



(10) 申请公布号 CN 118475611 A

(43) 申请公布日 2024.08.09

(21) 申请号 202280062098.6

(22) 申请日 2022.09.15

(30) 优先权数据

21306272.2 2021.09.15 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/075608 2022.09.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/041622 EN 2023.03.23

(71) 申请人 感应检查疗法公司

地址 法国马赛

(72) 发明人 E·瓦伦丁 P·弗罗纳

A·德盖萨特

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 孟凡宏

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书43页

序列表(电子公布) 附图10页

(54) 发明名称

抗BTN3A治疗的应答者选择

(57) 摘要

本公开涉及药物领域。更具体地,本发明涉及诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的分离的抗BTN3A抗体,其用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤,其中所述受试者已经通过评价所述受试者中的血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数而被选择用于用所述抗BTN3A抗体治疗。

1. 一种诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的分离的抗BTN3A抗体,其用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤,其中所述受试者已经通过评价所述受试者的血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数而被选择用于用所述抗BTN3A抗体治疗。

2. 根据权利要求1的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其中如果基线循环V γ 9V δ 2T细胞计数高于5000个细胞/mL、10000个细胞/mL或高于20000个细胞/mL,则选择所述受试者。

3. 根据权利要求1或2的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其中所述受试者是患有实体瘤的受试者,所述实体瘤通常选自黑色素瘤、胰腺导管腺癌(PDAC)、结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、前列腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈鳞状细胞癌和尿道上皮癌,优选选自头颈鳞状细胞癌(HNSCC)和卵巢癌。

4. 根据权利要求1或2的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其中所述受试者是患有血液恶性肿瘤的受试者,例如所述血液恶性肿瘤选自急性髓性白血病和/或弥漫性大B细胞淋巴瘤。

5. 根据权利要求1-4中任一项的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其与人BTN3A多肽结合,通过表面等离子共振所测量的 K_D 为10nM或更小,优选 K_D 为5nM或更小。

6. 根据权利要求1-5中任一项的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其中所述抗体体外诱导人PBMC中V γ 9V δ 2T细胞的活化,通过活化标记物CD69的表面表达测量的 EC_{50} 低于0.1 μ g/ml,优选0.01 μ g/ml或更低。

7. 根据权利要求1-6中任一项的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其中所述抗体在与表达BTN3的细胞共培养中诱导V γ 9V δ 2T细胞的活化,脱粒测定中测量的 EC_{50} 低于5 μ g/ml,优选1 μ g/ml或更低。

8. 根据权利要求1-7中任一项的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其包含突变的或化学修饰的IgG1恒定区,其中所述突变的或化学修饰的IgG1恒定区与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比,不赋予或降低与Fc γ 受体的结合。

9. 根据权利要求8的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其中所述突变的IgG1恒定区是IgG1三重突变L247、FL248E和P350S。

10. 根据权利要求1-9任一项的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其包含SEQ ID NO:12的HCDR1、SEQ ID NO:13的HCDR2、SEQ ID NO:14的HCDR3、SEQ ID NO:15的LCDR1、SEQ ID NO:16的LCDR2、SEQ ID NO:17的LCDR3。

11. 根据权利要求1-10任一项的用于用途的所述抗BTN3A抗体,其包含SEQ ID NO:1的可变重链多肽VH和SEQ ID NO:2的可变轻链多肽VL,通常为SEQ ID NO:4的全长重链和SEQ ID NO:6的全长轻链。

12. 根据权利要求1-11中任一项的用于用途的抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体与细胞因子如IL-2或IL-15或其聚乙二醇化变体联合施用。

13. 根据权利要求1-12中任一项的用于用途的抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体与抗PD1或抗PD-L1抗体例如帕博利珠单抗联合施用。

14. 根据权利要求1-13任一项的用于用途的抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体以每个剂量7至200mg,例如20至75mg的剂量静脉内施用至少两次,优选第二剂量在第一剂量后至少15天,通常在约21天后施用。

15. 一种诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的分离的抗BTN3A抗体,其用于治疗有需要的人类受试

者中的肿瘤,其中所述受试者患有用抗PD1或抗PD-L1治疗的复发性或难治性肿瘤,并且向所述受试者联合施用治疗有效量的抗PD1或抗PD-L1剂与治疗有效量的所述活化抗BTN3A抗体。

16.根据权利要求15的用于用途的分离的抗BTN3A抗体,其中所述肿瘤是实体瘤,特别是选自由膀胱癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌和头颈鳞状细胞癌组成的组。

17.根据权利要求15或16的用于用途的分离的抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链,且每次施用的活化抗BTN3A抗体的治疗剂量为7至200mg,优选20至75mg,且其中向受试者施用治疗有效量的帕博利珠单抗。

抗BTN3A治疗的应答者选择

技术领域

[0001] 本公开涉及药物领域。更具体地,本发明涉及用活化抗BTN3A抗体治疗癌症病症的方法。

背景技术

[0002] 外周血在技术上容易获得和处理,可以在更长的时间周期内重复获取,并且通常提供足够的样品体积。由于这些原因,外周血是肿瘤患者中免疫群体监测的高度利用的材料(Schnell et al,Biomedicines2018,6,25)。相反,对浸润肿瘤组织的不同免疫细胞进行获取和表型分型在技术上仍然具有挑战性(Maibach et al,2020,Front Immunol2020;11:2105;Lara et al 2019,Nature,Scientific Reports 9:17589)。

[0003] 考虑到免疫系统的高度多样性和动态性质,外周免疫细胞的表型、功能和代谢的变化通常不被认为是肿瘤内发生的变化的代表(Schnell et al,Biomedicines 2018,6,25;Maibach et al,2020,Front Immunol 2020;11:2105)。

[0004] 此外,外周血中不同免疫细胞群体的频率或绝对计数与它们在肿瘤组织中的相应浸润之间没有清楚的相关性。这对于固有免疫细胞群如NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞尤其如此。

[0005] W02020/025703公开了抗BTN3A抗体,其活化V γ 9V δ 2T细胞的细胞溶解功能、细胞因子产生和/或增殖(活化抗BTN3A抗体),并因此可以用作免疫治疗剂以克服在癌症患者中观察到的免疫抑制机制。

[0006] 本发明人现在提供了外周血中 $\gamma\delta$ T细胞的绝对计数与肿瘤组织中 $\gamma\delta$ T细胞的活化之间的相关性的证据,从而提高了基于外周血中 $\gamma\delta$ T细胞的绝对计数来选择用活化抗BTN3A抗体治疗的应答者的可能性。

[0007] 本发明人首次进一步提供了用抗BTN3A抗体和抗PD1抗体的组合疗法在已经接受了用抗PD1抗体的先前免疫疗法的具有难治性或复发性肿瘤的患者中的临床功效的证据。

[0008] 发明概述

[0009] 本公开的第一方面涉及诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的分离的活化抗BTN3A抗体,其用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤,其中所述受试者已经通过评价所述受试者的血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数而被选择用于用所述抗BTN3A抗体的所述治疗。在具体的实施方案中,当基线循环V γ 9V δ 2T细胞计数高于5000个细胞/mL、高于10000个细胞/mL或高于20000个细胞/mL时,选择所述受试者进行所述治疗。

[0010] 本公开的另一方面涉及诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的分离的活化抗BTN3A抗体,其用于治疗有需要的人类受试者中的实体瘤,其中所述受试者已经通过评价来自所述受试者的实体瘤活检的肿瘤基线V γ 9+T细胞密度而被选择用于用所述抗BTN3A抗体的所述治疗。在具体的实施方案中,当肿瘤基线V γ 9+T细胞密度高于2、3、4、5、6、7、8、9或10个细胞/mm²时,选择所述受试者进行所述治疗。

[0011] 本公开还涉及用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤的方法,其包括施用治疗有效量的活化抗BTN3A抗体,其中所述人类受试者已经通过评价所述受试者的血液基线V γ 9V

δ 2T细胞计数而被选择用于所述活化抗BTN3A抗体治疗。

[0012] 本公开还涉及用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤的方法,其包括施用治疗有效量的活化抗BTN3A抗体,其中所述人类受试者已经通过评价所述受试者的肿瘤活检的基线V γ 9+T细胞密度而被选择用于所述活化抗BTN3A抗体治疗。

[0013] 另一方面请求保护用于选择符合活化抗BTN3A抗体治疗条件的受试者的方法,所述方法包括评价所述受试者中血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数的步骤。

[0014] 另一方面请求保护用于选择符合活化抗BTN3A抗体治疗条件的受试者的方法,所述方法包括评价所述受试者的肿瘤活检中的基线V γ 9+T细胞密度的步骤。

[0015] 本公开还涉及用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤的方法,其包括与治疗有效量的抗PD1/PDL1治疗联合施用治疗有效量的诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的活化抗BTN3A,其中所述受试者在先前的抗PD1/PDL1治疗后患有复发性或难治性肿瘤。

[0016] 本文还公开了用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤的方法,其包括施用治疗有效量的诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的活化抗BTN3A,其中所述肿瘤为选自膀胱癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌和头颈鳞状细胞癌的实体瘤。

[0017] 在优选的实施方案中,所述活化BTN3A抗体为如本文所述的mAb1或其具有mAb1的6个CDR的功能性变体。

附图说明

[0018] 图1A:在EVICTION中,免疫活化和IFN γ 产生与ICT01剂量和基线循环V γ 9V δ 2T细胞绝对计数两者相关。通过流式细胞术检测患者血液中V γ 9V δ 2T细胞和活化标志物(CD69和PD-L1, D0+24h)的基线绝对数(每毫升血液)。通过超敏感PK测定(Chimera Biotec, 德国)测定ICT01 C_{max}。通过商业试剂盒(MesoScale Discovery)评价循环细胞因子水平。IFN γ 倍数变化定义为IFN γ AUC(使用时间点D0、D+30min、D0+4h和D+24h)与IFN γ 基线AUC之比。Spearman相关性。图A:CD69阳性NK细胞的%,图B:PD-L1阳性粒细胞的%,图C:IFN γ 倍数变化。

[0019] 图2:在EVICTION中,ICT01后肿瘤免疫浸润和活化的增加与基线V γ 9 δ 2T细胞计数相关。图A:ICT01施用前患者血液中V γ 9V δ 2T细胞的基线绝对数(每毫升血液)。图B:通过多重定量IHC(数字病理学, Veracyte, 法国)评价的来自A组和C组的具有可用的良好质量活检的所有患者的不同表型的肿瘤细胞密度(细胞/mm²)的Log10倍数变化(治疗后与治疗前活检)。图C至E:通过多重定量IHC(数字病理学, Veracyte, 法国)评价的不同表型的肿瘤细胞密度(细胞/mm²)的Log10倍数变化(治疗后与治疗前活检)。根据V γ 9V δ 2T细胞基线绝对数,20000个细胞/mL截止值来划分患者人群。

[0020] 图3:V γ 9TCR+肿瘤细胞与循环V γ 9V δ 2T细胞计数相关。通过数字病理学、定量IHC(细胞/mm²)评价V γ 9TCR+的基线肿瘤细胞密度。ICT01施用前患者血液中V γ 9V δ 2T细胞的基线绝对数(每毫升血液)。Spearman相关性。

[0021] 图4:ICT01增加EVICTION患者中的PD-1表达。ICT01诱导的V γ 9V δ 2T细胞的活化增加了EVICTION的A组(图4A)和B组(图4B)的经治疗癌症患者中PD-1的表面表达(冷冻活检上的流式细胞术,每个剂量组的平均值)。双向ANOVA和Holm-Šídák's多重比较检验。

[0022] 图5:ICT01/帕博利珠单抗治疗诱导多种免疫细胞群的活化和迁移。在不同时间点

通过流式细胞术评价的患者血液中的基线绝对数(每毫升血液,基线的%) and 活化标记物(CD69和PD-L1,阳性的%)。图A:V γ 9V δ 2T细胞,图B:NK细胞,图C:CD8 T细胞,和图D:粒细胞。

具体实施方式

[0023] 定义

[0024] 为了更容易理解本公开,首先定义某些术语。在整个详细描述中阐述了另外的定义。

[0025] 如本文所用,术语“BTN3A”具有其在本领域中的一般含义。在具体的实施方案中,它指人BTN3A多肽,包括SEQ ID NO:18的BTN3A1、SEQ ID NO:19的BTN3A2或SEQ ID NO:20的BTN3A3。

[0026] 本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。因此,术语抗体不仅包括整个抗体分子,而且包括抗体片段以及抗体的变体(包括衍生物)。

[0027] 在啮齿动物和灵长类动物的天然抗体中,两条重链通过二硫键彼此连接,并且每条重链通过二硫键与轻链连接。有两种类型的轻链, λ 和 κ 。有五种主要的重链类型(或同种型)决定抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG和IgE。每条链含有不同的序列结构域。在典型的IgG抗体中,轻链包括两个结构域,可变结构域(VL)和恒定结构域(CL)。重链包括四个结构域,可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3,统称为CH)。轻链(VL)和重链(VH)的可变区决定了对抗原的结合识别和特异性。轻链(CL)和重链(CH)的恒定区赋予重要的生物学特性,例如抗体链缔合、分泌、跨胎盘移动性、补体结合和与Fc受体(FcR)的结合。

[0028] Fv片段是免疫球蛋白Fab片段的N-末端部分,并由一个轻链和一个重链的可变部分组成。抗体的特异性在于抗体结合位点和抗原决定簇之间的结构互补性。抗体结合位点由主要来自高变或互补决定区(CDR)的残基组成。有时,来自非高变区或构架区(FR)的残基可参与抗体结合位点,或影响整个结构域结构并因此影响结合位点。互补决定区或CDR是指一起确定天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。免疫球蛋白的轻链和重链各自具有三个CDR,分别命名为L-CDR1,L-CDR2,L-CDR3和H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3。因此,抗原结合位点通常包括六个CDR,其包含来自重链和轻链V区各自的CDR组。构架区(FR)是指介于CDR之间的氨基酸序列。因此,轻链和重链的可变区通常包含具有以下序列的4个构架区和3个CDR:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0029] 抗体可变结构域中的残基通常根据Kabat等人设计的系统来编号。该系统在Kabat等人在1987年在Sequences of Proteins of immunological interest,USDepartment of Health and Human Services,NIH,USA(Kabat et al.,1992,Sequences of Proteins of Immunological Interest,DIANE Publishing,下文称为“Kabat等人”)中阐述。在本说明书中使用该编号系统。kabat残基命名并不总是直接对应于SEQ ID序列中氨基酸残基的线性编号。实际的线性氨基酸序列可以含有比严格的Kabat编号中更少或更多的氨基酸,其对应于基本可变结构域结构的结构组分(无论框架或互补决定区(CDR))的截短或插入。对于给定抗体,残基的正确Kabat编号可通过将抗体序列中的同源残基与“标准”Kabat编号序列比对来确定。根据Kabat编号系统,重链可变区的CDR位于残基31-35(H-CDR1),残基50-65(H-

CDR2) 和残基95-102 (H-CDR3)。根据Kabat编号系统,轻链可变区的CDR位于残基24-34 (L-CDR1),残基50-56 (L-CDR2) 和残基89-97 (L-CDR3)。

[0030] 如本文所用,抗BTN3A抗体是特异性结合BTN3A多肽的抗体。

[0031] 如本文所用,术语“特异性结合”是指抗体可检测地结合存在于抗原(如BTN3A多肽)上的表位的能力。在一些实施例中,意指与如在外周血骨髓细胞(PBMC)上表达的人类BTN3A结合的抗体,优选具有如以下实施例中所述的在结合测定中通过流式细胞术测量的低于50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 并且更优选低于10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的EC50。在其它实施方案中,其意在指如实施例中所述的通过多循环动力学分析测量的以100nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、100pM或更小,或10pM或更小的 K_D 结合抗原(例如BTN3A多肽)的抗体。

[0032] 如本文所用,“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如,特异性结合BTN3A的分离的抗体基本上不含特异性结合除BTN3A以外的其它抗原的抗体)。然而,特异性结合BTN3A的分离的抗体可与其它抗原如来自其它物种的相关BTN3A分子具有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学物质。

[0033] 本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单分子组合物的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物对特定表位显示单一结合特异性和亲和力。

[0034] 短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”在本文中可与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0035] 本文所用的术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而本文所用的术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。

[0036] 本文所用的术语“ K_D ”意指解离常数,其由 K_d 与 K_a 的比例(即 K_d/K_a)获得,并表示为摩尔浓度(M)。抗体的 K_D 值可以使用本领域公知的方法测定。测定抗体 K_D 的方法是通过使用表面等离子体共振,或使用生物传感器体系如Biacore®体系。

[0037] 特异性还可以通过例如结合特异性抗原的亲和力/亲合力与结合其他无关分子(在这种情况下,特异性抗原是BTN3A多肽)的非特异性结合的亲和力/亲合力的比例为约10:1、约20:1、约50:1、约100:1、10,000:1或更大来表现。本文所用的术语“亲和力”是指抗体与表位结合的强度。

[0038] 如本文所用,术语“活化抗体”是指能够直接或间接诱导效应细胞的免疫功能的抗体。特别地,如本文所用,活化抗BTN3A抗体至少具有在与表达BTN3的细胞共培养中诱导 $\gamma\delta$ T细胞(通常为V γ 9V δ 2T细胞)活化的能力,其EC50低于5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更低,如在以下实施例中所述的脱粒测定中所测量。

[0039] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0040] 如本文所用,术语“治疗”是指(1)抑制疾病中的一种或多种;例如,抑制正在经历或显示疾病、病症或障碍的病理学或症状学的个体中的疾病、病症或障碍(即阻止病理学和/或症状学的进一步发展);和(2)改善疾病的一种或多种;例如,改善正在经历或显示疾病、症或障碍的病理学或症状学的个体的疾病、病症或障碍(即逆转病理学和/或症状学),例如降低疾病的严重性或减少或减轻疾病的一种或多种症状。特别地,关于肿瘤的治疗,术语“治疗”可指抑制肿瘤生长或减小肿瘤大小。

[0041] 如本文所用,“血液V γ 9V δ 2T细胞计数”是指在受试者的一定体积的血液样品中循环的V γ 9V δ 2T细胞的绝对数,如通过与校准珠相关的标准流式细胞术方法测定,例如如实施例中所所述的。

[0042] 如本文所用,“肿瘤V γ 9+T细胞密度”是指用特异性结合V γ 9TCR的抗体(诸如单克隆抗体7B6)通过免疫组织化学测定的受试者的一定体积的活组织检查中每mm²的细胞数,例如如实施例中所所述的。

[0043] 如本文所用,“联用疗法”,“共同施用”,“联合施用”或“伴随施用”是指至少两种治疗剂的联合施用,其中第一药剂(通常为活化抗BTN3A抗体(例如mAb1))与第二药剂(例如抗PD-1抗体(例如帕博利珠单抗)在有需要的相同受试者中同时或在时间间隔内分开施用,其中这些时间间隔允许联用伴侣显示出用于治疗病症(例如癌症)的协同或协同效应。尽管这些递送方法在本文所述的范围内,但并不旨在暗示治疗剂必须同时施用和/或配制用于一起递送。活化抗BTN3A抗体可以与一种或多种其它另外的疗法或治疗剂同时或在之前或之后施用。所述术语还意欲涵盖其中所述药剂不一定通过相同施用途径施用的治疗方案。

[0044] 需要活化抗BTN3A抗体治疗的受试者

[0045] 活化抗BTN3A抗体可以活化V γ 9V δ 2T细胞的细胞溶解功能、细胞因子产生和/或增殖,并且由此可以用于克服在癌症患者中观察到的免疫抑制机制(WO2020/025703)。

[0046] 如本文所用,术语“癌症”是指具有自主生长能力的细胞的过度增殖性和肿瘤性疾病状态,即以快速增殖性细胞生长为特征的异常状态或病症。过度增生性和肿瘤性疾病状态可分类为病理性的,即表征或构成疾病状态,或可分类为非病理性的,即偏离正常但不与疾病状态相关。该术语包括所有类型的癌生长或致癌过程,转移组织或恶性转化细胞、组织或器官,而与组织病理学类型或侵入阶段无关。

[0047] 术语“癌症”或“赘生物”包括各种器官系统的恶性肿瘤,如影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴、胃肠和生殖泌尿道的恶性肿瘤,以及包括恶性肿瘤如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌的腺癌。

[0048] 癌症通常可分为实体瘤癌症(非血液学恶性肿瘤)和血液学恶性肿瘤。

[0049] 血液恶性肿瘤的示例包括但不限于B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B-NHL如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、T-NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、NK细胞淋巴瘤和骨髓细胞系瘤包括急性骨髓性白血病。

[0050] 非血液癌症的示例包括但不限于结肠直肠癌、乳腺癌、肺癌(例如NSCLC)、脑癌、前列腺癌、头颈癌(例如HNSCC)、胰腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、骨癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、口腔癌、食道癌、甲状腺癌、肾癌、胃癌、睾丸癌、尿道上皮癌和皮肤癌(例如黑色素瘤)。

[0051] 在具体的实施方案中,需要抗BTN3A活化抗体治疗的所述受试者患有复发性/难治性实体瘤。在更具体的实施方案中,所述受试者患有晚期复发性/难治性实体瘤。

[0052] 在更具体的实施方案中,所述受试者在使用抗PD1或抗PDL1剂,例如抗PD1或抗PDL1抗体,典型地伊匹木单抗、纳武利尤单抗或帕博利珠单抗治疗后患有复发性/难治性实体瘤。在更具体的实施方案中,在使用抗PD1或抗PDL1剂治疗后患有复发性/难治性实体瘤的所述受试者还选自患有膀胱癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌和/或头颈鳞状细胞癌的受试者。

[0053] 在可与前述实施方案组合的其它具体实施方案中,需要抗BTN3A活化抗体治疗的

所述受试者患有卵巢癌。

[0054] 活化抗BTN3A抗体治疗

[0055] 如本文所用,“活化抗BTN3A抗体治疗”涉及任何治疗性治疗,包括施用作为活性成分的治疗有效量的活化抗BTN3A抗体,任选地与其它治疗性化合物联用。

[0056] 这种活化抗BTN3A抗体治疗的优选示例描述于W02012/80351和W02020/025703中。

[0057] 在具体的实施方案中,活化的抗BTN3A抗体可以作为唯一的活性成分施用或与例如用于治疗或预防上述疾病的其它药物联合施用。

[0058] 在具体的实施方案中,活化抗BTN3A抗体可以与抗肿瘤剂联合施用。

[0059] 在其它具体实施方案中,活化抗BTN3A抗体可以与细胞疗法(特别是 γ δ T细胞疗法)联合施用。

[0060] 在其它具体实施方案中,活化抗BTN3A抗体可以与免疫细胞因子(特别是IL-2、IL-15、IL-21、IL-12、GM-CSF)联合施用。

[0061] 在其它具体实施方案中,活化抗BTN3A抗体可与免疫治疗药物一起施用,诸如免疫检查点抑制剂(具体地,抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA-4、抗TIGIT、抗LAG-3、抗TIL-3抗体或其它抗PD1或抗PD-L1剂)。

[0062] 如本文所用,术语“细胞疗法”是指包括向有需要的受试者体内施用至少治疗有效量的细胞组合物的疗法。向患者施用的细胞可以是同种异体的或自体的。术语“ γ δ T细胞疗法”是指其中细胞组合物包括作为活性成分的 γ δ T细胞,特别是V γ 9/V δ 2T细胞的细胞疗法。在具体的实施方案中,所述V γ 9/V δ 2T细胞已经用 γ δ T细胞激动剂离体扩增和/或活化。

[0063] 细胞疗法产品是指向所述患者施用用于治疗目的的细胞组合物。所述细胞疗法产品包括治疗有效剂量的细胞和任选的另外的赋形剂、佐剂或其它药学上可接受的载体。

[0064] 可以与活化抗BTN3A抗体(例如如下所述的mAb1)联合施用的抗肿瘤剂的示例可以包括但不限于烷化剂(例如环磷酰胺、美洛雷他明、苯丁酸氮芥、美法仑、硝基苏拉明、替莫唑胺)、蒽环类(例如柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、戊柔比星)、紫杉烷类(例如紫杉醇、多西他赛)、埃坡霉素、拓扑异构酶I的抑制剂(例如伊立替康或拓扑替康)、拓扑异构酶II的抑制剂(例如依托泊苷、替尼泊苷或他氟泊苷)、核苷酸类似物和前体类似物(例如阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯嘌呤、甲氨蝶呤或硫鸟嘌呤)、肽抗生素(例如卡铂、顺氯氨铂和奥沙利铂)、类视黄醇(例如维a酸、阿力维a酸、贝沙罗汀)、长春碱及其衍生物(例如长春碱、长春新碱、长春瑞滨)、靶向疗法例如激酶抑制剂(例如依鲁替尼、艾代拉利司、埃罗替尼、吉非替尼、伊马替尼、维罗非尼、维莫德吉)、蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米、卡非佐米)、组蛋白去乙酰化酶抑制剂(例如伏立诺他或罗米地辛)。

[0065] 可以与活化抗BTN3A抗体(例如如下所述的mAb1)联合施用的免疫治疗剂的示例包括但不限于磷酸抗原(例如唑来膦酸或其它二膦酸盐)、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体和细胞因子(例如白介素2(IL-2)(Choudhry H et al,2018,Biomed Res Int.2018May 6)、白细胞介素15(IL-15)(Patidar M et al.,Cytokine Growth Factor Rev.2016Oct;31:49-59)、白细胞介素21(IL-21)(Caccamo N.et al.,PLoS One.2012;7(7):e41940),或白细胞介素33(IL-33)(Duault C et al.,J Immunol.2016Jan1;196(1):493-502),或其重组形式及其衍生物,或能够诱导淋巴细胞活

性(例如增殖或细胞因子产生或代谢改变)的任何细胞因子。术语衍生物用于可依赖于PEG化(例如与聚乙二醇(PEG)链缀合)、突变(例如氨基酸缺失、取代或插入),或与增效剂(例如与IgG1 Fc融合的IL15/IL15Ra复合物,其中IL-15具有额外突变(asn72asp),其进一步增加生物活性,使此复合物成为IL-2和IL-15R β γ 超激动剂(Rhode PR et al, Cancer Immunol Res.2016;4(1):49-60)(Barroso-Sousa R et al, Curr Oncol Rep.2018Nov 15;21(1):1)。

[0066] 术语“IL-2”具有其一般含义并指人白介素-2。IL-2是机体天然免疫应答的一部分。IL-2主要通过与其受体结合来调节淋巴细胞活性。

[0067] 术语“IL-15”具有其一般含义并指人白介素-15。与IL-2一样,IL-15结合由IL-2/IL-15受体 β 链(CD122)和共同的 γ 链(γ -C,CD132)组成的复合物并通过其发出信号。IL-15调节T细胞和自然杀伤(NK)细胞的活化和增殖。

[0068] 术语“IL-21”具有其一般含义并指人白介素-21。IL-21具有多效性,包括但不限于增强NK细胞和CD8+T细胞的细胞毒性、调节浆细胞分化和抑制Treg细胞。

[0069] 术语“IL-33”具有其一般含义并指人白介素-33。IL-33被认为是在组织应激或损伤时释放的警报,是IL-1家族的成员并结合ST2受体。已知IL-33是T_H1免疫细胞、自然杀伤(NK)细胞、iNKT细胞和CD8T淋巴细胞的有效刺激物。

[0070] 术语“PD-1”具有其在本领域中的一般含义并且是指程序性死亡-1受体。术语“PD-1”还指属于CD28-B7信号传导受体家族的I型跨膜蛋白,其包括CD28、细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)、诱导型共刺激因子(ICOS)和B-和T-淋巴细胞衰减因子(BTLA)(Greenwald RJ et al.,2005,Annual Review of Immunology Vol 23pp515-548)。

[0071] 术语“抗PD-1抗体”或“抗PD-1剂”或“抗PD-L1”具有其在本领域中的一般含义,并且是指分别具有对PD-1或PD-L1的结合亲和力和对PD-1的拮抗剂活性(即其抑制与PD-1相关的信号转导级联并抑制PD-1配体结合(PD-L1;PD-12))的抗体或其它结合化合物。这种抗PD-1抗体/药剂或抗PD-L1抗体/药剂,相对于其与CD28-B7信号传导受体家族(CD28;CTLA-4;ICOS;BTLA)的其他亚型或同种型的相互作用,分别以更强的亲和力和效力优先灭活PD-1。用于确定化合物是否为PD-1拮抗剂的测试和测定是本领域技术人员熟知的,例如描述于Shaabani S, et al(2015-2018)中。Expert Opin Ther Pat.2018Sep;28(9):665-678; Seliger, B.J. Clin. Med. 2019, 8, 2168。

[0072] 这种抗PD1或抗PDL1抗体的示例包括但不限于纳武单抗、帕博利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗或阿特殊单抗。

[0073] 在具体的实施方案中,“抗PD1/PD-L1治疗”包括向有需要的受试者施用治疗有效量的抗PD-1或抗PD-L1剂,特别是抗PD-1或抗PD-L1抗体。

[0074] 这种抗CTLA4抗体的示例包括但不限于伊匹木单抗。

[0075] 在具体的实施方案中,“活化抗BTN3A抗体治疗”包括如上定义的方法,其包括共同施用,例如同时或依次施用治疗有效量的如本文定义的活化抗BTN3A抗体和至少一种第二药物物质,所述第二药物物质是免疫治疗剂(例如抗PD-1、抗PD-L1抗体或其它结合化合物)和/或细胞因子,例如IL-2或IL-15或其衍生物,例如如上所述。在具体的实施方案中,活化抗BTN3A抗体治疗包括共同施用治疗有效量的如本文定义的抗BTN3A活化抗体,和治疗有效量的抗PD-1或抗PD-L1剂,例如抗PD-1或抗PD-L1抗体。在其它具体实施方案中,活化抗

BTN3A抗体治疗包括共同施用,例如同时或依次施用治疗有效量的本文定义的抗BTN3A活化抗体,和治疗有效量的IL-2或IL-15或其衍生物,其聚乙二醇化变体和超激动剂变体,例如如上所述,任选地与抗PD1抗体如帕博利珠单抗组合。

[0076] 在具体的实施方案中,将活化抗BTN3A抗体配制在药物组合物中。例如,药物组合物可包括一种或多种额外的赋形剂,包括缓冲剂、稳定剂、抗氧化剂、表面活性剂或盐。

[0077] 根据一个实施方案,包含活化抗BTN3A抗体的药物组合物是水溶液,例如可注射制剂。根据特定的实施方案,包含活化抗BTN3A抗体的药物组合物是用于输注的溶液。用于静脉内或皮下施用的抗体制剂是本领域熟知的,并且例如Razinkov et al. *J Biomol Screen*. 2015APR;20(4):468-83中描述的。

[0078] 包含活化抗BTN3A抗体的药物组合物可以配制为各种浓度。例如,制剂可以包含浓度为0.1 μ M至1mM,更优选1 μ M至500 μ M,500 μ M至1mM,300 μ M至700 μ M,1 μ M至200 μ M,100 μ M至200 μ M,200 μ M至300 μ M,300 μ M至400 μ M,400 μ M至500 μ M,500 μ M至600 μ M,600 μ M至700 μ M,800 μ M至900 μ M,或900 μ M至1mM的活化抗BTN3A抗体。通常,制剂包含浓度为300 μ M至700 μ M的活化抗BTN3A抗体。

[0079] 通常,活化抗BTN3A抗体在人类患者中的治疗剂量将为每次施用100 μ g至700mg的范围内(基于70kg的体重)。例如,最大治疗剂量可以为每次施用0.1至10mg/kg的范围内,例如0.1至5mg/kg或1至5mg/kg,或0.1至2mg/kg。应当理解,这样的剂量可以以不同的间隔施用,如由肿瘤学家/医师所确定的;例如,剂量可以每天、每周两次、每周、每两周、每三周或每月施用。

[0080] 通常,在具体的实施方案中,所述活化抗BTN3A抗体以每个剂量7至200mg的剂量静脉内施用至少两次,通常每21天施用一次。

[0081] 例如,静脉内施用活化抗BTN3A抗体(优选下文所述的mAb1)作为单一疗法的合适剂量选自7、10、20、50、75、100、125、150、175和200mg。在其它具体实施方案中,静脉内施用活化抗BTN3A抗体(优选mAb1)作为单一疗法的合适剂量选自7、10、20、50、75、100、125、150、175和200mg。在更具体的实施方案中,静脉内施用活化抗BTN3A抗体(优选mAb1)作为单一疗法的合适剂量选自每次施用20和75mg。

[0082] 在所述活化抗BTN3A抗体与抗PD1或抗PD-L1抗体联合施用的具体实施方案中,用于静脉内施用活化抗BTN3A抗体的合适剂量选自7、10、20、50、75、100、125、150、175和200mg。抗PD1或抗PD-L1抗体可以根据制造商批准的剂量施用。例如,在本公开方法的具体实施方案中,帕博利珠单抗(KEYTRUDA)可以与所述活化抗BTN3A抗体(优选mAb1)联合施用,通常帕博利珠单抗通过静脉内输注以200mg的剂量施用,mAb1以20至70mg的剂量施用。

[0083] 在具体的实施方案中,根据本公开的方法用于用途的活化抗BTN3A抗体(优选如下文所述的mAb1)以每个剂量7至200mg的剂量静脉内施用至少两次,优选第二剂量在第一剂量后至少15天,通常在约21天后施用。

[0084] 优选的活化性抗BTN3A抗体

[0085] 在具体的实施方案中,根据本公开的本方法用于用途的所述活化抗BTN3A抗体具有以下性质中的一种或多种:

[0086] (i) 其与BTN3A结合的 K_D 为10nM或更小,优选 K_D 为1nM或更小,例如如以下实施例中描述的通过SPR所测量;

[0087] (ii) 其与猕猴BTN3A1 (SEQ ID NO:21)、BTN3A2 (SEQ ID NO:22) 和/或BTN3A3 (SEQ ID NO:23) 的BTN3A3以100nM或更小,优选以10nM或更小的 K_D 交叉反应,例如如以下实施例中所描述的通过SPR所测量;

[0088] (iii) 其与人PBMC结合的 EC_{50} 为50 μ g/ml或更低,优选为10 μ g/ml或更低,如在以下实施例中所描述的流式细胞术分析中所测量;

[0089] (iv) 其在与表达BTN3的细胞共培养中诱导 $\gamma\delta$ -T细胞(通常为V γ 9V δ 2T细胞)的活化, EC_{50} 低于5 μ g/ml,优选1 μ g/ml或更低,如在以下实施例中所描述的脱粒测定中所测量。

[0090] 在具体的实施方案中,本公开的方法中用于用途的活化抗BTN3A抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时具有与亲本非人抗体至少相同的亲和力(或更高的亲和力)。在具体实施方案中,活化抗BTN3A抗体是W02012/080351中公开的亲本抗体mAb7.2的人源化抗体。其它示例包括W02012/080351中公开的亲本抗体mAb20.1的人源化抗体。

[0091] 通常,人源化抗体包含一个或多个可变区,其中CDR(或其部分)来源于非人抗体,例如鼠mAb7.2或mAb20.1,框架区(FR)(或其部分)来源于具有降低免疫原性的突变的鼠抗体序列。

[0092] 人源化抗体任选还包含人恒定区的至少一部分。

[0093] 在具体的实施方案中,根据本公开的活化抗BTN3A抗体是人源化沉默抗体,通常是人源化沉默IgG1或IgG4抗体。

[0094] 如本文所用,术语“沉默”抗体是指在如实施例中所描述的那些结合测定中测量时不展现或展现低Fc γ r结合和/或C1q结合的抗体。

[0095] 在一个实施方案中,术语“无或低Fc γ r和/或C1q结合”是指沉默抗体表现出的Fc γ r和/或C1q结合是用具有野生型人IgG1或IgG4同种型的相应抗体观察到的Fc γ r和/或C1q结合的至少50%以下,例如80%以下。

[0096] 本公开的方法中用于用途的优选抗体包括使用具有重链和轻链的抗体,所述重链和轻链包括鼠mAb7.2抗体的以下6个CDR(也公开于W02012/80769中)。

[0097] mAb7.2和mAb20.1的VHCDR1(也称为HCDR1)、VHCDR2(也称为HCDR2)、VHCDR3(也称为HCDR1)、VLCDR1(也称为LCDR1)、VLCDR2(也称为LCDR2)、VLCDR3(也称为HCDR3)的氨基酸序列示于表1中,CDR区用Kabat编号描述(Kabat et al.,1992,下文称为“Kabat et al”)。

[0098] 为了便于阅读,CDR区在下文中分别称为HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3。

[0099] 表1:依照Kabat编号的CDR区鼠mAb7.2和mAb20.1抗体

原始抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR 2	LCDR 3
[0100] mAb 7.2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
mAb 20.1	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31

[0101] 更优选的抗体包括具有表1中公开的mAb7.2或mAb20.1的6个CDR的人源化抗体。

[0102] 在其它具体实施方案中,本公开的方法包括使用具有包括如W02012/80769中公开的mAb20.1抗体的CDR的重链和轻链的抗体。特别地,在更具体的实施方案中,本公开的方法包括使用亲本鼠mAb20.1的人源化抗体并包括mAb20.1抗体的CDR。

[0103] 本公开的方法中使用的人源化抗体可包括对VH和VL内的框架残基进行的修饰,与相应的鼠抗体相比,通常与mAb7.2或mAb20.1的相应框架区相比,来降低抗体的免疫原性。

[0104] 在一个具体的实施方案中,本公开的抗体是亲本鼠抗体mAb7.2的人源化单克隆抗体,其具有mAb7.2的6个CDR并且在VH框架区中进一步包括至少以下氨基酸突变:V5Q;V11L;K12V;R66K;S74F;I75S;E81Q;S82AR;R82BS;R83T;D85E;T87S;L108S;以及与亲本鼠mAb7.2的原始鼠框架区相比,所述V_H框架区中的至少以下氨基酸突变:T5N;V15L;R18T;V19I;K42N;A43I;D70G;F73L;Q100G。

[0105] 在另一个具体的实施方案中,本公开的抗体是亲本鼠抗体mAb7.2的人源化单克隆抗体,与mAb7.2相比,在VH框架区中包括至少以下氨基酸突变:V5Q;V11L;K12V;R66K;S74F;I75S;E81Q;S82AR;R82BS;R83T;D85E;T87S;L108S;以及与亲本鼠mAb7.2的原始鼠框架区相比,所述V_H框架区中的至少以下氨基酸突变:T5N;V15L;R18T;V19I;K42N;A43I;D70G;F73L;Q100G。

[0106] 在更优选的实施方案中,本公开的方法包括使用选自自由mAb1、mAb2、mAb3、mAb4和mAb5组成的组且包含可变重链和轻链氨基酸序列和任选的人恒定区(同种型)的以下人源化重组抗体之一,如下表2中所述:

[0107] 表2:mAb1-mAb4的可变重链和轻链氨基酸序列

抗体	VH 氨基酸序列	VL 氨基酸序列	同种型恒定区
mAb1	SEQ ID NO: 1 (VH27.2)	SEQ ID NO: 2 (VK17.2)	沉默 IgG1 L247f/l248e/p350s
mAb 2	SEQ ID NO: 1 (VH27.2)	SEQ ID NO: 3 (VK27.2)	沉默 IgG1 L247f/l248e/p350s
[0108] mAb 3	SEQ ID NO: 1 (VH27.2)	SEQ ID NO: 2 (VK17.2)	IgG4S241P/L248 E
mAb 4	SEQ ID NO: 1 (VH27.2)	SEQ ID NO: 3 (VK27.2)	IgG4S241P/L248 E
mAb 5	SEQ ID NO: 24 (人源化的 VHmAb20.1)	SEQ ID NO: 25 (人源化的 VLmAb20.1)	沉默 IgG1 L247f/l248e/p350s

[0109] 用于产生mAb1至mAb4和mAb5的IgG1、IgG4恒定同种型区及其突变形式IgG1 L247F/L248E/P350S和IgG4 S241P/L248E的相应氨基酸和核苷酸编码序列是本领域熟知的(Oganesyan et al., 2008; Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 64, 700-704; Reddy et al., 200; J. Immunol. 164, 1925-1933)。IgG中发现的C-端赖氨酸可以被天然切割掉,并且这种修饰不影响抗体的性质;因此,在mAb1至mAb4和mAb5的构建体中可以额外缺失该残基。

[0110] mAb1、mAb2、mAb3、mAb4和mAb5的全长轻链和重链以及相应的编码序列示于下表3中。

[0111] 表3:全长重链和轻链DNA编码序列

抗体	氨基酸序列	DNA 编码序列
mAb1	重链: SEQ ID NO: 4 轻链: SEQ ID NO: 6	重链: SEQ ID NO: 8 轻链: SEQ ID NO: 10
mAb2	重链: SEQ ID NO: 4 轻链: SEQ ID NO: 7	重链: SEQ ID NO: 8 轻链: SEQ ID NO: 11
mAb3	重链: SEQ ID NO: 5 轻链: SEQ ID NO: 6	重链: SEQ ID NO: 9 轻链: SEQ ID NO: 10
mAb4	重链: SEQ ID NO: 5 轻链: SEQ ID NO: 7	重链: SEQ ID NO: 9 轻链: SEQ ID NO: 11
mAb5	重链: SEQ ID NO: 32 轻链: SEQ ID NO: 33	-

[0112] 在可与前述实施方案组合的某些实施方案中,本文提供的抗体是上文定义的抗体的抗体片段。

[0114] 本文所用的术语抗体片段包括保持抗原结合区具有与原始抗体基本上相同的BTN3A靶功能特性的抗体的任何片段。

[0115] 抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、单体和scFv片段、双抗体、单结构域或纳米抗体和其它片段。

[0116] 在具体的实施方案中,所述抗体片段是单价抗体,如scFv片段的Fab。

[0117] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含在同一多肽链(VH-VL)中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用太短而不能在同一链上的两个结构域之间配对的接头,所述结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。

[0118] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如美国专利号6,248,516B1)。

[0119] 抗体片段可通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过本文所述的重组宿主细胞产生。

[0120] 产生活化抗BTN3A抗体的方法

[0121] 本公开的方法中用于用途的活化抗BTN3A抗体可以使用例如本领域熟知的重组DNA技术和基因转染方法的组合在宿主细胞转染瘤中产生(Morrison, 1985 Science 229, 1202-1207)。

[0122] 在一个具体实施方案中,根据本公开的克隆或表达载体包含mAb1、mAb2、mAb3、mAb4或mAb5中任一种的重链和轻链的编码序列之一。

[0123] 用于表达本公开的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞),包括与DHFR选择标记(描述于Kaufman and Sharp, 1982 Mol. Cell. Biol. 2, 1304-1319)一起

使用的dhfr-CHO细胞(描述于Urlaub and Chasin,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.77,4216-4220)、CHO K1 dhfr+细胞系、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞,例如连同GS Xceed™基因表达系统(Lonza)的GS CHO细胞系。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养足以在宿主细胞中表达抗体的一段时间,并任选将抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中来产生抗体。可以使用标准蛋白质纯化方法从例如分泌后的培养基中回收和纯化抗体(Shukla et al.,2007,J.Chromatogr.B 848,28-39)。

[0124] 在一个具体的实施方案中,本公开的宿主细胞是用表达载体转染的宿主细胞,所述表达载体具有分别适于表达mAb1、mAb2、mAb3、mAb4和mAb5的编码序列,其可操作地连接至合适的启动子序列。

[0125] 例如,至少包含分别编码mAb1的重链和轻链的SEQ ID NO:8和10的核酸的宿主细胞用于产生根据本公开的本方法用于用途的抗体。

[0126] 然后可以在合适的条件下进一步培养后者宿主细胞,以表达和产生活化抗BTN3A抗体,通常分别选自mAb1、mAb2、mAb3、mAb4和mAb5。

[0127] 或者,无细胞表达系统可用于产生任何活化抗BTN3A抗体,例如mAb1、mAb2、mAb3、mAb4和mAb5。通常,已经描述了无细胞表达蛋白质或抗体的方法((Stech et al.,2017,Sci.Rep.7,12030)。

[0128] 评价血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数或V γ 9+T细胞密度

[0129] 本公开的方法能够预测受试者对如上所述的活化抗BTN3A抗体治疗的应答水平。在某些实施方案中,所述预测基于血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数的评价。在其它实施方案中,所述预测基于来自患者肿瘤活检的V γ 9+T细胞密度的评价。在其它实施方案中,预测基于血液基线V γ 9/V δ 2T细胞计数和V γ 9+T细胞密度的评价。

[0130] 如本文所用,术语“预测”是指允许在治疗之前以一定概率水平(统计上显著)确定对所述治疗的应答水平的方法。因此,术语“预测”不一定包括绝对应答。相反,它可以包括允许确定与没有选择步骤的患者群体中的平均概率相比概率更高的患者作为应答者的应答。

[0131] 本文所用的观察到“对活化抗BTN3A抗体治疗的应答”或等同的“对活化抗BTN3A抗体治疗的临床应答”是在治疗后待通过所述活化抗BTN3A抗体治疗来治疗的癌症的至少一种症状与治疗前的所述症状相比减少。

[0132] 如本文所用,术语“减少”或“增加”意指对照值的统计学上显著的减少或增加,优选对照值的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少90%或至少99%的减少或增加。

[0133] 根据本发明的方法的某些实施方案,基于在治疗之前在所述受试者的血液样品的体积中确定的血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数的表达的评价,预测患者是应答者或非应答者。

[0134] 根据本发明方法的其它实施方案,基于在治疗之前在所述受试者的肿瘤活组织检查体积中测定的V γ 9+T细胞密度的表达的评价,预测患者是应答者或非应答者。

[0135] 本文所用的术语“应答者”是指与非应答者受试者相比,表现出或可能表现出对活化抗BTN3A治疗的更好临床应答的患者。在一个实施方案中,应答者是患有癌症的患者,其表现出或可能表现出肿瘤的显著尺寸减小,例如,如通过标准肿瘤评价(例如用于实体瘤的

RECIST、iRECIST或RECIL) 或用于血液学适应症的其它标准应答评价 (例如Cheson/IWG) 所确定。

[0136] 在本公开的某些方法中,通过评价所述受试者中的血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数,选择所述受试者用于用所述抗BTN3A抗体的治疗。血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数越高,对所述抗BTN3A活化抗体治疗的应答越好。在本公开的其他方法中,通过评价来自所述受试者的肿瘤活检的肿瘤V γ 9+T细胞密度,选择所述受试者用于用所述抗BTN3A抗体的治疗。肿瘤基线V γ 9+T细胞密度越高,对所述抗BTN3A活化抗体治疗的应答越好。

[0137] 本发明人确实提供了使用血液基础 γ δ T细胞计数或肿瘤V γ 9+T细胞密度作为选择活化抗BTN3A抗体 (通常是活化抗BTN3A抗体的mAb1) 的应答者的预测性标志物的临床证据。

[0138] 包括确定血液样品中的基线V γ 9V δ 2T细胞计数的方法

[0139] 在具体的实施方案中,本公开的方法包括确定从待用活化抗BTN3A抗体治疗治疗的所述受试者获得的血液样品中的基线V γ 9V δ 2T细胞计数的步骤。

[0140] 如本文所用,血液样品通过标准血液采集方法如真空采血管获得。

[0141] 测定血液样品中 γ δ T细胞的数目可以通过免疫分型的任何常规技术实现。通常,常规/标准流式细胞术方法使用珠子进行校准。特定测定及其组分的合适条件是本领域技术人员熟知的。

[0142] 基线V γ 9V δ 2T细胞计数的这种评价通常在第一次施用所述活化抗BTN3A抗体之前少于4天,优选少于48小时,更优选少于24小时进行。

[0143] 预期高基线V γ 9V δ 2T细胞计数预示更好的应答。然而,用于选择符合治疗条件的患者的精确基线V γ 9V δ 2T细胞计数可由本领域技术人员确定,特别是取决于患者的临床参数 (例如年龄、性别、先前的治疗方案)、癌症诊断和所用的方案 (特别是如果所述活化抗BTN3A抗体用作单一疗法或与其它疗法 (通常为抗PD1或抗PDL1疗法) 联用)。

[0144] 在具体的实施方案中,如果基线循环V γ 9V δ 2T细胞计数高于1000个细胞/mL、2000个细胞/mL、3000个细胞/mL、4000个细胞/mL、5000个细胞/mL、6000个细胞/mL、7000个细胞/mL、8000个细胞/mL、9000个细胞/mL、10000个细胞/mL、11000个细胞/mL、12000个细胞/mL、13000个细胞/mL、15000个细胞/mL、16000个细胞/mL、17000个细胞/mL、18000个细胞/mL、19000个细胞/mL或高于20000个细胞/mL,则选择所述受试者用于活化抗BTN3A治疗。

[0145] 在具体的实施方案中,所述受试者患有具有实体瘤的癌症,并且如果所述受试者中基线循环V γ 9V δ 2T细胞计数高于20000个细胞/mL,则选择所述受试者用于活化抗BTN3A治疗 (通常mAb1治疗,优选以7至200mg的剂量进行两次或更多次注射)。

[0146] 在具体的实施方案中,所述受试者患有卵巢癌,并且如果所述受试者中的基线循环V γ 9V δ 2T细胞计数高于20000个细胞/mL,则选择所述受试者用于活化抗BTN3A治疗 (通常mAb1治疗,优选以7至200mg的剂量进行两次或更多次注射)。

[0147] 在具体的实施方案中,所述受试者患有头颈鳞状细胞癌,并且如果所述受试者中基线循环V γ 9V δ 2T细胞计数高于20000个细胞/mL,则选择所述受试者用于活化抗BTN3A治疗 (通常mAb1治疗,优选以7至200mg的剂量进行两次或更多次注射)。

[0148] 本公开还涉及用于评价对于活化抗BTN3A治疗有需要的受试者的合格性的方法,所述方法包括确定所述受试者的血液样品中的基线循环V γ 9V δ 2T细胞计数,其中符合用于

活化抗BTN3A治疗条件的受试者具有高于特定参考值的基线V γ 9V δ 2T细胞计数,所述参考值通常建立在1000至20000个细胞/mL。

[0149] 包括确定肿瘤活组织检查中的V γ 9+T细胞密度的方法

[0150] 在具体的实施方案中,本公开的方法包括测定从待用活化抗BTN3A抗体治疗的所述受试者获得的肿瘤活检组织中的V γ 9+T细胞密度的步骤。

[0151] 测定V γ 9+T细胞密度可通过免疫分型的任何常规技术实现。通常,V γ 9+T细胞密度通过在活组织检查中用特异性针对V γ 9+TCR的单克隆抗体(例如抗体7B6)免疫组织化学来评价,例如如实施例所述。

[0152] 对基线V γ 9+T细胞密度的这种评价通常在向所述有需要的受试者第一次施用所述活化抗BTN3A抗体之前少于4天,优选少于48小时,更优选少于24小时进行。

[0153] 预期高V γ 9+T细胞密度预示着更好的应答。然而,用于选择符合治疗条件的患者的确切V γ 9+T细胞密度可由本领域技术人员确定,特别是取决于患者的临床参数(例如年龄、性别、先前的治疗方案)、癌症诊断和所用的方案(特别是如果所述活化抗BTN3A抗体用作单一疗法或与其它疗法(通常为抗PD1或抗PDL1疗法)联用)。

[0154] 在具体的实施方案中,如果来自所述受试者的肿瘤活检中基线V γ 9+T细胞密度高于1个细胞/mm²,2个细胞/mm²,3个细胞/mm²或4个细胞/mm²,则选择所述受试者用于活化抗BTN3A治疗。

[0155] 在具体的实施方案中,所述受试者患有具有实体瘤的癌症,并且如果来自所述受试者的肿瘤活检中基线V γ 9+T细胞密度高于3个细胞/mm²或高于4个细胞/mm²,则选择所述受试者用于活化抗BTN3A治疗(通常mAb1治疗,优选以7至200mg的剂量进行两次或更多次注射)。

[0156] 在具体的实施方案中,所述受试者患有卵巢癌,并且如果来自所述受试者的肿瘤活检中基线V γ 9+T细胞密度高于3个细胞/mm²或高于4个细胞/mm²,则选择所述受试者用于活化抗BTN3A治疗(通常mAb1治疗,优选以7至200mg的剂量进行两次或更多次注射)。

[0157] 在具体的实施方案中,所述受试者患有头颈鳞状细胞癌,并且如果来自所述受试者的肿瘤活检中基线V γ 9+T细胞密度高于3个细胞/mm²或高于4个细胞/mm²,则选择所述受试者用于活化抗BTN3A治疗(通常mAb1治疗,优选以7至200mg的剂量进行两次或更多次注射)。

[0158] 本公开还涉及用于评价对于活化抗BTN3A治疗有需要的受试者的合格性的方法,所述方法包括确定所述受试者的肿瘤活检中的基线V γ 9+T细胞密度,其中符合用于活化抗BTN3A治疗条件的受试者具有在来自所述受试者的肿瘤活检中确定的高于3个细胞/mm²或高于4个细胞/mm²的基线V γ 9+T细胞密度。

[0159] 本公开的方法的具体实施方案

[0160] E1.一种诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的分离的活化抗BTN3A抗体,其用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤,其中所述受试者已通过(i)在治疗之前评价所述受试者的血液样品中的血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数或(ii)在治疗之前所述受试者的肿瘤活组织检查中的基线V γ 9+T细胞密度而被选择用于用所述抗BTN3A抗体的所述治疗。

[0161] E2.根据E1的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中当(i)在血液样品中测定的基线循环V γ 9V δ 2T细胞计数高于5000个细胞/mL、高于10000个细胞/mL或高于20000个细胞/mL,

或(ii)在肿瘤活组织检查中测定的基线 $V\gamma 9+T$ 细胞密度高于2个细胞/ mm^2 或高于3个细胞/ mm^2 或高于4个细胞/ mm^2 时,选择所述受试者用于所述治疗。

[0162] E3.根据E1或E2的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述受试者患有非血液癌症。

[0163] E4.根据E3的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述受试者患有选自以下的癌症:黑色素瘤、胰腺导管腺癌(PDAC)、结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、前列腺癌、肺癌如非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈鳞状细胞癌和尿道上皮癌。

[0164] E5.根据E4的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述受试者患有头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)或卵巢癌。

[0165] E6.根据E1-E5中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述受试者患有复发性/难治性实体瘤。

[0166] E7.根据E1或E2的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述受试者患有血液恶性肿瘤。

[0167] E8.根据E7的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述受试者患有血液恶性肿瘤,所述血液恶性肿瘤选自B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B-NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、T-NHL慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、NK细胞淋巴瘤和骨髓细胞系肿瘤,包括急性骨髓性白血病(AML)。

[0168] E9.根据E1-E8中任一项的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述活化性抗BTN3A抗体以10nM或更小,优选以5nM或更小,例如50pM至5nM的 K_D 结合人BTN3A多肽,如通过表面等离子共振(SPR)所测量的。

[0169] E10.根据E1-E9中任一项的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述活化性抗BTN3A抗体与食蟹猴BTN3A交叉反应的 K_D 为100nM或更小,优选 K_D 为10nM或更小,如通过SPR所测量。

[0170] E11.根据E1-E10中任一项的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述活化性抗BTN3A抗体在体外诱导人PBMC中的 $V\gamma 9V\delta 2-T$ 细胞的活化,其 EC_{50} 低于0.1mg/mL,优选0.01mg/mL或更低,例如100pg/mL至0.1mg/mL,如通过活化标记物CD69的表面表达所测量;或者,所述活化抗BTN3A抗体在与表达BTN3的细胞共培养中诱导 $V\gamma 9V\delta 2T$ 细胞的活化, EC_{50} 低于5mg/mL,优选1mg/mL或更低,例如在100ng/mL至5mg/mL,如在脱粒测定中测量的。

[0171] E12.根据E1-E11任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:12的HCDR1,SEQ ID NO:13的HCDR2,SEQ ID NO:14的HCDR3,SEQ ID NO:15的LCDR1,SEQ ID NO:16的LCDR2和SEQ ID NO:17的LCDR3。

[0172] E13.根据E1-E12任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体是人源化抗体。

[0173] E14.根据E1-E13中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体在VH框架区中包含至少以下氨基酸突变:V5Q;V11L;K12V;R66K;S74F;I75S;E81Q;S82AR;R82BS;R83T;D85E;T87S;L108S;以及V κ 框架区中的至少以下氨基酸突变:T5N;V15L;R18T;V19I;K42N;A43I;D70G;F73L;Q100G。

[0174] E15.根据E1-E14中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A

抗体包含突变的或化学修饰的IgG1恒定区,其中当与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比时,所述突变的或化学修饰的IgG1恒定区不赋予或降低与Fc γ 受体的结合。

[0175] E16.根据E1-E15任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:1的可变重链(VH)和SEQ ID NO:2的可变轻链(VL)。

[0176] E17.根据E1-E15任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:1的可变重链(VH)和SEQ ID NO:3的可变轻链(VL)。

[0177] E18.根据E1-E17中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含沉默Fc区,通常为突变IgG1恒定区或突变IgG4恒定区。

[0178] E19.根据E18的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述突变体IgG1恒定区是IgG1三重突变体L247F、L248E和P350S。

[0179] E20.根据E18的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述突变体IgG4恒定区是IgG4双重突变体S241P、L248E。

[0180] E21.根据E1-E17中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链。

[0181] E22.根据E1-E17中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:7的轻链。

[0182] E23.根据E1-E17中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:6的轻链。

[0183] E24.根据E1-E17中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:7的轻链。

[0184] E25.根据E1-E24中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体与细胞因子联合施用。

[0185] E26.根据E25任一项的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述细胞因子是IL2或IL15激动剂。

[0186] E27.根据E1-E26中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体与免疫治疗剂联合施用。

[0187] E28.根据E27的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述免疫治疗剂是抗PD1或抗PD-L1抗体。

[0188] E29.根据E28的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述抗PD1或抗PD-L1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗或阿特珠单抗,优选帕博利珠单抗。

[0189] E30.根据E27的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体与(i)抗PD1或抗PD-L1抗体和(ii)细胞因子如IL2或IL15激动剂或其衍生物,其聚乙二醇化变体和超激动剂变体联合施用。

[0190] E31.根据E1-E30中任一项的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中活化性抗BTN3A抗体的治疗剂量为每次施用7至200mg内。

[0191] E32.根据E1-E31中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体是mAb1,且活化抗BTN3A抗体的治疗剂量为每次施用7至200mg内。

[0192] E33.用于根据E1-E32任一项的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述活化性

抗BTN3A抗体以每个剂量7至200mg的剂量静脉内施用至少两次,优选第二剂量在第一剂量后至少15天施用,通常在约21天后施用。

[0193] E34.根据E1-E33中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体以选自7、10、20、50、75、100、125、150、170或200mg的剂量施用。

[0194] E35.根据E1-E34任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体是mAb1,并且以选自7、10、20、50、75、100、125、150、170或200mg的剂量施用。

[0195] E36.根据E1-E34任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体是mAb1,并且以选自7、10、20、50、75、100、125、150、170或200mg的剂量与抗PD1或抗PD-L1抗体例如帕博利珠单抗联合施用。

[0196] E37.根据E1-E34中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体是mAb1且所述受试者患有头颈鳞状细胞癌(HNSCC)或卵巢癌,且当(i)在血液样品中测定的基线循环V γ 9+T细胞计数高于5000个细胞/mL、高于10000个细胞/mL、或高于20000个细胞/mL,或(ii)在肿瘤活检中测定的基线V γ 9+T细胞密度高于2个细胞/mm²,或高于3个细胞/mm²或高于4个细胞/mm²时,选择所述受试者用于所述治疗。

[0197] E38.一种用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤的方法,其包括施用治疗有效量的活化抗BTN3A抗体,其中所述人类受试者已通过评价(i)来自血液样品的血液基线V γ 9/V δ 2T细胞计数或(ii)来自所述受试者的肿瘤活检的基线V γ 9+T细胞密度而被选择用于所述抗BTN3A活化抗体治疗。

[0198] E39.根据E38的方法,其中当(i)基线循环V γ 9-V δ 2T细胞计数高于5000个细胞/mL、高于10000个细胞/mL或高于20000个细胞/mL或(ii)基线V γ 9+T细胞密度高于2个细胞/mm²或高于3个细胞/mm²或高于4个细胞/mm²时,选择所述受试者进行所述治疗。

[0199] E40.根据E38或E39的方法,其中所述受试者患有非血液癌症。

[0200] E41.根据E40的方法,其中所述受试者患有选自以下的癌症:黑色素瘤、胰腺导管腺癌(PDAC)、结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、前列腺癌、肺癌如非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈鳞状细胞癌和尿道上皮癌。

[0201] E42.根据E40的方法,其中所述受试者患有头颈鳞状细胞癌(HNSCC)或卵巢癌。

[0202] E43.根据E38-E42中任一项的方法,其中所述受试者患有复发性/难治性实体瘤。

[0203] E44.根据E38-E43中任一项的方法,其中所述受试者是患有血液恶性肿瘤的受试者。

[0204] E45.根据E44的方法,其中所述受试者患有血液恶性肿瘤,其选自B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B-NHL如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、T-NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、NK细胞淋巴瘤和骨髓细胞系瘤包括急性骨髓性白血病。

[0205] E46.根据E38-E45中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体以10nM或更小,优选以5nM或更小,例如50pM至5nM的K_D与人BTN3A多肽结合,如通过表面等离子共振(SPR)测量的。

[0206] E47.根据E38-E46中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体与食蟹猴BTN3A交叉反应的K_D为100nM或更小,优选K_D为10nM或更小,如通过SPR所测量。

[0207] E48.根据E38-E47中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体在体外诱导人PBMC

中的V γ 9V δ 2T细胞的活化,EC₅₀低于0.1mg/mL,优选0.01mg/mL或更低,例如100pg/mL至0.1mg/mL,如通过活化标志物CD69的表面表达测量的。

[0208] E49.根据E38-E48中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体在与表达BTN3的细胞共培养中诱导V γ 9V δ 2T细胞的活化,EC₅₀低于5mg/mL,优选1mg/mL或更低,例如100ng/mL至5mg/mL,如在脱粒测定中测量的。

[0209] E50.根据E38-E49中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:12的HCDR1,SEQ ID NO:13的HCDR2,SEQ ID NO:14的HCDR3,SEQ ID NO:15的LCDR1,SEQ ID NO:16的LCDR2和SEQ ID NO:17的LCDR3。

[0210] E51.根据E38-E50中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体是人源化抗体。

[0211] E52.根据E51的方法,其中所述活化性抗BTN3A抗体在VH框架区中包含至少以下氨基酸突变:V5Q;V11L;K12V;R66K;S74F;I75S;E81Q;S82AR;R82BS;R83T;D85E;T87S;L108S;以及所述V κ 框架区中的至少以下氨基酸突变:T5N;V15L;R18T;V19I;K42N;A43I;D70G;F73L;Q100G。

[0212] E53.根据E38-E51中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含突变体或化学修饰的IgG1恒定区,其中当与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比时,所述突变体或化学修饰的IgG1恒定区不赋予或降低与Fc γ 受体的结合。

[0213] E54.根据E38-E53中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:1的可变重链(VH)和SEQ ID NO:2的可变轻链(VL)。

[0214] E55.根据E38-E53中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:1的可变重链(VH)和SEQ ID NO:3的可变轻链(VL)。

[0215] E56.根据E38-E55中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含沉默Fc区,通常为突变IgG1恒定区或突变IgG4恒定区。

[0216] E57.根据E56的方法,其中所述突变体IgG1恒定区是IgG1三重突变体L247F L248E和P350S。

[0217] E58.根据E56的方法,其中所述突变体IgG4恒定区是IgG4双重突变体S241P L248E。

[0218] E59.根据E38-E58中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链。

[0219] E60.根据E38-E58中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:7的轻链。

[0220] E61.根据E38-E58中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:6的轻链。

[0221] E62.根据E38-E58中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:7的轻链。

[0222] E63.根据E38-E62中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体与细胞因子联合施用。

[0223] E64.根据E63的方法,其中所述细胞因子是IL2或IL15激动剂。

[0224] E65.根据E38-E64中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体与免疫治疗剂联合施用。

- [0225] E66. 根据E65的方法, 其中所述免疫治疗剂是抗PD1或抗PD-L1抗体。
- [0226] E67. 根据E66的方法, 其中所述抗PD1或抗PD-L1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗或阿特珠单抗, 优选帕博利珠单抗。
- [0227] E68. 根据E66的方法, 其中所述活化抗BTN3A抗体与 (i) 抗PD1或抗PD-L1抗体和 (ii) 细胞因子如IL2或IL15激动剂或其衍生物, 其聚乙二醇化变体和超激动剂变体联合施用。
- [0228] E69. 根据E38-E68中任一项的方法, 其中所述活化抗BTN3A抗体的治疗剂量为每次施用7至200mg内。
- [0229] E70. 根据E69的方法, 其中所述抗BTN3A抗体是mAb1且活化抗BTN3A抗体的治疗剂量为每次施用7至200mg内。
- [0230] E71. 根据E38-E70中任一项的方法, 其中所述活化抗BTN3A抗体以每个剂量7至200mg的剂量静脉内施用至少两次, 通常第二剂量在第一剂量后至少15天, 例如在第一剂量后21天施用。
- [0231] E72. 根据E38-E71中任一项的方法, 其中所述活化抗BTN3A抗体以选自7、10、20、50、75、100、125、150、170或200mg的剂量施用。
- [0232] E73. 根据E38-E72中任一项的方法, 其中所述活化抗BTN3A抗体是mAb1, 其以每个剂量7至200mg的剂量静脉内施用至少两次, 优选第二剂量在第一剂量后至少15天施用, 通常在约21天后施用。
- [0233] E74. 根据E38-E73中任一项的方法, 其中所述活化抗BTN3A抗体是mAb1且以选自7、10、20、50、75、100、125、150、170或200mg的剂量施用。
- [0234] E75. 根据E38-E74中任一项的方法, 其中所述活化抗BTN3A抗体是mAb1并且以选自7、10、20、50、75、100、125、150、170或200mg的剂量与抗PD1或抗PD-L1抗体例如帕博利珠单抗联合施用。
- [0235] E76. 根据E38-E75中任一项的方法, 其中所述活化抗BTN3A抗体是mAb1且所述受试者患有头颈鳞状细胞癌 (HNSCC) 或卵巢癌, 且当基线循环V γ 9V δ 2T细胞计数高于5000个细胞/mL、高于10000个细胞/mL或高于20000个细胞/mL时, 选择所述受试者进行所述治疗。
- [0236] E77. 本文公开的活化抗BTN3A抗体在制备用于治疗有需要的受试者的药物中的用途, 其中所述受试者已经通过评价 (i) 所述受试者的血液样品中的血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数而被选择用于所述治疗, 如贯穿本说明书所描述的; 或 (ii) 在所述受试者的肿瘤活组织检查中所测定的基线V γ 9+T细胞密度高于2个细胞/mm², 或高于3个细胞/mm²或高于4个细胞/mm², 如贯穿本说明书在本文中所描述。
- [0237] E78. 一种用于确定在有需要的受试者中用本文公开的活化抗BTN3A抗体治疗的合格性的方法, 所述方法包括评价 (i) 所述受试者的血液样品中的血液基线V γ 9V δ 2T细胞计数, 如贯穿本说明书在本文中所描述的; 或 (ii) 在所述受试者的肿瘤活组织检查中所测定的基线V γ 9+T细胞密度高于2个细胞/mm², 或高于3个细胞/mm²或高于4个细胞/mm², 如贯穿本说明书在本文中所描述。
- [0238] E79. 一种诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的分离的活化抗BTN3A抗体, 其用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤, 其中所述受试者在抗PD1或抗PD-L1治疗后患有复发性或难治性肿瘤, 并且向所述受试者施用治疗有效量的抗PD1或抗PD-L1药剂与治疗有效量的所述活化抗

BTN3A抗体的联用。

[0239] E80.一种诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的分离的活化抗BTN3A抗体,其用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤,其中所述肿瘤是实体瘤,特别是选自由膀胱癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌和头颈鳞状细胞癌组成的组。

[0240] E81.用于治疗恶性血液病的诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的活化抗BTN3A抗体,其中所述恶性血液病选自弥漫性大B细胞淋巴瘤和急性髓性白血病。

[0241] E82.根据E79的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤,其中所述肿瘤是实体瘤,特别是选自膀胱癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌和头颈鳞状细胞癌。

[0242] E83.根据E79-E82中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体与人BTN3A多肽结合的K_D为10nM或更小,优选K_D为5nM或更小,例如50pM至5nM,如通过表面等离子共振(SPR)所测量的。

[0243] E84.根据E79-E83中任一项的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述活化性抗BTN3A抗体与食蟹猴BTN3A交叉反应的K_D为100nM或更小,优选K_D为10nM或更小,如通过SPR所测量。

[0244] E85.根据E79-E84中任一项的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述活化性抗BTN3A抗体在体外诱导人PBMC中的V γ 9V δ 2-T细胞的活化,EC₅₀低于0.1mg/mL,优选0.01mg/mL或更低,例如在100pg/mL至0.1mg/mL,如通过活化标记物CD69的表面表达所测量的。

[0245] E86.根据E79-E85中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述抗体在与表达BTN3的细胞共培养中诱导V γ 9V δ 2T细胞的活化,EC₅₀低于5mg/mL,优选1mg/mL或更低,例如在100ng/mL至5mg/mL,如在脱粒测定中测量的。

[0246] E87.根据E79-E86中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:12的HCDR1,SEQ ID NO:13的HCDR2,SEQ ID NO:14的HCDR3,SEQ ID NO:15的LCDR1,SEQ ID NO:16的LCDR2和SEQ ID NO:17的LCDR3。

[0247] E88.根据E79-E87任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体是人源化抗体。

[0248] E89.根据E79-E88中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体在VH框架区中包含至少以下氨基酸突变:V5Q;V11L;K12V;R66K;S74F;I75S;E81Q;S82AR;R82BS;R83T;D85E;T87S;L108S;以及所述V κ 框架区中的至少以下氨基酸突变:T5N;V15L;R18T;V19I;K42N;A43I;D70G;F73L;Q100G。

[0249] E90.根据E79-E89中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含突变体或化学修饰的IgG1恒定区,其中当与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比时,所述突变体或化学修饰的IgG1恒定区不赋予或降低与Fc γ 受体的结合。

[0250] E91.根据E79-E90任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:1的可变重链(VH)和SEQ ID NO:2的可变轻链(VL)。

[0251] E92.根据E79-E90任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:1的可变重链(VH)和SEQ ID NO:3的可变轻链(VL)。

[0252] E93.根据E79-E92任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含沉默Fc区,通常是突变IgG1恒定区或突变IgG4恒定区。

[0253] E94.根据E93的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述突变体IgG1恒定区是IgG1三重突变体L247F L248E和P350S。

[0254] E95.根据E79-E94中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链。

[0255] E96.根据E79-E95任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:7的轻链。

[0256] E97.根据E79-E96任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:6的轻链。

[0257] E98.根据E79-E97中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:7的轻链。

[0258] E99.根据E79-E98中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体与细胞因子联合施用。

[0259] E100.根据E99的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述细胞因子是IL2或IL15激动剂。

[0260] E101.根据E80-E100中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体与免疫治疗剂联合施用。

[0261] E102.根据E79-E101的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体与选自抗PD1或抗PD-L1抗体的免疫治疗剂联合施用。

[0262] E103.根据E79-E102的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体与抗PD1或抗PD-L1抗体联合施用,所述抗PD1或抗PD-L1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗或阿特珠单抗,优选帕博利珠单抗。

[0263] E104.根据E79-E103中任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体的治疗剂量为每次施用7至200mg内,优选在20至75mg内。

[0264] E105.根据E79的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链,并且活化性抗BTN3A抗体的治疗剂量为每次施用7至200mg内,优选在20至75mg内,并且其中向受试者施用治疗有效量的帕博利珠单抗。

[0265] E106.根据E80的用于用途的活化性抗BTN3A抗体,其中所述抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链,且活化性抗BTN3A抗体的治疗单位剂量为每次施用7至200mg内,优选在20至75mg内。

[0266] E107.根据E79-E106任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体以每个剂量7至200mg的剂量静脉内施用至少两次,优选第二剂量在第一剂量后至少15天施用,通常在约21天后施用。

[0267] E108.用于根据E79-E107任一项的用于用途的活化抗BTN3A抗体,其中所述活化抗BTN3A抗体以选自7、10、20、50、75、100、125、150、170或200mg的剂量施用。

[0268] E109.一种用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤的方法,所述方法包括联合施用治疗有效量的诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的活化抗BTN3A与治疗有效量的抗PD1/PDL1治疗,其中所述受试者患有对抗PD1/PDL1治疗的复发性或难治性肿瘤。

[0269] E110.一种用于治疗有需要的人类受试者中的肿瘤的方法,包括施用治疗有效量的诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的活化抗BTN3A,其中所述肿瘤是实体瘤,特别是选自膀胱癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌和头颈鳞状细胞癌。

[0270] E111.一种在有需要的人类受试者中治疗血液恶性肿瘤的方法,所述方法包括施用治疗有效量的诱导V γ 9V δ 2T细胞活化的活化抗BTN3A,其中所述血液恶性肿瘤选自弥漫性大B细胞淋巴瘤和急性髓性白血病。

[0271] E112.根据E109的方法,其中所述肿瘤是实体瘤,特别是选自膀胱癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌和脑转移瘤。

[0272] E113.根据E109-E112中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体以10nM或更小,优选以5nM或更小,例如50pM至5nM的K_D与人BTN3A多肽结合,如通过表面等离子共振(SPR)所测定。

[0273] E114.根据E109-E113中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体与食蟹猴BTN3A交叉反应的K_D为100nM或更小,优选K_D为10nM或更小,如通过SPR所测量。

[0274] E115.根据E109-E114中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体在体外诱导人PBMC中的V γ 9V δ 2T细胞的活化,EC₅₀低于0.1mg/mL,优选0.01mg/mL或更低,例如在100pg/mL至0.1mg/mL,如通过活化标记物CD69的表面表达测量的。

[0275] E116.根据E109-E115中任一项的方法,其中所述抗体在与表达BTN3的细胞共培养中诱导V γ 9V δ 2T细胞的活化,EC₅₀低于5mg/mL,优选1mg/mL或更低,例如在100ng/mL至5mg/mL,如在脱粒测定中测量的。

[0276] E117.根据E109-E116中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:12的HCDR1,SEQ ID NO:13的HCDR2,SEQ ID NO:14的HCDR3,SEQ ID NO:15的LCDR1,SEQ ID NO:16的LCDR2和SEQ ID NO:17的LCDR3。

[0277] E118.根据E109-E117中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体是人源化抗体。

[0278] E119.根据E109-E118中任一项的方法,其中所述活化性抗BTN3A抗体在VH框架区中至少包含下列氨基酸突变:V5Q;V11L;K12V;R66K;S74F;I75S;E81Q;S82AR;R82BS;R83T;D85E;T87S;L108S;以及所述V κ 框架区中的至少以下氨基酸突变:T5N;V15L;R18T;V19I;K42N;A43I;D70G;F73L;Q100G。

[0279] E120.根据E109-E119中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含突变体或化学修饰的IgG1恒定区,其中当与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比时,所述突变体或化学修饰的IgG1恒定区不赋予或降低与Fc γ 受体的结合。

[0280] E121.根据E109-E120中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:1的可变重链(VH)和SEQ ID NO:2的可变轻链(VL)。

[0281] E122.根据E109-E120中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:1的可变重链(VH)和SEQ ID NO:3的可变轻链(VL)。

[0282] E123.根据E109-E122中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含沉默Fc区,通常是突变IgG1恒定区或突变IgG4恒定区。

[0283] E124.根据E109-E123中任一项的方法,其中所述突变体IgG1恒定区是IgG1三重突变体L247F L248E和P350S。

[0284] E125.根据E109-E124中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID

NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链。

[0285] E126.根据E109-E124中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:7的轻链。

[0286] E127.根据E109-E124中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:6的轻链。

[0287] E128.根据E109-E124中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:7的轻链。

[0288] E129.根据E109-E128中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体与细胞因子联合施用。

[0289] E130.根据E129的方法,其中所述细胞因子是IL2或IL15激动剂。

[0290] E131.根据E109-E130中任一项的方法,其中所述抗BTN3A抗体与免疫治疗剂联合施用。

[0291] E132.根据E109-E131中任一项的方法,其中所述抗BTN3A抗体与选自抗PD1或抗PD-L1抗体的免疫治疗剂联合施用。

[0292] E133.根据E109-E132中任一项的方法,其中所述抗BTN3A抗体与抗PD1或抗PD-L1抗体联合施用,所述抗PD1或抗PD-L1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗或阿特殊单抗,优选帕博利珠单抗。

[0293] E134.根据E109-E133中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体的治疗剂量为每次施用7至200mg之内,优选20至75mg之内。

[0294] E135.根据E109-E112中任一项的方法,其中所述抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链,且活化抗BTN3A抗体的治疗剂量为每次施用7至200mg内,优选20至75mg内,且其中向受试者施用治疗有效量的帕博利珠单抗。

[0295] E136.根据E109-E112中任一项的方法,其中所述抗BTN3A抗体包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链,且活化抗BTN3A抗体的治疗剂量为每次施用7至200mg内,优选20至75mg内。

[0296] E137.根据E109-E136中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体以每个剂量7至200mg的剂量静脉内施用至少两次,优选第二剂量在第一剂量后至少15天,通常在约21天后施用。

[0297] E138.根据E109-E137中任一项的方法,其中所述活化抗BTN3A抗体以选自7、10、20、50、75、100、125、150、170或200mg的剂量施用。

[0298] E139.一种用于增强有需要的受试者的肿瘤中的免疫细胞浸润的方法,所述方法包括施用有效量的如本文所公开的活化抗BTN3A抗体,优选地与有效量的抗PD1或抗PDL1剂联用,例如抗PD1抗体,如帕博利珠单抗。

[0299] E140.根据E139的方法,其中所述免疫细胞包含V γ 9V δ 2T细胞和CD8+T细胞。

[0300] 实施例

[0301] 表征根据本公开的用于用途的抗BTN3A活化抗体的方法

[0302] 1.1结合亲和力分析:多循环动力学测定 (SPR)

[0303] 可以使用运行Biacore T200评价软件V2.0.1 (Uppsala, Sweden) 的Biacore T200 (序号1909913) 仪器对抗BTN3A抗体进行多循环动力学分析。

[0304] 将纯化的抗体在2%BSA/PBS中稀释至2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度。在每个循环开始时,每种抗体以 $\sim 146.5\text{RU}$ 的密度(RL)(获得 $\sim 50\text{RU}$ 的RMax的理论值)被捕获在蛋白A上。捕获后,在注射BTN3A1抗原(Sino Biological货号15973-H098H)之前使表面稳定。BTN3A1在0.1%BSA/HBS-P+(流动缓冲液)中以25至0.78nM的两倍稀释度滴定。监测结合阶段400秒以及解离阶段35分钟(2100秒)。使用50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速获得动力学数据以使任何潜在的传质效应最小化。在每个循环结束时使用两次注射10mM甘氨酸-HCL pH1.5进行蛋白A表面的再生。对于每个测试的抗体进行两个空白(无BTN3A1)和一个分析物的单一浓度的重复,以检查在动力学循环中表面和分析物的稳定性。从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自参考通道Fc1的信号,以校正与参考表面的非特异性结合的差异。另外,对于每个Fc减去空白运行以校正任何抗原非依赖性信号变化,例如漂移。使用具有全局RMax参数且无大量信号(常数RI=0RU)的一对一结合数学模型来拟合传感图。

[0305] 1.2通过流式细胞术对人PBMC的结合测定

[0306] 根据本公开的用于用途的抗BTN3A抗体还可表征其与分离自健康供体血液的人PBMC的结合。使用Lymphoprep(Axis-shield,Dundee,UK)密度离心从白膜层细胞分离PBMC。然后将PBMC冷冻并储存在 -80°C 或液氮中直至需要。

[0307] 将100 μl 1×10^6 个细胞/ml的细胞转移至新鲜U形底96孔板的各孔中,然后将板离心并弃去上清液。

[0308] 在PBS2mM EDTA中制备抗体的连续稀释液,0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。将人PBMC再悬浮于50 μl 制备的稀释的测试抗体滴定体系中。

[0309] 在 4°C 下在黑暗中孵育30分钟后,将板离心并用150 μl /孔的PBS 2mM EDTA洗涤两次,随后将孔于50 μl 由1/100稀释于PBS2mM EDTA中的山羊抗人抗体(PE标记的)和1/500稀释于PBS2mM EDTA中的活/死纯IR组成的混合物中重悬。

[0310] 在 4°C 下在黑暗中孵育15分钟后,将板离心并用150 μl /孔PBS 2mM EDTA洗涤一次,随后将孔于200 μl PBS2mM EDTA中重悬。在BD LSR Fortessa细胞仪上分析细胞。使用Flowjo软件(Version10,Flowjo,LLC,Ashland,USA)分析数据。

[0311] 相同的方案可以在食蟹猴PBMC和在Daudi Burkitt淋巴瘤细胞系上进行。

[0312] 1.3体外功能功效: $\gamma\delta$ -T细胞脱粒测定

[0313] 该测定包括测量抗BTN3A抗体对 $\gamma\delta$ -T细胞针对Daudi Burkitt淋巴瘤细胞系脱粒的活化或抑制效果(Harly et al.,2012)。通过用唑来膦酸(1 μM)和IL2(200U/ml)培养11-13天,从健康供体的PBMC扩增 $\gamma\delta$ -T细胞。在第5天、第8天和此后每2天加入IL2。在培养开始时测定 $\gamma\delta$ -T细胞的百分比,并通过流式细胞术评价培养时间直到其达到至少80%。然后将冷冻或新鲜的 $\gamma\delta$ -T细胞用于针对Daudi细胞系的脱粒(E:T比例为1:1),其中所述细胞在10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的7.2和20.1人源化变体及其嵌合形式的存在下在 37°C 共培养4小时。通过PMA(20ng/ml)加lonomycin(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的活化作为 $\gamma\delta$ -T细胞脱粒的阳性对照,单独培养基作为阴性对照。在4小时共孵育结束时,通过流式细胞术分析细胞以评价CD107a(LAMP-1,溶酶体相关膜蛋白-1)+CD107b(LAMP-2)阳性的 $\gamma\delta$ -T细胞的百分比。CD107在活化诱导的颗粒胞吐后被动动员到细胞表面,因此表面CD107的测量是最近用于鉴定脱粒的溶细胞性T细胞的敏感标记。

[0314] 使用从患者分离的AML胚细胞作为靶细胞代替Daudi细胞可以进行相同的方案。

[0315] 1.4通过流式细胞术确定绝对血液基线 $\gamma\delta$ T细胞计数

[0316] 为了评价 γ δ T 细胞绝对计数,将新鲜血液样品 (100 μ l) 与在 PBS 1% 胎牛血清 (FBS) 中制备的抗体 (50 μ l)、校准珠 (例如来自 BD 的 Trucount 珠) 和活力标记的混合物混合。样品在室温下避光孵育 20 分钟。通过加入 2mL 预热的 1 \times RBC 裂解缓冲液 (Biolegend# 420302), 涡旋并再加入 2mL 1 \times RBC 裂解缓冲液, 然后在室温下在黑暗中孵育 15 分钟来裂解红细胞 (RBC)。在 PBS 1% FBS 中洗涤后, 将细胞沉淀重悬于 300 μ L 的 PBS 1% FBS 中, 并使用 BD FACSDiva 软件 (v8.0) 上的预定应用设置在 BD LSR Fortessa X-20 上获取。数据用以下等式归一化: $(\text{MFI}_{\text{试验}} - \text{MFI}_{\text{IC}}) / (\text{MFI}_{\text{试验}} - \text{MFI}_{\text{IC}}) \times 100$ 。使用 Flowjo 软件 (v10.6) 进行分析。

[0317] 1.5 确定肿瘤活组织检查中的 V γ 9+T 细胞密度

[0318] 为了评价肿瘤活检中的 V γ 9+T 细胞密度, 在治疗前和治疗后第 28 天收集来自人类患者的活检样品。在每个时间点, 将一半活检组织包埋在石蜡中, 另一半在最佳切割温度化合物 (OCT) 中快速冷冻。通过 Veracyte (Marseille, 法国) 在 Bond RX 自动染色仪 (Leica Biosystems) 上进行免疫组织化学, 并使用 Nanozoomer XR 扫描仪 (Hamamatsu) 获得图像。简言之, 将 6 μ m 厚的新鲜冷冻样品切片在室温下在锌福尔马林中固定 5 分钟, 用 5% 人血清孵育 30 分钟用于封闭, 并用抗 panBTN3A mAb (克隆 20.1) 或抗 V γ 9TCR mAb (克隆 7B6, Huang et al., Infection and Immunity 2008, pp 426-436) 以 2 μ g/mL 在室温下染色 45 分钟。用 Bond Polymer Refine RED 检测试剂盒 (Leica Biosystems) 揭示抗原-抗体结合。然后用苏木精对组织切片进行复染。使用来自 Veracyte 的 Brightplex 在单个 FFPE 载玻片上进行 BTN3A2、BTN3A3、 δ TCR (克隆 H-41)、CD3、CD4、FoxP3、Ki67、CD8、NKp46 和颗粒酶 B 的多重组织免疫化学染色。简言之, 将来自石蜡包埋活检组织的 4 μ m 载玻片脱蜡, 用 Epitope Retrieval Solution I (Leica Biosystems) 处理 20 分钟, 并用指定的 mAb 连续染色。使用 MACH 2HRP Polymer (Biocare) 揭示抗原-抗体结合。然后将组织切片用 ImmPACTTM AMEC Red (Vector Lab) 染色, 并用苏木精复染。在每个染色周期之间, 用乙醇对载玻片进行 AMEC 脱色, 并用变性溶液对抗体进行剥离。在每个染色周期之间获取图像。

[0319] 实施例 1: 临床研究-总结

[0320] 在患有晚期复发性/难治性癌症的患者中评价 ICT01 作为单一疗法和与免疫检查点抑制剂 (ICI) 联用的静脉内剂量的安全性、耐受性和活性的首次人体内、两部分、开放性临床研究 (EVICTION 研究)

[0321] 研究药物: ITC01; 人源化活化抗 BTN3A 免疫球蛋白 (Ig) G1 单克隆抗体 (mAb), 其被工程化以降低 Fc 效应子功能, 靶向人嗜乳酪蛋白-3A (BTN3A)。

[0322] 第 1 部分目的:

[0323] 主要: 在患有晚期复发性/难治性实体瘤或血液癌症的患者中表征 ICT01 作为单一疗法和与帕博利珠单抗联用的静脉内 (IV) 剂量范围的总体安全性和耐受性特征。

[0324] 次要:

[0325] 1. 表征向患有晚期复发性/难治性实体瘤或血液癌症的患者施用的 IV ICT01 的药代动力学 (PK) 和药效学 (PD)

[0326] 2. 确定 ICT01 作为单一疗法和与帕博利珠单抗联用的扩展队列 (第 2 部分) 的推荐剂量

[0327] 3. 表征向患有晚期复发性/难治性实体瘤或血液癌症的患者施用 ICT01 作为单一

疗法和与帕博利珠单抗联用的IV剂量范围的初步抗肿瘤活性

[0328] 第2部分目标:

[0329] 主要:在患有晚期复发性/难治性实体瘤或血液癌症的患者中表征ICT01作为单一疗法和与帕博利珠单抗联用的初步抗肿瘤活性。

[0330] 次要:

[0331] 1.在晚期复发性/难治性实体瘤或血液癌症患者中表征IV ICT01作为单一疗法和与帕博利珠单抗联用的总体安全性和耐受性。

[0332] 2.表征向晚期复发性/难治性实体瘤或血液癌症患者施用IV ICT01的PK和PD。

[0333] 研究设计:

[0334] 这是一项表征ICT01安全性、耐受性、PK、PD和抗肿瘤活性的阶段I/IIa、首次人体内、两部分、开放性研究。第1部分将是每21天向患有晚期复发性/难治性癌症的患者施用IV ICT01作为单一疗法的剂量递增(A组:混合实体瘤;组B:晚期血液恶性肿瘤)。IV ICT01与帕博利珠单抗(抗PD-1; **Keytruda®**)联用将在C组中进行评价(符合用帕博利珠单抗治疗条件的肿瘤,但在治疗期间显示无应答、进展或复发)。

[0335] 第2部分是研究的扩展阶段,其中在两种实体瘤适应症(D&E组)或血液恶性肿瘤(F组)中的额外患者将用第1部分中鉴定的ICT01剂量治疗,其作为单一疗法已经显示有利的风险/获益特征。G组将是ICT01(至多2个剂量水平)与帕博利珠单抗联用在单一适应症中的扩展。第2部分中剂量和适应症的最终细节将在本研究开始前通过实质性修改在方案中更新。

[0336] ICT01的施用途径为30分钟的IV输注。

[0337] C组所有患者均使用,剂量为200mg IV q 21天(此为批准剂量)的帕博利珠单抗(**KEYTRUDA®**)。根据制造商,不建议减少KEYTRUDA的剂量。根据附录:帕博利珠单抗(**Keytruda®**)帕博利珠单抗(**Keytruda®**)产品特性总结中所述,拒绝或停止KEYTRUDA以管理不良反应。

[0338] D组(卵巢癌)和E组(头颈鳞状上皮细胞癌(HNSCC)):ICT01的2个剂量水平是7mg和200mg,这两个剂量水平都显示出药物动力学活性和安全性。每个剂量组每个适应症最多25名患者。在完成所有筛选评价后和确认其合格性后,在第0天将患者以1:1的比例随机分配7mg或200mg的ICT01。

[0339] F组和G组:在开始第2部分之前提交实质性修订,以传达每组的选定患者人群和ICT01剂量。

[0340] 将在3周筛选期内评价患者的合格性。将按照第1部分收集活检标本。在D、E和F组中每21天用IV ICT01作为单一疗法治疗患者,或在G组中与帕博利珠单抗联用治疗患者。

[0341] 研究人群

[0342] 第1部分的入选标准

[0343] 在筛选期和基线时必须检查以下标准。必须符合所有入选标准,以将受试者纳入研究:

[0344] 1) ≥ 18 岁的男性或女性

[0345] 2) 在进行任何研究相关筛选程序之前自愿签署书面知情同意书

- [0346] 3) 组织学或细胞学确诊为晚期或复发性癌症的复发/难治性患者,包括:
- [0347] a. A组:膀胱、乳腺、结肠直肠、胃、黑色素瘤、卵巢、前列腺和PDAC
- [0348] b. B组:血液恶性肿瘤,包括急性骨髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤
- [0349] c. C组:黑色素瘤、膀胱、头颈SCC和非小细胞肺癌(美国和欧盟批准的帕博利珠单抗适应症)
- [0350] 4) 愿意接受基线和研究中肿瘤活检
- [0351] 5) 东部肿瘤协作组(ECOG)性能状态 ≤ 1
- [0352] 6) 研究者评价的预期寿命 > 3 个月
- [0353] 7) 临床实验室:
- [0354] a. 血液学:
- [0355] -血红蛋白 ≥ 8.5 g/dL(等于 5.28 mmol/L;输液依赖性或非依赖性);
- [0356] -仅A/C组:
- [0357] • 血小板计数 $\geq 75 \times 10^9$ /L;
- [0358] • 淋巴细胞计数 $\geq 0.5 \times 10^9$ /L;
- [0359] • 嗜中性粒细胞绝对计数 $\geq 1.0 \times 10^9$ /L;
- [0360] b. 肝脏酶:
- [0361] -天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT) $\leq 2.5 \times$ 正常上限(ULN)(在肝转移的情况下 $< 5 \times$ ULN);
- [0362] -胆红素 $\leq 1.5 \times$ ULN(肝转移情况下 $< 2 \times$ ULN);
- [0363] c. 肾功能:血清肌酐 $< 1.5 \times$ ULN或血清肌酐 $\geq 1.5 \times$ ULN的肌酐清除率 ≥ 50 mL/min(Cockcroft和Gault)。
- [0364] 8) 避孕措施
- [0365] a. 育龄妇女必须:
- [0366] i. 研究药物的首次给药前1周内妊娠试验阴性
- [0367] ii. 在研究期间和研究药物最后一次给药后至少5个月始终且正确地使用高效避孕方法
- [0368] iii. 同意在研究期间和研究最后一次给药后至少5个月不捐赠用于辅助生殖目的的卵子(卵、卵母细胞)
- [0369] iv. 意在研究期间和研究药物最后一次给药后至少5个月不计划母乳喂养和不计划怀孕。
- [0370] b. 性活跃的男性必须:
- [0371] i. 同意在研究期间和研究药物最后一次给药后至少5个月使用具有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的避孕套
- [0372] ii. 同意在研究期间和研究药物最后一次给药后至少5个月不捐献精子
- [0373] iii. 研究期间或研究药物最后一次给药后至少5个月不计划生育孩子。
- [0374] 9) 女性不得哺乳
- [0375] 10) 至少1个根据实体肿瘤应答评价标准(RECIST)/淋巴瘤应答评价标准(RECIL)可测量病变或 $> 5\%$ 骨髓原始细胞

- [0376] 11) 根据治疗研究者的确定,患者必须没有其疾病的可用护理标准。
- [0377] 12) ICT01联用组中的患者必须符合帕博利珠单抗获批包装标签中的合格标准,并满足以下条件:
- [0378] a. 不得为一线患者(即,必须符合入选标准#11)
- [0379] b. 不得有任何间质性肺病病史或正在发生间质性肺病
- [0380] c. 之前不得进行前部器官移植,包括同种异体干细胞移植
- [0381] 第2部分D组和E组:
- [0382] 13) 替换入选标准#3:组织学或细胞学确诊为晚期或复发性癌症的复发/难治性患者,包括:
- [0383] a. D组:持续性或复发性卵巢上皮癌,原发性输卵管或原发性腹膜癌;至少1次既往全身含铂方案失败
- [0384] b. E组:转移性或不可切除、复发性HNSCC,至少在1次既往全身方案失败
- [0385] 14) 替换入选标准#11:招募至研究前,患者必须接受至少一线癌症治疗
- [0386] 15) 筛选期间血液的循环 γ 9 δ 2T细胞计数 \geq 20000个细胞/mL
- [0387] 统计分析
- [0388] 分析人群
- [0389] 安全性人群将由接受至少1剂量的ICT01或ICT01与帕博利珠单抗联用的所有患者组成,将分别分析实体瘤、血液肿瘤和联用治疗患者的数据。可评价功效的群体将由用至少2个剂量的(i) ICT01(治疗>1个月)或(ii) ICT01与帕博利珠单抗联用治疗的所有患者组成,并且没有任何可能使功效评价偏离的方案偏离,而意向治疗(ITT)群体将用于探索性目的。对于第2部分,可评价功效的群体将由具有8周抗肿瘤评价(例如,RECIST)的所有被治疗患者组成。
- [0390] 主要终点
- [0391] 第1部分。安全性和耐受性的主要终点将在本研究中通过治疗突发不良事件(TEAE)、严重不良事件(SAE)、导致研究治疗中止的TEAE的发生率、严重度和关系进行评价;以及临床实验室检查、生命体征、ECG和体格检查的临床显著发现(第2部分中的关键次要终点)。
- [0392] 第2部分。疾病控制率(DCR),包括按照RECIST、RECIL或按照血液恶性肿瘤的疾病特异性标准的临床反应标准(例如AML的Cheson/IWG标准)。DCR是完全应答/缓解(CR)+CR与不完全恢复(CRi)+部分应答/缓解(PR)+稳定疾病的总和。
- [0393] 次要终点
- [0394] 在第1部分中,初步抗肿瘤活性终点将是按照RECIST、RECIL或按照血液适应症中的疾病特异性标准(例如AML的Cheson/IWG标准)的DCR和客观应答率(ORR)。实体瘤免疫疗法应答评价标准(iRECIST)将被认为是探索性的。
- [0395] 在第2部分中,根据RECIST、RECIL或根据血液恶性肿瘤的疾病特异性标准(例如AML的Cheson/IWG标准)的客观应答率(ORR)。客观应答率是完全应答/缓解(CR)+具有不完全恢复的CR(CRi)+部分应答/缓解(PR)的总和。iRECIST将是探索性的。
- [0396] 其他次要终点包括安全性和耐受性、进展时间(TTP)和无进展生存期(PFS)。
- [0397] 在第1和第2部分,ICT01的PK参数(包括 C_{\max} 、AUC、 $t_{1/2}$ 、清除率)按剂量水平计算。同

样,ICT01的PD活性(按剂量和患者群体)将包括外周血、外周血单核细胞(PBMC)和肿瘤活检组织中 γ 9 δ 2T细胞和其它免疫细胞的计数和活化状态相对于基线的变化、循环细胞因子水平(包括IFN γ 、TNF、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17a和MCP-1)以及肿瘤活检组织和PBMC中PD-L1,PD-1和其它免疫细胞标志物的表达。

[0398] 将表征来自肿瘤活检的基线BTN3A表达和 γ δ T细胞,以及循环中的基线 γ δ T细胞和BTN3A表达,并将其用作PD和临床反应分析的协变量。

[0399] 测定ICT01的活性剂量水平的主要PD活性测量将通过流式细胞术测量从基线的降低和循环 γ δ T细胞的活化的增加。

[0400] 实施例2:使用 γ δ T细胞计数或V γ 9+T细胞密度作为选择应答者的预测标记的临床证据

[0401] 材料和方法

[0402] 患者和临床试验

[0403] EVICTION(NCT04243499)是评价在晚期复发性/难治性癌症患者中ICT01(衍生自鼠mAb7.2的人源化抗体)作为单一疗法和与帕博利珠单抗联用的IV剂量的安全性、耐受性、药代动力学、药效学和抗肿瘤活性的首次人体内、两部分、开放性临床研究。除了试验的联用组的患者外,符合条件的成年患者的癌症必须是所有可用护理标准治疗都失败,并且在试验期间未接受其它抗癌治疗。患者每3周接受ICT01(范围:20 μ g至200mg),在多个时间点收集血样用于安全性测量、全血免疫表型分析和血清细胞因子分析。

[0404] 在基线和第28天收集活组织检查,并通过组织免疫化学对V γ 9V δ 2T细胞和其它抗肿瘤免疫标记物进行染色。

[0405] 多重细胞因子测定

[0406] 根据制造商的说明书,使用MSD(MesoScale Discovery)平台测量血清细胞因子水平(IFN γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-13、TNF α)。

[0407] 流式细胞分析

[0408] 为了评价ICT01给药后的靶标占用率(T0),将新鲜血液样品(100 μ l)与在PBS1%FBS中制备的含有抗-CD45、抗-CD3、抗-CD19的抗体、抗-BTN3A ICT01竞争mAb(克隆20.1),抗-BTN3A ICT01非竞争mAb(克隆103.2)和活力标记的混合物(50 μ l)混合。平行使用抗BTN3A被其各自同种型对照替换的第二混合物。样品在室温下在黑暗中孵育20分钟。通过加入2mL预热的1 \times RBC裂解缓冲液(Biolegend#420302),涡旋并再加入2mL的1 \times RBC裂解缓冲液,然后在黑暗中在室温下孵育15分钟来裂解RBC。在PBS1%FBS中洗涤后,将细胞沉淀重悬于300 μ L的PBS1%FBS中,并使用BD FACS Diva软件(v8.0)上的预定应用设置在BD LSR Fortessa X-20上获取。数据用以下等式归一化:((MFI试验-MFIIC)/(MFI试验给药前-MFIIC给药前) \times 100)。用经验证的13色板使用相同的程序进行免疫分型。使用Flowjo软件(v10.6)进行分析。

[0409] 组织免疫化学

[0410] 治疗前和治疗后第28天收集EVICTION临床试验的活检样本。在每个时间点,将一半活检组织包埋在石蜡中,另一半在最佳切割温度化合物(OCT)中快速冷冻。通过Veracyte(Marseille,法国)在Bond RX自动染色仪(Leica Biosystems)上进行免疫组织化学,并使用Nanozoomer XR扫描仪(Hamamatsu)获得图像。简言之,将6 μ m厚的新鲜冷冻样品切片在室

温下在锌福尔马林中固定5分钟,用5%人血清孵育30分钟用于封闭,并用抗panBTN3A mAb (克隆20.1)或抗V γ 9TCR mAb(克隆7B6,Huang et al.,Infection and Immunity2008,pp 426-436)以2 μ g/mL在室温下染色45分钟。用Bond Polymer Refine RED检测试剂盒(Leica Biosystems)揭示抗原-抗体结合。然后用苏木精对组织切片进行复染。使用来自Veracyte的Brightplex在单个FFPE载玻片上进行BTN3A2、BTN3A3、 δ TCR(克隆H-41)、CD3、CD4、FoxP3、Ki67、CD8、NKp46和颗粒酶B的多重组织免疫化学染色。简言之,将来自石蜡包埋活检组织的4 μ m载玻片脱蜡,用Epitope Retrieval Solution I(Leica Biosystems)处理20分钟,并用指定的mAb连续染色。使用MACH 2HRP Polymer(Biocare)揭示抗原-抗体结合。然后将组织切片用ImmPACT™ AMEC Red(Vector Lab)染色,并用苏木精复染。在每个染色周期之间,用乙醇对载玻片进行AMEC脱色,并用变性溶液对抗体进行剥离。在每个染色周期之间获取图像。

[0411] 结果

[0412] 1. 基线 γ δ T细胞计数与抗BTN3A抗体介导的外周血中CD8T细胞、NK细胞和粒细胞的活化相关

[0413] 在治疗前(基线)和ICT01输注后30分钟、1天、7天和21天获得EVICTON患者的血样。进行免疫分型以评价粒细、单核细胞、B细胞、NK细胞和T细胞(包括CD4和CD8 ab T细胞和V γ 9V δ 2T细胞亚群)的绝对数目和频率以及它们的活化状态(CD69和/或PDL-1表面表达)。

[0414] 在所有患者中,ICT01早在给药后4小时诱导V γ 9V δ 2T细胞的数量和频率下降。在接受0.07mg至20mg ICT01的患者中,V γ 9V δ 2T细胞水平在第7天至第21天逐渐向基线返回,而在用剂量 \geq 75mg给药的患者中,它们保持非常低。CD69表面表达的评价显示V γ 9V δ 2T细胞在大多数ICT01治疗的患者中具有ICT01给药后的活化特征。在接受 \geq 7mg ICT01的患者中,NK、常规 γ δ T细胞和B细胞数目在给药后30分钟持续降低,在一天后相对于基线保持较低,并且在所有队列中在第7天恢复接近基线。这种降低与较低程度的NK和CD8T细胞的活化特征(通过CD69表面染色评价)有关。此外,在给予 \geq 7mg ICT01的患者中始终观察到粒细胞上PDL-1表达的增加。

[0415] 当与本研究中评价的不同免疫亚群的基线数目相关(Spearman评级)时,NK、CD8T细胞和粒细胞活化似乎与循环V γ 9V δ 2T细胞的基线数目显著相关,但不与其它免疫区室显著相关,表明了ICT01介导的V γ 9V δ 2T细胞活化的次级效应。

[0416] 在EVICTON试验的A、B和C组的55名患者中,ICT01后NK细胞的活化(CD69阳性)与ICT01暴露和基线g9d2 T细胞计数强烈相关(Spearman $r=0.56$, $p<0.0001$) (参见图1A)。

[0417] 粒细胞的活化(PD-L1阳性)也与ICT01暴露和基线 γ 9 δ 2T细胞计数强烈相关(Spearman $r=0.55$, $p<0.0001$) (参见图1B)。

[0418] 2. 基线 γ δ T细胞计数与体内抗BTN3A抗体介导的细胞因子产生相关

[0419] 在治疗前和ICT01治疗后30分钟、4小时、1天、7天和21天,使用EVICTON患者血清中的MSD平板定量细胞因子的循环浓度。对于大多数细胞因子,在ICT01给药后4小时观察到峰值浓度,除了在ICT01给药后30分钟观察到峰值的TNF α 。

[0420] 对于IFN γ 、TNF α 、IL-6、IL-8和IL-1b、IL-4、IL-13和IL-12,观察到基线的循环 γ 9 δ 2T细胞绝对计数与ICT01给药后的血清细胞因子和趋化因子浓度之间的强关系。

[0421] 在EVICTON试验的A、B和C组的75名患者中,ICT01给药后24小时内循环IFN γ 水平的增加与ICT01暴露和基线 γ 9 δ 2T细胞计数强烈相关(Spearman $r=0.79, p<0.0001$) (参见图1C)。

[0422] 3. 基线 γ 8T细胞计数与肿瘤内抗BTN3A抗体免疫肿瘤浸润和活化相关联

[0423] 使用多重IHC结合数字病理学(Brightplex平台,HalioDX,Luminy,法国)和基因表达谱(nCounter NanoString平台)评价治疗前和治疗后肿瘤活检中的肿瘤免疫浸润。

[0424] 当比较治疗后活检与治疗前活检中不同免疫细胞群的细胞密度变化时,在基线具有最高外周血V γ 9T细胞绝对计数的患者倾向于在治疗后活检中增加免疫浸润和活化(参见图2A、2B、2C、2D和2E)。

[0425] 这些结果通过使用NanoString平台的基因表达分析证实。在基线时具有高V γ 9T细胞计数的患者中观察到治疗后活检组织中较高免疫浸润和活化的明显趋势(未显示)。

[0426] 4. 基线gd T细胞计数与肿瘤中V γ 9+T细胞密度相关

[0427] 治疗前(基线)获得EVICTON患者的血样。进行免疫分型以评价V γ 9V δ 2T细胞的绝对数目。在预处理活组织检查中使用IHC在新鲜冷冻切片上结合数字病理学(HalioDX, Luminy,法国)评价V γ 9TCR-阳性T细胞密度。

[0428] 观察到基线时血液V γ 9T+细胞绝对计数与基线肿瘤活检中V γ 9+细胞密度之间的相关性趋势(Spearman $r=0.5126, p=0.0027, n=32$) (参见图3),表明基线时V γ 9肿瘤浸润与血液中该亚群的绝对计数相关。

[0429] 实施例3: ICT01与抗PD1抗体联用治疗抗PD1/PDL1治疗后难治性或复发性肿瘤患者中的实体瘤的临床证据

[0430] 1. ICT01增加EVICTON患者中的PD-1表达

[0431] 冷冻活检上的流式细胞术证明ICT01诱导的 γ 9 δ 2T细胞的活化增加了EVICTON的A组(图4A)和B组(图4B)中治疗的癌症患者中PD-1的表面表达(描绘了每个剂量组的平均值)。

[0432] 双向ANOVA和Holm-Šídák's多重比较检验。

[0433] 2. ICT01/帕博利珠单抗治疗后多种免疫细胞群的活化和迁移

[0434] 在EVICTON C组中,流式细胞仪分析表明, γ 9 δ 2T细胞在给药后快速迁移,在所有测试剂量下观察到几乎100%的迁移,作用持续时间是剂量依赖性的(绝对细胞数,基线的%,图5A,左图),且24h时活化增加(CD69阳性的%,图5A,右图)。

[0435] 在7mg和更高剂量下观察到对NK细胞和CD8 T细胞的类似药效学作用,在75mg下观察到峰值作用(分别为图5B和5C)。

[0436] 在所有剂量下观察到粒细胞的活化,尽管从血液中的迁移是最小的(图5D)。

[0437] 在治疗后30分钟观察到对 γ 9 δ 2T细胞的峰值作用,而在治疗后24小时观察到对CD8和NK细胞的峰值作用。这些数据表明在 γ 9 δ 2T细胞活化后存在产生这些效应所需的步骤,我们已将其鉴定为细胞因子介导的。

[0438] 3. 临床活性

[0439] 在EVICTON试验的C组的递增阶段,ICT01加帕博利珠单抗的联用是良好耐受的,没有观察到任何DLT或安全性问题。

[0440] 最常见的TEAE与IRR一致,IRR是帕博利珠单抗的充分描述的事件。未报告免疫相

关AESI。

[0441] 在给药后30分钟内在所有ICT01剂量下观察血液中 γ 9 δ 2T细胞的活化和迁移。此外,在剂量 \geq 7mg ICT01下观察到CD8 T细胞和NK细胞在血液中的活化和迁移,并且似乎由活化 γ 9 δ 2T细胞释放的IFN γ 和TNF α 所介导。 Γ δ 、CD3和CD8T细胞对肿瘤的浸润反映了外周免疫活化。

[0442] 在这些CPI失败患者中,在低至2mg的ICT01剂量下观察到跨越多种不同实体瘤的临床反应,表明互补的作用机制导致增加的抗肿瘤免疫反应。

[0443] 实施例4:用于实施本发明的有用序列

[0444] 表5:用于实施本发明的有用的氨基酸和核苷酸序列的简述

SEQ ID NO:	类型	序列的描述
1	aa	mAb 7.2 的人源化重链可变区 VH2
2	aa	mAb 7.2 的人源化轻链可变区 V 1
3	aa	mAb 7.2 的人源化轻链可变区 V 2
4	aa	mAb 1 和 2 的全长重链 (VH2 7.2 沉默 IgG1)
5	aa	mAb 3 和 4 的全长重链 (VH2 7.2 沉默 IgG4)
6	aa	mAb 1 和 3 的全长轻链 (V κ 2 7.2)
7	aa	mAb 2 和 4 的全长轻链 (V κ 2 7.2)
8	aa	mAb 1 和 2 的全长重链 (VH2 7.2 沉默 IgG1)
9	aa	mAb 3 和 4 的全长重链 (VH2 7.2 沉默 IgG4)

[0445]

[0446]

10	aa	mAb 1 和 3 的全长轻链 (V κ 2 7.2)
11	aa	mAb 2 和 4 的全长轻链 (V κ 2 7.2)
12	aa	mAb 7.2、1、2、3 和 4 的 HCDR1
13	aa	mAb 7.2、1、2、3 和 4 的 HCDR2
14	aa	mAb 7.2、1、2、3 和 4 的 HCDR3
15	aa	mAb 7.2、1、2、3 和 4 的 LCDR1
16	aa	mAb 7.2、1、2、3 和 4 的 LCDR2
17	aa	mAb 7.2、1、2、3 和 4 的 LCDR3
18	aa	人 BTN3A1
19	aa	人 BTN3A2
20	aa	人 BTN3A3
21	aa	用于重组蛋白生产的食蟹猴 (<i>m. fascicularis</i>) BTN3A1 胞外域
22	aa	用于重组蛋白生产的食蟹猴 (<i>m. fascicularis</i>) BTN3A2 胞外域
23	aa	用于重组蛋白生产的食蟹猴 (<i>m. fascicularis</i>) BTN3A3 胞外域
24	aa	mAb 20.1 的人源化重链可变区
25	aa	mAb 20.1 的人源化轻链可变区
26	aa	HCDR1
27	aa	HCDR2
28	aa	HCDR3
29	aa	LCDR1
30	aa	LCDR2
31	aa	LCDR3
32	aa	人源化 mAb 20.1 的全长重链
33	aa	人源化 mAb 20.1 的全长轻链

[0447] 表6:用于实施本发明的有用的氨基酸和核苷酸序列的简述

SEQ ID NO:	具体的氨基酸和核苷酸序列
1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYIFTRYMY WVKQRPQGQLEWIGEINPNNGGTFNEKFKNRATLT VDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCSREDDYDGTPF AMDYWGQGTLLTVSS
2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFTGSGSGTDFTF TISSLQPEDIATYYCQQGQTYPYTFGQGTKLEIK
3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFTGSGSGTDFTF TISSLQPEDIATYYCQQGQTYPYTFGQGTKLEIK
4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYIFTRYMY WVKQRPQGQLEWIGEINPNNGGTFNEKFKNRATLT VDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCSREDDYDGTPF AMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYIFTRYMY WVKQRPQGQLEWIGEINPNNGGTFNEKFKNRATLT VDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCSREDDYDGTPF AMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHPSNTKV

[0448]

[0449]

	DKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLG
6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFTGSGSGTDFTF TISSLQPEDIATYYCQQGQTYPTYTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFTGSGSGTDFTF TISSLQPEDIATYYCQQGQTYPTYTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
8	CAGGTCCA ACTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAA GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGG CTTCTGGCTACATCTTCACCAGATACTATATGTATT GGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTG GATTGGAGAGATTAATCCTAACAATGGTGGTACTA AGTTCAATGAGAAGTTCAAGAACAGGGCCCACT GACTGTAGACAAATCCATCAGCACAGCATA CATGG AGCTCAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCGGT CTATTATTGTTCAAGAGAGGATGATTACGACGGGA CCCCCTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC

[0450]

CTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC
ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCA
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG
GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC
TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA
GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAG
CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACC
GTGCCCAGCACCTGAATTCGAGGGGGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTTG

[0451]

	A
9	<p> CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAA GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGG CTTCTGGCTACATCTTCACCAGATACTATATGTATT GGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTG GATTGGAGAGATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTA AGTTCAATGAGAAGTTCAAGAACAGGGCCACACT GACTGTAGACAAATCCATCAGCACAGCATAACATGG AGCTCAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCGGT CTATTATTGTTCAAGAGAGGATGATTACGACGGGA CCCCCTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCC ATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAG CACCTGAGTTCGAGGGGGGACCATCAGTCTTCCTG TTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTG GTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG </p>

	<p>TCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAA ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGC CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTTGA</p>
<p>10</p> <p>[0452]</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGTCTGTC TGCATCCGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC ATGCCAGTCAGAACATTAATGTTTGGTTATCTTGG TACCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAACTCTT GATCTATAAGGCTTCCAACCTTGCACACAGGCGTCC CATCAAGATTTACTGGCAGTGGATCTGGAACAGAT TTCACATTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGA CATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAAACCTT ATCCATACACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT</p>

[0453]

	CAACAGGGGAGAGTGTTAG
11	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGTCTGTC TGCATCCGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC ATGCCAGTCAGAACATTAATGTTTGGTTATCTTGG TACCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAACTCTT GATCTATAAGGCTTCCA ACTTGCACACAGGCGTCC CATCAAGATTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGAT TTCACATTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGA CATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAA ACTT ATCCATACACGTTCCGGACAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGTGTTAG
12	RYYMY
13	EINPNNGGTFNEKFKN
14	EDDYDGTPFAMDY
15	HASQNIN VWLS
16	KASNLHT
17	QQGQTYPYT
18	MKMASFLAFLLLNFRVCLLLLQLLMPHSAQFSVLGP SGPILAMVGEDADLPCHLFPTMSAETMELKWVSSSL RQVVNVYADGKEVEDRQSAPYRGRTSILRDGITAGK

[0454]

	<p>AALRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDGFYEKALVELKVA ALGSDLHVDVKGKYGKGGIHLECRSTGWYPQPQIQW SNNKGENIPTVEAPVVADGVGLYAVAASVIMRGSSG EGVSCTIRSSLLGLEKTASISADPFFRSAQRWIAALA GTLPVLLLLLGGAGYFLWQQQEEKKTQFRKKKREQ ELREMAWSTMKQEQSTRVKLLEELRWRSIQYASRG ERHSAYNEWKKALFKPADVILDPKTANPILLVSEDQ RSVQRAKEPQDLPDNPERFNWHYCVLGCESFISGRH YWEVEVGDRKEWHIGVCSKNVQRKGWVKMTPENG FWTMGLTDGNKYRTLTEPRTNLKLKPKPPKKVGVFLD YETGDISFYNAVDGSHIHTFLDVSFSEALYPVFRILTL EPTALTICPA</p>
<p>19</p>	<p>MKMASSLAFLLLNFHVSLLLVQLLTPCSAQFSVLGPS GPILAMVGEDADLPCHLFPTMSAETMELKWVSSSLR QVVNVYADGKEVEDRQSAPYRGRTSILRDGITAGKA ALRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDGFYEKALVELKVAA LGSNLHVEVKGYEDGGIHLECRSTGWYPQPQIQWSN AKGENIPAVEAPVVADGVGLYEVAASVIMRGGSGE GVSCIIRNSLLGLEKTASISADPFFRSAQPWIAALAGT LPILLLLL LAGASYFLWRQQKEITALSSEIESEQEMKE MGYAATEREISLRESLQEELKRKKIQYLTRGEESSD TNKSA</p>
<p>20</p>	<p>MKMASSLAFLLLNFHVSLFLVQLLTPCSAQFSVLGPS GPILAMVGEDADLPCHLFPTMSAETMELRWVSSSLR QVVNVYADGKEVEDRQSAPYRGRTSILRDGITAGKA ALRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDGFYEKALVELKVAA LGSDLHIEVKGYEDGGIHLECRSTGWYPQPQIKWSD TKGENIPAVEAPVVADGVGLYAVAASVIMRGSSGGG VSCIIRNSLLGLEKTASISADPFFRSAQPWIAALAGTL</p>

[0455]

	<p>PISLLLLAGASYFLWRQQKEKIALSRETEREREMKEM GYAATEQEISLREKLQEELKWRKIQYMARGEKSLAY HEWKMALFKPADVILDPDTANAILLVSEDQRSVQRA EEPRLPDNPERFEWRYCVLGCENFTSGRHYWEVEV GDRKEWHIGVCSKNVERKKGWVKMTPENGYWTMG LTDGNKYRALTEPRTNLKLPEPPRKVGIFLDYETGEI SFYNATDGSHIYTFPHASFSEPLYPVFRILTLEPTALTI CPIPKEVESSPDPDLVPDHSLETPLTPGLANESGEPQA EVTSLLLPAHPGAEVSPSATTNQNHKLQARTEALY</p>
21	<p>MGSSLAFLLLSFHVCVLLLQLLMPHSAQFAVVGPPG PILAMVGEDADLPCHLFPTMSAETMELRWVSSNLRQ VNVYADGKEVEDRQSAAYRGRTSILRDGITAGKA ALRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDGFYEKALVELKVAA LGSDLHIDVKGYEDGGIHLECRSTGWYPQPQIRWSN DKGENIPAVEAPVFDVGVGLYAVAASVILRGSSGEG VSCTIRSSLLGLEKTTSISIAG HHHHHH</p>
22	<p>MGSSLAFLLLNHFVSFFLVQLLTPCSAQFSVLGPSGPI LAMVGEDADLPCHLFPTMSAETMELRWVSSSLRQV VNVYADGKEVEDRQSAPYRGRTSILRDDIAAGKAAL RIHNVTASDSGKYLCYFQDADGFYEKALVELKVAALG SNLHVEVKGYEDGGIHLECRSTGWYPQPQIQWSNAK GQNIPAVEAPVVADGVGLYAVAASVIMRGGSGESVS CIIRNSVLGLEKTASISIAD HHHHHH</p>
23	<p>MANFLAFLLLNFRVCLLLVQLLTPCSAQFAVLGPHG PILAMVGEDVDLPCHLFPTMSAETMELRWVSSSLRQ VNVYSDGKEVEDRQSAPYRGRTSILRDGITAGKAA LRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDGFYEKALVELKVAAL GSDLHIEVKGYEDGGIHLECRSTGWYPQPQIQWSNT KGQHIPAVKAPVVADGVGLYAVAASVIMRGSSGEG</p>

	VSCIIRNSLLGLEKTASISITD HHHHHH
24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYLY WVKQRPGQGLEWIGEINPNNGGTFNEKFKSRATM TVDKSTRRTYMELSSLRSEDVAVYYCSREDDYDGRP DAMDYWGQGTLVTVSS
25	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCASHASNINLWLSWY QQKPGKAPKLLIYRASNLHTGVPSRFSGSGSATDFTF TISSLQPEDIATYYCQQGHSYPYTFGGGTKVDIK
26	RYYLY
27	EINPNNGGTFNEKFKS
28	EDDYDGRPAMDY
29	HASNINLWLS
30	RASNLT
31	QQGHSYPY
[0456] 32	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYLY WVKQRPGQGLEWIGEINPNNGGTFNEKFKSRATM TVDKSTRRTYMELSSLRSEDVAVYYCSREDDYDGRP DAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSK VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
33	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCASHASNINLWLSWY QQKPGKAPKLLIYRASNLHTGVPSRFSGSGSATDFTF

[0457]

	TISSLQPEDIATYYCQQGHSYPYTFGGGTKVDIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
--	--

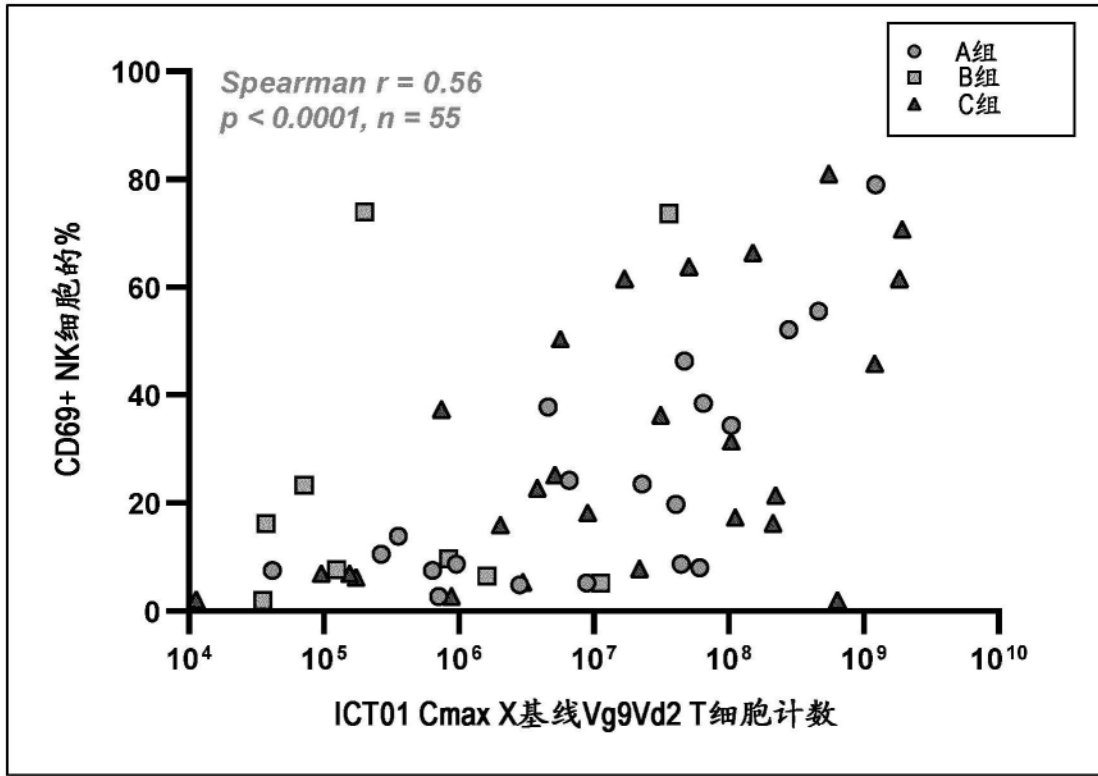


图1A

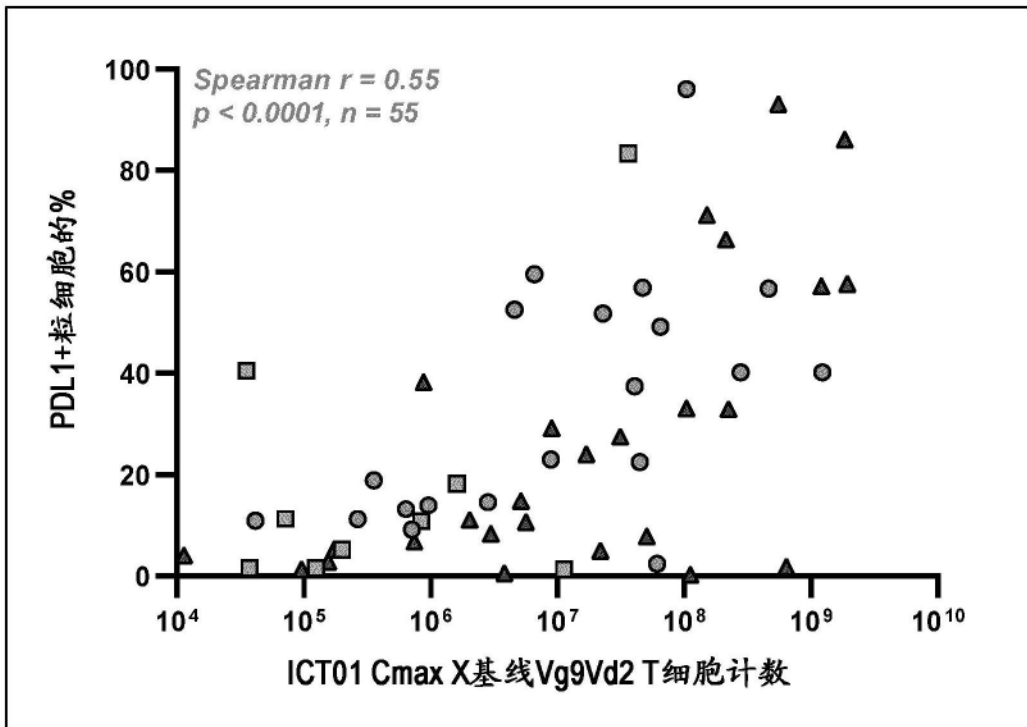


图1B

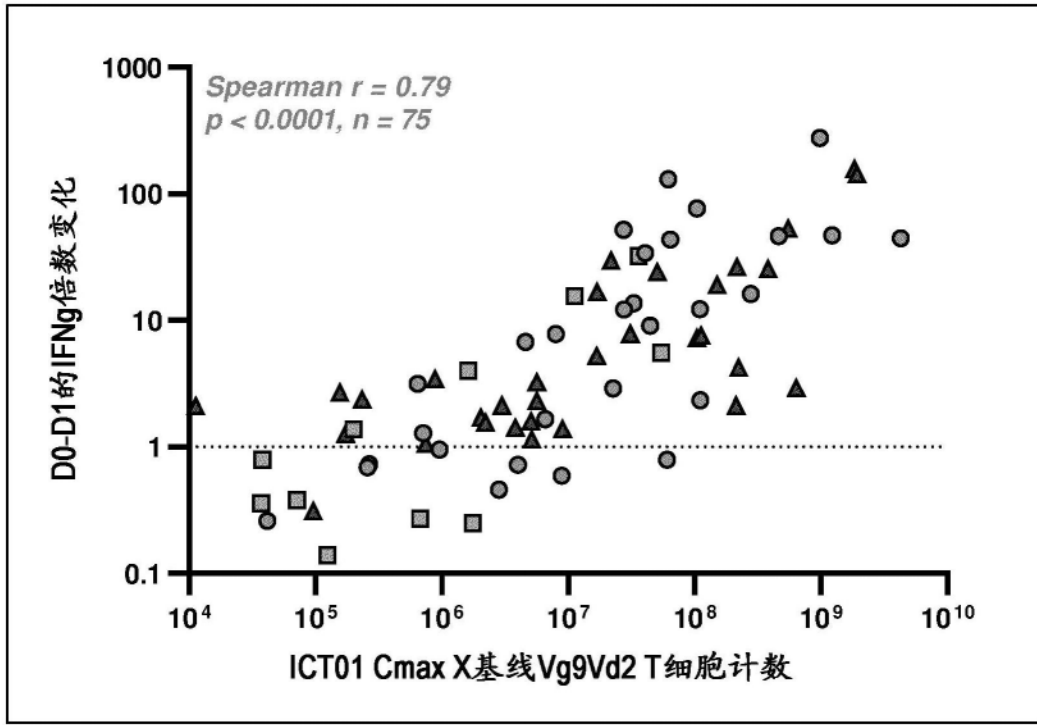


图1C

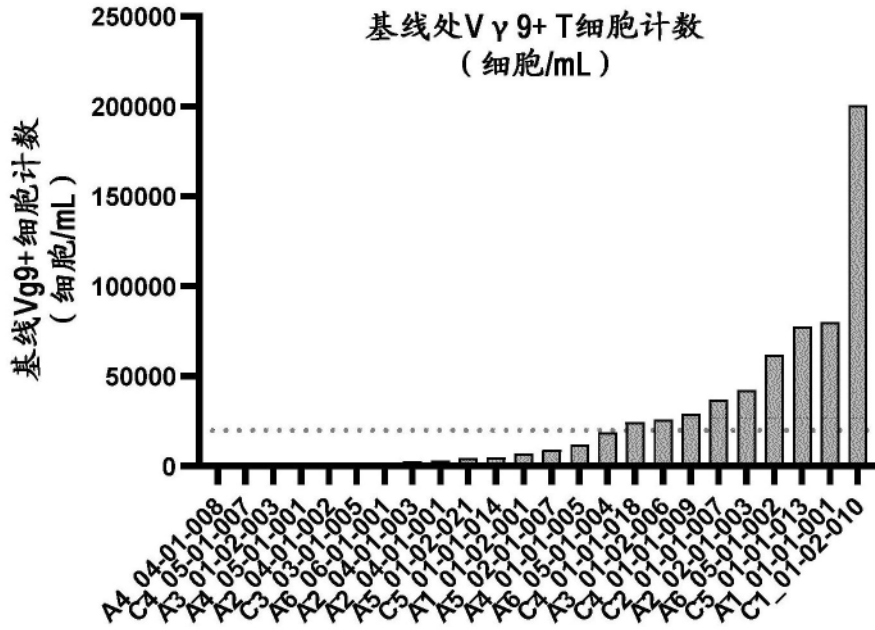


图2A

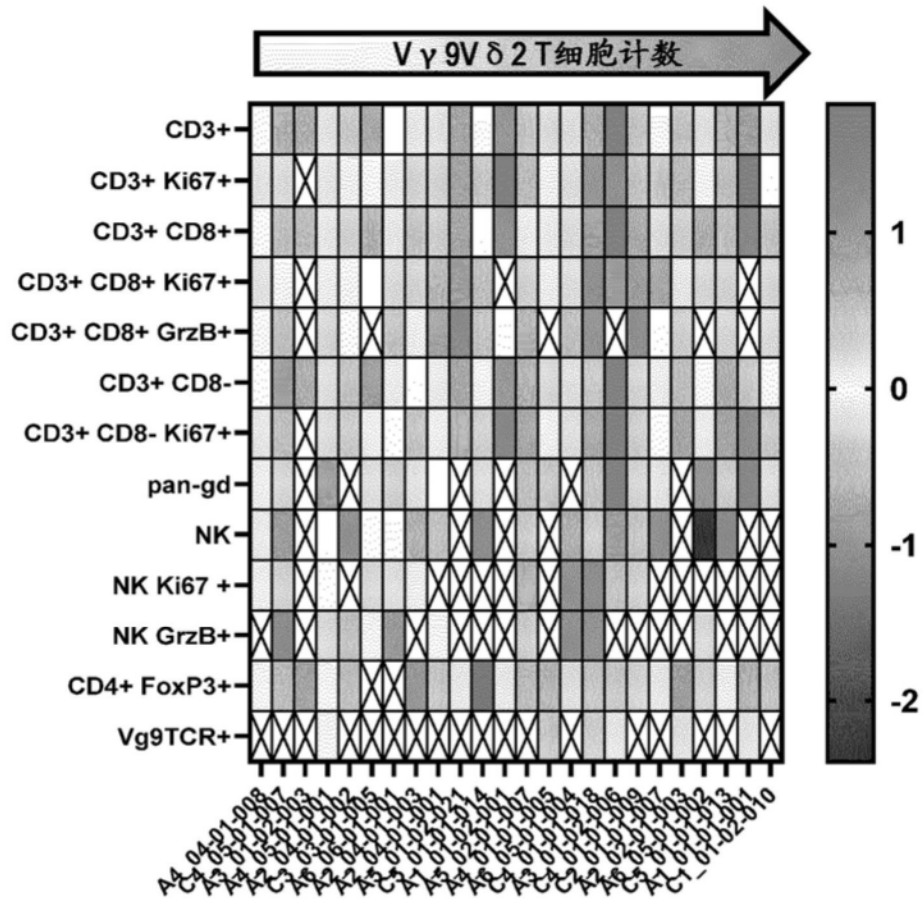


图2B

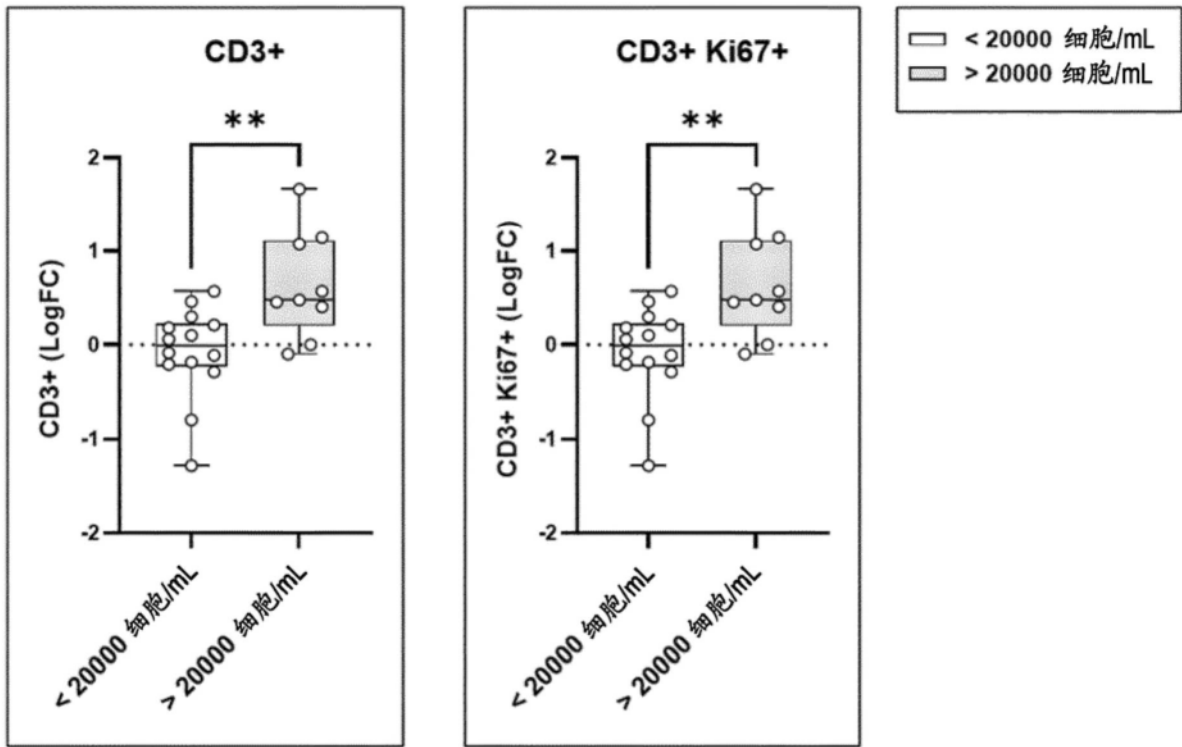


图2C

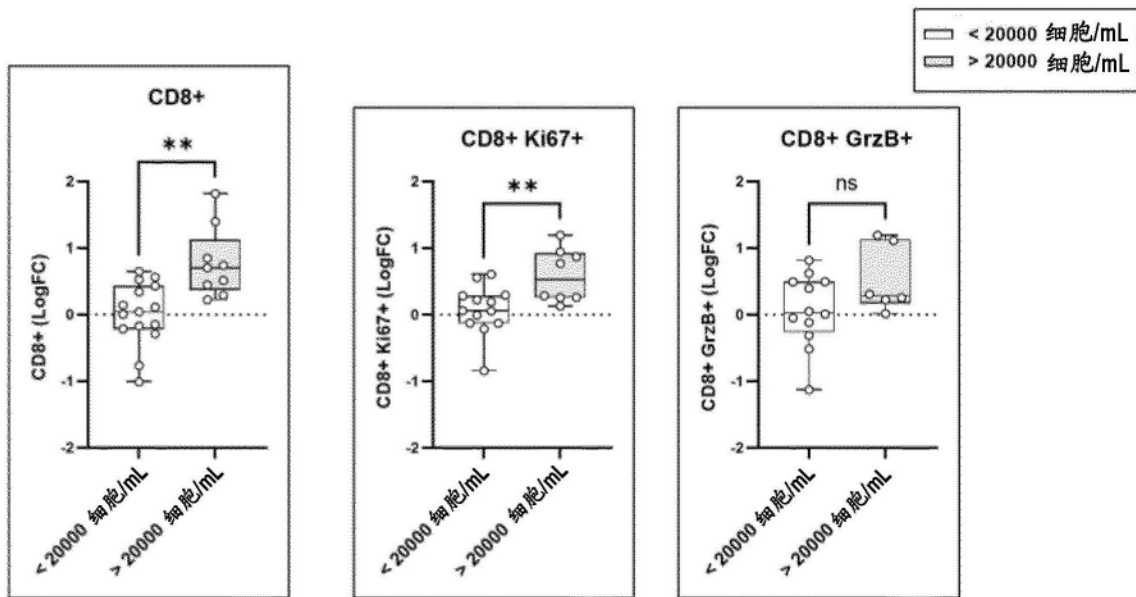


图2D

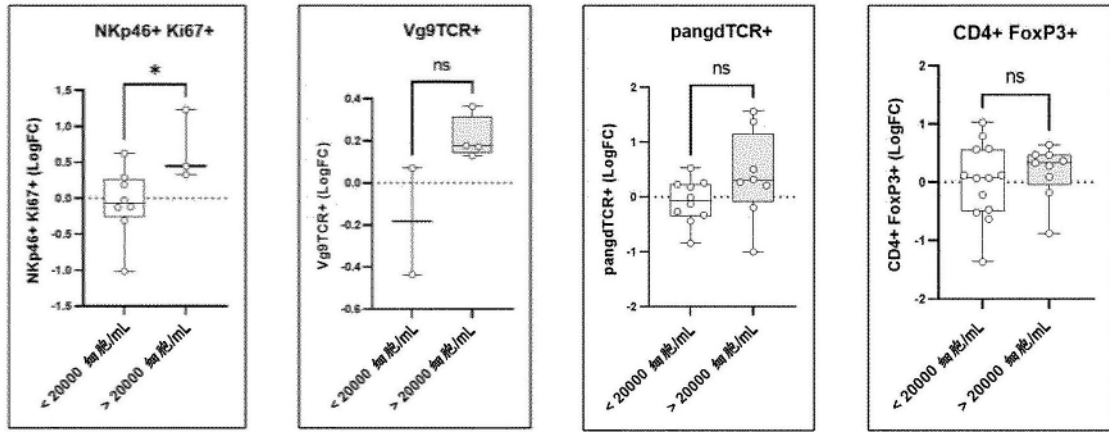


图2E

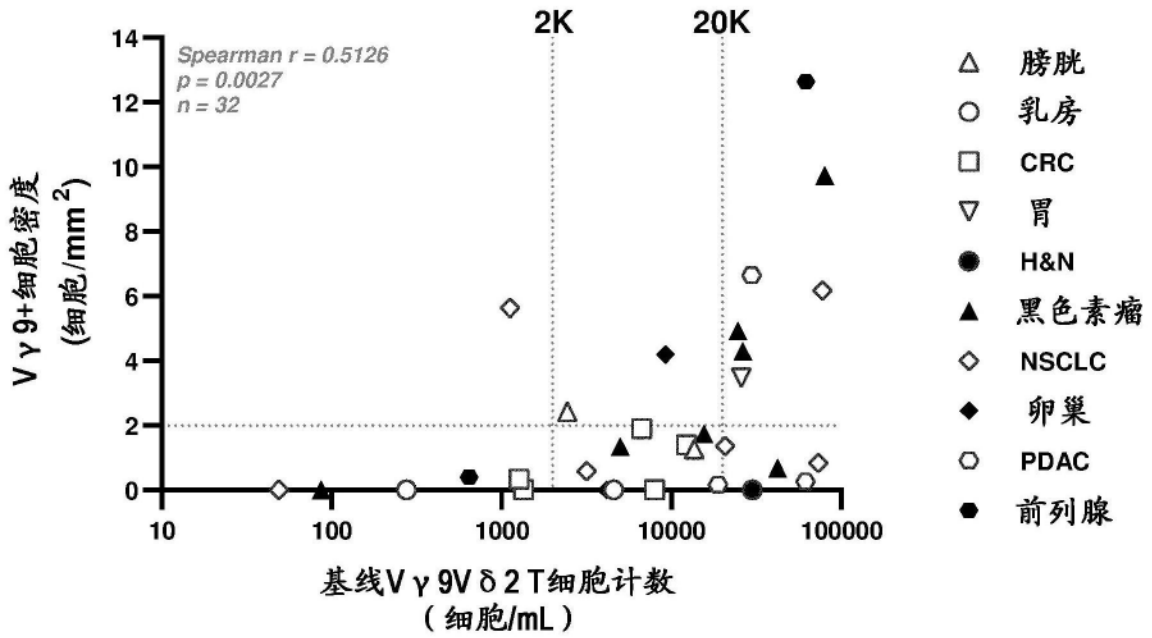


图3

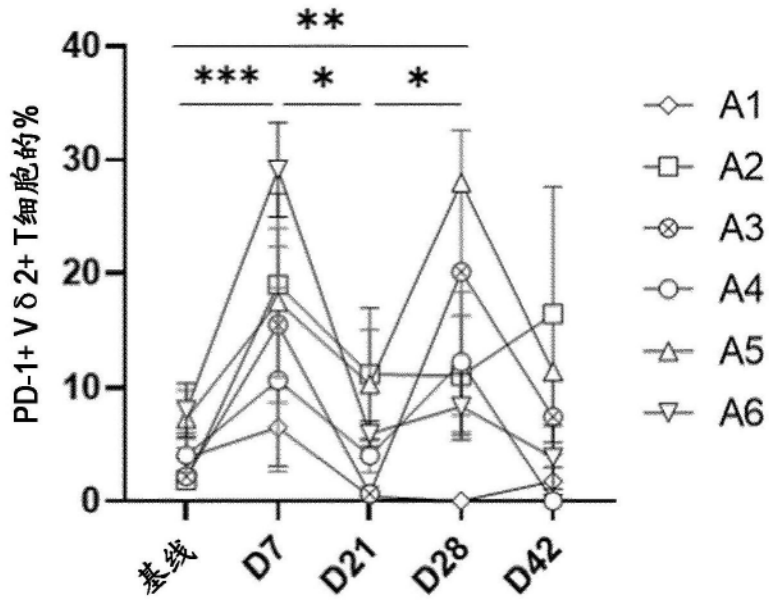


图4A

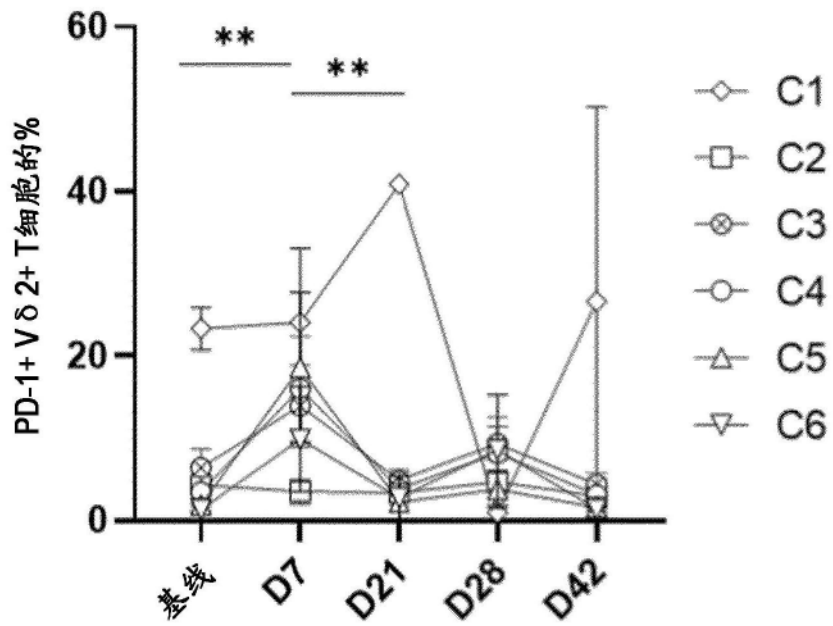


图4B

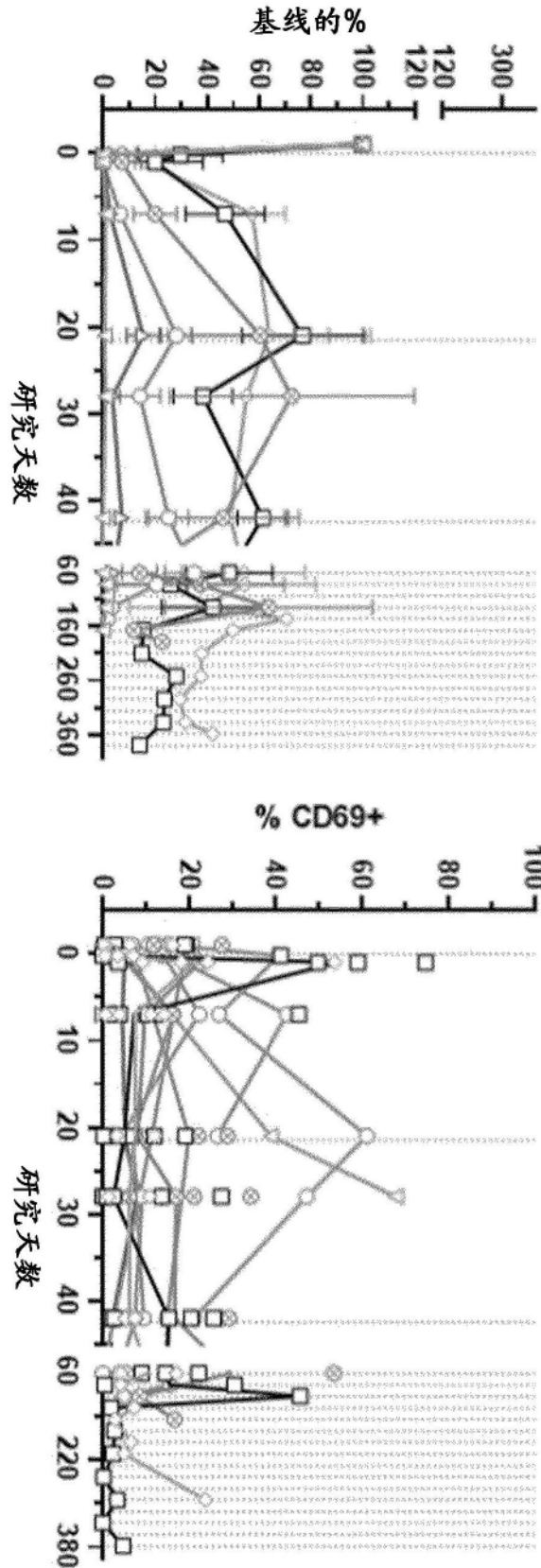


图5A

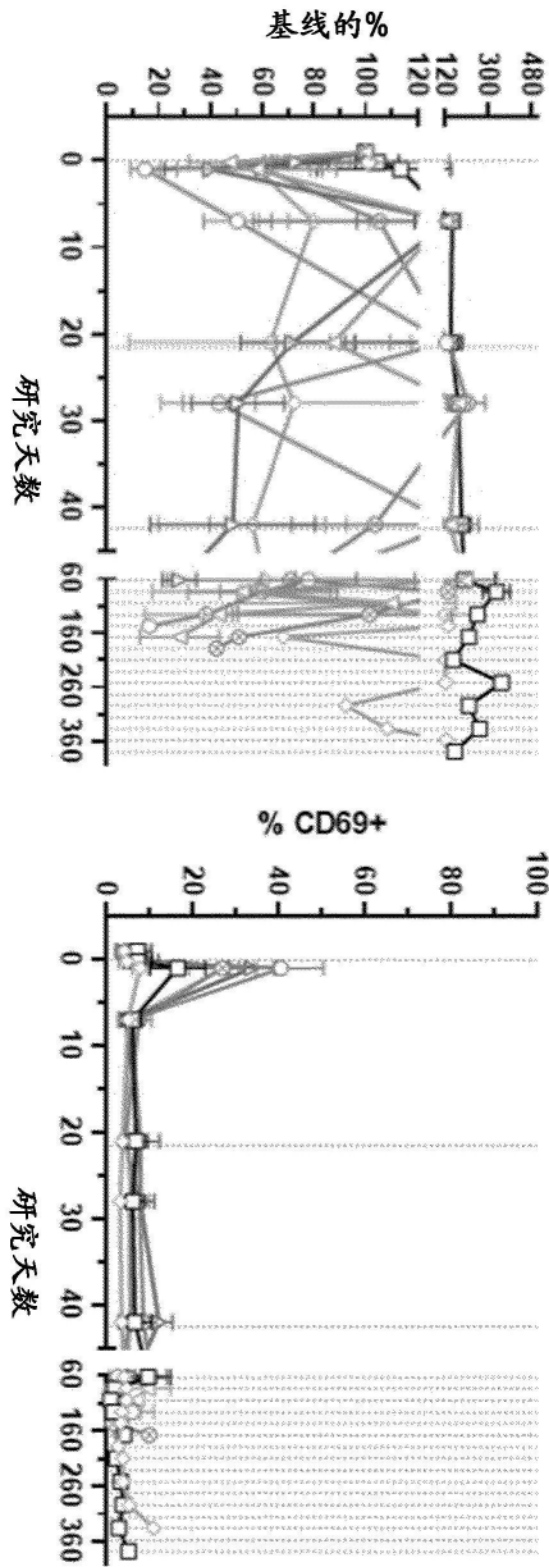


图5B

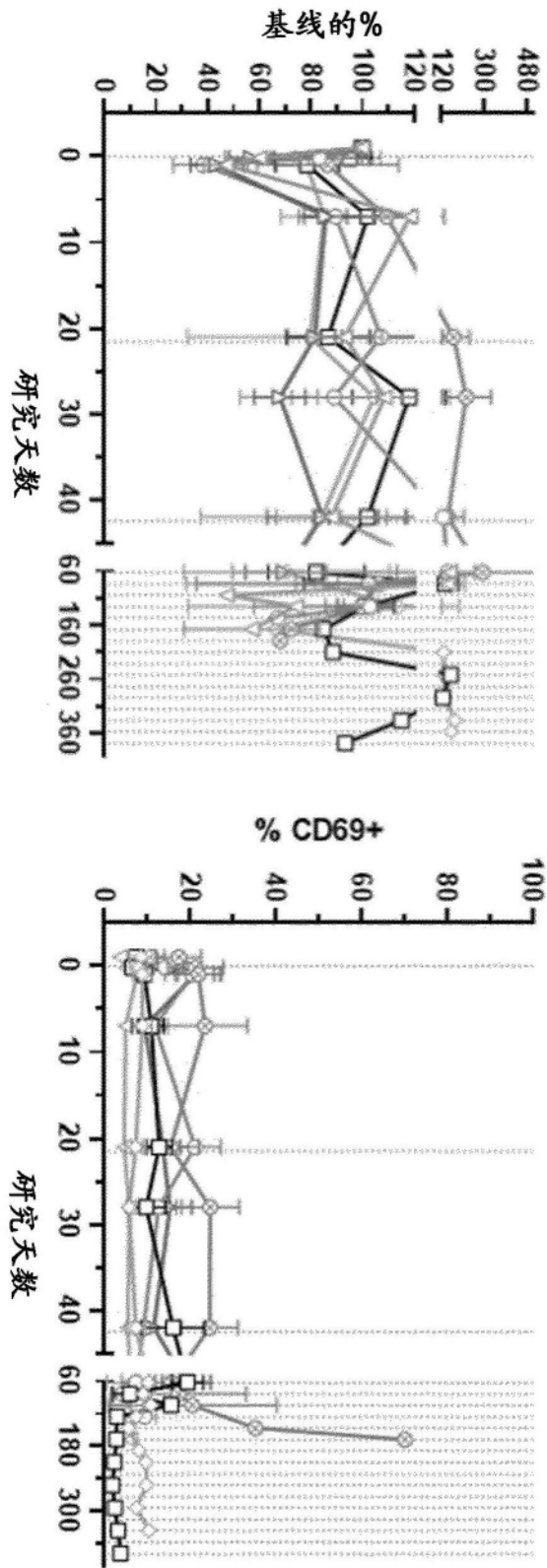


图5C

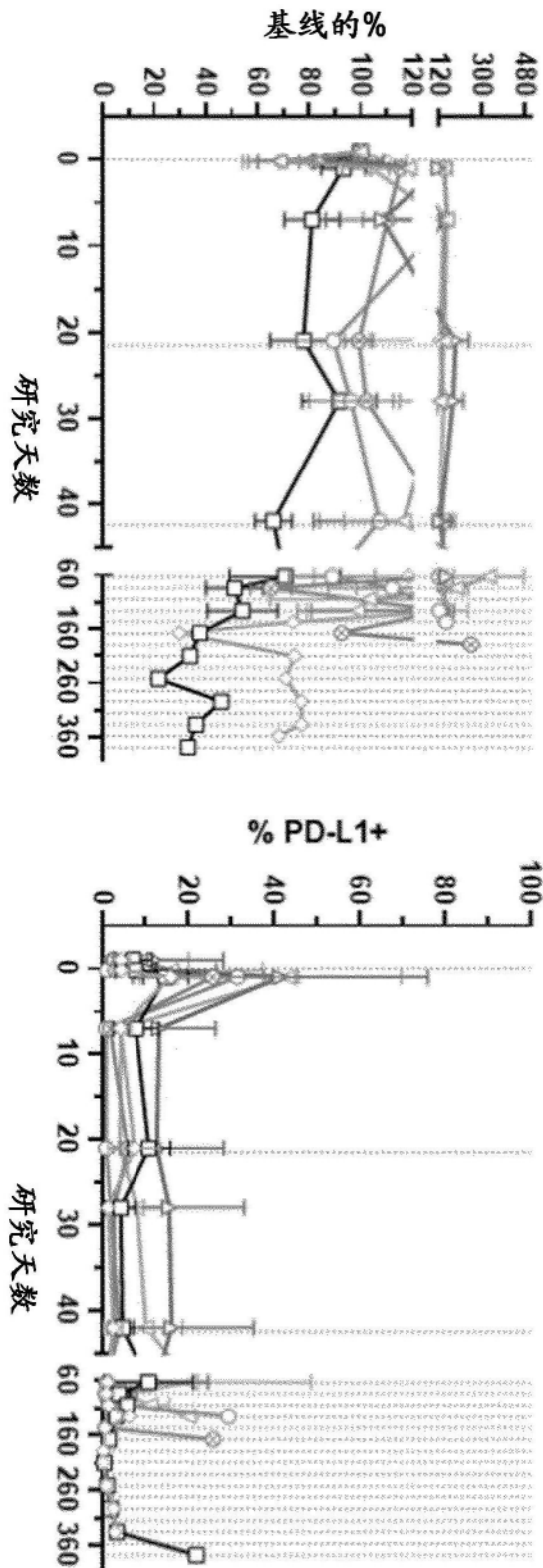


图5D