



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101801413 A

(43) 申请公布日 2010.08.11

(21) 申请号 200880106968.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.07.11

A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据

60/959,246 2007.07.12 US

61/001,021 2007.10.30 US

61/126,431 2008.05.05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/008502 2008.07.11

(87) PCT申请的公布数据

W02009/009116 EN 2009.01.15

(71) 申请人 托勒克斯股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 迈克尔·罗森茨韦格 保罗·波内思

乔斯·F·庞特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

权利要求书 3 页 说明书 36 页 序列表 3 页
附图 8 页

(54) 发明名称

采用 GITR 结合分子的联合疗法

(57) 摘要

本发明提供了采用与一种或多种别的药剂组合的 GITR 结合分子的联合疗法。

1. 一种用于在受试者中抑制肿瘤细胞生长的方法,包括对所述受试者施用 GITR 结合分子或其抗原结合片段和一轮或多轮至少一种别的药剂,使得在所述受试者中肿瘤细胞生长得到抑制。

2. 一种用于在具有肿瘤的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 结合分子或其抗原结合片段和一轮或多轮至少一种别的药剂,使得所述肿瘤大小得到缩小。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中在施用所述 GITR 结合分子或其抗原结合片段前对所述受试者施用所述至少一种别的药剂。

4. 权利要求 1 或 2 的方法,其中伴随所述 GITR 结合分子或其抗原结合片段对所述受试者施用所述至少一种别的药剂。

5. 权利要求 1 或 2 的方法,其中在施用所述 GITR 结合分子或其抗原结合片段后对所述受试者施用所述至少一种别的药剂。

6. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述至少一种别的药剂是化疗剂。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述化疗剂是抗代谢物。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述抗代谢物选自下组:氨基蝶呤、甲氨蝶呤、培美曲塞、雷替曲塞、克拉屈滨、氟达拉滨、氟达拉滨、疏嘌呤、喷司他丁、疏鸟嘌呤、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氟尿苷、和吉西他滨。

9. 权利要求 7 的方法,其中所述抗代谢物是核苷类似物。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述核苷类似物是吉西他滨。

11. 权利要求 9 的方法,其中所述核苷类似物是氟尿嘧啶。

12. 权利要求 6 的方法,其中所述化疗剂是影响微管形成的药剂。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述影响微管形成的药剂选自下组:帕利他塞、多西他赛、长春新碱、长春碱、长春地辛、长春瑞滨、泰索帝、依托泊苷、和替尼泊苷。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述影响微管形成的药剂是帕利他塞。

15. 权利要求 6 的方法,其中所述化疗剂是烷化剂。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述烷化剂是环磷酰胺。

17. 权利要求 6 的方法,其中所述化疗剂是细胞毒性抗生素。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述细胞毒性抗生素是拓扑异构酶 II 抑制剂。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述拓扑异构酶 II 抑制剂是多柔比星。

20. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述 GITR 结合分子是人源化抗体或其抗体片段。

21. 权利要求 16 的方法,其中所述人源化抗体包含 SEQ ID NO. :1、2 或 3、4、5、6、或 7 中所显示的 CDR。

22. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述 GITR 结合分子是嵌合抗体或其抗体片段。

23. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述肿瘤的类型选自下组:胰腺癌、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑癌或中枢神经系统癌、周围神经系统癌、食管癌、宫颈癌、子宫癌或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆管癌、小肠癌或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、和血液学组织的癌症。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述肿瘤是结肠肿瘤。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述结肠肿瘤是腺癌。
26. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述肿瘤是黑素瘤。
27. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述肿瘤选自下组:结肠肿瘤、肺肿瘤、乳腺肿瘤、胃肿瘤、前列腺肿瘤、宫颈肿瘤、阴道肿瘤、和胰腺肿瘤。
28. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述肿瘤处于选自下组的时期:I 期、II 期、III 期、和 IV 期。
29. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述肿瘤为至少约 0.5mmX0.5mm。
30. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述肿瘤为至少约 1mmX1mm。
31. 权利要求 2 的方法,其中所述肿瘤具有至少约 100mm³ 的体积。
32. 权利要求 2 的方法,其中所述肿瘤是转移性的。
33. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述施用 GITR 结合分子或其抗原结合片段和至少一种化疗剂导致肿瘤大小被抑制超过约 42%。
34. 一种用于在具有结肠腺癌的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮吉西他滨,使得所述肿瘤大小得到缩小。
35. 权利要求 34 的方法,其中所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。
36. 一种用于在具有黑素瘤的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮帕利他塞,使得所述肿瘤大小得到缩小。
37. 权利要求 36 的方法,其中所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。
38. 权利要求 36 的方法,其中所述肿瘤是在启动治疗时的继发性肿瘤。
39. 一种用于在具有结肠腺癌的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮环磷酰胺,使得所述肿瘤大小得到缩小。
40. 权利要求 39 的方法,其中所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。
41. 权利要求 39 的方法,其中所述肿瘤是在启动治疗时的继发性肿瘤。
42. 一种用于在具有结肠腺癌的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮氟尿嘧啶,使得所述肿瘤大小得到缩小。
43. 权利要求 42 的方法,其中所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。
44. 一种用于在具有结肠腺癌的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮多柔比星,使得所述肿瘤大小得到缩小。
45. 权利要求 44 的方法,其中所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。
46. 权利要求 34、36、39、42、和 44 任一项的方法,其中所述 GITR 结合分子是人源化抗体或其抗体片段。
47. 权利要求 46 的方法,其中所述人源化抗体包含 SEQ ID NO. :1、2 或 3、4、5、6、或 7 中所显示的 CDR。
48. 权利要求 34、36、39、42、和 44 任一项的方法,其中所述 GITR 结合分子是嵌合抗体或其抗体片段。
49. 一种试剂盒,其包含:
 - a) 包装材料;
 - b) GITR 结合分子或其抗原结合片段;和
 - c) 所述包装材料内含有的标签或包装插页,其指明所述 GITR 结合分子或其抗原结合

片段可以与至少一种别的药剂一起施用。

50. 权利要求 49 的试剂盒,其中所述至少一种别的药剂是化疗剂。
51. 权利要求 50 的试剂盒,其中所述化疗剂是抗代谢物。
52. 权利要求 51 的试剂盒,其中所述抗代谢物是核苷类似物。
53. 权利要求 52 的试剂盒,其中所述核苷类似物是吉西他滨。
54. 权利要求 52 的试剂盒,其中所述核苷类似物是氟尿嘧啶。
55. 权利要求 50 的试剂盒,其中所述化疗剂是影响微管形成的药剂。
56. 权利要求 55 的试剂盒,其中所述影响微管形成的药剂是帕利他塞。
57. 权利要求 50 的试剂盒,其中所述化疗剂是烷化剂。
58. 权利要求 57 的试剂盒,其中所述烷化剂是环磷酰胺。
59. 权利要求 50 的方法,其中所述化疗剂是细胞毒性抗生素。
60. 权利要求 59 的方法,其中所述细胞毒性抗生素是拓扑异构酶 II 抑制剂。
61. 权利要求 60 的方法,其中所述拓扑异构酶 II 抑制剂是多柔比星。
62. 权利要求 49 的试剂盒,其中所述 GITR 结合分子是人源化抗体或其抗体片段。
63. 权利要求 62 的试剂盒,其中所述人源化抗体包含 SEQ ID NO. :1、2 或 3、4、5、6、或 7 中所显示的 CDR。
64. 权利要求 49 的试剂盒,其中所述 GITR 结合分子是嵌合抗体或其抗体片段。

采用 GITR 结合分子的联合疗法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2007 年 7 月 12 日提交的题目为“Combination Therapies Employing GITR Binding Molecules”的美国临时申请 USSN 60/959,246、2007 年 10 月 30 日提交的题目为“Combination Therapies Employing GITR Binding Molecules”的 USSN 61/001,021、和 2008 年 5 月 5 日提交的题目为“Combination Therapies Employing GITR Binding Molecules”的 USSN 61/126,431 的优先权,由此通过提及而收录每篇的全部内容。

[0003] 发明背景

[0004] 癌症是当今世界上最普遍的健康问题之一,在美国影响约 1/5 的人口。常规采用各种化疗剂来抗击癌症。不幸的是,许多这些药物在有效对抗肿瘤的剂量时具有一些毒性。另外,化学疗法抗性是癌症治疗失败的一个主要原因。在多年里已经开发了用于改善癌症治疗的策略,但是仍需要有效的疗法。增强化疗剂的抗肿瘤效果的方法对于受试者(例如人)中瘤形成的治疗或者进展、严重程度或影响的减轻会是有用的。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明至少部分基于如下发现,即采用 GITR 结合分子(例如抗 GITR 抗体)和至少一种别的不是 GITR 结合分子的药剂(例如化疗剂)的联合疗法比没有 GITR 结合分子的情况中施用一种或多种药剂更有效地治疗和/或预防癌症和/或缩小某些肿瘤的大小。此外,在一个实施方案中,本发明的联合疗法具有改善的安全性概况。例如,在一个实施方案中,由于本发明的联合疗法是更有效的,至少一种药剂可以以比单独使用时实现功效所要求的剂量低的剂量使用。

[0007] 因而,一方面,本发明提供了一种用于在受试者中抑制肿瘤细胞生长的方法,包括对所述受试者施用 GITR 结合分子或其抗原结合片段和一轮或多轮至少一种别的药剂,使得在所述受试者中肿瘤细胞生长得到抑制。

[0008] 另一方面,本发明提供了一种用于在具有肿瘤的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 结合分子或其抗原结合片段和一轮或多轮至少一种别的药剂,使得所述肿瘤大小得到缩小。

[0009] 在一个实施方案中,在施用所述 GITR 结合分子或其抗原结合片段前对所述受试者施用所述至少一种别的药剂。在另一个实施方案中,伴随所述 GITR 结合分子或其抗原结合片段对所述受试者施用所述至少一种别的药剂。在又一个实施方案中,在施用所述 GITR 结合分子或其抗原结合片段后对所述受试者施用所述至少一种别的药剂。

[0010] 在一个实施方案中,所述至少一种别的药剂是化疗剂。在一个实施方案中,所述化疗剂是抗代谢物。在一个实施方案中,所述抗代谢物选自下组:氨基蝶呤(Aminopterin)、甲氨蝶呤(Methotrexate)、培美曲塞(Pemetrexed)、雷替曲塞(Raltitrexed)、克拉屈滨(Cladribine)、氯法拉滨(Clofarabine)、氟达拉滨(Fludarabine)、巯嘌呤(Mercaptopurine)、喷司他丁(Pentostatin)、硫鸟嘌呤(Thioguanine)、卡培他滨(Capecitabine)、阿糖胞苷(Cytarabine)、氟尿嘧啶(Fluorouracil)、氟尿苷(Floxuridine)、和吉西他滨(Gemcitabine)。在一个实施方案中,所述抗代谢物是核苷类似

物。在一个实施方案中,所述核苷类似物是吉西他滨。在另一个实施方案中,所述核苷类似物是氟尿嘧啶。在一个实施方案中,所述化疗剂是影响微管形成的药剂。在一个实施方案中,所述影响微管形成的药剂选自下组:帕利他塞 (paclitaxel)、多西他赛 (docetaxel)、长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、长春地辛 (vindesine)、长春瑞滨 (vinorelbine)、泰索帝 (taxotere)、依托泊苷 (etoposide)、和替尼泊苷 (teniposide)。在另一个实施方案中,所述影响微管形成的药剂是帕利他塞。在一个实施方案中,所述化疗剂是烷化剂。在一个实施方案中,所述烷化剂是环磷酰胺 (cyclophosphamide)。在一个实施方案中,所述化疗剂是细胞毒性抗生素。在一个实施方案中,所述细胞毒性抗生素是拓扑异构酶 II 抑制剂。在一个实施方案中,所述拓扑异构酶 II 抑制剂是多柔比星 (doxorubicin)。

[0011] 在一个实施方案中,所述 GITR 结合分子是人源化抗体或其抗体片段。在一个实施方案中,所述 GITR 结合分子是人抗体或其抗体片段。在一个实施方案中,所述人源化抗体包含 SEQ ID NO. :1、2 或 3、4、5、6、或 7 中所显示的 CDR。在另一个实施方案中,所述 GITR 结合分子是嵌合抗体或其抗体片段。

[0012] 在一个实施方案中,所述肿瘤的类型选自下组:胰腺癌 (pancreatic cancer)、黑色素瘤 (melanoma)、乳腺癌 (breast cancer)、肺癌 (lung cancer)、支气管癌 (bronchial cancer)、结肠直肠癌 (colorectal cancer)、前列腺癌 (prostate cancer)、胃癌 (stomach cancer)、卵巢癌 (ovarian cancer)、膀胱癌 (urinary bladder cancer)、脑癌或中枢神经系统癌 (brain or central nervous system cancer)、周围神经系统癌 (peripheral nervous system cancer)、食管癌 (esophageal cancer)、宫颈癌 (cervical cancer)、子宫癌或子宫内膜癌 (uterine or endometrial cancer)、口腔癌或咽癌 (cancer of the oral cavity or pharynx)、肝癌 (liver cancer)、肾癌 (kidney cancer)、睾丸癌 (testicular cancer)、胆管癌 (biliary tract cancer)、小肠癌或阑尾癌 (small bowel or appendix cancer)、唾液腺癌 (salivary gland cancer)、甲状腺癌 (thyroid gland cancer)、肾上腺癌 (adrenal gland cancer)、骨肉瘤 (osteosarcoma)、软骨肉瘤 (chondrosarcoma)、和血液学组织的癌症 (cancer of hematological tissue)。在一个实施方案中,所述肿瘤是结肠肿瘤。在一个实施方案中,所述结肠肿瘤是腺癌。在另一个实施方案中,所述肿瘤选自下组:结肠肿瘤 (colon tumor)、肺肿瘤 (lung tumor)、乳腺肿瘤 (breast tumor)、胃肿瘤 (stomach tumor)、前列腺肿瘤 (prostate tumor)、宫颈肿瘤 (cervical tumor)、阴道肿瘤 (vaginal tumor)、和胰腺肿瘤 (pancreatic tumor)。在又一个实施方案中,所述肿瘤处于选自下组的时期:I 期、II 期、III 期、和 IV 期。

[0013] 在一个实施方案中,所述肿瘤为至少约 0.5mm×0.5mm。在另一个实施方案中,所述肿瘤为至少约 1mm×1mm。在又一个实施方案中,所述肿瘤具有至少约 100mm³ 的体积。

[0014] 在一个实施方案中,所述肿瘤是转移性的。

[0015] 在一个实施方案中,所述施用 GITR 结合分子或其抗原结合片段和至少一种化疗剂导致肿瘤大小被抑制至少约 42% 至至少约 90%。

[0016] 另一方面,本发明提供一种用于在具有结肠腺癌的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮吉西他滨,使得所述肿瘤大小得到缩小。

[0017] 在一个实施方案中,所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。

[0018] 另一方面,本发明提供一种用于在具有黑素瘤的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮帕利他塞,使得所述肿瘤大小得到缩小。

[0019] 在一个实施方案中,所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。在另一个实施方案中,所述肿瘤是在启动治疗时的继发性肿瘤。

[0020] 又一方面,本发明提供了一种用于在具有结肠腺癌的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮环磷酰胺,使得所述肿瘤大小得到缩小。

[0021] 在一个实施方案中,所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。在另一个实施方案中,所述肿瘤是在启动治疗时的继发性肿瘤。

[0022] 另一方面,本发明提供了一种用于在具有结肠腺癌的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮氟尿嘧啶,使得所述肿瘤大小得到缩小。

[0023] 在一个实施方案中,所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。在另一个实施方案中,所述肿瘤是在启动治疗时的继发性肿瘤。

[0024] 另一方面,本发明提供了一种用于在具有结肠腺癌的受试者中缩小肿瘤大小的方法,包括对所述受试者施用 GITR 抗体或其抗原结合片段和一轮或多轮多柔比星,使得所述肿瘤大小得到缩小。

[0025] 在一个实施方案中,所述肿瘤是在启动治疗时已建立的肿瘤。在另一个实施方案中,所述肿瘤是在启动治疗时的继发性肿瘤。

[0026] 在一个实施方案中,所述抗 GITR 抗体是人源化抗体或其抗体片段。在一个实施方案中,所述人源化抗体包含 SEQ ID NO. :1、2 或 3、4、5、6、或 7 中所显示的 CDR。在另一个实施方案中,所述 GITR 结合分子是嵌合抗体或其抗体片段。

[0027] 本方面的又一方面提供了一种试剂盒,其包含:a) 包装材料;b) GITR 结合分子或其抗原结合片段;和 c) 所述包装材料内含有的标签或包装插页,其指明所述 GITR 结合分子或其抗原结合片段可以与至少一种别的药剂一起施用。

[0028] 在一个实施方案中,所述至少一种别的药剂是化疗剂。在一个实施方案中,所述化疗剂是抗代谢物。在一个实施方案中,所述抗代谢物是核苷类似物。在一个实施方案中,所述核苷抑制剂是吉西他滨。在另一个实施方案中,所述核苷类似物是氟尿嘧啶。在一个实施方案中,所述化疗剂是影响微管形成的药剂。在一个实施方案中,所述影响微管形成的药剂选自下组:帕利他塞、多西他赛、长春新碱、长春碱、长春地辛、长春瑞滨、泰索帝、依托泊苷、和替尼泊苷。在另一个实施方案中,所述影响微管形成的药剂是帕利他塞。在一个实施方案中,所述化疗剂是烷化剂。在一个实施方案中,所述烷化剂是环磷酰胺。在一个实施方案中,所述化疗剂是细胞毒性抗生素。在一个实施方案中,所述细胞毒性抗生素是拓扑异构酶 II 抑制剂。在一个实施方案中,所述拓扑异构酶 II 抑制剂是多柔比星。

[0029] 在一个实施方案中,所述 GITR 结合分子是人源化抗体或其抗体片段。在一个实施方案中,所述人源化抗体包含 SEQ ID NO. :1、2 或 3、4、5、6、或 7 中所显示的 CDR。在另一个实施方案中,所述 GITR 结合分子是嵌合抗体或其抗体片段。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1 描绘的图形显示了与单独的吉西他滨、单独的 2F8、和媒介物对照的效果相比在处理过程里与抗 GITR 抗体,即 2F8(0.4mg) 组合的核苷类似物,即吉西他滨 (Gemzar) (80mg/kg) 对肿瘤体积的影响。

[0032] 图 2 描绘的图形显示了与单独的吉西他滨、单独的 2F8、和媒介物对照的效果相比在处理过程里与抗 GITR 抗体,即 2F8(0.4mg) 组合的核苷类似物,即吉西他滨 (Gemzar) (80mg/kg) 对中线存活时间 (Kaplan-Meier 存活曲线) 的影响。

[0033] 图 3 描绘的图形显示了与单独的吉西他滨、单独的 2F8、和媒介物对照的效果相比在处理过程里与抗 GITR 抗体,即 2F8(0.4mg) 组合的核苷类似物,即吉西他滨 (Gemzar) (80mg/kg) 对转移性肿瘤数目的影响。

[0034] 图 4 描绘的图形显示了与单独的帕利他塞、单独的 2F8、和媒介物对照的效果相比在处理过程里与抗 GITR 抗体,即 2F8(0.4mg) 组合的影响微管形成的药剂,即帕利他塞 (Taxol[®]) (10mg/kg) 对肿瘤体积的影响。

[0035] 图 5 描绘的图形显示了与单独的环磷酰胺、和媒介物对照的效果相比在处理过程里与抗 GITR 抗体,即 2F8(0.4mg) 组合的烷化剂,即环磷酰胺 (Cytosan) (150mg/kg) 对肿瘤体积的影响。

[0036] 图 6 描绘的图形显示了与单独的氟尿嘧啶、和媒介物对照的效果相比在处理过程里与抗 GITR 抗体,即 2F8(0.4mg) 组合的核苷类似物,即氟尿嘧啶 (5-FU) (75mg/kg) 对肿瘤体积的影响。

[0037] 图 7 描绘的图形显示了与单独的氟尿嘧啶、和媒介物对照的效果相比在处理过程里与抗 GITR 抗体,即 2F8(0.4mg) 组合的拓扑异构酶 II 抑制剂,即多柔比星 (阿霉素) (5mg/kg) 对肿瘤体积的影响。

[0038] 图 8 描绘的图形显示了与单独的环磷酰胺、和媒介物对照的效果相比在处理过程里与抗 GITR 抗体,即 2F8(0.4mg) 组合的烷化剂,即环磷酰胺 (Cytosan) (150mg/kg) 对肿瘤体积的影响。

[0039] 发明详述

[0040] 本发明部分提供了用于治疗癌症的方法和试剂盒。更具体地,已经显示了,采用 GITR 结合分子 (例如抗 GITR 抗体) 和至少一种别的不是 GITR 结合分子的药剂 (例如化疗剂) 的联合疗法比单独的任一药剂更有效地缩小某些肿瘤的大小。

[0041] 糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子 (TNF) 受体家族相关基因 (GITR) (也称为 TNF 受体超家族成员 18 (TNFRSF 18)) 是与 TNF 受体家族成员具有同源性的 I 型跨膜蛋白 (Nocentini G 等 (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:6216-21; Gurney AL 等 (1999) Curr Biol 9:215-8)。GITR 在静息 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞上以低水平表达,并且在 T 细胞活化后上调。GITR 的连接提供增强 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞增殖和效应器功能的共刺激信号 (Kohm AP 等 (2004) J Immunol 172:4686-90; Kanamaru F 等 (2004) J Immunol 172:7306-14; Ronchetti S 等 (2004) Eur J Immunol 34:613-22; Tone M 等 (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:15059-64; Stephens GL 等 (2004) J Immunol 2004:173:5008-20)。另外, GITR 在调节性 T 细胞上以高水平组成性表达。虽然先前已经显示了 GITR 增强对某些蛋白质抗原的免疫应答,但是先前没有显示其增强用于抗击癌症的药剂的抗肿瘤效果。

[0042] 为了可以更容易地理解本发明,首先定义某些术语。

[0043] I. 定义

[0044] 为方便起见,在进一步描述本发明前,这里定义了说明书、实施例和所附权利要求书中所采用的某些术语。

[0045] 除非上下文另有清楚指明,单数形式“一个/一种”和“所述”包括复数提及物。

[0046] 术语“施用”包括将药物组合物或治疗剂投递入受试者的系统中或者投递至受试者中或受试者上的特定区域的任何方法。如本文中所使用的,短语“系统施用”(systemic administration,administered systemically)和“周围施用”(peripheral administration,administered peripherally)指不同于直接进入中枢神经系统中的化合物、药物或其它材料的施用,使得它进入受试者的系统,且如此进行新陈代谢和其它类似的过程,例如皮下施用。“胃肠外施用”指不同于肠和表面施用的施用模式,通常通过注射进行,并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0047] 如本文中所使用的,术语“糖皮质激素诱导的 TNF 受体”(在本文中缩写为“GITR”),又称为 TNF 受体超家族 18(TNFRSF18)、TEASR、和 312C2,指肿瘤坏死因子/神经生长因子受体家族的一个成员。GITR 是一种 241 个氨基酸的 I 型跨膜蛋白,其特征在于胞外域中有三个半胱氨酸假重复,而且特异性地保护 T 细胞受体诱导的凋亡,虽然它不保护细胞免于其它凋亡信号,包括 Fas 触发、地塞米松处理、或 UV 照射 (Nocentini,G 等 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94 :6216-6222)。人 GITR(hGITR)(有三种剪接变体)的核酸和氨基酸序列是已知的,而且可以在例如 GenBank 登录号 gi :40354198、gi :23238190、gi :23238193、和 gi :23238196 中找到。

[0048] 如本文中所使用的,术语“结合分子”包括含有至少一个特异性结合其靶物的抗原结合位点的分子。例如,在一个实施方案中,在本发明的方法中使用的结合分子包含免疫球蛋白抗原结合位点或配体分子中负责受体结合的部分。

[0049] 在一个实施方案中,结合分子包含至少两个结合位点。在一个实施方案中,结合分子包含两个结合位点。在一个实施方案中,结合分子包含三个结合位点。在另一个实施方案中,结合分子包含四个结合位点。

[0050] 术语“GITR 结合分子”指包含至少一个 GITR 结合位点的分子。适合于在本发明的方法和试剂盒中使用的 GITR 结合分子的例子包括但不限于记载于例如 US20070098719、US20050014224、或 W005007190(本文通过提及而完整收录这些中的每篇)的结合分子,或包含 US20070098719、US20050014224、或 W005007190 之一中所列 CDR 的结合分子。在另一个实施方案中,GITR 结合分子可以包含一种或多种在 SEQ ID NO. :1、2 或 3、4、5、6、或 7 中所列的 CDR。[SEQ ID NO. :1(GFSLSTSGMGVG(重链 CDR1)),SEQ ID NO. :2(HIWWDDDKYYNPSLKS(HC CDR2N)),SEQ ID NO. :4(TRRYFPFAY(HC CDR3)),SEQ ID NO. :5(KASQNVGTNVA(轻链 CDR1)),SEQ ID NO. :6(SASYRYS(LC CDR2)),SEQ ID NO. :7(QQYNTDPLT(LCCDR3)),和 SEQ ID NO. :3(HIWWDDDKYYQPSLKS(HC CDR2Q))]. 在一个实施方案中,结合分子包含 1 个 CDR。在另一个实施方案中,结合分子包含 2 个 CDR。在另一个实施方案中,结合分子包含 3 个 CDR。在另一个实施方案中,结合分子包含 4 个 CDR。在另一个实施方案中,结合分子包含 5 个 CDR。在又一个实施方案中,结合分子包含所有 6 个 CDR。适合于在本发明的方法中使用的例示性 GITR 结合分子还包括商品化的 GITR 结合分子,诸如 MAB689,其可购自 R&D Systems。

[0051] “特异性结合”表示结合分子对非 GITR 分子基本上只展现出背景结合。然而,特异性结合 GITR 的分离的结合分子对来自其它物种的 GITR 分子可具有交叉反应性。

[0052] 如本文中所使用的,术语结合分子包括抗体(包括全长抗体),单克隆抗体(包括全长单克隆抗体),多克隆抗体,多特异性抗体(例如双特异性抗体),人的、人源化的或嵌合的抗体,抗体片段,例如 Fab 片段、F(ab') 片段、由 Fab 表达文库生成的片段、上文任何的表位结合片段,和抗体的工程化改造形式(即,包含自抗体分子衍生的结合位点的分子),例如 scFv 分子或包含 scFv 分子的分子,只要它们展现出想要的活性,例如结合 GITR。在一个实施方案中,在本发明的联合疗法中使用的 GITR 结合分子结合 T 细胞和树突细胞上的 GITR。在一个实施方案中,在本发明的联合疗法中使用的 GITR 结合分子的特征在于以下一项或多项:以高亲和力结合 hGITR、激动 GITR 活性(例如在存在刺激剂(例如 CD3)的情况下)、和提高体液和/或 T 细胞效应器应答。

[0053] 在一个实施方案中,本发明的结合分子是“抗体”或“免疫球蛋白”分子,例如天然存在的抗体或免疫球蛋白分子或经过遗传工程改造的抗体分子,其以与抗体分子类似的方式结合抗原。如本文中所使用的,术语“免疫球蛋白”包括具有两条重链和两条轻链的组合的多肽,无论其是否拥有任何有关的特异性免疫反应性。“抗体”指对抗原具有重要的已知特异性免疫反应性活性的此类装配物。抗体和免疫球蛋白包含轻链和重链,它们之间具有或没有链间共价连接。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构是相对充分了解的。

[0054] 通称“免疫球蛋白”包含能在生化方面区别的 5 类不同抗体。所有 5 类抗体都明确在本发明的范围内。关于 IgG,免疫球蛋白包含两条约 23,000 道尔顿分子量的相同多肽轻链和两条 53,000-70,000 分子量的相同重链。四条链在“Y”构型中由二硫键连接,其中轻链包夹重链,在“Y”的口处开始,并经过可变区延续。

[0055] 轻链和重链两者都被分成结构和功能同源性的区域。术语“恒定的”和“可变的”在功能方面使用。在这点上,应当领会的是,轻(VL)链和重(VH)链部分两者的可变域都决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2 或 CH3)的恒定域赋予重要的生物学特性,诸如分泌、经胎盘的移动性、Fc 受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们变得距离抗体的抗原结合位点或氨基端越来越远而增加。N 端是可变区,而恒定区在 C 端;CH3 和 CL 域实际上分别构成重链和轻链的羧基端。

[0056] 轻链被归入卡帕或拉姆达(κ , λ)。每个重链种类可以与 κ 或 λ 轻链结合在一起。一般而言,轻链和重链彼此共价键合,而两条重链的“尾部”部分在杂交瘤、B 细胞或经过遗传工程改造的宿主细胞生成免疫球蛋白时通过共价二硫化物连接或非共价连接而彼此键合。在重链中,氨基酸序列从 Y 构型的叉状末端处的 N 端行进至每条链底部处的 C 端。本领域技术人员应当领会的是,重链被归入伽马、缪、阿尔法、德耳塔、或厄普西隆(γ , μ , α , δ , ϵ),它们之中有一些亚类(例如, $\gamma 1-\gamma 4$)。决定抗体“类”分别为 IgG、IgM、IgA、IgG、或 IgE 的正是该链的性质。免疫球蛋白亚类(同种型)(例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 等)是充分表征的,而且已知赋予功能特化。考虑到本公开内容,熟练技术人员可容易辨别每个这些类和同种型的修饰型式,因此在本发明的范围内。

[0057] 可变区容许抗体选择性识别且特异性结合抗原上的表位。也就是说,抗体的 V_L 域和 V_H 域联合以形成限定三维抗原结合位点的可变区。此四元抗体结构形成存在于 Y 的每条臂末端的抗原结合位点。更具体地,抗原结合位点由 V_H 和 V_L 链中每条上的三个互补决定

区 (CDR) 限定。

[0058] 如本文中所使用的,术语“抗体”包括例如任何同种型 (IgG、IgA、IgM、IgE 等) 的完整抗体,而且包括其抗原结合片段。例示性的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、和多价抗体。可以使用常规技术来使抗体片段化。如此,术语抗体包括抗体分子的蛋白水解方式切割的或重组方式制备的部分的能够主动结合某种抗原的区段。蛋白水解和 / 或重组抗原结合片段的非限制性例子包括 Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv、和含有由肽接头连接的 V_L 和 / 或 V_H 域的单链抗体 (sFv)。

[0059] 本发明的结合分子可以包含任何同种型 (例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、和 IgY)、类 (例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或亚类的免疫球蛋白分子的免疫球蛋白重链。结合分子可以具有重链和轻链两者。

[0060] “抗原”指结合分子所特异结合的实体 (例如蛋白质性质的实体或肽)。

[0061] 术语“表位”或“抗原决定簇”指抗原上结合分子特异性结合的位点。表位可以由连续氨基酸形成,也可以是不连续的氨基酸通过蛋白质的四级折叠而并列在一起的。由连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂后通常得到维持,而通过四级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理后丧失。表位通常包括处于独特空间构象的至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括,例如 X-射线结晶学和 2-维核磁共振。参见例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第 66 卷, G. E. Morris 编 (1996)。

[0062] 可以在显示一种抗体阻断另一种抗体结合靶抗原的能力的简单免疫测定法,即竞争性结合测定法中鉴定识别相同表位的结合分子。在所测试的结合分子抑制参照结合分子对共同抗原 (诸如 G1TR) 的特异性结合的测定法中确定竞争性结合。许多类型的竞争性结合测定法是已知的,例如固相直接或间接放射免疫测定法 (RIA); 固相直接或间接酶免疫测定法 (EIA) 三明治式 / 夹心竞争测定法 (参见 Stahli 等, Methods in Enzymology 9:242(1983)); 固相直接生物素-亲和素 EIA (参见 Kirkland 等, J. Immunol. 137:3614(1986)); 固相直接标记测定法、固相直接标记三明治式 / 夹心测定法 (参见 Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); 使用 I-125 标记物进行的固相直接标记 RIA (参见 Morel 等, Mol. Immunol. 25(1):7(1988)); 固相直接生物素-亲和素 EIA (Cheung 等, Virology 176:546(1990)); 和直接标记 RIA (Moldenhauer 等, Scand. J. Immunol. 32:77(1990))。通常,此类测定法牵涉使用结合至固体表面的纯化抗原或携带未标记的测试结合分子和标记的参照结合分子这些之任一细胞。通过在存在测试结合分子的情况下测定结合至固体表面和细胞的标记物的量来测量竞争性抑制。通常,测试结合分子是过量存在的。通常,在竞争性结合分子过量存在时,它会抑制参照结合分子对共同抗原的特异性结合达至少 50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75% 或更多。

[0063] 表位还受到免疫细胞,例如 B 细胞和 / 或 T 细胞的识别。可以通过测量抗原依赖性增殖的体外测定法来测定表位的细胞识别,如通过 ³H-胸苷掺入、细胞因子分泌、抗体分泌、或抗原依赖性杀伤 (细胞毒性 T 淋巴细胞测定法) 所测定的。

[0064] 如本文中所使用的,术语“单克隆结合分子”指从一群基本上同质的结合分子获得的结合分子。单克隆结合分子是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与通常包含针对不同决定簇 (表位) 的不同结合分子的多克隆结合分子制备物不同,每种单克

隆结合分子针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”指明所述结合分子的特征在于自基本同质的结合分子群体获得,并且不应解释为要求通过任何特定方法来生成结合分子。例如,要依照本发明使用的单克隆结合分子可以通过最初由 Kohler 等, Nature 256 : 495(1975) 记载的杂交瘤方法来制备,或者可以通过重组 DNA 方法来制备(参见例如美国专利 No. 4,816,567)。“单克隆结合分子”还可以使用例如 Clackson 等, Nature 352 : 624-628(1991) 和 Marks 等, J. Mol Biol. 222 :581-597(1991) 中记载的技术从噬菌体抗体文库分离。

[0065] 术语“嵌合结合分子”指包含自不同物种衍生的氨基酸序列的结合分子。可以例如自属于不同物种的结合分子基因区段通过遗传工程来构建嵌合结合分子。

[0066] 本文中的单克隆结合分子明确包括“嵌合”结合分子,其中重链和 / 或轻链的一部分与自特定物种衍生的或者属于具体抗体类或亚类的结合分子中的相应序列是相同或同源的,而链的剩余部分与自另一物种衍生的或者属于另一抗体类或亚类的结合分子中的相应序列是相同或同源的,以及此类结合分子的片段,只要它们展现出想要的生物学活性(美国专利 No. 4,816,567 ;和 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA 81 : 6851-6855(1984)),例如结合 GITR,例如人 GITR(hGITR) 和提高 T 效应器和 / 或体液应答。

[0067] 非人(例如鼠)结合分子的“人源化”形式指最低限度含有自非人结合分子衍生的序列的抗体。在极大程度上,人源化结合分子指人结合分子(受体 / 接受结合分子)中来自高变区的 CDR 残基用具有期望特异性、亲和力、和能力的来自非人物种(供体结合分子)诸如小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类的高变区的 CDR 残基替换得到的免疫球蛋白。在有些情况中,改变人结合分子的 Fv 框架区(FR)残基,例如用非供体残基(例如种系残基)替换或替代,或者回复突变成相应的供体人残基。此外,人源化结合分子可以包含在受体结合分子或供体结合分子中没有发现的残基。一般而言,进行这些修饰是为了进一步改进结合分子的性能。通常,人源化结合分子会包含至少一个、通常两个基本上整个如下的可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人结合分子的高变环,且所有或基本上所有 FR 区是人结合分子序列的。人源化结合分子任选还会包含至少部分结合分子恒定区(Fc),通常是人结合分子的恒定区。更多细节参见 Jones 等, Nature 321 :522-525(1986) ;Riechmann 等, Nature 332 :323-329(1988) ;及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 :593-596(1992)。

[0068] 术语“多特异性的”包括对超过一种靶抗原具有特异性的结合分子。此类分子具有超过一个结合位点,其中每个结合位点特异性结合不同靶分子或同一靶物上的不同抗原性位点(例如与其起免疫反应)。

[0069] 在一个实施方案中,本发明的多特异性结合分子是双特异性分子(例如抗体、微型抗体(minibody)、域删除的抗体、或融合抗体),其具有对至少两种靶物(例如超过一种靶分子或同一靶分子上的超过一种表位)的结合特异性。

[0070] 在一个实施方案中,可以使用本领域中已知的技术从完整的前体或亲本抗体制备抗体的修饰形式。下文更详细地记载了例示性的技术。在特别优选的实施方案中,本发明的多肽的可变区和恒定区两者都是人的。在一个实施方案中,可以使用本领域中已知的技术来制备完全人抗体。例如,可以通过给如下转基因动物施用抗原来制备针对特定抗原的完全人抗体,所述转基因动物已经进行过修饰以响应抗原考验而生成此类抗体,但是其内源基因座已经丧失能力。可以用于制备抗体的例示性技术记载于美国专利 :6,150,584 ;

6, 458, 592 ;6, 420, 140。其它技术诸如文库的使用是本领域中已知的。

[0071] 在一个实施方案中,本发明的结合分子包含抗体分子,例如完整的抗体分子或抗体分子的片段。在另一个实施方案中,本发明的结合分子是经过修饰的或合成的抗体分子。在一个实施方案中,本发明的结合分子包含单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、或重组生成的抗体的整个或部分(例如至少一个抗原结合位点、至少一个 CDR)。

[0072] 在结合分子是抗体或经修饰抗体的实施方案中,抗原结合位点和重链部分不需要衍生自相同免疫球蛋白分子。在这点上,可变区可以衍生自能被诱导来启动体液应答并生成针对想要的抗原的免疫球蛋白的任何类型的动物。因此,多肽的可变区可以是例如哺乳动物起源的,例如可以是人的、(小)鼠的、大鼠的、非人灵长类(诸如猕猴(*cynomolgus monkey*)、短尾猴(*macaque*)等)的、狼的、camelid(例如来自骆驼(*camel*)、美洲驼(*llamas*)和相关物种)的。在另一个实施方案中,可变区在起源方面可以是 *condricthoid*(例如来自鲨鱼)。

[0073] 在一个实施方案中,本发明的结合分子是经修饰的抗体。如本文中所使用的,术语“工程化改造的”或“经修饰的抗体”包括合成形式的抗体,其被进行改变,使得它们不是天然存在的,例如不包含完整重链的抗体(诸如域删除的抗体或微型抗体);进行过改变以结合两种或更多种不同抗原或单一抗原上的不同表位的多特异性形式的抗体(例如双特异性的、三特异性的等);与 scFv 分子连接的重链分子等。scFv 分子是本领域中已知的,并且记载于例如美国专利 5, 892, 019。另外,术语“工程化改造的”或“经修饰的抗体”包括多价形式的抗体(例如结合三个或更多个拷贝的相同抗原或不同抗原或同一抗原上的不同表位的三价、四价等抗体)。

[0074] 在一个实施方案中,依照本发明的术语“经修饰的抗体”包括如下的免疫球蛋白、抗体、或其免疫反应性片段或重组形式,其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已经被删除或者在其它方面改变过(例如突变),从而提供想要的生化特性,诸如非共价二聚化的能力、在肿瘤位置处定位的能力增强、或与具有近于相同的免疫原性的完整的、未改变的抗体相比时血清半衰期改变。

[0075] 在一个实施方案中,可以使用本领域公认的技术来修饰本发明的结合分子以降低其免疫原性。例如,可以使本发明的抗体或多肽人源化、脱免疫(*deimmunize*),或者可以制备嵌合抗体。这些类型的抗体衍生自非人抗体,通常是鼠抗体,其保留或基本上保留亲本抗体的抗原结合特性,但是其在人中具有较小的免疫原性。这可以通过多种方法来实现,包括(a)将整个非人可变域嫁接至人恒定区上以生成嵌合抗体;(b)将一个或多个非人互补决定区(CDR)的至少一部分嫁接入保留或未保留重要框架残基的人框架和恒定区中;或(c)移植整个非人可变域,但是通过替换表面残基来用人样部分“掩盖”它们。此类方法披露于 Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 :6851-5(1984);Morrison 等, *Adv. Immunol.* 44 : 65-92(1988);Verhoeyen 等, *Science* 239 :1534-1536(1988);Padlan, *Molec. Immun.* 28 : 489-498(1991);Padlan, *Molec. Immun.* 31 :169-217(1994), 及美国专利 No. 5, 585, 089, 5, 693, 761 和 5, 693, 762, 在此通过提及而完整收录所有这些。

[0076] 术语“化疗剂”与“化学治疗剂”和“抗肿瘤剂”在本文中可互换使用,指抑制或阻止细胞的生存力和/或功能,和/或引起细胞破坏(细胞死亡),和/或施加抗肿瘤/抗增殖效果,例如直接或间接阻止赘生性肿瘤细胞的形成、成熟或扩散的物质。该术语还包括仅

引起抑制细胞效果和不仅引起细胞毒性效果的此类药剂。如本文中所使用的,术语化疗剂包括抗血管发生剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白质激酶 A 抑制剂、细胞因子家族的成员、和放射性同位素。

[0077] 优选地,依照本发明的合适的化疗剂是天然的或合成的化学化合物。在商业应用、临床评估和临床前开发中有大量可用的抗肿瘤化学剂,其可以在本发明的联合疗法(下文所讨论的)中使用。

[0078] 术语“生物制剂”或“生物学药剂”指从活生物体和/或其产物制备的任何药理学活性剂,其意图作为治疗剂(例如毒素诸如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素)使用。在本发明的一个实施方案中,可以与 GITR 结合分子组合使用的生物学药剂包括但不限于例如抗体、核酸分子(例如反义核酸分子)、多肽或蛋白质。可以如下与 GITR 结合分子组合施用此类生物制剂,例如在施用 GITR 结合分子前、伴随 GITR 结合分子一起、或者在施用 GITR 结合分子后施用所述生物学药剂。

[0079] 如本文中所使用的,术语“联合疗法”指包含例如 GITR 结合分子和至少一种别的非 GITR 结合分子(例如化疗剂)的治疗方案。GITR 结合分子和至少一种别的药剂可以为分开施用而配制,或者可以为一起施用而配制。在一个实施方案中,所述至少一种别的药剂不是想要针对它的免疫应答的分子,例如不是疫苗。

[0080] 术语“癌症”或“瘤形成”一般指恶性新生物或细胞的自发生长或增殖。癌细胞通常处于肿瘤形式,但是此类细胞可以单独存在于受试者内,或者可以是非致瘤性癌细胞,诸如白血病细胞。如本文中所使用的,术语“癌症”包括恶变前的以及恶性的癌症。

[0081] 例如,患有“癌症”的受试者可以患有白血病、淋巴瘤、或血细胞的其它恶性肿瘤。在一个实施方案中,癌症选自下组:胰腺癌、黑素瘤和其它形式的皮肤癌(例如鳞状细胞癌)、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、脑癌或中枢神经系统癌、周围神经系统癌、食管癌、宫颈癌、子宫癌或子宫内膜癌、头颈癌(包括口腔癌或鼻咽癌)、肝癌和胆管癌、肾癌和肾收集系统癌(包括膀胱癌)、睾丸癌、小肠癌或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、肉瘤(包括骨肉瘤和软骨肉瘤)、和血液学组织的癌症。

[0082] 在某些实施方案中,使用主题方法来治疗实体瘤。例示性的实体瘤包括但不限于小细胞肺癌和非小细胞肺癌(NSCLC)、睾丸癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胰腺癌、结肠直肠癌(CRC)、乳腺癌、以及前列腺、胃(gastric)、皮肤、胃(stomach)、食管、和膀胱癌。

[0083] 在一个实施方案中,实体瘤是腺癌,例如结肠腺癌。在本发明的一个实施方案中,实体瘤是结肠肿瘤。在本发明的另一个实施方案中,实体瘤选自下组:结肠肿瘤、肺肿瘤、乳腺肿瘤、胃肿瘤、前列腺肿瘤、宫颈肿瘤、阴道肿瘤、和胰腺肿瘤。

[0084] 在本发明的一个实施方案中,要治疗的癌症是黑素瘤。

[0085] 在本发明的某些实施方案中,使用主题方法来降低和/或阻止肿瘤细胞增殖。在本发明的某些实施方案中,使用主题方法来降低和/或阻止肿瘤转移。在另一个实施方案中,使用主题方法来缩小肿瘤大小,例如已建立的肿瘤和/或继发性肿瘤,例如转移。如本文中所使用的,“已建立的肿瘤”指如下的实体瘤,其具有足够的大小,使得营养物,即氧不再能通过渗透而从受试者的血管系统渗入肿瘤中央,因此肿瘤需要其自身的血管供应来接受营养物。

[0086] 在一个实施方案中,使用主题方法来治疗血管化的肿瘤。术语“血管化的肿瘤”包

括具有已建立的血管系统的特点的肿瘤。此类肿瘤根据其大小和 / 或根据与血管或血管发生有关的标志物的存在来鉴定。在一个实施方案中,肿瘤至少是约 $0.5\text{mm} \times 0.5\text{mm}$ 。在另一个实施方案中,肿瘤至少是约 $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 。在又一个实施方案中,肿瘤具有至少约 100mm^3 的体积。在另一个实施方案中,肿瘤具有至少约 200mm^3 的体积。在另一个实施方案中,肿瘤具有至少约 300mm^3 的体积。在另一个实施方案中,肿瘤具有至少约 400mm^3 的体积。在另一个实施方案中,肿瘤具有至少约 500mm^3 的体积。在一个实施方案中,肿瘤大得足以通过触诊或通过使用本领域公认的成像技术来找到。

[0087] 在另一个实施方案中,使用主题方法来治疗如下实体瘤,其不是静止的,而是活跃地经历指数式生长。在一个实施方案中,使用主题方法来治疗小肿瘤,诸如微小转移,例如仅可通过组织学检查检测到而通过其它技术检测不到的肿瘤。

[0088] 术语“有效量”指足以对癌性细胞或肿瘤产生想要的结果(包括但不限于例如在体外或在体内缩小肿瘤大小和 / 或缩小实体瘤的肿瘤体积)的联合疗法量。在本发明的一个实施方案中,联合疗法的有效量是导致抑制肿瘤大小超过约 10%、超过约 20%、超过约 30%、超过约 35%、超过约 42%、超过约 43%、超过约 44%、超过约 45%、超过约 46%、超过约 47%、超过约 48%、超过约 49%、超过约 50%、超过约 51%、超过约 52%、超过约 53%、超过约 54%、超过约 55%、超过约 56%、超过约 57%、超过约 58%、超过约 59%、超过约 60%、超过约 65%、超过约 70%、超过约 75%、超过约 80%、超过约 85%、超过约 90%、超过约 95%、或超过约 100% 的量。

[0089] 该术语还包括足以实现想要的临床结果(包括但不限于例如阻止复发、改善疾病、使患者稳定、预防或延迟转移的发生、或预防或减缓患者中的癌症行进)的联合疗法量。可以基于疗法的每种药剂的一次施用或至少一种药剂的重复施用来确定联合疗法的有效量。检测和测量上述指标的方法是本领域普通技术人员已知的。此类方法包括但不限于测量肿瘤负荷的降低、肿瘤大小的缩小、肿瘤体积的缩小、继发性肿瘤增殖的减缓、降低的实体瘤血管形成、肿瘤组织或邻近组织中的基因表达改变、生物标志的存在或缺失、淋巴结的参与、组织学等级、检测肿瘤复发的缺乏、降低的肿瘤生长速率、降低的肿瘤细胞新陈代谢、和 / 或核等级。

[0090] 在本发明的一个实施方案中,测定肿瘤负荷。“肿瘤负荷”也称为“肿瘤负载”,指遍及整个身体分布的肿瘤物质的总量。肿瘤负荷指遍及整个身体(包括淋巴结和骨髓)的癌细胞总数或肿瘤总体大小。可以通过本领域中已知的多种方法来测定肿瘤负荷,诸如例如通过自受试者取出后测量肿瘤的尺寸,例如使用测径器,或者在身体内时使用成像技术,例如超声、骨扫描、计算机断层摄影术(CT)或磁共振成像(MRI)扫描来实现。

[0091] 在本发明的一个实施方案中,测定肿瘤大小。术语“肿瘤大小”指可以作为肿瘤的长度和宽度测量的肿瘤总体大小。可以通过本领域中已知的多种方法来测定肿瘤大小,诸如例如通过自受试者取出后测量肿瘤的尺寸,例如使用测径器,或者在身体内时使用成像技术,例如骨扫描、超声、CT 或 MRI 扫描来实现。

[0092] 在本发明的一个实施方案中,通过测定肿瘤重量来测定肿瘤大小。在一个实施方案中,如下测定肿瘤重量,即测量肿瘤的长度、使其乘以肿瘤宽度的平方,并使该总数除以 2。

[0093] 在本发明的一个实施方案中,通过测定肿瘤体积来测定肿瘤大小。术语“肿瘤体

积”指肿瘤的总体大小,包括肿瘤自身加上受累的淋巴结(若可适用的话)。可以通过本领域中已知的多种方法来测定肿瘤体积,诸如例如通过自受试者取出后测量肿瘤的尺寸,例如使用测径器,或者在身体内时使用成像技术,例如超声、CT 或 MRI 扫描,并使用基于例如 z -轴直径、或基于标准形状诸如球体、椭圆柱体、或立方体的公式来计算体积。在一个实施方案中,自 2 维肿瘤测量为长椭球计算肿瘤体积(mm^3): $\text{肿瘤体积}(\text{mm}^3) = (\text{长度} \times \text{宽度}^2 [L \times W^2]) \div 2$ 。采用单位密度,肿瘤体积被转换成肿瘤重量(即, $1\text{mm}^3 = 1\text{mg}$)。

[0094] 术语“实体瘤的血管化”指实体瘤中形成血管。可以通过本领域中已知的多种方法来测定肿瘤血管化,诸如例如通过对活检标本的免疫组织化学分析,或者通过成像技术,诸如肿瘤的超声波检查术(sonography)、血管造影术(angiography)、CT 或磁 MRI 扫描来实现。

[0095] 术语“% T/C”指处理组(T)的肿瘤重量均值除以对照组(C)的肿瘤重量均值乘以 100 的百分比。美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, USA)认为 42% 或更小的 % T/C 值指明有意义的活性。

[0096] 与 T/C 对应的术语“%抑制”通过用 100 减去 % T/C 来计算。

[0097] 术语“统计学显著的”或“统计学显著性”指结果会偶然发生的概率,假定自变量没有影响,或者假定的原假设(null hypothesis)是成立的。可以通过获得代表概率值的“P 值”(P)来确定统计学显著性。p 值指明通过实验获得的结果由于单独偶然性的概率如何。在本发明的一个实施方案中,可以通过获得双尾单样本 T 检验的 p 值来测定统计学显著性。认为小于 .05 的 p 值是统计学显著的,即不可能是由于单独的偶然性。或者,统计学显著的 p 值可以在约 0.05 至约 0.04 之间;在约 0.04 至约 0.03 之间;在约 0.03 至约 0.02 之间;在约 0.02 至约 0.01 之间。例如,上文所述数值中间的范围也意图是本发明的一部分。在某些情况中, p 值可以小于 0.01。可以使用 p 值来确定在使用联合疗法来治疗患有肿瘤的受试者时肿瘤大小是否有任何统计学显著性缩小和 / 或存活方面是否有任何统计学显著性升高。

[0098] “治疗癌症”或“治疗患有癌症的受试者”包括抑制癌细胞的复制、抑制癌症扩散、肿瘤大小的缩小、减少或降低身体中癌性细胞的数目、和 / 或改善或减轻癌症的症状。若在死亡率和 / 或发病率方面有降低,则认为处理是治疗性的,并且可以预防性或治疗性实施。

[0099] “患者”或“受试者”或“宿主”指人类或非人动物。

[0100] 在以下分部中更为详细地描述了本发明的各方面。

[0101] II. GITR 结合分子

[0102] 本发明方法中使用的 GITR 结合分子包括特异性结合 GITR 并充当 GITR 激动剂(如通过例如增强的效应 T 细胞应答和 / 或增强的体液免疫所表明的)的结合分子,诸如例如那些记载于 US20070098719、US20050014224、和 W005007190 的结合分子。

[0103] 在一个实施方案中,所述 GITR 结合分子是抗 GITR 抗体。可以使用标准的重组 DNA 技术来制备抗 GITR 抗体的各种形式(Winter 和 Milstein, Nature, 349, 第 293-99 页(1991))。

[0104] 在某些实施方案中,所述 GITR 结合分子可以是多克隆抗体。例如,可以通过相关抗原和佐剂的多次皮下或腹膜内注射来在哺乳动物中制备抗体。此免疫接种通常引发免疫应答,其包括从活化的脾细胞或淋巴细胞生成抗原反应性抗体。可以从动物的血清收获所

得的抗体以提供多克隆制备物。

[0105] 对 GITR 特异性的嵌合和 / 或人源化结合分子 (即, 嵌合和 / 或人源化免疫球蛋白) 也适合于在本发明的方法中使用。嵌合和 / 或人源化结合分子与提供用于构建嵌合或人源化结合分子的起始材料的小鼠或其它非人结合分子具有相同或类似的结合特异性和亲和力。

[0106] 嵌合结合分子是如下的结合分子, 所述结合分子的轻链和重链基因是自属于不同物种的免疫球蛋白基因区段构建的, 其通常通过遗传工程来实现。例如, 可以将来自小鼠单克隆结合分子的基因的可变 (V) 区段连接至人恒定 (C) 区段, 诸如 IgG1 或 IgG4。优选人同种型 IgG1。如此, 例示性的嵌合结合分子是由来自小鼠结合分子的 V 或抗原结合域和来自人结合分子的 C 或效应器域组成的杂合蛋白质。

[0107] 在一个实施方案中, 适合于在本发明方法中使用的结合分子包含 6C8 结合分子的人源化可变区。在一个实施方案中, 本发明的结合分子包含至少一种人源化 6C8 结合分子可变区, 例如轻链或重链可变区。

[0108] 如上文所列出的, 术语“人源化结合分子”指包含至少一条如下的链的结合分子, 该链包含自人结合分子链 (称为受体抗体或结合分子) 衍生的可变区框架残基和至少一种自小鼠结合分子 (称为供体抗体或结合分子) 衍生的互补决定区。可以使用重组 DNA 技术来生成人源化结合分子。参见例如, 例如 Hwang, W. Y. K. 等 (2005) Methods 36 :35 ; Queen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989), 86 :10029-10033 ; Jones 等, Nature, (1986), 321 :522-25 ; Riechmann 等, Nature, (1988), 332 :323-27 ; Verhoeyen 等, Science, (1988), 239 :1534-36 ; Orlandi 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989), 86 :3833-37 ; 美国专利号 US 5, 225, 539 ; 5, 530, 101 ; 5, 585, 089 ; 5, 693, 761 ; 5, 693, 762 ; 6, 180, 370, Selick 等, WO 90/07861, 及 Winter, US 5, 225, 539 (出于所有目的, 通过提及而完整收录)。优选地, 恒定区 (若存在的话) 也衍生自人免疫球蛋白。

[0109] 在某些实施方案中, 所述人源化抗体是人源化 6C8 或其抗体片段 (包括其核苷酸和氨基酸序列), 如 US20070098719 中所记载的。在一个实施方案中, 所述人源化抗体包含一种或多种在 SEQ ID NO. :1、2 或 3、4、5、6、或 7 中所显示的 CDR。在一个实施方案中, 所述人源化抗体包含 CDR 1、2 或 3、4、5、6、和 7。

[0110] 优选地, 人源化结合分子展现出至少 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、或 $10^{12}M^{-1}$ 的对抗原的特异性结合亲和力。通常, 人源化结合分子对抗原的结合亲和力的上限在供体免疫球蛋白对抗原的结合亲和力的上限的 3 倍、4 倍或 5 倍内。通常, 结合亲和力的下限也在供体免疫球蛋白结合亲和力下限的 3 倍、4 倍或 5 倍内。或者, 可以将所述结合亲和力与没有替代的人源化结合分子 (例如具有供体 CDR 和受体 FR, 但没有 FR 替代的结合分子) 的结合亲和力比较。在此类情况中, 优化的结合分子 (具有替代) 的结合优选比未替代的结合分子的结合大至少 2 倍至 3 倍, 或 3 倍至 4 倍。为了进行比较, 可以通过例如 BIACORE (即, 使用未标记的试剂进行的表面等离子共振) 或竞争性结合测定法来测定各种结合分子的活性。

[0111] 在某些实施方案中, GITR 结合分子是嵌合抗体。在一个实施方案中, 本发明的嵌合抗体可以是嵌合的 6C8 抗体, 其记载于美国专利公开文本号 US20070098719, 本文通过提及而明确收录其内容。

[0112] 在某些实施方案中, GITR 结合分子是单克隆抗体。在一个实施方案中, 本发明的

单克隆抗体可以是人源化的 6C8 抗体,其也记载于美国专利公开文本号 US20070098719。

[0113] 在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含自鼠人 GITR 结合分子(例如 6C8 结合分子)衍生的至少一种 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含自大鼠 GITR 结合分子(例如 2F8 结合分子)衍生的至少一种 CDR(例如 1、2、3、4、5、或 6 种 CDR)。如本文中所使用的,术语“衍生自”指定蛋白质的指多肽的起源。在一个实施方案中,自特定起始多肽衍生的多肽或氨基酸序列是 CDR 序列或与其相关的序列。在另一个实施方案中,自特定起始多肽衍生的多肽或氨基酸序列是框架(FR)序列或与其相关的序列。在一个实施方案中,自特定起始多肽衍生的氨基酸序列不是连续的。

[0114] 例如,在一个实施方案中,1、2、3、4、5、或 6 种 CDR 衍生自鼠 6C8 抗体。在一个实施方案中,本发明的结合分子包含鼠 6C8 抗体的至少一种重链或轻链 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自鼠 6C8 抗体的至少两种 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自鼠 6C8 抗体的至少三种 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自鼠 6C8 抗体的至少四种 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自鼠 6C8 抗体的至少五种 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自鼠 6C8 抗体的至少六种 CDR。

[0115] 在一个实施方案中,本发明的结合分子包含如下的多肽或氨基酸序列,其基本上与 6C8 抗体或其部分(例如 CDR)的多肽或氨基酸序列相同,其中所述部分由至少 3-5 个氨基酸、至少 5-10 个氨基酸、至少 10-20 个氨基酸、至少 20-30 个氨基酸、或至少 30-50 个氨基酸组成,或者其可以别的方式被本领域普通技术人员鉴定为在起始序列中具有其起源。

[0116] 在另一个实施方案中,自特定起始多肽或氨基酸序列衍生的多肽或氨基酸序列与 6C8 抗体或其部分(例如 CDR)共享约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的氨基酸序列同一性,或者其可以别的方式被本领域普通技术人员鉴定为在起始序列中具有其起源。

[0117] 本领域普通技术人员还应当理解的是,可以修饰本发明方法中使用的抗 GITR 结合分子,使得其在氨基酸序列方面与衍生其的分子有所不同。例如,可以进行导致“非必需”氨基酸残基处的保守替代或改变的核苷酸或氨基酸替代(例如在 CDR 和 / 或框架残基中),并且维持、提高、或降低结合 GITR(例如人 GITR)的能力。

[0118] 可以如下创建编码多肽的非天然变体的分离的核酸分子,即将一处或多处核苷酸替代、添加或删除引入结合分子的核苷酸序列中,使得将一处或多处氨基酸替代、添加或删除引入所编码的蛋白质中。可以通过标准技术来引入突变,诸如定点诱变和 PCR 介导的诱变。在一个实施方案中,在一个或多个非必需氨基酸残基处进行保守的氨基酸替代。“保守的氨基酸替代”是将氨基酸残基用具有类似侧链的氨基酸残基替换。本领域中已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。如此,结合分子多肽中的非必需氨基酸残基可以用来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基替换。在另一个实施方案中,一串氨基酸可以用结构类似,但侧链家族成员次序和 / 或组成有所不同的一串氨基酸替换。

[0119] 或者,在另一个实施方案中,可以沿着整个或部分结合分子编码序列随机引入突变。

[0120] 本发明方法中使用的优选的结合分子包含自人氨基酸序列衍生的框架和恒定区氨基酸序列。然而,结合分子可以包含自另一哺乳动物物种衍生的框架和/或恒定区序列。例如,灵长类框架区(例如非人灵长类的)、重链部分、和/或铰链部分可以包括在主题结合分子中。在一个实施方案中,一个或多个鼠氨基酸可以存在于结合多肽的框架区中,例如,人或非人灵长类框架氨基酸序列可以包含一处或多处氨基酸替代和/或回复突变,其中存在相应的鼠氨基酸残基。本发明优选的结合分子比起始 6C8 鼠抗体具有更小的免疫原性。

[0121] 单克隆抗体的制备是公知的方法(Kohler 等, Nature, 256 :495(1975)),其中融合来自已经注射过抗原的哺乳动物的相对短命的或必死的淋巴细胞与永生的肿瘤细胞系(例如骨髓瘤细胞系),如此产生杂交细胞或“杂交瘤”,它们都是永生的,而且能够生成B细胞的遗传编码的抗体。通过选择、稀释、和再生长来将所得的杂合物分离成单一遗传株,其中每个单独的株包含用于形成单一抗体的特定基因。它们生成针对想要的抗原的同质抗体,并且在提及它们的纯的遗传来源时,被称为“单克隆的”。

[0122] 在合适的培养基中接种并培养如此制备的杂交瘤细胞,所述合适的培养基优选含有一种或多种抑制未融合的、亲本骨髓瘤细胞的生长或存活的物种。本领域技术人员应当领会的是,供杂交瘤形成、选择和生长用的试剂、细胞系和培养基可购自许多来源,并且标准化的方案是充分建立的。一般而言,对杂交瘤细胞正在其中生长的培养液测定针对想要的抗原的单克隆抗体的生成。优选地,通过免疫沉淀或通过体外测定法诸如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)来测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。鉴定出生成具有想要的特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释规程来亚克隆所述克隆,并通过标准方法来培养(Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice,第59页-第103页(Academic Press,1986))。应当进一步领会的是,可以通过常规的纯化规程诸如例如蛋白A、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和力来从培养液、腹水或血清分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0123] 在另一个实施方案中,可以使用常规规程来容易地分离编码想要的单克隆抗体的DNA,并进行测序(例如通过使用能够特异性结合编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。所分离和亚克隆的杂交瘤细胞充当此类DNA的优选来源。一旦分离,可以将DNA置于表达载体中,然后将该表达载体转染入不另外生成免疫球蛋白的原核或真核宿主细胞中,诸如大肠杆菌(E. coli)细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞。更具体地,可以使用分离的DNA(其可以如本文所描述的那样进行修饰)来克隆恒定区和可变区序列以制备抗体,如记载于1995年1月25日提交的Newman等,美国专利号5,658,570的,本文通过提及而将其收录。实质上,这需要自选定的细胞提取RNA,转化成cDNA,并通过使用Ig特异性引物进行的PCR来扩增。适合于此目的的引物也记载于美国专利号5,658,570。如下文会更为详细地讨论的,可以相对大量地培养出表达想要的抗体的转化细胞以提供免疫球蛋白的临床和商业供应。

[0124] 本领域技术人员还应当领会的是,编码抗体或抗体片段的DNA也可以衍生自抗体噬菌体文库,例如使用pd噬菌体或Fd噬菌粒技术。例示性的方法记载于例如EP 36864B1;美国专利5,969,108, Hoogenboom, H. R. 和 Chames. 2000. Immunol. Today 21 :371 ;Nagy

等 2002. *Nat. Med.* 8 :801 ;Huie 等 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 :2682 ;Lui 等 2002. *J. Mol. Biol.* 315 :1063, 本文通过提及而将每篇收录。数份出版物 (例如 Marks 等 *Bio/Technology* 10 :779-783(1992)) 已经描述了通过链改组, 以及组合感染和体内重组作为构建大噬菌体文库的策略来生成高亲和力人抗体。在另一个实施方案中, 可以使用核糖体展示来替换噬菌体作为展示平台 (参见例如 Hanes 等 2000. *Nat. Biotechnol.* 18 :1287 ; Wilson 等 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 :3750 ;或 Irving 等 2001. *J. Immunol. Methods* 248 :31。在又一个实施方案中, 可以对细胞表面文库筛选抗体 (Boder 等 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 :10701 ;Daugherty 等 2000. *J. Immunol. Methods* 243 :211)。此类规程为用于分离和随后克隆单克隆抗体的传统杂交瘤技术提供了备选。

[0125] 本发明的其它实施方案包括在非人动物 (诸如含有一种或多种人免疫球蛋白转基因的转基因动物) 中生成人的或基本上人的抗体。可以使用此类动物作为供生成杂交瘤用的脾细胞的来源, 如记载于美国专利 5, 569, 825, W000076310, W000058499 和 W000037504 的, 本文通过提及而收录。

[0126] 用于生成重组抗体的又一种高度有效的手段披露于 Newman, *Biotechnology*, 10 :1455-1460(1992)。具体地, 此技术导致生成含有猴可变域和人恒定序列的灵长类抗体。本文通过提及而完整收录这篇参考文献。此外, 此项技术还记载共同转让的美国专利号 5, 658, 570, 5, 693, 780 和 5, 756, 096, 本文通过提及而将每篇收录。

[0127] 在另一个实施方案中, 可以通过显微操作来选择淋巴细胞, 并分离可变基因。例如, 可以自经过免疫的哺乳动物分离外周血单个核细胞, 并在体外培养约 7 天。可以对培养物筛选满足筛选标准的特异性 IgG。可以分离来自阳性孔的细胞。单个产生 Ig 的 B 细胞可以通过 FACS 或者通过在补体介导的溶血蚀斑测定法中鉴定它们来分离。可以将产生 Ig 的 B 细胞显微操作入管中, 并可以使用例如 RT-PCR 来扩增 VH 和 VL 基因。可以将 VH 和 VL 基因克隆入抗体表达载体中, 并转染入细胞 (例如真核或原核细胞) 中进行表达。

[0128] 或者, 可以使用熟练技术人员公知的技术来选择和培养抗体生成细胞系。此类技术记载于许多实验手册和原版出版物。在这方面, 如下文所描述的适合于在本发明中使用的技术记载于 *Current Protocols in Immunology*, Coligan 等编, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York(1991), 本文通过提及而完整收录 (包括补充材料)。

[0129] 可以自现有的来源 (例如自本文所描述的一种或多种抗 G1TR 抗体) 获得可变区和恒定区结构域, 并掺入本发明的修饰过的结合分子中。例如, 为了克隆抗体, 可以自杂交瘤、脾、或淋巴细胞分离 mRNA, 逆转录成 DNA, 并通过 PCR 扩增抗体基因。可以通过共有恒定区引物或通过基于发表的重链和轻链 DNA 和氨基酸序列的更为特异的引物来启动 PCR。还可以使用 PCR 来分离编码抗体轻链和重链的 DNA 克隆。在此情况中, 通过共有引物或更大的同源性探针, 诸如小鼠恒定区探针来筛选文库。许多适合于扩增抗体基因的引物组是本领域中已知的 (例如基于纯化的抗体的 N 端序列 (Benhar 和 Pastan. 1994. *Protein Engineering* 7 :1509) ;cDNA 末端的快速扩增 (Ruberti, F. 等 1994. *J. Immunol. Methods* 173 :33) ;抗体前导序列 (Larrick 等 1989. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160 :1250) ;或者基于来自 Kabat 的已知可变区框架氨基酸序列 (Kabat 等 1991. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. Bethesda, MD :JS Dep. Health Hum. Serv. 第 5 版) 或 V 碱基

数据库（例如 Orlandi 等 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :3833 ;Sblattero 等 1998. *Immunotechnology* 3 :271 ;或 Krebber 等 1997. *J. Immunol. Methods* 201 :35) 的 5' 引物)。可以选择如下的恒定区结构域,其具有特定的效应器功能（或缺乏特定的效应器功能）或者具有特定的修饰来降低免疫原性。可以例如使用聚合酶链式反应和选择用来扩增感兴趣的域的引物来克隆可变域和恒定域。PCR 扩增方法详细记载于美国专利号 4,683,195 ; 4,683,202 ;4,800,159 ;4,965,188 ;及例如“PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications”Innis 等编, Academic Press, San Diego, CA(1990) ;Ho 等 1989. *Gene* 77 :51 ;Horton 等 1993. *Methods Enzymol.* 217 :270)。

[0130] 或者,可以自选定动物的 V 基因序列文库获得 V 域。可以用想要的抗原筛选表达域的随机组合（例如 VH 域和 VL 域）的文库以鉴定具有想要的结合特性的元件。此类筛选的方法是本领域中公知的。例如,可以将抗体基因全集克隆入 λ 噬菌体表达载体中 (Huse, WD 等 1989. *Science* 2476 :1275)。另外,可以筛选在其表面上表达抗体的细胞 (Boder 和 Wittrup. 1997. *Nat. Biotechnol.* 15 :553 ;Daugherty, P. 等 2000. *J. Immunol. Methods.* 243 :211 ;Francisco 等 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 :10444 ;Georgiou 等 1997. *Nature Biotechnology* 15 :29) 或病毒（例如 Hoogenboom, HR. 1998 *Immunotechnology* 4 :1 Winter 等 1994. *Annu. Rev. Immunol.* 12 :433 ;Griffiths, AD. 1998. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 :102)。还可以使用核糖体展示来筛选抗体文库 (Hanes J. 等 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 :14130 ;Hanes, J. 和 Pluckthun. 1999. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 243 :107 ;He, M. 和 Taussig. 1997. *Nucleic Acids Research* 25 :5132)。

[0131] 用于筛选的优选文库是人 V 基因文库。也可以使用来自非人来源的 VL 域和 VH 域。在一个实施方案中,可以使用本领域公认的技术来改变此类非人 V 域以降低其免疫原性。

[0132] 文库可以是未接触抗原的、来自经免疫的受试者的,或者半合成的 (Hoogenboom, H. R. 和 Winter. 1992. *J. Mol. Biol.* 227 :381 ;Griffiths, AD 等 *EMBO J.* 13 :3245 ;de Kruif, J. 等 1995. *J. Mol. Biol.* 248 :97 ;Barbas, C. F. 等 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 :4457)。

[0133] 另外,许多抗体 V 域和 C 域的序列是已知的,并且可以使用本领域中公知的方法来合成此类域。在一个实施方案中,可以对免疫球蛋白域进行突变以创建具有更大异质性的核酸分子的文库 (Thompson, J. 等 1996. *J. Mol. Biol.* 256 :77 ;Lamminmaki, U. 等 1999. *J. Mol. Biol.* 291 :589 ;Caldwell, R. C. 和 Joyce GF. 1992. *PCR Methods Appl.* 2 :28 ;Caldwell RC 和 Joyce GF. 1994. *PCR Methods Appl.* 3 :S136。可以使用标准的筛选规程来选择高亲和力变体。在另一个实施方案中,可以对 VH 序列和 VL 序列进行改变以提高或降低抗体亲和力,例如使用自晶体结构获得的信息使用本领域中已知的技术来实现。

[0134] 可以自一种或多种亲本抗体衍生抗原识别位点或整个可变区。亲本抗体可以包括天然存在的抗体或抗体片段、自天然存在的抗体改编的抗体或抗体片段、使用已知对 GITR 特异性的抗体或抗体片段的序列从头构建的抗体。可以自亲本抗体衍生的序列包括重链和 / 或轻链可变区和 / 或其 CDR、框架区或其它部分。

[0135] 在一个实施方案中,所述 GITR 结合分子是人源化抗体。为了制备人源化抗体,用想要的抗原免疫动物,分离相应的抗体,并取出可变区序列中负责特异性抗原结合的部分。

然后将动物衍生的抗原结合区克隆入已经删除抗原结合区的人抗体基因的合适位置中。参见例如 Jones, P. 等 (1986), *Nature* 321, 522-525 或 Tempest 等 (1991) *Biotechnology* 9, 266-273。还有, 可以使用转基因小鼠或其它哺乳动物来表达人源化抗体。此类人源化可以是部分的或完全的。人源化抗体使人抗体中的异源(物种间)序列的使用最小化, 并且在所处理的受试者中引发免疫应答的概率较小。

[0136] 在一个实施方案中, 本发明的结合分子包含抗体的抗原结合片段或由其组成。术语“抗原结合片段”指免疫球蛋白或抗体中结合抗原或与完整抗体(即与衍生它们的完整抗体)竞争抗原结合(即, 特异性结合)的多肽片段。如本文中所使用的, 抗体分子的术语“片段”包括抗体的抗原结合片段, 例如抗体轻链(VL)、抗体重链(VH)、单链抗体(scFv)、F(ab')₂ 片段、Fab 片段、Fd 片段、Fv 片段、和单域抗体片段(DAb)。可以例如经由化学或酶促处理完整的或完全的抗体或抗体链或者通过重组手段来获得片段。

[0137] 在一个实施方案中, 本发明的结合分子是经过工程化改造的或经过修饰的抗体。经过工程化改造形式的抗体包括例如微型抗体、双抗体、与 CH3 分子融合的双抗体、四价抗体、胞内双抗体(intradiabody)(例如 Jendreyko 等 2003. *J. Biol. Chem.* 278 :47813)、双特异性抗体、融合蛋白(例如抗体细胞因子融合蛋白)、或双特异性抗体。其它免疫球蛋白(Ig)及其某些变体记载于例如美国专利号 4, 745, 055 ;EP 256, 654 ;Faulkner 等, *Nature* 298 :286 (1982) ;EP120, 694 ;EP 125, 023 ;Morrison, *J. Immun.* 123 :793 (1979) ;Kohler 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 :2197 (1980) ;Raso 等, *Cancer Res.* 41 :2073 (1981) ;Morrison 等, *Ann. Rev. Immunol.* 2 :239 (1984) ;Morrison, *Science* 229 :1202 (1985) ;Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 :6851 (1984) ;EP 255, 694 ;EP266, 663 ;及 WO 88/03559。重配的(reassorted)免疫球蛋白链也是已知的。参见例如美国专利号 4, 444, 878 ;WO 88/03565 ;和 EP 68, 763 及其中所引用的参考文献。

[0138] 在一个实施方案中, 本发明的经修饰的抗体是微型抗体。微型抗体是由两条多肽链构成的二聚体分子, 每条多肽链包含一个 ScFv 分子(包含一个或多个抗原结合位点的单个多肽, 例如 VL 域通过柔性接头与 VH 域连接, 而 VH 域经由连接肽与 CH3 域融合。

[0139] 可以以 VH- 接头-VL 取向或 VL- 接头-VH 取向构建 ScFv 分子。

[0140] 将构成抗原结合位点的 VL 和 VH 域连接在一起的柔性铰链优选包含约 10 至约 50 个氨基酸残基。用于此目的的例示性连接肽是 (Gly4Ser)₃ (Huston 等 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :5879)。其它连接肽是本领域中已知的。

[0141] 制备单链抗体的方法是本领域公知的, 例如 Ho 等 1989. *Gene* 77 :51 ;Bird 等 1988 *Science* 242 :423 ;Pantoliano 等 1991. *Biochemistry* 30 :10117 ;Milenic 等 1991. *Cancer Research* 51 :6363 ;Takkinen 等 1991. *Protein Engineering* 4 :837。

[0142] 可以使用本领域记载的方法(参见例如美国专利 5, 837, 821 或 WO94/09817A1) 通过构建 ScFv 构件和连接肽-CH3 构件来制备微型抗体。可以作为限制性片段自分开的质粒分离这些构件, 然后连接, 并再克隆入合适的载体中。可以通过限制性消化和 DNA 序列分析来证实合适的装配。

[0143] 双抗体类似于 scFv 分子, 但是通常具有连接两个 V 域的一个短的(小于 10 个, 且优选 1-5 个)氨基酸残基接头, 使得同一条多肽链上的 VL 和 VH 域不能相互作用。取而代之, 一条多肽链的 VL 和 VH 域与第二条多肽链上的 VH 和 VL 域(分别)相互作用(WO

02/02781)。在一个实施方案中,本发明的结合分子是与至少一个重链部分融合的双抗体。在一个优选的实施方案中,本发明的结合分子是与 CH3 域融合的双抗体。

[0144] 其它形式的修饰抗体也在本发明范围内(例如 WO 02/02781A1 ;5,959,083 ;6,476,198B1 ;US 2002/0103345A1 ;WO 00/06605 ;Byrn 等 1990. Nature. 344 :667-70 ;Chamow 和 Ashkenazi. 1996. Trends Biotechnol. 14 :52)。

[0145] 在一个实施方案中,将本发明的 GITR 结合分子进行修饰以改变一个或多个糖基化位点或者通过不改变一个或多个糖基化位点的一处或多处其它氨基酸替代来修饰。例如,因为氨基酸序列 Asn-X-(Ser/Thr) 是糖基化位点的假定共有序列,其可能影响结合分子生成,可以进行用谷氨酰胺 (Gln) 替换天冬酰胺 (Asn) 的保守替代。

[0146] 在一个实施方案中,本发明的结合分子包含免疫球蛋白恒定区。本领域中已知的是,恒定区介导数种效应器功能。例如,补体的 C1 组分与结合分子的结合激活补体系统。补体的活化在细胞病原体的调理作用和溶胞中是重要的。补体的活化还刺激炎症应答,也可能参与自身免疫超敏感性。此外,结合分子经由 Fc 区结合细胞,其中结合分子 Fc 区上的 Fc 受体位点结合细胞上的 Fc 受体 (FcR)。有许多对不同种类的结合分子特异性的 Fc 受体,包括 IgG(γ 受体)、IgE(ϵ 受体)、IgA(α 受体)和 IgM(μ 受体)。分子结合对细胞表面上的 Fc 受体的结合触发许多重要的且多种多样的生物学应答,包括对经结合分子包被的颗粒的内吞和破坏、对免疫复合物的清除、经结合分子包被的靶细胞被杀伤细胞溶胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或者 ADCC)、释放炎症介质、胎盘转运和控制免疫球蛋白生成。

[0147] 在一个实施方案中,可以如下消除或降低效应器功能,即例如使用 IgG4 结合分子的恒定区(其被认为没有能力消滅靶细胞),或者制备 Fc 变体,其中使用本领域已知的技术(例如美国专利 No. 5,585,097) 将 Fc 区中对效应器功能关键的残基突变。例如,删除或灭活(经由点突变或其它手段)恒定区结构域可降低 Fc 受体与循环中的经修饰的结合分子的结合,由此提高肿瘤定位。另外,用于除去 Fc 上的潜在糖基化位点的氨基酸替代可降低 Fc 受体结合(参见例如,Shields 等 (2001) J Biol Chem 276 :6591)。在一个实施方案中,进行 N297A 替代。在另一个实施方案中,进行 L235A 替代和 L237A。在又一个实施方案中,进行 L234A 替代和 L235A 替代。在另一个实施方案中,进行 E233P 替代。在另一个实施方案中,进行 L234V 替代。在另一个实施方案中,进行 L235A 替代。在另一个实施方案中,删除 C236。在另一个实施方案中,进行 P238A 替代。在另一个实施方案中,进行 D265A 替代。在另一个实施方案中,进行 N297A 替代。在另一个实施方案中,进行 A327Q 替代。在另一个实施方案中,进行 P329A 替代。上文所述氨基酸位置基于 EU 编号系统(参见例如 Kabat 等 (1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda)。

[0148] 在其它情况中,可能的是,与本发明一致的恒定区修饰调节 (moderate) 补体结合和 / 或降低血清半衰期。还可以使用对恒定区的其它修饰来修饰二硫化物连接或寡糖模块,其由于抗原特异性或结合分子柔性升高而使得定位增强。更为一般地,本领域技术人员会认识到如本文中所描述的那样修饰的结合分子可发挥多种微妙的效果,其可能很容易或者不容易理解。然而,可以在不需要过多实验的情况中使用公知的免疫学技术容易地测量和定量修饰的所得生理学概况、生物利用度和其它生化效果,诸如肿瘤定位、生物分布和血

清半衰期。

[0149] 在一个实施方案中,本发明的结合分子可以被衍生化或被连接至另一功能性分子(例如另一肽或蛋白质)。因而,本发明的结合分子包括本文中所描述的 G1TR 结合分子的衍生化和其它修饰形式,包括免疫粘附分子。例如,可以将本发明的结合分子功能性地连接(通过化学偶联、遗传融合、非共价联合或别的方式)至一种或多种其它分子实体,诸如另一种结合分子(例如 scFv 抗体、双特异性抗体或双抗体)、可检测试剂、化疗剂(例如如本文中所描述的)、药剂、和/或能介导该结合分子与另一种分子的联合的蛋白质或肽(诸如链霉亲和素核心区或多组氨酸标签)。

[0150] 在一个实施方案中,用聚乙二醇修饰本发明的结合分子。“PEG 化”在体内延长停留时间并降低免疫原性。例如 Knauf 等, *J. Biol. Chem.*, 263:15064-15070 (1988) 报告了白介素-2 的多种聚羟化甘油 (polyoxylated glycerol) 甘油和聚乙二醇修饰的种类在大鼠中的药效学行为。Delgado 等, *Br. J. Cancer*, 73:175-182 (1996), Kitamura 等, *Cancer Res.*, 51:4310-4315 (1991), Kitamura 等, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 171:1387-1394 (1990) 和 Pedley 等, *Br. J. Cancer*, 70:1126-1130 (1994) 报告了表征用低分子量 (5kD) PEG 衍生化的某些抗肿瘤抗原抗体或抗体片段的血液清除和组织摄取的研究。Zapata 等, *FASEB J.* 9:A1479 (1995) 报告了与亲本 Fab' 分子相比,低分子量 (5 或 10kD) PEG 附着至 Fab' 片段铰链区中的巯基减少清除。

[0151] 一种类型的衍生化结合分子是通过交联两个或更多个结合分子(相同类型或不同类型,例如为了创建双特异性抗体)而生成的。合适的交联剂包括异双功能的,即具有两个由适当的间隔物分开的不同反应性的基团(例如,间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯 (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)),或者是同双功能的(例如,辛二酸二琥珀酰亚胺基酯 (disuccinimidyl suberate))。此类接头可购自 Pierce Chemical Company, Rockford, IL。

[0152] 可以通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备本发明的结合分子。为了重组表达结合分子,用一种或多种携带编码结合分子的免疫球蛋白轻链和重链的 DNA 片段的重组表达载体转染宿主细胞,使得所述轻链和重链在宿主细胞中得到表达,且优选地,分泌入培养宿主细胞的培养基中,可以自该培养液回收结合分子。使用标准的重组 DNA 方法来获得抗体重链和轻链基因,将这些基因掺入重组表达载体中,并将该载体导入宿主细胞中,诸如那些记载于 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis(编), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. 等(编) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) 和 Boss 等的美国专利号 4,816,397 的。

[0153] 为了表达本发明的结合分子,可以使用本领域公知的方法将编码部分或全长轻链和重链的 DNA 插入表达载体中,使得所述基因可操作连接至转录和翻译控制序列。在此语境中,术语“可操作连接的”指结合分子基因被连接入载体中,使得载体内的转录和翻译控制序列发挥它们调节结合分子基因的转录和翻译的预期功能。在一个实施方案中,选择的表达载体和表达控制序列与所使用的表达宿主细胞相容。可以将结合分子轻链基因和结合分子重链基因插入分开的载体中,或者更典型地,将两种基因都插入同一个表达载体中。可以通过标准方法(例如将结合分子基因片段和载体上的互补限制性位点连接,或者若不存

在限制性位点,进行平末端连接)将结合分子基因插入表达载体中。在插入结合分子轻链或重链序列前,表达载体可能已经携带结合分子恒定区序列。例如,将 VH 和 VL 序列转换成全长结合分子基因的一个办法是将它们插入已经分别编码重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使得 VH 区段可操作连接至载体内的 CH 区段,而 VL 区段可操作连接至载体内的 CL 区段。另外/或者,重组表达载体可以编码促进结合分子链自宿主细胞分泌的信号肽。可以将结合分子链基因克隆入载体中,使得信号肽以符合读码框的方式连接至结合分子链基因的氨基末端。所述信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0154] 在结合分子链基因外,本发明的重组表达载体还携带控制结合分子链基因在宿主细胞中的表达的调节序列。术语“调节序列”包括启动子、增强子和其它控制结合分子链基因的转录或翻译的表达控制元件(例如多聚腺苷酸化信号)。此类调节序列记载于例如 Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185,Academic Press, San Diego, CA(1990)。本领域技术人员应当领会的是,表达载体的设计(包括调节序列的选择)可取决于如下的因素,诸如要转化的宿主细胞的选择,想要的蛋白质的表达水平等。优选的用于哺乳动物宿主细胞表达的调节序列包括指导蛋白质在哺乳动物细胞中高水平表达的病毒元件,诸如自巨细胞病毒(CMV)(诸如 CMV 启动子/增强子)、猿病毒 40(SV40)(诸如 SV40 启动子/增强子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)和多瘤病毒衍生的启动子和/或增强子。关于病毒调节元件及其序列的进一步描述,参见例如 Stinski 的美国专利 No. 5,168,062、Bell 等的美国专利 No. 4,510,245 及 Schaffner 等的美国专利 No. 4,968,615。

[0155] 在结合分子链基因和调节序列外,本发明的重组表达载体还可以携带别的序列,诸如调节载体在宿主细胞中的复制的序列(例如复制起点)和选择标志基因。选择标志基因便于选择其中已经导入有载体的宿主细胞(参见例如美国专利号 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017,都是 Axel 等的)。例如,通常选择标志基因对其中已经导入有载体的宿主细胞赋予对药物(诸如 G418、潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性。优选的选择标志基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于 dhfr⁻ 宿主细胞,用甲氨蝶呤进行选择/扩增)和 neo 基因(进行 G418 选择)。

[0156] 为了表达轻链和重链,通过标准技术将编码结合分子重链和轻链的表达载体转染入宿主细胞中。术语“转染”的各种形式意图涵盖极其多种常用于将外源 DNA 导入原核或真核宿主细胞中的技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。有可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的结合分子,最优选在真核细胞(且最优选哺乳动物宿主细胞)中表达结合分子,因为此类真核细胞,特别是哺乳动物细胞,比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠的且具有免疫学活性的结合分子。

[0157] 通常,表达载体含有选择标志(例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性 or 新霉素抗性)以容许检测用想要的 DNA 序列转化的那些细胞(参见,例如 Itakura 等,美国专利 4,704,362)。

[0158] 大肠杆菌是一种对于克隆本发明的多核苷酸(例如 DNA 序列)特别有用的原核宿主。其它适合使用的微生物宿主包括芽孢杆菌属(bacilli)(诸如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)),和其它肠杆菌科(enterobacteriaceae),诸如沙门氏菌属(Salmonella)、沙

雷氏菌属 (*Serratia*) 和各种假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种。在这些原核宿主中,也可以制备表达载体,它们通常会含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。另外,会存在任何数目的多种公知的启动子,诸如乳糖启动子系统、色氨酸 (*trp*) 启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统、或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常会控制表达,任选与操纵子序列一起,并且具有核糖体结合位点序列等,用于起始和结束转录和翻译。

[0159] 其它微生物诸如酵母也可用于表达。酵母属 (*Saccharomyces*) 是优选的酵母宿主,其具有根据需要具有表达控制序列(例如启动子)、复制起点、终止序列等的合适载体。典型的启动子包括 3-磷酸甘油激酶和其它糖酵解酶。诱导型酵母启动子包括来自醇脱氢酶、异细胞色素 C、和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子等。

[0160] 在微生物外,还可以使用哺乳动物组织细胞培养物来表达和生成本发明的多肽(例如编码结合分子的多核苷酸)。参见 Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987)。实际上优选真核细胞,因为本领域中已经开发了许多能够分泌异源蛋白质(例如完整的结合分子)的合适宿主细胞系,并且包括 CHO 细胞系、各种 Cos 细胞系、HeLa 细胞、骨髓瘤细胞系、或经转化的 B 细胞或杂交瘤。优选地,所述细胞是非人的。用于这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,诸如复制起点、启动子和增强子 (Queen 等, *Immunol. Rev.* 89 :49 (1986)), 和必要的加工信息位点,诸如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等衍生的启动子。参见 Co 等, *J. Immunol.* 148 :1149 (1992)。

[0161] 或者,可以在转基因中掺入编码结合分子的序列以导入转基因动物的基因组中,随后在转基因动物的乳中表达(参见,例如 Deboer 等, US 5, 741, 957, Rosen, US 5, 304, 489 和 Meade 等, US 5, 849, 992)。合适的转基因包括与来自乳腺特异性基因(诸如酪蛋白或 β -乳球蛋白)的启动子和增强子可操作连接的轻链和 / 或重链编码序列。

[0162] 用于表达本发明的重组结合分子的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢 (CHO 细胞) (包括 Urlaub 和 Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 :4216-4220 所记载的 dhfr⁻CHO 细胞,其与 DHFR 选择标志一起使用,例如如记载于 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159 :601-621 的)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。在将编码结合分子基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞中时,如下生成结合分子,即将宿主细胞培养一段时间,所述时间足以容许在宿主细胞中表达所述结合分子,或更优选地,将结合分子分泌入培养宿主细胞的培养基中。可以使用标准的蛋白质纯化方法自培养液回收结合分子。

[0163] 可以通过公知的方法(其根据细胞宿主的类型而有所变化)将含有感兴趣的多核苷酸序列(例如,结合分子重链和轻链编码序列和表达控制序列)的载体转移入宿主细胞中。例如,通常对原核细胞利用氯化钙转染,而对其它细胞宿主可以使用磷酸钙处理、电穿孔、脂转染、生物射弹或基于病毒的转染(一般参见 Sambrook 等, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 第2版, 1989) (出于所有目的,通过提及而完整收录)。其它用于转化哺乳动物细胞的方法包括 Polybrene 的使用、原生质体融合、脂质体、电穿孔和显微注射(一般参见 Sambrook 等, 见上文)。为了产生转基因动物,可以将转基因显微注射入受精的卵母细胞中,或者可以掺入胚胎干细胞基因组中,并将此类细胞

的细胞核转移入去核的卵母细胞中。

[0164] 在分开的表达载体上克隆重链和轻链时,共转染载体以便获得完整免疫球蛋白的表达和装配。一旦表达,可以依照本领域的标准规程来纯化本发明的整个结合分子、其二聚体、单个的轻链和重链、或其它免疫球蛋白形式,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、HPLC 纯化、凝胶电泳等(一般参见 Scopes, Protein Purification(Springer-Verlag, N.Y., (1982))。为了药学应用,优选至少约 90 至 95%同质的,且最优选 98 至 99%或更多同质的基本上纯的结合分子。

[0165] 还可以使用宿主细胞来生成完整结合分子的部分,诸如 Fab 片段或 scFv 分子。应当理解的是,对上文规程的各种变化在本发明的范围内。例如,可能希望用编码本发明结合分子的轻链或重链(但是非两者同时)的 DNA 转染宿主细胞。还可以使用重组 DNA 技术来除去编码对于结合 G1TR 不是必需的轻链和重链之任一或两者的 DNA 的一些或全部。本发明的结合分子也涵盖自此类截短的 DNA 分子表达的分子。另外,可以通过标准的化学交联方法通过交联本发明的结合分子与第二结合分子来生成双功能结合分子,其中一条重链和一条轻链是本发明的结合分子,而另一条重链和轻链对于不同于 G1TR 的抗原是特异性的。

[0166] III. 别的药剂

[0167] 在一个实施方案中,在本发明的联合疗法中使用的别的药剂是化疗剂。

[0168] 化疗剂一般属于多种种类,包括例如:

[0169] 1. 拓扑异构酶 II 抑制剂(细胞毒性抗生素),诸如蒽环类(anthracyclines, anthracyclines)/蒽二酮类(anthracenediones),例如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)和奈莫柔比星(nemorubicin),蒽醌类(anthraquinones),例如米托蒽醌(mitoxantrone)和洛索蒽醌(losoxantrone),和鬼臼毒素(podophyllotoxines, podophyllotoxin),例如依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide);

[0170] 2. 影响微管形成的药剂(有丝分裂抑制剂),诸如植物生物碱(例如属于自有生物学活性和细胞毒性的植物衍生的碱性含氮分子的家族的化合物),例如紫杉烷类(taxanes),例如帕利他塞(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel),和长春花生物碱(vinka alkaloids),例如长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、和长春瑞滨(vinorelbine)、和鬼臼毒素的衍生物;

[0171] 3. 烷化剂,诸如氮芥类(nitrogen mustards)、乙撑亚胺化合物、磺酸烷基酯类(alkyl sulphonates)和其它具有烷化作用的化合物诸如亚硝脲类(nitrosoureas)、达卡巴嗪(dacarbazine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)和美法仑(melphalan);

[0172] 4. 抗代谢物(核苷抑制剂),例如叶酸类(folates),例如叶酸,氟嘧啶类(fluoropyrimidines)、嘌呤或嘧啶类似物诸如 5-氟尿嘧啶、卡培他滨(capecitabine)、吉西他滨(gemcitabine)、甲氨蝶呤和依达曲沙(edatrexate);

[0173] 5. 拓扑异构酶 I 抑制剂,诸如托泊替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)、和 9-硝基喜树碱(nitrocamptothecin)、和喜树碱衍生物;

[0174] 6. 铂化合物/复合物,诸如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、和卡铂(carbopaltin, carboplatin);

[0175] 本发明方法中使用的例示性化疗剂包括但不限于氨磷汀 (amifostine) (Ethyol)、顺铂、达卡巴嗪 (dacarbazine) (DTIC)、放线菌素 D (dactinomycin)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine) (氮芥)、链佐星 (streptozocin)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、卡莫司汀 (carmustine) (BCNU)、洛莫司汀 (lomustine) (CCNU)、多柔比星 (阿霉素)、多柔比星脂质体 (Doxil)、吉西他滨 (Gemzar)、柔红霉素 (daunorubicin)、柔红霉素脂质体 (Daunoxome)、丙卡巴肼 (procarbazine)、丝裂霉素 (mitomycin)、阿糖胞苷 (cytarabine)、依托泊苷 (etoposide)、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、长春碱、长春新碱、博来霉素 (bleomycin)、帕利他塞 (Taxol)、多西他赛 (docetaxel) (Taxotere)、阿地白介素 (aldesleukin)、天冬酰胺酶 (asparaginase)、白消安 (busulfan)、卡铂、克拉屈滨 (cladribine)、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基-喜树碱 (SN38)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、S-I 卡培他滨、替加氟 (ftorafur)、5'-脱氧氟尿苷 (deoxyflurouridine, deoxyfluorouridine)、UFT、恩尿嘧啶 (eniluracil)、脱氧胞苷 (deoxycytidine)、5-氮杂胞嘧啶 (azacytosine)、5-氮杂脱氧胞嘧啶 (azadeoxycytosine)、别嘌呤醇 (allopurinol)、2-氯腺苷、三甲曲沙 (trimetrexate)、氨基蝶呤 (aminopterin)、亚甲基-10-脱氮氨基蝶呤 (deazaaminopterin) (MDAM)、奥沙利铂、皮卡铂 (picoplatin)、四铂 (tetraplatin)、沙铂 (satraplatin)、铂-DACH、奥马铂 (ormaplatin)、CI-973、JM-216、及其类似物、表柔比星、磷酸依托泊苷 (etoposidephosphate)、9-氨基喜树碱 (aminocamptothecin)、10,11-亚甲基二氧喜树碱 (methylenedioxycamptothecin)、karenitecin、9-硝基喜树碱、TAS 103、长春地辛、L-苯丙氨酸芥、ifosphamidemefosphamide、培磷酰胺 (perfosfamide)、曲磷胺 (trophosphamide)、卡莫司汀 (carmustine)、司莫司汀 (semustine)、埃博霉素 (epothilone) A-E、拓优得 (tomudex)、6-巯嘌呤 (mercaptapurine)、6-巯鸟嘌呤 (thioguanine)、安吡啶 (amsacrine)、磷酸依托泊苷 (etoposide phosphate)、karenitecin、阿昔洛维 (acyclovir)、伐昔洛韦 (valacyclovir)、更昔洛韦 (ganciclovir)、金刚烷胺 (amantadine)、金刚乙胺 (rimantadine)、拉米夫定 (lamivudine)、齐多夫定 (zidovudine)、贝伐单抗 (bevacizumab)、曲妥单抗 (trastuzumab)、利妥昔单抗 (rituximab)、5-氟尿嘧啶、卡培他滨 (Capecitabine)、喷司他丁 (Pentostatin)、三甲曲沙、克拉屈滨、氟尿苷、氟达拉滨、羟脲 (hydroxyurea)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、伊达比星 (idarubicin)、美司钠 (mesna)、伊立替康 (irinotecan)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、托泊替康 (topotecan)、亮丙瑞林 (leuprolide)、甲地孕酮 (megestrol)、美法仑 (melphalan)、巯基嘌呤 (mercaptapurine)、普卡霉素 (plicamycin)、米托坦 (mitotane)、培门冬酶 (pegasparase)、喷司他丁 (pentostatin)、哌泊溴烷 (pipobroman)、普卡霉素、链佐星 (streptozocin)、他莫昔芬 (tamoxifen)、替尼泊苷、睾内酯 (testolactone)、巯鸟嘌呤、塞替派 (thiotepa)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard)、长春瑞滨、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、顺铂、多柔比星、帕利他塞 (taxol) 和博来霉素 (bleomycin)、及其组合,它们对于本领域技术人员基于特定肿瘤或癌症的合适标准护理是容易显而易见的。

[0176] 在一个实施方案中,本发明的联合疗法中使用的化疗剂选自下组:Gemzar、5-FU、长春新碱、长春碱、阿霉素、顺铂、Taxol、沙利度胺 (Thalidomide)、Velcade、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、氟达拉滨 (fludarabine)、羟脲、柔红霉素 (danorubracin, daunorubicin)、依托泊苷

(etoposide)、米托蒽醌、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、美法仑 (melphelan)、塞替派、博来霉素、达卡巴嗪、L- 天冬酰胺酶、和丙卡巴肼。

[0177] 在一个实施方案中,化疗剂是拓扑异构酶 II 抑制剂。在另一个实施方案中,化疗剂是影响微管形成的药剂。在另一个实施方案中,化疗剂是烷化剂。在另一个实施方案中,化疗剂是拓扑异构酶 I 抑制剂。在另一个实施方案中,化疗剂是铂化合物 / 复合物。在另一个实施方案中,化疗剂是激素、激素类似物、和 / 或激素复合物。在另一个实施方案中,化疗剂是酶、蛋白质、肽、多克隆和 / 或单克隆抗体。在一个实施方案中,本发明方法中使用的化疗剂是抗代谢物。

[0178] 术语“抗代谢物”指在结构方面类似于导致 DNA 或 RNA 合成的生化途径中的关键天然中间体 (代谢物) 的物质,其被宿主在所述途径中利用,但是起到抑制所述途径 (即 DNA 或 RNA 的合成) 完成的作用。更具体地,抗代谢物通常如下发挥功能:(1) 与代谢物竞争 DNA 或 RNA 合成中的关键酶的催化或调节位点,或 (2) 替换通常掺入 DNA 或 RNA 中的代谢物,并且由此生成不能支持复制的 DNA 或 RNA。抗代谢物的主要种类包括 (1) 叶酸类似物,其是二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的抑制剂;(2) 嘌呤类似物,其模拟天然嘌呤 (腺嘌呤或鸟嘌呤),但是结构不同,因此它们竞争性或不可逆地抑制对 DNA 或 RNA 的核加工;和 (3) 嘧啶类似物,其模拟天然嘧啶 (胞嘧啶、胸腺嘧啶、和尿嘧啶),但是结构不同,因此它们竞争性或不可逆地抑制对 DNA 或 RNA 的核加工。本发明的抗代谢物的非限制性例子是 5- 氟尿嘧啶、氟尿苷 (Floxuridine, Floxuridine)、硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、6- 巯嘌呤、甲氨蝶呤、吉西他滨、卡培他滨、喷司他丁、三甲曲沙、和克拉屈滨。

[0179] 在一个实施方案中,所述抗代谢物是核苷类似物吉西他滨。在另一个实施方案中,所述抗代谢物是核苷类似物氟尿嘧啶。

[0180] 如本文中所使用的,“影响微管形成的药剂”或“有丝分裂抑制剂”指破坏微管聚合的药剂。有丝分裂抑制剂通过干扰和停止有丝分裂 (通常在细胞周期的 M 期期间),使得细胞不再会分裂来起作用。在一个实施方案中,影响微管形成的药剂是帕利他塞 (Taxol[®])。

[0181] 如本文中所使用的,“烷化剂”指交联 DNA 中的鸟嘌呤核碱基,使那些链不能解螺旋和分开的药剂。由于这是 DNA 复制必需的,所以细胞不再能分裂。在一个实施方案中,烷化剂是环磷酰胺,也称为 cytophosphane。环磷酰胺是前药。

[0182] 在另一个实施方案中,本发明的联合疗法中使用的别的药剂是生物学药剂。

[0183] 生物学药剂 (也称作生物制剂) 是生物学系统 (例如生物体、细胞、或重组系统) 的产物。此类生物学药剂的例子包括核酸分子 (例如反义核酸分子)、干扰素、白介素、集落刺激因子、抗体 (例如单克隆抗体)、抗血管发生剂、和细胞因子。下文更为详细地讨论了例示性的生物学药剂,并且一般属于多种种类,包括例如

[0184] 1. 激素、激素类似物、和激素复合物,例如雌激素和雌激素类似物、孕酮、孕酮类似物和黄体酮、雄激素、肾上腺皮质类固醇、抗雌激素、抗雄激素、抗睾酮、肾上腺类固醇抑制剂、和抗促黄体生成激素;和

[0185] 2. 酶、蛋白质、肽、多克隆和 / 或单克隆抗体,诸如白介素、干扰素、集落刺激因子等。

[0186] 在一个实施方案中,所述生物制剂是干扰素。干扰素 (IFN) 是身体中天然存在的一类生物学药剂。干扰素还在实验室中生成,并在生物学疗法中给予癌症患者。已经显示

了,它们改善癌症患者的免疫系统针对癌细胞起作用的方式。干扰素可直接对癌细胞起作用以减缓它们的生长,或者它们可以引起癌细胞改变成具有更加正常行为的细胞。一些干扰素还可以刺激天然杀伤细胞 (NK)、T 细胞、和巨噬细胞一血流中帮助抗击癌细胞的白细胞类型。

[0187] 在一个实施方案中,所述生物制剂是白介素。白介素 (IL) 刺激许多免疫细胞的生长和活性。它们是身体中天然存在的蛋白质 (细胞因子和趋化因子),但是也可以在实验室中制备。一些白介素刺激起破坏癌细胞作用的免疫细胞 (诸如淋巴细胞) 的生长和活性。

[0188] 在另一个实施方案中,所述生物制剂是集落刺激因子。集落刺激因子 (CSF) 是给予患者以促进骨髓内的干细胞生成更多血细胞的蛋白质。身体持续需要新的白细胞、红细胞、和血小板,尤其在存在癌症时。给予 CSF 以及化学疗法,以帮助加强免疫系统。在癌症患者接受化学疗法时,骨髓生成新的血细胞的能力受到抑制,使患者更倾向于发生感染。免疫系统的各部分在没有血细胞的情况中不能发挥功能,如此集落刺激因子促进骨髓干细胞生成白细胞、血小板、和红细胞。在适当的细胞生成的情况中,其它癌症治疗可以继续使患者能够安全地接受更高剂量的化学疗法。

[0189] 在另一个实施方案中,所述生物制剂是抗体。抗体 (例如单克隆抗体) 是在实验室中生成的结合癌细胞的药剂。在将癌症破坏剂 (cancer-destroying agent) 导入身体中时,它们找出抗体,并杀死癌细胞。单克隆抗体药剂不破坏健康的细胞。单克隆抗体经由多种机制来实现其治疗效果。它们在产生凋亡或程序性细胞死亡中可以具有直接效果。它们能阻断生长因子受体,这有效阻滞肿瘤细胞的增殖。在表达单克隆抗体的细胞中,它们能引起抗独特型抗体形成。

[0190] 可以在本发明的联合治疗中使用的抗体的例子包括抗 CD20 抗体,诸如但不限于西妥昔单抗 (Cetuximab)、托西莫单抗 (Tositumomab)、利妥昔单抗 (Rituximab)、和替伊莫单抗 (Ibritumomab)。也可以与抗 GITR 抗体组合使用抗 HER2 抗体以治疗癌症。在一个实施方案中,所述抗 HER2 抗体是曲妥单抗 (Herceptin)。可以与抗 GITR 抗体组合使用以治疗癌症的抗体的其它例子包括抗 CD52 抗体 (例如阿仑单抗 (Alemtuzumab))、抗 CD-22 抗体 (例如依帕珠单抗 (Epratuzumab))、和抗 CD33 抗体 (例如吉姆单抗 (Gemtuzumab)、奥佐米星 (ozogamicin))。也可以与抗 GITR 抗体组合使用抗 VEGF 抗体以治疗癌症。在一个实施方案中,所述抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。在其它实施方案中,所述生物学药剂是抗体,所述抗体是抗 EGFR 抗体,例如西妥昔单抗。另一个例子是抗糖蛋白 17-1A 抗体依决洛单抗 (edrecolomab)。

[0191] 在另一个实施方案中,所述生物制剂是细胞因子。细胞因子疗法使用蛋白质 (细胞因子) 来帮助受试者的免疫系统识别和破坏那些癌性细胞。细胞因子在身体中由免疫系统天然生成,但是也可以在实验室中生成。与晚期黑素瘤及与辅助疗法 (在主要的癌症治疗后或之外给予的治疗) 一起使用此疗法。细胞因子疗法到达身体的所有部分以杀死癌细胞,并阻止肿瘤生长。

[0192] 在一个实施方案中,所述生物制剂是融合蛋白。也可以使用融合蛋白。例如,可以在联合疗法中使用重组人 Apo2L/TRAIL (Genentech)。Apo2/TRAIL 是第一种设计用于活化促凋亡受体 DR4 和 DR5 两者 (它们牵涉对凋亡 (程序性细胞死亡) 的调节) 的双重促凋亡受体激动剂。

[0193] 在一个实施方案中,所述生物制剂是反义核酸分子。也可以在本发明的方法中使用反义核酸分子。如本文中所使用的,“反义”核酸包含与编码蛋白质的“有义”核酸互补(例如与双链 cDNA 分子的编码链互补、与 mRNA 序列互补或与基因的编码链互补)的核苷酸序列。因而,反义核酸能与有义核酸形成氢键。

[0194] 在一个实施方案中,生物学药剂是 siRNA 分子,例如增强血管发生的分子(例如 bFGF、VEGF 和 EGFR)的。在一个实施方案中,抑制血管发生的生物学药剂介导 RNAi。RNA 干扰(RNAi)是转录后的、靶向基因沉默技术,其使用双链 RNA(dsRNA)来降解含有与 dsRNA 相同序列的信使 RNA(mRNA)(Sharp, P. A. 和 Zamore, P. D. 287, 2431-2432(2000);Zamore, R. D. 等 Cell 101, 25-33(2000). Tuschl, T. 等 Genes Dev. 13, 3191-3197(1999);Cottrell TR 和 Doering TL. 2003. Trends Microbiol. 11 :37-43;Bushman F. 2003. Mol Therapy. 7 :9-10;McManus MT 和 Sharp PA. 2002. Nat Rev Genet. 3 :737-47)。该过程在内源核糖核酸酶将较长的 dsRNA 切割成较短的(例如长度为 21 或 22 个核苷酸的)RNA(称作小干扰 RNA 或 siRNA)时发生。然后较小的 RNA 区段介导对靶 mRNA 的降解。用于合成 RNAi 的试剂盒可购自例如 New England Biolabs 或 Ambion。在一个实施方案中,可以在介导 RNAi 的分子中采用反义 RNA 中使用的本文中所描述的一种或多种化学品。

[0195] 反义核酸下调特定蛋白质在细胞中的表达的应用是本领域中公知的(参见例如 Weintraub, H. 等, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews-Trends in Genetics, 卷 1(1)1986;Askari, F.K. 和 McDonnell, W.M. (1996) N. Eng. J. Med. 334 :316-318;Bennett, M.R. 和 Schwartz, S.M. (1995)Circulation 92 :1981-1993;Mercola, D. 和 Cohen, J.S. (1995)Cancer Gene Ther. 2 :47-59;Rossi, J.J. (1995)Br. Med. Bull. 51 :217-225;Wagner, R.W. (1994)Nature 372 :333-335)。反义核酸分子包含与另一种核酸分子的编码链(例如 mRNA 序列)互补的核苷酸序列,因而能够与另一种核酸分子的编码链形成氢键。与 mRNA 序列互补的反义序列可以与 mRNA 编码区、mRNA 的 5' 或 3' 非翻译区或桥接(bridge)编码区和非翻译区的区域(例如在 5' 非翻译区和编码区的接合处)中找到的序列互补。此外,反义核酸可以在序列上与编码 mRNA 的基因的调节区(例如转录起始序列或调节元件)互补。优选地,设计反义核酸,使得与编码链上的起始密码子前或跨越该起始密码子的区域或者 mRNA 的 3' 非翻译区中的区域互补。

[0196] 给予增强血管发生的分子的编码链序列,可以依照 Watson 和 Crick 碱基配对规则来设计本发明的反义核酸。反义核酸分子可以与 mRNA 的整个编码区互补,但是更优选的是,仅对 mRNA 的编码区或非编码区的部分反义的寡核苷酸。例如,反义寡核苷酸可以与 mRNA 的翻译起始位点周围的区域互补。反义寡核苷酸的长度可以为例如约 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个核苷酸。可以使用本领域中已知的规程使用化学合成和酶促连接反应来构建本发明的反义核酸。例如,可以使用天然存在的核苷酸或以各种方式修饰的核苷酸来化学合成反义核酸(例如反义寡核苷酸),所述以各种方式修饰的核苷酸设计用于提高该分子的生物学稳定性或者用于提高反义和有义核酸之间形成的双链体的物理稳定性,例如可以使用硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代核苷酸。可以用于生成反义核酸的修饰核苷酸的例子包括 5- 氟尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤(xantine, xanthine)、4- 乙酰基胞嘧啶、5-(羧基甲基)尿嘧啶、5- 羧基氨基甲基-2- 硫尿核苷、5- 羧基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D- 半乳糖基嘌呤(galactosylqueosine,

galactosylqueosine)、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤(isopentenyladenine)、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲氧甲基尿嘧啶、5-甲氧氨基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基腺苷(mannosylqueosine)、5'-甲氧羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-含氧乙酸(oxyacetic acid)(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷(queosine)、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-含氧乙酸甲酯(oxyacetic acid methylester)、尿嘧啶-5-含氧乙酸(v)、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)_w和2,6-二氨基嘌呤。为了抑制细胞中的表达,可以使用一种或多种反义寡核苷酸。或者,可以使用已经将核酸以反义取向(即,自所插入核酸转录的RNA会是对感兴趣靶核酸反义取向的,以下分部中进一步描述的)亚克隆入其中的表达载体来以生物学方式生成反义核酸。

[0197] 在又一个实施方案中,本发明的反义核酸分子是 α -异头(anomeric)核酸分子。 α -异头核酸分子与互补RNA形成特异性双链杂合物(其中与通常的 β 单元相反,所述链彼此平行)(Gaultier等(1987)*Nucleic Acids. Res.* 15:6625-6641)。反义核酸分子还可以包含2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue等(1987)*Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148)或嵌合的RNA-DNA类似物(Inoue等(1987)*FEBS Lett.* 215:327-330)。

[0198] 在另一个实施方案中,本发明的反义核酸是介导RNAi的化合物。RNA干扰剂包括但不限于核酸分子,包括与靶基因或基因组序列同源的RNA分子,“短干扰RNA”(siRNA)、“短发夹”或“小发夹RNA”(shRNA)、和小分子,它们通过RNA干扰(RNAi)来干扰或抑制靶基因表达。RNA干扰是转录后的、靶向基因沉默技术,其使用双链RNA(dsRNA)来降解含有与dsRNA相同序列的信使RNA(mRNA)(Sharp, P. A. 和 Zamore, P. D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P. D. 等 *Cell* 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. 等 *Genes Dev.* 13, 3191-3197 (1999))。该过程在内源核糖核酸酶将较长的dsRNA切割成较短的、长度为21或22个核苷酸的RNA(称作小干扰RNA或siRNA)时发生。然后较小的RNA区段介导对靶mRNA的降解。用于合成RNAi的试剂盒可购自例如New England Biolabs和Ambion。在一个实施方案中,可以采用反义RNA中使用的上文所描述的一种或多种化学品。

[0199] 可以以如下形式将编码例如抑制血管发生的分子的核酸分子导入受试者中,所述形式适合于在受试者的细胞中表达所编码的蛋白质,其也可以在本发明的方法中使用。抑制血管发生的例示性分子包括但不限于TSP-1、TSP-2、IFN- α 、IFN- γ 、血管他丁(angiotatin)、内皮他丁(endostsin, endostatin)、肿瘤他丁(tumastatin, tumstatin)、canstatin、VEGI、PEDF、vasohibin、和促乳素2-甲氧雌二醇的16kD片段(关于综述,参见Kerbel(2004)*J. Clin Invest* 114:884)。

[0200] 例如,使用标准的分子生物学技术来将全长或部分cDNA序列克隆入重组表达载体中,并将所述载体转染入细胞中。可以通过例如使用聚合酶链式反应(PCR)进行的扩增或者筛选合适的cDNA文库来获得cDNA。可以使用cDNA的核苷酸序列来设计容许通过标准的PCR方法扩增cDNA的PCR引物或设计可以用于使用标准的杂交方法筛选cDNA文库的杂交探针。分离或扩增cDNA后,将DNA片段导入合适的表达载体中。

[0201] 在本发明的方法中使用的例示性生物学药剂包括但不限于吉非替尼(gefitinib)

(Iressa)、阿那曲唑 (anastrozole)、二乙基己烯雌酚 (diethylstilbesterol)、雌二醇、普雷马林 (premarin)、雷洛昔芬 (raloxifene)、孕酮、异炔诺酮 (norethynodrel)、炔孕酮 (ethisterone, ethisterone)、地美炔酮 (dimethisterone, dimethisterone)、醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、醋酸甲羟孕酮 (medroxyprogesterone acetate)、己酸羟孕酮 (hydroxyprogesterone caproate)、炔诺酮 (norethisterone)、甲睾酮 (methyltestosterone)、睾酮、地塞米松 (dexamthasone, dexamethasone)、泼尼松 (prednisone)、考的松 (Cortisol)、solumedrol、他莫昔芬 (tamoxifen)、氟维司群 (fulvestrant)、托瑞米芬 (toremifene)、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、睾内酯、屈洛昔芬 (droloxifene)、阿那曲唑 (anastrozole)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、氟他胺 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、戈舍瑞林 (goserelin)、氟他胺、亮丙瑞林、曲普瑞林 (triptorelin)、氨鲁米特、米托坦 (mitotane)、戈舍瑞林、西妥昔单抗、埃罗替尼 (erlotinib)、伊马替尼 (imatinib)、托西莫单抗 (Tositumomab)、阿仑单抗、曲妥单抗、吉姆单抗、利妥昔单抗、替伊莫单抗 (Ibritumomab tiuxetan)、贝伐单抗、地尼白介素 - 毒素连接物 (Denileukin diftitox)、达克珠单抗 (Daclizumab)、干扰素 - α 、干扰素 - β 、抗 4-1BB、抗 4-1BBL、抗 CD40、抗 CD154、抗 OX40、抗 OX40L、抗 CD28、抗 CD80、抗 CD86、抗 CD70、抗 CD27、抗 HVEM、抗 LIGHT、抗 GITRL、抗 CTLA-4、可溶性 OX40L、可溶性 4-1BBL、可溶性 CD154、可溶性 GITRL、可溶性 LIGHT、可溶性 CD70、可溶性 CD80、可溶性 CD86、可溶性 CTLA4-Ig、GVAX®、及其组合，它们对于本领域技术人员基于特定肿瘤或癌症的合适标准护理是容易显而易见的。可以通过可操作连接所述药剂与例如 Ig-Fc 区来以例如融合蛋白制备可溶性形式的药剂。

[0202] 应当注意到，可以与 GTR 结合分子组合施用超过一种别的药剂，例如 1 种、2 种、3 种、4 种、5 种。例如，在一个实施方案中，可以与 GTR 结合分子组合施用两种化疗剂。在另一个实施方案中，可以施用化疗剂、生物学药剂、和 GTR 结合分子。

[0203] 可以使用多种形式的生物学药剂。这些包括但不限于如下形式，诸如原型 (proform) 分子、不带电荷的分子、分子复合物、盐、醚、酯、酰胺等，它们在植入、注射入或以别的方式插入肿瘤中后被生物学活化。

[0204] IV. 治疗性方法

[0205] 本发明进一步提供了给受试者施用本发明的联合疗法的方法。

[0206] 如上文所提出的，可以使用本发明的方法（即与在治疗癌症中有用的第二药剂组合使用 GTR 结合分子）来治疗受试者中的恶性肿瘤或癌症。例示性的癌症包括：胰腺癌、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑癌或中枢神经系统癌、周围神经系统癌、食管癌、宫颈癌、子宫癌或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆管癌、小肠癌或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、和血液学组织的癌症。

[0207] 在一个实施方案中，可以使用本发明的方法来治疗黑素瘤。在另一个实施方案中，可以使用本发明的方法来治疗实体瘤，例如癌瘤。可以由本发明的化合物治疗的实体瘤的例子包括但不限于乳腺癌、睾丸癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胰腺癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、结肠癌、以及前列腺癌、胃癌、皮肤癌、胃癌、食道癌和膀胱癌。在一个实施方案中，实体瘤是腺癌，例如结肠腺癌。在本发明的一个实施方案中，实体瘤是结肠肿瘤。在本发明

的另一个实施方案中,实体瘤选自下组:结肠肿瘤、肺肿瘤、乳腺肿瘤、胃肿瘤、前列腺肿瘤、宫颈肿瘤、阴道肿瘤、和胰腺肿瘤。

[0208] 在另一个实施方案中,所述肿瘤选自下组:I期、II期、III期、和IV期肿瘤。本领域技术人员使用本领域公认的分期方法容易确定肿瘤期,诸如肿瘤大小、肿瘤已经转移至的淋巴结或其它组织的数目、显微分析、组织学分析等。

[0209] 在本发明的一个实施方案中,使用主题联合疗法来治疗已建立的肿瘤,例如如下肿瘤,其具有足够的大小,使得营养物不再能通过渗透而从受试者的血管系统渗入肿瘤中央,因此该肿瘤需要其自身的血管供应来接受营养物,即血管化的肿瘤。在另一个实施方案中,使用主题联合疗法来治疗,例如抑制继发性肿瘤(例如转移)的建立,和/或降低肿瘤(例如已建立的肿瘤和/或继发性肿瘤,例如转移)的大小。在又一个实施方案中,使用主题联合疗法来预防继发性肿瘤(例如转移)的建立。

[0210] 在一个实施方案中,使用联合疗法来治疗具有至少约1mm×1mm的尺寸的肿瘤。在本发明的另一个实施方案中,使用联合疗法来治疗至少约0.5mm×0.5mm的肿瘤。在本发明的其它实施方案中,所述肿瘤具有至少约100mm³的体积。在一个实施方案中,使用本发明的联合疗法来治疗如下的肿瘤,所述肿瘤大得足以通过触诊或通过使用本领域中公知的成像技术来找到,诸如MRI、超声、或CAT扫描。

[0211] 在本发明的某些实施方案中,所述主题方法导致抑制肿瘤大小超过约10%、超过约20%、超过约30%、超过约35%、超过约42%、超过约43%、超过约44%、超过约45%、超过约46%、超过约47%、超过约48%、超过约49%、超过约50%、超过约51%、超过约52%、超过约53%、超过约54%、超过约55%、超过约56%、超过约57%、超过约58%、超过约59%、超过约60%、超过约65%、超过约70%、超过约75%、超过约80%、超过约85%、超过约90%、超过约95%、或超过约100%。在一个实施方案中,GITR结合分子或其抗原结合片段和至少一种化疗剂的施用导致约42%或更大的%T/C。

[0212] 在一个实施方案中,本发明的联合疗法具有协同效应。两种化合物的“协同效应”指两种药剂的组合的效果大于它们单个效果的总和,而且在统计学上不同于对照和单种药物。在另一个实施方案中,本发明的联合疗法具有加性效应。两种化合物的“加性效应”指两种药剂的组合的效果是它们单个效果的总和,而且在统计学上不同于对照和/或单种药物。

[0213] 可以以方便的方式诸如通过注射(皮下、静脉内等)、口服施用、吸入、经皮应用、或直肠施用来施用GITR结合分子。根据施用路径,可以在某种材料中包被活性化合物以保护所述化合物免于可能灭活该化合物的酶、酸和其它天然条件的作用。例如,为了通过不同于胃肠外施用来施用所述药剂,可能想要用某种材料包被所述药剂或者与所述材料共施用所述药剂以阻止其失活。

[0214] 一般而言,会经由单独使用时常规施用的路径来施用要与GITR结合分子组合施用的至少一种别的药剂。应当理解的是,所述GITR结合分子和所述至少一种别的药剂不需要经由相同路径施用。

[0215] 可以通过本领域中已知的多种方法来施用本发明的联合疗法,虽然对于许多治疗性应用,优选的施用路径/方式是静脉内注射或输注。如熟练技术人员应当领会的,施用路径和/或方式会根据想要的结果而有所变化。在某些实施方案中,与载体一起制备所述

活性化合物,所述载体保护所述化合物免于快速释放,诸如受控释放的配制剂,包括植入物、经皮贴剂、和微囊化投递系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类配制剂的许多方法是受专利保护的或者是本领域技术人员公知的。参见例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0216] 在某些实施方案中,可以与例如惰性稀释剂或可同化的、可食用的载体一起口服施用本发明的结合分子。还可以将化合物(和其它成分,若想要的话)装入硬壳或软壳明胶胶囊中,压制成片剂,或者直接掺入受试者的饮食中。对于口服治疗性施用,可以将所述化合物与赋形剂一起掺入,并且以可摄食的片剂、口含片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、速溶片(wafer)等形式使用。为了通过不同于胃肠外施用来施用本发明的化合物,可能有必要用某种材料包被所述化合物或者与所述材料共施用所述化合物以阻止其失活。

[0217] 在某些实施方案中,所述方法包括对受试者胃肠外施用有效量的 G1TR 结合分子和第二药剂。在一个实施方案中,所述方法包括对受试者动脉内施用 G1TR 结合分子和至少一种化疗剂。在其它实施方案中,所述方法包括直接向受试者中肿瘤的动脉血供施用有效量的 G1TR 结合分子和至少一种化疗剂。在一个实施方案中,所述方法包括使用导管直接向癌性肿瘤的动脉血供施用有效量的 G1TR 结合分子和至少一种化疗剂。在使用导管来施用 G1TR 结合分子和至少一种化疗剂的实施方案中,可以通过荧光镜检术或者本领域中已知的可以观察和/或引导导管插入的其它方法来引导或观察导管的插入。在另一个实施方案中,所述方法包括化疗栓塞(chemoembolization)。例如,化疗栓塞方法可以包括用如下组合物阻塞供给癌性肿瘤的血管,所述组合物由与油基混合的树脂样材料(例如 Ethiodol 中的聚乙烯醇)和一种或多种化疗剂构成。在其它实施方案中,所述方法包括对受试者系统施用 G1TR 结合分子和至少一种化疗剂。

[0218] 一般而言,不管位置,通常以类似的方式实施利用本发明的药学组合物的化疗栓塞或直接动脉内或静脉内注射疗法。简言之,首先可以如下实施要栓塞区域的血管造影术(血管道路图),或者更具体地在某些实施方案中,实施动脉造影术,即在采用 X 射线时经由插入动脉或静脉(取决于要栓塞或注射的位置)中的导管注射不透射线的造影剂。可以以经皮方式或通过手术来插入导管。然后可以如下栓塞血管,即经由导管使本发明的药学组合物回流,直至观察到流动停止。可以通过重复血管造影片来证实阻塞。在使用直接注射的实施方案中,然后用想要剂量的本发明的药学组合物输注血管。

[0219] 栓塞疗法一般导致含有抑制剂的组合物遍及要治疗的肿瘤或血管块间隙的分布。阻塞动脉内腔的栓塞性颗粒的物理体积导致血供的阻塞。在此效果外,抗血管发生因子的存在阻止新血管形成来供给肿瘤或血管块,这增强切断血供的早衰效应。直接的动脉内、静脉内或注射施用一般也导致含有抑制剂的组合物遍及要治疗的肿瘤或血管块间隙的分布。然而,预期用本方法一般不会使血供变得阻塞。

[0220] 在本发明的一方面,可以利用栓塞或直接动脉内或静脉内注射疗法来治疗原发性和继发性肿瘤。简言之,经由股动脉或肱动脉插入导管,并通过在荧光镜检指导下操纵其通过动脉系统来行进入例如肝动脉中。使导管行进入肝动脉树中,其远到必须容许完全阻断供给肿瘤的血管,而尽可能多得不伤害供给正常结构的动脉分枝。理想地,这会是肝动脉的区段分枝,但可以的是,胃十二指肠动脉起源远侧的整个肝动脉,或者甚至多条不同的动

脉会需要进行阻断,这取决于肿瘤的程度及其个体血供。一旦达到想要的导管位置,便如下栓塞动脉,即经由动脉导管注射组合物(如上文所描述的),直至要阻断的动脉中的流动停止,优选甚至在观察 5 分钟后。可以如下证实动脉的阻塞,即经由导管注射不透射线的造影剂,并通过荧光镜检术或 X 射线胶片来证明先前用造影剂注满的血管不再如此。在使用直接注射的实施方案中,通过经由动脉导管以想要的剂量注射组合物(如上文所描述的)来输注动脉。可以用要阻塞的每条供给动脉重复相同的规程。

[0221] 关于剂量给药,应当注意到,剂量数量、施用周期的数目、和施用次序可以随要减轻的状况的严重程度而变化。应当进一步理解的是,对于任何具体的受试者,可以依照个体需要和施用或监督所述组合物施用的个人的专业判断来随时间调整特定的剂量方案。通常,可使用本领域技术人员已知的技术来确定剂量给药。选定的剂量水平会取决于多种因素,包括药剂或其酯、盐或酰胺的活性、施用路径、施用时间、所采用的特定化合物的排泄或代谢速率、治疗的持续时间、与所采用的特定化合物组合使用的其它药物、化合物和 / 或材料、年龄、性别、重量、状况、一般健康、疾病状态、结合分子在个体中引发想要的响应的能力、和所治疗的患者的在先医学史、和医学领域中公知的类似因素。

[0222] 可以调整剂量方案以提供最佳的想要响应。例如,可以施用单次推注,可以随时间施用数个分剂,或者可以根据治疗状况的紧急事件所指明的按比例降低或提高剂量。在一个实施方案中,为了容易施用和剂量的一致性,可以将要施用的一种或多种药剂配制为剂量单位形式的胃肠外组合物。如本文中所使用的,剂量单位形式指物理上离散的单元,适用作为要治疗的哺乳动物受试者的单一剂量;每个单元含有与所需要的药学载体联合的,预先确定数量的活性化合物,其根据计算,产生想要的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格由下述各项规定,并直接依赖于下述各项:(a) 所述活性化合物的独特特性和要达到的具体治疗或预防效果,和 (b) 本领域配合此类活性化合物以治疗个体中敏感性所固有的局限性。

[0223] 具有本领域普通技能的医师或兽医能容易地确定和规定有效量的主题联合疗法的每种药剂。例如,医师或兽医能以如下剂量施用至少一种别的药剂,所述剂量就是所述药剂单独施用时或者作为不采用 GITR 结合分子的联合疗法的部分施用时会向受试者施用的。熟练技术人员无需过度实验便能确定此类本领域公认的剂量给药方案。

[0224] 如本文中所描述的 GITR 结合分子和至少一种化疗剂的组合使用可以降低任何单种药剂所需要的剂量。因而,在一个实施方案中,至少一种别的药剂的剂量可以低于单独施用所述药剂时为了实现想要的治疗效果所需要的剂量。

[0225] 关于 GITR 结合分子,本领域普通技术人员还会能够容易地确定最佳剂量。例如,可以以约 50mg/kg 和约 0.05mg/kg 之间的剂量施用抗 GITR 抗体。在一个实施方案中,可以以约 40mg/kg 和约 0.1mg/kg 之间的剂量施用抗 GITR 抗体。在另一个实施方案中,可以以约 30mg/kg 和约 0.5mg/kg 之间的剂量施用抗 GITR 抗体。在又一个实施方案中,可以以约 20mg/kg 和约 1mg/kg 之间的剂量施用抗 GITR 抗体。上文所述数值中间的范围也意图是本发明的一部分。在又一个实施方案中,可以以约 10mg/kg 和约 5mg/kg 之间的剂量施用抗 GITR 抗体。例如,例示性的剂量包括:约 0.06、约 0.07、约 0.08、约 0.09、约 0.1、约 0.2、约 0.3、约 0.4、约 0.5、约 0.6、约 0.7、约 0.8、约 0.9、约 1、约 1.5、约 2、约 2.5、约 3、约 3.5、约 4、约 4.5、约 5、约 10、约 20、约 30、或约 40mg/kg。注意到,本文中所列出的剂量和剂量范围

仅是例示性的,并不意图限制要求保护的组合物的范围或实施。

[0226] 可以如下在配制人用剂量范围中使用自细胞培养物测定法和动物研究获得的数据,即,例如测定在例如小鼠中不发生不利效果的剂量,并确定人等同剂量(参见例如 www.fda.gov/cber/gdlns/dose.htm,本文通过提及而收录其内容)。优选地,任何补充物的剂量,或者其中任何成分的剂量位于包括具有少许或没有毒性的 ED50(中值有效剂量)的循环浓度的范围内。剂量在此范围内可以有所变化,这取决于所采用的剂量形式和所利用的施用路径。对于本发明的药剂,最初可以从细胞培养物测定法评估治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以达到循环血浆浓度范围,其包括 IC50(即,对症状实现半数最大抑制的测试化合物浓度),如在细胞培养物中所测定的。可以使用此信息来更准确地确定在人中有用的剂量。可以通过例如高效液相层析来测量血浆中的水平。

[0227] 或者,可以通过参考组合物的血浆浓度来确定主题发明的剂量。例如,可以使用最大血浆浓度(C_{max})和在血浆浓度-时间曲线下从时间 0 至无穷大的面积(AUC(0-4))。本发明的剂量包括那些产生 C_{max} 和 AUC(0-4)的上述数值的剂量及产生那些参数的或大或小数值的其它剂量。

[0228] 任何特定化合物会在给定患者中产生最有效治疗的精确施用时间和量会取决于特定化合物的活性、药动学、和生物利用度、所述患者的生理学状况(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给定剂量的响应性和药疗类型)、施用路径等。可以使用本文中所呈现的准则来优化治疗,例如确定最佳的施用时间和/或量,其仅仅会需要如下的常规实验,包括监测受试者,并调整剂量和/或时机。

[0229] 在一个实施方案中,向受试者施用联合疗法的至少一种非 GITR 结合剂,之后施用 GITR 结合分子。可以向患者施用非 GITR 结合分子一次或超过一次。在重复施用的情况中,可以每天、隔天、每周、每月或者依照另一日程表来施用非 GITR 结合分子。例示性的治疗需要在延长的一段时间(例如至少六个月)里以多剂量施用。

[0230] 类似地,可以向受试者施用本发明的 GITR 结合分子一次或超过一次。在重复施用的情况中,可以每天、隔天、每周、每月或者依照另一日程表来施用 GITR 结合分子。例示性的治疗需要在延长的一段时间(例如至少六个月)里以多剂量施用。

[0231] 在施用 GITR 结合分子之前或之后施用非 GITR 结合分子的情况中,施用药剂之间的时间间隔可以是例如数分钟、数小时、数天、数周、或数月。

[0232] 任选地,包含 GITR 结合分子和至少一种别的药剂的本发明的联合疗法可包括施用别的有效治疗癌症的药剂或治疗方案,例如手术、放射疗法。优选的别的药剂是那些本领域公认的,且常规施用以治疗特定病症的药剂。

[0233] 在治疗受试者时,可以通过在预先确定的时间(例如 24 小时期间)测量一项或多项相关指数来监测患者的健康。可以依照此监测的结果来优化治疗,包括补充物、量、施用次数和配方。可以通过测量相同的参数来周期性地再评估患者以确定改善程度,第一次此类再评估通常在距治疗开始 4 周末时发生,而随后的再评估在治疗过程中每 4-8 周发生,然后其后的每 3 个月发生。治疗可以持续数月或者甚至数年,其中人治疗的典型长度最少是一个月。可以基于这些再评估来调整所施用的药剂量,并有可能调整施用次数。

[0234] 在一个实施方案中,使用本领域已知的方法来偶联 GITR 结合分子与第二药剂。

[0235] V. 本发明的试剂盒

[0236] 本发明提供了供本发明方法使用的试剂盒和制品。本发明还涉及包装好的药物组合物或试剂盒,其用于施用 GITR 结合分子和本发明中使用的第二药剂以治疗癌症。在本发明的一个实施方案中,所述试剂盒或制品包含 GITR 结合分子,和关于与至少一种别的药剂(例如化疗剂)组合施用以治疗癌症的说明书。在另一个实施方案中,所述试剂盒包含第二容器,其装有在与 GITR 结合分子的联合疗法中使用的至少一种别的药剂。所述说明书可以描述应当如何(例如静脉内)及何时(例如在第 0 周和第 2 周)向受试者施用不同剂量的 GITR 结合分子和至少一种化疗剂以进行治疗。

[0237] 或者,所述包装或试剂盒可以含有 GITR 结合分子,并且它可以在包装内或经由附随的信息宣传用途,宣传本文中所描述的各种用途或对病症的治疗。包装好的药物或试剂盒可以进一步包含化疗剂(如本文中所描述的),其与关于与第一药剂(例如 GITR 结合分子)一起使用第二药剂(例如化疗剂)的说明书一起包装或者用所述说明书共同宣传。

[0238] 例如,试剂盒可以包含包装材料、一种或多种 GITR 结合分子和至少一种如上文所描述的化疗剂和任选地,标签或包装插页。在其它实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其包含一种或多种 GITR 结合分子和至少一种化疗剂和一种或多种用于实现此类组合物施用的装置。例如,试剂盒可以包含包含 GITR 结合分子的药物组合物和用于实现向实体瘤中直接动脉内注射组合物的导管。任选地,所述试剂盒包含辅助成分诸如装有药学可接受缓冲剂的第二容器和关于使用所述组合物的说明书。

[0239] 通过以下实施例进一步例示本发明,这些实施例不应被理解为限制性的。本文通过提及而收录遍及本申请所引用的所有参考文献、专利和已公开的专利申请的内容,以及附图。

实施例

[0240] 实施例 1:在结肠癌的动物模型中 GITR 结合分子和核苷类似物的组合降低肿瘤负荷并延长存活时间。

[0241] 在体侧给小鼠注射 1×10^5 个 CT26 细胞,并分成组。一组对照小鼠是未处理的。在第 15 天用时 80mg/kg Gemzar 处理接受 Gemzar 的一组小鼠。在第 15 天、第 16 天和第 17 天时一组小鼠以 0.4mg 剂量(I.P.)接受单独的抗 GITR 抗体(2F8)。在第 15 天向接受 Gemzar+2F8 的一组小鼠给予 80mg/kg Gemzar,并在第 16 天时给予 0.4mg 2F8(I.P.)。

[0242] 监测肿瘤的大小和小鼠的存活。使用 GraphPadPrism 4 软件来标绘 Kaplan-Meier 存活曲线,并确认各组的中值存活时间。使用测径器来测量肿瘤,并使用公式 $(L \times W^2)/2$ 来计算肿瘤大小。

[0243] 与用媒介物、单独的 Gemzar、或单独的 2F8 处理的小鼠的肿瘤负荷相比,用 Gemzar 和 2F8 的组合处理的小鼠的肿瘤负荷是降低的(图 1)。

[0244] 另外,如图 2 中所显示的, IgG2a 对照小鼠和用单独的 GITR 结合分子处理的小鼠的中值存活是 24 天。对于用单独的 Gemzar 处理的小鼠,中值存活是 31 天。所有经 Gemzar 加上 2F8 处理的小鼠在第 31 天时仍然活着,并且肿瘤在大小方面是适度的。

[0245] 在第二项研究中,在尾静脉中给小鼠注射 1×10^5 个 CT26 细胞,并容许肿瘤在肺中建立 10 天。然后将动物分成组。一组对照小鼠是未处理的。在第 15 天用时 80mg/kg Gemzar 处理接受 Gemzar 的一组小鼠。一组小鼠在第 15 天、第 16 天和第 17 天时以 0.4mg

剂量 (I. P.) 接受单独的抗 GITR 抗体 (2F8)。在第 15 天时向接受 Gemzar+2F8 的一组小鼠给予 80mg/kg Gemzar, 并在第 16 天时给予 0.4mg 2F8 (I. P.)。在第 22 天时评估肿瘤数目。

[0246] 如图 3 中所显示的, 与用媒介物、单独的 Gemzar、或单独的 2F8 处理的小鼠中的肿瘤数目相比, 用 Gemzar 和 2F8 的组合处理的小鼠中的肿瘤数目是减少的。

[0247] 实施例 2: 在黑素瘤的动物模型中 GITR 结合分子和影响微管形成的药剂的组合降低肿瘤负荷。

[0248] 在体侧给小鼠注射 12×10^3 个 B16 黑素瘤细胞, 并分成组。一组对照小鼠是未处理的。在第 20 天时用 10mg/kg Taxol $\text{\textcircled{R}}$ 处理接受 Taxol $\text{\textcircled{R}}$ 的一组小鼠, 此时肿瘤约为 100mm^3 。在第 21 天时一组小鼠以 0.4mg 的剂量 (I. P.) 接受单独的抗 GITR 抗体 (2F8)。在第 20 天时向接受 Taxol $\text{\textcircled{R}}$ +2F8 的一组小鼠给予 10mg/kg Taxol $\text{\textcircled{R}}$, 并在第 21 天时给予 0.4mg 2F8 (I. P.)。

[0249] 监测肿瘤的大小和小鼠的存活。使用测径器来测量肿瘤, 并使用公式 $(L \times W^2)/2$ 来计算肿瘤大小。

[0250] 如图 4 中所显示的, 与用媒介物、单独的 Taxol $\text{\textcircled{R}}$ 、或单独的 2F8 处理的小鼠的肿瘤负荷相比, 用 Taxol $\text{\textcircled{R}}$ 和 2F8 的组合处理的小鼠中的肿瘤负荷是降低的。

[0251] 实施例 3: 在结肠癌瘤的动物模型中 GITR 结合分子和烷化剂的组合降低肿瘤负荷。

[0252] 给小鼠皮下注射 1×10^5 个 CT26 细胞, 并分成组。一组对照小鼠是未处理的。在第 13 天时用 150mg/kg Cytoxan 处理接受 Cytoxan 的一组小鼠。在第 14 天时一组小鼠以 0.4mg 的剂量 (I. P.) 接受单独的抗 GITR 抗体 (2F8)。在第 13 天时向接受 Cytoxan+2F8 的一组小鼠给予 150mg/kg Cytoxan $\text{\textcircled{R}}$, 并在第 14 天时给予 0.4mg 2F8 (I. P.)。

[0253] 监测肿瘤的大小和小鼠的存活。使用测径器来测量肿瘤, 并使用公式 $(L \times W^2)/2$ 来计算肿瘤大小。

[0254] 如图 5 中所显示的, 与用媒介物或单独的 Cytoxan 处理的小鼠的肿瘤负荷相比, 用 Cytoxan 和 2F8 的组合处理的小鼠中的肿瘤负荷是降低的。

[0255] 实施例 4: 用 GITR 结合分子和烷化剂或核苷类似物的组合处理的结肠癌瘤的动物模型对 CT26 细胞形成强烈的记忆应答。

[0256] 在研究中使用如上文在实施例 1 和实施例 4 那样处理且其肿瘤完全消退的小鼠, 其中给它们在其左体侧注射 3×10^5 个 CT26 细胞 IV (4 只小鼠) 或 10^6 个 CT26 细胞, 及在其右体侧注射 10^6 个 RENCA 细胞 (4 只小鼠)。使用未接触 CT26 的小鼠作为对照。所有 4 只经组合处理的小鼠排斥 CT26 细胞考验, 而 2/4 完全排斥 RENCA 细胞。在 IV 研究中, 注射细胞后 14 天切除肺, 用墨汁染色, 用 Fekete 氏溶液固定, 并分析肿瘤的存在; 对所有 4 只动物的肺的分析没有显示可见的肿瘤症候。

[0257] 实施例 5: 在结肠癌瘤的动物模型中 GITR 结合分子和抗代谢物的组合降低肿瘤负荷。

[0258] 给小鼠皮下注射 1×10^5 个 CT26 细胞, 并分成组。一组对照小鼠是未处理的。在第 10 天时用 75mg/kg 5-FU 处理接受氟尿嘧啶 (5-FU) 的一组小鼠。在第 10 天时向接受 5-FU+2F8 的一组小鼠给予 75mg/kg 5-FU, 并在第 11 天时给予 0.4mg 2F8 (I. P.)。

[0259] 监测肿瘤的大小和小鼠的存活。使用测径器来测量肿瘤, 并使用公式 $(L \times W^2)/2$ 来

计算肿瘤大小。

[0260] 如图 6 中所显示的,与用媒介物或单独的 5-FU 处理的小鼠的肿瘤负荷相比,用 5-FU 和 2F8 的组合处理的小鼠中的肿瘤负荷是降低的。

[0261] 实施例 6 :在结肠癌的动物模型中 GITR 结合分子和细胞毒性抗生素的组合降低肿瘤负荷。

[0262] 给小鼠皮下注射 1×10^5 个 CT26 细胞,并分成组。一组对照小鼠是未处理的。在第 10 天时用 5mg/kg 多柔比星处理接受多柔比星(阿霉素)的一组小鼠。在第 10 天向接受多柔比星+2F8 的一组小鼠给予 5mg/kg 多柔比星,并在第 11 天时给予 0.4mg 2F8(I.P.)。

[0263] 监测肿瘤的大小和小鼠的存活。使用测径器来测量肿瘤,并使用公式 $(L \times W^2)/2$ 来计算肿瘤大小。

[0264] 如图 7 中所显示的,与用媒介物或单独的多柔比星处理的小鼠的肿瘤负荷相比,用多柔比星和 2F8 的组合处理的小鼠中的肿瘤负荷是降低的。

[0265] 实施例 7 :在黑素瘤的动物模型中 GITR 结合分子和烷化剂的组合降低肿瘤负荷。

[0266] 给小鼠皮下注射 1×10^4 个 B16 黑素瘤细胞,并分成组。一组对照小鼠是未处理的。在第 13 天时用 150mg/kg Cytoxan 处理接受 Cytoxan 的一组小鼠。在第 14 天时一组小鼠以 0.4mg 的剂量(I.P.)接受单独的抗 GITR 抗体(2F8)。在第 13 天向接受 Cytoxan+2F8 的一组小鼠给予 150mg/kg Cytoxan®,并在第 14 天时给予 0.4mg 2F8(I.P.)。

[0267] 监测肿瘤的大小和小鼠的存活。使用测径器来测量肿瘤,并使用公式 $(L \times W^2)/2$ 来计算肿瘤大小。

[0268] 如图 8 中所显示的,与用媒介物或单独的 Cytoxan 处理的小鼠的肿瘤负荷相比,用 Cytoxan 和 2F8 的组合处理的小鼠中的肿瘤负荷是降低的。

[0269] 等同方案

[0270] 本领域技术人员只要使用常规的实验就会认识到,或者能够确定本文中所描述的发明的具体实施方案的许多等同方案。所附权利要求书意图涵盖此类等同方案。

[0271] 由此通过提及而完整收录本文所提及的所有出版物和专利,包括那些下文所列的各项,就像明确且单独指明通过提及而收录每篇单独的出版物或专利一样。

<110> 托勒克斯股份有限公司 (TOLERX, INC.)

PONATH, PAUL

ROSENZWEIG, MICHAEL

PONTE, F. JOSE

<120> 采用 GITR 结合分子的联合疗法

<130> TLN-040

<140> 随本文

<141> 随本文

<150> 60/959, 246

<151> 2007-07-12

<150> 61/001, 021

<151> 2007-10-30

<150> 61/126, 431

<151> 2008-05-05

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 : 合成肽

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly

1

5

10

<210>2

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>2

His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5				10					15		

<210>3

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>3

His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Gln	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5				10					15		

<210>4

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>4

Thr	Arg	Arg	Tyr	Phe	Pro	Phe	Ala	Tyr
1				5				

<210>5

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>5

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1

5

10

<210>6

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>6

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1

5

<210>7

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>7

Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu Thr

1

5

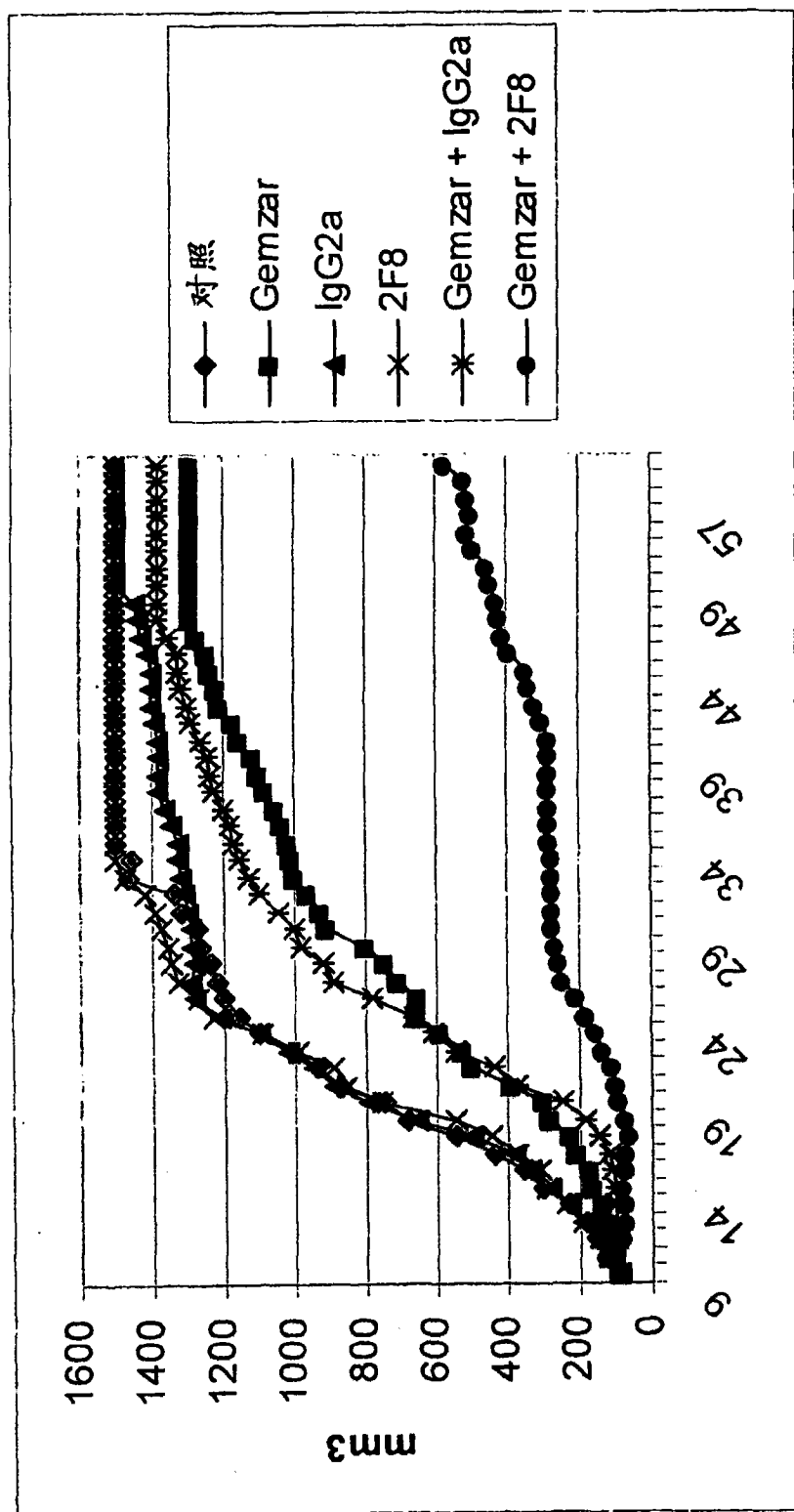


图 1

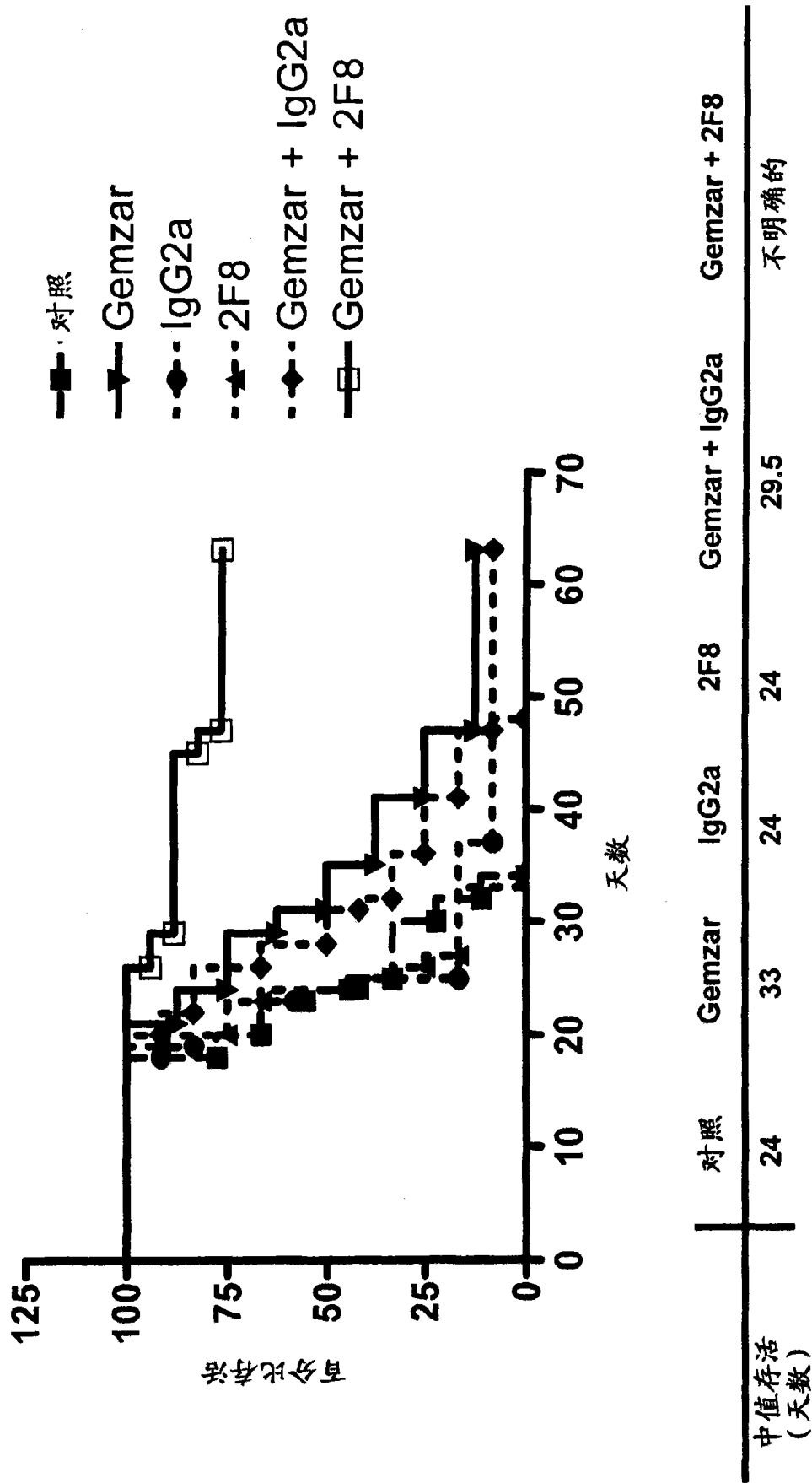


图 2

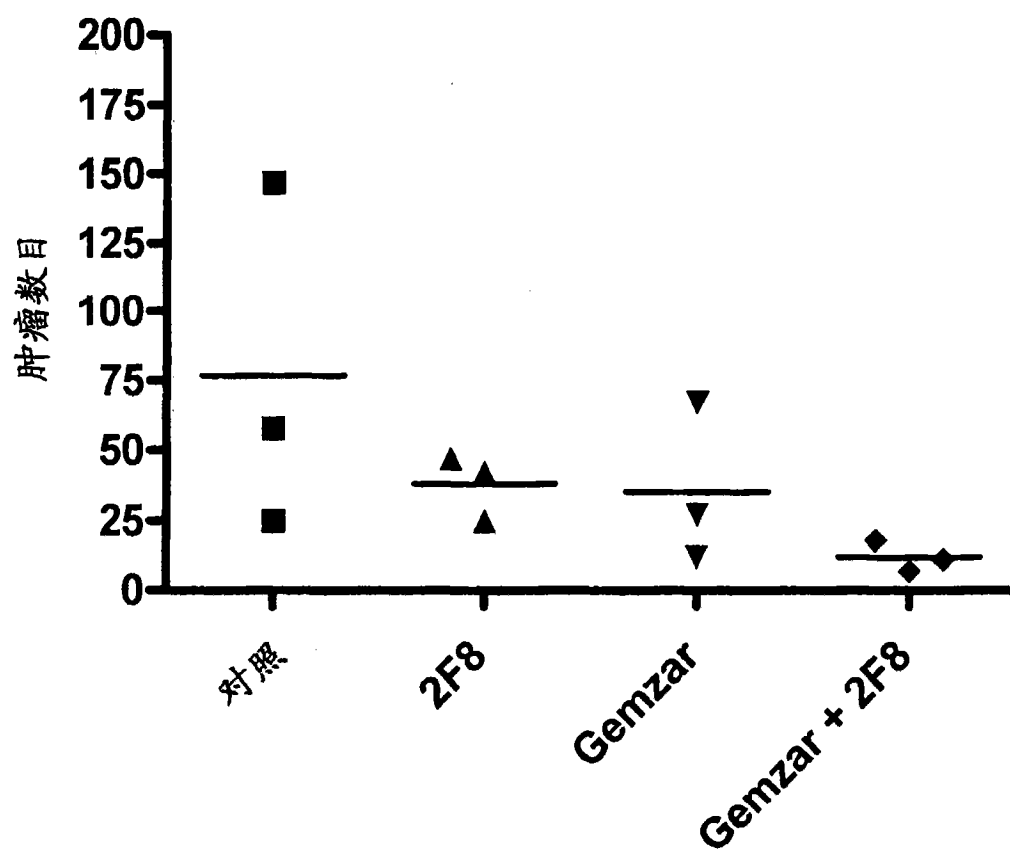


图 3

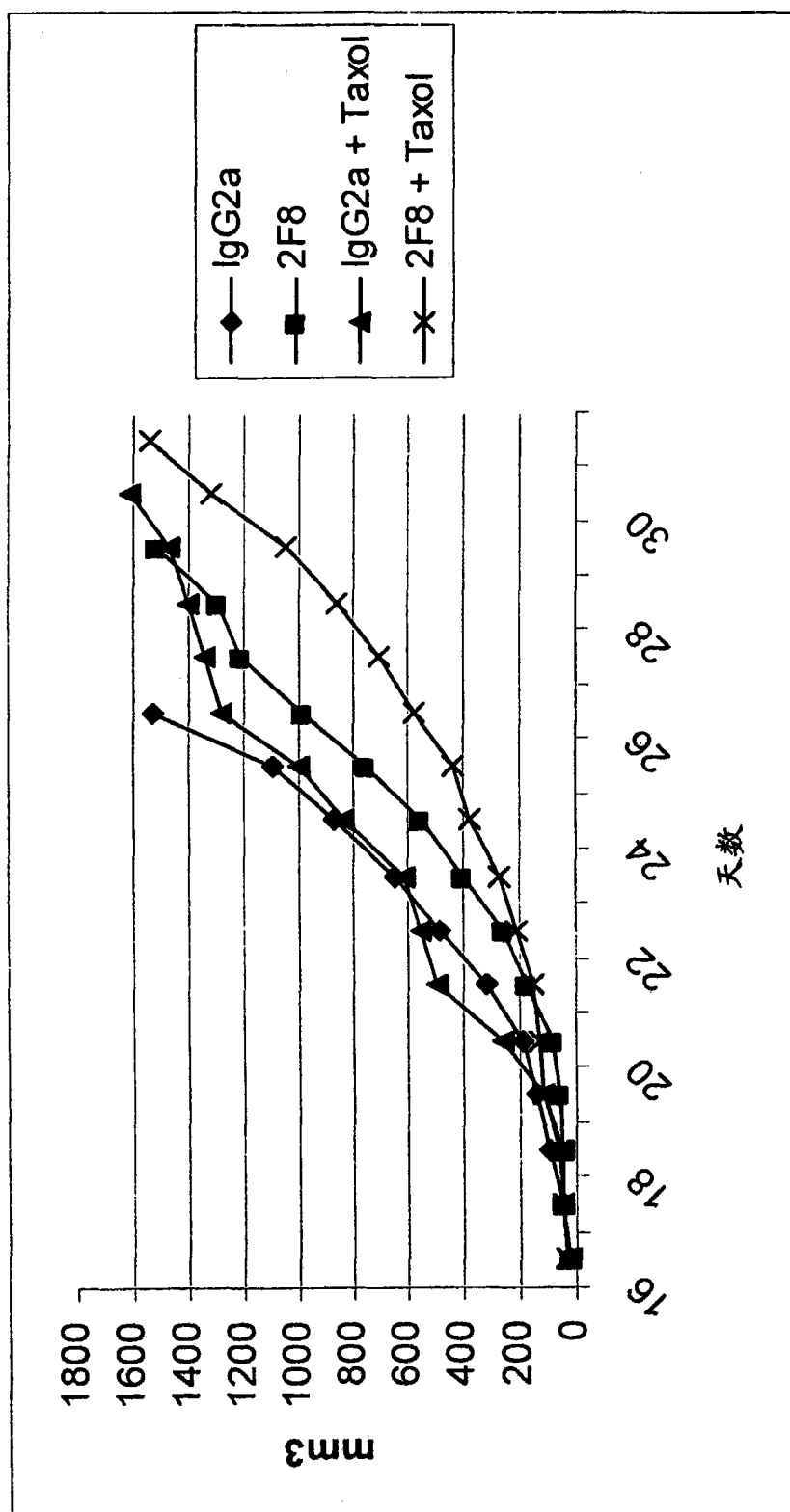


图 4

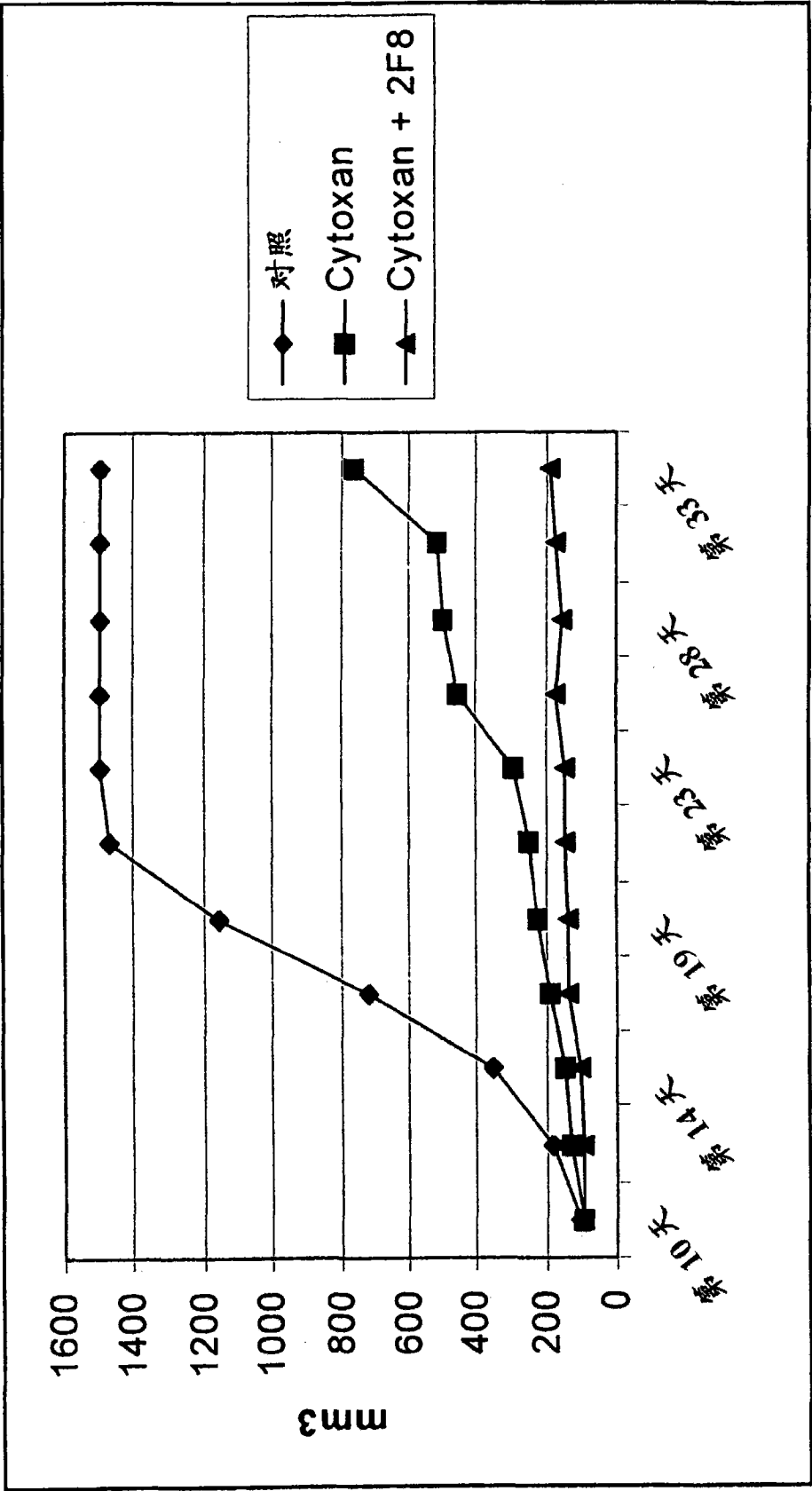


图 5

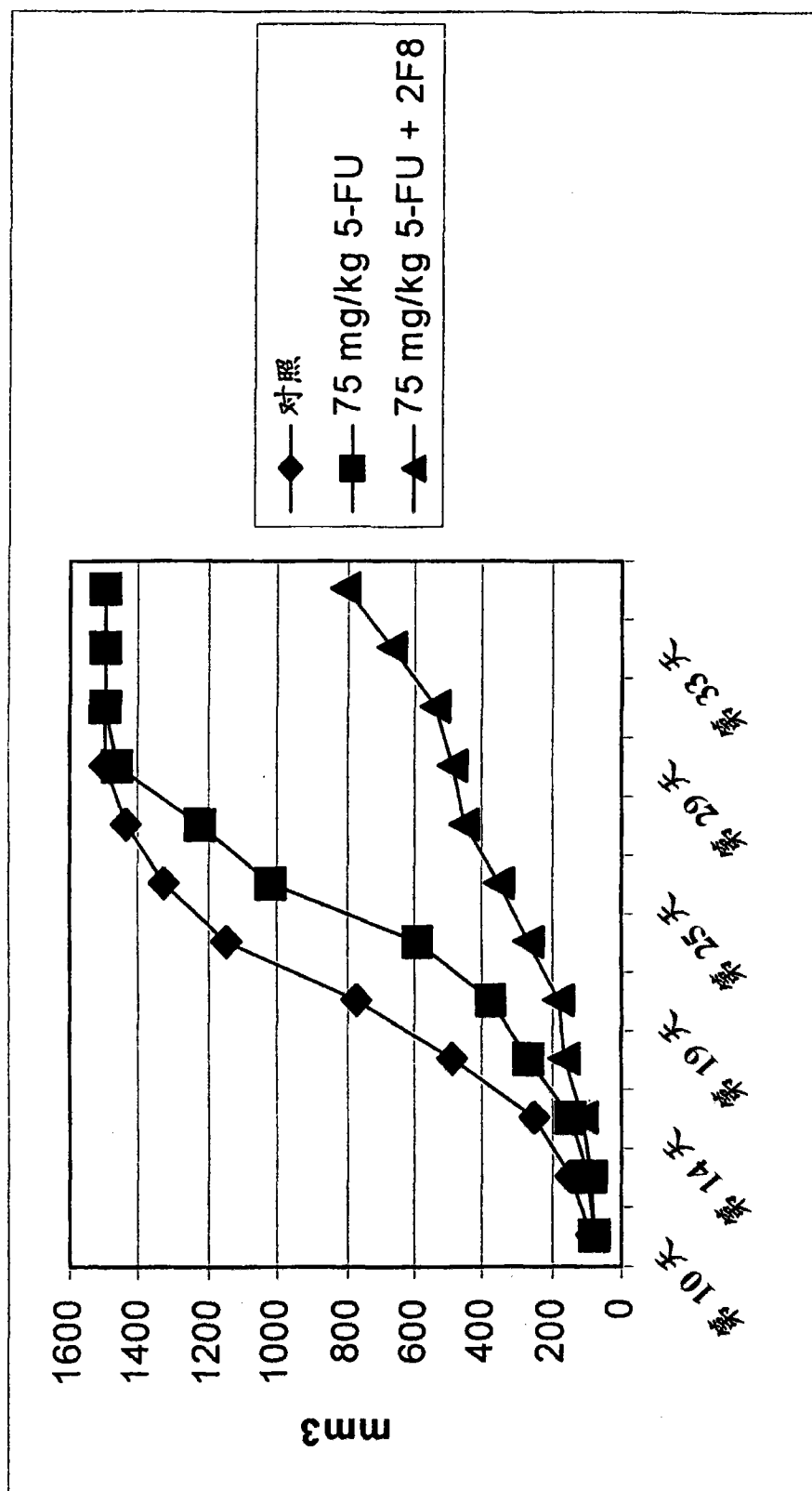


图 6

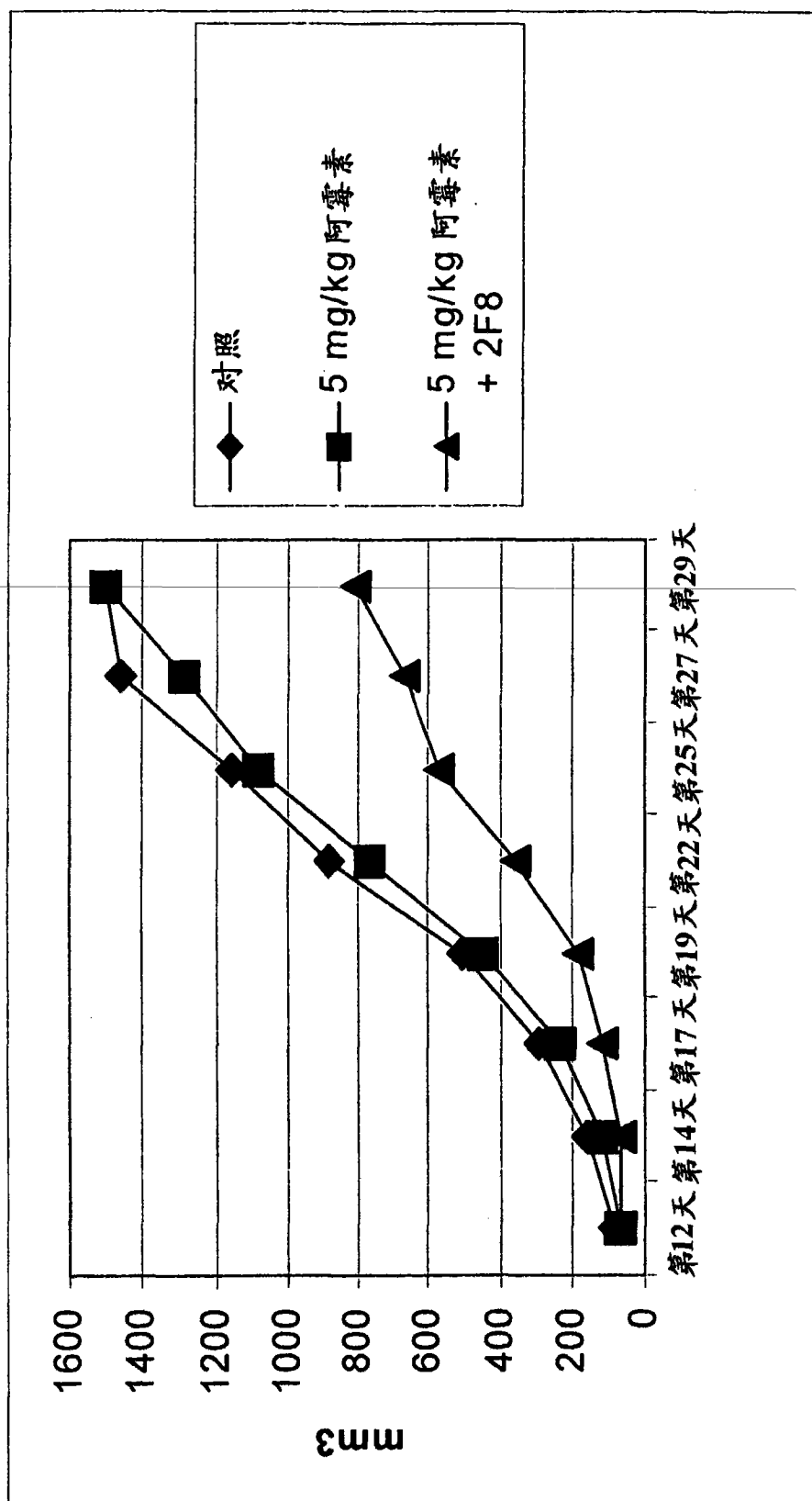


图 7

B16 黑色素瘤模型

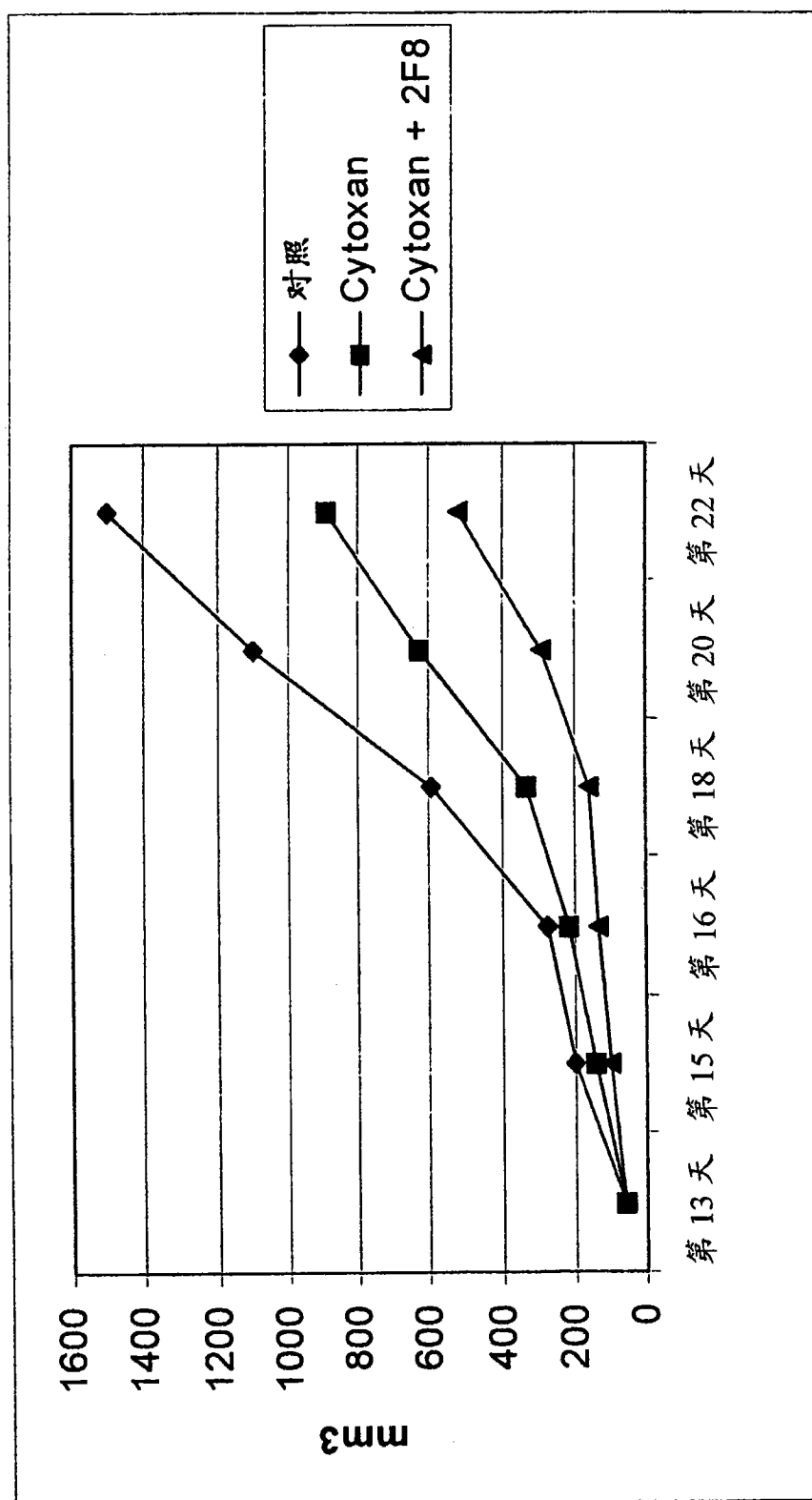


图 8