



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114364399 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 15

(21) 申请号 202080045550.9

(22) 申请日 2020.06.19

(30) 优先权数据

62/865,027 2019.06.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/038719 2020.06.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/257640 EN 2020.12.24

(71) 申请人 瓦西尼斯公司

地址 美国纽约州

申请人 H·李·莫菲特癌症中心和研究所
股份有限公司(一家佛罗里州的非
营利性公司)

(72) 发明人 B·切尔涅茨基 K·科杜姆迪
E·埃文斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 钱文字 陈扬扬

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G12N 5/0784 (2010.01)

权利要求书1页 说明书27页
序列表7页 附图35页

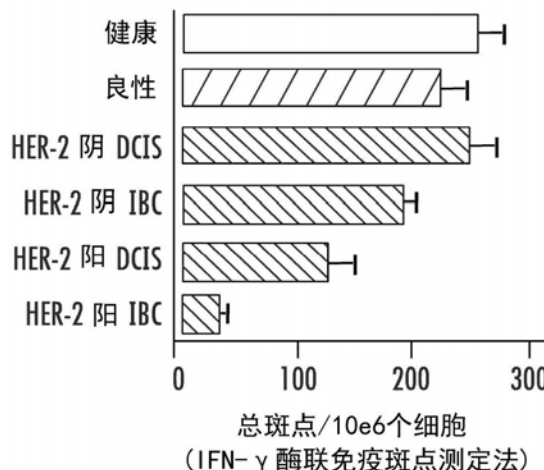
(54) 发明名称

脑信号蛋白-4D阻断剂(SEMA4D)与DC1疗法的
联合疗法

(57) 摘要

公开了组合物和方法,包括给予经脉冲的树
突细胞和免疫调节分子抑制剂以治疗癌症。

有HER-2阳性疾病进展情况的
HER-2 Th1响应的丧失



1. 一种抗癌联合疗法,包括至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞和至少一种免疫调节分子抑制剂;其中免疫调节分子包含脑信号蛋白4D或VEGF。
2. 如权利要求1所述的抗癌联合疗法,其中所述肿瘤驱动因子是人表皮生长因子受体(HER) HER2。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的抗癌联合疗法,其中在给予前用IL-12活化所述肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的抗癌联合疗法,其中所述免疫调节分子抑制剂包括能特异性结合至SEMA4D或VEGF的拮抗剂抗体。
5. 如权利要求4所述的抗癌联合疗法,其中所述能特异性结合至SEMA4D的拮抗剂抗体包括派盘单抗。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的抗癌联合疗法,其中所述至少一种免疫调节抑制剂被配制用于全身给予。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的抗癌联合疗法,其中至少一种肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞被配制用于瘤内给予。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的抗癌联合疗法,其中所述至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞通过如下方式获得:从待用抗癌联合疗法治疗的对象中移出树突细胞,然后使用肿瘤驱动因子离体脉冲所述树突细胞。
9. 如权利要求1-8中任一项所述的抗癌联合疗法,其中所述癌症是乳腺癌、黑素瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、它们的任意组合,或任何其转移。
10. 至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,其用于与至少一种免疫调节分子抑制剂组合以治疗对象的癌症;其中免疫调节分子包含脑信号蛋白4D或VEGF。
11. 如权利要求10所述应用的至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,其中所述肿瘤驱动因子是人表皮生长因子受体(HER) HER2。
12. 如权利要求10或11所述应用的至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,其中所述肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞在给予前用IL-12活化。
13. 如权利要求10-12中任一项所述应用的至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,其中所述免疫调节分子抑制剂包含能特异性结合至SEMA4D或VEGF的拮抗性抗体。
14. 如权利要求13所述应用的至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,其中所述能特异性结合至SEMA4D的拮抗剂抗体包括派盘单抗。
15. 如权利要求10-14中任一项所述应用的至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,其中所述至少一种免疫调节抑制剂被配制用于全身给予。
16. 如权利要求10-15中任一项所述应用的至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,其中至少一种肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞被配制成用于瘤内给予。
17. 如权利要求10-16中任一项所述应用的至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,其中至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞通过如下方式获得:从待用所述抗癌联合疗法治疗的对象中移出树突细胞,并用肿瘤驱动因子离体脉冲所述树突细胞。
18. 如权利要求10-17中任一项所述应用的至少一种用肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,其中所述癌症是乳腺癌、黑素瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、它们的任何组合,或其任何转移。

脑信号蛋白-4D阻断剂(SEMA4D)与DC1疗法的联合疗法

背景技术

[0001] 各种癌症类型的侵袭性特征主要由与细胞生长、增殖、存活和分化密切相关的HER2、HER3、EGFR、c-MET等肿瘤驱动因素(oncodriver)驱动。这些肿瘤驱动因素的过度表达与不良预后有关,并且是肿瘤细胞对靶向疗法产生耐药性的关键因素。原位导管癌(DCIS)是BC 0期的早期形式,每年在美国影响约60,000名女性。这些女性再次发生BC事件的风险升高(25%)。尽管有良好的预后和98%的存活率,但也有一些情况,即女性(包括40岁以下的那些、非洲裔美国妇女和患有雌激素受体阴性(ER^{阴性})DCIS的那些)显示有7-15%的几率死于后续的BC,这很可能是因为播散性癌细胞(DCC)在临床检测到浸润性乳腺癌(IBC)之前逃逸。约33-50%的高级别DCIS病变表达HER2蛋白,另外三分之一显示适度的HER2表达。我们已经显示,患有HER2 DCIS的这些女性具有显著更高的可能性在其DCIS中鉴定出IBC成分,通常为T1a/b(T1a是5mm以下的肿瘤,T1b是5mm-1cm的肿瘤(参见例如,美国癌症联合委员会(AJCC)分期手册(Staging Manual)-第8版,Amin,M.B.等编,施普林格自然出版社(Springer Nature)(2017)),且同侧乳房复发的风险增加。在T1b IBC患者中,后续死亡风险增加至20-30%,因此这些女性中的大多数接受曲妥珠单抗辅助化疗以降低风险。尽管有效,但即使每周给予紫杉醇和曲妥珠单抗也会导致神经、心脏、认知以及其它方面的疾病。这些患者中有许多出现较大面积的DCIS混合T1a/bIBC,并接受更强烈的化疗方案,如PTCH,因为IBC的T分期可能难以辨别。许多还需要接受乳房切除术,因为大面积的DCIS并不总是对新辅助治疗有响应。如果这些肿瘤也是雌激素受体阳性的,那么患者还要接受另外5年的抗雌激素(其进一步提高发病率)治疗。总而言之,一些HER2 DCIS患者可能治疗不足,这导致后续乳房事件的风险升高,甚至死亡率略有增加,T1a/b患者也不能频繁地被过度治疗。由于现有的靶向策略效果欠佳,因此需要有吸引力的免疫治疗策略。

发明内容

[0002] 本文公开了与包含肿瘤驱动因素脉冲的(pulsed)树突细胞和免疫调节分子抑制剂的新型联合疗法相关的方法和组合物。

[0003] 一方面,本文公开了抗癌联合疗法,其包括:用肿瘤驱动因子(例如,人表皮生长因子受体(HER)2(HER2))脉冲的至少一种树突细胞和免疫调节分子(例如,脑信号蛋白(SEMA)4D(SEMA4D)或VEGF)的至少一种抑制剂;其中被抑制的免疫调节分子影响肿瘤的脉管系统。

[0004] 一方面,本文公开了治疗、预防、减少和/或抑制对象的癌症(例如,乳腺癌(包括三阴性乳腺癌、转移性乳腺癌(MBC)、原位导管癌(DCIS)和浸润性乳腺癌(IBC))、黑素瘤、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌和胃癌,包括原发性和远端肿瘤)的方法,所述方法包括给予任何前述方面所述的抗癌联合疗法。因此,一方面,本文公开了治疗对象的癌症的方法,所述方法包括向所述对象给予:用肿瘤驱动因子(例如,人表皮生长因子受体(HER)2(HER2))脉冲的至少一种树突细胞和免疫调节分子(例如,脑信号蛋白(SEMA)4D(SEMA4D)或VEGF)的至少一种抑制剂;其中被抑制的免疫调节分子影响肿瘤的脉管系统。

[0005] 本文还公开了治疗、预防、减少和/或抑制任一前述方面所述的癌症的抗癌联合疗

法;其中至少一种免疫调节分子抑制剂为全身给予和/或肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞为肿瘤内给予。

[0006] 一方面,本文还公开了治疗、预防、减少和/或抑制任一前述方面所述的癌症的抗癌联合疗法;其中在给予前用IL-12活化肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞。

[0007] 本文还公开了治疗、预防、减少和/或抑制任一前述方面所述的癌症的抗癌联合疗法;其中至少一种免疫调节分子抑制剂包含能结合至SEMA4D(本文也称为CD100)的抗体或其功能性片段,例如,抗SEMA4D抗体Mab67或VX15/2503(派盘单抗(Pepinemab))。参见,例如,美国专利号8,496,938,其通过引用方式纳入本文。

[0008] 一方面,本文还公开了治疗、预防、减少和/或抑制任一前述方面所述的癌症的抗癌联合疗法;其中树突细胞从对象中移出并用肿瘤驱动因子离体脉冲。

[0009] 本文还公开了治疗、预防、减少和/或抑制任一前述方面所述的癌症的抗癌联合疗法;其中经脉冲的树突细胞给予至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,18,24,30,36小时,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,21,28,30,31,45天,2,3,4,5,或6个月,然后给予至少一种免疫调节分子抑制剂;与至少一种免疫调节分子抑制剂同时给予;或其中至少一种免疫调节分子抑制剂给予至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,18,24,30,36小时,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,21,28,30,31,45天,2,3,4,5,或6个月,然后给予经脉冲的树突细胞。

[0010] 一方面,本文公开了治疗、预防、减少和/或抑制任一前述方面所述的癌症的抗癌联合疗法;其中至少一种经脉冲的树突细胞给予至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,或24次/天,或至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,或14次/周,持续至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14天,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12周。

[0011] 本文还公开了治疗、预防、减少和/或抑制任一前述方面所述的癌症的抗癌联合疗法;其中至少一种免疫调节分子抑制剂给予至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,或24次/天,或至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,或14次/周,持续至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14天,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12周。

[0012] 附图简要说明

[0013] 包含在本说明书中并构成本说明书一部分的附图说明了几个实施方式,并且与说明书一起说明了所公开的组合物和方法。

[0014] 图1A、1B、1C和1D显示,随着表达肿瘤驱动因子的乳腺疾病的进展,出现了抗肿瘤驱动因子Th1响应的逐渐丧失,以及抗肿瘤驱动因子免疫与改善的临床结果的关联。图1A显示随HER-2阳性疾病进展的HER-2Th1响应的丧失;图1B显示疫苗而非标准疗法有助于恢复抗HER-2Th1免疫;图1C显示对HER-2的Th1免疫能预测对标准疗法的临床反应;而图1D显示HER-2Th1响应性能预测标准疗法后的无疾病生存。缩略词:DCIS:原位导管癌;IBC:浸润性乳腺癌;Tx:治疗;pCR:病理完全缓解;ER:雌激素受体;TNBC:三阴性乳腺癌。

[0015] 图2A、2B和2C显示,与DC1疫苗接种同时进行短程抗雌激素治疗能提高患有激素依赖性(ER-阳性)疾病的对象的pCR率(图2A)和抗HER2 Th1免疫(图2B),并且病例完全缓解(pCR)能预测全部疫苗接种对象免于后续乳房事件(SBE)的长期自由(图2C)。

[0016] 图3A-3G显示了肿瘤内DC1联合抗SEMA4D抗体在HER2阳性TUBO模型中诱导的肿瘤消退。图3A:与IgG同种型对照抗体相比,通过免疫组织化学测量的TUBO细胞中的SEMA4D表

达;图3B:在单一肿瘤模型中,瘤内II类HER2肽脉冲的DC1瘤内注射联合腹膜内给予的抗SEMA4D抗体(图3B1)和存活曲线(图3B2);图3C:瘤内DC1联合抗SEMA4D在双侧模型中的功效(图3C1和图3C2);携带TUB0的小鼠用未脉冲的或II类HER2肽脉冲的活化的DC1单独或联合抗SEMA4D抗体处理;图3D:DCIS和IBC患者的SEMA4D的IHC染色,数字表示SEMA4D染色阳性的患者数量;图3E:来自单独用DC1、单独用抗SEMA4D,或联合处理的每mg肿瘤的髓源性抑制细胞(MDSC)浸润;图3F:每mg肿瘤的CD4T细胞浸润;图3G:淋巴结中的CD4 T细胞浸润(绝对数量)。

[0017] 图4A、4B和4C显示,与来自单独疫苗接种HER2-DC1的小鼠的T细胞相比,来自HER2-DC1+aSema4D处理的小鼠的T细胞在增殖、功能和特异性方面更优。图4A:体外CD4 T细胞扩增三周后的倍数扩增。CD4+T细胞使用EASYSSEP™(Stemcell Technologies)从接种小鼠的分离的脾细胞分离,并与HER2肽脉冲的DC1共培养,然后用IL-2和IL-7扩增三周;图4B:与来自DC1疫苗接种小鼠的T细胞相比,来自DC1+抗SEMA4D处理小鼠的扩增的T细胞对HER2/neu肽抗原p5、p435和p1209具有更高的抗原特异性;图4C:扩增的T细胞的累积IFN- γ 响应。

[0018] 图5A、5B和5C显示了在neu转基因小鼠中DCC的检测。图5A:通过细胞角蛋白8/18和HER2表达对骨髓(BM)中的DCC进行流式染色;图5B:HER2、细胞角蛋白和ki67的免疫荧光染色;图5C:neu T小鼠不同器官中DCC的检测。

[0019] 图6A、6B、6C和6D显示HER2肽-DC1疫苗在NeuT小鼠中防止乳腺肿瘤发展、诱导衰老和消除DCC。图6A:来自对照和DC1疫苗接种的neu T小鼠的骨髓DCC的免疫荧光染色;图6B:使用超声波可检测到乳腺中的肿瘤块;图6C:使用流式细胞术测量的骨髓中的DCC百分比;图6D:使用 β -gal测定法进行的衰老细胞检测。 β -gal染色后的代表性图像。

[0020] 图7A和7B显示HER2肽脉冲的DC1疫苗和抗SEMA4D治疗诱导Neu T小鼠乳腺中B细胞的浸润和骨髓中CD4+T细胞的浸润。图7A:8周龄的NeuT小鼠用HER2肽脉冲的DC1疫苗(每周注射两次,持续三周)或抗SEMA4D抗体治疗。第16周,处死小鼠,收集乳腺。制备乳腺单细胞悬液并染色CD19阳性B细胞,然后通过流式细胞术进行分析。与未治疗的对照相比,在DC1疫苗接种小鼠和抗SEMA4D治疗的小鼠中观察到CDa19+B细胞水平增加;图7B:来自对照和DC1疫苗接种NeuT小鼠的骨髓细胞针对CD4和CD8 T细胞标志物进行染色,并通过流式细胞术进行分析。与未治疗的对照小鼠相比,在DC1疫苗接种NeuT小鼠的骨髓中观察到CD4 T细胞和CD8 T细胞的数量增加。

[0021] 图8A、8B、8C、8D和8E显示HER2和HER3的双重阻断联合Th1细胞因子能介导SK-BR-3乳腺癌细胞中的肿瘤衰老和细胞凋亡。图8A:SK-BR-3细胞中HER2/HER3的双重阻断联合Th1细胞因子TNF- α 和IFN- γ 增加了衰老细胞的数量,在细胞中观察到更高的SA- β -gal染色;图8B:SK-BR-3细胞未经处理(1)、用TNF- α 和IFN- γ 处理(2),或用曲妥珠单抗(赫赛汀,H(TZm))和帕妥珠单抗(Per)处理(3),或用TNF- α 、IFN- γ 和TZm和Per处理(4);图8C:用Th1细胞因子联合TZm和Per处理的SK-BR-3细胞的Western印迹分析,其诱导了细胞周期蛋白依赖性激酶4抑制剂B(也称p15^{INK4b})和裂解的半胱天冬酶-3的表达(处理编号如分图B所示);以及,图8D和图8E:膜联蛋白V/PI染色的细胞凋亡(处理编号如分图D和E所示)。

[0022] 图9A、9B和9C显示,Th1细胞因子TNF- α 和IFN- γ 在曲妥珠单抗和帕妥珠单抗抗性乳腺癌细胞中诱导衰老和细胞凋亡。图9A:HCC-1419和JIMT-1细胞;1)未处理;2)用TNF- α 和IFN- γ 处理;3)用TZm和Per处理,或4)用TNF- α 、IFN- γ 、TZm和Per处理。图9A:SA- β -gal阳性

细胞的百分比;图9B:处理后,HCC-1419的p15^{INKb}和裂解的半胱天冬酶3表达的Western印迹分析;和,图9C:JIMT-1细胞的Western印迹分析。粘着斑蛋白用作对照。

[0023] 图10A和10B显示了HER2-过表达的人乳腺癌细胞的HER2特异性CD4⁺Th1介导的衰老和细胞凋亡。图10A:SK-BR-3细胞与以下组分共培养:单独的CD4⁺T细胞(仅CD4⁺(1))、CD4⁺T细胞+HER2肽脉冲的未成熟树突细胞(CD4⁺IDC H(2)),CD4⁺T细胞+HER2肽脉冲的成熟树突细胞(CD4⁺DC H(3)),或CD4⁺DC H与曲妥珠单抗(Tzm)和帕妥珠单抗(Per)(4),或CD4⁺T细胞+无关肽脉冲的成熟树突细胞(BRAF(CD4⁺DC B)(5));或存活蛋白(CD4⁺DC S)(6),与Tzm和Per。图10B:肿瘤细胞的Western印迹分析显示,在Tzm和Per存在下,与DC H/CD4⁺T细胞共培养时,p15^{INK4b}和裂解的半胱天冬酶3表达的增加表明诱导的衰老和细胞凋亡,但该结果不来自DC B、DC S和iDC H组。粘着斑蛋白用作上样对照。

[0024] 图11显示,在一线转移性乳腺癌患者中,每周两次皮下给予IFN- γ ,连同每周一次紫杉醇和标准剂量的曲妥珠单抗和帕妥珠单抗是安全的,且导致部分响应的疾病稳定化。

[0025] 图12A、12B、12C和12D显示,DCIS中,DC1疫苗接种之前和之后,淋巴细胞浸润的免疫组织化学染色。图12A和图12B显示了密集的淋巴细胞浸润区域;图12C和图12D显示几乎没有或没有响应的区域。

[0026] 图13显示,DCIS中,DC1疫苗接种之前和之后,淋巴细胞的积累。显示了CD4、CD8和CD20浸润。

[0027] 图14显示了DC1疫苗接种后,DCIS导管中的淋巴细胞浸润。

[0028] 图15A和15B显示,肿瘤内DC1和抗SEMA4D的联合疗法改善了肿瘤血管分布。图15A:静脉内给予钆布醇(Gadavist)(基于钆的MRI造影剂,0.2mmol/kg)之后计算的DCE-MRI曲线的斜率。尽管肿瘤体积较大,但联合治疗显示较小的斜率,表明血管渗漏较少;图15B:TUBO肿瘤的DCE-MRI曲线显示联合疗法具有较小的DCE曲线。数据表示为相对值(相对于曲线的第一个点)以显示肿瘤之间的可靠比较。

[0029] 图16显示了用抗SEMA4D治疗的TUBO肿瘤的CEST MRI(肿瘤pH)图。从右到左:代表ROI的T2加权图像,插入的pH图显示了pH平均值及其标准偏差),以及代表计算出的全部像素的pH值的直方图。

[0030] 图17A-F显示,抗SEMA4D活性需要CD4⁺T细胞。图17A:在用Her2DC1、抗SEMA4D、HER2 DC1加抗SEMA4D或对照IgG治疗后,鼠Her2 TUBO乳腺癌模型中随时间的平均肿瘤大小(mm²)。图17B:用Her2DC1、抗SEMA4D、HER2DC1加抗SEMA4D或对照IgG治疗后Her2 TUBO荷瘤小鼠的存活百分比。图17C:在用Her2DC1、抗SEMA4D、HER2 DC1加抗SEMA4D处理或无处理后,CD4耗尽的Her2 TUBO荷瘤小鼠中随时间的平均肿瘤大小(mm²)。图17D:用Her2DC1、抗SEMA4D、HER2 DC1加抗SEMA4D治疗或无治疗后,CD4耗尽的Her2 TUBO荷瘤小鼠的存活百分比。图17E:在用Her2DC1、抗SEMA4D、HER2DC1加抗SEMA4D或对照IgG治疗后,随时间的个体Her2 TUBO荷瘤小鼠中的肿瘤大小(mm²)。在用抗SEMA4D和抗SEMA4D加Her2DC1的组合治疗后,在对照Balb/c小鼠中观察到完全的肿瘤消退。图17F:在用Her2DC1、抗SEMA4D、HER2DC1加抗SEMA4D或对照IgG治疗后,随时间的个体CD4耗尽的Her2 TUBO荷瘤小鼠中的肿瘤大小(mm²)。(17E,F:显示每只小鼠的肿瘤生长曲线;CR=肿瘤完全消退;肿瘤体积<50mm²。)(*p<0.05,**p<0.01)

[0031] 图18A-C显示,Fc受体 γ (FcR γ)是联合疗法治疗后肿瘤完全消退所必需的。图

18A:用HER2DC、抗SEMA4D、HER2DC加抗SEMA4D治疗或无治疗的BALB/C.129P2 (B6) - Fcrlg^{tm1Rav}N12荷瘤小鼠中的平均肿瘤大小(mm²)。图18B:用HER2DC、抗SEMA4D、HER2DC加抗SEMA4D治疗或无治疗的C.129P2 (B6) -Fcrlg^{tm1Rav} N12荷瘤小鼠的平均存活率。图18C:显示了每只小鼠的肿瘤生长曲线。未在FcR γ 缺陷小鼠中观察到完全的肿瘤消退。(*p<0.05,**p<0.01)

[0032] 图19显示干扰素 γ (IFN- γ)是DC1、抗SEMA4D和联合疗法的抗肿瘤活性所必需的。显示在用Her2DC1、抗SEMA4D、HER2DC1加抗SEMA4D或对照IgG处理后,随着时间推移的Balb/C IFN- γ 敲除(KO) (C.129S7 (B6) - IFNg^{tm1Ts}/J (IFN- γ ^{KO},杰克森实验室公司(Jackson Laboratories))小鼠中的平均肿瘤大小(mm²),所述小鼠携带从鼠Her2 TUBO乳腺癌细胞产生的肿瘤。

具体实施方式

[0033] 在公开和描述本发明的化合物、组合物、制品、装置和/或方法之前,应理解,除非另有说明,否则它们不限于特定的合成方法或特定的重组生物技术方法,或除非另有说明,否则它们不限于特定的试剂,因此当然可能会有所不同。还应理解,本文中使用的术语仅意在描述特定实施方式,并不旨在进行限制。

[0034] 定义

[0035] 在本说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个指示物,除非上下文中有明显的表示。因此,例如,提及“一种药学运载体”时,包括两种或更多种这样的运载体等。

[0036] 本文中,范围可以表示为从“约”一个具体值开始和/或至“约”另一个具体值终止。当表述这样的范围时,另一个实施方式包括自所述一个具体数值始和/或至所述另一具体数值止。类似地,当用先行词“约”将数值表示为近似值时,应理解具体数值构成了另一个实施方式。还应理解,每个范围的端点在与另一个端点有关及独立于另一个端点时都是重要的。还应理解,本文公开了多个数值,并且每个数值在本文中除了作为该数值本身公开之外,还作为“约”该具体数值来公开。例如,如果公开了数值“10”,则还公开了“约10”。还应理解,如本领域技术人员能够恰当理解的那样,当公开值时,“小于或等于”该值、“大于或等于该值”以及值之间的可能范围也被公开。例如,如果公开值“10”,则还公开了“小于或等于10”以及“大于或等于10”。还应理解,在整个申请中,以多种不同格式提供数据,并且该数据代表了各种终点和起点以及数据点任意组合而成的范围。例如,如果公开了特定数据点“10”和特定数据点15,则应理解为视为公开了大于、大于或等于、小于、小于或等于和等于10和15以及10至15之间。还应理解,也公开了两个特定单元之间的每个单元。例如,如果公开了10和15,则还公开了11、12、13和14。

[0037] 在本说明书和所附的权利要求书中提到了许多术语,这些术语应具有以下含义:

[0038] “任选的”或“任选地”意为随后描述的事件或情形可能发生,也可能不发生,而且该描述包括事件或情形发生的情况和事件或情形不发生的情况。

[0039] “减少/降低”可以指导致症状、疾病、成分、病症或活性减少的任何变化。当具有该物质的基因产物的遗传输出低于没有该物质的基因产物的输出时,该物质也被理解为减少/降低基因的遗传输出。又例如,减少/降低可以是紊乱的症状的变化,从而所述症状比以

前观察到的要少。减少/降低可以是病症、症状、活性、组合物的统计学显著量的任何个体、中值或平均减少/降低。因此,减少/降低可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100%减少/降低,只要减少/降低为统计学显著的即可。

[0040] “抑制”、“抑制了”和“抑制性”是指使活性、反应、病症、疾病或其它生物参数减少/降低。这可以包括但不限于活性、反应、病症或疾病的完全消退。这还可以包括,例如,与天然或对照水平相比,活性、反应、病症或疾病减少或降低10%。因此,与天然或对照水平相比,降低可以是10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%或介于两者之间的任何降低量。

[0041] “减少”或该词的其它形式,例如“降低”或“减低”,是指降低事件或特征(例如,肿瘤生长)。可以理解,这通常与某个标准或预期值有关,换言之,它是相对的,但并不总是需要参考标准或相对值。例如,“减少肿瘤生长”是指相对于标准或对照降低肿瘤的生长速率。

[0042] “防止”或该词的其它形式,例如“预防”或“御防”,是指阻止特定事件或特征,稳定或延迟特定事件或特征的发展或进展,或将特定事件或特征发生的可能性降到最低。预防不需要与对照进行比较,因为它通常比减少更绝对。如本文所用,某些事物可以被减少但不能被防止,但被减少的某些事物也可以被防止。同样,某些事物可以被防止但不被减少,但被防止的某些事物也可以被减少。应理解,在使用减少或防止的情况下,除非另外特别指明,还明确公开了其它词的使用。

[0043] “生物相容的”通常是指通常对受者无毒并且不会对对象造成显著不利影响的物质及其任何代谢物或降解产物。

[0044] “包括/包含”旨在表示组合物、方法等包括/包含所列举的要素,但不排除其它要素。当用于定义组合物和方法时,“基本上由……组成”是指包括/包含所列举的元素,但不包括/包含对该组合具有任何重要意义的其它元素。因此,基本上由本文定义的元素组成的组合物不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物和药学上可接受的运载体,例如磷酸盐缓冲盐水,防腐剂等。由“由……组成”应意味着排除多于痕量要件的其他成分,以及多于用于给予本公开中提供和/或要求保护的组合物的基本方法步骤的其他内容。通过各个这些转换术语定义的实施方式在本发明范围内。

[0045] “对照”是用于比较目的的实验中使用的替代对象或样品。对照可为“阳性(正)”或“阴性(负)”。

[0046] 药剂的“有效量”是指足以提供所需效果的药剂的量。“有效”的药剂的量将因对象而异,取决于许多因素,例如对象的年龄和一般状况、特定药剂等。因此,并不总是可以指定量化的“有效量”。然而,本领域普通技术人员可以使用常规实验确定任何对象情况下的适当“有效量”。此外,如本文所用,除非另外具体说明,否则药剂的“有效量”还可指涵盖治疗有效量和预防有效量的量。达到治疗效果所需的药剂的“有效量”可以根据例如对象的年龄、性别和体重等因素而变化。可以调整剂量方案以提供最佳治疗反应。例如,可以每天给予几个分开的剂量,或者可以根据治疗情况的紧急情况按比例减少剂量。

[0047] “药学上可接受的”成分可以指,在生物学或其它方面不是不合需要的成分,即,该成分可以被掺入由本公开提供的药物制剂中并如本文所述给予于对象而不引起显著的不合需要的生物学作用或以有害方式与包含它的制剂的任何其它成分相互作用。当用于人体给予时,该术语通常意味着该成分符合毒理学和制造测试的要求标准,或者包含在美国食

药监局编制的非活性成分指南 (Inactive Ingredient Guide) 中。

[0048] “药学上可接受的运载体” (有时称为“运载体”) 是指可用于制备通常安全无毒的药物或治疗组合物的运载体或赋形剂, 且包括兽医和/或人类药学或治疗用途可接受的运载体。术语“运载体”或“药学上可接受的运载体”可包括但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液 (例如油/水或水/油乳液) 和/或各种类型的润湿剂。如本文所用, 术语“运载体”包括但不限于任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、脂质、稳定剂或本领域公知的用于药物制剂的其他物质, 且如本文进一步所述。

[0049] “药理活性” (或简称“活性”), 如“药理活性”衍生物或类似物, 可以指具有与母体化合物相同类型且程度上大致等同的药理活性的衍生物或类似物 (例如, 盐、酯、酰胺、偶联物、代谢物、异构体、片段等)。

[0050] “聚合物”是指分子量相对较高的有机化合物, 无论是天然的还是合成的, 其结构可以用重复的小单元单体来表示。聚合物的非限制性示例包括聚乙烯、橡胶、纤维素。合成聚合物通常通过单体的加成或缩聚形成。术语“共聚物”是指由两种或更多种不同的重复单元 (单体残基) 形成的聚合物。作为示例而非限制, 共聚物可以是交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物或接枝共聚物。还预期在某些方面, 嵌段共聚物的各种嵌段链段本身可包含共聚物。术语“聚合物”涵盖所有形式的聚合物, 包括但不限于天然聚合物、合成聚合物、均聚物、杂聚物或共聚物、加成聚合物等。

[0051] 本文提供的“结合分子”或“抗原结合分子” (例如, 抗体或其抗原结合片段) 在其最广泛的意义上是指特异性结合抗原决定簇的分子。在一个实施方式中, 结合分子能与免疫调节剂分子 (例如, 约150kDa的跨膜SEMA4D (CD100) 多肽或约120kDa的可溶性SEMA4D多肽) 特异性结合。在另一个实施方式中, 结合分子是抗体或其抗原结合片段, 例如MAb67或派盘单抗 (pepinemab)。

[0052] “治疗剂”是指具有有益生物学作用的任何组合物。有益生物学作用包括治疗作用, 例如治疗紊乱或其它不期望的生理状况, 和预防作用, 例如预防紊乱或其它不期望的生理状况 (例如, 非免疫原性癌症)。该术语还包括本文具体提及的有益物质的药学上可接受的、药理学活性的衍生物, 包括但不限于盐、酯、酰胺、前体、活性代谢物、异构体、片段、类似物等。当使用术语“治疗剂”时, 或者当具体确定特定药剂时, 应理解该术语包括药剂本身以及药学上可接受的、药理学活性的盐、酯、酰胺、前药、偶联物、活性代谢物、异构体、片段、类似物等。

[0053] 组合物 (例如包含药剂的组合物) 的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指有效实现期望的治疗结果的量。在一些实施方式中, 期望的治疗结果是控制I型糖尿病。在一些实施方式中, 期望的治疗结果是控制肥胖。给定治疗剂的治疗有效量通常会随着例如所治疗的病症或疾病的类型和严重程度以及对象的年龄、性别和体重等因素而变化。该术语还可以指治疗剂的量, 或治疗剂的递送速率 (例如, 随时间推移的量), 其有效于促进期望的治疗效果, 例如疼痛缓解。确切期望的治疗效果将根据待治疗的病症、对象的耐受性、待给予的药剂和/或药剂制剂 (例如, 治疗剂的效力、制剂中药剂的浓度和等), 以及本领域普通技术人员所理解的各种其它因素而不同。在一些情况下, 在数天、数周或数年的时间段内向对象给予多剂量的组合物后能实现所需的生物学或医学响应。

[0054] 在本申请中, 引用了各种出版物。这些出版物的公开内容在此通过引用其全文方

式纳入本申请,以便更全面地描述与其相关的现有技术。所公开的参考文献也单独地和具体地以引用的方式纳入本文以用于其中所包含的材料,这些材料在参考文献所依赖的句子中进行了讨论。

[0055] 组合物

[0056] 公开了用于制备公开的组合物的组分以及在本文公开的方法中使用的组合物本身。在本文中公开了这些材料和其他材料,应理解的是,当公开了这些材料的组合、子集、相互作用、组等而未明确地具体公开这些化合物的每个不同的单独组合和共同组合以及排列时,在本文中具体设想和描述了它们中的每一种情况。例如,如果公开和讨论了特定的免疫调节剂分子抑制剂或肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞,并且讨论了可以对包括免疫调节剂分子抑制剂或肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞在内的许多分子进行的许多修饰,则特别考虑的是免疫调节剂分子抑制剂或肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞的每种及全部组合和排列以及可能的修饰,除非有特别相反指示。因此,如果公开了一类分子A、B和C且公开了一类分子D、E和F以及组合形式的分子A-D的实例,那么即使没有单独地陈述每一种组合形式,也认为公开了单独和共同构想的含义组合A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F。同样地,还公开了这些的任何子集或组合。因此,例如,应认为公开了子集A-E、B-F和C-E。这一概念适用于本申请所有方面,包括但不限于制造和采用本公开的组合物的方法中的各步骤。因此,如果存在可进行的多个附加步骤,应当理解可通过本公开的方法的任何特定实施方式或实施方式的组合来进行这些附加步骤中的每一个步骤。

[0057] 显示DCIS的患者一般预后良好,但是那些年龄小于40岁的非裔美国女性和ER^{阳性} DCIS适度增加了后续BC死亡的风险,手术和放疗似乎都无法预防。第二个问题是,许多年轻患者还存在较大的表达HER2的DCIS区域,其中包含T1a/T1b浸润区域。这些患者通常要么接受乳房切除术(归因于钙化区域的大小),要么接受卡铂、泰索帝联合曲妥珠单抗和帕妥珠单抗(PTCH)或紫杉醇和曲妥珠单抗(TH)的强力新辅助化疗方案治疗,会有良好的生存率,但要承受大量手术、放疗和化疗的长期后果。在个性化医疗的一天中,这些患者需要更个性化的有效治疗,这既降低了后续BC死亡率的几率,同时也减少了他们从化疗、一年的曲妥珠单抗、放疗和乳房切除术中接受的过度治疗。转移性乳腺癌(MBC)患者迫切需要新的免疫疗法来降低死亡率,尤其是那些对靶向疗法产生抗药性的患者。

[0058] HER-2/neu过度表达在乳腺癌(BC)发展中起着关键作用,且其在导管原位癌(DCIS)中的表达与侵袭性BC(IBC)的发展有关。在HER2阳性DCIS和侵袭性BC患者中,全身性抗HER2 Th1免疫反应逐渐丧失。II类HER2肽脉冲的I型极化树突细胞疫苗(HER2-DC1)的给予部分恢复了抗HER2 Th1免疫应答,其中,DCIS中的病理完全响应率(pCR)约为30%。有机会改善早期HER2 BC患者的免疫反应和临床活性。脑信号蛋白4D(SEMA4D)是一个可溶性跨膜蛋白家族,对组织和器官发育至关重要,并参与免疫调节。SEMA4D的过度表达与各种癌症的不良预后和肿瘤进展相关。在这项研究中,研究了鼠抗SEMA4D单克隆抗体(由Vaccinex提供)联合DC1疫苗以增强HER2阳性TUB0乳腺癌临床前模型中的抗肿瘤免疫反应。

[0059] 一方面,本文公开了抗癌联合疗法,其包含用肿瘤驱动因子(例如,人表皮生长因子受体HER2)脉冲的至少一种树突细胞和免疫调节分子的至少一种抑制剂(例如,脑信号蛋白(SEMA)4D(SEMA4D)或VEGF)。在某些非限制性方面,被抑制的免疫调节分子可影响肿瘤的脉管系统。

[0060] 可以理解并在本文中,预期所公开的抗癌联合疗法可用于治疗、预防、减少和/或抑制发生不受控制的细胞增殖的任何疾病,例如癌症,包括原发性和远端肿瘤。不同类型癌症的非限制性列表如下:淋巴瘤(霍奇金和非霍奇金)、白血病、癌、实体组织癌、鳞状细胞癌、腺癌、肉瘤、神经胶质瘤、高级神经胶质瘤、母细胞瘤、神经母细胞瘤、浆细胞瘤、组织细胞瘤、黑素瘤、腺瘤、缺氧肿瘤、骨髓瘤、艾滋病相关的淋巴瘤或肉瘤、转移性癌症或一般癌症。

[0061] 所公开的组合物可用于治疗的癌症的代表性但非限制性列表如下:淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、蕈样肉芽肿、霍奇金病、髓性白血病、膀胱癌、脑癌、神经系统癌症、头颈癌、头颈鳞状细胞癌、肺癌如小细胞肺癌和非小细胞肺癌、神经母细胞瘤/胶质母细胞瘤、卵巢癌、皮肤癌、肝癌、黑素瘤、口腔、咽喉、喉部和肺的鳞状细胞癌、宫颈癌(cervical cancer)、宫颈恶性上皮瘤(cervical carcinoma)、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌、转移性乳腺癌(MBC)、原位导管癌(DCIS)和浸润性乳腺癌(IBC))和上皮癌癌症、肾癌、泌尿生殖系统癌、肺癌、食道癌、头颈癌、大肠癌、造血系统癌、睾丸癌、结直肠癌、前列腺癌或胰腺癌。因此,一方面,本文公开了治疗、预防、减少和/或抑制对象的癌症(例如,乳腺癌(包括三阴性乳腺癌、转移性乳腺癌(MBC)、原位导管癌(DCIS)和浸润性乳腺癌(IBC))、黑素瘤、结直肠癌、胰腺癌和前列腺癌且包括原发性和远端肿瘤)的方法,所述方法包括给予任何前述方面所述的抗癌联合疗法。例如,本文公开了治疗、预防、减少和/或抑制对象癌症的方法,包括向对象给予用肿瘤驱动因子(例如,人表皮生长因子受体(HER)HER2)脉冲的至少一种树突细胞,和至少一种免疫调节分子抑制剂(例如脑信号蛋白(SEMA)4D(SEMA4D)或VEGF)。在某些非限制性方面,被抑制的免疫调节分子可影响肿瘤的脉管系统。

[0062] 一方面,应理解,本文所公开的方法和抗癌联合疗法包括免疫调节分子的抑制剂,其具有免疫调节作用,且在某些非限制性方面还可以影响肿瘤的脉管系统。应理解并在本文中预期,所述抑制剂可包括能够抑制免疫调节分子的免疫调节和/或血管活性的任何小分子、肽、蛋白质、抗体(包括抗体的任何功能性片段或其他结合分子),和/或功能性核酸(siRNA、RNA、适体)。一方面,免疫调节分子的抑制剂包括SEMA4D抑制剂派盘单抗(一种抗SEMA4D抗体)。

[0063] 抗体

[0064] 抗体一般介绍

[0065] 术语“抗体”在本文中以广义涵义使用并且包括多克隆和单克隆抗体。除了完整的免疫球蛋白分子之外,术语“抗体”还包括那些免疫球蛋白分子的片段或聚合物,以及免疫球蛋白分子的人源或人源化形式或其片段,只要它们有能力与免疫调节分子(例如,脑信号蛋白(SEMA)4D(SEMA4D)或VEGF)相互作用,以使免疫调节剂分子的免疫调节活性和/或其对肿瘤脉管系统的作用被抑制即可。可以使用本文所述的体外测定法或通过类似方法测试抗体的所需活性,之后,可以根据已知的临床测试方法测试体内治疗和/或预防活性。天然抗体通常是异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成。通常,各轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而二硫键的数量在不同免疫球蛋白同种型的重链之间有所不同。各重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键。各重链的一端都有一个可变域(V(H)),后跟多个恒定域。各轻链的一端有一个可变域(V(L)),另一端有一个恒定域;轻链恒定域与重链第一恒定域对齐,轻链可变域与重链可变域对齐。据信,特定的氨基酸残基在轻

链和重链可变域之间会形成界面。基于恒定域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体轻链可以归为两种明显不同的类型之一,称为卡帕(k)和拉姆达(l)。根据其重链的恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同的类别。人类免疫球蛋白有五个主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些可以进一步分为不同亚类(同种型),例如IgG-1、IgG-2、IgG-3和IgG-4;IgA-1和IgA-2。本领域技术人员能够识别小鼠的相当的类别。不同类别免疫球蛋白对应的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0066] 术语“可变”在本文中用于描述可变结构域的某些部分,其序列在抗体之间不同并且用于各特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,变异性通常不是均匀分布在抗体的可变域中的。它通常集中在轻链和重链可变域中称为互补决定区(CDR)或高变区的三个片段中。可变域中高度保守的部分称为框架(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR区,主要采用b-折叠构型,通过三个CDR相连,形成环间连接,并在某些情况下形成b-折叠结构的部分。各链中的CDR通过FR区紧密凑集在一起,并与另一链中的CDR一起形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat E.A.等,《免疫学热门蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),美国国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达(1987))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应物功能,例如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0067] 在本文公开的某些抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物(例如抗SEMA4D抗体派盘单抗)中,多聚体的一条多肽链的重链部分与多聚体的第二条多肽链上的那些相同。或者,含重链部分的单体不同。例如,各单体可以包含不同的靶结合位点,形成例如双特异性抗体。

[0068] 用于本文公开的诊断和治疗方法的结合分子的重链部分可以源自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可包含从IgG1分子衍生的 C_{H1} 结构域和从IgG3分子衍生的铰链区。在另一个示例中,重链部分可包含部分衍生自IgG1分子、部分衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个示例中,重链部分可以包括部分衍生自IgG1分子、部分衍生自IgG4分子的嵌合铰链。

[0069] 如本文所用,术语“轻链部分”包含衍生自免疫球蛋白轻链(例如, κ 或 λ 轻链)的氨基酸序列。优选地,轻链部分包含VL或CL结构域中的至少一种。

[0070] 本文公开的抗SEMA4D抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物可就其识别或特异性结合的抗原的表位或部分方面被描述或说明,例如,本文公开的靶多肽(例如,SEMA4D)。靶多肽与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶多肽可包含单个表位,但通常包含至少两个表位,并可包括任意数量的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。此外,应注意,靶多肽上的“表位”可以是或可以包含非多肽元件,例如,表位可包含碳水化合物侧链。

[0071] 抗体的肽或多肽表位的最小大小被认为是大约四到五个氨基酸。肽或多肽表位优选含有至少七个,更优选至少九个,最优选至少约15至约30个氨基酸。由于CDR可以识别三级形式的抗原肽或多肽,因此构成表位的氨基酸不需要是连续的,并且在某些情况下,甚至可以不在同一肽链上。被抗SEMA4D抗体识别的肽或多肽表位可包含SEMA4D的至少4、至少5、至少6、至少7、更优选至少8、至少9、至少10、至少15、至少20个、至少25个或约15至约30个连续或非连续氨基酸。

[0072] “特异性结合”通常是指抗体通过其抗原结合结构域与表位结合,并且结合需要抗原结合结构域和表位之间的一些互补性。按照这一定义,当抗体通过其抗原结合结构域与表位结合比其与随机、无关的表位结合更容易时,称该结合分子“特异性结合”该表位。本文中使用的术语“特异性”定性分析某一抗体与某一表位结合的相对亲和性。例如,可认为抗体“A”比抗体“B”对给定表位具有更高特异性,或者说抗体“A”比其对相关表位“D”的特异性更高的特异性结合表位“C”。

[0073] “优先结合”指的是抗体对某表位的特异性结合比其对相关、类似、同源或相似表位的可能的结合更加容易。因此,相比相关的表位,“优先结合”至给定表位的抗体将更可能结合至该表位,即便所述抗体可能与该相关表位交叉反应也是如此。

[0074] 本文所用术语“单克隆抗体”指获自基本均一抗体群体的抗体,即除了在较小亚组的抗体分子中存在的可能的天然产生的突变之外,该群体中的单独抗体均是相同的。本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的部分与源自特定物种的抗体的对应序列相同或同源或属于特定抗体类别或亚类,而其余部分的链与源自另一物种的抗体的对应序列相同或同源或属于另一抗体类别或亚类,此类抗体的片段也是如此,只要它们显示所需的拮抗活性即可。

[0075] 可以使用产生单克隆抗体的任何操作来制备所公开的单克隆抗体。例如,公开的单克隆抗体可以使用杂交瘤方法制备,例如由Kohler和Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) 描述的那些。在杂交瘤方法中,小鼠或其它合适的宿主动物通常用免疫剂进行免疫,以引发产生或能够产生特异性结合免疫剂的抗体的淋巴细胞。或者,淋巴细胞可以在体外免疫。

[0076] 单克隆抗体也可以通过重组DNA方法制备。用常规方法(例如,利用能特异性结合编码鼠抗体重链和轻链基因的寡核苷酸探针)能够易于分离和测序编码公开的单克隆抗体的DNA。也可以使用噬菌体展示技术产生和筛选抗体或活性抗体片段的文库,例如,如授予Burton等的美国专利号5,804,440和授予Barbas等的美国专利号6,096,441所述。

[0077] 体外方法也适用于制备单价抗体。消化抗体以产生其片段,特别是Fab片段,可以使用本领域已知的常规技术来完成。例如,可以使用木瓜蛋白酶进行消化。木瓜蛋白酶消化的示例描述于1994年12月22日公开的W094/29348和美国专利号4,342,566。抗体的木瓜蛋白酶消化通常会产生两个相同的抗原结合片段,称为Fab片段,各片段都有一个抗原结合位点和一个残留的Fc片段。胃蛋白酶处理产生的片段具有两个抗原结合位点,并且仍然能够交联抗原。

[0078] 如本文所用,术语“抗体或其片段”涵盖具有双重或多重抗原或表位特异性的嵌合抗体和杂合抗体,以及片段,例如F(ab')₂、Fab'、Fab、Fd、Fv、scFv、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含V_H或V_L结构域之一或两者的片段等,包括杂合片段。因此,提供了保留结合其特定抗原的能力的抗体片段。例如,保持免疫调节分子(例如,脑信号蛋白(SEMA)4D(SEMA4D)或VEGF)结合活性的抗体片段包括在术语“抗体或其片段”的含义内。此类抗体和片段可以通过本领域已知的技术制备并且可以根据实施方式中阐述的方法和一般用于产生抗体和筛选抗体的特异性和活性的方法筛选其特异性和活性(参见Harlow和Lane,《抗体,实验室手册》(Antibodies, A Laboratory Manual). 冷泉港出版公司(Cold Spring Harbor Publications), 纽约, (1988))。

[0079] “抗体或其片段”的含义中还包括抗体片段和抗原结合蛋白(单链抗体)的偶联物。

[0080] 片段, 无论是否与其它序列连接, 也可以包括特定区域或特定氨基酸残基的插入、缺失、替换或其它选择的修饰, 前提是抗体或抗体片段的活性没有被显著改变或与未修饰的抗体或抗体片段相比受损。这些修饰可以提供一些其它特性, 例如去除/添加能够形成二硫键的氨基酸, 增加其生物寿命, 改变其分泌特征等。在任何情况下, 抗体或抗体片段必须具有生物活性属性, 例如与其同源抗原的特异性结合。抗体或抗体片段的功能或活性区域可以通过蛋白质特定区域的诱变来鉴定, 然后是表达的多肽的表达和测试。此类方法对本领域技术人员来说是显而易见的, 并且可以包括编码抗体或抗体片段的核酸的位点特异性诱变。(Zoller, M. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:348-354, 1992)。

[0081] 本文所用的术语“重链部分”包括衍生自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链部分的多肽包含以下至少一种: CH1 结构域、铰链 (例如上、中和/或下铰链区) 结构域、CH2 结构域、CH3 结构域或其变体或片段。

[0082] 如本文所用, 术语“抗体”还可指人抗体和/或人源化抗体。许多非人类抗体 (例如, 源自小鼠、大鼠或兔的抗体) 在人类中具有天然抗原性, 因此当给予于人类时会引起不希望的免疫反应。因此, 在该方法中使用人抗体或人源化抗体有助于减少给予于人的抗体引起不希望的免疫反应的机会。

[0083] 人抗体

[0084] 可以使用任何技术来制备所公开的人抗体。所公开的人抗体也可以从转基因动物中获得。例如, 已经描述了能够响应免疫而产生完整的人抗体库的转基因突变小鼠 (参见例如, Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-255 (1993); Jakobovits 等, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann 等, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993))。具体而言, 这些嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区 (J (H)) 基因的纯合缺失导致内源抗体产生完全抑制, 而成功转移人种系抗体基因阵列进入这种种系突变小鼠能导致在抗原攻击时产生人类抗体。使用本文所述的 Env-CD4- 共同受体复合物选择具有所需活性的抗体。

[0085] 人源化抗体

[0086] 抗体人源化技术通常涉及使用重组 DNA 技术来操作编码抗体分子的一个或多个多肽链的 DNA 序列。因此, 非人抗体 (或其片段) 的人源化形式是嵌合抗体或抗体链 (或其片段, 例如 sFv、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂, 或抗体的其它抗原结合部分), 其包含来自整合到人 (受体) 抗体框架中的非人 (供体) 抗体的抗原结合位点的部分。

[0087] 为了产生人源化抗体, 来自受者 (人) 抗体分子的一个或多个互补决定区 (CDR) 的残基被来自供者 (非人) 抗体分子的已知具有所需的抗原结合特性 (例如, 对靶抗原具有一定水平的特异性和亲和力) 的一个或多个 CDR 的残基替换。在某些情况下, 人类抗体的 Fv 框架 (FR) 残基被相应的非人类残基取代。人源化抗体也可包含在受者抗体以及输入的 CDR 或构架序列中均未发现的残基。通常, 人源化抗体具有从非人类来源引入的一个或多个氨基酸残基。在实践中, 人源化抗体通常是人抗体, 其中一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基被啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。人源化抗体通常包含抗体恒定区 (Fc) 的至少部分, 通常是人抗体的恒定区 (Jones 等, *Nature*, 321:522-525 (1986), Reichmann 等, *Nature*, 332:323-327 (1988), 和 Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992))。

[0088] 人源化非人抗体的方法是本领域众所周知的。例如, 通过用啮齿动物的 CDR 或 CDR 序列代替人类抗体的相应序列, 人源化抗体可以根据 Winter 及同事的方法产生 (Jones 等,

Nature, 321:522-525 (1986), Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988), Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988))。可用于产生人源化抗体的方法也描述于美国专利号4, 816, 567 (Cabilly等), 美国专利号5, 565, 332 (Hoogenboom等), 美国专利号5, 721, 367 (Kay等), 美国专利号5, 837, 243 (Deo等), 美国专利号5, 939, 598 (Kucherlapati等), 美国专利号6, 130, 364 (Jakobovits等), 和美国专利号6, 180, 377 (Morgan等)。

[0089] 抗-SEMA4D抗体

[0090] 一方面, 免疫调节分子的抑制剂可以是SEMA4D抑制剂派盘单抗(一种抗SEMA4D抗体), 例如在US8496938、US8816058、US9605055和US9676840中描述的那些, 这些专利关于抗SEMA4D(抗DC100)抗体的教导以引用方式纳入本文。已开发出抗SEMA4D单克隆抗体来中和SEMA4D, 包括MAb67、MAb2503和MAb76。

[0091] 结合SEMA4D的抗体在本领域已有描述。参见例如, 美国公开号2008/0219971 A1, 国际专利申请W0 93/14125和Herold等, Int. Immunol. 7(1):1-8(1995), 其各自通过引用其全文方式纳入本文。

[0092] 抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可包括例如MAb2503、MAb67或MAb76。在某些实施方式中, 抗SEMA4D抗体结合人、鼠或人和鼠SEMA4D。在其它实施方式中, 抗SEMA4D抗体阻断SEMA4D与其受体例如丛状蛋白-B1或丛状蛋白-B2的结合。

[0093] 可以理解并在本文中考虑到, 所公开的抗癌联合疗法和使用所述抗癌联合疗法治疗、抑制、减少和/或预防癌症的方法可以包含多于一种免疫调节剂分子抑制剂和多于一群脉冲的树突细胞, 各脉冲的树突细胞群都用相同或不同的肿瘤驱动因子进行脉冲。

[0094] 术语“对象”是指作为给予或治疗目标的任何个体。对象可以是脊椎动物, 例如哺乳动物。一方面, 对象可以是人、非人灵长类动物、牛、马、猪、犬或猫。对象还可以是豚鼠、大鼠、仓鼠、兔、小鼠或鼯鼠。因此, 对象可以是人类或兽类患者。术语“患者”是指在临床医生例如医师的治疗下的对象。

[0095] 术语“治疗有效”是指所用组合物的量足以改善疾病或病症的一种或多种原因或症状。这种改善只需要减少或改变, 而不一定是消除。

[0096] 术语“治疗”是指旨在治愈、改善、稳定或预防疾病、病理状况或障碍的患者的医学管控。该术语包括积极治疗, 即专门针对改善疾病、病理状况或紊乱的治疗, 还包括因果治疗, 即针对消除相关疾病、病理状况或紊乱的原因的治疗。此外, 该术语还包括姑息治疗, 即旨在缓解症状而不是治愈疾病、病理状况或紊乱的治疗; 预防性治疗, 即旨在最小化或部分或完全抑制相关疾病、病理状况或紊乱发展的治疗; 和支持性治疗, 即旨在用于补充另一种旨在改善相关疾病、病理状况或紊乱的特定疗法的治疗。

[0097] 在一方面, 理解并在本文中预期, 脉冲的树突细胞可以在给予之前以及在使用肿瘤驱动因子脉冲之前被活化。树突细胞(DC1)的活化可以通过将细胞与IFN- γ 、TNF α 、CD40、IL-21和/或IL-12接触来实现。一方面, 进一步理解的是, 对象自身的树突细胞可以被移出并离体脉冲再转移回对象以用于所公开的用于治疗、预防、减少和/或抑制癌症的抗癌联合疗法。

[0098] 可以理解并在本文中预期所公开的抗癌联合疗法可以通过主治医师确定为合适的任何途径给予。对对象的给予”包括局部和/或全身地向对象引入或递送药剂的任何途径。给予可以通过任何合适的途径进行, 包括口服、局部、静脉内、皮下、经皮、经皮、肌肉内、

关节内、肠胃外、小动脉内、皮内、心室内、颅内、腹膜内、病灶内、鼻内、直肠、阴道、通过吸入、经由植入的储器、肠胃外(例如,皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、瘤内、胸骨内、鞘内、腹膜内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术)等。如本文所用,“同时给予”、“组合给予”、“同时地给予”或“共同给予”是指化合物在同一时间点给予或基本上紧随其后给予。在后一种情况下,两种化合物的给予时间足够接近,以至于观察到的结果与在同一时间点给予时所获得的结果没有区别。“全身给予”是指通过将药剂引入或递送至对象身体的广泛区域(例如大于身体的50%)的途径向对象引入或递送药剂,例如通过进入循环系统或淋巴系统。相比之下,“局部给予”是指通过将药剂引入或递送至紧邻给予点的区域或区域并且不以治疗显著量的方式全身性地引入药剂的途径向对象引入或递送药剂。例如,局部给予的药剂在给予位点的局部附近很容易检测到,但在对象身体的远端部分检测不到或检测到的量可忽略不计。给予包括自我给予和由他人给予。一方面,本文还公开了治疗、预防、减少和/或抑制任一前述方面所述的癌症的抗癌联合疗法;其中至少一种免疫调节分子抑制剂为全身给药和/或肿瘤驱动因子脉冲的树突细胞为肿瘤内给药。

[0099] 可以理解并在本文中考虑,虽然单次给予所公开的抗癌联合疗法的组分(即经脉冲的树突细胞和/或免疫调节分子抑制剂)将是理想的,但并非各患者都会以同样的方式响应。因此,一方面,本文公开了治疗、预防、减少和/或抑制癌症的抗癌联合疗法;其中至少一种经脉冲的树突细胞给予至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,或24次/天,或至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,或14次/周,持续至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14天,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12周。本文还公开了治疗、预防、减少和/或抑制任一前述方面所述的癌症的抗癌联合疗法;其中至少一种免疫调节分子抑制剂给予至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,或24次/天,或至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,或14次/周,持续至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14天,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12周。应进一步理解并在本文中考虑到,给予组分的顺序和持续时间可根据被治疗的对象的需要而变化。一方面,本文还公开了治疗、预防、减少和/或抑制癌症的抗癌联合疗法;其中经脉冲的树突细胞给予至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,18,24,30,36小时,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,21,28,30,31,45天,2,3,4,5,或6个月后给予至少一种免疫调节分子抑制剂;与至少一种免疫调节分子抑制剂同时给予;或其中至少一种免疫调节分子抑制剂给予至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,18,24,30,36小时,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,21,28,30,31,45天,2,3,4,5,或6个月后给予经脉冲的树突细胞。

[0100] 如上所述,本文旨在通过任何癌症治疗来增强所公开的治疗、抑制、减少和/或预防癌症的方法,包括但不限于癌症的手术、放射学和/或药物治疗。如本文所用,“手术治疗”是指通过本领域已知的任何方式对肿瘤进行肿瘤切除。类似地,“药物治疗”是指本领域中公知的任何抗癌剂的给予,所述抗癌剂包括但不限于阿贝西利,醋酸阿比特龙,Abitrexate(甲氨蝶呤),Abraxane(紫杉醇白蛋白稳定化纳米颗粒制剂),ABVD,ABVE,ABVE-PC,AC,AC-T,Adcetris(本妥昔单抗维多汀),ADE,Ado-曲妥单抗-Emtansine,阿霉素(多柔比星盐酸盐),阿法替尼马来酸氢盐,Afinitor(依维莫司),Akynteo(奈妥吡坦和帕洛诺司琼盐酸盐),Aldara(咪喹莫特),阿地白介素,Alecensa(艾乐替尼),艾乐替尼,阿仑单抗,爱宁达(培美曲塞二钠),Aliqopa(库潘尼西盐酸盐),Alkeran注射剂(美法仑盐酸盐),Alkeran片

剂(美法仑), Aloxi (盐酸帕洛诺司琼), Alunbrig (布加替尼), Ambochlorin (苯丁酸氮芥), Amboclorin (苯丁酸氮芥), 氨磷汀, 氨基酮戊酸, 阿那曲唑, 阿瑞吡坦, 阿可达 (帕米膦酸二钠), 瑞宁得 (阿那曲唑), Aromasin (依西美坦), Arranon (奈拉滨), 三氧化二砷, Arzerra (奥法木单抗), 天冬酰胺酶菊基腐病菌 (*Erwinia chrysanthemi*), 阿特殊单抗, 阿瓦斯丁 (贝伐单抗), 阿维单抗, 阿西替尼, 阿扎胞苷, Bavencio (阿维单抗), BEACOPP, Becenum (卡莫司汀), Beleodaq (贝利司他), 贝利司他, 苯达莫司汀盐酸盐, BEP, Besponsa (奥英妥珠单抗), 贝伐单抗, 蓓萨罗丁, Bexxar (托西莫单抗和碘I131托西莫单抗), 比卡鲁胺, BiCNU (卡莫司汀), 博来霉素, 博纳吐单抗, Blincyto (博纳吐单抗), 硼替佐米, Bosulif (波舒替尼), 波舒替尼, 本妥昔单抗维多汀 (Brentuximab Vedotin), 布加替尼, BuMel, 白消安, Busulfex (白消安), 卡巴他赛, Cabometyx (卡博替-S-苹果酸), 卡博替-S-苹果酸, CAF, 坎帕斯 (阿仑单抗), Camptosar (伊立替康盐酸盐), 卡培他滨, CAPOX, Carac (氟尿嘧啶局部用药), 卡铂, 卡铂-紫杉醇, 卡非佐米, Carmubris (卡莫司汀), 卡氮芥, 卡莫司汀植入物, 康士得 (比卡鲁胺), CEM, 色瑞替尼, Cerubidine (柔红霉素盐酸盐), Cervarix (重组HPV二价疫苗), 西妥昔单抗, CEV, 苯丁酸氮芥, 苯丁酸氮芥, 强的松, CHOP, 顺铂, 克拉屈滨, Clafen (环磷酰胺), 氯法拉滨, Clofarex (氯法拉滨), 科罗拉 (氯法拉滨), CMF, 考比替尼, Cometriq (卡博替-S-苹果酸), 库潘尼西盐酸盐, COPDAC, COPP, COPP-ABV, Cosmegen (放线菌素D), Cotellic (考比替尼), 克里唑替尼, CVP, 环磷酰胺, Cyfos (异环磷酰胺), Cyramza (雷莫芦单抗), 阿糖胞苷, 阿糖胞苷脂质体, Cytosar-U (阿糖胞苷), Cytoxan (环磷酰胺), 达拉菲尼, 达卡巴嗪, Dacogen (地西他滨), 放线菌素D, 达雷木单抗, Darzalex (达雷木单抗), 达沙替尼, 柔红霉素盐酸盐, 盐酸柔红霉素和阿糖胞苷脂质体, 地西他滨, 去纤苷钠 (Defibrotide Sodium), Defitelio (去纤苷钠), 地加瑞克, 尼白介素, 地诺单抗, DepoCyt (阿糖胞苷脂质体), 地塞米松, 右丙亚胺盐酸盐, 达妥昔单抗, 多西他赛, 阿霉素 (盐酸多柔比星脂质体), 盐酸阿霉素, 盐酸阿霉素脂质体, 阿霉素-SL (盐酸多柔比星脂质体), DTIC巨蛋 (达卡巴嗪), 度伐利尤单抗, EFUDEX (氟尿嘧啶-外用), 埃立特 (拉布立酶), Ellence (表柔比星盐酸盐), 埃罗妥珠单抗, Eloxatin (奥沙利铂), 伊屈泼帕乙醇胺 (Eltrombopag Olamine), Emend (阿瑞匹坦), Empliciti (埃罗妥珠单抗), 恩西地替尼甲磺酸盐, 恩杂鲁胺, 盐酸表阿霉素, EPOCH, 爱必妥 (西妥昔单抗), 艾日布林甲磺酸盐, Erivedge (维莫德吉), 盐酸厄洛替尼, Erwinaze (天冬酰胺酶菊欧文氏菌), Ethyol (氨磷汀), Etopophos (磷酸依托泊苷), 依托泊苷, 磷酸依托泊苷, Evacet (盐酸多柔比星脂质体), 依维莫司, Evista (盐酸雷洛昔芬), Evomela (美法仑盐酸盐), 依西美坦, 5-FU (氟尿嘧啶注射液), 5-FU (氟尿嘧啶-外用), 法乐通 (托瑞米芬), Farydak (帕比司他), FASLODEX (氟维司群), FEC, 弗隆 (来曲唑), 非格司亭, 氟达拉 (磷酸氟达拉滨), 磷酸氟达拉滨, Fluoroplex (氟尿嘧啶局部用药), 氟尿嘧啶注射剂, 氟尿嘧啶局部用药, 氟他米特, Folex (甲氨蝶呤), FOLEXPFS (甲氨蝶呤), FOLFIRI, FOLFIRI 贝伐单抗, FOLFIRI-西妥昔单抗, FOLFIRINOX, FOLFOX, Folutyn (普拉曲沙), FU-LV, 氟维司群, 加德西 (重组HPV四价疫苗), 加德西9 (重组HPV Nonavalent疫苗), Gazyva (奥比奴突珠单抗 (Obinutuzumab)), 吉非替尼, 盐酸吉西他滨, 吉西他滨-顺铂, 吉西他滨-奥沙利铂, 吉妥珠单抗奥佐米星, 健择 (盐酸吉西他滨), Gilotrif (阿法二马来酸酯), 格列卫 (甲磺酸伊马替), Gliadel (卡莫司汀植入物), Gliadel (卡莫司汀植入物), 羧肽酶 (Glucarpidase), 醋酸戈舍瑞林, Halaven (艾日布林甲磺酸盐), Hemangeol (盐酸普萘洛尔), 赫赛汀 (曲妥珠单

抗),HPV二价疫苗,重组,HPV Nonavalent疫苗,重组,HPV四价疫苗,重组,Hycamtin(托泊替康盐酸盐),Hydrea(羟基脲),羟基脲,超CVAD,Ibrance(帕博西尼),替伊莫单抗,依罗替尼,ICE,Iclusig(普纳替尼盐酸盐),Idamycin(伊达比星盐酸盐),伊达比星盐酸盐,艾代拉里斯,Idhifa(恩西地平甲磺酸盐),IFEX(异环磷酰胺),异环磷酰胺,Ifosfamidum(异环磷酰胺),IL-2(阿地白介素),甲磺酸伊马替尼,Imbruvica(依鲁替尼),Imfinzi(度伐利尤单抗),咪喹莫特,Imlygic(T-vec(Talimogene Laherparepvec)),Inlyta(阿西替尼),伊诺土珠单抗(Inotuzumab)奥佐米星,干扰素 α -2b,重组,白介素-2(阿地白介素),内含子A(重组干扰素 α -2b),碘I131托西莫单抗和托西莫单抗,易普利姆玛,易瑞沙(吉非替尼),伊立替康盐酸盐,依立替康盐酸盐脂质体,ISTODAX(罗米地辛),伊沙匹隆,柠檬酸伊克昔佐米,Ixempra(伊沙匹隆),Jakafi(鲁索利替尼磷酸盐),JEB,JEVTANA(卡巴他赛),Kadcyla(ADO-曲妥单抗Emtansine),Keoxifene(盐酸雷洛昔芬),Kepivance(帕利夫明),Keytruda(派姆单抗),Kisqali(瑞博西尼),Kymriah(Tisagenlecleucel),Kyprolis(卡非佐米),兰瑞肽醋酸盐,拉帕替尼二甲苯磺酸盐,Lartruvo(奥拉单抗),来那度胺,乐伐替尼甲磺酸盐,Lenvima(乐伐替尼甲磺酸盐),来曲唑,亚叶酸钙,瘤可宁(苯丁酸氮芥),乙酸亮丙瑞林,Leustatin(克拉屈滨),Levulan(氨基酮戊酸),Linfolizin(苯丁酸氮芥),LipoDox(盐酸阿霉素脂质体),洛莫司汀,Lonsurf(三氟尿苷和地匹福林盐酸盐),醋酸亮丙瑞林(乙酸亮丙瑞林),Luprondepot(乙酸亮丙瑞林),LupronDepot-Ped(醋酸亮丙瑞林),Lynparza(奥拉帕利),Marqibo(硫酸长春新碱脂质体),Matuane(盐酸丙卡巴肼),盐酸甲氯乙胺,醋酸甲地孕酮,Mekinist(曲美替尼),美法仑,美法仑盐酸盐,巯基嘌呤,美司钠,Mesnex(美司钠),Methazolastone(替莫唑胺),氨甲蝶呤,氨甲蝶呤LPF(甲氨蝶呤),甲基纳曲酮溴化物,Mexate(甲氨蝶呤),Mexate-AQ(甲氨蝶呤),米喹妥林,丝裂霉素C,盐酸米托蒽醌,丝裂霉素(丝裂霉素C),MOPP,Mozobil(普乐沙福),Mustargen(氮芥盐酸盐),Mutamycin(丝裂霉素C),马利兰(白消安),Mylosar(阿扎胞苷),米罗(吉姆单抗奥佐米星),纳米颗粒紫杉醇(紫杉醇白蛋白稳定化纳米颗粒制剂),诺维本(酒石酸长春瑞滨),奈昔,奈拉滨,Neosar(环磷酰胺),马来酸来那替尼,Nerlynx(马来酸来那替尼),Netupitant和帕洛诺司琼盐酸盐,Neulasta(聚乙二醇化非格司亭),Neupogen(非格司亭),多吉美(索拉非尼甲苯磺酸盐),NILANDRON(尼鲁米特),尼洛替尼,尼鲁米特,Ninlaro(柠檬酸伊克昔佐米),Niraparib甲苯磺酸盐一水合物,Nivolumab,诺瓦得士(柠檬酸三苯氧胺),Nplate(罗米司亭),奥滨尤妥珠单抗,0domzo(索尼德吉),OEPA,奥法木单抗,OFF,奥拉帕尼,奥拉单抗,高三尖杉酯碱,Oncaspar(培门冬酶),昂丹司琼盐酸盐,Onivyde(伊立替康盐酸盐的脂质体),ONTAK(尼白介素),Opdivo(纳武利尤单抗),OPPA,奥斯替尼,奥沙利铂,紫杉醇,紫杉醇白蛋白稳定化纳米颗粒制剂,PAD,帕博西尼,帕利夫明,帕洛诺司琼盐酸盐,帕洛诺司琼盐酸盐和奈妥吡坦,帕米膦酸二钠,帕尼单抗,帕比司他,Paraplat(卡铂),Paraplatin(卡铂),帕唑帕尼盐酸,PCV,PEB,培门冬酶,培非司亭,聚乙二醇干扰素 α -2b的,PEG-内含子(聚乙二醇干扰素 α -2b)中,派姆单抗,培美曲塞二钠,Perjeta(帕妥珠单抗),帕妥珠单抗,PLATINOL(顺铂),PLATINOL-AQ(顺铂),普乐沙福,泊马度胺,Pomalyst(泊马度胺),帕纳替尼盐酸盐,Portrazza(耐昔妥珠单抗),普拉曲沙,泼尼松,丙卡巴肼盐酸盐,Proleukin(阿地白介素),Prolia(狄诺塞麦),Promacta(艾曲波帕),盐酸普萘洛尔,Provenges的(西普鲁塞-T),PURINETHOL(巯嘌呤),Purixan(巯嘌呤),镭223二氯化物,盐酸雷洛昔芬,雷莫芦单抗,拉布

立酶, R-CHOP, R-CVP, 重组人乳头瘤病毒 (HPV) 二价疫苗, 重组人乳头瘤病毒 (HPV) Nonavalent 疫苗, 重组人乳头瘤病毒 (HPV) 四价疫苗, 重组干扰素 α -2b, 瑞戈非尼, Relistor (溴化甲基纳曲), R-EPOCH, 雷利米得 (来那度胺), Rheumatrex (甲氨蝶呤), 瑞博西尼, R-ICE, Rituxan (利妥昔单抗), Rituxan Hycela (利妥昔单抗和人透明质酸酶), 利妥昔单抗, 利妥昔单抗和人透明质酸酶, 罗拉吡坦盐酸盐, 罗米地辛, 罗米司亭, Rubidomycin (柔红霉素盐酸盐), Rubraca (卢卡帕尼樟脑磺酸盐), 卢卡帕尼樟脑磺酸盐, 鲁索利替尼磷酸盐, Rydapt (米喹妥林), Sclerosol 胸膜内气溶胶 (滑石), 司妥昔单抗, 西普鲁塞-T, Somatuline Depot (兰瑞肽醋酸酯), 索尼德吉, 甲苯磺酸索拉非, Sprycel (达沙替尼), STANFORD V, 无菌滑石粉 (滑石), Steritalc (滑石), Stivarga (瑞戈非尼), 苹果酸舒尼替, Sutent (苹果酸舒尼替), Sylatron (聚乙二醇干扰素 α -2b) 中, Sylvant (司妥昔单抗), Synribo (高三尖杉酯碱), Tabloid (硫鸟嘌呤), TAC, Tafinlar (达拉菲尼), Tagrisso (奥斯替尼), 滑石, T-vec (Talimogene Laherparepvec), 他莫昔芬柠檬酸盐, Tarabine PFS (阿糖胞苷), Tarceva (盐酸厄洛替尼), Targretin (萆萨罗丁), Tassigna (尼罗替尼), Taxol (紫杉醇), 泰索帝 (多西他赛), Tecentriq (阿特珠单抗), 替莫唑胺 (替莫唑胺), 替莫唑胺, 坦罗莫司, 沙立度胺, Thalomid (沙利度胺), 硫鸟嘌呤, 塞替派, 替沙仑赛, Tolak (氟尿嘧啶-局部), 盐酸拓扑替康, 托瑞米芬, TORISEL (坦罗莫司), 托西莫单抗和碘I131托西莫单抗, Totect (盐酸右雷佐生), TPF, 曲贝替定, 曲美替尼, 曲妥珠单抗, TREANDA (苯达莫司汀盐酸盐), 三氟尿苷和地匹福林盐酸盐, Trisenox (三氧化二砷), 的Tykerb (拉帕替尼二甲苯磺酸酯), Unituxin (达妥昔单抗), 尿苷三醋酸, VAC, 凡德他尼, VAMP, Varubi (罗拉吡坦盐酸盐), 维克替比 (帕尼单抗), VeIP, Velban (长春碱硫酸盐), Velcade (硼替佐米), Velsar (长春碱硫酸盐), 维莫非尼, Venclexta (维奈托克), 维奈托克, Verzenio (阿贝西利), Viadur (乙酸亮丙瑞林), VIDAZA (阿扎胞苷), 硫酸长春碱, Vincasar PFS (硫酸长春新碱), 硫酸长春新碱, 硫酸长春新碱脂质体, 酒石酸长春瑞滨, VIP, 维莫德吉, Vistogard (尿苷三醋酸盐), Voraxaze (葡糖苷酶), 伏立诺他, Votrient (盐酸帕唑帕尼), Vyxeos (盐酸柔红霉素和阿糖胞苷脂质体), 维尔康沃林 (亚叶酸钙), Xalkori (克里唑替尼), 希罗达 (卡培他滨), XELIRI, XELOX, Xgeva (狄诺塞麦), Xofigo (镭223二氯化物), Xtandi (恩杂鲁胺), Yervoy (易普利姆玛), Yondelis (曲贝替定), Zaltrap (谢夫-阿柏西普), Zarxio (非格司亭), Zejula (尼拉帕尼甲苯磺酸一水合物), Zelboraf (威罗菲尼), 泽娃灵 (替伊莫单抗), Zinecard (盐酸右雷佐生), 谢夫-阿柏西普, Zofran (盐酸昂丹司琼), Zoladex (醋酸戈舍瑞林), 唑来膦酸, Zolinza (伏立诺他), Zometa (唑来膦酸), Zydelig (艾达拉里斯), Zykadia (色瑞替尼) 和/或 Zytiga (醋酸阿比特龙)。本文还涵盖为PD1/PDL1阻断抑制剂的化学治疗剂 (例如, 帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、派姆单抗、匹地利珠单抗 (pidilizumab)、BMS-936559、阿特珠单抗、度伐利尤单抗或阿维单抗)。

[0101] 药物运载体/药物产品的递送

[0102] 如上所述, 组合物也可以在药学上可接受的运载体中体内给予。“药学上可接受的”是指在生物学上或其它方面非不合需要的材料, 即, 该材料可以与核酸或载体一起给予于对象, 而不会引起任何不合需要的生物学效应或以有害方式与包含它的药物组合物的任何其它成分相互作用。如本领域技术人员所公知的, 自然会选择运载体以使活性成分的任何降解最小化并使对象中的任何不利副作用最小化。

[0103] 组合物可以口服、肠胃外(例如静脉内)、肌肉注射、腹膜内注射、透皮、体外、局部等给予,包括局部鼻内给予或吸入剂给予。如本文所用,“局部鼻内给予”是指通过一个或两个鼻孔将组合物递送到鼻部和鼻道中,并且可以包括通过喷雾机制或液滴机制,或通过核酸或载体的气雾化递送。组合物通过吸入剂的给予可以通过喷雾或液滴机制通过鼻部或嘴巴进行递送。也可以通过插管直接递送至呼吸系统的任何区域(例如,肺)。所需组合物的确切量因对象而异,取决于对象的物种、年龄、体重和一般状况、所治疗的过敏性疾病的严重程度、所用的特定核酸或载体、其给予方式等。因此,不可能为各组合物指定准确的量。然而,适当的量可由本领域普通技术人员鉴于本文教导仅使用常规实验来确定。

[0104] 组合物的肠胃外给予,如果使用,通常以注射为特征。注射剂(injectable)可以常规形式制备,例如液体溶液或悬浮液,适合于在注射前在液体中形成溶液或悬浮的固体形式或乳液。最近修订的肠胃外给予方法涉及使用缓释或持续释放系统,以保持恒定剂量。参见,例如,美国专利号3,610,795,其通过引用方式纳入本文。

[0105] 材料可以是溶液、悬浮液(例如,掺入微粒、脂质体或细胞中)。这些可以通过抗体、受体或受体配体靶向特定细胞类型。以下参考文献是使用该技术将特定蛋白质靶向肿瘤组织的示例(Senter等,Bioconjugate Chem.,2:447-451,(1991);Bagshawe,K.D.,Br.J.Cancer,60:275-281,(1989);Bagshawe等,Br.J.Cancer,58:700-703,(1988);Senter等,Bioconjugate Chem.,4:3-9,(1993);Battelli等,Cancer Immunol.Immunother.,35:421-425,(1992);Pietersz和McKenzie,Immunolog.Reviews,129:57-80,(1992);和Roffler等,Biochem.Pharmacol,42:2062-2065,(1991))。载剂,例如“隐形(stalth)”和其它抗体偶联脂质体(包括脂质介导的靶向结肠癌的药物)、受体介导的DNA靶向通过细胞特异性配体、淋巴细胞引导的肿瘤靶向和体内鼠神经胶质瘤细胞的高度特异性治疗性逆转录病毒靶向。以下参考文献是使用该技术将特定蛋白质靶向肿瘤组织的示例(Hughes等,Cancer Research,49:6214-6220,(1989);和Litzinger与Huang,Biochimica et Biophysica Acta,1104:179-187,(1992))。通常,受体参与组成型或配体诱导的内吞作用途径。这些受体簇集在网格蛋白包被的小坑中,通过网格蛋白包被的囊泡进入细胞,通过酸化的内体,受体在其中进行分类,然后再循环到细胞表面,储存在细胞内,或在溶酶体中降解。内化途径具有多种功能,例如营养吸收、活化蛋白质的去除、大分子的清除、病毒和毒素的机会进入、配体的解离和降解以及受体水平调节。许多受体遵循不止一种细胞内途径,这取决于细胞类型、受体浓度、配体类型、配体价态和配体浓度。已经综述了受体介导的内吞作用的分子和细胞机制(Brown和Greene,DNA and Cell Biology 10:6,399-409(1991))。

[0106] 药学上可接受的运载体

[0107] 包括抗体的组合物可以联合药学上可接受的运载体用于治疗。

[0108] 合适的运载体及其制剂描述于《雷明顿:制药科学与实践》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)(第19版)编者A.R.Gennaro,马克出版公司(Mack Publishing Company),宾夕法尼亚州伊斯顿,1995。通常,在制剂中使用适量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的运载体的实例包括但不限于盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。溶液的pH值优选为约5至约8,更优选为约7至约7.5。其它运载体包括缓释制剂,例如含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成型制品的形式,例如薄膜、脂质体或微粒。对于本领域技术人员来说显而易见的是,某些运载体可能更优选,这取决于例如

给予途径和给予组合物的浓度。

[0109] 药物运载体是本领域技术人员已知的。这些最典型的是用于向人类给予药物的标准运载体,包括诸如无菌水、盐水和生理pH缓冲溶液等溶液。组合物可以肌肉内或皮下给予。其它化合物将根据本领域技术人员使用的标准程序给予。

[0110] 除了选择的分子之外,药物组合物还可以包括运载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂等。药物组合物还可包括一种或多种活性成分,例如抗微生物剂、抗炎剂、麻醉剂等。

[0111] 药物组合物可以多种方式给予,这取决于需要局部治疗还是全身治疗,以及治疗的区域。给予可以是局部(包括眼部、阴道、直肠、鼻内)、口服、吸入或肠胃外给予,例如通过静脉滴注、皮下、腹膜内或肌肉注射。所公开的抗体可以静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、腔内或经皮给予。

[0112] 胃肠道外给药制剂包括无菌的水性或非水性溶液、悬液和乳液。非水性溶剂的示例是丙二醇,聚乙二醇,植物油如橄榄油,和可注射的有机酯如油酸乙酯。水性运载体包括水、醇溶液/水溶液、乳液或悬液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外载剂包括氯化钠溶液,林格氏右旋糖,右旋糖和氯化钠,乳酸林格氏液或不挥发油。静脉内载剂包括液体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格右旋糖的那些物质等。也可存在防腐剂和和其它添加剂,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0113] 用于局部给予的制剂可包括软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规药学运载体、水性、粉末或油基、增稠剂等可能是必需的或理想的。

[0114] 用于口服给予的组合物包括粉剂或颗粒剂、混悬剂或在水或非水介质中的溶液剂、胶囊剂、小袋剂或片剂。可能需要增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。

[0115] 一些组合物可能作为药学上可接受的酸或碱加成盐给予,通过与无机酸如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸和有机酸,例如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和富马酸,或通过与无机碱例如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾和有机碱如单-、二-、三烷基和芳基胺和取代的乙醇胺反应。

[0116] 治疗用途

[0117] 用于给予组合物的有效剂量和时间表可以凭经验确定,并且做出这样的确定在本领域技术范围内。组合物的给予剂量范围足够大以产生影响疾病症状的所需效果。剂量不应大到引起不良副作用,例如不需要的交叉反应、过敏反应等。通常,剂量将随着患者的年龄、状况、性别和疾病程度、给予途径或方案中是否包括其它药物而变化,并且可由本领域技术人员确定。在任何禁忌症的情况下,个体医生可以调整剂量。剂量可以变化,并且可以每天一次或多次给予,持续一天或几天。可以在文献中找到有关给定类别药品的适当剂量的指南。例如,可以在关于抗体治疗用途的文献中找到选择合适抗体剂量的指南,例如,《单克隆抗体手册》(Handbook of Monoclonal Antibodies),Ferrone等编,诺基出版公司(Noges Publications),新泽西州帕克里奇,(1985)第22章第303-357页;Smith等,《人类诊断和治疗中的抗体》(Antibodies in Human Diagnosis and Therapy),Haber等编,拉文出版社(Raven Press),纽约(1977)第365-389页。根据上述因素,单独使用的抗体的通常日剂量可能为每天约1 μ g/kg体重至高达100mg/kg体重或更高。

[0118] 实施例

[0119] 给出下列实施例以向本领域的普通技术人员完整地公开和描述本文要求保护的化合物、组合物、制品和/或方法是如何制备和评价的,这些实施例完全是出于示例目的而不是为了限制本公开。已经进行了诸多努力,以确保数值(例如含量、温度等)的精确性,但是必须考虑到存在一些误差和偏差。除非另外指出,否则,份是重量份,温度以℃为单位或是环境温度,并且压力为大气压或接近大气压。

[0120] 实施例1:乳腺癌中的抗癌驱动因子Th1响应

[0121] 大多数乳腺肿瘤表达肿瘤驱动因子,包括HER2、EGFR (ER+和TNBC)、C-MET (TNBC) 和HER3 (ER+、HER2和TNBC)。这些肿瘤驱动因子或下游通路通常是许多治疗方法的靶标,转移性乳腺癌 (MBC) 患者通常接受靶向药物治疗,例如抗雌激素、CDK4/6抑制剂、HER2定向疗法和AKT抑制剂。然而,这些患者中的大多数对治疗产生耐药性或停止响应和进展。因此,这些患者需要其它治疗。检查点疗法在MBC中显示有希望但有限的有效性,因此非常需要鉴定有效的新免疫疗法,这些疗法可以与靶向药物联合使用,使它们在MBC中更有效。如下数据所示,肿瘤驱动因子可能是免疫应答的关键合适靶标。

[0122] 肿瘤发生过程中抗肿瘤驱动因子Th1响应丧失的证据:

[0123] 健康成年女性在外周血中对HER2具有异常高的、预先存在的Th1免疫力(图1A和1C,参见例如,Datta J等,Oncoimmunology.2015;4:e1022301;Datta J等,Breast Cancer Res.2015;17:71;和Fracol,M.等,Ann Surg Oncol (2017) 24:407. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5584-6>)。然而,这些Tbet^{阳性}Th1细胞在肿瘤发生过程中逐渐丢失。这种缺陷首先在原位导管癌 (DCIS) 阶段能被检测到,并在I期浸润性乳腺癌 (IBC) 阶段被显著抑制(图1A、1C和1D)。在HER2^{阳性}肿瘤发生期间没有这种HER2 Th1免疫反应的丧失(图1A),也没有对其它(非肿瘤)对照抗原的反应性的丧失(数据未显示),表明这种抑制是抗原选择性的,而不是整体失能的产物。使用曲妥珠单抗进行化疗、手术和放疗的标准疗法通常不能纠正这种抗HER2 Th1丢失,但接种HER2脉冲的I型树突细胞 (DC1) 能显著增加外周抗HER2 CD4 Th1,表明这不是固定的缺陷,而是可以通过适当的免疫来纠正的缺陷(图1B)。目前尚不清楚外周血CD4 Th1的减少是否表明真的损失细胞或代表从中心循环到外周部位的转变。

[0124] 抗HER2 Th1反应与临床转归相关:

[0125] 对新辅助化疗 (NAC) 实现了病理完全缓解 (pCR) 的HER2^{阳性}IBC患者表明存活率提高,而那些在手术时有残留疾病的患者表明复发风险增加。虽然侵袭性HER2^{阳性}IBC患者作为一个群体表现出抗HER2 Th1免疫力低下,但一些个体被严重遏制,而另一些个体保持中等反应性。那些恢复或部分保留抗HER2 Th1的患者对新辅助化疗/曲妥珠单抗治疗表现出更高的pCR率,而带有残留疾病的患者显示最低的抗HER2 CD4 Th1响应(图1D)。显示的是所有组成成分 (repertoire) 的丢失,但总体和累积响应也存在显著差异。抗肿瘤驱动因子CD4免疫应答的丧失代表了Tbet^{阳性}Th1群体而非GATA3^{阳性}Th2群体中干扰素 γ (IFN- γ) 产生的减少,表明Th1免疫应答可能对介导抗癌驱动因子BC响应而言至关重要。事实上,肿瘤中免疫基因表达的升高与转归的改善有关。我们还研究了抗HER2免疫与无病生存 (DFS) 之间的关系。复发和DFS降低的患者的抗HER2 Th1免疫应答减弱最严重(图1F),而外周抗HER2 Th1应答保留的患者的DFS显著增加(图1F)。外周CD4 Th1的这种缺陷可能反映了远离外周的免疫活性或耐受或耗竭反应的真实丧失。

[0126] 实施例2:在HER2^{阳性}早期乳腺癌中使用DC1疗法加强抗HER-2CD4 Th1:

[0127] 我们现在已经进行了四项临床试验：两项针对HER2^{阳性}DCIS患者，两项针对HER2^{阳性}IBC患者。参见：Lowenfeld L等. Clin Cancer Res. 2017; 23: 2961-71。全部四项研究都证明，我们可以通过给予DC疫苗来增加外周血中的抗HER2CD4 Th1响应，这与对治疗的响应并不真正相关，但确实证明给予DC1会加强抗HER2 CD4 Th1。DCIS患者仅在腹股沟远端淋巴结或乳房DCIS区域接受四到六周的疫苗，而侵袭性患者接受了最初的六周结内给予，随后是三个月的结内加强疫苗x3。85%患者表现出抗HER2 CD4 Th1增加。在其中于新辅助设置中给予DC1的两项DCIS研究中，约30%的ER^{阴性}患者显示对DC1疫苗接种的pCR(图2A)，而对于ER^{阳性}HER2^{阳性}患者，添加抗雌激素疗法和DC1疫苗接种将pCR率提高到相似水平(图2A)，相较于最小背景响应，表明组合方法的有效性。无论是在远处的淋巴结还是在乳房的DCIS区域，DC1治疗都是有效的。有趣的是，那些实现pCR的人在前哨淋巴结中显示出最高水平的抗HER2 CD4 Th1(图2B)。这表明在肿瘤局部区域实现显著的抗HER2 CD4 Th1响应具有最强的临床缓解，并促使我们在临床前模型中进一步研究这一点，这导致我们目前的有效DC1治疗。尽管通过DC1治疗在DCIS中实现pCR的对象数量较少，但它预示着任何后续乳房事件的非常有利的减少((SBE)，图2C)(与达到<pCR的那些相比)，这对于减少高风险DCIS患者的复发和降低死亡率至关重要。我们研究了DC1疗法和Th1细胞因子对播散性癌细胞(DCC)的影响，因为这可能对降低死亡率至关重要。对于在DCIS中具有IBC T1a/b病变的患者，在手术中没有发现残留病灶的发生率只有约8%。很明显，该疗法已显示一定的前景，但仍需改进以开发为对于具有HER2表达型DCIS和T1a/b IBC的患者组的令人满意的疗法。因此，我们回到临床前模型以利用这个机会。

[0128] 实施例3:DC1疫苗联合SEMA4D阻断:

[0129] 脑信号蛋白4D(SEMA4D)是细胞表面分子家族的成员，这些分子对组织和器官发育至关重要，并参与免疫调节。针对SEMA4D的抗体已显示调节淋巴细胞向肿瘤中的浸润(参见例如，美国专利号9,243,068)。在本实施例中，我们将抗SEMA4D单克隆抗体(Mab67，参见例如，美国专利号8,496,938)与DC1疫苗接种在HER2鼠TUBO肿瘤模型中组合如下。TUBO小鼠乳腺肿瘤细胞系(登录号CVCL_2A33, Rovero, S.等, J. Immunol 165: 5133-5142 (2000))首次通过免疫组织化学显示表达SEMA4D(图3A)。对于单一肿瘤模型(图3B1)，Balb/C小鼠在第0天右侧皮下接受 2.5×10^5 个TUBO细胞。当第7天可触及肿瘤时，将小鼠随机分为四组。小鼠腹膜内接受对照抗体或抗sema4D抗体的单一疗法直至终点或每周接受瘤内HER2-DC1治疗，持续六周。对于联合治疗，小鼠在接受第一次瘤内HER2-DC1注射之前接受抗sema4D抗体，每周一次，持续六周。对于双侧模型，Balb/c小鼠(N=6)在第0天在两侧皮下注射 2.5×10^5 个肿瘤细胞/位点。DC如前所述(Cintolo JA, 2016, Melanoma Res. 2016年2月; 26(1): 1-11)经产生、成熟为DC1，并用neu肽脉冲。BALB/c小鼠每周一次瘤内接种DC疫苗，持续六周。在具有两个肿瘤位置的那些动物中，该疫苗仅在两个肿瘤中的一个中接种。Mab 67以10mg/kg/体重的浓度以每周间隔腹膜内给予。对照小鼠接受同种型对照抗体、DC治疗或单独的Mab67。每2-3天用卡尺测量肿瘤直到终点。为了比较体外测量，进行了单向方差分析(随后是Tukey事后检验)。为了比较体内测量，使用在各时间点进行的肿瘤测量进行相同的测试。Mann-Whitney检验用于比较两个治疗组。所有数据的统计评估均使用GraphPad Prism软件进行。在 $p < 0.05$ 处达到统计显著性。

[0130] 与用抗SEMA4D抗体或单独的DC1治疗相比，将抗SEMA4D抗体与瘤内HER2脉冲的DC1

全身给予至携带已建立的TUBO肿瘤的小鼠导致疫苗治疗的肿瘤的完全肿瘤消退(图3B1)。这转化为增加的存活率(图3B2)。向单个肿瘤瘤内注射HER2 DC1导致未注射的对侧肿瘤消退(图3C1和3C2)。进一步的流式细胞术分析证明了抗HER2 CD4 Th1响应的富集,包括减少的髓源性抑制细胞肿瘤浸润(图3E)、增加的CD4 T细胞肿瘤浸润(图3F),以及增加的CD4 T细胞淋巴结浸润(图3G)。通过免疫组织化学测量,SEMA4D在约60%的人类HER2 DCIS或HER2 IBC中表达,这一事实突显了其与人肿瘤的相关性(图3D)。

[0131] 实施例4:瘤内HER2脉冲的DC1和全身性抗SEMA4D抗体的给予导致强抗肿瘤Th1响应。

[0132] 如实施例3所述,从通过全身给予抗SEMA4D抗体联合瘤内HER2脉冲的DC1疗法治愈了的TUBO肿瘤的小鼠,以及从单独用DC1疫苗瘤内疫苗接种或联合抗SEMA4D抗体的对照小鼠,收获脾,并且,从脾细胞中分离CD4+T细胞,其与HER2脉冲的DC1共培养三-四天,然后在IL-2 (10U/ml) 和IL-7 (20ng/ml) 的存在下扩增持续三周。从接种HER2脉冲的DC1的小鼠收获的脾中扩增的细胞单独或与全身性抗SEMA4D抗体治疗组合进行了比较(图4)。数据表明,来自接受联合治疗的小鼠的CD4 T细胞显示约7倍的体外扩增,而对照小鼠的体外扩增约为3倍(图4A)。接受联合治疗的小鼠脾脏扩增的CD4 T细胞也显示对HER2/neu衍生肽p5、p435和p1209的强抗原特异性(参见例如,Jalali等,Nanomedicine;8:692-701(2012)),与从仅接受DC1疫苗的小鼠扩增的CD4 T细胞相比(图4B)。此外,从接受联合治疗的小鼠脾脏扩增的CD4 T细胞显示强烈的IFN- γ 产生,表明强烈的TH1响应(图4C)。这些结果表明,与来自单独接种HER2-DC1的小鼠的T细胞相比,来自HER2-DC1+aSEMA4D处理的小鼠的CD4 T细胞在增殖、功能和特异性方面更优越。

[0133] 实施例5: BALB/cNeuT转基因小鼠的DC1处理影响表达HER2的乳腺癌中的播散癌细胞。

[0134] DC1疫苗在新辅助化疗/曲妥珠单抗后有残留病灶的HER2患者中进行了测试,DC1给予是安全的,并导致抗HER2 CD4 Th1增加,并且在17名患者中没有复发,中位随访时间为40个月。由于这些注定会复发的患者中有许多会携带播散性癌细胞(DCC),因此我们想研究Th1细胞因子以及CD4 Th1细胞对DCC的影响。为此,我们使用了BALB/cNeuT转基因小鼠模型。NeuT是一种转基因小鼠乳腺癌模型,其中小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子驱动neuT表达,小鼠在雌性小鼠的乳腺脂肪垫中产生自发性肿瘤。当雌性BALB-neuT小鼠达到21-28日龄时,neuT蛋白在乳腺中过表达,非典型增生区域开始形成,大约在第60天发展为原位癌,并在第120-150天发展为浸润癌。在所有乳腺中非同步地发生肿瘤性变化,因此到大约第120天,可以触及一个或多个肿瘤,并且到大约第230天,所有10个乳腺都包含可触及的肿瘤。我们和其他人已经证明,在乳腺癌出现之前,可以在几个器官中识别出播散的癌细胞(图5A和5B)。从第9周起,可在骨髓、肺和肝脏中检测到这些HER2+细胞角蛋白阳性细胞,它们占细胞的10-15%,并且通过Ki67测量处于合理的低增殖状态(图5C)。在第9周后,当DCC存在但在乳腺癌发展之前,用HER2脉冲的DC1对小鼠进行疫苗接种导致DCC降低以及Ki67表达降低(图6A)。DC1疫苗在第16周减少了乳腺癌的发展(图6B)。在来自用DC1处理的NeuT小鼠的DCC中,DCC的数量也减少(图6C)且肿瘤衰老标志物增加。如图6D所示 β -半乳糖苷酶表达是衰老的常见标志。后面的数据表明,除了治疗对原发性或转移性疾病的影响外,通过肿瘤内治疗,DC1可以通过诱导抗HER2 CD4 T细胞驱动衰老和防止肿瘤发展,并可能对BC死亡

率产生影响。

[0135] 实施例6:DC1或SEMA4D处理后的免疫细胞浸润:

[0136] BALB-neu转基因 (NeuT) 小鼠在8周龄时皮下注射 1×10^6 个大鼠neu肽脉冲的DC1,每周两次,或每周给予浓度为10mg/kg/体重的抗SEMA4D抗体。第16周处死小鼠,收集乳腺。制备乳腺单细胞悬液并染色CD19阳性B细胞,然后通过流式细胞术进行分析。与未处理的对照相比,在疫苗接种DC1的小鼠和抗SEMA4D抗体处理的小鼠中观察到CD19+B细胞水平增加,表明B细胞浸润到乳腺中(图7A)。B细胞在肿瘤区域的积累表明,抗肿瘤抗体在引起采用SEMA4D的DC1疗法中所见的效果中起作用。此外,对来自对照和DC1疫苗接种的NeuT小鼠的骨髓细胞进行CD4和CD8 T细胞标志物染色,并通过流式细胞术进行分析。与未治疗的对照小鼠相比,在DC1疫苗接种NeuT小鼠的骨髓中观察到CD4T细胞和CD8 T细胞的数量增加(图7B)。

[0137] 实施例7:来自CD4 Th1的IFN- γ 和TNF- α 在表达HER2的乳腺癌中造成肿瘤衰老的诱导:

[0138] 由于CD4和B细胞(MHC II类APC)在DCIS导管周围积聚,我们研究了Th1细胞因子对HER2 BC细胞的影响。IFN- γ 和TNF- α 在表达HER2的BC细胞中引起细胞凋亡和肿瘤衰老的诱导。阻断HER2/HER3信号在乳腺癌中的治疗益处已在体外研究和临床中体现。我们在用HER2和HER3 siRNA阻断的高表达和中表达HER2的细胞系中探索了Th1细胞因子的衰老和凋亡作用(图2)。虽然在HER3敲低的SK-BR-3细胞中的TNF- α 和IFN- γ 的联合治疗没有显著增加衰老细胞的数量,但在用双重HER2/HER3敲低联合Th1细胞因子处理的细胞中观察到更高的SA- β -gal染色(图8A)。曲妥珠单抗是一种针对HER2胞外亚结构域IV的人源化重组单克隆抗体,能够抑制配体独立的二聚化,阻断下游增殖信号转导通路,并诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC),而帕妥珠单抗是另一种靶向HER2胞外亚结构域II的人源化重组单克隆抗体,能够防止与HER家族其它成员的配体依赖性异二聚化,这也抑制增殖信号转导通路并诱导ADCC。两种抗体一起以互补的方式起作用。我们将我们的Th1细胞因子诱导的衰老和细胞凋亡范式应用于组合模型,采用TNF- α 和IFN- γ 治疗,连同曲妥珠单抗和帕妥珠单抗。在HER2高SK-BR-3细胞中,我们发现与未处理的细胞、单独用细胞因子处理的细胞或单独用抗体处理的细胞相比,用细胞因子和抗体的组合处理的细胞中的衰老协同增加,如SA- β -gal染色(图8B, $p < 0.001$)和p15^{INK4b}(细胞周期蛋白依赖性激酶4抑制剂B,也称为p15^{INK4b})表达(图8C)所测。值得注意的是,联合治疗不仅诱导了相对较高百分比的蓝色衰老细胞,而且总体细胞数量也明显减少。增加的活性半胱天冬酶3表达(图8C)和增加的膜联蛋白V和碘化丙啶阳性细胞(图8D和E)证明了以累加方式增加的细胞凋亡(图8D和E)。我们探索了TNF- α 和IFN- γ 在曲妥珠单抗和帕妥珠单抗耐药细胞系中诱导衰老和凋亡的潜力。HCC-1419和JIMT-1细胞用曲妥珠单抗处理,帕妥珠单抗不诱导衰老或细胞凋亡(图9)。然而,如HCC-1419细胞(图9B)和JIMT-1细胞(图9C)中p15^{INK4b}表达增加和SA- β -gal测定(图9A)所证明的,细胞因子和靶向治疗的双重治疗诱导了显著更大的衰老。即使在对曲妥珠单抗和帕妥珠单抗耐药的细胞系中,Th1细胞因子联合HER2/HER3阻断也能导致肿瘤衰老和凋亡。

[0139] 我们接下来测试了抗HER2 CD4 Th1细胞是否会影响被转移小室(transwell)膜分离的HER2^{阳性}BC细胞。SK-BR-3乳腺癌细胞与来自以II类HER2肽引发的乳腺癌患者的CD4+T细胞共培养导致SK-BR-3细胞衰老和凋亡,增加的SA- β -gal染色(图10A)和p15^{INK4b}与裂解的半

胱天冬酶3表达(图10B,CD4⁺-DC H,3)证明了这一点。用未成熟树突细胞(CD4⁺-IDC H(2))或成熟DC加不相关的II类肽(BRAF:CD4⁺-DC B(5);或存活蛋白:CD4⁺-DC S(6))引发的CD4⁺T细胞无法诱导SK-BR-3细胞的衰老或凋亡。与先前证明的协同效应类似,当将曲妥珠单抗和帕妥珠单抗(4)添加到培养物中时,衰老和细胞凋亡显著增强,这通过增加的SA-β-gal染色(图10A,p<0.001)和p15^{INK4b}和裂解的半胱天冬酶3表达(图10B,CD4⁺-DC HTP,4)来证明。这些结果表明,抗HER2 CD4⁺ Th1细胞不需要直接与肿瘤细胞相互作用,而是与TME中的抗原呈递细胞(APC)相互作用,并且Th1细胞因子可以与HER2靶向疗法协同作用。这可能构成经脉冲并在肿瘤环境中结合的DC1驱动抗HER2 CD4⁺ Th1响应的基础,以及像HP这样的抗体可以与Th1细胞因子协同消除肿瘤细胞的可能性。

[0140] 实施例8:Th1细胞因子(IFN-γ)在HER2乳腺癌中的临床活性:

[0141] 我们在临床前研究结果的基础上开展了一项I/II期研究,研究IFN-γ能否安全给予并对临床反应产生影响。一项I期研究表明,在一线转移性BC患者中每周3次皮下给予IFN-γ和THP是安全的,并导致部分反应的疾病稳定(图11)。现在已经进展到一项II期研究,该研究在新辅助治疗中对具有>T2ER+HER2+IBC的患者进行治疗。现在有15名患者入组,前4名患者中有2名获得了pCR。我们对此感到鼓舞,因为使用PTCH(一种毒性明显更高的方案)治疗的这种亚型患者显示约27%的pCR率。如本文所示,该方案至少在维持既定的pCR率方面是成功的,因此,该方案可以使用免疫疗法联合Th1细胞因子和标准疗法,用更简单的潜在更有效的方案替代毒性更大的方案。我们正在确定DC1疫苗能否在新辅助HER2患者中驱动类似的反应,以驱动pCR与PTCH联合。这些数据表明,像IFN-γ这样的Th1细胞因子在影响HER2肿瘤方面具有临床益处,并有望成为HER2 BC中真正的非化疗方案的组成部分。

[0142] 实施例9:B和T细胞的积累发生在对HER2脉冲的DC1疫苗有响应的患者中:

[0143] 虽然具有pCR的患者的乳房中没有残留的DCIS导管,但许多残留疾病的患者提供了评估残留疾病患者乳房响应的机会。乳房中的响应通常是异质的,具有致密的淋巴细胞浸润区域(图12A和B)和反应很少或没有反应的区域(图12C和D)。淋巴细胞的积累代表大部分CD4⁺T细胞以及CD20⁺B细胞和一些CD8⁺T细胞(图13)。这些结构能模拟与有利反应相关的异位淋巴结构。在这些淋巴结构在DCIS导管内和周围大量积聚的患者中,我们经常看到正在死亡或已死的导管,表明免疫反应导致DCIS死亡和消除(图14)。

[0144] 抗SEMA4D抗体对TME和肿瘤脉管系统的影响:

[0145] SEMA4D已被描述为肿瘤血管生成的启动物,因此与肿瘤进展相关(参见例如,Zhou等.Methods Mol.Biol 1493:429-441(2017))。为了研究SEMA4D如何改变TME,特别是肿瘤血管分布,我们通过体内MRI观察了注射了TUBO细胞的小鼠的肿瘤血管分布,如实施例3中所述。动态对比增强(DCE)-MRI用于检查肿瘤血管分布的不同特性:使用曲线下面积(AUC)、斜率、达到最大值的时间,我们确定了肿瘤血管分布的状态。我们通过尾静脉注射了0.2mmol/kg钆布醇,以研究单独使用DC1或单独使用抗SEMA4D或两种药物联合使用的单一治疗如何影响肿瘤血管分布和肿瘤消退。我们观察到,与未治疗或单一治疗相比,接受联合治疗的小鼠的斜率更小、造影剂积聚更少、血管渗漏更少(图15A和B)。该数据表明,肿瘤内DC1与全身给予抗SEMA4D抗体的联合治疗改善了肿瘤血管分布,表现为更小的斜率和更少的造影剂积聚以及更少的血管渗漏,这可能在诱导单和双边TUBO模型中的完全肿瘤消退中发挥作用。

[0146] 实施例10:抗SEMA4D对肿瘤pH的作用:

[0147] 抗SEMA4D对肿瘤pH的作用:以证明肿瘤是酸性的,并且肿瘤酸中毒与不良预后相关,并且很大程度上依赖于血管分布来降低其酸度,我们通过化学交换饱和转移(CERST)-MRI实验检查了肿瘤的pH值。如图16所示,我们观察到单独用SEMA4D处理对随时间将肿瘤pH从酸性转变为碱性具有作用。

[0148] 上述鼠单克隆抗体Mab 67公开于例如美国专利号8496938中。

[0149] MAb 67VH和VL基因的氨基酸序列如下所示,CDR1、CDR2和CDR3区域加下划线。

[0150] MAb 67VH:

[0151] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYYMHVVKQSPENSLEWIGQINPTTGGASYNQKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEESAVYYCTRYYYGRHFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:1)

[0152] MAb 67VL:

[0153] DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:2)

[0154] Mab VX15/2503 (派盘单抗)是Mab67的人源化形式,也在美国专利号8496938中公开。VX15/2503的氨基酸序列复制如下。

[0155] VX15/2503VH的序列:

[0156] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFSDYYMHVVRQAPGQGLEWMGQINPTTGGASYNQKFKGKA
TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYYYGRHFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)

[0157] VX15/2503VL的序列:

[0158] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVVDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPDRFSG
SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:4)

[0159] 实施例11:CD4+T细胞的消耗消除了抗SEMA4D活性,无论是单独情况还是与DC-1治疗联合的情况。

[0160] 总而言之,CD4+T细胞在激发和塑造适应性免疫反应方面发挥着重要作用。为了研究CD4+T细胞是否是对HER2 DC1疫苗/抗SEMA4D联合治疗的临床响应所必需的,产生了CD4耗竭的荷瘤小鼠,并将对治疗的免疫应答与非CD4耗竭(“正常”)荷瘤小鼠的情况做比较。

[0161] Ba1b/C小鼠在第0天右侧皮下接受 2.5×10^5 个TUB0细胞。当第7天可触及肿瘤时,将小鼠随机分为四组。小鼠接受IgG同种型对照抗体或抗SEMA4D抗体/Mab67(10mg/kg/体重)腹膜内单一疗法直至终点或 1×10^6 个/100 μ l瘤内HER2-DC1每周一次,持续六周。对于联合治疗,小鼠在接受第一次瘤内HER2-DC1注射之前接受抗sema4D抗体,每周一次,持续六周。

[0162] 通过在TUB0肿瘤植入前三天开始腹膜内给予300 μ g抗CD4耗竭抗体(克隆GK1.4)来产生CD4耗竭的Ba1b/C小鼠,并继续用抗CD4抗体进行治疗,每周注射两次直到终点。(参见Evans,E.E.等.(2015).Cancer Immunol Res 3(6):689-70)。CD4耗竭的小鼠用单一疗法、抗SEMA4D抗体/Mab67或联合疗法(如上文对于荷瘤非CD4耗竭小鼠所述)进行治疗。

[0163] 每组的平均肿瘤体积和存活率显示于图17A-D-17A和B(对照,无CD4耗竭;分别为肿瘤体积和存活率),以及于17C和D(CD4耗竭)。图17E(对照,无CD4耗竭)和17F(CD4耗竭)显示了每只小鼠的肿瘤生长曲线。用抗SEMA4D治疗后观察到肿瘤完全消退,联合治疗进一步增强了活性。非消耗组中所有联合治疗的小鼠都存活了60天的测试期(图17B),并且这些小鼠中有4/5显示完全的肿瘤消退(图17E)。然而,CD4+T细胞的消耗完全消除了抗SEMA4D治疗

的活性,无论是单独情况还是与DC-1疫苗组合的情况(图17D)。这些数据指示,CD4+T细胞是对抗SEMA4D疗法产生临床有效响应所需的。

[0164] 实施例12.Fc γ 受体(Fc γ R)对联合疗法的临床效果的作用。

[0165] Fc γ R介导的最常与治疗性抗体相关的功能是介导靶细胞消除-抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的那些功能,这是一种细胞介导的免疫防御机制,免疫系统的效应细胞通过该机制主动裂解靶细胞(其膜表面抗原已被特异性抗体结合)。当抗体与靶细胞表面抗原结合产生足够的亲合力以触发通过效应细胞(如NK细胞和巨噬细胞)上的Fc γ R进行信号转导时,这些功能就会被触发,然后通过直接杀伤或吞噬作用消除靶细胞。临床前模型表明,这些形式的Fc γ R介导的细胞毒性是某些肿瘤靶向抗体作用机制的重要组成部分。(Clynes RA等,抑制性Fc受体调节针对肿瘤靶标的体内细胞毒性(Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets.)Nat Med.2000,6:443-446)。

[0166] 为了研究Fc γ R在对联合疗法的临床响应中的作用,产生了Fc γ R敲除小鼠。简言之,该模型是通过在E14 ES细胞中引入新的终止密码子并将靶向的细胞注射到C57BL/6囊胚中,从而靶向破坏Fcer1g基因来建立的。C57BL/6背景上的杂合子被杂交以产生纯合的靶向突变小鼠。然后将小鼠回交12代(N12)至BALB/cByJ近交背景。(Takai T,Li M,Sylvestre D,Clynes R,Ravetch J.(1994)FcR γ 链缺失导致多营养效应细胞缺陷(FcR γ Chain Deletion results in Pleiotrophic Effector Cell Defects))。

[0167] 在第0天,BALB/C-Fcer1g KO小鼠(C.129P2(B6)-Fcer1g^{tm1Rav}N12)在两侧皮下注射2.5X10⁵肿瘤细胞/位点。产生DC,成熟为DC1并用MHC II类neu肽脉冲。小鼠每周一次瘤内接种1e6/100 μ l DC1疫苗,持续六周。在那些具有两个肿瘤位置的动物中,仅在两个肿瘤之一中接种疫苗。抗SEMA4D Mab 67以10mg/kg/体重的浓度每周腹膜内给予。对照小鼠接受同种型对照抗体、DC治疗或单独的Mab67。每2-3天用卡尺测量肿瘤直到终点。治疗的肿瘤的平均肿瘤体积和每组的存活率分别显示在图18A和18B中。每只小鼠的肿瘤生长曲线示于图18C。(CR=肿瘤完全消退;肿瘤体积<50mm²)。

[0168] 数据显示,在缺乏Fc受体 γ 表达的小鼠中,与不治疗或单一药剂治疗相比,联合治疗显著延迟了肿瘤生长(图18A和B)。然而,与用联合疗法治疗的对照小鼠(图17E)相反,没有实现完全的肿瘤消退(图18B),这表明Fc受体 γ 对于联合疗法的完全抗肿瘤功效是必不可少的。

[0169] 实施例12. IFN- γ 对联合疗法的临床效果的作用。

[0170] 干扰素- γ (IFN- γ)是一种具有相关联的抗增殖、促细胞凋亡和抗肿瘤机制的多效分子。认为这种效应细胞因子是免疫的主要效应物,是与抗肿瘤免疫反应相关的关键Th1细胞因子。

[0171] 为了研究IFN- γ 在对联合疗法的临床反应中的作用,在Balb/CIFN- γ 敲除(KO)(C.129S7(B6)-IFNg^{tm1Ts}/J(IFN- γ ^{KO},杰克逊实验室公司)小鼠中产生肿瘤。第0天,在小鼠右侧皮下注射2.5e5个TUBO细胞。产生树突细胞,成熟为DC1并用MHC II类neu肽脉冲。第7天,当肿瘤可触及时,小鼠被随机分为四组。小鼠接受单一疗法,使用对照抗体或抗sema4D抗体(10mg/kg/体重)腹膜内注射直至终点,或1e6/100 μ l瘤内HER2-DC1每周一次,持续六周。对于联合治疗,小鼠在接受第一次瘤内HER2-DC1注射之前接受抗sema4D抗体,每周一次,持续六周。每2-3天用卡尺测量肿瘤直到终点。每组的平均肿瘤体积如图19所示。

[0172] 数据表明DC1、抗SEMA和组合的抗肿瘤活性需要IFN- γ 以获得活性。这些结果与免疫活性小鼠的CD4耗竭所获得的结果相似(图17),表明IFN- γ 和CD4细胞对于抗SEMA4D疗法的抗肿瘤反应都是必需的。

序列表

<110> H·李·莫菲特癌症中心和研究所股份有限公司 (H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RESEARCH INSTITUTE, INC.)

瓦西尼斯公司 (VACCINEX, INC.)

<120> 脑信号蛋白-4D阻断剂 (SEMA4D) 与DC1疗法的联合疗法

<130> 8555.035W0

<140>

<141>

<150> 62/865,027

<151> 2019-06-21

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成多肽"

<400> 1

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
           20           25           30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Asn Ser Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Thr Arg Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
           100          105          110
Thr Val Thr Val Ser Ser
           115
```

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成多肽"

<400> 2

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp
			20					25					30		
Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
		50				55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
65					70					75					80
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
					85				90					95	
Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100					105						110	

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成多肽"

<400> 3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Asp	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Gln	Ile	Asn	Pro	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
		50					55					60			

<400> 5

Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr Met His

1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成肽"

<400> 6

Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成肽"

<400> 7

Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val

1 5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成肽"

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列描述:合成肽"
<400> 9
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列描述:合成肽"
<400> 10
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5
<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列描述:合成肽"
<400> 11
Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr Met His
1 5 10
<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列描述:合成肽"

<400> 12

Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成肽"

<400> 13

Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val

1 5

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成肽"

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成肽"

<400> 15

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列描述:合成
肽"

<400> 16

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1

5

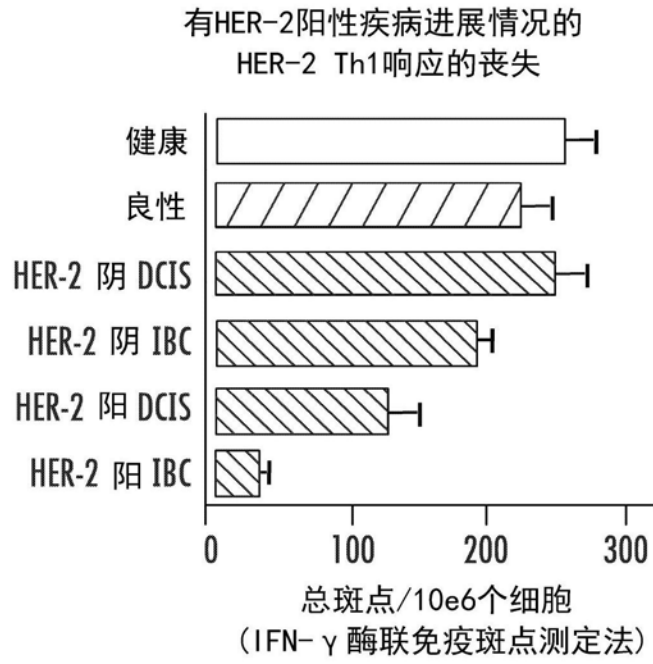


图1A

疫苗，但非标准疗法，
协助重建抗-HER2 TH1免疫

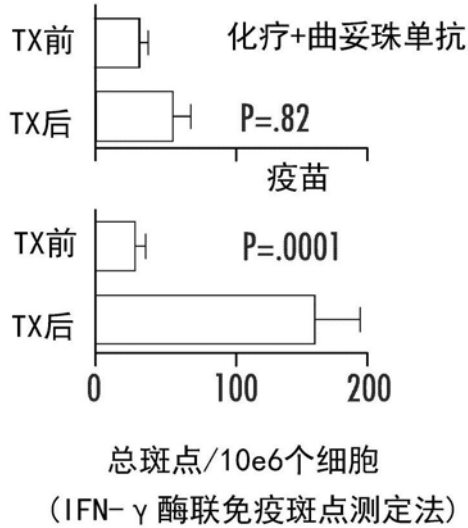


图1B

对HER-2的TH1免疫预测
对标准疗法的临床响应

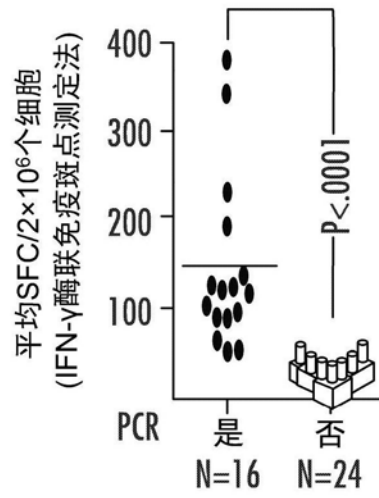


图1C

HER-2 TH1响应性
预测标准疗法后的无病生存

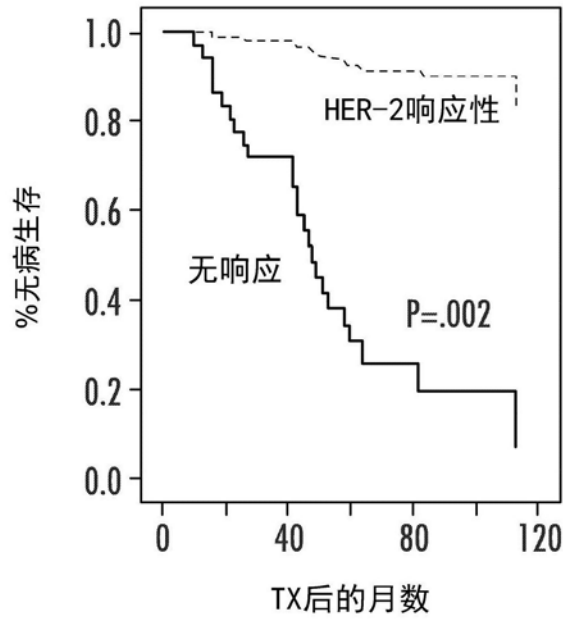


图1D

对于ER阳性对象，
抗雌激素疗法(AE)治疗
增强对疫苗接种的PCR率

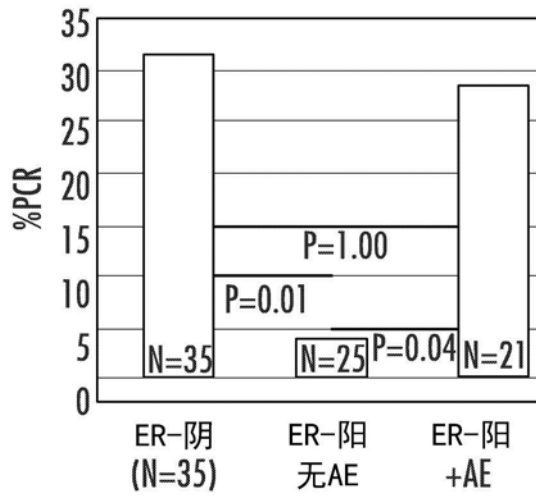


图2A

对于ER阳性对象，
抗雌激素疗法(AE)治疗
增强抗HER2 TH免疫

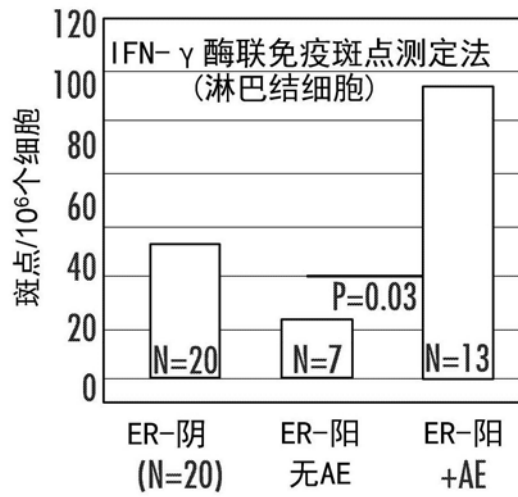


图2B

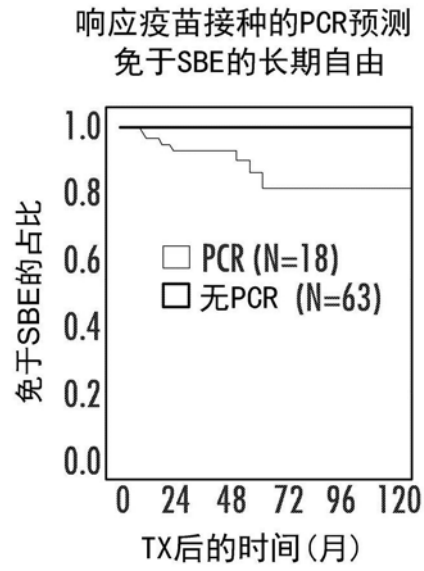


图2C

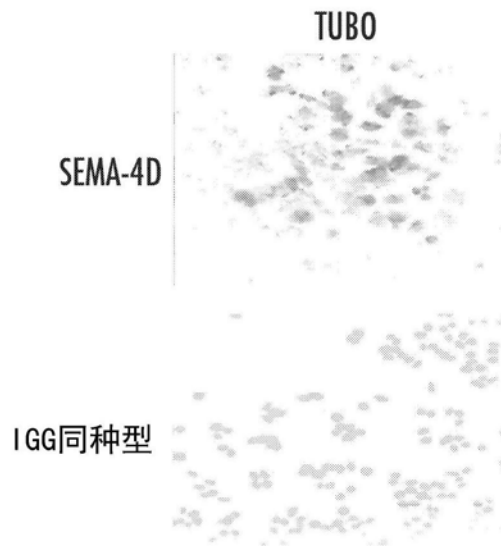


图3A

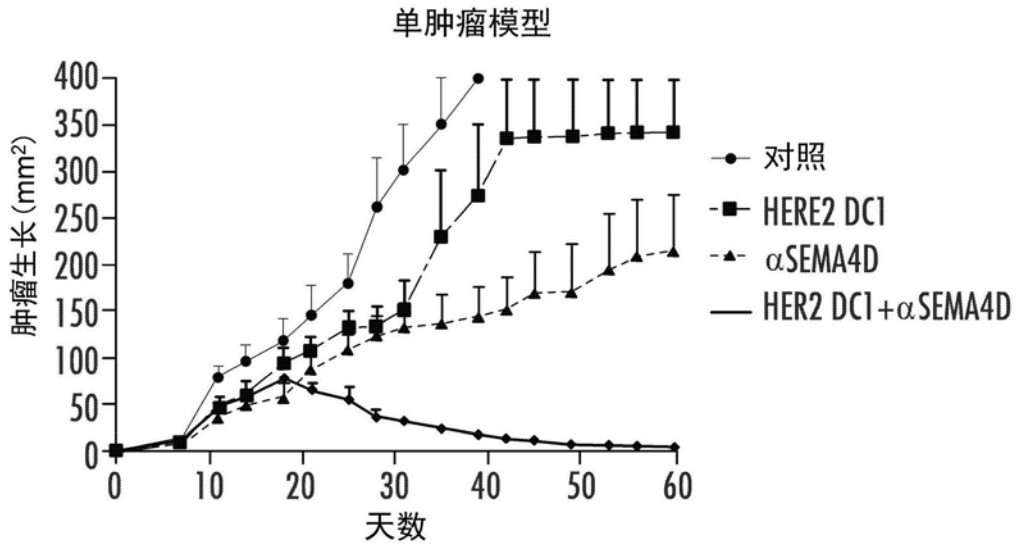


图3B

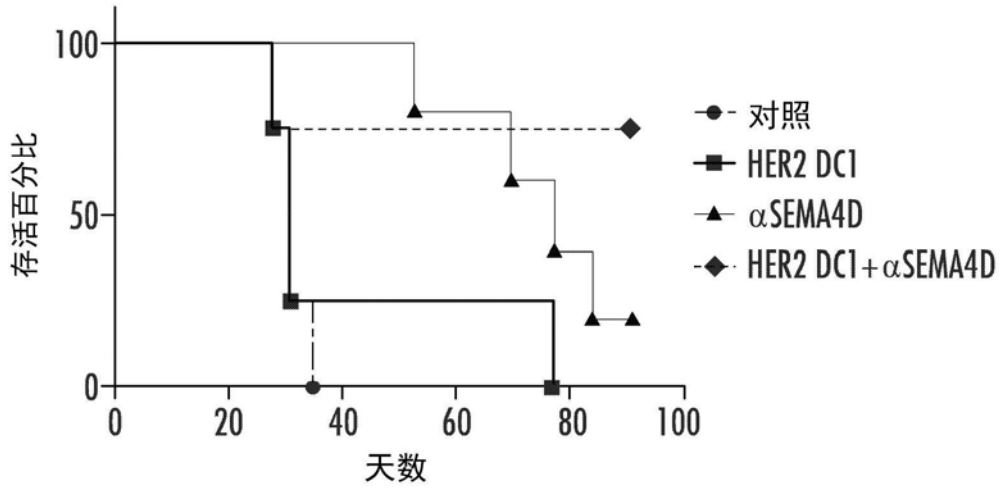


图3C

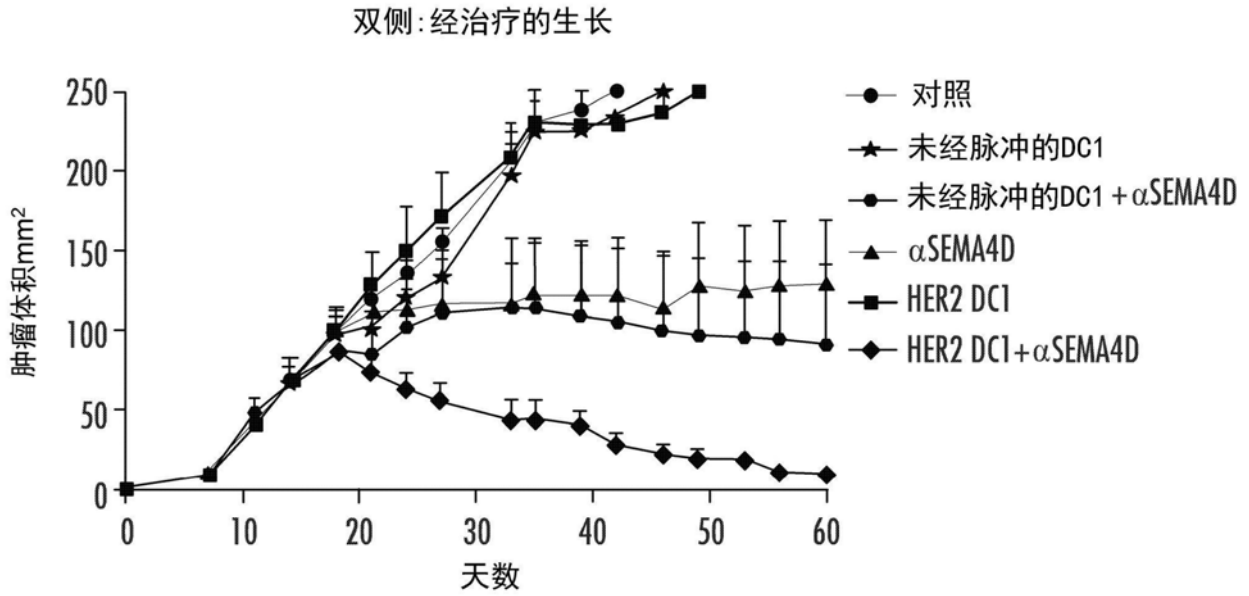


图3C1

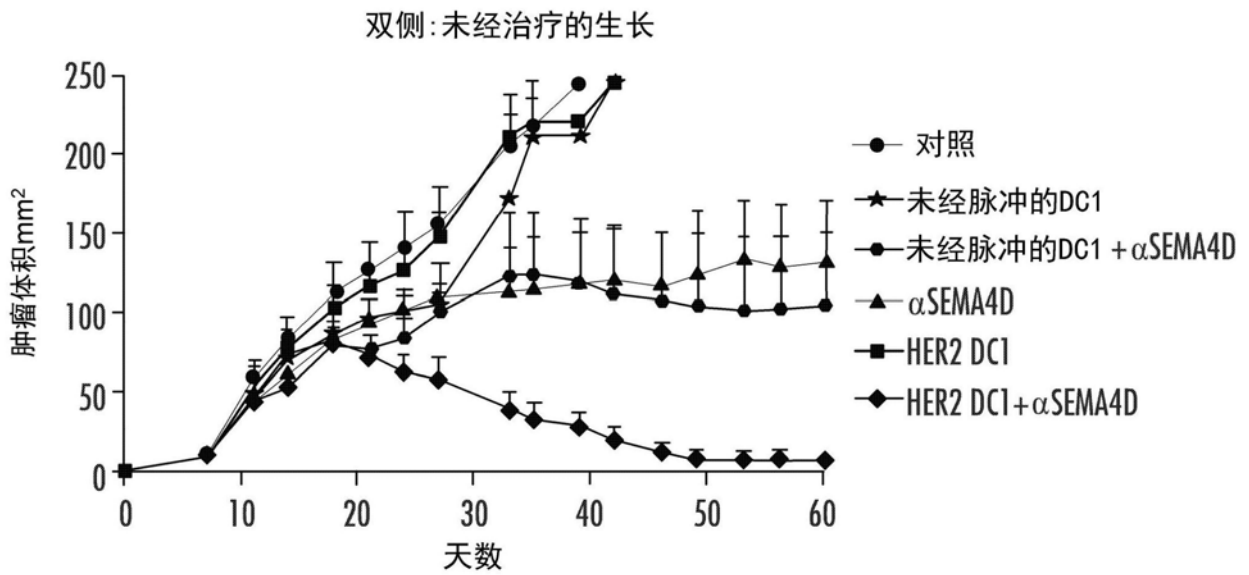


图3C2

HER2 乳腺癌	SEMA4D细胞角蛋白 阳性
DCIS	8/15
IBC	7/13

图3D

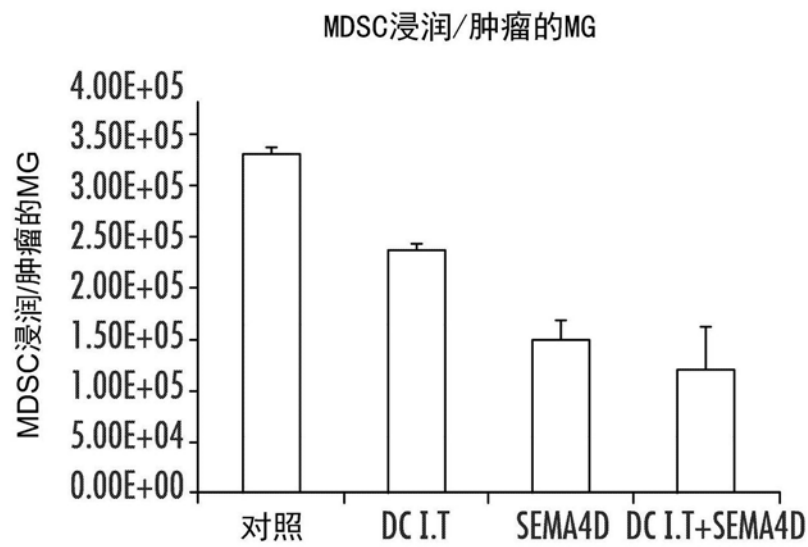


图3E

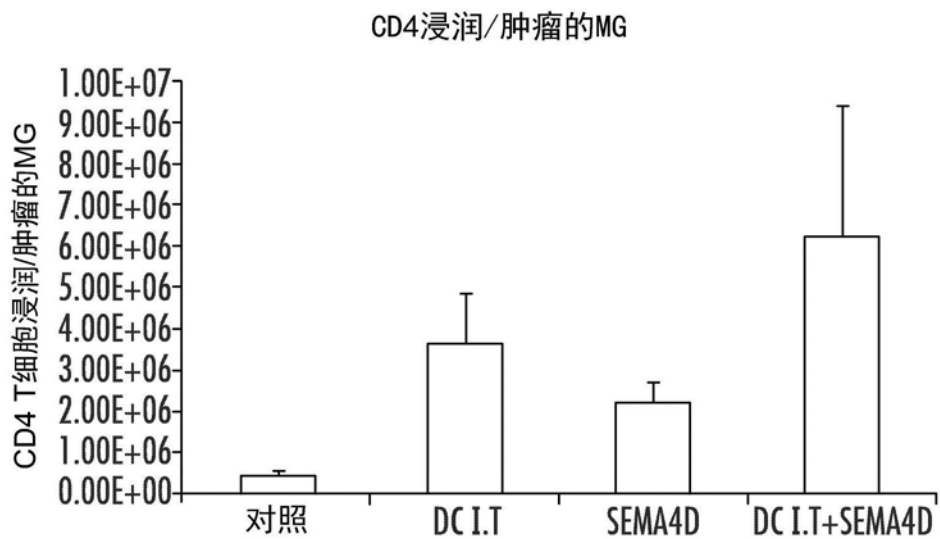


图3F

淋巴结中的CD4浸润

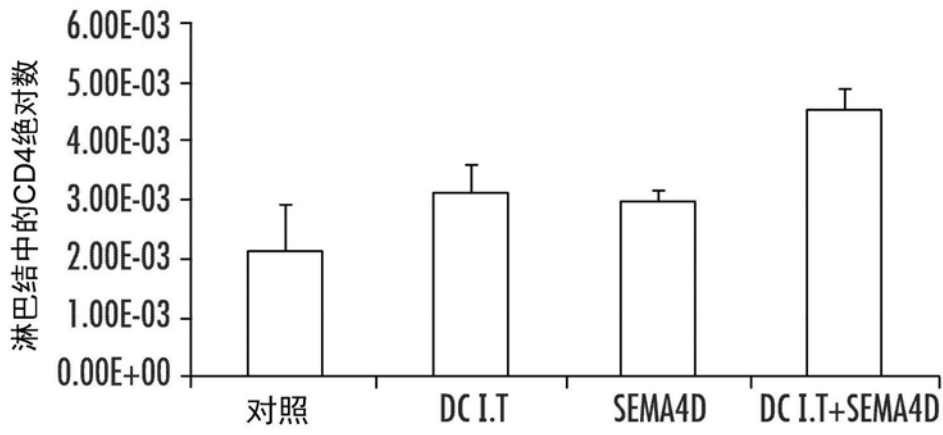


图3G

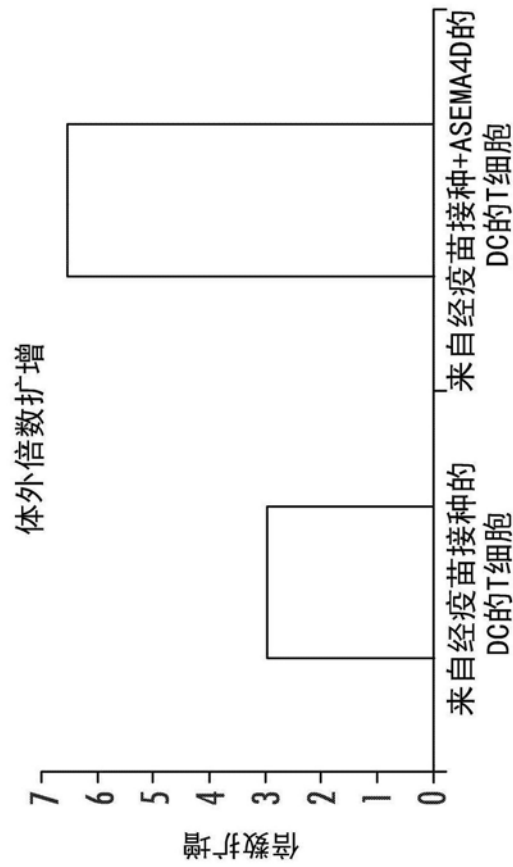


图4A

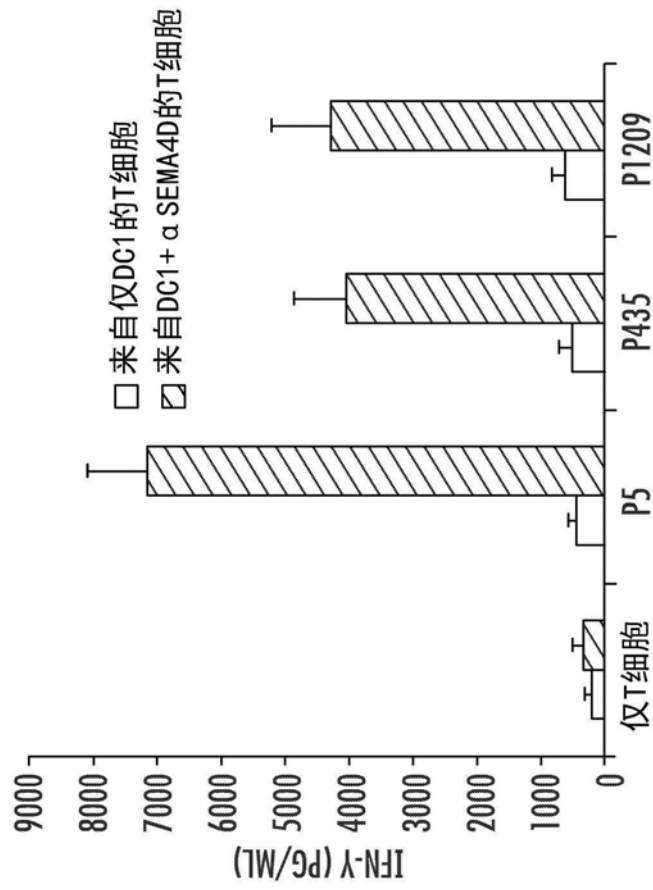


图4B

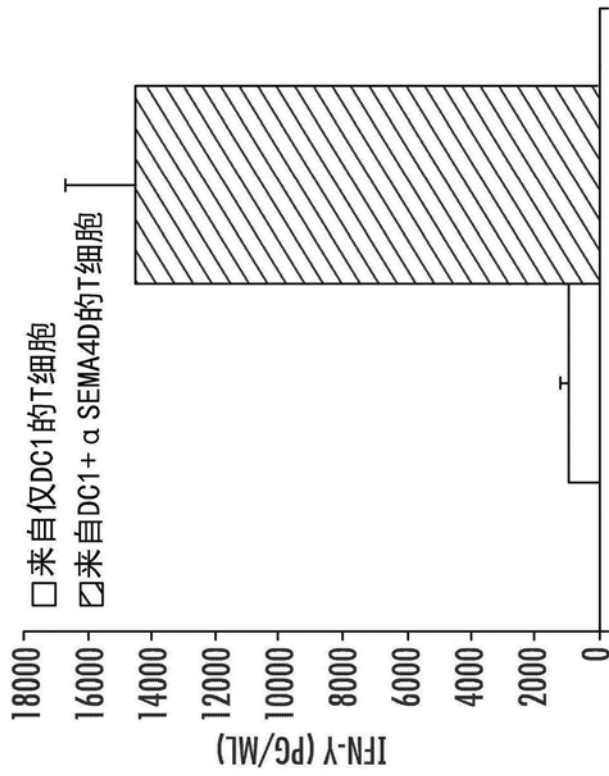


图4C

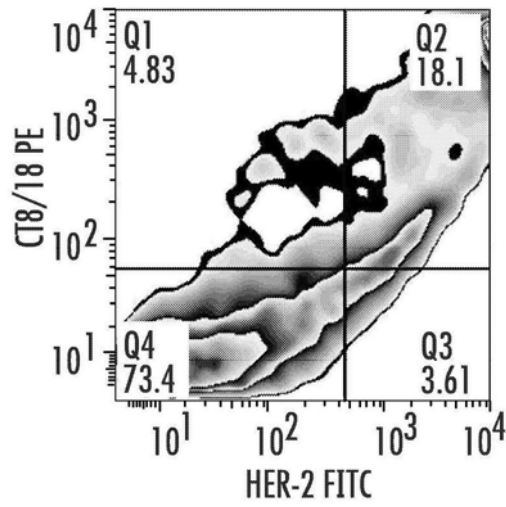


图5A

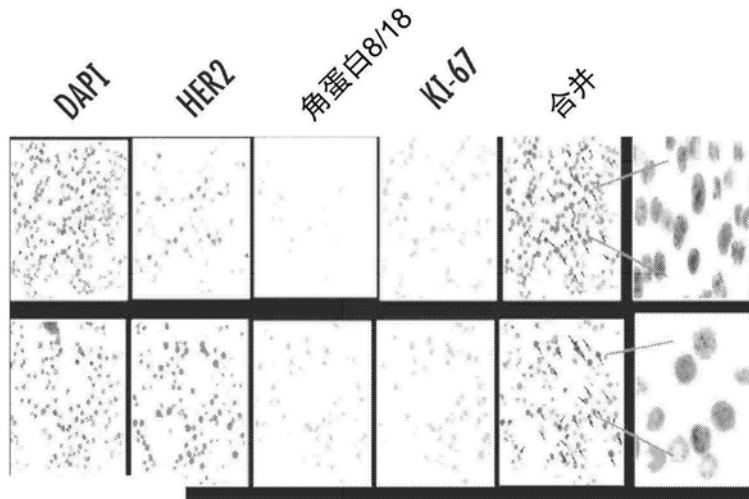


图5B

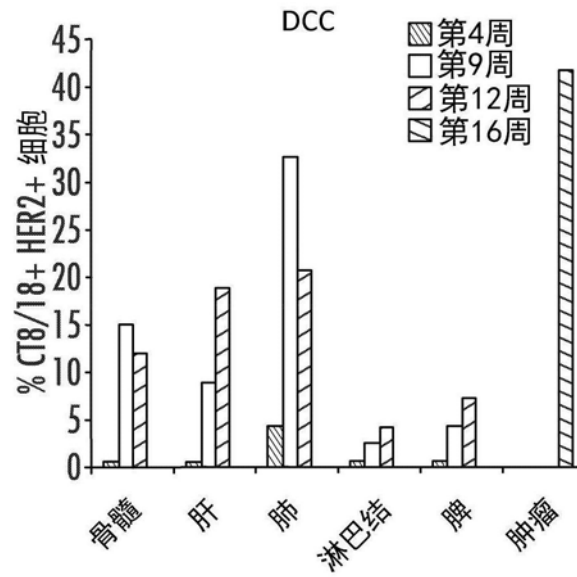


图5C

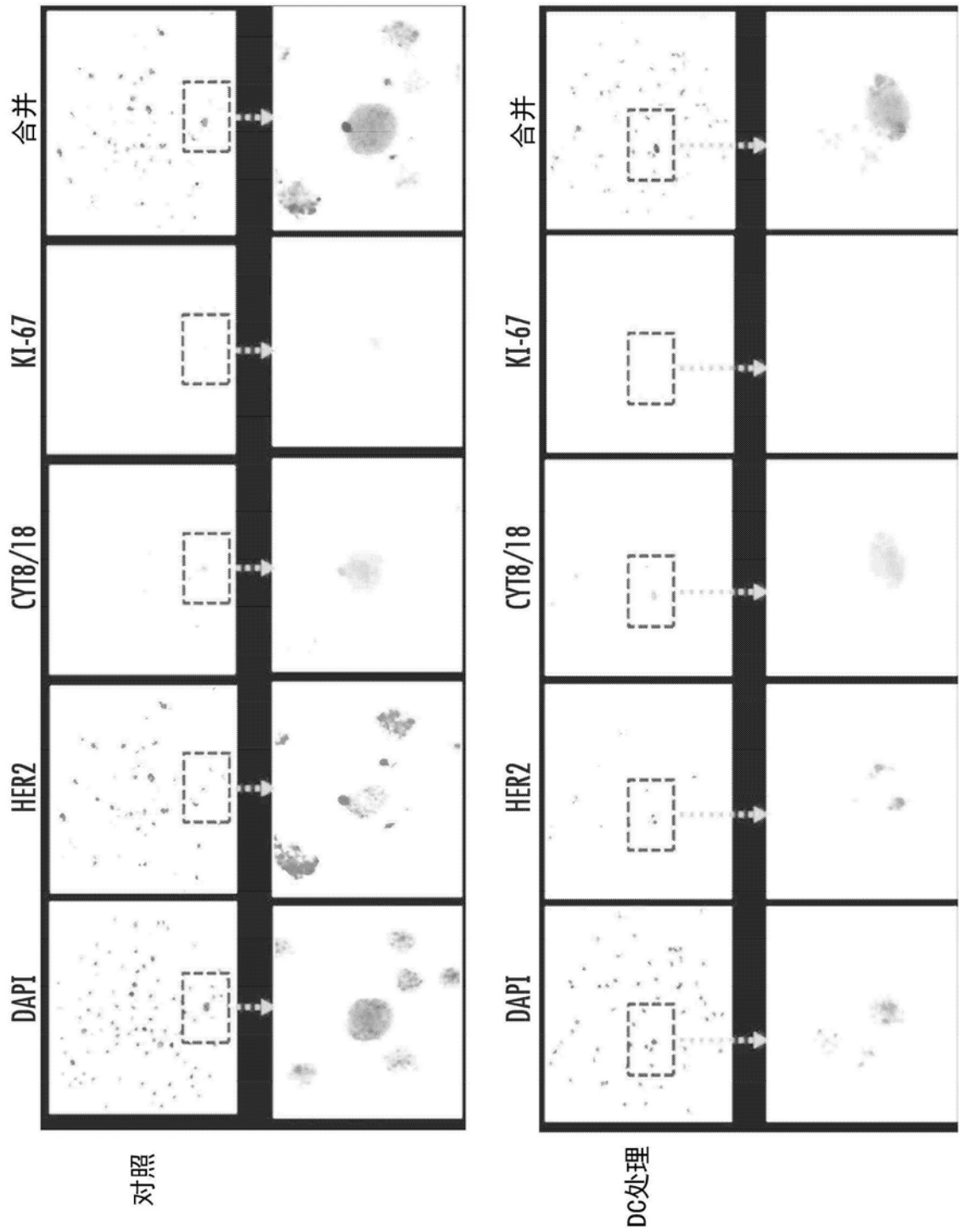


图6A

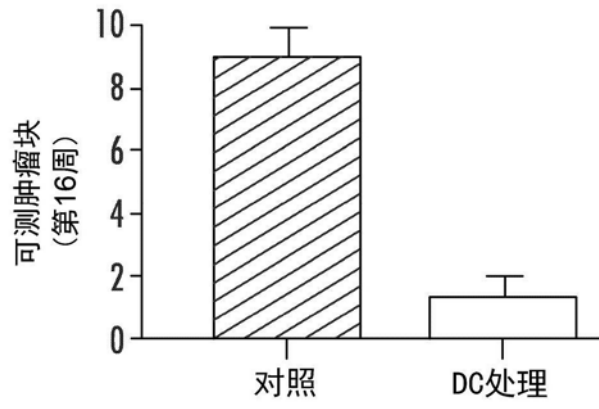


图6B

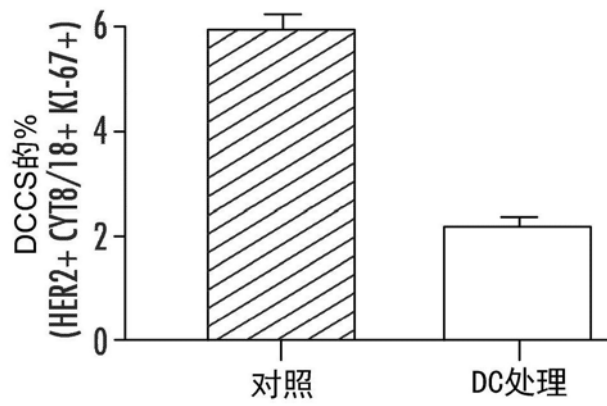


图6C

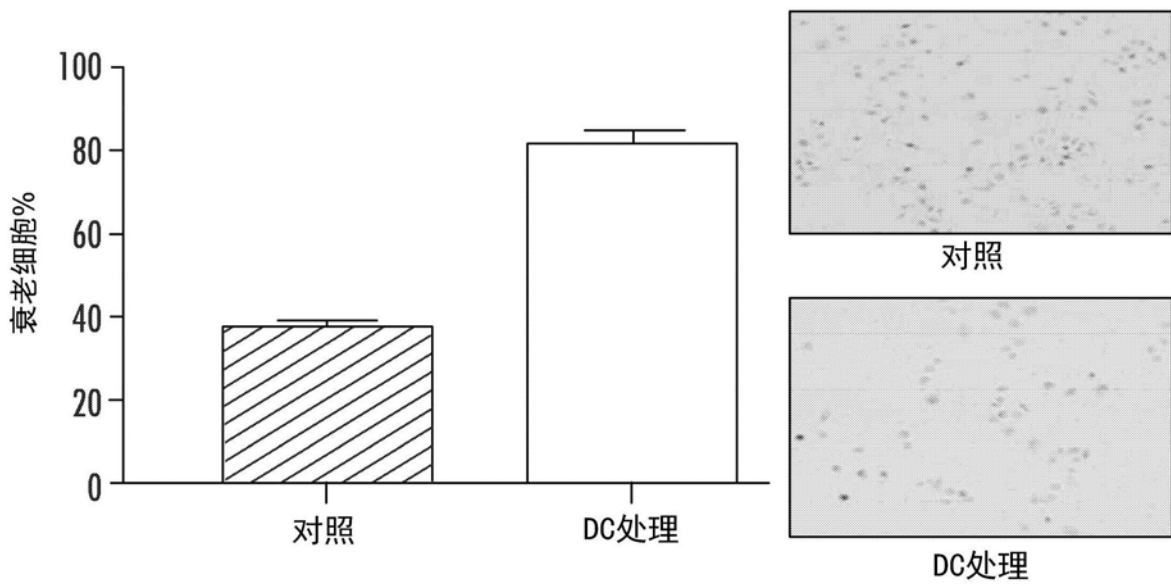


图6D

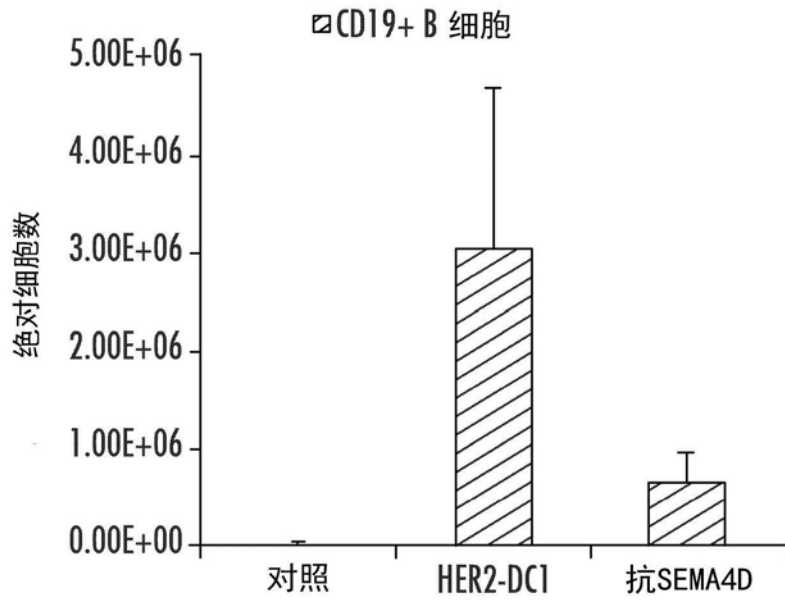


图7A

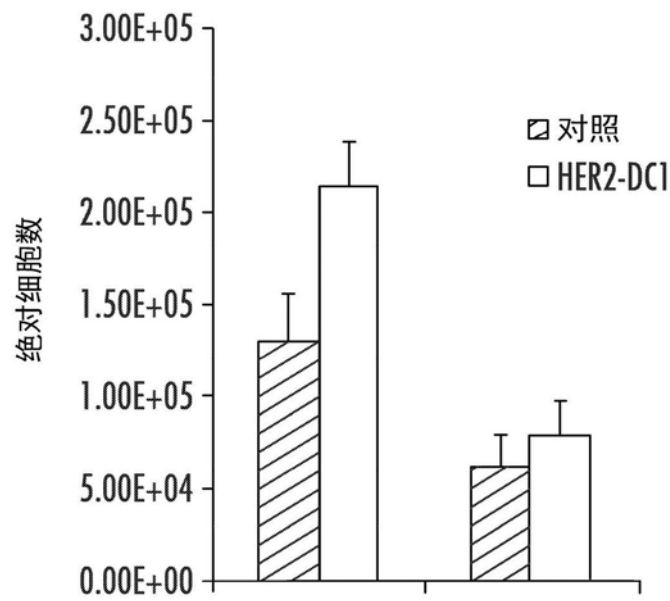


图7B

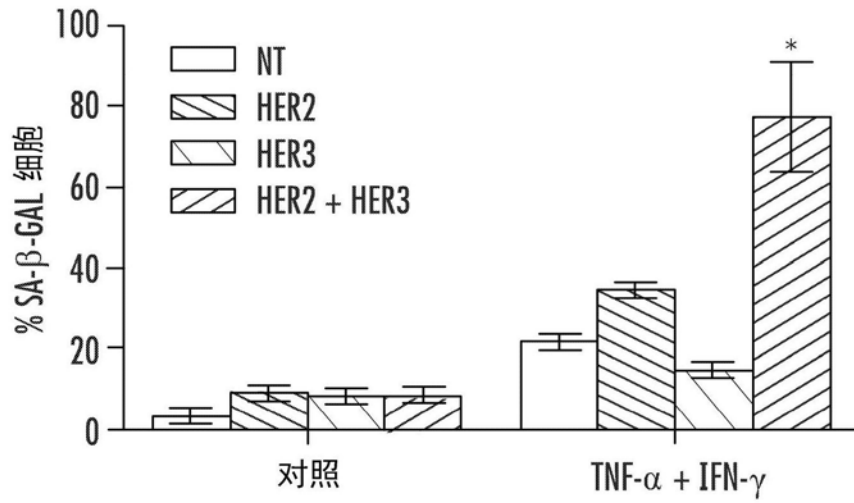


图8A

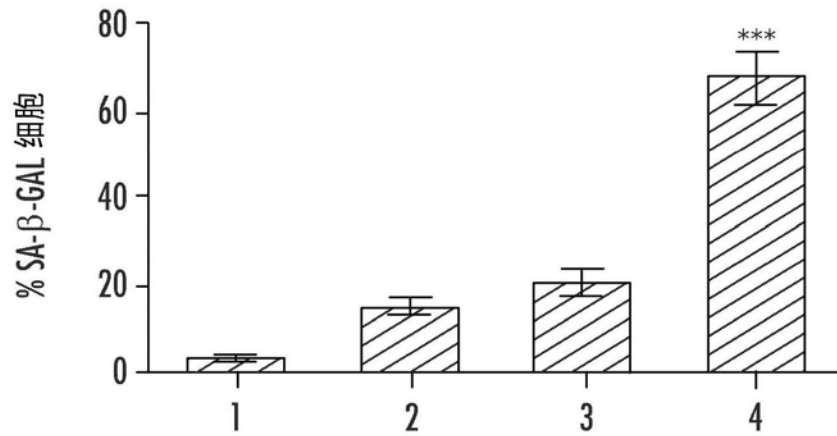


图8B

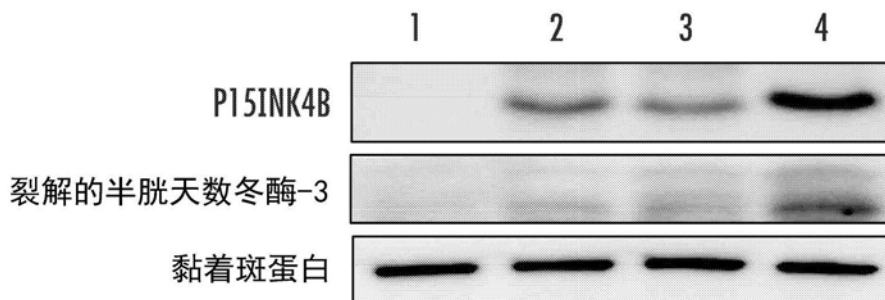


图8C

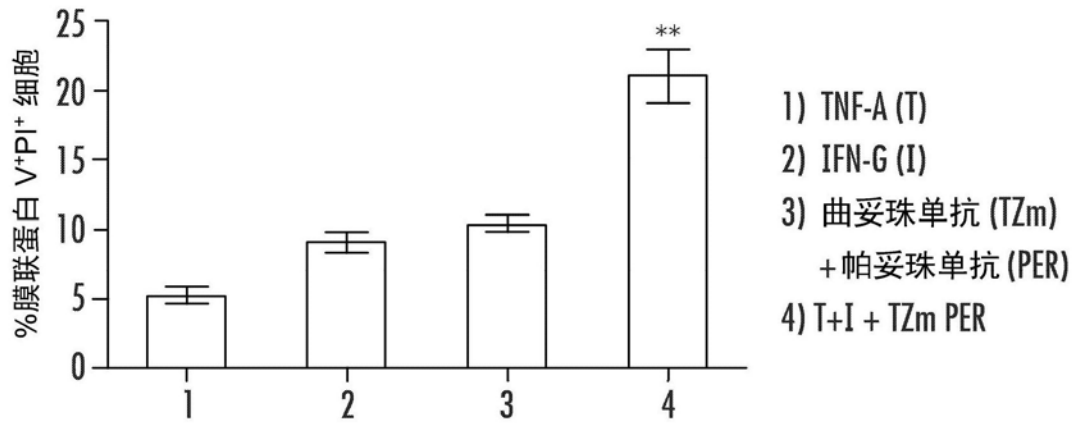


图8D

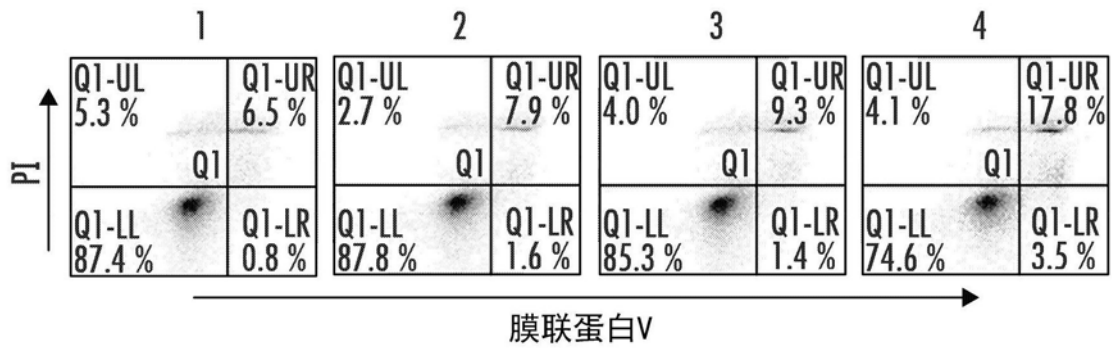


图8E

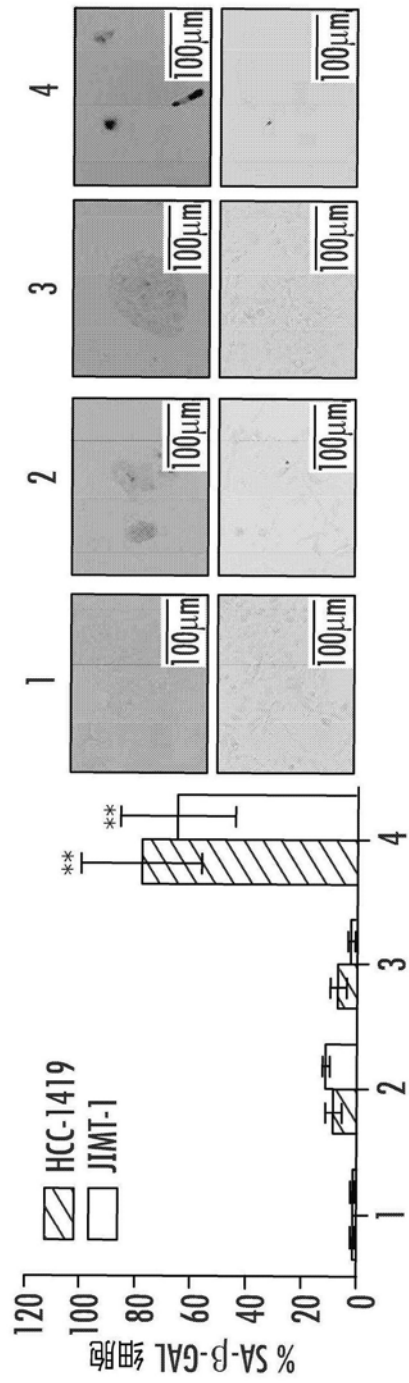


图9A

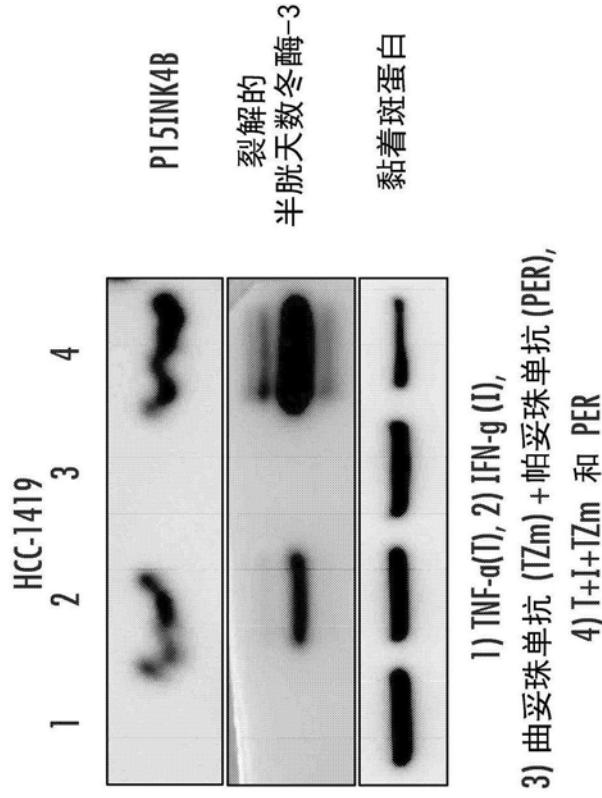


图9B

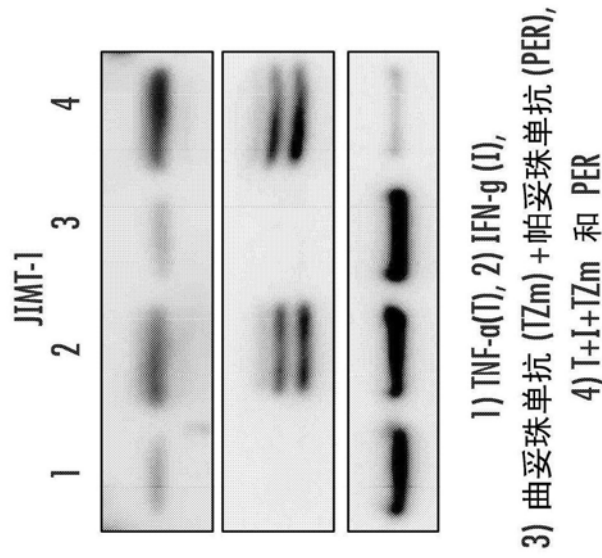


图9C

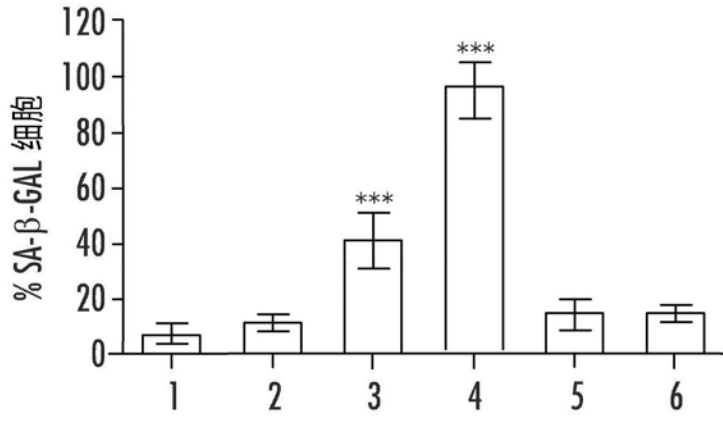


图10A

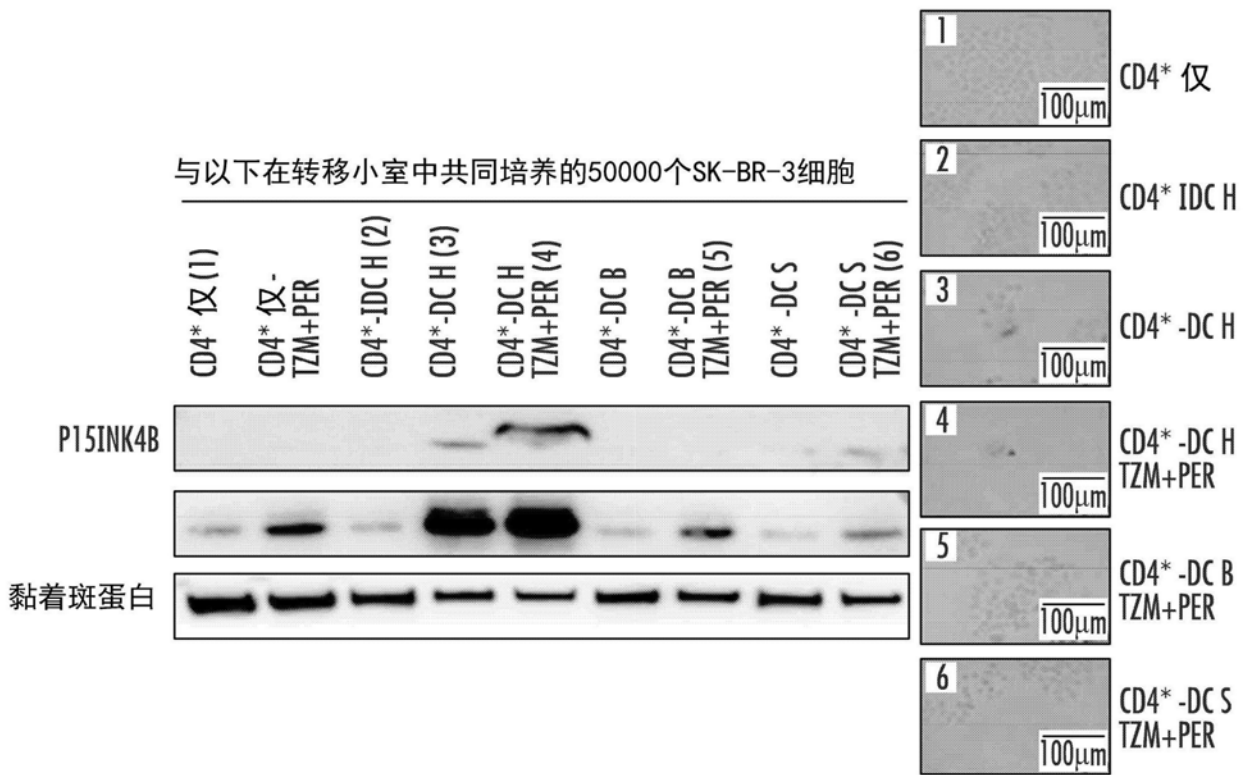


图10B

对THP-INF- γ 的I期响应数据

最佳响应			
臂	序列号	最佳响应	最佳响应
1	01	疾病稳定	09/27/2017
1	03	疾病稳定	10/17/2017
1	04	部分响应	10/25/2017
1	05	疾病稳定	11/20/2017
1	06	疾病稳定	10/19/2017
1	07	疾病稳定	11/30/2017
1	08	疾病稳定	01/24/2018
1	09	部分响应	02/16/2018
1	10	部分响应	02/15/2018

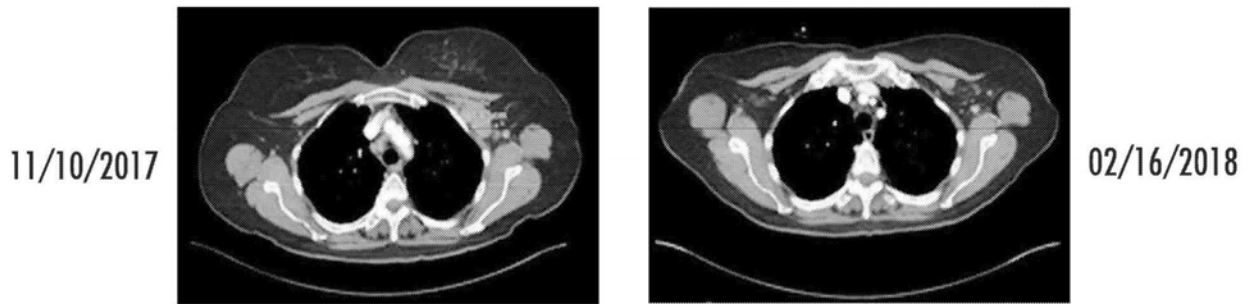


图11

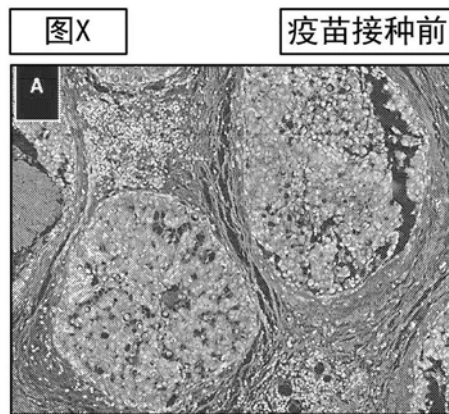


图12A

疫苗接种后

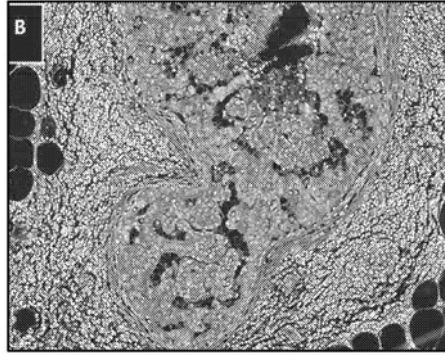


图12B

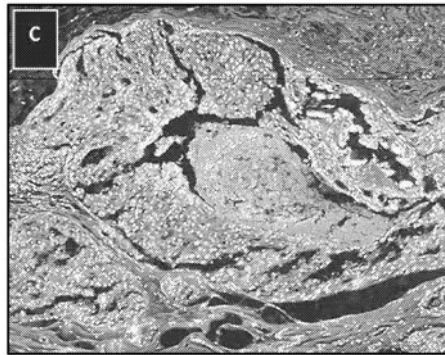


图12C

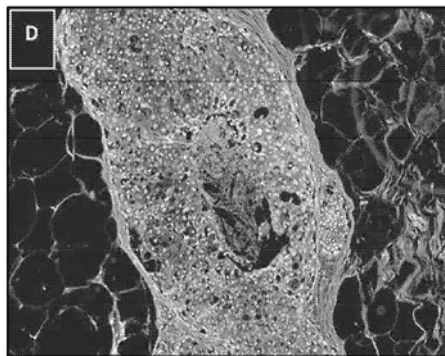


图12D

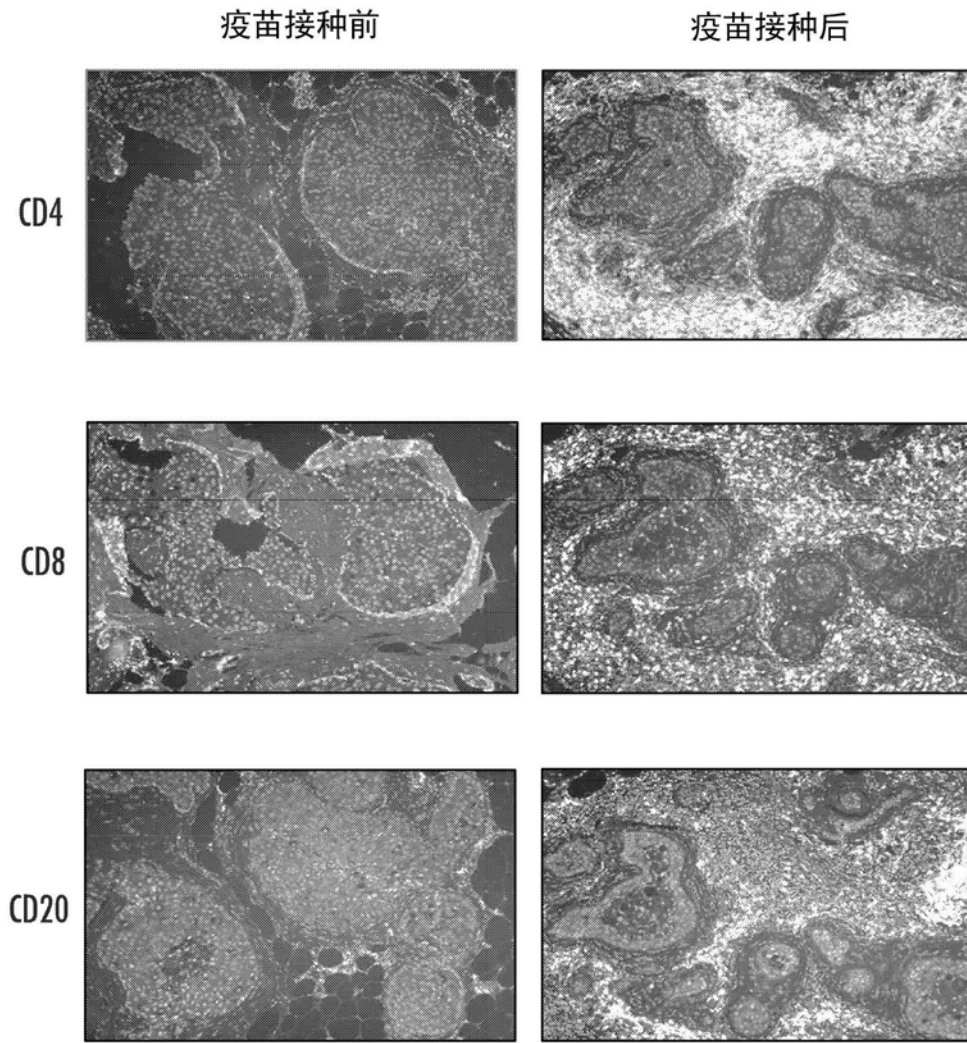


图13

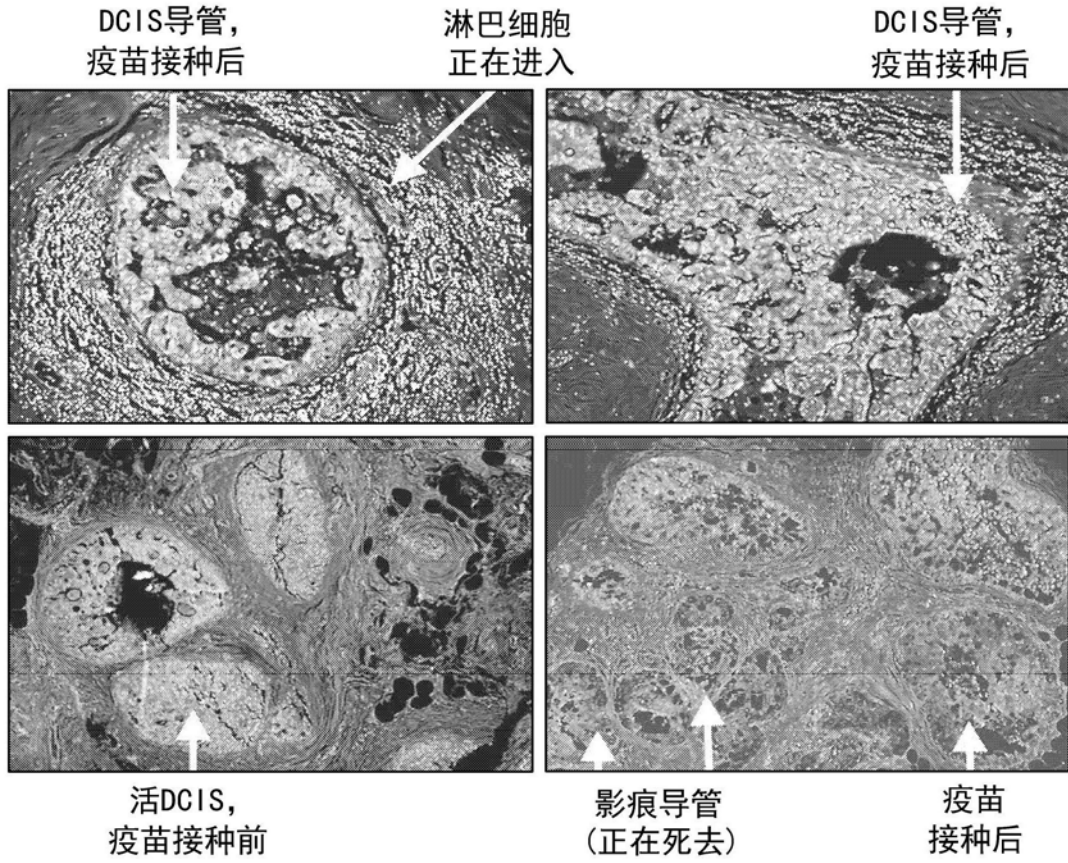


图14

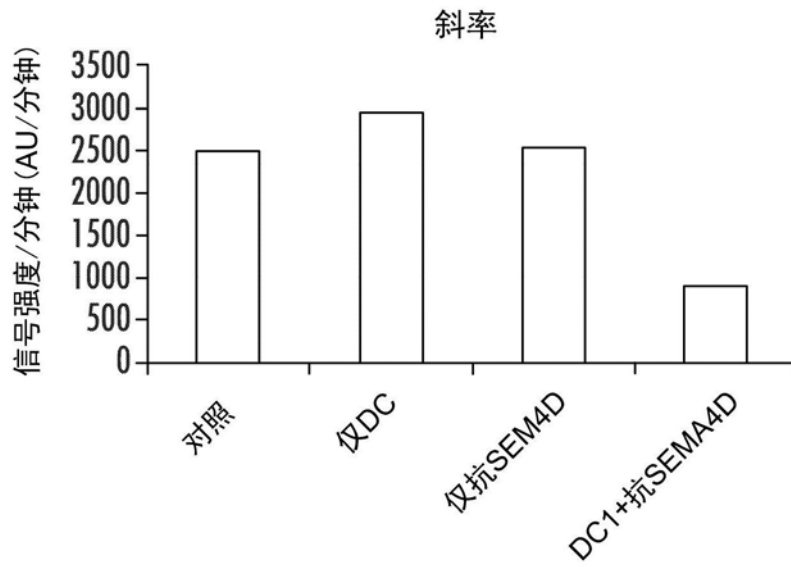


图15A

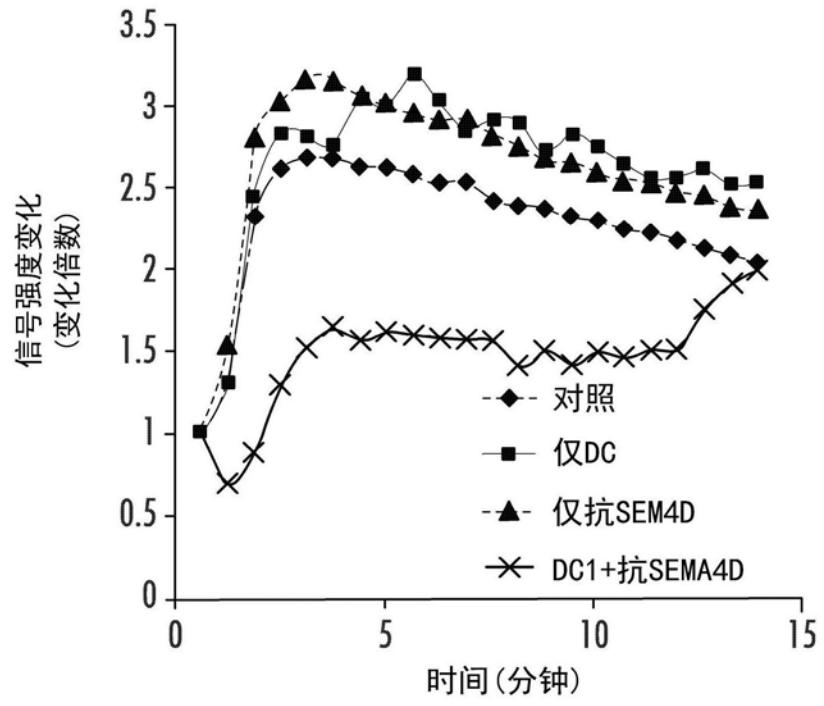


图15B

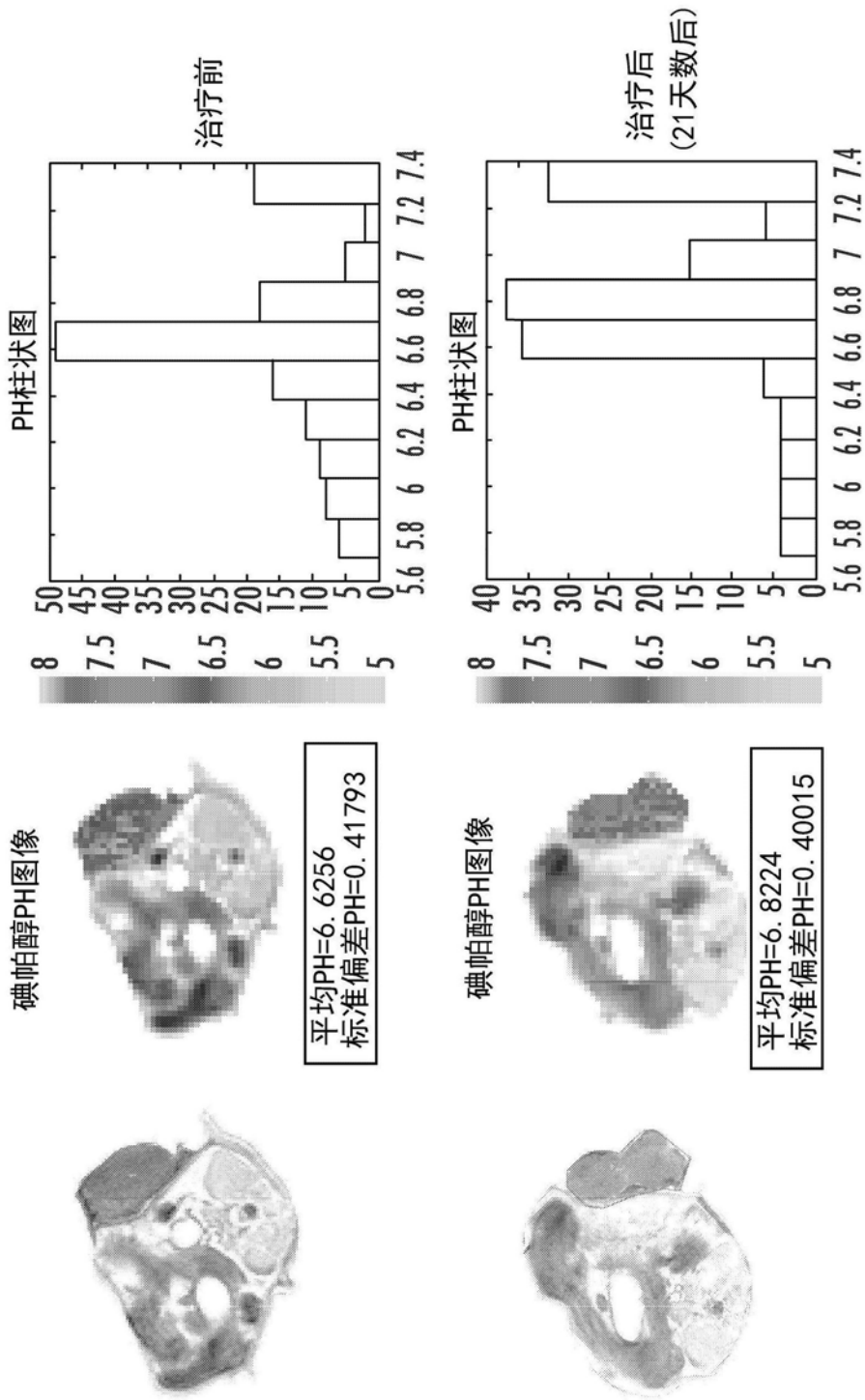


图16

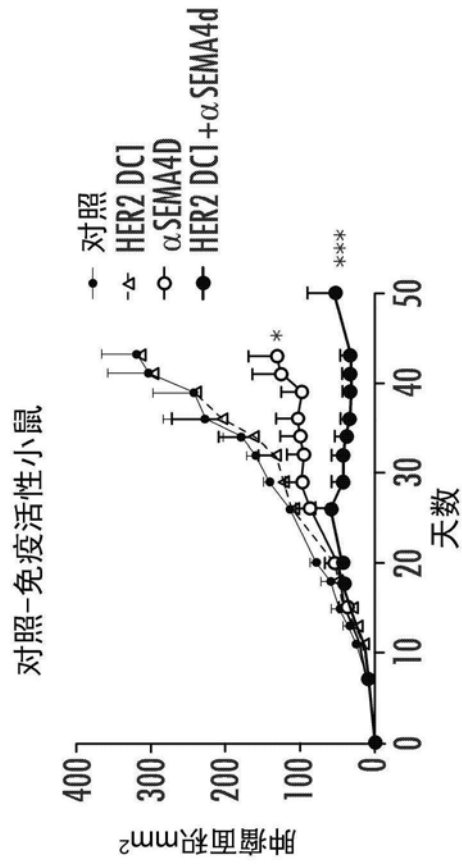


图17A

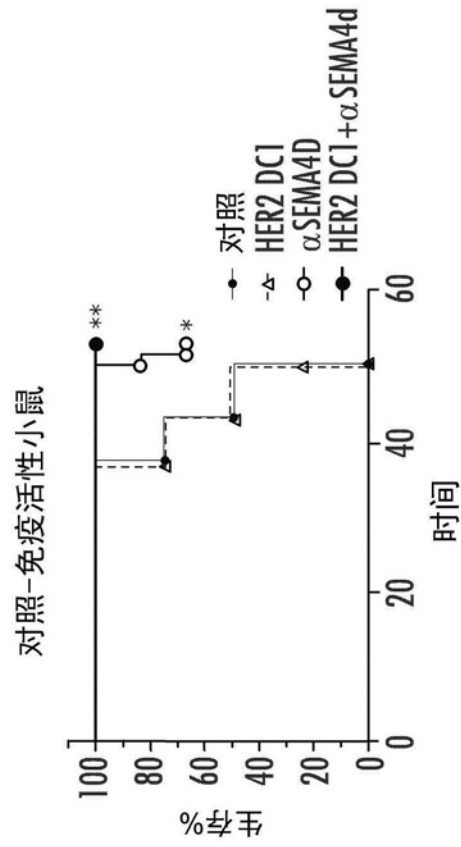


图17B

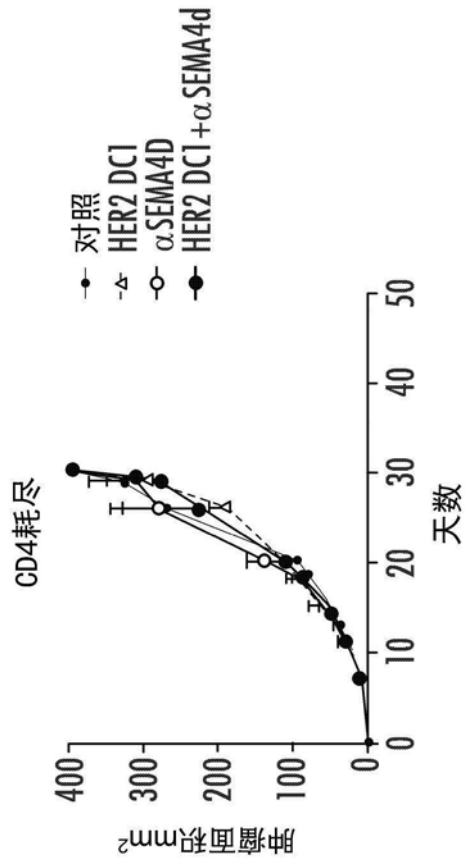


图17C

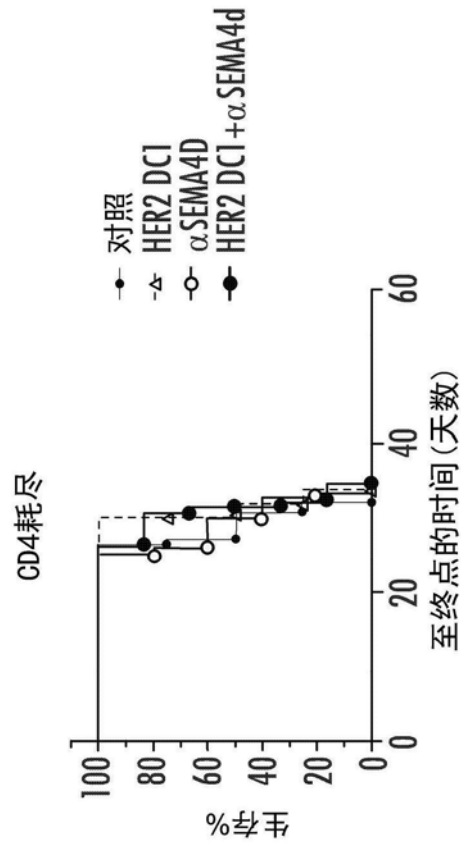


图17D

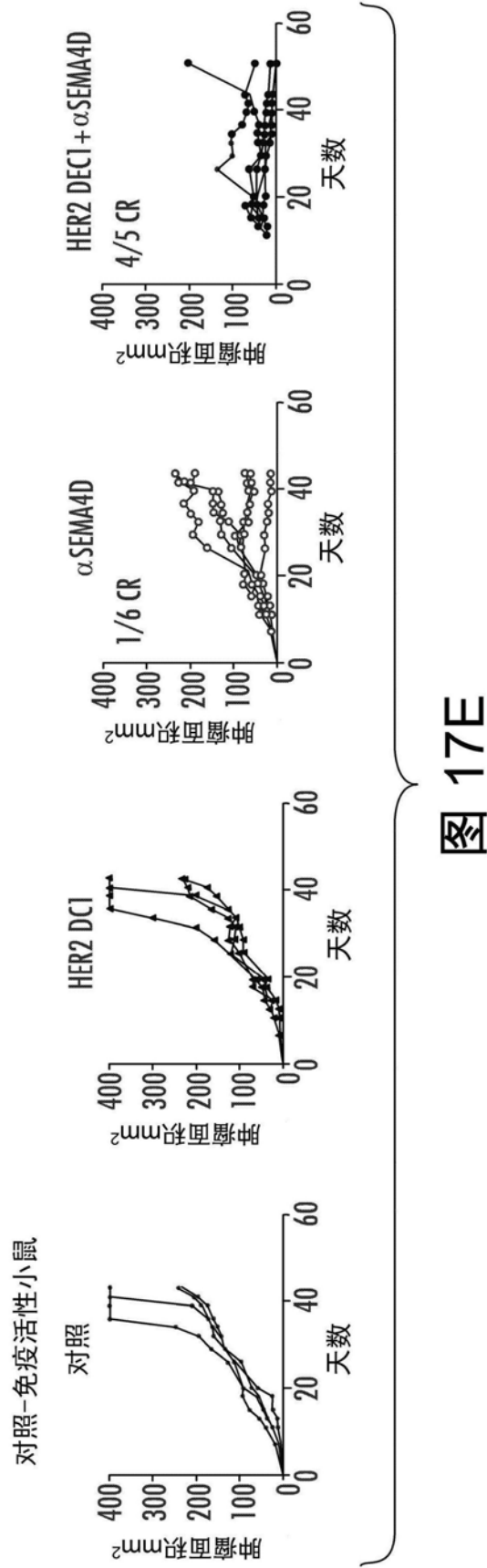


图17E

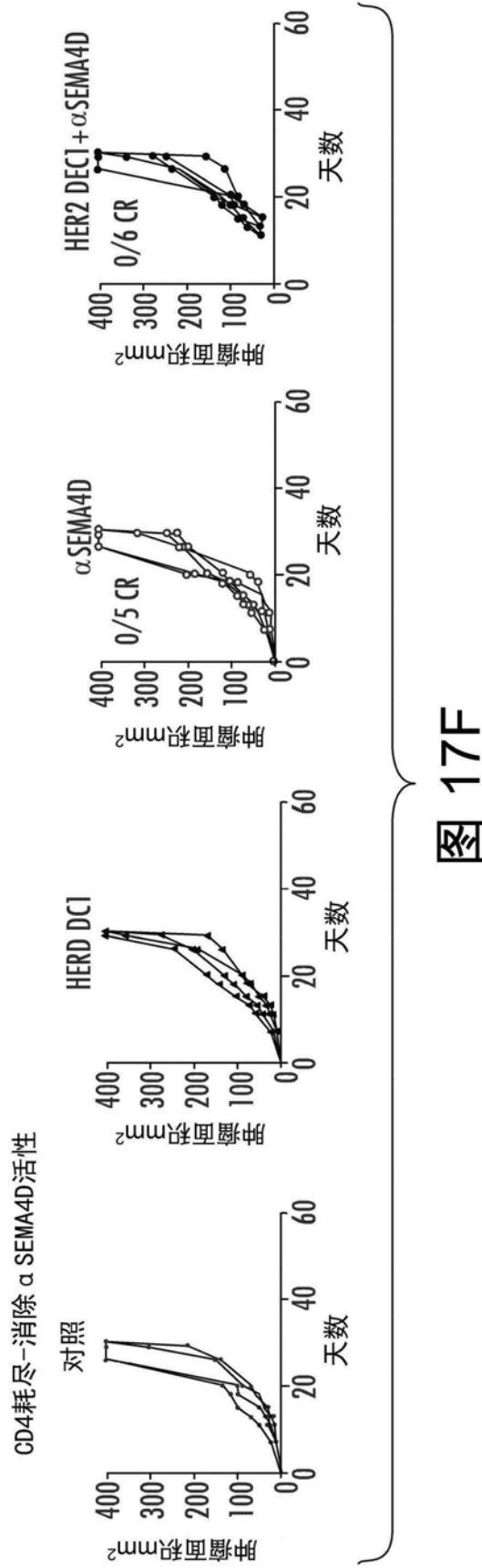


图17F

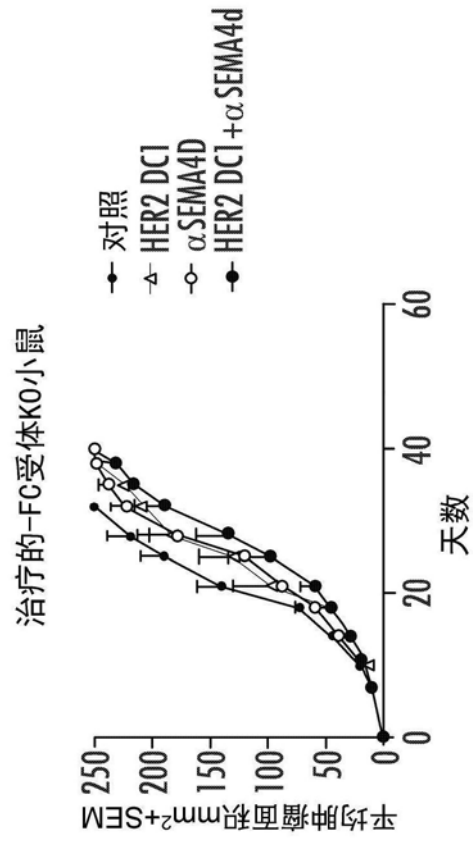


图18A

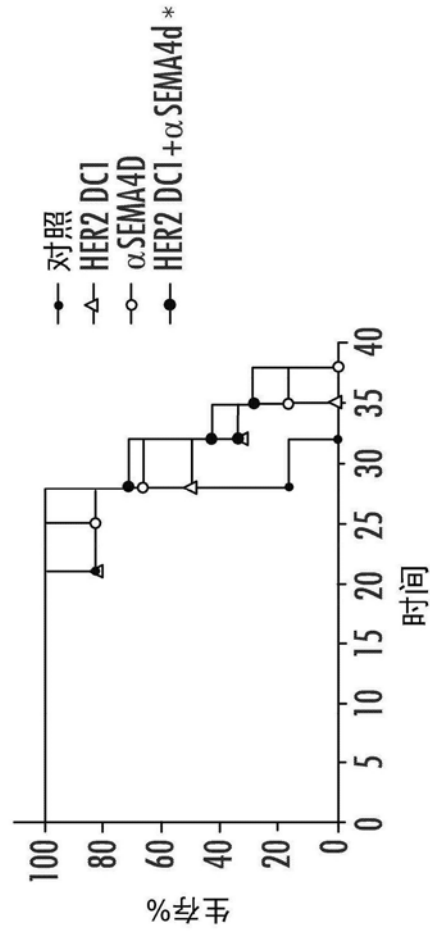


图18B

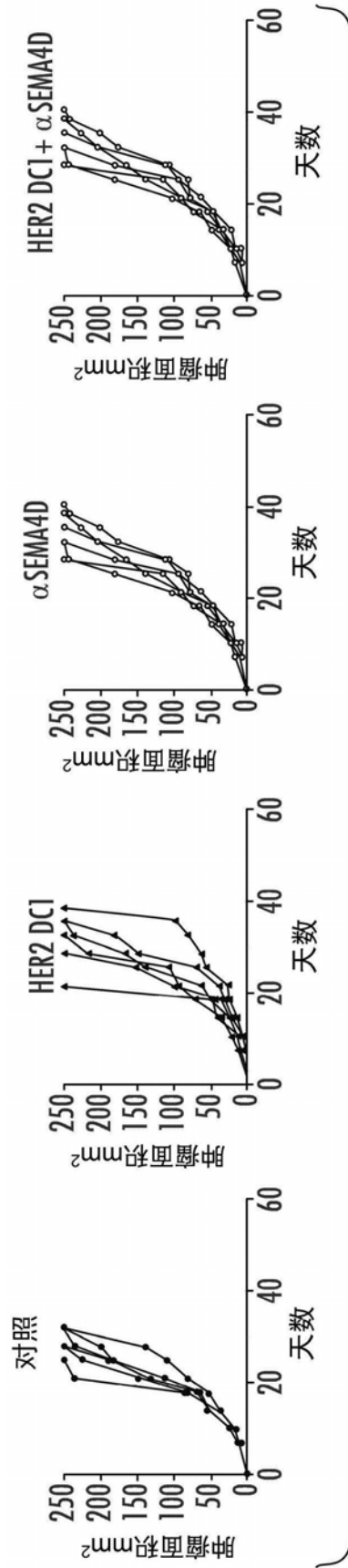


图 18C

图18C

IFN γ 缺陷小鼠

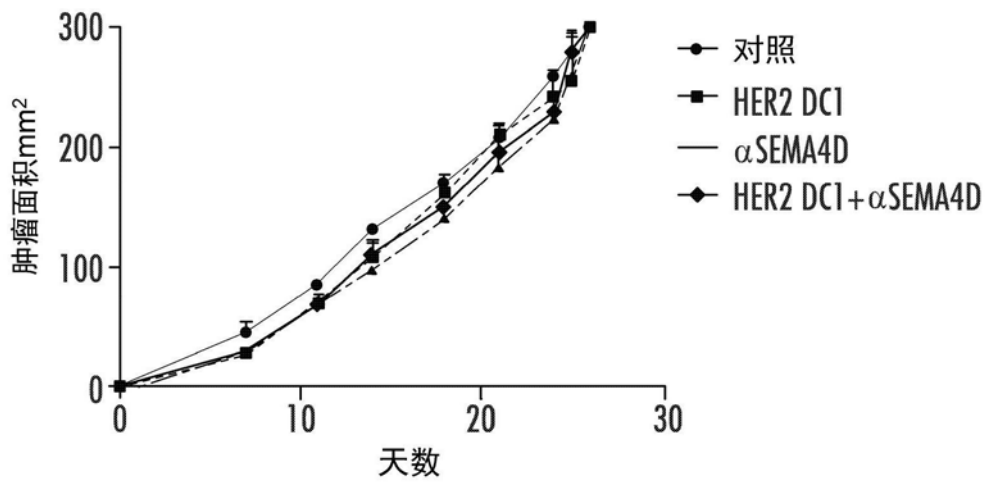


图19