



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109863402 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201780058161.8

(72)发明人 M.唐 J.S.沙恩 S.W.金 C.张

(22)申请日 2017.09.26

M.A.布朗

(30)优先权数据

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

62/400,589 2016.09.27 US

11105

62/406,727 2016.10.11 US

代理人 张晓飞 易方方

62/480,994 2017.04.03 US

(51)Int.Cl.

62/507,580 2017.05.17 US

G01N 33/574(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/28(2006.01)

2019.03.21

G01N 33/92(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/053370 2017.09.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/064013 EN 2018.04.05

(71)申请人 鼎航医药股份有限公司

权利要求书4页 说明书86页 附图27页

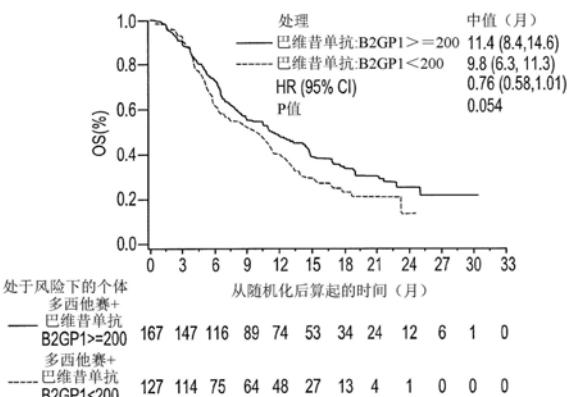
地址 美国马萨诸塞州

(54)发明名称

基于 β -2-糖蛋白1水平的用巴维昔单抗治疗癌症的方法和其测定

(57)摘要

公开使用巴维昔单抗和巴维昔单抗组合疗法的用于鉴别和治疗可用PS靶向抗体治疗的患者,特别是用于鉴别和治疗癌症患者的出人意料的新型方法和试剂盒。所述方法和试剂盒是基于以下出人意料的发现:限定范围的治疗前血液浓度的 β -2-糖蛋白1(β 2GPI),特别是功能性 β 2GPI充当准确预测患者具有较好治疗结果的指示物。



1. 一种巴维昔单抗，其用于治疗患者中的癌症的方法中，其中功能性β2-糖蛋白1(β2GPI)在来自所述患者的血液样品中以等于或大于200μg/ml的浓度存在；其中所述功能性β2GPI与磷脂酰丝氨酸(PS)和巴维昔单抗结合；其中巴维昔单抗是第一抗癌剂，并且其中所述方法还包含给予至少第二抗癌剂。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中所述方法包含：

(a) 鉴别来自所述患者的血液样品中所述功能性β2GPI的浓度；和

(b) 如果功能性β2GPI的所述血液浓度等于或大于200μg/ml，那么向所述患者给予巴维昔单抗和至少第二抗癌剂。

3. 根据权利要求1或2所述的巴维昔单抗，其中所述患者患有卵巢癌、胃癌、肝细胞癌、结肠直肠癌、乳腺癌、食道癌、恶性神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、前列腺癌、黑素瘤、头颈癌、肾细胞癌、膀胱癌、胰腺癌或肺癌。

4. 根据权利要求1或2所述的巴维昔单抗，其中所述患者患有胰腺癌或非小细胞肺癌(NSCLC)。

5. 根据权利要求1到4中任一项所述的巴维昔单抗，其中所述至少第二抗癌剂是化疗剂或免疫检查点抗体。

6. 根据权利要求5所述的巴维昔单抗，其中所述化疗剂为索拉非尼(sorafenib)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、卡铂、吉西他滨(gemcitabine)或多西他赛(docetaxel)。

7. 根据权利要求5所述的巴维昔单抗，其中所述免疫检查点抗体是与CTLA-4、PD-1或PD-L1结合的阻断抗体。

8. 根据权利要求5所述的巴维昔单抗，其中所述免疫检查点抗体是曲美木单抗(tremelimumab)、纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)或阿特珠单抗(atezolizumab)。

9. 根据权利要求1到8中任一项所述的巴维昔单抗，其中所述方法还包含给予第三抗癌剂。

10. 根据权利要求1到9中任一项所述的巴维昔单抗，其中功能性β2GPI的血液浓度在200μg/ml和290μg/ml之间。

11. 根据权利要求1到10中任一项所述的巴维昔单抗，其中在包含以下的测定中测量所述功能性β2GPI：

(a) 用磷脂酰丝氨酸(PS)涂布ELISA板以制备经PS涂布的ELISA板；

(b) 在有效允许所述血液样品中的β2GPI与所述巴维昔单抗和所述经PS涂布的ELISA板结合的条件下，将巴维昔单抗和所述血液样品添加到所述经PS涂布的ELISA板；和

(c) 检测巴维昔单抗和β2GPI与所述经PS涂布的ELISA板的结合，从而测量所述血液样品中的所述功能性β2GPI。

12. 根据权利要求1到11中任一项所述的巴维昔单抗，其中所述血液样品是血浆样品。

13. 根据权利要求1到11中任一项所述的巴维昔单抗，其中所述血液样品是血清样品。

14. 一种诊断可用第一抗癌剂和至少第二抗癌剂治疗的癌症患者的方法，其中所述第一抗癌剂是巴维昔单抗，其中所述方法包含测量功能性β2-糖蛋白1(β2GPI)在来自所述患者的血液样品中的浓度，其中如果所述功能性β2GPI的血液浓度等于或大于200μg/ml，那么确定所述患者可用巴维昔单抗和所述至少第二抗癌剂治疗；其中所述功能性β2GPI与磷脂

酰丝氨酸(PS)和巴维昔单抗结合。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述患者可用所述第一和至少第二和第三抗癌剂治疗。

16. 一种治疗人类患者中的癌症的方法,其包含向所述患者给予第一和至少第二抗癌剂,其中所述第一抗癌剂是巴维昔单抗;其中所述患者的功能性 β 2-糖蛋白1(β 2GPI)的治疗前血液浓度等于或大于200 μ g/ml;并且其中所述功能性 β 2GPI与磷脂酰丝氨酸(PS)和巴维昔单抗结合。

17. 一种治疗人类患者中的癌症的方法,其包含:

(a) 测量由所述患者获得的治疗前血液样品中的功能性 β 2-糖蛋白1(β 2GPI)的浓度;其中所述功能性 β 2GPI与磷脂酰丝氨酸(PS)和巴维昔单抗结合;和

(b) 向功能性 β 2GPI的治疗前血液浓度等于或大于200 μ g/ml的所述患者给予第一和至少第二抗癌剂,其中所述第一抗癌剂是巴维昔单抗。

18. 一种治疗人类患者中的癌症的方法,其包含:

(a) 由所述患者获得治疗前血液样品;

(b) 测量所述治疗前血液样品中功能性 β 2-糖蛋白1(β 2GPI)的浓度;其中所述功能性 β 2GPI与磷脂酰丝氨酸(PS)和巴维昔单抗结合;和

(c) 向功能性 β 2GPI的治疗前血液浓度等于或大于200 μ g/ml的所述患者给予第一和至少第二抗癌剂,其中所述第一抗癌剂是巴维昔单抗。

19. 一种鉴别可用第一和至少第二抗癌剂治疗的人类癌症患者的方法,其中所述第一种抗癌剂是巴维昔单抗,并且治疗所述患者包含:

(a) 测量由所述患者获得的治疗前血液样品中功能性 β 2-糖蛋白1(β 2GPI)的浓度;其中所述功能性 β 2GPI与磷脂酰丝氨酸(PS)和巴维昔单抗结合;

(b) 当所述治疗前血液样品中功能性 β 2GPI的浓度等于或大于200 μ g/ml时,将所述患者鉴别为可用巴维昔单抗和所述至少第二抗癌剂治疗;和

(c) 向功能性 β 2GPI的治疗前血液浓度等于或大于200 μ g/ml的所述患者给予巴维昔单抗和所述至少第二抗癌剂。

20. 一种鉴别可用第一和至少第二抗癌剂治疗的人类癌症患者的方法,其中所述第一种抗癌剂是巴维昔单抗,并且治疗所述患者包含:

(a) 由所述患者获得治疗前血液样品;

(b) 测量所述治疗前血液样品中功能性 β 2-糖蛋白1(β 2GPI)的浓度;其中所述功能性 β 2GPI与磷脂酰丝氨酸(PS)和巴维昔单抗结合;

(c) 当所述治疗前血液样品中功能性 β 2GPI的浓度等于或大于200 μ g/ml时,将患者鉴别为可用巴维昔单抗和所述至少第二抗癌剂治疗;和

(d) 向功能性 β 2GPI的治疗前血液浓度等于或大于200 μ g/ml的所述患者给予巴维昔单抗和所述至少第二抗癌剂。

21. 根据权利要求16到0中任一项所述的方法,其中以3mg/kg的量向所述患者给予所述巴维昔单抗。

22. 根据权利要求16到21中任一项所述的方法,其还包含向所述患者给予至少第二和第三抗癌剂。

23. 根据权利要求14到22中任一项所述的方法,其中所述患者患有卵巢癌、胃癌、肝细胞癌、结肠直肠癌、乳腺癌、食道癌、恶性神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、前列腺癌、黑素瘤、头颈癌、肾细胞癌、膀胱癌、胰腺癌或肺癌。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述患者患有胰腺癌或非小细胞肺癌(NSCLC)。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述非小细胞肺癌(NSCLC)是非鳞状非小细胞肺癌。

26. 根据权利要求14到25中任一项所述的方法,其中所述至少第二抗癌剂是化疗剂或免疫检查点抗体。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述化疗剂为索拉非尼、太平洋紫杉醇、卡铂、吉西他滨或多西他赛。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中所述免疫检查点抗体是与CTLA-4、PD-1或PD-L1结合的阻断抗体。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述免疫检查点抗体是曲美木单抗、纳武单抗、派姆单抗、德瓦鲁单抗或阿特珠单抗。

30. 根据权利要求14或15所述的方法,其中如果功能性 β 2GPI的血液浓度在200 μ g/ml和290 μ g/ml之间,那么所述患者被确定为可用巴维昔单抗和至少第二抗癌剂治疗。

31. 根据权利要求16到29中任一项所述的方法,其中所述患者具有在200 μ g/ml与290 μ g/ml之间的功能性 β 2GPI的治疗前血液浓度。

32. 根据权利要求14、15或17到31中任一项所述的方法,其中所述血液样品是血浆样品。

33. 根据权利要求14、15或17到31中任一项所述的方法,其中所述血液样品是血清样品。

34. 根据权利要求14、15或17到33中任一项所述的方法,其中在包含以下的测定中测量所述功能性 β 2GPI:

(a) 用磷脂酰丝氨酸(PS)涂布ELISA板以制备经PS涂布的ELISA板;

(b) 在有效允许所述血液样品中的 β 2GPI与所述巴维昔单抗和所述经PS涂布的ELISA板结合的条件下,将巴维昔单抗和所述血液样品添加到所述经PS涂布的ELISA板;和

(c) 检测巴维昔单抗和 β 2GPI与所述经PS涂布的ELISA板的结合,从而测量所述血液样品中的所述功能性 β 2GPI。

35. 一种测量功能性 β 2-糖蛋白1(β 2GPI)的方法,其中所述功能性 β 2GPI与磷脂酰丝氨酸(PS)和巴维昔单抗结合,所述方法包括:

(a) 用磷脂酰丝氨酸(PS)涂布ELISA板以制备经PS涂布的ELISA板;

(b) 在有效允许所述样品中的 β 2GPI与所述巴维昔单抗和所述经PS涂布的ELISA板结合的条件下,将巴维昔单抗和疑似含有 β 2GPI的生物样品添加到所述经PS涂布的ELISA板;和

(c) 检测巴维昔单抗和 β 2GPI与所述经PS涂布的ELISA板的结合,从而测量所述样品中的所述功能性 β 2GPI。

36. 根据权利要求0所述的方法,其中所述生物样品是血液样品。

37. 根据权利要求34或36所述的方法,其中所述血样是血浆样品。

38. 根据权利要求34或36所述的方法,其中所述血样是血清样品。

39. 根据权利要求34到38中任一项所述的方法,其中所述巴维昔单抗附接于产生可检测信号的可检测剂,并且其中通过检测和测量所述可检测信号来检测和测量巴维昔单抗和 β 2GPI与所述经PS涂布的ELISA板的结合。

40. 根据权利要求34到39中任一项所述的方法,其中在添加含有 β 2GPI的所述样品之前将所述巴维昔单抗添加到所述经PS涂布的ELISA板。

基于 β 2-糖蛋白1水平的用巴维昔单抗治疗癌症的方法和其测定

背景技术

[0001] 1. 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年5月17日提交的共同未决的临时申请序列号62/507,580;2017年4月3日提交的临时申请序列号62/480,994;2016年10月11日(2016年10月10日是美国联邦假日)提交的临时申请序列号62/406,727;和2016年9月27日提交的临时申请序列号62/400,589的优先权,所述申请的全部说明书、权利要求书、附图和序列通过引用并入本文中,无需免责声明。

2. 发明领域

[0003] 本发明涉及生物标记物领域,并且特别涉及治疗前水平的 β 2-糖蛋白1(β 2GPI),特别是功能性 β 2GPI,作为预测对使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗(bavituximab)的疗法的成功应答的指示物的用途。

[0004] 3. 相关技术的描述

[0005] 在对抗所有疾病,包括癌症和病毒感染时,功能正常的免疫系统是治疗应答的一个重要部分。因此,大量研究往往致力于免疫疗法,包括免疫肿瘤学(I0)领域,其现在被认为是治疗癌症的策略所在。近年来,研究人员和临床医生研究了操纵免疫应答的新靶标和化合物。例如,靶向程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)和程序性死亡配体1(PD-L1)的I0剂已获得批准用于治疗某些晚期恶性肿瘤,而与其它I0靶标相互作用的化合物也正在研发当中。

[0006] 尽管如此,即使有这些新型免疫疗法,也仅对某些患者有效。因此,鉴于对长期疗法和新型免疫疗法的应答的可变性以及最大化临床益处的期望,仍然需要可预测治疗结果,包括I0治疗的生物标记物。虽然一些研究人员专注于利用治疗目标来研发个性化的预测方法,但其它研究人员正在通过利用结合和下游信号传导分子的测量来探索患者选择和分化的替代方法。

[0007] 最近,膜磷脂,磷脂酰丝氨酸(PS)已被鉴别为独特并且高度免疫抑制的分子,其充当调节宿主免疫应答的上游免疫检查点。这意味着PS在各种疾病中发挥重要作用,包括癌症和病毒感染,以阻断PS的PS靶向抗体的形式开辟了免疫治疗的新领域。

[0008] 先导PS靶向抗体是巴维昔单抗,一种源自称为3G4的鼠mAb的小鼠-人嵌合单克隆抗体(mAb)(Ran等人,2005;Huang等人,2005;美国专利第7,247,303号)。3G4和巴维昔单抗是鼠嵌合和完全人类抗体家族的一部分,其以 β 2-糖蛋白1(β 2GPI)依赖性方式靶向PS。也就是说,巴维昔单抗和相关的PS靶向抗体在 β 2GPI存在下与PS结合,以使得其形成高亲和力抗体- β 2GPI-PS复合物(Luster等人,2006)。在操作上,这些 β 2GPI依赖性PS靶向抗体在体内对PS具有特异性,正如许多成像研究中最特别显示的那样(Jennewein等人,2008;Marconescu&Thorpe,2008;Saha等人,2010;Stafford&Thorpe,2011;Zhao等人,2011;Zhang等人,2014;和Zhou等人,2014;美国专利第7,790,860号),包括测量和预测对治疗的应答(Gong等人,2013;Stafford等人,2013)。

[0009] 巴维昔单抗具有经证明的对抗各种其中PS是标记物的疾病的活性,特别是癌症和病毒感染,还有细胞内寄生虫感染,如寄生原虫,亚马逊利什曼原虫(*Leishmania amazonensis*) (Wanderley等人,2013) 和细胞内细菌病原体,如鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*) 和土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*),其分别引起鼠疫和土拉菌病(Lonsdale等人,2011)。关于病毒感染,已经显示PS靶向抗体,如巴维昔单抗会抑制病毒复制,降低器官中的病毒载量并增加存活期(Soares等人,2008; Moody等人,2010; 美国专利第7,906,115号)。巴维昔单抗和相关的PS靶向抗体的抗癌活性已经在大量的临床前研究和临床试验中得到证实,其中的作用是介导肿瘤血管以及阻断PS的免疫抑制信号传导(Ran等人,2005; 美国专利第7,572,448号; DeRose等人,2011)。

[0010] 当抗体与增加PS在肿瘤微环境中的暴露的试剂或条件一起使用时,如通过使用放射和/或共同给予化学疗法,可以增强PS靶向抗体,如巴维昔单抗的抗肿瘤作用(美国专利第7,422,738号;美国专利第8,486,391号;美国专利第7,572,448号)。例如,当使用巴维昔单抗家族的PS靶向抗体与多西他赛(docetaxel)组合治疗乳腺肿瘤(Huang等人,2005);与吉西他滨(gemcitabine)组合治疗胰腺肿瘤(Beck等人,2006);与辐射组合治疗肺癌(He等人,2007)和脑癌、成胶质细胞瘤(He等人,2009);与多西他赛组合治疗前列腺癌并再激活抗肿瘤免疫力(Yin等人,2013);以及与索拉非尼(sorafenib)组合治疗肝细胞癌(Cheng等人,2016)时,临床前证明了改善的抗肿瘤作用。当PS靶向抗体,如巴维昔单抗与其它I0药剂组合使用,如针对黑素瘤(Freimark等人,2016)和三阴性乳腺癌(Gray等人,2016a)的治疗,与呈CTLA-4或PD-1抗体形式的检查点抑制剂组合临床前所示,也会产生增强的抗肿瘤作用。

[0011] 还在800多名患者的临床研究中对巴维昔单抗进行了评估,其中大多数患者接受了组合治疗。这些临床试验包括患有病毒感染,如慢性C型肝炎病毒(HCV)和人类免疫缺陷病毒(HIV)的患者,以及患有多种肿瘤类型,包括肺癌、乳腺癌、肝癌(肝细胞癌(HCC))、胰腺癌、结肠直肠癌和肾癌(肾细胞癌(RCC))的患者。已由使用巴维昔单抗与以下组合的临床试验报道有前景的抗肿瘤作用:在HER2阴性转移性乳腺癌患者中,与多西他赛(Chalasani等人,2015);在晚期非小细胞肺癌(NSCLC)中,与太平洋紫杉醇-卡铂(Digumarti等人,2014);在肝细胞癌中,与索拉非尼(Cheng等人,2016);在先前治疗过的晚期非鳞状NSCLC中,与多西他赛(Gerber等人,2016)。

[0012] 总体而言,I期和II期临床研究的结果证明了巴维昔单抗具有临床意义的治疗作用。尽管如此,还没有与巴维昔单抗疗法相关的任何生物标记物,因此仍然需要有效的方法来优化用PS靶向抗体,如巴维昔单抗进行的治疗。由于巴维昔单抗抗体和其生理/病理靶标PS的独特性质,解决缺乏相关生物标记物数据的尝试受到阻碍。因此,需要改进的患者筛查方法,以便可以优化治疗。鉴于巴维昔单抗治疗的一种或多种循环生物标记物将是特别重要的进步,提供微创测试以选择患者并改善治疗结果。

发明内容

[0013] 本发明通过提供用于优化使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗和类似抗体(例如1N11)的治疗的新型生物标记物方法、组合物、试剂盒和测定来解决现有技术的前述和其它需要。本发明特别涉及治疗前水平的β2-糖蛋白1(β2GPI),最优选功能性β2GPI作为预测对使用巴维昔单抗的疗法的成功应答的指示物或“生物标记物”的用途。

[0014] 这些出人意料的新型方法、组合物、试剂盒和测定均通过选择具有限定范围的治疗前血液浓度的功能性β2GPI的患者来提供鉴别和治疗可用β2GPI依赖性PS靶向抗体治疗的患者,特别是用含巴维昔单抗的治疗方案或组合疗法治疗的癌症患者;最优先地,来提供鉴别和治疗患有癌症的使用巴维昔单抗(第一抗癌剂)和至少第二或第三抗癌剂的患者。“功能性”β2GPI是结合于PS和β2GPI依赖性PS靶向抗体,优选巴维昔单抗的β2GPI。

[0015] 在最优先的实施例中,本发明涉及基于等于或大于200μg/ml的功能性β2GPI的治疗前水平来选择、鉴别、诊断并且优选治疗患者。

[0016] 本发明提供一种用于治疗人类患者中的其中PS是标记物的疾病,特别是癌症的方法,其包含向患者给予PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,其中所述患者具有等于或大于200μg/ml的功能性β2GPI的治疗前血液浓度。优选地,向患者给予PS靶向抗体,如巴维昔单抗(其在本文中称为“第一治疗剂”和“第一抗癌剂”)以及至少第二治疗剂或抗癌剂。

[0017] 本发明还提供了一种治疗人类患者中的其中PS是标记物的疾病,特别是癌症的方法,其包含(以下步骤):

[0018] (a) 测量由患者获得的治疗前血液样品中功能性β2GPI的浓度;和

[0019] (b) 向功能性β2GPI的治疗前血液浓度等于或大于200μg/ml的患者给予PS靶向抗体,优选巴维昔单抗。优选地,向所述患者给予PS靶向抗体,如巴维昔单抗以及至少第二治疗剂或抗癌剂。

[0020] 本发明进一步提供了一种治疗人类患者中的其中PS是标记物的疾病,特别是癌症的方法,其包含(以下步骤):

[0021] (a) 由患者获得治疗前血液样品;

[0022] (b) 测量治疗前血液样品中功能性β2GPI的浓度;和

[0023] (c) 向功能性β2GPI的治疗前血液浓度等于或大于200μg/ml的患者给予PS靶向抗体,优选巴维昔单抗。优选地,向所述患者给予PS靶向抗体,如巴维昔单抗以及至少第二治疗剂或抗癌剂。

[0024] 本发明还提供了一种用于鉴别可用PS靶向抗体,优选巴维昔单抗治疗的人类患者,优选人类癌症患者,并治疗所述患者的方法,其包含(以下步骤):

[0025] (a) 测量由患者获得的治疗前血液样品中功能性β2GPI的浓度;

[0026] (b) 当治疗前血液样品中功能性β2GPI的浓度等于或大于200μg/ml时,将患者鉴别为可用PS靶向抗体,优选巴维昔单抗治疗;和

[0027] (c) 向功能性β2GPI的治疗前血液浓度等于或大于200μg/ml的患者给予PS靶向抗体,优选巴维昔单抗。优选地,(b) 将患者鉴别为可用巴维昔单抗和至少第二治疗剂或抗癌剂治疗,并且(c) 向患者给予巴维昔单抗和至少第二治疗剂或抗癌剂。

[0028] 进一步提供一种用于鉴别可用PS靶向抗体,优选巴维昔单抗治疗的人类患者,优选人类癌症患者,并治疗所述患者的方法,其包含(以下步骤):

[0029] (a) 由患者获得治疗前血液样品;

[0030] (b) 测量治疗前血液样品中功能性β2GPI的浓度;

[0031] (c) 当治疗前血液样品中功能性β2GPI的浓度等于或大于200μg/ml时,将患者鉴别为可用PS靶向抗体,优选巴维昔单抗治疗;和

[0032] (d) 向功能性β2GPI的治疗前血液浓度等于或大于200μg/ml的患者给予PS靶向抗

体,优选巴维昔单抗。优选地,(c)将患者鉴别为可用巴维昔单抗和至少第二治疗剂或抗癌剂治疗,并且(d)向患者给予巴维昔单抗和至少第二治疗剂或抗癌剂。

[0033] 本发明的另一个实施例是一种诊断可用PS靶向抗体,优选巴维昔单抗治疗的患者,优选癌症患者的方法,其中所述方法包含测量来自患者的血液样品中功能性β2GPI的浓度,其中如果功能性β2GPI的血液浓度等于或大于200μg/ml,那么患者被确定为可用PS靶向抗体,优选巴维昔单抗治疗。优选地,如果功能性β2GPI的血液浓度等于或大于200μg/ml,那么患者被诊断为可用巴维昔单抗和至少第二治疗剂或抗癌剂治疗。

[0034] 本发明的另一个实施例是一种PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,其用于治疗患者,优选治疗患者中的癌症的方法中,其中功能性β2GPI在来自患者的血液样品中以等于或大于200μg/ml的浓度存在。优选地,这涉及用于治疗癌症的进一步包含给予至少第二抗癌剂的此类方法中的巴维昔单抗。

[0035] 本发明的又另一个实施例是一种PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,其用于治疗其中PS是标记物的疾病,优选癌症的方法中,其中所述方法包含(以下步骤):

[0036] (a)鉴别来自专利,优选癌症患者的血液样品中功能性β2GPI的浓度;和

[0037] (b)如果功能性β2GPI的血液浓度等于或大于200μg/ml,那么向患者给予PS靶向抗体,优选巴维昔单抗。优选地,提供用于治疗癌症的方法中的巴维昔单抗和至少第二治疗剂或抗癌剂。

[0038] 除了等于或大于200μg/ml的β2GPI的最优先水平,在某些优选实施例中,本发明涉及基于在200-290μg/ml范围内的治疗前功能性β2GPI选择患者。这些水平之内的所有数字和范围均包括在上述方法和用途中的每一种中,如基于等于或大于200或210μg/ml的功能性β2GPI;和在200或210μg/ml中的任何一个作为下限数,到270、280、290、300、310或320μg/ml中的任何一个作为上限数的范围内,包括200-270、200-280、200-290、200-300、200-310、200-320、210-270、210-280、210-290、210-300、210-310和210-320μg/ml等(目前优选的范围为210-270、210-280、210-290、200-280和200-290)的β2GPI的治疗前水平选择、鉴别、诊断并且优选治疗患者。

[0039] 在向患者,优选人类癌症患者给予PS靶向抗体,优选巴维昔单抗时,抗体以约1-10,1-6,3-6或1-3mg/kg之间,最优先约3mg/kg的剂量给定。

[0040] 在前述方法和用途中的每一种中,本发明适用于使用PS靶向抗体,优选巴维昔单抗以及呈化疗剂形式的第二或第三抗癌剂,如索拉非尼、太平洋紫杉醇、卡铂、吉西他滨或多西他赛,来治疗实体肿瘤,如卵巢癌、胃癌、肝癌、结肠直肠癌、乳腺癌、食道癌、脑癌(如神经胶质瘤、成胶质细胞瘤)、前列腺癌、皮肤癌(黑素瘤)、头颈癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌或肺癌,优选非小细胞肺癌(NSCLC),包括非鳞状NSCLC。巴维昔单抗在功能性β2GPI和PS复合物中的结合机制以及巴维昔单抗整体的免疫激活机制,对所有巴维昔单抗疗法来说都是常见的。因此,本发明适用于选择使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗)或类似抗体(例如1N11)的任何疗法的患者,特别是在如与化学疗法,并且优选地与免疫肿瘤学(IO)药剂的组合疗法中。

[0041] 合适的IO药剂是免疫检查点抗体,包括结合于激活免疫检查点、受体或分子(如CD28、OX40和/或GITR)的激动(激活)抗体,并且优选结合于抑制性免疫检查点、受体或分子(如PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3和/或LAG-3)的拮抗(阻断)抗体。结合于抑制性免疫检查点、受体或分子的拮抗(阻断)抗体在本文中也被称为“免疫检查点抑制剂”或“ICI”。免疫检查

点抗体的优选实例(或免疫检查点抑制剂)是CTLA-4、PD-1或PD-L1阻断抗体,诸如伊匹单抗(ipilimumab),曲美木单抗(tremelimumab),纳武单抗(nivolumab),派姆单抗(pembrolizumab),德瓦鲁单抗(durvalumab)和阿特珠单抗(atezolizumab)。

[0042] 本发明特别地考虑了使用PS靶向抗体,优选巴维昔单抗以及与第二和第三治疗剂或抗癌剂的患者的选择、诊断和治疗。例如,化学治疗剂和免疫检查点抗体,或具有两种免疫检查点抗体,包括使用PS靶向抗体,优选巴维昔单抗的治疗,其中用化学治疗剂治疗后用免疫检查点抗体治疗。

[0043] 关于这种 β 2GPI生物标记物技术,并且由于具有其它研究和临床用途,本发明还提供了特别适用于检测和量化功能性 β 2GPI的新型测定法、组合物和试剂盒。无论是在上述方法和用途方面,还是在作为新型测定方面,本发明因此进一步提供测量功能性 β 2GPI的方法,其包含(以下步骤):

[0044] (a) 任选地,用PS涂布固体支持物,如ELISA板以制备经PS涂布的固体支持物或经PS涂布的ELISA板(或可以使用预先制备的经PS涂布的固体支持物或ELISA板);

[0045] (b) 将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,和疑似含有 β 2GPI的生物样品添加到经PS涂布的固体支持物,从而在有效允许样品中的 β 2GPI结合于PS靶向抗体,优选巴维昔单抗和经PS涂布的固体支持物的条件下共培育抗体和样品;和

[0046] (c) 检测PS靶向抗体,优选巴维昔单抗和 β 2GPI结合于经PS涂布的固体支持物,从而测量结合样品中的功能 β 2GPI。

[0047] 疑似含有 β 2GPI的生物样品可以是血液样品,如血浆样品或血清样品。可以使用疑似含有 β 2GPI的其它生物流体样品,包括细胞上清液等。

[0048] 如本文所公开并且如所属领域技术人员已知,可以采用多种测定结合形式。在优选的实施例中,PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,本身将附接于产生可检测信号的可检测剂,以使得通过检测和测量可检测信号来检测和测量抗体和 β 2GPI与经PS涂布的固体支持物的结合。在其它优选的实施例中,在添加疑似含有 β 2GPI的样品(如血液样品)之前,将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗添加到经PS涂布的固体支持物中。

附图说明

[0049] 以下附图形成本说明书的一部分,并且包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文给出的具体实施例的详细描述,可以更好地理解本发明。美国专利或申请文件可含有至少一幅彩色附图。具有彩色附图的这一美国专利或专利申请公开的副本将在请求和支付必要费用后由专利局提供。

[0050] 图1A、图1B、图1C和图1D.用纯化至具有表观均质性的3G4抗体处理的小鼠中的肿瘤生长的抑制.图1A,在SCID小鼠的乳腺脂肪垫中生长的已确定(0.6-0.7cm直径,140mm³体积)的人类MDA-MB-435乳腺癌;图1B,在SCID小鼠的乳腺脂肪垫中生长的已确定(0.5-0.7cm直径,110mm³体积)的人类MDAMB-231乳腺癌;图1C,在同基因BALB/c小鼠中皮下生长的Meth A纤维肉瘤;和图1D,在SCID小鼠皮下生长的大(0.8-1cm直径,370mm³体积)人类L540霍奇金氏肿瘤。从箭头指示的那天开始,用100 μ g 3G4抗体(○,空心圆)或对照,BBG3抗体(●,实心圆)腹膜内注射8至10只小鼠的群组。此后一周三次持续加以处理。

[0051] 图2A和图2B.结合于经PS涂布的微量滴定板的3G4抗体是血清依赖性的。图2A,从

在含有牛血清的培养基(▲, SCM)或无血清培养基(■, SFM)中生长的细胞中纯化3G4抗体。用PS涂布微量滴定板并封闭在来自鸡蛋清的1%卵白蛋白(OVA)中。在10%胎牛血清(实线, FBS)或来自鸡蛋清的1%卵白蛋白(虚线, OVA)中进行3G4的连续稀释。图2B,用PS涂布微量滴定板并封闭在1%OVA中。如所示,在来自物种小鼠(◆)、大鼠(■)、人类(●)和牛(▲)的10%血清中进行SFM中3G4的连续稀释。

[0052] 图3.3G4抗体结合血浆蛋白 β 2GPI。用从人类血浆中纯化的人类 β 2GPI(h β 2GPI)涂布微量滴定板,并封闭在1%OVA中。在1%OVA中进行商购小鼠抗人类 β 2GPI(◆, α - β 2GPI)、来自SFM的3G4抗体(■, 3G4)和对照小鼠IgG(▲, 对照mIgG)的连续稀释。

[0053] 图4.3G4抗体结合于域II处的 β 2GPI。用重组全长h β 2GPI(◆, 域I-V);或不含域I的h β 2GPI肽(-X-, 域II-V)、不含域I和II的h β 2GPI肽(■, 域III-V)、不含域I、II和III的h β 2GPI肽(▲, 域IV-V)或不含域I、II、III和IV的h β 2GPI肽(●, 域V)涂布微量滴定板的孔。将板封闭在1%OVA中,并且在1%OVA中进行来自SFM的3G4抗体的连续稀释。

[0054] 图5.ch3G4抗体和 β 2GPI一起结合于具有暴露的PS的细胞。将成年牛主动脉内皮(ABAE)细胞与200 μ M溶血磷脂酰胆碱(LPC)在DMEM+10%正常小鼠血清(MS)中,加上(i)仅ch3G4,(ii)ch3G4+h β 2GPI(同时),或(iii)仅纯化h β 2GPI培育30分钟。然后洗涤细胞,并分别与(i)仅缓冲液,(ii)仅缓冲液,或(iii)ch3G4培育30分钟。最后,洗涤细胞,加以固定,并用荧光标记物染色以检测ch3G4的结合。ch3G4和h β 2GPI以2 μ g/ml的浓度使用。使用MetaVue软件量化ch3G4结合的像素区域。值是相对于条件(i)下ch3G4的结合,其设定为1。

[0055] 图6A和图6B. β 2GPI的脂质结合区介导ch3G4抗体与具有暴露的PS的细胞的结合。图6A,将ABAE细胞与ch3G4抗体加上(i) β 2GPI(切口h β 2GPI)的非脂质结合形式或(ii)完整的h β 2GPI("h β 2GPI")一起培育。在存在或不存在200 μ M LPC下在DMEM+10%MS中培育30分钟。然后洗涤细胞,加以固定,并用荧光标记物染色以检测ch3G4的结合。ch3G4抗体、完整的h β 2GPI和切口h β 2GPI以2 μ g/ml的浓度使用。使用MetaVue软件量化ch3G4结合的像素区域。值是相对于条件(i)无LPC下ch3G4的结合,其设定为1。图6B,用完整的h β 2GPI(三角形,h β 2GPI)或切口h β 2GPI(正方形,切口)涂布微量滴定板的孔,并封闭在1%OVA中。在1%OVA中进行ch3G4抗体(实心)或对照mIgG(空心)的连续稀释。

[0056] 图7A和图7B. β 2GPI介导的3G4抗体与具有暴露的PS的细胞的结合需要二价性。图7A,在200 μ M LPC存在下,在DMEM+10%FBS中,将ABAE细胞与20nM 3G4、3G4F(ab')₂或3G4Fab'单体一起培育30分钟。然后洗涤细胞,加以固定,并用荧光标记物染色以检测3G4抗体或抗体片段的结合(3G4F(ab')₂和3G4Fab'显示在图7A中)。使用MetaVue软件量化抗体结合的像素区域。值是相对于在不存在LPC下3G4的结合,其设定为1。图7B,将ABAE细胞与200 μ M LPC、40nM纯化的h β 2GPI、20nM ch3G4和一定效价的3G4Fab'单体在DMEM+10%MS中一起培育30分钟。然后洗涤细胞,加以固定,并用荧光标记物染色以检测ch3G4的结合。使用MetaVue软件量化ch3G4结合的像素区域。值是相对于不存在竞争3G4Fab'下的ch3G4的结合,其设定为100。

[0057] 图8.3G4和巴维昔单抗家族的抗体以 β 2GPI依赖性方式结合于PS。3G4、巴维昔单抗和相关治疗性PS靶向抗体与 β 2GPI结合(在域II处),而 β 2GPI又通过域V结合于PS。通常, β 2GPI是单体的,仅与PS微弱结合并快速解离。在存在PS靶向抗体,如3G4或巴维昔单抗的情况下,当存在具有暴露的PS的表面时,两个 β 2GPI分子能够结合于PS并通过二价抗体交联,

从而形成稳定的复合物。抗体- β 2GPI复合物从具有暴露的PS的细胞的解离要比单体 β 2GPI(在不存在PS靶向抗体的情况下)慢超过1000倍。

[0058] 图9A和图9B.低水平的 β 2GPI支持体内3G4抗体的临床前抗肿瘤活性。图9A,假设由杂交瘤细胞产生时,3G4抗体的纯度为90%,用3G4抗体处理的小鼠含有2 μ g/ml牛 β 2GPI,其中 β 2GPI与抗体的摩尔比为0.12。图9B,在纯度为80%的起始点处,用3G4抗体处理的小鼠含有4 μ g/ml牛 β 2GPI,其中 β 2GPI与抗体的摩尔比为0.25。

[0059] 图10.低水平的 β 2GPI支持体外巴维昔单抗结合于具有暴露的PS的细胞。将ABAE细胞与200 μ M LPC(以诱导PS暴露)、40nM纯化的h β 2GPI和增加浓度的ch3G4抗体(巴维昔单抗)在DMEM+10%小鼠血清中一起培育30分钟。然后洗涤细胞,固定并用荧光标记物染色以检测ch3G4的结合。使用MetaVue软件量化ch3G4结合的像素区域。值是相对于320pM ch3G4的结合,其设定为1。

[0060] 图11.低水平的 β 2GPI支持体外2aG4抗体结合于板上的PS。用PS涂布微量滴定板。在增加量的人类 β 2GPI(在卵白蛋白中)存在下,测试含有固量的2aG4抗体的溶液与PS的结合。使用HRP缀合的抗人类IgG作为二抗检测结合的抗体,以TMB作为底物并在450nm的波长下读取吸光度。

[0061] 图12.一定人类血清范围内的巴维昔单抗与PS的体外结合.用PS涂布微量滴定板。获得六种不同的独立人类血清样品,名义上称为血清#3(◆,深蓝色线)、#4(■,粉红色线)、#9(▲,黄线)、#11(-x-,浅蓝色线)、#13(-x-,紫色线)和#19(●,棕色线),并在PBS中稀释,以提供低至0.1%的人类血清%。将巴维昔单抗-HRP以2 μ g/ml添加到每种%人类血清溶液中。将人类血清中的那些巴维昔单抗-HRP混合物添加到PS板中并使其结合。洗涤板,添加TMB底物并在450nm波长下读取吸光度。

[0062] 图13.给予患有难治性晚期癌症的患者后的平均血清巴维昔单抗浓度.在第0天、第28天、第35天和第42天,以0.1mg/kg(o,空心圆)或0.3mg/kg(□,空心方块)静脉内给予巴维昔单抗;在第0天、第7天、第14天和第28天,以1mg/kg(●,实心圆)或3mg/kg(■,实心方块)给予巴维昔单抗。在给药后的指定日期测定平均血清巴维昔单抗浓度。量化下限为0.1 μ g/ml。

[0063] 图14.给予巴维昔单抗后患者的 β 2GPI水平.对于感染HCV的患者,以1mg/kg、3mg/kg和6mg/kg的量给予重复剂量的巴维昔单抗(在由粗体黑色箭头,↓指示的日期)。在每个剂量(1mg/kg,黄色顶线;3mg/kg,粉红色中线;6mg/kg,蓝色底线)处理后的指定日期测定血清 β 2GPI水平并与处理前 β 2GPI水平进行比较。

[0064] 图15.1N11(PGN635)抗体以血清依赖性方式结合于PS。通过ELISA针对经涂铺的PS和磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(SM)的混合物(PC/SM)测试1N11的scFv形式的结合。用10 μ g/ml PS或相同量的PC/SM混合物(各自溶于己烷中)涂布聚苯乙烯板。蒸发掉己烷后,添加PBS中的10%人类血清(+10%血清)或1%卵白蛋白(+1%OV)并培育一小时。将处于10%人类血清(+10%血清)或1%卵白蛋白(+1%OV)中的20 μ g/ml纯化的1N11scFv添加到针对每个抗原的六个孔中的第一个孔中,并用3倍稀释液滴定。用HRP缀合的抗c-myc标签小鼠单克隆抗体(Invitrogen)检测剩余的结合的scFv。

[0065] 图16.功能性 β 2GPI的标准曲线.如实例XVI中所述,在功能性 β 2GPI测定中测试已知量的功能性 β 2GPI样品,并绘图以提供标准曲线。根据所述标准曲线,可以确定测试样品,

特别是稀释的血浆或血清测试样品中的功能性 β 2GPI的量。

[0066] 图17A、图17B、图17C和图17D. 参与用于处理非小细胞肺癌(NSCLC)的巴维昔单抗和多西他赛的III期试验的患者中处理前功能性 β 2GPI水平($\mu\text{g}/\text{ml}$)的分布. 图17A,所有592名可评估患者的功能性 β 2GPI的分布;图17B,来自相同患者的 β 2GPI的框图;图17C,用巴维昔单抗和多西他赛处理的患者(294名可评估患者)的功能性 β 2GPI的分布;和图17D,用安慰剂和多西他赛处理的患者(298名可评估患者)的功能性 β 2GPI的分布。

[0067] 图18A和图18B. 来自III期临床试验的Kaplan-Meier存活曲线显示,当用巴维昔单抗处理时,功能性 β 2GPI水平等于或大于 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的NSCLC患者具有存活期延长(mOS)趋势。图18A,在用巴维昔单抗处理的患者中,功能性 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者(“巴维昔单抗: $\text{B2GP1} \geq 200$ ”;实心蓝色顶线)具有存活期延长趋势,其与 β 2GPI $< 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者(“巴维昔单抗: $\text{B2GP1} < 200$ ”;蓝色底线)相反。图18B,在功能性 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者中,那些用巴维昔单抗和多西他赛处理的患者(“巴维昔单抗”;蓝色顶线)具有存活期延长趋势,其与用安慰剂和多西他赛处理的具有相同 β 2GPI水平($200\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更高)的患者(“安慰剂”;绿色底线)相反。

[0068] 图19. 临床前研究中的支持3G4抗体的PS结合、功能性和抗肿瘤活性的 β 2GPI水平与III期和其它临床试验中的患者中的 β 2GPI水平的比较. III期试验中的592名可评估患者中的处理前功能性 β 2GPI水平的分布与图17A中所阐述相同。对于III期试验中用巴维昔单抗处理的NSCLC患者(以及用巴维昔单抗处理的其它NSCLC和胰腺癌患者,如实例XVIII和实例XX中),等于或大于 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的功能性 β 2GPI水平(暗橙色和浅橙色条状物一起)提供存活期延长趋势(图18A和图18B)。对于III期试验中用巴维昔单抗处理的NSCLC患者,在 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 $290\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间范围内的功能性 β 2GPI水平(深橙色)提供统计上显著更好的mOS(表14A)。在临床前研究(实例V)中,约 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更高(→,长绿色箭头)或约 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更高(>,短绿色箭头)的功能性 β 2GPI水平对于巴维昔单抗的PS结合、功能性和抗肿瘤活性为足够的。

[0069] 图20A、图20B、和图20C. 如实例XVIII,A中所报告,实例XIII的用于处理NSCLC的巴维昔单抗和多西他赛的II期试验中的患者的处理前功能性 β 2GPI水平($\mu\text{g}/\text{ml}$)的分布. 图20A,所有119名可评估患者的功能性 β 2GPI的分布;图20B,用 $3\text{mg}/\text{kg}$ 巴维昔单抗和多西他赛处理的患者(40名可评估患者)的功能性 β 2GPI的分布;和图20C,收集的对照组(安慰剂或 $1\text{mg}/\text{kg}$ 巴维昔单抗)中的患者(79名可评估患者)的功能性 β 2GPI的分布。

[0070] 图21A、图21B和图21C. 来自实例XIII的II期试验的Kaplan-Meier存活曲线显示,当用巴维昔单抗处理时,功能性 β 2GPI水平等于或大于 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的NSCLC患者具有存活期延长趋势。图21A,在用 $3\text{mg}/\text{kg}$ 巴维昔单抗处理的患者中,功能性 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者(“巴维昔单抗: $\text{B2GP1} \geq 200$ ”;蓝色顶线)具有存活期延长趋势,其与 β 2GPI $< 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者(“巴维昔单抗: $\text{B2GP1} < 200$ ”;黄色底线)相反。图21B,在功能性 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者中,用 $3\text{mg}/\text{kg}$ 巴维昔单抗处理的患者(“巴维昔单抗”;蓝色顶线)具有存活期延长趋势,其与组合对照组(“安慰剂”,绿色底线)中的患者相反。图21C,在组合对照组中的患者中,功能性 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者(“安慰剂: $\text{B2GP1} \geq 200$ ”;蓝线)与 β 2GPI $< 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者(“安慰剂: $\text{B2GP1} < 200$ ”;黄线)具有相似的存活率。

[0071] 图22. 如实例XVIII,B中所报告,实例XII的用于处理胰腺癌的吉西他滨和巴维昔

单抗的II期试验中的患者的处理前功能性β2GPI水平(μg/ml)的分布.示出所有31名可评估患者的功能性β2GPI的分布。

[0072] 图23.来自实例XII的II期试验的Kaplan-Meier存活曲线显示,当功能性β2GPI以等于或大于200μg/ml的水平(“B2GP1>=200”;蓝色顶线)存在时,用吉西他滨和巴维昔单抗处理的胰腺癌患者具有存活期延长趋势,其与低于200μg/ml的功能性β2GPI水平(“B2GP1<200”;黄色底线)相反。

[0073] 图24A、图24B和图24C.如实例XVIII,C中所报告,在用于处理NSCLC的巴维昔单抗和太平洋紫杉醇/卡铂的II期试验中的患者的处理前功能性β2GPI水平(μg/ml)的分布.图24A,所有84名可评估患者的功能性β2GPI的分布.图24B,用巴维昔单抗和太平洋紫杉醇/卡铂处理的患者(44名可评估患者)的功能性β2GPI的分布;和图24C,太平洋紫杉醇/卡铂对照组中的患者(40名可评估患者)的功能性β2GPI的分布.

[0074] 图25A、图25B和25C.来自实例XVIII,C中所报告的II期试验的Kaplan-Meier存活曲线显示,当用巴维昔单抗处理时,功能性β2GPI水平等于或大于200μg/ml的NSCLC患者具有存活期延长趋势。图25A,在用巴维昔单抗处理的患者中,功能性β2GPI≥200μg/ml的患者(“C/P+巴维昔单抗:B2GP1>=200”;蓝色顶线)具有存活期延长趋势,其与β2GPI<200μg/ml的患者(“C/P+巴维昔单抗:B2GP1<200”;黄色底线)相反。图25B,在功能性β2GPI≥200μg/ml的患者中,那些用巴维昔单抗处理的患者(“C/P+巴维昔单抗”;蓝色,顶线)与对照组患者相比具有存活期延长趋势(“C/P”;绿色,底线)。图25C,在对照组患者中,功能性β2GPI≥200μg/ml的患者(“C/P:B2GP1>=200”;蓝线)与β2GPI<200μg/ml的患者(“C/P:B2GP1<200”;黄线)相比,存活率降低。

[0075] 图26.Kaplan-Meier存活曲线显示,用巴维昔单抗和多西他赛处理,随后进行免疫疗法(“SACT-I0”)的患者(蓝色顶线)具有统计学上显著更好的mOS,其与使用单独多西他赛处理,随后进行免疫疗法的患者(绿色底线)相反。针对这些存活曲线,处理组、mOS和统计分析列于表16(实例XIX)中。

[0076] 图27.Kaplan-Meier存活曲线显示,当用巴维昔单抗处理,随后进行免疫疗法(“SACT-I0”)时,功能性β2GPI水平等于或大于200μg/ml的NSCLC患者具有统计学上显著更好的mOS。在功能性β2GPI≥200μg/ml的患者中,用巴维昔单抗处理的患者(“多西他赛+巴维昔单抗”,蓝线)具有延长的存活期,其与对照患者(“多西他赛+安慰剂”,绿线)相反,包括接受SACT-I0的患者(“伴随SACT I0”,实线)和不存在SACT-I0的患者(“无SACT I0”,虚线)。

具体实施方式

[0077] 在当今时代,越来越强调基于如疾病风险和/或预测应答等因素对个体患者进行定制治疗。这一概念通常可以描述为“个性化医疗”。对有助于特定疗法有效性的不同成分的更深入理解可以为对患者进行分级提供基础,从而改善连续患者群体的治疗结果。本发明通过提供新型生物标记物体现按照这样的思路作出的进步,通过所述生物标记物,使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗的免疫疗法得到优化。

[0078] A.磷脂酰丝氨酸作为治疗靶标

[0079] 磷脂酰丝氨酸(PS)是一种高度免疫抑制分子,其充当上游免疫检查点并调节宿主免疫应答。因此,PS涉及各种疾病,包括癌症和病毒感染。因此,PS靶向抗体形式的免疫治疗

剂为包括癌症在内的那些疾病提供了新的治疗选择。

[0080] 更详细地,在正常细胞中,PS被分离到质膜的内小叶,但是在各种疾病状态的患病和异常细胞中,特别是在癌症和病毒感染中,会外化到质膜的外小叶。在癌症情形下,引起PS外化的一些环境压力因素是缺氧/复氧、氧化应激和暴露于某些细胞因子。PS外化也发生在细胞死亡和免疫吞噬细胞清除的条件下(Birge等人,2016)。随后,PS被免疫细胞上的PS受体(例如,TIM 3和TIM4、BAI1、稳定蛋白2和RAGE)识别并结合,任选地通过一种或多种桥接蛋白,使得PS诱导并维持免疫抑制。在肿瘤微环境中,PS暴露于肿瘤血管内皮细胞、肿瘤细胞和源于肿瘤的外泌体的表面,并且复制免疫抑制过程,从而防止发生抗肿瘤和炎症反应。

[0081] 暴露的PS是促进识别和清除死亡细胞的吞噬信号,其触发免疫抑制性细胞因子(例如TGF-β和IL-10)的释放并抑制促炎细胞因子(例如TNF-α和IL-12)的产生。PS还使巨噬细胞偏向免疫抑制性M2表型,抑制树突细胞(DC)成熟和DC呈递抗原的能力,同时刺激DC分泌促进T细胞耐受的免疫抑制性介质。总之,PS是诱导和维持免疫抑制的肿瘤微环境的核心因素。

[0082] B. PS靶向抗体

[0083] 由于PS暴露在肿瘤微环境中具有促进肿瘤进展的倾向,PS靶向抗体可用于阻断PS与免疫细胞上特异性受体的结合,从而提供有效的癌症疗法(Yin等人,2013)。已研发出多种此类PS靶向抗体作为治疗剂,如下所示。“PS靶向抗体”组包括在体外可操作地结合于PS,并且在体外特异性定位并结合于疾病状态下暴露的PS,,特别是肿瘤细胞和肿瘤血管上的PS的所有抗体,无论抗体是否直接结合于PS或需要血清蛋白与PS形成紧密结合复合物。这种“直接”和“间接”PS靶向抗体在下文加以更详细地描述。

[0084] B1. 巴维昔单抗

[0085] 产生的用于评估PS靶向抗体的临床前潜力的早期单克隆抗体是称为3G4的抗体,其为小鼠IgG₃单克隆抗体(实例I;Ran等人,2005;Huang等人,2005)。将分泌3G4抗体的杂交瘤细胞系样品保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection; ATCC),并给定ATCC保藏号PTA 4545。保藏的杂交瘤的可用性不应被解释为违反任何政府的职权部门根据其专利法授予的权利来实施本发明的许可。

[0086] 巴维昔单抗是3G4小鼠抗体的人类嵌合形式,其中鼠可变区(抗原结合区)可操作地连接于人类抗体恒定区(实例III,C)。巴维昔单抗家族的抗体详细描述于众多美国专利,例如美国专利第7,247,303号和美国专利第7,572,448号中,并且巴维昔单抗可以通过制备保藏为ATCC PTA 4545的抗体的人类嵌合形式来再产生。巴维昔单抗当给予患者时,免疫原性较低,因为抗体的大部分来自人类。

[0087] 3G4和巴维昔单抗抗体有力结合于阴离子磷脂,特别是PS,在血清存在下,还结合于磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)和心磷脂(CL)(RAN等人,2005)。在这些阴离子磷脂中,PS在生理学和病理学上是最相关的。无论是否存在血清,3G4和巴维昔单抗均未展现出可检测的与中性磷脂、磷脂酰胆碱(PC)、鞘磷脂(SM)或磷脂酰乙醇胺(PE)的结合。

[0088] 尽管起初认为,3G4和巴维昔单抗抗体直接结合于PS,但后来据测定,所述PS结合是由血清蛋白(其被鉴别为β2糖蛋白1(β2GPI))介导(实例IV;Luster等人,2006)。事实上,3G4和巴维昔单抗在β2GPI(包括纯化的β2GPI以及通过存在于通常用于ELISA中的10%血清

中简单提供的 β 2GPI)存在下进行的酶联免疫吸附测定(ELISA)中有力结合PS。

[0089] β 2GPI,也称为载脂蛋白H,具有五个域,I、II、III、IV和V(1、2、3、4和5),并且域结构在哺乳动物中是保守的。 β 2GPI以三级结构形式折叠成所述五个可辨别域,并且可以具有封闭的圆形结构或开放的J形或钩形结构。 β 2GPI通过其C末端域,域V中的带正电荷区域与阴离子磷脂,特别是PS结合,只要如通过用纤溶酶在Lys317/Thr318裂解位点处裂解,域V没有“切口”(其破坏PS结合)(Hunt等人,1993;Hunt&Krilis,1994)。3G4和巴维昔单抗抗体结合于 β 2GPI的域II。这增强了3G4和巴维昔单抗作为治疗性抗体的安全性,因为与 β 2GPI结合的某些其它抗体与病理学相关,但这些抗体与 β 2GPI的域I结合。

[0090] 3G4和巴维昔单抗抗体与PS的高亲和力结合需要抗体与 β 2GPI的二价相互作用(实例IV;图8)。在不存在此类抗体的情况下, β 2GPI仅以低亲和力结合于阴离子磷脂,特别是PS。这已经在显示3G4和巴维昔单抗与PS在 β 2GPI存在下以高亲和力复合物形式结合,调整1 μ M至1nM下 β 2GPI与PS结合的研究中得到量化。

[0091] 3G4和巴维昔单抗抗体与PS的 β 2GPI依赖性结合描绘在图8中。巴维昔单抗家族抗体与 β 2GPI的域II结合。如上所述,由于巴维昔单抗与 β 2GPI的域II结合,所以其与副作用无关,如其中存在与 β 2GPI的域I结合的抗体的与抗磷脂综合征相关的副作用(de Laat等人,2005;de Laat等人,2006;Ioannou等人,2007)。抗体与 β 2GPI的高亲和力二价相互作用协调所得与PS的高亲和力结合,包括当PS在细胞表面和膜上外化时。

[0092] 尽管3G4和巴维昔单抗抗体与 β 2GPI结合,但将其称为“PS靶向抗体”,因为它们特异性定位并结合体内疾病状态下暴露的PS。由于PS维持在健康正常细胞的内部,并且仅暴露于疾病状态下的细胞表面,因此体内抗体定位不仅对PS具有特异性,而且对于其中PS是标记物的疾病,特别是癌症,以及病毒感染和某些其它病理学具有特异性。

[0093] 图8还显示,与PS结合的 β 2GPI依赖性抗体在体外与体内相同,使得ELISA是用于疗法的精确模型。确切地说,在其中用PS涂布板并且在血清存在下进行ELISA的所述ELISA中,3G4、巴维昔单抗等抗体能够与PS形成稳定的结合复合物。因此,ELISA测定模拟疗法期间的体内情况,其中PS仅在疾病环境中的细胞,如肿瘤微环境中的细胞或病毒感染的细胞上独特地暴露。与ELISA一样,当3G4和巴维昔单抗抗体遇到暴露的PS时,其能够与血液中存在的 β 2GPI形成稳定的结合复合物。无论PS是否在ELISA孔或患病细胞上,抗体- β 2GPI复合物均具有比单体 β 2GPI,即不存在PS靶向抗体的 β 2GPI高多于1000倍的PS亲和力。

[0094] B2. 直接PS结合抗体,如11.31

[0095] 除了间接PS结合或PS靶向抗体,如巴维昔单抗,整个PS靶向抗体家族包括与PS直接结合的抗体,即直接PS结合或PS靶向抗体。此类“直接PS结合抗体”(或“直接PS靶向抗体”)是一种以下抗体,其不仅对PS具有功能特异性,而且在体外和体内靶向并结合PS(间接结合抗体也是如此),但即使在体外结合测定中,也不需要血清蛋白,如 β 2GPI以与PS形成紧密结合复合物。

[0096] 此类直接PS结合抗体的一个特定实例是称为9D2的小鼠单克隆抗体(Ran等人,2002)。已显示9D2抗体定位于肿瘤血管并在体内发挥抗肿瘤作用(Ran等人,2002)。直接PS结合抗体的另一实例是称为11.31(PGN632)的全人类抗体。11.31抗体还显示在体内发挥抗肿瘤作用(例如,在携带MDA-MB-435乳腺癌异种移植物的小鼠中)并且显示出令人印象深刻的抗病毒作用(Moody等人,2010;美国专利第7,455,833号))。

[0097] 因此直接PS结合抗体用于治疗其中PS是标记物的各种疾病,最特别癌症和病毒感染。然而,用于优化使用此类直接结合PS靶向抗体的治疗的生物标记物通常将不依赖于血清蛋白,诸如 β 2GPI,如本发明中,但依赖于其他因子。针对直接结合抗体的适用生物标记物包括PS靶向抗体的免疫生物标记物。

[0098] B3.其它 β 2GPI依赖性PS靶向抗体,如1N11

[0099] 本发明的优选实施例涉及PS靶向抗体家族的另一部分,即间接PS结合抗体。如本文所用,“间接PS结合抗体”或“间接PS靶向抗体”,是一种以下抗体,其对PS具有功能特异性,体外可操作地结合于PS并体内靶向和结合于PS,但需要血清蛋白以与PS形成紧密结合复合物。本发明特别涉及间接PS结合或PS靶向抗体的子组,即 β 2GPI依赖性PS结合或PS靶向抗体。如本文所用,“ β 2GPI依赖性PS结合抗体”或“ β 2GPI依赖性PS靶向抗体”,是对PS具有功能特异性,体外可操作地结合于PS,即在含有 β 2GPI的血清或纯化血清存在下进行的测定中体外结合于PS,并体内靶向和结合于PS,但需要血清蛋白, β 2GPI以与PS形成紧密结合复合物。如上所述,此类抗体的实例包括小鼠抗体、3G4和嵌合抗体、巴维昔单抗。

[0100] β 2GPI依赖性PS靶向抗体的其它目前优选的实例是称为1N11 (PGN635) 和1G15的完全人类抗体,优选1N11抗体。已描述使用1N11抗体及其鼠嵌合形式的若干研究,包括成像和治疗 (Gong等人, 2013; Freimark等人, 2016年; Gray等人, 2016a)。1N11抗体的PS结合特性如图15所示。通过噬菌体展示产生1N11,并使用仅在血清存在下(或仅在 β 2GP1存在下)与PS结合的测定进行选择。如图15所示,所属领域技术人员可以常规地进行此类研究以制备和分离其它PS靶向抗体和 β 2GPI依赖性PS靶向抗体。

[0101] C.广泛的治疗经验

[0102] 正如上文论述的PS生物学所预测,来自PS的信号抑制免疫细胞识别和对抗肿瘤的能力。巴维昔单抗和相关抗体通过阻断PS与其受体的结合以及通过发送替代的免疫激活信号来超越所述PS介导的免疫抑制信号传导。因此已显示PS靶向抗体会改变肿瘤中免疫细胞的功能,导致免疫激活和抗肿瘤免疫应答的多种征象。

[0103] PS靶向抗体,如巴维昔单抗通过在肿瘤微环境中对免疫细胞进行多焦点重编程以支持免疫激活来实现PS介导的免疫抑制的这一阻挡 (Yin等人, 2013)。巴维昔单抗和相关抗体因此打破了肿瘤微环境中的免疫耐受性。抗体介导的PS阻断降低髓源性抑制细胞 (MDSC)、转化生长因子- β (TGF β) 和白细胞介素-10 (IL-10) 的水平,并增加促炎细胞因子,如干扰素 γ (IFN γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和白细胞介素-12 (IL-12) 的水平。所述PS阻断还将MDSC和肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 从主要的M2再极化到主要的M1表型,促进树突细胞 (DC) 的成熟,激活细胞毒性T细胞并诱导有效的适应性抗肿瘤T细胞免疫 (Yin等人, 2013)。

[0104] 巴维昔单抗和相关抗体还激活先天免疫,即NK细胞以及M1巨噬细胞。重要的是,这些抗体还引起预先存在的独特地暴露PS的肿瘤血管的选择性关闭 (Ran等人, 2005; 美国专利第7,572,448号),并且所述活性包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC),其经肿瘤浸润M1巨噬细胞和NK细胞介导。以这种方式破坏肿瘤血管引起肿瘤细胞破坏。免疫疗法和血管靶向的这些双重机制,特别是ADCC作用,意指巴维昔单抗可以有效对抗对免疫激活或常规的抗增生化疗有抗性的肿瘤。

[0105] 与其它免疫治疗剂一样,当用于联合治疗时,PS靶向抗体的抗肿瘤作用增加。与巴维昔单抗和相关抗体一起使用的一组药剂是增加PS在肿瘤微环境中的暴露的药剂和/或条

件,如放射和/或化疗剂(美国专利第7,422,738号;美国专利第8,486,391号;美国专利第7,572,448号)。因此,已临床前证明与多西他赛联合治疗乳腺肿瘤(Huang等人,2005)和前列腺癌(Yin等人,2013);与吉西他滨联合治疗胰腺肿瘤(Beck等人,2006);与辐射联合治疗肺癌(He等人,2007)和成胶质细胞瘤(He等人,2009);与重新激活突变肿瘤抑制因子p53的PRIMA-1联合治疗晚期乳腺肿瘤(Liang等人,2011);与腺病毒载体联合用于将腺病毒重新靶向肿瘤血管系统(Hogg等人,2011);与顺铂组合治疗肺癌术后复发(Judy等人,2012);与索拉非尼联合治疗肝细胞癌(Cheng等人,2016)的增强的抗肿瘤作用。

[0106] 另一组与PS靶向抗体(如巴维昔单抗)一起使用的药剂是其它I0药剂。巴维昔单抗的作用机制与可用治疗剂互补,因为PS是上游免疫检查点。因此,临幊上已显示巴维昔单抗家族抗体与呈CTLA-4、PD-1和PD-L1抗体形式的其它检查点抑制剂联合的令人印象深刻的联合疗法(Freimark等人,2016年;Gray等人,2016a)。与单独的PD-1阻断相比,此类包括增加的存活率的抗肿瘤活性与肿瘤内活化的CD8T细胞的增加、与PD-L1表达偶联的M2巨噬细胞和MDSC的减少相关,并增加脾脏中的肿瘤反应性T细胞。

[0107] 因此,诸如这些的临幊前结果证实,巴维昔单抗家族的PS靶向抗体的逆转PS介导的免疫抑制并启动治疗有效的适应性抗肿瘤免疫。因此,用巴维昔单抗联合下游免疫检查点的阻断进行的治疗会产生强效和持久的抗肿瘤免疫力,从而显著改善结果、持续时间和应答水平(Freimark等人,2016年;Gray等人,2016a)。

[0108] 鉴于PS靶向抗体,如巴维昔单抗的有利安全性,这些抗体也可以在三联疗法中有效地联合,包括与放射、化疗(“放化疗”)和/或免疫治疗剂的三重组合,以及与两种免疫治疗剂的三重组合。最近已显示使用针对PS、PD-1和LAG-3的抗体的三重组合的令人印象深刻的结果(Gray等人,2016b)。

[0109] 基于此类临幊前数据,已在大多数与其它适应症批准的治疗剂组合的800多名患者的临幊研究中对巴维昔单抗进行评估。一系列抗病毒和抗肿瘤研究显示出治疗活性。基于广泛的临幊前研究和在人类中的药代动力学特征(实例VI;还参见Gerber等人,2011;Digumarti等人,2014),确定静脉内(IV)给予的3mg/kg巴维昔单抗的剂量并选择用于大多数肿瘤学临幊研究,包括在肺癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、结肠直肠癌和肾癌患者中。现已公布有希望的临幊抗肿瘤结果,包括组合以下的巴维昔单抗:太平洋紫杉醇,在HER2阴性转移性乳腺癌患者中(Chalasani等人,2015);太平洋紫杉醇-卡铂,在晚期非小细胞肺癌(NSCLC)中(Digumarti等人,2014);索拉非尼,在肝细胞癌中(Cheng等人,2016);以及多西他赛,在先前治疗过的晚期非鳞状NSCLC中(Gerber等人,2016)。

[0110] 总之,I期和II期临幊研究结果证明了巴维昔单抗具有临幊意义的治疗作用。虽然现有大量研究显示,使用PS靶向抗体成功治疗了一系列疾病,但到目前为止,还没有针对此类疗法的已知生物标记物。使用PS靶向抗体的临幊经验主要是基于B2GPI依赖性PS靶向抗体,如巴维昔单抗。对于那些抗体,最需要生物标记物来优化治疗。如果可以鉴别出针对巴维昔单抗治疗的一种或多种循环生物标记物,以及用于量化此类生物标记物的灵敏且快速的方法,这将是一项重要发展,提供微创测试以促进患者选择以改善治疗结果。

[0111] D.PS靶向抗体的生物标记物

[0112] 在癌症疗法领域,生物标记物在鉴别影响治疗应答的特定患者特征方面发挥越来越重要的作用。历史上已伴随靶向癌症治疗,并且近年来伴随检查点抑制剂,包括PD-1和

PD-L1抑制剂观察到这一现象。

[0113] 对使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗的治疗具有重要性的生物标记物正处于分析当中。如本文所用,“巴维昔单抗生物标记物”是以下生物标记物,其单独或作为两种或更多种或多种生物标记物之一用于选择患者或患者群体以改善治疗的临床益处,所述治疗使用包含作为疗法的至少一部分的PS靶向抗体,优选巴维昔单抗的疗法。此类巴维昔单抗生物标记物,包括 β 2GPI,因此可用于在治疗之前预测患者、患者群体或亚群是否有可能受益于包含PS靶向抗体,优选巴维昔单抗的治疗的方法中,包括包含PS靶向抗体,优选巴维昔单抗的组合疗法。

[0114] 还考虑了用于鉴别最合适的患者群体的多标记物标签,以改善含有巴维昔单抗的治疗方案的临床益处。在这些分析中鉴别的第一个生物标记物是 β 2GPI(章节E;章节F)。总体而言,所鉴别的生物标记物的模式是指导临床研发和治疗的巴维昔单抗“标签”。

[0115] 作为巴维昔单抗生物标记物的一部分,巴维昔单抗免疫生物标记物正处于分析当中。这些数据支持使用巴维昔单抗“激发(prime)”免疫系统,即增强抗肿瘤免疫应答。在这方面,现已知晓肿瘤可放置在“热”到“冷”的层面上,这取决于其被T细胞和其它免疫细胞侵入的程度。免疫浸润水平(“热量(heat)”)反映了免疫系统是否识别并与肿瘤接触。患有“热”肿瘤的患者预后较好;而患有“冷”肿瘤,复发的可能性要高得多。重要的是,已经确定巴维昔单抗能够对冷肿瘤产生积极影响,使其更易于接受治疗,包括与其它检查点抑制剂一起。因此,巴维昔单抗免疫生物标记物不仅在选择进行巴维昔单抗疗法的患者方面,还在鉴别用巴维昔单抗和用于组合疗法的经明智选择的药剂治疗的患者方面具有额外用途。

[0116] D1. 样品

[0117] 对于除 β 2GPI(章节E)外的生物标记物,本发明可被用来测试含有或疑似含有一种或多种生物标记物的任何生物样品,包括来自动物、个体或患者的任何组织样品或活组织检查物,包括粪便。可以使用来自生物组织样品的澄清裂解物。然而,本发明优选与天然体液一起使用,由此提供可以对使用微创或无创技术获得的生物样品进行的测试,也称为“液体活组织检查”。与通常需要更长时间来提供结果并且自身可能造成健康风险的诸如活组织检查之类的更严格的技术相比,这是一个优势。

[0118] 含有或疑似含有一种或多种生物标记物的生物流体(biological fluids/biofluid)的实例包括血液、尿液、腹水、脑和脑脊液(CSF)、痰、唾液、鼻分泌物、骨髓抽吸物、关节液或滑液、房水(aqueous humor)、羊水、卵泡液、耳垢、母乳(包括初乳)、支气管肺泡灌洗液、精液、精液(包括前列腺液)、考珀液(Cowper's fluid)或射精前液、女性射液、汗液、泪液、囊液、胸膜和腹腔液或灌洗液、心包液、淋巴液、食糜、乳糜、胆汁、肝脏灌注液、间质液、月经、脓液、皮脂、呕吐物、阴道分泌物、粘膜分泌物、粪便水、粪便液、胰液、鼻窦腔灌洗液、支气管肺抽吸液或其它灌洗液。生物样品还可以包括囊胚腔、脐带血或母体循环,其可以源自胎儿或母体。

[0119] 用于测试的生物流体的优选实例是血液、尿液和腹水,特别是来自患有或怀疑患有卵巢癌的动物、个体或患者的腹水。在使用尿液样品的情况下,其优先用于泌尿系统、泌尿生殖系统和生殖系统的癌症,如卵巢癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、睾丸癌、尿道癌和阴茎癌。与 β 2GPI一样,检测和量化一种或多种其它生物标记物优先从外周血液样品,优先血浆,并且最优先血清中进行。

[0120] D2.PS阳性外泌体

[0121] 外泌体近年来因癌症而受到关注。外泌体是40–50至100纳米 (nm) 大小的膜衍生的囊泡，其在体内和体外由所有细胞组成性释放。外泌体是具有生物活性的分子梭，其在细胞间通讯中起重要作用并影响许多生理和病理过程。在癌症中，外泌体功能包括癌细胞和肿瘤基质之间的致癌基因的转移，所述肿瘤基质引发所谓的转移性扩散的“转移性生态位”(An等人, 2015)。

[0122] 由于外泌体形成中涉及的多个细胞内融合事件，细胞外释放的外泌体的腔内含物和蛋白质组谱与起源细胞的那些相反。因此，肿瘤衍生外泌体（“肿瘤外泌体”）具有反映其产生的癌细胞的特征。实际上，来自起源细胞的胞质（特别是核酸）和质膜组分的存在意味着循环外泌体是易于获得的替代物，其反映了用于生物标记物分析的亲本细胞的特性。

[0123] 与来自正常细胞的外泌体相反，肿瘤外泌体的特征在于其表面上具有PS。因此，PS阳性肿瘤外泌体可用于癌症的诊断。最近报道了通过使用固相测定检测和量化生物流体样品中的PS阳性肿瘤外泌体来诊断癌症的新型和改进的方法、组合物和试剂盒。此类技术描述于各于2016年6月9日提交的美国专利申请序列号15/177,747和PCT专利申请第PCT/US16/036629号中。

[0124] 由于PS具有高度免疫抑制性，因此PS阳性肿瘤外泌体的释放是肿瘤促进免疫抑制环境的另一种手段。因此，已提出治疗前PS阳性肿瘤外泌体的水平用作对任何癌症治疗的疗法应答的预测标记物。显然，PS靶向抗体需要在疾病微环境中与PS结合。因此，测量治疗前PS阳性肿瘤外泌体的水平特别引人注目，其用作使用PS靶向抗体，如巴维昔单抗的疗法应答的预测生物标记物。

[0125] 诸如美国序列号15/177747和PCT申请第PCT/US16/036629号中的那些方法因此可以用作本发明生物标记物测试的一部分。其与本发明的 β 2GPI的量化，和/或其它巴维昔单抗生物标记物的组合使用在某些实施例中可为优选的，例如以提高总体预测分析的灵敏度。

[0126] E. β 2GPI作为生物标记物

[0127] 尽管大量数据另外指出（例如，实例V），但本发明人决定研究 β 2GPI的治疗前水平是否可以用作生物标记物，或作为生物标记物组的一部分，以预测使用巴维昔单抗和相关抗体的疗法的治疗结果。

[0128] β 2GPI是一种丰富的血浆（血清）糖蛋白，其既可以游离也可以与脂蛋白结合。已知来自各种哺乳动物物种的 β 2GPI的DNA和氨基酸序列，包括小鼠、大鼠、狗、牛、黑猩猩和人类（Steinkasserer等人, 1991）。出于示范性参考，提供呈登录号1C1ZA的人类 β 2GPI氨基酸序列。 β 2GPI是糖基化的并且通常报告为50kDa蛋白质（实例IV, A4, B3；还参见McNeil等人, 1990, 图3; Balasubramanian等人, 1998, 图1; Luster等人, 2006年, 图1D）。尽管已研究 β 2GPI数十年，但 β 2GPI的准确生理作用仍然未知（Prakasam&Thiagarajan, 2012）。实际上，缺乏 β 2GPI的基因敲除小鼠的表面健康生命表明 β 2GPI作用并不重要（Sheng等人, 2011）。

[0129] 出人意料地，已经确定 β 2GPI，特别是功能性 β 2GPI的治疗前血液中的浓度，可有效地用作生物标记物来预测对使用PS靶向抗体，如巴维昔单抗的疗法的成功应答。实际上，“功能性” β 2GPI的水平，即结合PS和PS靶向抗体，如巴维昔单抗的 β 2GPI，可单独用作对巴维昔单抗的应答的生物标记物。

[0130] 在其中单独使用治疗前 β 2GPI水平作为对PS靶向抗体,如巴维昔单抗的应答的生物标记物的本发明实施例中,那些 β 2GPI水平在数值上受到限定并且在能够检测“功能性” β 2GPI的测定中进行测量,如本文所定义。然而,在其中治疗前 β 2GPI水平用作对PS靶向抗体,如巴维昔单抗的应答的两种或更多种或多种生物标记物之一的本发明实施例中, β 2GPI水平不需要在数值上受到严格限定,也不仅仅在功能性 β 2GPI的测定中进行测量。

[0131] 因此, β 2GPI水平作为含巴维昔单抗的疗法的双或多标记物标签的一部分可以呈“ β 2GPI高 (β 2GPI high)”与“ β 2GPI低 (β 2GPI low)”,类似于如VeriStrat[®]良好 (VeriStrat[®] Good; VS Good) 和VS不良 (VS Poor),和呈“热”或“冷”的肿瘤的描述。应选择伴随“ β 2GPI高”的患者用PS靶向抗体,如巴维昔单抗进行治疗。在这种情况下,呈“ β 2GPI高”的 β 2GPI水平是等于或大于约180、190、200、210、220、230、240、250或260 μ g/ml,优选等于或大于约200 μ g/ml的 β 2GPI(总 β 2GPI或优选功能性 β 2GPI)的治疗前水平。“ β 2GPI高”因此包括等于约180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310或320 μ g/ml的 β 2GPI(总 β 2GPI或优选功能性 β 2GPI)的治疗前水平。

[0132] 本发明还提供了针对某些数值上经限定的量和范围的功能性 β 2GPI的生物标记物,所述功能性 β 2GPI的量和范围在能够检测功能性 β 2GPI的测定中进行测量。在最优选的实施例中,本发明涉及基于等于或大于200 μ g/ml的治疗前水平的功能性 β 2GPI选择和治疗患者(实例XVII;图18A和图18B;实例XVIII;实例XX)。这可以包括等于约200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310或320 μ g/ml的功能性 β 2GPI的治疗前水平。

[0133] 如由实例XVII、实例XVIII和实例XX中的数据所示范,巴维昔单抗在从中可获得 β 2GPI数据的所有临床试验中均改善了功能性 β 2GPI等于或大于200 μ g/ml的患者的总存活期。结果汇总在表A中,其中治疗栏是指与所述药剂组合的所列适应症的巴维昔单抗治疗。此外,对于用巴维昔单抗,并且之后用IO治疗的NSCLC患者(实例XX),显示等于或高于200 μ g/ml的功能性 β 2GPI提供了巴维昔单抗优于安慰剂的存活期优势(对于巴维昔单抗对比进行12.3个月的安慰剂,未达到mOS;p=0.002;图27),但尚不能进行 β 2GPI \geq 200和 β 2GPI<200组中的经巴维昔单抗治疗的患者之间的比较,因为任一组都没有达到mOS。

[0134] 表A

[0135] 治疗前 β 2GPI \geq 200 μ g/ml提高巴维昔单抗总体存活期

治疗	N	中值总存活期 (月)			P 值
		β 2GPI \geq 200	β 2GPI<200		
[0136]	NSCLC 多西他赛	294	11.4	9.8	0.054
	NSCLC 多西他赛	40	16.8	9.4	0.564
	NSCLC 太平洋紫杉醇/卡铂	44	17.0	14.2	0.147
	胰腺癌 吉西他滨	31	7.4	5.3	0.038

[0137] 除了等于或大于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的可广泛适用的 $\beta2\text{GPI}$ 水平,本发明的某些当前优选实施例涉及基于200–290 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内的功能性 $\beta2\text{GPI}$ 的治疗前水平选择和治疗患者(实例XVII;比较表14A和表14B),特别是用于治疗NSCLC。这还包括在200–270、200–280、200–290、200–300、200–310、200–320、210–270、210–280、210–290、210–300、210–310和210–320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 等范围内的功能性 $\beta2\text{GPI}$ 的治疗前水平,其中优选范围为210–270、210–280、210–290、200–280和200–290。

[0138] 在其它实施例中,本发明涉及基于约190、200、210或220 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 中的任一个作为下限数到约260、270、280、290、300、310或320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 中的任一个作为上限数的范围内的功能性 $\beta2\text{GPI}$ 的治疗前水平选择和治疗患者。这些范围包括以下所有,其中约210–270、210–280、210–290、200–280和200–290 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围是优选的:

[0139] 约190–260、190–270、190–280、190–290、190–300、190–310和190–320;

[0140] 约200–260、200–270、200–280、200–290、200–300、200–310和200–320;

[0141] 约210–260、210–270、210–280、210–290、210–300、210–310和210–320;和

[0142] 约220–260、220–270、220–280、220–290、220–320、220–310和220–320。

[0143] 除了基于等于或大于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的功能性 $\beta2\text{GPI}$ 的治疗前水平进行患者的最优先和一般适用选择和治疗之外,无论针对任何特定治疗或联合治疗选择以上哪个数量或范围中的一个或多个,作为生物标记物或生物标记物组的一部分的 $\beta2\text{GPI}$,优选功能性 $\beta2\text{GPI}$ 的治疗前水平的使用均适用于选择患有其中PS为标记物的各种疾病,最特别是癌症和病毒感染,以及细胞内寄生虫感染的患者,以及其使用单独或优先呈任何联合疗法形式的任何PS靶向抗体,如巴维昔单抗的治疗。

[0144] F. $\beta2\text{GPI}$ 测定

[0145] 由于 $\beta2\text{GPI}$ 的治疗前水平是巴维昔单抗和相关抗体的生物标记物,因此提供关于 $\beta2\text{GPI}$ 测定的以下指导内容。本发明还提供了用于量化功能性 $\beta2\text{GPI}$ 的某些优选测定(章节G)。

[0146] F1. $\beta2\text{GPI}$ 样品

[0147] 作为血清蛋白, $\beta2\text{GPI}$ 对于在外周血(血浆,血清)样品中进行的检测是理想的,如下所述。然而,研究表明,在涉及PS的各种病理生理条件下, $\beta2\text{GPI}$ 在体内定位于内皮细胞(Agostinis等人,2011)。因此,全范围的生物样品(章节D1)均可潜在地用于 $\beta2\text{GPI}$ 检测。

[0148] 然而,外周血、血浆和血清样品对于检测和量化 $\beta2\text{GPI}$ (无论总 $\beta2\text{GPI}$ 或功能性 $\beta2\text{GPI}$ (章节G))是特别优选的。可以使用全血(红细胞、白细胞、血小板、蛋白质和血浆)。优选使用血浆,其是红细胞和白细胞沉淀后剩余的液体。血浆含有纤维蛋白原和其它凝血因子,因此在静置时往往会凝结。可利用较少易于凝结的血浆,这是优选的;也可以使用无血小板血浆。最优先地,使用血清来检测和量化 $\beta2\text{GPI}$ 。血清是不含凝血因子的血浆,主要是不含纤维蛋白原,因此血清在静置时不会凝结。通常将动物和人类血清用于诊断目的,并且制备技术是众所周知的。本文示出用于制备供 $\beta2\text{GPI}$ 测试用的血清样品的示范性方法(实例XV,A)。

[0149] 本发明的一个优点在于所述测试可以在生物样品,优选血液、血浆或血清上直接进行。由于灵敏度,可以在不进行任何预先富集或浓缩的情况下容易地检测 $\beta2\text{GPI}$ (但不排除这种情况)。测试样品,优选血清样品,其可以是新鲜的或经预先冷冻,然后加以解冻。实例XV、实例XVI、实例XVII和实例XVIII显示 $\beta2\text{GPI}$ 在-70°C下长期储存是稳定的。应优先使用

工业标准的冷冻、储存和/或解冻技术,如使用低温管或小瓶和/或蛋白酶抑制剂来限制总体蛋白水解。

[0150] F2. β 2GPI测定范围

[0151] 用于测量 β 2GPI而未提及是否是“功能性” β 2GPI的测定,即“总” β 2GPI的测定的广度适用于其中治疗前 β 2GPI水平仅用作两种或更多种针对巴维昔单抗的生物标记物之一的那些本发明实施例。当单独使用 β 2GPI水平作为巴维昔单抗的生物标记物时,应使用“功能性” β 2GPI测定,如章节G所述。

[0152] 可以使用所属领域已知的许多体外结合测定和试剂盒中的任何一种或多种来检测并优选量化总 β 2GPI水平。合适的结合测定包括例如免疫印迹法、西方印迹法(Western blot)、斑点印迹法、RIA、免疫组织化学法、荧光激活细胞分选法(FACS)、免疫沉淀法、亲和色谱法等。尽管通常优选固相结合测定,但是文献中已描述用于检测 β 2GPI的各种其它方法,可以使用其中的任何方法。例如,可以通过径向免疫扩散精确地测定 β 2GPI水平。实际上,从20世纪60年代后期开始到更现代,径向免疫扩散就已被用于量化 β 2GPI(例如,Balasubramanian等人,1998)。也可使用等电聚焦(IEF),然后进行免疫印迹法来量化 β 2GPI(Kamboh等人,1988),也可进行西方印迹法、免疫电泳法和欧氏双免疫扩散(Ouchterlony double immunodiffusion)(Takeuchi等人,2000)。

[0153] F3. 固相 β 2GPI结合测定

[0154] 针对 β 2GPI的许多灵敏的固相结合测定是所属领域已知的,并且优选使用一种或多种此类测定来检测和量化总 β 2GPI。此类测定的优选实例是酶联免疫吸附测定(ELISA)。在文献中已经报道了各种总 β 2GPI特异性ELISA,包括经改进的捕获ELISA(例如,Mehdi等人,1999)和竞争性ELISA(例如,Balasubramanian等人,1998)。可获得用于测定总 β 2GPI的众多商购试剂盒,如市售抗 β 2GPI抗体,包括附接到诊断标记的那些抗体。任何此类试剂盒或抗体均可用于检测和量化总 β 2GPI。例如,来自US Biological的抗 β 2GPI抗体在本文中用于比较测定中(实例XVI,A10,B2)。

[0155] 总体而言,总 β 2GPI ELISA使用一个或多个抗 β 2GPI抗体。尽管抗体技术非常先进,但商购试剂盒和商购抗 β 2GPI抗体通常使用多克隆抗 β 2GPI抗体,其在此类实施例中完全适用。在示范性的总 β 2GPI测定中,将抗 β 2GPI抗体吸附至固体表面,如96孔塑料板,并与疑似含有 β 2GPI的生物样品(在这种情况下,“抗原”)一起培育。使用直接或间接地标记有可检测剂,即产生可被检测和量化的可检测信号(如颜色或荧光)的试剂的第二结合剂来检测经结合的 β 2GPI(抗原)。优选地,第二结合剂是标记有可检测剂的抗 β 2GPI抗体。

[0156] 此类总 β 2GPI ELISA在实例XVI,A10,B2中加以示范,并且许多一般组分和步骤,如固体支持物和可检测剂,也在关于本发明的功能性 β 2GPI测定的下文(章节G)中加以更全面地描述。因此,除非特别说明试剂或步骤仅适用于功能性 β 2GPI测定,否则本文考虑将其用于检测总 β 2GPI的测定中。

[0157] G. 功能性 β 2GPI的优选ELISA

[0158] 尽管可以使用各种商业测定和研究工具来分析生物标记物的临床试验结果以预测更好的结果,但已知尚未存在可以特别适用于如巴维昔单抗的PS靶向抗体的测定和研究工具。尽管广泛的临床前建模和大量先前临床经验表明低水平和/或不同水平的血清 β 2GPI将不会显著影响巴维昔单抗的治疗结果(实例V;图19),但仍寻求对来自III期试验的患者

中的 β 2GPI浓度进行分析(实例XIV)。

[0159] 然而,无法获得特异性检测可结合PS的 β 2GPI,而不是总 β 2GPI的可靠并且定量的 β 2GPI测定。此类测定对于如应用于生物标记物的最精确测量是必需的,尤其是因为众所周知, β 2GPI(“总” β 2GPI)的一部分将以切口 β 2GPI形式存在,其不能与PS结合,并且因此不能介导疾病位点处的抗体结合。此外,显著缺乏特异性检测 β 2GPI的任何测定,所述测定不仅可以结合PS,还可以结合PS靶向抗体,如巴维昔单抗。这对于最高保真度生物标记物测量尤其重要,例如,排除检测到具有其它有意义变化,特别是突变和/或切割;或裂解或影响域II的 β 2GPI的可能性,因为任何此类 β 2GPI改变将减少或使抗体结合和治疗活性所需的抗体: β 2GPI:PS复合物的形成无效。

[0160] 因此,为了对用PS靶向抗体(如巴维昔单抗)治疗(或待用其治疗)的患者的 β 2GPI浓度,包括来自III期试验的患者(实例XIV)进行最佳分析,有必要首先发明一种新型检测。本申请公开了这样一种有利的测定,其特别适用于检测和量化人类血液样品(如血浆和血清)中功能性(活性) β 2GPI的量,所述测定可以测定出能够结合PS和PS靶向抗体,如巴维昔单抗的 β 2GPI水平。

[0161] 通过使用此类功能性 β 2GPI测定,本发明提供适用作对用巴维昔单抗和相关PS靶向抗体的治疗的应答的单一生物标记物的治疗前 β 2GPI的限定水平。值得注意的是,等于或大于200 μ g/ml的功能性 β 2GPI(实例XVII;图18A和图18B;实例XVIII;实例XX)广泛预测对用巴维昔单抗的治疗的应答,如在200–290 μ g/ml范围内的功能性 β 2GPI所示范(实例XVII;比较表14A和表14B)。本发明提供的功能性 β 2GPI的优选ELISA由实例XVI中的详细教导内容进行示范,并且还在下文加以更全面地描述。

[0162] G1. 测定方法

[0163] 一般而言,如用于功能性 β 2GPI的ELISA的固相测定使用PS和PS靶向抗体,如巴维昔单抗,其中至少一种与固体支持物可操作地结合和/或其中至少一种直接或间接地标记有可检测剂。可以使用所有结合形式。例如,PS靶向抗体可以吸附到固体支持物上,且用可检测剂标记PS。许多脂质,如用可检测剂标记的PS是所属领域已知的,可以使用其中的任何脂质。然而,为简单起见,目前优选的实施例是其中PS被吸附到固体表面,如96孔塑料板的那些。这意味着可以用可检测剂标记PS靶向抗体,如巴维昔单抗或1N11,所述可检测剂优选是与抗体附接的直接标记。

[0164] 在这些测定中,将经PS涂布的固体支持物(如ELISA板(或其孔))与PS靶向抗体(如巴维昔单抗或1N11)以及疑似含有 β 2GPI的生物样品一起培育。从概念上讲,重要的是,将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗和 β 2GPI样品在经PS涂布的固体支持物或板上“共培育”。从科学上讲, β 2GPI可以通过(完整的)域V与PS结合,然后与巴维昔单抗结合到与板结合的 β 2GPI的域II;或巴维昔单抗可以与溶液中的 β 2GPI的域II结合,然后是复合的巴维昔单抗/ β 2GPI(具有完整域V)与板上的PS结合。两种结合事件都在培育期间发生,因此共培育涵盖所有这些结合机制。

[0165] 在经PS涂布的支持物上“共培育”PS靶向抗体,优选巴维昔单抗和 β 2GPI样品因此意味着在“有效结合条件”下,即“在有效允许样品中的 β 2GPI与PS靶向抗体和经PS涂布的支持物结合的条件和时间下”一起培育。“结合”意指在有效允许“特异性结合”的条件下,即不会被常规洗涤去除的结合。因此,在使用巴维昔单抗时,有效结合条件允许PS与 β

2GPI的完整(非切口)域V结合并允许巴维昔单抗与β2GPI的域II结合。在使用除巴维昔单抗外的PS靶向抗体时,有效结合条件允许PS与β2GPI的完整(非切口)域V结合并允许PS域抗体与β2GPI的除域V外的域的β2GPI,优选连接域I和II的铰链区,并且最优先β2GPI的域II结合。

[0166] 本发明测定包括许多不同形式,但只要PS靶向抗体,优选巴维昔单抗和β2GPI样品在经PS涂布的固体支持物或板上共培育即可。例如,可以将PS靶向抗体和疑似含有β2GPI的样品大体上同时添加到经PS涂布的支持物中。优选地,将PS靶向抗体和疑似含有β2GPI的样品依次,即在间隔时间添加到经PS涂布的支持物中。

[0167] 在进行依序测定结合步骤时,可将经PS涂布的固体支持物(如ELISA孔)首先与疑似含有β2GPI的生物样品一起培育,然后与PS靶向抗体,优选巴维昔单抗共培育。上述测定可以利用预先制备的经PS涂布的支持物,在这种情况下,测定包含(或包含以下步骤):

[0168] (a) 在有效允许生物样品中的β2GPI通过β2GPI的完整域V与经PS涂布的支持物结合的条件下,将疑似含有β2GPI的生物样品添加到经PS涂布的支持物中,从而制备经PS和β2GPI涂布的支持物;

[0169] (b) 在有效允许PS靶向抗体与经PS和β2GPI涂布的支持物通过抗体结合除域V外的β2GPI域,优选允许巴维昔单抗与经PS和β2GPI涂布的支持物通过抗体结合β2GPI域II的条件下,将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗添加到经PS和β2GPI涂布的支持物中;和

[0170] (c) 检测PS靶向抗体,优选巴维昔单抗与经PS和β2GPI涂布的支持物的结合,从而测量生物样品中的功能性β2GPI。

[0171] 然而,在进行依序测定结合步骤时,优选首先将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,并且最优先经可检测标记的巴维昔单抗涂覆于经PS涂布的固体支持物,然后与疑似含有β2GPI的生物样品共培育。出于技术原因,此类测定或步骤顺序是优选的,例如以避免在移液期间发生交叉污染。此类优选的测定包含(或包含以下步骤):

[0172] (a) 用PS涂覆固体支持物以制备经PS涂布的支持物;

[0173] (b) 将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,并且最优先经可检测标记的巴维昔单抗添加到经PS涂布的支持物中,以制备抗体衬里的经PS涂布的支持物;

[0174] (c) 在有效允许生物样品中的β2GPI与抗体衬里的经PS涂布的支持物结合,即通过β2GPI与经PS涂布的支持物经由β2GPI的完整域V结合,以及通过β2GPI与PS靶向抗体经由除域V外的β2GPI域结合,优选通过β2GPI与巴维昔单抗经由β2GPI域II结合的条件下,将疑似含有β2GPI的生物样品添加到抗体衬里的经PS涂布的支持物上(基本上不加以洗涤);和

[0175] (d) 检测PS靶向抗体,优选巴维昔单抗(最优先经可检测标记的巴维昔单抗)和β2GPI与经PS涂布的支持物的结合,从而测量生物样品中的功能性β2GPI。

[0176] 这一测定还可以利用预先制备的PS涂覆的支持物,在这种情况下,测定包含(或包含以下步骤):

[0177] (a) 将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,并且最优先经可检测标记的巴维昔单抗添加到经PS涂布的支持物中,以制备抗体衬里的经PS涂布的支持物;

[0178] (b) 在有效允许生物样品中的β2GPI与抗体衬里的经PS涂布的支持物结合,即通过β2GPI与经PS涂布的支持物经由β2GPI的完整域V结合,以及通过β2GPI与PS靶向抗体经由除域V外的β2GPI域结合,优选通过β2GPI与巴维昔单抗经由β2GPI域II结合的条件下,将疑似

含有 β 2GPI的生物样品添加到抗体衬里的经PS涂布的支持物上(基本上不加以洗涤);和

[0179] (c) 检测PS靶向抗体,优选巴维昔单抗(最优先经可检测标记的巴维昔单抗)和 β 2GPI与经PS涂布的支持物的结合,从而测量生物样品中的功能性 β 2GPI。

[0180] 具有依序结合步骤,其中首先将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,并且最优先经可检测标记的巴维昔单抗涂覆于经PS涂布的固体支持物,然后与疑似含有 β 2GPI的生物样品共培育的优先测定简明地包含(或包含以下步骤):

[0181] (a) 用PS涂布固体支持物以制备经PS涂布的支持物;

[0182] (b) 在有效允许样品中的 β 2GPI与PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,和经PS涂布的支持物结合的条件下,将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,并且最优先经可检测标记的巴维昔单抗,和疑似含有 β 2GPI的生物样品添加到经PS涂布的支持物中;优选地,其中在添加含有 β 2GPI的样品之前将PS靶向抗体添加到经PS涂布的支持物中,并且其中将其一起共培育;和

[0183] (c) 检测PS靶向抗体和 β 2GPI与经PS涂布的支持物的结合,从而测量样品中的功能性 β 2GPI。

[0184] 同样,所述测定可以利用预先制备的经PS涂布的支持物,在这种情况下,所述测定包含(或包含以下步骤):

[0185] (a) 在有效允许样品中的 β 2GPI与PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,和经PS涂布的支持物结合的条件下,将PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,并且最优先经可检测标记的巴维昔单抗,和疑似含有 β 2GPI的生物样品添加到经PS涂布的支持物中;优选地,其中在添加含有 β 2GPI的样品之前将PS靶向抗体添加到经PS涂布的支持物中,并且其中将其一起共培育;和

[0186] (b) 检测PS靶向抗体和 β 2GPI与经PS涂布的支持物的结合,从而测量样品中的功能性 β 2GPI。

[0187] 使用呈至少一种PS靶向抗体,优选巴维昔单抗或1N11形式的第二结合剂检测经结合的PS靶向抗体和 β 2GPI(抗原),所述第二结合剂直接或间接地标记有可检测剂。未标记的PS靶向抗体可以与第三结合剂,优选另一种抗体结合使用,其结合PS靶向抗体并且直接标记有可检测剂。此类第三结合抗体是所属领域熟知的,并且例如特异性结合PS靶向抗体的Fc部分。

[0188] 为简单起见,当前优先实施例是其中所述PS靶向抗体,优选巴维昔单抗,本身直接附接于可检测剂的那些。可检测剂是产生可检测信号(如颜色或荧光)的试剂,所述信号可以被检测和测量或量化。一种示范性可检测剂是辣根过氧化物酶(HRP),其中HRP裂解底物3,3'5,5'四甲基联苯胺(TMB),以产生在450nm下检测并测量的有色信号。通常,将由信号测量的结合物质的量与“参考信号”的水平,如标准曲线进行比较。如果需要,可以在每次测定中复制标准曲线。

[0189] 在这些测定的所有形式中,最终检测到的唯一 β 2GPI是能够结合PS和PS靶向抗体的 β 2GPI,即不会被常规洗涤整体去除的 β 2GPI。因此,这些测定特别适合于检测呈与临床治疗最相关的形式的治疗前 β 2GPI,即,“起作用”以与施用的抗体,优选巴维昔单抗以及疾病位点,优选肿瘤微环境中暴露的PS形成结合复合物的 β 2GPI。因此,这些测定的使用有利于选择患者以改善对巴维昔单抗疗法的治疗结果。

[0190] 本发明提供的功能性 β 2GPI测定也是简单的、可再现的、灵敏的、成本有效的,并且适用于通过微创技术获得的生物样品,特别是血液(血清和血浆)样品。所述测定的快速性

提供了重要的优点,即生物标记物测试可以快速进行并且治疗决策可以得到及时制定和实施。然而,用于量化本发明提供的功能性 β 2GPI的新型测定不仅仅限于用于测量 β 2GPI用作使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗的疗法中的生物标记物。由于 β 2GPI是基础和定向临床前研究和临床研究中的重要分子,因此这些测定可用于测量例如与基因敲除小鼠或人类中的抗磷脂综合征(APS)相关的此类实施例中的任何一个或多个中的功能性 β 2GPI。

[0191] G2. 固体支持物

[0192] 本发明的固相结合测定通常需要将结合构建体与固体支持物或衬底(其具有至少一个用于涂布或附接的表面)可操作地结合。如本文所用,“结合构建体”包括与适用于检测生物标记物的组分结合的构建体。关于 β 2GPI生物标记物,结合构建体包括抗 β 2GPI抗体、PS和PS靶向抗体,如巴维昔单抗。

[0193] 此类固体支持物或衬底包括例如板、珠粒和纤维。在本发明的优选实施例中,固体支持物或衬底是多孔板,例如标准96孔板。固体支持物或衬底可由任何合适的材料制成,如琼脂糖、乳胶、玻璃、聚苯乙烯、聚乙烯、硝化纤维素、硅、二氧化硅、聚二甲基硅氧烷(PDMS)等。通过使支持物或衬底的至少一个表面与结合构建体有效接触,结合构建体与固体支持物或衬底可操作地结合。优选地,结合构建体固定在固体支持物或衬底的至少一个表面上。结合构建体也可以印刷在涂布的载玻片上并用于生物标记物阵列或微阵列。非接触和接触印刷均可用于制备此类微阵列,优选接触印刷。

[0194] G3. 可检测剂

[0195] 合适的可检测剂包括例如酶,如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶和脲酶。辣根过氧化物酶检测系统可以与例如发色底物四甲基联苯胺(TMB)一起使用,其在过氧化氢存在下产生可在450nm下检测的可溶性产物。其它适宜的酶联系统包括例如碱性磷酸酶检测系统,其可以与发色底物对硝基苯基磷酸盐一起使用,以产生可在405nm下易于检测的可溶性产物。类似地, β -半乳糖苷酶检测系统可以与发色底物邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)一起使用以产生可在410nm下检测的可溶性产物,或者脲酶检测系统可以与底物,如脲-溴甲酚紫一起使用。

[0196] 可检测剂的其它实例包括化学发光标记和用于荧光检测的标记。适用的荧光染料包括DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)、荧光素、Hoechst 3325S、R-藻蓝蛋白、B-藻红蛋白、R-藻红蛋白、罗丹明(rhodamine)、德克萨斯红(Texas red)和丽丝胺。可以使用荧光素或罗丹明标记的抗体或膜联蛋白,和/或荧光素或罗丹明标记的二抗。同位素也适用于检测方法,所述部分和测定是所属领域熟知的。

[0197] 可检测剂产生可检测信号,然后对其加以检测并优选量化。可以分析可检测信号,例如使用分光光度计来检测来自发色底物的颜色;使用辐射计数器,如用于检测 125 I的伽马计数器来检测辐射;或者使用荧光计,以在特定波长的光存在下检测荧光。在使用酶联测定的情况下,可以使用分光光度计进行可检测信号的定量分析。

[0198] G4. 试剂盒

[0199] 本发明还提供了一系列基于生物标记物的试剂盒,包括诊断、预后和预测治疗试剂盒。生物标记物试剂盒将通常包含一种或多种适用于检测本文所教导的生物标记物的结合构建体。与 β 2GPI生物标记物相关的试剂盒将通常包含至少第一 β 2GPI结合构建体,如抗 β 2GPI抗体、PS和PS靶向抗体,如巴维昔单抗。

[0200] 其它试剂盒将包含用于生物标记物检测的结合构建体和至少用于治疗选定患者的第一治疗剂,例如PS靶向抗体,如巴维昔单抗或1N11,或其免疫缀合物。此类试剂盒可进一步包含至少第二种或第三种不同的治疗剂,用于与PS靶向抗体的组合治疗。例如,一种或多种化疗剂、放射治疗剂、抗血管生成剂、免疫治疗剂和/或抗病毒剂。

[0201] 通常,试剂盒将在至少第一合适容器(或容器部件)中含有有所述组分。容器通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其它容器或容器部件,其中放置有所需的试剂,并且优选经适当地等分。所述试剂盒通常还将包括用于容纳独立小瓶等,呈密封递送形式的部件,如注射或吹塑模制的塑料容器,其中放置和保持有所需小瓶和另一设备。

[0202] 试剂盒的组分可以含于水性介质或冻干形式。当试剂或组分以干粉形式提供时,可以通过添加合适的溶剂来重构粉末。溶剂也可以在试剂盒内的另一个容器中提供。任何治疗组分将优选处于药学上可接受的调配物中,或原样备用于重构。所述试剂盒还可以含有用于将治疗剂给予动物或患者的部件,例如一个或多个针头或注射器、或滴管、移液管或可以将所述调配物注射到动物或施加于身体的患病区域的其它类似设备。

[0203] 试剂盒将优选具有用于每种所需组分或试剂,特别是生物标记物检测和诊断组分的不同容器。然而,为了在组合疗法中使用,试剂盒可包含一个容器,其含有;呈摩尔当量组合,或一种组分超过另一种的两种或更多种预混合的治疗剂。试剂盒可以包括呈完全缀合形式的预标记抗体,或由试剂盒的用户进行缀合的单独标记部分,优选具有随附说明书。对于免疫检测,一种或多种组分,如PS,可能已经与固体支持物,如微量滴定板的孔结合。

[0204] 试剂盒优选还将包括书面或电子说明书,例如用于量化、临床前、临床和/或兽医实施例,包括用于组合治疗。基于生物标记物,试剂盒优选还将包含对照剂,如标记的或未标记的,可用于制备检测测定的标准曲线的经适当等分的生物组合物。

[0205] G5. 芯片和纳米分析形式

[0206] 如果需要,包括针对总 β 2GPI和/或功能性 β 2GPI的固相和ELISA型生物标记物测定可以自动化或机械地进行,并且可以同时检测来自多个样品的信号。尽管不在本发明的情形中,但也已经使用各种此类测定形式来检测和量化生物标记物。例如,已经描述了称为“芯片”的纳米等离子体传感器和微流体装置,并将其用于来自癌症患者的循环生物标记物的片上分离、量化和表征。因此,本发明测定可以使用此类微流体、芯片、纳米技术和其它流线型和自动化测定来完成,同时仍然保留本发明的特异性。

[0207] 除了预测方法和生物标记物引导的治疗方法外,本发明还提供基于计算机的硬件和测试。本发明的基于计算机的此类实施例包括被配置用于读取一个或多个实验室生物标记物的测试(包括针对总 β 2GPI和/或功能 β 2GPI)的接口;和经编程以根据此类生物标记物的测试分析数据,并且优选地,比较分析数据以建立数据集,包括测试数据集和对照数据集的计算机。本发明的计算机实现的实施例将优选地包括存储器存储、被配置为基于输出来指导治疗的输出功能和指令。

[0208] H. 疾病治疗

[0209] 由于本发明提供了用于选择动物和人类以及优化使用如巴维昔单抗的PS靶向抗体的治疗的生物标记物方法、组合物和试剂盒,因此以下关于动物、个体和患者(包括人类患者)的指导适用于生物标记物检测和选定人群的治疗。

[0210] H1. 动物、个体和患者

[0211] 本发明最直接适用于人类个体和患者,使得对人类的选择和治疗是最优选的实施例。尽管如此,跨物种的生物标记物的共性和保守意味着本发明还适用于除人类外的动物。在动物中,哺乳动物是优选的,最优选的是有价值和有用的动物,如家养宠物、赛马和用于直接生产(例如,肉)或间接生产(例如,牛奶)食物供人类食用的动物,但也包括实验动物。因此,本发明包括临床、兽医和研究用途。除人类外,本发明因此适用于狗、猫、马、牛、猪、野猪、绵羊、山羊、水牛、野牛、美洲鸵、鹿、麋鹿和其它大型动物以及其幼体(包括牛犊和羔羊),以及小鼠、大鼠、兔、豚鼠、灵长类动物(如猴子)和其它实验动物。

[0212] H2. 抗体剂量

[0213] “治疗有效”量或剂量的PS靶向抗体,如巴维昔单抗是当向需要此类治疗的动物,优选人类患者给予时,包括当作为组合治疗的一部分时,发挥有益治疗作用的量或剂量。例如,治疗有效的抗癌剂量是当向患有癌症的动物,优选人类患者给予时,包括当作为组合癌症疗法的一部分给予时,发挥有益抗癌作用的量或剂量。治疗有效的抗病毒剂量是当向患有病毒感染或疾病的动物,优选人类患者给予时,包括当作为组合病毒疗法的一部分给予时,发挥有益抗病毒作用的量或剂量。

[0214] “有益抗癌作用”包括任何一致可检测的抗肿瘤和抗癌作用,包括肿瘤血管系统血栓形成和/或破坏、肿瘤坏死、肿瘤消退和肿瘤缓解,直至(并包括)治愈。有益抗癌作用的临床量度包括例如,总反应率(ORR)的改善,包括完全反应(CR)、部分反应(PR)和CR+PR;肿瘤进展时间(TTP);响应持续时间(DOR或DR);无进展存活期(PFS)、无病存活期(DFS)和总存活期(OS)的改善或延长,如适用,包括个体患者、患者人群和亚群的中位总存活期(mOS)。

[0215] “有益抗病毒作用”包括任何一致可检测的抗病毒作用,包括抑制病毒感染、复制、成熟、繁殖和释放和/或持续感染或扩散至其它细胞(宿主细胞)或组织。有益抗病毒作用的临床量度包括例如,早期病毒学应答、病毒载量的减少和病毒的清除,以及由病毒感染引起的症状的改善。

[0216] 应理解,有益治疗作用,特别是抗癌作用,可能并非治愈性的,特别是在中期或长期,但这并不否定疗法的适用性。在这方面,但通常,“有益”治疗、抗癌和抗病毒作用还包括相当和/或适度的治疗作用,但在任何一种或多种安全措施方面都有改进。“有益”治疗作用的另一个考虑因素是以下事实,PS靶向抗体,如巴维昔单抗可使疾病或肿瘤易于进一步治疗,使得后续治疗可产生总体改善的作用。

[0217] 现在可以使用广泛的数据,包括来自动物模型的数据,但特别是基于临床研究,例如本文详述,并且在文献中公开的那些,可以容易地确定PS靶向抗体,如巴维昔单抗或1N11的治疗有效剂量。通常,静脉内(IV)给予并以mg/kg给出的PS靶向抗体,如巴维昔单抗的有效剂量范围为约0.1至约13-15,优选约0.1至约6-10;优选地,在约0.3和约6之间;更优选地,在约0.5和约6之间;更优选地,在约1和约6之间;更优选地,在约0.5和约3之间或在约3和约6之间;更优选地,在约1和约3之间。IV给予并以mg/kg给出的PS靶向抗体,如巴维昔单抗的示范性有效剂量将为约1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14和约15;优选约0.1,0.3,0.5,1,1.5,2,2.5,3,3.5,4,4.5,5,5.5和约6;更优选地,约2或3;最优选约3mg/kg。

[0218] 基于广泛的临床前和临床数据,特别是人类的药代动力学特征(实例VI),以及广泛的安全数据,推荐目前优选的静脉内(IV)给予的用于临床治疗(特别是用于所有肿瘤适应症)的3mg/kg巴维昔单抗剂量。尽管如此,已显示出一系列剂量是有效的,包括0.3mg/kg

下的临床抗病毒活性(实例VI)。此外,巴维昔单抗已经以高于10mg/kg,高达100mg/kg的剂量安全地给予大鼠和猴。在猴中进行的100mg/kg剂量水平下,巴维昔单抗在体循环中短暂降低 β 2GPI,因此不建议使用超高剂量。

[0219] 因此,从数据的广度来看,显然3mg/kg的剂量虽然是优选的,但并不限制本发明。因此,应理解,鉴于本文提供的参数和详细指导,有效或最佳剂量范围和剂量的进一步变化将涵盖在本发明内。因此可以理解,较低剂量可能更适合与某些药剂组合,并且仍然可以耐受高剂量,特别是在治疗通常致命的疾病时。

[0220] 在给予PS靶向抗体,如巴维昔单抗时,将药学上可接受的组合物(根据FDA无菌性、致热原性、纯度和一般安全性标准)全身给予动物或患者。通常优选静脉内注射,并且最优选在数小时的时间段内连续输注。

[0221] 除了改变剂量本身之外,还可以调整给药方案以优化治疗策略,这是所属领域技术人员熟知的。取决于所治疗的个体的状况,剂量和治疗方案的一些变化可能是必要的。根据本公开内容,负责的医生将能够确定对个体个体的适当治疗。此类优化和调整通常在所属领域中进行,并且决不反映过多的实验。

[0222] H3. 用 β 2GPI补充治疗

[0223] 在单独或作为多生物标记物选择的一部分使用治疗前 β 2GPI水平作为对PS靶向抗体,如巴维昔单抗的响应的生物标记物时,并且无论是否测量总 β 2GPI或功能性 β 2GPI,所述方法将仅选择只有一子组患者进行治疗。

[0224] 因此,本申请的另一个实施例是通过将 β 2GPI与PS靶向抗体,如巴维昔单抗共给予任何未选定的患者,而使那些患者恢复至具备治疗资格。以这种方式,整个群体变得可用PS靶向抗体治疗。例如,在基于等于或大于200 μ g/ml的功能性 β 2GPI的治疗前水平选择患者进行治疗时,150 μ g/ml的功能性 β 2GPI的治疗前水平的患者可以通过共给予巴维昔单抗与足够的功能性 β 2GPI以使 β 2GPI水平恢复至至少约200 μ g/ml,而使其返回可治疗组。样品适用于生物标记物分析中使用 β 2GPI的治疗前水平的任何情况。

[0225] I. 治疗其中PS是标记物的疾病

[0226] 由于PS靶向抗体,如巴维昔单抗特异性靶向PS,治疗的第一个也是最重要的指征是癌症(章节K),特别是实体肿瘤及其转移瘤,还有液体肿瘤,如白血病,并且优选霍奇金氏淋巴瘤。

[0227] 在正常和健康的细胞中,PS保持在细胞膜内部并且不能进行结合。只有疾病中的细胞才能在细胞膜外部暴露PS,特别是肿瘤微环境中的细胞,还有垂死细胞、异常细胞、不适当活化细胞、感染细胞和病原微生物本身。在癌症中,肿瘤微环境中的PS暴露是“免疫抑制的”,这意味着身体不能充分对抗癌症。通过阻断PS,巴维昔单抗优先于经PS介导的免疫抑制,帮助身体攻击肿瘤。

[0228] 在肿瘤微环境中的细胞中,特别是在肿瘤中的血管内衬的细胞(以及病毒感染的细胞和病毒)中,PS是相对稳定的标记物,这意味着其是治疗的理想靶标。在存在大量细胞死亡的疾病中,PS也暴露在细胞外,这意味着巴维昔单抗可用于诊断,特别是用于出现增加或不适当的细胞死亡的各种疾病,包括如癌症和心脏发作的病状的“成像”,即体内诊断(参见关于成像的下文)。

[0229] 导致宿主细胞外化PS的突出病原体是病毒(章节J)。事实上,PS和PS受体作为包膜

病毒进入和感染的增强剂的作用现已得到充分证明，并适用于多种病毒。此外，PS和病毒之间的联系不仅限于包膜病毒，而是扩展到无包膜病毒。特别地，已知的是，从病毒感染的细胞释放的“PS脂质囊泡”使得能够进行高效肠病毒整体传播(Chen等人,2015)。

[0230] 除癌症和病毒感染外，多种疾病和致病性感染导致PS从健康细胞的内部位置翻转而暴露在细胞外，这意味着PS靶向抗体，如巴维昔单抗可以定位于那些细胞和病原体并发挥有益作用。总的来说，这些是“其中PS是标记物的疾病和病症”。

[0231] 除了癌症、病毒和病原体感染，其中PS是标记物的突出疾病和病症是涉及异常血管系统(血管)的疾病，包括具有促血栓形成血管(易于凝血)的疾病和病症以及涉及异常血管生成的疾病和病症。血管生成是由预先存在的血管形成新血管的过程；新血管的发育始于内皮细胞芽的形成，其需要PS(Weihua等人,2005)。异常血管生成涉及许多疾病，尤其是癌症。鉴于其异常血管系统，PS靶向抗体，如巴维昔单抗可治疗良性(与恶性相反)肿瘤，如良性前列腺增生(BPH)、听神经瘤、神经纤维瘤、沙眼、肉芽肿(包括化脓性肉芽肿和类肉瘤病(类肉瘤))、脑膜瘤、血管纤维瘤、血管瘤、肝血管瘤和肝血管瘤的全身形式、肝血管瘤病。

[0232] 可用PS靶向抗体，如巴维昔单抗治疗的与异常血管系统直接相关的病状包括血管再狭窄(血管变窄)，包括血管成形术之后再狭窄、静脉阻塞、动脉闭塞和颈动脉阻塞性或闭塞性疾病；血管炎(通过炎症破坏血管的病症)，包括贝赛特氏病(*Behcet's disease*) (也是一种眼病)、结节性多动脉炎(结节性全动脉炎或PAN)和韦格纳氏肉芽肿病(*Wegener's granulomatosis; WG*)或结节病(肉芽肿伴多血管炎,GPA)；动静脉畸形(AVM)和动静脉瘘；鼻出血(流鼻血)；血管粘连；和高粘度综合征。

[0233] 由于其与异常血管系统的关联，PS靶向抗体，如巴维昔单抗可以治疗临幊上重要的疾病，包括关节疾病，如关节炎(包括类风湿性关节炎和骨关节炎)、滑膜炎、血友病性关节和佩吉特病(*Paget's disease*)；皮肤疾病，如牛皮癣、皮炎、硬皮病(全身性硬化症或CREST综合征)、弹性假黄瘤(PXE，称为格-斯二氏综合征(*Grönblad-Strandberg syndrome*))、红斑痤疮、史-约二氏综合征(*Stevens-Johnson syndrome*)或疾病(PXE、红斑痤疮和史-约二氏综合征也是眼病)、类天疱疮、肥厚性瘢痕和瘢痕疙瘩；格雷夫病(*Grave's disease*)；子宫内膜异位症；和奥斯勒-韦伯(Osler-Weber) (或奥斯勒-韦伯-郎迪(Osler-Weber-Rendu)综合征)或疾病(也称为遗传性出血性毛细血管扩张症,HHT)。

[0234] 由PS靶向抗体，如巴维昔单抗治疗的涉及异常血管系统疾病的特别重要的实例是眼部新生血管疾病。这些疾病的特征在于新血管侵入眼部结构，如视网膜、脉络膜和/或角膜。其是失明的最常见原因，并且涉及大约二十种眼病。最常见的底部新生血管疾病是(增殖性)糖尿病视网膜病变、黄斑变性(包括年龄相关性黄斑变性(AMD))、早产儿视网膜病变(ROP或特里综合征(*Terry syndrome*))，以前称为晶状体后纤维组织增生症(RLF)、新生血管性青光眼、角膜移植植物新生血管和角膜移植排斥反应。脉络膜新生血管(CNV)占晚期AMD患者的严重视力丧失病例的90%，并已用PS靶向抗体，包括直接和直接PS靶向抗体有效治疗(Li等人,2015)。

[0235] 与可用PS靶向抗体，如巴维昔单抗治疗的视网膜/脉络膜新血管形成相关的其它疾病包括梅毒性、分枝杆菌和/或引起视网膜炎或脉络膜炎的其它眼部感染；葡萄膜炎(虹膜睫状体炎)，包括玻璃体炎和睫状体炎；伊尔斯氏病(*Eales disease*)、假定眼组织胞浆菌病综合征(POHS)、贝斯特氏病(*Best's disease*) (卵黄状黄斑营养不良)、斯塔加特氏病

(Stargardt disease)、眼外伤和激光后并发症。

[0236] 可用PS靶向抗体,如巴维昔单抗治疗的与角膜新血管形成特别相关的其它疾病包括所有形式的角膜结膜炎,包括角膜炎(仅角膜发炎)和结膜炎(仅结膜发炎),如特应性角膜炎、上方角膜缘角结膜炎、翼状胬肉干燥性角膜炎和边缘性角质层分离;疱性角结膜病(phlyctenulosis);蚕蚀性溃疡(Mooren ulcer);化学灼伤、细菌性溃疡、真菌性溃疡、疱疹感染和眼部创伤以及隐形眼镜超戴症(contact lens overwear)。

[0237] 可用PS靶向抗体,如巴维昔单抗治疗的其它眼部疾病包括巩膜炎、虹膜红变(虹膜新生血管形成)、角膜新生血管形成(NVA)以及由纤维血管或纤维组织异常增生引起的疾病,包括所有形式的增生性玻璃体视网膜病变(PVR),无论是否与糖尿病有关。

[0238] 内皮细胞芽的形成需要PS,因此新血管的发育也需要PS(Weihua等人,2005)。所述过程还涉及某些正常的生理事件,特别是伤口愈合和再生,并且在受精后的排卵和囊胚植入中是至关重要的。因此,使用巴维昔单抗预防所述过程可用于诱导闭经(育龄期妇女没有月经期)、阻止排卵和/或防止囊胚植入,即作为避孕药。在伤口愈合中,过度修复或纤维组织增生可能是外科手术的有害副作用,并且粘连是手术的常见并发症,其可导致如小肠梗阻的问题。这些也可以通过PS靶向抗体,如巴维昔单抗治疗。

[0239] 慢性炎症还涉及异常和病理性血管系统。确切来说,如溃疡性结肠炎和克罗恩病(Crohn's disease)的慢性炎性疾病状态随着新血管向发炎组织的向内生长而显示出组织学变化。因此,这些疾病也可以通过PS靶向抗体,如巴维昔单抗治疗。

[0240] 已知数种其它疾病和病症,其中宿主细胞暴露PS和/或其中已证实PS阳性细胞外微泡和外泌体。例如,在镰状细胞病(也称为镰状细胞性贫血)和危象中,30-40%的红细胞过早衰老并呈PS阳性("镰状红细胞"),而健康人类只有约1%。PS阳性镰状红细胞保持在循环中,粘附于内皮,并且其暴露的PS充当起始凝血级联的平台,所述凝血级联负责凝血蔓延(clot propagation)(Kennedy等人,2015)。

[0241] PS也在动脉粥样硬化中表达,并且PS阳性细胞外微泡从动脉粥样硬化斑块中释放(Mallat等人,1999)。在血管腔内形成的对PS呈阳性的斑块也已显示具有血管生成刺激活性。有特别证据表明血管生成标记物,如VEGF在人类冠状动脉粥样硬化的进展中以及阻塞性冠状动脉疾病的再通过程中具有病理生理学意义。因此,PS靶向抗体,如巴维昔单抗为动脉粥样硬化和阻塞性冠状动脉疾病提供了有效的治疗。

[0242] 1型和2型糖尿病患者均具有PS阳性细胞外微泡,如膜联蛋白V阳性所示(Sabatier等人,2002)。在阿尔茨海默病中,脑外泌体含有PS和淀粉样蛋白 β 肽(A β),所述疾病的致病因子(Yuyama等人,2012)。PS和PS阳性细胞外微泡也参与败血症(败血症性休克),在所述败血症中,其是败血症诱导的微血管功能障碍和免疫抑制的标记物和介质(Souza等人,2015)。

[0243] 抗磷脂综合征(APS)和全身性红斑狼疮(SLE或狼疮),其中针对身体自身的磷脂产生抗体的自身免疫性疾病与凝血障碍相关,包括流产和血小板减少症(低血小板计数)。因此,这些患者中的抗磷脂抗体是致病性抗体,其引起血栓形成。然而,PS靶向抗体,如巴维昔单抗靶向PS而没有表现出任何此类副作用。因此,巴维昔单抗还可以治疗抗磷脂综合征、相关疾病和其并发症。确切地说,巴维昔单抗可以拮抗APS患者中的致病抗体或与其竞争,从而从其体内的磷脂-蛋白质靶标中置换致病性抗体。

[0244] 至于致病性感染,例如细胞内寄生虫,如引起利什曼病的寄生原虫,亚马逊利什曼原虫(Zandbergen等人,2006;Wanderley等人,2009;Wanderley等人,2013);引起疟疾的恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*) (Eda&Sherman,2002;Pattanapanyasat等人,2010);和引起锥虫病的一种寄生原虫,克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*) (DaMatta等人,2007),所有结果均引起PS暴露。同样地,引起血吸虫病的寄生扁虫,血吸虫,也暴露PS(范德Kleij等人,2002),引起弓形体病的刚地弓形虫同样如此(Seabra等人,2004)。

[0245] 在分别引起鼠疫和土拉菌病的细胞内细菌病原体,如鼠疫耶尔森氏菌和土拉弗朗西斯菌感染后,外部细胞表面也显示PS暴露,(Lonsdale等人,2011)。引起李斯特菌病的单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)也促进了具有外壁PS的膜衍生囊泡从感染宿主细胞释放(Czuczman等人,2014)。类似地,用引起脑膜炎的病原体,奈瑟氏脑膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)感染的内皮细胞展现PS向细胞表面的易位(Schubert-Unkmeir等人,2007)。在巨噬细胞中细胞内复制并引起结核病(TB)的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的感染与结节病变中性粒细胞的PS外化有关(Francis等人,2014)。同样,嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*) (一种引起军团病(Legionnaires' disease)的兼性细胞内寄生虫)诱导人类单核细胞发生PS外化(Hägele等人,1998)。

[0246] 因此,上文详述的针对兼性细胞内寄生虫常见的PS外化有可能发生于其它此类病原体,如布鲁氏菌(*Brucella*)和沙门氏菌(*Salmonella*),其分别引起布鲁氏菌病和如伤寒、副伤寒和食物中毒的疾病。针对专性细胞内寄生虫,如引起性传播衣原体感染的衣原体属(*Chlamydia spp.*)的感染也已得到证实,其中PS外化对于发病机制至关重要,并已显示在受感染的上皮细胞、内皮细胞、粒细胞和单核细胞上(Goth&Stephens,2001)。引起沙眼的沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)也可以得到治疗(也参见上文)。

[0247] 实际上,宿主细胞上的PS外化现在是应答于一系列细菌和病原体感染的普遍公认的现象(Wandler等人,2010)。这进一步包括幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*),其侵入胃上皮细胞(Petersen&Krogfelt,2003)并引起胃溃疡。当幽门螺旋杆菌与胃上皮细胞直接接触时,其诱导PS外化至宿主质膜的外小叶(Murata-Kamiya等人,2010)。PS也存在于引起梅毒的梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)上。巴尔通氏体病(bartonellosis)是一种在南美洲发现的细菌感染,可以用巴维昔单抗治疗,特别是因为巴尔通氏体病会产生呈血管内皮细胞增殖特征的慢性期,而巴维昔单抗的作用机制之一,如癌症治疗中所明确显示,为破坏血管内皮细胞。

[0248] 参照体内诊断,PS靶向抗体,如巴维昔单抗可用于对任何前述疾病、病症和感染进行成像,最优选对血管化肿瘤成像(Jennewein等人,2008;Marconescu&Thorpe,2008;Saha等人,2010;Stafford和Thorpe,2011;Gong等人,2013;Stafford等人,2013;美国专利第7,790,860号)。巴维昔单抗也可用于血管血栓形成,特别是在心脏内或心脏附近,如深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞、心房颤动、假体心血管材料问题、中风(脑血管意外(CVA)或脑血管损伤(CVI))等。PS靶向抗体,如巴维昔单抗也可用于例如在如脓肿、再狭窄、关节炎症和止血障碍的条件下对活化血小板(如动脉、冠状动脉、静脉和脑血栓形成等)进行成像。

[0249] 因此,PS靶向抗体,如巴维昔单抗适用于治疗和/或诊断其中PS是经证明的标记物的所有上述疾病和病症。

[0250] J. 治疗病毒感染

[0251] 导致宿主细胞外化PS的突出病原体是病毒。已在病毒和病毒感染的细胞表面上证实了PS的存在和/或显示所述PS的存在对来自多种病毒家族的感染至关重要,包括沙粒病毒科(Arenaviridae)、布尼病毒科(Bunyaviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)、丝状病毒科(Filoviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、痘病毒科(Poxviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)和弹状病毒科(Rhabdoviridae)(还参见各自于2015年2月27日提交的美国专利申请序列号14/634607和PCT专利申请号PCT/US15/18183中的表2A和表2B)。此外,提供的数据证明,病毒和病毒感染的细胞上的此类PS暴露并不仅仅是偶然的,还在病毒感染中起重要作用(还参见美国专利申请序列号14/634607;美国专利第7,906,115号;W02015/131153A1中的表2C和表2D)。这通过使用PS靶向抗体在体外和体内抑制来自多种病毒家族的感染来显示。

[0252] PS和病毒感染之间的联系现在也在文献中得到充分地证明(例如,美国专利第7,906,115号;Soares等人,2008;Mercer和Helenius,2008;Moody等人,2010;Morizono等人,2011;Meertens等人,2012;Best,2013年;Bhattacharyya等人,2013;Jemielity等人,2013;Moller-Tank&Maury,2014;Birge等人,2016)。这包括PS和PS受体作为包膜病毒进入和感染的增强剂的作用(参见例如,Moller-Tank&Maury,2014中的表1)。近年来,PS、病毒感染和细胞外微泡,如外泌体之间的关系也变得越来越明显(Meckes&Raab-Traub,2011;Sims等人,2014),并且另外,适用于多种病毒(例如,Walker等人,2009;Meckes等人,2010;Izquierdo-Useros等人,2010;Meckes&Raab-Traub,2011)。

[0253] 此外,PS和病毒之间的联系不仅限于包膜病毒,而是延伸到无包膜病毒(Clayson等人,1989;Chen等人,2015)。确切地说,参见Chen等人,2015年的文章Cell的封面页上的图式,其显示“PS脂质囊泡”(基本上是外泌体)以及随附数据,其显示PS囊泡能够进行高效肠病毒整体传播。在不受特定机制的约束的情况下,以下基本原理解释了PS涉及包膜和非包膜病毒的感染。

[0254] 所有病毒均协调成熟病毒粒子从宿主细胞中定时退出,以确保成功感染新宿主细胞。包膜病毒利用宿主细胞质膜嵌入病毒蛋白,所述病毒蛋白介导子代病毒粒子与下一个宿主细胞的有效进入。在病毒释放之前在病毒感染细胞的外部发现PS,并且包膜病毒在离开宿主细胞时将PS掺入到病毒包膜中。

[0255] 不将包膜掺入其成熟病毒粒子的病毒通过其它机制离开宿主细胞。无包膜病毒用于从细胞中释放新病毒粒子的一些策略包括细胞裂解,这可由宿主对受感染细胞(T细胞或巨噬细胞)的免疫应答直接引起,或者是由于病毒直接作用于宿主细胞蛋白质合成或细胞结构的活性引起。病毒改变细胞结构以诱导细胞裂解的实例是腺病毒。腺病毒在感染后期表达数种蛋白质,通过破坏细丝网络和蛋白质合成来改变细胞的结构完整性。一些无包膜病毒能够通过非破坏性机制释放其子代病毒而没有任何细胞病变作用。虽然脊髓灰质炎病毒迅速(约8小时)诱导细胞裂解,但其也在能够感染新宿主细胞的PS脂质囊泡中从细胞释放。PS囊泡中的脊髓灰质炎病毒颗粒感染海拉(HeLa)细胞和原代巨噬细胞要比从PS囊泡中去除的病毒颗粒更有效,并且用膜联蛋白V阻断囊泡以剂量依赖性方式抑制感染细胞的囊泡,其表明PS脂质是脊髓灰质炎病毒感染的辅因子。除脊髓灰质炎病毒外,柯萨奇病毒(Coxsackievirus)B3和鼻病毒颗粒也被释放到PS脂质囊泡中(Chen等人,2015),表明肠病毒利用选择性释放成熟颗粒而不裂解细胞的常见机制。

[0256] 关于SV40, SV40也可能在上述类型的PS脂质囊泡中从细胞释放。例如,据报道,在诱导细胞病变作用之前,可以发现SV40颗粒从细胞中释放出来(Clayson等人,1989)。此外,在感染后48小时已在细胞质平滑囊泡中观察到SV40病毒粒子,并且莫能菌素抑制SV40粒子的释放,所述莫能菌素是一种钠离子载体,其通过阻断跨脂质膜的阳离子转运来阻断细胞内蛋白质转运。

[0257] 而且,许多病毒需要诱导宿主细胞的活化,以便创造有效复制的环境。利用病毒或非病毒活化剂的细胞活化导致细胞内钙离子(Ca^{2+})升高,其激活PS易位。因此,PS靶向抗体,如巴维昔单抗的潜在作用机制包括干扰细胞活化所需的蛋白质或其介导病毒释放的能力,通过免疫清除机制逆转PS介导的免疫抑制和感染细胞或病毒的清除。

[0258] 体内病毒模型证明用PS靶向抗体治疗的病毒感染动物的存活期增加。显示PS靶向抗体,如巴维昔单抗发挥此类抗病毒特性的所利用的潜在机制包括:1)与病毒颗粒的结合;2)与感染细胞结合;3)抑制病毒复制;4)通过阻断结合PS的免疫抑制细胞受体来增强免疫应答。HIV-1模型中的数据表明,由病毒感染的巨噬细胞产生的病毒粒子具有升高的PS水平,其充当HIV-1感染巨噬细胞的辅因子。用PS靶向抗体阻断HIV-1上的PS可以阻止细胞-细胞相互作用并阻断病毒-靶细胞融合。结果还表明,巴维昔单抗与皮钦德(pichinde)病毒颗粒结合,并且对经皮钦德病毒感染的豚鼠的治疗促进了抗皮钦德抗体和细胞应答的发展。

[0259] 总体来说,使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗治疗所有病毒感染,包括包膜和非包膜病毒教导于美国专利第7,611,704号和美国专利第7,906,115号中,其对涉及此类治疗的本公开内容进行了补充。确切地说,所述专利的表H、表J和表G举例说明了动物和人类中病毒感染和相关疾病的治疗(表H、表J)以及可用于与使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗的疗法组合使用的常见抗病毒药物(表G)。

[0260] K. 治疗癌症

[0261] 本申请的大量章节涉及使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗治疗肿瘤和癌症。良性肿瘤,如听神经瘤、神经纤维瘤、沙眼、化脓性肉芽肿和BPH的治疗包括在内。恶性肿瘤的治疗是优选的。除非另有明确说明,否则如本文所用,“肿瘤(tumor/tumors)、癌症(cancer/cancers)”旨在表示恶性肿瘤。

[0262] 涵盖治疗血源性肿瘤,如白血病和淋巴瘤,以及骨髓的各种急性或慢性赘生性疾病。优选地,待治疗的肿瘤是实体或血管化肿瘤,包括血管生成活跃的肿瘤和具有促血栓形成血管的肿瘤。“实体”和“血管”肿瘤是具有血管组分的肿瘤,即需要肿瘤血管为肿瘤细胞提供氧和营养物的肿瘤。

[0263] 包括如以下示范的所有癌症(无论是原发性还是转移性):乳腺癌、卵巢癌、胸癌、肺癌、肝癌(肝细胞癌(HCC))、结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌(神经胶质瘤和成胶质细胞瘤)、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、头颈癌、腮腺癌、食道癌、喉癌、甲状腺癌、胃肠癌、胃癌、肾癌(肾细胞癌(RCC))、胆道癌、膀胱癌、睾丸癌和其它癌症,包括癌瘤(鳞状和非鳞状,小细胞和非小细胞)、腺癌和成神经细胞瘤,以及黑素瘤、梅克尔细胞癌(merkel cell carcinoma)和血液恶性病。在某些实施例中,本发明尤其适用于非小细胞肺癌(NSCLC)或乳腺癌、胰腺癌、肝癌、肾癌、直肠癌或卵巢癌或黑素瘤。最特别地,本发明适用于NSCLC,例如非鳞状NSCLC。

[0264] 除了已公布的文献之外,在许多美国专利中教导了使用PS靶向抗体,如巴维昔单

抗治疗所有癌症。例如，美国专利第6,406,693号；第7,422,738号；第8,486,391号；第7,247,303号；和第7,572,448号，均是涉及此类治疗的本公开内容的补充。还参见关于治疗有效抗癌量的上述论述（章节H2）。由于PS靶向抗体，如巴维昔单抗的作用模式在所有实体肿瘤中基本上或完全相同，因此应理解，本发明可广泛应用于所有实体肿瘤的治疗，而不管特定的表型或肿瘤细胞自身的基因型。

[0265] L. 组合疗法

[0266] 本申请的相当大部分、公布的文献和许多美国专利也涉及在组合疗法中使用PS靶向抗体，如巴维昔单抗治疗癌症（例如，美国专利第7,422,738号；美国专利第8,486,391号；美国专利第7,572,448号）。

[0267] 因此，生物标记物和治疗方法可以与通常用于治疗动物或患者表现出的特定疾病或病症，特别是癌症和病毒感染和疾病的任何其它方法组合。只要不知晓给定的治疗方法本身是否对患者的病状有害，并且不显著抵消PS靶向抗体疗法，则考虑其与本发明的组合。还设想了用于非恶性疾病的组合疗法。

[0268] 关于癌症治疗，本发明可以与经典方法，如手术、化疗、放射疗法、细胞因子疗法、抗血管生成等，以及更新的方法，如免疫肿瘤学（I0）剂组合使用。因此，本发明提供了生物标记物和组合疗法，其中PS靶向抗体，如巴维昔单抗与手术或放射治疗同时、在其之前或在其之后使用；或者与常规化疗剂或放射治疗剂、细胞因子、抗血管生成剂、凋亡诱导剂、靶向治疗剂、I0剂等一起、在其之前或在其之后给予患者。

[0269] 就手术而言，可以结合本发明实施任何外科手术。关于放射疗法，考虑了在肿瘤细胞内局部诱导DNA损伤的任何机制，例如 γ 照射、X射线、UV照射、微波甚至电子发射等。还考虑了将放射性同位素定向递送至肿瘤细胞，并且这可以与靶向抗体或其它靶向手段一起使用。

[0270] 在癌症治疗中物质组合的一般用途是众所周知的。当一种或多种药剂与PS靶向抗体，如巴维昔单抗组合使用时，不需要组合的结果是当分别进行每种治疗时观察到的效果的相加。尽管通常需要至少累加作用，但是超过单一疗法之一的任何增加的治疗作用或益处（例如，减少的副作用）都将是有价值的。而且，对于组合治疗没有特别要求显示出协同效应，尽管这是可能并且有利的。

[0271] 如本文所用，用于本发明的“主要治疗剂”或“第一抗癌剂”是PS靶向抗体，如巴维昔单抗。本文所用的“二级或三级治疗剂”或“至少第二或第三抗癌剂”是不同的第二或第三治疗剂、抗癌剂或抗病毒剂，即并非主要治疗剂的治疗剂、抗癌剂或抗病毒剂。任何二级或三级治疗剂均可用于本发明组合疗法中。此外，根据本申请的指导内容和所属领域技术人员的知识，可以鉴于实现累加、超过累加或潜在协同作用而选择二级或三级治疗剂、“第二或第三抗癌剂”或“第二或第三抗病毒剂”。

[0272] 为了实施组合疗法、抗肿瘤疗法或抗病毒疗法，可以有效引起其在动物或患者体内的组合治疗、抗肿瘤或抗病毒作用的方式简单地向动物或患者给予PS靶向抗体，如巴维昔单抗，以及另一种，即不同的第二或第三治疗剂、抗癌或抗病毒剂。因此，所述药剂将以有效的量提供，并且持续有效引起其在疾病位点，例如肿瘤、肿瘤环境或微环境中的组合存在，和/或在动物或患者中发挥其组合治疗作用，优选地，对动物或患者的免疫系统施加其组合治疗作用的时间段。为了实现所述目标，可以以单一组合物形式基本上同时给予主要

治疗剂和不同的二级或三级治疗剂,或者使用不同的给药途径以两种或三种不同的组合物形式给予。

[0273] 或者,PS靶向抗体,如巴维昔单抗可以在不同的第二或第三治疗剂、抗癌剂或抗病毒剂之前或之后,例如间隔数分钟至数周或数月。在主要治疗剂和不同的第二或第三治疗剂分别施用于动物或患者的某些实施例中,可以确保在每次递送之间不存在不起作用的时间段,使得每种药剂将仍然能够发挥有利的组合效果。根据标准实践,包括迄今为止使用巴维昔单抗的临床经验,给予巴维昔单抗和不同的第二或第三治疗剂之间的一周或两周并非不起作用的时间段。实际上,约一周的间隔可为优选的。

[0274] 此外,一种优选的组合肿瘤疗法涉及基本上同时或优选以数周间隔向动物或患者给予PS靶向抗体,如巴维昔单抗以及不同的第二抗癌剂,然后在随后的时间给予不同的第三抗癌剂,并继续定期给予不同的第三抗癌剂持续后续有效时间,如数月时间段。

[0275] 可以基于特定标准,包括本文所论述和所属领域已知的标准选择用于分别定时组合疗法的二级或三级治疗剂。然而,如果需要,优选选择一种或多种不同的第二或第三治疗剂用于之前或之后的给药并不排除其基本上同时给药。

[0276] 就癌症而言,选择用于在主要治疗剂“之前”给予并旨在实现增加的和潜在的协同作用的不同的第二或第三抗癌剂包括在肿瘤微环境中诱导PS表达的药剂。例如,刺激局部钙产生,激活将PS移动到质膜外表面的膜转运子,损伤肿瘤内皮,引起促凋亡变化和/或诱导肿瘤内皮或肿瘤细胞凋亡的药剂通常会引起增加PS表达。此类药剂的实例是多西他赛和太平洋紫杉醇。然后可以使用PS靶向抗体,如巴维昔单抗靶向PS,从而扩增总体治疗作用,并且还通过宿主效应子(补体、ADCC、抗体介导的吞噬作用、CDC)提供增加的攻击。

[0277] 对血管生成、重塑或活化的内皮细胞具有选择性的药物,如存在于肿瘤血管中但不存在于正常静息血管中的药物,也可用于选择性地引起PS在肿瘤微环境中的暴露。此类药剂的实例是康普瑞汀(combretastatin)和多西他赛。这同样引起抗体结合增加和宿主效应机制的启动增强。

[0278] 选择用于在主要治疗剂“之后”给予并旨在实现增加的和潜在的协同作用的不同的第二或第三抗癌剂包括受益于主要治疗剂作用的药剂。PS靶向抗体,如巴维昔单抗引起肿瘤坏死。因此,用于后续给药的有效的不同的第二或第三抗癌剂包括抑制转移的抗血管生成剂;靶向坏死肿瘤细胞的药剂,如对体内可从恶性细胞接近的细胞内抗原具有特异性的抗体(美国专利第5,019,368号;第5,882,626号);和化疗剂和抗肿瘤细胞免疫缀合物,其攻击可能在外周存活的任何肿瘤细胞。用于在PS靶向抗体,如巴维昔单抗之后给予的目前最优秀的不同的第二或第三抗癌剂是免疫检查点抑制剂,如下所述。

[0279] 在某些情况下,可能需要延长治疗时间段,其中在各别给药之间延时数天(2、3、4、5、6或7),数周(1、2、3、4、5、6、7或8)或甚至数月(1、2、3、4、5、6、7或8)。这在一种治疗旨在基本上破坏肿瘤,并且另一种治疗旨在预防微转移或肿瘤再生长和/或刺激或辅助宿主对肿瘤的应答,如给予抗血管生成剂或免疫检查点抑制剂的情况下是有利的。然而,应在手术后的谨慎时间给予抗血管生成剂,以使伤口有效愈合。然后可以终生向患者给予抗血管生成剂。

[0280] 还可以预想的是,将利用主要治疗剂或不同的第二或第三治疗剂的多于一次给药。主要治疗剂和不同的第二或第三治疗剂可以交替数天或数周进行互换给药;或者可以

给予一定顺序的一种药剂治疗,然后是一定顺序的其它治疗。在任何情况下,为了使用组合疗法实现治疗作用,所需要的只是以有效发挥治疗作用的组合量递送两种或更多种药剂,而与给药时间无关。

[0281] L1. 化疗

[0282] 无论是基本上同时给予还是按顺序给予,PS靶向抗体,如巴维昔单抗可以与一种或多种化疗剂或药物组合给予。化疗药物可以杀死增殖的肿瘤细胞,促进总体治疗产生的坏死区域。因此,药物可以增强本发明的主要治疗剂的作用。

[0283] 大多数癌症化疗药物对分裂氧合细胞具有选择性。这些在组合疗法中具有优势,因为化疗药物作用于与主要治疗剂不同的靶标,产生更完全的抗肿瘤作用。例如,化疗药物对肿瘤周围的快速分裂的氧合肿瘤细胞具有选择性活性。对肿瘤周围充分氧合的血管生成血管具有选择性的抗血管生成药物也可以有效地组合使用。

[0284] 通过诱导肿瘤血管中血栓的形成,本发明的主要治疗剂还可以通过将药物保留或截留在肿瘤内来增强化疗药物的作用。因此,化疗剂保留在肿瘤内,而其余的药物从体内清除。因此,肿瘤细胞暴露于更高浓度的药物持续更长的时间段。这种药物在肿瘤内的截留使得可以减少药物的剂量,使得治疗更安全并且更有效。

[0285] 在本发明中组合使用的其它药物是那些作用于通过主要治疗剂的作用对药物“敏感”的细胞的药物,因此需要减少剂量的第二种药物来实现其抗肿瘤作用。例如,这可能发生在第二种药物作用的主要成分施加在肿瘤血管上并且本发明的抗体或药剂使细胞对药物敏感的情况下。当本发明的主要治疗剂直接或通过刺激细胞因子释放使肿瘤细胞对第二种药物敏感时,情况也是如此。

[0286] 用于组合疗法的其它合适的第二或第三抗癌剂是例如通过选择性地抑制免疫系统的免疫抑制组分的活性来增强宿主效应细胞活性的那些。此类药剂使得本发明的主要治疗剂能够更有效地起作用,所述主要治疗剂刺激效应细胞的攻击作为其机制的一部分。此类药剂的实例是多西他赛和免疫检查点抑制剂。

[0287] 虽然对于实施本发明的治疗不需要理解主要治疗剂的确切作用机制,但是可以使用关于这种机制的数据和推理推断来选择特定的第二或第三抗癌剂用于组合。用于本发明。所选择的组合疗法的有效性反过来支持原始数据和提出的作用机制,并且还产生用于实施组合疗法的第二或第三抗癌剂的优选类别。

[0288] 诱导细胞凋亡的药物可用于组合疗法中。例如,多西他赛通过与微管结合并破坏细胞有丝分裂而诱导细胞凋亡并因此诱导PS暴露(Hotchkiss等人,2002)。已知在亚临床浓度下使用多西他赛治疗顺肿瘤血管排列的内皮细胞和肿瘤细胞在细胞表面诱导PS表达。

[0289] PS靶向抗体,如巴维昔单抗的抗肿瘤作用包括Fc域介导的免疫效应功能的增强,如ADCC、CDC、细胞因子产生的刺激,以及此类组合机制。这也与多西他赛相关,因为其它研究表明,乳腺癌患者的使用多西他赛的治疗引起血清IFN γ 、IL-2、IL-6和GM-CSF的细胞因子水平增加,在这些患者中通过增强自然杀伤(NK)和淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞的活性增强抗肿瘤免疫应答。

[0290] 因此,多西他赛将诱导PS表达和给予的抗体的结合,并且还增强介导抗肿瘤作用的免疫效应子的活性。基于上述考虑,抗体与多西他赛的组合是一个优选实施例,特别是当还与免疫检查点抑制剂组合或随后用免疫检查点抑制剂进行治疗时,如下文所述。

[0291] 因此,多西他赛和其它诱导细胞凋亡的化疗剂是某些优选的用于本发明组合治疗的药剂。与诱导细胞凋亡的化疗药物(如多西他赛)的组合应协同地攻击肿瘤血管系统内皮细胞和肿瘤细胞室,不仅产生显著增强的治疗功效而且还降低毒性。这些组合预期用于乳腺癌治疗,特别是使用多西他赛与PS靶向抗体的规律化学疗法的组合。

[0292] 用于组合疗法的示范性化疗剂描述在美国专利第7,572,448号和美国专利第9,421,256号(例如,如列于美国专利7,572,448号中的表D中和美国专利第9,421,256号中的表C中),诸如培美曲塞、替莫唑胺、他莫昔芬、厄洛替尼、舒尼替尼、索拉非尼、太平洋紫杉醇、卡铂、吉西他滨和多西他赛。也可以使用其它治疗性抗体,如曲妥珠单抗、利妥昔单抗和贝伐单抗。所属领域已知的那些化疗剂、抗体和其它药物中的每一种都是示范性的而非限制性的。可以根据所治疗的病状而进行剂量改变。治疗医师将能够确定个体的适当剂量。在使用多西他赛的某些优选实施例中时,如以 $60\text{mg}/\text{m}^2$ 的起始剂量给予多西他赛或以 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 的量向患者给予多西他赛。

[0293] M. 免疫疗法(I0)组合

[0294] 对有效免疫疗法的挑战在于克服抑制先天性或适应性免疫活化的多种路径。PD-1免疫检查点已被鉴别为主要的免疫抑制路径,并且已成为毒性低于化疗的癌症免疫疗法的有希望的靶标。其作用是耗尽活化的肿瘤特异性T细胞并抑制其肿瘤杀伤活性。原生T细胞、B细胞、巨噬细胞、DC和单核细胞上不存在PD-1,但在其活化的对应物上表达很高。值得注意的是,肿瘤和相关的骨髓细胞利用PD-1路径,通过上调PD-L1表达产生先天性和适应性免疫抗性。机制研究表明,当存在从头或预先存在的抗肿瘤免疫应答时,阻断这些免疫检查点是最有效的。不幸的是,由于PS和其它通常在肿瘤微环境中占主导地位的免疫抑制因子的暴露,预先存在的肿瘤特异性免疫活性在癌症患者中受到限制。

[0295] 尽管伴随具有阻断PD-1信号传导的药剂,已经在多种癌症类型中观察到持久的抗肿瘤免疫应答,但只有一部分患者有应答;因此,仍然存在显著未满足的医疗需求。特别地,在肿瘤微环境中表达低水平的PD-1和PD-L1(免疫抑制的生物标记物并缺乏T细胞活化)的患者对检查点阻断疗法的应答较少。对免疫活化的观察已经显示,PS靶向抗体,如巴维昔单抗可以增加可以从抗PD-1/PD-L1和其它检查点疗法中受益的患者的比例。

[0296] 本文提供首次显示用巴维昔单抗和免疫疗法治疗的人类患者具有有意义的存活优势的临床数据。确切地说,实例XIX中的结果证明,与用安慰剂(单独的多西他赛)治疗,随后进行免疫疗法的患者相比,用巴维昔单抗(和多西他赛)治疗,之后进行免疫疗法(“SACT-I0”)的患者的具有统计学上显著更好的总存活期。延长的存活期具有统计学意义($p=0.006$),甚至更令人印象深刻,因为尚未达到接受后续I0的巴维昔单抗患者的mOS(实例XIX;图26;表16)。因此,巴维昔单抗确实增强了人类患者中免疫治疗剂的活性。

[0297] 因此,通过在实例XIX中的数据所例示,本发明的重要实施方式是癌症患者的治疗与PS靶向抗体,例如与免疫治疗或免疫肿瘤学(I0)剂组合单抗。用于组合治疗的示范性免疫治疗剂列于2016年10月11日提交的临时申请序列号62/406727中的表C中;和2017年4月03日提交的临时申请序列号62/480994与2017年5月17日提交的临时申请序列号62/507580中的每一个中的表D中,其与NK细胞和CAR-T的组合疗法是目前优选的。

[0298] I0剂的某些优选实例是批准用于临床治疗或人类临床试验,优选后期临床试验中的那些,例如2017年4月3日提交的临时申请序列号62/480994和2017年5月17日提交的临时

申请序列号62/507,580中的每一个中的表E中所述的那些。使用剂量和治疗适应症是所属领域普通技术人员熟知的,如2017年4月03日提交的临时申请序列号62/480994和2017年5月17日提交的临时申请序列号62/507,580中的每一个中的表E中的详情所示范。例如,以每2周240mg或3mg/kg的纳武单抗治疗黑素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾细胞癌(RCC)、经典型霍奇金(霍奇金氏)淋巴瘤、鳞状细胞头颈癌(头颈癌)、膀胱癌、小细胞肺癌、脑癌(如恶性神经胶质瘤)、间变性星形细胞瘤(AA)和多形性成胶质细胞瘤(GBM)、肝细胞癌(HCC)、食道癌、胃癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤;以每3周200mg或2mg/kg的派姆单抗治疗黑素瘤、NSCLC、经典霍奇金淋巴瘤、头颈癌、胃癌、乳腺癌、膀胱癌、所有实体肿瘤、结肠直肠癌、RCC、多发性骨髓瘤、食管癌和HCC;以每3周1200mg的阿特珠单抗治疗膀胱癌、NSCLC、RCC、结肠直肠癌、前列腺癌、黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌和小细胞肺癌;以每2周10mg/kg的阿维鲁单抗(avelumab)治疗转移性梅克尔细胞癌、NSCLC、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、RCC、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、非霍奇金淋巴瘤和头颈癌;并且以每2周10mg/kg的德瓦鲁单抗(MEDI4736)治疗NSCLC、头颈癌、膀胱癌和小细胞肺癌。

[0299] 其它合适的IO剂为伊匹单抗,其以每3周3mg/kg或10mg/kg治疗不可切除或转移性黑素瘤;曲美木单抗,其以每3个月15mg/kg治疗黑素瘤;REGN2810,其治疗NSCLC;PDR001,其治疗黑素瘤;拉克莫单抗(racotumomab),其治疗NSCLC;MEDI0562和GSK3174998,其治疗晚期实体肿瘤;乌瑞鲁单抗(urelumab),其治疗黑素瘤;乌图木单抗(utomilumab),其治疗DLBCL;以及BMS-986016、LAG525、JNJ-61610588、TSR-022、MBG453、MEDI1873和INCAGN01876中的每一种,其治疗实体肿瘤。

[0300] 特别优选的用于与PS靶向抗体,如巴维昔单抗的组合疗法的IO试剂,如实例XIX中的数据直接支持,是“检查点抑制剂”,其在本文中也称为“免疫检查点抗体”。合适的“免疫检查点抗体”包括结合于活化免疫检查点、受体或分子,如CD28,OX40和/或GITR的激动(激活)抗体,以及结合抑制免疫检查点、受体或分子,如PD-1,PD-L1,CTLA-4,TIM-3和/或LAG-3的拮抗(阻断)抗体。此类阻断抗体被常规称为“免疫检查点抑制剂”,其也被用于本发明中。数种此类抗体也描述在2017年4月03日提交的临时申请序列号62/480994与2017年5月17日提交的临时申请序列号62/507580中的每一个中的表E中,描述为批准用于临床治疗或后期临床试验。

[0301] 免疫检查点抗体(免疫检查点抑制剂)的目前最优选的实例为“结合CTLA-4、PD-1或PD-L1的阻断抗体”。结合CTLA-4、PD-1或PD-L1的数种此类阻断抗体,以及用于其选择、制备和使用的方法,包括功能测定,是所属领域普通技术人员所熟知的,如表B中所述。这些包括阻断CTLA-4的抗体,如伊匹单抗和曲美木单抗;阻断PD-1的抗体,如纳武单抗(Brahmer等人,2015)、REGN2810和派姆单抗(Garon等人,2015);阻断PD-L1的抗体,如德瓦鲁单抗(MEDI4736)和阿特珠单抗(Fehrenbacher等人,2016);和任何一种或多种此类抗体的组合,称为“IO双联体”。其中,目前优选曲美木单抗、纳武单抗、德瓦鲁单抗和阿特珠单抗。针对曲美木单抗、纳武单抗、德瓦鲁单抗和阿特珠单抗的主要美国专利分别是美国专利第6,682,736号、美国专利第8,008,449号、美国专利第8,779,108号和美国专利第8,217,149号。

[0302] 除了表B之外,抗-CTLA-4抗体的其它合适的实例是美国专利No.6,207,156中描述的那些,其特别涉及选自来自保藏的杂交瘤的限定抗体的包含CDR(CDR3、CDR2或CDR1)的抗CTLA-4抗体。

[0303] 除了表B之外,抗PD-L1抗体的其它合适的实例是以下中描述的那些:美国专利第8,168,179号,其特别涉及用人类抗PD-L1抗体治疗PD-L1过表达的癌症,包括化疗组合;美国专利第9,402,899号,其特别涉及用PD-L1抗体治疗肿瘤,包括嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体;以及美国专利第9,439,962号,其特别涉及用抗PD-L1抗体和化学疗法治疗癌症。这些抗PD-L1抗体组合物和方法包括小野药品工业(Ono Pharmaceuticals)和合作者研发的那些。

[0304] 另外合适的PD-L1抗体是美国专利第7,943,743号、第9,580,505号和第9,580,507号,其试剂盒(美国专利第9,580,507号)和编码抗体的核酸(美国专利第8,383,796号)。此类抗体与PD-L1结合并与参考抗体竞争结合;由VH和VL基因定义;或由重链和轻链CDR3(美国专利第7,943,743号)或重链CDR3(美国专利第8,383,796号)定义,具有限定序列或其保守修饰;或与参考抗体具有90%或95%序列一致性。这些抗PD-L1抗体还包括具有确定的定量(包括结合亲和力)和定性特性的抗体、免疫缀合物和双特异性抗体。还包括使用此类抗体的方法,以及具有确定的定量(包括结合亲和力)和定性特性的抗体,包括单链形式的抗体和具有分离的CDR形式的抗体,以增强免疫应答(美国专利第9,102,725号)。如美国专利第9,102,725号中所述,增强免疫应答可用于治疗癌症或感染性疾病,如病、细菌、真菌或寄生虫的病原性感染。这些抗PD-L1抗体组合物和方法包括产物BMS936559。

[0305] 另外合适的PD-L1抗体是美国专利申请第2016/0009805号中的抗体,其涉及PD-L1上特定表位的抗体,包括具有限定的CDR序列的抗体和竞争抗体;核酸、载体、宿主细胞、免疫缀合物;检测、诊断、预后和生物标记物方法;和治疗方法。

表 B 阻断 CTLA-4、PD-1 和 PD-L1 的抗体和功能测定				
靶标	代表性通用名称	代表品牌名称	美国专利	教导内容
[0306]	伊匹单抗	Yervoy®	6,984,720	由序列；定量和定性特性定义的 CTLA-4 抗体
			7,605,238	通过结合亲和力，包括抑制和竞争性结合测定；序列定义的 CTLA-4 抗体
			8,318,916	由 CDR3 序列定义的针对 CTLA-4 抗体的核酸
			8,784,815 8,017,114	增加免疫应答并用由 CDR3 序列和亲和力或与参考抗体和亲和力竞争定义的 CTLA-4 抗体来治疗癌症
			6,682,736	CTLA-4 抗体(特别是人类和灵长类动物)，由 VH 基因和其中的氨基酸置换；结合亲和力、定量特性、抗体竞争所定义
	曲美木单抗	Opdivo®	7,109,003	表达 CTLA-4 抗体，由定量结合特性或 VL 基因；亲和力、抗体竞争定义
			7,132,281	宿主细胞中，表达和纯化 CTLA-4 抗体，由抗体竞争(例如，保藏抗体)和 VL 基因；定量结合特性；90%、95% 序列一致性定义
			7,411,057	核酸、宿主细胞和表达 CTLA-4 抗体，由 CDR 序列和保藏的抗体定义
			7,807,797 7,824,679 8,143,379 8,491,895 8,883,984	CTLA-4 抗体，由重链或轻链序列(链改组)或 CDR，单链和双特异性定义，并且治疗癌症
			8,008,449 8,779,105 9,387,247	PD-1 抗体，其与参考抗体竞争结合；免疫缀合物；双特异性；定量和定性特性
PD-1	纳武单抗	Opdivo®	9,492,539 9,492,540	PD-1 抗体，其与参考抗体竞争结合，80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 框架序列一致性并且治疗癌症
			8,728,474	用 PD-1 抗体治疗肿瘤，包括嵌合、人源化和人类
			9,067,999	用 PD-1 抗体，包括组合治疗肺癌
			9,073,994	用 PD-1 抗体，包括组合治疗黑素瘤
			7,595,048	用人类抗 PD-1 抗体，包括化疗组合治疗 PD-L1 或 PD-L2 过表达癌症

表 B 阻断 CTLA-4、PD-1 和 PD-L1 的抗体和功能测定				
靶标	代表性通用名称	代表品牌名称	美国专利	教导内容
[0307]	派姆单抗	Keytruda®	8,354,509	PD-1 竞争性结合抗体；定量和定性特性
			8,900,587	由 CDR 或某些序列定义的 PD-1 抗体
			8,952,136	由 CDR 或某些序列定义的 PD-1 抗体
[0307]	德瓦鲁单抗	[MEDI4736]	8,779,108	PD-L1 (B7-H1) 抗体，其与保藏的抗体竞争结合已知的表位或具有 90%一致性的重链和轻链可变域；用于突变分析的竞争测定
			9493565	由 CDR 或序列定义的 PD-L1(B7-H1) 的抗体
	阿特珠单抗	Tecentriq®	8,217,149	重链可变区和由 CDR 定义的结合 PD-L1 的具有序列变体的抗体，包括无效应子的 Fc 突变和去糖基化；化疗、抗病毒和疫苗组合
[0308]	组合		9,084,776 [8,728,474] [9,067,999] [9,073,994]	用 PD-1 和 CTLA-4 抗体治疗肿瘤
			9,358,289	用 PD-1 和 CTLA-4 抗体治疗肿瘤，包括亚治疗剂量和 PD-L1 阴性肿瘤
			9,393,301 [9,402,899]	用 PD-L1 和 CTLA-4 抗体治疗肿瘤

[0308] ***

[0309] 包括以下实例以说明本发明的优选实施例。所属领域技术人员应理解，以下实例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中很好地起作用的技术，因此可以视为构成其实践的优选模式。然而，根据本公开内容，所属领域技术人员应理解，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，可以对所公开的具体实施例进行许多改变并仍然获得相同或相似的结果。

[0310] 实例I

[0311] 生成3G4抗体

[0312] 本实例描述了称为3G4的鼠PS靶向抗体的免疫方案、产生和初始表征。

[0313] 为了将免疫系统中的阴离子磷脂(主要为PS)呈现为更强的免疫原，将其在细胞环境中调配，最特别调配为PS阳性细胞。被其它膜组分包围的经膜暴露的PS具有用于产生抗体的更好构象。目的在于用表达PS的自体细胞免疫活性动物，其中动物不会产生针对所有自身表面抗原的抗体，但是会将经膜暴露的PS识别为外来元件。

[0314] 将小鼠内皮瘤细胞bEnd.3(永生化小鼠(BALB/c品系)内皮细胞)在在10%CO₂培养箱中在含有9ml/500ml HEPES缓冲液的10%DMEM中培养。将bEnd.3细胞在T175TC烧瓶中扩增，直至获得所需数量的细胞。通常，呈约70-80%汇合度的每个烧瓶具有约3×10⁶个细胞，并且每只小鼠应接受1×10⁶至20×10⁶个细胞，至多1×10⁷个细胞。

[0315] 用50μM至200μM的过氧化氢在37℃下处理bEnd.3细胞持续1或2小时，以在免疫前暴露阴离子磷脂，特别是PS。H₂O₂的储备液为[9.8M]；30% (v/v)。以1:1000稀释其，然后将

0.4ml添加到具有40ml培养基的T175TC烧瓶至100 μ M H₂O₂的最终浓度。将细胞在37℃下保持1小时。为了收集,用温磷酸盐缓冲盐水(PBS),+10mM EDTA将细胞洗涤3次,以除去培养基中的所有BSA或血清蛋白。用温和的胰蛋白酶处理除去细胞,洗涤并以1000rpm离心5分钟。吸出上清液,并在无添加剂达到适当体积的情况下再悬浮于DMEM的细胞(每只小鼠接受于200 μ l中的约1×10⁷个细胞),并保持在冰上。

[0316] 用1ml注射器和23号计量注射针将以这种方式处理的细胞注射(200 μ l细胞悬浮液)到BALB/c小鼠IP。首先以3至4周的间隔对小鼠进行3至7次免疫。从第二次加强开始,每次加强后10天通过对小鼠放血来收集免疫血清。通过ELISA测试PS抗体的血清滴度。

[0317] 用自体PS阳性细胞进行的这些免疫不会导致自身抗体的不受限制的产生,但是限于产生与PS反应的抗体,主要是与PS与其它阴离子磷脂的组合反应的抗体。获得具有与阴离子磷脂,如PS反应的极高滴度抗体的小鼠。小鼠未显示任何毒性迹象。

[0318] 在进一步免疫中,用过氧化氢处理的bEnd.3细胞免疫各种小鼠三次,并在第一次免疫后54天测试血清。用抗小鼠IgG,Fc特异性二抗检测血清内与PS反应的IgG抗体(用抗小鼠IgG μ 特异性二抗检测血清内的IgM抗体)。使用所述免疫方案获得了许多具有与PS反应的IgG和IgM抗体的有效抗血清,其中具有IgG抗体的抗血清通常更有效。

[0319] 通常,当PS的所需抗血清的IgG滴度达到>200,000,但PC滴度<50,000时,进行融合以产生单克隆抗体。通过将来自免疫动物的脾细胞与骨髓瘤配偶体P3X63AG8.653细胞(马里兰州罗克维尔ATCC(ATCC, Rockville, MD))融合而获得杂交瘤。

[0320] 制备适用于肿瘤治疗的单克隆抗体的所述技术的一个重要方面是选择策略,其涉及筛选以选择与阴离子磷脂结合但不结合中性磷脂的抗体。另一个重要方面是在血清不存在下选择与在血清存在下一样牢固结合经PS涂布的板的抗体。这是为了排除识别PS和血清蛋白复合物,如PS和 β 2GPI的复合物的抗体而进行。

[0321] 分离与PS反应的单克隆抗体的策略涉及使用抗小鼠IgG,Fc γ 特异性二抗在经PS涂布的板上筛选杂交瘤上清液。首先针对四种磷脂(磷脂酰丝氨酸(PS);磷脂酰乙醇胺(PE);心磷脂(CL);和磷脂酰胆碱(PC))以及bEnd3细胞进行筛选。丢弃与中性磷脂PC反应的克隆体,以及与bEnd3细胞不反应的克隆体。选择与PS高度结合的克隆体。首先亚克隆具有PS反应性或对PS有强烈偏好的孔,然后亚克隆表现出PS反应性并结合其它阴离子磷脂的孔。

[0322] 确定每种选择的杂交瘤的同种型。由于IgG类抗体具有优于IgM的许多优点,包括通常更高的亲和力、更低的体内清除率和纯化、修饰和处理的简单性,因此特别需要产生所述抗体。为了集中于具有同源IgG同种型的孔,丢弃或重新克隆含有IgM或不同Ig的混合物的孔。高度阳性克隆体的亚克隆重复三至四次。

[0323] 选择最初被称为“F3-G4”,并重新命名为3G4的一种有利的小鼠IgG抗体(IgG_{3K})。在存在和不存在血清的情况下,在ELISA中测试3G4抗体与PS的结合,并且最初表征为“血清非依赖性”,即在不存在血清下结合PS的抗体。

[0324] 使用以下“标准ELISA”研究3G4抗体,其用于测试与PS或其它磷脂的结合。应将磷脂抗原(PS抗原,P-6641 25mg 10mg/ml(溶剂为氯仿:MeOH 95:5)在2.5ml瓶中)储备溶液等分并储存在处于-30℃下的密闭容器中。优选的96孔板是Dynatech U bottom Immulon 1(来自Dynatech Labs,目录号011-010-3550)。

[0325] 使用的标准封闭缓冲液是溶解在PBS中的10%牛血清。一抗是测试样品。二抗是山羊抗小鼠IgG-HRP。显影溶液为:10ml 0.2M Na₂PO₄、10ml 0.1M柠檬酸、一个10mg OPD片剂,和10μl过氧化氢。终止溶液为0.18M H₂SO₄。

[0326] 所述方案需要用如下PS涂布96孔板:PS储备溶液在正己烷稀释至10μg/ml,并充分混合。向每个孔中添加50μl并使其蒸发1小时。将200μl 10%血清(作为封闭缓冲液)添加至每个孔中,加以覆盖并在室温下保持2小时或在4°C下保持过夜。将板用PBS洗涤三次。添加一抗(在封闭缓冲液中稀释)并在37°C下培育2小时。将板用PBS洗涤三次。添加每孔100μl的二抗(通常是山羊抗小鼠IgG-HRP)并在37°C下培育1小时。将板用PBS洗涤三次。通过向每个孔中添加100μl显影液,显影10分钟来进行ELISA;然后将100μl终止溶液添加到每个板并在490nm下读取OD。

[0327] 确定3G4抗体对PS的相对亲和力与先前的抗体相比得到改善,并且3G4抗体与PS、CL、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酸(PA)和磷脂酰甘油(PG)结合。与靶向在肿瘤中差异表达的PS的模型一致,3G4抗体不与中性磷脂,PC和SM反应。

[0328] 使用标准蛋白A程序从培养的杂交瘤的上清液中纯化3G4抗体至表观均质性。简单地说,将在生理pH下含有3G4抗体的样品施用于蛋白A柱并使其缓慢通过,以使IgG与固定的蛋白A结合。用洗涤缓冲液洗涤柱以除去未结合的血清组分。使用酸性洗脱缓冲液(约pH 2.8)从柱上洗脱3G4抗体,然后中和或透析含有洗脱抗体的分级以恢复到生理pH。在不存在血清下进行的ELISA中测试这种高度纯化的3G4抗体与PS结合时,仍然认为3G4与PS直接结合,即没有血清或血清蛋白。

[0329] 实例II

[0330] 3G4抗体的临床前抗肿瘤作用

[0331] 在所述实例中,提供数据以举例说明早期临床前体验,其显示3G4抗体在同基因和异种肿瘤模型中的一些抗肿瘤作用。

[0332] A. 动物肿瘤研究方案

[0333] 首先在同基因和异种肿瘤模型中检查3G4的作用。动物肿瘤处理研究的一般方案如下。

[0334] 这些动物来自查理斯河实验室(Charles Rivers Laboratories)。小鼠为4-5周雌性CB-17SCID或Fox Chase SCID小鼠。以高压灭菌笼养,无菌食物和水圈养小鼠,同时进行无菌处理。所有程序均在层流罩中进行。使小鼠适应1周,然后进行耳标记,从尾静脉取血液样品(约75-100μl),通过ELISA检查是否有泄漏。任何未通过泄漏ELISA测试的小鼠都不用于测试程序。将小鼠与肿瘤细胞原位注射到乳房脂肪垫(MFP)中,或者在耳标记和血液样品移除后2-3天皮下注射到右侧腹中。

[0335] 在原位模型中,通常将0.1ml DMEM中的 1×10^7 个细胞注射到麻醉小鼠的MFP中。用IP注射的0.075ml小鼠混合物麻醉小鼠。小鼠混合物是5ml氯胺酮(100mg/ml);2.5ml甲苯噻嗪(20mg/ml);1ml乙酰丙嗪(10mg/ml);11ml无菌水。通过IP途径,剂量为每20-30克体重0.1ml,持续30分钟。

[0336] 小鼠麻醉后,如通过对夹趾/夹脚没有反应所测量,将小鼠左侧卧,并在头后和右前臂/后部区域周围用70%乙醇擦拭。在右前臂(外侧胸廓)后面做2-3mm的切口,当皮瓣抬起时,显示出发白的脂肪垫。使用1ml注射器和27号计量注射针将0.1ml细胞注射到脂肪垫

中，在脂肪垫中产生泡。使用9mm无菌伤口夹闭合切口。将小鼠放回笼中观察，直到其从麻醉中苏醒并移动。确定术后健康状况，并且如果观察到任何痛苦迹象，则在饮用水中给予动物对乙酰氨基酚(0.24mg/ml)+可待因(0.024mg/ml)。1周后去除伤口夹。使用所述方法使细胞准确地放入选定的部位而不是放入皮下区域。肿瘤14-15天均体积(L×W×W)为约200μl并且成瘤率基本上是100%。

[0337] 在皮下模型中，通常给小鼠注射0.2ml的 1×10^7 个细胞。小鼠没有被麻醉，但是使用稳定的小鼠皮肤夹紧来暴露右侧腹。就在小鼠皮肤下方使用具有23号计量注射针的1ml注射器注射200μl的 1×10^7 个细胞，并看到起泡。观察到注射部位少量液体泄漏并不罕见。当从皮下注射中抽出针头时使用扭转运动以减少这种泄漏。通过L×W×H测量肿瘤体积。

[0338] 在灌注方案中，向小鼠静脉内注射处于0.2ml盐水中的1000U肝素。然后通过用0.1ml小鼠混合物IP注射小鼠使小鼠镇静。小鼠足够镇静后，如通过夹趾/夹脚时没有反应所测量，打开胸腔以暴露心脏和肺部。将连接到管和灌注泵的30号计量注射针插入左心室。右心室被剪断，以便血液可以滴出。将盐水以每分钟1ml的速度泵送12分钟。在灌注结束时，移除针和管。取出组织用于进一步的免疫组织化学或病理学研究。

[0339] 使用非参数检验(Mann-Whitney秩和检验)测试肿瘤生长速率的差异的统计学显著性。

[0340] B. 肿瘤处理结果

[0341] 对于同基因模型，将Meth A小鼠纤维肉瘤肿瘤细胞与BALB/c小鼠一起使用。在异种模型中，将人类MDA-MB-231乳腺肿瘤细胞或MDA-MB-435细胞接种到SCID小鼠的乳腺脂肪垫中。在另一种异种模型中，通过注射细胞并在处理前使肿瘤生长至超过500mm³的大小来建立大的人类霍奇金氏淋巴瘤L540异种移植植物。相较于对照抗体(称为BBG3，针对牛巴贝虫(Babesia bovis)抗原的小鼠IgG_{3κ}抗体，通过ATCC获得的杂交瘤，如23.8.34.24;HB-10113分泌)，荷瘤小鼠(每组8-10只动物)腹膜内注射100μg 3G4抗体，纯化至表观均质性。每周重复治疗3次。对动物进行每周两次或三次的监测以进行肿瘤测量。

[0342] 用3G4抗体处理可有效抑制同基因和异种肿瘤的生长(P<0.05)。在研究结束时，相较于对照小鼠，经3G4处理的小鼠中肿瘤生长的平均减少量对于MDA-MB-435为65%(图1A)，对于MDA-MB-231为75%(图1B)，对于MethA为90%(图1C)，对于L540为50%(图1D)。在用同种型匹配的对照抗体BBG3处理的对照小鼠中没有发生肿瘤生长的延迟。同系Meth A肿瘤细胞的处理特别成功。即使在已知具有抗坏死性的L540肿瘤的小鼠中，与对照相比，3G4抗体处理抑制肿瘤生长。在用3G4抗体处理的小鼠中未观察到毒性。

[0343] 总之，3G4抗体因此引起肿瘤血管损伤、局部血栓形成、肿瘤坏死和延迟的肿瘤生长，没有毒性迹象。

[0344] 实例III

[0345] 生成嵌合3G4抗体，巴维昔单抗

[0346] 本实例提供了3G4抗体的重链和轻链可变区的完整序列，其总共包括六个互补决定区(CDR)，并描述了3G4抗体的嵌合形式，包括小鼠-人类嵌合抗体(ch3G4)(现称为巴维昔单抗)的生成。

[0347] A. 3G4抗体序列

[0348] 通过RACE从产生3G4抗体的杂交瘤获得3G4抗体可变区的原始序列并验证所述序

列。3G4抗体的重链可变区 (V_H) 的核酸和氨基酸序列示于美国专利第7,572,448号中的图18A中。重链可变区序列在Kabat可预测的位置包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3 (Kabat等人,1991)。核酸序列中的BstEII位点可以用作制备功能性小鼠可变区,例如用于移植到人类恒定区上的适宜位点。

[0349] 实际上,使用Lonza pEE载体将3G4-2BVH序列移植到BstEII位点的人类 γ_1 恒定区上。所得产物含有小鼠前导序列,并且其VH以美国专利第7,572,448号中的图18A中所示的方式与人类CH1序列连接。

[0350] 3G4抗体的轻链可变区 (V_K) 的核酸和氨基酸序列示于美国专利第7,572,448号中的图18B中。轻链可变区序列在Kabat可预测的位置包括VLCDR1、VL CDR2和VL CDR3 (Kabat等人,1991)。核酸序列中的BbsI位点可以用作制备功能性小鼠可变区,例如用于移植到人类恒定区上的适宜位点。

[0351] 实际上,使用Lonza pEE载体将3G4-2BVL序列移植到BbsI位点的人类 κ 恒定区上。所得产物含有小鼠前导序列,并且其VL以美国专利第7,572,448号中的图18B中所示的方式连接在人类CL1序列内。

[0352] B. 生成小鼠嵌合抗体2aG4

[0353] 如下直接描述,鼠3G4抗体的人类嵌合体 (ch3G4) 是人类IgG₁同种型 (hIgG₁)。ch3G4的鼠IgG同源物对应于小鼠IgG_{2a}同种型 (mIgG_{2a})。制备并测试所述构建体,并显示其表现与原始小鼠IgG₃抗体基本相同。

[0354] 简单地说,通过RT-PCR从3G4杂交瘤细胞系分离的总RNA扩增3G4轻链编码序列。设计RT-PCR引物以使得扩增的片段在扩增产物的任一末端含有XmaI和EcoRI限制酶位点,用于克隆到Lonza表达载体,pEE12.4载体中。通过RT-PCR从3G4杂交瘤细胞系分离的总RNA扩增3G4重链的可变区。设计引物以使得扩增的片段在扩增产物的任一末端含有HindIII和XmaI限制酶位点,用于克隆到Lonza表达载体,pEE6.4载体中。

[0355] 通过PCR从质粒载体扩增鼠IgG_{2a}恒定区。设计PCR引物,在扩增产物的任一端具有BstII和EcoRI限制酶位点,用于克隆到pEE6.4+3G4VH载体中。BstEII位点设计为与上游的3G4VH可变区序列符合读框。通过用SalI和NotI切割两种载体,将重链和轻链构建体组合成单个双基因载体 (12.4 3G4IgG_{2a})。通过测序验证重链和轻链编码区。

[0356] 通过电穿孔将12.43G4IgG_{2a}载体转染到NS0细胞中。转染后,将NS0细胞稀释并涂铺于缺少谷氨酰胺的培养基中的96孔板中。只有用构建体转染的细胞(含有用于阳性选择的谷氨酰胺合成酶基因)才能在不存在谷氨酰胺下生长。使用实例I的标准ELISA鉴别转染子并筛选抗体分泌,并且在大培养物中培养分泌最高量抗体的那些转染子以产生纯化抗体。

[0357] 将所得2aG4抗体纯化至表观同质性并且显示,其具有与3G4抗体基本相同的亲和力和结合分布。

[0358] C. 生成人类嵌合抗体ch3G4 (巴维昔单抗)

[0359] 已经产生了含有鼠可变区和人类恒定区的嵌合构建体 (ch3G4),并显示出与原始鼠抗体具有基本相同的特征。

[0360] 将鼠3G4抗体转化为人类-鼠嵌合抗体。克隆鼠V_H并移植到Lonza 2BVH载体的BstE II位点的人类 γ_1 恒定区。克隆鼠V_K并移植到Lonza 2BVL载体的BbsI位点的人类 κ 恒定区。

验证序列。在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达整个构建体，并纯化抗体。这是现称为巴维昔单抗的抗体。

[0361] 使用实例I的标准ELISA，所得ch3G4，至少鼠3G4结合于经磷脂涂布的ELISA板。显示嵌合3G4与磷脂组，PS、PA、CL、PI和PG的体外结合分布与3G4相同。结合是抗原特异性的，因为没有观察到与不相关特异性的对照抗体的结合。在体内，还显示ch3G4定位于肿瘤血管内皮并在广泛的研究中发挥抗肿瘤作用和抗病毒作用。

[0362] 然而，当嵌合3G4构建体在无血清条件下在CHO细胞中表达，并且在不存在血清下在ELISA中测试纯化的抗体与PS的结合时，丧失与PS的结合。

[0363] 实例IV

[0364] 3G4抗体和巴维昔单抗以β2GPI依赖性方式靶向PS

[0365] 所述实例提供数据以解决来自原始杂交瘤的3G4抗体和CHO细胞中表达的嵌合抗体的PS结合分布的明显差异。为此，本实例证明3G4抗体和PS之间的相互作用依赖于血浆蛋白，β2-糖蛋白I(β2GPI)。

[0366] A. 材料和方法

[0367] 1. 材料

[0368] 达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM)和胰蛋白酶/EDTA获自Mediatech公司。(弗吉尼亚州赫恩登(Herndon, VA))。从Biomeda(加利福尼亚州福斯特市(Foster City, CA))获得胎牛血清(FBS)、正常人类血清、正常大鼠血清和正常小鼠血清。从Carter Blood Care(德克萨斯州达拉斯(Dallas, TX))获得新鲜人类血浆。无血清杂交瘤培养基、Synthechol NS0补充剂、L-α-磷脂酰丝氨酸(PS)、牛血清白蛋白(BSA)和来自鸡蛋清蛋白的卵白蛋白(OVA)和获自西格玛化学公司(Sigma Chemical Co.) (密苏里州圣路易斯市(St. Louis, MO))。DEAE纤维素、肝素-琼脂糖和Hybond-P膜获自Amersham Biosciences(英国白金汉郡(Buckinghamshire, UK))。1-棕榈酰-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸胆碱[溶血磷脂酰胆碱(LPC)]得自Avanti Polar Lipids(阿拉巴马州阿拉法斯特(Alabaster, AL))。从Thermo Lab Systems(马萨诸塞州富兰克林(Franklin, MA))获得96孔Immilon-1B和Immilon-2HB微量滴定板。从伯乐(Biorad)(加利福尼亚州赫拉克勒斯(Hercules, CA))获得Tris-HCl梯度SDS-PAGE凝胶和Opti-4CN底物试剂盒。从BD Biosciences(马萨诸塞州贝德福(Bedford, MA))获得八孔玻璃室载玻片。

[0369] 2. 抗体

[0370] 生成用于结合阴离子磷脂PS的3G4小鼠单克隆抗体，是实例I中所述的抗体。最初在杂交瘤上清液中产生3G4(实例I；实例II)。3G4也转化为小鼠IgG2a同种型(实例III,B)，并在NS0小鼠骨髓瘤细胞系中产生。NS0细胞在补充有10%FBS或无血清杂交瘤培养基的DMEM中与Synthechol NS0补充物一起培养。产生人类嵌合形式的3G4(ch3G4；巴维昔单抗)(实例III,C)，并且在无血清条件下由CHO细胞产生抗体。

[0371] 小鼠抗人类β2GPI(抗β2GPI或α-β2GPI)mAb获自US Biological(马萨诸塞州斯旺普斯科特(Swampscott, MA))。分泌C44(秋水仙碱特异性小鼠IgG2amAb)的杂交瘤获自美国典型培养物保藏中心(马里兰州罗克维尔(Rockville, MD))，并用作3G4和抗β2GPI的对照。利妥昔单抗(人类IgG1嵌合mAb)用作ch3G4的对照。所有二抗均获自杰克逊免疫研究实验室(Jackson Immunoresearch Labs)(宾夕法尼亚州西格罗夫(West Grove, PA))。

[0372] 3. 制备抗体片段

[0373] 通过与蛋白酶胃蛋白酶培育产生3G4F(ab')₂。通过与蛋白酶木瓜蛋白酶一起培育产生3G4Fab和对照Fab 7H11(抗腺病毒)。通过FPLC纯化所有抗体裂解产物，并通过SDS-PAGE验证。

[0374] 4. 从人类血浆中纯化β2GPI

[0375] 用于本实例的人类β2GPI(hβ2GPI)基本上如前所述从人类血浆中纯化(Polz等人, 1980; Wurm等人, 1984)。简单地说, 将高氯酸(70%)添加到合并的血浆中直到终浓度为1.57%(v/v)。丢弃沉淀物, 用饱和Na₂CO₃将上清液调节至pH 7.5, 然后对50mM Tris, pH 8.0进行充分透析。将所述材料施加到用50mM Tris, pH 8.0平衡的DEAE纤维素柱上以除去污染物。然后将DEAE柱流出物施加到用50mM Tris, pH 8.0平衡的肝素-琼脂糖亲和柱上, 并用1.0M NaCl洗脱结合的蛋白质。最后, 将β2GPI制剂对PBS透析, 并通过蛋白A/G进一步纯化以除去污染的IgG。最终的制剂含有50kDa均相带, 如由非还原SDS/PAGE和Coomassie[®]染色所示。

[0376] 5. β2GPI和β2GPI域的构建和表达

[0377] 为了产生β2GPI的纯的重组全长和删除形式, 使用酵母穿梭表达载体αpPIC6A(英杰(Invitrogen))和宿主菌株MUT⁺X-33(英杰)中。表达载体含有醇(甲醇)氧化酶基因(AOX1)的5'启动子和3'转录终止序列。载体还具有在AOX1启动子下游的酵母α交配因子信号序列, 外源cDNA可以融合到所述信号序列中以将重组异源蛋白分泌到培养基中。在巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)中的表达提供与哺乳动物细胞中类似的糖基化和二硫键形成。

[0378] 为了产生表达构建体, 使用人类β2GPI cDNA制备以下五种表达构建体, 如Luster等人, 2006和美国专利第8,956,616号中所述: β2GPI cDNA的完整编码区, 没有其同源信号肽(域I-V); 删除域I(域名II-V); 删除域I和II(域III-V); 删除I、II和III域(域IV-V); 和仅域V(删除域I、II、III和IV)。常用的3'引物用于所有片段的PCR。

[0379] 将PCR扩增的片段框内插入pPICαA的EcoR1和XbaI限制性位点之间, 直接位于α交配因子信号序列的下游。在每个片段的末端引入终止密码子以防止重组蛋白质与C末端的c-myc表位或His标签融合。质粒构建体在100μg/ml杀稻瘟素存在下在大肠杆菌中繁殖, 并通过限制性分析和核苷酸测序验证。由上述五种构建体表达的重组蛋白在糖基化之前分别编码约36、29、24、16和9kDa的蛋白质。

[0380] 为了转化和筛选表达克隆体, 将重组质粒构建体用限制酶SacI线性化, 加以纯化, 并用10μg通过原生质球法(英杰)转化宿主菌株X-33。在含有400μg/ml杀稻瘟素的YPD(酵母提取物蛋白胨葡萄糖培养基)板上选择这些构建体中的每一种的转化体持续4天。将这些构建体中的每一个的若干克隆体在具有400μg/ml杀稻瘟素的YPD板上重新划线以确定真正的整合体。然后将每种构建体的10个克隆体在最小葡萄糖(Minimal Dextrose, MD)和最小甲醇(Minimal Methanol, MM)板上划线。然后在液体MD和MM培养基中培养在MD和MM板上均生长良好的每种构建体的5个克隆体持续24、48、72、96和120小时。使用抗人类β2GPI多克隆抗体通过西方印迹法分析每个时间点的每个克隆体的上清液和沉淀。在上清液中显示出最高蛋白质表达的克隆体进一步用于大规模制备。

[0381] 对于重组蛋白的大规模纯化, 使用英杰推荐的培养条件产生重组蛋白。将每个克隆体的起子培养物在5ml缓冲的最小甘油复合培养基(BMGY)中在剧烈摇动下在30℃下培养

过夜。收集细胞，用于接种25mL BMGY并生长2天。然后使用来自25mL培养物的细胞接种1L缓冲的最小甲醇复合(BMMY)培养基(1.0%甲醇)。在剧烈摇动下在30℃下继续培养4天，每24小时添加100%甲醇(终浓度为1.0%)以维持蛋白质表达。通过离心(4000×g,15分钟)澄清培养基，并将上清液在4℃下在50mM Tris缓冲液中透析2天，然后施加到用50mM Tris缓冲液平衡的DEAE-sephadex柱上。收集流过溶液并施加到肝素-琼脂糖柱上。用1M NaCl从肝素-琼脂糖柱洗脱β2GPI，用50mM Tris缓冲液透析，用Amicon浓缩器浓缩，并通过西方印迹法加以分析。对每种蛋白质的N末端进行测序以确认α-因子前导序列的裂解。蛋白质产量从10mg/L(全长β2GPI)到25mg/L(β2GPI域V)变化。

[0382] 6.“切口”hβ2GPI的制备

[0383] 如上文在本实例中所述，从人类血浆中纯化的完整hβ2GPI制备切口hβ2GPI。将hβ2GPI与纤溶酶涂布的珠粒在37℃下培育17小时。通过离心去除珠粒，并且回收含有裂解蛋白质的上清液。纯化产物的西方印迹表明，切口β2GPI制剂不含纤溶酶并且不含纤溶酶自身蛋白水解产物(与抗纤溶酶或抗血管生成抑制素抗体无反应性)。N末端序列分析揭示了两个N末端，其对应于β2GPI的N末端和在Lys317/Thr318裂解位点处产生的新序列。

[0384] 7.PS ELISA

[0385] 通过以下修改调整实例I的标准ELISA。将经PS涂布的Immunon 1B微量滴定板在1%OVA(w/v)中封闭过夜。第二天，从初始浓度13.33nM制备从含血清或无血清上清液中纯化的3G4的连续2倍稀释液。在来自牛、人类、大鼠或小鼠的1%OVA或10%非热灭活血清中进行稀释。将板在37℃下培育1小时并检测到3G4的结合。所有ELISA研究进行至少三次。

[0386] 8.抗hβ2GPI ELISA

[0387] 如上所述进行测定，具有以下修改。将hβ2GPI，切口的hβ2GPI或重组hβ2GPI肽以10μg/mL的浓度涂布在96孔Immunon 2HB微量滴定板上过夜。然后将板在1%OVA中封闭1小时。在室温下。将3G4, ch3G4或抗β2GPI在1%OVA中稀释至初始浓度13.33nM，并制备连续2倍稀释液。将板培育1小时。在37℃和抗体结合检测。所有ELISA研究进行至少三次。

[0388] 9.西方印迹法

[0389] 将蛋白质样品在非还原性SDS样品缓冲液中加热至95℃持续5分钟。然后将样品装载到Tris-HCl 4-15%梯度SDS-PAGE凝胶上，并使用Mini Protean II设备(伯乐)分离。将分离的蛋白质转移至PVDF膜并在3%BSA(w/v)中封闭过夜。用在3%BSA中稀释至1μg/mL的抗β2GPI、3G4或对照小鼠IgG探测膜，充分洗涤并与过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG一起培育。使用Opti-4CN底物试剂盒开发膜。

[0390] 10.内皮细胞PS暴露的诱导和检测

[0391] 将成年牛主动脉内皮(ABAE)细胞维持在补充有10%FBS和2mM L-谷氨酰胺的DMEM中。通过短暂暴露于0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA从亚汇合培养物中除去ABAE细胞，并以 2×10^4 细胞/孔接种8孔室载玻片。过夜培养后，用PBS温和洗涤细胞，并用200μM溶血磷脂酰胆碱(LPC)处理以诱导PS暴露。在3G4、ch3G4或对照IgG存在下，在37℃下在10%FBS或10%正常小鼠血清(MS)中进行LPC处理持续30分钟。如果在10%MS中进行LPC处理，那么添加hβ2GPI作为辅因子，因为3G4/ch3G4不能结合MS中的PS(参见本实例中的以下结果)。

[0392] 通过免疫荧光染色测定PS暴露。将细胞在PBS中充分洗涤，在4%多聚甲醛(w/v)中固定，并与生物素缀合的抗小鼠二抗一起培育。之后，将细胞与FITC缀合的链霉抗生物素蛋

白(杰克逊免疫研究)一起培育以检测抗体结合。然后用PBS中的0.1% Triton-X100透化细胞，并用Texas Red缀合的鬼笔环肽(俄勒冈州尤金的分子探针公司(Molecular Probes, Eugene, OR))和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI; 分子探针公司)复染。使用安装在尼康(Nikon)显微镜上的Coolsnap数码相机(Photometrics, 亚利桑那州图森市(Tucson, AZ))捕获图像，并用MetaVue软件(Universal Imaging Corporation, 宾夕法尼亚州唐宁敦(Downingtown, PA))处理。

[0393] 11. 抗体与ABAE细胞结合的量化

[0394] 使用MetaVue图像分析软件确定抗体结合区域，所述软件能够量化图像中照射像素的数量。FITC荧光的图像用于量化抗体结合。使用DAPI荧光的相应图像来标准化FITC图像中存在于所述场中的细胞数量。较小FITC/DAPI比率表示较小抗体结合区域，而较大FITC/DAPI比率表示较大结合区域。FITC/DAPI比率用于确定抗体结合区域相对于在所选条件下抗体结合的基础量的增加或减少。每次分析使用放大200倍的五个图像。数据被分析为具有标准偏差的平均相对FITC/DAPI比率。

[0395] B. 结果

[0396] 总体来说，以下数据证明3G4(和巴维昔单抗)抗体和PS之间的相互作用依赖于血浆蛋白， β 2GPI。3G4在域II显示与 β 2GPI结合，这与从抗磷脂综合征(APS)患者分离的致病抗体无关，后者通常识别 β 2GPI域I。数据显示需要二价3G4/ β 2GPI复合物用于增强PS结合，包括PS阳性细胞，因为3G4Fab'片段不具有这种活性。

[0397] 1. 3G4需要血清因子来结合经PS涂布的微量滴定板

[0398] 当在10% FBS中进行连续稀释时，从含有血清的培养基(SCM)或无血清培养基(SFM)纯化的3G4抗体与经PS涂布的微量滴定板结合(图2A, 实线)。相比之下，当在1% OVA(其缺乏牛血清蛋白)中进行连续稀释时，从SFM纯化的3G4不再结合PS(图2A, 虚线，■)。所述发现表明，牛血清中存在的因子介导3G4和PS之间的相互作用。

[0399] 有趣的是，当在1% OVA中进行连续稀释时，从SCM纯化的3G4仍然与PS结合(图2A, 虚线，▲)。显然，来自含血清培养基的血清蛋白介导3G4和PS之间的相互作用。这表明即使在SCM中生长的3G4被纯化，纯化抗体中可存在的低水平的血清蛋白仍足以支持PS结合。

[0400] 鉴于这些发现，使用从SFM纯化的3G4进行下述研究。

[0401] 2. 3G4与不同物种血清中的PS结合

[0402] 为了确定来自其它哺乳动物物种的血清是否可以介导3G4抗体和PS之间的相互作用，在10%小鼠、大鼠、人类或其它血清中进行3G4的连续稀释。3G4抗体在大鼠和人类血清存在下结合PS，与牛血清存在下非常类似(图2B)。然而，3G4在小鼠血清存在下不结合PS(图2B)。在相关研究中，3G4在仓鼠、雪貂、豚鼠、兔和猴血清的存在下结合PS。因此，除小鼠外，3G4识别的血清蛋白表位在所有测试的哺乳动物物种中均是保守的。

[0403] 3. 3G4结合血清糖蛋白 β 2GPI

[0404] 在20世纪90年代早期，研究表明许多所谓的抗磷脂(aPL)抗体不能直接识别磷脂，而是与血清蛋白结合，而血清蛋白又对磷脂具有亲和力(Galli等人，1990；McNeil等人，1990)。因此，针对与3G4抗体的反应性筛选了一组已知与阴离子磷脂相互作用的人类血清蛋白。

[0405] 例如，将人类 β 2GPI(h β 2GPI)涂布在微量滴定板上，并与小鼠抗人类 β 2GPI抗体(抗

β 2GPI)、3G4抗体或无关特异性的对照小鼠 IgG2a(对照mIgG)一起培育。如所预期,抗 β 2GPI结合h β 2GPI,而对照mIgG不结合(图3)。3G4抗体也与经h β 2GPI涂布的板牢固结合(图3)。

[0406] 为了确定 β 2GPI是否是3G4抗体识别的唯一血清蛋白,将纯化的h β 2GPI和10%人类血清在SDS-PAGE凝胶上电泳并转移到膜支持物上进行免疫印迹。3G4检测到50kDa纯化的h β 2GPI和人类血清中相似大小的单一条带。重要的是,3G4免疫印迹实际上与使用抗 β 2GPI抗体产生的印迹相同。对照mIgG抗体未检测到任何蛋白质。

[0407] 测试已知与阴离子磷脂相互作用的其它人类血清蛋白以确认在ELISA中与3G4抗体缺乏反应性。将等量的特定蛋白质涂布在微量滴定板上,在1%OVA中封闭,并与连续稀释的3G4抗体一起培育。充分洗涤各板并用过氧化物酶标记的检测二抗检测抗体结合。所有研究均包括阳性和阴性对照抗体,其如预期进行。免疫印迹和ELISA研究的结果是:阳性, β 2GPI;阴性,膜联蛋白V、因子XII、激肽原(低分子量或高分子量)、氧化LDL、蛋白质C、蛋白质S、凝血酶原和组织纤溶酶原激活物(tPA)。总之,这些数据表明3G4抗体结合血清蛋白 β 2GPI。

[0408] 4. 3G4在域II结合 β 2GPI

[0409] β 2GPI具有五个域,其中第五个域负责结合阴离子磷脂,如PS。为了确定3G4抗体识别哪个 β 2GPI域,产生具有不同域结构的重组人类 β 2GPI构建体,并与重组全长h β 2GPI一起进行测试。这些域构建体通过N末端的连续截短制得,并且因此反过来缺少N末端域中的每一个,如下:重组全长h β 2GPI含有域I-V;已删除域I的h β 2GPI含有域II-V;已删除域I和II的h β 2GPI含有域III-V;已删除域I、II和III的h β 2GPI含有域IV-V;并且已删除域I、II、III和IV的h β 2GPI仅含有域V。

[0410] 将等量的全长h β 2GPI和每种上述h β 2GPI域构建体涂布在微量滴定板上,并与连续稀释的3G4抗体一起培育。所述结果显示,仅通过3G4检测到含有 β 2GPI(域I-V和域II-V)域II的h β 2GPI构建体(图4)。当域I被删除时,3G4与域II-V同样良好地结合(图4)。因此,3G4抗体在域II与 β 2GPI结合。

[0411] 鉴于从APS患者分离的致病抗体的已知信息,发现3G4抗体在域II与 β 2GPI结合是重要的。从APS患者分离的致病性抗 β 2GPI抗体通常识别 β 2GPI的域I(de Laat等人,2005)。来自APS患者的识别域II的抗 β 2GPI抗体通常并不致病。这可能解释了在各种动物模型中,以及如本文所述的广泛临床经验进行的毒理学研究之后缺乏与3G4相关的毒性。

[0412] 5. 3G4和 β 2GPI与具有暴露PS的细胞的共结合

[0413] 为了在更多生理条件下验证上述发现,研发了活细胞结合测定。所述测定检测和测量用膜破坏剂、溶血磷脂酰胆碱(LPC)处理而诱导PS暴露后的抗体与细胞膜表面的结合。

[0414] 在所述测定中,在存在或不存在200 μ M LPC的情况下,将ABAE细胞与3G4抗体或对照mIgG在DMEM+10%FBS中培育30分钟。然后洗涤细胞,加以固定并用荧光标记物染色以显现抗体与细胞表面的结合。使用MetaVue软件量化3G4或mIgG结合的像素区域。所有值均相对于3G4与非LPC处理的细胞的结合,其设定为1。

[0415] 当在正常条件下将3G4抗体添加到ABAE细胞培养基中时,未观察到与细胞的结合。然而,当在LPC存在下将ABAE细胞与3G4一起培育时,很容易检测到3G4抗体结合的许多精确定点。已知LPC诱导暂时的膜扭曲(Kogure等人,2003),其可能导致膜不对称性缺失和PS暴露。

[0416] 量化显示,在LPC处理后,3G4抗体结合的面积增加超过500倍,而对照mIgG的结合仍然不可检测。先前当用H₂O₂诱导PS暴露后,显示3G4和PS结合分子膜联蛋白V结合内皮细胞时,已获得类似结果(Ran等人,2005;美国专利第。经LPC处理的ABAE细胞未被膜不渗透染料碘化丙啶或DAPI染色,表明3G4在细胞表面上结合PS,而不是质膜的内小叶。

[0417] 为了证实β2GPI对于3G4抗体结合到具有暴露PS的细胞是必需的,在含有10%小鼠血清,而不是10%FBS的培养基中进行活细胞结合测定,以防止牛β2GPI干扰。如上所述,3G4抗体在小鼠血清存在下不结合PS。此外,3G4抗体未通过免疫印迹检测10%小鼠血清中的任何蛋白质,表明3G4不识别鼠β2GPI。

[0418] 对于所述研究,人类嵌合3G4抗体(ch3G4)用于预防由小鼠血清中存在的鼠IgG的检测引起的背景。当在10%小鼠血清和LPC存在下将ABAE细胞与ch3G4一起培育时,未检测到抗体结合(图5)。相比之下,向结合反应中添加纯化的hβ2GPI支持ch3G4的广泛结合(图5),证明ch3G4抗体结合依赖于hβ2GPI。在所有情况下, ch3G4结合依赖于LPC处理,并且使用不相关特异性的对照人类IgG未检测到结合。

[0419] 有趣的是,当在10%小鼠血清和LPC存在下将ABAE细胞与hβ2GPI一起培育,充分洗涤,然后与ch3G4抗体一起培育以检测hβ2GPI的结合时,检测到非常少的ch3G4结合(图5)。这一发现表明,hβ2GPI在ch3G4抗体不存在下不会与具有暴露PS的细胞结合,并且与生理条件下β2GPI对PS膜表面的亲和力较低的报道一致(Willems等人,1996;Bevers等人,2004;Bevers等人,2005)。总之,这些数据显示ch3G4抗体和hβ2GPI必须同时存在以与暴露的PS结合ABAE细胞,表明ch3G4抗体增强β2GPI对PS的亲和力。

[0420] 6. 3G4的共结合需要β2GPI的脂质结合区

[0421] 为了证实β2GPI的脂质结合区对于β2GPI和3G4以及ch3G4抗体与具有暴露PS的细胞的共结合是必需的,使用“切口”hβ2GPI进行活细胞结合测定。由于在域V的脂质结合区内的纤溶酶介导的裂解,切口hβ2GPI不能结合PS(Hunt等人,1993;Hunt&Krilis,1994)。

[0422] 当在不存在LPC下将ABAE细胞与ch3G4抗体和hβ2GPI或切口hβ2GPI一起培育时,未检测到ch3G4结合(图6A)。在LPC存在下,hβ2GPI能够介导ch3G4与具有暴露PS的ABAE细胞的结合,而切口hβ2GPI不能介导结合(图6A)。活细胞测定中缺乏结合并非由于ch3G4抗体不能结合切口hβ2GPI,因为当将等量的蛋白质涂布在微量滴定板上时, ch3G4结合切口hβ2GPI以及hβ2GPI(图6B)。这些发现表明, ch3G4/hβ2GPI复合物通过hβ2GPI域V的脂质结合区检测在ABAE细胞上暴露的PS。

[0423] 7. β2GPI的共结合需要抗体二价性

[0424] 上述数据表明,3G4抗体通过增强β2GPI对阴离子磷脂的亲合力来检测PS。为了确定3G4/β2GPI与具有暴露PS的细胞的结合是否需要二价性,产生3G4F(ab')₂和3G4Fab'单体并将其用于完整3G4抗体的活细胞结合测定。如所预期,完整的3G4抗体与经LPC处理的ABAE细胞结合,但不与未处理的细胞结合。等效浓度的3G4F(ab')₂也与经LPC处理的ABAE细胞结合(图7A),但3G4Fab'的结合可忽略不计(图7A)。检测到3G4F(ab')₂的结合相对于3G4明显降低,并且可能是由于多克隆二抗与3G4F(ab')₂上缺失的Fc表位的结合缺失。即使浓度为2 μM,也未在ABAE细胞上检测到3G4Fab'的结合,这比结合微量滴定板上涂布的β2GPI所需的浓度高1,000倍。

[0425] 此外,3G4Fab'以浓度依赖性方式抑制ch3G4/β2GPI与经LPC处理的ABAE细胞的结

合(图7B),而不相关特异性的对照Fab'则不然。3G4Fab'抑制ch3G4结合的能力证实,3G4Fab'能够结合β2GPI并且单体3G4Fab' / β2GPI复合物不能结合具有暴露PS的细胞。这些数据表明,二价3G4/β2GPI复合物对于与细胞表面上暴露的PS的结合是必需的。

[0426] 总之,如图4所示,3G4抗体在域II与β2GPI结合,并且如图6A和图6B所示,β2GPI域V的脂质结合区对于3G4(和ch3G4)以及β2GPI与细胞上暴露的PS的共结合是必需的。另外,如图7A和图7B所示,3G4(和ch3G4)以及β2GPI与暴露的PS的此类共结合需要抗体二价性。因此,提供如在活化内皮细胞、肿瘤血管内皮细胞和肿瘤细胞,以及病毒感染的细胞上进行的抗体和β2GPI共结合于暴露在膜的外表面上的PS的一个模式(图8)。

[0427] 实例V

[0428] 巴维昔单抗和β2GPI之间的相互作用的临床前模型

[0429] 本实例提供了关于巴维昔单抗家族抗体、β2GPI和PS之间相互作用的临床前数据。总体而言,数据显示相对较低水平的β2GPI(显著低于人群中的典型量)足以有效结合巴维昔单抗与PS。

[0430] A. 低β2GPI支持小鼠的抗肿瘤作用

[0431] 在鼠3G4抗体的初始研发中,使用标准蛋白A程序(实例I)将抗体从培养的杂交瘤的上清液中纯化至表观同质性。在小鼠的早期研究中,这种纯化抗体显示出在数种模型中发挥抗肿瘤作用(实例II)。

[0432] 在确定3G4抗体需要β2GPI进行PS结合(实例IV),并且所有β2GPI物种支持除小鼠外的PS结合(图2B)后,推断出实例II的抗肿瘤作用是3G4抗体的效力的低估结果。也就是说,图1A、图1B、图1C和图1D中的3G4抗体的抗肿瘤作用仅由低水平的牛β2GPI支持,其可通过蛋白A柱与3G4抗体共纯化。基本上,尽管递送的大部分蛋白质是纯3G4抗体,但是必须将低水平的牛β2GPI共同给予小鼠(源自用于培养杂交瘤细胞的10%胎牛血清(FBS))。因此,这些初始数据表明,高水平的β2GPI不是3G4抗体抑制体内肿瘤生长所必需的。

[0433] 使用蛋白A柱将3G4抗体纯化至表观均质性,其基于对IgG的亲和力纯化抗体。还存在使得来自培养基的β2GPI在纯化过程中将与3G4抗体分离的其它原因。首先,β2GPI对3G4抗体的亲和力较低(并且低于蛋白A和3G4之间的亲和力),使得β2GPI在装载和洗涤期间将与3G4分离。其次,低pH洗脱步骤(将3G4抗体与蛋白A分离)将除去与3G4复合的β2GPI。此外,在主抗体峰中收集洗脱的蛋白质时,较小的β2GPI蛋白质不会被收集。尽管如此,如图9A和图9B所示,即使假设递送到小鼠的10-20%显著较纯的3G4抗体实际上呈3G4-β2GPI复合物形式,按绝对值计算并且与抗体相比,此类水平的牛β2GPI仍然极低。

[0434] 更详细地,3G4抗体由10%FBS中的杂交瘤细胞产生。一升体积通常会产生10mg/L的3G4抗体。假设FBS含有200μg/ml的牛β2GPI(类似于人类血清中人类β2GPI的水平),10%FBS将含有20μg/ml的牛β2GPI。在收集时,一升杂交瘤细胞上清液含有10mg 3G4抗体和最多20mg牛β2GPI($20\mu\text{g}/\text{ml} \times 1,000 = 20\text{mg}$)。用蛋白A纯化后,所得物质含有10mg蛋白质。假设3G4纯度为80-90%,剩余的10-20%是3G4:β2GPI“复合物”,其中一种抗体与两个β2GPI附接(3G4-2×β2GPI)。

[0435] 向小鼠给予100μg此类蛋白质。在90%纯度下,100μg所施用的蛋白质中有90μg是纯3G4,有10μg是3G4-2×β2GPI复合物。使抗体的分子量(MW)为145kD,并且β2GPI的MW为50kD(实例IV,A4,B3;McNeil等人,1990;Luster等人,2006),并且在复合物中的每个抗体有

两个 β 2GPI的情况下,重量比约为3:2(精确地说,59.2%抗体和40.8%抗体)。因此,在10 μ g复合物中,大约6 μ g是3G4,4 μ g是 β 2GPI(精确地说,5.92 μ g GG4、并且4.08 μ g是 β 2GPI)。

[0436] 小鼠的血液量为2ml。纯3G4抗体以每只小鼠90 μ g或45 μ g/ml存在。在约3:2的比率下,每只小鼠10 μ g复合物含有约6 μ g的3G4和约4 μ g的 β 2GPI(3 μ g/ml的3G4和2 μ g/ml的 β 2GPI)。在2 μ g/ml的能够结合抗体的 β 2GPI下,这是人类血清中平均 β 2GPI水平的约1%,并且还支持抗肿瘤活性(图1A、图1B、图1C和图1D)。

[0437] 小鼠中2 μ g/ml的 β 2GPI对应于0.04 μ M。对于3G4,从给予的3G4-2× β 2GPI复合物向45 μ g/ml纯3G4添加3 μ g/ml的3G4,存在48 μ g/ml的3G4抗体。这相当于0.33 μ M的抗体。在90%纯度的起始点,伴随 β 2GPI为0.04 μ M,3G4抗体为0.33 μ M, β 2GPI与抗体的摩尔比为0.12(图9A)。即使在纯度为80%的起始点,相同的计算显示 β 2GPI的体内浓度为4 μ g/ml(0.08 μ M),体内抗体浓度为46 μ g/ml(0.32 μ M)。 β 2GPI与抗体的摩尔比仍然仅为0.25(图9B)。随后的研究,包括抗体制剂的敏感西方印迹(随后可以鉴别凝胶上的 β 2GPI带),证实3G4抗体纯度总呈至少80-90%。因此,在0.12和0.25之间的这些 β 2GPI与抗体摩尔比计算结果增加了原始解释的量化观点,即使用3G4抗体的初始小鼠数据显示高水平的 β 2GPI对于抗肿瘤活性并非必需的。

[0438] B. 低 β 2GPI支持细胞结合

[0439] 在分析3G4- β 2GPI复合物与细胞上的PS结合所需 β 2GPI水平的第一项研究中,用LPC处理ABAE细胞以诱导PS暴露(实例IV),然后与40nM纯化的人类 β 2GPI和不同浓度的ch3G4抗体(巴维昔单抗)一起培育。经测定,相对ch3G4结合以浓度依赖的方式从320pM升高到80nM ch3G4的表观峰,其呈2:1抗体与 β 2GPI比率(图10)。如表1所示(抗体MW,145kD;人类 β 2GPIMW,50kD),所述研究中的表观峰结合对应于0.5的 β 2GPI与抗体摩尔比。

[0440] 表1

[0441] 细胞结合中的巴维昔单抗和 β 2GPI

[0442]

ch3G4 (nM)	ch3G4 (μ M)	ch3G4 (μ g/ml)	β 2GPI (μ g/ml)	β 2GPI (μ M)	β 2GPI (nM)	β 2GPI 与 Ab 摩尔比
0.32	3.2×10^{-4}	0.0464	2	0.04	40	125
1.25	1.25×10^{-3}	0.1812	2	0.04	40	32
5	5×10^{-3}	0.725	2	0.04	40	8
20	0.02	2.9	2	0.04	40	2
80	0.08	11.6	2	0.04	40	0.5
320	0.32	46.4	2	0.04	40	0.125
1280	1.28	185.6	2	0.04	40	0.03125
5120	5.12	742.4	2	0.04	40	0.0078125

[0443] ch3G4浓度和细胞与暴露PS结合之间的钟形关系(图10)进一步支持膜表面上二价ch3G42× β 2GPI复合物的形成,并表明单价ch3G4- β 2GPI复合物形式以极高抗体浓度形成。在此类浓度下,认为一价(非结合)和二价(结合)络合物之间的竞争引起结合于细胞的ch3G42× β 2GPI复合物的量减少(也被称为“钩状效应”)。

[0444] 这项研究中的最大相对结合出现在80nM的抗体浓度下,其呈仅为0.5的 β 2GPI与抗体比(图10;表1)。这是比如图8所示的预测的二价相互作用更低的比率,但与上述报道的用于用从杂交瘤中纯化的3G4抗体处理小鼠的比率一致。然而,在这项研究中,细胞上PS的确

切密度尚不知晓。更重要的是，在所测试的ch3G4浓度下，未观察到饱和结合(稳定)，并且20与80nM之间和80与320nM之间的ch3G4浓度下的进一步测试将具信息性。然而，即使没有此类中间测试，也可得出以下结论，最佳抗体结合出现0.125、0.5和2之间的 β 2GPI与抗体摩尔比下。这些体外数字与上述关于使用杂交瘤纯化的3G4抗体的，其中 β 2GPI与抗体摩尔比在0.12和0.25之间(取决于抗体纯度)的体内治疗所报道一致。因此这一第一体外研究也表明低水平的 β 2GPI有效地支持巴维昔单抗与具有暴露PS的细胞的结合。

[0445] C. 低 β 2GPI支持PS结合

[0446] 在后续研究中，在不同浓度的人类 β 2GPI存在下，在ELISA中测试2aG4抗体与PS的结合(实例III)。

[0447] 制备含有固定量的2aG4抗体和增加量的人类 β 2GPI的溶液。简单地说，将62.5ng/ml(0.4nM)2aG4添加到卵白蛋白中的0.0032、0.016、0.08、0.4、2、10或50nM人类 β 2GPI中。不同2aG4- β 2GPI混合物添加到S微滴定板，并且使分子在37℃下结合持续1-2小时。通过用PBS洗涤除去未结合的分子。二抗是结合缓冲液中的经HRP缀合的抗人类IgG。将板在37℃下放置1小时，然后通过用PBS洗涤5次除去未结合的抗体。将TMB底物以100μl的体积添加到每个孔中，并在室温下放置15分钟以使比色反应发生。通过添加100μl 2M H_2SO_4 终止反应。在添加终止溶液的30分钟内，通过板光谱仪在450nm波长下读取吸光度(光密度(OD))，并使用SoftMax Pro软件分析(包括从测试样品的平均OD中减去没有 β 2GPI的对照的平均OD)。

[0448] 这项研究表明，2aG4抗体与PS的结合在呈约1的 β 2GPI与抗体摩尔比下开始稳定，其中两种分子都以约0.4nM存在(图11)。更精确地，如表2(抗体MW, 145kD；人类 β 2GPIMW, 50kD)所示，呈0.93的 β 2GPI与抗体摩尔比对支持抗体结合到经PS涂布的板为有效的。

[0449] 表2

[0450] PS结合中的抗体和 β 2GPI

[0451]	2aG4 (ng/ml)	2aG4 nM	β2GPI nM	β2GPI 与 Ab 摩尔比
[0452]	0	0	50	--
	62.5	0.43	0	--
	62.5	0.43	0.0032	7.42×10^{-3}
	62.5	0.43	0.016	0.037
	62.5	0.43	0.08	0.186
	62.5	0.43	0.4	0.93
	62.5	0.43	2	4.65
	62.5	0.43	10	23.26
	62.5	0.43	50	116.28

[0453] 从以上第一体外研究扩展观察结果，本研究表明，抗体与PS的结合在低 β 2GPI与抗体摩尔比下已达到饱和，之后达到平稳状态(在50nM β 2GPI下观察到PS结合有较小损失(图11)，这可能与通常在ELISA测定形式中检测到的典型饱和效应有关)。在本研究中， β 2GPI与抗体的有效摩尔比为约1(0.93)。将 β 2GPI与抗体比率增加到5或更高未引起结合改善(图11；表2)。

[0454] 在卵白蛋白中存在不同浓度的人类 β 2GPI的情况下，在ELISA中进行了一系列测试巴维昔单抗与PS的结合的相关研究。进行巴维昔单抗和 β 2GPI滴定。这些研究还表明，低水

平的 β 2GPI,包括低至0.5 μ g/ml的浓度,在支持一系列抗体浓度与经PS涂布的板结合方面是有效的。

[0455] D. 稀释人类血清中的抗体结合及活性

[0456] 进行另一系列研究以测试不同稀释度的人类血清中巴维昔单抗与PS的结合和功能。这些包括在ELISA、FACS分析中使用PS阳性细胞,和NFAT替代性ADCC生物测定形式的功能测定中的PS结合。

[0457] 1. ELISA

[0458] 进行ELISA以测试不同百分比的六种不同独立的人类血清样品中巴维昔单抗与PS的结合。不同人类血清(来自BioReclamationIVT,北美)被稀释在PBS中以制备低至0.1%的人类血清%范围。将巴维昔单抗-HRP(实例XVI,A3)以2 μ g/ml添加到每个%的人类血清溶液中。将不同巴维昔单抗-HRP混合物添加到PS微滴定板,并使其在37°C下结合1-2小时。用PBS洗涤板。将TMB底物以100 μ l的体积添加到每个孔中,并在室温下放置15分钟以使比色反应发生。通过添加100 μ l 2M H₂SO₄终止反应。在添加终止溶液的30分钟内,通过平板光谱仪在450nm波长下读取吸光度,并使用SoftMax Pro软件进行分析。

[0459] 2. FACS

[0460] 使用不同百分比的FBS作为牛 β 2GPI的来源测试巴维昔单抗与PS阳性细胞(经依托泊昔(etoposide)处理的HT 1080细胞)的结合,并通过荧光激活细胞分选法(FACS)(也称为流式细胞术)测量。

[0461] 制备不同百分比的FBS的PBS溶液并将10 μ g/ml巴维昔单抗添加到各溶液中。为了在细胞表面诱导PS暴露,用50 μ M依托泊昔处理HT 1080细胞持续18小时。然后用不同巴维昔单抗百分比FBS溶液培育细胞,随后使用针对巴维昔单抗的二抗,以允许经由流式细胞术观测抗体与细胞的结合。阴性对照包括未用依托泊昔处理的细胞,其不会在表面上暴露PS,以及缺乏任何FBS的PBS溶液。

[0462] 3. NFAT

[0463] 活化T细胞的核因子(NFAT)是应用于显示在免疫应答中至关重要的转录因子家族的通用名称。NFAT信号转导路径和NFAT响应元件(NFAT-RE)已用于研发测定和商购试剂盒,以监测培养细胞中的NFAT信号转导路径。

[0464] 一个NFAT生物测定已研发为与巴维昔单抗家族抗体一起使用(Larson等人,2013)。工程化以在细胞表面上表达Fc γ RIIIa-V158受体的Jurkat细胞(普洛麦格(Promega))也用含有荧光素酶基因的遗传元件在含有多个NFAT-RE的最小TATA启动子的控制下转染。这些是NFAT效应细胞,其与PS阳性靶细胞共培养。PS靶向抗体,如巴维昔单抗结合靶细胞的表面上的PS。然后,PS靶向抗体的Fc区与NFAT效应细胞上的Fc γ RIIIa-V158受体结合,并触发通过NFAT路径的信号传导。NFAT与NFAT-RE结合并激活荧光素酶表达,其可以得到量化。因此,这种NFAT测定是用于巴维昔单抗和其它PS靶向抗体的替代性ADCC生物测定。

[0465] 4. 结果

[0466] 上述ELISA测定的示范性结果示于图12中,其同样显示具有低水平的 β 2GPI的稀释的人类血清有效地支持抗体结合。与使用纯化 β 2GPI的上述PSELISA(图11)一样,在50%和100%人类血清中存在PS结合的一定损失,这与通常在ELISA测定形式中检测到的典型饱和

效应有关,特别是在使用未稀释的血清时。此类效果并未在FACS测定中观察到,并且显示巴维昔单抗与具有暴露PS的细胞的结合与50%、75%和100%胎牛血清下基本上相同。

[0467] 根据图12,可以看出在ELISA中巴维昔单抗与PS的结合在约1%的人类血清中开始平稳。正常人类血清平均含有 $200\mu\text{g}/\text{ml}\beta2\text{GPI}$ (Steinkasserer等人,1991;Mehdi等人,1999;Miyakis等人,2004),1%人类血清含有约 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 $0.04\mu\text{M}\beta2\text{GPI}$ 。图12显示,在所述 $\beta2\text{GPI}$ 浓度下,巴维昔单抗与PS的结合已经处于饱和状态。如表3(抗体MW,145kD;人类 $\beta2\text{GPI}$ MW,50kD)所示,在ELISA中1%人类血清对应于呈2.86的 $\beta2\text{GPI}$ 与抗体摩尔比。这通常符合以下基本原理:每个巴维昔单抗分子需要与两个 $\beta2\text{GPI}$ 分子结合,以在细胞表面上与PS形成稳定复合物(图8)。

[0468] 表3

[0469] 针对PS结合的人类血清中的 $\beta2\text{GPI}$ 量

[0470]

巴维昔单抗 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	巴维昔单抗 (μM)	人类血清%	$\beta2\text{GPI}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$\beta2\text{GPI}$ (μM)	$\beta2\text{GPI}$ 与 Ab 摩尔比
2	0.014	10	20	0.4	28.57
2	0.014	5	10	0.2	14.28
2	0.014	1	2	0.04	2.86
2	0.014	0.5	1	0.02	1.43
2	0.014	0.1	0.2	0.004	0.28
2	0.014	0	0	0	-

[0471] 如图12所示,即使在0.5%人类血清下,巴维昔单抗与PS的结合仍接近稳定,最特别为血清样品编号13,并且这对应于呈1.43的 $\beta2\text{GPI}$ 与抗体摩尔比(表3)。NFAT替代性ADCC生物测定的结果还表明,在这一一般范围内的 $\beta2\text{GPI}$ 与抗体摩尔比有效地支持巴维昔单抗功能。例如,虽然本研究并非设计用来鉴别针对巴维昔单抗活性的最佳比率,但显示,呈1.9的(牛) $\beta2\text{GPI}$ 与抗体摩尔比有效地支持NFAT测定中的巴维昔单抗活性。

[0472] 总之,本实例显示低至0.12至2.86的 $\beta2\text{GPI}$ 与抗体摩尔比支持抗体与PS和PS阳性细胞的结合,促进功能测定中的活性并允许有效治疗患有肿瘤的小鼠。鉴于所有上述数据,并采取预防方法,可以推断出,为了最大化单抗结合和功能, $\beta2\text{GPI}$ 与抗体摩尔比应为约2.86(表3),但其不需要高于约3。

[0473] 实例VI

[0474] 巴维昔单抗在临床研究中的药代动力学

[0475] 所述实例涉及当给予患有其中PS是标记物的疾病,特别是癌症和病毒感染的人类个体时的巴维昔单抗的药代动力学。如上所述,临床经验显示与临床前建模一致。

[0476] A. 初始I期研究

[0477] 进行I期、多中心、开放标记、剂量递增研究以评估当向26名患有难治性晚期实体肿瘤的患者静脉内给予(巴维昔单抗单一疗法)时,巴维昔单抗的安全性、耐受性和药代动力学(PK)。患者参与四个连续的剂量递增组(每周0.1、0.3、1或 $3\text{mg}/\text{kg}$ 巴维昔单抗)和两个给药方案。在 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 和 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 组中,患者在第0、28、35和42天接受巴维昔单抗;在 $1\text{mg}/\text{kg}$ 和 $3\text{mg}/\text{kg}$ 组群中,在第0、7、14和21天向患者给予巴维昔单抗。

[0478] 基于临床前模型(实例V)和其它患者群体的经验选择每周3mg/kg的较高剂量。在实例II的模型研究之后的广泛动物模型研究中,在每周3次的0.5mg/kg抗体剂量下实现最大功效,得到半衰期为48小时的5.5 μ g/ml的C_{max},并且治疗过程中模拟的平均血液浓度为2 μ g/ml。超过此类剂量,基于巴维昔单抗与PS阳性细胞的体外结合变得饱和的浓度的观察结果(实例V),巴维昔单抗的PS结合可能是饱和的。

[0479] 在研究之前,在第0天、第1天、第2天、第4天、第7天、第10天、第14天以及第21天至第70天每7天从0.1和0.3mg/kg剂量组中的患者收集样品。在研究之前,在第0天、第1天、第2天、第4天、第7天、第14天、第21天、第22天、第23天、第25天以及第28天至第56天每7天从1和3mg/kg剂量组中的患者收集样品。通过验证的ELISA确定巴维昔单抗血液水平。

[0480] 表4展现所述I期试验中单剂量给药(第0天)和多剂量给药(第21天)后巴维昔单抗的平均值(变差系数,CV)PK参数,包括最大浓度(C_{max})、清除率(CL)、半衰期(t_{1/2})和从零到无限大的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC_{inf})。

[0481] 表4

[0482] 巴维昔单抗在I期试验中的药代动力学参数

[0483]

剂量 (mg/kg)	第 0 天				
	N =	平均值 (CV%)			
		C _{max} (μg/ml)	CL (ml/h/kg)	t _{1/2} (h)	AUC _{inf} (d μg/ml)
0.1	8	2.11 (27.3)	1.10 (48.7)	43.9 (48.5)	113 (50.1)
0.3	6	5.13 (42.4)	1.39 (34.3)	39.8 (34.1)	241 (39.8)
1.0	6	16.6 (30.9)	1.14 (36.7)	40.3 (20.2)	966 (30.0)
3.0	6	56.4 (25.8)	1.34 (72.2)	37.2 (34.5)	3,017 (50.3)
剂量 (mg/kg)	第 21 天 (1 和 3 mg/kg)				
	N =	平均值 (CV%)			
		C _{max} (μg/ml)	CL (ml/kg/d)	t _{1/2} (h)	AUC _{inf} (d μg/ml)
1.0	6	18.7 (31.8)	1.12 (52.1)	46.8 (38.4)	1,053 (38.0)
3.0	4	59.6 (27.6)	1.51 (61.4)	46.0 (44.4)	2,672 (63.4)

[0484] 如表4所示,在单剂量给药后,确定巴维昔单抗的平均半衰期为37.2至43.9小时。在第0天,当达到最大血清浓度(T_{max})(介于2.04至3.73小时的值)时,平均最大血清浓度(C_{max})在给药后的中值时间为2.11至56.4 μ g/ml(取决于剂量)。对于以3mg/kg给药的巴维昔单抗,最大血清浓度为56.4 μ g/ml。对于整个研究,巴维昔单抗半衰期为37至47小时。本研究未达到最大耐受剂量。

[0485] 巴维昔单抗展现出线性单剂量(第0天)和多剂量(第21或42天)PK特征(图13)。在多剂量给药后,巴维昔单抗没有展现出明显的积累或时间依赖性PK差异。总之,所述研究表明,巴维昔单抗在每周高达3mg/kg的剂量范围内具有良好的耐受性,并且药代动力学支持每周给药方案。确切地说,据测定,在1mg/kg的剂量下,巴维昔单抗浓度保持高于2 μ g/ml(基于临床前模型所预测的治疗阈值)持续6天;并且在3mg/kg的剂量下,巴维昔单抗浓度保持高于这一2 μ g/ml持续7天(图13)。因此,选择每周3mg/kg的剂量用于肿瘤学的未来使用。

[0486] B.其它药代动力学研究

[0487] 除了上述I期试验外,现已在癌症或病毒感染患者的其它几项临床研究中在120多名患者中评估以单剂量、每周一次或每周两次输注(60–90分钟)给定的巴维昔单抗的PK。经证实,巴维昔单抗在剂量范围为0.1至6mg/kg时展现出线性单剂量和多剂量PK特征,并且没有明显的巴维昔单抗累积或时间依赖性PK差异的迹象。显示中值T_{max}在输注结束后的前2至3小时内发生。血清巴维昔单抗浓度以明显的单指数或双指数一阶方式下降。观察到的更快的分布阶段在6小时内基本完成,并且终末消除半衰期为约1至2天(21.9至46.8小时)。

[0488] 1. 病毒感染的PK

[0489] 巴维昔单抗PK特征在患有癌症和慢性病毒感染的患者中通常是相似的,如在患有和不患有HIV的慢性HCV感染的患者中所测试。

[0490] I期、开放标记、单中心、剂量递增研究评估了在慢性感染HCV的患者中单次静脉内输注巴维昔单抗(实例VII,A)。如表5所示,发现观察到的巴维昔单抗浓度与PK建模数据的预测结果非常一致。

[0491] 表5

[0492] 预测和测量的巴维昔单抗浓度

[0493]

参数	值				
剂量 (mg/kg)	0.1	0.3	1	3	6
预测 C _{最大} (μg/ml)	2.2	6.5	21.8	65.4	130.8
观察到的 C _{最大} (μg/ml)	2.5	5.7	24.3	75.8	135.0

[0494] 在慢性HCV患者的相应的Ib期、多中心、开放标记、非随机、逐步递增的重复剂量研究中,PK数据分析显示第0天的线性单剂量PK特征和第10天的所有剂量水平下的线性多剂量特征,而且在给药2周后没有巴维昔单抗积累或时间依赖性PK差异的迹象。

[0495] 在共同感染慢性HCV和HIV的患者的Ib期研究(实例VII,C)中,巴维昔单抗在第0天展现出线性单剂量PK特征,并且在0.3到6mg/kg的剂量范围内的每周一次给药后第49天展现线性多剂量PK特征。巴维昔单抗在每周一次多剂量给药8周后没有展现出时间依赖性PK差异或累积。

[0496] 2. 组合疗法中的PK

[0497] 重要的是,当组合给予巴维昔单抗和其它药物(特别是化疗剂)时,似乎没有任何药物的任何临床相关的药代动力学相互作用。这包括组合给予巴维昔单抗和多西他赛时。

[0498] 在这方面,Ib期、多中心、开放标记、非随机研究首先评估当在难治性晚期实体肿瘤患者中与吉西他滨、太平洋紫杉醇加卡铂或多西他赛组合使用时,3mg/kg的巴维昔单抗的每周一次静脉内给药的安全性、耐受性和PK。经测定,在单剂量(第0天)或多剂量给予巴维昔单抗(第21天)后三个处理组之间的任何可测量参数方面没有显著差异。C_{最大}和AUC的评估结果表明,在每周一次多剂量给药八周后没有积累巴维昔单抗。

[0499] 在评估先前处理的局部晚期或转移性非鳞状NSCLC患者中的巴维昔单抗加多西他赛的II期、随机、双盲、安慰剂对照研究(实例XIII)中,整个研究人群的一个子集(每组6名患者)还参与了PK子研究,以调查巴维昔单抗和多西他赛之间的任何药物-药物相互作用。在周期1和2期间的特定时间点对这些患者进行额外的抽血。对伴随多西他赛的巴维昔单抗没有观察到临床相关的药代动力学药物-药物相互作用。此外,多西他赛在给予或不给予巴

维昔单抗时展现出相似的药代动力学特征。因此,在这些患者中没有观察到伴随多西他赛的巴维昔单抗的临床相关的药代动力学药物-药物相互作用。

[0500] 实例VII

[0501] 使用巴维昔单抗处理患者的病毒感染

[0502] 在所述实例中,提供数据以举例说明使用巴维昔单抗处理患者的病毒感染的一些临床经验,包括巴维昔单抗与利巴韦林(ribavirin)的组合。还提供数据以显示,在选定的临床剂量下,给予巴维昔单抗不会明显降低人类个体中的 β 2GPI水平。

[0503] A.HCV患者的I期研究

[0504] 巴维昔单抗首先在慢性感染丙型肝炎病毒(HCV)的患者的I期、开放标记、剂量递增研究和Ib期、开放标记、逐步增加的重复剂量研究中进行评估。这些研究涉及巴维昔单抗的安全性、耐受性、PK曲线、病毒动力学、最大耐受剂量(MTD)和最大有效剂量(MED)。在I期给予0.1、0.3、1、3和6mg/kg的剂量(30名患者;6名患者的连续组),并且在Ib期给予0.3、1、3和6mg/kg的剂量(24患者;4个6名患者的组)。

[0505] 在HCV患者的I期和Ib期研究中,所有剂量水平的巴维昔单抗都耐受良好。在I期中,在所有剂量水平下均观察到病毒载量的短暂降低,其表明抗病毒活性。在Ib期中,用0.3、1和6mg/kg剂量的巴维昔单抗处理后病毒载量小幅下降;这些下降通常是短暂的,但每个组中至少有一名患者的病毒载量持续下降。值得注意的是,在3mg/kg的巴维昔单抗剂量下,在整个研究处理和随访中证实了HCV的持续降低。

[0506] B.巴维昔单抗不会消耗 β 2GPI

[0507] 上述Ib期研究还测量了患者中 β 2GPI的水平,以确定给予巴维昔单抗是否改变了这些人类个体中的 β 2GPI水平。结果如图14所示。在接受1mg/kg巴维昔单抗的患者中, β 2GPI水平几乎没有变化。在接受3mg/kg巴维昔单抗的患者中观察到血清 β 2GPI水平的短暂降低(20至25%)。然而,这种降低在剂量前水平上没有统计学上的显著变化(图14)。实际上,在3mg/kg巴维昔单抗剂量下, β 2GPI水平保持在正常范围内并在24小时内恢复到处理前水平。相比之下,在接受6mg/kg巴维昔单抗的患者中, β 2GPI水平显著降低($p<0.02$) (图14)。在6mg/kg剂量下, β 2GPI水平相对于处理前水平下降40%,大约为正常范围的下限。尽管如此,即使在用6mg/kg的巴维昔单抗处理的人类个体中, β 2GPI在3天内恢复至基线水平。

[0508] 因此,这些数据验证了用于人类的3mg/kg剂量的巴维昔单抗的选择。所述剂量被测定为巴维昔单抗和 β 2GPI一起存在的最大剂量,其中浓度有效地使巴维昔单抗- β 2GPI复合物形成并结合暴露于疾病位点中的细胞上的PS而不消耗血浆 β 2GPI水平。然而,数据还显示,在巴维昔单抗处理期间 β 2GPI的任何减少仅是暂时的,并且 β 2GPI水平会在3天内恢复。

[0509] C.HCV-HIV患者的I期研究

[0510] 进行单独的Ib期、多中心、开放标签、非随机、剂量递增、重复剂量研究,以评估共同感染慢性HCV(大多数HCV基因型1)和人类免疫缺陷病毒(HIV)的患者中的巴维昔单抗。主要目标是确定安全性、耐受性、PK曲线、病毒动力学、MTD和/或MED。所述研究涉及大约16周的16次预定访问。将巴维昔单抗以下列剂量给予连续患者组:0.3mg/kg,6名患者;1mg/kg,6名患者;3mg/kg,9名患者;和6mg/kg,6名患者。患者每周静脉内注射巴维昔单抗持续8周。在所述组中的所有患者完成前4周给药并且没有出现被分类为严重不良事件(SAE)的血栓形成事件之后,进行剂量递增。

[0511] 中值基线HCV病毒载量为 $6.76\log_{10}$,并且HIV的中值基线为 $3.99\log_{10}$ 。在研究期间的特定时间点测量HCV和HIV的血浆病毒载量。当用巴维昔单抗以所有剂量水平处理时,每个处理组中有数名患者展现出短暂的抗病毒活性($\geq 0.5\log_{10}$ 的HCV和/或HIV病毒载量自基线最大减少)。

[0512] D.HCV患者的II期研究

[0513] 进行II期、多中心、随机、主动对照研究,以评估巴维昔单抗与利巴韦林组合用于慢性HCV(基因型1)感染的初始治疗。主要终点是在研究第12周显示早期病毒学应答(EVR)的患者比例,EVR定义为等于或大于HCV RNA水平的 $2-1\log_{10}$ 国际单位(IU)降低量。安全性包括在次要终点之间。

[0514] 患者接受最长28天的筛查/清洗期,随后进行随机化(比率为1:1:1),每周接受0.3或3mg/kg巴维昔单抗输注或聚乙二醇化干扰素α-2a(聚乙二醇化干扰素,也称为PEG-IFNα-2a)皮下注射12周,均每日两次口服利巴韦林1000mg(体重<75kg)或1200mg(体重 $\geq 75\text{kg}$)。12周后显示EVR的患者接受聚乙二醇化干扰素加利巴韦林的长达48周疗程的非研究处理。

[0515] 共有66名患者(38名男性和28名女性)参与了所述研究,平均年龄为39.1岁。22名患者各自接受0.3mg/kg巴维昔单抗、3mg/kg巴维昔单抗和聚乙二醇化干扰素。接受的0.3和3mg/kg巴维昔单抗剂量的中值数分别为12剂,并且平均处理持续时间分别为78天和75天。

[0516] 在这项研究中,在使用巴维昔单抗加利巴韦林处理的一些患者中观察到超过12周的病毒逐渐减少。有趣的是,看到EVR在使用较低剂量的巴维昔单抗(0.3mg/kg)处理的患者中增加了一倍,其与3mg/kg较高剂量的巴维昔单抗相反(18%对9%)。虽然接受聚乙二醇化干扰素的患者的EVR率要高于任何剂量下的巴维昔单抗,但是巴维昔单抗显示出更有利的安全性;与含有巴维昔单抗的组相比,聚乙二醇化干扰素组中几乎两倍的患者报告了AE。

[0517] 实例VIII

[0518] 用巴维昔单抗和太平洋紫杉醇处理乳腺癌患者

[0519] 转向临床癌症处理,本实例提供了使用巴维昔单抗与紫杉烷、太平洋紫杉醇组合处理HER2阴性转移性乳腺癌患者的数据。

[0520] 在由研究者资助的单中心研究中,14名HER2阴性转移性乳腺癌患者每周接受3mg/kg巴维昔单抗并在4周周期中的第1天、第8天和第15天给予太平洋紫杉醇($80\text{mg}/\text{m}^2$)。骨痛、疲劳、头痛和嗜中性白细胞减少症是最常见的不良事件(AE)。可控制的输注相关反应是与巴维昔单抗相关的最常见的AE。巴维昔单抗没有显示血栓形成增加的迹象。处理引起总反应率(ORR)为85%,其中2名患者具有完全反应,中位无进展存活期(PFS)为7.3个月(95%CI:2.8、10.8)。

[0521] 总之,本研究表明,巴维昔单抗与太平洋紫杉醇组合对于转移性乳腺癌患者的处理具有良好的耐受性,在临床应答率(RR)和PFS方面观察到了有希望的结果。

[0522] 实例IX

[0523] 用巴维昔单抗和太平洋紫杉醇-卡铂处理乳腺癌患者

[0524] 本实例报告II期、开放标记、单组研究的结果,所述研究评估巴维昔单抗加太平洋紫杉醇和卡铂在局部晚期或转移性乳腺癌患者中的安全性和功效,其不受激素或HER2状态限制。

[0525] 这项II期研究采用了Simon两期设计。15名患者进入A期,并且所述试验在B期扩展

至另外31名患者,总共46名患者。主要目标是确定总体响应率(ORR),定义为完全响应(CR)加部分响应(PR),CR+PR。次要目标包括肿瘤进展时间、应答持续时间(DOR或DR)、总存活期(OS)和安全性。

[0526] 每周给予巴维昔单抗(3mg/kg)直至疾病进展,并且在28天循环的第1、8和15天给予卡铂(剂量AUC=2)和太平洋紫杉醇100mg/m²持续最多6个循环。46例患者中有16例(34.8%)未接受过处理。

[0527] 最常见的4级处理后出现的不良事件(TEAE)是嗜中性白细胞减少症(12名患者,26.1%),其为与本研究中所用的化学疗法处理的患者的预期发生率。最常见的3级TEAE是白细胞减少症(11例,23.9%)、嗜中性白细胞减少症(9例,19.6%)和贫血症(5例,10.9%)。这些也是本研究中所用的化学疗法处理的患者的预期发生率。

[0528] 46例患者中有34例(73.9%)出现根据实体肿瘤响应评估标准(RECIST)的客观响应;46名患者中有5名(10.9%)具有CR,并且29名患者(63.0%)具有PR。中值响应持续时间(DOR)为3.7个月(95%置信区间[CI]:3.1、5.8),并且中值PFS为6.9个月(95%CI:5.6,7.7)。在研究结束时,中值OS被测定为23.2个月(95%CI:553天至‘未确定’)。这些结果对于巴维昔单抗的持续研发非常令人鼓舞,特别是在组合疗法中。

[0529] 实例X

[0530] 用巴维昔单抗和多西他赛处理乳腺癌患者

[0531] 本实例报告了另一II期、开放标记、单组研究的结果,所述研究评估了这次与多西他赛组合的巴维昔单抗在局部晚期或转移性乳腺癌患者中的安全性和功效。

[0532] 这一试验也是利用Simon两期设计的II期多中心临床试验。15名患者进入A期,并且所述试验在B期扩展至另外31名患者,总共46名患者。主要目标是测定ORR(CR+PR)。次要目标包括肿瘤进展时间、DOR、OS和安全性。

[0533] 每周给予巴维昔单抗(3mg/kg)直至进展,并且在联合,在计划的4周周期的第1、8和15天给予多西他赛(35mg/m²)持续6个周期。所有患者先前均接受过一次化疗方案。在最常见的所报告的TEAE中,只有疲劳、头痛、背痛和高血压≥3级。

[0534] 在这项研究中,据测定,46例患者中有28例(60.9%)出现客观响应;46例患者中有5例(10.9%)具有CR,46例患者中有23例(50.0%)具有PR。中值DOR为6.1个月(95%CI:5.7,7.5),中值PFS为7.4(95%CI:6.1、9.1)个月。在最终分析时,中值OS约为20.7个月(95%CI:16.1个月至‘未确定’)。这些数据为巴维昔单抗的进一步研发提供了强有力的支持,包括与多西他赛的组合疗法。

[0535] 实例XI

[0536] 用巴维昔单抗和索拉非尼处理肝癌患者

[0537] 在所述实例中,展示来自使用巴维昔单抗与索拉非尼组合处理晚期肝细胞癌(HCC)患者的数据。

[0538] 进行了巴维昔单抗和索拉非尼在晚期肝细胞癌(HCC)中的II期单一机构研究。患者每周静脉内(IV)接受3mg/kg巴维昔单抗,口服400mg索拉非尼,每天两次(Po BID)直至有放射学进展。次要终点包括总存活期(OS)、疾病特异性存活期、4个月无进展存活期、安全性和应答率。所述研究累计有38名患者。

[0539] 在来自本研究中6名患者的相关翻译数据中,据测定,在一次巴维昔单抗处理周期

后,所评估的一半患者的抗肿瘤免疫细胞增加,其与多种临床前癌症模型中相关的PS靶向抗体所示相似。此外,免疫应答的增加与保持处于研究处理较长时间段的患者相关,表明临床上有意义的抗肿瘤免疫应答。评估的6名患者中有3名具有活化的抗肿瘤T细胞(CD8)浸润到肿瘤微环境中增加,这与疾病进展的延长时间相关。此外,这些应答患者在开始处理之前最初表达较低水平的PD-1阳性细胞,这是T细胞活化和疾病结果的既定标记物,随后在巴维昔单抗处理后出现可测量的升高。

[0540] 临幊上,未记录到4级或5级不良事件。最常见的所有等级事件是腹泻(32%)、疲劳(26%)和厌食(24%)。中值OS(mOS)为6.2个月。两名患者实现部分应答,并且四个月PFS为61%。

[0541] 这些结果证明,巴维昔单抗和索拉非尼在晚期HCC患者中耐受良好,没有伴随其它检查点免疫疗法可见的自体免疫不良事件的迹象。进展时间、疾病控制率和4个月无进展存活期的临床结果令人鼓舞,特别是在这个难以预处理的患者组中,所述患者组由于其不利的疾病生物学(包括高血管侵入率)而预后极差。

[0542] 实例XII

[0543] 用巴维昔单抗和吉西他滨处理胰腺癌患者

[0544] 在本实例中,展现来自用吉西他滨与巴维昔单抗组合处理患有先前未处理的IV期胰腺癌的患者的数据。

[0545] 本研究(PPHM 1002)是II期、随机、开放标记研究,其用于在先前未处理的IV期胰腺癌患者中评估与巴维昔单抗一起给予或不与其一起给予的吉西他滨。主要目标是比较处理组中患者的OS。次要目标包括比较PFS、ORR、DR和安全性。

[0546] 入组患者以1:1比率随机化接受单独的吉西他滨或吉西他滨与每周3mg/kg巴维昔单抗的研究处理。在每个28天周期(4周)的第1、8和15天给予吉西他滨(1000mg/m²)直至出现疾病进展或不可接受的毒性。共有70名患者参与所述研究。一般而言,患者群体具有非常广泛的疾病负担,这可能会降低两组的应答。

[0547] 巴维昔单抗加吉西他滨处理组最常见的TEAE是恶心(44.1%)、贫血(35.3%)、和疲劳、便秘和厌食(每种都发生在32.4%的患者中)。随机分配至吉西他滨的3名(9.1%)患者仅发生5级(致命)事件(猝死[1名患者]、肝脓肿[1名患者]和心脏骤停[1名患者])。吉西他滨加巴维昔单抗组均未发生5级(致命)事件。

[0548] 尽管大多数疗效终点在处理组之间相当,但在巴维昔单抗和吉西他滨组中,1年时的应答率和存活概率在数值上更高。在研究结束时,仅吉西他滨处理组的中值总存活率(95%CI)为5.2(4.0至6.3)个月,而巴维昔单抗加吉西他滨处理组为5.6(4.7至7.0)个月。添加巴维昔单抗的这些结果令人鼓舞,特别是在具有非常广泛疾病负担的患者群体中。

[0549] 在实例XIV的III期试验和实例XVII的功能性β2GPI分析之后,显示功能性β2GPI水平与处理结果相关,还测试了来自本II期试验的储存样品的功能性β2GPI。如实例XVIII中所报告,这些分析的结果强化了功能性β2GPI水平是成功的巴维昔单抗处理的生物标记物的发现。

[0550] 实例XIII

[0551] 巴维昔单抗和多西他赛在NSCLC患者中的II期试验

[0552] 在I期和单组II期经验的基础上,本实例涉及在先前处理的IIIb/IV期非鳞状非小

细胞肺癌(NSCLC)患者中进行测试巴维昔单抗加多西他赛的II期试验。

[0553] 本研究(PPHM 0902)是II期、随机、双盲、安慰剂对照试验,其评估先前接受过处理的局部晚期或转移性非鳞状NSCLC患者中的巴维昔单抗加多西他赛。本研究的主要目的是比较处理组之间的ORR(CR+PR)。次要目标包括比较PFS、DR、OS、安全性和PK。

[0554] 患者以1:1:1的比例随机化接受多西他赛加安慰剂、多西他赛加巴维昔单抗1mg/kg,或多西他赛加巴维昔单抗3mg/kg。在每个21天周期的第1天给予多西他赛75mg/m²持续多达6个周期,并且每周给予安慰剂或指定剂量的巴维昔单抗。患者继续每周接受指定的盲法处理(安慰剂、1mg/kg巴维昔单抗或3mg/kg巴维昔单抗)直至出现进展或毒性。

[0555] 总体研究人群(每组6名患者)的一个子集参与PK子研究以研究巴维昔单抗和多西他赛之间的药物-药物相互作用。在周期1和2期间的特定时间点对这些患者进行额外的抽血。

[0556] 共有121名患者(76名男性和45名女性)参与所述研究,平均年龄为60.0岁。在独立数据监测委员会(IDMC)会议之后,研究处理是非盲的,其中确定已达到ORR的主要终点,因此建议研究治疗揭盲。此外, IDMC没有发现任何安全性担忧或问题。

[0557] 在研究揭盲后,发现包装和标签供应商的标签错误涉及安慰剂和1mg/kg组。将调查汇总提交给食品药品监督管理局(FDA),并且将来自用安慰剂或1mg/kg巴维昔单抗投配的患者的数据合并以形成用于探索性分析和与3mg/kg巴维昔单抗组比较的组合对照组。

[0558] 总体而言,处理组之间毒性等级的AE发生率没有观察到显著差异。处理组之间的SAE没有观察到显著差异。组合对照组中的3名患者(3.8%)和伴随多西他赛的3mg/kg巴维昔单抗组中的2名患者(5.0%)具有5级(致命)事件。具有致命事件的组合对照患者包括1名患有败血症的患者、1名患有脑血管意外的患者以及1名患有肺炎和假单胞菌败血症的患者。在3mg/kg巴维昔单抗加多西他赛组中,1名患者患有与巴维昔单抗无关的致命性败血症,并且1名患者具有不能茁壮成长事件,其也与巴维昔单抗无关。

[0559] 功效终点的汇总示于表6中,其中所述分析基于所述意向治疗(ITT)人群和中央审查数据。与组合对照组(安慰剂或1mg/kg巴维昔单抗)相比,所有终点(ORR、PFS和OS)均显示出巴维昔单抗3mg/kg优越性的趋势。与组合组相比,巴维昔单抗3mg/kg的ORR大约高50%。虽然组合组和3mg/kg巴维昔单抗组的中值PFS相似,但接受巴维昔单抗3mg/kg的患者的中值OS时间约为60%。特别地,用3mg/kg巴维昔单抗加多西他赛处理的患者具有11.7个月的MOS,而对于组合组中的患者,MOS仅7.3个月(HR=0.66)。

[0560] 表6

[0561] 基于II期试验的功效分析汇总

[0562]

功效量度	安慰剂+巴维昔单抗 1 mg/kg	巴维昔单抗 3 mg/kg
N =	80	41
总体应答率 (CR + PR)		
N (%)	9 (11.3)	7 (17.1)
95% CI	(4.3, 18.2)	(5.6, 28.6)
无进展存活期		
天数中值 (月)	119 (3.9)	127 (4.2)
95% CI (天)	(79, 126)	(82, 197)
总体存活率		
死亡人数 (%)	60 (75.0)	22 (53.7)
天数中值 (月)	221 (7.3)	355 (11.7)
95% CI (天)	(169, 367)	(157, 525)

[0563] 在实例XIV的III期试验和实例XVII中功能性β2GPI的分析之后,其显示功能性β2GPI水平与治疗结果相关,还测试了来自本II期试验的储存样品的功能性β2GPI。来自实例XVIII中所述的这些分析的结果进一步证实功能性β2GPI的水平是成功的巴维昔单抗治疗的生物标记物。

[0564] 实例XIV

[0565] 巴维昔单抗和多西他赛在NSCLC患者中的III期试验

[0566] 如前述实例中所报告,来自I期和II期研究的总体结果证明了巴维昔单抗的临幊上有意义的治疗作用。基于此类结果,特别是基于上述双盲II期试验,进行III期试验,本实例描述了III期试验和得到的数据。

[0567] III期临床试验(PPHM 1202)为巴维昔单抗加多西他赛在先前经处理的IIIb/IV期非鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的随机化、双盲、安慰剂对照的多中心试验。这项全局双盲III期试验于2012年启动。选择标准适用于IIIb/IV期非鳞状NSCLC患者,对其进行铂双联化疗(如果已知EGFR或ALK突变,应在适当的靶向疗法上取得进展),同时允许ECOG PS 0-1和先前免疫疗法。所述试验以1:1比率累计597例此类患者接受多达6个21天周期的多西他赛($75\text{mg}/\text{m}^2$)以及每周 $3\text{mg}/\text{kg}$ 巴维昔单抗(巴维昔单抗加多西他赛)或安慰剂(单独的多西他赛)直到出现进展或毒性。主要终点是总存活期(OS)并且次要终点包括客观应答率(Independent Central Review, ICR)、无进展存活期(ICR)、安全性、PK、生活质量(LCSS)和探索性生物标记物,包括免疫相关性。所选患者的基线特征显示在表7中,其中‘安慰剂’栏是指单独用多西他赛处理的患者,‘巴维昔单抗’栏是指用巴维昔单抗加多西他赛处理的患者。

[0568] 表7

[0569] III期试验中患者的基线特征

[0570]

	安慰剂 n = 300	巴维昔单抗 n = 297
中值年龄, 岁 (范围)	62 (30-82)	63 (37-85)
> 75 (%)	5	8
男/女%	61/39	60/40
疾病期%		
IIIb 期	5	5
IV 期	95	95
当前/前吸烟者%	75	79
遗传突变%		
EGFR	8	12
ALK	2	2
其它	14	9
非上述	52	52
未知或未经测试	26	28

[0571]

性能状态%		
0	29	32
1	70	66
既往治疗%		
维持和/或靶向疗法	57	57
免疫疗法	4	2
基线 β2GP1\geq200 μg/ml%	49	56

[0572] A. 安全性

[0573] 在达到70%的目标OS事件时, 评定中值OS (mOS) (见下文)。在整个研究过程中, 据测定, 两组之间的安全概况普遍相似。最近公布了治疗和安全性汇总 (Palmero等人, 2017)。如所报告, 单抗与多西他赛的组合的安全概况与安慰剂加多西他赛相似。在巴维昔单抗加多西他赛组中有68%的患者发生3级或更高的不良事件, 并且在单独的多西他赛组中有60%发生所述不良事件。最近报告了大于15%的患者中所报告的治疗相关的AE (Palmero等人, 2017)。此外, 相比单独单多西他赛(5%), 与处理相关的3/4级发热性嗜中性白细胞减少症对于巴维昔单抗加多西他赛(8%)略高。应注意, 呈表7的基线特征的用单独多西他赛处理的患者数量(安慰剂, n=300)是基于ITT群体, 即包括所有随机化患者, 而如Palmero等人, 2017公布的用单独多西他赛处理的患者数量(安慰剂, n=299)是基于安全群体, 即包括所有接受治疗的随机化患者。

[0574] B. 功效

[0575] 在达到70%的目标OS事件时, 巴维昔单抗加多西他赛组中297例患者的mOS为10.7个月(95%置信区间[CI], 8.6-11.5), 并且单独多西他赛组中的300名患者的mOS为10.8个月(95%CI, 9.2-12.6)(死亡风险比(HR), 1.10(0.89, 1.37))。当达到70%的靶向OS事件时, 两组中无进展存活期(PFS)也相似, 其中巴维昔单抗加多西他赛组的中值PFS为4.1个月, 单独多西他赛组的中值PFS为3.9个月。研究中约15%的患者接受了随后的免疫疗法, 均匀分布在巴维昔单抗加多西他赛组和单独多西他赛组之间(参见实例XIX)。

[0576] 伴随对最后一名随机化患者的12个月随访,达到约85%的目标OS事件,巴维昔单抗加多西他赛组中297例患者的中值OS为10.5个月(95%置信区间[CI],8.4-11.9),并且单独多西他赛组中300例患者中的中值OS为10.9个月(95%CI,9.2-12.1)(HR,1.06;P=0.533)。此阶段的PFS在巴维昔单抗加多西他赛组中为4.2个月(95%CI,3.9-4.6),在单独多西他赛组中为4.1个月(95%CI,3.2-4.8)(HR,1.02;P=0.876)。此阶段的ORR在巴维昔单抗加多西他赛组中为15%,而单独多西他赛组为11%(优势比为0.7;P=0.15)。

[0577] 此阶段的功效分析(ITT)列于表8中,其中P值是基于双侧分级柯尔伦-曼特尔-汉塞尔(Cochran-Mantel-Haenszel)精确方法。分层因素包括疾病阶段(IIIB与IV)、地理区域(北美、欧洲、世界其它地方)、以前的维护和/或靶向治疗(是与否)。

[0578] 表8

[0579] III期试验,功效分析

[0580]

功效量度	安慰剂 n = 300	巴维昔单抗 n = 297
总体存活率 (OS)		
死亡患者人数 (%)	212 (70.7%)	206 (69.4%)
月数中值 (95% CI)	10.9 (9.2 至 12.1)	10.5 (8.4 至 11.9)
HR (95% CI); p 值	1.06 (0.88-1.29); p = 0.533	
客观应答率 (ORR) - CR + PR		
患者百分比 (95% CI)	11 (7-15)	14 (11-19)
优势比 (95% CI); p 值	0.7 (0.4-1.2); p 值 = 0.18	
应答持续时间 (DOR)		
月数中值 (范围)	4.6 (0.03+至 17.6)	4.2 (0.03+至 21.0)
无进展存活期 (PFS)		
伴随事件的患者人数 (%)	200 (66.7%)	190 (64.0%)
月数中值 (95% CI)	3.9 (2.8 至 4.4)	4.1 (3.3 到 4.6)
HR (95% CI); p 值	1.00 (0.82-1.22); p = 0.990	

[0581] 这些中值OS的结果与上文实例XIII中描述的II期数据和用于充实研究的假定mOS意外地不同,后者对于巴维昔单抗加多西他赛为9.1个月mOS,而对于单独多西他赛为7.0个月MOS(473个OS事件,以提供80%的动力和单侧2.5%的显著水平,假设9.1对7.0个月MOS;HR 0.77)。

[0582] 回顾性 VeriStrat®蛋白质组测试在巴维昔单抗加多西他赛组的80%和单独多西他赛组的84%表现出了良好VS特征标志(实例X V)。尽管经先前处理的非鳞状NSCLC患者的III期试验并未达到巴维昔单抗加多西他赛组优效OS的主要目标,但这一结果可能受到总体良好VS特征标志比例高于预期的影响,特别是单独多西他赛组。

[0583] 实例XV

[0584] 巴维昔单抗III期试验的初步生物标记物分析

[0585] 关于上述III期试验,进行生物标记物分析以针对从含有巴维昔单抗的治疗方案中获益最多的患者鉴别一种或多种生物标记物或生物标记物模式(巴维昔单抗“特征标志”)。本实例涉及适用于后期研究的样品收集技术,并描述了初步蛋白质组特征标志分析。

[0586] A. 样品采集

[0587] 设计了III期试验，并获得了收集患者血液样品的知情同意书。使用适当的静脉切开术技术获得患者血液样品。止血带被放置在静脉穿刺部位上方7至10厘米处，但是用于初步静脉选择的止血带不允许超过一分钟。要求患者闭合，但不要泵其第一个，并且用70%异丙醇垫使用从中心到周边的圆周运动清洁静脉穿刺部位并允许风干。

[0588] 使用21号计量注射针，将患者血液收集在5.0ml金顶血清分离管(SST)中。在血液开始流动后，止血带尽快释放，并允许管完全充满。收集后立即将管倒置5次，并使其凝结至少30分钟。为了分离血清，将管在收集的30至60分钟内以1,000至1,300g离心15分钟。用移液管将约1.25ml血清转移到3.6ml冷冻管×2中并冷冻那些样品。

[0589] 将冷冻的小瓶放入样品袋中并密封。干冰运送器的底部用干冰分层，并将样品袋放在盒子里。添加干冰直至盒子装满，将盖子固定在适当的位置，并将样品运送到中心实验室以在-70°C下储存。

[0590] 中心实验室通过解冻样品制备供细分用的小瓶。使用移液管将至少250μl血清转移到2ml天然帽冷冻管×4中并在-70°C下再冷冻。重复相同的运送指导内容，将亚等分样品在干冰上冷冻运送到测试实验室用于生物标记物测试。

[0591] B. VeriStrat®分析

[0592] 应了解，癌症的多维特征对于患者选择和处理计划非常重要。所述 VeriStrat® 测试是针对晚期NSCLC患者的市售的，基于血液的预测和预后的蛋白质组学测试。除了预测之外，VeriStrat还可以预测单药处理方案之间的差异治疗效益。VeriStrat在来自III期临床试验的患者样品上回顾性进行。

[0593] 来自的III期临床试验中的患者的处理前血清样品的蛋白质表达使用质谱法测试，将患者分类为VeriStrat (VS) 不良 (VS-P)，其与更严重的疾病相关，或VS良好 (VS-G)，其与更有利的预后相关。使用Kaplan-Meier统计方法由VeriStrat亚组分析OS。

[0594] VeriStrat分类适用于597名随机患者的569名患者。在巴维昔单抗加多西他赛组中，80%为VS良好，20%为VS不良。在单独多西他赛组中，84%为VS良好，16%为VS不良。所述VeriStrat良好/不良的特征标志因此在III期临床试验的处理组间基本平衡。

[0595] 所有VS良好的中值总存活期(mOS)为11.5个月(95%置信区间[CI], 10.6-12.9)和5.7(95%CI, 4.2-7.2); p<0.0001。HR OS (VS-G对VS-P) 0.49 (95%CI 0.37-0.64); p<0.001。这些VeriStrat结果与PROSE试验一致(Gregorc等人, 2014) 并且是PFS和OS的总体预后。

[0596] 在VS良好的患者中，巴维昔单抗加多西他赛组的MOS是11.2个月(95%CI, 10.2-12.8)，并且在单独多西他赛组为11.8个月(95%CI, 10.4-13.5); p值=0.38。在VS不良的患者中，巴维昔单抗加多西他赛组的MOS是5.8个月(95%CI, 5.0-11.3)，并且在单独多西他赛组为4.7个月(95%CI, 3.4-7.2); p值=0.27。鉴于本组患者的治疗选择有限，巴维昔单抗改善VS不良患者中的OS的能力是很重要的。

[0597] 总之，III期临床试验中的VeriStrat结果是PFS和OS总体预后，但不能预测巴维昔单抗处理应答。多西他赛组的意外OS结果可能受到VeriStrat良好患者的相对较高的总体比例的影响。确切地说，此III期临床试验中VeriStrat良好患者的百分比(大于80%)比先前报告(约67%)的高，表明患者总体预后较好，从而部分地解释了多西他赛组好于预期的表现。

[0598] 除了上述Veristrat分析之外,还专门针对巴维昔单抗探索了单独的蛋白质组学方法。虽然进行了大量的质谱分析和相关分析以研究能够鉴别患者从巴维昔单抗的添加受益的亚组患者的可能的测试,此类基因组富集分析并没有引起与临床益处相关的任何标记物的鉴别,所以强调需要进一步的工作和可能的新型方法。

[0599] 实例XVI

[0600] 功能性β2GPI的测定

[0601] 本实例涉及明确设计用于检测流体样品中功能性(活性)β2GPI的β2GPI测定的研发。所述测试方法独特地适用于检测和量化功能性β2GPI,其意指能够结合PS和巴维昔单抗的β2GPI。本实例因此提供了与巴维昔单抗处理有关的进一步的有意义的生物标记物分析所需的先前未可获得的工具。

[0602] A.材料和方法

[0603] 1.材料和设备

[0604] 在测定中使用以下特定材料和设备以产生在所述实例中的章节B1和B2下呈现的结果。材料:96孔中等结合平底板(Greiner BioOne,目录号655001);96孔非结合圆底板(科斯塔,目录号3605);己烷(西格玛,目录号32293);PS抗原(西格玛,目录号P6641);卵白蛋白(西格玛,目录号A5503);发色底物,四甲基联苯胺(TMB),(KPL,目录号50-76-00);2M H₂S0₄(飞世尔,目录号SA818-4);板盖(飞世尔015-027-11);粘合板密封剂(VWR 232701);试剂储存器(VistaLab目录号3054-1000)。还使用1.5ml微量离心管、50ml锥形管和15ml锥形管。

[0605] 设备:涡旋(Scientific Industries);计时器(VWR 62344-64);10到1,000μl的移液器(Rainin);100到300μl的多通道移液器(Rainin);450和650nm下的板阅读器(EN1835)。还使用了刻度搅拌棒和37°C培养箱。伴随测定使用SoftMax® Pro软件。

[0606] 2.缓冲液和技术

[0607] 洗涤缓冲液是1×磷酸盐缓冲盐水(PBS)并且封闭缓冲液是于1×PBS中的2%卵白蛋白。

[0608] 在整个测定中,当使用大体积(例如,≥500μl)时,使用减成移液。首先移取全部量的稀释剂。在添加另外的试剂之前除去等体积的稀释剂。所有潜在危险的蒸汽都在通风橱中进行处理。

[0609] 3.巴维昔单抗-HRP

[0610] 使巴维昔单抗抗体缀合于辣根过氧化物酶(HRP)以制备供测定用的巴维昔单抗-HRP检测剂。使用EZ-Link® Plus活化过氧化物酶物(赛默科技(ThermoScientific),目录号31487),按照在由制造商提供的pH7.2下缀合活化过氧化物酶与抗体的程序进行缀合。简言之,将1mg巴维昔单抗在pH 7.2的PBS中稀释至1mg/ml。将其添加1mg冻干的EZ-Link Plus活化过氧化物酶中以重构。在重构后立即将10μl 5M氰基硼氢化钠溶液添加到反应中并在室温下培育1小时。培育完成后,添加20μl猝灭缓冲液并在室温下培育15分钟。将缀合的巴维昔单抗-HRP(1mg/ml)在4°C下储存长达4周。

[0611] 4.涂布

[0612] 如下用PS抗原涂布ELISA板:制备5μg/ml PS抗原,并在鼓风机关闭的情况下在通风橱中稀释到6ml己烷中。使用12通道移液管向每个孔中添加50μlPS溶液。将通风橱鼓风机

重新打开,使己烷蒸发30-45分钟,通常30分钟。

[0613] 5. 封闭

[0614] 如下封闭经PS涂布的ELISA板:制备每板100ml封闭缓冲液(于1×PBS中的2%卵白蛋白)。使用12通道移液管向每个孔中添加200μl封闭缓冲液。将封闭的ELISA板在37℃下培育120分钟(±10分钟,其不改变测定性能)。

[0615] 6. 样品制备

[0616] 如下所述进行用于测定的标准阳性对照和样品制备。

[0617] 阳性对照的β2GPI标准物获自Haematologic Technologies公司。(HTI;目录号B2G1-0001-C;1.0mg/ml),处于0.2M甘氨酸、0.15M NaCl,pH 7.4的缓冲液中。将一小瓶β2GPI解冻,并如下进行标准和阳性对照制备:

[0618] 在封闭缓冲液中制备1ml呈10μg/ml的β2GPI亚类A;

[0619] 通过从亚类A中减去移液100μl,在封闭缓冲液中制备1ml的呈1,000ng/ml的β2GPI亚类B;

[0620] 通过从亚类B中减去移液250μl,在封闭缓冲液中制备1ml的呈250ng/ml的β2GPI标准物;并且

[0621] 根据表9,使用减成移液,由1000ng/ml基质制备200ng/ml、75ng/ml、30ng/ml和5ng/ml的对照样品。

[0622] 表9

[0623] 功能性β2GPI检测的阳性对照制备

[0624]

阳性对照浓度 ng/ml	亚类 B 体积(μl)	阻断缓冲液稀释剂体积(μl)	总体积(μl)
200	200	800	1000
75	75	925	1000
30	30	970	1000
5	5	995	1000

[0625] 制备未知样品用于如下测试:在封闭缓冲液中制备未知样品,最终稀释度为1:4000和1:8000;首先制备1:100稀释度的未知样品;由1:100稀释液制备1:40稀释液,以达到1:4000的稀释度;由1:100稀释液制备1:80稀释液,以达到1:8000的稀释度。

[0626] 如下进行的非结合板制备:将75μl缓冲液添加到行B-H的栏1-3;将150μl的250ng/ml标准物添加到栏1-3,行A;使用多通道移液器,将75μl栏1-3从行A连续稀释至行G;将75μl阳性对照和样品添加到指定孔中;并将75μl封闭缓冲液添加到任何空白孔中。板设置示于表10中。

[0627] 表10

[0628] 用于功能性β2GPI测定的板设置

[0629]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	250 ng/ml STD	(+)	对照 200 ng/ml	样品 3 稀释液 1	样品 7 稀释液 1							
B	125 ng/ml STD	(+)	对照 75ng/ml	样品 3 稀释液 2	样品 7 稀释液 2							
C	62.5 ng/ml STD	(+)	对照 30ng/ml	样品 4 稀释液 1	样品 8 稀释液 1							
D	31.3 ng/ml STD	(+)	对照 5ng/ml	样品 4 稀释液 2	样品 8 稀释液 2							
E	15.6 ng/ml STD		样品 1 稀释液 1	样品 5 稀释液 1	样品 9 稀释液 1							
F	7.8 ng/ml STD		样品 1 稀释液 2	样品 5 稀释液 2	样品 9 稀释液 2							
G	3.9 ng/ml STD		样品 2 稀释液 1	样品 6 稀释液 1	样品 10 稀释液 1							
H	0 ng/ml STD		样品 2 稀释液 2	样品 6 稀释液 2	样品 10 稀释液 2							

[0630] 7. 检测

[0631] 在完成阻断之前,在封闭缓冲液中制备6ml 300ng/ml巴维昔单抗-HRP。将测定板用1×PBS通过将250μl移液到每个孔中来洗涤,所述步骤再重复2次。可以使用洗板器,在这种情况下,所述板用1×PBS洗涤一次。确保所述板尽可能干燥。

[0632] 将50μl 300ng/ml巴维昔单抗-HRP添加到测定板的所有孔中。从非结合板的每个相应孔中添加50μl。以这种方式使用测定板和非结合板意味着首先将经可检测标记的巴维昔单抗添加到经PS涂布的测定板中,之后从非结合板添加含有β2GPI的样品。所述顺序避免了移液过程中发生交叉污染。巴维昔单抗-HRP和含有β2GPI的样品在板上一起培育,并且培育在37℃下进行90分钟。

[0633] 8. 显影

[0634] 在使用前至少1小时从冰箱中取出TMB过氧化物酶底物和TMB过氧化物酶溶液B。通过将250μl移液到每个孔中,用1×PBS洗涤测定板,并将其重复2次。可以使用洗板器,在这种情况下,所述板用1×PBS洗涤一次。确保所述板尽可能干燥。

[0635] 通过将6ml TMB过氧化物酶底物与6ml TMB溶液B混合来制备12mlTMB混合物。将100μl TMB溶液添加到测定板的每个孔中并使其显影5-6分钟。通过向测定板的每个孔中添加100μl 2M H₂SO₄来终止显影。读取测定板并在停止反应30分钟内测定450nm下的光密度(OD)。微板读数仪与SoftMaxPro板数据和分析模板结合使用,其可提供测定数据的打印输出。

[0636] 9. 制备切口β2GPI

[0637] 从人类血浆纯化的β2GPI和重组人类β2GPI的样品均用纤溶酶(酶水解)处理以制备含有大部分切口β2GPI的样品。对于初始研究,切口β2GPI未纯化至均质,但确定切口β2GPI过量存在于未切口的或“完整的”β2GPI上。

[0638] 10. 总β2GPI的测定

[0639] 设计了一种检测,所述检测应根据制造商针对所用抗体的说明书检测总β2GPI。这是使用来自US biological的市售抗体的测定,其中用针对β2GPI的捕获抗体涂布板,并且使用抗β2GPI-HRP缀合物作为检测抗体检测任何结合的β2GPI。抗体目录号是:捕获抗体,US Biological A2299-81A号;亲和纯化的抗β2GPI和检测抗体,US Biological#A2299-81B;过氧化物酶缀合的抗β2GPI。

[0640] 在pH 9.6的碳酸盐缓冲液(50mM碳酸氢钠)中制备1:100稀释度的捕获抗体。将100μl添加到ELISA板的每个孔中并在室温下培育。用含有Tween-20的1×PBS缓冲液洗涤板,然

后用200微升/孔含有1%BSA的测定稀释液封闭，并在37℃下培育。纯化的β2GPI用于制备在测定稀释剂中以500ng/ml开始的两倍稀释标准曲线。将样品稀释在测定稀释剂中以达到标准曲线的线性区域内的浓度。在封闭培育后，洗涤板，然后添加100微升/孔的标准曲线和样品，一式两份或一式三份。添加标准曲线和样品后，将板在37℃下培育。将检测抗体在测定稀释剂中以1:400稀释。在培育样品和标准曲线后，洗涤板，然后添加100微升/孔的检测抗体。将板在37℃下培育。在二抗培育后，洗涤板，然后用TMB显影。在板读数器上在450nm下读板，并根据标准曲线确定样品浓度。

[0641] B. 结果

[0642] 1. 区分功能性与切口β2GPI

[0643] 从人类血浆(“人类”)纯化的β2GPI或在重组表达后(“重组”)用纤溶酶处理以制备β2GPI测试样品，其含有大部分不与PS结合的纤溶酶裂解(切口)β2GPI。,在本发明测定(表11B)中，并使用利用市售捕获和检测抗体的设计用于检测总β2GPI的测定(表11A)，测试那些样品与无纤溶酶(完整)β2GPI和各自的50:50混合物。结果如下所示。

[0644] 表11A

[0645] 在总β2GPI测定中测试切口和功能性β2GPI

[0646]

样品		浓度 (ng/ml)
人类	纤溶酶处理的 β2GPI	104.12
	50:50 混合物	119.77
	不含纤溶酶的 β2GPI	140.90
重组	纤溶酶处理的 β2GPI	141.35
	50:50 混合物	134.51
	不含纤溶酶的 β2GPI	140.90

[0647] 表11B

[0648] 在功能性β2GPI测定中测试切口和功能性β2GPI

[0649]

样品		浓度 (ng/ml)
人类	纤溶酶处理的 β2GPI	32.95
	50:50 混合物	80.86
	不含纤溶酶的 β2GPI	136.42
重组	纤溶酶处理的 β2GPI	33.26
	50:50 混合物	88.29
	不含纤溶酶的 β2GPI	136.42

[0650] 首先可以看出，使用市售抗体的所谓“总β2GPI测定”(表11A)和本发明“功能性β2GPI测定”(表11B)均读出相似浓度的β2GPI(约141ng/ml和136ng/ml)。使用总β2GPI测定，检测纤溶酶处理的重组β2GPI中基本上没有差异，并且随着来自人类血浆的纤溶酶处理的β2GPI的量增加(141至104ng/ml)，检测中仅出现适度减少。相比之下，使用功能性β2GPI测定，增加量的纤溶酶处理的β2GPI(重组或血浆衍生)引起结合显著降低(136至33ng/ml)。

[0651] 与测定的设计一致，这些结果因此表明，相对于切口β2GPI，本发明测定能够有效地检测功能性β2GPI，即结合PS和巴维昔单抗的β2GPI。这将本发明功能性β2GPI测定与商购

检测试剂盒(以及使用商购的抗 β 2GPI抗体的测定)区分开来,其检测切口 β 2GPI(非PS结合)以及结合PS的 β 2GPI。

[0652] 2. 量化功能性 β 2GPI

[0653] 所述测定能够成功地确定流体样品中功能性 β 2GPI的量,其是,结合PS和巴维昔单抗的 β 2GPI。目前已常规进行这一测定以制备可再现的 β 2GPI标准曲线。在这方面,使用四参数逻辑拟合,其是用于非线性回归分析的统计方程。四参数拟合方程为:

$$[0654] y = \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} + D$$

[0655] 其中:

[0656] A是对应于X轴低值的渐近线(即曲线的平坦部分)的Y值;

[0657] B是描述曲线从曲线中心的渐近线过渡的速度的系数,通常称为斜率因子;

[0658] C是对应于A和D之间的中点的X值;通常称为EC50;并且

[0659] D是对应于X轴的高值的渐近线的Y值。

[0660] 功能性 β 2GPI的标准曲线的代表性实例示于图16中。根据此类标准曲线,可以测定出人类血液样品(如血浆或血清样品)中功能性 β 2GPI的浓度。主要是出于准确性,但也出于样品制备的经济性,标准曲线以ng/ml(纳克/毫升)为单位制备。由于正常人群中 β 2GPI的平均水平为约200 μ g/ml(微克/毫升)(Mehdi等人,1999; Miyakis等人,2004),因此制备标准曲线以期望测试样品将在测定中进行分析前稀释。在测定中运作稀释的血浆或血清测试样品,然后通过调节稀释因子计算患者中 β 2GPI的浓度。

[0661] 这一测定现已用于测定来自上述III期试验的患者的功能性 β 2GPI水平,其结果列于下文实例XVII以及实例XVIII和实例XX中。

[0662] 3. 替代性等效测定组分和步骤

[0663] 除了在本实例中章节A1-A8中描述的特定材料、设备和测定步骤之外,可以在不脱离用于检测和量化功能性 β 2GPI的测定的概念的情况下制备和实施组分和方法步骤的变化形式。以下结果表明,相关的试剂可以代替章节A1-A8中所述的试剂,并且获得基本上相同的结果。

[0664] 某些优选的ELISA板是针对脂质吸附而优化的那些,其可用于替换上文章节A1中的ELISA板。已知针对脂质吸附优化ELISA板,其具有提供更好脂质(PS)结合的表面化学。一种此类ELISA板是赛默飞世尔(ThermoFisher) PolySorp[®]板,其已以新测定形式使用。

[0665] 上述章节A4中的基于己烷的PS涂布方法可以优先选用基于异丙醇的PS涂布方法代替,其可以为用户提供某些安全益处(通过避免使用己烷)。在使用异丙醇作为呈新测定形式的涂布缓冲液时,ELISA板涂布有PS抗原,使用在异丙醇中稀释的10 μ g/ml抗原PS,并且培育时间是90分钟。

[0666] 为了产生有效的 β 2GPI校准曲线,可以使用任何已知的获得 β 2GPI的方法。例如,从商业供应商处购买,如HTI(以上章节A6)。还可以研发替代的 β 2GPI制剂用于限定的、可再现的校准控制。一种此类优选方法是在CHO细胞中表达 β 2GPI并纯化所表达的 β 2GPI。

[0667] 优选的从CHO细胞中纯化 β 2GPI包括:收集澄清,染色质提取步骤,其去除污染物并使澄清的收集物通过0.2 μ m过滤器;使用切向流过滤(TFF)系统,以缓冲交换澄清的收集物

并降低其电导率而不增加体积；在阴离子流通模式中的capto粘附步骤，以去除其它污染物；使用NuvisTMS去除聚集体和其它污染物的强阳离子步骤，浓缩洗脱液并促进任何缓冲液交换步骤；并且任选地，使用TFF系统缓冲交换并浓缩纯化的β2GPI。已经以这种方式表达和纯化β2GPI并以新测定形式使用。

[0668] 除上述章节A3外，某些优选的巴维昔单抗-HRP检测剂是使用两种常用的非专有交联剂SMCC (4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯) 或SATA (S-乙酰硫代乙酸N-琥珀酰亚胺酯) 交联的缀合物。其它优选的巴维昔单抗-HRP检测剂是其中HRP的数量超过巴维昔单抗抗体的缀合物，特别是引起HRP:巴维昔单抗比率为2:1或3:1的那些，其基本上没有游离(未缀合的)抗体。通过S-300上浆柱纯化此类缀合物以除去未反应的反应组分。具有这些成分和特性中的每一种的巴维昔单抗-HRP检测剂已获自马里兰州弗雷德里克的温彻斯特大道4985 (4985 Winchester Blvd., Frederick, Maryland), 21703的Columbia Biosciences，并以新测定形式以600ng/ml使用。

[0669] 尽管上述替代组分和测定步骤中的一种或多种可能是优选的，但特别是出于技术原因，甚至所有此类替代物的组合使用会提供功能性β2GPI测定，其提供与本实例中最初描述，即根据章节A1-A8的测定基本相同的结果。这些比较结果显示在下表12中，其展现使用从圣地亚哥血库(San Diego Blood Bank)获得的四个随机人类样品(供体)以两种不同测定形式测量的功能性β2GPI水平。

[0670] 表12

[0671] 功能性β2GPI分析的可比性能

[0672]

供体	β2GPI 浓度 (μg/ml)			
	测定形式, 实例 XVI, A1-A8		测定形式, 实例 XVI, B9	
	平均值	SD	平均值	SD
1	214	21	214	20
2	276	20	281	33
3	224	22	226	22
4	223	21	219	23

[0673] 实例XVII

[0674] 巴维昔单抗III期试验中的β2GPI生物标记物分析

[0675] 利用上述功能性β2GPI测定，本实施例报告实例XIV的III期临床试验的患者中的治疗前的功能性β2GPI的水平。根据功能性β2GPI的水平与治疗结果相关联，本实例还涉及功能性β2GPI作为成功巴维昔单抗治疗，如用巴维昔单抗和多西他赛处理的NSCLC患者中和其它组合疗法的生物标记物。

[0676] A. 患者的功能性β2GPI水平

[0677] 上述III期试验累计有597名患者。在实例XV,A中描述了来自III期试验中患者的血液样品的收集。在进行本分析时，有592个患者样品可评估功能性β2GPI。使用上面实例中刚刚描述的测定测试那些592名患者血液样品的亚等分试样的功能性β2GPI。

[0678] 表13展示了治疗前功能性β2GPI的水平(μg/ml)和统计学汇总，其中‘巴维昔单抗’行是指用巴维昔单抗加多西他赛处理的患者，‘安慰剂’行是指用单独多西他赛处理的患者。

[0679] 表13

[0680] III期患者中的功能性β2GPI水平

[0681]

	N	平均值 (SD)	最小值	Q1	中值	Q3	最大值
巴维昔单抗	294	202 (57.3)	22	162	207	240	365
安慰剂	298	195 (59.7)	0.5	159	199	238	402
总计	592	198 (58.6)	0.5	161	203	239	402

[0682] 治疗前功能性β2GPI的水平范围为0.5至402μg/ml，并且所有患者的功能性β2GPI的分布显示在图17A和图17B中。在用巴维昔单抗加多西他赛处理的患者中，功能性β2GPI的范围为22至365μg/ml，如图17C所示。用单独多西他赛处理的患者中的功能性β2GPI的分布示于图17D中，其涵盖研究的全部范围(0.5至402μg/ml)。

[0683] 对于每个治疗组(202和195μg/ml)，并且对于整个研究(198μg/ml)，治疗前功能性β2GPI的水平与文献(Mehdi等人,1999,20mg/dl,Miyakis等人,2004,200mg/l)中所报告的200μg/ml的平均水平一致。

[0684] 据测定，对于用巴维昔单抗加多西他赛处理的患者，治疗前β2GPI水平等于或大于200μg/ml的患者百分比为56%，并且对于用单独多西他赛处理的患者，其为49%。

[0685] B. 单一截止β2GPI生物标记物分析

[0686] 进行亚组分析以评估作为接受巴维昔单抗加多西他赛疗法的患者的应答预测因子的功能性β2GPI，表明存在存活延长的较强趋势。

[0687] 首先使用单一截止法评估患者β2GPI数据。在以这种方式搜索最佳截止值时，步骤1是针对巴维昔单抗加多西他赛组中的患者搜索高β2GPI对低β2GPI组的OS分离或显著OS分离；步骤2是针对那些高β2GPI患者搜索巴维昔单抗加多西他赛组与单独多西他赛组(安慰剂)的OS分离或显著OS分离。

[0688] 通过施加单一截止法到578名可评估患者的作用可能的生物标记物的功能性β2GPI的初始分析出人意料地表明，在高β2GPI患者中，巴维昔单抗加多西他赛组中167名患者的MOS是11.9个月(95%CI,9.0-14.7)，并且单独多西他赛组中141名患者的MOS是9.4个月(95%CI,7.7-11.7)(死亡HR,0.77;P=0.1)。在这些初步分析中，“高β2GPI”被定义为等于或高于200μg/ml($\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$)的功能性β2GPI的治疗前水平。由于这些分析是基于单一截止值，因此不具有“高β2GPI”的患者具有小于200μg/ml($< 200\mu\text{g}/\text{ml}$)的功能性β2GPI。

[0689] 随后将单一截止值分析扩展至592名可评估患者。尽管并非统计学显著的，但这些分析也证明了当患者具有等于或大于200μg/ml功能性β2GPI的治疗前水平时，在巴维昔单抗加多西他赛组中有出人意料的存活延长趋势。这些结果通过图18A和图18B中功能性β2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Kaplan-Meier存活曲线表示。在592名可评估患者中，图18A表明，对于用巴维昔单抗处理的患者，那些具有功能性β2GPI等于或高于200μg/ml的患者(167名患者)，MOS为11.4个月，而对于具有小于200μg/ml的“低β2GPI”患者，MOS为仅9.8个月(死亡HR,0.76;P=0.054,CI(0.58,1.01))。如图18B所示，在功能性β2GPI的治疗前水平 $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者(表示约52%的随机化患者)中，巴维昔单抗加多西他赛组中167名患者的MOS为11.4个月(95%CI,8.4-16.6)，并且单独多西他赛组中146名患者的MOS为10.2个月(95%CI,

8.5–11.9) (死亡HR, 0.82; P=0.134, CI (0.63, 1.06))。

[0690] C. 双截止β2GPI生物标记物分析

[0691] 在上述单一截止值分析后, 使用双截止法对592名可评估患者的数据进行进一步分析 (Klein&Moeschberger, 2003)。在双截止法中, 步骤1是针对用巴维昔单抗(加多西他赛)处理的患者, 搜索“范围内”与“范围外”的显著OS分离, 并且步骤2是针对“范围内”患者搜索巴维昔单抗与安慰剂组的显著OS分离。

[0692] 在592名可评估患者中使用双截止法进行的这些亚组分析产生了许多统计学上显著的功能性β2GPI范围, 其表明巴维昔单抗的存活益处, 各自以200μg/ml或更高的功能性β2GPI开始, 因此验证了等于或大于200μg/ml的功能性β2GPI的治疗前水平对于用巴维昔单抗进行的处理有益的初始意外发现。确切地说, 双截止法显示在210–270、210–280、210–290、200–280和200–290μg/ml范围内的功能性β2GPI的治疗前水平是在用巴维昔单抗加多西他赛与单独多西他赛处理的患者的总存活期方面的益处的统计学显著预测因子。针对210–270、210–280、210–290、200–280及200–290μg/ml功能性β2GPI范围的这些结果示于表14A和表14B。

[0693] 表14A

[0694] 治疗前β2GPI的范围提高巴维昔单抗总存活期

[0695]

β2GPI (μg/ml)		范围内 患者 (N)			范围内		
低	高	巴维昔 单抗	安慰剂	总计	风险比	CI	P 值
210	280	124	102	226	0.689891086	0.51,0.94	0.0184092
210	290	131	108	239	0.702335779	0.52,0.95	0.0206955

[0696]

210	270	111	93	204	0.704885964	0.51,0.98	0.0356625
200	280	149	129	278	0.750114990	0.57,1.00	0.0455542
200	290	156	135	291	0.758545153	0.58,1.00	0.0486627

[0697] 表14B

[0698] 治疗前β2GPI的范围提高巴维昔单抗总存活期

[0699]

β2GPI (μg/ml)		范围外 患者 (N)			范围外		
低	高	巴维昔 单抗	安慰剂	总计	风险比	CI	P 值
210	280	170	196	366	1.326781940	1.03,1.70	0.0260507
210	290	163	190	353	1.350309796	1.05,1.74	0.0205255
210	270	183	205	388	1.267025810	1.00,1.61	0.0537042
200	280	145	169	314	1.366480252	1.05,1.79	0.0217840
200	290	138	163	301	1.396948670	1.06,1.84	0.0164154

[0700] 总结表14A中的结果, 210–270、210–280、210–290、200–280和200–290μg/ml的功能性β2GPI范围中的每一个均具有小于一的风险比和统计学上显著的P值, 其代表存活期的改

善。表14B自然示出了相反结果,原因在于具有处于所述范围之外的功能性 β 2GPI的患者大于一的风险比和统计学显著的P值,其表示存活期降低(或死亡几率提高)。例如,当用巴维昔单抗(加多西他赛)处理时,治疗前 β 2GPI水平为200–290 μ g/ml的患者(代表随机化患者的约49%)的MOS为11.4个月,而对于具有相同范围的 β 2GPI水平的对照组中的患者,MOS仅为10.1个月。这11.4个月相对于10.1个月的增加反映了mOS的统计学显著改善(HR 0.76,P=0.049)。

[0701] 文献中并未表明等于或大于200 μ g/ml的功能性 β 2GPI的治疗前水平将指示巴维昔单抗处理有存活延长趋势,并且也未表明210–270、210–280、210–290、200–280或200–290 μ g/ml的功能性 β 2GPI治疗前水平可预测用巴维昔单抗处理的患者有总体存活期方面的益处。实际上,在使用巴维昔单抗的大部分先前临床经验中没有提出此类结果。此外,这些发现与来自广泛的临床前模型的数据极为不一致,这表明不同水平的血清 β 2GPI不会显著影响巴维昔单抗的处理结果。确切地说,临床前经验表明,相当较低水平的血清 β 2GPI,如大约10–20至50–60 μ g/ml,足以支持巴维昔单抗结合和活性(实例V)。

[0702] 特别地,使用不同测定,实例V显示为0.12至0.25(图9A和图9B,以及图1A、图1B、图1C和图1D);0.125、0.5至2(图10);0.93(图11);1.43至2.86(图12)的 β 2GPI与抗体的摩尔比有效支持巴维昔单抗与PS结合。考虑若干不同的结合和功能测试系统,包括临床前数据,其表明巴维昔单抗在约2.86的 β 2GPI与抗体摩尔比(表3)下是有效的,应不需要大于3的 β 2GPI与抗体摩尔比。在本发明III期试验中使用3mg/kg剂量的巴维昔单抗时,在低于60 μ g/ml的 β 2GPI水平下实现此类比率(图19)。作为参考,III期临床试验的 β 2GPI量、抗体和可比较的 β 2GPI-抗体比率示于表15中,其中N=具有处于每一限定增量内的功能性 β 2GPI水平的患者人数(来自592名可评估患者)。

[0703] 表15

[0704] III期患者的 β 2GPI和抗体水平和比率

[0705]

巴维昔单抗 (mg/kg)	C 最大 ($\mu\text{g/ml}$)	巴维昔单 抗 (μM)	$\beta2\text{GPI}$ ($\mu\text{g/ml}$)	N=	$\beta2\text{GPI}$ (μM)	$\beta2\text{GPI}$ 与 Ab 摩 尔比
3	56.4	0.389	10	3	0.2	0.514
3	56.4	0.389	20		0.4	1.028
3	56.4	0.389	30		0.6	1.542
3	56.4	0.389	40		0.8	2.057
3	56.4	0.389	50	0	1.0	2.571
3	56.4	0.389	60		1.2	3.085
3	56.4	0.389	80	9	1.6	4.113
3	56.4	0.389	100	26	2.0	5.141
3	56.4	0.389	120	28	2.4	6.170
3	56.4	0.389	140	43	2.8	7.198
3	56.4	0.389	160	36	3.2	8.226
3	56.4	0.389	180	43	3.6	9.254
3	56.4	0.389	200	90	4.0	10.283
3	56.4	0.389	220	101	4.4	11.311
3	56.4	0.389	240	70	4.8	12.339
3	56.4	0.389	260	62	5.2	13.368
3	56.4	0.389	280	44	5.6	14.396
3	56.4	0.389	300	23	6.0	15.424
3	56.4	0.389	320	7	6.4	16.452
3	56.4	0.389	340	2	6.8	17.481

[0706]

3	56.4	0.389	360	1	7.2	18.509
3	56.4	0.389	380	1	7.6	19.537
3	56.4	0.389	402	2	8.0	20.566

[0707] 对表15和图17A与用于建模的数据(表1、表2和表3)进行比较,可以看出,III期临床试验中的绝大多数患者具有等同于远足以饱和单抗结合的 $\beta2\text{GPI}$ 与抗体摩尔比(≥ 2.86)的功能性 $\beta2\text{GPI}$ 水平,即以 $60\mu\text{g/ml}$ 或 $1.2\mu\text{M}$ (表15;图19)开始,甚至当巴维昔单抗处于其在血液中的最大浓度时(C_{最大}为 $56.4\mu\text{g/ml}$;实例VI;Gerber等人,2011)。实际上,592名可评估患者中仅有4名(0.68%)具有小于 $60\mu\text{g/ml}$ 的功能性 $\beta2\text{GPI}$ 的治疗前水平。此外,随着功能性 $\beta2\text{GPI}$ 水平增加(试验中大多数患者的情况如此), $\beta2\text{GPI}$ 与巴维昔单抗的摩尔比远高于2或3,如在 $200\mu\text{g/ml}$ 时超过10。在先前的临床前建模或临床经验中没有指出此类 $\beta2\text{GPI}$ 水平或比率对于巴维昔单抗治疗是有益的。确切地说,如图19所示,临床前数据表明,以约 $10\mu\text{g/ml}$ 或更低开始($\beta2\text{GPI}$ 在 $5\mu\text{g/ml}$ 时的 $\beta2\text{GPI}:\text{Ab}$ 摩尔比为0.257),并且宜处于约 $60\mu\text{g/ml}$ 的低水平的血清 $\beta2\text{GPI}$ 足以支持巴维昔单抗结合和活性(实例V)。

[0708] 虽然出乎意料,但这些对功能性 $\beta2\text{GPI}$ 的治疗前水平作为巴维昔单抗结果的可能的生物标记物的详细分析是非常令人鼓舞的。因此,测量患者中功能性 $\beta2\text{GPI}$ 的治疗前浓度提供了预测对巴维昔单抗处理的应答,即选择叫可能,并且最可能受益于巴维昔单抗处理的患者的策略。这首先在使用巴维昔单抗和多西他赛时观察到,特别是在NSCLC中。然而,由于巴维昔单抗在功能性 $\beta2\text{GPI}$ 和PS复合物中的结合机制以及巴维昔单抗整体的免疫激活机制对于所有巴维昔单抗疗法都是常见的,因此基于等于或大于 $200\mu\text{g/ml}$ 的治疗前 $\beta2\text{GPI}$ 水

平选择患者可以包括在使用巴维昔单抗的所有未来试验和疗法中,以完全有理由期望这将提高治疗结果。实际上,在实例XVIII和实例XX中提供了支持这一点的进一步证据。

[0709] 实例XVIII

[0710] 其它巴维昔单抗临床试验中的 β 2GPI生物标记物分析

[0711] 根据实例XVII中鉴别功能性 β 2GPI为成功的巴维昔单抗处理的生物标记物,本实例延伸将功能性 β 2GPI测定用于来自早期巴维昔单抗临床试验的样品。以下结果表明,相同水平的功能性 β 2GPI也与巴维昔单抗的成功处理结果相关,因此证实功能性 β 2GPI是巴维昔单抗的生物标记物。

[0712] A. 实例XIII的II期试验

[0713] 使用实例XVI的功能性 β 2GPI测定测试来自实例XIII (PPHM 0902) 的NSCLC II期试验的样品。共有119个患者样品,其中可评估治疗前功能性 β 2GPI水平,其中40名患者处于巴维昔单抗3mg/kg组,79名患者处于组合对照组(安慰剂或1mg/kg巴维昔单抗)中。

[0714] 所有患者的治疗前功能性 β 2GPI水平范围为0.5至266 μ g/ml (图20A)。在用巴维昔单抗3mg/kg加多西他赛处理的患者中,功能性 β 2GPI范围为0.5至266 μ g/ml (图20B)。组合对照组中的患者的功能性 β 2GPI的分布为0.5到257.4 μ g/ml (图20C)。对于每个处理组(对于巴维昔单抗3mg/kg,169.4 μ g/ml;且对于组合对照组,171.8 μ g/ml)以及整体研究(171.0 μ g/ml),治疗前功能性 β 2GPI水平与文献中所报告的平均值一致。

[0715] 使用定义为等于或高于200 μ g/ml ($\geq 200\mu$ g/ml) 的功能性 β 2GPI的治疗前水平的“高 β 2GPI”的截值,据测定, β 2GPI $\geq 200\mu$ g/ml在巴维昔单抗3mg/kg组中(图21A和图21B)具有总存活期增加趋势,而不是在另一个组(图21C)。例如,对于用巴维昔单抗3mg/kg处理的患者,功能性 β 2GPI等于或高于200 μ g/ml的患者的MOS为16.8月,而对于小于200 μ g/ml的“低 β 2GPI”,MOS仅为9.4个月(图21A)。此外,在功能性 β 2GPI $\geq 200\mu$ g/ml的患者中,用巴维昔单抗3mg/kg处理的患者的16.8月的MOS超过了组合对照组中患者的仅8.7月的MOS(图21B)。将图21A和图21B中的每一个的曲线的明显分离与图21C中的相叠进行比较(在组合对照组中比较 β 2GPI $\geq 200\mu$ g/ml与 β 2GPI $< 200\mu$ g/ml)。

[0716] B. 实例XII的II期试验

[0717] 使用实例XVI的功能性 β 2GPI测定来测试来自实例XII (PPHM 1002) 的II期胰腺癌试验的样品。存在其中可以评估治疗前功能性 β 2GPI的水平的31个患者样品。所有患者的治疗前功能性 β 2GPI水平范围为82.5至343.2 μ g/ml (图22)。对于这些31名患者,治疗前功能性 β 2GPI的平均水平(219.2 μ g/ml)与文献中所报告的平均值一致。

[0718] 虽然样品量小,并且疾病极具侵略性,但使用等于或高于200 μ g/ml ($\geq 200\mu$ g/ml) 的功能性 β 2GPI的“高 β 2GPI”的截值,确定 β 2GPI $\geq 200\mu$ g/ml对于巴维昔单抗具有总体存活期增加趋势。用功能性 β 2GPI等于或高于200 μ g/ml的巴维昔单抗处理的患者的mOS为7.4月,而针对小于200 μ g/ml的“低 β 2GPI”,mOS为5.3个月(图23)。

[0719] C. 巴维昔单抗和太平洋紫杉醇/卡铂在NSCLC中的II期试验

[0720] 在先前未处理的患有局部晚期或转移性非鳞状NSCLC的患者中进行随机、开放标记的太平洋紫杉醇/卡铂(伴随或不伴随巴维昔单抗)的II期试验 (PPHM1001)。使用实例XVI的功能性 β 2GPI测定来测试来自所述试验的样品。存在其中可以评估处理前功能性 β 2GPI的水平的84个患者样品,其中44名患者处于巴维昔单抗组中,并且40名患者处于太平洋紫杉

醇/卡铂组中。

[0721] 所有患者的处理前功能性β2GPI水平范围为0.5至326 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (图24A)。在用巴维昔单抗处理的患者中,功能性β2GPI范围为0.5至326 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (图24B)。患者在太平洋紫杉醇/卡铂组中的患者中的功能性β2GPI范围为88.8至292.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (图24C)。对于每个处理组(对于巴维昔单抗,187.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$,并且对于太平洋紫杉醇/卡铂组,186.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$),以及整个研究(187.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的,预处理功能性β2GPI水平同样与文献中所报告的平均值一致。

[0722] 使用呈等于或高于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$)的功能性β2GPI的处理前水平的“高β2GPI”的同一截止值,确定 $\beta2\text{GPI} \geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 同样在巴维昔单抗组中具有增加总存活期趋势,而不是在对照(太平洋紫杉醇/卡铂)组中。例如,对于使用巴维昔单抗处理的患者,功能性β2GPI等于或高于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者的mOS为17.0个月,而小于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的“低β2GPI”的mOS为14.2月(图25A)。此外,在功能性β2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者中,用巴维昔单抗处理的患者的17.0个月的MOS超过了对照组中的患者的仅13.2个月的MOS(图25B)。将图25A和图25B,特别是图25A中的曲线的分离与图25C进行比较,其中当β2GPI小于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对于对照组中的患者,存在存活期延长趋势。

[0723] 总之,来自四个独立临床试验的实例XVII和实例XVIII中的数据一致显示,功能性β2GPI水平与治疗结果相关,因此验证功能性β2GPI水平为成功的巴维昔单抗处理的生物标记物。

[0724] 实例XIX

[0725] 与随后的免疫疗法组合的巴维昔单抗的存活期益处

[0726] 尽管与单独多西他赛组相比,实例XIV的III期试验的初始分析并未显示巴维昔单抗加多西他赛组的优越OS,但正在进行的研究旨在鉴别巴维昔单抗处理具有治疗益处的其它可能性指标。本实例表明,相对于用单独多西他赛处理,随后进行免疫疗法的患者,用巴维昔单抗和多西他赛处理,随后进行免疫疗法(SACT-I0)的患者具有统计学显著更好的MOS。

[0727] 用巴维昔单抗和多西他赛或单独多西他赛处理后,约15%的患者(597例中的93例)随后接受抗癌疗法(SACT),其呈使用免疫检查点抑制剂(ICI)的后续免疫肿瘤学(I0)疗法(SACT-I0或后续I0)形式。这93名患者在处理组之间均匀平衡,其中46名患者先前接受巴维昔单抗和多西他赛处理,47名患者先前接受使用单独多西他赛的处理。

[0728] 出人意料地,据测定,当用后续I0处理时,相对于安慰剂,先前接受巴维昔单抗处理的患者的MOS急剧增加(图26)。确切地说,对于随后接受I0的患者,巴维昔单抗和多西他赛组(95%CI,15.2-NA)的mOS尚未达到,而对于单独多西他赛组,mOS为12.6个月(95%CI,10.4-17.8);HR=0.46且p=0.006(图26;表16)。对于随后未接受I0的患者,MOS在巴维昔单抗和多西他赛组中为9.2个月,并且在单独多西他赛组为10.2个月;HR=1.16,p=0.172。

[0729] 表16

[0730] 与随后的免疫疗法组合的巴维昔单抗的存活期益处

[0731]

处理组	参数	巴维昔单抗 +多西他赛 n = 46	安慰剂+多西他赛 n = 47
后续 IO	中值 月数 (95% CI)	N/A -尚未达成 (15.2-N/A)	12.6 (10.4-17.8)
	HR (95% CI)	0.46 (0.24-0.79)	
	P 值	0.006	
无后续 IO	中值 月数 (95% CI)	9.2 (7.2-11.0)	10.2 (8.9-11.9)
	HR (95% CI)	1.16 (0.94-1.42)	
	P 值	0.172	

[0732] 在后续IO组中,还鉴别“第一后续IO”的特定免疫治疗剂。在用巴维昔单抗(和多西他赛)和随后IO处理的46名患者中,免疫治疗剂示于表17中,其均是呈与CTLA-4,PD-1或PD-L1结合的阻断抗体形式的检查点抑制剂抗体(免疫检查点抑制剂)。确切地说,所用阻断抗体是曲美木单抗,一种与CTLA-4结合的阻断抗体;纳武单抗,一种与PD-1结合的阻断抗体;和德瓦鲁单抗(MEDI4736),一种与PD-L1结合的阻断抗体。总之,46名巴维昔单抗患者中有42名随后接受了纳武单抗;有两个接受了德瓦鲁单抗单一疗法,并且有两名接受了曲美木单抗+德瓦鲁单抗(表17)。

[0733] 表17

[0734] 巴维昔单抗和后续免疫治疗剂

[0735]

巴维昔单抗 (+多西他赛)	后续 IO	患者人数
	德瓦鲁单抗 (MEDI4736)	4

[0736]

	纳武单抗 (Opdivo®)	41
	曲美木单抗	2
	纳武单抗加 IL-10	1

[0737] 将注意到,四名患者接受了多于一种IO剂,即其“第一后续IO”疗法本身就是“IO组合”,即第一和第二检查点抑制剂抗体。因此,在“ITT”(意向治疗)分析中,存在接受第一后续IO的用巴维昔单抗处理的46名患者,但表17中存在48种后续IO剂。这是因为有两名患者接受了“IO双重疗法”。总体而言,4名患者接受了超过一次的IO,并且每名患者都接受了MEDI4736(德瓦鲁单抗)和曲美木单抗的双重疗法。在这四个个体中,两个处于巴维昔单抗组,两个处于安慰剂组。

[0738] 在随后接受IO治疗的93例患者中,使用单独多西他赛(安慰剂)处理的患者也接受了曲美木单抗、纳武单抗或德瓦鲁单抗(MEDI4736)。此外,安慰剂组中两名患者接受派姆单抗(先前MK-3475)并且安慰剂组中一名患者接受REGN2810,其均为结合于PD-1的阻断抗体。总体而言,安慰剂组中47名患者的第一后续IO是:曲美木单抗(3)、纳武单抗(40)、德瓦鲁单抗(3)、派姆单抗(2)和REGN2810(1),在47名患者中总计有49种药剂,其中两名患者接受德

瓦鲁单抗(MEDI4736)-曲美木单抗的IO双重疗法。也就是说,对照组中47名患者中有40名随后接受了纳武单抗;一人接受了德瓦鲁单抗单一疗法;一人接受了曲美木单抗单一疗法;两人接受了曲美木单抗+德瓦鲁单抗;两人接受派姆单抗并且有一人接受REGN2810。

[0739] 图26示出了与从随机化后算起的时间相关的起初用巴维昔单抗随后IO处理的存活期益处。当随从第一后续IO处理后算起的时间测量时,起初用巴维昔单抗处理随后进行IO的存活益处甚至更加显著。在这种情况下,对于接受随后IO的患者,巴维昔单抗和多西他赛组的MOS尚未达到(95%CI,10.2-NA),而对于单独多西他赛组MOS仅为6.2个月(95%CI,3.9-8.7);HR=0.42,p=0.002。

[0740] 总之,本实例中的数据首次表明,巴维昔单抗增强了人类患者中免疫治疗剂的活性。因此,这些结果有力地支持了巴维昔单抗与免疫治疗剂,特别是免疫检查点抑制剂组合治疗癌症患者的持续和未来的治疗。

[0741] 实例XX

[0742] 巴维昔单抗和后续免疫疗法的β2GPI生物标记物分析

[0743] 如在实例XIX中所示,用巴维昔单抗(加多西他赛)和随后IO处理的患者的MOS要比用单独多西他赛和随后IO处理的患者的MOS显著更好。本实例进一步证明了使用功能性β2GPI作为巴维昔单抗生物标记物,显示出功能性β2GPI的相同水平也与成功的巴维昔单抗与免疫疗法组合的处理相关。

[0744] 使用实例XVI的测定,显示200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更高的功能性β2GPI水平与成功的巴维昔单抗处理相关,包括在III期试验中(实例XVII)。基于呈等于或高于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$)的功能性β2GPI的处理前水平的“高β2GPI”的同一截止值,再次确定 $\beta2\text{GPI} \geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 与用巴维昔单抗和随后IO处理的患者的总存活期增加相关,但在接受后续IO的对照患者中没有(图27)。

[0745] 确切地说,对于功能性β2GPI等于或高于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的患者,用巴维昔单抗和随后IO处理的患者的mOS尚未达到,而用多西他赛和随后IO处理的患者的mOS为12.3个月(10.2-17.6)(图27;p=0.002)。正如实例XVII中的数据所预测,在没有随后IO的患者中,与对照(9.2个月)相比,用巴维昔单抗(10.5个月)处理的患者中的 $\beta2\text{GPI} \geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 仍具有总存活期增加趋势,尽管曲线分离不如进行随后IO的患者观察到的那样明显(图27)。与巴维昔单抗处理相反,当 $\beta2\text{GPI} < 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对照组中的患者存在存活期延长趋势,对于伴随后续IO和没有后续IO的那些患者均如此。小于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组的β2GPI数据的详细分析受到 $\beta2\text{GPI} < 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 组中使用巴维昔单抗(n=12)和安慰剂(n=19)以及随后IO处理的患者数量相对较少的影响。

[0746] 因此,这些临床数据显示,功能性 $\beta2\text{GPI} \geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 是用于巴维昔单抗与免疫疗法,特别是与免疫检查点抑制剂,如曲美木单抗、纳武单抗、派姆单抗、德瓦鲁单抗和阿特珠单抗组合的成功治疗的生物标记物。

[0747] ***

[0748] 根据本公开内容,无需过度实验即可制备和实施本文公开和要求保护的所有组合物和方法。虽然已经根据优选实施例描述了本发明的组合物和方法,但是对于所属领域技术人员显而易见的是,组合物和方法以及本文中所述方法的步骤或步骤的顺序可以改变,且不脱离本发明的概念、精神和范围。更具体地,显而易见的是,化学和生理学相关的某些

试剂可以代替本文所述的试剂,同时可以获得相同或相似的结果。对于所属领域技术人员显而易见的是,所有这些类似的替代和修改均视为在由所附权利要求限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0749] 参考文献

[0750] 参考以下参考文献,其在一定程度上提供补充本文所述的那些的示范性程序或其它细节。

[0751] Agostinis et al., "In vivo distribution of β 2GPI under pathophysiologic conditions", Blood, 118(15) :4231-4238, 2011.

[0752] An et al., "Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis", J.Extracell.Vesicles, 4:27522, 2015; <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v4.27522>.

[0753] Balasubramanian et al., "Estimation of plasma beta-2-glycoprotein levels by competitive ELISA", Thromb.Res., 92:91-97, 1998.

[0754] Beck et al., "Combination of a monoclonal anti-phosphatidylserine antibody with gemcitabine strongly inhibits the growth and metastasis of orthotopic pancreatic tumors in mice", Int.J.Cancer, 118:2639-2643, 2006.

[0755] Best, "Viruses play dead to TAMe interferon responses", Cell Host & Microbe, 14(2) :117-8, 2013.

[0756] Bevers, Zwaal, Willems, "The effect of phospholipids on the formation of immune complexes between autoantibodies and β_2 -glycoprotein I or prothrombin", Clin.Immunol., 112:150-160, 2004.

[0757] Bevers et al., "Quantitative determination of the binding of β_2 -glycoprotein I and prothrombin to phosphatidylserine-exposing blood platelets", Biochem.J., 386:271-279, 2005.

[0758] Bhattacharyya et al., "Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors", Cell Host & Microbe, 14(2) :136-147, 2013.

[0759] Birge et al., "Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer", Cell Death Differ., 23(6) :962-78, 2016.

[0760] Brahmer et al., "Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer", N Engl J Med., 373(2) :123-135, 2015.

[0761] Chalasani et al., "A Phase I Clinical Trial of Bavituximab and Paclitaxel in Patients with HER2 Negative Metastatic Breast Cancer", Cancer Medicine, 4(7) :1051-1059, 2015.

[0762] Chen et al., "Phosphatidylserine Vesicles Enable Efficient En Bloc Transmission of Enteroviruses", Cell, 160:619-630, 2015.

[0763] Cheng et al., "Antibody-Mediated Blockade of Phosphatidylserine Enhances the Antitumor Effect of Sorafenib in Hepatocellular Carcinomas

- Xenografts", Ann.Surg.Oncol., 5107-5, DOI 10.1245/s10434-016-5107-5, 2016.
- [0764] Clayson et al., "Release of Simian Virus 40 Virions from Epithelial Cells is Polarized and Occurs without Cell Lysis", J.Virology, 63(5) :2278-2288, 1989.
- [0765] Czuczman et al., "Listeria monocytogenes exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread", Nature, 509:230-234, 2014.
- [0766] DaMatta et al., "Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism", FEMS Microbiol.Lett., 266:29-33, 2007.
- [0767] de Laat, Derksen, Urbanus, de Groot, "IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of β_2 -glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis", Blood, 105(4) :1540-5, 2005.
- [0768] de Laat, Derksen, van Lummel, Pennings, de Groot, "Pathogenic anti- β_2 -glycoprotein I antibodies recognize domain I of β_2 -glycoprotein I only after a conformational change", Blood, 107(5) :1916-24, 2006.
- [0769] DeRose et al., "Development of bavituximab, a vascular targeting agent with immune-modulating properties, for lung cancer treatment", Immunotherapy, 3(8) :933-944, 2011.
- [0770] Digumarti et al., "Bavituximab Plus Paclitaxel and Carboplatin for the Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer", Lung Cancer, 86:231-236, 2014.
- [0771] Eda & Sherman, "Cytoadherence of Malaria-Infected Red Blood Cells Involves Exposure of Phosphatidylserine", Cell Physiol.Biochem., 12:373-384, 2002.
- [0772] Fehrenbacher et al., "Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial", The Lancet, 387(10030) :1837-1846, 2016.
- [0773] Francis et al., "Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 is a leukocidin causing Ca²⁺ influx, necrosis and neutrophil extracellular trap formation", Cell Death and Disease, 5:e1474; doi:10.1038/cddis.2014.394, 2014.
- [0774] Freimark et al., "Antibody-Mediated Phosphatidylserine Blockade Enhances the Antitumor Responses to CTLA-4 and PD-1 Antibodies in Melanoma", Cancer Immunol.Res., 4(6) :531-40, 2016.
- [0775] Galli et al., "Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor", Lancet, 335(8705) :1544-1547, 1990.
- [0776] Garon et al., "Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer", N Engl.J.Med., 372(21) :2018-2028, 2015.
- [0777] Gerber et al., "Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of

Bavituximab,a Chimeric Phosphatidylserine-Targeting Monoclonal Antibody,in Patients with Advanced Solid Tumors",Clin.Cancer Res.,17(21):1-9,2011.

[0778] Gerber et al.,"Docetaxel Combined with Bavituximab in Previously Treated,Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer",Clinical Lung Cancer,17(3):169-176,2016.

[0779] Gong et al.,"Measuring Response to Therapy by Near-Infrared Imaging of Tumors Using a Phosphatidylserine-Targeting Antibody Fragment",Molecular Imaging,12(4):244-256,2013.

[0780] Goth&Stephens,"Rapid,Transient Phosphatidylserine Externalization Induced in Host Cells by Infection with Chlamydia spp",Infect.Immun.,69(2):1109-1119,2001.

[0781] Gray et al.,"Phosphatidylserine-targeting antibodies augment the anti-tumorigenic activity of anti-PD-1 therapy by enhancing immune activation and downregulating pro-oncogenic factors induced by T-cell checkpoint inhibition in murine triple-negative breast cancers",Breast Cancer Research,18(1):50,DOI 10.1186/s13058-016-0708-2,2016a.

[0782] Gray et al.,"LAG3 is an immunotherapeutic target in murine triple negative breast cancers whose activity is significantly enhanced in combination with phosphatidylserine targeting antibodies",Poster B019,CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference,New York,NY,September 25-28,2016b.

[0783] Gregorc et al.,"Predictive value of a proteomic signature in patients with non-small-cell lung cancer treated with second-line erlotinib or chemotherapy (PROSE):a biomarker-stratified,randomised phase 3 trial",Lancet Oncology,15(7):713-721,2014.

[0784] Hägele et al.,"Legionella pneumophila kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death",FEMS Microbiol.Lett.,169(1):51-58,1998.

[0785] He et al.,"Radiation-enhanced vascular targeting of human lung cancers in mice with a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids",Clin.Cancer Res.,13(17):5211-5218,2007.

[0786] He et al.,"Antiphosphatidylserine antibody combined with irradiation damages tumor blood vessels and induces tumor immunity in a rat model of glioblastoma",Clin.Cancer Res.,15(22):6871-80,2009.

[0787] Hogg et al.,"Retargeting Adenoviral Vectors to Improve Gene Transfer into Tumors",Cancer Gene Therapy,18:275-287,2011.

[0788] Hotchkiss et al.,"Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere):association with impaired repositioning of the microtubule organizing center",Mol.Cancer Ther.,1(13):

1191–200, 2002.

[0789] Huang, Bennett, Thorpe, "A monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on tumor blood vessels enhances the antitumor effect of docetaxel on human breast tumors in mice", *Cancer Res.*, 65(10):4408–4416, 2005.

[0790] Hunt, Simpson, Krilis, "Identification of a region of β_2 -glycoprotein I critical for lipid-binding and anticardiolipin antibody cofactor activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2141–2145, 1993.

[0791] Hunt and Krilis, "The fifth domain of β_2 -glycoprotein I contains a phospholipid-binding site (Cys281–Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies", *J. Immunol.*, 152:653–659, 1994.

[0792] Ioannou et al., "Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human β_2 -glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43", *Arthritis Rheum.*, 56(1):280–90, 2007.

[0793] Izquierdo-Useros et al., "HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse?", *PLoS Pathog.*, 6(3):e1000740, 2010.

[0794] Jennewein et al., "Vascular Imaging of Solid Tumors in Rats with a Radioactive Arsenic-Labeled Antibody that Binds Exposed Phosphatidylserine", *Clin. Cancer Res.*, 14(5):1377–1385, 2008.

[0795] Jemielity et al., "TIM-Family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-Associated Phosphatidylserine", *PLoS Pathogens*, 9(3):e1003232; 2013.

[0796] Judy et al., "Vascular Endothelial-Targeted Therapy Combined with Cytotoxic Chemotherapy Induces Inflammatory Intratumoral Infiltrates and Inhibits Tumor Relapses after Surgery", *Neoplasia*, 14:352–359, 2012.

[0797] Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp 647–669 in particular.

[0798] Kamboh et al., "Genetic Studies of Human Apolipoproteins. IV. Structural Heterogeneity of Apolipoprotein H (β_2 -Glycoprotein I)", *Am. J. Hum. Genet.*, 42:452–457, 1988.

[0799] Kennedy et al., "Attenuating a sickle cell crisis with annexin V", *Medical Hypotheses*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2015.01.037>, 2015.

[0800] Klein&Moeschberger, "Survival Analysis. Techniques for censored and truncated data", 2nd Edition, New York, 2003 (ISBN-10: 038795399X; ISBN-13: 978-0387953991).

[0801] Kogure et al., "Temporary membrane distortion of vascular smooth muscle cells is responsible for their apoptosis induced by platelet-activating factor-like oxidized phospholipids and their degradation product, lysophosphatidylcholine", *Chemistry and Physics of Lipids*, 126:29–38, 2003.

- [0802] Larson et al., "Customization, Scale-Up and Qualification of an Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) Bioassay", IBC's 23rd International Intensive Symposium Development, Validation and Maintenance of Biological Assays Conference, Seattle, Washington, May 14–16, 2013; Poster Board #7.
- [0803] Li et al., "Phosphatidylserine (PS) is Exposed in Choroidal Neovascular Endothelium: PS-Targeting Antibodies Inhibit Choroidal Angiogenesis In vivo and Ex Vivo", Invest.Ophthalmol.Vis.Sci., 56:7137–7145, 2015.
- [0804] Liang et al., "Targeting Mutant P53 Protein and the Tumor Vasculature: An Effective Combination Therapy for Advanced Breast Tumors", Breast Cancer Res.Treat., 125:407–420, 2011.
- [0805] Lonsdale et al., "Phosphatidylserine as a Therapeutic Target for the treatment of Francisella tularensis and Yersinia pestis infections", Chemical & Biological Defense Science & Technology Conference, 2011 Las Vegas, NV Abstract W15–048.
- [0806] Luster et al., "Plasma Protein β_2 -glycoprotein 1 Mediates Interaction between the Anti-tumor Monoclonal Antibody 3G4 and Anionic Phospholipids on Endothelial Cells", J.Biol.Chem., 281(40):29863–29871, 2006.
- [0807] Mallat et al., "Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in Human Atherosclerotic Plaques", Circulation, 99:348–353, 1999.
- [0808] Marconescu & Thorpe, "Coincident Exposure of Phosphatidylethanolamine and Anionic Phospholipids on the Surface of Irradiated Cells", Biochimica et Biophysica Acta, 1778(10):2217–2224, 2008.
- [0809] McNeil, Simpson, Chesterman, Krilis, "Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H)", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87(11):4120–4124, 1990.
- [0810] Meckes et al., "Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 107(47):20370–20375, 2010.
- [0811] Meckes and Raab-Traub, "Microvesicles and Viral Infection", J.Virology, 85(24):12844–12854, 2011.
- [0812] Mehdi et al., "Genetic variation in the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentrations", Hum.Genet., 105:6371, 1999.
- [0813] Meertens et al., "The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry", Cell Host & Microbe, 12(4):544–557, 2012.
- [0814] Mercer and Helenius, "Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells", Science, 320:531–535, 2008.
- [0815] Miyakis et al., " β_2 -glycoprotein I-function in health and disease",

- Thromb.Res.,114:335-346,2004.
- [0816] Moller-Tank&Maury,"Phosphatidylserine receptors:Enhancers of enveloped virus entry and infection",Virology,468-470(2014) 565-580,2014.
- [0817] Moody et al.,"Anti-phospholipid human monoclonal antibodies inhibit CCR5-tropic HIV-1 and induce β -chemokines",J.Exp.Med.,207 (4):763-776,2010.
- [0818] Morizono et al.,"The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine C254 to the TAM receptor tyrosine kinase Axl to mediate viral entry",Cell Host Microbe,9:286-298.2011.
- [0819] Murata-Kamiya et al.,"Helicobacter pylori Exploits Host Membrane Phosphatidylserine for Delivery,Localization, and Pathophysiological Action of the CagA Oncoprotein",Cell Host Microbe,7:399-411,2010.
- [0820] Palmero et al.,"Final Clinical Results from SUNRISE:A Phase III, Randomized,Double-Blind,Placebo-Controlled Multicenter Trial of Bavituximab Plus Docetaxel in Patients with Previously Treated Stage IIIb/IV Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer",Annals Oncol.,28(Suppl.5):487,Abstract 1364P, 2017.
- [0821] Pattanapanyasat et al.,"Febrile temperature but not proinflammatory cytokines promotes phosphatidylserine expression on Plasmodium falciparum malaria-infected red blood cells during parasite maturation",Cytometry,Part A,77A:515-523,2010.
- [0822] Petersen&Krogfelt,"Helicobacter pylori:an invading microorganism?A review",FEMS Immunol.Med.Microbiol.,36:117-126,2003.
- [0823] Polz,Wurm,Kostner,"Investigations on β 2-glycoprotein-I in the rat-isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions",Int.J.Biochem.,11:265-270,1980.
- [0824] Prakasam and Thiagarajan," β 2-Glycoprotein I-A Protein in Search of Function",In Antiphospholipid Syndrome,Ed.Alena Bulikova,ISBN:978-953-51-0526-8,InTech,Available from:<http://www.intechopen.com/books/antiphospholipid-syndrome/beta2-glycoprotein-i-i-n-search-of-function>,2012.
- [0825] Ran et al.,"Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice",Clin.Cancer Res.,11:1551-1562,2005.
- [0826] Sabatier et al.,"Type 1 And Type 2 Diabetic Patients Display Different Patterns of Cellular Microparticles",Diabetes,51:2840-2845,2002.
- [0827] Saha et al.,"An Orthotopic Lung Tumor Model for Image-Guided Microirradiation in Rats",Radiat.Res.,174:62-71,2010.
- [0828] Schubert-Unkmeir et al.,"Gene Expression Pattern in Human Brain Endothelial Cells in Response to Neisseria meningitidis",Infect.Immun.,75 (2):899-914,2007.

- [0829] Seabra et al., "Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β 1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion", *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 324(2) :744-752,2004.
- [0830] Sheng et al., "Impaired Thrombin Generation in β 2-Glycoprotein I Null Mice", *J.Biol.Chem.*, 276(17) :13817-13821,2011.
- [0831] Sims et al., "Neural stem cell-derived exosomes mediate viral entry", *Int.J.Nanomedicine*, 9:4893-4897,2014.
- [0832] Soares et al., "Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases", *Nature Medicine*, 14(12) :1357-1362, 2008.
- [0833] Souza et al., "Microparticles:markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI", *Kidney Int.*, doi:10.1038/ki.2015.26,2015.
- [0834] Stafford&Thorpe, "Increased Exposure of Phosphatidylethanolamine on the Surface of Tumor Vascular Endothelium", *Neoplasia*, 13:299-308,2011.
- [0835] Stafford et al., "Highly Specific PET Imaging of Prostate Tumors in Mice with an Iodine-124-Labeled Antibody Fragment that Targets Phosphatidylserine", *PLoS ONE*, 8(12) :e84864,2013.
- [0836] Steinkasserer et al., "Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human β 2-glycoprotein I", *Biochem.J.*, 277:387-391,1991.
- [0837] Takeuchi et al., "Coagulation and fibrinolytic activities in 2 siblings with β 2-glycoprotein I deficiency", *Blood*, 96:1594-1595,2000.
- [0838] U.S.Patent Application No.US 2016/0009805 A1.
- [0839] U.S.Patent No.5,019,368
- [0840] U.S.Patent No.5,882,626
- [0841] U.S.Patent No.7,247,303
- [0842] U.S.Patent No.7,422,738
- [0843] U.S.Patent No.7,455,833
- [0844] U.S.Patent No.7,572,448
- [0845] U.S.Patent No.7,611,704
- [0846] U.S.Patent No.7,790,860
- [0847] U.S.Patent No.7,906,115
- [0848] U.S.Patent No.8,486,391
- [0849] U.S.Patent No.8,956,616
- [0850] van der Kleij et al., "A Novel Host-Parasite Lipid Cross-talk: schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization", *J.Biol.Chem.*, 277(50) :48122-48129,2002.
- [0851] Walker et al., "Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+memory T cells by releasing antigenic exosomes"

J. Immunol., 182(3):1548-1559, 2009.

[0852] Wanderley et al., "Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis", PLoS One, 4(5):e5733, 2009.

[0853] Wanderley et al., "Phosphatidylserine exposure on the surface of Leishmania amazonensis amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function", Parasite Immunology, 35:109-119, 2013.

[0854] Wandler et al., "A Greasy Foothold for Helicobacter pylori", Cell Host Microbe, 7:338-339, 2010.

[0855] Weihua et al., "Apoptotic Cells Initiate Endothelial Cell Sprouting via Electrostatic Signaling", Cancer Res., 65(24):11529-11535, 2005.

[0856] Willems, Janssen, Pelsers et al., "Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody- β 2-glycoprotein I complexes to lipid membranes", Biochemistry, 35:13833-13842, 1996.

[0857] Wurm, " β 2-glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles", Int. J. Biochem., 16:511-15, 1984.

[0858] Yin et al., "Phosphatidylserine-targeting antibody induces M1 macrophage polarization and promotes myeloid-derived suppressor cell differentiation", Cancer Immunol. Res., 1(4):256-268, 2013.

[0859] Yuyama et al., "Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia", J. Biol. Chem., 287(14):10977-10989, 2012.

[0860] Zandbergen et al., "Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum", Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 103(37):13837-13842, 2006.

[0861] Zhang et al., "Phosphatidylserine-Targeted Bimodal Liposomal Nanoparticles for in vivo Imaging of Breast Cancer in Mice", J. Control. Release, 183:114-123, 2014.

[0862] Zhao et al., "Near-Infrared Optical Imaging of Exposed Phosphatidylserine in a Mouse Glioma Model", Translational Oncology, 4:355-364, 2011.

[0863] Zhou et al., "Phosphatidylserine-Targeted Molecular Imaging of Tumor Vasculature by Magnetic Resonance Imaging", J. Biomed. Nanotechnol., 10:1-10, 2014.

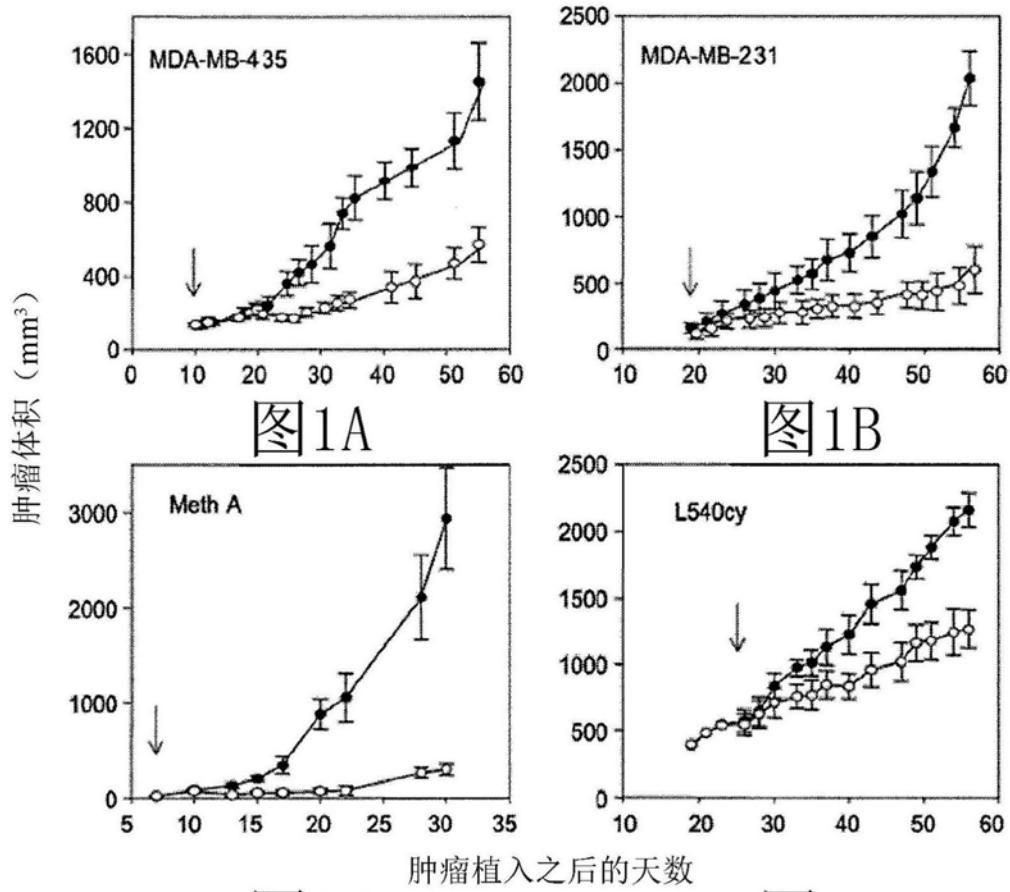


图1C

图1D

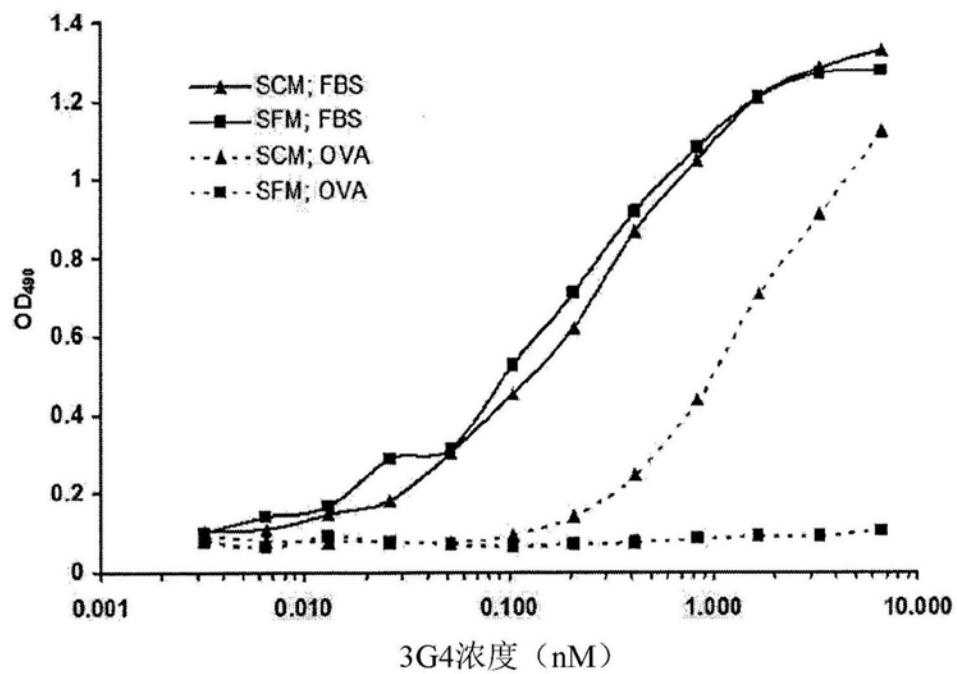


图2A

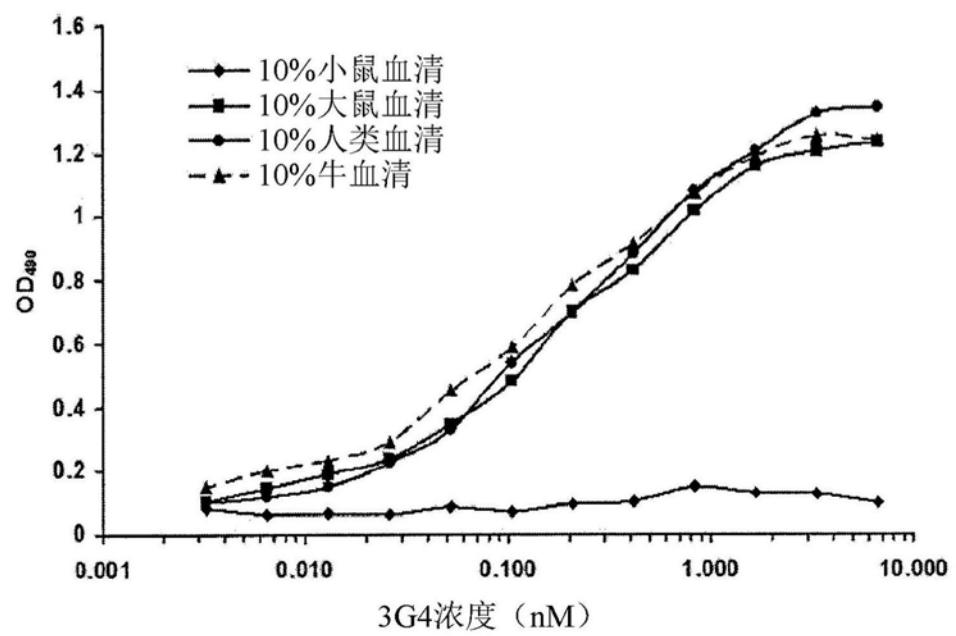


图2B

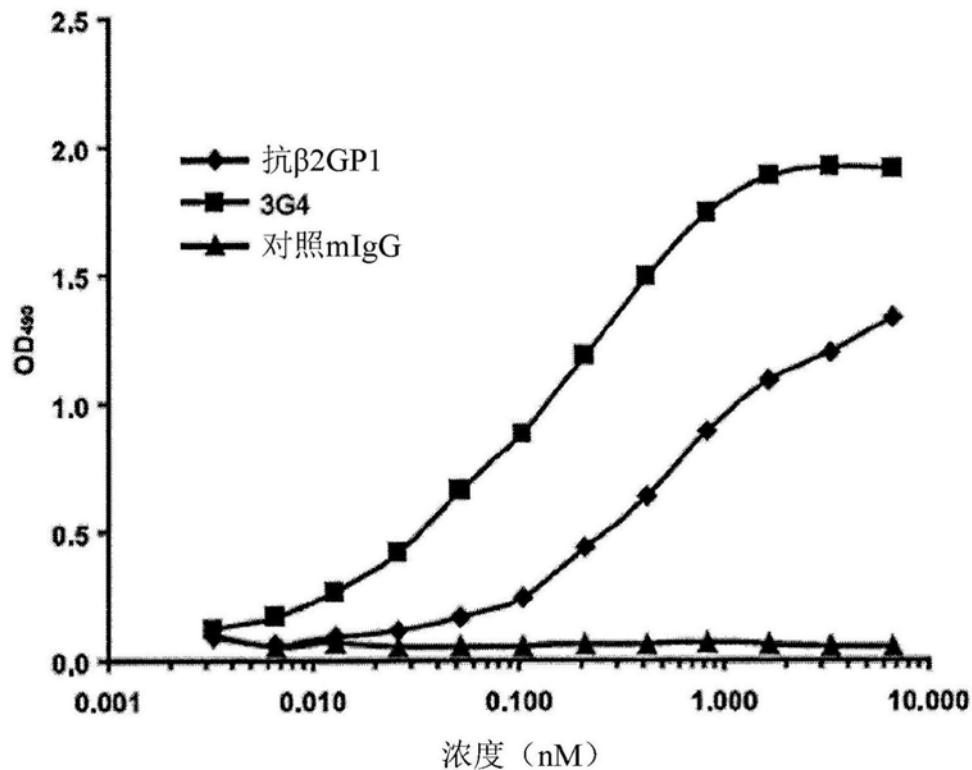


图3

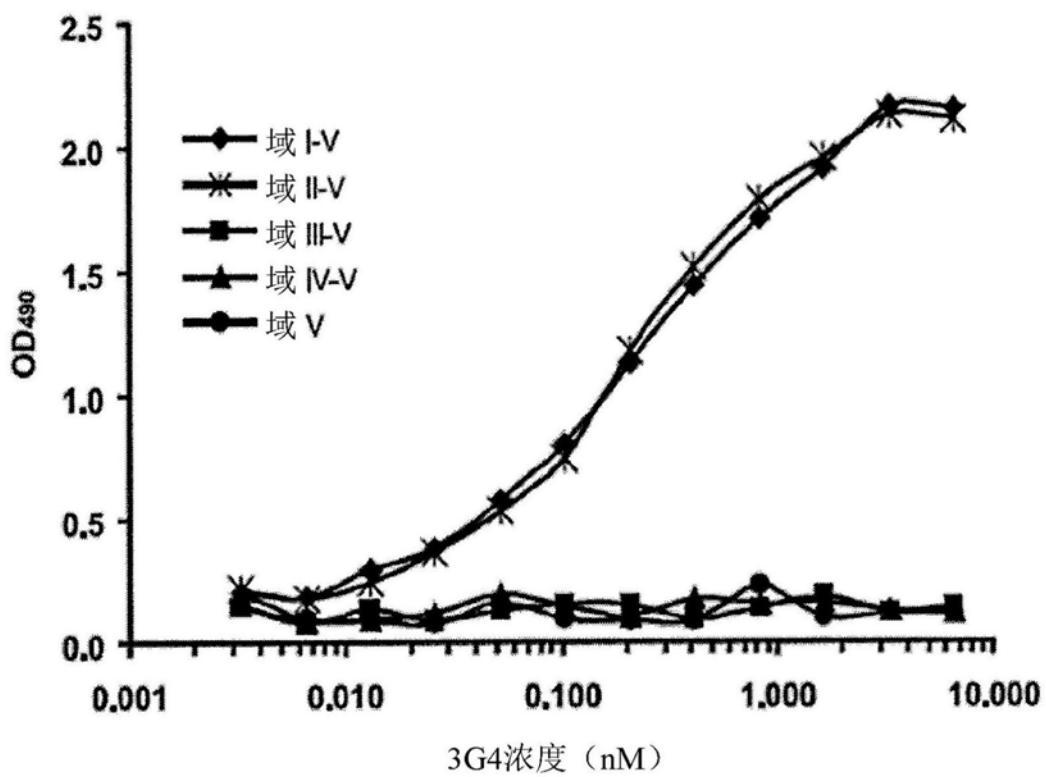


图4

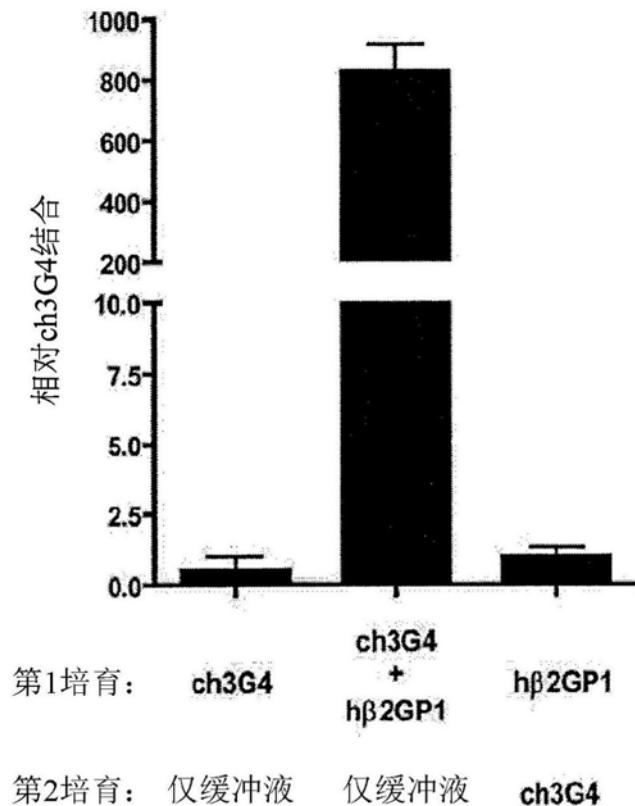


图5

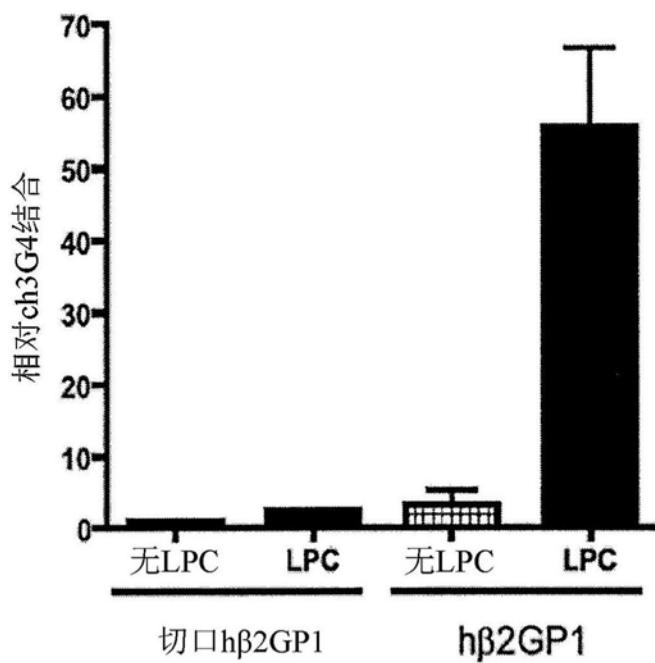


图6A

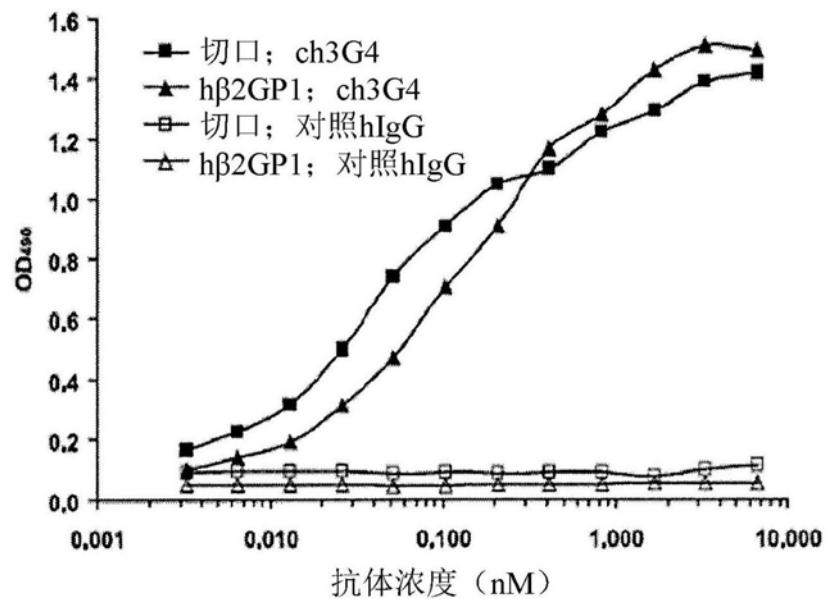


图6B

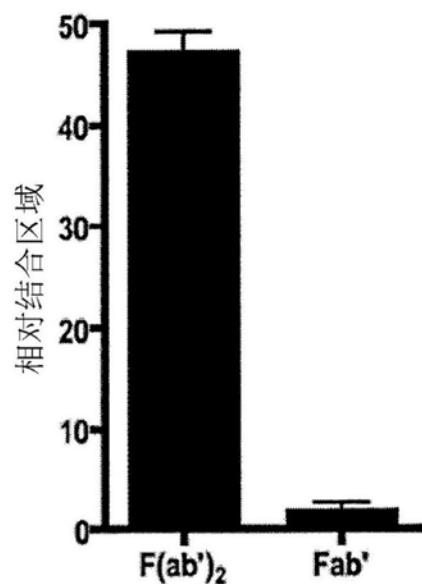


图7A

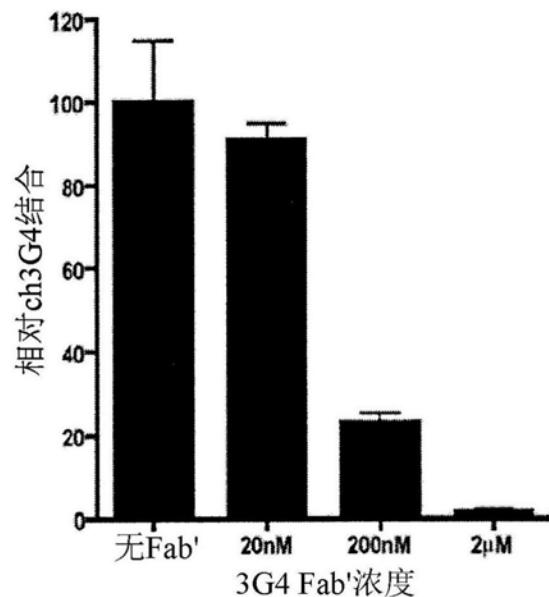


图7B

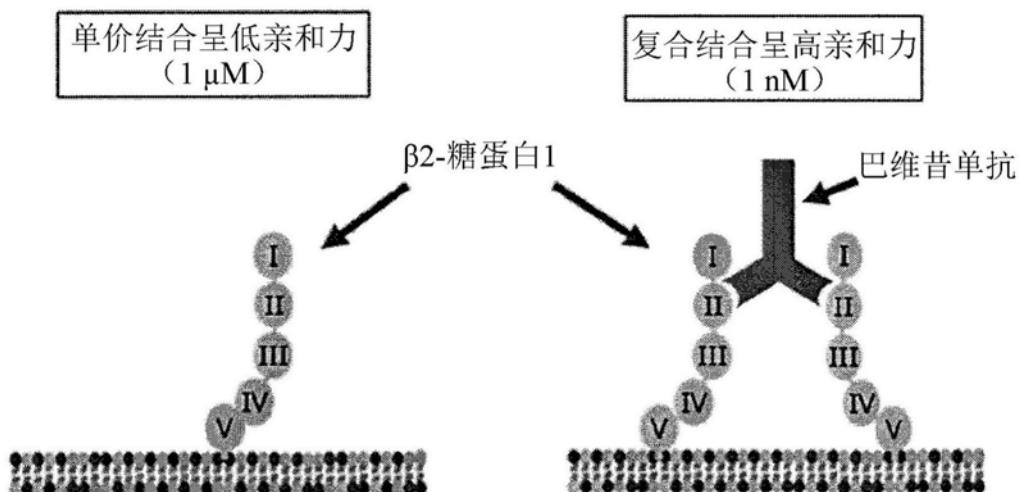


图8

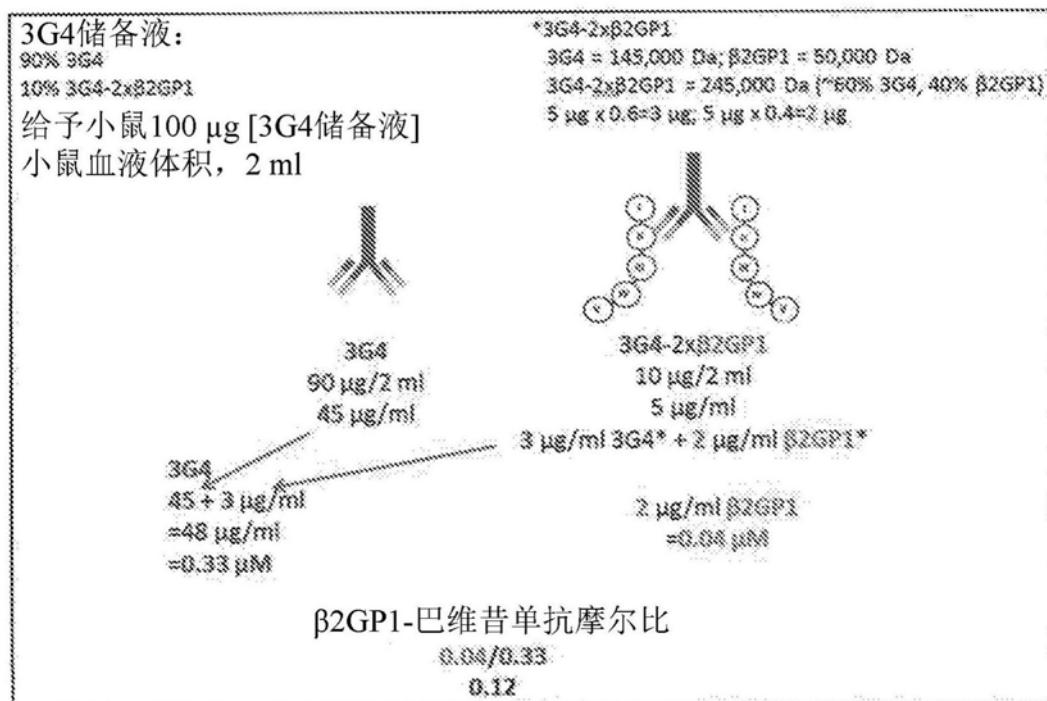


图9A

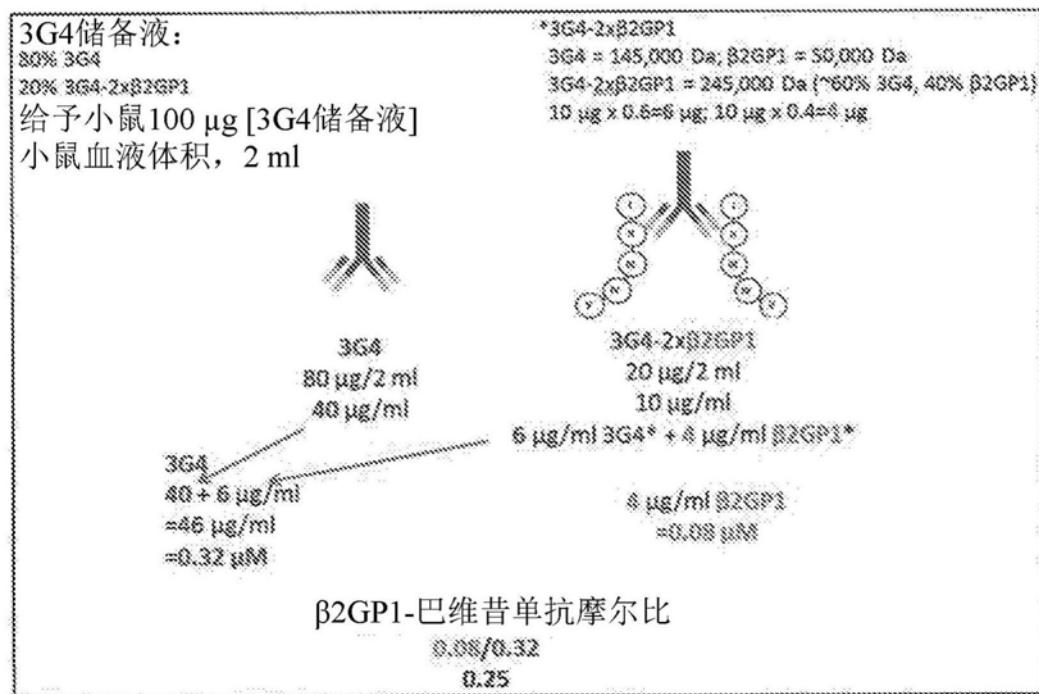


图9B

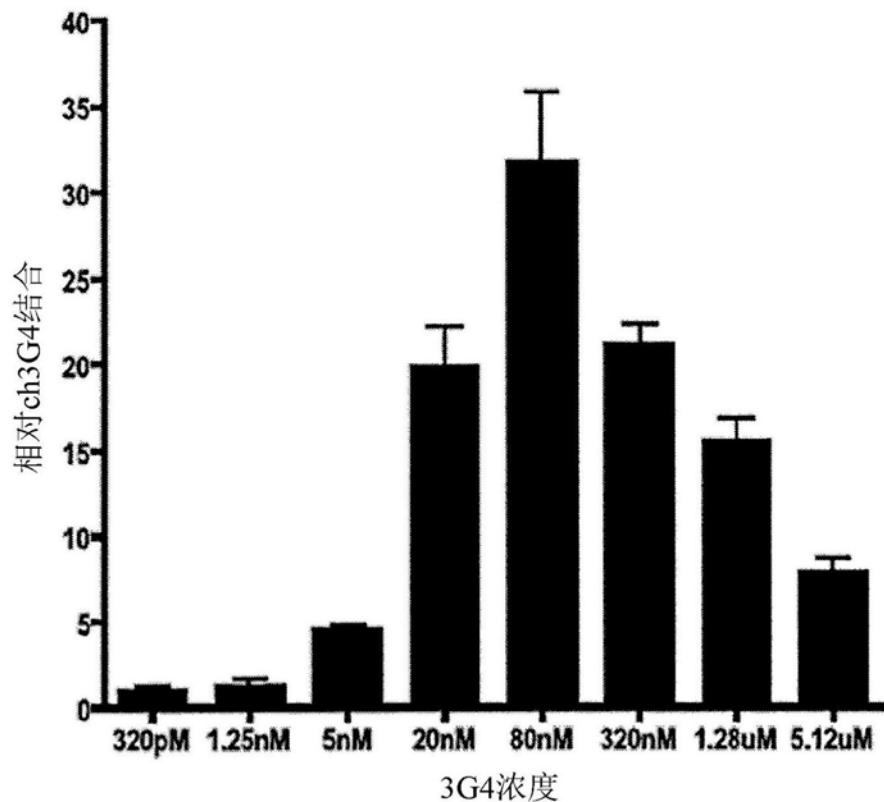


图10

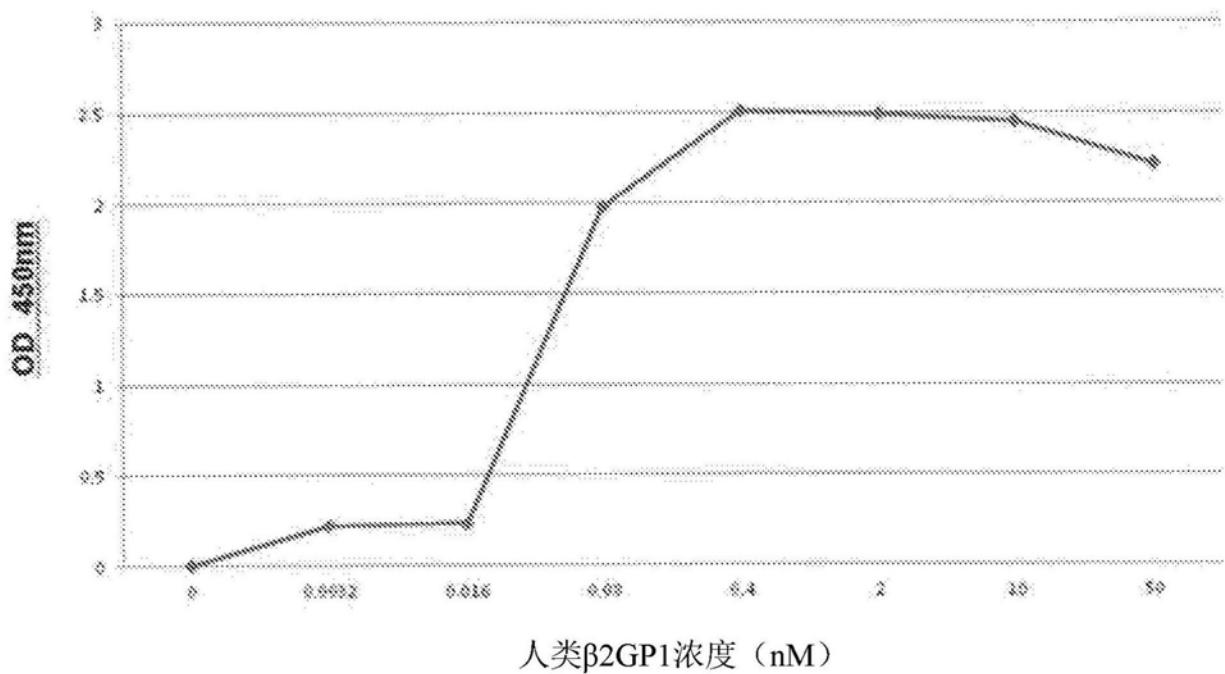


图11

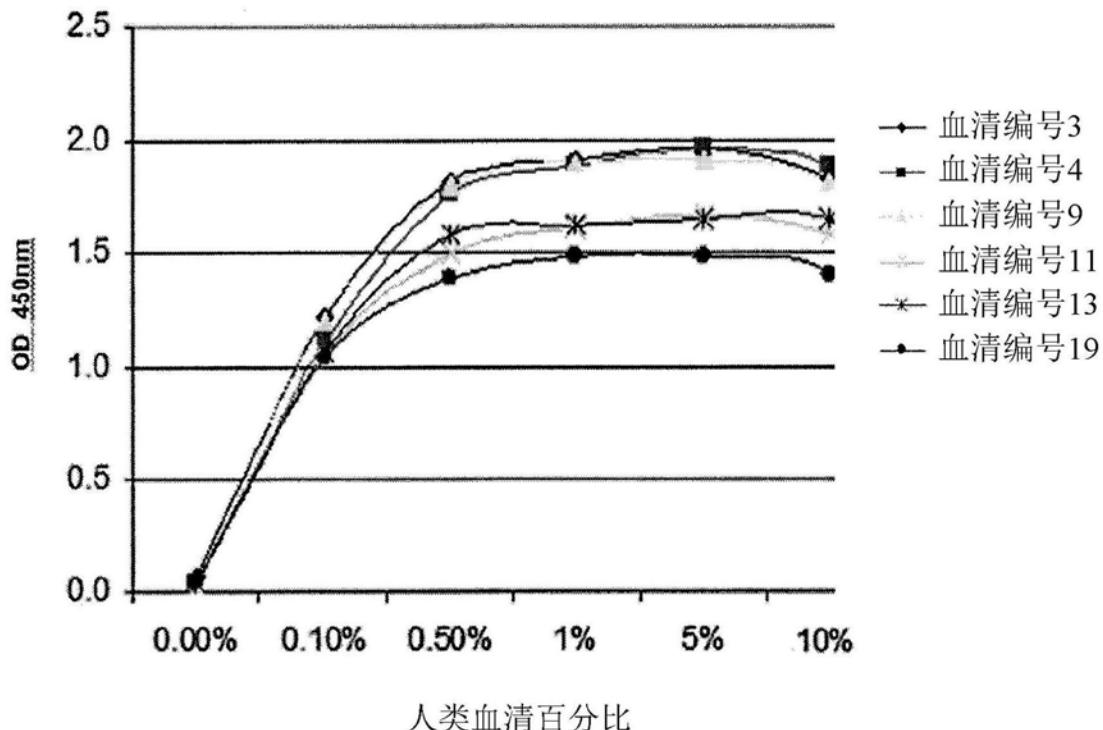


图12

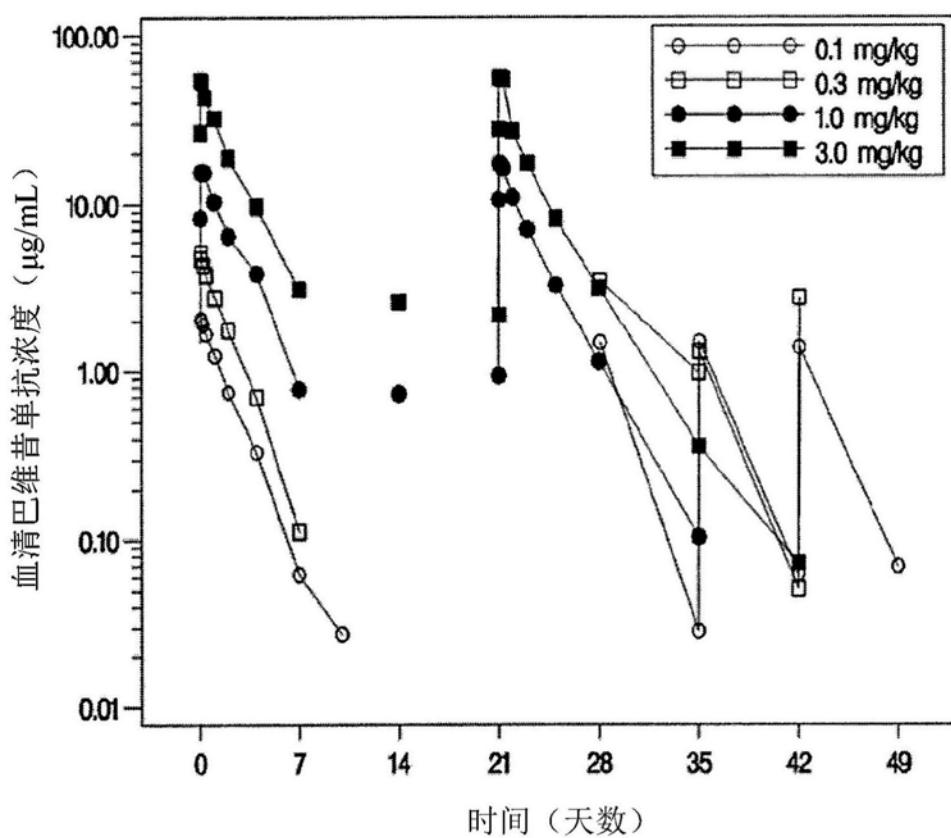


图13

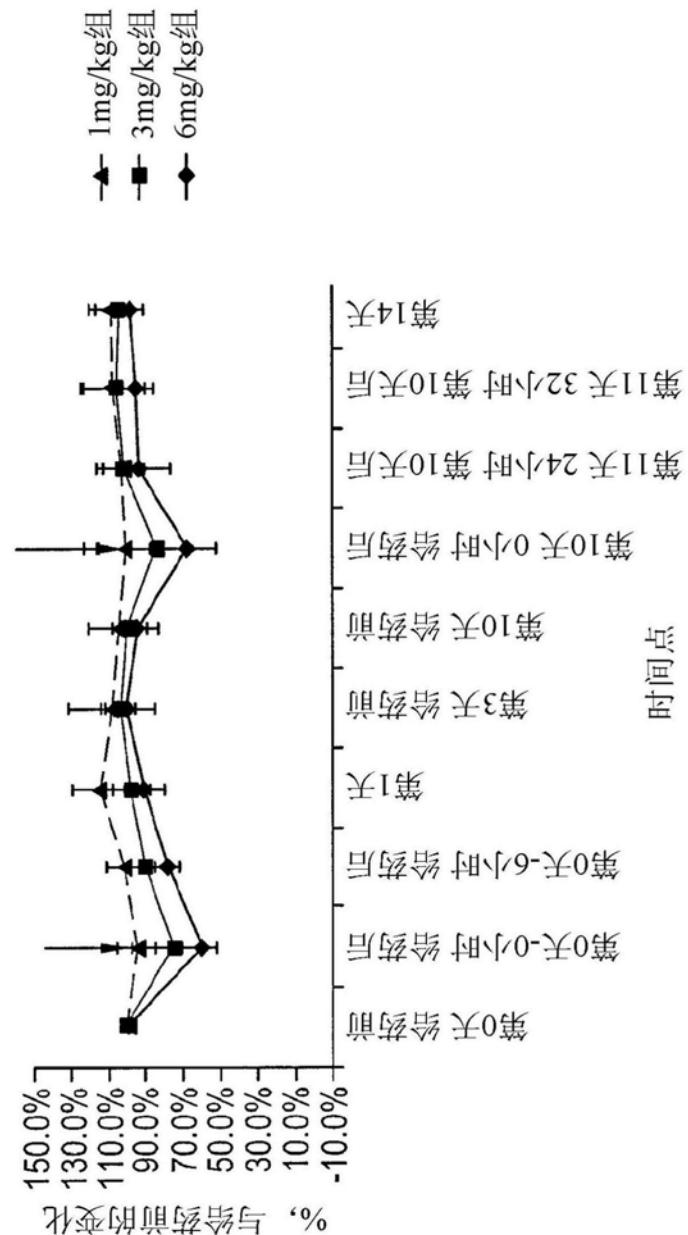


图14

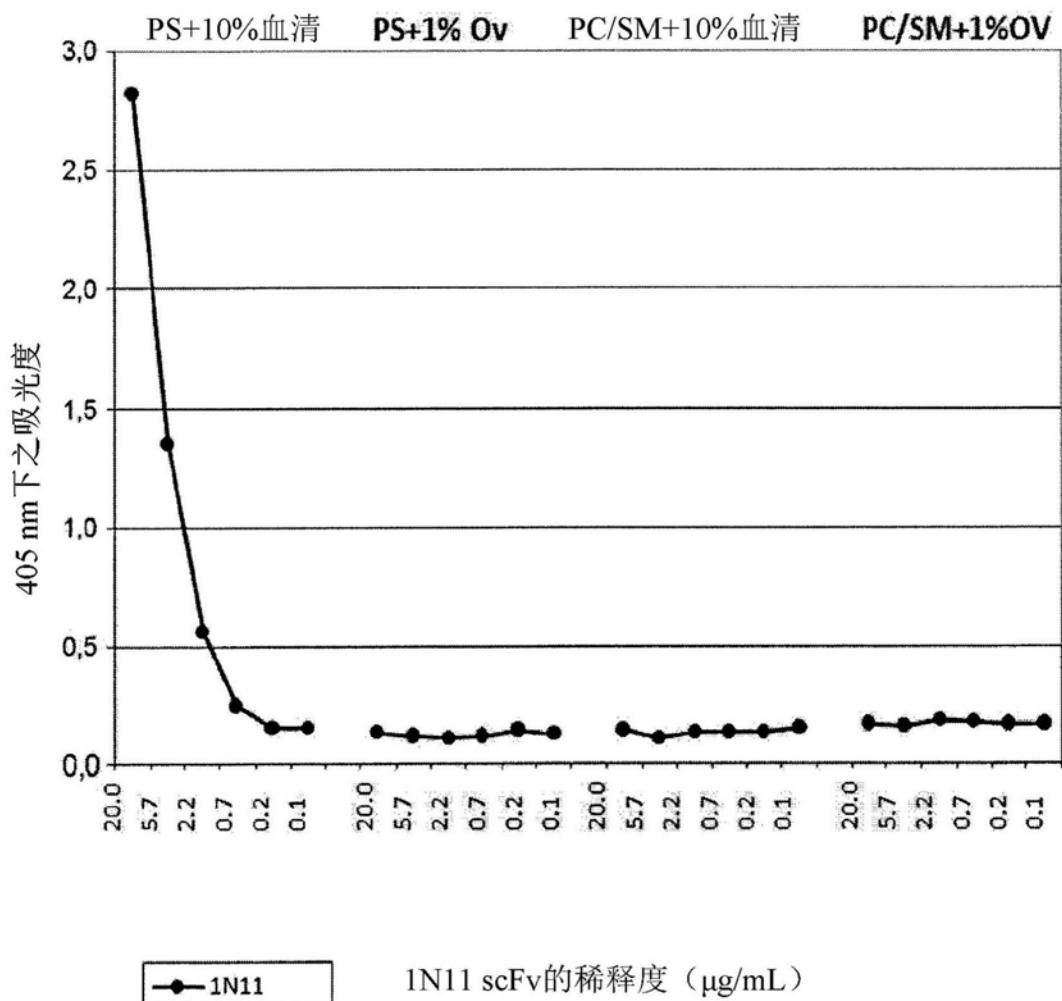


图15

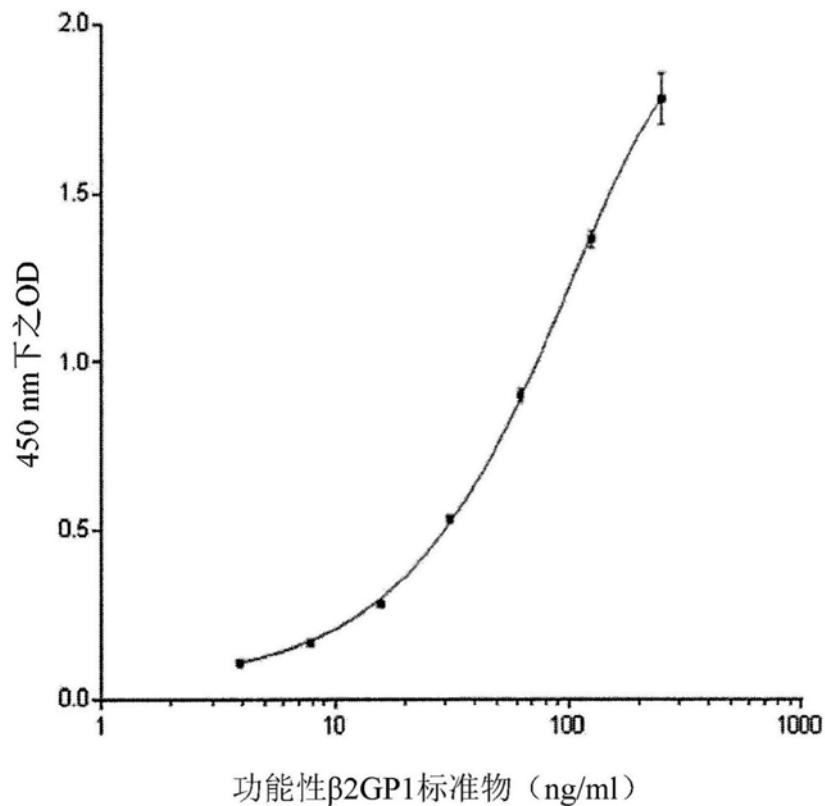


图16

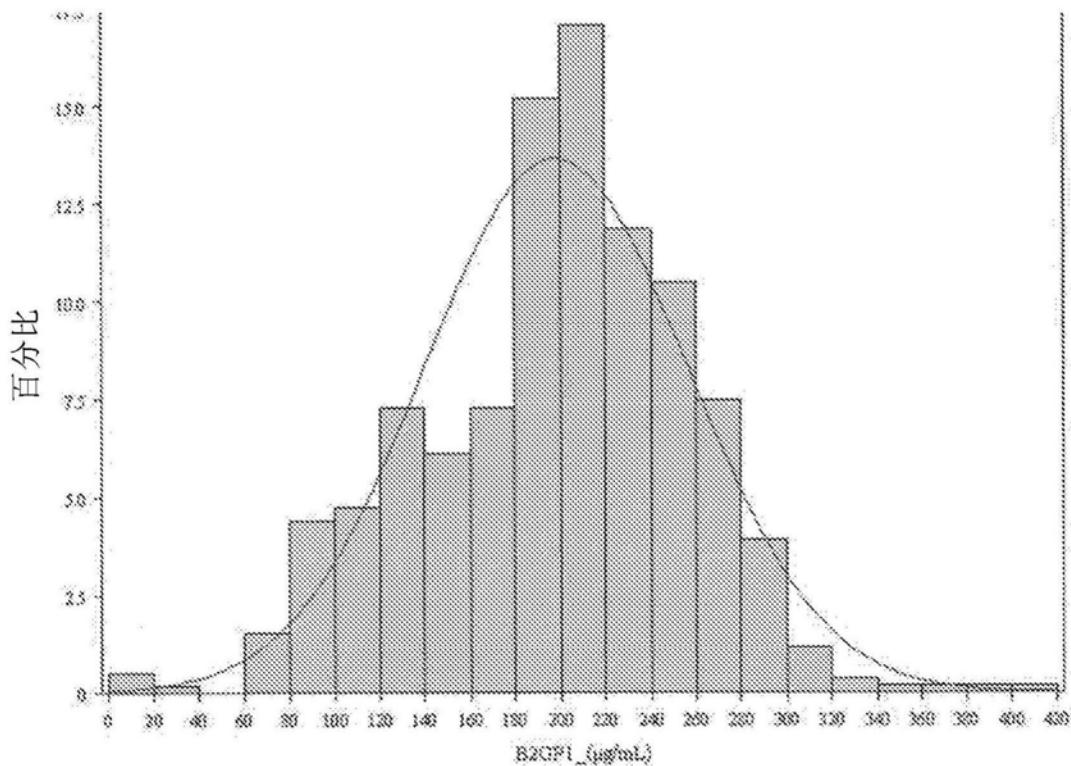


图17A

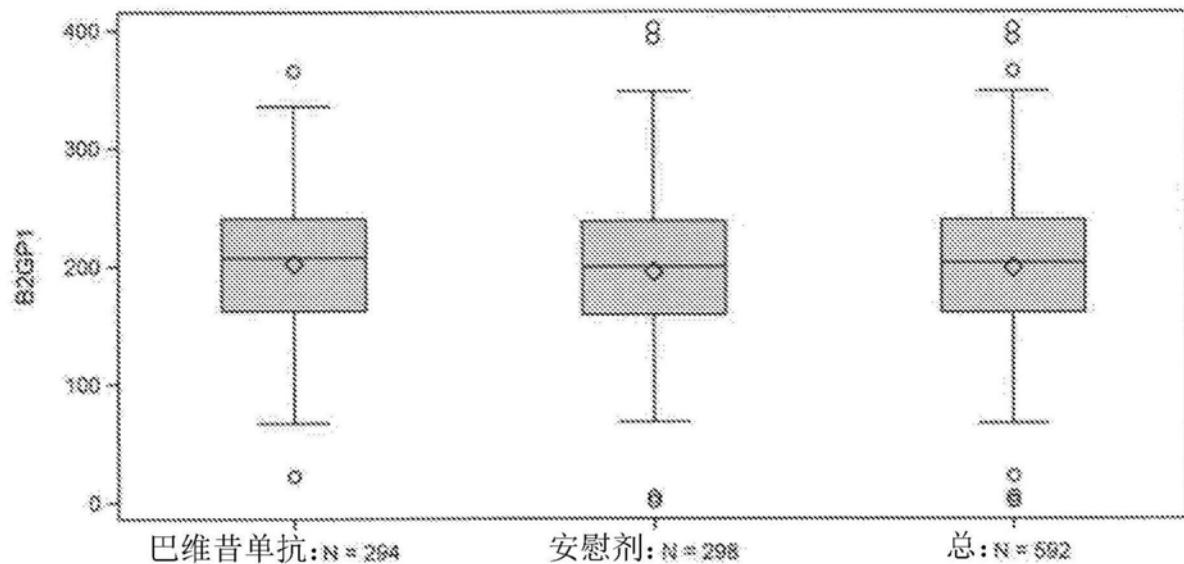


图17B

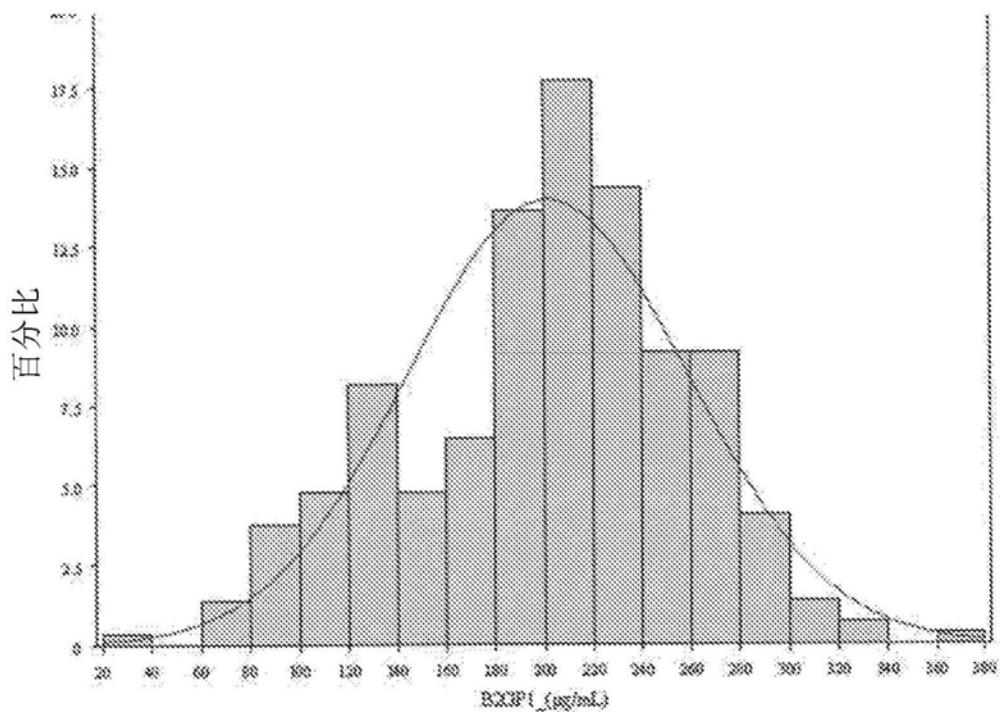


图17C

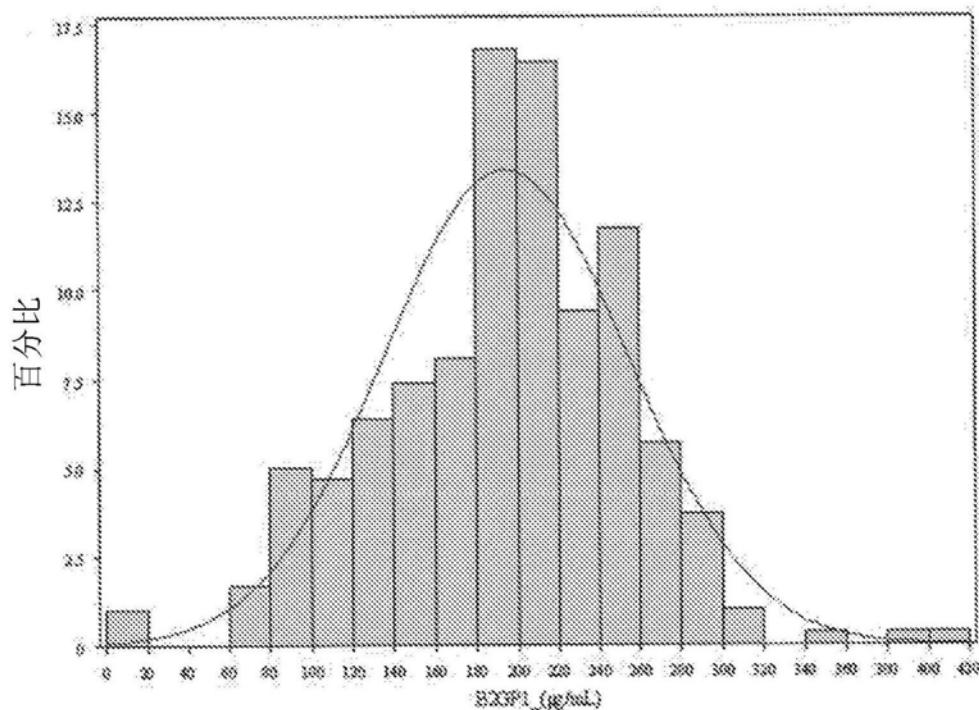


图17D

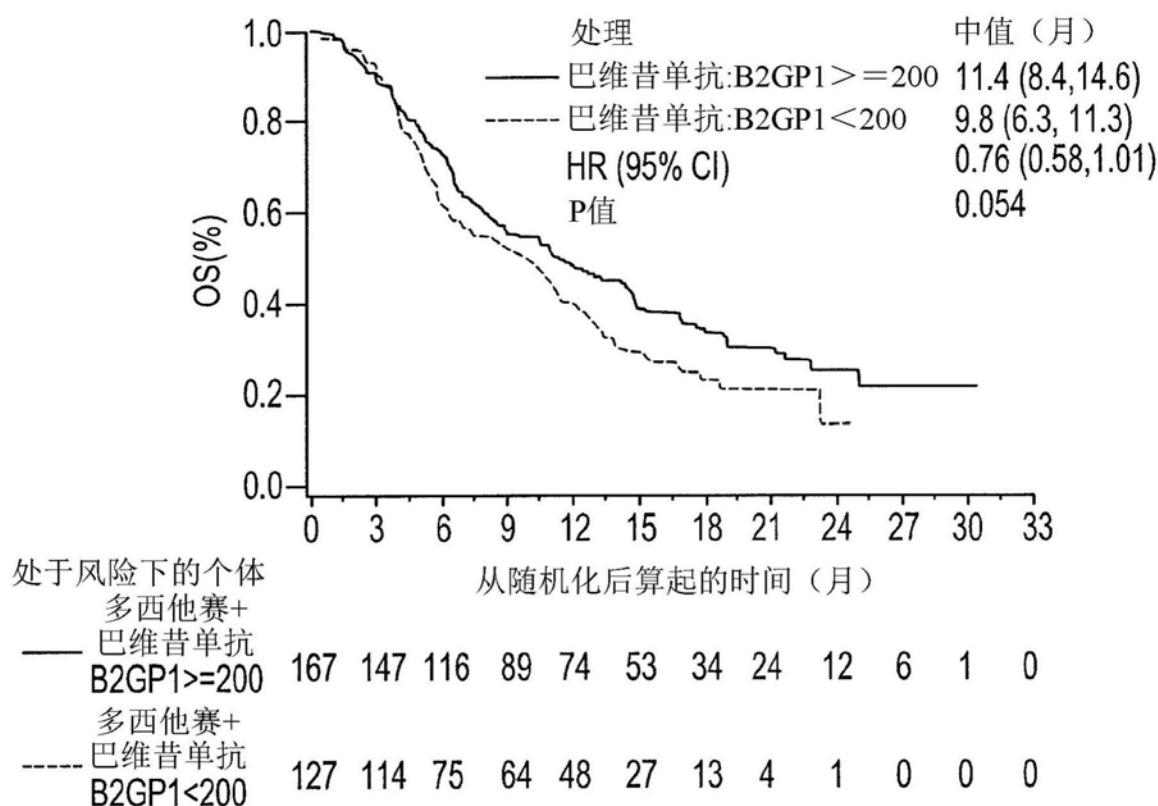


图18A

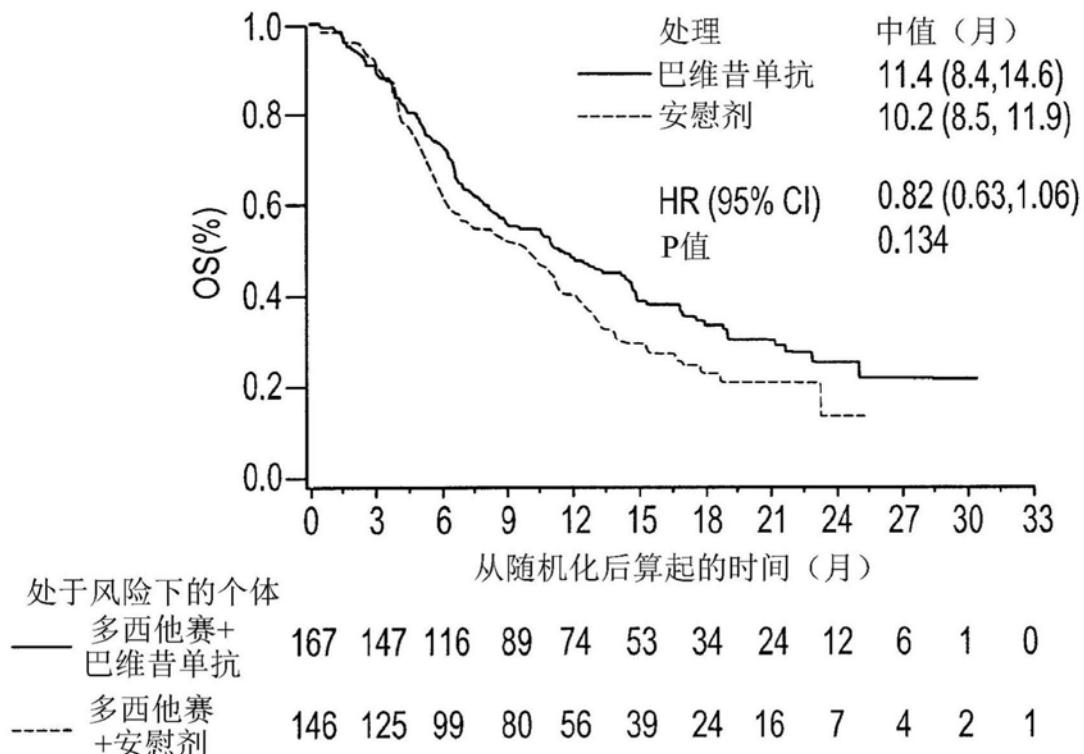


图18B

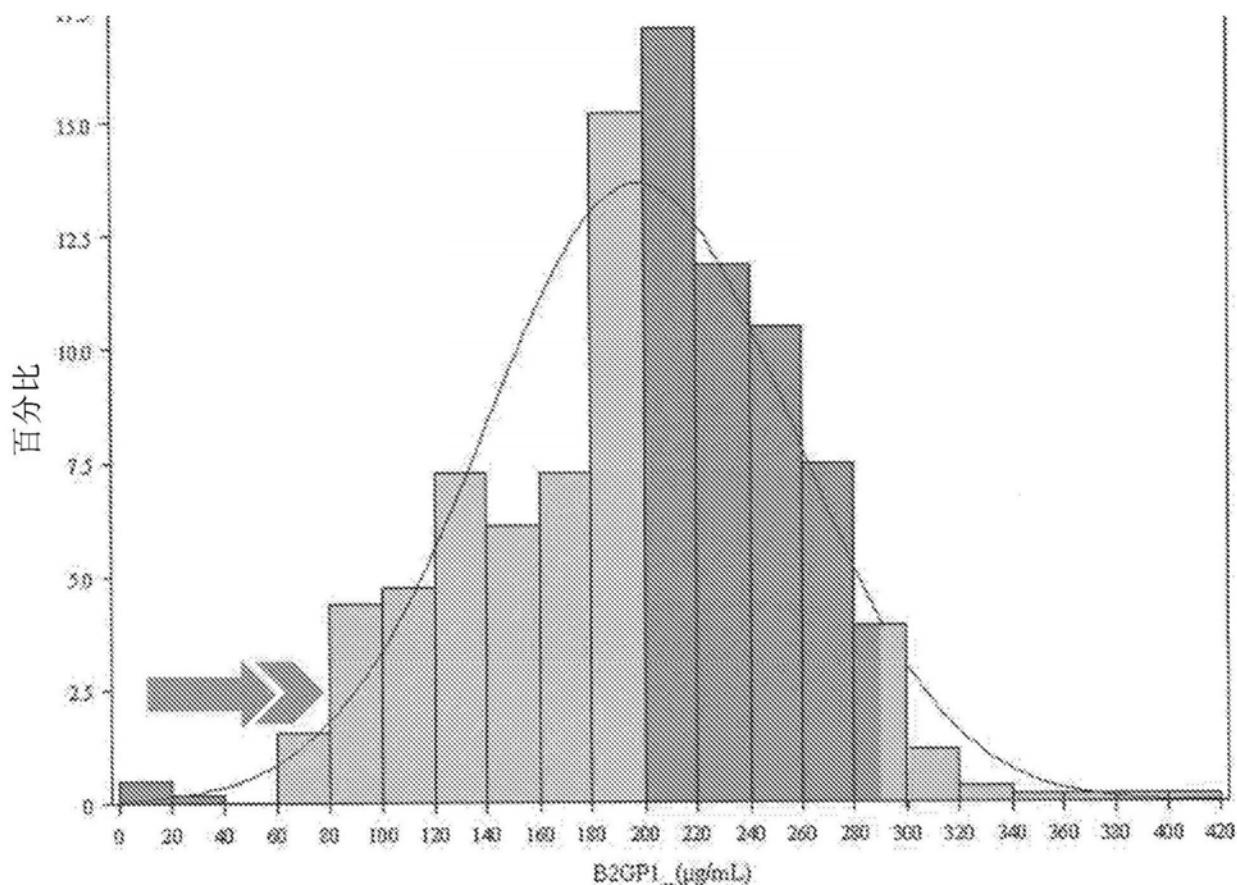


图19

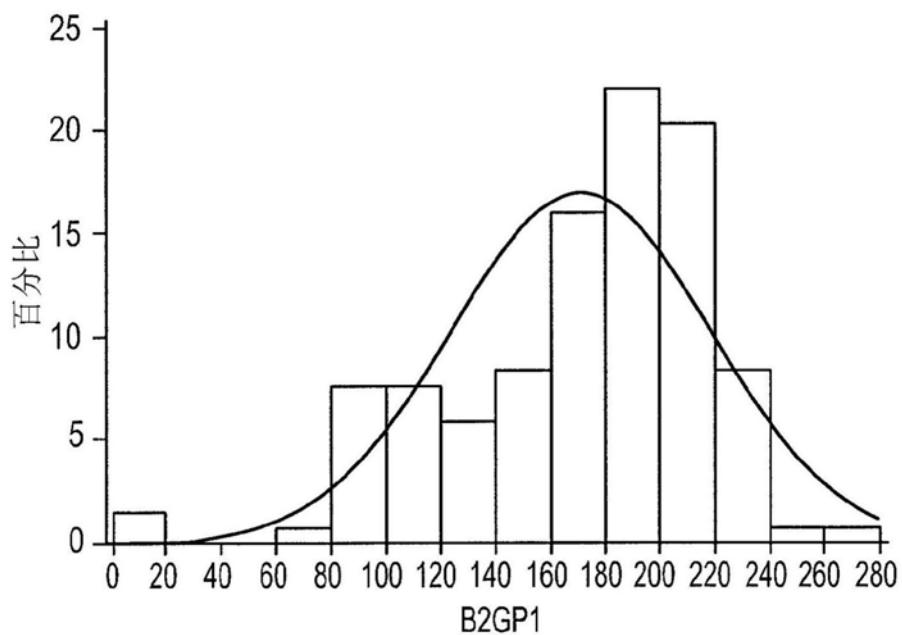


图20A

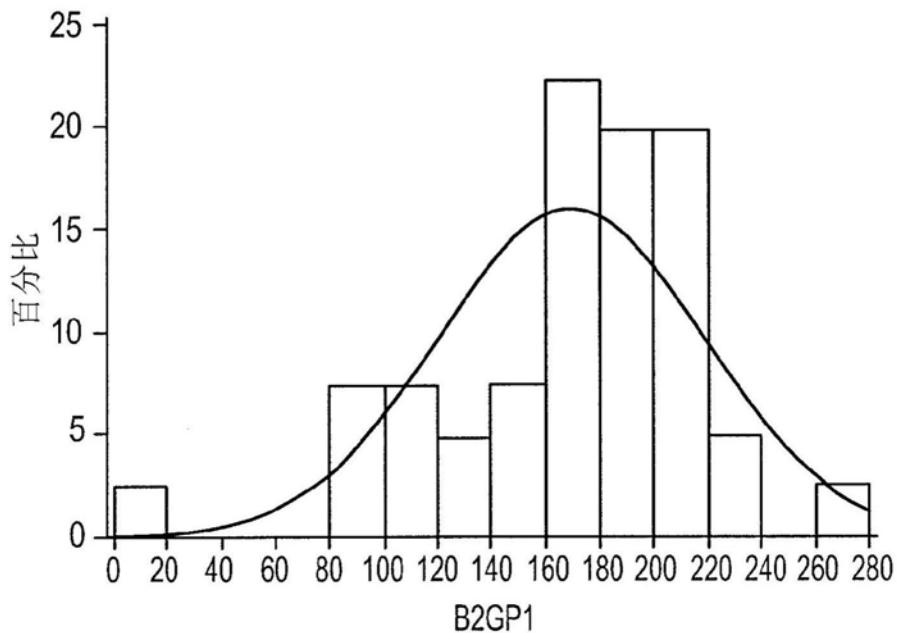


图20B

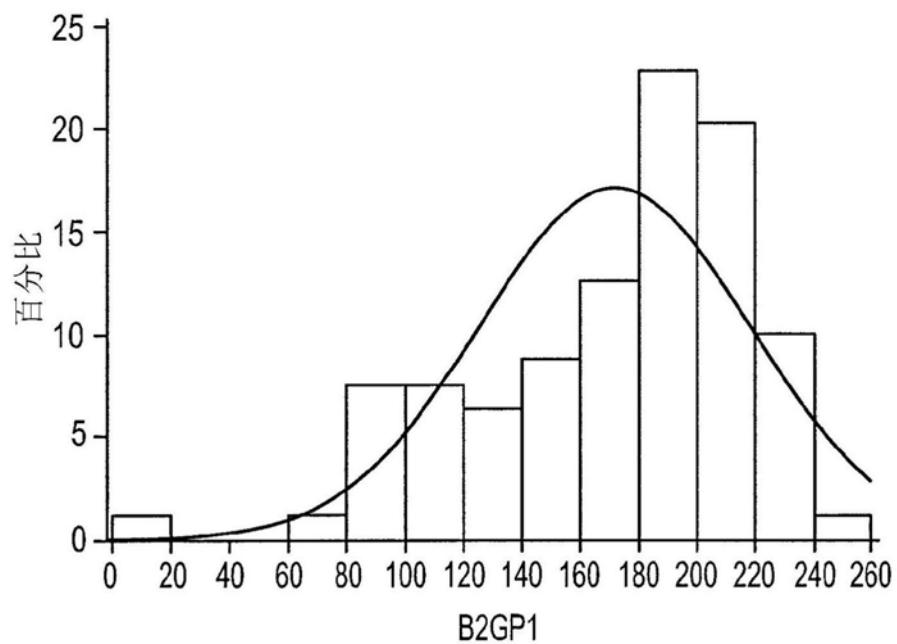


图20C

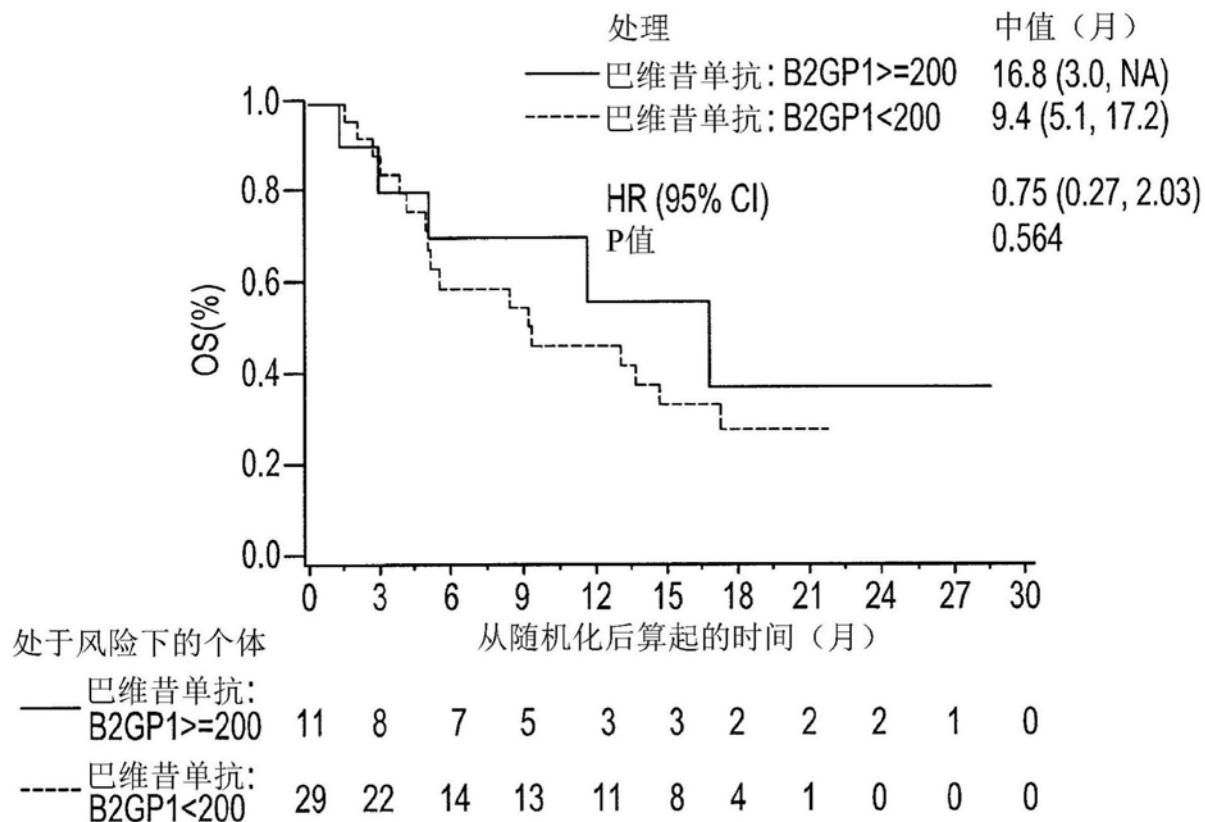


图21A

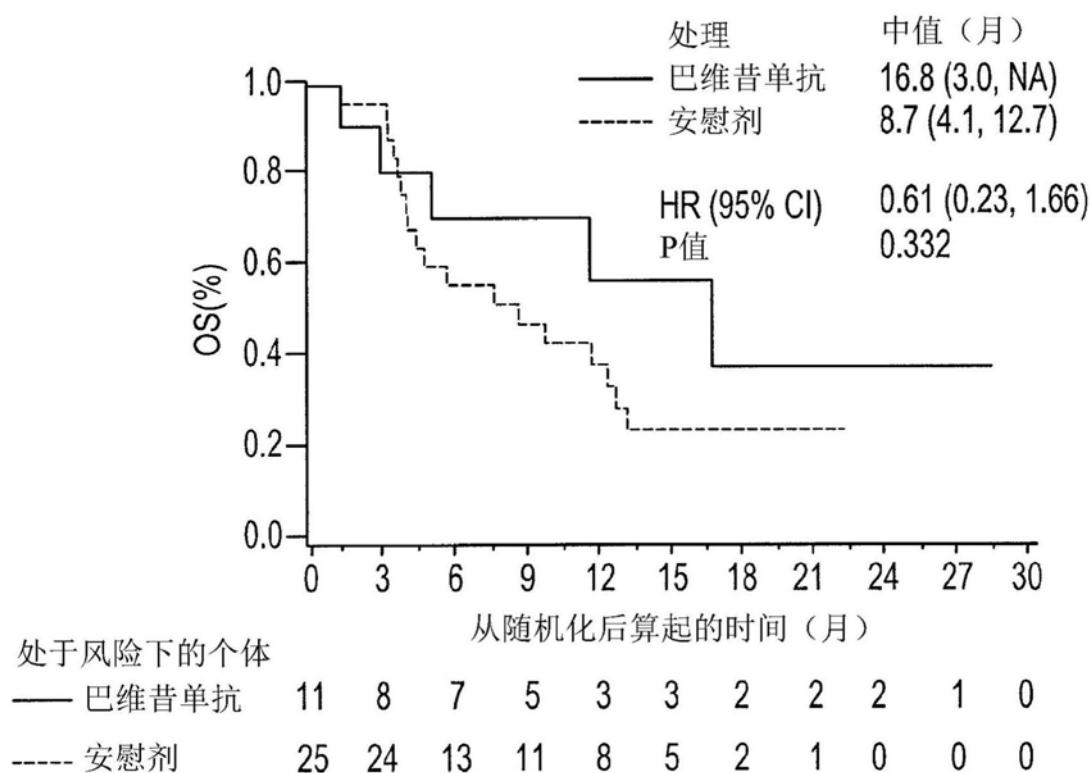


图21B

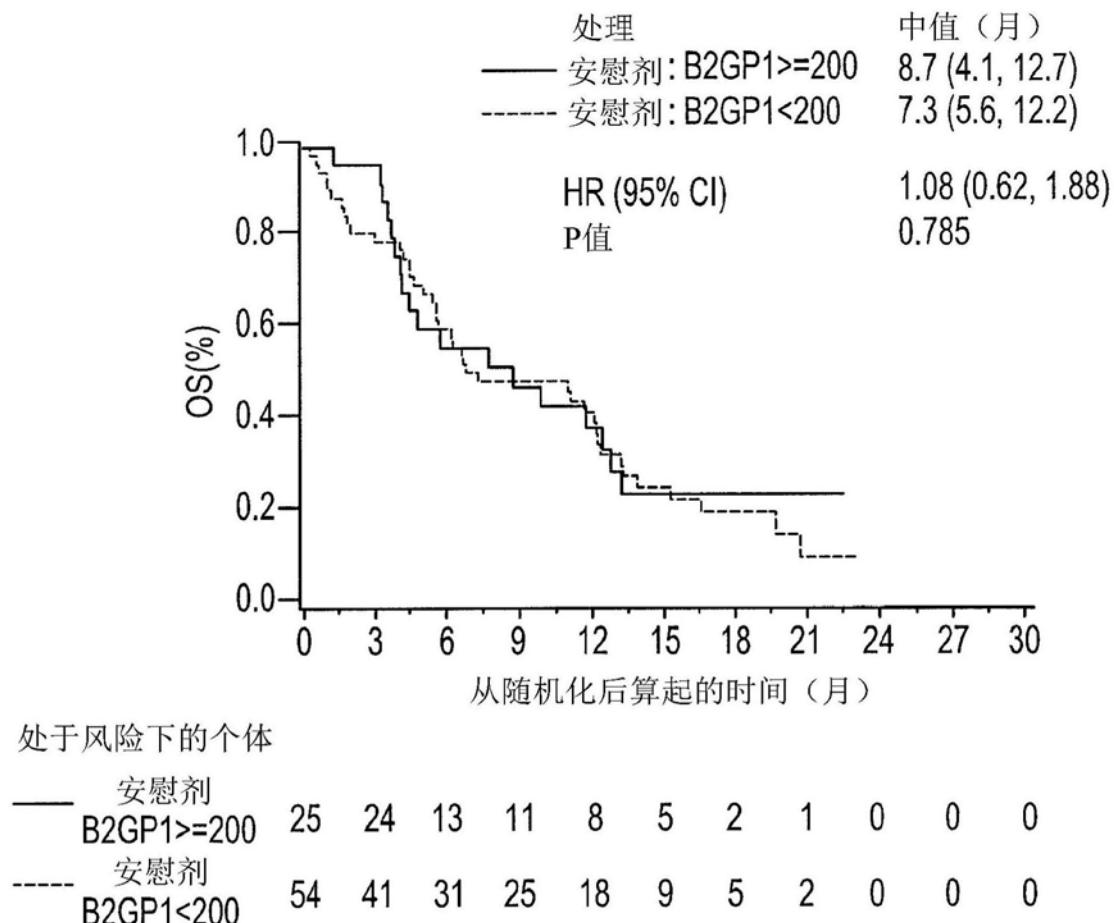


图21C

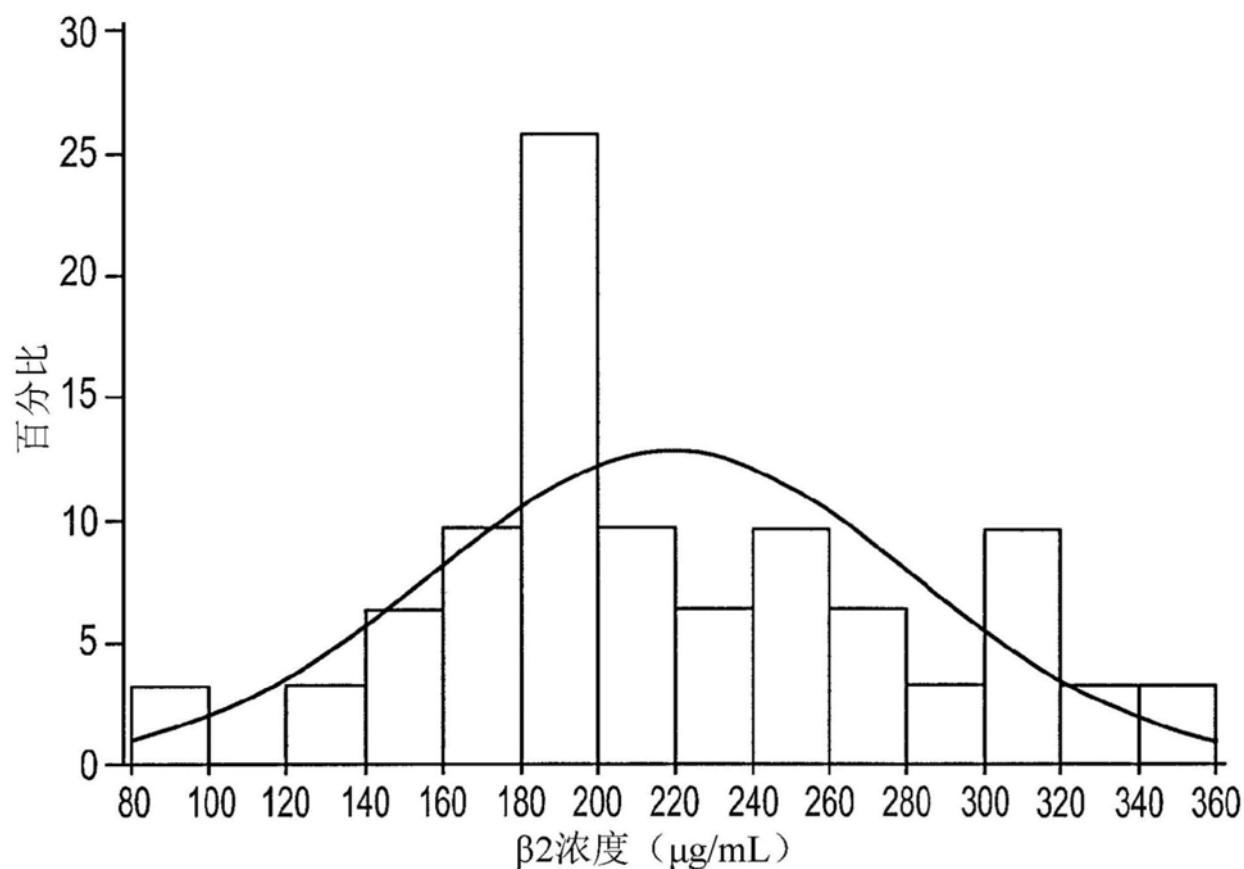


图22

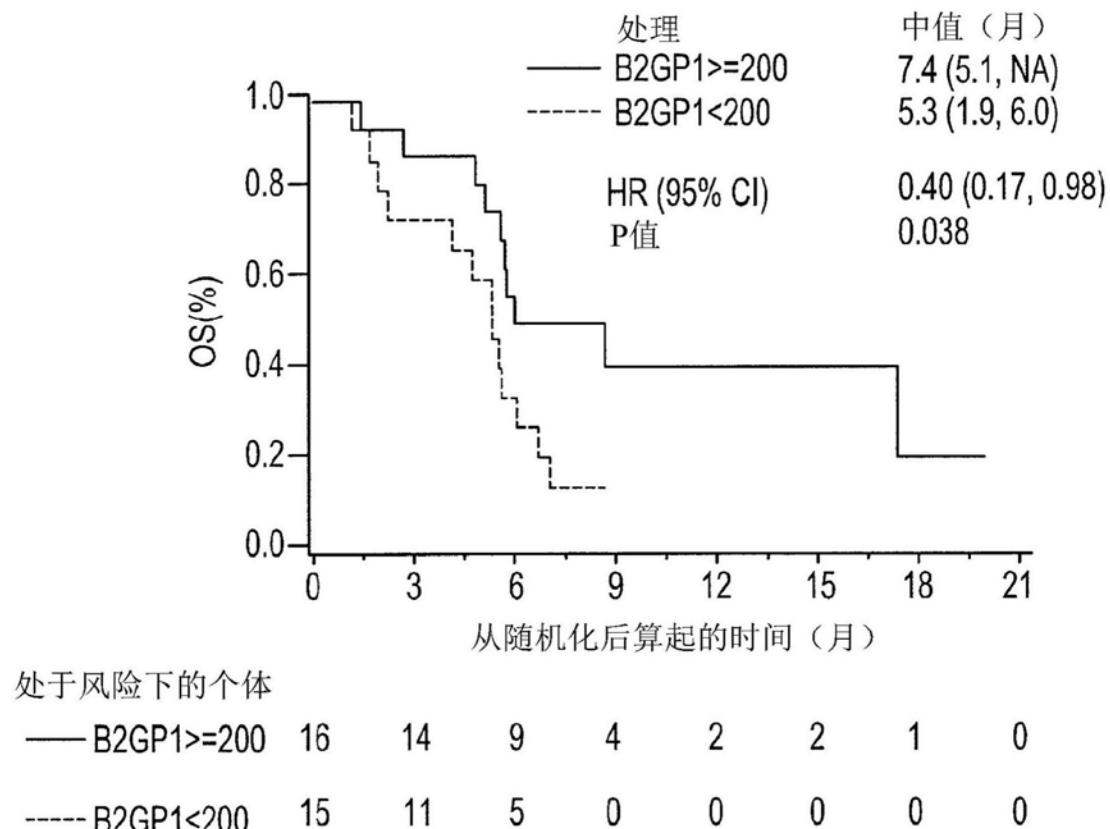


图23

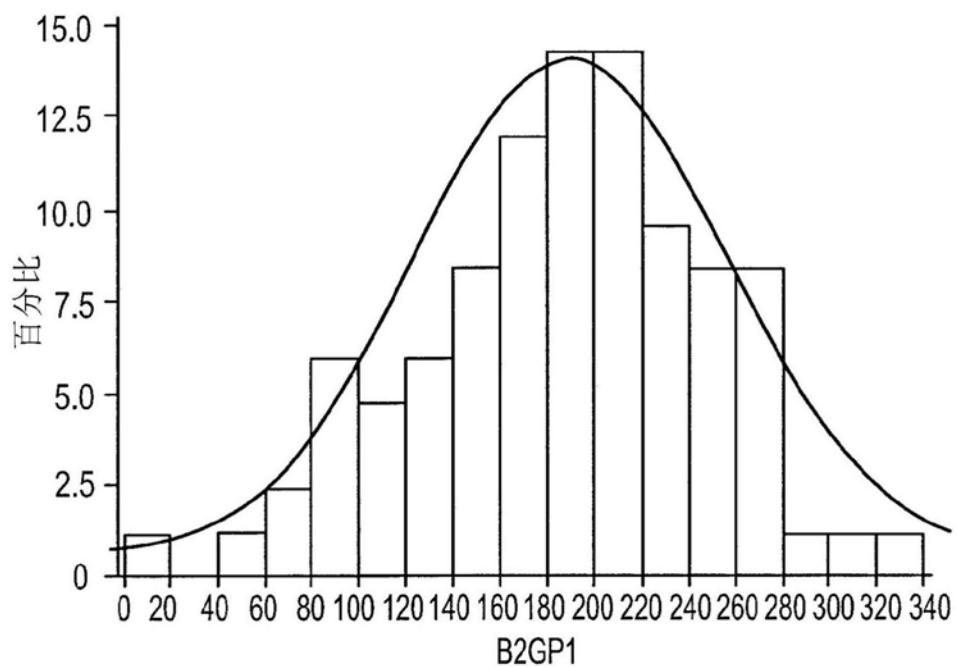


图24A

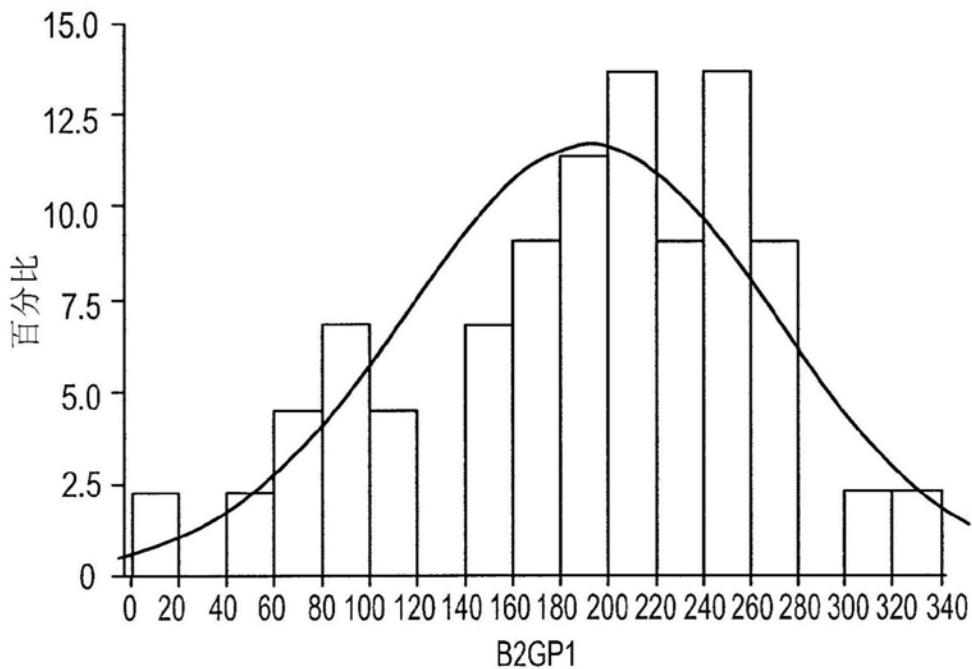


图24B

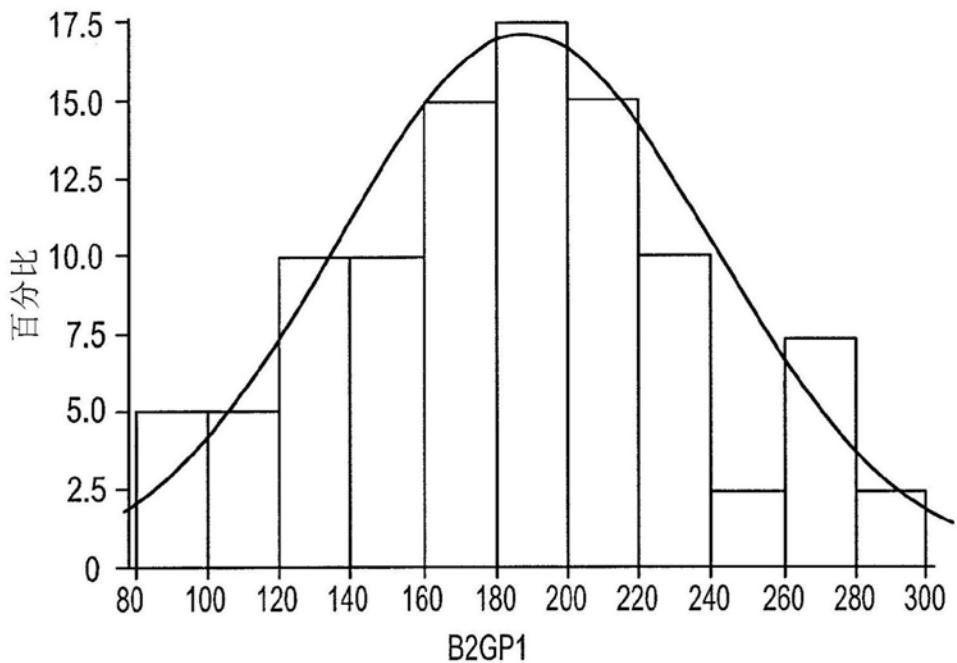


图24C

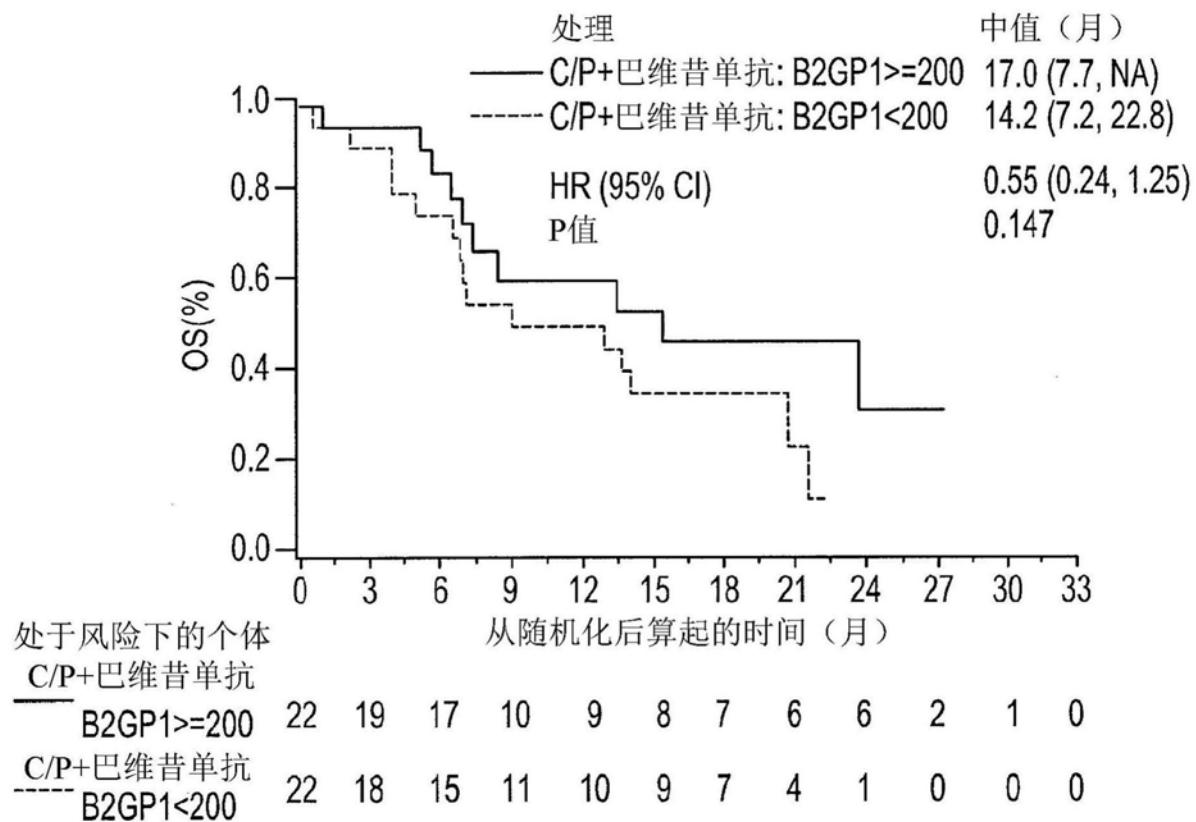


图25A

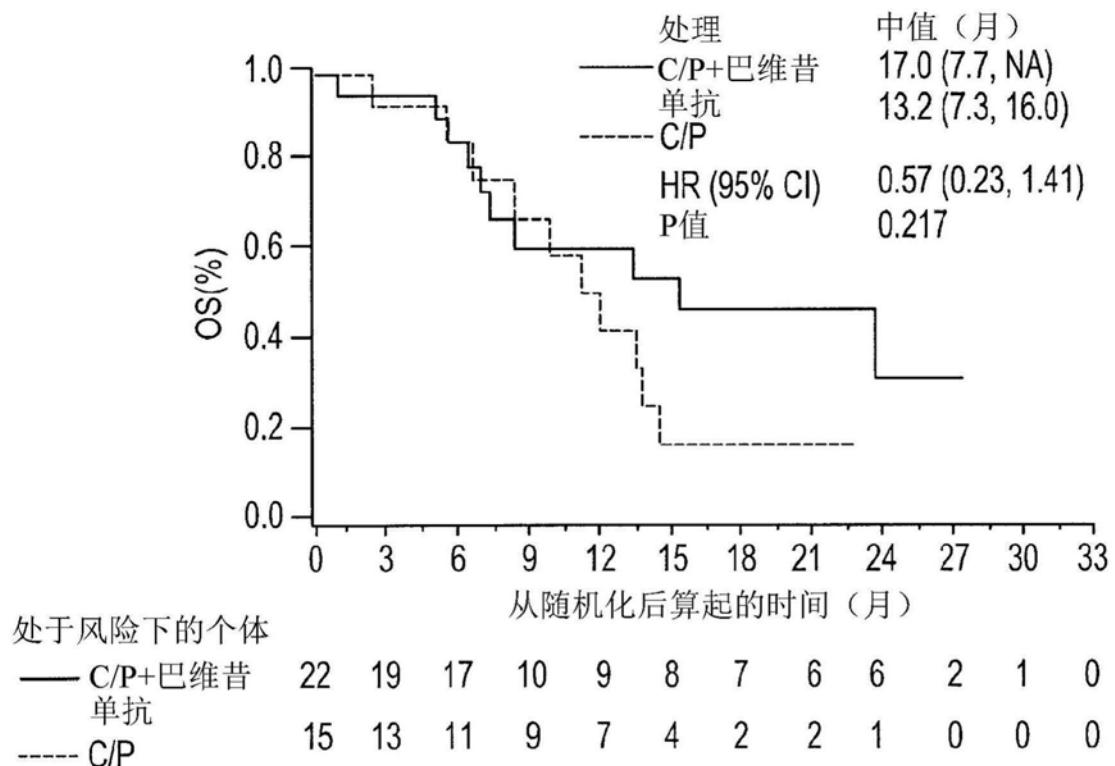


图25B

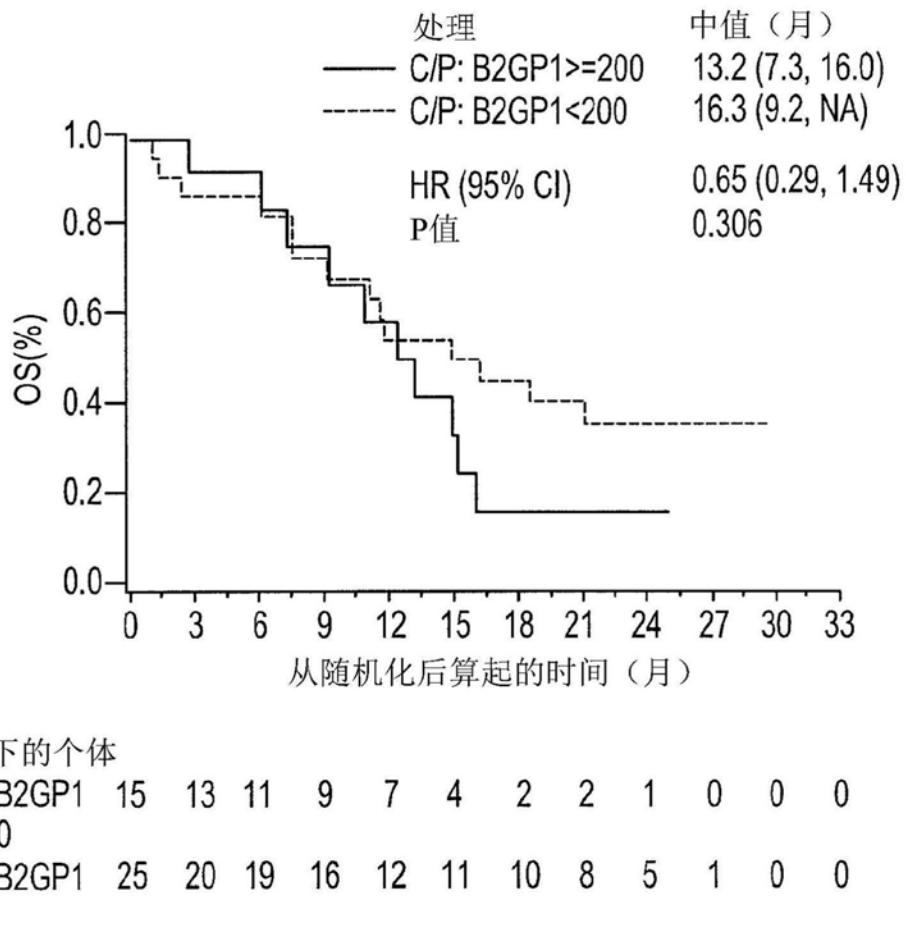


图25C

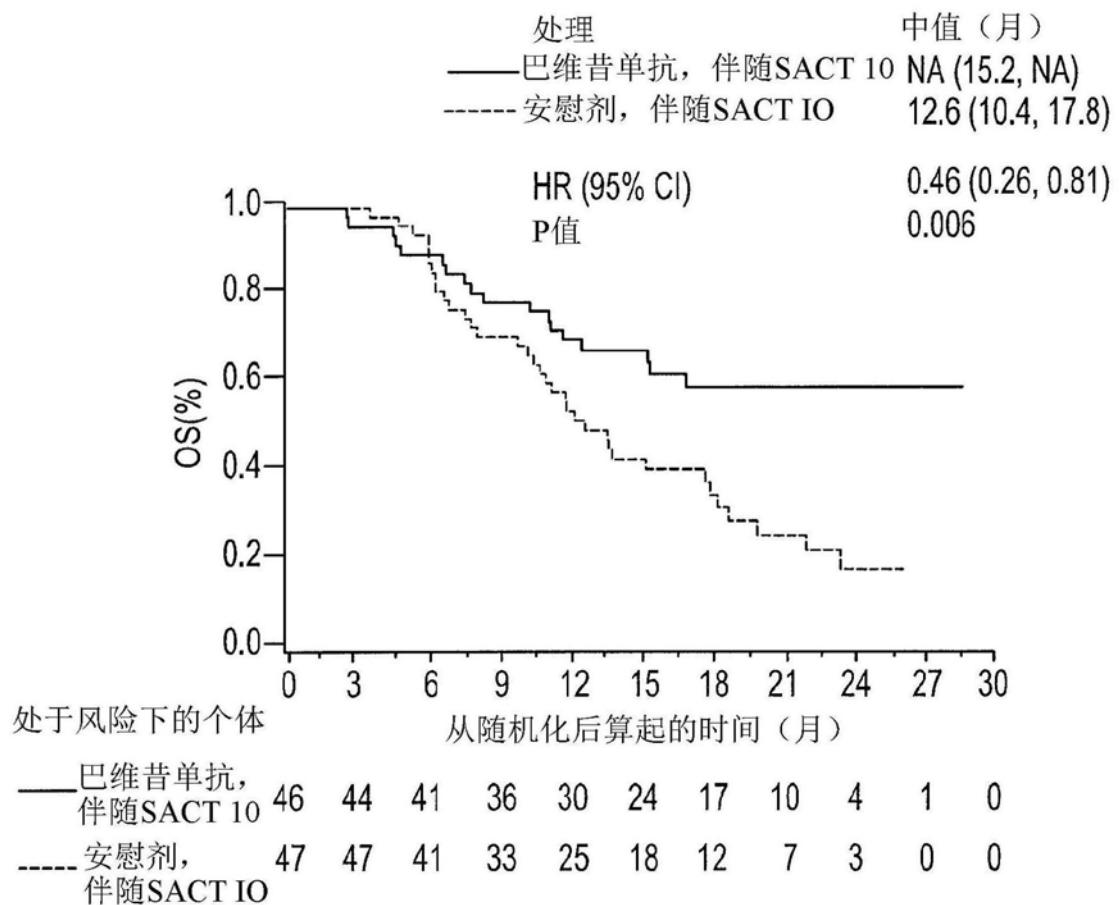


图26

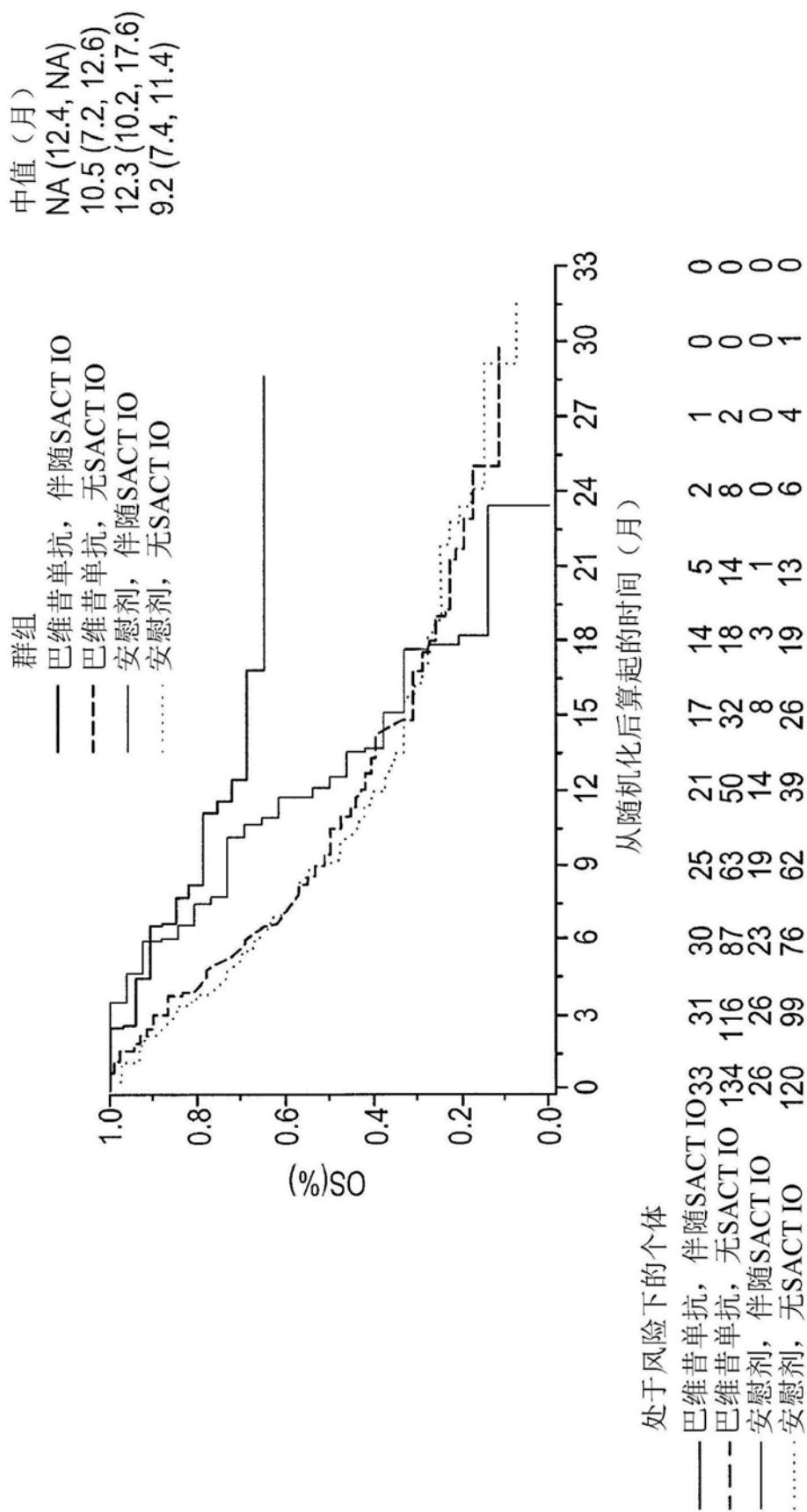


图27