珠單抗或巴利昔單抗競爭，但的確與非阻斷抗體7G7B6及參考非阻斷劑aCD25-a-075競爭以用於結合於人類CD25 (圖20)。

【0218】 STAT5分析展示與親本純系aCD25-a-686相當，變體抗體CD25-a-686-m1、aCD25-a-686-m2、aCD25-a-686-m3、aCD25-a-686-m4及aCD25-a-686-m5不阻斷IL-2信號傳導，而IL-2信號傳導經參考抗體達利珠單抗完全阻斷(圖22)。已展示經由所謂的「Tac」抗原決定基阻斷CD25與IL-2之相互作用的達利珠單抗結合於不同抗原決定基而非aCD25-a-686及其變體，其可解釋在STAT5磷酸化分析中為何達利珠單抗阻斷IL-2信號傳導且aCD25-a-686及其變體不阻斷IL-2信號傳導(圖22)。

總之，aCD25-a-686變體抗體經展示不干擾IL-2信號傳導且類似於其親本純系。特定言之，儘管親和力成熟之aCD25-a-686變體抗體展示與細

胞及重組CD25之經增加結合，但變體並未在IL-2信號阻斷中展現任何增加。此確認與CD25上之所觀測到抗原決定基之結合可實現不阻斷經由CD25之IL-2信號傳導的所需效果。

【0219】 實例4：非阻斷抗體之治療性分析：

【0220】 在第0天，將含 1×10^7 個SU-DHL-1細胞之200 μ l RPMI 1640移植至右側腹中。在第12天，將具有可觸腫瘤之小鼠隨機分為用媒劑或aCD25-a-686 2 mg/kg每週兩次進行治療。在第15天，將腫瘤大小為100-200 mm^3 之小鼠經隨機分組並以2 mg/kg每週兩次給藥媒劑、aCD25-a-686或以10 mg/kg給藥單一劑量之aCD25-a-686。

【0221】 結果

【0222】 在活體內模型中，在給藥aCD25-a-686後，展示抑制腫瘤生長。以2 mg/kg每週兩次給抗體aCD25-a-686阻止9/10小鼠之可觸腫瘤之生長(圖23(A)至圖23 (B))。在腫瘤大小為100-200 mm^3 之小鼠中，aCD25-a-686亦以2 mg/kg每週兩次之劑量及單次劑量10 mg/kg阻止腫瘤生長(圖23(C)-(E))。

【0223】 實例5：小鼠模型實驗

材料及方法

*非IL-2阻斷抗體之治療活性：*自Charles River獲得之雌性BALB/c小鼠在側腹中皮下注射有含 3×10^5 個CT26腫瘤細胞之0%基質膠，n=15隻/組。基於第1天體重將動物隨機分為治療組。治療在第6天開始且小鼠藉由以200 μ g/動物一次注射各抗體(小鼠IgG2a同型、IL-2中和抗體、PC61 mIgG1、小鼠IgG1同型之抗小鼠CD25阻斷IL-2信號傳導及7D4 mIgG2a、小鼠IgG2a同型之抗小鼠CD25非阻斷IL-2信號傳導)進行治療。

動物接受單藥療法治療(每種抗體一個組)或7D4 mIgG2a及IL-2中和抗體或7D4 mIgG2a及PC61 mIgG1抗體之組合治療。當腫瘤體積達到2000 mm³或在第50天時(無論首先達成哪一個)處死小鼠。

【0224】 結果

抗CD25清除非IL-2阻斷抗體7D4 mIgG2a誘導經治療小鼠之腫瘤排斥，而當與同型對照小鼠IgG2a相比較時，其他抗體展示作為單藥療法無效果。與IL2-阻斷抗體組合，PC61 mIgG1或IL2 nAb消除非IL-2阻斷抗體7D4 mIgG2a之治療活性(圖24)。此展現7D4 mIgG2a之非IL-2阻斷特徵為治療活性之關鍵。亦表明此抗體之治療活性依賴於由第三效應子細胞介導之抗腫瘤免疫反應，其視最佳活性之IL-2信號傳導而定。此等結果展示不存在IL-2/CD25阻斷活性係CD25靶向抗體之最佳治療活性所需的且支持在癌症療法中使用如本文所描述的抗CD25非IL-2阻斷抗體。

【0225】 實例6：

在人類胰腺癌模型中測試無岩藻糖基化aCD25-a-686。伊派利單抗及MOXRO0916經測試作為參考化合物。伊派利單抗為清除CTLA-4陽性Treg細胞之免疫檢查點抑制劑。MOXRO0916為靶向Ox40之免疫促效劑，其已展示活體外清除之Treg細胞。

【0226】 BXPC3細胞(人類胰臟癌細胞)最初係自ECACC (歐洲細胞培養物保藏中心(European Collection of Cell Culture))獲得且在擴增後保藏於Glycart內部細胞庫中。在含有10% FCS (PAA Laboratories, Austria)、1% Glutamax之RPMI中培養BXPC3細胞。在37°C下在5% CO₂下在水飽和氛圍中培養細胞。藉由22G至30G針頭將含細胞之RPMI介質(w/o)及基質膠1:1 (100 uL)皮下注射於經麻醉人類化小鼠之側腹中。NSG

雌性小鼠由Charles River提供且自身移植有人類造血幹細胞(HSC)。根據定向指南(GV-Solas ; Felasa ; TierschG)，在特定無病原體條件下伴隨每天12小時光照/12小時黑暗循環來維持小鼠。實驗研究方案經審閱且由當地政府批准(ZH193-2014)。動物在到達之後維持一週以使其適應新環境且進行觀察。在常規基礎上進行連續健康監測。對於人類化，對小鼠注射硫酸布他卡因(Busulfan) (15 20 mg/kg)，24小時後注射100,000人類HSC (購自StemCell Technologies)。

【0227】 在細胞注射前14天，小鼠經抽血且篩選血液中人類T細胞之量並因此隨機分組。在研究第0天對小鼠皮下注射 1×10^6 BxPC3。在整個實驗期間藉由測徑規每週量測腫瘤2至3次。在第14天，針對腫瘤大小對小鼠進行隨機分組，其中平均腫瘤大小為 237 mm^3 。第21天，小鼠腹膜內接受單一注射媒劑、無岩藻糖基化aCD25-a-686 [4 mg/kg]、MOXRO0916 [10 mg/kg]或伊派利單抗[10 mg/kg]。治療組為媒劑、無岩藻糖基化aCD25-a-686及伊派利單抗。對所有小鼠均靜脈內注射200 μl 適當溶液。媒劑組中之小鼠用組胺酸緩衝液注射。為每200 μl 獲得適當量化合物，必要時用組胺酸緩衝液稀釋儲備溶液。未觀測到不良跡象且小鼠很好地耐受治療。在研究第24天終止實驗。

【0228】 在結束日(第24天)採集腫瘤、血液及脾且儲存於PBS中直至製備單細胞懸浮液。根據製造商之說明書在室溫下使用BD Pharm溶解緩衝液(BD，目錄號555899)進行全血樣本之溶血作用持續3分鐘。藉由經由細胞過濾器(耐綸過濾器70 μm ，BD Falcon)進行脾之均質化，隨後為如上文所描述之溶血作用來分離脾細胞。藉由使用gentleMACS解離劑(Miltenyi)及在37°C下用DNase I ([0.025mg/mL], RocheDiagnostics, 目

錄號11284932001)及膠原蛋白酶D ([1 mG/mL], RocheDiagnostics, 目錄號11088882001)溶解均質物30分鐘來製備腫瘤單細胞懸浮液。其後，經由細胞過濾器(耐綸過濾器70 um，BD Falcon)過濾細胞懸浮液以移除殘渣。用盈餘冰冷FACS緩衝液洗滌所有制劑。在存在經純化大鼠抗小鼠CD16/CD32 (純系2.4G2, BD, 目錄號553142)的情況下，在4°C之黑暗下，在FACS緩衝液中，細胞經螢光染料共軛抗體抗人類CD3 (純系OKT3, BioLegend, 目錄號- 317322)、CD4 (純系OKT4, BioLegend, 目錄號317434)、CD8 (純系SK1, BD, 目錄號564629)、CD25 (純系2A3, BD Pharmingen, 目錄號335824.)、CTLA-4 (純系BNI3, BioLegend, 目錄號368514)及CD45 (純系, 純系: 2D1, BioLegend, 目錄號368514)表面染色30 min。對於FoxP3偵測，使用Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set(eBioscience, 目錄號00-5523-00)及抗人類FoxP3 (純系150D/E, eBioscience, 目錄號12-4774-42)根據製造商的說明書染色細胞。在次日使用5-雷射LSR-Fortessa (具有DIVA軟體之BD Bioscience)獲得樣品之前，將樣品再懸浮於FACS緩衝液中。Tregs (CD45+、CD3+、CD4+、CD25+、FoxP3+)及活化CD8 T細胞(CD45+、CD3+、CD8+、CTLA4+)經閘控，標準化計數(每微升血液，每毫克脾或每毫克腫瘤)計算且針對個別治療組繪製值。

【0229】結果：

抗CD25抗體無岩藻糖基化aCD25-a-686展示選擇性清除瘤內Treg細胞。使用注射有BxPC-3 (表現CEA之人類胰腺癌細胞株)之人類化小鼠。CD8 T細胞以及Treg細胞隨時間浸潤腫瘤基質，但CD8 T細胞不能夠控制腫瘤生長。在單一注射無岩藻糖基化aCD25-a-686以及MOXRO0916及伊

派利單抗後比較注射72小時後之化CD8 T細胞以及調節CD4 T細胞之瘤內數

【0230】 與經媒劑治療之對照動物相比較，所有抗體能夠減少瘤內Treg數，但在投與無岩藻糖基化aCD25-a-686後，僅瘤內活化CD8 T細胞數之增加顯而易見(圖27)。因此，僅無岩藻糖基化aCD25-a-686允許選擇性清除未閹控CD8 T細胞之擴增的瘤內Treg。由於療法後72小時所有動物終止以便分離腫瘤以用於瘤內淋巴球評估，因此不可能追蹤腫瘤生長持續經延長時間。然而，72小時後，與經媒劑治療之對照動物相比較，存在經無岩藻糖基化aCD25-a-686治療之動物之腫瘤體積減小的趨勢。

【0231】 序列

包括於應用中之序列概述提供於以下：

SEQ ID NO	抗體序列之描述	亦稱作
1	人類CD25	Uniprot碼P01589
2	aCD25-a-686可變重鏈CDR1	CD25-a-686-HCDR1 aCD25-a-686-m1 - HCDR1 aCD25-a-686-m3 - HCDR1
3	aCD25-a-686可變重鏈CDR2	aCD25-a-686-HCDR2
4	aCD25-a-686可變重鏈CDR3	aCD25-a-686-HCDR3 aCD25-a-686-m1-HCDR3 aCD25-a-686-m2-HCDR3 aCD25-a-686-m3-HCDR3 aCD25-a-686-m4-HCDR3 aCD25-a-686-m5-HCDR3
5	aCD25-a-686可變重鏈CDR 1、2、3及FR 1、2、3、4	aCD25-a-686-HCDR123 aCD25-a-686之可變重鏈序列
6	aCD25-a-686可變輕鏈CDR1	aCD25-a-686-LCDR1 aCD25-a-686-m1-LCDR1 aCD25-a-686-m2-LCDR1 aCD25-a-686-m3-LCDR1 aCD25-a-686-m4-LCDR1 aCD25-a-686-m5-LCDR1
7	aCD25-a-686可變輕鏈CDR2	aCD25-a-686-LCDR2 aCD25-a-686-m1-LCDR2 aCD25-a-686-m2-LCDR2 aCD25-a-686-m3-LCDR2 aCD25-a-686-m4-LCDR2 aCD25-a-686-m5-LCDR2

8	aCD25-a-686可變輕鏈CDR3	aCD25-a-686-LCDR3 aCD25-a-686-m1-LCDR3 aCD25-a-686-m2-LCDR3 aCD25-a-686-m3-LCDR3 aCD25-a-686-m4-LCDR3 aCD25-a-686-m5-LCDR3
9	aCD25-a-686可變輕鏈CDR 1、2、3及FR 1、2、3、4	aCD25-a-686-LCDR123 aCD25-a-686-m1-LCDR123 aCD25-a-686-m2-LCDR123 aCD25-a-686-m3-LCDR123 aCD25-a-686-m4-LCDR123 aCD25-a-686-m5-LCDR123 aCD25-a-686之可變輕鏈序列 aCD25-a-686-m1之變輕鏈序列 aCD25-a-686-m2之變輕鏈序列 aCD25-a-686-m3之變輕鏈序列 aCD25-a-686-m4之變輕鏈序列 aCD25-a-686-m5之變輕鏈序列
10	aCD25-a-686-m2可變重鏈CDR1	aCD25-a-686-m2 - HCDR1
11	aCD25-a-686-m4可變重鏈CDR1	aCD25-a-686-m4 - HCDR1
12	aCD25-a-686-m5可變重鏈CDR1	aCD25-a-686-m5 - HCDR1
13	aCD25-a-686-m1可變重鏈CDR2	aCD25-a-686-m1 - HCDR2
14	aCD25-a-686-m2可變重鏈CDR2	aCD25-a-686-m2 - HCDR2
15	aCD25-a-686-m3可變重鏈CDR2	aCD25-a-686-m3 - HCDR2
16	aCD25-a-686-m4可變重鏈CDR2	aCD25-a-686-m4 - HCDR2
17	aCD25-a-686-m5可變重鏈CDR2	aCD25-a-686-m5 - HCDR2
18	aCD25-a-686-m1可變重鏈CDR 1、2、3及FR 1、2、3、4	aCD25-a-686-m1-HCDR123 aCD25-a-686-m1之可變重鏈序列
19	aCD25-a-686-m2可變重鏈CDR 1、2、3及FR 1、2、3、4	aCD25-a-686-m2-HCDR123 aCD25-a-686-m2之可變重鏈序列
20	aCD25-a-686-m3可變重鏈CDR 1、2、3及FR 1、2、3、4	aCD25-a-686-m3-HCDR123 aCD25-a-686-m3之可變重鏈序列
21	aCD25-a-686-m4可變重鏈CDR 1、2、3及FR 1、2、3、4	aCD25-a-686-m4-HCDR123 aCD25-a-686-m4之可變重鏈序列
22	aCD25-a-686-m5可變重鏈CDR 1、2、3及FR 1、2、3、4	aCD25-a-686-m5-HCDR123 aCD25-a-686-m5之可變重鏈序列
23	抗原決定基	aCD25ep-a
24	抗原決定基	aCD25ep-b
25	抗原決定基	aCD25ep-c

等效物及範疇

【0232】 熟習此項技術者將瞭解本發明由所附申請專利範圍限定而並非由包括於本文中之實例或某些實施例之其他描述限定。

【0233】 類似地，除非上下文另外明確規定，否則單數形式「一 (a/an)」及「該」包括複數個指示物。

【0234】 除非上文另外規定，否則本文中所用之所有技術及科學術語具有與一般熟習此項技術者通常所理解相同的含義。類似於或等效於本文中所描述之方法及材料的方法及材料可用於實踐或測試本發明之型式。一般而言，本文中所描述之與細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學及蛋白與核酸化學使用的命名法及其技術為此項技術中熟知且常用者，或根據製造商的說明書。

【0235】 本文所提及之全部公開案均以引用之方式併入本文中，以揭示及描述與所引用之公開案相關的方法及/或材料。

參考

Barnard GC et al., 2010. J Ind Microbiol Biotechnol. 37:961-71.

Beck A et al., 2017. Nat Rev Drug Discov. 16:315-337.

Bielekova B., 2013. Neurotherapeutics, 10(1):55-67

Dantal J et al., 1991, Transplantation 52:110-5

Estep P et al., 2013 MAbs. 5(2):270-8.

Kearns JD et al., 2015. Mol Cancer Ther. 14:1625-36.

Kijanka M et al., 2015. Nanomedicine. 10:161-174.

Langedijk JP et al., 2011. Analytical Biochemistry. 417:149-155.

Liu L, 2015. J Pharm Sci. 104:1866-84.

Liu Y et al., 2014. MAbs. 6:483-92.

Lowenthal J.W et al., 1985. J. Immunol., 135, 3988-3994

Moreau, J.-L et al., 1987. Eur. J. Immunol. 17,929-935;

Onishi H et al., 2012 Anticanc. Res. 32, 997-1003

Queen C et al., 1989. PNAS. 86(24):10029-10033

Redman JM et al., 2015. Mol Immunol. 67: 28-45.

Setiady Y et al., 2010. Eur J Immunol. 40:780-6),

Shang B et al., 2015, Sci Rep. 5:15179

Siegel RW et al., 2004. J Immunol Methods. 286:141-53.

Sliwkowski M & Mellman I, 2013. Science. 341:1192-8.

Timmermann P et al., 2007, J. Mol. Recognit., 20, 283-99.

Volk HD et al., 1989 Clin. exp. Immunol. 76, 121-5

Vazquez-Lombardi R et al., 2015. Drug Discov Today. 20:1271-83.

Xu Y et al., 2013. Protein Eng Des Sel. 26:663-70

Smyth M et al., 2014, Immunol Cell Biol. 92, 473-4

Elpek et al., 2007 J Immunol. 178(11):6840-8.;

Golgher et al., 2002 Eur J Immunol. 32(11):3267-75;

Jones et al., 2002; Cancer Immun. 22;2:1

Onizuka et al., 1999 Cancer Res. 59(13):3128-33.;

Shimizu et al., 1999 J Immunol.163(10):5211-8

Hodi et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 3005-3010

Quezada et al., 2006, J Clin Invest.116(7):1935-45

Vargas A et al., 2017, Immunity, 46(4):577-586)

Kohm A et al., 2006, J Immunol. 176: 3301-5;

Hallett W et al., 2008. Biol Blood Marrow Transplant 14:1088-1099;

Fecci P et al., 2006 Clin Cancer Res. 12:4294-4305;
 McNeill A et al., 2007. Scand J Immunol 65: 63-9;
 Couper K et al., 2007. J Immunol. 178: 4136-4146;
 O'Mahony D et al, 2008, Blood, 112(11), 231;
 Oh et al, 2017, Oncotarget 8(29) 47440-4753;
 Kreitman RJ et al, 2016, Clin Cancer Res, 22(2) 310-318;
 Flynn MJ et al 2016, Mol Cancer Ther 15(11) 2709-2721;
 Ellington et al. Nature. 1990; 346(6287): 818-822;
 Tuerk et al., Science. 1990; 249(4968):505-510;
 Ni et al., Curr Med Che 2011; 18(27):4206-14.
 Jarasch A et al, Pharm Sci. 2015 Jun;104(6):1885-1898;
 Rajpal *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(24):8466-71;
 Steinwand *et al.*, MAbs, 2014, 6(1):204-18

【序列表】

<110> 英商塔斯克療法有限公司
英商癌症研究科技股份有限公司

<120> 抗-CD25抗體藥劑

<130> P115242WO

<150> US62642248

<151> 2018-03-13

<i60> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> i

<211> 272

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val
i 5 10 15

Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro
20 25 30

His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn
35 40 45

Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr
50 55 60

Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys
65 70 75 80

Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro
85 90 95

Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro
100 105 110

Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val
130 135 140

Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His
145 150 155 160

Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg
165 170 175

Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln
180 185 190

Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu
195 200 205

Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr
210 215 220

Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln
225 230 235 240

Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu
245 250 255

Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile
260 265 270

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Gly Thr Phe Ser Ser Leu Ala Ile Ser
1 5

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Ala Arg Gly Gly Ser Val Ser Gly Thr Leu Val Asp Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Leu
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Ser Val Ser Gly Thr Leu Val Asp Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人
<400> 7

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 8

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Ile Thr
1 5

<210> 9

<211> 107
<212> PRT
<213> 智人
<400> 9
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 10
Gly Thr Phe Ser Ser Leu Ala Ile Thr
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 11
Gly Thr Phe Ser Ala Leu Ala Ile Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 12
Gly Thr Phe Ser Ser Leu Ala Ile Phe
1 5

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Ala Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Asp Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Asp Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Arg Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Gln Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
i 5 10 15

Gly

<210> 18
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

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

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

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

Gly Ala Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Ser Val Ser Gly Thr Leu Val Asp Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

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

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

Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Asp Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Ser Val Ser Gly Thr Leu Val Asp Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Asp Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Ser Val Ser Gly Thr Leu Val Asp Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Arg Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Ser Val Ser Gly Thr Leu Val Asp Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

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

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

Ala Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Gln Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Ser Val Ser Gly Thr Leu Val Asp Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser
1 5 10 15

<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys
1 5 10 15

Arg Gly Phe Arg
20

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe
1 5



202003034

【發明摘要】**【中文發明名稱】**

抗-CD25抗體藥劑

【英文發明名稱】

ANTI-CD25 ANTIBODY AGENTS

【中文】

本發明提供在結合於人類CD25之抗體中發現的抗體序列。特別地，本發明提供抗人類CD25抗體之序列，其不阻斷CD25與IL-2之結合或IL-2信號傳導。包括此序列之抗體及其抗原結合部分可用於醫藥組合物及治療方法中，特別是用於治療癌症。

【英文】

The present disclosure provides antibody sequences found in antibodies that bind to human CD25. In particular, the present disclosure provides sequences of anti-human CD25 antibodies, which do not block the binding of CD25 to IL-2 or IL-2 signalling. Antibodies and antigen-binding portions thereof including such sequences can be used in pharmaceutical composition and methods of treatment, in particular for treating cancer.

【指定代表圖】

圖8

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種抗體或其抗原結合片段，其包含aCD25-a-686-HCDR3胺基酸序列(SEQ ID NO: 4)作為可變重鏈互補決定區3。

【第2項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其進一步包含

a) aCD25-a-686-HCDR1胺基酸序列(SEQ ID NO: 2)，作為可變重鏈互補決定區1；及

b) aCD25-a-686-HCDR2胺基酸序列(SEQ ID NO: 3)，作為可變重鏈互補決定區2。

【第3項】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其進一步包含：

a) aCD25-a-686-LCDR1胺基酸序列(SEQ ID NO: 6)，作為可變輕鏈互補決定區1；

b) aCD25-a-686-LCDR2胺基酸序列(SEQ ID NO: 7)，作為可變輕鏈互補決定區2；及

c) aCD25-a-686-LCDR3胺基酸序列(SEQ ID NO: 8)，作為可變輕鏈互補決定區3。

【第4項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈，該可變重鏈包含aCD25-a-686-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 5)。

【第5項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含aCD25-a-686-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)。

【第6項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為單株抗體、域抗體、單鏈抗體、Fab片段、F(ab')₂片段、單鏈可變片段(scFv)、scFv-Fc片段、單鏈抗體(scAb)或單域抗體。

【第7項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為兔、小鼠、嵌合、人類化或完全人類抗原結合抗體。

【第8項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體選自由以下組成之群：IgG1、IgG2、IgG3及IgG4同型(isotype)抗體。

【第9項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含於雙特異性抗體、多特異性抗體，或另包含治療劑或診斷劑之免疫共軛物中。

【第10項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合人類CD25之胞外域。

【第11項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合在表面上表現人類CD25之細胞且為抗CD25抗體藥劑。

【第12項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段不抑制介白素-2 (IL-2)與CD25之結合。

【第13項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段不抑制經由CD25信號傳導介白素-2 (IL-2)。

【第14項】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係無岩藻糖基化。

【第15項】

一種抗體或抗原結合片段，其特異性結合於人類CD25之抗原決定基，其中該抗原決定基包含一或多個包含於SEQ ID NO: 1之胺基酸70-84中之胺基酸殘基。

【第16項】

如請求項15之抗體或抗原結合片段，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO: 1之胺基酸70-84。

【第17項】

一種如請求項1至16中任一項之抗體或其抗原結合片段之親和力成熟之變體。

【第18項】

如請求項17之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含選自由以下組成之群的HCDR2區：AIIPVFGTASYAQKFQG (SEQ ID NO: 13)、GIIPIFGDASYAQKFQG (SEQ ID NO: 14)、

GIIPIFGDANYA QKLQG (SEQ ID NO: 15)、GIIPLFGRANYAQKFQG (SEQ ID NO: 16)及GIIPVFGQANYAQKFQG (SEQ ID NO: 17)。

【第19項】

如請求項17之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含選自由以下組成之群的HCDR1區：GTFSSLAIT (SEQ ID NO: 10)、GTFSSLAIS (SEQ ID NO: 2)、GTFSA LAIS (SEQ ID NO: 11)及GTFSSL AIF (SEQ ID NO: 12)。

【第20項】

如請求項17至19中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈，該可變重鏈包含選自以下之序列：aCD25-a-686-m1-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 18)、aCD25-a-686-m2-HCDR 123胺基酸序列(SEQ ID NO: 19)、aCD25-a-686-m3-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 20)、aCD25-a-686-m4-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 21)及aCD25-a-686-m5-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 22)。

【第21項】

如請求項17至20中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含選自以下之序列：aCD25-a-686-m1-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)、aCD25-a-686-m2-LCDR 123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)、aCD25-a-686-m3-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)、aCD25-a-686-m4-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)及aCD25-a-686-m5-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)。

【第22項】

如請求項17至21中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

a)包含aCD25-a-686-m1-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 18)之可變重鏈及包含aCD25-a-686-m1-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)之可變輕鏈；

b)包含aCD25-a-686-m2-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 19)之可變重鏈及包含aCD25-a-686-m2-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)之可變輕鏈；

c)包含aCD25-a-686-m3-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 20)之可變重鏈及包含aCD25-a-686-m3-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)之可變輕鏈；

d)包含aCD25-a-686-m4-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 21)之可變重鏈及包含aCD25-a-686-m4-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)之可變輕鏈；或

e)包含aCD25-a-686-m5-HCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 22)之可變重鏈及包含aCD25-a-686-m5-LCDR123胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)之可變輕鏈。

【第23項】

一種核酸分子，其編碼如請求項1至22中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【第24項】

一種核酸載體，其包含如請求項23之核酸分子。

【第25項】

一種宿主細胞，其包含如請求項24之核酸載體。

【第26項】

一種用於產生如請求項1至22中任一項之抗體或其抗原結合片段的方法，其包含培養如請求項25之宿主細胞。

【第27項】

一種組合物，其包含如請求項1至22中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【第28項】

如請求項27之組合物，其進一步包含醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【第29項】

如請求項27或請求項28之醫藥組合物，其中該組合物用於治療癌症。

【第30項】

一種如請求項1至22中任一項之抗體或其抗原結合片段或如請求項27或28之組合物的用途，其用於製造用於治療癌症之藥物。

【第31項】

一種與如請求項1至22中任一項之抗體競爭結合CD25之抗體或其抗原結合片段的用途，其用於製造用於治療癌症之藥物。

【第32項】

一種治療個體癌症之方法，其包含向該個體投與有效量之如請求項27或請求項28之組合物。

【第33項】

一種治療個體癌症之方法，其包含向該個體投與有效量之與如請求項1至22中任一項之抗體競爭結合CD25的抗體或其抗原結合片段。

【第34項】

如請求項32或33之方法，其進一步包含同時或以任何順序依序向該個體投與第二藥劑。

【第35項】

如請求項34之方法，其中該第二藥劑為免疫檢查點抑制劑或癌症疫苗。

【第36項】

如請求項35之方法，其中該第二藥劑為免疫檢查點抑制劑，其中該免疫檢查點抑制劑為PD-1拮抗劑。

【第37項】

如請求項36之方法，其中該PD-1拮抗劑為抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體。

【第38項】

如請求項32至37中任一項之方法，其中該個體具有實體腫瘤。

【第39項】

如請求項32至37中任一項之方法，其中該個體具有血液癌瘤。

【第40項】

一種清除(depleting)個體之腫瘤中調節性T細胞的方法，其包含投與有效量之如請求項27或請求項28之組合物或與如請求項1至22中任一項之抗體競爭結合CD25的抗體或抗原結合片段之步驟。

【第41項】

如請求項40之方法，其中該個體具有實體腫瘤。

【第42項】

如請求項40之方法，其中該個體具有血液癌瘤。

【第43項】

一種與如請求項1至22中任一項之抗體競爭結合CD25的抗體或抗原結合片段，其用於治療癌症。

【第44項】

一種套組，其在容器中包含如請求項27或請求項28之組合物。

【第45項】

一種製備抗CD25抗體之方法，其包含提供如請求項1至22中任一項之抗體，及使該抗體經歷親和力成熟，其中產生的抗CD25抗體對CD25之親和力大於親本抗體。

【第46項】

一種製備醫藥組合物之方法，其包含提供如請求項45之方法製備的抗體及使該抗體與至少一或多種醫藥學上可接受之賦形劑共調配。

【發明圖式】

aCD25-a-686-HCDR1
GTFSSLAIS

aCD25-a-686-HCDR2
GIIPIFGTANYAQKFQG

aCD25-a-686-HCDR3
ARGGSVSGTLVDFDI

aCD25-a-686-HCDR123:
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSLAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPF
GTANYAQKFQGGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSVSGTLVDFDI
WGQGTMTVSS

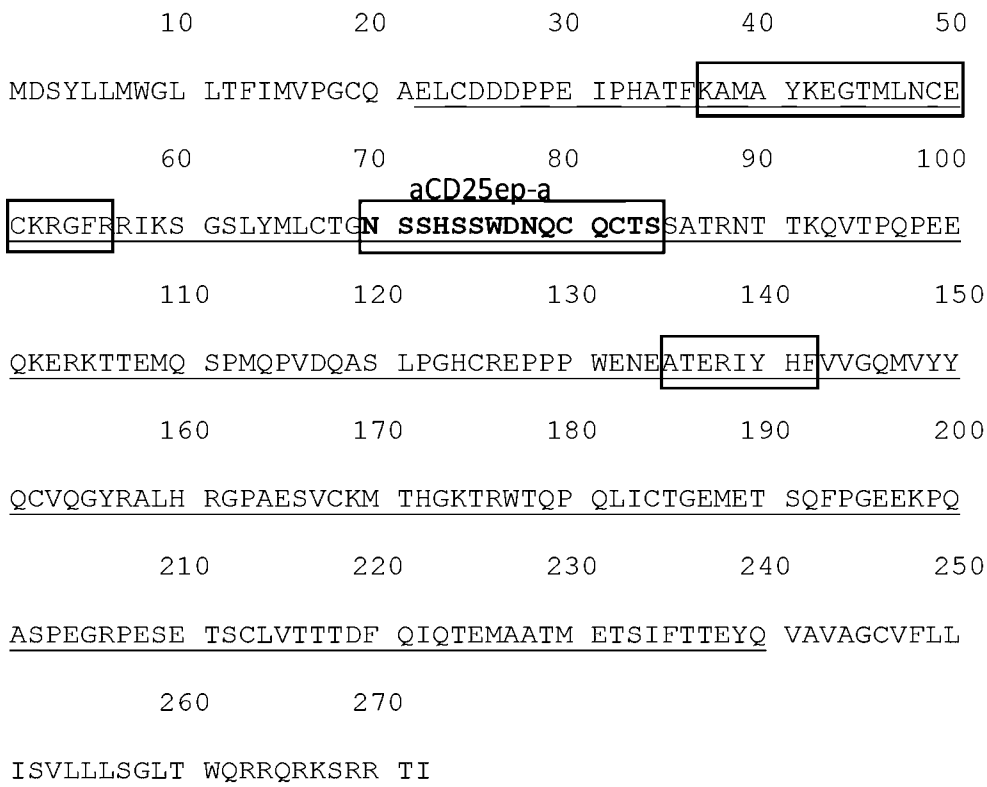
aCD25-a-686-LCDR1
RASQSISSWLA

aCD25-a-686-LCDR2
KASSLES

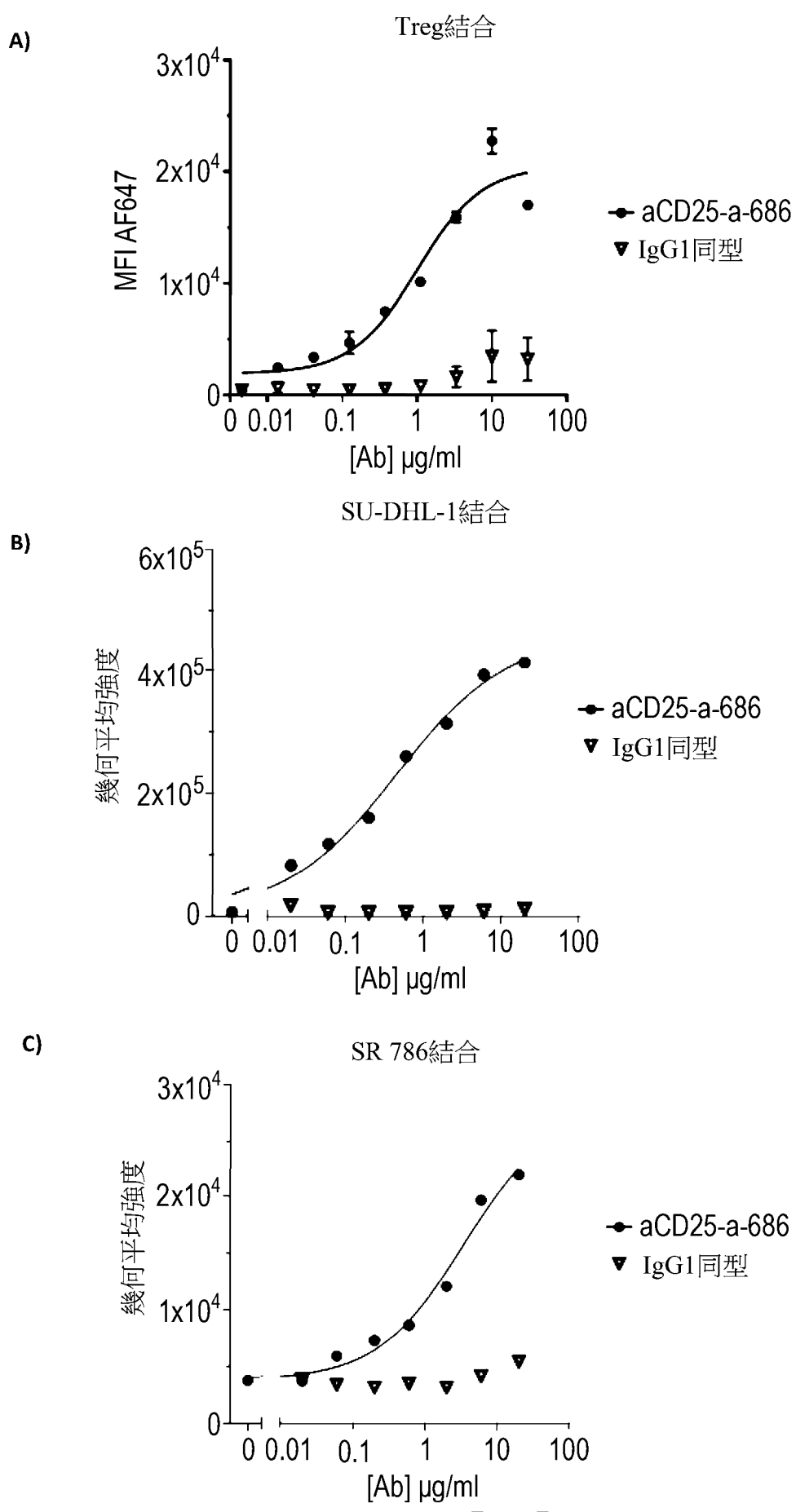
aCD25-a-686-LCDR3
QQYNIYPIT

aCD25-a-686-LCDR123
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESG
VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNIYPITFGGGTKVEIK

【圖1】



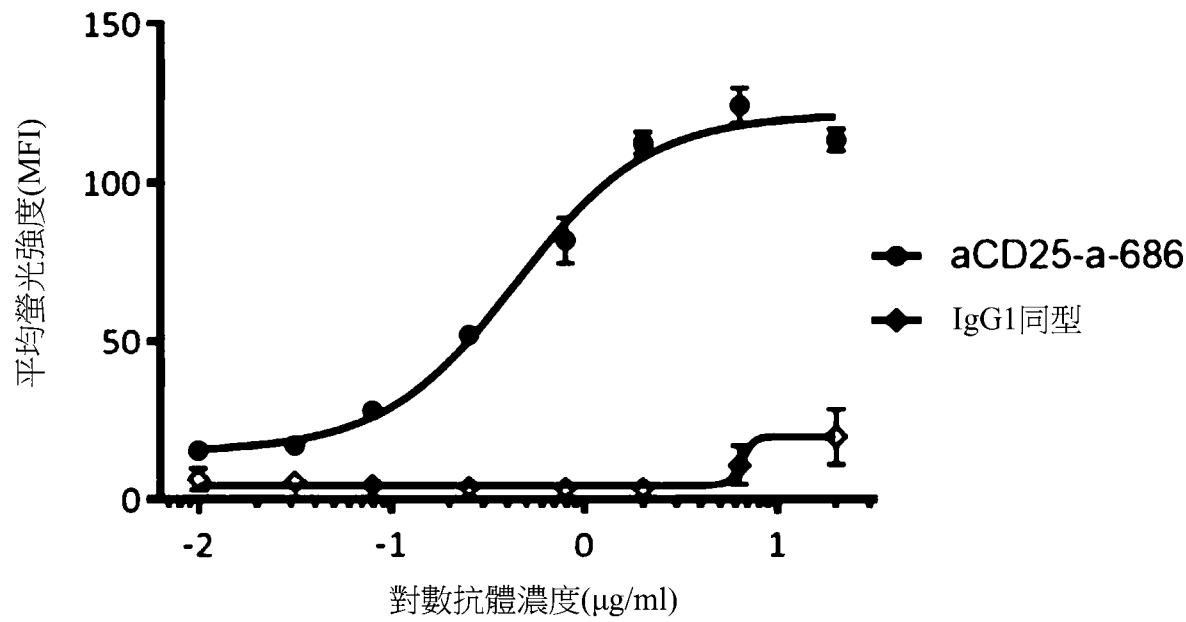
【圖2】



【圖3】

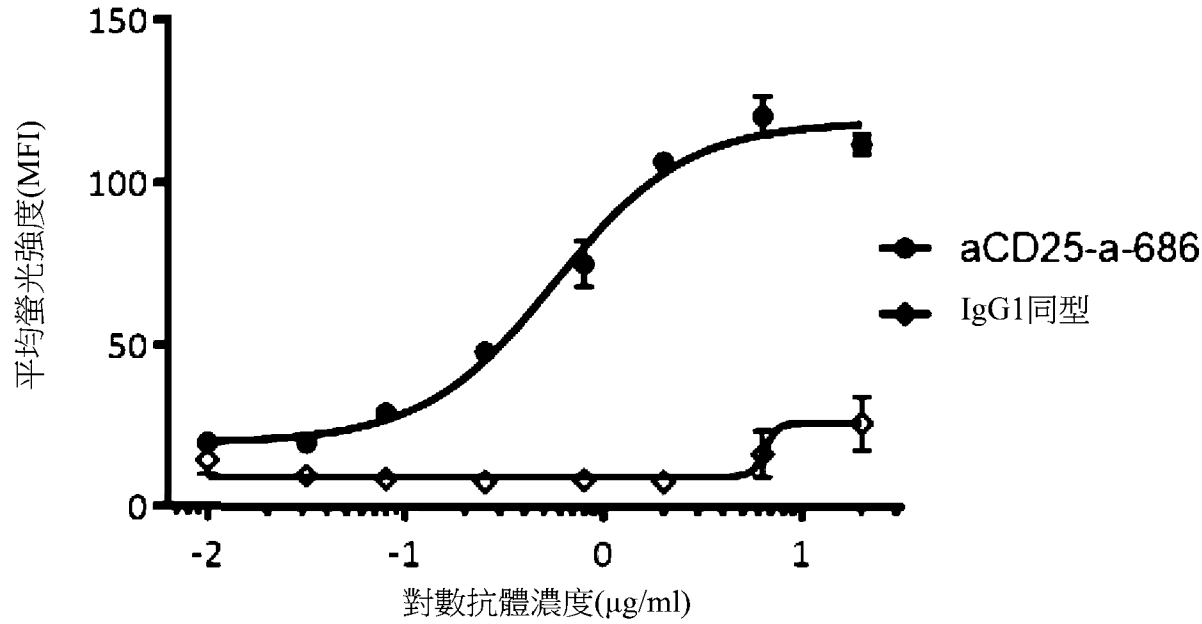
A)

人類供體CD25結合(在CD4+ T細胞上閘控)

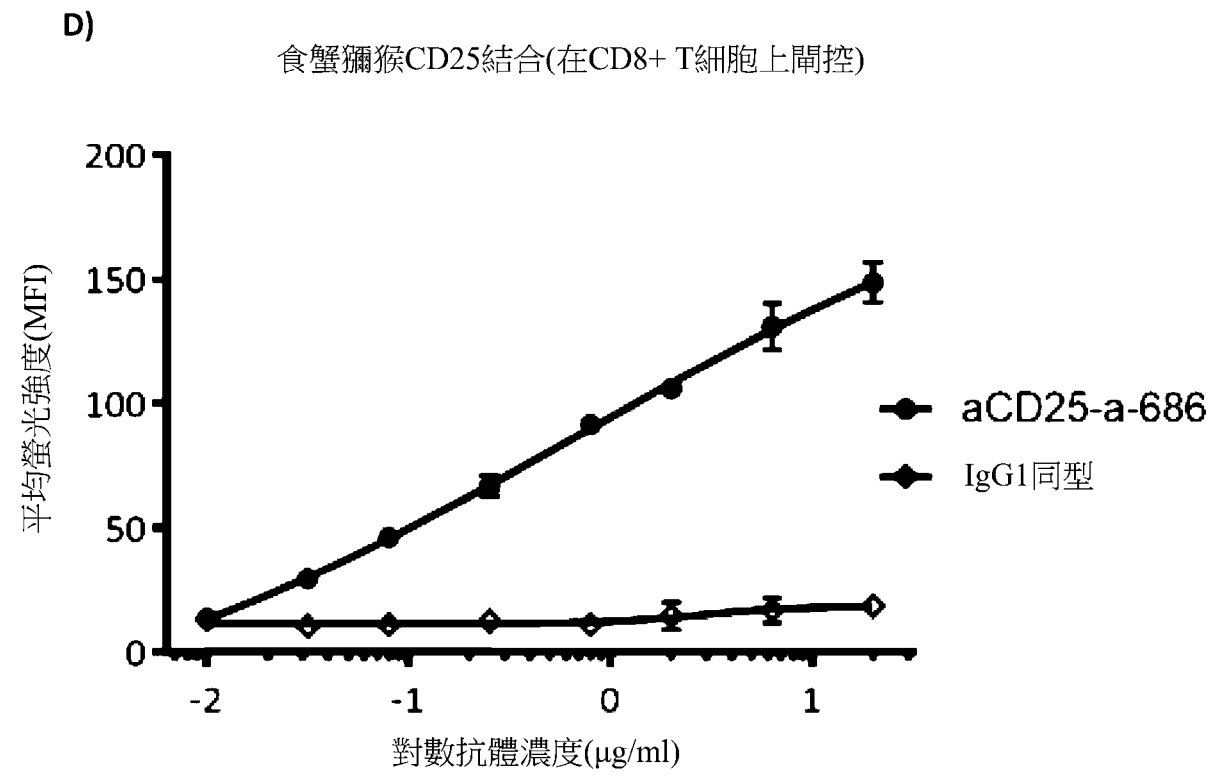
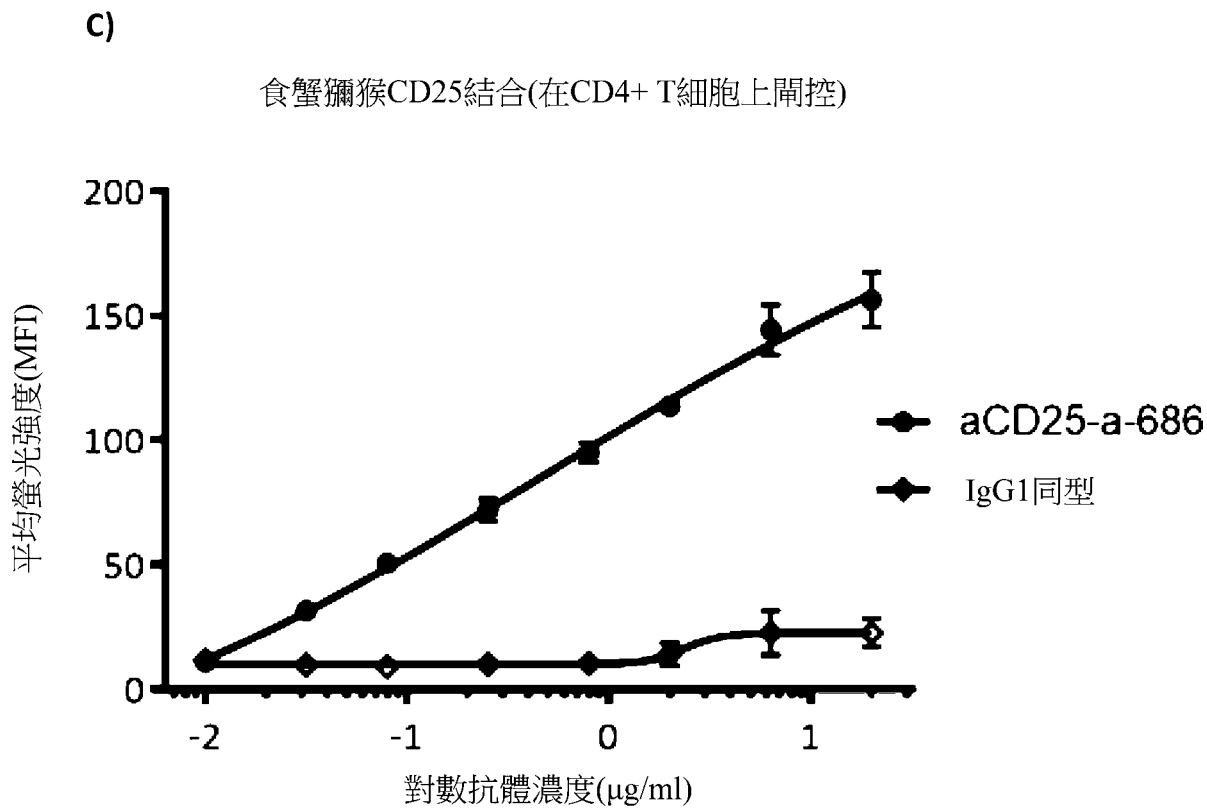


B)

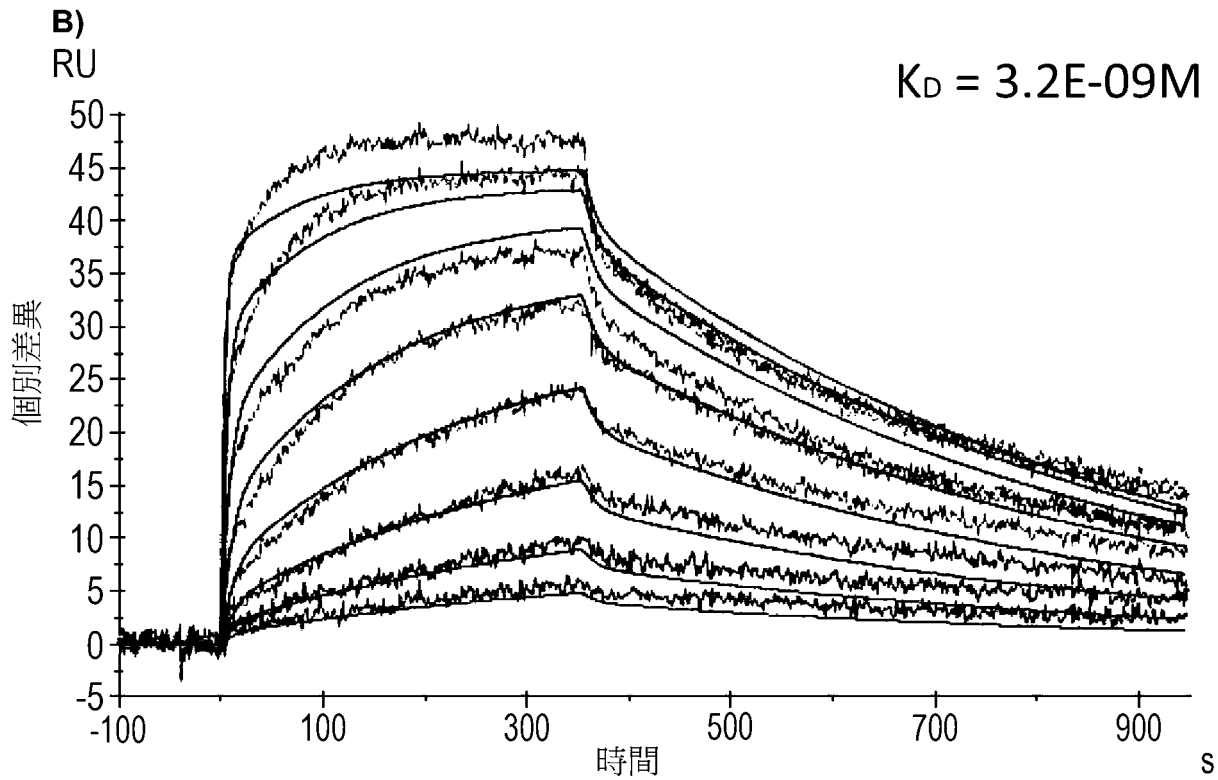
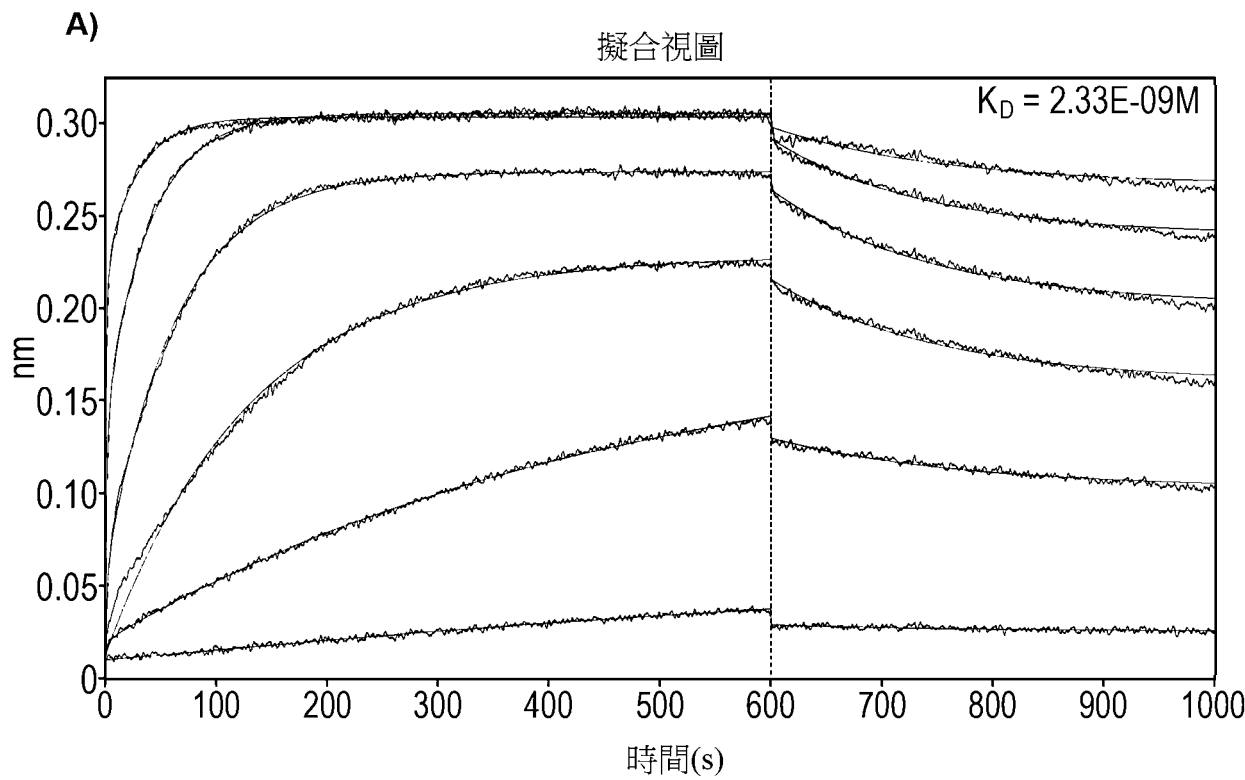
人類供體CD25 結合(在CD8+ T細胞上閘控)



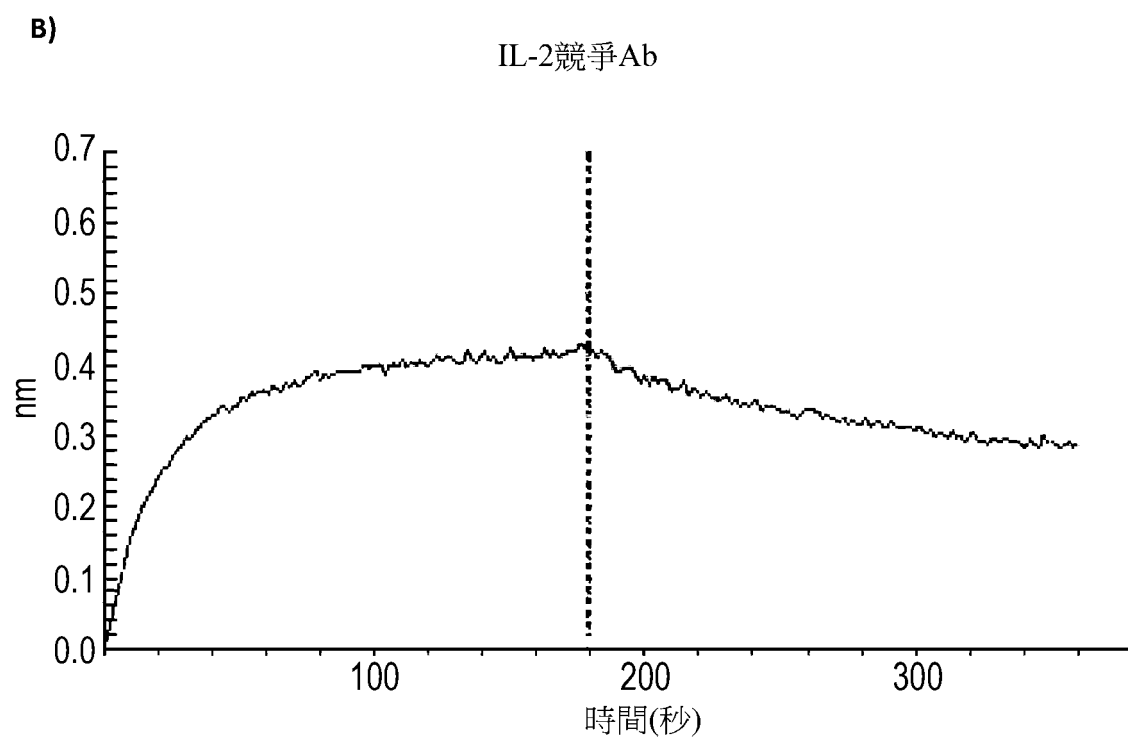
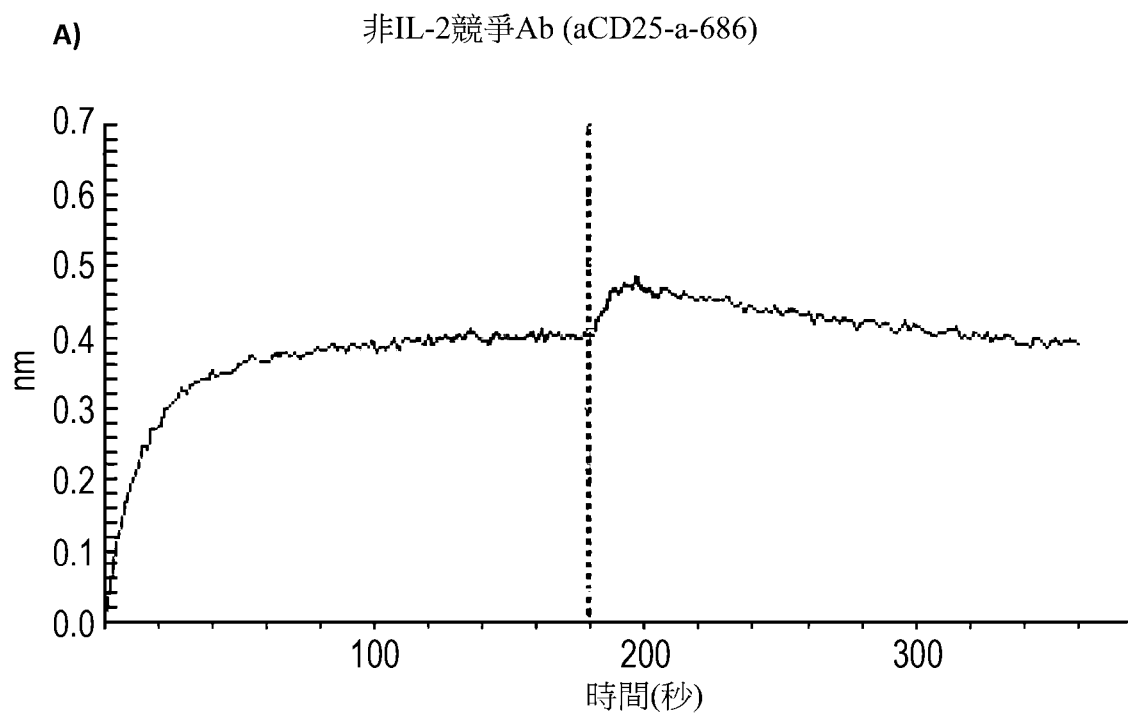
【圖4】



【圖4】(續)

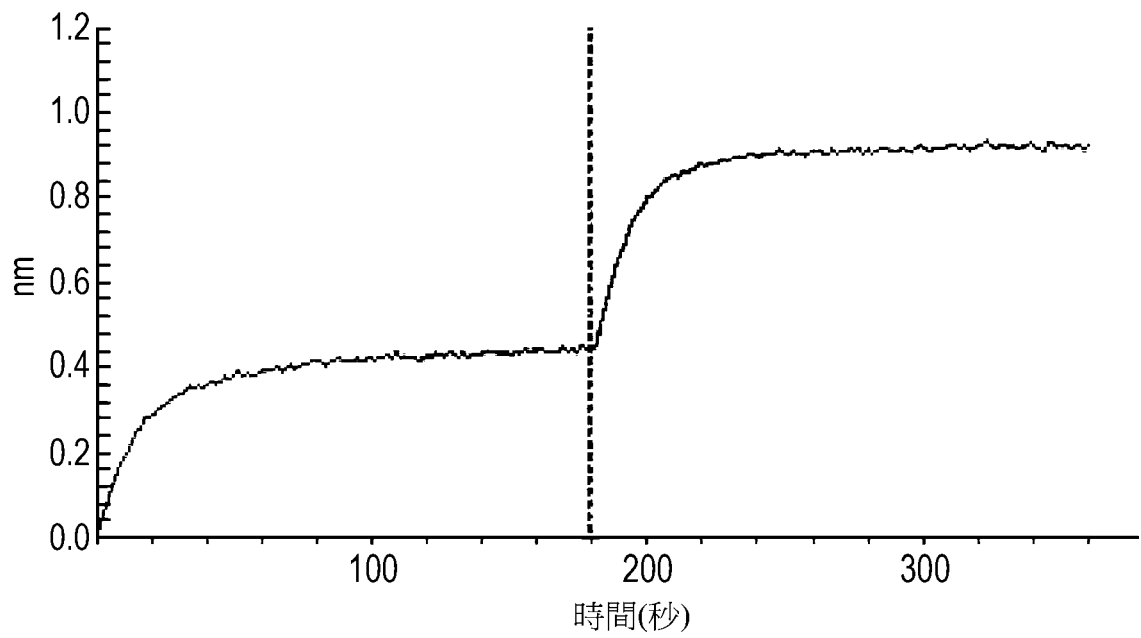


【圖5】



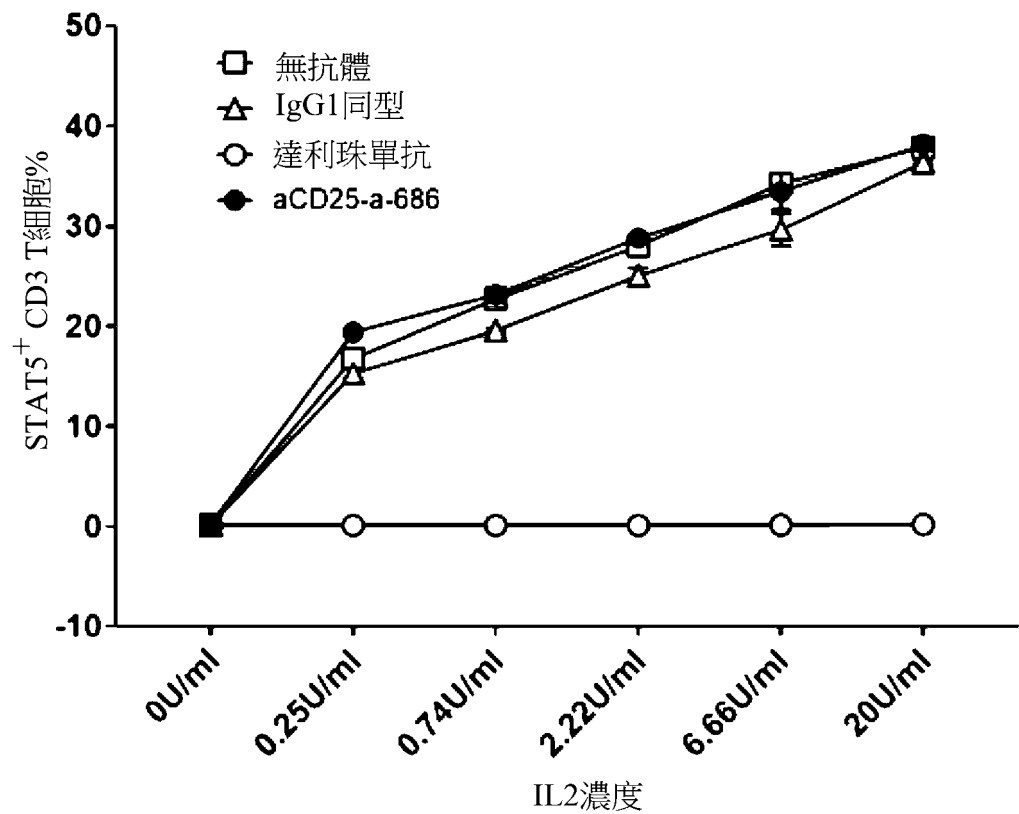
【圖6】

經由Octet測定競爭結合於達利珠單抗

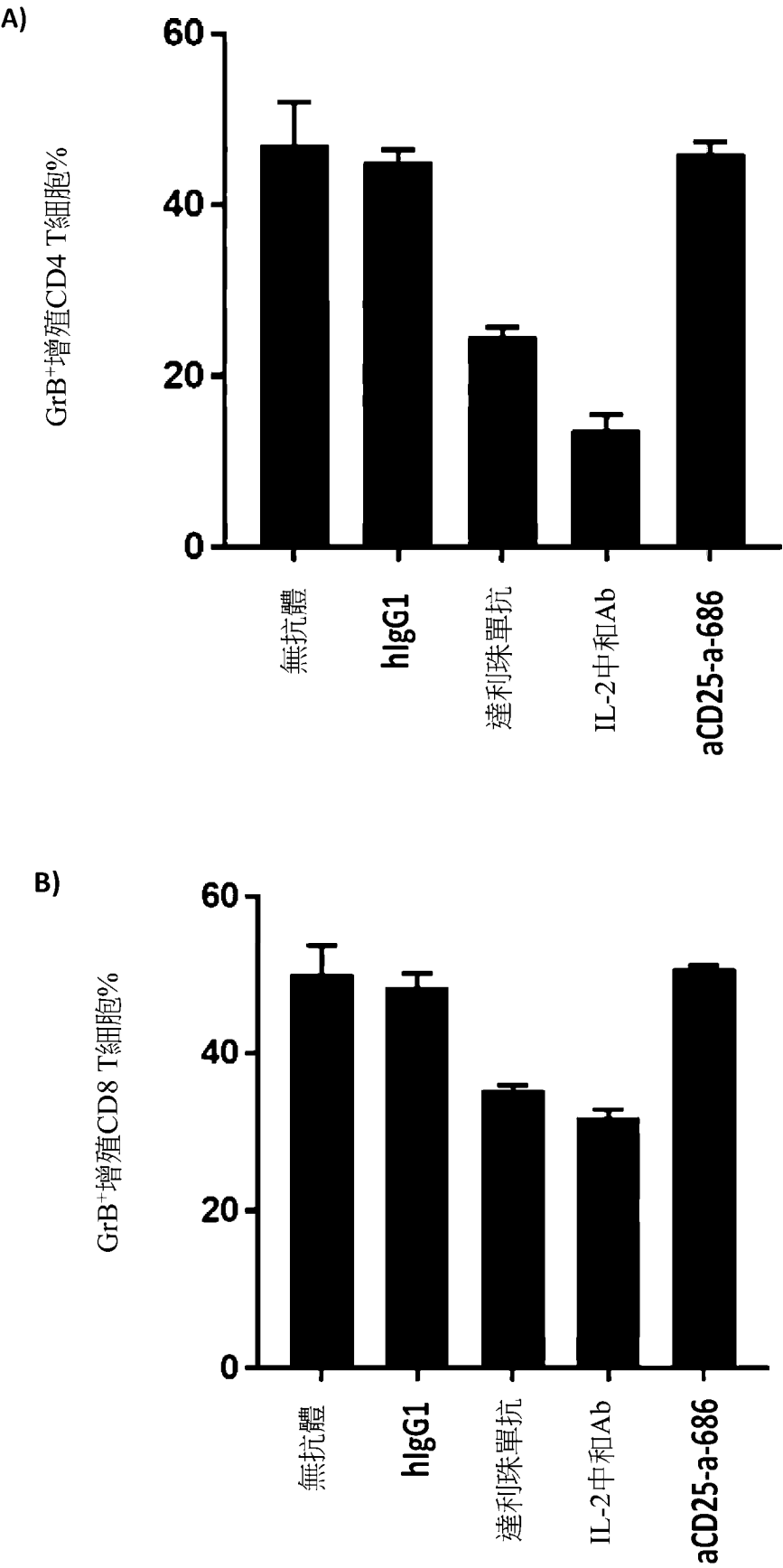


【圖7】

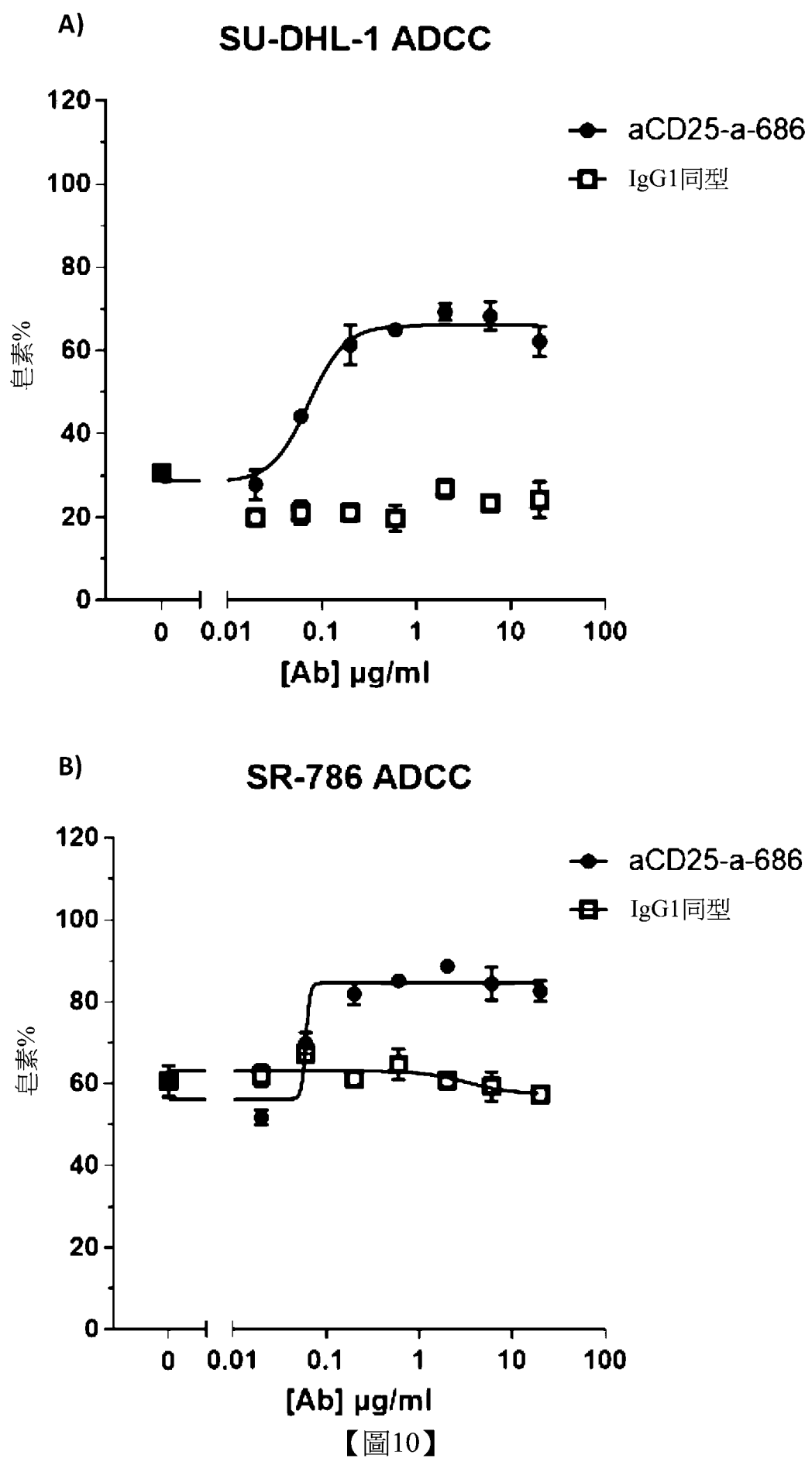
IL2滴定

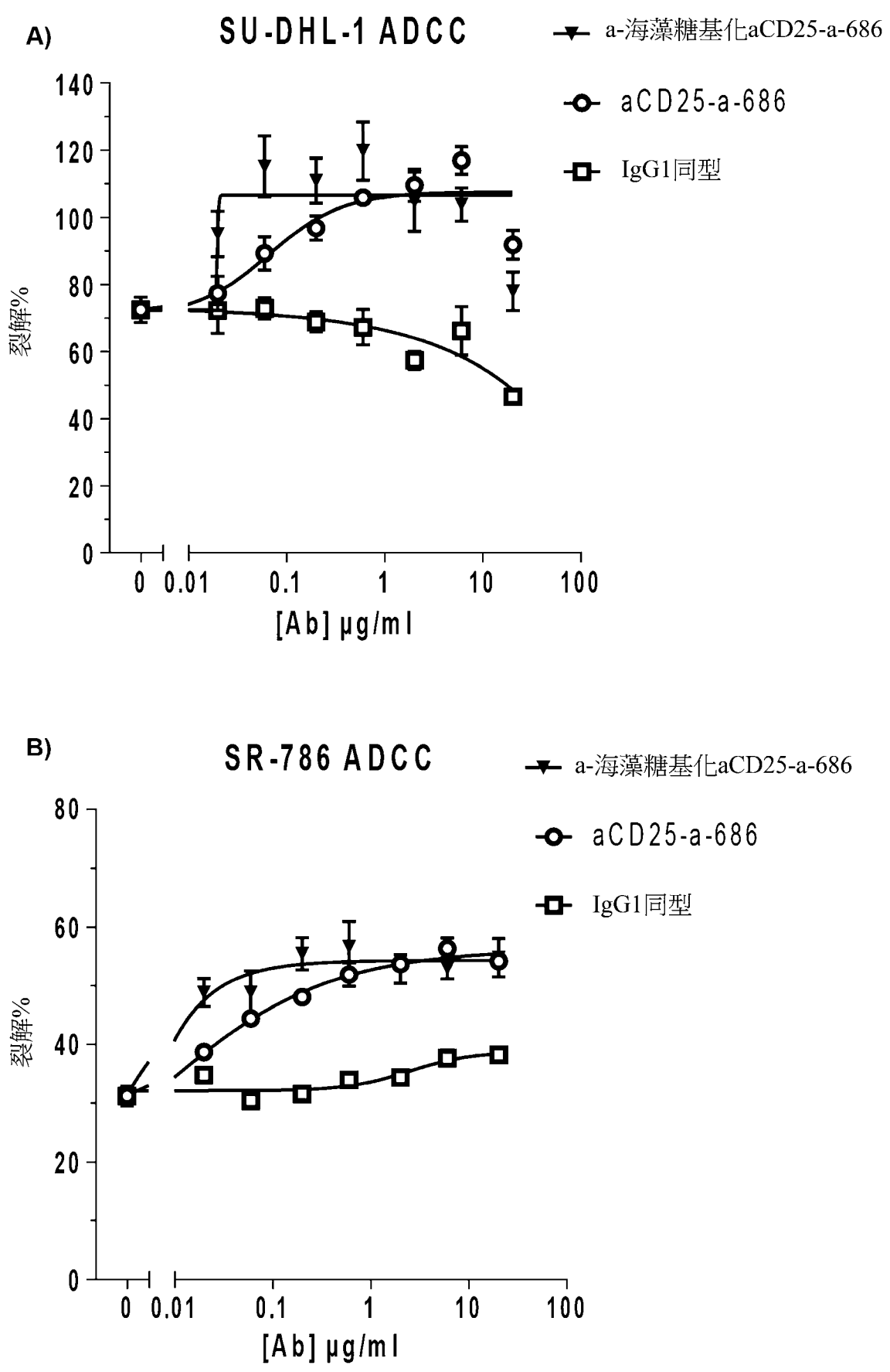


【圖8】

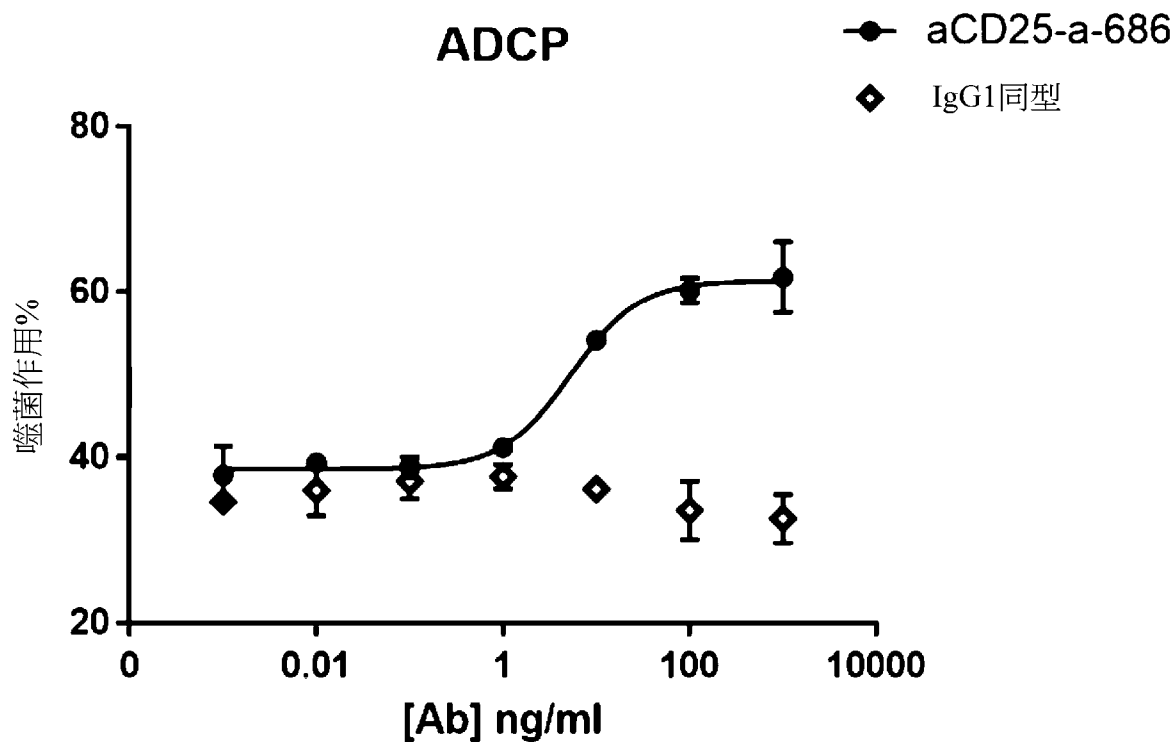


【圖9】

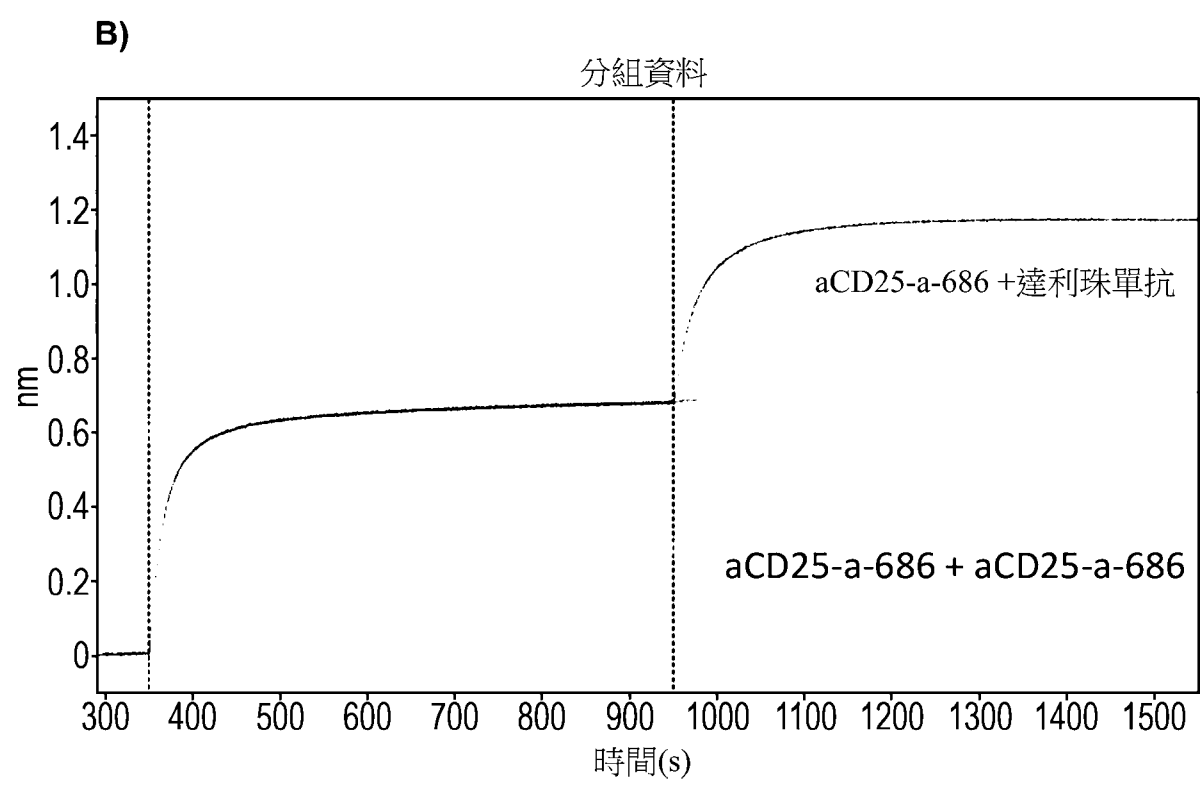
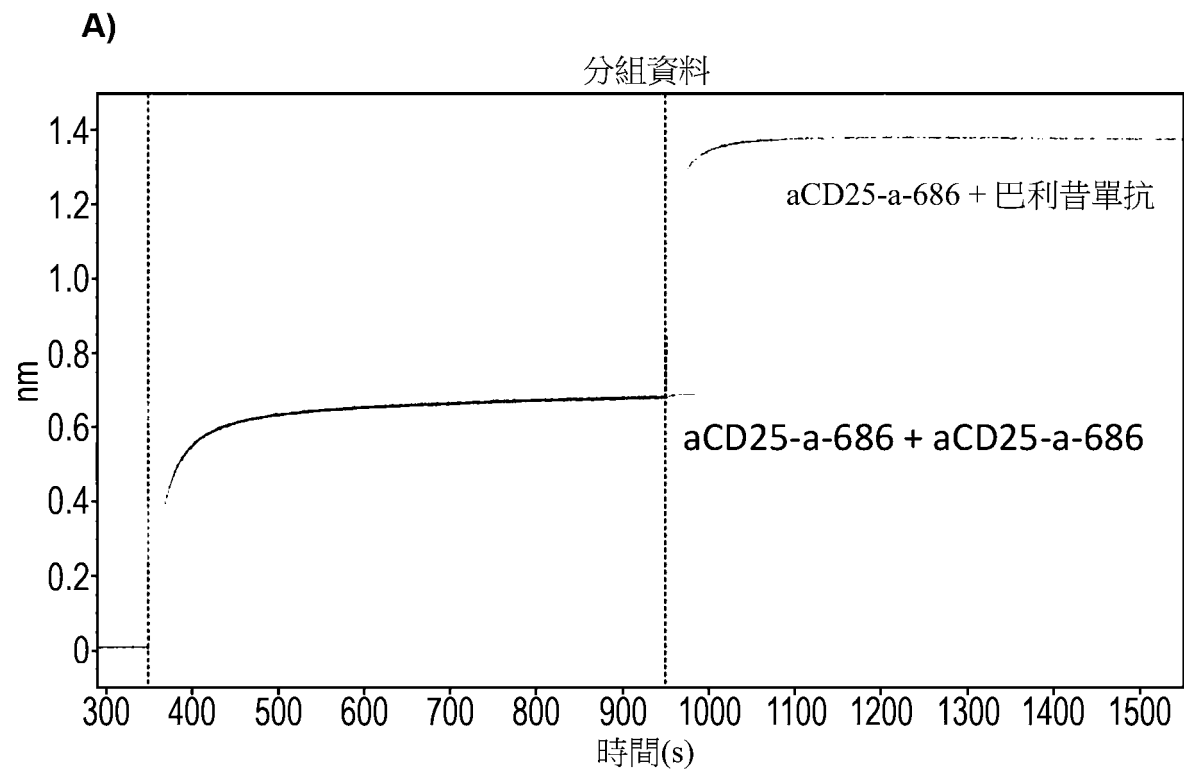




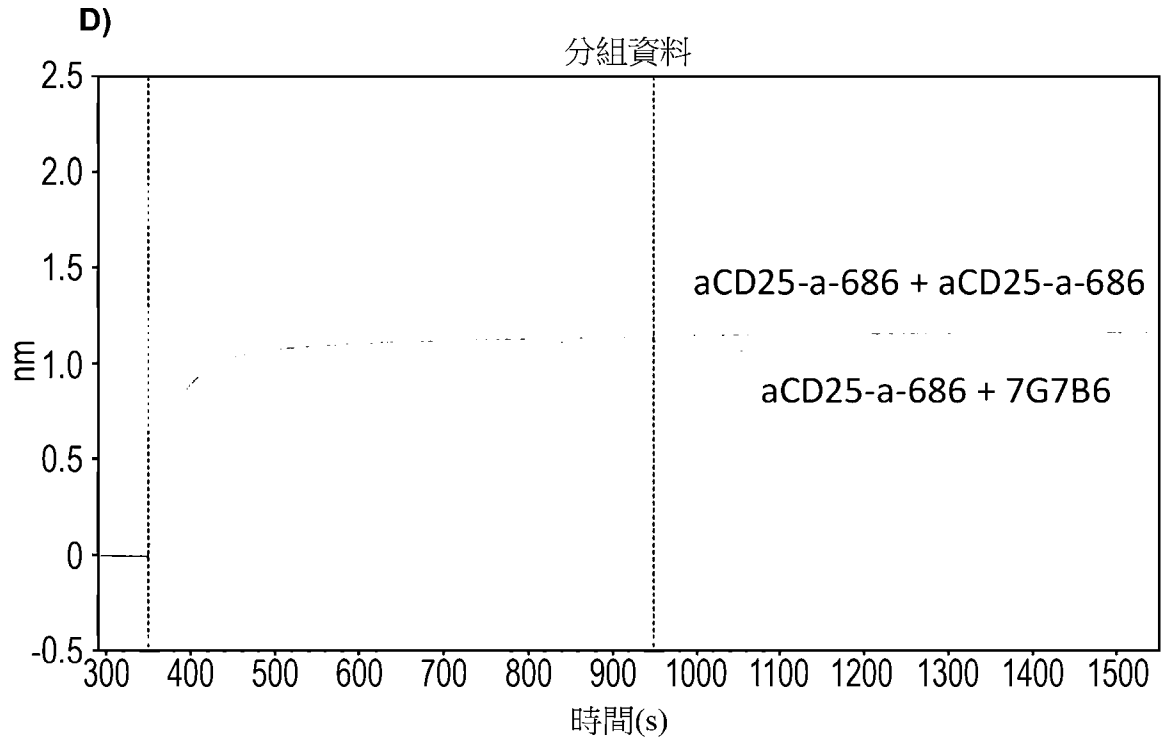
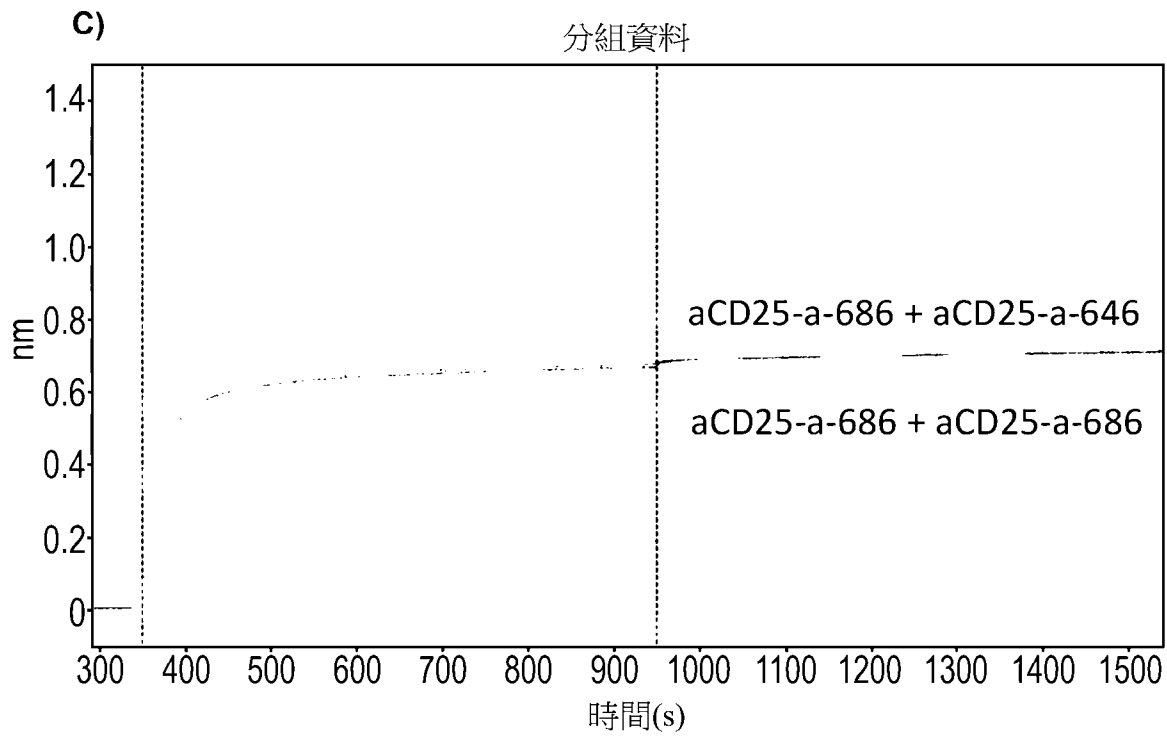
【圖11】



【圖12】



【圖13】



【圖13】(續)

aCD25-a686-m1-HCDR1 aCD25-a686-m1-HCDR2 aCD25-a686-m1-HCDR3

GTFSSLAIS AIPVFGTASYAQKFQG ARGGSVSGTLVDFDI

aCD25-a686-m1-HCDR123:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC**KASGGT**FSSLAISWVRQAPGQGLEWMGA**AIPVF**
GTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**CARGGSVSGTLVDFDI**
WGQGTMTVSS

aCD25-a686-m1-LCDR1 aCD25-a686-m1-LCDR2 aCD25-a686-m1-LCDR3

RASQSISSWLA KASSLES QQYNIYPIT

aCD25-a686-m1-LCDR123

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC**RASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESG**
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQYNIYPITFGGGTKVEIK**

【圖14】

aCD25-a686-m2-HCDR1 aCD25-a686-m2-HCDR2 aCD25-a686-m2-HCDR3

GTFSSLAIT GIPIFGDASYAQKFQG ARGGSVSGTLVDFDI

aCD25-a686-m2-HCDR123:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC**KASGGT**FSSLAITWVRQAPGQGLEWMGG**GIPIF**
GDASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**CARGGSVSGTLVDFDI**
WGQGTMTVSS

aCD25-a686-m2-LCDR1 aCD25-a686-m2-LCDR2 aCD25-a686-m2-LCDR3

RASQSISSWLA KASSLES QQYNIYPIT

aCD25-a686-m2-LCDR123

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC**RASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESG**
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC**QQYNIYPITFGGGTKVEIK**

【圖15】

aCD25-a686-m3-HCDR1 aCD25-a686-m3-HCDR2 aCD25-a686-m3-HCDR3

GTFSSLAIS GIPIFGDANYAQLQG ARGGSVSGTLVDFDI

aCD25-a686-m3-HCDR123:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSLAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GDANYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGSVSGTLVDFD
IWGQGTMTVTVSS

aCD25-a686-m3-LCDR1 aCD25-a686-m3-LCDR2 aCD25-a686-m3-LCDR3

RASQSISSWLA KASSLES QQYNIYPIT

aCD25-a686-m3-LCDR123

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNIYPITFGGGTKVEIK

【圖16】

aCD25-a686-m4-HCDR1 aCD25-a686-m4-HCDR2 aCD25-a686-m4-HCDR3

GTFSALAIIS GIPLFGRANYAQKFQG ARGGSVSGTLVDFDI

aCD25-a686-m4-HCDR123:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSAIAISWVRQAPGQGLEWMGGIPLF
GRANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSVSGTLVDFDI
WGQGTMTVTVSS

aCD25-a686-m4-LCDR1 aCD25-a686-m4-LCDR2 aCD25-a686-m4-LCDR3

RASQSISSWLA KASSLES QQYNIYPIT

aCD25-a686-m4-LCDR123

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNIYPITFGGGTKVEIK

【圖17】

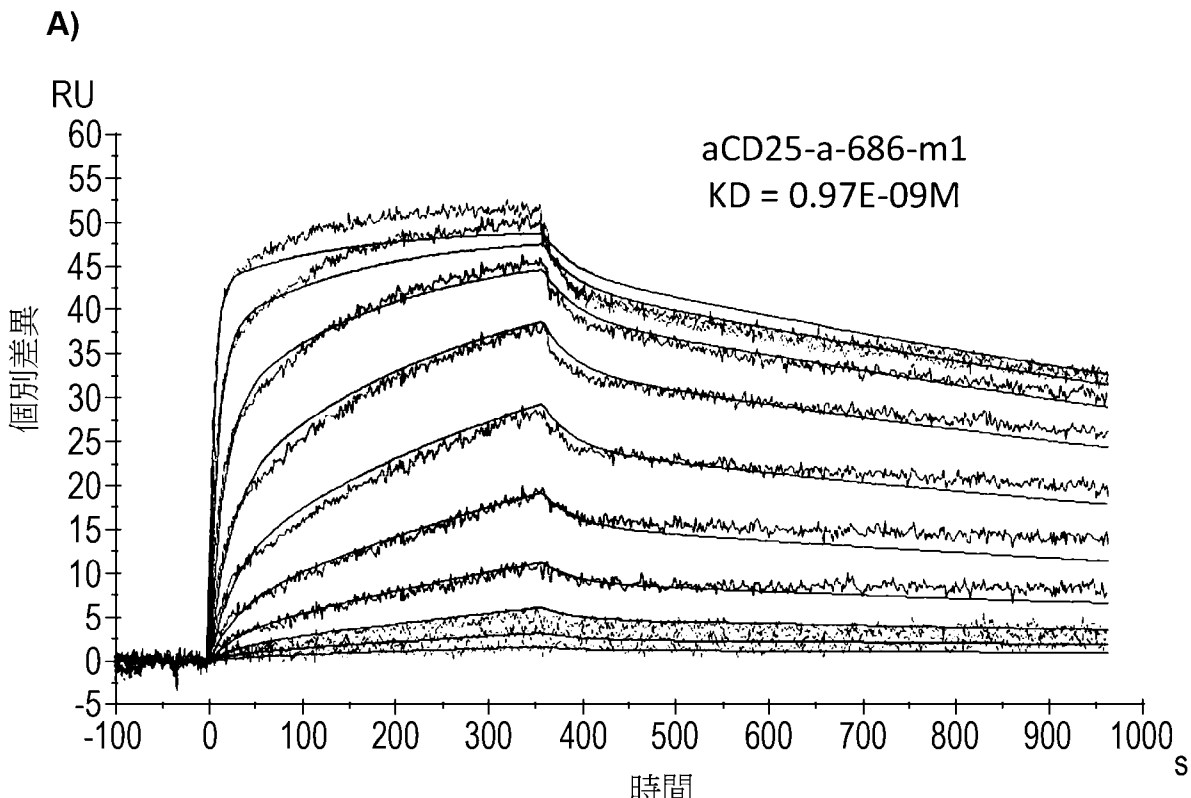
aCD25-a686-m5-HCDR1 aCD25-a686-m5-HCDR2 aCD25-a686-m5-HCDR3
GTFSSLAIF GIIPVFGQANYAQKFQG ARGGSVSGTLVDFDI

aCD25-a686-m5-HCDR123:
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSLAIFWVRQAPGQGLEWMGGGIIPVF
GQANYAQKFQGGRVTITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSVSGTLVDFDI
WGQGTMTVSS

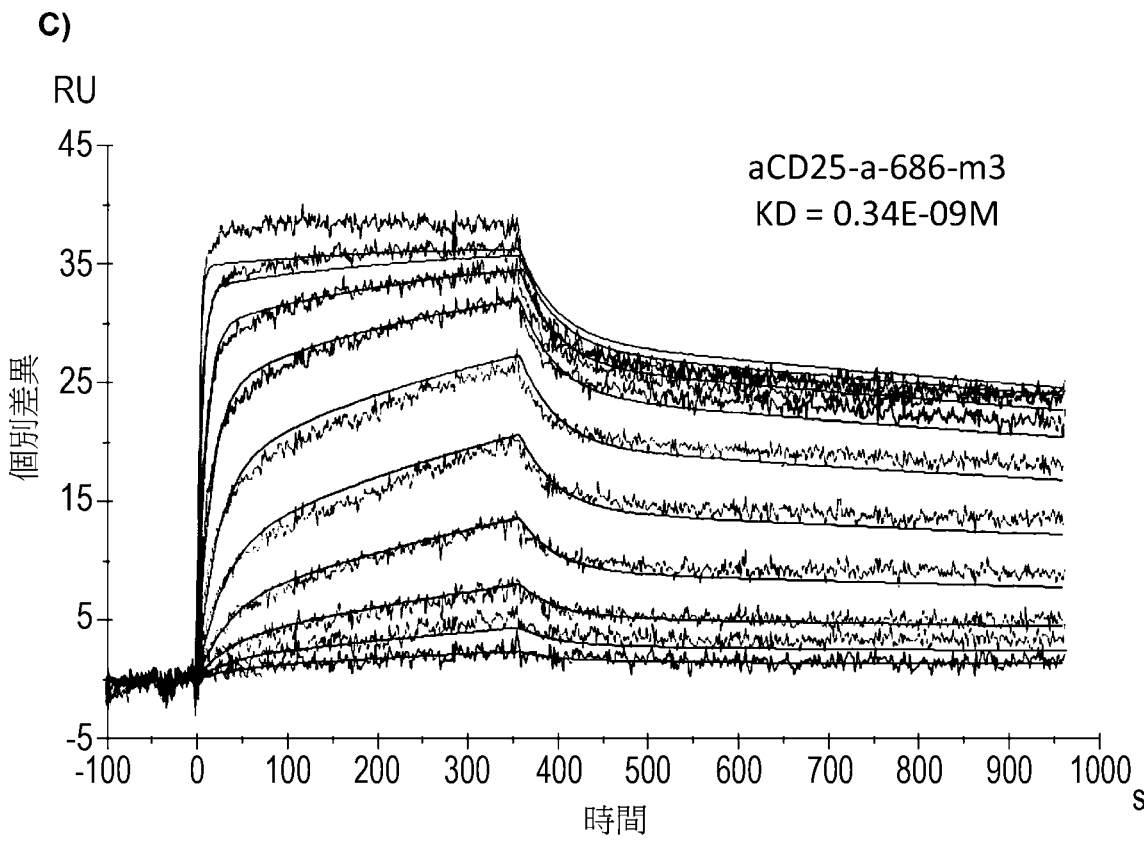
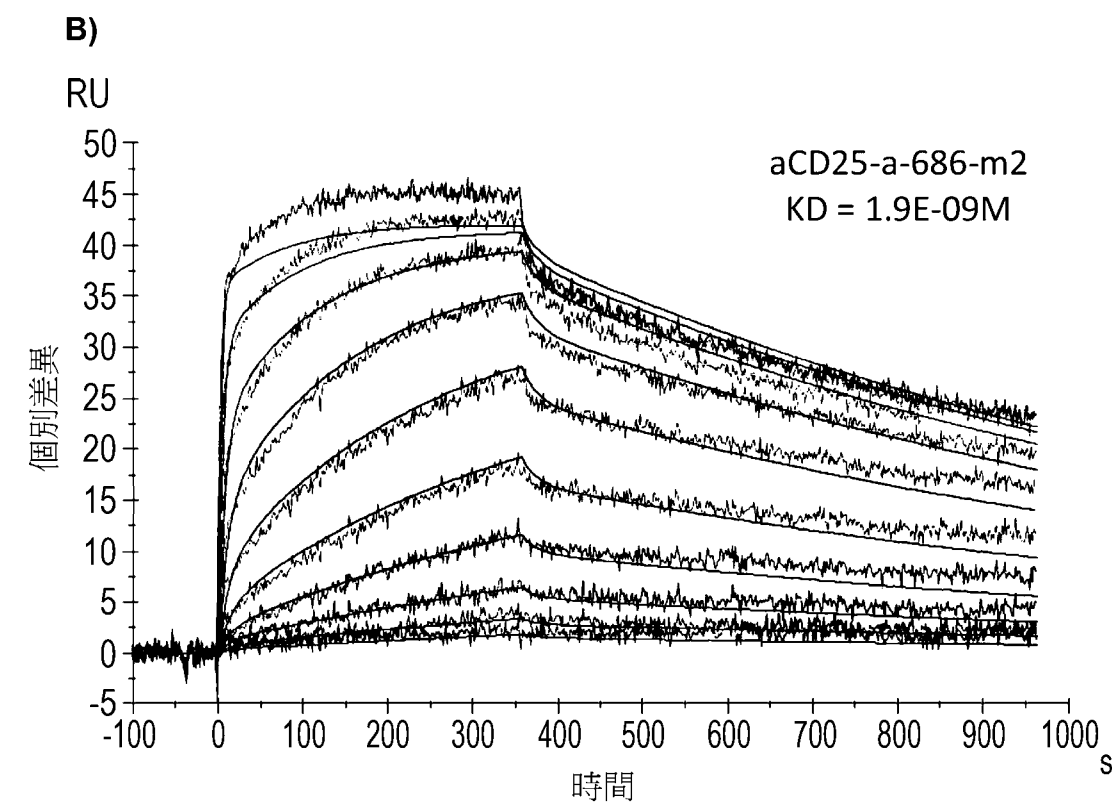
aCD25-a686-m5-LCDR1 aCD25-a686-m5-LCDR2 aCD25-a686-m5-LCDR3
RASQSISSWLA KASSLES QQYNIYPIT

aCD25-a686-m5-LCDR123
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESSG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNIYPITFGGGTKVEIK

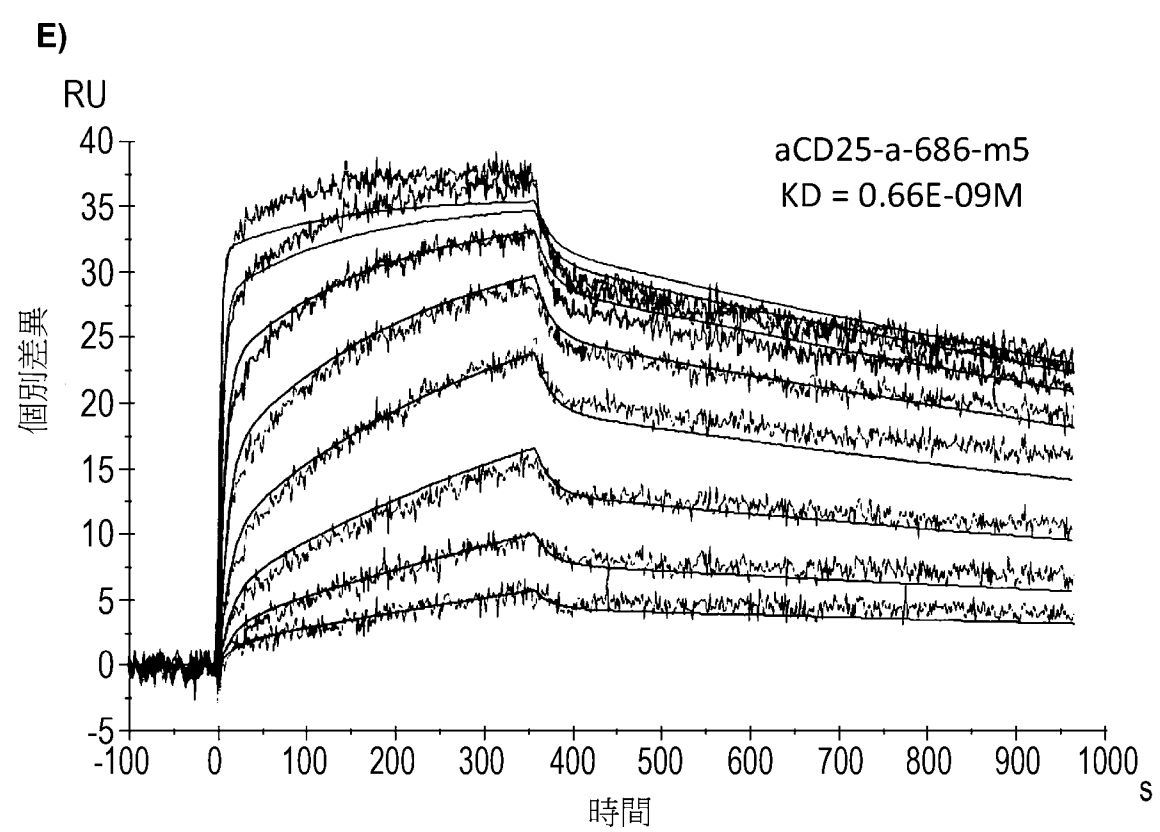
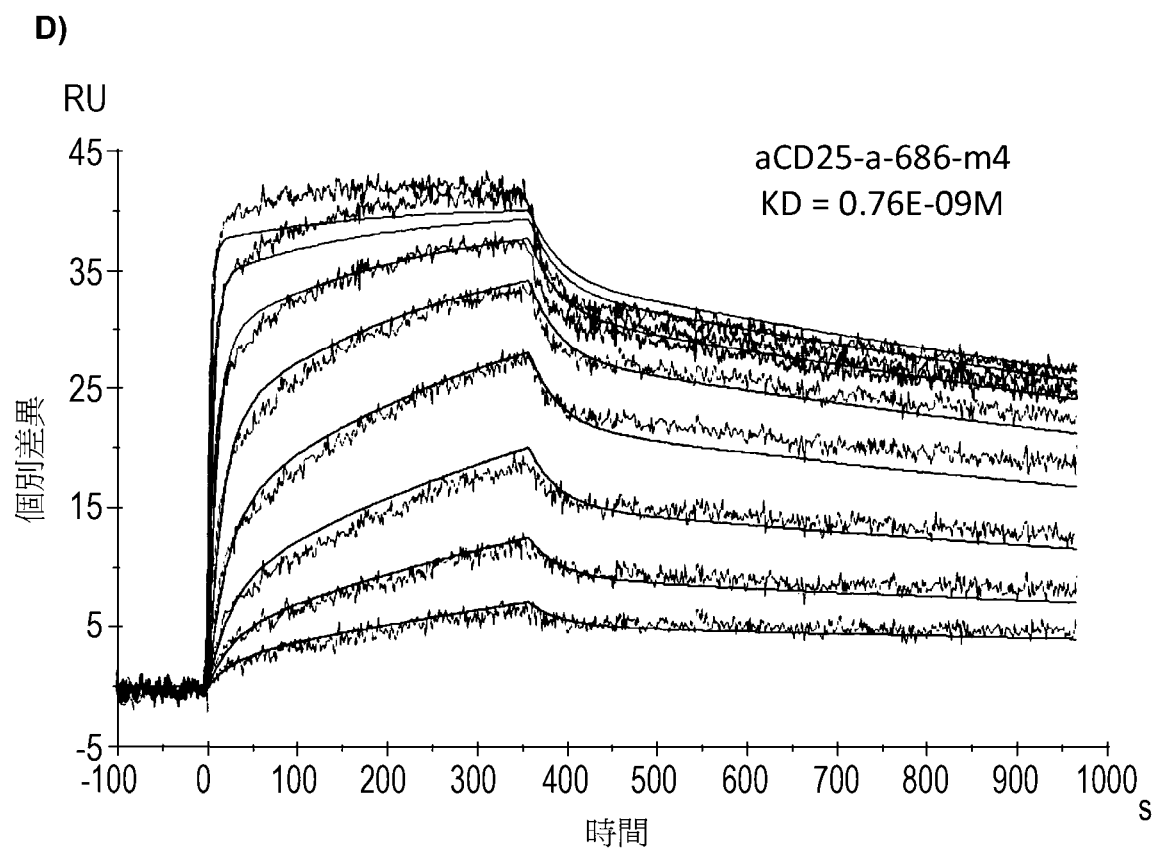
【圖18】



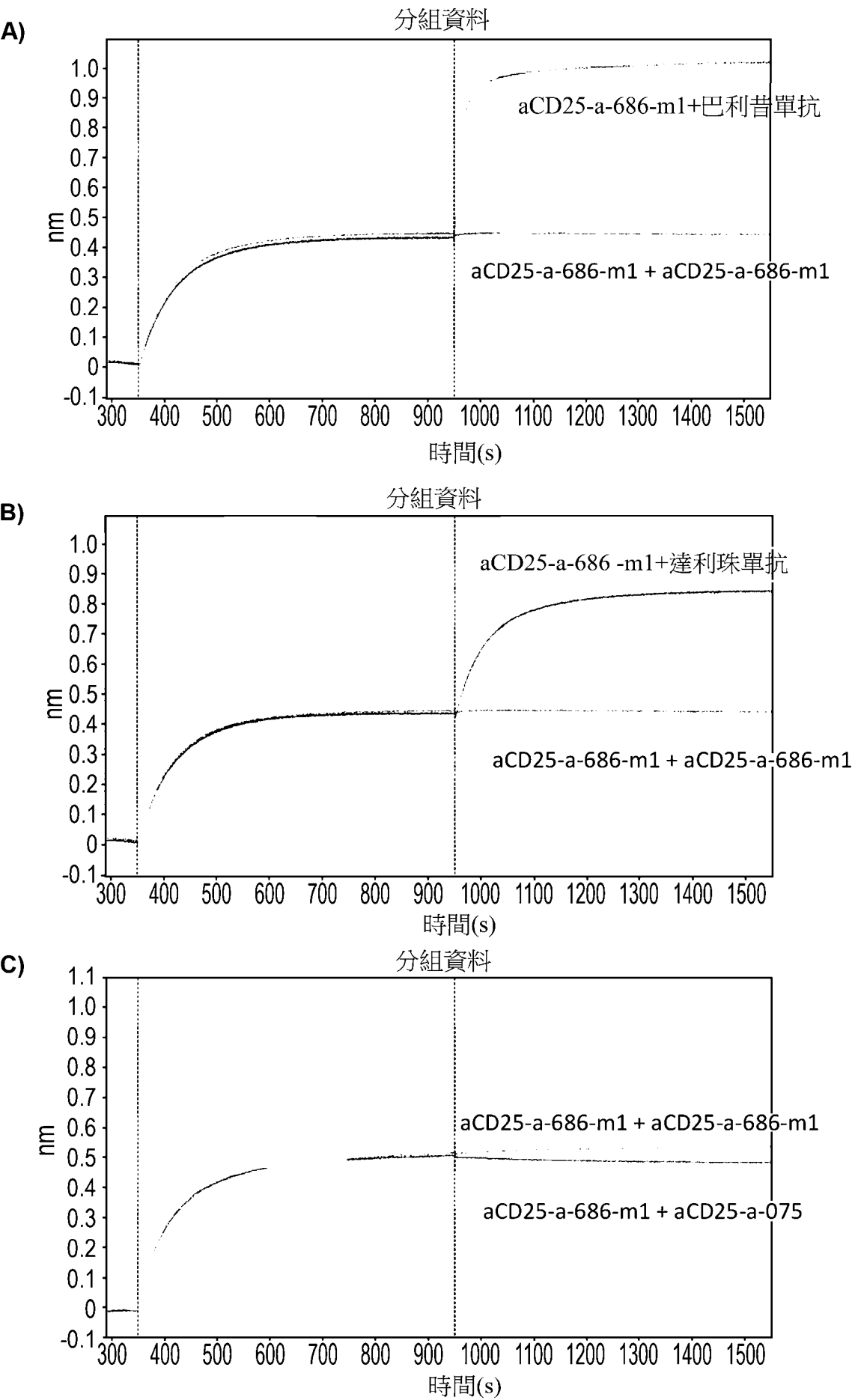
【圖19】



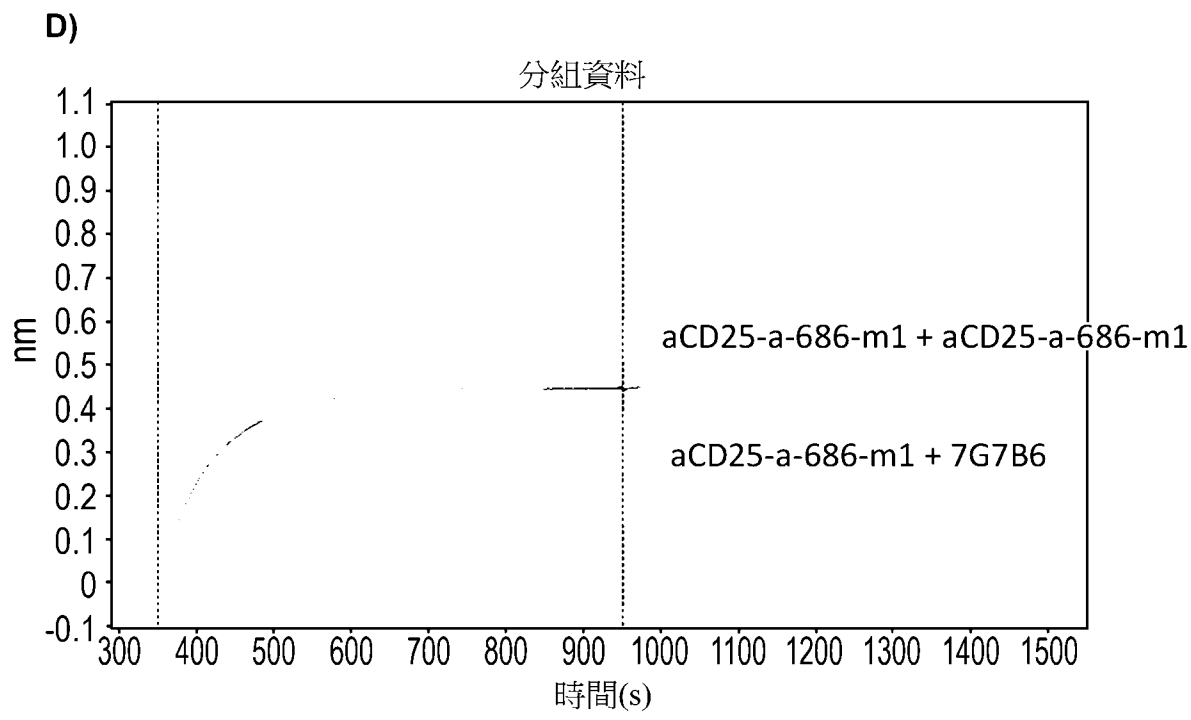
【圖19】(續)



【圖19】(續)

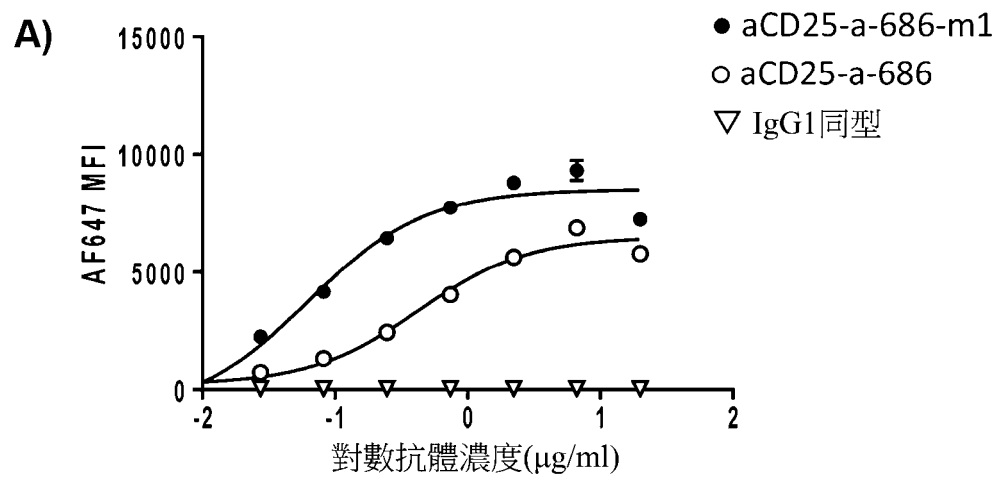


【圖20】

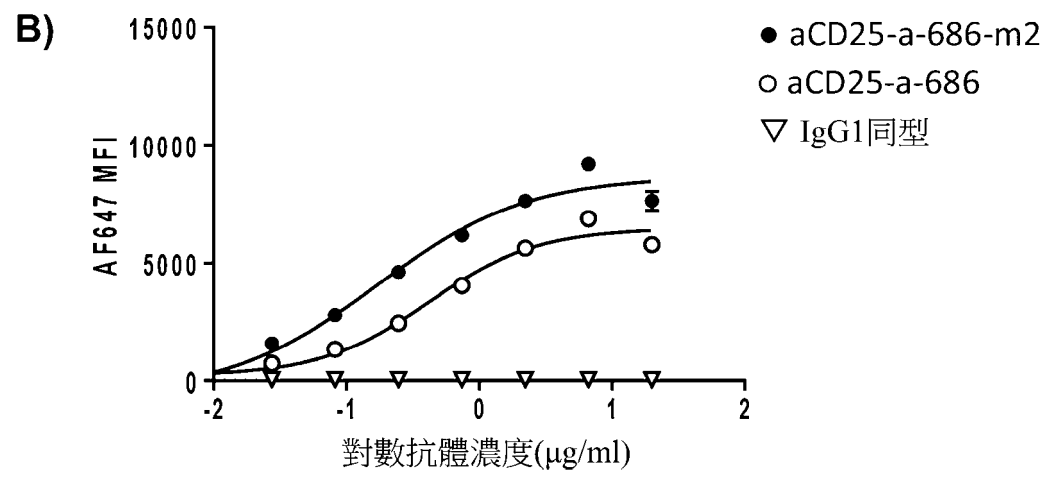


【圖20】(續)

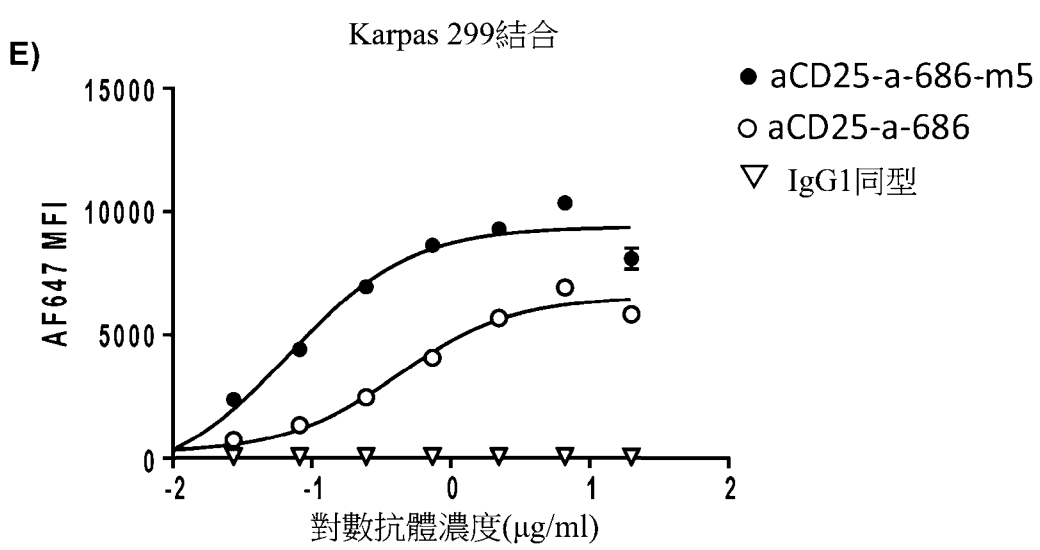
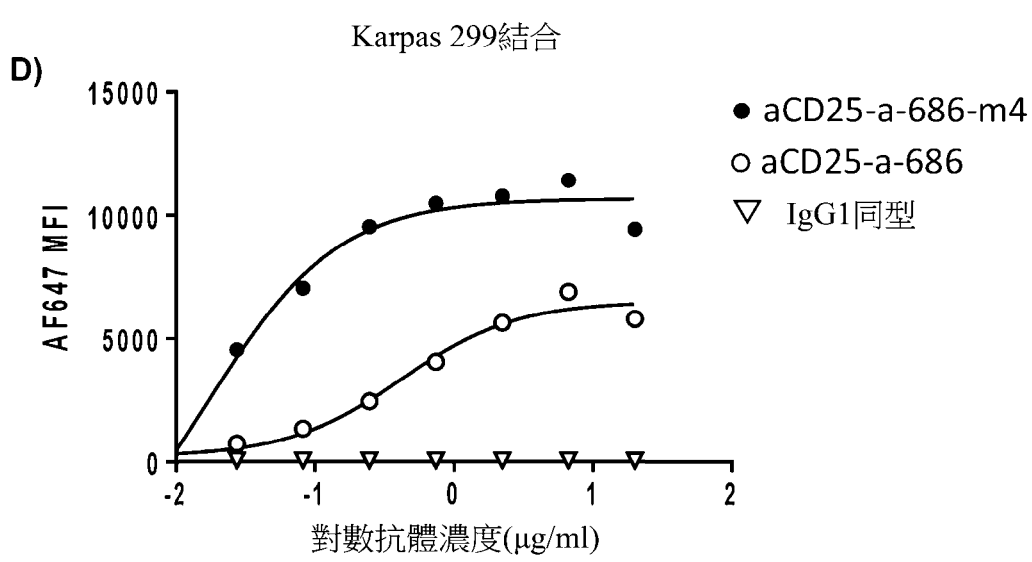
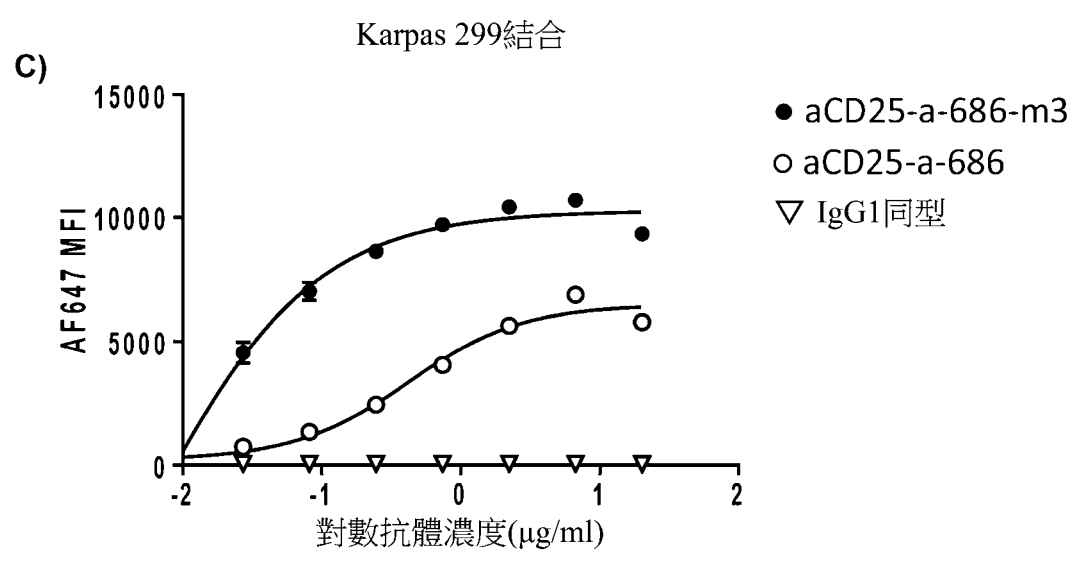
Karpas 299結合



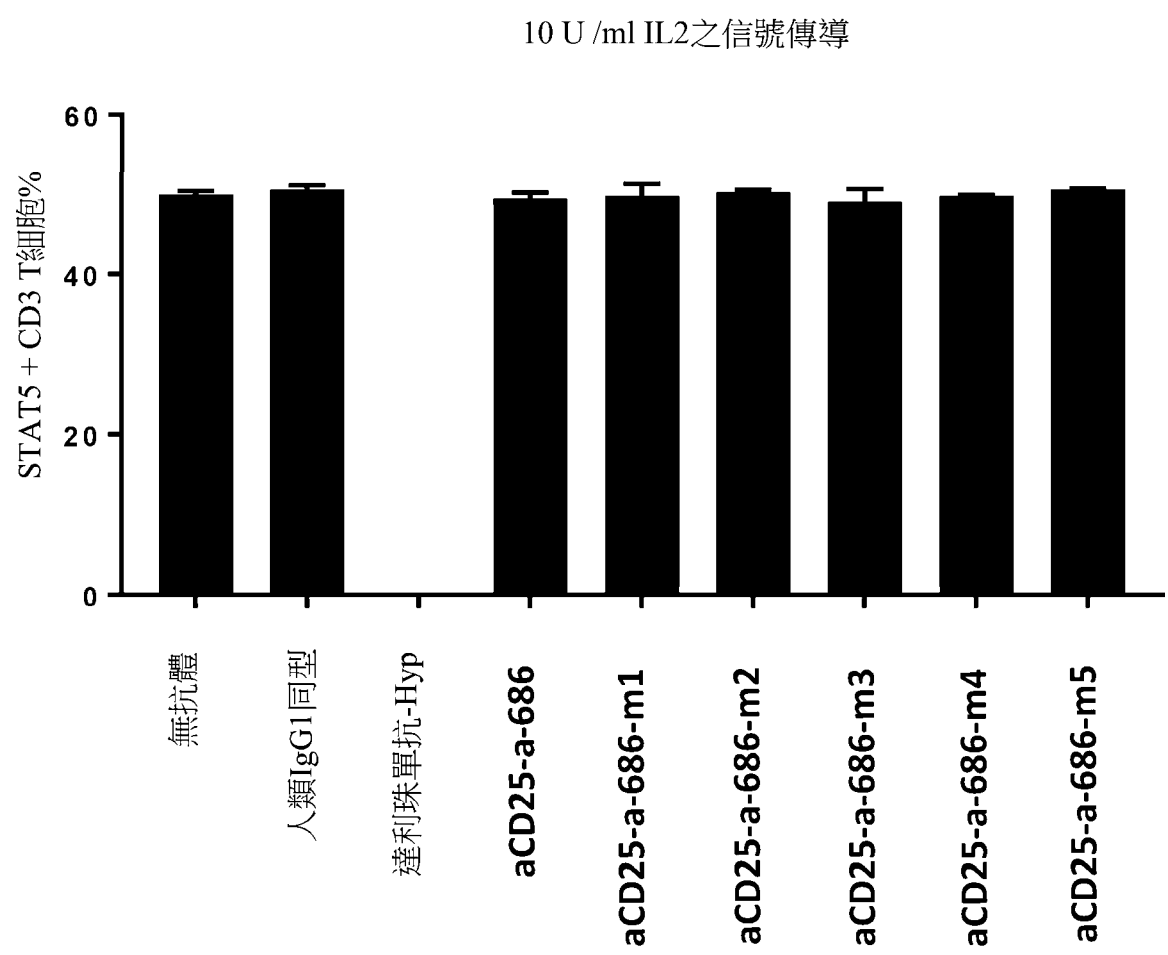
Karpas 299結合



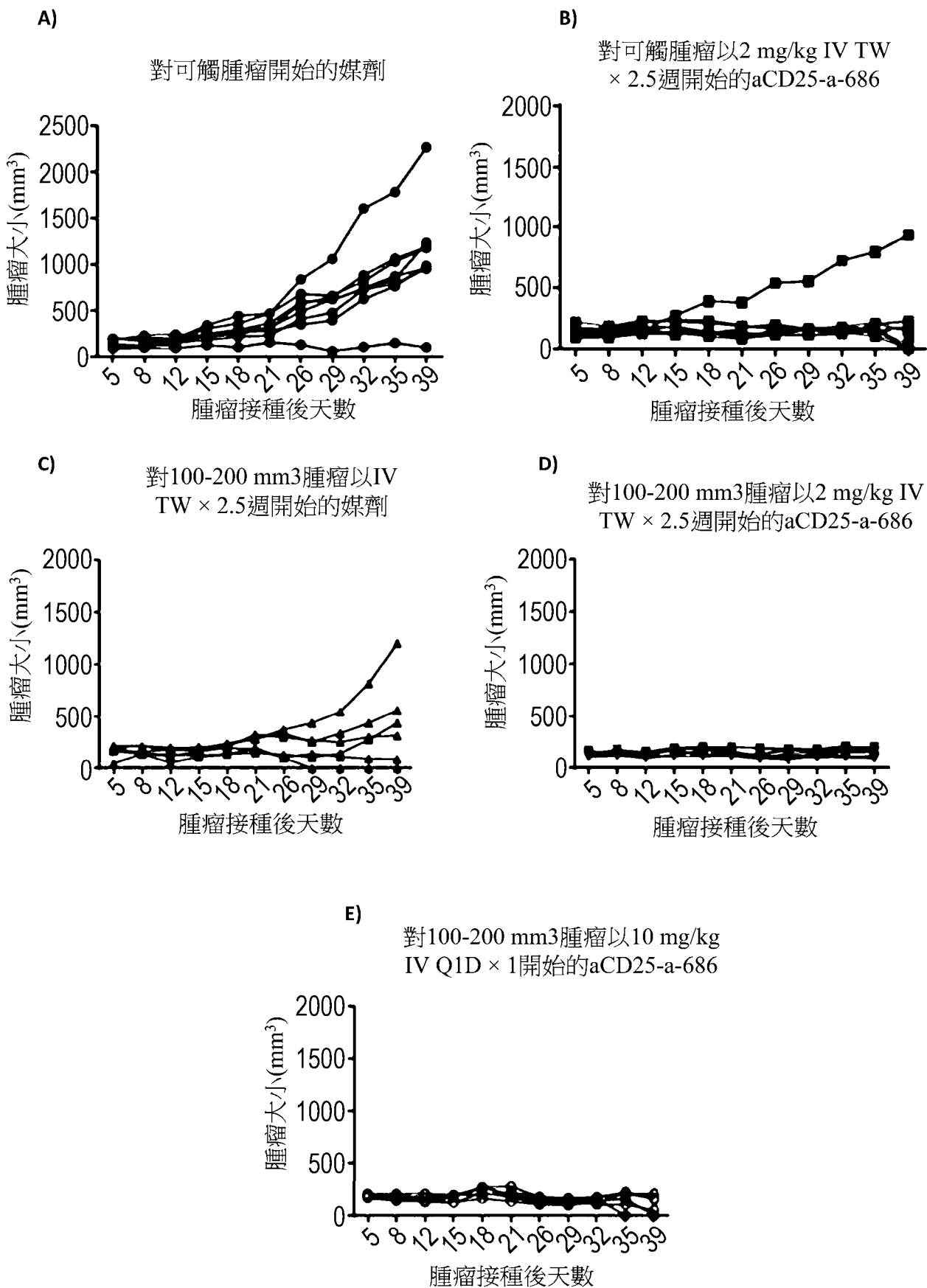
【圖21】



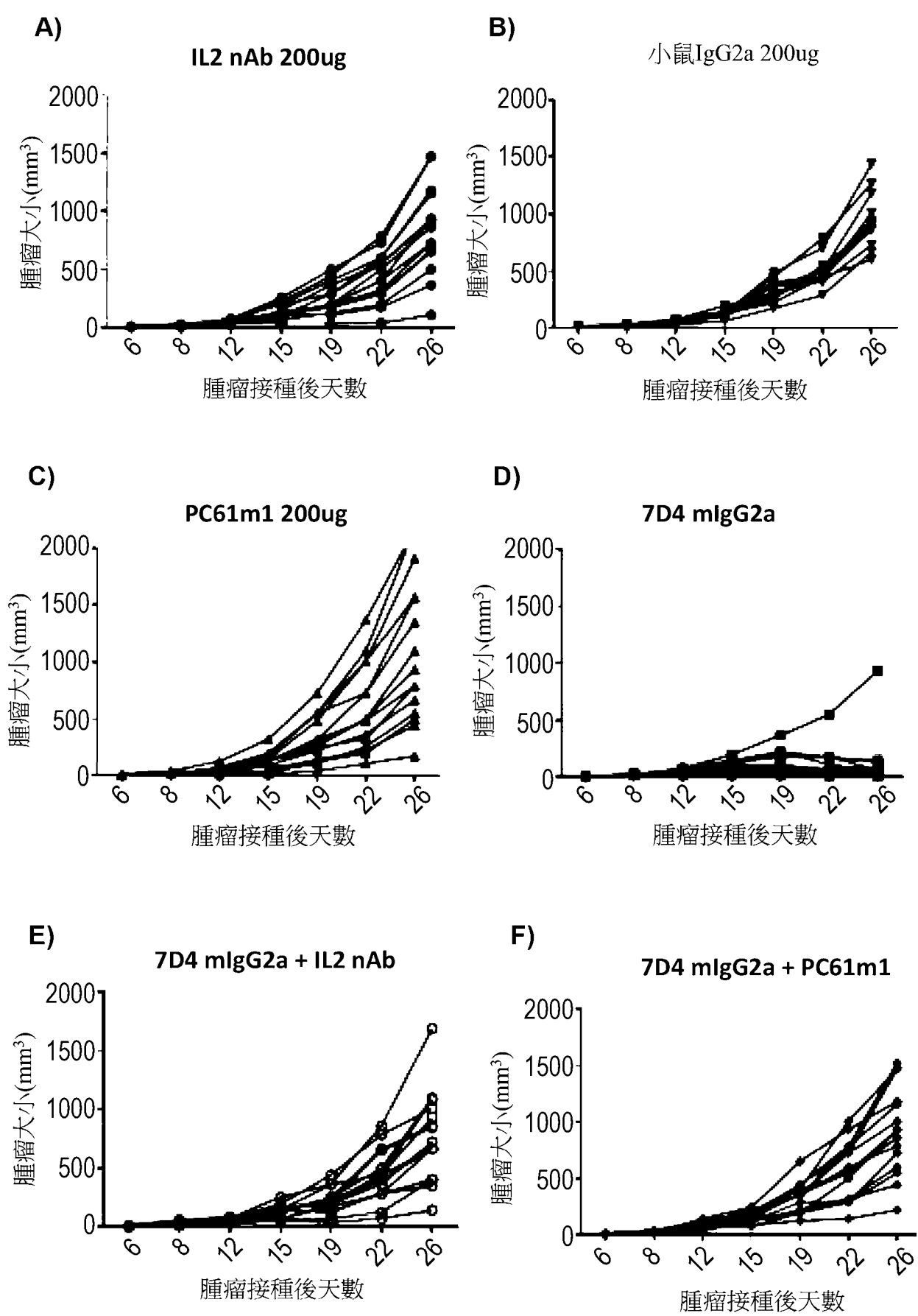
【圖21】(續)



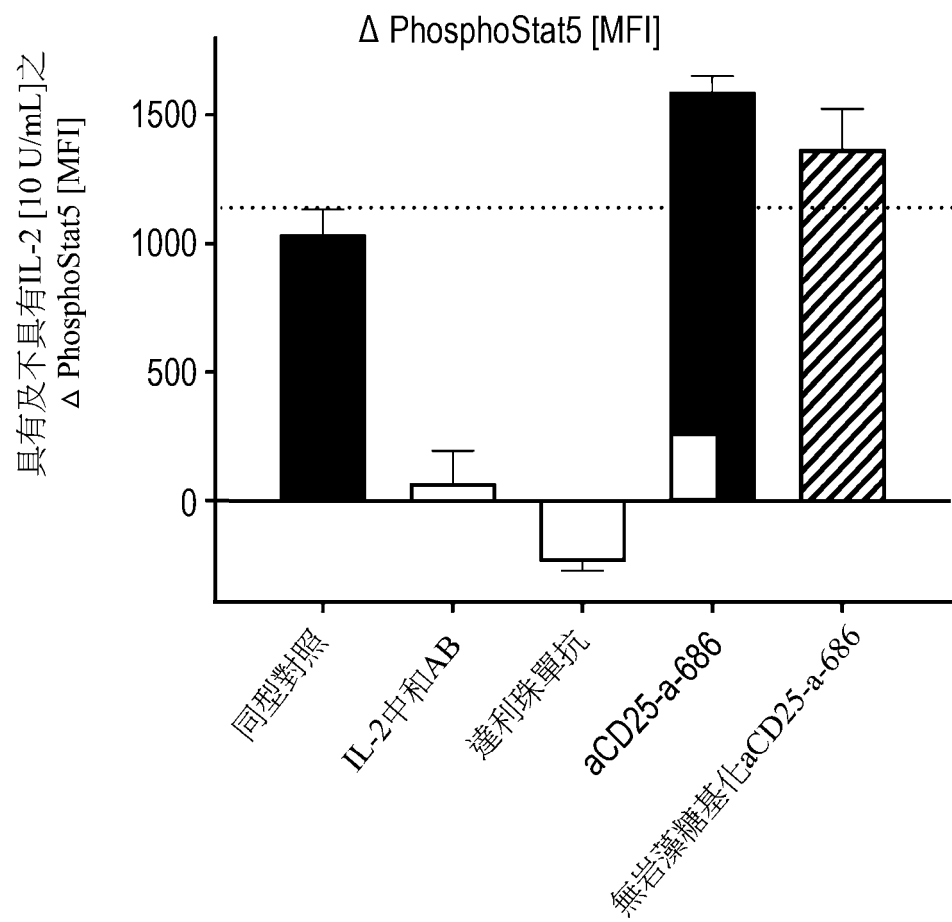
【圖22】



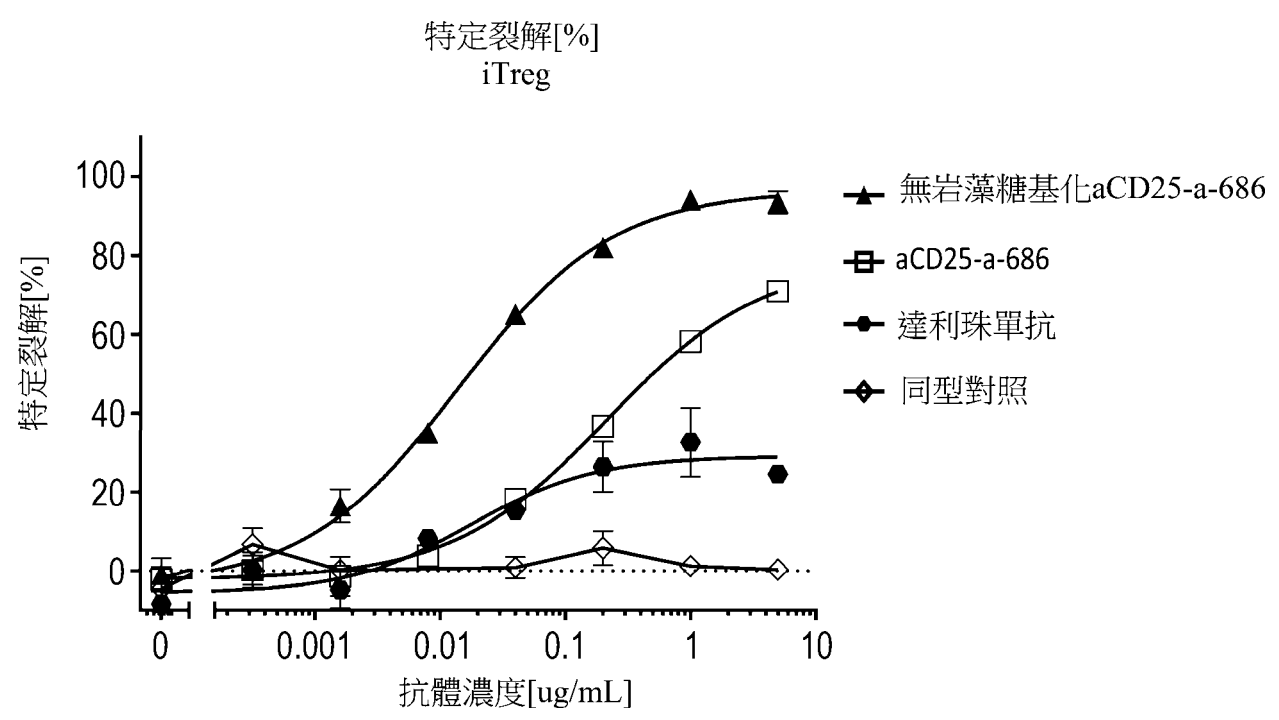
【圖23】



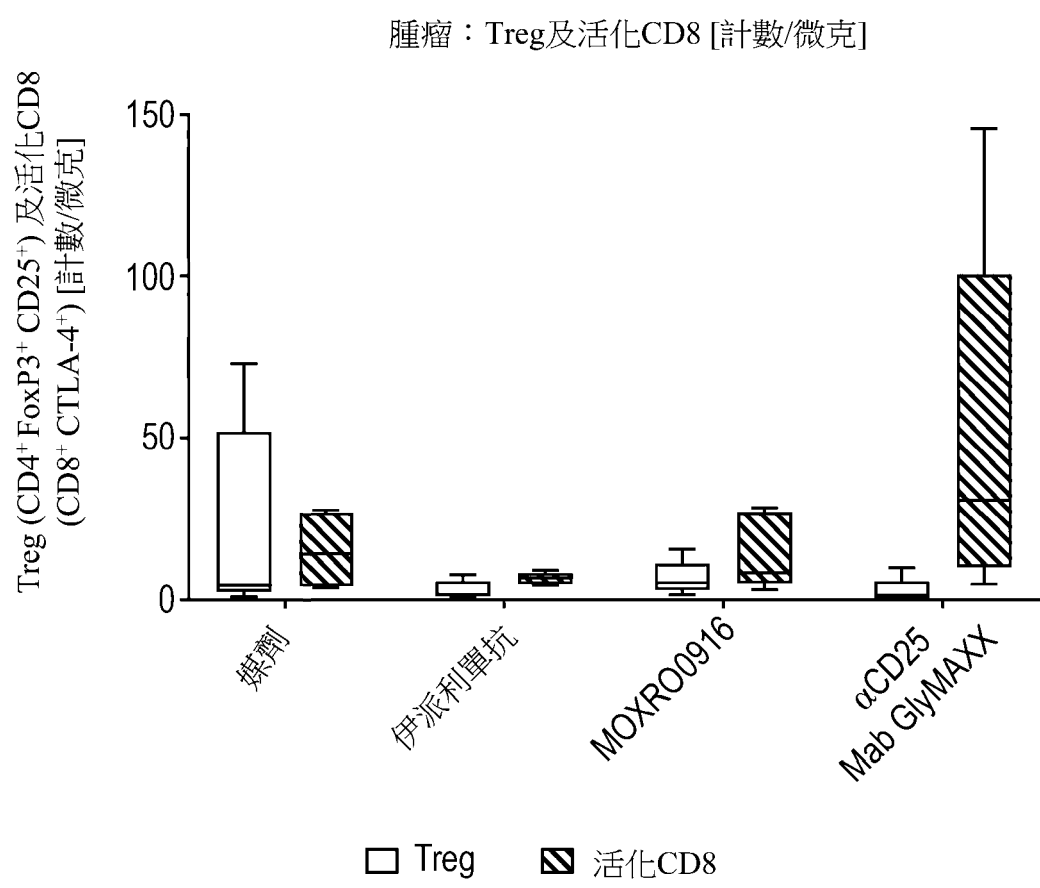
【圖24】



【圖25】



【圖26】



【圖27】