



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107921120 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680048975.9

(22)申请日 2016.06.24

(30)优先权数据

62/184018 2015.06.24 US

62/249546 2015.11.02 US

62/250566 2015.11.04 US

62/263307 2015.12.04 US

62/331489 2016.05.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/039165 2016.06.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/210223 EN 2016.12.29

(71)申请人 詹森生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 T.阿马迪 T.卡斯纽夫

H.M.洛克霍斯特 T.穆蒂斯

A.萨斯塞

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 彭昶 黄希贵

(51)Int.Cl.

A61K 39/39(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

权利要求书5页 说明书53页

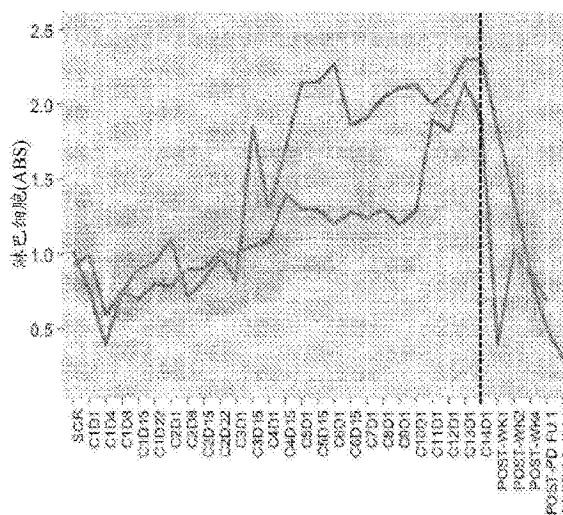
序列表24页 附图33页

(54)发明名称

用特异性结合CD38的抗体免疫调节和治疗
实体瘤

(57)摘要

本发明涉及用特异性结合CD38的抗体免疫
调节和治疗患有实体瘤的患者的方法。



1. 一种治疗患有实体瘤的患者的方法,所述方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗所述实体瘤的时间。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体在所述患者体内引起免疫应答。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述免疫应答是效应T细胞(Teff)应答。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述Teff应答由CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞介导。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述Teff应答由所述CD8⁺T细胞介导。

6. 根据权利要求3所述的方法,其中所述Teff应答是所述CD8⁺T细胞数量的增加、CD8⁺T细胞增殖的增加、T细胞克隆扩增的增加、CD8⁺记忆细胞形成的增加、抗原依赖性抗体产量的增加、细胞因子产量的增加、趋化因子产量的增加或白细胞介素产量的增加。(通过哪些细胞)

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体抑制免疫抑制细胞的功能。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述免疫抑制细胞是调节性T细胞(Treg)。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述Treg是CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} T细胞。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述Treg表达CD38。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中通过杀伤所述Treg来抑制Treg功能。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中杀伤所述Treg由抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)介导。

13. 根据权利要求7所述的方法,其中所述免疫抑制细胞是骨髓源的抑制细胞(MDSC)。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述MDSC是CD11b⁺HLADR⁻CD14⁻CD33⁺CD15⁺细胞。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述CD11b⁺HLADR⁻CD14⁻CD33⁺CD15⁺细胞表达CD38。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中通过杀伤所述MDSC来抑制MDSC功能。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中杀伤MDSC由ADCC介导。

18. 根据权利要求7所述的方法,其中所述免疫抑制细胞是调节性B细胞(Breg)。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述Breg是CD19⁺CD24⁺CD38⁺细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中通过杀伤所述Breg来抑制Breg功能。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中杀伤所述Breg由ADCC介导。

22. 根据权利要求7所述的方法,其中所述免疫抑制细胞存在于骨髓或外周血中。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述实体瘤是黑色素瘤、肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非鳞状NSCLC、结直肠癌、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、胃部癌症、卵巢癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈部的鳞状细胞癌、食道癌或胃肠道癌、乳腺癌、输卵管癌、脑癌、尿道癌、泌尿生殖系统癌、子宫内膜异位症、宫颈癌或癌症的转移性病变。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述实体瘤缺少可检测的CD38表达。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体是非激动性抗体。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述非激动性抗体以统计学上不显著的方式诱导外周血单核细胞样本的体外增殖。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体与包含为SEQ ID NO:4的重链可变区(VH)和为SEQ ID NO:5的轻链可变区(VL)的抗体竞争结合至CD38。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体至少结合至人CD38 (SEQ ID NO:1)的区域SKRNIQFSCKNIYR (SEQ ID NO:2)和区域EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO:3)。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体包含分别为SEQ ID NO:6、7、8、9、10和11的重链互补决定区(HCDR)1、HCDR2、HCDR3、轻链互补决定区(LCDR)1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL。

31. 根据权利要求1至26中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体包含以下序列的所述HCDR1、所述HCDR2、所述HCDR3、所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3:

- a) 为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;
- b) 为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;
- c) 为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL;或者
- d) 为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体包含:

- a) 为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;
- b) 为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;
- c) 为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL;或者
- d) 为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。

33. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体与第二治疗剂联合施用。

34. 根据权利要求33所述的方法, 其中所述第二治疗剂是化学治疗剂、靶向抗癌疗法、用于治疗实体瘤的标准护理药物、或免疫检查点抑制剂。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述免疫检查点抑制剂是抗-PD-1抗体、抗-PD-L1抗体、抗-PD-L2抗体、抗-LAG3抗体、抗-TIM3抗体、或抗-CTLA-4抗体。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述免疫检查点抑制剂是抗-PD-1抗体。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述抗-PD-1抗体包含:

- a) 为SEQ ID NO:22的VH和为SEQ ID NO:23的VL;
- b) 为SEQ ID NO:24的VH和为SEQ ID NO:25的VL;
- c) 为SEQ ID NO:32的VH和为SEQ ID NO:33的VL;或者
- d) 为SEQ ID NO:34的VH和为SEQ ID NO:35的VL。

38. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述免疫检查点抑制剂是抗-PD-L1抗体。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述抗-PD-L1抗体包含:

- a) 为SEQ ID NO:26的VH和为SEQ ID NO:27的VL;

- b) 为SEQ ID NO:28的VH和为SEQ ID NO:29的VL;或者
- c) 为SEQ ID NO:30的VH和为SEQ ID NO:31的VL。
40. 根据权利要求35所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是抗-PD-L2抗体。
41. 根据权利要求35所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是抗-LAG3抗体。
42. 根据权利要求35所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是抗-TIM-3抗体。
43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述抗-TIM-3抗体包含:
- a) 为SEQ ID NO:36的VH和为SEQ ID NO:37的VL;或者
- b) 为SEQ ID NO:38的VH和为SEQ ID NO:39的VL。
44. 根据权利要求33至43中任一项所述的方法,其中所述第二治疗剂同时施用、依序施用或分开施用。
45. 根据权利要求1至44中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体静脉内施用。
46. 根据权利要求1至44中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体以包含所述特异性结合CD38的抗体和透明质酸酶的药物组合物皮下施用。
47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述透明质酸酶是SEQ ID NO:40的rHuPH20。
48. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其中所述患者用放射疗法治疗或已经用放射疗法治疗。
49. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其中所述患者已经进行或将进行手术。
50. 一种抑制免疫抑制细胞的活性的方法,所述方法包括使所述免疫抑制细胞与特异性结合CD38的抗体接触。
51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述免疫抑制细胞是Treg。
52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述Treg是CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} T细胞。
53. 根据权利要求50所述的方法,其中所述免疫抑制细胞是MDSC。
54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述MDSC是CD11b⁺HLADR⁻CD14⁻CD33⁺CD15⁺细胞。
55. 根据权利要求50所述的方法,其中所述免疫抑制细胞是Breg。
56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述Breg是CD19⁺CD24⁺CD38⁺细胞。
57. 根据权利要求50至56中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体是非激动性抗体。
58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述非激动性抗体以统计学上不显著的方式诱导外周血单核细胞样本的体外增殖。
59. 根据权利要求50至58中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体与包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的抗体竞争结合至CD38。
60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体至少结合至人CD38 (SEQ ID NO:1)的区域SKRNIQFSCKNLYR (SEQ ID NO:2) 和区域EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO:3)。
61. 根据权利要求50至60中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体包含分别为SEQ ID NO:6、7、8、9、10和11的所述HCDR1、所述HCDR2、所述HCDR3、所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3氨基酸序列。
62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4

的VH和为SEQ ID NO:5的VL。

63. 根据权利要求50至58中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体包含以下序列的所述HCDR1、所述HCDR2、所述HCDR3、所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3:

- a) 为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;
- b) 为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;
- c) 为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL;或者
- d) 为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体包含:

- a) 为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;
- b) 为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;
- c) 为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL;或者
- d) 为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。

65. 一种增强患者体内免疫应答的方法,所述方法包括向所述患者施用特异性结合CD38的抗体。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述患者患有癌症或病毒感染。

67. 根据权利要求65或66所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体是非激动性抗体。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述非激动性抗体以统计学上不显著的方式诱导外周血单核细胞样本的体外增殖。

69. 根据权利要求65至68中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体与包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的抗体竞争结合至CD38。

70. 根据权利要求65至69中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体至少结合至人CD38 (SEQ ID NO:1) 的区域SKRNIQFSCIYR (SEQ ID NO:2) 和区域EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO:3)。

71. 根据权利要求65至70中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体包含分别为SEQ ID NO:6、7、8、9、10和11的所述HCDR1、所述HCDR2、所述HCDR3、所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3氨基酸序列。

72. 根据权利要求65至70中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL。

73. 根据权利要求65至68中任一项所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体包含以下序列的所述HCDR1、所述HCDR2、所述HCDR3、所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3:

- a) 为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;
- b) 为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;
- c) 为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL;或者
- d) 为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。

74. 根据权利要求73所述的方法,其中所述特异性结合CD38的抗体包含:

- a) 为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;
- b) 为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;
- c) 为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL;或者

d) 为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。

75. 一种治疗患有病毒感染的患者的方法, 所述方法包括向所述患者施用特异性结合CD38的抗体足以治疗所述病毒感染的时间。

76. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体是非激动性抗体。

77. 根据权利要求75或76所述的方法, 其中所述非激动性抗体以统计学上不显著的方式诱导外周血单核细胞样本的体外增殖。

78. 根据权利要求75至77中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体与包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的抗体竞争结合至CD38。

79. 根据权利要求75至78中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体至少结合至人CD38 (SEQ ID NO:1) 的区域SKRNIQFSCIYR (SEQ ID NO:2) 和区域EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO:3)。

80. 根据权利要求75至79中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体包含分别为SEQ ID NO:6、7、8、9、10和11的所述HCDR1、所述HCDR2、所述HCDR3、所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3氨基酸序列。

81. 根据权利要求75至80中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL。

82. 根据权利要求75至77中任一项所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体包含以下序列的所述HCDR1、所述HCDR2、所述HCDR3、所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3:

a) 为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;

b) 为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;

c) 为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL; 或者

d) 为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。

83. 根据权利要求82所述的方法, 其中所述特异性结合CD38的抗体包含:

a) 为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;

b) 为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;

c) 为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL; 或者

d) 为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。

用特异性结合CD38的抗体免疫调节和治疗实体瘤

技术领域

[0001] 本发明涉及用特异性结合CD38的抗体免疫调节和治疗实体瘤的方法。

背景技术

[0002] 免疫系统受共刺激和共抑制配体和受体的网络的严格控制。这些分子提供T细胞激活的次级信号,并提供正负信号的平衡网络以最大化针对感染和肿瘤的免疫应答,同时限制对自身的免疫(Wang等人,(2011年3月7日电子版)J Exp Med 208(3):577-92; Lepenies等人,(2008)Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 8:279-288)。

[0003] 随着抗-CTLA-4和抗-PD-1抗体YERVOY[®](ipilimumab)、KEYTRUDA[®](pembrolizumab)和OPDIVO[®](nivolumab)的批准,靶向T细胞中的协同抑制途径以促进抗肿瘤免疫应答的治疗实体瘤的免疫检查点疗法已推动癌症患者的临床护理进步。虽然抗-PD-1/PD-L1抗体在患有多发性实体瘤的患者中表现出令人鼓舞的临床应答,但是应答率仍然相当低,在经预处理的患者中为约15%至20%(Swaika等人,(2015)Mol Immunol doi:10.1016/j.molimm.2015.02.009)。

[0004] 虽然自然杀伤细胞(NK)、树突状细胞(DC)和效应T细胞能够驱动有效的抗肿瘤应答,但肿瘤细胞通常诱导免疫抑制性微环境,从而有利于免疫细胞中的免疫抑制性群体诸如骨髓源的抑制细胞(MDSC)、调节性T细胞(Treg)或调节性B细胞(Breg)的发育,这些免疫抑制性群体与癌症患者和实验性肿瘤模型中的肿瘤免疫耐受性和免疫疗法方案失败有关。

[0005] 因此,仍然需要开发诱导针对肿瘤的适应性免疫应答或靶向免疫抑制性免疫细胞的新的癌症免疫疗法。

发明内容

[0006] 本发明提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体。

[0007] 本发明还提供了用于治疗患有调节性T细胞(Treg)介导的疾病的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体。

[0008] 本发明还提供了用于治疗患有骨髓源的抑制细胞(MDSC)介导的疾病的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体。

[0009] 本发明还提供了用于治疗患有调节性B细胞(Breg)介导的疾病的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体。

[0010] 本发明还提供了抑制调节性T细胞(Treg)的活性的方法,该方法包括使Treg与特异性结合CD38的抗体接触。

[0011] 本发明还提供了抑制骨髓源的抑制细胞(MDSC)的活性的方法,该方法包括使MDSC与特异性结合CD38的抗体接触。

[0012] 本发明还提供了抑制调节性B细胞(Breg)的活性的方法,该方法包括使Breg与特异性结合CD38的抗体接触。

[0013] 本发明还提供了增强患者体内的免疫应答的方法,该方法包括向患者施用特异性结合CD38的抗体。

[0014] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括通过向患者施用特异性结合CD38的抗体来减少患者体内Treg细胞的数量。

[0015] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括通过向患者施用特异性结合CD38的抗体来减少患者体内骨髓源的抑制细胞(MDSC)的数量。

[0016] 本发明还提供了抑制免疫抑制细胞的活性的方法,该方法包括使免疫抑制细胞与特异性结合CD38的抗体接触。

[0017] 本发明还提供了治疗患有病毒感染的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用特异性结合CD38的抗体。

附图说明

[0018] 图1示出了响应于8mg/kg(上线)或16mg/kg(下线)剂量处的DARZALEX™(达雷木单抗)治疗,患者体内淋巴细胞的中位数随时间推移增加并且在治疗结束后淋巴细胞数量恢复到基线。研究:SIRIUS。X轴指示时间,表示为治疗周期和每个治疗周期内给药的天数(C1D1:第1周期第1天;C1D4:第1周期第4天,等等)。SCR:基线;EOT:治疗结束;WK:周;POST-WK:在指定周的后治疗;post-PD FU:进展后的随访。以灰色阴影突出显示的区域指示对有应答者每次访视的数据点的25%至27%四分位数间距(IQR)。

[0019] 图2示出了对于每个单独的患者,用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者的外周血中CD3⁺ T细胞相对于基线的绝对计数的百分比(%)变化(浅灰色线)。研究:SIRIUS(MMY2002)。X轴指示时间,表示为治疗周期和每个治疗周期内给药的天数(C1D1:第1周期第1天;C1D4:第1周期第4天,等等)。WK:周;POST-WK:在指定周的后治疗;POST-PD FU:进展后的随访。黑线示出了所有患者的中位数%变化。

[0020] 图3示出了对于每个单独的患者,用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者的外周血中CD4⁺ T细胞相对于基线的绝对计数的百分比(%)变化(浅灰色线)。研究:SIRIUS。X轴指示时间,表示为治疗周期和每个治疗周期内给药的天数(C1D1:第1周期第1天;C1D4:第1周期第4天,等等)。WK:周;POST-TMT:后治疗。黑线示出了所有患者的中位数%变化。

[0021] 图4示出了对于每个单个的患者,用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者的外周血中CD8⁺ T细胞相对于基线的绝对计数的百分比(%)变化(浅灰色线)。研究:SIRIUS。X轴指示时间,表示为治疗周期和每个治疗周期内给药的天数(C1D1:第1周期第1天;C1D4:第1周期第4天,等等)。WK:周;Pre-PD FU:进展前的随访;Post-PD FU:进展后的随访。黑线示出了所有患者的中位数%变化。

[0022] 图5示出了在8mg/kg或16mg/kg剂量处的DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间,骨髓抽吸物中CD45⁺CD3⁺细胞的数量(以淋巴细胞的百分比测量)随时间推移增加。如图所示,该图包括有应答者和无应答者两者。研究:SIRIUS。X轴指示时间,表示为治疗周期和每个治疗周期内给药的天数(C2D22:第2周期第22天,等等)。SCR:基线;Post-PD FU1:进展后的随访。以灰色阴影突出显示的区域指示分别对在8mg/kg剂量处的无应答者、在16mg/kg剂量处的有应答者或在16mg/kg剂量处的无应答者的每次访视的数据点的25%至27%四分位数间距(IQR)。NR:无应答者;R:有应答者。

[0023] 图6示出了在8mg/kg或16mg/kg剂量处的DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间,骨髓抽吸物中CD45⁺CD3⁺CD8⁺细胞的数量(以淋巴细胞的百分比测量)随时间推移增加。如图所示,该图包括有应答者和无应答者两者。研究:SIRIUS。X轴指示时间,表示为治疗周期和每个治疗周期内给药的天数(C2D22:第2周期第22天,等等)。SCR:基线;Post-PD FU1:进展后的随访。以灰色阴影突出显示的区域指示分别对在8mg/kg剂量处的无应答者、在16mg/kg剂量处的有应答者或在16mg/kg剂量处的无应答者的每次访视的数据点的25%至27%四分位数间距(IQR)。NR:无应答者;R:有应答者。

[0024] 图7A示出了在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间以所有受治疗患者的中值表示的外周血中CD8⁺/Treg与CD8⁺/CD4⁺细胞的比率随时间推移增加。时间点:C1D1:第1周期第1天;C3D1:第3周期第1天;C4D1:第4周期第1天。研究:SIRIUS。SRC:基线。

[0025] 图7B示出了在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间以所有受治疗患者的中值表示的骨髓抽吸物中CD8⁺/Treg细胞的比率随时间推移增加。时间点:C1D1:第1周期第1天;C3D1:第3周期第1天;C4D1:第4周期第1天。研究:SIRIUS。

[0026] 图8A示出了如使用特定克隆细胞的丰度变化%(CIA)所测量的,与无应答者相比,有应答者的CD8⁺ T细胞克隆性增加。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0027] 图8B示出了在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗前后单个患者的CD8⁺ T细胞克隆性的倍数变化。有应答者用星号指示。克隆性测量为特定克隆细胞的丰度的倍数变化(CIA)。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0028] 图8C示出了与无应答者(B组)相比,有应答者(A组)在TCR库中具有使用CIA(丰度变化)进行测量的更大的总扩增。 $P=0.037$ 。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0029] 图8D示出了有应答者和无应答者中每种扩增T细胞克隆的丰度的绝对变化(CIA)之和。有应答者(A组)和无应答者(B组)之间的 $P=0.035$ 。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0030] 图8E示出了有应答者(A组)和无应答者(B组)中单个T细胞克隆的最大CIA。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0031] 图8F示出了与无应答者(B组)相比,有应答者(A组)具有使用最大% CIA测量的更大的单个克隆的最大扩增。 $P=0.0477$ 。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0032] 图9A示出了在基线处或者在治疗的第2周、第4周或第8周或者复发后,对DARZALEX™(达雷木单抗)无应答者(NR,黑方块)和具有至少最小应答的患者(MR,白方块)的外周血中CD8⁺初始细胞的百分比(%)。研究:GEN501,17名患者亚组。 $**p=1.82 \times 10^{-4}$ 。

[0033] 图9B示出了在基线处或者在治疗的第2周、第4周或第8周或者复发后,对DARZALEX™(达雷木单抗)无应答者(NR,黑方块)和具有至少最小应答的患者(MR,白方块)的外周血中CD8⁺中枢记忆细胞(Tem)的百分比。研究:GEN501,17名患者亚组。 $*p=4.88 \times 10^{-2}$ 。

[0034] 图9C示出了在基线处或者在治疗的第1周、第4周或第8周或者复发后外周血中HLA I类限制性CD8⁺ T细胞的百分比增加。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0035] 图9D示出了在基线处或治疗期间CD38⁺在外周血中的CD8⁺初始T细胞和CD8⁺中枢记忆细胞(Tem)中以低水平表达。研究:GEN501,17名患者亚组。MFI:平均荧光强度。

[0036] 图10A示出了FACS分析的直方图,其示出了基线处多发性骨髓瘤患者中Treg(CD3⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim})的频率(顶部直方图,P4细胞群)和Treg群内的CD38⁺ Treg的频率(底部直方图,P5细胞群)。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0037] 图10B示出了FACS分析的直方图,其示出了在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗后多发性骨髓瘤患者中Treg (CD3⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim})的频率(顶部直方图,P4细胞群)和Treg群内CD38⁺ Treg的频率(底部直方图,P5细胞群))。DARZALEX™(达雷木单抗)治疗耗尽CD38⁺ Treg。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0038] 图10C示出了在基线处或者在复发后的第1周、第4周、第8周或者在6个月的治疗结束(EOT)时,用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者体内CD38^{high}CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Treg的频率。CD38^{high}Treg频率随DARZALEX™(达雷木单抗)治疗而减小,并在EOT时恢复至基线。Y轴:来自CD3⁺ T细胞的CD38^{high}CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Treg的%。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0039] 图10D示出了在基线、治疗的第1周、第4周、第8周有应答者和无应答者中的CD8⁺/Treg细胞比率。在治疗的第8周,有应答者中的CD8⁺/Treg细胞比率明显高于无应答者(p=0.00955)。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0040] 图10E示出了与CD38-Treg或阴性对照相比,在存在CD38⁺ Treg的情况下效应细胞增殖被更有效地抑制。误差条表示标准错误。星号代表显著改变。样本从多个健康供体处获得。细胞增殖通过稀释羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)来评估。

[0041] 图11示出了骨髓源的抑制细胞(MDSC)存在于多发性骨髓瘤患者中(顶部图,框中的细胞),并且约一半的该细胞表达CD38(中图,框中的细胞)。在用DARZALEX™(达雷木单抗)的一次输注治疗的患者中,CD38^{high} MDSC细胞群耗尽(底部图,框中的细胞)。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0042] 图12示出了在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗1周、4周、或8周后,CD38^{high} MDSC (CD11b⁺HLADR-CD14-CD33⁺CD15⁺)的数量与基线相比减少,并且在治疗结束(EOT)后恢复至接近基线。复发患者仍表现出减少的CD38^{high} MDSC。黑方块:无应答者;白方块:对DARZALEX™(达雷木单抗)治疗具有至少最小应答的患者。垂线指示每组的中值。患者2、4、15、16和17表现出高的初始CD38^{high} MDSC细胞群。研究:GEN501,17名患者亚组。

[0043] 图13示出了具有最高CD38^{high} MDSC的患者(患者2、4、15、16和17)具有最高的无进展生存期(PFS)。这些患者对DARZALEX™(达雷木单抗)治疗具有部分应答(PR)或最小应答(MR)。SD:稳定疾病;PD:进行性疾病。X轴示出了每个单个编号患者的PFS。

[0044] 图14示出了MDSC对DARZALEX™(达雷木单抗)诱导的ADCC敏感。Daudi细胞在测定中用作靶细胞的阳性对照。测量细胞裂解%。

[0045] 图15A示出了在治疗的第1周、第4周和第8周,在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者中CD38⁺Breg耗尽。

[0046] 图15B示出了CD38⁺Breg在被刺激后分泌IL-10。

[0047] 图16A示出了在基线和治疗期间的指定时间处,通过CMV、EBV和流感病毒特异性(CEF) IFN- γ 在来自DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的具有VGPR的患者的PBMC中的产生来测量抗病毒应答。OD:光密度。白条:阴性对照;黑条:增加了CEF;虚线条:仅同种异体PBMC。Asterix指示统计意义上的显著改变。Pre 4,8,10=治疗的第4周、第8周或第10周。

[0048] 图16B示出了在基线和治疗期间的指定时间处,通过CMV、EBV和流感病毒特异性(CEF) IFN- γ 在来自DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的具有CR的患者的PBMC中的产生来测量抗病毒应答。OD:光密度。白条:阴性对照;黑条:增加了CEF;虚线条:仅同种异体PBMC。

Asterix指示统计意义上的显著改变。Pre 4,8,10=治疗的第4周、第8周或第10周。

[0049] 图16C示出了在基线和治疗期间的指定时间处,通过CMV、EBV和流感病毒特异性(CEF) IFN- γ 在来自DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的具有PD的患者的PBMC中的产生来测量抗病毒应答。OD:光密度。白条:阴性对照;黑条:增加了CEF;虚线条:仅同种异体PBMC。Ns:不显著。Pre 4,8=治疗的第4周或第8周。

[0050] 图16D示出了在基线和治疗期间的指定时间处,通过CMV、EBV和流感病毒特异性(CEF) IFN- γ 在来自DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的具有MR的患者的PBMC中的产生来测量抗病毒应答。OD:光密度。白条:阴性对照;黑条:增加了CEF;虚线条:仅同种异体PBMC。Ns:不显著。Pre 4,8=治疗的第4周或第8周。

[0051] 图16E示出了在基线和治疗期间的指定时间处,在来自DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的具有VGPR的患者的PBMC中增殖的病毒反应性T细胞的百分比(%)。白条:阴性对照;黑条:增加了CEF。Asterix指示统计意义上的显著改变。Pre 4,8,10=治疗的第4周、第8周或第10周。

[0052] 图16F示出了在基线和治疗期间的指定时间处,在来自DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的具有CR的患者的PBMC中增殖的病毒反应性T细胞的百分比(%)。白条:阴性对照;黑条:增加了CEF。Asterix指示统计意义上的显著改变。Pre 4,8,10=治疗的第4周、第8周或第10周。

[0053] 图17A示出了FACS分析的直方图,其示出了来自健康供体的自然杀伤细胞(NK)、单核细胞、B细胞和T细胞上的CD38表达水平。

[0054] 图17B示出了FACS分析的直方图,其示出了来自多发性骨髓瘤患者的浆细胞、自然杀伤细胞(NK)、单核细胞、B细胞和T细胞上的CD38表达水平。

[0055] 图17C示出了来自复发性和难治性多发性骨髓瘤患者的CD38+Treg、Breg、NK、B细胞和T细胞中CD38的平均荧光强度(MFI)的比较。与CD38+Treg、Breg和NK细胞相比,CD38在B细胞和T细胞中的表达水平较低。

[0056] 图18示出了PD-L1蛋白在来自有应答者(R)的PBMC样本中随时间推移下调而在来自无应答者(NR)的PBMC样本中随时间推移上调。SD:稳定疾病。C1D1:第1周期第1天;C3D1:第3周期第1天。Y轴示出log2蛋白浓度值。

具体实施方式

[0057] 如本说明书和所附权利要求中所用,除非内容另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代。因此,例如,对“一个细胞”的提及包括两个或更多个细胞的组合等等。

[0058] “CD38”是指人CD38蛋白(同义词:ADP-核糖基环化酶1、cADPr水解酶1、环状ADP-核糖水解酶1)。人CD38具有GenBank登录号NP_001766和SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。众所周知,CD38是单通II型膜蛋白,其具有代表胞质结构域的第1-21位氨基酸残基、代表跨膜结构域的第22-42位氨基酸残基,以及代表CD38的胞外结构域的第43-300位残基。

[0059] SEQ ID NO:1

[0060]

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGPGTTRKFPETVLARCVKYTEIHP

RHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYLA
DDLTCWGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVFKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKN STFGS
VEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRN IQFSCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

[0061] 如本文所用,“抗体”广义上是指并包括免疫球蛋白分子,具体包括单克隆抗体(包括鼠科动物单克隆抗体、人单克隆抗体、人源化单克隆抗体和嵌合单克隆抗体),抗体片段,双特异性或多特异性抗体,二聚、四聚或多聚抗体,单链抗体、结构域抗体,以及包含具有所需特异性的抗原结合位点的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰构型。

[0062] 免疫球蛋白可根据重链恒定结构域氨基酸序列被指定为五种主要种类,即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。IgA和IgG进一步亚分类为同种型IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。基于其恒定结构域的氨基酸序列,可将任何脊椎物种的抗体轻链指定为两种完全不同的类型即 κ 和 λ 中的一种。

[0063] “抗体片段”是指免疫球蛋白分子的一部分,其保留重链抗原结合位点和/或轻链抗原结合位点,诸如重链互补决定区(HCDR)1、2和3,轻链互补决定区(LCDR)1、2和3,重链可变区(VH)或轻链可变区(VL)。抗体片段包括:Fab片段,其是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段,其是包含通过铰链区处的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;Fd片段,其由VH和CH1结构域组成;Fv片段,其由抗体的单臂的VL和VH结构域组成;结构域抗体(dAb)片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989),其由VH结构域组成。VH和VL域可被工程化并经由合成接头连接在一起以形成各种类型的单链抗体设计,其中在VH结构域和VL结构域由单独的单链抗体构建体表达的情况下,VH/VL结构域在分子内或分子间配对,以形成单价抗原结合位点,诸如单链Fv(scFv)或双价抗体;例如在国际专利公布号W01998/44001、W01988/01649、W01994/13804和W01992/01047中所描述。使用本领域的技术人员熟知的技术获得这些抗体片段,并筛选出效用方式与全长抗体相同的片段。

[0064] “分离抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体或抗体片段(例如,特异性结合CD38的分离抗体基本上不含特异性结合人CD38之外的抗原的抗体)。然而,特异性结合CD38的分离抗体可能对其它抗原具有交叉反应性,诸如人CD38的直系同源物,诸如食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*) (食蟹猴)CD38。就双特异性抗体而言,双特异性抗体特异性结合两种感兴趣的抗原,并且基本上不含特异性结合除两种感兴趣抗原以外的抗原的抗体。此外,分离抗体可基本上不含其它细胞物质和/或化学物质。“分离抗体”涵盖分离至更高纯度的抗体,诸如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯度的抗体。

[0065] “特异性结合”、“特异性地结合”或“结合”是指抗体以比针对其它抗原更高的亲和力结合至某个抗原或该抗原内的表位。通常,抗体以约 1×10^{-8} M或更小(例如约 1×10^{-9} M或更小、约 1×10^{-10} M或更小、约 1×10^{-11} M或更小、或者约 1×10^{-12} M或更小)的平衡解离常数(K_D)结合至抗原或抗原内的表位,通常该 K_D 为该抗体结合至非特异性抗原(如BSA、酪蛋白)的 K_D 的至少百分之一。可使用标准程序来测量解离常数。然而,特异性地结合至抗原或抗原内的表位的抗体可能对其它相关的抗原具有交叉反应性,例如,对来自其它物种(同源)(诸如人或猴,例如食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*) (*cynomolgus*, cyno)、黑猩猩(*Pan troglodytes*) (*chimpanzee*, chimp))或狨猴(*Callithrix jacchus*) (*common marmoset*, marmoset)的相同抗原具有交叉反应性。虽然单特异性抗体特异性地结合一个抗原或一个

表位,而双特异性抗体特异性地结合两个不同的抗原或两个不同的表位。

[0066] 抗体可变区由被三个“抗原结合位点”中断的“框架”区组成。使用不同术语来定义抗原结合位点:三个在VH中(HCDR1、HCDR2、HCDR3)且三个在VL中(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的互补决定区(CDR)是基于序列变异性(Wu和Kabat,(1970) J Exp Med 132:211-50;Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1991);三个在VH(H1、H2、H3)中且三个在VL(L1、L2、L3)中的“超变区”、“HVR”或“HV”,是指抗体可变结构域中的在结构上超变的区域,如Chothia和Lesk所定义(Chothia和Lesk,(1987,) Mol Biol 196:901-17)。其它术语包括“IMGT-CDR”(Lefranc等人,(2003) Dev Comparat Immunol 27:55-77)和“特异性决定残基使用”(SDRU)(Almagro,(2004) Mol Recognit 17:132-43)。国际免疫遗传学(IMGT)数据库(<http://www.imgt.org>)提供了抗原结合位点的标准化编号和定义。CDR、HV和IMGT描述之间的对应关系在Lefranc等人,(2003) Dev Comparat Immunol 27:55-77中有所描述。

[0067] 如本文所用,“Chothia残基”是根据Al-Lazikani编号的抗体VL残基和VH残基(Al-Lazikani等人,(1997) J Mol Biol 273:927-48)。

[0068] “框架”或“框架序列”是可变区的除了被定义为抗原结合位点的那些序列之外的其余序列。因为抗原结合位点可以由如上所述的各种术语定义,所以框架的精确氨基酸序列取决于如何定义抗原结合位点。

[0069] “人源化抗体”是指其中抗原结合位点来源于非人物种且可变区框架来源于人免疫球蛋白序列的抗体。人源化抗体在框架区中可包含置换,使得该框架可能不是表达的人免疫球蛋白序列或种系基因序列的精确拷贝。

[0070] “人抗体”是指具有重链可变区和轻链可变区的抗体,其中框架和抗原结合位点均来源于人起源的序列。如果所述抗体包含恒定区,则该恒定区也来源于人起源的序列。

[0071] 人抗体包含“来源于”人起源的序列的重链可变区或轻链可变区,其中抗体的可变区得自使用人种系免疫球蛋白或重排免疫球蛋白基因的系统。此类系统包括在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库,以及转基因非人动物,诸如携带人免疫球蛋白基因座的小鼠。在与人种系免疫球蛋白基因或重排免疫球蛋白基因进行比较时,人抗体可包含由于例如天然存在的体细胞突变或者在框架或抗原结合位点中特意引入置换或两者所引起的氨基酸差异。通常,“人抗体”的氨基酸序列与由人种系免疫球蛋白基因或重排免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在一些情况下,“人抗体”可包含由人框架序列分析得到的共有框架序列(例如Knappik等人,(2000) J Mol Biol 296:57-86中所述);或结合到展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库中的合成HCDR3(例如Shi等人,(2010) J Mol Biol 397:385-96和国际专利公布W02009/085462中所述)。

[0072] 来源于人免疫球蛋白序列的人抗体可使用系统诸如噬菌体展示结合合成的CDR和/或合成的框架来生成,或者可对其进行体外诱变以改善抗体特性,从而得到并非天然存在于体内整套人抗体种系内的抗体。

[0073] “人抗体”的定义中不包括抗原结合位点来源于非人物种的抗体。

[0074] “重组抗体”包括通过重组方法制备、表达、创建或分离的所有抗体,诸如从动物

(例如,小鼠或大鼠)分离的抗体,即人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体,或从其制备的杂交瘤分离的抗体(在下文中进一步描述);从经转化以表达抗体的宿主细胞分离的抗体;从重组的组合抗体文库分离的抗体;以及通过涉及将人免疫球蛋白基因序列与其它DNA序列剪接在一起的任何其它方法制备、表达、创建或分离的抗体,或者使用Fab臂交换体外生成的抗体,诸如双特异性抗体。

[0075] “单克隆抗体”是指单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力,或就双特异性单克隆抗体而言,显示出对于两种不同表位的双重结合特异性。因此,“单克隆抗体”是指在每条重链和每条轻链中具有单一氨基酸组成的抗体群,除了可能的熟知改变,诸如从抗体重链中除去C末端赖氨酸之外。单克隆抗体可在抗体群内具有异质糖基化。单克隆抗体可以是单特异性的或多特异性的,或者是单价的、二价的或多价的。术语“单克隆抗体”中包括双特异性抗体。

[0076] “表位”意指抗原的与抗体特异性结合的部分。表位通常由部分诸如氨基酸或多糖侧链的化学活性(诸如,极性、非极性或疏水性)表面基团组成,并且可具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。表位可由形成构象空间单元的连续和/或不连续氨基酸构成。对于不连续表位,来自抗原的线性序列的不同部分的氨基酸因蛋白质分子的折叠而在三维空间中靠近。

[0077] “变体”是指因一处或多处修饰(例如,置换、插入或缺失)而不同于参考多肽或参考多核苷酸的多肽或多核苷酸。

[0078] “与.....组合”意指将两种或更多种治疗剂以混合物一起、作为单一药剂同时或作为单一药剂以任何顺序依次施用给受治疗者。一般来讲,每种药剂将按针对该药剂确定的剂量和/或时间计划表进行施用。

[0079] “治疗”或“诊疗”是指治疗剂治疗,其中治疗对象将减慢(减轻)非期望的生理改变或疾病诸如肿瘤或肿瘤细胞的发展或扩散,或者用于在治疗期间提供有益或期望的临床结果。有益或期望的临床结果包括症状减轻、疾病程度减弱、疾病状态稳定(即未恶化)、疾病进展延迟或减慢、未转移、疾病状态改善或缓和,以及缓解(不论是部分缓解还是完全缓解),不论是可检测的还是不可检测的。“治疗”也可意指与受治疗者未接受治疗时的预期生存期相比延长生存期。需要治疗的那些受治疗者包括已经患有非期望的生理改变或疾病的那些受治疗者、以及倾向于患有生理改变或疾病的那些受治疗者。

[0080] “治疗有效量”是指在所需剂量和时间段有效实现期望的治疗结果的量。治疗有效量可根据以下因素变化:诸如个体的疾病状态、年龄、性别和重量,以及治疗剂或治疗剂组合在个体中引发期望的应答的能力。有效治疗剂或治疗剂组合的示例性指标包括,例如:患者健康状况的改善、肿瘤负荷的减少、肿瘤生长的遏止或减慢和/或癌细胞没有向身体其它部位转移的情况。

[0081] “抑制生长”(例如,涉及肿瘤细胞)是指与在不存在治疗药物或治疗药物的组合的情况下相同肿瘤细胞或肿瘤组织生长的下降或延迟相比,在与治疗药物或治疗药物的组合接触时体外或体内肿瘤细胞生长或肿瘤组织的可测量的下降或延迟。体外或体内肿瘤细胞或肿瘤组织生长的抑制可为至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

[0082] “调节性T细胞”或“Tregs”或“Treg”是指调节其它T细胞和/或其它免疫细胞的活

性(通常通过抑制其活性)的T淋巴细胞。Treg可以是CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} T细胞。应当理解,Treg可不完全限于这种表型,并且可表达Foxp3。

[0083] “效应T细胞”或“Teffs”或“Teff”是指可使肿瘤细胞从体内清除的执行免疫应答功能诸如杀伤肿瘤细胞和/或激活抗肿瘤免疫应答的T淋巴细胞。Teff可以是CD3⁺和CD4⁺或CD8⁺。Teff可分泌、包含或表达标志物,诸如IFN- γ 、粒酶B和ICOS。应当理解,Teff可不完全限于这些表型。

[0084] “Treg的功能”或“Treg功能”是指与调节宿主免疫应答和/或预防自身免疫有关的Treg的抑制功能。Treg的功能可以是抑制由CD8⁺ T细胞、自然杀伤(NK)细胞、~~MO~~细胞、B细胞或树突状细胞(DC)引起的抗肿瘤应答,或者抑制效应T细胞的增殖。

[0085] “Treg的抑制功能”或“抑制Treg功能”是指降低可通过本领域已知的常规技术来确定的动物或人类受治疗者体外或体内Treg功能的水平。Treg功能的水平可降低例如至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。“Treg的抑制功能”包括减少Treg的数量,例如经由抗体效应功能诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)杀伤Treg。

[0086] “骨髓源的抑制细胞”或“MDSCs”或“MDSC”是指来自造血细胞谱系并且表达巨噬细胞/单核细胞标志物CD11b和粒细胞标志物Gr-1/Ly-6G的特化细胞群。MDSC的表型可以是例如CD11b⁺HLA-DR-CD14⁻CD33⁺CD15⁺。MDSC低表达或不可检测的表达成熟的MHC II类抗原递呈细胞标志物和F480。MDSC是骨髓谱系的未成熟细胞,并且可进一步分化成若干细胞类型,包括巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、单核细胞或粒细胞。MDSC可在人和动物的正常成年骨髓中或在常规的造血部位(诸如脾)中天然存在。

[0087] “MDSC的抑制功能”或“抑制MDSC功能”是指降低可通过本领域已知的常规技术来确定的动物或人类受治疗者体外或体内MDSC功能的水平。MDSC功能的水平可降低例如至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。“MDSC的抑制功能”包括减少MDSC的数量,例如通过抗体效应功能诸如ADCC杀伤MDSC。MDSC可通过各种机制抑制T细胞应答诸如增殖、克隆扩增或细胞因子的产生,所述机制诸如产生反应性氧物质、过氧化亚硝酸盐,由于高水平的精氨酸酶而增加精氨酸酶代谢以及增加一氧化二氮合酶。MDSC可对IFN- γ 和若干细胞因子(诸如IL-4和IL-13)有响应。IFN- γ 可激活诱导一氧化氮合酶2(NOS2)的活性的MDSC。另选地,Th2细胞因子(诸如白细胞介素-4(IL-4)和IL-13)可激活可引起精氨酸酶-1(ARG1)活性的诱导的MDSC。L-精氨酸被NOS2或ARG1代谢可导致T细胞增殖的抑制,这两种酶的活性一起通过产生反应性氮氧化物物质导致T细胞凋亡。

[0088] “Treg相关疾病”是指与T调节细胞(Treg)相关的疾病或障碍。Treg相关疾病可由Treg功能(例如抗肿瘤应答的抑制或效应T细胞增殖的抑制)引起。Treg介导的疾病可以是癌症。“Treg相关疾病”和“Treg介导的疾病”在本文中可互换使用。

[0089] “增强效应T细胞的应答”或“增强T细胞应答”是指在动物或人类受治疗者中体内或体外效应T细胞的增强或刺激以具有持续或放大的生物学功能或者更新或重新激活耗尽或失活的T细胞。示例性T细胞应答为CD8⁺ T细胞的增殖、分泌 γ -干扰素,抗原响应性或克隆扩增。测量这种增强的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0090] “MDSC相关疾病”是指与骨髓源的抑制细胞(MDSC)相关的疾病或障碍。MDSC相关疾病可由MDSC功能(例如,抗肿瘤应答或效应T细胞增殖的抑制)引起。MDSC介导的疾病可以是

癌症。“MDSC相关疾病”和“MDSC介导的疾病”在本文中可互换使用。

[0091] “调节性B细胞”或“Breg”或“Bregs”是指抑制免疫应答的B淋巴细胞。Breg可以是CD19⁺CD24⁺CD38⁺细胞,并且可通过抑制由Breg分泌的IL-10介导的T细胞增殖来抑制免疫应答。应当理解,存在其它Breg亚组并且在例如Ding等人,(2015) Human Immunology 76:615-621中有所描述。

[0092] “Breg相关疾病”是指与调节性B细胞相关的疾病或障碍。Breg相关疾病可由例如Breg介导的抗肿瘤应答或效应T细胞增殖的抑制引起。Breg介导的疾病可以是癌症。“Breg相关疾病”和“Breg介导的疾病”在本文中可互换使用。

[0093] “患者”包括任何人或非人动物。“非人动物”包括所有的脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。“患者”和“受治疗者”在本文中可互换使用。

[0094] 本发明提供了用于用特异性结合CD38的抗体治疗患有实体瘤的患者的方法,无论该肿瘤细胞是否表达CD38。本发明还提供了用于治疗患有调节性T细胞(Treg)、骨髓源的抑制细胞(MDSC)或调节性B细胞(Breg)介导的疾病的患者的方法。本发明还提供用于调节Treg、MDSC或Breg活性以治疗CD38阳性的和/或与高水平的这些免疫抑制细胞相关联的实体瘤的方法。

[0095] 本发明至少部分基于这样的发现:抗-CD38抗体DARZALEX™(达雷木单抗)在患者体内具有减少免疫抑制性Treg、MDSC和Breg的数量、增加CD8⁺ T细胞的数量以及CD8⁺与Treg的比率、促进CD8⁺中枢记忆细胞形成和增加T细胞克隆性的免疫调节活性。

[0096] DARZALEX™(达雷木单抗)和其它抗-CD38抗体正在临床上评估其通过抗体的通过抗体效应功能消除CD38阳性细胞的能力(诸如ADCC、CDC、ACDP和细胞凋亡)治疗血红素恶性肿瘤和浆细胞障碍(包括多发性骨髓瘤)的功效,但尚未认识到它们在促进适应性免疫应答中的免疫调节活性。其它免疫调节抗体(抗-PD1、抗-CTLA4)通过靶向抑制抗肿瘤应答的免疫系统的成分来起作用。例如,已证明抗-PD1抗体增加T细胞增殖、刺激抗原特异性记忆应答并部分缓解体外Treg介导的效应T细胞的抑制(例如,参见美国专利8,779,105)。目前,两种抗-PD-1抗体(OPDIVO®(nivolumab)和KEYTRUDA®(pembrolizumab))被批准用于治疗黑色素瘤,并且这些抗体用于各种实体瘤诸如肺非小细胞癌、前列腺癌、头颈癌、胃部癌症、前列腺癌、输卵管癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌和脑癌、肾癌、膀胱癌、尿道癌、食管癌和结直肠癌的临床研究中。抗-CTLA-4抗体YERVOY®(ipilimumab)已被批准用于治疗黑色素瘤。YERVOY®(ipilimumab)和另一种抗-CTLA-4抗体tremelimumab也正在开发用于前列腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胃肠癌、胃部癌症、结直肠癌、肾癌、食管癌和泌尿生殖系统癌症。

[0097] 不希望受任何特定理论的束缚,基于用本文所述的DARZALEX™(达雷木单抗)所观察到的免疫调节效应,DARZALEX™(达雷木单抗)和其它抗-CD38抗体可有效治疗实体瘤。由于在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者中观察到免疫应答的普遍激活,患有CD38阴性实体瘤的患者也可能对抗-CD38抗体疗法有响应。

[0098] 本发明提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗实体瘤的时间。

[0099] 本发明还提供了治疗患有调节性T细胞 (Treg) 介导的疾病的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗Treg介导的疾病的时间。

[0100] 本发明还提供了治疗患有骨髓源的抑制细胞 (MDSC) 介导的疾病的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗MDSC介导的疾病的时间。

[0101] 本发明还提供了治疗患有调节性B细胞 (Breg) 介导的疾病的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗Breg介导的疾病的时间。

[0102] 本发明还提供了抑制调节性T细胞 (Treg) 的活性的方法,该方法包括使调节性T细胞与特异性结合CD38的抗体接触。

[0103] 本发明还提供了抑制骨髓源的抑制细胞 (MDSC) 的活性的方法,该方法包括使MDSC与特异性结合CD38的抗体接触。

[0104] 本发明还提供了抑制调节性B细胞 (Breg) 的活性的方法,该方法包括使Breg与特异性结合CD38的抗体接触。

[0105] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括通过向患者施用特异性结合CD38的抗体来减少患者体内调节性T细胞 (Treg) 的数量。

[0106] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括通过向患者施用特异性结合CD38的抗体来减少患者体内骨髓源的抑制细胞 (MDSC) 的数量。

[0107] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括通过向患者施用特异性结合CD38的抗体来减少患者体内调节性B细胞 (Breg) 的数量。

[0108] 本发明还提供了增强患者体内免疫应答的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用特异性结合CD38的抗体足以增强免疫应答的时间。

[0109] 在一些实施方案中,患者具有病毒感染。

[0110] 本发明还提供了治疗患者体内病毒感染的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用特异性结合CD38的抗体足以治疗病毒感染的时间。

[0111] 在一些实施方案中,免疫应答是效应T细胞 (Teff) 应答。

[0112] 在一些实施方案中,Teff应答由CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞介导。

[0113] 在一些实施方案中,Teff应答由CD4⁺ T细胞介导。

[0114] 在一些实施方案中,Teff应答由CD8⁺ T细胞介导。

[0115] 在一些实施方案中,Teff应答是CD8⁺ T细胞数量的增加、CD8⁺ T细胞增殖的增加、T细胞克隆扩增的增加、CD8⁺记忆细胞形成的增加、抗原依赖性抗体产量的增加,或者细胞因子、趋化因子或白细胞介素产量的增加。

[0116] T细胞的增殖可例如通过以下方式来评估:使用氘标记的胸苷测量DNA合成的速率或者测量体外干扰素- γ (IFN- γ) 的产生或者使用已知方法测量来自患者样本的细胞群体中T细胞的绝对数量或百分比。

[0117] 克隆扩增可通过例如使用已知方法对来自T细胞库的TCR进行测序来评估。

[0118] 记忆细胞形成可通过使用例如FACS测量初始T细胞 (CD45RO⁻/CD62L⁺) 与记忆T细胞 (CD45RO⁺/CD62L^{high}) 的比率来评估。

[0119] 细胞因子、趋化因子或白细胞介素的产生(诸如干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-16、IL-18和IL-23、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、CCL4的产生)可使用标准方法(诸如ELISA或ELLISPOT测定)来评估。

[0120] 可使用标准方法(诸如ELISA或放射免疫测定(RIA))从来自患者的样本中评估抗原特异性抗体的产生。

[0121] 很容易理解“增加”或“增加的”各种Teff应答的含义。与对照相比在测试样本或受治疗者中(例如与治疗前相同的患者相比在用抗-CD38抗体治疗的患者中,或者与对相同治疗无应答的患者或患者组相比,在对抗-CD38抗体治疗有应答的患者或患者组中)的增加可以是至少约5%、至少约10%、25%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%、250%、300%、350%、400%或以上的增加。通常,增加具有统计意义上的显著性。

[0122] 类似地,容易理解“降低”或“降低的”或“减少的”或“减少”Treg、MDSC和/或Breg的数量的含义。与对照相比在测试样本或受治疗者中(例如与治疗前相同的患者相比在用抗-CD38抗体治疗的患者中,或者与对相同治疗无应答的患者或患者组相比,在对抗-CD38抗体治疗有应答的患者或患者组中)的降低可以是至少约10%、25%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%、250%、300%、350%、400%或以上。通常,降低具有统计意义上的显著性。

[0123] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体抑制免疫抑制细胞的功能。

[0124] 在一些实施方案中,免疫抑制细胞是调节性T细胞(Treg)、骨髓源的抑制细胞(MDSC)或调节性B细胞(Breg)。

[0125] 在一些实施方案中,Treg是CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} T细胞。

[0126] 在一些实施方案中,CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}细胞表达Foxp3。

[0127] 在一些实施方案中,CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} T细胞表达CD38。

[0128] Treg功能诸如其抑制Teff细胞的能力可使用已知的方法评估,诸如评估Treg抑制混合淋巴细胞反应(M[R]中Teff增殖的能力。

[0129] 例如可通过直接杀伤Treg或Treg的亚群(诸如CD38⁺Treg)而减少Treg与Teff相比的相对数目(例如增加CD8⁺/Treg细胞的比率)来抑制Treg功能。

[0130] 在一些实施方案中,通过杀伤Treg细胞来抑制Treg功能。

[0131] 在一些实施方案中,Treg杀伤由抗体诱导的抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、补体依赖性细胞毒性(CDC)或特异性结合CD38的抗体诱导的细胞凋亡来介导。

[0132] 在一些实施方案中,Treg杀伤由ADCC介导。

[0133] 在一些实施方案中,杀伤CD38⁺ Treg。

[0134] 在一些实施方案中,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%或60%的Treg被杀伤。

[0135] 由于仅一部分Treg和MDSC中表达CD38,预计具有实体瘤的患者的治疗将不导致Treg和MDSC的全身性耗尽,因此可提供改善的安全性。

[0136] 在一些实施方案中,MDSC是CD11b⁺HLA-DR⁻CD14⁻CD33⁺CD15⁺细胞。

[0137] 在一些实施方案中,CD11b⁺HLA-DR⁻CD14⁻CD33⁺CD15⁺MDSC表达CD38。

[0138] 可例如通过直接杀伤细胞从而减少MDSC的数量来抑制MDSC功能。

[0139] 在一些实施方案中,通过杀伤CD38⁺MDSC来抑制MDSC功能。

[0140] 在一些实施方案中,MDSC杀伤由抗体诱导的抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 或特异性结合CD38的抗体诱导的细胞凋亡来介导。

[0141] 在一些实施方案中,MDSC杀伤由ADCC介导。

[0142] 在一些实施方案中,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%或60%的MDSC被杀伤。

[0143] 在一些实施方案中,Breg是CD19⁺CD24⁺CD38⁺细胞。

[0144] 可通过例如直接杀伤Breg从而减少Breg的数量来抑制Breg功能。

[0145] 在一些实施方案中,通过杀伤CD38⁺Breg来抑制Breg功能。

[0146] 在一些实施方案中,Breg杀伤由抗体诱导的抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 或特异性结合CD38的抗体诱导的细胞凋亡来介导。

[0147] 在一些实施方案中,Breg杀伤由ADCC介导。

[0148] 在一些实施方案中,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%或60%的Breg被杀伤。

[0149] Treg在维持外周自身耐受性方面起关键作用。天然存在的CD4⁺CD25^{hi} Treg在胸腺中产生并表达Foxp3,这是建立和维持Treg谱系识别和抑制功能所需的转录因子。Treg可在疾病部位(例如,肿瘤中)积聚,在这些部位中它们抑制肿瘤抗原特异性T细胞的效应功能,导致抗肿瘤应答不足。肿瘤浸润Foxp3⁺ Treg的密度增加与各种实体瘤(包括胰腺癌、卵巢癌和肝细胞癌)的不良预后有关。Treg的消耗导致小鼠模型中抗肿瘤免疫和肿瘤排斥增强,但也可导致自身免疫性疾病的发展。

[0150] 骨髓源的抑制细胞 (MDSC) 是早期骨髓祖细胞、未成熟粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞在不同分化阶段的异质群体。它们在癌症患者中大量积聚,并具有强效的免疫抑制作用,抑制自然杀伤细胞 (NK) 和自然杀伤T细胞 (NKT) 的细胞毒性活性并且抑制由CD8⁺ T细胞介导的适应性免疫应答。尽管NK细胞抑制的机制目前尚不清楚,但多种途径可响应于MDSC介导的T细胞抑制,包括精氨酸酶1/ARG1的产生和一氧化氮合酶2 (NOS2) 的上调。ARG1和NOS2代谢L-精氨酸,并一起或单独阻断T细胞CD3 ζ 链的翻译、抑制T细胞增殖并且促进T细胞凋亡。另选地,MDSC分泌免疫抑制细胞因子并且诱导调节性T细胞发育。

[0151] MDSC由促炎症细胞因子诱导,并且发现在感染性和炎性病理条件下数量增加。它们积聚在荷瘤小鼠的血液、骨髓和二级淋巴器官中,并且已认识到它们在肿瘤微环境中的存在对促进肿瘤相关免疫抑制起致病作用。

[0152] MDSC在患有结肠癌、黑色素瘤、肝细胞癌、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、肾细胞癌、胰腺癌和乳腺癌的患者中 (Mandrzzato等人, (2009) J Immunol 182:6562-6.568; Liu等人, (2009) J Cancer Res Clin Oncol 136:35-45; Ko等人, (2009) Clin Cancer Res 15:2148-2157; Morse等人, (2009) Expert Opin Biol Ther 9:331-339; Diaz-Montero等人, (2009) Cancer Immunol Immunother 58:49-59; Corzo等人, (2009) J Immunol 182:5693-5701) 有所描述。在癌症患者中, Diaz等人 (Diaz-Montero等人, (2009) Cancer Immunol Immunother 58:49-59) 提出, MDSC的积聚与更晚期的疾病和不良的预后相关。

[0153] 已在实体瘤中识别出肿瘤浸润Breg, 并且这些Breg可通过各种机制促进肿瘤生长和转移, 诸如抑制CD8⁺ T细胞和NK细胞的抗肿瘤活性, 如例如在Ding等人, (2015) Human Immunology 76:615-62中所描述。

[0154] “抗体依赖性细胞的细胞毒性”、“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是诱导细胞死亡的机制, 该机制依赖于抗体包被靶细胞与具有裂解活性的效应细胞 (诸如自然杀伤细胞、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞) 经由效应细胞上表达的Fc γ 受体 (Fc γ R) 发生的相互作用。例如, NK细胞表达Fc γ RIIIa, 而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIIIa。效应细胞通过分泌膜孔形成蛋白和蛋白酶而具有的活性会导致抗体包被靶细胞诸如表达CD38的细胞发生死亡。为评估特异性结合CD38的抗体的ADCC活性, 可将抗体与免疫效应细胞联合加入到表达CD38的细胞中, 所述免疫效应细胞可被抗原抗体复合物激活, 从而使靶细胞发生细胞溶解。通常根据从裂解细胞中释放的标记 (例如放射性底物、荧光染料或天然胞内蛋白) 来检测细胞溶解。用于此类测定法的示例性效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和NK细胞。示例性靶细胞包括表达CD38的Treg或MDSC。在示例性测定法中, 用20 μ Ci的⁵¹Cr标记靶细胞2小时, 然后充分冲洗。可将靶细胞的细胞浓度调节到1 $\times$ 10⁶个细胞/ml, 并添加各种浓度的抗-CD38抗体。以40:1的效应细胞:靶细胞比率添加靶细胞, 由此开始测定。在37 $^{\circ}$ C下温育3小时后, 通过离心终止测定, 然后在闪烁计数器中测量从裂解细胞中释放的⁵¹Cr。可按通过将3%高氯酸加入靶细胞中诱导的最大裂解%来计算细胞的细胞毒性的百分比。

[0155] “抗体依赖性细胞吞噬作用” (“ADCP”) 是指通过吞噬细胞 (诸如巨噬细胞或树突状细胞) 的内化作用消除抗体包被的靶细胞的机制。可通过使用表达CD38的Treg或MDSC作为工程化为表达GFP或其它标记分子的靶细胞来评估ADCP。效应细胞:靶细胞比率可为例如4:1。可在含或不含抗-CD38抗体的情况下, 将效应细胞与靶细胞一起温育4小时。在温育后, 可

使用细胞消化液 (accutase) 分离细胞。可使用偶联至荧光标记的抗-CD11b抗体和抗-CD14抗体鉴定巨噬细胞,并且可使用标准方法基于CD11⁺CD14⁺巨噬细胞中的GFP荧光%确定吞噬百分比。

[0156] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指诱导细胞死亡的机制,其中靶结合抗体的Fc效应结构域结合并激活补体成分C1q,C1q继而激活补体级联,从而导致靶细胞死亡。补体的激活也可导致补体成分沉积在靶细胞表面上,这些补体成分通过结合白细胞上的补体受体(例如,CR3)来促进ADCC。

[0157] 单克隆抗体诱导ADCC的能力可通过工程化其低聚糖组分来增强。人IgG1或IgG3在Asn297处被熟知的双分枝G0、G0F、G1、G1F、G2或G2F形式的大多数聚糖N-糖基化。未工程化的CHO细胞所产生的抗体通常具有约至少85%的聚糖岩藻糖含量。从连接到Fc区的双分枝复合物型低聚糖去除核心岩藻糖,可经由改善的Fc γ RIIIa结合来增强抗体的ADCC,而不会改变抗原结合或CDC活性。此类mAb可使用据报道能引起具有双分枝复合物型Fc低聚糖的相对较高去岩藻糖基化抗体的成功表达的不同方法实现,诸如培养物渗透压的控制(Konno等人,(2012) Cytotechnology 64:249-65)、应用变体CHO系Lec13作为宿主细胞系(Shields等人,(2002) J Biol Chem 277:26733-26740)、应用变体CHO系EB66作为宿主细胞系(Olivier等人,(2010) MAbs2(4),印刷前电子版;PMID:20562582)、应用大鼠杂交瘤细胞系YB2/0作为宿主细胞系(Shinkawa等人,(2003) J BiolChem 278:3466-3473)、引入特异性针对 α 1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)基因的小干扰RNA(Mori等人,(2004) BiotechnolBioeng 88:901-908)或共表达 β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III和高尔基体 α -甘露糖苷酶II或强效 α -甘露糖苷酶I抑制剂几夫碱(kifunensine)(Ferrara等人,(2006) J BiolChem 281:5032-5036; Ferrara等人,(2006) Biotechnol Bioeng 93:851-861;Xhou等人,(2008) Biotechnol Bioeng 99:652-65)。由用于本发明的方法中以及下文所列所有带编号的实施方案中的每一者中的一些实施方案中的抗-CD38抗体所引发的ADCC,也可通过抗体Fc中的某些置换来增强。示例性置换为例如在氨基酸位置256、290、298、312、356、330、333、334、360、378或430(根据EU索引对残基进行编号)处的置换,如美国专利6,737,056中所描述。

[0158] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体在抗体Fc中包含置换。

[0159] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体在抗体Fc中的氨基酸位置256、290、298、312、356、330、333、334、360、378或430(根据EU索引对残基进行编号)处包含置换。

[0160] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体具有岩藻糖含量为约0%至约15%(例如15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%)的双分枝聚糖结构。

[0161] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体具有岩藻糖含量为约50%、40%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%的双分枝聚糖结构。

[0162] Fc中的置换和减少的岩藻糖含量可增强特异性结合CD38的抗体的ADCC活性。

[0163] “岩藻糖含量”意指Asn297处糖链内的岩藻糖单糖的量。岩藻糖的相对量为含岩藻糖的结构相对于所有糖结构的百分比。这些可通过多种方法进行表征和定量,例如:1) 使用经N-糖苷酶F处理的样本(例如,复合结构、混合结构及低聚甘露糖结构和高甘露糖结构)的MALDI-TOF,如国际专利公布W02008/077546中所描述;2) 通过酶促释放Asn297聚糖,随后衍

生化并通过具有荧光检测的HPLC (UPLC) 和/或HPLC-MS (UPLC-MS) 进行检测/定量;3) 在用或不用Endo S或其它酶处理Asn297聚糖的情况下,对天然或还原后的mAb进行完整蛋白分析,所述其它酶在第一GlcNAc单糖和第二GlcNAc单糖之间进行裂解,留下连接至第一GlcNAc的岩藻糖;4) 通过酶消化(例如,胰蛋白酶或肽链内切酶Lys-C) 将mAb消化为成分肽,随后通过HPLC-MS (UPLC-MS) 进行分离、检测和定量;或5) 用PNGase F在Asn 297处进行特异性酶促去糖基化,从而将mAb低聚糖与mAb蛋白分离。可通过各种互补技术对释放的低聚糖进行荧光团标记、分离并鉴定,这些技术允许:采用基质辅助激光解吸电离(MALDI) 质谱法,通过比较实验质量与理论质量来对聚糖结构进行精细表征;通过离子交换HPLC (GlycoSep C) 确定唾液酸化程度;通过正相HPLC (GlycoSep N),根据亲水性标准分离和定量低聚糖形式;以及通过高效毛细管电泳激光诱导荧光(HPCE-LIF) 分离和定量低聚糖。

[0164] 如本文所用,“低岩藻糖”或“低岩藻糖含量”是指抗体的岩藻糖含量为约0%至15%。

[0165] 如本文所用,“正常岩藻糖”或“正常岩藻糖含量”是指抗体的岩藻糖含量大约高于50%,通常大约高于60%、70%、80%或高于85%。

[0166] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体可通过细胞凋亡诱导Treg、MDSC和/或Breg的杀伤。用于评估细胞凋亡的方法是熟知的,并且包括例如使用标准方法的膜联蛋白IV染色。用于本发明的方法中的抗-CD38抗体可在约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的细胞中诱导细胞凋亡。

[0167] 在一些实施方案中,Teff或免疫抑制细胞存在于骨髓或外周血中。

[0168] 在一些实施方案中,Teff或免疫抑制细胞存在于骨髓中。

[0169] 在一些实施方案中,Teff或免疫抑制细胞存在于外周血中。

[0170] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体增加CD8⁺ T细胞与Treg的比率。

[0171] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体增加CD8⁺中枢记忆细胞与CD8⁺初始细胞的比率。CD8⁺中枢记忆细胞可被识别为CD45RO⁺/CD62L^{high}细胞。CD8⁺初始细胞可被识别为CD45RO⁻/CD62L⁺细胞。

[0172] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体是非激动性抗体。

[0173] 特异性结合CD38的非激动性抗体是指与由同种型对照抗体或培养物单独诱导的增殖相比,在体外与CD38结合后不诱导外周血单核细胞样本的显著增殖的抗体。

[0174] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的非激动性抗体以统计意义上不显著的方式诱导外周血单核细胞(PBMC)的增殖。PBMC增殖可通过以下步骤来评估:从健康供体中分离PBMC,然后在存在或不存在测试抗体的情况下,在200μl RPMI中以1×10⁵细胞/孔在平底96孔板中进行细胞培养。在37℃下温育四天后,可加入30μl³H-胸苷(16.7μCi/ml),继续培养过夜。根据制造商的说明,可使用Packard Cobra γ 计数器(Packard Instruments, Meriden, DT, USA) 来评估³H-胸苷的结合。数据可计算为从若干供体获得的PBMC的平均cpm(±SEM)。使用标准方法计算在存在或不存在测试抗体的情况下培养的样本之间的统计意义上的显著性或不显著性。

[0175] 可用于本发明方法的示例性抗-CD38抗体为DARZALEXTM(达雷木单抗)。DARZALEXTM(达雷木单抗)包含分别以SEQ ID NO:4和5示出的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)氨基酸序列,分别为SEQ ID NO:6、7和8的重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3以及分别为

SEQ ID NO:9、10和11的轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,并且是IgG1/ κ 亚型,并在美国专利7,829,693中有所描述。DARZALEX™(达雷木单抗)重链氨基酸序列以SEQ ID NO:12示出,并且轻链氨基酸序列以SEQ ID NO:13示出。

[0176] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体与包含为SEQ ID NO:4的重链可变区(VH)和为SEQ ID NO:5的轻链可变区(VL)的抗体竞争结合至CD38。

[0177] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体至少结合至人CD38(SEQ ID NO:1)的区域SKRNIQFSCKNYR(SEQ ID NO:2)和区域EKVQTLEAWVIHGG(SEQ ID NO:3)。

[0178] SEQ ID NO:1

[0179] MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPWRQQWSGPGTTKRFETVLARCVK
YTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLE
DTLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFG
SVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESII SKRNIQFSCKNYRDPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

[0180] SEQ ID NO:2

[0181] SKRNIQFSCKNYR

[0182] SEQ ID NO:3

[0183] EKVQTLEAWVIHGG

[0184] SEQ ID NO:4

[0185]

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYFCAK DKILWFGPEPVFDYWGQGT LTVSS

[0186] SEQ ID NO:5

[0187] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

[0188] SEQ ID NO:6

[0189] SFAMS

[0190] SEQ ID NO:7

[0191] AISGSGGGTYADSVKG

[0192] SEQ ID NO:8

[0193] DKILWFGPEPVFDY

[0194] SEQ ID NO:9

[0195] RASQSVSSYLA

[0196] SEQ ID NO:10

[0197] DASNRAT

[0198] SEQ ID NO:11

[0199] QQRSNWPPTF

[0200] SEQ ID NO:12

[0201] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGPEPVFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPK

SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVMSHHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0202] SEQ ID NO:13

[0203] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0204] 可使用熟知的体外方法来评估抗体与参考抗体(诸如,具有SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:5的VL的DARZALEX™(达雷木单抗))竞争结合至CD38的情况。在一个示例性方法中,重组表达CD38的CHO细胞可与未标记的参考抗体一起在4℃下温育15分钟,然后与过量的荧光标记的测试抗体一起在4℃下温育45分钟。在PBS/BSA中洗涤后,可使用标准方法通过流式细胞术测量荧光。在另一示例性方法中,可将人CD38的胞外部分包被在ELISA板的表面上。可在约15分钟内加入过量的未标记的参考抗体,随后可加入生物素酰化测试抗体。在PBS/吐温中洗涤后,可使用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的链霉亲和素检测生物素酰化测试抗体的结合,并使用标准方法检测信号。显而易见的是,在竞争测定法中,参考抗体可带有标记,而测试抗体不带标记。当参考抗体抑制测试抗体的结合时,测试抗体与参考抗体竞争,或测试抗体将参考抗体对CD38的结合抑制至少80%,例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。可使用已知方法,通过例如肽作图或氢/氘保护测定法,或通过晶体结构测定,来进一步限定测试抗体的表位。

[0205] 结合到人CD38(SEQ ID NO:1)的区域SKRNIQFSCCKNIYR(SEQ ID NO:2)和区域EKVQTLEAWVIHGG(SEQ ID NO:3)的抗体可例如通过如下过程产生:使用标准方法和本文所述的那些方法,用具有SEQ ID NO:2和3所示的氨基酸序列的肽来免疫小鼠,并且使用例如ELISA或诱变研究来表征所获得的抗体与肽的结合。

[0206] 本发明还提供了一种治疗患有实体瘤的患者方法,包括向对其有需要的患者施用结合至人CD38(SEQ ID NO:1)的区域SKRNIQFSCCKNIYR(SEQ ID NO:2)和区域EKVQTLEAWVIHGG(SEQ ID NO:3)的抗-CD38抗体。用于本发明方法的抗体的表位包括具有以SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3示出的序列的一些或全部残基。在一些实施方案中,抗体表位包含人CD38(SEQ ID NO:1)的区域SKRNIQFSCCKNIYR(SEQ ID NO:2)中的至少一个氨基酸和区域EKVQTLEAWVIHGG(SEQ ID NO:3)中的至少一个氨基酸。在一些实施方案中,抗体表位包含人CD38(SEQ ID NO:1)的区域SKRNIQFSCCKNIYR(SEQ ID NO:2)中的至少两个氨基酸和区域EKVQTLEAWVIHGG(SEQ ID NO:3)中的至少两个氨基酸。在一些实施方案中,抗体表位包含人CD38(SEQ ID NO:1)的区域SKRNIQFSCCKNIYR(SEQ ID NO:2)中的至少三个氨基酸和区域EKVQTLEAWVIHGG(SEQ ID NO:3)中的至少三个氨基酸。

[0207] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体包含分别为SEQ ID NO:6、7和8的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列。

[0208] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体包含分别为SEQ ID NO:9、10和11的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列。

[0209] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体包含分别为SEQ ID NO:6、7、8、9、10和

11的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列。

[0210] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体包含与SEQ ID NO:4具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的VH,以及与SEQ ID NO:5具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的VL。

[0211] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL。

[0212] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:12的重链和为SEQ ID NO:13的轻链。

[0213] 可用于本发明的任何实施方案的其它示例性抗-CD38抗体为:

[0214] 包含分别为SEQ ID NO:14和15的VH和VL序列的mAb003,并且在美国专利7,829,693中有所描述。mAb003的VH和VL可以表达为IgG1/ κ 。

[0215] SEQ ID NO:14

[0216] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIPFLGIANSAQKFQGRVT
ITADKSTSTAYMIDLSSLRSEDTAVYYCARDLIAALGPFDYWGQGTLLVTVSSAS

[0217] SEQ ID NO:15

[0218]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISWLAHYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
LQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK;

[0219] 包含分别为SEQ ID NO:16和17的VH和VL序列的mAb024,并且在美国专利7,829,693中有所描述。mAb024的VH和VL可以表达为IgG1/ κ 。SEQ ID NO:16

[0220] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIPHDSDARYSPSFQGV
FSADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHVGWGSRYWYFDLWGRGTLVTVSS

[0221] SEQ ID NO:17

[0222] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAHYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISLEP

[0223] EDFAVYYCQQRNWPPTFGQGTKVEIK;

[0224] 包含分别为SEQ ID NO:18和19的VH和VL序列的MOR-202 (MOR-03087),并且在美国专利8,088,896中有所描述。MOR-202的VH和VL可以表达为IgG1/ κ 。

[0225] SEQ ID NO:18

[0226] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAFYWGQGTLLVTVSS

[0227] SEQ ID NO:19

[0228]

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYVYVYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT
QAEDEADYYCQTYTGASLVFGGGTKLTVLGQ;

[0229] Isatuximab;包含分别为SEQ ID NO:20和21的VH和VL序列,在美国专利8,153,765中有所描述。Isatuximab的VH和VL可表达为IgG1/ κ 。

[0230] SEQ ID NO 20:

[0231] QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKRPGQGLEWIGTIYPGDGDTGYAQKFQGKAT

LTADKSSKTVMHLSSLASEDSAVYYCARGDYYGSNSLDYWGQGTSTVTVSS

[0232] SEQ ID NO:21:

[0233] DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPDRFTGSGAGT
DFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGTKLEIK

[0234] 可用于本发明方法的其它示例性抗-CD38抗体包括描述于国际专利公布W005/103083、国际专利公布W006/125640、国际专利公布W007/042309、国际专利公布W008/047242或国际专利公布W014/178820中的那些。

[0235] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗实体瘤的时间,该抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL。

[0236] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗实体瘤的时间,该抗体包含为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL。

[0237] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗实体瘤的时间,该抗体包含为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL。

[0238] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗实体瘤的时间,该抗体包含为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL。

[0239] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体足以治疗实体瘤的时间,该抗体包含为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。

[0240] 在一些实施方案中,实体瘤为黑色素瘤。

[0241] 在一些实施方案中,实体瘤为肺癌。

[0242] 在一些实施方案中,实体瘤为鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0243] 在一些实施方案中,实体瘤为非鳞状NSCLC。

[0244] 在一些实施方案中,实体瘤为肺腺癌。

[0245] 在一些实施方案中,实体瘤为肾细胞癌(RCC)(例如,肾透明细胞癌或肾乳头状细胞癌)或其转移性病变。

[0246] 在一些实施方案中,实体瘤为间皮瘤。

[0247] 在一些实施方案中,实体瘤是鼻咽癌(NPC)。

[0248] 在一些实施方案中,实体瘤为结直肠癌。

[0249] 在一些实施方案中,实体瘤为前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌。

[0250] 在一些实施方案中,实体瘤为胃部癌症。

[0251] 在一些实施方案中,实体瘤为卵巢癌。

[0252] 在一些实施方案中,实体瘤为胃癌。

[0253] 在一些实施方案中,实体瘤为肝癌。

[0254] 在一些实施方案中,实体瘤为腺癌。

[0255] 在一些实施方案中,实体瘤为甲状腺癌。

- [0256] 在一些实施方案中,实体瘤为头颈部的鳞状细胞癌。
- [0257] 在一些实施方案中,实体瘤为食道或胃肠道的癌。
- [0258] 在一些实施方案中,实体瘤为乳腺癌。
- [0259] 在一些实施方案中,实体瘤为输卵管癌。
- [0260] 在一些实施方案中,实体瘤为脑癌。
- [0261] 在一些实施方案中,实体瘤为尿道癌。
- [0262] 在一些实施方案中,实体瘤为泌尿生殖系统癌。
- [0263] 在一些实施方案中,实体瘤为子宫内膜异位症。
- [0264] 在一些实施方案中,实体瘤为宫颈癌。
- [0265] 在一些实施方案中,实体瘤为癌症的转移性病变。
- [0266] 在一些实施方案中,实体瘤缺少可检测的CD38表达。
- [0267] 当实体瘤组织中的CD38表达或从实体瘤分离的细胞上的CD38表达与对照相比(例如使用熟知的方法用抗-CD38抗体检测到的表达与使用同种型对照抗体检测到的表达相比)在统计意义上不显著时,实体瘤缺少可检测的CD38表达。
- [0268] 用于本发明方法中的抗-CD38抗体也可从头选自例如噬菌体展示文库,其中噬菌体被工程化为表达人免疫球蛋白或其部分,诸如Fab、单链抗体(scFv)或者未配对或配对抗体可变区(Knappik等人,(2000) J Mol Biol 296:57-86;Krebs等人,(2001) J Immunol Meth 254:67-84;Vaughan等人,(1996) Nature Biotechnology 14:309-314;Sheets等人,(1998) PITAS (USA) 95:6157-6162;Hoogenboom和Winter,(1991) J Mol Biol 227:381;Marks等人,(1991) J Mol Biol 222:581)。CD38结合可变结构域可分离自例如噬菌体展示文库,该噬菌体展示文库将抗体重链可变区和轻链可变区表达为具有噬菌体pIX外壳蛋白的融合蛋白,如在Shi等人,(2010) J. Mol. Biol. 397:385-96和国际专利公布W009/085462中所描述。可筛选抗体文库中结合至人CD38细胞外结构域的那些,进一步表征所得的阳性克隆,从克隆溶解物分离Fab,并且随后克隆为全长抗体。此类用于分离人抗体的噬菌体展示方法在本领域是已建立的。参见例如美国专利5,223,409、美国专利5,403,484、美国专利5,571,698、美国专利5,427,908、美国专利5,580,717、美国专利5,969,108、美国专利6,172,197、美国专利5,885,793、美国专利6,521,404、美国专利6,544,731、美国专利6,555,313、美国专利6,582,915以及美国专利6,593,081。
- [0269] 在一些实施方案中,抗-CD38抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。
- [0270] 抗体的Fc部分可介导抗体效应子功能,诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)或补体依赖性细胞毒性(CDC)。此类功能可通过如下方式介导:(一个或多个)Fc效应子结构域结合至具有吞噬或裂解活性的免疫细胞上的Fc受体,或(一个或多个)Fc效应子结构域结合至补体系统的组分。通常,Fc结合细胞或补体组分所介导的效应导致靶细胞(例如,表达CD38的细胞)被抑制和/或耗尽。人IgG同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4表现出效应子功能的差异能力。ADCC可由IgG1和IgG3介导,ADCP可由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4介导,并且CDC可由IgG1和IgG3介导。
- [0271] 与包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的抗体基本上相同的抗体可用于本发明的方法中。如本文所用,术语“基本上相同”意指被比较的两个抗体VH或VL氨基酸序列是相同的或具有“非显著性差异”。非显著性差异是指抗体重链或轻链中有1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸被置换,这些置换不会对抗体的特性造成不利影响。百分比同一性可例如通过使用Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的AlignX模块的默认设置的配对比对而确定。本发明的蛋白质序列可以用作查询序列以针对公共或专利数据库进行检索,以例如鉴定相关序列。用来进行此类检索的示例性程序是使用默认设置的XBLAST或BLASTP程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 或GenomeQuest™ (GenomeQuest, Westborough, MA) 软件包。可对特异性结合CD38的抗体进行的示例性置换为例如用具有相似电荷、疏水性或立体化学特性的氨基酸进行的保守置换。还可作出保守置换以改善抗体特性,例如稳定性或亲和力,或改善抗体效应子功能。可例如对抗-CD38抗体的重链或轻链进行1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸置换。此外,VH或VL中的任何天然残基还可用于丙氨酸来置换,如先前对于丙氨酸扫描诱变所述 (MacLennan等人, *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67, 1998; Sasaki等人, *Adv Biophys* 35:1-24, 1998)。所需的氨基酸置换可以由本领域技术人员在需要此类置换时确定。氨基酸置换可以例如通过PCR诱变来进行 (美国专利4,683,195)。可使用熟知方法生成变体文库,例如使用随机 (NNK) 或非随机密码子 (例如DVK密码子,其编码11个氨基酸 (Ala、Cys、Asp、Glu、Gly、Lys、Asn、Arg、Ser、Tyr、Trp)), 并在文库中筛选具有所需特性的变体。可使用本文所述的方法检测所生成的变体对CD38的结合,及其体外诱导ADCC、ADCP或细胞凋亡的能力,或调节CD38酶活性的能力。

[0272] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体可以一系列亲和力 (K_D) 结合人CD38。在根据本发明的一个实施方案中,并且在下列带有编号的实施方案的每一者中的一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体以高亲和力结合至CD38,例如,由表面等离子体共振或Kinexa方法确定, K_D 等于或小于约 10^{-7} M,诸如但不限于1-9.9 (或其中的任何范围或值,诸如1、2、3、4、5、6、7、8或9) $\times 10^{-8}$ M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、 10^{-14} M、 10^{-15} M或其中的任何范围或值,如本领域技术人员所实践。一种示例性亲和力等于或小于 1×10^{-8} M。另一种示例性亲和力等于或小于 1×10^{-9} M。

[0273] 在一些实施方案中,特异性结合CD38的抗体是双特异性抗体。可将现有抗-CD38抗体的VL区和/或VH区或者如本文所述从头鉴定的VL区和VH区工程化为双特异性全长抗体。可使用诸如以下专利中所述的那些技术,通过调节单特异性抗体重链之间的CH3相互作用以形成双特异性抗体,从而制备此类双特异性抗体:美国专利7,695,936;国际专利公布W004/111233;美国专利公布US2010/0015133、美国专利公布US2007/0287170、国际专利公布W02008/119353、美国专利公布US2009/0182127、美国专利公布US2010/0286374、美国专利公布US2011/0123532、国际专利公布W02011/131746、国际专利公布W02011/143545、或美国专利公布US2012/0149876。可在其中结合本发明的抗体的VL区和/或VH区的另外双特异性结构,是例如双可变结构域免疫球蛋白 (国际专利公布W02009/134776), 或包括多种二聚化结构域以连接具有不同特异性的两条抗体臂的结构,诸如亮氨酸拉链或胶原二聚化结构域 (国际专利公布W02012/022811、美国专利5,932,448、美国专利6,833,441)。

[0274] 例如,双特异性抗体可通过如下过程在无细胞环境中体外产生:根据国际专利公布W02011/131746所述的方法,在两个单特异性同源二聚抗体的CH3区域中引入非对称突变,并在允许二硫键异构化的还原条件下由两个亲本单特异性同源二聚抗体形成双特异性异源二聚抗体。在所述方法中,将第一单特异性二价抗体 (例如,抗-CD38抗体) 和第二单特

异性二价抗体工程化为在CH3结构域处具有促进异源二聚体稳定性的某些置换;将这些抗体在足以使铰链区中的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下一起温育;从而通过Fab臂交换产生双特异性抗体。温育条件最理想地可恢复到非还原条件。可使用的示例性还原剂为2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和β-巯基乙醇,优选地为选自2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦的还原剂。例如,可使用如下条件:在至少25mM 2-MEA的存在下或至少0.5mM二硫苏糖醇的存在下,在5-8的pH例如pH 7.0或pH 7.4,至少20℃的温度下,温育至少90分钟。

[0275] 可用于双特异性抗体的第一重链和第二重链的示例性CH3突变是K409R和/或F405L。

[0276] 本发明的方法可用于治疗属于任何分类的动物患者。此类动物的示例包括哺乳动物,诸如人、啮齿动物、犬类、猫类和农畜。

[0277] 施用/药物组合物

[0278] 可在本发明的方法中以合适的药物组合物提供特异性结合CD38的抗体,该药物组合物包含特异性结合CD38的抗体和药学上可接受的载体。载体可为特异性结合CD38的抗体与之一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类媒介物可以是液体,诸如水和油,包括来源于石油、动物、植物的油或合成的那些油,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。例如,可使用0.4%盐水和0.3%甘氨酸。这些溶液是无菌的,并且通常不含颗粒物。它们可通过熟知的常规灭菌技术(例如过滤)进行灭菌。该组合物可根据需要含有药学上可接受的辅助物质,以接近生理条件,所述辅助物质诸如pH调节剂和缓冲剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂等。此类药物制剂中的特异性结合CD38的抗体的浓度可在很大范围内变化,即,从小于约0.5重量%,通常到至少约1重量%至多达15重量%、或20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%、45重量%或50重量%,并且将根据所选择的具体施用方式,主要基于所需的剂量、流体体积、粘度等进行选择。包含其它人蛋白(例如,人血清白蛋白)在内的合适的媒介物和制剂在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第21版, Troy, D.B. 编辑, Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, 第5部分, Pharmaceutical Manufacturing, 第691-1092页(特别参见第958-989页)中有所描述。

[0279] 本发明的方法中的特异性结合CD38的抗体的施用模式可为任何合适的途径,诸如胃肠外施用,例如真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内或皮下、肺部、粘膜(口腔、鼻内、阴道内、直肠)或如本领域所熟知的技术人员了解的其它方式。特异性结合CD38的抗体可使用已知的方法瘤内施用到淋巴结引流部位以局部递送到肿瘤中。

[0280] 特异性结合CD38的抗体可通过任何合适的途径施用给患者,例如通过静脉内(i.v.)输注或弹丸式注射以非肠道方式、以肌肉内方式或皮下方式或腹膜内方式。可在例如15分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟或240分钟内,或1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时或12小时内给予静脉内输注。

[0281] 向患者给予的剂量足以缓解或至少部分地遏止正在治疗的疾病(“治疗有效量”),并且有时可为0.005mg/kg至约100mg/kg,例如约0.05mg/kg至约30mg/kg,或约5mg/kg至约25mg/kg,或约4mg/kg,约8mg/kg,约16mg/kg或约24mg/kg,或例如约1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg,但可甚至更高,例如约15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、21mg/kg、22mg/kg、23mg/kg、24mg/kg

kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg或100mg/kg。

[0282] 也可以给予固定的单位剂量,例如50mg、100mg、200mg、500mg或1000mg,或者剂量可基于患者的表面积,例如500mg/m²、400mg/m²、300mg/m²、250mg/m²、200mg/m²或100mg/m²。通常可施用介于1和8之间(例如,1、2、3、4、5、6、7或8)的剂量,但可给予9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多的剂量。

[0283] 可在一天、两天、三天、四天、五天、六天、一周、两周、三周、一个月、五周、六周、七周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或更长时间之后重复施用本发明的方法中的特异性结合CD38的抗体。也可以重复治疗过程,按照慢性施用一样。重复施用可为相同剂量或不同剂量。例如,本发明的方法中的特异性结合CD38的抗体可通过静脉内输注以8mg/kg或以16mg/kg按一周的时间间隔施用8周,接着以8mg/kg或以16mg/kg按每两周一次的方式再施用16周,然后以8mg/kg或以16mg/kg按每四周一次的方式施用。

[0284] 特异性结合CD38的抗体在本发明的方法中可通过维持疗法施用,诸如例如按每周一次的方式持续6个月或更长时间。

[0285] 例如,本发明的方法中的特异性结合CD38的抗体可在治疗开始后第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天中的至少一天,或者另选地,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周中的至少一周,或其任何组合,使用单次剂量或者每24、12、8、6、4或2小时一次的分次剂量或其任何组合,以约0.1-100mg/kg的量作为日剂量提供,诸如0.5mg/kg/天、0.9mg/kg/天、1.0mg/kg/天、1.1mg/kg/天、1.5mg/kg/天、2mg/kg/天、3mg/kg/天、4mg/kg/天、5mg/kg/天、6mg/kg/天、7mg/kg/天、8mg/kg/天、9mg/kg/天、10mg/kg/天、11mg/kg/天、12mg/kg/天、13mg/kg/天、14mg/kg/天、15mg/kg/天、16mg/kg/天、17mg/kg/天、18mg/kg/天、19mg/kg/天、20mg/kg/天、21mg/kg/天、22mg/kg/天、23mg/kg/天、24mg/kg/天、25mg/kg/天、26mg/kg/天、27mg/kg/天、28mg/kg/天、29mg/kg/天、30mg/kg/天、40mg/kg/天、45mg/kg/天、50mg/kg/天、60mg/kg/天、70mg/kg/天、80mg/kg/天、90mg/kg/天或100mg/kg/天。

[0286] 本发明的方法中的特异性结合CD38的抗体也可预防性地施用,以降低罹患癌症的风险、延迟癌症进展中事件的发作和/或在癌症缓解后降低复发的风险。这对于肿瘤难以定位而由于其它生物因素已知患有肿瘤的患者可能尤其有用。

[0287] 本发明的方法中的特异性结合CD38的抗体可冻干以便于储存,使用之前可在合适的载体中复原。此项技术已被证实对常规的蛋白制剂有效,并且可采用熟知的冻干和复原技术。

[0288] 本发明的方法中的特异性结合CD38的抗体可与第二治疗剂联合施用。

[0289] 在本发明的方法中,特异性结合CD38的抗体可与本领域技术人员已知的任何一种或多种化疗药物或其它抗癌治疗剂一起施用。化学治疗剂是可用于治疗癌症的化学化合物,并且包括生长抑制剂或其它细胞毒性剂,并且包括烷基化剂、抗代谢药、抗微管抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、受体酪氨酸激酶抑制剂、血管生成抑制剂等。化学治疗剂的示例包括:烷基化剂,诸如噻替哌和环磷酰胺(CYTOXAN[®]);烷基磺酸盐,诸如白消安、硫丹和噻消安;氮丙啶,诸如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、麦曲多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);乙撑亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺

(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylomelamine);氮芥(nitrogen mustards),诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝脲(nitrosoureas),诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素,诸如阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素、氨茴霉素(anthracycline)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素、放线菌素(cactinomycin)、加利车霉素(calicheamicin)、carubicin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素、更生霉素、柔红霉素、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲霉素、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢药,诸如甲氨蝶呤和5-FU;叶酸类似物,诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷;雄激素类,诸如卡鲁甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitriostanol)、美雄烷(mepitriostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺类,诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸(frolic acid);醋葡萄糖醛内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);安吡啶;bestabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙;地磷酰胺(defofamide);地美可辛(demecolcine);地吡酮;elfomithine;依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidamine);米托胍脲(mitoguanazone);米托蒽醌;莫派达醇(mopidanmol);二胺硝吡啶(nitrarine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide);丙卡巴肼;PSK[®];雷佐生(razoxane);西佐喃(sizofiran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三氮唑酮(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦(urethan);长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷(arabinoside) ("Ara-C");环磷酰胺;噻替哌;新型紫杉类或紫杉烷家族的成员,诸如紫杉醇(TAXOL[®]多西他赛(TAXOTER[®]))及其类似物;苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,诸如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽

醌;长春新碱;长春瑞滨;去甲长春碱;诺安托(novantrone);替尼泊苷;道诺霉素;氨基蝶呤(aminopterin);希罗达;伊本膦酸盐(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸;埃斯波霉素(esperamicins);卡培他滨;受体酪氨酸激酶和/或血管生成的抑制剂,包括NEXAVAR[®](索拉非尼)、SUTENT[®](舒尼替尼)、VOTRIENT[™](帕唑帕尼)、PALLADIA[™](toceranib)、ZACTIMA[™](凡德他尼)、RECENTIN[®](西地尼布)、瑞格菲尼(BAY73-4506)、阿西替尼(AG013736)、来他替尼(CEP-701)、TARCEVA[®](厄洛替尼)、IRESSA[™](吉非替尼)、Gilotrif[®](阿法替尼)、TYKERB[®](拉帕替尼)、来那替尼等及上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。该定义还包括用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素药物诸如抗雌激素药物,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香化酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY 117018、奥那司酮和FARESTON[®](托瑞米芬);和抗雄激素药物,诸如氟他胺、尼鲁米特、bicalutamide、亮丙瑞林和戈舍瑞林;和上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。其它常规的细胞毒性化学化合物如在Wiemann等人,1985年,Medical Oncology (Calabresi等人编辑),第10章,McMillan Publishing中所公开的那些,也适用于本发明的方法。

[0290] 可与本发明方法中的特异性结合CD38的抗体联合使用的示例性制剂包括酪氨酸激酶抑制剂和靶向抗癌疗法,诸如IRESSA[™](吉非替尼)和Tarceva[®](厄洛替尼)以及HER2、HER3、HER4或VEGF的其它拮抗剂。示例性HER2拮抗剂包括CP-724-714、HERCEPTIN[™](曲妥珠单抗)、OMNITARG[™](帕妥珠单抗)、TAK-165、TYKERB[®](拉帕替尼)(EGFR和HER2抑制剂)和GW-282974。示例性HER3拮抗剂包括抗-Her3抗体(参见例如美国专利公布2004/0197332)。示例性HER4拮抗剂包括抗-HER4siRNA(参见例如Maatta等人,Mol Biol Cell 17:67-79, 2006)。示例性VEGF拮抗剂为(Avastin[™](贝伐单抗))。

[0291] 可与本发明方法中的特异性结合CD38的抗体联合使用的示例性药剂包括用于实体瘤的标准护理药物或免疫检查点抑制剂。

[0292] 本发明方法中的第二治疗剂可以是免疫检查点抑制剂。

[0293] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗-PD-1抗体、抗-PD-L1抗体、抗-PD-L2抗体、抗-LAG3抗体、抗-TIM3抗体或抗-CTLA-4抗体。

[0294] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是拮抗性抗-PD-1抗体、拮抗性抗-PD-L1抗体、拮抗性抗-PD-L2抗体、拮抗性抗-LAG3抗体或拮抗性抗-TIM3抗体。

[0295] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗-PD-1抗体。

[0296] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗-PD-L1抗体。

[0297] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗-PD-L2抗体。

[0298] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗-LAG3抗体。

[0299] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗-TIM3抗体。

[0300] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗-CTLA-4抗体。

[0301] 任何拮抗性抗-PD-1抗体都可用于本发明的方法中。可使用的示例性抗-PD-1抗体为OPVIDO[®](nivolumab)和KEYTRUDA[®](pembrolizumab)。OPVIDO[®](nivolumab)在例如美国专利8,008,449(抗体5C4)中有所描述,并且包含为SEQ ID NO:24的VH和为SEQ

ID NO:25的VL。KEYTRUDA® (pembrolizumab) 在例如美国专利8,354,509中有所描述,并且包含为SEQ ID NO:22的VH和为SEQ ID NO:23的VL。nivolumab和pembrolizumab的氨基酸序列也可通过CAS注册获得。可使用的另外的PD-1抗体在美国专利7,332,582、美国专利公布2014/0044738、国际专利公布W02014/17966和美国专利公布2014/0356363中有所描述。

[0302] “拮抗剂”是指当与细胞蛋白质结合时抑制由蛋白质的天然配体诱导的至少一种反应或活性的分子。当至少一种反应或活性被抑制超过在不存在拮抗剂的情况下(例如,阴性对照)被抑制的至少一种反应或活性的至少约30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%时或当与不存在拮抗剂情况下的抑制相比抑制具有统计意义上的显著性时,分子为拮抗剂。拮抗剂可以是抗体、可溶性配体、小分子、DNA或RNA(诸如siRNA)。例如由PD-1与其受体PD-L1或PD-L2结合诱导的典型反应或活性可减少T细胞的抗原特异性CD4⁺或CD8⁺细胞的增殖或者减少T细胞产生的干扰素- γ (IFN- γ),从而抑制针对例如肿瘤的免疫应答。由TIM-3与其受体(诸如半乳糖凝集素-9)结合诱导的典型反应或活性可减少抗原特异性CD4⁺或CD8⁺细胞的增殖、减少T细胞产生的IFN- γ 或者减少CD4⁺或CD8⁺细胞上的CD137表面表达,从而抑制针对例如肿瘤的免疫应答。因此,特异性结合PD-1的拮抗性PD-1抗体、拮抗性PD-L2、特异性结合TIM-3的拮抗性抗体通过抑制抑制性途径来诱导免疫应答。

[0303] SEQ ID NO:22

[0304] QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT
LTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS

[0305] SEQ ID NO:23

[0306] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAstyleSGVPARFSGS
GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK

[0307] SEQ ID NO:24

[0308] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRIYADSVKGRFT
ISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGTTLVTVSS

[0309] SEQ ID NO:25

[0310] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGGQTKVEIK

[0311] 增强免疫应答的抗-PD-L1抗体(例如,拮抗性抗-PD-L1抗体)可用于本发明的方法中。可使用的示例性抗-PD-L1抗体为durvalumab、atezolizumab和avelumab以及在例如美国专利公布2009/0055944、美国专利8,552,154、美国专利8,217,149和美国专利8,779,108中描述的那些。

[0312] Durvalumab包含为SEQ ID NO:26的VH和为SEQ ID NO:27的VL。

[0313] Atezolizumab包含为SEQ ID NO:28的VH和SEQ ID NO:29的VL。

[0314] Avelumab包含为SEQ ID NO:30的VH和SEQ ID NO:31的VL。

[0315] SEQ ID NO:26

[0316]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKN

SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG GWFGEAFDYWGQGLTVTVSS

[0317] SEQ ID NO:27

[0318] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK

[0319] SEQ ID NO:28

[0320] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS

[0321] SEQ ID NO:29

[0322] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK

[0323] SEQ ID NO:30

[0324] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSS

[0325] SEQ ID NO:31

[0326] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTRVFGTGTKVTVL

[0327] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-1抗体足以治疗实体瘤的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-1抗体包含为SEQ ID NO:24的VH和为SEQ ID NO:25的VL。

[0328] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-1抗体足以治疗实体瘤的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-1抗体包含为SEQ ID NO:22的VH和为SEQ ID NO:23的VL。

[0329] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-L1抗体足以治疗实体瘤的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-L1抗体包含为SEQ ID NO:26的VH和为SEQ ID NO:27的VL。

[0330] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-L1抗体足以治疗实体瘤的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-L1抗体包含为SEQ ID NO:28的VH和为SEQ ID NO:29的VL。

[0331] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-L1抗体足以治疗实体瘤的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-L1抗体包含为SEQ ID NO:30的VH和为SEQ ID NO:31的VL。

[0332] 本发明还提供了增强患者体内免疫应答的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-1抗体足以增强免疫应答的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-1抗体

包含为SEQ ID NO:24的VH和为SEQ ID NO:25的VL。

[0333] 本发明还提供了增强患者体内免疫应答的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-1抗体足以增强免疫应答的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-1抗体包含为SEQ ID NO:22的VH和为SEQ ID NO:23的VL。

[0334] 本发明还提供了增强患者体内免疫应答的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-L1抗体足以增强免疫应答的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-L1抗体包含为SEQ ID NO:26的VH和为SEQ ID NO:27的VL。

[0335] 本发明还提供了增强患者体内免疫应答的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-L1抗体足以增强免疫应答的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-L1抗体包含为SEQ ID NO:28的VH和为SEQ ID NO:29的VL。

[0336] 本发明还提供了增强患者体内免疫应答的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-L1抗体足以增强免疫应答的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-L1抗体包含为SEQ ID NO:30的VH和为SEQ ID NO:31的VL。

[0337] 本发明还提供了治疗患有结直肠癌的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和拮抗性抗-PD-1抗体足以治疗结直肠癌的时间。

[0338] 本发明还提供了治疗患有结直肠癌的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和拮抗性抗-PD-L1抗体足以治疗结直肠癌的时间。

[0339] 本发明还提供了治疗患有结直肠癌的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和拮抗性抗-PD-L2抗体足以治疗结直肠癌的时间。

[0340] 本发明还提供了治疗患有肺癌的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和拮抗性抗-PD-1抗体足以治疗肺癌的时间。

[0341] 本发明还提供了治疗患有肺癌的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和拮抗性抗-PD-L1抗体足以治疗肺癌的时间。

[0342] 本发明还提供了治疗患有肺癌的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和拮抗性抗-PD-L2抗体足以治疗肺癌的时间。

[0343] 本发明还提供了治疗患有前列腺癌的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和拮抗性抗-PD-1抗体足以治疗前列腺癌的时间。

[0344] 本发明还提供了治疗患有前列腺癌的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和拮抗性抗-PD-L1抗体足以治疗前列腺癌的时间。

[0345] 本发明还提供了治疗患有前列腺癌的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患

者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和拮抗性抗-PD-L2抗体足以治疗前列腺癌的时间。

[0346] 增强免疫应答的抗-LAG-3抗体可用于本发明的方法中。可使用的示例性抗-LAG-3抗体为在例如国际公布W02010/019570中描述的那些。

[0347] 增强免疫应答的抗-CTLA-4抗体可用于本发明的方法中。可使用的示例性抗-CTLA-4抗体是ipilimumab。

[0348] 可用于本发明方法中的抗-PD-1、抗-PD-L1、抗-PD-L2、抗-LAG3、抗-TIM3和抗-CTLA-4抗体也可使用本文所述的方法从头生成。

[0349] 在一些实施方案中,可使用包含为SEQ ID NO:32的VH和为SEQ ID NO:33的VL的抗-PD1抗体。

[0350] 在一些实施方案中,可使用包含为SEQ ID NO:34的VH和为SEQ ID NO:35的VL的抗-PD1抗体。

[0351] 在一些实施方案中,可使用包含为SEQ ID NO:36的VH和为SEQ ID NO:37的VL的抗-TIM-3抗体。

[0352] 在一些实施方案中,可使用包含为SEQ ID NO:38的VH和为SEQ ID NO:39的VL的抗-TIM-3抗体。

[0353] SEQ ID NO:32

[0354] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFDTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARPGLAAAYDTGSLDYWGQGTLVTVSS

[0355] SEQ ID NO:33

[0356] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIK

[0357] SEQ ID NO:34

[0358] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSRYDMSWVRQAPGKGLESVAYISGGGANTYYLDNVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYSYFDVWGQGTLVTVSS

[0359] SEQ ID NO:35

[0360] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLSDYLHWYQQKPGQAPRLLIKSASQSISGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQNGHSFPYTFGQGTKLEIK

[0361] SEQ ID NO:36

[0362]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KSPYAPLDYWGGQTLVTVSS

[0363] SEQ ID NO:37

[0364] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNDYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGGHAPITFGQGTKVEIK

[0365] SEQ ID NO:38

[0366] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMQWVRQMPGKGLEWMGAIYPGDGDIRYTQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARWEKSTTVVQRNYFDYWGGQTTVTVSS

[0367] SEQ ID NO:39

[0368]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVGTFVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCGQSYSTPTFGQGTKLEIK

[0369] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-1抗体足以治疗实体瘤的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-1抗体包含为SEQ ID NO:32的VH和为SEQ ID NO:33的VL。

[0370] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-PD-1抗体足以治疗实体瘤的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-PD-1抗体包含为SEQ ID NO:34的VH和为SEQ ID NO:35的VL。

[0371] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-TIM-3抗体足以治疗实体瘤的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-TIM-3抗体包含为SEQ ID NO:36的VH和为SEQ ID NO:37的VL。

[0372] 本发明还提供了治疗患有实体瘤的患者的方法,该方法包括向对其有需要的患者联合施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体和抗-TIM-3抗体足以治疗实体瘤的时间,该特异性结合CD38的抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL,该抗-TIM-3抗体包含为SEQ ID NO:38的VH和为SEQ ID NO:39的VL。

[0373] 在本发明的方法中,特异性结合CD38的抗体和第二治疗剂的组合可在任何方便的时间范围内施用。例如,特异性结合CD38的抗体和第二治疗剂可在同一天、甚至在同一静脉内输注中施用给患者。然而,特异性结合CD38的抗体和第二治疗剂也可以隔天或隔周或隔月等施用。在一些方法中,特异性结合CD38的抗体和第二治疗剂可在足够接近的时间施用,使得它们同时以可检测水平存在于正在治疗的患者体内(例如,血清中)。在一些方法中,在一定时间段内由多个剂量组成的特异性结合CD38的抗体的整个治疗过程之后或之前是由多个剂量组成的第二治疗剂的治疗过程。可在施用特异性结合CD38的抗体和第二治疗剂之间使用1天、2天或若干天或若干周的恢复期。

[0374] 特异性结合CD38的抗体或者特异性结合CD38的抗体和第二治疗剂的组合可连同任何形式的放射疗法(包括外照射、调强放射治疗(IMRT)、聚焦辐射)和任何形式的放射外科手术(包括伽玛刀、射波刀、直线加速器和组织间放射(例如,植入放射性粒子、GliaSite球囊))和/或连同外科手术一起施用。

[0375] 可使用的聚焦放射方法包括立体定向放射外科手术、分次立体定向放射外科手术、和调强放射疗法(IMRT)。明显的是立体定向放射外科手术涉及将放射精确递送至肿瘤组织如脑瘤,同时避开周围的非肿瘤正常组织。使用立体定向放射外科手术施用的放射剂量可变化,通常从1Gy至约30Gy,并且可包括中间范围,包括例如1至5、10、15、20、25、至多30Gy的剂量。因为有无创固定装置,立体定向放射不需要在单次治疗中递送。治疗计划可每天可靠地重复,从而允许递送多个分次放射剂量。当用于随时间治疗肿瘤时,放射外科手术称为“分次立体定向放射外科手术”或FSR。相比之下,立体定向放射外科手术是指一次性治疗。分次立体定向放射外科手术可导致高治疗比,即,高比率的肿瘤细胞杀灭和对正常组织

的低影响。肿瘤和正常组织对单次高放射剂量和多次较小放射剂量的响应不同。与若干次较小放射剂量相比,单次大放射剂量可杀伤更多正常组织。因此,多次较小放射剂量能够杀伤更多肿瘤细胞,同时避开正常组织。使用分次立体定向放射施用的放射剂量可变化,范围为从1Gy至约50Gy,并且可包括中间范围,包括例如1至5、10、15、20、25、30、40、至多50Gy的少分次剂量。也可使用调强放射疗法(IMRT)。IMRT是一种高精度三维适形放射治疗(3DCRT)的高级模式,其使用计算机控制的直线加速器以递送精确的放射剂量至恶性肿瘤或肿瘤内的特定区域。在3DCRT中,每个放射束的剖面使用多叶准直器(MLC)适形于射野方向观视(BEV)的目标外形,从而产生多个射束。IMRT允许通过调节在多个区中的放射束的强度,使放射剂量较精确地适配于肿瘤的三维(3-D)形状。因此,IMRT允许较高的放射剂量集中在肿瘤内的区域,同时最小化周围的正常关键结构的剂量。IMRT改善适配治疗区与凹肿瘤形状的能力,例如当肿瘤围绕易受伤害的结构时,诸如脊髓或主要器官或血管。

[0376] 包含特异性结合CD38的抗体以及透明质酸酶的药物组合物的皮下施用

[0377] 特异性结合CD38的抗体可作为包含特异性结合CD38的抗体和皮下透明质酸酶的药物组合物施用。

[0378] 特异性结合CD38的抗体的浓度在皮下施用的药物组合物中可以为约20mg/ml。

[0379] 皮下施用的药物组合物可包含介于约1,200mg至1,800mg之间的特异性结合CD38的抗体。

[0380] 皮下施用的药物组合物可包含约1,200mg的特异性结合CD38的抗体。

[0381] 皮下施用的药物组合物可包含约1,600mg的特异性结合CD38的抗体。

[0382] 皮下施用的药物组合物可包含约1,800mg的特异性结合CD38的抗体。

[0383] 皮下施用的药物组合物可包含介于约30,000U至45,000U之间的透明质酸酶。

[0384] 皮下施用的药物组合物可包含约1,200mg的特异性结合CD38的抗体和约30,000U的透明质酸酶。

[0385] 皮下施用的药物组合物可包含约1,800mg的特异性结合CD38的抗体和约45,000U的透明质酸酶。

[0386] 皮下施用的药物组合物可包含约1,600mg的特异性结合CD38的抗体和约30,000U的透明质酸酶。

[0387] 皮下施用的药物组合物可包含约1,600mg的特异性结合CD38的抗体和约45,000U的透明质酸酶。

[0388] 皮下施用的药物组合物可包含具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的透明质酸酶rHuPH20。

[0389] rHuPH20是一种重组透明质酸酶(HYLENEX[®]重组体),在国际专利公布W02004/078140中有所描述。

[0390] 透明质酸酶是一种降解透明质酸(EC 3.2.1.35)并降低细胞外基质中透明质酸(hyaluronan)的粘度从而增加组织渗透性的酶。

[0391] SEQ ID NO:40

[0392] MGVLKFKHIFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLD
MSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLKAKKIDITFYMPVDNLGMAVID
WEEWRPTWARNWPKPDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQFEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPD

CYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDLSQLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV
FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAMCS
QVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADVKTDA
VDVCIADGVCIDAFKPPMETEEPQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVASL

[0393] 可在一天、两天、三天、四天、五天、六天、一周、两周、三周、四周、五周、六周、七周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或更长时间之后重复施用包含特异性结合CD38的抗体和透明质酸酶的药物组合物。也可以重复治疗过程,按照慢性施用一样。重复施用可为相同剂量或不同剂量。例如,包含特异性结合CD38的抗体和透明质酸酶的药物组合物可一周一次施用八周,然后两周一次施用16周,接着四周一次。待施用的药物组合物可包含约1,200mg的特异性结合CD38的抗体和约30,000U的透明质酸酶,其中药物组合物中特异性结合CD38的抗体的浓度为约20mg/ml。待施用的药物组合物可包含约1,800mg的特异性结合CD38的抗体和约45,000U的透明质酸酶。待施用的药物组合物可包含约1,600mg的特异性结合CD38的抗体和约30,000U的透明质酸酶。待施用的药物组合物可包含约1,600mg的特异性结合CD38的抗体和约45,000U的透明质酸酶。

[0394] 包含特异性结合CD38的抗体和透明质酸酶的药物组合物可皮下施用到腹部区域。

[0395] 包含特异性结合CD38的抗体和透明质酸酶的药物组合物可以约80ml、90ml、100ml、110ml或120ml的总体积施用。

[0396] 对于施用,可将25mM乙酸钠、60mM氯化钠、140mM D-甘露糖醇、0.04%聚山梨醇酯20 (pHS.5) 中的20mg/ml特异性结合CD38的抗体与10mM L-组氨酸、130mM NaCl、10mM L-甲硫氨酸、0.02%聚山梨醇酯80 (pH6.5) 中的1.0mg/mL rHuPH20 (75-150kU/mL) 混合,然后将混合物施用给受治疗者。

[0397] 虽然已经概括地描述了本发明,但是本发明的实施方案还将在以下实施例中进一步公开,以下实施例不应理解为限制权利要求的范围。

[0398] 本发明的其它实施方案

[0399] 下文根据本文别处的公开内容陈述了本发明的某些其它实施方案。上文陈述为与本文所公开的发明相关的本发明的实施方案的特征还涉及所有这些其它带编号的实施方案中的每一者。

[0400] 1.一种特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有实体瘤的患者。

[0401] 2.一种特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有调节性T细胞 (Treg) 介导的疾病的患者。

[0402] 3.一种特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有骨髓源的抑制细胞 (MDSC) 介导的疾病的患者,包括向受治疗者施用治疗有效量的特异性结合CD38的抗体。

[0403] 4.一种特异性结合CD38的抗体,用于抑制调节性T细胞 (Treg) 的活性,包括使调节性T细胞与特异性结合CD38的抗体接触。

[0404] 5.一种特异性结合CD38的抗体,用于抑制骨髓源的抑制细胞 (MDSC) 的活性,包括使MDSC与特异性结合CD38的抗体接触。

[0405] 6.一种特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有实体瘤的患者,包括通过向患者施用特异性结合CD38的抗体来减少患者体内调节性T细胞的数量。

[0406] 7.一种特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有实体瘤的患者,包括通过向患者施

用特异性结合CD38的抗体来减少患者体内骨髓源的抑制细胞 (MDSC) 的数量。

[0407] 8. 根据实施方案1至7中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体在患者体内引起免疫应答。

[0408] 9. 根据实施方案1至8中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中免疫应答是效应T细胞 (Teff) 应答。

[0409] 10. 根据实施方案1至9中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中Teff应答由CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞介导。

[0410] 11. 根据实施方案9或10使用的特异性结合CD38的抗体, 其中Teff应答由CD8⁺ T细胞介导。

[0411] 12. 根据实施方案1至11中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中Teff应答是CD8⁺ T细胞数量的增加、CD8⁺ T细胞增殖的增加、T细胞克隆扩增的增加、CD8⁺记忆细胞形成的增加、抗原依赖性抗体产量的增加、或细胞因子、趋化因子或白细胞介素产量的增加。

[0412] 13. 根据实施方案1至13中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体抑制免疫抑制细胞的功能。

[0413] 14. 根据实施方案1至14中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中免疫抑制细胞是调节性T细胞 (Treg) 或骨髓源的抑制细胞 (MDSC)。

[0414] 15. 根据实施方案15使用的特异性结合CD38的抗体, 其中Treg是CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}T细胞。

[0415] 16. 根据实施方案14或15使用的特异性结合CD38的抗体, 其中Treg表达CD38。

[0416] 17. 根据实施方案13至16中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中Treg功能受到Treg杀伤的抑制。

[0417] 18. 根据实施方案17中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中Treg杀伤由抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)、细胞依赖性细胞毒性 (CDC) 或特异性结合CD38的抗体诱导的细胞凋亡来介导。

[0418] 19. 根据实施方案17至18中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中Treg杀伤由ADCC介导。

[0419] 20. 根据权利要求17至19所述的方法, 其中约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%或60%的Treg被杀伤。

[0420] 21. 根据实施方案14使用的特异性结合CD38的抗体, 其中MDSC是CD11b⁺HLA-DR-CD14-CD33⁺CD15⁺细胞。

[0421] 22. 根据实施方案21使用的特异性结合CD38的抗体, 其中CD11b⁺HLA-DR-CD14-CD33⁺CD15⁺细胞表达CD38。

[0422] 23. 根据实施方案21至22中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中MDSC功能受到MDSC杀伤的抑制。

[0423] 24. 根据实施方案23使用的特异性结合CD38的抗体, 其中MDSC杀伤由抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 或特

异性结合CD38的抗体诱导的细胞凋亡来介导。

[0424] 25. 根据实施方案23至24中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中MDSC杀伤由ADCC介导。

[0425] 26. 根据实施方案23至25中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%或60%的MDSC被杀伤。

[0426] 27. 根据实施方案14至26中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中Teff或免疫抑制细胞存在于骨髓或外周血中。

[0427] 28. 根据实施方案14至27中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中实体肿瘤是黑色素瘤、肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非鳞状NSCLC、结直肠癌、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、胃部癌症、卵巢癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈部的鳞状细胞癌、食道癌或胃肠道癌、乳腺癌、输卵管癌、脑癌、尿道癌、泌尿生殖系统癌、子宫内膜异位症、宫颈癌或癌症的转移性病变。

[0428] 29. 根据实施方案1至28中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中实体瘤缺少CD38表达。

[0429] 30. 根据实施方案1至29中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体与包含为SEQ ID NO:4的重链可变区(VH)和为SEQ ID NO:5的轻链可变区(VL)的抗体竞争结合至CD38。

[0430] 31. 根据实施方案1至30中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体至少结合至人CD38(SEQ ID NO:1)的区域SKRNIQFSCKNIYR(SEQ ID NO:2)和区域EKVQTLEAWVIHGG(SEQ ID NO:3)。

[0431] 32. 根据实施方案1至31中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体包含分别为SEQ ID NO:6、7和8的重链互补决定区(HCDR1)、2(HCDR2)和3(HCDR3)序列。

[0432] 33. 根据实施方案1至32中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体包含分别为SEQ ID NO:9、10和11的轻链互补决定区(LCDR1)、2(LCDR2)和3(LCDR3)序列。

[0433] 34. 根据实施方案1至33中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体包含分别为SEQ ID NO:6、7、8、9、10和11的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0434] 35. 根据实施方案1至34中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体包含与SEQ ID NO:4具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的VH, 以及与SEQ ID NO:5具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的VL。

[0435] 36. 根据实施方案1至31中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL。

[0436] 37. 根据实施方案1至29中任一项使用的特异性结合CD38的抗体, 其中该抗体包含以下序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3:

[0437] a. 为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;

[0438] b. 为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;

- [0439] c.为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL;或者
- [0440] d.为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。
- [0441] 38.根据实施方案37使用的特异性结合CD38的抗体,其中抗-CD38
- [0442] 抗体包含:
- [0443] a.为SEQ ID NO:14的VH和为SEQ ID NO:15的VL;
- [0444] b.为SEQ ID NO:16的VH和为SEQ ID NO:17的VL;c.为SEQ ID NO:18的VH和为SEQ ID NO:19的VL;或者d.为SEQ ID NO:20的VH和为SEQ ID NO:21的VL。
- [0445] 39.根据实施方案1至38中任一项使用的特异性结合CD38的抗体,其中该抗体与第二治疗剂联合施用。
- [0446] 40.根据实施方案39使用的特异性结合CD38的抗体,其中第二治疗剂是化学治疗剂、靶向抗癌疗法、用于治疗实体瘤的标准护理药物或免疫检查点抑制剂。
- [0447] 41.根据实施方案40使用的特异性结合CD38的抗体,其中免疫检查点抑制剂是抗-PD-1抗体、抗-PD-L1抗体、抗-PD-L2抗体、抗-LAG3抗体、抗-TIM3抗体或抗-CTLA-4抗体。
- [0448] 42.根据实施方案39使用的特异性结合CD38的抗体,其中第二治疗剂同时施用、依序施用或分开施用。
- [0449] 43.根据实施方案39至42中任一项使用的特异性结合CD38的抗体,其中患者用放射疗法治疗。
- [0450] 44.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有实体瘤的患者。
- [0451] 45.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有实体瘤的患者,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:22的VH和为SEQ ID NO:23的VL的抗-PD-1抗体联合施用。
- [0452] 46.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有实体瘤的患者,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:24的VH和为SEQ ID NO:25的VL的抗-PD-1抗体联合施用。
- [0453] 47.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于增强患者体内的免疫应答。
- [0454] 48.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于增强患者体内的免疫应答,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:22的VH和为SEQ ID NO:23的VL的抗-PD-1抗体联合施用。
- [0455] 49.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于增强患者体内的免疫应答,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:24的VH和为SEQ ID NO:25的VL的抗-PD-1抗体联合施用。
- [0456] 50.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有实体瘤的患者,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:26的VH和为SEQ ID NO:27的VL的抗-PD-L1抗体联合施用。
- [0457] 51.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体用于治疗患有实体瘤的患者,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:28的VH和为SEQ ID NO:29的VL的抗-PD-L1抗体联合施用。

[0458] 52.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于治疗患有实体瘤的患者,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:30的VH和为SEQ ID NO:31的VL的抗-PD-L1抗体联合施用。

[0459] 53.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于增强患者体内的免疫应答,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:26的VH和为SEQ ID NO:27的VL的抗-PD-L1抗体联合施用。

[0460] 54.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于增强患者体内的免疫应答,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:28的VH和为SEQ ID NO:29的VL的抗-PD-L1抗体联合施用。

[0461] 55.一种包含为SEQ ID NO:4的VH和为SEQ ID NO:5的VL的特异性结合CD38的抗体,用于增强患者体内的免疫应答,其中该抗体与包含为SEQ ID NO:30的VH和为SEQ ID NO:31的VL的抗-PD-L1抗体联合施用。

[0462] 实施例1:一般材料和方法

[0463] 样本收集和处理

[0464] 在紧接着第一次输注之前的基线处和治疗期间的特定时间点,将外周血和骨髓抽吸物收集到肝素化管中。当大部分样本在收集后24-48小时抵达中央实验室时,使用实时流式细胞仪进行评估。从通过密度梯度离心法分离的全血中获得外周血单核细胞(PBMC),并且在分析之前冷冻储存。使用冷冻的PBMC样本,同时对治疗前和治疗后的样本进行T细胞活化、克隆性和CD38⁺ Treg抑制测定分析。

[0465] 使用经验证的免疫表型测定法,在BARC全球中心实验室对这些样本进行流式细胞分析,以评估NK细胞、T细胞、B细胞、骨髓瘤细胞(CD138⁺)和CD38表达。简而言之,用以下多荧光染料抗体组合对血液样本和骨髓样本进行染色:细胞谱系组:PerCPCy5.5α-CD19(克隆HIB19;Becton Dickinson[BD])、APCα-CD24(SN3;eBioscience)、PC7α-CD3(UCHT-1; Beckman Coulter)、V500α-CD16(3G8;BD)和PEα-CD56(MY;BD);调节性T细胞(Treg)组:APCα-CD25(2A3;BD)、PEα-CD127(HIL-7R-M21;BD)、APC-H7α-HLA-DR(G46-6;BD)和PerCPα-CD4(L200;BD);初始/记忆T细胞组:APC-H7α-CD4(RPA-T4;BD)、PerCP-Cy5.5α-CD8(RPA-T4BD)、PEα-CD62L(SK11;BD)和APCα-CD45RA(H1100;BD)。使用美国专利7,829,693中描述的具有为SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH和VL序列的Alexa 647标记的抗体mAb 003评估CD38表达。使用不同的裂解洗涤方法制备血液样本。对于骨髓抽吸物样本,用各种抗体进行膜或细胞内染色。使用Becton Dickinson FACS裂解液裂解外周血样本中的红血细胞,使用得自Invitrogen公司的Fix和Perm细胞透化剂进行骨髓抽吸物样本的细胞内染色。从FACS Canto II流式细胞仪上获取染色后的样本,然后使用FacsDiva软件分析数据。在所有测试的时间点测定血液样本中免疫细胞群的绝对计数和骨髓样本中淋巴细胞的百分比。

[0466] T细胞受体(TCR)测序

[0467] 使用来自PBMC样本的基因组DNA,通过TCR重排的深度测序来分析T细胞多样性以评估CD8⁺ T细胞克隆性。使用Adaptive Biotechnologies商业Immunoseq™测定进行TCR测序,并且使用预认证的多重聚合酶链式反应(PCR)测定(TR2015CRO-V-019)进行分析,该PCR测定由直接靶向家族的可变(V)基因(正向引物)和连接(J)基因(反向引物)的正向引物和反向引物组成。每个V和J基因引物充当引物对以扩增体细胞重组TCR,并且每个引物含有特

定的通用DNA序列。在最初的PCR扩增之后,用正向引物和反向引物对每个扩增子进行第二次扩增,该正向引物和反向引物含有Illumina进行DNA测序所需的通用序列和衔接头序列。

[0468] 对病毒抗原和同种异体抗原的T细胞应答

[0469] 将患者PBMC接种到96孔板上 (2×10^5 细胞/孔) 并用来自人细胞巨化病毒 (CMV)、EB病毒 (EBV) 和流感病毒 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$, CEF肽库; PANATecs[®]) 的23种主要组织相容性复合物 (MHC) I类限制病毒肽混合物或来自健康供体的25Gy照射的相当数量的同种异体PBMC刺激5天。未刺激的PBMC和用抗-CD3/CD28包被珠刺激的PBMC分别作为阴性对照和阳性对照。在第5天,通过夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA; Human IFN gamma ELISA Ready-SET-Go; eBioscience) 测量不含细胞上清液中的干扰素 γ (IFN- γ), 并且用作T细胞活化的替代标志物。

[0470] 效应细胞功能的调节性T细胞 (Treg) 抑制: 羧基荧光素琥珀酰亚胺 (CFSE) 稀释测定

[0471] 将来自健康供体的PBMC用PerCP-Cy5.5-CD3 (SK7; BD)、K0-CD45, (J33; Beckman Coulter)、V450-CD4 (SK3; BD)、PE-CD25 (M-A251, BD)、PE Cy7-CD127 (HIL-7R-M21; BD) 和 APC-CD38 (HB-7; BD) 进行标记, 并且用FACS Aria (BD) 进行分选。分选后的效应细胞用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE; eBioscience) 进行标记, 并且在存在或不存在CD38⁺ Treg或CD38-Treg (Treg与效应细胞比率为1:1) 的情况下在RPMI加10%胎牛血清中用抗-CD3/CD28包被珠刺激。72小时后, 进行流式细胞术分析, 并且使用CFSE的百分比稀释度作为T细胞增殖的替代物。

[0472] 骨髓源的抑制细胞 (MDSC) 表型分型和DARZALEX[™] (达雷木单抗) 介导的ADCC

[0473] 将来自三个正常健康供体的PBMC与骨髓瘤细胞系 (RPMI8226, U266, H929) 共培养六天, 并如Gorgund等人, Blood 121:2975-87, 2013中所述对粒细胞MDSC (G-MDSC) (CD11b⁺ CD14⁻ HLA-DR⁻ CD15⁺ CD33⁺) 的产生进行评估。正常健康的PBMC中不存在G-MDSC, 然而在与所有三种骨髓瘤细胞系共培养后, G-MDSC以总PBMC细胞群的5%至25%存在 (数据未示出)。用于G-MDSC的流式细胞术评估的设门策略包括CD11b⁺作为第一设门, 其次是CD14⁻和HLA-DR-设门, 然后是CD15⁺和CD33⁺设门。对G-MDSC进行细胞分选并评估CD38表达水平和对DARZALEX[™] (达雷木单抗) 介导的ADCC的敏感性。为评估DARZALEX[™] (达雷木单抗) 对MDCC的ADCC/CDC的效应, 将含有补体或同种型对照的血清加入到ADCC测定中。

[0474] 初始T细胞和记忆T细胞分析

[0475] 在每次输注DARZALEX[™] (达雷木单抗) 之前从患者体内获得肝素化的外周血样本。通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心分离外周血单核细胞 (PBMC), 并将其储存在液氮中的冷冻保存培养基 (补充有10%人血清和10%二甲基亚砷的RPMI) 中。为进行FACS分析, 将PBMC解冻并且将 2×10^6 个细胞/组重悬于含有0.05%叠氮化物和0.1%HAS的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。

[0476] 数据分析

[0477] 所有数据分析和相关图的生成均使用R软件进行 (R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011, ISBN 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org/>)。数据分析中包括了具有可评估应答的所有经治疗的受治疗者。自始自

终,有应答者被定义为具有根据IRC的sCR、VGPR和PR最佳应答的受治疗者,而无应答者被定义为具有根据IRC的MR、SD和PD最佳应答的受治疗者。

[0478] 不同的统计学比较包括:(i)有应答者和无应答者之间的基线水平,(ii)有应答者和无应答者的基线对治疗期间,(iii)有应答者和无应答者之间的百分比变化,(iv)基线对治疗期间的比率变化。每个比较首先用Shapiro-Wilk检验(Royston(1995)Remark AS R94: A remark on Algorithm AS 181:The W test for normality.Applied Statistics,44, 547-551)测试以进行归一化。发现几乎所有的数据都不具有正态分布。差异水平测试包括进行非参数Wilcoxon秩和检验(Hollander和Wolfe(1973),Nonparametric Statistical Methods.New York:John Wiley&Sons,第27-33页(单样本),第68-75页(双样本)和Box Cox变换后的t检验(Weisberg,S.,(2014)Applied Linear Regression,Fourth Edition,Wiley Wiley,第7章)。对于Box Cox变换,小数值($1e-07$)被加上等于零的数值。在所有情况下,这两种检验都一致。除非另外指明,否则Wilcoxon秩和检验p值示出在整个说明书的表格中。当测试有应答者和无应答者的基线对治疗期间的差异时,对每个受治疗者进行两组配对测试,在所有其它情况下进行两组非配对测试。

[0479] 由于对于不同的给药方案,用于分析各种淋巴细胞群的样本是在不相同的时间点采取的,所以进行了群体建模。模型拟合根据访视的秩序进行。对总NK细胞和活化的NK细胞的群体建模包括拟合破棍模型(Lutz等人,“Statistical model to estimate a threshold dose and its confidence limits for the analysis of sublinear dose-response relationships,exemplified for mutagenicity data.”Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 678.2(2009):118-122)。具有随机截距和斜率的线性混合效应模型适合于B细胞、T细胞亚群以及白细胞、单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞患者群体数据(Bates等人,(2014).“lme4:Linear mixed-effects models using Eigen and S4.”ArXiv e-print;submitted to Journal of Statistical Software,<http://arxiv.org/abs/1406.5823>)。在治疗开始(ADY)后的相对天进行这种线性混合建模。线性混合模型拟合是在对数转换应答变量上完成的。在应答变量值等于零的情况下,将所有应答变量值加上0.1以允许以对数级别计进行建模。

[0480] 实施例2:研究54767414MMY2002设计(SIRIUS)

[0481] 研究54767414MMY2002(SIRIUS)的目标人群是接受了至少3种前线疗法(包括蛋白酶体抑制剂(PI)和免疫调节药物(IMiD))或对PI和IMiD双重难治的晚期多发性骨髓瘤患者。应答评估的主要终点/最终分析是使用2011年IMWG指南(Clinical Study Report:An Open-label,Multicenter,Phase 2Trial Investigating the Efficacy and Safety of DARZALEX™(daratumumab)in Subjects With Multiple Myeloma Who Have Received at Least 3Prior Lines of Therapy(Including a Proteasome Inhibitor and IMiD)or are Double Refractory to a Proteasome Inhibitor and an IMiD(EDMS-ERI-92399922;de Weers等人,(2011)J Immunol186(3):1840-1848)基于来自独立审查委员会(IRC)和计算机算法的评估。

[0482] 这些评估包括:总应答率(ORR)、应答持续时间、出现应答和最佳应答的时间、临床受益率、进展时间(TTP)、无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。

[0483] 在本研究中共有124名受治疗者接受DARZALEX™(达雷木单抗)治疗(de Weers等

人, (2011) J Immunol 186 (3):1840-1848)。18名受治疗者接受8mg/kg的治疗, 106名受治疗者接受16mg/kg的治疗。给药方案如下:

[0484] A组: DARZALEX™ (达雷木单抗) 16mg/kg: 第1周期和第2周期: 第1、8、15和22天 (每周), 第3至6周期: 第1天和第15天 (每隔一周), 第7+周期: 第1天 (每4周)。每个周期为4周。

[0485] B组: DARZALEX™ (达雷木单抗) 8mg/kg: 第1+周期: 第1天 (每4周)。

[0486] 研究的主要目的是确定如通过ORR (CR+PR) 所测量的DARZALEX™ (达雷木单抗) 的2种治疗方案在已接受至少3种前线疗法 (包括PI和IMiD) 或其疾病对PI和IMiD双重难治的多发性骨髓瘤受治疗者中的疗效 (Clinical Study Report: An Open-label, Multicenter, Phase 2 Trial Investigating the Efficacy and Safety of DARZALEX™ (daratumumab) in Subjects With Multiple Myeloma Who Have Received at Least 3 Prior Lines of Therapy (Including a Proteasome Inhibitor and IMiD) or are Double Refractory to a Proteasome Inhibitor and an IMiD. EDMS-ERI-92399922)。

[0487] 该研究的次要目的包括评估DARZALEX™ (达雷木单抗) 的安全性和耐受性、额外疗效 (例如, 临床受益、TTP、PFS和OS) 测量证明以及药代动力学、免疫原性、药效学的评估, 以及探索对DARZALEX™ (达雷木单抗) 应答的预测生物标志物。额外的研究相关信息可从临床研究方案中获得 (Clinical Study Report: An Open-label, Multicenter, Phase 2 Trial Investigating the Efficacy and Safety of DARZALEX™ (daratumumab) in Subjects With Multiple Myeloma Who Have Received at Least 3 Prior Lines of Therapy (Including a Proteasome Inhibitor and IMiD) or are Double Refractory to a Proteasome Inhibitor and an IMiD. EDMS-ERI-92399922)。

[0488] 在第1部分的第1阶段, 8mg/kg组有1名受治疗者 (6%) 有应答, 16mg/kg组有5名受治疗者 (31%) 有应答。因此, 在第1部分的第2阶段和第2部分只扩大了16mg/kg组。

[0489] 在16mg/kg组中, 31名受治疗者基于IRC评估获得PR或更好的应答; ORR为29% (95% CI: 21%, 39%)。三名受治疗者 (3%) 实现了sCR, 并且13名受治疗者 (12%) 实现了VGPR或更好。

[0490] 实施例3: 在参加54767414MMY2002研究 (SIRIUS) 的患者中DARZALEX™ (达雷木单抗) 对T细胞扩增和活性的效应

[0491] 多种免疫细胞和造血细胞表达了CD38。通过流式细胞术进行广泛的免疫分析来检查DARZALEX™ (达雷木单抗) 对免疫细胞亚群的效应和这些细胞的基线水平与临床应答的关联。在基线处和随后的DARZALEX™ (达雷木单抗) 治疗中, 通过流式细胞术评估外周血和骨髓抽吸物中的各种细胞群 (包括外周血和骨髓抽吸物中的T细胞 (CD3⁺细胞、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞和调节性T细胞 (Treg))、B细胞 (CD19⁺)、NK细胞、单核细胞 (CD14⁺)、白细胞和中性粒细胞) 以监测有应答者和无应答者中这些细胞群的变化。

[0492] 淋巴细胞、白细胞、单核细胞和中性粒细胞

[0493] 研究有应答者和无应答者的外周血中白细胞、淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞计数。在用8mg/kg和16mg/kg剂量的DARZALEX™ (达雷木单抗) 治疗的有应答者中均发现总淋巴细胞增加 (图1)。线性混合效应建模显示每100天以对数级别计增加 0.8×10^6 细胞/ μ L (CI = 0.06, 0.11)。发现单核细胞和白细胞略有增加, 每100天以对数级别计分别显著增加 0.03×10^6 细胞/ μ L (CI = 0.01, 0.04) 和 0.03×10^6 细胞/ μ L (CI = 0.01, 0.05)。尽管有些患者出现

中性粒细胞减少症,但中性粒细胞中位计数与基线一致,并没有显著变化。

[0494] 在应答组之间比较这些细胞群各自的基线水平。使用Wilcoxon符号秩检验,发现在不同应答组中任何这些细胞类型的基线水平是相同的(表1)。

[0495] 表1:

在基线处有应答者与无应答者的外周血细胞计数					
	N	中值	均值(SD)	范围	p-值*
白细胞: R	33	4.3	4.32 (1.65)	(1.6; 8.8)	
白细胞: NR	82	4.19	4.77 (2.26)	(2.13; 13.8)	0.60987
淋巴细胞: R	33	0.9	1.09 (0.59)	(0.27; 2.67)	
淋巴细胞: NR	82	1	1.05 (0.55)	(0.3; 2.8)	0.85028
单核细胞: R	33	0.43	0.5 (0.25)	(0.2; 0.97)	
单核细胞: NR	82	0.5	0.51 (0.25)	(0.04; 1.3)	0.72803
中性粒细胞: R	33	2.47	2.54 (1.23)	(1.06; 5.94)	
中性粒细胞: NR	82	2.44	3.05 (2.08)	(1; 11.7)	0.40373
N: 每组样本的数量					
R: 有应答者					
NR: 无应答者					
*无应答者对有应答者					
SD: 标准偏差					

[0498] NK细胞

[0499] 随时间推移,总NK细胞(CD16⁺CD56⁺)和活化的NK细胞(CD16⁺CD56^{dim})随DARZALEX™(达雷木单抗)治疗增加而减少(数据未示出)。

[0500] B细胞

[0501] 在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间,测量有应答者和无应答者的外周血或骨髓抽吸物中B细胞(CD45⁺CD3⁻CD19⁺)随时间推移的绝对计数。B细胞在全血中略微增加,而在骨髓抽吸物中维持不变。外周血中B细胞的线性混合模型揭示了在整个DARZALEX™(达雷木单抗)治疗过程中每100天以对数级别计最小增加 0.1×10^6 细胞/ μ l [CI=0.04, 0.16]。在达雷木单抗治疗期间,有应答者或无应答者的骨髓抽吸物中B细胞(CD45⁺CD3⁻CD19⁺/淋巴细胞)的百分比没有变化(p分别=0.1和0.4)。此外,没有证据表明有应答者和无应答者之间的B细胞计数在基线处是不同的(p=0.5)。

[0502] T细胞

[0503] 注意到淋巴细胞在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗后增加(图1),尽管B细胞仅显示最小量的增加(参见上文)。为了进一步探索,研究了外周血和骨髓中的各种T细胞群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞、调节性T细胞)。

[0504] DARZALEX™(达雷木单抗)治疗后,外周血中的CD3⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞增加(绝对计数/ μ l和淋巴细胞百分比)。图2示出了每个患者的外周血中CD3⁺ T细胞(CD45⁺CD3⁺)的绝对计数相对于基线随时间推移的百分比变化。图中的黑线示出了所有患者的绝对中位计数 $\times 10^6$ 细胞/ μ L。图中仅包含2次以上观察的访视。图3示出了每个患者的外周血中CD4⁺ T细胞(CD45⁺CD3⁺CD4⁺)的绝对计数相对于基线随时间推移的百分比变化。图中

的黑线示出了所有患者的中位数。图中仅包含2次以上观察的访视。图4示出了每个患者的外周血中CD8⁺ T细胞 (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) 的绝对计数相对于基线随时间推移的百分比变化。图中的黑线示出了所有患者的中位数。图中仅包含2次以上观察的访视。外周血中绝对计数的线性混合建模揭示了DARZALEX™ (达雷木单抗) 治疗后平均总T细胞 (CD45⁺CD3⁺) 每100天以对数级别计增加 0.13×10^6 细胞/ μ l (CI=0.1, 0.15)。发现CD8⁺ T细胞显著增加, 每100天以对数级别计增加 0.16×10^6 细胞/ μ l (CI=0.13, 0.19)。发现CD4⁺细胞适度增加, 每100天以对数级别计增加 0.11×10^6 细胞/ μ l (CI=0.09, 0.13)。

[0505] 对于每个T细胞亚群, 有应答者比无应答者显示出相对于基线绝对计数的更高的最大百分比变化 (CD3⁺ p=3.2993e-05; CD4⁺ p=3.486e-05; CD8⁺ p=2.7172e-05; 调节性T细胞 p=0.002)。表2示出了Wilcoxon符号秩检验的测试结果, 用于比较有应答者和无应答者之间外周血中的每个T细胞亚群的绝对计数相对于基线的百分比变化。

[0506] 表2:

[0507]

绝对细胞计数的百分比变化; 外周血					
样本	N	中值	均值(SD)	范围	p-值*
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	33	86.76	118.91 (104.07)	(-16.1; 398.71)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : NR	80	28.08	43.02(69.55)	(-67.11; 286.67)	3.30E-05
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : R	33	72.08	77.74 (60.99)	(-21.05; 233.21)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : NR	80	19.48	29.36 (59.58)	(-68; 298.89)	3.49E-05
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : R	33	106.6	180.81 (192.37)	(-7.07; 760.51)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : NR	80	32.24	63.96 (112.44)	(-66.22; 588.89)	2.72E-05
N: 每组样本的数量					
R: 有应答者					
NR: 无应答者					
*有应答者对无应答者					
SD: 标准偏差					

[0508] 同样在骨髓中, 均发现在DARZALEX™ (达雷木单抗) 治疗期间有应答者和无应答者的总T细胞 (CD45⁺CD3⁺作为淋巴细胞的百分比) 和CD8⁺T细胞 (CD45⁺CD3⁺CD8⁺作为淋巴细胞的百分比) 显著增加 (CD3⁺有应答者p=3.8147e-06, 无应答者p=9.8225e-05; CD8⁺有应答者p=3.8147e-06, 无应答者p=0.0003)。在任一临床应答组中, 骨髓中的CD4⁺ T细胞中位数没有变化。表3示出了骨髓中各种T细胞作为淋巴细胞%的Wilcoxon符号秩检验结果。图5示出了DARZALEX™ (达雷木单抗) 治疗期间随时间推移CD45⁺CD3⁺细胞的百分比 (%) (图中包括有应答者和无应答者)。图6示出了DARZALEX™ (达雷木单抗) 治疗期间随时间推移CD45⁺CD3⁺CD8⁺细胞的百分比 (%) (图中包括有应答者和无应答者)。

[0509] 表3:

[0510]

骨髓中的T细胞群 (淋巴细胞%)					
样本		NR: 基线	NR: 治疗期间	R: 基线	R: 治疗期间
CD45 ⁺ CD3 ⁺ /淋巴细胞	N	29	29	19	19
	中值	72.2	83.6	77.9	91.4
	均值(SD)	68.57 (13.64)	80.93 (11.57)	71.82 (14.92)	87.67 (9.49)
	范围	(36.3; 94.5)	(50.9; 97.4)	(42.2; 94.8)	(63.3; 97.2)
	p-值*		9.8225e-05		3.8147e-06
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ /淋巴细胞	N	29	29	19	19
	中值	33.7	29.2	22.7	22.8
	均值(SD)	31.24 (12.14)	32.96 (12.57)	24.18 (7.37)	24.29 (9.58)
	范围	(6.3; 54.2)	(9.6; 60.9)	(8.1; 36.6)	(12.5; 45.4)
	p-值*		0.18351		0.98432
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ /淋巴细胞	N	29	29	19	19
	中值	36.3	43.3	49.4	66.9
	均值(SD)	37.39 (13.64)	47.74 (18.14)	46.91 (14.89)	62.82 (12.79)
	范围	(15.9; 67.2)	(18.5; 81)	(24.5; 79.6)	(33.1; 83.3)
	p-值*		0.00026883		3.8147e-06
N: 每组样本的数量					
R: 有应答者					
NR: 无应答者					
*有应答者或无应答者组的基线对治疗期间					
SD: 标准偏差					

[0511] 虽然有应答者和无应答者的外周血和骨髓中均表现出T细胞增加,但有应答者相对于基线变化百分比最大。为区分有应答者或无应答者在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗前是否具有不同水平的CD3⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞,比较外周血中每个亚组的基线测量值。

[0512] 通过Wilcoxon符号秩检验,基线处有应答者和无应答者之间外周血中的绝对T细胞计数(表4)或骨髓中总淋巴细胞中的T细胞百分比(表5)没有统计意义上的显著性差异。

[0513] 表4:

[0514]

基线处治疗前外周血中的绝对细胞计数					
样本	N	中值	均值(SD)	范围	p-值*
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	33	574	715.91 (472.54)	(186; 2096)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : NR	80	638	672.5 (426.36)	(85; 2407)	0.81527
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : R	33	190	276.91 (207.39)	(77; 1085)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : NR	80	214	251.61 (146.13)	(21; 766)	0.94965
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : R	33	332	424.55 (324.49)	(93; 1238)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : NR	80	318	398.14 (354.52)	(43; 2221)	0.56555
N: 每组样本的数量					
R: 有应答者					
NR: 无应答者					
*根据细胞类型的有应答者对无应答者					
SD: 标准偏差					

[0515] 表5:

[0516]

治疗前骨髓中的T细胞(淋巴细胞%)					
样本	N	中值	均值(SD)	范围	p-值
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	23	78.4	73.66 (14.43)	(42.2; 94.8)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : NR	65	76.5	73.5 (13.93)	(36.3; 94.5)	0.81232
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : R	23	25	25.57 (8.32)	(8.1; 41.4)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : NR	65	25.3	27.53 (12.76)	(6.3; 55.2)	0.76482
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : R	23	50	47.7 (13.73)	(24.5; 79.6)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : NR	65	44.3	44.73 (15.49)	(15.9; 76.1)	0.41678
N: 每组样本的数量					
R: 有应答者					
NR: 无应答者					
*根据细胞类型的有应答者对无应答者					
SD: 标准偏差					

[0517] T调节性细胞

[0518] Treg细胞被识别为样本中的CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}细胞群。评估在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者的外周血和骨髓中CD8⁺T细胞与Treg随时间推移的比率。该比率在外周血和骨髓中增加。图7A示出了每个时间点所有患者的外周血中CD8⁺/Treg和CD8⁺/CD4⁺细胞比率的中值。图7B示出了每个时间点所有患者的骨髓中CD8⁺/Treg和CD8⁺/CD4⁺T细胞比率的中值。通过Wilcoxon符号秩检验,随治疗时间推移在外周血中(表6)和骨髓中(表7)CD8⁺Treg和CD8⁺/CD4⁺的绝对计数的比率变化显著。

[0519] 在SIRIUS和GEN501研究(实施例6)的组合数据分析中,外周血中的CD8⁺/CD4⁺与CD8⁺/Treg细胞的中位数比率在第8周(对于CD8⁺/CD4⁺, $p=5.1 \times 10^{-5}$, 对于CD8⁺/Treg, $p=1.8 \times 10^{-7}$)和第16周(对于CD8⁺/CD4⁺, $p=0.00017$, 对于CD8⁺/Treg, $p=4.1 \times 10^{-7}$)增加。相似地,在骨髓中,CD8⁺/CD4⁺和CD8⁺/Treg细胞的中位数比率与基线相比(对于CD8⁺/CD4⁺, $p=0.00016$; 对于CD8⁺/Treg, $p=2.8 \times 10^{-7}$)在治疗期间(第12周±第1周期)增加。在有应答者

和无应答者之间没有观察到显著差异。

[0520] 表6:

外周血中的 T 细胞比率					
样本	N	中值	均值(SD)	范围	p-值*
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : 基线	66	119.75	191.78 (231.09)	(24.17; 1461.18)	
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : C3D1	66	204.86	222.96 (167.44)	(25.53; 867.58)	0.00046409
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : C4D1	66	210.05	215.15 (151.31)	(25.86; 798.83)	0.00042154
CD8 ⁺ /Treg: 基线	66	1258.33	2338.46 (3465.12)	(206.82; 18550)	
CD8 ⁺ /Treg: C3D1	66	2326.74	3361.87 (3661.61)	(155; 23066.67)	5.25E-06
CD8 ⁺ /Treg: C4D1	66	2763.16	3382.86 (3629.69)	(316.67; 22087.5)	9.95E-08
*与基线的比较; N: 每组样本的数量; SD: 标准偏差					

[0522] 表7:

[0523]

骨髓中的 T 细胞比率					
样本	N	中值	均值 (SD)	范围	p-值*
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ (/淋巴细胞): 基线	31	163.18	184.4 (129.5)	(32.58; 674.58)	

[0524]

CD8 ⁺ /CD4 ⁺ (/淋巴细胞): 治疗期 间	31	221.89	240.85 (155.57)	(30.38; 666.4)	0.0038599
CD8 ⁺ /Treg (/淋巴细胞): 基线	30	1219.58	1802.73 (1582.7)	(306.41; 7960)	
CD8 ⁺ /Treg (/淋巴细胞): 治疗期 间	30	2273.56	3905.72 (4232.73)	(451.22; 20825)	3.15E-07
*与基线的比较; N: 每组样本的数量; SD: 标准偏差					

[0525] 实施例4: 研究设计 (GEN501)

[0526] 研究GEN501 (NCT00572488) 评估DARZALEX™ (达雷木单抗) 作为双重难治性MM患者的单一疗法。样本分离、处理和统计分析如实施例1和实施例2中所述。该研究已在Lokhorst等人, N Eng J Med 373:1207-19, 2005中有所描述。

[0527] 简而言之, 研究GEN501是DARZALEX™ (达雷木单抗) 在MM患者中的首例人体临床研究。该研究是分为两部分的1/2阶段、剂量递增的安全性研究。第一部分为非盲、剂量递增研究; 第2部分是基于第1部分确定的剂量水平的非盲、单组研究。

[0528] 在第1部分中, 评估了10个DARZALEX™ (达雷木单抗) 剂量水平: 0.005mg/kg、0.05mg/kg、0.10mg/kg、0.50mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、4mg/kg、8mg/kg、16mg/kg和24mg/kg。为

2个最低剂量组分别分配1(+3)名受治疗者,对剩余8个剂量组施采用标准3(+3)名受治疗者分配。第2部分是非盲的单一研究,包括两个剂量水平,8mg/kg和16mg/kg。第一部分包括32名受治疗者,并且第二部分包括72名受治疗者。

[0529] 实施例5:DARZALEX™(达雷木单抗)治疗诱导患者的T细胞克隆性

[0530] 鉴于MY2002研究中在外周血和骨髓中都发现CD8⁺ T细胞扩增,使用Immunoseq™测定法进行T细胞受体(TCR)的高通量下一代测序以确定扩增的CD8⁺ T细胞实际上是否具有指示适应性免疫应答的克隆性。评估参加GEN501研究的受治疗者的总共17个患者样本(n=6名有应答者,即,≥PR;n=11名无应答者,即,MR、SD、PD)。

[0531] TCR测序揭示了DARZALEX™(达雷木单抗)治疗显著增加患者间的克隆性。图8A示出了DARZALEX™(达雷木单抗)治疗之前与之后的T细胞克隆性之间的相关性(p=0.0056)。图8B示出了单个患者的克隆性的倍数变化。有应答者用星号标记。该数据表明用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗所指出的T细胞扩增实际上可能是克隆性的。

[0532] 与无应答者相比,有应答者在TCR库中有更大的总体扩增(如通过丰度变化来测量;CIA)。图8C示出了单个患者的CIA%。A组:有应答者,B组:无应答者。在有应答者和无应答者之间观察到统计意义上的显著差异(p=0.037)。图8D示出了有应答者和无应答者中每种扩增T细胞克隆的丰度绝对变化(CIA)之和。图8E示出了单个患者各自的最大CIA百分比。A组:有应答者,B组:无应答者。在有应答者和无应答者之间观察到统计意义上的显著差异(p=0.048)。图8F示出了有应答者(A组)和无应答者(B组)中单个T细胞克隆的最大CIA。

[0533] 通过使用Fisher精确检验来辨别两个样本之间克隆丰度的显著差异从而获得CIA(DeWitt等人,J.Virol.2015),并对每个扩增克隆的丰度绝对变化求和。

[0534] 实施例6:DARZALEX™(达雷木单抗)在参加GEN501研究的患者中的免疫调节效应

[0535] 评估参加GEN501的有应答者和无应答者中的各种T细胞群和B细胞群。

[0536] 淋巴细胞

[0537] 与SIRIUS(MMY2002)研究类似,在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间,外周血和骨髓中的淋巴细胞均增加。该增量归因于CD4⁺和CD8⁺细胞数量的增加。

[0538] CD8⁺中枢记忆细胞

[0539] 在参加GEN 501研究的17名患者的子集中,研究了在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者随时间推移的CD8⁺ T细胞表型。使用标准方案将来自患者的CD8⁺细胞识别为初始(CD45RO⁻/CD62L⁺)(T_N)或中枢记忆(T_{CM})(CD45RO⁺/CD62L^{high})细胞。

[0540] 图9A示出了CD8⁺初始细胞%(CD8⁺细胞%),并且图9B示出了CD8⁺中枢记忆细胞%。DARZALEX™(达雷木单抗)治疗显著降低初始CD8⁺ T细胞的数量(第8周p=1.82×10⁻⁴)并且增加CD8⁺记忆T细胞的数量(第8周p=4.88×10⁻²)。这表明初始细胞毒性T细胞向可针对特定抗原被激活的记忆性T细胞转变。白色方块指示达到至少最小应答(≥MR)的患者,并且黑色方块指示具有稳定疾病或进行性疾病的患者。在对治疗有应答的患者中CD8⁺初始T细胞的显著更多的降低是明显的(数据未示出)。图9C示出了DARZALEX™(达雷木单抗)治疗增加了HLA I类限制性T细胞的百分比,这部分地驱动了病毒特异性和同种异体反应性T细胞应答。图9D示出了扩增的效应记忆T细胞表达低水平的CD38。务必要注意,这些T细胞显示对病毒肽和同种异体抗原正常甚至增加的功能活性(见实施例8)。从这些功能性结果我们得出结论,在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间,有抗原经历的T细胞对病毒和同种异体抗原的

扩增或活性改善。这些数据表明,与调节性细胞亚群不同,效应T细胞不需要CD38表达来正常发挥作用和扩增。

[0541] CD38阳性调节性T细胞

[0542] 观察到细胞毒性T细胞的强力扩增和增加的活性连同最近的文献都表明,几种免疫抑制细胞亚群表达DARZALEX™(达雷木单抗)对调节性细胞群调节性T细胞(Treg)、骨髓源的抑制细胞(MDSC)和调节性B细胞(Breg)的效应的CD38促使检查。

[0543] 使用标准方案分离调节性T细胞(Treg) ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$)。使用流式细胞术分析Treg的频率。

[0544] 在Treg活化之前,外周Treg亚群($10\% \pm 10\%$)表达高水平的CD38。图10A的上图示出了在基线处 $CD3^+CD4^+$ 细胞群(P4细胞群)中Treg的频率。图10A的下图示出了表达高CD38的Treg的亚群(P5细胞群)。这些 $CD38^+$ Treg对DARZALEX™(达雷木单抗)治疗高度敏感,并在DARZALEX™(达雷木单抗)首次给药后表现出显著并且几乎立即的下降($n=17$ 名患者;与基线对比,在第1周, $P=8.88 \times 10^{-16}$)。DARZALEX™(达雷木单抗)治疗之后的Treg的频率示于图10B的上图中(P4细胞群)。图10B的下图示出了 $CD38^{high}$ Treg(P5细胞)是在第一次输注DARZALEX™(达雷木单抗)之后消耗最明显的Treg群。这些 $CD38^+$ Treg在整个DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间保持耗尽(与基线对比,在第1、4和8周分别为 $p=8.88 \times 10^{-16}$ 、 1.11×10^{-15} 和 1.50×10^{-11})。图10C示出了在治疗结束(EOT)后的基线、第1周、第4周、第8周、复发和第6个月时 $CD38^{high}$ Treg占总 $CD3^+$ 细胞的百分比。 $CD38^{high}$ Treg在这个时间点被恢复到基线。 $CD38^+$ Treg的变化在对治疗有应答和对治疗没有应答的患者之间类似,然而, $CD8^+$ T细胞:Treg比率在第8周在对DARZALEX™(达雷木单抗)表现出应答的患者中显著更高($P=0.00955$;图10D)。

[0545] 为了评估用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的 $CD38^+$ Treg消耗的可能生物相关性,评估 $CD38^+$ Treg与 $CD38^-$ Treg对自体 $CD3^+$ T细胞的抑制能力。在用来自多个健康供体的样本进行的一系列实验中, $CD38^+$ Treg比 $CD38^-$ Treg(观察到53.2%的细胞增殖)或阴性对照(观察到74.9%的细胞增殖)更强烈地抑制T细胞增殖(观察到9.9%的细胞增殖)(图10E)。

[0546] 由于MDSC在冷冻的PBMC样本中不易被检测到,因此 $CD38^+$ 粒细胞MDSC($CD11b^+CD14^-HLA-DR-CD15^+CD33^+$)从分离自基线处患者和已接受一次DARZALEX™(达雷木单抗)输注的患者的PBMC中体外生成。图11示出了所鉴定的MDSC的流式细胞术直方图(图11,顶部直方图,框出的细胞群)。大约一半的MDSC表达CD38(图11,中间图;图出的P7细胞群)。 $CD38^{high}$ MDSC在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者中几乎耗尽(图11,底部图;图出的P7细胞群)。

[0547] 在无应答者和对治疗至少具有最小应答的患者中, $CD38^{high}$ 谱系非特异性MDSC在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间随时间推移耗尽。图12示出了 $CD38^{high}$ MDSC的百分比在治疗后第1周、第4周或第8周时在患者中降至接近0%。 $CD38^{high}$ 谱系非特异性MDSC在治疗结束后恢复到基线。

[0548] 在谱系非特异性MDSC中具有最大 $CD38^+$ 群的患者表现出对DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的最佳和最持久的应答。图13示出了具有最高的 $CD38^{high}$ MDSC百分比(如图11所示)并且被归类为PR或MR患者的患者2、4、15、16和17具有至少8个月的无进展生存期(PFS)。

[0549] $CD38^{high}$ 谱系非特异性MDSC也对DARZALEX™(达雷木单抗)体外诱导的ADCC敏感。使用来自两个供体的 $CD38^{high}$ MDSC和作为对照靶细胞的Daudi细胞进行ADCC测定,其中效应

细胞:靶细胞比率为50:1。图14示出来自一个供体的实验结果。DARZALEX™(达雷木单抗)诱导MDSC细胞的裂解。

[0550] CD38⁺ Breg在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者(n=16)中测量,并且类似于CD38⁺ Treg,其在DARZALEX™(达雷木单抗)首次给药后被消耗(与基线相比,在第1周,p=0.0018;配对Wilcoxon秩检验),并在患者正进行治疗时保持较低(图15A)。FACS分选的Breg在受到刺激时产生IL-10(图15B)。

[0551] 总的来说,这些观察结果表明免疫抑制性CD38⁺MDSC、Breg和Treg的消耗对DARZALEX™(达雷木单抗)诱导的T细胞群和克隆性的变化而言为重要的贡献机制。

[0552] 实施例7:CD38⁺MDSC细胞存在于癌症患者中

[0553] 使用流式细胞术在患有NSCLC或前列腺癌的患者的外周血中研究MDSC的百分比(Lin-CD14-HLADR^{low}/-)及其CD38表达。

[0554] 在来自NSCLC患者和前列腺癌患者的分析样本中的PBMC,MDSC的百分比分别在约10%-37%之间和约10%-27%之间。在来自NSCLC患者的PBMC中,在80%-100%的Lin-CD14⁺HLADR^{-/low} MDSC中鉴定出CD38表达,并且在来自前列腺癌患者的PBMC中,在70%-100%的MDSC中鉴定出CD38表达。

[0555] 实施例8:DARZALEX™(达雷木单抗)增强抗病毒T细胞应答

[0556] 为了进一步评估DARZALEX™(达雷木单抗)对T细胞活化和功能的效应,在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的患者(n=7)中测量外周T细胞响应于病毒和同种异体抗原产生的IFN- γ 产量,得到一系列临床结果。具有PR或更好应答的患者在用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗后,在治疗期间的至少一个时间点表现出与基线相比响应于病毒和同种异体抗原的IFN- γ 分泌的显著增加,这表明T细胞功能未因低CD38表达而受损(参见实施例6,图9C)。与TCR克隆性数据类似,在对DARZALEX™(达雷木单抗)有应答的患者中,这种增加比那些对其没有应答的患者更为明显。图16A示出了具有VGPR的一个代表性患者的抗病毒应答。图16B示出了具有CR的一个代表性患者的抗病毒应答。图16C示出了具有PD的一个代表性患者的抗病毒应答。图16D示出了具有MR的一个代表性患者的抗病毒应答。在图中,误差条表示一式两份培养物的平均值的标准误差。星号表示所示比较之间的统计意义上显著的变化。示出了根据独立审查委员会的最佳应答。与这些结果一致,在具有VGPR(图16E)或CR(图16F)的患者中的病毒反应性T细胞在DARZALEX™(达雷木单抗)治疗期间显示出增殖能力的增加。

[0557] 实施例9:表达CD38的免疫细胞亚型对DARZALEX™(达雷木单抗)的敏感性机制

[0558] 来自GEN501和SIRIUS两种研究的数据表明,一些表达CD38的免疫细胞被消耗(NK细胞、调节性T细胞(Treg)、调节性B细胞(Breg)和骨髓源的抑制细胞(MDSC)),而采用DARZALEX™(达雷木单抗)疗法的表达CD38的其它免疫细胞数目增加(细胞毒性T细胞和辅助性T细胞)。

[0559] 为了解决敏感性机制,在参加GEN501或SIRIUS研究的健康供体和多发性骨髓瘤患者的免疫细胞的各种亚群中评估CD38的表达水平。图17A示出了来自健康供体的免疫细胞中CD38表达的直方图,并且图17B示出了来自多发性骨髓瘤患者的免疫细胞中CD38表达的直方图。在健康供体中,CD38表达在NK细胞为最高,其次是单核细胞、B细胞和T细胞。在多发性骨髓瘤患者中,CD38表达在浆细胞为最高,其次是B细胞、NK细胞、单核细胞、B细胞和T细

胞的亚群。图17C示出了在来自复发性和难治性骨髓瘤患者的NK细胞、Treg、Breg、B细胞和T细胞中CD38的平均荧光强度(MFI)的比较,表明在浆细胞后,NK细胞表达最高水平的CD38,接着是调节性T细胞(Treg)和调节性B细胞(Breg)。

[0560] 除CD38表达外,其它细胞表面蛋白诸如补体抑制蛋白(CIP;CD46、CD55、CD59)可与对DARZALEX™(达雷木单抗)的敏感性或抗性有关。对免疫细胞亚群中的CIP的体外评估发现,NK细胞表达非常低水平的CD59和CD55,而其它T细胞群和B细胞群则表达高得多的水平。这也可能导致在免疫细胞亚型中对DARZALEX™(达雷木单抗)的敏感性具有可变性(数据未示出)。

[0561] 讨论

[0562] 这项研究描述了DARZALEX™(达雷木单抗)的以前未知的免疫调节效应,通过减少CD38⁺免疫抑制细胞群以及伴随的对辅助性T细胞和细胞毒性T细胞扩增的诱导,响应于病毒肽而产生IFN- γ 以及增加的TCR克隆性,表明了改善的适应性免疫应答。

[0563] 这项研究表明,MDSC和Breg表达CD38,并易受DARZALEX™(达雷木单抗)治疗影响。已知这些细胞存在于肿瘤微环境中并且有助于肿瘤生长、免疫逃避、血管生成、转移、和抑制细胞因子的产生。除了这些CD38⁺抑制细胞亚群之外,还鉴定出调节性T细胞的新亚群(CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}),其也表达高水平的CD38并表现出优越的自体T细胞抑制能力。这些细胞对DARZALEX™(达雷木单抗)也很敏感,并在接受治疗的患者中显著降低。DARZALEX™(达雷木单抗)介导的对这些CD38⁺免疫调节性细胞的消除可减少骨髓瘤微环境内的局部免疫抑制,并允许阳性免疫效应细胞扩增并有助于抗肿瘤应答。

[0564] 事实上,在外周血中和骨髓内都观察到广泛的T细胞群(包括CD4⁺和CD8⁺两者)的显著增加(即,肿瘤)。特定的CD8⁺亚群被DARZALEX™(达雷木单抗)疗法改变,包括初始T细胞的显著减少以及伴随的效应记忆性CD8⁺T细胞的显著增加,表明效应T细胞向有抗原经历的表型转变,该表型保留免疫记忆并可对肿瘤抗原具有反应性。CD8⁺:CD4⁺和CD8⁺:Treg的比率也随着治疗而显著增加,表明从阳性免疫调节剂到阴性免疫调节剂的转变。

[0565] 为了评估扩增的CD4⁺和CD8⁺T细胞是否本质上是克隆的,在患者的亚组中检查了T细胞库。用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗显著增加了T细胞克隆性,即使在有最佳SD应答或有进展的患者中也是如此。因此,增加的T细胞克隆性不能简单地归因于肿瘤负荷减少。然而,在具有良好临床应答的患者中,T细胞克隆性的偏差更大,并且与CD8⁺T细胞的增加相关联,这表明所观察到的随DARZALEX™(达雷木单抗)治疗的T细胞扩增是抗原驱动的。在这个患者群体中是显著的,这个患者群体经过了重度预处理(5个先前治疗线的中值),预计不会产生强大的抗肿瘤免疫应答。除了增加的TCR克隆性之外,对DARZALEX™(达雷木单抗)有应答的患者表现出对预先存在的病毒抗原和同种异体抗原的T细胞应答增加,这表明从免疫抑制状态拯救了免疫系统。

[0566] 用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗引起免疫抑制性MDSC和调节性T细胞和B细胞的减少。这些减少伴随着CD4⁺辅助性T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞的扩增。用DARZALEX™(达雷木单抗)治疗也可增加如通过IFN- γ 产量度量的T细胞克隆性和功能性抗病毒应答。这些观察结果表明,尽管CD38表达低,但是T细胞继续正常发挥作用,并且表明增加的T细胞应答可能是由于调节性细胞的消耗。此外,T细胞扩增、活性和克隆性的这些变化在对DARZALEX™(达雷木单抗)有应答的患者中比在那些对其没有应答的患者中更为明显。从DARZALEX™(达雷

木单抗) 疗法复发与这些变化中许多变化的逆转有关。这表明DARZALEX™(达雷木单抗) 通过免疫调节的另一个之前未表征的作用机制可能有助于临床响应及其功效。

[0567] 最近, 促进抗肿瘤免疫应答而非直接靶向癌症的抗体已经在一系列环境中显示出功效。在患有晚期实体瘤和血液恶性肿瘤诸如霍奇金淋巴瘤的患者中, 抑制CTLA-4和PD-1的抗体促进T细胞扩增并增强T细胞活化, 使得生存期延长和疾病复发延迟。通过增强抗癌免疫力, 这些免疫调节抗体不仅可诱导临床应答, 还可预防疾病复发。

[0568] 实施例10: 在54767414MMY2002 (SIRIUS) 第2部分临床研究中使用单一药剂DARZALEX™(达雷木单抗) 治疗的多发性骨髓瘤受治疗者的血清蛋白质组学分析

[0569] 生物标志物样本收集和處理

[0570] 将外周血样本收集在标准血清分离管(2.5mL至5mL)中, 并将血清等分试样冷冻托运到SomaLogic, Inc (Boulder, CO), 以进行多分析物血清蛋白质谱分析。

[0571] 使用预先验证的SOMAscan测定法在SomaLogic进行血清蛋白质谱分析, 其通过使用基于SOMAmer亲和力的分子测量1129种蛋白质分析物。SOMAmer试剂是基于单链DNA的蛋白质亲和试剂。该测定使用少量的输入样本(150μL血浆) 并将蛋白质信号转换成由定制DNA微阵列定量的SOMAmer信号。

[0572] 每个SOMAmer包含4个功能部分:

[0573] 1. 独特的蛋白质识别序列

[0574] 2. 用于捕获的生物素

[0575] 3. 可光切割的接头

[0576] 4. 用于检测的荧光分子

[0577] 独特的蛋白质识别序列使用DNA并结合模拟氨基酸侧链的经化学修饰的核苷酸, 扩大了标准适配子的多样性并增强了蛋白质-核酸相互作用的特异性和亲和力(Gold等人, PLoS One 5:e15004, 2010)。适配子由SELEX选择。SOMAmer试剂使用天然构象的蛋白质进行选择。因为这样的SOMAmer试剂需要完整的三级蛋白质结构来进行结合。SOMAmer试剂未检测到未折叠或变性的可能无活性的蛋白质。

[0578] SOMAmer试剂的主混合物按样本类型和稀释度分组。在样本温育之前, 试剂预先结合到链霉抗生物素蛋白珠上。样本中的蛋白质在平衡过程中与同源SOMAmer结合, 洗涤, 与NHS-生物素一起温育, 洗涤, 然后将珠暴露于紫外线以切割可光切割的接头。洗脱液含有结合到其生物素标记的蛋白质上的SOMAmer试剂。链霉抗生物素蛋白捕获未结合的SOMAmer试剂并且随后洗涤除去未结合的SOMAmer试剂。在最终的洗脱液中, SOMAmer分子通过变性条件从其同源蛋白中释放出来。将最终的洗脱物与定制的安捷伦DNA微阵列杂交, 并按相对荧光单位(RFU) 对来自SOMAmer分子的荧光团进行定量。RFU与样本中蛋白质的量成正比。

[0579] MMY2002研究中的样本主要分两批进行测试。第一批180个样本包含来自90位受治疗者的配对的第1周期第1天(C1D1, 基线) 和C3D1(第3周期第1天) 的血清样本。将180个样本在3个独立的SomaScan板上一起分析。第二批样本包括50个C1D1样本, 包括来自批次1的35个重复样本。

[0580] 数据分析

[0581] 输入数据集和定义

[0582] 数据分析中包括了具有可评估应答的经治疗的受治疗者。贯穿整个报告, 有应答

者被定义为具有sCR、VGPR和PR的总体最佳应答(根据IRC,对于MMY2002)的受治疗者,作为具有最小应答(MR)或SD的受治疗者的稳定疾病(SD)受治疗者,而无应答者被定义为具有进行性疾病(PD)的总体最佳应答(根据IRC,对于MMY2002)的受治疗者。

[0583] Somallogic数据预处理

[0584] 批次比对

[0585] 在SOMAscan平台的两个不同版本上测试了MMY2002样本的第1批次和第2批次。两个版本之间的差异较小,并且包括在版本之间变化的三个SOMAmer序列(CTSE:3594-6_1->3594-6_5,FCN1:3613-62_1->3613-62_5,BMPER:3654-27_1->3654-27_4)。将这些差异从所述分析中去除。

[0586] 根据SomaLogic的标准板间校准工作流程,通过为每个SOMAmer定义板宽校准比例因子,并且通过计算主混合物特定的全局参考值与7英寸板控制校准值测量的中值的比率,来校正三个批次1的板的测量值。将每种SOMAmer试剂的板特定比例因子等同地应用于板上的每个样本。

[0587] 鉴于批次1和批次2的SOMAscan平台版本不同,通过利用跨批次的35个样本的重复测量值并采用对SomaLogic的标准板间校准工作流程的经修改的具体实施,进行批次间的系统可变性修正。对于每个SOMAmer,针对35个重复样本中的每一个,计算批次1的校准后测量值除以批次2的校准前测量值的比率($r_{i,j}$)。这35个比率的中值用于定义批次2样本的经修正的SOMAmer特定校准比例因子 $\bar{r}_i$ 。然后,根据与标准SOMAscan过程相同的方式实现这些校准比例因子。

$$[0588] \quad r_{i,j} = \left(\frac{\text{校准后浓度}_{\text{批次1},i,j}}{\text{校准前浓度}_{\text{批次2},i,j}} \right), \quad \bar{r}_i = (r_{i,1}, r_{i,2}, \dots, r_{i,j}) \text{ 对于所有的重复样本 } j$$

$$[0589] \quad \text{校准比例因子}_i = \text{中值}(\bar{r}_i) = \bar{r}_i$$

[0590] 一旦计算出经修正的校准比例因子,则针对分析的每个批次绘制所有比例因子的分布以评估异常值的存在。由于重现性较差,从分析中移除了9个具有极大或极小校准值(>0.25 且 <3)的SOMAmer。

[0591] 在完成对MMY2002的批次比对和SOMAmer过滤后,对MMY2002的所有蛋白质浓度值应用log2变换,使数据更符合正态分布,并提高参数统计检验的性能。

[0592] 混杂变量校正

[0593] 通过对中心数据集和扩展数据集的主成分分析,对数据集方差的通过元变量(如人口统计学、响应类别和样本时间点)解释的部分进行估计并识别潜在的混杂因子。简单的线性模型被拟合以识别与每个感兴趣的变量显著相关的排名最高的PC。这些关联的显著性是使用Wald检验来确定的,并且通过该模型解释的PC可变性的分数通过该拟合的R2来估计。对于MMY2002数据,发现位点ID与PCI相关,并解释了数据集可变性的最大部分($\geq 7.37\%$, p 值 $=3.71 \times 10^{-9}$)。为了减少数据中样本采集位点相关效应的影响,ComBat28被用于校正位点ID效应。

[0594] 重复样本合并

[0595] 通过计算每种蛋白质的平均值,将在MMY2002批次1和批次2之间重复的35个样本的数据合并。

[0596] 蛋白质浓度差异分析

[0597] 有应答者对无应答者

[0598] 使用以下两种互补法在基线处和在治疗期间对DARZALEXTM(达雷木单抗)有应答者与无应答者中的蛋白质浓度分布进行统计学比较:(i)对每个单独的SOMAmer进行Wilcoxon秩和检验(Hollander和Wolfe,Ninparametirc Statistical Methods.New York: John Wiley&Sons.1973.27-33(单样本),68-75(双样本);以及(ii)同时对所有SOMAmer进行Limma分析(Ritchie,M.E.等人,Nucleic Acids Res.2015;20:43(7):e47)。使用用于多重假设校正的Benjamini-Hochberg(BH)方法(Benjamini和Hochberg,(1995) J.R.Statist.Soc.B.57:289-300;R:A Language and Environment for Statistical Computing,R Development Core Team,R Foundation for Statistical Computing, Vienna,Austria.2011;ISBN 3-900051-07-0)调整所有p值。当经调整的p值<0.05时,无差异表达的无效假设被拒绝。

[0599] 在治疗期间对在基线处

[0600] 使用以下三种另选统计方法比较在基线处对在治疗期间的蛋白质水平:(i)双向重复测量ANOVA6;(ii)Wilcoxon符号秩检验;以及(iii)Friedman检验(Johnson等人,(2007)Biostatistics 8(1):118-127)。使用用于多重假设校正的BH方法(Benjamini和Hochberg,J.R.Statist.Soc.B.57:289-300,1995)调整所有p值以控制FDR。除了治疗显著性之外,双向重复测量ANOVA(Chambers等人,Analysis of variance;designed experiments:Chapter 5.Statistical Models in S,Editors J.M Chambers and T.J Hastie.Wadsworth&Brookes/Cole.1992)也用于确定是否对于每个SOMAmer都发生了显著时间点与响应类别的相互作用。将修改的Wilcoxon秩和检验应用为事后比较检验,以通过计算每个受治疗者在治疗期间与在基线处的蛋白质浓度值之间的差异并进行Wilcoxon秩和检验来具体地确定有应答者和无应答者是否表现出不同的治疗效果。使用BH方法调整显著性值,并且当经调整的p值<0.05时,无效假设被拒绝。

[0601] 分类器训练

[0602] 使用基线蛋白质水平MMY2002数据来构建应答预测分类器。使用以下4种不同的机器学习器将嵌套循环分层的10倍交叉验证方法重复30次:支持向量机(SVM)、随机森林(RF)、朴素贝叶斯(NB)和j48决策树。对于每个学习器来说,训练过程始于创建数据集的10个平衡折叠(外部循环)。这些折叠中的一个显示为测试组,其余9个被作为训练组传递到内部循环。在内部循环中,训练组再次分成10个平衡的折叠,形成内部训练集和内部测试集。对这些内部训练集中的每一个训练学习器,并且对于外循环内的每个组重复该方法30次。使用每个内部循环学习器在预测内部测试集时的准确性来选择特征并优化模型参数。一旦对每个训练组完成了30次内部循环,就(使用优化的参数和特征)对每个对应的测试组评估外部循环的性能。然后重复整个外部循环过程30次,为数据集内的每个样本产生30个应答预测。从这种循环方法获得的AUC、敏感性和特异性统计数据是对在完整的原始数据集上训练的最终模型在新的测试用例中将表现如何的近似。

[0603] MMY2002研究的结果

[0604] 进行各种比较,包括蛋白质表达中治疗诱导的应答依赖性变化。在有应答者中随时间推移表现出表达降低的蛋白之一是PD-L1,而在无应答者中PD-L1蛋白表达随时间推移

增加。PD-L1接合在T细胞上导致T细胞功能降低并且Treg发育增加。图1 8示出了在第1周期和第3周期,在有应答者、无应答者和具有稳定疾病的患者中PD-L1的蛋白质表达谱。

[0605] PD-L1与其受体PD-1的接合抑制抗肿瘤应答,并驱动T细胞无能和衰竭。虽然不希望受到任何特定理论的束缚,但在经CD38治疗后PD-L1的下调也可导致实体瘤中抗肿瘤免疫应答的改善的增强作用。

序列表

<110> Janssen Biotech, Inc.

Ahmadi, Tahamtan

Casneuf, Tineke

Lokhorst, Henk

Mutis, Tuna

Sasser, Amy

<120> 用特异性结合CD38的抗体免疫调节和治疗实体瘤

<130> JBI5067WOPCT

<140> 待转让

<141> 2016-06-24

<150> 62/331489

<151> 2016-05-04

<150> 62/263307

<151> 2015-12-04

<150> 62/250566

<151> 2015-11-04

<150> 62/249546

<151> 2015-11-02

<150> 62/184018

<151> 2015-06-24

<160> 40

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 300

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 1

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys

1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val

20 25 30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln

35 40 45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu

50 55 60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val

65 70 75 80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys		
85	90	95
His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu		
100	105	110
Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile		
115	120	125
Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr		
130	135	140
Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys		
145	150	155
Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp		
165	170	175
Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val		
180	185	190
Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu		
195	200	205
Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser		
210	215	220
Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala		
225	230	235
Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp		
245	250	255
Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln		
260	265	270
Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val		
275	280	285
Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile		
290	295	300

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 2

Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg

1

5

10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 3

Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly

1 5 10

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体的VH

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体的VL

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体的HCDR1

<400> 6

Ser Phe Ala Met Ser

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体的HCDR2

<400> 7

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

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体的HCDR3

<400> 8

Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体的LCDR1

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体的LCDR2

<400> 10

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体的LCDR3

<400> 11

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe

1 5 10

<210> 12

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体的重链

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
	115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr			
	130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
145	150	155	160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
	165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
	180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
	195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser			
	210	215	220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
225	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
	245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
	275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
	290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
305	310	315	320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
	325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
	340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
	355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			

370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		400
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445
Ser Pro Gly Lys		
450		
<210> 13		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗-CD38抗体的轻链		
<400> 13		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		15
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro		80
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		160

	165		170		175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr					
	180		185		190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser					
	195		200		205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	210				
<210>	14				
<211>	122				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	抗-CD38抗体003的VH				
<400>	14				
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser					
1	5		10		15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr					
	20		25		30
Ala Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met					
	35		40		45
Gly Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser Ala Gln Lys Phe					
	50		55		60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr					
65	70		75		80
Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Arg Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln					
	100		105		110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser					
	115		120		
<210>	15				
<211>	107				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	抗-CD38抗体003的VL				
<400>	15				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
1	5		10		15

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

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体024的VH

<400> 16

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

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体024的VL

<400> 17

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

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38抗体MOR202的VH

<400> 18

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

115	120
<210> 19	
<211> 109	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗-CD38抗体MOR202的VL	
<400> 19	
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg His Tyr Tyr Val	
20 25 30	
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr	
35 40 45	
Gly Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu	
65 70 75 80	
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Thr Gly Gly Ala Ser Leu	
85 90 95	
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln	
100 105	
<210> 20	
<211> 120	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗-CD38 mAb isatuximab的VH	
<400> 20	
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr	
65 70 75 80	

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD38 mAb isatuximab的VL

<400> 21

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

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

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

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

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 mAb Keytruda的VH

<400> 22

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35	40	45
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe		
50	55	60
Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210>	23	
<211>	111	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抗-PD-1 mAb Keytruda的VL	
<400>	23	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser		
20	25	30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
35	40	45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
85	90	95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110
<210>	24	
<211>	113	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抗-PD-1 mAb Opdivo的VH	
<400>	24	

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

Ser

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 mAb Opdivo的VL

<400> 25

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

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-L1 mAb durvalumab的VH

<400> 26

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

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-L1 mAb durvalumab的VL

<400> 27

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-L1 mAb atezolizumab的VH

<400> 28

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

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-L1 mAb atezolizumab的VL

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-L1 mAb avelumab的VH

<400> 30

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

<210> 31

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-L1 mAb avelumab的VL

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 mAb的VH

<400> 32

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

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 mAb的VL

<400> 33

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

<210> 34

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 mAb的VH

<400> 34

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

115

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 mAb的VH

<400> 35

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

<210> 36

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-TIM-3 mAb的VH

<400> 36

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-TIM-3 mAb的VL

<400> 37

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

<210> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-TIM-3 mAb的VH

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

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

<210> 39

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-TIM-3 mAb的VL

<400> 39

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

<210> 40

<211> 509

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组透明质酸酶

<400> 40

Met	Gly	Val	Leu	Lys	Phe	Lys	His	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Phe	Val	Lys
1				5				10					15		
Ser	Ser	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys
			20					25					30		
Cys	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Pro
			35					40					45		
Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Phe	Cys	Leu	Gly	Lys	Phe
			50					55					60		
Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg
65					70					75					80
Ile	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Ile	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu
					85					90					95
Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Gly
			100					105						110	
Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys
			115					120						125	
Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val
			130					135						140	
Ile	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro
145					150					155					160
Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn
					165					170					175
Val	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe
			180					185						190	
Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys
			195					200						205	
Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys
			210					215						220	
Tyr	Asn	His	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn
225					230					235					240
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser
					245					250					255
Thr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val
			260					265						270	
Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
			275					280						285	
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
			290					295						300	
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu

305	310	315	320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile			
	325	330	335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu			
340	345	350	
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn			
355	360	365	
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln			
370	375	380	
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu			
385	390	395	400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr			
	405	410	415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys			
420	425	430	
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp			
435	440	445	
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys			
450	455	460	
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile			
465	470	475	480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val			
	485	490	495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu			
500	505		

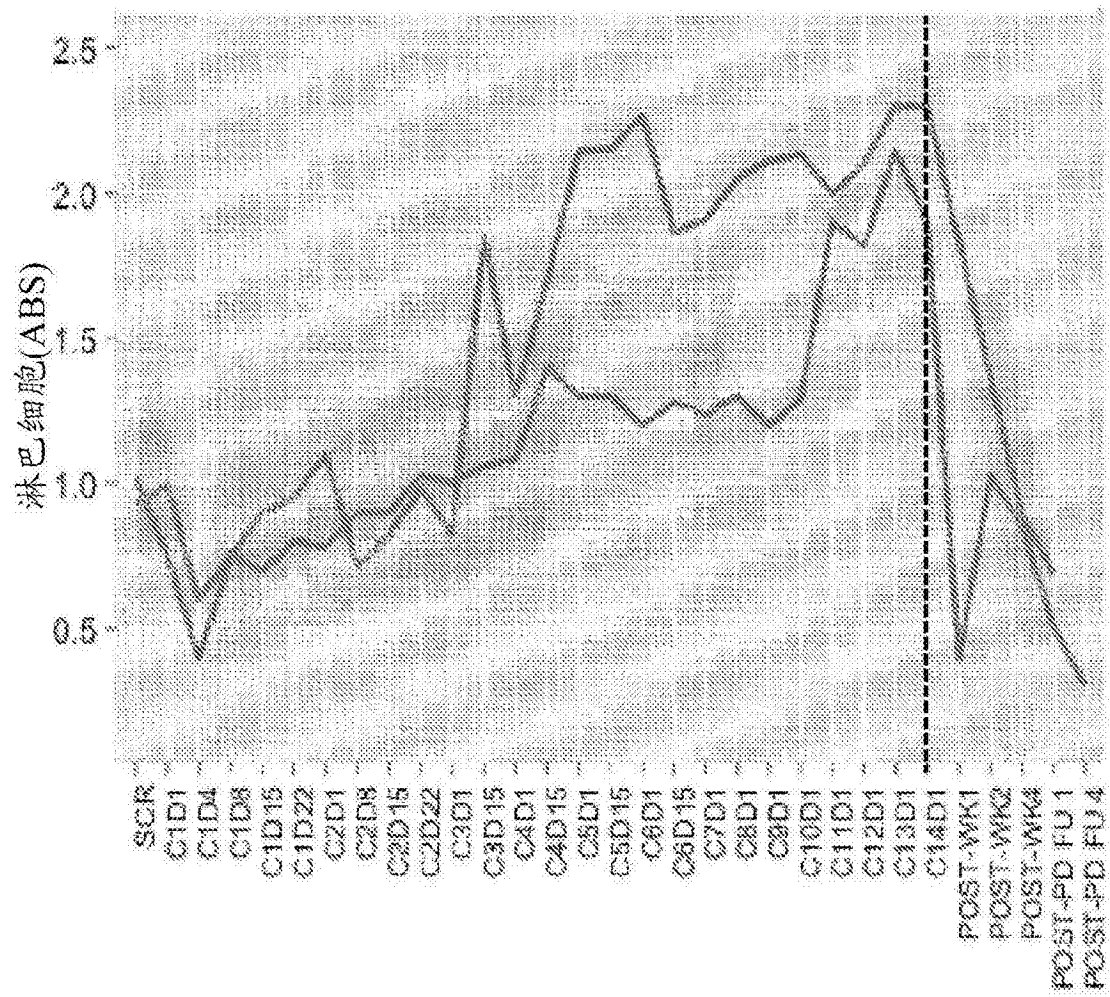


图1

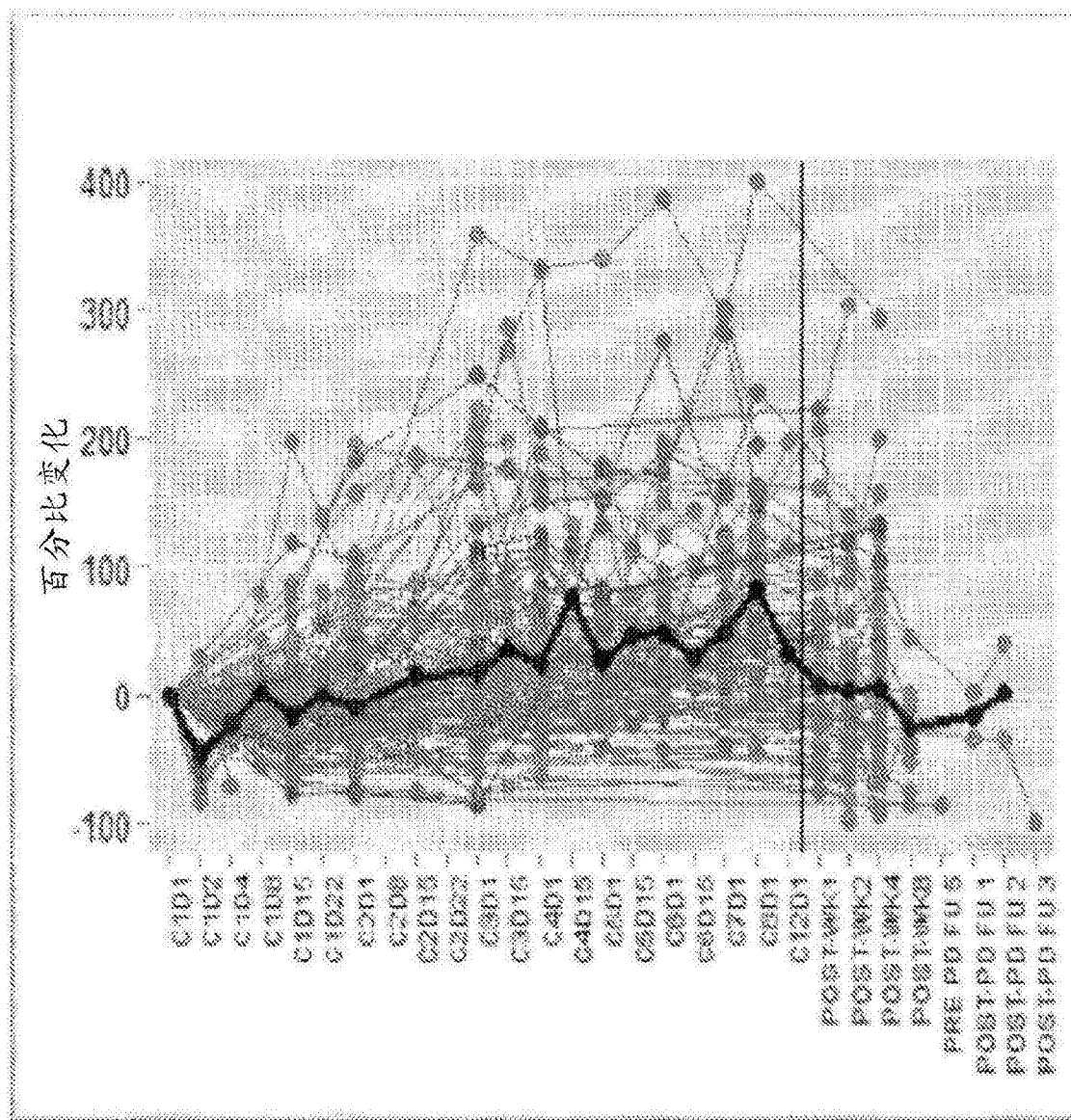


图2

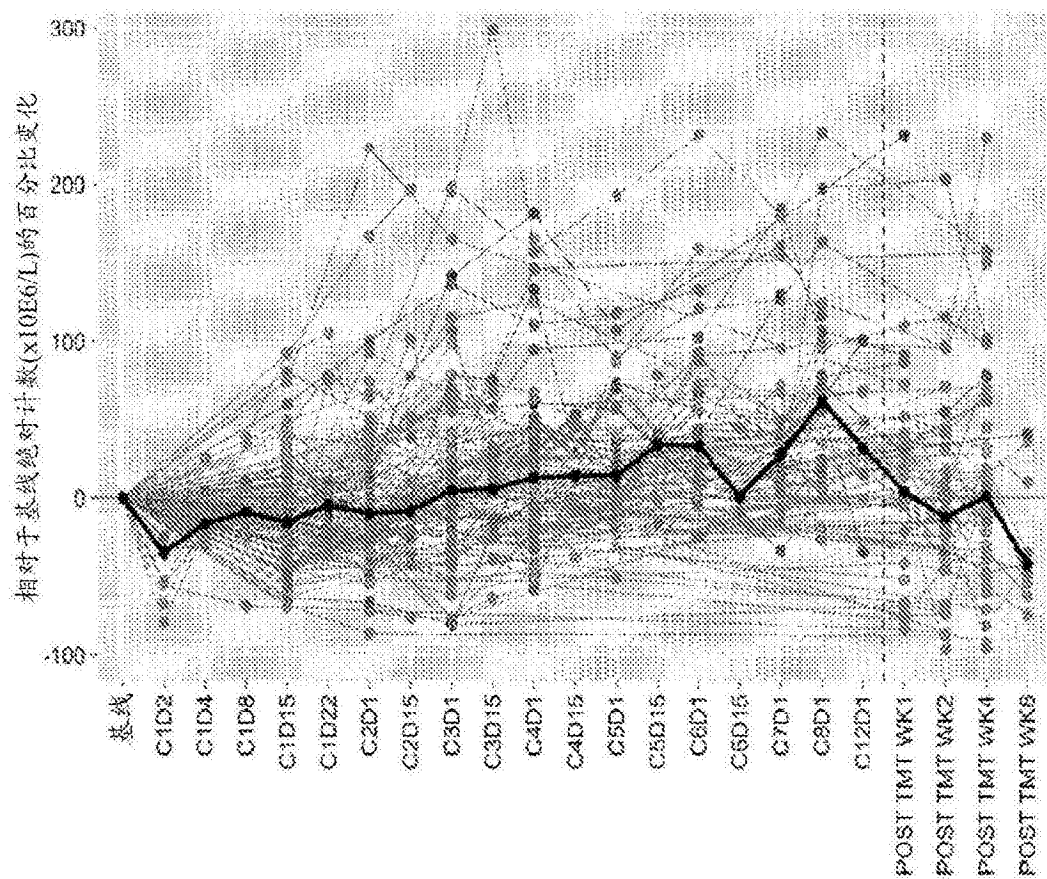


图3

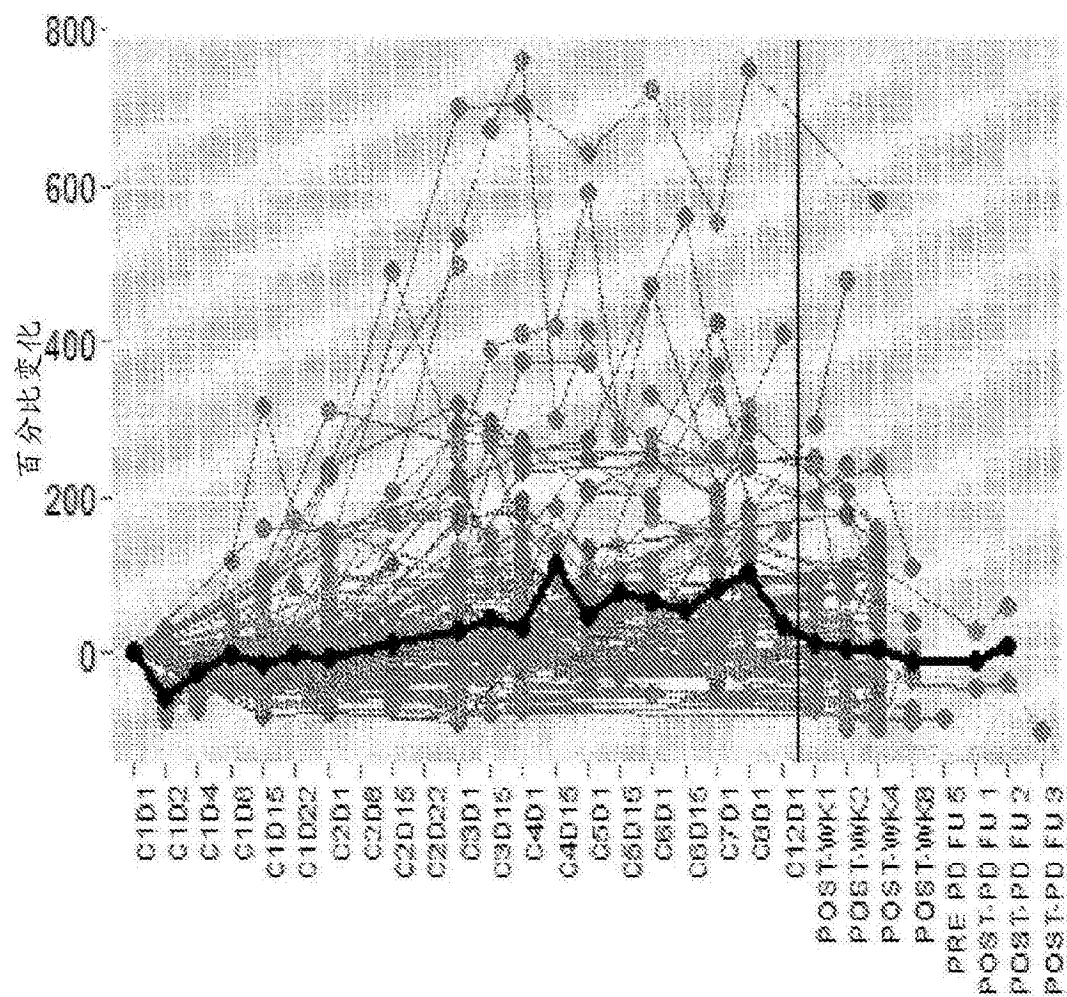


图4

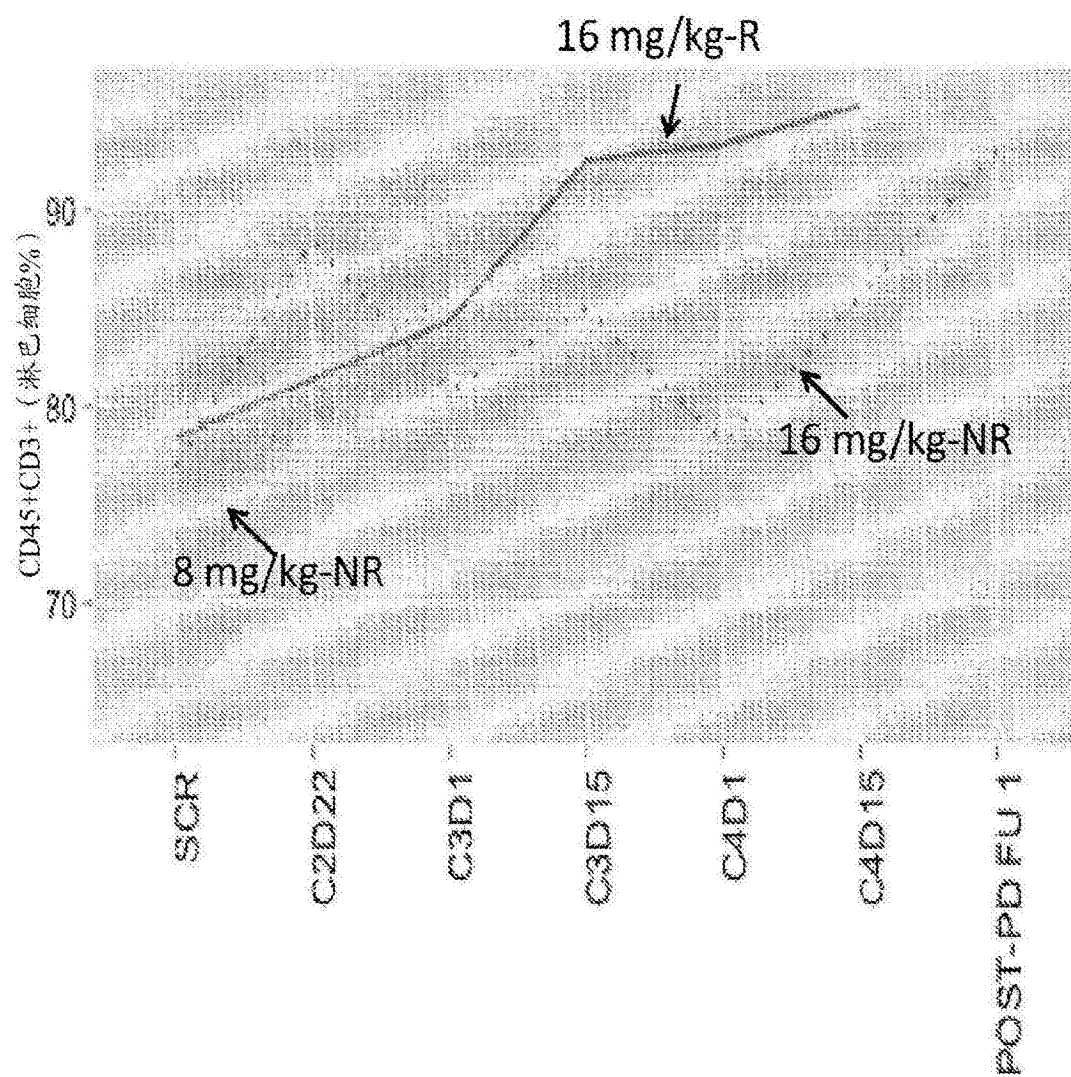


图5

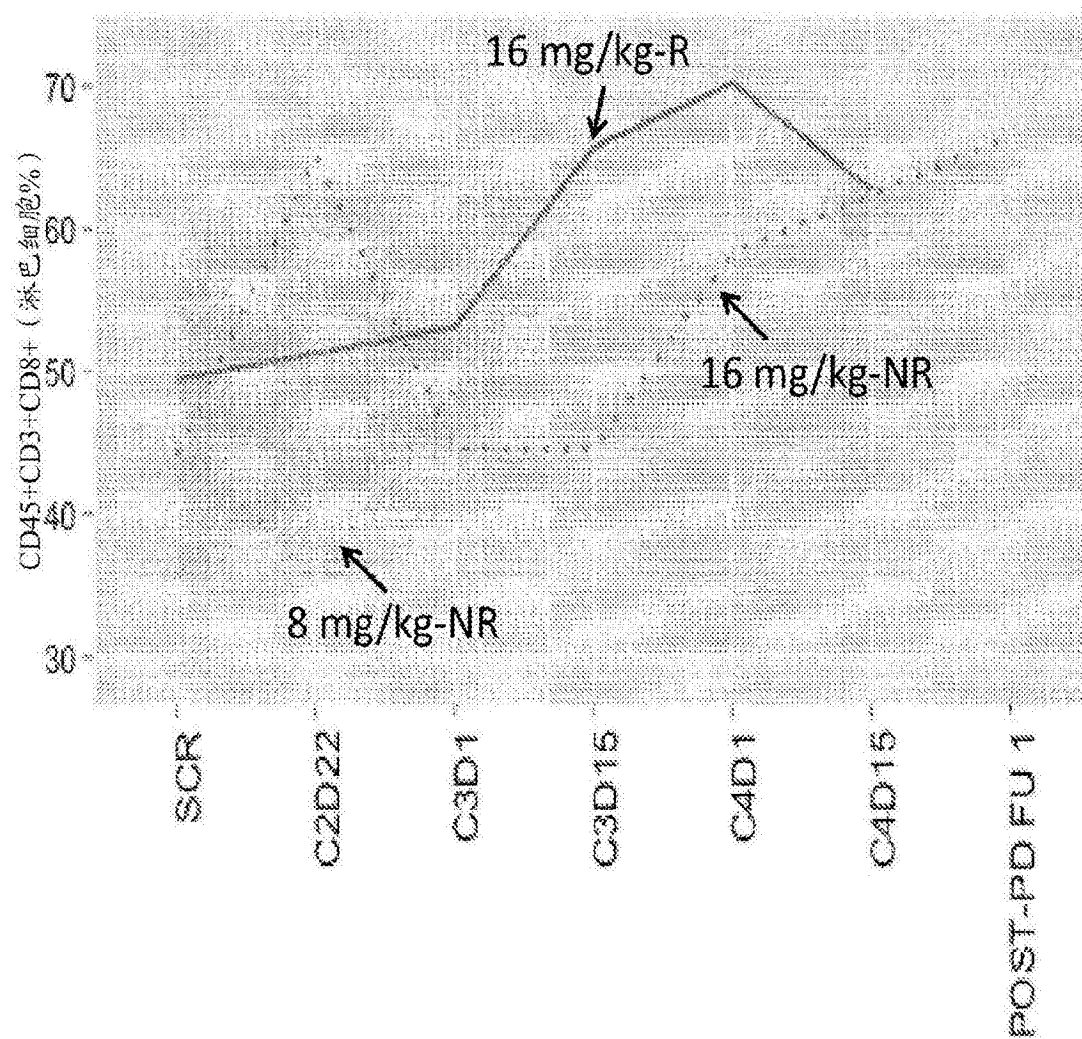


图6

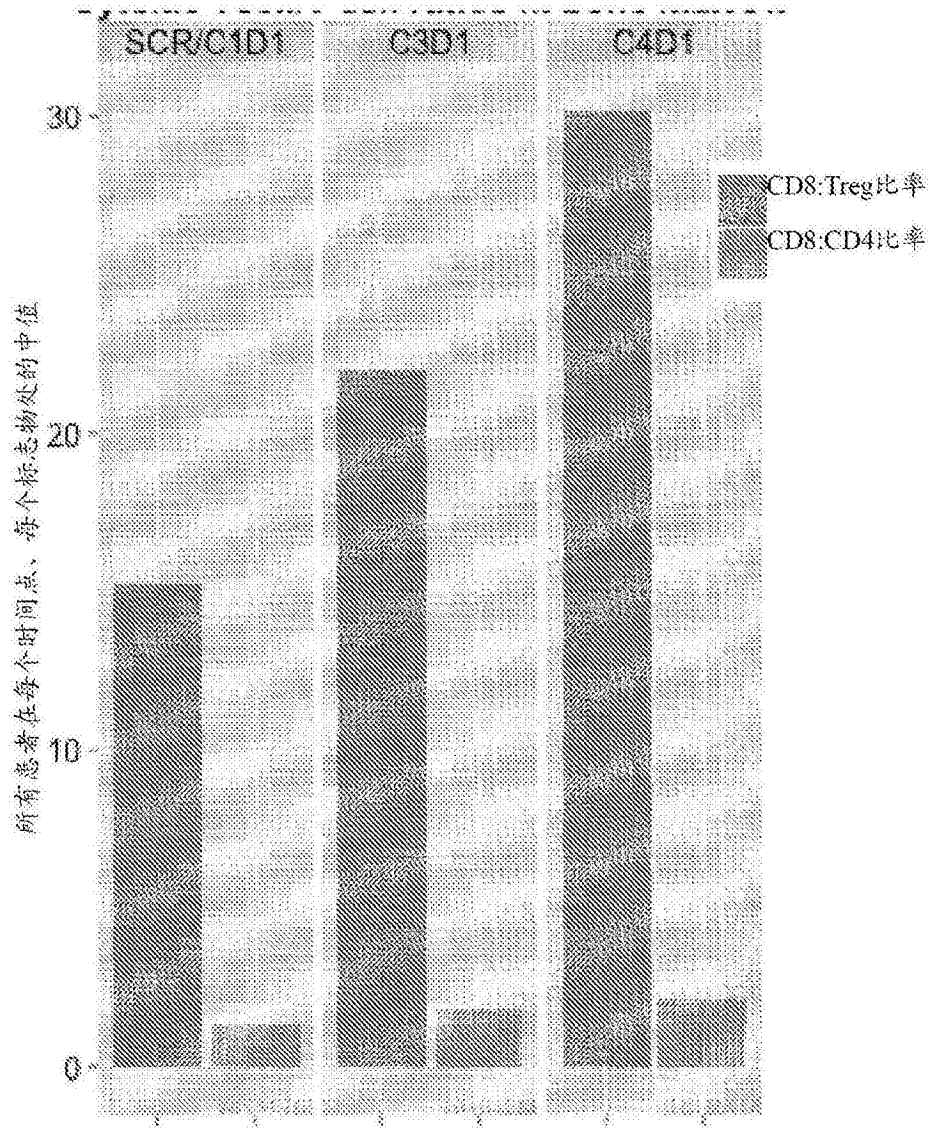


图7A

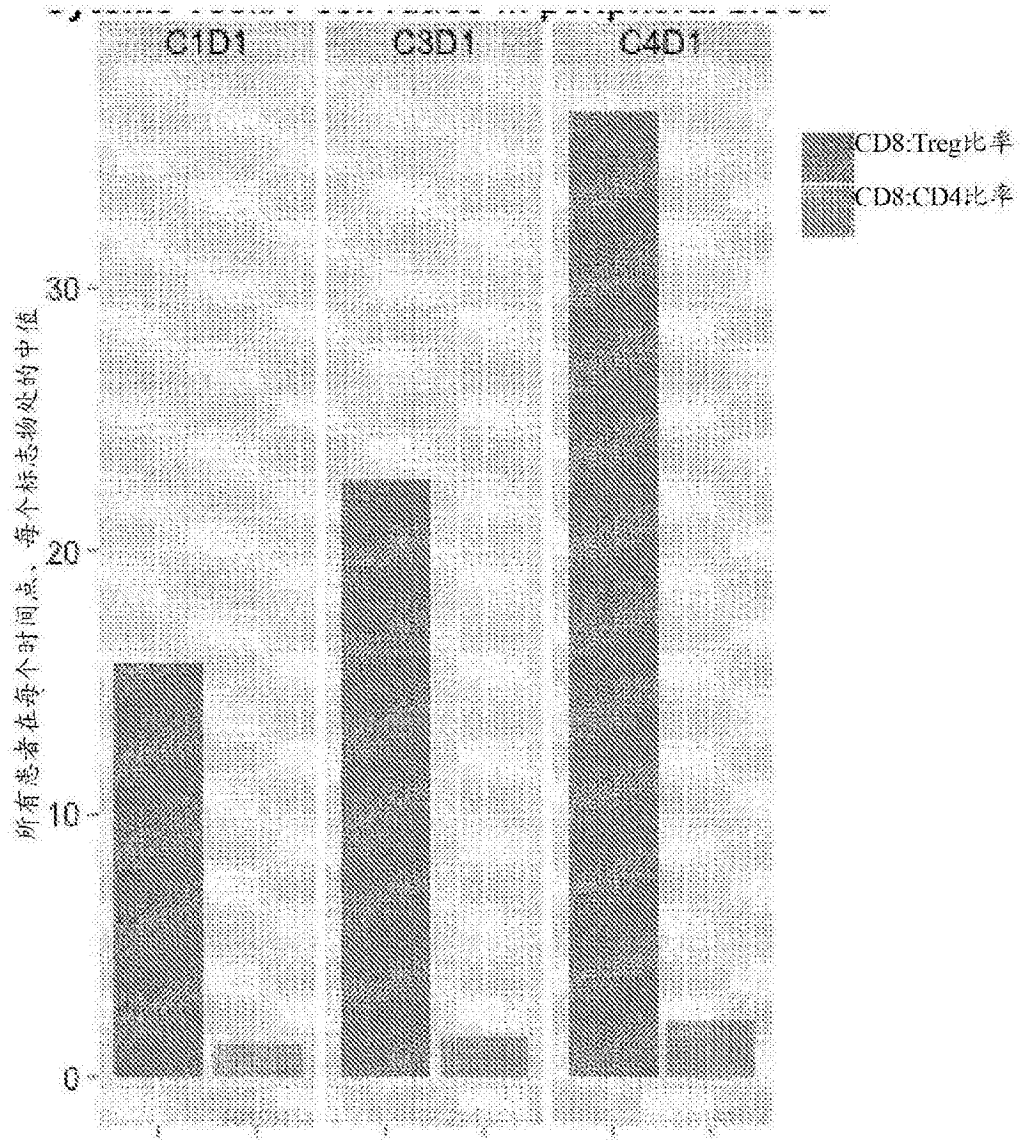


图7B

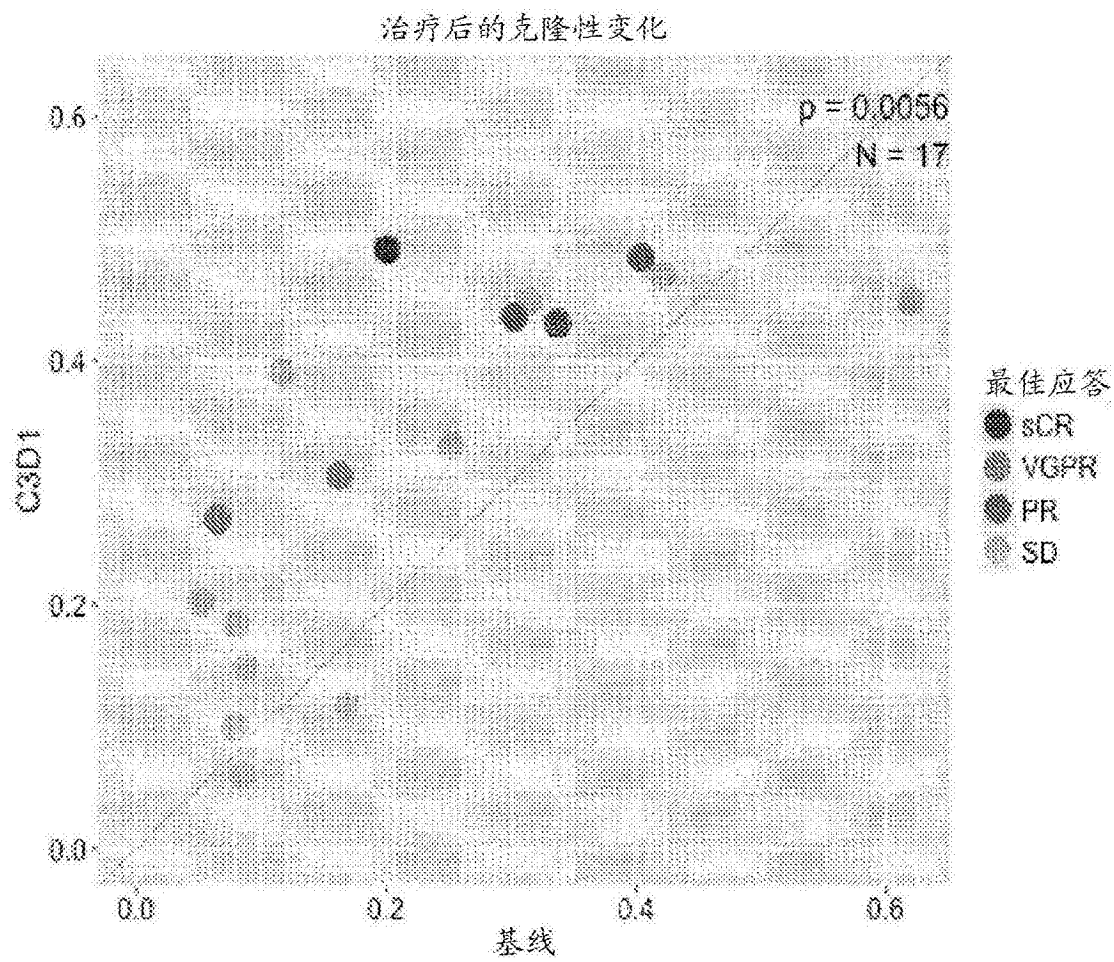


图8A

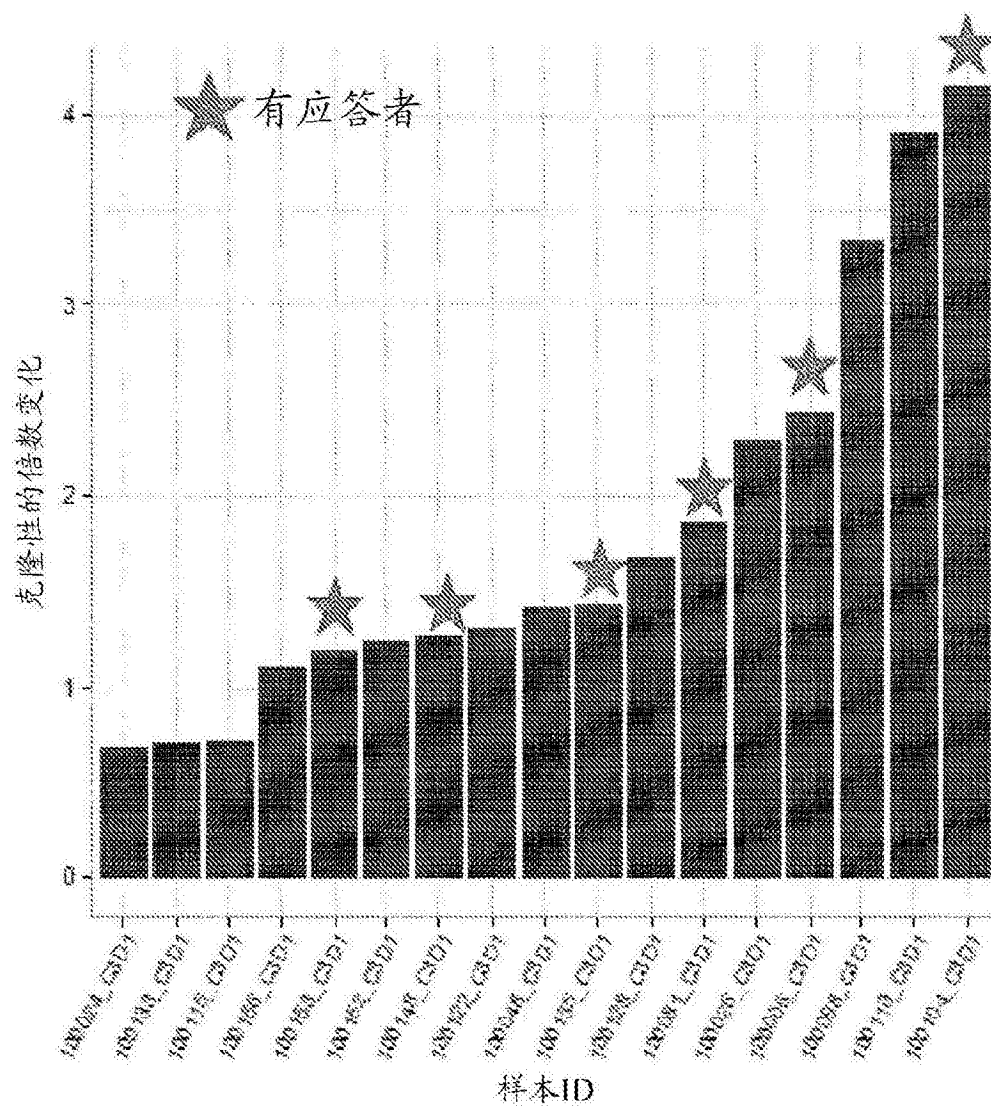


图8B

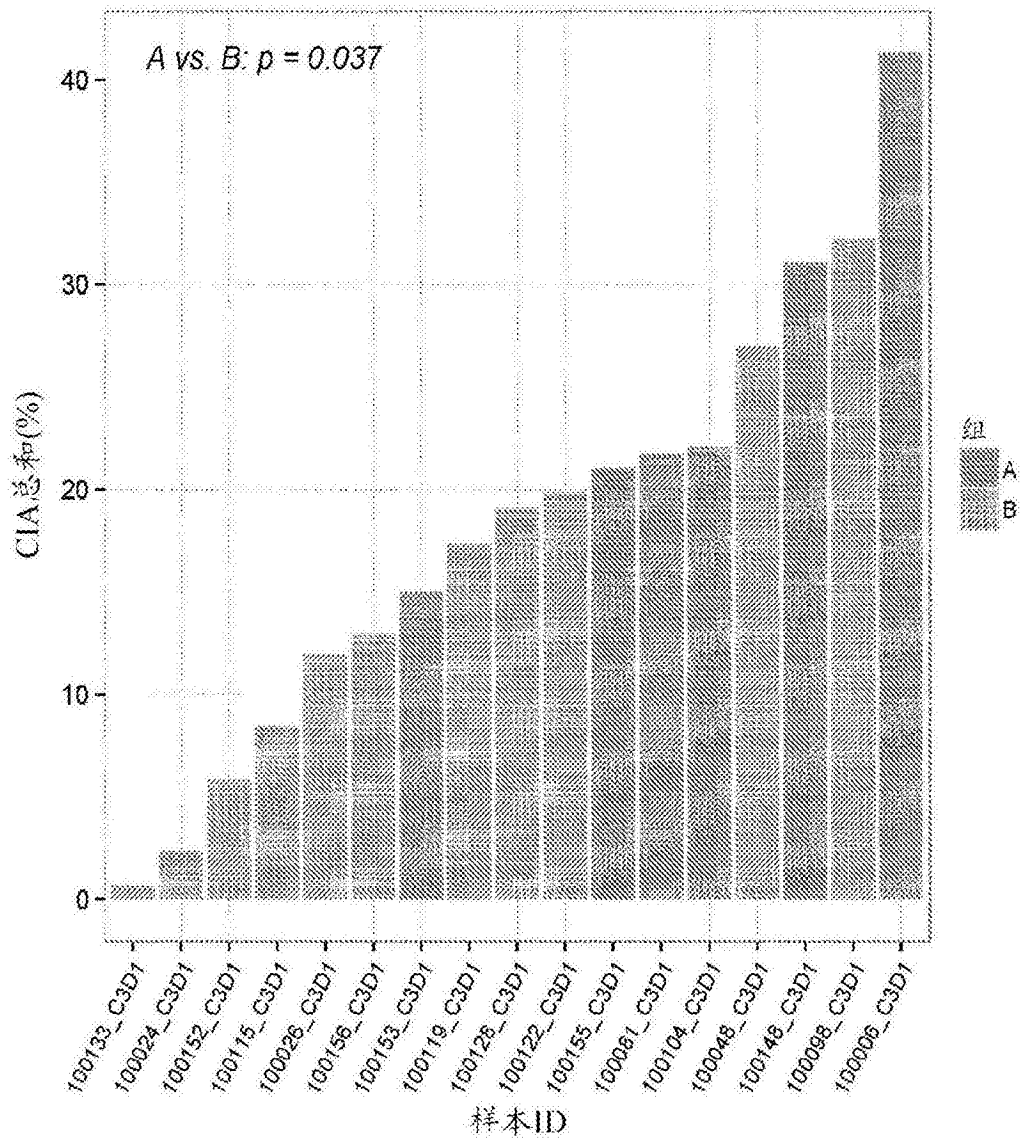


图8C

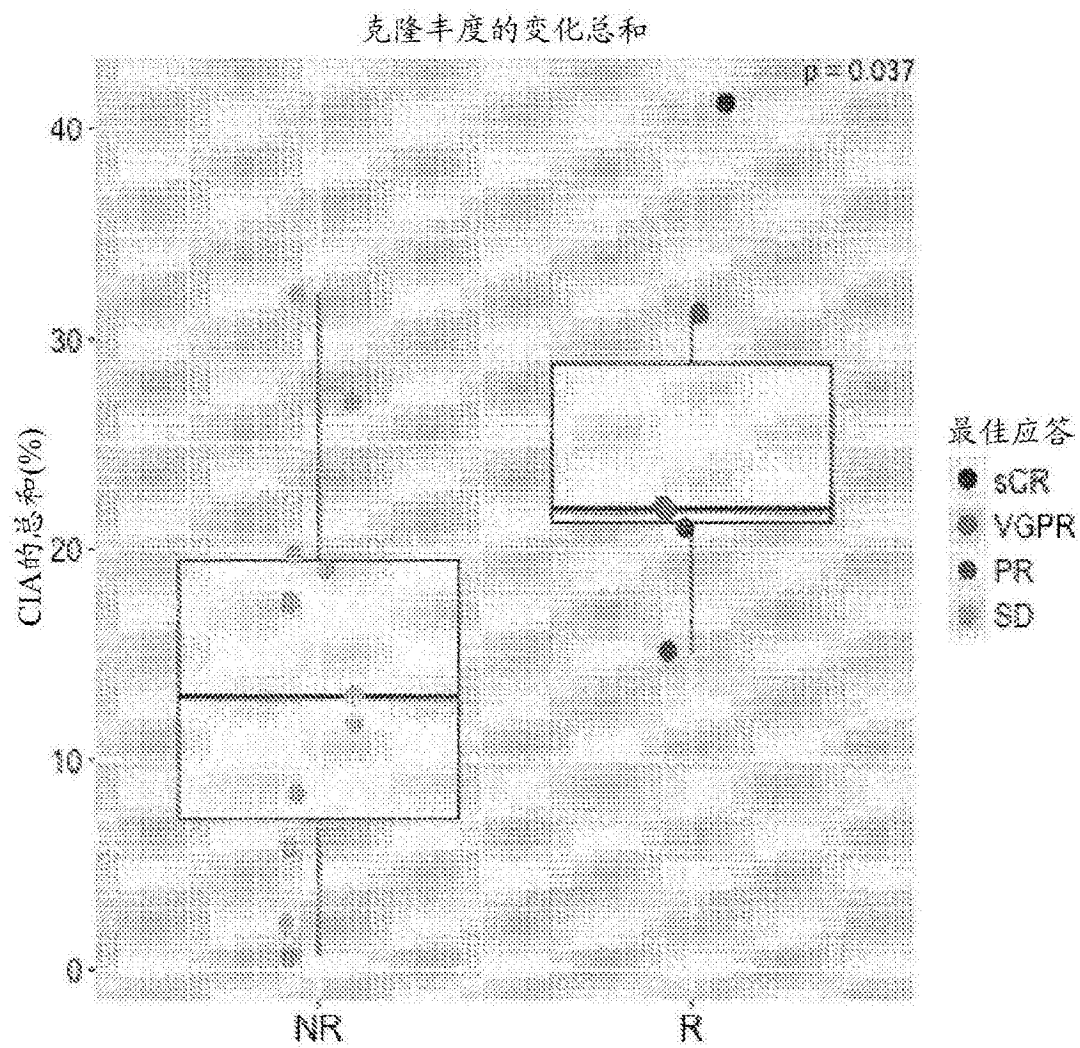


图8D

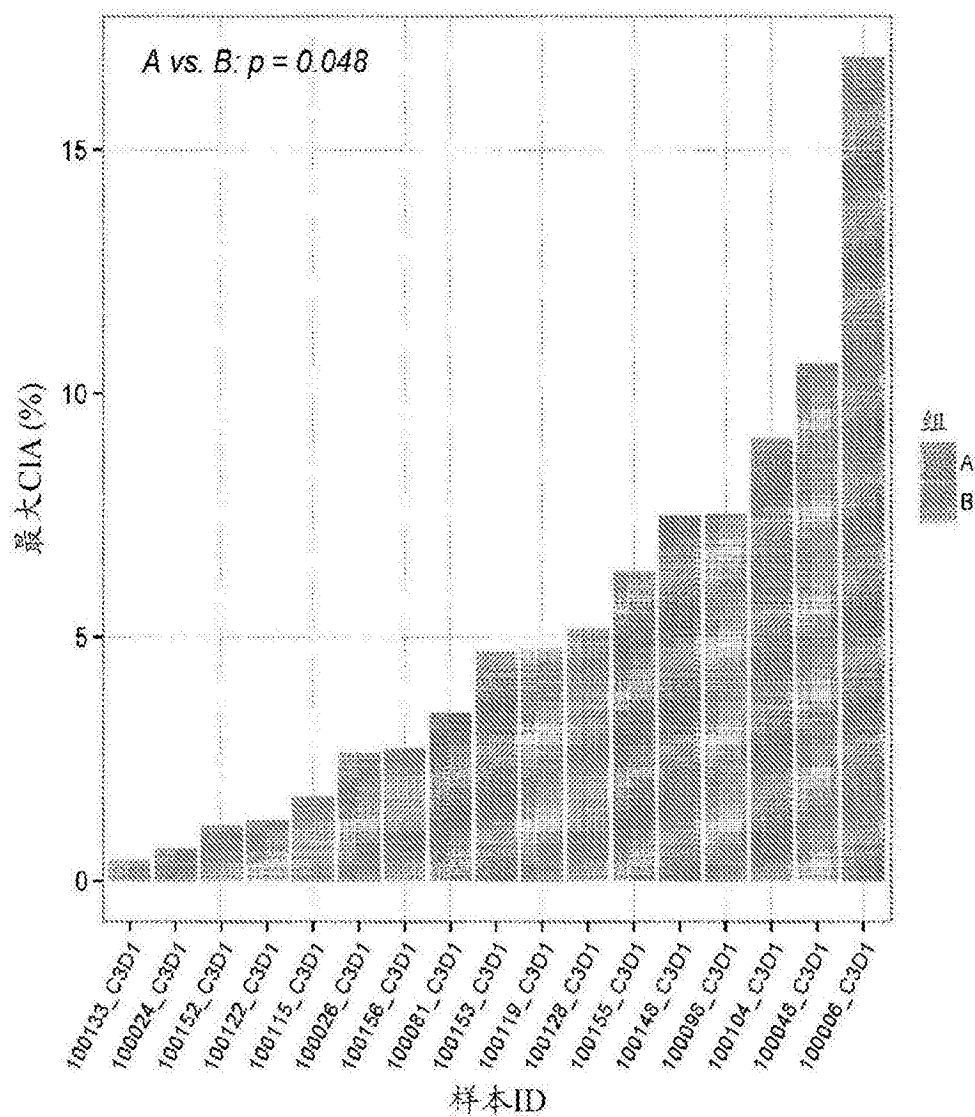


图8E

单个克隆丰度的最大变化

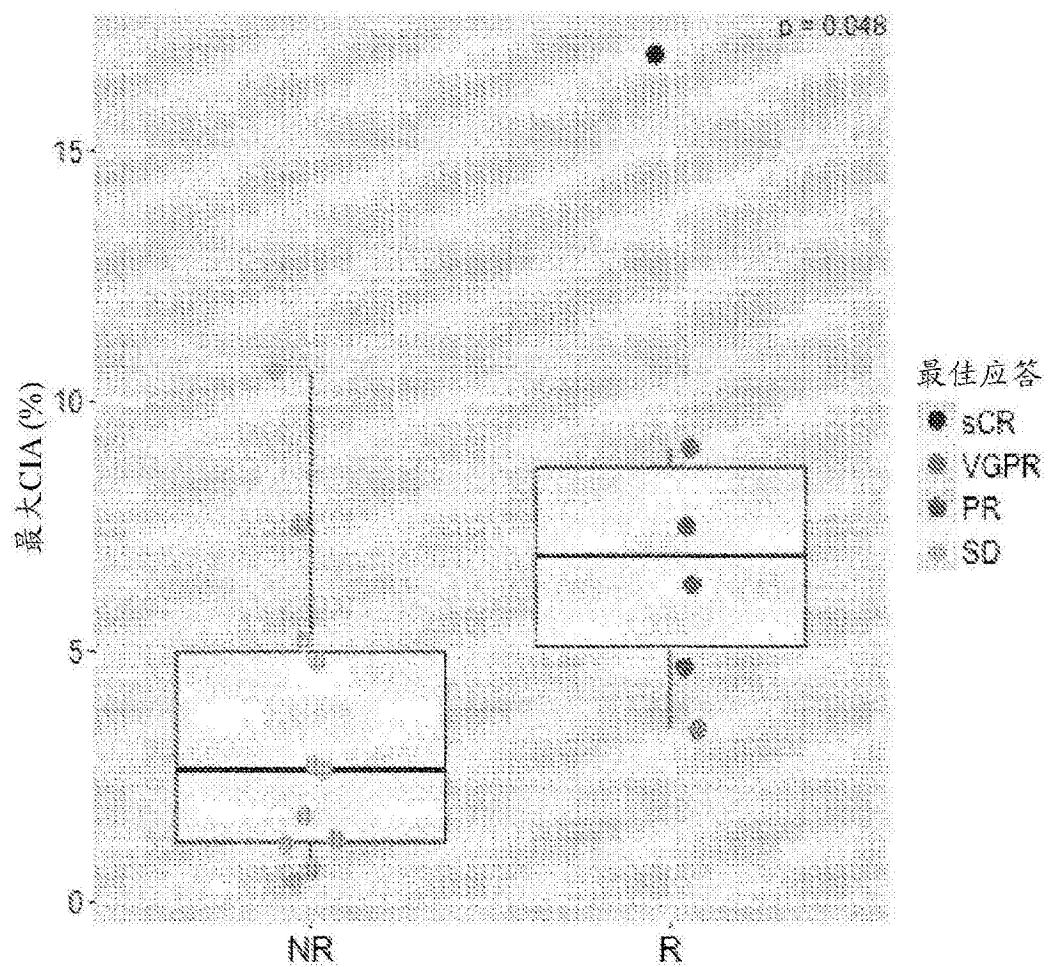


图8F

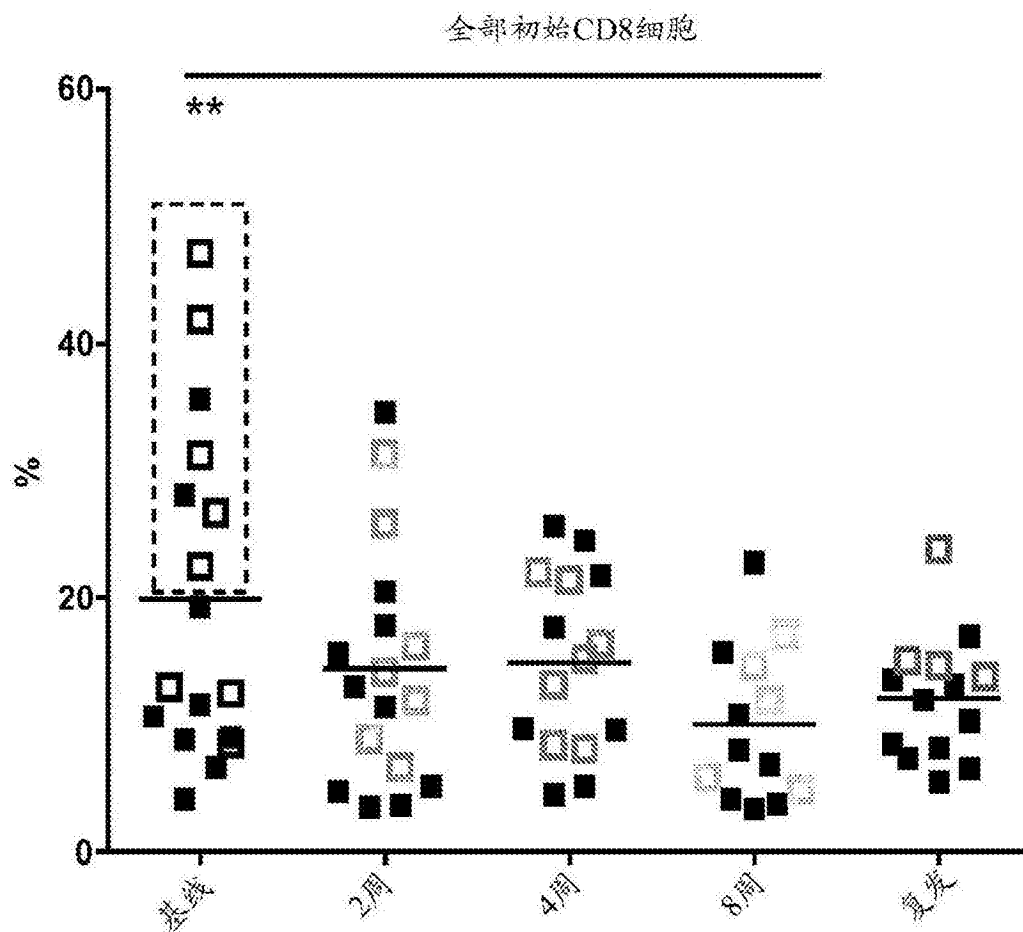


图9A

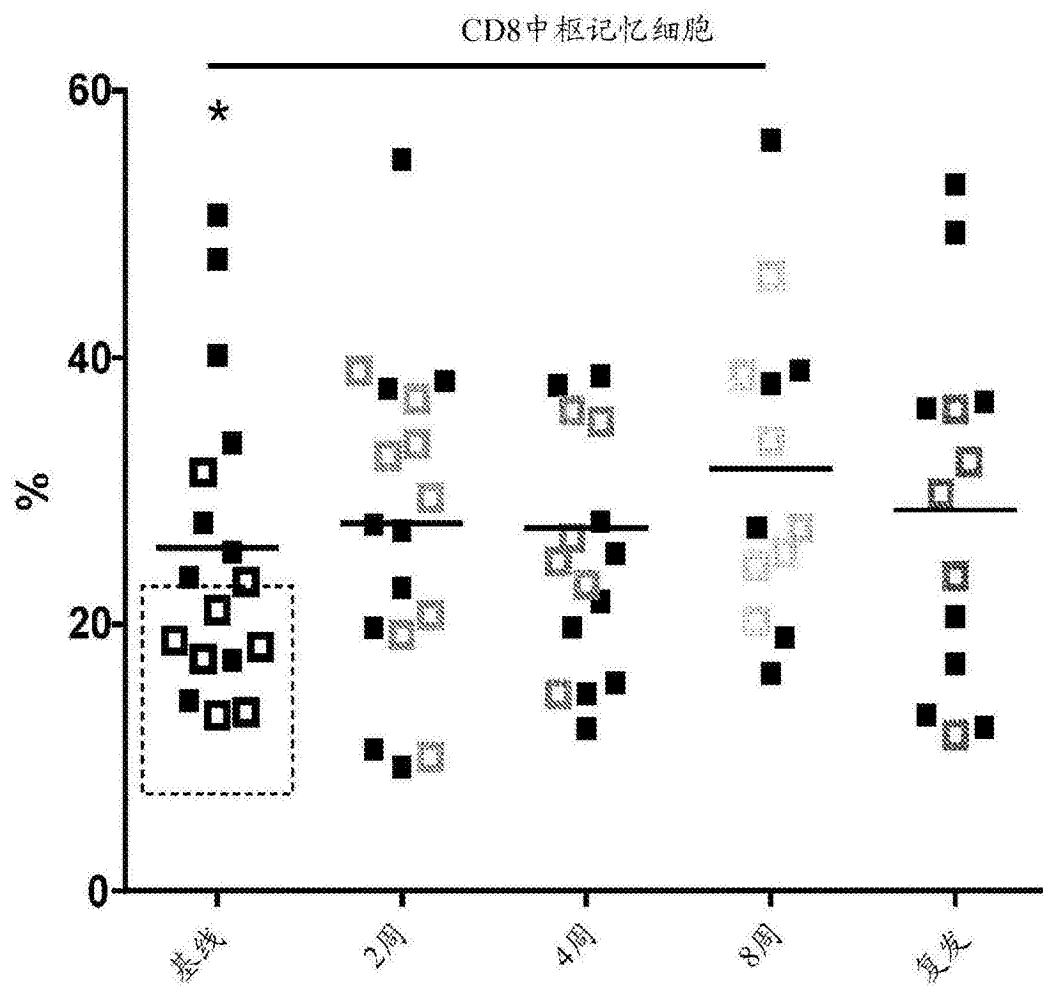


图9B

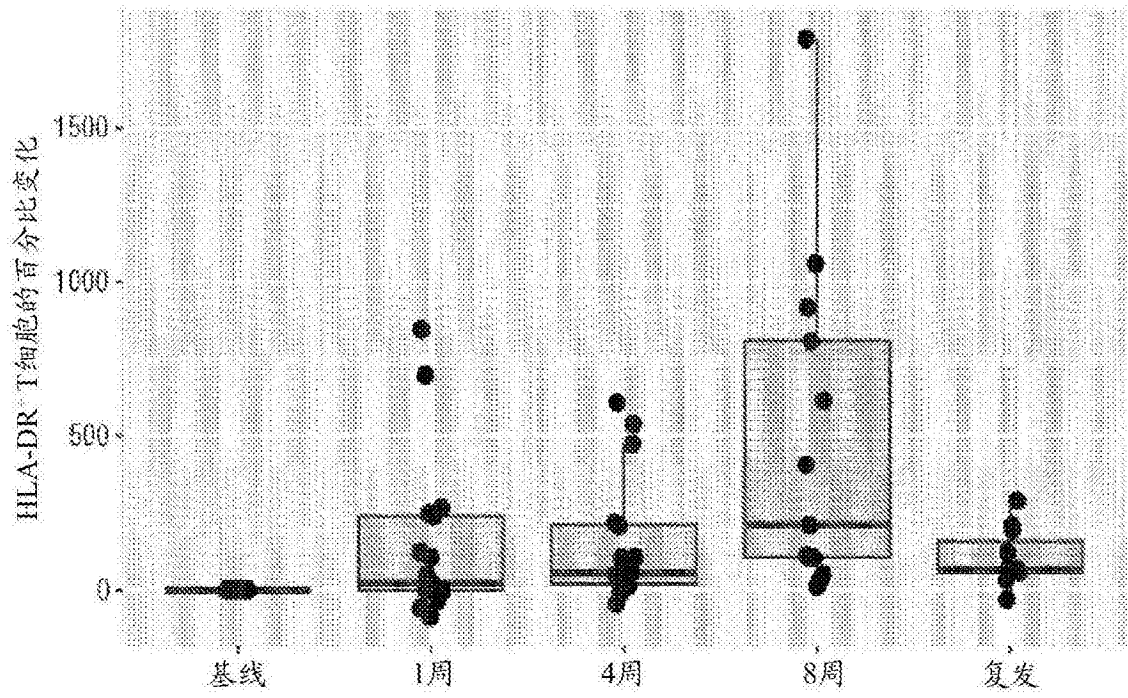


图9C

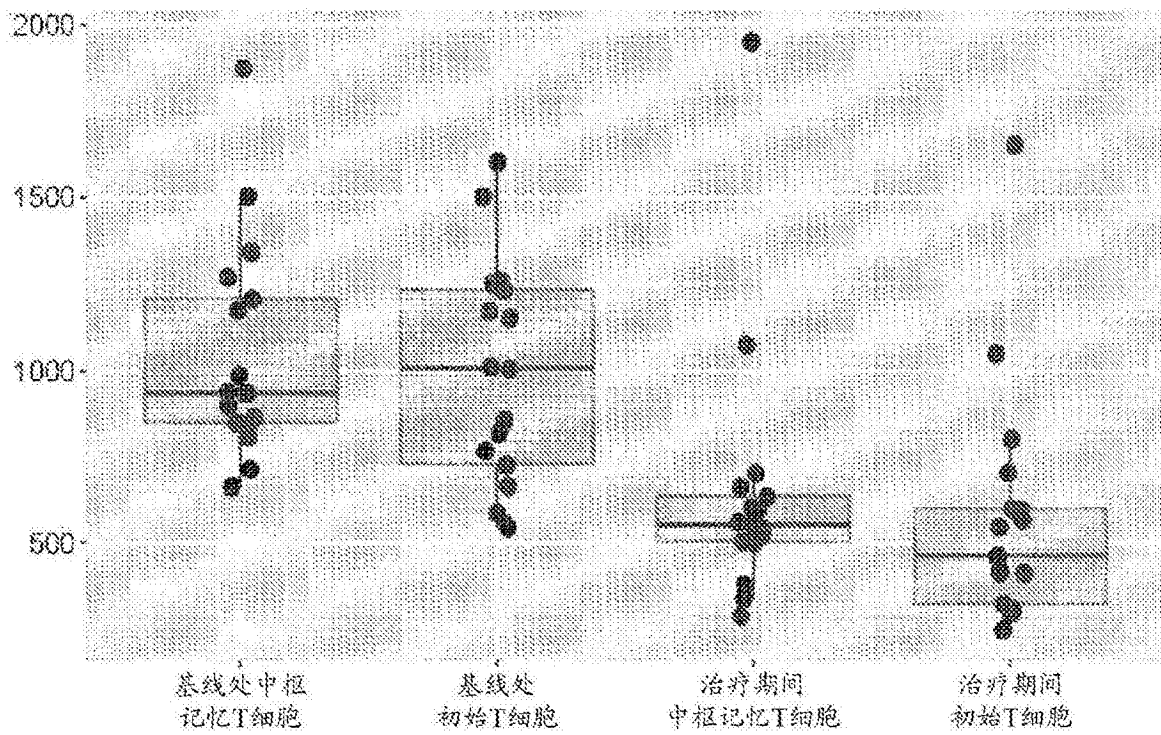


图9D

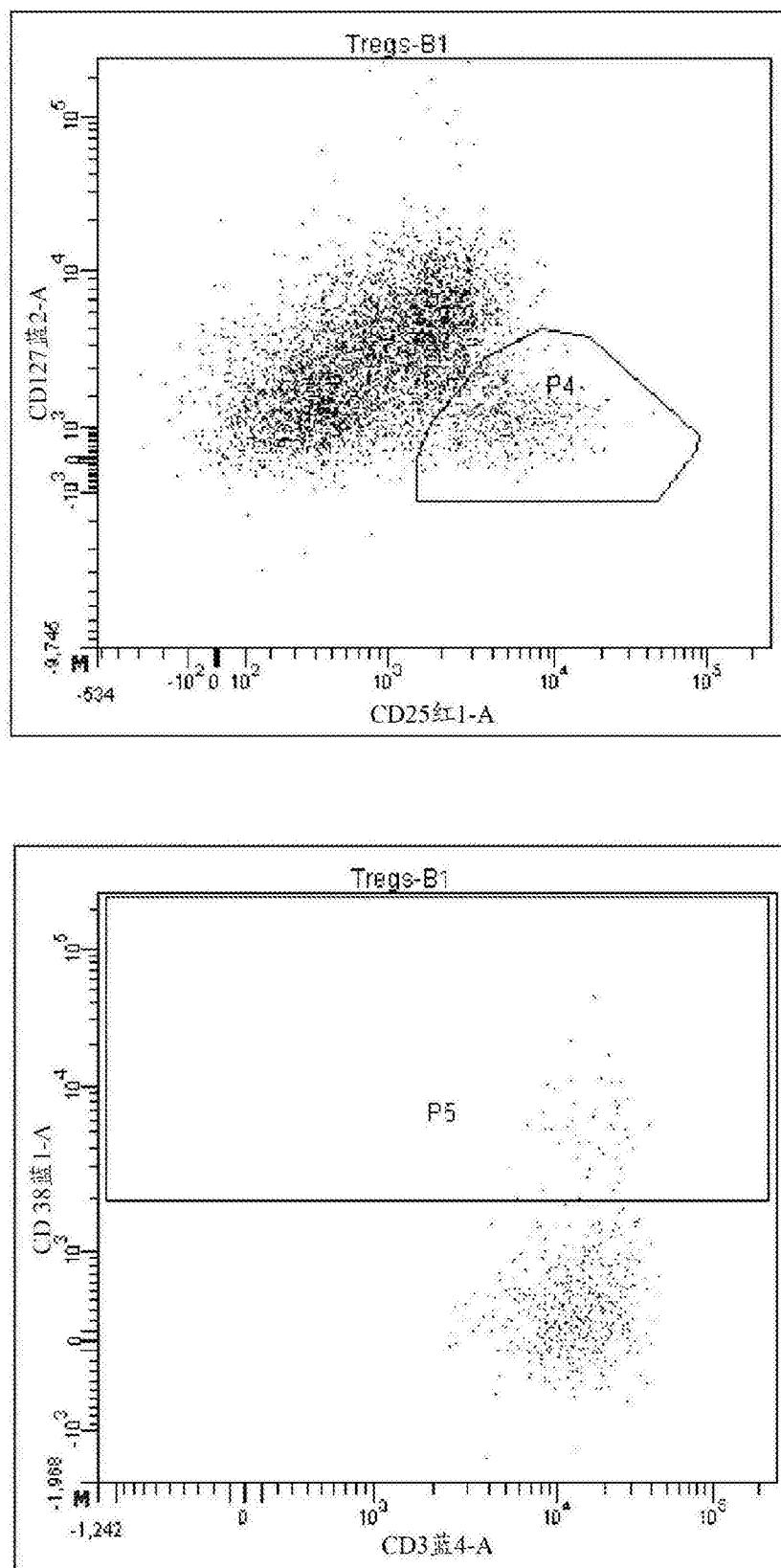


图10A

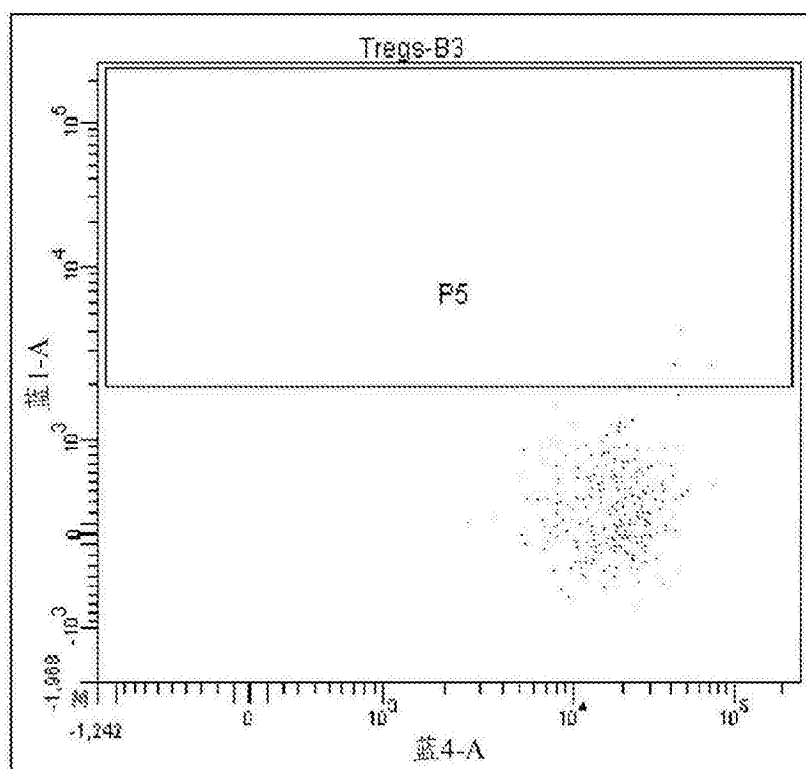
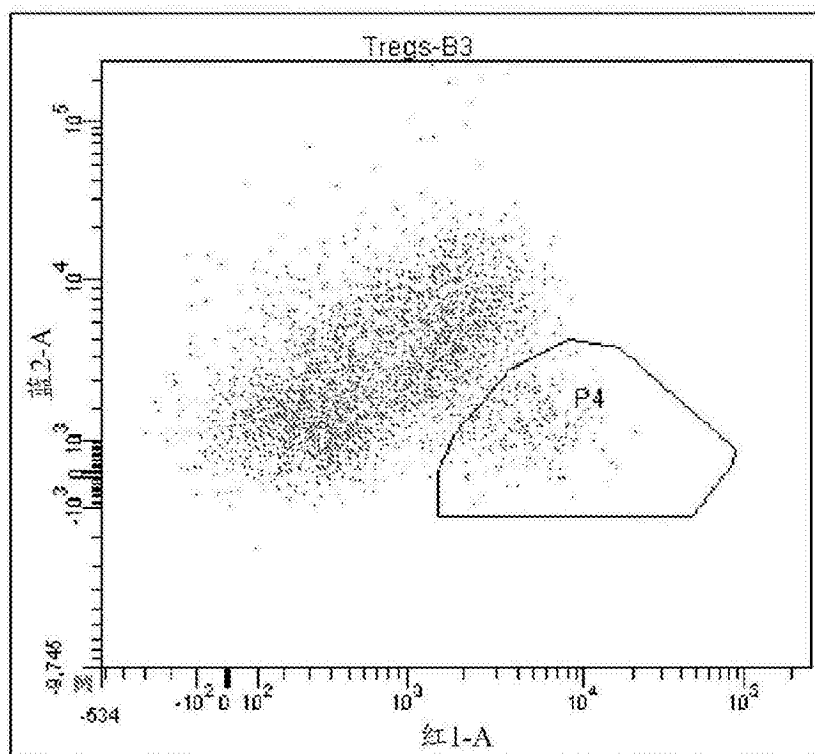


图10B

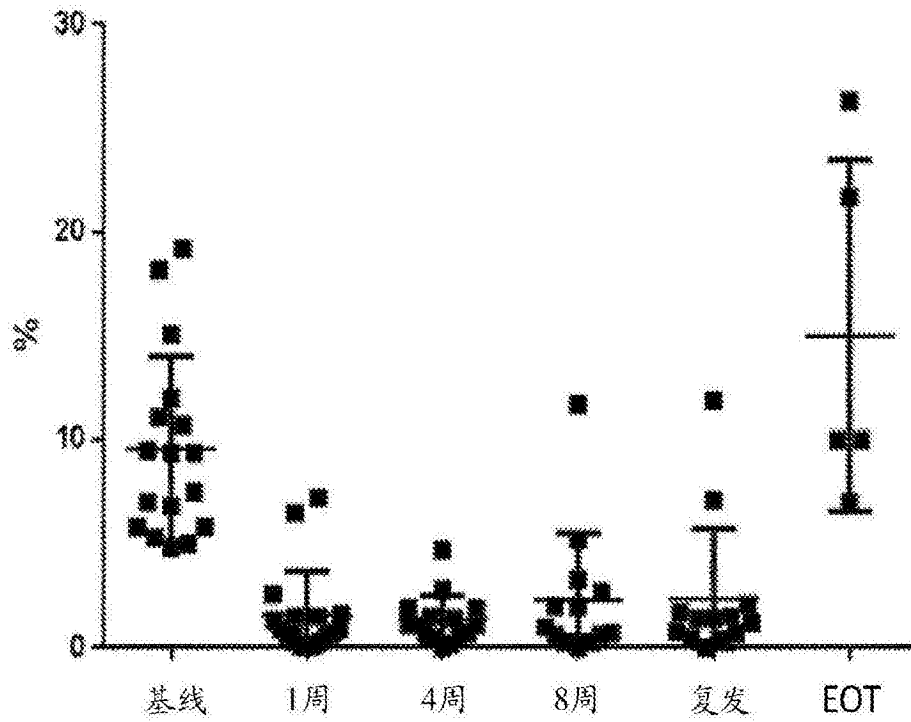


图10C

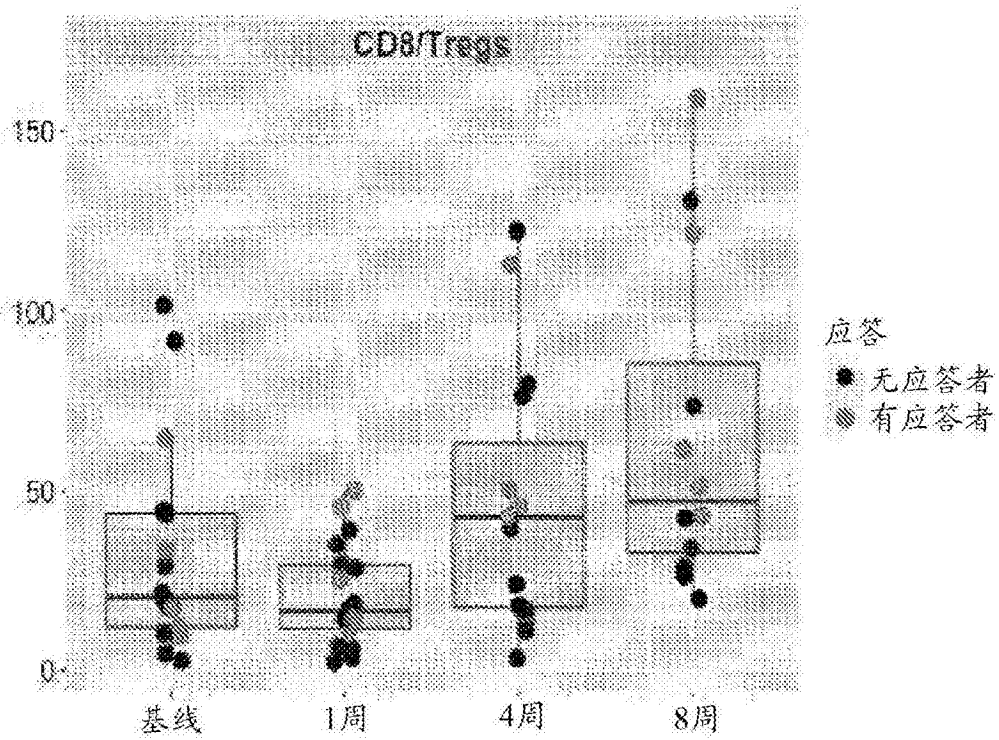


图10D

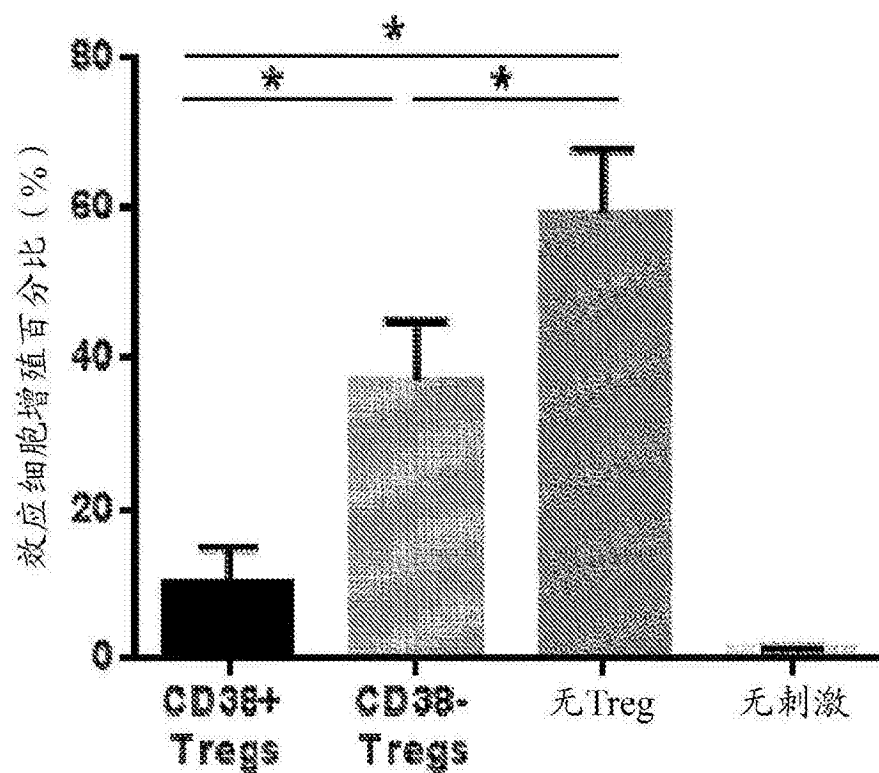


图10E

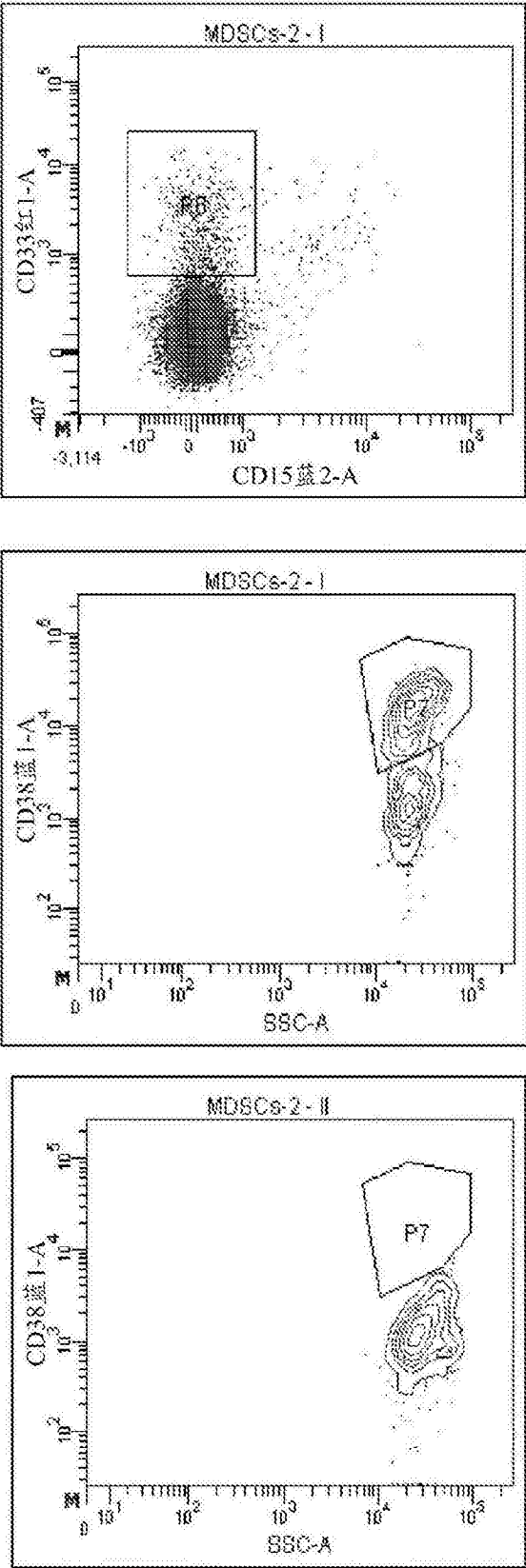


图11

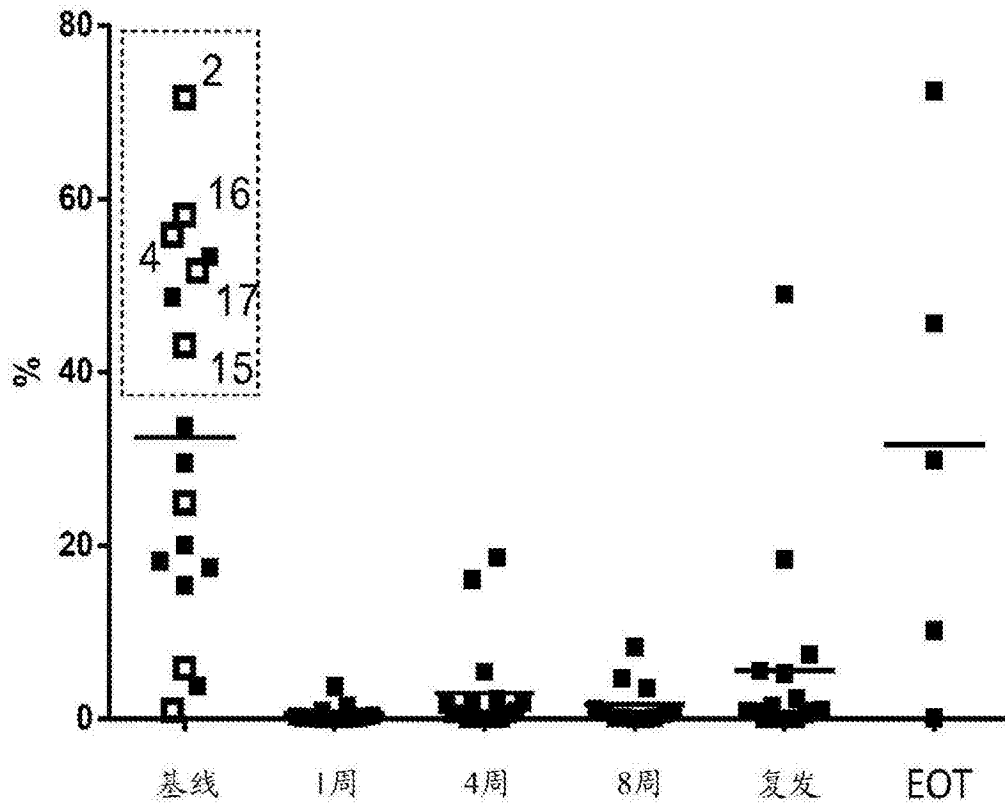


图12

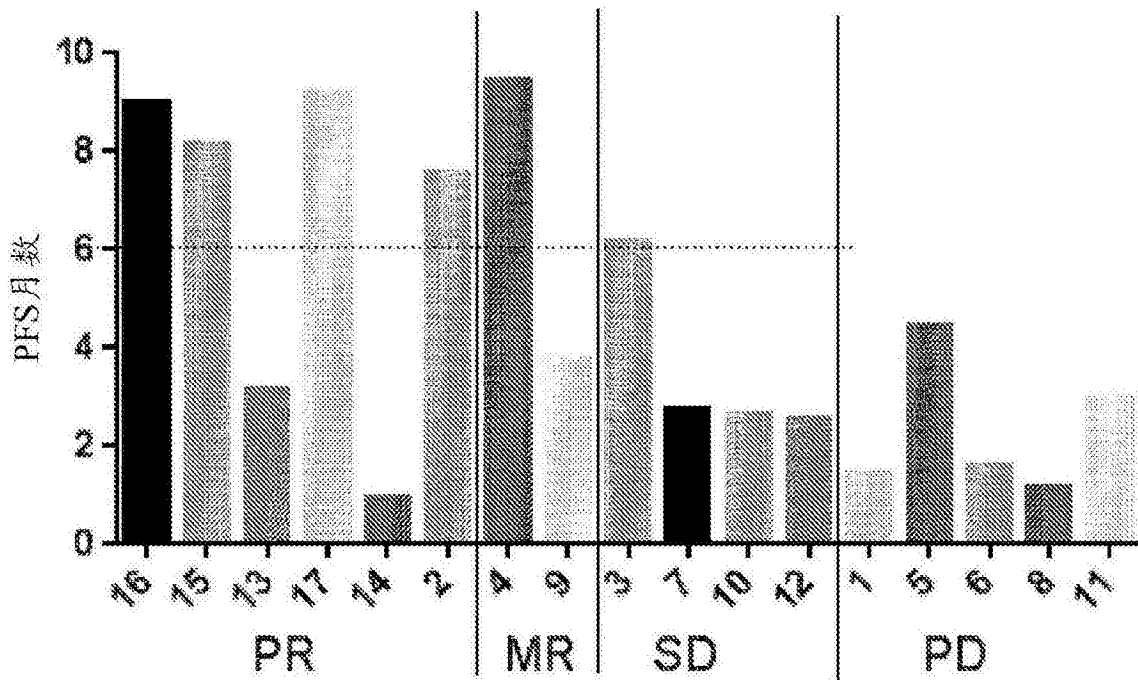


图13

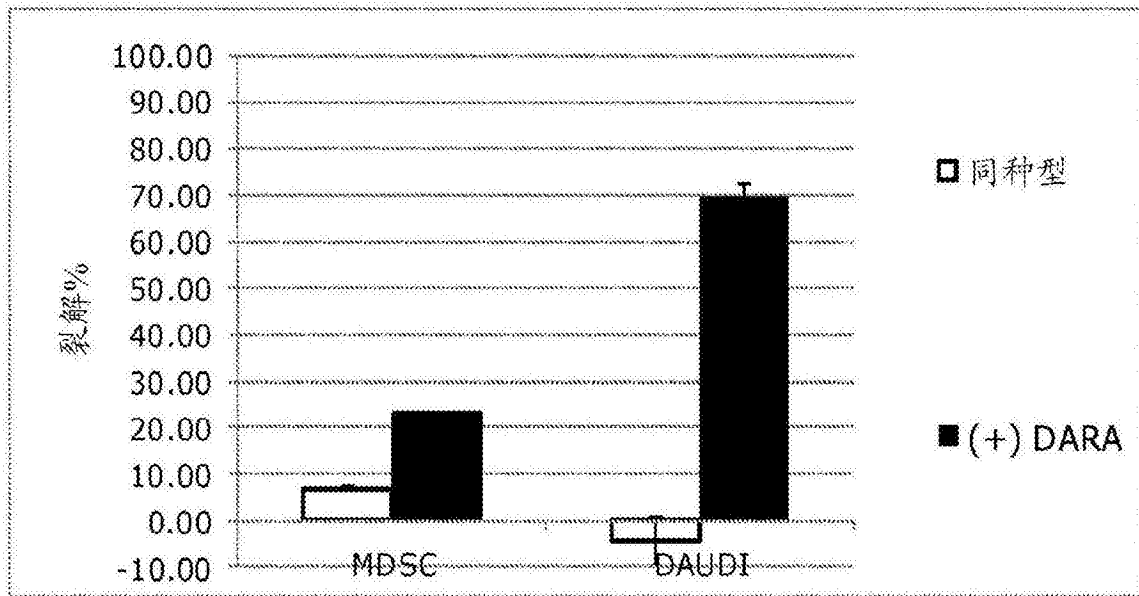


图14

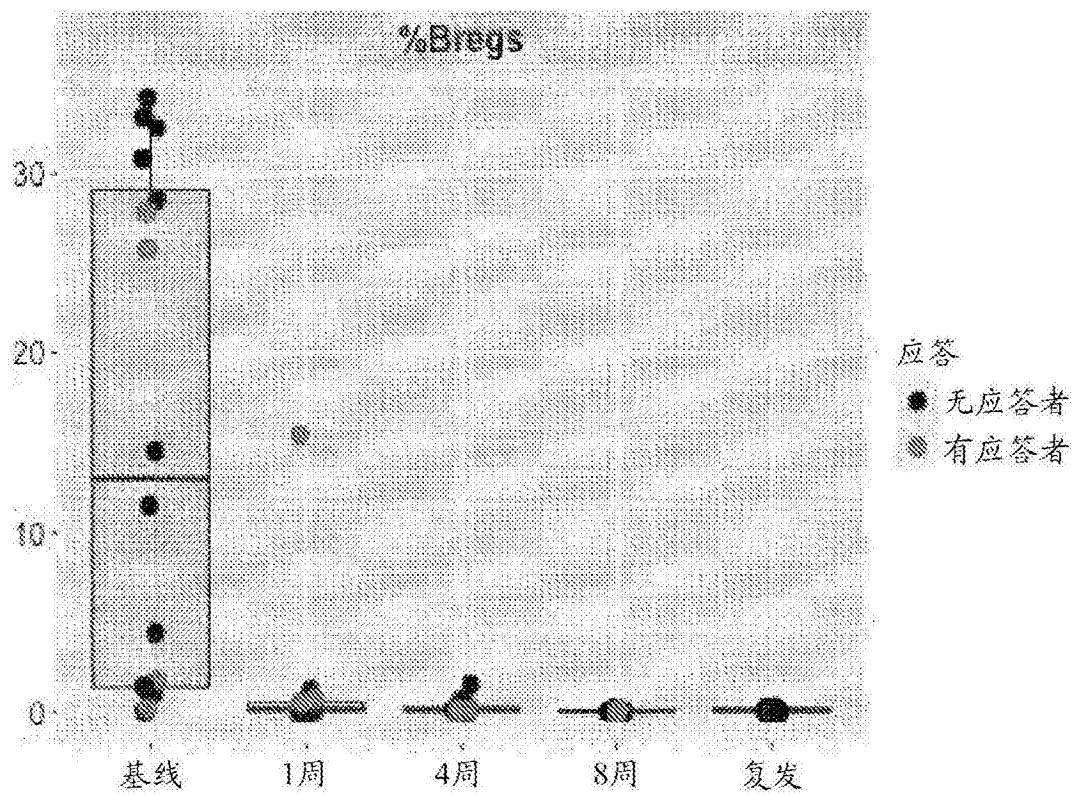


图15A

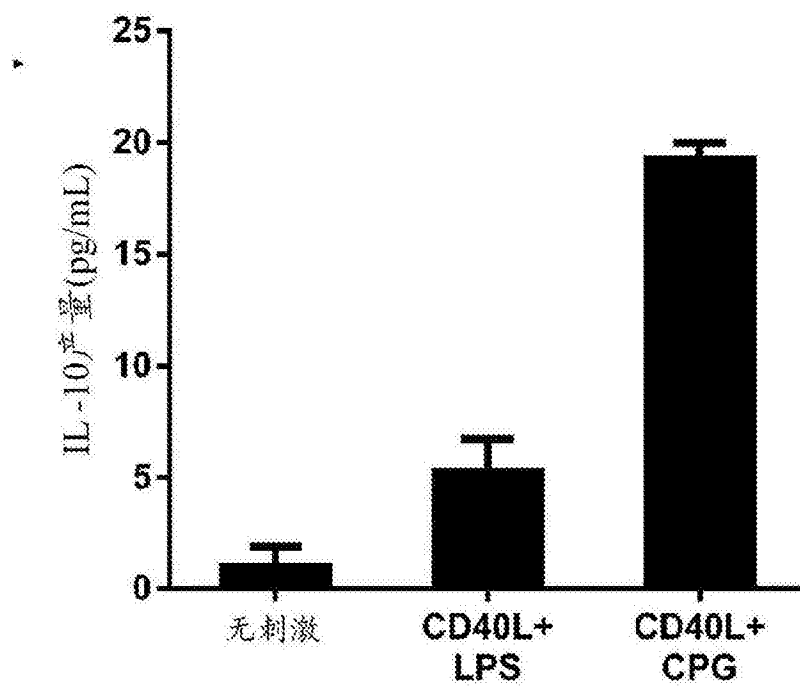


图15B

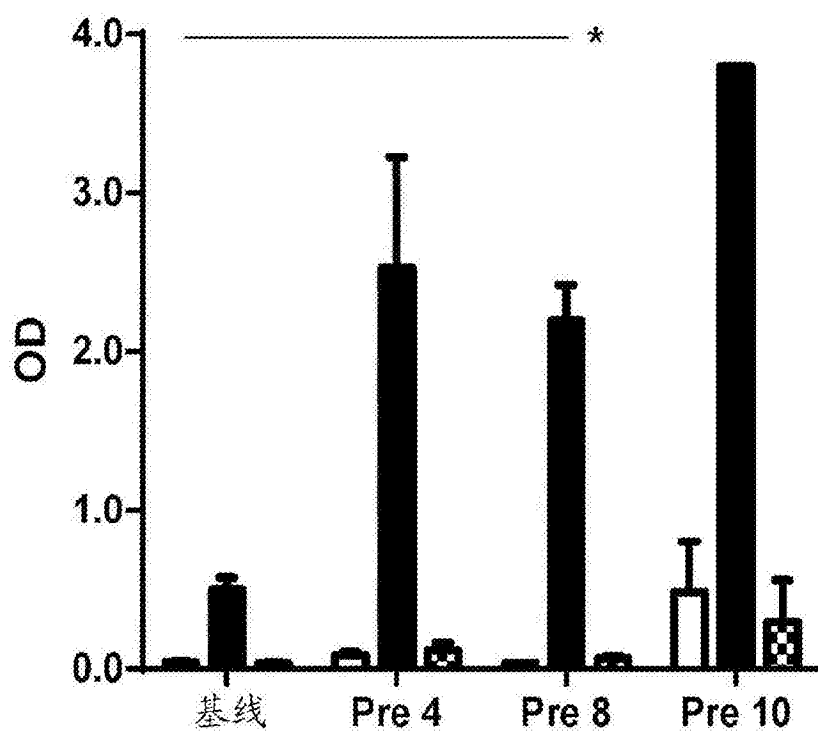


图16A

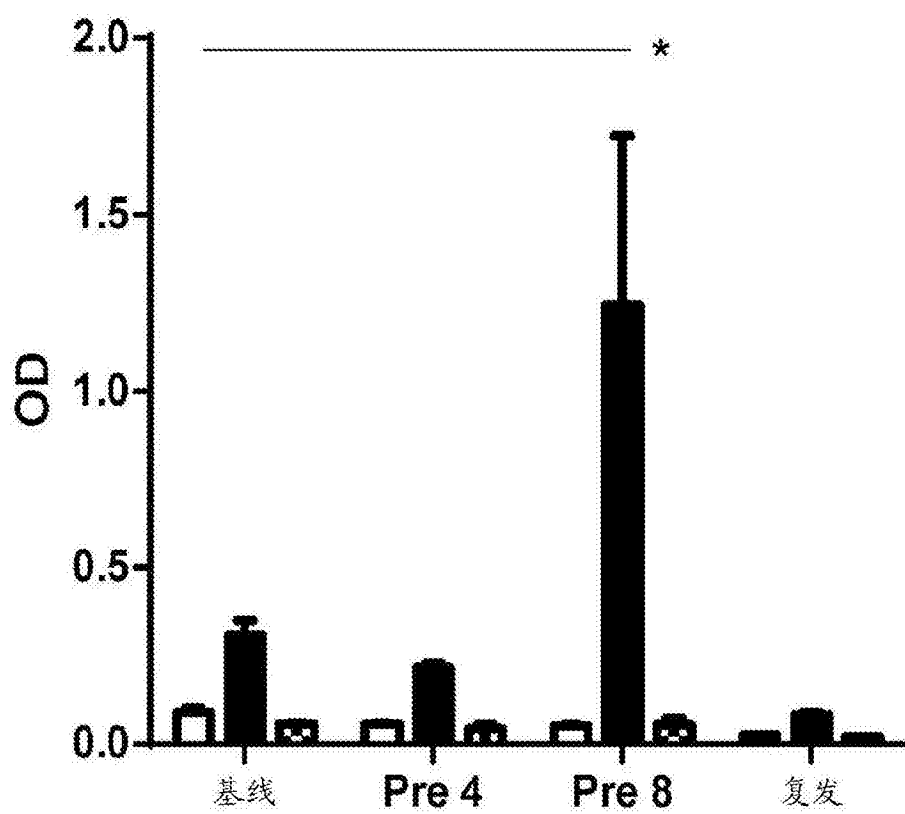


图16B

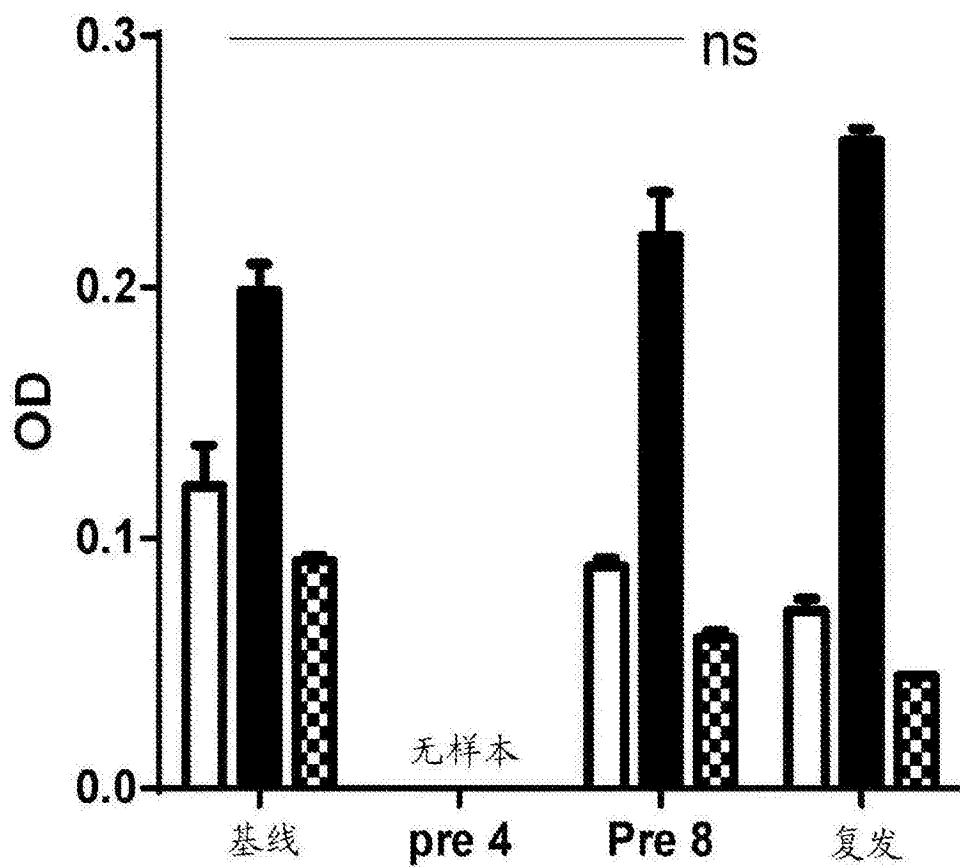


图16C

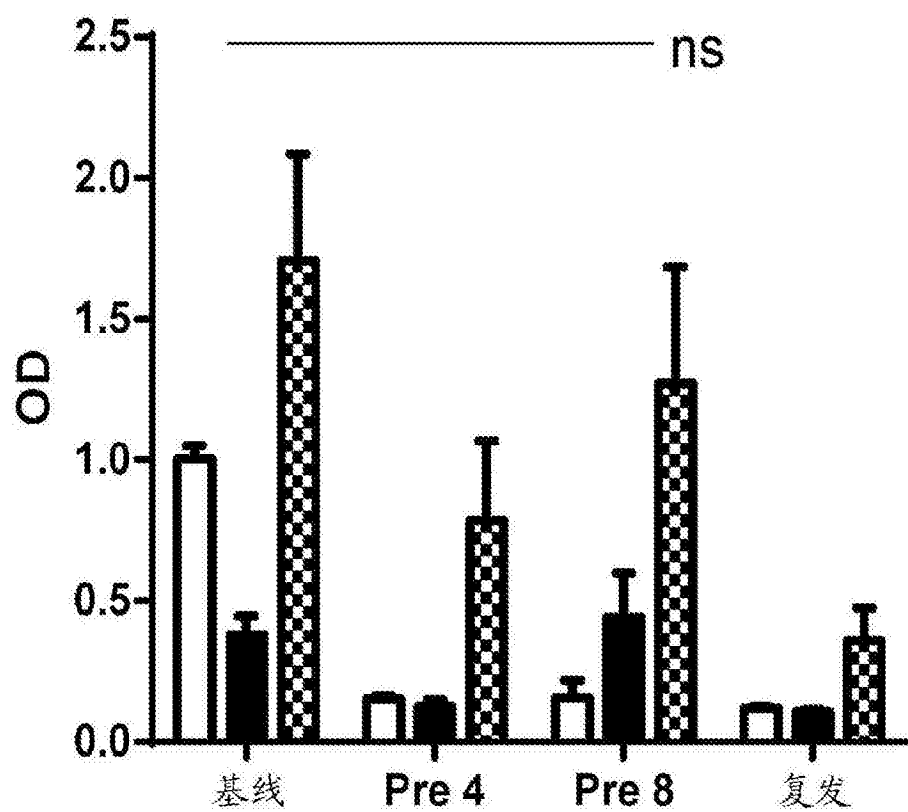


图16D

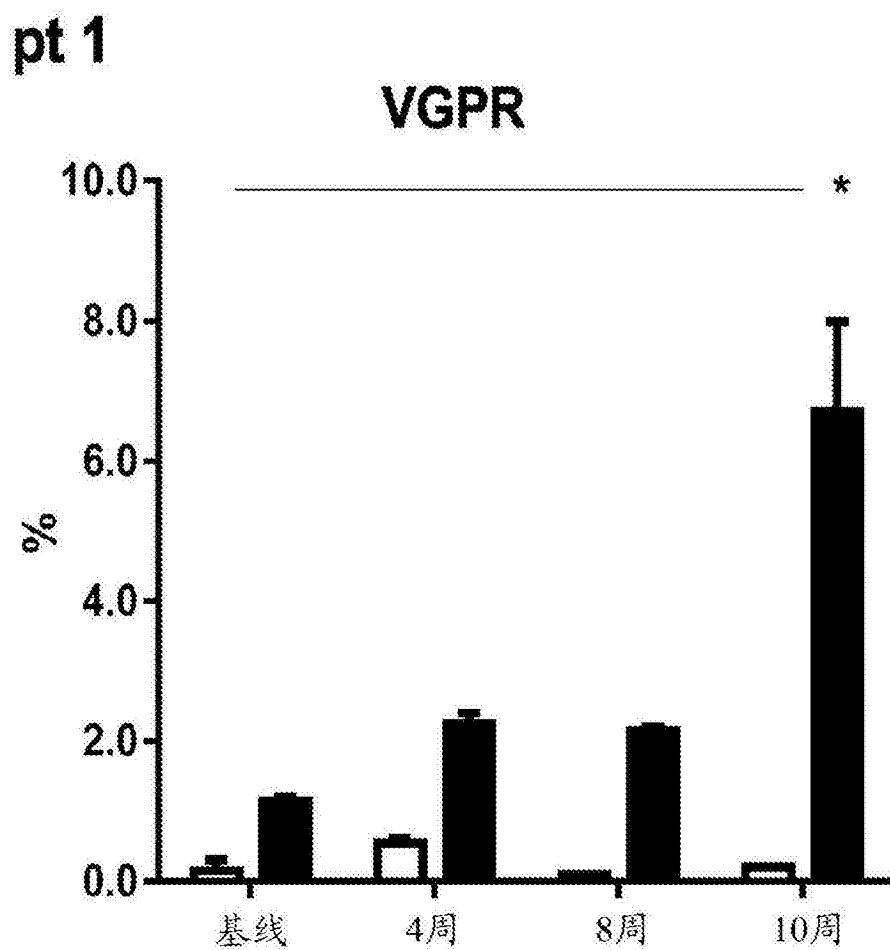


图16E

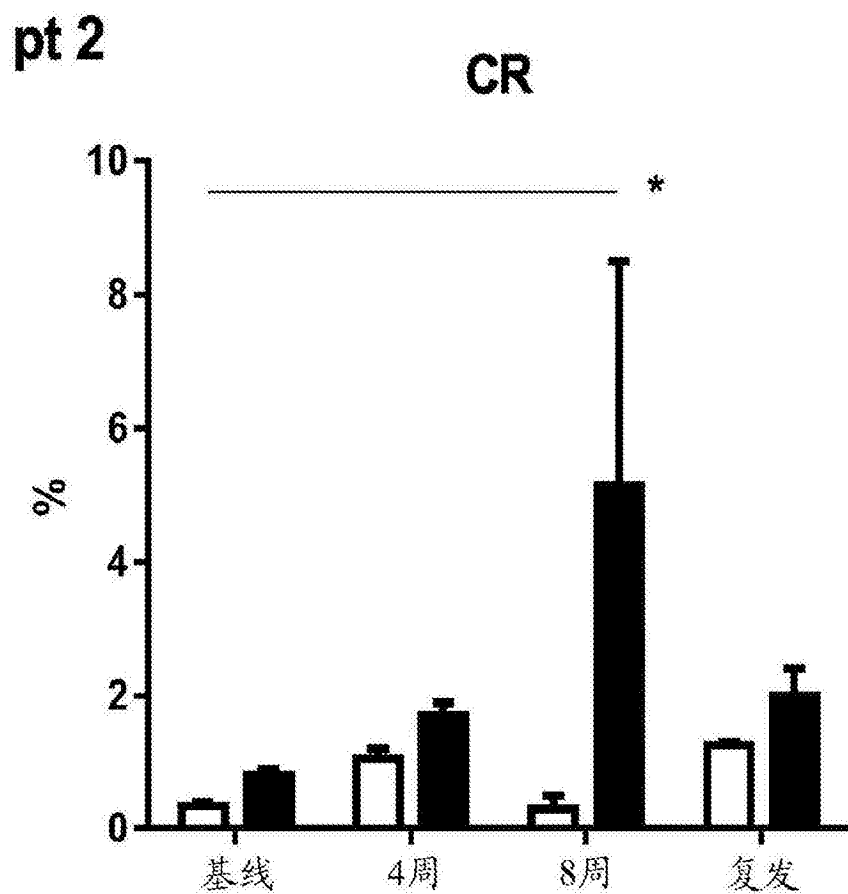


图16F

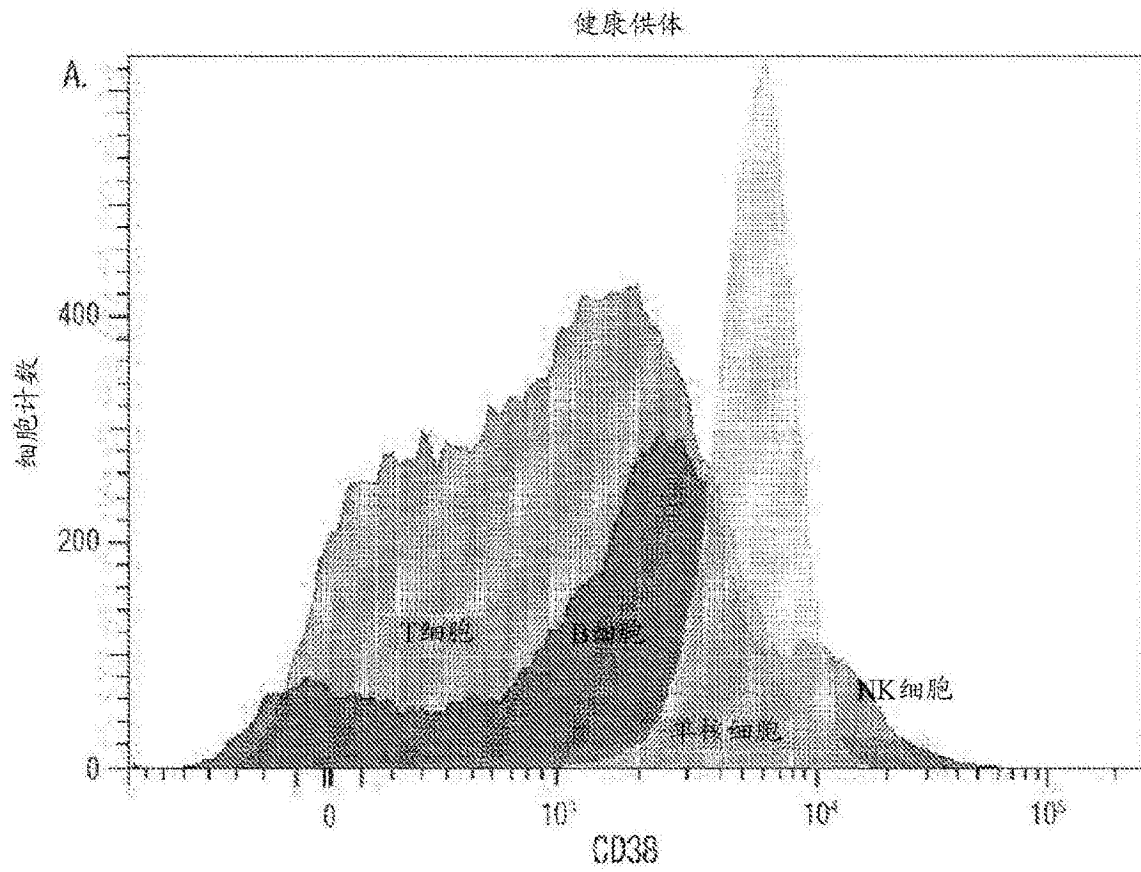


图17A

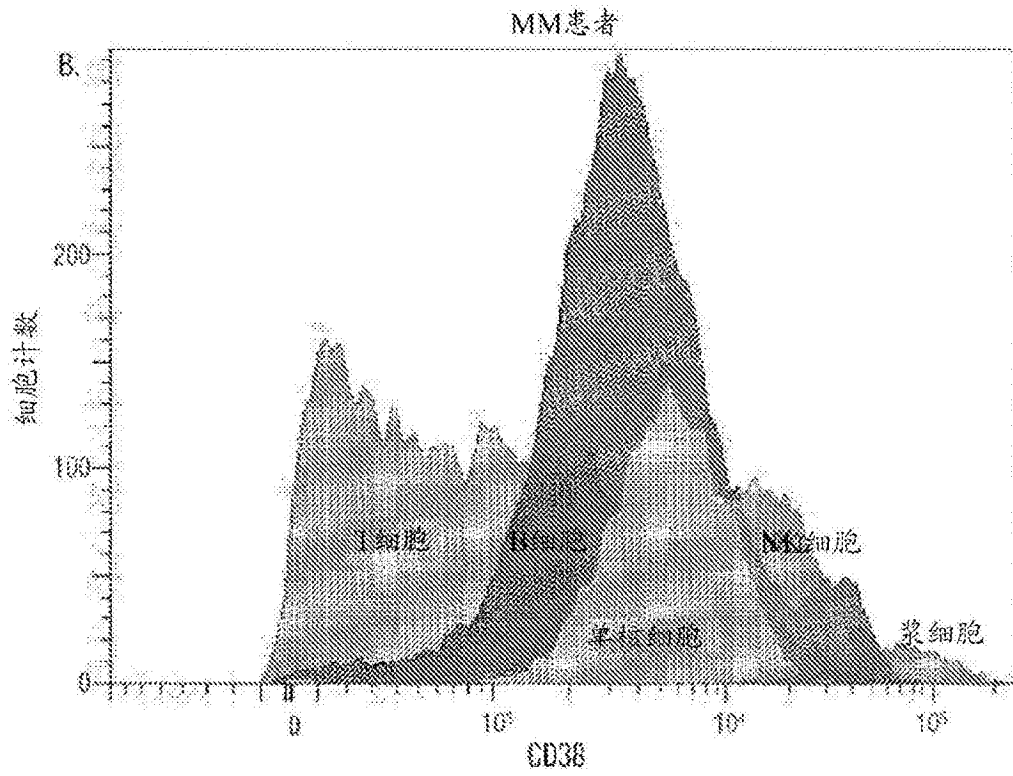


图17B

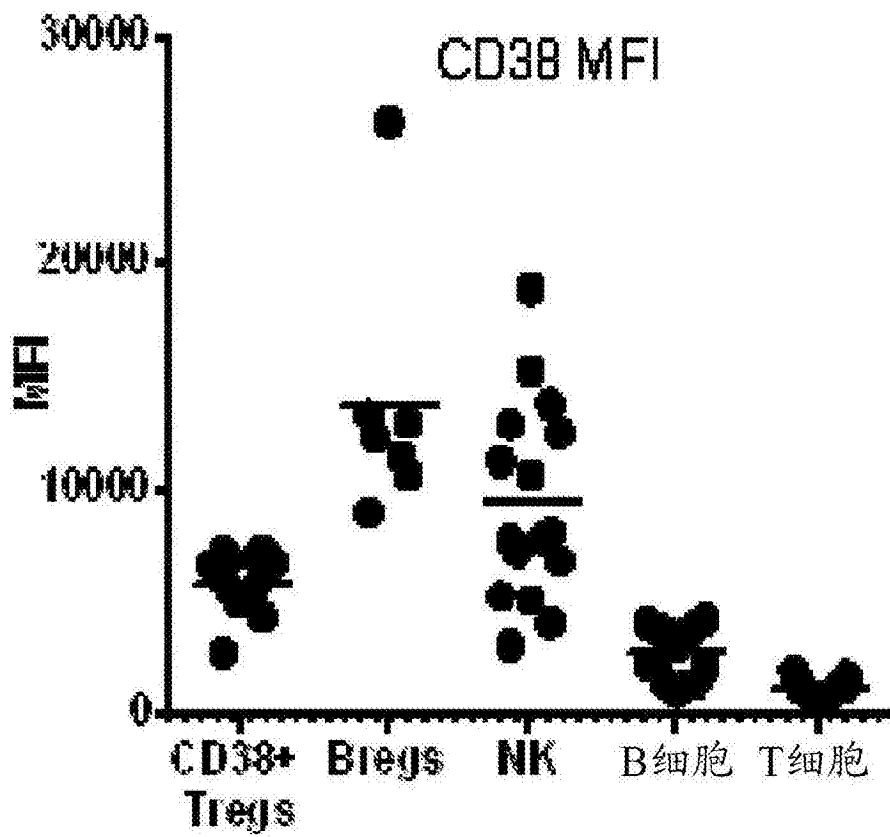


图17C

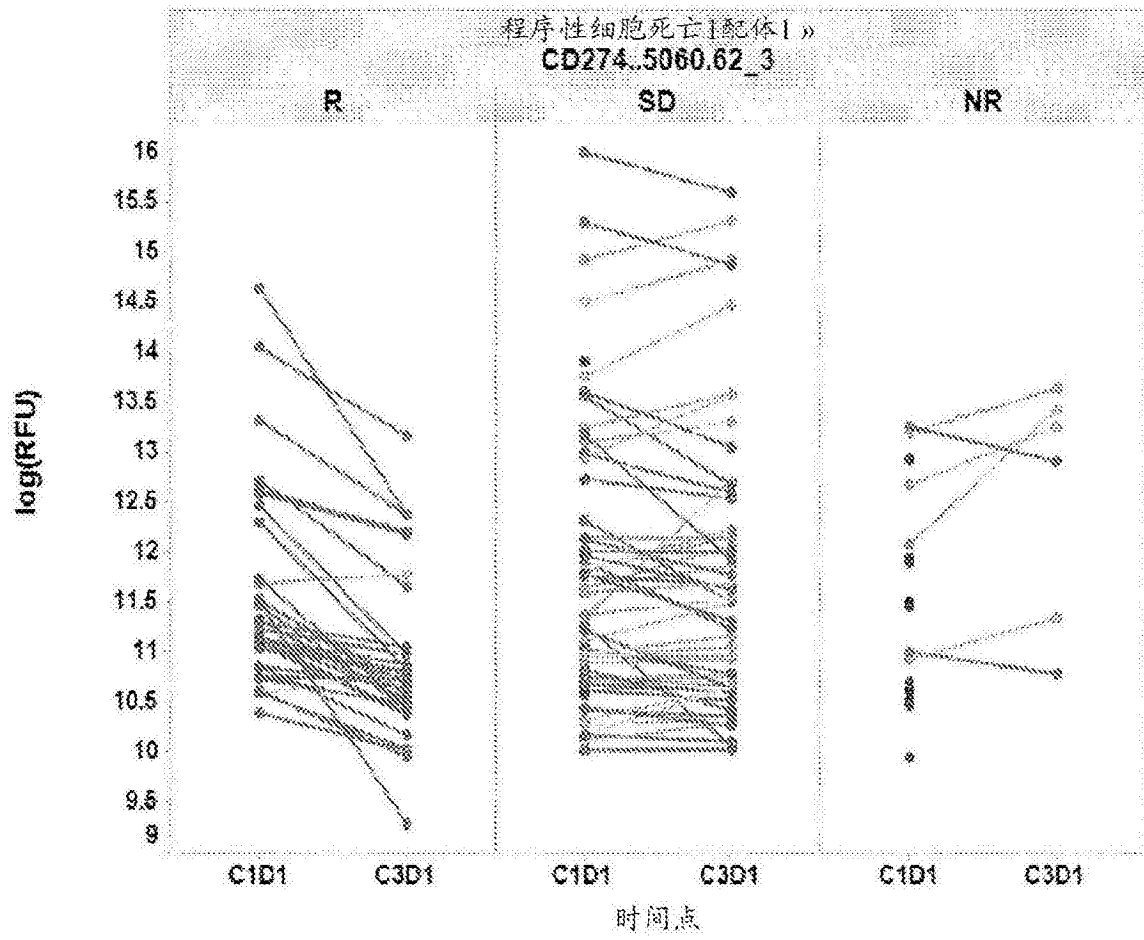


图18