(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119546329 A
(43)申请公布日 2025.02.28

(21)申请号 202380046150.3
(22)申请日 2023.04.11
(30)优先权数据
63/329,762 2022.04.11 US
63/347,330 2022.05.31 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/065627 2023.04.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/201226 EN 2023.10.19
(71)申请人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州
(72)发明人 E·史密斯 D·斯科科斯
K·奥尔森 L·哈伯 魏怡初
林家扬
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 黄遵玲 顾云峰
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书7页 说明书69页 附图69页

(54)发明名称

用于通用肿瘤细胞杀伤的组合物和方法

(57)摘要

本文提供了通过向受试者施用多特异性抗原结合分子来介导肿瘤细胞的杀伤的方法,所述多特异性抗原结合分子具有对第一靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区。在一些实施方案中,所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。在一些实施方案中,所述肿瘤细胞被预测不表达所述靶抗原。

CN 119546329 A

1.一种介导受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的杀伤的方法,其包括向所述受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,其中所述肿瘤细胞不表达或被预测不表达所述靶抗原。

2.一种诱导受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的杀伤的方法,所述方法包括向所述受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,其中至少一个亚群的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

3.一种诱导针对受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的T细胞活化的方法,所述方法包括向所述受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,其中至少一个亚群的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

4.一种治疗患有肿瘤的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,其中所述肿瘤中至少一个亚群的肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

5.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述方法还包括确定所述肿瘤中至少所述亚群的肿瘤细胞不表达所述靶抗原,任选地其中如果所述靶抗原的表达低于检测水平或低于信噪比,则肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

6.一种治疗受试者的癌症的方法,其包括

i)确定所述受试者包含含有不表达靶抗原的肿瘤细胞的肿瘤,并且

ii)向所述受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子包含对所述靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区。

7.一种选择受试者以供进行癌症疗法的方法,所述方法包括:

i)确定所述受试者包含含有不表达靶抗原的肿瘤细胞的肿瘤;并且

ii)向所述受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对所述靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,任选地其中如果所述靶抗原的表达低于检测水平或低于信噪比,则所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原,从而选择受试者以供进行癌症疗法。

8.如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述靶抗原是:

i)肿瘤相关抗原(TAA),

ii)与所述肿瘤的所述肿瘤微环境相关的抗原,任选地其中与所述肿瘤微环境相关的所述抗原是与肿瘤基质相关的抗原、与所述肿瘤的细胞外基质相关的抗原、与所述肿瘤微环境中的血管相关的抗原或与癌症相关成纤维细胞相关的抗原;或

iii)免疫抗原。

9.如权利要求8所述的方法,其中所述靶抗原是选自CD38、EGFR、CD22、MUC16、PSMA、CA9、FOLR1、HER2和SLAMF7的TTA。

10.如权利要求9所述的方法,其中所述靶抗原是CD22。

11.如权利要求8所述的方法,其中所述靶抗原是与肿瘤基质相关的抗原,其选自PSA、

CEA、CA-125、CA-19、COL10、FAP、B7H3、LRRC15和纤连蛋白-EDB同种型。

12.如权利要求8所述的方法,其中所述靶抗原是与所述肿瘤的细胞外基质相关的抗原,其选自连接蛋白、多功能蛋白聚糖(VACN)、纤连蛋白和癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)蛋白。

13.如权利要求8所述的方法,其中所述靶抗原是与癌症相关成纤维细胞相关的抗原,其选自α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、S100A4、血小板衍生的生长因子受体(PDGFRα/β)、波形蛋白、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-和CD49e。

14.如权利要求8所述的方法,其中所述靶抗原是与所述肿瘤微环境中的血管相关的抗原,其选自DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFRβ、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1和VEGFR2。

15.如权利要求8所述的方法,其中所述免疫抗原是在免疫细胞的表面上表达的抗原,其中所述免疫细胞选自巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、T细胞和B细胞。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述免疫细胞已经浸润到所述肿瘤或所述肿瘤的所述肿瘤微环境。

17.如权利要求8的方法,其中所述靶抗原是选自表4中所列的免疫抗原中的任何一种的免疫抗原。

18.如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述肿瘤包含免疫细胞。

19.如权利要求18所述的方法,其中所述免疫细胞是B细胞和/或表达CD20的细胞。

20.如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中不表达所述靶抗原的所述肿瘤细胞也不表达CD20。

21.如权利要求8所述的方法,其中所述靶抗原是TTA,并且所述肿瘤是还包含表达所述TAA的肿瘤细胞的异质肿瘤。

22.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述肿瘤的所述肿瘤微环境包含表达所述靶抗原的细胞。

23.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述肿瘤中至少20%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

24.如权利要求23所述的方法,其中所述肿瘤中至少30%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

25.如权利要求23所述的方法,其中所述肿瘤中至少40%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

26.如权利要求23所述的方法,其中所述肿瘤中至少50%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

27.如权利要求23所述的方法,其中所述肿瘤中至少60%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

28.如权利要求23所述的方法,其中所述肿瘤中至少70%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

29.如权利要求23所述的方法,其中所述肿瘤中至少80%的所述细胞不表达所述靶抗原。

30.如权利要求23所述的方法,其中所述肿瘤中至少90%的所述细胞不表达所述靶抗原。

31.如权利要求23所述的方法,其中所述肿瘤中100%的所述细胞不表达所述靶抗原。

32.如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述肿瘤中至少10%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述肿瘤中至少30%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

34.如权利要求32所述的方法,其中所述肿瘤中至少50%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

35.如权利要求32所述的方法,其中所述肿瘤中至少70%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

36.如权利要求32所述的方法,其中所述肿瘤中至少90%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述靶抗原。

37.如权利要求1-36中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗原结合分子是双特异性抗体或双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)或串联双抗体(TandAb)。

38.如权利要求1至7中任一项的方法,其中所述多特异性抗原结合分子是选自表3中所列的双特异性抗体的双特异性抗体。

39.如权利要求1至36中任一项的方法,其中将所述多特异性抗原结合分子与第二多特异性抗原结合分子联合施用于所述受试者,所述第二多特异性抗原结合分子具有对第二靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD3蛋白具有特异性的第二抗原结合区。

40.如权利要求39所述的方法,其中所述第二多特异性抗原结合分子是双特异性抗体或双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)和串联双抗体(TandAb)。

41.如权利要求39所述的方法,其中所述第二靶抗原选自表2中所列的TAA中的任何一个。

42.如权利要求39所述的方法,其中所述第二靶抗原是CD20蛋白。

43.如权利要求39所述的方法,其中所述第二多特异性抗原结合分子选自表5中的所述多特异性抗原结合分子中的任何一种。

44.如权利要求39至43中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗原结合分子在与所述第二多特异性抗原结合分子联合施用时表现出共刺激作用。

45.如权利要求44所述的方法,其中所述共刺激作用是以下中的一种或多种:活化T细胞、诱导IL-2释放、诱导PBMC中的CD25+上调、以及增加T细胞介导的细胞毒性。

46.如权利要求1至45中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是B细胞癌的肿瘤细胞。

47.如权利要求46所述的方法,其中所述B细胞癌是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤(瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症)、毛细胞白血病、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤或原发性眼内淋巴瘤(眼部淋巴瘤)。

48.如权利要求1至45中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是实体瘤。

49.如权利要求48所述的方法,其中所述肿瘤是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、血源性肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食道肿瘤、尤文氏肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、默克尔细胞肿瘤、睾丸肿瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或威尔姆斯肿瘤。

50.如权利要求1至49中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗原结合分子通过全身、静脉内、皮下或肌肉内施用。

51.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗原结合分子以药学上可接受的制剂施用于所述受试者。

52.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用另外的抗癌剂。

53.如权利要求52所述的方法,其中所述另外的抗癌剂是化疗剂、免疫检查点抑制剂、肿瘤疫苗或细胞疗法,任选地其中所述细胞疗法包括CAR-T细胞、自然杀伤细胞或巨噬细胞。

54.如权利要求53所述的方法,其中所述另外的抗癌剂是免疫检查点抑制剂。

55.如权利要求54所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1抗体、抗PDL1抗体、抗CTLA4抗体或抗LAG3抗体。

56.如权利要求1至55中任一项所述的方法,其中所述受试者患有难治性癌症。

57.一种治疗患有肿瘤的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用:

第一多特异性抗原结合分子,其具有对第一靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的抗原结合区;和

第二多特异性抗原结合分子,其具有对第二靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD3蛋白具有特异性的抗原结合区,

其中所述第一靶抗原与所述第二靶抗原不是相同的抗原。

58.一种诱导受试者的肿瘤中肿瘤细胞杀伤的方法,所述方法包括向所述受试者施用:

第一多特异性抗原结合分子,其具有对第一靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的抗原结合区;和

第二多特异性抗原结合分子,其具有对第二靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD3蛋白具有特异性的抗原结合区,

其中所述第一靶抗原与所述第二靶抗原不是相同的抗原。

59.一种诱导针对受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的T细胞活化的方法,所述方法包括向所述受试者施用:

第一多特异性抗原结合分子,其具有对第一靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的抗原结合区;和

第二多特异性抗原结合分子,其具有对第二靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD3蛋白具有特异性的抗原结合区,

其中所述第一靶抗原与所述第二靶抗原不是相同的抗原。

60.如权利要求57至59所述的方法,其进一步包括确定所述肿瘤包含不表达所述第一

靶抗原的至少一个亚群的肿瘤细胞。

61.如权利要求57至60中任一项所述的方法,其中所述肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

62.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少10%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

63.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少20%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

64.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少30%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

65.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少40%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

66.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少50%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

67.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少60%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

68.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少70%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

69.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少80%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

70.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少90%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

71.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中100%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

72.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少10%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

73.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少30%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

74.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少50%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

75.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少70%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

76.如权利要求61所述的方法,其中所述肿瘤中至少90%-100%的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原。

77.如权利要求57至76中任一项所述的方法,其中所述第一靶抗原是:

i)肿瘤相关抗原(TAA),

ii)与所述肿瘤的所述肿瘤微环境相关的抗原,任选地其中与所述肿瘤微环境相关的所述抗原是与肿瘤基质相关的抗原、与所述肿瘤的细胞外基质相关的抗原、与所述肿瘤微环境中的血管相关的抗原或与癌症相关成纤维细胞相关的抗原;或

iii)免疫抗原。

78.如权利要求77所述的方法,其中所述第一靶抗原是选自CD38、EGFR、CD22、MUC16、PSMA、CA9、FOLR1、HER2和SLAMF7的TTA。

79.如权利要求78所述的方法,其中所述第一靶抗原是CD22。

80.如权利要求77所述的方法,其中所述第一靶抗原是与所述肿瘤基质相关的抗原,其选自PSA、CEA、CA-125、CA-19、COL10、FAP、B7H3、LRRC15和纤连蛋白-EDB同种型。

81.如权利要求77所述的方法,其中所述第一靶抗原是与所述肿瘤的所述细胞外基质相关的抗原,其选自连接蛋白、多功能蛋白聚糖(VACN)、纤连蛋白和癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)蛋白。

82.如权利要求77所述的方法,其中所述第一靶抗原是与癌症相关成纤维细胞相关的抗原,其选自α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、S100A4、血小板衍生的生长因子受体(PDGFRα/β)、波形蛋白、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-和CD49e。

83.如权利要求77所述的方法,其中所述第一靶抗原是与所述肿瘤微环境中的血管相关的抗原,其选自DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFRβ、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1和VEGFR2。

84.如权利要求77所述的方法,其中所述第一靶抗原是在免疫细胞的表面上表达的免疫抗原,并且所述免疫细胞选自巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、T细胞和B细胞。

85.如权利要求84所述的方法,其中所述免疫细胞已经浸润到所述肿瘤或所述肿瘤的肿瘤微环境。

86.如权利要求84的方法,其中所述第一靶抗原是选自表4中所列的免疫抗原中的任何一种的免疫抗原。

87.如权利要求57至76中任一项所述的方法,其中第一靶抗原选自表2中所列的抗原中的任何一种。

88.权利要求57至87中任一项的方法,其中所述肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达所述第二靶抗原。

89.如权利要求57至88中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是包含表达所述第一靶抗原的细胞和表达所述第二靶抗原的细胞的异质肿瘤。

90.权利要求89所述的方法,其中所述肿瘤中的所述肿瘤细胞不表达所述第一靶抗原和所述第二靶抗原两者。

91.如权利要求57至90中任一项所述的方法,其中所述第一多特异性抗原结合分子是双特异性抗体或双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)或串联双抗体(TandAb)。

92.权利要求57至90中任一项的方法,其中所述第一多特异性抗原结合分子选自表3中所列的双特异性抗体。

93.如权利要求57至92中任一项所述的方法,其中第二靶抗原选自表2中所列的抗原中的任何一种。

94.如权利要求93的方法,其中所述第二靶抗原是CD20。

95.如权利要求57至92中任一项所述的方法,其中所述第二靶抗原是免疫肿瘤抗原。

96.如权利要求95所述的方法,其中所述免疫肿瘤抗原是CD22、CD20、CD72、CD19、CD21、CD24或CD79。

97.如权利要求57至96中任一项所述的方法,其中所述第二多特异性抗原结合分子是双特异性抗体或双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)或串联双抗体(TandAb)。

98.如权利要求57至97中任一项所述的方法,其中所述第二多特异性抗原结合分子选自表5中所列的双特异性抗体。

99.如权利要求57至98中任一项所述的方法,其中所述第一多特异性抗原结合分子在与所述第二多特异性抗原结合分子联合施用时表现出共刺激作用。

100.如权利要求99所述的方法,其中所述共刺激作用是以下中的一种或多种:活化T细胞、诱导IL-2释放、诱导PBMC中的CD25+上调、以及增加T细胞介导的细胞毒性。

101.权利要求57至100中任一项的方法,其中所述肿瘤来自B细胞癌。

102.如权利要求101所述的方法,其中所述B细胞癌是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤(瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症)、毛细胞白血病、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤或原发性眼内淋巴瘤(眼部淋巴瘤)。

103.如权利要求57至100中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是实体瘤。

104.如权利要求103所述的方法,其中所述肿瘤是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、血源性肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食道肿瘤、尤文氏肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、默克尔细胞肿瘤、睾丸肿瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或威尔姆斯肿瘤。

105.如权利要求57至104中任一项所述的方法,其中所述第一多特异性抗原结合分子通过全身、静脉内、皮下或肌肉内施用。

106.如权利要求57至105中任一项所述的方法,其中所述第二多特异性抗原结合分子通过全身、静脉内、皮下或肌肉内施用。

107.如权利要求57至106中任一项所述的方法,其中所述第一多特异性抗原结合分子和所述第二多特异性抗原结合分子以药学上可接受的制剂施用于所述受试者。

108.如权利要求57至107中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用另外的抗癌剂。

109.如权利要求108所述的方法,其中所述另外的抗癌剂是化疗剂、免疫检查点抑制剂或细胞疗法,任选地其中所述细胞疗法包括CAR-T细胞、自然杀伤细胞或巨噬细胞。

110.如权利要求109所述的方法,其中所述另外的抗癌剂是免疫检查点抑制剂。

111.如权利要求110所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1抗体、抗PDL1抗体、抗CTLA4抗体或抗LAG3抗体。

112.如权利要求1至111中任一项所述的方法,其中所述受试者患有难治性癌症。

用于通用肿瘤细胞杀伤的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年4月11日提交的美国临时申请号63/329,762和于2022年5月31日提交的美国临时申请号63/347,330的权益,每个临时申请的全部内容以引用的方式在此并入。

背景技术

[0003] 癌症是北美死亡的主要原因之一。尽管经过数十年的研究,许多癌症仍然对传统化疗和其他治疗剂没有反应或产生抗性。最近,免疫疗法的进展产生了一些有希望的疗法,但即使是这些治疗剂也往往只对特定患者和癌症类型有效。因此,需要新型癌症治疗。

发明内容

[0004] 本文提供的方法和组合物部分基于以下意外发现:靶向肿瘤相关抗原、靶向肿瘤微环境中的细胞的抗原或免疫抗原(例如,在肿瘤或肿瘤微环境中的免疫细胞表面表达的抗原)的CD28双特异性抗体可以诱导缺乏此类抗原表达的癌症或肿瘤细胞的杀伤。

[0005] 在某些方面,本文提供了通过向受试者施用多特异性(例如,双特异性)抗原结合分子来介导受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的杀伤的方法和组合物,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,其中肿瘤细胞不表达或被预测不表达靶抗原。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0006] 在一些方面,本文提供了用于诱导受试者的肿瘤细胞的杀伤和/或诱导针对肿瘤中的肿瘤细胞的T细胞活化的方法和组合物,所述方法包括向受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0007] 在一些方面,本文还提供了用于治疗患有肿瘤的受试者的癌症的方法和组合物,所述方法包括向受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0008] 在一些实施方案中,靶抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方案中,靶抗原是与肿瘤微环境(例如,受试者体内的肿瘤微环境)相关的抗原。例如,在一些实施方案中,靶抗原是免疫细胞上、肿瘤细胞基质上或肿瘤微环境内的细胞外基质上的抗原。细胞外基质抗原的实例包括连接蛋白(nectin)(例如,连接蛋白-3或连接蛋白-4)、多功能蛋白聚糖(VACN)、纤连蛋白和癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)蛋白抗原。

[0009] 在一些实施方案中,本文提供的方法还可以包括确定肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。在一些实施方案中,如果靶抗原的表达低于检测水平或低于信噪比,则肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0010] 在一些方面,本文提供了治疗受试者的癌症的方法,其包括i)确定受试者包含含有不表达靶抗原的肿瘤细胞的肿瘤,以及ii)向受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子包含对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区。

[0011] 在一些方面,本文提供了选择受试者以供进行癌症疗法的方法,所述方法包括:i)确定受试者包含含有不表达靶抗原的肿瘤细胞的肿瘤;和ii)向受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,任选地其中如果靶抗原的表达低于检测水平或低于信噪比,则肿瘤细胞不表达靶抗原,从而选择受试者以供进行癌症疗法。

[0012] 在一些实施方案中,靶抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方案中,肿瘤可以是还包含表达TAA的肿瘤细胞的异质肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤的肿瘤微环境包含表达TAA的细胞。在一些实施方案中,肿瘤中至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、或至少80%的肿瘤细胞不表达TAA。在一些实施方案中,肿瘤中至少10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100%或90%-100%的肿瘤细胞不表达TAA。

[0013] 在一些实施方案中,靶抗原是与肿瘤的肿瘤微环境相关的抗原,诸如与肿瘤基质相关的抗原、与肿瘤的细胞外基质相关的抗原、与肿瘤微环境中的血管相关的抗原或与癌症相关成纤维细胞相关的抗原。

[0014] 在一些实施方案中,靶抗原是与肿瘤基质相关的抗原,其选自PSA、CEA、CA-125、CA-19、COL10、FAP、B7H3、LRRC15和纤连蛋白-EDB同种型。

[0015] 在一些实施方案中,靶抗原是与肿瘤的细胞外基质相关的抗原,其选自连接蛋白(例如,连接蛋白-3或连接蛋白-4)、多功能蛋白聚糖(VACN)、纤连蛋白和癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)蛋白。

[0016] 在一些实施方案中,肿瘤的肿瘤微环境包含表达靶抗原的细胞。

[0017] 在一些实施方案中,靶抗原是在癌症相关成纤维细胞的表面上表达的抗原(例如,α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、S100A4、血小板衍生的生长因子受体(PDGFRα/β)、波形蛋白、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-或CD49e)。

[0018] 在一些实施方案中,靶抗原是在肿瘤微环境中血管的表面上表达的抗原,诸如DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFRβ、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1或VEGFR2。

[0019] 在一些实施方案中,靶抗原是免疫抗原。在一些实施方案中,免疫抗原是在免疫细胞的表面上表达的抗原。免疫细胞可以是巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、T细胞或B细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞已浸润到肿瘤或肿瘤的肿瘤微环境中。所述免疫抗原可选自表4中所列的免疫抗原中的任何一种。

[0020] 在一些实施方案中,肿瘤中至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、

56％、57％、58％、59％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的肿瘤细胞不表达靶抗原。在一些实施方案中,肿瘤中至少10％-100％、20％-100％、30％-100％、40％-100％、50％-100％、60％-100％、70％-100％、80％-100％或90％-100％的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0021] 在一些实施方案中,肿瘤包含免疫细胞(例如,B细胞和/或表达CD20的细胞)。在一些实施方案中,不表达靶抗原的肿瘤细胞也不表达CD20。靶抗原可以选自CD38、EGFR、CD22、MUC16、PSMA、CA9、FOLR1、HER2和SLAMF7。靶抗原可以是CD22。

[0022] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子可以是双特异性抗体(例如,表3中所列的双特异性抗体中的任何一种)或双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)和串联双抗体(TandAb)。在一些实施方案中,将多特异性抗原结合分子与第二多特异性抗原结合分子联合施用于受试者,所述第二多特异性抗原结合分子具有对第二靶抗原(例如,第二肿瘤相关抗原(TAA2))具有特异性的第一抗原结合区和对CD3蛋白具有特异性的第二抗原结合区。在一些实施方案中,第二多特异性抗原结合分子是双特异性抗体或双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)和串联双抗体(TandAb)。

[0023] 第二靶抗原可以选自表2中所列的抗原中的任何一种。第二靶抗原可以是CD20蛋白。在一些实施方案中,第二多特异性抗原结合分子选自表5中的多特异性抗原结合分子中的任何一种。当与第二多特异性抗原结合分子联合施用时,多特异性抗原结合分子可以表现出共刺激作用。在一些实施方案中,共刺激作用是以下一种或多种:活化T细胞、诱导IL-2释放、诱导PBMC中的CD25+上调、以及增加T细胞介导的细胞毒性。在一些实施方案中,肿瘤细胞是B细胞癌的肿瘤细胞。B细胞癌包括但不限于弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤(瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症)、毛细胞白血病、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤或原发性眼内淋巴瘤(眼部淋巴瘤)。

[0024] 在某些实施方案中,肿瘤为实体肿瘤。肿瘤可以是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、血源性肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食道肿瘤、尤文氏肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、默克尔细胞肿瘤、睾丸肿瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或威尔姆斯肿瘤。

[0025] 多特异性抗原结合分子可以全身、静脉内、皮下或肌肉内施用。多特异性抗原结合分子可以以药学上可接受的制剂施用于受试者。在一些实施方案中,所述方法还包括施用另外的抗癌剂。所述另外的抗癌剂可以是化疗剂、免疫检查点抑制剂、CAR-T细胞或肿瘤疫苗。免疫检查点抑制剂可以是抗PD-1抗体、抗PDL1抗体、抗CTLA4抗体或抗LAG3抗体。

[0026] 在一些实施方案中,受试者患有难治性癌症。

[0027] 在一些方面,本文提供了治疗患有肿瘤的受试者的癌症、诱导或介导受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的杀伤、和/或诱导针对受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的T细胞活化的方法,所述方法包括向受试者施用:第一多特异性抗原结合分子,所述第一多特异性抗原结合分子具有对第一靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的抗原结合区;以及第二多特异性抗原结合分子,所述第二多特异性抗原结合分子具有对第二靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD3蛋白具有特异性的抗原结合区,其中第一靶抗原与第二靶抗原不是相同的抗原。在一些实施方案中,第一靶抗原和/或第二靶抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。

[0028] 在一些实施方案中,所述方法还包括确定肿瘤包含不表达第一靶抗原的肿瘤细胞亚群。

[0029] 在一些方面,本文提供了治疗患有肿瘤的受试者的癌症、诱导或介导受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的杀伤、和/或诱导针对受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的T细胞活化的方法,所述方法包括确定肿瘤是否包含不表达第一靶抗原的肿瘤细胞,向受试者施用:第一多特异性抗原结合分子,所述第一多特异性抗原结合分子具有对第一靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的抗原结合区;以及第二多特异性抗原结合分子,所述第二多特异性抗原结合分子具有对第二靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD3蛋白具有特异性的抗原结合区,其中第一靶抗原与第二靶抗原不是相同的抗原。在一些实施方案中,第一靶抗原和/或第二靶抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。

[0030] 在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达第一靶抗原。在一些实施方案中,肿瘤中至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、或至少80%的肿瘤细胞不表达第一靶抗原。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达第二靶抗原。在一些实施方案中,肿瘤是包含表达第一靶抗原的细胞和表达第二靶抗原的细胞的异质肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤中的肿瘤细胞不表达第一靶抗原和第二靶抗原两者。

[0031] 在一些实施方案中,第一靶抗原是与肿瘤的肿瘤微环境相关的抗原,诸如与肿瘤基质相关的抗原、与肿瘤的细胞外基质相关的抗原、与肿瘤微环境中的血管相关的抗原或与癌症相关成纤维细胞相关的抗原。

[0032] 在一些实施方案中,第一靶抗原是与肿瘤基质相关的抗原,其选自PSA、CEA、CA-125、CA-19、COL10、FAP、B7H3、LRRC15和纤连蛋白-EDB同种型。

[0033] 在一些实施方案中,第一靶抗原是与肿瘤的细胞外基质相关的抗原,其选自连接蛋白(例如,连接蛋白-3或连接蛋白-4)、多功能蛋白聚糖(VACN)、纤连蛋白和癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)蛋白。

[0034] 在一些实施方案中,肿瘤的肿瘤微环境包含表达靶抗原的细胞。

[0035] 在一些实施方案中,第一靶抗原是在癌症相关成纤维细胞的表面上表达的抗原(例如,α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、S100A4、血小板衍生的生长因子受体(PDGFRα/β)、波形蛋白、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-或CD49e)。

[0036] 在一些实施方案中,第一靶抗原是在肿瘤微环境中血管的表面上表达的抗原,诸如DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFRβ、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1和VEGFR2。

[0037] 在一些实施方案中,第一靶抗原是免疫抗原。在一些实施方案中,免疫抗原是在免

疫细胞的表面上表达的抗原。免疫细胞可以是巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、T细胞或B细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞已浸润到肿瘤或肿瘤的肿瘤微环境中。所述免疫抗原可选自表4中所列的免疫抗原中的任何一种。

[0038] 在一些实施方案中,肿瘤中至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的肿瘤细胞不表达第一靶抗原或第二靶抗原。在一些实施方案中,肿瘤中至少10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100%或90%-100%的肿瘤细胞不表达第一靶抗原和/或第二靶抗原。

[0039] 第一靶抗原可以选自表2中所列的抗原中的任何一种。第一靶抗原可以是CD22。第一靶抗原可以是非免疫抗原。非免疫抗原可以是CD38、EGFR、MUC16、PSMA、CA9、FOLR1、HER2或SLAMF7。在一些实施方案中,第一多特异性抗原结合分子是双特异性抗体或双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)和串联双抗体(TandAb)。在一些实施方案中,第一多特异性抗原结合分子选自表3中所列的双特异性抗体。在一些实施方案中,第二靶抗原选自表2中所列的抗原中的任何一种。第二靶抗原可以是CD20。第二靶抗原可以是免疫抗原。在一些实施方案中,免疫抗原是CD22、CD20、CD72、CD19、CD21、CD24或CD79。第二多特异性抗原结合分子可以是双特异性抗体或双特异性抗体片段。在一些实施方案中,第二多特异性抗原结合分子选自表5中所列的双特异性抗体。在一些实施方案中,第二多特异性抗原结合分子是双特异性抗体或双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)和串联双抗体(TandAb)。

[0040] 在一些实施方案中,第一多特异性抗原结合分子在与第二多特异性抗原结合分子联合施用时表现出共刺激作用。共刺激作用可以是以下一种或多种:活化T细胞、诱导IL-2释放、诱导PBMC中的CD25+上调、以及增加T细胞介导的细胞毒性。

[0041] 肿瘤可来自B细胞癌,诸如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤(瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症)、毛细胞白血病、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤或原发性眼内淋巴瘤(眼部淋巴瘤)。

[0042] 在某些实施方案中,肿瘤为实体肿瘤。肿瘤可以是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、血源性肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食道肿瘤、尤文氏肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、默克尔细胞肿瘤、睾丸肿瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或威尔姆

斯肿瘤。

[0043] 在一些实施方案中,第一多特异性抗原结合分子通过全身、静脉内、皮下或肌肉内施用。第二多特异性抗原结合分子可以全身、静脉内、皮下或肌肉内施用。第一多特异性抗原结合分子和/或第二多特异性抗原结合分子可以以药学上可接受的制剂施用于受试者。

[0044] 在一些实施方案中,所述方法还包括施用另外的抗癌剂。在一些实施方案中,另外的抗癌剂是化疗剂、免疫检查点抑制剂、CAR-T细胞或肿瘤疫苗。在一些实施方案中,另外的抗癌剂是免疫检查点抑制剂。免疫检查点抑制剂是抗PD-1抗体、抗PDL1抗体、抗CTLA4抗体或抗LAG3抗体。

[0045] 在一些实施方案中,受试者可能患有难治性癌症。

附图说明

[0046] 图1A-图1C显示在奥尼妥单抗(odronextamab)治疗之前和之后,r/r NHL患者的肿瘤内CD8 T细胞上均表达CD28。图1A显示了来自奥尼妥单抗I期研究的基线DLBCL患者样品的多重IHC染色(CD3、CD8、CD28和DAPI)的代表性图像。图1B显示了来自基线DLBCL和FL样品的CD4+CD28+和CD8+CD28+细胞的密度。N=64。图1C显示了基线(左上)和开始奥尼妥单抗治疗后5周时(右上)DLBCL患者样品的代表性图像。来自基线和治疗5周时配对DLBCL和FL样品的CD8+Cd28+和CD8+CD28+细胞的密度。

[0047] 图2A-图2H显示REGN5837双特异性抗体在体外增强奥尼妥单抗介导的T细胞活化、细胞毒性和效应功能。将WSU-DLCL2细胞与富含淋巴细胞的人PBMC一起孵育,其中奥尼妥单抗剂量滴定,REGN5837浓度固定(范围为7.72x10-″至1.00x10^{-7}M)。图2A显示肿瘤细胞杀伤通过死细胞百分比来计算。图2B和图2D显示CD4和CD8 T细胞的活化由CD25上调表示。图2C和图2E显示增殖通过分裂CD4和CD8 T细胞的百分比计算。图2F显示对上清液中IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF-a、IFN-y和IL-17A细胞因子释放进行评估。箭头表示REGN5837最高浓度(1.00x10^{-7}M)与无REGN5837之间EC50的倍数变化或最大细胞因子浓度的倍数变化。图2G显示,通过将纯化的人T细胞与不同比率的混合CD22+和CD22-WSU-DLCL2肿瘤细胞以及固定浓度的REGN5837(范围为4.63x10^{-10}至1.67x10^{-8}M)和5pM奥尼妥单抗一起孵育,确定REGN5837(R5837)对CD22阴性细胞的T细胞杀伤的增强作用。CD22+靶标的杀伤以红色阴影描绘,而CD22-靶标的杀伤以蓝色阴影描绘。图2H显示,混合WSU-DLCL2CD22+和CD22-培养物中T细胞的活化由CD25的上调确定。

[0048] 图3A-图3F显示在预防性治疗环境下在WSU-DLCL2肿瘤模型中,REGN5837增强奥尼妥单抗的抗肿瘤功效并扩增肿瘤内CD8 T细胞。图3A显示植入NSG动物的WSU-DLCL2肿瘤的治疗方案。图3B显示单个肿瘤体积的绘图。比率表示无肿瘤小鼠的数量。图3C显示平均肿瘤生长(左)和存活率(右)。采用双因素方差分析和Tukey多重比较来计算平均肿瘤生长的统计学显著性。使用Kaplan-Meier方法和对数秩检验来计算存活率的统计学显著性。*P<0.05,“P<0.01,***P<0.001。植入后26天处死携带WSU-DLCL2肿瘤的动物,以分析肿瘤内T细胞反应的免疫表型。肿瘤中所有活细胞的UMAP图与由FlowSOM鉴定的颜色编码免疫细胞亚群相重叠(图3D左),并且密度UMAP图(图3D右)揭示了某些群体对组合治疗的反应的偏差。图3E显示WSU-DLCL2细胞的密度(左)和肿瘤内CD8+T细胞的密度(右)。图3F显示的饼图描绘了响应于治疗肿瘤内CD8 T细胞的活化和记忆亚群的比例(左)。效应记忆和中央记忆肿瘤

内CD8+T细胞的密度(右)。统计数据使用单因素方差分析和Tukey检验进行计算。***P<0.001,****P<0.0001

[0049] 图4A-图4F显示在治疗性治疗环境中REGN5837介导的共刺激增强奥尼妥单抗针对B细胞恶性肿瘤的抗肿瘤功效。图4A显示植入NSG动物的WSU-DLCL2肿瘤治疗的治疗方案。图4B显示单个肿瘤体积的绘图。比率表示无肿瘤小鼠的数量。图4C显示平均肿瘤生长(左)和存活率(右)。采用双因素方差分析和Tukey多重比较来计算平均肿瘤生长的统计学显著性。使用Kaplan-Meier方法和对数秩检验计算存活率的统计学显著性。*P<0.05,**P<0.01。图4D显示植入PBMC移植NSG动物的NALM6-luc肿瘤的治疗方案。图4E显示BLI,显示了单个小鼠的肿瘤负荷。图4F显示平均NALM6-luc肿瘤生长。采用双因素方差分析和Tukey多重比较来计算显著性。*P<0.05,***P<0.001。

[0050] 图5A-图5J显示在携带WSU-DLCL2肿瘤的人体免疫系统重建动物中REGN5837与奥尼妥单抗的组合增强外周和肿瘤内T细胞反应。图5A显示植入人体免疫系统重建动物的WSU-DLCL2肿瘤的治疗方案。图5B显示单个肿瘤体积的绘图。图5C显示平均肿瘤生长(左)和存活率(右)。采用双因素方差分析和Tukey多重比较来计算平均肿瘤生长的统计学显著性。使用Kaplan-Meier方法和对数秩检验计算存活率的统计学显著性。*P<0.05,″P<0.01。图5D显示响应于治疗外周CD8 T细胞计数(左)和外周B细胞计数(右)的时间过程。图5E显示响应于治疗诱导的血清细胞因子的时间过程。植入后30天处死携带WSU-DLCL2肿瘤的人免疫系统动物,以分析肿瘤内T细胞反应的免疫表型。血液、脾和肿瘤中所有活细胞的UMAP图与由FlowSOM鉴定的颜色编码免疫细胞亚群相重叠(图5F左),并且密度UMAP图(图5F右)揭示了某些群体对组合治疗的反应的偏差。图5G显示肿瘤内CD4 T细胞(右上)、CD8 T细胞(左上)和WSU-DLCL2细胞(底部)的密度。图5H显示所有肿瘤内T细胞的UMAP图与由FlowSOM鉴定的颜色编码元簇(metacluster)相重叠(左),并且密度UMAP图(右)揭示某些元簇的偏差。图5I显示FlowSOM用于鉴定T细胞元簇的T细胞活化、记忆、功能失调标志物的热图。图5J显示响应于组合治疗,所选T细胞簇的富集或减少的频率。统计数据使用单因素方差分析和Tukey检验进行计算。P<0.05,″P<0.01,****P<0.0001。

[0051] 图6A-图6D显示当REGN5837与奥尼妥单抗组合时,食蟹猴外周血中CD8 T细胞的协同活化。食蟹猴以1mg/kg或10mg/kg接受单剂量REGN5837(括号中指示)与剂量滴定的奥尼妥单抗的组合。给药后在指定时间(小时)收集血液。图6A显示给药后5小时(左)和实验持续期间(右)的B细胞计数。图6B显示给药后5小时(左)和实验持续期间(右)的外周CD8+T细胞计数。图6C显示给药后5小时外周CD8+T细胞上的ICOS上调(左)和给药后4天的增殖(右)。图6D显示给药后5小时诱导的血清细胞因子。统计数据使用单因素方差分析和Tukey检验进行计算。黑色星号表示与安慰剂相比具有显著性。n=3只动物/组。*P<0.05,**13<0.01,***13<0.001,****P<0.0001。

[0052] 图7A-图7C显示CD22表达在切除的DLBCL患者样品中是可变的。图7A显示切除的未接受治疗的DLBCL患者样品上的CD20和CD22的显色免疫组织化学染色。高(左)、中等(中)、低(右)CD22表达的代表性图像。图7B显示通过来自针对PAX5、CD20和CD22进行多重IHC染色的CD22表达百分比高(顶部)和低(底部)的DLBCL患者样品的代表性图像。图7C显示未接受治疗的DLBCL患者样品的B细胞标志物阳性细胞的百分比。

[0053] 图8A-图8B显示CD28、CTLA4、CD80和CD86是通过显色IHC可检测到的DLBCL患者样

品。图8A显示未接受治疗的切除的DLBCL患者样品(Tristar)上CD28、CTLA4、CD80和CD86的显色染色的代表性图像。图8B显示来自25个DLBCL患者样品的CD28'、CTLA4'、CD86'和CD80'细胞的密度。

[0054] 图9A-图9D显示REGN5837双特异性抗体增强奥尼妥单抗介导的T细胞细胞毒性和增殖。图9A显示将REGN5837、非靶向对照抗体或CD28超激动剂(REGN2329)使用湿涂法锚定到检测板上。将人PBMC在抗体包被的检测板中孵育,并在50-54小时后测量细胞因子释放。所显示的数据来自4个单独供体。指示与非结合对照组相比,观察到显著释放反应的细胞因子(Tukey事后检验)。图9B显示WSU-DLCL2细胞系上每个细胞的CD22(左)和CD20(右)表位的数量,报告为抗体结合能力。图9C显示在存在或不存在奥尼妥单抗的情况下与NALM-6或Raji CD80/CD86 DKO细胞一起培养时REGN5837介导的人CD4和CD8 T细胞增殖的概况。NC,未计算。图9D显示通过流式细胞术测得的WSU-DLCL2 CD22 ko(红色)和WSU-DLCL2CD22wt(绿色)细胞系上的CD22(左)和CD20(右)表达。

[0055] 图10A-图10D显示在WSU-DLBCL(DLBCL)肿瘤模型中奥尼妥单抗单一疗法治疗抑制肿瘤生长,但不能介导完全的肿瘤排斥。图10A显示植入NSG动物的WSU-DLCL2肿瘤的治疗方案。图10B显示响应于奥尼妥单抗的剂量滴定的单个肿瘤生长曲线。图10C显示平均肿瘤生长,并且图10D显示存活率。使用Kaplan-Meier方法用对数秩检验计算同种型治疗和R1979滴定之间的存活率的统计学显著性。***P<0.001,****P<0.0001。

[0056] 图11A-图11E显示REGN5837与奥尼妥单抗组合促进肿瘤内T细胞扩增和活化以及体内对WSU-DLBCL2肿瘤细胞的杀伤。图11A显示在植入后26天分析NSG小鼠中WSU-DLCL2肿瘤的免疫表型的治疗方案。图11B显示植入后26天每个治疗组的肿瘤质量图。图11C显示总活细胞中所示细胞群的百分比,表明CD4和CD8 T细胞有所扩增,并且偏离WSU-DLCL2细胞。图11D显示肿瘤内CD4 T细胞的密度图。图11E显示肿瘤内CD4 T细胞的记忆亚群百分比图。统计数据使用单因素方差分析和Tukey检验进行计算。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001。

[0057] 图12A-图12B显REGN5837在由奥尼妥单抗的同种异体反应介导的信号1存在的情况下增强IL-2的产生和T细胞增殖。使用富集的人原代T细胞和同种异体NALM-6细胞测定REGN5837在人B细胞白血病细胞系存在下介导IL-2释放和T细胞增殖的能力。图12A显示在奥尼妥单抗(500pM)存在下进行测定以提供信号1,或在奥尼妥单抗不存在下进行测定,其中信号1仅由同种异体反应和REGN5837或非结合CD28双特异性对照抗体的剂量滴定提供。将板孵育72小时,此时收集培养上清液进行IL-2分析。为了评估增殖,添加氚并将细胞再孵育16小时。图12B显示在奥尼妥单抗存在和不存在下REGN5837介导的IL-2释放和T细胞增殖的浓度依赖性增加的概况。

[0058] 图13A-图13H显示在携带DLBCL肿瘤的人体免疫系统重建动物中REGN5837与奥尼妥单抗的组合扩增外周和肿瘤内T细胞。图13A显示外周CD4 T细胞计数的时间过程。图13B显示响应于治疗诱导的血清IL-10的时间过程。图13C显示在处死以进行免疫表型分析之前的平均WSU-DLCL2肿瘤的平均生长。使用双因素方差分析和Tukey多重比较来计算组合治疗与同种型(黑色星号)或组合治疗与REGN5837单一疗法(红色星号)之间的统计学显著性。图13D显示所有活肿瘤内细胞中WSU-DLCL2细胞(左)和T细胞(右)的百分比。图13E和图13F显示肿瘤内CD8(图13E)和CD4(图13F)T细胞的记忆和活化亚群的百分比。图13G和图13H显示

记忆CD8(图13G)和CD4(图13H)T细胞的肿瘤内密度。统计数据使用单因素方差分析和Tukey检验进行计算。*P<0.05,**P<0.01,***1)<0.001,****P<0.0001。

[0059] 图14A-图14E显示,在患有DLBCL肿瘤的人体免疫系统重建动物中,奥尼妥单抗有效消耗脾脏和血液B细胞,同时促进效应记忆T细胞诱导。图14A和图14B显示植入WSU-DLCL2肿瘤后30天脾(图14A)或血液(图14B)中B细胞(左)和T细胞(右)的百分比。图14C显示脾中B细胞和T细胞亚群的计数。图14D显示血液中所有活细胞的密度UMAP图(右)。图14E显示血液中B细胞和T细胞亚群的计数。

[0060] 图15A-图15B显示当REGN5837与奥尼妥单抗组合时,食蟹猴外周血中CD4 T细胞的协同活化。图15A显示给药后4天(左)和实验持续期间的外周CD4 T细胞计数。图15B显示给药后5小时外周CD4T细胞上的ICOS上调(左)和给药后4天的增殖(右)。统计数据使用单因素方差分析和Tukey检验进行计算。黑色星号表示与安慰剂相比具有显著性。n=3只动物/组。*P<0.05,″P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001。

[0061] 图16显示DLBCL患者样品中CD22表达比CD20表达更可变。

[0062] 图17显示在CD22wt和CD22ko肿瘤细胞的混合培养物中,CD22xCD28与CD20xCD3组合可介导增强的T细胞对旁观者CD22ko靶细胞的杀伤。

[0063] 图18显示几种癌症中EGFR靶抗原的示例性表达谱。

[0064] 图19显示几种癌症中PMSA靶抗原的示例性表达谱。

[0065] 图20显示几种癌症中CA9靶抗原的示例性表达谱。

[0066] 图21显示几种癌症中HER2靶抗原的示例性表达谱。

[0067] 图22显示几种癌症中SLAMF7靶抗原的示例性表达谱。

[0068] 图23显示几种癌症中MUC16靶抗原的示例性表达谱。

[0069] 图24显示几种癌症中FOLR1靶抗原的示例性表达谱。

[0070] 图25显示几种癌症中CD38靶抗原的示例性表达谱。

[0071] 图26显示几种癌症中CD22靶抗原的示例性表达谱。

具体实施方式

[0072] 如本文所示,将T细胞与表达$CD22^{+}$的靶细胞和抗CD28/抗CD22双特异性抗体一起培养增强CD3双特异性介导的肿瘤细胞裂解。本文的公开内容部分基于以下发现:使用抗CD28/抗CD22双特异性抗体的组合治疗增加CD3双特异介导的$CD22^{+}$和$CD22^{-}$靶群体的肿瘤细胞裂解。类似的方法也增加了$CD22^{+}$和$CD22^{-}$靶群体中的CD4和CD8 T细胞活化。因此,申请人表明,靶向肿瘤相关抗原的抗CD28双特异性抗体可以增加对缺乏肿瘤相关抗原的肿瘤细胞的杀伤。

[0073] 本文提供了通过向受试者施用多特异性抗原结合分子来介导受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的杀伤的方法和组合物,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,其中肿瘤细胞不表达或被预测不表达靶抗原。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0074] 在一些方面,本文提供了用于诱导受试者的肿瘤细胞的杀伤和/或诱导针对肿瘤中的肿瘤细胞的T细胞活化的方法和组合物,所述方法包括向受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28

蛋白具有特异性的第二抗原结合区。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0075] 本文还提供了用于治疗患有肿瘤的受试者的癌症的方法和组合物,所述方法包括向受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0076] 如本文所用,当提及肿瘤中的肿瘤细胞"不表达靶抗原"时,该短语包括通过实验检测或确认至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原,以及通过方法预测(即,有或无进一步的实验确认)肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0077] 在一些实施方案中,靶抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方案中,靶抗原是与肿瘤微环境(例如,受试者体内的肿瘤微环境)相关的抗原。例如,在一些实施方案中,靶抗原是免疫细胞上、肿瘤细胞基质上或肿瘤微环境内的细胞外基质上的抗原。细胞外基质抗原的实例包括连接蛋白(例如,连接蛋白-3或连接蛋白-4)、多功能蛋白聚糖(VACN)、纤连蛋白和癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)。

[0078] 定义

[0079] 冠词"一个(种)(a/an)"在本文中用于指代冠词的一个或超过一个(即至少一个)语法对象。举例来说,"一个(种)要素"意指一个(种)要素或超过一个(种)要素。

[0080] 如本文所用,"施用(administering)"或"施用(administration)"意指将药剂或组合物提供给受试者,并且包括但不限于通过医学专业人员施用或自我施用。此类剂可以含有例如本文提供的双特异性抗体或双特异性抗体片段。

[0081] 如本文所用,术语"抗体"可指完整抗体和其抗原结合片段两者。完整抗体是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链包含重链可变区(本文中缩写为V_H)和重链恒定区。每条轻链包含轻链可变区(本文中缩写为V_L)和轻链恒定区。V_H和V_L区可进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,其中穿插有被称为骨架区(FR)的较保守区。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。术语"抗体"包括例如单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、三特异性抗体)、单链抗体和抗原结合抗体片段。

[0082] 如本文所用的术语抗体的"抗原结合片段"和"抗原结合部分"是指抗体的一个或多个保留结合抗原的能力的片段。抗原结合片段的非限制性实例包括:(i)Fab片段;(ii)F(ab')2片段;(iii)Fd片段;(iv)Fv片段;(v)单链Fv(scFv)分子;(vi)dAb片段;和(vii)由模拟抗体的高变区的氨基酸残基(例如分离的互补决定区(CDR),诸如CDR3肽)或限制性FR3-CDR3-FR4肽组成的最小识别单元。在如本文所用的表述"抗原结合片段"中还包括其他工程化分子,诸如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域。

[0083] 此外,术语"抗体"可以包括(除非另有说明或上下文明确)任何本领域已知的利用抗体结构和/或功能特征的构建体或形式,包括但不限于胞内抗体、结构域抗体、抗体模拟物、Zybodies®、Fab片段、Fab'片段、F(ab')2片段、Fd'片段、Fd片段、分离的CDR或其组、单

链抗体、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(sdFv)、多肽-Fc融合物、单结构域抗体(例如,鲨鱼单结构域抗体,如IgNAR或其片段)、骆驼抗体、骆驼化抗体、掩蔽抗体(例如,Probodies®)、affybodies、抗独特型(抗Id)抗体(包括例如,抗抗Id抗体)、小模块化免疫药物("SMIPsTM")、单链或串联双抗体(TandAb®),VHH、Anticalins®、Nanobodies®微型抗体、BiTE®、锚蛋白重复蛋白或DARPINs®、Avimers®、DART、TCR样抗体、Adnectins®、Affilins®、Trans-bodies®、Affibodies®、 TrimerX®、MicroProteins、Fynomers®、 Centyrins®和KALBITOR®、CAR、工程化TCR以及上述任何一种的抗原结合片段。

[0084] 用于本发明的抗体可以是双特异性抗体。双特异性抗体在单个抗体多肽内具有针对两种不同抗原的结合位点。抗原结合可以是同时的,也可以是顺序的。三源杂交瘤(trioma)和杂合杂交瘤是两种能够分泌双特异性抗体的细胞系的实例。美国专利4,474,893中公开了由杂合杂交瘤或三源杂交瘤产生的双特异性抗体的实例。双特异性抗体已通过化学方法(Staerz等人(1985)Nature 314:628,和Perez等人(1985)Nature 316:354)和杂交瘤技术(Staerz和Bevan(1986)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,83:1453,以及Staerz和Bevan(1986)Immunol.Today 7:241)构建。美国专利5,959,084中也描述了双特异性抗体。美国专利5,798,229中描述了双特异性抗体的片段。

[0085] 双特异性剂也可以通过融合杂交瘤或其他产生不同抗体的细胞来制备异种杂交瘤,然后鉴定产生和共同组装两种抗体的克隆来生成。它们也可以通过完整免疫球蛋白链或其部分(诸如Fab和Fv序列)的化学或基因缀合来产生。

[0086] 抗体还可以是"人源化的",其旨在包括由非人细胞产生的抗体,该抗体的可变区和恒定区已被改变,以更接近于由人细胞产生的抗体。例如,通过改变非人抗体氨基酸序列来掺入人种系免疫球蛋白序列中发现的氨基酸。本公开的人源化抗体可例如在CDR中包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如在体外通过随机或位点特异性诱变或在体内通过体细胞突变所引入的突变)。如本文所用,术语"人源化抗体"还包括其中源自另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已移植到人框架序列上的抗体。

[0087] 如本文所用,"癌症相关成纤维细胞"(CAF)包括在肿瘤组织内和周围发现的成纤维细胞,它们由正常驻留组织成纤维细胞活化或由于肿瘤微环境的刺激而从非成纤维细胞谱系(诸如上皮细胞和脂肪细胞)转分化而来。示例性的癌症相关成纤维细胞抗原包括α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、S100A4、血小板衍生的生长因子受体(PDGFRα/β)、波形蛋白、PDPN、CD70、Cd10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-.和CD49e。有关抗原和生物标志物的更多详细信息可在Han,C.,Liu,T.&Yin,R.Biomarkers for cancer-associated fibroblasts.Biomark Res8,64(2020)中找到。

[0088] "癌症"广义上指宿主自身细胞不受控制的异常生长,导致其侵入周围组织,并可能侵入宿主体内异常细胞生长的初始部位远端的组织。主要类别包括癌,其是上皮组织(例如皮肤、鳞状细胞)的癌症;肉瘤,其是结缔组织(例如骨、软骨、脂肪、肌肉、血管等)的癌症;白血病,其是造血组织(例如骨髓组织)的癌症;淋巴瘤和骨髓瘤,其是免疫细胞的癌症;以及中枢神经系统癌症,其包括脑和脊髓组织癌症。"癌症"和"赘生物"在本文中可互换使用。如本文所用,"癌症"是指所有类型的癌症或赘生物或恶性肿瘤,包括新发或复发的白血病、

癌和肉瘤。癌症的具体实例有:癌、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤和混合型肿瘤。癌症的非限制性实例包括脑癌、黑素瘤、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宫癌和髓母细胞瘤的新发或复发癌。在一些实施方案中,癌症包括实体肿瘤。在一些实施方案中,癌症包括转移。

[0089] 术语“嵌合抗原受体”(CAR)是指将针对靶细胞上存在的组分的结合结构域(例如,针对所需抗原(例如,肿瘤抗原)的基于抗体的特异性)与T细胞受体活化胞内结构域相组合以产生表现出特定抗靶细胞免疫活性的嵌合蛋白的分子。一般来说,CAR-T由胞外单链抗原结合结构域(scFv)与T细胞抗原受体复合物ζ链的胞内信号结构域融合而成,并且在T细胞中表达时,能够基于单克隆抗体的特异性重定向抗原识别。

[0090] 如本文所用,短语“联合施用”或“联合地施用”是指以任何形式施用两种或多种不同的治疗剂,使得在先前施用的治疗剂在体内仍然有效时施用第二种剂(例如,两种剂在受试者体内同时有效,其可以包括两种剂的协同作用)。例如,不同的治疗剂可以以相同制剂或单独制剂的形式、同时或顺序地施用。在某些实施方案中,不同的治疗剂可在彼此的约一小时、约12小时、约24小时、约36小时、约48小时、约72小时或约一周内施用。因此,接受此类治疗的受试者可以从不同治疗剂的组合效应中受益。

[0091] “共刺激结构域”或“共刺激分子”是指T细胞上的同源结合配偶体,其与共刺激配体特异性结合,从而介导细胞的共刺激反应,诸如但不限于增殖。共刺激结构域可以是人共刺激结构域。示例性共刺激分子包括CD28、4-1BB、CD27、CD8、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3。

[0092] “共刺激配体”是指抗原呈递细胞上的分子,其特异性结合T细胞上的同源共刺激分子,从而提供介导T细胞应答的信号,包括但不限于增殖活化、分化等。共刺激配体可以包括但不限于CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、可诱导共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、淋巴毒素β受体、3/TR6、ILT3、ILT4、结合Toll配体受体的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性结合的配体。

[0093] “共刺激信号”是指与原始信号组合导致T细胞增殖和/或关键分子上调或下调的信号。

[0094] 术语“表位”是指与抗体分子可变区中的特异性抗原结合位点(称为互补位)相互作用的抗原决定簇。单个抗原可具有超过一个表位。因此,不同抗体可结合于抗原上的不同区域并且可具有不同生物效应。表位可为构象或线性的。构象表位通过使来自线性多肽链的不同区段的氨基酸在空间上并置来产生。线性表位为由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可包括抗原上的糖、磷酰基或磺酰基部分。

[0095] 如本文所用,“免疫细胞”包括由骨髓中的干细胞发育而来的任何白细胞。实例包括巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、T细胞或B细胞。免疫细胞可以存在于肿瘤或肿瘤微环境中。

[0096] 如本文所用,短语“药学上可接受的”是指在合理医学判断范围内适于与人和动物的组织接触地使用而没有过量毒性、刺激性、过敏反应、或其它问题或并发症、与合理的利益/风险比相称的那些剂、化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0097] 如本文所用,短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒

介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂封装材料,其参与携带或转运剂从一个器官或身体的一部分到另一个器官或身体的一部分。每种载体在与制剂的其它成分相容的含义上必须为“可接受的”,并且对患者无害。可充当药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素和其的衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)粉状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石粉;(8)赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;(9)油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;以及(22)药物制剂中采用的其它无毒的可相容物质。

[0098] 如本文所用,“预防”疾患的治疗剂是指当在病症或疾患发作之前施用于统计样品时,相对于未治疗的对照样品,降低经治疗的样品中病症或疾患的发生率,或相对于未治疗的对照样品,延迟病症或疾患的一种或多种症状的发作或降低其严重程度的化合物。

[0099] 术语“基本同一性”或“基本同一”当提及核酸或其片段时,表示当在适当核苷酸插入或缺失的情况下与另一个核酸(或其互补链)进行最佳比对时,如通过任何公知的序列同一性算法诸如FASTA、BLAST或Gap测量,至少约95%,更优选至少约、96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基具有核苷酸序列同一性,如下所讨论的。在某些情况下,与参考核酸分子具有基本同一性的核酸分子可编码与由参考核酸分子编码的多肽具有相同或基本上类似的氨基酸序列的多肽。

[0100] 在应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本上类似”意指当诸如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空隙权重最佳比对时,两个肽序列共享至少95%序列同一性,甚至更优选地至少98%或99%序列同一性。优选地,不同一的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”为其中氨基酸残基由侧链(R基团)具有类似化学特性(例如电荷或疏水性)的另一氨基酸残基取代的取代。一般来说,保守氨基酸取代将不会基本上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列彼此因保守取代而不同的情况下,可调高序列同一性百分比或相似度以校正取代的保守性。用于进行此调节的手段为本领域技术人员熟知的。参见例如Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24:307-331,所述文献以引用的方式并入本文。侧链具有类似化学特性的氨基酸组的实例包括(1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸以及异亮氨酸;(2)脂族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸以及色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸以及组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸盐和谷氨酸盐,以及(7)含硫的侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选保守氨基酸取代组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸盐-天冬氨酸盐以及天冬酰胺-谷氨酰胺。或者,保守置换为在Gonnet等人(1992)Science 256:1443-1445中所公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化,所述文献以引用的方式并入本文。“适度保守”置换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0101] 如本文所用,术语“特异性地结合”或“特异性结合”在提及多肽时是指确定蛋白质或多肽或受体在异质蛋白质和其他生物制剂群体中的存在的结合反应。因此,在指定条件

(例如在抗体的情况下免疫测定条件)下,当特定配体或抗体不会与样品中存在的其他蛋白质或在生物体中配体或抗体可能接触的其他蛋白质大量结合时,它会“特异性地结合”到其特定的“靶标”(例如抗体特异性地结合到抗原)。通常,“特异性地结合”第二个分子的第一个分子与第二个分子的亲和常数(Ka)大于约10^5M^{-1}(例如10^6M^{-1}、10^7M^{-1}、10^8M^{-1}、10^9M^{-1}、$10^{10}M^{-1}$、$10^{11}M^{-1}$和$10^{12}M^{-1}$或更大)。例如,就PIG特异性CAR结合MHC(例如,I类MHC或II类MHC)上呈递的肽的能力而言;通常,CAR以至少约10-4M或更低的KD亲和力特异性地结合其肽/MHC,并且以是其与非特异性和不相关的肽/MHC复合物(例如,包含BSA肽或酪蛋白肽的复合物)结合的亲和力至少1/10、至少1/100或至少1/1000的亲和力(以KD表示)结合预定抗原/结合配偶体。

[0102] 如本文所用,“受试者”意指针对治疗或疗法所选择的人或非人动物。在本文提供的某些实施方案中,受试者是人受试者。在本文提供的一些实施方案中,受试者是需要本文提供的方法的受试者,诸如患有癌症的受试者。

[0103] “肿瘤微环境”是指肿瘤存在的细胞环境,并且包括例如基质、肿瘤周围的间质液、周围血管、免疫细胞、其他细胞、成纤维细胞、信号分子和细胞外基质。

[0104] 如本文所用,术语“治疗”是指在临床病理过程中旨在改变正在被治疗的个体的自然病程的临床干预。治疗的期望效果包括降低进展速度、改善或减轻病理状态、以及缓解或改善特定疾病、病症或疾患的预后。例如,如果与特定疾病、病症或疾患相关的一种或多种症状得到减轻或消除,则表明个体被成功“治疗”。

[0105] 如本文所用的短语“治疗有效量”和“有效量”意指在适用于任何医学治疗的合理效益/风险比下,在受试者的至少一个细胞亚群中有效产生所需治疗效果的剂的量。

[0106] 治疗性抗体

[0107] 概述

[0108] 在某些方面,本文提供的方法和组合物涉及治疗性抗体(例如,本文公开的双特异性抗体,诸如具有对第一靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的抗原结合区的双特异性抗体,其任选地与第二抗CD3双特异性抗体和/或免疫检查点抑制剂联合施用)的使用。

[0109] 如上所述,如本文所用,术语“抗体”涵盖完整抗体分子和完整抗体分子的抗原结合片段两者。抗原结合片段的非限制性实例包括:(i)Fab片段;(ii)F(ab')2片段;(iii)Fd片段;(iv)Fv片段;(v)单链Fv(scFv)分子;(vi)dAb片段;和(vii)由模拟抗体的高变区的氨基酸残基(例如分离的互补决定区(CDR),诸如CDR3肽)或限制性FR3-CDR3-FR4肽组成的最小识别单元。在如本文所用的表述“抗原结合片段”中还包括其他工程化分子,诸如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域。

[0110] 抗体的抗原结合片段将通常包含至少一个可变结构域。可变结构域可具有任何尺寸或氨基酸组成,并且通常将包含至少一个CDR,所述至少一个CDR靠近一个或多个构架序列或与其同框。在具有与VL结构域缔合的VH结构域的抗原结合片段中,VH和VL结构域可以任何适合的排列相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚的并且含有VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可含有单聚VH或VL结构域。

[0111] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可含有共价连接至至少一个恒定结构域的至少一个可变结构域。可以在本文公开的抗体的抗原结合片段中发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括:(i)VH-CH1;(ii)VH-CH2;(iii)VH-CH3;(iv)VH-CH1-CH2;(v)VH-CH1-CH2-CH3;(vi)VH-CH2-CH3;(vii)VH-CL;(viii)VL-CH1;(ix)VL-CH2;(x)VL-CH3;(xi)VL-CH1-CH2;(xii)VL-CH1-CH2-CH3;(xiii)VL-CH2-CH3;和(xiv)VL-CL。在可变结构域和恒定结构域的任何构型,包括上文所列的示例性构型中的任一者中,可变结构域和恒定结构域可彼此直接连接或可通过完全或部分铰链或接头区连接。铰链区可由至少2(例如,5、10、15、20、40、60或更多)个氨基酸组成,这在单个多肽分子中在相邻的可变结构域和/或恒定结构域之间产生柔性或半柔性键联。此外,本文公开的抗体的抗原结合片段可包含以上列出的任何可变结构域和恒定结构域构型的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体),它们彼此之间和/或与一个或多个单体VH或VL结构域(例如通过二硫键)非共价缔合。

[0112] 与全抗体分子一样,抗原结合片段可以是单特异性或多特异性的(例如,双特异性或三特异性)。抗体的多特异性抗原结合片段将通常包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够特异性结合于单独的抗原或相同抗原上的不同表位。使用本领域可用的常规技术,任何多特异性抗体形式,包括本文公开的示例性双特异性抗体形式,都可以适用于本文公开的抗体的抗原结合片段的情形。

[0113] 在本文提供的某些实施方案中,多特异性抗体的至少一个可变结构域能够特异性结合T细胞共刺激结构域,诸如CD28。在本文提供的某些实施方案中,本文公开的多特异性抗体的至少一个可变结构域能够特异性结合CD3。

[0114] 在一些实施方案中,本文提供的抗体可通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)发挥功能。“补体依赖性细胞毒性”(CDC)是指本文公开的抗体在存在补体的情况下对表达抗原的细胞的裂解。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(ADCC)是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞以及巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体并且由此引起靶细胞的裂解。可使用本领域中熟知和可获得的分析来测量CDC和ADCC。(参见例如美国专利号5,500,362和5,821,337以及Clynes等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)95:652-656)。抗体的恒定区在抗体固定补体并且介导细胞依赖性细胞毒性的能力方面很重要。因此,可基于是否需要抗体介导细胞毒性来选择抗体的同种型。

[0115] 在本文提供的某些实施方案中,本文提供的多特异性(例如,双特异性或三特异性)抗体是人抗体。如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本文公开的人抗体可包括例如在CDR中,特别是在CDR3中不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变引入的或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用,术语“人抗体”不旨在包括其中源自另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已移植到人框架序列上的抗体。

[0116] 在一些实施方案中,本文提供的抗体可为重组人抗体。如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包括通过重组手段制备、表达、形成或分离的所有人抗体,诸如使用转染至宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(下文进一步描述);从重组、组合人抗体文库分离的抗体(下文进一步描述);从对于人免疫球蛋白基因来说为转基因动物的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如Taylor等人(1992)Nucl.Acids Res.20:6287-6295);或通过涉及将人免

疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他手段制备、表达、形成或分离的抗体。此类重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,使此类重组人抗体经受体外诱变(或当使用对于人Ig序列来说为转基因的动物时,经受体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列为虽然源自人种系VH和VL序列并且与其有关,但在体内可能不天然存在于人抗体种系谱内的序列。

[0117] 人抗体可以与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包含约150-160kDa的稳定四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键结合在一起。在第二种形式中,二聚体不经由链间二硫键连接,而是形成由共价偶联的轻链和重链(半抗体)组成的约75-80kDa的分子。这些形式即使在亲和力纯化之后也极难分离。

[0118] 在各种完整IgG同型中第二种形式频繁出现是归因于但不限于与抗体的铰链区同型相关的结构差异。人IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸取代可使第二种形式的出现显著减少(Angal等人(1993)Molecular Immunology 30:105),达到通常使用人IgG1铰链所观测到的水平。本公开涵盖在铰链、CH2或CH3区中具有一个或多个突变的抗体,所述突变可能是例如在制备中改善所需抗体形式的产率所需的。

[0119] 序列变体

[0120] 在一些实施方案中,与抗体所来源的对应种系序列相比,本文所公开的单特异性或多特异性(例如,双特异性或三特异性)抗体可在重链可变结构域和轻链可变结构域的骨架区和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。可通过将本文所公开的氨基酸序列与可获自例如公共抗体序列数据库的种系序列相比较来轻易地确定此类突变。本公开包括抗体及其抗原结合片段,其源自本文公开的任何氨基酸序列,其中一个或多个框架区和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为抗体所来源的种系序列的相应残基,或另一种人种系序列的相应残基,或相应种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本领域普通技术人员从本文所公开的重链可变区序列和轻链可变区序列开始,可容易地产生许多包含一个或多个个别种系突变或其组合的抗体和抗原结合片段。在某些实施方案中,VH和/或VL结构域内的所有框架和/或CDR残基均突变回在抗体所来源的原始种系序列中发现的残基。在其他实施方案中,仅某些残基突变回原始种系序列,例如仅在FR1的前8个氨基酸内或FR4的最后8个氨基酸内发现的突变残基或仅在CDR1、CDR2或CDR3内发现的突变残基。在其他实施方案中,一个或多个框架和/或CDR残基中的一者或多者突变为不同种系序列(即,不同于最初抗体所来源的种系序列的种系序列)的一个或多个相应残基。此外,本文公开的抗体可在框架和/或CDR区内含有两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些单个残基突变为特定种系序列的相应残基,而不同于原始种系序列的某些其他残基被保留或突变为不同种系序列的相应残基。在获得含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段后,可容易地测试其一种或多种所需特性,诸如改善的结合特异性、增加的结合(例如,如通过细胞结合滴定或FACS结合所测量)或结合亲和力(例如,KD)、改善或增强的拮抗或激动生物特性(视情况而定)、降低的免疫原性等。本公开内涵盖了以此一般方式获得的抗体和抗原结合片段。

[0121] 在一些实施方案中,本文提供的多特异性(例如,双特异性或三特异性)抗体包含具有一个或多个保守取代的本文公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体。例如,在某些实施方案中,本文提供的抗CD40拮抗剂抗体或CD3多特异性(例如,双特异性或三特

异性)抗体具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列,其相对于本文公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。

[0122] Fc变体

[0123] 根据本文提供的某些实施方案,提供了包含含有一个或多个突变的Fc结构域的抗体和多特异性抗原结合分子,与中性pH相比,所述突变例如在酸性pH下增强或减弱抗体与FcRn受体的结合。例如,本公开包括在Fc结构域的CH2或CH3区中包含突变的抗体,其中所述突变增加了酸性环境中(例如,pH范围为约5.5至约6.0的核内体中)Fc结构域对FcRn的亲和力。此类突变可使得当向动物施用时抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如在位置250(例如E或Q);250和428(例如L或F);252(例如L/Y/F/W或T)、254(例如S或T)以及256(例如S/R/Q/E/D或T)的修饰;或在位置428和/或433(例如H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如H/F或Y)的修饰;或在位置250和/或428的修饰;或在位置307或308(例如308F、V308F)以及434的修饰。在一个实施方案中,修饰包括428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)以及308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254以及256(例如252Y、254T以及256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0124] 例如,本公开包括多特异性抗原结合分子(例如,抗CD28/抗TAA双特异性或抗CD3/抗TAA双特异性抗体),所述多特异性抗原结合分子包含Fc结构域,所述Fc结构域含有选自由以下组成的组的一对或多对或一组或多组突变:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T以及256E(例如,M252Y、S254T以及T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);以及433K和434F(例如,H433K和N434F)。本文设想了前述Fc结构域突变的所有可能的组合以及本文所公开的抗体可变结构域内的其他突变。

[0125] 生物等效物

[0126] 本文提供了具有不同于本文所公开的示例性分子但保留结合相同的一种或多种抗原的能力的氨基酸序列的抗原结合分子。当与亲本序列相比时,此类变体分子可包含一个或多个氨基酸添加、缺失或取代,但展现大体上等效于所描述的双特异性抗原结合分子的生物活性。

[0127] 本公开包括生物等效于本文所阐述的示例性抗原结合分子中的任一者的抗原结合分子。如果例如两种抗原结合蛋白或抗体为当在类似实验条件下以相同摩尔剂量(单个剂量或多个剂量)施用时吸收速率和程度不显示显著差异的药物等效物或药物替代物,那么它们被认为是生物等效的。如果一些抗原结合蛋白在它们的吸收程度方面为等效的,但在它们的吸收速率方面不等效,而又可被认为是生物等效的,因为此类在吸收速率方面的差异为有意的并且在标记中被反映出来,在例如长期使用后不是达到有效体内药物浓度所必需的,并且对于所研究的特定药物产品来说被认为在医学上不重要,那么它们将被认为是等效物或药物替代物。

[0128] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白在它们的安全性、纯度以及效力方面不存在临床上有意义的差异,那么它们为生物等效的。

[0129] 在一个实施方案中,如果患者可在参考产品与生物产品之间转换一次或多次而与未进行此类转换的持续疗法相比没有预期的有害作用风险增加,包括临床上显著的免疫原

性变化或有效性减弱,那么两种抗原结合蛋白为生物等效的。

[0130] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白均通过针对一种或多种使用条件的一种或多种常用作用机制(在此类机制已知的情况下)起作用,那么它们为生物等效的。

[0131] 生物等效性可通过体内和/或体外方法来证实。生物等效性测量包括例如(a)在人或其他哺乳动物中进行的随时间变化在血液、血浆、血清或其他生物流体中测量抗体或其代谢产物的浓度的体内测试;(b)与人体内生物利用率数据相关并且适当预示人体内生物利用率的体外测试;(c)在人或其他哺乳动物中进行的随时间变化测量抗体(或其靶标)的适当急性药理学效应的体内测试;以及(d)确定抗原结合蛋白的安全性、功效或生物利用率或生物等效性的完全受控的临床试验。

[0132] 可通过例如进行残基或序列的各种取代或缺失生物活性不需要的末端或内部残基或序列来构建本文所阐述的示例性双特异性抗原结合分子的生物等效变体。例如,不为生物活性所必需的半胱氨酸残基可缺失或用其他氨基酸替换以防止在复性后形成不必要或不恰当的分子内二硫桥。在其他情形中,生物等效抗原结合蛋白可包括本文所阐述的示例性双特异性抗原结合分子的变体,所述变体包含修饰分子的糖基化特征的氨基酸变化,例如消除或移除糖基化的突变。

[0133] 抗体结合

[0134] 如本文所用,在抗体、免疫球蛋白、抗体结合片段或含Fc的蛋白质结合于例如预定抗原诸如细胞表面蛋白或其片段的情形中,术语"结合"通常是指最少两个实体或分子结构之间的相互作用或缔合,诸如抗体-抗原相互作用。

[0135] 例如,当使用抗原作为配体并且使用抗体、Ig、抗体结合片段或含Fc的蛋白质作为分析物(或抗配体(antiligand))在BIAcore 3000仪器中通过例如表面等离子体共振(SPR)技术测定时,结合亲和力通常对应于KD值为约10-7M或更小,诸如约10-8M或更小,诸如约10-9M或更小。也常规使用基于细胞的结合策略,如荧光激活细胞分选(FACS)结合测定,并且FACS数据与诸如放射性配体竞争结合和SPR等其他方法良好地相关(Benedict,CA,J Immunol Methods.1997,201(2):223-31;Geuijen,CA等人J Immunol Methods.2005,302(1-2):68-77)。

[0136] 因此,本文提供的抗体或抗原结合蛋白结合于预定抗原或细胞表面分子(受体),亲和力对应于是它结合于非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)的亲和力的至多十分之一的KD值。根据本公开,抗体的亲和力对应于等于非特异性抗原或是非特异性抗原的十分之一的KD值可被认为是不可检测的结合,然而此类抗体可与第二抗原结合臂配对以产生本文公开的双特异性抗体。

[0137] 术语"KD"(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,或抗体或抗体结合片段结合于抗原的解离平衡常数。KD与结合亲和力之间存在相反关系,因此KD值越小,亲和力越高,即越强。因此,术语"更高的亲和力"或"更强的亲和力"与更高的形成相互作用的能力并且因此与更小的KD值有关,而相反地术语"更低的亲和力"或"更弱的亲和力"与更低的形成相互作用的能力并且因此与更大的KD值有关。在一些情况下,特定分子(例如抗体)对其相互作用配偶体分子(例如抗原X)的结合亲和力(或KD)与分子(例如抗体)对另一相互作用配偶体分子(例如抗原Y)的结合亲和力相比更高可表述为通过用较大的KD值(较低或较弱的亲和力)除以较小的KD(较高或较强的亲和力)所确定的结合比率,例如视情况而定表述

为结合亲和力是5倍或10倍。

[0138] 术语“kd”(秒-1或1/s)是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数,或抗体或抗体结合片段的解离速率常数。所述值也称为koff值。

[0139] 术语“ka”(M-1x秒-1或1/M)是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数,或抗体或抗体结合片段的缔合速率常数。

[0140] 术语“KA”(M-1或1/M)是指特定抗体-抗原相互作用的缔合平衡常数,或抗体或抗体结合片段的缔合平衡常数。通过用ka除以kd来获得缔合平衡常数。

[0141] 术语“EC50”或“EC50”是指半数最大有效浓度,半数最大有效浓度包括在指定暴露时间之后诱导基线与最大值之间一半的反应的抗体浓度。EC50大体上表示观测到最大效应的50%的抗体浓度。在某些实施方案中,EC50值等于如通过例如FACS结合测定所确定的本文公开抗体给出与表达CD28或肿瘤相关抗原(例如,表2中公开的抗原)的细胞的半数最大结合的浓度。因此,在增加的EC50或半数最大有效浓度值的情况下观察到降低或较弱的结合。

[0142] 在一个实施方案中,CD28多特异性抗体的减少的结合可定义为实现与半数最大量靶细胞的结合的EC50抗体浓度增加。

[0143] 在另一个实施方案中,EC50值代表引发T细胞细胞毒活性对靶细胞的半数最大消耗的本文公开的CD28多特异性抗体的浓度。因此,在EC50或半数最大有效浓度值降低的情况下观察到细胞毒活性(例如,T细胞介导的肿瘤细胞杀伤)增加。

[0144] 抗原结合结构域的制备和多特异性分子的构建

[0145] 可通过本领域中已知的任何抗体产生技术来制备对特定抗原具特异性的抗原结合结构域。在获得对两种不同抗原(例如,CD28和人肿瘤抗原)具特异性的两种不同抗原结合结构域后,可使其相对于彼此适当排列以使用常规方法产生本文公开的双特异性抗原结合分子。在某些实施方案中,本文公开的多特异性抗原结合分子的个别组分(例如重链和轻链)中的一者或多者源自嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。用于制备此类抗体的方法为本领域中熟知的。例如,可使用VELOCIMMUNE™技术制备本文公开的双特异性抗原结合分子的重链和/或轻链中的一者或多者。使用VELOCIMMUNE™技术(或任何其他人抗体产生技术),最初分离具有人可变区和小鼠恒定区的针对特定抗原(例如,CD28或人肿瘤相关抗原)的高亲和力嵌合抗体。针对包括亲和力、选择性、表位等所需特征对抗体进行表征和选择。将小鼠恒定区用所需人恒定区置换以产生可合并至本文公开的双特异性抗原结合分子中的完全人重链和/或轻链。

[0146] 可使用基因工程化动物来制备人双特异性抗原结合分子。例如,可使用基因修饰小鼠,所述基因修饰小鼠不能重排以及表达内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变序列,其中所述小鼠仅表达由在内源性小鼠κ基因座处可操作地连接至小鼠κ恒定基因的人免疫球蛋白序列编码的一个或两个人轻链可变结构域。可使用此类基因修饰的小鼠来产生完全人双特异性抗原结合分子,所述完全人双特异性抗原结合分子包含与相同轻链缔合的两条不同重链,所述相同轻链包含源自两个不同人轻链可变区基因区段中的一者的可变结构域。(参见例如,US 2011/0195454)。完全人的是指在抗体或其抗原结合片段或免疫球蛋白结构域的每个多肽的整个长度上包含由源自人序列的DNA编码的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段或免疫球蛋白结构域。在一些情况下,完全人序列源自对人来说内源的蛋白质。在其他情

况下,完全人蛋白质或蛋白质序列包含每个组分序列源自人序列的嵌合序列。虽然不受任一理论约束,但通常对嵌合蛋白或嵌合序列进行设计以例如与任何野生型人免疫球蛋白区或结构域相比使组分序列接点中免疫原性表位的形成减至最少。

[0147] CD28多特异性抗原结合分子

[0148] 在某些实施方案中,本文提供的方法和组合物涉及CD28抗原结合分子(即,包含至少一个与CD28结合的抗原结合区的抗原结合分子)。在某些实施方案中,本文提供的CD28多特异性抗原结合分子还包含与靶抗原(例如,癌细胞上表达的抗原,诸如肿瘤相关抗原(TAA))结合的抗原结合结构域。

[0149] 在某些实施方案中,本文提供为本文提供的CD3多特异性抗原结合分子的第二抗原结合分子,其还包含与靶抗原(例如,癌细胞上表达的抗原,诸如肿瘤相关抗原(TAA))结合的抗原结合结构域。

[0150] 在一些实施方案中,靶抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方案中,靶抗原是与肿瘤微环境(例如,受试者体内的肿瘤微环境)相关的抗原。例如,在一些实施方案中,靶抗原是免疫细胞上、肿瘤细胞基质上或肿瘤微环境内的细胞外基质上的抗原。细胞外基质抗原的实例包括连接蛋白(例如,连接蛋白-3或连接蛋白-4)、多功能蛋白聚糖(VACN)、纤连蛋白和癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)。

[0151] 如本文所用,表述“多特异性抗原结合分子”是指至少包含第一抗原结合区和第二抗原结合区的蛋白质、多肽或分子复合物。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子内的每个抗原结合结构域可包含至少一个单独的CDR,或至少一个CDR与一个或多个另外的CDR和/或FR的组合,特异性结合于特定抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域特异性结合第一抗原(例如,CD28),并且第二抗原结合结构域特异性结合第二不同的抗原(例如,肿瘤相关抗原)。

[0152] 在一些实施方案中,CD28多特异性抗原结合分子是CD28多特异性抗体,诸如CD28双特异性抗体。本文提供的CD28多特异性抗体可以是例如双特异性的或三特异性的。多特异性抗体可对一个靶多肽的不同表位具有特异性或可含有对超过一个靶多肽具有特异性的抗原结合结构域。参见例如,Tutt等人,1991,J.Immunol.147:60-69;Kufer等人,2004,Trends Biotechnol.22:238-244。本文提供的CD28双特异性抗体可连接至另一功能分子(例如,另一肽或蛋白质)或与其共表达。例如,抗体或其片段可在功能上连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或以其他方式)至一个或多个其他分子实体,诸如另一抗体或抗体片段以产生具有第二或另外的结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

[0153] 如本文所用,术语“CD28”是指分化簇28,它是T细胞上表达的蛋白质之一,可提供T细胞活化和存活所需的共刺激信号。除T细胞受体(TCR)外,通过CD28进行的T细胞刺激可为各种白细胞介素的产生提供强有力的信号。人CD28包含如下所示的氨基酸序列。

[0154] 表1:CD28的人蛋白质序列

[0155] >NP_001230006.1;GeneID=940;同种型=2前体

[0156] MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSWKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0157] >NP_001230007.1;GeneID=940;同种型=3前体

[0158] MLRLLLALNLFPSIQVTGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH

SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0159] >NP_006130.1;GeneID=940;同种型=1前体

[0160] MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVY GNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLF PGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF

[0161] WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA

[0162] PPRDFAAYRS

[0163] >XP_011510496.1;基因ID=940;同种型=X1

[0164] MPCGLSALIMCPKGMVAVVVAVDDGDSQALAGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASL HKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTP

[0165] RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0166] >XP_011510497.1;基因ID=940;同种型=X2

[0167] MPCGLSALIMCPKGMVAVVVAVDDGDSQALAGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSYNEKSNGTIIHVKGKH LCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRS

[0168] >XP_011510499.1;基因ID=940;同种型=X3

[0169] MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSYNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0170] 除非明确指定为来自非人物种,否则本文中所有提到蛋白质、多肽以及蛋白质片段旨在指人型式的相应蛋白质、多肽或蛋白质片段。因此,除非指定为来自非人物种,例如,“小鼠CD28”、“猴CD28”等,否则表述“CD28”意指人CD28。

[0171] 如本文所用,表述“细胞表面表达的CD28”是指如下一种或多种CD28蛋白,所述一种或多种CD28蛋白在体外或体内在细胞表面上表达,使得CD28蛋白的至少一部分暴露于细胞膜的细胞外侧并且可接近抗体的抗原结合部分。细胞表面表达的CD28包括在功能T细胞受体情形中含于细胞的膜中的CD28蛋白。细胞表面表达的CD28可包括在通常表达CD28蛋白的细胞的表面上表达的CD28蛋白或由其组成。或者,细胞表面表达的CD28可包括在表面上通常不表达人CD28但已进行人工工程化从而在表面上表达CD28的细胞的表面上表达的CD3蛋白或由其组成。

[0172] 在一些实施方案中,本公开包括双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂结合CD28,并且免疫球蛋白的另一个臂对靶抗原(例如,肿瘤抗原或“TAA”)具有特异性。在一些实施方案中,本公开包括三特异性抗体,其中免疫球蛋白的第一臂结合CD28,免疫球蛋白的第二臂对肿瘤抗原具有特异性,并且免疫球蛋白的第三臂结合另外的T细胞抗原(例如,CD3)或另外的肿瘤抗原。

[0173] 在一些实施方案中,CD28多特异性抗体可包括US2020/0239576中公开的抗体中的任何一种。在一些实施方案中,CD28结合臂可包含如US2020/0239576中公开的HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列中的任何一者。在某些实施方案中,CD28结合臂与人CD28结合并诱导人T细胞活化。在某些实施方案中,CD28结合臂与人CD28微弱地结合并诱导人T细胞活化。在其他实施方案中,在双特异性或多特异性抗体的情形中,CD28结合臂与人CD28微弱地结合并诱

导表达肿瘤相关抗原的细胞的杀伤。

[0174] 在某些实施方案中,用于本公开的多特异性抗体或抗原结合片段包含与ICOS、HVEM、CD27、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、SLAM、CD2、2B4、CD226、TIM1或TIM2结合以诱导T细胞活化的抗原结合臂。

[0175] 在某些实施方案中,CD28多特异性抗原结合分子包含对肿瘤相关抗原具有特异性的抗原结合结构域。

[0176] 在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是免疫肿瘤抗原。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是非免疫肿瘤抗原。

[0177] 肿瘤相关抗原可以是选自下表2中的抗原中的任何一种。

[0178] 表2:示例性肿瘤相关抗原

[0179]

AIM-2	ALDH1A1	α-辅肌动蛋白-4	甲胎蛋白 ("AFP")	ARTC1
B-RAF	BAGE-1	BCLX (L)	BCMA	BCR-ABL 融合蛋白 b3a2
β-连环蛋白	BING-4	CA-125	CALCA	癌胚抗原 ("CEA")
CD9	CASP-5	CASP-8	CD22	CD20
CD72	CD19	CD21	CD24	CD38
CD79	CD274	CD45	Cdc27	CDK12
CDK4	CDKN2A	CEA	CLPP	COA-1
CPSF	CSNK1A1	CTAG1	CTAG2	细胞周期蛋白 D1
细胞周期蛋白 -A1	dek-can 融合蛋白	DKK1	EFTUD2	延伸因子 2
EGFR	ENAH(hMena)	Ep-CAM	EpCAM	EphA3
上皮肿瘤抗原 ("ETA")	ETV6-AML 1 融合蛋白	EZH2	FOLR1	FGF5
FLT3-ITD	FN1	G250/MN/CAIX	GAGE-1	GAGE-2
GAGE-8	GAGE-3	GAGE-4	GAGE-5	GAGE-6
GAGE-7	GAS7	磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3	GnTV	gp100/Pmel17
GPNMB	HAUS3	Hepsin	HER-2/neu	HERV-K-MEL
HLA-A11	HLA-A2	HLA-DOB	hsp70-2	IDO1
IGF2B3	IL13Rα2	肠羧基酯酶	K-ras	激肽释放酶 4
KIF20A	KK-LC-1	KKLC1	KM-HN-1	KMHN1 也称为 CCDC110

[0180]

LAGE-1	LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白	Lengsin	M-CSF	MAGE-A1
MAGE-A10	MAGE-A12	MAGE-A2	MAGE-A3	MAGE-A4
MAGE-A6	MAGE-A9	MAGE-C1	MAGE-C2	苹果酸酶
乳腺珠蛋白-A	MART2	MATN	MC1R	MCSP
mdm-2	ME1	Melan-A/MART-1	Meloe	中期因子(Midkine)
MMP-2	MMP-7	MUC1	MUC5AC	MUC16
粘蛋白	MUM-1	MUM-2	MUM-3	肌球蛋白
肌球蛋白I类	N-raw	NA88-A	neo-PAP	NFYC
NY-BR-1	NY-ESO-1/LAGE-2	OA1	OGT	OS-9
P多肽	p53	PAP	PAX5	PBF
pml-RARα融合蛋白	多态性上皮粘蛋白(“PEM”)	PPP1R3B	PRAME	PRDX5
PSA	PSMA	PTPRK	RAB38/NY-MEL-1	RAGE-1
RBAF600	RGS5	RhoC	RNF43	RU2AS
SAGE	secernin 1	SIRT2	SNRPD1	SOX10
Sp17	SPA17	SLAMF7	SSX-2	SSX-4
STEAP1	STEAP2	生存素	SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白	TAG-1
TAG-2	端粒酶	TGF-βRII	TPBG	TRAG-3
磷酸丙糖异构酶	TRP-1/gp75	TRP-2	TRP2-INT2	酪氨酸酶
酪氨酸酶(“TYR”)	VEGF	WT1和XAGE-1b/GAGED2a		

[0181] 在某些实施方案中,肿瘤相关抗原选自AIM-2、ALDH1A1、α-辅肌动蛋白-4、甲胎蛋白(“AFP”)、ARTC1、B-RAF、BAGE-1、BCLX(L)、BCMA、BCR-ABL融合蛋白b3a2、β-连环蛋白、BING-4、CA-125、CALCA、癌胚抗原(“CEA”)、CASP-5、CASP-8、CD20、CD274、CD45、Cdc27、CDK12、CDK4、CDKN2A、CEA、CLPP、COA-1、CPSF、CSNK1A1、CTAG1、CTAG2、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白-A1、dek-can融合蛋白、DKK1、EFTUD2、延伸因子2、ENAH(hMena)、Ep-CAM、EpCAM、EphA3、上皮肿瘤抗原(“ETA”)、ETV6-AML1融合蛋白、EZH2、FGF5、FLT3-ITD、FN1、G250/MN/CAIX、GAGE-1,2,8、GAGE-3,4,5,6,7、GAS7、磷脂酰肌醇聚糖-3、GnTV、gp100/Pmel17、GPNMB、HAUS3、Hepsin、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、

IL13Rα2、肠羧基酯酶、K-ras、激肽释放酶4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1也称为CCDC110、LAGE-1,LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、Lengsin、M-CSF、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-C1、MAGE-C2、苹果酸酶、乳腺珠蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、Melan-A/MART-1、Meloe、中期因子、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、MUC16、粘蛋白、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白、肌球蛋白I类、N-raw、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RARα融合蛋白、多态性上皮粘蛋白(“PEM”)、PPP1R3B、PRAME、PRDX5、PSA、PSMA、PTPRK、RAB38/NY-MEL-1、RAGE-1、RBAF600、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、SAGE、secernin 1、SIRT2、SNRPD1、SOX10、Sp 17、SPA17、SSX-2、SSX-4、STEAP1、STEAP2、生存素、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF-βRII、TPBG、TRAG-3、磷酸丙糖异构酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2,酪氨酸酶、酪氨酸酶(“TYR”)、VEGF、WT1和XAGE-1b/GAGED2a。

[0182] 在一些实施方案中,肿瘤相关抗原可以包括ADAM 17、BCMA、CA-IX、CD19、CD20、CD21、CD22、CD24、CD30、CD33、CD38、CD52、CD56、CD70、CD72、CD74、CD79b、CD123、CD138、CDH3、CEA、EphA2、EpCAM、ERBB2、ENPP3、EGFR、EGFR-vIII、FLT3、FOLR1、GD-2、磷脂酰肌醇聚糖-3、gpA33、GPNMB、GPRC5D、HER2、HER3、LMP1、LMP2A、MUC16、间皮素、PSMA、PSCA、RON、ROR1、ROR2、STEAP1、STEAP2、SSTR2、SSTR5、5T4和Trop-2。在一些实施方案中,肿瘤抗原可以是CD19、CD123、STEAP2、CD20、SSTR2、CD38、STEAP1、5T4、ENPP3、PSMA、MUC16、GPRC5D或BCMA。

[0183] 在一些实施方案中,肿瘤相关抗原可以是选自CD38、EGFR、MUC16、PSMA、CA9、FOLR1、HER2和SLAMF7的非免疫相关抗原。

[0184] 在一些实施方案中,肿瘤相关抗原可以是选自CD22、CD20、CD72、CD19、CD21、CD24和CD79的免疫相关抗原。

[0185] CD22(Siglec 2)是一种在B细胞的细胞膜上表达的受体。CD22介导B细胞/B细胞相互作用。它也可能参与淋巴组织中B细胞的定位。CD22结合唾液酸化糖蛋白;其中之一是CD45。它还优先与α-2,6-连接唾液酸结合。它还通过与Src家族酪氨酸激酶相互作用发挥正向调节作用,并且还可以通过其SH2结构域募集细胞质磷酸酶来充当抑制性受体,所述细胞质磷酸酶通过信号分子的去磷酸化来阻断信号转导。

[0186] CD20是一种在成熟B细胞的细胞膜上表达的非糖基化磷蛋白。CD20被认为是B细胞肿瘤相关抗原,因为超过95%的B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)和其他B细胞恶性肿瘤都表达该抗原,但它并不存在于前体B细胞、树突状细胞和浆细胞中。人CD20蛋白具有美国专利申请公布号US2020/0129617的SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,所述专利申请公布的内容以引用的方式整体并入本文。

[0187] MUC16是指粘蛋白16。MUC16是一种单跨膜结构域高度糖基化的完整膜糖蛋白,其在卵巢癌中高度表达。人MUC16的氨基酸序列在美国专利申请公布号US2018/0118848A1的SEQ ID NO:1899中列出,所述专利申请公布的全部内容以引用的方式整体并入本文。

[0188] BCMA是指B细胞成熟抗原。BCMA(也称为TNFRSF17和CD269)是一种在恶性浆细胞上表达的细胞表面蛋白,在调节B细胞成熟和分化为产生免疫球蛋白的浆细胞方面起着核心作用。人BCMA蛋白的氨基酸序列在美国专利申请公布号US2020/0024356的SEQ ID NO:115中示出,所述专利申请公布的全部内容以引用的方式整体并入本文。它也可以在GenBank登录号NP_001183.2中找到。

[0189] PSMA是指前列腺特异性膜抗原,又称叶酸水解酶1(FOLH1)。PSMA是一种完整的、不脱落的膜糖蛋白,在前列腺上皮细胞中高度表达,并且是前列腺癌的细胞表面标志物。人PSMA的氨基酸序列在美国专利申请公布号US2020/0129617的SEQ ID NO:7中示出,所述专利申请公布的全部内容以引用的方式整体并入本文。

[0190] 在一些实施方案中,CD28多特异性抗体可以是双特异性CD28xCD19抗体、双特异性CD28xCD22抗体、双特异性CD28xCD20抗体、双特异性CD28xCD72抗体、双特异性CD28xCD20抗体、双特异性CD28xCD19抗体、双特异性CD28xCD21抗体、双特异性CD28xCD24抗体或双特异性CD28xCD79抗体。

[0191] 在一些实施方案中,CD28多特异性抗体可以是双特异性CD28xCD38抗体、双特异性CD28xEGFR抗体、双特异性CD28xMUC16抗体、双特异性CD28xPSMA抗体、双特异性CD28xCA9抗体、双特异性CD28xCD20抗体、双特异性CD28xFOLR1抗体、双特异性CD28xHER2抗体或双特异性CD28xSLAM7抗体。

[0192] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合分子是多特异性抗体或其抗原结合片段。双特异性抗体的每个抗原结合结构域包含重链可变结构域(HCVR)和轻链可变结构域(LCVR)。在双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域(例如,双特异性抗体)的情形中,可使用前缀“A1”来指定第一抗原结合结构域的CDR并且可使用前缀“A2”来指定第二抗原结合结构域的CDR。因此,第一抗原结合结构域的CDR在本文中可称为A1-HCDR1、A1-HCDR2以及A1-HCDR3;并且第二抗原结合结构域的CDR在本文中可称为A2-HCDR1、A2-HCDR2以及A2-HCDR3。在双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域(例如,三特异性抗体)的情形中,可使用前缀“A1”来指定第一抗原结合结构域的CDR,可使用前缀“A2”来指定第二抗原结合结构域的CDR,并且可使用前缀“A3”来指定第三抗原结合结构域的CDR。因此,第一抗原结合结构域的CDR在本文中可称为A1-HCDR1、A1-HCDR2以及A1-HCDR3;第二抗原结合结构域的CDR在本文中可称为A2-HCDR1、A2-HCDR2以及A2-HCDR3;并且第三抗原结合结构域的CDR在本文中可称为A3-HCDR1、A3-HCDR2以及A3-HCDR3。

[0193] 上面或本文讨论的双特异性抗原结合分子可以是双特异性抗体。在一些情况下,双特异性抗体包含人IgG重链恒定区。在一些情况下,人IgG重链恒定区是同种型IgG1。在一些情况下,人IgG重链恒定区是同种型IgG4。在各个实施方案中,双特异性抗体包含嵌合铰链,其相对于相同同种型的野生型铰链降低Fc γ 受体结合。

[0194] 在一些实施方案中,CD28多特异性抗体是表3中的多特异性抗体中的任何一种。

[0195] 表3:CD28多特异性抗体

[0196]

名称	靶标
REGN7075	EGFR/CD28
REGN5678	PSMA/CD28
SAR442257	CD38/CD28xCD3
REGN5668	MUC16/CD28
REGN7945	CD38/CD28
REGN5837	CD22/CD28

[0197] 在一些实施方案中,靶抗原是与肿瘤的肿瘤微环境相关的抗原。如本文所用,与肿

瘤微环境相关的抗原包括基质内的细胞、肿瘤周围的间质液、肿瘤周围的血管和细胞外基质上的任何抗原。还包括与免疫细胞、其他细胞、成纤维细胞或肿瘤微环境中的信号传导分子相关的抗原。

[0198] 在一些实施方案中,靶抗原是与肿瘤基质相关的抗原,其选自PSA、CEA、CA-125、CA-19、COL10、FAP、B7H3、LRRC15和纤连蛋白-EDB同种型。

[0199] 在一些实施方案中,靶抗原是与肿瘤的细胞外基质相关的抗原,其选自连接蛋白(例如,连接蛋白-3或连接蛋白-4)、多功能蛋白聚糖(VACN)、纤连蛋白和癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)蛋白。

[0200] 在一些实施方案中,靶抗原是在癌症相关成纤维细胞的表面上表达的抗原(例如,α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、S100A4、血小板衍生的生长因子受体(PDGFRα/β)、波形蛋白、PDPN、CD70、CD10、GPR77、CD10、CD74、CD146、CAV1、Saa3-或CD49e)。

[0201] 在一些实施方案中,靶抗原是在肿瘤微环境中血管的表面上表达的抗原,诸如DLK1、EphA2、HBB、NG2、NRP1、NRP2、PDGFRβ、PSMA、RGS5、TEM1、VEGFR1和VEGFR2。

[0202] 在一些实施方案中,靶抗原是免疫抗原。在一些实施方案中,免疫抗原是在免疫细胞的表面上表达的抗原。免疫细胞可以是巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、T细胞或B细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞已浸润到肿瘤或肿瘤的肿瘤微环境中。所述免疫抗原可选自表4中所列的免疫抗原中的任何一种。

[0203] 表4:示例性免疫抗原

[0204]

免疫细胞类型	靶抗原
巨噬细胞	CD11b/整合素 αM CD14 CD68 FcγRIII/CD16, FcγRI/CD64 CCR5
B 细胞	IgM CD19 $CD80^+$ $CD86^+$ $CD44^+$ $CD69^+$ $PD\text{-}L1^+$ $CD27^+$ $CD5^+$
T 细胞	CD27 CD28 CD127 PD-1 CD122 CD132 KLRG-1 CD58 CD99 CD62L CD103 CCR4 CCR5 CCR6 CCR9 CCR10 CXCR3 CXCR4 CLA 颗粒酶 A 颗粒酶 B 穿孔素 CD161 IL-18Ra c-Kit CD130

[0205]

树突状细胞	BDCA-1 CD8 CD8α CD11b CD11c CD103 CD205
中性粒细胞	CD11b CD16 CD32 CD44 CD55 CD15 CD33 CD45 CD66b+ CD18 CD62L
肥大细胞	CD33 CD45 CD117 CD203c CD32 Fc ε RO α+ IL-3 R α CD63 CD203
嗜酸性粒细胞	CD11b+ CD62L+ CDR3 CD11b CD14 CD15 CD16 CD45 CD66b EMR1 HLA-DR CD125 CD49d Siglec-8

[0206]

嗜碱性粒细胞	CCR3 CD11c CD22 CD45 CD69 CD117 CRTH-2 ENPP-3 Fc ε RIα HLA-DR IL-3 R α CD49b CD13 CD107a CD164
单核细胞	CD14 CD11b CCR2 CD16 CD141 CD11c HLA-DR CCR7 CCR5 CD62L CX3CR1 CD68
自然杀伤细胞	KLRK1 NCR1 NCR2 NCR3 KLRB1 CD122 KLRD1 ITGB2 KIR 受体 PRF1 IFNG CD56 CD16 CCR7 CSF2 CXCR3 IL2RB KLRC1 SELL

[0207] 第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域彼此可直接或间接连接以形成本文公开的双特异性抗原结合分子。或者,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可各自

连接至单独的多聚化结构域。一个多聚化结构域与另一多聚化结构域的缔合有助于两个抗原结合结构域之间的缔合,由此形成双特异性抗原结合分子。如本文所用,“多聚化结构域”为具有与相同或类似结构或构造的第二多聚化结构域缔合的能力的任何大分子、蛋白质、多肽、肽或氨基酸。例如,多聚化结构域可为包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽。多聚化组分的非限制性实例为免疫球蛋白(包含CH2-CH3结构域)的Fc部分,例如选自同种型IgG1、IgG2、IgG3以及IgG4的IgG的Fc结构域,以及每个同种型组内的任何同种异型。

[0208] 本文公开的双特异性抗原结合分子将通常包含两个多聚化结构域,例如各自个别地为单独抗体重链的一部分的两个Fc结构域。第一多聚化结构和第二多聚化结构域可属于相同的IgG同种型,诸如IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4。或者,第一多聚化结构域和第二多聚化结构域可属于不同的IgG同种型,诸如IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4等。

[0209] 在某些实施方案中,多聚化结构域为长度为1个至约200个氨基酸并且含有至少一个半胱氨酸残基的Fc片段或氨基酸序列。在其他实施方案中,多聚化结构域为半胱氨酸残基,或短的含半胱氨酸的肽。其他多聚化结构域包括包含亮氨酸拉链、螺旋-环基序或卷曲螺旋基序或由其组成的肽或多肽。

[0210] 可使用任何双特异性抗体形式或技术来制备本文公开的双特异性抗原结合分子。例如,具有第一抗原结合特异性的抗体或其片段可在功能上连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或以其他方式)至一个或多个其他分子实体,诸如具有第二抗原结合特异性的另一抗体或抗体片段以产生双特异性抗原结合分子。可用于本文提供的方法中的特定示例性双特异性形式包括但不限于例如基于scFv的或双抗体双特异性形式、IgG-scFv融合物、双可变结构域(DVD)-Ig、四体瘤、杵入臼结构、共同的轻链(例如,具有杵入臼结构的共同的轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)体、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双作用Fab(DAF)-IgG以及Mab2双特异性形式(关于前述形式的综述,参见例如,Klein等人2012,mAbs 4:6,1-11,以及其中所引用的参考文献)。

[0211] 在本文提供的双特异性抗原结合分子的情形中,多聚化结构域(例如,Fc结构域)与野生型、天然存在的型式的Fc结构域相比可包含一个或多个氨基酸变化(例如,插入、缺失或取代)。例如,本公开包括在Fc结构域中包含一个或多个修饰从而使得修饰的Fc结构域具有Fc与FcRn之间的经修饰的结合相互作用(例如,增强或减少)的双特异性抗原结合分子。在一个实施方案中,双特异性抗原结合分子在CH2或CH3区中包含修饰,其中所述修饰使在酸性环境中(例如,在pH值在约5.5至约6.0范围内的内体中)Fc结构域对FcRn的亲和力增加。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如在位置250(例如E或Q);250和428(例如L或F);252(例如L/Y/F/W或T)、254(例如S或T)以及256(例如S/R/Q/E/D或T)的修饰;或在位置428和/或433(例如L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如H/F或Y)的修饰;或在位置250和/或428的修饰;或在位置307或308(例如308F、V308F)以及434的修饰。在一个实施方案中,修饰包括428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)以及308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254以及256(例如252Y、254T以及256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0212] 在某些实施方案中,本文提供的双特异性抗原结合分子包含第一CH3结构域和第二Ig CH3结构域,其中第一和第二Ig CH3结构域因至少一个氨基酸而彼此不同,并且其中至少一个氨基酸差异使双特异性抗体与蛋白质A的结合与缺乏所述氨基酸差异的双特异性

抗体相比有所减少。在一个实施方案中,第一Ig CH3结构域结合蛋白质A并且第二Ig CH3结构域含有减少或消除蛋白质A结合的突变,诸如H95R修饰(根据IMGT外显子编号;根据EU编号为H435R)。第二CH3可还包含Y96F修饰(根据IMGT;根据EU为Y436F)。参见例如美国专利号8,586,713。第二CH3内可发现的其他修饰包括:在IgG1抗体的情况下的D16E、L18M、N44S、K52N、V57M以及V82I(根据IMGT;根据EU为D356E、L358M、N384S、K392N、V397M以及V422I);在IgG2抗体的情况下的N44S、K52N以及V82I(IMGT;根据EU为N384S、K392N以及V422I);以及在IgG4抗体的情况下的Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q以及V82I(根据IMGT;根据EU为Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q以及V422I)。

[0213] 在某些实施方案中,Fc结构域可为源自超过一种免疫球蛋白同型的嵌合组合Fc序列。例如,嵌合Fc结构域可包含源自人IgG1、人IgG2或人IgG4 CH2区的部分或全部CH2序列,以及源自人IgG1、人IgG2或人IgG4的部分或全部CH3序列。嵌合Fc结构域还可含有嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可包含源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上部铰链”序列与源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下部铰链”序列的组合。可包括在本文阐述的抗原结合分子中的任一者中的嵌合Fc结构域的具体实例从N端到C端包含:[IgG4CH1]-[IgG4上部铰链]-[IgG2下部铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG4 CH3]。可包括在本文阐述的抗原结合分子中的任一者中的嵌合Fc结构域的另一实例从N端到C端包含:[IgG1 CH1]-[IgG1上部铰链]-[IgG2下部铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG1 CH3]。2014年8月28日公布的美国公布2014/0243504中描述了可包括在本文公开的抗原结合分子中的任一者中的嵌合Fc结构域的这些和其他实例,所述美国公布以全文并入本文。具有这些一般结构排列的嵌合Fc结构域以及其变体可具有改变的Fc受体结合,这又影响Fc效应功能。

[0214] 与抗体所来源的对应种系序列相比,本文所公开的CD28多特异性(例如,双特异性或三特异性)抗体可在重链可变结构域和轻链可变结构域的构架区和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。可通过将本文所公开的氨基酸序列与可获自例如公共抗体序列数据库的种系序列相比较来轻易地确定此类突变。本公开包括抗体及其抗原结合片段,其源自本文公开的任何氨基酸序列,其中一个或多个框架区和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为抗体所来源的种系序列的相应残基,或另一种人种系序列的相应残基,或相应种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本领域普通技术人员从本文所公开的重链可变区序列和轻链可变区序列开始,可容易地产生许多包含一个或多个个别种系突变或其组合的抗体和抗原结合片段。在某些实施方案中,VH和/或VL结构域内的所有框架和/或CDR残基均突变回在抗体所来源的原始种系序列中发现的残基。在其他实施方案中,仅某些残基突变回原始种系序列,例如仅在FR1的前8个氨基酸内或FR4的最后8个氨基酸内发现的突变残基或仅在CDR1、CDR2或CDR3内发现的突变残基。在其他实施方案中,一个或多个框架和/或CDR残基中的一者或多者突变为不同种系序列(即,不同于最初抗体所来源的种系序列的种系序列)的一个或多个相应残基。此外,本文公开的抗体可在框架和/或CDR区内含有两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些单个残基突变为特定种系序列的相应残基,而不同于原始种系序列的某些其他残基被保留或突变为不同种系序列的相应残基。在获得含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段后,可容易地测试其一种或多种所需特性,诸如改善的结合特异性、增加的结合(例如,如通过细胞结合滴定或FACS结合所测量)或结合亲和力(例如,KD)、改善或增强的拮抗或激动生物

特性(视情况而定)、降低的免疫原性等。本公开内涵盖了以此一般方式获得的抗体和抗原结合片段。

[0215] 在一些实施方案中,肿瘤中至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的肿瘤细胞不表达靶抗原。在以下实施方案中,肿瘤中少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的肿瘤细胞不表达靶抗原。在一些实施方案中,肿瘤中特定百分比范围的肿瘤细胞不表达靶抗原,其中本文公开了上限和下限百分比范围。

[0216] 肿瘤抗原的表达或水平的测量可以通过本领域已知的任何方法来完成,所述方法包括通过流式细胞术直接检测抗原表面表达。因此,如本文所用,短语“肿瘤内不表达靶抗原的细胞”可指抗原的表面蛋白表达。例如,可以通过直接询问肿瘤免疫肽组来鉴定肿瘤抗原;即由细胞表面上的MHC分子呈递的所有内源肽。在这种方法中,从肿瘤细胞中提取肽后,将其从与MHC分子的复合物中洗脱出来,然后进行液相色谱结合串联质谱(LC-MS/MS)分析。可以将MS光谱与定制数据库进行比较,该数据库是通过将患者肿瘤的测序数据与参考蛋白质序列相结合而生成的。在一些实施方案中,肿瘤抗原的量化采用称为SureQuant-IsoMHC的平台,该平台利用一系列pMHC同位素体和内部标准触发的靶向质谱法来生成嵌入式多点校准曲线以确定内源性pMHC浓度。更多详细信息参见Stopfer LE,Gajadhar AS,Patel B,Gallien S,Frederick DT,Boland GM,Sullivan RJ,White FM。使用嵌入的MHC-I同位素体校准物对肿瘤抗原进行绝对定量。Proc Natl Acad Sci US A.2021年9月14日;118(37),在此以引用的方式整体并入。此外,T细胞受体(TCR)模拟抗体可用于估计抗原拷贝数。或者,可以通过测量肿瘤细胞中的核酸表达(例如,RNA,诸如mRNA表达)来完成对靶抗原(例如,本文公开的任何靶抗原)表达的测量。核酸表达可以通过核酸扩增和相关技术来实现。

[0217] CD3多特异性抗体

[0218] 在一些实施方案中,本文公开的CD28多特异性抗体可以与CD3抗体(例如,CD3多特异性抗体)联合施用。

[0219] 在一些实施方案中,CD3多特异性抗体是表5中所列的CD3多特异性抗体中的任何一种。

[0220] 表5:CD3多特异性抗体

[0221]

名称	靶标
奥尼妥单抗(REGN1979)	CD20xCD3
REGN2281	CD20xCD3
REGN5458	BCMAxCD3
REGN1979	CD20xCD3
AMV-564	CD33×CD3
GBR 1342	CD38xCD3
XmAb18968	CD3×CD38
SAR443216	CD3xCD28xHER2
A-319	CD19xCD3
AMG 330/艾卢维他单抗(eluvixtamab)	CD33/CD3
艾鲁妥单抗(emerfetamab)	CD33/CD3
厄妥索单抗(ertumaxomab)	CD3-HER2neu
REGN5459	BCMAxCD3

[0222]

REGN4336	PSMA×CD3
REGN4018	MUC16×CD3

[0223] 在一些实施方案中,本公开包括具有本文所述抗体的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗体、WO 2014/047231或WO 2017/053856中公开的抗CD3抗体、WO 2014/047231中公开的双特异性抗CD20 x抗CD3抗体、WO 2017/023761中公开的双特异性抗PSMA x抗CD3抗体、WO 2018/067331或WO2018/058003中公开的双特异性抗MUC16 x抗CD3抗体、WO 2018/058001中公开的双特异性抗STEAP2 x抗CD3抗体、或WO 2020/018820中公开的双特异性抗BCMA x抗CD3抗体,每个专利以引用的方式并入本文。

[0224] 可用于本文公开的组合物和方法的另外的示例性CD3多特异性抗体包括但不限于,例如,美国专利号10,787,521B2、美国专利申请公开号2018/0222987A1和US2019/0241657A1以及国际申请公开号WO 2016/036937A1、WO 2017/210443A1、WO 2019/050521A1、WO 2019/210147A1、WO 2019/232528A1和WO 2020/092404A1中公开的双特异性CD3xCD123抗体;国际申请公开号WO 2018/058001A1中公开的双特异性CD3xSTEAP2抗体;WO 2014/047231A1、WO 2015/143079A1、WO 2016/081490A1、WO 2017/112775A1、WO 2017/210485A1、WO 2018/114748A1、WO 2018/093821A8、WO 2018/223004A1、WO 2018/188612A1、WO 2019/155008A1、WO 2019/228406A1、WO 2020/088608A1、WO 2020/156405A1和美国专利申请公开号US2020/0199231A1和US2020/0172627A1中公开的双特异性CD3xCD20抗体2;国际申请公开号WO 2018/005706A1中公开的双特异性CD3xSSTR 2抗体;国际申请号WO 2015/149077A1和WO 2020/018556A1以及美国专利申请公开号US2018/0305465A1和US2020/0102403A1中公开的双特异性CD3xCD38抗体;Olivier Nolan-Stevaux(2020)美国癌症研究

协会2020年年会论文集摘要中公开的双特异性CD3xSTEAP1抗体;国际申请公开号WO 2013/041687A1、美国专利申请公开号US2017/0342160A1、US20200277397A1中公开的双特异性CD3x5T4抗体;国际申请公开号WO 2020/180726A1中描述的双特异性CD3xENPP3抗体;国际申请公开号WO 2018/067331A9和WO 2019/246356A1中公开的双特异性CD3xMUC16抗体;国际申请公开号WO 2013/072406A1、WO 2014/140248A1、WO 2016/166629A1、WO 2017/031104A1、WO 2017/134134A1、WO 2017/095267A1、WO 2019/220369A3、WO 2019/075359A1、WO 2019/226761A1、WO 2020/025596A1、WO 2020/191346A1、WO 2020018820A1、美国专利申请公开号US2013/0273055A1、US2019/0263920A1中公开的双特异性CD3xBCMA抗体;国际申请公开号WO 2012/055961A1、WO 2016/048938A1、WO 2017/087603A1、WO 2017/096368A1、WO 2018/188612A1、WO 2019/237081A1、WO 2020/048525A1、WO 2020/135335A1、美国专利申请公开号US2016/0326249A1、US2020/0283523A1、US2019/0284279A1、美国专利号US 9,315,567B2、US 7,575,923B2、US 7,635,472B2中公开的双特异性CD3xCD19抗体;国际申请公开号WO 2018/017786A3、WO 2019/220369A3中公开的双特异性CD3xGPRC5D抗体;美国专利申请公开号US2017/0320947A1中公开的双特异性CD3xP SMA抗体;美国专利申请公开号US2020/0140552A1中公开的三特异性CD3xCD28xCD38抗体;或国际申请公开号WO 2016/086189A2、WO 2020/088608A1、WO2019191120A1和WO 2016/105450A3中公开的其他CD3多特异性抗体,所述每个专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0225] 在一些实施方案中,前述特异性结合CD3和肿瘤抗原的多特异性(例如,双特异性或三特异性)抗原结合分子可包含如通过体外亲和力结合测定所测量以诸如展现大于约40nM的KD的弱结合亲和力与CD3结合的抗CD3抗原结合分子。前述双特异性抗原结合分子可包括抗CD3抗原结合分子,该分子与CD3结合并且如通过FACS滴定测定所测量表现出大于约100nM的EC50。前述双特异性抗原结合分子可以包括抗CD3抗原结合分子,该分子如通过体外亲和力结合测定或FACS滴定测定所测量未表现出可测量或可观察到的与CD3的结合,但仍保留活化人PBMC细胞和/或诱导对肿瘤抗原表达细胞系的细胞毒性活性的能力。

[0226] 治疗方法

[0227] 本文提供了通过向受试者施用多特异性抗原结合分子来介导受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的杀伤的方法和组合物,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,其中肿瘤细胞不表达或被预测不表达靶抗原。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0228] 在一些方面,本文提供了用于诱导受试者的肿瘤细胞的杀伤和/或诱导针对肿瘤中的肿瘤细胞的T细胞活化的方法和组合物,所述方法包括向受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0229] 本文还提供了用于治疗患有肿瘤的受试者的癌症的方法和组合物,所述方法包括向受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区。在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0230] 在一些方面,本文提供了选择受试者以供进行癌症疗法的方法,所述方法包括:i)

确定受试者包含含有不表达靶抗原的肿瘤细胞的肿瘤;和ii)向受试者施用多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子具有对靶抗原具有特异性的第一抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的第二抗原结合区,任选地其中如果靶抗原的表达低于检测水平或低于信噪比,则肿瘤细胞不表达靶抗原,从而选择受试者以供进行癌症疗法。

[0231] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子是双特异性T细胞衔接器(bispecific T cell engager)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子是双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)和串联双抗体(TandAb)。双特异性T细胞衔接器(BiTE)是含有两个抗体结合位点的小融合蛋白。DART是双特异性衔接器,其使用双抗体骨架,并添加提高稳定性的c端二硫桥。串联双抗体(TandAb)是一种双特异性抗体片段。tandAb是四价双特异性分子,具有2+2抗原结合价,由Fv结构域组成。TandAb通常以单体亚基(单链Diabody,scDb)的形式表达,具有来自两个亲本抗体的四个可变结构域。

[0232] 本文提供的方法可进一步包括确定肿瘤或肿瘤微环境中至少亚群(例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%、5%、5.1%、5.2%、5.3%、5.4%、5.5%、5.6%、5.7%、5.8%、5.9%、6%、6.1%、6.2%、6.3%、6.4%、6.5%、6.6%、6.7%、6.8%、6.9%、7%、7.1%、7.2%、7.3%、7.4%、7.5%、7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、8.6%、8.7%、8.8%、8.9%、9%、9.1%、9.2%、9.3%、9.4%、9.5%、9.6%、9.7%、9.8%、9.9%、10%、10.1%、10.2%、10.3%、10.4%、10.5%、10.6%、10.7%、10.8%、10.9%、11%、11.1%、11.2%、11.3%、11.4%、11.5%、11.6%、11.7%、11.8%、11.9%、12%、12.1%、12.2%、12.3%、12.4%、12.5%、12.6%、12.7%、12.8%、12.9%、13%、13.1%、13.2%、13.3%、13.4%、13.5%、13.6%、13.7%、13.8%、13.9%、14%、14.1%、14.2%、14.3%、14.4%、14.5%、14.6%、14.7%、14.8%、14.9%、15%、15.1%、15.2%、15.3%、15.4%、15.5%、15.6%、15.7%、15.8%、15.9%、16%、16.1%、16.2%、16.3%、16.4%、16.5%、16.6%、16.7%、16.8%、16.9%、17%、17.1%、17.2%、17.3%、17.4%、17.5%、17.6%、17.7%、17.8%、17.9%、18%、18.1%、18.2%、18.3%、18.4%、18.5%、18.6%、18.7%、18.8%、18.9%、19%、19.1%、19.2%、19.3%、19.4%、19.5%、19.6%、19.7%、19.8%、19.9%、20%、20.1%、20.2%、20.3%、20.4%、20.5%、20.6%、20.7%、20.8%、20.9%、21%、21.1%、21.2%、21.3%、21.4%、21.5%、21.6%、21.7%、21.8%、21.9%、22%、22.1%、22.2%、22.3%、22.4%、22.5%、22.6%、22.7%、22.8%、22.9%、23%、23.1%、23.2%、23.3%、23.4%、23.5%、23.6%、23.7%、23.8%、23.9%、24%、24.1%、24.2%、24.3%、24.4%、24.5%、24.6%、24.7%、24.8%、24.9%、25%、25.1%、25.2%、25.3%、25.4%、25.5%、25.6%、25.7%、25.8%、25.9%、26%、26.1%、26.2%、26.3%、26.4%、26.5%、26.6%、26.7%、26.8%、26.9%、27%、27.1%、27.2%、27.3%、27.4%、27.5%、27.6%、27.7%、27.8%、27.9%、28%、28.1%、28.2%、28.3%、28.4%、28.5%、28.6%、28.7%、28.8%、28.9%、29%、29.1%、29.2%、29.3%、29.4%、29.5%、29.6%、29.7%、29.8%、29.9%、30%、30.1%、30.2%、30.3%、30.4%、30.5%、30.6%、30.7%、30.8%、30.9%、31%、31.1%、31.2%、

31.3%、31.4%、31.5%、31.6%、31.7%、31.8%、31.9%、32%、32.1%、32.2%、32.3%、32.4%、32.5%、32.6%、32.7%、32.8%、32.9%、33%、33.1%、33.2%、33.3%、33.4%、33.5%、33.6%、33.7%、33.8%、33.9%、34%、34.1%、34.2%、34.3%、34.4%、34.5%、34.6%、34.7%、34.8%、34.9%、35%、35.1%、35.2%、35.3%、35.4%、35.5%、35.6%、35.7%、35.8%、35.9%、36%、36.1%、36.2%、36.3%、36.4%、36.5%、36.6%、36.7%、36.8%、36.9%、37%、37.1%、37.2%、37.3%、37.4%、37.5%、37.6%、37.7%、37.8%、37.9%、38%、38.1%、38.2%、38.3%、38.4%、38.5%、38.6%、38.7%、38.8%、38.9%、39%、39.1%、39.2%、39.3%、39.4%、39.5%、39.6%、39.7%、39.8%、39.9%、40%、40.1%、40.2%、40.3%、40.4%、40.5%、40.6%、40.7%、40.8%、40.9%、41%、41.1%、41.2%、41.3%、41.4%、41.5%、41.6%、41.7%、41.8%、41.9%、42%、42.1%、42.2%、42.3%、42.4%、42.5%、42.6%、42.7%、42.8%、42.9%、43%、43.1%、43.2%、43.3%、43.4%、43.5%、43.6%、43.7%、43.8%、43.9%、44%、44.1%、44.2%、44.3%、44.4%、44.5%、44.6%、44.7%、44.8%、44.9%、45%、45.1%、45.2%、45.3%、45.4%、45.5%、45.6%、45.7%、45.8%、45.9%、46%、46.1%、46.2%、46.3%、46.4%、46.5%、46.6%、46.7%、46.8%、46.9%、47%、47.1%、47.2%、47.3%、47.4%、47.5%、47.6%、47.7%、47.8%、47.9%、48%、48.1%、48.2%、48.3%、48.4%、48.5%、48.6%、48.7%、48.8%、48.9%、49%、49.1%、49.2%、49.3%、49.4%、49.5%、49.6%、49.7%、49.8%、49.9%、50%、50.1%、50.2%、50.3%、50.4%、50.5%、50.6%、50.7%、50.8%、50.9%、51%、51.1%、51.2%、51.3%、51.4%、51.5%、51.6%、51.7%、51.8%、51.9%、52%、52.1%、52.2%、52.3%、52.4%、52.5%、52.6%、52.7%、52.8%、52.9%、53%、53.1%、53.2%、53.3%、53.4%、53.5%、53.6%、53.7%、53.8%、53.9、54%、54.1%、54.2%、54.3%、54.4%、54.5%、54.6%、54.7%、54.8%、54.9%、55%、55.1%、55.2%、55.3%、55.4%、55.5%、55.6%、55.7%、55.8%、55.9%、56%、56.1%、56.2%、56.3%、56.4%、56.5%、56.6%、56.7%、56.8%、56.9%、57%、57.1%、57.2%、57.3%、57.4%、57.5%、57.6%、57.7%、57.8%、57.9%、58%、58.1%、58.2%、58.3%、58.4%、58.5%、58.6%、58.7%、58.8%、58.9%、59%、59.1%、59.2%、59.3%、59.4%、59.5%、59.6%、59.7%、59.8%、59.9%、60%、60.1%、60.2%、60.3%、60.4%、60.5%、60.6%、60.7%、60.8%、60.9%、61%、61.1%、61.2%、61.3%、61.4%、61.5%、61.6%、61.7%、61.8%、61.9%、62%、62.1%、62.2%、62.3%、62.4%、62.5%、62.6%、62.7%、62.8%、62.9%、63%、63.1%、63.2%、63.3%、63.4%、63.5%、63.6%、63.7%、63.8%、63.9%、64%、64.1%、64.2%、64.3%、64.4%、64.5%、64.6%、64.7%、64.8%、64.9%、65%、65.1%、65.2%、65.3%、65.4%、65.5%、65.6%、65.7%、65.8%、65.9%、66%、66.1%、66.2%、66.3%、66.4%、66.5%、66.6%、66.7%、66.8%、66.9%、67%、67.1%、67.2%、67.3%、67.4%、67.5%、67.6%、67.7%、67.8%、67.9%、68%、68.1%、68.2%、68.3%、68.4%、68.5%、68.6%、68.7%、68.8%、68.9%、69%、69.1%、69.2%、69.3%、69.4%、69.5%、69.6%、69.7%、69.8%、69.9%、70%、70.1%、70.2%、70.3%、70.4%、70.5%、70.6%、70.7%、70.8%、70.9%、71%、71.1%、71.2%、71.3%、71.4%、71.5%、71.6%、71.7%、71.8%、71.9%、72%、72.1%、72.2%、72.3%、72.4%、72.5%、72.6%、72.7%、72.8%、72.9%、73%、73.1%、73.2%、73.3%、73.4%、73.5%、73.6%、73.7%、73.8%、73.9%、74%、74.1%、

74.2%、74.3%、74.4%、74.5%、74.6%、74.7%、74.8%、74.9%、75%、75.1%、75.2%、75.3%、75.4%、75.5%、75.6%、75.7%、75.8%、75.9%、76%、76.1%、76.2%、76.3%、76.4%、76.5%、76.6%、76.7%、76.8%、76.9%、77%、77.1%、77.2%、77.3%、77.4%、77.5%、77.6%、77.7%、77.8%、77.9%、78%、78.1%、78.2%、78.3%、78.4%、78.5%、78.6%、78.7%、78.8%、78.9%、79%、79.1%、79.2%、79.3%、79.4%、79.5%、79.6%、79.7%、79.8%、79.9%、80%、80.1%、80.2%、80.3%、80.4%、80.5%、80.6%、80.7%、80.8%、80.9%、81%、81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%、81.6%、81.7%、81.8%、81.9%、82%、82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%、82.6%、82.7%、82.8%、82.9%、83%、83.1%、83.2%、83.3%、83.4%、83.5%、83.6%、83.7%、83.8%、83.9%、84%、84.1%、84.2%、84.3%、84.4%、84.5%、84.6%、84.7%、84.8%、84.9%、85%、85.1%、85.2%、85.3%、85.4%、85.5%、85.6%、85.7%、85.8%、85.9%、86%、86.1%、86.2%、86.3%、86.4%、86.5%、86.6%、86.7%、86.8%、86.9%、87%、87.1%、87.2%、87.3%、87.4%、87.5%、87.6%、87.7%、87.8%、87.9%、88%、88.1%、88.2%、88.3%、88.4%、88.5%、88.6%、88.7%、88.8%、88.9%、89%、89.1%、89.2%、89.3%、89.4%、89.5%、89.6%、89.7%、89.8%、89.9%、90%、90.1%、90.2%、90.3%、90.4%、90.5%、90.6%、90.7%、90.8%、90.9%、91%、91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%、91.6%、91.7%、91.8%、91.9%、92%、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%、92.6%、92.7%、92.8%、92.9%、93%、93.1%、93.2%、93.3%、93.4%、93.5%、93.6%、93.7%、93.8%、93.9%、94%、94.1%、94.2%、94.3%、94.4%、94.5%、94.6%、94.7%、94.8%、94.9%、95%、95.1%、95.2%、95.3%、95.4%、95.5%、95.6%、95.7%、95.8%、95.9%、96%、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%、96.6%、96.7%、96.8%、96.9%、97%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、100%)的肿瘤细胞不表达靶抗原(例如,靶抗原、第一靶抗原或第二靶抗原)。

[0233] 本文提供的方法可进一步包括确定肿瘤或肿瘤微环境中至少亚群(例如,至少0.1%-1%、1%-5%、1%-10%、5%-10%、10%-15%、10%-20%、15%-20%、15%-25%、20%-25%、25%-30%、20%-30%、25%-35%、30%-35%、30%-40%、35%-40%、40%-45%、40%-50%、45%-50%、50%-55%、50%-60%、55%-60%、60%-65%、60%-70%、65%-70%、65%-75%、70%-75%、70%-80%、75%-85%、75%-80%、80%-90%、85%-90%、85%-95%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的肿瘤细胞不表达靶抗原(例如,靶抗原、第一靶抗原或第二靶抗原)。

[0234] 本领域的普通技术人员可以理解,如果肿瘤微环境中的一部分细胞确实表达或预测会表达靶抗原,则本方法可用于其肿瘤不表达靶抗原(例如,100%的肿瘤不表达或被预测不表达靶抗原)的受试者。

[0235] 在一些方面,本文提供了治疗患有肿瘤的受试者的癌症、诱导或介导受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的杀伤、和/或诱导针对受试者的肿瘤中的肿瘤细胞的T细胞活化的方法,所述方法包括向受试者施用:第一多特异性抗原结合分子,所述第一多特异性抗原结合分子具有对第一靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD28蛋白具有特异性的抗原结合区;以

及第二多特异性抗原结合分子,所述第二多特异性抗原结合分子具有对第二靶抗原具有特异性的抗原结合区和对CD3蛋白具有特异性的抗原结合区,其中第一靶抗原与第二靶抗原不是相同的抗原。例如,第一靶抗原和第二靶抗原均可选自表2中所列的抗原,第一靶抗原和第二靶抗原不能为相同的抗原。

[0236] 在一些实施方案中,第一或第二多特异性抗原结合分子是双特异性T细胞衔接器。在一些实施方案中,第一或第二多特异性抗原结合分子是双特异性抗体片段,诸如双特异性T细胞衔接抗体(BiTE)、双亲和力重靶向分子(DART)和串联双抗体(TandAb)。

[0237] 因此,在某些实施方案中,本文公开的剂可以单独使用或与另一种类型的治疗剂联合施用。例如,不同的治疗剂可以以相同制剂或单独制剂的形式、同时或顺序地施用。在某些实施方案中,不同的治疗剂可在彼此的约一小时、约12小时、约24小时、约36小时、约48小时、约72小时或约一周内施用。因此,接受此类治疗的受试者可以从不同治疗剂的组合效应中受益。

[0238] 在某些实施方案中,本文提供了如下方法,所述方法包括以约每周四次、每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每八周一次、每十二周一次或更低频率的给药频率向受试者施用多特异性抗原结合分子,只要实现治疗反应即可。

[0239] 在某些实施方案中,本文提供了一种组合物,例如,药物组合物,其含有至少一种本文描述的剂以及药学上可接受的载体。在一个实施方案中,该组合物包含本文描述的多种(例如,两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、或者五种或更多种)剂的组合。

[0240] 在一些实施方案中,将药物组合物局部或全身递送。在一些实施方案中,可以将药物组合物局部施用至存在于受试者中的肿瘤或肿瘤微环境。在一些实施方案中,将剂或药物组合物与第二癌症治疗剂一起施用。

[0241] 本文描述的剂可以与任何其他癌症疗法(包括免疫疗法)联合使用。另外的癌症治疗方法包括免疫检查点抑制。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂抑制免疫检查点蛋白。免疫检查点抑制广义上是指抑制癌细胞可产生的检查点,以阻止或下调免疫反应。免疫检查点蛋白的实例有CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPα(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、嗜乳脂蛋白(butyrophilins)、A2aR及其组合。免疫检查点抑制剂可以是西米普利单抗(cemiplimab)(REGN2810)、纳武单抗(nivolumab)(BM S-936558、MDX-1106、ONO-4538)、派姆单抗(pembrolizumab)(MK-3475、SCH 900475)、阿特珠单抗(atezolizumab)(MPDL3280A、RG7446、RO5541267)、德瓦鲁单抗(durvalumab)(MEDI4736、MEDI-4736)、阿维鲁单抗(avelumab)(MSB0010718C)、伊匹单抗(ipilimumab)(BMS-734016、IBI310、MDX-010)、SHR1210、信迪利单抗(sintilimab)(IBI308)、斯巴达利珠单抗(spartalizumab)(PDR001)、替雷利珠单抗(ti slelizumab)(BGB-A317)、匹地利珠单抗(pidilizumab)、BCD-100、特瑞普利单抗(toripalimab)(JS001)、BAY 1905254、ASP 8374、PF-06801591、AMP-224、AB122、AK105、AMG 404、BCD-100、BI 754091、F520、HLX10、HX008、JTX-4014、LZM009、MEDI0680、MGA012、Sym021、TSR-042、PSB205、MGD019、MGD013、AK104、XmAb20717、RO7121661、CX-188、INCB086550、FS118、BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、HLX20、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-

1316、TG-1501、ZKAB001、INBRX-105、MCLA-145、KN046、M7824、LY3415244、INCB086550、CA-170、CX-072、ADU-1604、AGEN1181、AGEN1884、MK-1308、REGN4659、XmAb22841、ATOR-1015、PSB205、MGD019、AK104、XmAb20717、BMS-986249、曲美木单抗(tremelimumab)、BMS-986258、BGB-A425、INCAGN02390、Sym023、JNJ 61610588、BI 754111、LAG525、MK-4280、REGN3767、Sym022、TSR-033、relatlimab、JTX-2011、MGD009、BMS-986207、OMP-313M32、MK-7684或TSR-022。

[0242] 另外的癌症免疫疗法包括过继免疫疗法,诸如自体或同种异体T细胞疗法或自体或同种异体CAR T细胞疗法。过继免疫疗法是一种旨在增强患者对肿瘤或癌细胞的免疫反应的治疗方法。该方法涉及从个体中取出免疫细胞、离体形成效应细胞、将细胞扩增至临床相关数量以及将细胞重新注入患者体内。本文提供的方法包括联合施用本文公开的剂和表达特异性结合I类MHC上呈递的肽(例如,癌症肽或受试者特异性肽)的T细胞受体的同种异体或自体CTL。在一些实施方案中,CTL来自细胞库或来自正在施用CTL的受试者。在一些实施方案中,MHC是I类MHC。在一些实施方案中,II类MHC具有α链多肽,其为HLA-DMA、HLA-DOA、HLA-DPA、HLA-DQA或HLA-DRA。在一些实施方案中,II类MHC具有β链多肽,其为HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB、HLA-DQB或HLA-DRB。在一些实施方案中,CTL在施用于受试者之前被存储在细胞文库或细胞库中。

[0243] 另外的癌症疗法可以是细胞疗法。如本文所用,细胞疗法包括例如肿瘤浸润淋巴细胞、经修饰的TCR淋巴细胞或经修饰的CAR淋巴细胞。本文公开的方法还包括T细胞疗法,以及任何其他过继疗法,诸如使用自然杀伤细胞的疗法或巨噬细胞疗法。细胞疗法可能包含未经修饰的细胞,诸如传统的TIL疗法,或经遗传修饰的细胞。本文所包括的方法包括本领域已知的实现细胞疗法中细胞对肿瘤靶标的靶向的任何方法。例如,细胞疗法可能包括包含嵌合抗原受体(CAR)的细胞。可以使用单链抗体,并且CAR也可能包含共刺激结构域。CAR细胞靶标可能位于靶细胞的膜上,而TCR修饰可能使用细胞内靶标。

[0244] 在一个实施方案中,细胞疗法包括选自由T细胞、CD8+细胞、CD4+细胞、NK细胞、δ-γT细胞、调节性T细胞和外周单核细胞血液组成的组中的类型的细胞。在另一个实施方案中,TIL、T细胞、CD8+细胞、CD4+细胞、NK细胞、δ-γT细胞、调节性T细胞或外周血单核细胞形成如本文所公开的细胞疗法。在一个具体实施方案中,细胞疗法包括T细胞。如本文所用,“肿瘤浸润淋巴细胞”或TIL是指离开血流并迁移到肿瘤中的白细胞。淋巴细胞可分为三组,包括B细胞、T细胞和自然杀伤细胞。在另一个具体的实施方案中,细胞疗法包括用目标特异性嵌合抗原受体或特别是选定的T细胞受体修饰的T细胞。如本文所用,“T细胞”包括但不限于CD3+细胞(包括CD4+辅助细胞)、CD8+细胞毒性T细胞和γδT细胞。

[0245] 在一些实施方案中,T细胞与抗原呈递细胞(APC)接触,所述抗原呈递细胞呈递对受试者的癌症或肿瘤具有特异性的肽。在一些实施方案中,APC是B细胞、抗原呈递T细胞、树突状细胞或人工抗原呈递细胞(例如,aK562细胞)。可以通过从患者样品中提取PBMC并使其附着到塑料上来制备用于该过程的树突状细胞。一般来说,单核细胞群会附着,所有其他细胞都会被洗掉。然后用IL-4和GM-CSF使扶着群体分化,产生单核细胞来源的树突状细胞。这些细胞可以通过添加IL-1β、IL-6、PGE-1和TNF-α(上调树突状细胞表面上的重要共刺激分子)来成熟,然后用本文提供的一种或多种肽进行转导。在一些实施方案中,APC是人工抗原呈递细胞,诸如aK562细胞。在一些实施方案中,人工抗原呈递细胞被工程化以表达CD80、

CD83、41BB-L和/或CD86。美国专利公开号2003/0147869描述了示例性的人工抗原呈递细胞,包括aK562细胞,该专利以引用的方式在此并入。产生抗原呈递细胞的示例性方法可以在WO2013088114中找到,该文献以其全部内容在此并入。

[0246] 另一种示例性的过继免疫疗法方案涉及施用自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。TIL细胞具有强大的杀伤力。TIL细胞是在实体肿瘤中体内分化的效应细胞(参见美国专利号5,126,1 32,其描述了一种产生用于癌症的过继免疫疗法的TIL细胞的方法)。TIL细胞可以通过例如以下方式来产生:从患者取出肿瘤样品、分离浸润到10肿瘤样品中的淋巴细胞、在IL-2存在下使这些TIL细胞离体生长以及将这些细胞与IL-2一起重新注入患者中。

[0247] 另外的癌症疗法可以是CAR-T细胞疗法。嵌合抗原受体(CAR)是将基于抗体的针对肿瘤相关表面抗原的特异性与具有特异性抗肿瘤细胞免疫活性的T细胞受体活化胞内结构域相结合的分子(Eshhar,1997,Cancer Immunol Immunother 45(3-4)131-136;Eshhar等人,1993,Proc Natl Acad Sci USA 90(2):720-724;Brocker和Karjalainen,1998,Adv Immunol 68:257-269)。这些CAR允许T细胞通过单链Fv(scFv)抗原特异性胞外区域与提供T细胞活化和共刺激信号的胞内结构域融合来实现不依赖MHC的初级活化。第二代和第三代CAR还通过CD28和/或CD137(4-1BB)胞内活化基序提供适当的共刺激信号,从而增强多种实体瘤和白血病模型中的细胞因子分泌和抗肿瘤活性(Pinthus等人,2004,J Clin Invest 114(12):1774-1781;Milone等人,2009,Mol Ther 17(8):1453-1464;Sadelain等人,2009,Curr Opin Immunol 21(2):215-223)。嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法涉及对患者自体T细胞进行遗传修饰以表达对肿瘤抗原具有特异性的CAR,然后进行离体细胞扩增并重新输注回患者体内。CAR是来自特定单克隆抗体的选定的单链片段变量与一个或多个T细胞受体细胞内信号传导结构域的融合蛋白。这种T细胞遗传修饰可以通过基于病毒的基因转移方法或非病毒方法进行,诸如基于DNA的转座子、CRISPR/Cas9技术或通过电穿孔直接转移体外转录的mRNA。

[0248] 另外的癌症疗法可以是自然杀伤细胞疗法。自然杀伤(NK)细胞可以识别肿瘤细胞作为靶标,因此可能用于癌症的免疫疗法(Vivier等人,2011,Science 331:44-49;Ruggeri等人,2002,Science295:2097-2100;Cooley等人,2010,Blood 116:2411-2419;Miller等人,2005,Blood 105:3051-3057;Rubnitz等人,2010,J Clin Oncol.28:955-959)。NK细胞输注已用于治疗患有各种形式癌症的患者(Vivier等人,2011,Science 331:44-49;Caligiuri,2008,Blood112(3):461-469;Ruggeri等人,2002,Science 295:2097-2100;Miller等人,2005,Blood 105:3051-3057)。有可获得的方法使可能获得大量人NK细胞,这些细胞比未扩增的NK细胞展现更高的抗肿瘤能力(参见美国专利号7,435,596;Imai等人,2005,Blood 106:376-83;Fujisaki等人,2009,Cancer Res.69:4010-4017;Cho等人,2010,Clin Cancer Res.16:3901-3909)。本文包括从原代外周血单核细胞(PBMC)扩增的NK细胞。本文还包括包含嵌合抗原受体或其他修饰的NK细胞。

[0249] 另外的癌症疗法可以是巨噬细胞细胞疗法。在一些实施方案中,细胞疗法包括离体生长的细胞毒性巨噬细胞。巨噬细胞可以识别肿瘤细胞作为靶标,因此可用于癌症的免疫疗法(Andreesen R,Henneman n B,Krause SW.Adoptive immunotherapy of cancer using monocyt e-derived macrophages:rationale,current status,and perspectives.JLeukoc Biol.1998年10月;64(4):419-26)。巨噬细胞是强大的免疫效应细

胞,其功能可塑性在不同环境下产生抗肿瘤和促肿瘤功能,这种可塑性导致了人们做出显著的努力来消耗或复极化肿瘤相关巨噬细胞。或者,在一些实施方案中,巨噬细胞在例如离体遗传修饰后被过继转移(Anderson NR,Minutolo NG,Gill S,Klichinsky M.Macrophage-Based Approaches for Cancer Immunotherapy.Cancer Res.2021年3月1日;81(5):1201-1208)。

[0250] 本文还提供了治疗受试者的癌症的方法,方式是从受试者获得包含T细胞的样品、从样品分离细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、离体扩增CTL、并将扩增的CTL与至少一种剂(例如,本文公开的任何剂)联合施用于受试者。细胞毒性T细胞可能是肿瘤浸润淋巴细胞。扩增CTL可以包括使CTL与表达癌症特异性或肿瘤特异性抗原的抗原呈递细胞(APC)接触以产生抗原特异性CTL。在一些实施方案中,包含T细胞或分离的CTL的样品在施用于受试者之前受到刺激。该方法还可以包括在施用于受试者之前使CTL与抗CD3单克隆抗体(OKT3)接触。在其它实施方案中,该方法还包括在施用于受试者之前使CTL与人白细胞介素(IL)-2接触。

[0251] 另外的癌症疗法还包括任何已知的免疫细胞刺激剂,这样的剂包括例如诱导此类免疫细胞增殖、扩增或活化的那些剂。示例性的刺激方法包括施用刺激性细胞因子,诸如IL-2、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21。

[0252] 在一些实施方案中,受试者在施用该剂之前已经接受过化疗药物。受试者可能是化疗药物难治的。受试者可以按顺序或同时接受化疗剂和接受本文公开的另外癌症疗法的剂。化学治疗剂的实例包括烷化剂,诸如噻替哌(thiotepa)和环磷酰胺(Cytoxan™);烷基磺酸盐,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类,诸如苄替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙烯亚胺类(emylerumine)和甲基蜜胺类(methylamelamine),包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺(triemylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲蜜胺(trimemylolomelamine);多聚乙酰(特别是布拉它辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素(bryostatin);卡利他汀(callystatin)、CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻素(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);多拉司他汀(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CBI-TMI);软珊瑚醇(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑制素(spongistatin);氮芥,诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);硝基脲,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫斯汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素(calicheamicin),特别是卡奇霉素γII和卡奇霉素phili);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;二膦酸盐类,诸如氯膦酸盐;埃斯波霉素(esperamicin);以及新抑癌蛋白发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素类(aclacinomysins)、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉

素、放线菌素C(cactinomycin)、卡柔比星(carabicin)、洋红霉素(carrninomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、放线菌素D、道诺霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(Adramycin™)(包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯并多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、依达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素诸如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素、链脲佐菌素、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸(dempterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷;雄激素,诸如卡普睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯;抗肾上腺药(anti-adrenals),诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸(frolinic acid);醋葡醛内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶(eniluracil);安吖啶(amsacrine);贝他布昔(hestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地弗法明(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吖醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(elfornithine);依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidamine);美登素生物碱诸如美登素和美登木素;米托胍腙(mitoguazone);米托蒽醌;莫哌达醇(mopidamol);尼曲吖啶(nitracrine);喷司他汀(pentostatin);蛋氨氮芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸;2-乙肼;丙卡巴肼;PSK™;雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofiran);锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺(2,2',2"-tricUorotriemylamine);单端孢霉烯类(特别是T-2毒素、维拉库林A(verracurin A)、杆孢菌素A和蛇形菌素(anguidine));尿烷;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷(pipobroman);加西托星(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替哌;紫杉烷类,例如,紫杉醇(Taxol™,Bristol Meyers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)和多西他赛(docetaxel)(Taxoteret™,Rhone-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥;吉西他滨(Gemzar™);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,诸如顺铂和卡铂;长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌(mitroxantrone);长春新碱;长春瑞滨(vinorelbine)(Navelbine™);米托蒽醌(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素;氨蝶呤;希罗达(xeloda);伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类维生素A诸如维甲酸;卡培他滨;以及上述任一者的药学可接受的盐、酸或衍生物。"化疗剂"的定义还包括用于调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂,诸如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬(tamoxifen)(包括Nolvadex™)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen)、曲奥昔

芬(trioxifene)、酮昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene)(Fareston™);调节肾上腺中的雌激素产生的芳香酶的抑制剂,诸如,例如4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、醋酸甲地孕酮(Megace™)、依西美坦(exemestane)、福美司坦(formestane)、法曲唑(fadrozole)、伏氯唑(vorozole)(Rivisor™)、来曲唑(letrozole)(Femara™)和阿那曲唑(anastrozole)(Arimidex™);以及抗雄激素,例如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprohde)和戈舍瑞林(goserelin);以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0253] 如以下详细描述,本文公开的药物组合物和/或剂可以固体或液体形式特别配制以进行施用,所述固体或液体形式包括适合于以下的那些形式:(1)口服施用,例如灌服剂(水性或非水性溶液或混悬液)、片剂例如以经颊、舌下和全身吸收为目标的那些片剂、大丸剂、粉剂、颗粒剂、用于向舌部施加的糊剂;或(2)胃肠外施用,例如通过以例如无菌溶液或混悬液或持续释放制剂形式皮下、肌肉内、静脉内、鞘内、脑内或硬膜外注射。制备药物制剂或组合物的方法包括将本文所述的剂与载体以及任选的一种或多种辅助成分相缔合的步骤。通常,通过使本文所述的剂与液体载体或细碎固体载体或两者均匀并紧密地缔合,然后根据需要将产物成形来制备制剂。

[0254] 本文提供的药物组合物可以用适合的载体、赋形剂以及提供改善的转移、递送、耐受性等的其他剂来配制。在所有药物化学工作者已知的配方书(Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Easton,PA)中可找到许多适当的制剂。这些制剂包括例如粉末、糊状物、软膏、果冻、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(诸如LIPOFECTIN™,Life Technologies,Carlsbad,CA)、DNA缀合物、无水吸收糊状物、水包油和油包水乳液、乳液碳蜡(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶以及含有碳蜡的半固体混合物。还参见Powell等人"Compendium of excipients for parenteral formulations"PDA(1998)J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0255] 向患者施用的抗原结合分子的剂量可根据患者的年龄和体型大小、目标疾病、条件、施用途径等改变。

[0256] 各种递送系统为已知的并且可用于施用本文提供的药物组合物,例如于脂质体、微粒、微胶囊中的封装物、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见例如Wu等人,(1987)J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入的方法包括但不限于真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外以及经口途径。可通过任何方便的途径,例如通过输注或快速注射、通过经上皮或粘膜皮肤内衬(例如口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收来施用组合物并且可与其他生物活性剂一起施用。可以全身或局部施用。

[0257] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物可用标准针头和注射器进行皮下或静脉内递送。此外,相对于皮下递送,笔式递送装置已容易地应用于递送如本文所公开的药物组合物。这种笔式递送装置可为可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔式递送装置通常利用含有药物组合物的可替换药筒。在已施用药筒内的所有药物组合物并且药筒空掉后,可轻易地将空药筒弃去并且用含有药物组合物的新药筒代替。然后笔式递送装置可再次使用。在一次性笔式递送装置中,没有可替换的药筒。相反地,一次性笔式递送装置预填充有保持在装置内的储集器中的药物组合物。在将储集器内的药物组合物清空后,将整个

装置弃去。

[0258] 许多可重复使用的笔式和自动注射器递送装置已应用于皮下递送本文公开的药物组合物。实例包括但不限于AUTOPEN™(Owen Mumford,Inc.,Woodstock,UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems,Bergdorf,Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(Eli Lilly and Co.,Indianapolis,IN)、NOVOPEN™I、II和III(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、BD™笔(Becton Dickinson,Franklin Lakes,NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™以及OPTICLIK™(sanofi-aventis,Frankfurt,Germany),仅举几个例子。应用于皮下递送本文公开的药物组合物的一次性笔式递送装置的实例包括但不限于SOLOSTAR™笔(sanofi-aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)以及KWIKPEN™(EliLilly)、SURECLICK™自动注射器(Amgen,Thousand Oaks,CA)、PENLET™(Haselmeier,Stuttgart,Germany)、EPIPEN(Dey,L.P.)以及HUMIRA™笔(Abbott Labs,Abbott Park IL),仅举几个例子。

[0259] 在某些情况下,可在控制释放系统中递送药物组合物。在一个实施方案中,可使用泵(参见Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一实施方案中,可使用聚合物材料;参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Florida。在另一实施方案中,可将控制释放系统放在组合物的靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如Goodson,1984,Medical Applications of Controlled Release,同上,第2卷,第115-138页)。Langer,1990,Science 249:1527-1533进行的综述中论述了其他控制释放系统。

[0260] 可注射制剂可包括用于静脉内、皮下、皮内以及肌肉内注射、点滴输注等的剂型。这些可注射制剂可通过公众已知的方法来制备。例如,可例如通过将上文所描述的抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备可注射制剂。作为用于注射的水性介质,有例如生理盐水、含有葡萄糖和其他助剂的等张溶液等,这些水性介质可与诸如以下的适当增溶剂组合使用:醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等。作为油性介质,有已采用的例如芝麻油、大豆油等,这些油性介质可与诸如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等增溶剂组合使用。因此制备的注射物优选填充于适当的安瓿中。

[0261] 有利地,将上文所描述的用于口服或肠胃外用途的药物组合物制备成呈适合于符合活性成分的剂量的单位剂量形式的剂型。单位剂量的此类剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓿)、栓剂等。

[0262] 本文描述的剂可以以多剂量施用,诸如初始剂量、二次剂量和三次剂量。术语“初始剂量”、“二次剂量”以及“三次剂量”是指施用本文公开的抗原结合分子的时间顺序。因此,“初始剂量”为在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”);“二次剂量”为初始剂量之后施用的剂量;并且“三次剂量”为二次剂量之后施用的剂量。初始、二次以及三次剂量可全部含有相同量的本文所述的治疗剂,但就施用频率来说通常可彼此不同。然而,在某些实施方案中,在治疗过程期间,初始、二次和/或三次剂量中所含的抗原结合分子的量彼此不同(例如,适当时上调或下调)。在某些实施方案中,在治疗方案开始时施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个或5个)剂量作为“加载剂量”,随后为不太频繁地施用的后续剂量(例

如“维持剂量”)。

[0263] 在本文公开的一个示例性实施方案中,在紧挨着的前一剂量之后1至26(例如1、$1^1/_2$、2、$2^1/_2$、3、$3^1/_2$、4、$4^1/_2$、5、$5^1/_2$、6、$6^1/_2$、7、$7^1/_2$、8、$8^1/_2$、9、$9^1/_2$、10、$10^1/_2$、11、$11^1/_2$、12、$12^1/_2$、13、$13^1/_2$、14、$14^1/_2$、15、$15^1/_2$、16、$16^1/_2$、17、$17^1/_2$、18、$18^1/_2$、19、$19^1/_2$、20、$20^1/_2$、21、$21^1/_2$、22、$22^1/_2$、23、$23^1/_2$、24、$24^1/_2$、25、$25^1/_2$、26、$26^1/_2$或更多)周时施用每个二次和/或三次剂量。如本文所用,短语“紧挨着的前一剂量”意指在多次施用的顺序中,在施用顺序中没有中间剂量的紧接着施用下一剂量之前向患者施用的本文所述的治疗剂的剂量。

[0264] 根据本文公开的这个方面的方法可以包括向患者施用任意数量的二次和/或三次剂量的本文描述的治疗剂。例如,在某些实施方案中,仅向患者施用单个二次剂量。在其他实施方案中,向患者施用两个或更多(例如2、3、4、5、6、7、8或更多)个二次剂量。同样地,在某些实施方案中,仅向患者施用单个三次剂量。在其他实施方案中,向患者施用两个或更多(例如2、3、4、5、6、7、8或更多)个三次剂量。

[0265] 在涉及多个二级剂量的实施方案中,可以与其他二级剂量相同的频率施用每个二级剂量。例如,可在紧挨着的前一剂量之后1至2周时向患者施用每个二级剂量。类似地,在涉及多个三级剂量的实施方案中,可以与其他三级剂量相同的频率施用每个三级剂量。例如,可在紧挨着的前一剂量之后2至4周时向患者施用每个三级剂量。或者,在治疗方案的过程中向患者施用二级和/或三级剂量的频率可改变。还可在治疗过程期间在临床检查之后由医师根据个别患者的需要调整施用频率。

[0266] 适应症

[0267] 在一些实施方案中,本文描述的方法可用于治疗任何癌症,包括任何癌性或癌前肿瘤。可以通过本文提供的方法和组合物治疗的癌症包括但不限于膀胱癌、血癌、骨癌、骨髓癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、食道癌、胃肠道癌、牙龈癌、头部癌、肾癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、颈癌、卵巢癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、舌癌或子宫癌。此外,癌症可以具体为以下组织学类型,但不限于这些:恶性赘生物;癌;未分化癌;巨细胞癌和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;胆管癌;肝细胞癌;混合性肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉中的腺癌;家族性结肠息肉病腺癌;实体癌;恶性类癌瘤;细支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸性细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱性粒细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡性腺癌;乳头状和滤泡性腺癌;无包膜硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附属器癌;顶泌腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液性腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;乳腺佩吉特病;腺泡细胞癌;腺鳞癌;伴有鳞状化生的腺癌;恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质瘤;恶性卵泡膜瘤;恶性颗粒细胞瘤;恶性母细胞瘤;塞托利细胞癌;恶性间质细胞瘤;恶性脂质细胞瘤;恶性副神经节瘤;恶性乳房外副神经节瘤;嗜铬细胞瘤;血管球肉瘤(glomangiosarcoma);恶性黑素瘤;无色素性黑素瘤;浅表播散性黑素瘤;巨大色素痣中的恶性黑素瘤;上皮样细胞黑素瘤;恶性蓝痣;肉瘤;纤维肉瘤;恶性纤维组织细胞瘤;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;肺泡横纹肌肉瘤;间质肉瘤;恶性混合瘤;苗勒氏管混合瘤(mullerian mixed tumor);肾母细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;恶性间叶瘤;恶性布伦纳瘤;恶性叶状肿瘤;滑膜肉瘤;恶性间皮瘤;无性细胞瘤;胚胎癌;恶

性畸胎瘤;恶性卵巢甲状腺瘤;绒毛膜癌;恶性中肾瘤;血管肉瘤;恶性血管内皮瘤;卡波西肉瘤;恶性血管外皮细胞瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;近皮质骨肉瘤;软骨肉瘤;恶性软骨母细胞瘤;间叶软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因肉瘤;恶性牙源性肿瘤;成釉细胞性牙肉瘤;恶性成釉细胞瘤;成釉细胞纤维肉瘤;恶性松果体瘤;脊索瘤;恶性神经胶质瘤;室管膜瘤;星形细胞瘤;原生质星形细胞瘤;纤维状星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突胶质细胞瘤;少突母细胞瘤;原始神经外胚层;小脑肉瘤;神经节神经母细胞瘤;神经母细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;恶性脑膜瘤;神经纤维肉瘤;恶性神经鞘瘤;恶性颗粒细胞瘤;恶性淋巴瘤;霍奇金病;霍奇金淋巴瘤;类肉芽肿;小淋巴细胞恶性淋巴瘤;弥漫性大细胞恶性淋巴瘤;滤泡性恶性淋巴瘤;蕈样肉芽肿;其他特定的非霍奇金淋巴瘤;恶性组织细胞增生症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;淋巴样白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞白血病;髓样白血病;嗜碱性白血病;嗜酸性白血病;单核细胞白血病;肥大细胞白血病;巨核细胞母细胞白血病;髓样肉瘤;和毛细胞白血病。

[0268] 该组合物或方法可用于治疗表达CD20的癌症或肿瘤。所述组合物或方法可用于治疗B细胞恶性肿瘤,包括非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴母细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤或伯基特淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是滤泡性淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

[0269] 在一些实施方案中,癌症包括实体肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、血源性肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食道肿瘤、尤文氏肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、默克尔细胞肿瘤、睾丸肿瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或威尔姆斯肿瘤。

[0270] 在某些实施方案中,被治疗的肿瘤是预测不会表达特定靶抗原的肿瘤。本文公开的示例性靶抗原(例如,示例性TAA)的表达谱是本领域已知的并且/或者可以使用本文提供的方法确定。

[0271] 表达谱是已知的并且可以在例如以下数据库中找到:TANTIGEN 2.0(可在万维网上的projects.met-hilab.org/tadb/index.php上找到;更多详细信息可在Zhang,G.,Chitkushev,L.,Olsen,L.R.等人TAN TIGEN 2.0:a knowledge base of tumor T cell antigens and epitope s.BMC Bioinformatics22,40(2021)中找到);癌症表位数据库和分析资源(CEDAR)(更多详细信息可在Koşaloğlu-Yalçın,Z.等人,The Cance r Epitope Database and Analysis Resource:A Blueprint for the Esta blishment of a New Bioinformatics Resource for Use by the Cancer Immunology Community,Frontiers in Immunology,12(2021)中找到);人蛋白质图谱(可在万维网上的v17.proteinatlas.org/找到);dbPe pNeo(可在万维网上的biostatistics.online/dbPepNeo/search.php找到);和cBioPortal(可在万维网上的cbioportal.org找到)。

[0272] 图18-26中提供了某些示例性靶抗原的示例性表达谱。

[0273] 在一些实施方案中,基于已知表达谱(例如,本文公开的表达谱)肿瘤被预测不表达靶抗原。在一些实施方案中,如果少于1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、10.5%、11%、11.5%、12%、12.5%、13%、13.5%、14%、14.5%、15%、15.5%、16%、16.5%、17%、17.5%、18%、18.5%、19%、19.5%、20%、20.5%、21%、21.5%、22%、22.5%、23%、23.5%、24%、24.5%、25%、25.5%、26%、26.5%、27%、27.5%、28%、28.5%、29%、29.5%、30%、30.5%、31%、31.5%、32%、32.5%、33%、33.5%、34%、34.5%、35%、35.5%、36%、36.5%、37%、37.5%、38%、38.5%、39%、39.5%、40%、40.5%、41%、41.5%、42%、42.5%、43%、43.5%、44%、44.5%、45%、45.5%、46%、46.5%、47%、47.5%、48%、48.5%、49%、49.5%或50%的分析肿瘤表达靶抗原,则预测肿瘤类型不表达靶抗原。

[0274] 原发性肿瘤表现出在肿瘤内以及不同患者之间变化的抗原表达模式。具有相同组织学肿瘤类型的患者之间的抗原表达差异可能很大。因此,本文公开的示例性表达谱对于可使用本文公开的方法治疗的肿瘤类型具有参考价值,但并不局限于可使用本文公开的方法治疗的癌症或肿瘤类型。在一些实施方案中,被治疗的肿瘤可以是已经过测试并且不表达靶抗原或者含有不表达靶抗原的肿瘤细胞亚群的肿瘤,尽管肿瘤抗原表达谱显示该肿瘤类型通常表达靶抗原。在一些实施方案中,靶抗原在特定肿瘤类型中富集,但靶抗原不在患者的特定肿瘤类型中的肿瘤细胞亚群中表达。在一些实施方案中,靶抗原通常在多种肿瘤类型中表达,但靶抗原不在患者的肿瘤细胞亚群中表达。

[0275] 筛选、诊断和预后测定

[0276] 还提供了筛选、诊断和/或预后测定,用于鉴定受试者的癌症中癌症或肿瘤细胞上的肿瘤相关抗原的水平或量化其量。

[0277] 在一些实施方案中,肿瘤中的至少一个亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。本文提供的方法可进一步包括确定肿瘤中或肿瘤微环境中至少亚群(例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%、5%、5.1%、5.2%、5.3%、5.4%、5.5%、5.6%、5.7%、5.8%、5.9%、6%、6.1%、6.2%、6.3%、6.4%、6.5%、6.6%、6.7%、6.8%、6.9%、7%、7.1%、7.2%、7.3%、7.4%、7.5%、7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、8.6%、8.7%、8.8%、8.9%、9%、9.1%、9.2%、9.3%、9.4%、9.5%、9.6%、9.7%、9.8%、9.9%、10%、10.1%、10.2%、10.3%、10.4%、10.5%、10.6%、10.7%、10.8%、10.9%、11%、11.1%、11.2%、11.3%、11.4%、11.5%、11.6%、11.7%、11.8%、11.9%、12%、12.1%、12.2%、12.3%、12.4%、12.5%、12.6%、12.7%、12.8%、12.9%、13%、13.1%、13.2%、13.3%、13.4%、13.5%、13.6%、13.7%、13.8%、13.9%、14%、14.1%、14.2%、14.3%、14.4%、14.5%、14.6%、14.7%、14.8%、14.9%、15%、15.1%、15.2%、15.3%、15.4%、15.5%、15.6%、15.7%、15.8%、15.9%、16%、16.1%、16.2%、16.3%、16.4%、16.5%、16.6%、16.7%、16.8%、16.9%、17%、17.1%、17.2%、17.3%、17.4%、17.5%、17.6%、17.7%、17.8%、17.9%、18%、18.1%、18.2%、

18.3%、18.4%、18.5%、18.6%、18.7%、18.8%、18.9%、19%、19.1%、19.2%、19.3%、19.4%、19.5%、19.6%、19.7%、19.8%、19.9%、20%、20.1%、20.2%、20.3%、20.4%、20.5%、20.6%、20.7%、20.8%、20.9%、21%、21.1%、21.2%、21.3%、21.4%、21.5%、21.6%、21.7%、21.8%、21.9%、22%、22.1%、22.2%、22.3%、22.4%、22.5%、22.6%、22.7%、22.8%、22.9%、23%、23.1%、23.2%、23.3%、23.4%、23.5%、23.6%、23.7%、23.8%、23.9%、24%、24.1%、24.2%、24.3%、24.4%、24.5%、24.6%、24.7%、24.8%、24.9%、25%、25.1%、25.2%、25.3%、25.4%、25.5%、25.6%、25.7%、25.8%、25.9%、26%、26.1%、26.2%、26.3%、26.4%、26.5%、26.6%、26.7%、26.8%、26.9%、27%、27.1%、27.2%、27.3%、27.4%、27.5%、27.6%、27.7%、27.8%、27.9%、28%、28.1%、28.2%、28.3%、28.4%、28.5%、28.6%、28.7%、28.8%、28.9%、29%、29.1%、29.2%、29.3%、29.4%、29.5%、29.6%、29.7%、29.8%、29.9%、30%、30.1%、30.2%、30.3%、30.4%、30.5%、30.6%、30.7%、30.8%、30.9%、31%、31.1%、31.2%、31.3%、31.4%、31.5%、31.6%、31.7%、31.8%、31.9%、32%、32.1%、32.2%、32.3%、32.4%、32.5%、32.6%、32.7%、32.8%、32.9%、33%、33.1%、33.2%、33.3%、33.4%、33.5%、33.6%、33.7%、33.8%、33.9%、34%、34.1%、34.2%、34.3%、34.4%、34.5%、34.6%、34.7%、34.8%、34.9%、35%、35.1%、35.2%、35.3%、35.4%、35.5%、35.6%、35.7%、35.8%、35.9%、36%、36.1%、36.2%、36.3%、36.4%、36.5%、36.6%、36.7%、36.8%、36.9%、37%、37.1%、37.2%、37.3%、37.4%、37.5%、37.6%、37.7%、37.8%、37.9%、38%、38.1%、38.2%、38.3%、38.4%、38.5%、38.6%、38.7%、38.8%、38.9%、39%、39.1%、39.2%、39.3%、39.4%、39.5%、39.6%、39.7%、39.8%、39.9%、40%、40.1%、40.2%、40.3%、40.4%、40.5%、40.6%、40.7%、40.8%、40.9%、41%、41.1%、41.2%、41.3%、41.4%、41.5%、41.6%、41.7%、41.8%、41.9%、42%、42.1%、42.2%、42.3%、42.4%、42.5%、42.6%、42.7%、42.8%、42.9%、43%、43.1%、43.2%、43.3%、43.4%、43.5%、43.6%、43.7%、43.8%、43.9%、44%、44.1%、44.2%、44.3%、44.4%、44.5%、44.6%、44.7%、44.8%、44.9%、45%、45.1%、45.2%、45.3%、45.4%、45.5%、45.6%、45.7%、45.8%、45.9%、46%、46.1%、46.2%、46.3%、46.4%、46.5%、46.6%、46.7%、46.8%、46.9%、47%、47.1%、47.2%、47.3%、47.4%、47.5%、47.6%、47.7%、47.8%、47.9%、48%、48.1%、48.2%、48.3%、48.4%、48.5%、48.6%、48.7%、48.8%、48.9%、49%、49.1%、49.2%、49.3%、49.4%、49.5%、49.6%、49.7%、49.8%、49.9%、50%、50.1%、50.2%、50.3%、50.4%、50.5%、50.6%、50.7%、50.8%、50.9%、51%、51.1%、51.2%、51.3%、51.4%、51.5%、51.6%、51.7%、51.8%、51.9%、52%、52.1%、52.2%、52.3%、52.4%、52.5%、52.6%、52.7%、52.8%、52.9%、53%、53.1%、53.2%、53.3%、53.4%、53.5%、53.6%、53.7%、53.8%、53.9%、54%、54.1%、54.2%、54.3%、54.4%、54.5%、54.6%、54.7%、54.8%、54.9%、55%、55.1%、55.2%、55.3%、55.4%、55.5%、55.6%、55.7%、55.8%、55.9%、56%、56.1%、56.2%、56.3%、56.4%、56.5%、56.6%、56.7%、56.8%、56.9%、57%、57.1%、57.2%、57.3%、57.4%、57.5%、57.6%、57.7%、57.8%、57.9%、58%、58.1%、58.2%、58.3%、58.4%、58.5%、58.6%、58.7%、58.8%、58.9%、59%、59.1%、59.2%、59.3%、59.4%、59.5%、59.6%、59.7%、59.8%、59.9%、60%、60.1%、60.2%、60.3%、60.4%、60.5%、60.6%、60.7%、60.8%、60.9%、61%、61.1%、

61.2%、61.3%、61.4%、61.5%、61.6%、61.7%、61.8%、61.9%、62%、62.1%、62.2%、62.3%、62.4%、62.5%、62.6%、62.7%、62.8%、62.9%、63%、63.1%、63.2%、63.3%、63.4%、63.5%、63.6%、63.7%、63.8%、63.9%、64%、64.1%、64.2%、64.3%、64.4%、64.5%、64.6%、64.7%、64.8%、64.9%、65%、65.1%、65.2%、65.3%、65.4%、65.5%、65.6%、65.7%、65.8%、65.9%、66%、66.1%、66.2%、66.3%、66.4%、66.5%、66.6%、66.7%、66.8%、66.9%、67%、67.1%、67.2%、67.3%、67.4%、67.5%、67.6%、67.7%、67.8%、67.9%、68%、68.1%、68.2%、68.3%、68.4%、68.5%、68.6%、68.7%、68.8%、68.9%、69%、69.1%、69.2%、69.3%、69.4%、69.5%、69.6%、69.7%、69.8%、69.9%、70%、70.1%、70.2%、70.3%、70.4%、70.5%、70.6%、70.7%、70.8%、70.9%、71%、71.1%、71.2%、71.3%、71.4%、71.5%、71.6%、71.7%、71.8%、71.9%、72%、72.1%、72.2%、72.3%、72.4%、72.5%、72.6%、72.7%、72.8%、72.9%、73%、73.1%、73.2%、73.3%、73.4%、73.5%、73.6%、73.7%、73.8%、73.9%、74%、74.1%、74.2%、74.3%、74.4%、74.5%、74.6%、74.7%、74.8%、74.9%、75%、75.1%、75.2%、75.3%、75.4%、75.5%、75.6%、75.7%、75.8%、75.9%、76%、76.1%、76.2%、76.3%、76.4%、76.5%、76.6%、76.7%、76.8%、76.9%、77%、77.1%、77.2%、77.3%、77.4%、77.5%、77.6%、77.7%、77.8%、77.9%、78%、78.1%、78.2%、78.3%、78.4%、78.5%、78.6%、78.7%、78.8%、78.9%、79%、79.1%、79.2%、79.3%、79.4%、79.5%、79.6%、79.7%、79.8%、79.9%、80%、80.1%、80.2%、80.3%、80.4%、80.5%、80.6%、80.7%、80.8%、80.9%、81%、81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%、81.6%、81.7%、81.8%、81.9%、82%、82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%、82.6%、82.7%、82.8%、82.9%、83%、83.1%、83.2%、83.3%、83.4%、83.5%、83.6%、83.7%、83.8%、83.9%、84%、84.1%、84.2%、84.3%、84.4%、84.5%、84.6%、84.7%、84.8%、84.9%、85%、85.1%、85.2%、85.3%、85.4%、85.5%、85.6%、85.7%、85.8%、85.9%、86%、86.1%、86.2%、86.3%、86.4%、86.5%、86.6%、86.7%、86.8%、86.9%、87%、87.1%、87.2%、87.3%、87.4%、87.5%、87.6%、87.7%、87.8%、87.9%、88%、88.1%、88.2%、88.3%、88.4%、88.5%、88.6%、88.7%、88.8%、88.9%、89%、89.1%、89.2%、89.3%、89.4%、89.5%、89.6%、89.7%、89.8%、89.9%、90%、90.1%、90.2%、90.3%、90.4%、90.5%、90.6%、90.7%、90.8%、90.9%、91%、91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%、91.6%、91.7%、91.8%、91.9%、92%、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%、92.6%、92.7%、92.8%、92.9%、93%、93.1%、93.2%、93.3%、93.4%、93.5%、93.6%、93.7%、93.8%、93.9%、94%、94.1%、94.2%、94.3%、94.4%、94.5%、94.6%、94.7%、94.8%、94.9%、95%、95.1%、95.2%、95.3%、95.4%、95.5%、95.6%、95.7%、95.8%、95.9%、96%、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%、96.6%、96.7%、96.8%、96.9%、97%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、100%)的肿瘤细胞是否不表达靶抗原,并且如果所述确定的亚群/百分比不表达靶抗原,则向受试者施用本文所公开的一种或多种剂。本领域的普通技术人员可以理解,如果肿瘤微环境中的一部分细胞确实表达靶抗原或预测会表达靶抗原,则本方法可用于其肿瘤不表达靶抗原(例如,100%的肿瘤不表达靶抗原或被预测不表达靶抗

原)的受试者。

[0278] 本文提供的方法还可以包括确定肿瘤中的至少所述亚群的肿瘤细胞不表达靶抗原。在一些实施方案中,如果靶抗原的表达低于检测水平或低于信噪比,则肿瘤细胞不表达靶抗原。

[0279] 本文提供了通过测量或计算受试者癌症中肿瘤相关抗原的量或水平来筛选受试者的方法。肿瘤相关抗原可通过本领域已知的任何方法来测量。例如,可从患者采集生物样品。样品可通过本领域已知的任何方式获取。样品也可直接取自癌症、肿瘤或肿瘤微环境中。术语"生物样品"旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物流体,以及受试者体内存在的组织、细胞和流体。

[0280] 在一些实施方案中,表达靶抗原的肿瘤细胞的确定的百分比可以通过测量取自受试者的生物样品(例如,肿瘤或肿瘤微环境的活检)中的靶抗原的水平或表达来确定。在一些实施方案中,然后可以外推所述百分比以量化受试者中表达靶抗原的肿瘤和/或肿瘤微环境细胞的预测总百分比。

[0281] 本公开涵盖的检测方法可用于体外以及体内检测生物样品中的肿瘤相关抗原或其生物活性片段的mRNA,蛋白质或基因组DNA。例如,用于检测mRNA的体外技术包括Northern杂交和原位杂交。用于检测蛋白质的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。用于检测基因组DNA的体外技术包括Southern杂交。此外,用于检测蛋白质的体内技术包括将针对要检测的期望蛋白质的标记抗体引入受试者体内。例如,该抗体可以用放射性标记物标记,可以通过标准成像技术检测该放射性标记物在受试者中的存在和位置。

[0282] 本文描述的测定可以包括测量从细胞分离后(例如,在活检或生物样品分离后)的肿瘤相关抗原水平。这些可以以无细胞形式使用肿瘤相关抗原的基因表达的已知组分进行。可能需要固定测定的某些组分,并且此类实施方案可能受益于使用众所周知的用于生物分子固定的改造,诸如使用微量滴定板、珠粒、试管、微量离心管与可衍生部分组合,所述可衍生部分诸如融合蛋白结构域、生物素化、抗体等。

[0283] 为了确定受试者是否患有本文公开的疾患、是否具有发展此类疾患的风险、或者是否可受益于施用本文公开的剂,可从受试者获得生物样品,并且可使该生物样品与能够检测生物样品中的肿瘤相关抗原蛋白或编码所述肿瘤相关抗原的多核苷酸(例如,mRNA或基因组DNA)的化合物或剂接触。用于检测mRNA或基因组DNA的剂可以包括能够与mRNA或基因组DNA杂交的标记的核酸探针。核酸探针可以是例如与编码肿瘤相关抗原的核酸互补的序列或其部分,诸如长度至少为15、20、25、30、25、40、45、50、100、250或500个核苷酸的寡核苷酸,并且足以在严格条件下与所需的mRNA或基因组DNA特异性杂交。本文描述了本公开所涵盖的用于诊断测定的其他合适的探针。

[0284] 在另一个实施方案中,该方法进一步包括从对照受试者获得对照生物样品;将对照样品与能够检测蛋白质、mRNA或基因组DNA的化合物或剂接触,使得在生物样品中检测到所需蛋白质、mRNA或基因组DNA的存在;并将对照样品中蛋白质、mRNA或基因组DNA的存在与对照样品中蛋白质、mRNA或基因组DNA的存在进行比较。

[0285] 在一些实施方案中,本文描述的测定可以以无细胞形式使用肿瘤相关抗原的基因表达的已知组分进行。可能需要固定测定的某些组分,并且此类实施方案可能受益于使用

众所周知的用于生物分子固定的改造,诸如使用微量滴定板、珠粒、试管、微量离心管与可衍生部分组合,所述可衍生部分诸如融合蛋白结构域、生物素化、抗体等。

[0286] 对受试者中肿瘤相关抗原的一个或多个核酸区域的分析可用于预测受试者是否具有或可能受益于本文公开的方法。例如,检测癌症一部分中的肿瘤相关抗原使得该癌症将被归类为异质癌症,将表明受试者将受益于本文公开的方法。类似地,分析受试者的肿瘤相关抗原的基因组拷贝数可用于预测受试者是否会受益于本文公开的方法。在一些实施方案中,本公开所涵盖的方法的特征可以是包括在来自受试者的细胞样品中检测编码肿瘤相关抗原的基因的一个或多个多态性区域的存在或不存在。

[0287] 在其他检测方法中,需要首先扩增生物样品中检测到的至少一部分核酸。根据本领域已知的方法,扩增可例如通过PCR和/或LCR进行(参见Wu和Wallace,(1989)Genomics 4:560)。在一个实施方案中,使细胞的基因组DNA暴露于两个PCR引物并扩增足以产生所需量的扩增DNA的循环数。

[0288] 可选的扩增方法包括:自主维持序列复制(Guatelli,J.C.等人,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh,D.Y.等人,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177)、Q-β复制酶(Lizardi,P.M.等人,1988,Bio/Technology 6:1197)和自主维持序列复制(Guatelli等人,(1989)Proc.Nat.Acad.Sci.87:1874)和基于核酸的序列扩增(NABSA),或任何其他核酸扩增方法,然后使用本领域技术人员熟知的技术检测扩增的分子。如果核酸分子的数量非常少,这些检测方案对于检测此类分子特别有用。

[0289] 在一个实施方案中,可以使用本领域已知的多种测序反应中的任一种,通过将样品序列的序列与相应的参考(对照)序列进行比较,直接对生物样品中的核酸进行测序。示例性的测序反应包括基于由Maxam和Gilbert(Proc.Natl Acad Sci USA(1977)74:560)或Sanger(Sanger等人(1977)Proc.Nat.Acad.Sci 74:5463)开发的技术的那些。还设想在进行主题测定时可使用多种自动化测序程序中的任一种(Biotechniques(1995)19:448),包括通过质谱进行的测序(参见例如美国专利号5,547,835和国际专利申请公开号WO 94/16101,标题为“DNA Sequencing by Mass Spectrometry”,作者H.Köster;美国专利号5,547,835和国际专利申请公开号WO 94/21822,标题为“DNA Sequ encing by Mass Spectrometry Via Exonuclease Degradation”,作者H.Köster),以及美国专利号5,605,798和国际专利申请号PCT/US96/03651,标题为“DNA Diagnostics Based on Mass Spectrometry”,作者H.Köster;Cohen等人(1996)Adv Chromatogr 36:127-162;以及Griffin等人(1993)Appl Biochem Biotechnol 38:147-159)。对于本领域技术人员来说将显而易见的是,对于某些实施方案,在测序反应中需要确定仅一个、两个或三个核酸碱基的出现。例如,可以进行A-track等,例如,其中仅检测到一个核苷酸。

[0290] 针对肿瘤相关抗原的抗体也可用于疾病诊断和预后。此外,此类诊断方法可用于检测此类多肽表达水平的异常,或此类多肽的结构和/或组织、细胞或亚细胞位置的异常。结构差异可以包括,例如,突变多肽相对于正常多肽的大小、电负性或抗原性的差异。可以使用本领域技术人员熟知的技术容易地检测或分离来自待分析的组织或细胞类型的蛋白质,包括但不限于蛋白质印迹分析。有关进行蛋白质印迹分析的方法的详细说明,参见Sambrook等人,1989年,上文,第18章。本文所采用的蛋白质检测和分离方法还可以是诸如

Harlow和Lane中所述的那些方法(Harlow,E.和Lane,D.,1988,“Antibodies:ALaboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York),所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0291] 例如,这可以通过采用荧光标记抗体(见下文)的免疫荧光技术结合光学显微镜、流式细胞术或荧光检测来实现。另外,根据本公开有用的抗体(或其片段)可以在组织学上采用,如在免疫荧光或免疫电子显微镜中,用于原位检测肿瘤相关抗原。可以通过从受试者体内取出组织学样本,并将本文公开的标记抗体施加到其中来实现原位检测。可以通过将标记的抗体(或片段)覆盖到生物样品上来施加抗体(或片段)。通过使用这样的程序,不仅可以确定肿瘤相关抗原的存在,还可以确定其在所检查组织中的分布。本领域的普通技术人员将容易地认识到,可以修改多种组织学方法(诸如染色程序)以实现这种原位检测。

[0292] 通常使用固相支持物或载体作为能够结合抗原或抗体的支持物。众所周知的支持物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁矿。对于本公开内容所涵盖的目的,载体的性质可以是一定程度上可溶的,也可以是不可溶的。只要偶联分子能够结合抗原或抗体,支持材料实际上可以具有任何可能的结构配置。因此,支持配置可以是球形的,如珠粒,也可以是圆柱形的,如试管的内表面或杆的外表面。或者,表面可以是平坦的,诸如薄片、测试条等。支持物包括但不限于聚苯乙烯珠粒。本领域技术人员将了解许多其他适合结合抗体或抗原的载体,或者能够通过使用常规实验确定这些载体。

[0293] 用于标记抗体的一种方法是将其连接至酶并用于酶免疫测定(EIA)(Voller,“The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)”,Diagnostic Horizons 2:1-7,1978,Microbiological Associates Quarterly Publication,Walkersville,MD;Voller等人,J.Clin.Pathol.31:507-520(1978);Butler,Meth.Enzymol.73:482-523(1981);Maggio,(编辑)Enzyme Immunoassay,CRC Press,Boca Raton,FL,1980;Ishikawa等人,(编辑)Enzyme Immunoassay,Kgaku Shoin,Tokyo,1981)。与抗体结合的酶将与适当的底物(例如显色底物)以一定方式发生反应,从而产生可通过分光光度法、荧光法或目视方法检测的化学部分。可用于可检测地标记抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、δ-5-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、α-甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、β-半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。检测可以通过采用酶的显色底物的比色法来完成。还可以通过目测比较底物的酶反应程度与类似制备的标准物来进行检测。

[0294] 还可以使用多种其他免疫测定中的任何一种进行检测。例如,通过放射性标记抗体或抗体片段,有可能通过使用放射免疫测定(RIA)检测指纹基因野生型或突变型肽(参见,例如,Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,1986年3月,其以引用的方式并入本文)。放射性同位素可以通过使用伽马计数器或闪烁计数器或放射自显影等方法检测。

[0295] 也可以用荧光化合物标记抗体。当荧光标记的抗体暴露在适当波长的光下时,就可以通过荧光检测到其存在。最常使用的荧光标记化合物有异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛以及荧光胺。还可以使用荧光发射金属(诸如

^{152}Eu)或镧系元素的其他金属对抗体进行可检测标记。这些金属可以通过使用金属螯合基团(诸如二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA))连接到抗体上。

[0296] 还可以通过将抗体与化学发光化合物偶联来对所述抗体进行可检测标记。然后通过检测化学反应过程中产生的光的存在来确定化学发光标记抗体的存在。特别有用的化学发光标记化合物的实例有鲁米诺、异鲁米诺、芳香族吖啶酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吖啶盐或草酸酯。

[0297] 同样地,可以使用生物发光化合物来标记本公开内容所涵盖的抗体。生物发光是生物系统中发现的一种化学发光,其中催化蛋白提高化学发光反应的效率。通过检测发光的存在来确定生物发光蛋白的存在。用于标记目的的重要生物发光化合物是荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白。

[0298] 本文所述的方法可例如通过利用预先包装的诊断试剂盒(诸如上述试剂盒)来进行,所述诊断试剂盒包含至少一种本文所述的探针或引物核酸,其可方便地用于例如确定受试者是否患有与所关注的特定等位基因变体相关的疾病或处于发展所述疾病的风险。通过上述诊断和预后方法中的任何一种分析的样品核酸可以从受试者的任何细胞类型或组织中获得。例如,可以通过已知技术(例如,静脉穿刺)获得受试者的体液(例如血液)。或者,可以对干燥样品(例如,头发或皮肤)进行核酸测试。胎儿核酸样品可以从母体血液中获得,如Bianchi的国际专利申请号WO91/07660中所述。或者,可以获得羊水细胞或绒毛膜绒毛来进行产前测试。

[0299] 诊断程序也可直接对从活检或切除术中获得的受试者组织的组织切片(固定和/或冷冻)原位进行,从而无需核酸纯化。核酸试剂可用作此类原位程序的探针和/或引物(参见例如,Nuovo,G.J.,1992,PCR in situ hybridization:protocols and applications,Raven Press,NY)。

[0300] 除了主要注重于检测一个核酸序列的方法外,还可以通过这种检测方案来评估特征。例如,可以通过利用差异显示程序、Northern分析和/或RT-PCR来生成指纹图谱。

[0301] 本文还提供了通过靶抗原的组织或肿瘤表达谱预测受试者的肿瘤细胞是否表达靶抗原的方法。例如,受试者可能被诊断患有癌症,并且如果已知问题或肿瘤表达谱通常不表达靶抗原,则受试者肿瘤中的肿瘤细胞被预测不表达靶抗原。另外,受试者可能被诊断患有癌症,并且如果已知问题或肿瘤表达谱显示少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%或少于75%不表达靶抗原,则受试者的肿瘤中的肿瘤细胞被预测不表达靶抗原。

[0302] 本公开还涉及通过上述筛选测定鉴定的新型剂。因此,还提供了筛选、诊断和/或预后测定,用于鉴定对肿瘤相关抗原具有特异性的抗体,该抗体诱导/减轻对不表达肿瘤相关抗原的肿瘤细胞的杀伤或活化针对不表达肿瘤相关抗原的肿瘤细胞的T细胞。

[0303] 在一个实施方案中,本公开提供了用于筛选作为肿瘤相关抗原的底物或与肿瘤相关抗原相互作用的候选化合物或测试化合物的测定。

[0304] 在一个实施方案中,测定是基于细胞的测定,其中细胞(诸如癌细胞)与测试剂接触,并且确定测试化合物杀伤肿瘤细胞或活化T细胞的能力。可以通过监测本文描述的生物标志物(例如活检、生物标志物表达、物理测定等)来确定测试剂执行所讨论功能的能力。

[0305] 还可以确定测试剂调节抗体与其目标底物结合的能力。确定测试剂的结合能力可以通过例如以下方式来实现:将底物与放射性同位素或酶标记偶联,使得可以通过检测复合物中的标记底物来确定底物与抗体的结合。靶底物还可以与放射性同位素或酶标记偶联,以监测测试剂调节与复合物中底物结合的能力。确定测试剂结合靶蛋白的能力可以通过例如以下方式来实现:将剂与放射性同位素或酶标记偶联,使得可以通过检测复合物中的标记剂来确定结合。例如,此类剂可用^{125}I、^{35}S、^{14}C或^{3}H直接或间接标记,并且通过直接计数放射性发射或通过闪烁计数来检测放射性同位素。剂可以进一步用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶进行酶促标记,并且通过测定适当的底物到产物的转化来检测酶标记。

[0306] 在某些实施方案中,剂的结合能力在标记或不标记任何相互作用物的情况下确定。例如,可以使用微生理测量仪来检测相互作用而不标记任何组分(McConnell,H.M.等人(1992)Science 257:1906-1912。如本文所用,“微生理测量仪”(例如,细胞传感器)是这样一种分析仪器,其使用光寻址电位传感器(LAPS)测量细胞酸化其环境的速率。

[0307] 在一个方面,如本文所述的基于细胞的系统可用于鉴定治疗本文公开的癌症的剂。例如,此类细胞系统可以暴露于足够浓度的剂并持续足够长的时间以引起暴露细胞中疾病症状的改善。暴露后,可检查细胞以确定一种或多种疾病表型是否已改变为类似更正常或更野生型的表型。

[0308] 此外,可以使用动物或基于动物的疾病系统(诸如本文所述的系统)来鉴定此类剂。此类动物模型可用作测试底物,用于鉴定可有效结合肿瘤相关抗原或本文中的其他靶标的药物、药品、疗法和干预措施,诸如以治疗或预防本文公开的癌症。

[0309] 范例:

[0310] 实施例1:靶向CD22的CD28双特异性抗体增强奥尼妥单抗在难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤模型中的抗肿瘤功效

[0311] 虽然许多患有弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的患者可能对一线化学免疫疗法获得完全响应,但患有复发/难治性(r/r)疾病的患者的结局通常较差。奥尼妥单抗是一种CD20xCD3双特异性抗体,其通过活化T细胞受体/CD3复合物提供“信号1”,在I期试验中,它对高度难治性DLBCL患者表现出了早期、有希望的活性;然而,并非所有患者都能获得完全响应,许多患者会出现复发,这意味着存在很大的未满足的医疗需求。这里研究了通过衔接T细胞上的CD28受体添加共刺激“信号2”是否可以增强奥尼妥单抗活性。本文公开的数据首次证明,REGN5837(一种将表达CD22的肿瘤细胞与表达CD28的T细胞交联的双特异性抗体)通过增强T细胞活化和细胞溶解功能来增强奥尼妥单抗的活性。在使用人免疫系统重建动物进行的临床前DLBCL肿瘤研究中,REGN5837促进了奥尼妥单抗的抗肿瘤活性,并诱导了可塑性重编程T细胞的肿瘤内扩增,同时避免了功能失调状态。REGN5837单一疗法在灵长类动物研究中表现出活性且无毒性,并且与奥尼妥单抗组合给药时可增强T细胞活化。此外,对非霍奇金淋巴瘤(NHL)临床样品的分析揭示,奥尼妥单抗治疗后$CD28^{+}CD8^{+}$T细胞增加,证明存在可被CD22xCD28抗体靶向的群体。总之,这些数据表明REGN5837增强了奥尼妥单抗在临

床前NHL模型中的抗肿瘤活性,并且这两种双特异性抗体的组合可能为治疗r/r DLBCL提供一种新的无化疗方法。

[0312] 癌症免疫疗法领域的一种治疗策略是利用双特异性抗体将T细胞重定向至肿瘤,以增强抗肿瘤活性。这引起批准CD19xCD3 T细胞衔接器Blincyto用于治疗急性淋巴细胞白血病和EpCAMxCD3双特异性抗体Removab用于治疗恶性腹水。这些T细胞重定向治疗剂旨在通过一个抗原结合片段(Fab)臂衔接肿瘤抗原,并通过另一个Fab臂衔接T细胞活化受体。奥尼妥单抗是一种CD20xCD3双特异性抗体,其可在临床前肿瘤模型中有效触发T细胞介导的对CD20表达细胞的杀伤。来自1期试验的临床数据表明,在高度难治和复发性B-NHL患者中,该疗法具有有希望的活性和可控的安全性。然而,由于接受过大量预先治疗的患者不可避免地会出现复发,因此对于患有侵袭性淋巴瘤的患者,仍然有提高功效的可能。为了实现最佳的T细胞活化,T细胞需要T细胞受体复合物(TCR)的参与,后者提供“信号1”,并且还需要共刺激受体的参与,后者提供“信号2”。奥尼妥单抗通过交联CD3提供信号1来活化T细胞,而通过添加共刺激信号可以介导T细胞效应功能和活化的进一步增强。在本研究中检查了添加CD22xCD28双特异性抗体是否可以增强奥尼妥单抗的抗肿瘤活性。

[0313] REGN5837或CD22xCD28是一种铰链稳定的基于人IgG4的抗体,其旨在通过桥接表达CD22的细胞和表达CD28的T细胞来增强针对表达CD22的肿瘤(即NHL)的T细胞反应。CD22是一种结合唾液酸的跨膜蛋白,并且存在于正常B细胞和恶性B细胞(诸如DLBCL肿瘤)中。尽管人CD22的确切作用尚不完全清楚,但有研究表明CD22调节B细胞抗原受体的信号转导、B细胞迁移以及维持外周B细胞稳态和存活。通过将肿瘤细胞上的CD22与T细胞上的CD28交联,可以传导关键的CD28共刺激信号,以增强CD20xCD3定向的T细胞活化。本研究证明,通过与REGN5837组合可以在体外和体内有效增强奥尼妥单抗针对DLBCL肿瘤细胞的抗肿瘤活性。肿瘤内T细胞反应的表征揭示,CD28与奥尼妥单抗的组合参与不仅可以在DLBCL的临床前模型中介导治愈性肿瘤反应,而且还可以扩增肿瘤内T细胞和可重编程T细胞的诱导。因此,这些数据为REGN5837与奥尼妥单抗组合在r/r DLBCL患者中的潜在临床研究提供了支持。

[0314] 结果

[0315] 在r/r NHL患者中基线和奥尼妥单抗治疗后,在肿瘤内$CD8^+$T细胞上检测到CD28表达。

[0316] CD22是治疗B细胞白血病和淋巴瘤的经过充分验证的肿瘤靶标,在DLBCL患者样品中具有广泛但多变的表达(图7A-图7C)。此外,据观察,来自未经治疗的切除的DLBCL患者样品中的大量$CD28^+$细胞可以用CD22xCD28双特异性抗体进行靶向(图8A和图8B)。对来自针对奥尼妥单抗的剂量探索I期研究(ClinicalTrials.gov标识符:NCT02290951)的基线样品的分析表明,这种CD28表达优先出现在肿瘤内$CD8^+$T细胞上,而在$CD4^+$T细胞上的表达程度较低(图1A和B)。此外,虽然数量有限,但对几对患者样品在奥尼妥单抗治疗前后是否存在$CD28^+$ $CD8^+$T细胞进行了评估。在开始奥尼妥单抗疗法后五周,观察到滤泡性淋巴瘤和DLBCL患者样品中$CD8^+CD28^+$T细胞密度的特定增加(图1C),这与肿瘤内T细胞群的持续存在一致,REGN5837可以靶向该细胞群以增强效应记忆分化并进一步增强抗肿瘤活性。虽然CD86和较小程度的CD80(CD28的两种配体)也在切除的DLBCL患者样品中表达,但观察到共抑制分子CTLA4的同时表达(图8A和图8B),其对CD80和CD86具有更高的亲和力并可消除CD28共刺激

活性。因此,利用CD22xCD28双特异性抗体可以实现CD28的特定参与并潜在增强奥尼妥单抗活性。

[0317] REGN5837增强奥尼妥单抗介导的体外T细胞活化和效应功能。

[0318] 为了评价REGN5837增强奥尼妥单抗的细胞溶解和T细胞活化活性的能力,将富集淋巴细胞的人外周血单核细胞(PBMC)与WSU-DLCL2靶细胞或表达高水平CD20和CD22的DLBCL细胞共培养(图9B),并以作为单一剂的奥尼妥单抗的剂量滴定(4.8fM至10nM)或在固定浓度的REGN5837(范围从77pM至10uM)存在下进行。在奥尼妥单抗存在的情况下测定了REGN5837活性,因为与TeGenero类CD28超激动剂不同,CD28双特异性抗体在没有信号1或TCR/CD3复合物参与的情况下不能介导共刺激活性(图9A)。REGN5837共刺激的施用增强了奥尼妥单抗介导的WSU-DLCL2细胞的细胞毒性(图2A),上调了$CD4^+$(图2B)和$CD8^+$(图2D)T细胞上的活化标志物CD25,并以浓度依赖性方式诱导了$CD4^+$(图2C)和$CD8^+$(图2E)T细胞的增殖(表6)。

[0319] 表6:REGN5837双特异性抗体增强奥尼妥单抗介导的T细胞活化和细胞毒性

[0320]

	[R5837]	1.00E-07	1.67E-08	2.78E-09	4.63E-10	7.72E-11	No R5837
细胞毒性%	EC50	8.53E-14	1.85E-13	3.98E-13	3.46E-13	8.37E-13	2.69E-12
	Max	81.49	79.75	80.55	87.49	82.07	83.19
	倍数(EC50)	33.9	15.7	7.3	8.3	3.5	1.0
CD4 T细胞活化 (CD25%)	EC50	1.16E-13	8.70E-14	7.11E-14	1.46E-13	2.08E-13	9.17E-13
	Max	94.14	95.64	94.22	91.92	91.68	92.35
	倍数(EC50)	7.9	10.5	12.9	6.3	4.4	1.0
CD8T细胞活化 (CD25%)	EC50	6.32E-13	5.88E-13	2.68E-13	9.01E-13	1.64E-12	3.38E-12
	Max	89	90.87	89.66	86.2	88.38	87.12
	倍数(EC50)	5.3	5.7	12.6	3.8	2.1	1.0
CD4 T细胞增殖 (分裂%)	EC50	8.42E-13	9.31E-13	4.25E-13	1.25E-12	2.36E-12	1.63E-11
	Max	54.72	54.09	54.79	52.06	44.73	38.67
	倍数(EC50)	19.3	17.5	38.3	13.1	6.9	1.0
CD8T细胞增殖 (分裂%)	EC50	1.55E-12	8.31E-13	7.09E-13	3.43E-12	8.36E-12	1.97E-11
	Max	59.12	58.92	60.21	56.4	53.15	51.09
	倍数(EC50)	12.7	23.7	27.8	5.7	2.4	1.0

[0321] 对来自共培养的上清液的分析揭示,REGN5837还以剂量依赖性方式(表7)增强了奥尼妥单抗介导的细胞因子释放(图2F)。另外,以B细胞急性淋巴细胞白血病(NALM6)和伯基特淋巴瘤(Raji CD80/Cd86dko)细胞系为靶标,证明了REGN5837增强奥尼妥单抗活性的能力(图9C)。

[0322] 表7:REGN5837双特异性抗体增强由奥尼妥单抗治疗引起的细胞因子产生。

[0323]

[R5837]		1.00E-07	1.67E-08	2.78E-09	4.63E-10	7.72E-11	No R5837
IL-2	EC50	1.66E-11	1.53E-11	1.28E-11	1.89E-11	3.77E-10	9.997E-10
	Max (pg/ml)	2637	2793	2705	1560	935	775
	倍数 (max)	3.4	3.6	3.5	2.0	1.2	1.0
IL-4	EC50	2.81E-11	1.96E-11	5.18E-12	5.36E-11	3.89E-08	1.25E-10
	Max (pg/ml)	79.32	75.35	63.24	70.29	116.3	36.17
	倍数 (max)	2.2	2.1	1.7	1.9	3.2	1.0
IL-6	EC50	5.13E-11	7.89E-12	2.68E-11	1.45E-12	1.61E-11	7.42E-11
	Max (pg/ml)	366.2	303.8	367.1	246	210.3	189.8
	倍数 (max)	1.9	1.6	1.9	1.3	1.1	1.0
IL-10	EC50	3.54E-11	1.04E-10	2.43E-10	5.29E-11	3.34E-11	9.95E-11
	Max (pg/ml)	527.7	682.5	835	633.3	449.9	511.8
	倍数 (max)	1.0	1.3	1.6	1.2	0.9	1.0
TNFa	EC50	5.03E-12	8.69E-13	3.45E-12	2.08E-03	1.62E-10	2.43E-10
	Max (pg/ml)	235.5	129.2	170.3	NC	35.35	29.6
	倍数 (max)	8.0	4.4	5.8	NC	1.2	1.0
IFNg	EC50	1.17E-10	5.34E-11	2.00E-10	6.72E-11	6.57E-11	1.82E-10
	Max (pg/ml)	525.3	536.8	693.1	348.4	166.5	205.5
	倍数 (max)	2.6	2.6	3.4	1.7	0.8	1.0
IL-17a	EC50	3.22E-10	1.11E-10	7.60E-11	4.63E-10	1.86E-10	2.50E-10
	Max (pg/ml)	26.59	25.23	20.56	33.31	21.92	20.52
	倍数 (max)	1.3	1.2	1.0	1.6	1.1	1.0

[0324] 由于CD22表达在具有含有$CD22^+$和$CD22^-$肿瘤细胞的混合物的肿瘤的DLBCL患者样品中是可变的(图1A-C),因此还评价了REGN5837增强T细胞杀伤$CD22^+$和$CD22^-$靶标的能力的能力。将纯化的T细胞与CRISPR编辑的CD22缺陷型和CD22野生型WSU-DLCL2细胞一起孵育,并用固定浓度的奥尼妥单抗(5pM)和范围为$4.63x10^{-10}$至$1.67x10^{-8}$M的REGN5837刺激。将T细胞与表达$CD22^+$的靶细胞和REGN5837一起培养可增强奥尼妥单抗介导的肿瘤细胞裂解;而正如预期的那样,将T细胞与不表达CD22的靶细胞一起培养不会导致细胞毒性增强(图2G)。然而,将T细胞与由20-80%$CD22^+$靶标组成的混合群一起培养以REGN5837剂量依赖性方式导致$CD22^+$和$CD22^-$靶标群体的杀伤增加(图2G)和CD4和CD8 T细胞活化增加(图2H)。尽管在评价的最高REGN5837浓度下,$CD22^-$靶细胞的裂解程度与$CD22^+$靶细胞不同(当以4:1的比率混合时,$CD22^+$细胞的存活率为11%,而$CD22^-$细胞的存活率为21%,而未经REGN5837处理的存活率为60%),但即使在评估的最低$CD22^+/CD22^-$细胞比例下,$CD22^+$靶标的存在也能够增强对$CD22^-$细胞的杀伤。因此,这些数据表明,DLBCL肿瘤细胞上CD22表达的变化并不妨碍REGN5837增强奥尼妥单抗的体外细胞毒性活性。

[0325] REGN5837介导的共刺激增强奥尼妥单抗在异种DLBCL肿瘤模型中的抗肿瘤功效。

[0326] 在WSU-DLCL2肿瘤模型中评价了REGN5837增强奥尼妥单抗体内抗肿瘤活性的能力,该模型是一种异种DLBCL肿瘤,单独使用奥尼妥单抗不足以介导肿瘤清除,从而模拟对CD3双特异性抗体治疗缺乏完全响应的患者。奥尼妥单抗的剂量滴定显示,虽然WSU-DLCL2肿瘤模型最初对CD20xCD3介导的体内杀伤有响应(图10B和图10C),但这种治疗无法介导持续的肿瘤排斥,尽管以高剂量的奥尼妥单抗(10mg/kg)治疗,但所有动物最终仍因肿瘤负荷而死亡(图10B和10D)。因此,评价了添加REGN5837是否可以进一步增强抗肿瘤活性(图3A)。正如预期的那样,单独使用REGN5837进行预防性治疗对肿瘤生长没有任何影响(图3B、C)。虽然奥尼妥单抗单一疗法最初抑制了肿瘤生长(图3B、C左)并且与同种型对照治疗的动物相比具有存活优势(图3C右),但所有动物最终均因肿瘤生长而死亡。然而,REGN5837与奥尼妥单抗的组合增强了抗肿瘤免疫,导致86%(6/7)的动物排斥肿瘤(图3B),并且与单一疗法治疗组相比,显著延长动物的总存活期(图3C右)。

[0327] CD22xCD28介导的共刺激增强CD20xCD3针对B细胞恶性肿瘤的临床前模型的抗肿瘤功效

[0328] 为了研究组合治疗如何增强抗肿瘤免疫,对植入后26天不同治疗对肿瘤内T细胞反应的调节进行了评价(图11A)。此时,奥尼妥单抗治疗显著降低了肿瘤质量,组合治疗进一步抑制了肿瘤生长(图11B)。肿瘤内免疫亚群的高维降维分析(图3D)揭示了响应于CD3双特异性或组合治疗的某些群体的富集和消耗。奥尼妥单抗治疗的施用优先扩增肿瘤内$CD4^+$和$CD8^+$T细胞,同时降低WSU-DLCL2肿瘤细胞的百分比(图11C)。与具有CD3双特异性的单一疗法相比,将REGN5837添加到奥尼妥单抗治疗中进一步增加了T细胞的频率,同时降低了肿瘤细胞的频率(图11C)。对肿瘤和T细胞亚群的密度进行了计数,显示奥尼妥单抗单一疗法显著增加了肿瘤内$CD4^{+T}$细胞的密度(图11D)和$CD8^+$T细胞的密度(图3E)。与单独奥尼妥单抗相比,组合疗法进一步增加了$CD8^+$T细胞的密度,同时降低了每mg肿瘤中的WSU-DLCL2细胞的数量(图3E)。检查记忆亚群的诱导显示,与同种型对照相比,用奥尼妥单抗治疗显著促进了效应和中央记忆CD8T细胞(图3F左)和CD4 T细胞(图11E)的扩增。有趣的是,与奥尼妥单抗或CD22xCD28单一疗法治疗组相比,添加REGN5837显著增加了中央和效应记忆$CD8^+$T细胞的密度(图3F右),这是由$CD8^+$T细胞群的密度增加所致(图3E右)。组合治疗不会进一步改变记忆细胞与原初细胞的比例。

[0329] 由于观察到REGN5837与奥尼妥单组合用于WSU-DLCL2肿瘤的预防性治疗具有强大的协同作用,因此决定在延迟或治疗性治疗的背景下检查组合功效。将研究治疗延迟一周会消除奥尼妥单抗的单一疗法活性(图4B、C),因为肿瘤生长不再受到抑制。然而,组合治疗仍然介导强大的抗肿瘤活性,显著抑制肿瘤生长(图4C),总排斥率为40%,这与单独奥尼妥单抗(75天存活率为0%)相比,具有显著的存活益处(肿瘤植入后125天存活率为50%)。此外,评价了REGN5837在B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)全身肿瘤模型中增强奥尼妥单抗活性的功效。对免疫缺陷动物预先植入人PBMC,并在12天后通过静脉植入经过工程化以表达荧光素酶的NALM-6B-ALL细胞,以便使用生物发光成像(BLI)进行体内追踪。将治疗延迟至植入后8天导致奥尼妥单抗治疗组的肿瘤负荷下降趋势不显著(图4E和图4F)。然而,REGN5837与奥尼妥单抗的组合诱导了肿瘤生长的显著抑制(图4F)。

[0330] REGN5837与奥尼妥单抗组合增强患有DLBCL肿瘤的人免疫系统重建动物中的外周和肿瘤内$CD8^+$T细胞反应

[0331] 为了在更生理相关的环境中评价REGN5837的体内功效,将WSU-DLCL2肿瘤皮下植入$SIRPA^{h/h}TPO^{h/m}Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$小鼠或人免疫系统(HIS)动物,所述小鼠或动物已植入胚胎肝$CD34^+$细胞。根据胎肝供体、人T细胞植入频率和性别,将动物随机分为指定治疗组。使用0.4mpk奥尼妥单抗的单一疗法不能抑制肿瘤生长,而与单独CD3双特异性抗体(植入后64天存活率为0%)或同种型对照(植入后61天存活率为0%)(图5C右)相比,与REGN5837的组合治疗显著抑制肿瘤生长(图5C左)并提高存活率(植入后64天存活率为80%)。REGN5837单一疗法也诱导了肿瘤排斥(图5B和图5C),因为这种抗肿瘤反应的基础是供体T细胞和WSU-DLCL2肿瘤细胞之间的同种异体性,这提供了“信号1”。在体外,REGN5837增强了由同种异体信号1介导的T细胞活化和效应功能(图12A和图12B);因此,这种体内抗肿瘤活性的增强可能归因于同种异体反应的共刺激。

[0332] 为了检查外周T细胞活化和组合治疗后增强细胞因子释放的可能性,对血清细胞

因子进行了评价。在给药前后对带有肿瘤的人免疫系统小鼠进行采血,以评价淋巴细胞亚群和血清细胞因子的诱导。正如预期的那样,使用REGN5837的单一疗法治疗在外周血中没有表现出单一剂活性,因为治疗后没有可辨别的T细胞活化。然而,在初始T细胞边缘化之后,使用奥尼妥单抗的单一疗法治疗有效消耗了循环B细胞(图5D右)并增加了血液中的$CD8^+$(图5D左)T细胞,在临床前和临床研究中响应于其他CD3双特异性抗体也观察到了这种反应。与奥尼妥单抗单一疗法相比,REGN5837与奥尼妥单抗组合进一步促进了血液中$CD8^+$(图5D左)和$CD4^+$(图13A)T细胞的扩增。正如预期的那样,给药后对血清细胞因子的检查显示,REGN5837不会诱导任何血清细胞因子,因为没有来自同种异体肿瘤或来自CD20xCD3治疗的信号1。然而,与之前的研究一致,观察到奥尼妥单抗治疗在首次给药后诱导血清细胞因子(图5E和图13B)。与奥尼妥单抗单一疗法相比,组合治疗在首次给药后诱导了显著的细胞因子释放(TNFa、IL-2、IL-10),同时IL-6有增加的趋势。总体而言,血清细胞因子增加但短暂的诱导以及外周血中T细胞的扩增是CD28共刺激诱导T细胞活化增强的证据。

[0333] REGN5837与奥尼妥单抗的组合通过增加肿瘤内T细胞的积聚和使T细胞偏向可重编程状态并远离功能失调的表型来增强抗肿瘤活性。

[0334] 为了确定REGN5837如何增强奥尼妥单抗的抗肿瘤活性,植入后30天对肿瘤内、脾和血液T细胞反应进行了免疫分析。此时,与同种型和REGN5837单一疗法治疗的动物相比,奥尼妥单抗和REGN5837的组合显著抑制了肿瘤生长,并且与奥尼妥单抗单一疗法相比,肿瘤生长呈下降趋势(图13C)。使用FlowSOM(一种无监督聚类算法)分析了来自肿瘤、脾和血液的所有活细胞,以鉴定不同的细胞群(元簇)并将这些元簇映射到UMAP(用于降维的均匀流形近似和投影)图(图5F左)。脾(图5F右)、肿瘤(图5F右)和血液(图14D)UMAP图显示不同免疫亚群响应于不同治疗的相对比例存在显著差异。在脾(图14A和图14C)和血液(图14B和图14E)中,与同种型和REGN5837单一疗法治疗相比,奥尼妥单抗单一疗法足以介导B细胞的显著消耗。重要的是,组合治疗消耗的脾B细胞的程度与奥尼妥单抗单一疗法相似,与同种型治疗的动物相比,脾(图14A和C)和血液(图14B和E)T细胞群有扩增的趋势。此外,在肿瘤内,与奥尼妥单抗单一疗法相比,奥尼妥单抗和REGN5837治疗的组合治疗导致肿瘤细胞频率显著降低(图13D左),同时伴随肿瘤内T细胞扩增(图13D右)。

[0335] 对肿瘤细胞的绝对计数揭示,与同种型治疗的动物相比,响应于奥尼妥单抗或组合治疗,肿瘤生长得到显著抑制(图5G下)。虽然此时组合治疗或奥尼妥单抗治疗之间肿瘤体积(图13C)或WSU-DLCL2细胞绝对计数(图5G下)没有显著差异,但与奥尼妥单抗或REGN5837单一疗法相比时,响应于组合治疗,$CD4^+$和$CD8^+$T细胞显著扩增(图5G上)。检查记忆亚群的诱导显示,用奥尼妥单抗治疗或组合治疗显著促进了效应记忆(EM)$CD8^+$(图13E)和$CD4^+$(图13F)T细胞的扩增,其中超过90%获得了EM表型。虽然与奥尼妥单抗相比,响应于组合治疗,EM形成略有增加的趋势($CD8^+$T细胞:96%对比91%;$CD4^+$T细胞:(93%对比90%)),但由于肿瘤内总T细胞的总体增加,效应和中央记忆$CD8^+$(图13G)和$CD4^+$(图13H)T细胞的密度显着增加。

[0336] 为了更好地了解不同治疗如何调节肿瘤内T细胞表型,用FlowSOM分析了肿瘤内$CD4^+$和$CD8^+$T细胞群,并鉴定了11个元簇(图5H左)。UMAP图显示,组合治疗导致肿瘤内$CD8^+$T细胞中元簇1显著富集并且元簇3受到抑制,而肿瘤内$CD4^+$T细胞中向元簇11倾斜,并远离元簇10(图5H和图5J)。元簇1代表具有可重编程($CD38^{lo}$ $CD101^{lo}$)表型或先前在文献中描述过

的可逆性功能失调状态的$CD8^+$T细胞群,而元簇3代表高度增殖但与缺乏效应细胞因子产生和肿瘤进展相关的功能失调的CD8 T细胞群($PD1^{hi}CD28^+Ki67^+$)(图5I)。元簇11是$PD\text{-}1^+$ $CD38^{lo}$ $CD4^+$T细胞群,据报道,由于维持了干细胞特性和效应功能并防止了代谢衰竭,其表现出的肿瘤控制效果比元簇10中的$CD38^{hi}$ $CD4^+$T细胞更好(图5I)。因此,这些数据表明,用CD22xCD28双特异性抗体与奥尼妥单抗组合共刺激不仅可以扩增肿瘤内T细胞,而且还能防止诱导功能失调的T细胞,从而增强抗肿瘤免疫。

[0337] 虽然REGN5837单一疗法在食蟹猴研究中不会活化T细胞,但CD28双特异性抗体增强奥尼妥单抗介导的T细胞活化。

[0338] 为了评价单独REGN5837或与奥尼妥单抗组合的耐受性,在食蟹猴中进行了研究。每组三只猴子接受单次静脉内缓慢推注单独REGN5837(10mpk)、单独奥尼妥单抗(0.001、0.01、0.1 1mpk)或REGN5837(1或10mpk)后再接受奥尼妥单抗(0.001、0.01或0.1mpk)。在研究的整个阶段,耐受性和药理活性的评估包括体重、临床观察、兽医体检(其包括心率、体温和呼吸频率的评估)、神经肌肉/肌肉骨骼观察、临床病理学(血液学、血清化学[包括C反应蛋白]、凝血和尿液分析)。此外,在给药后5小时、1天、4天和研究完成后的第8天,收集血液样品通过流式细胞术进行细胞因子分析和免疫表型分析。在尸检时,进行了全面的肉眼和微观评价。单次或重复静脉施用REGN5837或奥尼妥单抗作为单一疗法或组合疗法与任何垂死状态或早期死亡无关。此外,临床观察中没有不良的测试品相关发现,包括没有细胞因子释放综合征(CRS)的迹象(例如呕吐或粪便变化)。

[0339] 如先前对其他基于CD28的共刺激双特异性抗体的描述,使用REGN5837作为单一剂的治疗不会诱导外周$CD4^+$或$CD8^+$T细胞扩增或活化(图6B、C和图15A-B),这与证明CD28双特异性抗体在没有信号1的情况下不会诱导T细胞活化的体外数据一致(图9A)。此外,REGN5837单一疗法对外周B细胞数量没有影响(图6A)。然而,与之前发表的对于CD3双特异性抗体的数据一致,奥尼妥单抗诱导了最初的淋巴细胞边缘化,随后呈现$CD4^+$(图15A、B)和$CD8^+$(图6B和图6C)T细胞扩增和活化的趋势,如ICOS上调和增殖诱导所示。在所有评价的奥尼妥单抗浓度下,T细胞活化都伴随着外周B细胞的持续消耗(图6A)。与单独奥尼妥单抗类似,将REGN5837添加到奥尼妥单抗中可有效消耗外周B细胞。值得注意的是,与奥尼妥单抗单一疗法和安慰剂对照相比,与1mpk的REGN5837组合显著扩增和活化外周$CD8^+$(图6B和6C)和$CD4^+$T(图15A和15B)细胞。虽然与10mpk的REGN5837的组合疗法也诱导了奥尼妥单抗介导的T细胞活化增强的趋势,但以这种浓度添加共刺激抗体并没有显著增强T细胞活性至与以1mpk给药的REGN5837相同的程度。这可能是由于CD28双特异性分子在高浓度下单臂结合,导致在检查T细胞活化参数时呈现钟形曲线。

[0340] 奥尼妥单抗单一疗法导致血清细胞因子的剂量依赖性增加(图6D),这与先前从另外的肿瘤靶向CD3双特异性抗体的观察结果相关。与安慰剂相比,奥尼妥单抗(0.1mpk)与REGN5837(1mpk)的组合显著增加了IL-2的产生,并且血清IL-6呈增加趋势,这反映了由组合治疗观察到的T细胞活化增加(图6C和图15B)。值得注意的是,0.1或0.01mpk的奥尼妥单抗与REGN5837(1mpk)的组合诱导IL-6的强度不如单独1mpk的奥尼妥单抗那样强;然而,组合治疗扩增和活化$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的程度与1mpk的奥尼妥单抗单一疗法相似(图6B和图15A)。总体而言,这些结果表明,将REGN5837添加到奥尼妥单抗中通过诱导血清细胞因子增加和扩增外周T细胞而增强食蟹猴动物中的T细胞活化。

[0341] 结论

[0342] 本文证明,REGN5837可以通过促进DLBCL和其他NHL细胞系的体外细胞毒性以及通过有效增强对无法通过CD3双特异性抗体治疗清除的DLBCL肿瘤的抗肿瘤活性来增强奥尼妥单抗介导的活性。虽然奥尼妥单抗作为单一剂抑制WSU-DLCL2肿瘤生长,但只有与REGN5837组合治疗才能在临床前体内模型中产生治愈反应并提高总存活率。此外,REGN5837与奥尼妥单抗的组合不仅保持了对表达CD20的细胞的细胞毒性,而且与奥尼妥单抗单一疗法相比,还导致肿瘤内T细胞的显著扩增,以及效应记忆细胞的增强诱导。对来自HIS小鼠的肿瘤内免疫区室的进一步表征揭示,向奥尼妥单抗中添加CD28共刺激会使$CD8^+$T细胞群偏向可重编程表型($CD38^{lo}CD101^{lo}$),或在适当的条件下可以逆转的可塑性功能失调状态,从而使重新活跃的T细胞产生高水平的促炎细胞因子并介导抗肿瘤免疫。这种扩增伴随着功能失调的$CD28^+Ki67^+CD8^+$T细胞诱导的减少,所述细胞是一种过度活化的细胞群,之前曾被描述为缺乏效应功能,在黑素瘤和晚期NSCLC中被扩增,并且与对PD-1阻断疗法的抗性有关。添加REGN5837还扩增了$PD\text{-}1^+CD38^{lo}$ $CD4^+$T细胞群,据报道,与$CD38^{hi}$T细胞相比,这些细胞表现出优异的肿瘤控制效果,这是由于效应功能的维持、T细胞持久性的促进、以及由增强的谷氨酰胺分解驱动的代谢重编程。因此,这些数据表明REGN5837不仅可以扩增肿瘤内T细胞,还可以防止诱导功能失调的T细胞,从而增强抗肿瘤免疫。

[0343] 在食蟹猴中的毒理学研究和来自HIS小鼠的外周血的分析表明,尽管外周B细胞上表达CD22,但由于缺乏信号1,REGN5837作为单一疗法活性很低,并且不表现出毒性。只有当REGN5837与介导TCR聚集的奥尼妥单抗组合给药时,才会观察到外周T细胞活化和扩增。值得注意的是,在食蟹猴研究中,将REGN5837添加到低剂量的奥尼妥单抗中能够介导与10-100倍高剂量的CD3双特异性相似水平的外周T细胞扩增;然而,与食蟹猴研究中使用CD3双特异性的高剂量单一疗法治疗相比,这种扩增与血清细胞因子的诱导较低有关。因此,使用组合或高剂量CD3双特异性抗体的治疗在动物中都耐受良好,且没有细胞因子释放综合征(CRS)的任何迹象。

[0344] 奥尼妥单抗目前正在对于治疗r/r B细胞NHL的1期和2期临床试验中进行评价,其中患者群体已经接受了大量的预先治疗,并且已经在至少2个先前的治疗线中失败。早期奥尼妥单抗临床试验的结果显示,对于每周接受至少5毫克奥尼妥单抗的难治性滤泡性淋巴瘤患者,活性令人鼓舞,其中ORR为92.9%,完全响应率(CR)为75.0%。接受过大量预先治疗,以>=80mg给药且未接受过先前CAR-T疗法的r/r DLBCL患者的ORR和CR率为60%,而CAR-T疗法难治的患者的ORR为33.3%,CR率为23.8%。总体而言,安全性似乎可控且与CD20 x CD3双特异性抗体类一致。尽管前景看好,但这些数据揭示,尤其是在CAR-T疗法后的情形中,r/r DLBCL患者的治疗仍有改进空间。总的来说,这些数据表明,新型CD22xCD28双特异性抗体REGN5837可以增强奥尼妥单抗的抗肿瘤活性,并为研究REGN5837与奥尼妥单抗一起用于治疗难以治疗的侵袭性淋巴瘤患者提供支持。

[0345] 实施例2:实施例1的材料和方法

[0346] 研究设计

[0347] 这项研究表明,靶向肿瘤的CD28双特异性抗体可以增强奥尼妥单抗介导的T细胞活化以增强抗肿瘤活性。对年龄和性别匹配的小鼠施用对照和实验治疗。样品大小根据经验进行选择,以确保足够的统计能力,并符合研究中使用的技术的现场标准。在治疗开始

前,将所有动物根据肿瘤体积随机分为不同的治疗组,并且研究人员对所有治疗组均不知情。图例中标明了实验重复的次数。

[0348] 细胞系

[0349] 对于WSU-DLCL2研究,DLBCL细胞系获自DSMZ(ACC 575),并在含有10% FBS(Seradigm)的RPMI-1640中维持,所述RPMI-1640补充有青霉素、链霉素、谷氨酰胺和1mM HEPES(Gibco)。使用Neon™转染系统100μL试剂盒(Invitrogen),通过用TrueCut™Cas9蛋白v2(Invitrogen)和靶向人CD22的高分TrueGuide™合成sgRNA(Invitrogen指导RNA:CCGGTGCACCTCAATGACAG)电穿孔Cas9核糖核蛋白(RNP)生成CRISPR编辑的CD22缺陷细胞系。将CD22缺陷细胞在电穿孔后96小时进行批量分选。

[0350] 对于NALM6-luc肿瘤实验,用EF1a-荧光素酶-2A-GFP-Puro慢病毒(GenTarget)修饰NALM6细胞系(DSMZ:ACC 128),以便在体内对肿瘤细胞生长进行成像。将细胞系在含有10% FBS的RPMI中维持,所述RPMI补充有PSG(青霉素、链霉素和谷氨酰胺)和嘌呤霉素选择(1ug/ml)。

[0351] 动物研究

[0352] 所有程序均按照NIH的《实验动物护理和使用指南》进行。该方案经再生元制药机构动物护理和使用委员会(Regeneron Pharmaceu ticals Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)批准,所有动物均在无病原体条件下饲养。

[0353] 对于NSG实验,收集WSU-DLCL2细胞(3x10^6个细胞)并将其与5x10^5个PBMC(ReachBio)混合,然后重新悬浮在PBS和GFR Matrigel(Corning)的1:1混合物中。对雌性NSG小鼠(Jackson Laborat ory)在右侧皮下注射细胞混合物。对于人免疫系统重建实验,将WS U-DLCL2细胞(3x10^6个细胞)皮下植入SIRPA$^{h/h}$ TPO$^{h/m}$ Rag2$^{-/-}$Il2rg$^{-/-}$小鼠,所述小鼠已植入胚胎肝CD34$^+$细胞;将动物分开,以使每个治疗组的胚胎肝供体分布、人免疫细胞植入频率和性别相似。将小鼠随机分配以接受同种型对照(EGFRV3xCD3或MUC16xCD28)或测试品(REGN5837、奥尼妥单抗)的盲法治疗,这些药物以单一疗法或组合在植入后第1天、第8天和第15天以指定浓度通过腹膜内注射施用以进行预防性治疗,并在第8天、第15天和第22天进行治疗性治疗。使用X和Y直径(长度和宽度的垂直测量值)数字卡尺(VWR)测量值随时间推移监测肿瘤生长。计算肿瘤体积(X*Y*(X/2)其中X是较短的直径)。当肿瘤达到指定的肿瘤终点(肿瘤直径>20mm,或肿瘤溃疡)时,对小鼠实施安乐死。该指定终点符合IACUC标准。

[0354] 对于NALM6-luc肿瘤实验,对雌性免疫缺陷NSG小鼠(Jackson Laboratories)植入4x10^6个人PBMC(ReachBio),并在PBMC植入后12天向成功植入的动物静脉内注射5x10^6个NALM6-luc细胞。小鼠随机接受同种型对照(EGFRV3xCD3或MUC16xCD28)或测试品(REGN5837、奥尼妥单抗)的盲法治疗,这些药物以单一疗法或组合在植入后第8天、第15天和第22天以指定浓度通过腹膜内注射施用。对植入NALM6-luc的小鼠在腹膜内注射底物荧光素(PerkinElmer)后,使用IVIS Spectrum(Perkin Elmer)每周进行两次成像。使用Living Image软件对生物发光(总通量)进行定量。当小鼠开始出现符合IACUC标准的GVHD迹象(体重减轻>=20%)时,实验结束。

[0355] 小鼠中血清细胞因子的测量

[0356] 在指定的时间点,将血液从颌下静脉收集到微量血清管(BD 365967)中。按照制造商的说明(Meso Scale Diagnostics),使用V-plex Human ProInflammatory-10Plex试剂

盒分析细胞因子浓度。

[0357] 流式细胞术

[0358] 对于免疫表型实验,在指定日期收集肿瘤、脾和血液。制备单细胞悬浮液,并使用Live/Dead Fixable Blue死细胞染色试剂盒(Therm o Fisher Scientific)进行活/死细胞鉴别。为了定量组织中的细胞数量,在采集之前向每个样品中添加固定数量的CountBright绝对计数珠粒(Thermo Fisher Scientific)。样品在Symphony(BD Biosciences)上获取,并使用FlowJo(TreeStar)或OMIQ进行分析。

[0359] 为了根据所选标志物自动鉴定T细胞簇,对在Symphony(BD Biosciences)上获取的样品运行OMIQ的FlowSOM。对每个样品相同数量的事件进行分析。事件的范围由具有最少细胞的样品决定。Omiq.ai中的肿瘤内$CD8^+$T细胞的FlowSOM聚类以选定参数(活化/功能失调和记忆标志物)使用默认设置运行。为了使由FlowSOM鉴定的簇可视化,对Omiq.ai中的所有样品运行高维降维方法UMAP。将每个治疗组的样品串联起来,并将FlowSOM簇叠加在UMAP图上。

[0360] 湿板包被测定

[0361] 将在PBS中稀释至10μg/ml的抗体湿涂布于聚丙烯板上过夜。将稀释的抗体(100μμl)一式三份加入到96孔聚丙烯测定板中。将板4℃下储存过夜,以允许抗体吸附。并在用于增殖测定之前用PBS将板洗涤两次。PBMC分离自从四名健康个体供体获得的富含白细胞的外周血(New York Blood Center)。将来自每个供体的PBMC重悬浮在含有10%人AB血清(GemCell)和青霉素/链霉素/谷氨酰胺(分别为100单位/ml、100μg/ml、292μg/ml,Gibco)的RPMI培养基(Irvine Scientific)中,然后以100,000个细胞/孔添加到96孔测定板中,最终体积为200μl/孔。然后将测定板在37℃+5% CO2下孵育54小时。54小时时,将测定板离心,并取出100μl上清液进行细胞因子分析。根据制造商的说明,使用V-PLEX Proinflammatory Panel 1Human试剂盒测定IFNg、IL1B、IL2、IL4、IL6、IL8、IL10、IL13和TNFa的细胞因子浓度。绘制了从4个供体获得的浓度平均值和范围(pg/mL),其中单独数据点代表从三个重复孔中进行的测定中获得的每个单独供体的平均浓度。

[0362] 为了评价增殖,向每个孔中添加100μl 1mCi/ml氚化胸苷(Perkin Elmer),并在37℃+5% CO_2下再孵育18小时。使用Filtermate Harvester(Perkin Elmer)收获每个96孔测定板,并在TopCount闪烁计数器(Perkin Elmer)上进行分析。放射性的量以每分钟每孔的计数(CPM)来度量,并且与增殖细胞的数量成比例。CPM值以四个数据点呈现,代表从三次重复的孔中进行的测定中获得的每个单独供体的平均计数。

[0363] 体外T细胞活化测定

[0364] 将使用50mL SepMate™管通过密度梯度离心从健康供体白细胞包中分离的先前冷冻的人$CD3^+$T细胞,在测定当天将在含有50U/ml benzonase核酸酶的刺激培养基(X-VIVO 15细胞培养基,补充有10%FBS、HEPES、NaPyr、NEAA和0.01mM BME)中解冻,并以$1x10^5$个细胞/孔的浓度接种到96孔圆底板中。将NALM6细胞在初级刺激培养基中用10ug/mL丝裂霉素C处理,浓度为10×10^6个细胞/mL。在37℃、5% CO_2下孵育1小时后,将丝裂霉素C处理的细胞用含有2%FBS的D-PBS洗涤3次,然后以每孔5×10^4个细胞的最终浓度添加到含有$CD3^+$T细胞的孔中。向所有孔中添加不相关的hIgG1 mAb(100nM/孔)以阻断Fc受体。将固定浓度的奥尼妥单抗或500pM的非结合同种型对照与剂量滴定从3.1pM至200nM的REGN5837或非结合同种

型对照添加到孔中。将板在37℃和5% CO2下孵育72小时,此时收集50μl培养上清液。根据制造商的人IL-2(AL221F)AlphaLISA测定(Perkin Elmer)的方案对5μl的该收集的上清液进行测试。测量结果通过Envision多标记板读取器(Perkin Elmer)获得。生成已知浓度的标准曲线来推断测定孔中产生的IL-2的浓度。为了评估T细胞增殖,培养基中补充了最终浓度为1.25μM[^{3}H]胸苷(Perkin Elmer),并将细胞在37℃、5% CO2下孵育16小时。使用Microbeta Filermat-96细胞收集器(Perkin Elmer)收获板,添加30μL MicroScint-20(Perkin Elmer),然后使用微孔板闪烁计数器TopCount NXT(Perkin Elmer)测量[^{3}H]胸苷掺入量。所有系列稀释液均一式三份进行测试。使用GraphPad Prism软件在10点剂量反应曲线上由四参数逻辑方程(four-parameter logistic equation)确定抗体的EC50值。

[0365] 体外细胞毒性测定

[0366] 将人PBMC解冻并以1x10^{6}个细胞/mL的密度接种于完全培养基(补充有10%FBS、青霉素-链霉素-谷氨酰胺的RPMI细胞培养基)中,并在37℃下孵育过夜,以通过消耗贴壁细胞(诸如巨噬细胞、树突状细胞和一些单核细胞)来富集淋巴细胞。第二天,收获PBMC并用1μM的Violet Cell Tracker荧光示踪染料进行标记。将WSU-DLCL2细胞用1μM荧光染料Vybrant CFDA-SE进行标记。标记后,将5,000个标记的靶细胞以与标记的PBMC 1:5的比率接种于圆底96孔板中。将R5837的系列稀释液与R1979的系列稀释液相组合,并添加到标记的靶细胞和效应细胞中,然后将板在37℃下孵育72小时。孵育后,将细胞洗涤并用PBS中的LIVE/DEAD染料染色,然后用荧光团标记的针对CD2、CD4、CD8和CD25的抗体混合物染色,以分析存活的靶细胞、T细胞活化和增殖。在BD Celesta流式细胞仪上进行样品分析之前立即添加计数珠粒(每孔20μL)。

[0367] 通过计算活的、CFDA-SE标记的靶细胞的数量/孔(以收集到的珠粒的数量/孔作归一化)来评估靶细胞杀伤。将生存力百分比以对照条件下的活靶细胞的数量(存在仅PBMC的情况下的靶细胞)作归一化。通过报告CD4+和CD8+T细胞上的CD25%来评估T细胞活化。通过报告Violet Cell Tracker染料的MFI降低的细胞的百分比来评估T细胞增殖。

[0368] 收集该测定的上清液以分析细胞因子水平。按照制造商的说明,使用流式细胞珠粒阵列(Cytometric Bead Array,CBA)试剂盒分析IL 17a、IFNγ、TNFα、IL-10、IL-6、IL-4和IL-2的浓度。简而言之,在室温下,将上清液的1/15稀释液连同标准样品与细胞因子特异性珠粒阵列在96孔测定板中孵育3小时。孵育后,将样品洗涤两次,然后在BD FACS Canto II上通过流式细胞术进行分析。由试剂盒标准品的MFI内推细胞因子水平,并且报告为pg/mL。

[0369] 使用GraphPad Prism软件在9点剂量反应曲线上由四参数逻辑方程确定EC50值。细胞毒性百分比、T细胞活化、增殖和细胞因子释放的最大响应被视为由Prism曲线拟合产生的平台值。EC50的倍数变化计算为$EC50_{NoR5837}/EC50_{[M]R5837}$,并且最大细胞因子释放的倍数变化计算为$Max_{[M]R5837}/Max_{NoR5837}$。

[0370] 显色IHC

[0371] 在Ventana Discovery ULTRA平台上对福尔马林固定石蜡包埋的DLBCL患者样品(Tristar)进行显色IHC测定。使用Tris-EDTA(pH9)缓冲液进行抗原恢复,并将载玻片与下面列出的一抗一起孵育。使用OptiView DAB检测系统,并且对于某些标记物,需要另外的扩增步骤才能使信号可视化。将载玻片用Novolink苏木精(Leica Microsy stems,Inc.)复

染,将盖玻片(Corning Coverglass,#1)用Cytoseal 60(Thermo Scientific/Richard Allen Scientific)封盖。一旦封固剂完全干燥,在Leica Aperio AT2扫描仪上以40倍扫描载玻片。使用

[0372] Indica HALO软件分析图像。

[0373] 表8

[0374]

靶标	克隆		供应商	目录编号	检测方法
CD20	SP32	兔单克隆	ABCAM	ab64088	OptiView DAB
CD22	SP104	兔单克隆	Roche	06391117001	OptiView DAB
CD28	EPR22076	兔单克隆	ABCAM	ab243228	OptiView DAB 和放大
CTLA4	CAL49	兔单克隆	ABCAM	ab2377712	OptiView DAB 和放大
CD80	37711	兔单克隆	R&D Systems	MAB140-500	OptiView DAB 和放大
CD86	E2G8P	兔单克隆	Cell Signaling	91882	OptiView DAB 和放大

[0375] 多重IHC

[0376] 在Ventana Discovery ULTRA平台(Ventana Medical Systems,Tucson,AZ)上进行全自动多重免疫组织化学测定。进行了五轮连续的一抗和二抗-辣根过氧化物酶缀合抗体的施加。每个步骤之间进行热变性以完全去除结合的一抗和二抗,从而消除下游的交叉反应。这使得可以使用在同一物种中产生的一抗。精心选择所用的荧光染料以确保光谱分离并提供最佳染色。优化一抗和酪胺-荧光团的组合和施加顺序,以确保表位和荧光团都能承受重复的热变性步骤。确定每种抗体的最佳浓度,按以下顺序进行施加并用指示的荧光团检测。

[0377] 表9

[0378]

靶标	克隆		供应商	目录编号	Roche 荧光团	目录编号
CD20	SP32	兔单克隆	ABCAM	ab64088	DISCOVERY 若丹明 6G	79881680 01
CD22	SP104	兔单克隆	ABCAM	ab240404	DISCOVERY DCC	79881920 01
CD19	SP291	兔单克隆	ABCAM	ab237772	DISCOVERY Red 610	79881760 01

CD79b	SP240	兔单克隆	ABCAM	ab245745	DISCOVERY Cy5	7551215001
PAX5	SP34	兔单克隆	Roche	05552729001	DISCOVERY FAM	7988150001

[0379]

靶标	克隆		供应商	目录编号	Roche 荧光团	目录编号
CD28	EPR22076	兔单克隆	ABCAM	ab243228	DISCOVERY 若丹明 6G	7988168001
CD3	SP162	兔单克隆	ABCAM	ab135372	DISCOVERY DCC	7988192001
CD8	SP239	兔单克隆	ABCAM	ab178089	DISCOVERY Red 610	7988176001
Ki67	EPR3610	兔单克隆	ABCAM	ab92742	DISCOVERY FAM	7988150001

[0380] 染色后,对组织进行复染,并用含有NucBlue的Invitrogen Pro Long Gold Antifade Mountant封固盖玻片。整个载玻片成像在配备有Colibri光源和用于使这些特定的荧光团可视化的适当滤光片的Ze iss Axioscan上进行。使用HALO Indica Labs Hyperplex模块(Indica Labs,Albuquerque,NM)进行定量图像分析。测量了每个免疫亚群的阳性细胞数量和整个肿瘤区域的密度。

[0381] 食蟹猴毒理学研究

[0382] 食蟹猴研究在由实验动物护理评估和认证协会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)认可的设施中进行,动物福利保证(Animal Welfare Assurance)由实验动物福利办公室(Office of Laboratory Animal Welfare)颁发,并在美国农业部(U.S.Department of Agriculture)和IACUC注册。该研究在Altasciences Preclinical Seattle(以前称为SNBL USA),使用雄性食蟹猴(Macaca fascicularis)(每组三只动物)进行。受试者通过静脉内推注(REGN5837)或静脉内输注(奥尼妥单抗,输注时间约30分钟)接受每种测试品的单剂量。通过在REGN5837施用后5-10分钟开始奥尼妥单抗输注来顺序施用组合治疗。治疗相关效果的评估包括体重测量、临床观察、兽医体检(包括心率、体温和呼吸频率的评估)、神经肌肉/肌肉骨骼观察、临床病理学(血液学、收集血液和/或组织样品进行细胞因子分析、免疫表型分析、组织病理学和毒代动力学评价。对于外周血流式细胞术,将血液收集到钾EDTA管中;裂解;用CD3、CD4、CD8、CD14、CD16、CD20、CD28和Ki67(BD Biosciences)和CD278(BioLegend)染色;然后用FACSCanto II流式细胞仪进行分析。对于细胞因子分析,将血液收集到含有抗凝剂的血清分离管中。在4℃下通过以1000g至2000g离心10至15分钟来分离血清,然后使用MSD U-Plex平台进行分析(IL-1β、IL-2、IL-6、MCP-1、TNF-α和IFN-γ)。

[0383] 统计学分析

[0384] 样品大小根据经验进行选择,以确保足够的统计能力,并符合研究中使用的技术标准。使用单因素和双因素方差分析(ANOVA)和采用长秩检验的Kaplan-Meier方法确定统计显著性以比较组间存活率。使用GraphPad Prism(版本8)进行图形生成和统计分析。

[0385] 实施例3:REGN5837增强由CD20xCD3双特异性抗体REGN1979活化的人T细胞介导的针对表达或不表达表面CD22的B细胞淋巴瘤细胞的细胞毒性。

[0386] 使用EasySep人T细胞分离试剂盒从刚解冻的PBMC中分离T细胞并立即使用。将WSU-DLCL2/CD22^{WT}细胞用1μM荧光染料Vybrant CFDA-SE进行标记。将WSU-DLCL2/CD22^{KO}细胞用1μM荧光染料CellTrace Far Red标记。将标记的WSU-DLCL2/CD22^{WT}和WSU-DLCL2/CD22^{KO}靶细胞以不同的比率(0:100、20:80、40:60、60:40、80:20、100:0)接种于圆底96孔板中,并以最终效应细胞与靶细胞5:1的比率添加未标记的T细胞。将靶细胞和效应细胞与单独5pM CD20xCD3(REGN1979)或不同浓度的REGN5837(16.7nM、2.77nM、463pM)一起孵育,然后将板在37℃下孵育72小时。

[0387] 孵育后,将细胞洗涤并用PBS中的LIVE/DEAD染料染色,然后用荧光团标记的针对CD4、CD8和CD25的抗体混合物染色,以分析T细胞活化。在BD Celesta流式细胞仪上进行样品分析之前立即添加计数珠粒(每孔20μL)。

[0388] 通过计算活的CFDA-SE标记的靶细胞的数量/孔(以收集到的珠粒的数量/孔作归一化)来评估WSU-DLCL2/CD22^{WT}杀伤。通过计算活的Far-Red标记的靶细胞的数量/孔(以收集到的珠粒的数量/孔作归一化)来评估WSU-DLCL2/CD22^{KO}杀伤。将生存力百分比以对照条件下的活靶细胞的数量(存在仅效应细胞的情况下的靶细胞)作归一化。通过报告CD4+和CD8+T细胞上的CD25的MFI来评估T细胞活化。

[0389] 结果概述:

[0390] 使用流式细胞术评价了REGN5837增强由CD20xCD3双特异性抗体REGN1979活化的人T细胞介导的针对表达或不表达表面CD22的B细胞淋巴瘤细胞的细胞毒性的能力。此外,还评估了T细胞活化,如通过T细胞上CD25的上调来衡量。

[0391] • 5pM REGN1979活化并指导人T细胞以相似程度杀伤WSU-DLCL2/CD22^{WT}和WSU-DLCL2/CD22^{KO}(表8)。无论CD22^{KO}:CD22^{WT}细胞的比率如何,在仅5pM REGN1979存在的情况下,T细胞活化都是相似的(表11)。

[0392] • REGN5837以剂量依赖性方式增强REGN1979介导的对WSU-DLCL2/CD22^{WT}细胞的杀伤;无论培养物中是否存在WSU-DLCL2/CD22^{KO},对WSU-DLCL2/CD22^{WT}细胞的杀伤都是相似的(表10)。

[0393] • 在含有20%或更多WSU-DLCL2/CD22^{WT}细胞的培养物中,REGN5837增强了REGN1979介导的对WSU-DLCL2/CD22^{KO}细胞的杀伤。在培养物中不存在任何WSU-DLCL2/CD22^{WT}细胞的情况下,REGN5837没有增强REGN1979介导的对WSU-DLCL2/CD22^{KO}细胞杀伤(表10)。

[0394] • 在含有WSU-DLCL2/CD22^{WT}细胞的培养物中,REGN5837以剂量依赖性方式增强了REGN1979介导的T细胞活化,其中当WSU-DLCL2/CD22^{WT}细胞的比率较高时,观察到较高的T细胞活化。在培养物中不存在任何WSU-DLCL2/CD22^{WT}细胞的情况下,REGN5837没有增强REGN1979介导的T细胞活化(表11)。

[0395] 总之,只要培养物中存在表达CD22的细胞,REGN5837共刺激就会增强REGN1979介导的对缺乏CD22表达的靶细胞的杀伤。

[0396] 表10:WSU-DLCL2/CD22^{KO}和WSU-DLCL2/CD22^{WT}存活率%

[0397]

		$CD22^{KO}$:$CD22^{WT}$ 比率					
		100:0	80:20	60:40	40:60	20:80	0:100
$CD22^{KO}$ 存活率%	仅 5 pM R1979	58.6	60.15	61.75	60.55	59.45	NA
	+ 16.7 nM R5837	45.4	26.95	19.1	19.85	20.85	NA
	+ 2.8 nM R5837	56	28.8	28.25	24.1	25.25	NA
	+ 0.46 nM R5837	60.1	37.2	33.9	31.85	29.9	NA
$CD22^{WT}$ 存活率%	仅 5 pM R1979	NA	54.75	55.15	49.9	48.8	58.75
	+ 16.7 nM R5837	NA	7.95	8.6	9.45	11.15	12.6
	+ 2.8 nM R5837	NA	13.1	12.45	12.8	16.45	22.4
	+ 0.46 nM R5837	NA	20.6	19.1	20.15	19.3	28.5

[0398] 表11:T细胞活化(CD25上调)

[0399]

		$CD22^{KO}$:$CD22^{WT}$ 比率					
		100:0	80:20	60:40	40:60	20:80	0:100
CD4+T 细胞活化 (CD25 的 MFI)	仅 5 pM R1979	4375	4306	4483	4463	3902	4633
	+ 16.7 nM R5837	3154	9853	12029	13583	15280	17661
	+ 2.8 nM R5837	4055	8275	10895	13229	14398	14845
	+ 0.46 nM R5837	4280	7518	8522	11751	11202	13365
	无刺激	678	654	695	657	634	595
CD8+T 细胞活化 (CD25 的	仅 5 pM R1979	2502	2486	2644	2617	2791	2837
	+ 16.7 nM R5837	2159	4971	6668	7880	8661	9875

[0400]

MFI)	+ 2.8 nM R5837	2510	4894	6618	7916	8413	9031
	+ 0.46 nM R5837	3001	4254	4796	6136	6310	7919
	无刺激	392	375	401	424	371	342

[0401] 以引用的方式并入

[0402] 本文提及的所有出版物、专利和专利申请都在此以引用的方式整体并入,如同已特定地和单独地指出将每个单独的出版物、专利或专利申请以引用的方式并入一样。在起冲突的情况下,将以包括本文任何定义的本申请为准。

[0403] 还以引用的方式整体并入了任何多核苷酸和多肽序列,这些序列引用了与公共数据库中的条目相关的登录号,诸如由万维网上的基因组研究所(The Institute for Genomic Research,TIGR)和/或万维网上的国家生物技术信息中心(National Center for

Biotechnology Information,NCBI)维护的那些数据库。

[0404] 等效案

[0405] 本领域技术人员将仅使用常规实验就会认识到或能够确定本文所述的本发明的特定实施方案的许多等效案。所述等效案意图由以下权利要求涵盖。

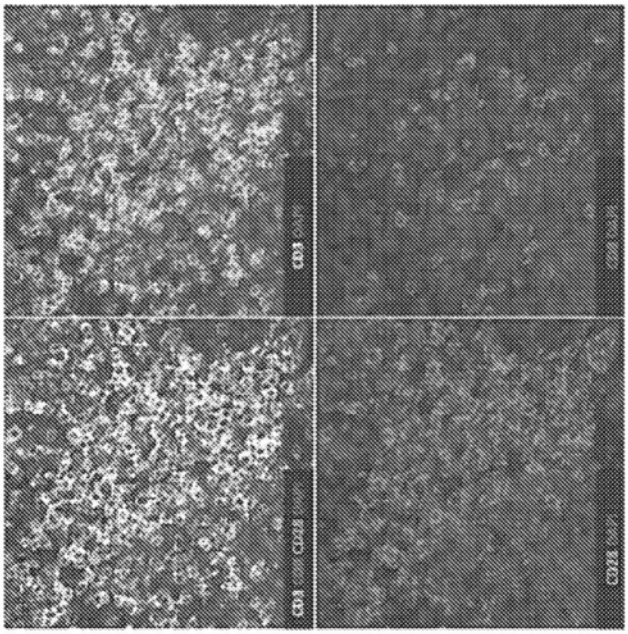


图1A

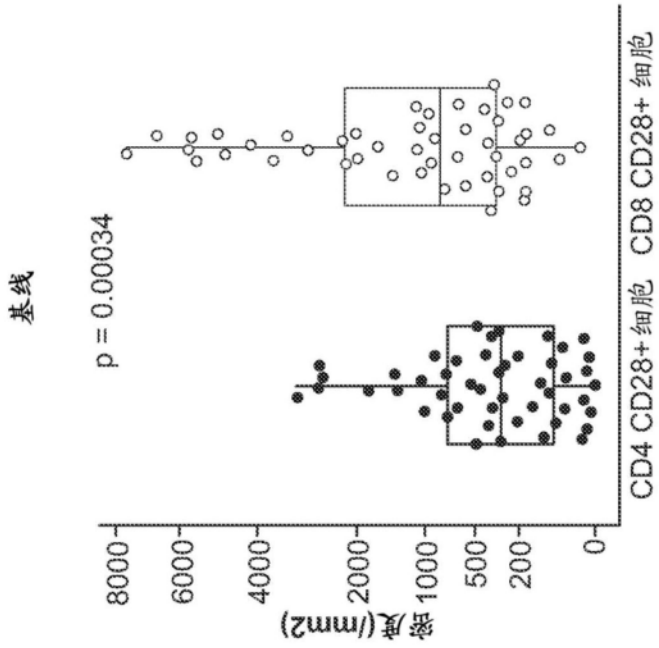

基线
p = 0.00034
8000
6000
4000
2000
1000
500
200
0
CD4 CD28+细胞
CD8 CD28+细胞

图1B

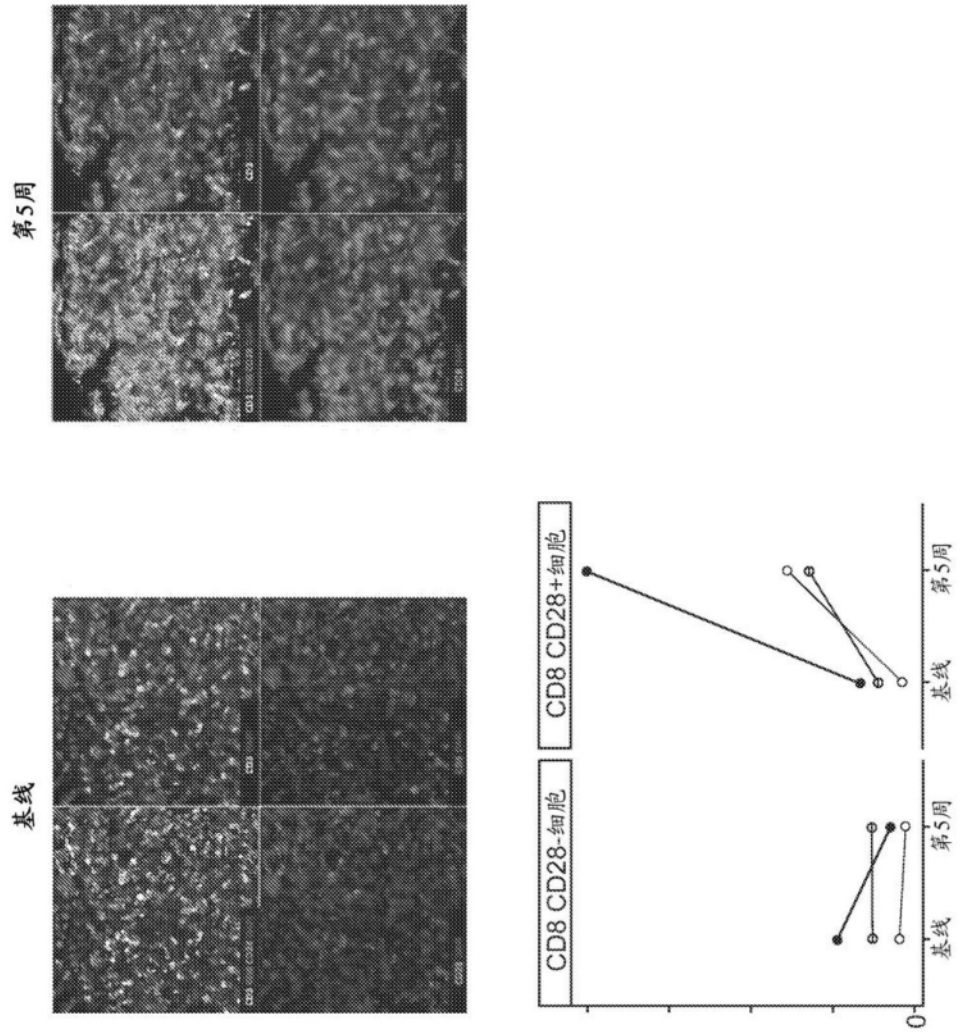


图1C

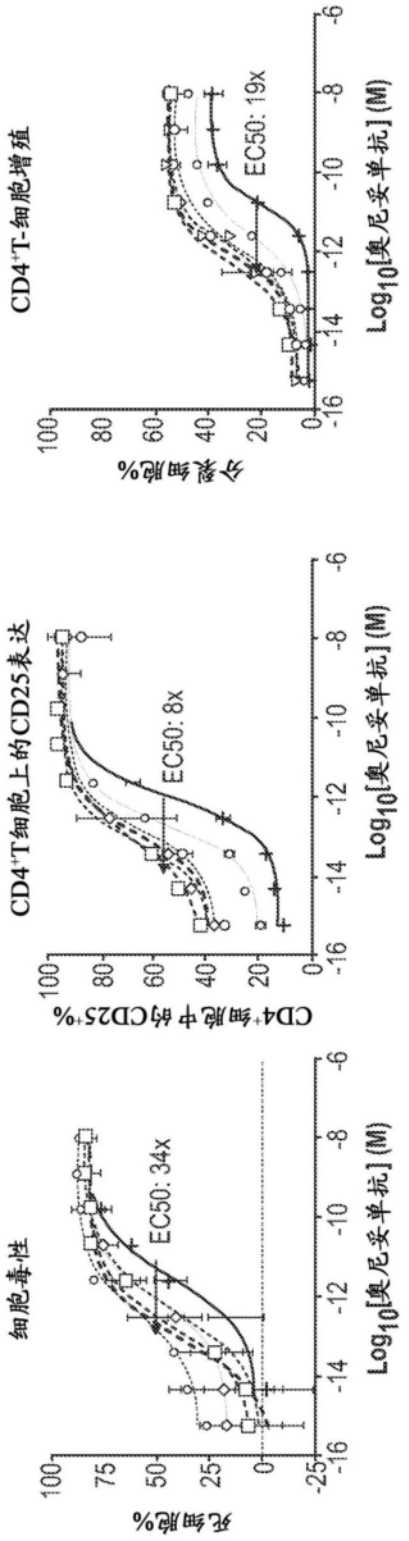


图 2A

图 2B

图 2C

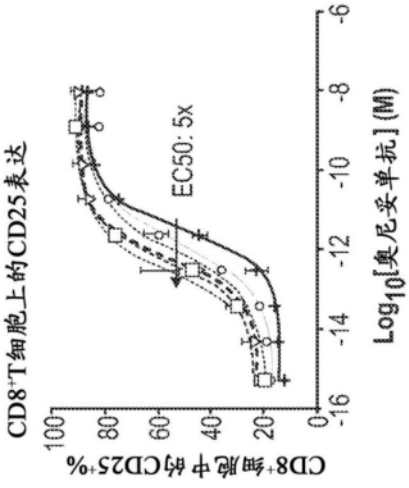


图 2D

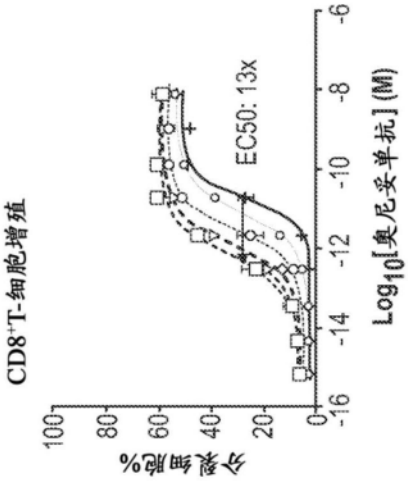


图 2E

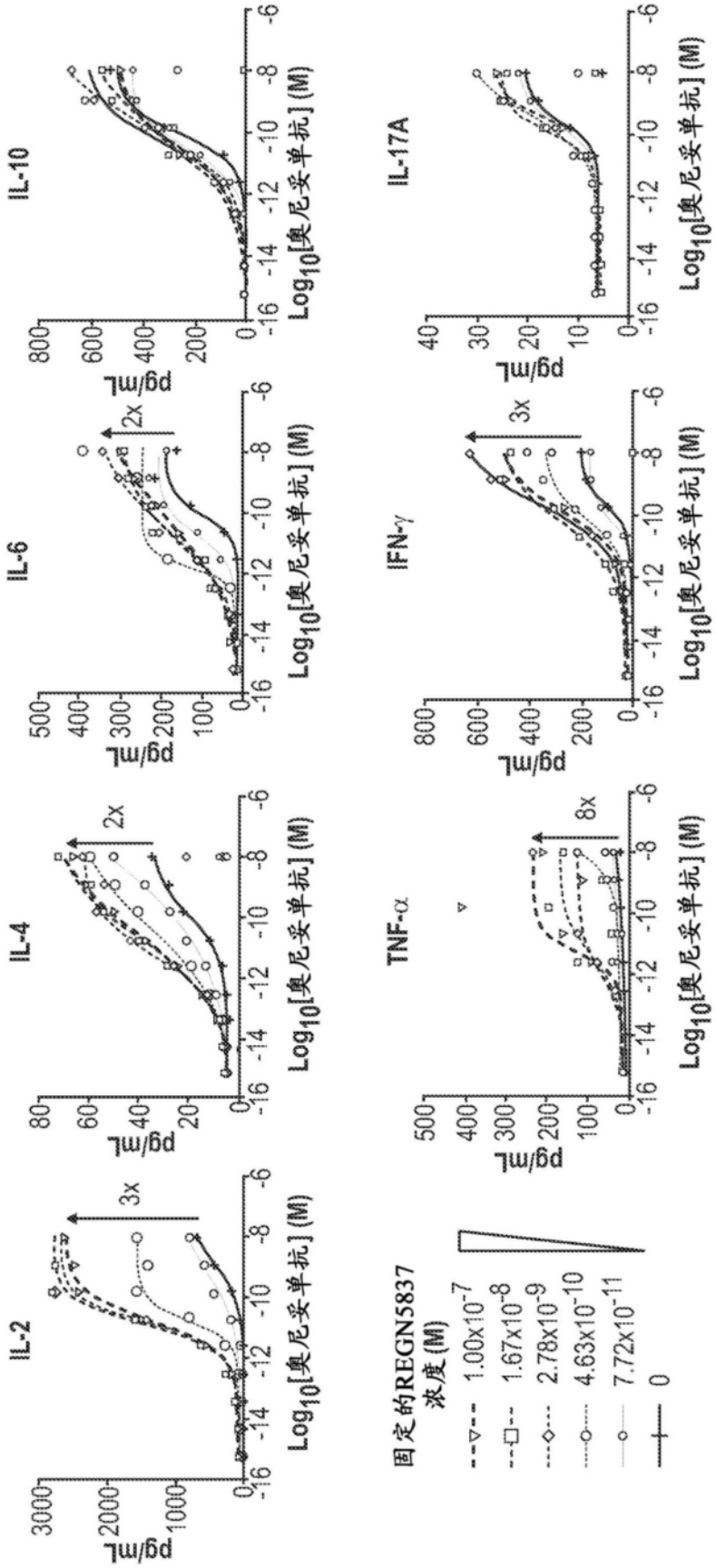

IL-10
IL-6
IL-17A
IL-4
IFN-γ
IL-2
TNF-α
pg/mL
Log10[奥尼妥单抗] (M)
2x
3x
8x
固定的REGN5837
浓度 (M)
1.00x10-7
1.67x10-8
2.78x10-9
4.63x10-10
7.72x10-11
0

图2F

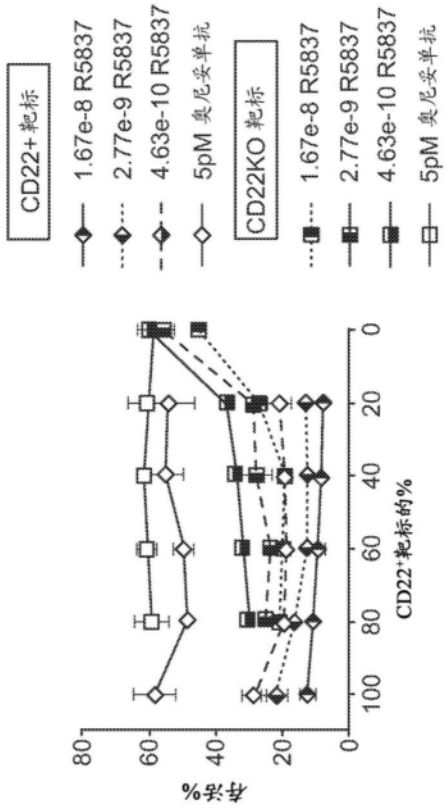

CD22+靶标
1.67e-8 R5837
2.77e-9 R5837
4.63e-10 R5837
5pM 奥尼妥单抗
CD22KO 靶标
1.67e-8 R5837
2.77e-9 R5837
4.63e-10 R5837
5pM 奥尼妥单抗
存活%
CD22+靶标的%

图2G

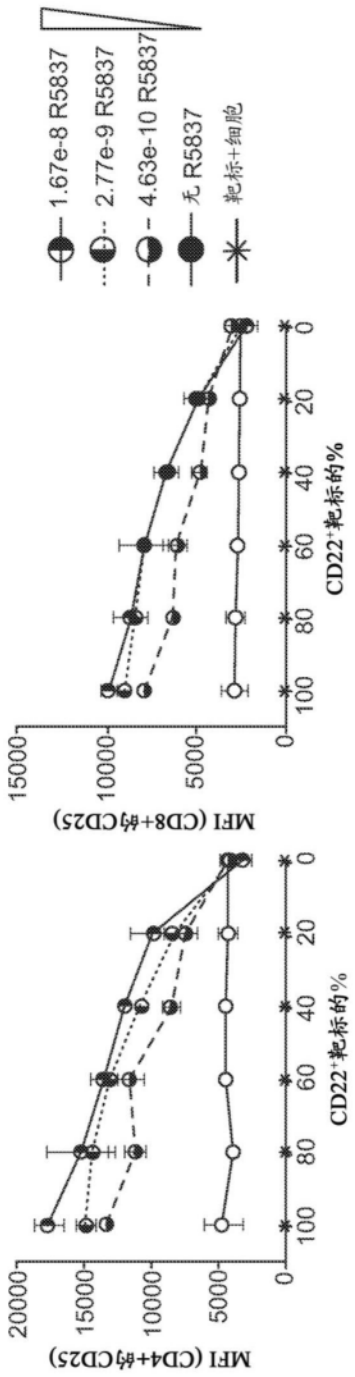

1.67e-8 R5837
2.77e-9 R5837
4.63e-10 R5837
无 R5837
靶标+细胞
MFI (CD8+的CD25)
15000
10000
5000
0
0
20
40
60
80
100
CD22+靶标的%
MFI (CD4+的CD25)
20000
15000
10000
5000
0
0
20
40
60
80
100
CD22+靶标的%

图2H

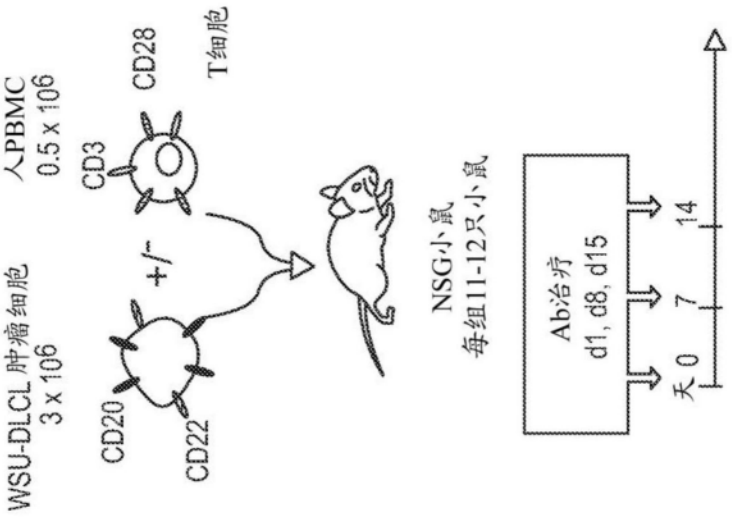

WSU-DLCL 肿瘤细胞
3 x 106
人PBMC
0.5 x 106
CD3
CD28
T细胞
CD20
+/-
CD22
NSG小鼠
每组11-12只小鼠
Ab治疗
d1, d8, d15
天 0
7
14

图3A

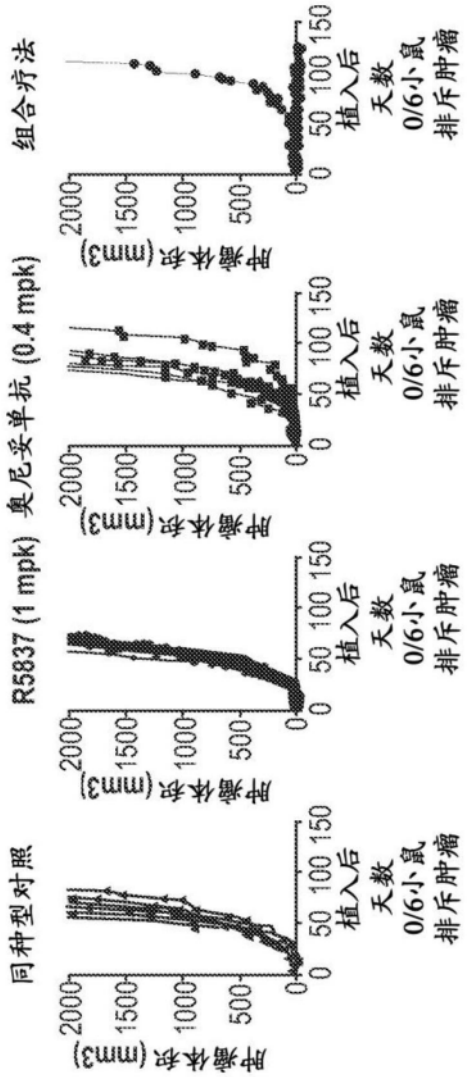

同种型对照
R5837 (1 mpk)
奥尼妥单抗 (0.4 mpk)
组合疗法
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0 50 100 150
植入后
天数
0/6小鼠
排斥肿瘤

图3B

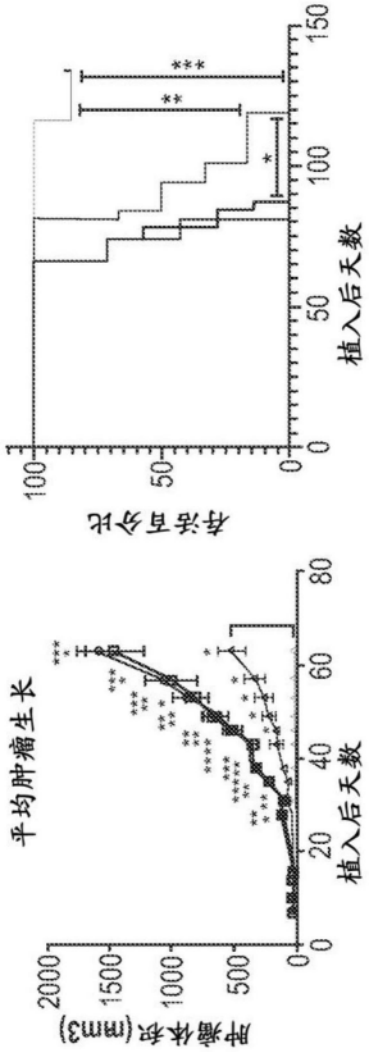


图3C

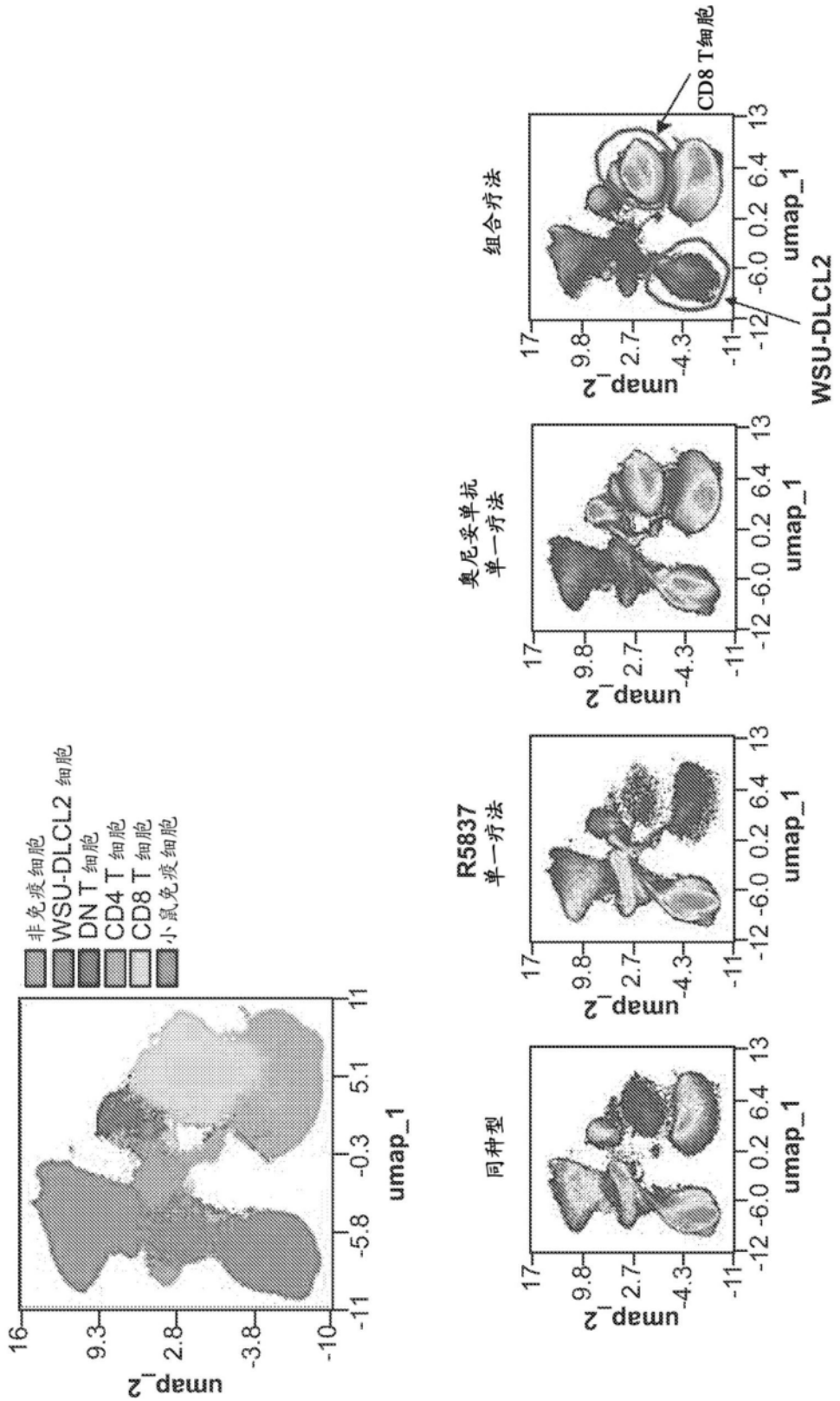

非免疫细胞
WSU-DLCL2 细胞
DN T 细胞
CD4 T 细胞
CD8 T 细胞
小鼠免疫细胞
umap_2
umap_1
同种型
R5837
单一疗法
奥尼妥单抗
单一疗法
组合疗法
CD8 T细胞
WSU-DLCL2

图3D

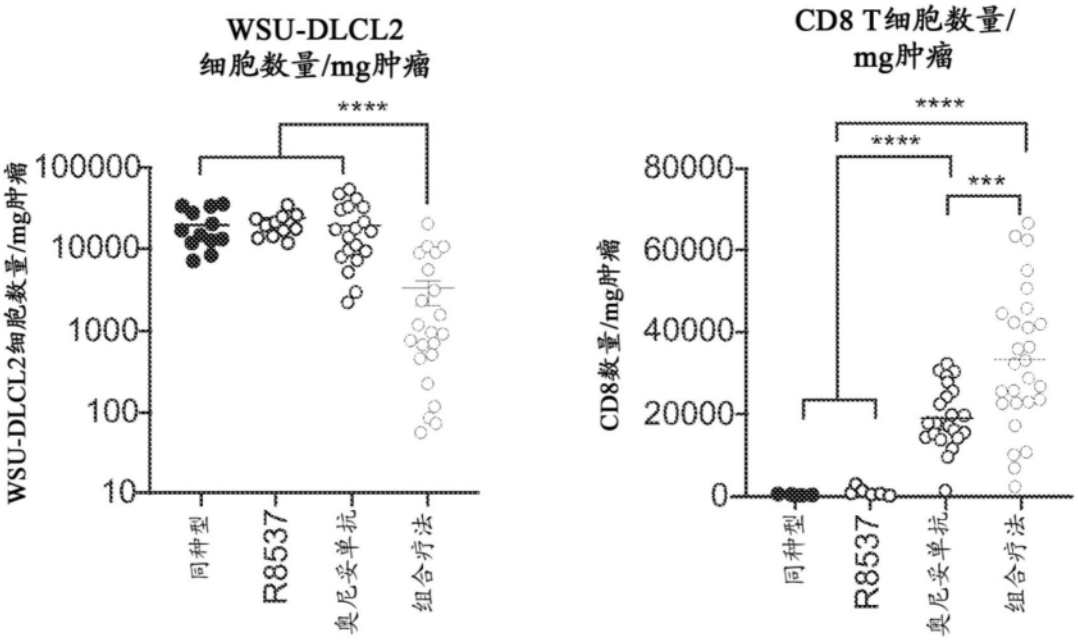

WSU-DLCL2
细胞数量/mg肿瘤
WSU-DLCL2细胞数量/mg肿瘤
100000
10000
1000
100
10
****
同种型
R8537
奥尼妥单抗
组合疗法
CD8 T细胞数量/
mg肿瘤
CD8数量/mg肿瘤
80000
60000
40000
20000
0
****
****
***
同种型
R8537
奥尼妥单抗
组合疗法

图3E

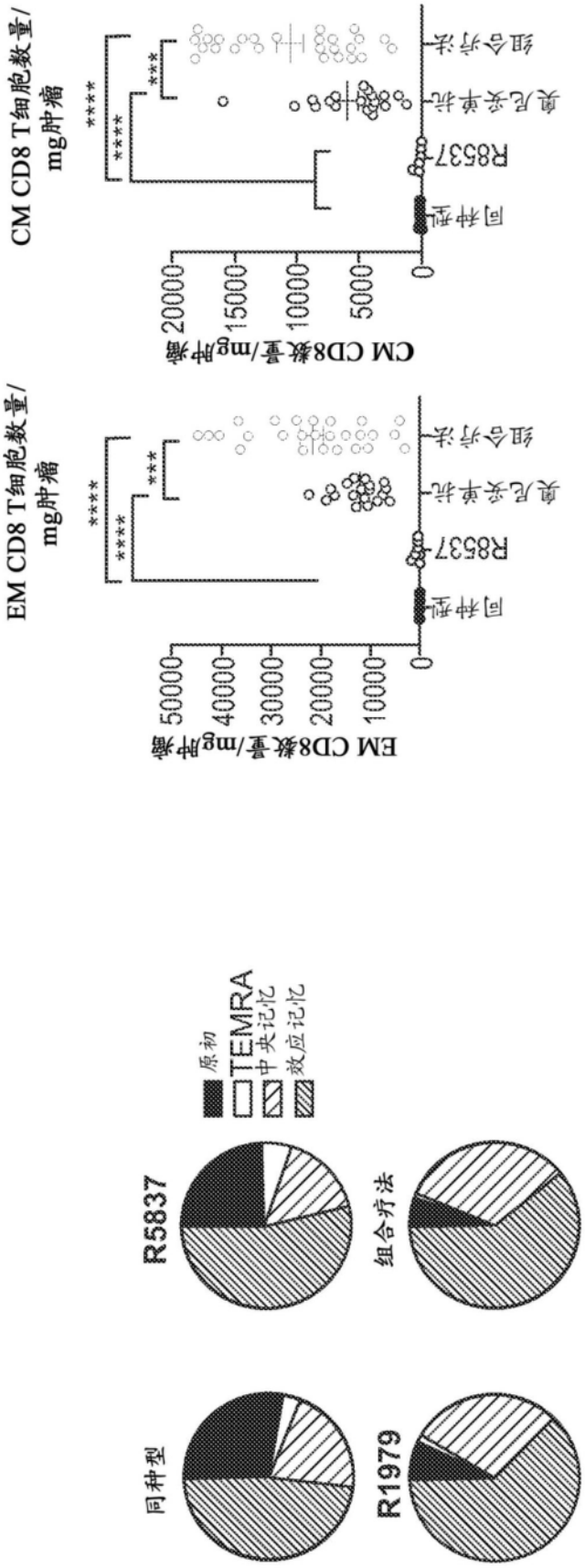

CM CD8 T细胞数量/mg肿瘤
EM CD8 T细胞数量/mg肿瘤
CM CD8数量/mg肿瘤
EM CD8数量/mg肿瘤
同种型
R8537
奥尼妥单抗
组合疗法
原初
TEMRA
中央记忆
效应记忆
R5837
R1979

图3F

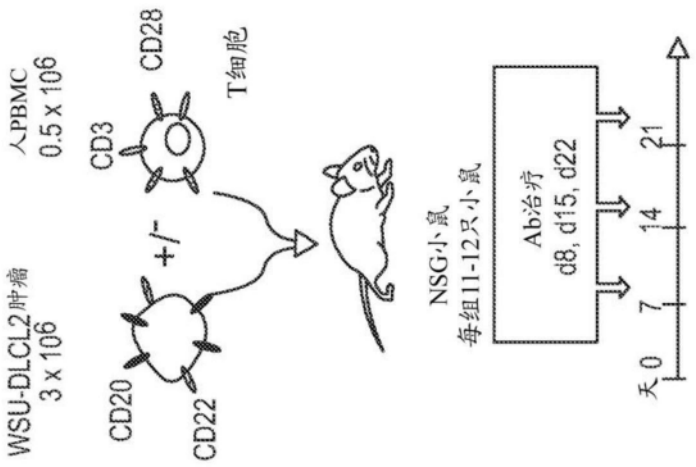

WSU-DLCL2肿瘤
3 x 10^6
人PBMC
0.5 x 10^6
CD20
CD22
+/-
CD3
CD28
T细胞
NSG小鼠
每组11-12只小鼠
Ab治疗
d8, d15, d22
天 0
7
14
21

图4A

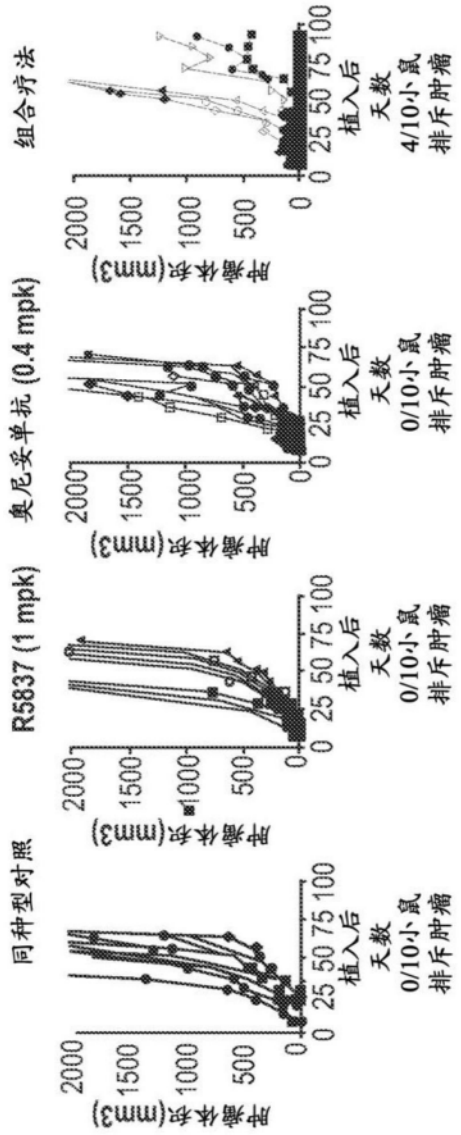

同种型对照
R5837 (1 mpk)
奥尼妥单抗 (0.4 mpk)
组合疗法
肿瘤体积(mm3)
植入后天数
0/10小鼠排斥肿瘤
4/10小鼠排斥肿瘤

图4B

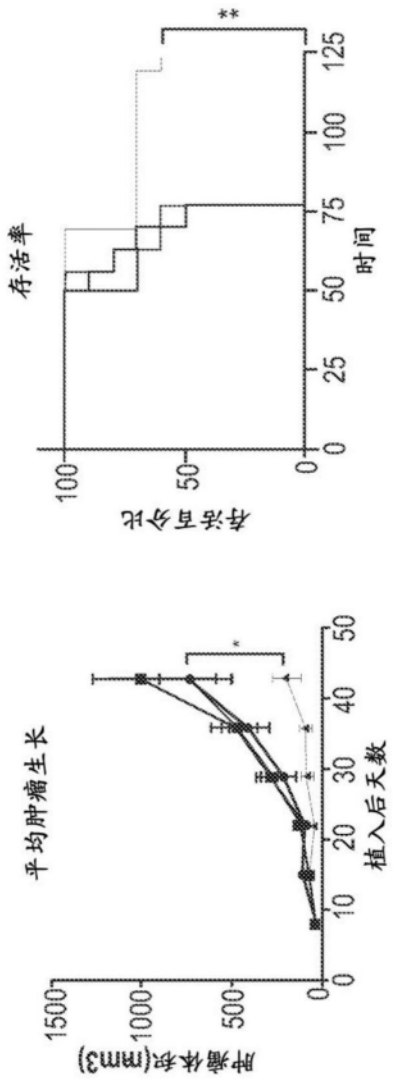

**
存活率
时间
存活百分比
0
25
50
75
100
125
100
50
0
*
平均肿瘤生长
肿瘤体积(mm3)
植入后天数
0
10
20
30
40
50
0
500
1000
1500

图4C

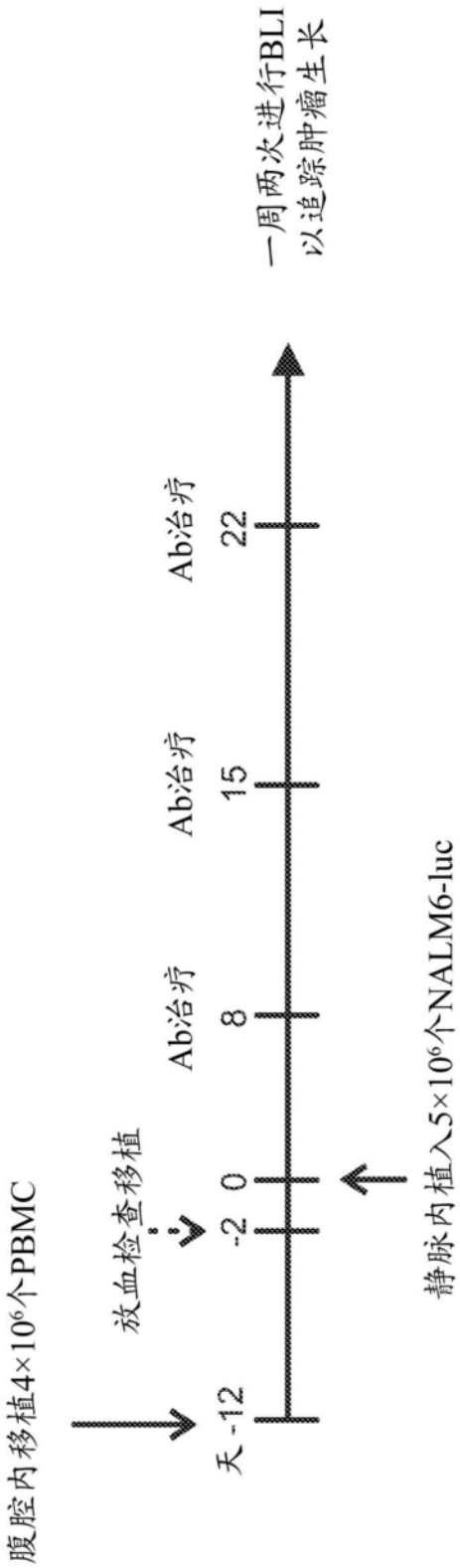

腹腔内移植4×10⁶个PBMC
放血检查移植
静脉内植入5×10⁶个NALM6-luc
天 -12
-2
0
8
15
22
Ab治疗
Ab治疗
Ab治疗
一周两次进行BLI
以追踪肿瘤生长

图4D

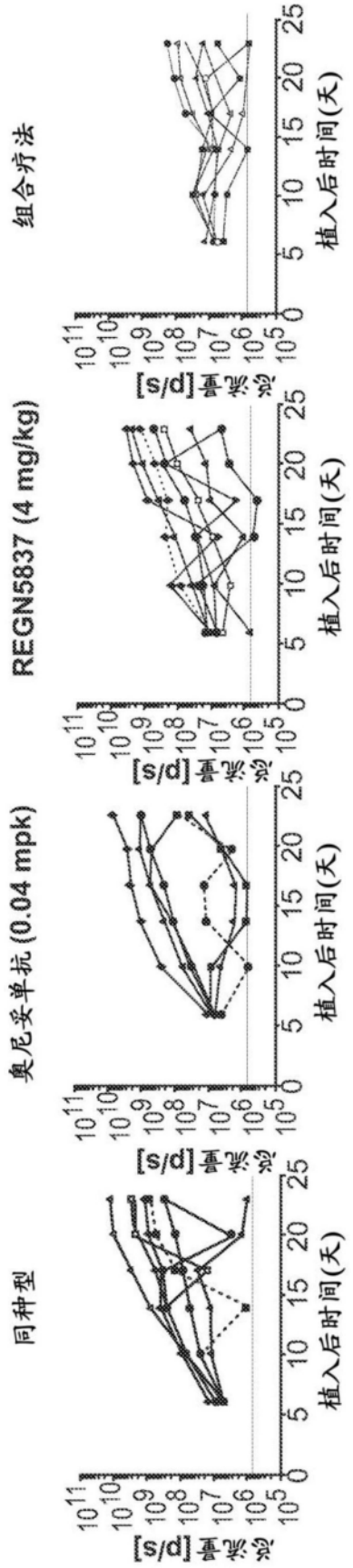


图4E

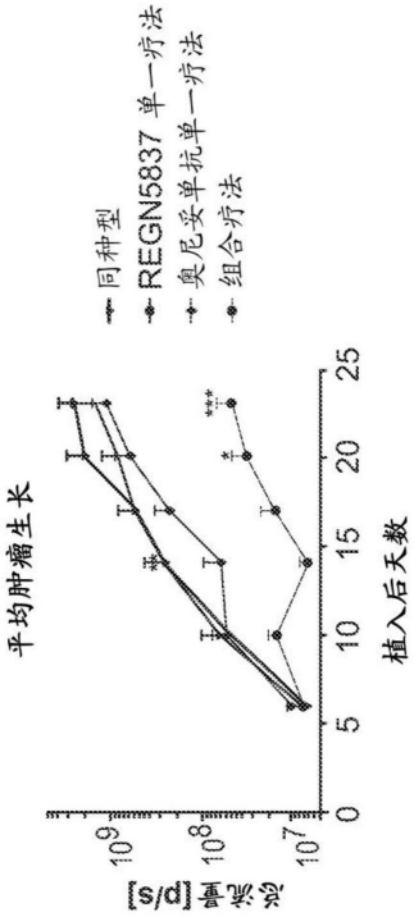

平均肿瘤生长
同种型
REGN5837 单一疗法
奥尼妥单抗单一疗法
组合疗法
植入后天数
0
5
10
15
20
25
10^9
10^8
10^7
[p/s]

图4F

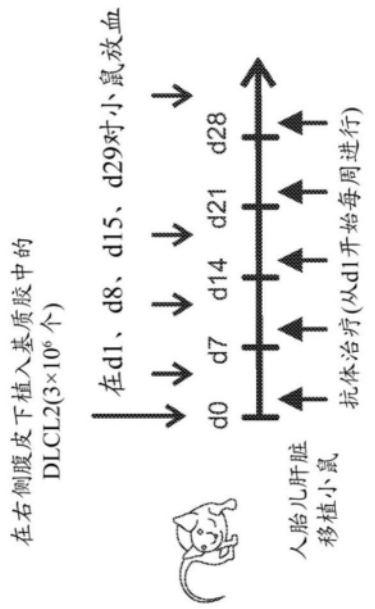

在右侧腹皮下植入基质胶中的
DLCL2(3×10^6个)
在d1、d8、d15、d29对小鼠放血
d0 d7 d14 d21 d28
人胎儿肝脏
移植小鼠
抗体治疗(从d1开始每周进行)

图5A

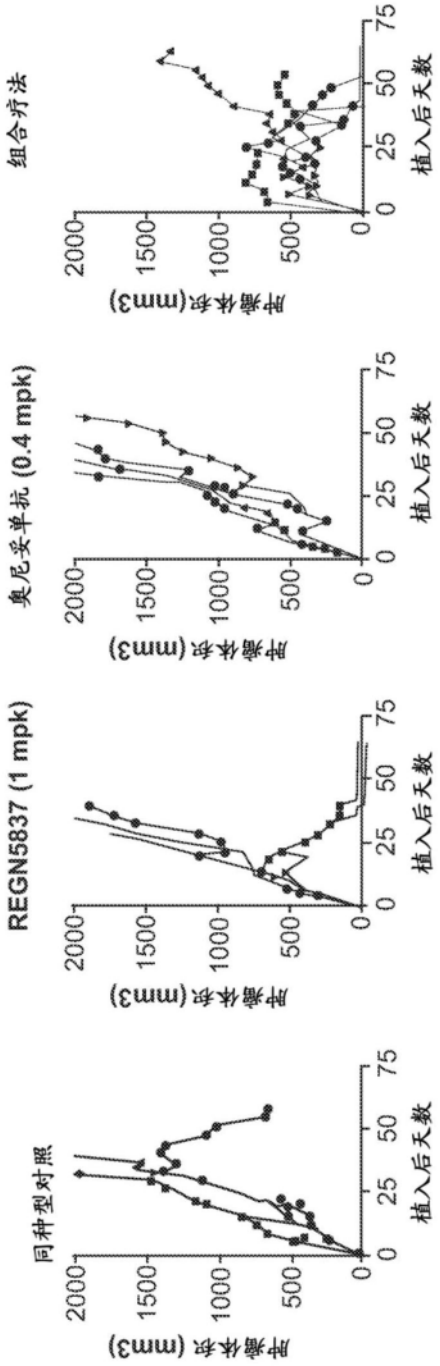

同种型对照
REGN5837 (1 mpk)
奥尼妥单抗 (0.4 mpk)
组合疗法
肿瘤体积 (mm3)
植入后天数
0
500
1000
1500
2000
0
25
50
75

图5B

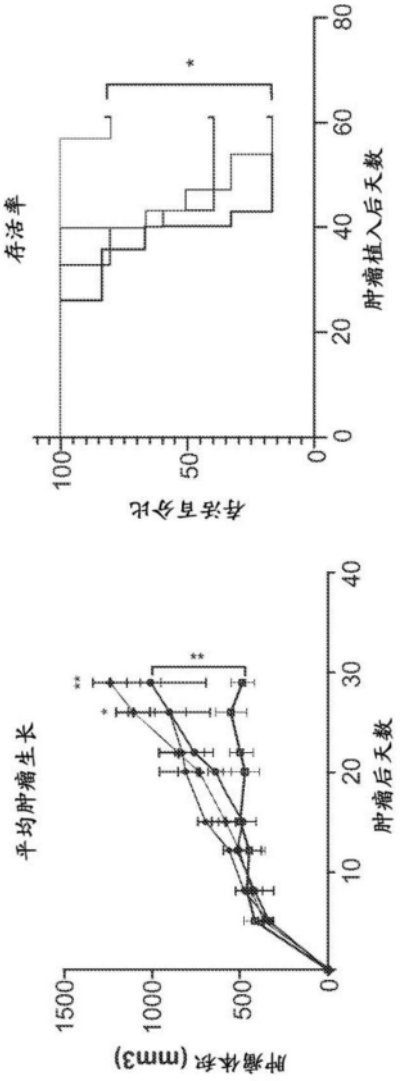


图5C

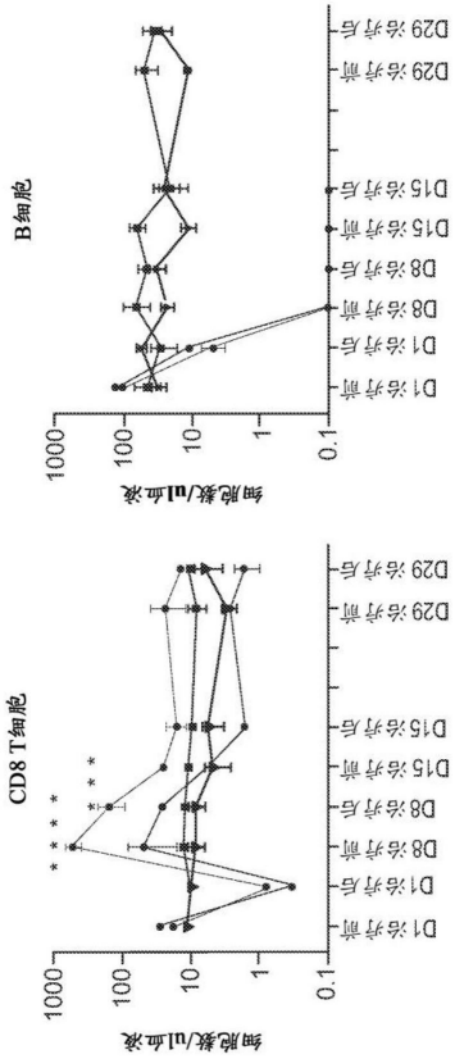

B细胞
细胞数/ul血液
1000
100
10
1
0.1
D1 治疗前
D1 治疗后
D8 治疗前
D8 治疗后
D15 治疗前
D15 治疗后
D29 治疗前
D29 治疗后
CD8 T细胞
细胞数/ul血液
1000
100
10
1
0.1
* * * *
* *
D1 治疗前
D1 治疗后
D8 治疗前
D8 治疗后
D15 治疗前
D15 治疗后
D29 治疗前
D29 治疗后

图5D

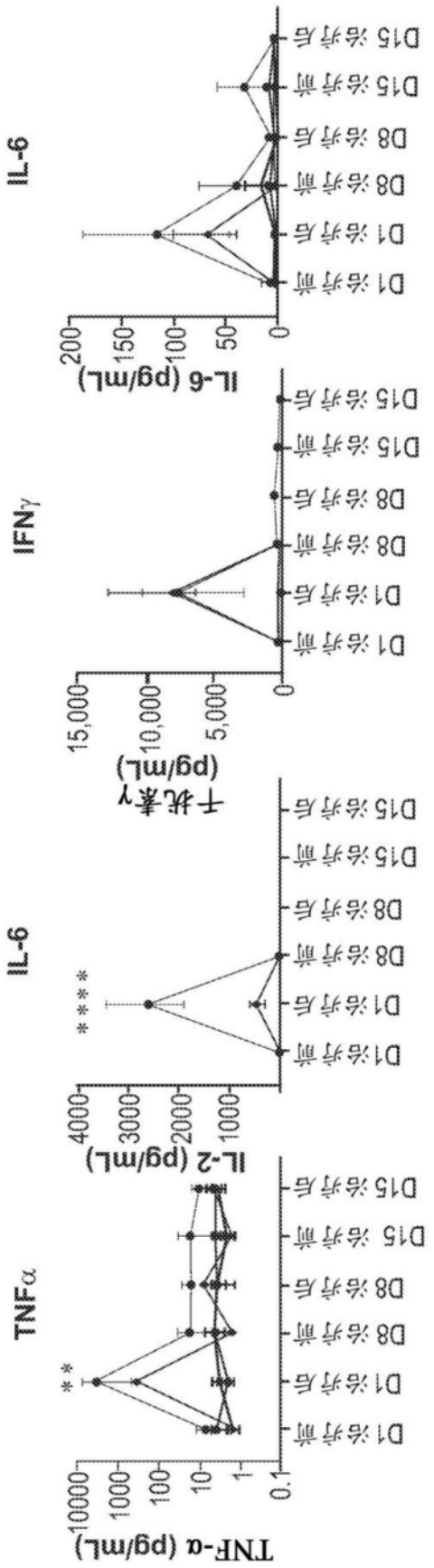

TNFα
TNF-α (pg/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
**
D1 治疗前
D1 治疗后
D8 治疗前
D8 治疗后
D15 治疗前
D15 治疗后
IL-6
IL-2 (pg/mL)
4000
3000
2000
1000
****
D1治疗前
D1治疗后
D8治疗前
D8治疗后
D15治疗前
D15治疗后
干扰素γ
(pg/mL)
15,000
10,000
5,000
0
IFNγ
D1治疗前
D1治疗后
D8治疗前
D8治疗后
D15治疗前
D15治疗后
IL-6
IL-6 (pg/mL)
200
150
100
50
0
D1治疗前
D1治疗后
D8治疗前
D8治疗后
D15治疗前
D15治疗后

图5E

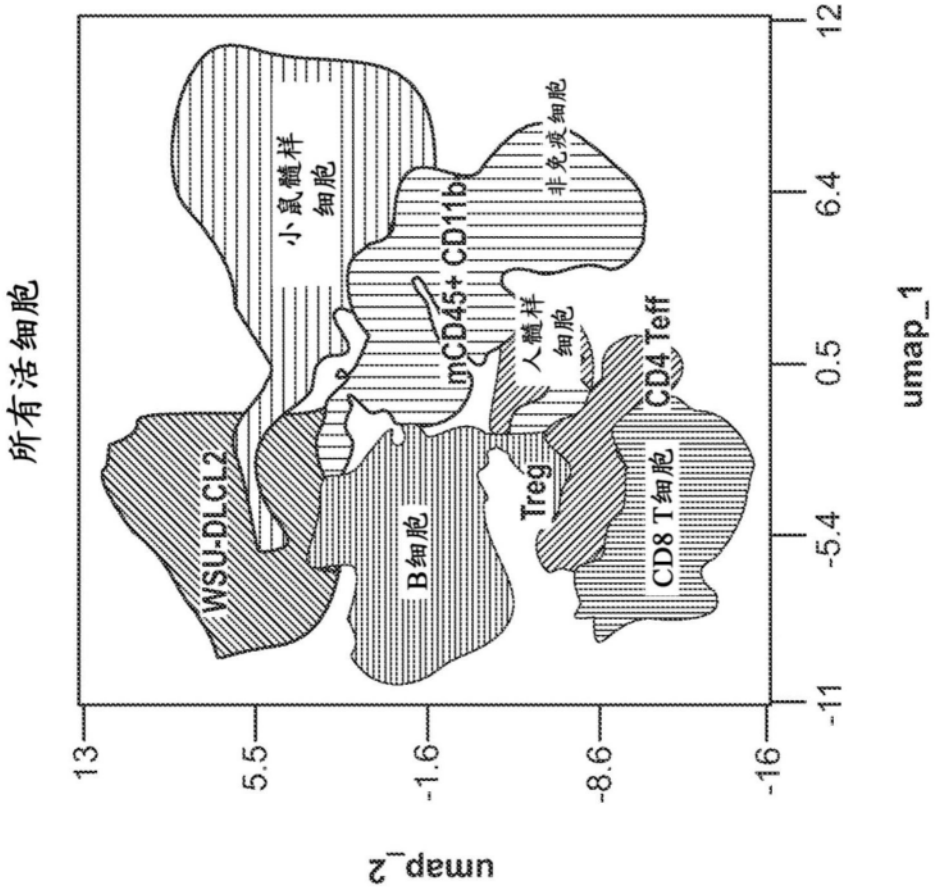

所有活细胞
小鼠髓样细胞
非免疫细胞
mCD45+ CD11b
人髓样细胞
CD4 Teff
WSU-DLCL2
B细胞
Treg
CD8 T细胞
umap_2
umap_1
13
5.5
-1.6
-8.6
-16
12
6.4
0.5
-5.4
-11

图5F

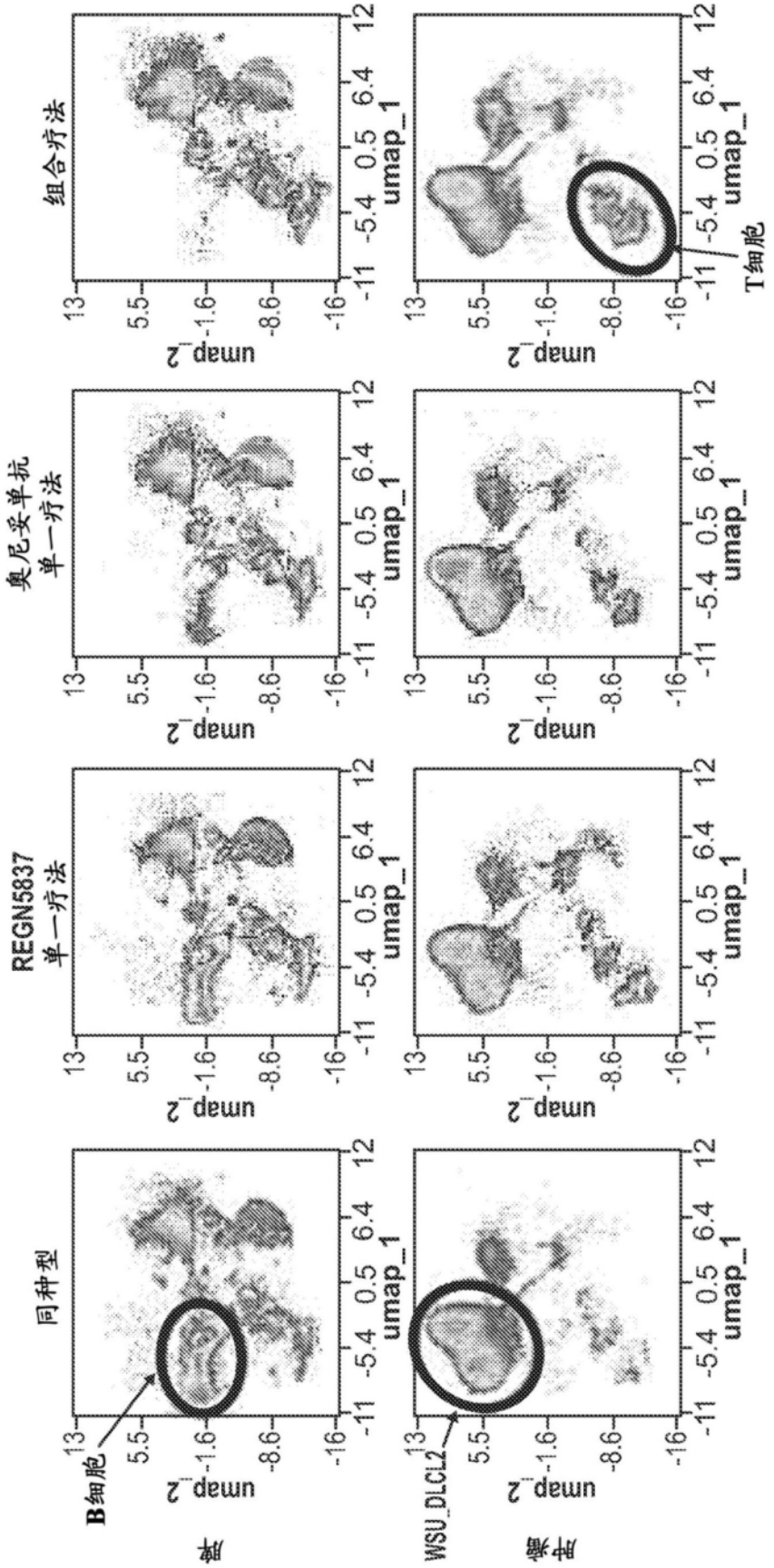

同种型
REGN5837
单一疗法
奥尼妥单抗
单一疗法
组合疗法
B细胞
T细胞
WSU_DLCL2
umap_1
umap_2
13
5.5
-1.6
-8.6
-16
-11
-5.4
0.5
6.4
12

图5F(续)

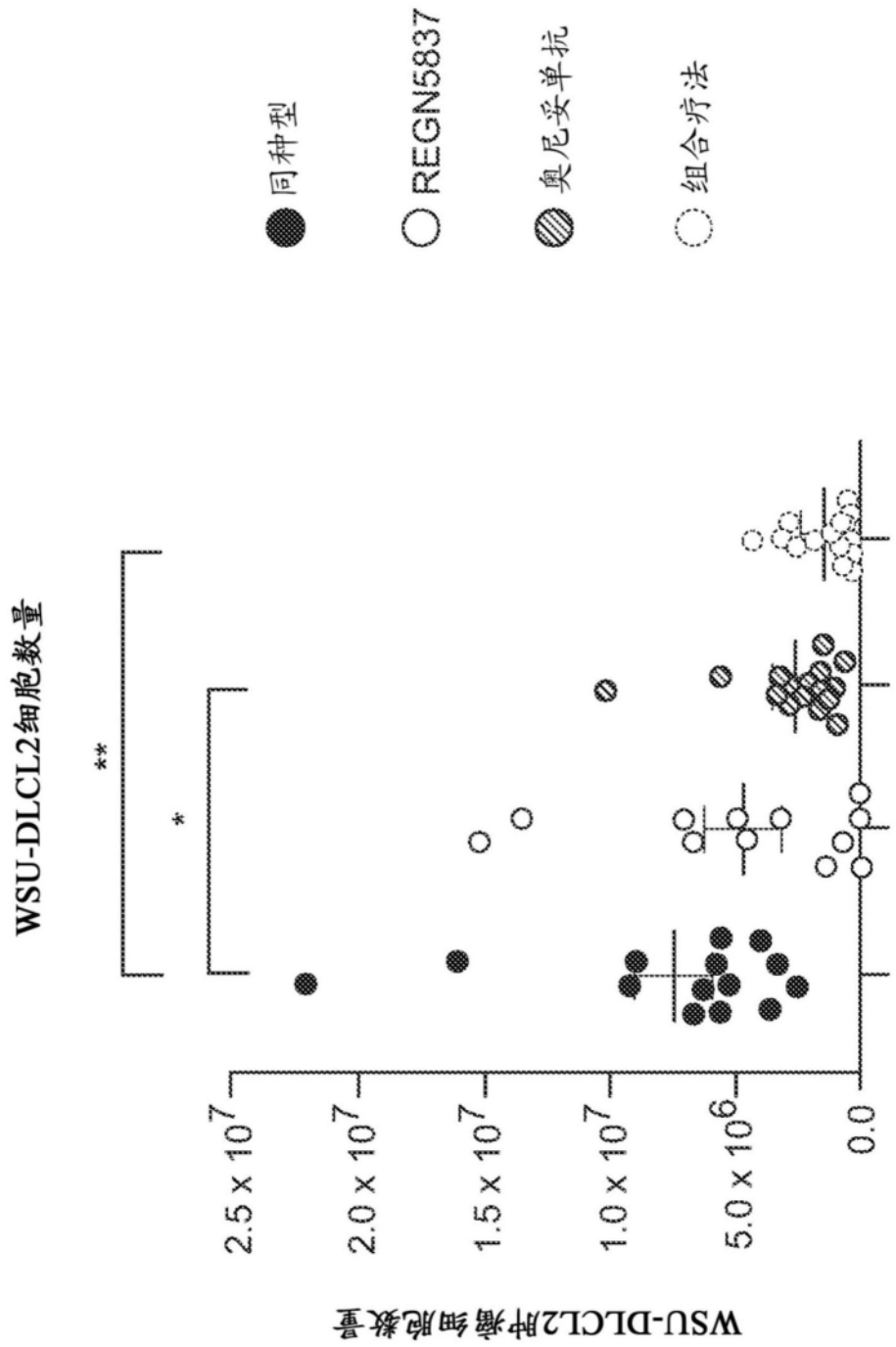

同种型
REGN5837
奥尼妥单抗
组合疗法
WSU-DLCL2细胞数量
**
*
2.5 x 10^7
2.0 x 10^7
1.5 x 10^7
1.0 x 10^7
5.0 x 10^6
0.0
WSU-DLCL2肿瘤细胞数量

图5F(续)

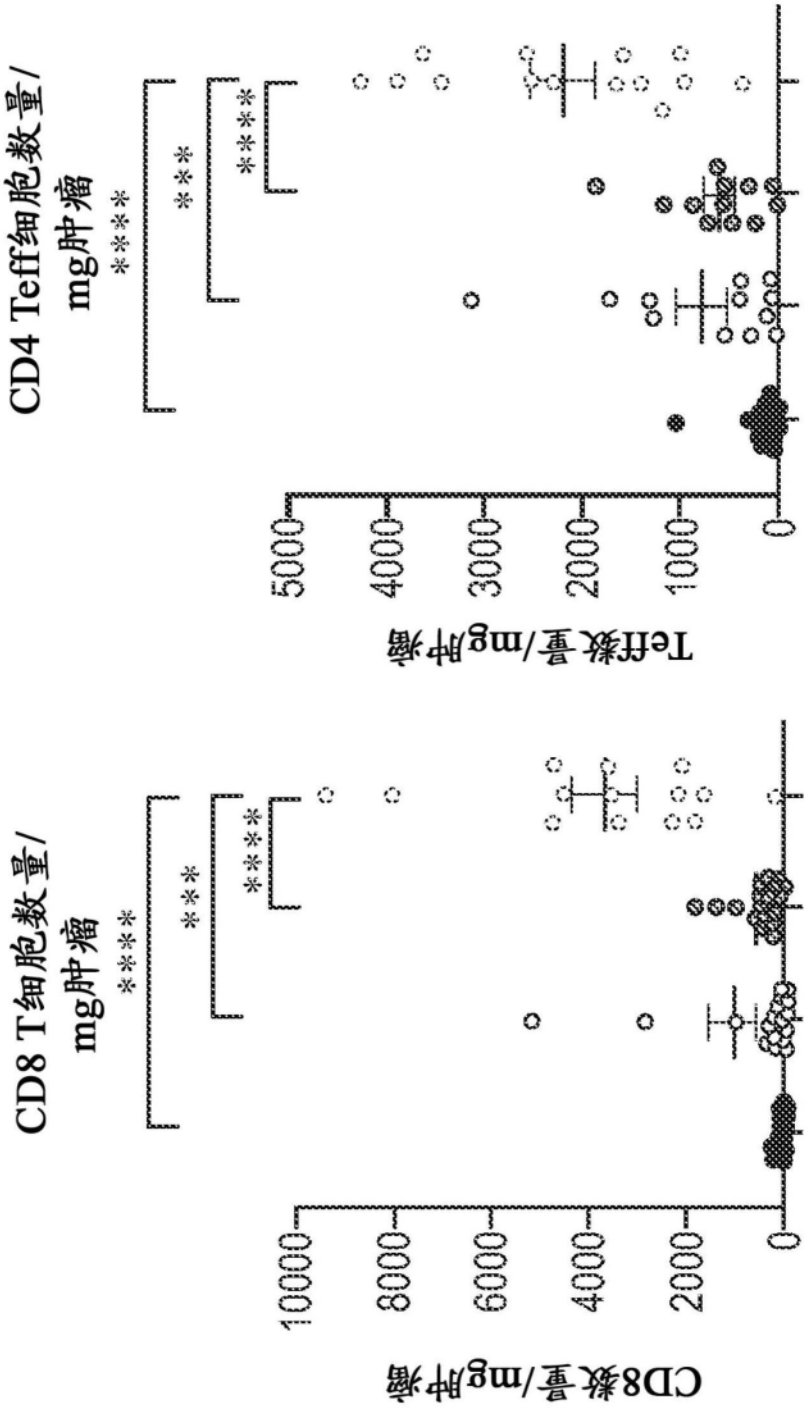

CD4 Teff细胞数量/mg肿瘤
****
***
****
Teff数量/mg肿瘤
5000
4000
3000
2000
1000
0
CD8 T细胞数量/mg肿瘤
****
***
****
CD8数量/mg肿瘤
10000
8000
6000
4000
2000
0

图5G

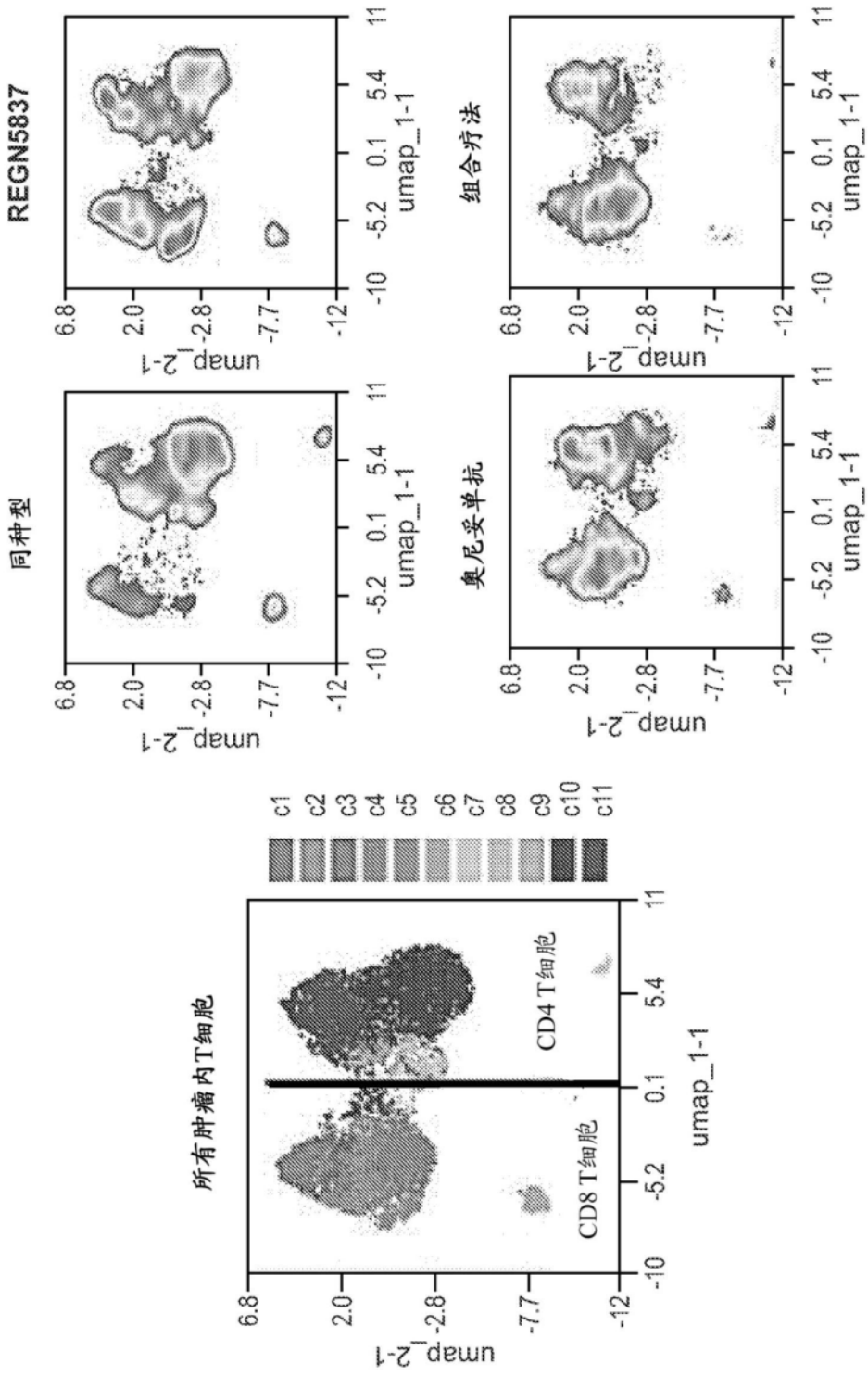

REGN5837
同种型
组合疗法
奥尼妥单抗
所有肿瘤内T细胞
CD4 T细胞
CD8 T细胞
c1
c2
c3
c4
c5
c6
c7
c8
c9
c10
c11
umap_1-1
umap_2-1
6.8
2.0
-2.8
-7.7
-12
-10
-5.2
0.1
5.4
11

图5H

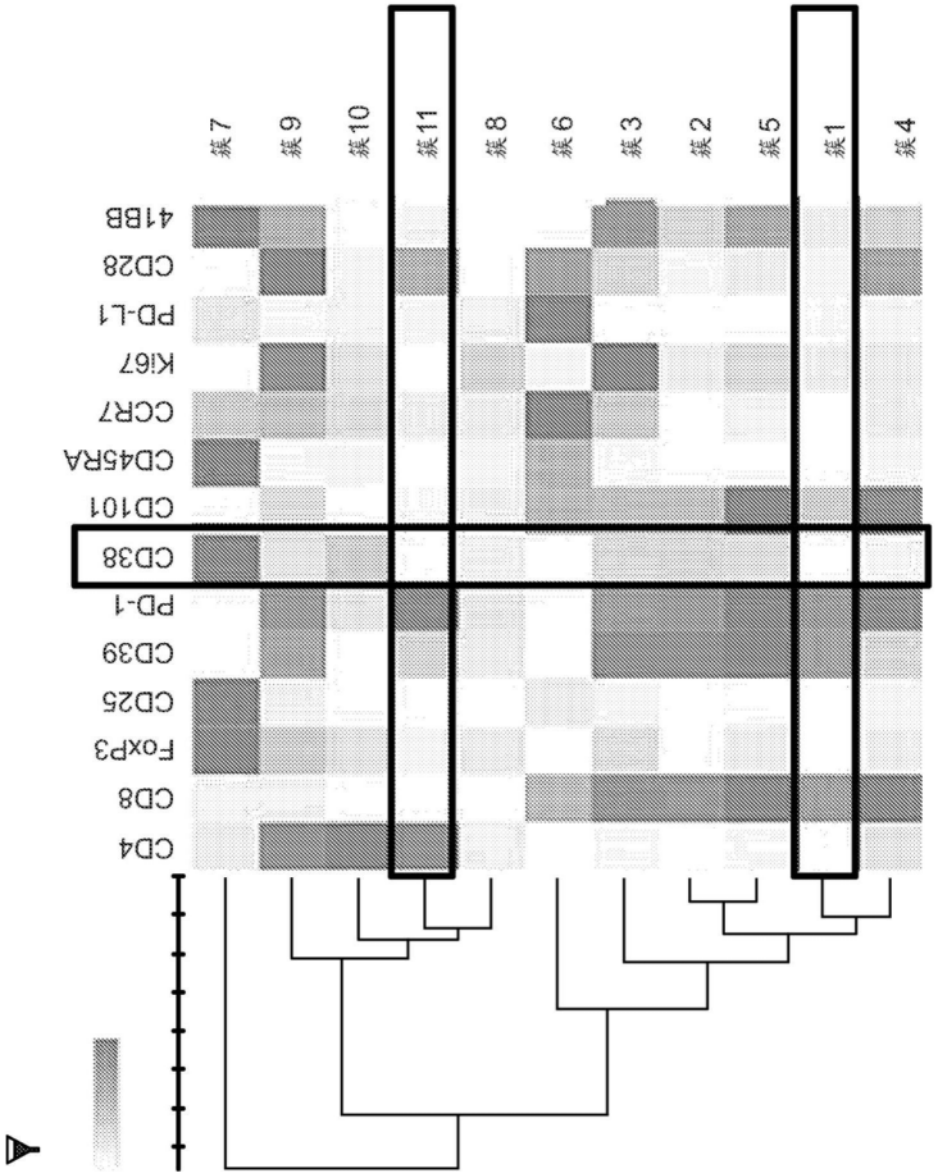

簇7
簇9
簇10
簇11
簇8
簇6
簇3
簇2
簇5
簇1
簇4
41BB
CD28
PD-L1
Ki67
CCR7
CD45RA
CD101
CD38
PD-1
CD39
CD25
FoxP3
CD8
CD4

图5I

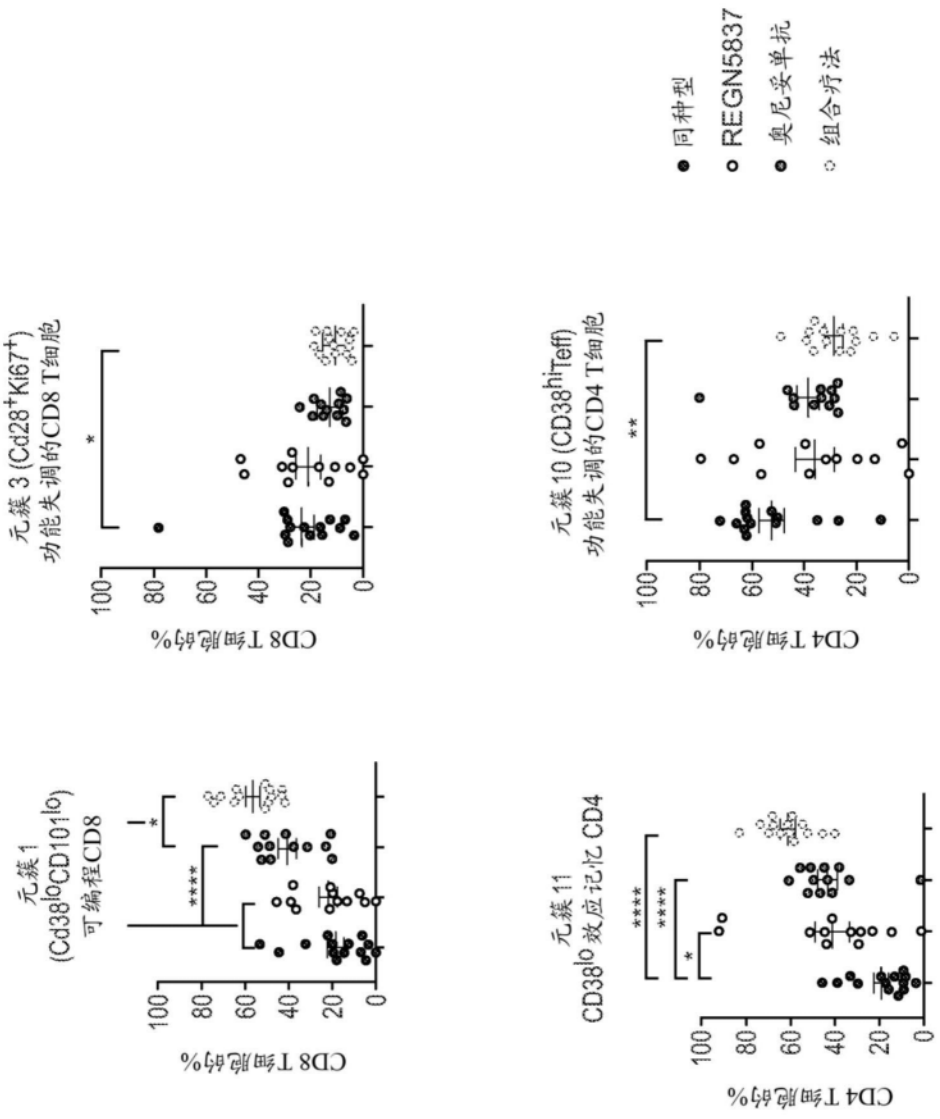
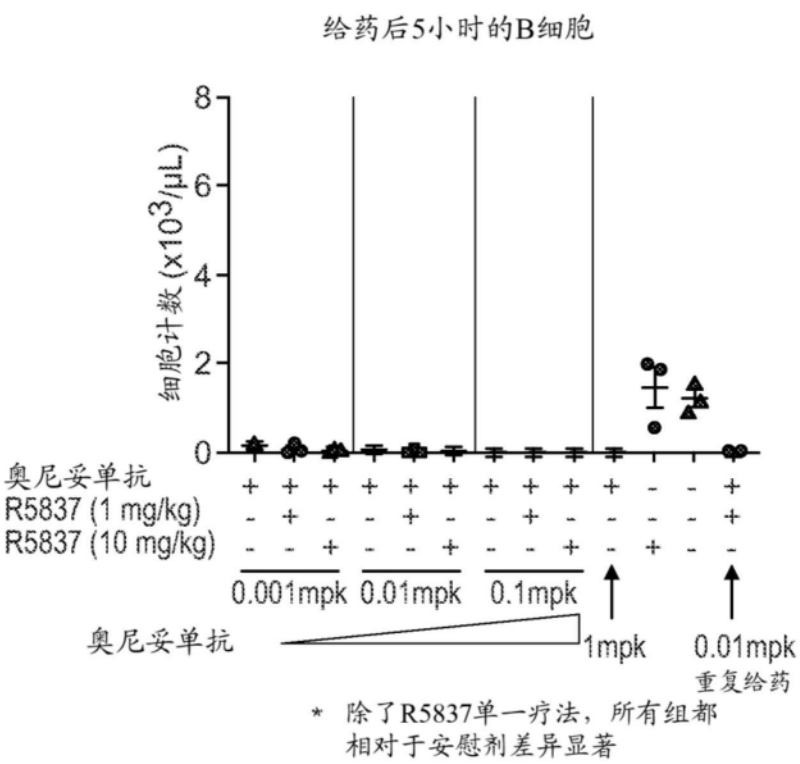

元簇 1
(Cd38loCD101lo)
可编程CD8
CD8 T细胞的%
元簇 11
CD38lo 效应记忆 CD4
CD4 T细胞的%
元簇 3 (Cd28+Ki67+)
功能失调的CD8 T细胞
CD8 T细胞的%
元簇 10 (CD38hiTeff)
功能失调的CD4 T细胞
CD4 T细胞的%
同种型
REGN5837
奥尼妥单抗
组合疗法

图5J


给药后5小时的B细胞
细胞计数 (x10³/μL)
8
6
4
2
0
奥尼妥单抗
R5837 (1 mg/kg)
R5837 (10 mg/kg)
0.001mpk
0.01mpk
0.1mpk
奥尼妥单抗
1mpk
0.01mpk
重复给药
* 除了R5837单一疗法，所有组都
相对于安慰剂差异显著

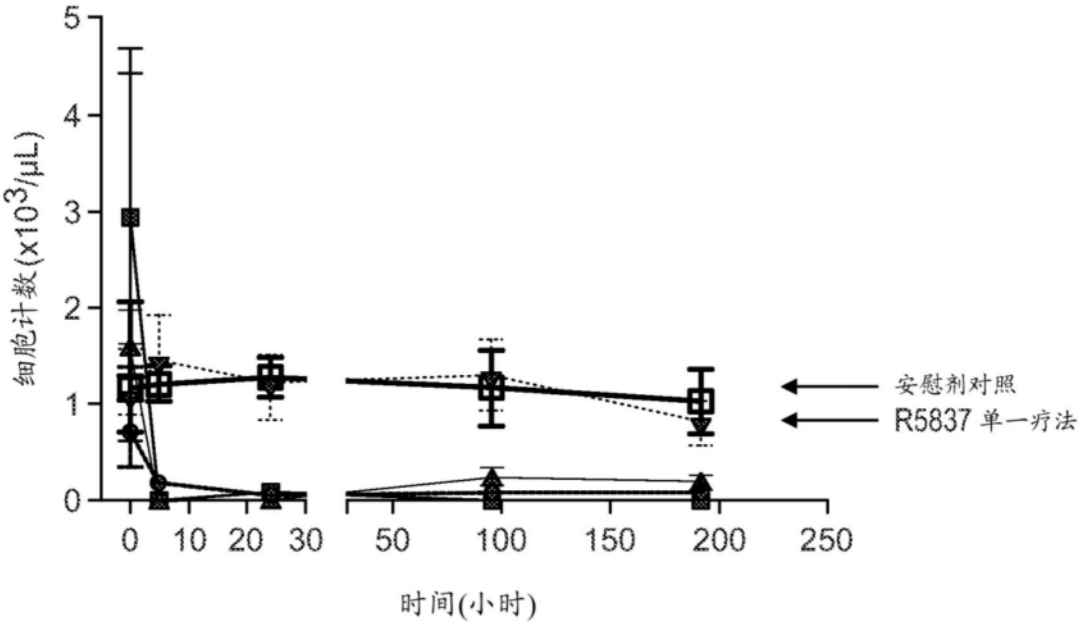
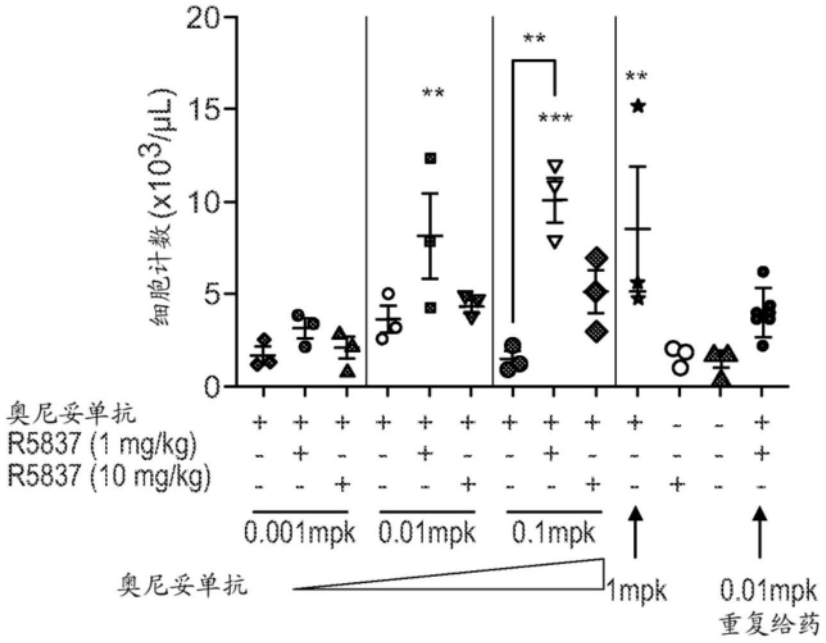

细胞计数(x10³/μL)
5
4
3
2
1
0
0 10 20 30 50 100 150 200 250
时间(小时)
安慰剂对照
R5837 单一疗法

图6A


细胞计数 (x10³/μL)
20
15
10
5
0
**
**
***
**
奥尼妥单抗
R5837 (1 mg/kg)
R5837 (10 mg/kg)
0.001mpk
0.01mpk
0.1mpk
奥尼妥单抗
1mpk
0.01mpk
重复给药

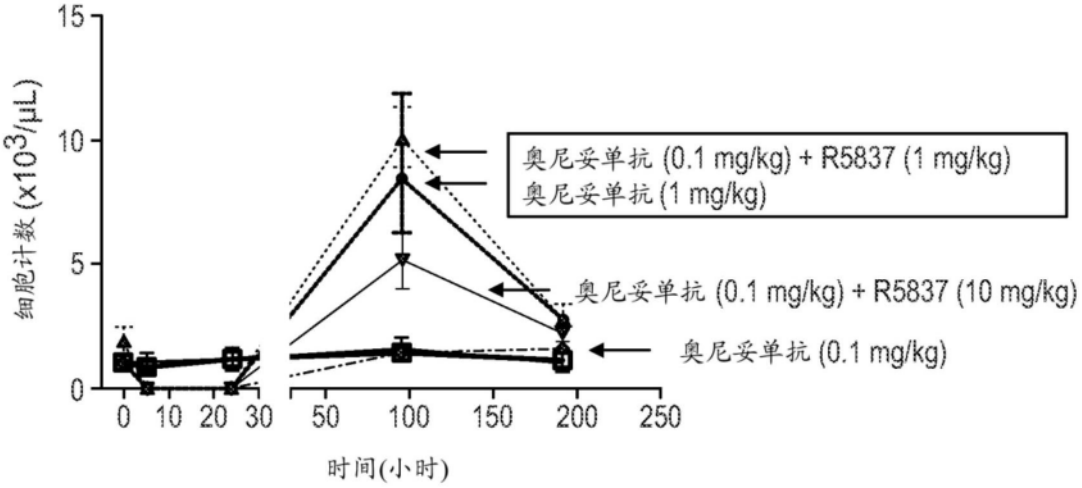
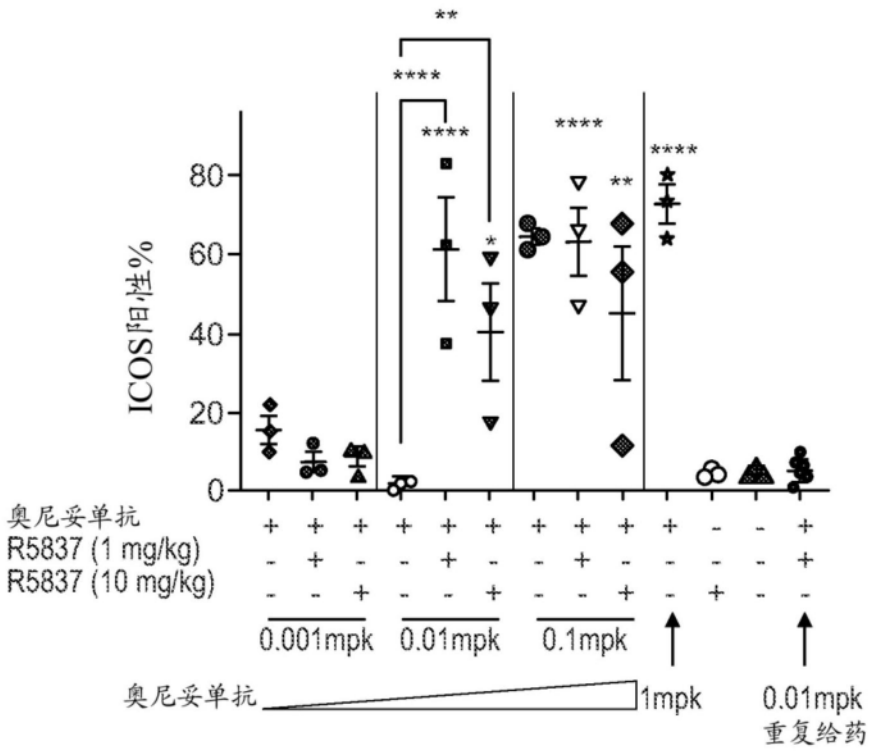

细胞计数 (x10³/μL)
15
10
5
0
0 10 20 30 50 100 150 200 250
时间(小时)
奥尼妥单抗 (0.1 mg/kg) + R5837 (1 mg/kg)
奥尼妥单抗 (1 mg/kg)
奥尼妥单抗 (0.1 mg/kg) + R5837 (10 mg/kg)
奥尼妥单抗 (0.1 mg/kg)

图6B


**
****
****
****
****
**
*
ICOS阳性%
80
60
40
20
0
奥尼妥单抗
R5837 (1 mg/kg)
R5837 (10 mg/kg)
0.001mpk
0.01mpk
0.1mpk
奥尼妥单抗
1mpk
0.01mpk
重复给药

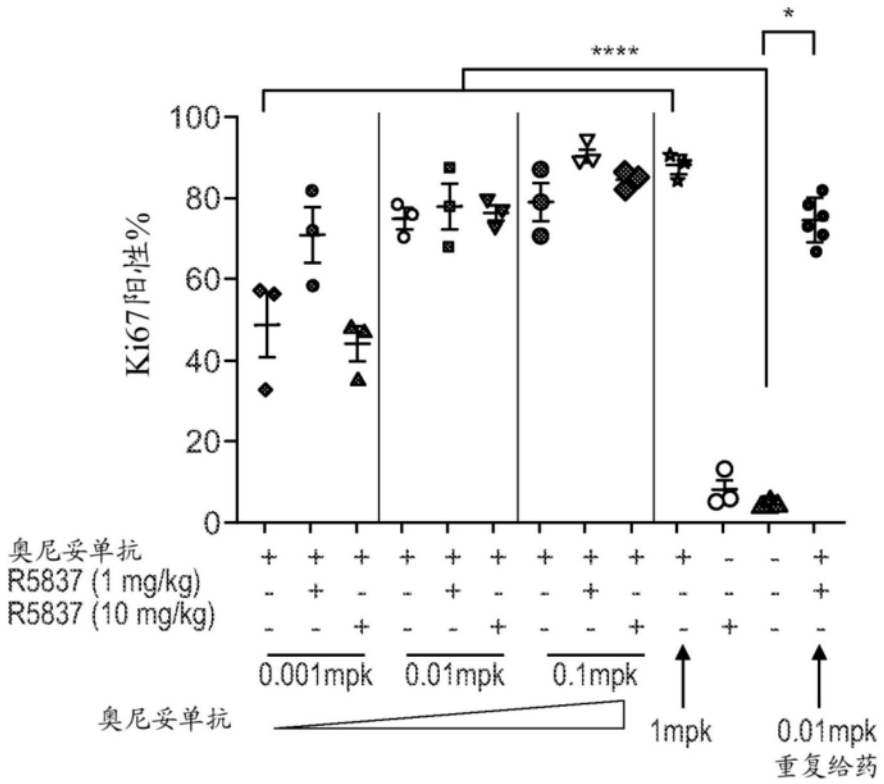

*
****
Ki67阳性%
100
80
60
40
20
0
奥尼妥单抗
R5837 (1 mg/kg)
R5837 (10 mg/kg)
0.001mpk
0.01mpk
0.1mpk
奥尼妥单抗
1mpk
0.01mpk
重复给药

图6C

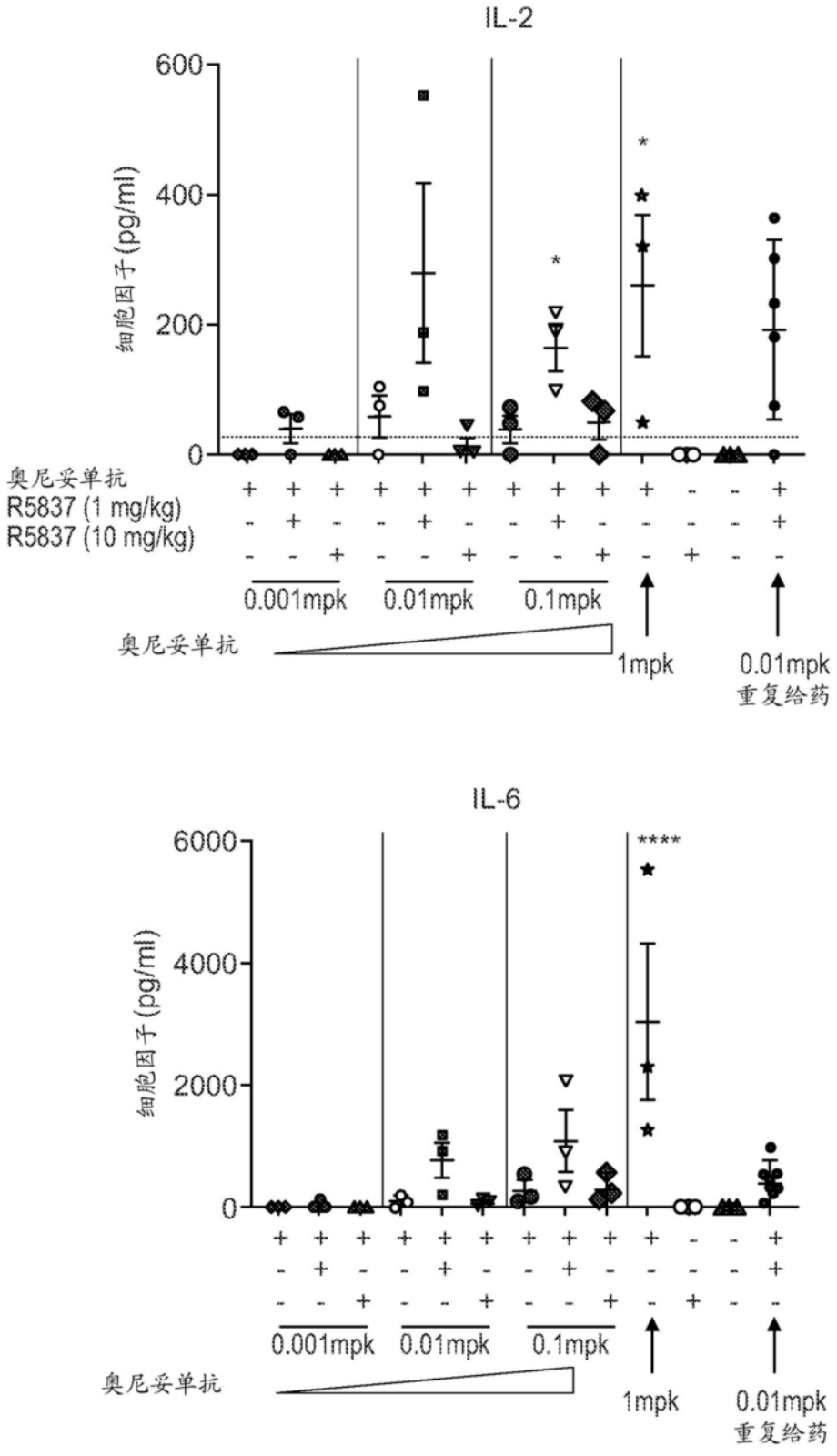

IL-2
600
400
200
0
细胞因子(pg/ml)
*
*
奥尼妥单抗
R5837 (1 mg/kg)
R5837 (10 mg/kg)
0.001mpk
0.01mpk
0.1mpk
奥尼妥单抗
1mpk
0.01mpk
重复给药
IL-6
6000
4000
2000
0
细胞因子(pg/ml)
****
0.001mpk
0.01mpk
0.1mpk
奥尼妥单抗
1mpk
0.01mpk
重复给药

图6D

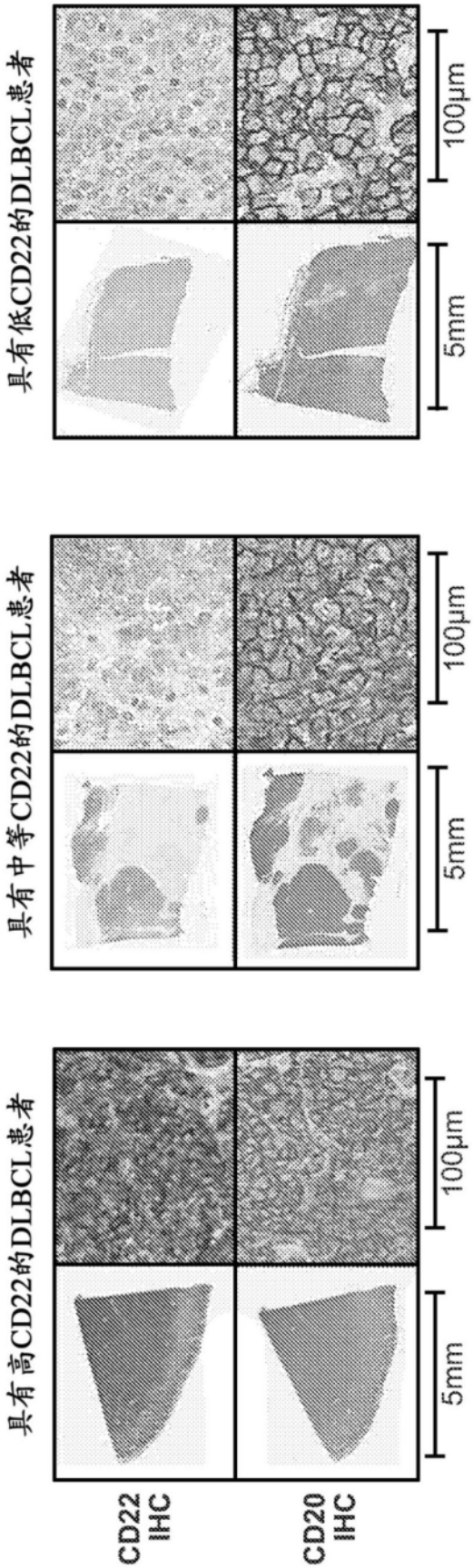

具有高CD22的DLBCL患者
具有中等CD22的DLBCL患者
具有低CD22的DLBCL患者
5mm
100μm
CD22 IHC
CD20 IHC

图7A

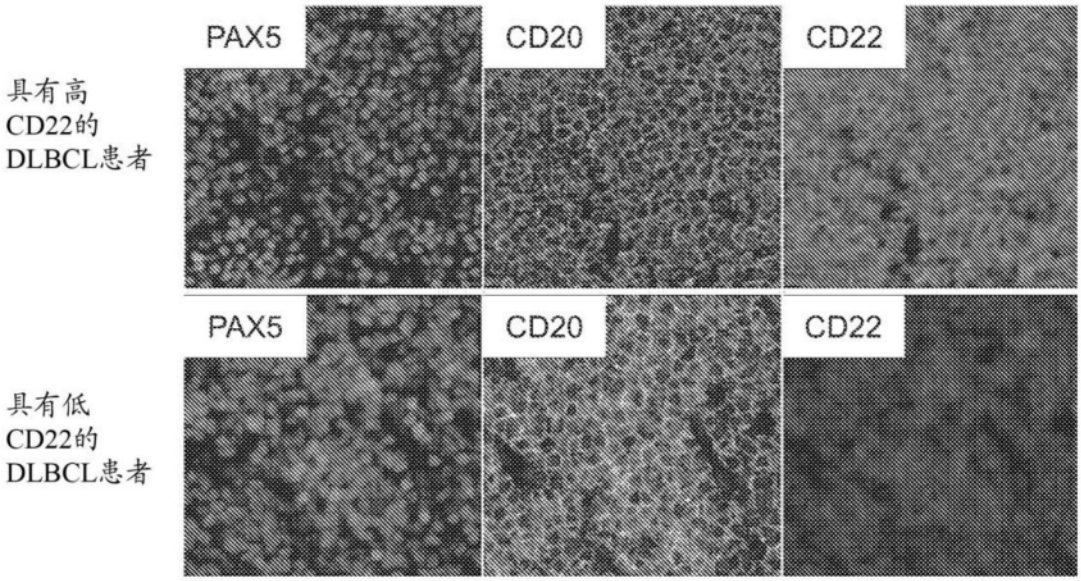

PAX5
CD20
CD22
具有高
CD22的
DLBCL患者
PAX5
CD20
CD22
具有低
CD22的
DLBCL患者

图7B

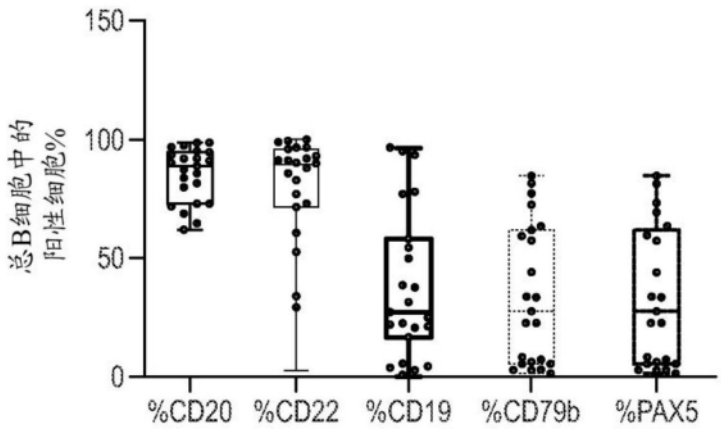

150
100
50
0
总B细胞中的
阳性细胞%
%CD20
%CD22
%CD19
%CD79b
%PAX5

图7C

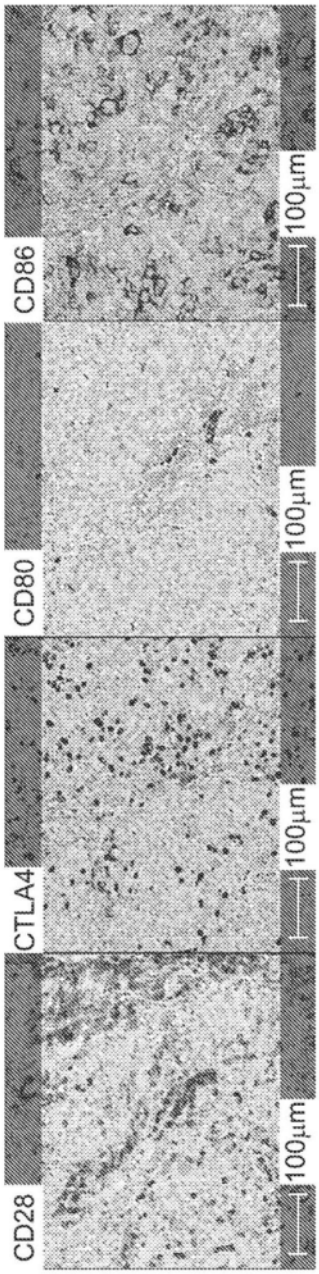


图8A

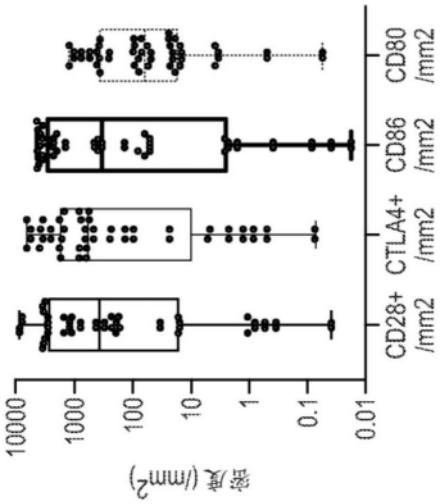

CD80 /mm2
CD86 /mm2
CTLA4+ /mm2
CD28+ /mm2
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
密度 (/mm²)

图8B

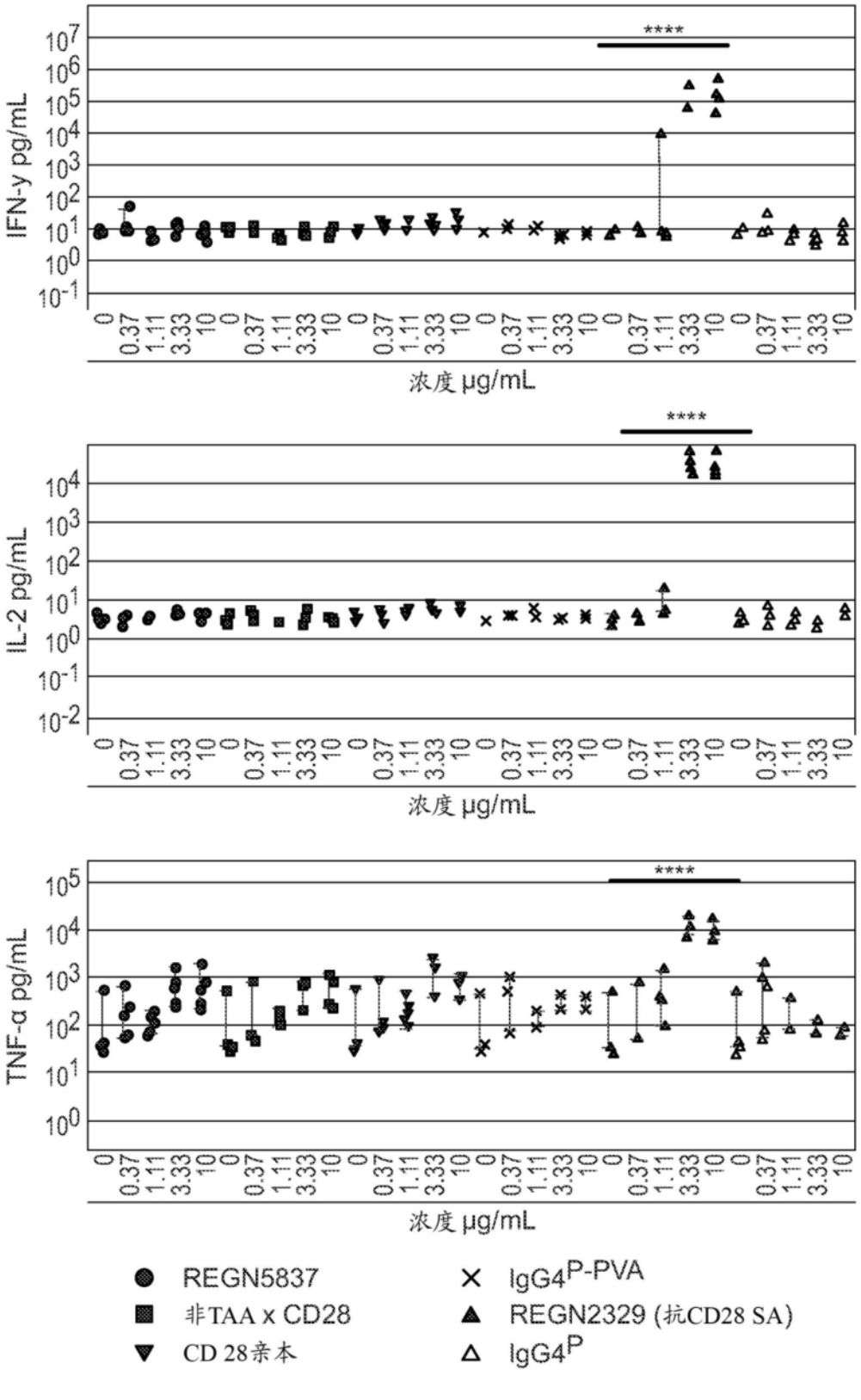
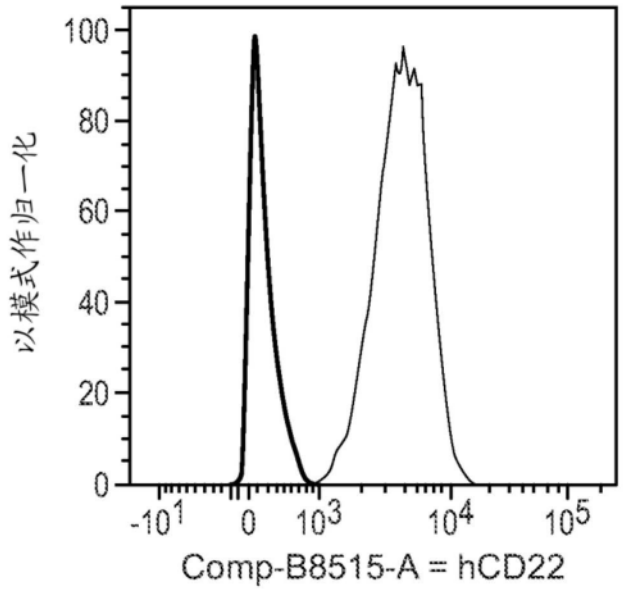
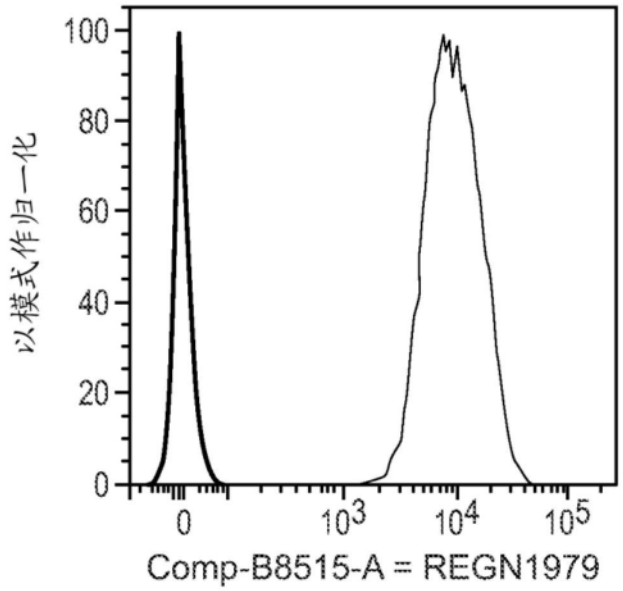

IFN-γ pg/mL
IL-2 pg/mL
TNF-α pg/mL
****
浓度 μg/mL
0
0.37
1.11
3.33
10
REGN5837
非TAA x CD28
CD 28亲本
IgG4P-PVA
REGN2329 (抗CD28 SA)
IgG4P

图9A



CD 22抗体结合能力
144,328



CD 20抗体结合能力
1,481,473

图9B

PBMC	细胞系	固定的奥尼妥单抗或对照浓度	细胞存活率		T细胞增殖			
					$CD4^+$ T细胞		$CD8^+$ T细胞	
			EC_{50} (M)	最大值%	EC_{50} (M)	最大值%	EC_{50} (M)	最大值%
人	NALM-6	15pM 奥尼妥单抗	$3.3x10^{-10}$	30	$1.02x10^{-9}$	40	$1.08x10^{-9}$	36
		15pM IgG4P-PVA	$2.94x10^{-10}$	53	ND	3.0	$3.30x10^{-10}$	9.3
	Raji CD80/CD86 DKO	15pM 奥尼妥单抗	$9.1x10^{-12}$	18	$3.40x10^{-11}$	81	$3.71x10^{-11}$	91
		15pM IgG4P-PVA	NC	55	$5.46x10^{-11}$	5.3	NC	13

图9C

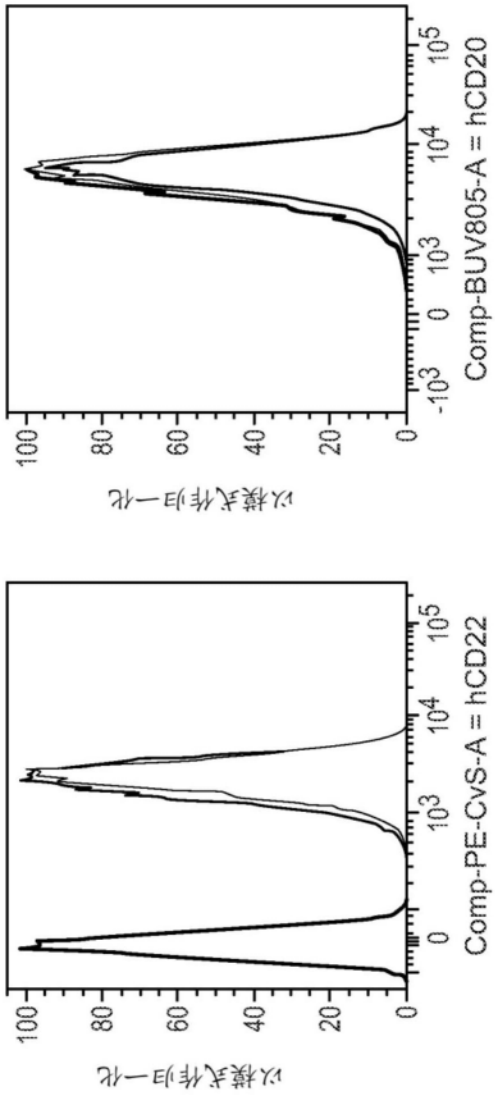


图9D

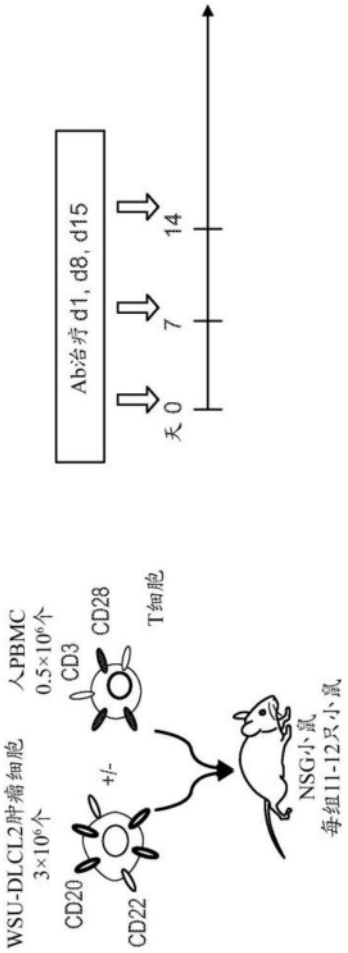

Ab治疗 d1, d8, d15
天 0
7
14
WSU-DLCL2肿瘤细胞
3×10⁶个
CD20
CD22
+/-
人PBMC
0.5×10⁶个
CD3
CD28
T细胞
NSG小鼠
每组11-12只小鼠

图10A

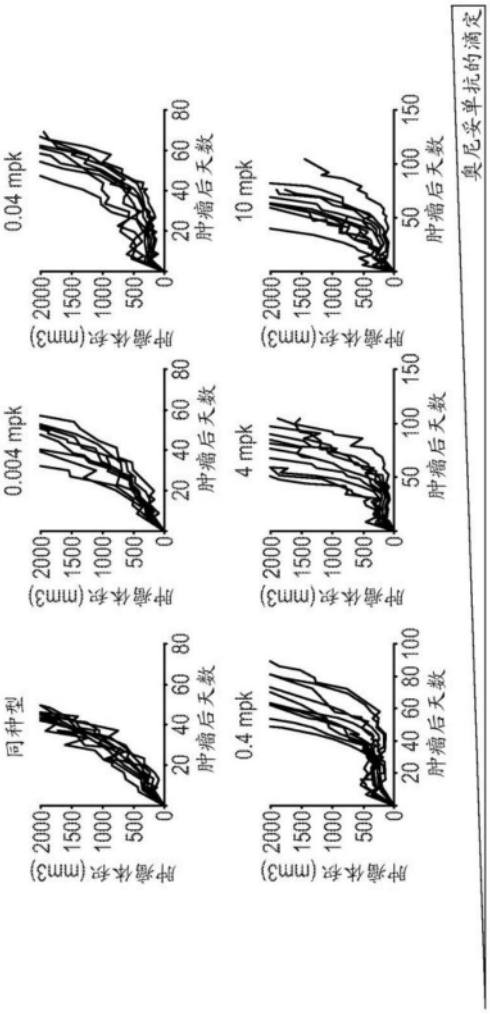

同种型
0.004 mpk
0.04 mpk
0.4 mpk
4 mpk
10 mpk
奥尼妥单抗的滴定
平均体积 (mm3)
肿瘤后天数

图10B

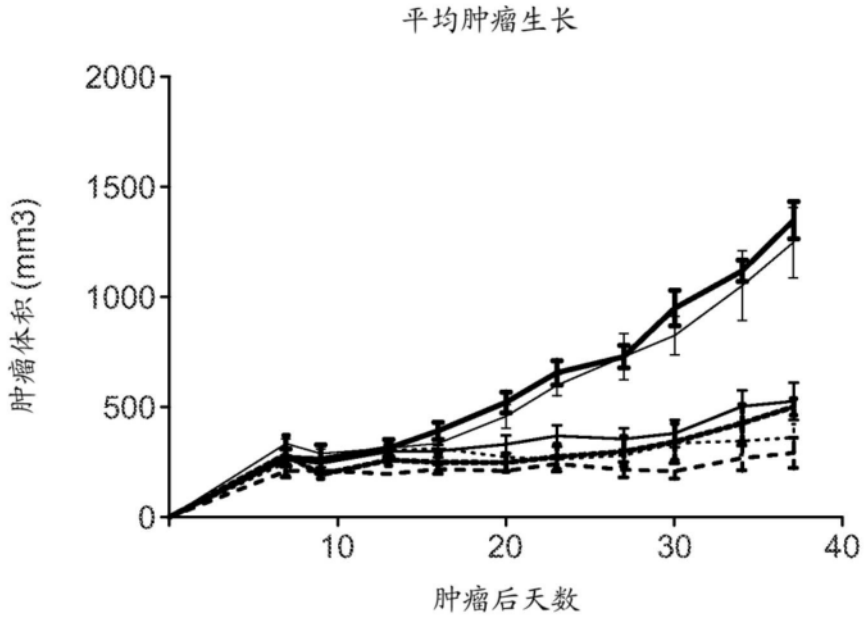

平均肿瘤生长
肿瘤体积(mm3)
2000
1500
1000
500
0
10
20
30
40
肿瘤后天数

图10C

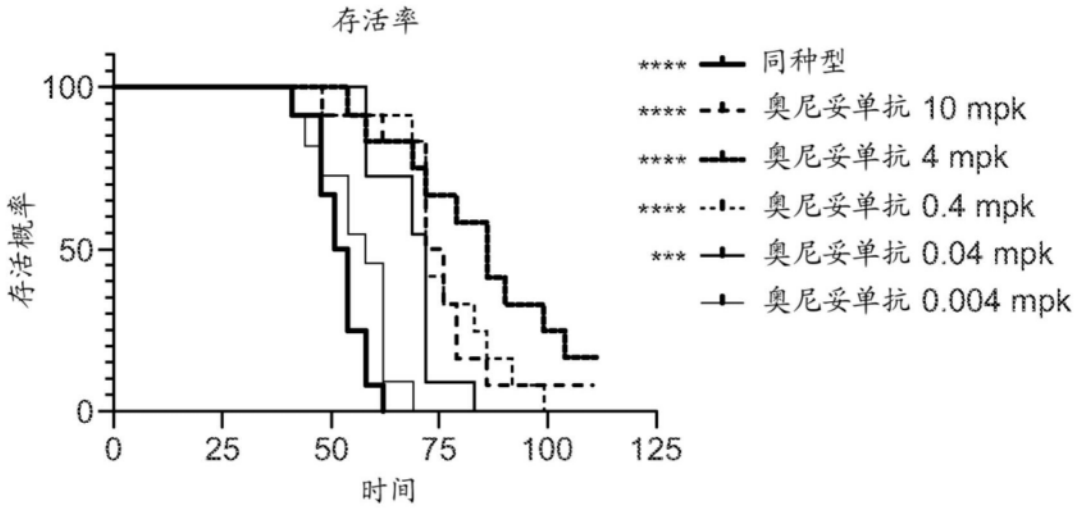

存活率
存活概率
100
50
0
0
25
50
75
100
125
时间
**** 同种型
**** 奥尼妥单抗 10 mpk
**** 奥尼妥单抗 4 mpk
**** 奥尼妥单抗 0.4 mpk
*** 奥尼妥单抗 0.04 mpk
奥尼妥单抗 0.004 mpk

图10D

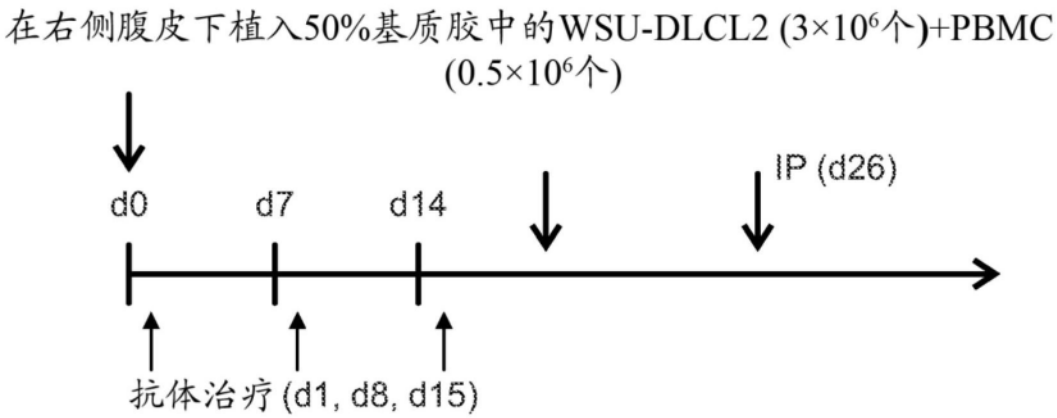

在右侧腹皮下植入50%基质胶中的WSU-DLCL2 (3×10⁶个)+PBMC (0.5×10⁶个)
d0
d7
d14
IP (d26)
抗体治疗 (d1, d8, d15)

图11A

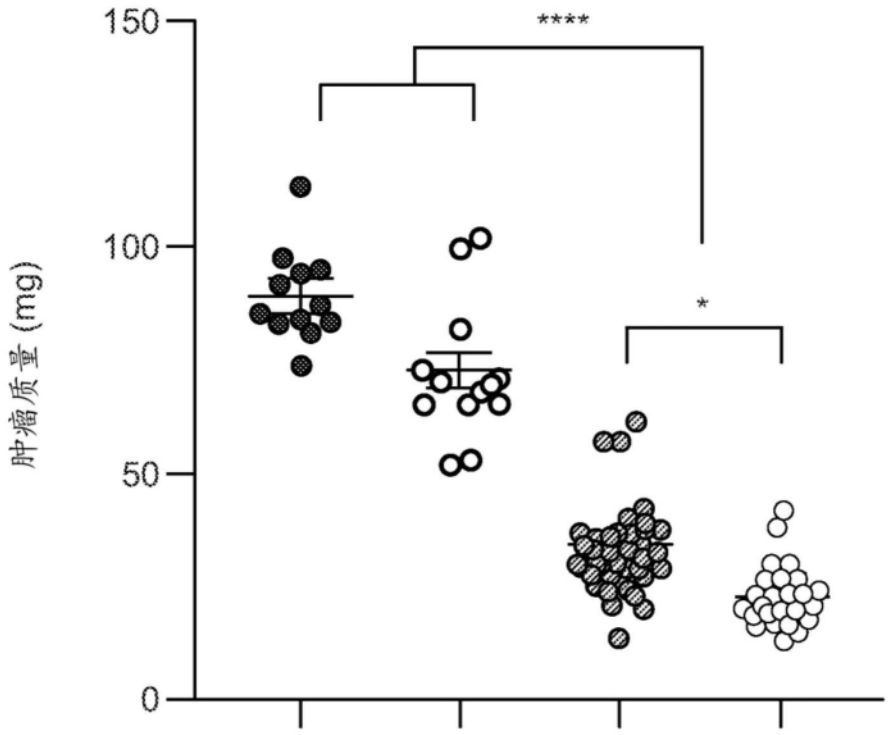

150
100
50
0
肿瘤质量 (mg)
****
*

图11B

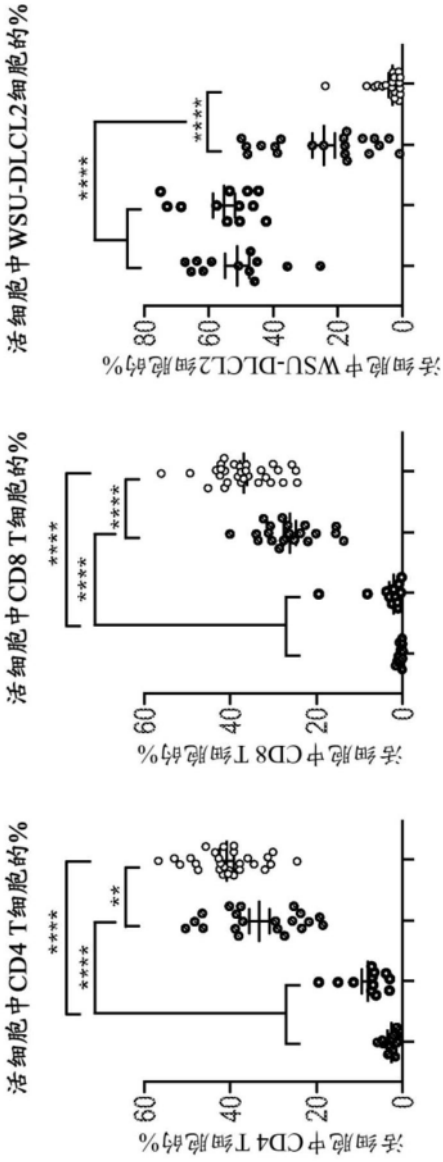

活细胞中CD4 T细胞的%
活细胞中CD4 T细胞的%
活细胞中CD8 T细胞的%
活细胞中CD8 T细胞的%
活细胞中WSU-DLCL2细胞的%
活细胞中WSU-DLCL2细胞的%

图11C

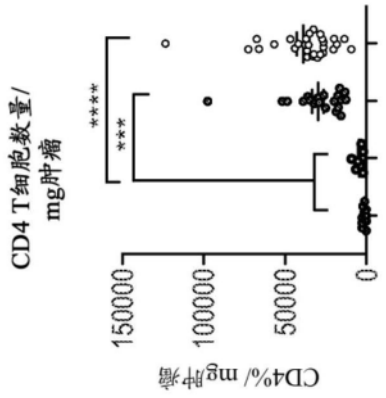

CD4 T细胞数量/mg肿瘤
CD4%/ mg肿瘤

图11D

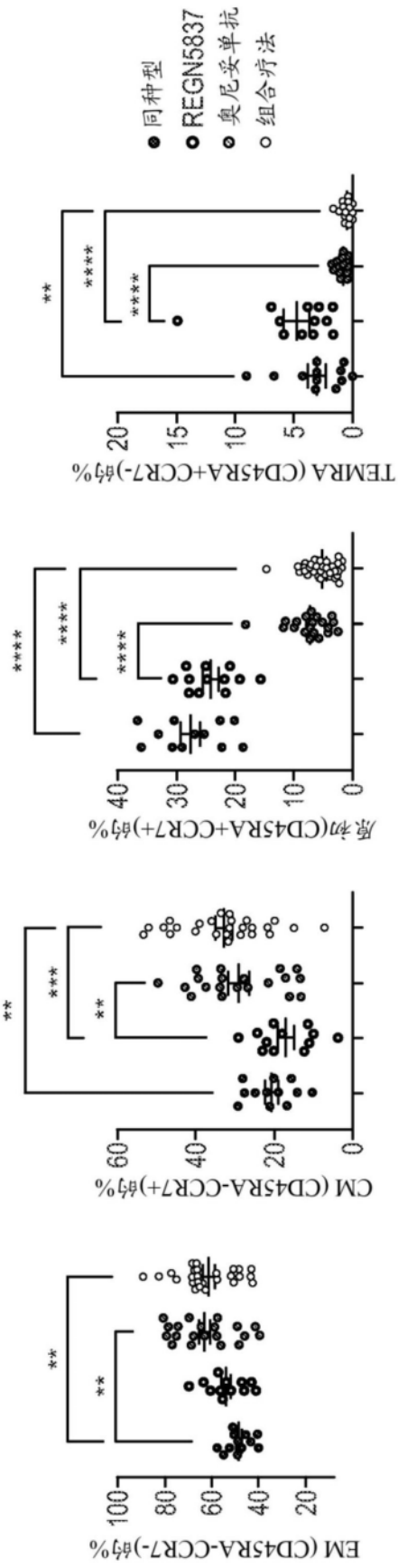

同种型
REGN5837
奥尼妥单抗
组合疗法
TEMRA (CD45RA+CCR7-)的%
原初(CD45RA+CCR7+)的%
CM (CD45RA-CCR7+)的%
EM (CD45RA-CCR7-)的%

图11E

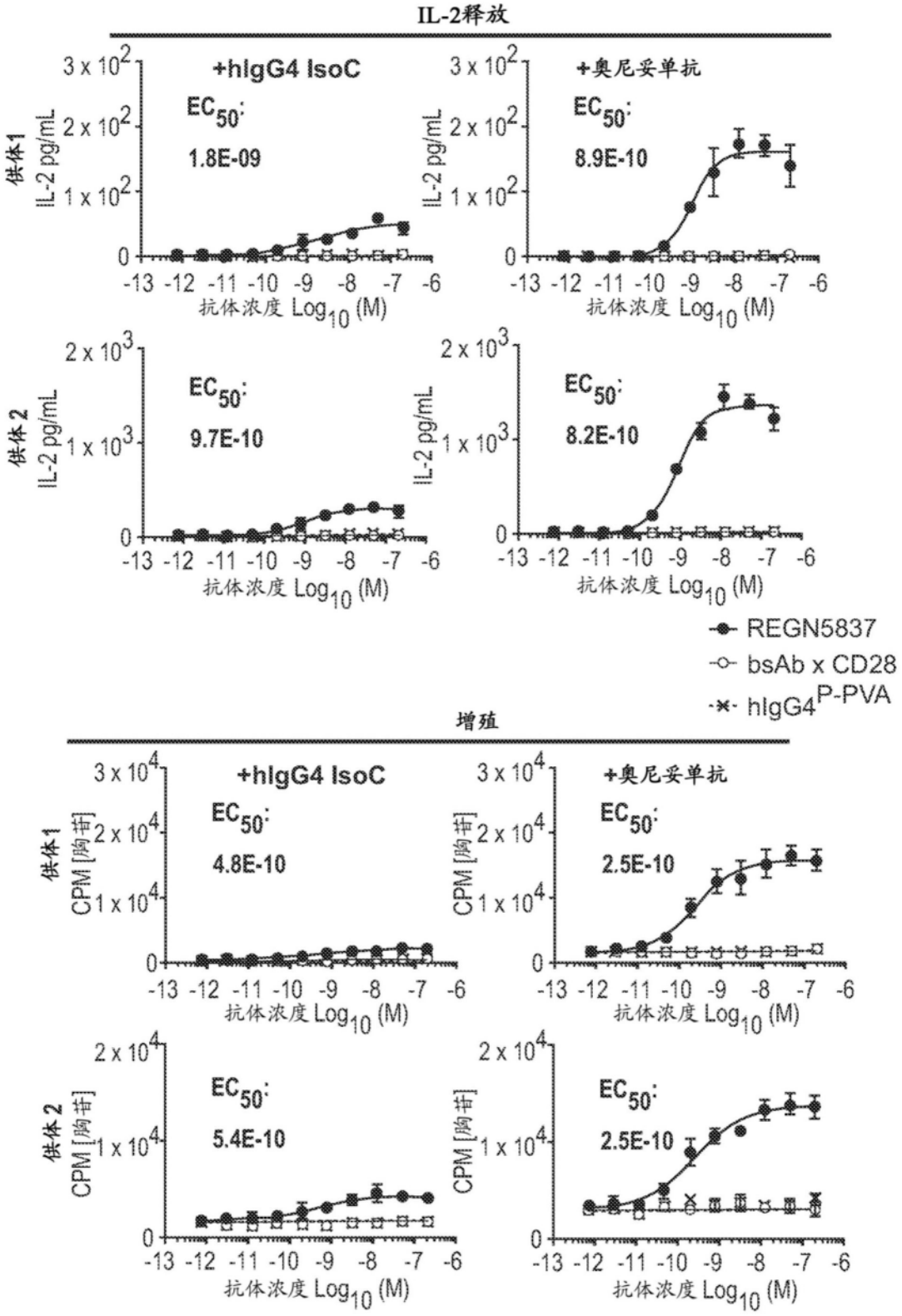

IL-2释放
+hIgG4 IsoC
EC50:
1.8E-09
+奥尼妥单抗
EC50:
8.9E-10
EC50:
9.7E-10
EC50:
8.2E-10
供体1
供体2
IL-2 pg/mL
抗体浓度 Log10 (M)
REGN5837
bsAb x CD28
hIgG4P-PVA
增殖
+hIgG4 IsoC
EC50:
4.8E-10
+奥尼妥单抗
EC50:
2.5E-10
EC50:
5.4E-10
EC50:
2.5E-10
CPM [胸苷]

图12A

靶细胞系	供体	固定浓度的抗体[a]	来自人原代T细胞的IL2释放		T细胞增殖	
			REGN5837 EC50 (M)[b]	增强倍数 (IL2)[c]	REGN5837 EC50 (M)[b]	增强倍数 (增殖)[c]
NALM-6	供体1	奥尼妥单抗	$8.9x10^{-10}$	85.2	$2.5x10^{-10}$	9.3
		$IgG4^{P}$-PVA	$1.8x10^{-9}$	12.1	$4.8x10^{-10}$	3.1
	供体2	奥尼妥单抗	$8.2x10^{-10}$	48.7	$2.5x10^{-10}$	3.5
		$IgG4^{P}$-PVA	$9.7x10^{-10}$	6.9	$5.4x10^{-10}$	2.9

图12B

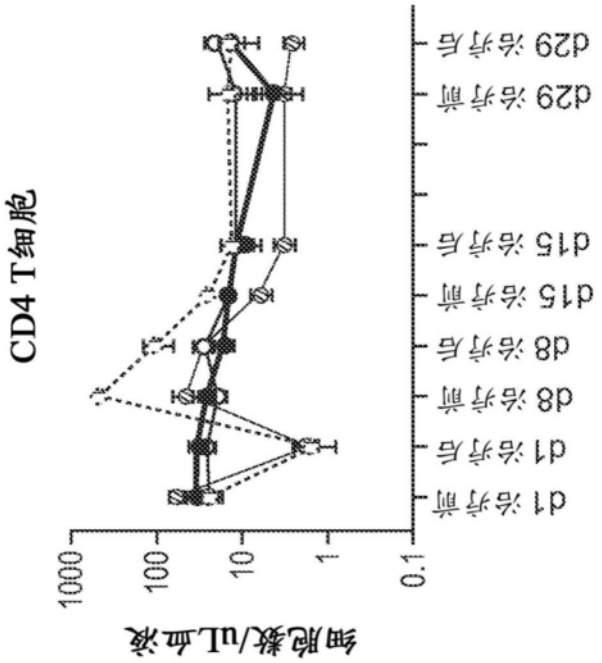

CD4 T细胞
细胞数/uL血液
1000
100
10
1
0.1
d1 治疗前
d1 治疗后
d8 治疗前
d8 治疗后
d15 治疗前
d15 治疗后
d29 治疗前
d29 治疗后

图13A

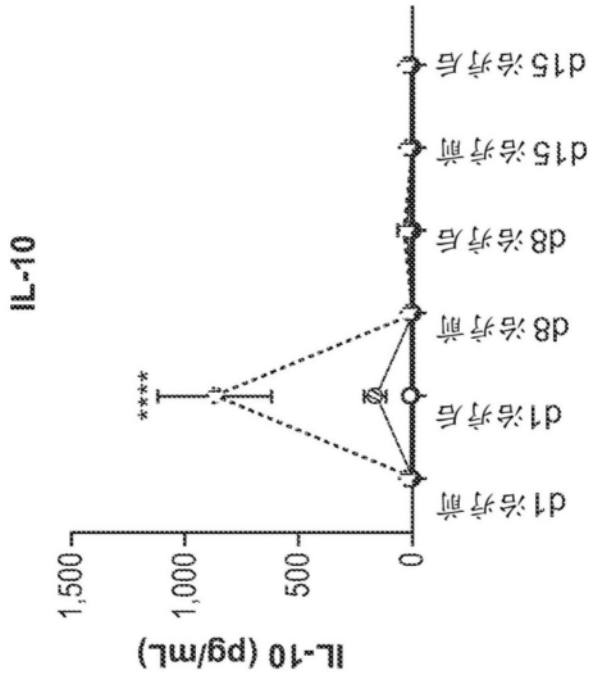

IL-10
IL-10 (pg/mL)
1,500
1,000
500
0
****
d1 治疗前
d1 治疗后
d8 治疗前
d8 治疗后
d15 治疗前
d15 治疗后

图13B

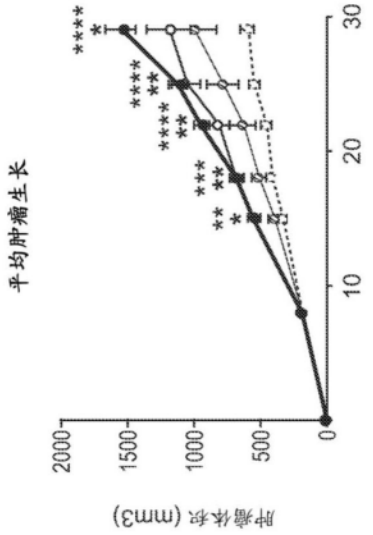

平均肿瘤生长
平均肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
10
20
30

图13C

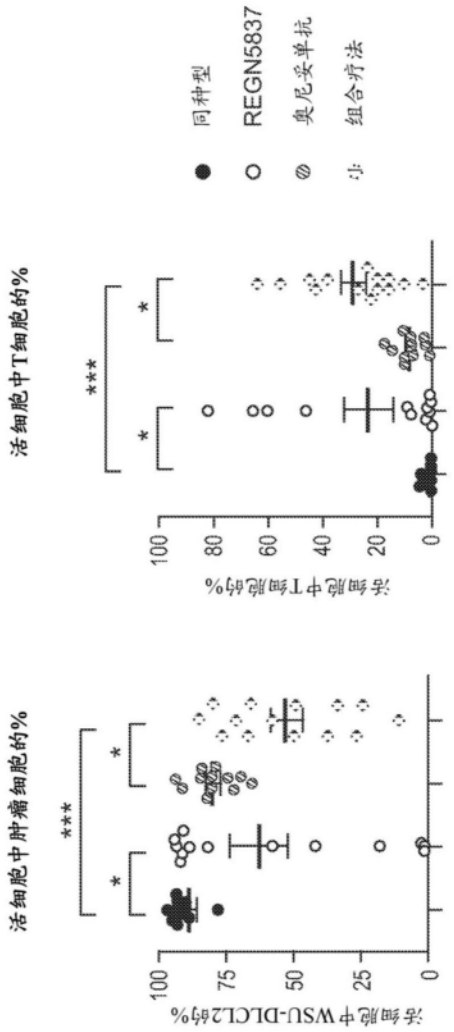

同种型
REGN5837
奥尼妥单抗
组合疗法
活细胞中肿瘤细胞的%
活细胞中WSU-DLCL2的%
活细胞中T细胞的%
活细胞中T细胞的%

图13D

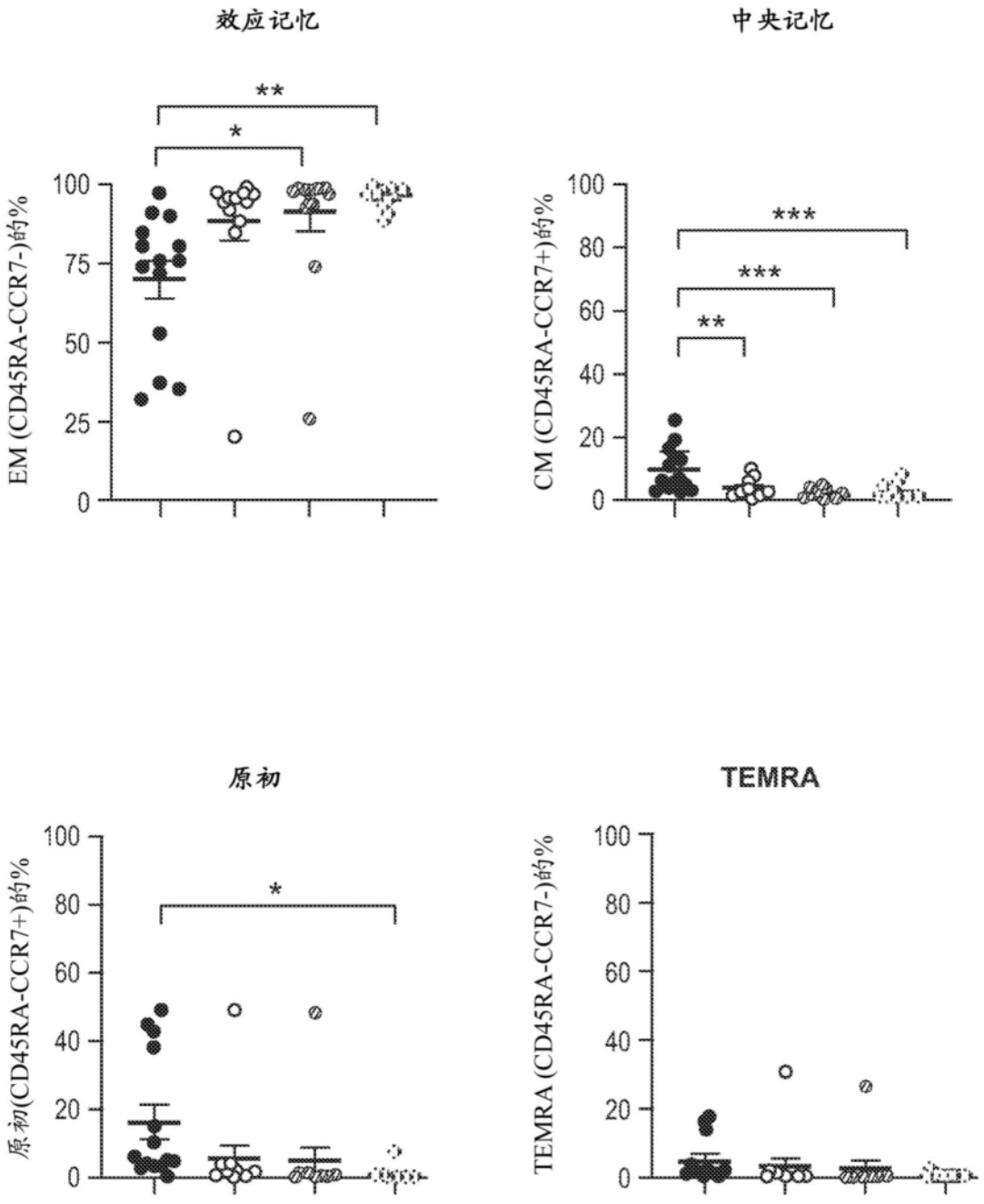

效应记忆
EM (CD45RA-CCR7-)的%
100
75
50
25
0
**
*
中央记忆
CM (CD45RA-CCR7+)的%
100
80
60
40
20
0
***
***
**
原初
原初(CD45RA-CCR7+)的%
100
80
60
40
20
0
*
TEMRA
TEMRA (CD45RA-CCR7-)的%
100
80
60
40
20
0

图13E

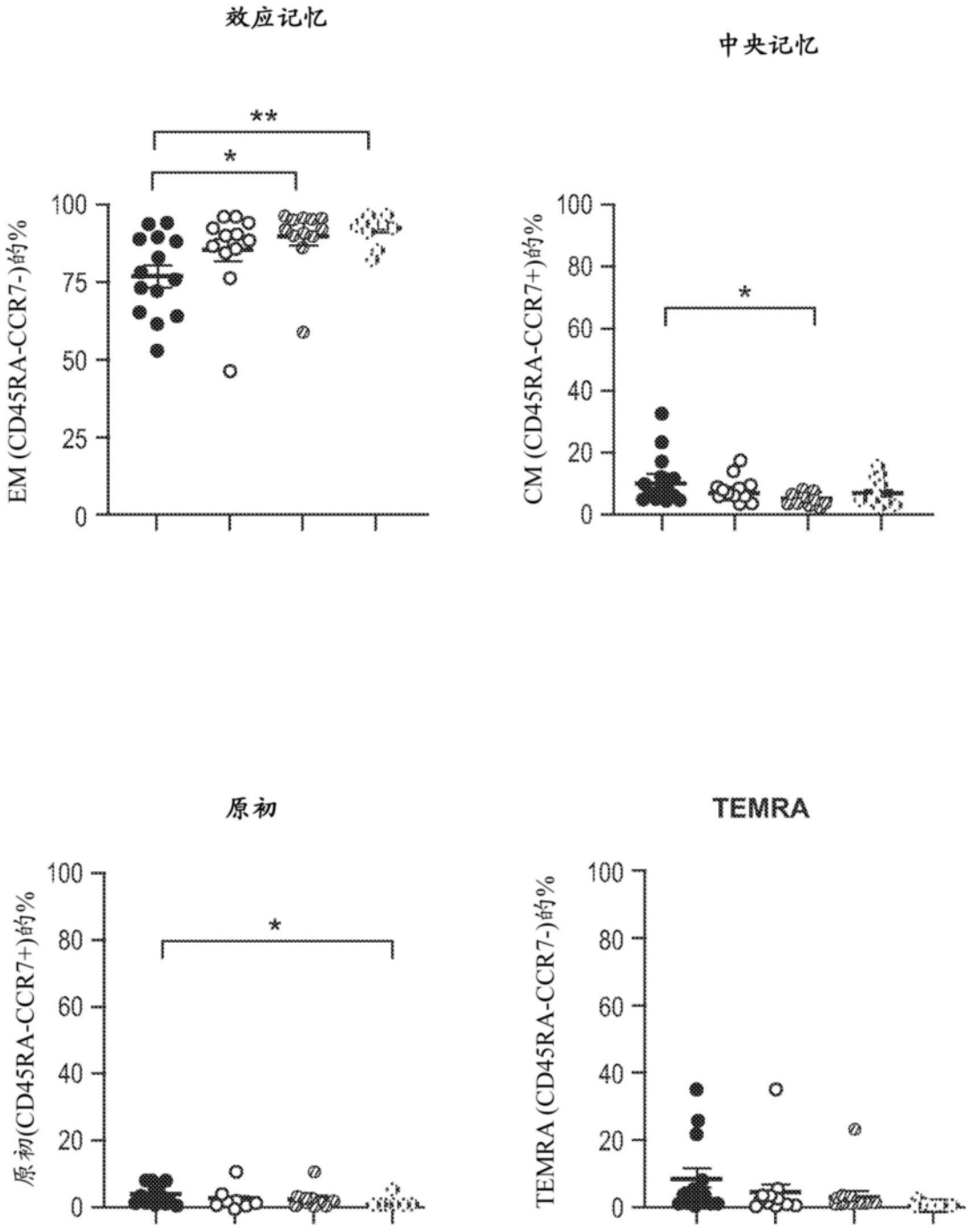

效应记忆
EM (CD45RA-CCR7-)的%
100
75
50
25
0
**
*
中央记忆
CM (CD45RA-CCR7+)的%
100
80
60
40
20
0
*
原初
原初(CD45RA-CCR7+)的%
100
80
60
40
20
0
*
TEMRA
TEMRA (CD45RA-CCR7-)的%
100
80
60
40
20
0

图13F

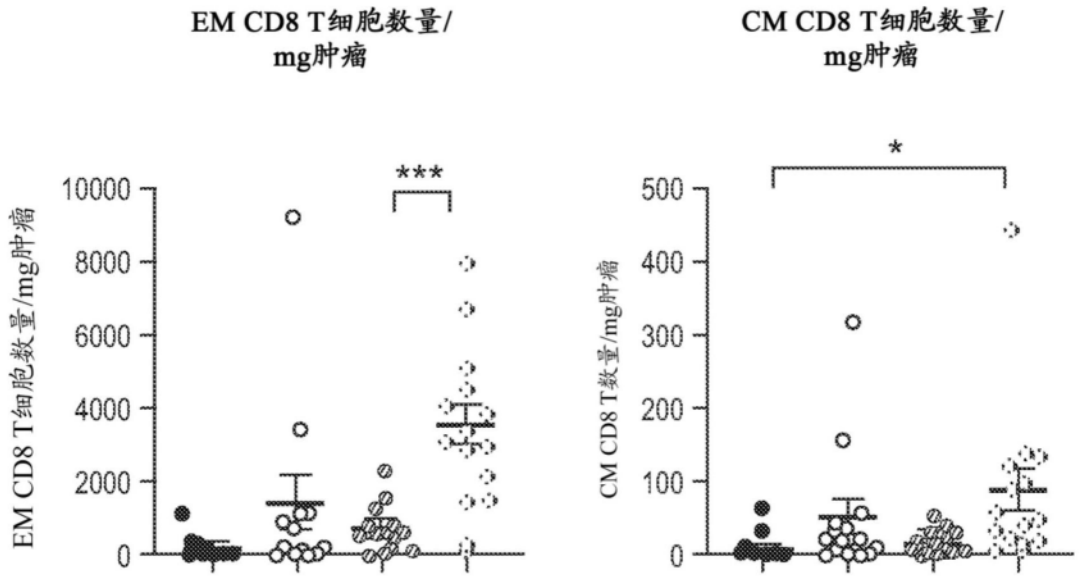

EM CD8 T细胞数量/
mg肿瘤
EM CD8 T细胞数量/mg肿瘤
10000
8000
6000
4000
2000
0
***
CM CD8 T细胞数量/
mg肿瘤
CM CD8 T数量/mg肿瘤
500
400
300
200
100
0
*

图13G

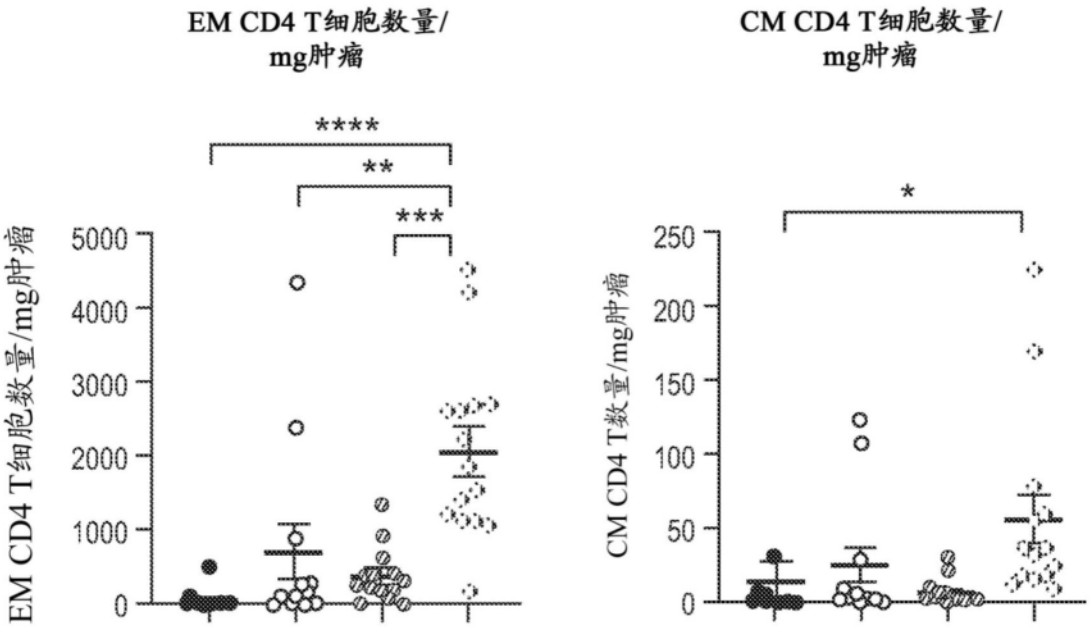

EM CD4 T细胞数量/
mg肿瘤
EM CD4 T细胞数量/mg肿瘤
5000
4000
3000
2000
1000
0
****
**
***
CM CD4 T细胞数量/
mg肿瘤
CM CD4 T数量/mg肿瘤
250
200
150
100
50
0
*

图13H

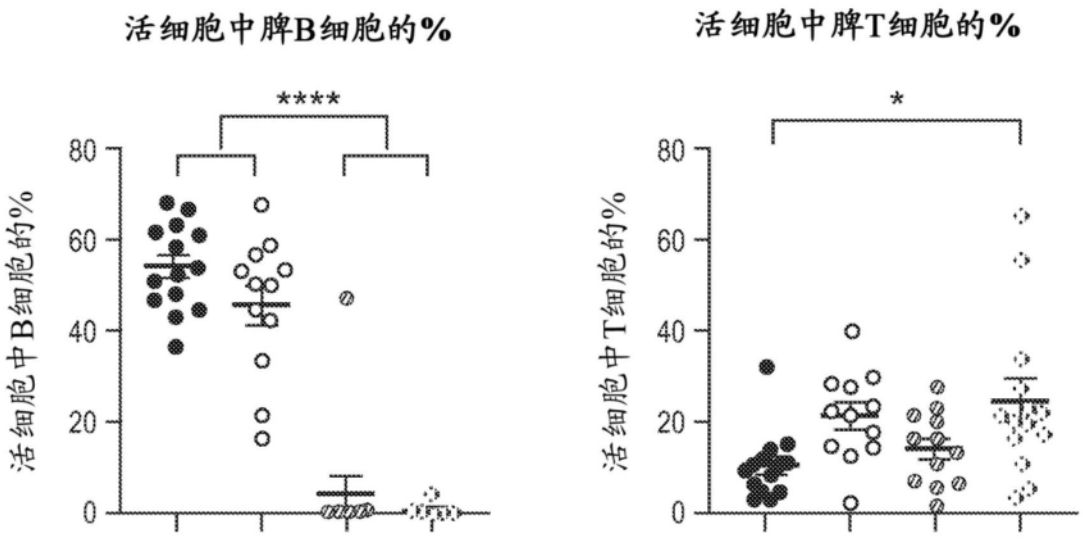

活细胞中脾B细胞的%
****
活细胞中B细胞的%
80
60
40
20
0
活细胞中脾T细胞的%
*
活细胞中T细胞的%
80
60
40
20
0

图14A

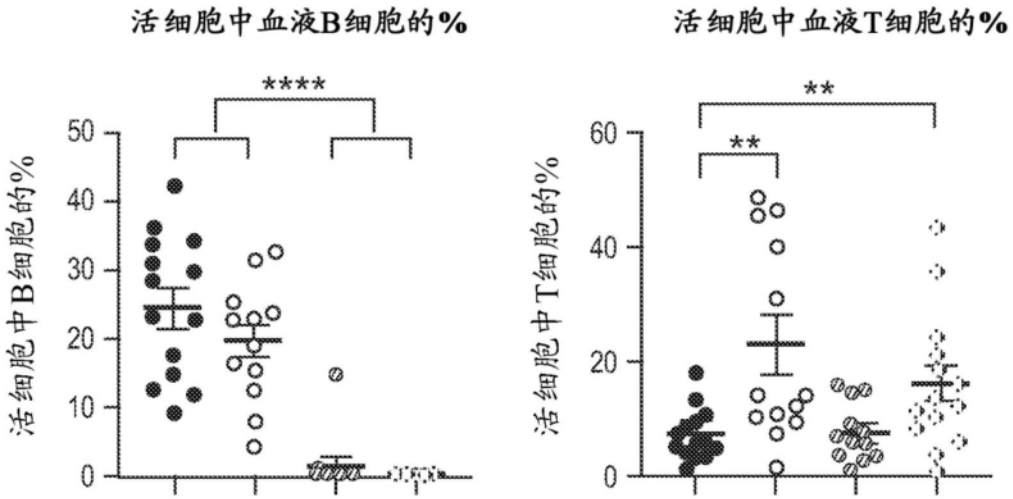

活细胞中血液B细胞的%
****
活细胞中B细胞的%
50
40
30
20
10
0
活细胞中血液T细胞的%
**
**
活细胞中T细胞的%
60
40
20
0

图14B

脾淋巴细胞亚组

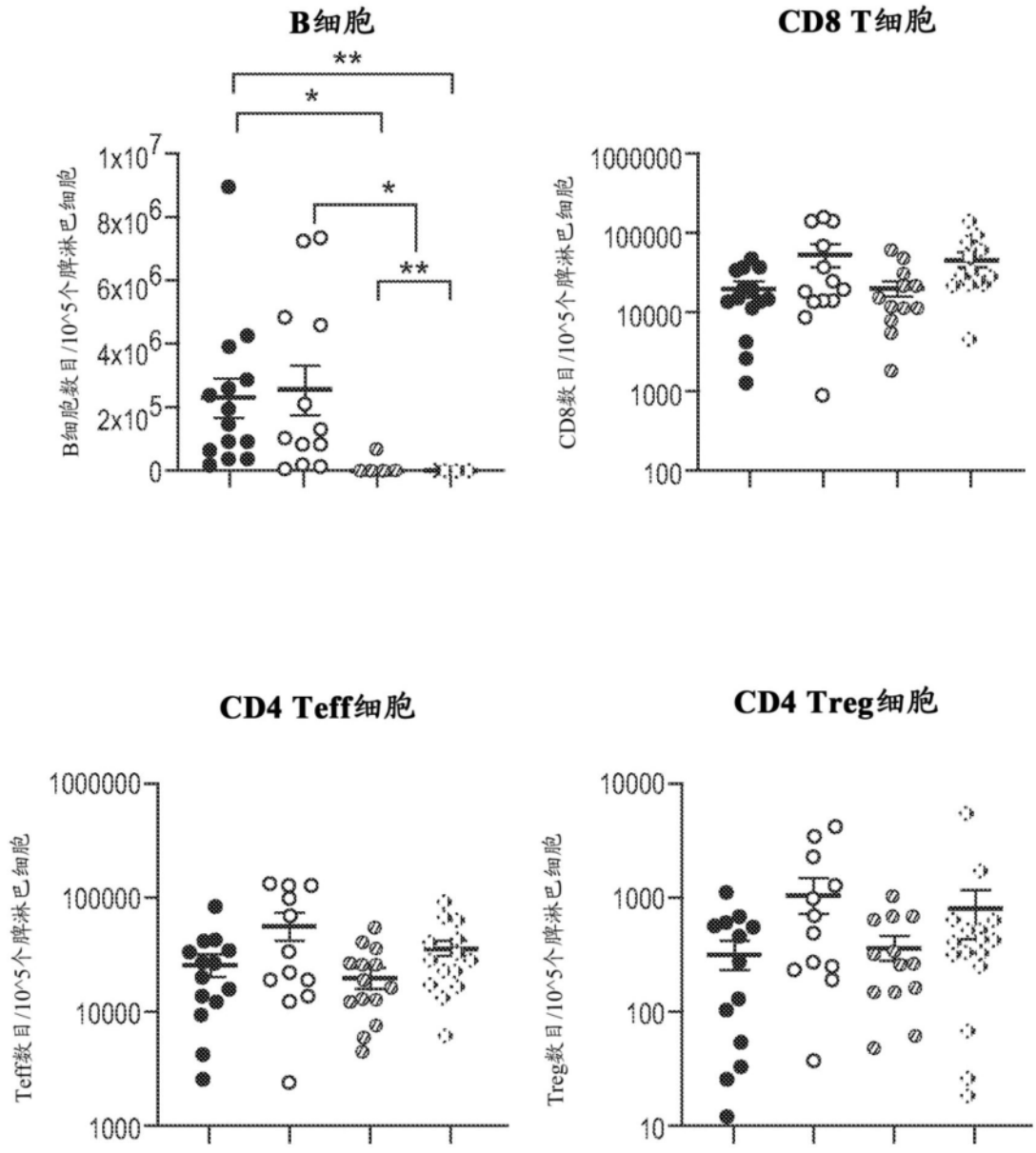


图14C

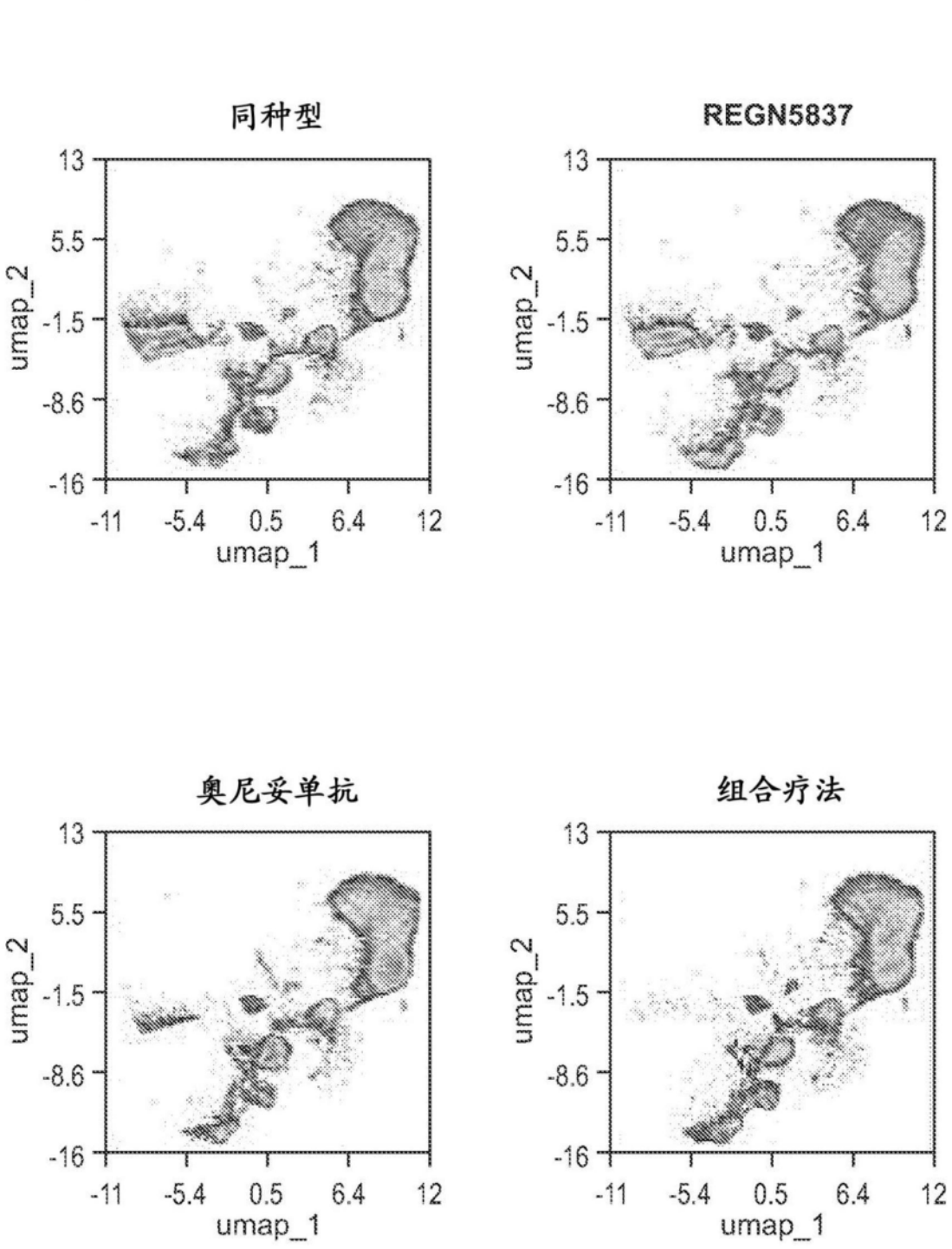

所有活血液细胞
同种型
REGN5837
奥尼妥单抗
组合疗法
umap_2
umap_1
13
5.5
-1.5
-8.6
-16
-11
-5.4
0.5
6.4
12

图14D

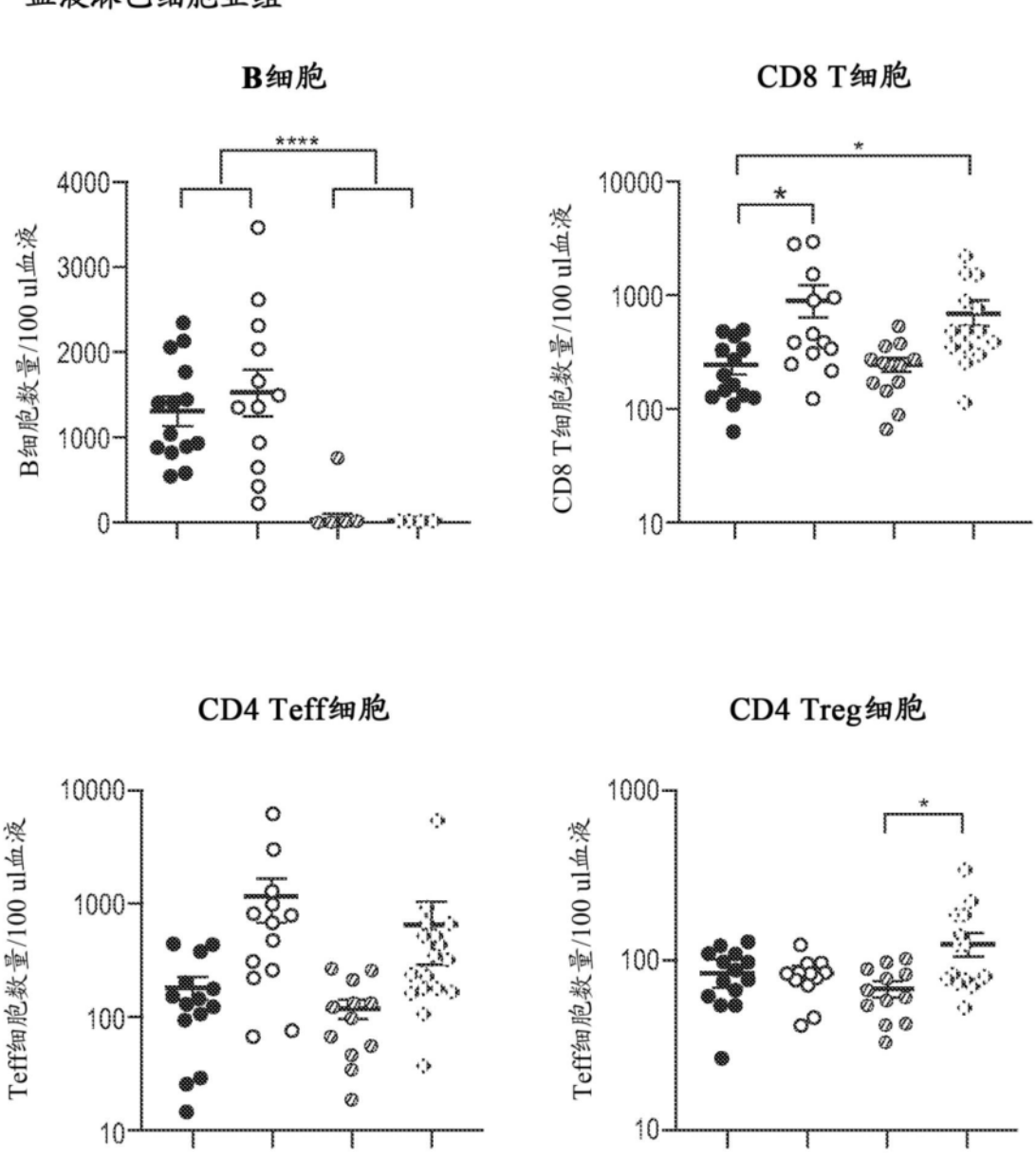

血液淋巴细胞亚组
B细胞
B细胞数量/100 ul血液
4000
3000
2000
1000
0
****
CD8 T细胞
CD8 T细胞数量/100 ul血液
10000
1000
100
10
*
*
CD4 Teff细胞
Teff细胞数量/100 ul血液
10000
1000
100
10
CD4 Treg细胞
Teff细胞数量/100 ul血液
1000
100
10
*

图14E

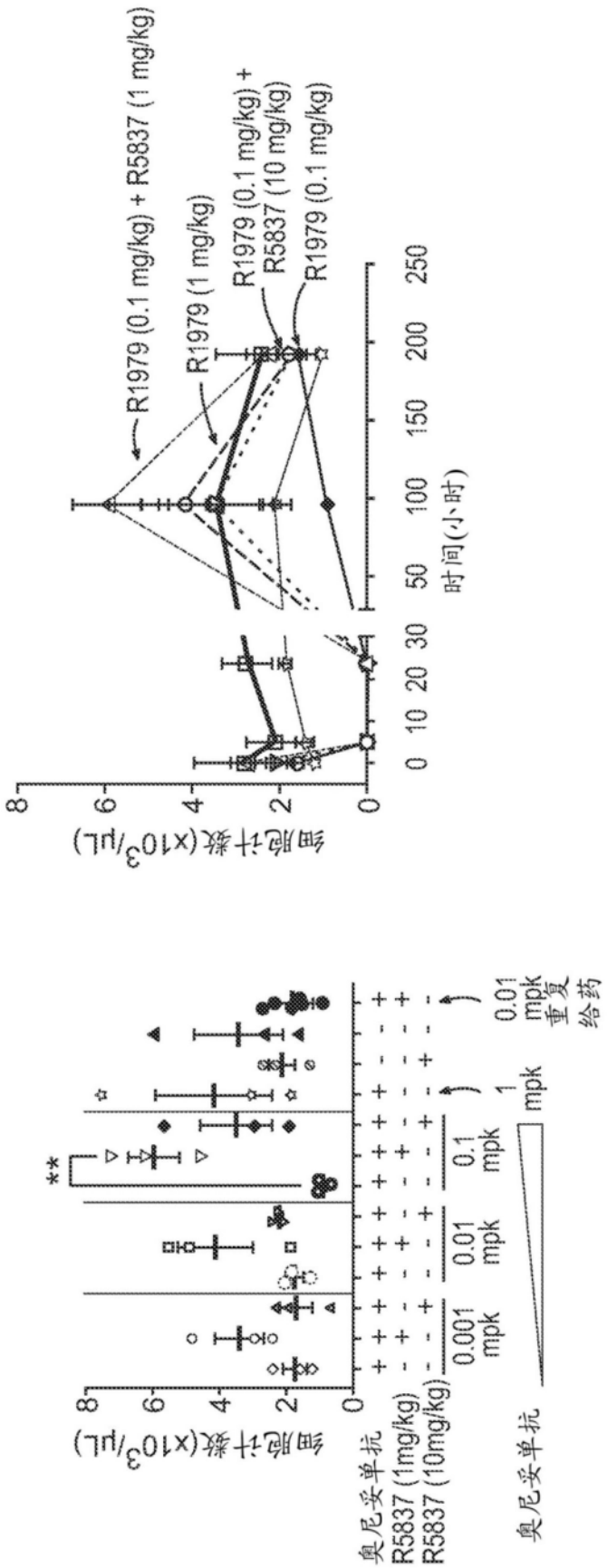

R1979 (0.1 mg/kg) + R5837 (1 mg/kg)
R1979 (1 mg/kg)
R1979 (0.1 mg/kg) + R5837 (10 mg/kg)
R1979 (0.1 mg/kg)
细胞计数(x10³/μL)
时间(小时)
0 10 20 30 50 100 150 200 250
0 2 4 6 8
**
奥尼妥单抗
R5837 (1mg/kg)
R5837 (10mg/kg)
0.001 mpk
0.01 mpk
0.1 mpk
1 mpk
0.01 mpk 重复给药

图15A

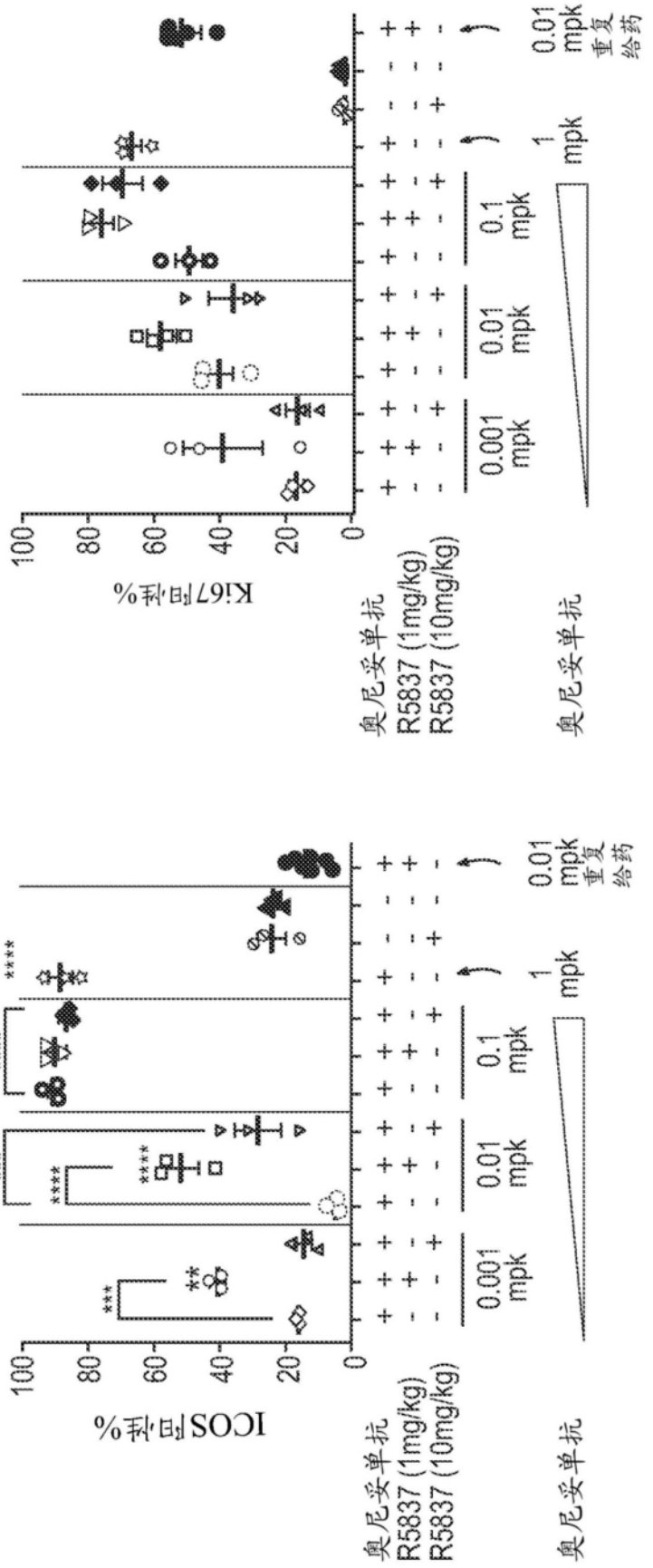

Ki67阳性%
ICOS阳性%
奥尼妥单抗
R5837 (1mg/kg)
R5837 (10mg/kg)
0.001 mpk
0.01 mpk
0.1 mpk
1 mpk
0.01 mpk 重复给药

图15B

在DLBCL患者样品中CD22表达比CD20表达更可变
%B细胞中的阳性细胞
150
100
50
0
%CD20
%CD22
%CD19
%CD79b
%PAX5
CD22×CD28共刺激可双特异性促进CD20 CD22癌细胞的旁观者细胞杀伤吗?

图16

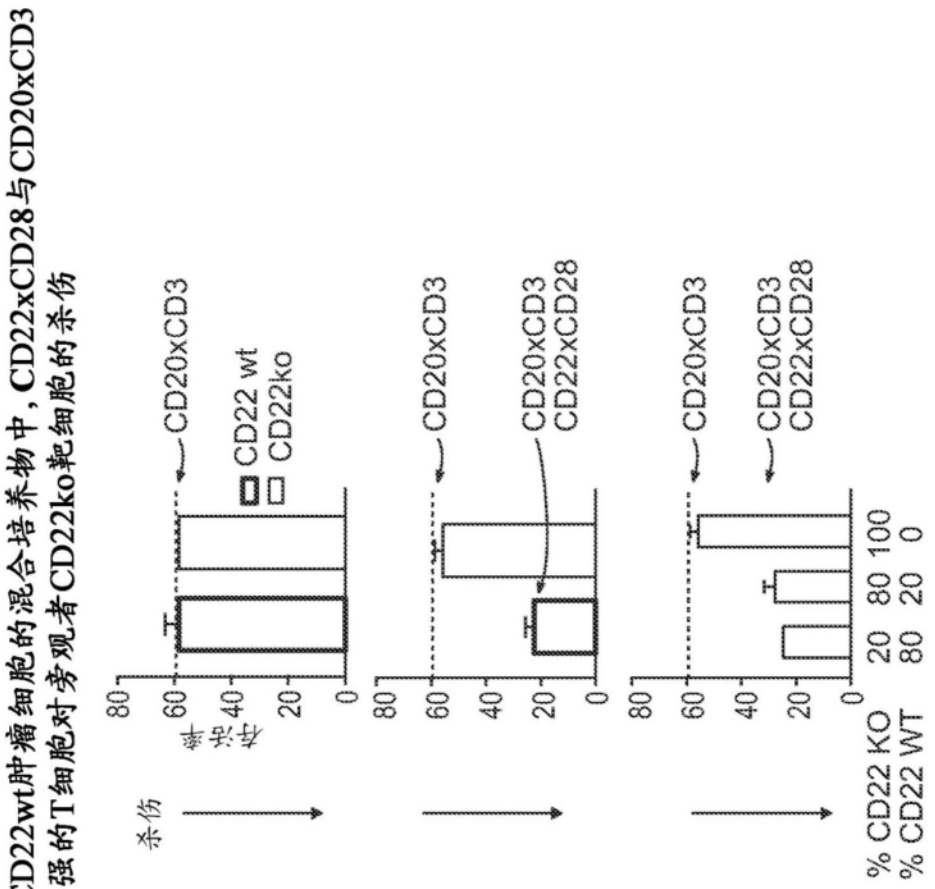

在CD22ko和CD22wt肿瘤细胞的混合培养物中，CD22xCD28与CD20xCD3组合可介导增强的T细胞对旁观者CD22ko靶细胞的杀伤
杀伤
特异性
CD20xCD3
CD22 wt
CD22ko
CD20xCD3
CD20xCD3
CD22xCD28
CD20xCD3
CD20xCD3
CD22xCD28
80
60
40
20
0
% CD22 KO 20 80 100
% CD22 WT 80 20 0

图17

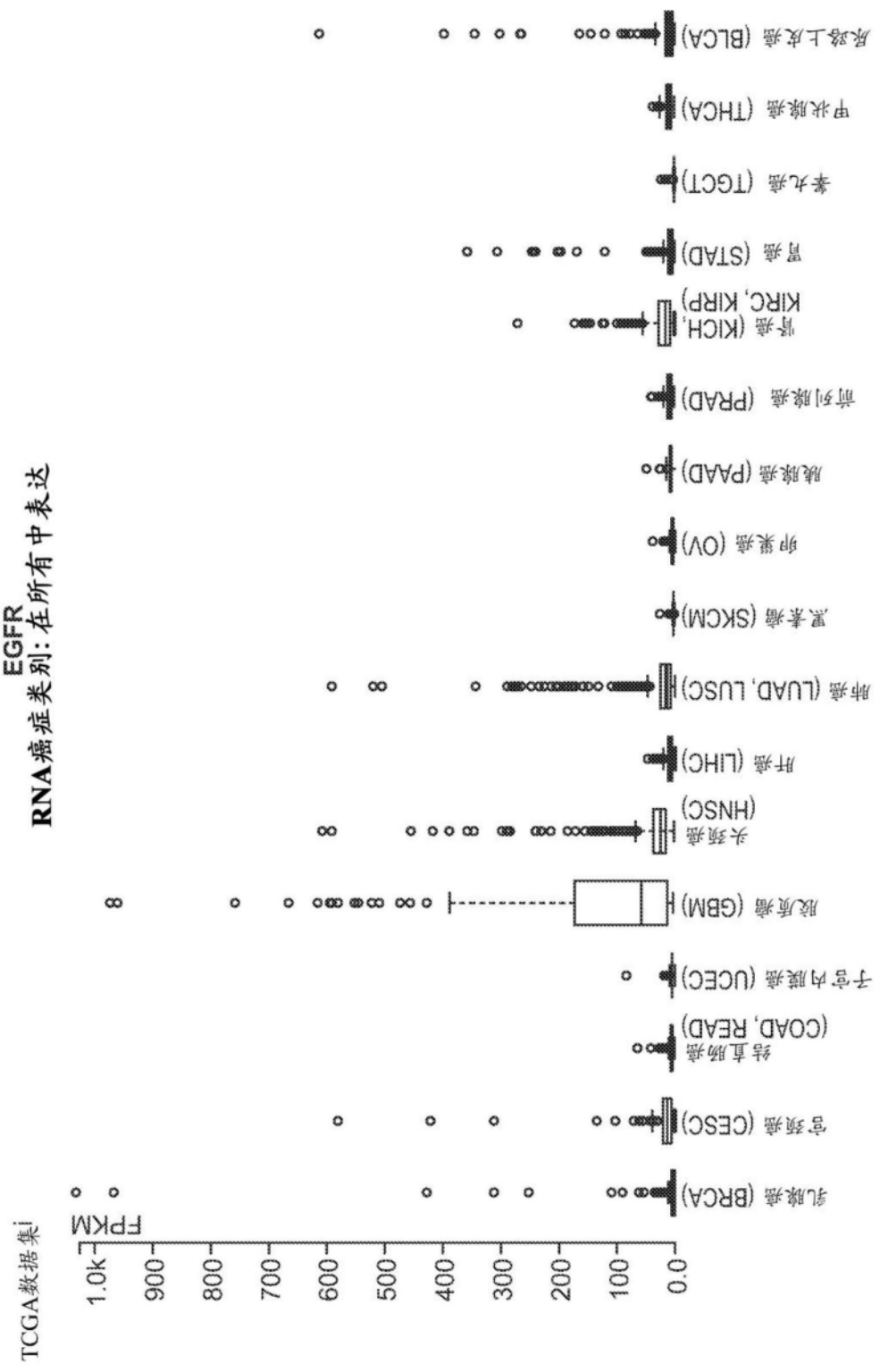

EGFR
RNA癌症类别：在所有中表达
TCGA数据集
TPKM
1.0k
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.0
乳腺癌 (BRCA)
宫颈癌 (CESC)
结直肠癌 (COAD, READ)
子宫内膜癌 (UCEC)
胶质瘤 (GBM)
头颈癌 (HNSC)
肝癌 (LIHC)
肺癌 (LUAD, LUSC)
黑素瘤 (SKCM)
卵巢癌 (OV)
胰腺癌 (PAAD)
前列腺癌 (PRAD)
肾癌 (KICH, KIRC, KIRP)
胃癌 (STAD)
睾丸癌 (TGCT)
甲状腺癌 (THCA)
尿路上皮癌 (BLCA)

图18

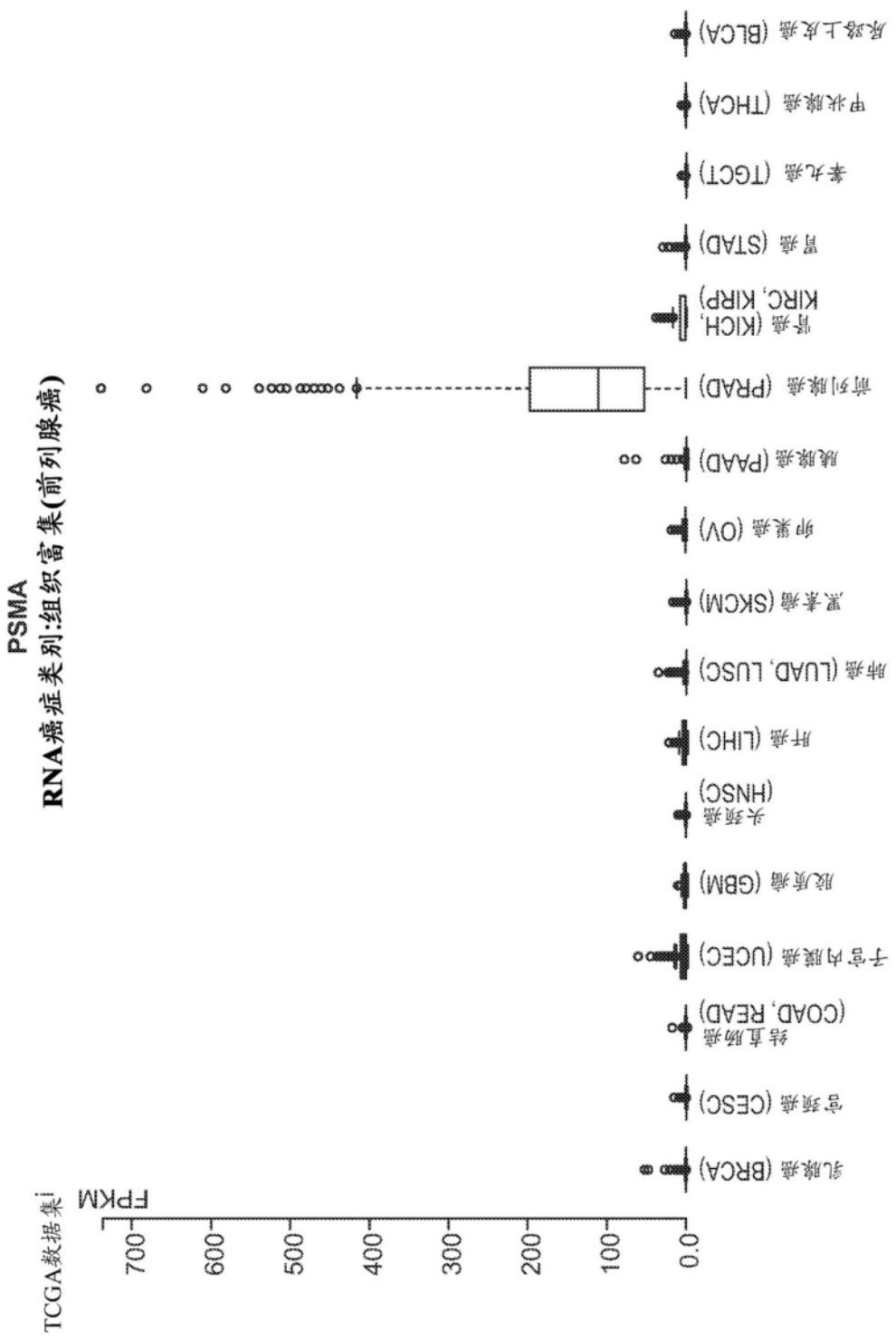

PSMA
RNA癌症类别:组织富集(前列腺癌)
TCGA数据集
FPKM
700
600
500
400
300
200
100
0.0
乳腺癌 (BRCA)
宫颈癌 (CESC)
结直肠癌 (COAD, READ)
子宫内膜癌 (UCEC)
胶质瘤 (GBM)
头颈癌 (HNSC)
肝癌 (LIHC)
肺癌 (LUAD, LUSC)
黑素瘤 (SKCM)
卵巢癌 (OV)
胰腺癌 (PAAD)
前列腺癌 (PRAD)
肾癌 (KICH, KIRC, KIRP)
胃癌 (STAD)
睾丸癌 (TGCT)
甲状腺癌 (THCA)
尿路上皮癌 (BLCA)

图19

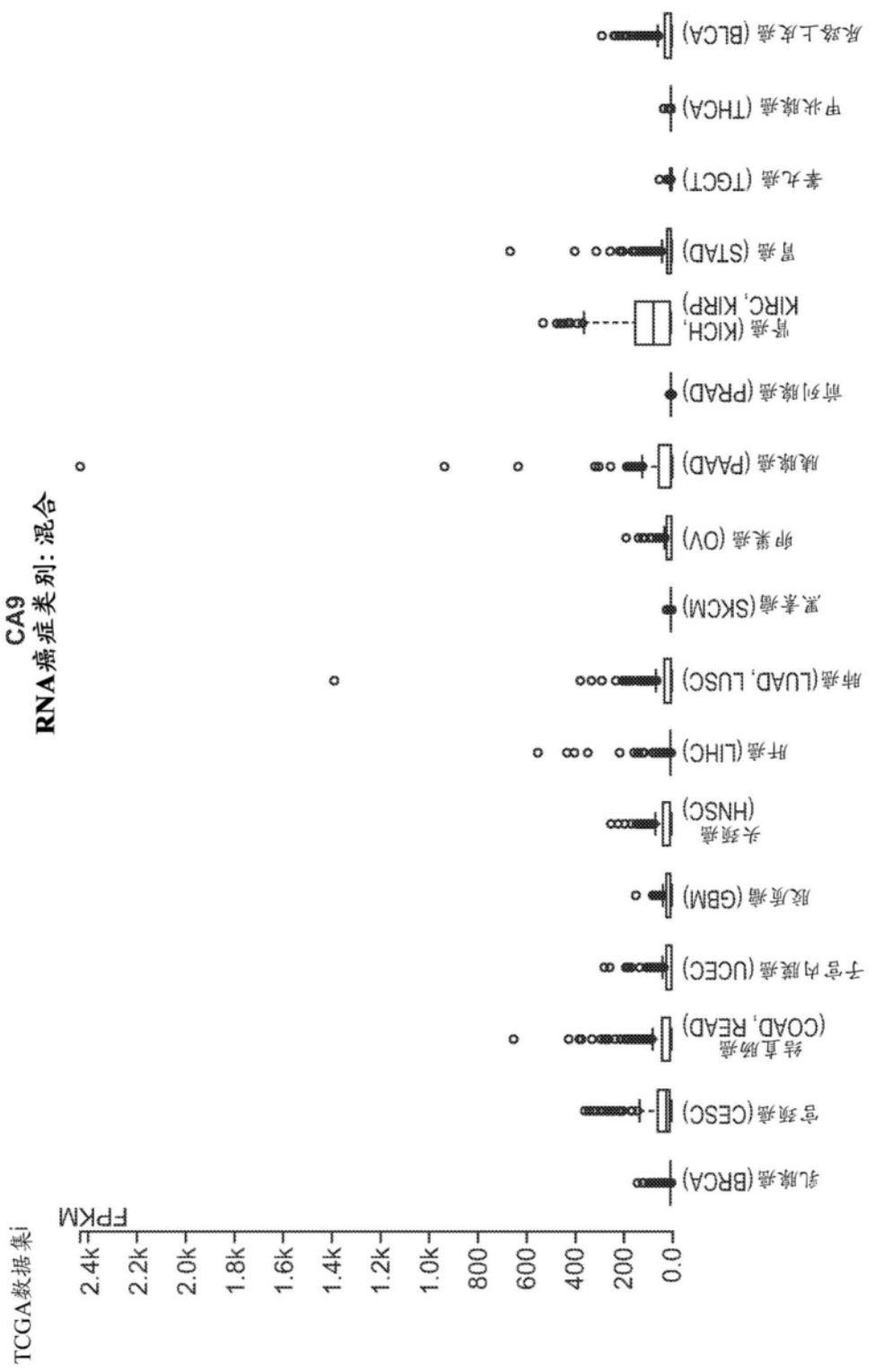

CA9
RNA癌症类别：混合
TCGA数据集
FPKM
2.4k
2.2k
2.0k
1.8k
1.6k
1.4k
1.2k
1.0k
800
600
400
200
0.0
乳腺癌(BRCA)
宫颈癌(CESC)
结直肠癌(COAD, READ)
子宫内膜癌(UCEC)
胶质瘤(GBM)
头颈癌(HNSC)
肝癌(LIHC)
肺癌(LUAD, LUSC)
黑素瘤(SKCM)
卵巢癌(OV)
胰腺癌(PAAD)
前列腺癌(PRAD)
肾癌(KICH, KIRC, KIRP)
胃癌(STAD)
睾丸癌(TGCT)
甲状腺癌(THCA)
尿路上皮癌(BLCA)

图20

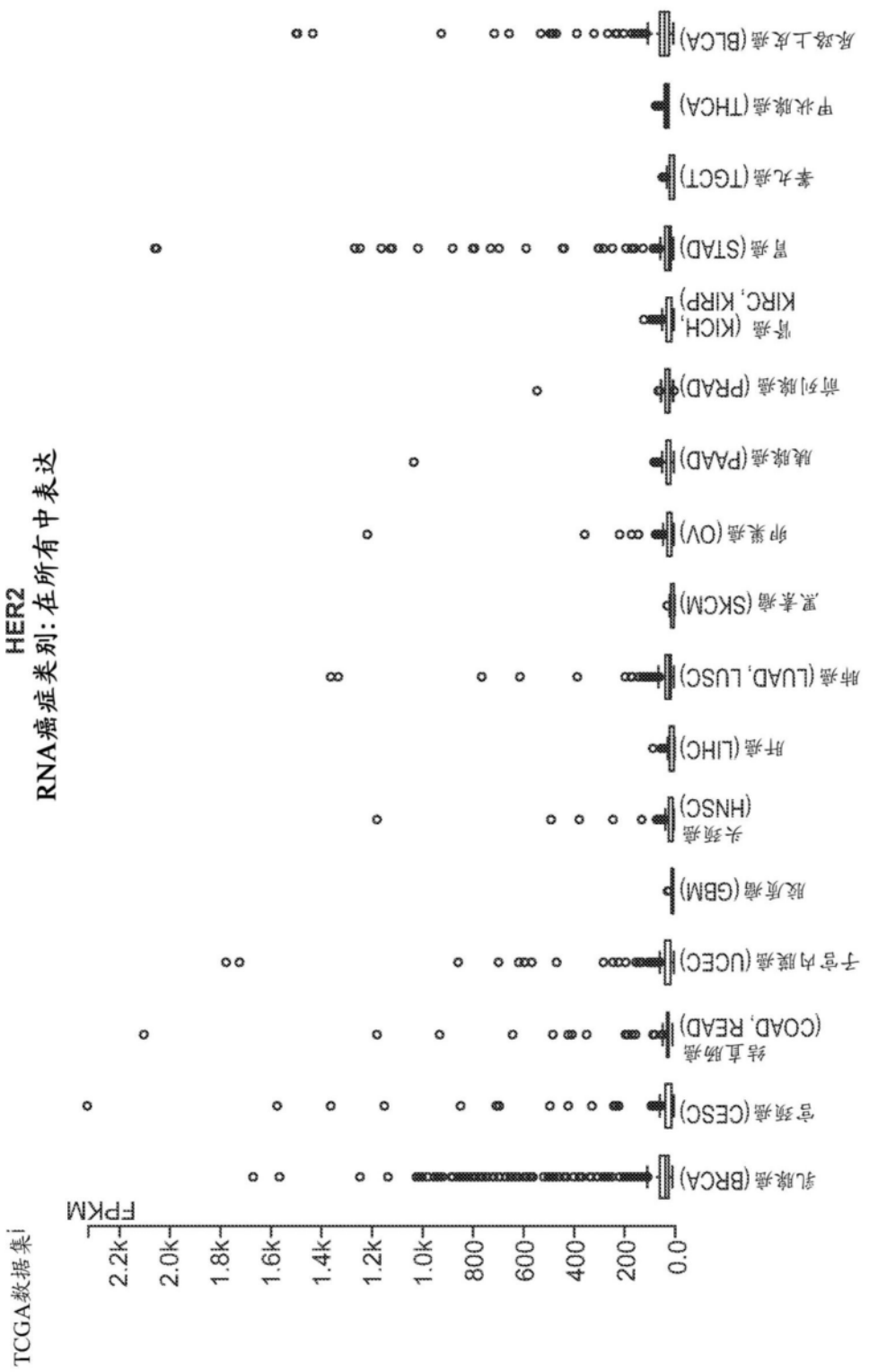

HER2
RNA癌症类别:在所有中表达
TCGA数据集
FPKM
2.2k
2.0k
1.8k
1.6k
1.4k
1.2k
1.0k
800
600
400
200
0.0
乳腺癌(BRCA)
宫颈癌(CESC)
结直肠癌(COAD, READ)
子宫内膜癌(UCEC)
胶质瘤(GBM)
头颈癌(HNSC)
肝癌(LIHC)
肺癌(LUAD, LUSC)
黑素瘤(SKCM)
卵巢癌(OV)
胰腺癌(PAAD)
前列腺癌(PRAD)
肾癌(KICH, KIRC, KIRP)
胃癌(STAD)
睾丸癌(TGCT)
甲状腺癌(THCA)
尿路上皮癌(BLCA)

图21

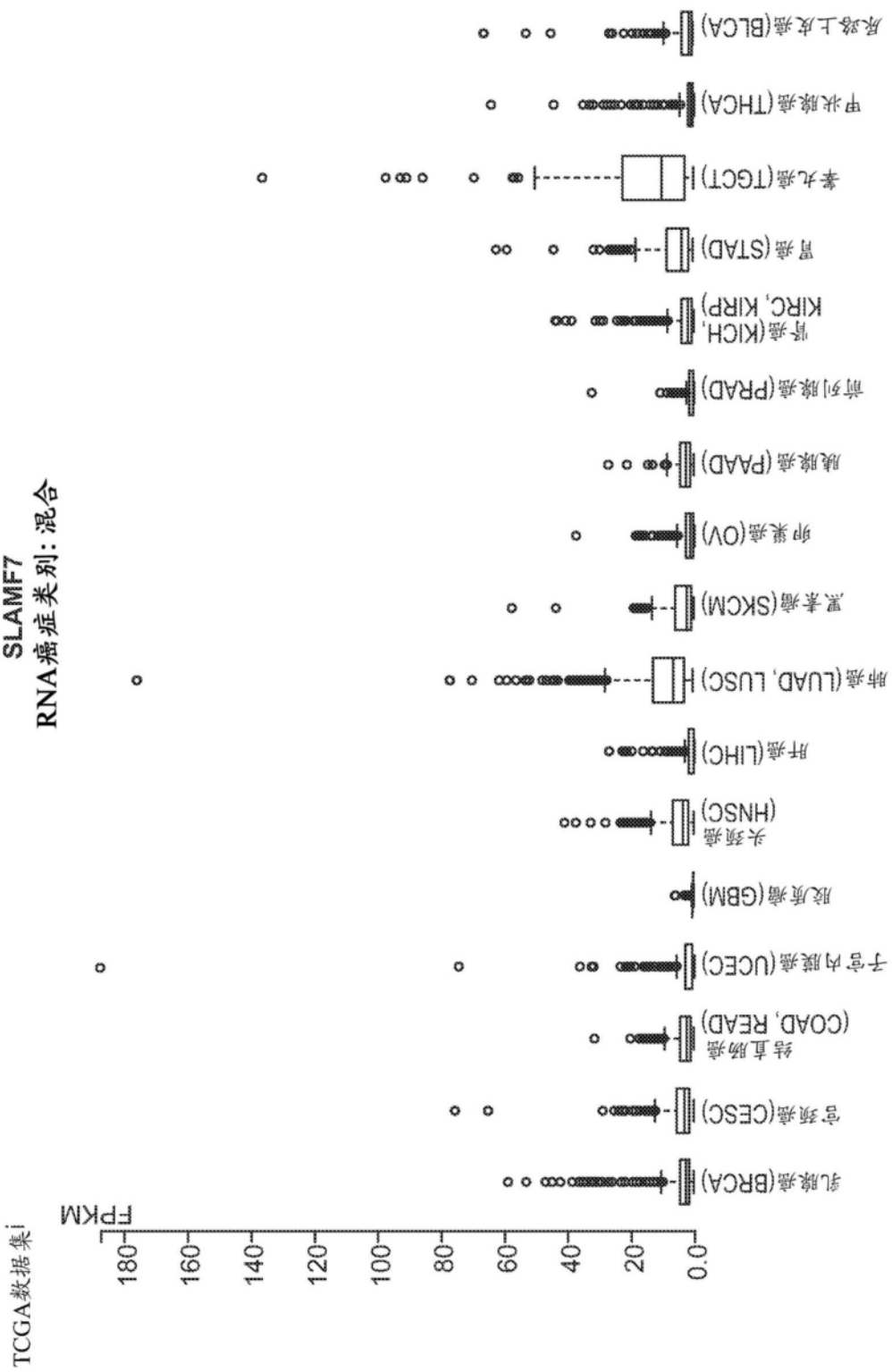

SLAMF7
RNA癌症类别：混合
TCGA数据集
TPM
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0.0
乳腺癌(BRCA)
宫颈癌(CESC)
结直肠癌(COAD, READ)
子宫内膜癌(UCEC)
胶质瘤(GBM)
头颈癌(HNSC)
肝癌(LIHC)
肺癌(LUAD, LUSC)
黑素瘤(SKCM)
卵巢癌(OV)
胰腺癌(PAAD)
前列腺癌(PRAD)
肾癌(KICH, KIRC, KIRP)
胃癌(STAD)
睾丸癌(TGCT)
甲状腺癌(THCA)
尿路上皮癌(BLCA)

图22

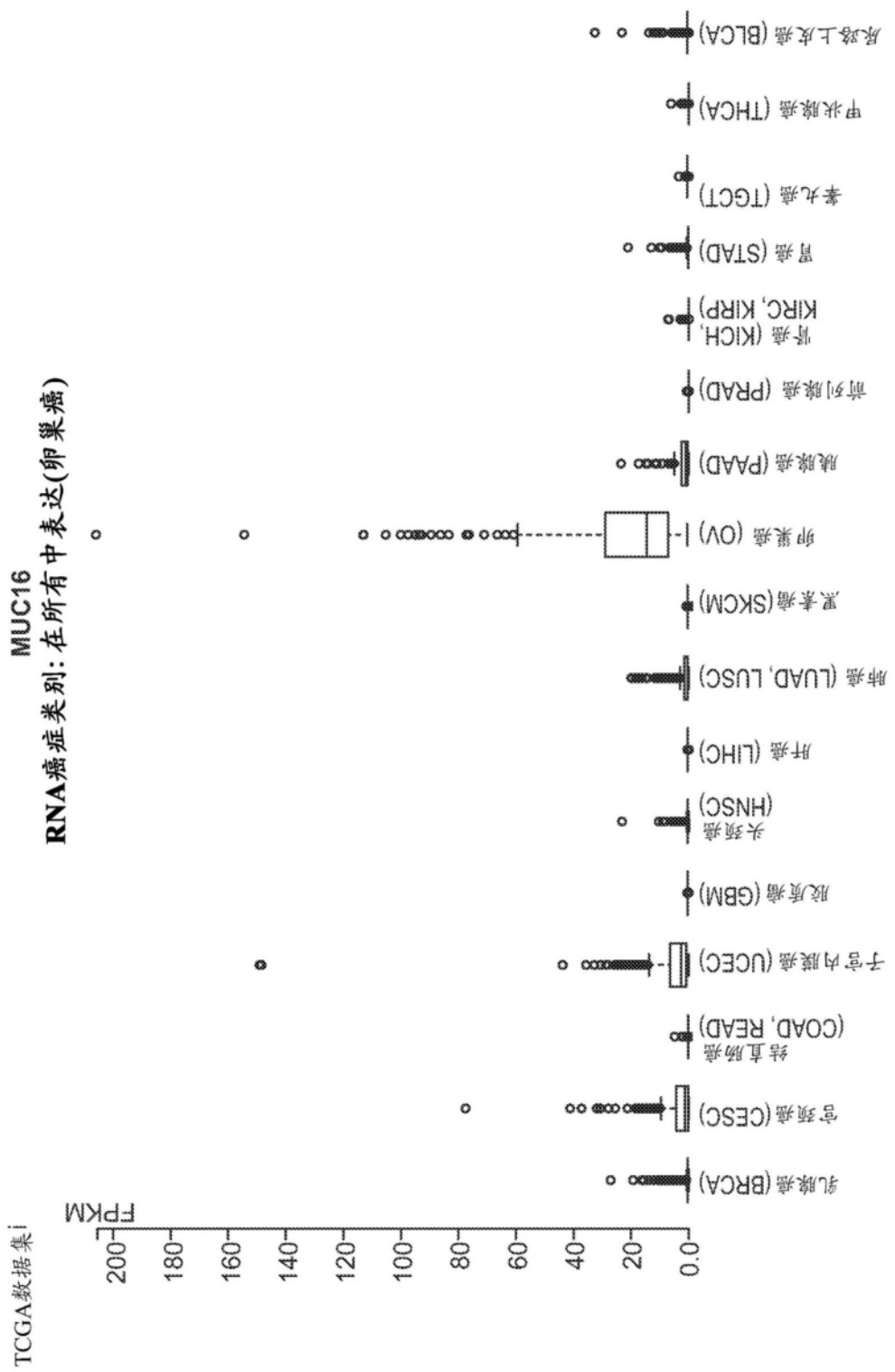

MUC16
RNA癌症类别：在所有中表达(卵巢癌)
TCGA数据集
FPKM
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0.0
乳腺癌 (BRCA)
宫颈癌 (CESC)
结直肠癌 (COAD, READ)
子宫内膜癌 (UCEC)
胶质瘤 (GBM)
头颈癌 (HNSC)
肝癌 (LIHC)
肺癌 (LUAD, LUSC)
黑素瘤 (SKCM)
卵巢癌 (OV)
胰腺癌 (PAAD)
前列腺癌 (PRAD)
肾癌 (KICH, KIRC, KIRP)
胃癌 (STAD)
睾丸癌 (TGCT)
甲状腺癌 (THCA)
尿路上皮癌 (BLCA)

图23

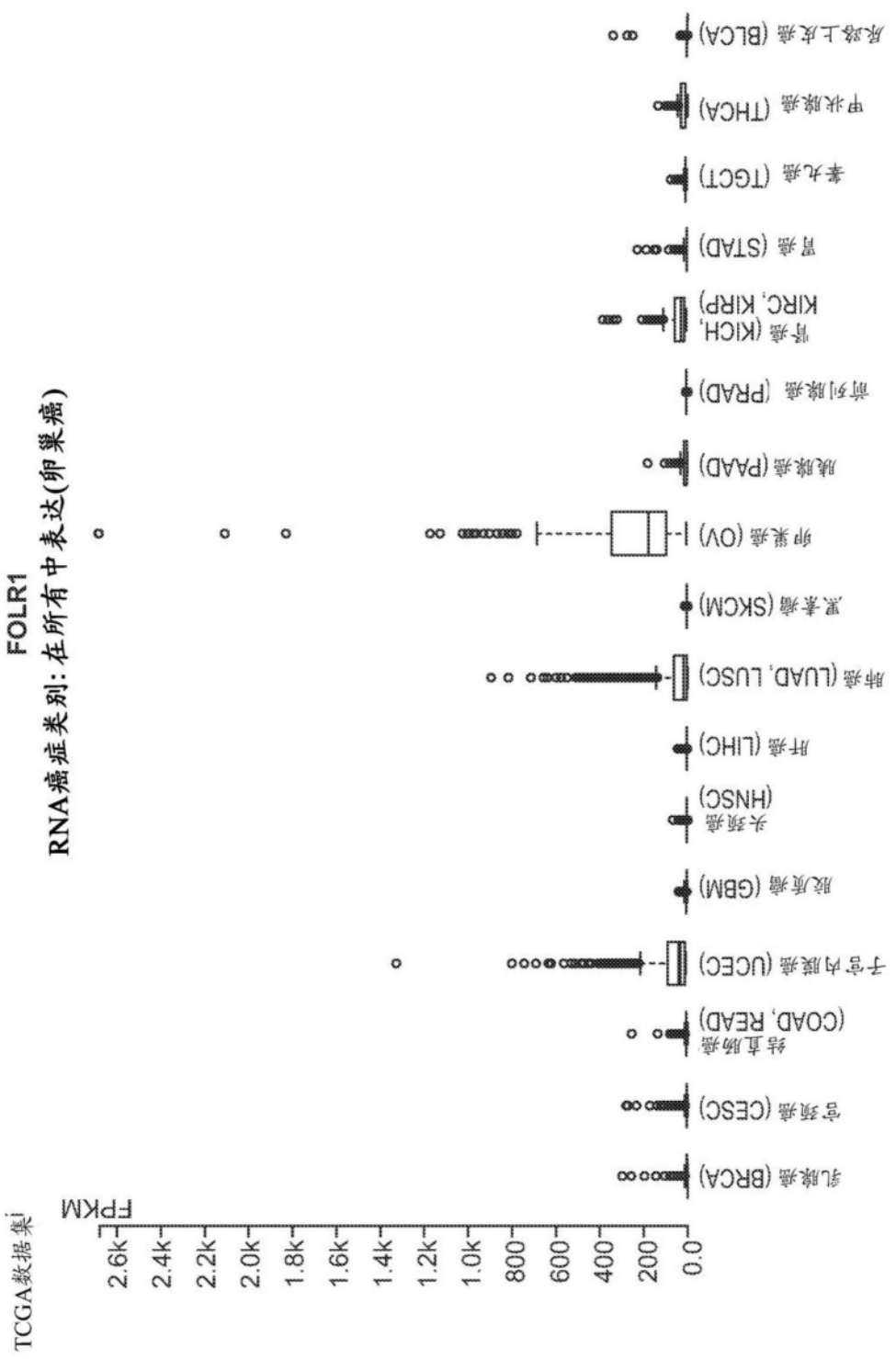

FOLR1
RNA癌症类别: 在所有中表达(卵巢癌)
TCGA数据集
FPKM
2.6k
2.4k
2.2k
2.0k
1.8k
1.6k
1.4k
1.2k
1.0k
800
600
400
200
0.0
乳腺癌 (BRCA)
宫颈癌 (CESC)
结直肠癌 (COAD, READ)
子宫内膜癌 (UCEC)
胶质瘤 (GBM)
头颈癌 (HNSC)
肝癌 (LIHC)
肺癌 (LUAD, LUSC)
黑素瘤 (SKCM)
卵巢癌 (OV)
胰腺癌 (PAAD)
前列腺癌 (PRAD)
肾癌 (KICH, KIRC, KIRP)
胃癌 (STAD)
睾丸癌 (TGCT)
甲状腺癌 (THCA)
尿路上皮癌 (BLCA)

图24

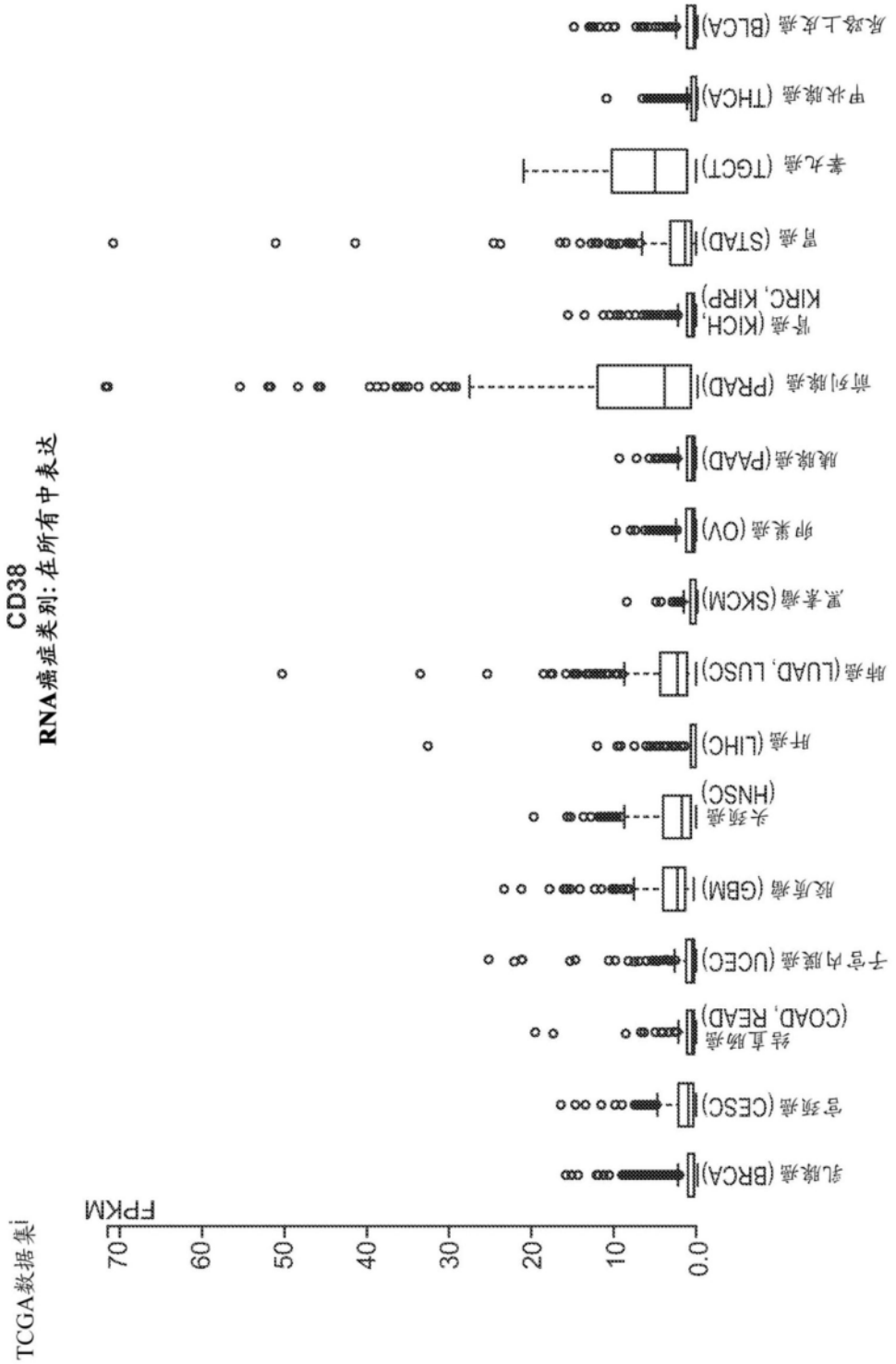

CD38
RNA癌症类别：在所有中表达
TCGA数据集
FPKM
70
60
50
40
30
20
10
0.0
乳腺癌 (BRCA)
宫颈癌 (CESC)
结直肠癌 (COAD, READ)
子宫内膜癌 (UCEC)
胶质瘤 (GBM)
头颈癌 (HNSC)
肝癌 (LIHC)
肺癌 (LUAD, LUSC)
黑素瘤 (SKCM)
卵巢癌 (OV)
胰腺癌 (PAAD)
前列腺癌 (PRAD)
肾癌 (KICH, KIRC, KIRP)
胃癌 (STAD)
睾丸癌 (TGCT)
甲状腺癌 (THCA)
尿路上皮癌 (BLCA)

图25

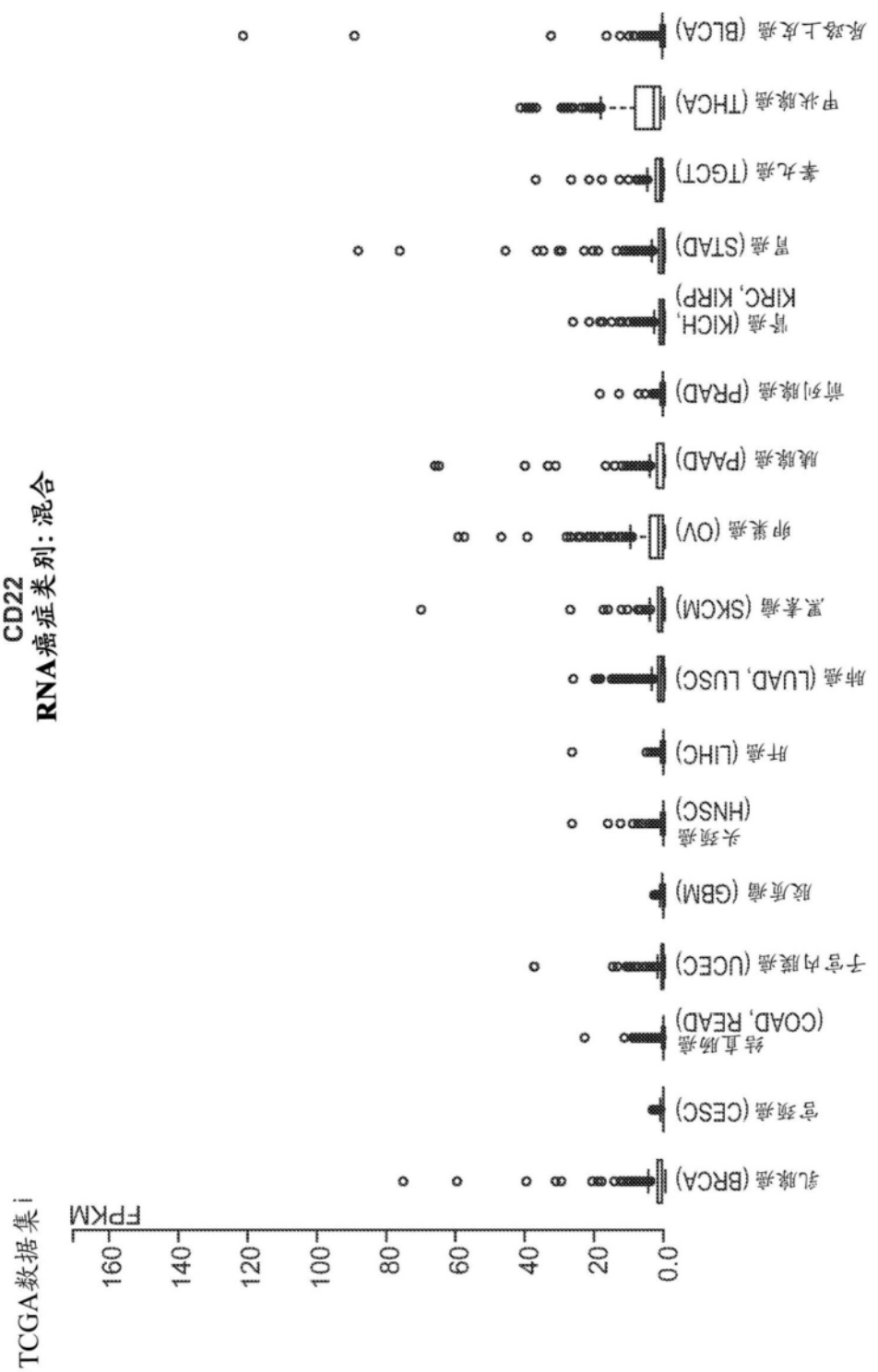

CD22
RNA癌症类别：混合
TCGA数据集 i
FPKM
160
140
120
100
80
60
40
20
0.0
乳腺癌 (BRCA)
宫颈癌 (CESC)
结直肠癌 (COAD, READ)
子宫内膜癌 (UCEC)
胶质瘤 (GBM)
头颈癌 (HNSC)
肝癌 (LIHC)
肺癌 (LUAD, LUSC)
黑素瘤 (SKCM)
卵巢癌 (OV)
胰腺癌 (PAAD)
前列腺癌 (PRAD)
肾癌 (KICH, KIRC, KIRP)
胃癌 (STAD)
睾丸癌 (TGCT)
甲状腺癌 (THCA)
尿路上皮癌 (BLCA)

图26