(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112020516 B
(45)授权公告日 2025.01.03

(21)申请号 201980019256.8
(22)申请日 2019.03.13
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112020516 A
(43)申请公布日 2020.12.01
(30)优先权数据
PCT/EP2018/056312 2018.03.13 EP
1804027.9 2018.03.13 GB
1804029.5 2018.03.13 GB
1804028.7 2018.03.13 GB
62/642,218 2018.03.13 US
62/642,248 2018.03.13 US
62/642,232 2018.03.13 US
62/642,230 2018.03.13 US
62/642,243 2018.03.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/056257 2019.03.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/175223 EN 2019.09.19

(73)专利权人 塔斯克疗法有限公司
地址 英国赫特福德郡
专利权人 癌症研究技术有限公司
(72)发明人 安妮·古比耶
贝特里兹·古耶内切亚·科尔佐
约瑟芬·萨利姆 凯文·莫尔德
帕斯卡·梅希尔
塞尔吉奥·克萨达
(74)专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224
专利代理师 黄爱娇

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 14/55(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 102947702 A,2013.02.27
CN 106459196 A,2017.02.22
审查员 刘晓晨

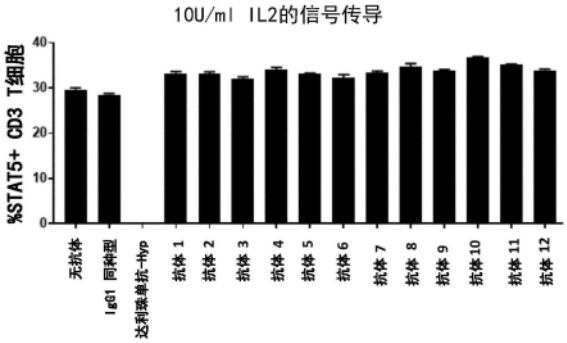
权利要求书2页 说明书40页
序列表6页 附图12页

(54)发明名称

用于肿瘤特异性细胞清除的抗-CD25

(57)摘要

本发明提供在结合人CD25的抗体中发现的抗体序列。特别地,本发明提供抗人CD25抗体的序列,其不阻断CD25与IL-2的结合或IL-2信号传导。包括此种序列的抗体及其抗原结合部分可用于药物组合物和治疗方法中,特别是用于治疗癌症。



CN 112020516 B

1.抗CD25抗体或其抗原结合片段,包含:

a)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和

b)轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,包含:

a.包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

b.包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区;

c.包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区;

d.包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区;

e.包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

f.包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区;

g.包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区;

h.包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区;

i.包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

j.包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区;

k.包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区;或

1.包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区。

3.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段是:单克隆抗体,Fab片段,F(ab')2片段,单链可变片段,scFv-Fc片段,或单链抗体。

4.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段是:人源化或完全人抗原结合抗体。

5.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体选自由以下各项组成的组:IgG1,IgG2,IgG3和IgG4同种型抗体。

6.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段被包含在免疫缀合物中,所述免疫缀合物还包含治疗剂或诊断剂。

7.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合

片段结合人CD25的细胞外结构域。

8.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段结合在其表面表达人CD25的细胞并且是抗-CD25抗体剂。

9.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段不抑制白介素-2与CD25的结合。

10.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段不抑制白介素-2经由CD25的信号传导。

11.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段是去岩藻糖化的。

12.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人CD25的表位,其中所述表位包含SEQ ID NO:8的氨基酸150至163或氨基酸166至180中包含的一个或多个氨基酸残基。

13.根据权利要求12所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述表位包含SEQ ID NO:7的氨基酸150至163或SEQ ID NO:8的氨基酸166至180。

14.核酸分子,其编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

15.核酸载体,其包含根据权利要求14所述的核酸分子。

16.宿主细胞,其包含根据权利要求15所述的核酸载体。

17.用于制备根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括培养根据权利要求16所述的宿主细胞。

18.组合物,其包含根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

19.根据权利要求18所述的组合物,其特征在于,所述组合物还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

20.根据权利要求18或19所述的组合物,其特征在于,所述组合物用于治疗癌症。

21.根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求18或19所述的组合物用于制备用于治疗癌症的药物的用途。

22.根据权利要求21所述的用途,其特征在于,所述抗体用于与第二药剂一起使用。

23.根据权利要求22所述的用途,其特征在于,所述第二药剂是免疫检查点抑制剂或癌症疫苗。

24.根据权利要求23所述的用途,其特征在于,所述第二药剂是免疫检查点抑制剂,其中所述免疫检查点抑制剂是PD-1拮抗剂。

25.根据权利要求24所述的用途,其特征在于,所述PD-1拮抗剂是抗-PD-1抗体或抗-PD-L1抗体。

26.根据权利要求21至25中任一项所述的用途,其特征在于,所述癌症为实体瘤。

27.根据权利要求21至25中任一项所述的用途,其特征在于,所述癌症为血液癌症。

28.试剂盒,其包含在容器中的根据权利要求18或19所述的组合物。

用于肿瘤特异性细胞清除的抗-CD25

技术领域

[0001] 本发明涉及抗-CD25抗体,包含抗-CD25抗体的药物组合物和这些抗体的治疗用途。

背景技术

[0002] 癌症免疫疗法涉及使用对象自身的免疫系统来治疗或预防癌症。免疫疗法利用癌细胞在其表面上通常具有可由免疫系统检测的细微不同的分子的事实。这些分子或癌症抗原为最常见的蛋白,但也包括诸如碳水化合物的分子。因此免疫疗法涉及诱导免疫系统经由这些靶抗原攻击肿瘤细胞。然而,恶性肿瘤(特别是实体瘤)可通过肿瘤细胞本身及由肿瘤微环境的组分介导的多种机制逃脱免疫监视。在后者中,通过调节性T细胞(Treg细胞或Treg)的肿瘤浸润,以及更具体地,效应物T细胞(Teff)对比Treg的不利平衡(即,Teff与Treg的较低比率)已被提议作为关键因子(Smyth M等人,2014)。

[0003] 自其发现以来,已发现Treg在介导免疫稳态和促进外周耐受的建立和维持中至关重要。然而,在癌症的情形下,其作用更复杂。由于癌细胞表达自相关抗原和肿瘤相关抗原两者,因此Treg的存在(其试图抑制效应物细胞反应)可助力于肿瘤进展。因此,通常,Treg在已形成的肿瘤中的浸润代表有效抗肿瘤反应及治疗癌症的主要障碍之一。Treg采用的抑制机制被认为显著促进对当前疗法的限制或甚至是其失败,特别是依赖于诱导或增强抗肿瘤反应的免疫疗法(Onishi H等人;2012)。

[0004] 已不断地证实Treg细胞促进鼠类模型中肿瘤的建立和进展并且证实其不存在导致肿瘤进展延迟(Elpek等人,2007;Golgher等人,2002;Jones等人,2002;Onizuka等人,1999;Shimizu等人,1999)。在人体内,通过Treg细胞的高肿瘤浸润及更重要的效应物T(Teff)细胞与Treg细胞的低比率与多种癌症中的不良结果相关联(Shang等人,2015)。相反地,高Teff/Treg细胞比率与对人及小鼠两者的免疫疗法的有利反应相关联(Hodi等人,2008;Quezada等人,2006)。尽管如此,清除肿瘤中的Treg是复杂的,且此领域中的临床前及临床研究的结果是不一致的,这主要是由于难以鉴别对Treg具有特异性的靶标。

[0005] CD25为用于实现Treg清除的潜在的分子靶标之一。实际上,CD25(也被称为白介素-2高亲和力受体α链(IL-2Rα))在Treg细胞上以较高水平进行组成型表达,且其不存在于T效应细胞上或以较低水平表达在T效应细胞上并且因此是有前景的Treg清除靶标。IL-2/CD25相互作用已经是鼠类模型中的若干研究的目标,其中大多数涉及大鼠抗鼠CD25抗体PC61的使用(Setiady Y等人,2010.)。此抗体的CD25结合和功能性活性已与由不同作者产生的一组单克隆抗体的活性进行了比较(Lowenthal J.W等人,1985.;Moreau,J.-L等人;Volk HD等人,1989;Dantal J等人,1991)。虽然原始研究证实了PC61的预防活性而非治疗活性,但当前研究显示此抗-CD25抗体的Fc优化形式引起肿瘤内Treg清除且在数种鼠类肿瘤模型中提供明显的治疗效益(Vargas A等人,2017)。

[0006] 可利用的抗-CD25抗体(如PC61)阻断或抑制IL-2与CD25的结合,如同许多其他抗小鼠CD25抗体及大多数作为抗人CD25抗体被公开的抗体;参见例如WO2004/045512、WO

2006/108670、WO1993/011238、WO1990/007861及WO2017/174331。例如,巴利昔单抗(basiliximab)及达克珠单抗(daclizumab)是抑制IL-2与CD25结合的抗人CD25抗体,且已被开发用于减少T效应细胞的活化(Queen C等人,1989及Bielekova B,2013)。巴利昔单抗是当前被批准用于移植物抗宿主病的嵌合小鼠-人CD25抗体,而达克珠单抗是被批准用于治疗多发性硬化的人源化CD25抗体。

[0007] 一些其他抗-CD25抗体仍允许IL-2与CD25结合,如克隆7D4(抗-小鼠CD25)、克隆2E4(抗-小鼠CD25)、克隆MA251(抗-人CD25)或7G7B6(抗-人CD25)(即非阻断抗体)。伊诺莫单抗(Inolimomab)/BT536尽管据称不阻断IL-2与CD25结合,但其的确阻断经由CD25的IL-2信号传导。7D4是在PC61或具有类似结合性质的抗体存在下或在用PC61或具有类似结合性质的抗体治疗后被广泛用于检测CD25-阳性细胞的大鼠IgM抗-小鼠CD25抗体(Onizuka S等人,1999)。极少文献公开7D4-IgM抗体单独的或相较于PC61的任何功能性质(Kohm A等人,2006;Hallett W等人,2008;Fecci P等人,2006;McNeill A等人,2007;Setiady Y等人,2010;Couper K等人,2007.)。实际上,现有技术并未教导调适或在某种程度上修饰7D4的同种型或其他结构特征以便获得经改良的抗体,特别是可用于癌症治疗的抗体的可能性。尚未详细评估7D4-IgM(本身或作为经工程改造抗体)或被设计或特征为具有类似于7D4对小鼠CD25的CD25结合特征的任何抗-人CD25关于优化的Treg细胞清除的能力。

[0008] 如上文讨论的,Treg细胞在肿瘤中的浸润,并且特别是效应物Teff细胞与Treg细胞的低比率可产生不良的临床结果。CD25已被鉴别为Treg标志物并且因此可以是旨在清除Treg的治疗性抗体的目的靶标。重要地,CD25是IL-2的受体的α亚基且IL-2是Teff反应之关键细胞因子。目前为止已进行临床测试的抗-CD25抗体尽管清除Treg细胞,但也阻断经由CD25(具体地CD25/CD122/CD132复合物)的IL-2信号传导。本发明人目前已发现IL-2信号传导的此种阻断限制Teff反应且并且未阻断IL2信号传导的抗-CD25抗体可有效清除Treg细胞,同时仍允许IL-2刺激Teff细胞,从而提供展现较强抗癌作用的抗体。然而,由于大多数抗体是在非人动物例如小鼠中开发出来的,这些抗体的免疫原性活性可能不理想,限制其在人类治疗上的有效性。

[0009] 因此,需要提供针对用于人类而优化的抗体,特别是用于人类的抗-CD25抗体,该抗体不阻断CD25与IL-2结合或IL-2信号传导并清除Treg(尤其是肿瘤中的)且可用于治疗癌症的方法。

发明内容

[0010] 本发明提供新的抗-CD25抗体剂。在一些实施方案中,抗-CD25抗体剂是这样的抗体或其抗原结合片段或变体:特异性结合CD25,特别是人CD25,而不阻断白介素2(IL-2)与CD25结合或经由CD25的IL-2的信号传导,并且有效清除Treg,特别是在肿瘤中。

[0011] 在一些实施方案中,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体结合CD25而不阻断IL-2与CD25的结合或经由CD25的IL-2的信号传导。即,在一些实施方案中,相比不存在抗体的情况下的IL-2信号传导,抗-CD25抗体抑制小于50％的IL-2信号传导,或者备选地陈述为,相比于不存在抗-CD25抗体的情况下的信号传导水平,抗-CD25抗体允许响应于IL-2与CD25的结合的至少50％的IL-2信号传导。抗-CD25抗体因此被称为非阻断或非IL-2阻断抗-CD25抗体。

[0012] 惊人地发现不阻断IL-2结合或经由CD25的信号传导并清除Treg的抗-CD25抗体具有强的抗肿瘤作用,特别是比清除Treg但是阻断IL-2信号传导的抗-CD25抗体具有更强的抗肿瘤作用。所述抗体增加CD4+Teff/Treg和CD8+Teff/Treg比率。有效清除肿瘤浸润Treg细胞同时保留Teff细胞上的IL-2信号传导导致用于单独或与其他抗癌剂组合地治疗癌症的治疗方法。

[0013] 然而,本领域技术人员将理解本发明的教导不受限于提供的抗体或其抗原结合片段或变体的特定作用机制。提供的抗体的相关结构和/或功能特征描述于本文中并且不言而喻。

[0014] 在一些实施方案中,提供的抗-CD25抗体剂表征为与结合人CD25细胞外结构域中的特定表位相关的一种或多种特征,和/或使其特别适合于药物用途和/或制造。

[0015] 提供的技术,包括提供的抗-CD25抗体剂(例如,提供的抗体或其抗原结合片段或变体),包含其的组合物,和/或其用途,在医学中是有用的。在一些实施方案中,提供的这些技术可用于癌症治疗和/或预防。

[0016] 在一些实施方案中,提供的抗-CD25抗体剂被例示为包含以下序列的抗体:SEQ ID NO 1和SEQ ID NO4的序列、SEQ ID NO 1和SEQ ID NO 5的序列、SEQ ID NO 1和SEQ ID NO 6的序列、SEQ ID NO 1和SEQ ID NO 7的序列、SEQ ID NO 2和SEQ ID NO 4的序列、SEQ ID NO 2和SEQ ID NO 5的序列、SEQ ID NO 2和SEQ ID NO 6的序列、SEQ ID NO 2和SEQ ID NO 7的序列、SEQ ID NO 3和SEQ ID NO 4、或SEQ ID NO 3和SEQ ID NO 5的序列、SEQ ID NO 3和SEQ ID NO 6的序列、SEQ ID NO 3和SEQ ID NO7的序列,在本文中也分别指抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12。提及到本文的抗-CD25抗体剂,例如抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12,包括其片段以及包括亲和力成熟的变体在内的变体。

[0017] 分配给示例性抗-CD25抗体剂,特别是抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11和抗体12的SEQ ID NO如下:

[0018]

	VH	VL
抗体 1	1	4
抗体 2	1	5
抗体 3	1	6
抗体 4	1	7

	VH	VL
抗体 7	2	6
抗体 8	2	7
抗体 9	3	4
抗体 10	3	5

[0019]

抗体 5	2	4
抗体 6	2	5

抗体 11	3	6
抗体 12	3	7

[0020] 提供抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11和抗体12的抗原结合片段和功能性变体(包括亲和力成熟的变体)。例如,在一个实施方案中,提供这样的抗-CD25抗体剂:包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列作为重链可变区序列和/或包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列作为轻链可变区序列。

[0021] 在一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:

包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区。在一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂,其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区。

[0022] 在一些实施方案中,提供的抗-CD25抗体剂或其抗原结合片段或变体以10^{-7}M或以下的范围(例如10^{-8}或10^{-9}或10^{-10}或10^{-11}或10^{-12}或10^{-13}的范围或以下)的Kd结合人CD25。在一些实施方案中,提供的抗-CD25抗体剂(例如提供的抗体或其抗原结合片段,包括其变体和衍生物,如亲和力成熟的变体)以10^{-7}至10^{-10}或10^{-7}至10^{-9}的Kd值结合人CD25。

[0023] 提供的抗-CD25抗体剂(例如,提供的抗体或其抗原结合片段或变体)可以结合人CD25细胞外结构域。在一些实施方案中,提供的抗-CD25抗体剂可以结合CD25的表位(例如,当使用如本文中所述的或其他本领域中已知的一种或多种测定评估时),特别是被鉴定为aCD25ep-a和aCD25ep-b的表位。在一些实施方案中,提供的抗体或其抗原结合片段或变体可以以10^{-7}M范围或以下,例如10^{-8}或10^{-9}或10^{-10}或10^{-11}或10^{-12}或10^{-13}范围或以下的Kd值结合人和非人灵长类(例如食蟹猴(Cynomolgus Monkey))CD25(例如,结合人和/或食蟹猴CD25上的细胞外表位)。在一些实施方案中提供的抗-CD25抗体剂(例如提供的抗体或其抗原结合片段,包括其变体和衍生物,如亲和力成熟的变体)以10^{-7}至10^{-10}或10^{-7}至10^{-9}的Kd值结合人CD25。

[0024] 除了别的之外,本发明提供这样的方法:可用于鉴别和/或表征如本文中所述的特别有用的抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体)(例如,表征为特定结构和/或功能特征如特异性结合人CD25(例如,结合其细胞外表位)的抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体),影响如本文中所述的IL-2信号传导活性、如本文中所述的细胞毒性活性(例如,关于CD25阳性细胞如免疫调节细胞或表达CD25的癌细胞),及其组合)。在一些实施方案中,如本文中所述的特别有用的抗-CD25抗体被表征为多个此种特征。在一些实施方案中,本文中所述的一种或多种抗体可以被表征为抗-CD25抗体剂。

[0025] 因此,如本文中例示的,某些抗体和/或抗原结合片段被表征为此种理想的结构和/或功能特征;此种抗体和/或其抗原结合片段或变体在本文中可被称为抗-CD25抗体剂。

[0026] 本文中所述的抗体(和/或其抗原结合片段或变体)尤其可用于医学中(例如,用于治疗和/或预防,例如用于治疗癌症),和/或用于关于需要或涉及靶向人CD25细胞外结构域内的表位(如被鉴定为aCD25ep-a,(蛋白质序列YQCVQGYRALHRGP;Uniprot序列P01589中的氨基酸150-163)和aCD25ep-b(蛋白质序列SVCKMTHGKTRWTQP;Uniprot序列P01589中的氨基酸166-180)的表位)的方法。提供的抗体或其抗原结合片段或变体可以被制备成呈现最合适的同种型,特别是来自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型抗体组成的组的人同种型,更特别是人IgG1或人IgG2,优选人IgG1。

[0027] 在一个方面,本发明提供包含可变重链的抗体或其抗原结合片段,所述可变重链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列、SEQ ID NO:2的氨基酸序列或SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可进一步包含可变轻链,所述可变轻链包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列、SEQ ID NO:5的氨基酸序列、SEQ ID NO:6的氨基酸序列或SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段选自由以下各项组成的组:

[0030] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的可变轻链;

[0031] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的可变轻链;

[0032] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的可变轻链;

[0033] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的可变轻链;

[0034] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的可变轻链;

[0035] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的可变轻链;

[0036] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的可变轻链;

[0037] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的可变轻链;

[0038] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的可变轻链;

[0039] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的可变轻链;

[0040] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的可变轻链;和

[0041] -抗体或抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的可变重链和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的可变轻链。

[0042] 在一些实施方案中,本发明提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:

[0043] a.i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);和/或

[0044] ii)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);

[0045] b.i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);和/或

[0046] ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);

[0047] c.i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);和/或

[0048] ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);

[0049] d.i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);和/或

[0050] ii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);

[0051] e.i)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);和/或

[0052] ii)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其

亲和力成熟的变体)；

[0053] f.i)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)；和/或

[0054] ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)；

[0055] g.i)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)；和/或

[0056] ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)；

[0057] h.i)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)；和/

[0058] ii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)；

[0059] i.i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)；和/或

[0060] ii)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)；

[0061] j.i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)；和/或

[0062] ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、

至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);

[0063] k.i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);和/或

[0064] ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);

[0065] l.i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的重链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体);和/或

[0066] ii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体),或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的轻链可变区序列(或其变体,如其亲和力成熟的变体)。

[0067] 本发明的抗体的氨基酸序列可包括关于SEQ ID NO中提供的氨基酸序列的多个氨基酸置换。例如,这样的序列可包括在SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3内含有多达1个、多达2个、多达3个、多达4个或更多个氨基酸置换的序列作为重链可变区,和/或在SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7内含有多达1个、多达2个、多达3个、多达4个或更多个氨基酸置换的序列作为轻链可变区。呈现出这样的氨基酸序列元件和这样的取代的抗体仍可以呈现出本发明的抗体以及通常的抗CD25抗体剂的结合和/或功能特性。

[0068] 在一个实施方案中,本发明提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段或变体),其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有多达5个氨基

酸置换,并且相比于SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。在另一个实施方案中,提供抗-CD25抗体剂(即抗体或其抗原结合片段),其包含:包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗体或其抗原结合片段相比于SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换,并且相比于SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有多达5个氨基酸置换。

[0069] 本发明还提供本文所述的抗体的变体抗体或其抗原结合片段。本发明提供抗体或其抗原结合片段,其中抗体的轻链或重链中的任何DG基序可以被改变,例如以减少天冬氨酸异构化和/或其中抗体的轻链或重链中的任何NG基序可以被改变,例如以减少天冬酰胺脱酰胺化和/或其中抗体的轻链或重链中的任何甲硫氨酸可以被改变,例如以减少甲硫氨酸氧化。例如,DG基序可以被改变以将基序中的一个或两个氨基酸置换成不同的氨基酸。NG基序可以被改变以将基序中的一个或两个氨基酸置换成不同的氨基酸。例如,此种基序可以被突变成EG、DQ或DA。甲硫氨酸残基可以被改变以将其替换成不同的氨基酸,例如亮氨酸或苯丙氨酸。

[0070] 在一些实施方案中,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体可以是,或可以来源于,例如,包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:4的序列的抗体(例如抗体1)、包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5的序列的抗体(例如抗体2)、包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:6的序列的抗体(例如抗体3)、包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:7的序列的抗体(例如抗体4)、包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的序列的抗体(例如抗体5)、包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:5的序列的抗体(例如抗体6)、包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:6的序列的抗体(例如抗体7)、包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:7的序列的抗体(例如抗体8)、包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的序列的抗体(例如抗体9)、包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5的序列的抗体(例如抗体10)、包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:6的序列的抗体(例如抗体11)、或包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:7的序列的抗体(例如抗体12)。包括亲和力成熟的变体在内的变体抗-CD25抗体提供具有抗体的任意并且可能地全部结合和功能性质的另外的抗体。例如,变体抗-CD25抗体是非IL-2阻断抗体。

[0071] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体或其片段可以在获得最终的序列前进行修饰(例如亲和力成熟)。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,提供变体抗体,其具有如本文公开的任何抗体的重链可变和轻链可变(例如,如本文所述的抗体1的可变重链和可变轻链、抗体2的可变重链和可变轻链、抗体3的可变重链和可变轻链、抗体4的可变重链和可变轻链、抗体5的可变重链和可变轻链、抗体6的可变重链和可变轻链、抗体7的可变重链和可变轻链、抗体8的可变重链和可变轻链、抗体9的可变重链和可变轻链、抗体10的可变重链和可变轻链、抗体11的可变重链和可变轻链或抗体12的可变重链和可变轻链),但是与给定序列的不同之处在于CDR中的至少一个或至少两个DG或NG基序(如果存在)或甲硫氨酸残基(如果存在)已被改变为不同基序。可以如针对其它抗-CD25抗体剂所述那样以相同方式使用和配制公开的变体抗体。

[0073] 本发明还提供亲和力成熟的抗体,例如来源于任何本文中公开的抗体的亲和力成熟的变体。在一个实施方案中,亲和力成熟的抗体是这样的亲和力成熟的抗体:进一步被改变以去除任何DG基序和/或NG基序或使任何DG基序和/或NG基序突变,以及被改变以去除任何甲硫氨酸残基或使任何甲硫氨酸残基突变。

[0074] 在一些实施方案中,本发明提供抗-CD25抗体的亲和力成熟的变体。在一些实施方案中,本发明提供制备抗-CD25抗体的方法,所述方法包括提供如本文中所述的抗体(例如,抗体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12或其抗原结合片段或变体),和使抗体进行亲和力成熟,其中制备的抗体以比亲本抗体更大的亲和力结合CD25。优选地制备的抗体以比亲本抗体结合CD25大至少20%、至少30%、至少40%、更优选地至少50%的亲和力结合CD25,例如如通过Kd测量的。

[0075] 例如,本发明提供制备亲和力成熟的抗体的方法,所述方法包括:

[0076] a.提供包含SEQ ID NO:1的重链可变序列和SEQ ID NO:4的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20%的亲和力结合CD25;

[0077] b.提供包含SEQ ID NO:1的重链可变序列和SEQ ID NO:5的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20%的亲

和力结合CD25；

[0078] c.提供包含SEQ ID NO:1的重链可变序列和SEQ ID NO:6的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25；

[0079] d.提供包含SEQ ID NO:1的重链可变序列和SEQ ID NO:7的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25；

[0080] e.提供包含SEQ ID NO:2的重链可变序列和SEQ ID NO:4的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25；

[0081] f.提供包含SEQ ID NO:2的重链可变序列和SEQ ID NO:5的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25；

[0082] g.提供包含SEQ ID NO:2的重链可变序列和SEQ ID NO:6的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25；

[0083] h.提供包含SEQ ID NO:2的重链可变序列和SEQ ID NO:7的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25；

[0084] i.提供包含SEQ ID NO:3的重链可变序列和SEQ ID NO:4的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25；

[0085] j.提供包含SEQ ID NO:3的重链可变序列和SEQ ID NO:5的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25；

[0086] k.提供包含SEQ ID NO:3的重链可变序列和SEQ ID NO:6的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25；

[0087] l.提供包含SEQ ID NO:3的重链可变序列和SEQ ID NO:7的轻链可变序列的亲本抗体,并使该抗体经历亲和力成熟,其中亲和力成熟的抗体以比亲本抗体高至少20％的亲和力结合CD25。

[0088] 测量亲和力的方法是本领域中已知的并且描述于以下实施例中。通过此种方法制备的亲和力成熟的抗体可以如本文中针对其他抗-CD25抗体剂所述的那样被配制和使用。

[0089] 亲和力成熟可以根据技术人员已知的任何合适的方法进行。例如,体外抗体展示系统被广泛用于生产具有高亲和力的特定抗体。在这些系统中,表型(即,抗体片段)与基因型(即,抗体基因)相结合,从而允许直接确定抗体的序列。已开发出若干系统用于实现抗体库的展示以允许随后对粘合剂的选择以及通过提高选择的严格性允许选择越来越高的亲和力变体。抗体片段可以在酵母、核糖体、噬菌体展示颗粒中或通过直接与DNA偶联而表达。

[0090] 目前的抗体亲和力成熟方法属于两个诱变类别:随机的和非随机的。易错聚合酶

链反应(PCR)、突变菌株和饱和诱变是随机诱变方法的典型实例。非随机技术通常使用丙氨酸扫描或定点诱变以产生特定变体的有限集合。此外,用以获得亲本抗体的重组变体的重组方法也可被用于进一步提高抗体亲和力。

[0091] 因此,在本发明的一个实施方案中,亲和力成熟的方法选自由以下各项组成的组:随机诱变(例如易错聚合酶链反应(PCR)、突变菌株或饱和诱变)、非随机诱变(例如丙氨酸扫描或定点诱变)、重组(例如DNA重组、链重组或CDR重组)和使用CRIPR-Cas9系统来引入修饰。

[0092] 亲和力成熟方法描述于例如Rajpal等人,Proc Natl Acad Sci USA,2005,102(24):8466-71,Steinwand等人,MAbs,2014,6(1):204-18,以及Handbook of Therapeutic Antibodies,Wiley,2014,第6章,Antibody Affinity(第115-140页)中。

[0093] 在一些实施方案中,提供制备药物组合物的方法,所述方法包括提供根据以上方法(即用于通过亲和力成熟制备抗体)制备的抗体以及将所述抗体与至少一种或多种药学上可接受的赋形剂共同配制。用于制备药物组合物的抗体可以是抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12的亲和力成熟的变体。通过此种方法制备的药物组合物可用于本发明的治疗方法,如本文中针对其他抗-CD25抗体剂所述的。

[0094] 还提供通过以上方法获得或可获得的亲和力成熟的抗体和药物组合物。

[0095] 如本文中所述的特异性结合CD25的抗体和/或抗原结合片段可以多种形式中的任一种提供。例如,在一些实施方案中,合适的形式可以是或包含:单克隆抗体,结构域抗体,单链抗体,Fab片段,F(ab')2片段,单链可变片段(scFv),scFv-Fc片段,单链抗体(scAb),适配体或纳米抗体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段或变体(特别是单克隆抗体)可以是人源化或完全人抗体或其抗原结合片段或变体。

[0096] 在一些实施方案中,提供的抗体或其抗原结合片段或变体可以属于IgG、IgA、IgE或IgM同种型(优选人同种型),如其可最适合于给定用途。在一些实施方案中,提供的抗体或其抗原结合片段或变体是IgG同种型,更特别是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。(在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段或变体来自人IgG1亚类。在另一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段或变体来自人IgG2亚类)。

[0097] 在一些实施方案中,提供的抗体或其抗原结合片段或变体作为多特异性结合剂的部分而提供,如例如,当需要将另外的结合和/或功能部分与抗-CD25抗体剂如抗体1氨基酸序列、抗体2氨基酸序列、抗体3氨基酸序列、抗体4氨基酸序列、抗体5氨基酸序列、抗体6氨基酸序列、抗体7氨基酸序列、抗体8氨基酸序列、抗体9氨基酸序列、抗体10氨基酸序列、抗体11氨基酸序列或抗体12氨基酸序列结合时,分离的抗体或抗原结合片段可被包含在双特异性抗体、多特异性抗体或本领域中可用的其他多特异性形式中。

[0098] 在一些实施方案中,提供的抗-CD25抗体剂包含CD25结合实体(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体,如本文所述)和缀合的有效载荷如治疗剂或诊断剂。在许多此种实施方案中,所述药剂被认为和/或被称为“免疫缀合物”。可用于产生特定的免疫缀合物如抗体-药物的技术和化合物的实例公开于文献(Beck A等人,2017)中且经描述为适用于若干已知抗-CD25抗体(O'Mahony D等人,2008;Oh等人,2017;Kreitman RJ等人,2016;Flynn MJ等人2016)。

[0099] 在一些实施方案中,本文所述的抗-CD25抗体或抗原结合片段特异性结合人CD25的表位,其中所述表位包括包含在SEQ ID NO:8的氨基酸150-163和/或SEQ ID NO:8的氨基酸166-180中的一个或多个氨基酸残基。优选地,所述表位包含至少4个氨基酸,其中所述表位包括包含在SEQ ID NO:8的氨基酸150-163和/或SEQ ID NO:8的氨基酸166-180中的一个或多个氨基酸。优选地,所述表位包含至少5个氨基酸、至少6个氨基酸、至少7个氨基酸、至少8个氨基酸、至少9个氨基酸、至少10个氨基酸、至少11个氨基酸、至少12个氨基酸、至少13个氨基酸或至少14个或更多个氨基酸,其中所述表位包括包含在SEQ ID NO:8的氨基酸150-163和/或SEQ ID NO:8的氨基酸166-180中的一个或多个氨基酸。所述表位可以是线型的或构象的,即不连续的。在一些实施方案中,抗-CD25抗体或抗原结合片段特异性结合人CD25的表位,其中所述表位包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个或至少14个或更多个包含在SEQ ID NO:8的氨基酸150-163和/或SEQ ID NO:8的氨基酸166-180中的氨基酸残基。在一些实施方案中,抗-CD25抗体或抗原结合片段结合包含SEQ ID NO:8的氨基酸150-163(蛋白质序列YQCVQGYRALHRGP(SEQ ID NO:9);Uniprot序列P01589中的氨基酸150-163)和SEQ ID NO:8的氨基酸166-180(蛋白质序列SVCKMTHGKTRWTQP(SEQ ID NO:10);Uniprot序列P01589中的氨基酸166-180)的表位。

[0100] 在一些实施方案中,本发明提供编码分离的抗体或其抗原结合片段的核酸分子,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含抗-CD25抗体剂,如抗体1氨基酸序列(即SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:4)、抗体2氨基酸序列(即SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5)、抗体3氨基酸序列(即SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:6)、抗体4氨基酸序列(即SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:7)、抗体5氨基酸序列(即SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4)、抗体6氨基酸序列(即SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:5)、抗体7氨基酸序列(即SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:6)、抗体8氨基酸序列(即SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:7)、抗体9氨基酸序列(即SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4)、抗体10氨基酸序列(即SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5)、抗体11氨基酸序列(即SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:6)或抗体12氨基酸序列(即SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,此种提供的核酸分子可含有经密码子优化的核酸序列,和/或可包括于适当的核酸载体内的表达盒中以用于表达于宿主细胞如例如细菌、酵母、昆虫、鱼类、鼠类、猴或人细胞中。

[0101] 在一些实施方案中,本发明提供包含异源核酸分子(例如,DNA载体)的宿主细胞,其表达具有例如如本文所述的抗-CD25抗体剂(例如,包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11和抗体12氨基酸序列的抗体)的一个或多个性质的提供的抗-CD25抗体剂(例如,抗体或其抗原结合片段或变体)。在一些实施方案中,本发明提供制备抗-CD25抗体剂(例如,抗体或其抗原结合片段或片段)的方法,该抗-CD25抗体剂具有例如如本文所述的抗-CD25抗体剂(例如,包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11和抗体12氨基酸序列的抗-CD25抗体剂)的一个或多个性质。在一些实施方案中,本发明提供制备具有例如如本文所描述的抗-CD25抗体剂(例如,包含aCD25-a-686氨基酸序列)的一种或多种性质的抗-CD25抗体剂(例如,抗体或其抗原结合片段)的方法。在一些实施方案中,此种方法可包含培养宿主细胞,该宿主细胞包含核酸(例如,可包含和/或经由载体递送至宿主细胞的异源核酸)。在一些实施方案中,此宿主细胞(和/或异源核酸序列)被配置和建构成使得抗-CD25抗体剂(例如,抗体或其抗

原结合片段或变体)自宿主细胞分泌(例如,使得其可自细胞培养上清液分离)和/或暴露于细胞表面上(例如,如果这样的抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11和抗体12氨基酸序列、及序列元件意欲用于此种细胞或与此种细胞一起使用,如在人工T细胞受体中将单克隆抗体的特异性移植至T细胞上)。

[0102] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以是去岩藻糖化的。众所周知抗体糖基化可能对抗体(例如,单克隆抗体、重组抗体和/或以其他方式改造或分离的抗体)及Fc融合蛋白的活性、药代动力学及药效学具有影响且可利用特定技术以获得具有所需糖基化特征的抗体(Liu L,2015)。可使用降低抗体岩藻糖基化水平的方法来增强支持用于根据本发明的用途的抗体(例如,如本文所描述的抗-CD25抗体,包括例如可以是或被描述为抗-CD25抗体剂的抗体)的细胞毒性的效应物功能。可例如通过使用用于经基因工程改造且不具有或具有降低的岩藻糖基化能力的细胞系的技术表达本文所述的该抗体的序列(其中一些是可商购的,如Potelligent(Lonza)、GlyMAXX(ProBiogen)、由Evitria提供的那些),或通过操控制造方法,例如通过控制摩尔渗透压浓度和/或使用酶抑制剂(也参见例如描述于EP2480671中的方法),来产生呈现此种性质的包含特定序列元件的抗体。

[0103] 在一些实施方案中,本发明提供组合物(例如,药物组合物),其包含具有如本文所述的所需性质的提供的抗体或其抗原结合片段或变体。在一些实施方案中,此种提供的组合物意在用于和/或被用于医学用途,如治疗性、诊断性或预防性用途。在一些实施方案中,此种提供的组合物可进一步包含药学上可接受的载体或赋形剂和/或可用于治疗癌症。在一些实施方案中,可用一种或多种载体、赋形剂、盐、缓冲剂等来配制药物组合物,如本领域中已知的。本领域技术人员将意识到并且能够容易地利用多种配制技术,包括对给定方法和/或施用位置可能是特别理想的和/或有用的,例如用于肠胃外(例如,皮下、肌肉内或静脉内注射)、黏膜、瘤内、瘤周、经口或局部施用。在许多实施方案中,提供的药物组合物(包含如本文所述的抗-CD25抗体剂(例如抗-CD25抗体或其抗原结合部分))被配制成用于肠胃外递送(例如通过注射和/或输注)。在一些实施方案中,此种提供的药物组合物可例如以预装注射器或瓶形式提供。在一些实施方案中,此种提供的药物组合物可例如以干燥(例如,冻干)形式提供和/或利用;备选地,在一些实施方案中,此种提供的药物组合物可以液体形式(例如,作为溶液、悬浮液、分散体、乳液等)、以凝胶形式等提供和/或利用。

[0104] 在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体)和/或包含其的组合物在治疗癌症和/或制备用于治疗癌症的药物中的用途,所述癌症诸如B细胞恶性肿瘤、淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkins Lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞白血病、骨髓瘤)、骨髓增生病症、实体瘤(如乳腺癌、鳞状细胞癌、结肠癌、头颈癌、肺癌、泌尿生殖癌、直肠癌、胃癌、肉瘤、黑素瘤、食道癌、肝癌、睾丸癌、宫颈癌、肥大细胞瘤、血管瘤、眼癌、喉癌、口腔癌、间皮瘤、皮肤癌、直肠癌、喉癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、非小细胞肺癌、肾癌、脑癌及卵巢癌)。癌症也可基于特定肿瘤相关标志物及抗原的存在来定义,所述标志物及抗原如CD20、HER2、PD-1、PD-L1、SLAM7F、CD47、CD137、CD134、TIM3、CD25、GITR、CD25、EGFR等,或已鉴别为具有被称为高度微卫星不稳定性(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR)的生物标志物的癌症。另外,当定义上述癌症如原位癌症、郁结性骨髓瘤、未确定显著性的单克隆丙种球蛋白病、宫颈上皮

内瘤形成、MALTomas/GALTomes及多种淋巴增生病症的癌前、非侵入状态时,也可考虑此种条件。优选地,在一些实施方案中,被治疗的对象患有实体瘤。

[0105] 因此,在一些实施方案中,本发明提供治疗对象的癌症的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的组合物,所述组合物包含如本文所述的提供的抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体)(例如,包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12氨基酸序列)。优选地,在一些实施方案中,对象患有实体瘤。

[0106] 因此,在一些实施方案中,本发明提供清除对象的调节性T细胞的方法,所述方法包括以下步骤:向对象施用有效量的组合物,所述组合物包含如本文所述的提供的抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体)(例如,抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12氨基酸序列)。在一个实施方案中,对象患有实体瘤。在一个实施方案中,对象患有血液癌。

[0107] 在一些实施方案中,提供的方法可进一步包括同时或以任何次序相继向对象施用至少一种另外的药剂或疗法(即,使得对象接受组合疗法)。在一些实施方案中,此至少一种另外的药剂或疗法可以是或包含抗癌药物(例如,化学治疗剂)、放射疗法(通过将辐射外部地应用于身体或通过施用放射缀合的化合物)、抗肿瘤抗原或标志物抗体(抗原或标志物为例如CD4、CD38、CA125、PSMA、c-MET、VEGF、CD137、VEGFR2、CD20、HER2、HER3、SLAMF7、CD326、CAIX、CD40、CD47或EGF受体)、检查点抑制剂或免疫调节抗体(例如,靶向PD-1、PD-L1、TIM3、CD38、GITR、CD134、CD134L、CD137、CD137L、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、B7RP1、LAG3、ICOS、TIM3、GAL9、CD28、AP2M1、SHP-2、OX-40、VISTA、TIGIT、BTLA、HVEM、CD160等的抗体)、疫苗(具体地,癌症疫苗,例如GVAX)、佐剂、标准使用方案、靶向癌细胞或刺激对癌细胞的免疫反应的一或多种其他化合物,或其任何组合。优选地,该另外的药剂为免疫检查点抑制剂,如PD-1拮抗剂,例如抗-PD-1抗体或抗-PD-L1抗体。在某些特定实施方案中,当此至少一种另外的药剂或疗法是或包含抗体时,此类抗体的形式和/或由此类抗体靶向的抗原可选自文献中列出的那些并且可能适用于给定癌症(Sliwkowski M&Mellman I,2013;Redman JM等人,2015;Kijanka M等人,2015)。此类抗原及对应抗体包括(但不限于):CD22(博纳吐单抗(Blinatumomab))、CD20(利妥昔单抗(Rituximab)、托西莫单抗(Tositumomab))、CD56(洛瓦土珠单抗(Lorvotuzumab))、CD66e/CEA(拉贝珠单抗(Labetuzumab))、CD152/CTLA-4(伊派利单抗(Ipilimumab))、CD221/IGF1R(MK-0646)、CD326/Epcam(依决洛单抗(Edrecolomab))、CD340/HER2(曲妥珠单抗(Trastuzumab)、帕妥珠单抗(Pertuzumab))及EGFR(西妥昔单抗(Cetuximab)、帕尼单抗(Panitumumab))。在实施方案中,当至少一种另外的药剂或疗法是化学治疗剂时,该化学治疗剂可以是本领域中已知用于癌症疗法的那些化学治疗剂。此类化学治疗剂包括但不限于烷基化剂、蒽环霉素、埃博霉素、亚硝基脲、乙烯亚胺/甲基三聚氰胺、烷基磺酸酯、烷化剂、抗代谢物、嘧啶类似物、表鬼臼毒素(epipodophylotoxin)、酶如L-天冬酰胺酶;生物反应调节剂如IFNα、IFN-γ、IL-2、IL-12、G-CSF及GM-CSF;铂配位化合物如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)及卡铂(carboplatin)、蒽二酮(anthracenedione)、取代的脲如羟基脲(hydroxyurea)、甲基肼衍生物(包括N-甲基肼(MIH)及丙卡巴肼(procarbazine))、肾上腺皮质抑制剂如米托坦(mitotane)(o,p'-DDD)及氨鲁米特(aminoglutethimide);激素及拮抗剂,包括肾上腺皮质

类固醇拮抗剂如强的松(prednisone)及等效物、地塞米松(dexamethasone)及氨鲁米特;孕激素如己酸羟基孕酮、乙酸甲羟孕酮及乙酸甲地孕酮;雌激素如己烯雌酚及乙炔基雌二醇等效物;抗雌激素如他莫昔芬(tamoxifen);雄激素,包括丙酸睾酮及氟甲睾酮/等效物;抗雄激素如氟他胺、促性腺激素释放激素类似物及亮丙立德(leuprolide);非甾体抗雄激素如氟他胺;靶向TGFβ途径的分子、吲哚胺脱氧酶(indoleamine deoxigenase,IDO)、精氨酸酶和/或CSF1R;PARP抑制剂如奥拉帕尼(olaparib)、维利帕尼(Veliparib)、依尼帕瑞(Iniparib)、如卡帕瑞(Rucaparib);及MET抑制剂如提瓦替尼(tivantinib)、弗雷替尼(foretinib)、格瓦替尼(golvatinib)、卡博替尼(cabozantinib)及克卓替尼(crizotinib)。

[0108] 进一步,本发明提供多种试剂盒或制品,所述试剂盒或制品含有如本文中所述的提供的抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体)(例如包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12氨基酸序列)或允许此种分离的抗体或抗原结合片段的施用、存储或其他用途的相关组合物。在一些实施方案中,提供的试剂盒包含容器、注射器、小瓶或其他包含此种组合物的容器,任选地与一种或多种制品、稀释剂、试剂、固相和/或用于正确使用试剂盒的使用说明在一起。

[0109] 在一些实施方案中,用于特定用途如医学用途,并且特别是用于治疗癌症的如本文中所述的特定抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体)(例如包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12氨基酸序列)的鉴定、表征和/或验证可以通过使用如本文中所述的一种或多种测定或系统来进行。在一些实施方案中,此种鉴定、表征和/或验证可以涉及在一种或多种基于细胞的测定中分析活性,例如使用不同的实验设定和/或所选的组(例如,癌症衍生细胞系)。在一些实施方案中,特别给出所提议的免疫机制相关的某些所需的如本文所述的抗-CD25抗体剂活性,所需鉴定、表征和/或验证可涉及收集动物模型中产生的相关数据,其中癌症被诱导或其中癌细胞作为异种移植物或作为同基因型/同种异体癌症衍生的细胞而被移植。备选地或另外,在一些实施方案中,可利用动物模型,其涉及传送人细胞如PBMC(即人源化PBMC小鼠模型)或CD34+造血干细胞单独(即CD34+人源化小鼠)或CD34+造血干细胞连同肝及胸腺(例如,NSG-BLT小鼠)以允许评估模型系统内的人免疫细胞上的抗-CD25抗体剂的活性。

[0110] 在一些实施方案中,可将如本文所述的抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体)(例如,包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12氨基酸序列)的相关序列克隆到于药学和/或技术原因更适当或所需的抗体骨架的背景中和/或在其中表达。例如,此类序列(可能如经密码子优化的VH和VL编码序列)可与人IgG1恒定区(hIgG1)一起克隆并使用适当的抗体表达载体和细胞系(如CHO衍生细胞系,例如CHO-S)表达。在一些特定实施方案中,可在细胞裂解物中的还原条件及上清液中的非还原性条件下转染后分析人IgG1形式抗体中的提供的抗体序列的表达及分泌,该细胞裂解物和上清液稍后将用于纯化抗体(通过亲和层析、凝胶过滤和/或其他适当的技术)。可例如通过使用下文实施例中描述的一或多种测定来分析人IgG1形式的提供的抗-CD25抗体序列(例如,抗-CD25抗体剂-hIgG1)的结合和/或其他功能性质。例如,可例如使用流式细胞术针对结合人及食蟹猴PBMC或纯化的Treg或活体外衍生的Treg或CD25阳性细胞系(如SU-DHL-1或Karpas299)来评估此类hIgG1形式的提供的抗体。

[0111] 另外,可评定如本文所述的一或多种抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体)(例如,包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12的氨基酸序列或以其他方式包括本文中描述为抗-CD25抗体剂-如抗-CD25抗体剂-hIgG1的药剂的结构和/或功能性质)对自健康人供体和/或患者分离的人原代肿瘤细胞和/或免疫细胞(包括调节性T细胞)的效果。为研究抗-CD25抗体剂的潜在效果,抗体可被用于处理PBMC和/或自肿瘤(和/或器官,如淋巴结)和/或肿瘤外植体或其他3D类器官分离的细胞,和/或纯化的或体外产生的调节性T细胞或其他CD25阳性细胞,如一些NK细胞或树突细胞。潜在读数包含CD25阳性细胞存活率、消除和/或细胞凋亡、肿瘤细胞杀伤、效应免疫细胞增殖及功能(例如,颗粒酶B产生、细胞毒性活性、脱粒)、抗原特异性反应(如例如通过响应于抗原的增殖、脱粒或细胞因子产生测量的)。备选地或另外,小鼠或非人灵长类动物可被治疗且可在血液样本(作为全血或分离的PBMC进行分析的)中或在自动物分离各种器官和/或细胞后通过例如流式细胞术或免疫组化追踪细胞状态。

[0112] 备选地或另外,可通过研究此类抗-CD25抗体剂对表达CD25的细胞(例如,Treg或表达CD25的癌细胞)的效果单独地或组合地评估如本文所述的抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体)(例如,这样的抗体:包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12的氨基酸序列;或以其他方式包括本文中描述为抗-CD25抗体剂-如抗-CD25抗体剂-hIgG1的药剂的结构和/或功能性质)的一种或多种性质。读数可包括细胞杀伤、细胞凋亡、细胞内信号传导监测(例如,Stat-5磷酸化)、对IL-2结合CD25及信号传导(例如,Stat-5磷酸化或IL-2受体下游的其他信号传导)的影响及IL-2依赖性功能活性(例如,增殖及细胞因子产生)。当向食蟹猴或相关小鼠模型施用aCD25抗体剂-hIgG1抗体时,可接着追踪抗体的体内细胞效果。

[0113] 为获得对于提供的抗-CD25抗体剂与人CD25之间的分子相互作用的进一步的了解,可测定抗-CD25抗体剂(例如,抗体1-hIgG1抗体、抗体2-hIgG1抗体、抗体3-hIgG1抗体、抗体4-hIgG1抗体、抗体5-hIgG1抗体、抗体6-hIgG1抗体、抗体7-hIgG1抗体、抗体8-hIgG1抗体、抗体9-hIgG1抗体、抗体10-hIgG1抗体、抗体11-hIgG1抗体或抗体12-hIgG1抗体)及人CD25蛋白质的晶体结构。可通过可溶性研究、加速压力研究、冻融研究和正式稳定性研究来评估提供的抗-CD25抗体剂(尤其包括例如抗体1-hIgG1抗体、抗体2-hIgG1抗体、抗体3-hIgG1抗体、抗体4-hIgG1抗体、抗体5-hIgG1抗体、抗体6-hIgG1抗体、抗体7-hIgG1抗体、抗体8-hIgG1抗体、抗体9-hIgG1抗体、抗体10-hIgG1抗体、抗体11-hIgG1抗体或抗体12-hIgG1抗体)的可溶性和/或稳定性。可通过目视检查、尺寸排阻层析及动态光散射以及$OD_{280/320}$吸光度来追踪抗体的聚集。

附图说明

[0114] 图1:抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11和抗体12的相关蛋白序列。重链序列(A)-SEQ ID NO:1,(B)-SEQ ID NO:2,(C)-SEQ ID NO:3。轻链序列(D)-SEQ ID NO:4,(E)-SEQ ID NO:5,(F)-SEQ ID NO:6,(G)-SEQ ID NO:7。针对每条链的推定CDR带下划线(Kabat定义)。

[0115] 图2:人CD25的共有序列(Uniprot编码P01589)(SEQ ID NO:8)。对应于氨基酸22-240的成熟CD25的胞外结构域带下划线。指出了预先鉴别的抗体的表位aCD25ep-a和

aCD25ep-b的位置。

[0116] 图3:抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11和抗体12以渐增的抗体浓度结合表达于Karpas 299细胞上的CD25且与人IgG1同种型对照比较的表征。

[0117] 图4:在Biacore 2000上对纯化的带his标签的针对rhCD25的抗体(IgG1)进行的基于SPR的分析。(A)抗体1,(B)抗体2,(C)抗体3,(D)抗体4,(E)抗体5,(F)抗体6,(G)抗体7,(H)抗体8,(I)抗体9,(J)抗体10,(K)抗体11和(L)抗体12。

[0118] 图5:Octet中的竞争测定。将第一Ab(抗体10)结合固定的rhCD25,随后结合第二Ab达利珠单抗(A)或巴利昔单抗(B)。

[0119] 图6:抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11和抗体12与人IgG1同种型对照、达利珠单抗-Hyp或不存在一抗相比的关于在使用人源的PBMC的STAT5磷酸化分析中阻断IL-2信号传导的表征。将细胞与10μg/ml抗体一起孵育,随后与浓度逐渐增大的IL-2孵育(如附图中所示)。分析限于CD3-阳性细胞磷酸化STAT5的百分比。

[0120] 图7:抗体10与抗人CD25 Fc沉默的对照抗体相比的关于在报告物生物测定中诱导ADCC的功能特征。在不同浓度抗体的存在下,将表达SR-786细胞的CD25与经基因工程改造以表达Fc γ RIIIa和驱动萤光素酶表达的NFAT反应元件(NFAT-RE-luc2)的Jurkat T细胞一起共培养(如图式中展示)。

[0121] 图8:抗体10与抗人CD25 Fc沉默的对照抗体相比较的关于在ADCP测定中体外分化的Treg细胞的吞噬作用的功能特征。在不同浓度抗体的存在下将Treg与MCSF分化的巨噬细胞一起共培养(如图式中展示)。用CD14+染色的巨噬细胞及eFluor450-染料标记的Treg进行两种颜色流式细胞分析。残余靶细胞定义为eFluor450-染料$^{+}$/CD14^{-}的细胞。双重标记的细胞(eFluor450-染料$^{+}$/CD14^{+})被认为表示巨噬细胞对靶标的吞噬作用。靶细胞的吞噬作用通过以下等式计算:吞噬作用%=100×[(双阳性%)/(双阳性%+残余靶标%)]。

[0122] 图9:抗体2(A)和抗体11(B)与抗人CD25 Fc沉默的对照抗体相比的关于在ADCP测定中体外分化的Treg细胞的噬菌作用的功能表征。在不同浓度抗体的存在下将Treg与MCSF分化的巨噬细胞一起共培养(如附图所示)。用CD14+染色的巨噬细胞及eFluor450-染料标记的Treg进行两种颜色流式细胞分析。残余靶细胞定义为eFluor450-染料$^{+}$/CD14^{-}的细胞。双重标记的细胞(eFluor450-染料$^{+}$/CD14^{+})被认为表示靶标通过巨噬细胞进行的噬菌作用。靶细胞的噬菌作用通过以下等式计算:噬菌作用%=100×[(双阳性%)/(双阳性%+残余靶标%)]。

[0123] 图10:评估仅7D4 mIgG2a(抗小鼠CD25非-IL-2阻断,Treg清除抗体)(D)与IL-2中和抗体(E)或IL-2阻断抗体(F)组合在雌性BALB/c小鼠中在携带CT26同基因型结肠肿瘤的小鼠中的治疗活性。测试小鼠IgG2a对照(A)、仅IL-2中和抗体(B)及仅IL-2阻断抗体(C)的活性以用于比较。

具体实施方式

[0124] 下文提供本文中所使用的术语、技术方式及实施方案的一些定义,其中的多数或大部分按本领域技术人员的通常理解。

[0125] 施用:如本文中所使用,术语“施用”是指向对象施用组合物。可通过任何适当途径向动物对象(例如人)施用。例如,在一些实施方案中,施用可为支气管(包括通过支气管滴注)、经颊、经肠、动脉内、皮内、胃内、髓内、肌肉内、鼻内、腹膜内、鞘内、静脉内、心室内、在特定器官或组织内(例如,肝内、肿瘤内、瘤周等)、经黏膜、经鼻、经口、经直肠、皮下、舌下、局部、气管(包括气管内滴注)、经皮、经阴道及经玻璃体。施用可以涉及间断的用药。备选地,施用可以涉及连续用药(例如,灌注)持续至少选定的时段。如本领域中已知的,抗体疗法通常肠胃外施用,例如通过静脉内、皮下或瘤内注射施用(例如,尤其当肿瘤内需要较高剂量时)。

[0126] 药剂:如本文中所使用,术语“药剂”可指任何化学品类别的化合物或实体,包括例如多肽、核酸、醣类、小分子、金属或其组合。可根据本发明使用的药剂的具体实施方案包括小分子、药物、激素、抗体、抗体片段、适体、核酸(例如,siRNA、shRNA、反义寡核苷酸、核酶)、肽、肽模拟物等。药剂可以是或包含聚合物。

[0127] 抗体:如本文中所使用,术语“抗体”是指包括典型免疫球蛋白序列元件的多肽,所述元件足以赋予与特定靶抗原如CD25,特别是人CD25和人CD25胞外结构域的特异性结合。如本领域中已知的,天然产生的完整抗体为大致150kD的四聚药剂,其由彼此缔合为常称为“Y形”结构的两条相同重链多肽(各自约50kD)及两条相同轻链多肽(各自约25kD)组成。各重链包含至少四个结构域(各自约110个氨基酸长):氨基末端可变(VH)结构域(位于Y结构的顶端处),之后是三个恒定结构域:CH1、CH2及羧基末端CH3(位于Y的主干的底部处)。被称为“转换(switch)”的短区连接重链可变区及恒定区。“铰链”将CH2及CH3结构域连接至抗体的其余部分。此铰链区中的两个二硫键使完整抗体中的两个重链多肽彼此连接。各轻链包含两个结构域,一个氨基末端可变(VL)结构域,之后是一个羧基末端恒定(CL)结构域,其彼此由另一个“转换”隔开。完整抗体四聚体包含两个重链-轻链二聚体,其中所述重链及轻链通过单个二硫键彼此连接;另外两个二硫键使重链铰链区彼此连接,使得二聚体彼此连接且形成四聚体。天然产生的抗体也被糖基化,典型地在CH2结构域上,且各结构域具有被表征为“免疫球蛋白折叠”的结构,所述免疫球蛋白折叠由在压缩的反平行β筒中彼此相对叠放的两个β片层(例如,3股、4股或5股片层)形成。各可变结构域含有被称为“互补决定区”(CDR1、CDR2及CDR3;如本领域中理解的,例如根据Kabat编号方案确定的)的三个高变环及四个在某种程度上不变的“骨架”区(FR1、FR2、FR3及FR4)。当天然抗体折叠时,FR区形成为结构域提供结构骨架的β片层,且使来自重链及轻链两者的CDR环区在三维空间中结合在一起以使得其产生位于Y结构顶端处的单个高变抗原结合位点。天然存在的抗体的Fc区结合补体系统的元件,并且也结合效应细胞,包括例如介导细胞毒性的效应细胞上的受体。如本领域中已知的,Fc受体的Fc区的亲和力和/或其他结合属性可通过糖基化或可改良抗体的可发展性的其他修饰来调节(Jarasch A等人,2015)。

[0128] 在一些实施方案中,根据本发明产生和/或利用的抗体包括糖基化的Fc结构域,包括具有修饰的或改造的此种糖基化的Fc结构域。出于本发明的目的,在某些实施方案中,包括如在天然抗体中发现的足够免疫球蛋白结构域序列的任何多肽或多肽复合物可被称为和/或用作“抗体”,无论此种多肽是天然产生(例如,由生物对抗原的反应产生)或通过重组工程改造、化学合成或其他人工系统或方法产生。在一些实施方案中,抗体是多克隆的或寡克隆的,其作为一组抗体产生,各自与单一抗体序列相关联且结合抗原内的或多或少的独

特表位(如与不同参比抗-CD25抗体相关联的人CD25胞外结构域内的不同表位)。

[0129] 可以单一制剂提供多克隆或寡克隆抗体以用于如文献中所描述的医药用途(Kearns JD等人,2015)。在一些实施方案中,抗体为单克隆的。在一些实施方案中,抗体具有恒定区序列,其具有人抗体的特征。在一些实施方案中,如本领域中已知的,抗体序列元件是人源化的。另外,如本文中所使用的术语"抗体"在适当的实施方案中(除非另外说明,否则根据上下文明显可见)可指用于在备选的展示中利用抗体结构及功能特征的本领域中已知的或开发的任何构建体或形式,例如作为如下所定义的抗原结合片段。例如,根据本发明利用的抗体为选自(但不限于)以下的形式:完整IgG、IgE及IgM、双特异性或多特异性抗体(例如,Zybodies®等)、单链可变结构域(scFv)、多肽-Fc融合体、Fab、骆驼科样抗体、重链鲨鱼抗体(IgNAR)、遮蔽抗体(例如,Probodies®)或具有允许表达及暴露在细胞表面上的多肽(作为用于获得用于将单克隆抗体的特异性移植至T细胞上的人工T细胞受体的构建体内的scFv)的融合蛋白。遮蔽抗体可包含特异性结合抗体的抗原结合表面且干扰抗体的抗原结合的阻断或"遮蔽"肽。遮蔽肽通过可裂解接头(例如,通过蛋白酶)连接至抗体。在所需环境下,例如在肿瘤环境下,接头的选择性裂解允许遮蔽/阻断肽解离,使得抗原结合能够在肿瘤中出现且因此限制潜在的毒性问题。在一些实施方案中,抗体可能缺少在其天然产生的情况下将具有的共价修饰(例如,聚糖的附接)。备选地,抗体可含有共价修饰(例如,聚糖的附接、负载[例如,可检测部分、治疗部分、催化部分等]或其他侧基[例如,聚乙二醇等])。

[0130] 非IL-2阻断抗体剂:本发明的抗-CD25抗体剂及抗原结合片段为非IL-2阻断抗体剂。本文中所使用的术语"非IL-2阻断抗体剂"是指能够特异性结合IL-2受体的CD25亚基而不阻断IL-2与CD25的结合或经由CD25的IL-2信号传导的那些抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25非IL-2阻断抗体)。相较于在不存在抗-CD25抗体剂的情况下的信号传导水平,抗-CD25抗体剂允许响应于IL-2结合CD25的至少50%的IL-2信号传导。优选地,相较于在不存在抗-CD25抗体剂的情况下的信号传导水平,抗-CD25抗体剂允许响应于CD25的至少75%的IL-2信号传导。

[0131] IL-2受体的CD25亚基也被称为IL-2受体的α亚基且被发现于活化的T细胞、调节性T细胞、活化的B细胞、一些胸腺细胞、骨髓前体细胞及少突细胞上。CD25与CD122及CD132缔合以形成充当IL-2的高亲和力受体的异源三聚复合物。人CD25的共有序列展示在图2中。

[0132] "特异性结合"被理解为表示抗体或抗原结合片段对于目的抗原具有小于约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M或10^{-12}M的解离常数(Kd)。在一优选实施方案中,解离常数小于10^{-8}M,例如在10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M或10^{-12}M的范围内。

[0133] 如本文中所使用且参考"非阻断"、"不阻断"等,相较于在不存在抗体的情况下的IL-2信号传导,"非IL-2阻断"(关于在存在抗-CD25抗体的情况下IL-2结合CD25的非阻断)包括其中抗-CD25抗体或抗原结合片段抑制小于50%的IL-2信号传导的实施方案。在如本文所述的本发明的特定实施方案中,相较于在不存在抗体的情况下的IL-2信号传导,抗-CD25抗体或抗原结合片段抑制小于约40%、35%、30%,优选地小于约25%的IL-2信号传导。抗-CD25非-IL-2阻断抗体允许结合CD25而不干扰IL-2结合CD25,或不实质上干扰IL-2结合CD25。对于非IL-2阻断抗体的本文中的参考备选地表达为"不抑制白介素2与CD25结合"的抗-CD25抗体或表达为"不抑制IL-2的信号传导"的抗-CD25抗体。

[0134] 一些抗-CD25抗体剂可允许IL-2结合CD25,但仍阻断经由CD25受体的信号传导。此

类抗体剂并不在本发明的范畴内。替代地,相较于在不存在抗-CD25抗体剂的情况下的信号传导,非IL-2阻断抗-CD25抗体剂允许IL-2结合CD25以促进经由CD25受体的至少50%的信号传导水平。

[0135] 可通过如实施例所论述及如本领域中已知的方法来测量经由CD25的IL-2信号传导。可在相同或大体上相同条件下在存在及不存在抗-CD25抗体剂的情况下进行IL-2信号传导的比较。

[0136] 在一些实施方案中,可使用标准Stat-5磷酸化测定通过测量细胞中的磷酸化STAT5蛋白质的水平来测定IL-2信号传导。例如,测量IL-2信号传导的Stat-5磷酸化测定可涉及在存在抗-CD25抗体的情况下以10ug/ml的浓度培养PMBC细胞30分钟且接着添加不同浓度的IL-2(例如,10U/ml或0.25U/ml、0.74U/ml、2.22U/ml、6.66U/ml或20U/ml的不同浓度)持续10分钟。接着可对细胞进行渗透化,然后可通过流式细胞术分析磷酸化STAT5肽的荧光标记抗体来测量STAT5蛋白的水平。IL-2信号传导的阻断百分比按如下计算:阻断%=100×[(Stat5$^+$细胞无抗体组%-Stat5$^+$细胞10ug/ml抗体组%)/(Stat5$^+$细胞无Ab组%)]。

[0137] 在一些实施方案中,如本文所述的抗-CD25抗体剂的特征在于其高效地清除肿瘤浸润性调节性T细胞,尤其是肿瘤内的。

[0138] 在一些实施方案中,抗-CD25抗体剂的特征在于其以高亲和力结合Fcy受体,优选地以高亲和力结合至少一种活化Fcy受体。优选地,抗体以小于约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M的解离常数结合至少一种活化Fcy受体。在一些实施方案中,抗-CD25抗体剂被表征为关于Fcγ受体的其他特征,特别是:

[0139] (a)以大于1的活化抑制比(A/I)结合Fcγ受体;和/或

[0140] (b)以比其结合FcγRIIb更高的亲和力结合FcγRI、FcγRIIc及FcγRIIIa中的至少一种。

[0141] 在一些实施方案中,CD25抗体剂为IgG1抗体,优选人IgG1抗体,其能够结合至少一种Fc活化受体。例如,抗体可结合选自以下的一种或多种受体:FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIc、FcγRIIIa及FcγRIIIb。在一些实施方案中,抗体能够结合FcγRIIIa。在一些实施方案中,抗体能够结合FcγRIIIa及FcγRIIa以及任选的FcγRI。在一些实施方案中,抗体能够以高亲和力,例如以小于约10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M的解离常数结合这些受体。在一些实施方案中,抗体以较低亲和力结合抑制性受体FcγRIIb。在一个方面,抗体以高于10^{-7}M、高于10^{-6}M或高于10^{-5}M的解离常数结合FcγRIIb。

[0142] 在一些实施方案中,如本文所述的所需的抗-CD25抗体剂的特征在于其对表达CD25的细胞(例如,表达较高水平的CD25),如免疫抑制细胞或肿瘤细胞(例如,在各情况下,在其表面上表达CD25)具有细胞毒性或诱导其噬菌作用。在一些实施方案中,抗-CD25抗体剂的特征在于:对免疫细胞(例如,当与免疫细胞,并且特别是与表达CD25的免疫细胞接触时)和肿瘤细胞而言,活性(例如,水平和/或类型)与抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12的活性合理相当。在一些实施方案中,相关活性是或包含:通过ADCP、ADCC或CDC清除Treg细胞(例如在实体瘤中)或某些表达CD25的细胞(例如高表达细胞),促进T细胞、B细胞或NK细胞扩增,使T细胞库偏移等,及其组合。在一些实施方案中,相对于在不存在实体或部分情况下的另外相当条件下观测到的水平和/或活性来评定或测定增加的水平和/或活性,或减小的水平和/或增加或无变化的水平或活

性。备选地或另外,在一些实施方案中,当存在参比抗-CD25抗体剂(例如,适当的参比抗-CD25抗体,其在多个实施方案中为阻断IL-2结合CD25的CD25抗体,如达利珠单抗或巴利昔单抗)时,增加的水平和/或活性相当于或大于在相当条件下观测到的水平和/或活性。在多个实施方案中,根据本发明使用的抗-CD25抗体剂是或包含直接或间接结合CD25(通常结合其胞外结构域)的实体或部分。在一些实施方案中,抗-CD25抗体剂为以下各项、包含以下各项:其抗原结合片段(例如,包含所有重链CDR、所有轻链CDR、所有CDR、重链可变区、轻链可变区或重链可变区及轻链可变区两者)、其亲和力成熟的变体(或其抗原结合片段或变体)或前述任一者的任何备选形式(例如,人源化、多特异性、替代同种型等)。备选地或另外,在一些实施方案中,如本文所述的抗-CD25抗体剂可由一个或多个特征表征,所述一个或多个特征可以是有利于以下的特征:筛选;制造;临床前测试;和/或鉴别人CD25内的相关表位,如被鉴别为aCD25ep-a或aCD25ep-b的序列);和/或配制、施用和/或在特定情形(例如,癌症疗法)中有效,如本文中所公开的。

[0143] 抗原:如本文中所使用,术语"抗原"是指引起免疫反应和/或结合T细胞受体(例如,当由MHC分子递呈时)和/或B细胞受体的药剂。引起体液反应的抗原涉及产生抗原特异性抗体或如在针对CD25胞外结构域的实例中所展示,可用于筛选抗体库且鉴别待进一步表征的候选抗体序列。

[0144] 抗原结合片段:如本文中所使用,术语"抗原结合片段"涵盖包括或包含足以赋予抗原结合片段上及特异性结合由抗体靶向的抗原的能力的如本文所述的抗体的一或多个部分的药剂。例如,在一些实施方案中,该术语涵盖包括足以赋予特异性结合的免疫球蛋白结构元件的任何多肽或多肽复合物。例示性抗原结合片段包括但不限于小模块免疫药物(Small Modular ImmunoPharmaceuticals,「SMIPsTM」)、单链抗体、骆驼科样抗体、单结构域抗体(例如,鲨鱼单结构域抗体)、单链或串联双抗体(TandAb®)、VHH、Anticalins®、Nanobodies®、微抗体、BiTE®、锚蛋白重复蛋白或DARPINs®、Avimers®、DART、TCR样抗体、Adnectins®、Affilins®、Trans-bodies®、Affibodies®、TrimerX®、微型蛋白质(MicroProtein)、Centyrins®、CoVX抗体、双环肽、Kunitz结构域衍生的抗体构建体或只要展现所需生物活性的任何其他抗体片段。在一些实施方案中,该术语涵盖其他蛋白质结构,如装订肽、抗体样结合肽模拟物、抗体样结合支架蛋白、单功能抗体和/或其他非抗体蛋白支架,例如如文献中所综述(Vazquez-Lombardi R等人,2015)。在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含多肽,所述多肽的氨基酸序列包括由本领域技术人员识别为互补决定区(CDR)的一个或多个结构元件。在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含多肽,所述多肽的氨基酸序列包括与如本文所述的抗-CD25抗体中(例如,在抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12的氨基酸序列中)发现的基本上相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗原结合片段时或包含多肽,所述多肽的氨基酸序列包括与此参比在序列上相同或含有比此参比序列更多的少量(例如,1、2、3或4)氨基酸改变(例如,置换、添加或缺失;在多数情况下为置换)的包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的至少一个重链氨基酸序列和/或包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的至少一个轻链氨基酸序列,同时保持结合衍生出参比序列的抗体的靶标。在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含多肽或其复合物,所述多肽或其复合物包括来自参比抗体(例如,抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12)的

重链或轻链的所有三个CDR(或在一些实施方案中,与其基本上一致的序列)。在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含多肽或其复合物,所述多肽或其复合物包括参比抗体(例如,抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12)的重链和/或轻链可变域(或在一些实施方案中,与其基本上一致的序列)。在一些实施方案中,术语"抗原结合片段"涵盖非肽和非蛋白质结构,如核酸适体,例如RNA适体及DNA适体。适体为结合特定靶标如多肽的寡核苷酸(例如,DNA、RNA或其类似物或衍生物)。适体为特异性结合各种分子靶标如小分子、蛋白质、核酸并且甚至是细胞和组织的合成的短的单链寡核苷酸。这些小的核酸分子可形成能够特异性结合蛋白质或其他细胞靶标的二级和三级结构并且基本上是抗体的化学等效物。适体为高度特异性的,尺寸相对小并且是非免疫原性的。适体通常选自被称为SELEX(指数富集配体系统进化,Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment)的生物淘选方法(参见例如Ellington等人,1990;Tuerk等人,1990;Ni等人,2011)。产生用于任何给定靶标的适体的方法是本领域中已知的。也涵盖包括亲和体(affimer)的肽适体。亲和体是被改造成展示为特定靶蛋白提供高亲和力结合表面的肽环的小的高度稳定的蛋白质。其是衍生自胱蛋白(cystatin)的半胱胺酸蛋白酶抑制剂家族的低分子量(12-14kDa)蛋白质。亲和体蛋白由支架(其为基于胱蛋白蛋白质折叠的稳定蛋白质)构成。其显示可以类似于对抗体的高亲和力和特异性随机结合不同靶蛋白的两个肽环和N端序列。在蛋白质支架限制肽可能采用的可能构形后使肽稳定,因此相较于游离肽文库增加结合亲和力和特异性。

[0145] 生物样品.如本文中所使用,术语"生物样品"或"样品"通常是指获自或衍生自目的生物源(例如,组织或生物或细胞培养物)的样品,如本文所述。目的来源可以是生物,如动物或人。生物样品可包含生物组织或液体。

[0146] 癌症:术语"癌症"、"恶性肿瘤"、"赘生物"、"肿瘤"及"瘤"在本文中可互换地使用以指代展现相对异常、不可控和/或自发生长的细胞,使得其展现表征为明显丧失对细胞增殖控制的异常生长表型。通常,用于本申请中的检测或治疗的目的细胞包括癌前(例如,良性)、恶性、转移前、转移性及非转移性细胞。本发明的教导可与任何及所有癌症有关。提供少数非限制性实例,在一些实施方案中,本发明的教导被应用于一种或多种癌症,如例如:造血癌症,包括白血病、淋巴瘤(霍奇金氏及非霍奇金氏)、骨髓瘤及骨髓增生病;肉瘤、黑素瘤、腺瘤、实体组织瘤、口、咽喉、喉及肺的鳞状细胞癌、肝癌、泌尿生殖癌如前列腺、宫颈、膀胱、子宫及子宫内膜癌及肾细胞癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、皮肤或眼内黑素瘤、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、头颈癌、乳腺癌、胃肠癌及神经系统癌症、良性病变如乳头状瘤等。本发明的抗体可用于治疗表达CD25+的肿瘤。治疗涉及表达CD25的肿瘤的癌症可包括但不限于:淋巴瘤如霍奇金氏淋巴瘤,及淋巴细胞性白血病如慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[0147] 组合疗法:如本文中所使用,术语"组合疗法"是指对象同时暴露于两种或更多种治疗方案(例如,两种或更多种治疗剂)的那些情况。在一些实施方案中,可同时施用两种或更多种药剂。备选地,可顺序施用此种药剂;或者,以重叠用药方案施用此种药剂。

[0148] 相当的:如本文中使用的,术语"相当的"是指可以彼此不相同但足够类似以准许在其间进行比较(例如,比较水平和/或活性)以使得可基于观测到的差异或相似性合理地得出结论的两种或更多种药剂、实体、情况、效果、条件组等。此种相当的条件组、效果、情形、个体或群体被表征为多个基本上相同的特征及一个或少量不同的特征。在上下文中,本

领域技术人员将理解在针对被视为相当的两种或更多种此种药剂、实体、情况、条件组、效果或群体等的任何给定情况下何种程度的同一性为必需的。

[0149] 包含:本文中被描述为“包含”一种或多种指定元件或步骤的组合物或方法是开放式的,意味着指定元件或步骤为必需的,但在组合物或方法的范围内可添加其他元件或步骤。也应理解,被描述为“包含”(或其“包含”)一种或多种指定元件或步骤的任何组合物或方法也描述“基本上由”(或其“基本上由”)相同的指定元件或步骤“组成”的对应的、更受限的组合物或方法,意味着组合物或方法包括指定的必需元件或步骤,并且还可以包括不会实质上影响组合物或方法的基本及新颖特征的额外元件或步骤。

[0150] 清除:如本文中所使用的,对“清除”(关于通过抗-CD25抗体剂清除调节性T细胞)的提及意味着Treg的数量、比率或百分比相对于未施用不抑制白介素2与CD25的结合的抗-CD25抗体时减小。在如本文所述的本发明的特定实施方案中,清除超过约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或99%的肿瘤浸润性调节性T细胞。

[0151] 剂型:如本文中所使用的,术语“剂型”是指用于施用至对象的活性剂(例如,治疗或诊断剂)的物理上离散的单位。各单位含有预定量的活性剂。在一些实施方案中,此种量为当向相关群体施用(即利用治疗用药方案)时适合于根据经测定与所需或有益结果相关的用药方案施用的单位剂量(或其完整部分)。本领域技术人员了解,向特定对象施用的治疗组合物或治疗剂的总量由一名或多名主治医生确定并且可涉及施用多个剂型。

[0152] 用药方案:如本文中所使用的,术语“用药方案”是指独立地向对象施用的,通常间隔一段时间的一组单位剂量(通常超过一个)。在一些实施方案中,给定治疗剂具有推荐的用药方案,其可涉及一个或多个剂量。在一些实施方案中,用药方案包含多个剂量,其中的每个彼此间隔相同长度的时间段。备选地,用药方案包含多个剂量和隔开单独的剂量的至少两个不同时段。在一些实施方案中,用药方案内的所有剂量具有相同单位剂量的量。备选地,用药方案内的不同剂量具有不同的量。在一些实施方案中,用药方案包含以第一用药量第一用药,随后为不同于第一用药量的第二用药量的一次或多次额外用药。用药方案可包含以第一用药量第一用药,随后为与第一用药量相同的第二用药量的一次或多次额外用药。在一些实施方案中,用药方案在跨相关群体施用时(即为治疗性用药方案)与所期望或有益结果相关。

[0153] 表位:如本文中所使用的,术语“表位”是指与抗体或抗原结合片段结合的抗原的部分。在抗原为多肽的一些实施方案中,当抗原处于相关构象时,表位为由在抗原中并不共价连续但在三维空间中彼此接近的抗原的部分构成的构象。例如,对于CD25,构象表位为由在CD25胞外结构域中并不连续的氨基酸残基构成的那些,线性表位为由在CD25胞外结构域中连续的氨基酸残基构成的那些。在一些实施方案中,根据本发明利用的表位通过参考与本文提供的抗-CD25抗体剂结合的表位(例如,与抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12结合并被定义为aCD25ep-a和aCD25ep-b的)提供。用于确定该抗体的表位的确切序列和/或特定氨基酸残基的方式在文献及实施例中是已知,包括与肽竞争、来自抗原序列、结合来自不同物种的CD25序列、截短和/或诱变(例如,通过丙胺酸扫描或其他定点诱变)、基于噬菌体展示的筛选或(共)结晶技术。

[0154] 同一性:本领域中已知的同一性百分比(%)为两个或更多个多肽序列或两个或更多个多核苷酸序列之间如通过将所述序列进行比较所确定的关系。在本领域中,同一性也

意味着,视具体情况而定,如通过此种序列串之间的匹配所确定的,多肽或多核苷酸序列之间的序列相关性程度。虽然存在多种方法用于测量两种多肽或两种多核苷酸序列之间的同一性,但通常用于确定同一性的方法是计算机程序编码的。用于确定两个序列之间同一性的优选计算机程序包括但不限于GCG程序包(Devereux,等人,Nucleic Acids Research,12,387(1984),BLASTP,BLASTN,及FASTA(Atschul等人,J.Molec.Biol.215,403(1990))。两种氨基酸序列或两种核酸序列的同一性百分比通过出于最佳比较目的进行序列比对(例如,可将间隙引入第一序列中用于与序列进行最佳比对)且比较对应位置处的氨基酸残基或核苷酸来确定。“最佳比对”是产生最高同一性百分比的两个序列的比对。同一性百分比通过将序列中相同氨基酸残基或核苷酸的数目进行比较来确定(即,同一性%=相同位置数/总位置数×100)。通常,除非上下文另有指定或暗示,否则本文中提及同一性%是指沿分子的整体长度的同一性%。

[0155] 免疫效应细胞:免疫效应细胞是指参与免疫反应的效应物阶段的免疫细胞。例示性免疫细胞包括骨髓或淋巴来源的细胞,例如淋巴细胞(例如,B细胞和T细胞,包括溶胞T细胞(CTL))、杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜曙红细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞及嗜碱性粒细胞。

[0156] 参与免疫反应的效应物阶段中的免疫效应细胞可表达特定Fc受体并且进行特定免疫功能。效应细胞可诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),例如能够诱导ADCC的嗜中性粒细胞。效应细胞也可诱导抗体依赖性细胞介导的噬菌作用(ADCP),其存在于靶抗原、靶细胞或微生物(例如能够ADCP的巨噬细胞)的吞噬作用中。例如,表达Fcγ R的单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞及淋巴细胞参与特异性杀伤靶细胞并向免疫系统的其他组分递呈抗原,或结合递呈抗原的细胞。如讨论的,根据本发明的抗体可针对诱导ADCC和/或ADCP的能力进行优化。

[0157] 调节性T细胞:如本文中所使用的,“调节性T细胞”(“Treg”或“Treg细胞”)是指专用于控制自体免疫、过敏及感染的CD4+ T淋巴细胞系。典型地,其调节T细胞群的活性,但其也可影响某些先天免疫系统细胞类型。Treg通常通过生物标志物CD4、CD25和Foxp3的表达以及CD127的低表达来鉴别。天然产生的Treg细胞通常构成约5%-10%的外周CD4+ T淋巴细胞。然而,在肿瘤微环境(即肿瘤浸润性Treg细胞)内,其可构成多达20%-30%的总CD4+ T淋巴细胞群。

[0158] 活化的人Treg细胞可通过穿孔蛋白或颗粒酶B依赖性途径直接杀伤靶细胞如效应T细胞和APC;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4+)Treg细胞通过APC诱导吲哚胺2,3-二氧酶(IDO)表达且这些转而通过减少色氨酸来抑止T细胞活化;Treg细胞可体内释放白介素-10(IL-10)并转化生长因子(TGFβ),并因此通过抑制MHC分子、CD80、CD86和IL-12的表达来直接抑制T细胞活化并抑止APC功能。Treg细胞也可通过表达高水平CTLA4来抑止免疫性,所述CTLA4可结合抗原递呈细胞上的CD80和CD86并防止效应T细胞的适当活化。

[0159] 患者:如本文中所使用的,术语“患者”或“对象”是指作为或可施用提供的组合物例如出于实验性、诊断性、防治性、美观性和/或治疗目的的任何生物。典型的患者包括动物(例如,哺乳动物,如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类及人)。在一些实施方案中,患者为人。在一些实施方案中,患者患有或易患一种或多种病症或病况。患者可显示病症或病况的一种或多种症状,或被诊断为患有一种或多种病症或病况(如癌症,或存在一种或多种肿瘤)。在一

些实施方案中,患者正接受或已接受某些疗法以诊断和/或治疗此类疾病、病症或病况。

[0160] 药学上可接受的:如本文中所使用的,应用于用于配制如本文所公开的组合物的载体、稀释剂或赋形剂的术语“药学上可接受的”意味着载体、稀释剂或赋形剂必须与组合物的其他成分是可相容的且对其接受者无毒。

[0161] 药物组合物:如本文中所使用的,术语“药物组合物”是指将活性剂与一种或多种药学上可接受的载体一起配制的组合物。在一些实施方案中,活性剂以适合施用的单位剂量的量存在于治疗方案中,其在向相关群体施用时展示出统计学上显著的实现预定治疗作用的概率。药物组合物可被配制成用于以固体或液体形式施用,包括适合于以下的形式:经口施用,例如灌服药(drench)(水性或非水性溶液或悬浮液)、锭剂(例如,靶向颊、舌下和全身吸收的锭剂)、大丸剂、粉剂、粒剂、用于施用于舌的糊剂;肠胃外施用,例如通过作为无菌溶液或悬浮液或持续释放制剂皮下、肌肉内、静脉内、瘤内或硬膜外注射;局部施用,例如作为膏剂、软膏或控制释放贴片或喷雾剂施用于皮肤、肺或口腔;阴道内、直肠内、舌下、经眼、经皮、经鼻、经肺以及施用至其他黏膜表面。

[0162] 实体瘤:如本文中所使用的,术语“实体瘤”是指通常不含有囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可为良性或恶性的。不同类型的实体瘤针对形成其的细胞类型而命名。实体瘤的实例为肉瘤(包括由组织如松质骨、软骨、脂肪、肌肉、血管、造血或纤维结缔组织的间叶细胞源的经转化的细胞引起的癌症)、瘤(包括由上皮细胞引起的肿瘤)、黑素瘤、淋巴瘤、间皮瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤等。涉及实体瘤的癌症包括但不限于脑癌、肺癌、胃癌、十二指肠癌、食道癌、乳腺癌、结直肠癌、肾癌(renal cancer)、膀胱癌、肾癌(kidney cancer)、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、黑素瘤、口腔癌、肉瘤、眼癌、甲状腺癌、尿道癌、阴道癌、颈癌、淋巴瘤等。

[0163] 治疗有效量:如本文中所使用的,术语“治疗有效量”意味着当根据治疗性用药方案向患有或易患疾病和/或病况的群体施用时足以治疗此类疾病和/或病况的量(例如,药剂或药物组合物的量)。治疗有效量为降低疾病、病症和/或病况的发病率和/或严重度,使疾病、病症和/或病况稳定和/或延迟疾病、病症和/或病况的一个或多个症状的发作的量。本领域技术人员将了解术语“治疗有效量”实际上并非需要在特定个体中实现成功治疗。

[0164] 治疗:如本文中所使用的,术语“治疗”是指部分或完全缓解、改善、减轻、抑制一种或多种症状、延迟其发作、降低其严重程度和/或降低其发生率的物质(例如,提供的抗-CD25抗体剂,例如抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12所例示)的任何施用。在一些实施方案中,治疗可涉及直接施用抗-CD25抗体剂(例如,作为可注射的水性组合物,任选地包含药学上可接受的载体、赋形剂和/或佐剂,以用于静脉内、瘤内或瘤周注射)或使用方案施用,所述方案包括自对象(例如,自血液、组织或肿瘤,基于存在或不存在标志物表达进行或不进行选择)获得细胞,将所述细胞与抗-CD25抗体剂体外接触,并将此种细胞施用于对象(基于存在或不存在标志物表达进行或不进行选择)。

[0165] 用药和施用.根据本发明使用的包含如本文所述的抗-CD25抗体剂(例如,抗-CD25抗体或其抗原结合片段或变体,例如包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12的氨基酸序列)的药物组合物可使用各种技术和/或本领域技术人员已知的和/或可用的技术中的任一项来制备以用于储存和/或递送。在一些

实施方案中,根据由管理机构如美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration,FDA)和/或欧洲药物管理局(European Medicines Agency,EMEA)批准的用药方案来施用提供的抗-CD25抗体剂,例如用于相关适应症。在一些实施方案中,提供的抗-CD25抗体剂与一种或多种其他药剂或疗法组合施用,例如用于相关适应症,所述一种或多种其他药剂或疗法本身可根据由管理机构如美国食品和药物管理局(FDA)和/或欧洲药物管理局(EMEA)批准的用药方案来施用。然而,在一些实施方案中,使用提供的抗-CD25抗体剂可允许与抗-CD25抗体剂疗法组合使用的批准的药剂或疗法的用药减少(例如,在一个或多个剂量中的较低量的活性物、较少的用药次数和/或减小的用药频率)。在一些实施方案中,用药和/或施用可适用于同样被施用的其他药物、患者状态和/或抗-CD25抗体剂的形式(例如,被修饰为免疫缀合物、单结构域抗体或双特异性抗体)。

[0166] 此外,在一些实施方案中,可能需要基于时机和/或CD25的阈值表达水平来调整用药方案,并且特别是设计连续用药方案,无论针对特定细胞类型、特定肿瘤或其类型还是特定患者群体(例如,携带遗传标志物)。在一些此种实施方案中,治疗性用药方案可与在治疗之前和/或期间评估一种或多种诱导性标志物的表达的检测方法或其他标准组合或依据其进行调整。

[0167] 在一些实施方案中,根据本发明的用药及施用利用具有所需纯度的活性剂并结合任何或多种形式的一种或多种生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。这些包括例如液体、半固体及固体剂型,如液体溶液(例如,可注射溶液及可输注溶液)、分散液或悬浮液、片剂、丸剂、粉剂、脂质体及栓剂。优选的形式可取决于所意欲的施用模式和/或治疗应用,典型地是可注射或可输注溶液的形式,如类似于用于用抗体治疗人对象的组合物。

[0168] 在一些实施方案中,成分可用保护药剂以免快速释放和/或降解的载体来制备,如控制释放制剂,包括植入物、经皮贴片及微囊递送系统。可使用可生物降解的生物兼容性聚合物,如聚酸酐、聚乙醇酸、聚原酸酯及聚乳酸。通常,使用与良好医学实践一致且适合于相关药剂(例如,用于如抗体的药剂)的药物组合物及用药方案来配制、用药及以治疗有效量施用各活性剂。含有活性剂的药物组合物可通过本领域中已知的任何适当方法施用,包括但不限于经口、经黏膜、通过吸入、局部、经颊、经鼻、经直肠或肠胃外(例如,静脉内、输注、瘤内、结节内、皮下、腹膜内、肌肉内、皮内、经皮或涉及使对象的组织产生物理裂口并通过此种裂口施用药物组合物的其他类型的施用)。

[0169] 在一些实施方案中,特定活性剂的用药方案可涉及间断的或连续的(例如,通过灌注或缓慢释放系统)施用,例如以在对象的一个或多个目的组织或体液中实现特定的所需的药代动力学曲线或其他暴露模式。在一些实施方案中,组合施用的不同药剂可经由不同递送途径和/或根据不同时间安排施用。备选地或另外,在一些实施方案中,第一活性剂的一个或多个剂量基本上与一种或多种其他活性剂同时施用,且在一些实施方案中,第一活性剂的一种或多种剂量经由常见途径和/或作为单一组合物的部分与一种或多种其他活性剂一起施用。

[0170] 在优化给定治疗方案的途径和/或用药时间安排时要考虑的因素可包括例如被治疗的特定癌症(例如,类型、阶段、位置等)、对象的临床病况(例如,年龄、总体健康状况、重量等)、药剂的递送部位、药剂的性质(例如,抗体或基于其他蛋白质的化合物)、药剂的施用模式和/或途径、组合疗法的存在或不存在及医学从业者已知的其他因素。

[0171] 本领域技术人员将了解例如特定递送途径可影响用药量和/或所需用药量可影响递送途径。例如,当目的是在特定部位或位置内(例如,组织或器官内)的特定高浓度药剂时,集中递送(例如,瘤内递送)可以是期望的和/或有用的。在一些实施方案中,特定药物组合物和/或所用的用药方案的一个或多个特征可随时间而被修改(例如,增加或减小任何单独剂量的活性物的量,增加或减小剂量之间的时间间隔等),例如为了使所需的疗效或反应(例如,与如本文所述的抗-CD25抗体剂的功能特征相关的治疗或生物反应)优化。通常,根据本发明的活性剂的用药类型、用药量及用药频率由在向哺乳动物(优选人)施用一种或多种相关药剂时应用的安全及疗效要求来控制。通常,选择此种用药特征以提供与在不存在治疗的情况下所观察到的相比特定且通常可检测的治疗反应。在本发明的上下文中,例示性的所需的治疗反应可涉及但不限于抑制和/或减小肿瘤生长、肿瘤大小、转移、与肿瘤相关联的症状及副作用中的一种或多种以及增加的癌细胞的凋亡、一种或多种细胞标志物或循环标志物的治疗相关减小或增加等。此种标准可通过文献中公开的多种免疫学、细胞学及其他方法中的任一项容易地评估。例如,单独的或与另一药剂组合的治疗有效量的抗-CD25抗体剂可被确定为足以增强如实例中所述的癌细胞的杀伤。

[0172] 作为活性剂的抗-CD25抗体剂或包含此种药剂的组合物的治疗有效量可使用本领域中可获得的技术容易地确定,所述技术包括例如考虑一种或多种因素,如被治疗的疾病或病况、疾病的阶段、被治疗的哺乳动物的年龄及健康和身体状况、疾病的严重度、被施用的具体化合物等。

[0173] 在一些实施方案中,治疗有效量为活性剂的有效剂量(和/或单位剂量),其可以是至少约0.01mg/kg体重、至少约0.05mg/kg体重、至少约0.1mg/kg体重、至少约1mg/kg体重、至少约5mg/kg体重、至少约10mg/kg体重、或更大(例如,0.01、0.1、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50mg/kg体重)。本领域技术人员应理解,在一些实施方案中可针对活性剂的分子量来调整此种指导原则。剂量也可针对施用途径、治疗周期或因此剂量递增方案变化,所述剂量递增方案可用于确定与施用增加剂量的包含抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11或抗体12氨基酸序列的分离的抗体或其抗原结合片段或变体有关的最大耐受剂量及剂量限制毒性(如果存在)。

[0174] 治疗组合物通常应在制造及储存条件下是无菌的和稳定的。组合物可被配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或适合于高药物浓度的其他有序结构。可通过在具有上述列举的成分中的一种或组合的合适溶剂中并入所需量的抗体,随后过滤杀菌来制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性化合物并入含有碱性分散介质和来自上述列举的其他所需成分的无菌载体中来制备分散液。在用于制备无菌可注射溶液的粉剂的情况下,优选的制备方法为真空干燥及冷冻干燥,其由先前经无菌过滤的溶液产生活性成分加任何其他所需成分的粉末。可例如通过使用包衣,通过在分散液的情况下维持所需粒度及通过使用表面活性剂来保持溶液的适当流动性。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸盐和明胶)来实现。

[0175] 各药剂的制剂理想地应为无菌的,如可通过经由无菌过滤膜过滤来实现的,然后以适用于团注(bolus)施用或连续施用的形式封装或出售。可注射制剂可以单位剂型制备、封装或出售,如在含有防腐剂的安瓿或多剂量容器中。用于肠胃外施用的制剂包括但不限于:油性或水性载体中的悬浮液、溶液、乳液;糊剂;及可植入的持续释放型或可生物降解型

制剂,如下文所述。可使用无毒性的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂(如水或1,3丁二醇)来制备无菌可注射制剂。有用的其他可肠胃外施用的制剂包括包含微晶形式的、在脂质体制剂中的或作为可生物降解聚合物系统的组分的活性成分的那些。用于持续释放或植入的组合物可包含药学上可接受的聚合性或疏水性材料如乳液、离子交换树脂、微溶性聚合物或盐。

[0176] 根据本发明使用的各药物组合物可包含药学上可接受的分散剂、润湿剂、悬浮剂、等张剂、包衣、抗菌及抗真菌剂、载体、赋形剂、盐或稳定剂,其在所采用的剂量及浓度下对对象是无毒的。此种额外的药学上可接受的化合物的非详尽清单包括:缓冲剂,如磷酸、柠檬酸及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸及甲硫氨酸;含有药理学上可接受的阴离子的盐(如醋酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、羟乙磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、次乙酸盐、丁二酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐、甲苯磺酸盐、thiethiodode及戊酸盐);防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六羟季铵;氯化苯甲烃铵;苄索氯铵;氯化钠;苯酚、丁醇或苄醇;对羟苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单醣、二醣及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇;成盐反离子,如钠;金属配合物(例如,Zn蛋白质配合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0177] 在一些实施方案中,当根据本发明利用两种或更多种活性剂时,可同时或顺序施用此种药剂。在一些实施方案中,在相对一种药剂施用的特定时间施用另一种药剂。在一些实施方案中,组合施用的药剂的所需的相对用药方案可例如使用离体、体内和/或体外模型进行评估或实证测定;在一些实施方案中,此种评估或实证测定在体内、在特定患者或患者群体中进行(例如使得产生相关性)。

[0178] 在一些实施方案中,用于本发明实施中的一种或多种活性剂根据包含至少两个周期的间断用药方案施用。当两种或更多种药剂组合并各通过此间断的循环方案施用时,不同药剂的单独剂量可互相交叉。在一些实施方案中,在如本文所述的抗-CD25抗体剂的剂量后的一段时间施用一个或多个剂量的第二药剂。在一些实施方案中,在如本文所述的抗-CD25抗体剂的剂量后的一段时间施用各剂量的第二药剂。在一些实施方案中,在抗-CD25抗体剂的剂量前的一段时间施用一个或多个剂量的第二药剂。在一些实施方案中,如本文所述的抗-CD25抗体剂也可以涉及不仅通过相同途径的后续施用而且还通过交替施用途径(如通过皮下(或肌肉内)施用及肿瘤内施用),在经一周、两周、四周或更多周的一个或多个治疗周期内的方案施用,以相同方案(或通过延长施用之间的间隔)重复此种周期,这取决于患者反应。并且,在一些实施方案中,相较于一个或多个其他周期,一个或多个周期的随后的精确方案(例如剂量次数、剂量间隔(例如相对于彼此或相对于另一事件,如另一疗法的施用))、剂量的量等可以不同。

[0179] 通过使用如本文所述的施用途径、剂量和/或方案中的任一项,如本文所述的抗-CD25抗体剂可被鉴别、表征和/或验证,例如考虑使用活检、血液样本对患者进行测量的一种或多种标准和/或其他临床标准。在一些实施方案中,作为直接评估肿瘤大小和/或癌转移的替代方案或除其以外,如本文所述的抗-CD25抗体剂的治疗功效可在评估以下一个或

多个不同通用标准的方法中确定:对癌细胞的直接细胞毒性(癌细胞的凋亡及坏死);肿瘤浸润性免疫细胞(如CD4阳性和/或CD8阳性肿瘤浸润性T细胞)的增加;血液中循环的免疫细胞(淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、树突细胞、巨噬细胞、B细胞等的总群体或特定亚群)的增加;和/或仅在反应或非反应患者中在治疗前相对治疗后呈现一定程度的差异表达(如通过RNA测序、大量流式细胞术和/或其他大量测序方法测定的)。备选地或另外地,在一些实施方案中,此种鉴别、表征和/或验证可涉及通过筛选一种或多种特定蛋白质或蛋白质集合的mRNA和/或蛋白质表达在分子层面进行追踪。在一些实施方案中,一种或多种此类技术可允许用于评估对如本文所描述抗-CD25抗体剂的反应的鉴别或相关信息,例如其可与肿瘤内(或附近)和/或在血液中循环的特定细胞群的组织分布和/或标志物有关。

[0180] 此种方法及免疫生物学数据可允许不仅测定一种或多种功效和/或安全性参数或特征,而且在一些实施方案中还可提供用于选择特定剂量、途径或用药方案的基本原理,例如其可单独和/或与其他药物、标准护理方案或可提供其他治疗益处的免疫疗法组合用于给定适应症的一种或多种临床试验。因此,在本发明的一系列其他实施方案中,在用此制剂治疗后或治疗前,在患者的细胞或组织(如肿瘤、血液样本、血液分离物)中在RNA和/或蛋白质水平测定一种或多种基因的表达的组合存在(和/或不存在)后,如本文所述的抗-CD25抗体剂被用于治疗患有疾病(如癌症)的患者或预防疾病(如癌症)的方法中。因此,此种方法可允许限定一种或多种生物标志物或与以下相关的更复杂的基因表达特征(或细胞群分布):治疗有效量的所需抗-CD25抗体剂、预测对象在用如本文所述的抗-CD25抗体剂治疗后可具有抗肿瘤或抗感染反应的治疗相关生物标志物、或预测对象在用抗-CD25抗体剂治疗后可对化合物治疗起反应的治疗相关生物标志物。

[0181] 备选地或另外,在一些实施方案中,可考虑人癌症和/或其他人组织中的CD25表达,例如通过聚集关于各种癌症、组织和/或患者中的基质和/或免疫亚群中的CD25分布的数据预先确定和/或稍后评估如本文中所公开的特定抗-CD25抗体剂的用药及施用。此种数据可通过使用常见癌症类型和/或组织(中枢神经系统、食道、胃、肝、结肠、直肠、肺、膀胱、心脏、肾、甲状腺、胰腺、子宫、皮肤、乳房、卵巢、前列腺及睾丸)中的常见技术(如流式细胞术、大量细胞计数法、免疫组织化学或mRNA表达文库)来产生以用于鉴别各种免疫及非免疫亚群中的CD25表达之间的关系和/或其与细胞浸润测量值和/或与癌细胞或免疫细胞的亚群相关的癌症相关标志物(如Foxp3和PD-1/PD-L1)的关系。CD25表达可受限(或不受限)于肿瘤组织中(如NK细胞及其他效应物或调节性免疫细胞中)的免疫亚群,并且如果是阳性的则可测定CD25表达与免疫检查点抑制剂之间的相关性,因此建议与靶向此种免疫检查点抑制剂的化合物(例如PD-1拮抗剂,如抗-PD-1抗体或抗-PD-L1抗体)组合来适当使用抗-CD25抗体剂。

[0182] 制品及试剂盒;在本发明的一些实施方案中,如本文所述的抗-CD25抗体剂以单独制品提供。在本发明的一些实施方案中,含有抗-CD25抗体剂的制品在具有标签的容器中或通过具有标签的容器提供。合适的容器可包括例如瓶子、小瓶、注射器及试管。在一些实施方案中,容器可由各种材料(如玻璃或塑料)制成。在一些实施方案中,容器容纳有效治疗特定疾病、病症或病况或其阶段或类型的组合物。在一些实施方案中,容器可具有无菌进入端口(例如,容器可为静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。例如,在一些实施方案中,包含如本文所述的抗-CD25抗体剂的组合物被封装在具有橡胶塞及铝封口的

透明玻璃小瓶中。容器上或与容器相关联的标签指示将所述组合物用于治疗所选病况。

[0183] 在一些实施方案中,制品可进一步包含单独的容器,该单独的容器包含药学上可接受的缓冲液,如磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液,和/或可进一步包含商业及使用者角度所需的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针、注射器及具有使用说明书的包装插页。例如,在一些实施方案中,制品可允许以含有总计2mg、5mg、10mg、20mg、50mg或更多的无菌水溶液形式提供每种药剂的静脉内制剂,所述无菌水溶液以0.1mg/ml、1mg/ml、10mg/ml的最终浓度或以更高浓度用适当稀释剂及缓冲液配制。

[0184] 在一些实施方案中,如本文所述的抗-CD25抗体剂可以冻干形式或使用任何相容的药物载体的其他类型的剂量单位提供在试剂盒内,所述冻干形式利用随试剂盒提供或未随试剂盒提供的任何合适的水溶液重构。可在包装或分配装置中提供一种或多种单位剂型的抗-CD25抗体剂。例如,此种包装或装置可包含金属或塑料箔,如泡罩包装。为正确使用此种多组分试剂盒,其可进一步包含缓冲剂、稀释剂、滤器、针、注射器及具有用于治疗癌症的说明书的包装插页。

[0185] 在一些实施方案中,与如本文所述的制品或试剂盒相关联的说明书可以是标签、小册、出版物、录音、图表或任何其他方式的形式,其可用于告知药剂、制剂及制品和/或试剂盒中的其他材料的正确用途和/或监测药剂、制剂及制品和/或试剂盒中的其他材料的可能效果。说明书可与制品和/或试剂盒一起提供。

[0186] 实施例

[0187] 实施例1:产生抗体

[0188] 使用本领域的标准技术,产生具有表1中所列出的重链和轻链序列的被命名为抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11和抗体12的抗体。

[0189] 表1

[0190]

	VH 蛋白	VL 蛋白
Ab1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT SYGIQWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNY NSALMSRVTISKDNSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLV TVSS （SEQ ID NO:1）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVS YMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:4）
Ab2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT SYGIQWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNY NSALMSRVTISKDNSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLV TVSS （SEQ ID NO:1）	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVS YMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:5）
Ab3	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT SYGIQWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNY NSALMSRVTISKDNSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLV TVSS （SEQ ID NO:1）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSV SYMHWYQQKPGKAPKPLIFATSNLASG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY YCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:6）
Ab4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT SYGIQWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNY NSALMSRVTISKDNSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLV	QIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVS YMHWYQQKPGKSPKPLIFATSNLASGV PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY

[0191]

	TVSS （SEQ ID NO:1）	CQQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:7）
AB5	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT SYGIQWVRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTN YNSALMSRVTISKDNSKSQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTL VTVSS （SEQ ID NO:2）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVS YMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:4）
Ab6	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT SYGIQWVRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTN YNSALMSRVTISKDNSKSQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTL VTVSS （SEQ ID NO:2）	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVS YMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:5）
Ab7	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT SYGIQWVRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTN YNSALMSRVTISKDNSKSQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTL VTVSS （SEQ ID NO:2）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSV SYMHWYQQKPGKAPKPLIFATSNLASG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY YCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:6）
Ab8	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT SYGIQWVRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTN YNSALMSRVTISKDNSKSQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTL VTVSS （SEQ ID NO:2）	QIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVS YMHWYQQKPGKSPKPLIFATSNLASGV PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:7）
Ab9	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFSL TSYGIQWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGST NYNSALMSRFTISKDNSKSTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGT LVTVSS （SEQ ID NO:3）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVS YMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:4）
Ab10	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFSL TSYGIQWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGST NYNSALMSRFTISKDNSKSTLYLQMNSLR	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVS YMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC

[0192]

	AEDTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO:3）	QQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:5）
Ab11	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFSLTSYGIQWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO:3）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIFATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:6）
Ab12	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFSLTSYGIQWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO:3）	QIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKSPKPLIFATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO:7）

[0193] 如图1所示的互补决定区(CDR;即CDR1、CDR2和CDR3)以及骨架区(FR)根据Kabat编号来定义。

[0194] 作为哺乳动物细胞中表达的人IgG1的抗CD25抗体的再克隆、产生及表征:

[0195] 抗体作为人IgG1而被合成并克隆。在哺乳动物细胞(HEK293)HEK293中表达抗体。将细胞用重链和轻链表达载体转染并再培养6至14天。转染适当体积的细胞以获得约1mg的抗体。收获培养物,并使用亲和层析进行一步纯化。按以下所述表征人IgG1抗体。

[0196] 1抗体还可以通过以下方法被合成并克隆。可以由Genewiz进行抗体的密码子优化的VH及VL编码序列的合成。将可变区的cDNA克隆至含有人IgG1重链及κ轻链恒定区(例如分别为P01857及P01834)的抗体表达载体(Icosagen,EST)中。通过在最终载体中测序来验证全长重链及轻链cDNA然后使用QMCF技术(Icosagen)进行全长重链及轻链cDNA再克隆以用于将其表达,所述QMCF技术为使用基于CHO的细胞(CHOEBNALT85)和适当的载体以用于产生重组蛋白、抗体的稳定附加体表达系统,将CHOEBNALT85细胞用1μg表达质粒转染以用于抗体产生。转染后48h,添加700μg/ml G418以选择含有质粒的细胞群。对于生产,将温度变为30℃并另外对培养物进行补料。在生产结束时,培养上清液通过离心(1000g,30min,15℃)来澄清,添加PMSF并处理或冷冻上清液直至纯化。将hIgG1抗体通过MabSelect SuRe亲和性层析并且继之以Superdex 200凝胶过滤来纯化到PBS或PBS 100mM L-Arg中。

[0197] 实施例2:抗CD25非IL-2阻断性抗体的表位绘谱

[0198] 使用固相Fmoc合成(Pepscan BV,The Netherlands;Timmermann P等人,2007J.Mol.Recognit.,20,283-99;Langedijk JP等人,2011,Analytical Biochemistry.417:149-155)来合成代表人CD25序列(Uniprot记录号P01589)的直链、单环、β-转向模拟物、二硫键桥模拟物、非连续二硫键桥、非连续表位模拟肽的不同集合。在ELISA(Pepscan,The Netherlands)中测试抗体与合成肽中的每个的结合。将肽阵列与一抗

溶液一起孵育(4℃过夜)。洗涤后,在25℃将肽阵列与1/1000稀释的适当抗体过氧化物酶缀合物(2010-05;Southern Biotech)一起孵育一小时。洗涤后,添加过氧化物酶底物2,2'-次偶氮基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸酯(ABTS)及20μl/ml的3%H2O2。一小时后,测量显色。利用电荷耦合装置(charge coupled device,CCD)照相机和图像处理系统来量化显色。自CCD照相机获得的值的范围介于0至3000mAU,类似于标准96孔板ELISA读数器。为验证合成肽的质量,平行地合成阳性及阴性对照肽的单独集合并用不相关的对照抗体进行筛选。

[0199] 结果

[0200] 表征抗体以确定针对非IL-2阻断性抗体的表位。针对抗人CD25抗体(抗体1至抗体12)的表位绘谱的结果示于表2中。

[0201] 表2-抗人CD25抗体

[0202]

抗体	表位1	表位2
抗体1	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体2	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体3	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体4	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体5	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体6	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体-7	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体8	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体9	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体10	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体11	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$
抗体12	$_{150}$YQCVQGYRALHRGP$_{163}$	$_{166}$SVCKMTHGKTRWTQP$_{180}$

[0203] 使用Pepscan技术进行的表位绘谱研究将指示抗体结合人CD25的氨基酸150-163和氨基酸166-180的区域(图2)并且以10^{-8}M至10^{-10}M的Kd值结合人CD25胞外蛋白质序列。

[0204] 实施例3:抗CD25抗体与表达CD25的细胞的结合

[0205] 可以评价抗体与Karpas299细胞的结合。通过用从30μg/ml抗体的浓度开始的测试物品(抗-CD25一抗)将Karpas299细胞染色,随后在冰上进行半对数连续稀释(7点)达30分钟来检测与表达CD25的Karpas299细胞的结合。这之后是在冰上用浓度为1μg/ml的二抗(Alexa Fluor 647-AffiniPure F(ab')2片段兔抗人IgG Fcγ片段-(Jackson ImmunoResearch))染色30分钟。以一式两份将所有样品染色。在样品获取期间通过流式细胞术使用FSC对比SSC参数对活细胞进行门控。将染色的细胞的平均荧光强度(MFI)绘制于XY图上,针对浓度的对数对MFI作图,数据拟合成非线性回归曲线,根据该曲线计算EC50。结果示于图3中。

[0206] 实施例4:抗人CD25抗体的亲和力测量

[0207] 使用CM-5传感器芯片,通过在25℃的环境实验温度在Biacore 2000中进行SPR测量抗人CD25抗体的KD来测定该抗人CD25抗体的亲和力。首先用10分钟将抗人抗体固定在测定缓冲液(pH 7.4,10mM HEPES,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05%Tween 20)中的所有流动室中至RU为12,000-14,000。将配体(抗体测试物品)依次加载至145-190RU的捕获水平。然后

将分析物(带His标签的重组人CD25)在分析缓冲液(以400nM开始的2倍稀释,最低浓度为3.13nM)缔合6分钟。在分析缓冲液中进行10分钟解离。在10mM甘氨酸pH 1.7中进行样品浓度之间的再生步骤达10分钟。在整个过程中保持25μl/min的流速。在减去参比的情况下,使用全局1:1朗谬尔模型拟合动力学数据。结果示于图4(A)至(L)。

[0208] 实施例5:抗-人CD25 Ab竞争测定

[0209] 在Forte Bio Octet Red96系统(Pall Forte Bio Corp.,USA)上使用标准连续结合测定进行抗体竞争。将26.8nM带his标签的重组人CD25加载至Ni-NTA生物传感器上持续200s。在利用动态缓冲液的基线步骤后,将传感器暴露于66.6nM的第一抗体达600s,随后暴露于第二抗CD25抗体(也在66.6nM下持续600s)。使用Forte Bio数据分析软件9.0处理数据。第二抗体的额外结合指示未占用的表位(不竞争表位),而无结合指示表位阻断(竞争表位)。结果示于图5。

[0210] 实施例6:通过STAT5磷酸化测定的体外IL-2信号传导

[0211] 使用检测IL-2信号传导的STAT5磷酸化测定表征IL-2阻断。在10μg/ml抗-CD25抗体存在下在96孔U形底板中将之前冷冻的PBMC(Stemcell Technologies)培养30分钟,之后在含有10%FBS(Sigma)、2mM L-谷氨酰胺(Life Technologies)和10,000U/ml Pen-Strep(Sigma)的RPMI 1640(Life Technologies)中添加10U/ml的IL-2(Peprotech)持续10分钟。当将细胞固定并用eBioscience™ Foxp3/转录因子染色缓冲液套装(Invitrogen)渗透并用BD Phosflow Perm缓冲液III(BD Biosciences)处理时,终止IL-2诱导的STAT5磷酸化。然后将细胞同时用表面和胞内荧光染料标记的抗体(STAT5-Alexa Fluor 647克隆47/stat5/pY694 BD Bioscience、CD3-PerCP-Cy5.5克隆UCHT1 Biolegend、CD4-BV510克隆SK3 BD Bioscience、CD8-Alexa Fluor700克隆RPA-T8 Invitrogen、CD45RA-PE-Cy7克隆HI100 Invitrogen、FoxP3-Alexa Fluor 488克隆236A/E7Invitrogen)染色并在Fortessa LSR X20流式细胞仪(BD Bioscience)上获得样品并使用BD FACSDIVA软件进行分析。使用FCS-H对比FCS-A来排除二重峰并使用SSC-A对比FCS-A参数限定淋巴细胞。使用CD3PerCP-Cy5.5-A对比FCS-A图来限定$CD3^+$ T细胞并将门控绘制在显示计数对比STAT5 Alexa Fluor 647-A的直方图上以确定$STAT5^+CD3^+$ T细胞群。IL-2信号传导的阻断百分比按如下计算:阻断%=100×[($Stat5^+$细胞无Ab组%-$Stat5^+$细胞10ug/ml Ab组%)/($Stat5^+$细胞无Ab组%)]。还可以通过在各个亚组上进行门控并按如上进行分析来评估不同T细胞亚组($CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+$ $FoxP3^+$、幼稚和记忆T细胞)的STAT5磷酸化的进一步分析。使用GraphPad Prism v7进行图形和统计分析。

[0212] 实施例7:体外T细胞活化测定

[0213] 在检测胞内颗粒酶B(GrB)上调和增殖的T细胞活化测定中表征IL-2信号传导对于Teff反应的影响。将之前冷冻的原代人Pan T细胞(Stemcell Technologies)根据制造商的建议用eFluor450细胞增殖染料(Invitrogen)标记,并以1×10^5个细胞/孔添加至96U形底孔板中的含有10%FBS(Sigma)、2mM L-谷氨酰胺(Life Technologies)和10,000U/ml Pen-Strep(Sigma)的RPMI 1640(Life Technologies)中。然后将细胞用10μg/ml抗-CD25抗体或对照抗体并且继之以人T-活化物CD3/CD28(20:1细胞与珠粒比率;Gibco)处理并在37℃,5%CO_2的潮湿培养箱中培养72小时。为评估T细胞活化,将细胞用eBioscience Fixable Viability Dye efluor780(Invitrogen)并且继之以用于表面T细胞标志物的荧光染料标

记的抗体(CD3-PerCP-Cy5.5克隆UCHT1 Biolegend、CD4-BV510克隆SK3 BD Bioscience、CD8-Alexa Fluor 700克隆RPA-T8 Invitrogen、CD45RA-PE-Cy7克隆HI100 Invitrogen、CD25-BUV737克隆2A3 BD Bioscience)染色然后固定并用eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set(Invitrogen)进行渗透,之后针对胞内GrB和核内FoxP3(颗粒酶B-PE克隆GB11 BD Bioscience、FoxP3-APC克隆236A/E7)进行染色。在Fortessa LSR X20流式细胞仪(BD Bioscience)上获得样品并使用BD FACSDIVA软件分析。使用FCS-H对比FCS-A排除二重峰,并使用SSC-A对比FCS-A参数限定淋巴细胞。使用GrB-PE-A对比增殖eFluor450-A图来评估由活$CD3^+$淋巴细胞门控的$CD4^+$ T细胞亚组。结果表示为来自全部$CD4^+$或$CD8^+$ T细胞群的增殖GrB阳性细胞的百分比。使用GraphPad Prism v7进行图形和统计分析(结果未显示)。

[0214] 实施例8:体外ADCC测定

[0215] 使用在37℃下与不同浓度的抗人CD25抗体在低IgG的补充有FBS的培养基(4%FBS在RPMI中)中孵育20分钟的表达CD25的SR786细胞(本文中称为靶(T)细胞)进行抗体依赖性细胞介导的细胞毒性测定(ADCC测定)以表征抗人CD25抗体。然后将ADCC效应(E)细胞以1:1的E:T比添加到细胞-mAbs混合物中。效应细胞是用萤光素酶报告物系统稳定转染并过表达CD16/FcgammaRIIIA(Promega)的Jurkat细胞。在37℃过夜孵育后,裂解细胞,并按照生产商的说明(Promega Bio-Glow方案)通过从特定萤光素酶底物水解释放的发光来测量萤光素酶活性。使用Graphpad Prism v7产生原始数据的图以生成剂量响应曲线。将相对发光单位(RLU)针对抗体浓度的对数绘制在XY图上,数据拟合成非线性回归曲线,根据该曲线计算EC50。

[0216] 实施例9:体外ADCP测定

[0217] 使用体外分化的Treg作为靶细胞以及单核细胞衍生的巨噬细胞作为效应细胞来进行抗体依赖性细胞介导的噬菌作用(ADCP)测定。通过Ficoll梯度离心将PBMC自白细胞锥中分离。使用CD14微珠(Miltenyi Biotec)分离单核细胞(CD14+细胞)。将单核细胞在50ng/ml M-CSF存在下在含有10%FBS(Sigma)、2mM L-谷氨酰胺(Life Technologies)和10,000U/ml Pen-Strep(Sigma)的RPMI 1640(Life Technologies)中培养5天,3天后添加含有M-CSF的新鲜培养基。使用人Treg细胞分化试剂盒(R&D Systems)分离调节性T细胞(Treg)。根据制造商的建议,将这些细胞在37℃,5%CO_2潮湿培养箱中培养5天并用eFluor450染料(Invitrogen)标记。第5天,将巨噬细胞和eFluor450-染料标记的Treg以10比1的效应物比靶标比在抗-CD25抗体或对照物存在下共培养4小时,如后所述。以1×10^4个细胞/孔添加靶细胞(Treg),同时以1×10^5个细胞/孔添加效应细胞(巨噬细胞)以实现10比1的效应物比靶标比。然后以最高浓度1μg/ml并继之以对数系列(7点)添加抗-CD25抗体,一式两份。将细胞和抗体在37℃,5%CO_2培养4小时。为评估ADCP,将细胞置于冰上,用细胞表面标志物CD14(CD14-PerCP-Cy5.5克隆MfP9 BD Biosciences)染色并用eBioscience固定缓冲液固定。使用Fortessa LSR X20进行双色流式细胞术分析。将残余的靶细胞定义为作为eFluor450-染料$^+$/$CD14^-$的细胞。巨噬细胞被定义为$CD14^+$。双重标记的细胞(eFluor450-染料$^+$/$CD14^+$)被认为表示巨噬细胞对靶标的噬菌作用。靶细胞的噬菌作用通过下式计算:噬菌作用%=100×[(双阳性%)/(双阳性%+残余靶标%)]。

[0218] 总结

[0219] 进一步评估实施例1中鉴别的抗体关于其不干扰IL-2信号传导的能力及其杀伤表达CD25的靶细胞的能力。STAT5测定显示,无论测试的IL-2浓度如何,测试的抗体不阻断IL-2信号传导,而IL-2信号传导被参比抗体达利珠单抗完全阻断(图6)。竞争测定显示,抗体10不与达利珠单抗或巴利昔单抗竞争(图5)。被证明经由所谓的"Tac"表位(Queen C等人,1989及Bielekova B,2013)阻断CD25与IL-2的相互作用的达利珠单抗以及巴利昔单抗结合与抗体10不同的表位(图5)。这可解释在STAT5磷酸化测定中为何达利珠单抗阻断IL-2信号传导而抗体2不阻断IL-2信号传导(图6)。最后,当与IgG1同种型或Fc沉默的CD25靶向抗体相比时,抗体诱导针对表达CD25的癌细胞的ADCC(图7)以及经由ADCP的对人巨噬细胞的杀伤(图8和图9)。

[0220] 总之,对抗体进行了表征且该抗体展现对CD25阳性细胞(Treg或癌细胞系)的强效杀伤且不干扰IL-2信号传导并因此不抑制T效应细胞响应。因此,该抗体是可作为单一疗法或以组合应用于治疗癌症的Treg清除抗体。

[0221] 实施例10:小鼠模型实验

[0222] 材料和方法

[0223] 非IL-2阻断抗体的治疗活性:将从Charles River获得的雌性BALB/c小鼠在侧腹中皮下注射在0%基质胶中的3×10^5个CT26肿瘤细胞,n=15只/组。基于第1天体重将动物随机分到治疗组中。治疗在第6天开始并且小鼠通过以200μg/动物注射一次各抗体(小鼠IgG2a同种型,IL-2中和抗体,PC61 mIgG1(小鼠IgG1同种型的抗小鼠CD25阻断IL-2信号传导抗体),以及7D4 mIgG2a(小鼠IgG2a同种型的抗小鼠CD25非阻断IL-2信号传导抗体)进行治疗。动物接受单一疗法治疗(每种抗体一个组)或7D4 mIgG2a和IL-2中和抗体或7D4 mIgG2a和PC61 mIgG1抗体的组合治疗。当肿瘤体积达到2000mm^3或在第50天时(先达成的那个)处死小鼠。

[0224] 结果

[0225] 当与同种型对照小鼠IgG2a相比时,抗-CD25清除非IL-2阻断抗体7D4 mIgG2a诱导被治疗的小鼠的肿瘤排斥,而其他抗体未显示作为单一疗法的效果。在与IL2-阻断抗体组合的情况下,PC61 mIgG1或IL2nAb消除非IL-2阻断抗体7D4 mIgG2a的治疗活性(图10)。这证明7D4 mIgG2a的非IL-2阻断特征是治疗活性的关键。其还表明该抗体的治疗活性依赖于由T效应细胞介导的抗肿瘤免疫反应,其取决于最佳活性的IL-2信号传导。这些结果显示不存在IL-2/CD25阻断活性是CD25靶向抗体的最佳治疗活性所需的并且支持在癌症疗法中使用如本文所述的抗-CD25非IL-2阻断抗体。

[0226] 等效物及范畴

[0227] 本领域技术人员将了解本发明由所附权利要求限定而非由包括于本文中的实施例或某些实施方案的其他描述限定。

[0228] 类似地,除非上下文另外明确指出,否则单数形式"一个"、"一种"和"所述"包括复数指代。

[0229] 除非上文另外规定,否则本文中所用的所有技术和科学术语具有与本领域技术人员通常所理解相同的含义。与本文中所描述的方法和材料类似或等效的方法和材料可用于实施或测试本发明。一般而言,本文中所描述的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白与核酸化学使用的命名法及其技术是本领域中已知且常用的,或是

根据制造商的说明。

[0230] 本文所提及的全部公开都通过引用并入本文中,以公开和描述与所引用的公开相关的方法和/或材料。

[0231] 参考文献

[0232] Beck A等,2017.Nat Rev Drug Discov.16:315-337.

[0233] Bielekova B.,2013.Neurotherapeutics,10(1):55-67

[0234] Dantal J等,1991,Transplantation 52:110-5

[0235] Kearns JD等,2015.Mol Cancer Ther.14:1625-36.

[0236] Kijanka M等,2015.Nanomedicine.10:161-174.

[0237] Langedijk JP等,2011.Analytical Biochemistry.417:149-155.

[0238] Liu L,2015.J Pharm Sci.104:1866-84.

[0239] Liu Y等,2014.MAbs.6:483-92.

[0240] Lowenthal J.W等,1985.J.Immunol.,135,3988-3994

[0241] Moreau,J.-L等,1987.Eur.J.Immunol.17,929-935;

[0242] Onishi H等,2012Anticanc.Res.32,997-1003

[0243] Queen C等,1989.PNAS.86(24):10029-10033

[0244] Redman JM等,2015.Mol Immunol.67:28-45.

[0245] Setiady Y等,2010.Eur J Immunol.40:780-6),

[0246] Shang B等,2015,Sci Rep.5:15179

[0247] Sliwkowski M&Mellman I,2013.Science.341:1192-8.

[0248] Timmermann P等,2007,J.Mol.Recognit.,20,283-99.

[0249] Volk HD等,1989Clin.exp.Immunol.76,121-5

[0250] Vazquez-Lombardi R等,2015.Drug Discov Today.20:1271-83.

[0251] Smyth M等,2014,Immunol Cell Biol.92,473-4

[0252] Elpek等,2007J Immunol.178(11):6840-8.;

[0253] Golgher等,2002Eur J Immunol.32(11):3267-75;

[0254] Jones等,2002;Cancer Immun.22;2:1

[0255] Onizuka等,1999Cancer Res.59(13):3128-33.;

[0256] Shimizu等,1999J Immunol.163(10):5211-8

[0257] Hodi等,2008,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,105,3005-3010

[0258] Quezada等,2006,J Clin Invest.116(7):1935-45

[0259] Vargas A等,2017,Immunity,46(4):577-586)

[0260] Kohm A等,2006,J Immunol.176:3301-5;

[0261] Hallett W等,2008.Biol Blood Marrow Transplant 14:1088-1099;

[0262] Fecci P等,2006Clin Cancer Res.12:4294-4305;

[0263] McNeill A等,2007.Scand J Immunol 65:63-9;

[0264] Couper K等,2007.J Immunol.178:4136-4146;

[0265] O'Mahony D等,2008,Blood,112(11),231;

[0266] Oh等,2017,Oncotarget 8(29)47440-4753;

[0267] Kreitman RJ等,2016,Clin Cancer Res,22(2)310-318;

[0268] Flynn MJ等,2016,Mol Cancer Ther 15(11)2709-2721;

[0269] Ellington等Nature.1990;346(6287):818-822;

[0270] Tuerk等,Science.1990;249(4968):505-510;

[0271] Ni等,Curr Med Che 2011;18(27):4206-14;

[0272] Altschul SF等,1997,Nucleic Acids Res.25:33389-3402

[0273] Rajpal等,Proc Natl Acad Sci USA,2005,102(24):8466-71;

[0274] Steinwand等,MAbs,2014,6(1):204-18

[0275] Jarasch A等,Pharm Sci.2015Jun;104(6):1885-1898.

[0001] 序列表

[0002] <110> 塔斯克疗法有限公司

[0003] 癌症研究技术有限公司

[0004] <120> 用于肿瘤特异性细胞清除的抗-CD25

[0005] <130> P115243WO

[0006] <150> GB1804029.5

[0007] <151> 2018-03-13

[0008] <160> 10

[0009] <170> PatentIn version 3.5

[0010] <210> 1

[0011] <211> 119

[0012] <212> PRT

[0013] <213> 智人

[0014] <400> 1

[0015] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

[0016] 1 5 10 15

[0017] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

[0018] 20 25 30

[0019] Gly Ile Gln Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[0020] 35 40 45

[0021] Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

[0022] 50 55 60

[0023] Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

[0024] 65 70 75 80

[0025] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0026] 85 90 95

[0027] Arg Ala Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

[0028] 100 105 110

[0029] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0030] 115

[0031] <210> 2

[0032] <211> 119

[0033] <212> PRT

[0034] <213> 智人

[0035] <400> 2

[0036] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

[0037] 1 5 10 15

[0038] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

[0039] 20 25 30

[0040] Gly Ile Gln Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[0041] 35 40 45

[0042] Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

[0043] 50 55 60

[0044] Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu

[0045] 65 70 75 80

[0046] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0047] 85 90 95

[0048] Arg Ala Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

[0049] 100 105 110

[0050] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0051] 115

[0052] <210> 3

[0053] <211> 119

[0054] <212> PRT

[0055] <213> 智人

[0056] <400> 3

[0057] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

[0058] 1 5 10 15

[0059] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

[0060] 20 25 30

[0061] Gly Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0062] 35 40 45

[0063] Ser Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

[0064] 50 55 60

[0065] Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu

[0066] 65 70 75 80

[0067] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0068] 85 90 95

[0069] Arg Ala Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

[0070] 100 105 110

[0071] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0072] 115

[0073] <210> 4

[0074] <211> 106

[0075] <212> PRT

[0076] <213> 智人

[0077] <400> 4

[0078] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0079] 1 5 10 15
[0080] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0081] 20 25 30
[0082] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Phe
[0083] 35 40 45
[0084] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0085] 50 55 60
[0086] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
[0087] 65 70 75 80
[0088] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
[0089] 85 90 95
[0090] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0091] 100 105
[0092] <210> 5
[0093] <211> 106
[0094] <212> PRT
[0095] <213> 智人
[0096] <400> 5
[0097] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0098] 1 5 10 15
[0099] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0100] 20 25 30
[0101] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Phe
[0102] 35 40 45
[0103] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0104] 50 55 60
[0105] Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
[0106] 65 70 75 80
[0107] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
[0108] 85 90 95
[0109] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0110] 100 105
[0111] <210> 6
[0112] <211> 106
[0113] <212> PRT
[0114] <213> 智人
[0115] <400> 6
[0116] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0117] 1 5 10 15

[0118] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0119] 20 25 30

[0120] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Phe

[0121] 35 40 45

[0122] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

[0123] 50 55 60

[0124] Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

[0125] 65 70 75 80

[0126] Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

[0127] 85 90 95

[0128] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0129] 100 105

[0130] <210> 7

[0131] <211> 106

[0132] <212> PRT

[0133] <213> 智人

[0134] <400> 7

[0135] Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0136] 1 5 10 15

[0137] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0138] 20 25 30

[0139] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Leu Ile Phe

[0140] 35 40 45

[0141] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

[0142] 50 55 60

[0143] Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

[0144] 65 70 75 80

[0145] Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

[0146] 85 90 95

[0147] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0148] 100 105

[0149] <210> 8

[0150] <211> 272

[0151] <212> PRT

[0152] <213> 智人

[0153] <400> 8

[0154] Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val

[0155] 1 5 10 15

[0156] Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro
[0157] 20 25 30
[0158] His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn
[0159] 35 40 45
[0160] Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr
[0161] 50 55 60
[0162] Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys
[0163] 65 70 75 80
[0164] Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro
[0165] 85 90 95
[0166] Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro
[0167] 100 105 110
[0168] Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro
[0169] 115 120 125
[0170] Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val
[0171] 130 135 140
[0172] Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His
[0173] 145 150 155 160
[0174] Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg
[0175] 165 170 175
[0176] Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln
[0177] 180 185 190
[0178] Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu
[0179] 195 200 205
[0180] Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr
[0181] 210 215 220
[0182] Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln
[0183] 225 230 235 240
[0184] Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu
[0185] 245 250 255
[0186] Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile
[0187] 260 265 270
[0188] <210> 9
[0189] <211> 14
[0190] <212> PRT
[0191] <213> 智人
[0192] <400> 9
[0193] Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro
[0194] 1 5 10

[0195] <210> 10

[0196] <211> 15

[0197] <212> PRT

[0198] <213> 智人

[0199] <400> 10

[0200] Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro

[0201] 1 5 10 15

(A)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGIQWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNYNSALMSRVT
ISKDNSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLVTVSS

(B)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGIQWVRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNYNSALMSRVT
ISKDNSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLVTVSS

(C)

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFSLTSYGIQWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTNYNSALMSRFT
ISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLVTVSS

(D)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK

(E)

QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIPARFSGSGSGT
DYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK

(F)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIFATSNLASGVPSRFSGSGSGT
DYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK

(G)

QIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKSPKPLIFATSNLASGVPSRFSGSGSGT
DYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK

图1

```
          10         20         30         40         50         60
MDSYLLMWGL LTFIMVPGCQ AELCDDDPPE IPHATFKAMA YKEGTMLNCE CKRGFRRIKS

          70         80         90        100        110        120
                                                              DAC
GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVTPQPEE QKERKTTEMQ SPMQPVDQAS

         130        140        150        160        170        180
DAC cont.                              aCD25ep-a          aCD25ep-b
LPGHCREPPP WENEATERIY HFVVGQMVYY QCVQGYRALH RGPAESVCKM THGKTRWTQP

         190        200        210        220        230        240
QLICTGEMET SQFPGEEKPQ ASPEGRPESE TSCLVTTTDF QIQTEMAATM ETSIFTTEYQ

         250        260        270
VAVAGCVFLL ISVLLLSGLT WQRRQRKSRR TI
```

图2

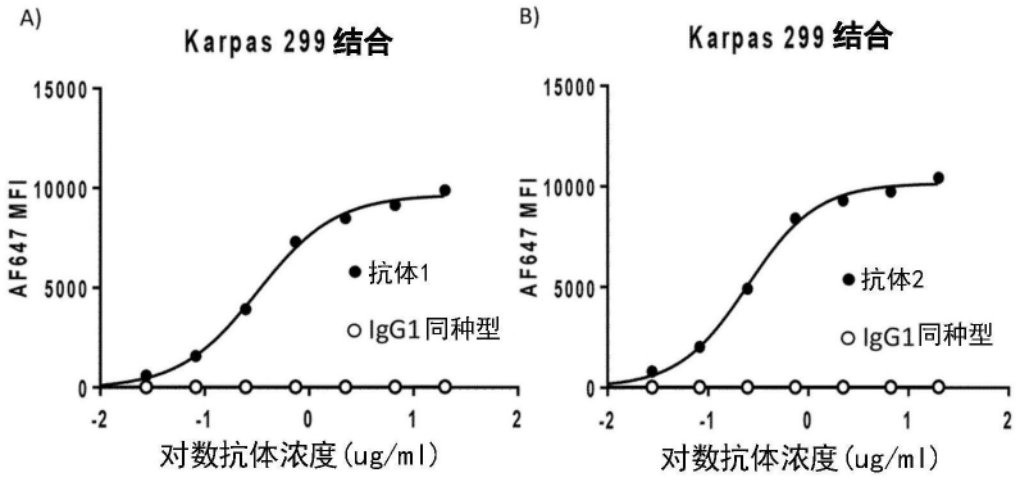


图3

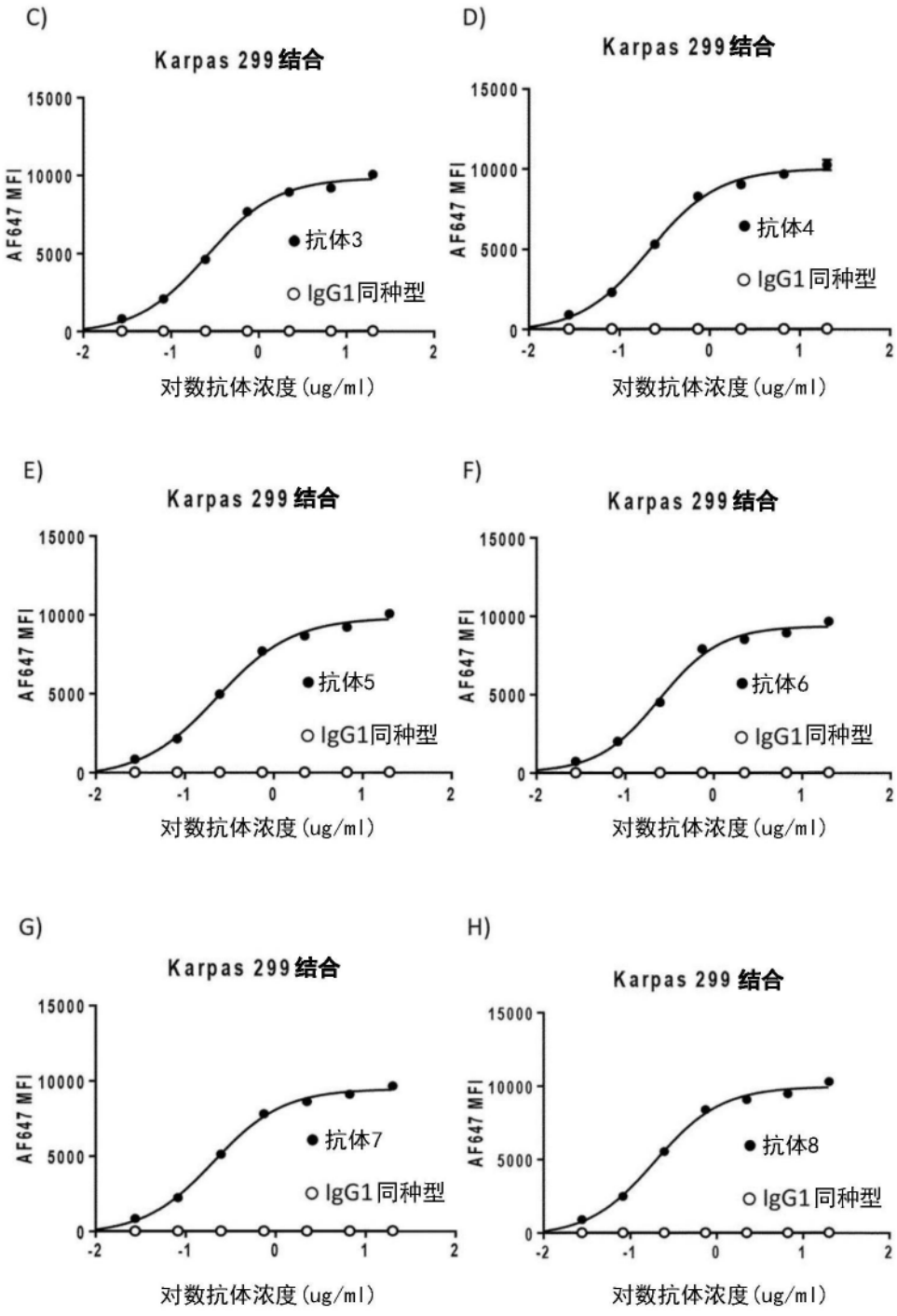

C)
Karpas 299结合
AF647 MFI
15000
10000
5000
0
-2
-1
0
1
2
抗体3
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)
D)
Karpas 299结合
抗体4
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)
E)
Karpas 299结合
抗体5
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)
F)
Karpas 299结合
抗体6
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)
G)
Karpas 299结合
抗体7
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)
H)
Karpas 299结合
抗体8
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)

图3续

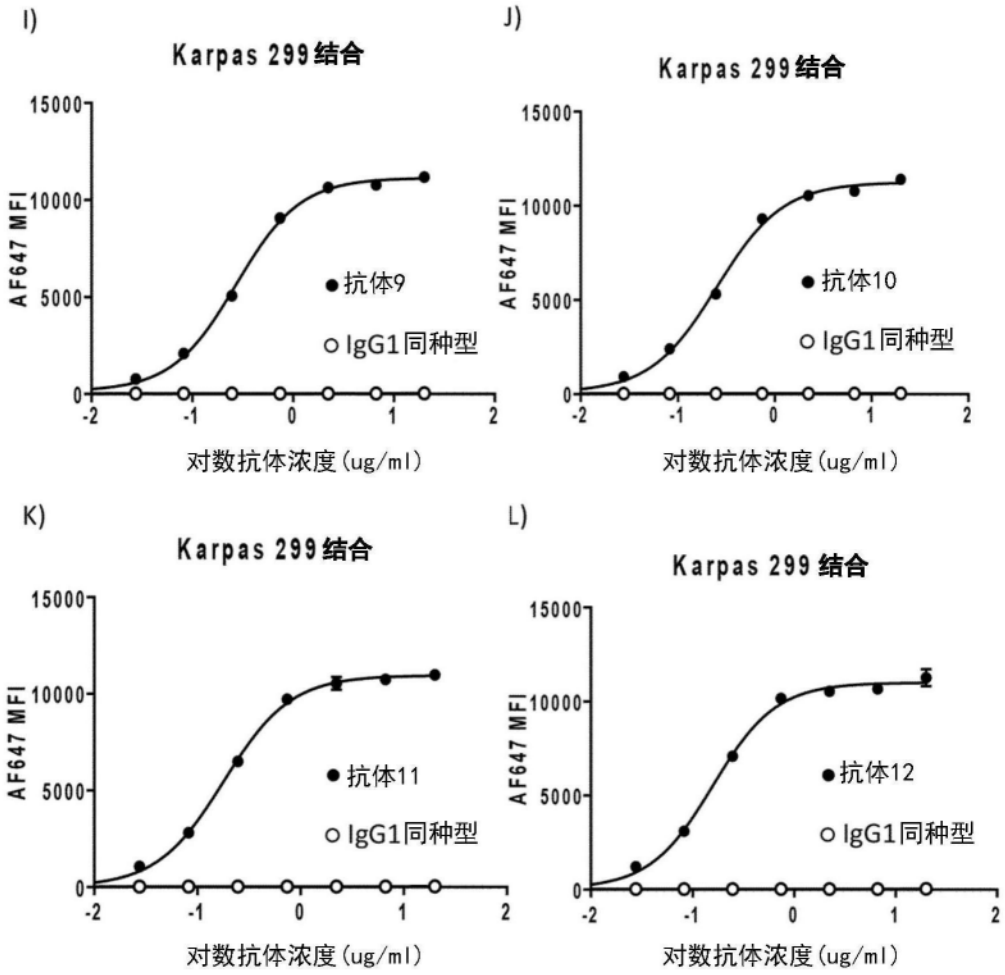

I)
Karpas 299结合
AF647 MFI
15000
10000
5000
0
-2
-1
0
1
2
抗体9
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)
J)
Karpas 299结合
AF647 MFI
抗体10
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)
K)
Karpas 299结合
AF647 MFI
抗体11
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)
L)
Karpas 299 结合
AF647 MFI
抗体12
IgG1同种型
对数抗体浓度(ug/ml)

图3续

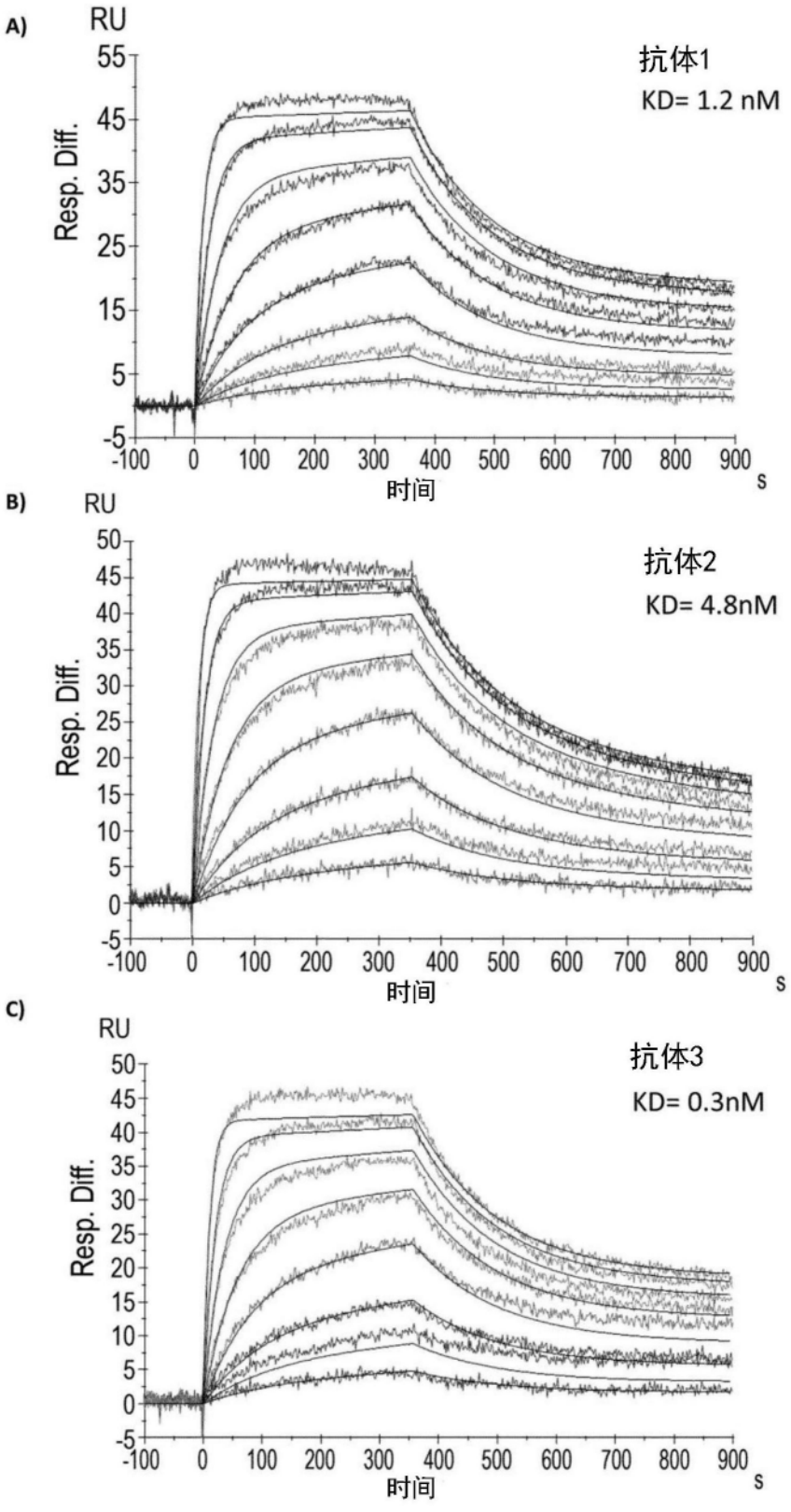

A)
RU
Resp. Diff.
抗体1
KD= 1.2 nM
时间
s
B)
RU
Resp. Diff.
抗体2
KD= 4.8nM
时间
s
C)
RU
Resp. Diff.
抗体3
KD= 0.3nM
时间
s

图4

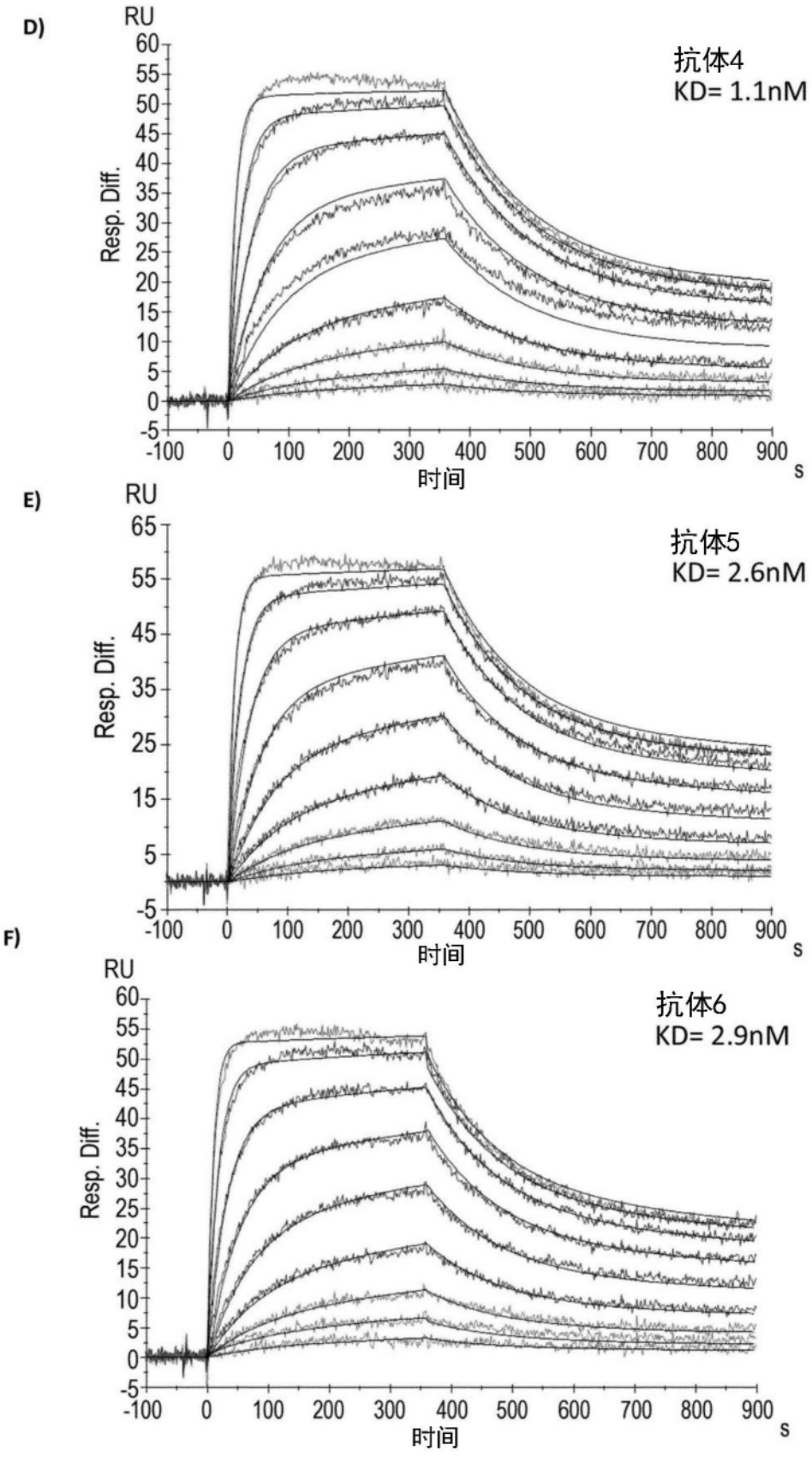

D)
RU
Resp. Diff.
抗体4
KD= 1.1nM
时间
s
E)
RU
Resp. Diff.
抗体5
KD= 2.6nM
时间
s
F)
RU
Resp. Diff.
抗体6
KD= 2.9nM
时间
s

图4续

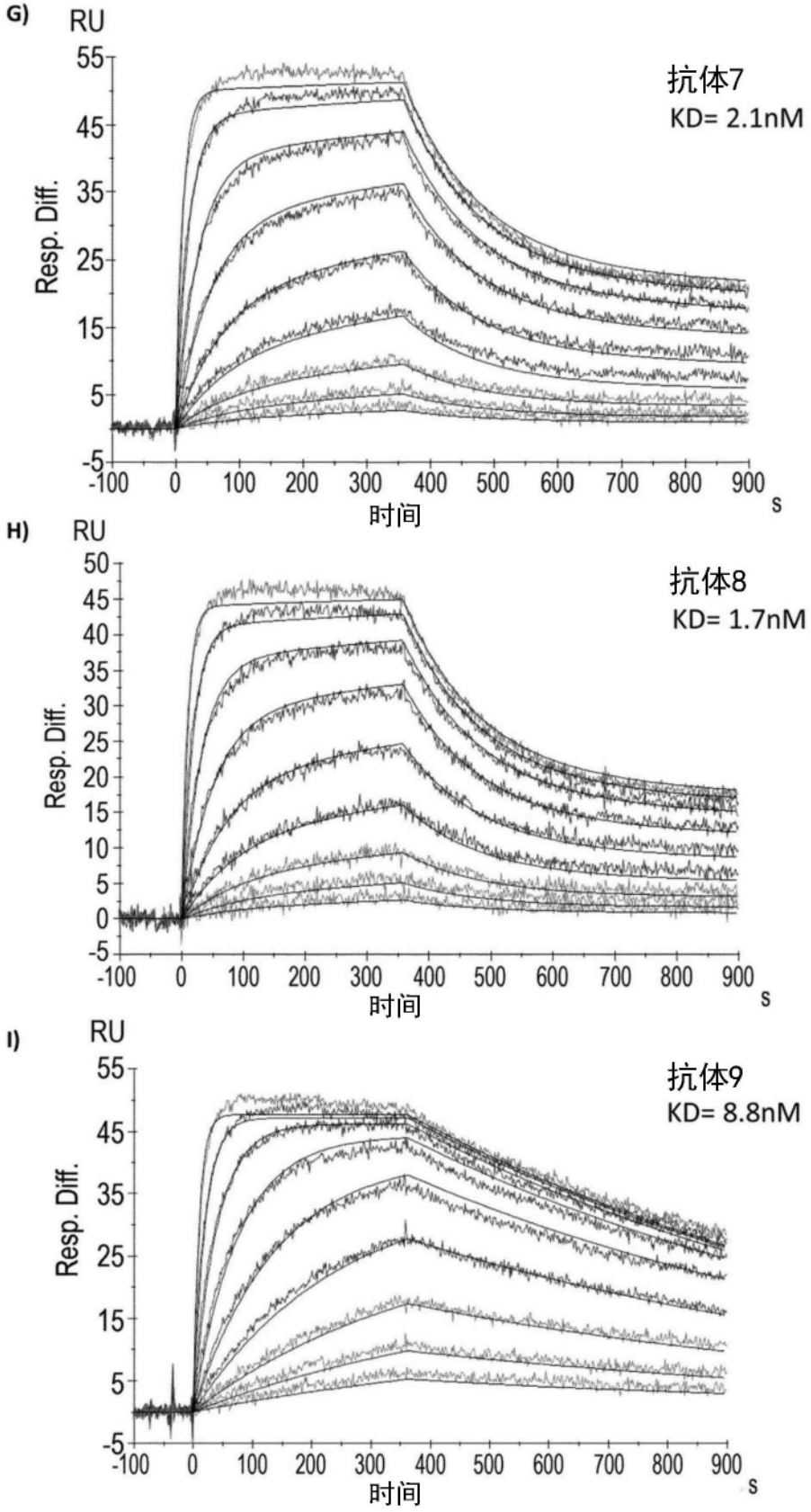

G)
RU
Resp. Diff.
时间
s
抗体7
KD= 2.1nM
H)
RU
Resp. Diff.
时间
s
抗体8
KD= 1.7nM
I)
RU
Resp. Diff.
时间
s
抗体9
KD= 8.8nM

图4续

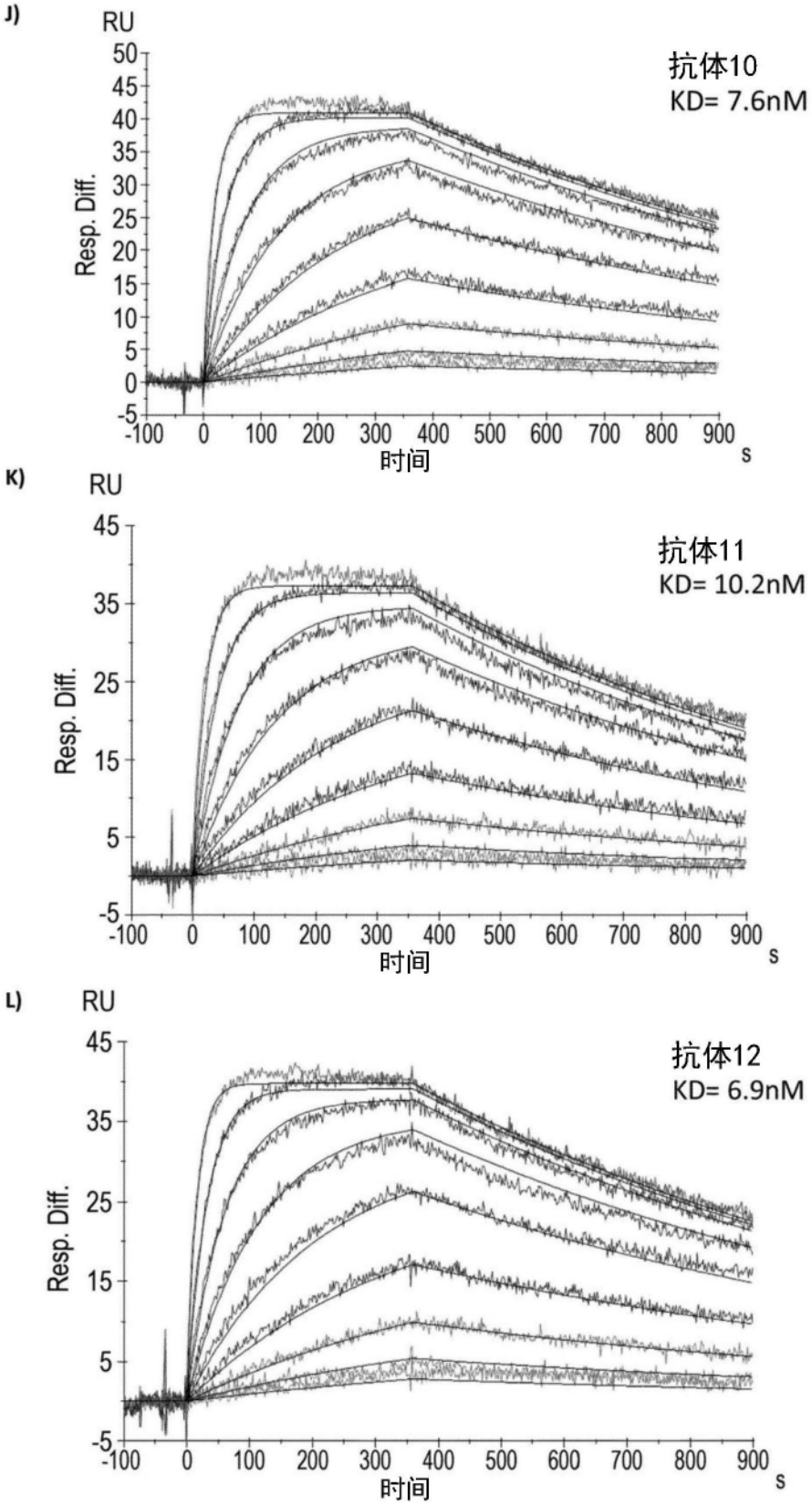

J)
RU
Resp. Diff.
抗体10
KD= 7.6nM
时间
s
K)
RU
Resp. Diff.
抗体11
KD= 10.2nM
时间
s
L)
RU
Resp. Diff.
抗体12
KD= 6.9nM
时间
s

图4续

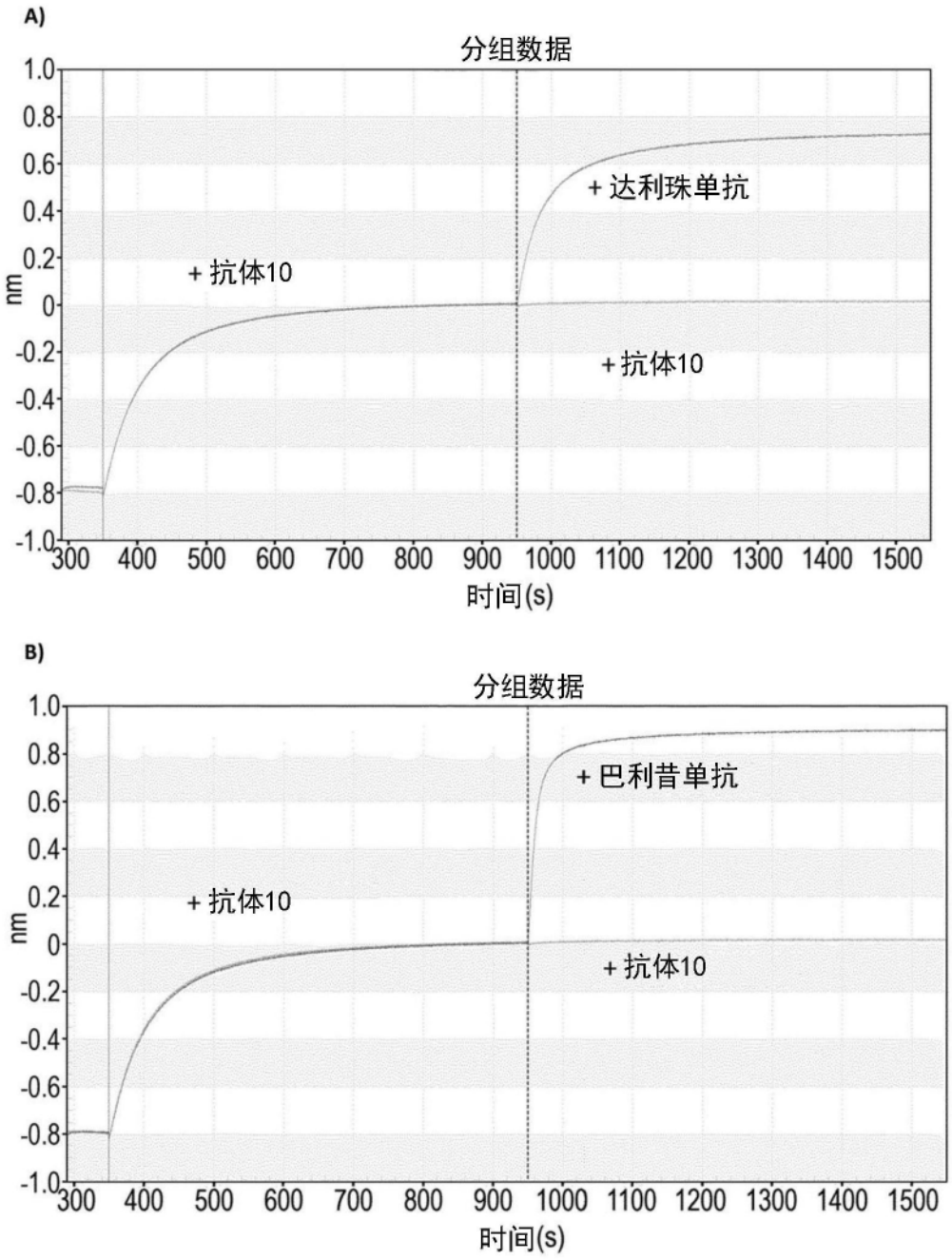

A)
分组数据
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
-0.8
-1.0
nm
+ 抗体10
+ 达利珠单抗
+ 抗体10
300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500
时间(s)
B)
分组数据
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
-0.8
-1.0
nm
+ 抗体10
+ 巴利昔单抗
+ 抗体10
300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500
时间(s)

图5

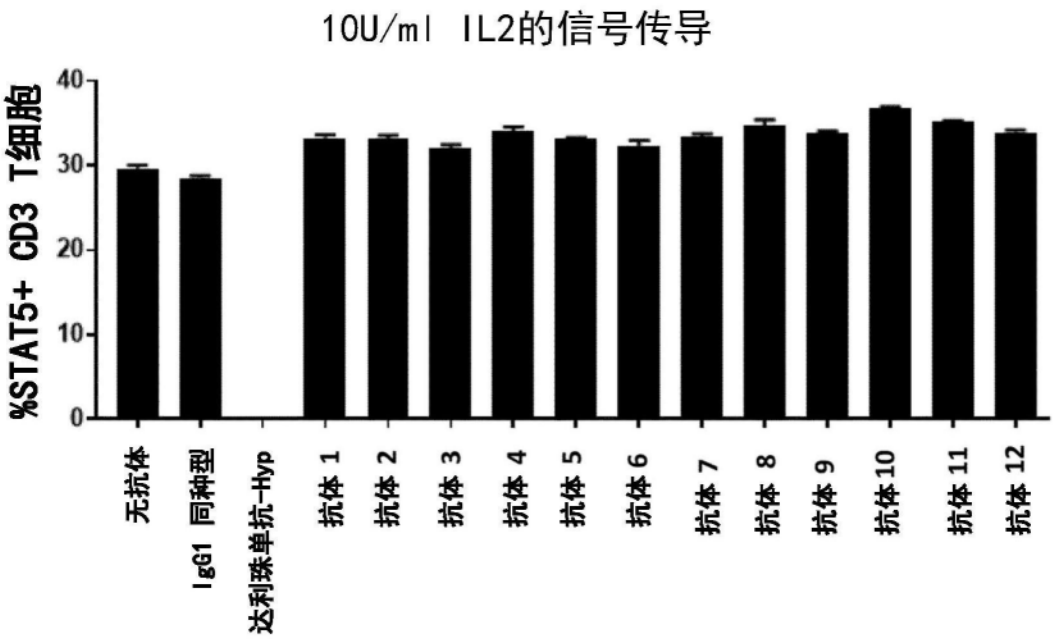

10U/ml IL2的信号传导
%STAT5+ CD3 T细胞
40
30
20
10
0
无抗体
IgG1 同种型
达利珠单抗-Hyp
抗体 1
抗体 2
抗体 3
抗体 4
抗体 5
抗体 6
抗体 7
抗体 8
抗体 9
抗体 10
抗体 11
抗体 12

图6

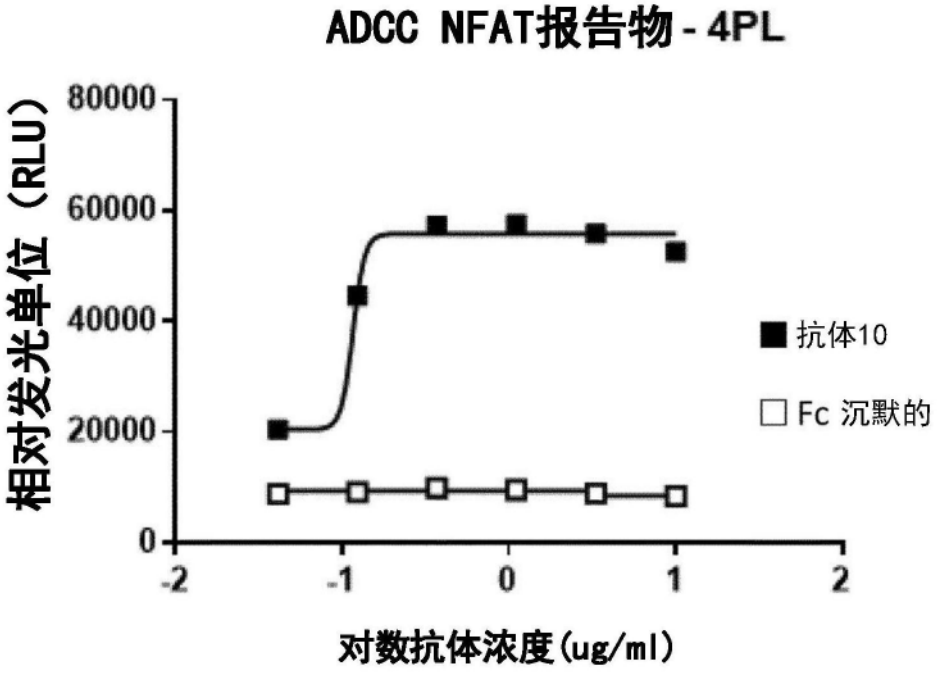

ADCC NFAT报告物 - 4PL
相对发光单位（RLU）
80000
60000
40000
20000
0
-2
-1
0
1
2
对数抗体浓度(ug/ml)
抗体10
Fc 沉默的

图7

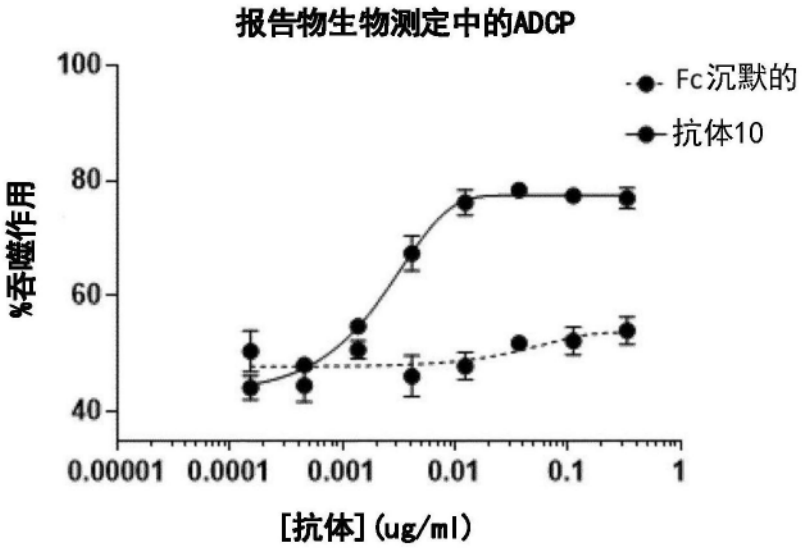

报告物生物测定中的ADCP
Fc沉默的
抗体10
%吞噬作用
100
80
60
40
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
[抗体](ug/ml)

图8

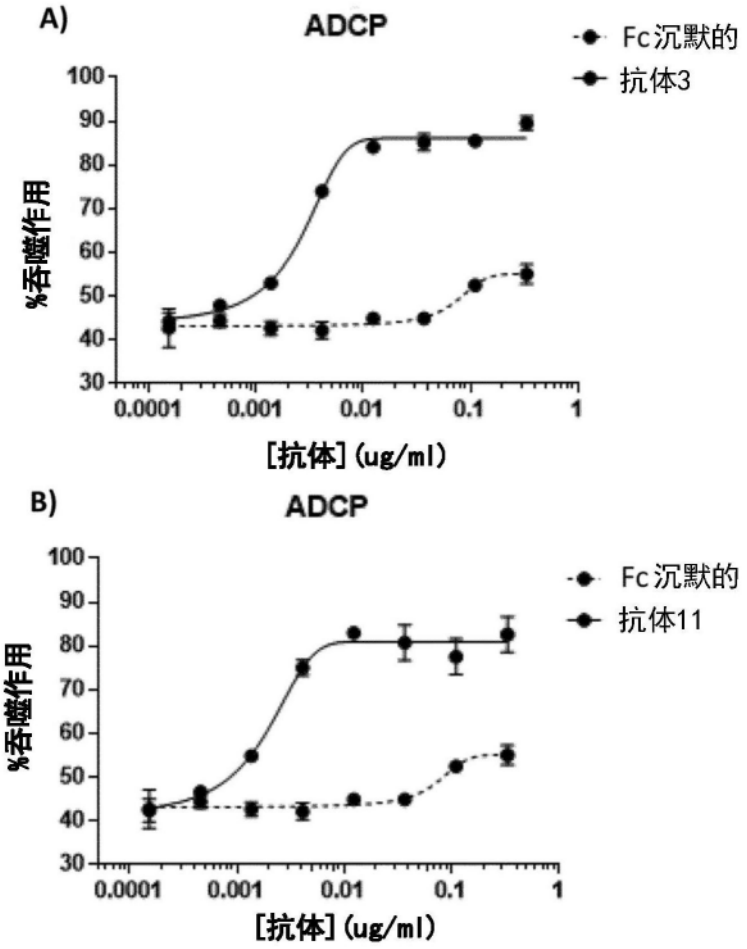

A)
ADCP
Fc沉默的
抗体3
%吞噬作用
100
90
80
70
60
50
40
30
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
[抗体](ug/ml)
B)
ADCP
Fc沉默的
抗体11
%吞噬作用
100
90
80
70
60
50
40
30
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
[抗体](ug/ml)

图9

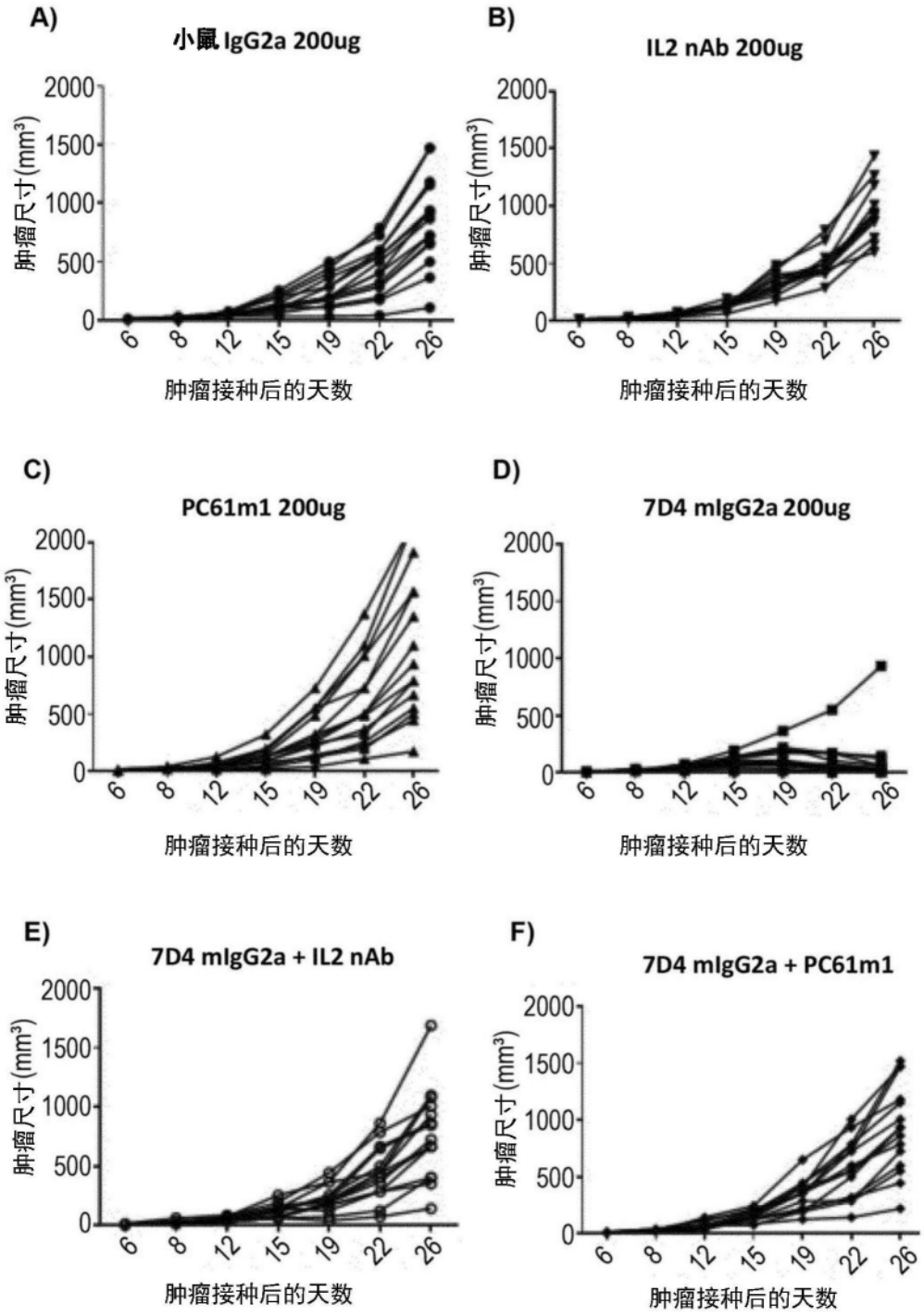

A)
小鼠 IgG2a 200ug
B)
IL2 nAb 200ug
C)
PC61m1 200ug
D)
7D4 mIgG2a 200ug
E)
7D4 mIgG2a + IL2 nAb
F)
7D4 mIgG2a + PC61m1
肿瘤尺寸(mm³)
肿瘤接种后的天数
0
500
1000
1500
2000
6
8
12
15
19
22
26

图10