



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109476739 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780022552.4

(22)申请日 2017.03.17

(30)优先权数据

1605947.9 2016.04.07 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/056469 2017.03.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/174331 EN 2017.10.12

(71)申请人 癌症研究技术有限公司

地址 英国伦敦

(72)发明人 塞尔吉奥·克萨达 卡尔·佩格斯

弗雷德·瓦尔加斯

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

代理人 胡杰 王雯雯

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书28页

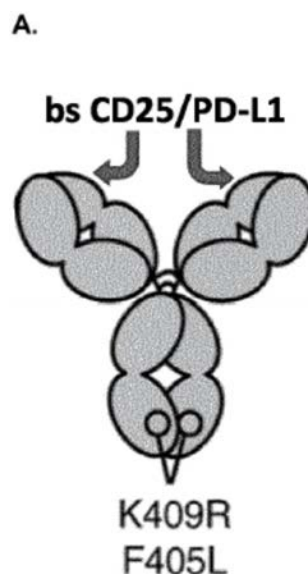
序列表3页 附图20页

(54)发明名称

用于肿瘤特异性细胞消减的抗CD25 FC γ 受体双特异性抗体

(57)摘要

本公开涉及一种治疗实体瘤的方法,其中所述方法涉及使用针对CD25的抗体。特别地,所述针对CD25的抗体针对肿瘤内调控T细胞(Treg)的消减进行了优化。本发明还提供了新颖的抗CD25抗体及其与其他抗癌药物如免疫检查点抑制剂、靶向癌症抗原或抑制性Fc受体Fc γ R11b(CD32b)的化合物的组合。



1. 一种治疗患有癌症的人受试者的方法,所述方法包括向受试者施用抗CD25抗体的步骤,其中所述受试者患有实体瘤,并且其中所述抗CD25抗体是以高亲和力结合选自Fc γ RI、Fc γ RIIc和Fc γ RIIIa的至少一种活化Fc γ 受体并消减肿瘤浸润性调控T细胞的IgG1抗体。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗CD25抗体对于CD25的解离常数(K_d)为小于 10^{-8} M,和/或对于至少一种活化Fc γ 受体的解离常数为小于约 10^{-6} M。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述抗CD25抗体:

(a) 以高于1的活化与抑制比(A/I)结合Fc γ 受体;和/或

(b) 以比结合Fc γ RIIb的亲和力更高的亲和力结合Fc γ RI、Fc γ RIIc和Fc γ RIIIa中的至少一种。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述抗CD25抗体是单克隆抗体。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述抗CD25抗体是人抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述抗CD25抗体引发增强的CDC、ADCC和/或ADCP应答,优选增加的ADCC和/或ADCP应答,更优选增加的ADCC应答。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述抗CD25抗体施用于患有确定的肿瘤的受试者。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述方法还包括鉴定患有实体瘤的受试者的步骤。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用免疫检查点抑制剂。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是PD-1拮抗剂。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述PD-1拮抗剂是抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

12. 一种如权利要求1至6中任一项所定义的抗CD25抗体。

13. 一种如权利要求1至6中任一项所定义的抗CD25抗体,其用于治疗人受试者的癌症,其中所述受试者患有实体瘤。

14. 如权利要求1至6中任一项所定义的抗CD25抗体用于制造用于治疗人受试者的癌症的药物的用途,其中所述受试者患有实体瘤。

15. 用于根据权利要求13所述的用途或根据权利要求13所述的用途的抗CD25抗体,其中所述抗体用于与免疫检查点抑制剂组合施用。

16. 用于根据权利要求15所述的用途或根据权利要求14所述的用途的抗CD25抗体,其中所述免疫检查点抑制剂是PD-1拮抗剂。

17. 一种如权利要求1至6中任一项所定义的抗CD25抗体与如权利要求9至11中任一项所定义的免疫检查点抑制剂的组合,其用于治疗人受试者的癌症,其中所述受试者患有实体瘤,并且所述抗CD25抗体和所述PD-1拮抗剂同时地、分开地或顺序地施用。

18. 一种用于治疗癌症的药盒,所述药盒包含如权利要求1至6中任一项所定义的抗CD25抗体和如权利要求9至11中任一项所定义的免疫检查点抑制剂。

19. 一种药物组合物,其包含药学上可接受的介质中的抗CD25抗体和免疫检查点抑制剂。

20. 一种双特异性抗体,其包含:

(a) 第一抗原结合部分,所述第一抗原结合部分结合CD25;以及

(b) 第二抗原结合部分,所述第二抗原结合部分结合免疫检查点蛋白;

其中所述双特异性抗体是以高亲和力结合选自Fc γ RI、Fc γ RIIc和Fc γ RIIIa的至少一种活化Fc γ 受体并消减肿瘤浸润性调控T细胞的IgG1抗体。

21. 根据权利要求20所述的双特异性抗体,其中所述免疫检查点蛋白是选自由以下组成的组:PD-1、CTLA-4、BTLA、KIR、LAG3、VISTA、TIGIT、TIM3、PD-L1、B7H3、B7H4、PD-L2、CD80、CD86、HVEM、LLT1、GAL9、GITR、OX40、CD137以及ICOS。

22. 根据权利要求21所述的双特异性抗体,其中所述免疫检查点蛋白在肿瘤细胞上表达。

23. 根据权利要求21或22所述的双特异性抗体,其中所述免疫检查点蛋白是PD-L1。

24. 根据权利要求23所述的双特异性抗体,其中所述结合PD-L1的第二抗原结合部分包含于阿特珠单抗中。

25. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用如权利要求20至24中任一项所定义的双特异性抗体的步骤。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述受试者患有实体瘤。

27. 一种如权利要求19至24中任一项所定义的双特异性抗体,其用于治疗受试者的癌症。

28. 用于根据权利要求27所述的用途的双特异性抗体,其中所述受试者患有实体瘤。

29. 一种消减受试者的实体瘤中的调控T细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用抗CD25抗体的步骤,其中所述抗体是如权利要求1至6中任一项所定义。

用于肿瘤特异性细胞消减的抗CD25 FC γ 受体双特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明属于癌症免疫疗法领域,并且涉及一种治疗癌症的方法,包括一种治疗实体瘤的方法,其中所述方法涉及使用针对CD25的抗体。

[0002] 发明背景

[0003] 癌症免疫疗法涉及使用受试者自身的免疫系统来治疗或预防癌症。免疫疗法利用以下事实:癌细胞通常在其表面上具有略微不同的分子,所述分子可通过免疫系统检测到。这些分子或癌症抗原是最常见的蛋白质,但也包括诸如碳水化合物的分子。免疫疗法因此涉及经由这些靶抗原激发免疫系统攻击肿瘤细胞。然而,恶性肿瘤(特别是实体瘤)可通过肿瘤细胞所固有的和肿瘤微环境的组分介导的各种机制逃避免疫监视。在后者中,已经提出调控T细胞(Treg细胞或Treg)的肿瘤浸润且更具体地,效应T细胞(Teff)与Treg的不利平衡(即Teff与Treg的低比率)作为关键因素(Smyth M等人,2014,Immunol Cell Biol.92, 473-4)。

[0004] 自其发现以来,已经发现Treg在介导免疫稳态和促进外周耐受的建立和维持方面是至关重要的。然而,在癌症的背景下,它们的作用更加复杂。由于癌细胞表达自身和肿瘤相关抗原两者,所以寻求阻抑效应细胞应答的Treg的存在可导致肿瘤进展。确定的肿瘤中Treg的浸润因此代表了有效抗肿瘤应答和一般癌症治疗的主要障碍之一。Treg所采用的抑制机制被认为显著导致当前疗法的限制或甚至失败,所述疗法特别是依赖于抗肿瘤应答的诱导或增强的免疫疗法(Onishi H等人;2012Anticanc.Res.32,997-1003)。

[0005] 作为治疗癌症的治疗方法消减Treg是通过研究支持的方法,所述研究显示了Treg对鼠类模型中的肿瘤确定和进展的贡献。此外,Treg的肿瘤浸润也一直与几种人癌症的预后较差相关(Shang B等人,2015,Sci Rep.5:15179)。然而,肿瘤中Treg的消减是复杂的,并且此领域中研究的结果存在差异。因此,本领域中需要一种涉及Treg的消减的治疗癌症的方法。

[0006] 在用于实现Treg消减的潜在分子靶标中,IL-2/CD25相互作用一直是鼠类模型中几项研究的目的,所述研究中的一些涉及使用PC61(一种大鼠抗小鼠CD25抗体)(Setiady Y等人,2010.Eur J Immunol.40:780-6)。已将这种抗体的CD25结合和功能活性与由不同作者产生的一组单克隆抗体的CD25结合和功能活性进行了比较(Lowenthal J.W等人,1985.J.Immunol.,135,3988-3994;Moreau,J.-L等人,1987.Eur.J.Immunol.17,929-935;Volk HD等人,1989Clin.exp.Immunol.76,121-5;Dantal J等人,1991,Transplantation 52:110-5)。

[0007] 以这种方式,已经表征了这种靶标内的抗小鼠CD25的与小鼠IL-2结合位点不同或共同的三个表位。PC61(具有小鼠IgG1同种型)阻断或抑制IL-2与CD25的结合,与抗小鼠CD25抗体的许多其他杂交瘤一样(并且那些中的大多数公开为抗人CD25抗体;参见例如W02004/045512、W02006/108670、W01993/011238和W01990/007861)。此外,PC61与小鼠CD25的结合不受CD25在IL-2结合位点的ADP-核糖基化影响,如对于其他抗小鼠CD25抗体(如7D4)(Teege S等人,2015,Sci Rep 5:8959)。

[0008] 一些文献提及在癌症中或与Treg消减结合单独或组合使用抗CD25。(W02004/074437;W02006/108670;W02006/050172;W02011/077245;W02016/021720;W02004/045512;Grauer 0等人,2007Int.J.Cancer:121:95-105)。然而,当在小鼠癌症模型中进行测试时,大鼠抗小鼠CD25 PC61在肿瘤确定后递送时未能展示抗肿瘤活性。

[0009] 在鼠类自身免疫模型的背景下,重新工程化抗CD25 PC61抗体以评价抗CD25抗体内高度不同的Fc效应子功能对IL-2受体阻断和外周Treg消减的影响(Huss D等人,2016.Immunol.148:276-86)。然而,从未评价单独或与其他抗体或抗癌化合物组合使用的PC61消减肿瘤中的Treg或介导抗肿瘤治疗活性的能力(因此,作为工程化抗体,或作为设计或表征为具有与PC61对小鼠CD25的那些类似的CD25结合特征的抗人CD25)。

发明内容

[0010] 本发明提供了新颖抗CD25抗体和抗CD25抗体的新颖用途,所述抗CD25抗体特征在于允许有效消减特别是肿瘤内的Treg的结构元件。在此范围内,已经修改了大鼠IgG1 PC-61的结构和功能特征(如关于小鼠CD25所描述),以便提供单独或与其他抗癌剂组合的在用作消减Treg和针对肿瘤的功效方面呈现出人意料改善的特征的抗体。这些发现可用于定义和产生提供针对人受试者中的肿瘤的相当作用的新颖抗人CD25。

[0011] 因此,本发明人的关键发现是以下意外发现:抗小鼠抗CD25PC61仅能够消减淋巴结和循环中的Treg,而未能在肿瘤内不能如此。肿瘤中缺乏Treg消减与缺乏抗肿瘤活性相关。这种新的和意外的数据促使本发明人通过Fc工程化增加抗小鼠CD25的消减活性,这导致肿瘤内Treg的有效消减和抗肿瘤活性。

[0012] 在一个主要方面,本发明提供了一种治疗患有癌症的人受试者的方法,所述方法包括向受试者施用抗CD25抗体的步骤,其中所述受试者患有肿瘤(优选实体瘤),其中所述抗CD25抗体是以高亲和力结合至少一种活化Fc γ 受体(优选选自Fc γ RI、Fc γ RIIc和Fc γ RIIIa)并消减肿瘤浸润性调控T细胞的IgG1抗体。

[0013] 这种抗体优选对于CD25的解离常数(K_d)为小于 10^{-8} M,和/或对于至少一种活化Fc γ 受体的解离常数为小于约 10^{-6} M。最优选地,所述抗CD25抗体的特征在于与Fc γ 受体相关的其他特征,特别是:

[0014] (a) 以高于1的活化与抑制比(A/I)结合Fc γ 受体;和/或

[0015] (b) 以比结合Fc γ RIIb的亲和力更高的亲和力结合Fc γ RI、Fc γ RIIc和Fc γ RIIIa中的至少一种。

[0016] 考虑到在治疗方法中使用抗CD25抗体,它可提供进一步优选的特征。抗CD25抗体优选是单克隆抗体,特别是人抗体或人源化抗体。此外,鉴于其与免疫细胞和/或免疫系统的组分相互作用以发挥其活性,所述抗CD25抗体可进一步引发增强的CDC、ADCC和/或ADCP应答,优选增加的ADCC和/或ADCP应答,更优选增加的ADCC应答。

[0017] 本发明的抗CD25抗体(如上文总体定义和具体实施方式中的进一步细节)可用于治疗人受试者的方法,其中所述抗CD25抗体施用于、患有确定的实体瘤的受试者(优选用于还包括鉴定患有实体瘤的受试者的步骤的方法)。此类方法还可包括向所述受试者施用免疫检查点抑制剂,例如呈结合并抑制免疫检查点蛋白的抗体形式的免疫检查点抑制剂。优选的免疫检查点抑制剂是PD-1拮抗剂,其可以是抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。更一般地,抗

CD25抗体可用于消减受试者的实体瘤中的调控T细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用所述抗CD25抗体的步骤。

[0018] 在另一方面,本发明的抗CD25抗体可用于制造用于治疗人受试者的癌症的药物,其中所述受试者患有实体瘤。在此范围内,所述抗体用于与免疫检查点抑制剂,优选PD-1拮抗剂组合施用。

[0019] 在另一方面,本发明提供了一种如以上定义的抗CD25抗体与另一种抗癌化合物(优选免疫检查点抑制剂或如具体实施方式中所示的其他化合物)的组合,其用于治疗人受试者的癌症,其中所述受试者患有实体瘤,并且所述抗CD25抗体和所述抗癌化合物(例如,免疫检查点抑制剂,如PD-1拮抗剂)同时地、分开地或顺序地施用。在此范围内,本发明还提供了一种用于治疗癌症的药盒,所述药盒包含如以上定义的抗CD25抗体和抗癌化合物(例如,免疫检查点抑制剂,如PD-1拮抗剂),

[0020] 在另一方面,本发明还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的介质中的如以上定义的抗CD25抗体。这种组合物还可包含抗癌化合物(例如,免疫检查点抑制剂,如PD-1拮抗剂),

[0021] 在又一方面,本发明还提供了一种双特异性抗体,所述双特异性抗体包含:

[0022] (a) 第一抗原结合部分,所述第一抗原结合部分结合CD25;以及

[0023] (b) 第二抗原结合部分,所述第二抗原结合部分结合另一种抗原;

[0024] 其中所述双特异性抗体是以高亲和力结合至少一种活化Fc γ 受体并消减肿瘤浸润性调控T细胞的IgG1抗体。优选地,这种第二抗原结合部分结合选自免疫检查点蛋白、肿瘤相关抗原的抗原,或者是(或是基于)抗人活化Fc受体抗体(抗-Fc γ RI、抗Fc γ RIIc或抗Fc γ RIIIa抗体)或是(或是基于)拮抗性抗人Fc γ RIIb抗体。

[0025] 优选地,这种双特异性抗体包含结合免疫检查点蛋白的第二抗原结合部分,所述免疫检查点蛋白是选自由以下组成的组:PD-1、CTLA-4、BTLA、KIR、LAG3、VISTA、TIGIT、TIM3、PD-L1、B7H3、B7H4、PD-L2、CD80、CD86、HVEM、LLT1、GAL9、GITR、OX40、CD137以及ICOS。这种免疫检查点蛋白优选在肿瘤细胞上表达,并且最优选选自PD-1、PD-L1和CTLA-4。结合免疫检查点蛋白的第二抗原结合部分可包含于或基于可商购的抗体,所述抗体充当免疫检查点抑制剂,例如:

[0026] (a) 在PD-1的情况下,抗PD-1抗体可以是纳武单抗或派姆单抗。

[0027] (b) 在PD-L1的情况下,抗PD-L1是阿特珠单抗;

[0028] (c) 在CTLA-4的情况下,抗CTLA-4是伊匹单抗。

[0029] 这种双特异性抗体可以任何可商购的形式提供,包括Duobody、BiTE DART、CrossMab、钮-孔(Knobs-in-holes)、Triomab或双特异性抗体及其片段的其他合适的分子形式。

[0030] 或者,这种双特异性抗体包含结合肿瘤相关抗原的第二抗原结合部分。在此替代实施方案中,此类抗原和相应的抗体包括但不限于CD22(布利那图单抗)、CD20(利妥昔单抗、托西莫单抗)、CD56(洛沃珠单抗)、CD66e/CEA(拉贝珠单抗)、CD152/CTLA-4(伊匹单抗)、CD221/IGF1R(MK-0646)、CD326/Epcam(依决洛单抗)、CD340/HER2(曲妥珠单抗、培妥珠单抗)以及EGFR(西妥昔单抗、帕尼单抗)。

[0031] 本发明的抗CD25抗体与另一种抗癌化合物的组合或如以上定义的双特异性抗体

可用于治疗癌症的方法,所述方法包括将所述组合或所述双特异性抗体施用于受试者的步骤,特别是当所述受试者患有实体瘤并且用于治疗受试者的癌症时。

[0032] 本发明的其他目的,包括本发明的抗人CD25抗体的进一步定义及其在治疗癌症的方法中、在药物组合物中、与其他抗癌化合物的组合中、在双特异性抗体中的用途提供于具体实施方式和实施例中。

具体实施方式

[0033] 本发明提供了一种治疗或预防受试者的癌症(特别是实体瘤)的方法,所述方法包括向所述受试者施用结合CD25的抗体的步骤,其中所述抗CD25抗体的特征在于允许有效消减特别是肿瘤内的Treg的结构元件。本发明还提供了一种如本发明中定义的结合CD25的抗体,所述抗体用于治疗或预防癌症,特别是实体瘤。或者,本发明提供了结合CD25且允许有效消耗Treg的抗体用于制造用于治疗或预防癌症(特别是实体瘤)的药物的用途。本发明还提供了结合CD25并允许有效消减Treg的抗体在治疗或预防癌症(特别是实体瘤)中的用途。

[0034] 本发明公开了将抗CD25抗体(由大鼠抗小鼠CD25抗体PC61例示)的同种型转换为消减同种型(针对PC61的小鼠IgG2,但等效于人中的IgG1)的方式使得实体瘤背景下的调控T细胞的消减改善。此外,本发明人首次发现CD25可被靶向以消减治疗背景下(例如在确定的实体瘤中)的调控T细胞,并且CD25优先在调控T细胞中表达。本发明人已经发现,具有增强的与活化Fc γ 受体结合的工程化抗CD25抗体产生肿瘤浸润性调控T细胞的有效消减,其是可例如与其他癌症靶向化合物如靶向免疫检查点蛋白、肿瘤相关抗原或抑制性Fc γ 受体的那些(与双特异性抗体组合或其内)相关的治疗方法。

[0035] 本发明人还首次发现抑制性Fc γ 受体IIb在肿瘤部位上调,从而防止通过原始抗小鼠CD25抗体PC61有效肿瘤内调控T细胞消减。因此,本发明涵盖涉及组合方法的治疗应用,所述组合方法涉及靶向CD25和Fc γ 受体IIb。

[0036] CD25是IL-2受体的 α 链,并且存在于活化的T细胞、调控T细胞、活化的B细胞、一些胸腺细胞、骨髓前体和少突胶质细胞上。CD25与CD122和CD132缔合以形成异源三聚体复合物,所述复合物充当IL-2的高亲和力受体。人CD25的共有序列在以下SEQ ID NO:1中示出(Uniprot登录号P01589;成熟人CD25的细胞外结构域(对应于氨基酸22-240)加下划线并显示在SEQ ID NO:2中):

	10	20	30	40	50
	MDSYLLMWGL	LTFIMVPGCQ	AELCDDDPPE	IPHATFKAMA	YKEGTM LNCE
	60	70	80	90	100
	CKRGFRRIKS	GSLYMLCTGN	SSHSSWDNQC	QCTSSATRNT	TKQVTPQPEE
	110	120	130	140	150
[0037]	QKERKTTEMQ	SPMQPVDQAS	LPGHCREPPP	WENEATERIY	HFVVGQMVYY
	160	170	180	190	200
	QCVQGYRALH	RGPAESVCKM	THGKTRWTQP	QLICTGEMET	SQFPGECKPQ
	210	220	230	240	250
	ASPEGRPESE	TSCLVTTTDF	QIQTEMAATM	ETSIFTTEYQ	VAVAGCVFLL
	260	270			
	ISVLLLSGLT	WQRRQRKSRR	TI		

[0038] 如本文所用,“结合CD25的抗体”是指能够结合IL-2受体的CD25亚基的抗体。此亚基也被称为IL-2受体的 α 亚基。这种抗体在本文中也称为“抗CD25抗体”。

[0039] 抗CD25抗体是能够特异性结合IL-2受体的CD25亚基(抗原)的抗体。“特异性结合”、“特异性地结合”和“特异性地结合”应理解为是指抗体对于目标抗原的解离常数(K_d)为小于约 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 或 $10^{-12}M$ 。在优选的实施方案中,解离常数是小于 $10^{-8}M$,例如在 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 或 $10^{-12}M$ 的范围内。

[0040] 如本文所用,术语“抗体”是指完整免疫球蛋白分子以及其包含抗原结合位点的片段,并且包括多克隆、单克隆、遗传工程化和其他修饰形式的抗体,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、异缀合物和/或多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)以及抗体的抗原结合片段,包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG、多肽-Fc融合、单链变体(scFv片段、VHH、Trans-bodies®、Affibodies®、鲨鱼单结构域抗体、单链或串联双抗体(TandAb®)、VHH、Anticalins®、Nanobodies®、微型抗体、BiTE®、双环肽和其他替代免疫球蛋白蛋白支架)。在一些实施方案中,抗体可缺乏如果天然产生则将具有的共价修饰(例如,聚糖的附接)。在一些实施方案中,抗体可含有共价修饰(例如,聚糖、可检测部分、治疗部分、催化部分或提供抗体的改善的稳定性或施用的其他化学基团如聚乙二醇的附接)。“抗体”也可指骆驼科动物抗体(仅重链抗体)和抗体样分子如抗运载蛋白(Skerra (2008) FEBS J 275,2677-83)。在一些实施方案中,抗体是多克隆抗体或寡克隆抗体,即作为一组抗体产生,每种抗体与单个抗体序列缔合并且结合抗原内或多或少不同的表位(如人CD25细胞外结构域内与不同参考抗人CD25抗体相关的不同表位)。多克隆或寡克隆抗体可以如文献(Keams JD等人,2015.Mol Cancer Ther.14:1625-36)中描述的用于医学用途的单一制剂提供。

[0041] 在本发明的一方面,抗体是单克隆抗体。抗体可另外地或替代地是人源化抗体或人抗体。在另一方面,抗体是人抗体,或在任何情况下是具有允许其在人受试者中使用和施用的形式和特征的抗体。

[0042] 抗体(Ab)和免疫球蛋白(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。免疫球蛋白可来自任

何类别,如IgA、IgD、IgG、IgE或IgM。免疫球蛋白可具有任何亚类,如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄。在本发明的一个优选方面,抗CD25抗体是来自IgG类,优选IgG₁亚类。在一方面,抗CD25抗体是来自人IgG₁亚类。

[0043] IgG抗体的Fc区与若干细胞Fc γ 受体(Fc γ R)相互作用以刺激并调控下游效应子机制。存在五种活化受体,即Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa(CD32a)、Fc γ RIIc(CD32c)、Fc γ RIIIa(CD16a)和Fc γ RIIIb(CD 16b),以及一种抑制性受体Fc γ RIIb(CD32b)。IgG抗体与免疫系统的通讯由Fc γ R控制和介导,所述Fc γ R将由抗体感测和收集的信息传递至免疫系统,从而提供先天免疫系统与适应性免疫系统之间的联系,并且特别是在生物治疗剂的背景下(Hayes J等人,2016.J Inflamm Res 9:209-219)。

[0044] IgG亚类在其结合Fc γ R的能力方面不同,并且这种差异结合决定了它们引发一系列功能反应的能力。例如,在人中,Fc γ RIIIa是参与抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的活化的主要受体,并且IgG₃、紧密接着IgG₁展示对这种受体的最高亲和力,从而反映它们有效诱导ADCC的能力。

[0045] 在本发明的一个优选实施方案中,所述抗体以高亲和力结合Fc γ R,优选以高亲和力结合活化受体。优选地,所述抗体以高亲和力结合Fc γ RI和/或Fc γ RIIa和/或Fc γ RIIIa。在一个特定实施方案中,所述抗体结合Fc γ R的解离常数为小于约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M。

[0046] 在一方面,所述抗体是IgG₁抗体,优选人IgG₁抗体,其能够结合至少一种Fc活化受体。例如,所述抗体可结合选自Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb的一种或多种受体。在一方面,所述抗体能够结合Fc γ RIIIa。在一方面,所述抗体能够结合Fc γ RIIIa和Fc γ RIIa以及任选的Fc γ RI。在一方面,所述抗体能够以高亲和力结合这些受体,例如解离常数为小于约 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M,

[0047] 在一方面,所述抗体以低亲和力结合抑制性受体Fc γ RIIb。在一方面,所述抗体结合Fc γ RIIb的解离常数为高于 10^{-7} M、高于 10^{-6} M或高于 10^{-5} M。

[0048] 在本发明的一个优选实施方案中,抗人CD25抗体是来自人IgG₁亚类,并且优选具有ADCC和/或ADCP活性,如本文所论述,特别是相对于人来源的细胞。确实,如先前所描述(Nimmerjahn F等人,2005.Science,310:1510-2),mIgG_{2a}同种型(其对应于人IgG₁同种型)以至少高于1的高活化与抑制比(A/I)结合所有Fc γ R亚型。相比之下,其他同种型(如rIgG₁同种型)以与仅单一活化Fc γ R(Fc γ RIII)以及抑制性Fc γ RIIb相似的亲和力结合,从而导致低A/I比(<1)。如实施例所示,这种较低A/I比与同种型的较低肿瘤内Treg消减和较低抗肿瘤治疗活性相关。

[0049] 在优选的实施方案中,如本文所述的抗CD25抗体优选以高亲和力结合人CD25。仍然优选地,所述抗CD25抗体结合人CD25的细胞外区,如上所示。在一方面,本发明提供一种如本文所述的抗CD25抗体。特别地,实施例提供了用由PC-61.5.3杂交瘤分泌并且通常被鉴定为PC61或PC-61的抗体产生的实验数据。文献中涉及PC-61和小鼠CD25的测定(例如Setiady Y等人,2010.Eur.J.Immunol.40:780-6;McNeill A等人,2007.Scand J Immunol.65:63-9;Teege S等人,2015,Sci Rep 5:8959)以及实施例中公开的那些(包括包含PC61的CD25结合结构域的重组抗体)可适用于在适当的同种型相关时表征识别在与CD25(特别是,通过阻断IL-2结合)和与Fc γ 受体(特别是通过优选结合人活化Fc γ 受体和有效

消灭Treg)相互作用的水平具有PC61的相同功能性特征的人CD25的那些人抗体,如实施例中所描述。合适的方法将是本领域技术人员已知的,以实现如本文所述的抗体的所需功能特征。

[0050] 在优选的实施方案中,所述治疗患有癌症的人受试者的方法包括向受试者施用抗CD25抗体的步骤,其中所述受试者优选患有实体瘤,并且其中所述抗CD25抗体优选是以高亲和力结合选自Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIc (CD32c)和Fc γ RIIIa (CD16a)的至少一种活化Fc γ 受体并消灭肿瘤浸润性调控T细胞的人IgG1抗体。优选地,所述抗CD25抗体对于CD25的解离常数(K_d)为小于 10^{-8} M。更优选地,所述抗CD25抗体结合人CD25,从而对IL-2结合和Treg消灭提供类似于对小鼠CD25的作用的作用。在另一实施方案中,所述抗CD25抗体以高于1的活化与抑制比(A/I)结合Fc γ 受体,和/或以比结合Fc γ RIIb (CD32b)的亲和力更高的亲和力结合Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIc (CD32c)、Fc γ RIIIa (CD16a)。

[0051] 已经克隆了PC-61抗体的CD25结合结构域并将其表达为与适当恒定区融合的重组蛋白。PC-61抗体的CD25结合结构域的序列以及其对CD25的细胞外结构域内的不同表位的特异性和/或它的其他功能活性可用于比较通过任何合适的技术产生和筛选的候选抗CD25抗体(例如通过从CD25免疫的啮齿动物培养多组杂交瘤或产生重组抗体文库,且然后用CD25片段筛选这些抗体谱系以用于如本文所述进行功能性表征)。因此鉴定的抗CD25抗体也可以作为重组抗体,特别是作为本文所述的完整抗体或作为片段或变体产生。

[0052] 天然抗体和免疫球蛋白通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。每条重链在氨基末端具有可变结构域(V_H),之后跟随多个恒定结构域。每条轻链在氨基末端具有可变结构域(V_L),并且在羧基末端具有恒定结构域。

[0053] 可变区能够与结构互补的抗原靶标相互作用,并且其特征在于氨基酸序列与具有不同抗原特异性的抗体的差异。H链或L链的可变区含有能够特异性地结合抗原靶标的氨基酸序列。在这些序列内的是称为“高变”的较小序列,因为它们在具有不同特异性的抗体之间具有极端可变性。此类高变区也称为“互补决定区”或“CDR”区。

[0054] 这些CDR区解释了抗体对特定抗原决定簇结构的基本特异性。CDR代表可变区内的非连续氨基酸链段,但是无论物种如何,已发现可变重链和轻链区内的这些关键氨基酸序列的位置定位在可变链的氨基酸序列中具有相似的定位。所有抗体的可变重链和轻链各自具有3个CDR区,每个CDR区与相应轻链(L)和重链(H)的其他CDR区(称为L1、L2、L3、H1、H2、H3)不邻接。先前已经描述了接受的CDR区(Kabat等人,1977.J Biol Chem 252,6609-6616)。

[0055] 本发明的抗体可通过补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)以及允许靶向、阻断增殖和/或消灭Treg细胞的任何其他机制起作用。

[0056] “补体依赖性细胞毒性(CDC)”涉及在补体的存在下通过本发明的抗体裂解抗原表达细胞。

[0057] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)”是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并由此导致靶细胞的溶解。

[0058] “抗体依赖性细胞介导的吞噬作用”(ADCP)是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的吞噬细胞(如巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并由此导致靶细胞的吞噬作用。

[0059] CDC、ADCC和ADCP可使用本领域中已知和可获得的测定来进行测量(Clynes等人(1998)Proc Natl Acad Sci USA 95,652-6)。抗体的恒定区在抗体固定补体和介导细胞依赖性细胞毒性和吞噬作用的能力中是重要的。因此,如本文所论述,抗体的同种型可基于是否希望抗体介导细胞毒性/吞噬作用来选择。

[0060] 如本文所论述,在本发明的一个实施方案中,使用导致Treg细胞消减的抗CD25抗体。例如,可使用引发强CDC应答和/或强ADCC和/或强ADCP应答的抗CD25抗体。用于增加CDC、ADCC和/或ADCP的方法是本领域中已知的。例如,CDC应答可随抗体中的突变而增加,所述突变增加C1q结合的亲和力(Idusogie等人(2001)J Immunol 166,2571-5)。

[0061] 可通过从抗体聚糖中消除岩藻糖部分的方法来增加ADCC,如通过在YB2/0细胞系中产生抗体,或者通过在人IgG₁的Fc部分上引入特异性突变(例如,S298A/E333A/K334A、S239D/I332E/A330L/G236A/S239D/A330L/I332E)(Lazar等人(2006)Proc Natl Acad Sci USA 103,2005-2010;Smith等人(2012)Proc Natl Acad Sci USA 109,6181-6)。还可通过在人IgG₁的Fc部分上引入特异性突变来增加ADCP(Richards等人(2008)Mol Cancer Ther 7,2517-27)。

[0062] 在本发明的一个优选实施方案中,对抗体进行优化以引发ADCC应答,即相对于其他抗CD25抗体或示例性未修饰的抗CD25单克隆抗体,ADCC应答得以增强、增加或改善。

[0063] 如本文所用,“嵌合抗体”可指具有源自一种物种(如大鼠或小鼠抗体)的免疫球蛋白的可变序列和来自另一种物种(如来自人抗体)的免疫球蛋白恒定区的抗体。在一些实施方案中,所述嵌合抗体可具有恒定区,其被增强以诱导ADCC。

[0064] 根据本发明的抗体也可以是部分或全部合成的,其中抗体的多肽链的至少一部分是合成的,并且可能针对结合其同源抗原而进行优化。此类抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体,并且可以是完整的四聚体结构,或者可以是二聚体并且仅包含单一重链和单一轻链。

[0065] 本发明的抗体也可以是单克隆抗体。如本文所用,“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指来源于单一克隆的抗体,包括任何真核生物、原核生物或噬菌体克隆,而不指代产生所述抗体的方法。

[0066] 本发明的抗体也可以是人抗体。如本文所用,“人抗体”是指具有可变区的抗体,其中框架区和CDR区两者均源自人种系免疫球蛋白序列。此外,如果所述抗体包含恒定区,则所述恒定区也来源于人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0067] 呈现如本文所述的特征的抗CD25抗体代表本发明的另一个目的。在另一实施方案中,本发明提供了编码如本文所定义的抗CD25抗体的核酸分子。在一些实施方案中,此类提供的核酸分子可含有密码子优化的核酸序列,和/或可包含在适当核酸载体内的表达盒中,以用于在宿主细胞例如像细菌、酵母、昆虫、鱼、鼠、类人猿或人细胞中表达。在一些实施方案中,本发明提供了包含表达所需抗体的异源核酸分子(例如DNA载体)的宿主细胞。

[0068] 在一些实施方案中,本发明提供了制备如上文所定义的分离的抗CD25抗体的方法。在一些实施方案中,此类方法可包括培养包含核酸(例如,可通过载体包含和/或递送至

宿主细胞的异源核酸)的宿主细胞。优选地,宿主细胞(和/或异源核酸序列)被排列和构建成使得抗体或其抗原结合片段从宿主细胞分泌并从细胞培养上清液中分离。

[0069] 本发明的抗体可为单特异性、双特异性或多特异性。“多特异性抗体”可对一种靶抗原或多肽的不同表位具有特异性,或者可含有对多于一种靶抗原或多肽具有特异性的抗原结合结构域(Kufer等人(2004) Trends Biotechnol 22,238-44)。

[0070] 在本发明的一方面,所述抗体是单特异性抗体。如下文进一步论述的,在一个替代方面,所述抗体是双特异性抗体。

[0071] 如本文所用,“双特异性抗体”是指具有结合单一抗原或多肽上或两种不同抗原或多肽上的两种不同表位的能力的抗体。

[0072] 如本文所论述的本发明的双特异性抗体可通过以下方法产生:生物学方法,如体细胞杂交;或遗传方法,如在细胞系或生物体中表达编码所需抗体结构的非天然DNA序列;化学方法(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其他方式至一种或多种分子实体,如另一种抗体或抗体片段);或其组合。

[0073] 允许产生单特异性或双特异性的技术和产品是本领域已知的,如在文献中,还关于替代形式、抗体-药物缀合物、抗体设计方法、体外筛选方法、恒定区、翻译后和化学修饰、用于触发癌细胞死亡的改进特征如Fc工程化进行了广泛综述(Tiller K和Tessier P, 2015 Annu Rev Biomed Eng.17:191-216;Speiss C等人,2015.Molecular Immunology 67:95-106;Weiner G,2015.Nat Rev Cancer,15:361-370;Fan G等人,2015.J Hematol Oncol8:130)。

[0074] 如本文所用,“表位”或“抗原决定簇”是指抗体所结合的抗原上的位点。如本领域中众所周知的,表位可由连续氨基酸(线性表位)或由蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸(构象表位)形成。由连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时通常得以保留,而通过三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理时通常丧失。表位通常包括至少3个、并且更通常至少5个或8-10个呈独特空间构象的氨基酸。确定表位的空间构象的方法是本领域中熟知的,并且包括例如x射线晶体学和2-D核磁共振。参见例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,Glenn E.Morris,编(1996)。

[0075] 在一些实施方案中,所述抗CD25抗体可包含在药剂中,所述药剂还包含缀合的有效负载,如治疗剂或诊断剂,特别是用于癌症治疗或诊断。可使用具有放射性核素或毒素的抗CD25抗体缀合物。通常使用的放射性核素的实例是例如,⁹⁰Y、¹³¹I和⁶⁷Cu等,并且通常使用的毒素的实例是阿霉素和卡奇霉素。在另一实施方案中,可修饰抗CD25抗体以具有改变的半衰期。用于实现改变的半衰期的方法是本领域中已知的。

[0076] 在一个实施方案中,所述抗体优选除了促进表达CD25的细胞的消减(通过ADCC、ADCP和/或CDC)外还可阻断人CD25的功能。优选地,它还阻断人IL-2与人CD25的结合,并且最优选阻断表达CD25的细胞中的人IL-2信号传导。

[0077] 在本发明的一个优选实施方案中,如本文所述的本发明的任何方面的受试者是哺乳动物,优选猫、狗、马、驴、绵羊、猪、山羊、牛、仓鼠、小鼠、大鼠、兔或豚鼠,但最优选地受试者是人。因此,在如本文所述的本发明的所有方面中,受试者优选是人。

[0078] 如本文所用,术语“癌症”、“癌性”和“恶性”是指或描述哺乳动物中通常特征在于细胞生长不受调控的生理病状。

[0079] 癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、白血病、母细胞瘤以及肉瘤。此类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、肝细胞癌(HCC)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤、胃肠(道)癌症、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑色素瘤、软骨肉瘤、成神经细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌以及头颈癌。

[0080] 在一方面,癌症涉及实体瘤。实体瘤的实例是肉瘤(包括由组织,如松质骨、软骨、脂肪、肌肉、血管、造血细胞或纤维结缔组织中的间充质起源的转化细胞引起的癌症)、癌瘤(包括由上皮细胞引起的肿瘤)、间皮瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤等。涉及实体瘤的癌症包括但不限于脑癌、肺癌、胃癌、十二指肠癌、食道癌、乳腺癌、结肠和直肠癌、肾癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、口腔癌、肉瘤、眼癌、甲状腺癌、尿道癌、阴道癌、颈癌、淋巴瘤等。

[0081] 在本发明的一方面,癌症是选自黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾癌、卵巢癌、膀胱癌、肉瘤和结肠癌。在本发明的一个优选方面,癌症是选自黑色素瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌和肾癌。在一个实施方案中,癌症不是黑色素瘤、卵巢癌或乳腺癌。在一个优选的方面,癌症是肉瘤、结肠癌、黑色素瘤或结肠直肠癌,或更一般地针对其MCA205、CT26、B16或MC38细胞系(如实施例中所鉴定)可代表用于验证化合物为对其治疗管理有用的临床前模型的任何人癌症。

[0082] 如本文所用,术语“肿瘤”在其应用于被诊断患有或疑似患有癌症的受试者时是指任何大小的恶性或潜在恶性赘生物或组织块,并且包括原发性肿瘤和继发性赘生物。术语“癌症”、“恶性肿瘤”、“赘生物”、“肿瘤”和“癌瘤”在本文中也可互换用于指表现出相对异常、不受控制和/或自主生长,以使得它们表现出特征在于显著丧失对细胞增殖的控制的异常生长表型的肿瘤和肿瘤细胞。通常,用于检测或治疗的目标细胞包括癌前(例如,良性)、恶性、转移前、转移和非转移细胞。本公开的教义可与任何和所有癌症相关。

[0083] 如本文所用,“实体瘤”是组织的异常生长或肿块,其通常不包含囊肿或液体区域,特别是除白血病或非实体淋巴癌之外的肿瘤和/或转移(无论位于何处)。实体瘤可以是良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞的类型和/或它们所在的组织或器官命名。实体瘤的实例是肉瘤(包括由组织,如松质骨、软骨、脂肪、肌肉、血管、造血细胞或纤维结缔组织中的间充质起源的转化细胞引起的癌症)、癌瘤(包括由上皮细胞引起的肿瘤)、黑色素瘤、淋巴瘤、间皮瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

[0084] 根据本发明的特别优选的癌症包括以实体瘤的存在为特征的癌症,即受试者不患有非实体瘤。在如本文所论述的本发明的所有方面中,优选癌症是实体瘤,即受试者患有实体瘤(并且不患有非实体瘤)。

[0085] 如本文所用的对“治疗(treat)”或“治疗(treating)”癌症的提及定义至少一种积极治疗作用的实现,所述作用例如像癌细胞数量减少、肿瘤大小减小、癌细胞浸润到外周器官中的速率降低或肿瘤转移或肿瘤生长的速率降低。

[0086] 可以多种方式测量癌症中的积极治疗作用(例如Weber(2009) J Nucl Med 50,1S-10S)。例作为举例,关于肿瘤生长抑制,根据美国国家癌症研究所(NCI)标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$ 被认为是高抗肿瘤活性水平,其中 $T/C(\%) = \text{处理物的}$

中值肿瘤体积/对照物的中值肿瘤体积 $\times 100$ 。在一些实施方案中,通过治疗有效量实现的治疗是无进展存活(PFS)、无疾病存活(DFS)或总体存活(OS)中的任一种。PFS(也称为“肿瘤进展时间”)表示治疗期间和之后癌症不生长的时间长度,并且包括患者经历完全应答或部分应答的时间的量,以及患者经历稳定疾病的时间的量。DFS是指在治疗期间或之后患者保持无疾病的时间长度。OS是指相较于原初或未治疗的个体或患者,预期寿命的延长。

[0087] 如本文所用的对“预防”(或防治)的提及是指延迟或预防癌症症状的发作。预防可以是绝对的(以使得不会发生疾病)或可仅在某些个体中或在有限量的时间内有效。

[0088] 在本发明的一个优选方面,受试者患有确定的肿瘤,即已经患有肿瘤的受试者,例如被分类为实体瘤。因此,当受试者已经患有肿瘤(如实体瘤)时,可使用如本文所述的发明。因此,本发明提供了一种可用于治疗现有肿瘤的治疗选择。在本发明的一方面,受试者患有现有实体瘤。本发明可用作预防,或优选用作已经患有实体瘤的受试者的治疗。在一方面,本发明不用作预防或防治。

[0089] 在一方面,使用如本文所述的发明,例如与其他癌症治疗(例如针对给定癌症的标准护理治疗)相比,可增强肿瘤消退,可损害或减轻肿瘤生长,和/或可增强存活时间。

[0090] 在本发明的一方面,如本文所述的治疗或预防癌症的方法还包括鉴定患有癌症的受试者,特别是鉴定患有肿瘤如实体瘤的受试者的步骤。

[0091] 本文所述的有效治疗癌症患者的疗法的剂量方案可根据诸如患者的疾病状态、年龄和体重的因素以及所述疗法引发受试者的抗癌应答的能力变化。合适剂量的选择将在本领域技术人员的能力范围内。例如,0.01、0.1、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50mg/kg。在一些实施方案中,这种量是适合根据给药方案施用的单位剂量的量(或其整个部分),所述单位剂量的量已被确定为与当施用于相关群体时的所需或有益结果(即,与治疗剂量方案)相关。

[0092] 如本文所述的根据本发明任一方面的抗体可呈药物组合物的形式,所述药物组合物另外包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。这些组合物包括例如液体、半固体和固体剂量制剂,如液体溶液(例如,可注射溶液和可输注溶液)、分散液或悬浮液、片剂、丸剂或脂质体。在一些实施方案中,优选的形式可取决于意图施用模式和/或治疗应用。含有抗体的药物组合物可通过本领域中已知的任何适当方法施用,包括但不限于口服、经粘膜、通过吸入、局部、经颊、经鼻、直肠或肠胃外(例如,静脉内、输注、肿瘤内、结内、皮下、腹膜内、肌肉内、皮内、经皮或其他类型的施用,涉及物理破坏受试者的组织和通过组织中的缺口施用药物组合物)。这种制剂可例如呈可注射或可输注溶液的形式,其适合于皮内、肿瘤内或皮下施用或用于静脉内输注。施用可涉及间歇给药。或者,施用可涉及连续给药(例如,灌注)至少选定的时间段,在施用其他化合物同时或之间。

[0093] 在一些实施方案中,抗体可与保护其免于快速释放和/或降解的载体制备,如控释制剂,如植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。可使用生物可降解的、生物相容的聚合物。

[0094] 本领域技术人员将理解,例如,递送途径(例如,口服对静脉内对皮下对比肿瘤内等)可影响剂量的量和/或所需剂量的量可影响递送途径。例如,当特定部位或位置内(例如,肿瘤内)特定高浓度的药剂受到关注时,集中递送(例如,在此实例中,肿瘤内递送)可能是所需和/或有用的。在优化给定治疗方案的途径和/或给药方案时要考虑的其他因素可包括,例如,所治疗的特定癌症(例如,类型、阶段、位置等)、受试者的临床状况(例如,年龄、总

体健康等)、存在或不存在组合疗法以及执业医师已知的其他因素。

[0095] 所述药物组合物通常应在制造和储存条件下无菌且稳定。可将组合物配制成溶液、微乳剂、分散液、脂质体或适用于较高药物浓度的其他有序结构。可通过按照需要将所需量的抗体与上文列举的成分中的一种或其组合掺入适当的溶剂中、随后进行过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。用于肠胃外施用的制剂包括但不限于如本文所论述的油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液、乳液,糊剂和可植入的缓释或生物可降解的制剂。可使用无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂来制备无菌可注射制剂。根据本发明使用的每种药物组合物可包括在所用的剂量和浓度下对受试者无毒的药学上可接受的分散剂、润湿剂、悬浮剂、等渗剂、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、载体、赋形剂、盐或稳定剂。优选地,这种组合物还可包含用于在癌症的治疗中使用的药学上可接受的载体或赋形剂,所述载体或赋形剂与给定施用方法和/或部位相容,例如用于肠胃外(例如皮下、皮内或静脉内注射)、肿瘤内或肿瘤周围施用。

[0096] 虽然根据本发明使用的治疗方法或组合物的一个实施方案可能不能有效地在每个受试者中实现积极治疗作用,但它应该在使用药物组合物和给药方案中这样做,所述药物组合物和给药方案与良好的医疗实践和如通过本领域中已知的任何统计学测试(如学生t-检验、 χ^2 -检验、根据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验)确定的统计学显著数目的受试者一致。

[0097] 在上文和随后,提及肿瘤、肿瘤疾病、癌瘤或癌症,还可替代地或另外地暗示原始器官或组织和/或任何其他位置中的转移,无论肿瘤和/或转移的位置如何。

[0098] 如本文所论述,本发明涉及消减调控T细胞(Treg)。因此,在本发明的一方面,抗CD25抗体消减或减少肿瘤浸润性调控T细胞。在一方面,所述消减是通过ADCC。在另一方面,所述消减是通过ADCP。抗CD25抗体还可消减或减少循环调控T细胞。在一方面,所述消减是通过ADCC。在另一方面,所述消减是通过ADCP。

[0099] 因此,本发明提供了一种用于消减受试者的肿瘤中的调控T细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用抗CD25抗体。在优选的实施方案中,Treg在实体瘤中消减。“消减”是指相对于不施用抗CD25抗体时,Treg的数量、比率或百分比降低。在如本文所述的本发明的特定实施方案中,超过约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或99%的肿瘤浸润性调控T细胞被消减。

[0100] 如本文所用,“调控T细胞”(“Treg”、“Treg细胞”或“Tregs”)是指专门控制自身免疫、过敏反应和感染的CD4⁺T淋巴细胞谱系。通常,它们调控T细胞群体的活性,但它们也可影响某些先天性免疫系统细胞类型。通常通过生物标志物CD4、CD25和Foxp3的表达来鉴定Treg。天然存在的Treg细胞通常占外周CD4⁺T淋巴细胞的约5%-10%。然而,在肿瘤微环境(即肿瘤浸润性Treg细胞)内,它们可构成总CD4⁺T淋巴细胞群体的多至20%-30%。

[0101] 活化的人Treg细胞可通过穿孔蛋白或颗粒酶B依赖性途径直接杀死靶细胞,如效应T细胞和APC;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4⁺) Treg细胞通过APC诱导吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)表达,并且这些进而通过减少色氨酸抑制T细胞活化;Treg细胞可体内释放白细胞介素-10(IL-10)和转化生长因子(TGF β),并且因此通过抑制MHC分子、CD80、CD86和IL-12的表达直接抑制T细胞活化并抑制APC功能。Treg细胞还可通过表达高水平的CTLA4来抑制免疫,CTLA4可结合抗原呈递细胞上的CD80和CD86并阻止效应T细胞的正确活化。

[0102] 在本发明的一个优选实施方案中,实体瘤中效应T细胞与调控T细胞的比例增加。在一些实施方案中,实体瘤中效应T细胞与调控T细胞的比例增加至超过5、10、15、20、40或80。

[0103] 免疫效应细胞是指参与免疫应答的效应期的免疫细胞。示例性免疫细胞包括髓样或淋巴样起源的细胞,例如淋巴细胞(例如,B细胞和T细胞,包括细胞溶解T细胞(CTL))、杀伤细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞以及嗜碱性粒细胞。

[0104] 参与免疫应答的效应期的免疫效应细胞表达特异性Fc受体并执行特异性免疫功能。效应细胞可诱导体液依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),例如能够诱导ADCC的嗜中性粒细胞。例如,表达Fc α R的单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞参与靶细胞的特异性杀伤并将抗原呈递至免疫系统的其他组分,或结合呈递抗原的细胞。效应细胞还可吞噬靶抗原、靶细胞或微生物。如本文所论述,可针对诱导ADCC的能力优化根据本发明的抗体。

[0105] 在一些实施方案中,针对癌症的不同药剂可通过相同或不同的递送途径和/或根据不同的方案与抗体组合施用。或者或另外地,在一些实施方案中,一种或多种剂量的第一活性剂与一种或多种其他活性剂基本上同时施用,并且在一些实施方案中通过共同途径和/或作为单一组合物的一部分施用。本领域技术人员将进一步理解,根据本发明提供的组合疗法的一些实施方案实现协同作用;在一些此类实施方案中,在所述组合中使用的一种或多种药剂的剂量可与当所述药剂用于不同的治疗方案(例如,作为单一疗法和/或作为不同组合疗法的一部分)时标准、优选或必要的实质上不同的(例如,更低)和/或可通过替代途径递送。

[0106] 在一些实施方案中,当根据本发明使用两种或更多种活性剂时,此类药剂可同时或顺序施用。在一些实施方案中,一种药剂的施用相对于另一种药剂的施用具体地定时。例如,在一些实施方案中,施用第一药剂以使得观察到特定作用(或预期观察到,例如基于显示给定给药方案与目标特定作用之间的相关性的群体研究)。在一些实施方案中,可根据经验评估或确定组合中施用的药剂的所需相对给药方案,例如使用离体、体内和/或体外模型;在一些实施方案中,这种评估或经验确定在体内、在患者群体中进行(例如,以使得建立相关性),或者可替代地在特定目标患者中进行。

[0107] 在本发明的另一方面,本发明人已经表明,当与免疫检查点抑制剂组合时,抗CD25抗体显示出改善的治疗作用。如本实施例中所示,与抗CD25抗体和免疫检查点抑制剂的组合疗法可在确定的肿瘤的治疗中具有协同作用。本实施例中关于PD-1/PD-L1的数据涉及干扰PD-1/PD-L1相互作用。因此,PD-1受体与PD-L1配体之间的相互作用可被阻断,从而导致“PD-1阻断”。在一方面,例如与单独抗CD25抗体或PD-1/PD-L1阻断(直接使用抗PD1抗体,或间接使用抗PD-L1抗体)相比,使用如本文所述的本发明,所述组合可产生增强的肿瘤消退、增强的肿瘤生长受损或减轻和/或可增强存活时间。

[0108] 如本文所用,“免疫检查点”或“免疫检查点蛋白”是指属于免疫系统中的抑制途径的蛋白质,特别是用于调节T细胞应答。在正常生理条件下,免疫检查点对于预防自身免疫至关重要,特别是在对病原体的应答期间。癌细胞能够改变免疫检查点蛋白表达的调控,以便避免免疫监视。

[0109] 免疫检查点蛋白的实例包括但不限于PD-1、CTLA-4、BTLA、KIR、LAG3、TIGIT、CD155、B7H3、B7H4、VISTA和TIM3,以及还有OX40、GITR、ICOS、4-1BB和HVEM。免疫检查点蛋白也可指与以抑制方式调节免疫应答的其他免疫检查点蛋白结合的蛋白质。此类蛋白质包括PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、HVEM、LLT1和GAL9。

[0110] “免疫检查点蛋白抑制剂”是指可干扰由免疫检查点蛋白介导的信号传导和/或蛋白质-蛋白质相互作用的任何蛋白质。在本发明的一方面,免疫检查点蛋白是PD-1或PD-L1。在如本文所述的本发明的优选方面,免疫检查点抑制剂通过抗PD-1或抗PD-L1抗体干扰PD-1/PD-L1相互作用。

[0111] 因此,本发明还提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用抗CD25抗体和检查点抑制剂。本发明还提供一种用于治疗癌症的抗CD25抗体和免疫检查点抑制剂。

[0112] 本发明另外提供抗CD25抗体和免疫检查点抑制剂用于制造用于治疗癌症的药物的用途。抗CD25抗体和免疫检查点抑制剂的施用可以是同时的、分开的或顺序的。

[0113] 本发明提供一种用于治疗受试者的癌症的抗CD25抗体和免疫检查点抑制剂的组合,其中所述抗CD25抗体和所述免疫检查点抑制剂同时地、分开地或顺序地施用。这种抗人CD25抗体优选是人IgG1,并且可特别与靶向免疫检查点的抗体组合使用,所述免疫检查点存在或缺乏允许ADCC、ADCP和/或CDC的序列。

[0114] 在一个替代方面,本发明提供了一种用于治疗癌症的抗CD25抗体,其中所述抗体用于与免疫检查点抑制剂组合施用。本发明还提供了抗CD25抗体在制造用于治疗癌症的药物中的用途,其中所述药物用于与免疫检查点抑制剂组合施用。

[0115] 本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的介质中的抗CD25抗体和免疫检查点抑制剂。如上文所论述,免疫检查点抑制剂可以是PD-1的抑制剂,即PD-1拮抗剂。

[0116] PD-1(程序性细胞死亡蛋白1)(也称为CD279)是在活化的T细胞和B细胞上表达的细胞表面受体。已显示与其配体的相互作用减弱体外和体内T细胞应答。PD-1结合两种配体,PD-L1和PD-L2。PD-1属于免疫球蛋白超家族。PD-1信号传导需要与主要组织相容性复合物(MHC)呈递的肽抗原紧密接近的PD-1配体结合(Freeman(2008) Proc Natl Acad Sci USA 105,10275-6)。因此,防止T细胞膜上PD-1和TCR的共连接的蛋白质、抗体或小分子是有用的PD-1拮抗剂。

[0117] 在一个实施方案中,PD-1受体拮抗剂是抗PD-1抗体,或其抗原结合片段,其特异性地结合PD-1并阻断PD-L1与PD-1的结合。抗PD-1抗体可以是单克隆抗体。抗PD-1抗体可以是人抗体或人源化抗体。抗PD-1抗体是能够特异性结合PD-1受体的抗体。本领域中已知的抗PD-1抗体包括纳武单抗和派姆单抗。

[0118] 本发明的PD-1拮抗剂还包括结合和/或阻断PD-1配体以干扰或抑制所述配体与PD-1受体的结合,或直接结合并阻断PD-1受体而无需通过PD-1受体诱导抑制性信号转导的化合物或试剂。或者,PD-1受体拮抗剂可直接结合PD-1受体而不触发抑制性信号转导,并且还结合PD-1受体的配体以减少或抑制配体通过PD-1受体触发信号转导。通过减少结合PD-1受体并触发抑制信号的转导的配体的数量和/或量,更少的细胞通过由PD-1信号转导递送的负信号减弱,并且可实现更稳健的免疫应答。

[0119] 在一个实施方案中,PD-1受体拮抗剂是抗PD-L1抗体,或其抗原结合片段,其特异性地结合PD-L1并阻断PD-L1与PD-1的结合。抗PD-L1抗体可以是单克隆抗体。抗PD-L1抗体可以是人抗体或人源化抗体,如阿特殊单抗(MPDL3280A)。

[0120] 本发明还提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用抗CD25抗体和为T细胞活化共刺激途径的激动剂的抗体。T细胞活化共刺激途径的抗体激动剂包括但不限于针对ICOS、GITR、OX40、CD40、LIGHT和4-1BB的激动剂抗体。

[0121] 出人意料地,本发明人已经鉴定,抑制性Fc受体Fc γ RIIb(CD32b)的水平可在实体瘤中增加。因此,另一种治疗癌症的方法包括施用抗CD25抗体和减少、阻断、抑制和/或拮抗Fc γ RIIb(CD32b)的化合物。这种Fc γ RIIb拮抗剂可以是干扰Fc γ RIIb诱导的细胞内信号传导的小分子,不接合抑制性Fc γ RIIb受体的修饰的抗体,或抗人Fc γ RIIb(抗CD32b抗体。例如,拮抗性抗人Fc γ RIIb抗体也已经针对其抗肿瘤特性进行了表征(Roghanian A等人,2015,Cancer Cell.27,473-488;Rozan C等人,2013,Mol Cancer Ther.12:1481-91;WO2015173384;WO2008002933)。

[0122] 在另一方面,本发明提供了一种双特异性抗体,所述双特异性抗体包含:

[0123] (a) 第一抗原结合部分,所述第一抗原结合部分结合CD25;以及

[0124] (b) 第二抗原结合部分,所述第二抗原结合部分结合免疫检查点蛋白、肿瘤相关抗原,是(或是基于)抗人活化Fc受体抗体(例如抗Fc γ RI、抗Fc γ RIIa、抗Fc γ RIII),或者是(或是基于)拮抗性抗人Fc γ RIIb抗体;

[0125] 其中所述双特异性抗体优选地是以高亲和力结合至少一种活化Fc γ 受体并消减肿瘤浸润性调控T细胞的IgG1抗体。

[0126] 如本文所用,“肿瘤相关抗原”是指在肿瘤细胞上表达的抗原,从而使得它们与邻近它们的非癌细胞区分开,并且包括但不限于CD20、CD38、PD-L1、EGFR、EGFRV3、CEA、TYRP1和HER2。已经公开了描述相关肿瘤相关抗原和相应的治疗上有用的抗肿瘤抗体剂的各种综述文章(参见,例如,Sliwowski&Mellman(2013)Science 341,192-8)。此类抗原和相应的抗体包括但不限于CD22(布利那图单抗)、CD20(利妥昔单抗、托西莫单抗)、CD56(洛沃珠单抗)、CD66e/CEA(拉贝珠单抗)、CD152/CTLA-4(伊匹单抗)、CD221/IGF1R(MK-0646)、CD326/Epcam(依决洛单抗)、CD340/HER2(曲妥珠单抗、培妥珠单抗)以及EGFR(西妥昔单抗、帕尼单抗)。

[0127] 在一方面,如本文所述的根据本发明的双特异性抗体产生ADCC,或在一方面产生增强的ADCC。

[0128] 所述双特异性抗体可结合CD25上的特定表位,以及如本文定义的免疫检查点蛋白或肿瘤相关抗原上的特定表位。在优选的实施方案中,第二抗原结合部分结合PD-L1。在一个优选的方面,本发明提供了一种双特异性抗体,所述双特异性抗体包含:

[0129] (a) 第一抗原结合部分,所述第一抗原结合部分结合CD25;以及

[0130] (b) 第二抗原结合部分,所述第二抗原结合部分结合肿瘤细胞上表达的免疫检查点蛋白。

[0131] 在一个特定实施方案中,在肿瘤细胞上表达的免疫检查点蛋白是PD-L1、VISTA、GAL9、B7H3或B7H4。仍然优选地,抗CD25抗体是以高亲和力结合Fc γ 受体并消减肿瘤浸润性调控T细胞的IgG1抗体。

[0132] 本领域技术人员将能够使用已知的方法产生双特异性抗体。根据本发明的双特异性抗体可用于如本文所述的本发明的任何方面。优选地,根据本发明的双特异性抗体内的第二抗原结合部分结合人PD-1、人PD-L1或人CTLA-4。

[0133] 在一方面,所述双特异性抗体可结合CD25和在肿瘤浸润性Treg上以高水平表达的免疫调节性受体,例如CTLA4、ICOS、GITR、4-1BB或OX40。

[0134] 本发明还提供了一种药盒,所述药盒包含如本文所述的抗CD25抗体,和如本文论述的免疫检查点抑制剂,优选PD-1拮抗剂(直接使用抗PD1抗体,或间接使用抗PD-L1抗体)。在一方面,免疫检查点抑制剂是抗PD-L1。在一个替代实施方案中,所述药盒包含如本文所述的抗CD25抗体和为T细胞活化共刺激途径的激动剂的抗体。所述药盒可包括使用说明书。

[0135] 在另一方面,所述药盒可包含如本文所述的抗CD25抗体和还原、阻断、抑制和/或拮抗Fc γ RIIb (CD32b)的化合物,或可替代地如本文所述的抗CD25抗体和抗人活化Fc受体抗体(抗-Fc γ RI、抗-Fc γ RIIc或抗-Fc γ RIIIa)。

[0136] 如本文所述的本发明的任何方面可与另外的癌症疗法组合进行。特别地,根据本发明的抗CD25抗体和任选的免疫检查点抑制剂(或任何其他组合疗法)可与共刺激抗体、化学疗法和/或放射疗法、靶向疗法或单克隆抗体疗法组合施用。

[0137] 如本文所用的化学治疗实体是指对细胞具有破坏性的实体,即所述实体降低细胞的存活力。化学治疗实体可以是细胞毒性药物。考虑的化学治疗剂包括但不限于烷化剂、蒽环类药物、埃博霉素、亚硝基脲、乙烯亚胺/甲基胍、烷基磺酸酯、烷化剂、抗代谢药、嘧啶类似物、表鬼臼毒素、酶如L-天冬酰胺酶;生物学翻译调节剂,如IFN α 、IFN- γ 、IL-2、IL-12、G-CSF和GM-CSF;铂配位复合物(如顺铂、奥沙利铂和卡铂)、蒽二酮、取代的脲如羟基脲、甲基胍衍生物(包括N-甲基胍(MIH)和丙卡巴胍)、肾上腺皮质抑制剂如米托坦(o,p'-DDD)和氨鲁米特;激素和拮抗剂,包括肾上腺皮质类固醇拮抗剂如泼尼松和等效物、地塞米松和氨鲁米特;孕激素如己酸羟孕酮、醋酸甲羟孕酮和醋酸甲地孕酮;雌激素如己烯雌酚和乙炔雌二醇等效物;抗雌激素如他莫昔芬;雄激素,包括丙酸睾酮和氟甲睾酮/等效物;抗雄激素如氟他胺、促性腺激素释放激素类似物和亮丙瑞林;以及非类固醇抗雄激素,如氟他胺。

[0138] 另外的癌症疗法还可包括施用癌症疫苗。如本文所用的“癌症疫苗”是指向癌症患者施用的治疗性癌症疫苗,并且旨在通过加强患者自身的免疫应答来根除癌细胞。癌症疫苗包括肿瘤细胞疫苗(自体 and 同种异体)、树突细胞疫苗(离体产生的和肽活化的)、基于蛋白质/肽的癌症疫苗和基因疫苗(基于DNA、RNA和病毒的疫苗)。因此,原则上,治疗性癌症疫苗可用于抑制对常规疗法(如外科手术、放射疗法和化学疗法)难治的晚期癌症和/或复发性肿瘤的进一步生长。基于肿瘤细胞的疫苗(自体 and 同种异体)包括经遗传修饰以分泌可溶性免疫刺激剂如细胞因子(IL2、IFN-g、IL12、GMCSF、FLT3L)、针对免疫调节受体(PD-1、CTLA-4、GITR、ICOS、OX40、4-1BB)的单链Fv抗体和/或在其膜上表达免疫刺激性受体的配体如ICOS配体、4-1BB配体、GITR配体和/或OX40配体等的那些。

[0139] 另外的癌症疗法可以是减少外周和肿瘤微环境内的免疫调控的其他抗体或小分子试剂,例如靶向TGF β 途径、IDO(吡啶胺脱氢酶)、精氨酸酶和/或CSF1R的分子。

[0140] ‘组合’可指在施用根据本发明的任何方面之前、同时或之后施用另外的疗法。

[0141] 现在将参考附图通过以下实施例进一步描述本发明,所述实施例旨在用于帮助本领域普通技术人员实施本发明,并且不意图以任何方式限制本发明的范围,其中:

[0142] 图1-示出血液和淋巴结的CD25pos调控T细胞的表达 (A) CD25 (检测抗体克隆7D4; 抗小鼠CD25, IgM同种型) 在不同肿瘤模型的淋巴结 (LN) 和肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 中存在的T细胞亚群表面上的表达。直方图代表每种肿瘤模型的一只小鼠。(B) 来自使用MCA205肿瘤模型的各个实验的合并数据 ($n=10$) 的PBMC和T细胞亚群中CD25阳性细胞的百分比和CD25的MFI。在 (C) 和 (D) 中已经在MC38、B16和CT26肿瘤模型中进行了相同的评估 (限于T细胞亚群)。误差棒表示平均值的标准误差 (SE)。指示了CD4阳性细胞、Foxp3阳性细胞与CD8阳性或CD4阳性/Foxp3阴性细胞之间的统计相关性。

[0143] 图2-示出MCA205肿瘤模型中抗CD25 (α CD25) 介导的血液和淋巴结的CD25阳性、调控T细胞消减的限制。(A) CD4阳性T细胞中CD25 (检测抗体克隆7D4; 抗小鼠CD25, IgM同种型) 和FoxP3的表达。(B) Treg上CD25的平均荧光强度 (在CD4阳性、FoxP3阳性T细胞上同控)。在皮下接种 5×10^5 个MCA205细胞后第5天和第7天将携带肿瘤的小鼠注射200 μ g抗CD25-r1 (α CD25-r1; 抗CD25大鼠IgG1)、抗CD25-m2a (α CD25-m2a; 抗CD25鼠IgG2a)、抗CTLA-4 (α CTLA-4; 抗CTLA4克隆B56), 或未处理 (无tx)。在第9天收获外周血单核细胞 (PBMC)、淋巴结 (LN) 和肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL), 加工并染色以用于流式细胞术分析。

[0144] 图3-示出抗CD25 (α CD25) 介导的对图2的MCA205肿瘤模型中的T细胞亚群体的影响。(A) 来自总CD4阳性T细胞的FoxP3阳性细胞的百分比和 (B) 平行于CD4阳性、FoxP3阴性T细胞示出PBMC (细胞数目/mL)、LN (三个引流淋巴结中的细胞总数) 和TIL (细胞数目/g肿瘤) 中CD4阳性、FoxP3阳性T细胞的绝对数目 (C) 效应CD4阳性、FoxP3阳性T细胞 (Treg细胞) 的比率和 (D) 效应CD8阳性T细胞/Treg细胞的比率, 在CD4阳性FoxP3阴性和CD8阳性T细胞上同控。

[0145] 图4-示出B细胞 (CD19阳性)、T细胞 (CD3阳性, CD5阳性)、NK细胞 (NK1.1阳性)、粒细胞 (CD11b+Ly6G+)、常规树突细胞 (cDC; CD11c-高MHCII阳性) 和单核细胞/巨噬细胞 (Mono/M ϕ ; CD11b阳性, Ly6G阴性, NK1.1阴性, CD11c-低/阴性) 上Fc γ R的表达的代表性直方图, 如在肿瘤激发后10天, 在未处理的MCA205肿瘤模型 (参见图2) 中通过流式细胞术所评估。误差棒表示SEM ($n=3$); 数据对应于三个独立实验中的一个, 跨三个独立实验发现是一致的。

[0146] 图5-示出Treg消减如何依赖于活化Fc γ 受体的表达。将C57BL/6野生型小鼠 (wt) 和Fcer1g $^{-/-}$ 小鼠在第0天皮下注射 5×10^5 个MCA205细胞, 且然后在第5天和第7天注射200 μ g的抗CD25。在第9天收获肿瘤、引流淋巴结和血液, 加工并染色以用于流式细胞术分析。通过PBMC、LN和TIL中的CD4和FoxP3表达鉴定了调控T细胞。示出来自总CD4 $^{+}$ 细胞的Foxp3 $^{+}$ 的百分比 (A)。在野生型 (wt)、Fcgr3 $^{-/-}$ 、Fcgr4 $^{-/-}$ 或Fcgr2b $^{-/-}$ 中应用相同的方法, 从而证明Fc γ RIIb对肿瘤中 α CD25-r1介导的Treg消减的抑制。所述图示出来自仅TIL中的总CD4 $^{+}$ T细胞的Treg (CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$) 的百分比的定量 (B)。

[0147] 图6-示出抗CD25-m2a和抗PD-1组合的协同作用导致确定的肿瘤的根除。示出个体小鼠的生长曲线 (A) 和随时间推移, 每个处理组的MCA205肿瘤体积的平均值 (B)。在每个图中指示100天后无肿瘤存活者的数量或统计显著性。误差棒表示平均值的SE。还示出具有两个独立实验的累积数据的卡普兰-迈耶存活曲线。还示出注射MC38 (C) 或CT26 (D) 肿瘤细胞并如MCA205模型中所描述处理的小鼠 (每种条件 $n=10$) 的存活曲线。将小鼠皮下注射 5×10^5 个MCA205、MC38或CT26细胞且然后在第5天用所指示的抗CD25 (200 μ g腹膜内) 处理, 随后 (或不) 在第6天、第9和第12天施用抗PD-1 (α PD-1、抗PD1、克隆RMP1-14; 100 μ g腹膜内)。每周

两次测量肿瘤大小,并且当任何正交直径达到150mm时使小鼠安乐死。

[0148] 图7-示出使用在第14天收获的免疫细胞,如图6中所描述确定的MCA205肿瘤模型的功能分析。MCA205肿瘤中肿瘤浸润性CD4⁺Foxp3⁺-T细胞中和CD8⁺T细胞中Ki67⁺细胞的比例(%)。(A)和对于每个处理组示出肿瘤中CD4阳性、FoxP3阴性Teff/Treg比率和CD8阳性/Treg比率(B)。对于CD4阳性和CD8阳性细胞中的相同处理组,还示出用PMA和离子霉素离体再刺激后肿瘤浸润性淋巴细胞针对IFN γ 表达的细胞内染色(C)和产生干扰素 γ (IFN γ)的效应T细胞的频率(D)。(B)中的直方图对应于每个处理组的代表性小鼠。在(A)、(B)和(D)中提供来自两个独立实验(n=10)的代表性图和统计显著性。

[0149] 图8-示出抗CD25-m2a/抗PD1的肿瘤消除是CD8⁺T细胞依赖性的。未处理的个体小鼠的MCA205肿瘤生长曲线(无tx,A),用抗CD25-m2a与抗PD-1的组合处理(α PD-1+ α CD25-m2a;B),或还包括抗CD8的相同组合(α PD-1+ α CD25-m2a+ α CD8;C)。在每个图中指示每个处理组(n=7)在40天后存活者的数量。还产生了相应的卡普兰-迈耶存活曲线(D)。将小鼠皮下注射 5×10^5 个MCA205细胞,并在第5天用200 μ g的抗CD25-m2a(α CD25-m2a,克隆PC61,小鼠IgG2a同种型)处理,然后在第6天、第9天和第12天腹膜内注射100 μ g的抗PD-1(α PD-1,克隆RMP1-14)。在所示组的小鼠中,通过在第4天、第9天、第12天和第17天腹膜内注射200 μ g的抗CD8(α CD8,克隆2.43)来消减CD8阳性细胞。每周两次测量肿瘤大小,并且当任何正交直径达到150mm时使小鼠安乐死。

[0150] 图9-示出抗CD25-m2a/抗PD-1疗法诱导针对B16黑色素瘤肿瘤的至少部分肿瘤控制。如图6(A)中所定义,用单独Gvax或与指定抗体的组合处理的个体小鼠的B16肿瘤生长曲线。还产生了相应的卡普兰-迈耶存活曲线(B)。向小鼠皮内(i.d.)注射 5×10^4 个B16黑色素瘤细胞,且然后在第5天用200 μ g的抗CD25(α CD25-r1,克隆PC61大鼠IgG1同种型或 α CD25-m2a,克隆PC61小鼠IgG2a同种型)处理,随后在第6天、第9天和第12天腹膜内注射200 μ g的抗PD-1(α PD-1,克隆RMP1-14)和皮内注射 1×10^6 个照射的(150Gy)B16-Gvax。跟踪肿瘤生长,并且当任何正交直径达到150mm时或在研究的第80天(以先达到者为准)使小鼠安乐死。不同组(n,小鼠数目)的中值存活天数是:对于仅Gvax21天(n=14),对于Gvax+ α PD-1 27天(n=15),对于Gvax+ α CD25-r1 21天(n=7),对于Gvax+ α CD25-m2a 33天(n=8),对于Gvax+ α PD-1+ α CD25-r1 29天(n=13),并且对于Gvax+ α PD-1+ α CD25-m2a 39天(n=12)。

[0151] 图10-示出未处理(PBS,仅媒介物)、用具有IgG1(PC61m1;小鼠IgG1同种型,因此具有低Fc受体介导的杀伤活性、低ADCC和CDC活性)或IgG2a(PC61m2;小鼠IgG2a,因此具有高Fc受体介导的活性、高ADCC和CDC活性)且进一步与或不与抗小鼠PD1(α PD1RMP1-14)组合的抗小鼠CD25处理的个体小鼠的CT26肿瘤生长曲线。在对数期生长期间收获用于植入的CT26细胞并重新悬浮于冷PBS中。在研究的第1天,将每只小鼠在右侧腹中皮下注射在0.1mL细胞悬浮液中的 3×10^5 个细胞。在第6天腹膜内注射抗小鼠CD25(10mg/kg)(当检测到可触知的肿瘤时)。在第7天、第10天、第14天和第17天腹膜内注射抗小鼠PD1(100 μ g/注射)。每周两次对肿瘤进行二维测量以监测生长。肿瘤大小(mm³)计算如下:肿瘤体积=(w² x l)/2,其中w=肿瘤的宽度,并且l=肿瘤的长度(mm)。研究终点是2000mm³的肿瘤体积或者60天,以先达到者为准。

[0152] 图11-示出未处理(PBS,仅媒介物)、用具有IgG1或IgG2a(分别PC61m1和PC61m2)且进一步与或不与抗小鼠PD-L1克隆10F.9G2(α PDL1 10F.9G2)组合的抗小鼠CD25处理的个体

小鼠的CT26肿瘤生长曲线。如对于图10的基于 α PD1的组合实验一样进行模型、方案和分析。

[0153] 图12-示出未处理(PBS,仅媒介物)、用具有IgG1或IgG2a(分别PC61m1和PC61m2)且进一步与或不与抗小鼠PD1克隆RMP1-14(α PD1 RMP1-14)组合的抗小鼠CD25处理的个体小鼠的MC38肿瘤生长曲线,如针对图10中的CT26肿瘤模型所描述。在对数期生长期间收获用于植入的MC38结肠癌细胞并重新悬浮于冷PBS中。将每只小鼠在右侧腹中皮下注射在0.1mL细胞悬浮液中的 5×10^5 个肿瘤细胞。在肿瘤的体积接近100至150mm³的目标范围时监测肿瘤。在肿瘤植入后22天,在研究的第1天,将具有63-196mm³范围内的个体肿瘤体积的动物分为9组(n=10),组平均肿瘤体积在104-108mm³的范围内。在携带确定的MC38肿瘤的小鼠中,在D1开始处理。将每种治疗的效果与在第1天、第2天、第5天、第9天和第12天接受腹膜内(i.p.)PBS的媒介物处理的对照组进行比较。从第2天开始,以100 μ g/动物腹膜内施用抗PD1,每周两次持续两周。在第1天,以200 μ g/动物腹膜内施用PC61-m1和PC61-m2a一次。每周两次进行肿瘤测量直到第45天,其中个体动物在达到1000mm³的肿瘤体积终点时退出研究。

[0154] 图13-示出未处理(PBS,仅媒介物)、用具有IgG1或IgG2a(分别PC61m1和PC61m2)且进一步与或不与抗小鼠PD-L1克隆10F.9G2(α PDL1 10F.9G2)组合的抗小鼠CD25处理的个体小鼠的MC38肿瘤生长曲线。如对于图12的基于 α PD1的组合实验一样进行模型、方案和分析。

[0155] 图14-示出来自不同类型的人癌症的样品中肿瘤定位的免疫细胞的外周中的CD25表达。代表性直方图展示来自IV期人卵巢癌(腹膜转移;A)和人膀胱癌(B)的TIL亚群中的CD25表达。还获得了从其他类型的癌症中分离的PBMC和TIL内的个体CD8阳性、CD4阳性、FoxP3阴性和CD4阳性、FoxP3阳性T细胞亚群的代表性直方图(C)。还示出对于黑色素瘤(上图)、NSCLC(中图)和RCC(下图)的每个研究患者组内的个体T细胞亚群的CD25表达的定量(作为百分比(%))和平均荧光强度(MFI)(D)。

[0156] 图15-示出关于用抗PD-1处理的患者中CD25表达的数据。在抗PD-1治疗之前('基线')和在两次输注之后('第6周')皮下黑色素瘤转移的多重免疫组织化学(IHC)分析与在在两名患者(在第6周一名患者对治疗应答且一名患者对治疗无应答)中在基线和第6周的CD8和FoxP3 IHC染色的定量并行显示(B;展示平均计数/ $\times 40$ 高倍视野)。对于用抗PD1(C)处理的黑色素瘤和RCC患者示出在基线和治疗时(第6周)CD8阳性、CD25阳性和FoxP3阳性、CD25阳性、双染色细胞的百分比(%)。

[0157] 图16-示出通过使用抗小鼠CD25(PC61)和抗小鼠/人PD-L1(克隆S70)的抗原结合区产生的双特异性基于抗IgG1、抗PD-L1的Duobody(bs CD25/PD-L1)的结构和结合活性,两者均具有人IgG1同种型和特定氨基酸中的突变(PC61-IgG1的K409R和S70-IgG1的F405L;A)。bs CD25/PD-L1对CD25的特异性已使用细胞系(SUP-T1细胞,人T成淋巴细胞;SUP-T1[VB] ATCC®CRL-1942™)进行了测试,所述细胞系已用表达小鼠CD25(CD25+细胞系)或小鼠PD-L1(PD-L1+细胞系)的载体转染。原始细胞系和其他两种所得细胞系已用于比较bsCD25/PD-L1的结合能力与相关单特异性抗体(aCD25,克隆PC61;aPD-L1,克隆S70)结合。将CD25+细胞系和PD-L1+细胞系以1:1比例相互混合(或各自分别与未转染的对照细胞混合),然后与bsCD25/PD-L1、aCD25、aPD-L1一起或无任何抗体(无抗体)孵育30分钟。在孵育后,在流式细胞术中分析三组细胞样品,以计算不同细胞样品中双阳性细胞的百分比(B)。已分别使用CD25+细胞系和PD-L1+细胞系证实了bs CD25/PD-L1(BsAb)的特异性。已用bs CD25/PDL1或作为第一抗体的相应单特异性Ab(MsAb,对于CD25+细胞抗小鼠CD25IgG1且对

于PD-L1+细胞抗小鼠PD-L1)或用仅缓冲液标记了每种细胞系。然后将细胞与作为第二抗体的aHuman AF647 (aHuman)以及可固定的存活力染料在FACS缓冲液中一起孵育30分钟。仅用第二抗体(aHuman AF647)孵育的细胞或未用第一抗体和第二抗体孵育的细胞(未染色)用作阴性对照。然后通过流式细胞术对细胞进行分析以计算与MsAb相比用BsAb获得的阳性细胞的百分比(在每个图的右侧中指示;C)。

[0158] 图17-示出双特异性基于IgG1的Duobody (Bs CD25 PD-L1)、抗小鼠CD25 (aCD25) IgG1和抗小鼠PD-L1 (aPD-L1) IgG1单特异性抗体(单独的或混合在一起(aCD25和aPD-L1))或同种型IgG1对照(如图16中所描述)对MCA205肿瘤小鼠模型(如图3所描述建立;每组有4或5只小鼠)中的LN和肿瘤中的效应和调控T细胞的影响。样品用于分离肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)或淋巴结细胞(LN),并基于FoxP3、CD3和CD4阳性(A)或CD8阳性/Treg (FoxP3阳性, CD4阳性)比率(B)分析每个处理组中效应和调控T细胞th的存在。还评价了每种处理对肿瘤浸润性CD4阳性T细胞响应于刺激的能力的体内作用。在存在高尔基体栓蛋白抑制剂的情况下,使用PMA和离子霉素在体外再次刺激TIL,且然后针对CD5和CD4进行细胞外染色,并在固定后针对干扰素- γ (IFN γ)进行细胞内染色。通过流式细胞术分析对IFN γ 也呈阳性的CD5阳性和CD4阳性T细胞的百分比(C)。

[0159] 实施例

[0160] 材料与方法

[0161] 小鼠

[0162] C57BL/6和BALB/c小鼠获自Charles River Laboratories。Fcer1g^{-/-}和Fcgr3^{-/-}小鼠由S.Beers (University of Southampton,UK)友情提供。Fcgr4^{-/-}和Fcgr2b^{-/-}小鼠是来自J.V.Ravetch (The Rockefeller University, New York, USA)的惠赠。所有动物研究均在伦敦大学学院和英国内政部的道德批准和规定下进行。

[0163] 细胞系和组织培养

[0164] MC38、B16、CT26和MCA205肿瘤细胞(3-甲基胆蒽诱导的弱免疫原性纤维肉瘤细胞;来自G.Kroemer, Gustave Roussy癌症研究所)和用于逆转录病毒产生的293T细胞在补充有10%胎牛血清(FCS, Sigma)、100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和2mM L-谷氨酰胺(均来自Gibco)的杜氏改良的伊格尔氏培养基(DMEM, Sigma)中培养。用于抗体生产的K562细胞在补充有10%IgG耗尽的FCS (Life Technologies)的无酚红Iscove改良的杜氏培养基(IMDM)中培养。可通过ATCC获得B16(小鼠皮肤黑色素瘤细胞)和CT26(N-亚硝基-N-甲基氨基甲酸酯诱导的、未分化的结肠癌细胞系)细胞和相关的培养条件。

[0165] 抗体产生

[0166] 通过cDNA末端的快速扩增(RACE)从PC-61.5.3杂交瘤中解析抗CD25的重链和轻链可变区的序列,且然后克隆到源自pFUSEss-CHIg-mG2A和pFUSE2ss-CLIg-mk质粒(Invivogen)的鼠IgG2a和 κ 链的恒定区中。然后将每个抗体链亚克隆到鼠白血病病毒(MLV)源性的逆转录病毒载体中。对于初步实验,使用用编码所述重链和轻链的载体转导的K562细胞产生抗体。

[0167] 来自PC-61.5.3抗体的重新克隆的抗CD25重链可变DNA序列编码以下蛋白质序列:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKVSGDTITAYYIHFV
[0168] KQRPGQGLEWIGRIDPEDDSTEYAEKFKNKATITANTSSNTAHLKYSRLTSEDATY
FCTTDNMGATEFVYWGQGTLVTVSS

[0169] 来自PC-61.5.3抗体的重新克隆的抗CD25轻链可变DNA序列编码以下蛋白质序列:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGQVLTQPKSVSASLESTVKLSCKLNSGNIGSYMHV

[0170] YQQREGRSPTNLIYRDDKRPDGPDRFSGSIDISSNSAFLTINNVTQTEDEAMYFCHS
YDGRMYIFGGGTKLTVL

[0171] 使用蛋白G HiTrap MabSelect柱 (GE Healthcare) 从上清液中纯化抗体,在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中透析,浓缩并过滤灭菌。对于进一步实验,抗体产生外包给Evitria AG。商业抗CD25克隆PC-61购自BioXcell。

[0172] 已公开的抗PDL1 (MPDL3280A/RG7446) 可变重链和轻链DNA序列已被重新克隆并表达为重组抗体。

[0173] 体力肿瘤实验

[0174] 将培养的肿瘤细胞进行胰蛋白酶消化、洗涤并重新悬浮于PBS中,并在侧腹中皮下 (s.c.) 注射 (对于C57BL/6小鼠中的MCA205和MC38模型 5×10^5 个细胞;对于C57BL/6小鼠中的B16模型 2.5×10^5 个细胞,对于BALB/c小鼠中的CT26模型 5×10^5 个细胞) 细胞)。在图例中描述的时间点腹膜内 (i.p.) 注射抗体。对于功能实验,10天后收获肿瘤、引流淋巴结和组织,并如Simpson等人 (2013) J Exp Med 210,1695-710中所描述通过流式细胞术进行加工以用于分析。对于治疗实验,每周两次测量肿瘤,并将体积计算为三个正交直径的乘积。当任何直径达到150mm时,将小鼠人道安乐死。将携带肿瘤的小鼠在第5天和第7天用200 μ g的抗CD25-r1 (α CD25-r1)、抗CD25-m2a (α CD25-m2a) 或抗CTLA-4 (α CTLA-4) 且在第6天、第9天和第12天用100 μ g的抗PD-1处理。对于治疗实验,仅在第5天处理小鼠,以用于第5天和第7天的表型分型和消减。每周两次测量肿瘤大小,并且当任何肿瘤尺寸达到150mm时使小鼠安乐死。在第9天收获外周血单核细胞 (PBMC)、淋巴结 (LN) 和肿瘤 (TIL),加工并染色以用于流式细胞术分析。

[0175] 流式细胞术

[0176] 使用BD LSR II Fortessa (BD Biosciences) 进行采集。使用以下直接缀合的抗体: 抗CD25 (7D4) -FITC、CD4 (RM4-5) -v500 (BDBiosciences); 抗IFN γ (XMG1.2) -AlexaFluor488、抗PD-1 (J43) -PerCP-Cy5.5、抗Foxp3 (FJK-16s) -PE、抗CD3 (145-2C11) -PE-Cy7、抗Ki67 (SolA15) -eFluor450、抗CD5 (53-7.3) -eFluor450、可固定的存活力染料-eFluor780 (eBioscience); 抗CD8 (53-6.7) -亮紫650 (BioLegend); 以及抗颗粒酶B (GB11) -APC (Invitrogen)。以下抗体用于染色人细胞: 抗CD25 (BC96) -亮紫650 (Biolegend)、抗CD4 (OKT4) -AlexaFluor700 (eBioscience)、抗CD8 (SK1) -V500、抗Ki67 (B56) -FITC (BD Biosciences); 抗FoxP3 (PCH101) -PerCP-Cy5.5 (eBioscience); 抗CD3 (OKT3) -亮紫785 (Biolegend)。使用Foxp3转录因子染色缓冲液组 (eBioscience) 进行Foxp3的核内染色。对于细胞因子的细胞内染色,将细胞用佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯 (PMA, 20ng/mL) 和离子霉素 (500ng/mL) (Sigma Aldrich) 在37C下在GolgiPlug (BD Biosciences) 存在下再刺激4小时且然后使用Cytofix/Cytoperm缓冲液组 (BD Biosciences) 染色。为了定量绝对细胞数目,在采集之前将确定数量的荧光珠粒 (用于UV激光器的细胞分选设置珠粒,

ThermoFisher) 添加到每个样品中并用作计数参考。

[0177] 人组织

[0178] 外周血 (PBMC) 和肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 在患有晚期黑色素瘤 (n=10, 12个病灶)、早期非小细胞肺癌 (NSCLC) (n=8) 和肾细胞癌 (RCC) (n=5) 的三个独立组中进行了研究。所呈现的人数据来自三个独立的、经伦理批准的翻译研究 (黑色素瘤 REC 编号 11/L0/0003、NSCLC-REC 编号 13/L0/1546、RCC-REC 编号 11/L0/1996)。在所有情况下都获得了书面知情同意书。

[0179] 肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 的分离

[0180] 将肿瘤直接从手术室带到病理科, 在那里分离肿瘤代表区域。随后将样品在无菌条件下切碎, 然后在 37°C 下酶消化 (具有 Liberase TL 研究级 (Roche) 和 DNA 酶 I (Roche) 的 RPMI-1640 (Sigma)) 30 分钟, 然后使用温和的 MACS (Miltenyi Biotech) 进行机械解离。过滤所得单细胞悬浮液, 并通过穿过 Ficoll-paque (GE Healthcare) 梯度富集白细胞。对活细胞进行计数并在含有 10% 二甲亚砜的人 AB 血清 (Sigma) 中于 -80°C 冷冻, 然后转移至液氮。

[0181] 通过多参数流式细胞术对 TIL 和 PBMC 的表型分析

[0182] 将肿瘤样品和 PBMC 解冻, 在完全 RPMI 中洗涤, 重新悬浮于 FACS 缓冲液 (500mL PBS, 2% FCS, 2mM EDTA) 中并置于圆底 96 孔板中。以制造商推荐的稀释度制备表面抗体的主混合物: CD8-V500、SK1 克隆 (BD Biosciences)、PD-1-BV605、EH12.2H7 克隆 (Biolegend)、CD3-BV785。可固定的存活力染料 (eFlour780, eBioscience) 也包括于表面主混合物中。在使用细胞内固定和透化缓冲液组 (eBioscience) 透化 20 分钟后, 施加细胞内染色组, 其由以制造商推荐的稀释度使用的以下抗体组成: 颗粒酶 B-V450、GB11 克隆 (BD Biosciences)、FoxP3-PerCP-Cy5.5、PCH101 克隆 (eBioscience)、Ki67-FITC、克隆 B56 (BD Biosciences) 和 CTLA-4-APC、L3D10 克隆 (Biolegend)。

[0183] 多重免疫组织化学

[0184] 将肿瘤样品固定在缓冲的福尔马林中并包埋在石蜡中。切割 2-5μm 组织切片并用以下抗体染色用于免疫组织化学: 抗 CD8 (SP239)、抗 CD4 (SP35) (Spring Biosciences Inc.)、抗 FoxP3 (236A/E7) (来自 Dr. G. Roncador CNI0, Madrid, Spain 的惠赠) 和抗 CD25 (4C9) (Leica Biosystems)。对于多重染色, 通过使用细胞调节 1 试剂 (Ventana Medical Systems, Inc.) 和过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, 在抗原修复后将石蜡包埋的组织切片与第一抗体孵育 30 分钟。使用基于过氧化物酶的检测试剂 (OptiView DAB IHC Detection Kit Ventana Medical Systems, Inc.) 和碱性磷酸酶检测试剂 (UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit, Ventana Medical Systems, Inc.) 进行检测。通过使用替代底物 (如果先前已经使用了固红, 则坚牢蓝, 或反之亦然) 进行另一个免疫-碱性磷酸酶循环。评估免疫组织化学和蛋白质反应性模式。还进行了多次免疫染色的评分。此研究的批准获自国家研究伦理服务、研究伦理委员会 4 (REC 参考编号 09/H0715/64)。

[0185] 基于抗 CD25 和抗 PD-L1 的双特异性 Duobody 的构建和验证

[0186] 已经根据文献中描述的技术从在 CH3 结构域中含有允许 Fab 交换的单个匹配点突变的两种亲本 IgG1 生成和产生了 Bs CD25 PD-L1 Duobody (Labrijn AF 等人, Nat Protoc. 2014, 9:2450-63)。简言之, 将抗小鼠 CD25 (PC61; 小鼠 IgG1 同种型, 如上所述) 和抗小鼠/人 PD-L1 (克隆 S70, 也称为阿特殊单抗、MPDL3280A、RG7446 或克隆 YW243.55.S70; 参见

W02010077634和Herbst R等人,2014,Nature515:563-7)克隆于在CH3结构域中具有K409R突变(对于PC61-IgG1)和F405L突变(对于S70-IgG1)的哺乳动物表达载体(504865|UCOE®表达载体-小鼠3.2kb Puro Set-Novagen)中,同时轻链保持相同,并在哺乳动物细胞中作为单独的重组蛋白产生。在允许的氧化还原条件(例如,75mM 2-MEA;5小时孵育)将这些亲本IgG1以等摩尔量在体外混合以便实现半分子的重组。在除去还原剂以允许链间二硫键再氧化之后,使用基于SDS-PAGE色谱的或基于质谱的方法分析所得异聚蛋白质的交换效率。在Bs CD25 PD-L1的情况下,质谱法已证实异二聚体蛋白质的分子量为151Kd,对应于克隆S70单一重链和轻链(74Kd)和PD61-IgG1单一重链和轻链(77Kd)的分子量的相加,并且表明每种亲本IgG1的一半已合并并在单一分子中。

[0187] Bs CD25 PD-L1的特异性已通过如实施例5中所述的流式细胞术进一步证实,使用亲本抗体作为对照和在FACS缓冲液(PBS+2%FCS+2mM EDTA)中稀释的根据文献和制造商的说明书使用的IgG1识别检测抗体(aHuman,Alexa Fluor®647,AffiniPure山羊抗人IgG,Fc γ 片段特异性;Jackson Labs 109-605-098)。另外的流式细胞术和细胞生物学材料是可固定的存活力染料eFluor780(Ebioscience65086514)、PMA(50ng/ml;Santa Cruz Biotechnology,sc-3576)和离子霉素(400ng/ml;Sigma 10634)和高尔基体栓蛋白抑制剂(BD Bioscience,512301KZ)。

[0188] MCA205模型中Bs CD25 PD-L1的验证通过使用前面实施例中所示的相同方法进行,在MCA205注射后第7天施用同种型对照、单特异性抗体(各自100 μ g)或双特异性Duobody(各自200 μ g),并在第10天获得并制备小鼠组织。

[0189] 实施例1-Treg中CD25的高表达使其成为它们的消减的合适靶标

[0190] 白细胞介素-2高亲和力受体 α (IL2R α)CD25历来用作Treg的真实表面标志物,并且因此是抗体介导的Treg消减的靶标。因为关于抗CD25(aCD25)是否也可导致活化效应T细胞的消除存在争议,所以分析了肿瘤和外周淋巴器官中的淋巴细胞亚群体中的CD25的表达。

[0191] 将小鼠在侧腹中皮下(s.c.)注射MCA205(5×10^5 个细胞,C57BL/6小鼠)、B16(2.5×10^5 个细胞,C7BL/6小鼠)或CT26(5×10^5 个细胞,BALB/c小鼠)细胞,并且10天后收获肿瘤(TIL)和引流淋巴结并加工以通过流式细胞术进行分析。

[0192] 试图在肿瘤激发后10天评估携带肿瘤的小鼠的肿瘤、引流淋巴结和血液内的单独T淋巴细胞亚群体的CD25的相对表达。结果在图1中示出。在可移植的肿瘤细胞系(包括MCA205肉瘤、MC38结肠腺癌、B16黑色素瘤和CT26结肠直肠癌)的不同模型中,CD25表达在CD4阳性、Foxp3阳性T细胞(Treg)中始终较高且在CD4+Foxp3⁻和CD8⁺T细胞中最小(图1(A)),如先前所描述(Sakaguchi等人1995.J Immunol;Shimizu等人1999.J Immunol)。由于其免疫原性和较高T细胞浸润,更详细地研究了MCA205肿瘤模型中对Treg消减的影响(图1(B-C))。与体外研究相反,在体内观察到CD25在效应室(CD4⁺FoxP3⁻和CD8⁺T细胞)上的最小表达。尽管CD25在肿瘤浸润性CD8⁺和CD4⁺FoxP3⁻T效应细胞(Teff)上略微上调。在此中—CD25阳性细胞的百分比(3.08%-8.35%CD8⁺,14.11%-26.87%CD4阳性、Foxp3阴性细胞)和基于每个细胞的表达水平(平均荧光强度(MFI)在CD8阳性细胞中为166.6且在CD4阳性、Foxp3阴性细胞中为134)显著低于Treg中(83.66%-90.23%,MFI 1051.9;p<0.001)。最后,CD25也在引流淋巴结和血液中存在的Treg上表达,但是基于平均荧光强度(MFI)的表达水平在肿瘤浸润性Treg中更高。与Treg细胞相比,Teff细胞上CD25的表达显著更低表明

CD25是Treg上的表达水平显著更高的肿瘤中用于Treg消滅的合适且有吸引力的靶标。

[0193] 实施例2-同种型交换对于用抗CD25有效且安全的肿瘤内Treg消滅是必需的

[0194] 传统上,抗CD25抗体(α CD25)克隆PC-61(大鼠IgG1,k)(α CD25-r1)已被用于小鼠模型中的Treg消滅,其中已反复显示其导致外周淋巴器官中Treg的消除。为了避免Fc γ R接合的种间差异,将PC-61的恒定区与鼠IgG2a, κ (α CD25-m2a)-经典的小鼠消滅同种型-交换,并且定量外周和肿瘤中的Treg数量并与抗CTLA4(α CTLA4,克隆9H10)(其已知导致肿瘤浸润性Treg的消滅)的作用进行比较。

[0195] 基于先前证明肿瘤内Treg消滅在共定义免疫调节抗体的活性中的重要性证据,由于其较高免疫原性而试图比较 α CD25-r1对MCA205小鼠模型中血液、引流淋巴结(LN)和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)中的Teff和Treg频率的影响,并用于评估抗CD25对肿瘤内活化的Teff的任何潜在负面影响。

[0196] 在皮下接种 5×10^5 个MCA205细胞后第5天和第7天将携带肿瘤的小鼠注射200 μ g的抗CD25-r1(α CD25-r1)、抗CD25-m2a(α CD25-m2a)或抗CTLA-4(α CTLA-4)。在第9天收获外周血单核细胞(PBMC)、淋巴结(LN)和肿瘤(TIL),加工并染色以用于流式细胞术分析。结果在图2和3中示出。

[0197] 体内施用 α CD25降低了淋巴结且特别是血液中CD25+细胞的数量,与抗体同种型无关。当通过其特征转录因子Foxp3的表达定量Treg的数量时,两种同种型在外周再次同样有效,但出人意料地,仅小鼠IgG2a同种型导致肿瘤浸润性Treg的频率和绝对数量显著降低至与在 α CTLA4情况下观察到的水平相当的水平。尽管CD25表达在一小部分肿瘤浸润性效应T细胞中上调(参见实施例1),但未观察到外周或肿瘤中CD8+和CD4+Foxp3-的数量显著减少。结果,两种 α CD25同种型均导致外周中Teff/Treg比率增加。然而,仅 α CD25-m2a以与抗CTLA4(其已知优先消滅肿瘤部位而不是外周中的Treg)类似的方式增加此比率。这潜在解释了在先前研究中观察到的针对确定的肿瘤的功效缺乏。因此,仅抗CD25(小鼠IgG2a)减少淋巴结和血液中Treg的数量并消滅肿瘤浸润性Treg。重要的是,尽管循环和LN驻留Treg的数量减少,但在多个剂量的 α CD25-m2a后,在皮肤、肺和肝中未观察到肉眼可见的毒性证据。因为在此类实验期间其小鼠中的毒性,所以这种类型的抗CD25治疗与其他主要问题不相关,因为在不同处理组中未测量到一般健康状况和总体重以及乳酸脱氢酶(LDH)和肝酶(ALT,天冬氨酸转氨酶;AST,丙氨酸转氨酶)的血清水平的统计上相关的差异。

[0198] 还测定了携带皮下MCA205肿瘤的小鼠的血液、脾、LN和肿瘤中的不同白细胞亚群体上活化和抑制性Fc γ R的表达水平(图4)。相对于所有其他研究的器官,Fc γ R似乎在肿瘤浸润性骨髓细胞(粒细胞、常规树突细胞和单核细胞/巨噬细胞)上表达更多。还通过表面等离子共振测定了抗CD25的两种Fc变体与Fc γ R的结合亲和力(表1)。

[0199] 表1

[0200]

	rlgG1	mlgG2a
Fc γ RI	n.b.	1.1×10^{-8}
Fc γ RIIb	2.6×10^{-6}	4.2×10^{-6}
Fc γ RIII	2.5×10^{-6}	4.5×10^{-6}
Fc γ RIV	n.b.	2.2×10^{-7}

[0201] 这些数据证明mIgG2a同种型以高活化与抑制比(A/I)结合所有Fc γ R亚型。相比之下,rIgG1同种型以与单一活化Fc γ R、Fc γ RIII以及抑制性Fc γ RIIb相似的亲和力结合,从而导致低A/I比(<1)。

[0202] 在不同的小鼠模型中确立了缺乏不同Fc γ R表达的小鼠中肿瘤浸润性Treg的数量,以区分哪些特异性Fc γ R参与抗CD25介导的Treg消减(图5)。将C57BL/6对照小鼠和Fcer1g^{-/-}小鼠皮下注射MCA205细胞和肿瘤,收获引流淋巴结和血液,加工并染色以用于流式细胞术分析。通过CD4和FoxP3表达鉴定调控T细胞。来自总CD4阳性细胞的Foxp3阳性的百分比显示抗-CD25效应如何归因于Fcer1g基因的表达。对Fcer1g^{-/-}小鼠(其不表达活化Fc γ R(I、III和IV)中的任一种)的分析证明完全不存在Treg消减。外周中 α CD25-r1以及外周和肿瘤中 α CD25-m2a的Treg消减因此来自Fc γ R介导的ADCC并且不阻断IL-2与CD25的结合。通过 α CD25-m2a消减不依赖于任何单独活化Fc γ R,其中Treg消减在Fcgr3^{-/-}和Fcgr4^{-/-}小鼠两者中保持。因此,尽管这种受体的高肿瘤内表达,但 α CD25-r1对外周Treg的消减未能在肿瘤中消减。然而,在缺乏抑制性受体Fc γ RIIb表达的小鼠中,肿瘤内Treg消减得到有效恢复。在这种情况下, α CD25-r1与 α CD25-m2a之间的肿瘤内Treg消减是相当的。因此,肿瘤中 α CD25-r1的Treg消减的缺乏可通过其低A/I结合比和Fc γ RIIb的高肿瘤内表达来解释,其抑制由这种同种型接合的单一活化受体介导的ADCC。

[0203] 实施例3-抗CD25疗法与抗PD-1协同作用,根除确定的肿瘤并增加携带肿瘤的小鼠的存活

[0204] 由于其在肿瘤内Treg消减中的更好效率,因此假设 α CD25-m2a在确定的肿瘤的治疗中具有更好的治疗结果。当肿瘤确定时,通过在皮下植入MCA205细胞后5天施用单剂量的 α CD25来评价 α CD25-m2a和 α CD25-r1针对确定的肿瘤的抗肿瘤活性。结果在图6中提供。

[0205] 与观察到的缺乏消减肿瘤内Treg的能力一致,给予至具有确定的肿瘤的小鼠的单剂量 α CD25(第5天)导致在 α CD25-r1情况下无保护。另一方面,观察到给予 α CD25-m2a的小鼠的生长延迟和长期存活(15.4%)。由于靶向共抑制受体PD-1作为免疫治疗靶标的药剂和PD-1在控制肿瘤微环境内的T细胞调控中的关键作用的临床相关性,假设CD25⁺Treg细胞的消减和PD-1阻断可在组合中具有协同作用。在同一模型中,测试了使用抗PD-1(α PD-1,克隆RMP1-14;每三天100 μ g的剂量)的 α CD25与PD-1阻断的组合。作为单一疗法的 α PD-1在确定的MCA205肿瘤模型的治疗中无效,并且与 α CD25-r1的组合未改善其作用。然而,单剂量的 α CD25-m2a、随后 α PD-1治疗在78.5%的小鼠中根除了确定的肿瘤,从而产生超过100天的长期存活。在MC38和CT26肿瘤模型中观察到类似的结果,其中 α CD25-m2a具有与 α PD-1疗法协同的部分治疗作用,其与同 α CD25-r1的组合(其未能消减这些肿瘤中的肿瘤浸润性Treg)相反。因此,这种组合施用允许显著改善不同肿瘤小鼠模型的长期存活的有效肿瘤消除。

[0206] 为了理解 α CD25-m2a和 α PD-1组合的协同作用的作用机制,评估了在治疗方案结束时(在第三剂量的 α PD-1后24小时)MCA205肿瘤微环境中存在的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的表型和功能(图7)。使用 α PD-1的单一疗法对Teff增殖和肿瘤中Teff浸润的程度都没有影响,其中还观察到持续存在的高频率的Treg(数据未示出),以及与缺乏治疗活性一致的低Teff/Treg比率。相反,使用 α CD25-m2a的肿瘤内Treg消减产生较高比例的肿瘤中的增殖和产生干扰素- γ (IFN- γ)的CD4⁺FoxP3⁻T细胞,其对应于高Teff/Treg比率和抗肿瘤应答。与使用抗CD25-m2a的单一疗法相比,这种作用在于抗PD-1的组合中进一步增强,其产生甚至

更高的增殖和产生IFN- γ 的CD4阳性、FoxP3阴性T细胞数量的1.6倍增加。相比之下,当作为单一疗法或与抗PD-1组合使用时,使用抗CD25-r1观察到的缺乏Treg消减导致Teff增殖或IFN- γ 产生没有变化。

[0207] 用具有原始小鼠IgG1同种型或允许有效Treg消减的小鼠IgG2a同种型的PC61产生的数据表明,单独或与抗癌抗体组合的这种抗CD25可有效地排斥确定的肿瘤,特别是对于需要有效肿瘤内Treg消减的那些肿瘤而言。

[0208] 如上所示,施用单剂量的 α CD25-m2a、随后 α PD-1治疗对MCA205鼠模型中的肿瘤大小和小鼠存活具有积极作用。由于抗CD25-m2a/抗-PD1所致的这种治疗作用依赖于CD8阳性T细胞的活性,因为进一步施用抗CD8抗体使肿瘤大小和小鼠存活达到在未处理动物中观察到的水平(图8)。因此,MCA205肿瘤消除取决于 α PD-1/ α CD25协同作用对CD8阳性和Treg细胞群体两者的影响,并且总体效应T细胞应答不会受消减抗CD25抗体负面影响。

[0209] 当 α CD25-m2a和 α PD-1与表达GM-CSF的全肿瘤细胞疫苗Gvax组合时,也观察到针对免疫原性较差的B16黑色素瘤肿瘤模型的这种协同作用(图9)。在这种系统中,单独Gvax治疗和Gvax与 α PD-1或 α CD25-r1的组合都不能阻止肿瘤生长或延长携带肿瘤的小鼠的存活。在这种环境中,仅Gvax与 α CD25-m2a(单独或与 α PD-1一起)的组合。在施用 α CD25-r1的任何处理组中未观察到这种改善。

[0210] 当施用 α PD-1(图10)或 α PD-L1(图11)时,在MC38肿瘤模型中观察到关于免疫检查点抑制剂与 α CD25-m2a的协同作用的类似结果。CT26肿瘤模型也证实了这些组合的治疗作用(图12和13)。因此,当 α CD25-m2a由于Treg消减已经具有部分治疗作用时,这种有利的性质提供了基于免疫检查点抑制剂出人意料地改善对治疗的反应的可能性。

[0211] 实施例4-CD25在Treg浸润性人肿瘤中高度表达并且抗PD-1疗法诱导人肿瘤中表达CD25的Treg的浸润

[0212] CD25似乎是基于小鼠模型的Treg消减和组合免疫治疗方法的有吸引力的靶标。为了验证CD25作为人中Treg消减的可能靶标,使用从卵巢癌、膀胱癌、黑色素瘤、非小细胞癌(NSCLC)和肾细胞癌(RCC)患者获得的生物样品通过流式细胞术和免疫组织化学(IHC)比较了其在外周血和肿瘤浸润性淋巴细胞中的表达水平。还定量了在接受用派姆单抗进行 α PD-1治疗之前和之后来自RCC患者的肿瘤样品中Treg和CD25表达的数量。结果在图14和15中示出。

[0213] 独立于解剖位置、肿瘤类型或阶段,观察到Treg中的CD25表达比CD4+Foxp3⁻(10%-15%)和CD8+(<5%)T细胞中的CD25表达显著更高(50%-85%)。与鼠模型类似,在所有研究的肿瘤亚型中如通过MFI评估的CD25表达的水平相对于CD4+FoxP3⁻和CD8+Teff在CD4+FoxP3+Treg上显著更高。

[0214] 多重免疫组织化学(IHC)进一步支持了这些观察结果。来自相同患者群组的黑色素瘤、NSCLC和RCC肿瘤的分析表明,即使在致密的CD8阳性、T细胞浸润的区域中,CD25表达仍然限于FoxP3阳性细胞。突出地,无论肿瘤亚型、阶段、切除部位、当前或先前治疗如何,这种表达谱保持一致,并且它们与在小鼠模型中获得的数据一致。

[0215] 此外,与在皮下鼠肿瘤中观察到的高比例Treg相比,RCC样品在未处理的肿瘤中显示出稀少数量的Treg。然而,抗PD-1疗法导致被CD8+T细胞和Treg(Foxp3阳性细胞)显著浸润。此外,从黑色素瘤和RCC样品生成的数据证实CD25由Foxp3阳性细胞高度表达,而其表达

在Foxp3阴性、CD8阳性细胞中最小。

[0216] 当在治疗性免疫调节的背景下评估CD25表达时。在分别患有晚期肾癌和黑色素瘤的患者中在基线和4个周期的纳武单抗或2个周期的派姆单抗)后在同一病灶上进行核心活组织检查。尽管全身免疫调节,CD25表达仍然限于FoxP3阳性Treg,甚至在通过多重IHC评估的致密CD8阳性T细胞浸润的区域中也是如此。

[0217] 这些发现证实了所描述临床前数据的翻译价值,并进一步支持了人癌症中通过CD25对Treg的选择性治疗靶向的概念。此外,人实体癌症中与抗PD1治疗相关的CD25表达谱为具有CD25结合和Fc γ 受体特异性的抗人CD25抗体的治疗组合提供了与针对抗小鼠CD25PC61(IgG2a)与免疫检查点抑制剂如PD-1拮抗剂所示的那些可比较的理论基础。

[0218] 实施例5-基于抗CD25和抗PD-L1的双特异性抗体和抗体的组合提供有效的Treg消减和细胞因子诱导特性

[0219] 前面的实施例已经表明,基于PC61且具有适当同种型的抗体的Treg消减、CD25结合特性可与其他抗癌化合物,如靶向免疫检查点蛋白的抗体如PD-1拮抗剂(是抗PD-1或抗PD-L1抗体)组合使用。这些发现提出构建组合两种抗原结合特性和相关同种型(例如IgG1)的双特异性抗体。

[0220] 这种方法已经通过使用在单一异聚蛋白质内称为Bs CD25PD-L1的Duobody技术得到验证,所述技术允许单一重链和轻链与单独产生的两种不同的单特异性抗体的有效缔合(图16A)。这种抗体的结合特异性已经使用两种遗传修饰的人细胞系进行了验证,所述细胞系各自表达小鼠CD25或小鼠PD-L1;并且与初始单特异性抗体的结合特异性进行了比较(图16B和C)。这些细胞系已通过流式细胞术进行了测试(单独或以等量混合),从而表明Bs CD25 PD-L1保留其双重CD25、PD-L1特异性,甚至允许检测通过Bs CD25 PD-L1同时与CD25阳性和PD-L1阳性细胞的结合形成的双阳性细胞复合物的复合。

[0221] BsAb CD25 PD-L1的功能特性已经通过使用在先前实施例中用于验证PC61的细胞相互作用和消减模型在体内进行了评估。MCA205模型用于评估BsAb对肿瘤和LN中效应和调控T细胞的影响。在此模型中,BsAb CD25 PD-L1可识别并消减CD4阳性、Foxp3阳性调控T细胞,并且以与抗CD25(PC61-m2a)或单特异性抗CD25和抗PD-L1抗体的组合等效的增效增加肿瘤和LN中的CD8阳性、Foxp3阳性调控T细胞比率(图17AB)。此外,BsAb CD25 PD-L1增加表达干扰素 γ 的CD4阳性、CD5阳性细胞的数量,其水平至少类似于单特异性抗CD25和抗PD-L1的组合,并且可能优于单独抗CD25m2a抗体的组合(图17C)。

[0222] 数据表明如何使用基于PC61的Treg消减的抗人CD25抗体治疗癌症不仅可通过选择合适的同种型来改善,而且可与其他抗癌药物有效结合,特别是与结合不同细胞表面抗原的抗癌抗体有效组合。这种方法可通过产生和施用作为单特异性抗体的新颖混合物或作为新颖双特异性抗体的两种产物来实现,所述双特异性抗体缔合并产生以维持亲本单克隆抗体的Treg消减、CD25结合和其他结合特性。

[0223] 本文提及的所有文献均以引用的方式整体并入本文,特别注意引用它们的主题。本发明的所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将显而易见,而不背离本发明的范围和精神。虽然已结合具体优选的实施方案描述了本发明,但应理解的是,要求保护的本发明不应不适当地局限于所述具体实施方案。事实上,对于分子生物学、细胞免疫学或相关领域的技术人员来说显而易见的用于进行本发明的所描述模式的各种修改意

图在以下权利要求的范围内。

序列表

<110> 癌症研究技术有限公司

<120> 方法

<130> P108669PCT

<150> GB 1605947.9

<151> 2016-04-07

<160> 2

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 272

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

195	200	205
Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr		
210	215	220
Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln		
225	230	235
Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu		240
245	250	255
Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile		
260	265	270
<210> 2		
<211> 222		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 2		
Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala		
1	5	10
Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu		
20	25	30
Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu		
35	40	45
Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys		
50	55	60
Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro		
65	70	75
Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln		
85	90	95
Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro		
100	105	110
Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln		
115	120	125
Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly		
130	135	140
Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr		
145	150	155
Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln Phe Pro		
165	170	175
Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu Ser Glu		
180	185	190
Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr Glu Met		

195	200	205
Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln		
210	215	220

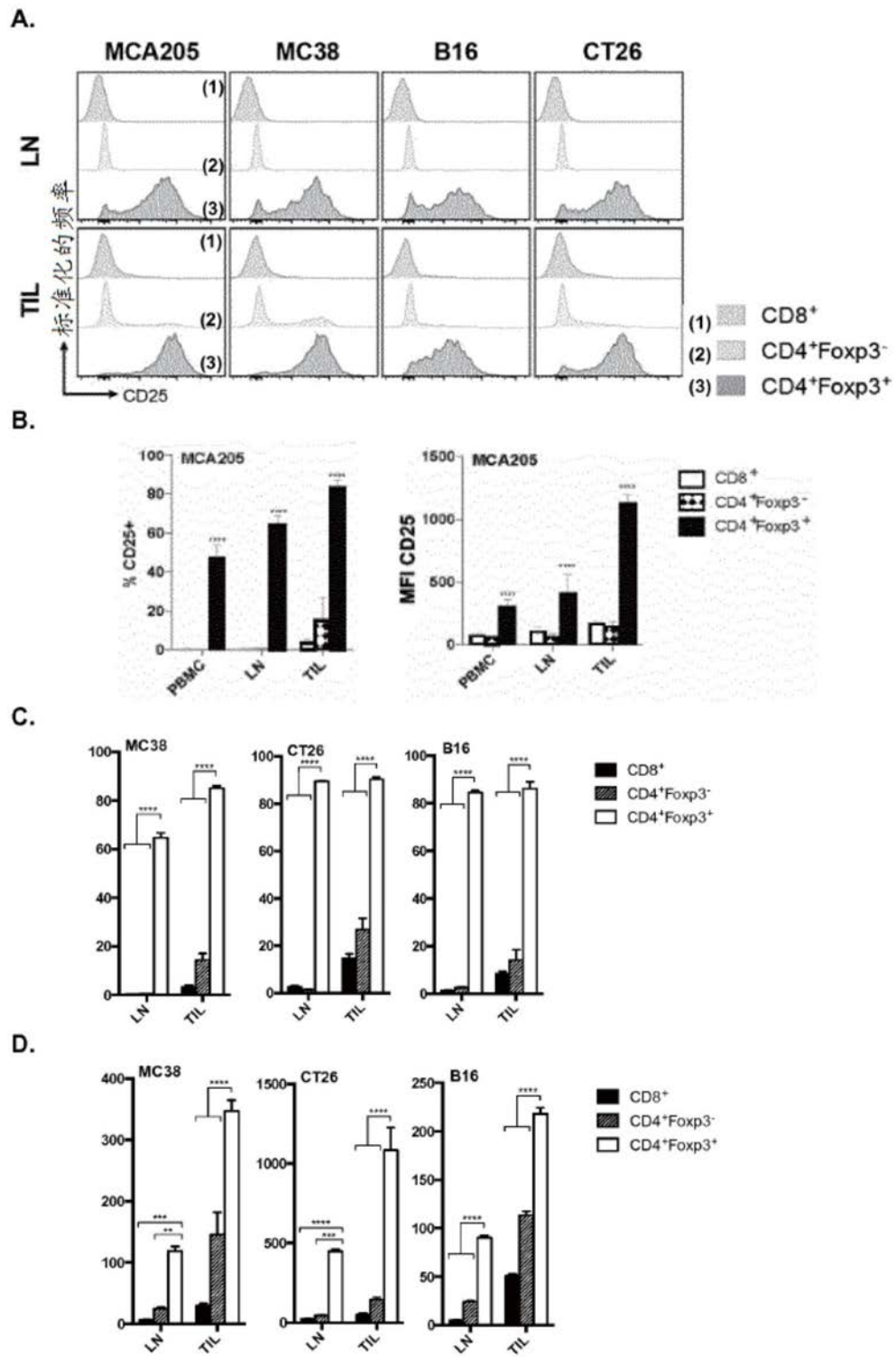


图1

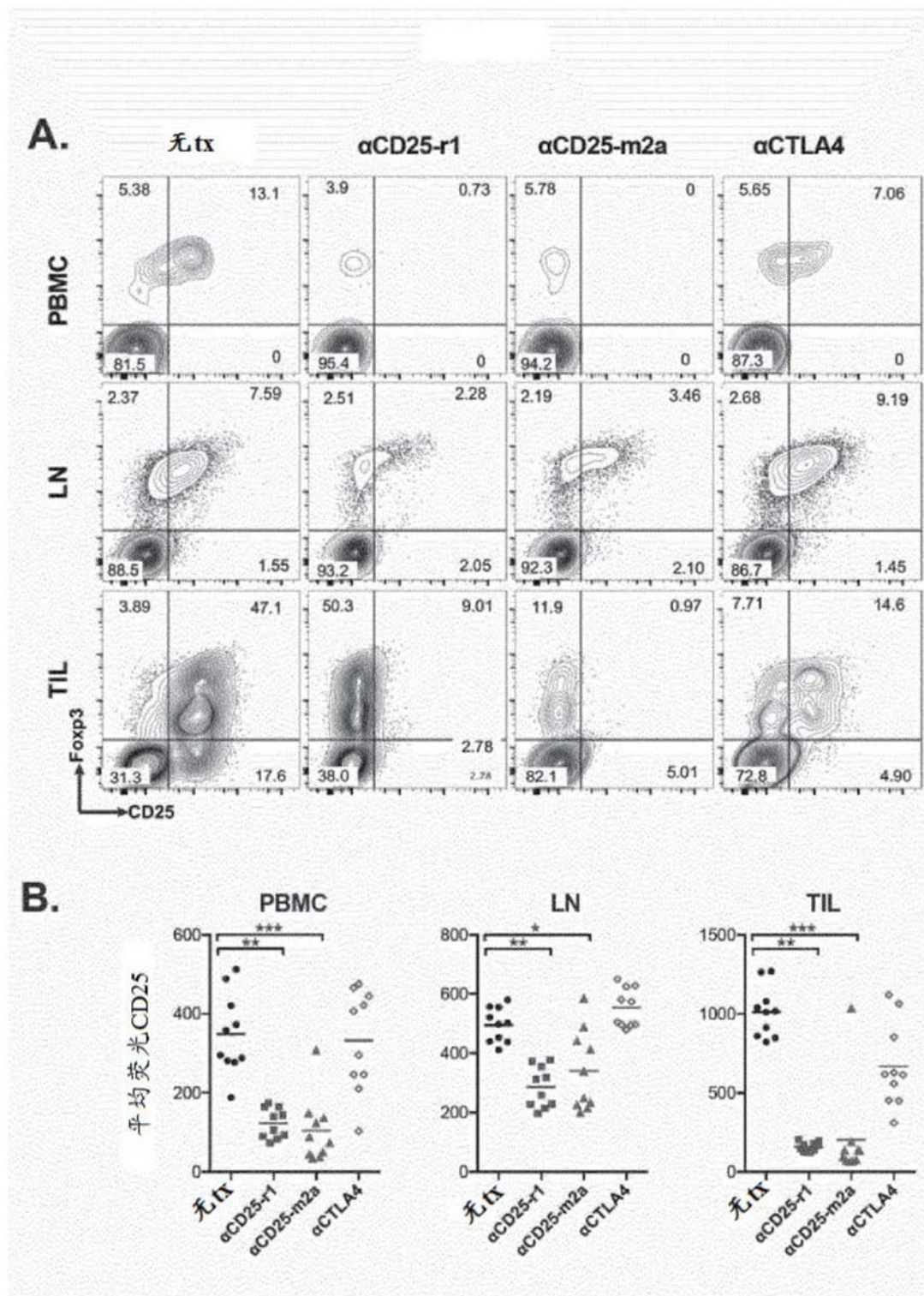
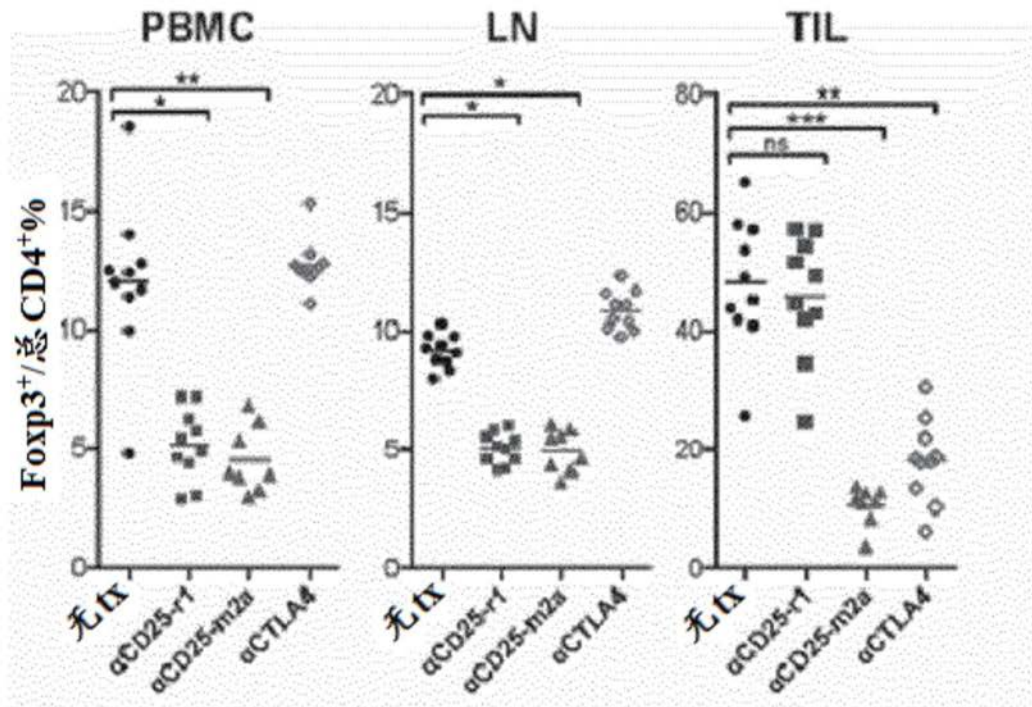
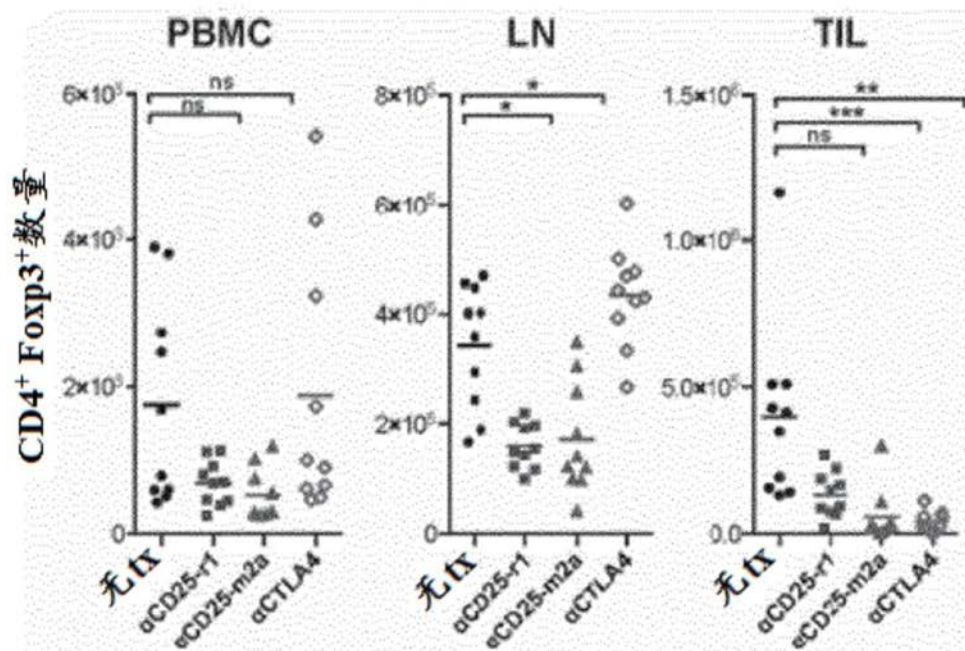


图2

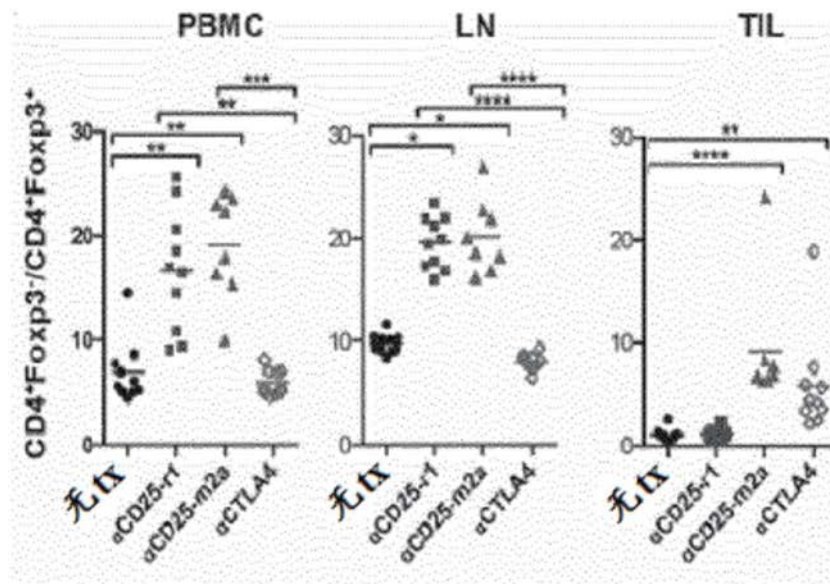
A



B



C



D

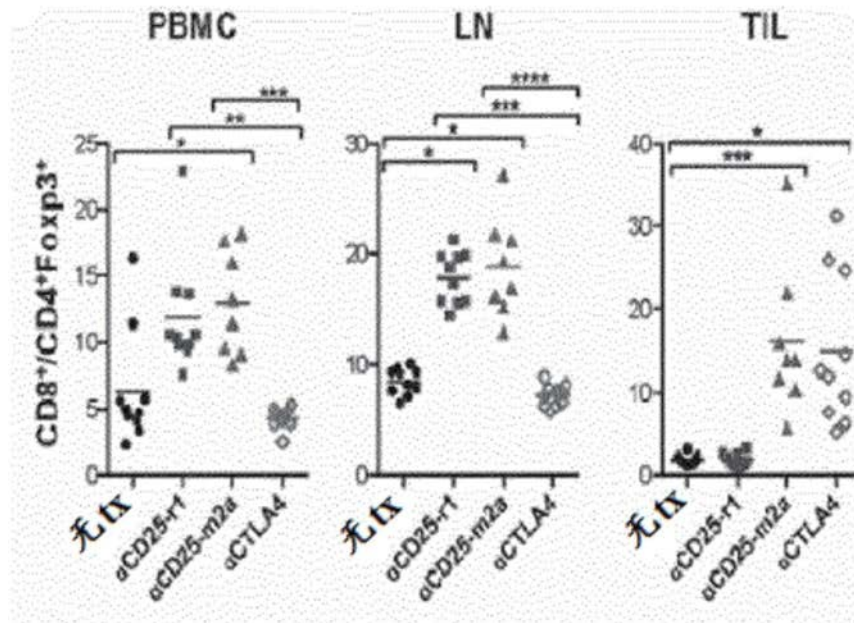


图3

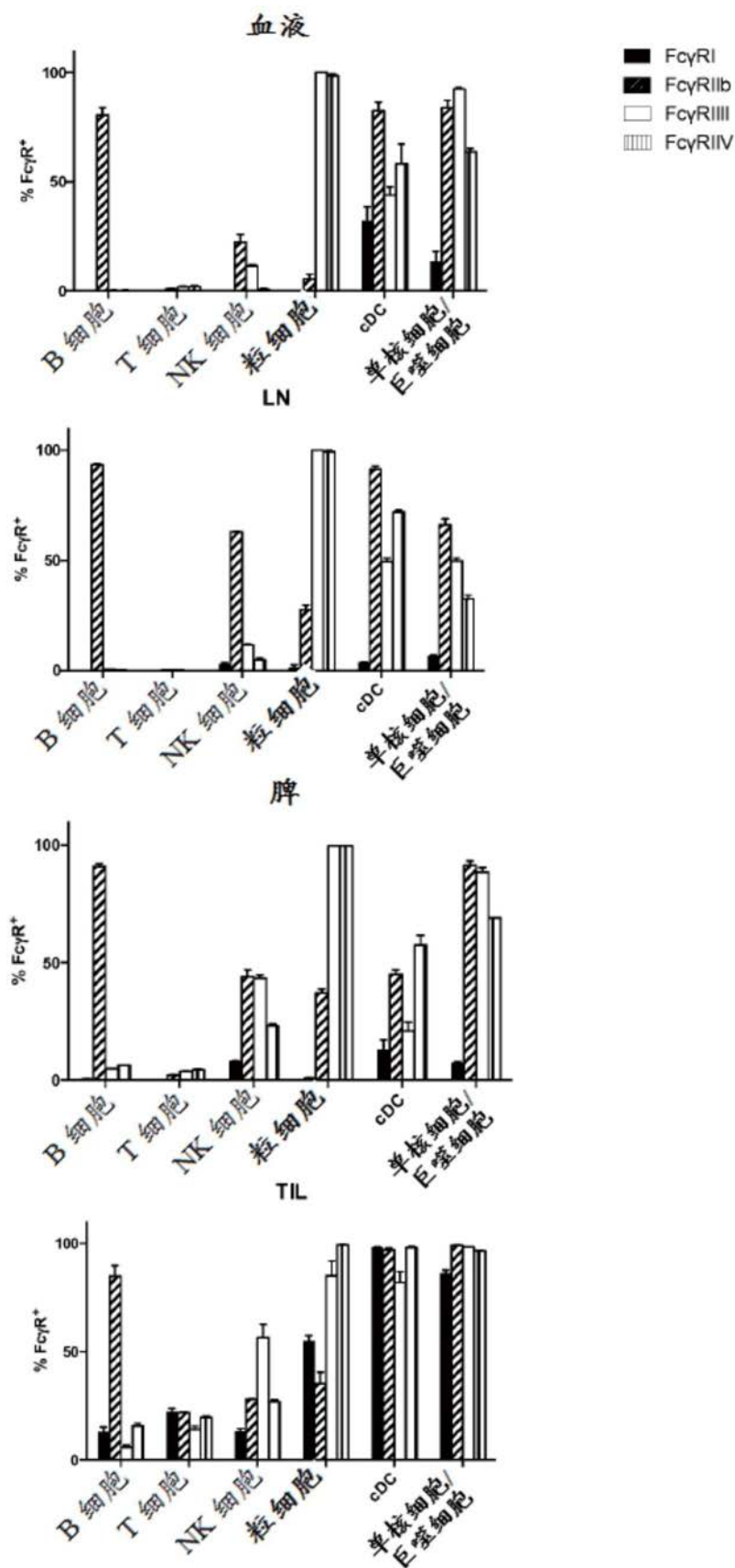


图4

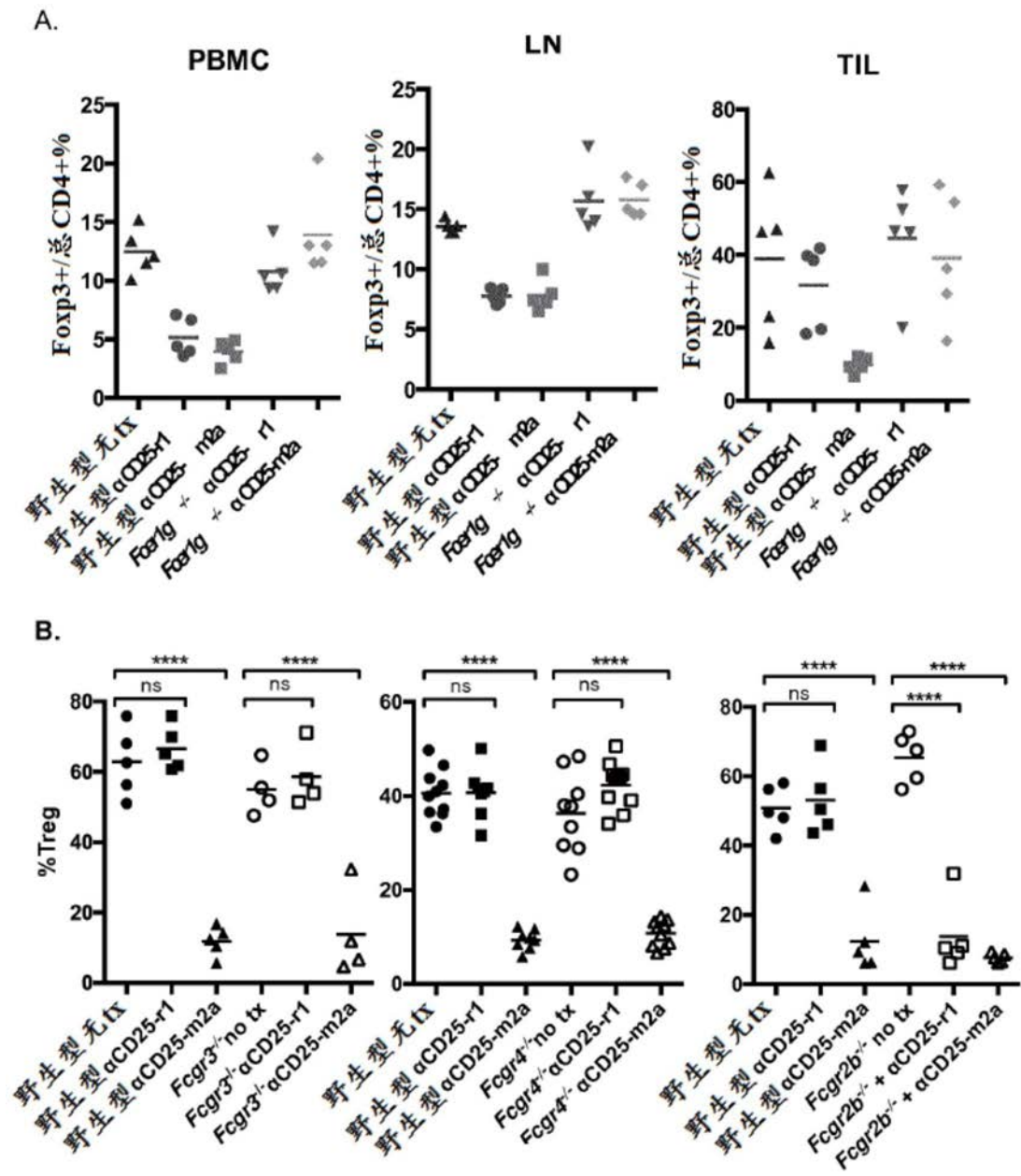
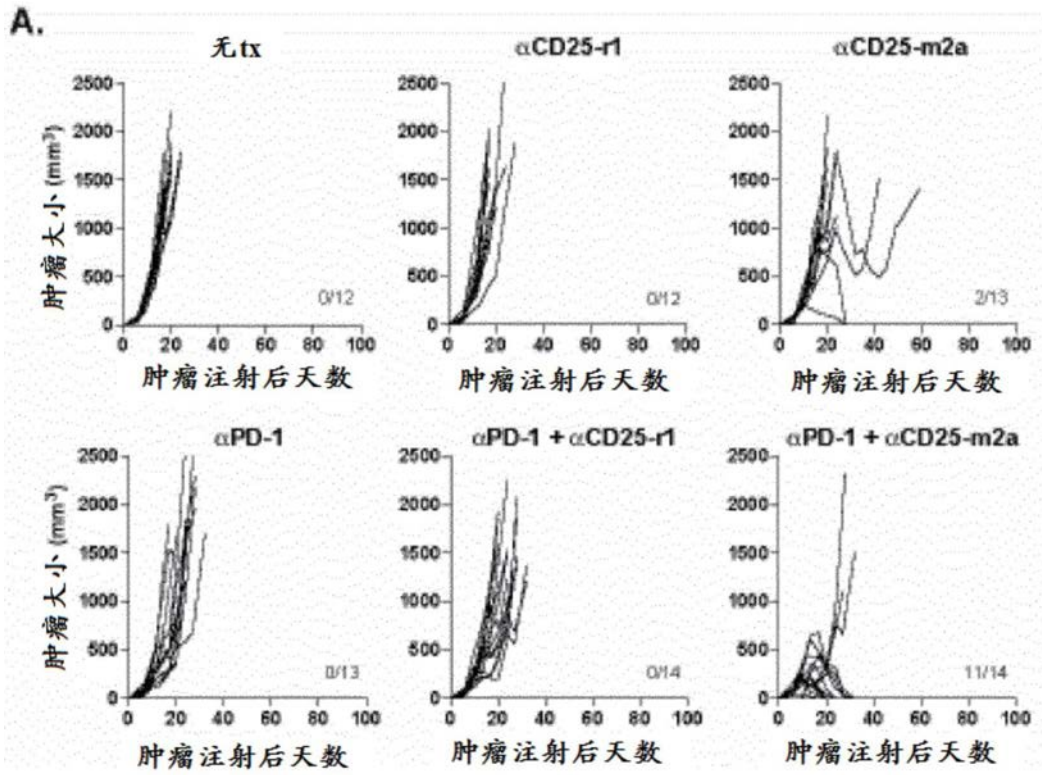


图5



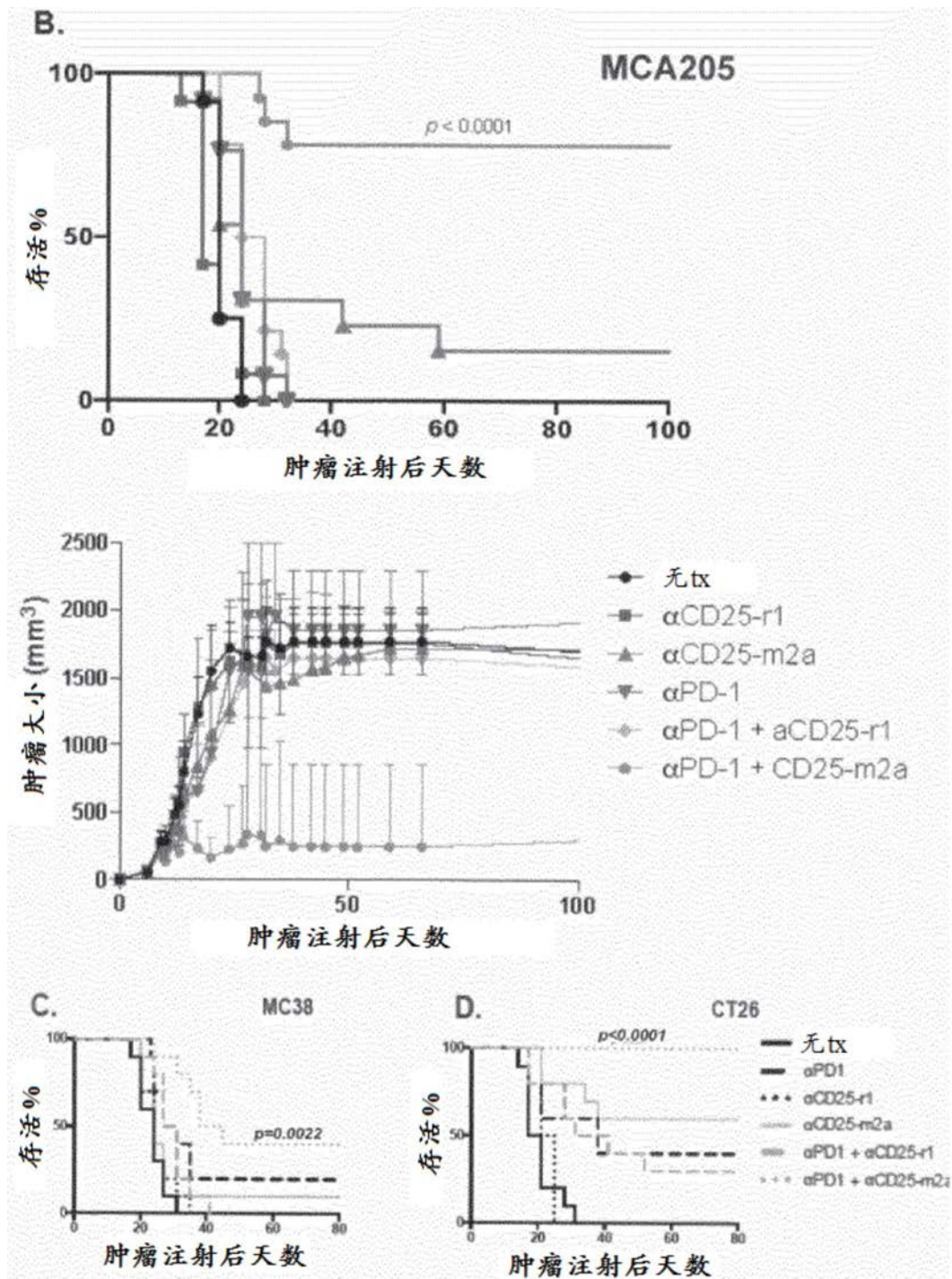


图6

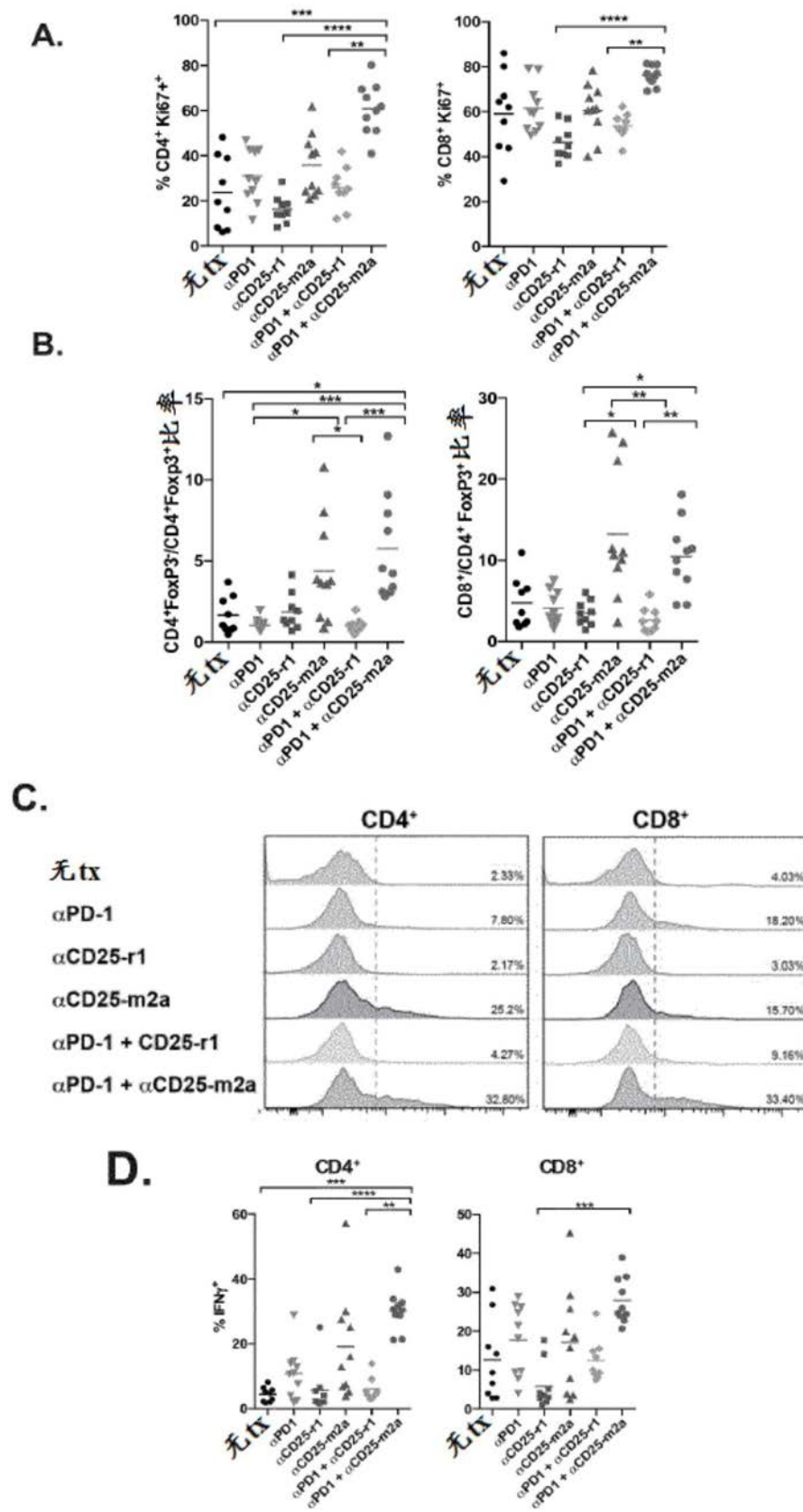


图7

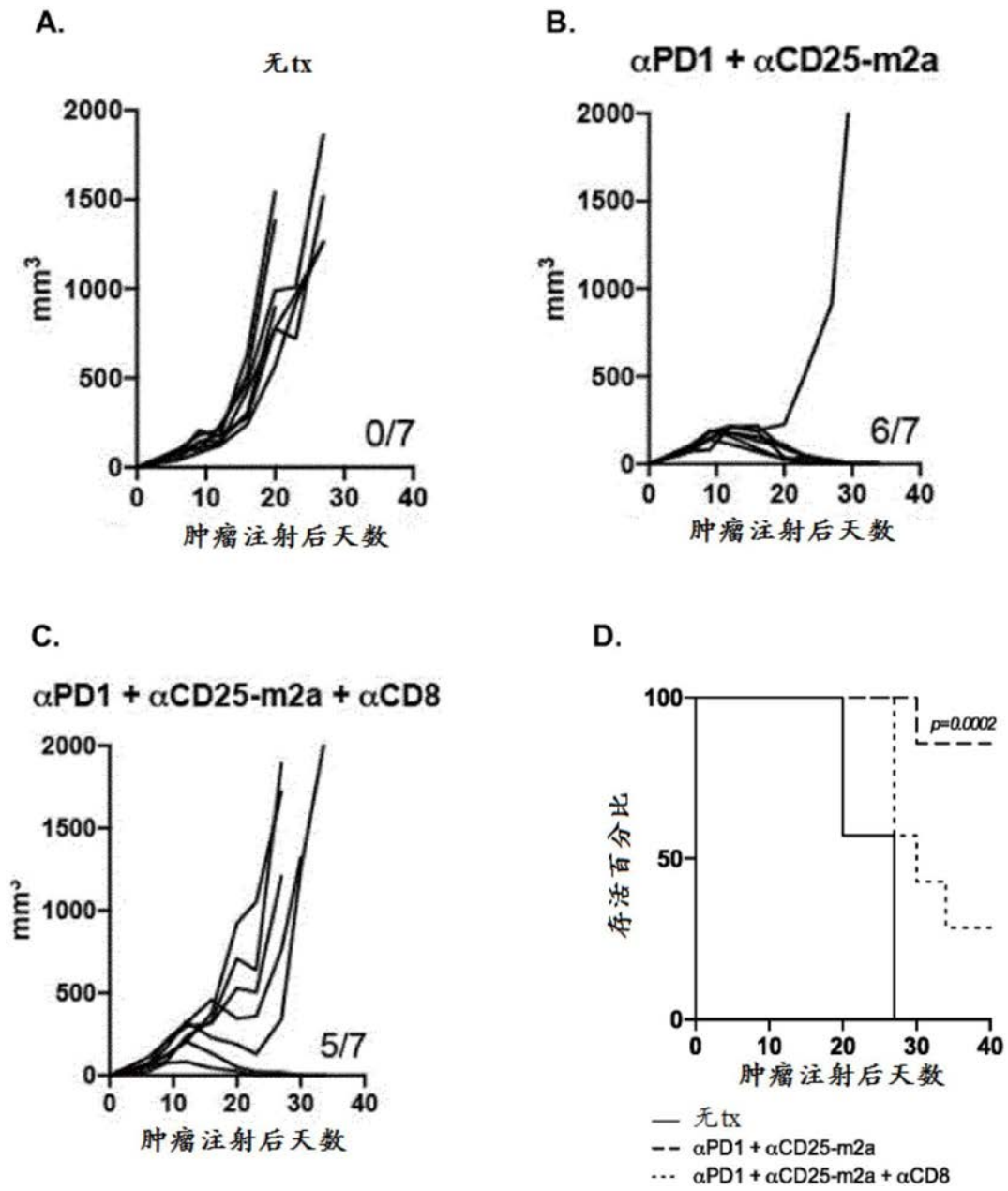


图8

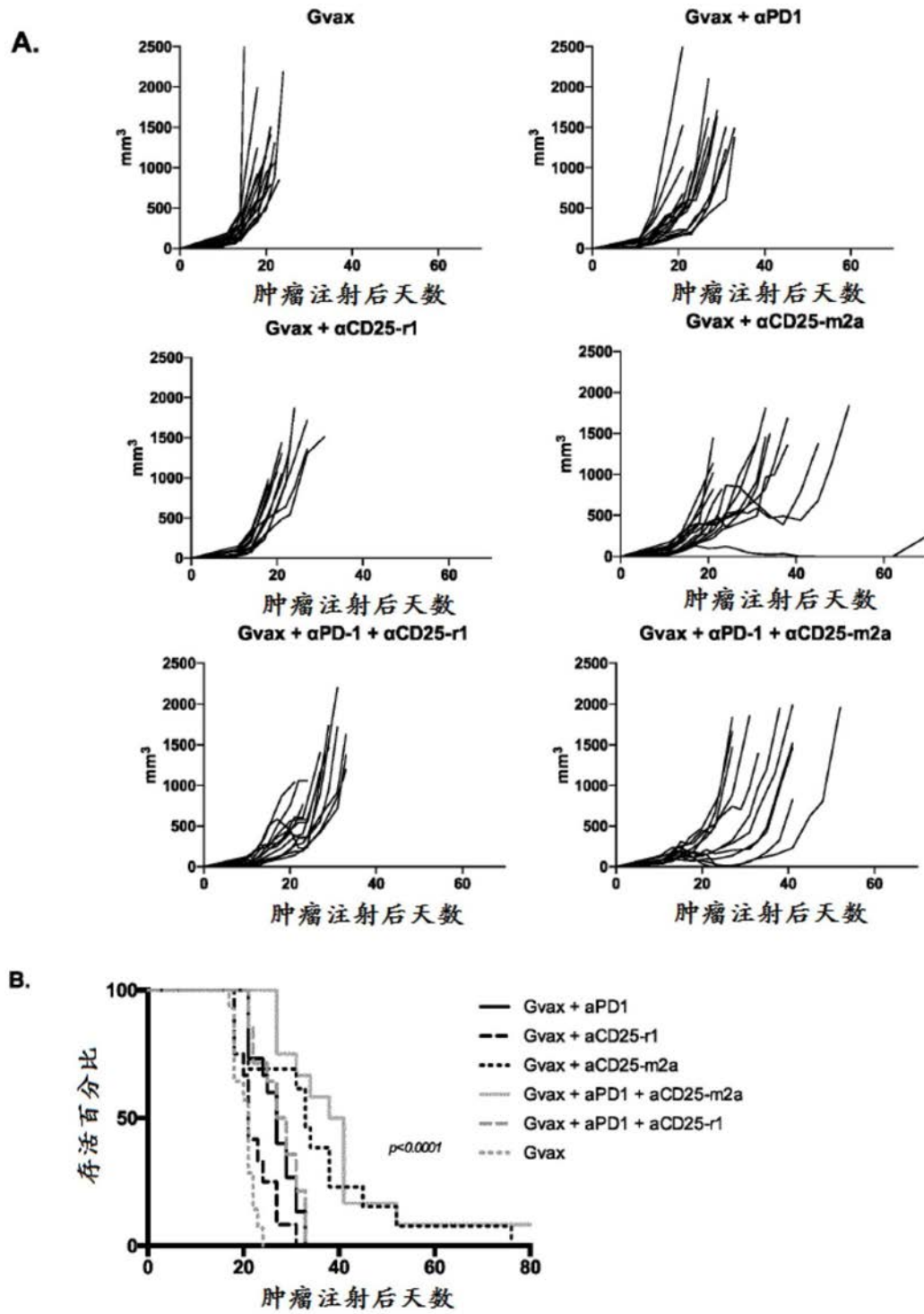


图9

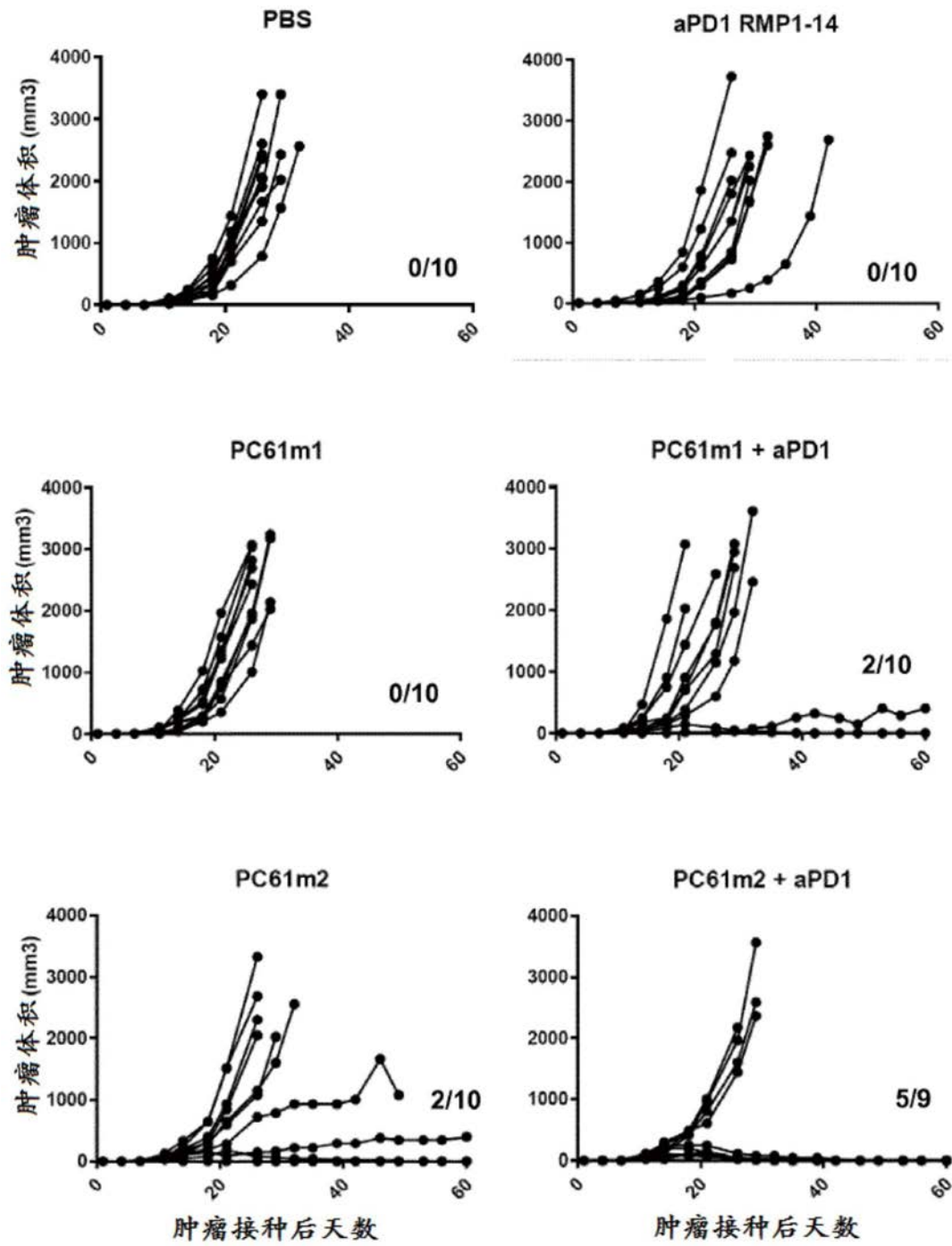


图10

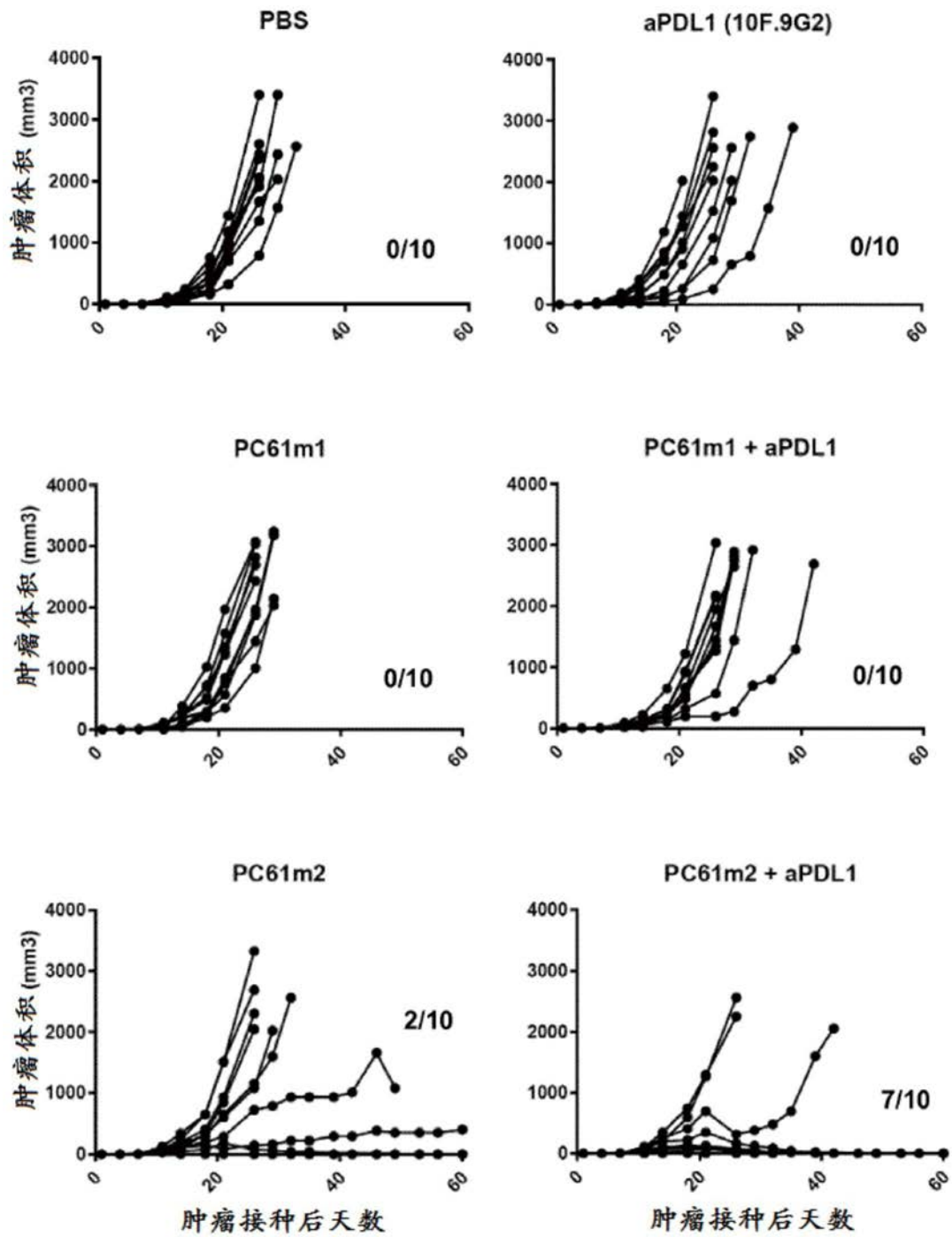


图11

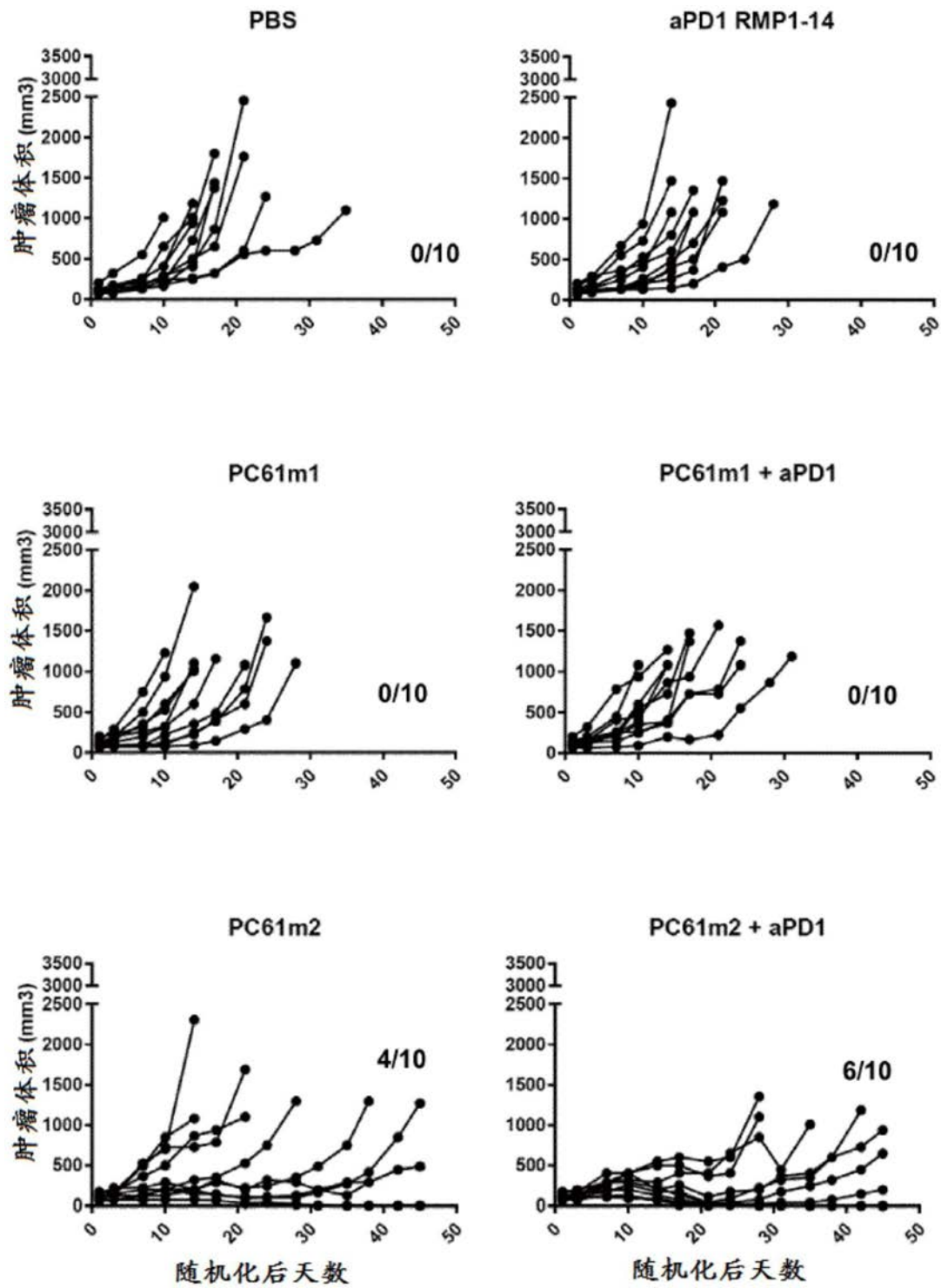


图12

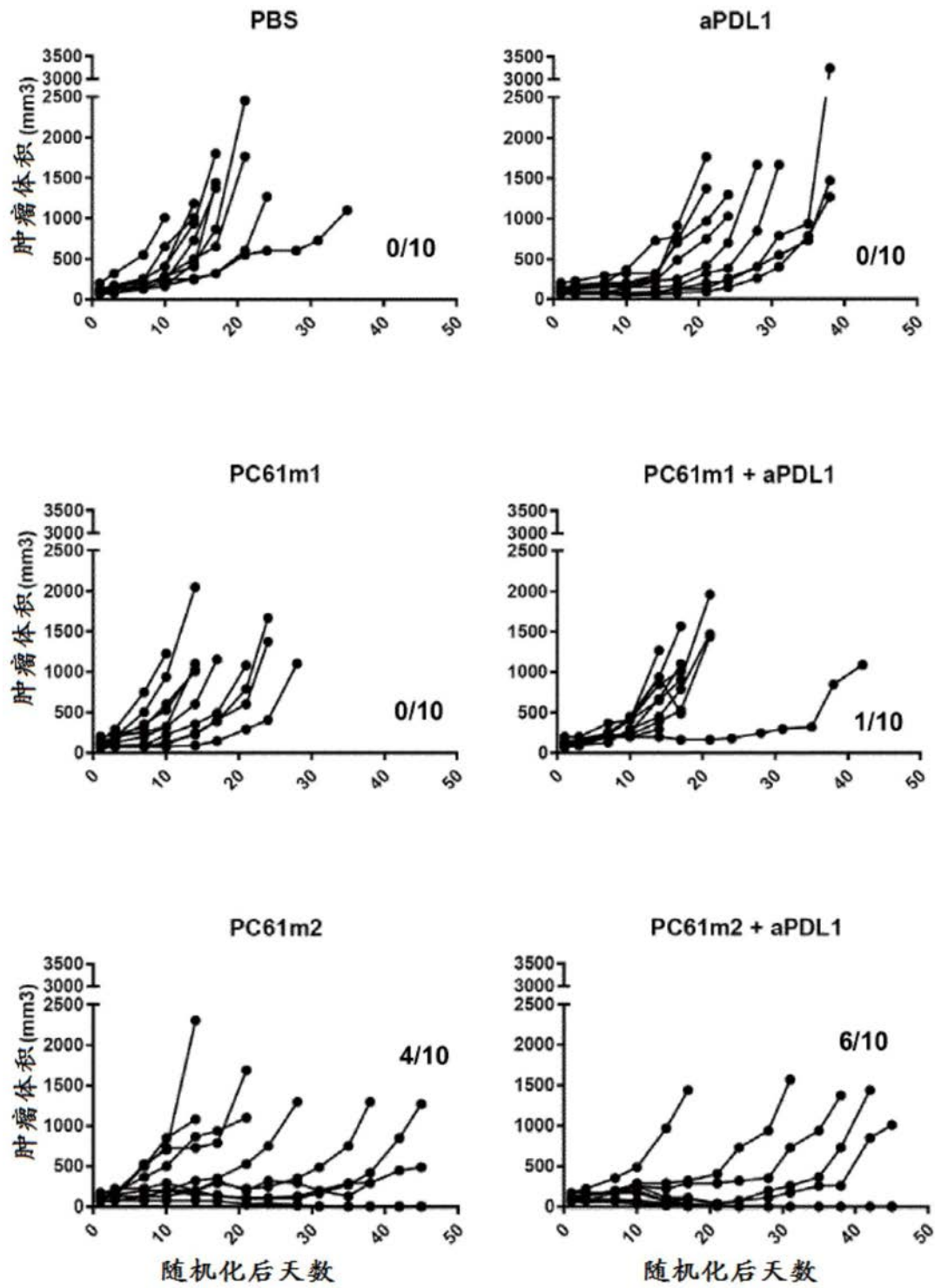
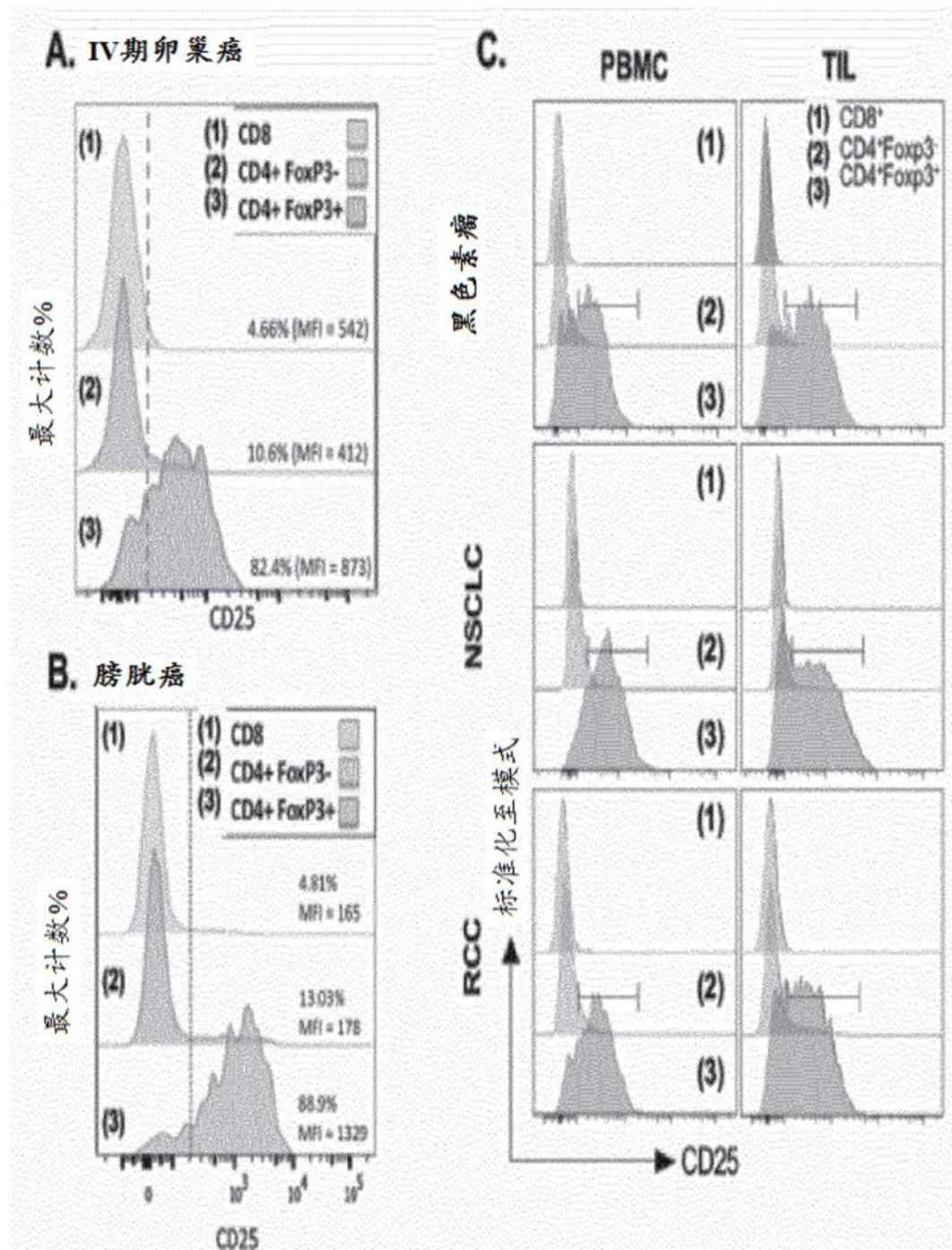


图13



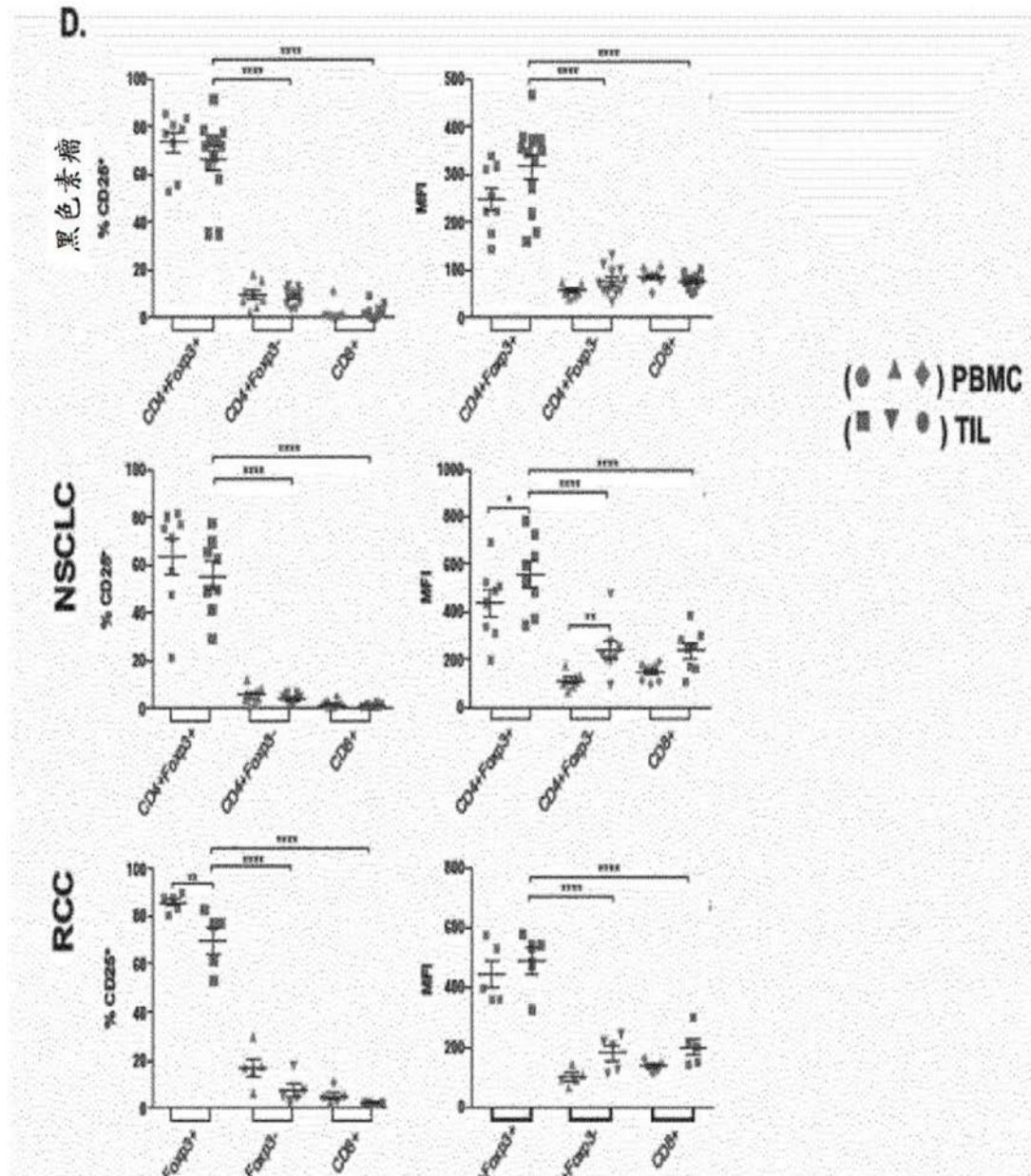


图14

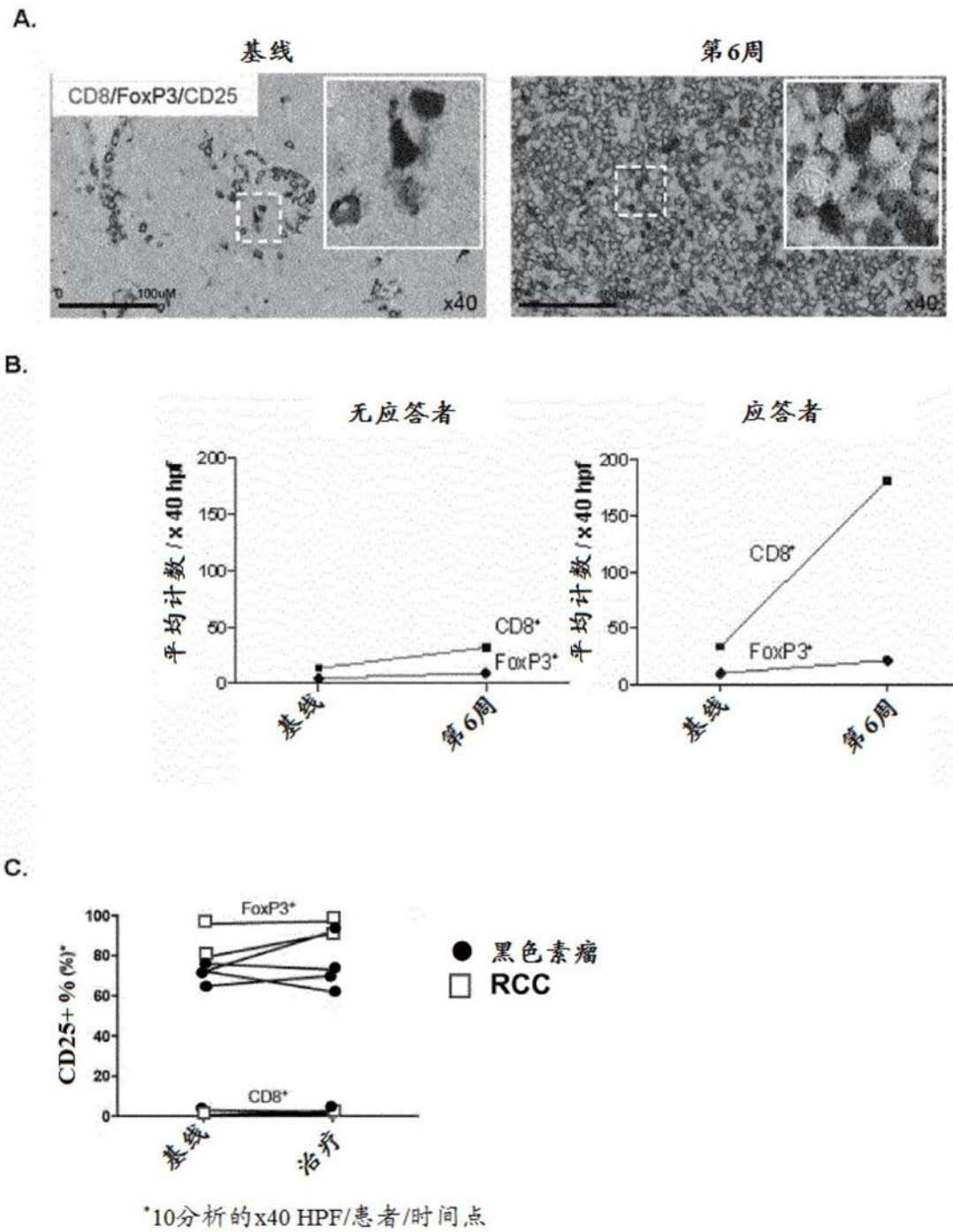


图15

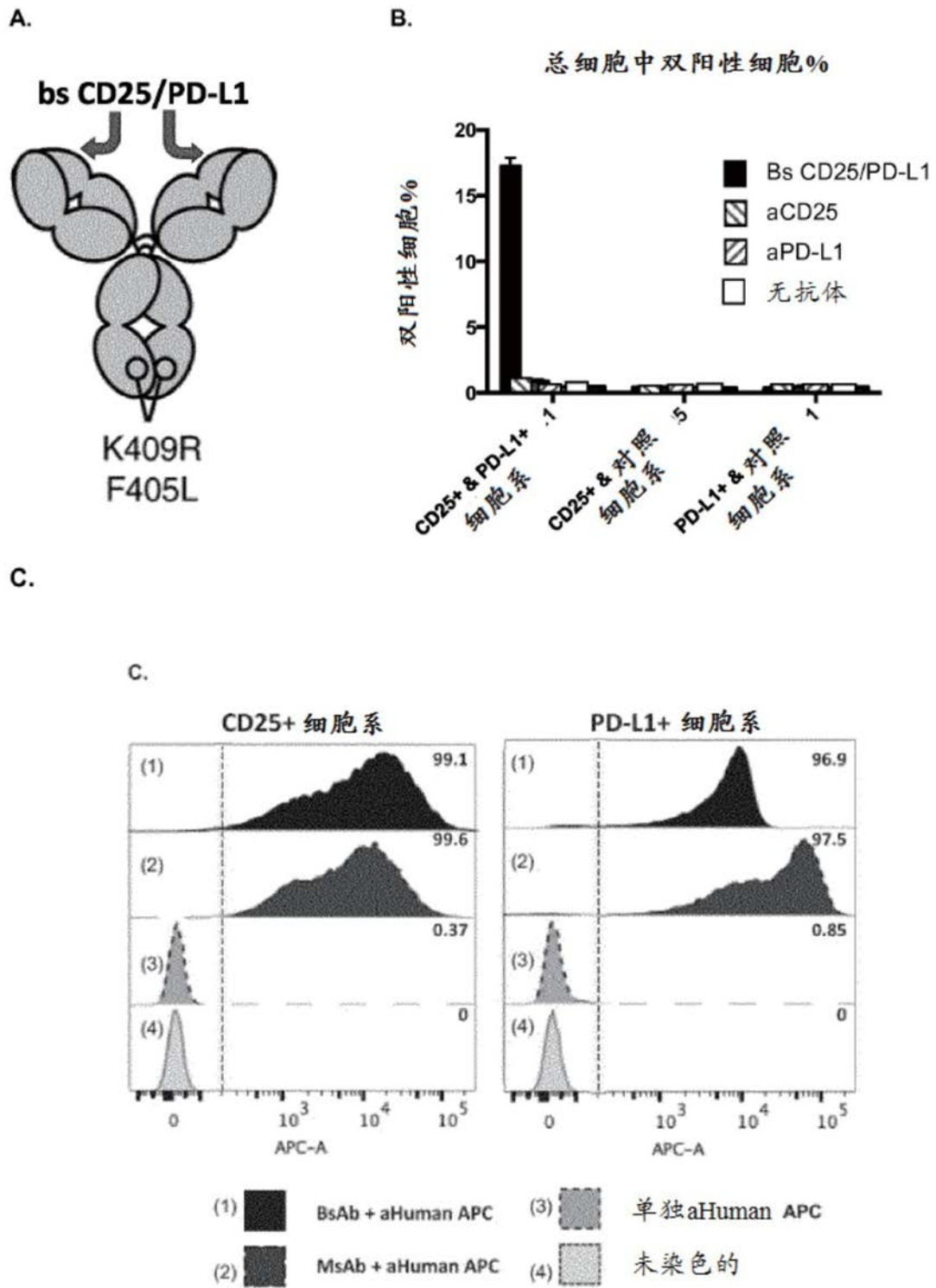


图16

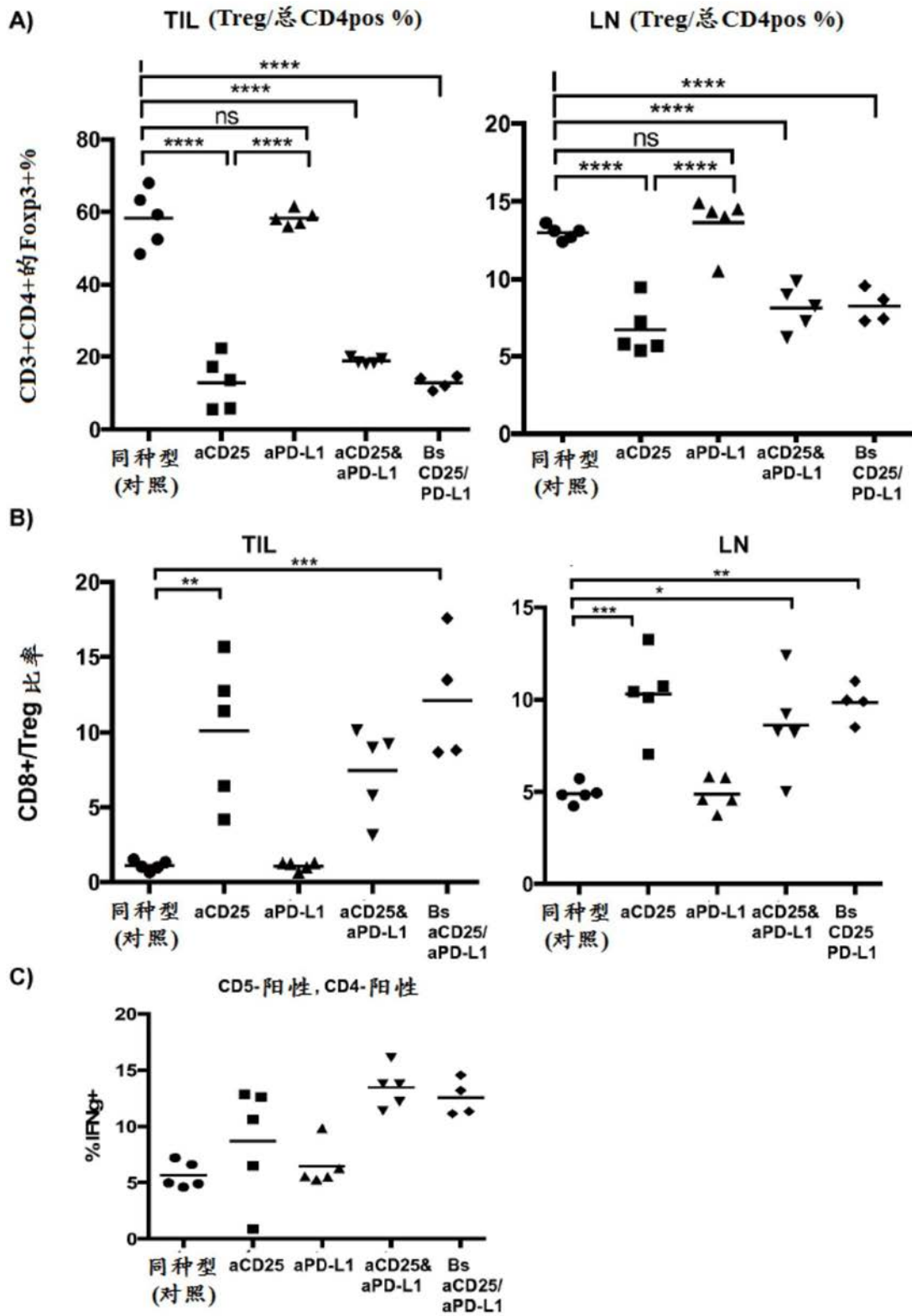


图17