(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109789206 A
(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201780056887.8

(22)申请日 2017.09.14

(30)优先权数据
2016903724 2016.09.16 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.15

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2017/050998 2017.09.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/049474 EN 2018.03.22

(71)申请人 生态有限公司
地址 澳大利亚,南澳大利亚州

(72)发明人 T·C·拉芙兰诺斯 D·J·因吉斯 C·L·雷韦斯

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟 韩文华

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书11页
序列表8页 附图4页

(54)发明名称

抗体和检查点抑制剂的组合疗法

(57)摘要

本发明提供一种组合疗法,用于在受试者中治疗肿瘤。组合疗法包括施用(i)针对癌症干细胞的抗体和(ii)检查点抑制剂。

CN 109789206 A

1.一种用于在受试者中治疗肿瘤的组合疗法,所述组合疗法包括施用(i)针对癌症干细胞的抗体和(ii)检查点抑制剂。

2.根据权利要求1所述的组合疗法,其中(i)是抗LGR5抗体。

3.根据权利要求2所述的组合疗法,其中所述抗LGR5抗体是人源化或人单克隆抗体。

4.根据权利要求3所述的抗体,其中所述抗体包含具有氨基酸GYSFTAYW(SEQ ID NO:1)的重链CDR1或其保守变体。

5.根据权利要求3或4所述的抗体,其中所述抗体包含具有氨基酸ILPGSDST(SEQ ID NO:2)的重链CDR2或其保守变体。

6.根据权利要求3至5中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含具有氨基酸ARSGYYGSSQY(SEQ ID NO:3)的重链CDR3或其保守变体。

7.根据权利要求3至6中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含具有氨基酸ESVDSYGNSF(SEQ ID NO:4)的轻链CDR1或其保守变体。

8.根据权利要求3至7中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含具有氨基酸LTS(SEQ ID NO:5)的轻链CDR2或其保守变体。

9.根据权利要求3至8中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含具有氨基酸QQNAEDPRT(SEQ ID NO:6)的轻链CDR3或其保守变体。

10.根据权利要求3至9中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:7或8。

11.根据权利要求3至10中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:9或10。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的组合疗法,其中所述检查点抑制剂是免疫检查点蛋白的抑制剂,所述免疫检查点蛋白选自:程序性死亡配体1(PD-L1)、程序性死亡蛋白1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷脂酰丝氨酸)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1及其组合。

13.根据权利要求12所述的组合疗法,其中所述免疫检查点抑制剂是PD-L1的抑制剂、PD-1的抑制剂或CTLA-4的抑制剂。

14.根据权利要求12或13所述的组合疗法,其中所述检查点抑制剂是抗体。

15.根据权利要求14所述的组合疗法,其中所述抗体选自依匹单抗、帕博利珠单抗、纳武单抗及其组合。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的组合疗法,其中所述组合疗法与标准癌症护理一起施用。

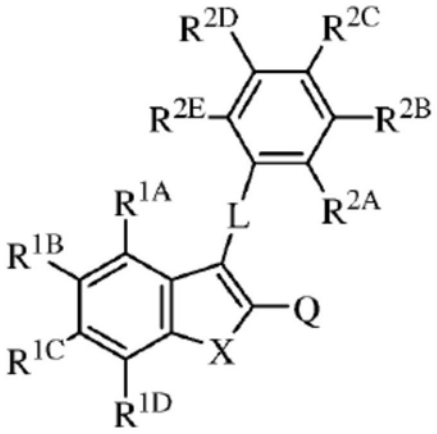
17.根据权利要求16所述的组合疗法,其中所述标准癌症护理包括施用一种化疗剂或化疗剂组合。

18.根据权利要求17所述的组合疗法,其中所述化疗剂选自:环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、多柔比星、氮芥、长春新碱、丙卡巴肼、泼尼松龙、博来霉素、长春碱、达卡巴嗪、依托泊苷、顺铂、表柔比星、卡培他滨、甲酰四氢叶酸、亚叶酸、奥沙利铂、吉西他滨、蛋白结合的紫杉醇、伊立替康及其组合。

19.根据权利要求17或19所述的组合疗法，其中所述标准护理包括5-氟尿嘧啶+甲酰四氢叶酸+伊立替康。

20.根据权利要求17所述的组合疗法，其中所述化疗剂是血管破坏剂。

21.根据权利要求20所述的组合疗法，其中所述血管破坏剂是式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药及其盐：



(I)

其中，

X代表O、S、SO、SO_2、Se、SeO、SeO_2或NR，其中R选自H、O、任选取代的酰基、任选取代的烯基、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的环烯基、任选取代的环烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、和任选取代的磺酰基；

R^{1A}和R^{1B}各自独立地代表H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酰基氨基、膦酰基、氧膦基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、任选取代的酰基、任选取代的酰氨基、任选取代的酰基亚氨基、任选取代的酰基亚氨基氧基、任选取代的酰氧基、任选取代的芳基烷基、任选取代的芳基烷氧基、任选取代的烯基、任选取代的烯氧基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷基、任选取代的炔基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基、任选取代的氨基酰基、任选取代的氨基酰氧基、任选取代的氨基磺酰基、任选取代的氨基硫代酰基、任选取代的芳基、任选取代的芳氧基、任选取代的环烯基、任选取代的环烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的氧酰基、任选取代的氧酰氨基、任选取代的氧酰氧基、任选取代的氧酰基亚氨基、任选取代的氧亚磺酰基氨基、任选取代的氧磺酰基氨基、任选取代的氧硫代酰基、任选取代的氧硫代酰氧基、任选取代的亚磺酰基、任选取代的亚磺酰基氨基、任选取代的磺酰基、任选取代的磺酰氨基、任选取代的硫代、任选取代的硫代酰基、任选取代的硫代酰氨基，或R^{1A}和R^{1B}一起形成任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的杂芳基、任选取代的环烷基或任选取代的环烯基；

R^{1C}代表C_{1-3}烷氧基、C_{1-3}烷硫基、C_{1-3}烷基氨基或C_{1-3}二烷基氨基；

R^{1D}代表羟基或氨基；

L代表C＝O、O、S、SO、SO_2、Se、SeO、SeO_2、C＝NZ'或NR'，其中Z'是H、任选取代的烷基、任选取代的芳基或任选取代的氨基；

其中R'选自H、O、任选取代的酰基、任选取代的烯基、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的环烯基、任选取代的环烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、或任选取代的磺酰基；

R^{2A}-R^{2E}各自独立地表示H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷

酰基氨基、膦酰基、氧膦基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、任选取代的酰基、任选取代的酰氨基、任选取代的酰基亚氨基、任选取代的酰基亚氨基氧基、任选取代的酰氧基、任选取代的芳基烷基、任选取代的芳基烷氧基、任选取代的烯基、任选取代的烯氧基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷基、任选取代的炔基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基、任选取代的氨基酰基、任选取代的氨基酰氧基、任选取代的氨基磺酰基、任选取代的氨基硫代酰基、任选取代的芳基、任选取代的芳氧基、任选取代的环烯基、任选取代的环烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的氧酰基、任选取代的氧酰氨基、任选取代的氧酰基亚氨基、任选取代的氧酰氧基、任选取代的氧亚磺酰基氨基、任选取代的氧磺酰基氨基、任选取代的氧硫代酰基、任选取代的氧硫代酰氧基、任选取代的亚磺酰基、任选取代的亚磺酰基氨基、任选取代的磺酰基、任选取代的磺酰氨基、任选取代的硫代、任选取代的硫代酰基、任选取代的硫代酰氨基、或任选取代的硫代酰氧基；或任何R2A和R2B、R2B和R2C、R2C和R2D、以及R2D和R2E一起形成任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的杂芳基、任选取代的环烷基、或任选取代的环烯基；和

Q表示H、CN、卤素、三烷基硅烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的酰基、任选取代的氧酰基、任选取代的酰氨基、任选取代的氨基酰氨基、OR”、SR”或NR”R”，其中每个R”独立地表示H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的酰基和任选取代的氧酰基，或NR”’NR”’，其中每个R”’独立地代表H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基和任选取代的杂芳基。

22.根据权利要求20或21所述的组合疗法，其中所述血管破坏剂是2-甲基-7-羟基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基苯并呋喃(BNC105)或[6-甲氧基-2-甲基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-1-苯并呋喃-7-基]磷酸二钠(BNC105P)。

23.根据权利要求1至22中任一项所述的组合疗法，其中所述肿瘤选自：膀胱癌肿瘤、乳癌肿瘤、结肠癌肿瘤、胃肠癌肿瘤、肾癌肿瘤、肺癌肿瘤、卵巢癌肿瘤、胰腺癌肿瘤、前列腺癌肿瘤、近端或远端胆管癌肿瘤、黑色素瘤、结直肠癌肿瘤、转移性结直肠癌肿瘤、转移性胰腺癌肿瘤、三阴性乳癌肿瘤和小细胞肺癌肿瘤。

24.一种治疗受试者中肿瘤的方法，包括权利要求1至22中任一项所述的组合疗法。

25.根据权利要求22所述的方法，其中所述肿瘤选自：膀胱癌肿瘤、乳癌肿瘤、结肠癌肿瘤、胃肠癌肿瘤、肾癌肿瘤、肺癌肿瘤、卵巢癌肿瘤、胰腺癌肿瘤、前列腺癌肿瘤、近端或远端胆管癌肿瘤、黑色素瘤、结直肠癌肿瘤、转移性结直肠癌肿瘤、转移性胰腺癌肿瘤、三阴性乳癌肿瘤和小细胞肺癌肿瘤。

26.一种组合物，其包含混合形式的组分(i)和(ii)。

27.权利要求1至22中任一项所述组合疗法中的组分(i)和(ii)在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

28.根据权利要求27所述的用途，其中所述肿瘤选自：膀胱癌肿瘤、乳癌肿瘤、结肠癌肿瘤、胃肠癌肿瘤、肾癌肿瘤、肺癌肿瘤、卵巢癌肿瘤、胰腺癌肿瘤、前列腺癌肿瘤、近端或远端胆管癌肿瘤、黑色素瘤、结直肠癌肿瘤、转移性结直肠癌肿瘤、转移性胰腺癌肿瘤、三阴性乳癌肿瘤和小细胞肺癌肿瘤。

抗体和检查点抑制剂的组合疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗肿瘤的组合疗法。该组合包含针对癌症干细胞标记物的抗体和检查点抑制剂。

背景技术

[0002] 目前，有很强的动力将免疫疗法的临床益处扩展到更广泛的患者群体，在这一群体中的许多患者无法应答。将检查点抑制剂用作治疗的免疫学方法，偏向于由分化的肿瘤细胞组成的肿瘤块(bulk)。

[0003] 检查点抑制剂寻求克服针对免疫系统攻击的癌症主要防御之一。免疫系统T细胞不断在身体中巡逻，以寻找疾病或感染的迹象。当它们遇到另一个细胞时，它们会在其表面探测某些蛋白，这些蛋白可作为细胞身份的标志。如果蛋白显示细胞正常且健康，则T细胞对其置之不理。如果蛋白表明细胞被感染或癌变，T细胞将引发攻击。一旦T细胞发起攻击，免疫系统就会增加一系列额外的分子，以防止这些攻击破坏体内的正常组织。这些分子被称为免疫检查点。

[0004] 肿瘤细胞经常带有揭示细胞癌变的蛋白。但它们有时会犯身份盗窃的行为，将自己排在正常细胞的蛋白中。最近的研究表明，癌细胞通常利用免疫检查点分子来抑制和逃避免疫系统攻击。被这些看起来很正常的蛋白所欺骗的T细胞，可能使肿瘤细胞不受打扰。

[0005] 检查点抑制剂可阻断癌细胞上的这些正常蛋白、或T细胞上对其产生反应的蛋白。结果是去除了阻止T细胞将细胞识别为癌细胞并导致免疫系统对其进行攻击的遮蔽。

[0006] 已获得美国食品和药物监督管理局快速批准的三种检查点抑制剂，包括依匹单抗（Yervoy®）、帕博利珠单抗（Keytruda®）和纳武单抗（Opdivo®）。这些以及其它免疫检查点疗法代表了当今癌症治疗中最有前途的前沿之一。

[0007] 另一方面，与这种更分化的肿瘤块(bulk)相比，癌症干细胞(CSC)显示出不同的基因和抗原表达谱。这使它们能够逃避检查点抑制剂的治疗益处并重新构成肿瘤。已经在一些实体癌中鉴定出LGR5是CSC或肿瘤起始亚群的功能标记物，其能够自我更新并分化成缺乏这些能力的后代细胞。重要证据还表明，这些CSC具有免疫抑制表型，使它们能够逃避抗肿瘤的宿主免疫反应[1-8]。这开启了CSC亚群可能下调T细胞免疫的可能性。

[0008] 肿瘤内存在能够逃避检查点抑制剂并下调对治疗整体反应性的细胞亚群，这为组合疗法提供了更大的治疗益处，其中抗LGR5抗体与检查点抑制剂组合。

[0009] 免疫检查点疗法与CSC靶向剂的组合可以改善每种方法的临床效用，并且允许将检查点抑制剂的高治疗价值更深入地带到患者群体中，从而产生更多“反应者”。

发明内容

[0010] 本发明人已经确定，与单独使用抗癌症干细胞抗体或免疫治疗剂的治疗相比，针对癌症干细胞的抗体和免疫治疗剂的组合增加了治疗癌症的效果。

[0011] 因此，在第一方面，本发明提供用于治疗受试者肿瘤的组合疗法，该组合疗法包括

施用(i)针对癌症干细胞的抗体和(ii)检查点抑制剂。

[0012] 在第二方面,本发明提供了治疗受试者肿瘤的方法,该方法包括本发明的组合疗法。

[0013] 在第三方面,本发明提供了一种组合物,其包含混合形式的组合疗法组分(i)和(ii)。

[0014] 在第四方面,本发明提供组合疗法组分(i)和(ii)在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

附图说明

[0015] 图1.小鼠结直肠癌(CRC)肿瘤模型中的肿瘤生长抑制。

[0016] 图2.募集至肿瘤的总T细胞-肿瘤$CD3^+$占总淋巴细胞的%。

[0017] 图3.募集至肿瘤的细胞毒性T细胞-肿瘤$CD8^+$占CD3的%。

[0018] 图4.肿瘤Treg占$CD4^+$的%。

具体实施方式

[0019] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括”或变体,如“包含”或“含有”,将被理解为暗示包含所述元素、或整数、或一组元素或整数,但不排除任何其它元素、或整数、或一组元素或整数。

[0020] 本说明书中对任何先前出版物(或从中得出的信息)或任何已知事物的引用,不是也不应被视为承认、或认同、或任何形式建议先前出版物(或从中得出的信息)或任何已知事物构成本说明书所涉及领域中公知常识的一部分。

[0021] 本说明书中提及的所有出版物均通过引用整体并入本文。

[0022] 必须注意的是,如在本说明书中使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数方面,除非上下文另有明确规定。因此,例如,提及“一种试剂”包括单一试剂、以及两种或更多种试剂;提及“一种分子”包括单一分子、以及两种或更多种分子;等等。

[0023] 在第一方面,本发明提供用于治疗受试者肿瘤的组合疗法,该组合疗法包括施用(i)针对癌症干细胞的抗体和(ii)检查点抑制剂。

[0024] 在第二方面,本发明提供了治疗受试者肿瘤的方法,该方法包括本发明的组合疗法。

[0025] 在第三方面,本发明提供了一种组合物,其包含混合形式的组合疗法的组分(i)和(ii)。

[0026] 在第四方面,本发明提供组合疗法的组分(i)和(ii)在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0027] 针对癌症干细胞的抗体优选为抗LGR5抗体。这种抗体的实例在WO 2015/153916中详细描述,其公开内容通过交叉引用并入本文。

[0028] 如上文所述,在许多实施方案中组合疗法涉及使用特异性结合LRG5的人或人源化抗体。在一些实施方案中,抗体特异性结合LGR5,但不抑制R-Spo与LGR5的结合。其它实施方案包括结合LGR5但不通过LGR5抑制R-Spo信号传导的抗体。其它实施方案包括结合LGR5但不通过LGR5抑制R-Spo结合或信号传导的抗体。另一个实施方案是结合LGR5并且还通过Wnt

途径抑制LGR5信号传导的抗体。在一些实施方案中，这些抗体可以通过Wnt途径抑制LGR5信号传导，并且不依赖RSpo信号传导。

[0029] 通过谱系追踪研究，LGR5鉴定为肠道中正常干细胞和肿瘤起始细胞的高度特异性标记物。先前鉴定了约150个基因，其表达在消除Wnt表达后被淬灭。这些“Wnt靶标基因”的综合表征发现在隐窝基部的10-14个增殖楔形细胞群上选择性表达LGR5。这些隐窝基部的柱状细胞先前被提议作为候选干细胞群。利用可遗传的lacZ-LGR5报告基因进行体内谱系追踪，已经证实LGR5肠干细胞是成体肠道干细胞的多能、自我更新群体，从隐窝基部起并延伸到绒毛尖端，产生lacZ+子代细胞的不间断带。

[0030] LGR5在CSC上的特异性表达，为选择性且有效靶向CSC提供了机会。与正常组织相比，LGR5在CRC、胰腺和大多数其它实体瘤中高度过表达，从而为CRC、胰腺、乳腺、卵巢、肺、胃和肝癌中靶向CSC提供了广泛的治疗窗口。

[0031] LGR5本身是Wnt-Fzd-LRP受体复合物的兼性成分，其结合分泌的R-spondin配体，以选择性地扩增和增强LGR5阳性细胞上的Wnt信号。还有证据表明LGR5可以以Wnt非依赖性方式发出信号。此外，相关的跨膜RING型E3泛素连接酶ZNRF3(锌和RING指3)或RNF43(RING指43)在LGR5+干细胞中独特表达，并通过选择性泛素化卷曲受体(frizzled receptor)来减少Wnt信号，从而靶向这些Wnt受体以便降解。R-spondin配体与LGR5相互作用，与跨膜ZNRF3或RNF43形成三元复合物。这些三元复合物的形成从Wnt-Fzd-LRP复合物中螯合(sequester)ZNRF3或RNF43，并稳定经典和非经典Wnt信号传导。最后，Norrin已被鉴定为LGR家族的额外配体，其相关生物学信息未知。

[0032] CRC中的看门(gate keeping)突变是缺失腺瘤性结肠息肉(APC)，导致Wnt信号传导的异常激活，该Wnt信号传导通常用于调节结肠隐窝中干细胞自我更新和分化之间的平衡。肠干细胞中Wnt信号传导的失调导致在结肠中形成腺瘤性息肉，其是恶性CRC的前体。采用诱导型APC基因敲除小鼠与LGR5干细胞用四种(GFP/YFP/ECFP/RFP)荧光遗传标记物中的一种进行特异性和随机标记的小鼠杂交的策略，LGR5干细胞被确认为这些小鼠肠道肿瘤的来源或根源。诱导APC缺失4周后出现单色肿瘤(即全部GFP或全部RFP)，证实这些肿瘤来自单个LGR5干细胞。此外，该模型还允许LGR5干细胞中荧光遗传标签翻转成不同的颜色，因此产生红色肿瘤的RFP+LGR5癌症干细胞可以在中途转化为ECFP+LGR5癌症干细胞，仍在传播肿瘤但产生蓝色肿瘤细胞，其侵入到之前所有红色GFP+肿瘤质中。这种翻转实验进一步证实LGR5CSC不仅是肠道肿瘤的起源，能够引发和传播肠肿瘤的生长，而且它们还持续维持肿瘤形成(即，具有长期的再构成能力)。

[0033] 通过核糖核酸干扰(RNAi)敲低研究，验证了LGR5在癌症中的功能作用。在CRC肿瘤细胞系组中敲低LGR5显著抑制体外软琼脂集落的生长，以及HCT116结肠肿瘤异种移植物的体内生长。随后显示LGR5 RNAi敲低也降低来自患者来源CRC肿瘤细胞的CSC集落在体外的生长。最后，与对照LGR5-细胞相比，发现分选的LGR5+源自患者的异种移植物CRC肿瘤细胞在体内具有高度致瘤性。

[0034] 在许多经手术和标准化疗治疗的癌症患者中，CSC被认为是肿瘤复发率高的原因。例如，发现来自乳癌患者的CD44+CSC在化疗后富集，并且高水平的CSC与对化疗的临床反应不良相关。类似地，在转移性CRC中，化疗后受损肝脏中LGR5表达上调，表明响应化疗的LGR5 CSC的增加引发和/或激发了转移性疾病。实际上，已发现与原发性CRC肿瘤相比，LGR5在转

移部位中的表达显著更高。

[0035] 抗LGR5抗体

[0036] 如本文所用,术语“抗体”包括但不限于合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、合成抗体、单链Fv(scFv)、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)(包括双特异性sdFv)和抗独特型(抗Id)抗体、以及以上任何一种的表位结合片段。本文提供的几个实施方案的抗体可以是单特异性的、双特异性的、三特异性的或更多的多特异性。多特异性抗体可以对多肽的不同表位具有特异性,或者对多肽以及异源表位都具有特异性,例如异源多肽或固体支持材料。参见,例如PCT公开WO93/17715;WO 92/08802;WO91/00360;WO 92/05793;Tutt等人J.Immunol.147:60-69(1991);U.S专利4,474,893;4,714,681;4,925,648;5,573,920;5,601,819;Kostelny等人J.Immunol.148:1547-1553(1992);其各自通过引用整体并入本文。

[0037] 如本文所用,LGR5包括但不限于人LGR5,包括NCBI登录号NP_003658.1的多肽或其片段,其由NM_003667.2内的编码核苷酸序列或其片段编码。NCBI登录号NP_003658.1的氨基酸序列和整个条目以及NM_003667.2的核苷酸序列和整个条目通过引用整体并入本文。本文考虑的LGR5片段的实例包括LGR5胞外域、跨膜结构域或细胞内结构域及其部分。

[0038] WO 2015/15396公开了产生抗LGR5抗体的轻链和/或重链的杂交瘤,包括命名为18G7H6A3和18G7H6A1的抗LGR5抗体。对于人类治疗,优选抗LGR5抗体是人源化或人单克隆抗体。这些抗体的具体形式是描述于WO2015/153916中的18G7H6A1或18G7H6A3。

[0039] 在某些实施方案中,所述抗体包含具有氨基酸GYSFTAYW(SEQ ID NO:1)的重链CDR1或其保守变体。

[0040] 在某些实施方案中,所述抗体包含具有氨基酸ILPGSDST(SEQ ID NO:2)的重链CDR2或其保守变体。

[0041] 在某些实施方案中,所述抗体包含具有氨基酸ARSGYYGSSQY(SEQ ID NO:3)的重链CDR3或其保守变体。

[0042] 在某些实施方案中,所述抗体包含具有氨基酸ESVDSYGNSF(SEQ ID NO:4)的轻链CDR1或其保守变体。

[0043] 在某些实施方案中,所述抗体包含具有氨基酸LTS(SEQ ID NO:5)的轻链CDR2或其保守变体。

[0044] 在某些实施方案中,所述抗体包含具有氨基酸QQNAEDPRT(SEQ ID NO:6)的轻链CDR3或其保守变体。

[0045] 在某些实施方案中,所述抗体包含重链可变结构域,其包含SEQ ID NO:7或8。

[0046] 在某些实施方案中,所述抗体包含轻链可变结构域,其包含SEQ ID NO:9或10。

[0047] 在各种实施方案中,可以修饰抗体的糖基化。例如,可以制备非糖基化抗体(即,抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化从而例如增加抗体对靶标抗原的亲和力。这种碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,其导致消除一个或多个可变区框架的糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种非糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。这种方法在美国专利5,714,350和6,350,861中有更详细的描述;其各自通过引用整体并入本文。

[0048] 在一些实施方案中,抗体特异性结合包含LGR5多肽或由LGR5多肽组成的多肽,所

述LGR5多肽与NCBI登录号NP_003658.1(SEQ ID NO:47)的人LGR5多肽或其片段具有至少60%同一性、或至少70%同一性、或至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、或至少97%同一性、或至少99%同一性或100%同一性。例如,这样的片段可以是LGR5多肽的至少约5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850或900个连续或非连续氨基酸,或任何上述长度之间的任何数目的连续或非连续氨基酸。

[0049] 如上所述,本发明的组合疗法涉及使用检查点抑制剂。如本文所用,"检查点抑制剂"是指任何抑制免疫检查点蛋白活性的化合物或试剂。检查点抑制剂可包括但不限于免疫检查点分子结合蛋白、结合免疫检查点分子的抗体(或其片段或变体)、下调免疫检查点分子表达的核酸、或结合免疫检查点分子(即小有机分子、肽模拟物、适体等)并且抑制免疫检查点蛋白功能和/或活性的任何其它分子。

[0050] 在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂选自以下(物质)的抑制剂:程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡蛋白1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷脂酰丝氨酸)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、和/或VTCN1。

[0051] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是PD-1的抑制剂。在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗PD-1抗体。在一个具体的实施方案中,免疫检查点抑制剂是纳武单抗(nivolumab)。例如,美国专利号7,029,674;6,808,710;或美国专利申请号20050250106和20050159351中公开的PD-1生物活性(或其配体)的抑制剂,可用于本文提供的方法中。针对PD-1的示例性抗体包括:来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆J43(Cat#BE0033-2);来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆RMP1-14(Cat#BE0146);小鼠抗PD-1抗体克隆EH12;默克公司的MK-3475抗小鼠PD-1抗体(Keytruda、帕博利珠单抗、兰博利珠单抗);和AnaptysBio的抗PD-1抗体,称为ANB011;抗体MDX-1 106(ONO-4538);Bristol-Myers Squibb的人IgG4单克隆抗体纳武单抗(Opdivo®、BMS-936558、MDX1106);AstraZeneca的AMP-514和AMP-224;和匹利珠单抗(Pidilizumab)(CT-011),CureTech Ltd。

[0052] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是PD-L1的抑制剂。示例性免疫检查点抑制剂包括抗体(例如,抗PD-L1抗体)、RNAi分子(例如,抗PD-L1RNAi)、反义分子(例如,抗PD-L1反义RNA)、显性失活(dominant negative)蛋白(例如,显性失活的PD-L1蛋白)和小分子抑制剂。示例性的抗PD-L1抗体包括克隆EH12。针对PD-L1的示例性抗体包括:Genentech的MPDL3280A(RG7446);来自BioXcell的抗小鼠PD-L1抗体克隆10F.9G2(Cat#BE0101);抗PD-L1单克隆抗体MDX-1105(BMS-936559)和来自Bristol-Meyer's Squibb的BMS-935559;MSB0010718C;小鼠抗PD-L1克隆29E.2A3;和AstraZeneca的MEDI4736。

[0053] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是PD-L2的抑制剂。在其它实施方案中,免疫检查点抑制剂减少PD-1和PD-L2之间的相互作用。示例性免疫检查点抑制剂包括抗体(例如,抗PD-L2抗体)、RNAi分子(例如,抗PD-L2RNAi)、反义分子(例如,抗PD-L2反义RNA)、显性失活蛋白(例如,显性失活的PD-L2蛋白)和小分子抑制剂。抗体包括单克隆抗体、人源化抗体、去免疫抗体和Ig融合蛋白。

[0054] 在一些实施方案中，免疫检查点抑制剂是CTLA-4的抑制剂。在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体。在一个具体的实施方案中，免疫检查点抑制剂是依匹单抗。在一个实施方案中，抗CTLA-4抗体阻断CTLA-4与抗原呈递细胞上表达的CD80(B7-1)和/或CD86(B7-2)的结合。抗CTLA-4的示例性抗体包括:Bristol Meyers Squibb的抗CTLA-4抗体依匹单抗(也称为Yervoy®、MDX-010、BMS-734016和MDX-101);抗-CTLA4抗体，来自Millipore的克隆9H10;Pfizer的替西木单抗(tremelimumab)(CP-675,206、ticilimumab);来自Abcam的抗CTLA4抗体克隆BNI3。

[0055] 在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体例如公开于:WO 98/42752;美国专利号6,682,736和6,207,156;Hurwitz等人(1998);Camacho等人(2004)(抗体CP-675206);Mokyr等人(1998)(通过引用并入本文)。

[0056] 在一些实施方案中，CTLA-4抑制剂是如WO1996040915中公开的CTLA-4配体。在一些实施方案中，CTLA-4抑制剂是CTLA-4表达的核酸抑制剂。

[0057] 预期任何合适的免疫检查点抑制剂与本文公开的组合物、剂型和方法一起使用。免疫检查点抑制剂的选择取决于多种因素，并且免疫检查点抑制剂的选择在本领域技术人员的技能范围内。例如，要考虑的因素包括免疫检查点抑制剂的任何额外药物相互作用、以及服用免疫检查点抑制剂的时间长短。在某些情况下，免疫检查点抑制剂是可以长时间服用(例如慢性服用)的免疫检查点抑制剂。

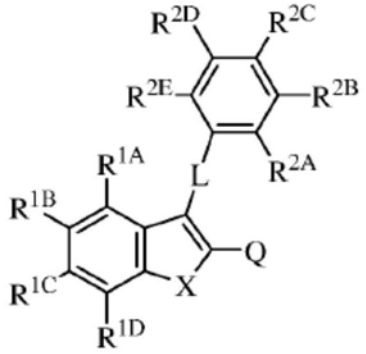
[0058] 在免疫检查点抑制剂是抗体的实施方案中，抗体可以是单克隆抗体、合成抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链Fv(scFv)(包括双特异性scFv)、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)和任何上述的表位结合片段。特别地，用于本发明的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即含有免疫上特异性结合免疫检查点分子的免疫检查点分子结合位点的分子。用于本发明的免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。优选地，用于本发明的抗体是IgG，更优选IgG1。

[0059] 另外，在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂可以包括但不限于阻断PD-L1的人源化或完全人抗体，例如MEDI-4736(在WO2011066389A1中公开)、MPDL3280A(在US8217149B2中公开)和MIH1(通过eBioscience(16.5983.82)可获得的Affymetrix)和目前正在研究的其它PD-L1抑制剂。根据本发明，免疫检查点抑制剂优选选自CTLA-4、PD-1或PD-L1抑制剂，例如选自上述已知的CTLA-4、PD-1或PD-L1抑制剂(依匹单抗、替西木单抗、兰博利珠单抗、纳武单抗、匹利珠单抗、AMP-244、MEDI-4736、MPDL3280A、MIH1)。

[0060] 本发明的组合疗法通常作为对患者施用典型标准癌症护理的辅助施用。使用的标准化疗剂的实例包括环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、多柔比星、氮芥、长春新碱、丙卡巴肼、泼尼松龙、博来霉素、长春碱、达卡巴嗪、依托泊苷、顺铂、表柔比星、卡培他滨、甲酰四氢叶酸、亚叶酸、奥沙利铂、吉西他滨、蛋白结合的紫杉醇和伊立替康。在某些情况下，标准护理将涉及使用试剂的组合用于治疗结直肠癌，如5-氟尿嘧啶+甲酰四氢叶酸+伊立替康。

[0061] 本发明的组合疗法还可包括施用血管破坏剂(VDA)。关于血管破坏剂的信息在WO 06/084338、WO 07/087684和WO 08/070908中提供，其公开内容通过引用并入本文。

[0062] 血管破坏剂优选是式(I)化合物或其盐、溶剂化物或前药及其盐：

[0063] 

(I)

[0064] 其中，

[0065] X代表O、S、SO、SO_2、Se、SeO、SeO_2或NR，其中R选自H、O、任选取代的酰基、任选取代的烯基、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的环烯基、任选取代的环烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、和任选取代的磺酰基；

[0066] R^{1A}和R^{1B}各自独立地代表H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酰基氨基、膦酰基、氧膦基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、任选取代的酰基、任选取代的酰氨基、任选取代的酰基亚氨基、任选取代的酰基亚氨基氧基、任选取代的酰氧基、任选取代的芳基烷基、任选取代的芳基烷氧基、任选取代的烯基、任选取代的烯氧基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷基、任选取代的炔基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基、任选取代的氨基酰基、任选取代的氨基酰氧基、任选取代的氨基磺酰基、任选取代的氨基硫代酰基、任选取代的芳基、任选取代的芳氧基、任选取代的环烯基、任选取代的环烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的氧酰基、任选取代的氧酰氨基、任选取代的氧酰氧基、任选取代的氧酰基亚氨基、任选取代的氧亚磺酰基氨基、任选取代的氧磺酰基氨基、任选取代的氧硫代酰基、任选取代的氧硫代酰氧基、任选取代的亚磺酰基、任选取代的亚磺酰基氨基、任选取代的磺酰基、任选取代的磺酰氨基、任选取代的硫代、任选取代的硫代酰基、任选取代的硫代酰氨基，或R^{1A}和R^{1B}一起形成任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的杂芳基、任选取代的环烷基或任选取代的环烯基；

[0067] R^{1C}代表C_{1-3}烷氧基、C_{1-3}烷硫基、C_{1-3}烷基氨基或C_{1-3}二烷基氨基；

[0068] R^{1D}代表羟基或氨基；

[0069] L代表C＝O、O、S、SO、SO_2、Se、SeO、SeO_2、C＝NZ'或NR'，其中Z'是H、任选取代的烷基、任选取代的芳基或任选取代的氨基；以及其中R'选自H、O、任选取代的酰基、任选取代的烯基、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的环烯基、任选取代的环烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、或任选取代的磺酰基；

[0070] R^{2A}-R^{2E}各自独立地表示H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酰基氨基、膦酰基、氧膦基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、任选取代的酰基、任选取代的酰氨基、任选取代的酰基亚氨基、任选取代的酰基亚氨基氧基、任选取代的酰氧基、任选取代的芳基烷基、任选取代的芳基烷氧基、任选取代的烯基、任选取代的烯氧基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷基、任选取代的炔基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基、任选取代的氨基酰基、任选取代的氨基酰氧基、任选取代的氨基磺酰基、任选取代的氨基硫代酰基、任选取代的芳基、任选取代的芳氧基、任选取代的环

烯基、任选取代的环烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的氧酰基、任选取代的氧酰氨基、任选取代的氧酰基亚氨基、任选取代的氧酰氧基、任选取代的氧亚磺酰基氨基、任选取代的氧磺酰基氨基、任选取代的氧硫代酰基、任选取代的氧硫代酰氧基、任选取代的亚磺酰基、任选取代的亚磺酰基氨基、任选取代的磺酰基、任选取代的磺酰氨基、任选取代的硫代、任选取代的硫代酰基、任选取代的硫代酰氨基、或任选取代的硫代酰氧基；或任何R2A和R2B、R2B和R2C、R2C和R2D、以及R2D和R2E一起形成任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的杂芳基、任选取代的环烷基、或任选取代的环烯基；和

[0071] Q表示H、CN、卤素、三烷基硅烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的酰基、任选取代的氧酰基、任选取代的酰氨基、任选取代的氨基酰氨基、OR”、SR”或NR”R”，其中每个R”独立地表示H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的酰基和任选取代的氧酰基，或NR”’NR”’，其中每个R”’独立地代表H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基和任选取代的杂芳基。

[0072] 血管破坏剂优选是2-甲基-7-羟基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基苯并呋喃(BNC105)或[6-甲氧基-2-甲基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-1-苯并呋喃-7-基]磷酸二钠(BNC105P)。

[0073] 待治疗的肿瘤可以是任何广范围的肿瘤，然而，在某些实施方案中，组合疗法用于选自以下的肿瘤：膀胱癌肿瘤、乳癌肿瘤、结肠癌肿瘤、胃肠癌肿瘤、肾癌肿瘤、肺癌肿瘤、卵巢癌肿瘤、胰腺癌肿瘤、前列腺癌肿瘤、近端或远端胆管癌肿瘤、黑色素瘤、结直肠癌肿瘤、转移性结直肠癌肿瘤、转移性胰腺癌肿瘤、三阴性乳癌肿瘤和小细胞肺癌肿瘤。

[0074] 实施例

[0075] 实施例1.18G7(BNC101鼠等同物)与抗PD1的组合

[0076] 本发明人进行研究以确定18G7(在WO2015/153916中详细描述)与免疫治疗性抗PD1抗体的组合在同系MC38小鼠结肠肿瘤模型中的功效。在第1天、第8天和第15天以15mg/kg i.v施用18G7抗体；在第1、4、8、12和16天以5mg/kg i.p.施用抗PD1抗体(克隆RMP1-14)。用MC38细胞皮下接种C57/BL6小鼠。当肿瘤达到约100-150mm^3体积时，将动物随机分成每组10只小鼠的组。

[0077] 分组：

[0078]

组	N	治疗	剂量水平	给药途径	计划的给药方案/天	施用的剂量 [a]
1	15	PBS	-	*i.p.*	第 1、4、8、12、15、16 天	第 1、4、8、12、15、16、19 天
2	15	小鼠 IgG1 同种型	15mg/kg	*i.p.*	第 1、8、15 天	第 1、8、15、19 天
		大鼠 IgG2a 同种型	5mg/kg	*i.p.*	第 1、4、8、12、16 天	第 1、4、8、12、16、19 天
3	15	18G7 抗体	15mg/kg	*i.p.*	第 1、8、15 天	第 1、8、15、19 天
		大鼠 IgG2a 同种型	5mg/kg	*i.p.*	第 1、4、8、12、16 天	第 1、4、8、12、16、19 天
4	15	小鼠 IgG1 同种型	15mg/kg	*i.p.*	第 1、8、15 天	第 1、8、15、19 天
		抗 PD-1	5mg/kg	*i.p.*	第 1、4、8、12、16 天	第 1、4、8、12、16、19 天
5	15	18G7 抗体	15mg/kg	*i.p.*	第 1、8、15 天	第 1、8、15、19 天
		抗 PD-1	5mg/kg	*i.p.*	第 1、4、8、12、16 天	第 1、4、8、12、16、19 天

[0079] 本研究的目的是临床前评估18G7抗体作为单一试剂、或18G7抗体与抗PD-1抗体的组合在C57BL/6免疫活性的小鼠中治疗皮下MC38小鼠结肠腺癌模型的体内治疗效果。已知该同系模型对抗PD-1单一疗法有反应，允许在传统肿瘤生长抑制研究中从补充疗法中看到加和/协同效应。然而，针对癌症干细胞(CSC)的靶向试剂的预期在于，在短期研究中不一定能看到直接的TGI效应，更可能的是治疗将在标准化疗治疗或手术后使肿瘤和免疫系统获得长期益处，而延长了反应的持续时间。目前的研究便针对这种情况。

[0080] 在图1中，如MC38模型所预期的，肿瘤生长抑制图显示在生长抑制方面抗PD-1是效应物。在该仅仅观察了18天的肿瘤生长抑制的实验形式中，18G7抗体对LGR5的抑制没有获得额外的益处。已知MC38细胞表达LGR5，但18G7抗体与细胞的结合不会导致直接的抗增殖作用。

[0081] 已知CSC对肿瘤微环境具有免疫抑制能力，抑制对肿瘤的免疫攻击。理想地，通过BNC101治疗减少LGR5+ve CSC，将限制它们的免疫抑制能力，从而允许抗PD-1发挥更强的治疗活性。这种可能需要超出动物模型伦理极限的更长时间才能看到的效果，将需要或不得

不在再植入试验中得到证明。

[0082] 考虑到这些局限性，肿瘤的流式细胞术分析可以给效应免疫细胞拍摄快照，这些效应免疫细胞中的群体变化可指向在18天的早期时间框架内可能没有机会看到的变化(尽管通过假定的作用机制(其中细胞毒性T细胞对肿瘤靶标保持活性)，抗PD-1在此时具有活性)。在终止时(第20天)对样品进行流式细胞术。分析肿瘤的下列群体：CD3、CD4、CD8；CD4、CD25、Foxp3和CD11b、Ly6G、Ly6C。

[0083] 尽管与维持/扩增CD8细胞(CD3子集)的治疗一致地，在抗PD-1治疗的动物肿瘤中可以看到T细胞含量的小幅度非显著地增加，但是募集至肿瘤的总T细胞(CD3+ve)在整个治疗期间保持相对稳定(图2)。

[0084] 在抗PD-1治疗的动物中，基于肿瘤的细胞毒性T细胞的显著增加是明显的，并且最有趣的是通过添加18G7得到进一步的增加。尽管抗PD-1和抗PD-1+18G7之间的比较不显著，但与同种型相比，则显著性的进一步增加证明与前提(即，免疫抑制性CSC的减少允许积累更多细胞毒性T细胞——一种进一步的“解除免疫系统抑制”)相一致的效果(图3)。由抗LGR5靶向表达LGR5的肿瘤块引起的、而不仅仅是CSC单独引起的其它肿瘤微环境因子可以增强这种效果。

[0085] 分析肿瘤Treg细胞可能是最有希望的结果。调节性T细胞(CD4+/CD25+/FoxP3+)或抑制性细胞通常抑制或下调免疫系统的局部活动，并防止病理性自身反应。在癌症的背景下，通过肿瘤抑制细胞毒性CD8细胞的诱导和增殖，这转化为免疫抑制和免疫逃逸。

[0086] 在文献中可见并且可能在此指出，Treg细胞在CSC和免疫抑制之间复杂的信号传导途径联系。与同种型对照相比，18G7治疗中Treg发生减少(9.4％)，当使用抗PD-1单一疗法时，Treg显著减少(减少33.9％)，但当与18G7组合使用时Treg更显著减少(减少57.3％)(图4)。该结果可能是理解免疫治疗性组合领域内抗LGR5抗体疗法的关键。

[0087] 序列ID列表

[0088]

描述	SEQ ID NO:
重链CDR1	1
重链CDR2	2
重链CDR3	3
轻链CDR1	4
轻链CDR2	5
轻链CDR3	6
重链可变结构域	7
轻链可变结构域	8
重链可变结构域	9
轻链可变结构域	10

[0089] 参考文献

[0090] 1.Lee Y,Sunwoo J.PD-L1 is preferentially expressed on CD44+tumor-initiating cells in head and neck squamous cell carcinoma.Journal for Immunotherapy of Cancer.2014;2(Suppl 3):P270.doi:10.1186/2051-1426-2-S3-P270.

[0091] 2.Hanahan D,Coussens LM.Accessories to the crime:functions of cells recruited to the tumor microenvironment.Cancer Cell.2012;21:309-322.[PubMed]

[0092] 3.Galon J,Costes A,Sanchez-Cabo F,Kirilovsky A,Mlecnik B,Lagorce-Pagès C,Tosolini M,Camus M,Berger A,Wind P等人,Type,density,and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.Science.2006;313:1960-1964.[PubMed]

[0093] 4.Zindl CL,Chaplin DD.Immunology.Tumor immune evasion.Science.2010;328:697-698.[PubMed]

[0094] 5.Schatton T,Schütte U,Frank NY,Zhan Q,Hoerning A,Robles SC,Zhou J,Hodi FS,Spagnoli GC,Murphy GF等人,Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells.Cancer Res.2010;70:697-708.[PubMed]

[0095] 6.Wei J,Barr J,Kong LY,Wang Y,Wu A,Sharma AK,Gumin J,Henry V,Colman H,Sawaya R等人,Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression.Clin Cancer Res.2010;16:461-473.[PubMed]

[0096] 7.Wei J,Barr J,Kong LY,Wang Y,Wu A,Sharma AK,Gumin J,Henry V,Colman H,Priebe W等人,Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway.Mol Cancer Ther.2010;9:67-78.[PubMed]

[0097] 8.Kryczek I,Lin Y,Nagarsheth N,Peng D,Zhao L,Zhao E,Vatan L,Szeliga W,Dou Y,Owens S等人,IL-22(+)CD4(+)T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L.Immunity.2014;40:772-784[PubMed]。

序列表

<110> 生态有限公司

<120> 抗体和检查点抑制剂的组合疗法

<130> WJP35271563

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> 小鼠(mus musculus)

<220>

<221> misc_feature

<223> 重链CDR1

<400> 1

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

Leu Tyr Thr Tyr Arg Thr Arg Pro
20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> 小鼠(mus musculus)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 18G7.1 重链CDR2氨基酸

<400> 2

Ile Leu Glu Leu Glu Pro Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Ala Ser Pro
1 5 10 15

Ser Glu Arg Thr His Arg
20

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> 小鼠(mus musculus)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 重链CDR3

<400> 3

Ala Leu Ala Ala Arg Gly Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr Arg Thr
1 5 10 15
Tyr Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Ser Glu Arg Gly Leu Asn Thr Tyr
20 25 30
Arg

<210> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> 小鼠(mus musculus)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 轻链CDR1
<400> 4
Gly Leu Ser Glu Arg Val Ala Leu Ala Ser Pro Ser Glu Arg Thr Tyr
1 5 10 15
Arg Gly Leu Tyr Ala Ser Asn Ser Glu Arg Pro His Glu
20 25

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠(mus musculus)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 轻链CDR2
<400> 5
Leu Glu Thr His Arg Ser Glu Arg
1 5

<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 轻链CDR3
<400> 6
Gly Leu Asn Gly Leu Asn Ala Ser Asn Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ser
1 5 10 15

Pro Pro Arg Ala Arg Gly Thr His Arg
20 25

<210> 7
<211> 391
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 重链可变结构域
<400> 7

Met Glu Thr Gly Leu Thr Arg Pro Ser Glu Arg Thr Arg Pro Val Ala
1 5 10 15
Leu Pro His Glu Leu Glu Pro His Glu Pro His Glu Leu Glu Ser Glu
20 25 30
Arg Val Ala Leu Thr His Arg Thr His Arg Gly Leu Tyr Val Ala Leu
35 40 45
His Ile Ser Ser Glu Arg Gly Leu Val Ala Leu Gly Leu Asn Leu Glu
50 55 60
Val Ala Leu Gly Leu Asn Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Ala Leu Ala Gly
65 70 75 80
Leu Val Ala Leu Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Pro Arg Gly Leu Tyr Gly
85 90 95
Leu Ser Glu Arg Leu Glu Ala Arg Gly Ile Leu Glu Ser Glu Arg Cys
100 105 110
Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr
115 120 125
Arg Ser Glu Arg Pro His Glu Thr His Arg Ala Leu Ala Thr Tyr Arg
130 135 140
Thr Arg Pro Ile Leu Glu Gly Leu Thr Arg Pro Val Ala Leu Ala Arg
145 150 155 160
Gly Gly Leu Asn Ala Leu Ala Pro Arg Gly Leu Tyr Leu Tyr Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Leu Glu Gly Leu Thr Arg Pro Ile Leu Glu Gly Leu Tyr Gly
180 185 190
Leu Ile Leu Glu Leu Glu Pro Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Ala Ser
195 200 205
Pro Ser Glu Arg Thr His Arg Ala Ser Asn Thr Tyr Arg Ala Ser Asn

210 215 220
Gly Leu Leu Tyr Ser Pro His Glu Leu Tyr Ser Gly Leu Tyr His Ile
225 230 235 240
Ser Val Ala Leu Thr His Arg Ile Leu Glu Ser Glu Arg Ala Leu Ala
245 250 255
Ala Ser Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Arg Ile Leu Glu Ser Glu Arg Thr
260 265 270
His Arg Ala Leu Ala Thr Tyr Arg Leu Glu Gly Leu Asn Thr Arg Pro
275 280 285
Ser Glu Arg Ser Glu Arg Leu Glu Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Ser Glu
290 295 300
Arg Ala Ser Pro Thr His Arg Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Tyr Arg
305 310 315 320
Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala Leu Ala Ala Arg Gly Ser Glu Arg Gly
325 330 335
Leu Tyr Thr Tyr Arg Thr Tyr Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Ser Glu
340 345 350
Arg Gly Leu Asn Thr Tyr Arg Thr Arg Pro Gly Leu Tyr Gly Leu Asn
355 360 365
Gly Leu Tyr Thr His Arg Leu Glu Val Ala Leu Thr His Arg Val Ala
370 375 380
Leu Ser Glu Arg Ser Glu Arg
385 390

<210> 8
<211> 391
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 重链可变结构域
<400> 8
Met Glu Thr Gly Leu Thr Arg Pro Ser Glu Arg Thr Arg Pro Val Ala
1 5 10 15
Leu Pro His Glu Leu Glu Pro His Glu Pro His Glu Leu Glu Ser Glu
20 25 30
Arg Val Ala Leu Thr His Arg Thr His Arg Gly Leu Tyr Val Ala Leu
35 40 45

His Ile Ser Ser Glu Arg Gly Leu Val Ala Leu Gly Leu Asn Leu Glu
50 55 60
Val Ala Leu Gly Leu Asn Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Ala Leu Ala Gly
65 70 75 80
Leu Val Ala Leu Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Pro Arg Gly Leu Tyr Gly
85 90 95
Leu Ser Glu Arg Leu Glu Ala Arg Gly Ile Leu Glu Ser Glu Arg Cys
100 105 110
Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr
115 120 125
Arg Ser Glu Arg Pro His Glu Thr His Arg Ala Leu Ala Thr Tyr Arg
130 135 140
Thr Arg Pro Ile Leu Glu Gly Leu Thr Arg Pro Val Ala Leu Ala Arg
145 150 155 160
Gly Gly Leu Asn Ala Leu Ala Pro Arg Gly Leu Tyr Leu Tyr Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Leu Glu Gly Leu Thr Arg Pro Ile Leu Glu Gly Leu Tyr Gly
180 185 190
Leu Ile Leu Glu Leu Glu Pro Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Ala Ser
195 200 205
Pro Ser Glu Arg Thr His Arg Ala Ser Asn Thr Tyr Arg Ala Ser Asn
210 215 220
Gly Leu Leu Tyr Ser Pro His Glu Leu Tyr Ser Gly Leu Tyr His Ile
225 230 235 240
Ser Val Ala Leu Thr His Arg Ile Leu Glu Ser Glu Arg Ala Leu Ala
245 250 255
Ala Ser Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Arg Ile Leu Glu Ser Glu Arg Thr
260 265 270
His Arg Ala Leu Ala Thr Tyr Arg Leu Glu Gly Leu Asn Thr Arg Pro
275 280 285
Ser Glu Arg Ser Glu Arg Leu Glu Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Ser Glu
290 295 300
Arg Ala Ser Pro Thr His Arg Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Tyr Arg
305 310 315 320
Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala Leu Ala Ala Arg Gly Ser Glu Arg Gly
325 330 335
Leu Tyr Thr Tyr Arg Thr Tyr Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Ser Glu
340 345 350
Arg Gly Leu Asn Thr Tyr Arg Thr Arg Pro Gly Leu Tyr Gly Leu Asn

355 360 365
Gly Leu Tyr Thr His Arg Leu Glu Val Ala Leu Thr His Arg Val Ala
370 375 380
Leu Ser Glu Arg Ser Glu Arg
385 390

<210> 9
<211> 365
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 轻链可变结构域
<400> 9

Met Glu Thr Ser Glu Arg Val Ala Leu Pro Arg Thr His Arg Gly Leu
1 5 10 15
Asn Val Ala Leu Leu Glu Gly Leu Tyr Leu Glu Leu Glu Leu Glu Leu
20 25 30
Glu Thr Arg Pro Leu Glu Thr His Arg Ala Ser Pro Ala Leu Ala Ala
35 40 45
Arg Gly Cys Tyr Ser Ala Ser Pro Ile Leu Glu Val Ala Leu Leu Glu
50 55 60
Thr His Arg Gly Leu Asn Ser Glu Arg Pro Arg Ala Leu Ala Ser Glu
65 70 75 80
Arg Leu Glu Ala Leu Ala Val Ala Leu Ser Glu Arg Pro Arg Gly Leu
85 90 95
Tyr Gly Leu Asn Ala Arg Gly Ala Leu Ala Thr His Arg Ile Leu Glu
100 105 110
Thr His Arg Cys Tyr Ser Ala Arg Gly Ala Leu Ala Ser Glu Arg Gly
115 120 125
Leu Ser Glu Arg Val Ala Leu Ala Ser Pro Ser Glu Arg Thr Tyr Arg
130 135 140
Gly Leu Tyr Ala Ser Asn Ser Glu Arg Pro His Glu Met Glu Thr His
145 150 155 160
Ile Ser Thr Arg Pro Thr Tyr Arg Gly Leu Asn Gly Leu Asn Leu Tyr
165 170 175
Ser Pro Arg Gly Leu Tyr Gly Leu Asn Pro Arg Pro Arg Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Glu Leu Glu Ile Leu Glu Thr Tyr Arg Leu Glu Thr His Arg Ser
195 200 205
Glu Arg Ala Ser Asn Leu Glu Gly Leu Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Val
210 215 220
Ala Leu Pro Arg Ala Ser Pro Ala Arg Gly Pro His Glu Ser Glu Arg
225 230 235 240
Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Thr
245 250 255
His Arg Ala Ser Pro Pro His Glu Thr His Arg Leu Glu Thr His Arg
260 265 270
Ile Leu Glu Ala Ser Asn Pro Arg Val Ala Leu Gly Leu Ala Leu Ala
275 280 285
Ala Ser Asn Ala Ser Pro Ala Leu Ala Ala Leu Ala Thr His Arg Thr
290 295 300
Tyr Arg Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Gly Leu Asn Gly Leu Asn Ala Ser
305 310 315 320
Asn Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ser Pro Pro Arg Ala Arg Gly Thr His
325 330 335
Arg Pro His Glu Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Thr His Arg
340 345 350
Leu Tyr Ser Leu Glu Gly Leu Ile Leu Glu Leu Tyr Ser
355 360 365

<210> 10
<211> 365
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 轻链可变结构域
<400> 10

Met Glu Thr Ser Glu Arg Val Ala Leu Pro Arg Thr His Arg Gly Leu
1 5 10 15
Asn Val Ala Leu Leu Glu Gly Leu Tyr Leu Glu Leu Glu Leu Glu Leu
20 25 30
Glu Thr Arg Pro Leu Glu Thr His Arg Ala Ser Pro Ala Leu Ala Ala
35 40 45
Arg Gly Cys Tyr Ser Ala Ser Pro Ile Leu Glu Val Ala Leu Leu Glu

50 55 60

Thr His Arg Gly Leu Asn Ser Glu Arg Pro Arg Ala Leu Ala Ser Glu
65 70 75 80

Arg Leu Glu Ala Leu Ala Val Ala Leu Ser Glu Arg Pro Arg Gly Leu
85 90 95

Tyr Gly Leu Asn Ala Arg Gly Ala Leu Ala Thr His Arg Ile Leu Glu
100 105 110

Thr His Arg Cys Tyr Ser Ala Arg Gly Ala Leu Ala Ser Glu Arg Gly
115 120 125

Leu Ser Glu Arg Val Ala Leu Ala Ser Pro Ser Glu Arg Thr Tyr Arg
130 135 140

Gly Leu Tyr Ala Ser Asn Ser Glu Arg Pro His Glu Met Glu Thr His
145 150 155 160

Ile Ser Thr Arg Pro Thr Tyr Arg Gly Leu Asn Gly Leu Asn Leu Tyr
165 170 175

Ser Pro Arg Gly Leu Tyr Gly Leu Asn Pro Arg Pro Arg Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Glu Leu Glu Ile Leu Glu Thr Tyr Arg Leu Glu Thr His Arg Ser
195 200 205

Glu Arg Ala Ser Asn Leu Glu Gly Leu Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Val
210 215 220

Ala Leu Pro Arg Ala Ser Pro Ala Arg Gly Pro His Glu Ser Glu Arg
225 230 235 240

Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Thr
245 250 255

His Arg Ala Ser Pro Pro His Glu Thr His Arg Leu Glu Thr His Arg
260 265 270

Ile Leu Glu Ala Ser Asn Pro Arg Val Ala Leu Gly Leu Ala Leu Ala
275 280 285

Ala Ser Asn Ala Ser Pro Ala Leu Ala Ala Leu Ala Thr His Arg Thr
290 295 300

Tyr Arg Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Gly Leu Asn Gly Leu Asn Ala Ser
305 310 315 320

Asn Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ser Pro Pro Arg Ala Arg Gly Thr His
325 330 335

Arg Pro His Glu Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Thr His Arg
340 345 350

Leu Tyr Ser Leu Glu Gly Leu Ile Leu Glu Leu Tyr Ser
355 360 365

肿瘤生长抑制

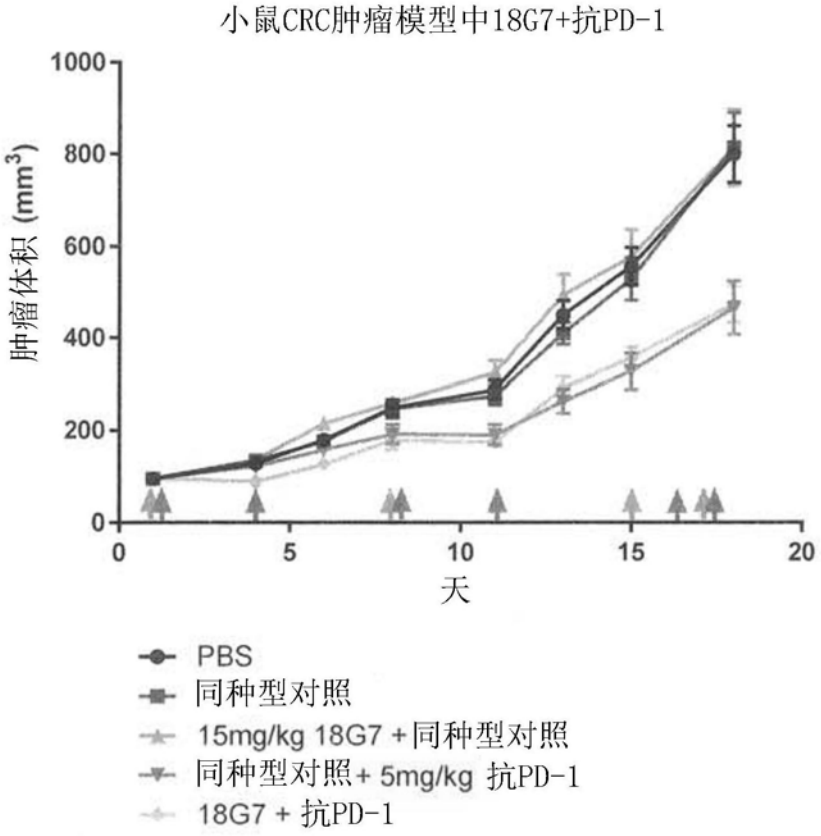

小鼠CRC肿瘤模型中18G7+抗PD-1
肿瘤体积 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
天
PBS
同种型对照
15mg/kg 18G7 +同种型对照
同种型对照+ 5mg/kg 抗PD-1
18G7 + 抗PD-1

图1

募集至肿瘤的总T细胞

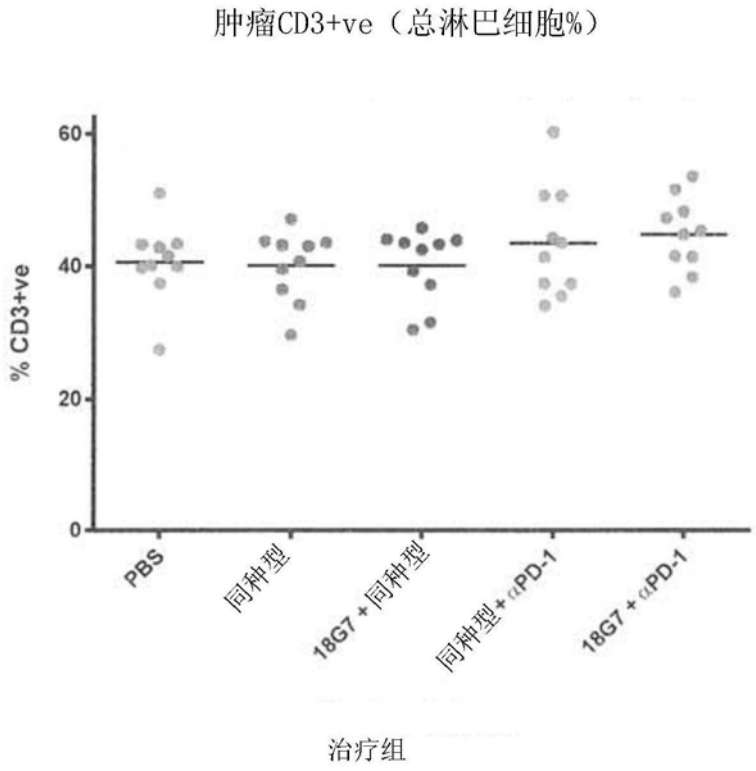


图2

募集至肿瘤的细胞毒性T细胞

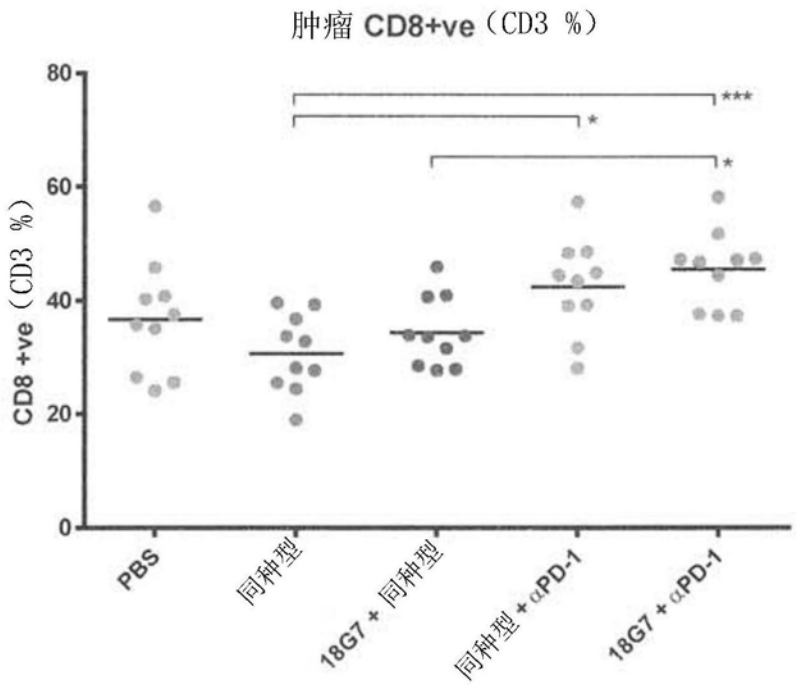


图3

肿瘤Treg

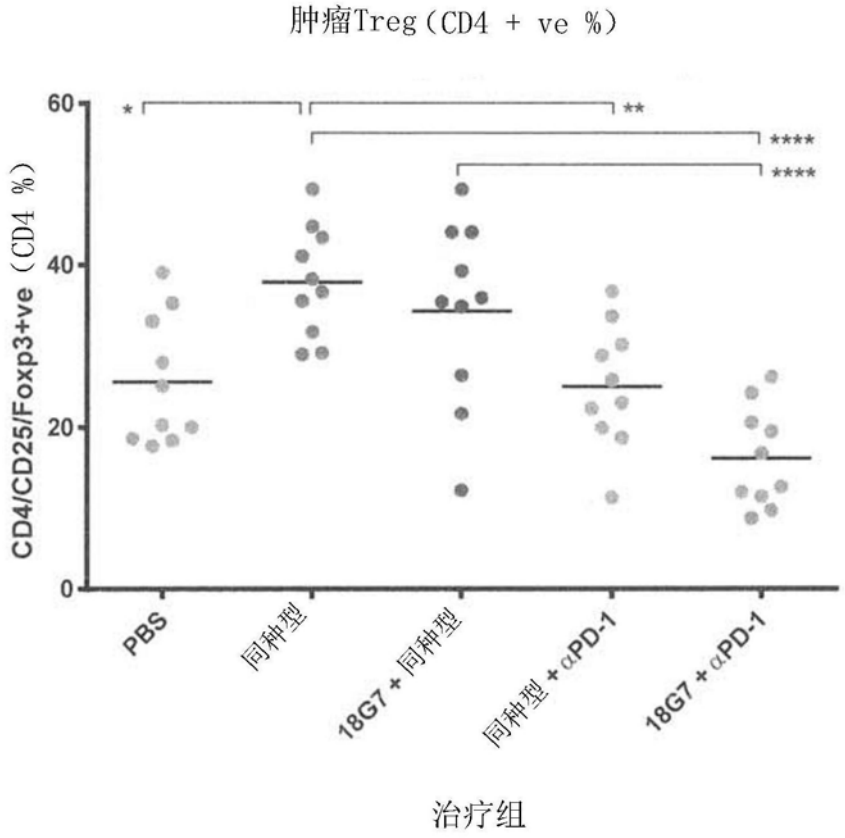

肿瘤Treg（CD4 + ve %）
CD4/CD25/Foxp3+ve（CD4 %）
60
40
20
0
*
**
****
****
PBS
同种型
18G7 + 同种型
同种型 + αPD-1
18G7 + αPD-1
治疗组

图4