(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105073128 A
(43)申请公布日 2015.11.18

(21)申请号 201380075311.8
(22)申请日 2013.12.14
(30)优先权数据
61/807998 2013.04.03 US
13/966450 2013.08.14 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/075201 2013.12.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/163684 EN 2014.10.09
(71)申请人 IBC药品公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 张健行 D.M.戈登伯格 E.A.罗西 D.罗西
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 罗文锋 彭昶
(51)Int.Cl.
A61K 38/21(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

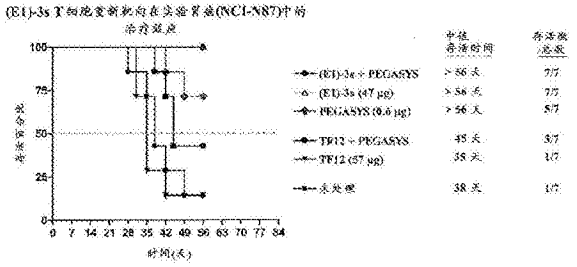
权利要求书8页 说明书84页
序列表53页 附图22页

(54)发明名称

用于诱导对疾病的免疫应答的组合疗法

(57)摘要

本发明涉及两种或更多种用于诱导对癌症或传染病的免疫应答的药剂的组合。药剂可以包括白细胞重定向复合物、抗体-药物缀合物、干扰素(优选干扰素-a)和/或检查点抑制子抗体。白细胞重定向复合物具有至少一个针对白细胞抗原的结合位点和至少一个针对患病细胞或病原体上的抗原的结合位点。优选地,所述复合物是DNL™复合物。更优选地,所述复合物包含双特异性抗体(bsAb)。最优选地,所述bsAb是抗CD3×抗CD19双特异性抗体,但可以使用针对其它白细胞抗原和/或疾病相关抗原的抗体。所述复合物能够靶向效应子T细胞、NK细胞、单核细胞或嗜中性粒细胞,以诱导与癌症或传染病相关的细胞的白细胞介导的细胞毒性。通过共同施用干扰素、检查点抑制子抗体和/或ADC来增强所述细胞毒性免疫应答。



CN 105073128 A

1.一种诱导对癌症或传染病的免疫应答的方法，其包括向患有癌症或传染病的受试者施用两种或更多种药剂的组合，所述药剂是选自 (i) 白细胞重新定向双特异性抗体；(ii) 选自干扰素 α、干扰素 β、干扰素 λ1、干扰素 λ2 和干扰素 λ3 的干扰素；(iii) 检查点抑制子抗体；和 (iv) 抗体 - 药物缀合物 (ADC)；

其中所述两种或更多种药剂的施用诱导针对所述癌症或传染病的白细胞介导的免疫应答。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述白细胞重新定向双特异性抗体包含：

a) 结合于白细胞抗原的第一抗体或其抗原结合片段，所述白细胞抗原是选自 ADAM17、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11a、CD11b、CD14、CD16、CD16b、CD25、CD28、CD30、CD32a、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD56、CD57、CD64、CD69、CD74、CD89、CD90、CD137、CD177、CEACAM6、CEACAM8、HLA-DRα 链、KIR 和 SLC44A2；和

b) 结合于靶抗原或病原体的第二抗体或其抗原结合片段，所述靶抗原或病原体是选自：碳酸酐酶 IX、甲胎蛋白、α - 辅肌动蛋白 -4、A3、A33 抗体特异性抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3- 抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1α、结肠特异性抗原 -p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250 抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 和其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、低氧可诱导因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN-γ、IFN-α、IFN-β、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子 -1 (IGF-1)、KC4- 抗原、KS-1- 抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白 -2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL 受体、TNF-α、Tn 抗原、汤姆森 - 弗里德里希抗原、肿瘤坏死抗原、TROP-2、VEGFR、ED-B 纤连蛋白、WT-1、17-1A- 抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、致癌基因产物、HIV 病毒、结核分枝杆菌 (*mycobacterium tuberculosis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、抗甲氧西林性金黄色葡萄球菌 (meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophilia*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌 (*Pneumococcus*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、B型流感嗜血杆菌 (*Hemophilis influenzae B*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、莱姆病螺旋体 (Lyme disease spirochetes)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium*

leprae)、流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*)、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘 - 带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T 细胞白血病病毒、埃 - 巴二氏病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病病毒、仙台病毒、猫白血病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒 40、小鼠乳腺瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗河病毒、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、让氏锥虫 (*Trypanosoma rangeli*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、罗德西亚锥虫 (*Trypanosoma rhodesiensei*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、曼森氏裂体吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、日本裂体吸虫 (*Schistosoma japonicum*)、牛巴贝虫 (*Babesia bovis*)、艾美耳球虫 (*Elmeria tenella*)、旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*)、热带利什曼虫 (*Leishmania tropica*)、旋毛虫 (*Trichinella spiralis*)、小泰勒虫 (*Theileria parva*)、泡状带绦虫 (*Taenia hydatigena*)、羊绦虫 (*Taenia ovis*)、牛肉绦虫 (*Taenia saginata*)、细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*)、科氏中殖孔绦虫 (*Mesocestoides corti*)、关节炎支原体 (*Mycoplasma arthritidis*)、鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、口腔支原体 (*M. orale*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*)、拉氏无胆甾原体 (*Acholeplasma laidlawii*)、唾液支原体 (*M. salivarium*) 和肺炎支原体 (*M. pneumoniae*)。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述第一抗体或其片段结合于 CD3 或 CD16。

4. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述第二抗体或其片段结合于选自 CD19、CD20、CD22、CD74、HLA-DR、TROP-2、MUC5ac、CEACAM5、CEACAM6、甲胎蛋白 (AFP) 和 IGF-1R 的抗原。

5. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述第二抗体选自 hR1 （抗 IGF-1R）、hPAM4 （抗粘蛋白）、KC4 （抗粘蛋白）、hA20 （抗 CD20）、hA19 （抗 CD19）、hIMMU31 （抗 AFP）、hLL1 （抗 CD74）、hLL2 （抗 CD22）、RFB4 （抗 CD22）、hMu-9 （抗 CSAp）、hL243 （抗 HLA-DR）、hMN-14 （抗 CEACAM5）、hMN-15 （抗 CEACAM6）、hRS7 （抗 TROP-2）、hMN-3 （抗 CEACAM6）、CC49 （抗 TAG-72）、J591 （抗 PSMA）、D2/B （抗 PSMA）、G250 （抗碳酸酐酶 IX）、英夫利昔单抗（抗 TNF-α）、聚乙二醇化赛妥珠单抗（certolizumab pegol）（抗 TNF-α）、阿达木单抗（抗 TNF-α）、阿仑单抗（抗 CD52）、贝伐单抗（抗 VEGF）、西妥昔单抗（抗 EGFR）、吉姆单抗（抗 CD33）、替伊莫单抗（抗 CD20）、帕尼单抗 (panitumumab)（抗 EGFR）、利妥昔单抗（抗 CD20）、托西莫单抗（抗 CD20）、GA101 （抗 CD20）、曲妥单抗（抗 HER2/neu）、托珠单抗 (tocilizumab)（抗 IL-6 受体）、巴利昔单抗（抗 CD25）、达克珠单抗（抗 CD25）、依法利珠单抗（efalizumab）（抗 CD11a）、莫罗单抗（muromonab）-CD3 （抗 CD3 受体）、那他珠单抗（抗 α4 整合素）、BWA-3 （抗组蛋白 H2A/H4）、LG2-1 （抗组蛋白 H3）、MRA12 （抗组蛋白 H1）、PR1-1 （抗组蛋白 H2B）、LG11-2 （抗组蛋白 H2B）、LG2-2 （抗组蛋白 H2B）、P4/D10 （抗 gp120) 和奥玛珠单抗 (omalizumab)（抗 IgE）。

6. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述第二抗体选自 hA19、hR1、hPAM4、hA20 （维妥珠单抗 (veltuzumab)）、hIMMU31、hLL1 （米拉珠单抗 (milatuzumab)）、hLL2 （依帕珠单抗）、hMu-9、hL243、hMN-14、hMN-15、hRS7 和 hMN-3。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述白细胞重定向 bsAb 选自布利莫单抗 (blinatumomab)、MT110、卡妥索单抗 (catumaxomab)、厄妥索单抗、FBTA05 和 TRBS07。

8.如权利要求1所述的方法，其中所述干扰素是干扰素α。

9.如权利要求1所述的方法，其中所述检查点抑制子抗体选自兰利珠单抗(lambrolizumab)(MK-3475)、尼鲁单抗(nivolumab)(BMS-936558)、皮地珠单抗(pidilizumab)(CT-011)、AMP-224、MDX-1105、MEDI4736、MPDL3280A、BMS-936559、伊匹单抗(ipilimumab)、利利单抗(lirlumab)、IPH2101和曲美目单抗(tremelimumab)。

10.如权利要求1所述的方法，其中所述检查点抑制子抗体结合于选自CTLA4、PD1、PD-L1、LAG3、B7-H3、B7-H4、KIR和TIM3的抗原。

11. 如权利要求1所述的方法，其中所述抗体-药物缀合物选自hLL1-多柔比星、hRS7-SN-38、hMN-14-SN-38、hLL2-SN-38、hA20-SN-38、hPAM4-SN-38、hLL1-SN-38、hRS7-Pro-2-P-Dox、hMN-14-Pro-2-P-Dox、hLL2-Pro-2-P-Dox、hA20-Pro-2-P-Dox、hPAM4-Pro-2-P-Dox、hLL1-Pro-2-P-Dox、P4/D10-多柔比星、吉姆单抗-奥佐米星、贝伦妥单抗(brentuximab)-维多汀(vedotin)、曲妥单抗-安坦辛(emtansine)、伊珠单抗(inotuzumab)-奥佐米星、格巴妥莫单抗(glembatumomab)-维多汀、SAR3419、SAR566658、BIIB015、BT062、SGN-75、SGN-CD19A、AMG-172、AMG-595、BAY-94-9343、ASG-5ME、ASG-22ME、ASG-16M8F、MDX-1203、MLN-0264、抗-PSMA ADC、RG-7450、RG-7458、RG-7593、RG-7596、RG-7598、RG-7599、RG-7600、RG-7636、ABT-414、IMGN-853、IMGN-529、伏司妥珠单抗(vorsetuzumab)-马佛多汀(mafodotin)和洛妥珠单抗(lorvotuzumab)-默坦辛(mertansine)。

12.如权利要求1所述的方法，其中所述组合包含选自以下各项的两种或更多种药剂：(i)白细胞重定向双特异性抗体；(ii)干扰素α；和(iii)检查点抑制子抗体。

13. 如权利要求1所述的方法，其中所述组合选自：白细胞重新定向双特异性抗体(bsAb)加IFN-α；白细胞重定向bsAb加检查点抑制子抗体；白细胞重新定向bsAb加IFN-α加检查点抑制子抗体；抗体-药物缀合物(ADC)加检查点抑制子抗体；ADC加白细胞重定向bsAb；ADC加IFN-α加检查点抑制子抗体；ADC加IFN-α加白细胞重定向bsAb；ADC加白细胞重定向bsAb加检查点抑制子抗体；和ADC加白细胞重定向bsAb加IFN-α加检查点抑制子抗体。

14.如权利要求1所述的方法，其中所述两种或更多种药剂是同时或相继施用。

15.如权利要求1所述的方法，其中ADC是在任何其它药剂之前施用。

16.如权利要求1所述的方法，其中所述干扰素是作为游离干扰素、PEG化干扰素、干扰素融合蛋白质或与抗体缀合的干扰素来施用。

17.如权利要求2所述的方法，其中所述第一抗体片段和所述第二抗体片段选自scFv、Fab和dAb。

18. 如权利要求1所述的方法，其中所述白细胞重定向双特异性抗体包含：

a) 与AD（锚定结构域）部分缀合的第一抗体或其抗原结合片段，其中所述AD部分的氨基酸序列来自于AKAP蛋白质；和

b) 与DDD（二聚和对接结构域）部分缀合的第二抗体或其抗原结合片段，其中所述DDD部分的氨基酸序列来自于蛋白激酶A(PKA)调节亚单位RIα、RIβ、RIIα或RIIβ；

其中所述DDD部分的两个拷贝形成二聚体，所述二聚体与所述AD部分的一个拷贝结合以形成复合物。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述 DDD 部分的氨基酸序列选自 RIIα 的残基 1-44、RIIβ 的残基 1-44、RIα 的残基 12-61 和 RIβ 的残基 13-66。

20. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述癌症选自非何杰金氏淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、T 细胞淋巴瘤、T 细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、伯基特淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、毛细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、神经胶质瘤、华氏巨球蛋白血症、癌瘤、黑素瘤、肉瘤、神经胶质瘤、皮肤癌、口腔癌、胃肠道癌、结肠癌、胃癌、肺道癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、胰腺癌、骨癌、肝癌、胆囊癌、肾癌和睾丸癌。

21. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述传染病是感染有选自以下的病原体：小孢霉属（*Microsporum spp.*）、发癣菌属（*Trichophyton spp.*）、表皮癣菌属（*Epidermophyton spp.*）、申克孢子丝菌（*Sporothrix schenckii*）、新型隐球菌、粗球孢子菌（*Coccidioides immitis*）、荚膜组织胞浆菌、皮炎芽生菌（*Blastomyces dermatitidis*）、白色念珠菌（*Candida albican*）、人类免疫缺陷性病毒（HIV）、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病病毒、流感病毒、人类乳头状瘤病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、Reo 病毒、脊髓灰质炎病毒、人血清细小样病毒、猿猴病毒 40、呼吸道合胞病毒、小鼠乳腺瘤病毒、水痘 - 带状疱疹病毒、登革热病毒、风疹病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T 细胞白血病病毒、埃 - 巴二氏病毒、鼠类白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、蓝舌病病毒、炭疽杆菌（*Bacillus anthracis*）、无乳链球菌、嗜肺军团菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、肺炎球菌属（*Pneumococcus spp.*）、B 型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、结核分枝杆菌和支原体属（*Mycoplasma spp*）。

22. 如权利要求 1 所述的方法，其还包括向所述受试者施用治疗剂。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述治疗剂是选自抗体、抗体片段、药物、毒素、酶、细胞毒性剂、抗血管生成剂、促细胞凋亡剂、抗生素、激素、免疫调节剂、细胞因子、趋化因子、反义寡核苷酸、小干扰 RNA（siRNA）、硼化合物和放射性同位素。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述药物是选自 5- 氟尿嘧啶、阿法替尼（afatinib）、阿普立定（aplidin）、阿扎立平、阿那曲唑、蒽环类、阿西替尼（axitinib）、AVL-101、AVL-291、苯达莫司汀、争光霉素、硼替佐米（bortezomib）、博舒替尼、苔藓抑素 -1、白消安、刺孢霉素、喜树碱、卡铂、10- 羟基喜树碱、亚硝脲氮芥、西乐葆、苯丁酸氮芥、顺铂（CDDP）、Cox-2 抑制剂、伊立替康（CPT-11）、SN-38、卡铂、克拉屈滨、camptothecans、克唑替尼（crizotinib）、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、达沙替尼（dasatinib）、地尼西宝（dinaciclib）、多西他赛、放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星、2- 吡咯啉并多柔比星（2P-DOX）、氰基吗啉基多柔比星、多柔比星葡萄糖醛酸苷、表柔比星葡萄糖醛酸苷、埃罗替尼（erlotinib）、雌氮芥、表鬼臼毒素（epidophyllotoxin）、埃罗替尼、恩替诺特（entinostat）、雌激素受体结合剂、依托泊苷（VP16）、依托泊苷葡萄糖醛酸苷、依托泊苷磷酸盐、依西美坦、芬戈莫德（fingolimod）、氟尿苷（FUdR）、3',5'-O- 二油酰基 -FudR（FUdR-dO）、氟达拉滨、氟他胺、法呢基蛋白转移酶抑制剂、夫拉平度（flavopiridol）、福他替尼（fostamatinib）、吉尼替比（ganetespib）、GDC-0834、GS-1101、吉非替尼（gefitinib）、吉西他滨、羟基脲、依鲁替尼（ibrutinib）、伊达比星、艾

代拉利司 (idelalisib)、异环磷酰胺、伊马替尼 (imatinib)、L- 天冬酰胺酶、、拉帕替尼 (lapatinib)、来那度胺 (lenolidamide)、甲酰四氢叶酸、LFM-A13、环己亚硝脲、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、6- 巯基嘌呤、氨甲蝶呤、米托蒽醌、光神霉素、丝裂霉素、米托坦、诺维本、来那替尼 (neratinib)、尼罗替尼 (nilotinib)、亚硝基脲、奥拉帕尼 (olaparib)、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、PCI-32765、喷司他丁、Pro-2-P-Dox、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、索拉非尼 (sorafenib)、链脲霉素、SU11248、舒尼替尼 (sunitinib)、它莫西芬、替莫唑胺 (DTIC 的水溶液形式)、反铂 (transplatinum)、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替派、替尼泊苷、托泊替康、尿嘧啶芥 (uracil mustard)、瓦他拉尼 (vatalanib)、长春瑞滨、长春花碱、长春新碱、长春花生物碱和 ZD1839。

25. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述趋化因子是选自 RANTES、MCAF、MIP1- α 、MIP1- β 和 IP-10。

26. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述免疫调节剂是选自细胞因子、干细胞生长因子、淋巴细胞毒素、造血因子、集落刺激因子 (CSF)、干扰素 (IFN)、促红细胞生成素和促血小板生成素。

27. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述细胞因子是选自人生长激素、N- 甲硫氨酰基人生长激素、牛生长激素、甲状旁腺激素、甲状腺素、胰岛素、胰岛素原、松弛素、松弛素原、促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH)、促黄体生成激素 (LH)、肝生长因子、前列腺素、成纤维细胞生长因子、催乳素、胎盘催乳素、OB 蛋白、肿瘤坏死因子 α 、肿瘤坏死因子 β 、苗勒氏管抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、活化素、血管内皮生长因子、整合素、血小板生成素 (TPO)、神经生长因子 (NGF)、NGF- β 、血小板生长因子、转化生长因子 (TGF)、TGF- α 、TGF- β 、胰岛素样生长因子 I、胰岛素样生长因子 II、促红细胞生成素 (EPO)、骨诱导因子、干扰素、干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 λ 、集落刺激因子 (CSF)、巨噬细胞 -CSF (M-CSF)、粒细胞 - 巨噬细胞 -CSF(GM-CSF)、粒细胞 -CSF(G-CSF)、白介素 -1 (IL-1)、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、LIF、kit 配体、FLT-3、制管张素、血小板反应蛋白、内皮抑素、肿瘤坏死因子和 LT(淋巴毒素)。

28. 一种治疗癌症或传染病的方法，其包括向患有癌症或传染病的受试者施用选自以下各项的两种或更多种药剂的组合 :(i) 白细胞重新定向双特异性抗体 ;(ii) 选自干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 λ 1、干扰素 λ 2 和干扰素 λ 3 的干扰素 ;(iii) 检查点抑制子抗体 ; 和 (iv) 抗体 - 药物缀合物 (ADC) ;

其中所述两种或更多种药剂的施用诱导白细胞介导的针对所述疾病的免疫应答。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述癌症是选自非何杰金氏淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、T 细胞淋巴瘤、T 细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、伯基特淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、毛细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、神经胶质瘤、华氏巨球蛋白血症、癌瘤、黑素瘤、肉瘤、神经胶质瘤、皮肤癌、口腔癌、胃肠道癌、结肠癌、胃癌、肺道癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、胰腺癌、骨癌、肝癌、胆囊癌、肾癌和睾丸癌。

30. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述传染病是感染有选自以下的病原体 : 小孢霉属、发癣菌属、表皮癣菌属、申克孢子丝菌、新型隐球菌、粗球孢子菌、荚膜组织胞浆菌、皮炎

芽生菌、白色念珠菌、人类免疫缺陷性病毒 (HIV)、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病病毒、流感病毒、人类乳头状瘤病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、仙台病毒、猫白血病毒、Reo 病毒、脊髓灰质炎病毒、人血清细小样病毒、猿猴病毒 40、呼吸道合胞病毒、小鼠乳腺瘤病毒、水痘 - 带状疱疹病毒、登革热病毒、风疹病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T 细胞白血病毒白血病病毒、埃 - 巴二氏病毒、鼠类白血病毒白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、蓝舌病病毒、炭疽杆菌、无乳链球菌、嗜肺军团菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、肺炎球菌属、B 型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、结核分枝杆菌和支原体属。

31. 如权利要求 28 所述的方法，其还包括向所述受试者施用治疗剂。

32. 如权利要求 31 所述的方法，其中所述治疗剂是选自抗体、抗体片段、药物、毒素、酶、细胞毒性剂、抗血管生成剂、促细胞凋亡剂、抗生素、激素、免疫调节剂、细胞因子、趋化因子、反义寡核苷酸、小干扰 RNA (siRNA)、硼化合物和放射性同位素。

33. 如权利要求 28 所述的方法，其还包括向所述受试者施用靶结合蛋白，其包含：

(a) 第一多肽，其包含由第一肽连接子连接于 VL-CL 免疫球蛋白结构域的 CL 的第一单链 Fv 结合位点 (scFv)；和

(b) 第二多肽，其包含由第二肽连接子连接于 VH-CH1 免疫球蛋白结构域的 CH1 的第二单链 Fv 结合位点 (scFv)，其中所述 CH1 是人类 IgG1 CH1；

其中所述第一 scFv 和所述第二 scFv 各自独立地形成靶结合位点，且其中所述 VL 区和所述 VH 区缔合以形成靶结合位点；其中所述第二肽连接子中的半胱氨酸残基与所述 CL 区形成二硫键；且其中所述三个靶结合位点结合于选自肿瘤相关抗原、病原体表达的抗原和由效应子 T 细胞、NK 细胞、单核细胞或嗜中性粒细胞表达的抗原的抗原。

34. 一种组合物，其包含选自以下各项的两种或更多种药剂：(i) 白细胞重新定向双特异性抗体；(ii) 选自干扰素 α、干扰素 β、干扰素 λ1、干扰素 λ2 和干扰素 λ3 的干扰素；(iii) 检查点抑制子抗体；和 (iv) 抗体 - 药物缀合物 (ADC)；

其中所述组合物的施用诱导白细胞介导的针对所述疾病的免疫应答。

35. 如权利要求 34 所述的组合物，其中所述白细胞重新定向双特异性抗体包含：

a) 结合于选自以下各项的白细胞抗原的第一抗体或其抗原结合片段：ADAM17、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11a、CD11b、CD14、CD16、CD16b、CD25、CD28、CD30、CD32a、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD56、CD57、CD64、CD69、CD74、CD89、CD90、CD137、CD177、CEACAM6、CEACAM8、HLA-DRα 链、KIR 和 SLC44A2；和

b) 结合于选自以下各项的靶抗原或病原体的第二抗体或其抗原结合片段：碳酸酐酶 IX、甲胎蛋白、α - 辅肌动蛋白 -4、A3、A33 抗体特异性抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3 抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1α、结肠特异性抗原 -p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、

Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250 抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 和其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、低氧可诱导因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN-γ、IFN-α、IFN-β、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子 -1 (IGF-1)、KC4 抗原、KS-1 抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白 -2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL 受体、TNF-α、Tn 抗原、汤姆森 - 弗里德里希抗原、肿瘤坏死抗原、TROP-2、VEGFR、ED-B 纤连蛋白、WT-1、17-1A- 抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、致癌基因产物、HIV 病毒、结核分枝杆菌、无乳链球菌、抗甲氧西林性金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、B 型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘 - 带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T 细胞白血病病毒、埃 - 巴二氏病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病病毒、仙台病毒、猫白血病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒 40、小鼠乳腺瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗河病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、刚地弓形虫、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼森氏裂体吸虫、日本裂体吸虫、牛巴贝虫、艾美耳球虫、旋盘尾丝虫、热带利什曼虫、旋毛虫、小泰勒虫、泡状带绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科氏中殖孔绦虫、关节炎支原体、鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、拉氏无胆甾原体、唾液支原体和肺炎支原体。

36. 如权利要求 35 所述的组合物，其中所述第一抗体或其片段结合于 CD3。

37. 如权利要求 35 所述的组合物，其中所述第二抗体或其片段结合于选自 CD19、CD20、CD22、CD74、HLA-DR、TROP-2、MUC5ac、CEACAM5、CEACAM6、甲胎蛋白 (AFP) 和 IGF-1R 的抗原。

38. 如权利要求 35 所述的组合物，其中所述第二抗体选自 hR1 (抗 IGF-1R)、hPAM4 (抗粘蛋白)、KC4 (抗粘蛋白)、hA20 (抗 CD20)、hA19 (抗 CD19)、hIMMU31 (抗 AFP)、hLL1 (抗 CD74)、hLL2 (抗 CD22)、RFB4 (抗 CD22)、hMu-9 (抗 CSAp)、hL243 (抗 HLA-DR)、hMN-14 (抗 CEACAM5)、hMN-15 (抗 CEACAM6)、hRS7 (抗 TROP-2)、hMN-3 (抗 CEACAM6)、CC49 (抗 TAG-72)、J591 (抗 PSMA)、D2/B (抗 PSMA)、G250 (抗碳酸酐酶 IX)、英夫利昔单抗 (抗 TNF-α)、聚乙二醇化赛妥珠单抗 (抗 TNF-α)、阿达木单抗 (抗 TNF-α)、阿仑单抗 (抗 CD52)、贝伐单抗 (抗 VEGF)、西妥昔单抗 (抗 EGFR)、吉姆单抗 (抗 CD33)、替伊莫单抗 (抗 CD20)、帕尼单抗 (抗 EGFR)、利妥昔单抗 (抗 CD20)、托西莫单抗 (抗 CD20)、GA101 (抗 CD20)、曲妥单抗 (抗 HER2/neu)、托珠单抗 (抗 IL-6 受体)、巴利昔单抗 (抗 CD25)、达克珠单抗 (抗 CD25)、依法利珠单抗 (抗 CD11a)、莫罗单抗 -CD3 (抗 CD3 受体)、那他珠单抗 (抗 α4 整合素)、P4/D10 (抗 gp120) 和奥玛珠单抗 (抗 IgE)。

39. 如权利要求 35 所述的组合物，其中所述第二抗体选自 hA19、hR1、hPAM4、hA20 (维

妥珠单抗）、hIMMU31、hLL1（米拉珠单抗）、hLL2（依帕珠单抗）、hMu-9、hL243、hMN-14、hMN-15、hRS7 和 hMN-3。

40. 如权利要求 34 所述的组合物，其中所述干扰素是干扰素 α。

41. 如权利要求 34 所述的组合物，其中所述检查点抑制子抗体选自兰利珠单抗 (MK-3475)、尼鲁单抗 (BMS-936558)、AMP-224、MDX-1105、MEDI4736、MPDL3280A、BMS-936559、伊匹单抗、利利单抗、IPH2101 (Innate Pharma) 和曲美目单抗。

42. 如权利要求 34 所述的组合物，其中所述检查点抑制子抗体结合于选自 CTLA4、PD1、PD-L1、LAG3、B7-H3、B7-H4、KIR 和 TIM3 的抗原。

43. 如权利要求 34 所述的组合物，其中所述抗体 - 药物缀合物是选自 hLL1- 多柔比星、hRS7-SN-38、hMN-14-SN-38、hLL2-SN-38、hA20-SN-38、hPAM4-SN-38、hLL1-SN-38、hRS7-Pro-2-P-Dox、hMN-14-Pro-2-P-Dox、hLL2-Pro-2-P-Dox、hA20-Pro-2-P-Dox、hPAM4-Pro-2-P-Dox、hLL1-Pro-2-P-Dox、P4/D10- 多柔比星、吉姆单抗 - 奥佐米星、贝伦妥单抗 - 维多汀、曲妥单抗 - 安坦辛、伊珠单抗 - 奥佐米星、格巴妥莫单抗 - 维多汀、SAR3419、SAR566658、BIIB015、BT062、SGN-75、SGN-CD19A、AMG-172、AMG-595、BAY-94-9343、ASG-5ME、ASG-22ME、ASG-16M8F、MDX-1203、MLN-0264、抗 PSMA ADC、RG-7450、RG-7458、RG-7593、RG-7596、RG-7598、RG-7599、RG-7600、RG-7636、ABT-414、IMGN-853、IMGN-529、伏司妥珠单抗 - 马佛多汀和洛妥珠单抗 - 默坦辛。

44. 如权利要求 34 所述的组合物，其中所述组合物包含选自以下各项的两种或更多种药剂：(i) 白细胞重新定向双特异性抗体；(ii) 干扰素 α；和 (iii) 检查点抑制子抗体。

45. 如权利要求 34 所述的组合物，其中所述组合物是选自：白细胞重新定向双特异性抗体 (bsAb) 加 IFN-α；白细胞重新定向 bsAb 加检查点抑制子抗体；白细胞重新定向 bsAb 加 IFN-α 加检查点抑制子抗体；抗体 - 药物缀合物 (ADC) 加检查点抑制子抗体；ADC 加白细胞重新定向 bsAb；ADC 加 IFN-α 加检查点抑制子抗体；ADC 加 IFN-α 加白细胞重新定向 bsAb；ADC 加白细胞重新定向 bsAb 加检查点抑制子抗体；和 ADC 加白细胞重新定向 bsAb 加 IFN-α 加检查点抑制子抗体。

46. 如权利要求 34 所述的组合物，其中所述白细胞重新定向双特异性抗体包含：

a) 与 AD（锚定结构域）部分缀合的第一抗体或其抗原结合片段，其中所述 AD 部分的氨基酸序列来自于 AKAP 蛋白质；和

b) 与 DDD（二聚和对接结构域）部分缀合的第二抗体或其抗原结合片段，其中所述 DDD 部分的氨基酸序列来自于蛋白激酶 A (PKA) 调节亚单位 RIα、RIβ、RIIα 或 RIIβ；

其中所述 DDD 部分的两个拷贝形成二聚体，所述二聚体与所述 AD 部分的一个拷贝结合以形成复合物。

47. 如权利要求 46 所述的组合物，其中所述 DDD 部分的氨基酸序列是选自 RIIα 的残基 1-44、RIIβ 的残基 1-44、RIα 的残基 12-61 和 RIβ 的残基 13-66。

用于诱导对疾病的免疫应答的组合疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是2013年8月14日提交的美国专利申请序列号13/966,450的部分接续，该专利申请根据35U.S.C.119(e)第要求2013年4月3日提交的临时美国专利申请61/807,998的权益，各优先权申请是以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表，其已经以ASCII格式经由EFS-Web提交且以全文引用的方式并入在此。所述ASCII副本创建于2013年12月10日，命名为IBC138WO2_SL.txt，且大小为49,084字节。

发明领域

[0005] 本发明涉及两种或更多种用于诱导对诸如癌症或传染病等疾病的免疫应答的药剂的组合。示例性药剂可以包括：(i)白细胞重定向双特异性抗体；(ii)抗体-药物缀合物；(iii)干扰素，诸如干扰素α、干扰素β或干扰素λ(最优选干扰素-α)；和/或(iv)检查点抑制子抗体。两种或更多种此类药剂的任何组合均可用于标的目标方法和组合物中。所述组合可以同时或相继施用。此类组合可以包含任两种药剂、任三种药剂或所有四种类型药剂。

[0006] 在某些实施方案中，本发明涉及使用白血球白细胞重定向复合物的组合物和方法。所使用的白血球白细胞可以包括T细胞、NK细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞。优选地，所述复合物包含一个结合位点针对T细胞、NK细胞、单核细胞或嗜中性粒细胞上所表达的抗原且另一个结合位点针对患病细胞或病原体上所表达的抗原的双特异性抗体。在更优选的实施方案中，所述复合物被制造为DOCK-AND-LOCK™复合物，其中使用来自人蛋白激酶A(PKA)的二聚和对接结构域(DDD)部分与来自AKAP(A激酶锚定蛋白)的锚定域锚定结构域(AD)部分之间的结合相互作用将所述组分连接在一起。然而，已知并且可以使用制造双特异性抗体复合物的其它方法。标的目标复合物可以包含一种或多种可结合诸如CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69或CD90(最优选CD3)等表达于T细胞上的抗原的抗体或抗原结合抗体片段和一种或多种可结合诸如CD19、CD20、CD22、CD33、CD66e(CEACAM5)、CEACAM6、EpCAM、HER2/neu、EGF受体、Trop-2、MUC5ac或另一种肿瘤相关抗原(TAA)等处于靶细胞上的抗原或表达于不同的患病细胞或病原微生物上的抗原的抗体或抗原结合抗体片段。以下更详细地论述所使用的特定靶抗原。所述双特异性抗体重新定向效应子T细胞、单核细胞、NK细胞或嗜中性粒细胞以靶向患病的细胞、组织或病原体，且诱导针对靶标的目标免疫应答。

[0007] 其它实施方案涉及诸如干扰素α、干扰素β或干扰素λ(最优选干扰素α)的使用。干扰素是可以通过活化NK细胞和巨噬细胞来增强免疫系统功能的细胞激素型免疫调节剂。干扰素还可以具有作为拮抗剂的直接效应且通过诱导靶抗原或其它效应蛋白的表达而起作用。

[0008] 检查点抑制子抗体主要用于癌症疗法。免疫检查点是指免疫系统中负责维持自体

耐受性和调节免疫系统反应度反应从而将周围组织损伤减至最小的抑制途径。然而，肿瘤细胞还可以活化免疫系统检查点以降低针对肿瘤组织的免疫应答的有效性。针对细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA4，也称为CD152)、程序性细胞死亡蛋白1(，PD1，也称为CD279)和程序性细胞死亡1配体1(PD-L1，也称为CD274)的示例性检查点抑制子抗体描述如下并且可以与一种或多种其它药剂组合用于提高对疾病细胞、组织或病原体的免疫应答的有效性。

[0009] 可以通过与例如能在施用免疫调节剂之前降低肿瘤负担或使免疫原性抗原从被杀死的肿瘤细胞中释放的其它药剂组合来提高疾病疗法的免疫系统诱导效力。在许多种类型的癌症中，抗体－药物缀合物(ADC)可以有效地降低肿瘤负担。本领域中已知许多种示例性ADC，诸如IMMU-130(拉贝珠单抗-SN-38)、IMMU-132(hRS7-SN-38)和米拉珠单抗－多柔比星或pro-2-吡咯啉并多柔比星(Pro2PDox)抗体缀合物，如以下所论述。任何此类已知ADC均可与一种、两种或三种如本文中所描述的免疫调节剂组合施用。

[0010] 所使用的不同组合可以包括白血球白细胞重定向双特异性抗体(bsAb)加干扰素(例如干扰素α)；白血球白细胞重定向bsAb加检查点抑制子抗体；白血球白细胞重定向bsAb加IFN加检查点抑制子抗体；ADC加检查点抑制子抗体；ADC加IFN加检查点抑制子抗体；ADC加白血球白细胞重定向bsAb加检查点抑制子抗体；或ADC加白血球白细胞重定向bsAb加IFN加检查点抑制子抗体。如上文所论述，本文中所公开的不同类型药剂的任何组合均可用于疾病治疗。

[0011] 发明背景

[0012] 使用双特异性抗体(bsAb)重定向效应子T细胞以便靶向杀死肿瘤细胞已经显示出了可观的临床前和临床前景(参见例如Topp等，2012，Blood 120:5185-87；Bargou等，2008，Science 321:974-77)。迄今为止所开发的双特异性抗体含有对用于T细胞募集和活化的CD3具有特异性的第一结合位点和针对诸如CD19等目标疾病相关抗原的第二结合位点(Bassan，2012，Blood 120:5094-95)。双特异性抗体使$CD3^+$T细胞与所靶向的疾病细胞直接接触且诱导细胞介导的细胞毒性(Bassan，2012)。已经报告了抗CD3X抗CD19双特异性抗体在大约70％的成年MRD^+ALL患者中在极低浓度下即产生完全而又持久的分子缓解(Topp等，2012，Blood 120:5185-87)。识别T细胞上的神经胶质瘤和CD3表位的双特异性抗体已经成功地用于治疗人类患者的脑肿瘤(Nitta等，Lancet 1990;355:368-371)。

[0013] 白细胞重新定向bsAb不局限于T细胞。包含针对NK细胞抗原CD16和肿瘤相关抗原(例如CD19、CD22、CD33)的scFv的双特异性杀伤衔接子(BiKE)亦显示有效的抗癌活性(例如，Miller，Hematology Soc Hematol Educ Pogram 2013:247-53)。其它替代方案包括三特异性杀伤衔接子(TriKE)，诸如抗CD16× 抗CD19× 抗CD22(Miller，2013；Gleason等，2012，Mol Cancer Ther 11:2674-84)。抗CD16× 抗CD33BiKE被用于治疗AML和脊髓发育不良综合征(Miller，2013；Wiernik等，2013，Clin Cancer Res 19:3844-55)。在难治性AML中，CD16×CD33BiKE引起有效的肿瘤细胞杀死和NK细胞的细胞因子产生。对ADAM17的抑制增强了CD16×CD33BiKE反应(Miller，2013)。已经报告了针对例如CD16/CD19/HLA-DR的其它三特异性三价构建体(Schubert等，2012，mAbs 4:45-56)。

[0014] 用于产生双特异性抗体的许多方法是已知的(参见例如美国专利号7,405,320)。可以通过四价体瘤法产生双特异性抗体，这涉及使两个不同的杂交瘤融合，各杂交瘤产生识别不同的抗原位点的单克隆抗体(Milstein和Cuello，Nature 1983;305:537-540)。融

合的杂交瘤能够合成两个不同的重链和两个不同的轻链，它们可以随机缔合，得到具有 10 种不同的抗体结构的异源群体，其中仅一种（达总抗体分子的 1/8）将是双特异性的，且因此必须进一步提纯而与其它形成分离。融合杂交瘤的细胞基因稳定性通常弱于亲本杂交瘤，使得生产细胞系的产生更成问题。

[0015] 另一种用于产生双特异性抗体的方法使用杂双官能交联剂来化学系栓两个不同的单株抗体，使得所得混合缀合物将结合于两个不同的靶标 (Staerz 等，Nature 1985；314：628-631；Perez 等，Nature 1985；316：354-356)。通过这种方法产生的双特异性抗体本质上是两个 IgG 分子的异源缀合物，其缓慢扩散至组织中且快速从循环中去除。双特异性抗体还可以通过将两个亲本单株抗体各自还原成相应的半分子，最后混合且允许再氧化以获得杂合结构来产生 (Staerz 和 Bevan. Proc Natl Acad Sci USA 1986；83：1453-1457)。替代方法包括使用适当的连接子使两种或三种分开纯化的 Fab′ 片段化学交联。所有这些化学方法对于商业开发来说由于高制造成本、费力的生产工艺、广泛的纯化步骤、低产率（＜ 20％）和不均质产物而不合需要。

[0016] 通过重组 DNA 技术产生的抗体的离散 V_H 和 V_L 结构域可以彼此配对以形成具有结合能力的二聚体（重组 Fv 片段）（美国专利号 4,642,334)。然而，此类非共价缔合分子在生理条件下的稳定性不足以具有任何实际用途。同源 V_H 和 V_L 结构域可以利用具有适当组成和长度（通常由多于 12 个氨基酸残基组成）的肽连接子连接以形成具有结合活性的单链 Fv (scFv)。通过改变连接子长度来制造基于 scFv 的多价多特异性药剂的方法公开于美国专利号 5,844,094、美国专利号 5,837,242 和 WO 98/44001 中。往往与产生基于 scFv 的多价多特异性药剂相关的常见问题是低表达水平、不均质产物、在溶液中不稳定从而产生聚集物、在血清中不稳定和亲和力受到削弱。

[0017] 若干种靶向 CD3 和 CD19 的双特异性抗体正在临床开发中。被称作 BITE® 的基于 scFv 的双特异性抗体构建体（双特异性 T 细胞衔接子）采用含有 2 个抗原结合特异性的单个多肽，各抗原结合特异性由经由挠性连接子串联连接的同源 VH 和 VL 贡献（参见例如 Nagorsen 等，2009，Leukemia&Lymphoma 50：886-91；Amann 等，2009，J Immunother 32：453-64；Baeuerle 和 Reinhardt，2009，Cancer Res69：4941-44)。被称为 DART®（的另一种双特异性抗体（双亲和力再靶向）利用经二硫化物稳定的双功能抗体设计（参见例如 Moore 等，2011，Blood 117：4542-51；Veri 等人，2010，Arthritis Rheum 62：1933-43)。BITE® 和 DART® 两者由于其小尺寸（～ 55kDa) 均展现快速血液清除率，这需要频繁施用以维持双特异性抗体的治疗水平。

[0018] 干扰素在抗癌和抗微生物宿主防御中起重要作用，并且已经作为癌症和传染病治疗剂而被广泛探究 (Billiau 等，2006，Cytokine Growth Factor Rev 17：381-409；Pestka 等，2004，Immunol Rev 202：8-32)。尽管用 I 型和 II 型干扰素 (IFN-α/β 和 γ）进行了大量工作，但其在临床处置中的使用由于在患者中的短循环半衰期、全身毒性和次最佳反应而受到限制 (Pestka 等，2004，Immunol Rev 202：8-32；Miller 等，2009，Ann NY Acad Sci 1182：69-79)。2003 初发现 IFN-λ 家族为开发用于这些未被满足的临床适应症的替代性 IFN 药剂带来了令人激动的新机遇 (Kotenko 等，2003，Nat Immunol 4：69-77；Sheppard 等，2003，Nat Immunol 4：63-8)。

[0019] 迄今为止已经通过批准 IFN-α 2 用于治疗毛细胞白血病、慢性髓性白血病、恶性

黑色素瘤、滤泡性淋巴瘤、尖锐湿疣、AID 相关卡波西肉瘤和慢性乙型和丙型肝炎；IFN-β 用于治疗多发性硬化；和 IFN-γ 用于治疗慢性肉芽肿病和恶性骨硬化病而验证了 IFN 的疗效。尽管关于这组自分泌和旁分泌细胞激素有大量文献，但仍阐述其在健康和疾病中的功能，包括临床上引入的更为有效而又新颖的形式 (Pestka，2007，J. Biol. Chem 282：20047-51；Vilcek，2006，Immunity 25：343-48)。还持续调查各种干扰素与基于抗体的疗法的组合的效果。

[0020] 抗体 - 药物缀合物 (ADC) 是一类有效的治疗构建体，其允许将细胞毒性剂靶向递送至靶细胞，诸如癌细胞。由于靶向功能，这些化合物与同样全身递送的药剂相比显示出高得多的治疗指数。已经开发了呈完整抗体或诸如 scFv 等抗体片段形式的 ADC。所述抗体或片段经由在生理条件下稳定但一旦在靶细胞内后就可能裂解的连接子连接于药物的一个或多个拷贝。批准用于治疗性用途的 ADC 包括用于 AML 的吉姆单抗 - 奥佐米星（随后退出市场）、用于 ALCL 和何杰金氏淋巴瘤的贝伦妥单抗 - 维多汀和用于 HER2 阳性转移性乳腺癌的曲妥单抗 - 安坦辛 (Verma 等，2012，N Engl J Med 367：1783-91；Bross 等，2001，Clin Cancer Res 7：1490-96；Francisco 等，2003，Blood 102：1458-65)。许多其它候选 ADC 目前在临床试验中，诸如伊珠单抗 - 奥佐米星 (Pfizer)、格巴妥莫单抗 - 维多汀 (Celldex Therapeutics)、SAR3419(Sanofi-Aventis)、SAR56658(Sanofi-Aventis)、AMG-172(Amgen)、AMG-595(Amgen)、BAY-94-9343(Bayer)、BIIB015(Biogen Idec)、BT062(Biotest)、SGN-75(Seattle Genetics)、SGN-CD 19A(Seattle Genetics)、伏司妥珠单抗 - 马佛多汀 (Seattle Genetics)、ABT-414(AbbVie)、ASG-5ME(Agensys)、ASG-22ME(Agensys)、ASG-16M8F(Agensys)、IMGN-529(ImmunoGen)、IMGN-853(ImmunoGen)、MDX-1203(Medarex)、MLN-0264(Millenium)、RG-7450(Roche/Genentech)、RG-7458(Roche/Genentech)、RG-7593(Roche/Genentech)、RG-7596(Roche/Genentech)、RG-7598(Roche/Genentech)、RG-7599(Roche/Genentech)、RG-7600(Roche/Genentech)、RG-7636(Roche/Genentech)、抗 PSMA ADC(Progenics)、洛妥珠单抗 - 默坦辛 (ImmunoGen)、米拉珠单抗 - 多柔比星 (Immunomedics)、IMMU-130(Immunomedics)、IMMU-132(Immunomedics) 和 pro-2- 吡咯啉并多柔比星的抗体缀合物。（参见例如 Li 等，2013，Drug Disc Ther 7：178-84；Firer 和 Gelle rman，J Hematol Oncol 5：70；Beck 等，2010，Discov Med 10：329-39；Mullard，2013，Nature Rev Drug Discovery 12：329，临时美国专利申请 61/761,845。）由于 ADC 充当具有降低的系统毒性的有效抗癌剂的潜力，它们可以单独或作为附属疗法用以减少肿瘤负担。

[0021] 另一种有前景的免疫疗法涉及使用针对免疫检查点蛋白质的拮抗性抗体（例如，Pardoll，2012，Nature Reviews Cancer 12：252-64)。免疫检查点充当用于维持自体耐受性和调节对抗原刺激的免疫应答的持续时间和程度的免疫系统功能的内源性抑制途径 (Pardoll，2012)。然而，似乎肿瘤组织和可能某些病原体可以指派检查点系统以降低宿主免疫应答的有效性，从而导致肿瘤生长和 / 或慢性感染（参见例如 Pardoll，2012，Nature Reviews Cancer 12：252-64；Nirschl 和 Drake，2013，Clin Cancer Res 19：4917-24)。检查点分子包括 CTLA4（细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4)、PD1（程序性细胞死亡蛋白 1)、PD-L1（程序性细胞死亡配位体配体 1)、LAG-3（淋巴细胞活化基因 -3)、TIM-3（T 细胞免疫球蛋白和粘蛋白 -3) 和若干种其它检查点分子 (Pardoll，2012，Nature Reviews Cancer 12：

252-64;Nirschl 和 Drake,2013,Clin Cancer Res19:4917-24)。针对若干种检查点蛋白质 (CTLA4、PD1、PD-L1) 的抗体正在临床试验中,并且对耐标准治疗性肿瘤显示了出乎意料的效力。

[0022] 需要用于产生具有更长 $T_{1/2}$、更佳药代动力学性质、增加的体内稳定性和 / 或改良的体内效力的经改良双特异性抗体复合物的方法和组合物。还需要用于改良涉及诱导针对诸如癌症或传染病等各种疾病的免疫应答的治疗的效力的组合疗法。

发明概要

[0023] 本发明涉及利用选自白细胞重新定向复合物、干扰素、检查点抑制子抗体和抗体 - 药物缀合物 (ADC) 的两种或更多种药剂的组合疗法。前三种类型的药剂可以用来诱导或增强对诸如肿瘤相关抗原 (TAA) 或病原体 (微生物) 表达的抗原等疾病相关抗原的免疫应答。ADC 可以与任何或所有免疫调节剂组合用于减少肿瘤负担和提高总体治疗效力。

[0024] 在利用白细胞重新定向复合物的实施方案中,所述复合物优选地是双特异性抗体 (bsAb),其中一个结合位点针对白细胞表达的抗原,且第二结合位点结合于肿瘤细胞或病原体 (即,微生物) 上的靶抗原。示例性 T 细胞抗原是选自 CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69 和 CD90。NK 细胞上表达的示例性抗原是选自 CD8、CD16、CD56、CD57、ADAM17、KIR 和 CD137。示例性单核细胞抗原是选自 CD74、HLA-DR α 链、CD14、CD16、CD64 和 CD89。示例性嗜中性粒细胞抗原是选自 CEACAM6、CEACAM8、CD16b、CD32a、CD89、CD177、CD11a、CD11b 和 SLC44A2。优选地,T 细胞抗原是 CD3,或 NK 细胞抗原是 CD16。第二抗体的靶抗原可以选自甲胎蛋白 (AFP)、α 4 整合素、B7、碳酸酐酶 IX、补体因子 C1q、C1r、C1s、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5a、C5aR、C5b、C5、C6、C7、C8、C9n、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3R、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD86、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CEACAM-5、CEACAM-6、CSAp、纤连蛋白的 ED-B、EGFR、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ErbB2、因子 H、FHL-1、纤维蛋白、Flt-3、叶酸受体、糖蛋白 IIb/IIIa、gp41、gp120、GRO-β、HLA-DR、HM1.24、HM1.24、HMGB-1、低氧可诱导因子 (HIF)、Ia、ICAM-1、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、IFN-λ、IgE、IGF-1R、IL-1、IL-1Ra、IL-2、IL-4R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-13R、IL-15R、IL-15、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、胰岛素样生长因子 1(ILGF-1)、IP-10、KIR、Le(y)、脂多糖 (LPS)、MAGE、MCP-1、mCRP、MIF、MIP-1A、MIP-1B、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、NCA-90、NCA-95、NF-κB、PlGF、PSMA、RANTES、T101、TAC、TAG-72、腱生蛋白、汤姆森 - 弗里德里希抗原、凝血酶、组织因子、Tn 抗原、TNF-α、TRAIL 受体 (R1 和 R2)、肿瘤坏死抗原、VEGF、VEGFR 和致癌基因产物。

[0025] 以下实施例中所公开的白细胞重新定向 bsAb 的示例性设计组合了抗 CD3scFv 与抗 CD19F(ab)$_2$,以形成被命名为 (19)-3s 的构建体,其特异性靶向 B 细胞。以下更详细地论述的组合抗 CD3 与针对其它肿瘤相关抗原的抗体片段的其它 bsAb 用于各种实性肿瘤的靶向白细胞免疫疗法。这种设计的优势包括与肿瘤细胞二价结合、阻止快速肾清除的大尺寸 (～ 130kDa) 和有效的白细胞介导的细胞毒性。bsAb 介导白细胞白细胞与同源靶细胞之间

的免疫学突触的形成，在靶细胞存在下诱导白细胞活化和增殖，重新定向有效的白细胞介导的体外靶细胞杀死，且抑制体内人类肿瘤生长。

[0026] 优选的实施方案涉及所产生的呈三价 DNL™复合物形式的白细胞重新定向双特异性抗体，其具有更久 $T_{1/2}$、更佳药代动力学性质和增加的体内稳定性。用于产生和使用包含与来自 AKAP 的 AD 部分结合的来自人类 PKA 调节亚单位 RIα、RIβ、RIIα 或 RIIβ 的 DDD 部分的二聚体的 DNL™复合物的方法是熟知的（参见例如美国专利号 7,550,143、7,521,056、7,534,866、7,527,787、7,666,400、7,906,118、7,901,680、8,003,111 和 8,034,352，各专利的实施例部分是以引用的方式并入本文中）。通过将不同的效应部分，诸如抗体或抗体片段，连接于 DDD 和 AD 部分，可以构建并使用实际上包含效应因子的任何组合的 DNL™复合物。

[0027] 所使用的抗体可以具有各种同型，优选地人类人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4，更优选地包含人类人 IgG1 铰链和恒定区序列。所述抗体或其片段可以是嵌合人类－小鼠、人源化（人类架构和鼠类高变 (CDR) 区）或完全人类的以及其变异形式，诸如半 IgG4 抗体（称为“单抗体”），如 van der Neut Kolfschoten 等所描述 (Science 2007 ;317 :1554-1557)。更优选地，抗体或其片段可以经过设计或选择而包含属于特定同种异型的恒定区序列，这在施用于人类受试者时可以降低免疫原性。所施用的优选同种异型包括非 G1m1 同种异型 (nG1m1)，诸如 G1m3、G1m3,1、G1m3,2 或 G1m3,1,2。更优选地，所述同种异型是选自 nG1m1、G1m3、nG1m1,2 和 Km3 同种异型。

[0028] 其它优选实施方案涉及白细胞重新定向复合物与一种或多种检查点抑制子抗体组合的组合物和／或用途。此类抗体对检查点抑制剂功能具有拮抗性。许多此类抗体在本领域中是已知的，诸如兰利珠单抗 (MK 3475, Merck)、尼鲁单抗 (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb)、皮地珠单抗 (CT-011, CureTech Ltd.)、AMP-224 (Merck)、MDX-1105 (Medarex)、MEDI4736 (MedImmune)、MPDL3280A (Genentech)、BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb)、伊匹单抗 (Bristol-Myers Squibb) 和曲美目单抗 (Pfizer)。诸如利利单抗 (Innate Pharma) 和 IPH2101 (Innate Pharma) 等抗 KIR 抗体可以在 NK 细胞中执行类似的功能。任何已知的检查点抑制子抗体均可与一种或多种其它药剂组合使用。

[0029] 可以组合使用的另一种药剂是干扰素。可用的干扰素在本领域中是已知的，并且可以包括干扰素 α、干扰素 β、干扰素 λ1、干扰素 λ2 或干扰素 λ3。优选地，所述干扰素是干扰素 α。标的目标干扰素可以作为游离干扰素、PEG 化干扰素、干扰素融合蛋白质或与抗体缀合的干扰素来施用。

[0030] 在替代实施方案中，以上所论述的一种或多种免疫调节剂可以与抗体－药物缀合物 (ADC) 组合使用。ADC 对于在无显著系统毒性的情况下减少肿瘤负担特别有效，并且可以用于提高由白细胞重新靶向 bsAb、干扰素和／或检查点抑制子抗体所诱导的免疫应答的有效性。有用的示例性 ADC 可以包括批准用于治疗性用途的 ADC，包括用于 AML 的吉姆单抗－奥佐米星（随后退出市场）、用于 ALCL 和何杰金氏淋巴瘤的贝伦妥单抗－维多汀和用于 HER2 阳性转移性乳腺癌的曲妥单抗－安坦辛 (Verma 等, 2012, N Engl J Med 367 :1783-91 ;Bross 等, 2001, Clin Cancer Res 7 :1490-96 ;Francisco 等, 2003, Blood 102 :1458-65)。许多其它候选 ADC 目前正在临床试验中，诸如伊珠单抗－奥佐米星 (Pfizer)、格巴妥莫单抗－维多汀 (Celldex Therapeutics)、SAR3419 (Sanofi-aventis)、

SAR56658(Sanofi-Aventis)、AMG-172(Amgen)、AMG-595(Amgen)、BAY-94-9343(Bayer)、BIIB015(Biogen Idec)、BT062(Biotest)、SGN-75(Seattle Genetics)、SGN-CD19A(Seattle Genetics)、伏司妥珠单抗-马佛多汀(Seattle Genetics)、ABT-414(Abb Vie)、ASG-5ME(Agensys)、ASG-22ME(Agensys)、ASG-16M8F(Agensys)、IMGN-529(ImmunoGen)、IMGN-853(ImmunoGen)、MDX-1203(Medarex)、MLN-0264(Millenium)、RG-7450(Roche/Genentech)、RG-7458(Roche/Genentech)、RG-7593(Roche/Genentech)、RG-7596(Roche/Genentech)、RG-7598(Roche/Genentech)、RG-7599(Roche/Genentech)、RG-7600(Roche/Genentech)、RG-7636(Roche/Genentech)、抗PSMA ADC(Progenics)、洛妥珠单抗-默坦辛(ImmunoGen)、米拉珠单抗-多柔比星(Immunomedics)、IMMU-130(Immunomedics)和IMMU-132(Immunomedics)。(参见例如Li等,2013,Drug Disc Ther 7:178-84;Firer和Gellerman,J Hematol Oncol 5:70;Beck等,2010,Discov Med 10:329-39;Mullard,2013,Nature Rev Drug Discovery 12:329。)优选地,在ADC与免疫调节剂组合使用的情况下,ADC是在免疫调节剂之前施用。

[0031] 在某些实施方案中,标的目标组合疗法可用于治疗癌症。预期可以靶向任何类型的肿瘤和任何类型的肿瘤抗原。可以靶向的示例性癌症类型包括急性淋巴母细胞性白血病、急性髓性白血病、胆癌、乳腺癌、子宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、头颈癌、何杰金氏淋巴瘤、肺癌、骨髓甲状腺癌、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾癌、卵巢癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑素瘤、肝癌、前列腺癌和膀胱癌。然而,熟练的技术人员应认识到,已知肿瘤相关抗原实际上用于任何类型的癌症。

[0032] 可以被白细胞重新定向bsAb和/或被ADC靶向的肿瘤相关抗原包括但不限于甲胎蛋白(AFP)、α-辅肌动蛋白-4、A3、A33抗体特异性抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1α、结肠特异性抗原-p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子(FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO-β、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)和其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、低氧可诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN-γ、IFN-α、IFN-β、IFN-λ、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PAM4抗原、胰腺癌粘蛋白、PD1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF-α、Tn抗原、汤姆森-弗里德里希抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、

WT-1、17-1A 抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、致癌基因标记物和致癌基因产物（参见例如 Sensi 等，Clin Cancer Res 2006，12：5023-32；Parmiani 等，J Immunol2007，178：1975-79；Novellino 等，Cancer Immunol Immunother 2005，54：187-207）。

[0033] 可以用于癌症疗法的示例性抗体包括但不限于 hA19（抗 CD19，美国专利号 7,109,304）、hR1（抗 IGF-1R，美国专利申请序列号 12/722,645，2010 年 12 月 3 日提交）、hPAM4（抗 MUC5ac，美国专利号 7,282,567）、hA20（抗 CD20，美国专利号 7,251,164）、hIMMU31（抗 AFP，美国专利号 7,300,655）、hLL1（抗 CD74，美国专利号 7,312,318）、hLL2（抗 CD22，美国专利号 7,074,403）、hMu-9（抗 CSAp，美国专利号 7,387,773）、hL243（抗 HLA-DR，美国专利号 7,612,180）、hMN-14（抗 CEACAM5，美国专利号 6,676,924）、hMN-15（抗 CEACAM6，美国专利号 7,541,440）、hRS7（抗 EGP-1，美国专利号 7,238,785）、hMN-3（抗 CEACAM6，美国专利号 7,541,440）、Ab124 和 Ab125（抗 CXCR4，美国专利号 7,138,496），各引用专利或申请的实施例部分是以引用的方式并入本文中。

[0034] 已经报告了利用免疫调节抗体的组合疗法用于提高例如对抗肿瘤细胞的效力。Morales-Kastresana 等（2013，Clin Cancer Res 19：6151-62）显示抗 PD-L1（10B5）抗体与抗 CD137（1D8）和抗 OX40（OX86）抗体的组合在肝细胞癌转基因小鼠模型中提供提高的效力。还报告了抗 CTLA4 与抗 PD1 抗体的组合是高度有效的（Wolchok 等，2013，N Engl J Med 369：122-33）。利妥昔单抗与诸如利利单抗（Innate Pharma）或 IPH2101（Innate Pharma）等抗 KIR 抗体的组合对造血肿瘤也更有效（Kohrt 等，2012）。技术人员应认识到标的目标组合疗法可以包括与作为免疫刺激性抗肿瘤或抗感染剂的多种抗体的组合。

[0035] 可用于治疗各种疾病状态的替代抗体包括但不限于阿昔单抗（抗糖蛋白 IIb/IIIa）、阿仑单抗（抗 CD52）、贝伐单抗（抗 VEGF）、西妥昔单抗（抗 EGFR）、吉姆单抗（抗 CD33）、替伊莫单抗（抗 CD20）、帕尼单抗（抗 EGFR）、利妥昔单抗（抗 CD20）、托西莫单抗（抗 CD20）、曲妥单抗（抗 ErbB2）、兰利珠单抗（抗 PD1 受体）、尼鲁单抗（抗 PD1 受体）、伊匹单抗（抗 CTLA4）、阿巴伏单抗（抗 CA-125）、阿德目单抗（抗 EpCAM）、阿利珠单抗（抗 IL-6 受体）、贝那利珠单抗（抗 CD125）、奥妥珠单抗（GA101、抗 CD20）、CC49（抗 TAG-72）、AB-PG1-XG1-026（抗 PSMA，美国专利申请 11/983,372，作为 ATCC PTA-4405 和 PTA-4406 寄存）、D2/B（抗 PSMA，WO 2009/130575）、托珠单抗（抗 IL-6 受体）、巴利昔单抗（抗 CD25）、达克珠单抗（抗 CD25）、依法利珠单抗（抗 CD11a）、GA101（抗 CD20；Glycart Roche）、那他珠单抗（抗 α4 整合素）、奥玛珠单抗（抗 IgE）；抗 TNF-α 抗体，诸如 CDP571（Ofei 等，2011，Diabetes 45：881-85）、MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B、M303（Thermo Scientific，Rockford，IL）、英夫利昔单抗（Centocor，Malvern，PA）、聚乙二醇化赛妥珠单抗（UCB，Brussels，Belgium）、抗 CD40L（UCB，Brussels，Belgium）、阿达木单抗（Abbott，Abbott Park，IL）、BENLYSTA® （Human Genome Sciences）；抗 CD38 抗体，诸如 MOR03087（MorphoSys AG）、MOR202（Celgene）、HuMax-CD38（Genmab）或达拉木单抗（Johnson&Johnson）；抗 HIV 抗体，诸如 P4/D10（美国专利 8,333,971）、Ab75、Ab76、Ab77（Paulik 等，1999，Biochem Pharmacol58：1781-90）以及由 Polymun（Vienna，Austria）所描述和出售、还描述于美国专利 5,831,034、美国专利 5,911,989 和 Vcelar 等，AIDS 2007；21（16）：2161-2170 和 Joos 等，Antimicrob. Agents Chemother. 2006；50（5）：1773-9

中的抗 HIV 抗体。

[0036] 在其它实施方案中，标的目标组合疗法可用于治疗感染了诸如细菌、病毒或真菌等致病生物体的受试者。可以治疗的示例性真菌包括小孢霉、发癣菌、表皮癣菌、申克孢子丝菌、新型隐球菌、粗球孢子菌、荚膜组织胞浆菌、皮炎芽生菌或白色念珠菌。示例性病毒包括人免疫缺陷病毒 (HIV)、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病病毒、流感病毒、人类乳头状瘤病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、仙台病毒、猫白血病毒、Reo 病毒、脊髓灰质炎病毒、人血清细小样病毒、猿猴病毒 40、呼吸道合胞病毒、小鼠乳腺瘤病毒、水痘 - 带状疱疹病毒、登革热病毒、风疹病毒、麻疹病毒、腺病毒、人类 T 细胞白血病毒白血病病毒、埃 - 巴二氏病毒、鼠类白血病毒白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒或蓝舌病病毒。示例性细菌包括炭疽杆菌、无乳链球菌、嗜肺军团菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、肺炎球菌属、B 型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、结核分枝杆菌或支原体。ADC 对抗传染物的示例性用途公开于 Johannson 等 (2006，AIDS 20 :1911-15) 和 Chang 等，2012，PLos One 7 :e41235 中。

[0037] 针对病原体的已知抗体包括但不限于 P4D10（抗 HIV）、CR6261（抗流感）、艾韦单抗（抗乙型肝炎）、泛维珠单抗（抗呼吸道合胞病毒）、夫瑞韦如（抗狂犬病病毒）、莫维珠单抗（抗呼吸道合胞病毒）、帕利珠单抗（抗呼吸道合胞病毒）、帕诺库单抗（抗假单胞菌）、瑞非韦鲁（抗狂犬病病毒）、瑞加韦单抗（抗巨细胞病毒）、司韦单抗（抗巨细胞病毒）、替韦卢单抗（抗乙型肝炎）和乌珠单抗（抗大肠杆菌）。

[0038] 目标药剂可以与一种或多种其它免疫调节剂组合施用以增强免疫应答。免疫调节剂可以包括但不限于细胞因子、趋化因子、干细胞生长因子、淋巴细胞毒素、造血因子、集落刺激因子 (CSF)、促红细胞生成素、促血小板生成素、肿瘤坏死因子 α (TNF)、TNF-β、粒细胞 - 集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞 - 集落刺激因子 (GM-CSF)、干扰素 α、干扰素 β、干扰素 γ、干扰素 λ、被命名为“S1 因子的”干细胞生长因子、人生长激素、N- 甲硫氨酰基人生长激素、牛生长激素、甲状旁腺激素、甲状腺素、胰岛素、胰岛素原、松弛素、松弛素原、促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH)、促黄体生成激素 (LH)、肝生长因子、前列腺素、成纤维细胞生长因子、催乳素、胎盘催乳素、OB 蛋白、苗勒氏管抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、活化素、血管内皮生长因子、整合素、NGF-β、血小板生长因子、TGF-α、TGF-β、胰岛素样生长因子 I、胰岛素样生长因子 II、巨噬细胞 -CSF(M-CSF)、IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-25、LIF、FLT-3、制管张素、血小板反应蛋白、内皮抑素或淋巴毒素。在某些实施方案中，白细胞重新定向双特异性抗体或抗体片段可以连接于免疫调节剂，诸如细胞因子。细胞因子复合物公开于例如美国专利号 7,906,118 和 8,034,3522 中，各专利的实施例部分是以引用的方式并入本文中。

[0039] 虽然在优选的实施方案中白细胞重新定向 bsAb 的 T 细胞结合组件结合于 CD3 抗原，但效应子 T 细胞上所表达的其它抗原是已知的，并且可以被白细胞重新定向复合物靶向。示例性 T 细胞抗原包括但不限于 CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69 和 CD90。对于 NK 细胞，其它示例性抗原可以选自 CD8、CD16、CD56、CD57、ADAM17 和 CD137 ；对于单核细胞，CD74、HLA-DRα 链、CD14、CD16、CD64 和 CD89 ；且对

于嗜中性粒细胞，CEACAM6、CEACAM8、CD16b、CD32a、CD89、CD177、CD11a、CD11b 和 SLC44A2。

[0040] 图式简单描述

[0041] 以下图式形成本说明书的一部分且包括在内以进一步说明本发明的某些实施方案。通过参考这些图式中的一个或多个，结合对本文中所提供的特定实施方案的详细描述，可以更透彻地理解所述实施方案。

[0042] 图 1. 形成包含抗 CD19F(ab)$_2$× 抗 CD3scFv 的 DOCK-AND-LO CK™复合物的示意图。

[0043] 图 2A. 由 (19)-3s 介导的 Daudi 伯基特淋巴瘤与 T 细胞之间的免疫突触形成。将新分离的 T 细胞与 Daudi 细胞以 2.5 ：1 的 E ：T 比组合。在室温下用 0、1 或 5 μg/mL(19)-3s 将细胞处理 30 分钟，随后通过流式细胞术进行分析。分别使用抗 CD20-FITC 和抗 CD7-APC 来鉴别 Daudi 细胞和 T 细胞。共同结合表示为 $CD20^+/CD7^+$事件的%。在用 (19)-3s 处理之后，45.5%的流动事件是 CD20/CD7 双阳性，表明形成突触的 Daudi 细胞和 T 细胞。

[0044] 图 2B. 条件如图 2(A) 中，但不存在 (19)-3s 抗体。与图 2(A) 相比，在无抗体的情况下，仅 2%的流动事件是无抗体的 CD20/CD7 双阳性的。

[0045] 图 2C. 加入 (19)-3s 导致＞ 90%的 Daudi 细胞与 T 细胞缔合。

[0046] 图 3A. 将 Jurkat(T 细胞）和 Daudi(B 细胞）以 1 ：1 比率组合，用 0.1 μg/mL(19)-3s 处理 30 分钟，且用抗 CD20-FITC 染色，随后通过荧光显微术进行分析。

[0047] 图 3B. 将 Jurkat(T 细胞）和 Daudi(B 细胞）以 1 ：1 比率组合，用 0.1 μg/mL(19)-3s 处理 30 分钟，且用抗 CD20-FITC 和抗 CD3-PE 染色，随后通过荧光显微术进行分析。

[0048] 图 3C. 图 3A 和图 3B 的合并图像显示绿色染色的 Daudi 细胞与红色染色的 Jurkat 细胞之间的突触形成。

[0049] 图 3D. 在不存在 (19)-3s 的情况下，突触形成不明显。

[0050] 图 4. 对 (19)-3s 介导的 Daudi 细胞和 Jurkat 细胞的细胞与细胞缔合随 (19)-3s 浓度增加而变化的剂量反应分析。

[0051] 图 5A. 由 BITE®和 DART™介导的细胞与细胞缔合的比较。 BITE®和 DART™的数据是从 Moore 等，(2011)，Blood 117 :4542-4551 获得。

[0052] 图 5B. 由 (19)-3s 介导的细胞与细胞缔合的比较。

[0053] 图 6A. 由 (19)-3s 对照 bsAb 介导的 T 细胞和 Capan-1 胰腺癌细胞之间的突触形成。将经 CFSE 标记的 Capan-1 细胞与经 PKH26 标记的 Jurkat 在所述 bsAb 存在下共同孵育。

[0054] 图 6B. 由 (M1)-3s MUC5AC bsAb 介导的 T 细胞和 Capan-1 胰腺癌细胞之间的突触形成。将经 CFSE 标记的 Capan-1 细胞与经 PKH26 标记的 Jurkat 在所述 bsAb 存在下共同孵育。

[0055] 图 6C. 由 (E1)-3s TROP-2 靶向 bsAb 介导的 T 细胞和 Capan-1 胰腺癌细胞之间的突触形成。将经 CFSE 标记的 Capan-1 细胞与经 PKH26 标记的 Jurkat 在所述 bsAb 存在下共同孵育。

[0056] 图 7A. 由 (19)-3s 引起的 T 细胞活化。CD69 表达上调是 T 细胞活化中的早期事件。用所指示的抗体将与 PBMC 组合的 Daudi 细胞处理过夜，且用抗 CD3-PE 和抗 CD69-APC 染色，随后通过流式细胞术进行分析。在通过正面对比侧面散射和抗 CD3 染色闸选 T 细胞之

后评估 CD69 表达。Daudi 细胞与相等数目的 PBMC 组合产生 1.6％ CD69+T 细胞。加入 3ng/mL(19)-3s 诱导 27％ CD69+T 细胞。包含与非靶向 $F(ab)_2$融合的 Okt3-scFv-AD2 模块的对照构建体 [(M1)-3s] 或 hA19-Fab-DDD2 模块都不诱导 T 细胞活化。

[0057] 图 7B. 由 (19)-3s 引起的 T 细胞活化。用所指示的抗体将与经纯化的 T 细胞组合的 Daudi 细胞处理过夜，且用抗 CD3-PE 和抗 CD69-APC 染色，随后通过流式细胞术进行分析。在通过正面对比侧面散射和抗 CD3 染色闸选 T 细胞之后评估 CD69 表达。与未经处理的细胞混合物相比，用 (M1)-3s 或 hA19-Fab-DDD2 处理 Daudi 和经纯化的 T 细胞不增加 CD69+T 细胞的数目（＜ 4％）。替代地，(19)-3s 诱导稳定 T 细胞活化，产生 80％ CD69+ 细胞。

[0058] 图 7C. 由 (19)-3s 引起的 T 细胞活化。用所指示的抗体将单独的经纯化的 T 细胞处理过夜，且用抗 CD3-PE 和抗 CD69-APC 染色，随后通过流式细胞术进行分析。在通过正面对比侧面散射和抗 CD3 染色闸选 T 细胞之后评估 CD69 表达。在不加入 Daudi（靶标）细胞的情况下，(19)-3s 不诱导 CD69 表达和 T 细胞活化。这些结果显示 (19)-3s 介导的 T 细胞与靶细胞之间的突触形成都为 T 细胞活化所需要且足以进行 T 细胞活化。

[0059] 图 8A. 由 (19)-3s 诱导 T 细胞增殖。将 PBMC 与 3nM 或 30pM(19)-3s 一起孵育，与 IL-2/PHA 阳性对照和 (14)-3s（非靶标结合对照）相比较。

[0060] 图 8B. 由 (19)-3s 诱导 T 细胞增殖。在消耗 B 细胞的 PBMC 中未观察到 T 细胞增殖，表明 T 细胞活化和增殖需要靶细胞 (B 细胞)。

[0061] 图 9A.(19)-3s T 细胞重新定向 bsAb 的体外细胞毒性。测定 (19)-3s DNL™ bsAb 复合物对 Nalm-6、Raji、Ramos 和 Namalwa 癌细胞的细胞毒性的剂量反应曲线。

[0062] 图 9B.(19)-3s T 细胞重新定向 bsAb 的体外细胞毒性。测定 (14)-3s（非靶向）DNL™ bsAb 复合物对 Nalm-6、Raji、Ramos 和 Namalwa 癌细胞的细胞毒性的剂量反应曲线。

[0063] 图 9C. 使用 PBMC 或获自两个不同的供体的 T 细胞和 Nalm-6 癌细胞观察到了一致的结果。

[0064] 图 10A.(20)-3s、(22)-3s 和 (C2)-3s T 细胞重新定向 bsAb 的体外细胞毒性。测定由 (20)-3s、(22)-3s 和 (C2)-3s T 细胞重新定向 bsAb 诱导的对 Namalwa 细胞的细胞毒性的剂量反应曲线。

[0065] 图 10B.(20)-3s、(22)-3s 和 (C2)-3s T 细胞重新定向 bsAb 的体外细胞毒性。测定由 (20)-3s、(22)-3s 和 (C2)-3s T 细胞重新定向 bsAb 诱导的对 Jeko 细胞的细胞毒性的剂量反应曲线。

[0066] 图 10C.(20)-3s、(22)-3s 和 (C2)-3s T 细胞重新定向 bsAb 的体外细胞毒性。测定由 (20)-3s、(22)-3s 和 (C2)-3s T 细胞重新定向 bsAb 诱导的对 Daudi 细胞的细胞毒性的剂量反应曲线。

[0067] 图 11A.T 细胞重新定向 bsAb 在实性肿瘤细胞系中的体外细胞毒性。测定 (14)-3s bsAb 对 LS174T 结肠腺癌细胞系的细胞毒性的剂量反应曲线，与非靶向 (19)-3s bsAb 相比较。

[0068] 图 11B.T 细胞重新定向 bsAb 在实性肿瘤细胞系中的体外细胞毒性。测定 (E1)-3s bsAb 对 Capan-1 胰腺癌细胞系的细胞毒性的剂量反应曲线，与非靶向 (19)-3s bsAb 相比较。

[0069] 图 11C.T 细胞重新定向 bsAb 在实性肿瘤细胞系中的体外细胞毒性。测定 (E1)-3s 和 (15)-3s bsAb 对 NCI-N87 胃癌细胞系的细胞毒性的剂量反应曲线，与非靶向 (19)-3s bsAb 相比较。

[0070] 图 12.T 细胞重新定向 bsAb 在癌细胞系中的体外细胞毒性数据的汇总。

[0071] 图 13A. 使用 (19)-3s bsAb 体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物。将带有 Raji 伯基特淋巴瘤 (1×10^6个细胞）异种移植物的 NOD/SCID 小鼠与人类 PBMC(5×10^6个细胞）一起复原，且用 (19)-3s 处理仅 1 周，如箭头所指示来施用。以未经处理的细胞作为对照。

[0072] 图 13B. 使用 (19)-3s bsAb 体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物。将带有 Raji 伯基特淋巴瘤 (1×10^6个细胞）异种移植物的 NOD/SCID 小鼠与人类 PBMC(5×10^6个细胞）一起复原，且用 (19)-3s 处理仅 1 周，如箭头所指示来施用。用 130 μg 单次剂量处理细胞。

[0073] 图 13C. 使用 (19)-3s bsAb 体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物。将带有 Raji 伯基特淋巴瘤 (1×10^6个细胞）异种移植物的 NOD/SCID 小鼠与人类人 PBMC(5×10^6个细胞）一起复原，且用 (19)-3s 处理仅 1 周，如箭头所指示来施用。用每剂量 43 μg 将细胞处理 3 次。

[0074] 图 13D. 使用 (19)-3s bsAb 体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物。将带有 Raji 伯基特淋巴瘤 (1×10^6个细胞）异种移植物的 NOD/SCID 小鼠与人类人 PBMC(5×10^6个细胞）一起复原，且用 (19)-3s 处理仅 1 周，如箭头所指示来施用。用每剂量 26 μg 将细胞处理 5 次。

[0075] 图 14A. 使用 (19)-3s bsAb 重复给药对体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物的效应。如图 13 的图例中所指示来制备 NOD/SCID 小鼠异种移植物。如箭头所指示来施用 (19)-3s。图 14A 显示未经处理的对照。

[0076] 图 14B. 使用 (19)-3s bsAb 重复给药对体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物的效应。如箭头所指示来施用 (19)-3s。用 i.v. 经静脉内施用的每剂量 130 μg(19)-3s 将细胞处理 2 次。

[0077] 图 14C. 使用 (19)-3s bsAb 重复给药对体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物的效应。如箭头所指示来施用 (19)-3s。用 s.c 经皮下施用的每剂量 130 μg(19)-3s 将细胞处理 2 次。

[0078] 图 14D. 使用 (19)-3s bsAb 重复给药对体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物的效应。如箭头所指示来施用 (19)-3s。用 i.v. 经静脉内施用的每剂量 65 μg(19)-3s 将细胞处理 4 次。

[0079] 图 14E. 使用 (19)-3s bsAb 重复给药对体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物的效应。如箭头所指示来施用 (19)-3s。用经静脉内 i.v. 施用的每剂量 43 μg(19)-3s 将细胞处理 6 次。

[0080] 图 14F. 使用 (19)-3s bsAb 重复给药对体内重新靶向 Raji 淋巴瘤异种移植物的效应。如箭头所指示来施用 (19)-3s。用经静脉内 i.v. 施用的每剂量 43 μg 对照 (M1)-3s 将细胞处理 6 次。

[0081] 图 15A.T 细胞重新靶向 bsAb 在实性肿瘤异种移植物中的体内效力。用 LS174T 结肠腺癌制备 NOD/SCID 小鼠异种移植物。对小鼠施用仅 T 细胞而无 bsAb。

[0082] 图 15B.T 细胞重新靶向 bsAb 在实性肿瘤异种移植物中的体内效力。用 LS174T 结

肠腺癌制备 NOD/SCID 小鼠异种移植物。如所指示用 (E1)-3s bsAb 处理小鼠。

[0083] 图 15C. T 细胞重新靶向 bsAb 在实性肿瘤异种移植物中的体内效力。用 Capan-1 胰腺癌制备 NOD/SCID 小鼠异种移植物。对小鼠施用仅 PBMC 而无 bsAb。

[0084] 图 15D. T 细胞重新靶向 bsAb 在实性肿瘤异种移植物中的体内效力。用 Capan-1 胰腺癌制备 NOD/SCID 小鼠异种移植物。如所指示用 (14)-3s bsAb 处理小鼠。

[0085] 图 16A. 在存在或不存在干扰素 α 的情况下通过 (E1)-3s DNL™复合物体内抑制肿瘤生长。在有或无加入的干扰素 α 的情况下用抗 TROP-2× 抗 CD3bsAb 处理 NOD/SCID 小鼠中的 Capan-1 胰腺癌异种移植物。干扰素 α 是以 TROP-2 靶向 DNL™复合物的形式加入。

[0086] 图 16B. 在存在或不存在干扰素 α 的情况下通过 (E1)-3s DNL™复合物体内抑制肿瘤生长。在有或无加入的干扰素 α 的情况下用抗 TROP-2× 抗 CD3bsAb 处理 NOD/SCID 小鼠中的 Capan-1 胰腺癌异种移植物。干扰素 α 是以市售PEGASYS®（聚乙二醇化干扰素 α-2a) 的形式加入。

[0087] 图 17. 在有或无干扰素 α 的情况下经 (E1)-3s 处理的 NOD/SCID 小鼠的存活曲线。对照未经处理或仅经干扰素 α 处理。

[0088] 图 18. 在有或无干扰素 α 的情况下通过 (E1)-3s DNL™复合物体内抑制肿瘤生长，与 TF12 对照相比较。在有或无加入的干扰素 α（以PEGASYS®形式加入）的情况下用抗 TROP-2× 抗 CD3bsAb 处理 NOD/SCID 小鼠中的 Capan-1 胰腺癌异种移植物，与未经处理的对照、TF12 对照或单独PEGASYS®相比较。

[0089] 图 19. 在有或无干扰素 α（PEGASYS®）的情况下经 (E1)-3s 处理的 NOD/SCID 小鼠的存活曲线。对照未经处理或经单独PEGASYS®或单独 TF12 处理。

[0090] 图 20. 在有或无干扰素 α 的情况下通过 (E1)-3s DNL™复合物体内抑制肿瘤生长，与 TF12 对照相比较。在有或无加入的干扰素 α（以PEGASYS®形式加入）的情况下用抗 TROP-2× 抗 CD3bsAb 处理 NOD/SCID 小鼠中的 NCI-N87 人胃癌异种移植物，与未经处理的对照、TF12 对照或单独PEGASYS®相比较。

[0091] 图 21. 在有或无干扰素 α（PEGASYS®）的情况下经 (E1)-3s 处理的具有 NCI-N87 胃癌异种移植物的 NOD/SCID 小鼠的存活曲线。对照未经处理或经单独PEGASYS®或单独 TF12 处理。

[0092] 详细描述

[0093] 定义

[0094] 除非另外说明，否则“一个（种）”意指“一个（种）或多个（种）”。

[0095] 如本文中所使用，术语“和”和“或”可用来指连词或反意连词。也就是说，除非另外说明，否则两个术语都应该理解为相当于“和 / 或”。

[0096] “治疗剂”是可用于治疗疾病的原子、分子或化合物。治疗剂的实例包括抗体、抗体片段、肽、药物、毒素、酶、核酸酶、激素、免疫调节剂、反义寡核苷酸、小干扰 RNA(siRNA)、螯合剂、硼化合物、光敏剂、染料和放射性同位素。

[0097] 如本文中所使用的“抗体”是指全长（即，天然存在的或由正常免疫球蛋白基因片段重组过程形成的）免疫球蛋白分子（例如IgG抗体）或免疫球蛋白分子的免疫活性（即，特异性结合）部分，如抗体片段。“抗体”包括单克隆、多克隆、双特异性、多特异性、鼠类、嵌合、人源化和人类抗体人抗体。

[0098] “裸抗体”是未与治疗剂或诊断剂连接的抗体或其抗原结合片段。完整裸抗体的Fc部分可以提供效应因子功能，诸如补体固定和ADCC（参见例如Markrides，Pharmacol Rev 50:59-87,1998）。裸抗体诱导细胞死亡的其它机制可能包括细胞凋亡。(Vaswani和Hamilton,Ann Allergy Asthma Immunol 81:105-119,1998。)。

[0099] “抗体片段”是完整抗体的一部分，诸如$F(ab')_2$、$F(ab)_2$、Fab′、Fab、Fv、scFv、dAb等等。无论结构如何，抗体片段结合与全长抗体所识别的相同抗原。举例来说，抗体片段包括由可变区组成的经分离片段，诸如由重链或轻链可变区组成的“Fv”片段或轻链与重链可变区通过肽连接子连接的重组单链多肽分子（“scFv蛋白”）。“单链抗体”通常缩写为“scFv”，由包含V_H和V_L结构域的多肽链组成，所述结构域相互作用以形成抗原结合位点。V_H和V_L结构域通常通过具有1至25个氨基酸残基的肽连接。抗体片段还包括双功能抗体、三功能抗体和单结构域抗体(dAb)。

[0100] “嵌合抗体”是含有包括来源于一个物种的抗体，优选地啮齿动物抗体的互补性决定区(CDR)的可变结构域的重组蛋白质，而所述抗体分子的恒定结构域来源于人类抗体人抗体的恒定域恒定结构域。对于兽医应用，所述嵌合抗体的恒定结构域可以来源于诸如猫或狗等其它物种的恒定结构域。

[0101] “人源化抗体”是来自一个物种的抗体（例如，啮齿动物抗体）的CDR从所述啮齿动物抗体的重链和轻链可变区被转移到人重链和轻链可变结构域（包括人类框架区(FR)中的重组蛋白质。所述抗体分子的恒定域恒定结构域来源于人抗体的恒定域恒定结构域。为了维持结合活性，来自亲本（例如，鼠类）抗体的有限数目的FR氨基酸残基可以取代为相应的人类FR残基。

[0102] “人类抗体人抗体”是例如从经过基因工程改造以响应于抗原激发而产生特定人类抗体人抗体的转基因小鼠获得的抗体。在这种技术中，将人重链和轻链基因座的元件引入来源于含有内源性重链和轻链基因座的靶向断裂的胚胎干细胞系的小鼠品系中。转基因小鼠可以合成对人类抗原具有特异性的人类抗体人抗体，且所述小鼠可用于产生分泌人类抗体人抗体的杂交瘤。Green等，Nature Genet.7:13(1994)、Lonberg等，Nature 368:856(1994)和Taylor等，Int.Immun.6:579(1994)描述了从转基因小鼠获得人类抗体人抗体的方法。还可以通过基因或染色体转染方法，以及噬菌体呈现技术来构建人类抗体人抗体，所有方法均为本领域中已知的。（关于由得自未免疫供体的免疫球蛋白可变域可变结构域基因谱系体外产生人类抗体人抗体和其片段，参见例如McCafferty等，1990，Nature 348:552-553)。在这种技术中，将抗体可变域可变结构域基因同框克隆到丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中，并且在噬菌体颗粒表面上呈现为功能抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝，所以基于抗体的功能性质进行选择还引起对编码展现那些性质的抗体的基因进行选择。这样，噬菌体模拟了B细胞的一些性质。噬菌体呈现可以用多种形式进行，关于综述，参见例如Johnson和Chiswell，Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571(1993)。人类抗体人抗体还可以通过体外活化B细胞来

产生。(参见美国专利号 5,567,610 和 5,229,275)。

[0103] 如本文中所使用,术语“抗体融合蛋白质”是重组产生的抗原结合分子,其中抗体或抗体片段连接于另一个蛋白质或肽,诸如相同或不同的抗体或抗体片段或者 DDD 或 AD 肽。融合蛋白质可以包含单个抗体组分、不同的抗体组分的多价或多特异性组合或同一抗体组分的多拷贝。融合蛋白质可以另外包含抗体或抗体片段和治疗剂。适合于此类融合蛋白质的治疗剂的实例包括免疫调节剂和毒素。一种优选的毒素包含核糖核酸酶 (RNA 酶),优选地重组 RNA 酶。优选的免疫调节剂可以是干扰素,诸如干扰素 α、干扰素 β 或干扰素 λ。

[0104] “多特异性抗体”是可以同时结合至少两个具有不同结构的靶标,例如两个不同的抗原、同一抗原上的两个不同的表位或半抗原和 / 或抗原或表位的抗体。“多价抗体”是可以同时结合至少两个具有相同或不同结构的靶标的目标抗体。原子价指示抗体具有多少个针对单个抗原或表位的结合臂或位点;即,单价、二价、三价或多价。抗体的多价意指它在结合抗原时可以利用多种相互作用,从而增加与抗原结合的亲合力。特异性指示抗体能够结合多少个抗原或表位;即,单特异性、双特异性、三特异性、多特异性。使用这些定义,自然抗体(例如 IgG)是二价的,因为它具有两个结合臂,但是单特异性的,因为它结合于一个表位。多特异性多价抗体是具有多于一个具有不同的特异性的结合位点的构建体。

[0105] “双特异性抗体”是可以同时结合于两个具有不同结构的靶标的抗体。双特异性抗体 (bsAb) 和双特异性抗体片段 (bsFab) 可以具有至少一个特异性结合于例如 T 细胞、NK 细胞、单核细胞或嗜中性粒细胞的臂和至少一个特异性结合由患病细胞、组织、器官或病原体产生或与其相关的抗原(例如肿瘤相关抗原)的其它臂。可以使用分子工程来产生多种双特异性抗体。

[0106] 如果施用量具有生理学显著性,则称本文中所描述的抗体制剂或组合物是以“治疗有效量”施用。如果药剂的存在在受体受试者的生理学方面产生可检测的变化,则它具有生理学显著性。在特定实施方案中,若抗体制剂的存在引起抗癌反应或缓解传染病状态的体征和症状,则其具有生理学显著性。生理学上显著的效应还可以是在受体受试者中引起体液和 / 或细胞免疫应答,从而引起靶细胞的生长抑制或死亡。

[0107] 白细胞重新定向双特异性抗体复合物

[0108] 各种实施方案涉及包含与针对疾病相关抗原的抗体或其片段连接的抗白细胞抗体或其片段的 bsAb。示例性 T 细胞抗原包括 CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69 和 CD90。对于 NK 细胞,其它示例性抗原可以选自 CD8、CD16、CD56、CD57、ADAM17 和 CD137;对于单核细胞,CD74、HLA-DR α 链、CD14、CD16、CD64 和 CD89;而对于嗜中性粒细胞,CEACAM6、CEACAM8、CD16b、CD32a、CD89、CD177、CD11a、CD11b 和 SLC44A2。在优选的实施方案中,抗 T 细胞抗体结合于 CD3,或抗 NK 抗体结合于 CD16。如以下所论述,疾病相关抗原,诸如肿瘤相关抗原 (TAA) 或病原体表达的抗原的许多实例是已知的。示例性优选 TAA 是 CD19。

[0109] 各种双特异性抗 CD3× 抗 CD19 抗体在本领域中是已知的和目前正在临床开发中的,诸如 BITE® (双特异性 T 细胞衔接子)(例如,Nagorsen 等,2009,Leukemia&Lymphoma 50:886-91;Amann 等,2009,J Immunother 32:453-64;Baeuerle 和 Reinhardt,2009,Cancer Res 69:4941-44) 和 DART® (参见例如 Moore 等,2011,Blood 117:4542-51;

Veri 等,2010,Arthritis Rheum 62 :1933-43)。布利莫单抗是BITE®抗体,其所包含的抗 CD3 和抗 CD19 抗体片段的 V_H和 V_L结构域与 5- 氨基酸连接子连接且表达为与自身粘接以形成抗原结合位点的单多肽链。人们认为布利莫单抗通过使 T 细胞特异性 CD3 和 B 细胞特异性 CD19 抗原紧密相邻,以引发针对毗邻 B 细胞的 T 细胞细胞毒性反应而起作用,这不需要 T 细胞对癌细胞的特异性(例如 Portell 等,2013,Clin Pharmacol 5(Suppl 1) :5-11)。由于其短半衰期,布利莫单抗需要连续静脉内输注来生效 (Portell 等,2013)。对伴随持续或复发性轻微残余疾病的 B 细胞 ALL 患者的 II 期试验报告了大约 80% 的完全缓解率 (Portell 等,2013)。

[0110] 据报告布利莫单抗低达 0.005mg/m^2/ 天的剂量能有效消除非何杰金氏淋巴瘤患者的癌细胞 (Bargou 等,2008,Science 321 :974-77)。观察到部分和完全缓解起始于 0.015mg 的剂量水平且所有六名测试患者在 0.06mg 的剂量下均经历肿瘤消退 (Bargou 等,2008)。在体外,布利莫单抗在 10pg/mL 的浓度下诱导 MEC-1 细胞 50% 细胞溶解 (Topp 等,2012,Blood 120 :5185-87 ;Bassan 等,2012,Blood 120 :5094-95)。

[0111] 布利莫单抗的抗 CD19 部分来源于 HD37 杂交瘤(参见例如美国专利号 7,575,923,其实施例部分是以引用的方式并入本文中),所述杂交瘤是公开可获得的(例如,Santa Cruz Biotechnology 目录号 sc-18894)。布利莫单抗的抗 CD3 部分来源于 TR66 杂交瘤(美国专利号 7,575,923 ;Traunecker 等,1991,EMBO J. 10 :3655-59),也是公开可获得的(例如,Enzo Life Sciences,目录号 ALX-804-822-C100)。

[0112] 可用于要求保护的方法和组合物中的多种针对 CD3 的抗体是公开已知的和 / 或市售的,诸如得自 LSBio(目录号 LS-B6698、LS-B8669 ;LS-B8765、LS-C96311、LS-C58677 等);ABCAM®(目录号 ab5690、ab16669、ab699、ab828、ab8671 等);Santa Cruz Biotechnology(目录号 sc-20047、sc-20080、sc-19590、sc-59008、sc-101442 等);和许多其它供应商。

[0113] 在一个优选的实施方案中,用作 DNL™复合物的一部分的抗 CD3 部分的氨基酸序列如以下 SEQ ID NO :96 至 SEQ ID NO :101 中所公开。然而,一般技术人员应认识到,任何已知的抗 CD3 抗体均可用于要求保护的方法和组合物中。优选地,可用的抗体部分是人源化的或人类的。

[0114] 可用于要求保护的方法和组合物中的多种针对 CD19 的抗体是公开已知的和 / 或市售的,诸如得自 Santa Cruz Biotechnology(目录号 sc-390244、sc-373897、sc-18894、sc-18896 等);ABCAM®(目录号 ab25232、ab134114、ab140981、ab1255 等);ABBIOTEC™(目录号 252262、252248、250585、251063 等)和许多其它供应商。

[0115] 在一个优选的实施方案中,抗 CD19 抗体部分是人源化 A19 抗体,其包含轻链 CDR 序列 CDR1KASQSVDYDGDSYLN(SEQ ID NO :90)、CDR2DASNLVS(SEQ ID NO :91) 和 CDR3QQSTEDPWT(SEQ ID NO :92) 和重链 CDR 序列 CDR1SYWMN(SEQ ID NO :93)、CDR2 QIWPGDGDTNYNGKFKG(SEQ ID NO :94) 和 CDR3 RETTTVGRYYYAMDY(SEQ ID NO :95)。

[0116] 其它抗 CD3× 抗 CD19 双特异性抗体是已知的,诸如 DART®,其还并入了 HD37 的抗 CD19Fv 序列和 TR66 的抗 CD3 Fv 序列 (Moore 等,2011,Blood 117 :4542-51 ;Veri 等.,2010,Arthritis Rheum 62 :1933-43)。Moore 等 (2011) 报告了 DART® 双特异性抗体在诱

导 B 细胞溶解时比带有同一的抗 CD19 和抗 CD3 可变区序列的单链双特异性抗体（BITE®）更有效，EC_{50}值在 pg/mL 范围内 (Moore 等，2011)。已经报告了除 DART®和 BITE®以外的其它抗 CD3× 抗 CD19 双特异性抗体（参见例如 Wei 等，2012，Cell Oncol 35 :423-34 ; Portner 等，2012，Cancer Immunol Immunother 61 :1869-75 ;Zhou 等，2012，Biotechnol Lett. 34 :1183-91)。在某些实施方案中，任何已知的抗 CD3× 抗 CD19 双特异性抗体均可用来诱导针对疾病相关细胞或病原体的免疫应答。

[0117] 卡妥索单抗是抗 CD3× 抗 EpCAM 双特异性抗体，在欧洲已经批准其用于治疗与转移的癌症相关的恶性腹水 (Chames 和 Baty，2009，MAbs 1 :539-47)。在小鼠模型系统中，卡妥索单抗在 10pM 的浓度范围下能够杀死肿瘤细胞，且据报告产生了黑素瘤肿瘤的总体根除 (Chames 和 Baty，2009)。伴随恶性腹水的卵巢癌患者的人类临床试验也显示了统计上显著的效力 (Chames 和 Baty，2009)。然而，大鼠 / 小鼠杂合 bsAb 的高免疫原性可能限制经静脉内 i.v. 施用抗体 (Chames 和 Baty，2009)。抗肿瘤 bsAb 的使用不局限于抗 CD3× 抗 CD19，而是还包括抗 HER2× 抗 CD64(MDX-210、MDX-H210)、抗 EGFR× 抗 CD64(MDX-447)、抗 CD30× 抗 CD16(HRS-3/A9)、抗 HER2× 抗 CD3(Her2Bi)、抗 CD20× 抗 CD3(CD20Bi、Bi20)、抗 EpCAM× 抗 CD3（卡妥索单抗、MT110)、抗 HER2× 抗 CD3（厄妥索单抗）和抗 NG2× 抗 CD28(rM28) (Chames 和 Baty，2009)。

[0118] 在一个最优选的实施方案中，抗 CD3× 抗 CD19 双特异性抗体或其它白细胞重新定向 bsAb 被制成如以下实施例 1 中所公开的 DNL™构建体。熟练技术人员应认识到标的目标白细胞重新定向双特异性抗体不局限于抗 CD3× 抗 CD19 构建体，而是可能包含与抗 CD3 抗体部分连接的针对任何已知疾病相关抗原的抗体。替代地，还可以使用针对除 CD3 以外的其它 T 细胞抗原或 NK 细胞、单核细胞或嗜中性粒细胞上所表达的其它抗原的抗体。示例性 T 细胞抗原包括但不限于 CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69 和 CD90。对于 NK 细胞，其它示例性抗原可以选自 CD8、CD16、CD56、CD57、ADAM17、KIR 和 CD137 ;对于单核细胞，CD74、HLA-DRα 链、CD14、CD16、CD64 和 CD89 ;且对于嗜中性粒细胞，CEACAM6、CEACAM8、CD16b、CD32a、CD89、CD177、CD11a、CD11b 和 SLC44A2。针对各白细胞抗原的抗体是公开已知的和 / 或公开可获得的（参见例如 ABCAM® 目录号 ab131276、ab139266、ab8360、ab51312、ab846、ab133616、ab75877、ab133255、ab109217、ab93278、ab17147、ab115851、ab128955、ab13463、ab85986 ;Santa Cruz Biotechnology 目录号 sc-46683、sc-59047 ;Enzo Life Sciences，Inc. 目录号 ALX-805-037-C100 ;Sino Biological Inc. 目录号 12211-RP02、11150-R074 ;Millipore 目录号 04-1102、04-1102、MAB1406)。这些和许多其它抗白细胞抗体是公开可获得的，并且可以用于标的目标白细胞重新定向 bsAb。如以下所论述，许多针对多种疾病相关抗原的抗体是公开是已知的和 / 或市售的，并且可用于标的目标白细胞重新定向双特异性抗体。可能使用的其它示例性白细胞重新定向 bsAb 包括 FBTA05（抗 CD20× 抗 CD3) 和 TRBS07（抗 GD2× 抗 CD3)。

[0119] 干扰素疗法

[0120] 在各种实施方案中，白细胞重新定向 bsAb、抗体 - 药物缀合物和 / 或检查点抑制子抗体可以与一种或多种诸如干扰素 α、干扰素 β 或干扰素 λ 等干扰素组合使用。人类干扰素人干扰素在本领域中是熟知的且人类干扰素人干扰素的氨基酸序列可以从公开数

据库容易地获得（例如 GenBank 登录号 AAA52716.1、AAA52724、AAC41702.1、EAW56871.1、EAW56870.1、EAW56869.1）。人类干扰素人干扰素还可以购自多种供应商（例如 Cell Signaling Technology, Inc.，Danvers，MA；Genentech，South San Francisco，CA、；EMD Millipore，Billerica，MA）。

[0121] 已经报告了干扰素 α（IFNα）在癌症的动物模型（Ferrantini 等，1994，J Immunol 153：4604-15）和人类癌症患者（Gutterman 等，1980，Ann Intern Med 93：399-406）中具有抗肿瘤活性。IFNα 可以发挥多种直接抗肿瘤效应，包括下调致癌基因、上调肿瘤抑制因子、经由增加肿瘤表面 MHC I 类蛋白的表达来增强免疫识别、促进细胞凋亡和对化疗剂敏感（Gutterman 等，1994，PNAS USA 91：1198-205；Matarrese 等，2002，Am J Pathol 160：1507-20；Mecchia 等，2000，Gene Ther 7：167-79；Sabaawy 等，1999，Int J Oncol 14：1143-51；Takaoka 等，2003，Nature 424：516-23）。对于一些肿瘤，IFNα 可以通过活化 STAT1 而具有直接和有效的抗增殖效应（Grimley 等，1998 Blood 91：3017-27）。干扰素 α2b 在体外和体内与诸如 hL243 抗 HLA-DR 抗体等抗肿瘤抗体缀合且消耗淋巴瘤和骨髓瘤细胞（Rossi 等，2011，Blood 118：1877-84）。

[0122] 间接地，IFNα 可以抑制血管生成（Sidky 和 Borden，1987，Cancer Res 47：5155-61）和刺激宿主免疫细胞，这对总体抗癌反应是必需的但在很大程度上被低估了（Belardelli 等，1996，Immunol Today 17：369-72）。IFNα 通过对骨髓细胞（Raefsky 等，1985，J Immunol 135：2507-12；Luft 等，1998，J Immunol 161：1947-53）、T 细胞（Carrero 等，2006，J Exp Med 203：933-40；Pilling 等，1999，Eur J Immunol 29：1041-50）和 B 细胞（Le 等，2001，Immunity 14：461-70）的作用而对免疫应答具有多效性影响。作为先天免疫系统的重要调节剂，IFNα 诱导树状细胞的快速分化和活化（Belardelli 等，2004，Cancer Res 64：6827-30；Paquette 等，1998，J Leukoc Biol 64：358-67；Santini 等，2000，J Exp Med 191：1777-88）且增强 NK 细胞的细胞毒性、迁移、细胞因子产生和抗体依赖性细胞毒性（ADCC）（Biron 等，1999，Ann Rev Immunol17：189-220；Brunda 等，1984，Cancer Res 44：597-601）。

[0123] 已经报告了干扰素 β 对于治疗多种实性肿瘤是有效的。每周两次经 6 百万单位的 IFN-β 治疗 36 个月的患者显示在患有 HCV 相关肝癌的患者中完全切除或摘除原发肿瘤后肝细胞癌复发减少（Ikeda 等，2000，Hepatology 32：228-32）。利用干扰素 β 的基因疗法诱导神经胶质瘤、黑素瘤和肾细胞癌的细胞凋亡（Yoshida 等，2004，Cancer Sci 95：858-65）。已经观察到内源性 IFN-β 通过抑制体内血管生成而抑制肿瘤生长（Jablonska 等，2010，J Clin Invest.120：1151-64）。

[0124] 被命名为 III 型干扰素的 IFN-λ 是一组新描述的细胞因子，其由位于染色体 19 上的三个不同的基因所编码的 IFN-λ1、IFN-λ2、IFN-λ3（分别也称为白介素 -29、28A 和 28B）组成（Kotenko 等，2003，Nat Immunol4：69-77；Sheppard 等，2003，Nat Immunol 4：63-8）。在蛋白层面上，IFN-λ2 和 IFN-λ3 高度同源，具有 96％氨基酸同一性，而 IFN-λ1 与 IFN-λ2 和 IFN-λ3 具有大约 81％同源性（Sheppard 等，2003，Nat Immunol 4：63-8）。IFN-λ 经由 JAK/STAT 途径活化信号转导，类似于 I 型 IFN 所诱导的途径，包括 JAK1 和 TYK2 激酶活化、STAT 蛋白磷酸化和 IFN 刺激的基因因子 3（ISGF3）的转录复合物活化（Witte 等，2010，Cytokine Growth Factor Rev 21：237-51；Zhou 等，2007，JVirol 81：7749-58）。

[0125] III 型与 I 型 IFN 系统之间的主要差异是其相应受体复合物的分布。IFN-α/β 通过两种广泛表达的 I 型干扰素受体进行信号转导，且与 IFN-α/β 施用相关的所产生的系统毒性已经限制了其用作治疗剂 (Pestka 等，2007，J Biol Chem 282 :20047-51)。相反，IFN-λ 通过由独特的 IFN-λ 受体 1(IFN-λR1) 和 IL-10 受体 2(IL-10R2) 组成的异源二聚受体复合物进行信号传导。如先前所报告 (Witte 等，2009，Genes Immun 10 :702-14)，IFN-λR1 具有非常局限的表达模式，在上皮细胞、黑素细胞和肝细胞中的水平最高，且在原代中枢神经系统 (CNS) 细胞中的水平最低。血液免疫系统细胞表达高水平的能抑制 IFN-λ 作用的短 IFN-λ 受体剪接变异体 (sIFN-λR1)。神经元细胞和免疫细胞的有限反应性暗示在 IFN-λ 的情况下可能不存在或显著减少往往与 IFN-α 疗法相关的严重毒性 (Witte 等，2009，Genes Immun 10 :702-14 ;Witte 等，2010，Cytokine Growth Factor Rev 21 :237-51)。近期出版物报告了尽管 IFN-α 和 IFN-λ 在肝细胞中诱导一组常见 ISG(干扰素刺激的基因) 的表达，不同于 IFN-α，但施用 IFN-λ 在经纯化的淋巴细胞或单核细胞中不诱导 STAT 活化或 ISG 表达 (Dickensheets 等，2013，J Leukoc Biol.93,12/20/12 在线出版)。据建议，对于治疗慢性 HCV 感染，IFN-λ 可能优于 IFN-α，因为其诱导通常与 IFN-α 疗法相关的白血球白细胞减少症的可能性较低 (Dickensheets 等，2013)。

[0126] IFN-λ 显示类似于 IL-10 相关细胞因子的结构特征，但在功能上具有 I 型 IFN 样抗病毒和抗增殖活性 (Witte 等，2009，Genes Immun 10 :702-14 ;Ank 等，2006，J Virol 80 :4501-9 ;Robek 等，2005，JVirol 79 :3851-4)。IFN-λ1 和 IFN-λ2 已经显示减少各种病毒的病毒复制或细胞病变效应，包括 DNA 病毒 (乙型肝炎病毒 (Robek 等，2005，J Virol 79 :3851-4 ;Doyle 等，2006，Hepatology 44 :896-906) 和单纯疱疹病毒 2(Ank 等，2008，J Immunol 180 :2474-85))、ss(+)RNA 病毒 (EMCV ;Sheppard 等，2003，Nat Immunol 4 :63-8) 和丙型肝炎病毒 (Robek 等，2005，J Virol 79 :3851-4 ;Doyle 等，2006，Hepatology 44 :896-906 ;Marcello 等，2006，Gastroenterol 131 :1887-98 ;Pagliaccetti 等，2008，J Biol Chem 283 :30079-89)、ss(-)RNA 病毒 (水泡性口膜炎病毒 ;Pagliaccetti 等，2008，J Biol Chem 283 :30079-89) 和流感 A 病毒 (Jewell 等，2010，J Virol 84 :11515-22) 和双链 RNA 病毒，诸如轮状病毒 (Pott 等，2011，PNAS USA 108 :7944049)。已经由基因研究鉴别了 IFN-λ3 在 HCV 感染中作为关键细胞因子 (Ge 等，2009，Nature 461 :399-401)，并且还显示针对 EMCV 的有效活性 (Dellgren 等，2009，Genes Immun 10 :125-31)。据报告，鼻病毒诱导的 IFN-λ 产生缺陷与鼻病毒诱导的哮喘恶化的严重程度高度相关 (Contoli 等，2006，Nature Med 12 :1023-26)，且已经建议 IFN-λ 疗法作为治疗变应性哮喘的新方法 (Edwards 和 Johnston，2011，EMBO Mol Med 3 :306-8 ;Koltsida 等，2011，EMBO Mol Med 3 :348-61)。

[0127] 已经在若干种人类癌细胞系中确定了 IFN-λ 的抗增殖活性，包括神经内分泌癌瘤 BON1(Zitzmann 等，2006，Biochem Biophys Res Commun 344 :1334-41)、成胶质细胞瘤 LN319(Meager 等，2005，Cytokine 31 :109-18)、永生化角质细胞 HaCaT(Maher 等，2008，Cancer Biol Ther 7 :1109-15)、黑素瘤 F01(Guenterberg 等，2010，Mol Cancer Ther 9 :510-20) 和食道癌 TE-11(Li 等，2010，Eur J Cancer 46 :180-90)。在动物模型中，IFN-λ 通过先天性和适应性免疫应答来诱导肿瘤细胞凋亡和破坏，表明 IFN-λ 的局部递送在治疗人类恶性肿瘤时可以是有用的附加策略 (Numasaki 等，2007，J Immunol 178 :5086-98)。

Fab连接的干扰素-λ显示在靶细胞中具有有效的抗肿瘤和抗病毒活性(Liu等,2013,PLoS One 8:e63940)。

[0128] 在临床处置中,PEG化IFN-λ1(PEG-IFN-λ1)已经临时用于慢性丙型肝炎病毒感染的患者。在Ib期研究(n=56)中,在所有剂量水平(0.5-3.0μg/kg)下观察到抗病毒活性,且当PEG-IFN-λ1施用于IFN-α疗法后复发的基因型1HCV患者时病毒负载减少2.3至4.0个对数(Muir等,2010,Hepatology 52:822-32)。IIb期研究(n=526)显示HCV基因型1和4患者对PEG-IFN-λ1治疗的反应率显著高于PEG-IFN-α。同时,通常与I型干扰素治疗相关的不利事件率在PEG-IFN-λ1的情况下低于PEG-IFN-α。不常观察到中性白细胞减少症和血小板减少症,且流感样症状、贫血和肌肉骨骼症状的比率降至在PEG-IFN-α治疗时所见的约1/3。然而,PEG-IFN-λ1与PEG-IFN-α之间的严重不利事件、抑郁和其它常见不利事件率(≥10%)类似。与PEG-IFN-α相比,在最高剂量PEG-IFN-λ1下观察到较高肝毒性率("Investigational Compound PEG-Interferon Lambda Achieved Higher Response Rates with Fewer Flu-like and Musculoskeletal Symptoms and Cytopenias Than PEG-Interferon Alfa in Phase IIb Study of 526 Treatment-Naive Hepatitis C Patients",2011年4月2日,由Bristol-Myers Squibb新闻发布)。

[0129] 在各种实施方案中,标的目标白细胞重新定向双特异性抗体、ADC和/或检查点抑制剂mAb可以与一种或多种诸如干扰素α、干扰素β、干扰素λ1、干扰素λ2或干扰素λ3等干扰素组合使用。当与其它药剂一起使用时,干扰素可以在另一种药剂之前、同时或之后施用。当同时施用时,干扰素可以与另一种药剂缀合或分开。

[0130] 检查点抑制子抗体

[0131] 以检查点抑制子抗体用于癌症疗法的研究已经在先前认为对癌症治疗具有抗性的癌症中产生了前所未有的反应率(参见例如Ott和Bhardwaj,2013,Frontiers in Immunology 4:346;Menzies和Long,2013,Ther Adv Med Oncol 5:278-85;Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-64;Mavilio和Lugli,)。利用针对诸如CTLA4、PD1和PD-L1等免疫系统检查点的拮抗性检查点阻断抗体的疗法是用于癌症和其它疾病的免疫疗法的最有前景的新手段之一。与大多数抗癌剂相反,检查点抑制剂不直接靶向肿瘤细胞,而是靶向淋巴细胞受体或其配位体配体,以提高免疫系统的内源性抗癌活性。(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)因为此类抗体主要通过调节对患病细胞、组织或病原体的免疫应答起作用,所以它们可以与其它治疗形态组合使用,诸如标的目标白细胞重新定向双特异性抗体、ADC和/或干扰素,以提高此类药剂的抗肿瘤效果。因为检查点活化还可能与慢性感染相关(Nirschl和Drake,2013,Clin Cancer Res 19:4917-24),所以此类组合疗法还可以用于治疗传染病。

[0132] 现在已经清楚,肿瘤可以通过强占某些免疫检查点途径而逃避免疫监测,特别是在肿瘤抗原特异性T细胞中(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。因为许多此类免疫检查点由配位体配体-受体相互作用引发,所以相互作用它们可以通过针对所述配位体配体和/或其受体的抗体容易地容易地阻断(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。虽然针对CTLA4、PD1和PD-L1的检查点抑制子抗体是临床上最先进的,但其它潜在检查点抗原是已知的,并且可以用作诸如LAG3、B7-H3、B7-H4和TIM3等治疗抗体的靶标(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。

[0133] 程序性细胞死亡蛋白1(PD1,也称为CD279)编码B细胞和NK细胞中所表达的免疫球蛋白超家族的细胞表面膜蛋白(Shinohara等,1995,Genomics 23:704-6;Blank等,2007,Cancer Immunol Immunother 56:739-45;Finger等,1997,Gene 197:177-87;Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。PD1之主要作用在于限制T细胞在响应于感染而发炎期间在周围组织中之活性以及限制自体免疫性(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。在活化的T细胞中诱导PD1表达,且PD1与其内源性配位体配体之一结合藉由抑制刺激性激酶而起抑制T细胞活化的作用(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。PD1还起抑制TCR“停止信号”的作用(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。PD1高度表达于T_{reg}细胞上,且可在配位体配体存在下增加其增殖(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。

[0134] 抗PD1抗体已用于治疗黑素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、前列腺癌、结肠直肠癌、头颈癌、三阴性乳腺癌、白血病、淋巴瘤及肾细胞癌(Topalian等,2012,N Engl J Med 366:2443-54;Lipson等,2013,Clin Cancer Res 19:462-8;Berger等,2008,Clin Cancer Res 14:3044-51;Gildener-Leapman等,2013,Oral Oncol 49:1089-96;Menzies及Long,2013,Ther Adv Med Oncol 5:278-85)。因为PD1/PD-L1及CTLA4通过不同的途径起作用,所以利用针对各抗原的检查点抑制子抗体的组合疗法可以提供增强的免疫应答是有可能的。

[0135] 示例性抗PD1抗体包括兰利珠单抗(MK-3475,MERCK)、尼鲁单抗(BMS-936558,BRISTOL-MYERS SQUIBB)、AMP-224(MERCK)及皮地珠单抗(CT-011,CURETECH LTD.)。抗PD1抗体可购自市面,例如购自ABCAM®(AB137132)、BIOLEGEND®(EH12.2H7、RMP1-14)及AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(J105、J116、MIH4)。

[0136] 程序性细胞死亡1配位体配体1(PD-L1,也称为CD274及B7-H1)是在活化的T细胞、B细胞、骨髓细胞和巨噬细胞上发现的PD1的配位体配体。虽然PD1存在两种内源性配位体配体,即PD-L1和PD-L2,但抗肿瘤疗法已经集中于抗PD-L1抗体。PD1和PD-L1的复合物抑制CD8+T细胞增殖且减少免疫应答(Topalian等,2012,N Engl J Med 366:2443-54;Brahmer等,2012,N Eng J Med 366:2455-65)。抗PD-L1抗体已用于治疗非小细胞肺癌、黑素瘤、结肠直肠癌、肾细胞癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌和血液恶性肿瘤(Brahmer等,N Eng J Med 366:2455-65;Ott等,2013,Clin Cancer Res 19:5300-9;Radvanyi等,2013,Clin Cancer Res 19:5541;Menzies及Long,2013,Ther Adv Med Oncol 5:278-85;Berger等,2008,Clin Cancer Res14:13044-51)。

[0137] 示例性抗PD-L1抗体包括MDX-1105(MEDAREX)、MEDI4736(MEDIMMUNE)、MPDL3280A(GENENTECH)和BMS-936559(BRISTOL-MYERS SQUIBB)。抗PD-L1抗体也可购自市面,例如购自AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(MIH1)。

[0138] 细胞毒性T-淋巴细胞抗原4(CTLA4,也称为CD152)也是专门表现在T细胞上的免疫球蛋白超家族的成员。CTLA4起抑制T细胞活化的作用且据报告能抑制辅助T细胞活性和提高调节T细胞免疫抑制活性(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。虽然CTL4-A的确切作用机制仍在研究中,但已经提出其藉由在竞争结合CD80和CD86方面胜出CD28以及积极向T细胞递送抑制信号而抑制T细胞活化(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。抗CTL4A抗体已用于临床试验中用于治疗黑素瘤、前列腺癌、小细

胞肺癌、非小细胞肺癌 (Robert 和 Ghiringhelli,2009, Oncologist 14 :848-61 ;Ott 等, 2013, Clin Cancer Res 19 :5300 ;Weber,2007, Oncologist 12 :864-72 ;Wada 等,2013, J Transl Med 11 :89)。抗 CTL4A 的显著特征是抗肿瘤效应的动力学性质,其中生理反应所需的初步治疗后停滞期多达 6 个月 (Pardoll,2012, Nature Reviews Cancer 12 :252-264)。在一些情况下,治疗开始之后肿瘤尺寸实际上可能增加,随后可见减小 (Pardoll,2012, Nature Reviews Cancer 12 :252-264)。

[0139] 示例性抗 CTLA4 抗体包括伊匹单抗 (Bristol-Myers Squibb) 和曲美目单抗 (PFIZER)。抗 PD1 抗体可购自市面,例如购自 ABCAM® (AB134090)、SINO BIOLOGICAL INC.(11159-H03H、11159-H08H) 和 THERMO SCIENTIFIC PIERCE(PA5-29572、PA5-23967、PA5-26465、MA1-12205、MA1-35914)。伊匹单抗最近已经接到 FDA 批准用于治疗转移性黑素瘤 (Wada 等,2013, J Transl Med 11 :89)。

[0140] 本领域技术人员应认识到,确定检查点抑制子抗体单独或与一种或多种其它药剂组合施用于需要其的患者的最佳剂量的方法可以通过本领域中熟知的标准剂量 - 反应和毒性研究来确定。在一个示例性实施例中,检查点抑制子抗体可能优选地以约 0.3-10mg/kg 或最大耐受剂量施用,约每三周或约每六周施用一次。替代地,检查点抑制子抗体可以通过升高的剂量方案施用,包括施用约 3mg/kg 的第一剂量、约 5mg/kg 的第二剂量和约 9mg/kg 的第三剂量。替代地,逐步升高的剂量方案包括施用检查点抑制子抗体约 5mg/kg 的第一剂量和约 9mg/kg 的第二剂量。另一个逐步升高的剂量方案施用可以包括施用检查点抑制子抗体约 3mg/kg 的第一剂量、约 3mg/kg 的第二剂量、约 5mg/kg 的第三剂量、约 5mg/kg 的第四剂量和约 9mg/kg 的第五剂量。在另一个方面,逐步升高的剂量方案可以包括施用 5mg/kg 的第一剂量、5mg/kg 的第二剂量和 9mg/kg 的第三剂量。检查点抑制剂 mAb 的示例性报告剂量包括 3mg/kg 伊匹单抗,每三周施用一次,持续四个剂量 ;10mg/kg 伊匹单抗,每三周一次持续八个循环 ;10mg/kg,每三周一次持续四个循环,随后每 12 周一次总计三年 ;10mg/kg MK-3475,每两周或每三周一次 ;2mg/kg MK-3475,每三周一次 ;15mg/kg 曲美目单抗,每三个月一次 ;0.1、0.3、1、3 或 10mg/kg 尼鲁单抗,每两周一次持续多达 96 周 ;0.3、1、3 或 10mg/kg BMS-936559,每两周一次持续多达 96 周 (Kyi 和 Postow,2013 年 10 月 23 日,FEBS Lett[印刷前电子版] ;Callahan 和 Wolchok,2013, J Leukoc Biol 94 :41-53)。

[0141] 刺激针对肿瘤及 / 或病原体的免疫应答的这些和其它已知药剂可以与单独或进一步与诸如干扰素 α 的干扰素和 / 或用于改良癌症疗法的抗体 - 药物缀合物组合的白细胞重新定向双特异性抗体组合使用。可以组合使用的其它已知共刺激途径调节剂包括但不限于阿托莫德、贝拉西普、布利莫单抗、CD40 配体、抗 B7-1 抗体、抗 B7-2 抗体、抗 B7-H4 抗体、AG4263、依立托仑、抗 OX40 抗体、ISF-154 和 SGN-70 ;B7-1、B7-2、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD48、LFA-3、CD30 配位体配体、CD40 配位体配体、耐热抗原、B7h、OX40 配体、LIGHT、CD70 和 CD24。

[0142] 在某些实施例中,抗 KIR 抗体也可以与白细胞重新定向 bsAb、干扰素、ADC 和 / 或检查点抑制子抗体组合使用。当被抗体活化时 NK 细胞通过自发性细胞毒性和通过 ADCC 介导抗肿瘤和抗感染剂活性 (Kohrt 等,2013, Blood, [印刷前电子版 12/10/13])。细胞毒性反应程度由 NK 细胞接到的抑制信号与活化信号的平衡来决定 (Kohrt 等人,2013)。杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 介导能降低 NK 细胞反应的抑制信号。抗 KIR 抗体,诸如利利

单抗 (Innate Pharma) 和 IPH2101(Innate Pharma)，已在多发性骨髓瘤中显示抗肿瘤活性 (Benson 等，2012，Blood 120 :4324-33)。在体外，抗 KIR 抗体防止 NK 细胞与靶细胞的致耐受性相互作用，且增加 NK 细胞对肿瘤细胞的细胞毒性反应 (Kohrt 等，2013)。在体内，在与利妥昔单抗 (抗 CD20) 组合时，抗 KIR 抗体在 0.5mg/kg 的剂量下诱导的针对淋巴瘤的 NK 细胞介导的利妥昔单抗依赖性细胞毒性有所增强 (Kohrt 等，2013)。抗 KIR mAb 可以与 ADC、白细胞重新定向 bsAb、干扰素和 / 或检查点抑制子抗体组合以增强对肿瘤细胞或致病生物体的细胞毒性。

[0143] 一般抗体技术

[0144] 用于制备实际上针对任何靶抗原的单克隆抗体的技术在本领域中是熟知的。参见例如 Kohler 和 Milstein，Nature 256 :495(1975)，和 Coligan 等 (编)，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY，第 1 卷，第 2.5.1-2.6.7 页 (John Wiley&Sons 1991)。简而言之，单克隆抗体可以通过以下方式获得 :向小鼠注射包含抗原的组合物，取出脾脏以获得 B 淋巴细胞，使该 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤，克隆所述杂交瘤，选择能产生针对所述抗原的抗体的阳性克隆，培养能产生针对所述抗原的抗体的克隆，和从杂交瘤培养物中分离抗体。

[0145] 可以通过多种大家公认的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化 MAb。此类分离技术包括利用蛋白 A 琼脂糖凝胶的亲和色谱法、尺寸排阻色谱法和离子交换色谱法。参见例如 Coligan 第 2.7.1-2.7.12 页和第 2.9.1-2.9.3 页。还参见 Baines 等，“Purification of Immunoglobulin G(IgG)”，METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY，第 10 卷，第 79-104 页 (The Humana Press，Inc.1992)。

[0146] 在初步产生针对免疫原的抗体之后，可以对抗体进行测序且随后藉由重组技术制备。鼠类抗体和抗体片段的人源化和嵌合对于本领域技术人员是熟知的。使用来源于人源化、嵌合或人类抗体人抗体的抗体组分能回避与鼠类恒定区的免疫原性相关的潜在问题。

[0147] 嵌合抗体

[0148] 嵌合抗体为其中人类抗体人抗体的可变区已经被例如小鼠抗体的可变区，包括小鼠抗体的互补性决定区 (CDR) 置换的重组蛋白质。当施用于受试者时，嵌合抗体展现出降低的免疫原性和增加的稳定性。用于克隆鼠类免疫球蛋白可变域可变结构域的一般技术公开于例如 Orlandi 等，Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA 86 :3833(1989) 中。用于构建嵌合抗体的技术对于本领域技术人员是熟知的。举例来说，Leung 等，Hybridoma 13 :469(1994) 通过组合编码抗 CD22 单克隆抗体鼠类 LL2 的 V_{κ} 和 V_{H} 结构域的 DNA 序列与相应的人类 κ 和 IgG_1 恒定区结构域来产生 LL2 嵌合体。

[0149] 人源化抗体

[0150] 用于产生人源化 MAb 的技术在本领域中是熟知的 (参见例如 Jones 等，Nature 321 :522(1986) ;Riechmann 等，Nature 332 :323(1988) ;Verhoeyen 等，Science 239 :1534(1988) ;Carter 等，Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA 89 :4285(1992) ;Sandhu，Crit.Rev.Biotech.12 :437(1992) ;和 Singer 等，J. Immun.150 :2844(1993))。嵌合或鼠类单克隆抗体可以通过将来自于小鼠免疫球蛋白重链和轻链可变区的小鼠 CDR 转移至人类抗体人抗体的对应可变域可变结构域而得以人源化。嵌合单克隆抗体中的小鼠架构区 (FR) 也置换为人类 FR 序列。因为简单地将小鼠 CDR 转移至人类 FR 中往往导致抗体亲和力降低或甚至

丧失，所以可能需要额外修饰以恢复鼠类抗体的原始亲和力。这可以通过将FR区中的一个或多个人类残基置换成其鼠类对应物以获得对其表位具有良好结合亲和力的抗体来实现。参见例如Tempest等人，Biotechnology 9:266(1991)和Verhoeyen等人，Science 239:1534(1988)。一般来说，与其鼠类对应物不同且位于接近或接触一个或多个CDR胺基酸氨基酸残基处的那些人类FR胺基酸氨基酸残基将为取代候选者。

[0151] 人类抗体人抗体

[0152] 使用组合法或经人类免疫球蛋白基因座转化过的转基因动物来产生完全人类抗体人抗体的方法在本领域中是已知的（例如，Mancini等，2004，New Microbiol.27:315-28;Conrad和Scheller，2005，Comb.Chem.High Throughput Screen.8:117-26;Brekke和Loset，2003，Curr.Opin.Phamacol.3:544-50)。还可以通过基因或染色体转染方法，以及噬菌体呈现技术来构筑完全人抗体，所有方法均为本领域中已知的。参见例如McCafferty等，Nature 348:552-553(1990)。预计此类完全人类抗体人抗体与嵌合或人源化抗体相比展现甚至更少的副作用且在体内充当本质上内源性人类抗体人抗体。在某些实施方案中，要求保护的方法和程序可以利用由此类技术产生的人类抗体人抗体。

[0153] 在一个替代方案中，可以使用噬菌体呈现技术来产生人类抗体人抗体（例如Dantas-Barbosa等，2005，Genet.Mol.Res.4:126-40)。人类抗体人抗体可以由正常人或展现特定疾病状态（诸如癌症）的人产生(Dantas-Barbosa等，2005)。由患病个体构建人类抗体人抗体的优势在于循环抗体谱系可能偏向于针对疾病相关抗原的抗体。

[0154] 在这种方法的一个非限制性实施例中，Dantas-Barbosa等(2005)构建了来自于骨肉瘤患者的人类Fab抗体片段的噬菌体呈现库。一般来说，从循环血液淋巴细胞获得总RNA(Id.)。从μ、γ和κ链抗体谱系克隆重组Fab且插入噬菌体呈现库中(Id.)。将RNA转化成cDNA且用于使用针对重链和轻链免疫球蛋白序列的特定引物制造Fab cDNA库(Marks等，1991，J. Mol.Biol.222:581-97)。根据Andris-Widhopf等(2000，PHAGE DISPLAY LABORATORY MANUAL，Barbas等（编），第1版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，NY第9.1至9.22页）进行库构建。用限制内切酶消化最终的Fab片段且插入细菌噬菌体基因组中以制造噬菌体呈现库。可以通过如本领域中已知的标准噬菌体呈现方法来筛选这样的库（参见例如Pa squalini和Ruoslahti，1996，Nature 380:364-366;Pasqualini，1999，T he Quart.J. Nucl.Med.43:159-162)。

[0155] 噬菌体呈现可以用多种形式进行，关于其综述，参见例如Johnson和Chiswell，Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571(1993)。还可以通过体外活化的B细胞来产生人类抗体人抗体。参见美国专利第5,567,610号和第5,229,275号，所述专利以全文引用的方式并入本文中。熟练技术人员应意识到，这些技术是示例性的并且可利用制造和筛选人类抗体人抗体或抗体片段的任何已知方法。

[0156] 在另一替代方案中，可以使用已经过基因工程改造以产生人类抗体人抗体的转基因动物，使用标准免疫方案来产生本质上针对任何免疫原性靶标的目标抗体。Green等，Nature Genet.7:13(1994);Lonberg等，Nature 368:856(1994);和Taylor等，Int.Immun.6:579(1994)公开了从转基因小鼠获得人类抗体人抗体的方法。此类系统的一个非限制性实例是得自Abgenix(Fremont，CA)的XENOMOUSE®（例如Green等，1999，J.

Immunol.Methods 231:11-23)。在XENOMOUSE®和类似的动物中,小鼠抗体基因已经被灭活并且被功能人类抗体人抗体基因置换,而小鼠免疫系统的其余部分保持完好。

[0157] 用经种系配置的YAC(酵母人工染色体)转化XENOMOUSE®,所述YAC含有部分人IgH和Igκ基因座,包含大多数可变区序列以及辅助基因和调节序列。人可变区谱系可用于产生能产生抗体的B细胞,所述细胞可通过已知技术加工成杂交瘤。经靶抗原免疫的XENOMOUSE®将通过正常免疫应答产生人类抗体人抗体,可以收集和/或通过上文所论述的标准技术产生所述抗体。可利用多种品系的XENOMOUSE®,各品系能够产生不同类别的抗体。转基因产生的人类抗体人抗体已经显示出具有治疗潜力,同时保留正常人类抗体人抗体的药代动力学性质(Green等,1999)。熟练技术人员应认识到,要求保护的组合物和方法不限于使用XENOMOUSE®系统,而是可以利用经基因工程改造以产生人类抗体人抗体的任何转基因动物。

[0158] 抗体克隆和产生

[0159] 各种技术,诸如产生嵌合或人源化抗体,可能涉及抗体克隆和构建程序。目标抗体的抗原结合$V_κ$(可变轻链)和V_H(可变重链)序列可以通过多种分子克隆程序来获得,诸如RT-PCR、5′-RACE和cDNA文库筛选。来自表达鼠类抗体的细胞的抗体的V基因可以通过PCR扩增进行克隆并测序。为证实其可靠性,可以使所克隆的V_L和V_H基因在细胞培养物中表达为嵌合Ab,如Orlandi等(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:3833(1989))所描述。基于V基因序列,随后可以如Leung等(Mol.Immunol.,32:1413(1995))所描述来设计和构建人源化抗体。

[0160] 可以通过一般分子克隆技术从产生鼠类抗体的任何已知杂交瘤细胞系或经过转染的细胞系制备cDNA(Sambrook等,Molecular Cloning,A laboratory manual,第2版(1989))。抗体的$V_κ$序列可以使用引物VK1BACK和VK1FOR(Orlandi等,1989)或Leung等(BioTechniques,15:286(1993))所描述的延伸引物组进行扩增。V_H序列可以使用引物对VH1BACK/VH1FOR(Orlandi等,1989)或Leung等(Hybridoma,13:469(1994))所描述的与鼠类IgG恒定区退火的引物进行扩增。可如Leung等(Mol.Immunol.,32:1413(1995))所描述通过组合长寡核苷酸模版合成和PCR扩增来构建人源化V基因。

[0161] $V_κ$的PCR产物可亚克隆到阶段载体中,诸如基于pBR327的阶段载体VKpBR,其含有Ig启动子、信号肽序列和适宜的限制位点。V_{II}的PCR产物可亚克隆到类似阶段载体中,诸如基于pBluescript的VHpBS。含有$V_κ$和V_H序列连同启动子和信号肽序列的表达盒可从VKpBR和VHpBS中切除且分别连接于适当的表达载体中,诸如pKh和pG1g(Leung等Hybridoma,13:469(1994))。所述表达载体可以共转染于适当的细胞中且监测上清液的嵌合、人源化或人类抗体人抗体产生。替代地,可以切除$V_κ$和V_H表达盒并亚克隆于单一表达载体中,诸如pdHL2,诸如Gillies等(J.Immunol.Methods125:191(1989)所描述且还示于Losman等,Cancer,80:2660(1997)中。

[0162] 在一个替代实施方案中,可将表达载体转染于已预先适应在无血清培养基中转染、生长和表达的宿主细胞中。可使用的示例性细胞系包括Sp/EEE、Sp/ESF和Sp/ESF-X细胞系(参见例如美国专利号7,531,327、7,537,930和7,608,425,各自的实施例部分以引用

的方式并入本文)。这些示例性细胞系是基于以突变型Bcl-EEE基因转染、暴露于甲氨蝶呤以扩增经过转染的基因序列且预先适应无血清细胞系以进行蛋白质表达的Sp2/0骨髓瘤细胞系。

[0163] 抗体片段

[0164] 可以通过已知的技术来产生识别特定表位的抗体片段。抗体片段是抗体的抗原结合部分,诸如$F(ab')_2$、Fab′、$F(ab)_2$、Fab、Fv、scFv等等。$F(ab')_2$片段可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化来产生且Fab′片段可以通过还原$F(ab')_2$片段的二硫桥来产生。替代地,可以构建Fab′表达库(Huse等,1989,Science,246:1274-1281)以允许快速而又容易地鉴别具有所需特异性的单克隆Fab′片段。可以通过抗体的木瓜蛋白酶消化来产生$F(ab)_2$片段。

[0165] 单链Fv分子(scFv)包含VL结构域和VH结构域。VL和VH结构域缔合以形成靶结合位点。这两个结构域通过肽连接子(L)进一步共价连接。用于制造scFv分子和设计合适的肽连接子的方法描述于以下文献中:美国专利第4,704,692号;美国专利第4,946,778号;Raag和Whitlow,FASEB 9:73-80(1995);以及Bird和Walker,TIBTECH,9:132-137(1991)。

[0166] 用于产生单结构域抗体(DAB或VHH)的技术在本领域中也是已知的,如例如Cossins等(2006,Prot Express Purif 51:253-259)中所公开,该文献以引用的方式并入本文中。单结构域抗体可以例如通过标准免疫技术获自骆驼、羊驼或美洲驼。(参见例如Muyldermans等,TIBS26:230-235,2001;Yau等,J Immunol Methods 281:161-75,2003;Maass等,J Immunol Methods 324:13-25,2007)。VHH可以具有有效抗原结合能力并且可以与常规VH-VL对不可接近的新颖表位相互作用。(Muyldermans等,2001)。羊驼血清IgG含有约50%仅有重链的骆驼IgG抗体(HCAb)(Maass等,2007)。羊驼可用诸如TNF-α的已知抗原免疫并且可分离结合并中和靶抗原的VHH(Maass等,2007)。已经鉴别了实际上扩增所有羊驼VHH编码序列的PCR引物并且可用于构建羊驼VHH噬菌体呈现文库,所述文库可用于通过本领域中熟知的标准生物淘选技术来分离抗体片段(Maass等,2007)。在某些实施方案中,抗胰腺癌VHH抗体片段可用于所主张的方法和组合物中。

[0167] 抗体片段可藉由全长抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌或另一个宿主中表达编码所述片段的DNA来制备。可以通过用常规方法对全长抗体进行胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化来获得抗体片段。这些方法描述于例如Goldenberg的美国专利第4,036,945号和第4,331,647号以及其中所含的参考文献中。还参见Nisonoff等,Arch Biochem. Biophys.89:230(1960);Porter,Biochem.J. 73:119(1959);Edelman等,METHODS IN ENZYMOLOGY第1卷,第422页(Academic Press1967);及Coligan第2.8.1-2.8.10页和第2.10.-2.10.4页。

[0168] 抗体同种异型

[0169] 治疗抗体的免疫原性与输注反应的风险增加和治疗反应的持续时间减少相关(Baert等,2003,N Engl JMed 348:602-08)。治疗抗体在宿主中诱导免疫应答的程度可能部分由抗体的同种异型决定(Stickler等人,2011,Genes and Immunity 12:213-21)。抗体同种异型涉及抗体恒定区序列中特定位置上的胺基酸氨基酸序列变异。含有重链γ型恒定区的IgG抗体的同种异型被命名为Gm同种异型(1976,J Immunol117:1056-59)。

[0170] 对于常见 IgG1 人抗体，最流行的同种异型是 G1m1(Stickler 等，2011，Genes and Immunity 12 :213-21)。然而，G1m3 同种异型通常也存在于白种人中 (Stickler 等，2011)。已经报告 G1m1 抗体含有当施用于非 G1m1(nG1m1) 受体，诸如 G1m3 患者时倾向于诱导免疫应答的同种异型序列 (Stickler 等，2011)。当施用于 G1m1 患者时，非 G1m1 同种异型抗体同样的免疫原性 (Stickler 等，2011)。

[0171] 人类 G1m1 同种异型包含重链 IgG1 的 CH3 序列中 Kabat 位置 356 上的氨基酸天冬氨酸和 Kabat 位置 358 上的亮氨酸。nG1m1 同种异型包含 Kabat 位置 356 上的氨基酸谷氨酸和 Kabat 位置 358 上的甲硫氨酸。G1m1 和 nG1m1 同种异型都包含 Kabat 位置 357 上的谷氨酸残基，且所述同种异型有时被称为 DEL 和 EEM 同种异型。G1m1 和 nG1m1 同种异型抗体的重链恒定区序列的非限制性实例如针对示例性抗体利妥昔单抗 (SEQ ID NO :85) 和维妥珠单抗 (SEQ ID NO :86) 所显示。

[0172] 利妥昔单抗重链可变区序列 (SEQ ID NO :85)

[0173] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEAIHNHYTQKSLSLSPGK

[0174] 维妥珠单抗重链可变区 (SEQ ID NO : 86)

[0175] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0176] Jefferis 和 Lefranc(2009，mAbs 1 :1-7) 回顾了 IgG 同种异型的序列变异特征和其对免疫原性的影响。其报告 G1m3 同种异型的特征在于 Kabat 位置 214 上的精氨酸残基，相当比于 G1m17 同种异型中 Kabat214 上的赖氨酸残基。nG1m1,2 同种异型的特征在于 Kabat 位置 356 上的谷氨酸、Kabat 位置 358 上的甲硫氨酸和 Kabat 位置 431 上的丙氨酸。G1m1,2 同种异型的特征在于 Kabat 位置 356 上的天冬氨酸、Kabat 位置 358 上的亮氨酸和 Kabat 位置 431 上的甘氨酸。除重链恒定区序列变异体以外，Jefferis 和 Lefranc(2009) 还报告了 K 轻链恒定区的同种异型变异体，其中 Km1 同种异型的特征在于 Kabat 位置 153 上的缬氨酸和 Kabat 位置 191 上的亮氨酸，Km1,2 同种异型的特征在于 Kabat 位置 153 上的丙氨酸和 Kabat 位置 191 上的亮氨酸，且 Km3 同种异型的特征在于 Kabat 位置 153 上的丙氨酸和 Kabat 位置 191 上的缬氨酸。

[0177] 关于治疗抗体，维妥珠单抗和利妥昔单抗分别是用于治疗多种血液恶性病和 / 或自体免疫疾病的针对 CD20 的人类化人源化和嵌合 IgG1 抗体。表 1 比较了利妥昔单抗对比维妥珠单抗的同种异型序列。如表 1 中所示，利妥昔单抗 (G1m17,1) 为 DEL 同种异型 IgG1，其中 Kabat 位置 214(重链 CH1) 上的额外序列变异在于利妥昔单抗中的赖氨酸对比维妥珠单抗中的精氨酸。已经报告了维妥珠单抗在受试者中的免疫原性弱于利妥昔单抗 (参见例如 Morchhauser 等，2009，J Clin Oncol 27 :3346-53 ;Goldenberg 等，2009，Blood 113 :

1062-70 ;Robak 和 Robak,2011, BioDrugs 25 :13-25),这种效果归因于人类化人源化抗体与嵌合抗体之间的差异。然而,EEM 同种异型与 DEL 同种异型之间的差异可能也解释了维妥珠单抗的较低免疫原性。

[0178] 表 1. 利妥昔单抗对比维妥珠单抗的同种异型

[0179]

		重链位置和相关同种异型					
	完整同种异型	214 (同种异型)		356/358 (同种异型)		431 (同种异型)	
利妥昔单抗	G1m17,1	K	17	D/L	1	A	-
维妥珠单抗	G1m3	R	3	E/M	-	A	-

[0180] 为了降低治疗抗体在 nG1m1 基因型个体中的免疫原性,需要选择抗体的同种异型以对应于以 Kabat 214 上的精氨酸为特征的 G1m3 同种异型和以 Kabat 位置 356 上的谷氨酸、Kabat 位置 358 上的甲硫氨酸和 Kabat 位置 431 上的丙氨酸为特征的 nG1m1,2null 同种异型。令人惊讶的是,发现重复皮下施用 G1m3 抗体持续较长时间段未产生显著免疫应答。在替代实施方案中,人 IgG4 重链和 G1m3 同种异型一样具有 Kabat 214 上的精氨酸、Kabat 356 上的谷氨酸、Kabat 359 上的甲硫氨酸和 Kabat 431 上的丙氨酸。因为免疫原性看似至少部分涉及那些位置上的残基,所以将人 IgG4 重链恒定区序列用于治疗抗体也是一个优选的实施方案。G1m3 IgG1 抗体与 IgG4 抗体的组合还可以用于治疗性施用。

[0181] 已知的抗体

[0182] 靶抗原和示例性抗体

[0183] 在一个优选的实施方案中,使用能识别和 / 或结合于以高水平表达于靶细胞上且对比正常组织主要或专门表达于患病细胞上的抗原的抗体。用于治疗例如癌症的示例性抗体包括但不限于 LL1(抗 CD74)、LL2 或 RFB4(抗 CD22)、维妥珠单抗 (hA20、抗 CD20)、利妥昔单抗 (抗 CD20)、奥妥珠单抗 (GA101、抗 CD20)、兰利珠单抗 (抗 PD1)、尼鲁单抗 (抗 PD1)、MK-3475(抗 PD1)、AMP-224(抗 PD1)、皮地珠单抗 (抗 PD1)、MDX-1105(抗 PD-L1)、MEDI4736(抗 PD-L1)、MPDL3280A(抗 PD-L1)、BMS-936559(抗 PD-L1)、伊匹单抗 (抗 CTLA4)、曲维珠单抗 (抗 CTL4A)、RS7(抗上皮糖蛋白 -1(EGP-1,也称为 TROP-2))、PAM4 或 KC4(均为抗粘蛋白)、MN-14(抗癌胚抗原 (CEA,也称为 CD66e 或 CEACAM5)、MN-15 或 MN-3(抗 CEACAM6)、Mu-9(抗结肠特异性抗原 -p)、Immu 31(抗甲胎蛋白)、R1(抗 IGF-1R)、A19(抗 CD19)、TAG-72(例如 CC49)、Tn、J591 或 HuJ591(抗 PSMA(前列腺特异性膜抗原))、AB-PG1-XG1-026(抗 PSMA 二聚体)、D2/B(抗 PSMA)、G250(抗碳酸酐酶 IX MAb)、L243(抗 HLA-DR)、阿仑单抗 (抗 CD52)、贝伐单抗 (抗 VEGF)、西妥昔单抗 (抗 EGFR)、吉姆单抗 (抗 CD33)、替伊莫单抗 (抗 CD20) ;帕尼单抗 (抗 EGFR) ;托西莫单抗 (抗 CD20) ;PAM4(又名克里伏单抗,抗粘蛋白)、BWA-3(抗组蛋白 H2A/H4)、LG2-1(抗组蛋白 H3)、MRA12(抗组蛋白 H1)、PR1-1(抗组蛋白 H2B)、LG11-2(抗组蛋白 H2B)、LG2-2(抗组蛋白 H2B) 和曲妥单抗 (抗 ErbB2)。此类抗体在本领域中是已知的 (例如美国专利号 5,686,072、5,874,540、6,107,090、6,183,744、6,306,393、6,653,104、6,730,300、6,899,864、6,926,893、6,962,702、7,074,403、7,230,084、7,238,785、7,238,786、7,256,004、7,282,567、7,300,655、7,312,318、7,585,491、7,612,180、7,642,239 ; 和美国专利申请公布号

20050271671、20060193865、20060210475、20070087001；各自的实施例部分以引用的方式并入本文中）。可用的特定已知抗体包括hPAM4（美国专利号7,282,567）、hA20（美国专利号7,251,164）、hA19（美国专利号7,109,304）、hIMMU-31（美国专利号7,300,655）、hLL1（美国专利号7,312,318）、hLL2（美国专利号7,074,403）、hMu-9（美国专利号7,387,773）、hL243（美国专利号7,612,180）、hMN-14（美国专利号6,676,924）、hMN-15（美国专利号7,541,440）、hR1（美国专利申请12/772,645）、hRS7（美国专利号7,238,785）、hMN-3（美国专利号7,541,440）、AB-PG1-XG1-026（美国专利申请11/983,372，作为ATCC PTA-4405和PTA-4406寄存）和D2/B（WO 2009/130575），各所述专利或申请的关于图和实施例部分的正文以引用的方式并入本文中。

[0184] 可以使用所描述的缀合物靶向的其它可用抗原包括碳酸酐酶IX、B7、CCCL19、CCCL21、CSAp、HER-2/neu、BrE3、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20（例如，C2B8、hA20、1F5MAb）、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CEACAM5、CEACAM6、CTLA4、甲胎蛋白（AFP）、VEGF（例如AVASTIN®，纤连蛋白剪接变异体）、ED-B纤连蛋白（例如，L19）、EGP-1（TROP-2）、EGP-2（例如，17-1A）、EGF受体（ErbB1）（例如，ERBITUX®）、ErbB2、ErbB3、因子H、FHL-1、Flt-3、叶酸受体、Ga 733、GRO-β、HMGB-1、低氧可诱导因子（HIF）、HM1.24、HER-2/neu、胰岛素样生长因子受体（ILGF）、IFN-γ、IFN-α、IFN-β、IFN-λ、IL-2R、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IP-10、IGF-1R、Ia、HM1.24、神经节苷脂、HCG、L243结合的HLA-DR抗原、CD66抗原（即，CD66a-d或其组合）、MAGE、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、巨噬细胞迁移抑制因子（MIF）、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、胎盘生长因子（P1GF）、PSA（前列腺特异性抗原）、PSMA、PAM4抗原、PD1受体、NCA-95、NCA-90、A3、A33、Ep-CAM、KS-1、Le(y)、间皮素、S100、腱生蛋白、TAC、Tn抗原、托马斯-弗里德里希抗原、肿瘤坏死抗原、肿瘤血管生成抗原、TNF-α、TRAIL受体（R1和R2）、TROP-2、VEGFR、RANTES、T101，以及癌症干细胞抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5和致癌基因产物。

[0185] 如通过流式细胞术所示，并且可以指导选择适用于免疫疗法的抗体的对造血恶性细胞上的合适的抗原（群集名称或CD）靶标的综合分析是Craig和Foon，Blood，2008年1月15日在线预出版；DOL10.1182/blood-2007-11-120535。

[0186] CD66抗原由分别由癌胚抗原（CEA）基因家族成员BCG、CGM6、NCA、CGM1和CEA编码的五种具有类似结构的不同糖蛋白CD66a-e组成。这些CD66抗原（例如CEACAM6）主要表达于粒细胞、消化道的正常上皮细胞和各种组织的肿瘤细胞中。合适的癌症靶标还包括癌症睾丸抗原，诸如NY-ESO-1（Theurillat等，Int.J. Cancer 2007；120(11)：2411-7）以及骨髓性白血病（Kozlov等，Cancer Genet.Cytogenet.2005；163(1)：62-7）还有B细胞疾病中的CD79a，和非何杰金淋巴瘤的CD79b（Poison等，Blood 110(2)：616-623）。许多上述抗原公开于2002年11月15日提交的名为“Use of Multi-specific,Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics”的美国临时申请序列号60/426,379中。归于治疗抗性更大的前驱恶性细胞群体（Hill和Perris，J. Natl.Cancer Inst.2007；99：

1435-40) 的癌症干细胞具有在某些癌症类型中可靶向的抗原，诸如前列腺癌 (Maitland 等，Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006 ;5 :155-79)、非小细胞肺癌 (Donnenberg 等，J. Control Release 2007 ;122(3) :385-91) 和成胶质细胞瘤 (Beier 等，Cancer Res. 2007 ;67(9) :4010-5) 中的 CD133，和结肠直肠癌 (Dalerba 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007 ;104(24)10158-63)、胰腺癌 (Li 等，Cancer Res. 2007 ;67(3) :1030-7) 和头颈部鳞状细胞癌 (Prinee 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007 ;104(3)973-8) 中的 CD44。

[0187] 抗癌症抗体已经显示在一些情况下可结合于组蛋白。Kato 等 (1991，Hum Antibodies Hybridomas 2 :94-101) 报告了肺癌特异性人类单克隆抗体 HB4C5 结合于组蛋白 H2B。Garzelli 等 (1994，Immunol Lett39 :277-82) 观察到经过埃 - 巴二氏病毒转化的人 B 淋巴细胞产生针对组蛋白的天然抗体。在某些实施方案中，针对组蛋白的抗体可用于目标组合中。已知的抗组蛋白抗体包括但不限于 BWA-3 (抗组蛋白 H2A/H4)、LG2-1 (抗组蛋白 H3)、MRA12 (抗组蛋白 H1)、PR1-1 (抗组蛋白 H2B)、LG11-2 (抗组蛋白 H2B) 和 LG2-2 (抗组蛋白 H2B) (参见例如 Monestier 等，1991，Eur J Immunol 21 :1725-31 ;Monestier 等，1993，Molec Immunol 30 :1069-75)。

[0188] 对于多发性骨髓瘤疗法，已经描述了针对例如 CD38 和 CD138(Stevenson，Mol Med 2006 ;12(11-12) :345-346 ;Tassone 等，Blood 2004 ;104(12) :3688-96)、CD74(Stein 等，出处同上)、CS1(Tai 等，Blood 2008 ;112(4) :1329-37) 和 CD40(Tai 等，2005 ;Cancer Res. 65(13) :5898-5906) 的合适的靶向抗体。

[0189] 巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF) 是先天性和适应性免疫性和细胞凋亡的重要调节因子。已经报告了 CD74 是 MIF 的内源性受体 (Leng 等，2003，J Exp Med 197 :1467-76)。拮抗性抗 CD74 抗体对 MIF 介导的细胞内途径的治疗效果可用于治疗多种疾病状态，诸如膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌和慢性淋巴细胞性白血病 (例如 Meyer-Siegler 等，2004，BMC Cancer 12 :34 ;Shachar 和 Haran，2011，Leuk Lymphoma 52 :1446-54)。米拉珠单抗 (hLL1) 是具有治疗 MIF 介导的疾病的治疗性用途的示例性抗 CD74 抗体。

[0190] 最优选的抗体 / 抗原对的一个实例是 LL1，抗 CD74MAb (不变链，II 类特异性侣伴蛋白，Ii) (参见例如美国专利号 6,653,104、7,312,318 ；各自的实施例部分以引用的方式并入本文中)。CD74 抗原是高度表达于 B 细胞淋巴瘤 (包括多发性骨髓瘤) 和白血病、某些 T 细胞淋巴瘤、黑素瘤、结肠癌、肺癌和肾癌、成胶质细胞瘤和某些其它癌症上 (Ong 等，Immunology 98 :296-302(1999))。CD74 抗体用于癌症中的用途的综述包含于 Stein 等，Clin Cancer Res. 2007 年 9 月 15 日 ;13(18 Pt 2) :5556s-5563s 中，该文献以引用的方式并入本文中。优选用抗 CD74 抗体治疗的疾病包括但不限于非何杰金氏淋巴瘤、何杰金氏病、黑素瘤、肺癌、肾癌、结肠癌、多形性成胶质细胞瘤、组织细胞瘤、骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

[0191] 在另一个优选的实施方案中，可以使用针对病原体的治疗组合，因为针对病原体的抗体是已知的。举例来说，已经公开了特异性结合由感染性病变，包括例如由诸如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌和病毒的病原体造成的病毒、细菌、真菌和寄生虫感染，以及与此种微生物相关的抗原和产物产生的或与其相关的标记物的抗体和抗体片段，尤其在以下文献中 :Hansen 等，美国专利号 3,927,193 以及 Goldenberg 美国专利号 4,331,647、4,348,376、4,361,544、4,468,457、4,444,744、4,818,709 和 4,624,846，

各自的实施例部分以引用的方式并入本文中；以及 Reichert 和 Dewitz(Nat Rev Drug Discovery 2006；5：191-195)。列出了针对感染性生物体（抗毒素和抗病毒抗体）以及其它靶标的抗体的综述包含在 Casadevall，Clin Immunol1999；93(1)：5-15 中，该文献以引用的方式并入本文中。可利用针对多种人类病原体的市售抗体（例如 KPL，Inc.，Gaithersburg，MD)，包括金黄色葡萄球菌（目录号 011-90-05)、无乳链球菌（目录号 011-90-08)、酿脓链球菌（目录号 01-90-07)、幽门螺旋杆菌（目录号 01-93-94)、伯氏疏螺旋体（目录号 05-97-91)、大肠杆菌（目录号 01-95-91；01-95-96)、军团菌属（目录号 01-90-03)、李斯特菌属（目录号 01-90-90)、霍乱弧菌（目录号 01-90-50)、志贺氏菌属（目录号 16-90-01）和弯曲杆菌属（目录号 01-92-93)。

[0192] 在一优选的实施方案中，病原体选自 HIV 病毒、结核分支杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺性军团病菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、B 型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘－带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T 细胞白血病病毒、埃－巴二氏病毒、鼠类白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、辛德比斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒 40、鼠乳房肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗河病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、刚地弓形虫、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏裂体吸虫、日本裂体吸虫、牛巴贝虫、艾美耳球虫、旋盘尾丝虫、热带利什曼虫、旋毛虫、小泰勒虫、泡状带绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科氏中殖孔绦虫、关节炎支原体、鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、拉氏无胆甾原体、唾液支原体和肺炎支原体，如美国专利号 6,440,416 中所公开，该专利的实施例部分以引用的方式并入本文中。

[0193] 在各种实施方案中，要求保护的方法和组合物可以利用本领域中已知的多种抗体中的任一种。所使用的抗体可从许多已知来源商购获得。举例来说，多种抗体分泌杂交瘤系可从美国典型培养物保藏中心 (ATCC；Manassas，VA) 获得。针对各种疾病靶标，包括但不限于肿瘤相关抗原的大量抗体寄存在 ATCC 和 / 或已经公布了可变区序列，且可用于要求保护的方法和组合物中。参见例如美国专利号 7,312,318、7,282,567、7,151,164、7,074,403、7,060,802、7,056,509、7,049,060、7,045,132、7,041,803、7,041,802、7,041,293、7,038,018、7,037,498、7,012,133、7,001,598、6,998,468、6,994,976、6,994,852、6,989,241、6,974,863、6,965,018、6,964,854、6,962,981、6,962,813、6,956,107、6,951,924、6,949,244、6,946,129、6,943,020、6,939,547、6,921,645、6,921,645、6,921,533、6,919,433、6,919,078、6,916,475、6,905,681、6,899,879、6,893,625、6,887,468、6,887,466、6,884,594、6,881,405、6,878,812、6,875,580、6,872,568、6,867,006、6,864,062、6,861,511、6,861,227、6,861,226、6,838,282、6,835,549、6,835,370、6,824,780、6,824,778、6,812,206、6,793,924、6,783,758、6,770,450、6,767,711、6,764,688、6,764,681、6,764,679、6,743,898、6,733,981、6,730,307、6,720,155、6,716,966、6,709,653、6,693,176、6,692,908、6,689,607、6,689,362、6,689,355、6,682,737、6,682,736、6,682,734、6,673,344、6,653,104、6,652,852、

6,635,482、6,630,144、6,610,833、6,610,294、6,605,441、6,605,279、6,596,852、6,592,868、6,576,745、6,572;856、6,566,076、6,562,618、6,545,130、6,544,749、6,534,058、6,528,625、6,528,269、6,521,227、6,518,404、6,511,665、6,491,915、6,488,930、6,482,598、6,482,408、6,479,247、6,468,531、6,468,529、6,465,173、6,461,823、6,458,356、6,455,044、6,455,040、6,451,310、6,444,206、6,441,143、6,432,404、6,432,402、6,419,928、6,413,726、6,406,694、6,403,770、6,403,091、6,395,276、6,395,274、6,387,350、6,383,759、6,383,484、6,376,654、6,372,215、6,359,126、6,355,481、6,355,444、6,355,245、6,355,244、6,346,246、6,344,198、6,340,571、6,340,459、6,331,175、6,306,393、6,254,868、6,187,287、6,183,744、6,129,914、6,120,767、6,096,289、6,077,499、5,922,302、5,874,540、5,814,440、5,798,229、5,789,554、5,776,456、5,736,119、5,716,595、5,677,136、5,587,459、5,443,953、5,525,338,各专利的实施例部分以引用的方式并入本文中。这些仅是示例性的,且多种其它抗体和它们的杂交瘤在本领域中是已知的。技术人员将认识到,几乎针对任何疾病相关抗原的抗体序列或抗体分泌杂交瘤可以通过在 ATCC、NCBI 和 / 或 USPTO 数据库对针对所选疾病相关靶标的相关抗体进行简单搜索来获得。克隆抗体的抗原结合域可以使用本领域中熟知的标准技术进行扩增、切除、结扎于表达载体中、转染至经改造的宿主细胞中,且用于蛋白质产生(参见例如美国专利号 7,531,327、7,537,930、7,608,425 和 7,785,880,各专利的实施例部分以引用的方式并入本文中)。

[0194] 在其它实施方案中,抗体复合物结合于 I 类 MHC、II 类 MHC 或辅助分子,诸如 CD40、CD54、CD80 或 CD86。抗体复合物还可以结合于白细胞活化细胞因子,或结合细胞因子介质,例如 NF-κB。

[0195] 在某些实施方案中,两个不同的靶标之一可以是癌细胞受体或癌症相关抗原,特别选自以下的抗原:B 细胞系抗原 (CD19、CD20、CD21、CD22、CD23 等)、VEGF、VEGFR、EGFR、癌胚抗原 (CEA)、胎盘生长因子 (P1GF)、腱生蛋白、HER-2/neu、EGP-1、EGP-2、CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD45、CD52、CD74、CD80、CD138、NCA66、CEACAM1、CEACAM6(癌胚抗原相关细胞粘连分子 6)、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC16、IL-6、甲胎蛋白 (AFP)、A3、CA125、结肠特异性抗原 -p(CSAp)、叶酸受体、HLA-DR、人绒膜促性腺激素 (HCG)、Ia、EL-2、胰岛素样生长因子 (IGF) 和 IGF 受体、KS-1、Le(y)、MAGE、坏死抗原、PAM-4、前列腺酸性磷酸酶 (PAP)、Pr1、前列腺特异性抗原 (PSA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、S100、T101、TAC、TAG72、TRAIL 受体和碳酸酐酶 IX。

[0196] 可使用的其它抗体包括针对诸如细菌、病毒、支原体或其它病原体的感染性疾病因素的抗体。许多针对此类感染性因素的抗体在本领域中是已知的,并且任何此类已知抗体都可以用于要求保护的方法和组合物中。举例来说,针对人免疫缺陷病毒 I(HIV-1) 的 gp120 糖蛋白抗原的抗体是已知的,且某些此类抗体可以对人具有免疫保护作用。参见例如 Rossi 等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.86:8055-8058,1990。已知的抗 HIV 抗体包括由 Johansson 等 (AIDS,2006 年 10 月 3 日;20(15):1911-5) 描述的抗包膜抗体,以及由 Polymun(Vienna,Austria) 描述并出售、还描述于美国专利 5,831,034、美国专利 5,911,989 和 Vcelar 等,AIDS 2007;21(16):2161-2170 和 Joos 等,Antimicrob.Agents Chemother.2006;50(5):1773-9 中的抗 HIV 抗体,所有参考文献以引用方式并入本文中。

[0197] 针对疟疾寄生虫的抗体可以针对子胞子阶段、裂殖子阶段、裂殖体阶段和配子体阶段。已经产生了针对子孢子（环子孢子抗原）的单克隆抗体，并且已显示可在体外和啮齿动物内中和子孢子 (N.Yoshida 等，Science 207 :71-73,1980)。若干个小组已经开发了针对刚地弓形虫，即涉及弓形体病的原生寄生虫的抗体 (Kasper 等，J.Immunol.129 :1694-1699,1982 ;Id.,30 :2407-2412,1983)。已开发出针对血吸虫童虫表面抗原的抗体，且已发现在体内或体外对血吸虫童虫起作用 (Simpson 等，Parasitology,83 :163-177,1981 ;Smith 等，Parasitology,84 :83-91,1982 ;Gryzch 等，J.Immunol.,129 :2739-2743,1982 ;Zodda 等，J.Immunol.129 :2326-2328,1982 ;Dissous 等，J.Immunol.,129 :2232-2234,1982)。

[0198] 克氏锥虫是恰加斯氏病的致病因素，并且通过吸血的食虫椿象科昆虫传播。已经产生在体外特异抑制寄生虫的一种形式向另一种形式（上鞭毛体向锥鞭毛体阶段）分化且与细胞表面糖蛋白反应的抗体 ;然而，哺乳动物（血流）形式的寄生虫不存在此抗原 (Sher 等，Nature,300 :639-640,1982)。

[0199] 抗真菌抗体在本领域中是已知的，诸如抗核盘菌抗体（美国专利 7,910,702）；抗葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖抗体 (Zhong 和 Priofski,1998, Clin Diag Lab Immunol 5 :58-64）；抗假丝酵母抗体 (Matthews 和 Burnie,2001, Curr Opin Investig Drugs 2 :472-76）；以及抗鞘糖脂抗体 (Toledo 等，2010, BMC Microbiol 10 :47)。

[0200] 已经开发了针对大部分造成大多数人感染的微生物（细菌、病毒、原生生物、真菌、其它寄生虫）的合适的抗体，且许多先前已用于体外诊断目的。这些抗体和可以通过常规方法产生的更新的抗体适用于本发明。

[0201] 免疫缀合物

[0202] 在某些实施方案中，抗体或其片段可以与一种或多种治疗剂和 / 或诊断剂缀合。治疗剂不需要是相同的，而是可以有所不同，例如药物和放射性同位素。举例来说，^{131}I 可以并入抗体或融合蛋白质的酪氨酸中且药物与赖氨酸残基的 ε 氨基连接。治疗剂和诊断剂还可以连接于例如经还原的 SH 基团和 / 或碳水化合物侧链。用于制造治疗剂或诊断剂与抗体或融合蛋白质的共价或非共价缀合物的许多方法在本领域中是已知的，并且可以利用任何此类已知方法。

[0203] 治疗剂或诊断剂可以经由二硫键形成而连接在经过还原的抗体组分的铰链区。替代地，此类试剂可以使用异双官能交联剂，诸如 3-(2- 吡啶基二硫基）丙酸 N- 琥珀酰酯 (SPDP) 连接。Yu 等，Int.J.Cancer56 :244(1994)。用于此类缀合的一般技术在本领域中是众所周知的。参见例如 Wong,CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING(CRC Press 1991) ;Upeslacis 等，“Modification of Antibodies by Chemical Methods”, MONOCLONAL ANTIBODIES :PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch 等（编），第 187-230 页 (Wiley-Liss, Inc.1995) ;Price,“Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies”, MONOCLONAL ANTIBODIES :PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter 等（编），第 60-84 页 (Cambridge University Press 1995)。替代地，可以经由抗体 Fc 区中的碳水化合物部分缀合治疗剂或诊断剂。碳水化合物基团可用于增加与硫醇基结合的相同试剂的负载，或碳水化合物部分可用于结合不同的治疗剂或诊断剂。

[0204] 经由抗体碳水化合物部分将肽缀合于抗体组分的方法是本领域技术人员熟知的。参见例如 Shih 等，Int. J. Cancer 41 :832(1988) ;Shih 等，Int. J. Cancer 46 :1101(1990) ;和 Shih 等，美国专利号 5,057,313，所述文献以全文引用的方式并入本文中。一般方法涉及使具有经氧化的碳水化合物部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能的载剂聚合物反应。此反应产生初步希夫碱（亚胺）键联，其可以通过还原成仲胺而加以稳定，以便形成最终缀合物。

[0205] 在用作免疫缀合物的抗体组分的抗体是抗体片段的情况下，可能不存在 Fc 区。然而，有可能将碳水化合物部分引入全长抗体或抗体片段的轻链可变区中。参见例如 Leung 等，J. Immunol. 154 :5919(1995) ;Hansen 等，美国专利号 5,443,953(1995) ;Leung 等，美国专利号 6,254,868，所述文献以全文引用的方式并入本文中。使用经过工程改造的碳水化合物部分来连接治疗剂或诊断剂。

[0206] 在一些实施方案中，螯合剂可连接于抗体、抗体片段或融合蛋白质且用于螯合治疗剂或诊断剂，如放射性核素。示例性螯合剂包括但不限于 DTPA（诸如 Mx-DTPA）、DOTA、TETA、NETA 或 NOTA。缀合并使用螯合剂将金属或其它配体连接于蛋白质的方法在本领域中是熟知的（参见例如美国专利号 7,563,433，其实施例部分以引用的方式并入本文中）。

[0207] 在某些实施方案中，放射性金属或顺磁性离子可通过与具有可能连接有多个螯合基团用于结合离子的长尾部的试剂反应而连接于蛋白质或肽。此类尾部可以是具有可结合螯合基团的侧基的聚合物，例如聚赖氨酸、多糖或其它衍生化或可衍生链，所述螯合基团为诸如，例如乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、卟啉、聚胺、冠醚、双缩氨基硫脲、聚肟和已知可用于此目的的类似基团。

[0208] 螯合物可直接连接于抗体或肽，例如，如美国专利 4,824,659 中所公开，该专利以全文引用的方式并入本文中。特别有用的金属螯合物组合包括 2- 苯甲基 -DTPA 及其单甲基和环己基类似物，其与大体能量范围为 60 至 4,000keV 的诊断同位素，诸如 ^{125}I、^{131}I、^{123}I、^{124}I、^{62}Cu、^{64}Cu、^{18}F、^{111}In、^{67}Ga、^{68}Ga、^{99m}Tc、^{94m}Tc、^{11}C、^{13}N、^{15}O、^{76}Br 一起用于放射成像。相同的螯合物在与非放射性金属，诸如锰、铁和钆复合时可用于 MRI。诸如 NOTA、DOTA 和 TETA 的巨环螯合剂可与各种金属和放射性金属，最特别地分别与放射性核素镓、钇和铜一起使用。可以通过根据目标金属调整环尺寸而使此类金属螯合物复合物变得非常稳定。涵盖其它环型螯合物，诸如大环聚醚，其对于稳定地结合核素，诸如用于 RAIT 的 ^{223}Ra 感兴趣。

[0209] 最近，已经公开了用于 PET 扫描技术中的 ^{18}F 标记法，例如通过使 F-18 与金属或诸如铝的其它原子反应。^{18}F-Al 缀合物可与直接连接于抗体或用于在预靶向方法中标记可靶向构建体的螯合基团，诸如 DOTA、NOTA 或 NETA 复合。此类 F-18 标记技术公开于美国专利号 7,563,433 中，其实施例部分以引用的方式并入本文中。

[0210] 另一种示例性免疫缀合物公开于 Johannson 等 (2006，AIDS20 :1911-15) 中，其中发现多柔比星缀合的 P4/D10（抗 gp120) 抗体在治疗感染 HIV 的细胞方面非常有效。

[0211] 喜树碱缀合物

[0212] 在某些优选的实施方案中，免疫缀合物可以包含喜树碱药物，诸如 SN-38。喜树碱 (CPT) 和其衍生物是一类有效的抗肿瘤剂。伊立替康（也称为 CPT-11) 和托泊替康是作为经过批准的癌症治疗剂的 CPT 类似物 (Iyer 和 Ratain，Cancer Chemother. Phamacol. 42 : S31-S43(1998))。CPT 通过稳定拓扑异构酶 I-DNA 复合物来抑制拓扑异构酶 I 酶而起作

用 (Liu 等, The Camptothecins :Unfolding Their Anticancer Potential, Liehr J.G., Giovanella, B.C. 和 Verschraegen(编), NY Acad Sci., NY 922 :1-10(2000))。

[0213] 免疫缀合物的优选的最佳给药可以包括介于 3mg/kg 与 20mg/kg 之间的剂量,优选地每周、每周两次或每隔一周给予。最佳给药时程可以包括以下治疗循环 :治疗连续两周随后停止一、二、三或四周 ;或交替数周治疗和停止 ;或治疗一周,随后停止二、三或四周 ;或治疗三周,随后停止一、二、三或四周 ;或治疗四周,随后停止一、二、三或四周 ;或治疗五周,随后停止一、二、三、四或五周 ;或每两周一次,每三周一次或每月一次施用。治疗可以延续任何循环数目,优选地至少 2 个、至少 4 个、至少 6 个、至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个或至少 16 个循环。剂量可以是至多 24mg/kg。可用的示例性剂量可以包括 1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、22mg/kg 和 24mg/kg。优选的剂量是 4、6、8、9、10、12、14、16 或 18mg/kg。本领域技术人员应认识到,在选择免疫缀合物的最佳剂量时可能考虑多种因素,诸如年龄、一般健康状况、特定器官功能或体重以及先前疗法对特定器官系统 (例如骨髓) 的效应,且在治疗过程中可以增减施用剂量和 / 或频率。需要时可以重复所述剂量,在少达 4 至 8 个剂量之后即观察到肿瘤收缩的证据。本文中所公开的经过优化的施用剂量和时程在人类受试者中显示出乎意料的优越效力和降低的毒性,这无法由动物模型研究预测。令人惊讶的是,所述优越的效力允许治疗先前发现对一或多种标准抗癌疗法具有抗性的肿瘤,包括在体内衍生出 SN-38 的亲本化合物 CPT-11。

[0214] 一个示例性优选实施方案涉及通式 1 的药物衍生物与抗体缀合物,

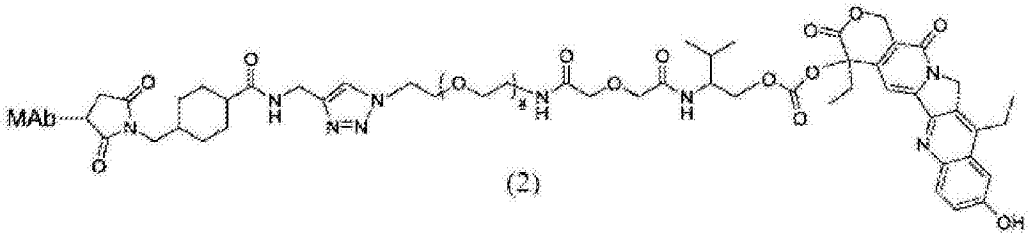
[0215] $MAb-[L2]-[L1]-[AA]_m-[A']-药物$ (1)

[0216] 其中 MAb 为疾病靶向抗体 ;L2 为包含抗体偶联部分和一个或多个乙炔 (或叠氮) 基团的交联剂组分 ;L1 包含在一端具有与 L2 中的乙炔 (或叠氮) 部分互补的叠氮 (或乙炔) 且在另一端具有诸如羧酸或羟基的反应基团的确定的 PEG ;AA 是 L- 氨基酸 ;m 是值为 0、1、2、3 或 4 的整数 ;且 A′ 选自乙醇胺、4- 羟基苯甲醇、4- 氨基苯甲醇或者经取代或未经取代的乙二胺的额外间隔基。'AA' 的 L 氨基酸选自丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。若 A′ 基团含有羟基,则其分别呈碳酸盐或氨基甲酸盐形式连接于药物的羟基或氨基。

[0217] 在式 1 的优选实施方案中,A′ 为来源于 L- 氨基酸的经取代乙醇胺,其中所述氨基酸的羧酸基经羟甲基部分置换。A′ 可以来源于以下 L- 氨基酸中的任一种 :丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。

[0218] 在式 1 的优选实施方案的缀合物的一个实例中,m 是 0,A′ 是 L- 缬氨醇,且药物以 SN-38 示例。所得结构示于式 2 中。

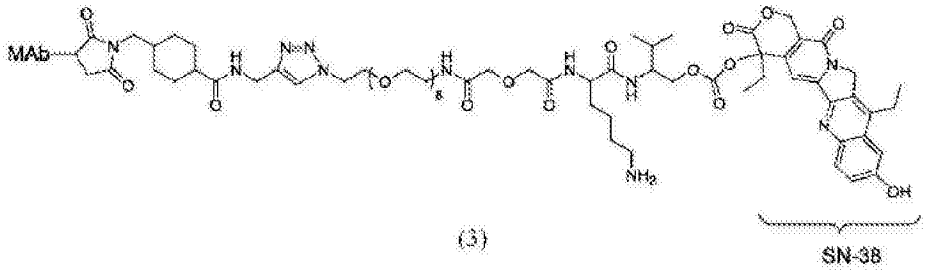
[0219]



(2)

[0220] 在式 1 的优选实施方案的缀合物的另一个实例中，m 是 1 且由经过衍生化的 L- 赖氨酸表示，A′ 是 L- 缬氨醇，且药物以 SN-38 示例。所得结构示于式 3 中。

[0221]



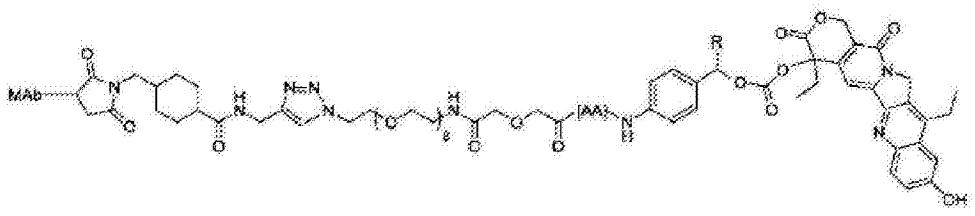
(3)

[0222] 在这个实施方案中，使用针对赖氨酸氨基的正交保护基，首先在诸如赖氨酸的氨基酸的羧酸与缬氨醇的氨基之间形成酰胺键。去除赖氨酸 N 末端上的保护基，保持赖氨酸侧链上的保护基完整，并且使 N 末端与另一端具有叠氮（或乙炔）的确定的 PEG 上的羧基偶联。然后将缬氨醇的羟基连接于 10- 羟基经保护的 SN-38 的 20- 氯甲酸酯衍生物，且将这一中间物与携带靶向载体 - 结合部分以及涉及点击环加成化学的互补乙炔（或叠氮）基的 L2 组分偶联。最后，去除赖氨酸侧链和 SN-38 两处的保护基得到本实例的产物，示于式 2 中。

[0223] 在另一个优选的实施方案中，通式 2 的 A′ 是 A-OH，其中 A-OH 是可折叠部分，诸如 4- 氨基苯甲醇或在苯甲基位置上经 C_1-C_{10} 烷基取代的经取代 4- 氨基苯甲醇，后者经由其氨基连接于 L- 氨基酸或包含最多 4 个 L- 氨基酸部分的多肽；其中 N 末端连接于以抗体结合基团为末端的交联剂。

[0224] 以下提供优选实施方案的一个实例，其中通式 (1) 的 A′ 的 A-OH 实施方案衍生自经取代的 4- 氨基苯甲醇，且 'AA' 包括单个 L- 氨基酸（通式 (1) 中 m = 1），且药物以 SN-38 示例。结构表示如下（式 2，称为 MAb-CLX-SN-38）。AA 的单个氨基酸选自以下 L- 氨基酸中的任一种：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。4- 氨基苯甲醇部分 (A′ 的 A-OH 实施方案）上的取代基 R 是氢或选自 C1-C10 烷基的烷基。

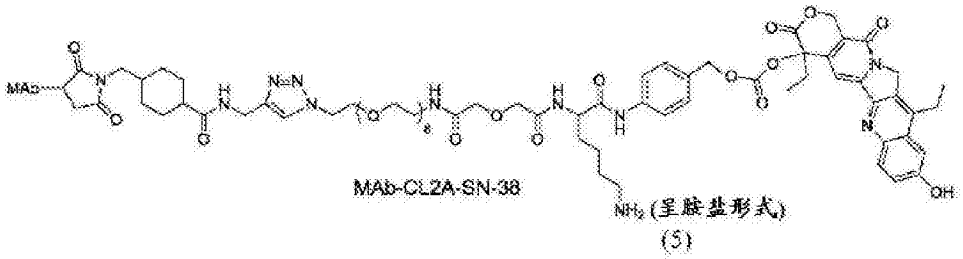
[0225]



MAb-CLX-SN-38 (4)

[0226] 式 4 的 MAb-CLX-SN-38 的一个实施方案，其中单个氨基酸 AA 是 L- 赖氨酸且 R = H，且药物以 SN-38 示例（式 5 ；称为 MAb-CL2A-SN-38）。用于制备 CL2A-SN-38 以及用于制备和使用其抗体缀合物的方法在本领域中是已知的（参见例如美国专利号 7,999,083 和 8,080,250，各自的实施例部分以引用的方式并入本文中）。

[0227]



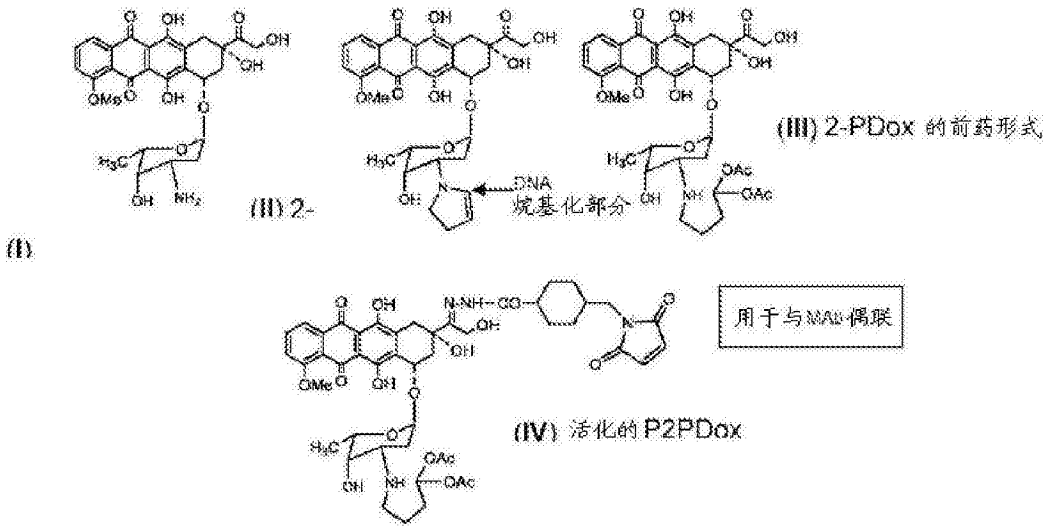
(5)

[0228] Pro-2- 吡咯啉并多柔比星结合物

[0229] 1996 年沙利小组首先描述了化合物 2- 吡咯啉并多柔比星，稍后使用其与许多受体靶向肽缀合以用于临床前探测 (Nagy 等，1996，Proc Natl Aad Sci USA 93 :7269-73 ；Nagy 等，1996，Proc Natl Acad Sci USA 96 :2464-29)。这是多柔比星的衍生物，其中柔红糖胺氮并入 5 元烯胺中，使其成为非常有效的烷基化剂，细胞毒性是多柔比星的 500 至 1000 倍。药物的超毒性使得为安全起见，必需在隔离器中专门处理。其前药形式为 N-(4,4- 二乙酰氧基丁基）多柔比星，其在体内转化成 2- 吡咯啉并多柔比星。可如本文中所公开制备 Pro-2- 吡咯啉并多柔比星 (Pro-2-P-Dox)，且与抗体或抗体片段缀合以用于 ADC 疗法中。

[0230] 以下流程显示了 Dox、2-PDox、Pro-2-P-Dox(P2PDox) 和活化的 Pro-2-P-Dox 的结构。为了与 IgG 偶联，可以用 SMCC- 酰肼活化 Pro-2-P-Dox，此程序引入了酸不稳定腙以及马来酰亚胺基，后者用于与经适度还原的抗体的硫醇缀合。

[0231]

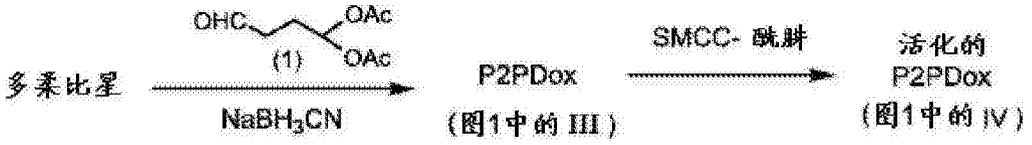


[0232] 目前在临床研究的大部分 ADC 并入了具有细胞周期阶段特异性的微管蛋白作用超毒性类美登素和奥里斯他汀。说来有趣，除了曲妥单抗 -DM1 以外，这些 ADC 看似在实体癌症中在临床上展现了相对狭窄的治疗指数。DNA 烷基化剂，诸如 2-PDox，不具细胞周期阶段特异性并且将提供改良的治疗指数。在胰腺癌和胃癌的 2 个侵袭性异种移植模型中的初步研究（未示出）显示 hRS7-6 缀合物在低且安全的剂量（例如，2.25mg/kg 蛋白质剂量或

0.064mg/kg 药物剂量）下极具活性，从而引起完全消退。

[0233] 使用氰基硼氢钠，用 4,4- 二乙酰氧基丁醛对多柔比星进行还原性烷基化产生 P2PDox（以下流程）。对市售 4- 苯甲氧基丁醛进行脱乙酰氧基，随后对与多柔比星还原性偶联的醛进行氢解和氧化处理，获得 P2PDox。用 SMCC- 酰肼活化后者。

[0234]



[0235] 在 PBS 中混合缀合物制剂从而适度还原 IgG 与 TCEP 的链间二硫键，随后与 10 倍过量的活化 P2PDox 偶联。在离心 SEC 上在于 25mM 组氨酸 pH 7 中平衡过的 SEPHADEX® 上纯化缀合物，随后通过疏水性柱。将产物与海藻糖和吐温 80 一起配制，并且冻干。具有 6-7 个药物 /IgG 的典型取代的缀合产物通过尺寸排阻 HPLC 作为单峰洗脱，且典型地含有 ＜ 1％的未缀合游离药物（逆相 HPLC）。

[0236] 本领域技术人员应认识到，P2PDox 可与任何已知的抗体或其片段缀合以便与本文中所论述的免疫调节剂组合用于肿瘤和 / 或感染性疾病的 ADC 治疗。

[0237] 双特异性抗体

[0238] 在各种实施方案中，目标组合疗法可以利用一种或多种双特异性抗体 (bsAb)，诸如白细胞重定向 bsAb。尽管以下部分论述了优选的实施方案，其中 bsAb 是以 DOCK-AND-LOCK™(DNL™) 构建体的形式制造，但许多其它类型的 bsAb 在本领域中是已知的并且在要求保护的组合疗法的范围内可以使用。如本文中所使用的双特异性抗体是含有针对两个不同的抗原或同一抗原上的两个不同表位的结合位点的抗体。尽仅可结合于单一抗原上的单一表位的抗体是单特异性的，不考虑抗体分子上的抗原结合位点数目。

[0239] 如背景部分中所论述，双特异性抗体构建的早期尝试利用化学交联或杂合杂交瘤或四价体瘤以便将两种不同的抗体的两半接合在一起（例如 Staerz 等，1985，Nature 314：628-31；Milstein 和 Cuello，Nature 1983；305：537-540；Karpovsky 等，1984，J Exp Med 160：1686-701）。虽然所述技术用于制造 bsAb，但各种产生问题使得此类复合物难以使用，诸如产生含有抗原结合位点的不同组合的混合群体、蛋白质表现方面的困难、需要纯化目标 bsAb、低产率、生产费用等。

[0240] 最近的方法利用经过基因工程改造的构建体，其能够产生单一 bsAb 的均质产物而无需彻底纯化以去除不需要的副产物。此类构建体包括串联 scFv、二抗体、串联二抗体、双可变结构域抗体和使用诸如 Ch1/Ck 结构域或 DNL™的基元的异源二聚 (Chames 和 Baty，2009，Curr Opin Drug Discov Devel 12：276-83；Chames 和 Baty，mAbs 1：539-47)。

[0241] 三功能单抗是四价体瘤方法的变化形式，与大鼠 / 大鼠或小鼠 / 小鼠四价体瘤中常见的随机配对相比，其使用小鼠 IgG2a 与大鼠 IgG2b 抗体的组合以抗体优先产生重组抗体 (Chames 和 Baty，mAbs 1：539-47)。由此技术产生的抗 CD3× 抗 EpCAM bsAb（卡妥索单抗）能够有效地征募巨噬细胞和 NK 细胞且活化 T 细胞 (Chames 和 Baty，mAbs 1：539-47)。如上文所论述，欧洲已批准卡妥索单抗用于治疗 EpCAM 阳性癌瘤患者的恶性腹水 (Chames 和 Baty，mAbs 1：539-47)。令人惊讶的是，据报告重组 bsAb 在人类中仅诱导中度抗小鼠和抗大鼠反应 (Chames 和 Baty，mAbs 1：539-47)，大概至少部分是由于 i.p. 施用于腹水的途

径。厄妥索单抗是靶向 HER2 的另一种三功能单抗，其可用于转移性乳腺癌。Bi20 是靶向 CD20 的另一种三功能单抗。在体外，Bi20 展现得自 CLL 患者的 B 细胞的有效溶解 (Chames 和 Baty，mAbs 1 :539-47)。

[0242] BITE®是指由短肽连接子接合的串联 scFv(Chames 和 Baty，mAbs 1 :539-47)。布利莫单抗是抗 CD19× 抗 CD3 BITE®，其在极低浓度下在诸如非何杰金氏淋巴瘤和 ALL 的血液学癌症中具有所报告的效力 (Nagorsen 等，2009，Leukemia&Lymphoma 50 :886-91 ；Chames 和 Baty，mAbs 1 :539-47 ；Topp 等，2012，Blood 120 :5185-87 ；Bargou 等，2008，Science 321 :974-77)。对 EpCAM 具有特异性的另一种BITE®已经用于胃肠癌、卵巢癌、结肠直肠癌和肺癌 (Amann 等，2009，J Immunother 32 :452-64 ；Chames 和 Baty，mAbs 1 :539-47)。已经提出靶向 CEACAM5 的另一种BITE® (MEDI-565) 用于黑素瘤、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、子宫癌和乳腺癌 (Sanders 等，1994，JPathol 172 :343-8)。已经报告了BITE®在皮摩尔或甚至飞摩尔浓度下展现抗肿瘤活性 (Chames 和 Baty，mAbs 1 :539-47)。

[0243] 涉及组装来源于两种不同的之前存在的抗体的两个重链和两个轻链的另一种 bsAb 形成方法是基于钮入穴法，其有助于异源二聚体形成且防止同源二聚体形成 (Schaefer 等，2011，Proc Natl.Acad Sci USA 108 :11187-92)。“CrossMab”技术进一步涉及交换双特异性抗体中一半的 Fab 内的重链和轻链结构域，从而产生两个不同所以不会发生轻 - 重链错配的臂 (Schaefer 等，2011)。钮入穴法将具有庞大侧链的氨基酸引入一个重链的 CH3 结构域中，从而配合另一个重链的 CH3 结构域中适当设计的穴。方法组合预防重链与重链和重链与轻链相互作用错配，从而主要产生单一产物。所产生的针对血管生成素 -2(Ang-2) 和 VEGF-A 的最初 CrossMab 展现与亲本 mAb 相当的结合特征，具有强效的抗血管生成和抗肿瘤活性 (Schaefer 等，2011，Proc Natl.Acad Sci USA 108 :11187-92 ；Kienast 等，Clin Cancer Res，2013 年 10 月 25 日，印刷前电子版)。

[0244] 除上文所论述的 DART™技术以外，其它 bsAb 产生方法包括四价 IgG-scFv 融合 (Dong 等，2011，MAbs 3 :273-88) ；双作用 Fab(DAF) 抗体 (Bostrom 等，2009，Science 323 :1610-14) ；Igg 样双可变结构域抗体 (DVD-Ig)(Wu 等，2007，Nat Biotechnol 25 :1290-97) ；和使用 IgG4 分子之间的动态交换 (van der Neut Kolfschoten 等，2007，Science 317 :1554-57)。虽然优选以下所论述的 DNL™技术用于形成白细胞重定向 bsAb，但本领域技术人员应认识到，其它类型 bsAb 也可用于要求保护的方法和组合物中。

[0245] DOCK-AND-LOCK™(DNL™)

[0246] 在优选的实施方案中，单独或与一种或多种诸如细胞因子的效应因子复合的双特异性抗体形成为 DOCK-AND-LOCK™(DNL™) 复合物 (参见例如美国专利号 7,521,056、7,527,787、7,534,866、7,550,143、7,666,400、7,901,680、7,906,118、7,981,398、8,003,111，各自的实施例部分以引用的方式并入本文中)。一般来说，该技术利用 cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA) 调节 (R) 亚单位的二聚和对接结构域 (DDD) 序列与来源于多种 AKAP 蛋白中任一种的锚定结构域 (AD) 之间发生的特异性高亲和力结合相互作用 (Baillie 等，FEBS Letters.2005 ;579 :3264 ；Wong 和 Scott，Nat.Rev.Mol.Cell Biol.2004 ;5 :959)。DDD 和 AD 肽可以连接于任何蛋白质、肽或其它分子。因为 DDD 序列自发二聚且结合于 AD 序列，所以该技术允许可连接于 DDD 或 AD 序列的任何选定分子之间形成复合物。

[0247] 虽然标准DNL™复合物包含两个DDD连接的分子连接于一个AD连接的分子的三聚体，但复合物结构的变化允许形成二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体和其它多聚体。在一些实施方案中，DNL™复合物可以包含结合于同一抗原决定子或者两个或更多个不同的抗原的两个或更多个抗体、抗体片段或融合蛋白质。DNL™复合物还可以包含一种或多种其它效应因子，诸如蛋白质、肽、免疫调节剂、细胞因子、白介素、干扰素、结合蛋白、肽配体、载体蛋白、毒素、诸如豹蛙酶的核糖核酸酶、诸如siRNA的抑制性寡核苷酸、抗原或异种抗原、诸如PEG的聚合物、酶、治疗剂、激素、细胞毒性剂、抗血管生成剂、促细胞凋亡剂或任何其它分子或聚集物。

[0248] 1968年，首次从兔骨骼肌中分离出PKA，其在受到最透彻研究的由第二信使cAMP与R亚单元结合触发的信号转导途径之一中起重要作用(Walsh等，J.Biol.Chem.1968；243:3763)。全酶的结构由通过R亚单元保持为非活性形式的两个催化亚单元组成(Taylor，J.Biol.Chem.1989;264:8443)。发现PKA的同工酶具有两种类型的R亚单元(RI和RII)，并且各类型具有α和β同种型(Scott，Pharmacol.Ther.1991;50:123)。因此，PKA调控亚单元的四个同种型是RIα、RIβ、RIIα和RIIβ，其各自包括DDD部分氨基酸序列。R亚单元仅分离为稳定二聚体且显示二聚结构域由RIIα的前44个氨基端残基组成(Newlon等，Nat.Struct.Biol.1999;6:222)。如下文所论述，其它调控亚单元的氨基酸序列的类似部分涉及二聚和对接，其各自位于调控亚单元的N-末端附近。cAMP与R亚单元结合造成用于广谱丝氨酸/苏氨酸激酶活性的活性催化亚单元释放，所述活性催化亚单元通过PKA区室化经由其与AKAP对接而面向所选择的底物(Scott等，J.Biol.Chem.1990;265;21561)。

[0249] 自从1984年表征第一种AKAP微管相关蛋白-2以来(Lohmann等，Proc.Natl.Acad.Sci USA 1984;81:6723)，又在从酵母到人范围内的物种中鉴别出具有多样性结构的超过50种AKAP，其定位于各种亚细胞位点，包括质膜、肌动蛋白细胞骨架、细胞核、线粒体和内质网(Wong和Scott，Nat.Rev.Mol.Cell Biol.2004;5:959)。AKAP中针对PKA的AD是具有14-18个残基的两亲性螺旋(Carr等，J.Biol.Chem.1991;266:14188)。AD的氨基酸序列在个别AKAP之间不同，其中针对RII二聚体所报告的结合亲和力在2至90nM范围内(Alto等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2003;100:4445)。AKAP仅结合于二聚R亚单元。对于人RIIα而言，AD结合于由23个氨基末端残基形成的疏水性表面(Colledge和Scott，TrendsCell Biol.1999;6:216)。因此，人RIIα的二聚结构域和AKAP结合结构域都位于相同N末端的44个氨基酸的序列内(Newlon等，Nat.Struct.Biol.1999;6:222;Newlon等，EMBO J.2001;20:1651)，其在本文中称为DDD。

[0250] 我们已发展出一种平台技术，其利用人PKA调控亚单元的DDD和AKAP的AD作为一对优良的连接子模块用于对接任何两个实体(在下文称为A和B)于非共价复合物中，所述复合物可通过在DDD与AD的战略位置上引入半胱氨酸残基以促进形成二硫键而进一步锁定于DNL™复合物中。所述途径的一般方法如下。通过将DDD序列连接于A的前体来构建实体A，从而产生第一组分，在下文中称为a。因为DDD序列将实现二聚体的自发形成，因此A将由a_2构成。通过将AD序列连接于B的前体来构建实体B，从而产生第二组分，在下文中称为b。a_2中所含的DDD的二聚基元将产生用于结合b中所含的AD序列的对接位点，由此促进a_2与b容易地缔合形成由a_2b构成的二元三聚复合物。此结合事件通过随后经

由二硫桥共价固定两个实体的反应而加以稳定，这基于有效局部浓度的原则而非常有效地发生，因为初始结合相互作用会使置于 DDD 和 AD 两者上的反应性硫醇基靠近 (Chmura 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 ;98 :8480) 从而位点特异性地连接。通过使用连接子、衔接子模块和前体的各种组合，可产生并使用具有不同化学计量关系的多种 DNL™ 构建体（参见例如美国专利号 7,550,143、7,521,056、7,534,866、7,527,787 和 7,666,400）。

[0251] 通过在远离两个前体的官能团处连接 DDD 和 AD，还预期所述位点特异性连接将保留两个前体的原始活性。此方法本质上是模块化的并且可能应用于位点特异性共价连接多种物质，包括肽、蛋白质、抗体、抗体片段和具有多种活性的其它效应子部分。利用构建以下实施例中所描述的 AD 和 DDD 缀合效应子的融合蛋白法，实际上可将任何蛋白质或肽并入 DNL™ 构建体中。然而，该技术不具限制性且可利用其它缀合方法。

[0252] 已知用于制备融合蛋白的多种方法，包括核酸合成、杂交和 / 或扩增以产生编码目标融合蛋白的合成双链核酸。可通过标准分子生物学技术将所述双链核酸插入用于制造融合蛋白的表达载体中（参见例如 Sambrook 等，MOLECULAR CLONING，A LABORATORY MANUAL，第 2 版，1989）。在此类优选实施方案中，AD 和 / 或 DDD 部分可连接于效应蛋白或肽的 N- 末端或 C- 末端。然而，熟练技术人员应认识到，AD 或 DDD 部分与效应子部分的连接位点可根据效应子部分的化学性质和效应子部分中参与其生理活性的部分而改变。多种效应子部分的位点特异性连接可使用本领域中已知的技术来进行，诸如使用二价交联试剂和 / 或其它化学偶联技术。

[0253] Dock-and-Lock™ (DNL™) 技术用于产生不同格式的多种复合物 (Rossi 等，2012，Bioconjug Chem 23 :309-23)。通过将与二聚和对接结构域 (DDD) 融合的经稳定的 $(Fab)_2$ 与含有附接于各重链 C- 末端的锚定结构域 (AD) 的 IgG (C_H3-AD2-IgG) 组合来构建基于维妥珠单抗（抗 -CD20）和依帕珠单抗（抗 -CD22）的双特异性六价抗体 (bsHexAb) (Rossi 等，2009，Blood 113，6161-71)。与其亲本 mAb 的混合物相比，这些基于 Fc 的 bsHexAb，下文称为“Fc-bsHexAb”，诱导独特信号转导事件 (Gupta 等人，2010，Blood 116 :3258-67)，且在体外展现有效的细胞毒性。然而，Fc-bsHexAb 从小鼠循环中清除的速率比亲本 mAb 快大约两倍 (Rossi 等，2009，Blood 113，6161-71)。虽然 Fc-bsHexAb 离体高度稳定，但在体内可能发生一定程度的解离，例如通过细胞内加工。此外，Fc-bsHexAb 缺乏 CDC 活性。

[0254] 基于 Fc 的免疫细胞因子也组装为 DNL™ 复合物，其包括融合于 C_H3-AD2-IgG Fc 的 C- 末端的二或四分子的干扰素 α 2b (IFNα 2b) (Rossi 等，2009，Blood 114 :3864-71 ;Rossi 等，2010，Cancer Res 70 :7600-09 ;Rossi 等，2011，Blood 118 :1877-84)。Fc-IgG-IFNα 维持接近于重组 IFNα 的高比活性，且在体外和体内针对非何杰金氏淋巴瘤 (NHL) 异种移植物显著有效。Fc-IgG-IFNα 在小鼠中的 $T_{1/2}$ 长于 PEG 化 IFNα，但为亲本 mAb 的一半长。与 Fc-bsHexAb 相似，Fc-IgG-IFNα 在体内随着时间推移而解离且展示降低的 CDC，但 ADCC 增强。

[0255] AD 和 DDD 部分中的结构功能关系

[0256] 对于不同类型的 DNL™ 构建体，可以利用不同的 AD 或 DDD 序列。示例性 DDD 和 AD 序列提供如下。

[0257] DDD1

[0258] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :1)

[0259] DDD2

[0260] CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:2)

[0261] AD1

[0262] QTEYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:3)

[0263] AD2

[0264] CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC(SEQ ID NO:4)

[0265] 熟练技术人员应认识到,DDD1 和 DDD2 是基于蛋白激酶 A 的人 RIIα 同种型的 DDD 序列。然而,在替代实施方案中,DDD 和 AD 部分可以基于蛋白激酶 A 的人 RIα 形式的 DDD 序列和相应的 AKAP 序列,如以下 DDD3、DDD3C 和 AD3 中所例示。

[0266] DDD3

[0267] SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK(SEQ ID NO:5)

[0268] DDD3C

[0269] MSCGGSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK(SEQ ID NO:6)

[0270] AD3

[0271] CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC(SEQ ID NO:7)

[0272] 在其它替代实施方案中,在 DNL™复合物的构建中可利用 AD 和 / 或 DDD 部分的其它序列变异体。举例来说,人 PKADDD 序列仅存在 4 种变异体,对应于 PKARIα、RIIα、RIβ 和 RIIβ 的 DDD 部分。RIIα DDD 序列是上文所公开的 DDD1 和 DDD2 的基础。四种人 PKADDD 序列示于下文中。所述 DDD 序列表示 RIIα 的残基 1-44、RIIβ 的残基 1-44、RIα 的残基 12-61 和 RIβ 的残基 13-66。(应注意,DDD1 的序列相对于人 PKA RIIα DDD 部分稍有改变。)

[0273] PKA RIα

[0274] SLRECELYVQKHNIQALLKDVSIVQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK(SEQ ID NO:8)

[0275] PKA RIβ

[0276] SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFEKLEKEENRQILA(SEQ ID NO:9)

[0277] PKA RHα

[0278] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ(SEQ ID NO:10)

[0279] PKA RIIβ

[0280] SIEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER(SEQ ID NO:11)

[0281] AD 和 DDD 结构域的结构功能关系是研究目标。(参见例如 Burns-Hamuro 等,2005, Protein Sci 14:2982-92;Carr 等,2001,J Biol Chem 276:17332-38;Alto 等,2003,Proc Natl Acad Sci USA100:4445-50;Hundsrucker 等,2006,Biochem J 396:297-306;Stokka 等,2006,Biochem J 400:493-99;Gold 等,2006,Mol Cell24:383-95;Kinderman 等,2006, Mol Cell 24:397-408,各自的整个正文以引用的方式并入本文中。)

[0282] 举例来说,Kinderman 等 (2006,Mol Cell 24:397-408) 检查了 AD-DDD 结合相互作用的晶体结构,且得出结论:人 DDD 序列含有许多在二聚体形成或 AKAP 结合中非常重要的保守氨基酸残基,在以下 SEQ ID NO:1 中以加下划线示出。(参见 Kinderman 等,2006 的图 1,以引用的方式并入本文中)。熟练技术人员应将认识到,在设计 DDD 序列的序列变异体时,将需要避免改变任何加下划线的残基,而对于二聚和 AKAP 结合不太关键的残基可进

行保守氨基酸取代。

[0283] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:1)

[0284] 如以下更详细论述，已对于二十个常见L-氨基酸中的每一种表征保守氨基酸取代。因此，基于Kinderman(2006)的数据和保守氨基酸取代，基于SEQ ID NO:1的潜在替代性DDD序列示于表2中。在制定表2时，仅考虑高度保守氨基酸取代。举例来说，带电残基仅取代相同电荷的残基，具有较小侧链的残基经类似大小的残基取代，羟基侧链仅经其它羟基取代等。因为脯氨酸对于氨基酸次级结构具有独特的效应，因此没有其它残基取代脯氨酸。有限数目的此类潜在替代性DDD部分序列示于以下SEQ ID NO:12至SEQ ID NO:31中。本领域技术人员应认识到DDD部分种类内的替代物质可通过标准技术来构建，例如使用市售肽合成器或熟知的定点诱变技术。氨基酸取代对AD部分结合的效应还可以通过标准结合测定容易地确定，例如，如Alto等(2003，Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50)中所公开。

[0285] 表2.DDD1(SEQ ID NO:1)中的保守氨基酸取代。共有序列公开为SEQ ID NO:87。

[0286]

S	H	I	Q	I	P	P	G	L	T	E	L	L	Q	G	Y	T	V	E	Y	L	R
T	K R		N				A		S	D			N	A		S		D			K

[0287]

Q	Q	P	P	D	L	V	E	F	A	V	E	Y	F	T	R	L	R	E	A	R	A
N	N			E			D		L I V		D			S	K		K	D	L I V	K	L I V

[0288] THIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:12)

[0289] SKIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:13)

[0290] SRIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:14)

[0291] SHINIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:15)

[0292] SHIQIPPALTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:16)

[0293] SHIQIPPGLSELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:17)

[0294] SHIQIPPGLTDLLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:18)

[0295] SHIQIPPGLTELLNGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:19)

[0296] SHIQIPPGLTELLQAYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:20)

[0297] SHIQIPPGLTELLQGYSVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:21)

[0298] SHIQIPPGLTELLQGYTVDVLRQQPPDLVEFAVEYPTRLREARA(SEQ ID NO:22)

[0299] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLKQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:23)

[0300] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRNQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:24)

[0301] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQNPPDLVEPAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:25)

[0302] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPELVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:26)

[0303] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVDEAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:27)

[0304] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFLVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:28)

[0305] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFIVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:29)

[0306] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFVVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:30)

[0307] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEPAVDYFTRLREARA(SEQ ID NO:31)

[0308] Alto 等 (2003, Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50) 对各种 AKAP 蛋白的 AD 序列进行生物信息学分析，以设计 RII 选择性 AD 序列，称为 AKAP-IS(SEQ ID NO:3)，其对 DDD 的结合常数为 0.4 nM。AKAP-IS 序列设计为 AKAP 与 PKA 结合的肽拮抗剂。AKAP-IS 序列中取代倾向于使与 DDD 的结合减弱的残基在以下 SEQ ID NO:3 中以下划线示出。熟练技术人员应认识到，在设计 AD 序列的序列变异体时，将需要避免改变任何加下划线的残基，而对 DDD 结合不太关键的残基可进行保守氨基酸取代。表 3 示出了 AKAP-IS(AD1, SEQ ID NO:3) 序列中的潜在保守氨基酸取代，类似于以上表 2 中的针对 DDD1(SEQ ID NO:1) 所示的氨基酸取代。

[0309] 有限数目的此类潜在替代性 AD 部分序列示于以下 SEQ ID NO:32 至 SEQ ID NO:49 中。基于 Alto 等 (2003) 的数据，可能的 AD 部分序列种类内的其它物质可由熟练技术人员制备、测试并使用。应注意，Alto(2003) 的图 2 示出了可基于实际结合实验在保留对 DDD 部分的结合活性的同时进行的许多氨基酸取代。

[0310] AKAP-IS

[0311] QIEYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:3)

[0312] 表 3. AD1(SEQ ID NO:3) 中的保守氨基酸取代。共有序列公开为 SEQ ID NO:88。

[0313]

Q	I	E	Y	L	A	K	Q	I	V	D	N	A	I	Q	Q	A
N	L V	D	F T S	I V		R	N			E	Q			N	N	L I V

[0314] NIEYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:32)

[0315] QLEYIAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:33)

[0316] QVEYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:34)

[0317] QIDYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:35)

[0318] QIEPLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:36)

[0319] QIETLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:37)

[0320] QIESLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:38)

[0321] QIEYIAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:39)

[0322] QIEYVAKQTVDNAIQQA(SEQ ID NO:40)

[0323] QIEYLARQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:4)

[0324] QIEYLAKNIVDNAIQQA(SEQ ID NO:42)

[0325] QIEYLAKQIVENAIQQA(SEQ ID NO:43)

[0326] QIEYLAKQIVDQAIQQA(SEQ ID NO:44)

[0327] QIEYLAKQIVDNAINQA(SEQ ID NO:45)

[0328] QIEYLAKQIVDNAIQNA(SEQ ID NO:46)

[0329] QIEYLAKQIVDNAIQQL(SEQ ID NO:47)

[0330] QIEYLAKQIVDNAIQQI(SEQ ID NO:48)

[0331] QIEYLAKQIVDNAIQQV(SEQ ID NO:49)

[0332] Gold 等 (2006,Mol Cell 24:383-95) 利用结晶学和肽筛选开发了 SuperAKAP-IS 序列 (SEQ ID NO:50),其对 PKA 的 RII 同种型表现出与 RI 同种型相比高出 5 个数量级的选择性。加下划线的残基指示相对于 AKAP-IS 序列的氨基酸取代位置,所述氨基酸取代增强与 RIIα 的 DDD 部分的结合。在此序列中,N- 末端 Q 残基编号为第 4 号残基且 C- 端 A 残基为第 20 号残基。可以进行取代以影响对 RIIα 的亲和性的残基是残基 8、11、15、16、18、19 和 20(Gold 等,2006)。预期在某些替代实施方案中,可用 SuperAKAP-IS 序列取代 AKAP-IS AD 部分序列来制备 DNL™构建体。可用来取代 AKAP-IS AD 序列的其它替代序列示于 SEQ ID NO:51-53 中。相对于 AKAP-IS 序列的取代以下划线示出。预期如同 SEQ ID NO:4 中所示的 AD2 序列,AD 部分也可以包括额外 N- 末端残基半胱氨酸和甘氨酸以及 C- 末端残基甘氨酸和半胱氨酸。

[0333] SuperAKAP-IS

[0334] QIEYVAKQIVDYAIHQA(SEQ ID NO:50)

[0335] 替代性 AKAP 序列

[0336] QIEYKAKQIVDHAIHQA(SEQ ID NO:51)

[0337] QIEYHAKQIVDHAIHQA(SEQ ID NO:52)

[0338] QIEYVAKQIVDHAIHQA(SEQ ID NO:53)

[0339] Gold 等的图 2 公开了来自以下所示的多种 AKAP 蛋白的额外 DDD 结合序列。

[0340] RII 特异性 AKAP

[0341] AKAP-KL

[0342] PLEYQAGLLVQNAIQQAI(SEQ ID NO:54)

[0343] AKAP79

[0344] LLIETASSLVKNAIQLSI(SEQ ID NO:55)

[0345] AKAP-Lbc

[0346] LIEEAASRIVDAVIEQVK(SEQ ID NO:56)

[0347] RI 特异性 AKAP

[0348] AKAPce

[0349] ALYQFADRFSELVISEAL(SEQ ID NO:57)

[0350] RLAD

[0351] LEQVANQLADQIIKEAT(SEQ ID NO:58)

[0352] PV38

[0353] FEELAWKIAKMIWSDVF(SEQ ID NO:59)

[0354] 双特异性 AKAP

[0355] AKAP7

[0356] ELVRLSKRLVENAVLKAV(SEQ ID NO:60)

[0357] MAP2D

[0358] TAEEVSARIVQVVTAEAV(SEQ ID NO:61)

[0359] DAKAP1

[0360] QIKQAAFQLISQVILEAT(SEQ ID NO:62)

[0361] DAKAP2

[0362] LAWKIAKMIVSDVMQQ(SEQ ID NO:63)

[0363] Stokka 等 (2006, Biochem J 400:493-99) 也开发了 AKAP 结合 PKA 的肽竞争剂，其示于 SEQ ID NO:64-66 中。肽拮抗剂命名为 Ht31(SEQ ID NO:64)、RIAD(SEQ ID NO:65) 和 PV-38(SEQ ID NO:66)。Ht-31 肽对 PKA 的 RII 同种型展现较高亲和力，而 RIAD 和 PV-38 对 RI 显示较高亲和力。

[0364] Ht31

[0365] DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY(SEQ ID NO:64)

[0366] RIAD

[0367] LEQYANQLADQIIKEATE(SEQ ID NO:65)

[0368] PV-38

[0369] FEELAWKIAKMIWSDVFQQC(SEQ ID NO:66)

[0370] Hundsrucker 等 (2006,Biochem J 396:297-306) 开发了 AKAP 与 PKA 结合的其它肽竞争剂，与 PKA 的 RII 形式的 DDD 的结合常数低至 0.4nM。各种 AKAP 拮抗性肽的序列提供于 Hundsrucker 等的表 1 中，复制于以下表 4 中。AKAPIS 代表一种合成 RII 亚单元结合肽。所有其它肽都来源于所指示的 AKAP 的 RII 结合结构域。

[0371] 表 4. AKAP 肽序列

[0372] 肽序列

[0373] AKAPIS QIEYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:3)

[0374] AKAPIS-P QIEYLAKQIPDNAIQQA(SEQ ID NO:67)

[0375] Ht31 KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG(SEQ ID NO:68)

[0376] Ht31-P KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG(SEQ ID NO:69)

[0377] AKAP7δ-wt-pep PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY(SEQ ID NO:70)

[0378] AKAP7δ-L304T-pep PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY(SEQ ID NO:71)

[0379] AKAP7δ-L308D-pep PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY(SEQ ID NO:72)

[0380] AKAP7δ-P-pep PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY(SEQ ID NO:73)

[0381] AKAP7δ-PP-pep PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY(SEQ ID NO:74)

[0382] AKAP7δ-L314E-pep PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY(SEQ ID NO:75)

[0383] AKAP1-pep EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA(SEQ ID NO:76)

[0384] AKAP2-pep LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ(SEQ ID NQ:77)

[0385] AKAP5-pep QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL(SEQ ID NO:78)

[0386] AKAP9-pep LEKQYQEQLEEEVAKVIVSMSIAFA(SEQ ID NO:79)

[0387] AKAP10-pep NTDEAQEELAWKIAKMIVSDIMQQA(SEQ ID NO:80)

[0388] AKAP11-pep VNLDKKAVLAEKIVAEAIEKAEREL(SEQ ID NO:81)

[0389] AKAP12-pep NGILELETKSSKLVQNIIQTAVDQF(SEQ ID NO:82)

[0390] AKAP14-pep TQDKNYEDELTQVALALVEDVINYA(SEQ ID NO:83)

[0391] Rab32-pep ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH(SEQ ID NO:84)

[0392] 以下通过参考 AKAP IS 序列 (SEQ ID NO:3) 以下划线指示在不同的 AKAP 蛋白的 AD

结构域间高度保守的残基。所述残基与 Alto 等 (2003) 所观察的相同，其中添加 C- 末端丙氨酸残基。(参见 Hundsrucker 等 (2006) 的图 4，以引用的方式并入本文中。)。对 RII DDD 序列有特别高的亲和力的肽拮抗剂的序列是 AKAP-IS、AKAP7 δ -wt-pep、AKAP7 δ -L304T-pep 和 AKAP7 δ -L308D-pep 的序列。

[0393] AKAP-IS

[0394] QIEYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO :3)

[0395] Carr 等 (2001，J Biol Chem 276 :17332-38) 检查了来自人和非人蛋白质的不同 AKAP 结合 DDD 序列之间的序列同源性程度，且鉴别了 DDD 序列中似乎在不同的 DDD 部分间最高度保守的残基。这些残基在以下通过参考 SEQ ID NO :1 的人 PKA RII α DDD 序列以下划线示出。特别保守的残基进一步以斜体指示。所述残基与 Kinderman 等 (2006) 提出的对于结合 AKAP 蛋白质非常重要的那些残基重叠但不相同。熟练技术人员应认识到，在设计 DDD 的序列变异体时，最优选的是避免改变最保守的残基 (斜体)，且优选还避免改变保守残基 (加下划线)，而既未加下划线也不是斜体的残基可考虑进行保守氨基酸取代。

[0396] SHIQIPPGETELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO :1)

[0397] 基于 Carr 等 (2001) 的数据，DDD1(SEQ ID NO :1) 序列的一组经修饰保守氨基酸取代示于表 5 中。即使在这一组经取代序列有所减少的情况下，本领域技术人员也在不进行过度实验的情况下产生、测试并使用了超过 65,000 个可能的替代性 DDD 部分序列。熟练技术人员可以容易获得此类替代性 DDD 氨基酸序列，如以上表 2 和表 3 所公开。

[0398] 表 5. DDD1(SEQ ID NO :1) 中的保守氨基酸取代。共有序列公开为 SEQ ID NO :89。

[0399]

S	H	I	Q	I	P	P	G	L	T	E	L	L	Q	G	Y	T	V	E	V	L	R
T			N						S								I L A				

[0400]

Q	Q	P	P	D	L	V	E	F	A	V	E	Y	F	T	R	L	R	E	A	R	A
N										I L A	D			S	K		K		L I V		L I V

[0401] 熟练技术人员应将认识到，使用本领域中标准的技术和仅常规的实验，DDD 或 AD 氨基酸序列中的这些和其它氨基酸取代可用于产生 AD 或 DDD 部分种类内的替代物质。

[0402] 氨基酸取代

[0403] 在替代实施方案中，所公开的方法和组合物可涉及产生和使用具有一个或多个取代氨基酸残基的蛋白质或肽。举例来说，用于制备 DNL™ 构建体的 DDD 和 / 或 AD 序列可如以上所论述加以修饰。

[0404] 熟练技术人员应意识到，一般来说，氨基酸取代典型地涉及将氨基酸置换为具有相对类似性质的另一种氨基酸 (即，保守氨基酸取代)。各种氨基酸的性质和氨基酸取代对蛋白质结构和功能的效应在本领域中是广泛研究和知识的主题。

[0405] 举例来说，可以考虑氨基酸的亲水性指数 (Kyte 和 Doolittle，1982，J. Mol.

Biol.,157:105-132)。氨基酸的相对亲水性特征有助于所得蛋白质的次级结构,这又限定了蛋白质与其它分子的相互作用。已经基于其疏水性和电荷特征来指定各氨基酸的亲水性指数(Kyte和Doolittle,1982),这些是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。在进行保守取代时,使用其亲水性指数在±2内的氨基酸是优选的,在±1内是更优选的,且在±0.5内是甚至更优选的。

[0406] 氨基酸取代还可考虑氨基酸残基的亲水性(例如,美国专利号4,554,101)。已指定氨基酸残基的亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0);谷氨酸(+3.0);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5.+-.1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);蛋氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5)和色氨酸(-3.4)。将氨基酸置换为具有类似亲水性的其它氨基酸是优选的。

[0407] 其它考虑因素包括氨基酸侧链的大小。举例来说,用诸如甘氨酸或丝氨酸的紧凑侧链、用例如色氨酸或酪氨酸的具有庞大侧链的氨基酸置换氨基酸总体上不是优选的。还考虑了各种氨基酸残基对于蛋白质次级结构的效应。通过实验研究,已经确定了不同的氨基酸残基对蛋白质结构域采用α-螺旋、β-薄片或反转次级结构的倾向性的效应,且在本领域中是已知的(参见例如Chou和Fasman,1974,Biochemistry,13:222-245;1978,Ann.Rev.Biochem.,47:251-276;1979,Biophys.J.,26:367-384)。

[0408] 基于此类考虑因素和广泛实验研究,已经构建了保守氨基酸取代的表格且在本领域中是已知的。举例来说:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。替代地:Ala(A)leu、ile、val;Arg(R)gln、asn、lys;Asn(N)his、asp、lys、arg、gln;Asp(D)asn、glu;Cys(C)ala、ser;Gln(Q)glu、asn;Glu(E)gln、asp;Gly(G)ala;His(H)asn、gln、lys、arg;Ile(I)val、met、ala、phe、leu;Leu(L)val、met、ala、phe、ile;Lys(K)gln、asn、arg;Met(M)phe、ile、leu;Phe(F)leu、val、ile、ala、tyr;Pro(P)ala;Ser(S)、thr;Thr(T)ser;Trp(W)phe、tyr;Tyr(Y)trp、phe、thr、ser;Val(V)ile、leu、met、phe、ala。

[0409] 氨基酸取代的其它考虑因素包括残基是位于蛋白质内部或是暴露于溶剂。对于内部残基,保守取代将包括:Asp和Asn;Ser和Thr;Ser和Ala;Thr和Ala;Ala和Gly;Ile和Val;Val和Leu;Leu和Ile;Leu和Met;Phe和Tyr;Tyr和Trp。(参见例如PROWL网站rockefeller.edu)对于溶剂暴露残基,保守取代将包括:Asp和Asn;Asp和Glu;Glu和Gln;Glu和Ala;Gly和Asn;Ala和Pro;Ala和Gly;Ala和Ser;Ala和Lys;Ser和Thr;Lys和Arg;Val和Leu;Leu和Ile;Ile和Val;Phe和Tyr。(同上)已经构建了有助于选择氨基酸取代的各种矩阵,诸如PAM250评分矩阵、Dayhoff矩阵、Grantham矩阵、McLachlan矩阵、Doolittle矩阵、Henikoff矩阵、Miyata矩阵、Fitch矩阵、Jones矩阵、Rao矩阵、Levin矩阵和Risler矩阵(同上)。在确定氨基酸取代时,还可能考虑分子间或分子内键的存在,诸如形成带正电残基(例如,His、Arg、Lys)与带负电残基(例如,Asp、Glu)之间的离子键(盐桥)或相邻半胱氨酸残基之间的二硫键。

[0410] 将任何氨基酸取代为所编码的蛋白质序列中的任何其它氨基酸的方法对于熟练技术人员是熟知的且实际上是常规实验，例如通过定点诱变技术或通过合成并组装编码氨基酸取代的寡核苷酸并剪接于表达载体构建体中。

[0411] 治疗剂

[0412] 在替代实施方案中，可使用治疗剂，诸如细胞毒性剂、抗血管生成剂、促细胞凋亡剂、抗生素、激素、激素拮抗剂、趋化因子、药物、前药、毒素、酶或其它药剂，其与标的目标 bsAb、ADC 和 / 或抗体缀合，或在 bsAb、ADC 和 / 或抗体之前、同时或之后个别地施用。所使用的药物可具有选自以下的药学性质 ：抗有丝分裂剂、抗激酶剂、烷基化剂、抗代谢物剂、抗生素剂、生物碱、抗血管生成剂、促细胞凋亡剂和其组合。

[0413] 可用的示例性药物可以包括但不限于 5- 氟尿嘧啶、阿法替尼、阿普立定、阿扎立平、阿那曲唑、蒽环类、阿西替尼、AVL-101、AVL-291、苯达莫司汀、争光霉素、硼替佐米、博舒替尼、苔藓抑素 -1、白消安、刺孢霉素、喜树碱、卡铂、10- 羟基喜树碱、亚硝脲氮芥、西乐葆、苯丁酸氮芥、顺铂 (CDDP)、Cox-2 抑制剂、伊立替康 (CPT-11)、SN-38、卡铂、克拉屈滨、camptothecans、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、达沙替尼、地尼西宝、多西他赛、放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星、2- 吡咯啉并多柔比星 (2P-DOX)、氰基吗啉基多柔比星、多柔比星葡萄糖醛酸苷、表柔比星葡萄糖醛酸苷、埃罗替尼、雌氮芥、表鬼臼毒素、埃罗替尼、恩替诺特、雌激素受体结合剂、依托泊苷 (VP16)、依托泊苷葡萄糖醛酸苷、依托泊苷磷酸盐、依西美坦、芬戈莫德、氟尿苷 (FUdR)、3′ ,5′ -O- 二油酰基 -FudR(FUdR-dO)、氟达拉滨、氟他胺、法呢基蛋白转移酶抑制剂、夫拉平度、福他替尼、吉尼替比、GDC-0834、GS-1101、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、依鲁替尼、伊达比星、艾代拉利司、异环磷酰胺、伊马替尼、L- 天冬酰胺酶、拉帕替尼、来那度胺、甲酰四氢叶酸、LFM-A13、环己亚硝脲、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、6- 巯基嘌呤、氨甲蝶呤、米托蒽醌、光神霉素、丝裂霉素、米托坦、诺维本、来那替尼、尼罗替尼、亚硝基脲、奥拉帕尼、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、PCI-32765、喷司他丁、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、索拉非尼、链脲霉素、SU11248、舒尼替尼、它莫西芬、替莫唑胺 (DTIC 的水溶液形式)、反铂、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替派、替尼泊苷、托泊替康、尿嘧啶芥、瓦他拉尼、长春瑞滨、长春花碱、长春新碱、长春花生物碱和 ZD1839。

[0414] 所使用的毒素可包括蓖麻毒素、相思子毒素、肥皂草素、核糖核酸酶 (RNA 酶)(例如豹蛙酶)、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 -A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。

[0415] 有用的趋化因子可以包括 RANTES、MCAF、MIP1-α 、MIP1-β 和 IP-10。

[0416] 在某些实施方案中，可以使用抗血管生成剂，诸如制管张素、杆抑素、癌抑素、乳腺丝抑蛋白、抗 VEGF 抗体、抗 PlGF 肽和抗体、抗血管生长因子抗体、抗 Flk-1 抗体、抗 Flt-1 抗体和肽、抗 Kras 抗体、抗 -cMET 抗体、抗 MIF(巨噬细胞迁移抑制因子) 抗体、层粘连蛋白肽、纤连蛋白肽、纤溶酶原激活物抑制剂、组织金属蛋白酶抑制剂、干扰素、白细胞介素 -12、IP-10、Gro-β 、血小板反应蛋白、2- 甲氧基雌二醇、增殖蛋白相关蛋白质、羧胺三唑、CM101、马立马司他、戊聚糖多硫酸盐、血管生成素 -2、干扰素 -α 、除莠霉素 A、PNU145156E、16K 催乳素片段、利诺胺 (罗喹美克)、沙利度胺、己酮可可碱、染料木黄酮、TNP-470、内皮抑素、紫杉醇、蛇毒解离素、制管张素、西多福韦、长春新碱、博来霉素、AGM-1470、血小板因子 4 或米诺环素。

[0417] 所使用的免疫调节剂可以选自细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、造血因子、集落刺激因子 (CSF)、干扰素 (IFN)、红细胞生成素、血小板生成素和其组合。特别适用者为淋巴毒素，诸如肿瘤坏死因子 (TNF)；造血因子，诸如白介素 (IL)；集落刺激因子，诸如粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)；干扰素，诸如干扰素 -α、干扰素 -β 或干扰素 -λ；和干细胞生长因子，诸如称为“S1 因子”者。细胞因子中包括生长激素，诸如人生长激素、N- 甲硫氨酰基人生长激素和牛生长激素；甲状旁腺激素；甲状腺素；胰岛素；胰岛素原；松弛素；松弛素原；糖蛋白激素，诸如促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和促黄体激素 (LH)；肝细胞生长因子；前列腺素、成纤维细胞生长因子；催乳素；胎盘催乳素、OB 蛋白；肿瘤坏死因子 -α 和肿瘤坏死因子 -β；苗勒氏管抑制物质；小鼠促性腺激素相关肽；抑制素；活化素；血管内皮生长因子；整合素；促血小板生成素 (TPO)；神经生长因子，诸如 NGF-β；血小板生长因子；转化生长因子 (TGF)，诸如 TGF-α 和 TGF-β；胰岛素样生长因子 -I 和胰岛素样生长因子 -II；红细胞生长素 (EPO)；骨诱导因子；干扰素，诸如干扰素 -α、干扰素 -β 和干扰素 -γ；集落刺激因子 (CSF)，诸如巨噬细胞 -CSF(M-CSF)；白介素 (IL)，诸如 IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-25、LIF、kit 配体或 FLT-3、制管张素、血小板反应蛋白、内皮抑素、肿瘤坏死因子和 LT。

[0418] 有用的放射性核素包括但不限于 -^{111}In、^{177}Lu、^{212}Bi、^{213}Bi、^{211}At、^{62}Cu、^{67}Cu、^{90}Y、^{125}I、^{131}I、^{32}P、^{33}P、^{47}Sc、^{111}Ag、^{67}Ga、^{142}Pr、^{153}Sm、^{161}Tb、^{166}Dy、^{166}Ho、^{186}Re、^{188}Re、^{189}Re、^{212}Pb、^{223}Ra、^{225}Ac、^{59}Fe、^{75}Se、^{77}As、^{89}Sr、^{99}Mo、^{105}Rh、^{109}Pd、^{143}Pr、^{149}Pm、^{169}Er、^{194}Ir、^{198}Au、^{199}Au、^{211}Pb 和 ^{227}Th。治疗性放射性核素优选具有在 20keV 至 6,000keV 范围内的衰变能量，对于俄歇发射体，优选在 60keV 至 200keV 范围内；对于 β 发射体，100keV 至 2,500keV；且对于 α 发射体，4,000keV 至 6,000keV。可用 β 粒子发射核素的最大衰变能优选为 20-5,000keV，更优选为 100-4,000keV，且最优选为 500-2,500keV。实质上随俄歇发射粒子衰变的放射性核素也是优选的。举例来说，Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m 和 Ir-192。可用 β 粒子发射核素的衰变能优选地＜ 1,000keV，更优选地＜ 100keV，且最优选地＜ 70keV。实质上随 α 粒子产生而衰变的放射性核素也是优选的。此类放射性核素包括但不限于 Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213、Th-227 和 Fm-255。可用 α 粒子发射放射性核素的衰变能优选为 2,000-10,000keV，更优选为 3,000-8,000keV，且最优选为 4,000-7,000keV。额外的潜在可用放射性同位素包括 ^{11}C、^{13}N、^{15}O、^{75}Br、^{198}Au、^{224}Ac、^{126}I、^{133}I、^{77}Br、^{113m}In、^{95}Ru、^{97}Ru、^{103}Ru、^{105}Ru、^{107}Hg、^{203}Hg、^{121m}Te、^{122m}Te、^{125m}Te、^{165}Tm、^{167}Tm、^{168}Tm、^{197}Pt、^{109}Pd、^{105}Rh、^{142}Pr、^{143}Pr、^{161}Tb、^{166}Ho、^{199}Au、^{57}Co、^{58}Co、^{51}Cr、^{59}Fe、^{75}Se、^{201}Tl、^{225}Ac、^{76}Br、^{169}Yb 等等。一些可用的诊断核素可包括 ^{18}F、^{52}Fe、^{62}Cu、^{64}Cu、^{67}Cu、^{67}Ga、^{68}Ga、^{86}Y、^{89}Zr、^{94}Tc、^{94m}Tc、^{99m}Tc 或 ^{111}In。

[0419] 治疗剂可以包括光活性剂或染料。荧光组合物（诸如荧光体）和其它色原体或染料（诸如对可见光敏感的卟啉）已经通过将适合的光引导至病变而用来检测并治疗病变。在治疗中，这被称为光辐射、光疗法或光动力学疗法。参见 Jori 等（编），PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES(Libreria Progetto 1985)；van den Bergh, Chem. Britain(1986), 22：430。此外，已经将单克隆抗体与光活化的染料偶联以实现光疗法。参见 Mew 等，J. Immunol. (1983), 130：1473；同上，Cancer Res. (1985), 45：4380；

Oseroff 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1986)，83：8744；同 上，Photochem.Photobiol.(1987)，46：83；Hasan 等，Prog.Clin.Biol.Res.(1989)，288：471；Tatsuta 等，Lasers Surg.Med.(1989)，9：422；Pelegrin 等，Cancer(1991)，67：2529。

[0420] 其它可用治疗剂可以包含寡核苷酸，尤其是优选地针对诸如 bcl-2 或 p53 的致癌基因和致癌基因产物的反义寡核苷酸。治疗性寡核苷酸的优选形式是 siRNA。熟练技术人员应认识到任何 siRNA 或干扰 RNA 种类都可以连接于抗体或其片段用于递送至所靶向的组织。针对多种标靶的许多 siRNA 物质在本领域中是已知的，且在要求保护的方法和组合物中可利用任何此类已知 siRNA。

[0421] 有可能使用的已知 siRNA 物质包括对以下各项具有特异性的那些：IKK-γ（美国专利 7,022,828）；VEGF、Flt-1 和 Flk-1/KDR（美国专利 7,148,342）；Bcl2 和 EGFR（美国专利 7,541,453）；CDC20（美国专利 7,550,572）；转导蛋白（β）样蛋白 3（美国专利 7,576,196）；KRAS（美国专利 7,576,197）；碳酸酐酶 II（美国专利 7,579,457）；补体组分 3（美国专利 7,582,746）；白介素 -1 受体相关激酶 4(IRAK4)（美国专利 7,592,443）；存活蛋白（美国专利 7,608,7070）；超氧化物歧化酶 1（美国专利 7,632,938）；MET 原癌基因（美国专利 7,632,939）；淀粉样蛋白 β 驱体前体蛋白 (APP)（美国专利 7,635,771）；IGF-1R（美国专利 7,638,621）；ICAM1（美国专利 7,642,349）；补体因子 B（美国专利 7,696,344）；p53(7,781,575) 和载脂蛋白 B(7,795,421)，各参考专利的实施例部分以引用的方式并入本文中。

[0422] 其它 siRNA 物质可得自已知的商业来源，诸如 Sigma-Aldrich(St Louis，MO)、Invitrogen(Carlsbad,CA)、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz,CA)、Ambion(Austin，TX)、Dharmacon(Thermo Scientific，Lafayette，CO)、Promega(Madison，WI)、Mirus Bio(Madison,WI) 和 Qiagen(Valencia,CA) 以及许多其它来源。siRNA 物质的其它可公开获得的来源包括位于斯德哥尔摩生物信息学中心的 siRNAdb 数据库、MIT/ICBP siRNA 数据库、位于博得研究院的 RNAi 联合 shRNA 文库和位于 NCBI 的探针数据库。举例来说，在 NCBI 探针数据库中存在 30,852 种 siRNA 物质。熟练技术人员应认识到，对于任何目标基因，或者已对 siRNA 物质进行了设计，或者其可使用可公开获得的软件工具进行容易地设计。任何此类 siRNA 物质都可以使用标的目标 DNL™复合物进行递送。

[0423] 治疗性治疗方法

[0424] 各种实施方案涉及治疗受试者，诸如哺乳动物，包括人、驯养或伴侣宠物，诸如犬和猫的癌症的方法，其包括向受试者施用治疗有效量的细胞毒性剂和 / 或免疫调节剂的组合。

[0425] 施用细胞毒性 bsAb、ADC 和 / 或检查点抑制子抗体可补充以同时或依序施用治疗有效量的与靶细胞表面上的另一个抗原结合或反应的另一种抗体。优选额外 MAb 包括选自以下的至少一种人源化、嵌合或人类 MAb：与 CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、IGF-1R、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD70、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD95、CD126、CD133、CD138、CD154、CEACAM5、CEACAM6、B7、AFP、PSMA、EGP-1、EGP-2、碳酸酐酶 IX、PAM4 抗原、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、Ia、MIF、HM1.24、HLA-DR、腱生蛋白、Flt-3、VEGFR、PlGF、ILGF、IL-6、IL-25、腱生蛋白、TRAIL-R1、TRAIL-R2、补体因子 C5、致癌基因产物或其组合反应的 MAb。所使用

的各种抗体，诸如抗 CD19、抗 CD20 和抗 CD22，是本领域技术人员已知的。参见例如 Ghetie 等，Cancer Res. 48 :2610(1988) ;Hekman 等，Cancer Immunol. Immunother. 32 :364(1991) ; Longo，Curr. Opin. Oncol. 8 :353(1996) ；美国专利号 5,798,554、6,187,287、6,306,393、6,676,924、7,109,304、7,151,164、7,230,084、7,230,085、7,238,785、7,238,786、7,282,567、7,300,655、7,312,318、7,501,498、7,612,180、7,670,804 ；以及美国专利申请公布号 20080131363、20070172920、20060193865 和 20080138333，各自的实施例部分以引用的方式并入本文中。

[0426] 组合疗法可进一步补充以同时或依序施用至少一种其它治疗剂。举例来说，“CVB”(1.5g/m^2环磷酰胺、200-400mg/m^2依托泊苷和 150-200mg/m^2卡莫司汀）是用于治疗非何杰金氏淋巴瘤的方案。Patti 等，Eur. J. Haematol. 51 :18(1993)。其它合适的组合化学治疗方案是本领域技术人员所熟知的。参见例如 Freedman 等，“Non-Hodgkin′ s Lymphomas”，CANCER MEDICINE，第 2 卷，第 3 版，Holland 等（编），第 2028-2068 页 (Lea&Febiger 1993)。作为说明，用于治疗中级非何杰金氏淋巴瘤 (NHL) 的第一代化学治疗方案包括 C-MOPP（环磷酰胺、长春新碱、丙卡巴肼和泼尼松）和 CHOP（环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松）。可用的第二代化学治疗方案是 m-BACOD（甲氨蝶呤、博来霉素、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、地塞米松和甲酰四氢叶酸），而合适的第三代方案是 MACOP-B（甲氨蝶呤、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、泼尼松、博来霉素和甲酰四氢叶酸）。其它可用药物包括丁酸苯酯、苯达莫司汀和苔藓抑素 -1。

[0427] 治疗剂组合可根据已知方法进行配制以制备药学上可用的组合物，由此将 bsAb、ADC、干扰素和 / 或检查点抑制子抗体与药学上合适的赋形剂组合成混合物。无菌磷酸盐缓冲生理盐水是药学上合适的赋形剂的一个实例。其它合适的赋形剂是本领域技术人员熟知的。参见例如 Ansel 等，PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS，第 5 版 (Lea&Febiger 1990) ；和 Gennaro（编），REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES，第 18 版 (Mack Publishing Company 1990) 和其修订版。

[0428] 目标 bsAb、ADC、干扰素和 / 或抗体可以经配制以经由例如推注或连续输注用于静脉内施用。优选地，bsAb、ADC 和 / 或抗体输注持续少于约 4 个小时的时间，且更优选地持续少于约 3 个小时的时间。举例来说，第一次推注可在 30 分钟，优选地甚至 15 分钟内输注，且其余部分在接下来的 2-3 小时内输注。注射制剂可以呈单位剂型提供，例如，在安瓿或多剂量容器中，其中添加防腐剂。组合物可采用诸如于油性或水性媒剂中的混悬液、溶液或乳液的形式，并且可含有配制剂，诸如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。替代地，活性成分可呈在使用前用合适的媒剂（例如无菌无热原质水）复原的粉末形式。

[0429] 可以采用额外药学方法来控制治疗组合的作用持续时间。可以通过使用聚合物以复合或吸附欲施用的药剂来制备控制释放制剂。举例来说，生物相容性聚合物包括聚（乙烯 - 乙酸乙烯酯）共聚物基质和硬脂酸二聚体与癸二酸的聚酐共聚物基质。Sherwood 等，Bio/Technology 10 :1446(1992)。从此类基质释放的速率取决于治疗剂的分子量、基质内的药剂的量，和分散粒子的大小。Saltzman 等，Biophys. J. 55 :163(1989) ;Sherwood 等，同上。其它固体剂型描述于以下文献中 :Ansel 等，PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS，第 5 版 (Lea&Febiger 1990) ；以及 Gennaro（编），REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES，第 18 版 (Mack Publishing Company 1990) 和其修订版。

[0430] bsAb、干扰素和/或检查点抑制子抗体可以经皮下或甚至通过其它肠胃外途径，诸如经静脉内、肌肉内、腹膜内或血管内施用于哺乳动物。ADC可以经静脉内、腹膜内或血管内施用。此外，施用可以通过连续输注或通过单次或多次推注来进行。优选地，bsAb、ADC、干扰素和/或检查点抑制子抗体输注持续少于约4个小时的周期，且更优选持续少于约3个小时的周期。

[0431] 更一般来说，bsAb、ADC、干扰素和/或检查点抑制子抗体用于人类的施用剂量将取决于诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医学病状和既往病史的因素而变化。可能需要给接受者提供在约1mg/kg至25mg/kg范围内的作为单次静脉输注的bsAb、ADC素和/或抗体剂量，但也可以施用较低或较高的剂量，视情况决定。举例来说，对于70kg患者，1-20mg/kg的剂量是70-1,400mg，或对于1.7m患者，41-824mg/m^2。需要时剂量可以重复，例如每周一次持续4-10周、每周一次持续8周或每周一次持续4周。在维持疗法中，需要时其还可以较低频率给予，诸如每隔一周一次持续若干个月，或者每月或每季度一次持续许多个月。

[0432] 替代地，bsAb、ADC和/或检查点抑制子抗体可以按照每2周或3周一个剂量施用，总共重复至少3个剂量。或者，所述组合可以每周施用2次，持续4至6周。如果使剂量降至约200-300mg/m^2(对于1.7m患者是每剂340mg，或对于70kg患者是4.9mg/kg)，则其可每周施用一次或甚至两次持续4至10周。替代地，给药时程可减少，即，每2或3周一次持续2-3个月。然而已经确定，甚至可通过缓慢i.v.输注施用甚至更高的剂量，诸如20mg/kg每周一次或每2-3周一次，用于重复给药循环。给药时程可任选地以其它间隔重复，且剂量可在对剂量和时程进行适当调节的情况下通过各种胃肠外途径给予。

[0433] 本领域技术人员应认识到，尽管上文所论述的给药时程是关于ADC、bsAb和/或mAb，但干扰素药剂应以实质上较低的剂量施用以避免全身毒性。干扰素(诸如PEGINTERFERON)用于人类的剂量更典型地在微克范围内，例如可以使用180μg s.c.每周一次，或100至180μg，或135μg，或135μg/1.73m^2，或90μg/1.73m^2，或250μg s.c.每隔一天一次，视干扰素类型而定。

[0434] 尽管bsAb、干扰素、ADC和/或检查点抑制子抗体可以周期性推注形式施用，但在替代实施方案中，bsAb、ADC、干扰素和/或检查点抑制子抗体可以通过连续输注来施用。为了增加Cmax且延伸治疗剂在血液中的PK，连续输注可以例如通过留置导管来施用。此类设备在本领域中是已知的，诸如HICKMAN®、BROVIAC®或PORT-A-CATH®导管(参见例如Skolnik等，Ther Drug Monit 32:741-48,2010)，并且可以使用任何此类已知留置导管。各种连续输注泵在本领域中也是已知的并且可使用任何此类已知输注泵。连续输注的剂量范围可以在0.1与3.0mg/kg/天之间。更优选地，bsAb、ADC、干扰素和/或检查点抑制子抗体可以通过在2至5小时，更优选地2-3小时的相对较短周期内经静脉内输注来施用。

[0435] 在优选的实施方案中，药剂组合对癌症疗法是有用的。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、成胶质细胞瘤、黑素瘤、肉瘤和白血病、骨髓瘤或淋巴恶性疾病。此类癌症的更特定实例如下所述且包括：鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、尤因氏肉瘤、韦尔姆斯氏肿瘤、星形细胞瘤、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃部癌症(包括胃肠癌)、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、肝细胞癌瘤、神经内分泌肿瘤、甲状腺髓样癌、甲状腺分化癌、乳腺

癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌或肾癌、前列腺癌、阴门癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。术语“癌症”包括原发性恶性细胞或肿瘤（例如细胞未迁移至受试者体内除原始恶性病或肿瘤部位以外的部位的肿瘤）和继发性恶性细胞或肿瘤（例如由转移，即，恶性细胞或肿瘤细胞迁移至与原始肿瘤部位不同的次级部位而产生的肿瘤）。得益于本发明的治疗方法的癌症涉及表达、过度表达或异常表达 IGF-1R 的细胞。

[0436] 癌症或恶性病的其它实例包括但不限于：急性儿童成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、肾上腺皮质癌、成人（原发性）肝细胞癌、成人（原发性）肝癌、成人急性淋巴细胞性白血病、成人急性骨髓性白血病、成人何杰金氏淋巴瘤、成人淋巴细胞性淋巴瘤、成人非何杰金氏淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、AIDS 相关性淋巴瘤、AIDS 相关性恶性病、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干神经胶质瘤、脑瘤、乳腺癌、肾盂和输尿管癌、中枢神经系统（原发性）淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤、宫颈癌、儿童（原发性）肝细胞癌、儿童（原发性）肝癌、儿童急性成淋巴细胞性白血病、儿童急性骨髓性白血病、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童大脑星形细胞瘤、儿童颅外胚细胞瘤、儿童何杰金氏病、儿童何杰金氏淋巴瘤、儿童下丘脑和视通路神经胶质瘤、儿童成淋巴细胞性白血病、儿童成神经管细胞瘤、儿童非何杰金氏淋巴瘤、儿童松果体和幕上原始神经外胚层瘤、儿童原发性肝癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视通路和下丘脑神经胶质瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、结肠癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤、内分泌胰岛细胞癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮癌、食道癌、尤因氏肉瘤和相关肿瘤、外分泌胰腺癌、颅外胚细胞瘤、性腺外胚细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳癌、高歇氏病、胆囊癌、胃部癌、胃肠道良性肿瘤、胃肠道肿瘤、胚细胞瘤、妊娠性滋养层细胞瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、何杰金氏淋巴瘤、高丙种球蛋白血症、下咽癌、肠癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波济氏肉瘤、肾癌、喉癌、唇口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴增生性病症、巨球蛋白血症、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、成神经管细胞瘤、黑素瘤、间皮瘤、转移性原发灶隐匿性鳞状颈癌、转移性原发性鳞状颈癌、转移性鳞状颈癌、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤／浆细胞赘瘤、骨髓发育不良综合症、髓细胞性白血病、骨髓性白血病、骨髓增生性病症、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非何杰金氏淋巴瘤、非黑素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、转移性原发灶隐匿性鳞状颈癌、口咽癌、骨肉瘤／恶性纤维肉瘤、骨肉瘤／恶性纤维组织细胞瘤、骨肉瘤／骨骼的恶性纤维组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢胚细胞瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、病变蛋白血症、真性红细胞增多症、副甲状腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉状瘤病肉瘤、塞扎里综合症、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状颈癌、胃癌、幕上原始神经外胚层和松果体瘤、T 细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行迁移细胞癌、移行迁移肾盂和输尿管癌、滋养层细胞瘤、输尿管和肾盂细胞癌、输尿管癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视通路和下丘脑神经胶质瘤、阴门癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、韦尔姆斯氏瘤和位于以上所列出的器官系统中的除赘瘤以外任何其它过度增生性疾病。

[0437] 本文中所描述和要求保护的方法和组合物可用于治疗恶性或恶变前病状和预防进展成赘生性或恶性状态，包括但不限于上文所描述的那些病症。指示此类用途用于已知

或疑似提前进展成赘瘤或癌症的病状，特别是在已发生由增生、化生或最特别的是发育不良组成的非赘生性细胞生长的情况下（关于此类异常生长病状的综述，参见 Robbins 和 Angell，BASIC PATHOLOGY，第 2 版，W. B. Saunders Co.，Philadelphia，第 68-79 页 (1976)）。

[0438] 发育不良往往是癌症的前兆，并且主要发现于上皮中。它是非赘生性细胞生长的最无序形式，涉及个别细胞一致性和细胞结构定向的丧失。在存在慢性刺激或炎症的情况下，特征性地发生发育不良。可以治疗的发育不良病症包括但不限于：无汗性外胚层发育不良、前面部发育不良、窒息性胸廓发育不良、心房 - 手指发育不良、支气管肺发育不良、大脑发育不良、宫颈发育不良、软骨外胚层发育不良、锁骨颅骨发育不良、先天性外胚层发育不良、颅骨干发育不良、颅腕跗发育不良、颅骨干骺端发育不良、牙本质发育不良、骨干结构不良、外胚层发育不良、牙釉质发育不良、脑性眼球发育不全、偏侧骨骺发育不良、多发性骨骺发育不良、点状骨骺发育不良、上皮异常增生、面指生殖器发育不良、家族性颌骨纤维性发育不良、家族性白色皱褶性发育不良、纤维肌肉发育不良、骨纤维性结构不良、旺盛骨性发育不良、遗传性肾视网膜发育不良、有汗性外胚层发育不良、少汗性外胚层发育不良、淋巴细胞减少性胸腺发育不良、乳腺发育不良、下颌骨颜面发育不良、干骺端发育不良、蒙蒂尼氏发育不良、单骨纤维性骨发育不良、粘液上皮发育不良、多发性骨骺发育不良、眼耳脊椎发育不良、眼齿指发育不良、眼椎骨发育不全、牙原性发育不良、眼下颌骨发育不良、根尖周牙骨质结构不良、多骨纤维性结构不良、假性软骨发育不全性脊椎骨骺发育不良、视网膜发育不良、中隔 - 眼发育不良、脊椎骨骺发育不良和脑室径向发育不良。

[0439] 可以治疗的其它赘生前病症包括但不限于良性异常增生性病症（例如良性肿瘤、纤维囊性病状、组织肥大、肠息肉或腺瘤和食道发育不良）、粘膜白斑病、角化病、博文氏病、农夫皮肤、日光性唇炎和日光性角化病。

[0440] 在优选的实施方案中，使用本发明的方法抑制癌症，特别是上文所列出的癌症的生长、进展和 / 或转移。

[0441] 其它过度增生性疾病、病症和 / 或病状包括但不限于恶性病和相关病症的进展和 / 或转移，诸如白血病（包括急性白血病（例如急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓细胞性白血病（包括成骨髓细胞性、早幼粒细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病））和慢性白血病（例如慢性骨髓细胞性（粒细胞性）白血病和慢性淋巴细胞性白血病））、真性红细胞增多症、淋巴瘤（例如何杰金氏病和非何杰金氏病）、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病和实体肿瘤，包括但不限于肉瘤和癌瘤，诸如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、韦尔姆斯氏瘤、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

[0442] 表达载体

[0443] 其它实施方案可以涉及包含编码抗体、抗体片段、细胞因子或诸如 DNL™ 构建体的 bsAb 组成融合蛋白质的核酸的 DNA 序列。融合蛋白质可以包含连接于例如 AD 或 DDD 部分

的抗体或片段或细胞因子。

[0444] 各种实施方案涉及包含编码DNA序列的表达载体。载体可以含有编码人免疫球蛋白的轻链和重链恒定区和铰链区的序列，其可以连接嵌合、人源化或人可变区序列。载体可另外含有在选定宿主细胞中表达所编码的蛋白质的启动子、增强子和信号或前导序列。尤其适用的载体是pdHL2或GS。更优选地，轻链和重链恒定区和铰链区可以来自人EU骨髓瘤免疫球蛋白，其中任选地，同种异型位置上的至少一个氨基酸变成在不同的IgG1同种异型中发现的氨基酸，且其中任选地，基于EU编号系统的EU重链氨基酸253可置换成丙氨酸。参见Edelman等，Proc.Natl.Acad.Sci USA 63:78-85(1969)。在其它实施方案中，IgG1序列可转化成IgG4序列。

[0445] 本领域技术人员应认识到基因工程改造表达构建体且插入宿主细胞中以表达经过工程改造的蛋白质的方法在本领域中是熟知的且实际上是常规实验。宿主细胞和克隆抗体或片段的表达方法描述于例如美国专利号7,531,327、7,537,930、7,785,880、8,076,410、8,153,433和8,372,603中，各自的实施例部分以引用的方式并入本文中。

[0446] 试剂盒

[0447] 各种实施方案可涉及含有适合治疗或诊断患者的患病组织的组分的试剂盒。示例性试剂盒可以含有如本文中所描述的一种或多种bsAb、ADC、干扰素和/或检查点抑制子抗体。如果未配制含有供施用的多种组分的组合物以便经由消化道递送，诸如通过口服递送，则可以包括能够通过一些其它途径递送试剂盒组分的装置。用于诸如肠胃外递送的应用的一种类型装置是注射器，其用于将组合物注入受试者体内。还可以使用吸入装置。在某些实施方案中，治疗剂可以呈含有无菌液体制剂或冻干制剂的预填充式注射器或自动注射笔形式提供。

[0448] 试剂盒组分可以包装在一起或分隔于两个或更多个容器中。在一些实施方案中，容器可以是含有适合于复原的组合物的无菌冻干制剂的小瓶。试剂盒还可以含有一种或多种适合于复原和/或稀释其它试剂的缓冲液。可以使用的其它容器包括但不限于袋、盘、盒、管等等。试剂盒组分可以无菌包装和维持于容器中。可以包括的另一个组件是给试剂盒使用者的说明书。

实施例

[0449] 提供以下实施例以说明但不限制本发明的权利要求。

[0450] 实施例1.T-细胞重定向双特异性抗体DOCK-AND-LOCK™(DNL™)复合物

[0451] 若干种类的示例性白细胞重定向双特异性抗体制备为DNL™复合物，如以下所描述。所述复合物有效诱导针对适当靶细胞的免疫应答。

[0452] 材料和方法

[0453] 用于制备和使用DOCK-AND-LOCK™(DNL™)复合物的一般技术描述于以下实施例中。具有CD3和CD19结合位点的示例性白细胞重新定向双特异性抗体制备为DNL™复合物，其被称为(19)-3s(图1)。通过Fd链的羧基末端上的二聚和对接结构域(DDD2)的重组融合来构建抗CD19F(ab)$_2$DNL模块。在添加锚定结构域(AD2)的情况下由Okt3 mAb来设计抗CD3-scFv模块，且以格式V_H-L1-V_K-L2-6H-L3-AD2(公开为SEQ ID NO:105的“6H”)组装，其中经由柔性肽连接子融合V结构域且AD2肽前面是6-His连接子(SEQ ID NO:105)。抗

CD3 可变区、连接子和 AD2 的序列如下所示。

[0454] 抗 CD3 scFv 的 V_H 序列

[0455] QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:96)

[0456] L1 连接子

[0457] GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:97)

[0458] 抗 CD3 scFv 的 V_K 序列

[0459] DIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWTYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIKR(SEQ ID NO:98)

[0460] L2 连接子

[0461] GGGGS(SEQ ID NO:99)

[0462] Poly-His-L3 连接子

[0463] HHHHHHGGGSG(SEQ ID NO:100)

[0464] AD2

[0465] CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC(SEQ ID NO:101)

[0466] 表达载体和 DNL™ 模块 - 构建包含连接于抗 CD3 抗体部分的针对各种疾病相关抗原的抗体部分的 DNL™ 复合物，一般缩写为 (X)-3s bsAb。对于用于制备 (X)-3s bsAb 的各 DNL™ 模块，在 SpESFX-10 小鼠骨髓瘤细胞中开发独立生产细胞系 (Rossi 等，2011，Biotechnol Prog 27:766-75)。合成编码 Okt3scFv-AD2 多肽的 cDNA 序列 (SEQ ID NO:96-101) 且经由 5′ Xba I 和 3′ Eag I 限制位点克隆至 pdHL2 表达载体中。所述构建体包含与 scFv 中的 V_L 融合的 V_H 结构域，其具有结构 V_H-L1-V_K-L2-6H-L3-AD2(公开为 SEQ ID NO:105 的“6H”)。所表达的蛋白质具有来自原始 Okt3 mAb 的两个氨基酸取代。将 CDR-H3 中的半胱氨酸残基变成丝氨酸 (Kipryanov，1997，J Immunol Methods 200:69-77)。将 V_L 中倒数第二个残基由天冬氨酸变成赖氨酸。

[0467] 将 Okt3scFv-AD2 模块与各种 C_H1-DDD2-Fab 模块组合以产生一组 (X)-3s 三价 bsAb(表 6)。如先前针对类似构建体所描述来构建 C_H1-DDD2-Fab-pdHL2 表达载体 (Rossi 等，2008，Cancer Res 68:8384-92)。简而言之，通过用 Sac II 和 Eag I 限制酶切除 C_H1- 铰链 -C_H2-C_H3 结构域的编码序列且置换为用相同酶从 C_H1-DDD2-Fab-hA20-pdHL2 表达载体 (Rossi 等，2008，Cancer Res 68:8384-92) 切下的 C_H1-DDD2 的 507bp 编码序列而由相应的 IgG-pdHL2 表达载体产生编码 C_H1-DDD2-Fab 的表达载体。C_H1-DDD2-Fab 模块来源于人源化 mAb hA19(抗 CD19)、拉贝珠单抗 (hMN-14、抗 CEACAM5)、克里伏单抗 (hPAM4、抗粘蛋白)、hMN-15(抗 CEACAM6)、hRS7(抗 TROP-2)、维妥珠单抗 (hA20、抗 CD20)、hL243(抗 HLA-DR) 和依帕珠单抗 (hLL2、抗 CD22)。被称为 hA19 的 mAb 是由小鼠抗 CD19mAb B43 人源化 (Uckun 等，1988，Blood71:13-29)。各表达载体通过用 Sal I 限制酶消化来进行线性化，且用于通过电穿孔来转染 SpESFX-10 细胞。

[0468] 在含有 0.2 μM 甲氨喋呤 (MTX) 的培养基中选择克隆且通过 ELISA 筛选蛋白质表达。将 Okt3scFv-AD2 俘获在 Ni-NTA HisSorb 板 (Qiagen) 上，且用抗 -AD2mAb 检测。用山羊抗人 κ 链捕获 C_H1-DDD2-Fab 模块，且用山羊抗人 F(ab′)$_2$-HRP 检测。通过逐步增加 MTX 浓度直至 3 μM 来扩增蛋白质表达的生产力。通过亲和色谱法，分别使用 Ni-SEPHAROSE®

和 κ 选择树脂将 Okt3scFv-AD2 和 C_H1-DDD2-Fab 模块从滚瓶培养物的肉汤中纯化至均质。使用 DNL™法经由摩尔当量 Okt3scFv-AD2 与 C_H1-DDD2-Fab 模块的位点特异性缀合来组装 (X)-3s bsAb。举例来说，通过将 22mg Okt3scFv-AD2 与 80mg C_H1-DDD2-Fab-hA19 组合来产生大约 100mg(19)-3s。在室温下用 1mM 还原型谷胱甘肽将混合物还原过夜，随后加入 2mM 氧化谷胱甘肽。通过使用 κ 选择和 Ni-SEPHAROSE® 的连续亲和色谱法从反应混合物中纯化 (19)-3s。按照类似方法，在不同的规模下组装其它 (X)-3s 构建体。

[0469] 表 6. (X)-3s DNL™构建体

[0470]

代码	靶标	C_H1-DDD2-Fab	AD2- 抗 -CD3
(19)-3s	CD19	C_H1-DDD2-Fab-hA19	scFv-AD2-Okt3
(20)-3s	CD20	C_H1-DDD2-Fab-hA20	scFv-AD2-Okt3
(22)-3s	CD22	C_H1-DDD2-Fab-hLL2	scFv-AD2-Okt3
(C2)-3s	HLA-DR	C_H1-DDD2-Fab-hL243	scFv-AD2-Okt3
(M1)-3s	MUC5AC	C_H1-DDD2-Fab-hPAM4	scFv-AD2-Okt3

[0471]

(14)-3s	CEACAM5	C_H1-DDD2-Fab-hMN-14	scFv-AD2-Okt3
(15)-3s	CEACEAM6	C_H1-DDD2-Fab-hMN-15	scFv-AD2-Okt3
(E1)-3s	TROP-2	C_H1-DDD2-Fab-hRS7	scFv-AD2-Okt3

[0472] 分析方法 - 使用具有 BioSuite™ 250、4μm UHR SEC 柱的 Alliance HPLC 系统 (Waters Corp) 进行尺寸排阻高效液相色谱 (SE-HPLC)。利用 1200 系列 HPLC 联合 6210TOF MS(Agilent Technologies,Santa Clara,CA) 来进行电喷雾电离飞行时间 (ESI-TOF) 液相色谱 / 质谱法 (LC-MS)。在 60℃下，使用 30-80％乙腈 /0.1％甲酸水溶液的 14 分钟梯度，利用 Aeris 宽孔 3.6μm C4 柱 (Phenomenex)，通过逆相 HPLC(RP-HPLC) 拆分 (19)-3s。对于 TOF MS，毛细管和碰撞电压分别设定于 5500 和 300V。

[0473] 细胞系和试剂 -Raji、Ramos、Daudi、LS174T 和 Capan-1 细胞系购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC，Manassas，MD)，且 Nalm-6 细胞购自 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellinien(DSMZ,Braunchweig,Germany)。除了 Capan-1 以外，所有细胞系都维持于含有 10％ FBS、1％ L- 谷氨酰胺、1％青霉素 - 链霉素和 1％ MEM 非必需氨基酸的 RPMI-1640 中。用 20％ FBS 维持 Capan-1 细胞。所有细胞培养基和补充物都购自 Life Technologies(Carlsbad,CA)。

[0474] PBMC 和 T 细胞分离 - 使用 UNI-SEP_{MAXI}管 (Novamed，Ltd，Jerusalem，Israel) 从供体全血 (NJ 血站，East Orange，NJ) 纯化人外周血单核细胞 (PBMC)。根据制造商方案，通过使用 Pan T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec，Auburn，CA) 进行阴性选择而从 PBMC 中

分离 CD3 阳性 T 细胞。在用抗 CD3-PE 抗体将经过富集的 T 细胞染色之后，通过 FACS 评估 T 细胞分离效率。在一些情况下，还用 CD-19 和 CD-14 进行进一步染色来鉴别污染细胞。

[0475] T 细胞活化 - 将分离的 T 细胞以 2.25×10^6 个细胞 / 孔的最终密度涂覆于 6 孔组织培养板中。将 Daudi 细胞以 1.5×10^6 个细胞 / 孔的最终密度加入一些孔，其它孔保持仅含 T 细胞。替代地，将 PBMC 以 6×10^6 个细胞 / 孔的最终细胞密度加入 6 孔组织培养板。使各孔的体积达到 3mL。向适当的孔中加入 3ng/mL 的 (19)-3s、(M1)-3s 或 (19)-DDD2。在 37℃下孵育过夜之后，取出 1mL 的各样品。使细胞球团化且在冰上用 CD69-APC 和 CD3-PE 标记 20 分钟。用含 1％ BSA 的 PBS 将细胞洗涤 2 次且使用 FACSCALIBER™流式细胞仪 (BD Biosciences，San Jose，CA) 加以分析。

[0476] T 细胞增殖 - 将 PBMC 以 1×10^6 个细胞 / 毫升的浓度播种于含有指定试剂的 T25 烧瓶中。对于 B 细胞耗竭的烧瓶，根据制造商方案通过使用得自 Miltenyi 的 B 细胞分离试剂盒进行阴性选择来移除 B 细胞。在选择当天，从各烧瓶中取出 100μL 培养基，在冰上用抗 CD7-APC 标记 20 分钟，洗涤一次且再悬浮于含 7-AAD 的 300μL 1％ BSA/PBS 中。对于各样品，使用 FACSCALIBER™流式细胞仪来分析整个体积。各样品重复计数两次。使用 FlowJo 软件进行分析。对于各样品，去除死亡 (7-AAD+) 细胞和残骸 (基于前向相比于侧向分散)。最后，选择活的 CD7+ 细胞且使用 Prism 软件作图。

[0477] 细胞结合测定 (Jurkat/Capan-1)- 用 PKH26 红色荧光细胞连接子试剂盒 (Sigma) 根据制造商方案将 Jurkat 细胞染色。用 5μM CFSE(羧基荧光素双乙酸琥拍酰亚胺基酯，Life Technologies) 根据制造商方案将 Capan-1 细胞染色。将经过标记的 Capan-1 细胞加入 8 孔腔室载玻片 (ThermoWaltham，MA) 且允许连接过夜。第二天，取出培养基且加入处于含有 0.1μg/mL(E1)-3s、(M1)-3s 或 (19)-3s 的培养基中的经 PKH26- 标记的 Jurkat 细胞。在 37℃下孵育 1 小时之后，用 PBS 洗涤载玻片以移除任何未结合的细胞且通过荧光显微术来观察。

[0478] 细胞结合测定 (Jurkat/Daudi)- 分别用抗 CD3-PE 和抗 CD20-FITC 来标记 Jurkat 和 Daudi 细胞。随后在室温下将经过标记的细胞以 2.5 ： 1 比率与 0.1μg/mL(19)-3s 共同孵育 30 分钟。随后通过荧光显微术来观察细胞的等分试样。

[0479] 细胞毒性测定 (血液肿瘤细胞系)- 用 PKH67 绿色荧光细胞连接子试剂盒 (Sigma) 根据制造商方案来标记靶细胞。简而言之，使 5×10^6 个靶细胞再悬浮于 250μL 稀释剂 C 中。在第二个管中，将 1μL PKH26 染料加入 250μL 稀释剂 C。随后将细胞悬浮液加入染料溶液，充分混合且在室温下孵育 2 分钟。通过加入相等体积的 FBS 淬灭反应物。随后用完全 RPMI 将经过标记的细胞洗涤 3 次。在未刺激的情况下，使用经分离的 T 细胞作为效应细胞。将效应细胞和经 PKH67 标记的靶细胞以 10 ： 1 比率组合且涂覆于含有 (19)-3s 或 (14)-3s 的连续稀释的 48 孔板中。各孔含有 5×10^4 个靶细胞和 5×10^5 个效应细胞。在 20％ RPMI 中进行 Jeko-1 测定。在含有 5％ CO_2 的 37℃孵育箱中将板孵育 18-24 小时。在孵育之后，将所有细胞从 48 孔板中移入流式细胞仪管中，且再悬浮于含有 1μg/mL 7AAD(以区分活细胞与死细胞) 和 30,000 个 COUNTBRIGHT™绝对计数珠粒 (Life Technologies) 的 1％ BSA/PBS 中。在 FACSCALIBER™流式细胞仪上分析细胞。对于各样品，8,000 个 COUNTBRIGHT ™珠粒计数作为标准化参考。使用 FlowJo 软件 (Treestar，Inc.，Ashland，OR) 来分析数据。对于各样品，排除死细胞和残骸且对总活靶细胞进行计数。

[0480] 细胞毒性测定（实体肿瘤细胞系）- 按照与用 PKH23 染色相同的程序，用 PKH67 绿色荧光细胞连接子试剂盒 (Sigma) 来标记靶细胞。所使用的效应细胞如下：对于 Capan-1 测定，使用从 CD8+ 富集柱 (R&D Systems,Minneapolis,MN) 纯化之后的 CD8+ 富集 T 细胞。对于 LS174T 细胞：使用在含有 25U/mL IL-2 和 50ng/mL Okt3Mab 的培养基将 PBMC 孵育 5 天之后，随后在含有单独 25U/mL IL-2 的培养基中孵育 2 天的经过刺激的 T 细胞。将效应细胞和经 PKH67 标记靶细胞以 3 ： 1 比率组合 (5×10^4 个靶细胞和 1.5×10^5 个效应细胞 / 孔），且涂覆于含有 (E1)-3s、(14)-3s 或 (19)-3s 的连续稀释液的 48 孔板上。在 20％ RPMI 中进行 Capan-1 测定。在含有 5％ CO_2 的 37℃孵育箱中将板孵育 42-48 小时。孵育之后，将悬浮细胞与来自所有孔的经胰酶消化的连接细胞组合且转移至流式细胞仪管中。将细胞洗涤一次且再悬浮于含有 1ug/mL 7AAD（以区分活细胞与死细胞）和 30,000 个 COUNTBRIGHT™绝对计数珠粒的 1％ BSA/PBS 中。在 FACSCALIBER™流式细胞仪上分析细胞。对于各样品，8,000 个 COUNTBRIGHT™珠粒计数为标准化参考。使用 FlowJo 软件 (Treestar, Inc., Ashland, OR) 来分析数据。对于各样品，排除死细胞和残骸且对总活靶细胞进行计数。

[0481] 体内效力 -8 周龄雌性 NOD/SCID 小鼠是购自 Charles River(Wilmington,MA)。向小鼠 s.c. 注射 Raji(1×10^6) 和人 PBMC(5×10^6 个细胞）与基质胶 1 ： 1 混合的混合物。1 小时后开始治疗。各实验中的治疗方案、剂量和动物数目描述于结果中。每日监测动物的肿瘤长出迹象。一旦肿瘤出现，则对其每周测量两次。通过使用卡尺进行二维测量来确定肿瘤体积 (TV)，体积定义为：$L\times w^2/2$，其中 L 是肿瘤的最长尺寸且 w 是最短的。使用 Prism GraphPad 软件 (v5 ;LaJolla,CA) 通过对数秩检验在 Kaplan-Meier 曲线上使用存活替代端点作为达到 $1.0cm^3$ 的肿瘤进展时间 (TTP) 来确定效力。在 $P < 0.05$ 时认为显著。

[0482] 结果

[0483] 白细胞重定向双特异性抗体的构建和生物化学分析。使用 DNL™方法产生一组白细胞重定向 bsAb 即 (X)-3s 用于靶向各种肿瘤相关抗原，包括 CD19、CD20、HLA-DR、TROP-2、CEACAM5 和 MUC5AC。通过 SE-HPLC 和 SDS-PAGE 分析来证明这些结构的纯度，其中仅代表三种组成多肽 (Okt3scFv-AD2、hA19-Fd-DDD2 和 hA19 κ）的谱带是明显的（数据未示出）。LC-MS 分析鉴别了单个 RP-HPLC 峰，其具有与来自于其推断氨基酸序列的 (19)-3s 的计算质量 (137432.37Da) 一致（质量精确度＝ 11ppm) 的解卷积质谱，包括 Okt3scFv-AD2 和两个 C_H1-DDD2-hA19Fd 链中的每一个上的预测氨基末端焦谷氨酸盐（数据未示出）。未指示其它翻译后修饰，包括糖基化。

[0484] 由 (19)-3s 介导的 Daudi 伯基特淋巴瘤与 T 细胞之间的免疫突触形成。检查白细胞重新定向 (19)-3s DNL™复合物对效应子 T 细胞靶向 $CD19^+$ 淋巴瘤细胞的效应（图 2)。将新鲜分离的 T 细胞以 2.5 ： 1 的 E ： T 比与 Daudi 细胞组合。在室温下用 0、1 或 5 μg/mL 的 (19)-3s DNL™复合物将细胞处理 30 分钟，随后通过流式细胞术加以分析。分别使用抗 CD20-FITC 和抗 CD7-APC 来鉴别 Daudi 和 T 细胞。共结合指示为 $CD20^+/CD7^+$ 事件的％。用 (19)-3 处理之后，45.5％的流动事件是 CD20/CD7 双阳性的，表明 Daudi 与 T 细胞形成突触（图 2A)，与对不含抗体的混合细胞所测量的 2％（图 2B) 形成对比。加入 (19)-3s 导致＞ 90％的 Daudi 与 T 细胞缔合（图 2C)。这些结果表明 (19)-3s DNL™复合物可有效地将 T 细胞引导至表达目标抗原的淋巴瘤细胞。

[0485] 通过荧光显微术来证明 T 细胞与靶淋巴瘤细胞之间的突触形成（图 3)。将

Jurkat(T 细胞）和 Daudi(B 细胞）以 1 ： 1 比率组合，用 0.1 μg/mL(19)-3s DNL™复合物处理 30 分钟，且用抗 CD20-FITC（图 3A）和抗 CD3-PE（图 3B）染色，随后通过荧光显微术加以分析。合并的图像（图 3C）显示经绿色染色 Daudi 与经红色染色 Jurkat 细胞之间的突触形成。在不存在 (19)-3s 的情况下突触形成不明显（图 3D）。图 3C 显示靶淋巴瘤细胞与目标 T 细胞直接接触。

[0486] 对于 (19)-3s 介导的 T 细胞与示例性 B 细胞淋巴瘤细胞系缔合，进行剂量反应系列（图 4）。如图 4 中所示，在本实验的条件下，(19)-3s 介导的 T 细胞与靶细胞的细胞与细胞缔合在介于 0.037 与 0.111 μg/ml 之间的 DNL™复合物浓度下达到饱和。

[0487] 图 5 示出了 BITE®（图 5A）、DART™（图 5A）和 DNL™（图 5B）抗 CD3× 抗 CD19 复合物使 T 细胞重新定向于目标 $CD19^+$ B 细胞的相对效力的比较。BITE®和 DART™的数据是获自 Moore 等 (2011，Blood 117 :4542-51)。在 0.0005 μg/ml 的最低测试浓度下，(19)-3s DNL™复合物比 BITE®或 DART™更有效地使 T 细胞靶向 B 细胞淋巴瘤（图 5）。与相当的 BITE®和 DART™复合物相比，(19)-3s DNL™复合物也诱导稍高最大水平的细胞与细胞缔合（图 5A）。虽然难以从 (19)-3s DNL™复合物产生的单个数据点来推断，但 BITE®、DART™和 DNL™的 EC_{50} 水平似乎是相似的（图 5）。

[0488] (19)-3s、(E1)-3s 和 (M1)-3s 介导的 T 细胞与靶肿瘤细胞的细胞 -细胞缔合。为了评估 T- 细胞重新定向 BsAb 促进 T 细胞与其靶肿瘤细胞缔合的能力，将 Jurkat T 细胞与含有 (X)-3s 的靶肿瘤细胞共同孵育，且通过流式细胞术和荧光显微术加以评估。Jurkat T 细胞是 CD4+T 细胞白血病细胞系，针对其在各种浓度的 (19)-3s 的存在下显示 T 细胞结合而不耗竭经 FITC 标记的 Daudi 细胞的能力加以选择，且通过流式细胞术加以分析，以检测指示 T 细胞 -B 细胞缔合复合物的双阳性 (CD3+CD20+) 群体。在用 0.5ng/mL(19)-3s 处理之后可见明显细胞 - 细胞缔合，且用 0.1 μg/m 处理之后，超过 25％的细胞群体存在于细胞 - 细胞缔合中（图 5）。荧光显微术支持此数据，因为在用 0.1 μg/mL(19)-3s 处理之后，免疫突触是明显的（图 4）。在不存在 (19)-3s 的情况下，未见突触形成（数据未示出）。

[0489] 胰腺肿瘤细胞系 Capan-1 中也观察到了这种细胞 - 细胞缔合（图 6）。Capan-1 表达高水平的 TROP2 和中等水平的 MUC5AC。因此，将 TROP2 靶向 bsAb(E1)-3s（图 6C）和 MUC5AC 靶向 bsAb(M1)-3s（图 6B）与非靶向对照 bsAb(19)-3s（图 6A）相比较。在这些 bsAb 存在下将经 CFSE 标记的 Capan-1 细胞与经 PKH26 标记的 Jurkat 共同孵育。如预期，荧光显微术显示由 (E1)-3s 介导的大 T 细胞 /Capan 复合物，随后为由 (M1)-3s 介导的较小但大量的复合物和 (19)-3s 处理后相对较低的复合物形成（图 6）。

[0490] (19)-3s 特异性诱导 T 细胞活化和增殖。在 PBMC 中（图 7A）或在与 Daudi B 细胞共同孵育的 T 细胞中（图 7B），通过测量 T 细胞活化早期标记物 CD69 的表达水平来评估 (19)-3s 活化 T 细胞的能力。用 3ng/mL(19)-3s 处理在与 Daudi B 细胞共同孵育的 T 细胞中诱导 T 细胞活化，如与非靶向对照抗体 (19)-DDD2 和 (M1)-3s 以及在无 Daudi 靶细胞的情况下用 (19)-3s 处理的 T 细胞相比，CD69 表达增加＞ 50 倍所指示（图 7B）。在抗体与含有 T 和 B 细胞的 PBMC 一起孵育时，观察到相似结果 ；(19)-3s 刺激 CD69 表达水平比非靶向对照高＞ 20 倍（图 7A）。在不存在靶细胞的情况下，经 (19)-3s 处理的纯化 T 细胞不显示活化（图 7C）。

[0491] 在用各种 CD3 靶向抗体处理 PBMC 之后评估 T 细胞增殖作为 T 细胞活化的另一个指示。(19)-3s 在 3nM 或 30pM 下诱导的 T 细胞增殖类似于阳性对照 IL-2/PHA(图 8A)。非靶向对照抗体 (14)-3s 在最高 (3nM) 浓度下显示一些非特异性 T 细胞增殖 (图 8A)。然而,在耗竭 B 细胞的 PBMC 中未观察到 T 细胞增殖 (图 8B),表明靶细胞对特异性 (19)-3s 诱导的 T 细胞增殖是必需的。

[0492] (X)-3s 重定向的 T- 细胞介导的杀灭恶性肿瘤细胞系。各白细胞靶向分子的细胞毒性是通过其介导特定肿瘤靶细胞溶解的能力加以评估。对于血液肿瘤细胞系,在 18-24 小时测定中,使用未受刺激的富集 T 细胞群体作为效应细胞的 10 ∶ 1E ∶ T 比显示最佳测定条件。CD19 靶向 bsAb(19)-3s 诱导相对较低 CD19 表达的细胞系 Ramos(IC_{50}= 0.17pM,溶解 $_{Max}$= 79%)、Daudi(IC_{50}= 1pM,溶解 $_{Max}$= 60%) 和 Nalm6(IC_{50}= 6pM,溶解 $_{Max}$= 93%) 的最有效特异性杀灭 (图 9A)。令人感兴趣的是,高 CD19 表达细胞系 Namalwa(IC_{50}= 63pM,溶解 $_{Max}$= 60%) 和 Raji(IC_{50}= 3nM,溶解 $_{Max}$= 41%) 对于 (19)-3s 的敏感性最小 (图 9A)。非靶向 (14)-3s DNL™构建体在所测试的任何细胞系中均具有极小细胞毒性效应 (图 9B)。用获自两个不同的供体的 PBMC 来获得 (19)-3s 构建体对于 Nalm-6ALL 细胞系的一致细胞毒性效应 (图 9C)。

[0493] 在若干个细胞系中测定 (20)-3s、(22)-3s 和 (C2)-3s T 细胞重新定向 bsAb 的体外细胞毒性效应 (图 10)。CD22 靶向 bsAb(22)-3s 在 CD22 阳性 Daudi 细胞系中显示有效的 (IC_{50}= 5pM,溶解 $_{Max}$= 60%) 特异性 T 细胞介导的溶解 (图 10C),但在 CD22 阴性 Namalwa 细胞中不显示 (图 10A)。

[0494] 与较低 CD20 表达 Namalwa 细胞系 (IC_{50}= 30pM,溶解 $_{Max}$= 53%) (图 10A) 相比,CD20 靶向 bsAb(20)-3s 在较高表达 CD20 细胞系 Daudi(IC_{50}=< 0.3pM,溶解 $_{Max}$= 90%) (图 10C) 和 Jeko(IC_{50}= 1pM,溶解 $_{Max}$= 90%) (图 10B) 中显示最高效力。

[0495] 在表达 HLA-DR 的 Jeko-1 细胞系 (IC_{50}= 20pM,溶解 $_{Max}$= 88%) 中测试 HLA-DR 靶向 bsAb(C2)-3s(图 10B)。

[0496] 在 10 ∶ 1 的 E ∶ T 比下,使用分离的 T 细胞作为效应细胞,bsAb 在各种 B 细胞恶性病中诱导有效 T 细胞介导的细胞毒性,包括伯基特淋巴瘤 (Daudi、Ramos、Namalwa)、套细胞淋巴瘤 (Jeko-1) 和急性淋巴细胞性白血病 (Nalm-6)(表 7)。非肿瘤结合对照 (14)-3s 在> 10nM 下仅诱导中度 T- 细胞杀灭。对于 T 细胞重新靶向效力,抗原 / 表位的性质,尤其是其尺寸和与细胞表面的接近程度,似乎比抗原密度更重要 (表 7)。可能 (20)-3s 始终比 (19)-3s 和 (C2)-3s 更有效,即使在 CD19 或 HLA-DR 的表达大大高于 CD20 时,分别如在 Namalwa 和 Jeko-1 的情况下所见 (表 7)。这可能是因为 CD20 表位包括紧密邻近细胞表面的小细胞外环。当使用 Daudi 直接比较时,(22)-3s 具有最低有效性。与 CD19 和 CD20 相比,以最低密度表达的 CD22 是快速内在化抗原,且其表位更远离细胞表面。这些因素中的每一个都可能造成其效力下降。最后,对 T 细胞重新靶向杀灭的敏感性具有细胞系依赖性,如使用 (19)-3s 所观察,其中 Raji(IC_{50}> 3nM) 在很大程度上无反应,而 Ramos(IC_{50}= 2pM) 具有高敏感性,尽管前者表达较高 CD19 抗原密度 (表 7)。

[0497] 总之,(19)-3s、(20)-3s、(22)-3s 和 (C2)-3s 同时结合于 T 细胞和靶 B 细胞,且在体外诱导 T 细胞介导的杀灭。DNL 方法的模块化性质允许快速产生若干种相关缀合物以用于各种 B 细胞恶性病的重新定向白细胞杀灭,而无需额外重组工程改造和蛋白质产生。

CD20 细胞外表位与细胞表面的紧密邻近性导致 (20)-3s 的效力最高。

[0498] 表 7. 离体重定向的 T 细胞灭杀

[0499]

细胞系	类型[1]	抗原表达[2]				IC_{50}[4] (pM)			
		CD19	CD20	CD22	HLA-	(19)-3s	(20)-	(22)-3s	(C2)-
Daudi	BL	1.00	1.00	1.00	1.00	1	0.3	6	N.D.
Ramos	BL	0.76	0.65	0.26	0.36	2	0.4	N.D.	2
Nalm-6	ALL	1.63	0.05	0.19	0.17	6	N.D.	N.D.	N.D.
Namalwa	BL	0.76	0.11	0.05	0.40	63	30	>3000	N.D.
Raji	BL	1.41	0.69	0.59	0.84	>3000	N.D.	N.D.	N.D.
Jeko-1	MCL	0.89	1.02	0.05	1.06	3000	1	N.D.	20

[0500] B L，伯基特淋巴瘤；ALL 急性淋巴细胞性白血病；MCL，套细胞淋巴瘤。通过流式细胞术测定表达水平且相对于 Daudi 的表达水平进行标准化。IC_{50}，实现 50％靶细胞杀灭的皮摩尔浓度。

[0501] 白细胞重定向 bsAb 的体外细胞毒性效应也在实体肿瘤细胞中确定（图 11）。对于实体肿瘤细胞系，最佳测定条件确定为在 42-48 小时测定中使用经过刺激的 T 细胞的 3 ： 1E ： T 比。各 bsAb 诱导肿瘤靶细胞的特异性 T 细胞介导的溶解。在用 (14)-3s 处理之后，表达 CEACAM5 的人类结肠腺癌细胞系 LS-174T 显示有效特异性溶解 (IC_{50}= 2pM)（图 11A）。(E1)-3s 介导了表达 Capan-1 人胰腺癌细胞系的 TROP2 的有效特异性溶解 (IC_{50}= 29pM)（图 11B）。表达高水平的 CEACAM6 和 TROP 2 的胃癌细胞系 NCI-N87 对 T 细胞靶向分子 (15)-3s 和 (E1)-3s 显示非常有效的特异性溶解（分别 IC_{50}= 3pM 和 0.85pM)（图 11C）。对于 Capan-1 和 LS174T，非靶向对照抗体 (19)-3s 在＞ 1nM 的浓度下诱导低（＜ 20％）非特异性溶解，且在 NCI-N87 细胞中诱导中度（～ 40％）非特异性溶解（图 11A-C）。各种白细胞重定向 bsAb 在各种肿瘤细胞系中的体外细胞毒性数据的汇总示于图 12 中。各种构建体显示目标肿瘤细胞的最大细胞溶解高达 90％或更大，其中表达目标抗体的细胞系的 IC_{50} 值一般在低皮摩尔范围内（图 12）。

[0502] 实施例 2. 白细胞重定向 DNL™复合物的体内研究

[0503] 较小（＜ 60kDa）基于 scFv 的构建体，诸如BITE®和 DART™的一个潜在限制是需要通过长期连续输注来施用，这是因于其毒性和从循环中快速清除。因为DNL™ bsAb 的分子尺寸高于典型地与肾清除率相关联的阈值，所以它应展现从循环中较慢清除。在单次静脉内推注 5mg/kg(19)-3s bsAb 之后，我们测量小鼠的药代动力学参数（数据未示出）。观察到双阶段清除，t1/2α 和 t1/2β 分别是 1.1 和 5.1h，从而产生 1880pmol*h/mL 的曲线下面积（数据未示出），比在相同摩尔浓度下施用的 MT103（抗 -CD19× 抗 -CD3 BITE®）所报告的结果大几乎 6 倍（美国专利 US2010/0303827A1）。主要差异显然是 (19)-3s 的 t1/2α 更长（数据未示出）。因为 (19)-3s 的潜在有利性质，我们评估使用较低频率给药方案而非动物研究中典型地用于BITE®的每日给药的可能性。

[0504] 在用人 PBMC 重构的 NOD/SCID 小鼠中使用 Raji 人伯基特淋巴瘤异种移植物来进行前瞻性研究（图 13、图 14）。将 Raji 细胞 (1×10^6个细胞 / 小鼠）与自单一健康供体新鲜分离的 PBMC(5×10^6个细胞 / 小鼠）组合，与基质胶 1 ： 1 混合，且在第 0 天经 SC 注入所有研究动物体内。5 只小鼠的群组接受 i.v. 注射的 (19)-3s，共计第 0 天 130 μg 作为单

剂量（图 13B）、三个剂量的 43 μg（第 0、2 和 4 天）（图 13C）或五个每日剂量的 26 μg（第 0 至 5 天）（图 13D）。接种相同细胞混合物但未接受 (19)-3s 的未处理组（图 13A）的中值存活时间 (MST) 是 31 天。各治疗方案改善存活时间 ($p \leq 0.05$)，其中三个剂量（每隔一天）方案提供最大的存活益处 (MST = 91 天；$P = 0.0018$，通过对数秩分析）。

[0505] 开始随访研究以确定较低频率给药的效力（图 14）。9 只 NOD/SCID 小鼠的群组以与上述类似的方式接种 Raji 和 PBMC。在此项研究中，与第一个研究中的一周相比，治疗延长两周。群组接受 i.v. 注射 (19)-3s，共计 360 μg，作为 2×130-μg（图 14B）、4×65-μg（图 14D）或两周内 6×43-μg 剂量（图 14E）。经 SC 而非 i.v. 向另一群组施用 2×130-μg 剂量（图 14C）。为了比较，制备未经处理小鼠（图 14A）或经非靶向 (M1)-3s 抗体处理的小鼠（图 14F）的对照组。截至第 28 天，各 (19)-3s 治疗组具有比未治疗的对照显著更小的 AUC（$P < 0.05$）。令人惊讶的是，经由皮下途径的两个每周剂量显然与更大频率 i.v. 给药 - 样有效。

[0506] 还使用实体肿瘤进行体内研究（图 15）。对于 LS174T 结肠腺癌（图 15A、图 15B）或 Capan-1 胰腺癌（图 15C、图 15D），如上所述来制备 NOD/SCID 小鼠异种移植物。在各情况下，与对照相比，施用靶向 (E1)-3s（图 15B）或 (14)-3s（图 15D）bsAb DNL™构建体的小鼠显示改善的存活时间。

[0507] 总之，白细胞重新靶向 bsAb，包括 (19)-3s、(E1)-3s 和 (M1)-3s DNL™构建体经由分别与 CD3 和 CD19 的一价和二价结合来介导 T 细胞分别与 B 细胞、结肠腺癌或胰腺癌细胞之间的突触形成。通过在 pM 浓度下的 DNL™ bsAb 在离体环境中诱导 T 细胞活化、增殖和靶细胞杀灭。与在动物模型中每日 i.v. 施用且在临床上连续输注的 BITE® 或 DART™构建体相比，DNL™ bsAb 的有利性质，包括二价肿瘤结合和较慢清除，将允许较低频率给药和可能经 SC 施用。DNL™方法的模块化性质允许快速产生很多相关缀合物以便重新定向的白细胞杀灭各种恶性病，而无需进行额外重组工程改造和蛋白质产生。

[0508] 本领域技术人员应认识到结合于 CD3 或其它白细胞抗原的其它抗体以及结合于 CD19 或其它疾病相关抗原的其它抗体在本领域中是已知的，且任何此类抗体均可用于使用本领域中熟知的技术制备 $F(ab)_2$、scFv 或其它抗体片段。此类替代抗体或其片段可用于本发明方法和组合物中。如以下所论述，制造 DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) 复合物的方法可用于将任何已知抗体或抗体片段并入稳定的生理活性复合物中。

[0509] 实施例 3. 干扰素 -α 增强白细胞重定向双特异性抗体的细胞毒性效应

[0510] 针对由 hRS7 和 OKT3 制备为 DNL™复合物的抗人 Trop-2× 抗人 CD3 双特异性抗体 (E1)-3s) 在与人 T 细胞混合且注入小鼠中时延迟 Capan-1 人胰腺癌肿瘤细胞的肿瘤生长的能力来测试其治疗效力。还评估了干扰素 -0（呈 E1*-2b 或 PEGASYS® 形式）在与此疗法组合时的效应。

[0511] 方法

[0512] 向五周龄雌性 NOD/SCID 小鼠 s.c 注射 Capan-1（5×10^6 个）和人 T 细胞（2.5×10^6 个细胞）与基质胶 1 ：1 混合的混合物（E ：T 比 1 ：2）。存在六个不同的治疗组，各有 8 只小鼠。治疗由在施用 Capan-1/T 细胞混合物之后 1 小时开始每天 i.v. 接收 47 μg (E1)-3s 持续五天的一个群组组成。两个群组用等摩尔量的 IFN 治疗，一组接受由 IFN-α 2b-DDD2-CK-hRS7IgG1 制备的 DNL 分子 (E1*-2b；每周 s.c 2.5 μg×4 周），而另一组

接受PEGASYS®(Roche;每周 s.c 0.6μg×4 周)。其它两组接受(E1)-3s 加 E1*2b 或(E1)-3s 加PEGASYS®的组合。最后一组对照组保持未处理。表 8 汇总了各个治疗组。

[0513] 表 8.(E1)-3s 疗法的治疗组

[0514]

人胰腺癌异种移植物(Capan-1)用于 NOD/SCID 小鼠的(E1)-3s 疗法			
组别	(N)	注射量	方案
1	8	未处理	N.A.
2	8	(E1)-3s (47 g i.v.)	qdx5
3	8	E1*-2b (2.5 g s.c.)	qwkx4

[0515]

4	8	PEGASYS® (0.6 g s.c.)	qwkx4
5	8	(E1)-3s + E1*-2b	qdx5 + qwkx4
6	8	(E1)-3s + PEGASYS	qdx5 + qwkx4

[0516] 每日监测小鼠的肿瘤长出迹象。一旦肿瘤开始出现,所有动物的肿瘤每周测量两次。如果其肿瘤体积大小超过 1.0cm^3,则对小鼠施以安乐死以获得疾病进展。

[0517] 结果

[0518] 各个组的平均肿瘤体积示于图 16 中。为了清楚起见,含有PEGASYS®组的数据(图 16B)与 E1*2b 组(图 16A)分开示于图中。直至第 29 天,当与未治疗小鼠相比时,所有治疗就曲线下面积(AUC)而言在控制肿瘤生长方面显著较好,此时对未治疗组中的第一只小鼠施以安乐死以获得疾病进展(P < 0.0009;AUC_{29}天)。(E1)-3s 与 PEGASYS®的组合在肿瘤长出方面引起最佳总体抗肿瘤反应(图 16B)。此治疗比任何个别治疗显著更好(P < 0.042;AUC),以及优于(E1)-3s 加 E1*-2b 的组合(P = 0.0312;AUC_{53}天)(图 16A)。当与单独 E1*2b 或PEGASYS®相比时,(E1)-3s 加 E1*2b 的组合可显著控制肿瘤生长(P < 0.0073;AUC_{46}天),但与单独(E1)-3s 相比则不然(图 16A-B)。经(E1)-3s、PEGASYS®或 E1*-2b 治疗的小鼠之间无显著差异(图 16A-B)。

[0519] 就存活时间而言,当与未治疗的小鼠相比时,所有治疗均提供显著存活益处(P < 0.0112;对数秩)(图 17)。截至第 81 天,在经(E1)-3s 加 E1*-2b 的组合治疗的小鼠与经(E1)-3s 加PEGASYS®治疗的小鼠之间不存在显著中值存活时间(MST)差异(分别 MST = 79.5 和 > 81 天)(图 17)。与任何个别治疗相比,经(E1)-3s 加PEGASYS®治疗的小鼠具有显著改善的存活结果(P < 0.0237)(图 17)。经(E1)-3s 加 E1*2b 治疗的小鼠在与经单独 E1*-2b 治疗的小鼠相比时具有存活益处(MST = 53 天;P < 0.0311),但在与

仅经 (E1)-3s 或PEGASYS®治疗的小鼠相比时则不然（分别 MST = 68 天和 53 天）（图 17）。用 (E1)-3s 治疗在与用 E1*-2b 治疗的小鼠相比时显著改善存活时间 (P = 0.0406)，但在与用单独PEGASYS®治疗的小鼠相比时则不然（图 17）。在仅用 E1*2b 治疗的小鼠与用单独 PEGASYS®治疗的小鼠之间无显著差异（图 17）。

[0520] 结果显示加入干扰素 -α 在与白细胞重定向 bsAb 组合时大幅增加存活时间且削弱肿瘤生长。本领域技术人员应认识到，在加入 I 型或 III 型干扰素（干扰素 -α、干扰素 -β 或干扰素 -λ）的情况下所观察到的改善功效不限于特定 (E1)-3s bsAb，而是在制备为DNL™复合物或其它形式的其它白细胞重定向bsAb，诸如 BITE®或DART™的情况下都将观察到。

[0521] 实施例 4. 对含白细胞重定向双特异性抗体的干扰素 -α 组合疗法的进一步研究

[0522] 在以上实施例中，(E1)-3s 加 PEGASYS®的组合被证明在控制肿瘤生长方面是非常有效的治疗。为了证实这些结果且对其进行延伸，进行了研究，其中加入两个新群组。首先包括 (E1)-3s 对照组，其中向动物施用等摩尔量的 TF12。TF12 由与一个非靶向 679Fab（抗 HSG）连接的两个 hRS7-Fab 分子组成。另外，因为 Capan-1 对 IFN 敏感，所以加入另一组，其中在不利用 T 细胞的情况下评估PEGASYS®对 Capan-1 肿瘤生长的效应。

[0523] 在给小鼠 (40) 注射 Capan-1/T 细胞混合物之后，将其随机分成五个治疗组。一小时后，一个 11 只小鼠的群组每天 i.v. 接受 47 μg(E1)-3s，肿瘤细胞注射后 1h 开始且持续连续四天 (qdx5)。一个 7 只动物的群组每周经皮下接受呈 PEGASYS®形式的干扰素持续四周。另一组接受 i.v.(E1)-3s 加 s.c. PEGASYS®的组合。未处理的对照动物接受 Capan-1/T 细胞但无治疗。另一对照组接受用量以摩尔数计相当于 (E1)-3s 的 TF12(57 μg qdx5)。第 6 组小鼠 (8 只动物）接受单独注射仅 Capan-1 细胞（即，无 T 细胞）且经PEGASYS®治疗。所有疗法注射都是以 100 μL 的体积进行。表 9 汇总了各个组。

[0524] 表 9.(E1)-3s 和 TF12 疗法的治疗组

[0525]

人胰腺癌异种移植物(Capan-1)用于 NOD/SCID 小鼠的(E1)-3s 疗法			
组别	(N)	注射量	方案
1	7	未治疗 (Capan-1 +仅 T 细胞)	N.A.
2	11	(E1)-3s (47 μg i.v.)	qdx5
3	7	TF12 (57 μg i.v.)	qdx5
4	7	PEGASYS® (0.6 μg s.c.)	qwkx4
5	8	(E1)-3s + PEGASYS®	qdx5 + qwkx4
6	8	PEGASYS® (0.6 μg s.c.) (仅 Capan-1 细胞)	qwkx4

[0526] 每日监测小鼠中肿瘤长出的迹象。一旦肿瘤开始出现后，每周两次测量所有动物的肿瘤。若其肿瘤体积尺寸超过 1.0cm^3，则对小鼠施以安乐死以获得疾病进展。

[0527] 结果

[0528] 示出了平均肿瘤生长（图 18）和存活曲线（图 19）。尽管彼此并无不同，但当与 TF12 和未治疗对照组相比时经 (E1)-3s、PEGASYS®或PEGASYS®（无 T 细胞）治疗的小鼠显示了显著的抗肿瘤效应 ($P < 0.0102$;AUC)。在本实验结束当天（第 59 天），经 (E1)-3s 加PEGASYS®组合治疗的小鼠的平均肿瘤体积是 0.083±0.048cm^3。总体上，该处理组在与所有其它治疗组相比时显示显著的抗肿瘤效应 ($P < 0.0072$;AUC)。

[0529] 与 TF12 和未处理对照组相比，各个别治疗（PEGASYS®、PEGASYS®无 T 细胞和 (E1)-3s) 显著提高了存活时间 ($P < 0.0059$;对数秩）（图 18、图 19)。除了 (E1)-3s 加 PEGASYS®组合，所有群组都达到了它们相应的 MST。在该组合组中，未对动物施以安乐死以获得疾病进展 (TV > 1.0cm^3)。重要的是，当与所有其它治疗相比时，(E1)-3s 加 PEGASYS®组合提供显著的存活效益 ($P < 0.0007$;对数秩）（图 18、图 19)。

[0530] 实施例 5. 含 T 细胞重定向双特异性抗体的干扰素 -α 组合疗法在人胃癌中的效应

[0531] 使用前两个实施例中所公开的方法和组合物来研究单独或与干扰素 -α（PEGASYS®）组合的白细胞重定向 bsAb 在 IFN 难治性 NCI-N87 人胃肿瘤细胞系中的效应。对小鼠 s.c 注射与基质胶混合的 5×10^6个 NCI-N87 细胞 +2.5×10^6个 T 细胞 (1 ： 2E ： T 比）且在 1h 后开始治疗。治疗组示于表 10 中。

[0532] 表 10. (E1)-3s 和 TF12 疗法的治疗组

[0533]

人胃癌异种移植物(NCI-N87)用于 NOD/SCID 小鼠的(E1)-3s 疗法			
组别	(N)	注射量	方案
1	8	未治疗 (NCI-N87+仅 T 细胞)	N.A.
2	8	**(E1)-3s** (47 μg i.v.)	qdx5
3	8	**TF12** (57 μg i.v.)	qdx5
4	8	**PEGASYS** (0.6 μg s.c.)	qwkx4
5	8	**TF12** + **PEGASYS**	qdx5 + qwkx4
6	8	**(E1)-3s** + **PEGASYS**	qdx5 + qwkx4

[0534] 单独或与干扰素组合的白细胞重定向 bsAb(E1)-3s 的效应示于图 20 和图 21 中。(E1)-3s bsAb 能有效减缓胃癌的肿瘤生长且增加存活时间。与干扰素 -α 组合甚至显著增强了白细胞重定向 bsAb 在干扰素抗性肿瘤中的效应。组合疗法比单独添加任一药剂更有效。与未处理的动物相比,经单独或与干扰素 -α 组合的 TF12bsAb 治疗的小鼠对照显示对肿瘤生长或死亡率具有极小的效应。

[0535] 实施例 6. 抗体 - 药物缀合物 (ADC) 在人胰腺癌或结肠癌的临床前模型中的体内治疗性用途

[0536] 如先前所描述来制备 CL2A-SN-38 抗体缀合物(参见例如美国专利号 7,999,083 和 8,080,250)。将带有皮下人类胰腺或结肠肿瘤异种移植物的免疫受损无胸腺裸鼠(雌性)用特定 CL2A-SN-38 缀合物或对照缀合物治疗,或保持未处理。观察特定缀合物的治疗效力。在 Capan1 胰腺肿瘤模型中,与对照 hA20-CL2A-SN-38 缀合物(抗 CD20)和未处理对照(未示出)相比,hRS7(抗 TROP2)、hPAM4(抗 MUC5ac)和 hMN-14(抗 CEACAM5)抗体的特定 CL2A-SN-38 缀合物显示更好的效力。类似地,在人胰腺癌的 BXPC3 模型中,与对照治疗(未示出)相比,特定 hRS7-CL2A-SN-38 显示更好的治疗效力。同样,在人结肠癌的侵袭性 LS174T 模型中,用特定 hMN-14-CL2A-SN-38 治疗比不治疗(未示出)更有效。

[0537] 实施例 7. 使用 ADC hMN-14-[CL2-SN-38]、IMMU-130 在体内治疗裸鼠中的 GW-39 人结肠肿瘤肺转移

[0538] 通过 i.v. 注射 GW-39 人结肠肿瘤悬浮液在裸鼠中建立结肠癌的肺转移模型,且在 14 天后开始治疗。使用不同的剂量,以 q4d×8 剂量方案注射特定抗 CEACAM5 抗体缀合物 hMN14-CL2-SN-38 以及非靶向抗 CD22MAb 对照缀合物 hLL2-CL2-SN-38 和 hMN14 与 SN-38 的等剂量混合物。在 hMN-14ADC 情况下观察选择性治疗效应(未示出)。在 250μg 剂量下,经 hMN14-CL2-SN-38 治疗的小鼠显示大于 107 天的中值存活时间。经不特异性靶向肺癌细胞的对照缀合抗体 hLL2-CL2-SN-38 治疗的小鼠显示 77 天的中值存活时间,而经未缀合 hMN14IgG 和游离 SN-38 治疗的小鼠显示 45 天的中值存活时间,与未处理的生理盐水对照(43.5 天)相当。实质上比未缀合抗体和单独游离化学治疗剂更有效的缀合癌细胞靶向

抗体 -SN-38 缀合物的有效性的显著且令人惊讶的增加清楚可见（未示出）。还观察到了缀合抗体的治疗效应的剂量反应性（未示出）。这些结果显示在同一体内人类肺癌系统中 SN-38 抗体缀合物与未缀合抗体和游离 SN-38 的组合效应相比具有明显的优越性。

[0539] 实施例 8. ADC(IMMU-132 或 hRS7-SN-38) 用于治疗疗法难治性转移性结肠癌 (mCRC) 的用途

[0540] 患者是患有 mCRC 的 62 岁妇女，其最初在 2012 年 1 月呈现转移性疾病。她在诊断后数周进行了腹腔镜回肠横向结肠切除术作为第一疗法，且随后在新辅助情形下接受 4 个循环的 FOLFOX（甲酰四氢叶酸、5- 氟尿嘧啶、奥沙利铂）化学疗法，随后在 2012 年 3 月进行了右侧肝切除术以去除右肝叶中的转移性病变。这之后在 2012 年 6 月恢复辅助 FOLFOX 方案，持续总计 12 个 FOLFOX 循环。8 月份由于神经毒性加剧而从该方案中减去奥沙利铂。她的最后一个 5-FU 循环是在 2012 年 09 月 25 日。

[0541] 2013 年 1 月进行的 CT 显示转移至肝脏。她随后被评估为参与 IMMU-132(hRS7-SN-38) 调查型研究的良好候选人。她的病历中的并存病包括哮喘、糖尿病、高血压、高胆固醇血症、心杂音、食管裂孔疝、甲状腺机能减退、腕管综合征、青光眼、抑郁、不宁腿综合征和神经病。她的手术史包括输卵管结扎 (1975 年）、甲状腺切除术 (1983 年）、胆囊切除术 (2001 年）、腕管解除 (2008 年）和青光眼手术。

[0542] 在进入本疗法时，她的目标病变是左肝叶中的 3.1cm 肿瘤。非目标病变包括肝脏中的若干个低衰减块。她的基线 CEA 是 781ng/mL。

[0543] 按照每周一次的方案通过输注连续 2 周给予 IMMU-132，随后停止一周，由此构成治疗循环。在耐受时重复这些循环。第一次 IMMU-132 输注 (8mg/kg) 开始于 2013 年 2 月 15 日，且在无值得注意的事件的情况下完成。她在第一个循环过程中经历了恶心 (2 级）和疲劳 (2 级），且继续治疗，从那以后没有重大不利事件。她在 2013 年 3 月报告了脱发和便秘。通过计算机断层扫描 (CT)，2013 年 4 月 8 日进行（在 6 个剂量之后）的第一次反应评估显示目标病变收缩 29％。2013 年 3 月 25 日，她的 CEA 水平降至 230ng/mL。在 2013 年 5 月 23 日的第二次反应评估 (10 个剂量之后）中，目标病变收缩 39％，因而根据 RECIST 标准构成部分响应。她继续治疗，接受了由 12 个剂量的 8mg/kg hRS7-SN-38(IMMU-132) 构成的 6 个循环。她的总体健康状况和临床症状自开始该调查型研究开始得到了相当大的改良。

[0544] 实施例 9. IMMU-132 用于转移性实体癌症的 ADC 疗法

[0545] IMMU-132 是包含通过 pH 值敏感性连接子与 hRS7 抗 Trop-2 人源化单克隆抗体缀合的 CPT-11 活性代谢物 SN-38 的 ADC（平均药物 - 抗体比＝ 7.6)，当与 Trop-2 结合时，其展现快速内在化。IMMU-132 靶向以高流行率和特异性表达于许多癌瘤中的 I 型跨膜蛋白 Trop-2。此本实施例报告了在 3 种（中值）先前治疗（一些包括拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 抑制药物）失败后的 25 名不同的转移性癌症（胰腺癌，7 例；三阴性乳腺癌 [TNBC]，4 例；结肠直肠癌 [CRC]，3 例；胃癌，3 例；食道癌、前列腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌 [SCLC]、肾癌、扁桃体癌、膀胱癌，各 1 例）患者的 I 期临床试验。

[0546] IMMU-132 以重复 21 天循环施用，在第 1 天和第 8 天给予各治疗。在 3+3 试验设计中，起始剂量为 8mg/kg/ 剂量（即，16mg/kg/ 循环），且升高至 18mg/kg 直至遇到剂量限制性中性粒细胞减少症。疲劳、脱发和偶尔轻度至中度腹泻是较常见的非血液学毒性中的一些，其中 2 名患者还报告了皮疹。通过 CT，在各种转移性癌症中，24 名可评估患者中超过 80％

具有稳定的疾病或肿瘤收缩 (SD 和 PR) 作为最佳反应。通过 RECIST,三名患者 (CRC、TNBC、SCLC) 具有 PR ;所有患者的中值 TTP ＞ 18 周,不包括胰腺癌患者。通过剂量减至 8-10mg/kg/ 剂量 (16-20mg/kg/ 循环) 来控制中性粒细胞减少症。

[0547] 免疫组织化学显示 Trop-2 强表达于大部分存档患者肿瘤中,但在血清中未检测到它。血液肿瘤标记物效价 (例如 CEA、CA19-9) 的相应降低体现了肿瘤反应。尽管重复给药,但未检测到抗抗体或抗 SN-38 抗体。血清中 IMMU-132 浓度的峰和谷评估值显示缀合物在 7 天内完全清除,这是基于体外研究的意料之中的发现,所述研究显示每天在血清中释放 50％的 SN-38。这些结果表明,以介于 16-24mg/kg/ 循环范围内的剂量给予的这种新颖 ADC 在多样性转移性实体癌症中显示高治疗指数。

[0548] 实施例 10. IMMU-130(靶向 CEACAM5 的 SN-38ADC) 在转移性结肠直肠癌 (mCRC) 中具有治疗活性

[0549] IMMU-130(由 pH 值敏感性连接子 (7.6 平均药物 - 抗体比) 缀合于人源化抗 CEACAM5 抗体 (拉贝珠单抗) 的 SN-38 的 ADC) 正在完成两个 I 期试验。在两者中,要求患有晚期 mCRC 的合格患者进行过失败 / 复发标准治疗,即拓扑异构酶 I 抑制药物 CPT-11(伊立替康) 且具有升高的血浆 CEA(＞ 5ng/mL)。

[0550] 在第一种方案 (IMMU--130-01) 中,每 14 天 (EOW) 以始于 2.0mg/kg 的剂量施用 IMMU-130。在 24mg/kg 下,三分之二的患者中出现了发热性中性粒细胞减少症 ;另外,在 ≤ 16mg/kg 下,在 7 名患者中观察到中性粒细胞减少症 (≥ 2 级),其中一名还经历血小板减少症。一名患者 [在接受≥ 4 个剂量 (2 个循环) 的 8 名患者中] 显示肝脏 (起始于 7cm) 和肺目标病变在 4.7 个月内减少 40.6％ (PR,通过 RECIST),无重大毒性,耐受总计 18 个 16mg/kg 剂量。该研究以 12mg/kg EOW 继续进行。

[0551] 因为 SN-38 在 S 期细胞中最有效,所以进一步延长暴露可以提高效力。因此,在第二个 I 期试验 (IMMU-130-02) 中,给药加强至每周两次,在 3+3 试验设计中,起始于 6mg/kg/ 剂量持续 2 周 (4 个剂量),停止 1 周,作为一个治疗循环。中性粒细胞减少症和易控制腹泻是主要副作用,直至剂量减至 4.0mg/kg 每周两次,早期结果表明充分耐受多个循环。目前,在完成≥ 4 个剂量 (1 个循环) 的 6 名患者中,3 名患者中出现了肿瘤收缩,其中 1 名继续 PR(-46％,通过 RECIST)。在两个试验中, CEA 血液效价与肿瘤反应相关,且高水平不干扰疗法。基于 ELISA 测试,还没有抗抗体或抗 SN-38 抗体反应。在各研究中, ADC 在前 24h 内被清除 50％,该暴露比亲本分子 CPT-11 的典型剂量长得多。这些结果表明,以平均～ 16-24mg/kg/ 循环的不同方案给予的这种新颖 ADC 在晚期 mCRC 患者中显示高治疗指数。因为 CEACAM5 在乳腺癌和肺癌以及其它上皮细胞肿瘤中的表达有所升高,所以它也可能是其它癌症的可用靶标。

[0552] 实施例 11. 单独或与 T 细胞重定向 bsAb、IFN-α 或 ADC 组合的检查点抑制子抗体的抗肿瘤活性

[0553] 为了确定示例性检查点抑制子抗体伊匹单抗 (抗 CTLA4) 的抗肿瘤活性是与其它治疗剂协同还是因加入其它治疗剂而受到抑制,在鼠类肿瘤模型中评估了单独或与示例性 T 细胞重定向 bsAb(E1)-3s、与干扰素 -α (PEGINTERFERON®) 或与示例性 ADC hRS7-SN-38(IMMU-132) 组合的 CTLA4mAb。基于对各种药剂和 CTLA4 封锁的不同敏感性而选择了 M109 肺癌、SA1N 纤维肉瘤和 CT26 结肠癌模型。将人 T 细胞与所述抗体共同施用。

[0554] 所有化合物均在其最佳剂量和时程下进行测试。当组合使用时，在 IMMU-132、(E1)-3s 或干扰素 -α 的第一个剂量之后一天开始 CTLA4mAb。使用肿瘤生长抑制百分比和达到目标肿瘤尺寸的天数来评估效力。抗肿瘤活性评分为：完全消退 (CR；非可感知肿瘤) 或部分消退 (PR；肿瘤体积减小 50％)。协同定义为抗肿瘤活性显著 ($p < 0.05$) 优于各药剂的单一疗法的活性。

[0555] 在对 CTLA4 封锁敏感且对 (E1)-3s、干扰素 -α 和 IMMU-132 适度敏感的 SA1N 纤维肉瘤肿瘤模型中，界线协同作用在 CTLA4mAb 与 (E1)-3s 组合的情况下是明显的，而在干扰素 -α 下未观察到效应。IMMU-132 单一疗法不产生显著的 SA1N 抗肿瘤活性。然而，组合 IMMU-132 与 CTLA4mAb 产生协同作用。在 M109 肺转移模型和 CT26 结肠癌模型中，在 CTLA4mAb 与 IMMU-132、(E1)-3s 和干扰素 -α 中的每一者组合时检测到协同作用。

[0556] 总之，向干扰素 -α 、IMMU-132 或 (E1)-3s 中加入 CTLA4mAb 产生了模型依赖性协同活性。在不考虑肿瘤的免疫原性和仅当至少一种疗法具有活性时观察到了协同作用。所有组合方案都被充分耐受且组合疗法看似不抑制 CTLA4mAb 活性。在对单独 CTLA4mAb 无反应的肿瘤中观察到协同作用，表明其它治疗剂可能诱导免疫原性细胞死亡。

[0557] 实施例 12. 用于治疗难治性转移性非小细胞肺癌的含 ADC(IMMU-132) 和干扰素 -α (PEGINTERFERON®)的组合疗法

[0558] 患者是经诊断患有非小细胞肺癌的 60 岁男性。给予该患者卡铂、贝伐单抗的化学疗法方案持续 6 个月，且显示了反应，且随后在进展之后，在接下来的 2 年内接受含卡铂、依托泊苷、TAXOTERE®、吉西他滨的其它化学疗法疗程，偶然反应持续不超过 2 个月。所述患者随后呈现测量为 6.5×4cm 的左纵隔块和胸腔积液。

[0559] 在签署知情同意书之后，每隔一周以 18mg/kg 的剂量给予所述患者 IMMU-132。在治疗第一周之后，给予所述患者含 IMMU-132 和 PEGINTERFERON® 的组合疗法。在前两次注射期间，经历了短期中性粒细胞减少症和腹泻，在 4 小时内有 4 次排便，但这些在 2 天内被对症用药解决或作出反应。在总计 6 次 IMMU-132 输注和 5 次 PEGINTERFERON®输注之后，指数病变的 CT 评估显示 22％减少，刚好在部分反应部分响应以下但存在明确的肿瘤收缩。患者再继续该疗法两个月，此时通过 CT 注意到指数病变直径总和的 45％肿瘤收缩的部分反应，因而根据 RECIST 准则构成部分反应。与分开施用两种药剂相比，组合疗法看似提供了协同反应。

[0560] 实施例 13. 用于治疗晚期结肠癌的含 ADC(IMMU-130) 和 T 细胞重定向 bsAb(MT100) 的组合疗法

[0561] 患者是初步诊断为患有转移性结肠癌 (IV 期) 的 75 岁妇女。她进行了右部半结肠切除术和小肠切除术，且随后接受 FOLFOX、FOLFOX+ 贝伐单抗、FOLFIRI+ 雷莫芦单抗和 FOLFIRI+ 西妥昔单抗疗法持续一年半，此时她显示疾病进展，疾病扩散至后穹窿、网膜，骨盆中出现腹水且胸腔右侧出现胸腔积液。就在此疗法之前，她的基线 CEA 效价是 15ng/mL。她被连续 2 周每周两次给予 6mg/kg IMMU-130(抗 CEACAM5-SN-38)，然后休息一周 (3 周的周期)。在第一个循环之后，给予所述患者含 IMMU-132 和白细胞重定向 bsAb MT110 的组合疗法，按照同样的 3 周循环通过连续输注施用。在耐受性非常良好而无任何主要血液学或非血液学毒性的 5 个循环之后，她的血浆 CEA 效价适度降至 1.3ng/mL，但在 8 周评估中，她

显示了指数肿瘤病变的21％收缩，这在13周时增至27％收缩。令人惊讶的是，此时患者的腹水和胸腔积液均减少（后者消失），因而显著改良了患者的总体状态。与分开施用两种药剂相比，组合疗法看似提供了协同反应。

[0562] 实施例14.用于治疗具有IV期转移性疾病的胃癌患者的含ADC(IMMU-130)、T细胞重定向bsAb((E1)-3s)和干扰素-α的组合疗法

[0563] 患者是由于与进食相关的胃部不适和疼痛持续约6年且在过去的12个月期间伴随体重损失而求医的52岁男性。对胃部区域的触诊显示硬块，随后进行胃镜检查，显示他的胃下部存在溃疡块。对此进行活组织检查且诊断为胃腺癌。实验室测试显示无特定异常变化，但在肝功能测试中，LDH和CEA升高，后者是10.2ng/mL。本专利随后进行了全身PET扫描，除胃部肿瘤以外，还显露了左腋下和右肝叶中的转移性疾病（2个小转移）。切除患者的胃部肿瘤，且随后获得他的转移性肿瘤的基线CT测量值。手术后四周，他接受3个疗程的由顺铂和5-氟尿嘧啶(CF)方案组成的组合化学疗法，但对此耐受不良，所以转而用多西他赛治疗。基于CT扫描，看起来疾病稳定了约4个月，随后患者抱怨又出现体重损失、腹痛、食欲不振和极度疲劳导致重复CT研究，显示转移尺寸增加合计20％且在原始胃切除术部位出现位点疑似病变。

[0564] 随后按照8mg/kg的每周方案给予患者含IMMU-130（抗CEACAM5-SN-38）的实验治疗。在第一周之后，开始含IMMU-130、(E1)-3s和干扰素-α的组合疗法。患者在随后的4周内未展现腹泻或中性粒细胞减少症的证据。随后对患者进行CT研究以测量其转移性肿瘤尺寸和察看原始胃切除术区域。根据RECIST准则，放射科医师测量转移性病变总和与治疗前基线相比减少23％。原始胃切除术区域内似乎不存在任何明确的病变。此时患者的CEA效价是7.2ng/mL，相对于基线值14.5ng/mL大幅降低。患者继续每周一次组合疗法，且在总计13次输注之后，他的CT研究显示一个肝脏转移已经消失且所有转移性病变的总和减少41％，从而构成部分反应（通过RECIST）。患者的一般状况得到改善，且恢复其日常活动，同时继续每三周接受维持疗法。在最后一次测量血液CEA时，值是4.8ng/mL，这对于吸烟者（这是该患者的情况）来说在正常范围内。

[0565] 实施例15.DOCK-AND-LOCK™的一般技术

[0566] 以下所论述的一般技术可用于使用所公开的方法和组合物来产生具有连接于任何抗体或抗原结合抗体片段的AD或DDD部分的DNL™复合物。

[0567] 表达载体

[0568] 已使用质粒载体pdHL2来产生多种抗体和基于抗体的构建体。参见Gillies等，J Immunol Methods(1989)，125：191-202；Losman等，Cancer(Phila)(1997)，80：2660-6。双顺反子哺乳动物表达载体引导IgG重链和轻链的合成。许多不同IgG-pdHL2构建体的载体序列大部分相同，仅有的差异存在于可变结构域（V_H和V_L）序列中。使用本领域技术人员已知的分子生物学工具，可将这些IgG表达载体转化成Fab-DDD或Fab-AD表达载体。

[0569] 为了产生Fab-DDD表达载体，将重链铰链、CH2和CH3结构域的编码序列用编码铰链的前4个残基、具有14个残基的连接子和诸如人RIIα的DDD部分的前44个残基（称为DDD1，SEQ ID NO：1）的序列置换。为了产生Fab-AD表达载体，将IgG的铰链、CH2和CH3结构域的序列用编码铰链的前4个残基、具有15个残基的连接子和诸如使用生物信息学和肽阵列技术产生且显示以极高亲和性(0.4nM)结合RIIα二聚体的具有17个残基的合成

AD(称为AKAP-IS)的AD部分(称为AD1,SEQ ID NO:3)的序列置换。参见Alto等,Proc. Natl.Acad.Sci.,U.S.A(2003),100:4445-50。设计两个穿梭载体以促进IgG-pdHL2载体转化为Fab-DDD1或Fab-AD1表达载体,如以下所秒述。

[0570] CH1的制备

[0571] 使用pdHL2质粒载体作为模板,通过PCR扩增CH1结构域。左侧PCR引物由CH1结构域的上游(5′)端和作为CH1编码序列的5′的SacII限制核酸内切酶位点组成。右侧引物由编码铰链(PKSC,SEQ ID NO:102)前4个残基的序列组成,随后是4个甘氨酸和丝氨酸,其中最后两个密码子(GS)包含BamHI限制位点。将410bp PCR扩增引物克隆到PGEMT® PCR克隆载体(PROMEGA®,Inc.)中,且针对T7(5′)方向上的插入片段来筛选克隆。

[0572] 合成双链寡核苷酸,以编码DDD1的氨基酸序列,所述氨基酸序列前面是连接子肽的11个残基,其中前两个密码子包含BamHI限制位点。终止密码子和EagI限制位点附接于3′端。所编码的多肽序列示于以下。

[0573] GSGGGGSGGGGSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID NO:103)

[0574] 合成了在其3′端上有30个碱基对重叠两种寡核苷酸,命名为RIIA1-44顶部和RIIA1-44底部,且对其进行组合从而包含174bp DDD1序列的中心154个碱基对。使所述寡核苷酸退火且用Taq聚合酶进行引物延伸反应。引物延伸后,通过PCR扩增双链体。将扩增引物克隆到PGEMT®中,且针对T7(5′)方向上的插入片段进行筛选。

[0575] 合成双链寡核苷酸,以编码AD1的氨基酸序列,所述氨基酸序列前面是连接子肽的11个残基,其中前两个密码子包含BamHI限制位点。终止密码子和EagI限制位点附接于3′端。所编码的多肽序列示于以下。

[0576] GSGGGGSGGGGSQIEYLAKQIVDNAIQQA(SEQ ID NO:104)

[0577] 合成编码上述肽序列的两个互补重叠寡核苷酸,命名为AKAP-IS顶部和AKAP-IS底部,且使其退火。通过PCR扩增双链体。将扩增引物克隆到PGEMT®载体中且针对T7(5′)方向上的插入片段进行筛选。

[0578] 连接DDD1与CH1

[0579] 用BamHI和NotI限制酶将编码DDD1序列的190bp片段从PGEMT®中切除,且随后连接于CH1-PGEMT®中的相同位点中以产生穿梭载体CH1-DDD1-PGEMT®。

[0580] 连接AD1与CH1

[0581] 利用BamHI和NotI从PGEMT®中切除含有AD1序列的110bp片段,且随后将其连接于CH1-PGEMT®中的相同位点中以产生穿梭载体CH1-AD1-PGEMT®。

[0582] 利用这种模块设计,可以将CH1-DDD1或CH1-AD1并入pdHL2载体中的任何IgG构建体中。通过从pdHL2移除SacII/EagI限制片段(CH1-CH3)且将其置换为从相应PGEMT®穿梭载体中切除的CH1-DDD1或CH1-AD1的SacII/EagI限制片段而将整个重链恒定域恒定结构域置换为上述构建体之一。

[0583] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2

[0584] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2 是用于产生 C-DDD2-Fab-hMN-14 的表达载体，其所具有的二聚和对接结构域序列 DDD2(SEQ ID NO:2) 经由具有 14 个氨基酸残基的 Gly/Ser 肽连接子附接于 hMN-14 的 Fd 的羧基末端。所分泌的融合蛋白由通过 DDD2 结构域的非共价相互作用保持在一起的 hMN-14Fab 的两个相同拷贝构成。

[0585] 表达载体如下进行工程改造。合成制备包含连接子肽的一部分和 DDD2 的残基 1-13 的编码序列的两个重叠互补寡核苷酸。使所述寡核苷酸退火且用 T4PNK 磷酸化，从而在 5′ 和 3′ 端上产生与跟分别经限制核酸内切酶 BamHI 和 PstI 消化的 DNA 连接相容的悬突。

[0586] 将双链体 DNA 与通过用 BamHI 和 PstI 消化制备的穿梭载体 CH1-DDD1-PGEMT® 连接，以产生穿梭载体 CH1-DDD2-PGEMT®。用 SacII 和 EagI 从 CH1-DDD2-PGEMT® 中切除 507bp 片段，且将其与通过用 SacII 和 EagI 消化而制备的 IgG 表达载体 hMN-14(I)-pdHL2 连接。最终表达构建体命名为 C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2。已利用类似技术产生了多种不同的人源化抗体的 Fab 片段的 DDD2 融合蛋白。

[0587] h679-Fd-AD2-pdHL2

[0588] h679-Fab-AD2 经设计与 C-DDD2-Fab-hMN-14 配对。h679-Fd-AD2-pdHL2 是用于产生 h679-Fab-AD2 的表达载体，所述 h679-Fab-AD2 具有经由具有 14 个氨基酸残基的 Gly/Ser 肽连接子接附于 CH1 结构域的羧基末端的锚定域锚定结构域序列 AD2(SEQ ID NO:4)。AD2 的一个半胱氨酸残基在 AD1 的锚定域锚定结构域序列之前且另一个半胱氨酸残基在其之后。

[0589] 表达载体如下进行工程改造。合成制备包含 AD2 和连接子序列的一部分的编码序列的两个重叠互补寡核苷酸 (AD2 顶部和 AD2 底部)。将所述寡核苷酸退火且用 T4PNK 磷酸化，从而在 5′ 和 3′ 端上产生与跟分别经限制性核酸内切酶 BamHI 和 SpeI 消化的 DNA 连接相容的悬突。

[0590] 将双链体 DNA 连接到通过用 BamHI 和 SpeI 消化制备的穿梭载体 CH1-AD1-PGEMT® 中，以产生穿梭载体 CH1-AD2-PGEMT®。利用 SacII 和 EagI 限制酶从所述穿梭载体中切除含有 CH1 和 AD2 编码序列的 429 碱基对片段，且将其连接于通过用这些相同的酶消化制备的 h679-pdHL2 载体中。最终表达载体是 h679-Fd-AD2-pdHL2。

[0591] TF2DNL™构筑体的产生

[0592] 通过使 C-DDD2-Fab-hMN-14 与 h679-Fab-AD2 反应获得了三聚 DNL™构建体，命名为 TF2。如下产生 TF2 的试验批次，产率 > 90 %。将经蛋白质 L 纯化的 C-DDD2-Fab-hMN-14(200mg) 与 h679-Fab-AD2(60mg) 以 1.4 : 1 摩尔比混合。以总蛋白质浓度 1.5mg/ml 处于 1mM EDTA 的 PBS 中。后续步骤包括 TCEP 还原、HIC 色谱、DMSO 氧化和 IMP 291 亲和色谱。在加入 TCEP 之前，SE-HPLC 未显示 a_2b 形成的任何证据。加入 5mM TCEP 快速引起 a_2b 复合物形成，与对二元结构所预期的 157kDa 蛋白质一致。通过 IMP 291 亲和色谱将 TF2 纯化至接近均质 (未示出)。IMP 291 是含有与 679Fab 结合的 HSG 半抗原的合成肽 (Rossi 等，2005，Clin Cancer Res 11:7122s-29s)。对 IMP291 未结合级分的 SE-HPLC

分析显示自产物移除 a_4、a_2和游离 κ 链（未示出）。

[0593] 通过 BIACORE® 测定法测定 TF2 的功能性。将 TF2、C-DDD1-hMN-14+h679-AD1（用作非共价 a_2b 复合物的对照样品）或 C-DDD2-hMN-14+h679-AD2（用作未还原的 a_2和 b 组分的对照样品）稀释至 1 μg/ml（总蛋白质）且流过经 HSG 固定的感测芯片。对 TF2 的反应大约是两个对照样品的两倍，表明对照样品中仅 h679-Fab-AD 组分将结合并保留在感测芯片上。随后注入针对 hMN-14 的抗独特型抗体 WI2IgG 显示证明仅 TF2 具有与 h679-Fab-AD 紧密缔合的 DDD-Fab-hMN-14 组分，如另一信号反应所指示。由 WI2 与固定于感测芯片上的 TF2 结合引起的反应单位额外增加对应于各自由 C-DDD2-Fab-hMN-14 的一个亚单元贡献的两个完全功能性结合位点。这通过 TF2 能够结合 WI2 的两个 Fab 片段而得以证实（未示出）。

[0594] TF10DNL™构建体的产生

[0595] 使用类似方案产生包含 C-DDD2-Fab-hPAM4 的两个拷贝和 C-AD2-Fab-679 的一个拷贝的三聚 TF10DNL™构建体。使用针对产生（抗 CEA）$_2$× 抗 HSG bsAb TF2 所公开的方法，如上文所描述来产生 TF10 双特异性（[hPAM4]$_2$×h679）抗体。TF10 构建体带有两个人源化 PAM4Fab 和一个人源化 679Fab。

[0596] 在稳定转染的骨髓瘤细胞中独立地表达两个融合蛋白（hPAM4-DDD2 和 h679-AD2）。合并组织培养物上清液，得到两倍摩尔过量的 hPAM4-DDD2。在室温下在使用 1mM 还原型谷胱甘肽的温和还原条件下将反应混合物孵育 24 小时。还原后，通过使用 2mM 氧化型谷胱甘肽轻微氧化而完成反应。通过亲和色谱使用 IMP291- 亲和凝胶树脂分离 TF10，所述树脂以高特异性结合 h679Fab。

[0597] 实施例 16. 由多个抗体产生 AD 和 DDD 连接的 Fab 和 IgG 融合蛋白

[0598] 使用前一实施例中所描述的技术，构建表 11 中所示的 IgG 和 Fab 融合蛋白，且将其并入 DNL™构建体中。所述融合蛋白保留了亲本抗体的抗原结合特征，且所述 DNL ™构建体展现所并入的抗体或抗体片段的抗原结合活性。

[0599] 表 11. 包含 IgG 或 Fab 的融合蛋白

[0600]

融合蛋白	结合特异性
C-AD1-Fab-h679	HSG
C-AD2-Fab-h679	HSG
C-(AD)$_2$-Fab-h679	HSG
C-AD2-Fab-h734	铟 -DTPA
C-AD2-Fab-hA20	CD20
C-AD2-Fab-hA20L	CD20
C-AD2-Fab-hL243	HLA-DR

C-AD2-Fab-hLL2	CD22
N-AD2-Fab-hLL2	CD22
C-AD2-IgG-hMN-14	CEACAM5
C-AD2-IgG-hR1	IGF-1R
C-AD2-IgG-hRS7	EGP-1

[0601]

C-AD2-IgG-hPAM4	MUC
C-AD2-IgG-hLL1	CD74
C-DDD1-Fab-hMN-14	CEACAM5
C-DDD2-Fab-hMN-14	CEACAM5
C-DDD2-Fab-h679	HSG
C-DDD2-Fab-hA19	CD19
C-DDD2-Fab-hA20	CD20
C-DDD2-Fab-hAFP	AFP
C-DDD2-Fab-hL243	HLA-DR
C-DDD2-Fab-hLL1	CD74
C-DDD2-Fab-hLL2	CD22
C-DDD2-Fab-hMN-3	CEACAM6
C-DDD2-Fab-hMN-15	CEACAM6
C-DDD2-Fab-hPAM4	MUC
C-DDD2-Fab-hR1	IGF-1R
C-DDD2-Fab-hRS7	EGP-1
N-DDD2-Fab-hMN-14	CEACAM5

[0602] 实施例 17. 包含两个不同抗体部分和一个细胞因子的 DNL™ 构建体的产生和使用

[0603] 在某些实施方案中，三聚体 DNL™构建体可包括三个不同效应部分，例如两个不同的抗体部分和一个细胞因子部分。我们在此报告了称为 20-C2-2b 的双特异性 MAb-IFNα 的产生和表征，其包括 IFN-α 2b 的两个拷贝和位点特异性连接于维妥珠单抗（人源化抗 CD20）的 hL243（人源化抗 -HLA-DR；IMMU-114）的经稳定 $F(ab)_2$。在体外，20-C2-2b 抑制四个淋巴瘤和八个骨髓瘤细胞系中的每一个，且在除一个 (HLA-DR /CD20) 以外的所有骨髓瘤细胞系中比单特异性 CD20 靶向 MAb-IFNα 或包含亲本抗体和 IFNα 的混合物更有效（未示出），表明 20-C2-2b 可用于治疗各种造血病症。与只靶向 HLA-DR 或 CD20 的单特异性 MAb-IFNα 相比，20-C2-2b 显示更大的针对 KMS12-BM($CD20^+$/$HLA\text{-}DR^+$骨髓瘤）的细胞毒性（未示出），表明 20-C2-2b 中的所有三个组分均可造成毒性。

[0604] 抗体

[0605] 以下论述中所使用的缩写是：20(C_H3-AD2-IgG-v-mab，抗 -CD20IgG DNL™模块）；C2(C_H1-DDD2-Fab-hL243，抗 HLA-DR Fab_2DNL™模块）；2b（二聚 IFNα 2B-DDD2DNL™模块）；734（抗 in-DTPA IgG DNL™模块，用作非靶向对照）。以下 MAb 由 Immunomedics，Inc. 提供：维妥珠单抗或 v-mab（抗 -CD20IgG_1）、hL243γ (4p(Immu-114，抗 -HLA-DR IgG_4)、鼠类抗 IFNα MAb 和针对 v-mab(WR2) 和 hL243(WT) 的大鼠抗独特型 MAb。

[0606] DNL™构建体

[0607] 使用 DNL™方法，通过将 IgG-AD2 模块与 DDD2 模块组合来产生单特异性 MAb-IFNα (20-2b-2b、734-2b-2b 和 C2-2b-2b) 和双特异性 HexAb(20-C2-C2)，如前述实施例中所述。包括四聚 IFNα 2b 和 MAb h734[抗 - 铟 -DTPA IgG_1] 的 734-2b-2b 用作非靶向对照 MAb-IFNα 。

[0608] 哺乳动物表达载体的构建以及产生克隆的后续产生和 C_H3-AD2-IgG-v-mab 的纯化公开于前述实施例中。所表达的重组融合蛋白质的 AD2 肽经由 15 个氨基酸长的柔性连接子肽连接于 v-mab 的 C_H3 结构域的羧基末端。重链 AD2 和轻链多肽的共同表达形成了配备有两个 AD2 肽的 IgG 结构。通过电穿孔将表达载体转染于 Sp/ESF 细胞（经工程改造的细胞系 Sp2/0）中。pdHL2 载体含有针对二氢叶酸还原酶的基因，因而允许克隆选择以及使用甲氨喋呤 (MTX) 进行基因扩增。从用含有 0.2μM MTX 的培养基选择的 96 孔板分离稳定克隆。经由夹心 ELISA 筛选克隆的 C_H3-AD2-IgG-vmab 生产力。在含无血清培养基的滚瓶培养物中产生模块。

[0609] 如以上所论述通过使 DDD2 肽经由 18 个氨基酸长的柔性连接子肽与人 IFNα 2b 的羧基末端重组融合来产生 DDD 模块 IFNα 2b-DDD2。如所有 DDD 模块的情况，所表达的融合蛋白质自发形成稳定同源二聚体。

[0610] 通过用 SacII 和 EagI 限制酶切除 C_H1- 铰链 -C_H2-C_H3 结构域序列且置换为编码用相同酶从 C-DDD2-hMN-14-pdHL2 表达载体中切除的 C_H1-DDD2 的 507bp 序列而由 hL243-IgG-pdHL2 载体产生 C_H1-DDD2-Fab-hL243 表达载体。通过电穿孔将 C_H1-DDD2-Fab-hL243-pdHL2 转染至 Sp/ESF 细胞中之后，使用涂布有小鼠抗人 κ 链以俘获融合蛋白质的 96 孔微量滴定板经由夹心 ELISA 筛选稳定抗 MTX 性克隆的生产力，所述融合蛋白质用辣根过氧物酶缀合山羊抗人 Fab 来检测。在滚瓶培养物中产生所述模块。

[0611] 在无血清 H-SFM 培养基中进行滚瓶培养物和分批馈料生物反应器产生使得产率与迄今为止所产生的其它 IgG-AD2 模块和细胞因子 -DDD2 模块相当。通过亲和色谱法，分

别使用MABSELECT™(GE Healthcare)和HIS-SELECT® HF镍亲和力凝胶(Sigma)从培养液中纯化C_H3-AD2-IgG-v-mab和IFNα2b-DDD2,如先前所描述(Rossi等,Blood 2009,114:3864-71)。将含有C_H1-DDD2-Fab-hL243模块的培养液直接应用于KAPPASELECT®亲和凝胶(GE-Healthcare),用PBS洗涤至基线且用0.1M甘氨酸pH 2.5来洗脱。

[0612] 通过DNL™产生20-C2-2b

[0613] 将三个DNL™模块(C_H3-AD2-IgG-v-mab、C_H1-DDD2-Fab-hL243和IFN-α2b-DDD2)以等摩尔数量组合以产生bsMAb-IFNα、20-C2-2b。在室温下、在温和还原条件(1mM还原型谷胱甘肽)下进行过夜对接步骤之后,加入氧化型谷胱甘肽(2mM)以促进二硫键形成(锁定)。使用三个连续亲和色谱步骤将20-C2-2b纯化至接近于均质。最初,用结合C_H3-AD2-IgG-v-MAb基团且消除未反应的IFNα2b-DDD2或C_H1-DDD2-Fab-hL243的蛋白A(MABSELECT™)纯化DNL™混合物。通过IMAC使用特异性结合IFNα2b-DDD2部分且消除缺乏此基团的任何构建体的HIS-SELECT® HF镍亲和力凝胶进一步纯化蛋白A结合的材料。使用hL243-抗独特型亲和力凝胶的最终方法步骤移除缺乏C_H1-DDD2-Fab-hL243的任何分子。

[0614] 本领域技术人员应认识到亲和色谱可用于纯化包括效应部分的任何组合的DNL™复合物,只要可获得三个效应部分各自的配体且连接于柱材料即可。选定的DNL™构建体是结合于含有三个效应部分各自的配体的三个柱中的每一个并且可在洗涤之后洗脱以移除未结合的复合物的构建体。

[0615] 以下实施例代表20-C2-2b的若干种类似制备。将等摩尔量的C_H3-AD2-IgG-v-mab(15mg)、C_H1-DDD2-Fab-hL243(12mg)和IFN-α2b-DDD2(5mg)组合于30mL反应体积中,且将1mM还原型谷胱甘肽加入溶液中。在室温下16h之后,将2mM氧化型谷胱甘肽加入混合物,在室温下再保持6h。将反应混合物应用于5mL蛋白A亲和力柱,用PBS洗涤至基线且用0.1M甘氨酸pH 2.5来洗脱。用3M Tris-HCl pH 8.6中和包含~20mg蛋白质的洗脱液且渗析至HIS-SELECT®结合缓冲液(10mM咪唑、300mM NaCl、50mM NaH_2PO_4,pH 8.0)中,随后应用于5mL HIS-SELECT® IMAC柱。用结合缓冲液将柱洗涤至基线且用250mM咪唑、150mM NaCl、50mM NaH_2PO_4pH 8.0洗脱。

[0616] 将包含~11.5mg蛋白质的IMAC洗脱液直接应用于WP(抗hL243)亲和力柱,用PBS洗涤至基线且用0.1M甘氨酸pH 2.5来洗脱。所述方法产生7mg高度纯化的20-C2-2b。这是20-C2-2b理论产量的大约44%,占总起始材料(在此实施例中为16mg)的50%,其中20-2b-2b和20-C2-C2各自的25%以副产物形式产生。

[0617] 20-C2-2b的产生和表征

[0618] 通过将IgG-AD2模块C_H3-AD2-IgG-v-mab与两个不同二聚DDD模块C_H1-DDD2-Fab-hL243和IFNα2b-DDD2组合来产生双特异性MAb-IFNα。由于DDD模块与两个AD2基团随机缔合,所以预期除了20-C2-2b以外还会形成两个副产物,即20-C2-C2和20-2b-2b。

[0619] 非还原SDS-PAGE(未示出)将20-C2-2b(~305kDa)拆分为位于20-C2-C2(~365kDa)与20-2b-2b(255kDa)的谱带之间的谱带簇。还原SDS-PAGE拆分了包含20-C2-2b的五种多肽(v-mab HC-AD2、hL243Fd-DDD2、IFNα2b-DDD2和共迁移v-mab和hL243κ

轻链)(未示出)。20-C2-C2 和 20-2b-2b 中不存在 IFNα2b-DDD2 和 hL243Fd-DDD2。MABSELECT™结合于 DNL™反应中产生的所有三种主要物质,但去除任何过量 IFNα2b-DDD2 和 C_H1-DDD2-Fab-hL243。HIS-SELECT®未结合级分主要含有 20-C2-C2(未示出)。来自 WT 亲和色谱的未结合部分包含 20-2b-2b(未示出)。对各样品进行 SE-HPLC 和免疫应答性分析,证实了 SDS-PAGE 分析的结果和结论。

[0620] 还原 20-C2-2b 之后,通过 RP-HPLC 来拆分其五个组分多肽,且产生各峰的个别 ESI-TOF 解卷积质谱(未示出)。原生但非细菌表达的重组 IFNα2 在 Thr-106 处经 O-糖基化(Adolf 等,Biochem J 1991;276(Pt 2):511-8)。我们确定包含 IFNα2b-DDD2 模块的多肽中~15%经 O-糖基化,且可通过 RP-HPLC 和 SDS-PAGE 从非糖基化多肽拆分(未示出)。20-C2-2b 的 LC/MS 分析分别以 15ppm 和 2ppm 的质量精度鉴别了 IFNα2b-DDD2 的 O-糖基化和非糖基化物质(未示出)。O-糖基化形式的观察质量指示 O-连接多糖具有结构 NeuGc-NeuGc-Gal-Gal NAc,其也是对 20-2b-2b 所预测的(<1ppm)(未示出)。LC/MS 将 v-mab 和 hL243κ链以及 hL243-Fd-DDD2(未示出)鉴别为单一未修饰物质,且观察质量匹配计算质量(<35ppm)。v-mab HC-AD2 的两种主要糖型鉴别为具有 53,714.73(70%)和 53,877.33(30%)的质量,分别指示典型地与 IgG 缔合的 G0F 和 G1F N-多糖(未示出)。该分析还证实 HC-AD2 的氨基末端被修饰成焦谷氨酸,如对具有氨基末端谷氨酰胺的多肽所预测。

[0621] 20-C2-2b 的 SE-HPLC 分析拆分了滞留时间(6.7 分钟)与其计算质量一致且在较大 20-C2-C2 的滞留时间(6.6 分钟)与较小 20-2b-2b 的滞留时间(6.85 分钟)之间的主要蛋白质峰,以及可能表示经由 IFNα2b 的自缔合形成的非共价二聚体的一些较高分子量峰(未示出)。

[0622] 免疫应答性测定显示 20-C2-2b 的均质性,其中各分子含有三个官能团(未示出)。20-C2-2b 与针对三个组成模块中任一个的过量抗体一起孵育引起高分子量免疫复合物的定量形成和 20-C2-2b 峰消失(未示出)。HIS-SELECT®和 WT 亲和力未结合级分分别不与 WT 和抗 IFNα具有免疫应答性(未示出)。MAb-IFNα示出了与其亲本 MAb 类似的结合亲合力(未示出)。

[0623] IFNα生物活性

[0624] 使用基于细胞的报告基因测定法来测量各种 MAb-IFNα的比活性,且与聚乙二醇化干扰素 α-2b 相比较(未示出)。正如所料,具有两个 IFNα2b 基团的 20-C2-2b 的比活性(2454IU/pmol)显著低于 20-2b-2b 的比活性(4447IU/pmol)或 734-2b-2b 的比活性(3764IU/pmol),却大于聚乙二醇化干扰素 α-2b($P<0.001$)(未示出)。20-2b-2b 与 734-2b-2b 之间的差异不显著。所有试剂的比活性在相对于总 IFNα的 IU/pmol 进行标准化时最少变化。基于这些数据,MAb-IFNα的各 IFNα2b 基团的比活性是重组 IFNα2b(~4000IU/pmol)的大约 30%。

[0625] 在离体环境中,20-C2-2b DNL™构建体比正常 B 细胞更有效地耗竭淋巴瘤细胞,且对 T 细胞无效应(未示出)。然而,它确实有效地消除单核细胞(未示出)。在 v-mab 对单核细胞无效应时,在经 hL243α4p 和 MAb-IFNα治疗之后观察到耗竭,且 20-2b-2b 和 734-2b-2b 展现类似的毒性(未示出)。因此,20-C2-2b 的可预见的较高效力归因于抗-HLA-DR 与 IFNα的组合作用,其可以通过 HLA-DR 靶向来增强。这些数据表明单核细胞

耗竭可能是与抗 -HLA-DR 以及 IFNα 疗法相关的药效学效应；然而，此副作用可能是瞬时的，因为单核细胞群体将由造血干细胞恢复。

[0626] 本领域技术人员应认识到，本文中所描述的产生和使用双特异性免疫细胞因子，或包括三个不同的效应部分的其它 DNL™构建体的方法可以与可并入 DNL™构建体中的抗体、抗体片段、细胞因子或其它效应子的任何组合，例如抗 CD3 与抗 CD19 或其它抗 TAA 与 IFNα 2b 的组合一起利用。

[0627] 实施例 18. NK 靶向的白细胞重定向 bsAb 的用途

[0628] 使用 bsAb 重新靶向白细胞不限于针对 T 细胞的抗体。在替代实施方案中，结合于单核细胞、NK 细胞或嗜中性粒细胞的 bsAb 也可以用于重新靶向目的。

[0629] CD16 是针对由 NK 细胞的 $CD56^{dim}$子集高度表达的 IgG 的活化低亲和力 Fc-γ 受体 (Gleason 等，2012，Mol Cancer Ther11 :2674-84)。除其在 NK 细胞重新靶向方面的用途以外，包含抗 CD16 抗体组分的 bsAb 能够通过 CD16 的直接信号转导来活化 NK 介导的细胞毒性，从而诱导溶解性颗粒定向分泌和靶细胞死亡 (Gleason 等，2012)。

[0630] 使用如先前所报告的 DNA 改组和连接技术 (Vallera 等，2005，Clin Cancer Res 11 :3879-88)，根据 Gleason 等，2012，Mol Cancer Ther11 :2674-84 制备 CD16/CD19 双特异性杀伤细胞衔接子 (BiKE) 和 CD16/CD19/CD22 三特异性杀伤细胞衔接子 (TriKe)。通过相继进行离子交换和尺寸排阻柱色谱法来纯化所表达的 BiKE 和 TriKE。在 CD16/CD19BiKE 或 CD16/CD19/CD22TriKE 存在 (10μg/mL) 下将其余 PBMC 暴露于原发性 ALL 和 CLL 肿瘤细胞。与无重新靶向抗体时的细胞相比，在 BiKE 或 TriKE 存在下观察到对肿瘤细胞的细胞毒性显著增加。肿瘤细胞在不存在 PBMC 的情况下暴露于 BiKE 或 TriKE 时未观察到效应。相对于 BiKE，TriKE 对肿瘤细胞毒性具有较大作用，表明与额外肿瘤细胞抗原结合可以增强重新靶向效应。使用经过纯化的 NK 细胞代替 PBMC 观察到了类似的结果。

[0631] 如 Wiernik 等 (2013)，Clin Cancer Res 19 :3844-55 中所公开来制备 CD16/CD33BiKE。将 BiKE 施用于已注入与人 PBMC 共同施用的人 HL60 早幼粒细胞性白血病异种移植细胞的裸鼠。与经对照 bsAb 治疗的小鼠相比，经 BiKE 治疗的小鼠显示死亡率和肿瘤生长率降低。加入抗 CD33-SN-38ADC 进一步增强了 BiKE 的细胞毒性效应。

[0632] 实施例 19. 使用缀合的抗 HIV 抗体在体外和体内抑制 HIV 感染

[0633] 概述

[0634] 为了显示免疫缀合物对 HIV-1 的效力，使针对 HIV 包被抗原的鼠类单克隆抗体 (Mab)(P4/D10) 与常规抗癌药物多柔比星缀合，且在体外和体内针对感染性病毒和受感染细胞进行测试。将 P4/D10 抗体与游离病毒（中和）或感染 HIV 的细胞（抑制）一起孵育，且通过 p24 俘获酶联免疫吸附测定来测量所产生的感染。在 HIV-1/MuLV 小鼠攻击模型中，测量缀合物在体内抑制感染的能力。

[0635] 多柔比星缀合的 P4/D10 在体外中和 $HIV\text{-}1_{IIIB}$且消除受感染的 Jurkat 细胞中的细胞间传播和 HIV 复制。它还能在比游离抗体所需低八倍的浓度下防止小鼠被 $HIV\text{-}1_{IIIB}$/MuLV 攻击，而对于游离药物或无关缀合物对照则未或观察到效应。

[0636] 这些结果显示，多柔比星被 P4/D10 抗体集中于受 HIV 感染的细胞，显著 ($P = 0.0001$) 有助于 HIV 消除。相同的组合物和方法可用于消除经 ART（抗逆转录病毒疗法）治疗的患者的其余抗原表达 T 细胞。

[0637] 在本研究中，我们利用已知的药理学、毒理学和在患者中的抗肿瘤活性缀合了抗癌葱环类多柔比星与针对 HIV-1 外包被 gp120（第三可变环区）开发的中和性和 ADCC 介导性单克隆抗体 (Mab)。

[0638] 在体外测试与多柔比星缀合的 P4/D10 抗体在通过从腹腔内去除受 HIV-1/MuLV（鼠类白血病病毒）感染的同基因细胞而消除未受感染细胞和小鼠模型中的受 HIV-1 感染的细胞方面的效力。抗 gp120 抗体 P4/D10 中和了 HIV-1 病毒且介导 ADCC(Broliden 等，1990)。它还以未缀合形式用于晚期 HIV-1 感染个体的 I 期临床试验，其中其在较长时间段内减少 HIV 抗原 (Hinkula 等，1994)。本发明的研究首先在临床前 HIV 模型中研究呈药物缀合形式的 P4/D10 组合，与游离 Mab、游离药物以及以类似方式与多柔比星缀合的无关抗体 hRS7(Stein 等，Int J Cancer 1993,55 :938-946) 和 hLL1(Griffiths 等，Clin Cancer Res 2003,9 :6567-6571 ;Sapra 等，Clin Cancer Res 2005,11 :5257-5264) 相比较。

[0639] 材料和方法

[0640] 抗体和药物缀合。多柔比星与 IgG1 κ 抗 gp120 抗体 P4/D10(Broliden 等，1990) 和对照抗体缀合以及具有马来酰亚胺基的双功能多柔比星腙衍生物的制备是根据 Griffiths 等 (2003) 进行。简而言之，在含有 5mM EDTA 的 PBS(pH 7.5) 中，使用对应于还原剂相对于抗体 38 倍摩尔过量的约 2.2mM 最终 DTT 浓度，用 DTT（二硫苏糖醇）温和地还原最终浓度是大约 9mg/ml 的抗体 P4/D10、hLL1（人源化抗 CD74) 和 hRS7（人源化抗 EGP-1)。在 37℃下将溶液孵育 40 分钟。在 Sephadex G50/80 旋转柱上在含有 150mM NaCl 和 2mM EDTA 的 50mM 乙酸钠缓冲液 (pH 5.3) 中纯化经过还原的 Mab。通过埃尔曼氏测定法来测定抗体上所产生的硫醇基数目。对于缀合，将经温和还原的抗体以 6.5mg/ml 与双功能多柔比星混合。将孵育物保持在冰上 15 分钟，且在 G50/80 旋转柱上在 0.1M 乙酸钠 (pH 6.5) 中纯化，随后通过在相同缓冲液中平衡的 Bio-Beads SM2 短柱 (Bio-Rad,Hercules,CA)。通过测量吸光度来分析产物的多柔比星 /Mab 取代比。在分析型 BioSil 250 柱上进行尺寸排阻 HPLC 分析。

[0641] 将得自 HIV 感染患者的 IgG(HIVIgG) 的由 GMP 产生的批次 (Guay 等，AIDS 2002,16 :1391-1400) 用作阳性对照且得自 HIV 阴性个体的血清用作阴性对照。包括游离多柔比星以及以类似方式与多柔比星缀合的抗癌人源化 Mab LL1 和 RS7 作为缀合的 P4/D10 抗体的对照。

[0642] HIV-1 中和测定。将多柔比星 P4/D10、未经标记的 P4/D10、HIV 免疫球蛋白 (HIVIgG) 和 HIV 阴性血清与 HIV-1 孤立 $HIV\text{-}1_{IIIB}$(LAI) 混合且在 37℃孵育 1h，随后加入 50,000 个 Jurkat T 细胞 / 孔。孵育 1h 之后，用培养基洗涤细胞且加入新的完全培养基 (200 μl/ 孔）。在培养 7 天之后，通过 p24 俘获 ELISA（酶联免疫吸附测定）测量所产生的 p24 的量，且计算对 HIV-1p24 产生的抑制百分比。

[0643] 体外 HIV-1 抑制。通过将 $5\text{-}10\times10^6$ 个细胞与 $100\times TCID_{50}$ $HIV\text{-}1_{IIIB}$ 混合用 $HIV\text{-}1_{IIIB}$ 感染 Jurkat T 细胞，且在 37℃下孵育 1h。在培养基中洗涤细胞且在 37℃下孵育。每三天更换培养基且检查上清液的 p24 产生。当接近 100％细胞被感染时，将不同比例的 $HIV\text{-}1_{IIIB}$ 感染细胞与未感染细胞混合。用 100 至 0.00001 μg/ml 的抗体、血清或游离多柔比星连续稀释处理细胞。在 37℃下培养七天之后，测量 HIV-1p24 抑制且收集先前经 0.1-10 μg/ml 多柔比星 -P4/D10、未缀合 P4/D10 和 0.05-0.5mg/ml HIV 阴性血清处理的细胞的上清液，并

且转移至新鲜 Jurkat T 细胞中以测试 p24ELISA 在培养开始后第 3 天、第 7 天、第 10 天、第 12 天和第 15 天是否能鉴别感染性 HIV。

[0644] HIV-1/MuLV 攻击模型。用 $HIV\text{-}1_{IIIB}$感染具有基因整合的 MuLV 基因组的人 T 细胞系 CEM-1B，由此产生具有 HIV-1 基因组和 MuLV 包被的假病毒 (Adang 等，PNAS USA 1999，96 :12749-753 ;Hinkula 等，Cells Tissues Organs 2004，177 :169-184)。使用这些病毒上清液来感染得自 HLA-A201 转基因 C57B1/6xDBA F1$K^{b/d}$小鼠的脾细胞。用 $HIV\text{-}1_{IIIB}$/MuLV 感染的脾细胞 i.p. 攻击等基因小鼠，且立即 i.p. 给予缀合抗体、游离抗体或游离多柔比星。攻击之后十天，将小鼠处死且收集腹壁细胞。使腹壁细胞形成球团且加入在 24 孔板中生长的 1×10^6个 HIV 易感性 Jurkat T 细胞或人 PBMC 中。从这些次级培养物取出上清液且每 3-4 天加入新鲜培养基。通过 p24ELISA 测量上清液中所回收的感染性 HIV 的量，持续 3 周。

[0645] 统计分析。为了比较抗 gp120Mab 和对照抗体的体外 HIV-1 中和能力，使用斯氏 t 检验和非参数克鲁斯凯 - 沃利斯检验。使用非参数曼 - 惠特尼 U 检验和克鲁斯凯 - 沃利斯检验进行经不同的抗体处理的小鼠群组之间的统计比较。当获得 < 0.05 的 p 值时认为差异显著。使用 GraphPad Prism 版本 4.0a(GraphPad Software，San Diego，CA) 进行非参数单向 ANOVA 检验，且用于比较研究群组之间的 HIV-1 分离和 p24 抗原阳性。

[0646] 结果

[0647] 通过温和还原在相应抗体上产生的硫醇基数目以及最终经纯化的缀合物中的多柔比星 /Mab 取代比介于 8.8(P4/D10、hRS7) 与 9.4(hLL1) 之间的范围内，得到每个 IgG 大约 9 个药物分子的比率。高压液相色谱显示缀合物和天然 Mab 具有类似的滞留时间，存在零至极小聚集 (数据未示出)。

[0648] 多柔比星缀合的 P4/D10Mab 与未缀合 P4/D10Mab 或 HIVIgG 抗体之间可以显示游离 HIV-1 病毒的 HIV-1 中和能力无显著差异 (未示出)。然而，在中和 $HIV\text{-}1_{IIIB}$方面，所有抗 HIV-1 特异性抗体与阴性对照血清相比显著更佳 ($p = 0.001$)。

[0649] 当将 3％经 $HIV\text{-}1_{IIIB}$感染的 Jurkat 细胞与 97％未经感染的细胞混合时，在 0.5 或 0.05 μg/ml 的浓度下，与游离 P4/D10、多柔比星缀合的对照抗体 hLL1 或游离多柔比星相比，多柔比星 -P4/D10 介导显著 ($p = 0.002$) 更强的 HIV-1 感染细胞间传播抑制 (未示出)。在所有其它浓度的经感染和未经感染细胞下可见类似的结果。特别感兴趣的是与用多柔比星 -P4/D10 作为中和剂所获得的效应相比，细胞间感染传播看似受到甚至更有力的抑制。而且，在经高剂量多柔比星 -P4/D10 处理的培养物中未发现感染性病毒，这是因为在得自这些细胞培养物的上清液转移至未经感染的 Jurkat 细胞之后未检测到 p24 产生 (数据未示出)。根据中和游离 HIV-1 病毒的结果无法预测多柔比星 -P4/D10 与未缀合的 P4/D10 之间的显著效应差异 (未示出)。

[0650] 为了测试多柔比星 -P4/D10 抗体的体内效力，经腹膜内给予小鼠同基因 HIV/MuLV 感染细胞连同缀合物。10 天后收集腹壁细胞且所有对照中均显示感染性 HIV，类似于先前的研究 (Hinkula 等，2004)。多柔比星 -P4/D10 抗体防止小鼠完全对抗经 HIV-1 感染的原代淋巴细胞攻击 ($p = 0.0001$)(未示出)。在用 100 μg 多柔比星 -P4/D10 抗体攻击和处理之后从腹壁细胞中未回收到感染性 HIV。当用 100 μg 未缀合 P4/D10 抗体处理小鼠时，对于 p24 产生都是阳性。单独抗体的完全保护仅在剂量增加八倍达到每只小鼠 800 μg 未缀合 P4/D10 时可见。多柔比星缀合的对照抗体 (hLL1 或 hRS7) 在 100-200 μg 剂量下无一提

供任何保护，100-400 μg 游离多柔比星剂量也不提供。

[0651] 讨论

[0652] 以上结果显示抗体针对 HIV-1 包被的总病毒抑制性质可以通过与多柔比星偶联而显著扩增。多柔比星 -P4/D10 能够在体外以及在实验体内攻击模型中消除 HIV-1 感染细胞。未缀合的 P4/D10Mab 介导针对 HIV-1 感染靶细胞的 ADCC 以及中和 HIV-1 的能力 (Broliden 等，1990 ；Hinkula 等，1994) 可以用无毒方式增强其作为药物免疫缀合物的效力。

[0653] 以类似方式与多柔比星缀合的抗癌抗 CD74Mab LL1 已在极低剂量下在体外和非何杰金氏淋巴瘤或多发性骨髓瘤的人异种移植模型中显示显著活性 (Griffiths 等，2003 ；Sapra 等，2005)。这些研究以及在猴子中的毒理学指示仅极高剂量的免疫缀合物将产生骨髓抑制的证据，但未观察到与多柔比星有关的心脏毒性 (Sapra 等，2005)。为了避免病毒逃逸，应一起测试针对 HIV 中可达表位的保守和可变位点的抗体 (Trkola 等，2005 ；Ferrantelli 等，J Infect Dis 2004，189 ：2167-2173)。

[0654] 在先前的体外研究中，与假单胞菌外毒素 A(PE40) 缀合的 HIV-1 特异性免疫球蛋白去除了 HIV-1 感染细胞 (Pincus 等，2003 ；Ashorn 等，Proc Natl Acad Sci USA1990，87 ：8889-8893)。然而，在临床试验中，PE40 与 CD4 细胞偶联被证明具有免疫原性和肝毒性 (Davey 等，1994 ；Ramachandran 等，1994)。因此，本发明的结果显示多柔比星 -Mab 缀合物的效力且具有极小或不具有副作用，这是令人惊讶且出乎意料的。PE40-CD4 的毒性可以由与以高浓度存在于未经 ART 治疗的高病毒负载患者中的游离 gp120 形成毒性复合物来解释 (Berger 等，1998)。为了避免与高病毒负载相关的潜在毒性问题，靶向 HIV 包被特异性表位的分子将优选用于病毒负担较低的情形，诸如在 ART 期间、HIV 感染早期或甚至已知或可能暴露于 HIV 感染后不久。举例来说，可以根据所公开的方法用缀合抗体处理暴露于含被 HIV 污染或可能被污染的血液或其它体液的意外针刺的健康护理工作者。作为多柔比星 -P4/D10 缀合物的抗细胞活性的结果，对经 ART 处理的患者增加药物缀合物可以消除携带抗原的细胞以及游离的病毒粒子，且因此甚至进一步减少病毒负载。熟练技术人员应认识到，要求保护的组合物和方法不限于 P4/D10 的多柔比星缀合物，而是可以利用与 P4/D10 或与其它已知抗 HIV 抗体缀合的其它已知细胞毒性剂。

[0655] 在其它实施方案中，为了避免非特异性毒性，可以使用双特异性抗体和其它预靶向策略，其中抗体靶向和毒性剂递送分开进行 (Wu 等，2005)。此策略已经在临床前和临床癌症试验中显示出有前景的结果 (Forero 等，Blood 2004，104 ：227-236 ；Rossi 等，Clin Cancer Res 2005，11 ：7122s-7129s)。对于在人类受试者中的体内使用，优选人类或人源化形式的抗体用于重复临床使用。

[0656] 实施例 20. 用 ADC 和 T 细胞重定向 bsAb 治疗感染 HIV 的患者

[0657] 47 岁男性患者测定为 HIV 血清阳性。所述患者的 CD4 计数小于 200/mm^3。用非核苷类逆转录酶抑制剂奈韦拉平的标准方案治疗所述患者。CD4 细胞计数提高至 300/mm^3，但所述患者仍呈 HIV 血清阳性。依序用人源化多柔比星 -P4/D10 抗体和白细胞重定向 (P4/D10)-3s bsAb 治疗所述患者。所述患者的 CD4 计数提高至超过 350/mm^3，且所述患者不再呈 HIV 血清阳性。一年后，所述患者仍无症状且不存在可检测的 HIV 感染。

[0658] 实施例 21. 用于治疗性用途的三价抗体

[0659] 如专利EP1309795B1中所描述来制造三价三特异性细胞靶向构建体，包括：(i)对如专利US 618728中所描述的衍生出EP1309795的技术方案1的Fab的小鼠抗CD16mab进行嵌合或人源化；(ii)构建由US7512189中所描述的人源化抗HLA-DR抗体的Fv构成的单链抗体，且通过连接子将所述scFv接合于(i)的抗CD16Fab的轻链的羧基末端；和(iii)构建由US8486395中所描述的人源化抗CD19抗体的Fv构成的单链抗体，且通过连接子将所述scFv接合于(ii)的抗CD16Fab的CH1的羧基末端。

[0660] 将所述三价构建体与hLL2-SN38组合施用于患有非何杰金氏淋巴瘤的受试者。观察到部分反应且肿瘤显示尺寸消退，持续12个月。

[0661] ***

[0662] 根据本公开内容，不需要过度实验就可以制备和使用本文中所公开和要求保护的所有组合物和方法。尽管已经就优选实施方案描述了组合物和方法，但本领域技术人员应显而易见，可在不背离本发明的理念、精神和范围的情况下对本文中所描述的组合物和方法以及方法中的步骤或步骤序列施加变化。更具体地说，化学上和生理学上相关的某些试剂可以取代本文中所描述的试剂，同时实现相同或类似的结果。认为对本领域技术人员显而易见的所有此类相似的取代和修改都在如由所附权利要求所限定的本发明精神、范围和理念之内。

[0001]

序列表

<110> IBC PHARMACEUTICALS, INC.

<120> 用于诱导针对疾病的免疫反应的组合疗法

<130> IBC138W02

<140>
<141>

<150> 13/966,450
<151> 2013-08-14

<150> 61/807,998
<151> 2013-04-03

<160> 105

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 1
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 2
<211> 45

[0002]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 2
Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe
20 25 30

Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40 45

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 3
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

[0003]

<400> 4
Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile
1 5 10 15

Gln Gln Ala Gly Cys
20

<210> 5
<211> 50
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 5
Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys His Asn Ile Gln Ala
1 5 10 15

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

Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Arg Leu Glu Lys Glu Glu
35 40 45

Ala Lys
50

<210> 6
<211> 55
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 6
Met Ser Cys Gly Gly Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys

[0004]

1 5 10 15

His Asn Ile Gln Ala Leu Leu Lys Asp Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr
20 25 30

Ala Arg Pro Glu Arg Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Arg
35 40 45

Leu Glu Lys Glu Glu Ala Lys
50 55

<210> 7
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 7
Cys Gly Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser
1 5 10 15

Asp Val Phe Gln Gln Gly Cys
20

<210> 8
<211> 51
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8
Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys His Asn Ile Gln Ala
1 5 10 15

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

[0005]

Arg Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Lys Leu Glu Lys Glu
35 40 45

Glu Ala Lys
50

<210> 9
<211> 54
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9
Ser Leu Lys Gly Cys Glu Leu Tyr Val Gln Leu His Gly Ile Gln Gln
1 5 10 15

Val Leu Lys Asp Cys Ile Val His Leu Cys Ile Ser Lys Pro Glu Arg
20 25 30

Pro Met Lys Phe Leu Arg Glu His Phe Glu Lys Leu Glu Lys Glu Glu
35 40 45

Asn Arg Gln Ile Leu Ala
50

<210> 10
<211> 44
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Gly Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Asp Phe Ala Val
20 25 30

[0006]

Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Arg Gln
35 40

<210> 11
<211> 44
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11
Ser Ile Glu Ile Pro Ala Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Val Glu Val Leu Arg His Gln Pro Ala Asp Leu Leu Glu Phe Ala Leu
20 25 30

Gln His Phe Thr Arg Leu Gln Gln Glu Asn Glu Arg
35 40

<210> 12
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 12
Thr His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

[0007]

<210> 13
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 13
Ser Lys Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 14
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 14
Ser Arg Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 15

[0008]

<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 15
Ser His Ile Asn Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 16
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 16
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Ala Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 17
<211> 44
<212> PRT

[0009]

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 17
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Ser Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 18
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 18
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Asp Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 19
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

[0010]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 19
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Asn Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 20
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 20
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Ala Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 21
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

[0011]

<400> 21
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Ser Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 22
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 22
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Asp Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 23
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 23

[0012]

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Lys Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 24
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 24
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Asn Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 25
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 25
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

[0013]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Asn Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 26
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 26
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Glu Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 27
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 27
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

[0014]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Asp Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 28
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 28
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Leu
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 29
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 29
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ile
20 25 30

[0015]

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 30
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 30
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Val
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 31
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 31
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

[0016]

Val Asp Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 32
Asn Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 33
Gln Leu Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0017]

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 34
Gln Val Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 35
Gln Ile Asp Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 36
Gln Ile Glu Phe Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

[0018]

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 37
Gln Ile Glu Thr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 38
Gln Ile Glu Ser Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 39

[0019]

Gln Ile Glu Tyr Ile Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 40
Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 41
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Arg Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 42
<211> 17

[0020]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 42
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Asn Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 43
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Glu Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 44
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Gln Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

[0021]

Ala

<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 45
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Asn Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 46
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Asn
1 5 10 15

Ala

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0022]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 47
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Leu

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 48
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ile

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 49
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Val

[0023]

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 50
Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Tyr Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 51
Gln Ile Glu Tyr Lys Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

[0024]

<400> 52
Gln Ile Glu Tyr His Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 53
Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 54
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 54
Pro Leu Glu Tyr Gln Ala Gly Leu Leu Val Gln Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala Ile

<210> 55

[0025]

<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 55
Leu Leu Ile Glu Thr Ala Ser Ser Leu Val Lys Asn Ala Ile Gln Leu
1 5 10 15

Ser Ile

<210> 56
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 56
Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu Gln
1 5 10 15

Val Lys

<210> 57
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽
<400> 57
Ala Leu Tyr Gln Phe Ala Asp Arg Phe Ser Glu Leu Val Ile Ser Glu
1 5 10 15

[0026]

Ala Leu

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽
<400> 58
Leu Glu Gln Val Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala
1 5 10 15

Thr

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 59
Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val
1 5 10 15

Phe

<210> 60
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0027]

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 60
Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn Ala Val Leu Lys
1 5 10 15

Ala Val

<210> 61
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 61
Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Arg Ile Val Gln Val Val Thr Ala Glu
1 5 10 15

Ala Val

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 62
Gln Ile Lys Gln Ala Ala Phe Gln Leu Ile Ser Gln Val Ile Leu Glu
1 5 10 15

Ala Thr

[0028]

<210> 63
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 63
Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Val Ser Asp Val Met Gln Gln
1 5 10 15

<210> 64
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 64
Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu
1 5 10 15

Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala Tyr
20

<210> 65
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 65
Leu Glu Gln Tyr Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala
1 5 10 15

[0029]

Thr Glu

<210> 66
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 66
Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val
1 5 10 15

Phe Gln Gln Cys
20

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 67
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Pro Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 68
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0030]

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 68
Lys Gly Ala Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala
1 5 10 15

Val Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly
20 25

<210> 69
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 69
Lys Gly Ala Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Pro Asp Ala
1 5 10 15

Pro Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly
20 25

<210> 70
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 70
Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

[0031]

<210> 71
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 71
Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Thr Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

<210> 72
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 72
Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Asp Val Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

<210> 73
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 73

[0032]

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Pro Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

<210> 74
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 74
Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Pro Glu Asn
1 5 10 15

Ala Pro Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

<210> 75
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 75
Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Glu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

<210> 76
<211> 25

[0033]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 76
Glu Glu Gly Leu Asp Arg Asn Glu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Phe Gln
1 5 10 15

Ile Ile Ser Gln Val Ile Ser Glu Ala
20 25

<210> 77
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 77
Leu Val Asp Asp Pro Leu Glu Tyr Gln Ala Gly Leu Leu Val Gln Asn
1 5 10 15

Ala Ile Gln Gln Ala Ile Ala Glu Gln
20 25

<210> 78
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 78
Gln Tyr Glu Thr Leu Leu Ile Glu Thr Ala Ser Ser Leu Val Lys Asn
1 5 10 15

[0034]

Ala Ile Gln Leu Ser Ile Glu Gln Leu
20 25

<210> 79
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 79
Leu Glu Lys Gln Tyr Gln Glu Gln Leu Glu Glu Glu Val Ala Lys Val
1 5 10 15

Ile Val Ser Met Ser Ile Ala Phe Ala
20 25

<210> 80
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 80
Asn Thr Asp Glu Ala Gln Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met
1 5 10 15

Ile Val Ser Asp Ile Met Gln Gln Ala
20 25

<210> 81
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

[0035]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 81
Val Asn Leu Asp Lys Lys Ala Val Leu Ala Glu Lys Ile Val Ala Glu
1 5 10 15

Ala Ile Glu Lys Ala Glu Arg Glu Leu
20 25

<210> 82
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 82
Asn Gly Ile Leu Glu Leu Glu Thr Lys Ser Ser Lys Leu Val Gln Asn
1 5 10 15

Ile Ile Gln Thr Ala Val Asp Gln Phe
20 25

<210> 83
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 83
Thr Gln Asp Lys Asn Tyr Glu Asp Glu Leu Thr Gln Val Ala Leu Ala
1 5 10 15

Leu Val Glu Asp Val Ile Asn Tyr Ala
20 25

[0036]

<210> 84
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 84
Glu Thr Ser Ala Lys Asp Asn Ile Asn Ile Glu Glu Ala Ala Arg Phe
1 5 10 15

Leu Val Glu Lys Ile Leu Val Asn His
20 25

<210> 85
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

[0037]

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

[0038]

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 86
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0039]

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

[0040]

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 87
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Ser 或 Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> His、Lys 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES

[0041]

<222> (4)..(4)
<223> Gln 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Gly 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Thr 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Glu 或 Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Gln 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Gly 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Thr 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Glu 或 Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> Arg 或 Lys

<220>

[0042]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (23)..(24)
<223> Gln 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Asp 或 Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> Glu 或 Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (32)..(32)
<223> Ala、Leu、Ile 或 Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Glu 或 Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (37)..(37)
<223> Thr 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (38)..(38)
<223> Arg 或 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (40)..(40)
<223> Arg 或 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (41)..(41)
<223> Glu 或 Asp

[0043]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> Ala、Leu、Ile或Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (43)..(43)
<223> Arg或Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (44)..(44)
<223> Ala、Leu、Ile或Val

<400> 87
Xaa Xaa Ile Xaa Ile Pro Pro Xaa Leu Xaa Xaa Leu Leu Xaa Xaa Tyr
1 5 10 15

Xaa Val Xaa Val Leu Xaa Xaa Xaa Pro Pro Xaa Leu Val Xaa Phe Xaa
20 25 30

Val Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40

<210> 88
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Gln或Asn

<220>
<221> MOD_RES

[0044]

<222> (2)..(2)
<223> Ile、Leu 或 Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Glu 或 Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Tyr、Phe、Thr 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Leu、Ile 或 Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Lys 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Gln 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Asp 或 Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Asn 或 Gln

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(16)
<223> Gln 或 Asn

<220>

[0045]

<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Ala、Leu、Ile 或 Val

<400> 88
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ile Val Xaa Xaa Ala Ile Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 89
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Ser 或 Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Gln 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Thr 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Val、Ile、Leu 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES

[0046]

<222> (23)..(23)
<223> Gln 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> Val、Ile、Leu 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Glu 或 Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (37)..(37)
<223> Thr 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (38)..(38)
<223> Arg 或 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (40)..(40)
<223> Arg 或 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> Ala、Leu、Ile 或 Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (44)..(44)
<223> Ala、Leu、Ile 或 Val

<400> 89
Xaa His Ile Xaa Ile Pro Pro Gly Leu Xaa Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Xaa Glu Val Leu Arg Xaa Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala

[0047]

20 25 30

Xaa Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Glu Xaa Arg Xaa
35 40

<210> 90
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 90
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 91
Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 92
Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

[0048]

<210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 93
Ser Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 94
Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 95
Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

[0049]

<210> 96
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 96

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 97
<211> 15

[0050]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 97
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 98
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 98
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

[0051]

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

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 99
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 100
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 100
His His His His His His Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10

<210> 101
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 101
Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile
1 5 10 15

Gln Gln Ala Gly Cys

[0052]

20

<210> 102
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102
Pro Lys Ser Cys
1

<210> 103
<211> 55
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 103
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Ile Gln Ile
1 5 10 15

Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr Thr Val Glu Val Leu
20 25 30

Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala Val Glu Tyr Phe Thr
35 40 45

Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
50 55

<210> 104
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0053]

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 104
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln Ala
20 25

<210> 105
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成 6xHis 标签

<400> 105
His His His His His His
1 5

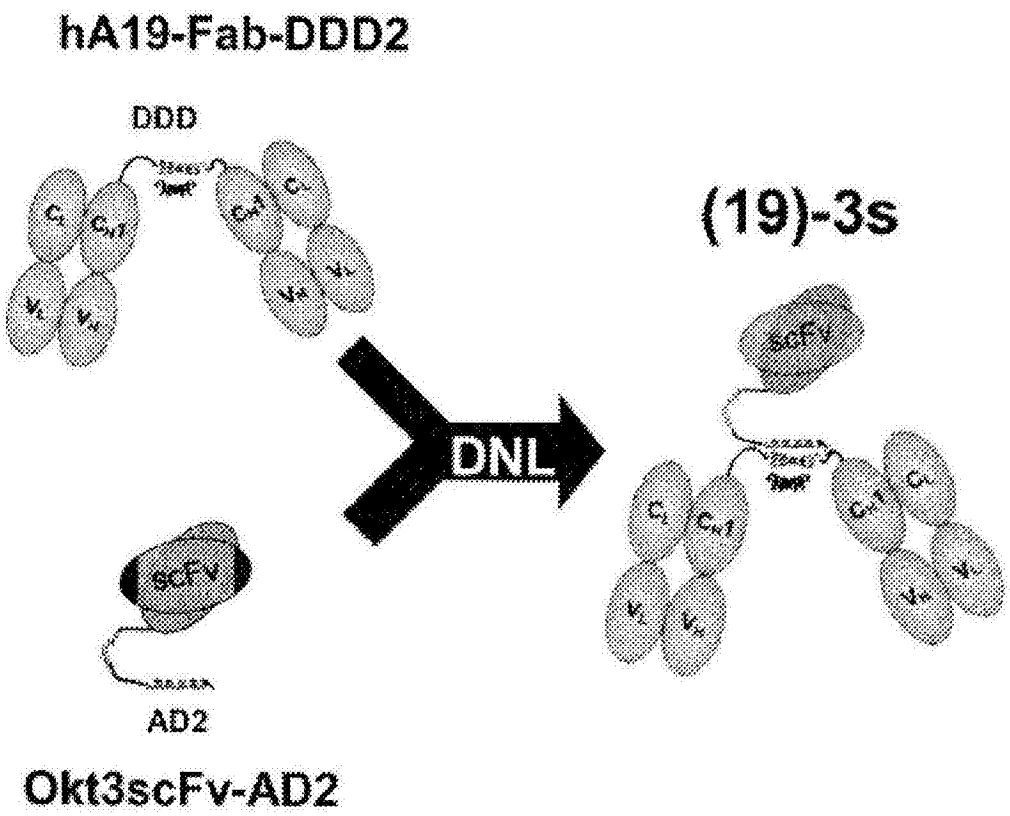


图 1

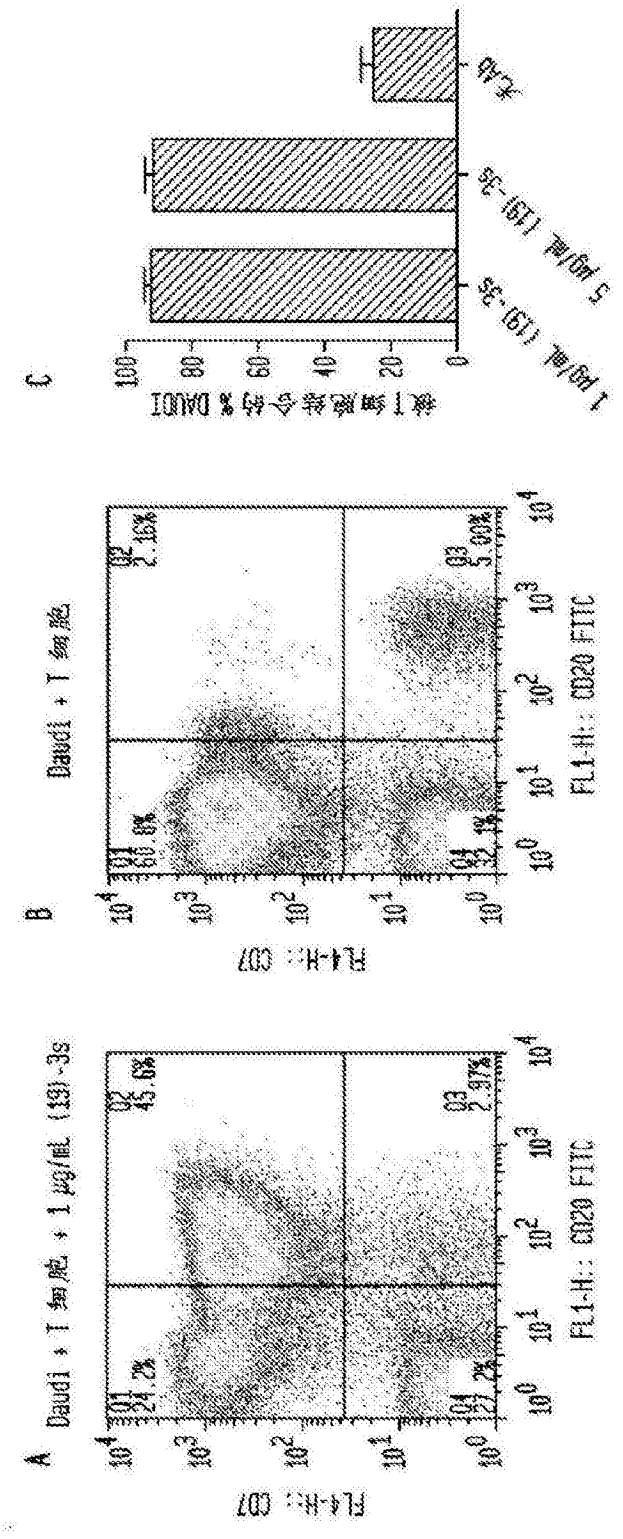

A
Daudi + T 细胞 + 1 μg/mL (19)-3s
Q2 45.6%
Q3 2.97%
Q1 24.2%
Q4 27.2%
FL4-H:: CD7
FL1-H:: CD20 FITC
B
Daudi + T 细胞
Q2 2.16%
Q3 5.00%
Q1 60.8%
Q4 32.1%
FL4-H:: CD7
FL1-H:: CD20 FITC
C
杀T细胞株介导的% DAUDI
100
80
60
40
20
0
1 μg/mL (19)-3s
5 μg/mL (19)-3s
未处理

图 2


A
B
C
D

图 3

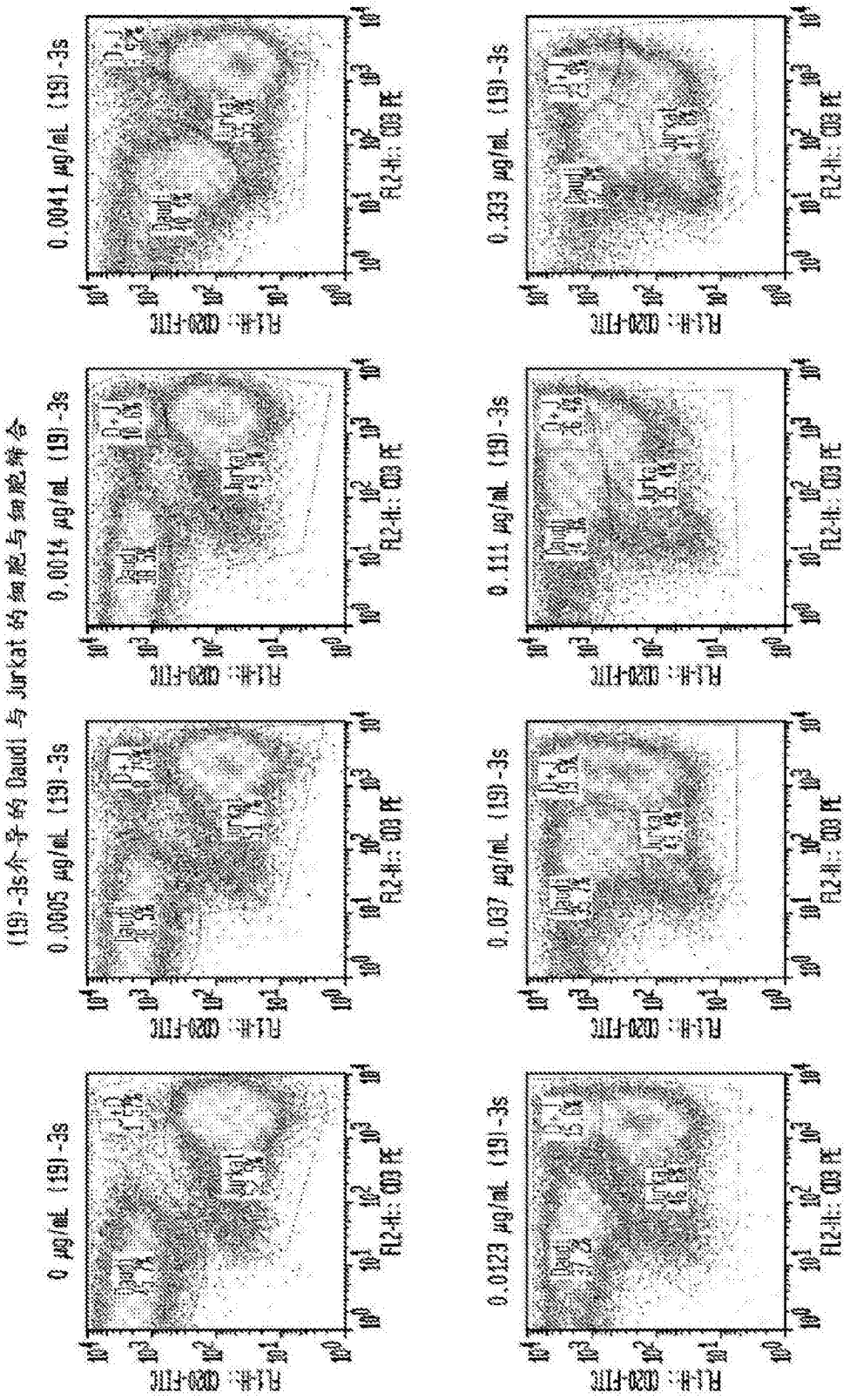

(19)-3s介导的 Daudi 与 Jurkat 的细胞与细胞聚合
0 μg/mL (19)-3s
0.0005 μg/mL (19)-3s
0.0014 μg/mL (19)-3s
0.0041 μg/mL (19)-3s
0.0123 μg/mL (19)-3s
0.037 μg/mL (19)-3s
0.111 μg/mL (19)-3s
0.333 μg/mL (19)-3s
FL1-H:: CD20-FITC
FL2-H:: CD3 PE

图 4

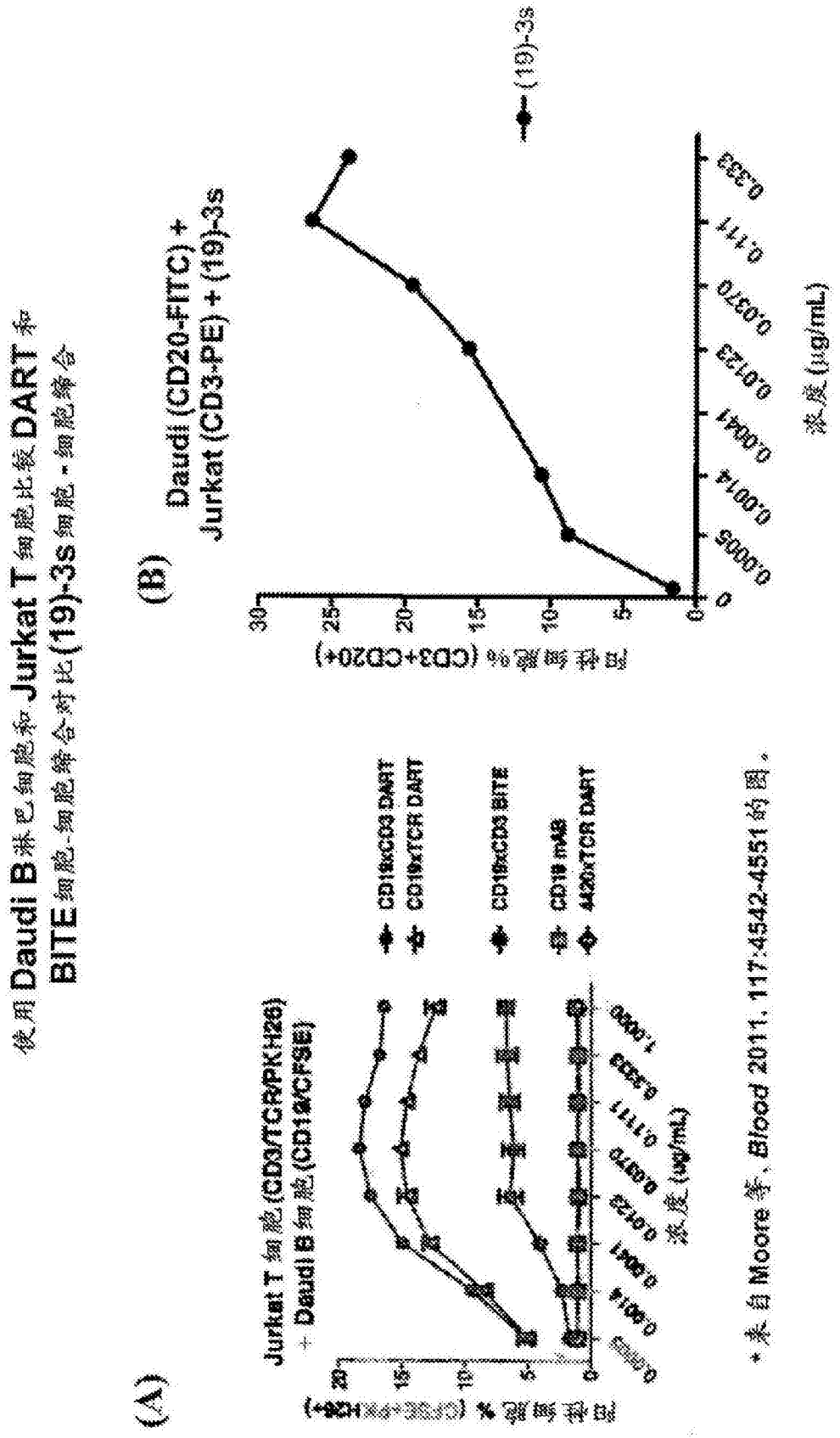

使用 Daudi B 淋巴细胞和 Jurkat T 细胞比较 DART 和
BITE 细胞-细胞桥合对比(19)-3s 细胞 - 细胞桥合
(A)
Jurkat T 细胞(CD3/TCR/PKH26)
+ Daudi B 细胞(CD19/CFSE)
CD19xCD3 DART
CD19xTCR DART
CD19xCD3 BITE
CD19 mAb
4420xTCR DART
浓度 (ug/mL)
(B)
Daudi (CD20-FITC) +
Jurkat (CD3-PE) + (19)-3s
(19)-3s
浓度 (μg/mL)
* 来自 Moore 等, Blood 2011, 117:4542-4551 的图。

图 5

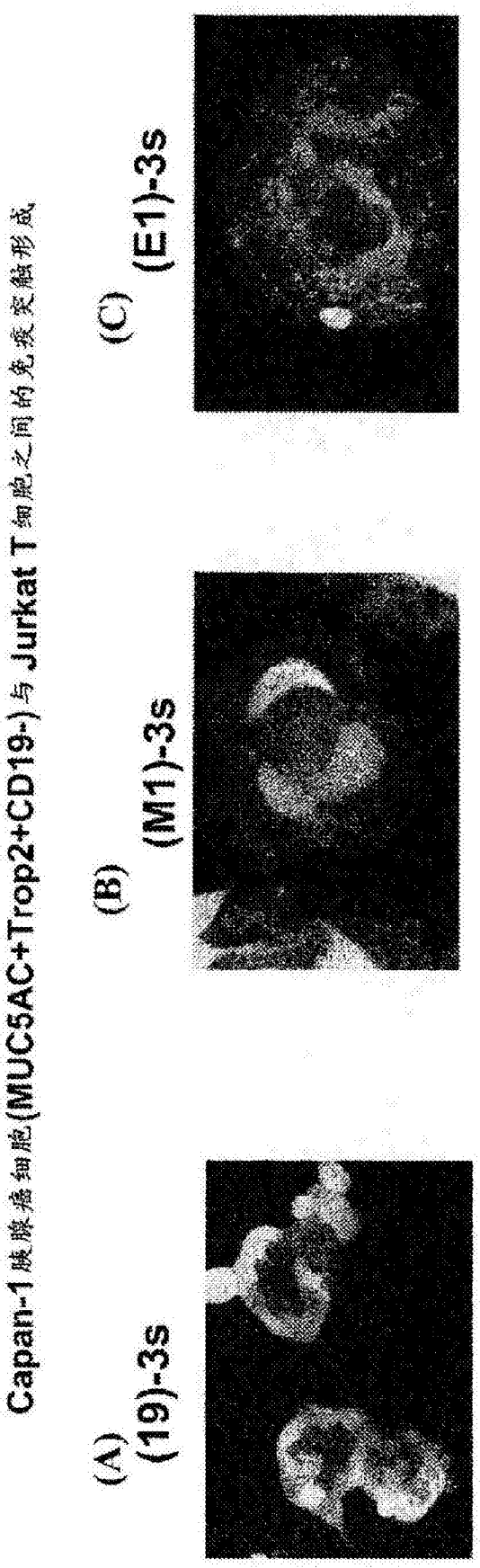

Capan-1胰腺癌细胞(MUC5AC+Trop2+CD19-)与Jurkat T细胞之间的免疫突触形成
(A)
(19)-3s
(B)
(M1)-3s
(C)
(E1)-3s

图 6

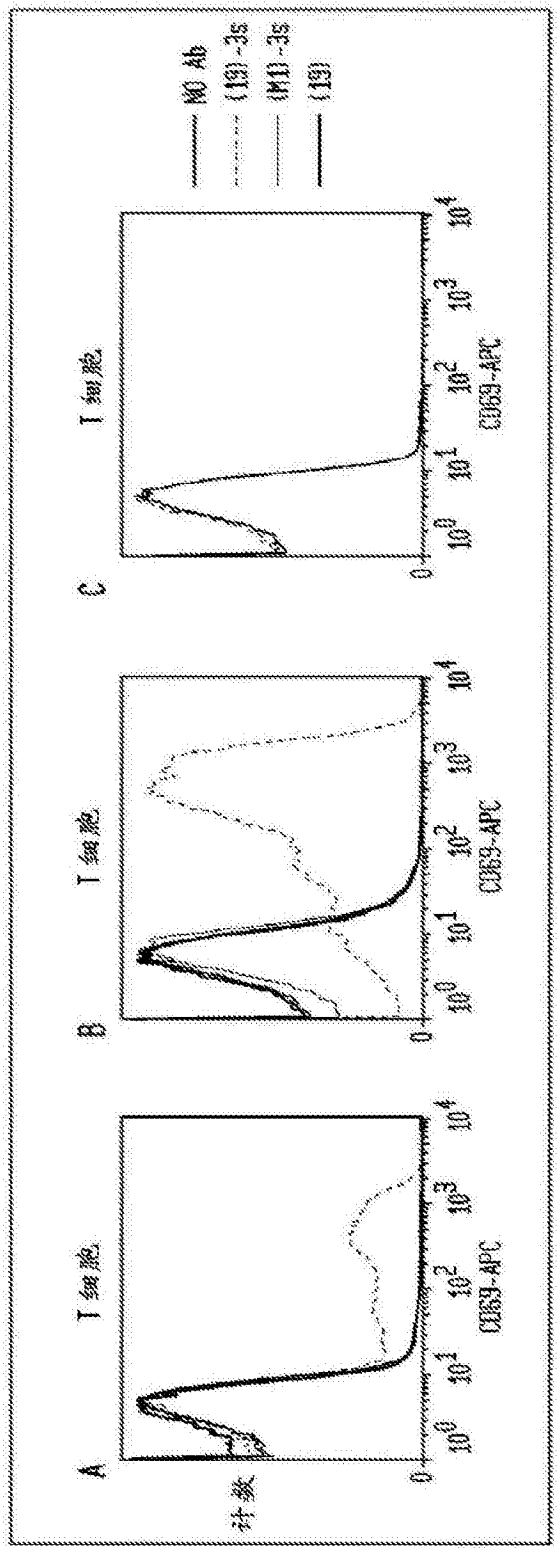

A
T 细胞
计数
CD69-APC
B
T 细胞
CD69-APC
C
T 细胞
CD69-APC
MO Ab
(19)-3s
(M1)-3s
(19)

图 7

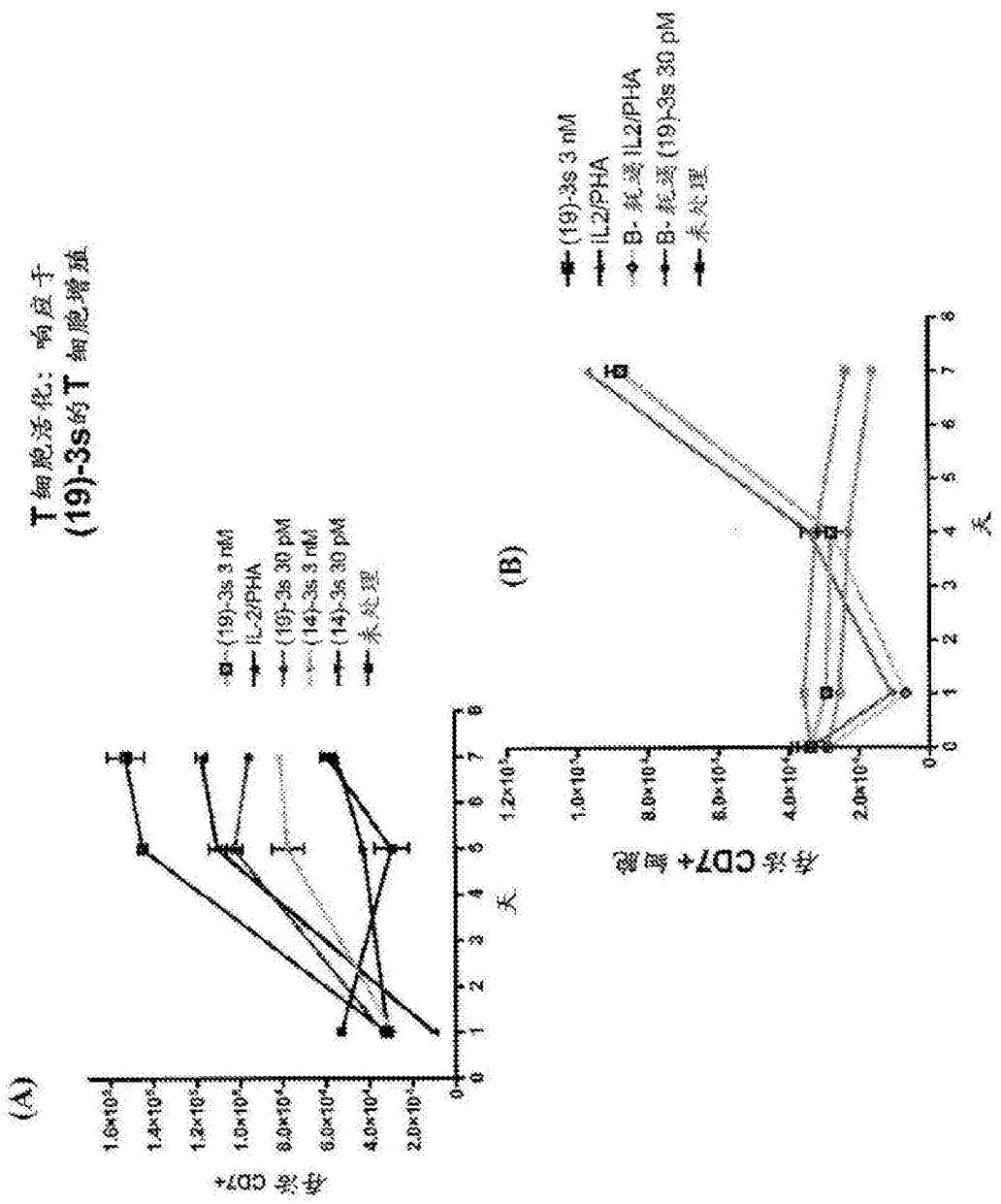

T细胞活化：响应于
(19)-3s的T细胞增殖
(A)
(19)-3s 3 nM
IL-2/PHA
(19)-3s 30 pM
(14)-3s 3 nM
(14)-3s 30 pM
未处理
存活 CD7+
天
(B)
(19)-3s 3 nM
IL2/PHA
B- 耗竭 IL2/PHA
B- 耗竭 (19)-3s 30 pM
未处理
存活 CD7+ 数据
天

图 8

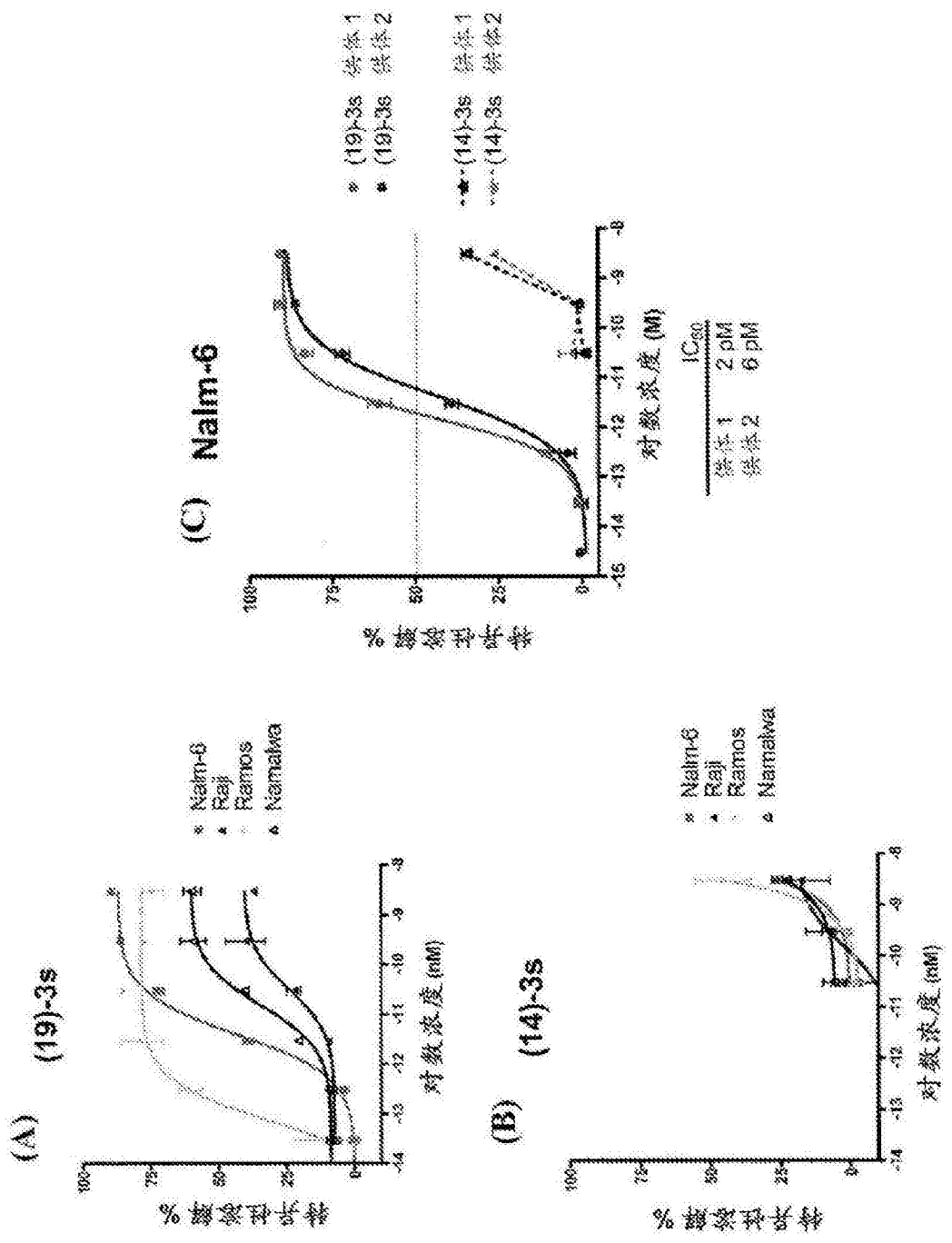

(A)
(19)-3s
Nalm-6
Raji
Ramos
Namalwa
特异性杀解 %
对数浓度 (nM)
(B)
(14)-3s
Nalm-6
Raji
Ramos
Namalwa
特异性杀解 %
对数浓度 (nM)
(C)
Nalm-6
(19)-3s 供体 1
(19)-3s 供体 2
(14)-3s 供体 1
(14)-3s 供体 2
特异性杀解 %
对数浓度 (M)
IC50
供体 1 2 pM
供体 2 6 pM

图 9

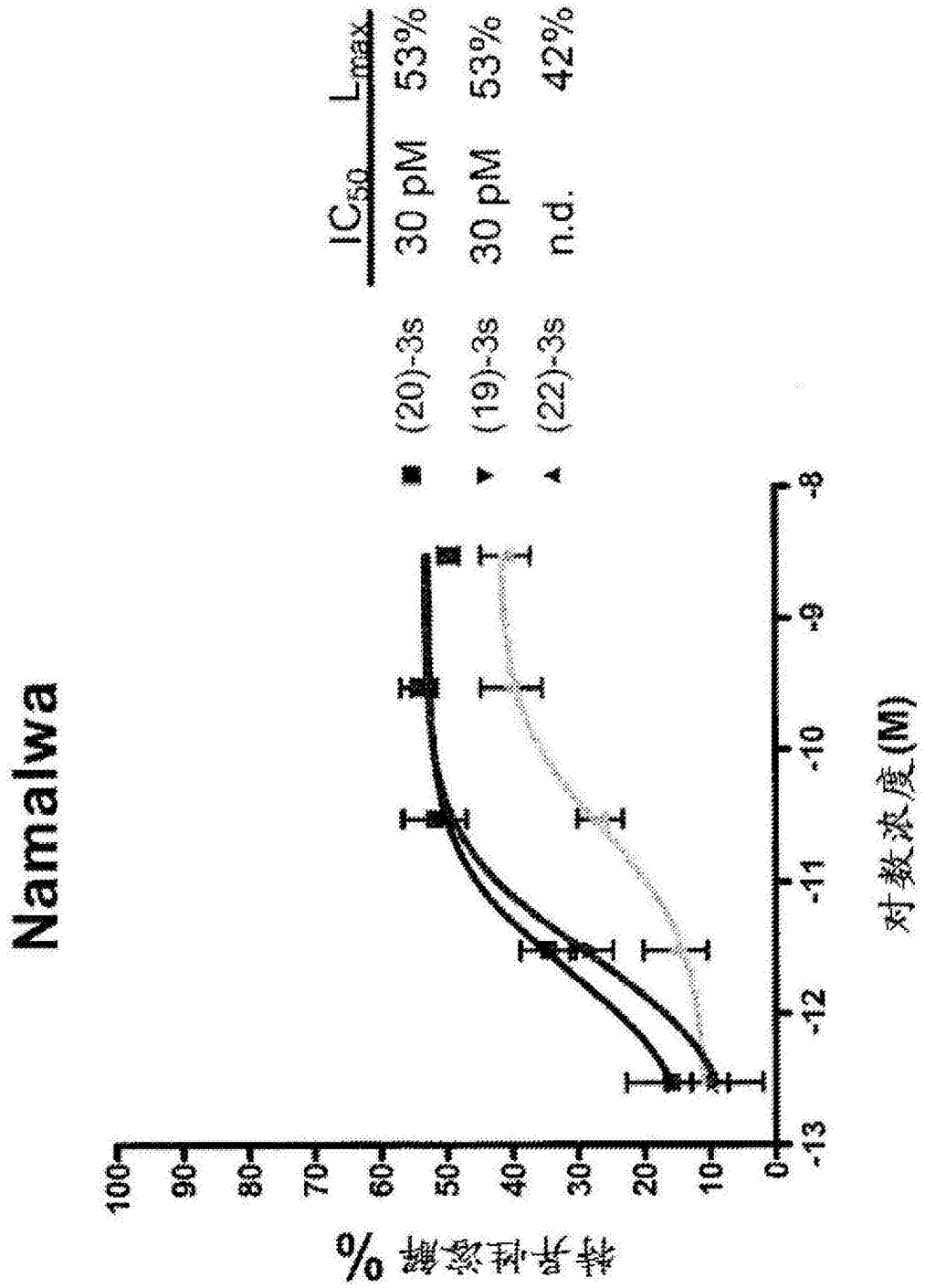

Namalwa
IC50 Lmax
(20)-3s 30 pM 53%
(19)-3s 30 pM 53%
(22)-3s n.d. 42%
特异性溶解 %
对数浓度(M)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-13
-12
-11
-10
-9
-8

图 10A

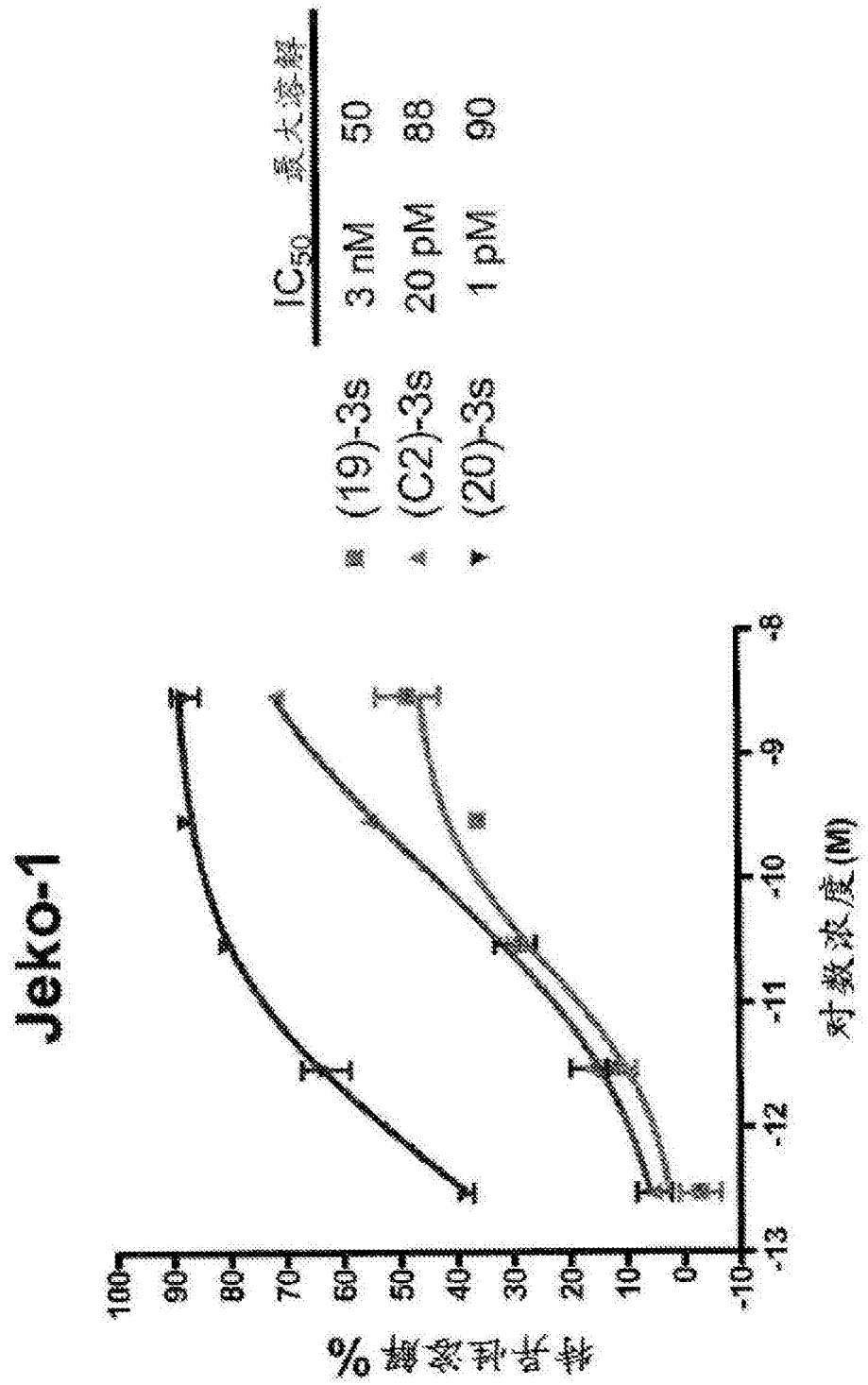

Jeko-1
IC50 最大溶解
(19)-3s 3 nM 50
(C2)-3s 20 pM 88
(20)-3s 1 pM 90
特异性溶解 %
对数浓度 (M)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-13
-12
-11
-10
-9
-8

图 10B

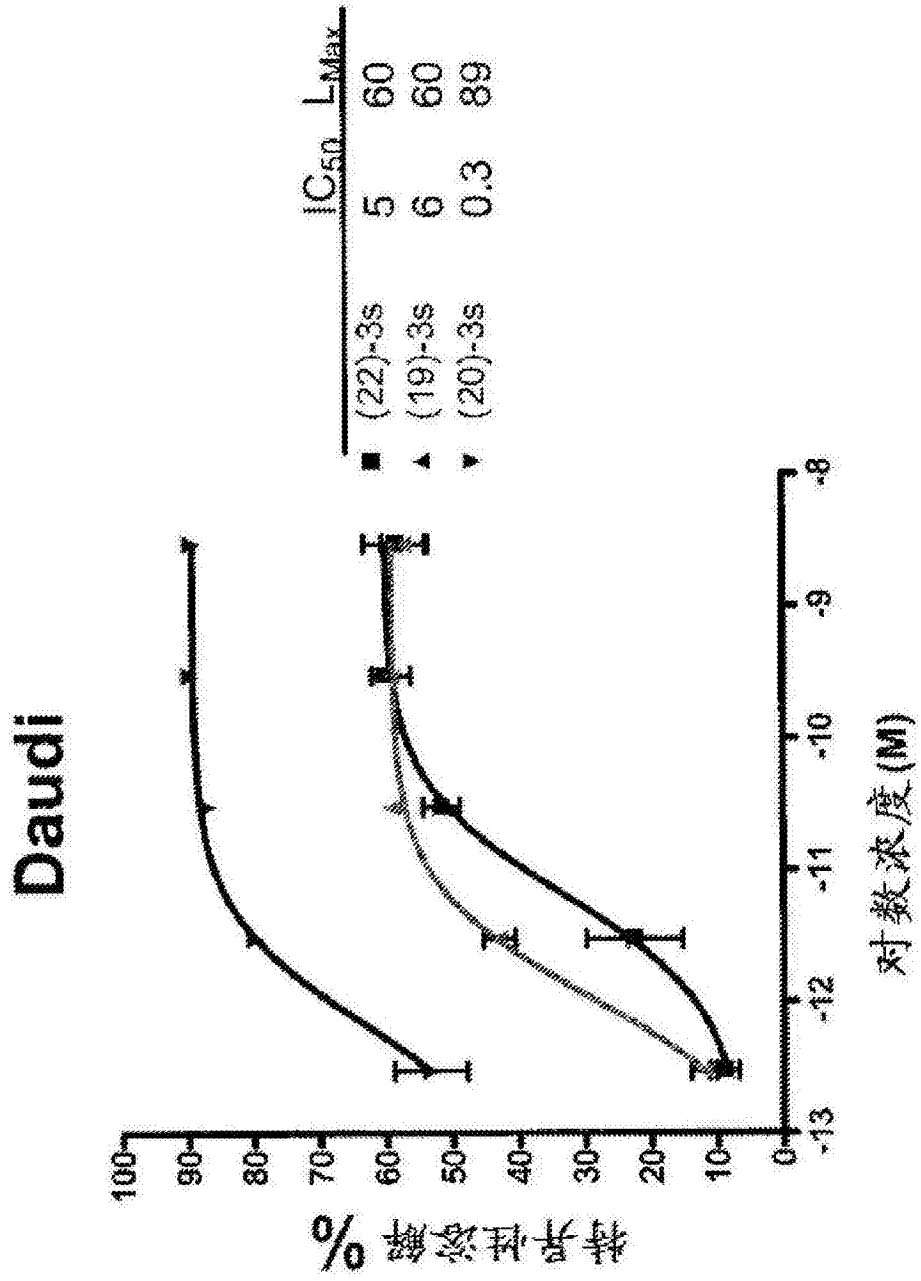


图 10C

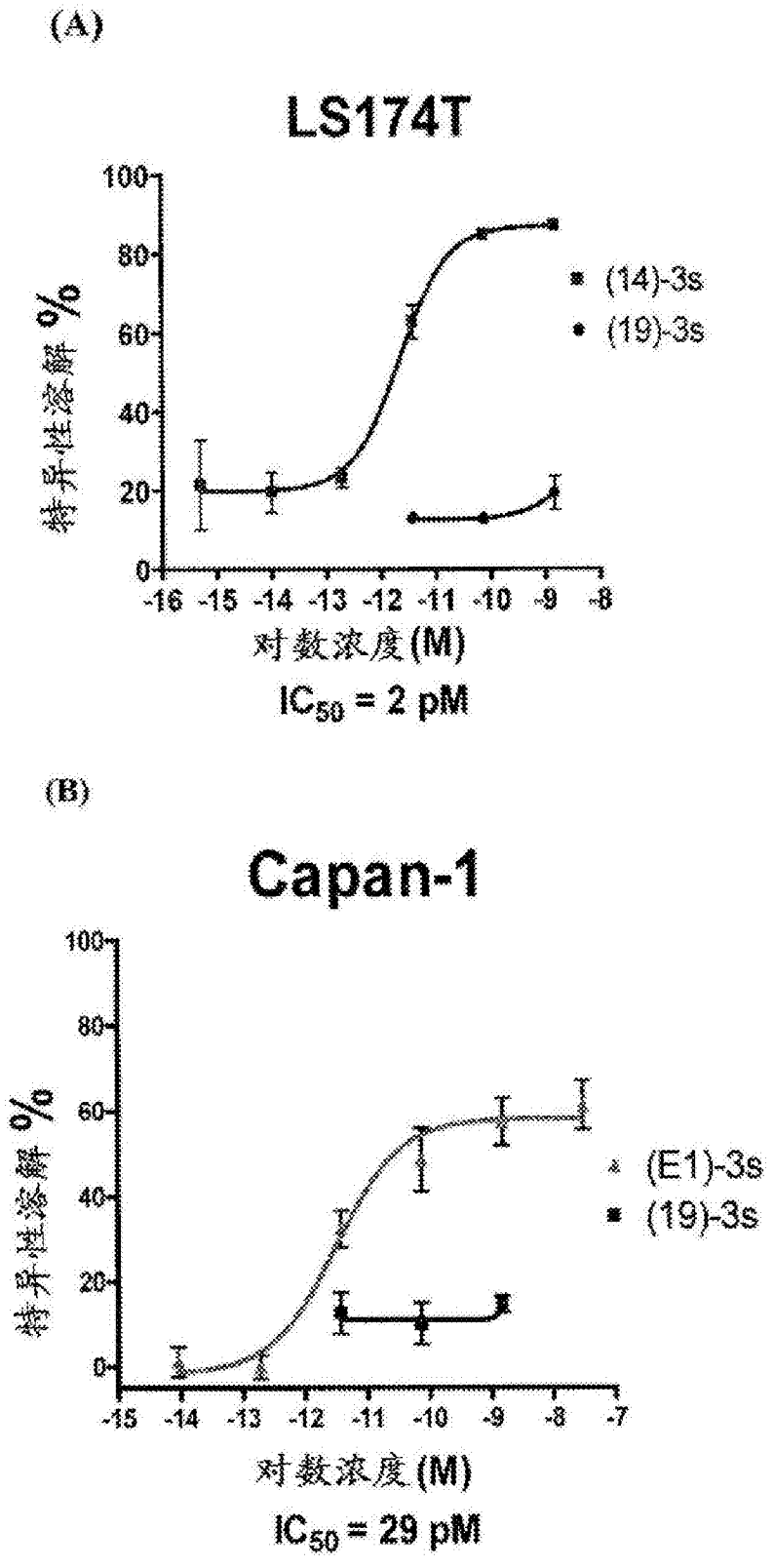

(A)
LS174T
特异性溶解 %
100
80
60
40
20
0
-16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8
对数浓度(M)
(14)-3s
(19)-3s
IC50 = 2 pM
(B)
Capan-1
特异性溶解 %
100
80
60
40
20
0
-15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7
对数浓度(M)
(E1)-3s
(19)-3s
IC50 = 29 pM

图 11

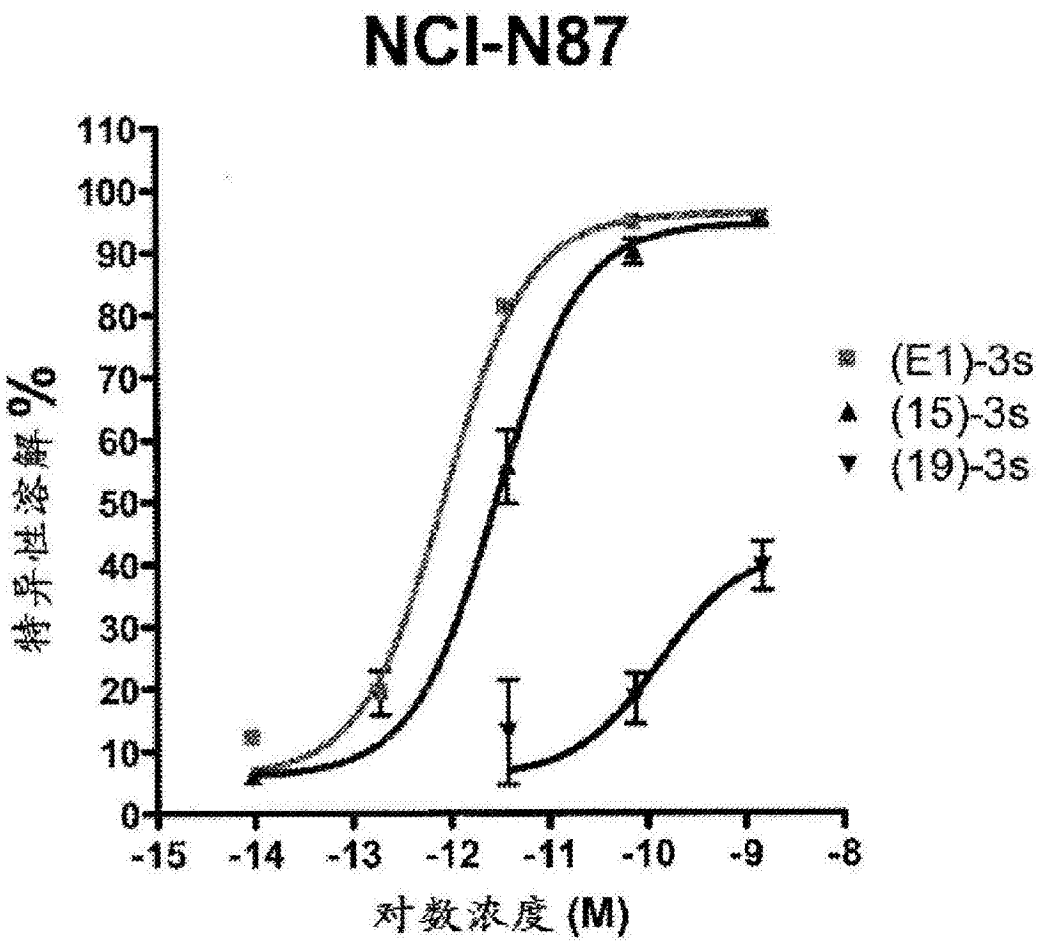

NCI-N87
特异性溶解 %
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
对数浓度 (M)
(E1)-3s
(15)-3s
(19)-3s

图 11C

			表达 *	IC50 (pM)	最大溶解 (%)
(20)-3s	CD20	Daudi	1	<0.3	~90
(19)-3s	CD19	Daudi	1	1	~60
(22)-3s	CD22	Daudi	1	~5	~60
(20)-3s	CD20	Nalmawa	0.11	30	53
(19)-3s	CD19	Namalwa	1.67	63	60
(22)-3s	CD22	Namalwa	0.06	ND	42
(20)-3s	CD20	Jeko-1	1.02	1	90
(19)-3s	CD19	Jeko-1	1.93	3000	50
(20)-3s	CD20	Ramos	TBD	TBD	TBD
(19)-3s	CD19	Ramos	0.84	0.17	79
(20)-3s	CD20	Nalm6	TBD	TBD	TBD
(19)-3s	CD19	Nalm6	0.75	6	~93
(20)-3s	CD20	Raji	TBD	TBD	TBD
(19)-3s	CD19	Raji	2.55	>3000	41
(C2)-3s		Daudi			
		Jeko-1		20	88

图 12

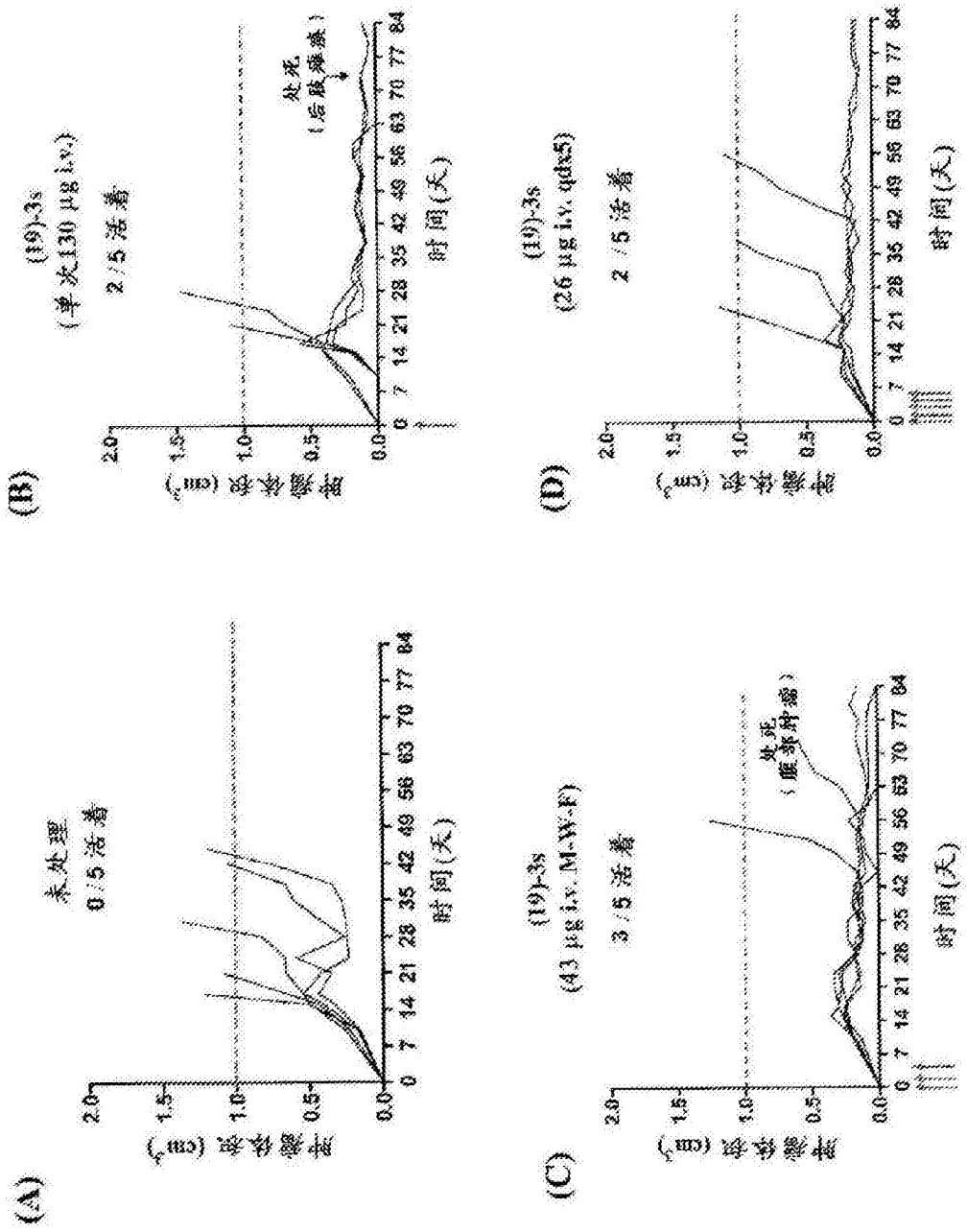

(A)
未处理
0 / 5 活着
(B)
(19)-3s
(单次130 μg i.v.)
2 / 5 活着
处死
(后肢瘫痪)
(C)
(19)-3s
(43 μg i.v. M-W-F)
3 / 5 活着
处死
(鹿茸肿瘤)
(D)
(19)-3s
(26 μg i.v. qdx5)
2 / 5 活着
肿瘤体积 (cm³)
时间(天)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84

图 13

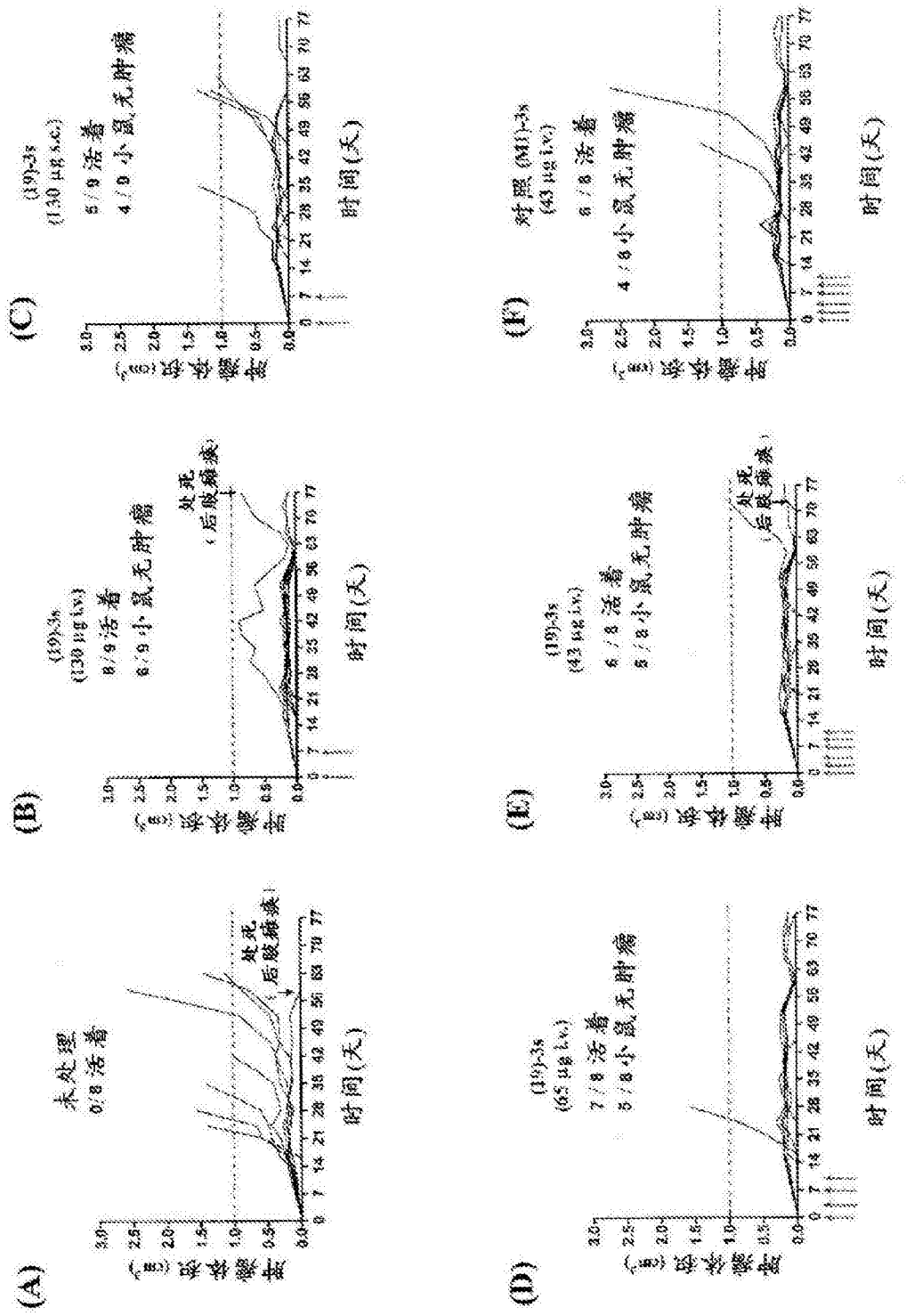

(A)
未处理
0/8 活着
(B)
(19)-3s
(130 μg i.v.)
8/9 活着
6/9 小鼠无肿瘤
处死
(后肢麻痹)
(C)
(19)-3s
(130 μg s.c.)
5/9 活着
4/9 小鼠无肿瘤
(D)
(19)-3s
(65 μg i.v.)
7/8 活着
5/8 小鼠无肿瘤
(E)
(19)-3s
(43 μg i.v.)
6/8 活着
5/8 小鼠无肿瘤
(F)
对照 (M1)-3s
(43 μg i.v.)
6/8 活着
4/8 小鼠无肿瘤
肿瘤体积 (cm³)
时间(天)

图 14

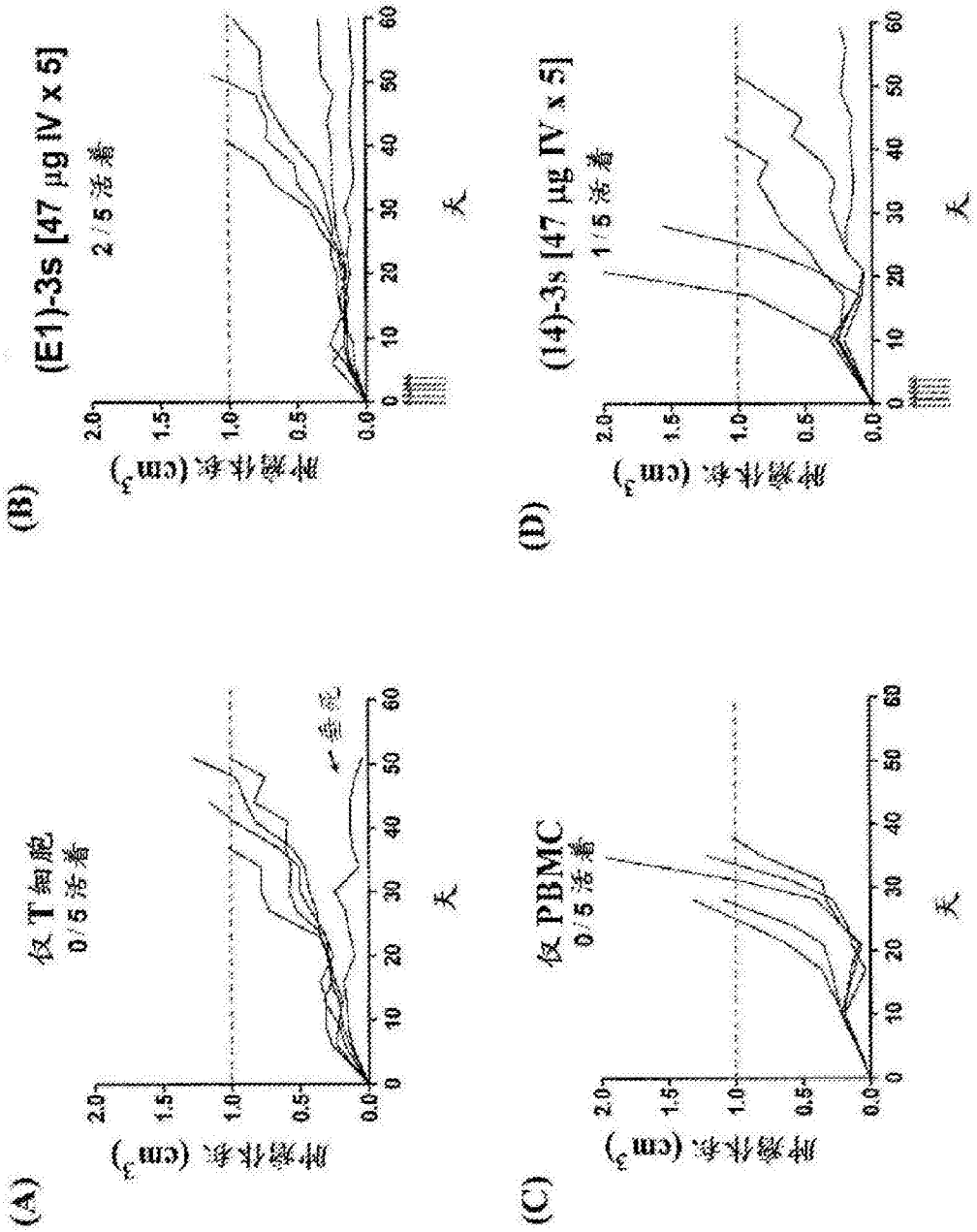
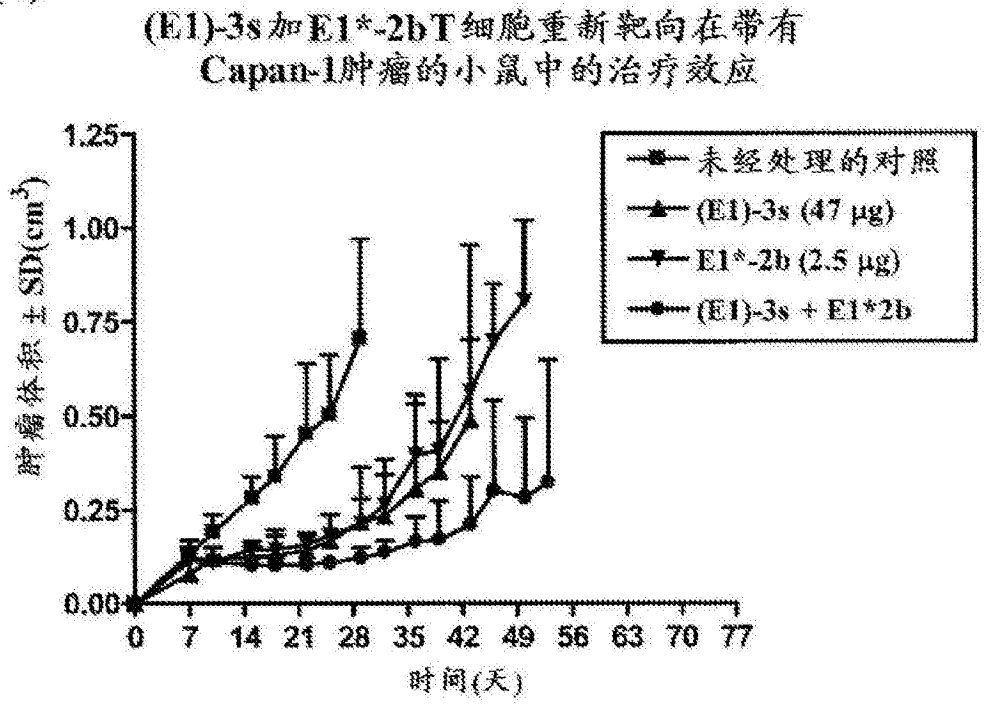

(A)
仅 T 细胞
0 / 5 活着
(B)
(E1)-3s [47 μg IV x 5]
2 / 5 活着
(C)
仅 PBMC
0 / 5 活着
(D)
(14)-3s [47 μg IV x 5]
1 / 5 活着
肿瘤体积 (cm³)
天
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
10
20
30
40
50
60

图 15

(A)


(E1)-3s加E1*-2bT细胞重新靶向在带有
Capan-1肿瘤的小鼠中的治疗效应
肿瘤体积 ± SD(cm³)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77
时间(天)
未经处理的对照
(E1)-3s (47 μg)
E1*-2b (2.5 μg)
(E1)-3s + E1*2b

(B)

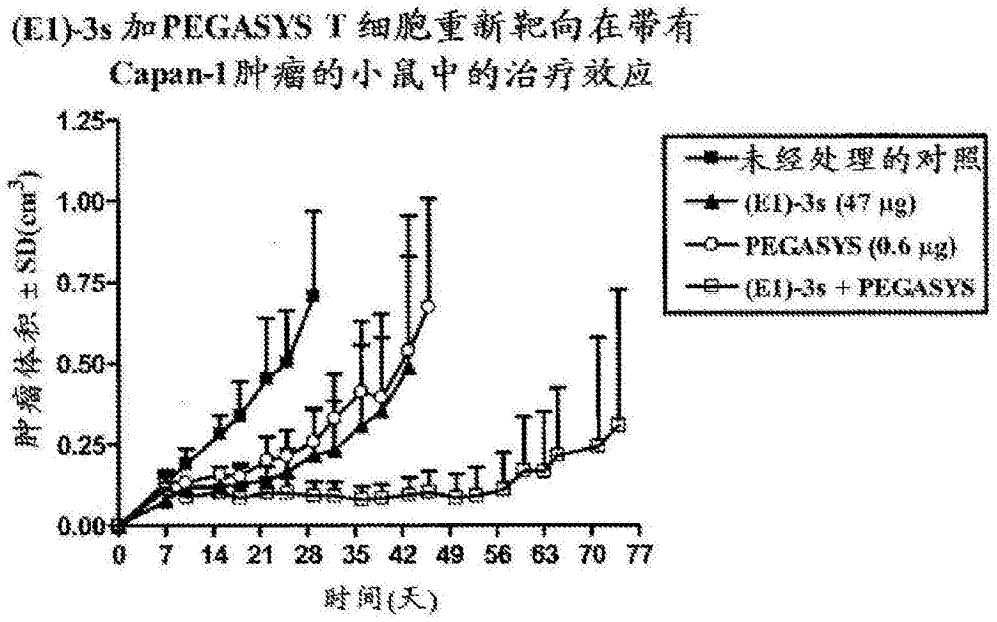

(E1)-3s 加PEGASYS T 细胞重新靶向在带有
Capan-1肿瘤的小鼠中的治疗效应
肿瘤体积 ± SD(cm³)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77
时间(天)
未经处理的对照
(E1)-3s (47 μg)
PEGASYS (0.6 μg)
(E1)-3s + PEGASYS

图 16

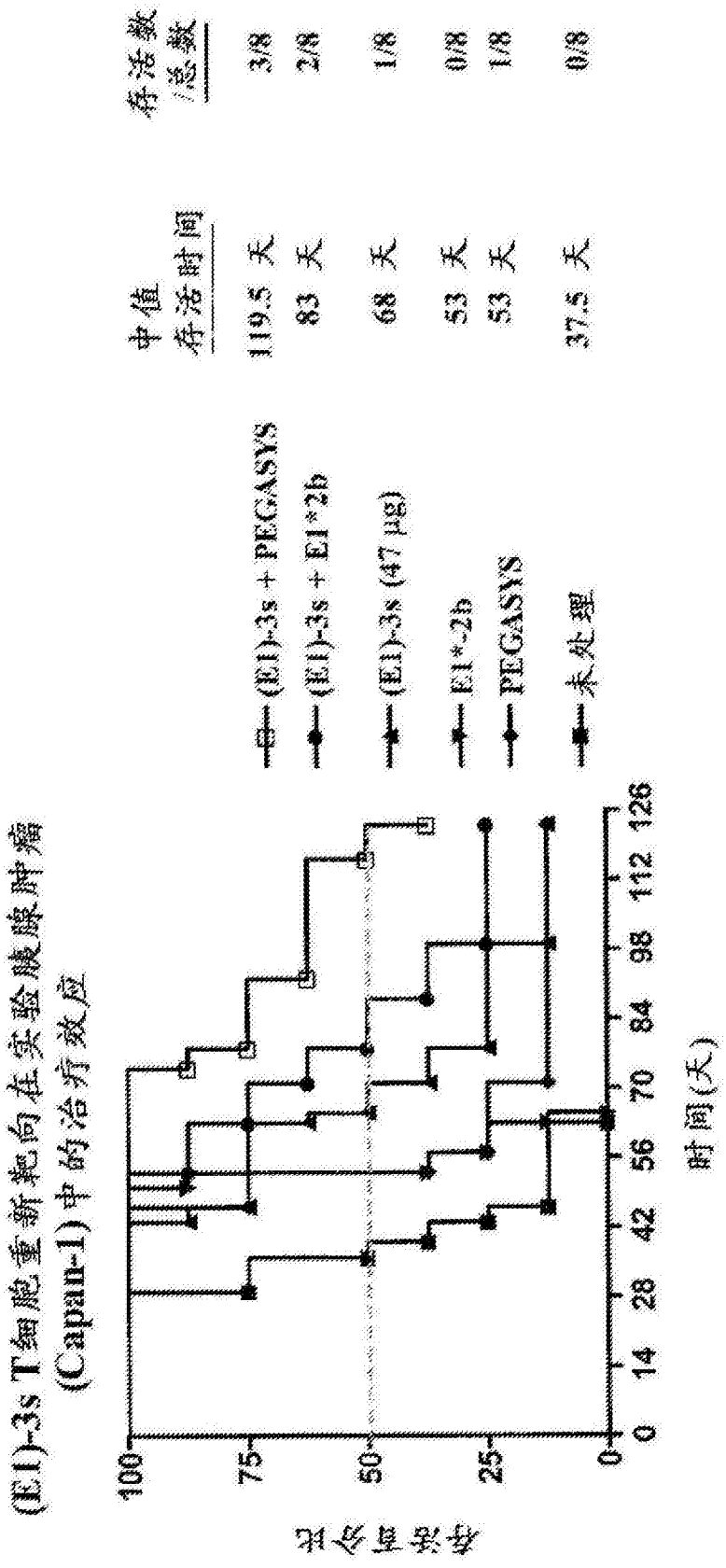

(E1)-3s T细胞重新靶向在实验胰腺肿瘤
(Capan-1)中的治疗效应
存活百分比
时间(天)
0
14
28
42
56
70
84
98
112
126
100
75
50
25
0
(E1)-3s + PEGASYS
(E1)-3s + E1*2b
(E1)-3s (47 μg)
E1*-2b
PEGASYS
未处理
中值 存活时间
119.5 天
83 天
68 天
53 天
53 天
37.5 天
存活数/总数
3/8
2/8
1/8
0/8
1/8
0/8

图 17

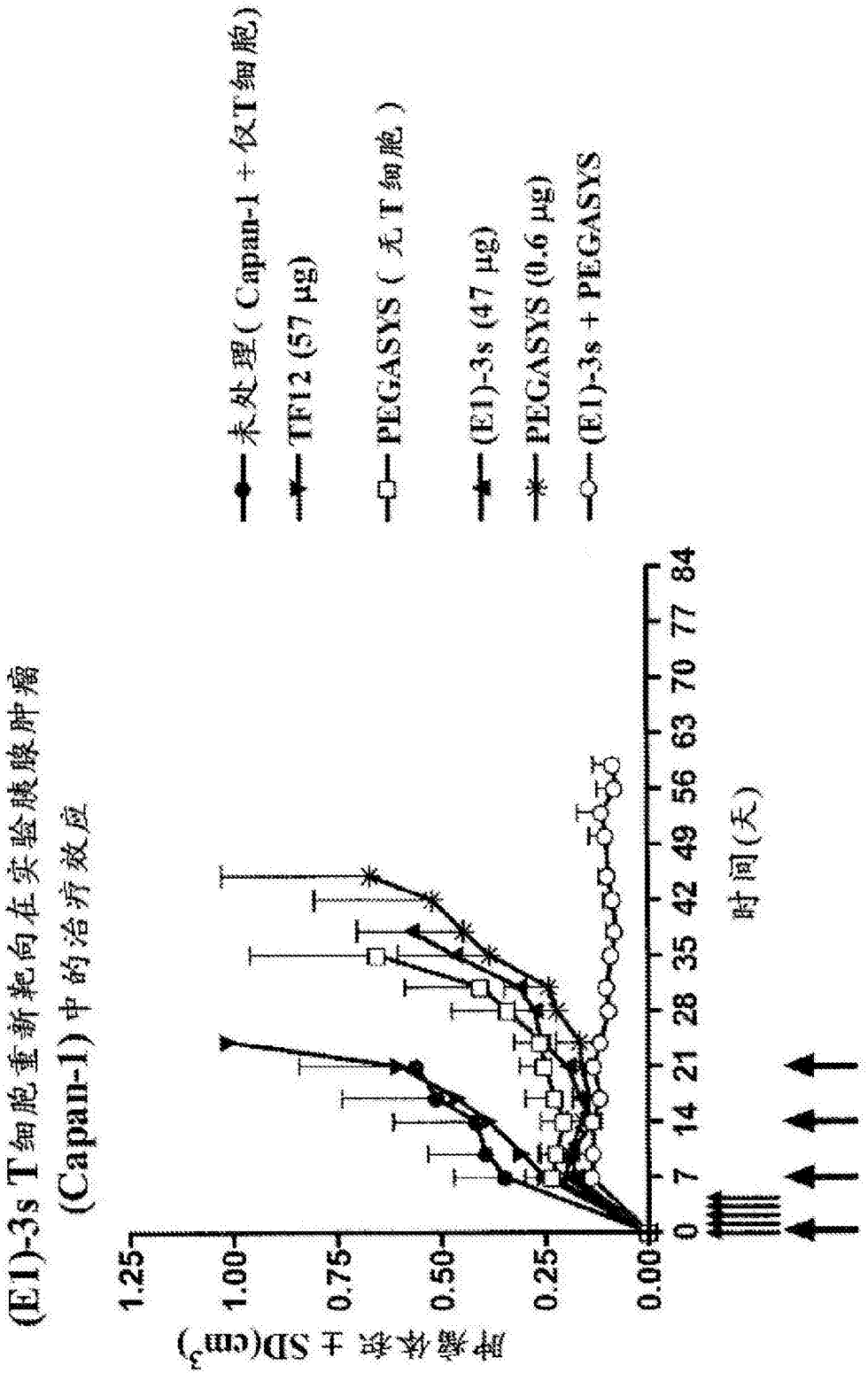

(E1)-3s T细胞重新靶向在实验胰腺肿瘤
(Capan-1)中的治疗效应
未处理(Capan-1 + 仅T细胞)
TF12 (57 μg)
PEGASYS (无T细胞)
(E1)-3s (47 μg)
PEGASYS (0.6 μg)
(E1)-3s + PEGASYS
肿瘤体积 ± SD(cm³)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84
时间(天)

图 18

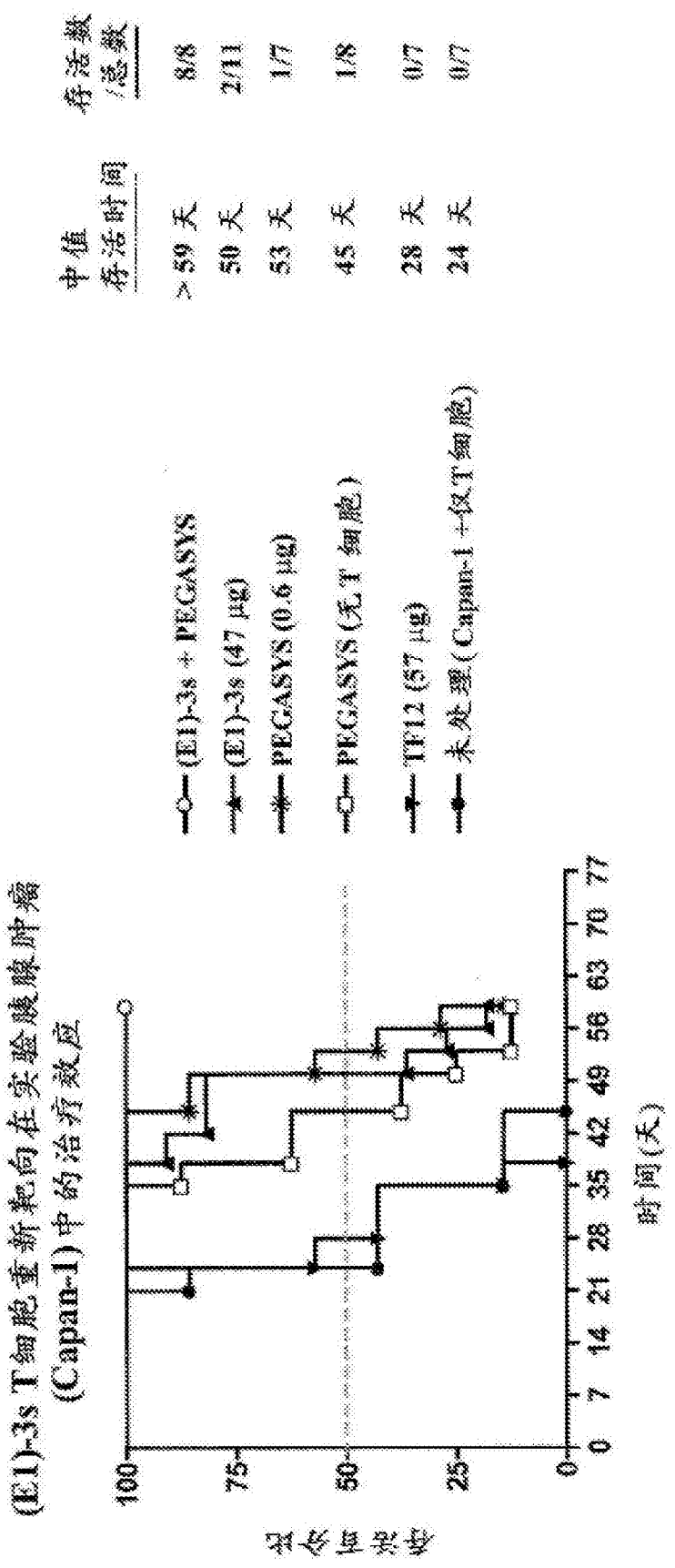

(E1)-3s T细胞重新靶向在实验胰腺肿瘤
(Capan-1)中的治疗效应
存活百分比
100
75
50
25
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77
时间(天)
(E1)-3s + PEGASYS
(E1)-3s (47 μg)
PEGASYS (0.6 μg)
PEGASYS (无 T 细胞)
TF12 (67 μg)
未处理(Capan-1 +仅T细胞)
中值 存活时间 存活数 /总数
>59 天 8/8
50 天 2/11
53 天 1/7
45 天 1/8
28 天 0/7
24 天 0/7

图 19

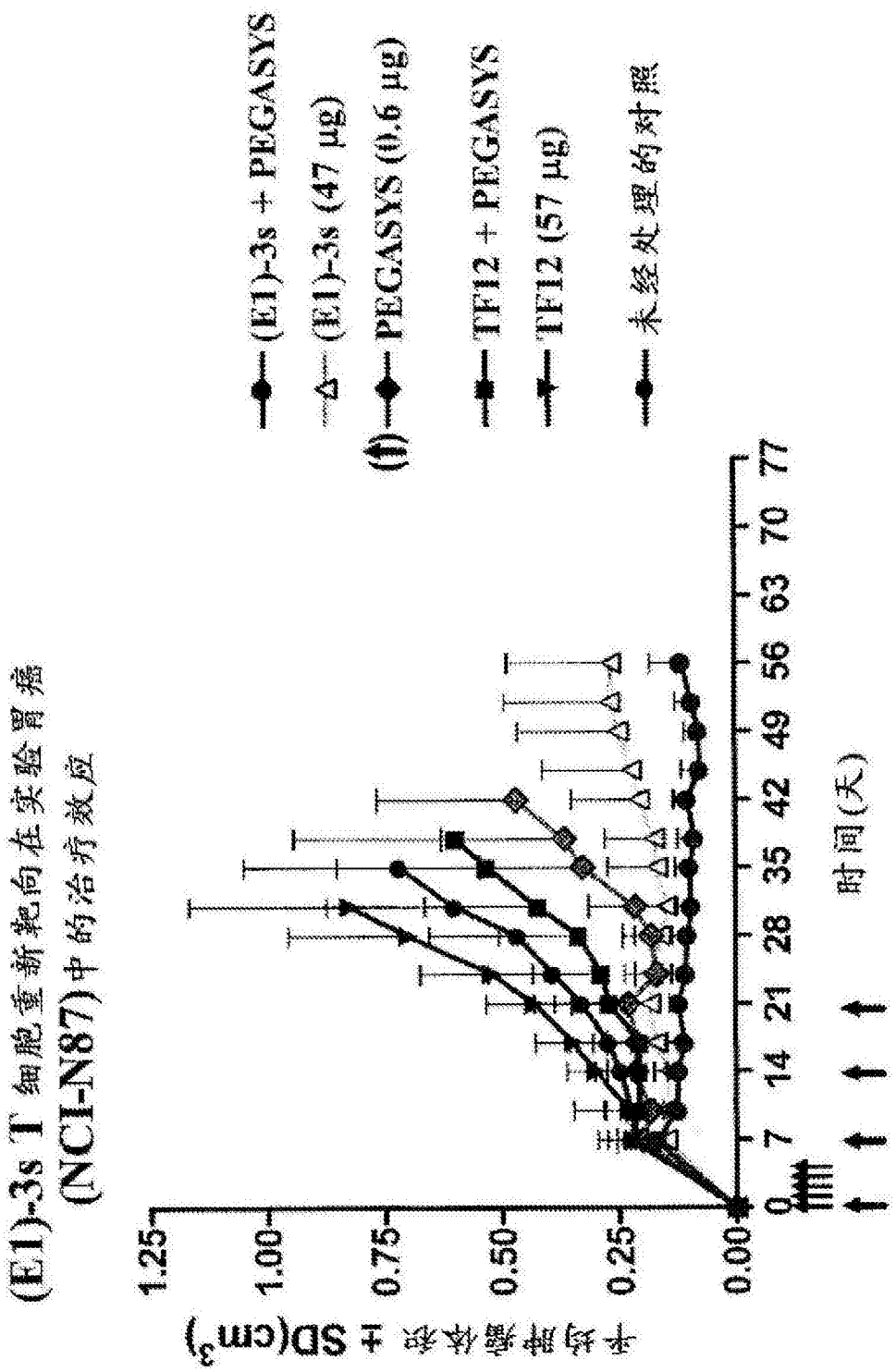

(E1)-3s T 细胞重新靶向在实验胃癌
(NCI-N87)中的治疗效应
(E1)-3s + PEGASYS
(E1)-3s (47 μg)
PEGASYS (0.6 μg)
TF12 + PEGASYS
TF12 (57 μg)
未经处理的对照
平均肿瘤体积 ± SD(cm³)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
时间(天)

图 20

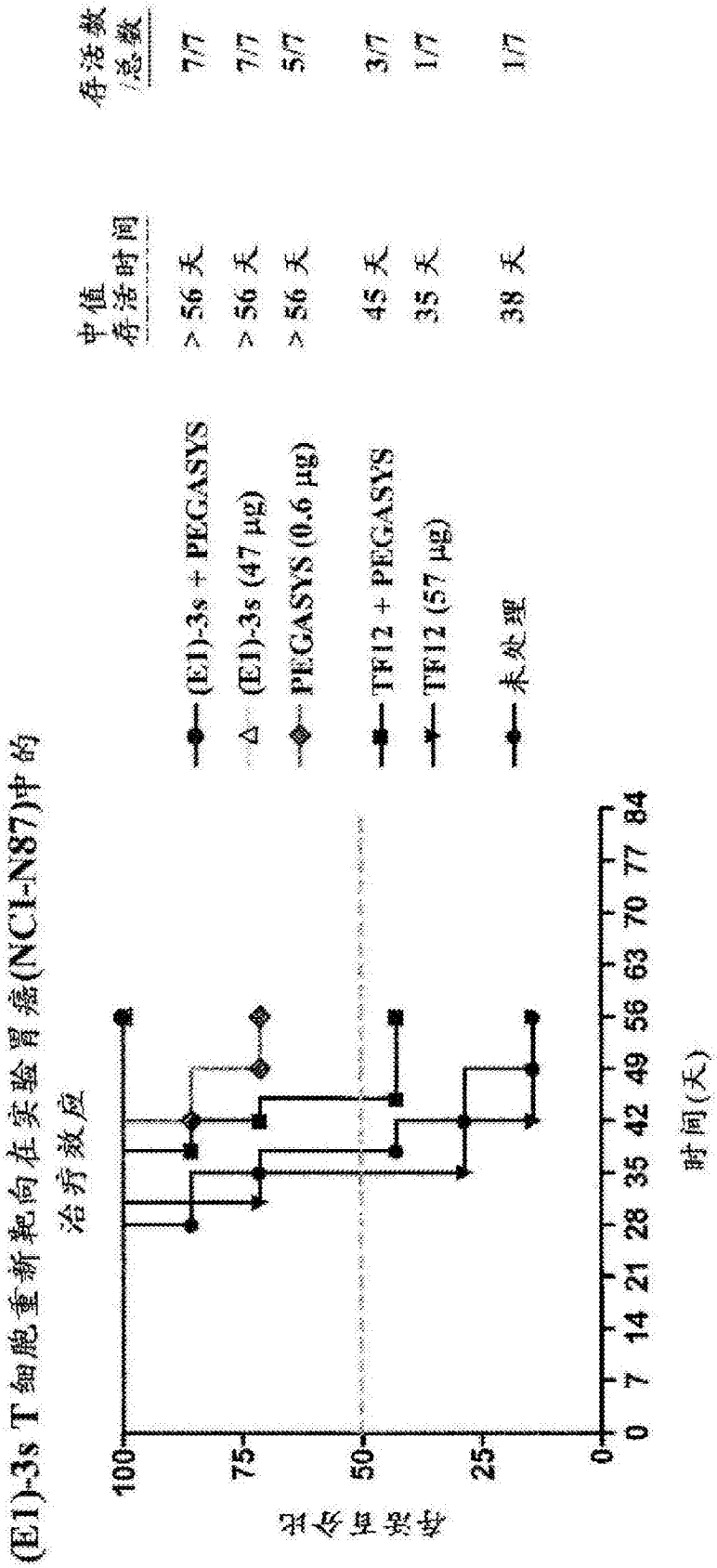

(E1)-3s T 细胞重新靶向在实验胃癌(NCI-N87)中的
治疗效应
存活百分比
时间(天)
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
84
25
50
75
100
(E1)-3s + PEGASYS
(E1)-3s (47 μg)
PEGASYS (0.6 μg)
TF12 + PEGASYS
TF12 (57 μg)
未处理
中值
存活时间
存活数
/总数
> 56 天
7/7
> 56 天
7/7
> 56 天
5/7
45 天
3/7
35 天
1/7
38 天
1/7

图 21