(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119818670 A
(43)申请公布日 2025.04.15

(21)申请号 202411827485.1

(22)申请日 2019.09.27

(30)优先权数据
62/737,155 2018.09.27 US

(62)分案原申请数据
201980076608.3 2019.09.27

(71)申请人 MUSC研究发展基金会
地址 美国南卡罗来纳州

(72)发明人 N·德摩尔

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

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

权利要求书1页 说明书27页 附图13页

(54)发明名称

治疗癌症的药物组合

(57)摘要

本文提供了一种药物组合,其包含SFRP2拮抗剂和PD-1抗体拮抗剂。本发明还提供了一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的SFRP2拮抗剂和PD-1拮抗剂。

CN 119818670 A

1.一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂和治疗有效量的PD-1拮抗剂。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述施用是同时施用或顺序施用。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂是:

a.特异性结合SFRP2、CD38和/或PD-1受体并抑制其激活的抗体或抗体的抗原结合片段,或者

b.特异性结合SFRP2和/或CD38配体并抑制所述SFRP2、CD38和/或PD-1配体结合SFRP2、CD38和/或PD-1受体的所述SFRP2、CD38和/或PD-1受体的可溶形式。

4.根据权利要求1所述的方法,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂是SFRP2、CD38和/或PD-1单克隆抗体(mAb)。

5.根据权利要求4所述的方法,其中所述SFRP2单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述PD-1拮抗剂是:

a.特异性结合PD-1受体并抑制其激活的抗体或抗体的抗原结合片段,或者

b.特异性结合PD-1配体并抑制所述PD-1配体与PD-1受体结合的所述PD-1受体的可溶形式。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述PD-1配体是PD-L1或PD-L2。

8.根据权利要求1所述的方法,其中所述PD-1拮抗剂是PD-1单克隆抗体。

9.根据权利要求1所述的方法,其中所述PD-1拮抗剂是纳武单抗。

10.根据权利要求1所述的方法,其中所述PD-1拮抗剂是派姆单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗、西米普利单抗或阿特珠单抗。

治疗癌症的药物组合

[0001] 本申请是申请日为2019年9月27日、申请号为2019800766083、发明名称为“治疗癌症的药物组合”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2018年9月27日提交的美国临时申请号62/737,155的优先权,其全部公开内容通过引用特此并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及一种用于治疗癌症的疗法,其包括将SFRP2拮抗剂作为单一疗法或与PD-1拮抗剂组合同时或顺序地施用至有需要的患者。

[0005] 出于所有目的将本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他参考文献通过引用以其整体并入本文,并且其程度如同明确地且单独地指出出于所有目的将每个单独的出版物、专利、专利申请或其他参考文献通过引用以其整体并入一般。本文中对参考文献的引用不应被解释为承认这是本发明的现有技术。

背景技术

[0006] Wnt配体是分泌的糖蛋白,其通过与细胞表面G蛋白偶联的跨膜受体(称为卷曲受体)结合来激活下游效应子。正常的胚胎发育中涉及Wnt信号传导的激活,但这种途径的调节异常与各种癌症的肿瘤进展有关(1、2)。分泌的卷曲相关蛋白(SFRP)先前被认为是经典Wnt-β-连环蛋白途径(1)的抑制剂,表明SFRP2可能是肿瘤抑制因子。然而,若干项另外的研究已展示,SFRP2可充当β-连环蛋白激动剂而不是拮抗剂(3-7),表明其在肿瘤促进方面起作用。

[0007] 现在大量证据有力地支持SFRP2在乳腺癌(5,8-11)、血管肉瘤(9,10)、骨肉瘤(12)、横纹肌肉瘤(13)、腺泡状软组织肉瘤(14)、恶性胶质瘤(15)、多发性骨髓瘤(16)、肾细胞癌(2)、前列腺癌(17)、肺癌(18)和黑色素瘤(19)中促进肿瘤生长的贡献。此外,体内SFRP2分子成像展示SFRP2表达随肿瘤大小而成比例增加(20),并且本发明人展示鼠SFRP2单克隆抗体抑制体内血管肉瘤和乳腺癌生长(21)。此外,Techavichit等人展示,SFRP2在转移性骨肉瘤中高度过表达,并且在低转移性骨肉瘤细胞中的过表达增加了体内转移,而在高转移性骨肉瘤中敲低SFRP2降低了体外细胞迁移和侵袭(12)。除SFRP2对肿瘤细胞的直接作用之外,SFRP2还参与肿瘤血管新生(9、10、19、22-24)。因此,SFRP2在直接激活肿瘤生长中起双重作用并且在激活血管新生中起次要作用。

[0008] 在内皮细胞中,SFRP2激活非经典Wnt/Ca^2途径,而不是经典β-连环蛋白途径,以刺激血管新生(22、24)。Wnt/Ca^{2+}途径通过激活的G蛋白和磷脂酶来介导。这导致胞质游离钙的短暂增加和磷酸酶钙调神经磷酸酶的激活,其将激活的T细胞的核因子(NFAT)去磷酸化,然后从胞质易位至核。越来越多的数据支持NFAT在介导肿瘤生长(包括细胞生长、存活、侵袭和血管新生)中的关键作用(25)。NFAT蛋白还在免疫系统的发育和功能(包括T细胞的激活)起重要作用。具体地说,核NFAT与其他转录因子合作以调节免疫系统功能中所涉及的一系

列基因(26),包括IL2和环加氧酶2(27)。

[0009] 组合疗法

[0010] 施用两种药物来治疗给定病状(如癌症)产生许多潜在的问题。两种药物之间的体内相互作用是复杂的。任何单一药物的作用都与其吸收、分布和消除有关。当将两种药物引入至体内时,每种药物都可能影响另一种药物的吸收、分布和消除,并且因此改变另一种药物的作用。例如,一种药物可以抑制、激活或诱导参与消除另一种药物的代谢途径的酶的产生(44)。在一个例子中,已通过实验展示了组合施用醋酸格拉替雷(GA)和干扰素(IFN)可消除任何一种疗法的临床有效性(49)。在另一个实验中,报道了在与IFN-β的组合疗法中添加泼尼松拮抗其上调物作用(48)。因此,当施用两种药物来治疗相同病状时,无法预测在受试者中每种药物将补充另一种药物的治疗活性,对其没有影响还是对其造成干扰。

[0011] 两种药物之间的相互作用不仅可能影响每种药物的预期治疗活性,而且这种相互作用可能增加毒性代谢物的水平(44)。这种相互作用还可能升高或降低每种药物的副作用。因此,当施用两种药物来治疗疾病时,无法预测每种药物的副作用谱会发生什么变化。在一个例子中,观察到那他珠单抗和干扰素β-1a的组合增加了意料之外的副作用的风险(47、45、46)。

[0012] 此外,难以准确地预测这两种药物之间的相互作用的影响将何时会变得明显。例如,药物之间的代谢相互作用可能在初始施用第二种药物时、在两种药物达到稳态浓度之后或在停用其中一种药物时变得明显(44)。

[0013] 因此,提交时的最新技术为,在可获得组合研究的结果之前,无法以任何合理的确定性预测两种药物的添加或组合疗法(特别是SFRP2拮抗剂连同PD-1拮抗剂)的效果。

发明内容

[0014] 本发明涉及一种药物组合,其包含治疗有效量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂和治疗有效量的PD-1拮抗剂。本发明还涉及一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者同时或顺序施用治疗有效量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂和治疗有效量的PD-1拮抗剂。本发明还涉及一种用于治疗某些癌症的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂。

附图说明

[0015] 下文描述的附图仅出于说明性目的,且不意图限制本发明的范围。

[0016] 图1:将gp100反应性小鼠脾T细胞单独或在存在Hs578T(上行)或RF420细胞(下行)的情况下培养3天,并且处理3天。通过FACS分析测量每个条件的强度。这项实验使用抗CD3和抗CD28抗体(TCR刺激)作为阳性对照。压制百分比是基于分裂指数法计算的。分裂指数是通过增殖指数乘以分裂细胞的百分比来计算的,因此表示整个群体的分裂状态。实验重复三次。代表性重叠呈现在左边,而所有重复的累积数据呈现在柱状图中(*p<0.01)。

[0017] 图2:A)FZD5蛋白存在于T细胞中。B-C)T细胞用SFRP2(30nM)处理1h,并且分离出(B)核和(C)胞质级分。用针对指示的蛋白标志物的抗体对样本进行探测。D)将T细胞用抗原gp100(0.87μM)或hSFRP2 mAb(10μM)单独或组合处理60min,并且分离核级分。将SFRP2处理细胞中NFATc3的蛋白水平与未处理细胞相比较。A-C)肌动蛋白:胞质级分的上样对照;组蛋

白H3和TATA:核级分的上样对照。B-D)使用ImageJ进行密度测定,并且通过将平均强度乘以每个条带的表面来计算密度。上样对照用于消除样本间可变性。通过将每个值针对未处理的对照(B-D)或抗原处理的样本(D)归一化来获得最终结果。

[0018] 图3.A)用IL2、IL2+TCR抗原、IL2+TCR抗原+TGFb处理脾T细胞。或IL2+TCR抗原+TGFb和hSFRP2 mAb。提取蛋白裂解物并针对SFRP2进行蛋白质印迹探测。这展示,SFRP2在TCR和TGF b的情况下增加,在hSFRP2mAb的情况下降低。B)NAD+浓度将小鼠脾细胞用IL-2(6,000u/孔)、用或不用TCR/TGFβ(5ng/ml)以及用或不用hSFRP2 mAb(10nM)处理3天(每组n=3)。与未处理的对照相比,hSFRP2 mAb使NAD+浓度增加(*p=0.02)。C)CD38+细胞数(Z轴)。如上文处理细胞,但处理36小时。在添加TCR/TGFβ的情况下,CD38+细胞增加,这被hSFRP2 mAb显著抑制(n=3,**p<0.001)。

[0019] 图4.SFRP2 mAb抑制T细胞中的PD-1。将脾T细胞用单独的IL2、或IL2与TCR抗原和TGFB、或IL2与TCR抗原和TGFB和hSFRP2 mAb处理。通过FACS分析细胞。TCR和TGFB增加PD-1柱状图,这被hsFRP2 mAb逆转。

[0020] 图5.A)将骨肉瘤RF420细胞静脉内注射于C57BL6小鼠体内。用IgG1对照或hSFRP2 mAb(4mg/kg,每3天)治疗,注射肿瘤细胞之后10天开始。3周后,将动物安乐死,切除它们的肺并对表面结节进行计数(*:p≤0.0001;n=12)。B)有肿瘤转移的代表性肺。C)从注射RF420细胞并用IgG1对照或hSFRP2 mAb治疗的C57BL/6小鼠的脾脏分离的T细胞。用CD38和荧光染料将细胞染色,并且通过FACS分析平均荧光强度(MFI)。柱状图展示对于每种治疗,从自4个不同脾脏中分离出的T细胞获得的荧光测量值(n=4)。在脾细胞和TIL二者中,使用hSFRP2 mAb时CD38具有统计学差异(*p≤0.001)。

[0021] 图6.将RF420小鼠骨肉瘤细胞注射于C57BL/6小鼠尾静脉中。第7天开始,用IgG1对照、hSFRP2 mAb、小鼠PD-1mAb或两种抗体的组合治疗小鼠21天。将小鼠安乐死并收获肺。通过H&E对每组中表面转移和微转移的数量进行计数。在PD-1mAb治疗的情况下,转移数没有减少。在作为单一疗法的hSFRP2的情况下,转移数显著减少(p<0.001),且在组合的情况下进一步促进所述减少(p<0.001)。

[0022] 图7:人源化SFRP2 mAb体外活性。(A)浓度-反应曲线EC_{50}:半最大有效浓度:Kd:平衡解离常数;希尔:希尔系数。(B)柱状图;(C-H)柱状图,其展示在Hs578T乳腺癌细胞(C-E)和SVR血管肉瘤细胞(F-H)中,递增浓度的hSFRP2 mAb(0至10μM)对凋亡(C、F;n=8)和坏死(D、G;n=8)、增殖(E、H;n=12)的作用。*:p≤0.05;**:p≤0.001。用Cyquant®测量增殖,同时使用膜联蛋白V和碘化丙啶测量凋亡和坏死。凋亡和坏死的结果是2个独立实验的汇编,每个实验包含4个孔,n=8。增殖呈现的结果是3个实验的汇编,每个实验包含4个重复(n=12)。

[0023] 图8:人源化SFRP2 mAb在血管肉瘤和乳腺癌中肿瘤生长中的作用。A)AUC:曲线下面积;T 1/2:半衰期;CL:清除率;Vd:分布体积;Cmax:最大血清浓度。每个数据点表示至少3个独立样本的测量值的平均值±SEM(每个时间点n=3)。A-C)天数是从基线日期起计数,所述基线日期是自肿瘤接种起30天。

[0024] 图9:人源化SFRP2 mAb处理促进肿瘤的凋亡。上部柱状图展示与IgG1对照处理的肿瘤(黑色柱)相比,用hSFRP2 mAb处理的肿瘤中凋亡细胞数量增加(白色柱)。*:P≤0.05。下部图像:将石蜡包埋的SVR(上图)和Hs578T(下图)肿瘤切片并处理以用于TUNEL染色。对

每个肿瘤,拍摄总计5个视野,计数每个视野中凋亡细胞(棕色)的数量,并对每个肿瘤取平均值。将每种处理总计10个肿瘤(n＝10)用于分析。

[0025] 图10:人源化SFRP2 mAb降低转移性骨肉瘤生长。A)治疗后肺表面结节数。B)从用IgG1对照和hSFRP2 mAb治疗的小鼠中收获脾细胞和TIL并进行流式细胞术。

[0026] 图11:人源化SFRP2 mAb和纳武单抗的组合抑制转移性骨肉瘤生长。A)各种治疗后肺表面结节数。B)图展示对于每种治疗,从自4个不同脾脏中分离出的T细胞获得的荧光测量值(n＝4),***p≤0.001。平均荧光强度(MFI)。

[0027] 图12:使用变体抗体的SFRP2竞争ELISA。

[0028] 图13:SDS Page。1μg纯化的先导hSFRP2 mAb在4-12％ NuPAGE-SDS凝胶上。

[0029] 图14:健康供体T细胞增殖对测试抗体的应答。

具体实施方式

[0030] 应当理解,本文所使用的术语是出于描述特定实施方案的目的,而不意图进行限制。此外,尽管在本发明的实践或测试中可以使用与本文描述的方法、装置和材料类似或等同的任何方法、装置和材料,但现在描述某些方法、装置和材料。

[0031] 本发明提供一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用一定量的SFRP2拮抗剂和一定量的PD-1拮抗剂,其中所述量当一起服用时对所述受试者有效。本发明还提供了一种药物组合,其包含一定量的SFRP2拮抗剂(如SFRP2 mAb)和一定量的PD-1拮抗剂(如抗PD-1抗体)。在一个实施方案中,提供了一种新型人源化SFRP2单克隆抗体(hSFRP2 mAb),其在体内减少脾细胞和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中的CD38,并且在抑制体内肿瘤生长方面具有优异的与PD-1抗体的伴随作用。在另一个实施方案中,人源化SFRP2单克隆抗体降低体外淋巴细胞中的PD-1。因此,本发明的hSFRP2 mAb在多种细胞类型中通过抑制非经典WNT途径来影响细胞功能。

[0032] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的SFRP2拮抗剂、CD38拮抗剂和/或PD-1拮抗剂以及治疗有效量的PD-1拮抗剂。

[0033] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的SFRP2拮抗剂、CD38拮抗剂和PD-1拮抗剂以及治疗有效量的PD-1拮抗剂。

[0034] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的SFRP2拮抗剂和/或CD38拮抗剂以及治疗有效量的PD-1拮抗剂。

[0035] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的SFRP2拮抗剂和CD38拮抗剂以及治疗有效量的PD-1拮抗剂。

[0036] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的SFRP2拮抗剂或CD38拮抗剂以及治疗有效量的PD-1拮抗剂。

[0037] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的SFRP2拮抗以及治疗有效量的PD-1拮抗剂。

[0038] 在一个实施方案中,SFRP2拮抗剂是:(a)特异性结合SFRP2受体并抑制其激活的抗体或抗体的抗原结合片段;或者(b)特异性结合SFRP2配体并抑制SFRP2配体结合SFRP2受体

的SFRP2受体的可溶形式。

[0039] 在一个实施方案中,PD-1拮抗剂是:(a)特异性结合PD-1受体并抑制其激活抗体或抗体的抗原结合片段;或(b)特异性结合PD-1配体并抑制PD-1配体结合PD-1受体的PD-1受体的可溶形式。

[0040] 肉瘤是一组异质性恶性肿瘤,其包括>50种不同的亚型,每一种均具有独特的临床和病理特质。一般来讲,有50%的死亡率,并且大多数的治愈是用伴有或不伴有放射治疗的完全手术切除来实现的。针对不可切除或转移性疾病的化学治疗剂的结果令人失望,其长期益处极小并且转移性疾病患者的5年存活率仅为15%(34)。多柔比星的反应率为20%至25%。最近正在研究将PD-1抑制剂用于肉瘤。在对28名用纳武单抗治疗的转移性软组织肉瘤患者的回顾性研究中,50%患者具有部分反应或稳定疾病(35)。虽然靶向剂在肉瘤中有一定活性,但是改善的治疗剂和新型治疗剂组合对于改善反应和结果来说是必要的。在此研究中,发明人报道了人源化SFRP2 mAb的开发,其不具有免疫原性并且以高亲和力结合SFRP2。hSFPR2 mAb不仅在三种肿瘤细胞系(血管肉瘤、骨肉瘤和乳腺癌肉瘤)中作为单一药剂压制肿瘤生长,而且在骨肉瘤中这种作用远优于单独的PD-1抑制剂。

[0041] 在黑色素瘤、非小细胞肺癌和肾癌患者的III期试验中,阻断PD-1受体或其配体PD-L1均改善了总体生存率。早期研究表明,PD-1途径阻断可能有益于许多其他癌症类型的患者子集。然而,大多数患者对PD-1途径阻断没有反应,因此迫切需要对提高反应率的了解(36)。

[0042] 尽管本发明人和其他人先前已展示了SFRP2对血管新生和肿瘤细胞的作用(9、10、19、20、22、24),但本发明人的目前研究揭示了一种新的机制:SFRP2不仅在内皮细胞和肿瘤细胞中,而且在T细胞中刺激NFAT。鉴于CD4和CD8 T-细胞的TCR刺激之后的PD-1诱导需要NFAT,由于钙调神经磷酸酶/NFAT途径抑制剂环孢菌素A能够阻断PD-1(37、38),所以本发明人假设阻断SFRP2将减少效应T-细胞的消耗并得到更好的肿瘤控制。本发明人的数据展示,尽管消耗标志物CD5和CD103表达没有改变,但非经典外核苷酸酶CD38的表达减少,最近也已经展示其在T细胞上的表达与肿瘤控制呈负相关(39)。CD38调节抗肿瘤T细胞应答,并且基因切除或抗体介导的对T细胞上CD38的靶向改善了肿瘤控制。此外,还展示了CD38表达减少的T细胞仍维持高效应细胞因子分泌能力,并且尽管表达PD-1但没有功能失调。还展示了CD38表达在具有固定染色质状态的不可重编程的$PD1^{hi}$功能失调T细胞上高表达(40)。此外,组合的PD-1和CTLA-4阻断根除了小鼠的CD38缺陷性肿瘤,并且用组合的PD-1和CTLA-4阻断抗体治疗的荷瘤小鼠通过CD38的上调产生抗性(41)。因此,降低CD38的表达可拯救T细胞免于肿瘤诱导的消耗。

[0043] 由于已展示钙和NFAT信号传导调节各种细胞类型中的CD38表达(42),所以有可能其对SFRP2的抑制导致T细胞中的Ca2+/NFAT信号传导降低,从而导致CD38表达减少。在B细胞中,已报道NFATc1对于CD38表达来说至关重要(43),这使得发明人假设hSFRP2 mAb可通过其对T细胞中NFATc3的抑制作用来减少CD38。然而,本发明人的数据支持SFRP2与PD-1一起的抑制得到更好的肿瘤控制,这可能是由于同时靶向T细胞中因CD38所致的免疫抑制减少和肿瘤中的Wnt信号传导途径所致。在没有本发明人的数据的情况下,没有理由期望这种组合有更好的肿瘤控制。

[0044] 在一个实施方案中,如果与对应的健康受试者或不具有增加的CD38和/或PD-1表

达的癌症受试者相比,受试者体内的任何细胞(例如,T细胞)具有更多CD38和/或PD-1表达,那么受试者具有此类增加的CD38和/或PD-1表达。

[0045] 定义

[0046] 冠词“一个/一种(a和an)”在本公开文本中用于指一个/一种或多于一个/多于一种(即,至少一个/至少一种)所述冠词的语法宾语。

[0047] “受试者”是人,并且术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。

[0048] 关于受试者的术语“治疗”涵盖例如诱导疾病或障碍的抑制、消退或停滞;或治愈、改进或至少部分改善病症;或缓和、减轻、压制、抑制疾病或障碍,降低其严重性,消除或基本上消除或改善其症状。“抑制”受试者的疾病进展或疾病并发症意指预防或减少受试者的疾病进展和/或疾病并发症。

[0049] 与癌症有关的“症状”包括与癌症有关的任何临床或实验室表现,并且不限于受试者可感觉或观察到的那些。

[0050] “向受试者施用”或“向(人)患者施用”意指向受试者/患者给予、分配或应用药剂、药物或药品以缓解、治愈或减少与病症(例如,病理病症)有关的症状。施用可以是定期施用。

[0051] 如本文所用,“定期施用”意指间隔一段时间的重复/反复施用。施用之间的时间段优选每次一致。定期施用可包括例如每天一次、每天两次、每天三次、每天四次、每周、每周两次、每周三次、每周四次等施用。

[0052] 如本文所用,“单位剂量(unit dose)”、“单位剂量(unit doses)”和“一个或多个单位剂型”意指一个或多个单一药物施用实体。

[0053] 如本文所用,当提及PD-1拮抗剂和/或SFRP2拮抗剂的量时,“有效的”或“治疗有效的”是指PD-1拮抗剂和/或SFRP2拮抗剂的足以产生所需治疗反应的量。在某些实施方案中,有效量是指在必需剂量下并且持续必需的时间段有效实现所需治疗或预防结果的量。本发明的SFRP2拮抗剂和/或PD-1/PD-L1拮抗剂或抑制剂的治疗有效量可以根据诸如以下的因素而变化:疾病状态、个体的年龄、性别和体重以及一种或多种抗体诱发个体的所需反应的能力。治疗有效量涵盖治疗有益作用胜过一种或多种抗体的任何毒性或有害作用的量。在一个实施方案中,当组合施用时,SFRP2拮抗剂的量和PD-1拮抗剂的量对治疗受试者有效。根据某些实施方案,本发明的抗体的施用量为0.1 mg/kg体重至100mg/kg体重。根据其他实施方案,本发明的抗体的施用量为0.5mg/kg体重至20mg/kg体重。根据另外的实施方案,本发明的抗体的施用量为1.0mg/kg体重至10mg/kg体重。

[0054] 本说明中所用一般术语的以下缩写,无论是所讨论术语单独出现或与其他基团组合出现,均适用:

[0055] 曲线下面积(AUC);牛血清白蛋白(BSA);钙(Ca^{2+});羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE);清除率(CL);解离常数(Kd);酶联免疫吸附测定(ELISA);胎牛系统(FBS);荧光激活细胞分选(FACS);卷曲5(FZD5);人源化SFRP2单克隆抗体(hSFRP2 mAb);人重组分泌的卷曲相关蛋白2(hrSFRP2);辣根过氧化物酶(HRP);半最大有效浓度(EC50);静脉内(i.v.);腹膜内(i.p.);改良伊格尔基础培养基(DMEM);平均荧光强度(MIF);非房室分析(NCA);激活的T细胞的核因子(NFAT);药代动力学(PK);程序性细胞死亡蛋白1(PD-1);分泌的卷曲相关蛋白2(SFRP2);T细胞受体(TCR);终末半衰期(T1/2);以及分布体积(Vd)。

[0056] 本发明的组合可与至少一种如本文所述的药学上可接受的载体、添加剂、佐剂或媒介物一起配制以用于其同时、单独或顺序施用。因此,可施用两种活性化合物的组合:

[0057] • 作为同一药物配制品的一部分的组合,然后同时施用两种活性化合物,或

[0058] • 作为两个单元的组合,每个单元具有一种活性物质,从而产生同时、顺序或单独施用的可能性。

[0059] 如本文所用,“组合”是指通过同时或同时期施用来集合用于疗法的试剂。同时施用是指施用PD-1拮抗剂和SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的混合物(无论是真正的混合物、悬浮液、乳液还是其他物理组合)。在这种情况下,组合可以是PD-1拮抗剂和SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的混合物或单独容器,在即将施用之前将它们组合。同时期施用或并行施用是指在同一时间、或者在足够接近使得观察到相对于单独PD-1拮抗剂或单独SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的活性的协同活性的时间、或者在时间上足够靠近仅以允许每种药剂的单独治疗效果叠加,来单独施用PD-1拮抗剂和SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂。

[0060] 如本文所使用,“添加”或“添加疗法”意指用于治疗的试剂的集合,其中接受治疗的受试者开始一种或多种试剂的第一治疗方案,之后开始除第一治疗方案之外的一种或多种不同试剂的第二治疗方案,使得疗法中所用的所有试剂不是都在同一时间开始。例如,向已经接受SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂疗法的患者添加PD-1拮抗剂疗法。

[0061] 任何已知的PD-1拮抗剂都可以用于本发明的实践中,本领域中已知并且公开了多种PD-1拮抗剂。PD-1拮抗剂优选在结合之后中和生物功能。PD-1拮抗剂优选为人PD-1拮抗剂。任选地,PD-1拮抗剂可以是抗体,如单克隆抗体或其片段;嵌合单克隆抗体(如人-鼠嵌合单克隆抗体);完全人单克隆抗体;重组人单克隆抗体;人源化抗体片段;可溶性PD-1拮抗剂,包括小分子PD-1阻断剂。任选地,PD-1拮抗剂是单克隆抗体的功能片段或包含功能片段的融合蛋白,如Fab、F(ab')2、Fv,并且优选为Fab。优选地,片段被聚乙二醇化或包封(例如,为了稳定性和/或缓释)。PD-1拮抗剂也可以是骆驼科动物抗体。如本文所用,PD-1拮抗剂包括但不限于PD-1受体抑制剂。

[0062] PD-1拮抗剂可选自例如纳武单抗、派姆单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗、西米普利单抗或阿特珠单抗或其功能片段中的一种或组合。

[0063] 任何已知的SFRP2和/或CD38拮抗剂都可以用于本发明的实践中,本领域中已知并且公开了多种SFRP2和/或CD38拮抗剂。SFRP2和/或CD38拮抗剂优选在结合之后中和生物功能。SFRP2和/或CD38拮抗剂优选为人SFRP2和/或CD38拮抗剂。任选地,SFRP2和/或CD38拮抗剂可以是抗体,如单克隆抗体或其片段;嵌合单克隆抗体(如人-鼠嵌合单克隆抗体);完全人单克隆抗体;重组人单克隆抗体;人源化抗体片段;可溶性SFRP2和/或CD38拮抗剂,包括小分子SFRP2和/或CD38阻断剂。任选地,SFRP2和/或CD38拮抗剂是单克隆抗体的功能片段或包含功能片段的融合蛋白,如Fab、F(ab')2、Fv,并且优选为Fab。优选地,片段被聚乙二醇化或包封(例如,为了稳定性和/或缓释)。SFRP2和/或CD38拮抗剂也可以是骆驼科动物抗体。如本文所用,SFRP2和/或CD38拮抗剂包括但不限于SFRP2和/或CD38受体抑制剂。例如,SFRP2拮抗剂披露于美国专利号8,734,789和9,073,982中,其内容通过引用特此并入。

[0064] 现在将在下文实施例中进一步描述本发明,这些实施例仅意在作为说明而不限制本发明的范围。

[0065] 实施例

[0066] 通过以下实施例进一步说明本公开文本,所述实施例不应解释在范围或精神上将本公开文本限制在本文所述的具体程序内。应当理解,提供这些实施例是为了说明某些实施方案,并且并非意在借此限制本公开文本的范围。应进一步理解,在不背离本公开文本的精神和/或所附权利要求书的范围的情况下,可能不得不诉诸本领域技术人员可能提出的各种其他实施方案、修改及其等同物。

[0067] 实施例1

[0068] 人源化SFRP2 mAb拯救肿瘤细胞对T细胞增殖的抑制。由于SFRP2激活NFATc3,并且NFAT蛋白调节T细胞增殖(28),所以本发明人检查在用TCR刺激(抗CD3/抗CD28抗体)激活之后,hSFRP2 mAb是否影响T细胞增殖(图1)。将T细胞单独、与TCR刺激、与TCR刺激+肿瘤细胞、与TCR刺激+肿瘤细胞+IgG1对照或与TCR刺激+肿瘤细胞+hSFRP2 mAb一起孵育。与在单独T细胞群体中观察到的增殖相比,TCR抗原(阳性对照)使增殖增加。在存在Hs578T(人化生型乳腺癌细胞系)的情况下,增殖减少(图1)。向共培养物中添加IgG1对照没有影响。相比较而言,在共培养物中添加hSFRP2 mAb部分拯救了T细胞增殖。当将T细胞在存在RF420小鼠骨肉瘤细胞的情况下共培养时也看到这种效果,其中hSFRP2 mAb的存在显著拯救肿瘤细胞介导的增殖压制(图1)。同样,与在存在RF420细胞的情况下用TCR处理的T细胞相比,添加IgG1对照不影响增殖。

[0069] SFRP2诱导T细胞中的Wnt信号传导。FZD5受体结合内皮细胞中的SFRP2以刺激NFATc3激活和血管新生(23)。然而,先前尚没有评价SFRP2在T细胞激活和Wnt信号传导方面的作用。T细胞裂解物的蛋白质印迹分析展示FZD5蛋白存在于T细胞中(图2A)。用SFRP2(30nM)刺激小鼠脾T细胞1小时,并且分离核和胞质级分。在SFRP2处理的情况下,在胞质级分中,CD38增加(图2B)。在SFRP2处理的情况下,在核级分中,NFATc3增加(图2C)。接下来,在有或没有hSFRP2 mAb的情况下,用同源抗原处理T细胞三天,并收集核级分。当用同源抗原刺激时,核级分中的NFATc3增加,并且在hSFRP2mAb处理的情况下,核级分中的NFATc3减少(图2D)。

[0070] hSFRP2 mAb抑制T细胞中的PD-1和CD38并恢复NAD。接下来,评价体外hSFRP2 mAb处理T细胞是否抑制TGFβ暴露T细胞中的CD38并恢复NAD+水平。TGFβ是存在于肿瘤微环境中的细胞因子,其增加来自T细胞的CD38。图3A通过蛋白质印迹展示用IL2、TCR抗原和TGFβ处理脾T细胞导致SFRP2增加。FACS分析展示在添加TCR/TGFβ的情况下,CD38+细胞统计学显著地增加,这被hSFRP2 mAb显著抑制(图3c,$n=3$,$p<0.001$)。与此同时,在hSFRP2处理的情况下NAD+浓度反向增加(图3b,$n=3$,$p=0.02$)。此外,考虑SFRP2 mAb是否直接抑制脾T细胞中的PD-1。用IL2、TCR抗原和TGFβ处理CD8+和CD4+脾T细胞使PD-1增加。这被SFRP2 mAb的添加逆转(图4)。

[0071] 实施例2

[0072] 骨肉瘤的预后和治疗选项。骨肉瘤(OS)是最常见的原发性骨恶性肿瘤,通常影响青少年和青年。如果可行,手术切除原发性肿瘤,且递送新辅助化疗和辅助化疗。然而,即使使用化疗,也仅有三分之二的患有初始可切除疾病的患者被治愈,而患有转移性或复发性肿瘤的患者的长期生存率<30%。肺在约80%的转移性疾病的病例中受累,并且随后的呼吸窘迫是大多数死亡的原因(29)。尽管免疫疗法在一些肿瘤类型中展示了功效,但在II期试验(SARC028)中,施用派姆单抗导致在骨肉瘤的治疗中缺乏功效,在所述试验中,仅5%转移

性骨肉瘤患者对派姆单抗有客观反应(30)。30多年来,新活性剂的缺乏阻碍了增加骨肉瘤患者存活率的任何进展,并且迫切需要新型治疗方法(31)。

[0073] 越来越多的证据强力支持分泌的SFRP2对骨肉瘤转移的贡献。与非转移性骨肉瘤相比,SFRP2在转移性骨肉瘤中过表达(32)。在OS患者样本中SFRP2的高表达与低存活率相关,并且SFRP2过表达压制正常成骨细胞分化,促进OS特征并有利于血管新生(33)。功能性研究显示SFRP2在局部性人和小鼠OS细胞中的稳定过表达显著增加体外细胞迁移和侵袭能力并且增强体内转移潜能。在转移性OS细胞中敲低SFRP2的另外研究展示体外细胞迁移和侵袭能力降低,因此确证通过SFRP2进行的关键生物学表型(12)。因此,SFRP2已成为骨肉瘤潜在的治疗靶标。还展示SFRP2有助于乳腺癌(5、8-11)、血管肉瘤(9、10)、横纹肌肉瘤(13)、腺泡状软组织肉瘤(14)、恶性胶质瘤(15)、多发性骨髓瘤(16)、肾细胞癌(2)、前列腺癌(17)、肺癌(18)和黑色素瘤(19)的肿瘤生长。考虑到免疫疗法在骨肉瘤中缺乏功效以及在本申请其他地方详述的发明人的数据,发明人研究了人源化SFRP2单克隆抗体(hSFRP2 mAb)的组合是否会增强PD-1抑制剂的活性。

[0074] 人源化SFRP2 mAb抑制体内转移。为了评价hSFRP2 mAb在免疫活性小鼠中的抗肿瘤活性,在C57BL/6小鼠中的肿瘤转移RF420鼠骨肉瘤模型中测试了hSFRP2 mAb。将RF420细胞注射于C57BL/6小鼠尾静脉中。在初始注射肿瘤细胞之后7天验证肺中转移的存在。在第一个实验中,在肿瘤注射之后第10天开始用hSFRP2 mAb治疗(每3天i.v.注射4mg/kg),且与用IGg1对照治疗相比较。在终点时,与对照相比,hSFRP2 mAb治疗时肺表面结节数显著减少($n=7$,$p<0.01$,图5)。在评价细胞表面标志物的消耗时,我们注意到,与用IgG1对照治疗的小鼠相比,用hSFRP2 mAb治疗的小鼠的脾中CD38(已展示其与PD-1紧密共表达(41))显著减少($n=4$,$p<0.01$)(图5)。

[0075] 施用hSFRP2 mAb与小鼠PD-1抑制剂有效抑制体内转移性骨肉瘤生长。将RF420小鼠骨肉瘤细胞注射于C57BL/6小鼠尾静脉中。7天之后,用以下治疗小鼠:每周iv 4mg/kg IgG1对照;每3天iv 4mg/kg hSFRP2 mAb;每3天小鼠PD-1mAb(200ug/小鼠);或两种抗体的组合。治疗21天之后,对小鼠进行安乐死并收获肺。对每组中表面转移的数量进行计数。与IgG1对照相比,hSFRP2 mAb的组合使表面结节数量减少75%(图6)。

[0076] 实施例1-2的方法

[0077] 抗体和蛋白质。对照IgG1奥马珠单抗购自Novartis(巴塞尔,瑞士)。人SFRP2重组蛋白(SFRP2)如先前所述制备(23),并由北卡罗来纳大学教堂山分校的蛋白质表达和纯化核心实验室提供。人源化SFRP2单克隆抗体(hSFRP2 mAb)如先前所述并且如实施例4中所述制备,并纯化除去内毒素。

[0078] 在蛋白质印迹中使用以下一抗:兔抗CD38(#14637s)和兔抗组蛋白H3抗体(#2650s)来自Cell Signaling(丹佛斯,马萨诸塞州,美国);兔抗FZD5(#H00007855-D01P,Abnova,台北市,中国台湾);小鼠抗PD1(#66220-1,Proteintech,罗斯蒙特,伊利诺伊州,美国);兔抗NFATc3(#SAB2101578);和兔抗肌动蛋白(#A2103,Sigma-Aldrich,圣路易斯,密苏里州,美国)。二抗是:辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗小鼠(#7076,Cell Signaling);HRP缀合的抗兔(#403005,Southern Biotech,伯明翰,阿拉巴马州,美国)。对于FACS分析,大鼠抗CD38-PE抗体(#102707)来自BioLegend(圣地亚哥,加利福尼亚州,美国)。抗小鼠CD3(#BE00011)和抗小鼠CD28(#BE0015-1)来自BioXCell(西黎巴嫩,新罕布什尔州,美国)。以下

抗体购自Biolegend,圣地亚哥,加利福尼亚州,并用于流式细胞术:抗CD103(克隆2E7,目录号121435)、抗-CD5:gp100抗原片段来自AnaSpec(#AS-62589)。

[0079] 细胞培养。获得由基因工程骨肉瘤小鼠模型(32)建立的RF420和小鼠骨肉瘤细胞。在37℃下在加湿的5% CO_2-95%室内空气气氛中培养细胞。细胞系通过ATCC®认证,并且每逢体内使用它们时,由Charles River Research Animal(威明顿,马萨诸塞州,美国)测试小鼠细胞的啮齿动物病原体,包括支原体。

[0080] 通过测量羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)信号强度来进行细胞增殖的荧光激活细胞分选(FACS)分析。CFSE信号的稀释与细胞增殖的增加密切相关。根据CellTrace™CFSE细胞增殖试剂盒(Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)的说明书,用CFSE染料预标记脾T细胞。然后将细胞保持不处理,或者用可溶性抗CD3(#BE0001-1,BioXCell,西黎巴嫩,新罕布什尔州,美国;2μg/ml)/抗CD28抗体(#BE0015-1,BioXCell;2μg/ml)单独地或在以2:1比率存在肿瘤细胞(RF420或Hs578T乳腺癌-肉瘤)的情况下激活3天。此外,用对照IgG1(10μM)或用hSFRP2 mAb(10μM)处理一些共培养物。3天之后,使用共培养物的T细胞测量CFSE强度。通过FACS测量平均荧光强度(MFI),并使用FlowJo软件进行分析。

[0081] 蛋白质印迹。用或不用SFRP2(30nM)或hSFRP2 mAb(10μM)处理脾T细胞1小时。对于SFRP2,对照细胞接受单独的培养基,并且对于hSFRP2mAb实验,对照细胞接受10μM IgG1。然后以1000rpm将细胞离心10min。去除培养基,并且在处理前将细胞在-80℃下冷冻储存。如制造商手册(Pierce Biotechnology,罗克福德,伊利诺伊州)中所述,使用NE-PER核和胞质提取试剂制备核提取物。用或不用rhSFRP2(30nM)或hSFRP2 mAb(10μM)将获自转基因Pmel1小鼠(The Jackson laboratory,巴尔港,缅因州,美国)的脾T细胞处理1小时。对于rhSFRP2,对照细胞接受单独的培养基,并且对于hSFRP2 mAb实验,对照细胞接受10μM IgG1。然后以1000rpm将细胞离心10min。去除培养基,并且在处理前将细胞在-80℃下冷冻储存。如制造商手册(Pierce Biotechnology,罗克福德,伊利诺伊州)中所述,使用NE-PER核和胞质提取试剂制备核提取物。使用Bio-Rad蛋白质测定(Bio-Rad Laboratories,赫拉克勒斯,加利福尼亚州,美国)测量蛋白质浓度。将等量的蛋白质上样至SDS-PAGE凝胶上。将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜,并且使用以下一抗进行蛋白质印迹:兔抗CD38和兔抗组蛋白H3抗体、兔抗FZD5、小鼠抗PD1、兔抗NFATC3和兔抗肌动蛋白。使用以下二抗:HRP缀合的抗小鼠和HRP缀合的抗兔。使用ECL Advance底物进行可视化(GE Healthcare Bio-Sciences,皮斯卡特维,新泽西州,美国)。

[0082] 接下来,我们评价了体外hSFRP2 mAb处理是否在TGFβ暴露的T细胞中抑制CD38并恢复NAD+水平。自C57/BL6小鼠获得脾脏,并且制备单细胞悬浮液并用PBS将其再悬浮于ACK裂解缓冲液中1分钟。添加1% FCS以停止反应。一旦为单细胞悬浮液,便通过使用以下抗体的混合物,通过负向减去法(negative subtraction)分离$CD4^+$和$CD8^+$细胞:TCR119、CD25、GR1、NK1.1、CD11C、CD11B、CD19,并将所述细胞在冰上孵育15分钟。将细胞与200μL链霉亲和素结合的珠溶液一起孵育。分离之后,对细胞进行计数,并且将400,000个细胞铺板在预涂布抗CD3(2μg/mL)和抗CD28(5μg/mL)的板上。阴性对照仅含在富含IL-2的培养基中的分离细胞,并且无抗CD3/Cd28(TCR)涂布。每个具有细胞的实验孔含有TCR和IL-2(6,000U/mL)以及以下实验条件之一:hSFRP2 mAb(10uM),有或没有TGFβ(5ng/ml)。所有条件以一式三份进

行,并且培养三天。实验之后,对细胞进行计数,并且针对FACS进行染色,或者用基于NAD/NADH细胞的测定试剂盒处理以用于NAD分析。对于NAD分析,需要至少250,000个细胞,并遵循NAD方案立即处理。将细胞离心并与透化缓冲液一起在搅拌下孵育。在再一次离心之后,将样本和标准物与反应缓冲液一起在搅拌下孵育1h 30min。最后使用读板器在450nm处读取光学密度。对于FACs分析,将300,000个细胞再悬浮于PBS中,并根据制造商的方案,在Live dead染色剂中孵育,然后用PBS洗涤,旋转沉降,去除上清液。然后将细胞悬浮在抗体和染色缓冲液的主混合物(50μL/样本)中,所述混合物含有抗CD38 PE/Cy5(1/200)、抗CD4 FITC(1/100)、抗CD8 APC(1/200)、抗PD1 PE(1/200),在室温和避光下缓冲20min。最终将细胞在4%多聚甲醛中固定10-15分钟,之后再悬浮于250μL染色缓冲液中。

[0083] 体内转移性骨肉瘤生长。在第一个实验中,将无菌PBS中悬浮的RF420骨肉瘤细胞(5×10^5)通过6-8周龄C57BL/6小鼠(10只雌性和13只雄性)的尾静脉i.v.注射。第7天,处死2只小鼠,去除它们的肺,在10%福尔马林中固定,包埋于石蜡中并用苏木精和伊红染色。针对转移的存在,在显微镜下对切片进行筛选。一旦确认存在转移,则在第10天,用4mg/kg IgG1对照或4mg/kg hSFRP2 mAb治疗小鼠(n=10)。治疗3周之后,处死动物并去除肺和脾脏。然后对肺表面结节进行计数,并在治疗组之间进行比较。收集新鲜的脾脏以用于T细胞分离,以便进行流式细胞术。

[0084] 接下来,将再悬浮于无菌PBS中的RF420细胞(5×10^5)i.v.注射于购自Envigo(印第安纳波利斯,印第安纳州,美国)的6-8周龄C57Bl/6雄性和雌性小鼠(品系代码044)的尾静脉中。将小鼠随机分为4组:对照组(奥马珠单抗,n=13);hSFRP2 mAb(n=11);小鼠PD-1MAb(n=12);PD-1m Ab+hSFRP2 mAb(n=12)。肿瘤细胞接种之后10天,开始治疗。剂量、递送途径和频率如下:对照(奥马珠单抗)4mg/kg i.v.每周一次;hSFRP2 mAb 4mg/kg i.v.每3天;pd-1mab 8mg/kg腹膜内(i.p.)每3天。治疗23天之后,处死动物并切除其肺,并且对表面结节进行计数。从切除之后立即拍摄的全肺照片对表面结节进行计数。将肺固定于福尔马林中并包埋于石蜡中。将它们切片并用H&E染色。

[0085] 流式细胞术。通过在4℃下将来自在静脉中注射RF420骨肉瘤的实验的脾细胞与针对CD38的一抗在FACS缓冲液(含0.1%牛血清白蛋白(BSA)的PBS)一起孵育30min,来进行针对CD38的染色。在LSRFortessa上针对平均荧光强度(MFI)水平对样本进行筛选,并且用FlowJo软件(Tree Star,俄勒冈州)进行分析。

[0086] 统计学。使用PASS 08.0.13版进行所有检验力(power)和样本大小计算。体外实验以一式三份进行并重复三次。在技术人员不知晓实验条件的情况下收集定量测量,以减少潜在的偏差。对于两组或多组比较,分别使用双样本t检验或ANOVA进行连续测量的分组比较。

[0087] 实施例3

[0088] SFRP2 mAb的人源化。在竞争ELISA测定中,针对与SFRP2的结合,对嵌合抗体以及复合重链和轻链的组合(总计16种抗体)进行测试。具体地说,使一系列稀释的纯化全人复合IgG变体针对固定浓度的生物素化小鼠抗体竞争结合SFRP2肽B。接下来,使用链霉亲和素HRP和TMB底物检测结合的生物素化mAb 80.8.6(小鼠SFRP2 mAb)。这说明了,所有复合抗体对SFRP2的结合效率与嵌合抗体的结合效率大致相当,当与鼠抗体相比时,所有变体均展示了改善(图12)。在蛋白A琼脂糖柱上从细胞培养上清液纯化抗SFRP2的嵌合抗体和复合变

体,缓冲液交换至pH 7.4PBS中并基于预测的氨基酸序列,使用消光系数(Ec($_{0.1}$%)=1.76),通过OD_{280}nm进行定量。先导hSFRP2mAb的内毒素测试展示内毒素<0.5EU/m。先导hSFRP2 mAb的SDS-PAGE展示对应于重链和轻链的两个条带(图13)。在图13中,SDS Page。将1μg纯化的先导hSFRP2 mAb上样在4-12% NuPAGE-SDS凝胶上。上样PageRuler Plus预染色梯带,以允许确定条带的大小。泳道1用β-巯基乙醇还原;样本出现了对应于重链和轻链的两个条带。泳道2未还原。

[0089] hSFRP2 mAb的免疫原性测试。使用EpiScreen™时程T细胞测定针对22名健康供体的群组测试先导完全人源化和嵌合抗SFRP2抗体,以确定免疫原性的相对风险。在增殖测定中,在任一供体中,使用SI≥2.0,p<0.05阈值,完全人源化抗SFRP2抗体未诱导阳性应答,而嵌合抗SFRP2抗体在23%供体中诱导阳性T细胞增殖应答。用对照抗原KLH的结果展示,重复研究中的阳性与阴性结果之间有良好的相关性(<10%测定间变异性),这表明所述测定具有高再现性水平(图14)。在图14中,在与三种测试样本一起孵育之后第5、6、7和8天,对来自大量培养的PBMC取样的并评估其增殖。在该图中,使用未配对的双样本student's t检验,将显著的(p<0.05)通过虚线指示的SI≥2.0(p<0.05)的增殖应答视为阳性。

[0090] 人源化SFRP2 mAb以高亲和力结合SFRP2。为了确定先导hSFRP2 mAb与SFRP2的结合亲和力,在微板固相蛋白结合ELISA测定中,将rhSFRP2(1μM)与递增浓度的hSFRP2 mAb一起孵育。hSFRP2 mAb结合rhSFRP2的EC50为8.72nM并且Kd为74.1nM。图1A展示,人源化SFRP2 mAb以高亲和力结合rhSFRP2并产生浓度-反应曲线,所述曲线展示在ELISA测定(n=16)中,在递增浓度的hSFRP2 mAb与1μM预设浓度的rhSRP2结合之后测量的480nm吸光度。

[0091] 人源化SFRP2 mAb抑制内皮管形成、肿瘤细胞增殖并促进肿瘤细胞凋亡。与先前的报告一致;与对照细胞相比,rhSFRP2诱导分支点数量增加(n=4,p≤0.05)。图7B为展示rhSFRP2和hSFRP2 mAb对2H11内皮管形成的影响的柱状图。为了获得这个数据,将2H11细胞与以下一起孵育并用以下处理:仅IgG1对照(5μM)、或IgG1(5μM)+rhSFRP2蛋白(30nM)、或rhSFRP2(30nM)和hSFRP2 mAb(0.5至10μM)的组合。n=4,*:p≤0.05;**:p≤0.001。相反,递增浓度的hSFRP2 mAb显著抵消了rhSFRP2对管形成的影响(n=4,p≤0.05)。针对SFRP2刺激的管形成的hSFRP2 mAb抑制的IC_{50}为4.9±2μM。

[0092] 在体外在Hs578T人癌/肉瘤乳腺癌和小鼠SVR血管肉瘤细胞中评价rhSFRP2 mAb对肿瘤细胞增殖、凋亡和坏死的影响。在Hs578T乳腺癌(图7C;对于5μM和10μM hSFRP2 mAb,分别地p≤0.05和p≤0.001)和SVR血管肉瘤细胞(图7F;对于5μM和10μM hSFRP2 mAb二者,p≤0.001)中,用hSFRP2mAb处理均使肿瘤细胞凋亡显著增加,而坏死没有变化。用hSFRP2 mAb处理对SVR增殖无影响(图7H),但显著减少了Hs578T乳腺癌细胞的肿瘤细胞增殖(图7E,5μM p≤0.05,10μM p≤0.001)。

[0093] 体内hSFRP2 mAb的功效和毒性的确定。用每三天i.v.2、4、10和20mg/kg hSFRP2 mAb剂量或IgG1对照治疗接种SVR血管肉瘤细胞的小鼠,持续21天。在抗体治疗的任一小鼠中不存在体重减轻或嗜睡。即使在20mg/kg剂量下,肝或肺中也没有病理性变化。在实验结束时,各组之间的体重保持相似(对照,32.2±1.4g;2mg/kg,31.3±1.1g;4mg/kg,32.1±0.5g;10mg/kg,31.8±0.9g;以及20mg/kg,32.7±1.0g)。影响最大的剂量为4mg/kg,其中肿瘤体积减少69%(每组n=5,p=0.05)。

[0094] 为了研究抗体的药代动力学特性,通过尾静脉向裸鼠注射单剂量4mg/kg hSFRP2

mAb,并在不同时间点收集血液样本(图8)。重组hSFRP2治疗导致膜CD38和核NFATc3蛋白增加,而hSFRP2 mAb抑制核NFATc3在T细胞中的积累。图8A中的数据说明,FZD5蛋白存在于T细胞中。图8A是药代动力学曲线,其展示在单一i.v.注射4mg/kg之后,小鼠血清中hSFRP2 mAb浓度随时间而降低。抗体在动物血清中的半衰期为4.1±0.5天,最大血清浓度(Cmax)为7.8±1.0mg/L,并且清除率(CL)为13.0±0.6mL/小时。

[0095] 为了确认MTD实验中鉴定的剂量的功效,本发明人用SVR血管肉瘤肿瘤对更大数量的动物(n=10只动物/组)重复实验,并用4mg/kg hSFRP2 mAb开始治疗它们。用rhSFRP2(30nM)处理T细胞1h,并使用NE-PER试剂盒处理以分离胞质和核级分(图8B)。用针对指示的蛋白标志物的抗体探测样本,并将所处理细胞中的蛋白水平与未处理细胞中的蛋白水平进行比较。3周之后,用hSFRP2 mAb处理的肿瘤比用IgG1对照处理的肿瘤小43%(对照,1,631.3±283mm^3;hSFRP2 mAb,928.5±148mm^3;p≤0.05)。

[0096] 接下来,本发明人考虑hSFRP2 mAb是否可以影响其他肿瘤类型的生长。用hSFRP2 mAb或IGg1对照治疗具有Hs578T乳腺癌-肉瘤异种移植物的小鼠。将T细胞用抗原gp100(0.87μM)或hSFRP2 mAb(10μM)单独或组合处理60min,并且分离核级分(图8C)。将rhSFRP2处理细胞中NFATc3的蛋白水平与未处理细胞中的那些水平相比较。在每个时间点对照与每个处理组之间的比较展示,从基线起在第22天、第25天以及从第31天起的所有时间点,处理是统计学显著的(p=0.05)。事实上,hSFRP2 mAb治疗小鼠的肿瘤体积减少61%(n=11,*P<0.05)。此外,在任一治疗的小鼠中不存在体重减轻或嗜睡。

[0097] 人源化SFRP2 mAb诱导体内肿瘤细胞凋亡。hSFRP2 mAb诱导体外细胞凋亡且抑制乳腺癌细胞的增殖,并且本发明人研究了在体内是否保留这些表型。尽管与IgG1对照肿瘤相比,增殖性(Ki67阳性)细胞的比例未受hSFRP2mAb治疗影响(SVR肿瘤,23±1.6%相对于29±4.2%;Hs578T肿瘤,18±2.7%相对于18±2.8%,p=NS),但是凋亡细胞的比例在SVR肿瘤中增加188%(IgG1对照为8.4±0.9,hSFRP2 mAb肿瘤为24.2±3.5;n=10,p≤0.05)并且在Hs578T肿瘤中增加181%(IgG1对照为15.1±4.9,hSFRP2 mAb肿瘤为42.4±3.9;n=10,p≤0.05)(图9)。

[0098] 为了评价hSFRP2 mAb在免疫活性小鼠中的抗肿瘤活性,本发明人在肿瘤转移模型中在C57BL/6小鼠的RF420鼠骨肉瘤中测试了hSFRP2 mAb。将RF420骨肉瘤细胞注射于C57BL/6小鼠尾静脉中。第10天开始用IgG1对照或hSFRP2 mAb治疗。在治疗第21天对小鼠实施安乐死,并对表面结节进行计数。与对照相比,用hSFRP2 mAb治疗的小鼠的表面结节数量显著减少(n=7,p<0.01,图10A)。在评价细胞表面标志物的消耗时,本发明人注意到,与IgG对照的小鼠相比,用hSFRP2 mAb治疗的小鼠中脾细胞(n=4,p<0.01)和TIL(n=4,p<0.01)上与PD-1紧密共表达的CD38显著减少,PD-1、CD103和CD5无显著差异(n=3)(图6B)。脾细胞或TIL中其他消耗标志物如PD-1、CD103、TNFα或CD5的表达不显著(n=4,p=NS)。

[0099] 在第二个骨肉瘤实验中,将骨肉瘤RF420细胞静脉内注射于免疫活性小鼠体内。研究被分成四组。第一组每3天用i.v.4mg/kg hSFRP2 mAb治疗。还有IGg1对照组;每3天以8mg/kg i.v.施用抗PD-1抗体纳武单抗的组;以及接受hSFRP2 mAb和抗PD-1抗体二者的组。注射之后第10天开始治疗,并且3周后将动物安乐死,切除它们的肺并对表面结节进行计数(*:p≤0.0001;**:p≤0.01,n=12)。对这些组进行比较以测量肺转移的发展。与IgG1对照相比,每种单独治疗都使表面结节数减少(IgG1对照为43.6±6.8,hSFRP2mAb为18.3±3.4,

纳武单抗为16.3±1.1;p≤0.0001,图11A)。将用hSFRP2mAb与纳武单抗的组合治疗的小鼠与用IgG1对照治疗的小鼠相比较,转移病灶的发生率减少80%(IRR=0.20,95% CI=0.13至0.32;p<0.0001)。将用hSFRP2 mAb与纳武单抗的组合治疗的小鼠与用单一药剂hSFRP2 mAb治疗的小鼠相比较,转移病灶的发生率减少51%(IRR=0.49,95% CI=0.31至0.77;p=0.0021)。将用hSFRP2 mAb与纳武单抗的组合治疗的小鼠与用单一药剂纳武单抗治疗的小鼠相比较,转移病灶的发生率减少45%(IRR=0.55,95% CI=0.35至0.86;p=0.0084)(图11A)。

[0100] 本发明人测量了作为单独治疗或以组合方式给予的纳武单抗和hSFRP2mAb对小鼠T细胞中CD38水平的影响。具体地说,从C57BL/6小鼠的脾脏中分离出T细胞,所述小鼠注射了RF420细胞并用IgG1对照、hSFRP2 mAb、纳武单抗或hSFRP2 mAb与纳武单抗的组合治疗。然后用荧光染料标记的CD38将细胞染色,并且通过FACS分析平均荧光强度(MFI)。单独的纳武单抗治疗对CD38水平没有影响。然而,与获自用对照IgG抗体治疗的组的T细胞相比,hSFRP2 mAb减少了T细胞中的CD38表面表达(p<0.001,图11B),表明靶向SFRP2足以减少T细胞上的CD38表达。这些结果支持了以下主张,即hSFPR2 mAb施用可恢复T细胞免疫应答并防止肿瘤生长。应注意的是,因为纳武单抗是人抗体,所以它并非最适合于在小鼠模型中治疗。

[0101] SFRP2单克隆抗体的人源化。首先克隆了编码鼠SFRP2单克隆抗体80.8.6(21)的V区基因,并用于构建嵌合抗体,所述嵌合抗体包含鼠V区以及人IgG1重链恒定区和κ轻链恒定区。嵌合抗体以及复合重链和轻链的组合(总计16种抗体)在NS0或HEK293细胞中表达,将其纯化并在竞争ELISA测定中测试其与SFRP2肽的结合。

[0102] 免疫原性测试。使用EpiScreen™时程T细胞测定,评估了先导完全人源化抗SFRP2抗体(VH2/VK5)和参考嵌合抗SFRP2抗体的免疫原性潜力,其中使用$CD8^+$耗尽的PBMC建立大量培养,并且在添加样本之后通过掺入[^{3}H]-胸腺嘧啶在各个时间点测量T细胞增殖。使用EpiScreen™时程T细胞测定针对22名健康供体的群组测试先导完全人源化和嵌合抗SFRP2抗体,以确定非特异性免疫原性的相对风险。基于Antitope的先前研究,在最终浓度50μg/ml下测试样本,所述研究展示此饱和浓度足以刺激可检测的抗体特异性T细胞应答。为了评估每个样本的免疫原性潜力,将Episcreen™时程T细胞测定与增殖分析一起用于测量T细胞激活。由于先前没有在基于PBMC的测定中评估样本,所以确定样本对PBMC活力的任何总体毒性影响的初始评估。用测试样本培养之后7天,使用PBMC的台盼蓝染料排除来计算细胞活力。

[0103] 抗体和蛋白质。在蛋白质印迹中使用以下一抗:兔抗CD38(#14637s)和兔抗组蛋白H3抗体(#2650s)来自Cell Signaling(丹佛斯,马萨诸塞州,美国);兔抗FZD5(#H00007855-D01P,Abnova,台北市,中国台湾);小鼠抗PD1(#66220-1,Proteintech,罗斯蒙特,伊利诺伊州,美国);兔抗NFATc3(#SAB2101578);和兔抗肌动蛋白(#A2103,Sigma-Aldrich,圣路易斯,密苏里州,美国)。二抗是:HRP缀合的抗小鼠(#7076,Cell Signaling);HRP缀合的抗兔(#403005,Southern Biotech,伯明翰,阿拉巴马州,美国)。对于ELISA,HRP缀合的山羊抗人IgG来自Abcam,坎布里奇,马萨诸塞州,美国。对于FACS分析,大鼠抗CD38-PE抗体(#102707)来自BioLegend(圣地亚哥,加利福尼亚州,美国)。抗小鼠CD3(#BE00011)和抗小鼠CD28(#BE0015-1)来自BioXCell(西黎巴嫩,新罕布什尔州,美国)。对照IgG1奥马珠单抗购自

Novartis(巴塞尔,瑞士)。人SFRP2蛋白(rhSFRP2)是如先前所述制备的。gp100抗原片段来自AnaSpec(#AS-62589)。

[0104] 确定rhSFRP2与hSFRP2 mAb的结合亲和力的微板固相蛋白结合(ELISA)测定。使用微板固相蛋白结合测定来确定rhSFRP2和hSFRP2 mAb的EC_{50}。将平底Ni^{2+}涂布的96孔微板(#15442,Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)在4℃下用含0.05%牛血清白蛋白(BSA,#001-000-162,Jackson ImmunoResearch,西格罗夫,宾夕法尼亚州,美国)的磷酸盐缓冲盐水(PBS,#BP399-1,Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)封闭过夜。在37℃下,在封闭的板上将稀释于PBS(pH 7.4)中的1μM his标记的rhSFRP2孵育过夜。用250μl/孔的PBS将板洗涤3次。在37℃下,在板上将递增剂量的在PBS中的hSFRP2 mAb(0pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1.6nM、3.15nM、6.3nM、12.5nM、25nM、50nM、100nM)与rhSFRP2一起孵育过夜。将板洗涤3次,在室温下于含0.1% BSA的PBS中封闭1小时,然后在37℃下与1:40,000稀释于PBS中的100μl/孔的二抗(HRP缀合的山羊抗人IgG)一起孵育1小时。将板洗涤5次之后,在黑暗中,将每个孔与100μl K-Blue TMB底物(#308176,Neogen,列克星敦,肯塔基州,美国)一起孵育5分钟。用100ul 2N H_2SO_4停止反应。在450nm处读取吸光度。通过非线性回归分析和可变斜率,使用GraphPad Prism log(抑制剂)相对于归一化应答-可变斜率函数,来确定EC_{50}计算,所述函数的顶部约束为100%。使用Cheng-Prusoff方程,将EC_{50}转换为Kd,其中激动剂浓度和EC_{50}是相等的(40)。结果表述为平均值±平均值的标准误差。每个数据点是8次独立测量的结果(n=8)。

[0105] 细胞培养。将2H11小鼠内皮细胞(#CRL-2163,ATCC®,马纳萨斯,弗吉尼亚州,美国)于具有5%热灭活胎牛血清(FBS,#FB-12,Omega Scientific,比尔(Biel/Bienne),瑞士)和1%青霉素/链霉素(v/v)的Opti-MEM(#22600134,Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)中培养。将Hs578T人乳腺癌-肉瘤三阴性细胞(#30-202,ATCC®,马纳萨斯,弗吉尼亚州,美国)于具有10% FBS、0.01mg/ml牛胰岛素(#I0516,Sigma-Aldrich,圣路易斯,密苏里州,美国)和1%青霉素/链霉素(#MT30009C,Thermo Fisher Scientific)的DMEM(ATCC®)中培养。SVR血管肉瘤细胞是从美国典型培养物保藏中心(#CRL-2280,ATCC®)获得,并且将其于具有8% FBS和1%青霉素/链霉素(v/v)的Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific)中培养。由基因工程骨肉瘤小鼠模型建立的RF420小鼠骨肉瘤细胞(41)获自Dr.Jason T.Yustein(Texas Children's Cancer and Hematology Centers,Department of Pediatrics,Baylor College of Medicine,休斯顿,得克萨斯州,美国),并且将其于具有10%热灭活FBS和1%青霉素/链霉素(v/v)的DMEM(ATCC®)中培养。在37℃下在加湿的5% CO_2-95%室内空气气氛中培养所有细胞系。所有细胞系通过ATCC®认证,并且每逢体内使用它们时,由Charles River Research Animal(威明顿,马萨诸塞州,美国)测试小鼠细胞的啮齿动物病原体,包括支原体。鼠T细胞分离自C57BL/6小鼠,并且在C57BL/6背景上携带gp100反应性TCR的Pmel转基因小鼠获自Jackson Laboratory(Bar Harbor,缅因州,美国)。

[0106] 内皮管形成测定。将2H11内皮细胞铺板于具有5% FBS的Opti-MEM中,使其静置24小时。通过在具有2.5% FBS的Opti-MEM中维持细胞过夜来诱导静止。根据体外血管新生测定方案,在96孔板的孔中聚合Matrigel™(#ECM625,Millipore,贝德福德,马萨诸塞州,美

国)。在这项测定中,制备了9种处理条件:单独IgG1(5μM;奥马珠单抗);rhSFRP2蛋白(30nM)与IgG1(5μM);或rhSFRP2(30nM)与递增浓度的hSFRP2 mAb(0.5、1、5、10或20μM)的组合。将再悬浮于具有2.5% FBS的Opti-MEM中的处理物在37℃、5% CO2下于摇床上预孵育90分钟,之后将它们添加至细胞中。将1.9×10^4个细胞再悬浮于150μL预孵育处理物中,然后在37℃、5% CO2下于摇床上再孵育30min。最后,将细胞悬浮液添加至每个已涂布了聚合的Matrigel™的孔中。每个实验独立地重复4次,每个条件n=4。向对照细胞给予具有2.5% FBS和5μM IgG1的新鲜Opti-MEM。对于每种处理条件,在37℃、5%CO_2下孵育4h之后,使用EVOS FL数字成像系统(Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)的4X物镜采集图像。使用ImageJ血管新生分析软件(National Institutes of Health,贝塞斯达,马里兰州,美国)对分支点进行计数。在GraphPad Prism软件中,使用非线性回归和剂量-反应-抑制系列方程分析数据以确定IC50。

[0107] 增殖测定。将Hs578T乳腺癌-肉瘤和SVR血管肉瘤细胞以3,000个细胞/孔铺板于96孔板中。4小时之后,将hSFRP2 mAb(1、5或10μM)以指示浓度添加至生长培养基中。允许细胞在37℃、5% CO_2下孵育72小时。使用Cyquant直接细胞增殖测定试剂盒(#C35011,Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)评估增殖。使用EVOS FLc数字成像系统(Thermo Fisher Scientific)采集图像。使用FIJI细胞计数软件对细胞进行计数。

[0108] 凋亡/坏死。将Hs578T乳腺癌-肉瘤乳腺和SVR血管肉瘤细胞分别以2×10^4、3×10^4和7.5×10^3个细胞/孔铺板于16孔腔室载玻片(#178599,Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)中。第二天,将细胞在37℃、5%CO_2下与1、5或10μM hSFRP2 mAb或5μM IgG1对照一起在具有生长培养基的悬浮液中孵育2小时。根据凋亡/坏死检测试剂盒(#PK-CA707-30017,PromoCell,GmbH,海德堡,德国)的方案,确定坏死和凋亡。使用EVOS FLc数字成像系统(Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)采集图像。使用ImageJ细胞计数软件对细胞进行计数。每个数据点为2次独立的实验重复的结果,每次重复含有4个单独的孔(总计n=8)。

[0109] 蛋白质印迹。用或不用rhSFRP2(30nM)或hSFRP2 mAb(10μM)将获自转基因Pmel1小鼠(The Jackson laboratory,巴尔港,缅因州,美国)的脾T细胞处理1小时。对于rhSFRP2,对照细胞接受单独的培养基,并且对于hSFRP2 mAb实验,对照细胞接受10μM IgG1。然后以1000rpm将细胞离心10min。去除培养基,并且在处理前将细胞在-80℃下冷冻储存。如制造商手册(Pierce Biotechnology,罗克福德,伊利诺伊州)中所述,使用NE-PER核和胞质提取试剂制备核提取物。使用Bio-Rad蛋白质测定(Bio-Rad Laboratories,赫拉克勒斯,加利福尼亚州,美国)测量蛋白质浓度。将等量的蛋白质上样至SDS-PAGE凝胶上。将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜,并且使用以下一抗进行蛋白质印迹:兔抗CD38和兔抗组蛋白H3抗体、兔抗FZD5、小鼠抗PD1、兔抗NFATC3和兔抗肌动蛋白。使用以下二抗:HRP缀合的抗小鼠和HRP缀合的抗兔。使用ECL Advance底物进行可视化(GE Healthcare Bio-Sciences,皮斯卡特维,新泽西州,美国)。

[0110] 通过测量CFSE信号强度进行细胞增殖的FACS分析。CFSE信号的稀释与细胞增殖的增加密切相关。根据CellTrace™CFSE细胞增殖试剂盒(Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)的说明书,用CFSE染料预标记Pmel1转基因小鼠的脾T细胞。然后保持细胞不处理或将其用可溶性抗CD3(#BE0001-1,BioXCell,西黎巴嫩,新罕布什尔州,美国;2

μg/ml)/抗CD28抗体(#BE0015-1,BioXCell;2μg/ml)单独地或在以2:1比率存在肿瘤细胞(SVR血管肉瘤或Hs578T乳腺癌-肉瘤)的情况下激活3天。此外,用对照IgG1(10μM)或用hSFRP2 mAb(10μM)处理一些共培养物。3天之后,使用共培养物的T细胞测量CFSE强度。通过FACS测量平均荧光强度(MFI),并使用FlowJo软件进行分析。

[0111] 体内hSFRP2 mAb的最大耐受剂量(MTD)。动物实验方案符合NIH照顾和使用实验动物指南。将10^6个SVR血管肉瘤细胞皮下注射至获自Charles River(威明顿,马萨诸塞州,美国)的6周龄雄性和雌性裸鼠的右侧腹中。第二天,用每3天通过尾静脉注射的PBS对照和各种浓度的纯化hSFRP2 mAb(2、4、10和20mg/kg)i.v.治疗小鼠(每组n=5)。治疗动物并每三天测量肿瘤体积,直到对照肿瘤达到平均直径2cm,将其定义为终点。安乐死之后,收获肿瘤、肺和肝并将它们固定在10%福尔马林中。

[0112] 药代动力学研究。在不同时间点(0、5min、1、2、7、14、21、28、35和42天)向雄性和雌性C57BL/6小鼠注射4mg/kg的hSFRP2 mAb。每个时间点使用3只小鼠(n=3)。在终点时,通过门静脉取得血液样本并放置在分离管(#367981,Becton Dickinson,富兰克林湖,新泽西州,美国)中。将样本以1300xg离心15min。

[0113] hSFRP2 mAb的药代动力学(PK)的微板固相蛋白结合(ELISA)测定。在4℃下,用含0.05% BSA的PBS封闭平底Ni^{2+}涂布的96孔微板过夜。在37℃下,将稀释于PBS(pH 7.4)中的1μM his标记的rhSFRP2孵育过夜。用250μl/孔的PBS将板洗涤3次。然后,将1:50稀释的小鼠血清添加至板,并在37℃下轻轻摇动孵育过夜。将板洗涤3次,在室温下于含0.1% BSA的PBS中封闭1小时,然后在37℃下与1:40,000稀释于PBS中的100μl/孔的二抗(HRP缀合的山羊抗人IgG)一起孵育1小时。将板洗涤5次之后,在黑暗中,将每个孔与100μl K-Blue TMB底物一起孵育5分钟。用100μl 2N H_2SO_4停止反应。在450nm处读取吸光度。对于AUC的PK估计,使用EXCEL和(42)中的非房室分析(NCA)确定t1/2、CL、Vd、Tmax和Cmax。NCA使用线性梯形法则确定血浆浓度-时间曲线下面积(AUC)。$T_{1/2}$表示终末半衰期。对于AUC计算,将来自ELISA的nM浓度转换为mg/L。

[0114] 体内血管肉瘤同种异体移植物。将10^6个SVR血管肉瘤细胞皮下注射至获自Charles River(威明顿,马萨诸塞州,美国)的6周龄雄性和雌性裸鼠的右侧腹中。第二天,通过尾静脉向小鼠(n=10只动物/组)i.v.注射hSFRP2 mAb(4mg/kg)或IgG1对照(奥马珠单抗4mg/kg),并且每3天治疗。使用一周两次进行的垂直直径的连续卡尺测量,使用下式来计算肿瘤体积:[(L(mm)×W(mm)×H(mm))×0.5]。每天监测小鼠的身体调理得分和体重。当对照达到2cm直径时处死小鼠,并且切除肿瘤并固定在福尔马林中且包埋于石蜡中。

[0115] 体内Hs578T乳腺癌-肉瘤异种移植物。在Charles River(威明顿,马萨诸塞州,美国)的5至6周龄雌性裸鼠中建立Hs578T异种移植物。在小鼠乳房脂肪垫中接种10^6个细胞,并且当平均肿瘤大小为大约100mm^3时(第30天)开始治疗。用每3天i.v.注射的4mg/kg hSFRP2 mAb(n=11)或用4mg/kg IgG1对照(n=11)治疗动物直到终点,即当对照肿瘤的直径达到2cm时。每周两次使用卡尺测量肿瘤,然后如上所述计算肿瘤体积。将肿瘤切除,固定于福尔马林中并包埋于石蜡中。

[0116] 体内RF420转移性骨肉瘤。在第一个实验中,将无菌PBS中悬浮的RF420骨肉瘤细胞(5×10^5)通过6-8周龄C57BL/6小鼠(10只雌性和13只雄性)的尾静脉i.v.注射。第7天,处死2只小鼠,去除它们的肺,在10%福尔马林中固定,包埋于石蜡中并用苏木精和伊红染色。针

对转移的存在,在显微镜下对切片进行筛选。一旦确认存在转移,则在第10天,用4mg/kg IgG1对照或4mg/kg hSFRP2 mAb治疗小鼠(n=10)。治疗3周之后,处死动物并去除肺。对表面结节进行计数。在第二个实验中,将再悬浮于无菌PBS中的RF420细胞(5×10^5)i.v.注射于购自Envigo(印第安纳波利斯,印第安纳州,美国)的6-8周龄C57Bl/6雄性和雌性小鼠(品系代码044)的尾静脉中。将小鼠随机分为4组:对照组(奥马珠单抗,n=13);hSFRP2 mAb(n=11);纳武单抗(NDC#0003-3772-11,Bristol-Meyers Squibb,普林斯顿,新泽西州)(n=12);纳武单抗+hSFRP2 mAb(n=12)。肿瘤细胞接种之后10天,开始治疗。剂量、递送途径和频率如下:对照(奥马珠单抗)4mg/kg i.v.每周一次;hSFRP2mAb 4mg/kg i.v.每3天;纳武单抗8mg/kg i.p.每3天。治疗23天之后,处死动物并切除其肺,并且对表面结节进行计数。从切除之后立即拍摄的全肺照片对表面结节进行计数。收集新鲜的脾脏以用于T细胞分离、免疫组织化学和tunnel测定。

[0117] 免疫组织化学。将福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤切片在二甲苯中脱石蜡两次,持续10分钟,并且在无水乙醇中水合两次,在95%乙醇中水合两次,然后在自来水中水合。将载玻片在3%过氧化氢中在室温下孵育十分钟,接着在PBS1X中洗涤两次。使用试剂盒载体抗原修复柠檬酸盐缓冲液pH6(H-3300),在蔬菜蒸笼中进行柠檬酸盐缓冲液抗原修复步骤,持续40分钟,冷却10分钟。在室温下,在加湿的载玻片腔室中,将载玻片在载体兔IMPRESS HRP试剂盒(MP-4100)中提供的封闭血清中孵育1小时。然后排出封闭血清,并且在4℃下,将载玻片与1:40稀释的Ki67抗体(PA1-21520)一起孵育过夜。第二天,在PBS中淋洗载玻片3次,每次洗涤5min。添加来自载体兔MPRESS HRP试剂盒的二抗,并且将载玻片在RT下孵育30min,然后在PBS中淋洗3次,每次洗涤5min。如载体DAB试剂盒(SK-4100)中所指导,制备DAB溶液并添加至载玻片,持续5min,在PBS中淋洗,并且用苏木精复染30秒。然后在蒸馏水中洗涤载玻片,之后在氨醇中洗涤,在95%乙醇中脱水两次,在100%乙醇中脱水两次,在二甲苯中脱水两次,然后盖上盖玻片。将肿瘤增殖定量为阳性染色的细胞数/单位面积,每个切片使用平均3个视野。

[0118] TUNEL测定。根据Apoptag®过氧化物酶原位凋亡检测试剂盒(#S7100)的制造商方案,对来自Hs578T和SVR肿瘤的切片针对凋亡细胞进行染色。所有切片均用(#HS-200,National Diagnostics,亚特兰大,佐治亚州,美国)脱石蜡。以下材料并非用TUNEL试剂盒供应,并且是单独购买的:30%过氧化氢(#5155-01,J.T.Baker,菲利普斯堡,新泽西州,美国)、蛋白酶K(#21627,Millipore,伯灵顿,马萨诸塞州,美国)、金属增强的DAB底物试剂盒(#34065,Thermoscientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)、稳定过氧化物酶底物缓冲液1X(#1855910,Thermoscientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)和1-丁醇(#B7908,Sigma-Aldrich,圣路易斯,密苏里州,美国)。在每个样本中随机选择五个视野,并使用EVOS FLc显微镜(Life Technologies Inc.,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)拍照。在每个视野中,将肿瘤细胞凋亡定量为凋亡核数/HPF。

[0119] 流式细胞术。通过在4℃下将来自在静脉中注射RF420骨肉瘤的实验的脾细胞与大鼠抗CD38-PE抗体(1:200;#102707,Biolegend,圣地亚哥,加利福尼亚州,美国)一起在FACS缓冲液(含0.1% BSA的PBS)中孵育30min,来进行针对CD38表面表达的染色。在LSRFortessa上针对CD38平均荧光强度(MFI)水平对样本进行筛选,并且用FlowJo软件(Tree Star,俄勒冈州)进行分析。

[0120] 统计学。对于体外测定,使用双尾student's t检验计算IgG1与hSFRP2 mAb治疗之间的统计学差异,p≤0.05视为显著的。对于血管肉瘤的体内肿瘤研究(其中在肿瘤接种后一天开始治疗),使用双尾student's t检验。对于Hs578T,在第30天当肿瘤可触知时开始治疗的情况下,通过将第34天至第82天的肿瘤体积除以每组的基线(第30天)肿瘤体积,将数据归一化,以调整基线肿瘤体积的差异。使用每个时间点的双样本t检验,并且比较治疗与对照动物之间的肿瘤体积。为了满足t检验的正态性假设,对归一化的肿瘤体积进行对数变换。对于骨肉瘤研究中的多重比较,本发明人使用负二项式广义线性模型(NBGLM)将宏转移病灶的计数建模为治疗组的函数。使用基于模型的线性对比来进行治疗组比较。所有分析均使用R 3.2.3版进行。本发明人总结了将IgG1、hSFRP2 mAb和纳武单抗与hSFRP2 mAb和纳武单抗的组合相比较的发病率比率(IRR)和对应的95%置信区间(CI)。本发明人设想,组合疗法相对于单一药剂疗法将降低宏转移性病灶的发生率,因此用分母中表示的治疗(IgG1、hSFRP2 mAb或纳武单抗)构建IRR,有助于解释组合疗法相对于单一药剂的影响。

[0121] 参考文献

[0122] 1.Kawano Y,Kypta R.Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway

[0123] 1.J Cell Sci.2003;116(Pt 13):2627-34.

[0124] 2.Yamamura S,et al.Oncogenic functions of secreted Frizzled-related protein 2 in human renal cancer.MolCancer Ther.2010;9(6):1680-7.

[0125] 3.Esteve P,et al..Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/beta-catenin signalling activation in the vertebrate optic cup

[0126] 1.Development.2011;138(19):4179-84.

[0127] 4.Gehmert S,Sadat S,Song YH,Yan Y,Alt E.The anti-apoptotic effect of IGF-1on tissue resident stem cells is mediated via PI3-kinase dependent secreted frizzled related protein 2(Sfrp2)release.BiochemBiophysRes Commun.2008;371(4):752-5.

[0128] 5.Lee JL,Chang CJ,Wu SY,Sargan DR,Lin CT.Secreted frizzled-related protein 2(SFRP2)is highly expressed in canine mammary gland tumors but not in normal mammary glands.Breast Cancer Res Treat.2004;84(2):139-49.

[0129] 6.Melkonyan HS,Chang WC,Shapiro JP,Mahadevappa M,Fitzpatrick PA,Kiefer MC,Tomei LD,Umansky SR.SARPs:a family of secreted apoptosis-related proteins.Proc NatlAcadSciUSA.1997;94(25):13636-41.

[0130] 7.Mirotsou M,Zhang Z,Deb A,Zhang L,Gnecchi M,Noiseux N,Mu H,Pachori A,Dzau V.Secreted frizzled related protein 2(Sfrp2)is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair.Proc NatlAcadSciUSA.2007;104(5):1643-8.

[0131] 8.Gene Expression Omnibus[www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/].

[0132] 9.Bhati R,et al.Molecular characterization of human breast tumor vascular cells.Am J Pathol.2008;172(5):1381-90.

[0133] 10.Fontenot E,et al.A Novel Monoclonal Antibody to Secreted Frizzled Related Protein 2Inhibits Tumor Growth.Molecular Cancer Therapeutics.2013.

[0134] 11.Lee JL,Chang CJ,Chueh LL,Lin CT.Secreted Frizzled Related Protein 2(sFRP2)Decreases Susceptibility to UV-Induced Apoptosis in Primary Culture of Canine Mammary Gland Tumors by NF-kappaB Activation or JNK Suppression.Breast Cancer Res Treat.2006;100(1):49-58.

[0135] 12.Techavichit P,Gao Y,Kurenbekova L,Shuck R,Donehower LA,Yustein JT.Secreted Frizzled-Related Protein 2(sFRP2)promotes osteosarcoma invasion and metastatic potential.BMC Cancer.2016;16(1):869.doi:10.1186/s12885-016-2909-6.PubMed PMID:27821163;PMCID:PMC5100268.

[0136] 13.Singh S,et al.Impaired Wnt signaling in embryonal rhabdomyosarcoma cells from p53/c-fos double mutant mice.The American journal of pathology.2010;177(4):2055-66.doi:10.2353/ajpath.2010.091195.PubMed PMID:20829439;PMCID:PMC2947299.

[0137] 14.Tanaka M,Homme M,Yamazaki Y,Shimizu R,Takazawa Y,Nakamura T.Modeling Alveolar Soft Part Sarcoma Unveils Novel Mechanisms of Metastasis.Cancer Res.2017;77(4):897-907.doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2486.PubMed PMID:27979841.

[0138] 15.Roth W,Wild-Bode C,Platten M,Grimmel C,Melkonyan HS,Dichgans J,Weller M.Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells.Oncogene.2000;19(37):4210-20.

[0139] 16.Oshima T,Abe M,Asano J,Hara T,Kitazoe K,Sekimoto E,Tanaka Y,Shibata H,Hashimoto T,Ozaki S,Kido S,Inoue D,Matsumoto T.Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor,sFRP-2.Blood.2005;106(9):3160-5.doi:10.1182/blood-2004-12-4940.PubMed PMID:16030194.

[0140] 17.Sun Y,Zhu D,Chen F,Qian M,Wei H,Chen W,Xu J.SFRP2 augments WNT16B signaling to promote therapeutic resistance in the damaged tumor microenvironment.Oncogene.2016;35(33):4321-34.doi:10.1038/onc.2015.494.PubMed PMID:26751775;PMCID:4994019.

[0141] 18.Xiao X,Xiao Y,Wen R,Zhang Y,Li X,Wang H,Huang J,Liu J,Long T,Tang J.Promoting roles of the secreted frizzled-related protein 2 as a Wnt agonist in lung cancer cells.Oncol Rep.2015;34(5):2259-66.doi:10.3892/or.2015.4221.PubMed PMID:26323494;PMCID:4583535.

[0142] 19.Kaur A,et al.sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance.Nature.2016;532(7598):250-4.doi:10.1038/nature17392.PubMed PMID:27042933;PMCID:PMC4833579.

[0143] 20.Tsuruta JK,Klauber-DeMore N,Streeter J,Samples J,Patterson C,Mumper RJ,Ketelsen D,Dayton P.Ultrasound molecular imaging of secreted frizzled related protein-2 expression in murine angiosarcoma.PloS one.2014;9(1):e86642.doi:10.1371/journal.pone.0086642.PubMed PMID:24489757;PMCID:

3906081.

[0144] 21.Fontenot E,et al.A novel monoclonal antibody to secreted frizzled-related protein 2 inhibits tumor growth.MolCancer Ther.2013;12(5):685-95.doi:1535-7163.MCT-12-1066[pii];10.1158/1535-7163.MCT-12-1066[doi].

[0145] 22.Siamakpour-Reihani S,Caster J,Bandhu ND,Courtwright A,Hilliard E,Usary J,Ketelsen D,Darr D,Shen XJ,Patterson C,Klauber-DeMore N.The Role of Calcineurin/NFAT in SFRP2 Induced Angiogenesis-A Rationale for Breast Cancer Treatment with the Calcineurin Inhibitor Tacrolimus.PLoSOne.2011;6(6):e20412.

[0146] 23.Peterson YK,Nasarre P,Bonilla IV,Hilliard E,Samples J,Morinelli TA,Hill EG,Klauber-DeMore N.Frizzled-5:a high affinity receptor for secreted frizzled-related protein-2 activation of nuclear factor of activated T-cells c3signaling to promote angiogenesis.Angiogenesis.2017;20(4):615-28.doi:10.1007/s10456-017-9574-5.PubMed PMID:28840375;PMCID:PMC5675522.

[0147] 24.Courtwright A,Siamakpour-Reihani S,Arbiser JL,Banet N,Hilliard E,Fried L,Livasy C,Ketelsen D,Nepal DB,Perou CM,Patterson C,Klauber-DeMore N.Secreted Frizzle-Related Protein 2 Stimulates Angiogenesis via a Calcineurin/NFAT Signaling Pathway.Cancer Res.2009.

[0148] 25.Mancini M,Toker A.NFAT proteins:emerging roles in cancer progression.Nat Rev Cancer.2009;9(11):810-20.doi:10.1038/nrc2735.PubMed PMID:19851316;PMCID:PMC2866640.

[0149] 26.Macian F.NFAT proteins:key regulators of T-cell development and function.Nat Rev Immunol.2005;5(6):472-84.doi:10.1038/nri1632.PubMed PMID:15928679.

[0150] 27.Urso K,Alfranca A,Martinez-Martinez S,Escolano A,Ortega I,Rodriguez A,Redondo JM.NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T-cell activation and angiogenesis.Blood.2011;118(3):795-803.doi:10.1182/blood-2010-12-322701.PubMed PMID:21642596.

[0151] 28.Dutta D,Barr VA,Akpan I,Mittelstadt PR,Singha LI,Samelson LE,Ashwell JD.Recruitment of calcineurin to the TCR positively regulates T cell activation.Nat Immunol.2017;18(2):196-204.doi:10.1038/ni.3640.PubMed PMID:27941787.

[0152] 29.Lindsey BA,Markel JE,Kleinerman ES.Osteosarcoma Overview.Rheumatol Ther.2017;4(1):25-43.doi:10.1007/s40744-016-0050-2.PubMed PMID:27933467;PMCID:PMC5443719.

[0153] 30.Tawbi HA,et al.Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma(SARC028):a multicentre,two-cohort,single-arm,open-label,phase 2trial.Lancet Oncol.2017;18(11):1493-501.doi:10.1016/S1470-2045(17)30624-1.PubMed PMID:28988646.

[0154] 31.Wedekind MF,Wagner LM,Cripe TP.Immunotherapy for osteosarcoma:

Where do we go from here?Pediatr Blood Cancer.2018;65(9):e27227.doi:10.1002/pbc.27227.PubMed PMID:29923370.

[0155] 32.Zhao S,et al.NKD2,a negative regulator of Wnt signaling,suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma.Oncogene.2015;34(39):5069-79.doi:10.1038/onc.2014.429.PubMed PMID:25579177;PMCID:PMC4802362.

[0156] 33.Kim H,Yoo S,Zhou R,Xu A,Bernitz JM,Yuan Y,Gomes AM,Daniel MG,Su J,Demicco EG,Zhu J,Moore KA,Lee DF,Lemischka IR,Schaniel C.Oncogenic role of SFRP2 in p53-mutant osteosarcoma development via autocrine and paracrine mechanism.Proc Natl Acad Sci U S A.2018;115(47):E11128-E37.doi:10.1073/pnas.1814044115.PubMed PMID:30385632;PMCID:PMC6255152.

[0157] 34.Schoffski P,Cornillie J,Wozniak A,Li H,Hompes D.Soft tissue sarcoma:an update on systemic treatment options for patients with advanced disease.Oncol Res Treat.2014;37(6):355-62.doi:10.1159/000362631.PubMed PMID:24903768.

[0158] 35.Paoluzzi L,Cacavio A,Ghesani M,Karambelkar A,Rapkiewicz A,Weber J,Rosen G.Response to anti-PD1 therapy with nivolumab in metastatic sarcomas.Clin Sarcoma Res.2016;6:24.doi:10.1186/s13569-016-0064-0.PubMed PMID:28042471;PMCID:PMC5200964.

[0159] 36.Zhang J,et al.Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance.Nature.2018;553(7686):91-5.doi:10.1038/nature25015.PubMed PMID:29160310;PMCID:PMC5754234.

[0160] 37.Bally AP,Lu P,Tang Y,Austin JW,Scharer CD,Ahmed R,Boss JM.NF-kappaB regulates PD-1 expression in macrophages.J Immunol.2015;194(9):4545-54.doi:10.4049/jimmunol.1402550.PubMed PMID:25810391;PMCID:PMC4402259.

[0161] 38.Oestreich KJ,Yoon H,Ahmed R,Boss JM.NFATc1 regulates PD-1expression upon T cell activation.J Immunol.2008;181(7):4832-9.PubMed PMID:18802087;PMCID:PMC2645436.

[0162] 39.Chatterjee S,et al.CD38-NAD(+)Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response.Cell Metab.2018;27(1):85-100 e8.doi:10.1016/j.cmet.2017.10.006.PubMed PMID:29129787;PMCID:PMC5837048.

[0163] 40.Philip M,et al..Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming.Nature.2017;545(7655):452-6.doi:10.1038/nature22367.PubMed PMID:28514453;PMCID:PMC5693219.

[0164] 41.Chen L,et al.CD38-Mediated Immunosuppression as a Mechanism of Tumor Cell Escape from PD-1/PD-L1 Blockade.Cancer Discov.2018.doi:10.1158/2159-8290.CD-17-1033.PubMed PMID:30012853.

[0165] 42.Vukcevic M,Zorzato F,Spagnoli G,Treves S.Frequent calcium oscillations lead to NFAT activation in human immature dendritic cells.J Biol Chem.2010;285(21):16003-11.doi:10.1074/jbc.M109.066704.PubMed PMID:20348098;

PMCID:PMC2871469.

[0166] 43.Marklin M,Bugl,S.,Bechtel,M.,Poljak,A.,Kopp,H.,Kanz,L.,Rao,A.,Wirths,S.,Muller,M.Ca2+/NFAT Signaling REgulates the Expression of CD38and ZAP70 in Murine B Cells and Controls B1 a Cell Homeostasis.Blood.2011;118(21):183.

[0167] 44.Guidance for Industry.In vivo drug metabolism/drug interaction studies-study design,data analysis,and recommendations for dosing and labeling,U.S.Dept.Health and Human Svcs.,FDA,Ctr.for Drug Eval.and Res.,Ctr.For Biologics Eval.and Res.,Clin./Pharm.,November 1999<http://www.fda.gov/cber/gdlns/metabol.pdf>.

[0168] 45.Kleinschmidt-DeMasters et al.(2005)New England Journal of Medicine,353:369-379.

[0169] 46.Langer-Gould et al.(2005)New England Journal of Medicine,353:369-379.

[0170] 47.Rudick et al.(2006)New England Journal of Medicine,354:911-923

[0171] 48.Salama,Hassan H.,et al.“Effects of Combination Therapy of Beta-Interferon 1a and Prednisone on Serum Immunologic Markers in Patients with Multiple Sclerosis.”Multiple Sclerosis,vol.9,no.1,Feb.2003,pp.28-31.PubMed.

[0172] 49.Brod et al.(2000)Annals of Neurology,47:127-131.

[0173] 50.U.S.Patents Nos.8,734,789,and 9,073,982

[0174] ***

[0175] 应当理解,本发明不限于上述本发明的具体实施方案,因为可以对具体实施方案进行变化,并且所述变化仍然落入所附权利要求的范围内。

[0176] 本发明将通过但不限于以下编号的段落进一步描述:

[0177] 1.一种药物组合,其包含治疗有效量的SFRP2拮抗剂、CD38拮抗剂和/或PD-1拮抗剂以及治疗有效量的PD-1拮抗剂。

[0178] 2.根据段落1的药物组合,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂是:

[0179] a.特异性结合SFRP2、CD38和/或PD-1受体并抑制其激活的抗体或抗体的抗原结合片段,或者

[0180] b.特异性结合SFRP2、CD38和/或PD-1配体并抑制所述SFRP2、CD38和/或PD-1配体结合SFRP2、CD38和/或PD-1受体的所述SFRP2、CD38和/或PD-1受体的可溶形式。

[0181] 3.根据段落1-2中任一项的药物组合,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂是SFRP2、CD38和/或PD-1单克隆抗体(mAb)。

[0182] 4.根据段落3的药物组合,其中所述SFRP2单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

[0183] 5.根据段落1-4中任一项的药物组合,其中所述PD-1拮抗剂是:

[0184] a.特异性结合PD-1受体并抑制其激活的抗体或抗体的抗原结合片段,或者

[0185] b.特异性结合PD-1配体并抑制所述PD-1配体与PD-1受体结合的所述PD-1受体的可溶形式。

[0186] 6.根据段落5的药物组合,其中所述PD-1拮抗剂是PD-1受体的可溶形式,并且所述

PD-1配体是PD-L1或PD-L2。

[0187] 7.根据段落1-5中任一项的药物组合,其中所述PD-1拮抗剂是PD-1单克隆抗体。

[0188] 8.根据段落1-5中任一项的药物组合,其中所述PD-1拮抗剂是纳武单抗。

[0189] 9.根据段落1-5中任一项的药物组合,其中所述PD-1拮抗剂是派姆单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗、西米普利单抗或阿特珠单抗。

[0190] 10.根据段落1-9中任一项的药物组合,其中SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的所述治疗有效量是0.1mg/kg体重至100mg/kg体重。

[0191] 11.根据段落1-9中任一项的药物组合,其中SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的所述治疗有效量是0.2-3、0.27-2.70、0.27、0.54、1.35或2.70mg/kg体重。

[0192] 12.根据段落1-11中任一项的药物组合,其中SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的所述治疗有效量是10mg-200mg、17mg、33mg、84mg或167mg。

[0193] 13.根据段落1-12中任一项的药物组合,其中PD-1拮抗剂的所述治疗有效量是0.1mg/kg体重至100mg/kg体重。

[0194] 14.根据段落1-12中任一项的药物组合,其中PD-1拮抗剂的所述治疗有效量是0.02-1.2、0.027-1.08、0.027或1.08mg/kg体重。

[0195] 15.根据段落1-14中任一项的药物组合,其中PD-1拮抗剂的所述治疗有效量是1-80、1.6-67、1.6或67mg/kg体重。

[0196] 16.一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂和治疗有效量的PD-1拮抗剂。

[0197] 17.根据段落16的方法,其中所述施用是同时施用或顺序施用。

[0198] 18.根据段落16或17的方法,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂是:

[0199] a.特异性结合SFRP2、CD38和/或PD-1受体并抑制其激活的抗体或抗体的抗原结合片段,或者

[0200] b.特异性结合SFRP2、CD38和/或PD-1配体并抑制所述SFRP2、CD38和/或PD-1配体结合SFRP2、CD38和/或PD-1受体的所述SFRP2、CD38和/或PD-1受体的可溶形式。

[0201] 19.根据段落16-18中任一项的方法,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂是SFRP2、CD38和/或PD-1单克隆抗体(mAb)。

[0202] 20.根据段落19的方法,其中所述SFRP2单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

[0203] 21.根据段落16-20中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是:

[0204] a.特异性结合PD-1受体并抑制其激活的抗体或抗体的抗原结合片段,或者

[0205] b.特异性结合PD-1配体并抑制所述PD-1配体与PD-1受体结合的所述PD-1受体的可溶形式。

[0206] 22.根据段落21的方法,其中所述PD-1拮抗剂是所述PD-1受体的可溶形式,并且所述PD-1配体是PD-L1或PD-L2。

[0207] 23.根据段落16-22中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是PD-1单克隆抗体。

[0208] 24.根据段落16-23中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是纳武单抗。

[0209] 25.根据段落16-23中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是派姆单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗、西米普利单抗或阿特珠单抗。

[0210] 26.根据段落16-25中任一项的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

[0211] 27.根据段落16-26中任一项的方法,其中所述癌症是血管肉瘤、肺癌、骨肉瘤、黑色素瘤、非小细胞肺癌或肾癌。

[0212] 28.根据段落16-27中任一项的方法,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的施用先于所述PD-1拮抗剂的施用。

[0213] 29.根据段落16-27中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂的施用先于所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的施用。

[0214] 30.根据段落16-29中任一项的方法,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂是辅助所述PD-1拮抗剂施用的。

[0215] 31.根据段落16-29中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是辅助所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂施用的。

[0216] 32.根据段落16-31中任一项的方法,其中每天、多于每天一次或少于每天一次施用所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂。

[0217] 33.根据段落16-31中任一项的方法,其中每3天一次、每周一次、每2周一次、每3周一次或每4周一次施用所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂。

[0218] 34.根据段落16-33中任一项的方法,其中每天、多于每天一次或少于每天一次施用所述PD-1拮抗剂。

[0219] 35.根据段落16-33中任一项的方法,其中每3天一次、每周一次、每2周一次、每3周一次或每4周一次施用所述PD-1拮抗剂。

[0220] 36.根据段落16-35中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是纳武单抗并且向所述受试者施用的纳武单抗的量是每3周3mg/kg体重、每2周240mg或每4周480mg。

[0221] 37.根据段落16-35中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是派姆单抗并且向所述受试者施用的派姆单抗的量是每3周200mg。

[0222] 38.根据段落16-35中任一项所述的方法,其中所述PD-1拮抗剂是阿维鲁单抗并且向所述受试者施用的阿维鲁单抗的量是每2周800mg。

[0223] 39.根据段落16-35中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是度伐鲁单抗并且向所述受试者施用的度伐鲁单抗的量是每2周10mg/kg体重。

[0224] 40.根据段落16-35中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是西米普利单抗并且向所述受试者施用的西米普利单抗的量是每3周250mg。

[0225] 41.根据段落16-35中任一项的方法,其中所述PD-1拮抗剂是阿特珠单抗并且向所述受试者施用的阿特珠单抗的量是每2周840mg、每3周1200mg或每4周1680mg。

[0226] 42.根据段落16-41中任一项的方法,其中在开始SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂疗法之前,所述受试者正在接受PD-1拮抗剂疗法。

[0227] 43.根据段落16-41中任一项的方法,其中在开始PD-1拮抗剂疗法之前,所述受试者正在接受SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂疗法。

[0228] 44.根据段落42或43的方法,其中在开始第二疗法之前,所述受试者正在接受第一疗法至少8周、至少10周、至少24周、至少28周、至少48周或至少52周。

[0229] 45.根据段落16-44中任一项的方法,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂和/或所述PD-1拮抗剂的定期施用持续至少3天、至少30天、至少42天、至少8周、至少12周、至少24周或至少6个月。

[0230] 46.根据段落16-45中任一项的方法,其中SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的所述量在单独服用时以及PD-1拮抗剂的所述量在单独服用时,各自对治疗所述受试者有效。

[0231] 47.根据段落16-45中任一项的方法,其中SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的所述量在单独服用时,PD-1拮抗剂的所述量在单独服用时,或每个这种量在单独服用时,对治疗所述受试者无效。

[0232] 48.根据段落16-45中任一项的方法,其中SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的所述量在单独服用时,PD-1拮抗剂的所述量在单独服用时,或每个这种量在单独服用时,对治疗所述受试者不太有效。

[0233] 49.根据段落16-48中任一项的方法,其中所述受试者是人患者。

[0234] 50.根据段落16-49中任一项的方法,其中所述患者先前接受PD-1拮抗剂疗法,并且在接受组合疗法之前停止接受PD-1拮抗剂疗法。

[0235] 51.根据段落16-50中任一项的方法,其中所述患者先前对PD-1拮抗剂疗法没有反应,或者施用PD-1拮抗剂无法治疗所述受试者。

[0236] 52.一种用于治疗罹患癌症的患者的试剂盒,所述试剂盒包含治疗有效量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂、治疗有效量的PD-1拮抗剂和包含所述试剂盒的使用说明的插页。

[0237] 53.一种药物组合物,所述药物组合物包含一定量的PD-1拮抗剂和一定量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂。

[0238] 54.根据段落53的药物组合物,其基本上包含一定量的PD-1拮抗剂和一定量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂。

[0239] 55.根据段落53或54的药物组合物,其用于治疗患有癌症的受试者,其中所述量的所述PD-1拮抗剂和一定量的所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂是同时、同时期或并行施用的。

[0240] 56.一种分配至或用于分配至患有癌症的受试者的治疗包装,所述治疗包装包含:a)一个或多个单位剂量,每个这种单位剂量包含:i)一定量的PD-1拮抗剂和ii)一定量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂,其中在向所述受试者并行施用时,所述单位剂量中所述PD-1拮抗剂和所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂的相应量对治疗所述受试者有效,以及b)其成品药物容器,所述药物容器含有所述一个或多个单位剂量,所述容器进一步含有或包含在所述受试者的治疗中指导所述包装的使用的标签。

[0241] 57.一种SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂,其作为添加疗法或与PD-1拮抗剂组合用于治疗患有癌症的受试者。

[0242] 58.一种PD-1拮抗剂,其作为添加疗法或与SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂组合用于治疗患有癌症的受试者。

[0243] 59.一定量的SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂和一定量的PD-1拮抗剂在制备用于治疗患有癌症的受试者的组合中的用途,其中所述SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂和所述PD-1拮抗剂被制备为同时、同时期或并行施用。

[0244] 60.一种SFRP2、CD38和/或PD-1拮抗剂和PD-1拮抗剂用于制造药物的组合。

[0245] 61.根据段落60的组合,其中所述药物用于治疗、预防或缓和癌症的症状。

[0246] 62.一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量

的SFRP2单克隆抗体(mAb),其中所述受试者的CD38和/或PD-1的表达增加。

[0247] 63.根据段落62的方法,其中所述受试者的T细胞的CD38和/或PD-1的表达增加。

[0248] 64.根据段落62或63的方法,其中所述SFRP2单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

[0249] 65.根据段落62-64中任一项的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

[0250] 66.根据段落62-64中任一项的方法,其中所述癌症是血管肉瘤、肺癌、骨肉瘤、黑色素瘤、非小细胞肺癌或肾癌。

[0251] 67.根据段落62-66中任一项的方法,其中每天、多于每天一次或少于每天一次施用所述SFRP2单克隆抗体。

[0252] 68.根据段落62-67中任一项的方法,其中每3天一次、每周一次、每2周一次、每3周一次或每4周一次施用所述SFRP2单克隆抗体。

[0253] 69.根据段落62-67中任一项的方法,其中所述SFRP2单克隆抗体的定期施用持续至少3天、至少30天、至少42天、至少8周、至少12周、至少24周或至少6个月。

[0254] 70.根据段落62-69中任一项的方法,其中所述受试者是人患者。

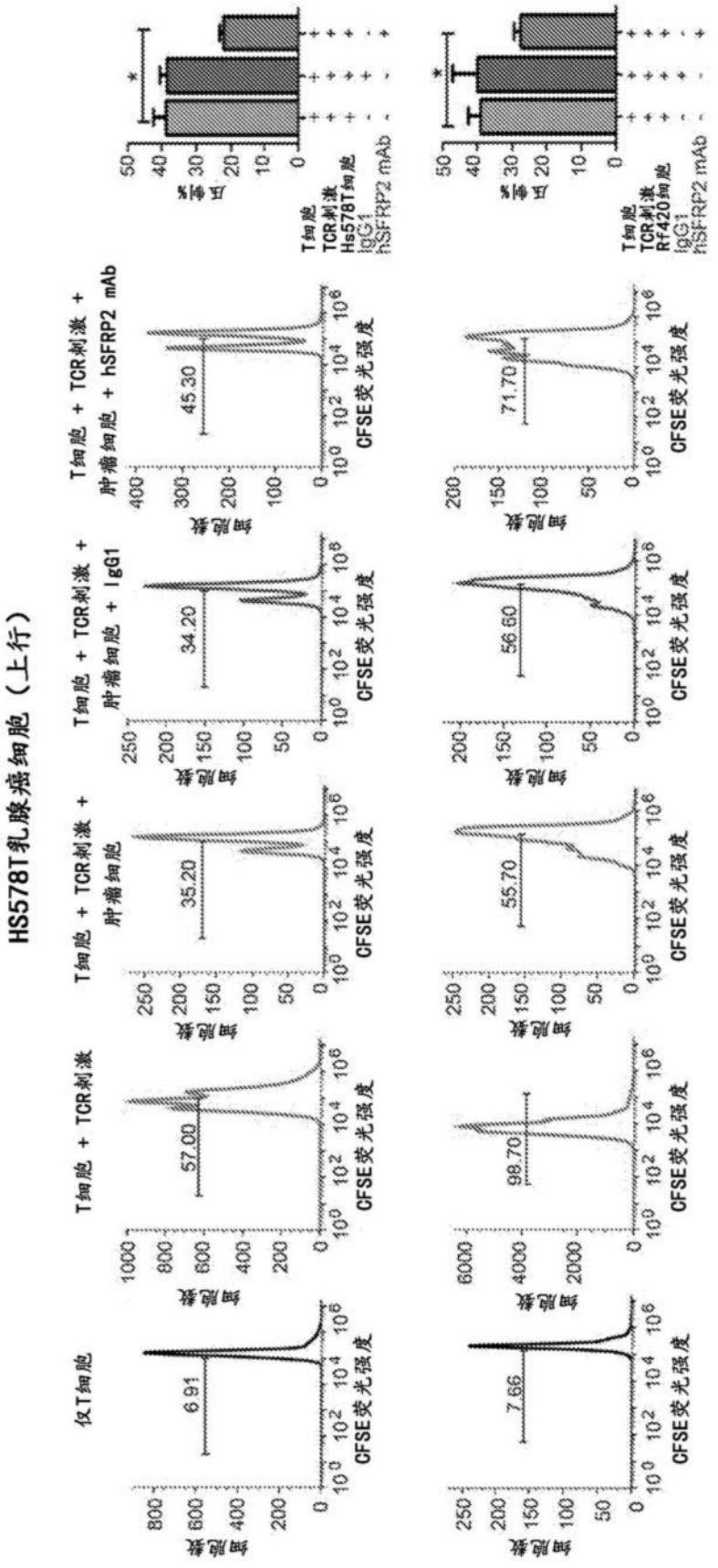

HS578T乳腺癌细胞（上行）
Rf420骨肉瘤细胞（下行）
仅T细胞
T细胞 + TCR刺激
T细胞 + TCR刺激 + 肿瘤细胞
T细胞 + TCR刺激 + 肿瘤细胞 + IgG1
T细胞 + TCR刺激 + 肿瘤细胞 + hSFRP2 mAb
细胞数
CFSE荧光强度
6.91
57.00
35.20
34.20
45.30
7.66
98.70
55.70
56.60
71.70
%杀伤
T细胞
TCR刺激
Hs578T细胞
Rf420细胞
IgG1
hSFRP2 mAb

图1

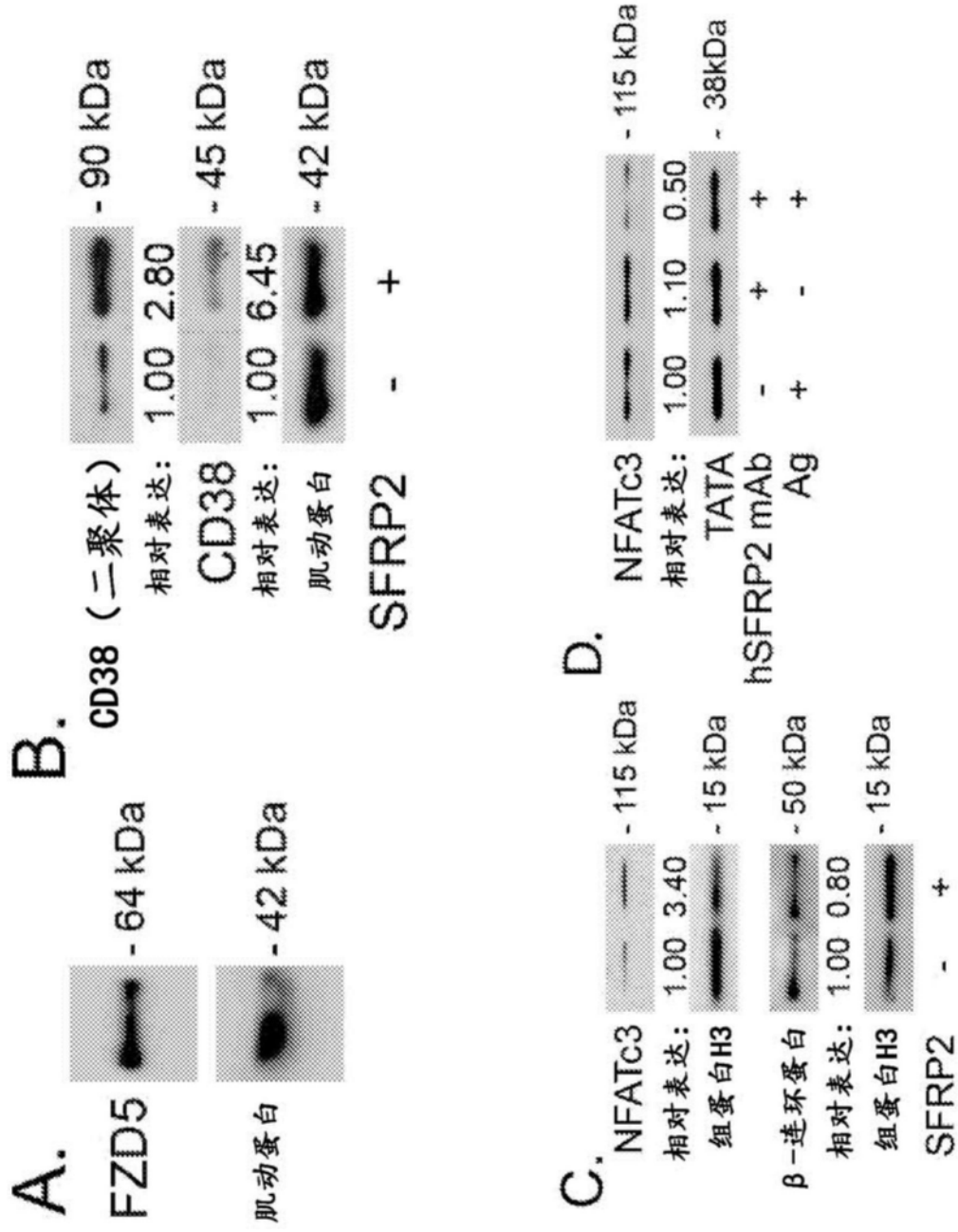

A.
FZD5
- 64 kDa
肌动蛋白
- 42 kDa
B.
CD38（二聚体）
- 90 kDa
相对表达: 1.00 2.80
CD38
- 45 kDa
相对表达: 1.00 6.45
肌动蛋白
- 42 kDa
SFRP2 - +
C.
NFATc3
- 115 kDa
相对表达: 1.00 3.40
组蛋白H3
- 15 kDa
β-连环蛋白
- 50 kDa
相对表达: 1.00 0.80
组蛋白H3
- 15 kDa
SFRP2 - +
D.
NFATc3
- 115 kDa
相对表达: 1.00 1.10 0.50
TATA
- 38kDa
hSFRP2 mAb - + +
Ag + - +

图2

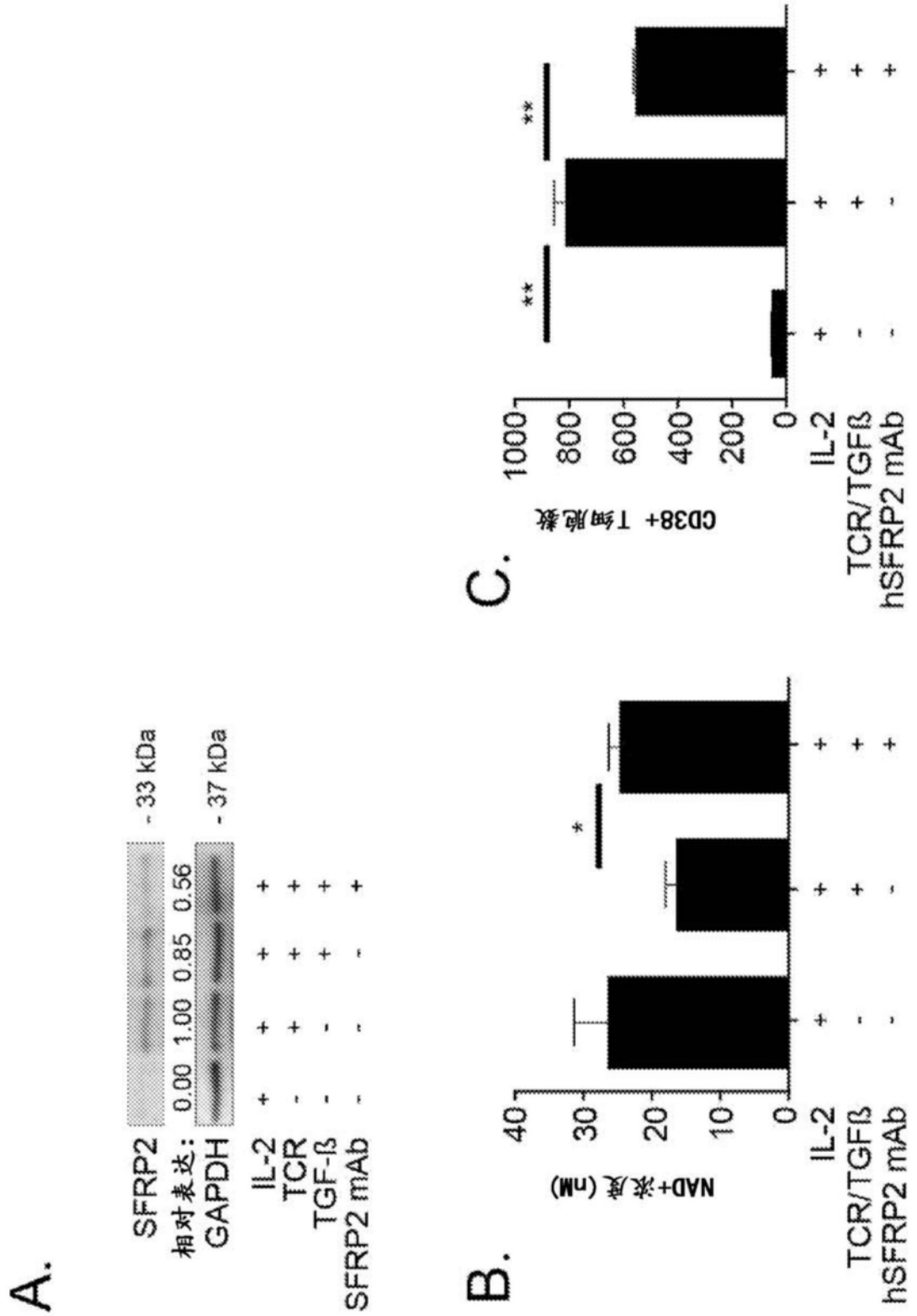

A.
SFRP2
- 33 kDa
相对表达:
0.00 1.00 0.85 0.56
GAPDH
- 37 kDa
IL-2
TCR
TGF-ß
SFRP2 mAb
B.
NAD+浓度 (nM)
40
30
20
10
0
*
IL-2
TCR/TGFß
hSFRP2 mAb
C.
CD38+ T细胞数
1000
800
600
400
200
0
**
**
IL-2
TCR/TGFß
hSFRP2 mAb

图3

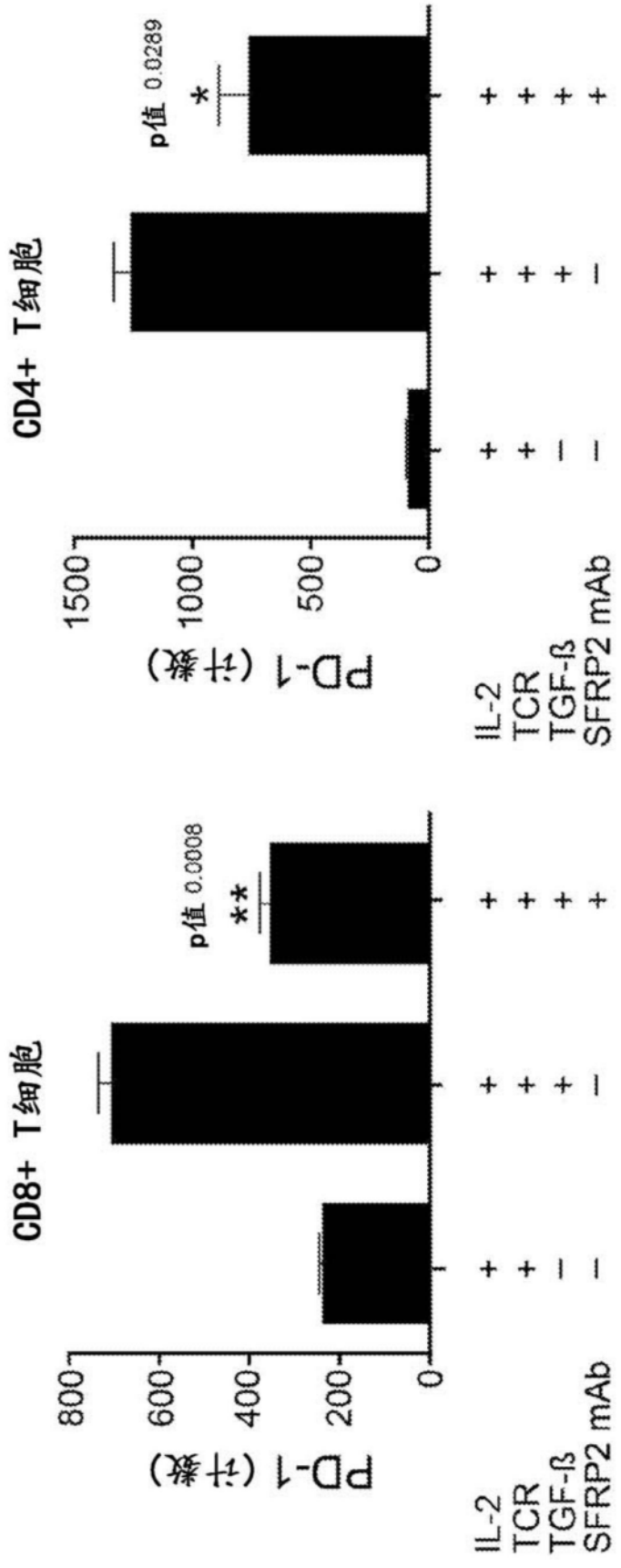

CD8+ T细胞
PD-1 (计数)
800
600
400
200
0
p值 0.0008
**
CD4+ T细胞
PD-1 (计数)
1500
1000
500
0
p值 0.0289
*
IL-2
TCR
TGF-ß
SFRP2 mAb
+ + + −
+ + + −
+ + − −
− − − −

图4

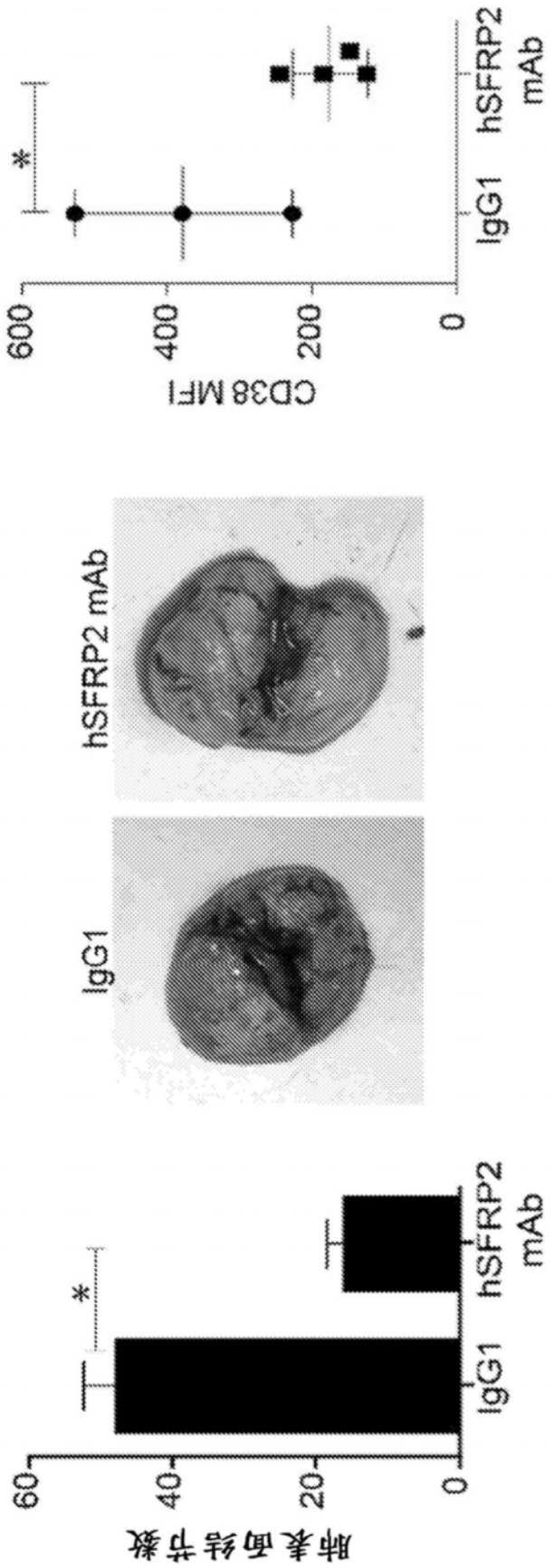

CD38 MFI
600
400
200
0
*
IgG1
hSFRP2 mAb
hSFRP2 mAb
IgG1
肺表面结节数
60
40
20
0
*
IgG1
hSFRP2 mAb

图5

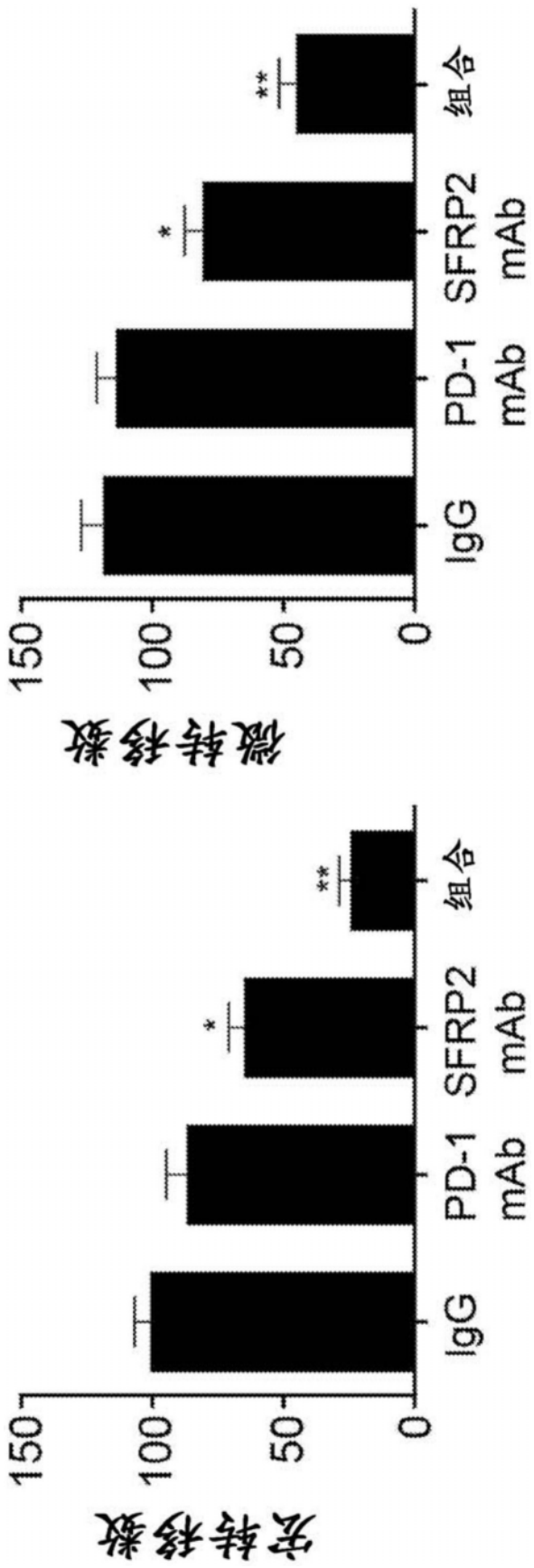

微转移数
150
100
50
0
IgG
PD-1 mAb
SFRP2 mAb
组合
*
**
穿转移数
150
100
50
0
IgG
PD-1 mAb
SFRP2 mAb
组合
*
**

图6

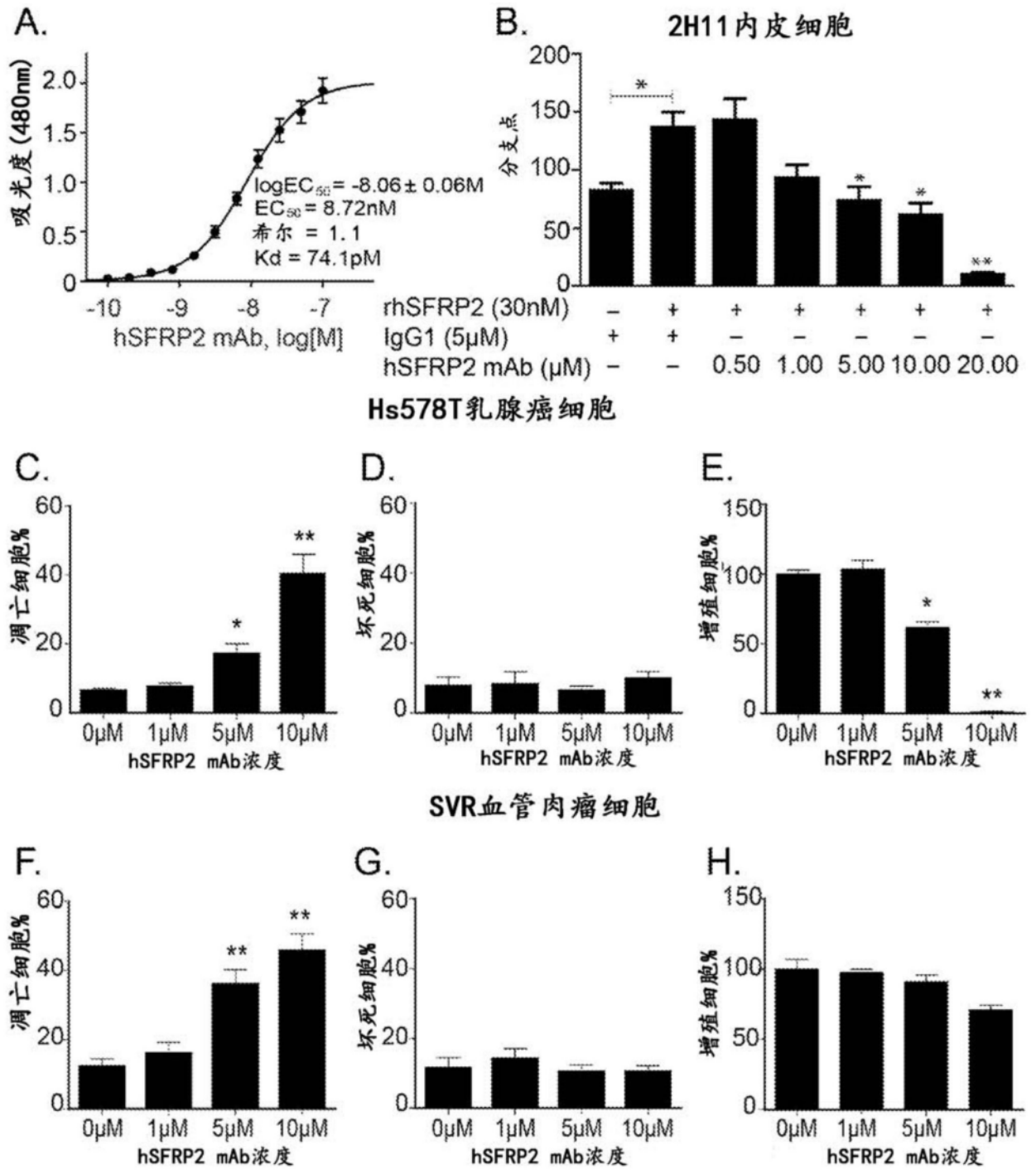

A.
吸光度(480nm)
logEC50 = -8.06 ± 0.06M
EC50 = 8.72nM
希尔 = 1.1
Kd = 74.1pM
hSFRP2 mAb, log[M]
B.
2H11内皮细胞
分支点
rhSFRP2 (30nM)
IgG1 (5μM)
hSFRP2 mAb (μM)
0.50 1.00 5.00 10.00 20.00
Hs578T乳腺癌细胞
C.
凋亡细胞%
D.
坏死细胞%
E.
增殖细胞%
0μM 1μM 5μM 10μM
hSFRP2 mAb浓度
SVR血管肉瘤细胞
F.
凋亡细胞%
G.
坏死细胞%
H.
增殖细胞%

图7

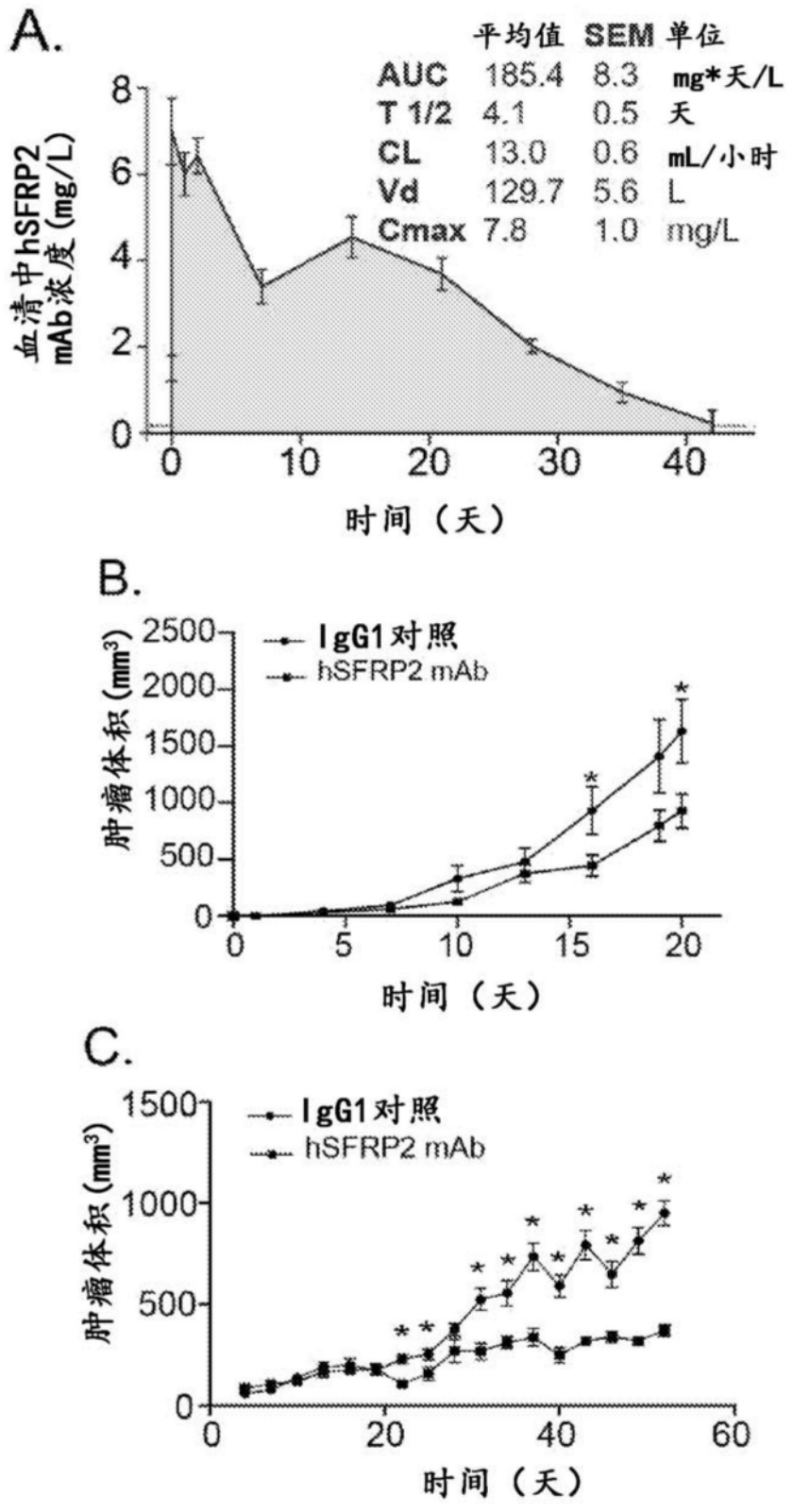

A.
平均值 SEM 单位
AUC 185.4 8.3 mg*天/L
T 1/2 4.1 0.5 天
CL 13.0 0.6 mL/小时
Vd 129.7 5.6 L
Cmax 7.8 1.0 mg/L
血清中hSFRP2 mAb浓度 (mg/L)
时间（天）
B.
IgG1对照
hSFRP2 mAb
肿瘤体积 (mm³)
时间（天）
C.
IgG1对照
hSFRP2 mAb
肿瘤体积 (mm³)
时间（天）

图8

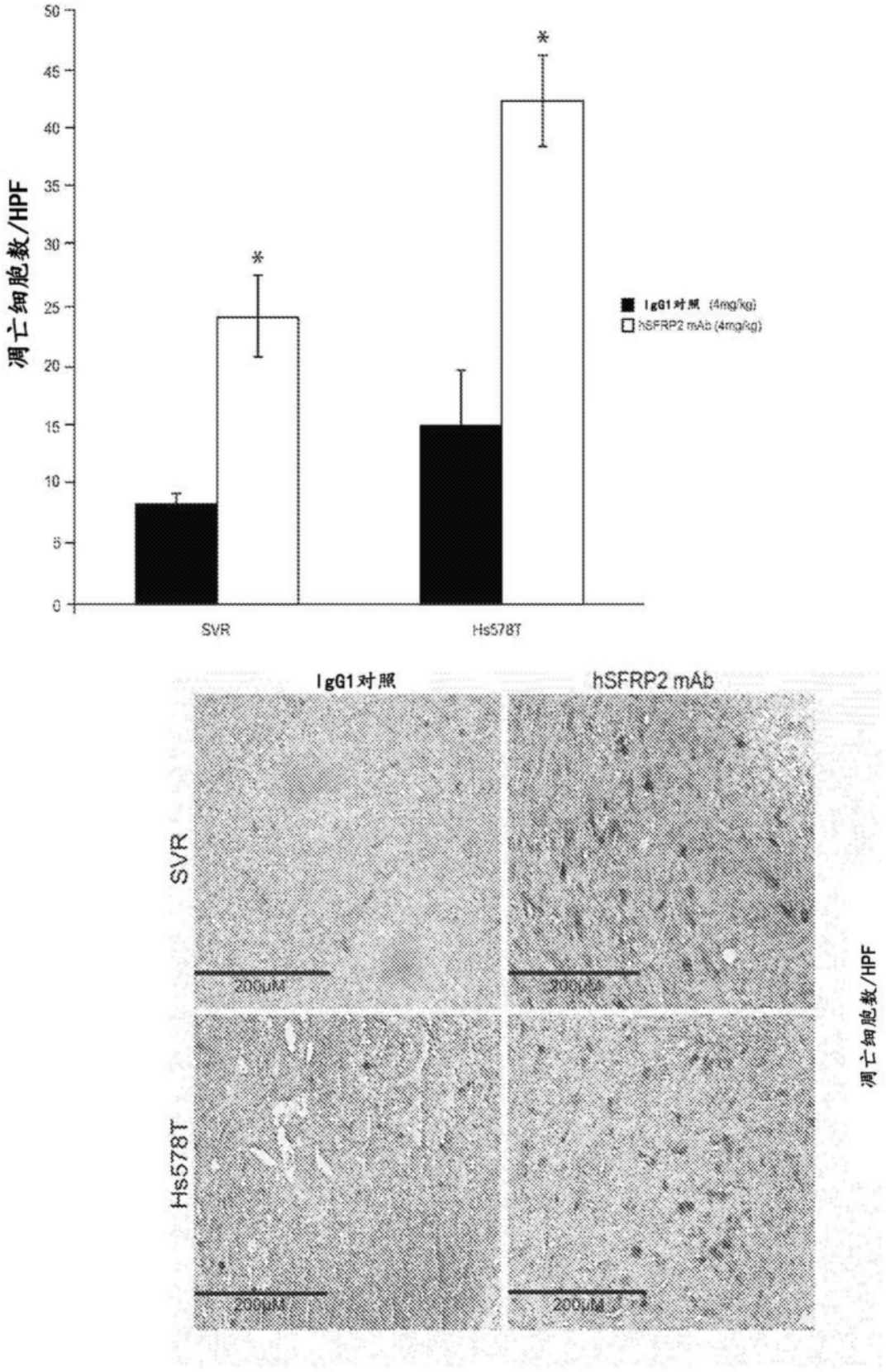

凋亡细胞数/HPF
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
*
IgG1对照 (4mg/kg)
hSFRP2 mAb (4mg/kg)
SVR
Hs578T
IgG1对照
hSFRP2 mAb
SVR
Hs578T
200μM
200μM
200μM
200μM
凋亡细胞数/HPF

图9

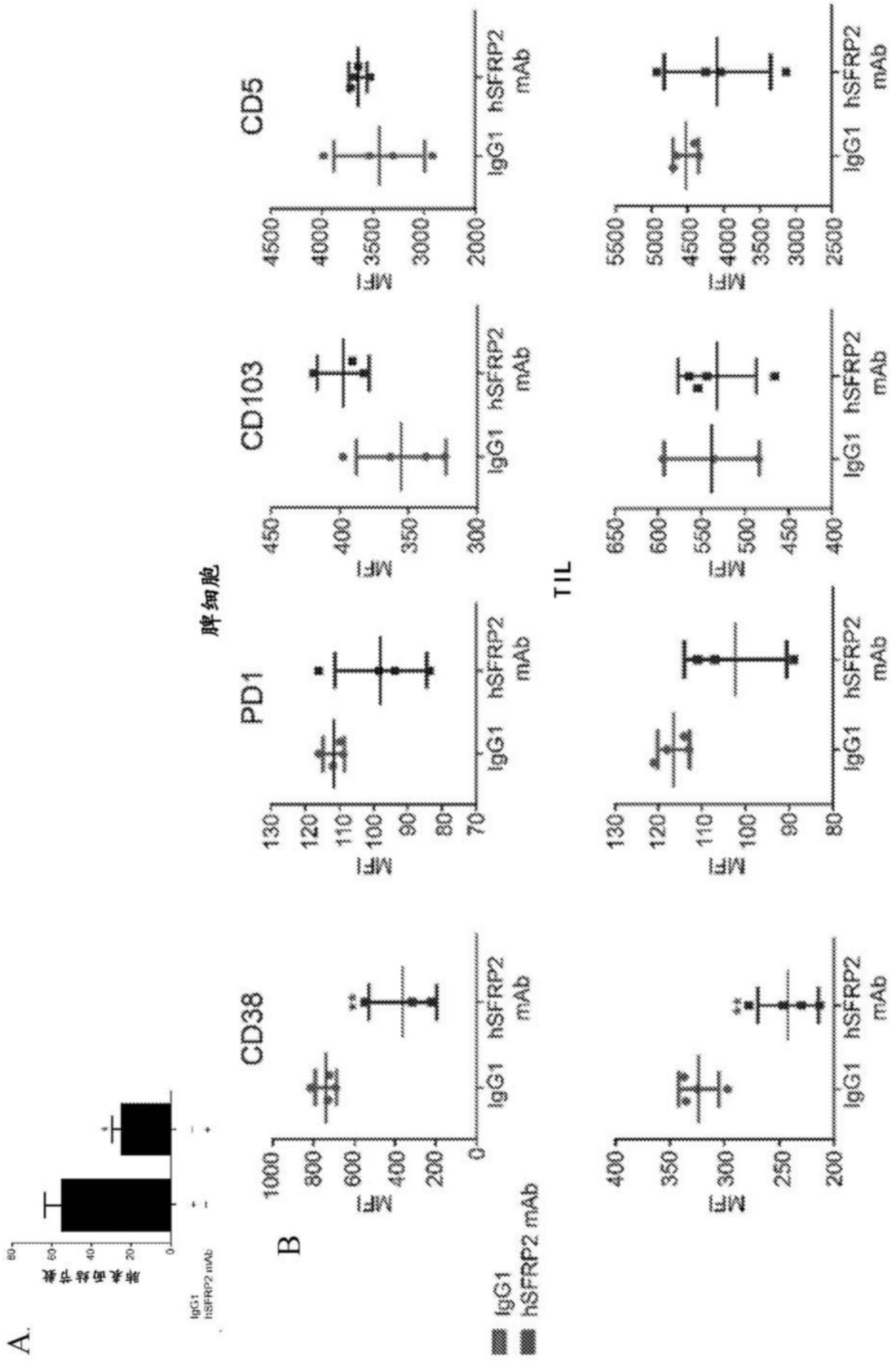

A.
脾表面结节数
IgG1
hSFRP2 mAb
B
CD38
PD1
CD103
CD5
MFI
IgG1
hSFRP2
mAb
脾细胞
TIL
IgG1
hSFRP2 mAb

图10

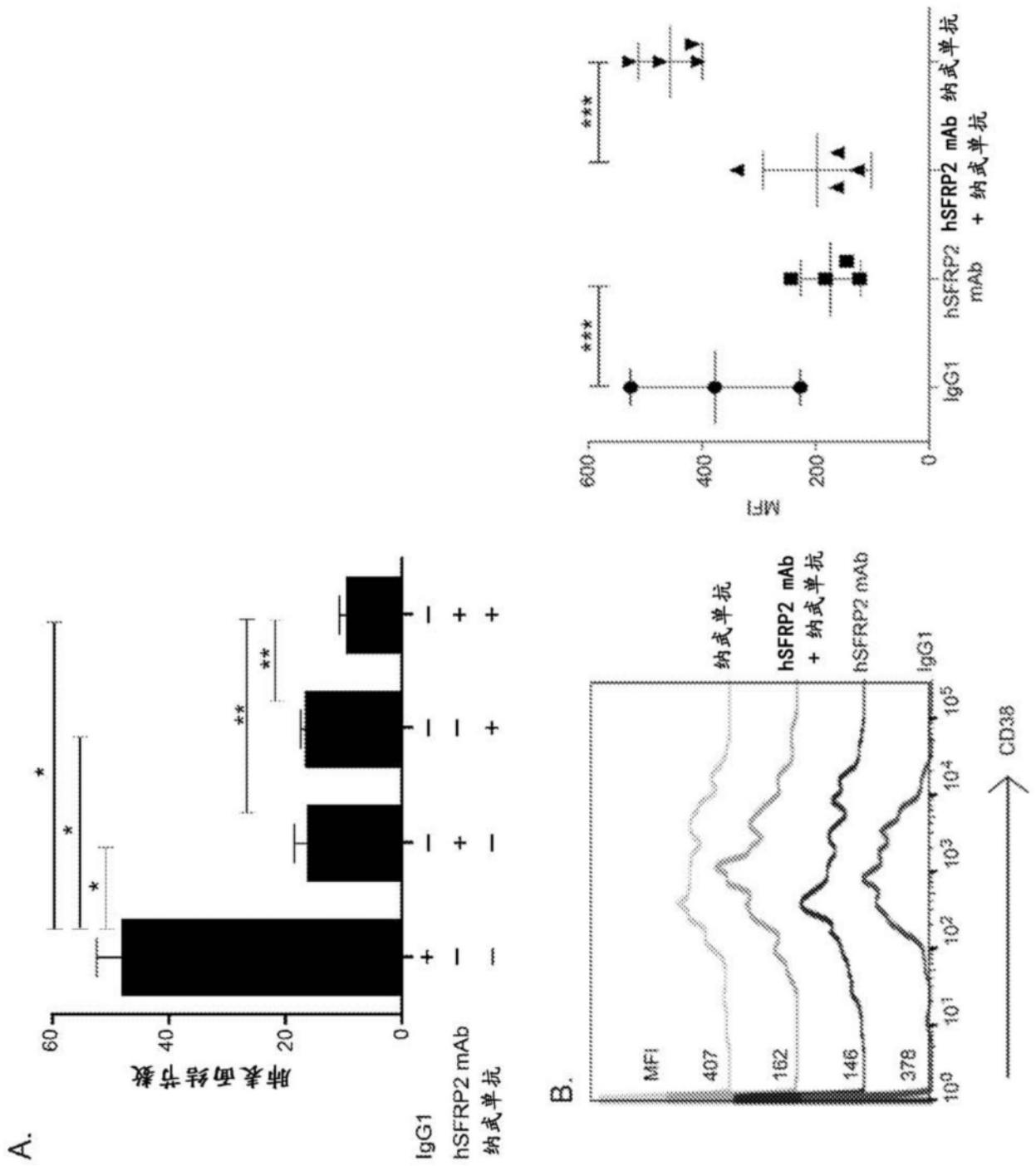

A.
肺表面结节数
60
40
20
0
*
*
*
**
**
IgG1
hSFRP2 mAb
纳武单抗
B.
MFI
407
162
146
378
纳武单抗
hSFRP2 mAb
+ 纳武单抗
hSFRP2 mAb
IgG1
CD38
600
400
200
0
***
***
IgG1
hSFRP2 mAb
hSFRP2 mAb + 纳武单抗

图11

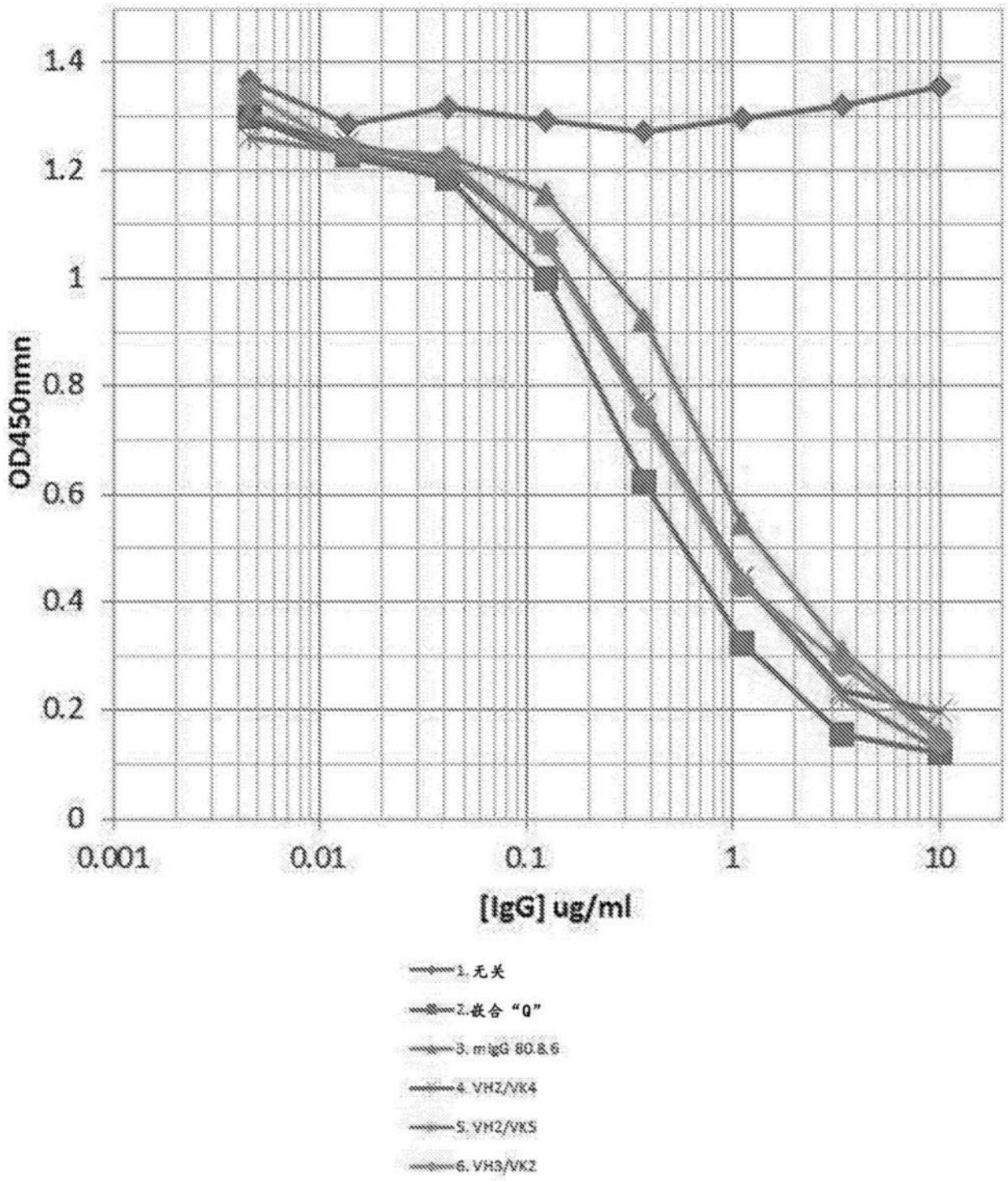

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD450nm
0.001
0.01
0.1
1
10
[IgG] ug/ml
1.无关
2.嵌合“Q”
3.mIgG 80.8.6
4.VH2/VK4
5.VH2/VK5
6.VH3/VK2

图12

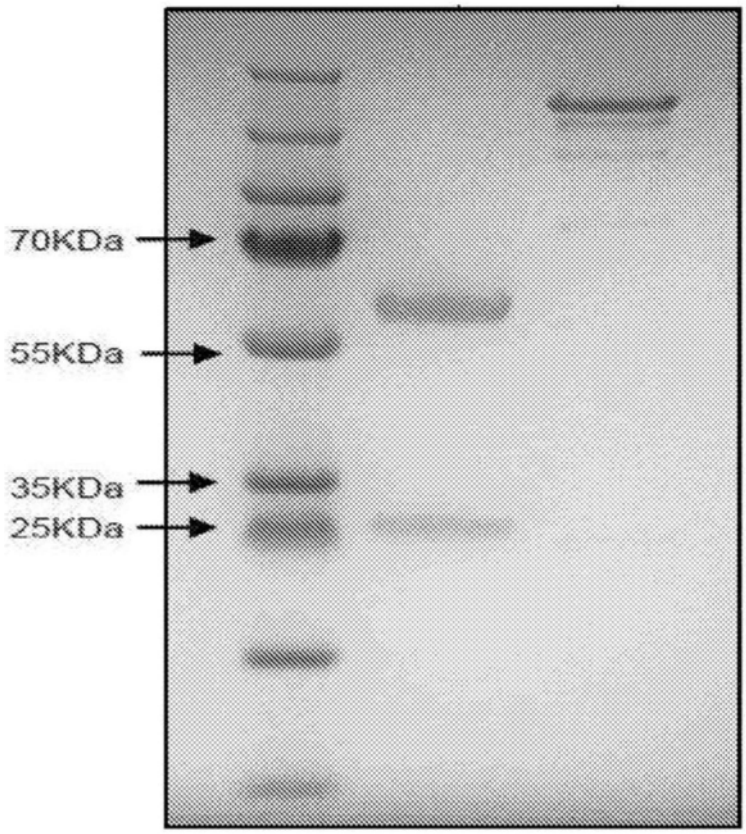


图13

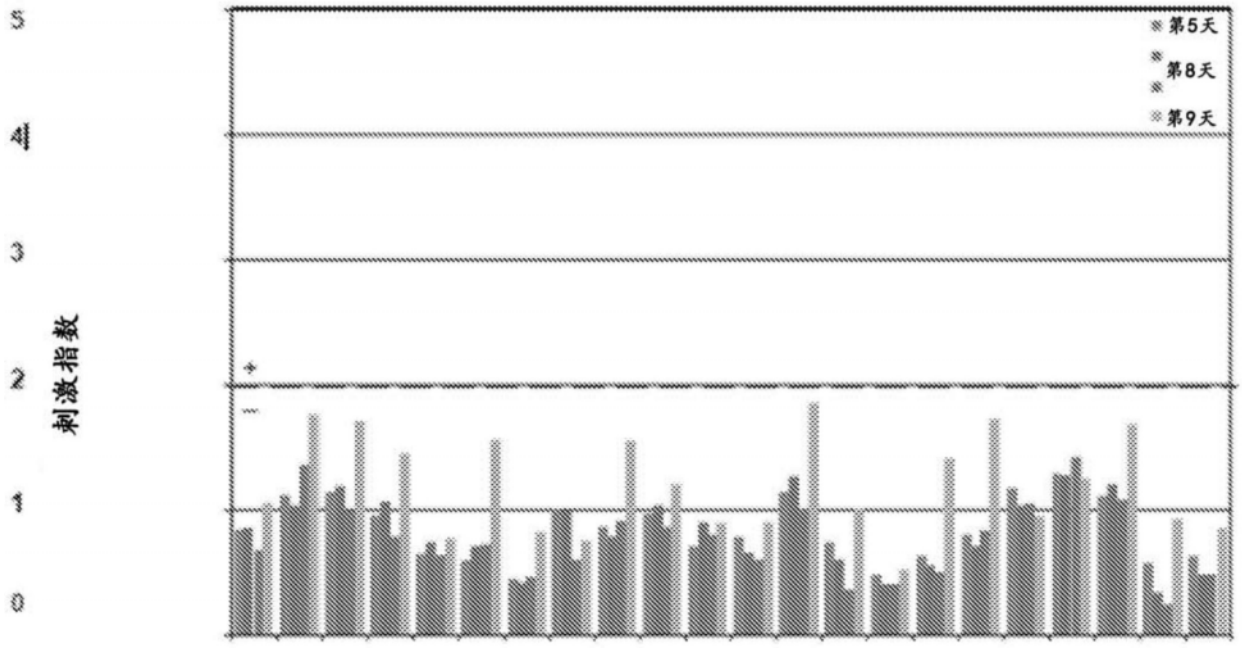


图14