

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107847587 B

(45) 授权公告日 2020.10.09

(21) 申请号 201680026411.5

(73) 专利权人 阿菲姆德股份有限公司

(22) 申请日 2016.05.04

地址 德国海德堡

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 马丁·特里德 乌维·罗伊施

申请公布号 CN 107847587 A

延斯-彼得·马什纳

(43) 申请公布日 2018.03.27

斯特凡·奈克马斯

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

15166303.6 2015.05.04 EP

代理人 王朋飞 张晶

16152650.4 2016.01.25 EP

(51) Int.CI.

A61K 39/395 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/00 (2006.01)

2017.11.06

审查员 田园

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/060113 2016.05.04

权利要求书1页 说明书8页

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/177846 EN 2016.11.10

序列表6页 附图13页

(54) 发明名称

CD30×CD16抗体与PD-1拮抗剂的联合药物

(57) 摘要

本发明描述了(i)对CD30和CD16A有特异性的多功能抗体和(ii)抗PD-1抗体用于治疗肿瘤(特别是霍奇金淋巴瘤)的联合疗法。

1. (i) 对CD30和CD16A有特异性的双特异性抗体与(ii)拮抗性抗PD-1抗体的组合,其用于治疗CD30⁺淋巴瘤的方法中,其中所述双特异性抗体包含抗CD30结合结构域,并且所述抗CD30结合结构域包含SEQ ID NO:2所示的重链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3以及SEQ ID NO:3所示的轻链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3,并且所述双特异性抗体包含抗CD16A结合结构域,所述抗CD16A结合结构域包含SEQ ID NO:4所示的重链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3,以及SEQ ID NO:5所示的轻链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3。

2. 根据权利要求1所述的组合,其中所述双特异性抗体包含抗CD30结合结构域,所述抗CD30结合结构域包含SEQ ID NO:2所示的重链可变结构域和SEQ ID NO:3所示的轻链可变结构域,并且所述双特异性抗体包含抗CD16A结合结构域,所述抗CD16A结合结构域包含SEQ ID NO:4所示的重链可变结构域和SEQ ID NO:5所示的轻链可变结构域。

3. 根据权利要求1所述的组合,其中所述双特异性抗体为CD30/CD16A串联双价抗体。

4. 根据权利要求3所述的组合,其中所述双特异性CD30/CD16A串联双价抗体具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1所述的组合,其中所述拮抗性抗PD-1抗体选自潘博丽珠单抗(pembrolizumab)和尼莫单抗(nivolumab)。

6. 根据权利要求1所述的组合,其中与单独使用对CD30和CD16A有特异性的双特异性抗体相比,所述组合用于增加固有免疫应答的方法中。

7. 根据权利要求6所述的组合,其中增加的固有免疫应答为固有细胞进入肿瘤的肿瘤内细胞浸润的增加。

8. 根据权利要求7所述的组合,其中巨噬细胞、树突状细胞和NK细胞的肿瘤内浸润增加。

9. 根据权利要求8所述的组合,其中CD4+和CD8+T细胞的肿瘤内浸润进一步增加。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的组合,其中所述淋巴瘤为霍奇金淋巴瘤。

11. 根据权利要求1-4中任一项所述的组合,其包含调节免疫检查点分子的其他试剂,所述其他试剂选自由抗CD137抗体和抗CTLA-4抗体组成的抗体组。

12. 根据权利要求5所述的组合,其包含调节免疫检查点分子的其他试剂,所述其他试剂选自由抗CD137抗体和抗CTLA-4抗体组成的抗体组。

13. 根据权利要求11所述的组合,其包含对CD30和CD16A有特异性的双特异性抗体、抗CD137抗体和拮抗性抗PD-1抗体。

14. 根据权利要求1-9中任一项所述的组合,其中所述双特异性抗体在所述拮抗性抗PD-1抗体之前施用。

CD30×CD16抗体与PD-1拮抗剂的联合药物

技术领域

[0001] 本发明涉及 (i) 对肿瘤细胞上的CD30具有特异性且对自然杀伤 (NK) 细胞上的CD16 (特别是CD16A) 具有特异性的多功能抗体和 (ii) PD-1拮抗剂 (例如抗PD-1抗体) 的联合药物 (combination) , 该联合药物用于治疗肿瘤, 特别是霍奇金淋巴瘤 (HL)。

背景技术

[0002] 因为NK细胞介导固有免疫并被组成型激活, 因此它们是癌症免疫疗法的候选药物。双特异性CD30/CD16A串联双抗体 (tandem diabody) (**TandAb®**) 通过CD16A结合NK细胞, 并具有针对CD30的第二结合结构域, CD30为癌症特异性靶标, 例如CD30⁺霍奇金里德-斯泰伯格 (HRS) 淋巴瘤细胞。这种串联双抗体募集NK细胞并将其重定向到CD30+肿瘤细胞, 并以高亲和力结合两个靶标, 建立借以激活NK细胞并将NK细胞重定向以杀死肿瘤细胞的桥梁。已经报道了该双特异性CD30/CD16A串联双抗体相对于天然抗体和Fc增强的抗体具有更高的细胞毒性效力 (参见 Reusch U. et al., MABS. 2014; 6 (3) : 727-738)。CD30/CD16A串联双抗体在霍奇金淋巴瘤患者中具有良好的耐受性并且具有活性 (参见 Rothe A. et al., Blood. 2015; 125 (26) : 4024-4031)。尽管获得了这些满意的结果, 但仍期望进一步改善这种肿瘤靶向的NK细胞参与的免疫疗法。

[0003] 免疫检查点分子是细胞表面蛋白, 例如调节免疫反应的共刺激或共抑制途径的受体。免疫检查点分子的实例为细胞毒性T淋巴细胞抗原 -4 (CTLA-4) 、程序性死亡受体-1 (PD-1) 、程序性死亡配体-1 (PD-L1) 或程序性死亡配体-2 (PD-L2) 、NK细胞上的免疫共刺激分子和TNF受体家族的共刺激受体, 例如CD137。

[0004] PD-1 (PDCD1或CD279) 受体介导共抑制途径。此外, PD-1结合PD-L1, PD-L1在受体-配体连接后诱导共抑制信号转导。PD-1途径是限制T细胞介导的免疫应答的检查点 (Keir ME et al., Annu. Rev. Immunol. 2008; 26: 677-704)。通过在细胞表面表达PD-1并与PD-1⁺ 免疫效应细胞结合, 肿瘤可以挑选PD-1途径以逃避免疫反应 (Weber J, Semin Oncol. 2010; 37: 430-9; Ansell S et al., N. Engl. J. Med. 2015; 372: 311-319)。已经研究了在多种癌症中阻止PD-1和PD-L1之间相互作用的PD-1拮抗剂, 该相互作用与T细胞应答的下调有关, 已经提出了PD-1阻断与CTLA-4阻断组合用于调节适应性免疫力 (Dolan D and Gupta S, Cancer Control. 2014; 21: 231-237)。在霍奇金淋巴瘤患者的单臂单药治疗试验中抗PD-1抗体潘博丽珠单抗 (pembrolizumab) 已显示出根据缓解率 (response rate) 确定的初步临床疗效。进行中的临床试验正在这些肿瘤类型以及许多其他晚期实体肿瘤适应症和血液恶性肿瘤上进行。

[0005] 此外, 已将结合NK细胞上的共刺激分子CD137的抗CD137抗体与其他单克隆抗体 (如利妥昔单抗或来那度胺) 组合用于增强NK细胞功能 (Miller J., Hematology 2013: 247-253)。

发明内容

[0006] 本文提供了以下物质的联合药物(combination)：对CD30和CD16(特别是CD16A)具有特异性的多功能抗体；和PD-1拮抗剂，特别是抗PD-1抗体，所述联合药物用于治疗肿瘤(特别是霍奇金淋巴瘤)的方法。这种联合药物导致增强的肿瘤细胞杀伤，因为结合(engaging)NK细胞并靶向肿瘤的多功能抗体与免疫调节剂的联合药物通过涉及NK细胞、T细胞、巨噬细胞和树突状细胞的综合免疫应答而具有协同的抗肿瘤作用。因此，该联合疗法激活所有免疫亚群，并且诱导所述免疫亚群浸润肿瘤。CD30/CD16A 双特异性抗体和抗PD-1抗体的联合药物通过增强固有免疫细胞(特别是 NK细胞、巨噬细胞和树突状细胞)的肿瘤浸润而显著增强初始固有免疫应答。在使用自体患者材料(即源自患者的异种移植物(PDX))和来自同一供体的血液(PBMC)的免疫细胞)进行的霍奇金淋巴瘤的临床前动物研究中，用双特异性CD30/CD16抗体与调节剂抗PD1抗体联合处理或单独处理已患上的肿瘤。尽管与对照治疗组(无关IgG)相比，大多数分子的单药物治疗显示出显著降低的肿瘤生长，但是双特异性CD30/CD16多功能抗体和抗PD-1抗体的联合药物显示出增强的抗肿瘤功效。与 IgG治疗相比，观察到在用CD30/CD16抗体和抗PD-1抗体联合处理的动物中，肿瘤中的NK细胞群增加。早在治疗后2天(第30天)，双特异性CD30/CD16A串联双抗体单药治疗诱导NK细胞和巨噬细胞在肿瘤中的浸润。随着时间的推移，这种效应得到增强，这两种免疫细胞群在实验结束时(第58天)表现出强烈的由双特异性CD30/CD16A串联双抗体介导的肿瘤浸润。当双特异性 CD30/CD16A串联双抗体与免疫调节抗体抗PD-1抗体联合时，对固有免疫的作用最初由双特异性CD30/CD16A串联双抗体单独驱动，但是抗 PD-1治疗在实验结束时确实会导致更显著的固有细胞浸润。另外，尽管在仅使用CD30/CD16抗体治疗的动物中T细胞有小幅增加，但是在使用 CD30/CD16抗体与调节免疫检查点分子的试剂联合治疗的动物中检测到的细胞毒性T细胞增加。

[0007] 虽然使用抗PD-1抗体的单药治疗在一定程度上诱导T细胞浸润，但CD30/CD16抗体与抗PD-1抗体的联合药物增强了CD4+和CD8+T细胞在肿瘤中的浸润。与CD30/CD16抗体或抗PD-1抗体的单药治疗相比，CD30/CD16抗体和抗PD-1抗体的联合药物显著诱导T细胞和树突状细胞(图8B)。CD30/CD16抗体与抗PD-1抗体(anti-PD-1)的联合药物在施用后不久(第30天和第40天)有利地诱导树突状细胞浸润到肿瘤中。与分别使用 CD30/CD16抗体和抗PD-1抗体的单药治疗相比，CD30/CD16抗体和抗 PD-1抗体的联合药物显著增加了所有免疫亚群(例如T细胞、NK细胞、巨噬细胞和树突状细胞)的肿瘤浸润(图8B)。

[0008] 因此，(i) 对CD30有特异性且对CD16(特别是CD16A)具有特异性的多功能抗体和(ii) 抗PD-1抗体的联合药物协同增加肿瘤细胞的杀伤，这显著增强了肿瘤消退。显著的肿瘤消退是凭借结合NK细胞的多功能抗体和调节免疫检查点分子的试剂的组合活性通过所有免疫亚群(如CD4+和CD8+ T细胞和NK细胞、巨噬细胞和树突状细胞)的协调作用(即综合作用)以及炎性细胞因子(特别是IFN- γ)的肿瘤内增加而实现的。本文提供的联合疗法首次证明了由结合NK细胞且靶向肿瘤的抗体诱导的固有免疫应答的功效可以通过已知用于通过阻断PD-1途径刺激适应性免疫应答的抗PD-1 抗体来增强。

[0009] 与对CD30和CD16A具有特异性的单独的多功能抗体相比，对CD30 和CD16(特别是CD16A)具有特异性的多功能抗体与PD-1拮抗剂(特别是 PD-1抗体)的联合药物被在治疗肿瘤(特别是霍奇金淋巴瘤(HL))的方法中用于增强固有免疫应答。特别是通过固有细胞(特

别是巨噬细胞、树突状细胞和NK细胞)的细胞浸润进入肿瘤来增加固有免疫应答。此外,CD4+ 和CD8+T细胞的肿瘤内浸润增加。

[0010] “固有免疫应答”是指先天免疫系统(或非特异性免疫系统或固有免疫系统)的一种或多种先天白细胞的激活。固有免疫应答的激活的白细胞包括自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和树突状细胞。先天免疫系统不同于包括淋巴细胞如CD4+或CD8+T细胞的适应性免疫系统(或特异性免疫系统)。

[0011] “联合药物”是指组合疗法、联合疗法或联合配伍用药治疗,其使用多于一种药物治疗肿瘤,即单一疾病。在本发明中,“联合药物”用于联合疗法,该联合疗法包括施用对CD30和CD16A具有特异性的多功能抗体(例如,双特异性CD30/CD16A串联双抗体)和PD-1拮抗剂(例如抗PD-1 抗体)用于治疗肿瘤(如霍奇金淋巴瘤)的步骤。因此,将双特异性 CD30/D16A串联双抗体和抗PD-1抗体联合施用。相比之下,“单药治疗”是指单独使用单一药物(例如双特异性CD30/CD16A双价抗体或抗PD-1抗体)的治疗方法。

[0012] 所述联合用药包含用于基于NK细胞的肿瘤免疫治疗的多功能抗体。本文所用的术语“多功能”是指抗体表现出两种或更多种不同的生物功能。例如,不同的生物功能是对不同抗原的不同特异性。在某些情况下,多功能抗体是多特异性的,例如双特异性、三特异性等。这种多特异性(例如双特异性)结合蛋白包括例如IgA、IgD、IgE、IgG或IgM类型的双特异性单克隆抗体,以及包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、单链Fv、串联单链Fv(scFv)₂、双重亲和力重定向抗体(DARTTM)、双价抗体和串联双抗体(**TandAb®**)、单链双抗体(scDb)和柔性抗体的抗体片段或抗体衍生物。本文所用的术语“抗体”是指单克隆抗体以及包含抗体结合结构域的抗体片段和抗体衍生物。可以从具有与天然抗体相似的抗体结合特异性的抗体片段和抗体衍生物产生各种抗体形式,但由于结合结构域的数量或 Fc区缺失,其有效性和效应子功能不同。双特异性抗体的抗体形式的实例描述于Spiess,C. et al., Mol Immunol. 2015 Oct; 67 (2 Pt A): 95–106 和 Kontermann,R.E., Brinkmann,U., Drug Discov.Today 2015 Jul; 20 (7): 838–47。

[0013] 在某些实施方案中,多功能抗体是多特异性(例如双特异性)串联双价抗体(**TandAb®**)。通过在单条多肽中将两个或更多个不同Fv结合结构域的重链和轻链(VH和VL)的四个可变结构域连接起来构建串联双价抗体。放置这些结构域使得当两个分子的多肽以头对尾的方式对准时,相应的VH 和VL可以配对。结构域之间的短接头(十二个或更少个氨基酸)阻止Fv的分子内配对。串联双抗体的抗体形式及其制造描述于Weichel et al., European Pharmaceutical Review 2015, vol. 20:27–32, Kipriyanov SM: Methods Mol.Biol. 2009; 562:177–93 或 Kipriyanov SM: Methods Mol Biol 2003; 207:323–33。

[0014] 在某些实施方案中,首先施用多功能抗体,例如双特异性 CD30/CD16A串联双抗体,然后施用作为免疫调节分子的药剂,即抗PD-1 抗体。因此,通常可以在一段时间内依次施用CD30/CD16A抗体和抗PD-1 抗体。多功能抗体和抗PD-1抗体的施用可以通过不同的方式进行,例如,通过静脉内、腹膜内、皮下、肌内、局部或皮内施用。在一些实施方案中,给药途径取决于疗法的种类和药物组合物中所含的化合物的种类。剂量方案由主治医师和其他临床因素决定。任何一个患者的剂量取决于许多因素,包括患者的体型、体表面积、年龄、性别、待施用的特定化合物、给药时间和途径、疗法的种类、一般健康状况和其他同时正在施用的药物。“有效剂量”是指足以影响疾病进程和疾病严重程度的活性成分的量,其引起这

种病状的减轻或缓解。可以使用已知方法测定可用于治疗肿瘤的“有效剂量”。因此，本发明包括一种治疗方法，即联合疗法，其包括向患有CD30+肿瘤(例如霍奇金淋巴瘤)的个体施用有效剂量的多功能抗体与抗PD-1抗体(PD-1抗体)的步骤，其中多功能抗体对CD30和CD16具有特异性，例如，是CD30/CD16A抗体。

[0015] 使用多功能抗体的、由抗体介导将NK细胞募集至肿瘤的免疫治疗方法可用于治疗肿瘤，例如霍奇金淋巴瘤。因此，本发明提供了对CD30和CD16A具有特异性的多功能抗体(例如双特异性CD30/CD16A串联双抗体)与抗PD-1抗体的联合药物，其用于治疗肿瘤(如霍奇金淋巴瘤或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL))的联合疗法中。

[0016] 在某些实施方案中，多功能抗体通过仅与CD16同种型CD16A结合来募集NK细胞。抗CD16A结合结构域及其产生的实例描述于WO 2006/125668中。在某些实施方案中，抗CD16A结合结构域包含SEQ ID NO:4中所示的重链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3以及SEQ ID NO:5所示的轻链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3。在具体实施方案中，抗CD16A结合结构域包含SEQ ID NO:4中所示的重链可变结构域和SEQ ID NO:5所示的轻链可变结构域。

[0017] 适用于本发明的多功能抗体的CD30抗体结合结构域的实例公开于Arndt MA et al., Blood. 1999;94:2562-8; Schlapschy M. et al., Protein Eng Des Sel. 2004;12:847-60和Reusch U. et al., MABS. 2014;6 (3):727-738。在某些实施方案中，抗CD30结合结构域是修饰的抗CD30IgG HRS-3(Reusch U. et al., 2014)，并且包含SEQ ID NO:2中所示的重链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3以及SEQ ID NO:3中所示的轻链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3。在具体实施方案中，抗CD30抗体具有经修饰的抗CD30IgG HRS-3的Fv结合结构域(Reusch U. et al., 2014)，并且包含SEQ ID NO:2中所示的重链可变结构域和SEQ ID NO:3中所示的轻链可变结构域。

[0018] 在本发明的某个实施方案中，多功能抗体是双特异性四价串联双抗体CD30/CD16A，其是两个非共价缔合的多肽链的同二聚体，其中每个串联双抗体多肽链具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。实施例1描述了CD30/CD16A串联双抗体，其通过与同种型CD16A结合而特异地募集NK细胞。串联双抗体对于每种抗原具有两个结合位点，但没有Fc结构域。实施例1的CD30/CD16A串联双抗体的分子量为约104kDa，并且可以在细菌或哺乳动物细胞中产生，例如，CHO。它特异地靶向霍奇金淋巴瘤细胞上的CD30，并通过结合CD16A募集并激活NK细胞。这种串联双抗体的构建和产生描述于Reusch U. et al., MABS. 2014;6 (3):727-738，并且该CD30/CD16A串联双抗体的功效报道于Rothe A. et al., Blood. 2015; 125 (26):4024-4031中。

[0019] 在某些实施方案中，PD-1拮抗剂是PD-1抗体或PD-L1抗体。PD-1抗体(抗PD-1抗体)的实例包括尼莫单抗(nivolumab)、潘博丽珠单抗(pembrolizumab, MK3475, Keytruda)，PD-L1抗体(抗PD-L1抗体)的实例为pidilizumab。

[0020] 多功能CD30/CD16抗体(例如双特异性CD30/CD16A抗体)与抗PD-1抗体的联合药物可用于治疗CD30+肿瘤，例如霍奇金淋巴瘤或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0021] 在某些实施方案中，首先施用CD30/CD16抗体(如CD30/CD16A抗体)，例如双特异性CD30/CD16A串联双抗体，随后施用抗PD-1抗体。例如，在施用CD30/CD16抗体(例如双特异性CD30/CD16A串联双抗体)后10-72小时(例如1天)，施用抗PD-1抗体。

[0022] 在某些实施方案中，联合药物(即联合疗法)包括施用用于调节另一种免疫检查点

分子的另一种药剂,例如阻断共抑制途径的拮抗性抗体或通过结合相应的免疫检查点分子诱导共刺激途径的激动性抗体。这些抗体也称为检查点抑制剂(CPI)或检查点激动剂(CPA),已被描述且已经过临床测试。

[0023] 用于联合药物(即联合疗法)的另一种免疫检查点分子的实例是CTLA-4和CD137。

[0024] CTLA-4诱导抑制T细胞应答的信号。用于所述联合药物的CTLA-4抗体的实例是伊曲单抗(ipilimumab)和曲美木单抗(tremelimumab)。

[0025] CD137(4-1BB)或TNF受体超家族9(TNFRSF9)是属于TNF受体超家族的共刺激受体,其是参与调节免疫细胞激活的肿瘤坏死因子受体超家族的成员。CD137的功能作用是增强细胞毒性T细胞应答。增强T细胞应答的CD137激动性抗体的实例是urelumab。

[0026] 在某些实施方案中,本发明的联合药物(即联合疗法)还包含选自抗CTLA4抗体和抗CD137抗体的抗体。

[0027] 在一个具体实施方案中,抗PD-1抗体和抗CD137抗体这两种抗体与双特异性CD30/CD16抗体联合施用。因此,在该特定实施方案中,联合药物(即联合疗法)包括施用双特异性CD30/CD16A抗体、抗PD-1抗体和抗CTLA4抗体的步骤。

附图说明

[0028] 图1示出了铬释放试验。在不同的效应细胞:靶细胞(KARPAS-299)比例下培养预激活的、纯化的NK细胞后,测定细胞溶解百分数:在培养基中仅有⁵¹Cr标记的淋巴瘤细胞(无抗体);或存在单一抗体(抗CD137抗体(aCD137)、抗PD1抗体(aPD1)、抗CTLA4抗体(aCTLA4))或存在多种抗体(抗CD137抗体和抗PD1抗体),其中“a”是“抗……抗体(anti)”的缩写。

[0029] 图2示出了铬释放试验。在不同的效应细胞:靶细胞(KARPAS-299)比例下培养预激活的、纯化的NK细胞后,测定细胞溶解百分数:在培养基中仅有⁵¹Cr标记的淋巴瘤细胞(无抗体);或存在单一抗体(抗CD137抗体(aCD137)、抗PD1抗体(aPD1)、抗CTLA4抗体(aCTLA4))或存在多种抗体(抗CD137抗体和抗PD1抗体),以1pM的浓度使用CD30/CD16A串联双抗体,其中“a”是“抗……抗体(anti)”的缩写。

[0030] 图3示出了体内PDX模型的结果。AFM13表示CD30/CD16A串联双抗体。

[0031] 图4示出了体内PDX模型的结果。AFM13表示CD30/CD16A串联双抗体。

[0032] 图5为体内PDX模型:在用CD30/CD16A串联双抗体治疗的小鼠中淋巴细胞增加。

[0033] 图6示出了在第30天四个体内PDX模型的结果:(A)肿瘤尺寸:IgG表示无关对照IgG抗体,AFM13表示CD30/CD16A串联双抗体,AFM22表示无关对照串联双抗体(EGFRvIII/CD16A),anti-PD-1表示潘博丽珠单抗(pembrolizumab);(B)肿瘤内淋巴细胞群。

[0034] 图7示出了在第44天四个体内PDX模型的结果:(A)肿瘤尺寸:IgG表示无关对照IgG抗体,AFM13表示CD30/CD16A串联双抗体,AFM22表示无关对照串联双抗体(EGFRvIII/CD16A),anti-PD-1表示潘博丽珠单抗;(B)肿瘤内淋巴细胞群。

[0035] 图8示出了第58天四个体内PDX模型的结果:(A)肿瘤尺寸:IgG表示无关对照IgG抗体,AFM13表示CD30/CD16A串联双抗体,AFM22表示无关对照串联双抗体(EGFRvIII/CD16A),anti-PD-1表示潘博丽珠单抗;(B)肿瘤内淋巴细胞群。

[0036] 图9示出了第58天4个体内PDX模型的肿瘤内细胞因子分布图。

[0037] 图10示出了肿瘤内人白细胞分布图。在第0天将来自HL患者肿瘤块移植至Rag2^{-/-}

IL2R $\gamma^{敲除(null)}$ 小鼠，并在第28天用自体患者来源的外周血单核细胞(PBMC)通过腹膜内注射重构(reconstitute)。在第28天注射5mg/kg AFM13或对照串联双抗体AFM22或IgG开始抗体治疗，并延迟一天注射抗PD-1抗体，每周一次，共进行三个周期。在第30天(A、C)和第58天(B、D)处死小鼠，对肿瘤浸润CD3 $^{-}$ /CD56 $^{+}$ NK细胞和CD11b $^{+}$ /HLA-DR $^{+}$ /CD163 $^{+}$ 巨噬细胞(A、B)或CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T细胞、CD3 $^{+}$ /CD4 $^{+}$ T细胞和 CD11c $^{+}$ /CD80 $^{+}$ /CD86 $^{+}$ 树突状细胞(C、D)进行定量。

实施例

[0038] CD137共刺激和/或阻断PD-1增强由双特异性CD30/CD16A串联双抗体引起的NK细胞介导的靶细胞溶解

[0039] 方法：

[0040] 使用CD30/CD16A串联双抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体或抗CD137抗体在体外用人PBMC、富集的NK和CD30 $^{+}$ 靶细胞以及细胞系评估功效以及用患者来源的异种移植物体内模型评价功效。

[0041] 为了评估NK细胞对CD30 $^{+}$ 淋巴瘤细胞系的细胞毒性，进行如下的铬释放试验：将PBMC以1:1的比例与抗CD30抗体(10 μ g/mL)和经辐射的(5,000拉德)CD30 $^{+}$ 淋巴瘤肿瘤细胞一起培养24小时。24小时后，根据制造商的说明书，使用NK细胞分离珠(Miltenyi Biotec)通过负磁性细胞分选从这些培养物中分离NK细胞。在铬释放测定之前，评价NK细胞的纯度(流式细胞术定义为>90%的纯度)。以每 1×10^6 个细胞150 μ Ci ^{51}Cr 标记靶细胞2小时。在不同的效应细胞：靶细胞比例下培养预激活的、纯化的NK细胞4小时后，测定细胞溶解百分数：在培养基中仅 ^{51}Cr 标记的淋巴瘤细胞；存在单一抗体或存在多种抗体。

[0042] 观察Rag2 $^{-/-}$ IL2R $\gamma^{敲除}$ 小鼠(n~100)中的来自新近被诊断患有CD30 $^{+}$ 淋巴瘤(包括霍奇金病)的患者的手术标本的异种移植肿瘤块的移植，在第28天将多达80只具有相似尺寸(0.5cm 2)的移植物的小鼠随机分成多达8组。第28天腹膜内输注自体PBMC(2×10^6 PBMC/小鼠)。治疗从第28天开始，每周一次，持续治疗总计三次腹膜内注射，每次注射剂量为15mg/kg。使用联合疗法，在第28天给药抗CD30/CD16A抗体(AFm13; Reusch U. et al., MABS. 2014; 6 (3) : 727-738)，并在第29天给药抗CTLA4抗体(伊曲单抗)、抗CD137抗体(Urelumab)或抗PD1抗体(潘博丽珠单抗)。在第56天，在组与组之间比较肿瘤大小。第58天，一旦一组小鼠由于肿瘤生长至原始肿瘤大小的700%(约为3.5cm 2)而需要安乐死，则将所有小鼠被处死以进行免疫分型。

[0043] 在第30、44和58天，即治疗开始后2、16和30天，评估肿瘤浸润性人淋巴细胞、骨髓细胞和肿瘤内细胞因子。测定以下生物标记物：以CD3 $^{-}$ 和CD56 $^{+}$ 测定NK细胞浸润；以CD25 $^{+}$ 和CD4 $^{+}$ ，CD3 $^{+}$ 和CD4 $^{+}$ ，CD3 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ 测定T细胞浸润；以CD56dim、CD56bright、CD16A、CD69测定NK细胞亚群；以CD11b、HL-DR和CD163测定巨噬细胞；以CD11c、CD80和CD86测定树突状细胞(图6B、7B和8B)。

[0044] CD30/CD16A串联双抗体是在Reusch U. et al., MABS. 2014; 6 (3) : 727-738中描述的抗体AFM13。CD30/CD16A串联双抗体包含杂交瘤细胞HRS-3的抗CD30结构域，其构建和在细菌中的表达在WO 2006/125668的实施例19中被公开。

[0045] 结果：

[0046] 相对于其他CD30 $^{+}$ 抗体形式，CD30/CD16A串联双抗体对靶细胞和效应细胞表现出

更高的功效和效能 ($EC_{50}=15\text{pM}$)。当CD30/CD16A串联双抗体与 $CD30^+$ 肿瘤细胞和富集的NK细胞一起孵育时,这些有利的特性导致了优异的细胞毒性(图2)。使用富集的NK细胞时,用次最佳浓度(1pM)的 CD30/CD16A串联双抗体进行的单一治疗诱导的依赖于效应细胞:靶细胞比例的 (effector-to-target cell-dependent) $CD30^+$ 淋巴瘤细胞细胞溶解达 40%。单独的免疫调节抗体介导显著较低的细胞溶解(<25%) (图1)。然而,将抗PD-1抗体或抗CD137抗体添加到CD30/CD16A串联双抗体中,将特异性细胞溶解强力提高至70%,而将抗CTLA-4抗体添加至CD30/CD16A串联双抗体未显示出有益的效果。当将CD30/CD16A串联双抗体与抗PD-1 抗体和抗CD137抗体一起应用时,观察到最可观的功效增加(图2)。在体内,观察到了CD30/CD16A串联双抗体和免疫调节抗体组合的协同作用,每种免疫调节抗体被检测并且被抗PD1抗体(在9/10的肿瘤中出现消退)、抗CTLA-4 (3/10) 抗体和抗CD137单克隆抗体(mAb) (3/10) 加强,并受到调节性T细胞、NK细胞和Th1细胞因子的存在的影响(图3和图4)。

[0047] 与IgG治疗相比,观察到在用CD30/CD16A串联双抗体与抗CTLA-4 抗体、抗PD-1抗体和抗CD137抗体联合处理的动物中,肿瘤中的NK细胞群增加。另外,仅用单独的CD30/CD16A串联双抗体或抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体和抗CD137抗体治疗的动物中T细胞没有增加,但在用 CD30/CD16A串联双抗体与抗CTLA-4、抗PD-1和抗CD137联合治疗的动物中检测到的细胞毒性T细胞增加(图5)。

[0048] 该研究结果支持了以下结论:双抗体疗法增强了CD30/CD16A串联双抗体和免疫调节抗体的效能,实现了显著的肿瘤消退。

[0049] CD30/CD16A串联双抗体与免疫调节抗体联合药物的增强的抗肿瘤活性与更多数量的肿瘤浸润NK细胞和T细胞有关,并与增加的促炎细胞因子的释放有关。用对照IgG或不相关的募集CD16A的双抗体进行治疗不会诱导非特异性免疫细胞激活,这证明了CD30/CD16A串联双抗体严格的靶依赖性NK细胞激活。CD30/CD16A串联双抗体与免疫调节抗CTLA-4 抗体、抗CD137抗体和抗PD-1抗体的组合不仅增强了NK细胞的抗肿瘤活性,而且刺激了肿瘤中T细胞的浸润和细胞因子释放,这证明了固有免疫和适应性免疫之间的串扰。

[0050] 在使用上述相同的PDX模型和抗PD-1抗体(潘博丽珠单抗)的进一步实验中,在第30、44和58天,即治疗开始后第2、16和30天,评估肿瘤尺寸、肿瘤浸润人淋巴细胞、骨髓细胞和肿瘤内细胞因子。使用CD30/CD16A 串联双抗体进行的单药治疗可再现地比用抗PD-1抗体进行的单药治疗更有效,并且当两种药物组合时观察到协同作用。在第58天对肿瘤进行的分析显示肿瘤生长抑制(图8A)与肿瘤浸润NK细胞、T细胞、骨髓细胞的水平(图8B)以及肿瘤内细胞因子(如IFN γ)的水平(图9)之间存在强相关性。与使用抗PD-1抗体的单药治疗仅诱导T细胞浸润相反,使用CD30/CD16A 串联双抗体的单药治疗能够诱导肿瘤中NK细胞和T细胞的浸润,然而 CD30/CD16A串联双抗体与抗PD-1抗体的组合进一步增强了二者(即NK细胞和T细胞)的浸润。CD30/CD16A串联双抗体引起的巨噬细胞浸润比抗 PD-1抗体更强,巨噬细胞的浸润也被两种药剂的组合增强(图8B),因此进一步证明了固有免疫和适应性免疫之间的串扰。此外,在早期时间点第30(图6B) 和第44天(图7B)的肿瘤分析显示,初始免疫应答的特征在于 NK细胞浸润和激活以及巨噬细胞的浸润,而由T细胞和激活的树突状细胞进行的适应性免疫应答在第58天更明显(图8B)。将CD30/CD16A串联双抗体和抗PD-1抗体组合可增强所有免疫亚群的浸润和激活(图8B)。早在治疗后2天(第30天),CD30/CD16A串联双抗体单药治疗诱导NK细胞和巨噬细胞在肿瘤中的浸润。随着时间的推移,这种效应得到增强,

在实验结束时(第58天),这两种免疫细胞群均表现出强烈的由串联双抗体介导的肿瘤浸润。当CD30/CD16A串联双抗体与免疫调节抗体抗PD-1抗体结合时,对固有免疫力的影响最初是单独由串联双抗体驱动,但是实验结束时抗PD-1抗体治疗确实导致更明显的固有细胞浸润(图10)。

[0051] 总之,数据显示当在霍奇金淋巴瘤PDX模型中将CD30/CD16A串联双抗体与抗PD-1检查点封闭物组合时,由肿瘤浸润淋巴细胞(CD4⁺和CD8⁺T细胞、巨噬细胞和树突状细胞)介导的抗肿瘤效果更强。因此,由CD30/CD16A串联双抗体诱导的初始抗肿瘤应答是由天然免疫细胞如NK细胞和巨噬细胞的募集和激活所驱动的,并且它们的激活导致固有免疫和适应性免疫之间的串扰,如与高效的肿瘤生长控制相关的CD4和CD8+T细胞。这些观察结果也与肿瘤内细胞因子如IFN γ 或TNF α 的释放有关。

[0052] 序列总结

	SEQ ID NO:	序列
[0053]	1	双特异性双链抗体CD30/CD16A的氨基酸序列 QVQLVQSGAEVKPGESLKVSKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSAYQKFQGRVTMTRDTS TSTVYMEPLLSEDTAVYYCARGSAYYDFADYWGQGTLTVSSGGSGGSGGSDIVMTQSPKFMSTSVGDRVTCK ASQNVGTNVAWFQQKPGQSPKVLIYSASYRYSGVPDFRTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYHTYPLTFGGGT KLEINGSGSGSGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTIHWVRQRPGHDLEWIGYINPSSGYSDynQ NFKGKTTLTADKSSNTAYMQLNSLTSEDAVYYCARRADYGNYEYTWFAYWGQGTTVTVSSGGSGGSGGSSYVLTQPS SVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQSPVVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYY CQVWDNYSVLFGGGTKLTVL
	2	重链可变结构域氨基酸序列抗CD30 QVQLQQSGAEELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTIHWVRQRPGHDLEWIGYINPSSGYSDynQNFKGKTTLTADKSSN TAYMQLNSLTSEDAVYYCARRADYGNYEYTWFAYWGQGTTVTVSS
	3	轻链可变结构域氨基酸序列抗CD30 DIVMTQSPKFMSTSVGDRVTCKASQNVGTNVAWFQQKPGQSPKVLIYSASYRYSGVPDFRTGSGSGTDFTLTISNV QSEDLAEYFCQQYHTYPLTFGGGTKLEIN
	4	重链可变结构域氨基酸序列抗CD16A QVQLVQSGAEVKPGESLKVSKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSAYQKFQGRVTMTRDTS TSTVYMEPLLSEDTAVYYCARGSAYYDFADYWGQGTLTVSS
	5	轻链可变结构域氨基酸序列抗CD16A SYVLTQPSSVSVPQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQSPVVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVL

序列表

<110> Affimed GmbH

<120> 双特异性CD30×CD16抗体与免疫调节分子PD-1拮抗剂的联合药物用于治疗

<130> A 3283PCT

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 483

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> Fv 串联双抗体

[0001] <400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly			
115	120	125	
Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val			
130	135	140	
Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr			
145	150	155	160
Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu			
165	170	175	
Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr			
180	185	190	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln			
195	200	205	
Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro			
210	215	220	
[0002] Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly Gly Ser Gly			
225	230	235	240
Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu			
245	250	255	
Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr			
260	265	270	
Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His			
275	280	285	
Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp			
290	295	300	
Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser			
305	310	315	320
Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser			
325	330	335	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr			
340	345	350	

Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
355	360	365	
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro			
370	375	380	
Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly			
385	390	395	400
Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro			
405	410	415	
Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser			
420	425	430	
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr			
435	440	445	
Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys			
450	455	460	
[0003] Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu Phe Gly Gly Thr Lys Leu			
465	470	475	480
Thr Val Leu			

<210> 2
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>
<223> 抗 CD30 结构域的 FH

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala			
1	5	10	15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr			
20	25	30	

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

 Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)

 [0004]
 <220>
 <223> 抗 CD30 结构域的 VL

 <400> 3

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

 Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
100 105

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>
<223> 抗 CD16A 的 VH

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

[0005]

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 抗 CD16A 结构域的 VL

<400> 5

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

[0006]

Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

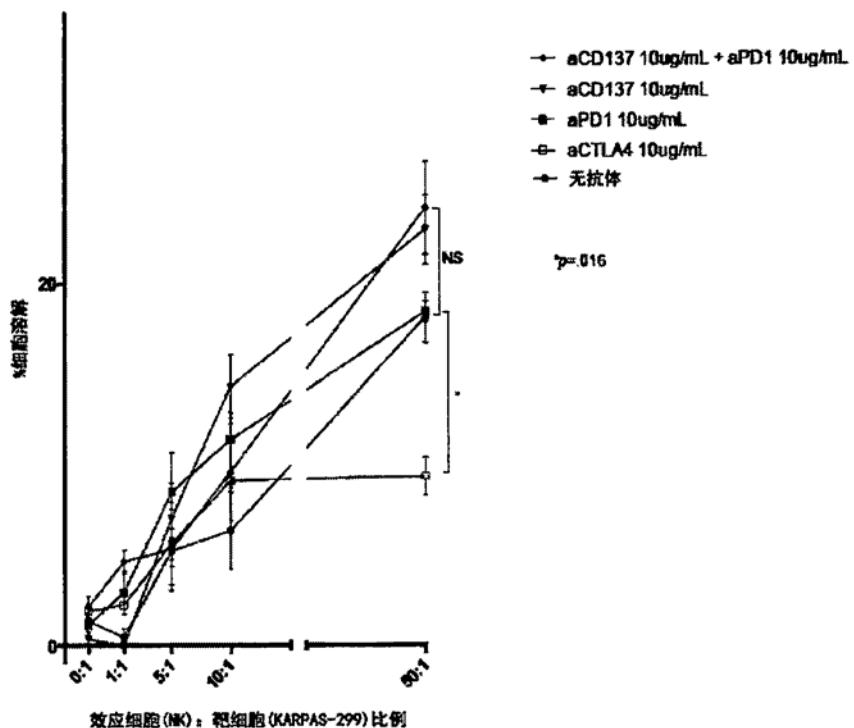


图1

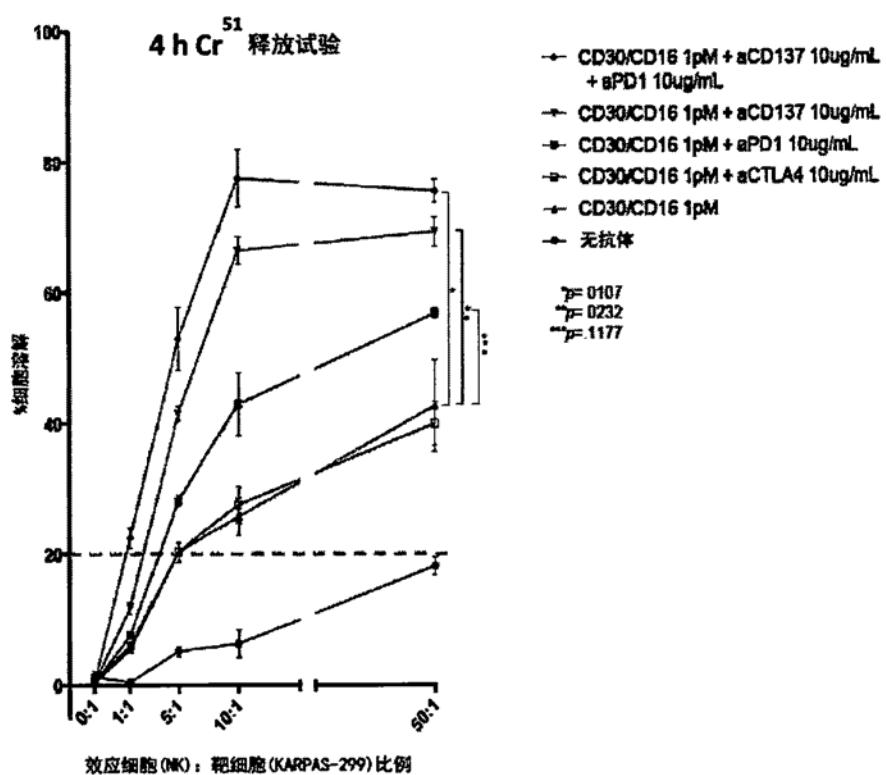


图2

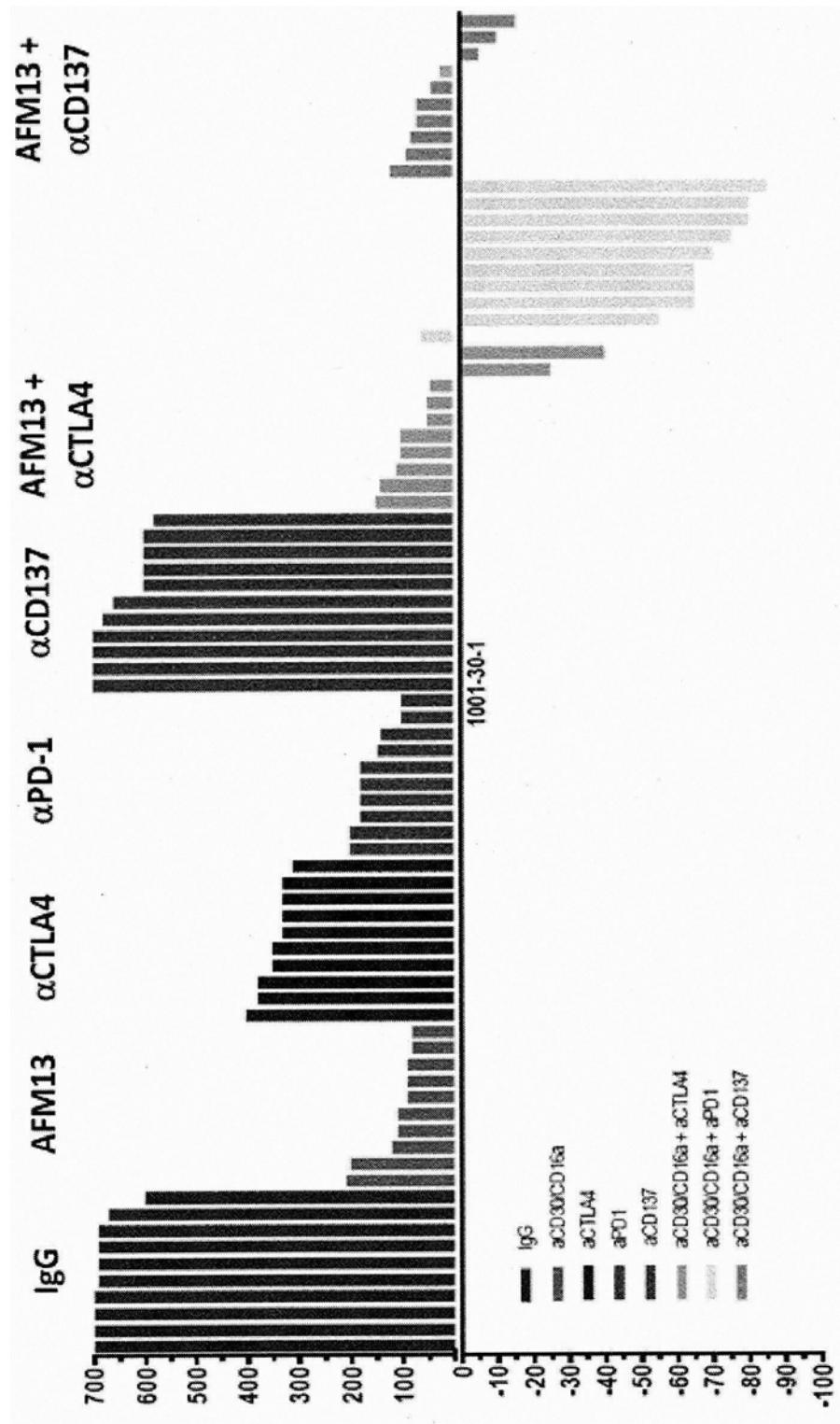


图3

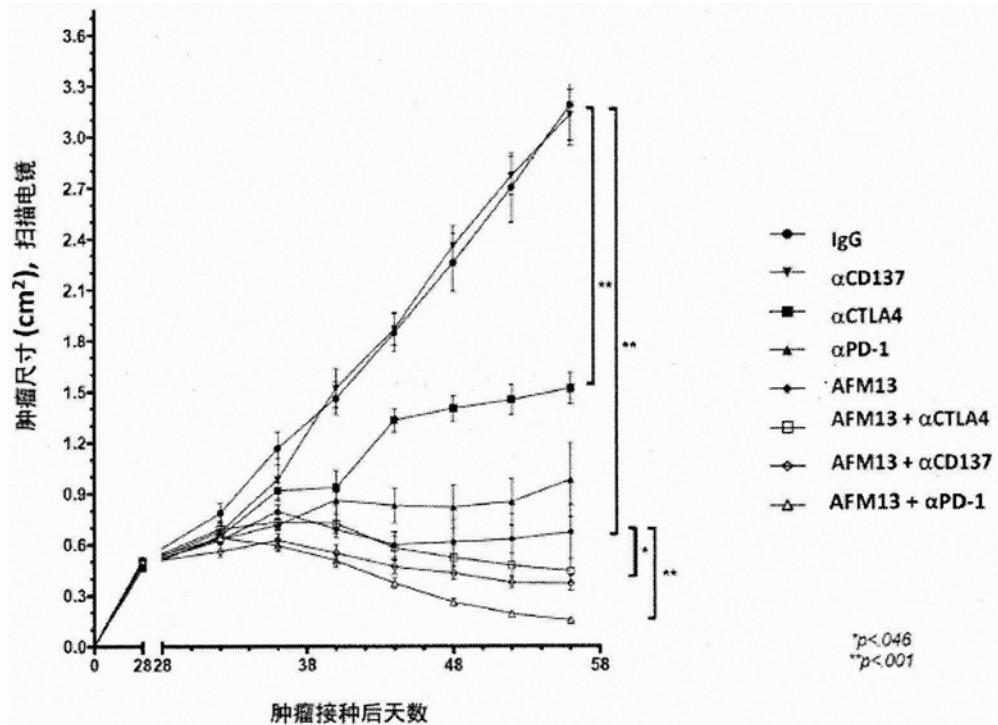


图4

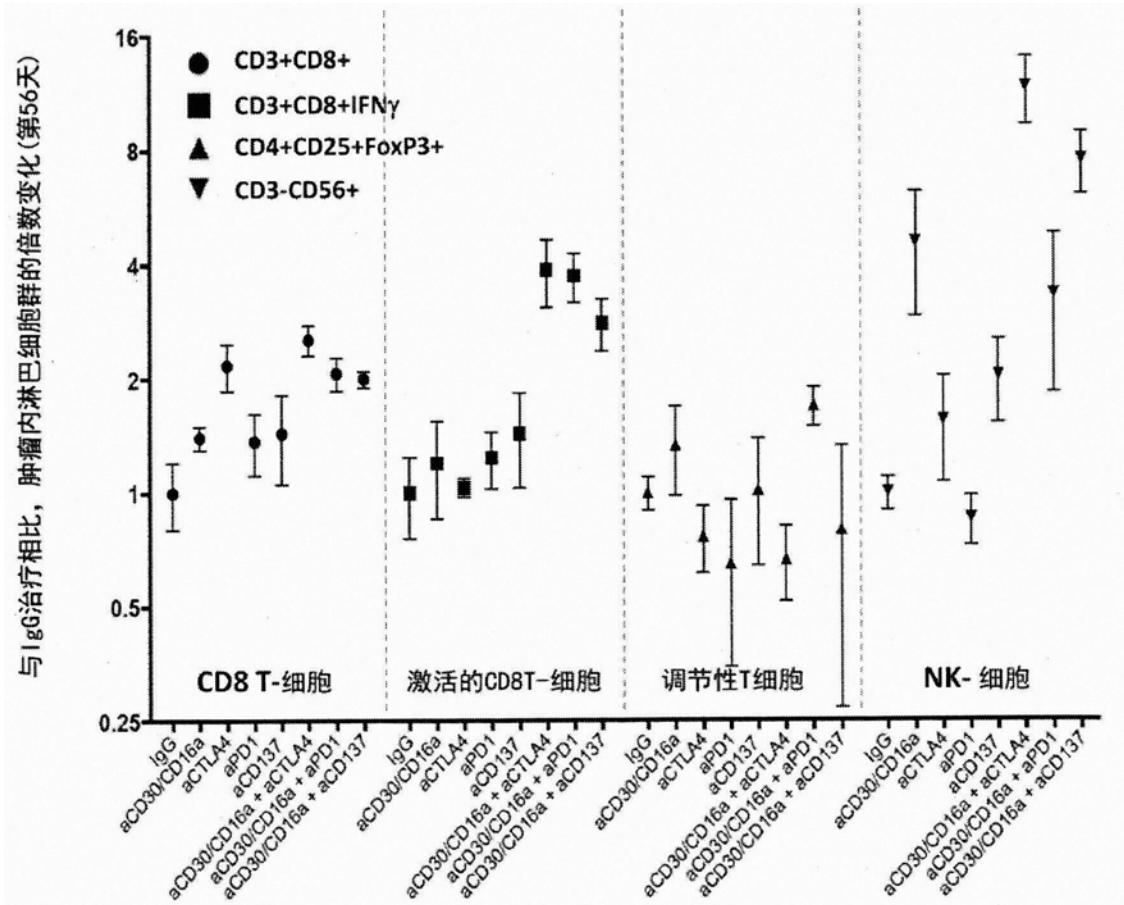


图5

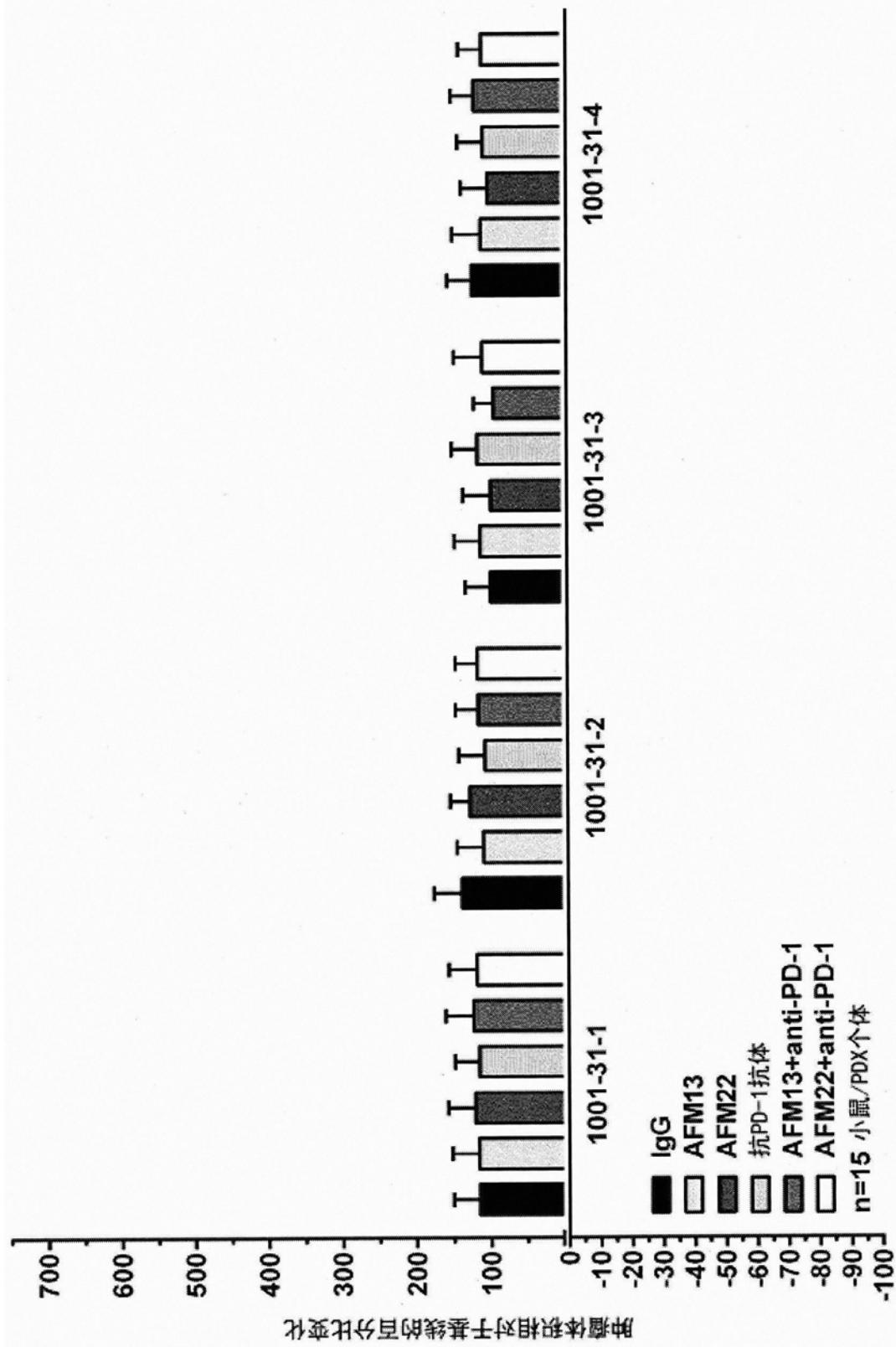


图6A

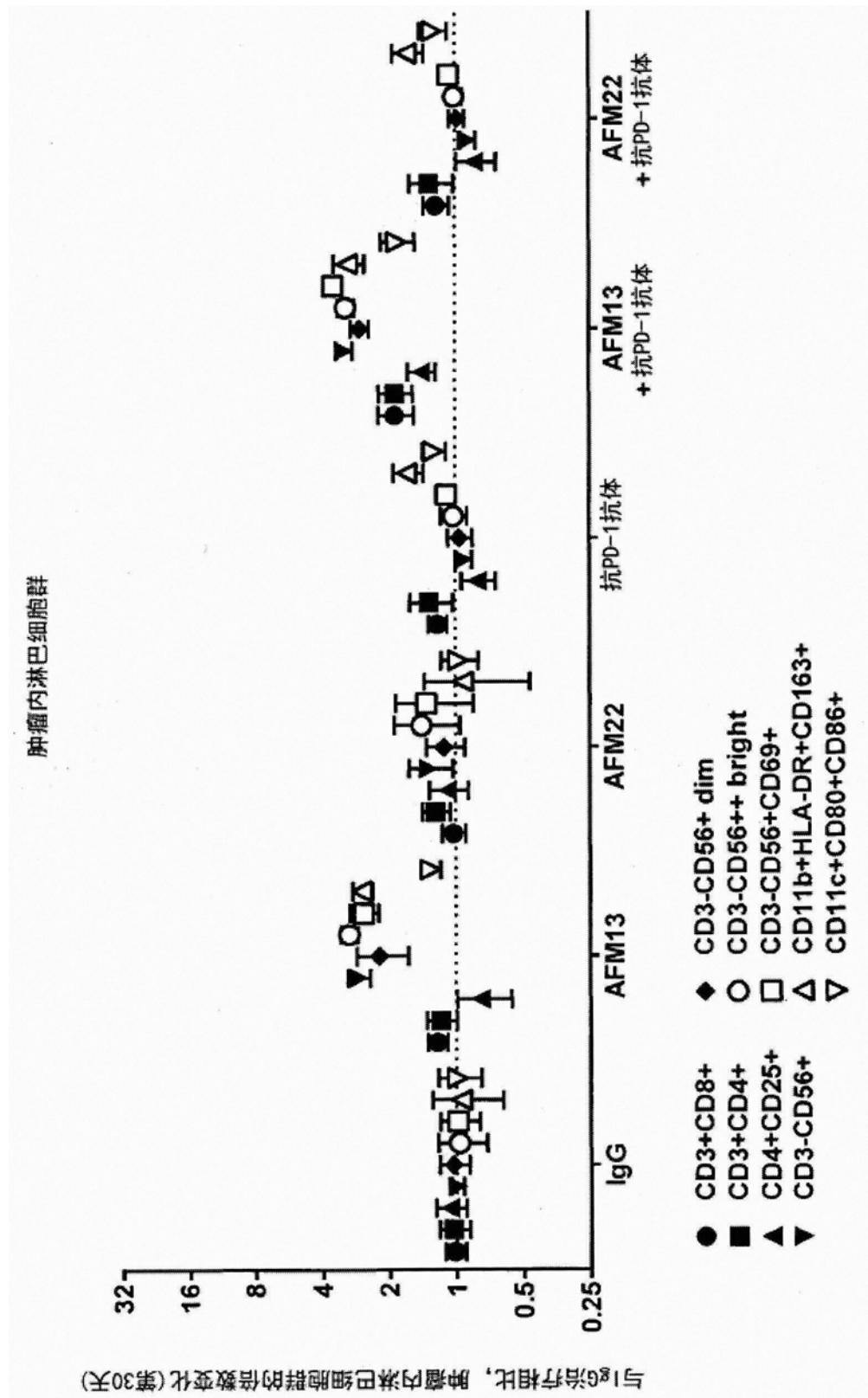


图6B

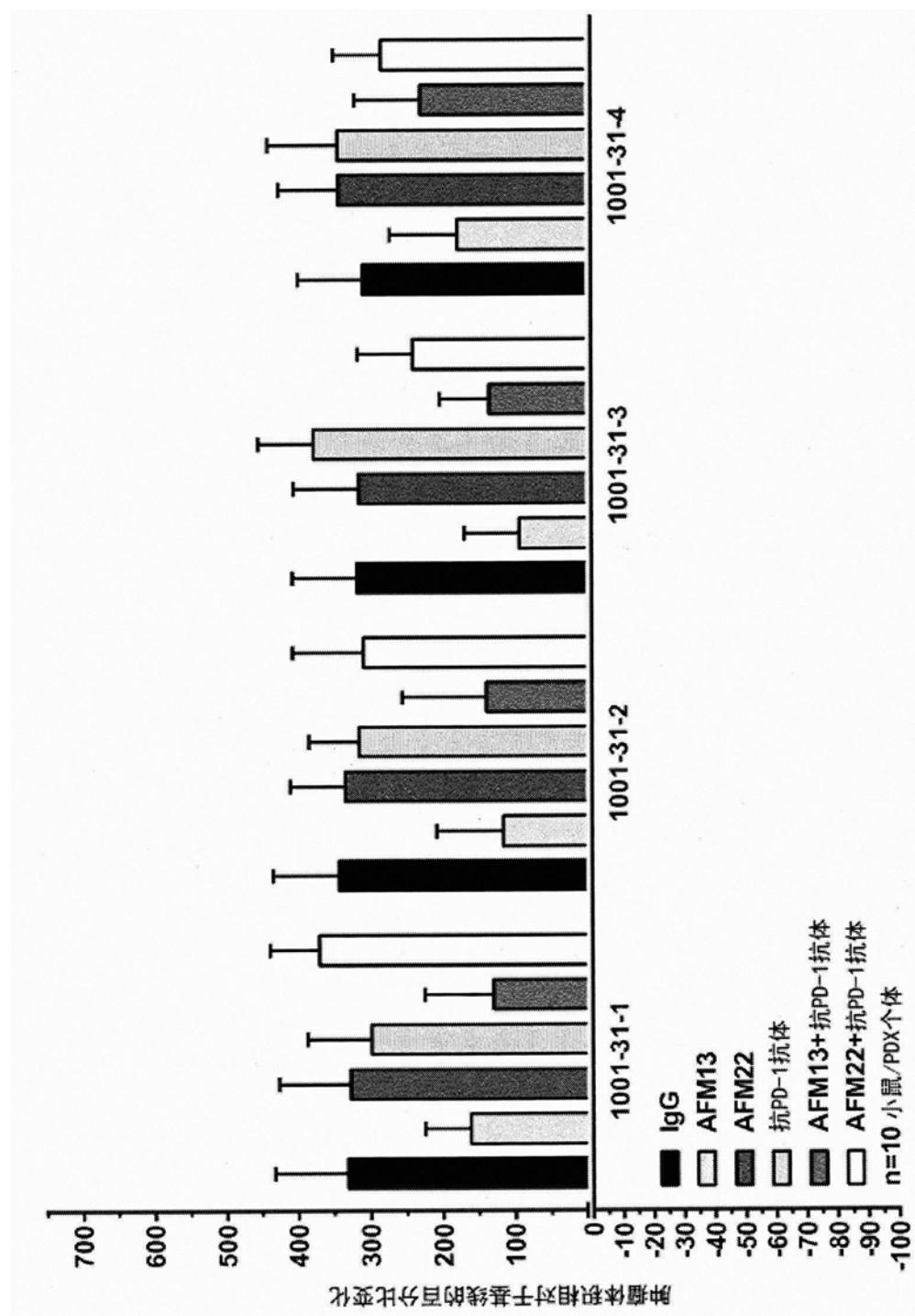


图7A

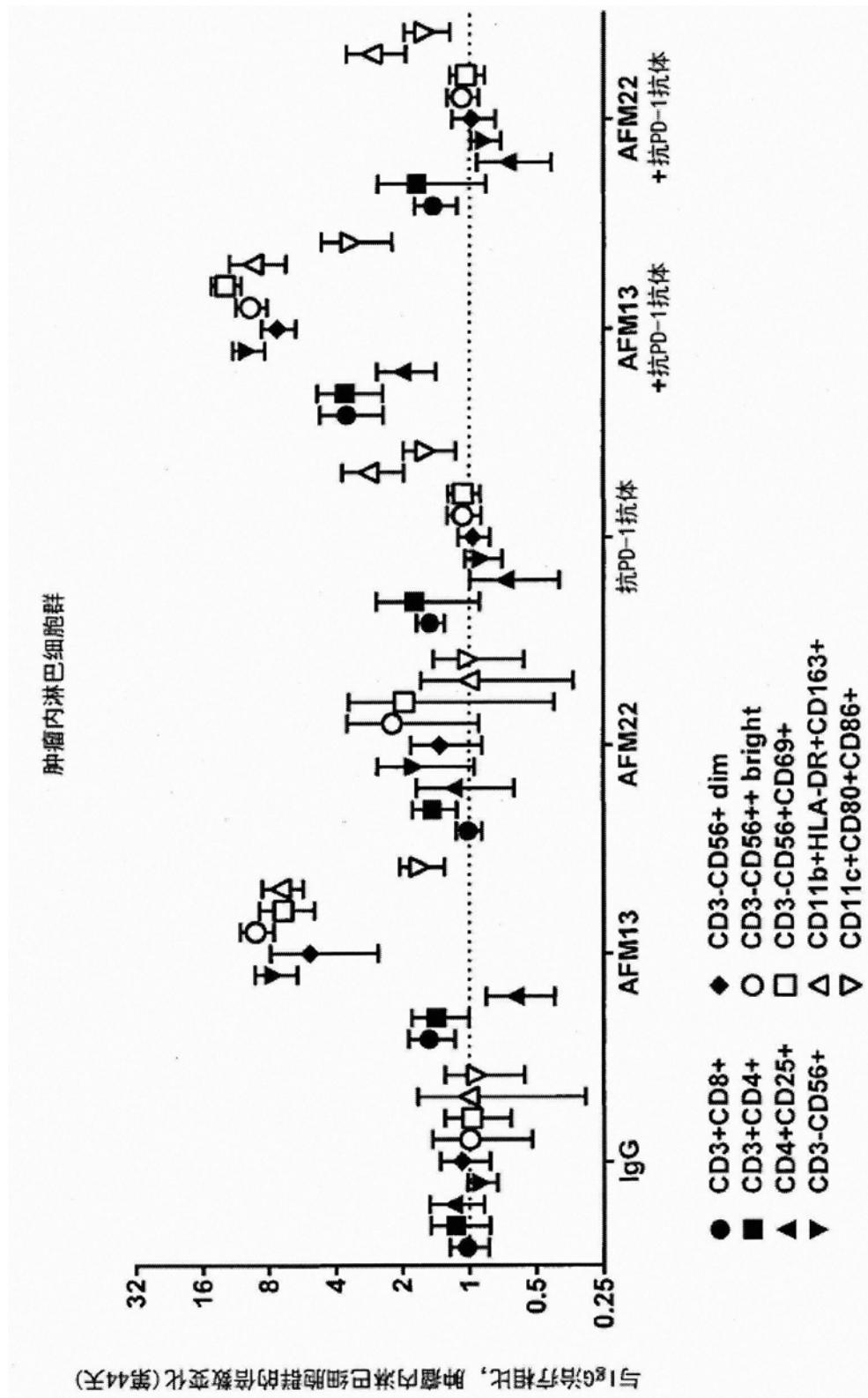


图7B

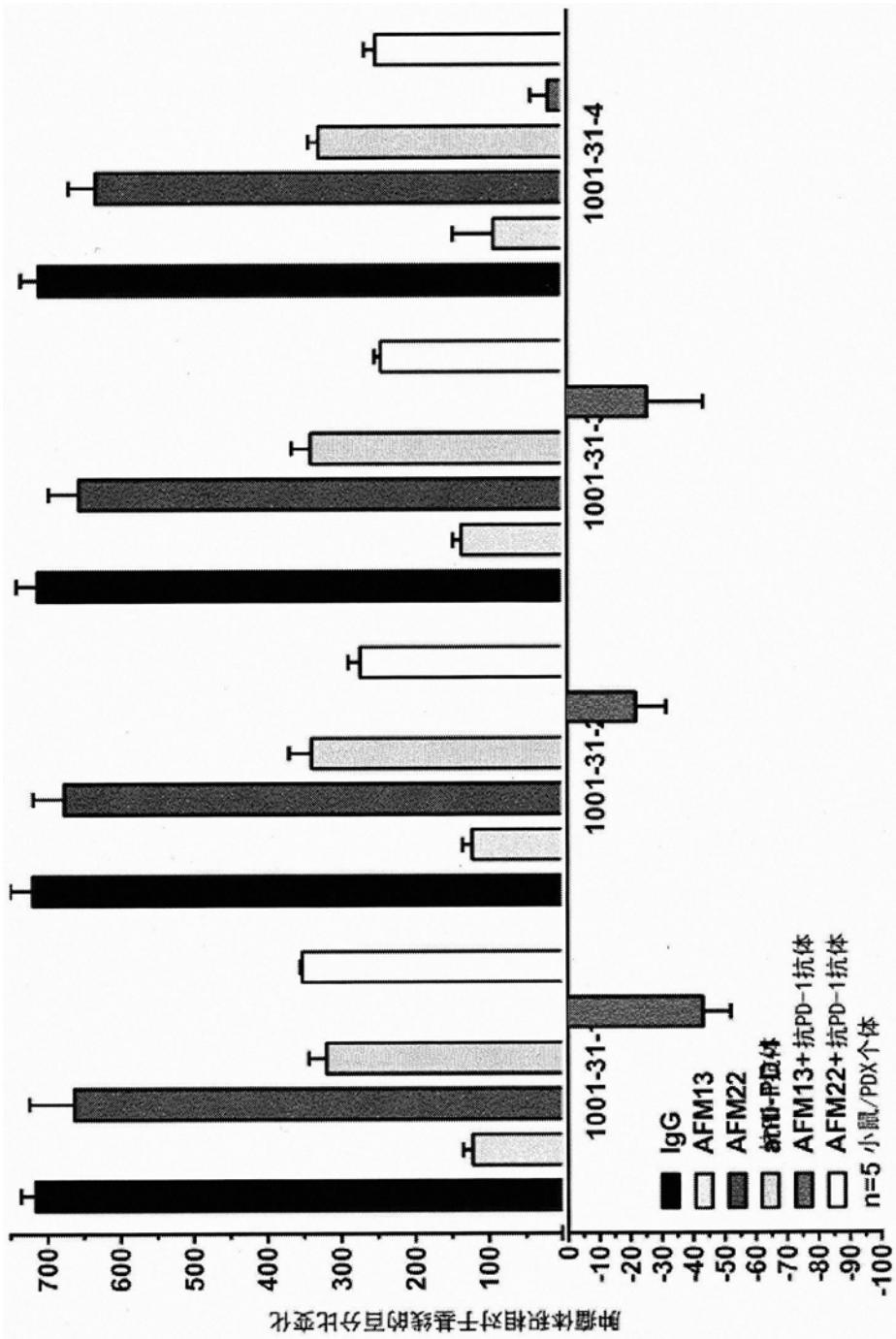


图8A

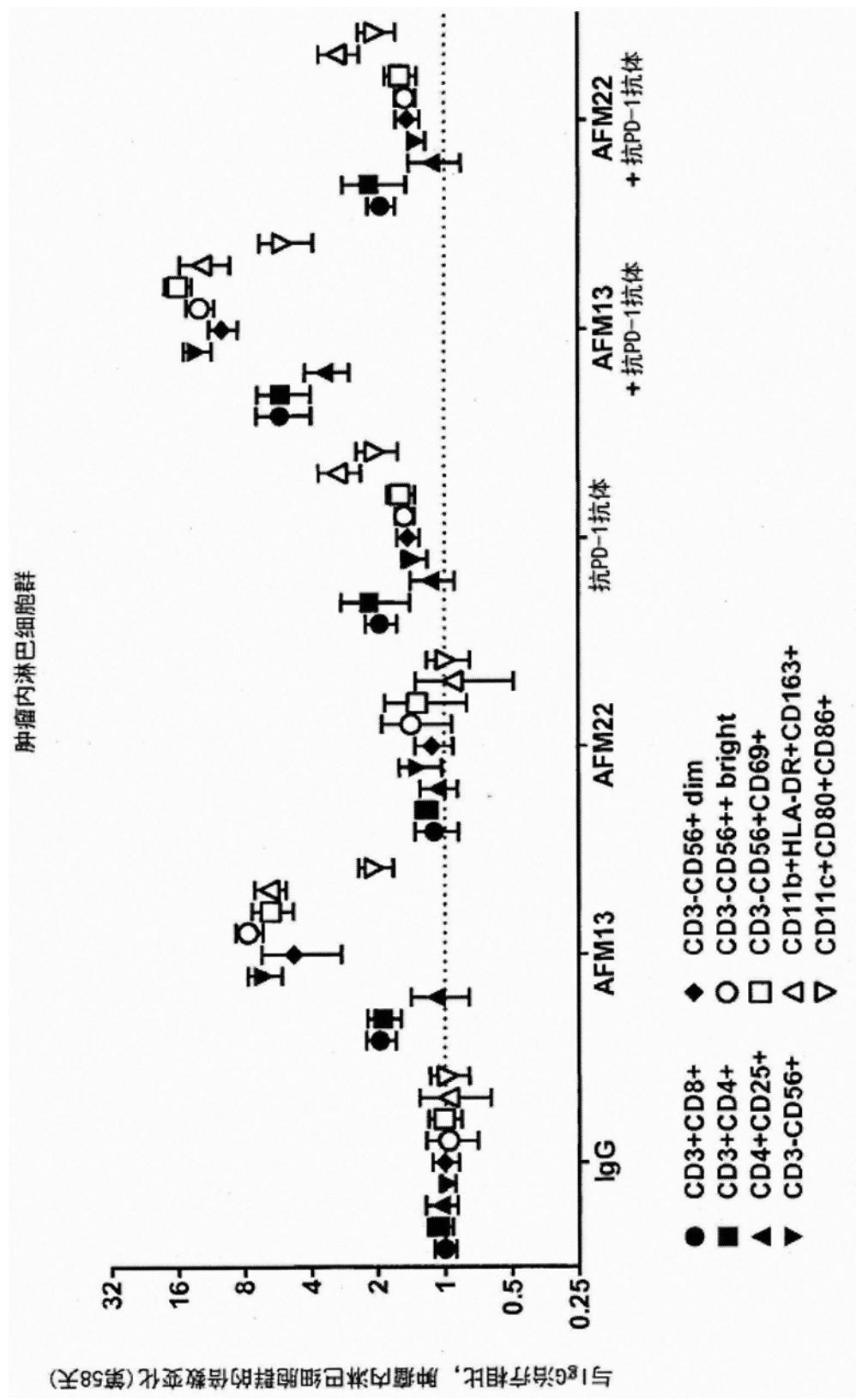


图 8B

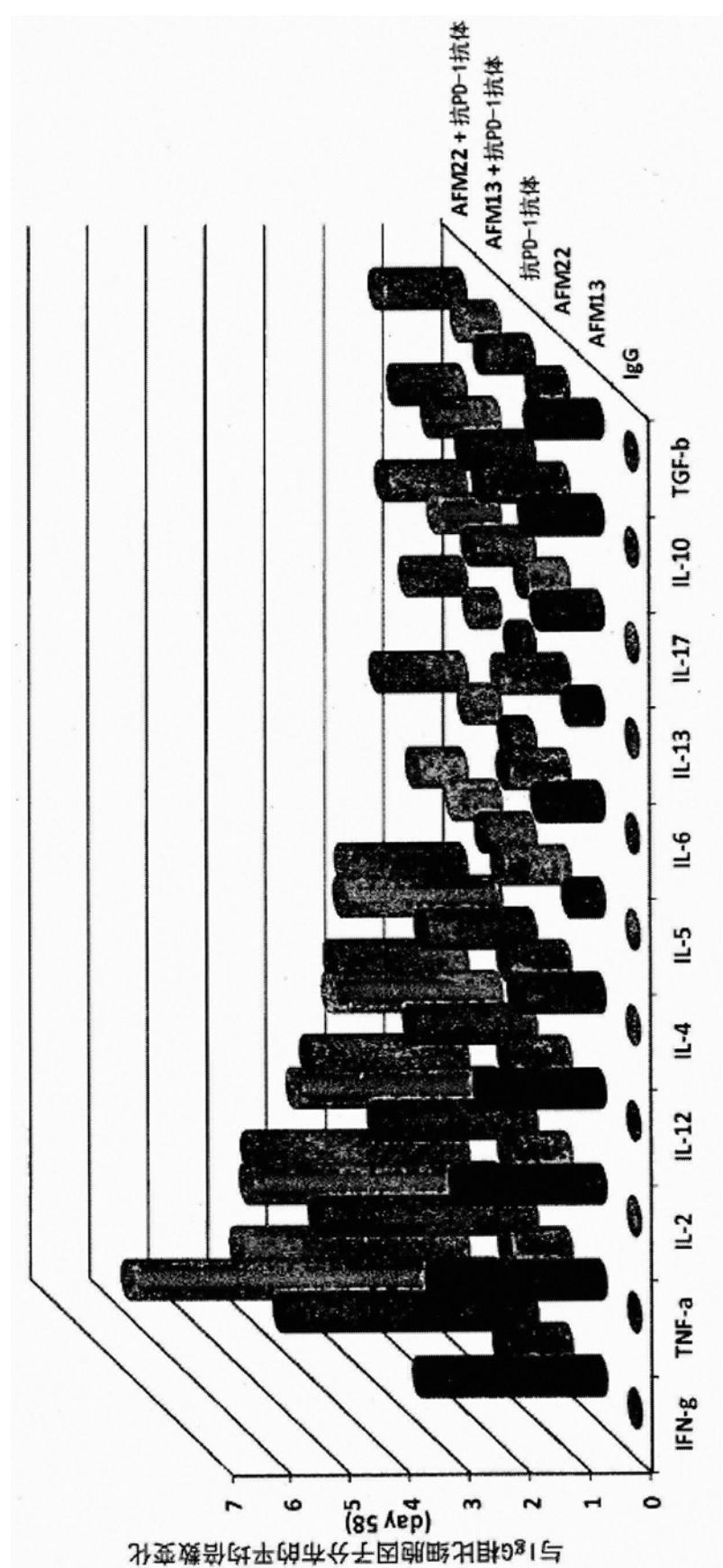


图9

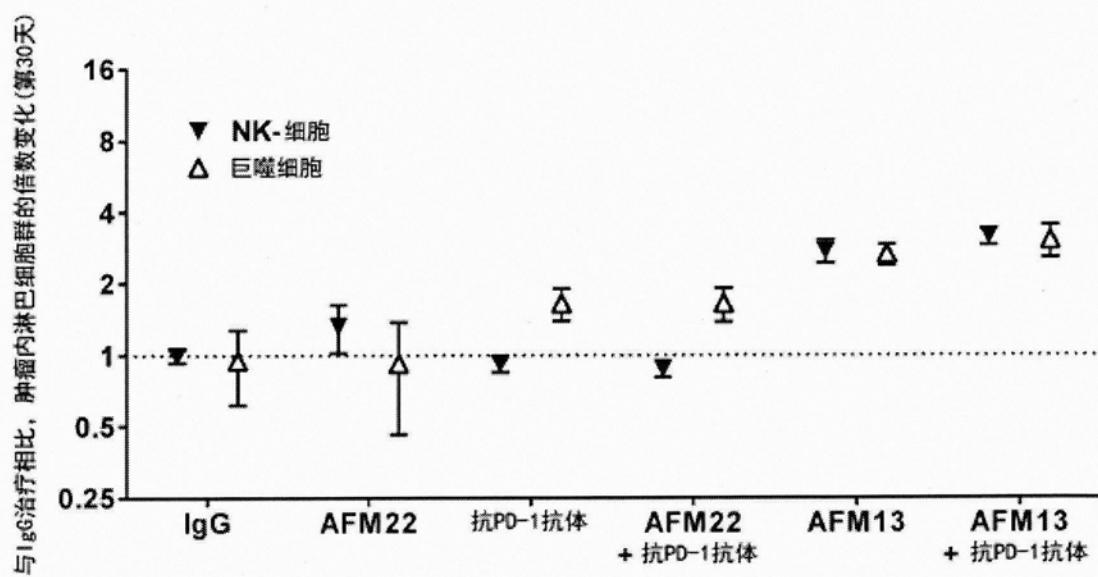
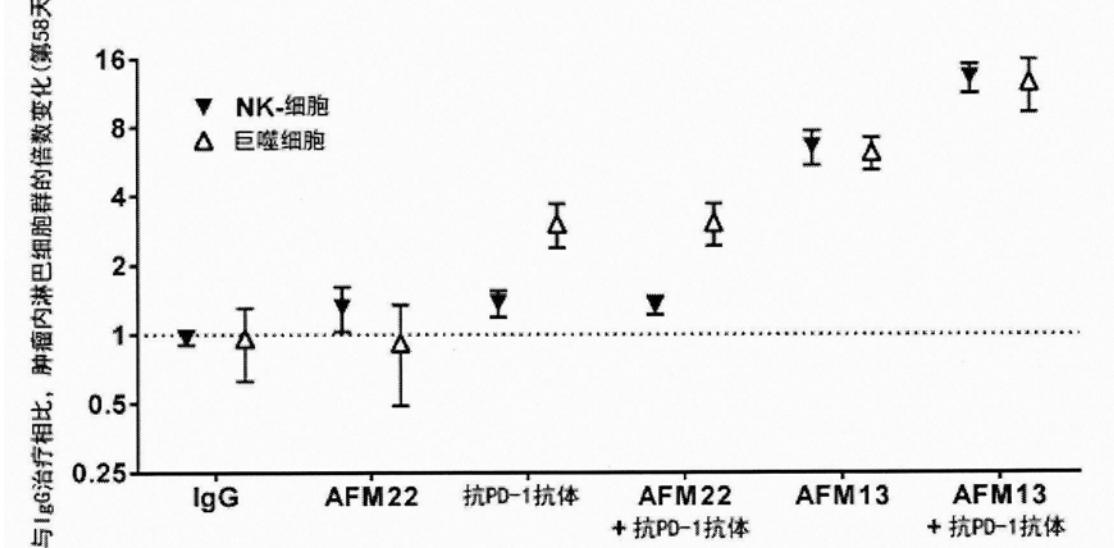
A**B**

图10A,B

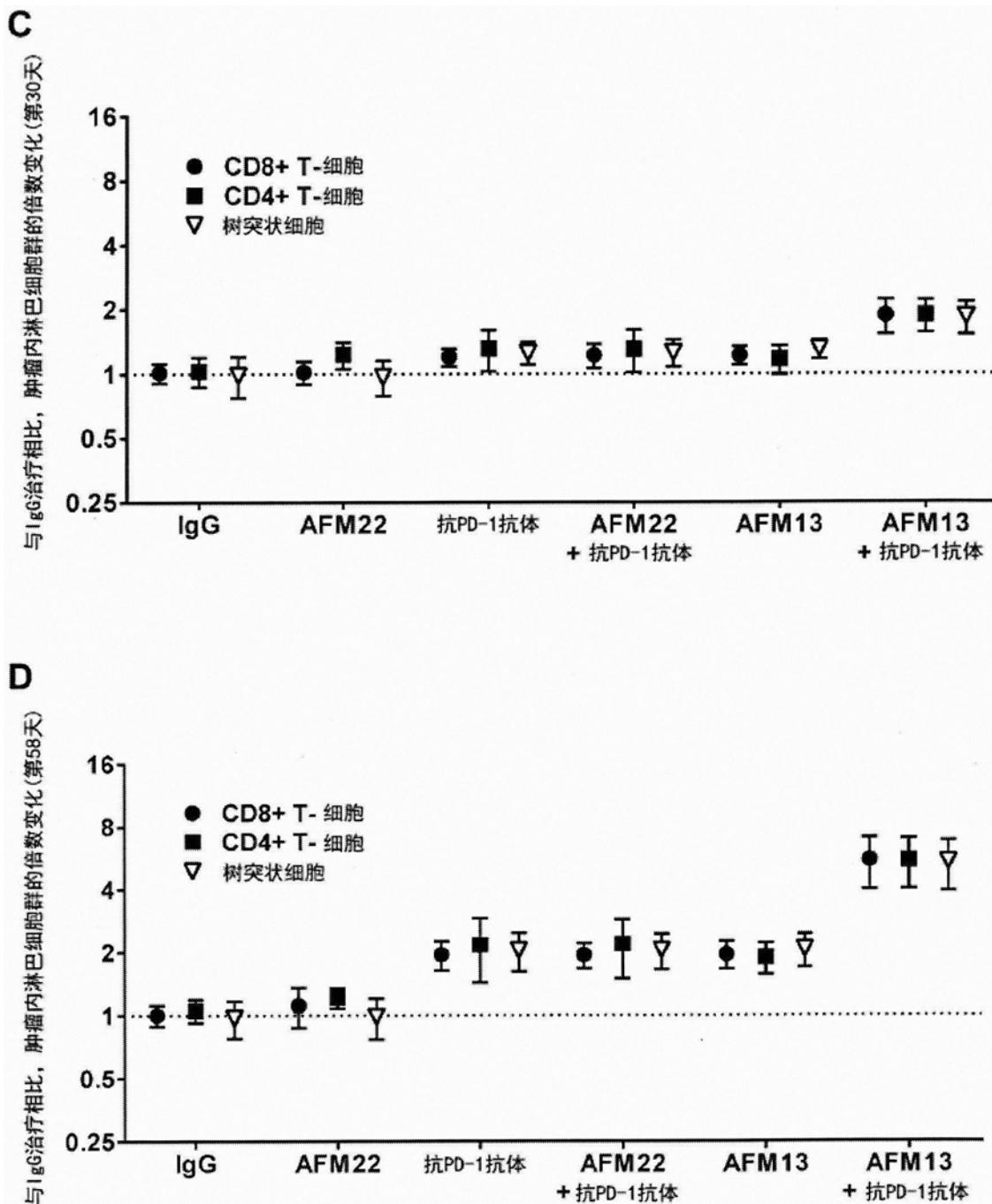


图10C,D