



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112585164 A

(43) 申请公布日 2021.03.30

(21) 申请号 201980038348.0

申请人 瓦尔德希伯伦肿瘤研究所
加泰罗尼亚研究和深造学院

(22) 申请日 2019.04.11

(72) 发明人 J·塞奥内苏亚雷斯
J·阿尼多富尔盖拉 J·弗兰森
R·M·哈勒特
M·帕斯夸尔加西亚
E·邦菲尔泰克西多尔
E·普拉纳斯里戈尔

(30) 优先权数据

18382248.5 2018.04.12 EP
18382326.9 2018.05.14 EP
18382360.8 2018.05.25 EP
19382132.9 2019.02.22 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.08

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/000423 2019.04.11

代理人 初明明 黄希贵

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/197903 EN 2019.10.17

(51) Int.Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(71) 申请人 免疫医疗有限公司

地址 英国剑桥郡

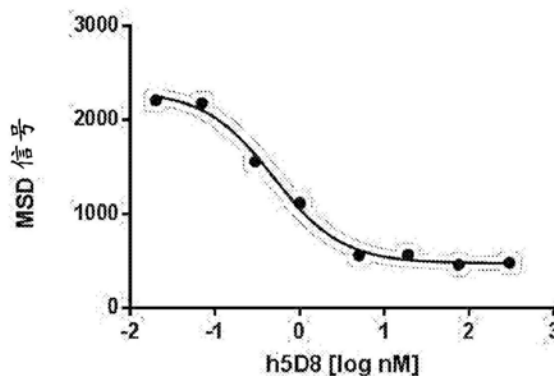
权利要求书8页 说明书83页 附图57页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的、LIF抑制剂和PD-1轴抑制剂的组合

(57) 摘要

本文描述了使用白血病抑制因子(LIF)结合多肽和PD-1轴抑制剂的组合治疗癌症的方法。



1. 白血病抑制因子 (LIF) 结合抗体与PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂组合治疗个体的癌症的用途,其中该LIF结合抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;

b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;

c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;

d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;

e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及

f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的用途,其中该LIF结合抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1所阐述的氨基酸序列;

b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4所阐述的氨基酸序列;

c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6所阐述的氨基酸序列;

d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9所阐述的氨基酸序列;

e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11所阐述的氨基酸序列;以及

f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的用途,其中该LIF结合抗体包括:

a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:3所阐述的氨基酸序列;

b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:5所阐述的氨基酸序列;

c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:7所阐述的氨基酸序列;

d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:10所阐述的氨基酸序列;

e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:12所阐述的氨基酸序列;以及

f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。

5. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。

6. 如权利要求1至4中任一项所述的用途,其中在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。

7. 如权利要求1至4中任一项所述的用途,其中在将该LIF结合抗体施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

8. 如权利要求1至4中任一项所述的用途,其中在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的用途,其中该LIF结合抗体是人源化的。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的用途,其中该LIF结合抗体包括免疫球蛋白重链可变区(VH),其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;以及免疫球蛋白轻链可变区(VL),其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同。

11. 如权利要求10所述的用途,其中该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的用途,其中该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。

13. 如权利要求12所述的用途,其中该癌症包括非小细胞肺癌。

14. 如权利要求12所述的用途,其中该癌症包括胰腺导管腺癌。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的用途,其中先前用检查点抑制剂治疗该癌症并不成功。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的用途,其中先前用LIF结合抗体治疗该癌症并不成功。

17. 如权利要求15或16所述的用途,其中该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的用途,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。

19. 白血病抑制因子(LIF)结合抗体与PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂组合用于治疗个体的癌症的用途,其中该LIF结合抗体包括免疫球蛋白重链可变区(VH),其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;以及免疫球蛋白轻链可变区(VL),其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同。

20. 如权利要求19所述的用途,其中将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。

21. 如权利要求19所述的用途,其中将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。

22. 如权利要求19或20所述的用途,其中在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。

23. 如权利要求19或20所述的用途,其中在将该LIF结合抗体施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

24. 如权利要求19至21中任一项所述的用途,其中在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

25. 如权利要求19至24中任一项所述的用途,其中该LIF结合抗体是人源化的。

26. 如权利要求19至25中任一项所述的用途,其中该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的

氨基酸序列相同；并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。

27. 如权利要求19至26中任一项所述的用途，其中该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。

28. 如权利要求27所述的用途，其中该癌症包括非小细胞肺癌。

29. 如权利要求27所述的用途，其中该癌症包括胰腺导管腺癌。

30. 如权利要求19至29中任一项所述的用途，其中先前用检查点抑制剂治疗该癌症并不成功。

31. 如权利要求19至30中任一项所述的用途，其中先前用LIF结合抗体治疗该癌症并不成功。

32. 如权利要求30或31所述的用途，其中该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。

33. 如权利要求19至32中任一项所述的用途，其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。

34. 一种治疗患有癌症的个体的方法，其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合：

a) 特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体，该抗体包括：

i. 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1)，其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列；

ii. 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2)，其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列；

iii. 免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3)，其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列；

iv. 免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1)，其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列；

v. 免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2)，其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列；以及

vi. 免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3)，其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列；以及

b) PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。

35. 如权利要求34所述的方法，其中该LIF结合抗体包括：

a) 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1)，其包括SEQ ID NO:1所阐述的氨基酸序列；

b) 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2)，其包括SEQ ID NO:4所阐述的氨基酸序列；

c) 免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3)，其包括SEQ ID NO:6所阐述的氨基酸序列；

d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1)，其包括SEQ ID NO:9所阐述的氨基酸序列；

e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2)，其包括SEQ ID NO:11所阐述的氨基酸序列；以及

f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3)，其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

36. 如权利要求34所述的方法,其中该LIF结合抗体包括:

- a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:3所阐述的氨基酸序列;
- b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:5所阐述的氨基酸序列;
- c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:7所阐述的氨基酸序列;
- d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:10所阐述的氨基酸序列;
- e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:12所阐述的氨基酸序列;以及
- f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

37. 如权利要求34至36中任一项所述的方法,其中将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。

38. 如权利要求34至36中任一项所述的方法,其中将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。

39. 如权利要求34至37中任一项所述的方法,其中在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。

40. 如权利要求34至37中任一项所述的方法,其中在将该LIF结合抗体施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

41. 如权利要求34至37中任一项所述的方法,其中在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

42. 如权利要求34至41中任一项所述的方法,其中该LIF结合抗体是人源化的。

43. 如权利要求34至42中任一项所述的方法,其中该LIF结合抗体包括免疫球蛋白重链可变区 (VH),其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;以及免疫球蛋白轻链可变区 (VL),其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同。

44. 如权利要求43所述的方法,其中该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。

45. 如权利要求34至44中任一项所述的方法,其中该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。

46. 如权利要求45所述的方法,其中该癌症包括非小细胞肺癌。

47. 如权利要求45所述的方法,其中该癌症包括胰腺导管腺癌。

48. 如权利要求34至45中任一项所述的方法,其中先前用检查点抑制剂治疗该癌症并不成功。

49. 如权利要求34至45中任一项所述的方法,其中先前用LIF结合抗体治疗该癌症并不成功。

50. 如权利要求48或49所述的方法,其中该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。

51. 如权利要求34至50中任一项所述的方法,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制

剂是与PD-1结合的抗体或其片段。

52. 如权利要求51所述的方法,其中该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。

53. 如权利要求51所述的方法,其中该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。

54. 如权利要求53所述的方法,其中该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。

55. 如权利要求34至50中任一项所述的方法,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。

56. 如权利要求55所述的方法,其中该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。

57. 如权利要求34至50中任一项所述的方法,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。

58. 如权利要求57所述的方法,其中PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的该小分子抑制剂包括以下一种或多种:N- {2- [((2- 甲氧基-6- [(2- 甲基 [1,1'- 联苯基] -3- 基) 甲氧基] 吡啶-3- 基) 甲基) 氨基] 乙基} 乙酰胺 (BMS 202); (2- ((3- 氰基苄基) 氧基) -4- ((3- (2,3- 二氢苯并 [b] [1,4] 二噁英-6- 基) -2- 甲基苄基) 氧基) -5- 甲基苄基) -D- 丝氨酸盐酸盐; (2R,4R) -1- (5- 氯-2- ((3- 氰基苄基) 氧基) -4- ((3- (2,3- 二氢苯并 [b] [1,4] 二噁英-6- 基) -2- 甲基苄基) 氧基) 苄基) -4- 羟基吡咯烷-2- 甲酸; 3- (4,6- 二氯-1,3,5- 三嗪-2- 基) -1- 苯基吡啶; 3- (4,6- 二氯-1,3,5- 三嗪-2- 基) -1- 苯基-1h- 吡啶; L- α - 谷氨酰胺, N2, N6- 双 (L- 丝氨酸基-L- 天冬酰胺基-L- 苏氨酸基-L- 丝氨酸基-L- α - 谷氨酸基-L- 丝氨酸基-L- 苯丙氨酸基) -L- 赖氨酸基-L- 苯丙氨酸基-L- 精氨酸基-L- 戊基-L- 苏氨酸基-L- 谷氨酸基-L- 亮氨酸基-L- 丙氨酸基-L- 脯氨酸基-L- 赖氨酸基-L- 丙氨酸基-L- 谷氨酸基-L- 异亮氨酸基-L- 赖氨酸基; (2S) -1- [[2, 6- 二甲氧基-4- [(2- 甲基 [1,1'- 联苯基] -3- 基) 甲氧基] 苄基] 甲基] -2- 哌啶甲酸; 甘氨酸, N- (2- 巯基乙酰基) -L- 苯丙氨酸基-N- 甲基-L- 丙氨酸基-L- 天冬酰胺基-L- 脯氨酸基-L- 组氨酸基-L- 亮氨酸基-N- 甲基甘露糖基-L- 色氨酸基-L- 丝氨酸基-L- 色氨酸基-N- 甲基-L- 正亮氨酸-N- 甲基-L- 正亮氨酸-L- 精氨酸基-L- 半胱氨酸基-, 环状 (1 \rightarrow 14) - 硫醚; 或其衍生物或类似物。

59. 一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:

a) 特异性结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体,该抗体包括:

i. 免疫球蛋白重链可变区 (VH), 其包括与SEQ ID NO: 42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列; 和

ii. 免疫球蛋白轻链可变区 (VL), 其与SEQ ID NO: 46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同; 以及

b) PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。

60. 如权利要求59所述的方法,其中该VH序列与SEQ ID NO: 42所阐述的氨基酸序列相同; 并且该VL序列与SEQ ID NO: 46所阐述的氨基酸序列相同。

61. 如权利要求59或60所述的方法,其中将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。

62. 如权利要求59或60所述的方法,其中将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信

号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。

63. 如权利要求59至61中任一项所述的方法,其中在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。

64. 如权利要求59至61中任一项所述的方法,其中在将该LIF结合抗体施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

65. 如权利要求59至61中任一项所述的方法,其中在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

66. 如权利要求59至65中任一项所述的方法,其中该LIF结合抗体是人源化的。

67. 如权利要求59至66中任一项所述的方法,其中该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤、软组织瘤或其任何组合。

68. 如权利要求67所述的方法,其中该癌症包括非小细胞肺癌。

69. 如权利要求67所述的方法,其中该癌症包括胰腺导管腺癌。

70. 如权利要求59至69中任一项所述的方法,其中先前用检查点抑制剂治疗该癌症并不成功。

71. 如权利要求59至69中任一项所述的方法,其中先前用LIF结合抗体治疗该癌症并不成功。

72. 如权利要求70或71所述的方法,其中该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。

73. 如权利要求59至72中任一项所述的方法,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。

74. 如权利要求73所述的方法,其中该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。

75. 如权利要求73所述的方法,其中该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。

76. 如权利要求75所述的方法,其中该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。

77. 如权利要求59至72中任一项所述的方法,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。

78. 如权利要求77所述的方法,其中该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。

79. 如权利要求59至72中任一项所述的方法,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。

80. 如权利要求79所述的方法,其中PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的该小分子抑制剂包括以下一种或多种:N- {2- [((2-甲氧基-6- [(2-甲基 [1,1'-联苯基]-3-基) 甲氧基] 吡啶-3-基) 甲基) 氨基] 乙基} 乙酰胺 (BMS 202); (2- ((3-氰基苄基) 氧基) -4- ((3- (2,3-二氢苯并 [b] [1,4] 二噁英-6-基) -2-甲基苄基) 氧基) -5-甲基苄基) -D-丝氨酸盐酸盐; (2R,4R) -1- (5-氯-2- ((3-氰基苄基) 氧基) -4- ((3- (2,3-二氢苯并 [b] [1,4] 二噁英-6-基) -2-甲基苄基) 氧基) 苄基) -4-羟基吡咯烷-2-甲酸; 3- (4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基) -1-苯基吡啶; 3- (4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基) -1-苯基-1h-吡啶; L- α -谷氨酰胺, N2, N6-双 (L-丝氨酰基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酰基-L-丝氨酰基-L- α -谷酰基-L-丝氨酰基-L-苯丙氨酰基) -L-赖氨酰

基-L-苯丙氨酰基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酰基-L-谷酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-脯氨酰基-L-赖氨酰基-L-丙氨酰基-L-谷酰基-L-异亮氨酰基-L-赖氨酰基; (2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酸, N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酰基-N-甲基-L-丙氨酰基-L-天冬酰胺基-L-脯氨酰基-L-组氨酰基-L-亮氨酰基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酰基-L-丝氨酰基-L-色氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰-N-甲基-L-正亮氨酰-L-精氨酸基-L-半胱氨酰基-, 环状(1→14)-硫醚;或其衍生物或类似物。

81. 如权利要求18所述的用途,其中该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。

82. 如权利要求18所述的用途,其中该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。

83. 如权利要求82所述的用途,其中该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。

84. 如权利要求1至17中任一项所述的用途,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。

85. 如权利要求84所述的用途,其中该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。

86. 如权利要求1至17中任一项所述的用途,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。

87. 如权利要求86所述的用途,其中PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的该小分子抑制剂包括以下一种或多种:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基)氨基]乙基}乙酰胺(BMS 202);(2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L-α-谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酰基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酰基-L-丝氨酰基-L-α-谷酰基-L-丝氨酰基-L-苯丙氨酰基)-L-赖氨酰基-L-苯丙氨酰基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酰基-L-谷酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-脯氨酰基-L-赖氨酰基-L-丙氨酰基-L-谷酰基-L-异亮氨酰基-L-赖氨酰基; (2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酸, N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酰基-N-甲基-L-丙氨酰基-L-天冬酰胺基-L-脯氨酰基-L-组氨酰基-L-亮氨酰基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酰基-L-丝氨酰基-L-色氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰-N-甲基-L-正亮氨酰-L-精氨酸基-L-半胱氨酰基-, 环状(1→14)-硫醚;或其衍生物或类似物。

88. 如权利要求33所述的用途,其中该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。

89. 如权利要求33所述的用途,其中该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。

90. 如权利要求89所述的用途,其中该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。

91. 如权利要求19至32中任一项所述的用途,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。

92. 如权利要求91所述的用途,其中该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。

93. 如权利要求19至32中任一项所述的用途,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。

94. 如权利要求93所述的用途,其中PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的该小分子抑制剂包括以下一种或多种:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基)氨基]乙基}乙酰胺(BMS 202);(2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N₂,N₆-双(L-丝氨酰基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酰基-L-丝氨酰基-L- α -谷酰基-L-丝氨酰基-L-苯丙氨酰基)-L-赖氨酰基-L-苯丙氨酰基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酰基-L-谷酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-脯氨酰基-L-赖氨酰基-L-丙氨酰基-L-谷酰基-L-异亮氨酰基-L-赖氨酰基; (2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苄基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酰胺,N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酰基-N-甲基-L-丙氨酰基-L-天冬酰胺基-L-脯氨酰基-L-组氨酰基-L-亮氨酰基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酰基-L-丝氨酰基-L-色氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-L-精氨酸基-L-半胱氨酰基-,环状(1 \rightarrow 14)-硫醚;或其衍生物或类似物。

用于治疗癌症的、LIF抑制剂和PD-1轴抑制剂的组合

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年4月12日提交的EP 18382248.5、于2018年5月14日提交的EP 18382326.9、于2018年5月25日提交的EP 18382360.8、于2019年2月22日提交的EP 19382132.9的优先权的权益,这些专利申请中的每一个通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 白血病抑制因子(LIF)是一种白细胞介素6(IL-6)型细胞因子,参与多种生物学活动,包括抑制细胞分化。人LIF是一种202个氨基酸的多肽,通过与gp130同源二聚化的细胞表面LIF受体(LIFR或CD118)结合发挥生物学效应。这导致促生长信号传导通路如丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和Janus活化激酶(JAK/STAT)通路的活化。LIF的高表达水平和高血清水平已被证明与许多类型癌症的不良预后有关。

[0004] 程序性细胞死亡蛋白1,也称为PD-1和CD279,是一种细胞表面受体,由活化的T细胞和B细胞表达,通过抑制T细胞炎症活动,在下调免疫系统和促进自身耐受中发挥重要作用。已显示PD-1与两种不同的配体PDL-1(CD274)和PDL-2(CD273)结合。通过此PD-1轴进行信号传导借由允许逃避免疫监视,是肿瘤生长和转移的重要机制。最近,许多不同类型的肿瘤已显示表达PDL-1和PDL-2,促进逃避免疫监视,导致肿瘤生长和转移增加。

发明内容

[0005] 本文描述了治疗或预防个体的癌症、肿瘤或其他新生物的方法。方法和物质组合物包括LIF结合多肽和PD-1轴抑制剂的组合。这些方法可利用拮抗或阻断LIF活性的抗LIF抗体和抑制PD-1、PDL-1和PDL-2的结合活性或PD-1、PDL-1和PDL-2信号传导的多肽。在某些实施例中,PD-1轴抑制剂结合并抑制PD-1与PDL-1或PDL-2之间的相互作用。特别是,当与抗LIF抗体或PD-1轴抑制剂单独比较时,这些组合展现出令人惊讶的协同作用。

[0006] 在一方面,本文描述了白血病抑制因子(LIF)结合抗体与PD-1(CD279)、PDL-1(CD274)或PDL-2(CD-273)信号传导抑制剂组合治疗个体的癌症的用途,其中该LIF结合抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。在某些实施例中,在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体之前,

将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中，在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时，将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中，该LIF结合抗体包括至少一个衍生自人抗体框架区的框架区。在某些实施例中，该LIF结合抗体是人源化的。在某些实施例中，该LIF结合抗体是去免疫化的。在某些实施例中，该LIF结合抗体包括免疫球蛋白重链可变区(VH)，其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列；以及免疫球蛋白轻链可变区(VL)，其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同。在某些实施例中，该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同；并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中，该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。在某些实施例中，该癌症包括非小细胞肺癌。在某些实施例中，该癌症包括胰腺导管腺癌。在某些实施例中，先前已经用检查点抑制剂治疗该癌症。在某些实施例中，该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。在某些实施例中，该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。

[0007] 在一方面，本文描述了白血病抑制因子(LIF)结合抗体与PD-1(CD279)、PDL-1(CD274)或PDL-2(CD-273)信号传导抑制剂组合治疗个体的癌症的用途，其中该LIF结合抗体包括：(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1)，其包括SEQ ID NO:1所阐述的氨基酸序列；(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2)，其包括SEQ ID NO:4所阐述的氨基酸序列；(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3)，其包括SEQ ID NO:6所阐述的氨基酸序列；(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1)，其包括SEQ ID NO:9所阐述的氨基酸序列；以及(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2)，其包括SEQ ID NO:11所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中，将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。在某些实施例中，将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。在某些实施例中，在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前，将该LIF结合抗体施用给该个体。在某些实施例中，在将该LIF结合抗体施用给该个体之前，将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中，在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时，将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中，该LIF结合抗体包括至少一个衍生自人抗体框架区的框架区。在某些实施例中，该LIF结合抗体是人源化的。在某些实施例中，该LIF结合抗体是去免疫化的。在某些实施例中，该LIF结合抗体包括免疫球蛋白重链可变区(VH)，其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列；以及免疫球蛋白轻链可变区(VL)，其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同。在某些实施例中，该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同；并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中，该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。在某些实施例中，该癌症包括非小细胞肺癌。在某些实施例中，该癌症包括胰腺导管腺癌。在某些实施例中，先前已经用检查点抑制剂治疗该癌症。在某些实施例中，该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。在某些实施例中，该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。

[0008] 在一方面,本文描述了白血病抑制因子(LIF)结合抗体与PD-1(CD279)、PDL-1(CD274)或PDL-2(CD-273)信号传导抑制剂组合治疗个体的癌症的用途,其中该LIF结合抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:3所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:5所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:7所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:10所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:12所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。在某些实施例中,在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,该LIF结合抗体包括至少一个衍生自人抗体框架区的框架区。在某些实施例中,该LIF结合抗体是人源化的。在某些实施例中,该LIF结合抗体是去免疫化的。在某些实施例中,该LIF结合抗体包括免疫球蛋白重链可变区(VH),其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;以及免疫球蛋白轻链可变区(VL),其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌。在某些实施例中,该癌症包括胰腺导管腺癌。在某些实施例中,先前已经用检查点抑制剂治疗该癌症。在某些实施例中,该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。

[0009] 在一方面,本文描述了白血病抑制因子(LIF)结合抗体与PD-1(CD279)、PDL-1(CD274)或PDL-2(CD-273)信号传导抑制剂组合治疗个体的癌症的用途,其中该LIF结合抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:2所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:7所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。在某些实施例中,在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或

PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,该LIF结合抗体包括至少一个衍生自人抗体框架区的框架区。在某些实施例中,该LIF结合抗体是人源化的。在某些实施例中,该LIF结合抗体是去免疫化的。在某些实施例中,该LIF结合抗体包括免疫球蛋白重链可变区(VH),其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;以及免疫球蛋白轻链可变区(VL),其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌。在某些实施例中,该癌症包括胰腺导管腺癌。在某些实施例中,先前已经用检查点抑制剂治疗该癌症。在某些实施例中,该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。

[0010] 在一方面,本文描述了白血病抑制因子(LIF)结合多肽与PD-1(CD279)、PDL-1(CD274)或PDL-2(CD-273)信号传导抑制剂组合治疗个体的癌症的用途。在某些实施例中,将该LIF结合多肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。在某些实施例中,将该LIF结合多肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。在某些实施例中,在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合多肽施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合多肽施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合多肽施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白重链恒定区的片段。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括与LIF特异性结合的抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括至少一个衍生自人抗体框架区的框架区。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是人源化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是去免疫化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是IgG抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括(a)免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:41、42、44或66中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链可

变区 (VL) 序列,其具有与SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a) 免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:57-60或67中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b) 免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约200皮摩尔的 K_D 结合。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约100皮摩尔的 K_D 结合。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括抗体或其PD-1、PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PD-1。在某些实施例中,该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。在某些实施例中,该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PD1-2结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。在某些实施例中,该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。在某些实施例中,PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的小分子抑制剂包括:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基]氨基]乙基}乙酰胺(BMS 202);(2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酰基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酰基-L-丝氨酰基-L- α -谷酰基-L-丝氨酰基-L-苯丙氨酰基)-L-赖氨酰基-L-苯丙氨酰基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酰基-L-谷酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-脯氨酰基-L-赖氨酰基-L-丙氨酰基-L-谷酰基-L-异亮氨酰基-L-赖氨酰基;(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苄基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酰胺,N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酰基-N-甲基-L-丙氨酰基-L-天冬酰胺基-L-脯氨酰基-L-组氨酰基-L-亮氨酰基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酰基-L-丝氨酰基-L-色氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-L-精氨酰基-L-半胱氨酰基-,环状(1 \rightarrow 14)-硫醚;或其衍生物或类似物。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤或软组织癌。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌、上皮性卵巢癌或胰腺腺癌。在某些实施例中,该癌症对于以单一疗法施用的治疗量的LIF结合多肽或PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂的治疗是难治的。

[0011] 在另一方面,本文描述了特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体与PD-1结合抗体组合治疗个体的癌症的用途,其中该LIF结合抗体包括:(a) 免疫球蛋白重链互补决定区1

(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

[0012] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向患有癌症的个体施用有效量的:(a)白血病抑制因子(LIF)结合多肽;以及(b)PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274)或PDL-2 (CD273)信号传导抑制剂。在某些实施例中,该方法包括将有效量的该LIF结合多肽施用给该患有癌症的个体。在某些实施例中,该方法包括将有效量的该PD-1抑制剂施用给该患有癌症的个体。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白重链恒定区的片段。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括与LIF特异性结合的抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括至少一个衍生自人抗体框架区的框架区。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是人源化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是去免疫化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是IgG抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:41、42、44或66中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:57-60或67中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约200皮摩尔的K_D结合。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗

体以小于约100皮摩尔的 K_D 结合。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括抗体或其PD-1、PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PD-1。在某些实施例中,该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。在某些实施例中,该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。在某些实施例中,该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。在某些实施例中,PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的小分子抑制剂包括:N- {2- [({2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基)氨基]乙基}乙酰胺(BMS 202); 2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酸基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酸基-L-丝氨酸基-L- α -谷氨酸基-L-丝氨酸基-L-苯丙氨酸基)-L-赖氨酸基-L-苯丙氨酸基-L-精氨酸基-L-戊氨酸基-L-苏氨酸基-L-谷氨酸基-L-亮氨酸基-L-丙氨酸基-L-脯氨酸基-L-赖氨酸基-L-丙氨酸基-L-谷氨酸基-L-异亮氨酸基-L-赖氨酸基;(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苄基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酸,N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酸基-N-甲基-L-丙氨酸基-L-天冬氨酸基-L-脯氨酸基-L-组氨酸基-L-亮氨酸基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酸基-L-丝氨酸基-L-色氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-L-精氨酸基-L-半胱氨酸基-,环状(1 \rightarrow 14)-硫醚;或其衍生物或类似物。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤或软组织癌。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌、上皮性卵巢癌或胰腺腺癌。在某些实施例中,该癌症对于治疗量的LIF结合多肽抑制剂的治疗是难治的。在某些实施例中,该癌症对于治疗量的PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂的治疗是难治的。在某些实施例中,将该白血病抑制因子(LIF)结合多肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂分开施用。在某些实施例中,将该LIF结合多肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂同时施用。在某些实施例中,将该LIF结合多肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以单一组合物施用。

[0013] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括:将有效量的白血病抑制因子(LIF)结合多肽施用给该患有癌症的个体,其中已将治疗量的PD-1(CD279)、PDL-1(CD274)或PDL-2(CD-273)信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,该方法抑制该癌症的生长或转移。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白重链恒定区的片段。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括与LIF特异性结合的抗体。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括至少一个衍生自人免疫球蛋白框架区的框架区。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是人源化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是去免疫化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是IgG抗

体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:41、42、44或66中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:57-60或67中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约200皮摩尔的K_d结合。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约100皮摩尔的K_d结合。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括抗体或其PD-1、PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PD-1。在某些实施例中,该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、或斯巴达珠单抗、或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。在某些实施例中,该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。在某些实施例中,该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。在某些实施例中,PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的小分子抑制剂包括:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基)氨基]乙基}乙酰胺(BMS202);(2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L-α-谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酰基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酰基-L-丝氨酰基-L-α-谷氨酰基-L-丝氨酰基-L-苯丙氨酰基)-L-赖氨酰基-L-苯丙氨酰基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酰基-L-谷氨酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-脯氨酰基-L-赖氨酰基-L-丙氨酰

基-L-谷酰基-L-异亮氨酰基-L-赖氨酰基; (2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-哌啶甲酸; 甘氨酸胺, N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酰基-N-甲基-L-丙氨酰基-L-天冬酰胺基-L-脯氨酰基-L-组氨酰基-L-亮氨酰基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酰基-L-丝氨酰基-L-色氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰-N-甲基-L-正亮氨酰-L-精氨酰基-L-半胱氨酰基-, 环状(1→14)-硫醚; 或其衍生物或类似物。在某些实施例中, 该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤或软组织癌。在某些实施例中, 该癌症包括非小细胞肺癌、上皮性卵巢癌或胰腺腺癌。在某些实施例中, 该癌症对于治疗量的PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂的治疗是难治的。

[0014] 在另一方面, 本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法, 该方法包括: 向该患有癌症的个体施用; 有效量的PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274) 或PDL-2 (CD273) 信号传导抑制剂, 其中已将治疗量的白血病抑制因子 (LIF) 结合多肽施用给该个体。在某些实施例中, 该方法抑制该癌症的生长或转移。在某些实施例中, 该LIF结合多肽包括免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白重链恒定区的片段。在某些实施例中, 该LIF结合多肽包括与LIF特异性结合的抗体。在某些实施例中, 该LIF结合多肽包括至少一个衍生自人免疫球蛋白框架区的框架区。在某些实施例中, 该与LIF特异性结合的抗体是人源化的。在某些实施例中, 该与LIF特异性结合的抗体是去免疫化的。在某些实施例中, 该与LIF特异性结合的抗体包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。在某些实施例中, 该与LIF特异性结合的抗体是IgG抗体。在某些实施例中, 该与LIF特异性结合的抗体是Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段 (scFv) 或纳米抗体。在某些实施例中, 该与LIF特异性结合的抗体包括: (a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1), 其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列; (b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列; (c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列; (d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列; (e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列; 以及 (f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中, 该与LIF特异性结合的抗体包括: (a) 免疫球蛋白重链可变区 (VH) 序列, 其具有与SEQ ID NO:41、42、44或66中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列; 以及 (b) 免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 序列, 其具有与SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中, 该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同; 并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施例中, 该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同; 并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中, 该与LIF特异性结合的抗体包括: (a) 免疫球蛋白重链序列, 其具有与SEQ ID NO:57-60或67中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列; 以及 (b) 免疫球蛋白轻链序列, 其具有与SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中, 该与LIF特异性

结合的抗体以小于约200皮摩尔的 K_D 结合。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约100皮摩尔的 K_D 结合。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括抗体或其PD-1、PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PD-1。在某些实施例中,该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。在某些实施例中,该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。在某些实施例中,该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。在某些实施例中,PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274) 或PDL-2 (CD273) 信号传导的小分子抑制剂包括:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基]氨基}乙基}乙酰胺(BMS 202); 2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酸基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酸基-L-丝氨酸基-L- α -谷氨酸基-L-丝氨酸基-L-苯丙氨酸基)-L-赖氨酸基-L-苯丙氨酸基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酸基-L-谷氨酸基-L-亮氨酸基-L-丙氨酸基-L-脯氨酸基-L-赖氨酸基-L-丙氨酸基-L-谷氨酸基-L-异亮氨酸基-L-赖氨酸基;(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苄基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酸,N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酸基-N-甲基-L-丙氨酸基-L-天冬氨酸基-L-脯氨酸基-L-组氨酸基-L-亮氨酸基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酸基-L-丝氨酸基-L-色氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-L-精氨酸基-L-半胱氨酸基-,环状(1 \rightarrow 14)-硫醚;或其衍生物或类似物。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤或软组织癌。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌、上皮性卵巢癌或胰腺腺癌。在某些实施例中,该癌症对于治疗量的LIF结合多肽抑制剂的治疗是难治的。

[0015] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向患有癌症的个体施用有效量的:(a) 特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,其包括:(i) 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii) 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii) 免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv) 免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v) 免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和(vi) 免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及(b) PD-1结合抗体。

[0016] 在另一方面,本文描述了一种试剂盒,其包括:(a) 白血病抑制因子(LIF)结合多肽;以及(b) PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274) 或PDL-2 (CD273) 信号传导抑制剂。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白重链恒定区的片段。在某些实施例

中,该LIF结合多肽包括与LIF特异性结合的抗体。在某些实施例中,LIF结合多肽包含至少一个衍生自人免疫球蛋白框架区的框架区。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是人源化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是去免疫化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是IgG抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:41、42、44或66中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:57-60或67中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约200皮摩尔的K_d结合。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约100皮摩尔的K_d结合。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PD-1。在某些实施例中,该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、或斯巴达珠单抗、或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。在某些实施例中,该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。在某些实施例中,该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。在某些实施例中,PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的小分子抑制剂包括:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基]氨基}乙基}乙酰胺(BMS 202);(2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧

基) 苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酸基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酸基-L-丝氨酸基-L- α -谷氨酸基-L-丝氨酸基-L-苯丙氨酸基)-L-赖氨酸基-L-苯丙氨酸基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酸基-L-谷氨酸基-L-亮氨酸基-L-丙氨酸基-L-脯氨酸基-L-赖氨酸基-L-丙氨酸基-L-谷氨酸基-L-异亮氨酸基-L-赖氨酸基;(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-嘧啶甲酸;甘氨酸酰胺,N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酸基-N-甲基-L-丙氨酸基-L-天冬氨酸基-L-脯氨酸基-L-组氨酸基-L-亮氨酸基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酸基-L-丝氨酸基-L-色氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-L-精氨酸基-L-半胱氨酸基-,环状(1 \rightarrow 14)-硫醚;或其衍生物或类似物。在某些实施例中,该试剂盒进一步包括药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0017] 在另一方面,本文描述了一种组合物,其包括:(a)白血病抑制因子(LIF)结合多肽;以及(b)PD-1(CD279)、PDL-1(CD274)或PDL-2(CD273)信号传导抑制剂。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白重链恒定区的片段。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括与LIF特异性结合的抗体。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括至少一个衍生自人免疫球蛋白框架区的框架区。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是人源化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是去免疫化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是IgG抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:41、42、44或66中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括:(a)免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:57-60或67中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约200皮摩

尔的 K_D 结合。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体以小于约100皮摩尔的 K_D 结合。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括抗体或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PD-1。在某些实施例中,该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、或斯巴达珠单抗、或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。在某些实施例中,该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。在某些实施例中,该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。在某些实施例中,PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274)或PDL-2 (CD273)信号传导的小分子抑制剂包括:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基]氨基}乙基}乙酰胺(BMS 202);(2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酸基-L-天冬氨酸基-L-苏氨酸基-L-丝氨酸基-L- α -谷氨酸基-L-丝氨酸基-L-苯丙氨酸基)-L-赖氨酸基-L-苯丙氨酸基-L-精氨酸基-L-戊氨酸基-L-苏氨酸基-L-谷氨酸基-L-亮氨酸基-L-丙氨酸基-L-脯氨酸基-L-赖氨酸基-L-丙氨酸基-L-谷氨酸基-L-异亮氨酸基-L-赖氨酸基;(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酸,N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酸基-N-甲基-L-丙氨酸基-L-天冬氨酸基-L-脯氨酸基-L-组氨酸基-L-亮氨酸基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酸基-L-丝氨酸基-L-色氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-L-精氨酸基-L-半胱氨酸基-,环状(1→14)-硫醚;或其衍生物或类似物。在某些实施例中,该组合物进一步包括药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0018] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:(a)特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,其包括:(i)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和(vi)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及PD-1或PDL-1结合抗体。在某些实施例中,该方法包括将有效量的该特异性结合LIF的抗体施用给该患有癌症的个体。在某些实施例中,该方法包括将有效量的该PD-1或PDL-1结合抗体施用给该患有癌症的个体。在某些实施例中,将该特异性结合LIF的抗体和该PD-1或PDL-1结合抗体分开施用。在某些实施例中,该癌症为多形性胶质母细胞瘤(GBM)、NSCLC(非小细胞肺癌)、卵巢癌、结肠直肠癌、甲状腺癌或胰腺癌。

[0019] 在另一方面,本文描述了一种减少患有癌症的个体的肿瘤前肿瘤相关巨噬细胞

(TAM)的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:(a)特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,其包括:(i)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和(vi)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及PD-1或PDL-1结合抗体。在某些实施例中,将该特异性结合LIF的抗体和该PD-1或PDL-1结合抗体分开施用。在某些实施例中,该TAM展现选自由CD11b、CD206和CD163组成的清单的任何1个、2个或3个分子的细胞表面表达。

[0020] 在另一方面,本文描述了一种在患有癌症的个体中产生免疫记忆的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:(a)特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,其包括:(i)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和(vi)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及PD-1或PDL-1结合抗体。在某些实施例中,将该特异性结合LIF的抗体和该PD-1或PDL-1结合抗体分开施用。在某些实施例中,免疫记忆由CD8+T细胞介导。在某些实施例中,免疫记忆由CD4+T细胞介导。

[0021] 在另一方面,本文描述了一种增加肿瘤中的T淋巴细胞量的方法,其包括向患该肿瘤的个体施用有效量的以下项的组合:(a)特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,其包括:(i)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和(vi)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及PD-1或PDL-1结合抗体。在某些实施例中,将该特异性结合LIF的抗体和该PD-1或PDL-1结合抗体分开施用。在某些实施例中,该T淋巴细胞包括CD8+T细胞。在某些实施例中,该T淋巴细胞包括CD4+T细胞。

[0022] 在另一方面,本文描述了白血病抑制因子(LIF)结合抗体与PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂组合治疗个体的癌症的用途,其中该LIF结合抗体包括免疫球蛋白重链可变区(VH),其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;以及免疫球蛋白轻链可变区(VL),其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品

施用给该个体。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。在某些实施例中,在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,其中LIF结合抗体是人源化的。在某些实施例中,其中该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中,其中该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌。在某些实施例中,该癌症包括胰腺导管腺癌。在某些实施例中,其中该癌症先前已经用检查点抑制剂治疗。在某些实施例中,该癌症先前已经用LIF抗体治疗。在某些实施例中,该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。

[0023] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:(a)特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,其包括:(i)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和(vi)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及(b)PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。在某些实施例中,该LIF结合抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9所阐述的氨基酸序列;以及(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该LIF结合抗体包括:(a)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:3所阐述的氨基酸序列;(b)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:5所阐述的氨基酸序列;(c)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:7所阐述的氨基酸序列;(d)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:10所阐述的氨基酸序列;(e)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:12所阐述的氨基酸序列;以及(f)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。在某些实施例中,在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗

体施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,该LIF结合抗体是人源化的。在某些实施例中,该LIF结合抗体包括免疫球蛋白重链可变区(VH),其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;以及免疫球蛋白轻链可变区(VL),其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌。在某些实施例中,其中该癌症包括胰腺导管腺癌。在某些实施例中,先前已经用检查点抑制剂治疗该癌症。在某些实施例中,该癌症先前已经用LIF抗体治疗。在某些实施例中,其中该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。在某些实施例中,该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。在某些实施例中,该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。在某些实施例中,该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。在某些实施例中,PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的小分子抑制剂包括:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基]氨基}乙基}乙酰胺(BMS 202);(2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酸基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酸基-L-丝氨酸基-L- α -谷氨酸基-L-丝氨酸基-L-苯丙氨酸基)-L-赖氨酸基-L-苯丙氨酸基-L-精氨酸基-L-戊氨酸基-L-苏氨酸基-L-谷氨酸基-L-亮氨酸基-L-丙氨酸基-L-脯氨酸基-L-赖氨酸基-L-丙氨酸基-L-谷氨酸基-L-异亮氨酸基-L-赖氨酸基;(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苄基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酸, N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酸基-N-甲基-L-丙氨酸基-L-天冬氨酸基-L-脯氨酸基-L-组氨酸基-L-亮氨酸基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酸基-L-丝氨酸基-L-色氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸基-L-精氨酸基-L-半胱氨酸基-,环状(1 \rightarrow 14)-硫醚;或其衍生物或类似物。

[0024] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:(a)特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,其包括:(i)免疫球蛋白重链可变区(VH),其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约90%相同的氨基酸序列;以及(ii)免疫球蛋白轻链可变区(VL),其与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约90%相同;以及(b)PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。在某些实施例中,该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述

的氨基酸序列相同。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。在某些实施例中,将该LIF结合抗体和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。在某些实施例中,在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合抗体施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,在将该LIF结合抗体施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。在某些实施例中,该LIF结合抗体是人源化的。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌。在某些实施例中,该癌症包括胰腺导管腺癌。在某些实施例中,先前已经用检查点抑制剂治疗该癌症。在某些实施例中,该癌症先前已经用LIF抗体治疗。在某些实施例中,该检查点抑制剂是PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。在某些实施例中,该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。在某些实施例中,该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。在某些实施例中,该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。在某些实施例中,PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的小分子抑制剂包括:N- {2- [((2-甲氧基-6- [(2-甲基 [1,1'-联苯基]-3-基) 甲氧基] 吡啶-3-基) 甲基) 氨基] 乙基} 乙酰胺 (BMS 202); (2- ((3-氰基苄基) 氧基) -4- ((3- (2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基) -2-甲基苄基) 氧基) -5-甲基苄基) -D-丝氨酸盐酸盐; (2R,4R) -1- (5-氯-2- ((3-氰基苄基) 氧基) -4- ((3- (2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基) -2-甲基苄基) 氧基) 苄基) -4-羟基吡咯烷-2-甲酸; 3- (4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基) -1-苯基吡啶; 3- (4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基) -1-苯基-1h-吡啶; L- α -谷氨酰胺, N2, N6-双 (L-丝氨酰基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酰基-L-丝氨酰基-L- α -谷氨酰基-L-丝氨酰基-L-苯丙氨酰基) -L-赖氨酰基-L-苯丙氨酰基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酰基-L-谷氨酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-脯氨酰基-L-赖氨酰基-L-丙氨酰基-L-谷氨酰基-L-异亮氨酰基-L-赖氨酰基; (2S) -1- [[2,6-二甲氧基-4- [(2-甲基 [1,1'-联苯基]-3-基) 甲氧基] 苯基] 甲基] -2-哌啶甲酸; 甘氨酸, N- (2-巯基乙酰基) -L-苯丙氨酰基-N-甲基-L-丙氨酰基-L-天冬酰胺基-L-脯氨酰基-L-组氨酰基-L-亮氨酰基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酰基-L-丝氨酰基-L-色氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-L-精氨酸基-L-半胱氨酰基-, 环状 (1 \rightarrow 14) -硫醚; 或其衍生物或类似物。

附图说明

[0025] 图1描绘了蛋白质印迹,其示出了不同抗LIF人源化抗体对LIF诱导的STAT3磷酸化的抑制。

[0026] 图2A和2B描绘了蛋白质印迹,其示出了人源化和亲本5D8抗体对LIF诱导的STAT3

磷酸化的抑制。

[0027] 图3A示出了使用h5D8抗体在U-251细胞中抑制LIF的 IC_{50} 。

[0028] 图3B示出了在内源性LIF刺激条件下对pSTAT3的r5D8和h5D8抑制的代表性 IC_{50} 剂量反应曲线。示出的是代表性曲线 ($n=1h5D8, n=2r5D8$)。

[0029] 图4描绘了蛋白质印迹,其示出了本披露中描述的不同单克隆抗体对LIF诱导的STAT3磷酸化的抑制。

[0030] 图5描绘了来自人类患者的多形性胶质母细胞瘤 (GBM)、NSCLC (非小细胞肺癌)、卵巢癌、结肠直肠癌和胰腺肿瘤中LIF表达的免疫组织化学染色和定量。条代表平均值 \pm SEM。

[0031] 图6A是示出使用人源化5D8抗体在非小细胞肺癌小鼠模型中进行的实验的图。

[0032] 图6B是示出使用r5D8抗体在非小细胞肺癌小鼠模型中进行的实验的图。

[0033] 图7A示出了r5D8对GBM原位小鼠模型中U251细胞的抑制作用。示出第26天的定量。

[0034] 图7B示出了来自小鼠的数据,该小鼠接种了表达萤光素酶的人U251 GBM细胞,然后每周两次用100、200或300 μ g的h5D8或媒介物治疗。在第7天通过生物发光(精诺真公司(Xenogen) IVIS光谱)确定肿瘤大小。该图示出了个体肿瘤测量,水平条表示平均值 \pm SEM。使用未配对的非参数Mann-Whitney U检验计算统计显著性。

[0035] 图8A示出了在同系小鼠模型中r5D8对卵巢癌细胞生长的抑制作用。

[0036] 图8B示出了在第25天的个体肿瘤测量。

[0037] 图8C展示了当以每周两次200 μ g/小鼠施用, h5D8示出了肿瘤生长的显著降低 ($p < 0.05$)。符号为平均值 \pm SEM,与媒介物相比的统计学显著性(使用未配对的非参数Mann-Whitney U检验)。

[0038] 图9A示出了在同系小鼠模型中r5D8对结肠直肠癌细胞生长的抑制作用。

[0039] 图9B示出了在第17天的个体肿瘤测量。

[0040] 图10A示出了GBM原位小鼠模型中巨噬细胞向肿瘤部位浸润的减少,具有代表性图像和CCL22+细胞的定量。

[0041] 图10B示出了人类器官型组织切片培养模型中巨噬细胞浸润的减少。示出的是代表性图像(左)和定量(右)。

[0042] 图10C示出了卵巢癌同系小鼠模型中巨噬细胞向肿瘤部位浸润的减少,具有代表性图像和CCL22+细胞的定量。

[0043] 图10D示出了结肠直肠癌同系小鼠模型中巨噬细胞向肿瘤部位浸润的减少,具有代表性图像和CCL22+细胞的定量。

[0044] 图10E示出了在第25天(终点)从用h5D8 (15mg/kg, 2QW) 治疗的肿瘤中收获的肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的炎性表型。在治疗的肿瘤中,TAM朝着M1促炎表型极化。统计显著性由未配对的t检验确定。

[0045] 图10F示出了用LIF敲低细胞的条件下培养基培养的单核细胞的基因表达数据。

[0046] 图11A示出了在用r5D8治疗后卵巢癌同系小鼠模型中非骨髓效应细胞的增加。

[0047] 图11B示出了在用r5D8治疗后结肠直肠癌同系小鼠模型中非骨髓效应细胞的增加。

[0048] 图11C示出了在用r5D8治疗后NSCLC癌症小鼠模型中 $CD4+T_{REG}$ 细胞的百分比降低。

[0049] 图12示出了在存在或不存在抗CD4和抗CD8耗竭抗体的情况下腹膜内施用PBS(对照)或r5D8每周两次治疗的携带CT26肿瘤的小鼠的数据。该图示出了在d13的个体肿瘤测量,表示为平均肿瘤体积+SEM。组间的统计差异通过未配对的非参数Mann-Whitney U检验确定。R5D8抑制CT26肿瘤的生长(* $p < 0.05$)。在存在抗CD4和抗CD8耗竭抗体的情况下,r5D8对肿瘤的生长抑制作用显著降低(**** $p < 0.0001$)。

[0050] 图13A展示了与LIF复合的h5D8 Fab的共晶体结构的概观。gp130相互作用位点映射在LIF的表面上(深色阴影)。

[0051] 图13B展示了LIF与h5D8之间的详细相互作用,其示出了形成盐桥的残基和掩埋表面积大于 100 \AA^2 的h5D8残基。

[0052] 图14A展示了五个h5D8 Fab晶体结构的叠加,并且指示尽管在不同化学条件下结晶,但高度相似。

[0053] 图14B展示了由未配对的Cys100介导的范德华相互作用的广泛网络。该残基是有序的,参加塑造HCDR1和HCDR3的构象,并且不参与不希望的二硫键错配。残基之间的距离以虚线示出并标记。

[0054] 图15A通过ELISA展示了h5D8 C100突变体与人LIF的结合。

[0055] 图15B通过ELISA展示了h5D8 C100突变体与小鼠LIF的结合。

[0056] 图16A通过Octet展示了h5D8不阻断LIF和LIFR之间的结合。h5D8与LIF的顺序结合,随后进行LIFR。

[0057] 图16B和16C展示了与固定的LIFR或gp130结合的LIF/mAb复合物的ELISA分析。物种特异性过氧化物酶缀合的抗IgG抗体的信号(-)和h5D8的抗人抗体,r5D8和B09的抗大鼠抗体检测结合固定的LIFR(图16B)或gp130(图16C)涂层板的mAb/LIF复合物的抗体部分。

[0058] 图17A和17B展示了72种不同的人类组织中LIF(图16A)或LIFR(图16B)的mRNA表达。

[0059] 图18A-D示出了与抗PD-1治疗的肿瘤相比,h5D8和抗PD-1治疗的CT26肿瘤小鼠显示生长显著减慢的数据。在三个独立的CT26功效实验中获得了相似的结果。18A示出了肿瘤生长的时间过程,而18B示出了第24天的个体数据点。统计学显著性由Mann-Whitney检验确定。18C示出了抗PD1(RMP1-14)和h5D8/抗PD1治疗的携带CT26或MC38(第10天开始使用抗PD1)肿瘤的小鼠的Kaplan-Meier存活率图。底部为对照(IgG)和h5D8单一疗法治的携带CT26或MC38肿瘤的小鼠的Kaplan-Meier存活率图。18D肿瘤再植入后长期无肿瘤的CT26幸存者中的肿瘤体积。

[0060] 图19A-D示出了检测在h5D8/抗PD-1治疗的肿瘤中功能性CD8T细胞的丰度的流式细胞术分析。19A示出了根据其响应于肿瘤相关肽(GP70)产生IFN γ 的能力定义的CD8 T细胞功能。19B示出了代表性FAC数据图。显著性由未配对的t检验确定。19C左侧示出了治疗后CT26肿瘤中总CD45+免疫浸润物的CD8+TIL频率($n = 7$ /组);右侧是用CT26肿瘤表达的来自MuLV的H2-L^d限制性gp70(a.a.423-431;AH1)表位对应的肽体外刺激后IFN- γ +CD8+TIL的频率($n = 7$ /组)。19D左侧示出了治疗后MC38肿瘤中总CD45+免疫浸润物的CD8+TIL频率($n = 6-7$ /组)。右侧是用MC38肿瘤表达的来自MuLV的H2-K^b限制性p15e(a.a.604-611)表位对应的肽体外刺激后IFN- γ +CD8+TIL的频率($n = 6-7$ /组)。

[0061] 图20A-P示出了在表达高水平LIF的GBM和卵巢癌模型中,LIF阻断降低了肿瘤的生

长并调节了免疫细胞的浸润。20A示出了LIF mRNA表达(\log_2 RSEM)在28种不同的实体瘤中的分布。黑线代表低表达/背景噪音之间的估计截止值。底部面板示出了基于免疫细胞类型基因签名的ssGSEA, LIF表达与TAM和Treg相对丰度之间的相关值(Pearson R^2 值)。仅当相关显著(调整的P值 <0.1)时,才会示出相关值。20B示出了GBM、前列腺腺癌(PRAD)、甲状腺癌(THCA)和卵巢癌(OV)队列中的LIF表达以及TAM和Treg相对丰度(出于可视化目的,将ssGSEA从0重调为1)的线性回归图。阴影代表回归估计的置信区间。20C、20H和20K示出了分别以总通量(p/s)或腹部体积(mm^3)来测量的GL261N(20C)、RCAS(20H)和ID8(20K)模型的肿瘤生长。示出了代表实验程序的时间表。抗LIF(r5D8)或同种型对照(IgG)治疗在手术当天(GL261N和RCAS)或接种后(dpi)14天(ID8)开始。20D和20L示出了GL261N(20D)和ID8(20L)肿瘤染色的代表性p-STAT3、Ki67、CC3和CD8 IHC百分比。20E-20F、20I-20J和20M-20N示出了通过流式细胞术分析的 $\text{CD11b}^+\text{F4}/80^+\text{CD163}^+\text{CD206}^+\text{MHCII}^{\text{低}}\text{TAM}$ (20E、20M)、或 $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^-\text{Ly6C}^-\text{CD163}^+\text{CD206}^+\text{MHCII}^{\text{低}}$ (20I)以及GL261N(20F)、RCAS(20J)和ID8(20N)肿瘤的 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞($\text{CD3}^+\text{CD8}^+$)百分比。20G和20P示出了用抗LIF(r5D8)或IgG治疗的GL261N(20G)和ID8(20P)模型的总体存活率。用抗LIF(r5D8)或IgG(200)治疗的ID8小鼠的腹部体积的时程。数据是平均值 \pm SEM。通过Mann-Whitney T检验和对数秩检验进行统计分析。 $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$; $****P<0.0001$ 。

[0062] 图21A-G示出了LIF调节TAM中的CXCL9、CCL2、CD206和CD163。21A示出了来自抗LIF(r5D8)治疗的ID8小鼠与对照的分离的 CD11b^+ 细胞的差异表达分析。代表该基因显著过表达(Q值 <0.1)和显著低表达的火山图。热图代表指示基因的表达值,每列代表一个样品,每行代表一个基因。最后一栏代表基因表达的 \log_2 倍数变化(\log_2 FC)。21B示出了来自抗LIF(r5D8)治疗的或未治疗的ID8和GL261N肿瘤的分离的 CD11b^+ 细胞中指示基因的mRNA表达。21C示出了来自抗LIF(r5D8)治疗的或未治疗的GL261N肿瘤的TAM($\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^-\text{Ly6C}^-$)中 CCL2^+ 和 CXCL9^+ 的百分比和平均荧光强度(MFI)。21D示出了双阳性细胞相对于TAM标记阳性细胞的百分比。CXCL9定量相对于细胞总数。21E示出了来自20个GBM肿瘤的指示标记物的IHC定量。计算了LIF染色(y轴)与CCL2、CD206、CD163和CXCL9染色(x轴)之间的相关性,显示R平方系数(R^2)。21F示出了GL261N在 $\text{CXCL9}^{-/-}$ 和 $\text{CCL2}^{-/-}$ 小鼠或用指示抗体治疗的小鼠中的肿瘤生长,以总通量(p/s)示出。21G示出了在指示治疗中,肿瘤浸润性 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞的倍数增加(FI)。数据是平均值 \pm SEM。通过Mann-Whitney T检验进行统计分析。 $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$; $****P<0.0001$ 。

[0063] 图22A-H示出了LIF通过表观遗传沉默阻遏CXCL9,并通过活化STAT3诱导CCL2。22A和22B示出了BMDM中指示基因的qRT-PCR分析。将BMDM与20ng/ml LIF预孵育72h,然后在6h期间用5ng/ml $\text{IFN}\gamma$ 或10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IL4刺激(22A)或用0.1、0.5、1和5ng/ml $\text{IFN}\gamma$ 刺激24h(22B)。22C示出了用20ng/ml LIF预孵育并且然后用0.1ng/ml $\text{IFN}\gamma$ 刺激24h的BMDM的CXCL9 ELISA。22D示出了来自以20ng/ml LIF培养72h并且然后以0.1ng/ml $\text{IFN}\gamma$ 培养24h的人GBM的人 CD11b^+ 分选细胞(77% $\text{CD11b}^+\text{CD14}^+$,参见图29A)的CXCL9 ELISA。22E示出了在以20ng/ml LIF治疗72h的BMDM中进行三甲基-组蛋白H3(H3K27me3)、EZ2和乙酰基-组蛋白4(H4ac)的ChIP。时间表示出了分析的CXCL9启动子区。22F示出了在用20ng/ml LIF治疗6和24h的BMDM中的CCL2 ELISA和CCL2 mRNA水平。22G示出了用20ng/ml LIF刺激15分钟的BMDM中的p-STAT3 ChIP。描绘了CCL2启动子上的STAT结合位点(SBS)的示意性图示。数据为平均

值±SD,并通过学生t检验进行统计分析。22H示出了相对于Iba1⁺细胞的双重阳性细胞的百分比,以及相对于细胞总数的用10μg/ml抗LIF (r5D8) 孵育3天的GBM有机型切片(患者1、2、3)中CXCL9⁺细胞的百分比。数据为所有患者的平均值±SEM。通过Mann-Whitney T检验进行统计分析。*P<0.05,**P<0.01;***P<0.001;****P<0.0001。

[0064] 图23A-I示出了LIF阻断诱导人GBM中的CD8⁺T细胞肿瘤浸润,并且其与抗PD1的组合促进肿瘤消退。23A示出了用GBM患者衍生的异种移植物和人类器官型模型进行的实验程序的示意性图示。23B示出了用抗LIF (r5D8) 处理72h并且然后用PBMC培养24h的器官型样本(患者4、5、6)中的CXCL9和CCL2 mRNA表达水平。23C示出了通过流式细胞术检测的在用抗LIF (r5D8) 治疗72h并且然后用PBMC培养48h的器官型组织(患者4、5、6)中的CD8⁺T浸润性细胞的FI。23D示出了通过流式细胞术检测的在用抗LIF (r5D8) 和/或抗CXCL9治疗72h并且然后用PBMC培养48h的GBM器官型组织中的CD8⁺T浸润性细胞的FI。23E示出了CD8⁺T浸润性细胞进入NSG小鼠皮下植入的GBM样本中。条形图表示通过流式细胞术在组织中检测到的CD8⁺T细胞与在同一动物血液中检测到的CD8⁺T细胞的比率。有四名患者(7、8、9、10)及其相应的PBMC。23F示出了用抗LIF (r5D8)、抗PD1或该组合治疗的GL261N小鼠的存活率。示出了由Kaplan-Meier曲线确定的总存活率。23G示出了经治疗的GL261N模型的肿瘤生长,表示为在13dpi与6dpi之间的肿瘤大小倍数变化。23H示出了时间表,其代表在6只小鼠中接种3x10⁵个GL261N细胞并通过抗LIF (r5D8)、抗PD1组合治疗完全消退的实验程序。10只幼稚小鼠平行接种3x10⁵个GL261N细胞。23I示出了LIF CD8⁺T细胞肿瘤浸润的作用的示意性图示。通过Mann-Whitney T检验或对数秩检验进行统计分析。*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001。

[0065] 图24A-D示出了在肿瘤中的LIF表达。在24A中,在人GBM的组织微阵列中进行LIF IHC,染色程度使用H评分法进行定量。24B示出了来自15个患者神经球培养物的上清液的LIF ELISA。24C和24D示出了从人GBM肿瘤(24C)和GL261N肿瘤(24D)分离的CD45⁺和CD45⁻细胞中的指示基因的qRT-PCR分析。

[0066] 图25A-J示出了在小鼠模型中的LIF阻断抑制了肿瘤的生长。25A示出了在GL261、GL261N和GL261N CRISPR/LIF细胞上进行的LIF的qRT-PCR和ELISA的结果。25B示出了在接种GL261N和GL261N CRISPR/LIF的小鼠中在12dpi下作为总通量(p/s)的肿瘤生长。25C和25D示出了ID8细胞感染了pLK0.1或两种独立的pLK0.1-shLIF慢病毒。通过qRT-PCR和ELISA测定LIF表达(25C)。25D示出了在小鼠腹膜中接种ID8细胞的结果。示出了治疗时间表。在40dpi下测量腹部体积(mm³)。25E示出了在12dpi下在抗LIF (r5D8) 或对照IgG治疗的小鼠中GL261肿瘤的生长。25F示出了在C57BL/6小鼠和两个免疫缺陷模型NOD SCID和RAG1^{-/-}中接种GL261N细胞的结果。示出了治疗时间表。在12dpi下测量肿瘤生长。25G-25J示出了通过流式细胞术确定的GL261N(25G-25H)和ID8(25I-25J)肿瘤中CD4⁺T细胞群门控的NK细胞(CD335⁺)和Treg(CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺)的百分比。数据呈现为平均值±SEM。通过Mann-Whitney T检验进行统计分析。*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001;****P<0.0001。

[0067] 图26A-H示出了用抗LIF (r5D8) 治疗后免疫细胞浸润物的表征。26A示出了GL261N肿瘤的CD8⁺T细胞群中GZMA的百分比和MFI。26B和26C示出了GL261N(26B)和ID8(26C)模型肿瘤中PD1⁺CD8⁺T细胞的百分比。26D示出了响应于抗LIF (r5D8) 治疗,GL261N和RCAS肿瘤中浸润性TAM(CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻CD49d⁺)的百分比。示出了流式细胞术门控策略。26E示出了GL261N肿瘤中的树突细胞群(DC)(CD11b⁺CD11c⁺MHCII⁺)和抗原呈递,其通过MHCII表达确

定。26F示出了GL261N肿瘤中的IL-12和IL-10的ELISA。26G示出了在8dpi下抗LIF (r5D8) 治疗的GL261N荷瘤小鼠的结果。在13dpi下作为总通量 (p/s) 测量肿瘤体积。26H示出了通过流式细胞术确定的肿瘤中CD8⁺T细胞 (CD3⁺CD8⁺) 的百分比。数据呈现为平均值±SEM。通过Mann-Whitney T检验进行统计分析。*P<0.05;**P<0.01。

[0068] 图27A示出了如通过流式细胞术确定的, TAM (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻) 和CD8⁺T细胞 (CD3⁺CD8⁺) 群上CCR2、CXCR3和LIFR表达的百分比。数据呈现为平均值±SEM。通过Mann-Whitney T检验进行统计分析。*P<0.05。27B示出了从GL261N肿瘤中分选出的CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻和CD11b⁻Ly6G⁻Ly6C⁻细胞中指示基因的qRT-PCR分析。

[0069] 图28示出了GBM和卵巢癌中LIF与CD163、CD206和CCL2表达之间的相关性。GBM和卵巢癌(OV) TCGA肿瘤队列中LIF与CD163、CD206、CCL2表达 (以log₂ RSEM计) 之间的回归图。

[0070] 图29A和29B示出了在鼠和人巨噬细胞中LIF对CXCL9的调节。图29A示出了通过流式细胞术确定培养物中的CD11b⁺CD14⁺细胞。数据呈现为平均值±SD。通过学生t检验进行统计分析。**P<0.01;***P<0.001。图29B示出了将BMDM与LIF (20ng/ml) 预孵育18h, 然后用1μg/ml LPS刺激6h。

[0071] 图30示出了在GL261N、RCAS和ID8模型中对抗LIF (r5D8) 和抗PD1组合治疗的抗肿瘤反应。图30示出了用抗LIF (r5D8) 和/或抗PD1治疗了GL261N、RCAS和ID8荷瘤小鼠 (示出了治疗时间表)。肿瘤生长以总通量 (p/s) (GL261N和RCAS) 或腹部体积 (mm³) (ID8) 进行测量。通过Mann-Whitney T检验进行统计分析。*P<0.05;**P<0.01。

具体实施方式

[0072] 除非另有定义, 本文所使用的所有技术术语具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解的相同的意义。如本说明书和所附权利要求书中所用的, 单数形式“一个/一种 (a/an)”和“该 (the)”包括复数引用, 除非上下文明确地指示其他的情况。除非另有说明, 否则本文中对“或”的任何引用旨在涵盖“和/或”。

[0073] 在一方面, 本文描述了白血病抑制因子 (LIF) 结合多肽与PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274) 或PDL-2 (CD-273) 信号传导抑制剂组合治疗个体的癌症的用途。

[0074] 在另一方面, 本文描述了白血病抑制因子 (LIF) 结合抗体与PD-1结合抗体组合治疗个体的癌症的用途, 其中该LIF结合抗体包括: (a) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1), 其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列; (b) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列; (c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列; (d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列; (e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列; 以及 (f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

[0075] 在另一方面, 本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法, 其包括向患有癌症的个体施用有效量的: (a) 白血病抑制因子 (LIF) 结合多肽; 以及 (b) PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274) 或PDL-2 (CD273) 信号传导抑制剂。

[0076] 在另一方面, 本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法, 该方法包括: 将有效量

的白血病抑制因子 (LIF) 结合多肽施用给该患有癌症的个体,其中已将治疗量的PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274) 或PDL-2 (CD-273) 信号传导抑制剂施用给该个体。

[0077] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括:向该患有癌症的个体施用;有效量的PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274) 或PDL-2 (CD273) 信号传导抑制剂,其中已将治疗量的白血病抑制因子 (LIF) 结合多肽施用给该个体。

[0078] 在另一方面,本文描述了一种减少患有癌症的个体的肿瘤中的肿瘤前肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:(a) 特异性结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体;以及 (b) PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。

[0079] 在另一方面,本文描述了一种在患有癌症的个体中产生免疫记忆的方法,其包括向患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:(a) 特异性结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体;以及 (b) PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。

[0080] 在另一方面,本文描述了一种增加个体的肿瘤中的T淋巴细胞量的方法,其包括向患该肿瘤的个体施用有效量的以下项的组合:(a) 特异性结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体;以及 (b) PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂。

[0081] 在另一方面,本文描述了一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向患有癌症的个体施用有效量的:(a) 白血病抑制因子 (LIF) 结合抗体,其包括:(i) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和 (vi) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及 (b) PD-1结合抗体。

[0082] 在另一方面,本文描述了一种试剂盒,其包括:(a) 白血病抑制因子 (LIF) 结合多肽;以及 (b) PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274) 或PDL-2 (CD273) 信号传导抑制剂。

[0083] 在另一方面,本文描述了一种组合物,其包括:(a) 白血病抑制因子 (LIF) 结合多肽;以及 (b) PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274) 或PDL-2 (CD273) 信号传导抑制剂。

[0084] 在另一方面,本文描述了一种减少患有癌症的个体的肿瘤前肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:(a) 特异性结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体,其包括:(i) 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii) 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和 (vi) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及PD-1轴抑制剂。

[0085] 在另一方面,本文描述了一种在患有癌症的个体中产生免疫记忆的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:(a) 特异性结合白血病抑制因子 (LIF) 的

抗体,其包括:(i)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和(vi)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及PD-1轴抑制剂。

[0086] 在另一方面,本文描述了一种增加肿瘤中的T淋巴细胞量的方法,其包括向患该肿瘤的个体施用有效量的以下项的组合:(a)特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,其包括:(i)免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;(ii)免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;(iii)免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;(iv)免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;(v)免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和(vi)免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及PD-1轴抑制剂。

[0087] 如本文所用,术语“个体”、“受试者”和“患者”可互换使用,且包括被诊断出或怀疑患有肿瘤、癌症或其他赘生物的人。个体也可以包括哺乳动物,诸如小鼠、大鼠、狗、猫、猪、绵羊、母牛、马、山羊、美洲驼、羊驼或牦牛。

[0088] 如本文所用,术语“约”是指在所述量附近变化10%的量。

[0089] 如本文所用,术语“治疗(treat或treating)”是指对设计或旨在减轻与所述生理或疾病状态相关的至少一种体征或症状的对个体的生理或疾病状态的干预。本文所述的关于癌症的治疗是指旨在诱导完全应答、部分应答、所治疗的癌症或肿瘤的延迟进展、肿瘤大小或肿瘤负荷的减少或者肿瘤生长或肿瘤负荷的延迟的干预。治疗还指旨在减少癌症或肿瘤的转移或恶性度的干预。本领域技术人员将认识到,在患有疾病的个体的异质群体中,并非所有个体都会对给定的治疗产生同等或完全的反应。尽管如此,这些个体仍被视为已接受治疗。不成功的治疗通常会导致疾病进展,因此有必要采用其他治疗方法进行额外治疗。在某些方面,本文所述的抗体和方法可用于维持癌症的缓解或预防与治疗的癌症有关的相同癌症或不同癌症的复发。

[0090] 如本文所用,术语“组合”或“组合治疗”可以指同时施用要被组合的物品或顺序施用要被组合的物品。如本文所述,当组合指的是物品的顺序施用时,可以以任何时间顺序施用物品。

[0091] 术语“癌症”和“肿瘤”涉及以细胞生长失调为特征的哺乳动物的生理状况。癌症是一类疾病,其中一组细胞显示不受控制的生长或不想要的生长。癌细胞也可以扩散到其他位置,这可能导致转移的形成。癌细胞在体内的扩散可以例如通过淋巴或血液发生。不受控制的生长、侵袭和转移形成也被称为癌症的恶性特性。这些恶性特性使癌症与良性肿瘤区分开来,良性肿瘤典型地不会侵袭或转移。

[0092] 如本文所用,术语“有效量”是指当施用于哺乳动物时引起生物学效应的治疗剂的量。生物学效应包括但不限于抑制或阻断受体配体相互作用(例如,LIF-LIFR、PD-1-PDL1/

PDL-2),抑制信号传导通路(例如,STAT3磷酸化),减少肿瘤生长,减少肿瘤的转移,或延长携带肿瘤的动物的存活。“治疗量”是经计算可发挥治疗作用的药物浓度。治疗量包括能够在个体群体中诱导治疗反应的剂量范围。该哺乳动物可以是人类个体。该人类个体可能患有或怀疑患有肿瘤。

[0093] 如本文所用,“检查点抑制剂”是指抑制生物体产生的生物分子(“检查点分子”)的药物,其负调节该生物体中T细胞的抗肿瘤/癌症活性。检查点分子包括但不限于PD-1、PDL-1、PDL-2、CTLA4、TIM-3、LAG-3、VISTA、SIGLEC7、PVR、TIGIT、IDO、KIR、A2AR、B7-H3、B7H4和NOX2。

[0094] 如本文所用,除非另有指示,否则术语“抗体”包括抗体的抗原结合片段,即,保留与全长抗体结合的抗原特异性结合能力的抗体片段,例如,保留一个或多个CDR区的片段。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;重链抗体、单链抗体分子,例如,单链可变区片段(scFv)、纳米抗体和由具有不同特异性的抗体片段形成的多特异性抗体,诸如双特异性抗体。在某些实施例中,以降低个体对该抗体的免疫反应的方式将这些抗体人源化。例如,该抗体可以是嵌合的,例如,具有人恒定区的非人可变区,或CDR移植的,例如,具有人恒定区和可变区框架序列的非人CDR区。在某些实施例中,人源化后抗体是去免疫化的。去免疫化涉及去除或使该抗体恒定区中的一个或多个T细胞表位突变。在某些实施例中,本文所述的抗体是单克隆的。如本文所用,“重组抗体”是包括衍生自两种不同物种或两种不同来源的氨基酸序列的抗体,并且包括合成分子,例如,包括非人CDR和人框架或恒定区的抗体。在某些实施例中,本发明的重组抗体由重组DNA分子产生或合成。

[0095] 相对于参考多肽或抗体序列的序列同一性百分比(%)是候选序列中与参考多肽或抗体序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,在比对序列并引入缺口后,必要时,要获得最大的序列同一性百分比,并且不考虑将任何保守取代作为序列同一性的一部分。为了确定氨基酸序列同一性百分数的目的的比对可以通过已知的各种方式来实现,例如,使用公开可用的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。能够确定用于比对序列的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列比较计算机程序由基因泰克公司(Genentech, Inc.)编写,源代码已与用户文档一起归档在华盛顿特区20559的美国版权局中,其中在美国版权注册号TXU510087下进行了注册。该ALIGN-2程序可从加利福尼亚南旧金山的基因泰克公司公开获得,或可以从源代码中进行编译。该ALIGN-2程序应编译为在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置,并且没有变化。

[0096] 在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A对/与/相对于给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(替代性地这可以用短语表示为对/与/相对于给定氨基酸序列B具有或包含特定%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A)计算如下:100乘以分数X/Y,其中X是在A和B的程序比对中通过序列比对程序ALIGN-2评定为相同匹配的氨基酸残基数,其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的%氨基酸序列同一性将不等于B与A的%氨基酸序列同一性。除非另外特别说明,否则本文使用的所有%氨基酸序列一致性值都是使用ALIGN-2计算机程序如

刚才前一段所述获得的。

[0097] 术语“表位”包括能够被抗原结合蛋白诸如抗体结合的任何决定簇。表位是由靶向该抗原的抗原结合蛋白结合的抗原区,并且当抗原是蛋白质时,表位包括直接接触抗原结合蛋白的特定氨基酸。表位最常位于蛋白质上,但在一些情况下可以位于其他种类的分子(诸如糖或脂质)上。表位决定簇可以包括分子的化学活性表面基团,诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基基团,且可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。通常,对特定靶抗原具有特异性的抗体将优先识别蛋白和/或大分子的复杂混合物中靶抗原上的表位。

[0098] 如本文所用,术语“TAM”或“肿瘤相关的巨噬细胞”包括在实体瘤的微环境中大量存在的巨噬细胞或单核细胞衍生的免疫细胞。TAM包括但不限于表达CD11b⁺、Ly6G⁻、Ly6C⁻、CD206⁺、CD163⁺、MHCII^低、CD49d⁺或其任何组合的细胞。

[0099] 本文所述抗体的结构属性

[0100] 互补决定区(“CDR”)是免疫球蛋白(抗体)可变区的一部分,其主要负责抗体的抗原结合特异性。即使抗体特异性结合相同的靶点或表位,CDR区也从一个抗体到另一个抗体高度可变。重链可变区包括三个CDR区,缩写为VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3;轻链可变区包括三个CDR区,缩写为VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3。这些CDR区在可变区中连续排列,其中CDR1是最N端,而CDR3是最C端。散布在CDR之间的是框架区,其有助于结构并且显示出比CDR区少得多的可变性。重链可变区包括四个框架区,缩写为VH-FR1、VH-FR2、VH-FR3和VH-FR4;轻链可变区包括四个框架区,缩写为VL-FR1、VL-FR2、VL-FR3和VL-FR4。包括两条重链和轻链的完整的全尺寸二价抗体将包括:12个CDR,其具有三个独特的重链CDR和三个独特的轻链CDR;16个FR区,其具有四个独特的重链FR区和四个独特的轻链FR区。在某些实施例中,本文所述的抗体最少包括三个重链CDR。在某些实施例中,本文所述的抗体最少包括三个轻链CDR。在某些实施例中,本文所述的抗体最少包括三个重链CDR和三个轻链CDR。给定的CDR或FR的精确氨基酸序列边界可以使用许多众所周知的方案中的任何一个来容易地确定,包括Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],”第5版美国马里兰州贝塞斯达市国立卫生研究院公共卫生服务(“卡巴特(Kabat)”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“乔西亚(Chothia)”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography[抗体-抗原相互作用:接触分析和结合位点形貌],”(“Contact”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains[IMGT独特的免疫球蛋白和T细胞受体可变结构域和Ig超家族V样结构域编码],”Dev Comp Immunol[发育与比较免疫学],2003年1月;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);以及Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool[又另一种免疫球蛋白可变结构域的编号方案:一种自动建模和分析工具],”JMolBiol[分子生物学杂志],2001年6月8日;309(3):657-70(“Aho”编号方案)所述的那些。本文从使用不同编号系统提供的可变序列中鉴定出CDR,本文中使用的卡巴特、IMGT、乔西亚编号系统或这三种的任何组合。给定CDR或FR的边界可能会有所不同,取决于用于鉴定的方案。例如,卡

卡特方案基于结构比对,而乔西亚方案基于结构信息。卡卡特和乔西亚方案的编号均基于最常见的抗体区序列长度,通过插入字母(例如“30a”)进行插入,并且一些抗体中显现缺失。这两种方案将某些插入和缺失(“indel”)放在不同的位置,从而产生不同的编号。接触方案基于复杂晶体结构的分析,并且在许多方面与乔西亚编号方案相似。在一些实施例中,本披露的CDR通过卡卡特方法、IMGT方法、乔西亚方法或其任何组合来确定。

[0101] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的结构域,其涉及抗体与抗原的结合。天然抗体的重链和轻链(分别为VH和VL)的可变结构域通常具有相似的结构,每个结构域包括四个保守框架区(FR)和三个CDR(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology [Kuby免疫学],第六版,W.H.Freeman and Co.[W.H.弗里曼公司],第91页(2007))。单个VH或VL结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用VH或VL结构域从结合抗原的抗体中分离结合特定抗原的抗体,以分别筛选互补的VL或VH结构域的文库(参见例如,Portolano等人,J. Immunol. [免疫学杂志]150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature [自然]352:624-628(1991))。在某些实施例中,本文所述的抗体是人源化的。在某些实施例中,本文所述的抗体是嵌合的。在某些实施例中,本文所述的抗体包括大鼠来源的可变区。在某些实施例中,本文所述的抗体包括大鼠来源的CDR。在某些实施例中,本文所述的抗体包括小鼠来源的可变区。在某些实施例中,本文所述的抗体包括小鼠来源的CDR。

[0102] 可以在CDR中进行改变(例如,取代),例如以改善抗体亲和力。可以在体细胞成熟过程中以高突变率在CDR编码密码子中进行此类改变(参见,例如,Chowdhury, Methods Mol. Biol. [分子生物学方法]207:179-196(2008)),并且可以测试所得变体的结合亲和力。亲和力成熟(例如,使用易错PCR、链改组、CDR随机化或寡核苷酸定向诱变)可用于改善抗体亲和力(参见例如Hoogenboom等人Methods in Molecular Biology [分子生物学方法]178:1-37(2001))。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性地鉴定涉及抗原结合的CDR残基(参见例如Cunningham和Wells Science [科学],244:1081-1085(1989))。CDR-H3和CDR-L3特别是通常靶向的。替代性地或另外地,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定该抗体和抗原之间的接触点。可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基作为取代候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有所需的性质。

[0103] 在某些实施例中,本文所述的抗体除可变区外还包括恒定区。该重链恒定区(C_H)包括四个结构域,缩写为 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和 C_{H4} ,位于完整重链多肽的C末端,即可变区的C末端。该轻链恒定区(C_L)比该 C_H 小得多,且位于完整轻链多肽的C末端,即可变区的C末端。该恒定区是高度保守的,且包括与稍微不同的功能和特性相关的不同同种型。在某些实施例中,该恒定区对于结合靶抗原的抗体是可有可无的。在某些实施例中,该抗体的恒定区、重链和轻链都是可有可无的。在某些实施例中,本文所述的抗体缺少轻链恒定区、重链恒定区或两者中的一个或多个。大多数单克隆抗体为IgG同种型;进一步分为四个亚类IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。在某些实施例中,本文所述的抗体包括任何IgG亚类。在某些实施例中,该IgG亚类包括IgG₁。在某些实施例中,该IgG亚类包括IgG₂。在某些实施例中,该IgG亚类包括IgG₃。在某些实施例中,该IgG亚类包括IgG₄。

[0104] 抗体包括负责与补体和Fc受体结合的片段可结晶区(Fc区)。该Fc区包括该抗体分子的 C_{H2} 、 C_{H3} 和 C_{H4} 区。抗体的Fc区负责活化补体和抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。该Fc区也有助于抗体的血清半衰期。在某些实施例中,本文所述的抗体的Fc区包括促进补体介

导的细胞裂解的一个或多个氨基酸取代。在某些实施例中，本文所述的抗体的Fc区包括促进ADCC的一个或多个氨基酸取代。在某些实施例中，本文所述的抗体的Fc区包括减少补体介导的细胞裂解的一个或多个氨基酸取代。在某些实施例中，本文所述的抗体的Fc区包括增加该抗体与Fc受体的结合的一个或多个氨基酸取代。在某些实施例中，该Fc受体包括Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32)、Fc γ RIIIA (CD16a)、Fc γ RIIIB (CD16b) 或其任何组合。在某些实施例中，本文描述的抗体的Fc区包括一个或多个氨基酸取代，其增加了该抗体的血清半衰期。在某些实施例中，增加该抗体的血清半衰期的一个或多个氨基酸取代增加了该抗体对新生儿Fc受体 (FcRn) 的亲合力。

[0105] 在一些实施例中，本披露的抗体是具有一些但不是全部效应子功能的变体，这使其成为用于如下应用的理想候选物，其中抗体的体内半衰期很重要但某些效应子功能 (诸如补体和ADCC) 是不必要或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定，以证实CDC和/或ADCC活性的降低/耗竭。例如，可以进行Fc受体 (FcR) 结合测定以确保抗体缺乏Fc γ R结合 (因此可能缺乏ADCC活性)，但是保留FcRn结合能力。评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例在美国专利号5,500,362和5,821,337中有描述。替代性地，可以采用非放射性测定方法 (例如，ACTITM和CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性测定)。用于这类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC)、单核细胞、巨噬细胞和自然杀伤 (NK) 细胞。

[0106] 抗体可具有增加的半衰期和改善的与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合 (参见例如US 2005/0014934)。此类抗体可包括其中具有一个或多个取代的Fc区，其改善Fc区与FcRn的结合，并包括在如下一个或多个Fc区残基处具有取代的那些：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434 (根据EU编号体系) (参见例如美国专利号7,371,826)。还考虑了Fc区变体的其他实例 (参见例如，Duncan & Winter, Nature [自然] 322:738-40 (1988)；美国专利号5,648,260和5,624,821；和WO 94/29351)。

[0107] 在临床上有用的抗体通常被“人源化”以降低人类个体的免疫原性。人源化抗体改善了单克隆抗体治疗的安全性和有效性。一种人源化的常用方法是在任何合适的动物 (例如，小鼠、大鼠、仓鼠) 中产生单克隆抗体，并用人恒定区代替恒定区，以此方式改造的抗体称为“嵌合的”。另一种常见的方法是“CDR移植”，其用人V-FR代替非人V-FR。在CDR移植方法中，除CDR区外的所有残基都是人源的。在某些实施例中，本文所述的抗体是人源化的。在某些实施例中，本文所述的抗体是嵌合的。在某些实施例中，本文所述的抗体是CDR移植的。

[0108] 人源化通常降低抗体的整体亲和力或对抗体的整体亲和力几乎没有影响。本文描述了在人源化后意外地对其靶点具有更大亲和力的抗体。在某些实施例中，人源化使对该抗体的亲和力增加了10%。在某些实施例中，人源化使对该抗体的亲和力增加了25%。在某些实施例中，人源化使对该抗体的亲和力增加了35%。在某些实施例中，人源化使对该抗体的亲和力增加了50%。在某些实施例中，人源化使对该抗体的亲和力增加了60%。在某些实施例中，人源化使对该抗体的亲和力增加了75%。在某些实施例中，人源化使对该抗体的亲和力增加了100%。亲和力是适合时使用表面等离子共振 (SPR) 测量的。在某些实施例中，使用糖基化的人LIF测量亲和力。在某些实施例中，该糖基化的人LIF被固定到该SPR芯片的表面。在某些实施例中，该抗体以小于约300纳摩尔、200纳摩尔、150纳摩尔、125纳摩尔、100纳摩尔、90纳摩尔、80纳摩尔、70纳摩尔、60纳摩尔、50纳摩尔、40纳摩尔或更低的K_d结合。

[0109] 本文所述的组合物和方法包括LIF结合多肽与PD-1轴抑制剂的组合。在某些实施例中,该LIF结合多肽包括免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白重链恒定区的片段。在某些实施例中,该LIF结合多肽为与LIF特异性结合的抗体。在某些实施例中,该LIF结合抗体包括至少一个衍生自人免疫球蛋白框架区的框架区。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是人源化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是去免疫化的。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是IgG抗体。在某些实施例中,该与LIF特异性结合的抗体是Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施例中,该LIF结合抗体是本文所述的h5D8抗体(SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:46),或重链半胱氨酸突变体(SEQ ID NO:66)或具有h5D8的CDR的抗体或其半胱氨酸突变体形式。

[0110] 在本文所述的某些实施例中,该与PD-1抑制剂组合利用或施用的抗体是该h5D8抗体。该h5d8抗体特异性结合LIF,该抗体包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的VH-CDR1、SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的VH-CDR2以及SEQ ID NO:6至8中任一项所阐述的VH-CDR3。在本文所述的某些实施例中,h5D8特异性结合LIF且包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的VL-CDR1、SEQ ID NO:11或12所阐述的VL-CDR2以及SEQ ID NO:13所阐述的VL-CDR3。在本文所述的某些实施例中,h5D8特异性结合LIF且包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的VH-CDR1、SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的VH-CDR2以及SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的VH-CDR3、SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的VL-CDR1、SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的VL-CDR2以及SEQ ID NO:13所阐述的VL-CDR3。

[0111] 在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个人重链框架区,其包括:与SEQ ID NO:14-17中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:18或19中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20-22中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:23-25中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个人轻链框架区,其包括:与SEQ ID NO:26-29中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:30-33中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38-40中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人轻链框架区包括与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%或约95%相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的

氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区和该一个或多个人轻链区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR3氨基酸序列,与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR4氨基酸序列,与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR3氨基酸序列,以及与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个人重链框架区,其包括:与SEQ ID NO:14-17中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:18或19中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20-22中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:23-25中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个人轻链框架区,其包括:与SEQ ID NO:26-29中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:30-33中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38-40中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人轻链框架区包括与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区和该一个或多个人轻链区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR3氨基酸序列,与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR4氨基酸序列,与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR2,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR3,以及与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该抗体特异性结合人LIF。

[0112] 本文所述的r5D8抗体由用编码人LIF的DNA免疫的大鼠产生。r5D8被克隆并测序,且包括具有以下氨基酸序列的CDR(使用卡巴特和IMGT CDR编号方法的组合):对应于SEQ

ID NO:1 (GFTFSHAWMH) 的VH-CDR1、对应于SEQ ID NO:4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG) 的VH-CDR2、对应于SEQ ID NO:6 (TCWEWDLDF) 的VH-CDR3、对应于SEQ ID NO:9 (RSSQSLLSDSGHTYLN) 的VL-CDR1、对应于SEQ ID NO:11 (SVSNLES) 的VL-CDR2以及对应于SEQ ID NO:13 (MQATHAPPYT) 的VL-CDR3。该抗体已通过CDR移植被人源化,且该人源化版本被称为h5D8。

[0113] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的抗体,其包括与SEQ ID NO:1 (GFTFSHAWMH) 所阐述的至少80%或90%相同的VH-CDR1、与SEQ ID NO:4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG) 所阐述的至少80%、90%或95%相同的VH-CDR2以及与SEQ ID NO:6 (TCWEWDLDF) 所阐述的至少80%或90%相同的VH-CDR3。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的抗体,其包括与SEQ ID NO:9 (RSSQSLLSDSGHTYLN) 所阐述的至少80%或90%相同的VL-CDR1、与SEQ ID NO:11 (SVSNLES) 所阐述的至少80%相同的VL-CDR2以及与SEQ ID NO:13 (MQATHAPPYT) 所阐述的至少80%或90%相同的VL-CDR3。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的抗体,其包括SEQ ID NO:1 (GFTFSHAWMH) 所阐述的VH-CDR1、SEQ ID NO:4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG) 所阐述的VH-CDR2、SEQ ID NO:6 (TCWEWDLDF) 所阐述的VH-CDR3、SEQ ID NO:9 (RSSQSLLSDSGHTYLN) 所阐述的VL-CDR1、SEQ ID NO:11 (SVSNLES) 所阐述的VL-CDR2以及SEQ ID NO:13 (MQATHAPPYT) 所阐述的VL-CDR3。在本披露的CDR的氨基酸序列中设想了某些保守氨基酸取代。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:1、4、6、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:1、4、6、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸,且不会对结合亲和力造成大于10%、20%或30%的影响。在某些实施例中,特异性结合LIF的抗体包括一个或多个人重链框架区,其包括:与SEQ ID NO:14-17中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:18或19中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20-22中任一项所阐述的氨基酸序列至少90%相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:23-25中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个人轻链框架区,其包括:与SEQ ID NO:26-29中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:30-33中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38-40中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人轻链框架区包括与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-

FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区和该一个或多个人轻链区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR3氨基酸序列,与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列至少90%相同的VH-FR4氨基酸序列,与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR3氨基酸序列,以及与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该抗体特异性结合人LIF。在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个人重链框架区,其包括:与SEQ ID NO:14-17中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:18或19中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20-22中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:23-25中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个人轻链框架区,其包括:与SEQ ID NO:26-29中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:30-33中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38-40中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人轻链框架区包括与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区和该一个或多个人轻链区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR3氨基酸序列,与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR4氨基酸序列,与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR2,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR3,以及与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该抗体特异性结合人LIF。

[0114] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的抗体,其包括与SEQ ID NO:1 (GFTFSHAWMH) 所阐述的至少80%或90%相同的VH-CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG) 所阐述的至少80%、90%或95%相同的VH-CDR2氨基酸序列、以及

与SEQ ID NO:8 (TSWEWDLDF) 所阐述的至少80%或90%相同的VH-CDR3氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的抗体,其包括与SEQ ID NO:9 (RSSQSLLDSDGHTYLN) 所阐述的至少80%或90%相同的VL-CDR1氨基酸序列、与SEQ ID NO:11 (SVSNLES) 所阐述的至少80%相同的VL-CDR2氨基酸序列以及与SEQ ID NO:13 (MQATHAPPYT) 所阐述的至少80%或90%相同的VL-CDR3氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的抗体,其包括SEQ ID NO:1 (GFTFSHAWMH) 所阐述的VH-CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG) 所阐述的VH-CDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:8 (TSWEWDLDF) 所阐述的VH-CDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:9 (RSSQSLLDSDGHTYLN) 所阐述的VL-CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:11 (SVSNLES) 所阐述的VL-CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:13 (MQATHAPPYT) 所阐述的VL-CDR3氨基酸序列。在本披露的CDR的氨基酸序列中设想了某些保守氨基酸取代。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:1、4、8、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸。在某些实施例中,该抗体包括CDR,其与SEQ ID NO:1、4、8、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸,且不会对结合亲和力造成大于10%、20%或30%的影响。在某些实施例中,特异性结合LIF的抗体包括一个或多个重链框架区,其包括:与SEQ ID NO:14-17中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:18或19中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20-22中任一项所阐述的氨基酸序列至少90%相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:23-25中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个重链框架区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个轻链框架区,其包括:与SEQ ID NO:26-29中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:30-33中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38-40中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个轻链框架区包括与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列至少90%相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个重链框架区和该一个或多个轻链区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-

FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VH-FR3氨基酸序列,与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列至少90%相同的VH-FR4氨基酸序列,与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR3氨基酸序列,以及与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该抗体特异性结合人LIF。在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个人重链框架区,其包括:与SEQ ID NO:14-17中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:18或19中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20-22中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:23-25中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该特异性结合LIF的抗体包含一个或多个人轻链框架区,其包括:与SEQ ID NO:26-29中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:30-33中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:34-37中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38-40中任一项所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人轻链框架区包括与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR3氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该一个或多个人重链框架区和该一个或多个人轻链区包括与SEQ ID NO:15所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR2氨基酸序列,与SEQ ID NO:20所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR3氨基酸序列,与SEQ ID NO:24所阐述的氨基酸序列相同的VH-FR4氨基酸序列,与SEQ ID NO:27所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR1氨基酸序列,与SEQ ID NO:31所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR2,与SEQ ID NO:35所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR3,以及与SEQ ID NO:38所阐述的氨基酸序列相同的VL-FR4氨基酸序列。在某些实施例中,该抗体特异性结合人LIF。

[0115] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括与SEQ ID NO:41、42和44中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括SEQ ID NO:41、42和44中任一项所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化轻链可变区,该人源化轻链可变区包括与SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源

化轻链可变区,该人源化轻链可变区包括SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,该抗体特异性结合人LIF。

[0116] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链可变区,该人源化轻链可变区包括与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链可变区,其包括SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列。

[0117] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括与SEQ ID NO:66所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链可变区,该人源化轻链可变区包括与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括SEQ ID NO:66所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链可变区,其包括SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列。

[0118] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链可变区,该人源化重链可变区包括与SEQ ID NO:57-60中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链可变区,该人源化轻链可变区包括与SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括SEQ ID NO:57-60中任一项所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列。

[0119] 在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括与SEQ ID NO:58所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链,该人源化轻链包括与SEQ ID NO:62所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括SEQ ID NO:58所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括SEQ ID NO:62所阐述的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括与SEQ ID NO:67所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链,该人源化轻链包括与SEQ ID NO:62所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文描述了一种特异性结合LIF的抗体,其包括人源化重链,该人源化重链包括SEQ ID NO:67所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链,其包括SEQ ID NO:62所阐述的氨基酸序列。

[0120] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合白血病抑制因子(LIF)的重组抗体,其包括:重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:3所阐述的氨基酸序列;重链互补决定

区2 (VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO:4所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区3 (VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:7所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

[0121] 在某些实施例中, 本文描述了特异性结合白血病抑制因子 (LIF) 的重组抗体, 其包括:重链互补决定区1 (VH-CDR1), 其包括SEQ ID NO:2所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区2 (VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO:5所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区3 (VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:6所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:10所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:12所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在本披露的CDR的氨基酸序列中设想了某些保守氨基酸取代。在某些实施例中, 该抗体包括CDR, 其与SEQ ID NO:2、5、6、10、12和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸。在某些实施例中, 该抗体包括CDR, 其与SEQ ID NO:2、5、6、10、12和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸, 且不会对结合亲和力造成大于10%、20%或30%的影响。

[0122] 在某些实施例中, 本文描述了特异性结合白血病抑制因子 (LIF) 的重组抗体, 其包括:重链互补决定区1 (VH-CDR1), 其包括SEQ ID NO:3所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区2 (VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO:4所阐述的氨基酸序列;重链互补决定区3 (VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:7所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11所阐述的氨基酸序列;轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。在本披露的CDR的氨基酸序列中设想了某些保守氨基酸取代。在某些实施例中, 该抗体包括CDR, 其与SEQ ID NO:3、4、7、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸。在某些实施例中, 该抗体包括CDR, 其与SEQ ID NO:3、4、7、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3或4个氨基酸, 且不会对结合亲和力造成大于10%、20%或30%的影响。

[0123] 在某些实施例中, 本文描述了特异性结合LIF的抗体, 其包括人源化重链, 该人源化重链包括与SEQ ID NO:49-52中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链, 其包括与SEQ ID NO:53-56中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中, 本文描述了特异性结合LIF的抗体, 其包括人源化重链, 该人源化重链包括SEQ ID NO:49-52中任一项所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链, 其包括SEQ ID NO:53-56中任一项所阐述的氨基酸序列。

[0124] 在某些实施例中, 本文描述了特异性结合LIF的抗体, 其包括人源化重链, 该人源化重链包括与SEQ ID NO:50所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列;以及人源化轻链, 其包括与SEQ ID NO:54所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的氨基酸序列。在某些实施例中, 本文描述了特异性结合LIF的抗体, 其包括人源化重链, 该人源化重链包括SEQ ID NO:50所阐述的氨基酸序列;以及人源化轻链, 其包括SEQ ID NO:54所阐述的氨基酸序列。

[0125] 由治疗上有用的LIF抗体结合的表位

[0126] 本文描述了人LIF的独特表位, 其在被结合时抑制LIF的生物学活性 (例如, STAT3

磷酸化)且在体内抑制肿瘤生长。本文所述的表位由两个不连续的氨基酸片段(从人LIF的残基13到残基32和残基120到138)组成,它们存在于人LIF蛋白的两个不同拓扑域(α 螺旋A和C)。这种结合是弱(范德华力吸引)、中等(氢结合)和强(盐桥)相互作用的组合。在某些实施例中,接触残基是LIF上的残基,其与抗LIF抗体上的残基形成氢键。在某些实施例中,接触残基是LIF上的残基,其与抗LIF抗体上的残基形成盐桥。在某些实施例中,接触残基是LIF上的残基,其与抗LIF抗体上的残基形成范德华力并在至少5.4或3埃之内。

[0127] 在某些实施例中,本文所述的包括LIF结合抗体和PD-1轴抑制剂的方法和组合物包括分离的抗体,其结合以下残基中的任何一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,本文描述了结合以下所有残基的分离的抗体:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,本文描述了结合以下所有残基的分离的抗体:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强或中等相互作用的残基。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强相互作用的残基。在某个实施例中,该抗体与LIF的螺旋A和C相互作用。在某个实施例中,该抗体阻断LIF与gp130的相互作用。

[0128] 在某些实施例中,本文描述了一种抗体,其包括具有SEQ ID NO:1、4、6、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列的CDR,该抗体结合以下残基中的任何一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,本文描述了一种抗体,其包括具有SEQ ID NO:1、4、6、9、11和13中任一项所述氨基酸序列的CDR,该抗体与以下所有残基结合:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强或中等相互作用的残基。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强相互作用的残基。

[0129] 在某些实施例中,本文描述了一种抗体,其包括具有SEQ ID NO:1、4、8、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列的CDR,该抗体结合以下残基中的任何一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,本文描述了一种抗体,其包括具有SEQ ID NO:1、4、8、9、11和13中任一项所述氨基酸序列的CDR,该抗体与以下所有残基结合:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强或中等相互作用的残基。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强相互作用的残基。

[0130] 在某些实施例中,本文描述了一种抗体,该抗体包括与SEQ ID NO:1、4、6、9、11和

13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3、4或5个氨基酸的CDR,且结合以下残基中的任何一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,本文描述了一种抗体,该抗体包括与SEQ ID NO:1、4、6、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3、4或5个氨基酸的CDR,且与以下所有残基结合:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强或中等相互作用的残基。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强相互作用的残基。

[0131] 在某些实施例中,本文描述了一种抗体,该抗体包括与SEQ ID NO:1、4、8、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3、4或5个氨基酸的CDR,且结合以下残基中的任何一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,本文描述了一种抗体,该抗体包括与SEQ ID NO:1、4、8、9、11和13中任一项所阐述的氨基酸序列相差1、2、3、4或5个氨基酸的CDR,且与以下所有残基结合:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强或中等相互作用的残基。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强相互作用的残基。

[0132] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的抗体,其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的人源化重链可变区氨基酸序列;以及与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的人源化轻链可变区氨基酸序列,且结合以下残基中的任何一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的抗体,其包括与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的人源化重链可变区氨基酸序列;以及与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的人源化轻链可变区氨基酸序列,且与以下所有残基结合:SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强或中等相互作用的残基。在某些实施例中,该抗体仅结合和该抗体一起参与强相互作用的残基。

[0133] 在某些实施例中,本文描述了特异性结合LIF的抗体,其包括与SEQ ID NO:66所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的人源化重链可变区氨基酸序列;以及与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的人源化轻链可变区氨基酸序列,且结合以下残基中的任何一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十

四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个：SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中，本文描述了特异性结合LIF的抗体，其包括与SEQ ID NO:66所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的人源化重链可变区氨基酸序列；以及与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、约90%、约95%、约97%、约98%或约99%相同的人源化轻链可变区氨基酸序列，且与以下所有残基结合：SEQ ID NO:68的A13、I14、R15、H16、P17、C18、H19、N20、Q25、Q29、Q32、D120、R123、S127、N128、L130、C131、C134、S135或H138。在某些实施例中，该抗体仅结合和该抗体一起参与强或中等相互作用的残基。在某些实施例中，该抗体仅结合和该抗体一起参与强相互作用的残基。

[0134] 在某些实施例中，本文披露的抗体抑制细胞中的LIF信号传导。在某些实施例中，用于在血清饥饿条件下在U-251细胞中生物抑制该抗体的 IC_{50} 小于或等于约100、75、50、40、30、20、10、5或1纳摩尔。在某些实施例中，用于在血清饥饿条件下在U-251细胞中生物抑制该抗体的 IC_{50} 小于或等于约900、800、700、600、500、400、300、200或100纳摩尔。

[0135] 在某些实施例中，本文披露的抗体可用于治疗表达LIF的肿瘤和癌症。在某些实施例中，已经将用本披露的抗体治疗的个体选择为具有LIF阳性肿瘤/癌症用于治疗。在某些实施例中，该肿瘤是LIF阳性或产生升高水平的LIF。在某些实施例中，与参考值或一组病理学标准相比，确定LIF阳性。在某些实施例中，LIF阳性肿瘤表达比其来源的非转化细胞高2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或更多的LIF。在某些实施例中，该肿瘤已获得LIF的异位表达。LIF阳性肿瘤可以使用例如抗LIF抗体的免疫组织化学在组织学上确定；通过常用的分子生物学方法，诸如像通过实时PCR或RNA-seq进行mRNA定量；或者例如，通过蛋白质印迹、流式细胞术、ELISA或同质蛋白质定量测定（例如，AlphaLISA[®]）进行蛋白质定量。在某些实施例中，该抗体可用于治疗诊断为癌症的患者。在某些实施例中，该癌症包括一种或多种癌症干细胞，或者是一种或多种癌症干细胞。

[0136] 在某些实施例中，本文披露的抗体可用于治疗表达LIF受体（CD118）的癌症中的肿瘤。LIF受体阳性肿瘤可以通过组织病理学或流式细胞术确定，并且在某些实施例中，包括结合LIF受体抗体的细胞，大于同种型对照的2x、3x、4x、5x、10x或更多。在某些实施例中，该肿瘤已经获得了该LIF受体的异位表达。在某个实施例中，该癌症是癌症干细胞。在某个实施例中，可以使用抗LIF和抗LIF抗体通过免疫组织化学来确定LIF阳性肿瘤或癌症。在某个实施例中，通过IHC分析确定LIF阳性肿瘤，其中LIF水平在肿瘤的前10%、20%、30%、40%或前50%中。

[0137] 本文所述的抗体影响许多结果。在某个实施例中，与对照抗体（例如同种型对照）相比，本文所述的抗体可以减少肿瘤模型肿瘤中M2巨噬细胞的存在至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。可通过在IHC切片中染色CCL22和CD206或通过肿瘤浸润性免疫细胞或骨髓细胞的流式细胞术来鉴定M2巨噬细胞。在某个实施例中，与对照抗体（例如，同种型对照）相比，本文所述的抗体可将LIF与gp130肿瘤的结合降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某个实施例中，与对照抗体（例如同种型对照）相比，本文所述的抗体可以在LIF反应性细胞系中减少LIF信号传导至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。LIF信号传导可以通过例如磷酸化

STAT3 (LIF信号传导的下游靶点)的蛋白质印迹来测量。与其他IL-6家族成员细胞因子相比,此处的抗体对LIF也具有高度特异性。在某些实施例中,该抗体以比任何其他IL-6家族成员细胞因子的亲和力大约10x、约50x或约100x的亲和力结合人LIF。在某些实施例中,该LIF抗体不结合在哺乳动物系统中产生的其他IL-6家族成员细胞因子。在某些实施例中,该抗体不结合在哺乳动物系统中产生的制瘤素M。

[0138] 在某些实施例中,该LIF结合多肽和抗体可以通过适合于施用含抗体的药物组合物的任何途径来施用,诸如像皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、肿瘤内或脑内等。在某些实施例中,该抗体是静脉内施用的。在某些实施例中,以合适的剂量时间表,例如每周、每周两次、每月、每月两次等施用该抗体。在某些实施例中,每三周一次施用该抗体。可以任何治疗有效量施用该抗体。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约0.1mg/kg与约50mg/kg之间。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约1mg/kg与约40mg/kg之间。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约5mg/kg与约30mg/kg之间。LIF结合多肽或抗体可以在至少约60分钟的时间段内静脉内施用;但是,根据与每个个体施用相关的条件,此时间段可能会多少有所不同。

[0139] PD-1轴抑制剂

[0140] 该PD-1轴是PD-1对T细胞反应产生抑制作用的信号传导通路,包括PD-1与PDL-1或PDL-2的相互作用。本文所述的LIF结合多肽和抗体可以与PD-1轴抑制剂组合,且用于治疗肿瘤、癌症或其他赘生物的方法中。在某些实施例中,本文所述的LIF结合多肽和抗体可以与可用于治疗癌症、肿瘤或其他赘生物的药物组合物中的PD-1轴抑制剂组合。本文所述的h5D8抗体可以与PD-1轴抑制剂组合,且用于治疗肿瘤、癌症或其他赘生物的方法中。在某些实施例中,本文所述的h5D8抗体可以与可用于治疗癌症、肿瘤或其他赘生物的药物组合物中的PD-1轴抑制剂组合。

[0141] 本文的组合物和方法中利用的PD-1轴抑制剂可以抑制通过PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274)或PDL-2 (CD273)的信号传导。该抑制剂可以是抗体或抗体片段、可溶性配体-Fc融合构建体或小分子抑制剂。在某些实施例中,该PD-1轴抑制剂包括抗体或其PD-1结合片段。在某些实施例中,该特异性结合PD-1 (CD279)的抗体或抗原结合片段包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、斯巴达珠单抗、替雷利珠单抗 (BGB-A317)、匹姆单抗或其PD-1 (CD279)结合片段。在某些实施例中,该PD-1轴抑制剂是PD-L2 Fc融合蛋白(例如,AMP-224)。在某些实施例中,该PD-1轴抑制剂包括特异性结合PDL-1 (CD274)的抗体或PDL-1结合片段。在某些实施例中,该与PDL-1 (CD274)特异性结合的抗体或抗原结合片段包括德瓦鲁单抗 (MEDI4376)、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1 (CD274)结合片段。在某些实施例中,该PD-1轴抑制剂包括特异性结合PDL-2 (CD273)的抗体或其PDL-2结合片段。

[0142] 在某些实施例中,该PD-1轴抑制剂包括一种或多种小分子抑制剂,诸如N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基)氨基]乙基}乙酰胺 (BMS 202); 2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-

基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酰基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酰基-L-丝氨酰基-L- α -谷酰基-L-丝氨酰基-L-苯丙氨酰基)-L-赖氨酰基-L-苯丙氨酰基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酰基-L-谷酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-脯氨酰基-L-赖氨酰基-L-丙氨酰基-L-谷酰基-L-异亮氨酰基-L-赖氨酰基;(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酰胺,N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酰基-N-甲基-L-丙氨酰基-L-天冬酰胺基-L-脯氨酰基-L-组氨酰基-L-亮氨酰基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酰基-L-丝氨酰基-L-色氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-L-精氨酰基-L-半胱氨酰基-,环状(1 \rightarrow 14)-硫醚;或其衍生物或类似物。

[0143] 在某些实施例中,该PD-1轴抑制剂可以通过适合于施用小分子多肽或含抗体的药物组合物的任何途径来施用,诸如像皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、肿瘤内、脑内或口服。在某些实施例中,静脉内施用PD-1轴抑制抗体。在某些实施例中,以合适的剂量时间表,例如每周、每周两次、每月、每月两次、每两周一次、每三周一次或每四周一次施用该PD-1轴抑制抗体。可以任何治疗有效量施用该抗体。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约0.1mg/kg与约50mg/kg之间。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约1mg/kg与约40mg/kg之间。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约5mg/kg与约30mg/kg之间。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约5mg/kg与约20mg/kg之间。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约5mg/kg与约15mg/kg之间。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约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或20mg/kg。在一实例中,可以约10mg/kg的剂量每两周一次施用德瓦鲁单抗。

[0144] 在某些实施例中,可以约100毫克与约1000毫克之间的平剂量水平向个体施用PD-1轴抑制剂。在某些实施例中,对个体施用该PD-1轴抑制剂可以以约200毫克与约800毫克之间、约200毫克与约600毫克之间、约200毫克与约500毫克之间、约300毫克与约500毫克之间的平剂量水平。在某些实施例中,对个体施用该PD-1轴抑制剂可以以约100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000毫克的平剂量水平。在某些实施例中,向个体施用PD-1轴抑制剂可以处于适于单一疗法的水平。例如,可以每两周约240毫克或每四周约480毫克的剂量施用纳武单抗。在另一个实例中,可以约200毫克每三周一次施用帕博利珠单抗。

[0145] h5D8的剂量

[0146] 在某些实施例中,h5D8抗体可以通过适合于施用含抗体的药物组合物的任何途径来施用,诸如像皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、肿瘤内或脑内等。在某些实施例中,静脉内施用h5D8。在某些实施例中,以合适的剂量时间表,例如每周、每周两次、每月、每月两次等施用h5D8。在某些实施例中,每三周一次施用h5D8。H5D8可以任何治疗有效量施用。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约0.1mg/kg与约50mg/kg之间。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约1mg/kg与约40mg/kg之间。在某些实施例中,该治疗上可接受的量为约5mg/kg与约30mg/kg之间。h5D8抗体可以平剂量施用,而与h5D8抗体所施用个体的体重或质量无关。不论施用h5D8抗体的个体的体重或质量如何,均可以平剂量施用h5D8抗体,条件是该个体的质量至少约为37.5千克。可以从约75毫克至约2000毫克施用平剂量的h5D8。可以从约225毫克至约2000毫克、约750毫克至约2000毫克、约1125毫克至约2000毫克或约1500毫克

至约2000毫克施用平剂量的h5D8。可以约75毫克施用平剂量的h5D8。可以约225毫克施用平剂量的h5D8。可以约750毫克施用平剂量的h5D8。可以约1125毫克施用平剂量的h5D8。可以约1500毫克施用平剂量的h5D8。可以约2000毫克施用平剂量的h5D8。

[0147] 预期h5D8的其他剂量。可以约50、100、150、175、200、250、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1025、1050、1075、1100、1150、1175、1200、1225、1250、1275、1300、1325、1350、1375、1400、1425、1450、1475、1525、1550、1575、1600、1625、1650、1675、1700、1725、1750、1775、1800、1825、1850、1875、1900、1925、1950、1975、2025、2050、2075或2100毫克施用平剂量的h5D8。可以每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次施用这些剂量中的任何一种。

[0148] 可以从约75毫克至约2000毫克每周一次施用平剂量的h5D8。可以从约75毫克至约1500毫克每周一次施用平剂量的h5D8。可以从约225毫克至约1500毫克、约750毫克至约1500毫克、约1125毫克至约1500毫克每周一次施用平剂量的h5D8。可以约75毫克每周一次施用平剂量的h5D8。可以约225毫克每周一次施用平剂量的h5D8。可以约750毫克每周一次施用平剂量的h5D8。可以约1125毫克每周一次施用平剂量的h5D8。可以约1500毫克每周一次施用平剂量的h5D8。可以约2000毫克每周一次施用平剂量的h5D8。

[0149] 可以从约75毫克至约2000毫克每两周一次施用平剂量的h5D8。可以从约75毫克至约1500毫克每两周一次施用平剂量的h5D8。可以从约225毫克至约1500毫克、约750毫克至约1500毫克、约1125毫克至约1500毫克每两周一次施用平剂量的h5D8。可以约75毫克每两周一次施用平剂量的h5D8。可以约225毫克每两周一次施用平剂量的h5D8。可以约750毫克每两周一次施用平剂量的h5D8。可以约1125毫克每两周一次施用平剂量的h5D8。可以约1500毫克每两周一次施用平剂量的h5D8。可以约2000毫克每两周一次施用平剂量的h5D8。

[0150] 可以从约75毫克至约2000毫克每三周一次施用平剂量的h5D8。可以从约75毫克至约1500毫克每三周一次施用平剂量的h5D8。可以从约225毫克至约1500毫克、约750毫克至约1500毫克、约1125毫克至约1500毫克每三周一次施用平剂量的h5D8。可以约75毫克每三周一次施用平剂量的h5D8。可以约225毫克每三周一次施用平剂量的h5D8。可以约750毫克每三周一次施用平剂量的h5D8。可以约1125毫克每三周一次施用平剂量的h5D8。可以约1500毫克每三周一次施用平剂量的h5D8。可以约2000毫克每三周一次施用平剂量的h5D8。

[0151] 可以从约75毫克至约2000毫克每四周一次施用平剂量的h5D8。可以从约75毫克至约1500毫克每四周一次施用平剂量的h5D8。可以从约225毫克至约1500毫克、约750毫克至约1500毫克、约1125毫克至约1500毫克每四周一次施用平剂量的h5D8。可以约75毫克每四周一次施用平剂量的h5D8。可以约225毫克每四周一次施用平剂量的h5D8。可以约750毫克每四周一次施用平剂量的h5D8。可以约1125毫克每四周一次施用平剂量的h5D8。可以约1500毫克每四周一次施用平剂量的h5D8。可以约2000毫克每四周一次施用平剂量的h5D8。

[0152] 可以基于被施用h5D8抗体的个体的体重或质量的剂量来施用h5D8抗体。可以从约1mg/kg至约25mg/kg施用体重调整剂量的h5D8。可以从约3mg/kg至约25mg/kg、约10mg/kg至约25mg/kg、约15mg/kg至约25mg/kg或约20mg/kg至约25mg/kg施用体重调整剂量的h5D8。可以约1mg/kg施用体重调整剂量的h5D8。可以约3mg/kg施用体重调整剂量的h5D8。可以约10mg/kg施用体重调整剂量的h5D8。可以约15mg/kg施用体重调整剂量的h5D8。可以约20mg/

kg施用体重调整剂量的h5D8。可以约25mg/kg施用体重调整剂量的h5D8。

[0153] 可以从约1mg/kg至约25mg/kg每三周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约3mg/kg至约25mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg、约15mg/kg至约25mg/kg、约20mg/kg至约25mg/kg每一、二、三或四周一次施用体重调整剂量的h5D8。

[0154] 预期h5D8的其他体重调整剂量。可以约2mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、21mg/kg、22mg/kg、23mg/kg、24mg/kg、26mg/kg、27mg/kg、28mg/kg、29mg/kg、或30mg/kg施用体重调整剂量的h5D8。可以每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次施用这些剂量中的任何一种。

[0155] 可以约1mg/kg每周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约3mg/kg每周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约10mg/kg每周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约15mg/kg每周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约20mg/kg每周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约25mg/kg每周一次施用体重调整剂量的h5D8。

[0156] 可以约1mg/kg每两周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约3mg/kg每两周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约10mg/kg每两周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约15mg/kg每两周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约20mg/kg每两周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约25mg/kg每两周一次施用体重调整剂量的h5D8。

[0157] 可以约1mg/kg每三周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约3mg/kg每三周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约10mg/kg每三周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约15mg/kg每三周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约20mg/kg每三周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约25mg/kg每三周一次施用体重调整剂量的h5D8。

[0158] 可以约1mg/kg每四周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约3mg/kg每四周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约10mg/kg每四周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约15mg/kg每四周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约20mg/kg每四周一次施用体重调整剂量的h5D8。可以约25mg/kg每四周一次施用体重调整剂量的h5D8。

[0159] 本文详述的任何剂量均可在至少约60分钟的时间段内静脉内施用；但是，根据与每个个体施用相关的条件，此时间段可能会多少有所不同。

[0160] 组合疗法的剂量时间表

[0161] 可以多种方式施用包括LIF结合多肽和PD-1轴抑制剂的组合治疗。该LIF结合多肽和该PD-1轴抑制剂可以相同的时间表同时施用或以不同的时间表在不同的时间施用。当同时施用时，可以通过分开的配制品或包括LIF结合多肽和PD-1轴抑制剂的单一配制品进行施用。可以混合施用方式，例如LIF结合多肽可以静脉内施用，而PD-1轴抑制剂可以口服或肠胃外注射施用。在某些实施例中，LIF结合多肽经静脉内、肠胃外、皮下、肿瘤内或口服施用。在某些实施例中，PD-1轴抑制剂经静脉内、肠胃外、皮下、肿瘤内或口服施用。

[0162] 当以相同的方案对个体进行组合治疗时，可每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次施用该LIF结合多肽和该PD-1轴抑制剂。该LIF结合多肽和该PD-1轴抑制剂可以分开施用或作为单一配制品施用。H5D8和PD-1轴抑制剂可以分开施用或作为单一配制品施用。

[0163] 当以不同的时间表对个体进行组合治疗时，可以交替使用LIF结合多肽和PD-1轴

抑制剂。在某些实施例中,可在施用LIF结合多肽之前施用个体一次或多次PD-1轴抑制剂。可以在施用PD-1轴抑制剂的1天、2天、3天、4天、5天或6天之内施用LIF结合多肽。可以在施用PD-1轴抑制剂的1周、2周、3周或4周内施用LIF结合多肽。可以在施用PD-1轴抑制剂的1天、2天、3天、4天、5天或6天内施用该h5D8抗体。可以在施用PD-1轴抑制剂的1周、2周、3周或4周内施用该h5D8抗体。

[0164] 可以在施用PD-1轴抑制剂之前将LIF结合多肽施用给个体一次或多次。在某些实施例中,可以在施用LIF结合多肽的1天、2天、3天、4天、5天或6天内施用PD-1轴抑制剂。在某些实施例中,可以在施用LIF结合多肽的1周、2周、3周或4周内施用PD-1轴抑制剂。在某些实施例中,可以在施用该h5D8抗体的1天、2天、3天、4天、5天或6天内施用PD-1轴抑制剂。在某些实施例中,可以在施用该h5D8抗体的1周、2周、3周或4周内施用PD-1轴抑制剂。

[0165] 在某些实施例中,可每周一次向个体施用LIF结合多肽,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用PD1轴抑制剂。在某些实施例中,可每两周一次向个体施用LIF结合多肽,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用PD1轴抑制剂。在某些实施例中,可每三周一次向个体施用LIF结合多肽,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用PD1轴抑制剂。在某些实施例中,可每四周一次向个体施用LIF结合多肽,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用PD1轴抑制剂。在某些实施例中,可每周一次向个体施用PD1轴抑制剂,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用LIF结合多肽。在某些实施例中,可每两周一次向个体施用PD1轴抑制剂,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用LIF结合多肽。在某些实施例中,可每三周一次向个体施用PD1轴抑制剂,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用LIF结合多肽。在某些实施例中,可每四周一次向个体施用PD1轴抑制剂,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用LIF结合多肽。在某些实施例中,可以在施用PD-1轴抑制剂之前向个体施用一次或多次h5D8。在某些实施例中,可每周一次向个体施用h5D8,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用PD1轴抑制剂。在某些实施例中,可每两周一次向个体施用h5D8,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用PD1轴抑制剂。在某些实施例中,可每三周一次向个体施用h5D8,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用PD1轴抑制剂。在某些实施例中,可每四周一次向个体施用h5D8,且可每周、每两周、每三周或每四周向个体施用PD1轴抑制剂。

[0166] 根据本披露的组合治疗可以包括其中一种或两种活化成分(例如,LIF结合多肽和PD-1抑制剂)本身无效,但是当作为组合治疗的一部分施用时有有效的组合。在某些实施例中,以对于单一疗法无效但与LIF结合多肽组合有效的水平施用PD-1抑制剂。在某些实施例中,以对于单一疗法无效但与h5D8抗体组合有效的水平施用PD-1抑制剂。在某些实施例中,以对于单一疗法无效但与PD-1抑制剂组合有效的水平施用LIF结合多肽。在某些实施例中,以对于单一疗法无效但与PD-1抑制剂组合有效的水平施用h5D8。在某些实施例中,LIF结合多肽和PD-1抑制剂二者均以对于单一疗法无效但组合有效的水平施用。在某些实施例中,h5D8和PD-1抑制剂二者均以对于单一疗法无效但组合有效的水平施用。

[0167] 治疗适应症

[0168] 在某些实施例中,本文披露了可用于治疗癌症或肿瘤的方法和组合物。在某些实施例中,该癌症包括乳腺、心脏、肺、小肠、结肠、脾脏、肾脏、膀胱、头、颈、卵巢、前列腺、脑、胰腺、皮肤、骨、骨髓、血液、胸腺、子宫、睾丸和肝肿瘤。在某些实施例中,可以用本发明的抗

体治疗的肿瘤包括腺瘤、腺癌、血管肉瘤、星形细胞瘤、上皮癌、生殖细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、血管内皮瘤、血管肉瘤、血肿、肝母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、髓母细胞瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤和/或畸胎瘤。在某些实施例中,该肿瘤/癌症选自以下的组:肢端雀斑痣性黑色素瘤、光化性角化病、腺癌、腺样囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鳞癌、星形细胞肿瘤、巴氏腺癌、基底细胞癌、支气管腺癌、毛细管类癌、癌、癌肉瘤、胆管癌、软骨肉瘤、囊腺瘤、皮内窦瘤、子宫内膜增生、子宫内膜间质肉瘤、子宫内膜样腺癌、室间隔肉瘤、尤文肉瘤、局灶性结节性增生、胃腺瘤、生殖细胞系肿瘤、胶质母细胞瘤、胰高血糖素瘤、成血管细胞瘤、血管内皮瘤、血管瘤、肝腺瘤、肝脏腺癌、肝细胞癌、胰岛素瘤(insulinite)、上皮内瘤变、上皮内鳞状细胞瘤变、浸润性鳞状细胞癌、大细胞癌、脂肪肉瘤、肺癌、淋巴母细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、平滑肌肉瘤、黑素瘤、恶性黑素瘤、恶性间皮瘤、神经鞘瘤、髓母细胞瘤、髓上皮瘤、间皮瘤、粘液表皮样癌、髓性白血病、神经母细胞瘤、神经上皮腺癌、结节性黑素瘤、骨肉瘤、卵巢癌、乳头浆液性腺瘤、垂体瘤、浆细胞瘤、假肉瘤、前列腺癌、肺母细胞瘤、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、浆液性癌、鳞状细胞癌、小细胞癌、软组织癌、生长抑素分泌性肿瘤、鳞状癌、鳞状细胞癌、未分化癌、葡萄膜黑素瘤、疣状癌、阴道/外阴癌、血管活性肠肽瘤(VIPpoma)和威尔姆氏瘤(Wilm's tumor)。在某些实施例中,要用一种或多种本发明的抗体治疗的肿瘤/癌症包括脑癌、头颈癌、结肠直肠癌、急性髓性白血病、前B细胞急性淋巴母细胞性白血病、膀胱癌、星形细胞瘤(优选II、III或IV级星形细胞瘤)、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、小细胞癌和非小细胞癌(优选非小细胞肺癌)、肺腺癌、转移性黑素瘤、非雄激素依赖性转移性前列腺癌、雄激素依赖性转移性前列腺癌、前列腺腺癌和乳腺癌(优选乳腺导管癌和/或乳腺癌)。在某些实施例中,用本披露的抗体治疗的癌症包括胶质母细胞瘤。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括胰腺癌。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括卵巢癌。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括肺癌。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括前列腺癌。在某些实施例中,用本披露的一种或多种抗体治疗的癌症包括结肠癌。在某些实施例中,所治疗的癌症包括胶质母细胞瘤、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌或肺癌。在某个实施例中,该癌症对其他治疗是难治的。在某个实施例中,该治疗的癌症是复发的。在某个实施例中,该癌症是复发/难治性胶质母细胞瘤、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌或肺癌。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤或软组织癌。在某些实施例中,该癌症包括非小细胞肺癌、上皮性卵巢癌或胰腺腺癌。在某些实施例中,该癌症包括晚期实体瘤。在某些实施例中,该个体对于先前用LIF结合抗体作为单一疗法的治疗是难治的。在某些实施例中,该个体对于先前用PD-1轴抑制剂作为单一疗法的治疗是难治的。

[0169] 药理学上可接受的赋形剂、载体和稀释剂

[0170] 在某些实施例中,本披露的PD-1轴抑制剂和LIF结合多肽是药物组合物的组分。在某些实施例中,本披露的PD-1轴抑制剂和LIF结合多肽是相同药物组合物的组分。在某些实施例中,该药物组合物包括生理上合适的盐浓度(例如,NaCl)。在某些实施例中,该药物组合物包括约0.6%与1.2%之间的NaCl。在某些实施例中,该药物组合物包括约0.7%与1.1%之间的NaCl。在某些实施例中,该药物组合物包括约0.8%与1.0%之间的NaCl。在某

些实施例中,该药物组合物包括约5%的右旋糖。在某些实施例中,该药物组合物进一步包括以下一种或多种:缓冲液,例如,乙酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、琥珀酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐和羟甲基氨基甲烷(Tris);表面活性剂,例如,聚山梨酯80(吐温80)、聚山梨酯20(吐温20)、聚山梨酯和泊洛沙姆188;多元醇/二糖/多糖,例如,葡萄糖、右旋糖、甘露糖、甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和右旋糖酐40;氨基酸,例如,组氨酸、甘氨酸或精氨酸;抗氧化剂,例如,抗坏血酸、蛋氨酸;以及螯合剂,例如,EDTA或EGTA。

[0171] 在某些实施例中,本披露的PD-1轴抑制剂、LIF结合多肽或PD-1轴抑制剂和LIF结合多肽二者悬浮在无菌溶液中施用。在某些实施例中,该PD-1轴抑制剂和该LIF结合多肽从相同溶液中施用。在某些实施例中,该溶液包括生理上合适的盐浓度(例如,NaCl)。在某些实施例中,该溶液包括约0.6%与1.2%之间的NaCl。在某些实施例中,该溶液包括约0.7%与1.1%之间的NaCl。在某些实施例中,该溶液包括约0.8%与1.0%之间的NaCl。在某些实施例中,可以在约0.9%NaCl中稀释抗体的高度浓缩的母液。在某些实施例中,该溶液包括约0.9%NaCl。在某些实施例中,该溶液进一步包括以下一项或多项:缓冲液,例如,乙酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、琥珀酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐和羟甲基氨基甲烷(Tris);表面活性剂,例如,聚山梨酯80(吐温80)、聚山梨酯20(吐温20)、聚山梨酯和泊洛沙姆188;多元醇/二糖/多糖,例如葡萄糖、右旋糖、甘露糖、甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和右旋糖酐40及其组合;氨基酸,例如,组氨酸、甘氨酸或精氨酸;抗氧化剂,例如,抗坏血酸、蛋氨酸及其组合;以及螯合剂,例如,EDTA或EGTA。在某些实施例中,本披露的PD-1轴抑制剂和LIF结合多肽在施用前被冻干运输/储存和重构。在某些实施例中,冻干的抗体配制品包括增量剂,诸如甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和右旋糖酐40及其组合。在某个实施例中,本披露的抗LIF抗体可以作为浓缩的母液运输和储存,在治疗部位使用时对该母液进行稀释。在某些实施例中,该母液包括约25mM组氨酸、约6%蔗糖、约0.01%聚山梨酸酯和约20mg/mL的抗LIF抗体。在某些实施例中,溶液的pH是约6.0。在某些实施例中,施用给个体的形式是包括约25mM组氨酸、约6%蔗糖、约0.01%聚山梨酯80和约20mg/mL h5D8抗体的水溶液。在某些实施例中,溶液的pH是约6.0。

[0172] 在某些实施例中,本披露的PD-1轴抑制剂和LIF结合多肽悬浮在无菌溶液中施用。在某些实施例中,该PD-1轴抑制剂和该LIF结合多肽从相同溶液中施用。在某些实施例中,该PD-1轴抑制剂和该LIF结合多肽从分开的溶液中施用。在某些实施例中,该溶液包括生理上合适的盐浓度(例如,NaCl)。在某些实施例中,该溶液包括约0.6%与1.2%之间的NaCl。在某些实施例中,该溶液包括约0.7%与1.1%之间的NaCl。在某些实施例中,该溶液包括约0.8%与1.0%之间的NaCl。在某些实施例中,可以在约0.9%NaCl中稀释抗体的高度浓缩的母液。在某些实施例中,该溶液包括约0.9%NaCl。在某些实施例中,该溶液进一步包括以下一项或多项:缓冲液,例如,乙酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、琥珀酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐和羟甲基氨基甲烷(Tris);表面活性剂,例如,聚山梨酯80(吐温80)、聚山梨酯20(吐温20)、聚山梨酯和泊洛沙姆188;多元醇/二糖/多糖,例如葡萄糖、右旋糖、甘露糖、甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和右旋糖酐40及其组合;氨基酸,例如,组氨酸、甘氨酸或精氨酸;抗氧化剂,例如,抗坏血酸、蛋氨酸;以及螯合剂,例如,EDTA或EGTA。在某些实施例中,本披露的PD-1轴抑制剂和LIF结合多肽在施用前被冻干运输/储存和重构。在某些实施例中,冻干的抗体配制品包括增量剂,诸如甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和右旋糖酐40及其组合。在某个实施例

中,本披露的抗LIF抗体可以作为浓缩的母液运输和储存,在治疗部位使用时对该母液进行稀释。在某些实施例中,该母液包括约25mM组氨酸、约6%蔗糖、约0.01%聚山梨酸酯和约20mg/mL的抗LIF抗体。在某些实施例中,溶液的pH是约6.0。在某些实施例中,施用给个体的形式是包括约25mM组氨酸、约6%蔗糖、约0.01%聚山梨酯80和约20mg/mL h5D8抗体的水溶液。在某些实施例中,溶液的pH是约6.0。

[0173] 本文还描述了用于进行本文所述的组合疗法的试剂盒。在某些实施例中,试剂盒包括LIF结合多肽和PD-1轴抑制剂。在某些实施例中,试剂盒包括h5D8和PD-1轴抑制剂。两种组分中的一种或两种都可以以冻干或液体形式包含在玻璃或其他合适材料的小瓶中。

[0174] 本文所述的h5D8抗体可包括在试剂盒中,该试剂盒包括装有无菌溶液的小瓶,该无菌溶液包括浓度约为20mg/mL的h5D8抗体、约25mM组氨酸、约6%蔗糖和约0.01%聚山梨酯80。该小瓶可以是一次性玻璃小瓶。该一次性玻璃小瓶可以填充约10毫升浓度为约20mg/mL h5D8抗体、约25mM组氨酸、约6%蔗糖和约0.01%聚山梨酯80的5D8抗体。在某些实施例中,溶液的pH是约6.0。本文所述的h5D8抗体可包括在试剂盒中,该试剂盒包括装有冻干组合物的小瓶,该冻干组合物包括h5D8抗体,当将其以适当量的无菌稀释剂重构时,其产生浓度为约20mg/mL h5D8抗体、约25mM组氨酸、约6%蔗糖和约0.01%聚山梨酯80。该小瓶可以是一次性玻璃小瓶。

[0175] 可以根据最终要递送给患者的剂量水平对本文所述的抗体进行施用或者制备或稀释用于不同方式施用。可以这样做以例如优化患者剂量的药物特性,例如减少颗粒物。H5D8可以以约8mg/mL的浓度制备,而不管递送给患者的最终剂量如何。在某些实施例中,可以以不超过约10、9、8、7、6、5或4mg/mL的水平制备h5D8。在某些实施例中,可以以大于约1、2、3、4、5、6或7mg/mL的水平制备h5D8。

[0176] 实例

[0177] 以下说明性实例代表了本文所述的组合物和方法的实施例,并不意味着以任何方式进行限制。

[0178] 实例1-对LIF具有特异性的大鼠抗体的产生

[0179] 将编码人LIF的氨基酸23-202的cDNA克隆到表达质粒(阿尔德弗龙公司(Aldevron GmbH),弗莱堡,德国)中。使用手持式粒子轰击装置(“基因枪”),通过皮内施用涂有DNA的金粒子对各组实验大鼠(威斯达(Wistar))进行免疫。用识别添加到LIF蛋白N末端的标签的抗标签抗体证实了瞬时转染的HEK细胞上的细胞表面表达。一系列免疫后收集血清样品,并在流式细胞术中用上述表达质粒瞬时转染的HEK细胞进行测试。分离产生抗体的细胞,并根据标准程序与小鼠骨髓瘤细胞(Ag8)融合。如上所述,通过在流式细胞术测定中进行筛选来鉴定产生对LIF具有特异性的抗体的杂交瘤。使用RNA保护剂(RNAlater,目录号AM7020,赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))制备阳性杂交瘤细胞的细胞沉淀,并进一步处理以用于抗体可变结构域的测序。

[0180] 实例2-对LIF具有特异性的小鼠抗体的产生

[0181] 将编码人LIF的氨基酸23-202的cDNA克隆到表达质粒(阿尔德弗龙公司(Aldevron GmbH),弗莱堡,德国)中。使用手持式粒子轰击装置(“基因枪”),通过皮内施用涂有DNA的金粒子对各组实验小鼠(NMRI)进行免疫。用识别添加到LIF蛋白N末端的标签的抗标签抗体证实了瞬时转染的HEK细胞上的细胞表面表达。一系列免疫后收集血清样品,并在流式细胞术

中对用上述表达质粒瞬时转染的HEK细胞进行测试。分离产生抗体的细胞,并根据标准程序与小鼠骨髓瘤细胞(Ag8)融合。如上所述,通过在流式细胞术测定中进行筛选来鉴定产生对LIF具有特异性的抗体的杂交瘤。使用RNA保护剂(RNAlater,目录号AM7020,赛默飞世尔科技公司)制备阳性杂交瘤细胞的细胞沉淀,并进一步处理以用于抗体可变结构域的测序。

[0182] 实例3-对LIF具有特异性的大鼠抗体的人源化

[0183] 从大鼠免疫中选择一个克隆(5D8)用于随后的人源化。使用标准CDR移植方法进行人源化。使用标准分子克隆技术从5D8杂交瘤中克隆出重链和轻链区,并通过Sanger方法测序。然后针对人的重链和轻链可变序列进行BLAST搜索,并从每个可变序列中选择4个序列作为用于人源化的受体框架。将这些受体框架去免疫化以除去T细胞反应表位。将5D8的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3克隆到4个不同的重链受体框架(H1至H4)和4个不同的轻链框架(L1至L4)中。然后对所有16种不同的抗体测试:在CHO-S细胞(斯莱希斯(Selexis))中的表达;LIF诱导的STAT3磷酸化的抑制;以及通过表面等离子体共振(SPR)的结合亲和力。这些实验总结于表1中。

[0184]

表 1.5D8 人源化概览			
重链轻链组合	来自图 1 的 LIF 诱导的 pSTAT3 的抑制	SPR 得到的亲和力 K_{D1} (pM)	表达 (ug/mL)
H0L0	+++	133 ± 46	393
H1L1	-	N/A	627
H1L2	+++	55 ± 23	260
H1L3	+++	54 ± 31	70

[0185]	H1L4	-	N/A	560
	H2L1	-	N/A	369
	H2L2	+++	52 ± 22	392
	H2L3	++	136 ± 19	185
	H2L4	-	N/A	78
	H3L1	N/A	N/A	无表达
	H3L2	N/A	N/A	无表达
	H3L3	N/A	N/A	无表达
	H3L4	N/A	N/A	无表达
	H4L1	-	N/A	259
	H4L2	++	913 ± 308	308
	H4L3	+		252
	H4L4	-	N/A	186
	N/A=未尝试; H0L0=具有完整大鼠重链和轻链可变区的嵌合抗体			

[0186] 细胞培养10天后,在分批补料培养中的锥形瓶中(接种 3×10^5 个细胞/mL,200mL培养体积)比较转染细胞的表达性能。在这一点上,收获细胞并使用蛋白A柱纯化分泌的抗体,然后定量。所有人源化抗体均表达,但使用H3重链(SEQ ID NO:43)的抗体除外。与其他可变区(SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:46)相比,H2和L2可变区表现良好。

[0187] 通过蛋白质印迹确定在酪氨酸705上LIF诱导的STAT3磷酸化的抑制。将U251神经胶质瘤细胞以100,000个细胞/孔的密度铺板在6孔板中。在进行任何治疗之前,将细胞在完全培养基中培养24小时,之后将血清饥饿8小时。之后,将含有指示抗体的细胞以 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度过夜。治疗后,在包含放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液的磷酸酶和蛋白酶抑制剂中获得蛋白质,进行定量(BCA蛋白质测定,赛默飞世尔科技公司)并用于蛋白质印迹。对于蛋白质印迹,将膜在5%脱脂奶粉-TBST中1小时,并与一抗孵育过夜(p-STAT3,目录号阻断9145,细胞信号传导公司(Cell Signaling)或STAT3,目录号9132,细胞信号传导公司)或30分钟(β -肌动蛋白过氧化物酶,目录号A3854,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))。然后将膜用TBST洗涤,与二抗一起孵育并再次洗涤。通过化学发光检测蛋白质(SuperSignal底物,目录号34076,赛默飞世尔科技公司)。这些结果示出于图1中。pSTAT3条带越黑,抑制作用越小。在标记为5D8(非人源化大鼠)、A(H0L0)、C(H1L2)、D(H1L3)和G(H2L2)的泳道中,抑制作用较高;在H(H2L3)、O(H4L2)和P(H4L3)中抑制作用中等;在B(H1L1)、E(H1L4)、F(H2L1)、I(H2L4)、N(H4L1)和Q(H4L4)中没有抑制作用。

[0188] 然后通过SPR分析展现出抑制LIF诱导的STAT3磷酸化的抗体,以确定结合亲和力。简而言之,使用Biacore™ 2002仪器观察到了A(H0L0)、C(H1L2)、D(H1L3)和G(H2L2)、H(H2L3)和O(H4L2)人源化抗体与胺偶联的hLIF的结合。在六个配体浓度下,通过在所有传感器芯片表面上生成的所有传感图的数学传感图拟合(朗格缪尔相互作用模型[A+B=AB])确

定动力学常数和亲和力。将每个浓度的最佳拟合曲线(最小Chi²)用于计算动力学常数和亲和力。参见表1。

[0189] 由于实验装置使用二价抗体作为分析物,最佳拟合的传感器图也基于二价分析物拟合模型[A+B=AB;AB+B=AB₂]进行分析,以便更详细地了解人源化抗体的靶向结合机制。使用二价拟合模型[A+B=AB;AB+B=AB₂]的动力学传感图分析证实了mAb样品的相对亲和力排序。

[0190] 包括H2和L2的人源化5D8因其高结合亲和力和高分批培养产率,而被选作更深入的分析。

[0191] 实例4-克隆5D8的人源化改善了与LIF的结合

[0192] 选择H2L2克隆(h5D8)进行进一步分析,并通过SPR比较与亲本大鼠5D8(r5D8)和小鼠克隆1B2的结合。该1B2抗体是先前披露的小鼠抗LIF抗体,先前存放于Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH(DSM ACC3054),并用于比较目的。分别将从大肠杆菌和HEK-293细胞中纯化的重组人LIF用作配体。使用胺偶联化学将人或大肠杆菌来源的LIF共价偶联至Biacore光学传感器芯片的表面,并根据动力学常数计算结合亲和力。

[0193] 材料和方法

[0194] 来自大肠杆菌的人LIF获自密理博公司(Millipore),参考号LIF1010;来自HEK-293细胞的人LIF获自ACRO生物系统公司(ACRO Biosystems),参考LIF-H521b。使用Biacore胺偶联试剂盒(BR-1000-50;GE医疗集团(GE-Healthcare),乌普萨拉),将LIF与传感器芯片偶联。使用CM5光学传感器芯片(BR-1000-12;GE医疗集团,乌普萨拉)在Biacore™ 2002仪器上运行样品。在机器运行(BR-1001-88;GE医疗集团,乌普萨拉)期间使用Biacore HBS-EP缓冲液。结合传感图的动力学分析是使用BIAevaluation 4.1软件进行的。在分析物浓度渐增的情况下,通过所有传感器芯片表面上生成的所有传感图的数学传感图拟合(朗格缪尔相互作用模型[A+B=AB])确定动力学常数和亲和力。传感器图也根据二价分析物传感器图拟合模型[A+B=AB;AB+B=AB₂]进行分析,包括成分分析,以便生成对确定的朗格缪尔抗体-靶亲和力(例如亲和力贡献)的二价贡献的估计。将每个浓度的最佳拟合曲线(最小Chi²)用于计算动力学常数和亲和力。这些亲和力实验的概览示于表2(在大肠杆菌中制成的人LIF)和表3(在HEK 293细胞中制成的人LIF)。

表 2.人源化后改善的 5D8 结合		K_D [pM]	
[0195]	hLIF (大肠杆菌)	朗格缪尔 1:1 传感图拟合	二价分析物 拟合
	小鼠 1B2	400 ± 210	1500 ± 200
	r5D8 (大鼠)	130 ± 30	780 ± 130
[0196]	h5D8 (人源化)	26 ± 14	82 ± 25

表 3.人源化后改善的 5D8 结合		K _D [pM]	
[0197]	hLIF (HEK 293)	朗格缪尔 1:1 传感图拟合	二价分析物拟合
	小鼠 1B2	320 ± 150	3900 ± 900
	r5D8 (大鼠)	135 ± 100	410 ± 360
	h5D8 (人源化)	13 ± 6	63 ± 30

[0198] 来自这组实验的朗格缪尔1:1传感图拟合模型指示,人源化5D8 (h5D8) 抗体与人LIF的亲合力比小鼠1B2和r5D8的高约10-25倍。

[0199] 接下来,通过SPR针对多个物种的LIF测试了h5D8抗体。对源自不同物种和表达系统的重组LIF分析物进行了h5D8 SPR结合动力学:人LIF(大肠杆菌,HEK293细胞);小鼠LIF(大肠杆菌,CHO细胞);大鼠LIF(大肠杆菌);食蟹猴LIF(酵母,HEK293细胞)。

[0200] 材料和方法

[0201] 该h5D8抗体通过非共价Fc特异性捕获固定在传感器芯片表面。重组的Ig(Fc)特异性金黄色葡萄球菌蛋白A/G被用作捕获剂,从而可以将抗LIF抗体在空间上均匀且灵活地呈递给LIF分析物。LIF分析物的来源如下:人LIF(来自大肠杆菌;密理博参考号LIF 1050);人LIF(来自HEK细胞,ACRO生物系统公司LIF-H521);小鼠LIF(大肠杆菌;密理博公司目录号NF-LIF2010);小鼠LIF(来自CHO细胞;瑞普罗金公司(Reprokine)目录号RCP09056);猴LIF(酵母,翠丰生物技术公司(Kingfisher Biotech)目录号RP1074Y);HEK-293细胞中产生的猴LIF。总体而言,h5D8展现出与几种物种的LIF结合。该亲和力实验的概览示于表4中。

表 4.人源化 5D8 的广泛物种反应性		朗格缪尔 1:1 传感图拟合		
分析物	平均 K _a (1/Ms)[10 ⁵]	平均 K _d (1/S) [10 ⁻⁵]	平均 K _D [pM]	
人 LIF (大肠杆菌)	8.5 ± 0.7	7.2 ± 0.7	86 ± 9	
人 LIF (HEK-293)	5.5 ± 0.02	3.1 ± 0.7	56 ± 13	
小鼠 LIF (大肠杆菌)	21.4 ± 3.7	5.7 ± 1.0	27 ± 6	
小鼠 LIF (CHO 细胞)	6.5 ± 0.7	1.1 ± 0.3	17 ± 4	
食蟹猴 LIF (酵母)	6.3 ± 0.8	5.4 ± 0.7	89 ± 10	
食蟹猴 LIF (HEK-293)	2.4 ± 0.2	3.3 ± 0.3	134 ± 6	

[0203] 实例5-人源化克隆5D8在体外抑制LIF诱导的STAT3磷酸化

[0204] 为了确定h5D8的生物学活性,在LIF活化的细胞培养模型中测试了人源化和亲本

形式。图2A示出了当神经胶质瘤细胞系与人LIF一起孵育时,人源化克隆展现对STAT3磷酸化(Tyr 705)的抑制作用增加。图2B示出了用不同稀释度的h5D8抗体重复进行的图2A相同设置的实验。

[0205] 材料和方法

[0206] 将U251神经胶质瘤细胞以150,000个细胞/孔的密度铺板在6孔板中。在进行任何治疗之前,将细胞在完全培养基中培养24小时。之后,用r5D8抗LIF抗体或h5D8抗LIF抗体以10 μ g/ml的浓度过夜治疗或不治疗(对照细胞)。

[0207] 治疗后,在包含放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液的磷酸酶和蛋白酶抑制剂中获得蛋白质,进行定量(BCA蛋白质测定,赛默飞世尔科技公司)并用于蛋白质印迹。对于蛋白质印迹,将膜在5%非脂肪乳-TBST中1小时,并与一抗孵育过夜(p-STAT3,目录号阻断9145,细胞信号传导公司或STAT3,目录号9132,细胞信号传导公司)或30分钟(β -肌动蛋白过氧化物酶,目录号A3854,西格玛奥德里奇公司)。然后将膜用TBST洗涤,必要时与二抗一起孵育,并再次洗涤。通过化学发光检测蛋白质(SuperSignal底物,目录号34076,赛默飞世尔科技公司)。

[0208] 实例6-U-251细胞中LIF的内源性水平的h5D8抗体治疗的IC₅₀值。

[0209] 还确定了在血清饥饿条件下在U-251细胞中对h5D8的生物抑制作用的IC₅₀低至490皮摩尔(图3A)。参见图3A和3B和表5的代表性结果。

细胞系组织	细胞系名称	治疗	IC ₅₀ (nM)				IC ₉₀ (nM)	JAK 抑制 (%)
			n = 1	n = 2	平均值	SD	平均值	平均值
内源性 LIF 条件			n = 1	n = 2	平均值	SD	平均值	平均值
GBM	U251	h5D8	0.78	0.54	0.66	0.12	4.1	84%
		r5D8	1.6	1.5	1.4	0.15	8.5	86%
1.2	1.4							

[0211] 材料和方法

[0212] 将该U-251细胞以每6cm板600,000个细胞接种(每种条件)。在血清饥饿(0.1% FBS)下,在37 $^{\circ}$ C下用h5D8以相应的浓度(滴定)处理细胞过夜。作为pSTAT3的阳性对照,将重组LIF(R&D#7734-LF/CF)用于在37 $^{\circ}$ C以1.79nM刺激细胞10分钟。作为pSTAT3的阴性对照,将JAK I抑制剂(Calbiochem#420099)用于在37 $^{\circ}$ C以1 μ M使用30分钟。然后按照Meso Scale Discovery多点检测系统总STAT3(目录号K150SND-2)和Phospho-STAT3(Tyr705)(目录号K150SVD-2)试剂盒的方案在冰上收获细胞作为裂解物,以测量通过MSD Meso Sector S600可检测的蛋白质水平。

[0213] 实例7-与人LIF特异性结合的其他抗体

[0214] 鉴定了特异性结合人LIF的其他大鼠抗体克隆(10G7和6B5),其结合特征的概览显

示在下表6中,将克隆1B2用作比较。

[0215] 材料和方法

[0216] 使用重组LIF靶蛋白[人LIF(大肠杆菌);密理博公司目录号LIF 1010和人LIF(HEK293细胞);ACRO生物系统公司目录号LIF-H521b]作为分析物,对固定在CM5光学传感器芯片表面的抗LIF mAb 1B2、10G7和6B5进行动力学实时结合测定。

[0217] 动力学常数和亲和力是通过使用朗格缪尔1:1结合模型应用全局(传感器图集的同时拟合)以及单曲线拟合算法通过数学传感器图拟合获得的。通过 k_{obs} 分析评估全局拟合的合理性。

[0218]

表 6.其他抗LIF抗体的亲和力测量		朗格缪尔 1:1 传感图拟合		
分析物	克隆	平均 K_a (1/Ms)	平均 K_d (1/S)	平均 K_D [nM]
人 LIF (大肠杆菌)	1B2	$1.1 \pm 0.4E5$	$1.1 \pm 0.3E-3$	9.7 ± 1.4
人 LIF (HEK-293)	1B2	$2.0 \pm 0.04E6$	$1.4 \pm 0.2E-3$	0.7 ± 0.03
人 LIF (大肠杆菌)	10G7	$7.9 \pm 5.8E4$	$6.0 \pm 2.3E-4$	12.6 ± 9.5
人 LIF (HEK-293)	10G7	$3.6 \pm 1.75E5$	$3.1 \pm 0.5E-4$	1.1 ± 0.6
人 LIF (大肠杆菌)	6B5	N/A	N/A	N/A
人 LIF (HEK-293)	6B5	$3.6 \pm 1.7E5$	$3.1 \pm 0.5E-4$	62 ± 6

[0219] 实例8-其他抗LIF抗体在体外抑制LIF诱导的STAT3磷酸化

[0220] 测试了其他克隆在细胞培养物中抑制LIF诱导的STAT3磷酸化的能力。如图4所示,与1B2克隆相比,克隆10G7和先前详述的r5D8展现出对LIF诱导的STAT3磷酸化的高度抑制。包括抗LIF多克隆抗血清(阳性)作为阳性对照。尽管6B5没有展现出抑制作用,这可能是由于6B5与本实验中使用的未糖基化LIF的结合可能缺乏。

[0221] 材料和方法

[0222] 将患者来源的神经胶质瘤细胞以150,000个细胞/孔的密度接种在6孔板中。在任何治疗之前,在补充有B27(生命技术公司(Life Technologies))、青霉素/链霉素和生长因子(20ng/ml EGF和20ng/ml FGF-2[派普泰克公司(PeproTech)])的神经元基础培养基(Neurobasal medium)(生命技术公司)组成的GBM培养基中培养细胞24小时。第二天,是否

用大肠杆菌中产生的重组LIF或重组LIF和该指示抗体的混合物处理细胞15分钟(抗体的最终浓度为10 μ g/ml,重组LIF的最终浓度为20ng/ml)。治疗后,在包含放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液的磷酸酶和蛋白酶抑制剂中获得蛋白质,进行定量(BCA蛋白质测定,赛默飞世尔科技公司)并用于蛋白质印迹。对于蛋白质印迹,将膜在5%非脂肪乳-TBST中1小时,并与一抗孵育过夜(p-STAT3,目录号阻断9145,细胞信号传导公司)或30分钟(β -肌动蛋白过氧化物酶,目录号A3854,西格玛奥德里奇公司)。然后将膜用TBST洗涤,必要时与二抗一起孵育,并再次洗涤。通过化学发光检测蛋白质(SuperSignal底物,目录号34076,赛默飞世尔科技公司)。

[0223] 实例9-LIF在多种肿瘤类型中高度过表达

[0224] 对多种人肿瘤类型进行了免疫组织化学实验,以确定LIF表达的程度。如图5所示,LIF在多形性胶质母细胞瘤(GBM)、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、结肠直肠癌(CRC)和胰腺癌中高表达。

[0225] 实例10-人源化克隆h5D8在非小细胞肺癌小鼠模型中抑制肿瘤生长

[0226] 为了确定人源化5D8克隆在体内抑制LIF阳性癌症的能力,在非小细胞肺癌(NSCLC)小鼠模型中测试了该抗体。图6A示出了与媒介物阴性对照相比,用该抗体治疗的小鼠的肿瘤生长降低。图6B示出了使用r5D8版本生成的数据。

[0227] 材料和方法

[0228] 具有高LIF水平的鼠非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系KLN205被表达萤火虫萤光素酶基因的慢病毒稳定感染,用于体内生物发光监测。为了建立小鼠模型,通过肋间穿刺将5x10⁵个KLN205非小细胞肺癌(NSCLC)细胞原位植入8周龄免疫感受态同系DBA/2小鼠的左肺中。每周两次用对照媒介物或用15mg/kg或30mg/kg的h5D8抗体腹膜内治疗小鼠,且通过生物发光监测肿瘤的生长。对于生物发光成像,小鼠在1%-2%吸入异氟烷麻醉下接受了0.2mL 15mg/mL D-萤光素的腹膜内注射。使用IVIS系统2000系列(精诺真公司(Xenogen Corp.),阿拉米达,加利福尼亚州,美国)监测生物发光信号,其由高灵敏度的冷却CCD相机组成。使用Living图像软件(精诺真公司)对成像数据进行网格化,且在每个框状区域中整合总生物发光信号。使用目的区域(ROI)中的总光子通量发射(光子/秒)分析数据。结果证明用h5D8抗体治疗促进肿瘤消退。数据呈现为平均值 \pm SEM。

[0229] 实例11-h5D8在多形性胶质母细胞瘤小鼠模型中抑制肿瘤生长

[0230] 在使用表达萤光素酶的人细胞系U251的原位GBM肿瘤模型中,r5D8显著降低每周两次腹膜内(IP)注射施用300 μ g r5D8和h5D8的小鼠的肿瘤体积。该研究的结果示于图7A中(治疗后第26天的定量)。该实验还使用200 μ g或300 μ g人源化h5D8治疗小鼠进行,治疗7天后显示出统计学上显著的肿瘤减少。

[0231] 材料和方法

[0232] 收获稳定表达萤光素酶的U251细胞,在PBS中洗涤,以400g离心5分钟,重悬于PBS中,并用自动细胞计数器(Countess,英杰公司(Invitrogen))计数。将细胞保持在冰上以维持最佳生存力。腹膜内注射氯胺酮(Ketolar50 $\text{\textcircled{R}}$)/木糖胺(Rompun $\text{\textcircled{R}}$) (分别为75mg/kg和10mg/kg)麻醉小鼠。将每只小鼠小心地放置在立体定向设备中并固定。用脱毛膏去除头部的头发,并用解剖刀切开头部皮肤以露出头骨。用钻头小心地在 λ 侧面1.8mm,前面1mm的位置上做一个小切口。使用Hamilton 30G注射器将5 μ L细胞接种到深度为2.5mm的右纹体

中。用Hystoacryl组织粘合剂(博朗公司(Braun))闭合头部切口,并给小鼠注射皮下镇痛药美洛昔康(Metacam®)(1mg/kg)。植入每只小鼠的最终细胞数为 3×10^5 。

[0233] 每周两次腹膜内施用h5D8治疗小鼠。肿瘤细胞接种后立即在第0天开始治疗。小鼠共接受2剂h5D8或媒介物对照。

[0234] 体重和肿瘤体积:测量体重2次/周,且在第7天通过生物发光定量肿瘤生长(精诺真公司IVIS光谱)。为了定量体内的生物发光活性,使用异氟烷麻醉小鼠,且腹膜内注射萤光素底物(珀金埃尔默公司(PerkinElmer))(167 μ g/kg)。

[0235] 在第7天评估通过生物发光(精诺真公司IVIS光谱)确定的肿瘤大小。计算每个治疗组的个体肿瘤测量和平均值 \pm SEM。由未配对的非参数Mann-Whitney U检验确定统计显著性。

[0236] 实例12-h5D8在卵巢癌小鼠模型中抑制肿瘤生长

[0237] 在其他两个同系肿瘤模型中评估r5D8的功效。在卵巢原位肿瘤模型ID8中,按腹膜内注射萤光素底物(珀金埃尔默公司(PerkinElmer))(167 μ g/kg)测量,每周两次腹膜内施用300 μ g r5D8显著抑制肿瘤生长(图8A和8B)。图8C的结果示出了h5D8在200 μ g及以上的剂量下也减少了肿瘤体积。

[0238] 材料和方法

[0239] 在补充有10%胎牛血清(FBS)(Gibco,英杰公司)、40U/mL青霉素和40 μ g/mL链霉素(PenStrep)(Gibco,英杰公司)和0.25 μ g/mL血浆霉素(Plasmocin)(因韦真公司(Invivogen))的杜尔贝科氏改良伊格培养基(DMEM)中培养ID8细胞。

[0240] 收获ID8细胞,在PBS中洗涤,以400g离心5分钟,并且重悬于PBS中。将细胞置于冰上以保持最佳生存力,并用27G针腹膜内注射200 μ L细胞悬液。植入小鼠体内的最终细胞数为 5×10^6 。

[0241] 每周两次按照指示的不同剂量经腹膜内注射施用h5D8对小鼠进行治疗。测量体重2次/周,且通过使用卡尺(飞世尔科技公司(Fisher Scientific))测量腹围来监测肿瘤的进展。

[0242] 实例13-r5D8在结肠直肠癌小鼠模型中抑制肿瘤生长

[0243] 在患有皮下结肠CT26肿瘤的小鼠中,r5D8(每周两次腹膜内施用300 μ g)显著抑制了肿瘤的生长(图9A和9B)。

[0244] 材料和方法

[0245] 在补充有10%胎牛血清(FBS)、40U/mL青霉素和40 μ g/mL链霉素(PenStrep)和0.25 μ g/mL血浆霉素的罗斯维公园纪念研究所(Roswell ParkMemorial Institute)培养基(RPMI[Gibco,英杰公司])中培养CT26细胞。

[0246] 用胰蛋白酶消化CT26细胞(8×10^5),用PBS冲洗,以400g离心5分钟,并且重悬于100 μ L PBS中。将细胞置于冰上以避免细胞死亡。使用27G针通过皮下注射将该CT26细胞施用于小鼠。

[0247] 从CT26细胞植入后第3天起,每周两次通过腹膜内注射(IP)向小鼠施用300 μ g r5D8或媒介物对照。

[0248] 每周测量三次体重和肿瘤体积。使用卡尺(飞世尔科技公司)测量肿瘤体积。

[0249] 实例14-r5D8减少了肿瘤模型中的炎性浸润

[0250] 如图10A所示,在U251 GBM原位模型中,在用r5D8治疗的肿瘤中CCL22(M2极化巨噬

细胞的标记物)的表达显著降低。如图10B所示,在使用r5D8的生理相关器官型组织切片培养模型中也证实了这一发现,其中三个患者样品在治疗后CCL22和CD206(MRC1)表达(也是M2巨噬细胞的标记物)显著降低(比较MRC1和CCL22的上限(对照)和下限(经治疗))。此外,r5D8还降低了免疫感受态小鼠中同系ID8(图10C)和CT26(图10D)肿瘤中的CCL22⁺M2巨噬细胞。h5D8治疗还朝向同系CT26肿瘤模型中的免疫刺激表型程序化巨噬细胞(图10E)。h5D8治疗增加了具有M1表型的巨噬细胞,如增加的CD206阴性/MHCII阳性级分所示,而M2表型的巨噬细胞减少,如减少的CD206阳性/MHCII阴性级分所示。图10F示出了来自在LIF敲低的U251细胞的条件培养基中培养的单核细胞的基因表达数据。MRC1、CCL2、CCL1和CTSK(用三角形表示)都示出显著的表达降低。

[0251] 实例15-r5D8增加非骨髓效应细胞

[0252] 为了研究其他免疫机制,评估了r5D8对肿瘤微环境中T细胞和其他非骨髓免疫效应细胞的作用。如图11A所示,在卵巢原位ID8同系模型中,r5D8治疗导致肿瘤内NK细胞增加以及总数和活化的CD4⁺和CD8⁺T细胞增加。如图11B所示,类似地,在结肠同系CT26肿瘤模型中,r5D8增加了瘤内NK细胞,增加了CD4⁺和CD8⁺T细胞,且趋向于减少CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-reg细胞。如图11C所示,在r5D8治疗后同系原位KLN205肿瘤模型中还观察到了CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-reg细胞减少的趋势。如图12所示,与T细胞介导功效的要求一致,CT26模型中CD4⁺和CD8⁺T细胞的耗竭抑制了r5D8的抗肿瘤功效。

[0253] T细胞耗竭的材料和方法

[0254] 在补充有10%胎牛血清(FBS[Gibco,英杰公司])、40U/mL青霉素和40μg/mL链霉素(PenStrep[Gibco,英杰公司])和0.25μg/mL血浆霉素(因韦真公司)的RPMI培养基(Gibco,英杰公司)中培养CT26细胞。收集CT26细胞(5×10^5),用PBS冲洗,以400g离心5分钟,并且重悬于100μLPBS中。将细胞置于冰上以避免细胞死亡。使用27G注射器通过皮下注射将CT26细胞在两肋施用给小鼠。如研究设计所示,每周两次腹膜内施用r5D8治疗小鼠。如研究设计所述,每周两次通过腹膜内注射(IP)向小鼠施用媒介物对照(PBS)、大鼠r5D8和/或抗CD4和抗CD8。伴随施用所有抗体治疗。

[0255] 实例16-与人LIF复合的h5D8的晶体结构

[0256] 将h5D8的晶体结构解析到3.1埃的分辨率,以便确定h5D8与之结合的LIF上的表位,且确定参与结合的h5D8残基。共晶体结构揭示,LIF的N末端环位于h5D8轻链和重链可变区之间的中心位置(图13A)。另外,h5D8与LIF的螺旋A和C上的残基相互作用,从而形成不连续的和构象性的表位。结合是由几种盐桥、H-键和范德华相互作用驱动的(表7,图13B)。LIF的h5D8表位跨越了与gp130相互作用的区域。参见Boulanger,M.J.,Bankovich,A.J.,Kortemme,T.,Baker,D.&Garcia,K.C.Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130[通过共享的信号传导受体gp130识别不同细胞因子的收敛机制].Molecular cell[分子细胞]12,577-589(2003)。结果总结在下表7中,并在图13中进行了描绘。

LIF 残基 (表位)	相互作用类型	h5D8 残基 (互补位, 卡巴特编号)
Ala13	VDW	L-Tyr49、L-Asn53
Ile14-O	HB	L-Ser50-OG
Ile	VDW	L-His30、L-Tyr32、L-Tyr49、L-Ser50
		H-Trp97
Arg15-NE	SB	L-Glu55-OE1、L-Glu55-OE2
Arg15-NH1	SB	L-Glu55-OE1、L-Glu55-OE2
Arg15-NH2	SB	L-Glu55-OE1、L-Glu55-OE2
Arg15-O	HB	L-Asn34-ND2
Arg15	VDW	L-Asn34、L-Leu46、L-Tyr49、L-Glu55、L-Ser56
		H-Glu96、H-Trp97、H-Asp98、H-Leu99、

[0257]

[0258]

		H-Asp101
His16-NE2	SB	H-Asp101-OD2
His16	VDW	L-Tyr32、L-Asn34、L-Met89
		H-Trp95、H-Glu96、H-Trp97、H-Asp101
Pro17	VDW	L-Tyr32、L-Ala91
		H-Trp97
Cys18	VDW	L-Tyr32
		H-Trp33、H-Trp97
His19-NE2	SB	H-Glu96-OE1、H-Glu96-OE2
His19	VDW	H-His31、H-Trp33、H-Glu96
Asn20-OD1	HB	H-Lys52-NZ
Asn20-ND2	HB	H-Asp53-OD1
Asn20	VDW	H-Trp33、H-Lys52、H-Asp53
Gln25-NE2	HB	H-Asp53-OD2
Gln25	VDW	H-His31、H-Ser52C、H-Asp53
Gln29	VDW	H-His31
Gln32	VDW	H-Lys52B
Asp120-OD2	HB	H-Ser30-OG
Asp120	VDW	H-Thr28、H-Ser30
Arg123-NE	HB	H-Thr28-OG
Arg123	VDW	H-Thr28
Gly124	VDW	H-His31
Leu125	VDW	H-His31
Ser127-OG	HB	H-Asp98-OD2
Ser127-O	HB	H-Trp97-NE1
Ser127	VDW	H-His31、H-Trp97、H-Asp98
Asn128-OD1	HB	H-His31-NE2
Asn128	VDW	H-His31
Leu130	VDW	H-Trp97

	Cys131	VDW	H-Trp97
	Cys134	VDW	H-Trp97
	Ser135-O	HB	L-His30-NE2
[0259]	Ser135	VDW	L-His30
	His138	VDW	L-His30
VDW , 范德华 低能量结合; HB , 氢键 (中等能量结合); SB , 盐桥 (高能量结合)			

[0260] 材料和方法

[0261] 将LIF在HEK293S (GntI^{-/-}) 细胞中瞬时表达, 并使用Ni-NTA亲和层析纯化, 随后在20mM Tris pH 8.0和150mM NaCl中进行凝胶过滤层析。将重组h5D8 Fab在HEK293F细胞中瞬时表达, 并使用KappaSelect亲和层析随后阳离子交换层析进行纯化。将纯化的h5D8 Fab和LIF以1:2.5的摩尔比混合, 并在室温下孵育30分钟, 之后使用EndoH去糖基化。随后使用凝胶过滤层析纯化复合物。将该复合物浓缩至20mg/mL, 并使用稀疏矩阵筛选进行结晶试验。在包含19% (v/v) 异丙醇、19% (w/v) PEG4000、5% (v/v) 甘油、0.095M柠檬酸钠pH 5.6的条件下于4°C形成晶体。该晶体在加拿大光源 (CLS) 的08ID-1光束线上衍射到3.1 Å的分辨率。按照Kabsch等人Xds. Acta crystallographica. Section D [晶体学报:D分卷], Biological crystallography [生物晶体学] 66, 125-132 (2010) 使用XDS收集、处理和缩放数据。按照McCoy等人Phaser crystallographic software [移相器晶体学软件]. JAppl Crystallogr [应用晶体学杂志] 40, 658-674 (2007) 使用移相器通过分子置换来确定结构。使用Coot和phenix.refine进行了模型构建和完善的几次迭代, 直到结构收敛到可接受的R_{工作}和R_{自由}。分别参见Emsley等人Features and development of Coot [Coot的特征和发展]. Acta crystallographica. Section D [晶体学报:D分卷], Biological crystallography [生物晶体学] 66, 486-501 (2010); 以及Adams等人PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution [PHENIX: 一个全面的用于大分子结构解决方案的基于python的体系]. Acta crystallographica. Section D [晶体学报:D分卷], Biological crystallography [生物晶体学] 66, 213-221 (2010)。这些数字是在PyMOL (PyMOL分子图形系统, 版本2.0, 薛定谔有限责任公司 (Schrödinger, LLC)) 中生成的。

[0262] 实例17-h5D8对LIF具有高特异性

[0263] 测试了h5D8与其他LIF家族成员的结合, 以确定结合特异性。当在大肠杆菌中生产两种蛋白质时, 使用Octet96分析, h5D8与人LIF的结合比与LIF最高同源性IL-6家族成员制瘤素M (OSM) 的结合大约100倍。当两种蛋白都在哺乳动物系统中产生时, h5D8不展现出与OSM的结合。数据汇总于表8中。

表 8: 通过 Octet 测量的细胞因子 h5D8 亲和力测量的概览

	KD [M]	kon [1/Ms]	kdis [1/s]
h5D8 + huLIF (大肠杆菌)	4.3E-10 +/-2.0E-11	3.1E+05 +/-3.1E+03	1.3E-04 +/-5.8E-06
h5D8 + huLIF (哺乳动物)	1.3E-09 +/-7.2E-11	1.2E+05 +/-1.3E+03	1.5E-04 +/-8.5E-06
h5D8 + huOSM (大肠杆菌)	3.6E-08 +/-1.4E-09	8.5E+04 +/-3.1E+03	3.1E-03 +/-4.1E-05
h5D8 + huOSM (哺乳动物)	ND	ND	ND
h5D8 + huIL-6 (大肠杆菌)	ND	ND	ND

ND = 无结合

[0264]

[0265] 材料和方法

[0266] Octet结合实验:按照制造商提供的手册使用和制备了试剂。基本动力学实验是使用如下的Octet数据采集软件版本9.0.0.26进行的:传感器/程序的设置:i)平衡(60秒);ii)加载(15秒);iii)基线(60秒);iv)缔合(180秒);以及v)解离(600秒)

[0267] h5D8对细胞因子的Octet亲和力:基本动力学实验是使用如下的Octet数据采集软件版本9.0.0.26进行的:将胺反应性第二代生物传感器(AR2G)在水中水合最低15分钟。h5D8与生物传感器的缀合是根据ForteBio技术说明26(请参阅参考文献)使用胺偶联第二代试剂盒进行的。浸入步骤如下所述在30°C 1000rpm下进行:i)水中平衡60秒;ii)在水中20mM ECD,10mM磺基-NHS中活化300秒;iii)将10μg/ml h5D8在pH 6.0的10mM乙酸钠中固定600秒;iv)在1M乙醇胺中(pH 8.5)淬灭300秒;v)在水中基线120秒。然后在30°C,1000rpm下通过以下浸入和读取步骤进行动力学实验:vi)1X动力学缓冲液中基线60秒;vii)在1X动力学缓冲液中缔合适当的细胞因子系列稀释液180秒;viii)在1X动力学缓冲液中解离300秒;ix)三个再生/中和循环分别在10mM甘氨酸pH 2.0和1X动力学缓冲液之间交替(每个5秒,3个循环)。再生后,将生物传感器重新用于随后的结合分析。

[0268] 由哺乳动物细胞产生的人重组LIF来自ACRO生物系统公司(LIF-H521b);在哺乳动物细胞中产生的人重组OSM来自R&D(8475-0M/CF);以及大肠杆菌细胞中生产的人重组OSM来自R&D(295-0M-050/CF)。

[0269] 实例18-h5D8 fab的晶体结构

[0270] 确定了h5D8 Fab在宽谱化学条件下的五个晶体结构。这些结构的高分辨率指示CDR残基的构象与较小的柔韧性相关,并且在不同的化学环境中高度相似。该抗体的独特特征是在可变重区的第100位存在非典型的半胱氨酸。结构分析表明,半胱氨酸是未配对的,并且在很大程度上是溶剂不可及的。

[0271] H5D8 Fab是通过木瓜蛋白酶消化其IgG,随后使用标准亲和力、离子交换和尺寸层

析技术进行纯化而获得的。使用气相扩散方法获得晶体,并确定分辨率在1.65 Å至2.0 Å之间变动的五个晶体结构。尽管结晶条件跨越五个不同的pH水平变动:5.6、6.0、6.5、7.5和8.5,所有结构均在相同的晶体学空间群中解析,并且具有相似的晶胞尺寸(P212121, a~53.8 Å, b~66.5 Å, c~143.3 Å)。这样,这些晶体结构允许比较不受晶体堆积伪像阻碍和跨越宽谱化学条件的h5D8 Fab三维布置。

[0272] 观察所有互补决定区(CDR)残基的电子密度,随后对其进行建模。值得注意的是,LCDR1和HCDR2采用了细长的构型,与浅LCDR3和HCDR3区域一起在互补位的中心形成了一个结合槽(图14A)。这五个结构在所有残基上都非常相似,所有原子的均方根偏差在0.197 Å与0.327 Å之间变动(图14A)。这些结果指示,CDR残基的构象在各种化学环境中均得到保持,包括pH水平在5.6与8.5之间变动以及离子强度在150mM与1M之间变动。对h5D8互补位的静电表面的分析揭示,带正电和带负电区同样有助于亲水性,没有普遍的疏水性斑块。h5D8在HCDR3(Cys100)的碱基上具有非典型的半胱氨酸的罕见特征。在所有五个结构中,该游离半胱氨酸是有序的,不会形成任何二硫键错配。此外,它不被Cys(半胱氨酸化)或谷胱甘肽(谷胱甘肽化)的加入而修饰,并与重链的Leu4、Phe27、Trp33、Met34、Glu102和Leu105的主链和侧链原子发生范德华相互作用(3.5-4.3 Å距离)(图14B)。最后,Cys100是一个主要被掩埋的结构残基,显现参与介导CDR1和HCDR3的构象。因此,正如我们的五个晶体结构中该区的均匀分布所观察到的,它不太可能与其他半胱氨酸具有反应性。

[0273] 材料和方法

[0274] H5D8-1 IgG获自康泰伦特生物制剂公司(Catalent Biologics),并在25mM组氨酸、6%蔗糖、0.01%聚山梨酯80(在pH 6.0)中配制。使用10K MWC0浓缩器(密理博公司)将配制的IgG广泛地缓冲液交换为PBS,之后在37°C下于PBS、1.25mM EDTA、10mM半胱氨酸中以1:100微克木瓜蛋白酶(西格玛公司)消化1小时。使用AKTA Start层析系统(GE医疗集团)将木瓜蛋白酶消化的IgG流经蛋白A柱(GE医疗集团)。回收包含h5D8 Fab的蛋白A流通液,并使用10K MWC0浓缩器(密理博公司)将其缓冲液交换为pH 5.6的20mM乙酸钠。使用AKTA Pure层析系统(GE医疗集团)将所得样品上样到Mono S阳离子交换柱(GE医疗集团)上。用1M氯化钾梯度洗脱产生了一个主要的h5D8 Fab峰,该峰在20mM Tris-HCl、150mM氯化钠(pH 8.0)中用Superdex 200Increase凝胶过滤柱(GE医疗集团)回收、浓缩并纯化至大小均一。通过在还原和非还原条件下的SDS-PAGE证实了h5D8 Fab的高纯度。

[0275] 使用10K MWC0浓缩器(密理博公司)将纯化的h5D8 Fab浓缩至25mg/mL。使用Oryx 4分配器(道格拉斯仪器公司(Douglas Instruments))在20°C下使用稀疏矩阵96条件商业筛JCSG TOP96(Rigaku试剂)和MCSG-1(阿纳塔斯公司(Anatrace))设置气相扩散结晶实验。在以下五个结晶条件下四天后,获得并收获晶体:1) 0.085M柠檬酸钠,25.5% (w/v) PEG 4000,0.17M乙酸铵,15% (v/v) 甘油,pH 5.6;2) 0.1M MES,20% (w/v) PEG 6000,1M氯化锂,pH 6.0;3) 0.1M MES,20% (w/v) PEG 4000,0.6M氯化钠,pH 6.5;4) 0.085M HEPES钠,17% (w/v) PEG 4000,8.5% (v/v) 2-丙醇,15% (v/v) 甘油,pH 7.5;5) 0.08M Tris,24% (w/v) PEG 4000,0.16M氯化镁,20% (v/v) 甘油,pH 8.5。在液氮中快速冷冻之前,根据需要,向含有晶体的母液中补充5%-15% (v/v) 甘油或10% (v/v) 乙二醇。以高级光子源光束线23-ID-D(芝加哥,伊利诺伊州)对晶体进行X射线同步加速器辐射,并在Pilatus36M检测器上记录衍射

图。使用XDS处理数据,并使用移相器通过分子置换确定结构。在PHENIX中进行了完善,在Coot中建立了迭代模型。在PyMOL中生成图片。所有软件都通过SBGrid访问。

[0276] 实例19-h5D8在半胱氨酸100处的突变保持结合

[0277] 对h5D8的分析揭示,在重链可变区的100位(C100)处有一个游离的半胱氨酸残基。H5D8变体是通过用每个天然存在的氨基酸取代C100而生成的,以表征与人和小鼠LIF的结合以及对人和小鼠LIF的亲合力。使用ELISA和Octet测定表征结合。结果汇总在表9中。ELISA EC50曲线显示在图15中(图15A人LIF和图15B小鼠LIF)。

表 9.通过 Octet 测定确定的亲和力和通过 ELISA 确定的 EC50 的概览

突变	亲合力/ k_D (M)		结合 EC50 (nM)	
	人 LIF	小鼠 LIF	人 LIF	小鼠 LIF
C100	< 1.0E-12 ± 2.252E-11	9.946E-11 ± 8.272E-12	0.09878	0.1605
C100S	8.311E-10 ± 5.886E-11	2.793E-09 ± 5.925E-11	n.d.	n.d.
C100Q	3.87E-09 ± 1.55E-10	2.84E-09 ± 4.85E-11	10.18	26.33
C100N	5.59E-09 ± 1.01E-10	6.68E-09 ± 9.8E-11	13.18	45.87
C100E	2.67E-09 ± 4.64E-11	4.1E-09 ± 7.56E-11	7.179	25.3
C100D	2.02E-09 ± 8.08E-11	6.49E-09 ± 7.16E-11	11.89	22.88
C100T	4.36E-10 ± 2.1E-11	1.02E-09 ± 1.77E-11	5.575	8.753
C100G	2.49E-09 ± 4.2E-11	3.33E-09 ± 5.42E-11	21.94	40.17
C100P	2.74E-10 ± 2.97E-10	< 1.0E-12 ± 7.64E-10	34.44	101.9
C100A	< 1.0E-12 ± 2.713E-11	< 1.0E-12 ± 1.512E-11	0.6705	0.9532
C100V	< 1.0E-12 ± 1.805E-11	< 1.0E-12 ± 8.086E-12	0.2785	0.3647
C100L	< 1.0E-12 ±	1.998E-10 ±	0.454	0.547

[0278]

	1.963E-11	1.055E-11		
C100I	< 1.0E-12 ± 1.424E-11	3.361E-11 ± 7.545E-12	0.299	0.3916
C100M	1.155E-09 ± 3.400E-11	2.676E-09 ± 2.449E-11	0.7852	1.563
C100F	4.376E-09 ± 1.127E-10	1.147E-08 ± 9.099E-11	8.932	21.53
C100Y	1.444E-08 ± 1.159E-09	2.514E-08 ± 2.047E-09	n.d.	n.d.
C100W	2.508E-08 ± 7.036E-09	4.819E-08 ± 4.388E-09	n.d.	n.d.
C100H	1.304E-10 ± 1.416E-10	4.284E-09 ± 1.231E-10	8.254	n.d.
C100K	7.477E-08 ± 1.581E-09	6.053E-08 ± 2.589E-09	n.d.	n.d.
C100R	1.455E-07 ± 6.964E-09	5.142E-08 ± 3.247E-09	n.d.	n.d.

[0279]

[0280] 材料和方法

[0281] ELISA: 通过ELISA确定h5D8 C100变体与人和小鼠LIF的结合。将重组的人或小鼠LIF蛋白以1ug/mL涂在Maxisorp 384孔板上,在4°C下过夜。在室温下将板用1x阻断缓冲液阻断2小时。加入每种h5D8 C100变体的滴定并在室温下结合1小时。将板用PBS+0.05%吐温-20洗涤三次。加入缀合有HRP的抗人IgG,并在室温下结合30分钟。将板用PBS+0.05%吐温-20洗涤三次,并使用1x TMB底物显影。用1M Hcl终止反应,并测量在450nm的吸光度。使用Graphpad Prism进行图形生成和非线性回归分析。

[0282] Octet RED96: 使用Octet RED96系统,通过BLI确定了h5D8 C100变体对人和小鼠LIF的亲合力。在1x动力学缓冲液中经过30秒的基线后,将h5D8 C100变体以7.5ug/mL加载到抗人Fc生物传感器上。将人或小鼠LIF蛋白的滴定与加载的生物传感器关联90秒,并在1x动力学缓冲液中解离300秒。通过数据分析软件使用1:1全局拟合模型计算KD。

[0283] 实例20-h5D8在体外阻断LIF与gp130的结合

[0284] 为了确定h5D8是否阻止LIF与LIFR结合,使用Octet RED 96平台进行了分子结合测定。通过抗人Fc捕获将H5D8加载到AHC生物传感器上。然后,将生物传感器浸入LIF中,并按预期观察到缔合(图16A,中间三分之一)。随后,将生物传感器浸入不同浓度的LIFR中。观察到剂量依赖性的缔合(图16A,右三分之一)。对照实验证明这种缔合是LIF特异性的(未显示),而不是由于LIFR与h5D8或与生物传感器的非特异性相互作用。

[0285] 为了进一步表征h5D8和LIF的结合,进行了一系列ELISA结合实验。预孵育H5D8和LIF,然后将其引到涂有重组人LIFR (hLIFR) 或gp130的板上。h5D8/LIF复合物与涂覆的底物

之间缺乏结合,这指示h5D8以某种方式破坏了LIF与受体的结合。此外,也使用了不结合LIF(同种型对照,由(-)指示)或在已知结合位点结合LIF的对照抗体(B09不与gp130或LIFR竞争LIF结合;r5D8是h5D8的大鼠亲本版本)。ELISA结果证明,h5D8/LIF复合物能够结合hLIFR(r5D8/LIF复合物也是如此),指示这些抗体不能阻止LIF/LIFR缔合(图16A)。相反,h5D8/LIF复合物(和r5D8/LIF复合物)不能结合重组人gp130(图16B)。这指示当LIF与h5D8结合时,LIF的gp130结合位点受到影响。

[0286] 实例21-人组织中的LIF和LIFR表达

[0287] 为了确定LIF和LIFR的表达水平,对许多不同类型的人体组织进行了实时定量PCR。图17A和17B中所示的平均表达水平以每100ng总RNA的拷贝数给出。大多数组织每100ng总RNA表达至少100个拷贝。在人脂肪组织(肠系膜回肠[1])、血管组织(脉络丛[6]和肠系膜[8])和脐带[68]组织中,LIF mRNA表达最高;在脑组织(皮质[20]和黑质[28])中最低。在人脂肪组织(肠系膜回肠[1])、血管组织(肺[9])、脑组织[11-28]和甲状腺[66]组织中,LIFRmRNA表达最高;在PBMC中最低[31]。食蟹猴组织中的LIF和LIFR mRNA表达水平与人组织中观察到的相似,其中在脂肪组织中LIF表达高,在脂肪组织中LIFR表达高而在PBMC中低(数据未显示)。

[0288] 图17A和图17B的组织编号为:1-脂肪(肠系膜回肠);2-肾上腺;3-膀胱;4-膀胱(膀胱三角);5-血管(大脑:大脑中动脉);6-血管(脉络丛);7-血管(冠状动脉);8-血管(肠系膜(结肠));9-血管(肺);10-血管(肾脏);11-脑(杏仁核);12-脑(尾核);13-脑(小脑);14-脑(皮质:扣带前区);15-脑(皮质:扣带后区);16-脑(皮质:额叶外侧);17-脑(皮质:额叶内侧);18-脑(皮质:枕骨);19-脑(皮质:顶叶);20-脑(皮质:颞叶);21-脑(背缝核(dorsal-raphe-nucleus));22-脑(海马);23-脑(下丘脑:前区);24-脑(下丘脑:后区);25-脑(蓝斑);26-脑(延髓);27-脑(伏核);28-脑(黑质);29-乳腺;30-盲肠;31-外周血单核细胞(PBMC);32-结肠;33-背根节(DRG);34-十二指肠;35-输卵管;36-胆囊;37-心脏(左心房);38-心脏(左心室);39-回肠;40-空肠;41-肾脏(皮质);42-肾脏(延髓);43-肾脏(骨盆);44-肝脏(实质);45-肝脏(支气管:一级);46-肝脏(支气管:三级);47-肺(实质);48-淋巴腺(扁桃腺);49-肌肉(骨骼);50-食道;51-卵巢;52-胰腺;53-松果体;54-垂体腺;55-胎盘;56-前列腺;57-直肠;58-皮肤(包皮);69-脊髓;60-脾(薄壁组织);61-胃(胃窦);62-胃(胃体);63-胃(胃底);64-胃(幽门管);65-睾丸;66-甲状腺;67-气管;68-脐带;69-输尿管;70-子宫(子宫颈);71-子宫(子宫肌层);以及72-输精管。

[0289] 实例22-h5D8和抗PD-1抗体在结肠直肠癌小鼠模型中抑制肿瘤生长

[0290] 在同系CT26和MC38模型中,与PD-1抑制剂组合评估了h5D8的疗效。与单独用PD-1抑制剂或h5D8治疗的小鼠相比,用PD-1抑制剂和h5D8组合治疗的小鼠展现出降低的CT26肿瘤生长,如图18A和18B所示。尽管未观察到h5D8单一疗法的持久存活率获益(图18C),仅在抗PD1疗法中很少观察到(图18C),但h5D8和抗PD1组合分别带来治疗的CT26和MC38荷瘤小鼠的约40%和30%的长期生存率益处(图18C)。重要的是,长期无肿瘤的CT26幸存者对肿瘤的再植入具有抵抗力,与获得持久的适应性免疫相一致(图18D)。

[0291] 为了研究h5D8和PD-1抑制剂组合对肿瘤生长有影响的其他免疫机制,如图19A和19B所示,评估了该组合对浸润性CD8 T细胞功能性的作用。使用单一疗法h5D8治疗,在CT26和MC38肿瘤中分别未观察到CD8 TIL的作用或名义上的增加。尽管由于抗PD1单一疗法对

CD8 TIL的影响很小,但与h5D8的组合在CT26和MC38肿瘤中均显著增加了CD8 TIL,这表明该组合观察到的疗效增加可能由CD8 TIL的增加所驱动(图19C和19D)。

[0292] 相对于对照组和单一疗法治疗组,从用h5D8和抗PD1组合治疗的小鼠收获的肿瘤不仅示出CD8 TIL增加,而且还示出分别由GZMB、Ki67和CD44鉴定的细胞溶解的、增殖性的和经历抗原的亚群增加。组合治疗的肿瘤还示出CD8/Treg、M1/M2和CD8/CD11b比率增加,证明对肿瘤微环境(TME)的有效调节有利于抗肿瘤免疫。这些数据支持LIF至少部分地通过巨噬细胞的抑制极化来驱动对TME的抑制,其随后钝化宿主抗肿瘤免疫力。用h5D8抑制LIF逆转此作用,并与T细胞促进疗法(诸如抗PD1疗法)组合,驱动强大的抗肿瘤免疫力,从而在癌症小鼠模型中实现持久的存活率益处。

[0293] 为了检查在用抗PD1单一疗法或h5D8和抗PD1组合治疗的小鼠中收获的肿瘤中CD8 TIL基于每个细胞的功能是否不同,检查了CD8 TIL响应于肿瘤特异性抗原产生IFN γ 的能力。当用AH1肽(gp70;423-431a.a.)进行离体刺激时,从抗PD1或h5D8和抗PD1组合治疗的CT26肿瘤中分离出的CD8 TIL显示无功能差异,其包括CT26的免疫显性排斥抗原(图19C)。类似地,在用免疫显性肿瘤抗原肽(p15e;604-611a.a.)进行离体刺激时,从抗PD1或h5D8和抗PD1组合治疗的MC38肿瘤中分离得到的CD8 TIL也没有显示功能差异,表明组合功效的增加是由CD8 TIL频率的总体增加而非基于每个细胞的CD8 TIL功能性增加所驱动的。

[0294] 材料和方法

[0295] 分别以15mg/kg和10mg/kg的剂量每周两次施用h5D8和PD-1抑制剂抗体克隆RMP1-14(拜艾斯细胞公司(BioXCell)),且通过基于卡尺的测量监测肿瘤体积。

[0296] 实例23-LIF、TAM和Treg之间的关联

[0297] LIF对癌症免疫系统的作用是通过测量来自癌症基因组图谱(TCGA)的28种类型的实体瘤中肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和调节性T细胞(Treg)的相对丰度来确定的。在几种肿瘤类型中,观察到LIF与TAM和Treg之间存在显著相关性(图20A和20B)。胶质母细胞瘤(GBM)、前列腺腺癌、甲状腺癌和卵巢癌是4种在LIF、TAM和Treg之间展现最高相关性的肿瘤类型,而在各样品中均显示出高LIF表达(图20A和20B)。在由肿瘤细胞和免疫细胞浸润物表达的GBM肿瘤中观察到了广泛的LIF表达(图24)。

[0298] 在人GBM和卵巢癌(OV)的TCGA数据集的分析中,都发现LIF与CCL2、CD163和CD206之间存在显著正相关(图28)。在LIF和CXCL9之间未观察到相关性(数据未显示),但在各个肿瘤中观察到相对较低水平的CXCL9 mRNA。通过分析一个20名GBM患者的队列并进行肿瘤的LIF、CXCL9、CCL2、CD163和CD206 IHC,在蛋白质水平上验证了这些结果。观察到LIF与CCL2、CD163和CD206之间的强正相关(图21E)。CXCL9在分离的细胞簇中表达,解释了肿瘤中存在的低水平CXCL9 mRNA。值得注意的是,CXCL9与人GBM中的LIF显示负相关(图21E)。

[0299] 本文所述的实例进一步说明,LIF在CD8⁺T细胞的排除中起着关键作用,同时促进了肿瘤前TAM的存在。观察到在表达高水平LIF的肿瘤中对LIF的阻断降低了TAM中的CD206、CD163和CCL2且诱导了CXCL9表达。LIF的阻断释放了CXCL9的表观遗传沉默,从而触发CD8⁺T细胞肿瘤浸润。LIF中和抗体与PD1免疫检查点的抑制相组合促进肿瘤消退和总存活率增加。

[0300] 材料和方法

[0301] 从Firebrowse服务器(firebrowse.org,版本2016_01_28)的癌基因组图谱(TCGA)

下载了针对9,403名患有28种不同实体瘤的患者的RNA-seq数据。对所有下游分析,将表达数据(RSEM)进行log2转换。接下来,获得了四个目的免疫群体的基因签名:TAM、Treg、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞。然后计算LIF表达与四个免疫群体的基因签名之间的相关性,以及LIF与一组目的基因之间的相关性。

[0302] 实例24-在GL261N、RCAS和ID8模型中阻遏LIF功能

[0303] 在免疫感受态小鼠GBM和卵巢癌(LIF与TAM和Treg高度相关的肿瘤类型)模型中,研究了LIF在癌症中的潜在免疫调节作用。在小鼠的脑(GL261N和RCAS)和腹膜(ID8)中产生肿瘤的GBM细胞系、GL261N(GL261细胞系的衍生物)、GFAP-tv-a RCAS-PDGFA、shp53、shNF1(RCAS)转基因模型和卵巢癌细胞系ID8被鉴定为表达高水平的LIF(图25)。

[0304] 使用中和抗体阻遏了GL261N、RCAS和ID8模型中的LIF功能。在这些模型中观察到肿瘤生长的减少和存活率的增加(图20C、20G、20H、20K、20P)。在GL261肿瘤模型(不表达LIF的肿瘤)中对LIF的阻断不抑制肿瘤的生长(图25E)。针对LIF的中和抗体诱导p-STAT3水平显著降低,表明在这些动物模型(基于高LIF表达选择)中,LIF是诱导JAK-STAT3通路的主要细胞因子(图20D和20L)。此外,虽然未观察到Ki67阳性细胞的显著减少,但观察到裂解的半胱天冬酶3(CC3)的增加,指示LIF的阻断诱导了肿瘤细胞死亡(图20D和20L)。

[0305] 材料和方法

[0306] 所有动物实验均已获得瓦尔德希伯隆(Vall d'Hebron)研究所机构动物护理委员会的批准并根据其指导方针进行,符合欧盟和国家指令。雌性C57BL/6和NOD SCID购自詹维尔公司(Janvier)。对于脑肿瘤模型,将 3×10^5 个GL261N、GL261或RCAS细胞(它们均带有萤光素酶表达)立体定向接种到8周大的C57BL/6小鼠的右脑半球的纹状体(λ 前面1mm,侧面1.8mm;实质内2.5mm)中。对于卵巢肿瘤模型,将 5×10^6 个ID8卵巢癌细胞腹膜内注射到8周龄的C57BL/6小鼠中。每周两次腹膜内施用300 μ g(ID8)或600 μ g(GL261N、GL261和RCAS)剂量的抗LIF或对照IgG。此外,每周两次腹膜内注射200 μ g大鼠抗小鼠PD1阻断抗体(抗PD1,拜艾斯细胞公司)、抗小鼠/人/大鼠CCL2抗体(MCP-1,拜艾斯细胞公司)或3 μ g抗小鼠CXCL9抗体(R&D)。通过体重和腹围(ID8)或使用精诺真公司IVIS®光谱(GL261N、GL261和RCAS)进行生物发光测量来监测肿瘤的进展。当小鼠展现出疾病或劣性应激(即恶病质、厌食症或呼吸频率增加)的临床体征或肿瘤开始干扰正常身体机能时,将其安乐死。

[0307] 实例25-抗LIF治疗GL261N肿瘤

[0308] 使用免疫缺陷动物评估了免疫系统在抗LIF治疗反应中的作用。在RAG^{-/-}或NOD SCID小鼠(均为缺乏适应性免疫反应的小鼠品系)的GL261N肿瘤中,用抗LIF进行治疗对肿瘤的生长没有显示显著影响(图25F)。结果指示,对LIF阻断的抗肿瘤反应主要由适应性免疫反应介导。

[0309] 材料和方法

[0310] 使用实例24的方法,不同的是所用的小鼠是来自杰克逊实验室(Jackson Laboratories)的RAG^{-/-}、CCL2^{-/-}和CXCL9^{-/-}以及来自查尔斯河(Charles River)的NOD SCID γ (NSG)。

[0311] 实例26-抗LIF治疗减少了肿瘤前TAM的数量且增加了CD8⁺T细胞肿瘤浸润

[0312] 通过观察肿瘤前TAM(CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻CD206⁺CD163⁺MHCII^{hi})的数量减少来进一步研究涉及抗LIF治疗的免疫反应的分子机制(图20E、20I、20M)。重要的是,用抗LIF治疗后,

CD8⁺T细胞的肿瘤浸润伴随增加(图20D、20F、20J、20L、20N)。用抗LIF治疗后,Treg和NK细胞数量分别减少和增加(图25G-25J)。浸润性CD8⁺T细胞表达GZMA,表明它们正在介导细胞毒性作用(图26A)。而且,CD8⁺T细胞的区室表达PD1(图26B、26C)。源自募集的单核细胞(CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻CD49d⁺)¹²的TAM响应于抗LIF而降低(图26D),未观察到对树突细胞群(CD11b⁺、CD11c⁺、MHCII⁺) (图26E)或组织中IL-10或IL-12的水平(图26F)的主要作用。

[0313] 材料和方法

[0314] 对小鼠实施安乐死并分离肿瘤。用脑肿瘤解离试剂盒对GL261N和RCAS肿瘤进行酶促消化,且用髓磷脂去除珠II(均来自美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec))去除髓磷脂。用小鼠肿瘤解离试剂盒(美天旎生物技术公司)处理ID8肿瘤,且收集腹水。用人肿瘤解离试剂盒(美天旎生物技术公司)酶促消化器官型模型的人GBM样本和患者来源的异种移植物。

[0315] 使用抗Ly6C-APC和抗APC微珠以及抗Ly6G微珠从GL261N细胞悬液中分离出CD11b⁺细胞,以耗竭Ly6G⁺和Ly6C⁺群体,然后用CD11b磁珠。用抗小鼠CD45磁珠进行CD45⁺细胞分离。使用抗CD11b磁珠从ID8细胞悬液中分离出CD11b⁺细胞。最后,使用抗人CD45磁珠从器官型切片中分离出CD45⁺细胞。按照制造商的说明,使用MultiMACS Cell124分离器Plus执行所有分离步骤,磁珠购自美天旎生物技术公司。

[0316] 将鼠抗CD3、CD4、CD335、CD163、II类MHC、CXCR3(e生物科学公司(eBioscience))、CD45、CD8、F4/80、CD11b、CD11c、CD206、CD49d(BD生物科学公司(BD Bioscience))、LIFR(诺伟司生物制剂公司(Novus Biologicals))Ly6G、Ly6C、CCR2和PD1(生物传奇公司(Biolegend))抗体用于流式细胞术。使用特定的染色套件(e生物科学公司)对FoxP3、颗粒酶A(GZMA)、CXCL9(e生物科学公司)和CCL2(生物传奇公司)进行细胞内染色。为了进行人流研究(flow human study),使用了针对CD11b、CD14(BD生物科学公司)、CD45、CD3、CXCR3(生物传奇公司)和CD8(BD制药公司(BD Pharmigen))的抗体。在一些情况下,先前将样品与LIVE/DEAD可固定黄色死染色试剂盒(赛默飞世尔科技公司)一起孵育以确定生存力。作为人GBM有机型和患者来源的异种移植物的阳性对照,将10⁶个PBMC(称为“刺突PBMC”)添加到对照样品中以建立白细胞群。

[0317] 在BD LSRFortessa™细胞分析仪或Navios(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))上采集样品,并使用Flow Jo软件分析数据。

[0318] 实例27-CD8⁺T细胞浸润不是对LIF阻断的抗肿瘤反应的结果LIF介导的对肿瘤免疫浸润物的调节是抗肿瘤反应的原因还是结果,是通过进行急性治疗实验来评估的,其中小鼠在建立肿瘤后用抗LIF进行了4天的治疗。4天的治疗不影响肿瘤生长(图26G),但是足以衔接CD8⁺T细胞肿瘤浸润(图26H)。这表明CD8⁺T细胞浸润不是对LIF阻断的抗肿瘤反应的结果。

[0319] 实例28-基因反应验证

[0320] 通过从ID8小鼠模型中分离CD11b⁺细胞,用抗LIF抗体处理细胞并进行转录组分析来确定与下调的致癌表型相关的基因。鉴定的基因为CCL2、CCL3、CCL7、PF4、CTSK、CD206和CD163。而且,有趣的是,CXCL9被上调(图21A)。在ID8和GL261N模型中通过qRT-PCR验证了前述基因反应(图21B)。

[0321] CXCL9和CCL2分别突出为CD8⁺T细胞肿瘤浸润以及TAM和Treg募集的关键趋化因

子。证实了通过中和TAM中的LIF (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻)对CXCL9和CCL2的调节(图21C)。TAM的免疫染色和分离显示CXCL9、CCL2、CD206和CD163主要在TAM中表达(图21D),并且用抗LIF处理可调节其表达(图21C、21D)。CXCR3(CXCL9受体)、CCR2(CCL2受体)和LIFR在TAM和CD8⁺T细胞中表达(图27A)。qRT-PCR分析定量了从GL261N肿瘤中分选出来的CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻和CD11b⁻Ly6G⁻Ly6C⁻细胞中CD11b和CXCL9 mRNA的存在。(图27B)

[0322] 材料和方法

[0323] 裂解细胞以进行mRNA提取(RNeasy Mini或Micro试剂盒,凯杰公司(Qiagen)),逆转录(来自伯乐公司(BioRad)的iScript Reverse Supermix,用于mRNA),并根据制造商的建议使用应用生物系统公司(Applied Biosystems)的Taqman探针进行qRT-PCR。对于石蜡包埋的切片,通过使用High Pure FFPE RNA分离试剂盒(罗氏公司(Roche))并按照制造商的说明获得RNA。反应在CFX384 TouchTM实时PCR检测系统(伯乐公司(Bio-Rad))中进行,结果表示为通过Ct方法计算的相对于对照样品的倍数变化。将鼠或人ACTB或GAPDH用作内部归一化对照。

[0324] 在Affymetrix微阵列平台上使用小鼠Gene 2.1ST测定RNA。接下来,基于稳健微阵列平均值(Robust-Microarray Average,RMA)将其归一化。考虑到成对的样品,使用limma Bioconductor软件包通过贝叶斯线性回归确定了抗LIF治疗的小鼠中差异表达的基因。

[0325] 实例29CXCL9敲除小鼠和CCL2敲除小鼠中的抗LIF反应

[0326] 使用CXCL9和CCL2基因敲除(CXCL9^{-/-},CCL2^{-/-})小鼠模型来测试CXCL9和CCL2调节在LIF致癌功能中的相关性。这些小鼠模型中的肿瘤用针对CXCL9和CCL2的阻断抗体治疗。有趣的是,在CXCL9^{-/-}小鼠中对LIF抑制的抗肿瘤反应减弱了,但在CCL2^{-/-}小鼠中却没有减弱(图21F)。类似地,该CXCL9中和抗体而非CCL2抗体削弱了对抗LIF的抗癌反应(图21F)。这些结果指示抗LIF反应的主要介质是CXCL9。如所预期的,CXCL9的阻断降低了响应于抗LIF的CD8⁺T细胞肿瘤浸润(图21G)。

[0327] 材料和方法

[0328] 将玻片脱蜡并水合。在室温下,使用pH 6或pH 9柠檬酸盐抗原提取溶液(DAKO),10分钟10%过氧化物酶(H₂O₂)和阻断溶液(2%BSA)进行抗原提取1h。根据制造商的说明,使用EnVision FLEX+(DAKO)作为检测系统,随后用苏木精复染、脱水并固定(DPX)。患者GBM肿瘤中LIF、CCL2、CD163、CD206和CXCL9染色的定量表示为H评分(3×强染色百分比+2×中度染色百分比+弱染色百分比),范围为0到300。用ImageJ进行p-STAT3、Ki67、CC3和CD8的定量,对每只小鼠三个不同视野的细胞总数进行计数,每组五只小鼠,并计算阳性细胞的百分比。图中数据呈现为平均值±SEM。

[0329] 免疫组化抗体:人LIF(阿特拉斯(Atlas);1:200)、鼠LIF(艾博抗公司(AbCam);1:200)、鼠p-STAT3(细胞信号传导公司;1:50)、鼠Ki67(艾博抗公司;1:200)、鼠裂解的半胱天冬酶3(CC3)(细胞信号传导公司;1:500)、鼠CD8(百奥斯公司(Bioss);1:200)、人/鼠CCL2(诺伟司生物制剂公司,1:200)、人CXCL9(赛默飞世尔科技公司;1:100)和人CD163(莱卡诺瓦卡斯特拉公司(Leica Novacastra);1:200)。

[0330] 将核用DAPI复染色,并使用激光扫描共聚焦NIKON Eclipse Ti显微镜捕获图像。用ImageJ进行免疫荧光的定量,对3-5个小鼠/组的每只小鼠的2-3个不同视野的CD11b、Iba1或CD3阳性的全部或多达100个细胞进行计数,并计算这些细胞对Iba1(对于GL261N型)

或CD68/CD11b(对于ID8型)阳性群体内的CCL2、CD206和CD163阳性的百分比。对于CXCL9,计算了在总细胞群内被该细胞因子信号包围的细胞的百分比。对于器官型切片,每位患者的3-4个视野(n=3)被定量。对于器官型组织免疫荧光,每个条件用Fiji-Image J软件处理五张不同的Z-栈图像。对于CD8⁺T细胞,计算了CD8⁺T细胞在总群体中所占的百分比。图中数据表示为平均值±SEM。

[0331] 免疫荧光抗体:人/鼠CCL2(诺伟司生物制剂公司,1:200)、人/鼠CD11b(艾博抗公司;1:2000)、人/鼠Iba1(和光公司(Wako);1:1000)、鼠CD68(艾博抗公司;1:200)、人/鼠CD206(艾博抗公司;1:500)、鼠CD163(艾博抗公司;1:200)、CXCL9(鼠,诺伟司生物制剂公司,1:200;人,赛默飞世尔科技公司1:200)和人CD8(DAKO;1:200)。

[0332] 实例30-LIF对小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)的原代培养的作用

[0333] 研究了LIF对小鼠BMDM原代培养的作用,以探索LIF在巨噬细胞中调节CXCL9和CCL2的分子机制。LIF调节了BMDM中IFN γ 或IL4诱导的几种M1样和M2样标记物的表达(图22A)。除了当用IFN γ 处理BMDM时,未检测到CXCL9表达。重组LIF在mRNA和蛋白质水平上均阻遏了IFN γ 对CXCL9的诱导(图22B和22C)。从新鲜的人GBM肿瘤获得的患者来源的TAM(CD11b⁺CD14⁺)中,CXCL9也受到IFN γ 和LIF的调节(图22D和29A)。在观察到重组LIF在mRNA和蛋白质水平上均阻遏LPS对CXCL9的诱导后,进一步验证了这些结果。(图29B)。因此,LIF充当CXCL9诱导的阻遏物。用LIF治疗后未观察到p-STAT3的CXCL9启动子结合(数据未显示)。与此相符,发现LIF治疗增加三甲基化H3赖氨酸27(H3K27me3)的水平,降低乙酰化H4(H4ac)的水平,并增加EZH2与CXCL9启动子区的结合,表明LIF通过表观遗传沉默调节CXCL9表达(图22E)。

[0334] 材料和方法

[0335] 从六到十周龄的C57BL/6小鼠中获得了骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)。简而言之,将骨髓前体培养在补充有20%热灭活的FBS和30%L细胞条件培养基(cm)的DMEM(生命技术公司)中,作为巨噬细胞集落刺激因子的来源。培养6天后获得分化的巨噬细胞。从生长在补充有10%热灭活的FBS的DMEM(生命技术公司)中的L929细胞获得L细胞cm。从人GBM样本中分离出人巨噬细胞。简而言之,用肿瘤解离试剂盒酶促消化肿瘤组织,并使用CD11b磁珠和MultiMACS Cell24分离器Plus(均来自美天旎生物技术公司)分离CD11b⁺细胞。将获得的CD11b⁺细胞在补充有10%热灭活的FBS的RPMI培养基(生命技术公司)中培养。重组LIF、IFN γ 、LPS和IL4分别购自密理博公司、R&D系统公司(R&D Systems)、西格玛公司和创意百奥玛特公司(Creative BioMart)。

[0336] 染色质的免疫沉淀是根据Upstate(密理博公司)标准方案进行的。简而言之,将 1.2×10^7 个BMDM使用1%甲醛在37°C下固定10分钟,收获并超声处理以生成200-500bp的染色质片段。然后用2 μ g抗p-STAT3(Tyr705)抗体、抗三甲基-组蛋白H3(Lys27)(细胞信号传导公司)、抗乙酰基H4(密理博公司)或抗EZH2(密理博公司)免疫沉淀20 μ g剪切染色质过夜。使用20 μ g的蛋白G磁珠回收免疫复合物,洗涤并洗脱。交联在65°C 4h逆转,并使用来自凯杰公司的PCR纯化试剂盒回收了免疫沉淀的DNA。使用SYBR Green预混液(英杰公司)通过实时定量PCR(qPCR)鉴定目的基因组区。

[0337] 实例3-LIF对患者免疫细胞肿瘤浸润的调节

[0338] 为了证实LIF通过阻遏实际癌症患者肿瘤中的CXCL9来调节免疫细胞肿瘤浸润,从

患者新鲜获得的GBM样本中产生器官型组织培养物。这些器官型模型允许短期培养维持患者肿瘤组织结构和基质(包括免疫细胞)的肿瘤切片。来自3名肿瘤细胞表达高水平LIF的患者的器官型组织培养物(图22H)。通过Iba1标记物检测到,在所有3种培养物中均存在大量TAM浸润,大多数TAM表达CCL2、CD163和CD206。有趣的是,用针对LIF的中和抗体对器官型培养物进行3天的治疗促进了CCL2、CD163和CD206的减少以及CXCL9表达的增加(图22H)。

[0339] 材料和方法

[0340] 人GBM样本是从瓦尔德希伯隆大学医院和诊所医院获得的。该临床方案已获得瓦尔德希伯隆机构审查委员会和诊所医院(CEIC)的批准,征得了所有受试者的知情同意。

[0341] 如下所述产生GBM神经球。简而言之,在手术切除后30分钟内处理肿瘤样品。将人GBM样品的切碎肉块用200U/ml胶原酶I(西格玛公司)和500U/ml DNA酶I(西格玛公司)在PBS中在37℃下持续剧烈搅拌消化1h。将单细胞悬液通过70μm细胞过滤器(BD Falcon)过滤,并用PBS洗涤。最后,将细胞重悬,随后在GBM培养基中培养,该培养基由补充了B27、青霉素/链霉素(均来自生命技术公司)和生长因子(20ng/ml EGF和20ng/ml FGF-2(派普泰克公司))的神经元基础培养基组成。

[0342] GBM器官型切片培养物如下产生。切除后,用手术刀将手术样本切成5-10mm长和1-2mm宽的矩形块,并分别转移到6孔板内的0.4μm膜培养插入物(密理博公司)中。在将插入物放入6孔板之前,将补充有B27(生命技术公司)、青霉素/链霉素(生命技术公司)和生长因子(20ng/ml EGF和20ng/ml FGF-2)(PeproTech)的1.2ml神经元基础培养基(生命技术公司)放入每个孔中。将培养物保持在37℃,恒定湿度,95%空气和5%CO₂下。一天后,将切片用大鼠抗LIF阻断抗体或其相应的正常IgG(10μg/ml)处理3天。为了进行阻断CXCL9研究,将针对人CXCL9(R&D系统公司)的中和小鼠单克隆抗体以1.5μg/ml加入培养物中。在一些情况下,添加0.1ng/ml人rIFNγ(R&D系统公司)24h。平行地,通过使用Lymphosep(Biowest)的离心密度分离从同一患者的全血中获得外周血单核细胞(PBMC)。将PBMC冷冻保存在补充有10%灭活FBS和10%DMSO的RPMI培养基中直至使用。对于免疫细胞浸润测定,将对照或抗LIF切片包埋入基质胶(Matrigel)(康宁公司(Corning))中,随后将1x 10⁶个PBMC加入24孔板中的完全RPMI培养基中。另外,收集上清液并从基质胶回收器官型切片,并进一步处理以用于IF和流式细胞术。在一些条件下,用浓度为10⁶个细胞/ml的PBS重悬PBMC,并与5μM细胞追踪CFSE(英杰公司)一起孵育20分钟。孵育后,将细胞用RPMI洗涤并添加到包埋入基质胶的切片中。24h后,通过在每种条件下计数五个不同区域中的迁移细胞,在显微镜下评估侵入基质胶的荧光PBMC。

[0343] 实例32-用抗LIF治疗在表达高水平LIF的肿瘤中增加了CXCL9并降低了CCL2表达

[0344] 评估了LIF对免疫细胞肿瘤浸润的影响。在抗LIF治疗之后,将来自3名表达高水平LIF的肿瘤的患者器官型切片与来自同一患者的外周血单核细胞(PBMC)一起孵育(图23A)。用抗LIF治疗增加了CXCL9并降低了CCL2表达(图23B),并诱导免疫细胞浸润到肿瘤样本周围的基质胶中(图23B)。值得注意的是,CD8⁺T细胞在LIF阻断后被募集到肿瘤组织中(图23B、23C),并且这种作用取决于CXCL9,因为中和CXCL9阻止CD8⁺T细胞浸润(图23D)。

[0345] 在体内模型的背景下证实了类似的结果。在NSG小鼠中接种了来自其肿瘤表达高LIF水平的4个患者的肿瘤片段,并用LIF中和抗体对这些小鼠进行5天的治疗。接下来,在小鼠中接种每个患者的PBMC。有趣的是,用抗LIF治疗的小鼠显示出CD8⁺T细胞肿瘤浸润的增

加,并且大多数浸润性CD8⁺T细胞表达CXCL9受体CXCR3(图23E)。

[0346] 实例33-通过PD1阻断增加抗肿瘤反应

[0347] 用抗LIF和抗PD1抗体治疗了带有明显肿瘤的小鼠模型,与GL261N、RCAS和ID8肿瘤中的每种单独治疗相比,观察到LIF和PD1阻断的组合进一步降低了肿瘤的生长(图30)。而且重要的是,抗LIF和抗PD1的组合治疗增加总存活率并诱导肿瘤消退(图23F和23G)。

[0348] 收集展现完全肿瘤消退的小鼠,并重新接种 3×10^5 个肿瘤细胞。在这些小鼠中没有肿瘤显现,而在平行接种相同数量细胞的幼稚小鼠中肿瘤迅速生长(图23H)。该再激发实验的结果指示,抗LIF和抗PD1的组合治疗产生了免疫记忆。

[0349] 要求保护的发明的实施例

[0350] 本文描述了本文描述的本发明的具体实施例。

[0351] 1. 白血病抑制因子(LIF)结合多肽与PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂组合治疗个体的癌症的用途。

[0352] 2. 如实施例1所述的用途,其中将该LIF结合多肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以分开的配制品施用给该个体。

[0353] 3. 如实施例1所述的用途,其中将该LIF结合多肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以相同的配制品施用给该个体。

[0354] 4. 如实施例1或2所述的用途,其中在将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体之前,将该LIF结合多肽施用给该个体。

[0355] 5. 如实施例1或2所述的用途,其中在将该LIF结合多肽施用给该个体之前,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

[0356] 6. 如实施例1或2所述的用途,其中在将该LIF结合多肽施用给该个体的同时,将该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂施用给该个体。

[0357] 7. 如实施例1至6中任一项所述的用途,其中该LIF结合多肽包括免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白重链恒定区的片段。

[0358] 8. 如实施例1至7中任一项所述的用途,其中该LIF结合多肽包括与LIF特异性结合的抗体。

[0359] 9. 如实施例8所述的用途,其中该与LIF特异性结合的抗体包括至少一个衍生自人抗体框架区的框架区。

[0360] 10. 如实施例8所述的用途,其中该与LIF特异性结合的抗体是人源化的。

[0361] 11. 如实施例8所述的用途,其中该与LIF特异性结合的抗体是去免疫化的。

[0362] 12. 如实施例8所述的用途,其中该与LIF特异性结合的抗体包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。

[0363] 13. 如实施例8所述的用途,其中该与LIF特异性结合的抗体是IgG抗体。

[0364] 14. 如实施例8所述的用途,其中该与LIF特异性结合的抗体是Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。

[0365] 15. 如实施例8至14中任一项所述的用途,其中该与LIF特异性结合的抗体包括:

[0366] a) 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0367] b) 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐

述的氨基酸序列；

[0368] c) 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列；

[0369] d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列；

[0370] e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列；以及

[0371] f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

[0372] 16. 如实施例8至15中任一项所述的用途, 其中该与LIF特异性结合的抗体包括：

[0373] a) 免疫球蛋白重链可变区 (VH) 序列, 其具有与SEQ ID NO:41、42、44或66中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；以及

[0374] b) 免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 序列, 其具有与SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0375] 17. 如实施例16所述的用途, 其中该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同；并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同。

[0376] 18. 如实施例17所述的用途, 其中该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同；并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。

[0377] 19. 如实施例8至15中任一项所述的用途, 其中该与LIF特异性结合的抗体包括：

[0378] a) 免疫球蛋白重链序列, 其具有与SEQ ID NO:57-60或67中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；以及

[0379] b) 免疫球蛋白轻链序列, 其具有与SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0380] 20. 如实施例8至19中任一项所述的用途, 其中该与LIF特异性结合的抗体以小于约200皮摩尔的 K_D 结合。

[0381] 21. 如实施例8至19中任一项所述的用途, 其中该与LIF特异性结合的抗体以小于约100皮摩尔的 K_D 结合。

[0382] 22. 如实施例8至21中任一项所述的用途, 其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括抗体或其PD-1、PDL-1或PDL-2结合片段。

[0383] 23. 如实施例22所述的用途, 其中该抗体特异性结合PD-1。

[0384] 24. 如实施例22所述的用途, 其中该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。

[0385] 25. 如实施例22所述的用途, 其中该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。

[0386] 26. 如实施例25所述的用途, 其中该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。

[0387] 27. 如实施例8至16中任一项所述的用途, 其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。

- [0388] 28. 如实施例27所述的用途,其中该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。
- [0389] 29. 如实施例1至28中任一项所述的用途,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。
- [0390] 30. 如实施例29所述的用途,其中PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的该小分子抑制剂包括:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基]氨基}乙基}乙酰胺(BMS 202);(2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N₂,N₆-双(L-丝氨酰基-L-天冬氨酰基-L-苏氨酰基-L-丝氨酰基-L- α -谷氨酰基-L-丝氨酰基-L-苯丙氨酰基)-L-赖氨酰基-L-苯丙氨酰基-L-精氨酸基-L-戊基-L-苏氨酰基-L-谷氨酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-脯氨酰基-L-赖氨酰基-L-丙氨酰基-L-谷氨酰基-L-异亮氨酰基-L-赖氨酰基;(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苄基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酰胺,N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酰基-N-甲基-L-丙氨酰基-L-天冬氨酰基-L-脯氨酰基-L-组氨酰基-L-亮氨酰基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酰基-L-丝氨酰基-L-色氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-L-精氨酰基-L-半胱氨酰基-,环状(1 \rightarrow 14)-硫醚;或其衍生物或类似物。
- [0391] 31. 如实施例1至30中任一项所述的用途,其中该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。
- [0392] 32. 如实施例31所述的用途,其中该癌症包括非小细胞肺癌、上皮性卵巢癌或胰腺导管腺癌。
- [0393] 33. 如实施例1至32中任一项所述的用途,其中该癌症对于以单一疗法施用的治疗量的LIF结合多肽或PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂的治疗是难治的。
- [0394] 34. 一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:
- [0395] a) 白血病抑制因子(LIF)结合多肽;以及
- [0396] b) PD-1(CD279)、PDL-1(CD274)或PDL-2(CD273)信号传导抑制剂。
- [0397] 35. 如实施例34所述的方法,其中将该LIF结合多肽和该PD-1(CD279)、PDL-1(CD274)或PDL-2(CD273)信号传导抑制剂分开施用。
- [0398] 36. 如实施例34所述的方法,其包括将有效量的该LIF结合多肽施用给该患有癌症的个体。
- [0399] 37. 如实施例34所述的方法,其包括将有效量的该PD-1抑制剂施用给该患有癌症的个体。
- [0400] 38. 如实施例34至37中任一项所述的方法,其中该LIF结合多肽包括免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白重链恒定区的片段。
- [0401] 39. 如实施例34至37中任一项所述的方法,其中该LIF结合多肽包括与LIF特异性结合的抗体。
- [0402] 40. 如实施例39所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体包括至少一个衍生自

人抗体框架区的框架区。

[0403] 41. 如实施例39所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体是人源化的。

[0404] 42. 如实施例39所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体是去免疫化的。

[0405] 43. 如实施例39所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。

[0406] 44. 如实施例39所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体是IgG抗体。

[0407] 45. 如实施例39所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体是Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。

[0408] 46. 如实施例39至45中任一项所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体包括:

[0409] a) 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0410] b) 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0411] c) 免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0412] d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0413] e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;以及

[0414] f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

[0415] 47. 如实施例39至46中任一项所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体包括:

[0416] a) 免疫球蛋白重链可变区(VH)序列,其具有与SEQ ID NO:41、42、44或66中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及

[0417] b) 免疫球蛋白轻链可变区(VL)序列,其具有与SEQ ID NO:45-48中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0418] 48. 如实施例47所述的方法,其中该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同。

[0419] 49. 如实施例48所述的方法,其中该VH序列与SEQ ID NO:42所阐述的氨基酸序列相同;并且该VL序列与SEQ ID NO:46所阐述的氨基酸序列相同。

[0420] 50. 如实施例39至46中任一项所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体包括:

[0421] a) 免疫球蛋白重链序列,其具有与SEQ ID NO:57-60或67中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;以及

[0422] b) 免疫球蛋白轻链序列,其具有与SEQ ID NO:61-64中任一项所阐述的氨基酸序列至少约80%、90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0423] 51. 如实施例39至50中任一项所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体以小于约200皮摩尔的K_D结合。

- [0424] 52. 如实施例39至50中任一项所述的方法,其中该与LIF特异性结合的抗体以小于约100皮摩尔的 K_D 结合。
- [0425] 53. 如实施例34至52中任一项所述的方法,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括抗体或其PD-1、PDL-1或PDL-2结合片段。
- [0426] 54. 如实施例53所述的方法,其中该抗体特异性结合PD-1。
- [0427] 55. 如实施例54所述的方法,其中该抗体包括帕博利珠单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、斯巴达珠单抗或其PD-1结合片段。
- [0428] 56. 如实施例53所述的方法,其中该抗体特异性结合PDL-1或PDL-2。
- [0429] 57. 如实施例56所述的方法,其中该抗体包括德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2结合片段。
- [0430] 58. 如实施例34至52中任一项所述的方法,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括结合PD-1、PDL-1或PDL-2的Fc融合蛋白。
- [0431] 59. 如实施例58所述的方法,其中该Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。
- [0432] 60. 如实施例34至52中任一项所述的方法,其中该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂包括PD-1、PDL-1或PDL-2小分子抑制剂。
- [0433] 61. 如实施例60所述的方法,其中PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导的该小分子抑制剂包括:N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基]氨基}乙基}乙酰胺(BMS 202);(2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-5-甲基苄基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苄基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)苄基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶;L- α -谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酸基-L-天冬酰胺基-L-苏氨酸基-L-丝氨酸基-L- α -谷氨酸基-L-丝氨酸基-L-苯丙氨酸基)-L-赖氨酸基-L-苯丙氨酸基-L-精氨酸基-L-戊氨酸基-L-苏氨酸基-L-谷氨酸基-L-亮氨酸基-L-丙氨酸基-L-脯氨酸基-L-赖氨酸基-L-丙氨酸基-L-谷氨酸基-L-异亮氨酸基-L-赖氨酸基;(2S)-1-[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酸, N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酸基-N-甲基-L-丙氨酸基-L-天冬氨酸基-L-脯氨酸基-L-组氨酸基-L-亮氨酸基-N-甲基甘露糖基-L-色氨酸基-L-丝氨酸基-L-色氨酸基-N-甲基-L-正亮氨酸-N-甲基-L-正亮氨酸-L-精氨酸基-L-半胱氨酸基-, 环状(1 \rightarrow 14)-硫醚;或其衍生物或类似物。
- [0434] 62. 如实施例34至61中任一项所述的方法,其中该癌症包括晚期实体瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、食道癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、软组织癌或其任何组合。
- [0435] 63. 如实施例62所述的方法,其中该癌症包括非小细胞肺癌、上皮性卵巢癌或胰腺导管腺癌。
- [0436] 64. 如实施例34至63中任一项所述的方法,其中该癌症对于治疗量的LIF结合多肽抑制剂的治疗是难治的。
- [0437] 65. 如实施例34至63中任一项所述的方法,其中该癌症对于治疗量的PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂的治疗是难治的。
- [0438] 66. 如实施例34至65中任一项所述的方法,其中将该白血病抑制因子(LIF)结合多

肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂分开施用。

[0439] 67. 如实施例34至65中任一项所述的方法, 其中将该LIF结合多肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂同时施用。

[0440] 68. 如实施例34至65中任一项所述的方法, 其中将该LIF结合多肽和该PD-1、PDL-1或PDL-2信号传导抑制剂以单一组合物施用。

[0441] 69. 特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体与PD-1或PDL-1结合抗体组合用于治疗个体的癌症的用途, 其中该LIF结合抗体包括:

[0442] a) 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1), 其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0443] b) 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0444] c) 免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0445] d) 免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0446] e) 免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列; 以及

[0447] f) 免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列。

[0448] 70. 一种治疗患有癌症的个体的方法, 其包括向该患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:

[0449] a) 特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体, 该抗体包括:

[0450] i. 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1), 其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0451] ii. 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0452] iii. 免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0453] iv. 免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0454] v. 免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列; 和

[0455] vi. 免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列; 以及

[0456] b) PD-1或PDL-1结合抗体。

[0457] 71. 如实施例70所述的方法, 其包括将有效量的该特异性结合LIF的抗体施用给该患有癌症的个体。

[0458] 72. 如实施例70所述的方法, 其包括将有效量的该PD-1或PDL-1结合抗体施用给该患有癌症的个体。

[0459] 73.如实施例70至72中任一项所述的方法,其中将该特异性结合LIF的抗体和该PD-1或PDL-1结合抗体分开施用。

[0460] 74.如实施例70至73中任一项所述的方法,其中该癌症为多形性胶质母细胞瘤(GBM)、NSCLC(非小细胞肺癌)、卵巢癌、结肠直肠癌、甲状腺癌、胰腺癌或其组合。

[0461] 75.一种减少患有癌症的个体的肿瘤中的肿瘤前肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的方法,其包括向患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:

[0462] a) 特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,该抗体包括:

[0463] i. 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0464] ii. 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0465] iii. 免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0466] iv. 免疫球蛋白轻链互补决定区1(VL-CDR1),其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0467] v. 免疫球蛋白轻链互补决定区2(VL-CDR2),其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列;和

[0468] vi. 免疫球蛋白轻链互补决定区3(VL-CDR3),其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列;以及

[0469] b) PD-1或PDL-1结合抗体。

[0470] 76.如实施例75所述的方法,其包括将有效量的该特异性结合LIF的抗体施用给该患有癌症的个体。

[0471] 77.如实施例75所述的方法,其包括将有效量的该PD-1或PDL-1结合抗体施用给该患有癌症的个体。

[0472] 78.如实施例75至77中任一项所述的方法,其中将该特异性结合LIF的抗体和该PD-1或PDL-1结合抗体分开施用。

[0473] 79.如实施例75至78中任一项所述的方法,其中该TAM展现选自由CD11b、CD206和CD163组成的清单的任何1个、2个或3个分子的细胞表面表达。

[0474] 80.如实施例75至78中任一项所述的方法,其中该肿瘤包括肺肿瘤、脑肿瘤、胰腺肿瘤、乳腺肿瘤、肾肿瘤、结肠直肠肿瘤、卵巢肿瘤或其组合。

[0475] 81.一种在患有癌症的个体中产生免疫记忆的方法,其包括向患有癌症的个体施用有效量的以下项的组合:

[0476] a) 特异性结合白血病抑制因子(LIF)的抗体,该抗体包括:

[0477] i. 免疫球蛋白重链互补决定区1(VH-CDR1),其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0478] ii. 免疫球蛋白重链互补决定区2(VH-CDR2),其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;

[0479] iii. 免疫球蛋白重链互补决定区3(VH-CDR3),其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;

- [0480] iv. 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;
- [0481] v. 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列; 和
- [0482] vi. 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列; 以及
- [0483] b) PD-1或PDL-1结合抗体。
- [0484] 82. 如实施例81所述的方法, 其包括将有效量的该特异性结合LIF的抗体施用给该患有癌症的个体。
- [0485] 83. 如实施例81所述的方法, 其包括将有效量的该PD-1或PDL-1结合抗体施用给该患有癌症的个体。
- [0486] 84. 如实施例81至83中任一项所述的方法, 其中将该特异性结合LIF的抗体和该PD-1或PDL-1结合抗体分开施用。
- [0487] 85. 如实施例81至84中任一项所述的方法, 其中免疫记忆由CD8+T细胞介导。
- [0488] 86. 如实施例81至84中任一项所述的方法, 其中免疫记忆由CD4+T细胞介导。
- [0489] 87. 一种增加个体的肿瘤中的T淋巴细胞量的方法, 其包括向该患肿瘤的个体施用有效量的以下项的组合:
- [0490] a) 特异性结合白血病抑制因子 (LIF) 的抗体, 该抗体包括:
- [0491] i. 免疫球蛋白重链互补决定区1 (VH-CDR1), 其包括SEQ ID NO:1-3中任一项所阐述的氨基酸序列;
- [0492] ii. 免疫球蛋白重链互补决定区2 (VH-CDR2), 其包括SEQ ID NO:4或5中任一项所阐述的氨基酸序列;
- [0493] iii. 免疫球蛋白重链互补决定区3 (VH-CDR3), 其包括SEQ ID NO:6-8中任一项所阐述的氨基酸序列;
- [0494] iv. 免疫球蛋白轻链互补决定区1 (VL-CDR1), 其包括SEQ ID NO:9或10中任一项所阐述的氨基酸序列;
- [0495] v. 免疫球蛋白轻链互补决定区2 (VL-CDR2), 其包括SEQ ID NO:11或12中任一项所阐述的氨基酸序列; 和
- [0496] vi. 免疫球蛋白轻链互补决定区3 (VL-CDR3), 其包括SEQ ID NO:13所阐述的氨基酸序列; 以及
- [0497] b) PD-1或PDL-1结合抗体。
- [0498] 88. 如实施例87所述的方法, 其包括将有效量的该特异性结合LIF的抗体施用给该患有癌症的个体。
- [0499] 89. 如实施例87所述的方法, 其包括将有效量的该PD-1或PDL-1结合抗体施用给该患有癌症的个体。
- [0500] 90. 如实施例87所述的方法, 其中将该特异性结合LIF的抗体和该PD-1或PDL-1结合抗体分开施用。
- [0501] 91. 如实施例87至90中任一项所述的方法, 其中该T淋巴细胞包括CD8+T细胞。
- [0502] 92. 如实施例87至90中任一项所述的方法, 其中该T淋巴细胞包括CD4+T细胞。

[0503] 93.如实施例87至90中任一项所述的方法,其中该肿瘤包括肺肿瘤、脑肿瘤、胰腺肿瘤、乳腺肿瘤、肾肿瘤、结肠直肠肿瘤、卵巢肿瘤或其组合。

[0504] 虽然在本文示出并描述了本发明的优选实施例,但是对本领域技术人员显而易见的是此类实施例仅以示例性的方式提供。在不偏离本发明的情况下,本领域技术人员现在能想到众多变化、改变和取代。应当理解,在实施本发明时,可以采用本文描述的本发明的实施例的各种替代方案。

[0505] 本说明书中提到的所有公开、专利申请、授权专利以及其他文献均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物、专利申请、授权专利或其他文献被具体和单独地指示通过引用并入。在与本披露中的定义相矛盾的程度,通过引用并入的文本中所含的定义被排除。

[0506] 序列

SEQ ID NO	序列
1	GFTFSHAWMH
2	GFTFSHAW
3	HAWMH
4	QIKAKSDDYATYYAESVKG
5	IKAKSDDYAT
6	TCWEWDLDF
[0507] 7	WEWDLDF
8	TSWEWDLDF
9	RSSQSLLDSDGHTYLN
10	QSLLDSDGHTY
11	SVSNLES
12	SVS
13	MQATHAPPYT
14	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS
15	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSAAS

[0508]

16	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS
17	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATS
18	WVRQAPGKGLEWVA
19	WVRQAPGKGLEWVG
20	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC
21	RFSISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYC
22	RFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYC
23	WGQGTLLTVSS
24	WGQGTMTVTVSS
25	WGQGTTVTVSS
26	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
27	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC
28	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
29	DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISC
30	WFQQRPGQSPRRLIY
31	WLQQRPGQPPRLLIY
32	WLLQKPGQPPQLLIY
33	WLQQRPGQSPRRLIY
34	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYC
35	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
36	GVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYC
37	GVPDRFNGSGSGTDFTLSISRVEAEDVGVYYC
38	FGQGTKLEIK
39	FGGGTKVEIK
40	FGQGTKVEIK
41	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSHAWMHWVVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVK GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTLLTVSS
42	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWVVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTMTVTVSS
43	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHAWMHWVVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVK GRFSISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYCTCWEWDLDFWGQGTTVTVSS
44	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATS GFTFSHAWMHWVVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVK GRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTLLTVTVSS
45	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWVWFQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFSGS GSG TDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIK
46	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQPPRLIYSVSNLESGVPDRFSGS GAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIK

[0509]

47	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLLQKPGQPPQLLIYSVSNLESGVPNRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGGGTKVEIK
48	DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFNG SGSGTDFTLSISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKVEIK
49	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGFTFSHAWMHVWRQAPGKGLEW VAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVQLQESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSHAWMHVWRQAPGKGLEW VGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGT TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGVVQPGSRRLSCAASGFTFSHAWMHVWRQAPGKGLEW VAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFISRDNKNSLYLQMNLSRVEDTVVYYCTCWEWDLDFWGQGT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLMESGGGLVKGPGSLRLSCATSGFTFSHAWMHVWRQAPGKGLEW VGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	MVSSAQFLGLLLLCFQGTTRCDVVMVTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWFQQRPGQSP RRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
54	MVSSAQFLGLLLLCFQGTTRCDIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQPP RRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS

[0510]

	VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWLLQKPGQPPQ LLIYSVSNLESGVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGGGKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWLQQRPGQSP RRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
57	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVK GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDAVYYCTCWEWDLDFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCLASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDAVYYCTCWEWDLDFWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	EVQLVESGGGVVQGRSLRLSCLASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVK GRFSISRDNANKSLYLQMNSLRVEDTVVYYCTCWEWDLDFWGQGTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
60	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVK GRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDAVYYCTCWEWDLDFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0511]

61	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWFQQRPGQSPRRLIYVSVNLESGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
62	DIVMTQTPLSPPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQPPRLIYVSVNLESGVPDRFSGS GAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
63	DIVMTQTPLSLVTPGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLLQKPGQPQLLIYVSVNLESGVPNRFGSGG SGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
64	DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQSPRRLIYVSVNLESGVPDRFSGS GSGTDFTLISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
65	Blank
66	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTSEWEWDLDFWGQGTMTVSS
67	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTSEWEWDLDFWGQGTMTVSSASTKGPSVFLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
68	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEFPNNDKLCGPNVTDFFPF HANGTEKAKLVELYRIVVYLGTSIGNITRDQKILNPSALSLSKLNATADILRGLLSNVLRCRLCSKYHVGHV DVTYGPDTSGKDVFQKKLGCQLLGKYKQIIAVLAQAF

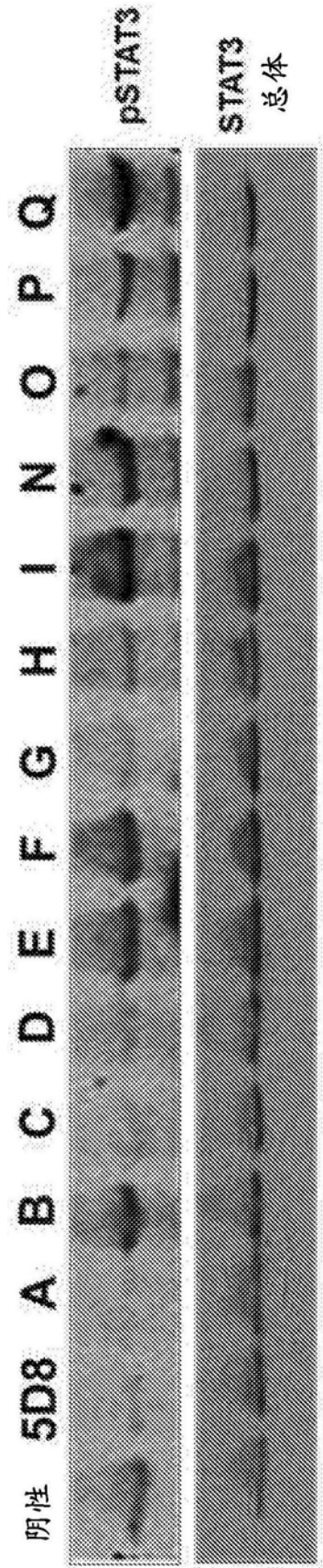


图1

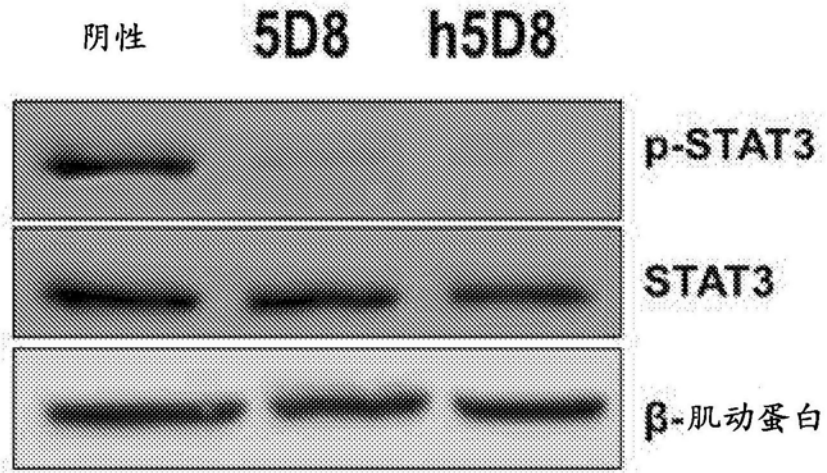


图2A

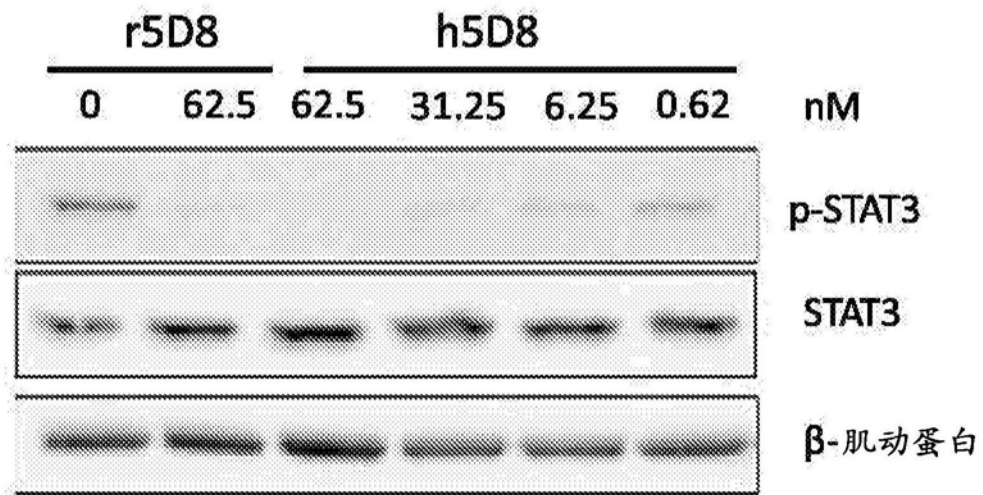


图2B

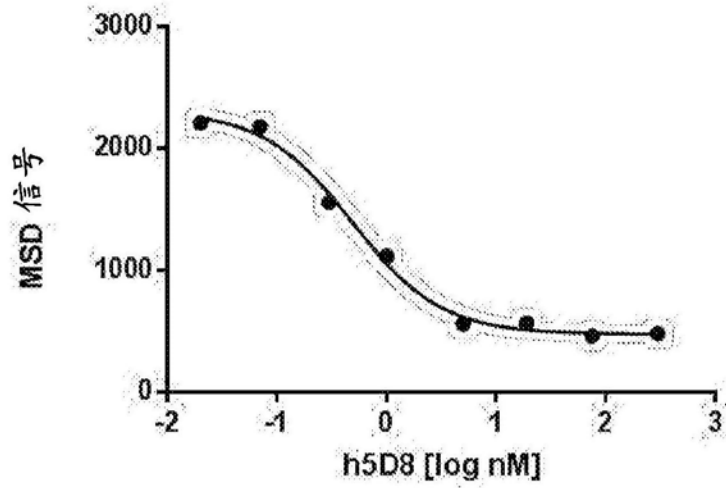


图3A

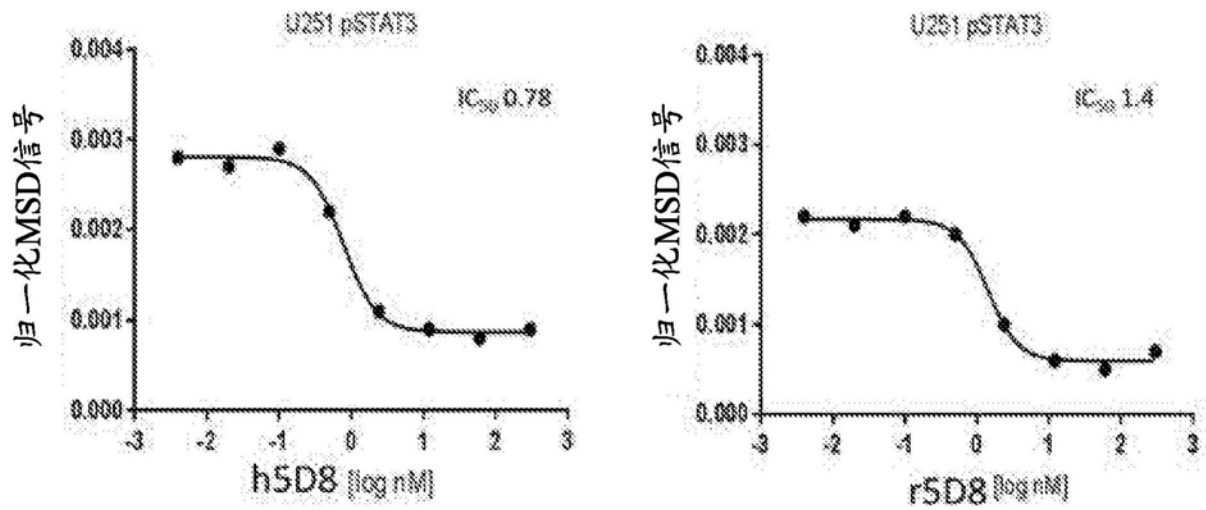


图3B

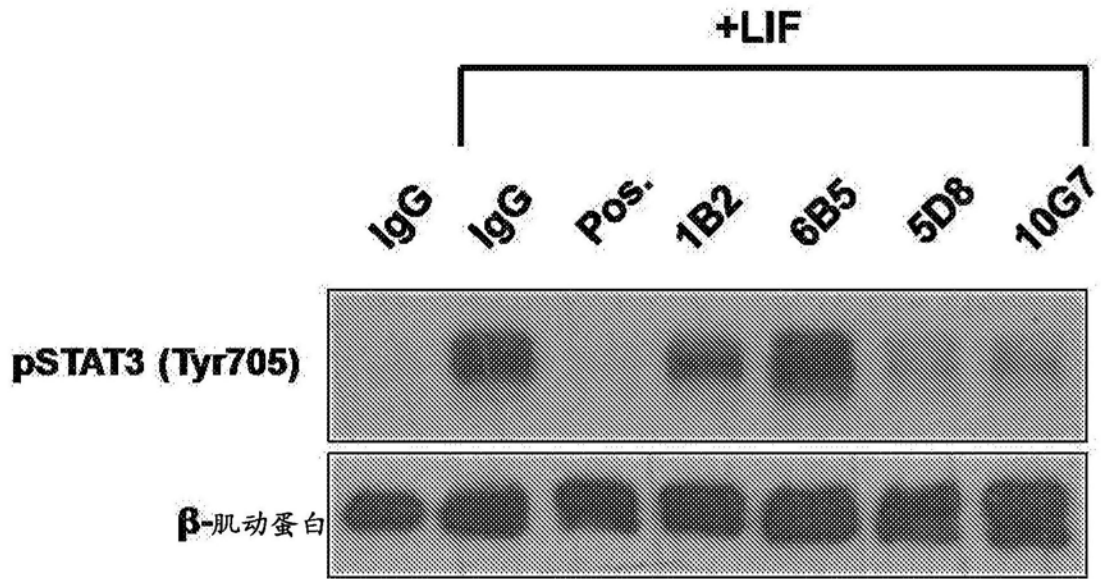


图4

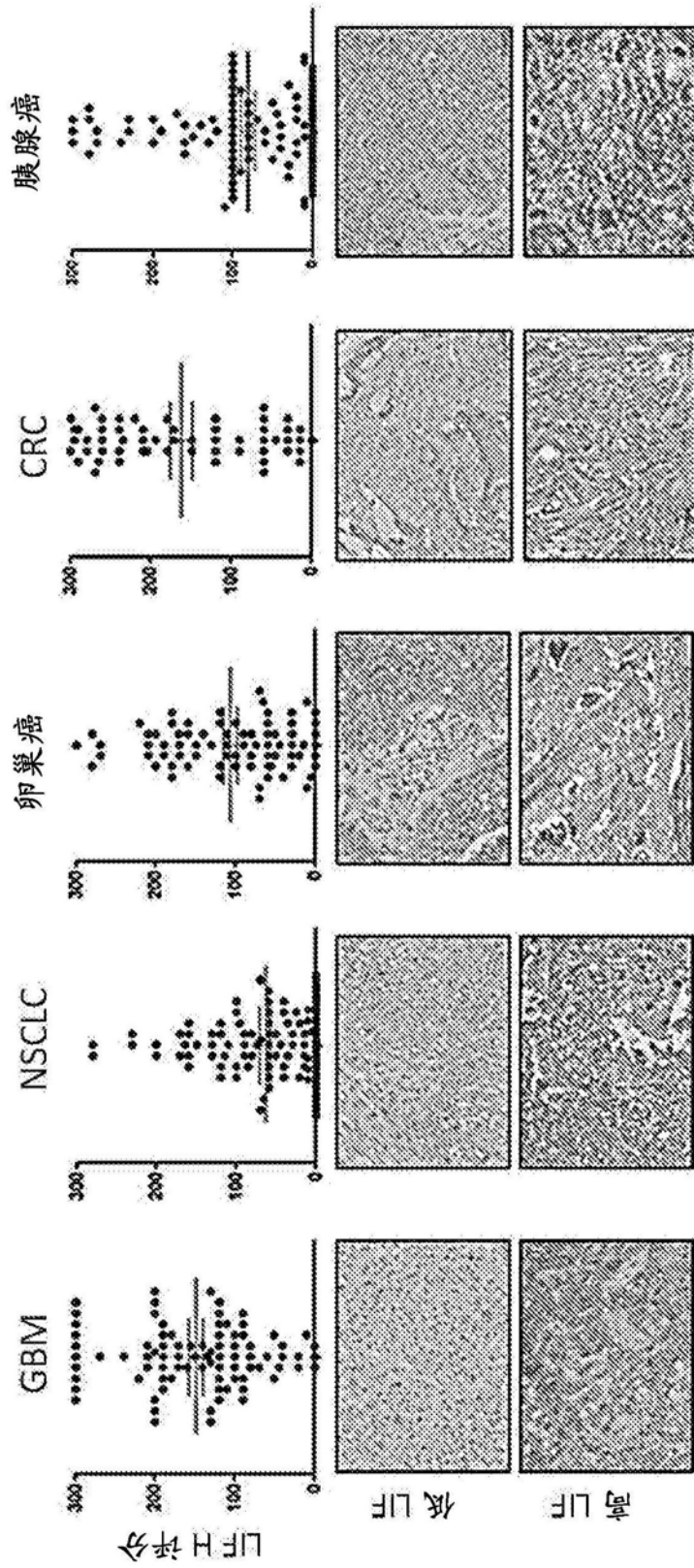


图5

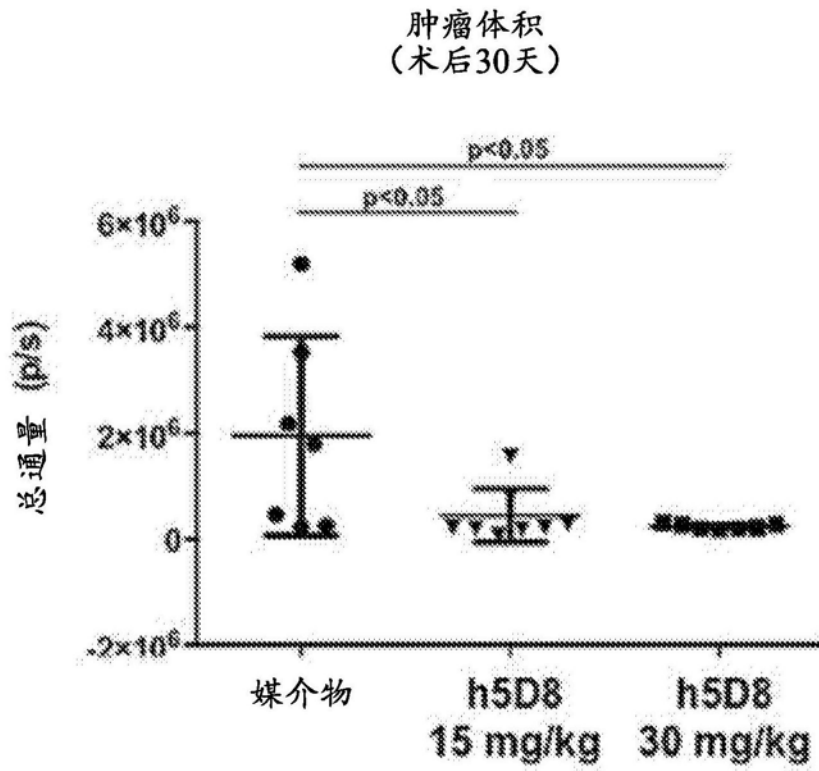


图6A

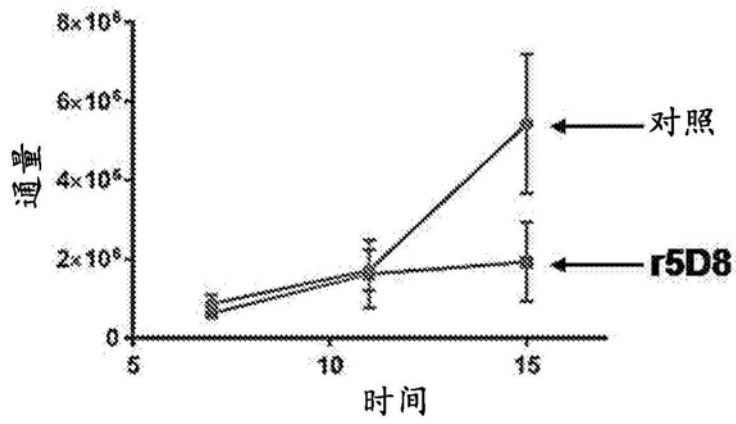


图6B

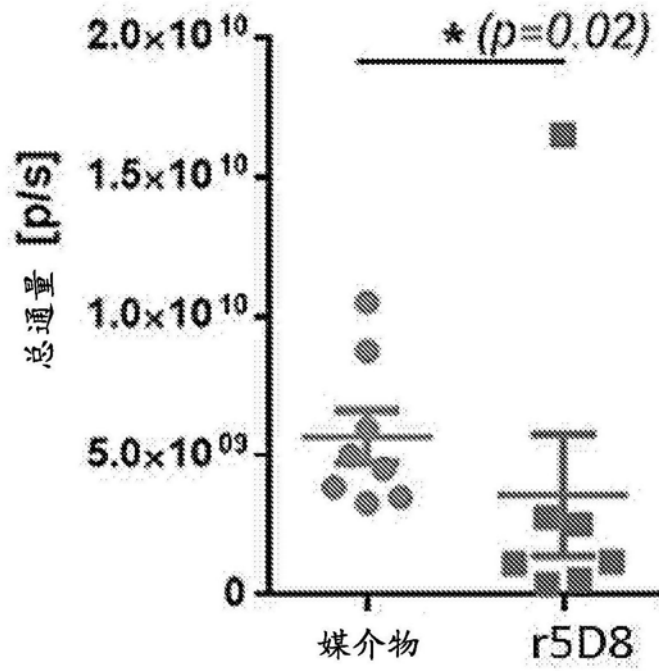


图7A

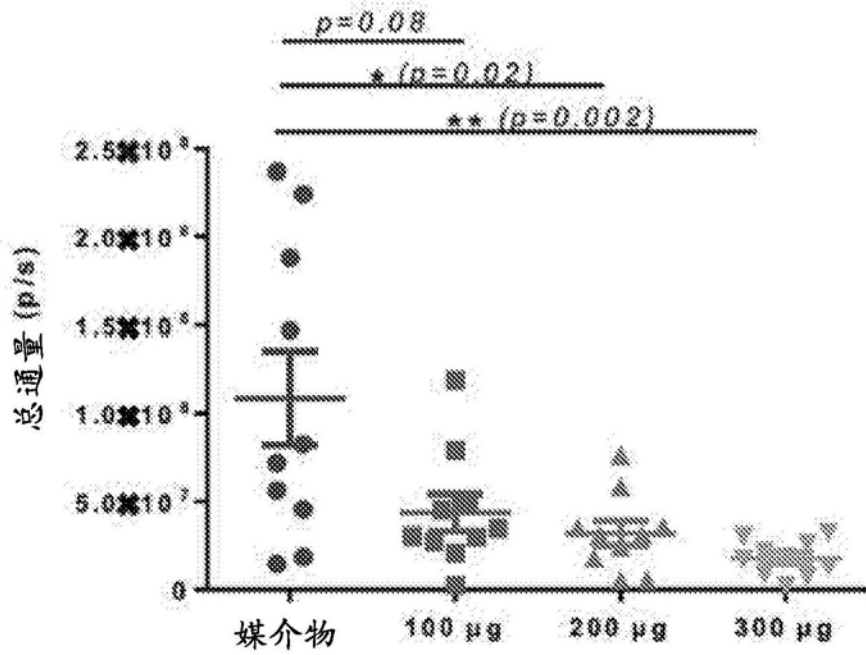


图7B

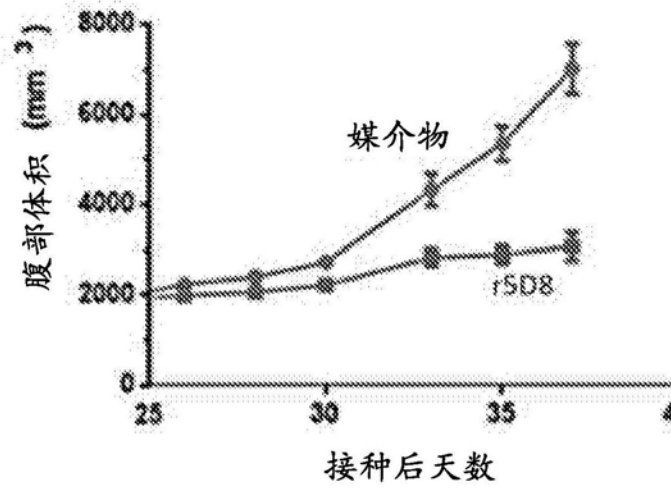


图8A

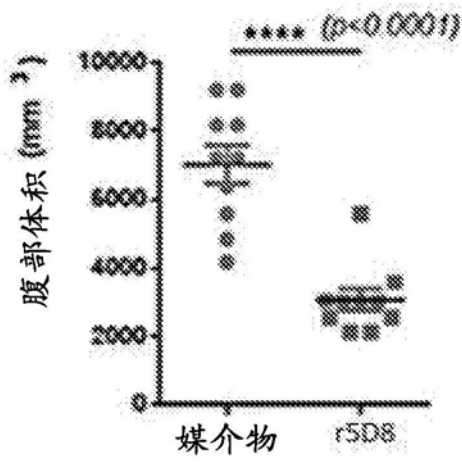


图8B

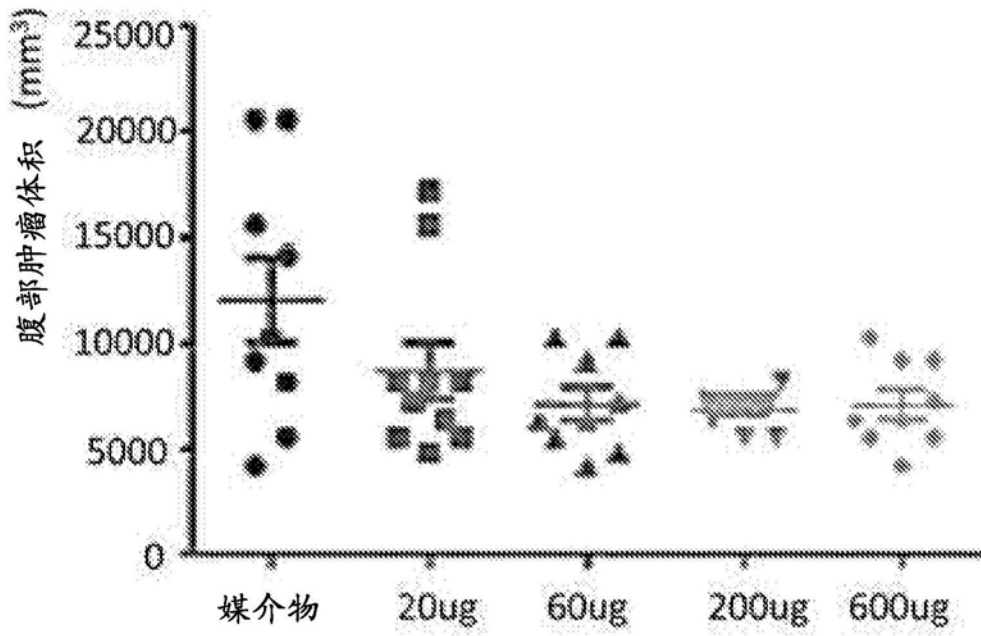


图8C

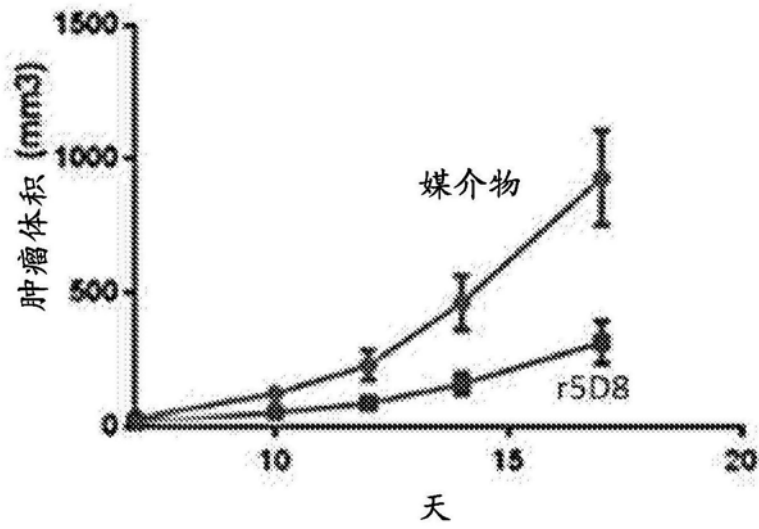


图9A

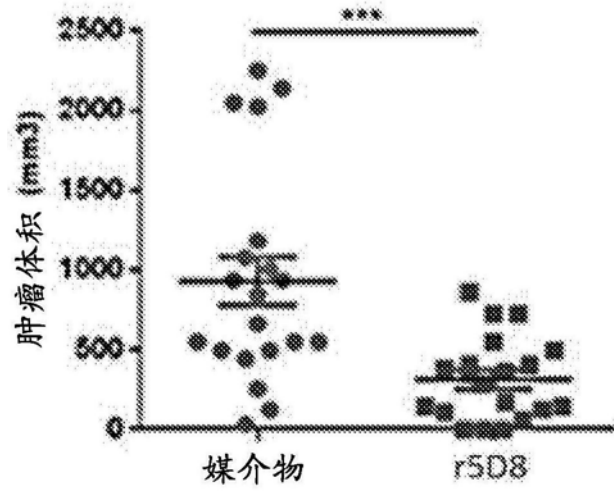


图9B

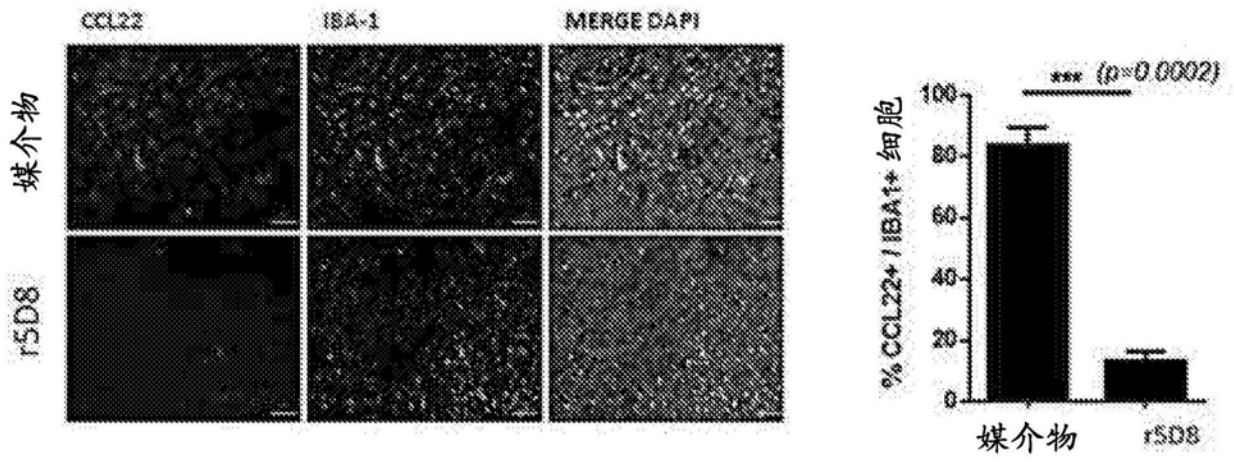


图10A

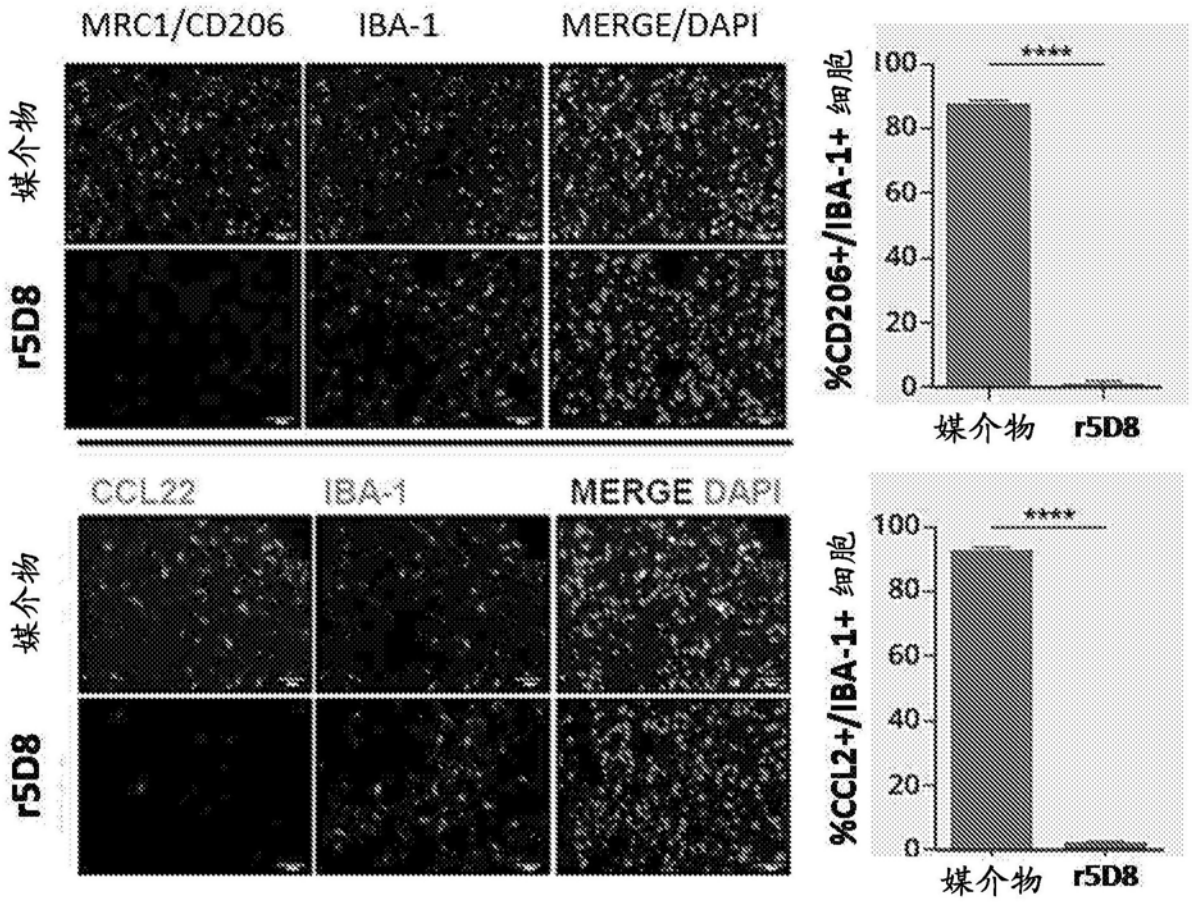


图10B

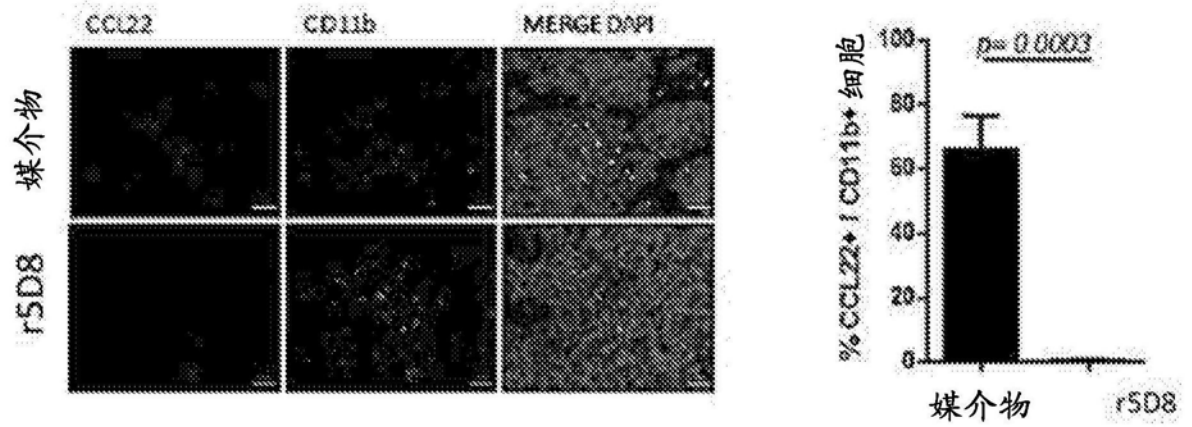


图10C

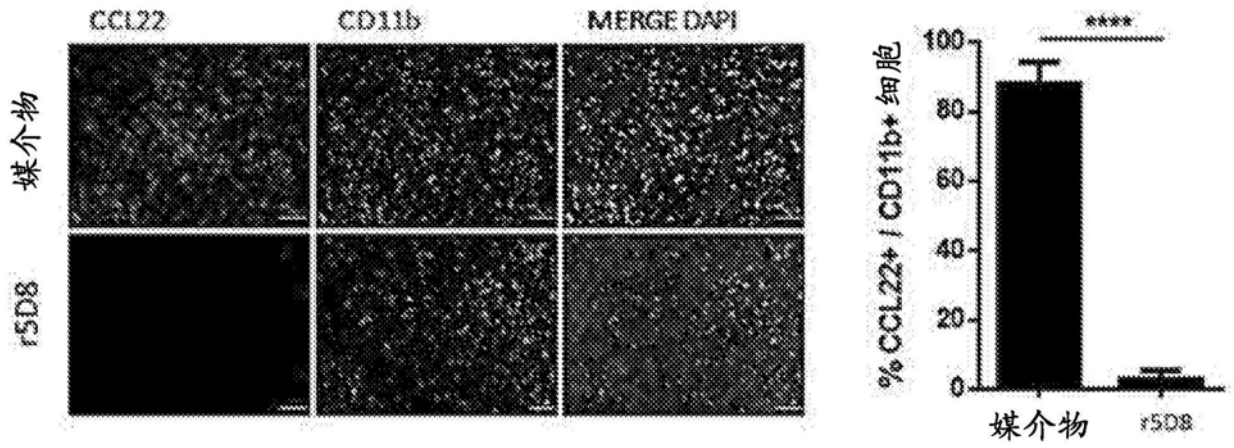


图10D

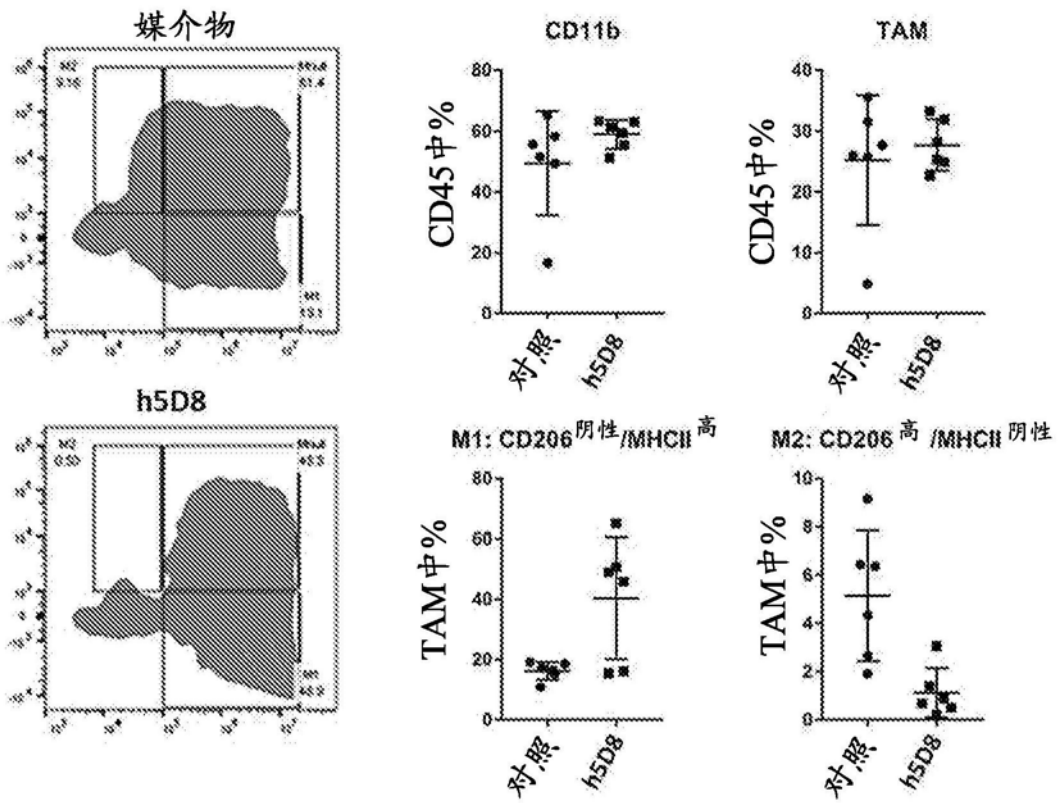


图10E

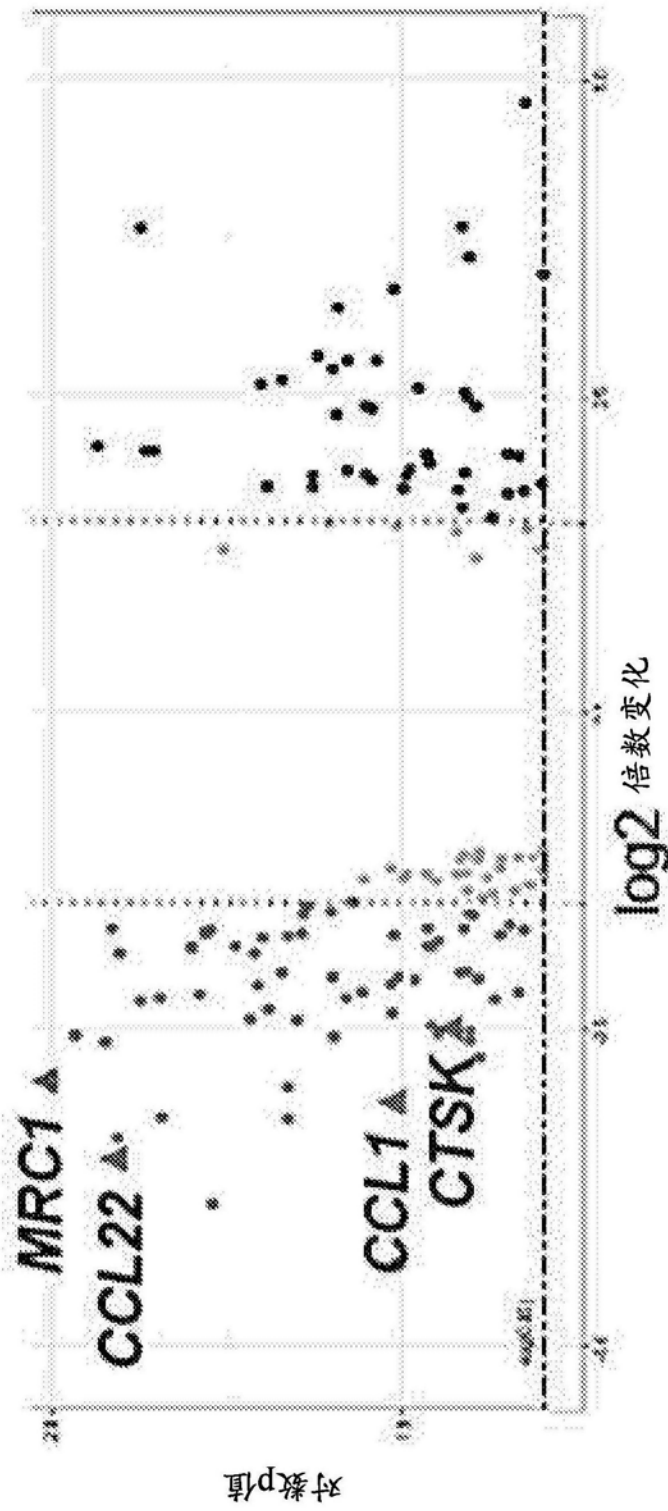


图10F

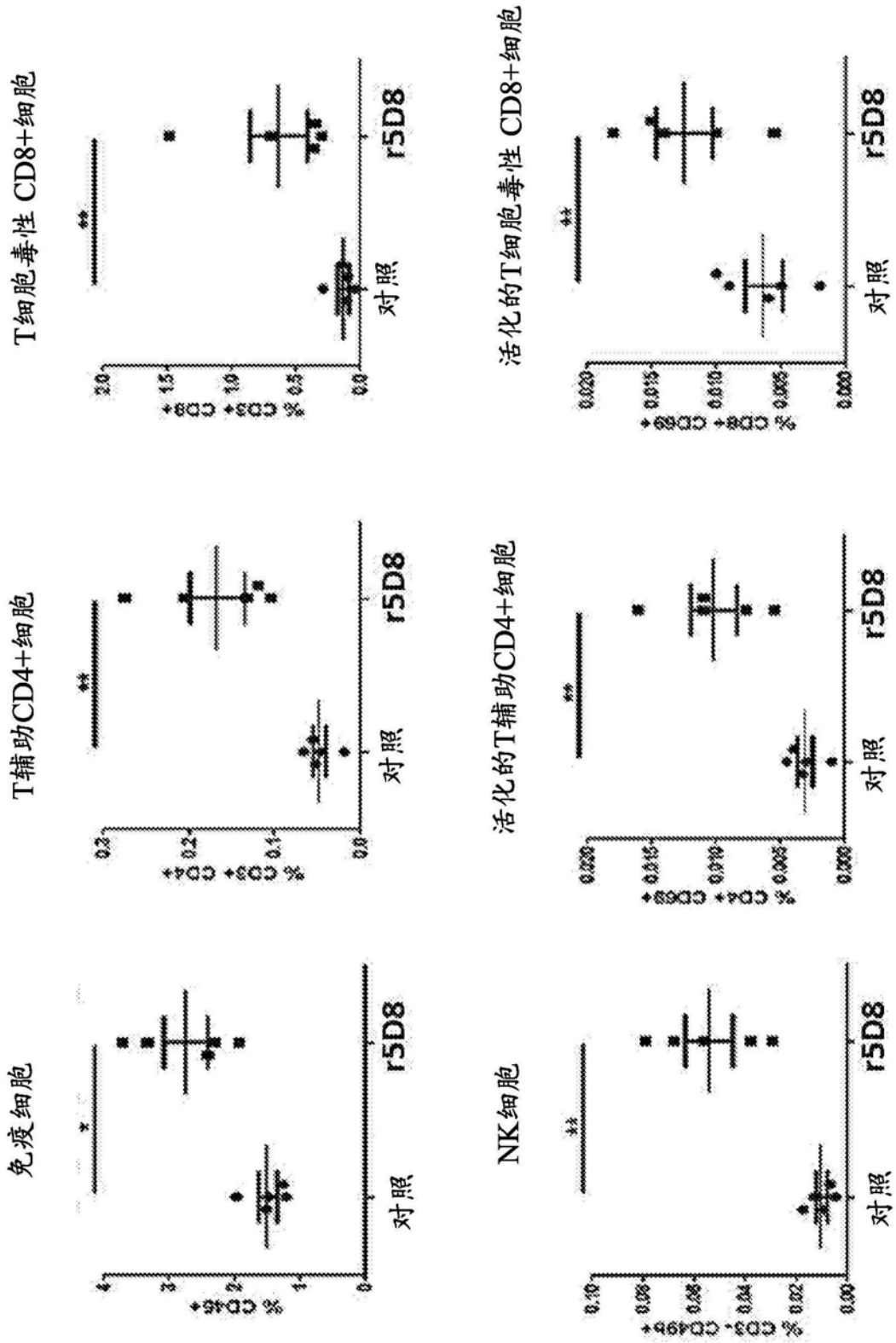


图11A

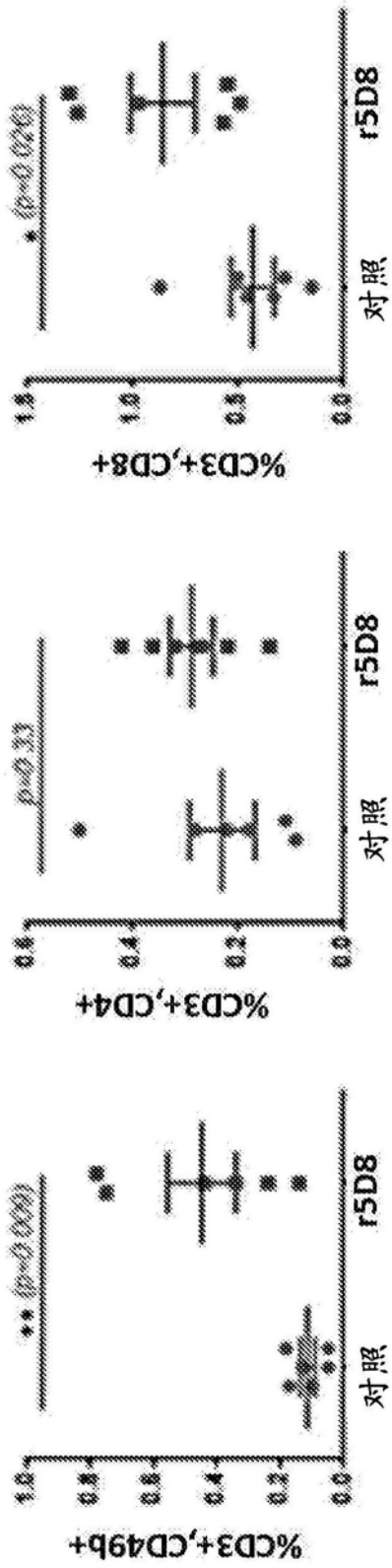


图11B

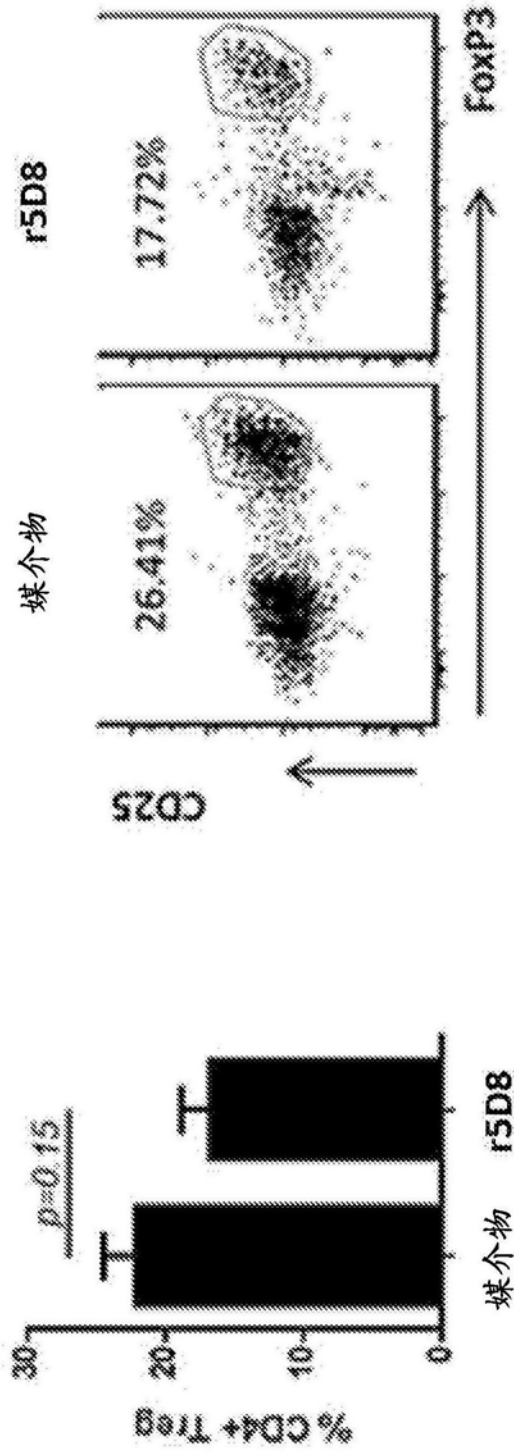


图11C

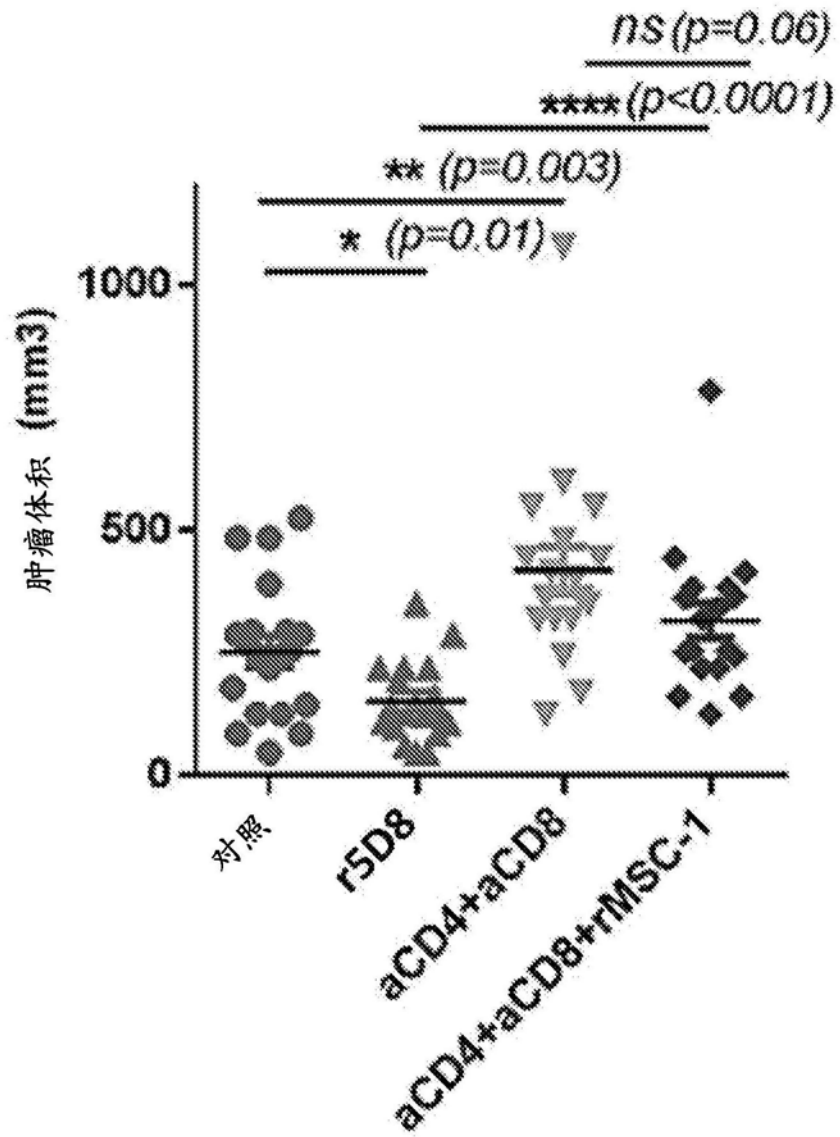


图12

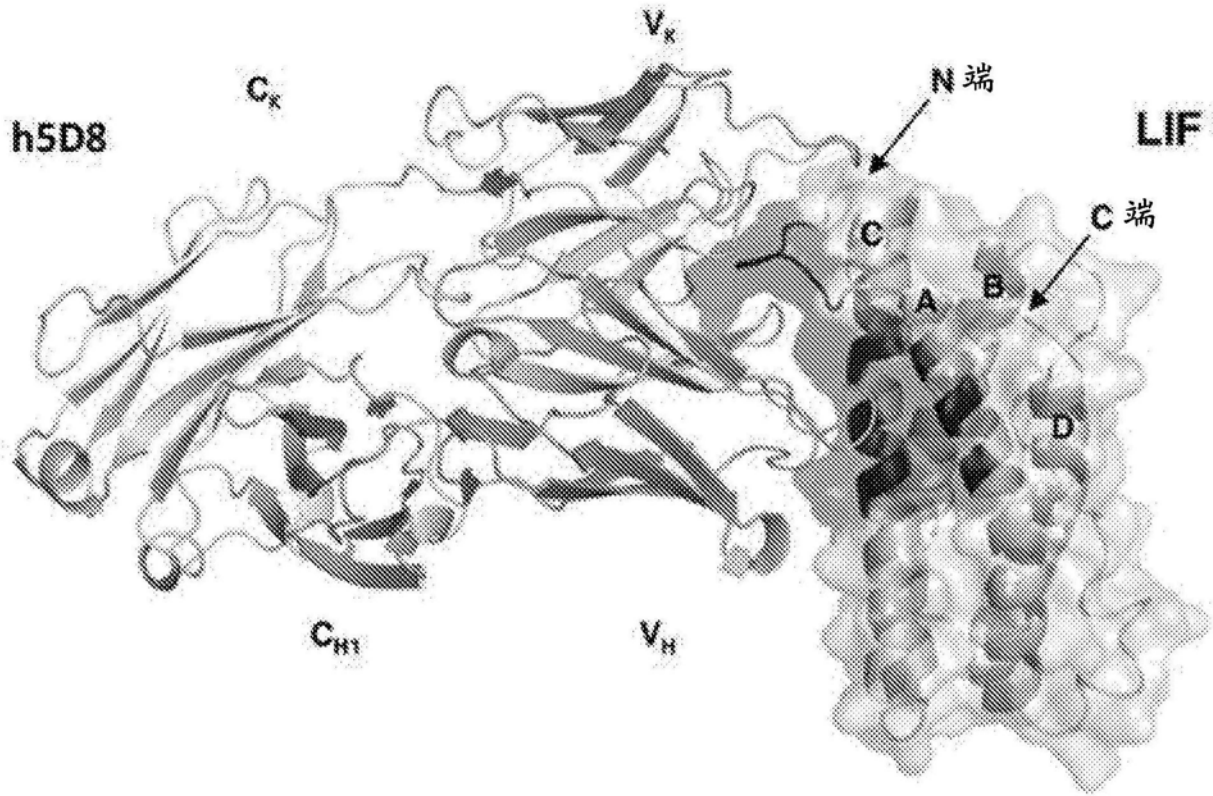


图13A

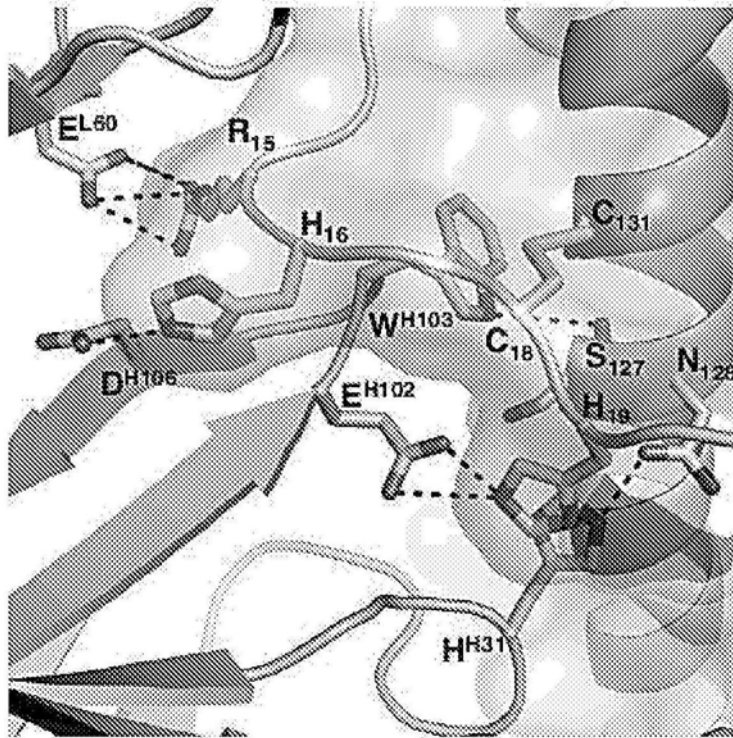


图13B

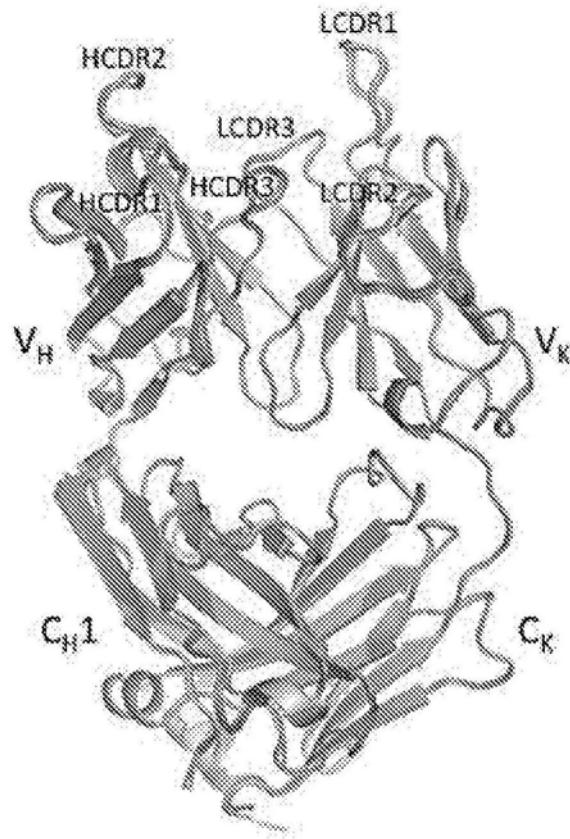


图14A

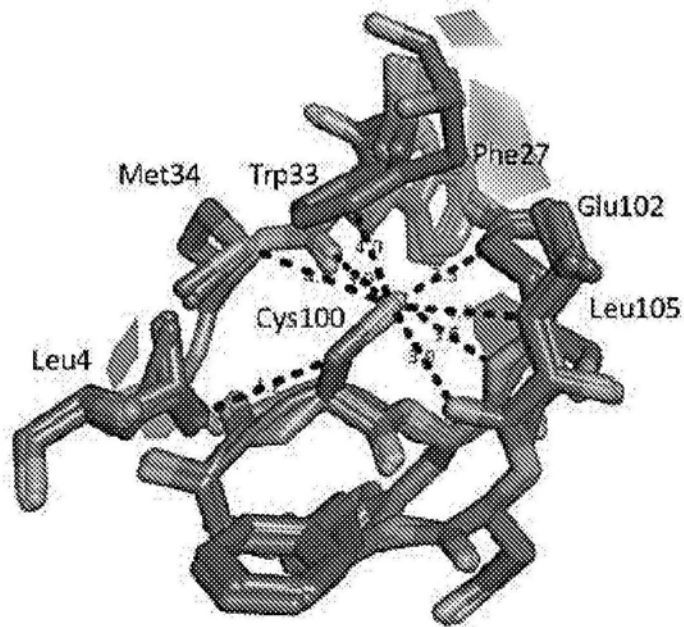


图14B

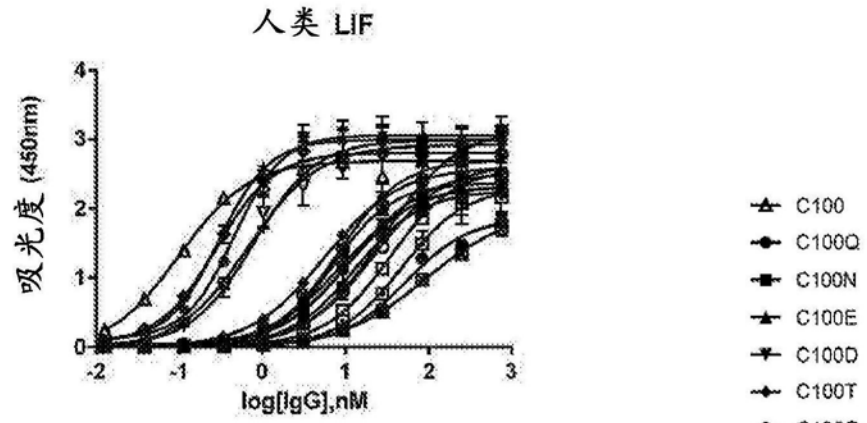


图 15A

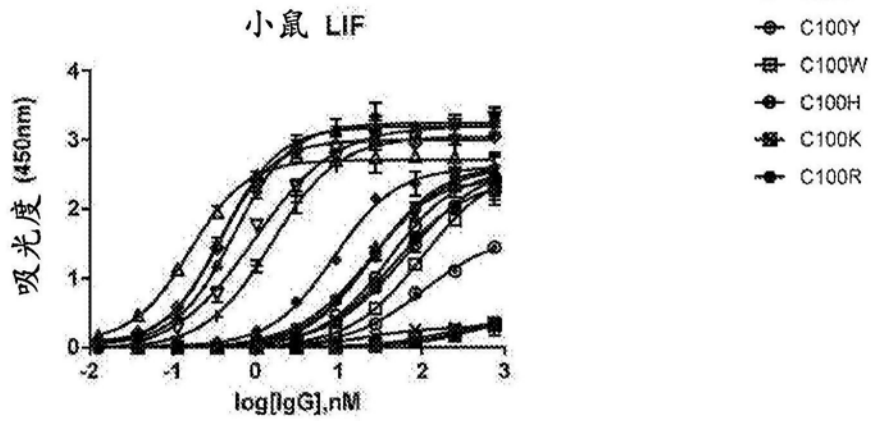


图 15B

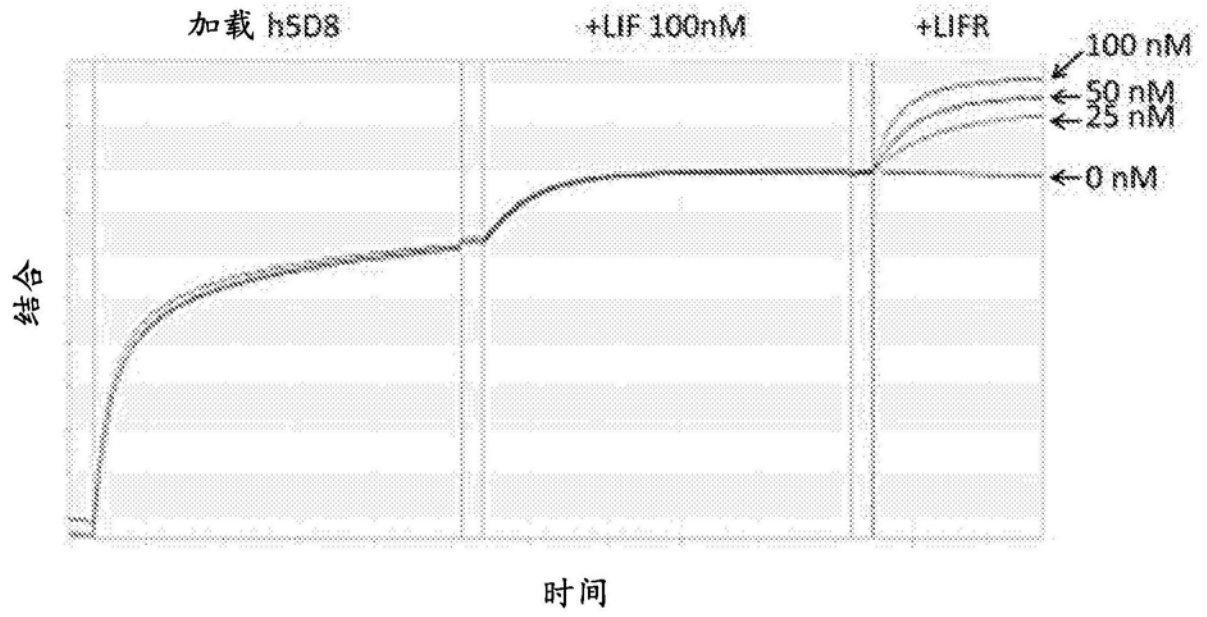


图16A

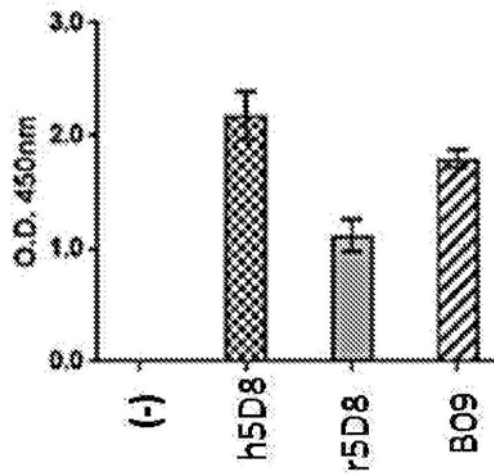


图16B

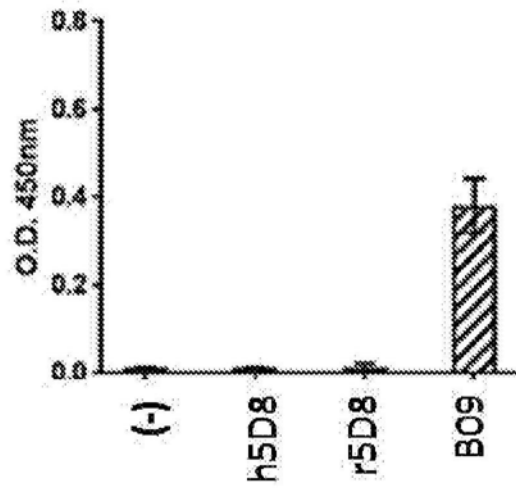


图16C

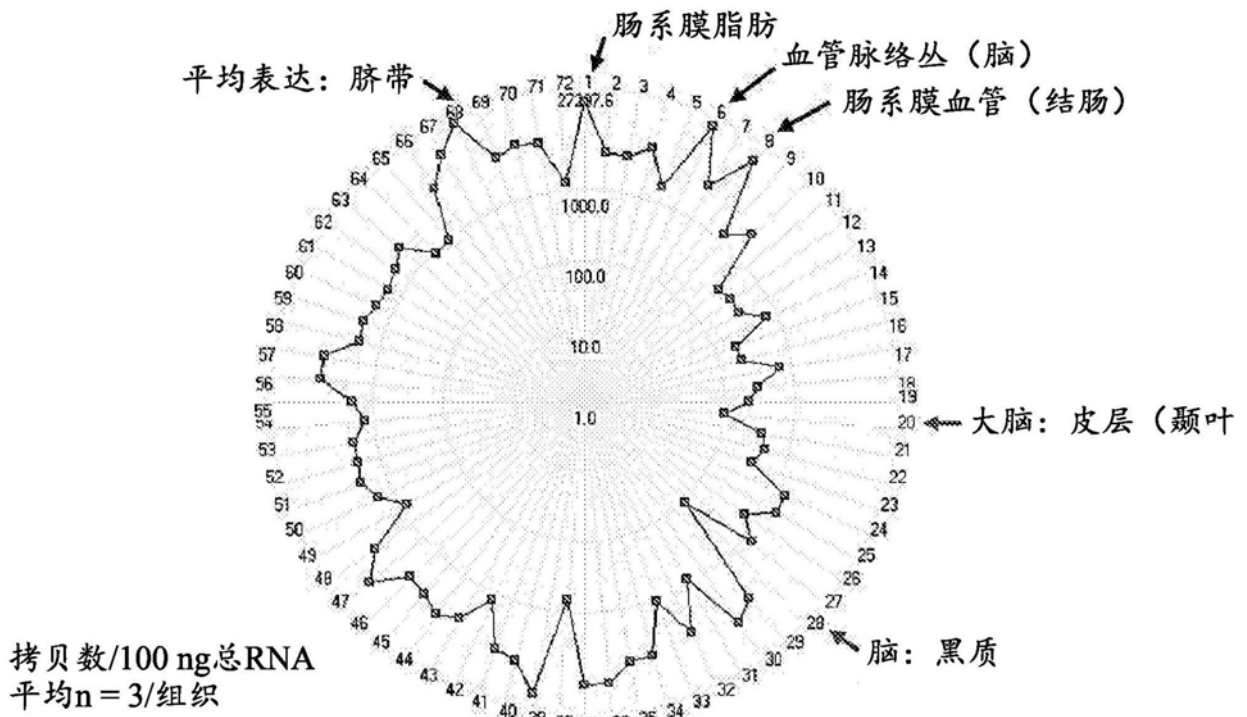


图17A

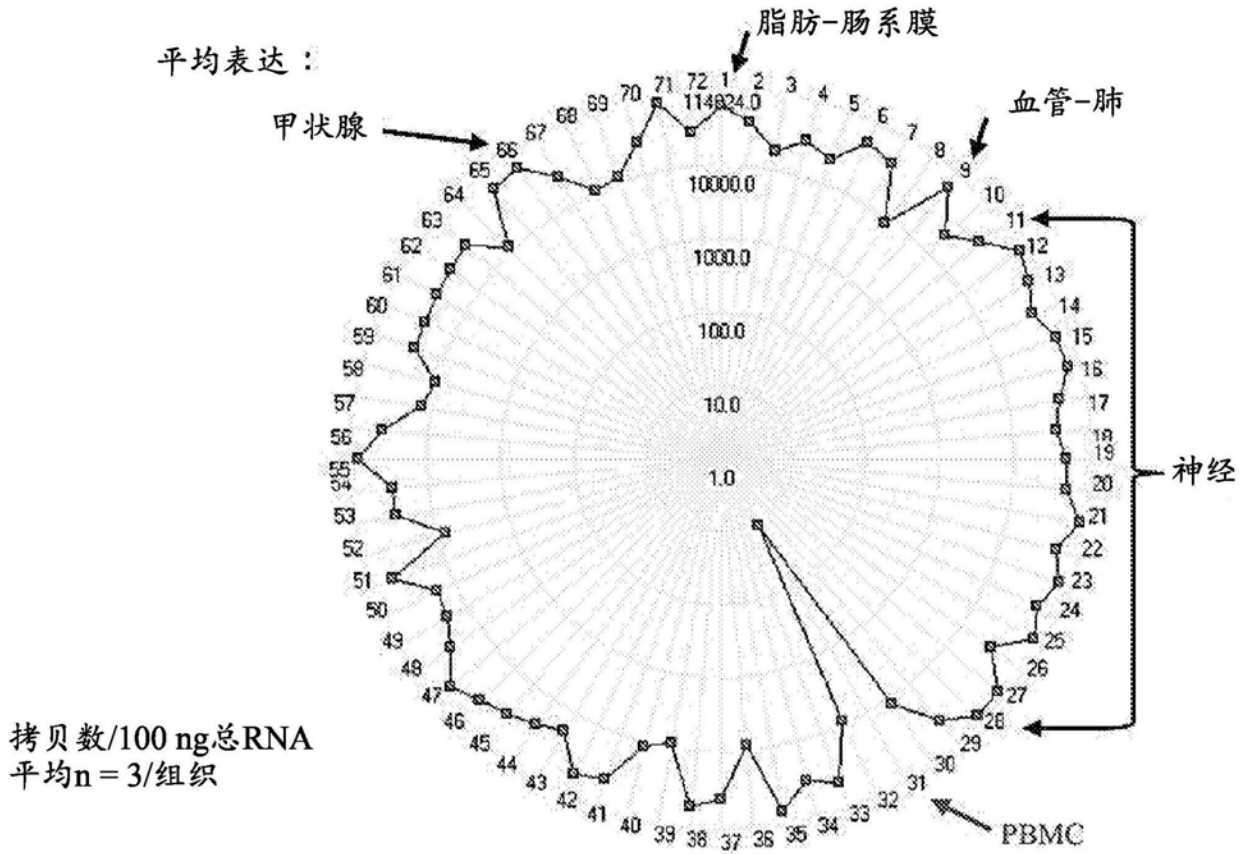


图17B

CT26 肿瘤生长

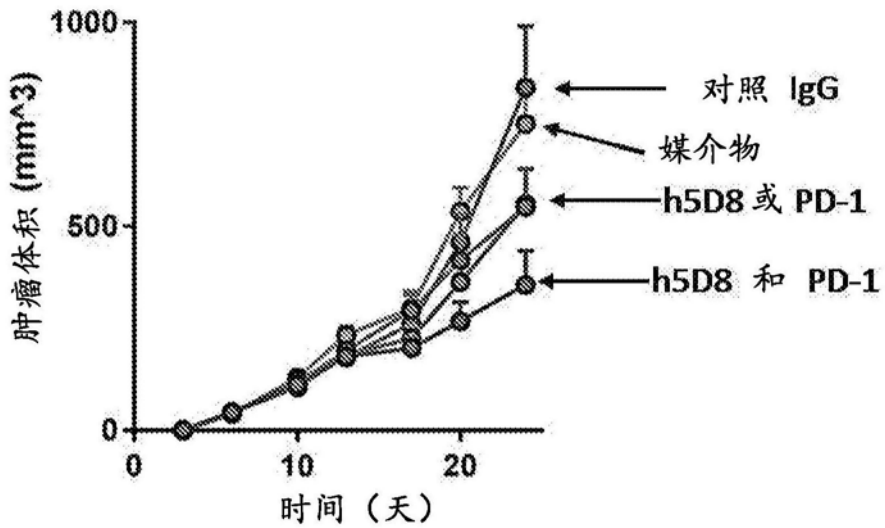


图18A

CT26 肿瘤体积 (t=24)

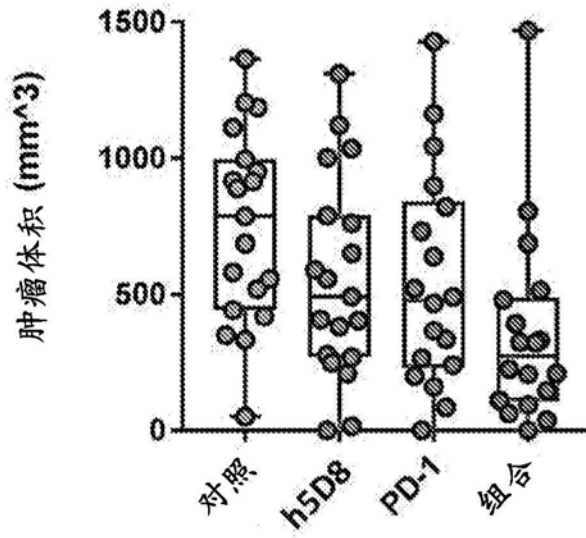


图18B

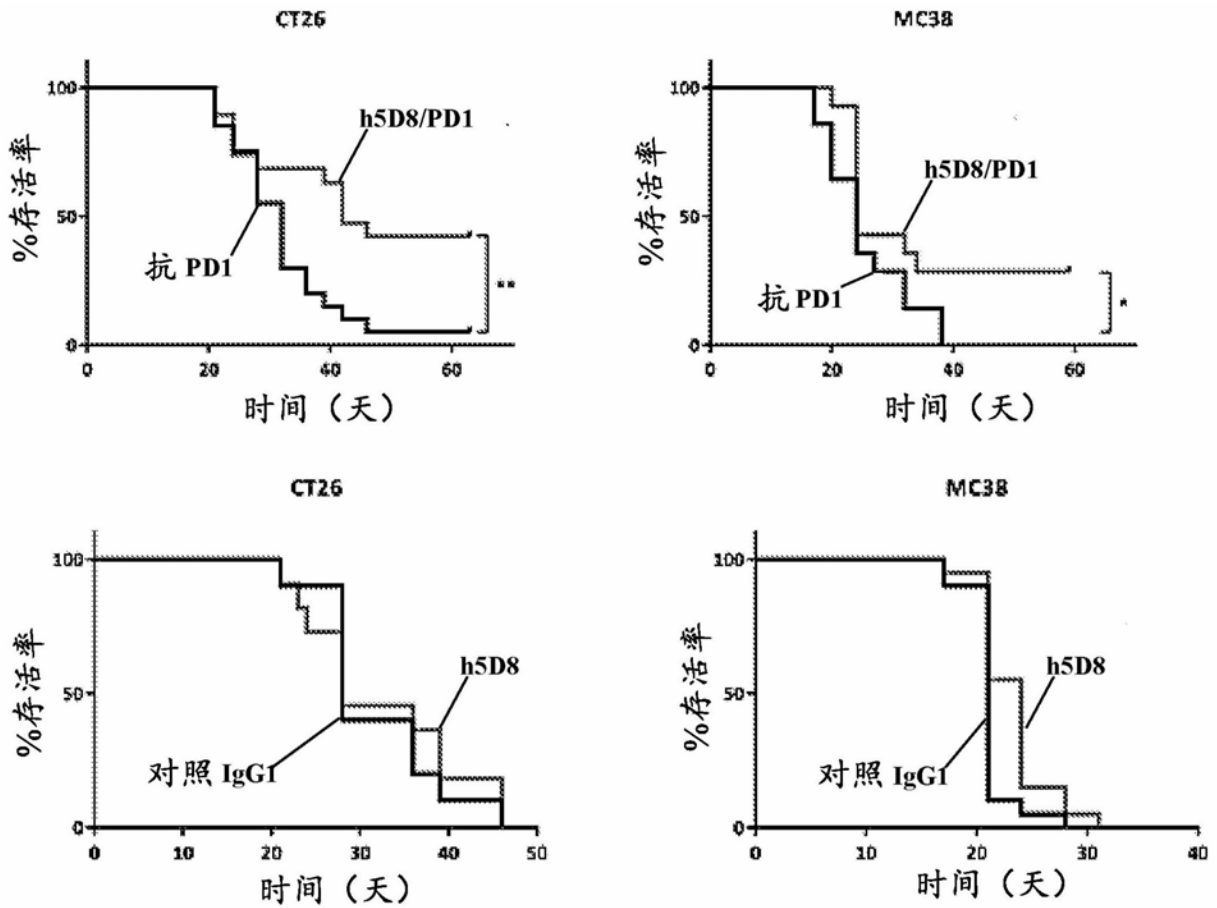


图18C

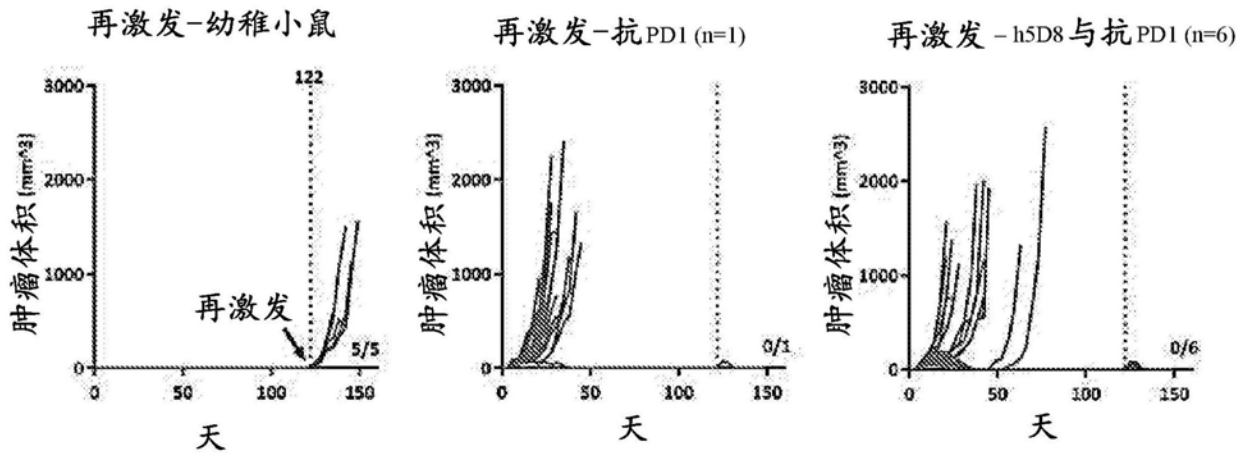


图18D

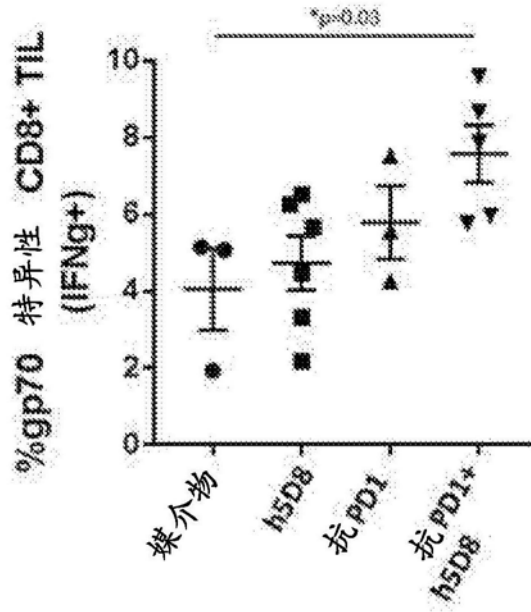


图19A

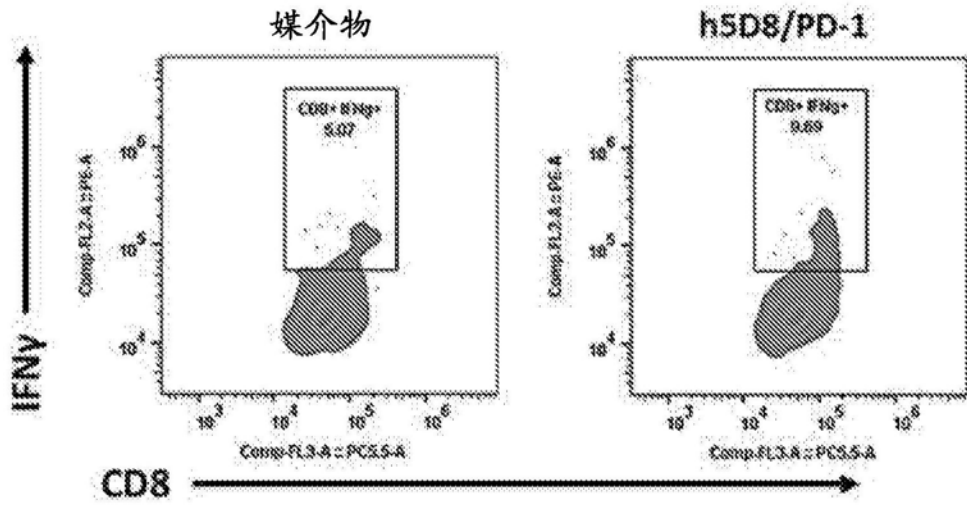


图19B

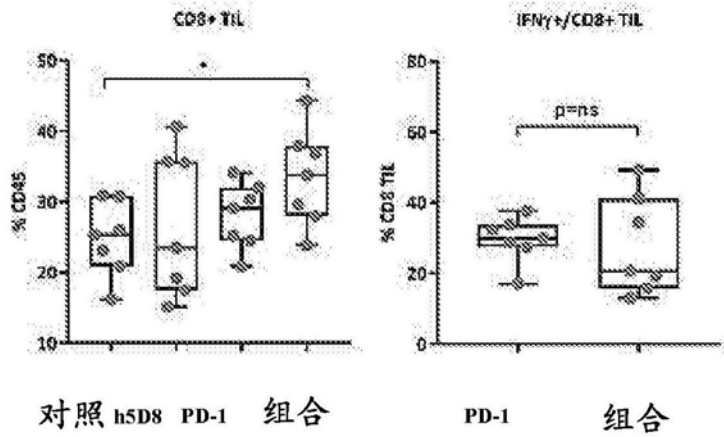


图19C

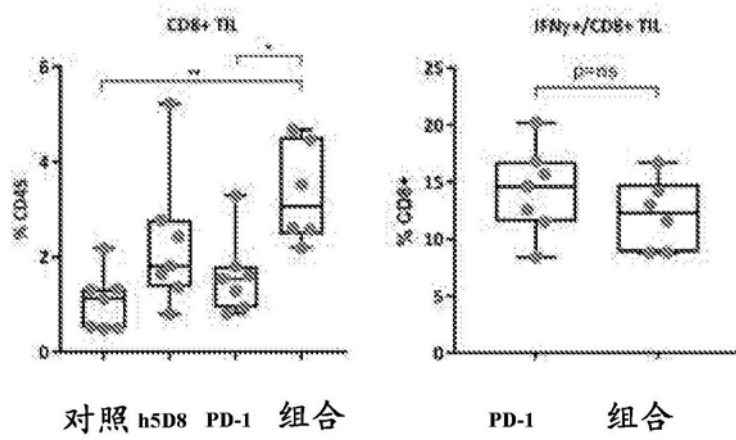


图19D

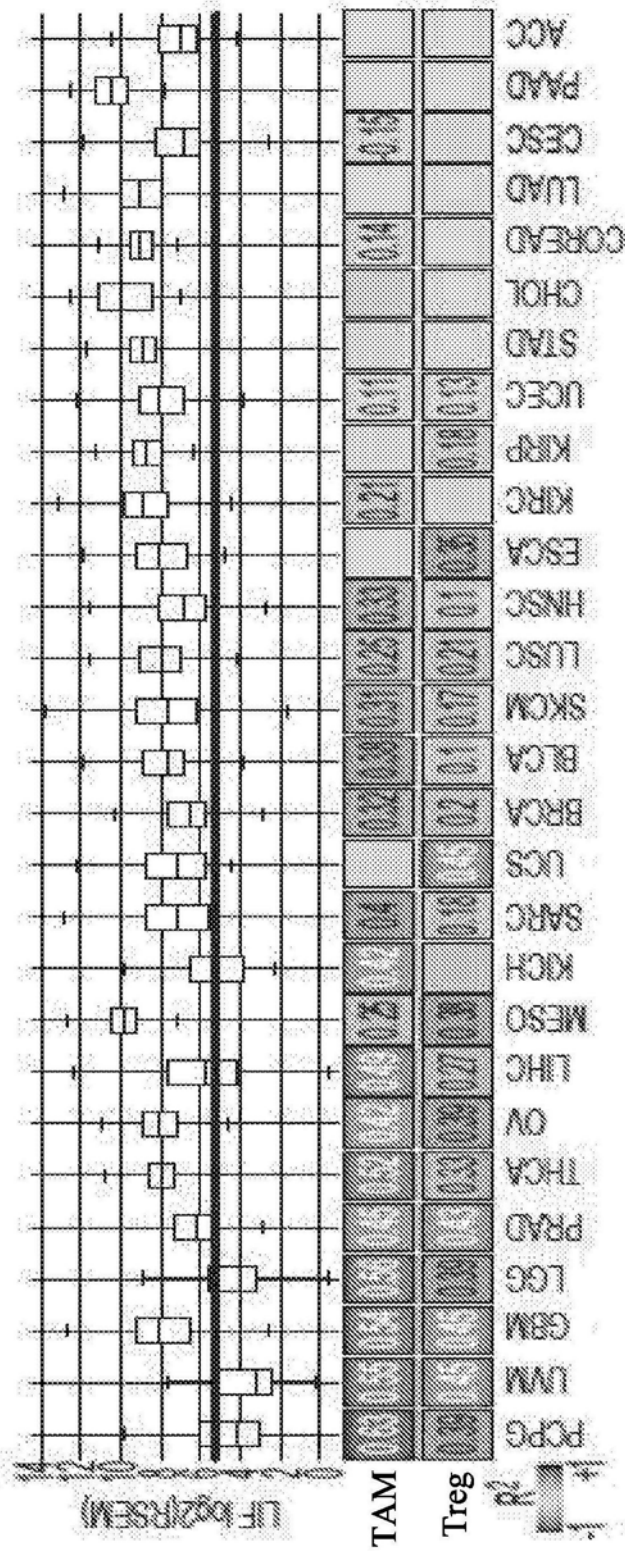


图20A

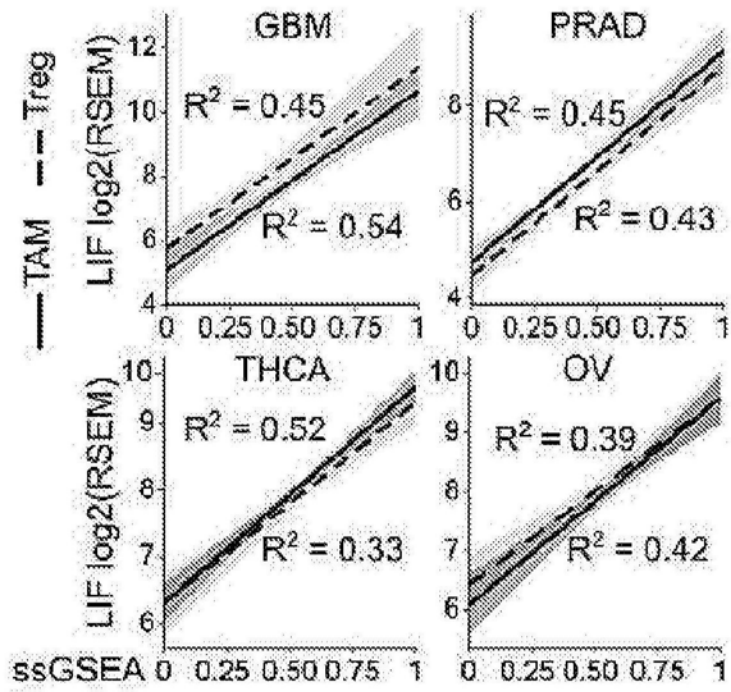


图20B

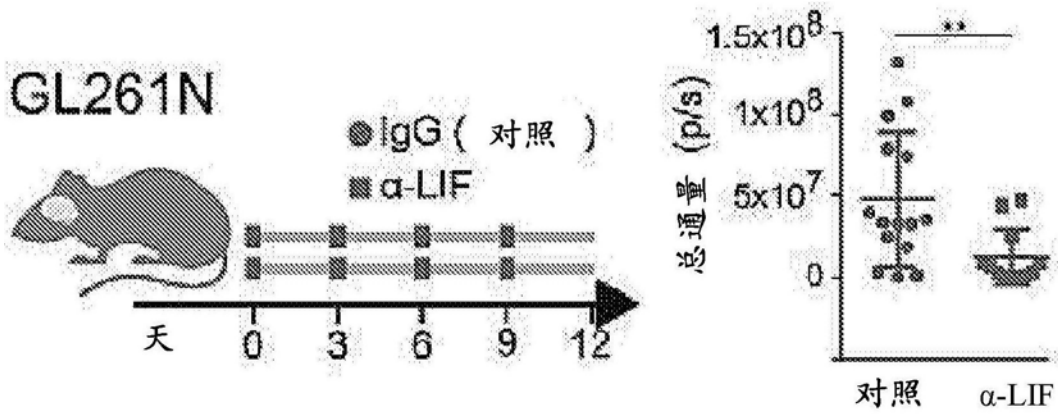


图20C

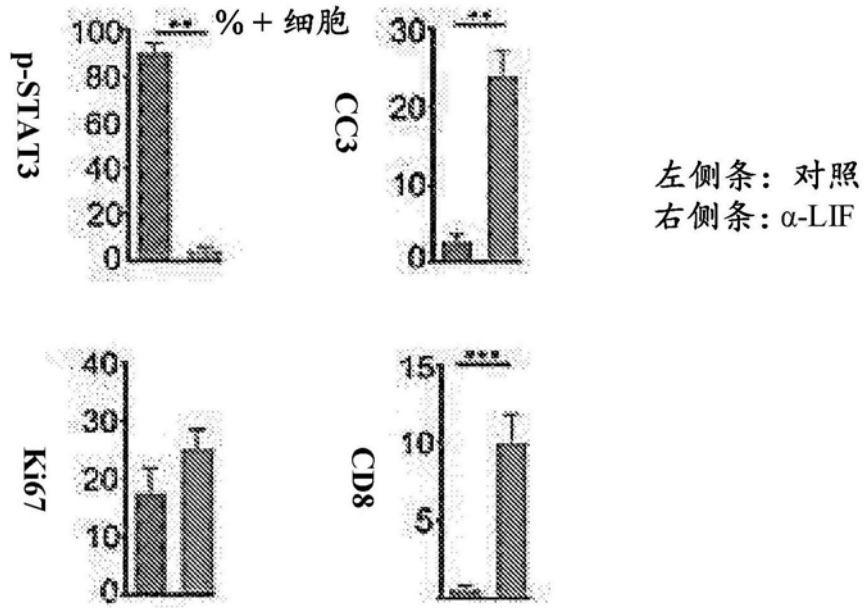


图20D

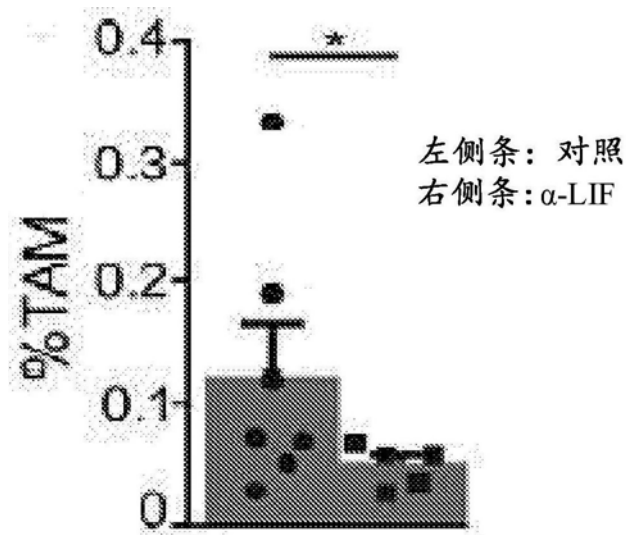


图20E

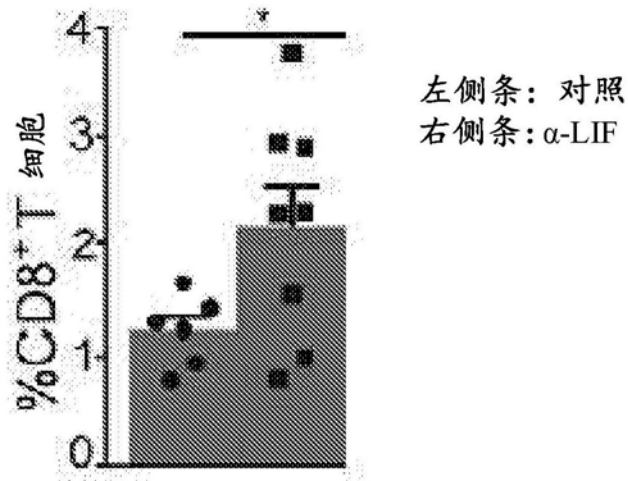


图20F

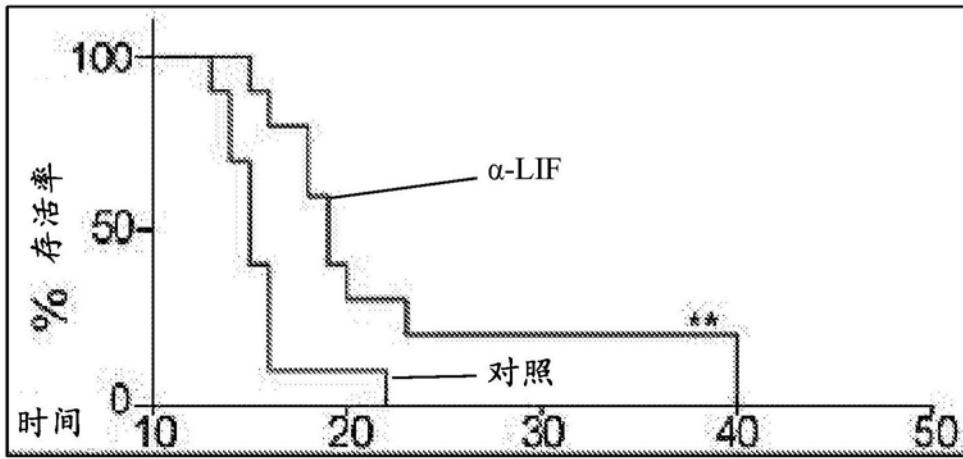


图20G

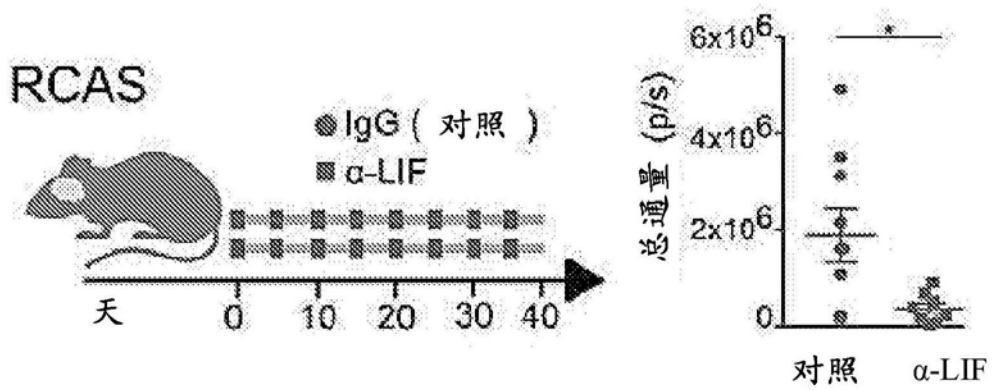


图20H

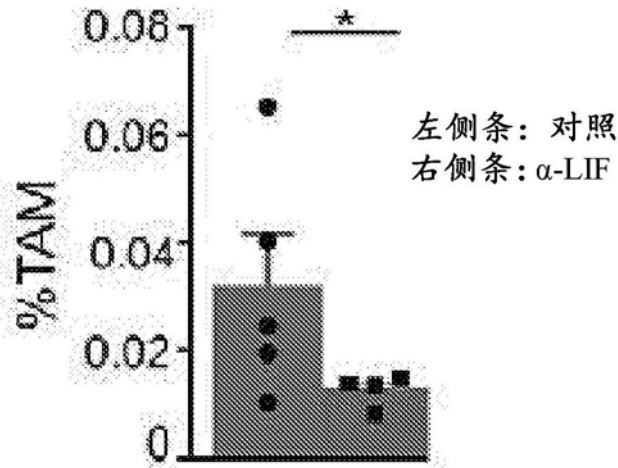


图20I

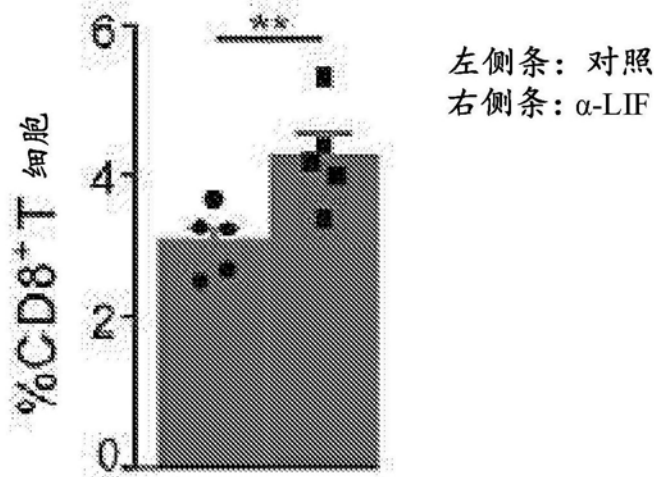


图20J

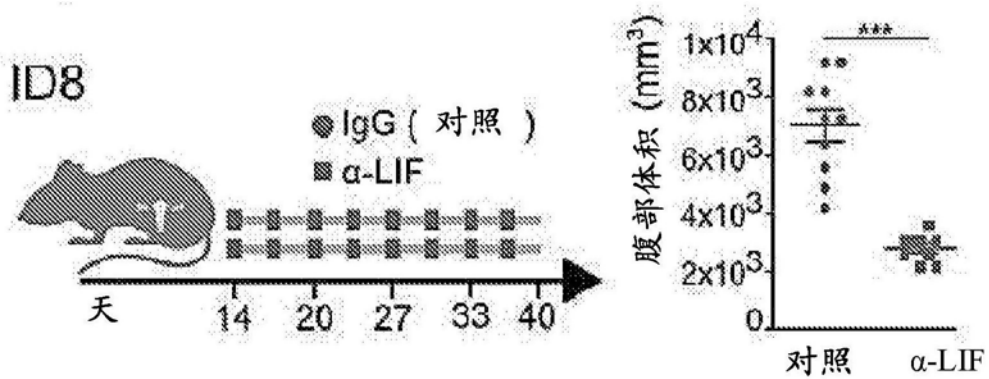


图20K

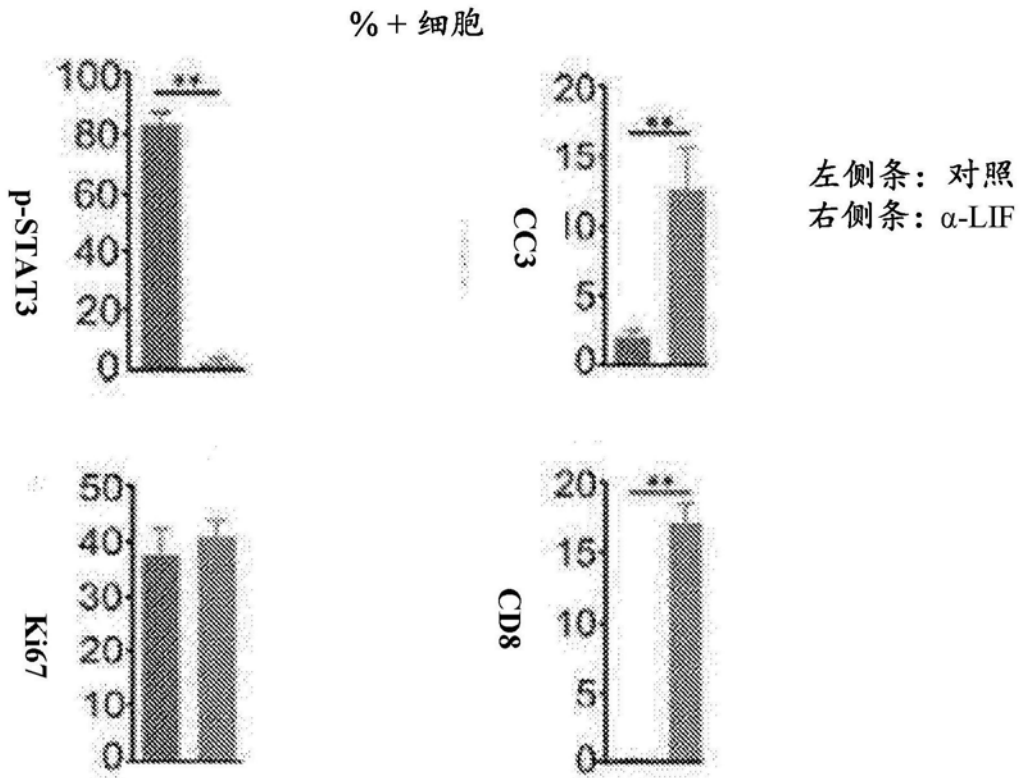


图20L

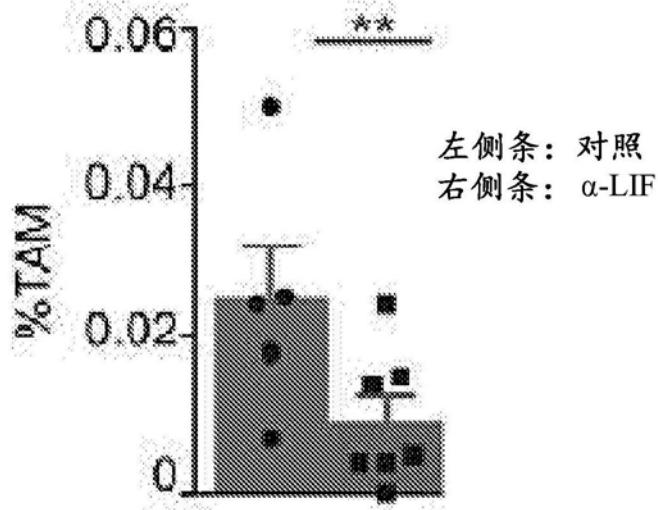


图20M

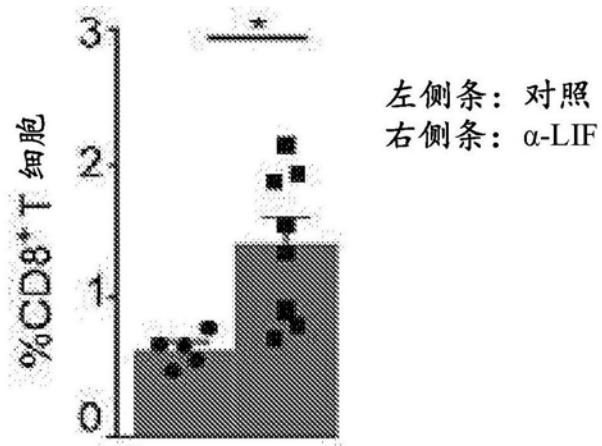


图20N

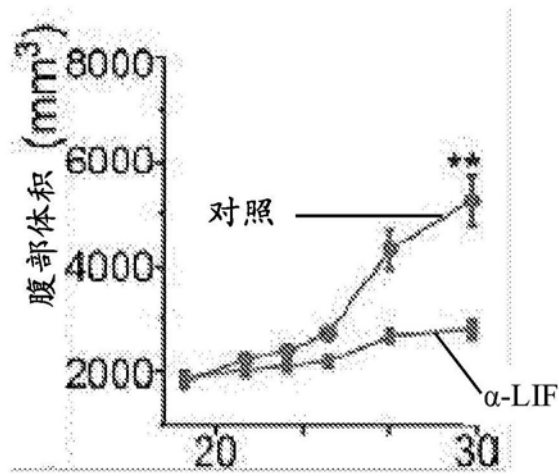


图200

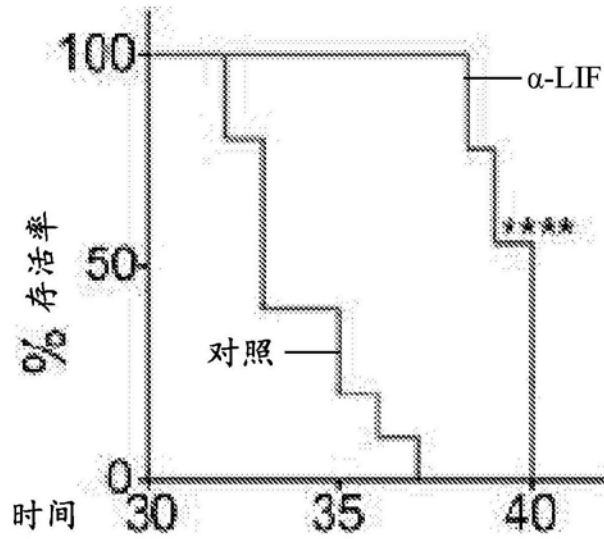


图20P

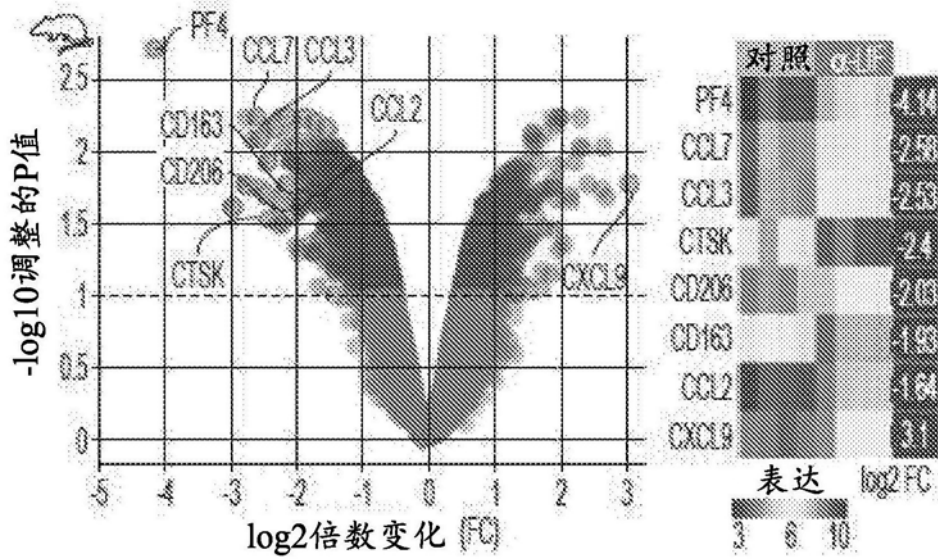


图21A

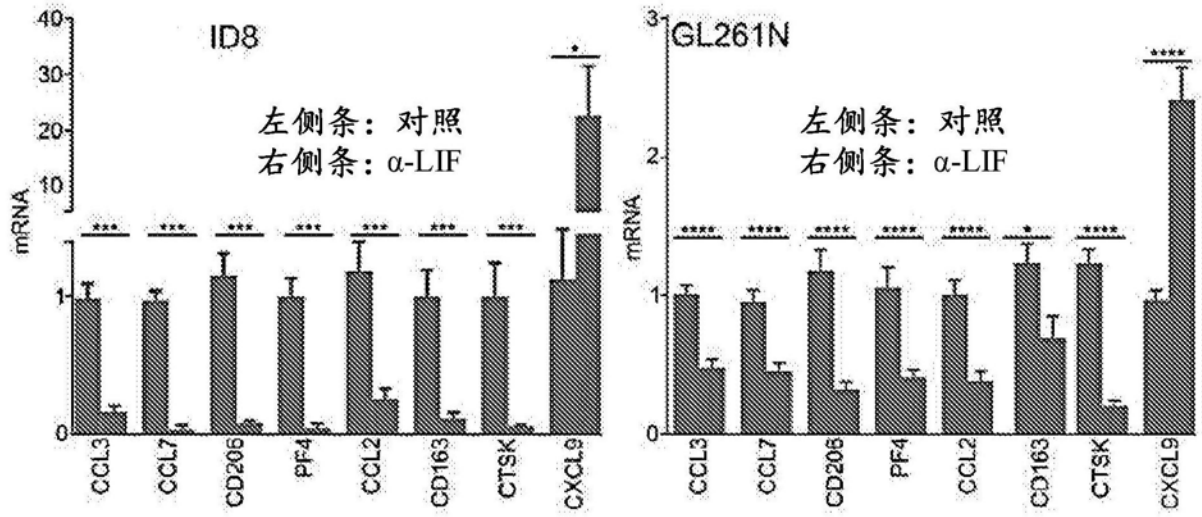


图21B

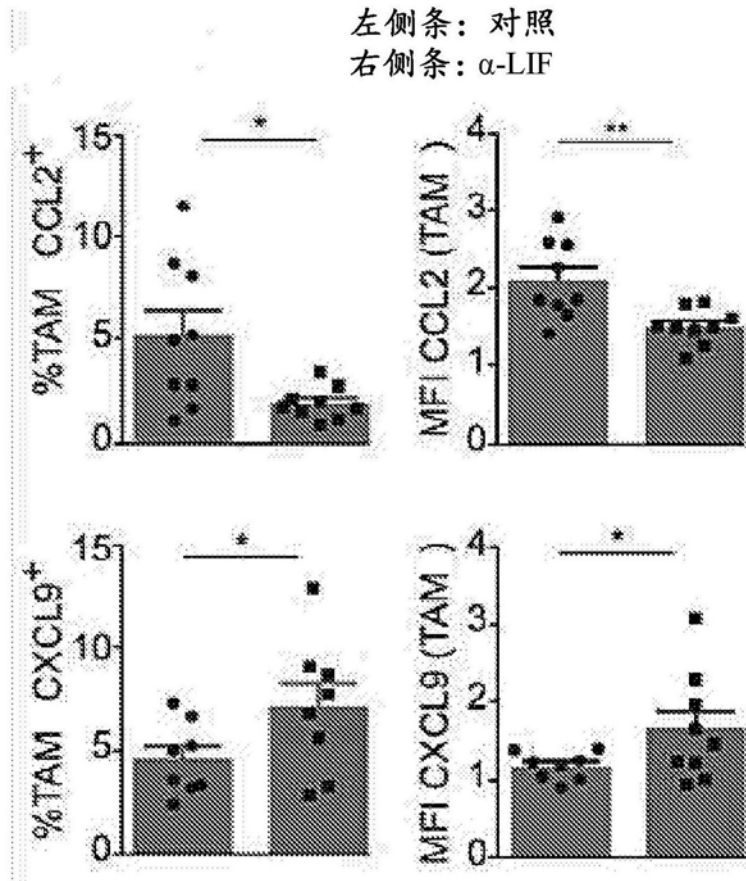


图21C

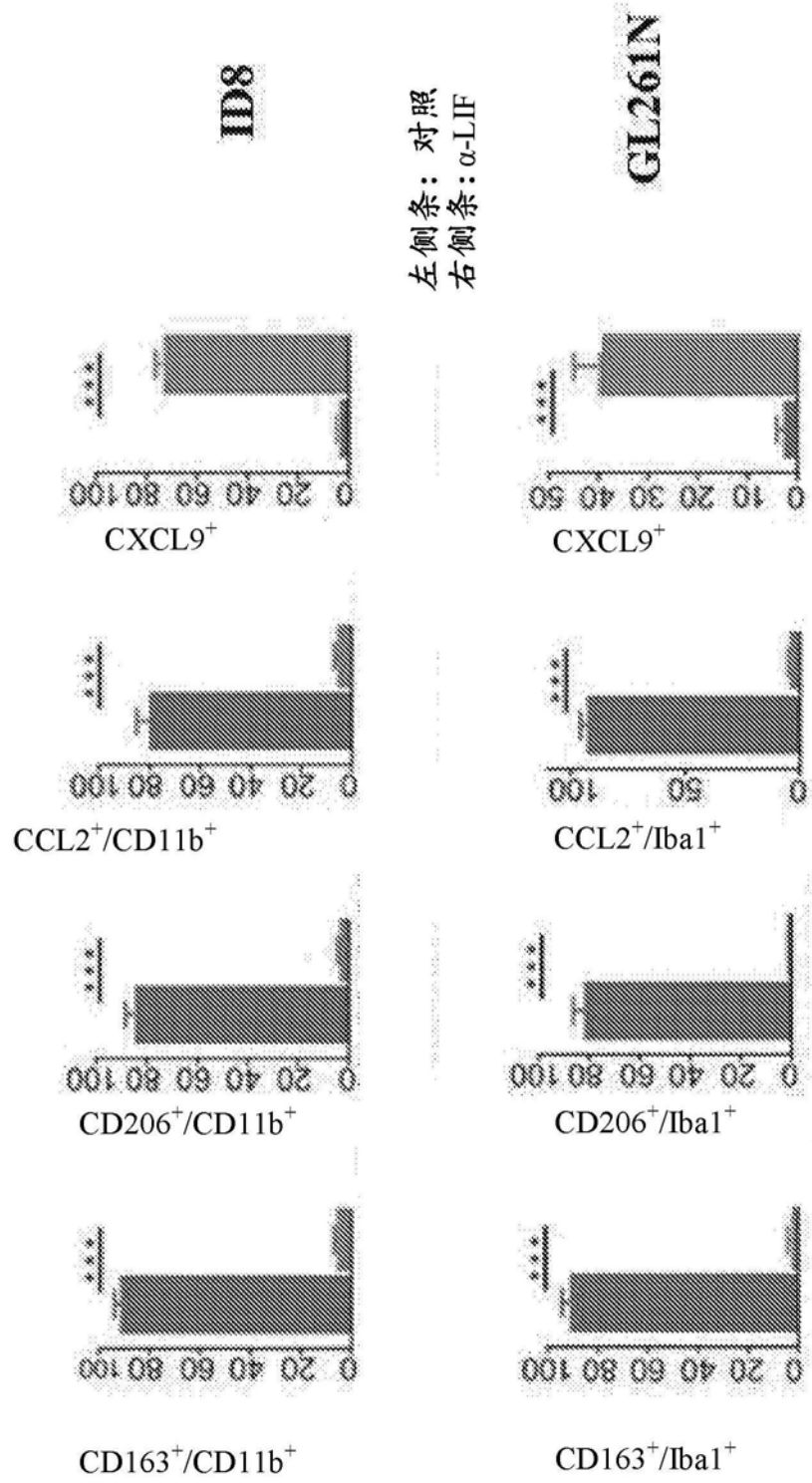


图21D

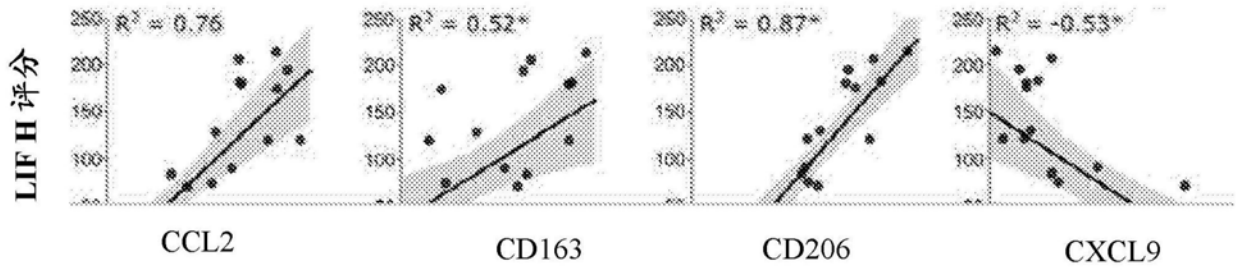


图21E

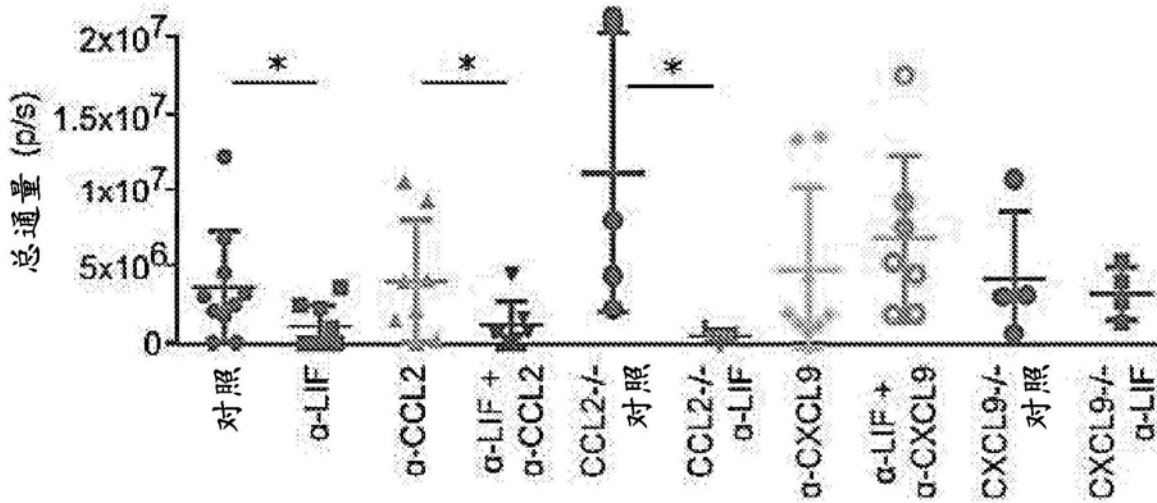


图21F

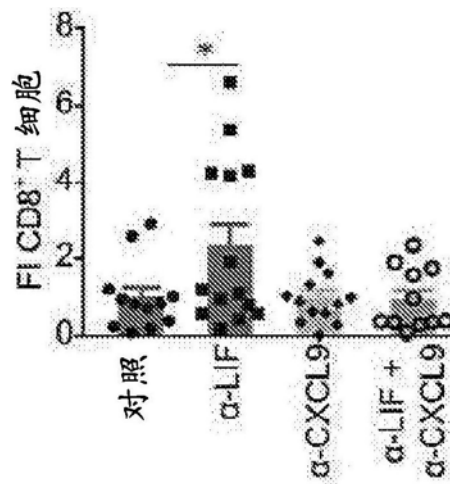


图21G

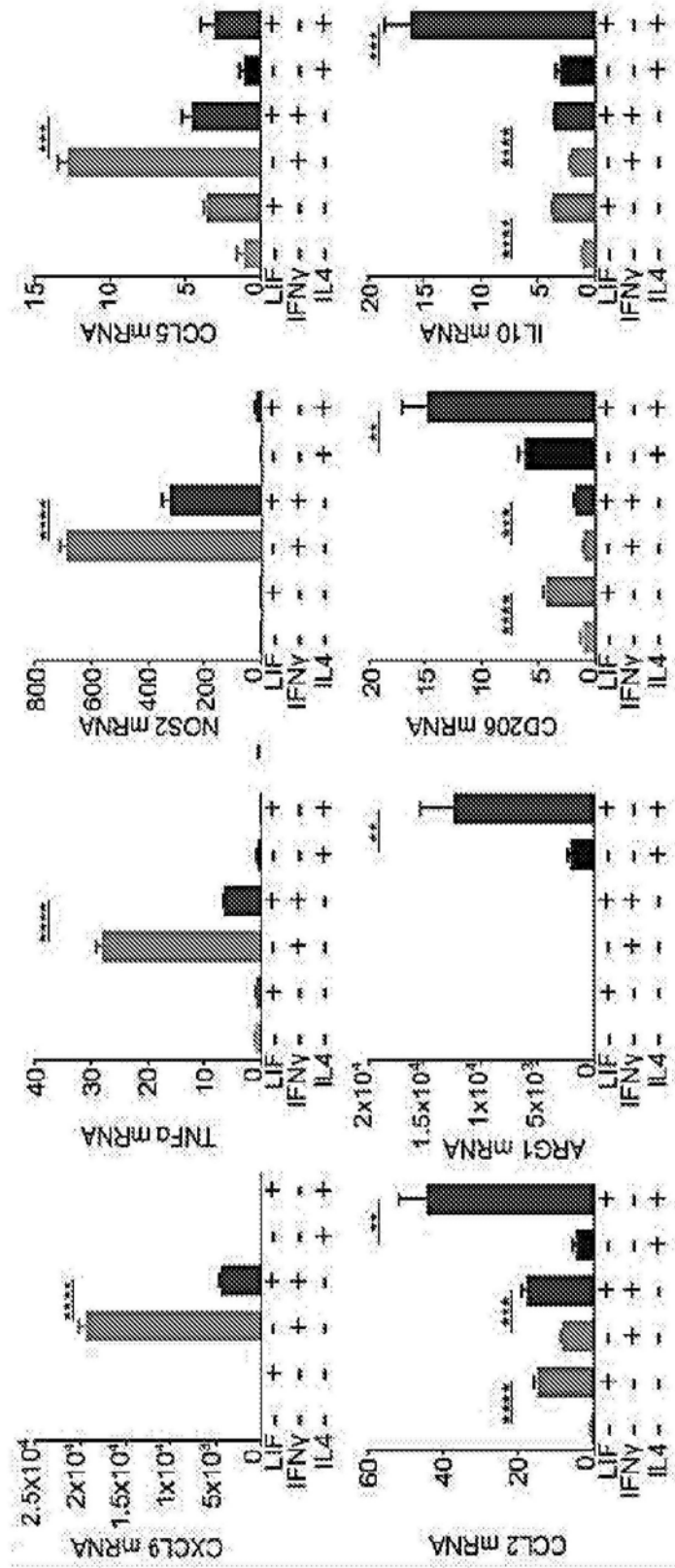


图22A

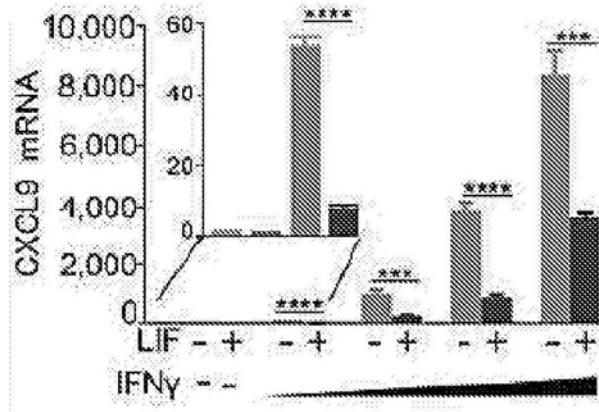


图22B

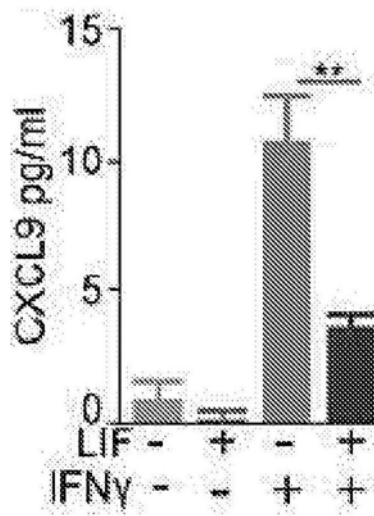


图22C

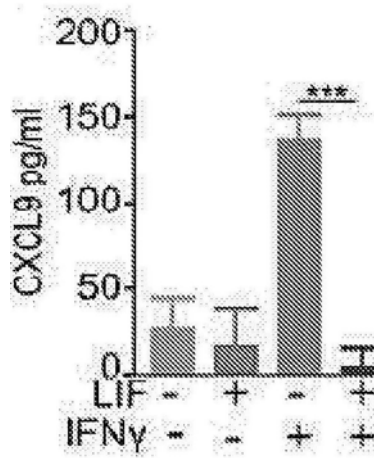


图22D

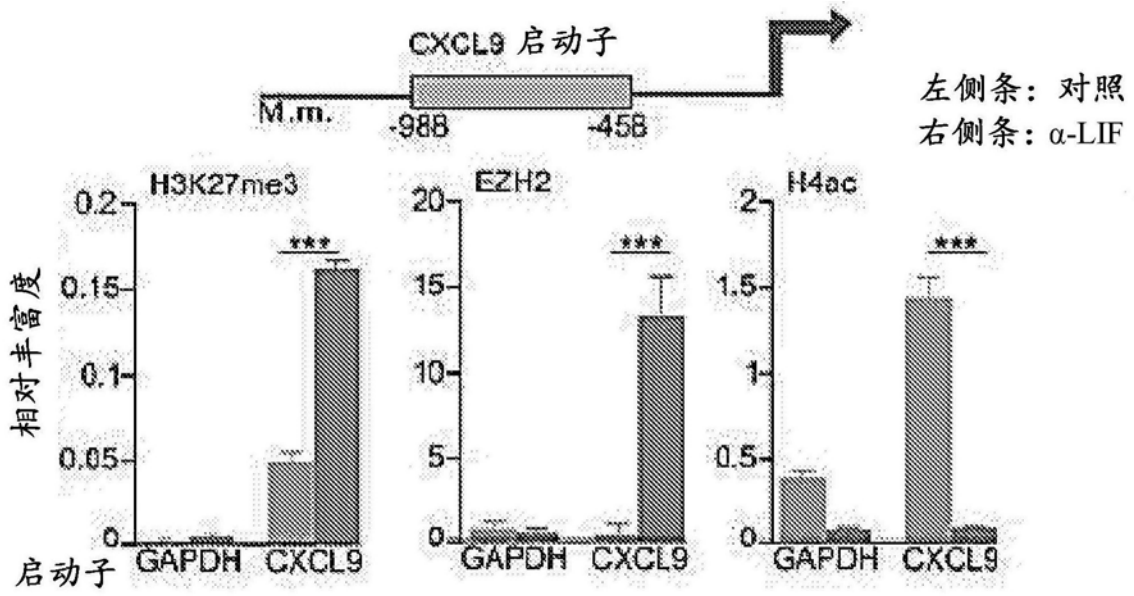


图22E

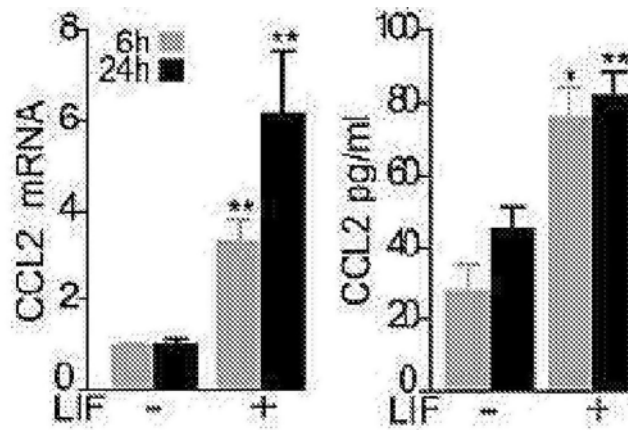


图22F

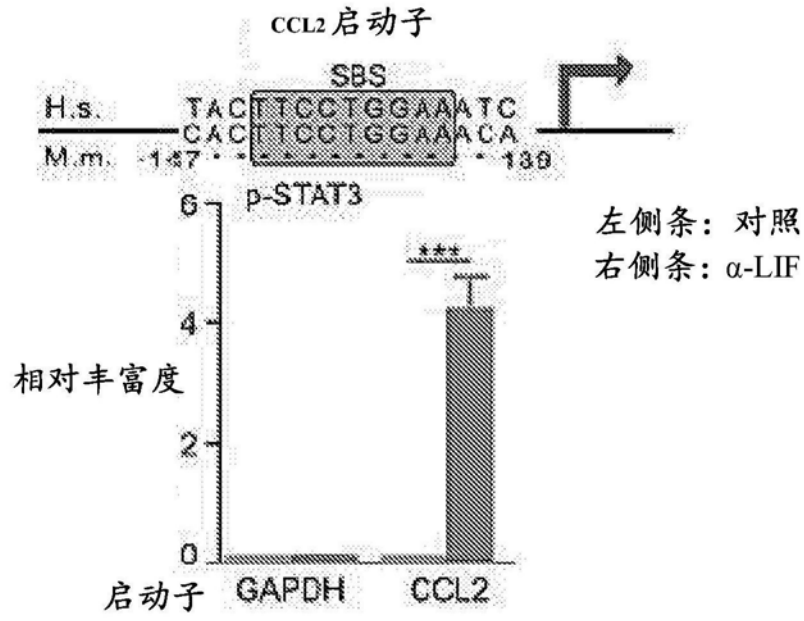


图22G

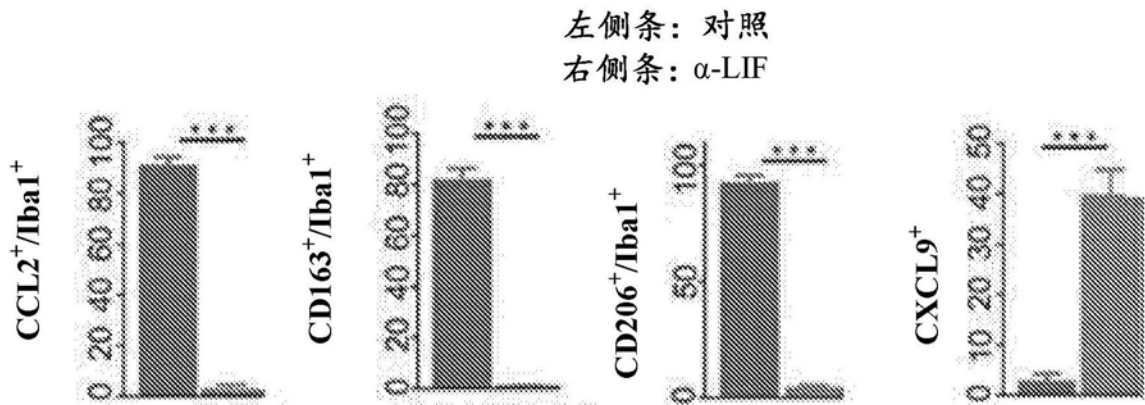


图22H

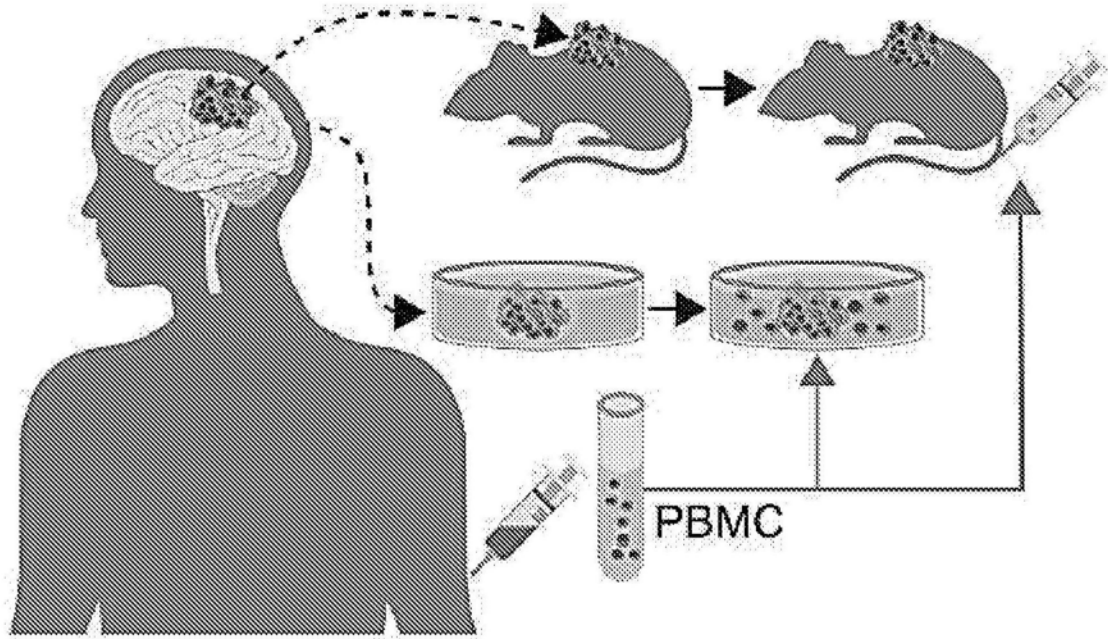


图23A

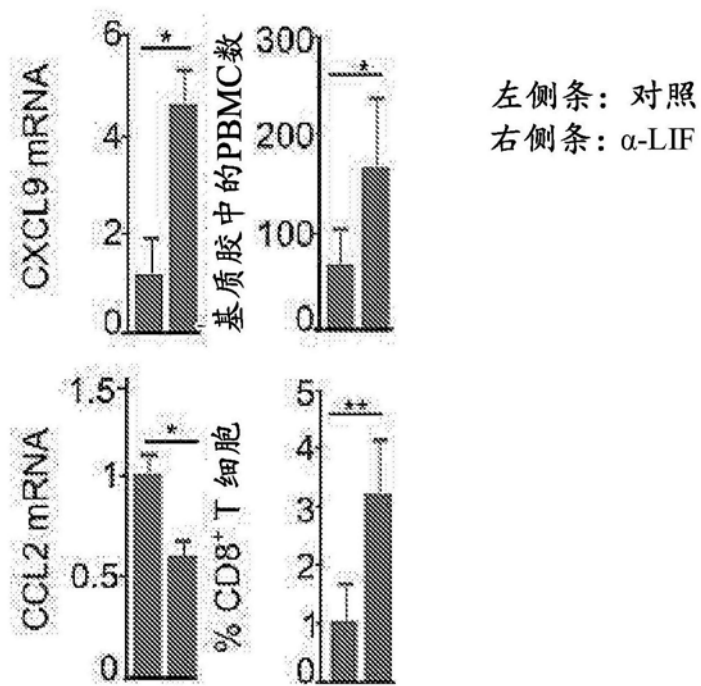


图23B

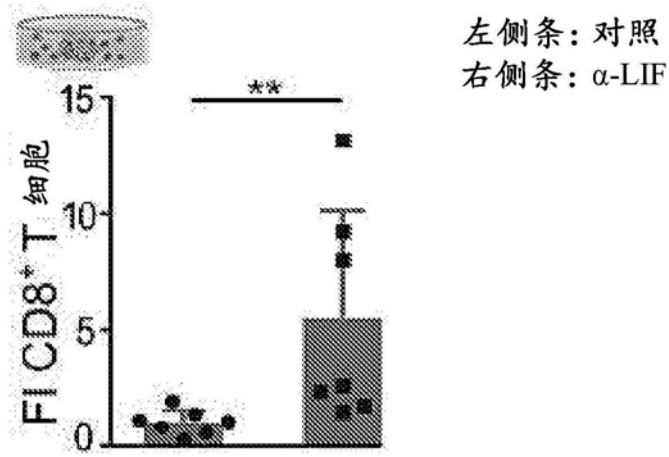


图23C

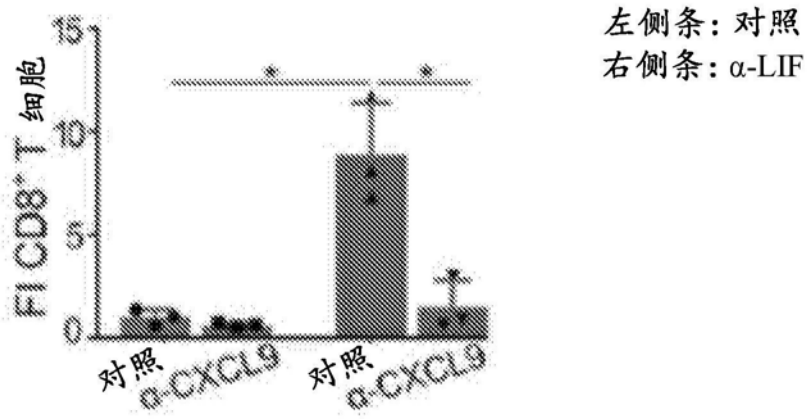


图23D

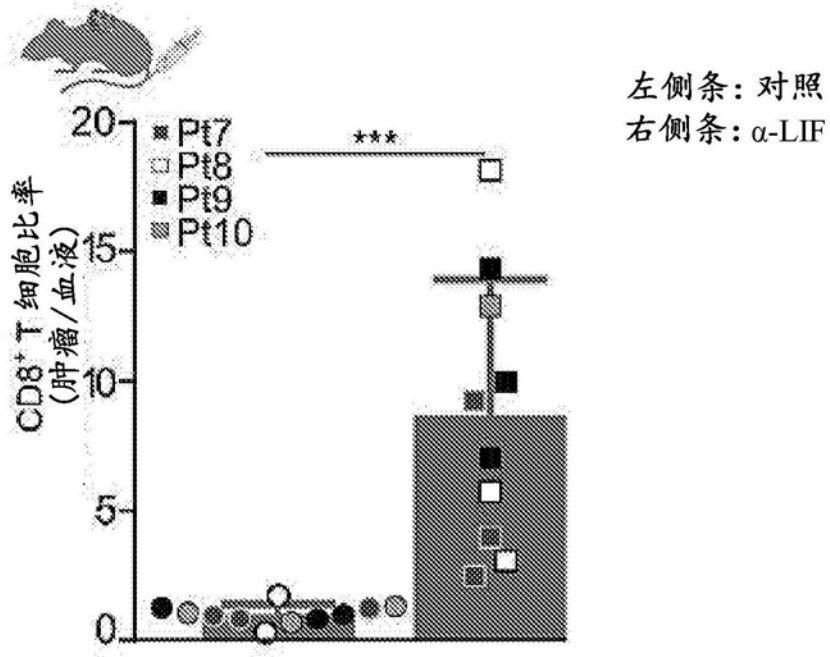


图23E

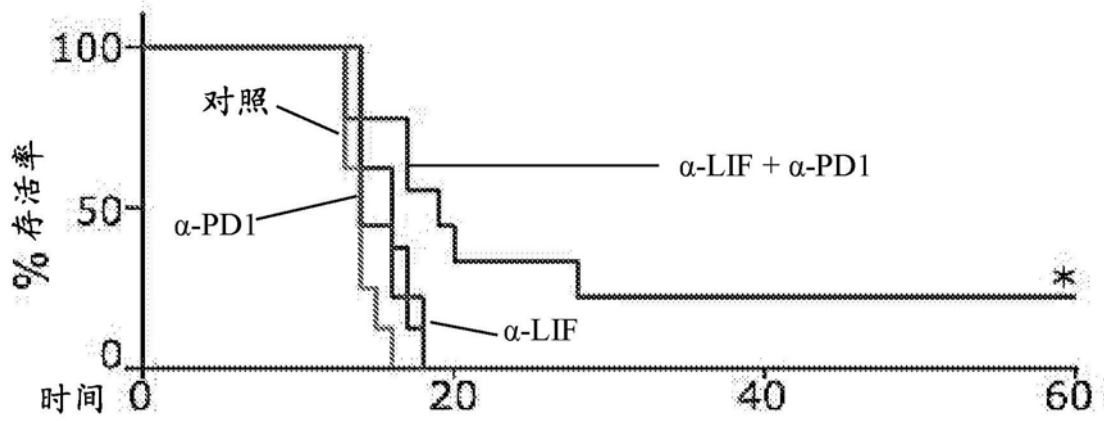


图23F

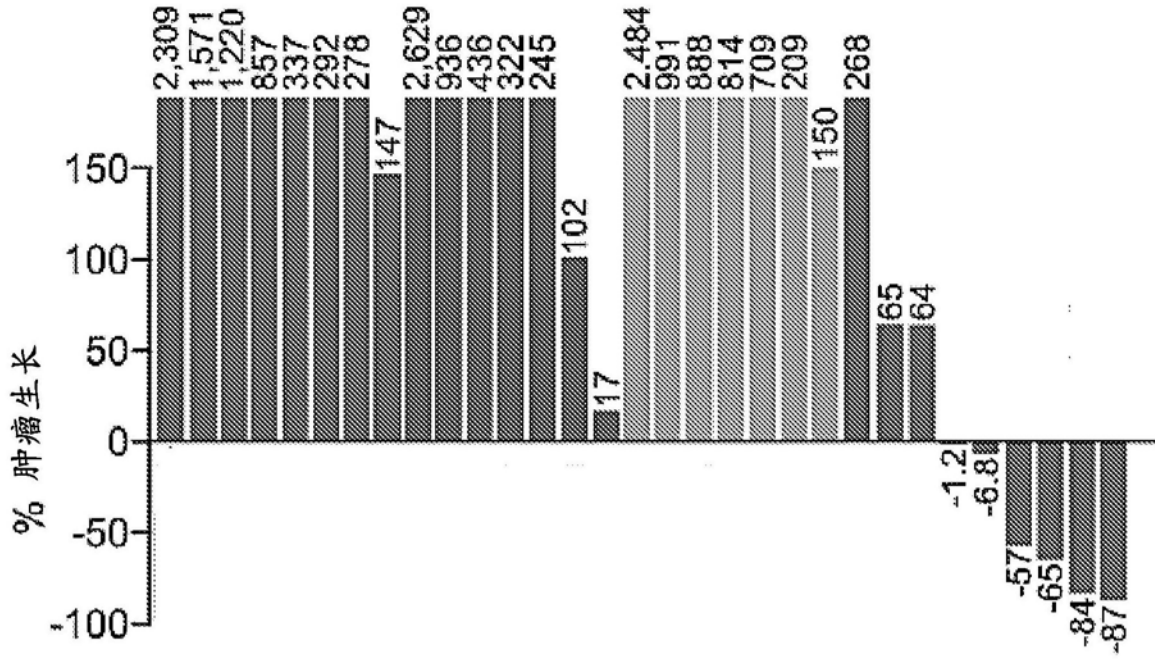


图23G

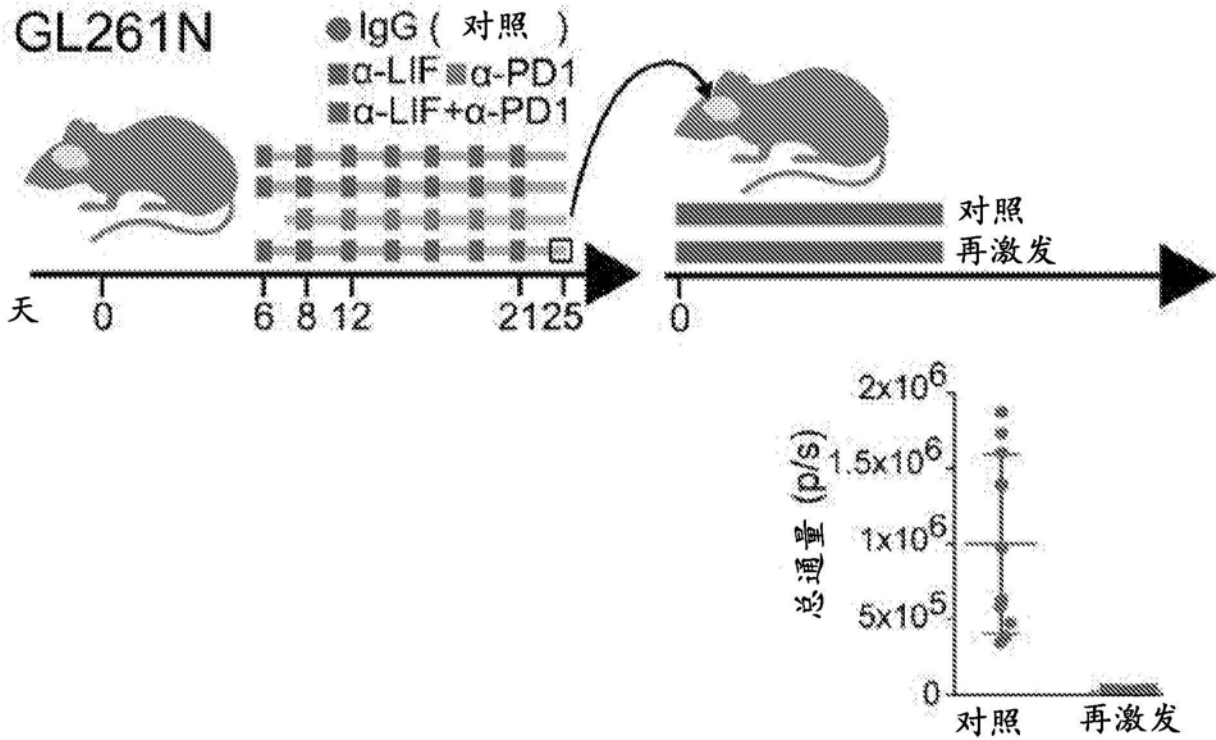


图23H

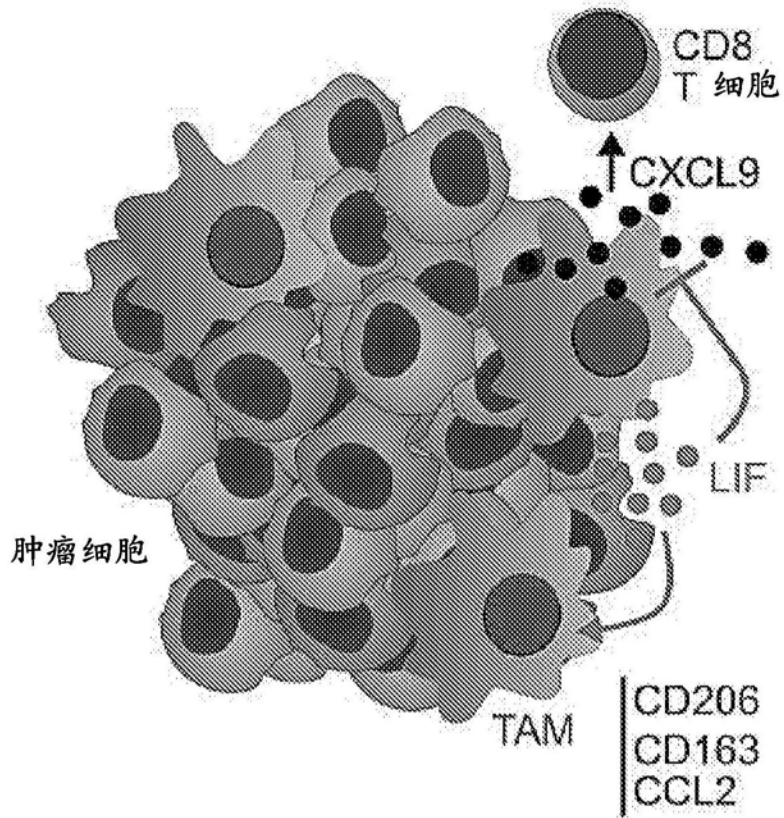


图23I

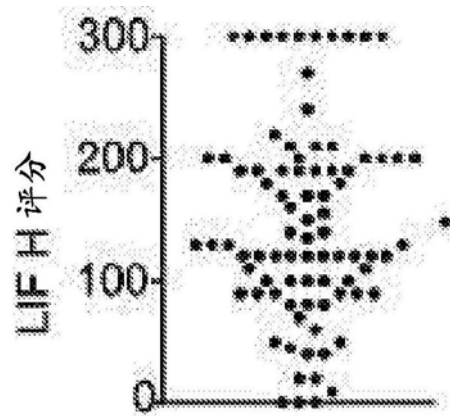


图24A

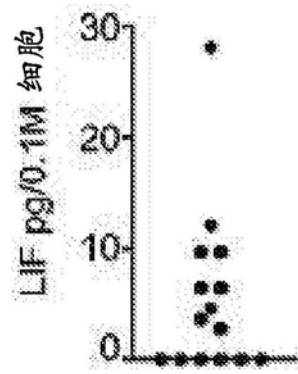


图24B

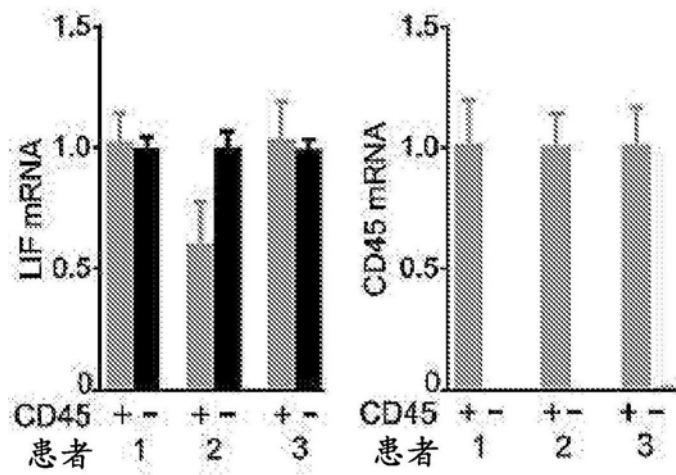


图24C

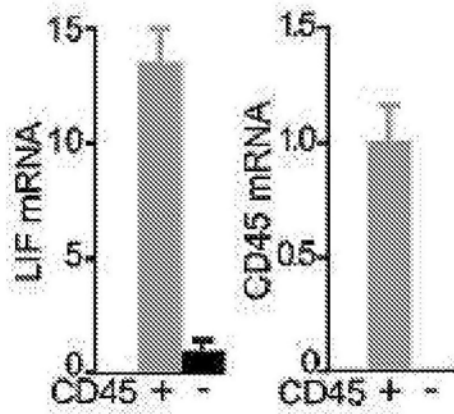


图24D

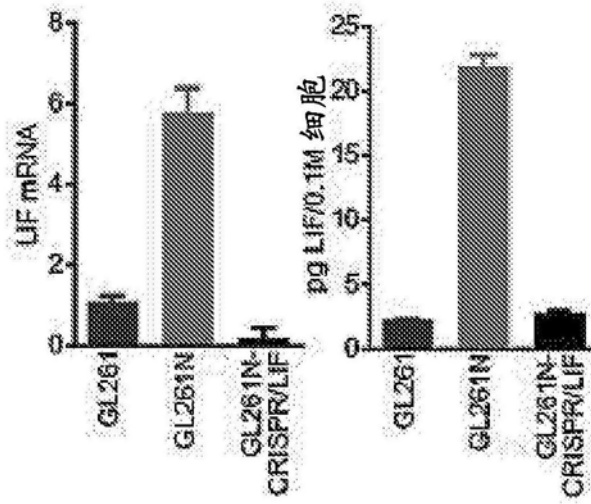


图25A

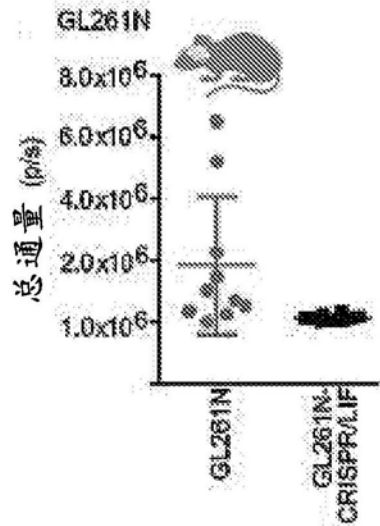


图25B

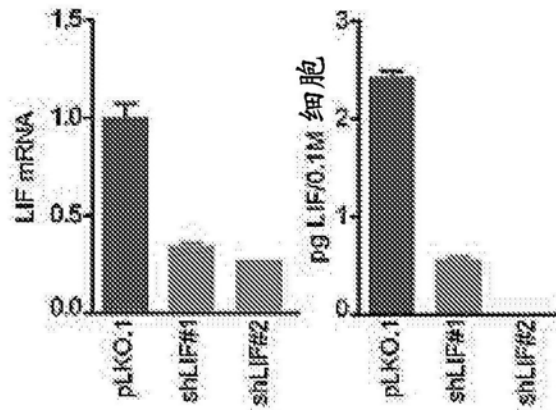


图25C

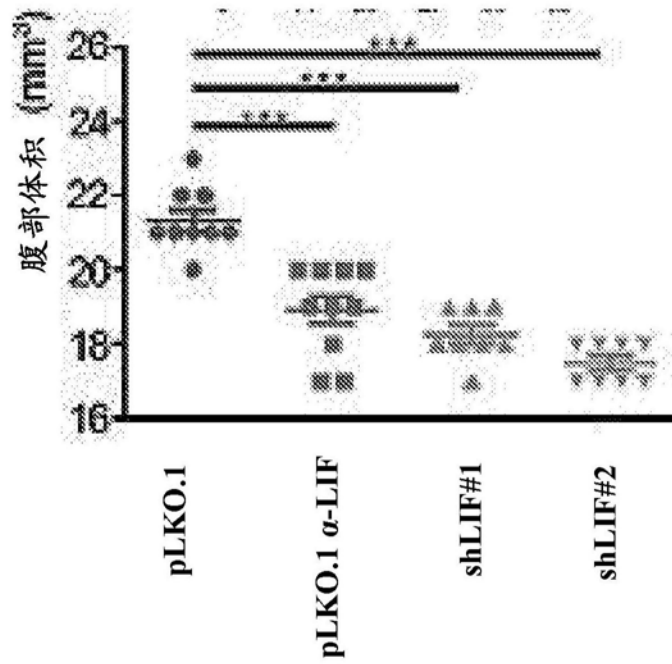


图25D

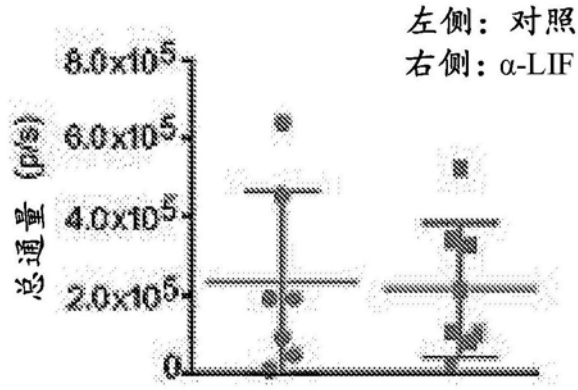


图25E

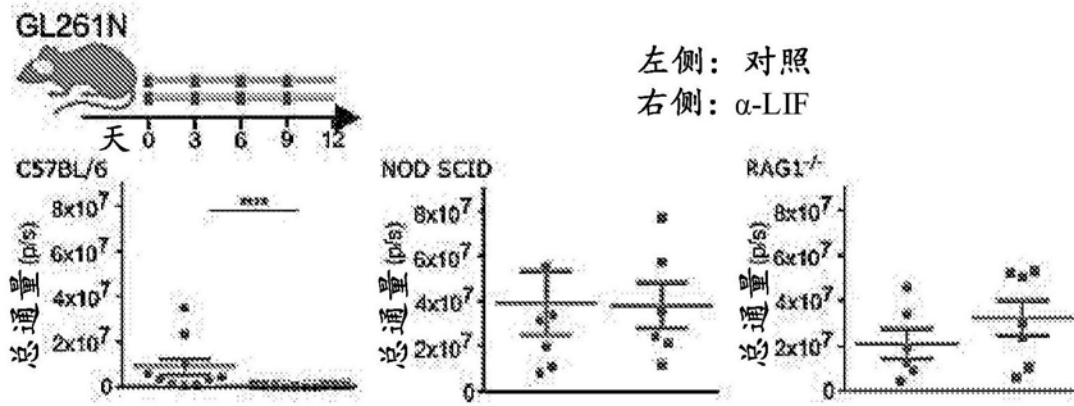


图25F

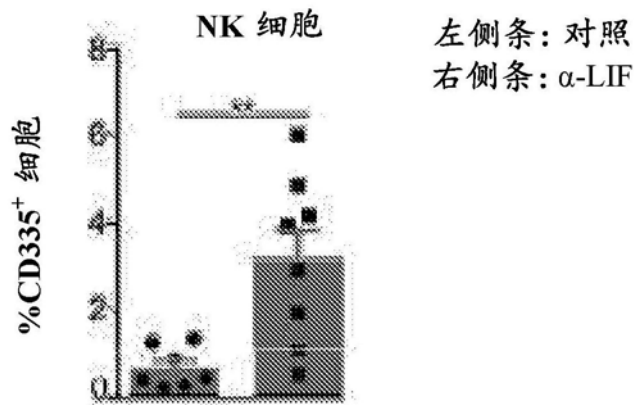


图25G

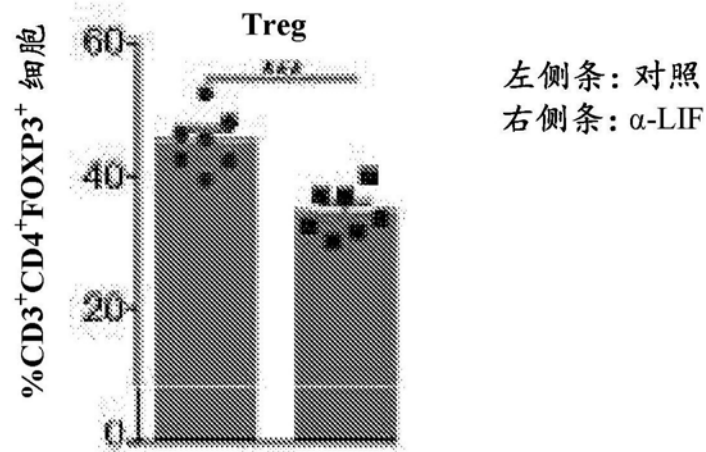


图25H

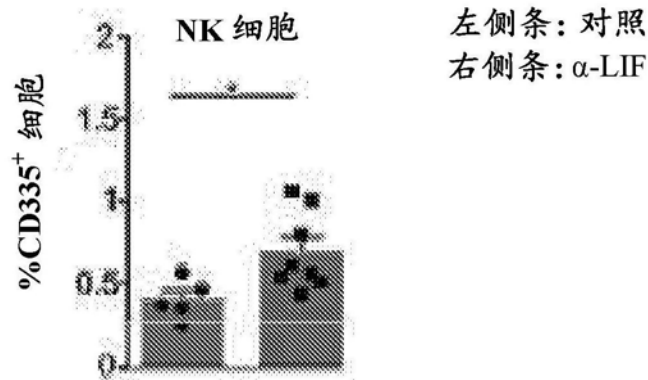


图25I

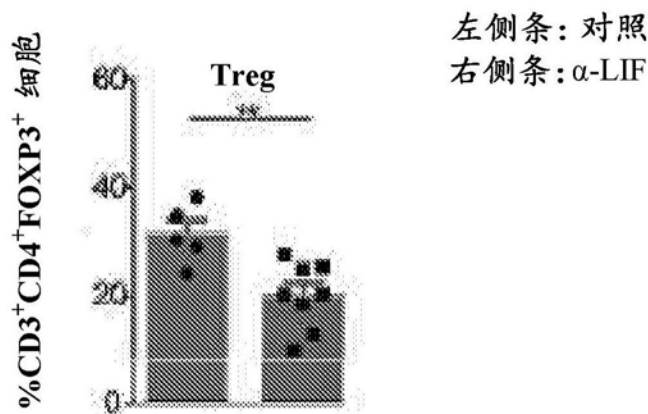
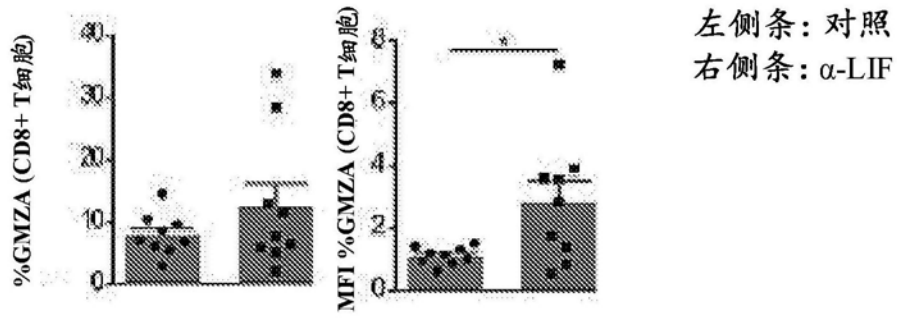
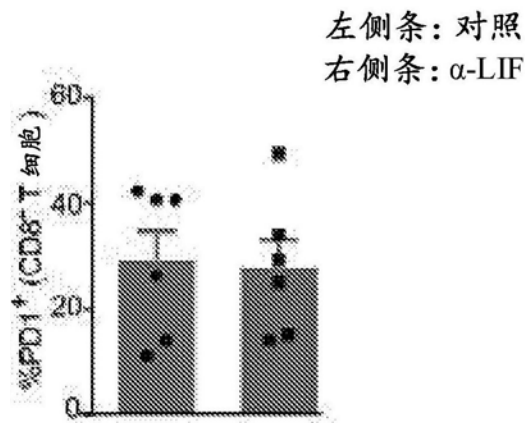


图25J



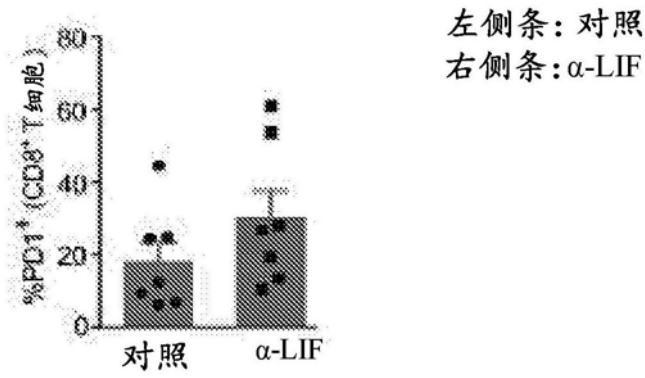
左侧条: 对照
右侧条: α -LIF

图26A



左侧条: 对照
右侧条: α -LIF

图26B



左侧条: 对照
右侧条: α -LIF

图26C

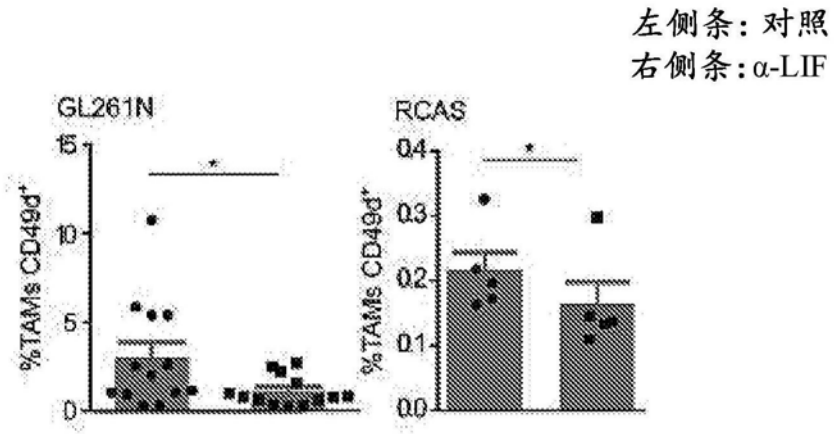


图26D

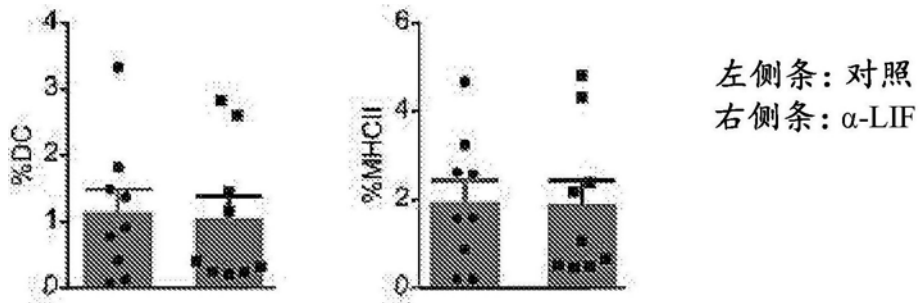


图26E

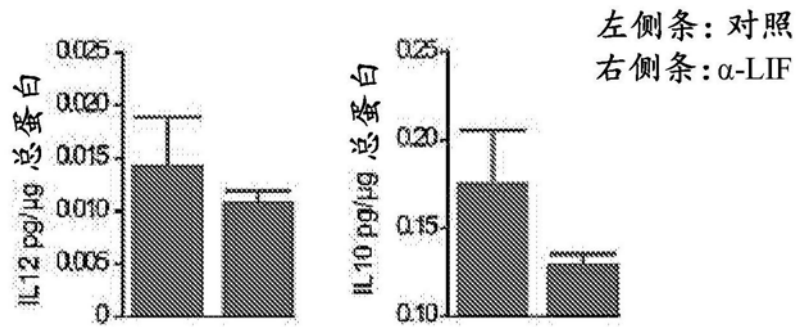


图26F

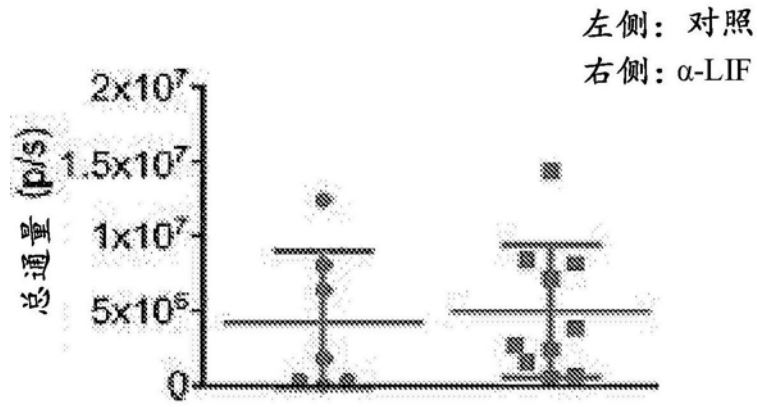


图26G

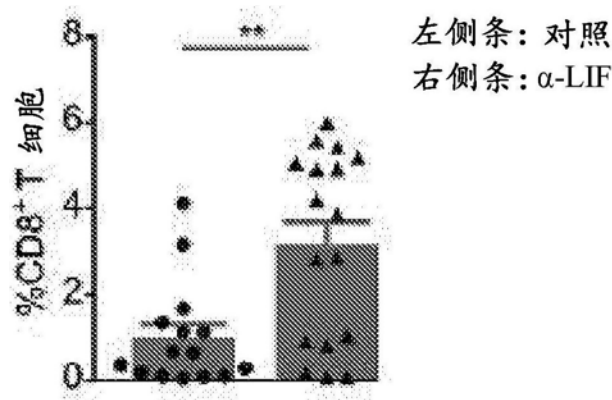


图26H

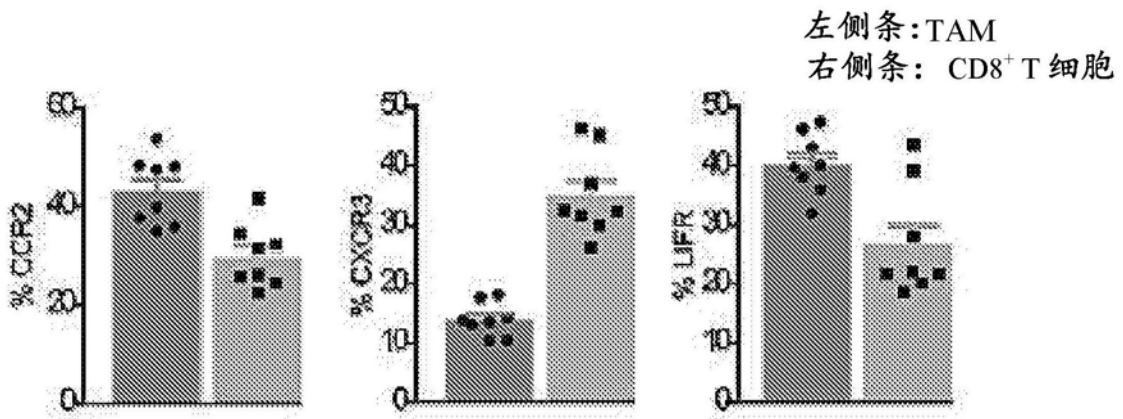


图27A

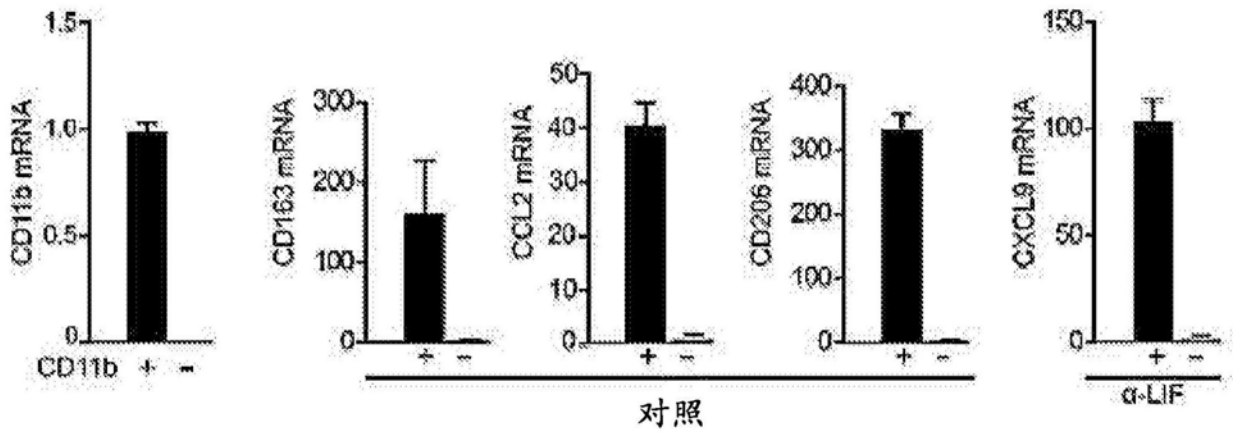


图27B

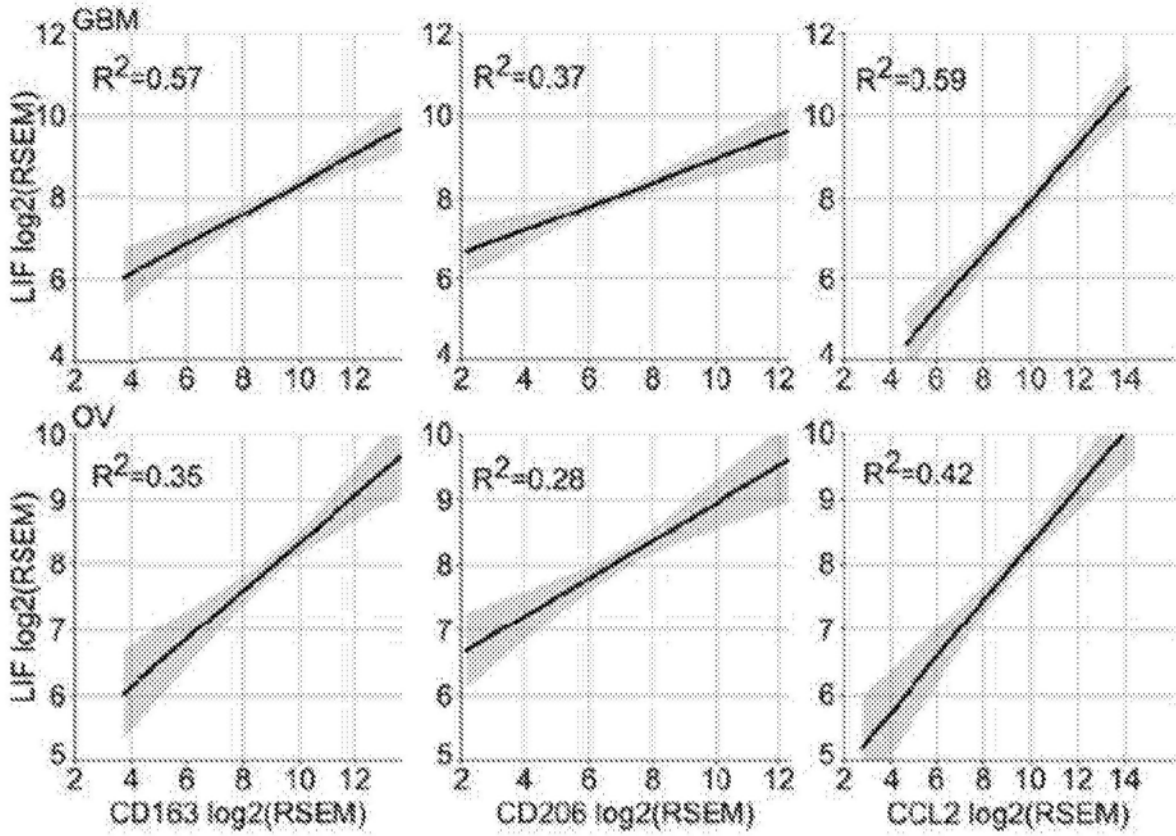


图28

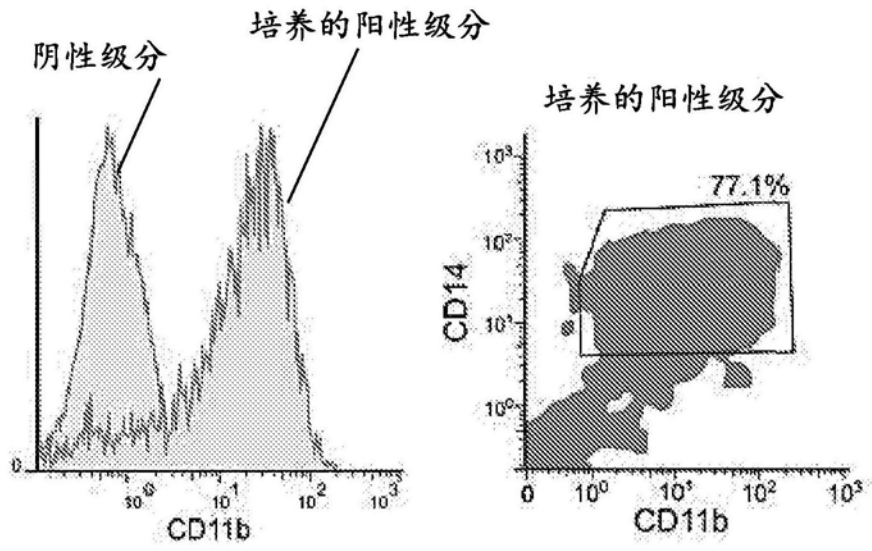


图29A

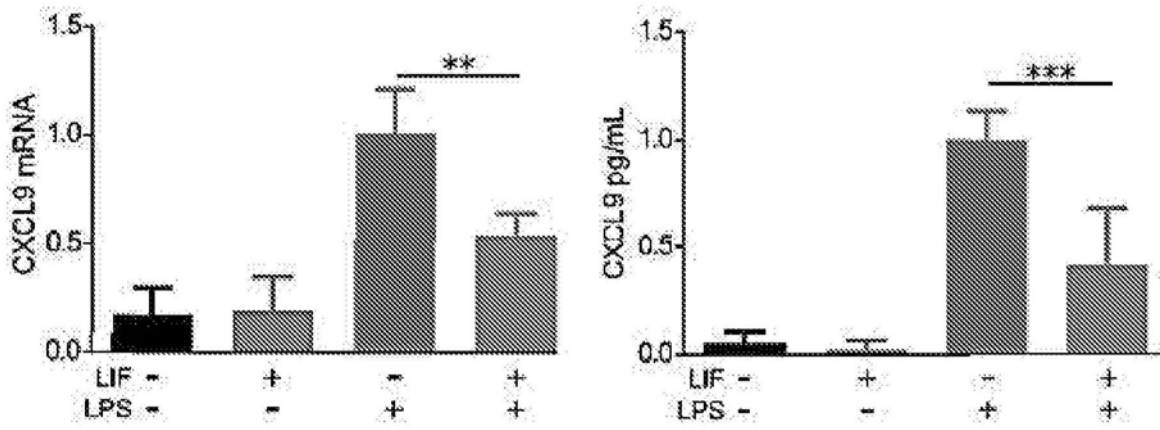


图29B

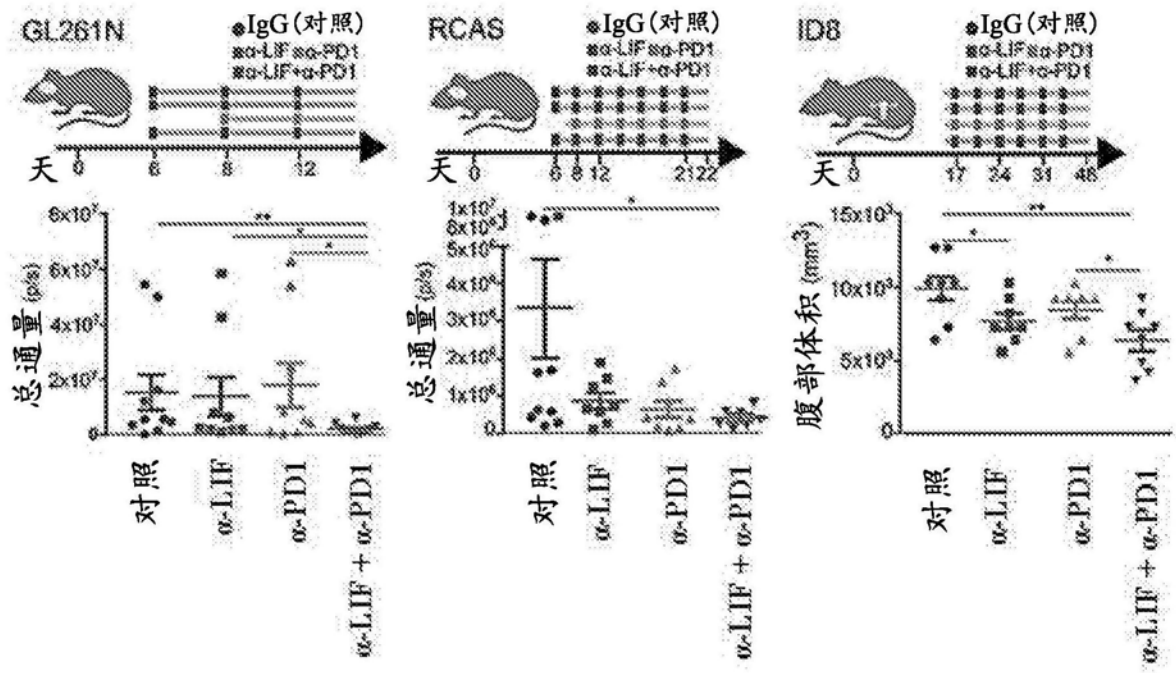


图30