(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118215683 A
(43)申请公布日 2024.06.18

(21)申请号 202280074709.9
(22)申请日 2022.11.09
(30)优先权数据
63/277,505 2021.11.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/079528 2022.11.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/086810 EN 2023.05.19
(71)申请人 悟境股份有限公司
地址 美国密苏里州
(72)发明人 A·卡巴基比 R·P·沙利文
(74)专利代理机构 北京市路盛律师事务所 11326
专利代理师 冯云 李宓
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)

权利要求书4页 说明书35页
序列表（电子公布） 附图15页

(54)发明名称

记忆NK细胞和抗癌双特异性分子的组合癌症疗法

(57)摘要

本文披露了治疗癌症的方法，该方法包括施用记忆NK细胞以及包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的单克隆抗体。本文还披露了用于治疗有需要的患者的卵巢癌的方法，该方法包括使卵巢癌细胞或胃癌细胞与记忆NK细胞和抗HER2单克隆抗体的组合接触。本文还披露了用于治疗有需要的患者的头颈癌或结直肠癌的方法，该方法包括使头颈癌细胞或结直肠癌细胞与记忆NK细胞和抗EGFR单克隆抗体的组合接触。本文还披露了用于治疗有需要的患者的尿路上皮癌、头颈癌、结直肠癌或胃癌细胞的方法，该方法包括使这些癌细胞与记忆NK细胞和抗PDL-1单克隆抗体的组合接触。

CN 118215683 A

1.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括施用记忆NK细胞以及包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的单克隆抗体。

2.如权利要求1所述的方法,其中该单克隆抗体是IgG。

3.如权利要求2所述的方法,其中该单克隆抗体是IgG1或IgG3。

4.如权利要求3所述的方法,其中该IgG1单克隆抗体的Fc部分突变以增强CD16结合亲和力。

5.如权利要求3和4中任一项所述的方法,其中该IgG1或IgG3抗体选自抗HER2抗体、抗PDL-1抗体和抗EGFR抗体。

6.如权利要求5所述的方法,其中该IgG1或IgG3抗体是抗HER2单克隆抗体。

7.如权利要求6所述的方法,其中该癌症是卵巢癌。

8.如权利要求7所述的方法,其中该卵巢癌是透明细胞癌。

9.如权利要求7所述的方法,其中该卵巢癌是子宫内膜样腺癌。

10.如权利要求7所述的方法,其中该卵巢癌是粘液性腺癌。

11.如权利要求7所述的方法,其中该卵巢癌是浆液性癌。

12.如权利要求7所述的方法,其中该卵巢癌是间质瘤。

13.如权利要求7所述的方法,其中该卵巢癌是生殖细胞瘤。

14.如权利要求7所述的方法,其中该卵巢癌是卵巢的小细胞癌。

15.如权利要求6所述的方法,其中该癌症是胃癌。

16.如权利要求6-15中任一项所述的方法,其中该抗HER2单克隆抗体选自曲妥珠单抗和马吉妥昔单抗。

17.如权利要求16所述的方法,其中该抗HER2单克隆抗体是曲妥珠单抗。

18.如权利要求5所述的方法,其中该IgG1抗体是抗EGFR单克隆抗体。

19.如权利要求18所述的方法,其中该癌症是头颈癌。

20.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是口咽癌。

21.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是下咽癌。

22.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是喉癌。

23.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是唇和口腔癌。

24.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是鼻咽癌。

25.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是鼻旁窦癌。

26.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是唾液腺癌。

27.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是鳞状细胞颈癌。

28.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是鼻腔癌。

29.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是软组织肉瘤。

30.如权利要求19所述的方法,其中该头颈癌是甲状腺癌。

31.如权利要求18所述的方法,其中该癌症是结直肠癌。

32.如权利要求19-31中任一项所述的方法,其中该抗EGFR单克隆抗体选自西妥昔单抗、帕尼单抗和耐昔妥珠单抗。

33.如权利要求33所述的方法,其中该抗EGFR单克隆抗体是西妥昔单抗。

34.如权利要求5所述的方法,其中该IgG1或IgG3抗体是抗免疫检查点蛋白抗体。

35.如权利要求34所述的方法,其中该抗免疫检查点蛋白抗体选自抗PD-1单克隆抗体、抗PD-L1单克隆抗体和抗CTLA-4单克隆抗体。

36.如权利要求34所述的方法,其中该癌症选自尿路上皮癌、头颈癌、结直肠癌和胃癌。

37.如权利要求36所述的方法,其中该抗体是抗PD-L1单克隆抗体。

38.如权利要求37所述的方法,其中该抗PD-L1单克隆抗体是阿维鲁单抗。

39.如权利要求37和38中任一项所述的方法,其中该癌症是尿路上皮癌。

40.如权利要求37和38中任一项所述的方法,其中该癌症是头颈癌。

41.如权利要求37和38中任一项所述的方法,其中该癌症是结直肠癌。

42.如权利要求37和38中任一项所述的方法,其中该癌症是胃癌。

43.如权利要求36所述的方法,其中该抗体是抗PD-1单克隆抗体。

44.如权利要求43所述的方法,其中该抗PD-1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗和多塔利单抗。

45.如权利要求36所述的方法,其中该抗体是抗CTLA-4单克隆抗体。

46.如权利要求45所述的方法,其中该抗CTLA-4单克隆抗体是抗体伊匹单抗。

47.如权利要求37所述的方法,其中该抗PD-L1单克隆抗体选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、柯希利单抗和度伐利尤单抗。

48.如权利要求47所述的方法,其中该抗PD-L1单克隆抗体是阿维鲁单抗。

49.如权利要求1所述的方法,其中双特异性分子是NK细胞接合物或三特异性杀伤细胞接合物。

50.如任一前述权利要求所述的方法,其中这些记忆NK细胞在该抗体之前施用。

51.如任一前述权利要求所述的方法,其中这些记忆NK细胞与该抗体同时施用。

52.如任一前述权利要求所述的方法,其中这些记忆NK细胞在该抗体之后施用。

53.一种免疫治疗组合物,该免疫治疗组合物包含记忆NK细胞、包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的单克隆抗体、和治疗上可接受的载剂。

54.一种免疫治疗试剂盒,该免疫治疗试剂盒包含记忆NK细胞、包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的单克隆抗体,和任选地,将这些记忆NK细胞和抗体同时或依序组合施用于患有癌症的受试者的说明书。

55.如权利要求53和54中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该单克隆抗体是IgG。

56.如权利要求55所述的组合物或试剂盒,其中该单克隆抗体是IgG1。

57.如权利要求56所述的组合物或试剂盒,其中该IgG1单克隆抗体的Fc部分突变以增强CD16结合亲和力。

58.如权利要求55和56中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该单克隆抗体选自抗HER2单克隆抗体、抗PDL-1单克隆抗体和抗EGFR单克隆抗体。

59.如权利要求58所述的组合物或试剂盒,其中该IgG1抗体是抗HER2单克隆抗体。

60.如权利要求59所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是卵巢癌。

61.如权利要求60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是透明细胞癌。

62.如权利要求60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是子宫内膜样腺癌。

63.如权利要求60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是粘液性腺癌。

64.如权利要求60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是浆液性癌。

65.如权利要求60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是间质瘤。

66.如权利要求60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是生殖细胞瘤。

67.如权利要求60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是卵巢的小细胞癌。

68.如权利要求59所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是胃癌。

69.如权利要求59-68中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该抗HER2单克隆抗体选自曲妥珠单抗和马吉妥昔单抗。

70.如权利要求69所述的组合物或试剂盒,其中该抗HER2单克隆抗体是曲妥珠单抗。

71.如权利要求58所述的组合物或试剂盒,其中该IgG1抗体是抗EGFR单克隆抗体。

72.如权利要求71所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是头颈癌。

73.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是口咽癌。

74.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是下咽癌。

75.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是喉癌。

76.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是唇和口腔癌。

77.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是鼻咽癌。

78.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是鼻旁窦癌。

79.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是唾液腺癌。

80.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是鳞状细胞颈癌。

81.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是鼻腔癌。

82.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是软组织肉瘤。

83.如权利要求72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是甲状腺癌。

84.如权利要求71所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是结直肠癌。

85.如权利要求71-84中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该抗EGFR单克隆抗体选自西妥昔单抗、帕尼单抗和耐昔妥珠单抗。

86.如权利要求85所述的组合物或试剂盒,其中该抗EGFR单克隆抗体是西妥昔单抗。

87.如权利要求58所述的组合物或试剂盒,其中该IgG1抗体是抗免疫检查点蛋白抗体。

88.如权利要求87所述的组合物或试剂盒,其中该抗免疫检查点蛋白抗体选自抗PD-1单克隆抗体、抗PD-L1单克隆抗体和抗CTLA-4单克隆抗体。

89.如权利要求88所述的组合物或试剂盒,其中该癌症选自尿路上皮癌、头颈癌、结直肠癌和胃癌。

90.如权利要求89所述的组合物或试剂盒,其中该抗体是抗PD-L1单克隆抗体。

91.如权利要求90所述的组合物或试剂盒,其中该抗PD-L1单克隆抗体是阿维鲁单抗。

92.如权利要求90和91中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是尿路上皮癌。

93.如权利要求90和91中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是头颈癌。

94.如权利要求90和91中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是结直肠癌。

95.如权利要求90和91中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是胃癌。

96.如权利要求89所述的组合物或试剂盒,其中该抗体是抗PD-1单克隆抗体。

97.如权利要求96所述的组合物或试剂盒,其中该抗PD-1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗和多塔利单抗。

98.如权利要求89所述的组合物或试剂盒,其中该抗体是抗CTLA-4单克隆抗体。

99.如权利要求98所述的组合物或试剂盒,其中该抗CTLA-4单克隆抗体是抗体伊匹单抗。

100.如权利要求90所述的组合物或试剂盒,其中该抗PD-L1单克隆抗体选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、柯希利单抗和度伐利尤单抗。

101.如权利要求100所述的组合物或试剂盒,其中该抗PD-L1单克隆抗体是阿维鲁单抗。

102.如前述权利要求中任一项所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞在该抗体之前施用。

103.如前述权利要求中任一项所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞与该抗体同时施用。

104.如前述权利要求中任一项所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞在该抗体之后施用。

105.如前述权利要求中任一项所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞相对于正常NK细胞具有增加的CD16表达。

106.如权利要求106所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞相对于正常NK细胞增加的CD16表达持续至少30天。

记忆NK细胞和抗癌双特异性分子的组合癌症疗法

[0001] 本申请要求于2021年11月9日提交的美国临时专利申请号63/277,505的优先权权益,该美国临时专利申请的披露内容通过援引并入,就像完整地写在本文中一样。

[0002] 本披露总体上尤其涉及记忆/记忆样和细胞因子诱导记忆样(CIML)NK细胞,其制备和使用方法,例如用于通过用记忆NK细胞与抗癌单克隆抗体组合治疗来治疗癌症以及增加NK细胞的抗肿瘤特性。

[0003] 自然杀伤(NK)细胞构成一组先天免疫细胞,其常常表征为经由颗粒酶和穿孔素的靶标定向释放而表现出抗体依赖性细胞毒性的细胞毒性淋巴细胞。大多数NK细胞除了具有各种活化性和抑制性受体外还具有特异性的细胞表面标记谱(例如,CD3、CD56+、CD16+、CD57+、CD8+)。尽管最近NK细胞已经成为某些癌症治疗的重要组成部分,但是由于全血中NK细胞的比例相对较低,因此产生大量NK细胞一直非常困难。

[0004] 每年全世界估计有300,000人诊断出卵巢癌,并导致大致180,000人死亡。在2021年,美国将有大约21,000人诊断出卵巢癌并导致约14,000人死亡,在美国卵巢癌是妇科癌症死亡的主要原因。靶向HER-2受体的单克隆抗体曲妥珠单抗(trastuzumab)和多克隆NK细胞显示对原初SKOV-3卵巢癌细胞的协同杀伤。然而,在治疗过程中,疗法抗性肿瘤细胞克隆的生长经常导致复发。因此,需要提供更有效的卵巢癌免疫疗法。

[0005] 胃癌在全世界癌症特定死亡最常见原因中排名第三。2018年,在美国记录了总共26,240例胃癌新发病例,同年记录了10,800例死亡。HER2是一种原癌基因,属于促进细胞增殖和癌症发展的表皮生长因子受体(EGFR)家族。在大约22%-32%的胃癌中观察到HER2的表达。已经在一线临床试验和二线临床试验中对靶向HER2的曲妥珠单抗用于胃癌治疗进行了评价。一线临床试验中组合化疗和曲妥珠单抗展示,与仅化疗的对照相比,患者的OS从11.1个月增加至13.8个月。然而,在最近的T-ACT二线曲妥珠单抗组合试验中,没有观察到OS生存的显著差异。HER2的肿瘤损失和异质性仍然是挑战,并且在胃癌适应症中仍然需要更有效的免疫疗法。

[0006] 结直肠癌(CRC)在全球范围内具有第三高的发病率,2018年新增病例超过180万。同年全球有881,000人死于CRC,表明这是癌症相关死亡的第二大主要原因。几个CRC突变在预后中非常重要,包括当前推荐进行分子测试的KRAS/NRAS、BRAF、HER2、NTRK和MMR/MS。通过目前的治疗方法,在美国CRC的5年相对生存率为64.7%,然而,对于具有不利遗传特征的患者,预后更差。已知EGFR在结直肠癌的发生和进展中起重要作用。西妥昔单抗(cetuximab)改善10%-20%患者的生存和生活质量,但是随着抗体治疗的进行,许多患者出现耐药性。据信这种耐药性的机制至少部分是ADCC受损。因此,需要开发在这些患者中增强西妥昔单抗介导的ADCC的策略。

[0007] 头颈癌(HNC)是包括几种不同类型的癌症的集合术语。头部和颈部的癌症按它们开始的区域分类。这包括口(口腔)、咽喉(咽)、喉头(喉)、鼻窦和鼻腔以及唾液腺。靶向EGFR的单克隆抗体对HNC有效,但是仅在15%-20%的患者中有效。值得注意的是,西妥昔单抗治疗增加肿瘤内Treg细胞的频率,这些肿瘤内Treg细胞阻抑西妥昔单抗介导的NK细胞ADCC并且它们的存在与较差的临床结局相关。因此,需要提供更有效的HNC免疫疗法。

[0008] 尿路上皮癌是最常见的膀胱癌类型,并且约50%的患者发展出转移性疾病。早期疾病通常手术治疗,但是转移风险增加的侵袭性尿路上皮癌需要连同手术的其他治疗方法。PD-L1是在许多肿瘤上表达的检查点蛋白,其通过充当损伤T细胞功能的检查点使细胞逃避免疫系统。最近已批准PD-L1靶向检查点抑制剂阿维鲁单抗(avelumab)用于尿路上皮癌。用阿维鲁单抗作为二线疗法治疗的患者在转移性尿路上皮癌中展示出约17%的总体应答率。阿维鲁单抗的作用机制还包括靶向肿瘤的ADCC及其对检查点抑制的影响。值得注意的是,研究已经显示阿维鲁单抗增强NK细胞介导的对肿瘤靶标的毒性,并且表达更高水平PD-L1的肿瘤对阿维鲁单抗介导的ADCC更敏感。因此,需要鉴定用于尿路上皮癌的新的和改进的免疫疗法。

[0009] 本文披露了用于治疗卵巢癌、结直肠癌、HNC、胃癌和尿路上皮癌的新方式,这些新方式利用记忆NK细胞(有时称为记忆样或细胞因子诱导记忆样NK细胞)与针对这些癌症的单克隆抗体的组合。

序列简要说明

[0010] 表1中的SEQ ID NO:1和2是示例性扩增融合蛋白链的序列。

[0011] 表2中的SEQ ID NO:3至22是示例性抗TF抗体(“ATF1”)的序列。

[0012] 表3中的SEQ ID NO:23和24是示例性引发融合蛋白链的序列。

[0013] SEQ ID NO:25至60是本文讨论的某些抗体的重链和轻链以及VH结构域和VL结构域的序列。

附图说明

[0014] 图1是在有或没有单克隆抗体或有对照非靶向同种型抗体和有CD16参与的情况下用于测试记忆NK细胞的实验设计的示意图。

[0015] 图2示出了连同曲妥珠单抗的情况下记忆NK细胞的细胞毒性的结果。曲妥珠单抗增强记忆NK细胞针对卵巢癌细胞系SKOV-3的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0016] 图3示出了在连同增强记忆NK细胞针对HNC细胞系SCC-25的ADCC的西妥昔单抗的情况下记忆NK细胞细胞毒性的结果。

[0017] 图4示出了在THP-1AML肿瘤模型中注射后至少35天小鼠血液中记忆NK细胞的持久性。

[0018] 图5示出了从注射到小鼠体内的时间开始并在整个研究过程中持续的记忆NK细胞表面上增加的CD16表达。

[0019] 图6示出了SCC-25头颈癌细胞上PD-L1表达的IFNg剂量反应。

[0020] 图7示出了IFNg对人LoVo结肠癌细胞上PD-L1表达的诱导。

[0021] 图8A)示出了肿瘤细胞活力和B)用记忆NK细胞处理后结直肠癌细胞系中的PD-L1表达。

[0022] 图9示出了在连同西妥昔单抗、阿维鲁单抗及其组合的情况下记忆NK细胞针对CRC细胞系LoVo-GFP的细胞毒性的结果。上图A),示出了上部腔室中LoVo细胞上的PD-L1表达,显示为平均荧光强度(MFI),以及下图B),示出了上部腔室中LoVo细胞上的PD-L1表达,显示为PD-L1阳性细胞的百分比(%)。

[0023] 图10示出了与记忆NK细胞一起孵育后,SCC-25细胞(头颈癌)上的PD-L1诱导,示为

12小时原代共培养物的百分比细胞毒性。

[0024] 图11示出了与记忆NK细胞一起孵育后,SCC-25细胞(头颈癌)上的PD-L1诱导,示为24小时原代共培养物的百分比细胞毒性。

[0025] 图12示出了与记忆NK细胞一起孵育后,SCC-25细胞(头颈癌)上的PD-L1诱导,示为42小时原代共培养物的百分比细胞毒性。

[0026] 图13示出了用条件培养基孵育后,SCC-25细胞(头颈癌)上的PD-L1诱导,示为12小时继代条件共培养物的百分比细胞毒性。

[0027] 图14示出了用条件培养基孵育后,SCC-25细胞(头颈癌)上的PD-L1诱导,示为24小时继代条件共培养物的细胞毒性百分比。

[0028] 图15示出了用条件培养基孵育后,SCC-25细胞(头颈癌)上的PD-L1诱导,示为42小时继代条件共培养物的细胞毒性百分比。

[0029] 图16示出了与记忆NK细胞一起孵育后或用条件培养基孵育后,SCC-25细胞(HNC)上PD-L1的诱导。

[0030] 图17示出了阿维鲁单抗和记忆NK细胞共培养物杀伤NCI-N87细胞(胃癌细胞)的结果。

具体实施方式

[0031] 本文提供了能够实现针对卵巢癌、结直肠癌、HNC、胃癌和尿路上皮癌更有效的免疫疗法的组合物和方法。这些组合物包含引发的和扩增的记忆NK细胞以及选自抗HER2受体抗体、抗EGFR抗体或抗PD-L1抗体的单克隆抗体。这些方法包括使卵巢癌细胞、结直肠癌细胞、HNC癌细胞、胃癌细胞或尿路上皮癌细胞与引发和扩增的记忆NK细胞以及选自抗HER2受体抗体、抗EGFR抗体和抗PD-L1抗体的单克隆抗体的组合接触。记忆NK细胞可以在这样的过程中产生,其中NK细胞被同时引发以形成记忆NK细胞并扩增至所需数量。可替代地,可将NK细胞扩增至所需数量,然后引发以形成记忆NK细胞,或者反过来。

[0032] 本文提供了治疗增殖性恶性肿瘤的方法,该方法包括将根据以上实施例的记忆NK细胞与抗癌单克隆抗体组合施用。

[0033] 在一些实施例中,该增殖性恶性肿瘤是卵巢癌,并且该单克隆抗体是抗HER2抗体。在一些实施例中,该抗HER2抗体选自曲妥珠单抗和马吉妥昔单抗(margetuximab)。在一些实施例中,该抗HER2抗体是曲妥珠单抗。在一些实施例中,该卵巢癌选自透明细胞癌、子宫内膜样腺癌、粘液性腺癌、浆液性癌、间质瘤、生殖细胞瘤和卵巢的小细胞癌。

[0034] 在一些实施例中,该增殖性恶性肿瘤是头颈癌(HNC)或胃癌,并且该单克隆抗体是抗EGFR抗体。在一些实施例中,该抗EGFR抗体选自西妥昔单抗(cetuximab)、帕尼单抗(panitumumab)和耐昔妥珠单抗(necitumumab)。在一些实施例中,该抗EGFR抗体是西妥昔单抗。在一些实施例中,HNC选自口咽癌、下咽癌、喉癌、唇和口腔癌、鼻咽癌、鼻旁窦癌、唾液腺癌、鳞状细胞颈癌、鼻腔癌、软组织肉瘤和甲状腺癌。在一些实施例中,胃癌选自胃腺癌、胃肠间质瘤、胃肠神经内分泌(类癌)肿瘤、淋巴瘤、鳞状细胞癌、小细胞癌和平滑肌肉瘤。

[0035] 在一些实施例中,该增殖性恶性肿瘤是尿路上皮癌,并且该单克隆抗体是抗PD-L1抗体。在一些实施例中,该单克隆抗体选自阿维鲁单抗(avelumab)和柯希利单抗(coseibelimab)。在一些实施例中,该单克隆抗体是阿维鲁单抗。在一些实施例中,胃癌选

自乳头状癌、扁平癌、鳞状细胞癌、腺癌、胃肉瘤和小细胞癌。

[0036] 本文提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括施用记忆NK细胞以及包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的双特异性分子(例如,单克隆抗体、NK细胞接合物或三特异性杀伤细胞接合物)。

[0037] 本文还提供了免疫治疗组合物,该免疫治疗组合物包含记忆NK细胞以及包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的双特异性分子(例如,单克隆抗体、NK细胞接合物或三特异性杀伤细胞接合物),以及治疗上可接受的载剂。

[0038] 本文还提供了免疫治疗试剂盒,该免疫治疗试剂盒包含记忆NK细胞以及包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的双特异性分子(例如,单克隆抗体、NK细胞接合物或三特异性杀伤细胞接合物),以及任选地,将记忆NK细胞和抗体同时或依序组合施用于患有癌症的受试者的说明书。

[0039] 在一些实施例中,该双特异性分子是IgG型单克隆抗体。在一些实施例中,该单克隆抗体是IgG1。在一些实施例中,该单克隆抗体是IgG3。在一些实施例中,该IgG1单克隆抗体的Fc部分突变以增强CD16结合亲和力。

[0040] 在一些实施例中,该IgG1或IgG3抗体选自抗HER2抗体、抗PDL-1抗体和抗EGFR抗体。

[0041] 在一些实施例中,该IgG1(或IgG3)抗体是抗HER2单克隆抗体。

[0042] 在一些实施例中,该癌症是卵巢癌。在一些实施例中,该卵巢癌是透明细胞癌。在一些实施例中,该卵巢癌是子宫内膜样腺癌。在一些实施例中,该卵巢癌是粘液性腺癌。在一些实施例中,该卵巢癌是浆液性癌。在一些实施例中,该卵巢癌是间质瘤。在一些实施例中,该卵巢癌是生殖细胞瘤。在一些实施例中,该卵巢癌是卵巢的小细胞癌。

[0043] 在一些实施例中,该癌症是胃癌。

[0044] 在一些实施例中,该抗HER2单克隆抗体选自曲妥珠单抗和马吉妥昔单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。在一些实施例中,该抗HER2单克隆抗体是曲妥珠单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0045] 在一些实施例中,该IgG1(或IgG3)抗体是抗EGFR单克隆抗体。

[0046] 在一些实施例中,该癌症是头颈癌。在一些实施例中,该头颈癌是口咽癌。在一些实施例中,该头颈癌是下咽癌。在一些实施例中,该头颈癌是喉癌。在一些实施例中,该头颈癌是唇和口腔癌。在一些实施例中,该头颈癌是鼻咽癌。在一些实施例中,该头颈癌是鼻旁窦癌。在一些实施例中,该头颈癌是唾液腺癌。在一些实施例中,该头颈癌是鳞状细胞颈癌。在一些实施例中,该头颈癌是鼻腔癌。在一些实施例中,该头颈癌是软组织肉瘤。在一些实施例中,该头颈癌是甲状腺癌。

[0047] 在一些实施例中,该癌症是结直肠癌。

[0048] 在一些实施例中,该抗EGFR单克隆抗体选自西妥昔单抗、帕尼单抗和耐昔妥珠单

抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。在一些实施例中,该抗EGFR单克隆抗体是西妥昔单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0049] 在一些实施例中,该IgG1抗体是抗免疫检查点蛋白抗体。在一些实施例中,该抗免疫检查点蛋白抗体选自抗PD-1单克隆抗体、抗PD-L1单克隆抗体和抗CTLA-4单克隆抗体。在一些实施例中,该癌症选自尿路上皮癌、头颈癌、结直肠癌和胃癌。

[0050] 在一些实施例中,该抗体是抗PD-L1单克隆抗体。在一些实施例中,该抗PD-L1单克隆抗体是阿维鲁单抗。在一些实施例中,该癌症是尿路上皮癌。在一些实施例中,该癌症是头颈癌。在一些实施例中,该癌症是结直肠癌。在一些实施例中,该癌症是胃癌。

[0051] 在一些实施例中,该抗体是抗PD-1单克隆抗体。在一些实施例中,该抗PD-1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗和多塔利单抗;并且任选地,其中该抗体与那些抗体相关的或本领域已知的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0052] 在一些实施例中,该抗体是抗CTLA-4单克隆抗体。在一些实施例中,该抗CTLA-4单克隆抗体是抗体伊匹单抗(ipilimumab);并且任选地,其中该抗体与那些抗体相关的或本领域已知的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0053] 在一些实施例中,该抗PD-L1单克隆抗体选自阿替利珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗、柯希利单抗和度伐利尤单抗(durvalumab);并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。在一些实施例中,该抗PD-L1单克隆抗体是阿维鲁单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0054] 在一些实施例中,该双特异性分子是NK细胞接合物或三特异性杀伤细胞接合物。

[0055] 在一些实施例中,这些记忆NK细胞在该抗体(或其他双特异性分子)之前施用。在一些实施例中,这些记忆NK细胞与该抗体(或其他双特异性分子)同时施用。在一些实施例中,这些记忆NK细胞在该抗体(或其他双特异性分子)之后施用。

[0056] 在一些实施例中,这些记忆NK细胞相对于正常NK细胞具有增加的CD16表达。在一些实施例中,这些记忆NK细胞相对于正常NK细胞增加的CD16表达持续至少30天。

列举的实施例

[0057] 实施例1.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括施用记忆NK细胞以

及包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的双特异性分子(例如,单克隆抗体、NK细胞接合物或三特异性杀伤细胞接合物)。

[0058] 实施例2.如实施例1所述的方法,其中该双特异性分子是IgG型单克隆抗体。

[0059] 实施例3.如实施例2所述的方法,其中该单克隆抗体是IgG1。

[0060] 实施例4.如实施例3所述的方法,其中该IgG1单克隆抗体的Fc部分突变以增强CD16结合亲和力。

[0061] 实施例5.如实施例3和4中任一项所述的方法,其中该IgG1抗体选自抗HER2抗体、抗PDL-1抗体和抗EGFR抗体。

[0062] 实施例6.如实施例5所述的方法,其中该IgG1抗体是抗HER2单克隆抗体。

[0063] 实施例7.如实施例6所述的方法,其中该癌症是卵巢癌。

[0064] 实施例8.如实施例7所述的方法,其中该卵巢癌是透明细胞癌。

[0065] 实施例9.如实施例7所述的方法,其中该卵巢癌是子宫内膜样腺癌。

[0066] 实施例10.如实施例7所述的方法,其中该卵巢癌是粘液性腺癌。

[0067] 实施例11.如实施例7所述的方法,其中该卵巢癌是浆液性癌。

[0068] 实施例12.如实施例7所述的方法,其中该卵巢癌是间质瘤。

[0069] 实施例13.如实施例7所述的方法,其中该卵巢癌是生殖细胞瘤。

[0070] 实施例14.如实施例7所述的方法,其中该卵巢癌是卵巢的小细胞癌。

[0071] 实施例15.如实施例6所述的方法,其中该癌症是胃癌。

[0072] 实施例16.如实施例6-15中任一项所述的方法,其中该抗HER2单克隆抗体选自曲妥珠单抗和马吉妥昔单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0073] 实施例17.如实施例16所述的方法,其中该抗HER2单克隆抗体是曲妥珠单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0074] 实施例18.如实施例5所述的方法,其中该IgG1抗体是抗EGFR单克隆抗体。

[0075] 实施例19.如实施例18所述的方法,其中该癌症是头颈癌。

[0076] 实施例20.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是口咽癌。

[0077] 实施例21.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是下咽癌。

[0078] 实施例22.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是喉癌。

[0079] 实施例23.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是唇和口腔癌。

[0080] 实施例24.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是鼻咽癌。

[0081] 实施例25.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是鼻旁窦癌。

[0082] 实施例26.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是唾液腺癌。

[0083] 实施例27.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是鳞状细胞颈癌。

[0084] 实施例28.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是鼻腔癌。

[0085] 实施例29.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是软组织肉瘤。

[0086] 实施例30.如实施例19所述的方法,其中该头颈癌是甲状腺癌。

[0087] 实施例31.如实施例18所述的方法,其中该癌症是结直肠癌。

[0088] 实施例32.如实施例19-31中任一项所述的方法,其中该抗EGFR单克隆抗体选自西妥昔单抗、帕尼单抗和耐昔妥珠单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0089] 实施例33.如实施例33所述的方法,其中该抗EGFR单克隆抗体是西妥昔单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0090] 实施例34.如实施例5所述的方法,其中该IgG1抗体是抗免疫检查点蛋白抗体。

[0091] 实施例35.如实施例34所述的方法,其中该抗免疫检查点蛋白抗体选自抗PD-1单克隆抗体、抗PD-L1单克隆抗体和抗CTLA-4单克隆抗体。

[0092] 实施例36.如实施例34所述的方法,其中该癌症选自尿路上皮癌、头颈癌、结直肠癌和胃癌。

[0093] 实施例37.如实施例36所述的方法,其中该抗体是抗PD-L1单克隆抗体。

[0094] 实施例38.如实施例37所述的方法,其中该抗PD-L1单克隆抗体是阿维鲁单抗。

[0095] 实施例39.如实施例37和38中任一项所述的方法,其中该癌症是尿路上皮癌。

[0096] 实施例40.如实施例37和38中任一项所述的方法,其中该癌症是头颈癌。

[0097] 实施例41.如实施例37和38中任一项所述的方法,其中该癌症是结直肠癌。

[0098] 实施例42.如实施例37和38中任一项所述的方法,其中该癌症是胃癌。

[0099] 实施例43.如实施例36所述的方法,其中该抗体是抗PD-1单克隆抗体。

[0100] 实施例44.如实施例43所述的方法,其中该抗PD-1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗和多塔利单抗;并且任选地,其中该抗体与那些抗体相关的或本领域已知的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0101] 实施例45.如实施例36所述的方法,其中该抗体是抗CTLA-4单克隆抗体。

[0102] 实施例46.如实施例45所述的方法,其中该抗CTLA-4单克隆抗体是抗体伊匹单抗;并且任选地,其中该抗体与那些抗体相关的或本领域已知的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0103] 实施例47.如实施例37所述的方法,其中该抗PD-L1单克隆抗体选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、柯希利单抗和度伐利尤单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0104] 实施例48.如实施例47所述的方法,其中该抗PD-L1单克隆抗体是阿维鲁单抗;并

且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0105] 实施例49.如实施例1所述的方法,其中该双特异性分子是NK细胞接合物或三特异性杀伤细胞接合物。

[0106] 实施例50.如任一前述实施例所述的方法,其中这些记忆NK细胞在该抗体(或其他双特异性分子)之前施用。

[0107] 实施例51.如任一前述实施例所述的方法,其中这些记忆NK细胞与该抗体(或其他双特异性分子)同时施用。

[0108] 实施例52.如任一前述实施例所述的方法,其中这些记忆NK细胞在该抗体(或其他双特异性分子)之后施用。

[0109] 实施例53.一种免疫治疗组合物,该免疫治疗组合物包含记忆NK细胞以及包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的双特异性分子(例如,单克隆抗体、NK细胞接合物或三特异性杀伤细胞接合物),以及治疗上可接受的载剂。

[0110] 实施例54.一种免疫治疗试剂盒,该免疫治疗试剂盒包含记忆NK细胞以及包含肿瘤抗原结合部分和CD16结合部分的双特异性分子(例如,单克隆抗体、NK细胞接合物或三特异性杀伤细胞接合物),以及任选地,将记忆NK细胞和抗体同时或依序组合施用于患有癌症的受试者的说明书。

[0111] 实施例55.如实施例53和54中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该双特异性分子是IgG型单克隆抗体。

[0112] 实施例56.如实施例55所述的组合物或试剂盒,其中该单克隆抗体是IgG1或IgG3。

[0113] 实施例57.如实施例56所述的组合物或试剂盒,其中该IgG1单克隆抗体的Fc部分突变以增强CD16结合亲和力。

[0114] 实施例58.如实施例55和56中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该单克隆抗体选自抗HER2单克隆抗体、抗PDL-1单克隆抗体和抗EGFR单克隆抗体。

[0115] 实施例59.如实施例58所述的组合物或试剂盒,其中该IgG1(或IgG3)抗体是抗HER2单克隆抗体。

[0116] 实施例60.如实施例59所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是卵巢癌。

[0117] 实施例61.如实施例60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是透明细胞癌。

[0118] 实施例62.如实施例60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是子宫内膜样腺癌。

[0119] 实施例63.如实施例60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是粘液性腺癌。

[0120] 实施例64.如实施例60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是浆液性癌。

[0121] 实施例65.如实施例60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是间质瘤。

[0122] 实施例66.如实施例60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是生殖细胞瘤。

[0123] 实施例67.如实施例60所述的组合物或试剂盒,其中该卵巢癌是卵巢的小细胞癌。

[0124] 实施例68.如实施例59所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是胃癌。

[0125] 实施例69.如实施例59-68中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该抗HER2单克隆抗体选自曲妥珠单抗和马吉妥昔单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至

少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0126] 实施例70.如实施例69所述的组合物或试剂盒,其中该抗HER2单克隆抗体是曲妥珠单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90％序列同一性(例如,至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0127] 实施例71.如实施例58所述的组合物或试剂盒,其中该IgG1(或IgG3)抗体是抗EGFR单克隆抗体。

[0128] 实施例72.如实施例71所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是头颈癌。

[0129] 实施例73.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是口咽癌。

[0130] 实施例74.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是下咽癌。

[0131] 实施例75.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是喉癌。

[0132] 实施例76.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是唇和口腔癌。

[0133] 实施例77.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是鼻咽癌。

[0134] 实施例78.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是鼻旁窦癌。

[0135] 实施例79.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是唾液腺癌。

[0136] 实施例80.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是鳞状细胞颈癌。

[0137] 实施例81.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是鼻腔癌。

[0138] 实施例82.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是软组织肉瘤。

[0139] 实施例83.如实施例72所述的组合物或试剂盒,其中该头颈癌是甲状腺癌。

[0140] 实施例84.如实施例71所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是结直肠癌。

[0141] 实施例85.如实施例71-84中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该抗EGFR单克隆抗体选自西妥昔单抗、帕尼单抗和耐昔妥珠单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90％序列同一性(例如,至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0142] 实施例86.如实施例85所述的组合物或试剂盒,其中该抗EGFR单克隆抗体是西妥昔单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90％序列同一性(例如,至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0143] 实施例87.如实施例58所述的组合物或试剂盒,其中该IgG1(或IgG3)抗体是抗免疫检查点蛋白抗体。

[0144] 实施例88.如实施例87所述的组合物或试剂盒,其中该抗免疫检查点蛋白抗体选自抗PD-1单克隆抗体、抗PD-L1单克隆抗体和抗CTLA-4单克隆抗体。

[0145] 实施例89.如实施例88所述的组合物或试剂盒,其中该癌症选自尿路上皮癌、头颈癌、结直肠癌和胃癌。

[0146] 实施例90.如实施例89所述的组合物或试剂盒,其中该抗体是抗PD-L1单克隆抗体。

[0147] 实施例91.如实施例90所述的组合物或试剂盒,其中该抗PD-L1单克隆抗体是阿维

鲁单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0148] 实施例92.如实施例90和91中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是尿路上皮癌。

[0149] 实施例93.如实施例90和91中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是头颈癌。

[0150] 实施例94.如实施例90和91中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是结直肠癌。

[0151] 实施例95.如实施例90和91中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该癌症是胃癌。

[0152] 实施例96.如实施例89所述的组合物或试剂盒,其中该抗体是抗PD-1单克隆抗体。

[0153] 实施例97.如实施例96所述的组合物或试剂盒,其中该抗PD-1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗和多塔利单抗;并且任选地,其中该抗体与那些抗体相关的或本领域已知的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0154] 实施例98.如实施例89所述的组合物或试剂盒,其中该抗体是抗CTLA-4单克隆抗体。

[0155] 实施例99.如实施例98所述的组合物或试剂盒,其中该抗CTLA-4单克隆抗体是抗体伊匹单抗;并且任选地,其中该抗体与该抗体相关的或本领域已知的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0156] 实施例100.如实施例90所述的组合物或试剂盒,其中该抗PD-L1单克隆抗体选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、柯希利单抗和度伐利尤单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的那些抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0157] 实施例101.如实施例100所述的组合物或试剂盒,其中该抗PD-L1单克隆抗体是阿维鲁单抗;并且任选地,其中该抗体与本文披露的或本领域已知的抗体相关的SEQ ID NO.具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性),或具有这些SEQ ID NO.的序列。

[0158] 实施例102.如前述实施例中任一项所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞在该抗体之前施用。

[0159] 实施例103.如前述实施例中任一项所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞与该抗体同时施用。

[0160] 实施例104.如前述实施例中任一项所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞在该抗体之后施用。

[0161] 实施例105.如前述实施例中任一项所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞相对于正常NK细胞具有增加的CD16表达。

[0162] 实施例106.如实施例106所述的方法、组合物或试剂盒,其中这些记忆NK细胞相对于正常NK细胞增加的CD16表达持续至少30天。

[0163] 本文披露的且目前本文未要求保护的实施例并非旨在贡献给公众。

免疫效应细胞的扩增和引发方法

[0164] NK细胞的体外扩增可以在富集过程中进行,该过程使用扩增剂,该扩增剂包含细胞因子或者优选地含有细胞因子的功能片段的扩增融合蛋白及其多链复合物。例如,扩增剂可包含IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21中的一种或多种,或其组合,例如IL-7、IL-21和IL-15的混合物,其量足以产生所需数量或倍数扩增的NK细胞。此类细胞因子可以商业获得或通过本领域已知的方法制备。或者,例如,扩增剂可包含一种或多种扩增融合蛋白,例如,可选自WO 2020047299、WO202047473或WO 2020257639中披露的多链融合蛋白复合物,例如7t15-21s,其量足以扩增NK细胞。7t15-21s的序列披露于表1。

表1:示例性扩增融合蛋白链的序列

元件	WO'299 SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	序列
成熟 7t15	104	SEQ ID NO:1	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEI GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRA ARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTIL LNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKS LKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILM GTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEW EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQS FEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRD VFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEF LIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSP VECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLEL QVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNG NVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTS
成熟 21s	108	SEQ ID NO:2	QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVP EFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSAN TGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKH RLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIH QHLSSRTHGSEDSITCPPPMSVEHADIWVK SYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLN KATNVAHWTTPSLKCIR

[0165] 另外,通过使用交联剂(例如靶向上文披露的融合蛋白的连接结构域的抗体,例如抗组织因子抗体)可促进扩增。抗组织因子抗体的实例是本领域已知的。WO 202047473和WO 2020257639披露了所使用的a-TF Ab。还参见US 8,007,795和WO 2003037911,特别是包含H36杂交瘤的CDR以及人源化框架区LC-08(该申请图12)和HC-09(该申请的图13)的IgG1人源化抗体。下表2披露了a-TF Ab的序列,a-TF Ab据信在WO'473和WO'639中使用、在US'795和WO'911中披露、获自HCW生物制品公司(HCW Biologics)并在下文的实验中使用(除非另有陈述),在本文称为ATF1。ATF1 HCDR2是以下两个序列之一。因此,如本文披露的扩增剂可以包含一种或多种细胞因子的组合或如上披露的EFP与交联剂例如ATF1(其一个或多个序列披露于表2)。另外的抗TF抗体是本领域已知的,并且可以容易地从商业来源获得。

表2:示例性抗TF抗体("ATF1")的序列

a-TF 抗体元件	US'795 SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	序列
LC-CDR1	116	SEQ ID NO:3	LASQTIDTWLA
LC-CDR2	6	SEQ ID NO:4	AATNLAD
LC-CDR3	7	SEQ ID NO:5	QQVYSSPFT
LC-FR1	109	SEQ ID NO:6	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITC
LC-FR2	108	SEQ ID NO:7	WYLQKPGKSPQLLIY
LC-FR3	112	SEQ ID NO:8	GVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDFATYYC
LC-FR4	110	SEQ ID NO:9	FGQGTKLEIK
VL	n/a	SEQ ID NO:10	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCLASQTIDTWLAWYLQKPGKSPQLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDFATYYCQQVYSSPFT GQGTKLEIK
HC-CDR1	134	SEQ ID NO:11	DYNVY
HC-CDR2 (a)	9	SEQ ID NO:12	YIDPYNGITIYDQNFKG
HC-CDR2 (b)	101	SEQ ID NO:13	YIDPYNGITIYDQNLKG
HC-CDR3	10	SEQ ID NO:14	DVTTALDF
HC-FR1	129	SEQ ID NO:15	QIQLVQSGGEVKKPGASVRVSCKASGYSFT
HC-FR2	123	SEQ ID NO:16	WVRQSPGKGLEWIG

HC-FR3	126	SEQ ID NO:17	KATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYF CAR
HC-FR4	122	SEQ ID NO:18	WGQGTTVTVSS
VH-1	n/a	SEQ ID NO:19	QIQLVQSGGEVKKPGASVRVSCKASGYS FTDYNVYWVRQSPGKGLEWIGYIDPYN GITIYDQNFKGKATLTVDKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYFCARDVTTALDFWGQGTT VTVSS
VH-2	n/a	SEQ ID NO:20	QIQLVQSGGEVKKPGASVRVSCKASGYS FTDYNVYWVRQSPGKGLEWIGYIDPYN GITIYDQNLKGKATLTVDKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYFCARDVTTALDFWGQGTT VTVSS
IgG1 LC 恒定区	97	SEQ ID NO:21	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
IgG1 HC 恒定区	98	SEQ ID NO:22	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQEFASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKG+C7FYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[0166] 可替代的交联方法是本领域已知的,并且包括功能化微粒(珠)、饲养细胞和质膜颗粒。无饲养细胞系统通常是优选的。例如,研发系统公司(R&D Systems)Cloudz人NK细胞扩增试剂盒(采用用抗CD2和抗NKp46抗体功能化的可溶性海藻酸钠微球)可以与如本文披露的扩增细胞因子(或其片段,或包含其片段的融合蛋白)及其组合一起使用,并在扩增后与释放缓冲液一起用于快速溶解微粒,促进细胞收获。

[0167] 为获得记忆样特征而进行的引发是用引发剂进行的,该引发剂包含刺激性细胞因

子的组合,例如IL-12、IL-23、IL-27和IL-35中的一种或多种;IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21中的一种或多种;以及IL-18、IL-1a、IL-1b、IL-36a、IL-36b和IL-36g中的一种或多种。可替代地,引发剂可包含含有细胞因子的功能片段的引发融合蛋白及其多链复合物。例如,融合蛋白可以选自WO 2020047299、WO 202047473或WO 2020257639中披露的多链融合蛋白复合物,例如18t15-12s(HCW-9201),其序列披露于表3。

表3:示例性引发融合蛋白链的序列

元件	WO'299 SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	序列
成熟 18t15	70	SEQ ID NO:23	YFGKLESKLSVIRNLNMTDSDCRDNAPRTIFIISM YKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEM NPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYE GYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQN EDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQ VYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKD VKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFT PYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVR RNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAK TNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTD SPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSM HIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
成熟 12s	74	SEQ ID NO:24	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEE DGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT

			CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSG GGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQ NLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKD KTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLAS RKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQK SSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYL NASITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSG FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[0168] 因此,本文提供了记忆自然杀伤(NK)细胞,其依序地通过以下步骤产生:

a)纯化NK细胞群体;

b)引发NK细胞;以及

c)扩增这些NK细胞。

[0169] 本文还提供了记忆自然杀伤(NK)细胞,其依序地通过以下步骤产生:

a)纯化NK细胞群体;

b)扩增这些NK细胞;以及

c)引发这些NK细胞。

[0170] 本文还提供了记忆自然杀伤(NK)细胞,其通过以下产生:

a)纯化NK细胞群体;以及

b)同时引发和扩增这些NK细胞。

[0171] 在一些实施例中,NK细胞群体从供体血液、或新鲜的或先前冷冻保存的白细胞分离液开始纯化。在一些实施例中,纯化通过阳性选择进行(例如在美天旎公司(Miltenyi)CliniMACS Prodigy上进行)。在一些实施例中,纯化通过阴性选择进行(例如,通过StemCell公司EasySep NK细胞富集试剂盒进行)。在一些实施例中,纯化使用阳性选择和阴性选择的组合进行。在一些实施例中,NK细胞由淋巴祖细胞分化而来。

[0172] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于扩增剂来扩增,该扩增剂包含细胞因子组合或其功能片段、和/或包含其功能片段的融合蛋白、或任何前述的组合,以及任选地交联剂。

[0173] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于包含以下项的扩增剂来扩增:

• IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21中的一种或多种,或其功能片段;或者

• 包含IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21中的一种或多种的功能片段的融合蛋白;

以及任选地交联剂;或者

• 用NK细胞交联抗体和扩增细胞因子功能化的微球;

或任何前述的组合。

[0174] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于扩增剂来扩增,该扩增剂包含IL-7、IL-21和IL-15的组合,或其功能片段和/或包含其功能片段的融合蛋白,或任何前述的组合。

[0175] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于扩增剂来扩增,该扩增剂包含含有IL-7、IL-21和IL-15的功能片段的融合蛋白。

[0176] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于包含7t15-21s的扩增剂来扩增。

[0177] 在一些实施例中,扩增剂包含交联剂。在一些实施例中,交联剂是交联抗体。在一些实施例中,交联抗体是ATF1。

[0178] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于包含7t15-21s和ATF1的扩增剂来扩增。

[0179] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于扩增剂1天至40天来扩增。在一些实施例中,NK细胞通过暴露于扩增剂7天至21天来扩增。在一些实施例中,NK细胞通过暴露于扩增剂约14天来扩增。

[0180] 在一些实施例中,扩增剂包含7t15-21s和ATF1。在一些实施例中,扩增剂包含浓度0.1-300nM的7t15-21s和浓度0.01-200nM的ATF1。在一些实施例中,扩增剂包含浓度0.2-200nm的7t15-21s和浓度0.01-100nM的ATF1。在一些实施例中,扩增剂包含浓度约50nM的7t15-21s和浓度约25nM的ATF1。

[0181] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于7t15-21s和ATF1约14天来扩增。在一些实施例中,NK细胞通过暴露于浓度约50nM的7t15-21s和浓度约25nM的ATF1约14天来扩增。

[0182] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于引发剂来引发,该引发剂例如选自细胞因子组合或其功能片段、和/或包含其功能片段的融合蛋白、或任何前述的组合。

[0183] 在一些实施例中,NK细胞扩增至大于起始数量的10倍。在一些实施例中,NK细胞扩增至大于起始数量的100倍。在一些实施例中,NK细胞扩增至大于起始数量的1000倍。

[0184] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于包含以下项的引发剂来引发:

- IL-12、IL-23、IL-27和IL-35中的一种或多种;
- IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21中的一种或多种;以及
- IL-18、IL-1a、IL-1b、IL-36a、IL-36b和IL-36g中的一种或多种;

或其功能片段,和/或包含其功能片段的融合蛋白,或任何前述的组合。

[0185] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于包含IL-12、IL-15和IL-18的组合的引发剂来引发。

[0186] 在一些实施例中,NK细胞通过暴露于引发剂来引发,该引发剂包含含有IL-12、IL-15和IL-18的功能片段的融合蛋白。在一些实施例中,NK细胞通过暴露于包含融合蛋白18t15-12s的引发剂来引发。

[0187] 在一些实施例中,NK细胞用浓度200-300nM的18t15-12s引发。在一些实施例中,NK细胞用浓度250nM的18t15-12s引发。

[0188] 在一些实施例中,将NK细胞引发1分钟至24小时。在一些实施例中,将NK细胞引发0.5至16小时。在一些实施例中,将NK细胞引发1至3小时。

[0189] 在一些实施例中,NK细胞冷冻保存。

[0190] 在一些实施例中,记忆样表型由细胞表面CD69、CD25、CD16和/或NKG2A的表达水平指示。

[0191] 在一些实施例中,与未引发的NK细胞相比,记忆NK细胞具有以下一项或多项:

a)改善的针对癌细胞的细胞毒性;

b)改善的持久性;

c)改善的抗肿瘤活性;和/或

d)细胞因子的产生增加。

[0192] 在一些实施例中,产生的细胞因子选自IFNg、TNFa、GM-CSF及其组合。

[0193] 在以上列举的实施例中的任一项中,记忆NK细胞可进一步受这些前述实施例限制。

免疫效应细胞

[0194] 如本文披露的免疫效应细胞包括NK细胞及其亚型,例如记忆NK细胞、记忆样(ML)NK细胞和细胞因子诱导记忆样(CIML)NK细胞及其变体,其中任何一种可以源自多种来源,包括外周血或脐带血细胞、干细胞、诱导多能干细胞(iPSC)和永生化NK细胞,例如NK-92细胞。

[0195] NK细胞

[0196] 传统上认为自然杀伤(NK)细胞是通过靶向和消除异常或应激细胞而介导针对病原体的宿主防御和抗肿瘤免疫反应的先天免疫效应淋巴细胞,该靶向和消除不是通过抗原识别或先前的致敏,而是通过整合来自激活和抑制性受体的信号。自然杀伤(NK)细胞是用于同种异体细胞免疫疗法的T细胞替代物,因为它们施用安全而没有重大毒性,不会引起移植物抗宿主病(GvHD),其自然地识别和消除恶性细胞,并且可用于细胞工程。

记忆、记忆样和CIML NK细胞

[0197] 除了其固有的细胞毒性和免疫刺激活性外,NK细胞还构成异质且多功能的细胞亚群,包括持久记忆NK群体,在一些情况下也称为记忆样或细胞因子诱导记忆样(CIML)NK细胞,它们产生强烈的回忆反应。记忆NK细胞可以通过促炎细胞因子或激活受体通路的刺激自然或人工产生(“引发”)。通过细胞因子激活产生的记忆NK细胞已在临床上用于白血病免疫疗法的情况中。

[0198] 在体内分化的记忆NK细胞中已观察到CD56、Ki-67、NKG2A增加以及活化受体NKG2D、NKp30和NKp44增加。另外,体内分化显示CD16和CD11b的中值表达轻度降低。与ACT和BL NK细胞两者相比,在ML NK细胞中观察到TRAIL、CD69、CD62L、NKG2A和NKp30阳性NK细胞的频率增加,而CD27+和CD127+NK细胞的频率降低。最后,与体外分化的ML NK细胞不同,体内分化的ML NK细胞不表达CD25。

[0199] 细胞因子诱导记忆样自然杀伤细胞(CIML-NK)

[0200] 例如通过用细胞因子的组合(例如白细胞介素-12(IL-12)、IL-15和IL-18)引发(预激活)可以诱导NK细胞以获得记忆样表型。这些细胞因子诱导记忆样(CIML)NK细胞(CIML-NK或CIML)在用细胞因子再刺激或经由激活受体触发时表现出增强的反应。CIML NK细胞可通过用细胞因子(如IL-12、IL-15和IL-18)和/或其相关家族成员、或其功能片段、或包含其功能片段的融合蛋白激活而产生。

[0201] 与传统NK细胞相比,记忆NK细胞典型地表现出差异性细胞表面蛋白表达模式。此类表达模式是本领域已知的,并且可以包含例如CIML NK细胞中增加的CD56、CD56亚群CD56暗、CD56亚群CD56亮、CD16、CD94、NKG2A、NKG2D、CD62L、CD25、NKp30、NKp44和NKp46(与对照

NK细胞相比)(参见例如Romee等人Sci Transl Med.[科学转化医学]2016年9月21日;8(357):357)。记忆NK细胞也可以通过与异源NK细胞群体相比时观察到体外和体内特性(这些特性例如增强的效应功能(例如细胞毒性)、改善的持久性、增加的IFN-γ产生等)来识别。

抗体

[0202] 本文提供了包含本文披露的多肽的抗体。在一些实施例中,抗体包含本文披露的和/或本领域已知的轻链和重链、V_H链和V_L链或CDR组群。

[0203] 本文考虑了不同形式的披露的抗体。例如,抗体可以具有同种型IgA、IgD、IgE、IgG和IgM(更特别是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)的人框架和恒定区,并且在一些情况下具有改变Fc受体功能或防止Fab臂交换的不同突变,或者抗体片段,例如F(ab')2片段、F(ab)片段、单链Fv片段(scFv)等。

[0204] 在某些实施例中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。例如,还可以通过分离选自人源性噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生人抗体。然后,可以将这样的可变结构域序列与希望的人恒定结构域组合。

[0205] 如本文提供的抗体可以是嵌合抗体,例如包含非人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(如猴)的可变区)和人恒定区的嵌合抗体,或者是"类别转换"抗体,其中类别或亚类已经从亲本抗体的类别或亚类改变。

[0206] 如本文提供的抗体可以是人源化抗体。典型地,非人抗体经人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR(例如CDR)(或其部分)源自非人抗体,并且FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如HVR残基所源自的抗体)的对应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0207] 本文披露的抗体也可以是双特异性或三特异性的——即其包含含有本文披露的多肽中的一种的抗原识别结构域以及一个或多个与另一抗原结合的其他抗原识别结构域。例如,抗体的一个臂可以结合癌细胞上的抗原的多态物,并且另一个臂可以结合EGFR、HER-2或PD-L1或另一种癌细胞靶标。在三特异性抗体的实例中,抗体还将结合另一靶标(如CD16)以增强所募集的记忆NK细胞的活性。

[0208] 在一些实施例中,除了可变区之外,人源化抗体还包含人受体框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。可用于人源化的人框架区包括但不限于使用"最佳拟合"方法选择的框架区、源自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体共有序列的框架区、人成熟(体细胞突变的)框架区或人种系框架区、以及源自筛选FR文库的框架区。

[0209] 在某些实施例中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同的位点具有结合特异性的单克隆抗体。例如,结合特异性中的一种是针对EGFR、HER-2或PD-L1,并且另一种是针对任何其他抗原。在某些实施例中,双特异性抗体可以与同一抗原的两个不同表位结合。双特异性抗体也可用于将细胞毒性药剂定位至表达靶抗原的细胞。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段。用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达、"杵臼(knob-in-hole)"工程化、用于制备抗体Fc异二聚体分子的对静电导向作用的工程化、使

两个或更多个抗体或片段交联、使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体、使用“双抗体”技术制备双特性抗体片段、以及使用单链Fv(scFv)二聚体。

[0210] 考虑了本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能希望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过将适当的修饰引入编码该抗体的核苷酸序列或通过肽合成来制备。这样的修饰包括例如从抗体的氨基酸序列中缺失和/或在抗体的氨基酸序列中插入和/或取代抗体的氨基酸序列内的残基。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终的构建体,前提是该最终的构建体具有所希望的特征,例如抗原结合。

[0211] 用于取代性诱变的目的位点包括可变区和框架区。可以根据常见的侧链特性将氨基酸分组:

(1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、He;

(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gin;

(3)酸性:Asp、Glu;

(4)碱性:His、Lys、Arg;

(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;

(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0212] 可以将氨基酸取代引入目的抗体和针对希望的活性筛选的产物中,该活性例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性、改善的ADCC或CDC、和/或改变的药代动力学特性(如延长的半衰期)。保守取代是本领域已知的。此类取代的实例包括对Fc区的LS和YTE突变。非保守取代将需要将这些类别中的一个类别的成员交换为另一类别的成员。

[0213] 抗体还可以包含对聚糖链的修饰,从而取代某些残基,如Asn297。例如,可以将抗体工程化或处理为去岩藻糖基化以改善ADCC。

[0214] 本文披露的抗体及其他蛋白质和肽包含的氨基酸序列可以不同于本文披露的或本领域已知的它们的序列,例如与本文披露的或本领域已知的序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性)或具有本文披露的或本领域已知的序列的序列。在一些实施例中,重链、轻链、V_H结构域、V_L结构域和/或一个或多个CDR与所叙述的氨基酸序列之一具有至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0215] 包含本文披露的CDR、可变重链和轻链的抗体可以通过本领域已知的方法制备。例如,可以将可变抗体结构域克隆到IgG表达载体中(IgG转化)。可以将PCR扩增的重链和轻链V结构域的DNA片段框内插入到例如含有人IgG1恒定重链的受体哺乳动物表达载体中。抗体表达可由MPSV启动子驱动,并且转录可由位于CDS下游的合成聚A信号序列终止。

[0216] 可以使用重组方法和组合物产生抗体。提供了编码本文所述抗体的核酸。这样的核酸可以编码包含抗体的V_L的氨基酸序列和/或包含抗体的V_H的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。提供了包含这样的核酸(即用这样的核酸转化)的表达载体,以及包含这样的核酸的宿主细胞。在一个这样的实施例中,宿主细胞包含(1)包含编码包含V_L的氨基酸序列和包含V_H的氨基酸序列的核酸的载体,或(2)包含编码包含抗体V_L的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码包含抗体V_H的氨基酸序列的核酸的第二载体。

[0217] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适的宿主细胞包括本文所述的其他原核或

真核细胞。例如,可以在细菌(例如大肠杆菌(E.coli))中产生抗体,特别是当不需要糖基化和Fc效应功能时。除了原核生物外,真核微生物(如丝状真菌或酵母)是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,包括其糖基化通路已“人源化”的真菌和酵母菌株,从而产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。用于表达糖基化抗体的另外的合适的宿主细胞也源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒菌株,它们可以与昆虫细胞结合使用,特别是用于转染草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。也可以使用植物细胞培养物作为宿主。在一些实施例中,宿主细胞可以是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。可以在适用于表达的条件下培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,并从宿主细胞或培养基中回收抗体。

[0218] 在一些实施例中,本文提供的抗体的解离常数(Kd)为<1μM、<100nM、<50nM、<10nM、<5nM、<1nM、<0.1nM、<0.01nM或<0.001nM,并且任选地为>10^{-13}M(例如10^{-8}M或更低,例如10^{-8}M至10^{-13}M,例如10^{-9}M至10^{-13}M)。在一个实施例中,通过利用目的抗体的Fab形式及其抗原进行的放射性标记的抗原结合测定(RIA)或者使用表面等离子体共振测定(例如WO 2015089344)来测量Kd。

[0219] 根据本文披露的方法和/或作为本文披露的药物组合物或免疫治疗组合物或试剂盒的一部分施用的抗体包括抗EGFR抗体、抗HER2抗体、抗VEGFR2抗体和抗PD-L1抗体,以及相关化合物,诸如结合这些中的一种或多种并且任选地还结合NK细胞抗原的多特异性抗体。这些抗体中每一种的临床阶段实例在下文给出;许多更多的临床前阶段的生物药物候选抗体和相关化合物是本领域已知的并且处于不同开发阶段。

[0220] 抗EGFR抗体包括西妥昔单抗、帕尼单抗和耐昔妥珠单抗。在一些实施例中,抗EGFR抗体选自帕尼单抗、耐昔妥珠单抗。

[0221] 抗HER2抗体包括曲妥珠单抗(及其Fc糖基工程改造的对应物,替加珠单抗(timigutuzumab))、马吉妥昔单抗,和根据一些定义,帕妥珠单抗(pertuzumab)。在一些实施例中,该抗HER-2抗体选自曲妥珠单抗和马吉妥昔单抗。

[0222] 检查点抑制剂是抑制免疫检查点例如PD-1、PD-L1和CTLA-4的化合物。抗PD-1抗体包括纳武单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗和多塔利单抗。抗PD-L1抗体包括阿替利珠单抗、阿维鲁单抗和度伐利尤单抗。抗CTLA-4抗体包括伊匹单抗。在一些实施例中,抗体选自这些中的一种。在一些实施例中,抗体是抗PD-L1抗体,例如阿维鲁单抗。

[0223] 抗VEGFR2抗体包括雷莫芦单抗(ramucirumab)。在一些实施例中,该抗VEGFR2抗体是雷莫芦单抗。

[0224] 下文提供了本领域已知的所选临床阶段抗体的序列。

西妥昔单抗

[0225] 西妥昔单抗及其制备方法可见于例如WO 2011059762 A1,其特此通过援引以其全文并入。

重链CDR-西妥昔单抗

HCDR1	HCDR2	HCDR3
NYGVH（SEQ ID NO:25）	VIWSGGNTDYNTPFTS（SEQ ID NO:26）	ALTYYDYEFAY（SEQ ID NO:27）

轻链CDR-西妥昔单抗

LCDR1	LCDR2	LCDR3
RASQSIGTNIH（SEQ ID NO:28）	YASESIS（SEQ ID NO:29）	QQNNNWPTT（SEQ ID NO:30）

重链（HC）	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMN SLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO:31）
轻链（LC）	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSP RLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQ QNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C（SEQ ID NO:32）

帕尼单抗

[0226] 帕尼单抗及其制备方法可见于例如美国专利号6,235,883和7,807,798,其特此通过援引以其全文并入。

重链CDR-帕尼单抗

HCDR1	HCDR2	HCDR3
SGDYYWT（SEQ ID NO:33）	HIYYSGNTNYNPSLKS（SEQ ID NO:34）	RVTGAFDI（SEQ ID NO:35）

轻链CDR-帕尼单抗

LCDR1	LCDR2	LCDR3
QASQDISNYLN（SEQ ID NO:36）	DASNLET（SEQ ID NO:37）	QHFDHLPLA（SEQ ID NO:38）

重链（HC）	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQS PGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSS VTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD
	KTVERKC（SEQ ID NO:39）
轻链（LC）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYF CQHFDHLPLAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （SEQ ID NO:40）

马吉妥昔单抗

[0227] 马吉妥昔单抗及其制备方法可见于例如WO 2021133653 A1,其特此通过援引以其全文并入。

重链CDR-马吉妥昔单抗

HCDR1	HCDR2	HCDR3
DTYIH（SEQ ID NO:41）	RIYPTNGYTRYDPKFQD（SEQ ID NO:42）	WGGDGFYAMDY（SEQ ID NO:43）

轻链CDR-马吉妥昔单抗

LCDR1	LCDR2	LCDR3
KASQDVNTAVA（SEQ ID NO:44）	SASFRYT（SEQ ID NO:45）	QQHYTTPPT（SEQ ID NO:46）

重链（HC）	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQ GLEWIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLT SEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELVGGPSVFLLPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYN STLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV

	MHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO:47）
轻链（LC）	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGH SPKLLIYSASFRYTGVPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLAVYY CQQHYTTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （SEQ ID NO:48）

阿维鲁单抗

[0228] 阿维鲁单抗及其制备方法可见于例如US11,274,154,其特此通过援引以其全文并入。

重链CDR-阿维鲁单抗

HCDR1	HCDR2	HCDR3
SYIMM（SEQ ID NO:49）	SIYPSGGITFY（SEQ ID NO:50）	IKLGTVTTVDY（SEQ ID NO:51）

轻链CDR-阿维鲁单抗

LCDR1	LCDR2	LCDR3
TGTSSDVGGYNYVS（SEQ ID NO:52）	DVSNRPS（SEQ ID NO:53）	SSYTSSSTRV（SEQ ID NO:54）

重链（HC）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAP GKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
	KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO:55）
轻链（LC）	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS（SEQ ID NO:56）

耐昔妥珠单抗

[0229] 耐昔妥珠单抗及其制备方法可见于本领域中。

重链（HC）	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQP PGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLK VNSVTAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO:57）
轻链（LC）	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCHQYGSTPLTFGGGTKAEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC（SEQ ID NO:58）

曲妥珠单抗

[0230] 曲妥珠单抗及其制备方法可见于本领域中。

重链（HC）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO:59）
轻链（LC）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC（SEQ ID NO:60）

[0231] 另外的抗EGFR抗体、抗HER-2抗体、抗VEGFR2抗体和抗检查点抑制剂抗体(例如抗PD-L1抗体抗PD-1抗体)是本领域已知的并且可以从商业来源获得。

当与靶向肿瘤的mAb一起施用时增强NK细胞应答的策略

[0232] 本领域已知许多方法在与靶向癌抗原的mAb组合施用时增强NK细胞应答。这些包括队抗体Fc区的遗传操纵或糖基工程改造以调节它们与Fc γ R家族的活化和抑制成员的相互作用。实例包括在阿替利珠单抗中使用的A297N突变,在IgG1重链的铰链区(例如,在G237和G238之间)插入短序列如(GGGS),和其他改变,或去除岩藻糖残基,增加IgG对CD16的亲和力并引起增强的NK细胞介导的ADCC和/或多个mAb包被的靶细胞的连续杀伤。另一种方法牵涉采用靶向同一抗原的两个或更多个不同表位的多特异性抗体。

[0233] NK细胞接合物和三特异性杀伤细胞接合物(TriKE)。NK细胞接合物(NKCE)是结合NK细胞表面抗原(例如CD16)和癌细胞抗原(包括但不限于HER2、EGFR或PD-L1)并诱导NK细胞的细胞毒性的双特异性多肽。在一些实施例中,NK细胞接合物是双特异性单克隆抗体。TriKE是结合NK细胞表面抗原(例如CD16)和两种不同的癌细胞抗原(包括但不限于HER2、EGFR、CD33或PD-L1)并诱导NK细胞的细胞毒性的三特异性多肽。

药物组合物和治疗方法

[0234] 还披露了药物组合物或免疫治疗组合物,其包含在药学上可接受的载剂中的所披露的物质组成。药物载剂是本领域技术人员已知的。这些最典型地将是用于向人施用药物

的标准载剂,包括溶液如无菌水、盐水和生理pH缓冲溶液。典型地,在配制品中使用适当量的药学上可接受的盐以赋予该配制品等渗性。药学上可接受的载剂的实例包括但不限于盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。溶液的pH优选为约5至约8,并且更优选地为约7至约7.5。溶液应不含RNA酶。另外的载剂包括缓释制剂,如含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透性基质,这些基质呈成形制品的形式,例如薄膜、脂质体或微粒。对本领域技术人员来说将显而易见的是,某些载剂可以是更优选的,这取决于例如施用途径和所施用组合物的浓度。

[0235] 除了选择的分子之外,药物组合物还可以包括载剂、增稠剂、稀释剂、缓冲液、防腐剂、表面活性剂等。药物组合物还可以包括一种或多种活性成分,如抗微生物剂、抗炎剂、麻醉剂等。

[0236] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)和可注射有机酯(如油酸乙酯)。水性载剂包括水、醇/水性溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于林格氏右旋糖的那些)等。也可以存在防腐剂和其他添加剂,例如像抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0237] 组合物可通过例如静脉内输注或适于递送活细胞和抗体治疗剂的任何其他方法(一起或分开)施用。

治疗应用

[0238] 本文披露的NK细胞可用于治疗增殖性疾病(例如癌症和骨髓增生异常综合征)或预防其进展。癌症可以是血液恶性肿瘤或实体瘤。

[0239] 血液恶性肿瘤包括白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、及其亚型。淋巴瘤可以通过各种方式进行分类,通常基于潜在的恶性细胞类型进行分类,包括霍奇金淋巴瘤(通常是里德-斯滕伯格(Reed-Sternberg)细胞的癌症,但有时也起源于B细胞;所有其他淋巴瘤均是非霍奇金淋巴瘤)、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、以及如本文定义的和本领域已知的其他淋巴瘤。骨髓增生异常综合征包含一组影响未成熟的白细胞和/或造血干细胞(HSC)的疾病;MDS可能进展为AML。

[0240] B细胞淋巴瘤包括但不限于弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)/小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、以及如本文定义的和本领域已知的其他B细胞淋巴瘤。

[0241] T细胞淋巴瘤包括T细胞急性淋巴母细胞白血病/淋巴瘤(T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)、T细胞慢性淋巴细胞白血病(T-CLL)、塞扎里综合征、以及如本文定义的和本领域已知的其他T细胞淋巴瘤。

[0242] 白血病包括急性髓性(或骨髓性)白血病(AML)、慢性髓性(或骨髓性)白血病(CML)、急性淋巴细胞(或淋巴母细胞)白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(有时被分类为淋巴瘤)、以及如本文定义的和本领域已知的其他白血病。

[0243] 浆细胞恶性肿瘤包括淋巴浆细胞性淋巴瘤、浆细胞瘤和多发性骨髓瘤。

[0244] 实体瘤包括黑色素瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤或癌,例如脑、头颈、乳腺、肺(例如非小细胞肺癌,NSCLC)、生殖道(例如卵巢)、上消化道、胃食管腺癌(GEA,也称为肠癌、结肠癌或直肠癌)、胰腺、肝脏、肾系统(例如肾脏)、膀胱、前列腺和结直肠的肿瘤。

[0245] 头颈癌包括头颈部鳞状细胞癌(SCCHN,由上呼吸消化道产生的异质类上皮肿瘤)、

软组织肉瘤、鼻咽癌、喉癌、鼻旁窦癌、唾液腺癌和鼻腔癌。

[0246] 包含本文披露的记忆NK细胞和mAb的治疗及治疗组合物(包括免疫治疗组合物)和试剂盒可以以任何顺序或同时施用。

[0247] 本文所述的方法通常在有需要的受试者上进行。需要本文所述的治疗性方法的受试者可以是患有、诊断出患有、怀疑患有癌症,或有发展为癌症的风险,或有进展到癌症后期的风险的受试者。治疗需求的确定将典型地通过病史、身体检查或与具有争议的疾病或病况相符的诊断测试来评估。通过本文所述的方法可治疗的各种病况的诊断在本领域的技术范围内。受试者可以是动物受试者,包括哺乳动物,如马、牛、狗、猫、绵羊、猪、小鼠、大鼠、猴、仓鼠、豚鼠和人,或者其他动物,如鸡。例如,受试者可以是人受试者。通常,疗法(例如记忆NK细胞与抗癌单克隆抗体组合)的安全有效量是例如将在受试者中引起希望的治疗效果同时最大程度减少不希望的副作用的量。

[0248] 根据本文所述的方法,施用可以是肠胃外、肺、口服、局部、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、肿瘤内、鞘内、颅内、侧脑室内、皮下、鼻内、硬膜外、眼、口腔或直肠施用。例如,在产品是生物疗法或细胞疗法的情况下,施用模式将可能是经由静脉内注射或输注。

定义

[0249] 除非另有定义,否则结合本披露使用的科技术语应当具有本领域的普通技术人员通常所了解的含义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。总体而言,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、以及蛋白质和寡聚体或多核苷酸化学及杂交学结合使用的命名法及其技术是本领域中熟知并且常用的那些。

[0250] 如本文所用,术语“抗体”是指包括经典免疫球蛋白序列元件(足以赋予特异性结合或例如免疫反应)和/或针对特定靶抗原的多肽。如本领域所知,天然产生的完整抗体是大约150kD的四聚体药剂,该四聚体药剂由彼此缔合成通常称为“Y形”结构的两条相同的重链多肽(各约50kD)和两条相同的轻链多肽(各约25kD)构成。每条重链由至少四个结构域(各长约110个氨基酸)构成:氨基末端可变(V_H)结构域,随后是三个恒定结构域:C_H1、C_H2、以及羧基末端C_H3。被称为“开关”的短区域连接重链可变区和恒定区。“铰链”将C_H2和C_H3结构域连接至抗体的其余部分。该铰链区的两个二硫键将完整抗体中的两条重链多肽连接至彼此。每条轻链由两个结构域构成:氨基末端可变(V_L)结构域,随后是羧基末端恒定(C_L)结构域,它们由另一“开关”彼此隔开。完整的抗体四聚体由两个重链-轻链二聚体构成,其中重链和轻链由单个二硫键连接至彼此;其他两个二硫键将重链铰链区连接至彼此,使得二聚体彼此连接并形成四聚体。天然产生的抗体也经糖基化,典型地在C_H2结构域上。天然抗体中每个结构域的结构特征在于由两个β片(例如,3-、4-或5-链片)形成的“免疫球蛋白折叠”,这些β片在压缩的反平行β桶中相对彼此封装。每个可变结构域含有三个被称为“互补决定区”(CDR1、CDR2和CDR3)的高变环和四个稍微不变的“框架”区(FR1、FR2、FR3和FR4)。当天然抗体折叠时,FR区形成为结构域提供结构性框架的β片,并且使来自重链和轻链的CDR环区域在三维空间中聚集在一起,使得它们在Y结构的尖端产生单个高变抗原结合位点。天然存在的抗体的Fc区与补体系统的元件结合,并且也与效应细胞(包括例如介导细胞毒性的效应细胞)上的受体结合。

[0251] “抗体片段”是指并非为完整抗体的分子,其包含结合完整抗体所结合的抗原的完整抗体的一部分。抗体片段的几个实例包括但不限于Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)2、双抗

体、线性抗体、单链可变片段(scFv)和由抗体片段形成的多特异性抗体。在一些实施例中,抗体片段是抗原结合片段。

[0252] 当前用于抗体工程化和改善的方法的综述可见于R.Kontermann和S.Dubel,(2010)Antibody Engineering[抗体工程化]第1卷和第2卷,Springer Protocols[施普林格方案],第2版以及W.Strohl和L.Strohl(2012)Therapeutic antibody engineering:Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry[治疗性抗体工程化:驱动制药工业中的最强增长区域的当前和未来进展],Woodhead Publishing[伍德海德出版社]。用于产生和纯化抗体和抗原结合片段的方法在本领域是熟知的,并且可以见于Harlow和Lane(1988)Antibodies:ALaboratory Manual[抗体:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约,第5-8和15章。

[0253] 术语“抗原”是指可以是可溶性或特别地细胞膜结合的分子实体,但不限于可通过适应性免疫系统识别的分子实体,该系统包括但不限于抗体或TCR,或工程化分子,这些工程化分子包括但不限于转基因TCR、嵌合抗原受体(CAR)、scFv或其多聚体、Fab片段或其多聚体、抗体或其多聚体、单链抗体或其多聚体、或任何其他能够以高亲和力与结构实现结合的分子。

[0254] 如本文所用,术语“结合亲和力”是指一个分子在该分子上的一个位点处结合到另一个分子上的强度。如果特定的分子将结合到另一个特定的分子上或者与之特异性地缔合,则这两个分子被称为对彼此表现出结合亲和力。结合亲和力与一对分子的缔合常数和解离常数有关,但这些常数单独测量或确定对于本文的这些方法不是关键的。相反,用来描述在这些所述方法的分子之间的相互作用的如本文所用的亲和力通常是在经验研究中观察到的表观亲和力(除非另有说明),其可以用来比较一个分子(例如,抗体或其他特异性结合配偶体)将藉此结合两个其他分子(例如,肽的两种形式或变体)的相对强度。结合亲和力、缔合常数、和解离常数的概念是熟知的。

[0255] 术语“癌症”在医学上被称为恶性赘生物。癌症是涉及细胞生长上调的一组广泛的疾病。在癌症中,细胞(癌性细胞)不受控制地分裂和生长,形成恶性肿瘤,并侵入身体附近部位。癌症也可能通过淋巴系统或血流扩散到体内更远的部位。已知有200多种不同的影响人的癌症。

[0256] 术语“化疗”是指使用一种或多种细胞毒性抗瘤药物(“化疗剂”或“化疗药物”)作为标准化方案的一部分治疗癌症(癌性细胞)。化疗的给予可以具有治愈性意图,或者其可以旨在延长寿命或减轻症状。它通常与其他癌症治疗(如放疗、手术和/或高温热疗)结合使用。传统的化疗剂通过杀伤快速分裂的细胞来发挥作用,快速分裂是大多数癌细胞的主要特性之一。这意味着化疗也会伤害在正常情况下快速分裂的细胞,如骨髓、消化道和毛囊中的细胞。这导致化疗最常见的副作用,如骨髓抑制(减少血细胞的产生,因此也导致免疫抑制)、黏膜炎(消化道衬里的炎症)和脱发(毛发损失)。

[0257] 术语“组合免疫疗法”是指共同应用两种治疗方法,例如本领域已知的用于治疗疾病(如癌症)的治疗方法。术语“组合免疫疗法”也可指共同应用免疫疗法(如使用抗原识别受体进行治疗)和另一种疗法,如NK细胞(例如记忆NK细胞)的移植。抗原在细胞上的表达意指抗原充分存在于细胞的细胞表面上,使得其可以被抗原识别受体检测、结合和/或识别。

[0258] 涉及NK细胞的术语“细胞因子诱导记忆样”(或相当于“CIML”)意指具有“记忆”或“记忆样”表型并且是使用引发剂产生的。

[0259] 如本文所用,涉及记忆NK细胞的术语“细胞毒性”是指细胞靶向并杀伤患病细胞的能力。

[0260] “患病细胞”是指细胞、组织或生物体的状态与正常或健康状态不同,并且可由病原体、有毒物质、辐照或细胞内部失调的影响导致。“患病细胞”也可以指已感染致病性病毒的细胞。此外,术语“患病细胞”可以指在个体中可能构成或引起癌症的恶性细胞或瘤细胞。

[0261] 如本文所用,术语“工程化细胞”和“基因修饰的细胞”可以互换地使用。该术语意指含有和/或表达外来基因或核酸序列,或含有已被基因修饰以偏离其天然形式或功能的基因(例如缺失或敲除的基因),该基因进而修饰基因型或细胞或其后代的表型。可以通过本领域熟知的重组方法来修饰细胞,以稳定地或瞬时地表达肽或蛋白质,在天然状态下这些肽或蛋白质在这些细胞中不表达。细胞的基因修饰方法可以包括但不限于转染,电穿孔,核转染,使用逆转录病毒载体、慢病毒载体、非整合逆转录病毒或慢病毒载体的转导,转座子,设计核酸酶(包括锌指核酸酶、TALEN或CRISPR/Cas核酸酶)。

[0262] 如本文所用,与NK细胞相关的术语“富集”意指浓缩、纯化或分离以供进一步分析或使用。富集和纯化的细胞群体包含大部分所需细胞和可忽略不计的其他细胞。

[0263] 如本文所用,术语“选择性倍数”意指对一种靶标的亲和力比其对另一靶标的亲和力大至少x倍,其中x至少是2,并且可以更高,例如10、20、50、100或1000。在优选的实施例中,选择性倍数在治疗上是有意义的,即,足以允许杀伤表达一种靶标的细胞而保留携带另一种靶标的细胞。

[0264] 术语“基因修饰”或“基因修饰的”是指核酸(包括但不限于细胞的基因组DNA)含量的改变。这包括但不限于通过引入、交换或缺失核酸序列的单个核苷酸或片段来改变细胞基因组DNA序列。该术语还指将核酸向细胞内的任何引入,其与是否导致细胞基因组DNA序列的直接或间接改变无关。

[0265] 术语“免疫细胞”或“免疫效应细胞”是指可以是免疫系统的一部分并执行特定效应功能的细胞,如α-βT细胞、NK细胞(包括记忆NK、ML-NK和CIML-NK)、NKT细胞(包括iNKT细胞)、B细胞、先天淋巴细胞(ILC)、细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞、淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞、γ-δT细胞、间充质干细胞或间充质基质细胞(MSC)、单核细胞和巨噬细胞。优选的免疫细胞是具有细胞毒性效应功能的细胞,如α-βT细胞、NK细胞(包括记忆NK、ML-NK和CIML-NK)、NKT细胞(包括iNKT细胞)、ILC、CIK细胞、LAK细胞或γ-δT细胞。“效应功能”意指细胞的特殊功能,例如在NK细胞中,效应功能可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括分泌细胞因子。

[0266] 术语“免疫疗法”是定义为“通过诱导、增强或遏制免疫反应来治疗疾病”的医学术语。经设计以引发或放大免疫反应的免疫疗法被分类为激活免疫疗法,而减少或遏制免疫反应的免疫疗法则被分类为遏制免疫疗法。作为激活免疫疗法的癌症免疫疗法试图刺激免疫系统以排斥和破坏肿瘤。过继细胞转移使用基于细胞的细胞毒性反应来攻击癌细胞。在体外产生对患者的癌症具有天然或基因工程化反应性的免疫细胞(如T细胞),然后将其转移回癌症患者体内。

[0267] 如本文所用,术语“个体”是指动物。优先地,个体是哺乳动物,如小鼠、大鼠、牛、

猪、山羊、鸡、狗、猴或人。更优先地,个体是人。个体可以是患有疾病(如癌症)的个体(患者),但是受试者也可以是健康受试者。术语“恶性”或“恶性肿瘤”描述了构成赘生物的细胞、细胞群或组织,其源自赘生物或者可能是新的瘤细胞的来源。该术语用于描述与组织的正常或健康细胞形成对比的瘤细胞。恶性肿瘤与非癌性良性肿瘤的对比在于,恶性肿瘤的生长不受自身限制,能够侵入相邻组织,并可能能够扩散到远端组织。良性肿瘤没有这些特性。恶性肿瘤的特征是间变、侵袭性和转移以及基因组不稳定性。术语“癌前细胞”是指尚非恶性但即将变为恶性的细胞或组织。

[0268] 术语“记忆”或“记忆样”涉及NK细胞时意指与一般NK细胞群体相比,具有激活的表型(该表型具有改善的细胞毒性和寿命/持久性),并且与一般NK细胞群体相比通常表现出细胞表面CD69、CD25和NKG2A表达增加且CD16表达维持不变。

[0269] 如应用于本披露中所述的抗体的术语“单克隆抗体”(mAb)是源自任何真核、原核或噬菌体克隆的单个拷贝或克隆的化合物,而不是其产生方法。本披露的mAb能以均质或基本上均质的群体存在。

[0270] 本文所用的术语“持久性”是指细胞(尤其是过继转移到受试者中的细胞)持续存活的能力。

[0271] 术语“多肽”、“肽”以及“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。这些术语还应用到氨基酸聚合物上,其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在氨基酸的人工化学模拟物,并且应用到天然存在的氨基酸聚合物以及非天然存在的氨基酸聚合物上。

[0272] 涉及NK细胞的术语“引发”意指使用引发剂刺激或激活记忆/记忆样表型。“引发剂”包含刺激性细胞因子的组合,例如,

- IL-12、IL-23、IL-27和IL-35中的一种或多种;
- IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21中的一种或多种;以及
- IL-18、IL-1a、IL-1b、IL-36a、IL-36b和IL-36g中的一种或多种,

或一种或多种包含此类细胞因子的功能片段的“引发融合蛋白”,或其一种或多种多链复合物。本文披露了此类蛋白的实例。

[0273] 通常,术语“受体”是指如下生物分子,其可以是可溶性的或附接至细胞表面膜上,并特异性结合限定的结构,该结构可附接至细胞表面膜上或是可溶性的。受体包括但不限于抗体和抗体样结构、黏附分子、转基因或天然存在的TCR或CAR。如本文所用,术语“抗原识别受体”或“抗原结合受体”可以是膜结合受体或可溶性受体,如天然TCR、转基因TCR、CAR、scFv或其多聚体、Fab片段或其多聚体、抗体或其多聚体、双特异性T细胞增强物(BiTE)、双抗体或任何其他能够以高亲和力实现特异性结合的分子。

[0274] 关于抗原识别受体,术语“特异性结合”或“对……具有特异性”或“特异性识别”是指该抗原识别受体的抗原结合结构域,其识别并结合抗原的特异性多态性变体,但基本上不识别或结合其他变体。

[0275] 术语“副作用”是指除所希望的治疗结果外,使用抗原识别受体的免疫疗法出现的任何并发症、不想要的或病理性结果。术语“副作用”优先是指在细胞上存在靶抗原的情况下,在免疫疗法期间可能发生的中靶脱肿瘤毒性,该细胞是表达抗原的非靶细胞,但不是如本文所述的患病细胞。免疫疗法的副作用可能是移植物抗宿主病的发展。

[0276] 术语“靶标”或“靶抗原”是指靶细胞表面上存在的任何细胞表面蛋白、糖蛋白、糖脂或任何其他结构。该术语还指特别地存在于靶细胞上任何其他结构,但不限于可通过适应性免疫系统识别的结构,该适应性免疫系统包括但不限于抗体或TCR,或工程化分子,这些工程化分子包括但不限于转基因TCR、CAR、scFv或其多聚体、Fab片段或其多聚体、抗体或其多聚体、单链抗体或其多聚体、或任何其他能够以高亲和力与结构实现结合的分子。

[0277] 如本文所用,术语“靶细胞”是指由应用或将应用于个体的抗原识别受体识别的细胞。

[0278] 术语“治疗有效量”意指提供治疗性益处的量。

[0279] 如本文所用,术语“移植”意指向受试者施用供体细胞群体,例如NK细胞群体。

[0280] 如本文所用,术语“治疗”意指降低疾病的至少一种体征或症状的频率或严重程度。

实例

[0281] 本发明进一步通过以下实例说明。

实例1.记忆NK细胞的体外培养

[0282] 材料和方法:记忆NK细胞可以如WO 2020047299、WO 202047473或WO 2020257639中披露描述的那样或通过本领域已知的方法产生。

[0283] 可替代地,可以如下产生记忆NK细胞。可以使用CD3耗竭和CD56阳性选择从全血中分离NK细胞。然后将选择的NK细胞在96孔板中在NK MACS培养基+补充剂+10% HI-HAB中培养,并在以下条件下引发/扩增,其中1x 7t15-21s和ATF1分别为200nM和100nM,并且1x 18t15-12s为250nM;所有稀释度均根据所示的这些值计算。

a)仅扩增:+7t15-21s和ATF1在37度、5% CO2和指定浓度下持续2、6或10天。随后每2天,用新鲜培养基将7t15-21s和ATF1补充至指定浓度。

b)引发和扩增:+18t15-12s在37度、5% CO2和指定浓度下持续2、6或10天。随后每2天,用新鲜培养基将7t15-21s和ATF1补充至指定浓度。

实例2.记忆NK细胞的表型分析

[0284] 为了评估通过上述过程产生的NK细胞的表型,在适当的时间点,将NK细胞收获、洗涤,并通过使用包含纯度和/或激活标记(例如抗CD56、抗CD3、Live/Dead Yellow、抗NKG2A、抗CD69、抗CD25和抗CD16)的流式板染色来评估受体表达。使用以下克隆:

- 抗CD45(HI30克隆)
- 抗CD56(CMSSB克隆)
- 抗CD3(SK7克隆)
- Live/Dead Yellow(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher))
- 抗NKG2A(REA110克隆)
- 抗CD69(FN50克隆)
- 抗CD25(CD25-4E3克隆)
- 抗CD16(eBioCD16克隆)

[0285] 使用Attune NXt流式细胞仪。然后在Flowjo v10.7中分析数据,对活CD56+CD3-细胞进行门控并评估每个上述标记的中值荧光强度。CD69、CD25和NKG2A表达增加以及CD16表达维持不变指示记忆NK细胞表型。

实例3.记忆NK细胞的ADCC

[0286] 为了评估通过上述过程产生的NK细胞的杀伤活性,在适当的时间点,将培养的NK细胞收获并洗涤,然后重悬于含有10％人AB血清(吉博科公司(Gibco))的NK MACS培养基中,并可以指定的效:靶(E:T)比添加到96孔板中24-48小时,板中含有10,000个荧光素酶表达人肿瘤细胞(ATCC),含或不含IL-2(美天旎公司),之后通过荧光素酶读数(普洛麦格公司(Promega))评估荧光素酶活性(活肿瘤细胞)。数据未显示。

[0287] 结果:本实例可以用于展示通过上述过程产生的NK细胞的体外活性和流式细胞术表型。可以跟踪单个基因的表面蛋白表达、细胞大小和中值荧光强度的累积倍数变化。与正常NK细胞相比,记忆NK细胞表现出增加的ADCC。

实例4.使用IncuCyte的体外ADCC细胞毒性测定

[0288] 使用NucLight Red慢病毒试剂(NLR;埃森生物科技公司(Essen BioScience)),用红色荧光蛋白转导头颈癌细胞系(SCC-25)或卵巢细胞系(SKOV-3)。对于肿瘤细胞杀伤的动力学分析,将每个NLR转导的细胞系分别以3×10^3或4×10^3个细胞/孔的浓度单独接种在96孔平底板中,并在加湿培养箱中孵育过夜。第二天,以0.5:1至10:1范围的效:靶(E:T)比添加NK细胞。西妥昔单抗和曲妥珠单抗也分别以1ug/ml和3ug/ml的浓度添加。所有共培养在各自的靶细胞培养基和100U/ml人IL-2中进行。通过频繁荧光成像(每3小时)监测活细胞数72小时,通过IncuCyte S3软件(埃森生物科技公司)定量,并相对于仅靶细胞对照组中剩余的活细胞数进行归一化。结果示于图1、图2和图3中。

实例5.记忆NK细胞持久性和CD16的表面表达

[0289] 使用THP-1细胞模型在急性髓性白血病(AML)模型中评估记忆NK细胞的抗肿瘤活性和持久性。将THP-1细胞(ATCC TIB-202)工程化以表达绿色荧光蛋白(GFP)和叩头虫红荧光素酶(CBR),以允许通过使用IVIS成像仪测量全身生物发光(BLI)来监测肿瘤负荷。经由静脉注射到尾静脉中将THP-1-CBR-GFP细胞(2×10^5个细胞/只小鼠)接种于雌性NSG小鼠(杰克逊实验室(Jackson Labs);n＝5只/组)。使肿瘤移植3天,之后用媒介物或记忆NK细胞(1×10^7个细胞/只小鼠)经由尾静脉注射处理。肿瘤进展后在异氟烷麻醉下进行全身生物发光(BLI)测量。使用EDTA抗凝剂通过颌下静脉血获得的血样与适当的抗体荧光团缀合物[CD16 PerCP-eF710(赛默飞世尔46-0168-42)、CD45 APC-eF780(赛默飞世尔47-0459-42)、mCD45 BV421(BD生物科学563890)、Viability Live/Dead Yellow(赛默飞世尔L34968)、CD3 SB780(赛默飞世尔78-0036-42)、CD56PE-Cy7(赛默飞世尔25-0567-42)、小鼠CD16/32Fc阻断剂(百进生物科技公司(BioLegend)156604)]在冰上在染色缓冲液(DPBS+2％ HI-FBS+2mM EDTA)中孵育30分钟。染色的血样用染色缓冲液洗涤,然后与固定/透化缓冲液(赛默飞世尔00-5123-43)孵育以裂解红细胞并固定样品。裂解后,用染色缓冲液洗涤样品,并在Attune NxT流式细胞仪(赛默飞世尔)上获取数据。在FCS Express 7软件上进行分析。使用样品CountBright绝对计数珠(赛默飞世尔C36950)将群体密度定量为细胞数/mL血液。结果示于图4和图5中。

[0290] CD16(Fcγ RIII)是Fc受体,其将单克隆抗体的Fc结构域结合至免疫细胞,以实现细胞相关的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性,导致增强的肿瘤杀伤。从注射到小鼠体内的时间开始记忆NK细胞表面上的CD16表达增加并在整个研究过程中持续。这使得单克隆抗体的Fc结构域能够与记忆NK细胞结合并增强记忆NK细胞疗法的ADCC活性。

实例6.IFNg诱导SCC-25头颈癌细胞上的PD-L1表达

[0291] 将SCC-25细胞在含有10％ FBS、1％ PenStrep、1％碳酸氢钠、1％HEPES、1％glutamax、1％丙酮酸钠的DMEM/F12培养基中培养。将细胞与递增浓度的重组人IFNg(研发系统公司;目录号285-IF-100)孵育,并在37℃下孵育24小时。然后收获细胞,洗涤并使用PE抗人CD274(B7-H1,PD-L1)抗体(百进生物科技公司目录号393608)和Attune NxT流式细胞仪(生命科技公司(Life Technologies))通过FACS分析测定PD-L1表达。SCC-25细胞上的PD-L1表达以平均荧光强度(MFI)表示。结果示于图6中。

实例7.IFNg诱导LoVo结肠癌细胞上的PD-L1表达

[0292] 将LoVo细胞在含有10％ FBS、1％ PenStrep的F12K培养基中培养。将细胞用递增浓度的重组人IFNg(研发系统公司;目录号285-IF-100)处理并在37℃下孵育24小时。收获细胞,洗涤并使用PE抗人CD274(B7-H1,PD-L1)抗体(百进生物科技公司目录号393608)和Attune NxT流式细胞仪(生命科技公司)通过FACS分析测定PD-L1表达。荧光团和同种型匹配的小鼠抗体(百进生物科技公司目录号400113)用作FACS分析的阴性对照。结果示于图7中。

实例8.记忆NK细胞杀伤肿瘤细胞增加表面PD-L1表达,为检查点抑制剂(CPI)组合提供了机会

[0293] 使用transwell测定(Corning®HTS Transwell®24孔板,目录号3422,8um孔径),我们测试了对实体瘤细胞如结直肠癌细胞系(LoVo)的杀伤,并且在相同的实验中,我们测量了LoVo细胞上的PD-L1表达。首先,我们将LoVo-GFP与记忆NK细胞在下部腔室中以不同比率共培养(效:靶(E:T)0:1、1:1、2.5:1、5:1、10:1,靶细胞数目固定在0.6mL培养基中为25×10^3个);然后将100uL含有25×10^3个LoVo细胞的上部腔室置于该孔内部。24小时后,收获来自上部腔室和下部腔室的细胞,洗涤,并用抗人PD-L1抗体(PE,目录号393608,克隆MIH2)和活-死可固定远红染料(目录号L34974)在冰上染色30分钟。洗涤细胞并重悬于200uL FACS缓冲液中,并通过流式细胞仪(Attune NxT流式细胞仪,生命科技公司)分析。肿瘤细胞活力以活的LoVo-GFP+细胞的％表示。LoVo细胞上的PD-L1表达以平均荧光强度(MFI)表示。结果示于图8中。

[0294] 这些发现表明,增加记忆细胞比率增强下部腔室中LoVo细胞的杀伤,并分泌更高水平的细胞因子,如干扰素γ(IFN-γ),这又刺激上部腔室中LoVo细胞中PD-L1的表面表达。癌细胞上记忆NK介导的PD-L1表达为用检查点抑制剂(CPI)如抗PD1和抗PDL1抗体组合治疗提供了机会。

实例9.记忆NK细胞与具有ADCC能力的mAb的组合进一步增强肿瘤细胞上的PD-L1表达

[0295] 使用transwell测定,我们将LoVo-GFP与记忆NK细胞在下部腔室中以比率E:T 2:1(50×10^3个记忆NK细胞:25×10^3个LoVo细胞,在0.6mL完全培养基中)共培养;然后我们将100uL含有25×10^3个LoVo细胞的上部腔室置于该孔内部。为了评估具有ADCC能力的mAb对PD-L1表达的影响,我们将1ug/ml的西妥昔单抗(抗EGFR抗体)或阿维鲁单抗(抗PD-L1抗体),或西妥昔单抗和阿维鲁单抗的组合添加到下部孔的培养基中。48小时后,我们从上部腔室收获LoVo细胞,洗涤并用抗人PD-L1抗体(Brilliant Violet 711,目录号329722,克隆29E.2A3)在冰上染色30分钟。然后,洗涤细胞并重悬于200uL FACS缓冲液中,并通过流式细

胞仪(Attune NxT流式细胞仪,生命科技公司)对样品进行分析。上部腔室中LoVo细胞上的PD-L1表达以PD-L1阳性细胞的百分比(%)和平均荧光强度(MFI)展示。结果示于图9中。

[0296] 这些发现证明,记忆NK细胞杀伤下部腔室中的LoVo细胞将可溶性因子(最可能是IFNg)释放到培养基中,这增加了上部腔室中LoVo细胞上的PD-L1表达,并且这通过添加西妥昔单抗、阿维鲁单抗或两种抗体的组合而增强。

实例10.在与记忆NK细胞孵育或与条件培养基孵育后在SCC-25细胞(头颈癌)上诱导PD-L1。

[0297] 将SCC-25细胞与记忆NK细胞在37℃下以E:T比0:1、1:1、3:1或9:1共培养12小时、24小时或42小时。在每个时间点,收集上清液,高速旋转以去除任何残留的细胞或细胞碎片,并转移到含有新鲜SCC-25细胞的孔中进行次代条件培养。通过酶法收集原代共培养物的剩余细胞,并用于流式细胞术分析,以通过分别用可固定的水性死亡细胞染剂(英杰公司(Invitrogen)目录号L34957A)和PE抗人抗体(百进生物科技目录号393608)染色来评估肿瘤细胞死亡和表面PD-L1表达。使次代条件培养物生长24小时,之后收获细胞,并以与原代共培养物相同的方式分析。结果示于图10中。

[0298] 从原代共培养物看,在存在记忆NK细胞的所有处理中均发生肿瘤细胞死亡,显示与PD-L1表达的正相关。细胞死亡和PD-L1表达均与共培养持续时间和ET比率呈正协调。然而,在用原代培养物上清液中存在的可溶性因子(包括IFNg)刺激新鲜SCC-25细胞的条件培养物中,只有PD-L1表达显示出与原代共培养物相似的相关性,而细胞死亡则没有,从而指示IFNg不会引起肿瘤细胞死亡。综上所述,这些结果表明,记忆NK细胞诱导的细胞死亡诱导肿瘤细胞上的PD-L1表达,这支持了将针对ADCC的抗PDL1抗体诸如阿维鲁单抗与记忆NK组合使用的基本原理,并且其中阿维鲁单抗还破坏T细胞上的PD1和肿瘤细胞上的PDL-1的相互作用,从而增强T细胞介导的免疫疗法。

实例11.向NCI-N87细胞(胃癌细胞)+记忆NK细胞共培养物中添加阿维鲁单抗增强通过ADCC机制对NCI-N87细胞的杀伤。

[0299] 将荧光标记的胃癌细胞系(NCI-N87)(用30ng/ml人重组IFNg预处理过夜以上调PD-L1)单独培养或与记忆NK细胞(E:T＝1:1)在存在或不存在1ug/ml阿维鲁单抗的情况下在37℃培养72小时。经由IncuCyte S3活细胞分析仪监测以活的荧光肿瘤细胞消失所指示的肿瘤细胞死亡。结果示于图11中。

[0300] 虽然单独的阿维鲁单抗并未诱导显著的肿瘤细胞死亡,但向记忆NK细胞+NCI-N87共培养细胞中添加阿维鲁单抗显著增强了肿瘤细胞死亡,指示ADCC介导的肿瘤杀伤。

[0301] 提供上文列出的详细描述是为了帮助本领域技术人员实践本发明。然而,本文描述和要求权利的本发明的范围并不受本文所披露的特定实施例的限制,因为这些实施例旨在阐明本发明的几个方面。任何等同实施例旨在处于本发明的范围之内。事实上,除了本文所示和所述的那些,本发明的各种修改根据前面描述对于本领域技术人员而言也将变得清楚,这些修改并不偏离本发明性发现的精神或范围。这样的修改也旨在落入所附权利要求的范围之内。

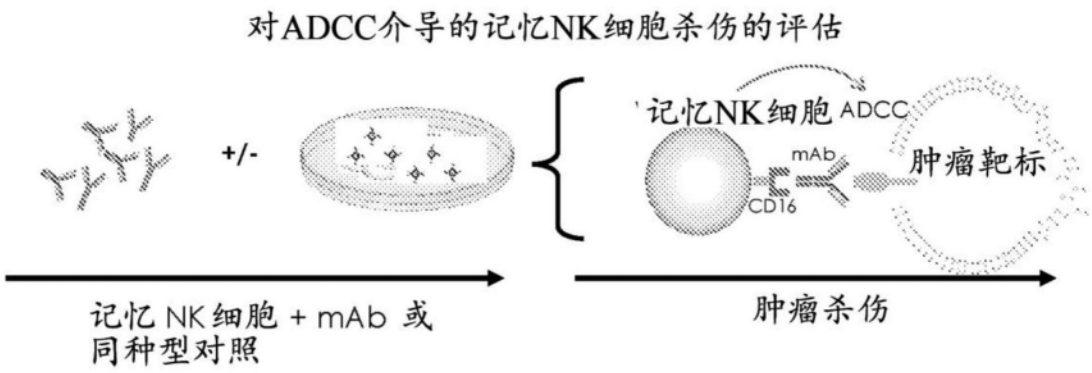

对ADCC介导的记忆NK细胞杀伤的评估
+/-
记忆NK细胞 ADCC
mAb
CD16
肿瘤靶标
记忆 NK 细胞 + mAb 或
同种型对照
肿瘤杀伤

图1

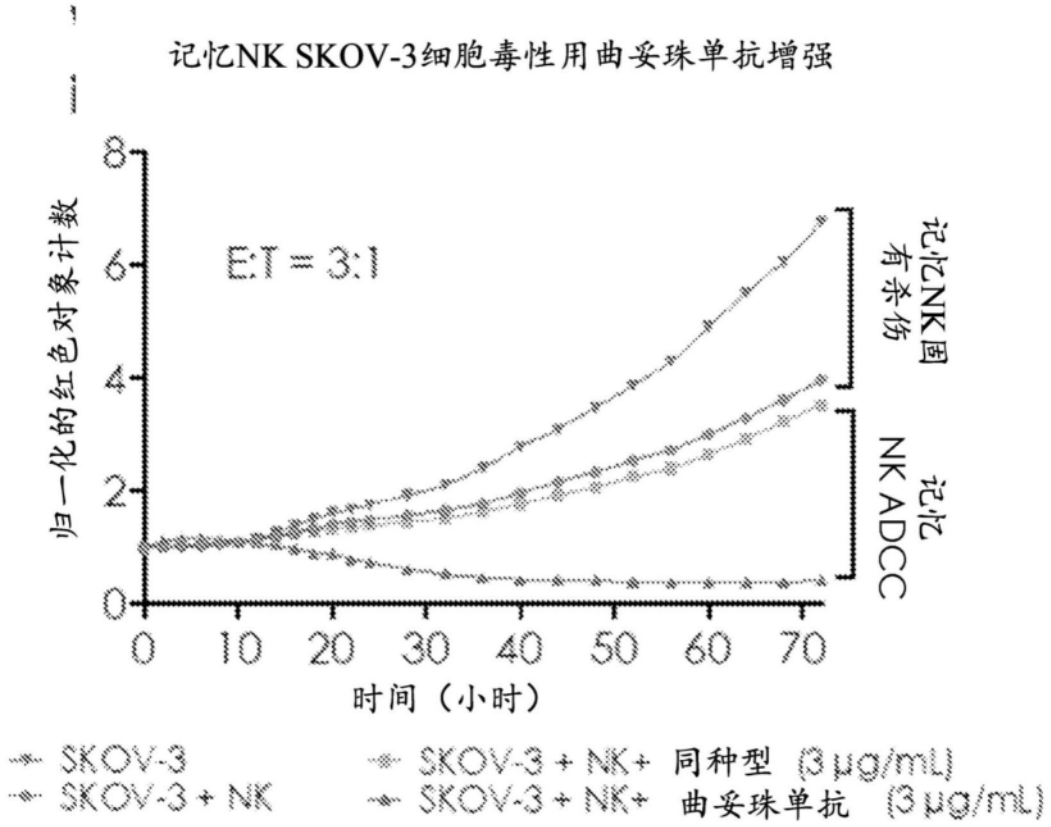

记忆NK SKOV-3细胞毒性用曲妥珠单抗增强
归一化的红色对象计数
E:T = 3:1
记忆NK固有杀伤
记忆NK ADCC
0
2
4
6
8
0 10 20 30 40 50 60 70
时间（小时）
SKOV-3
SKOV-3 + NK
SKOV-3 + NK+ 同种型 (3 µg/mL)
SKOV-3 + NK+ 曲妥珠单抗 (3 µg/mL)

图2

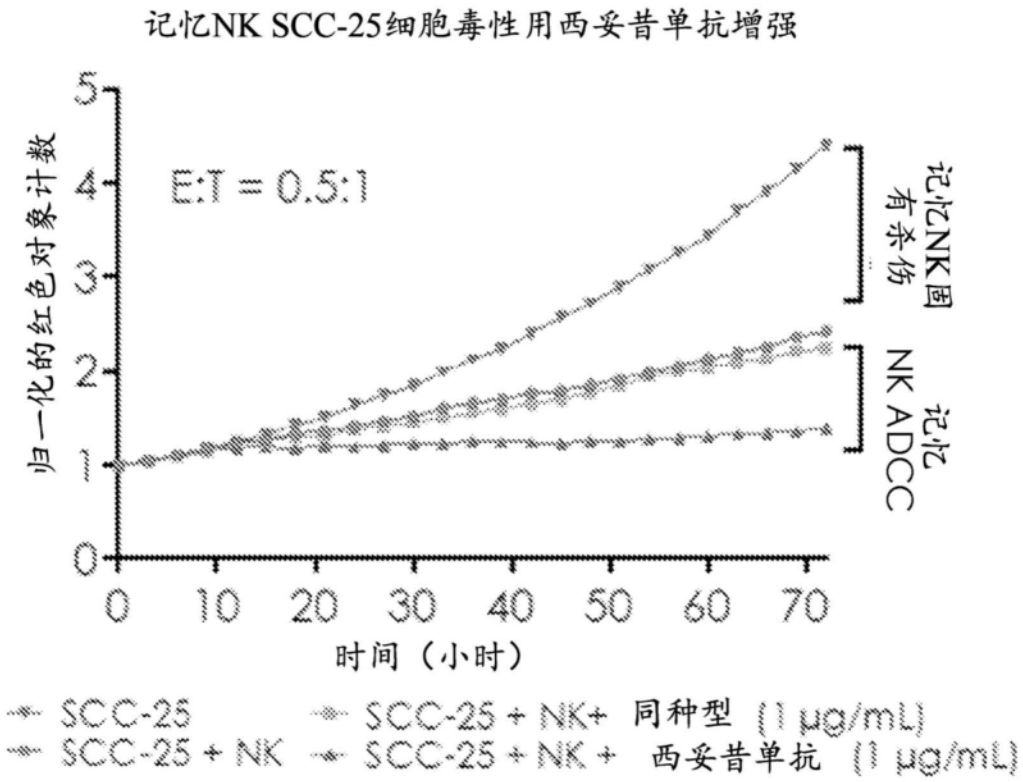

记忆NK SCC-25细胞毒性用西妥昔单抗增强
归一化的红色对象计数
E:T = 0.5:1
记忆NK细胞有杀伤
记忆NK ADCC
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
60
70
时间（小时）
SCC-25
SCC-25 + NK
SCC-25 + NK+ 同种型 (1 µg/mL)
SCC-25 + NK + 西妥昔单抗 (1 µg/mL)

图3

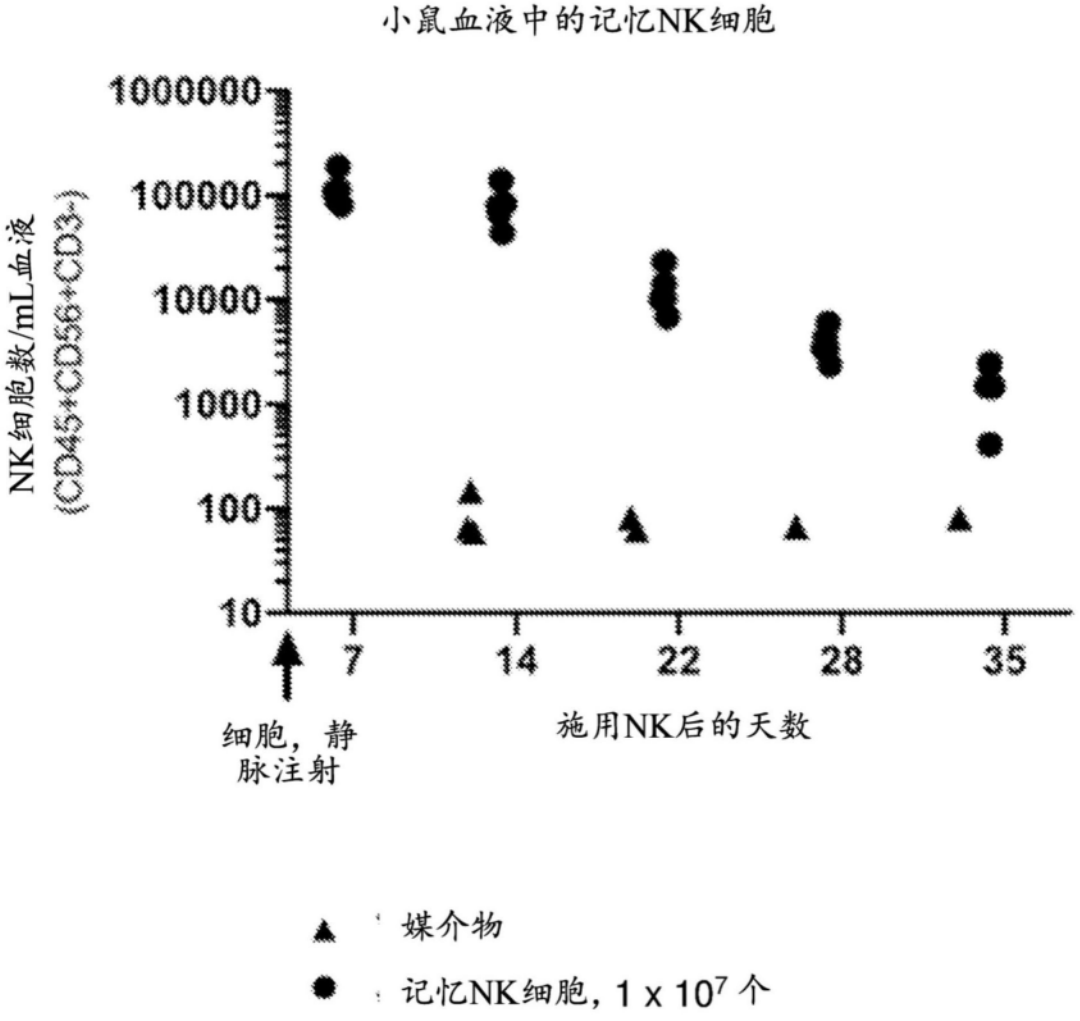

小鼠血液中的记忆NK细胞
NK细胞数/mL血液
(CD45+CD56+CD3-)
1000000
100000
10000
1000
100
10
7
14
22
28
35
细胞，静
脉注射
施用NK后的天数
媒介物
记忆NK细胞，1 x 10^7 个

图4

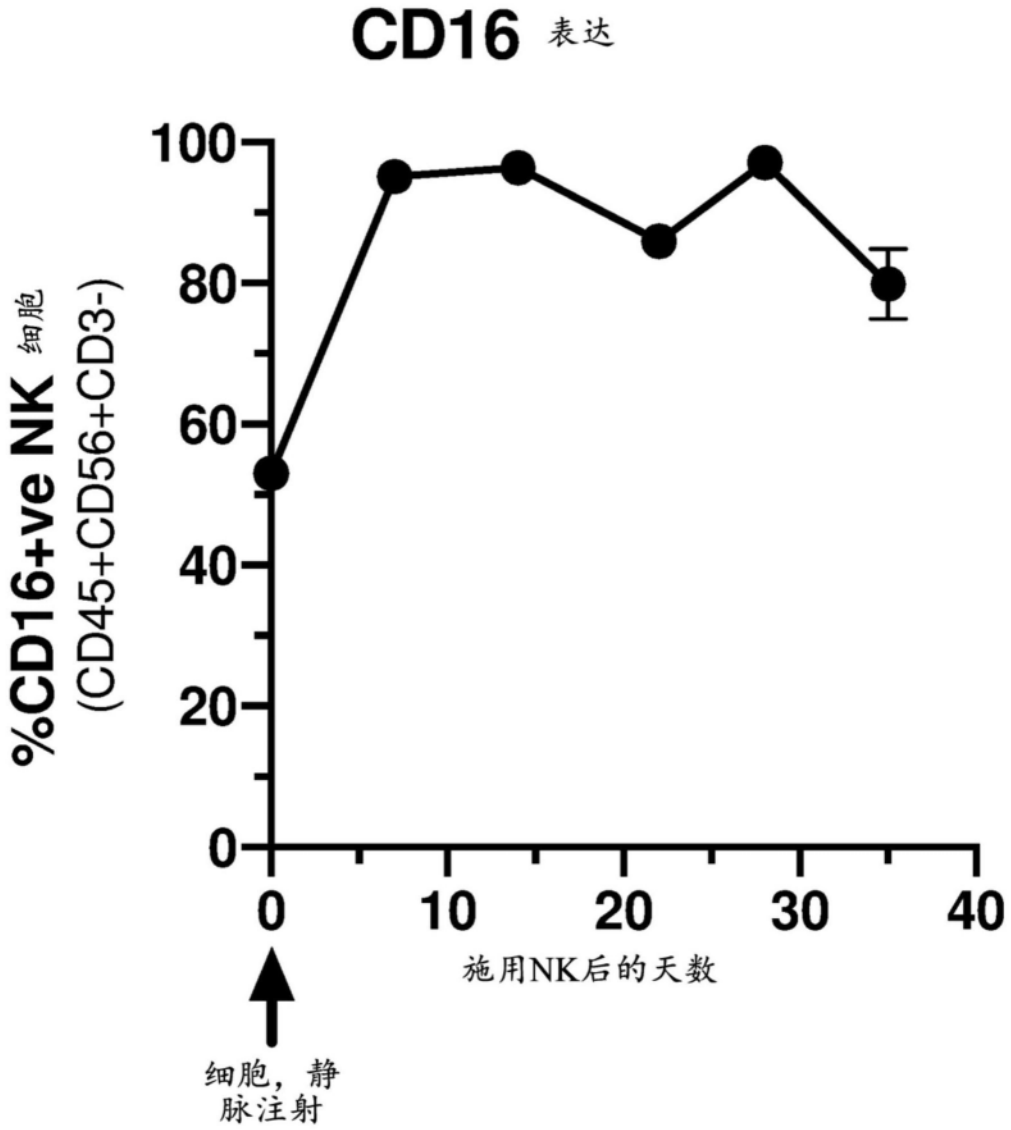

CD16 表达
%CD16+ve NK 细胞
(CD45+CD56+CD3-)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
施用NK后的天数
细胞，静
脉注射
记忆NK细胞，1 x 10^7 个

图5

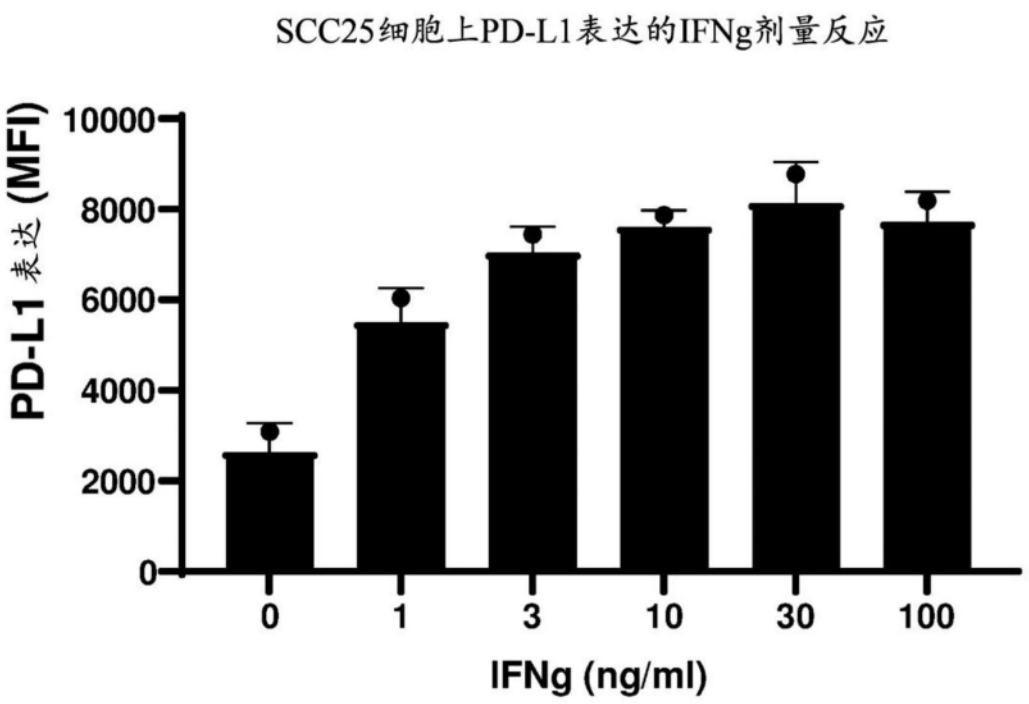

SCC25细胞上PD-L1表达的IFNg剂量反应
PD-L1 表达 (MFI)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
1
3
10
30
100
IFNg (ng/ml)

图6

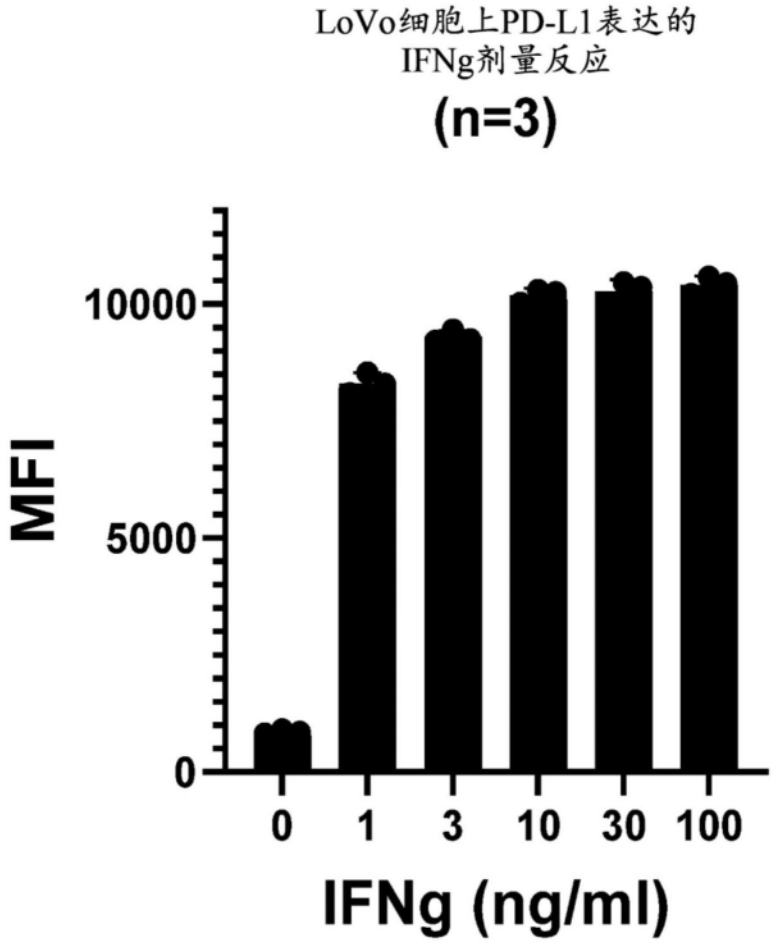
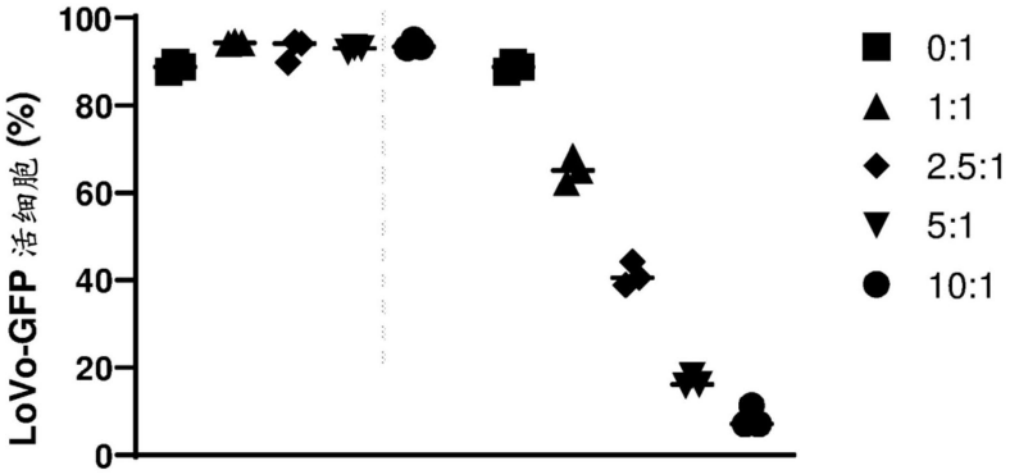

LoVo细胞上PD-L1表达的
IFNg剂量反应
(n=3)
MFI
10000
5000
0
0
1
3
10
30
100
IFNg (ng/ml)

图7

A)


LoVo-GFP 活细胞 (%)
100
80
60
40
20
0
0:1
1:1
2.5:1
5:1
10:1

B)

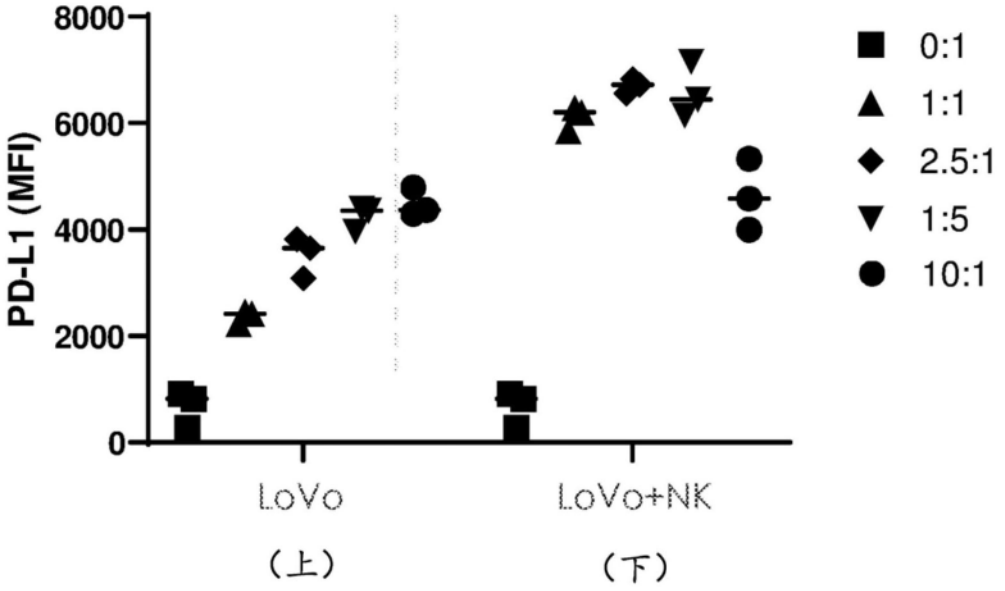

PD-L1 (MFI)
8000
6000
4000
2000
0
0:1
1:1
2.5:1
1:5
10:1
LoVo
LoVo+NK
(上)
(下)

图8

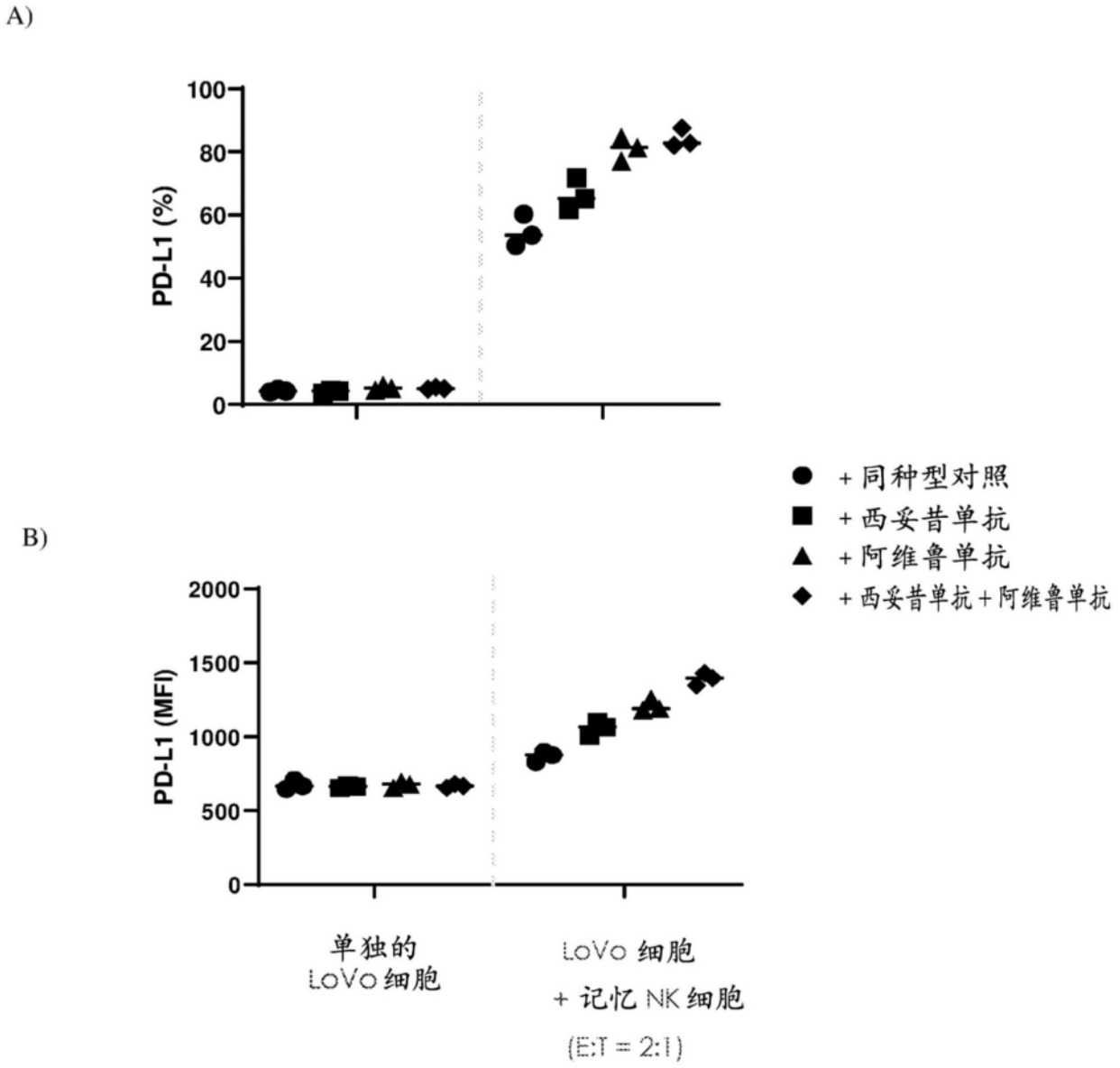

A)
100
80
60
40
20
0
PD-L1 (%)
B)
2000
1500
1000
500
0
PD-L1 (MFI)
单独的
LoVo 细胞
LoVo 细胞
+ 记忆 NK 细胞
(E:T = 2:1)
+ 同种型对照
+ 西妥昔单抗
+ 阿维鲁单抗
+ 西妥昔单抗 + 阿维鲁单抗

图9

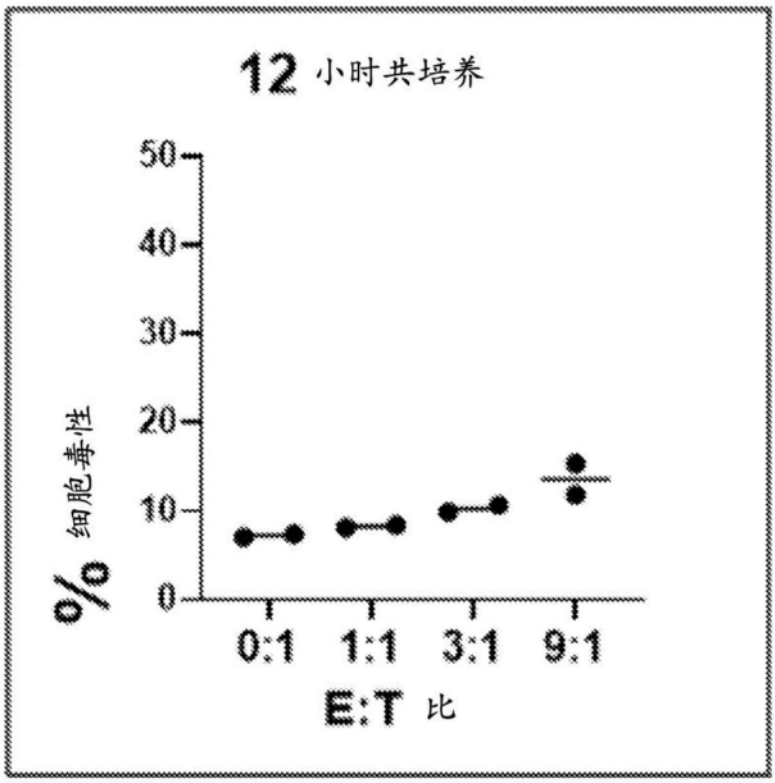

12 小时共培养
50
40
30
20
10
0
% 细胞毒性
0:1
1:1
3:1
9:1
E:T 比

图10

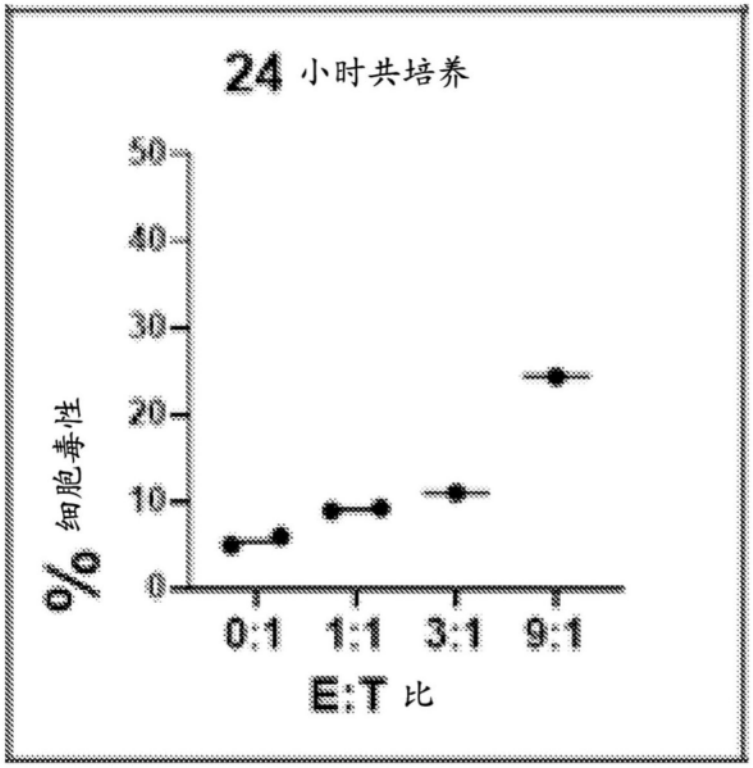

24 小时共培养
50
40
30
20
10
0
% 细胞毒性
0:1
1:1
3:1
9:1
E:T 比

图11

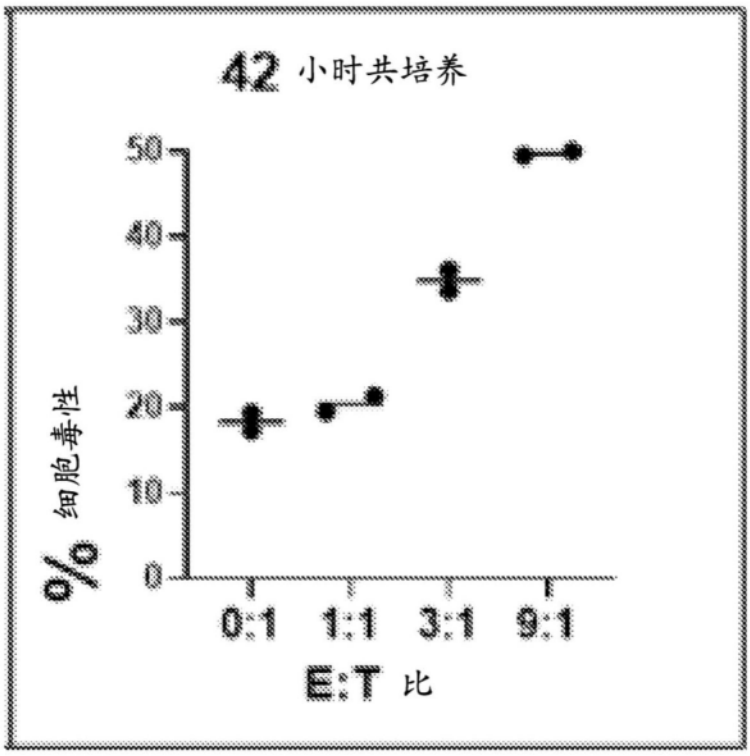


图12

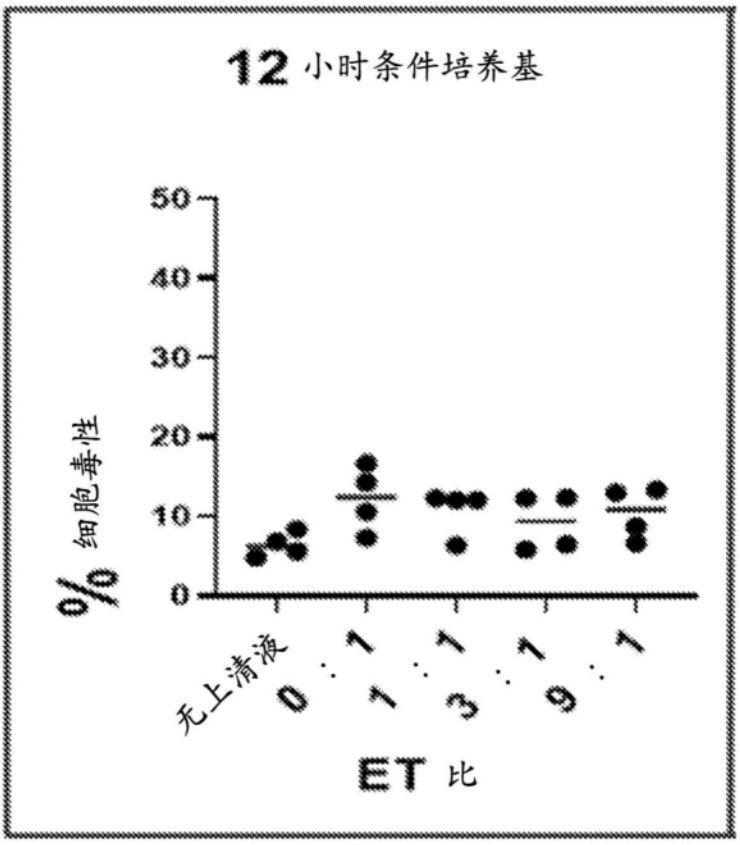


图13

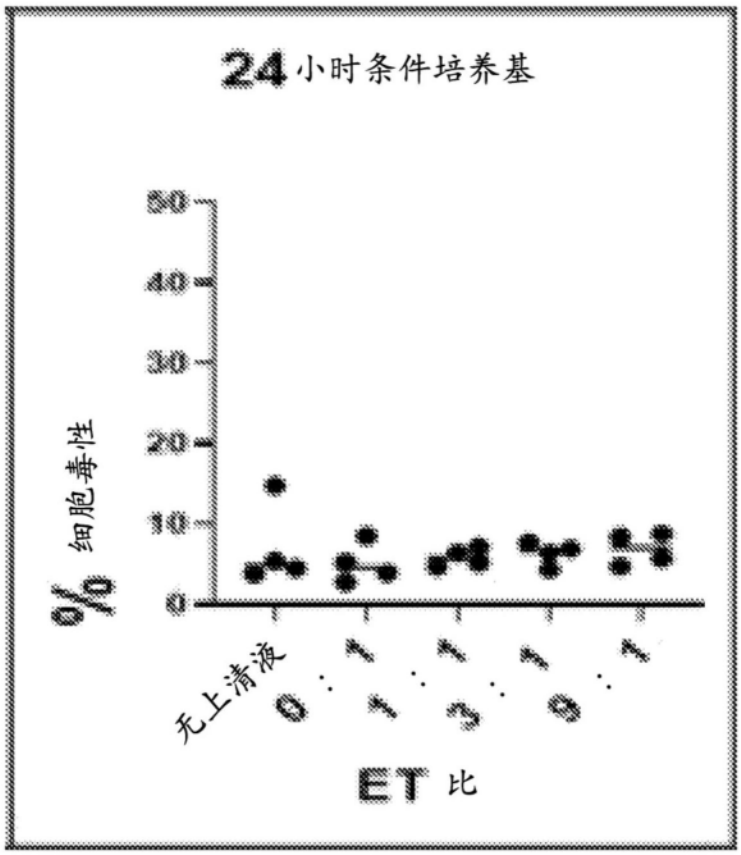


图14

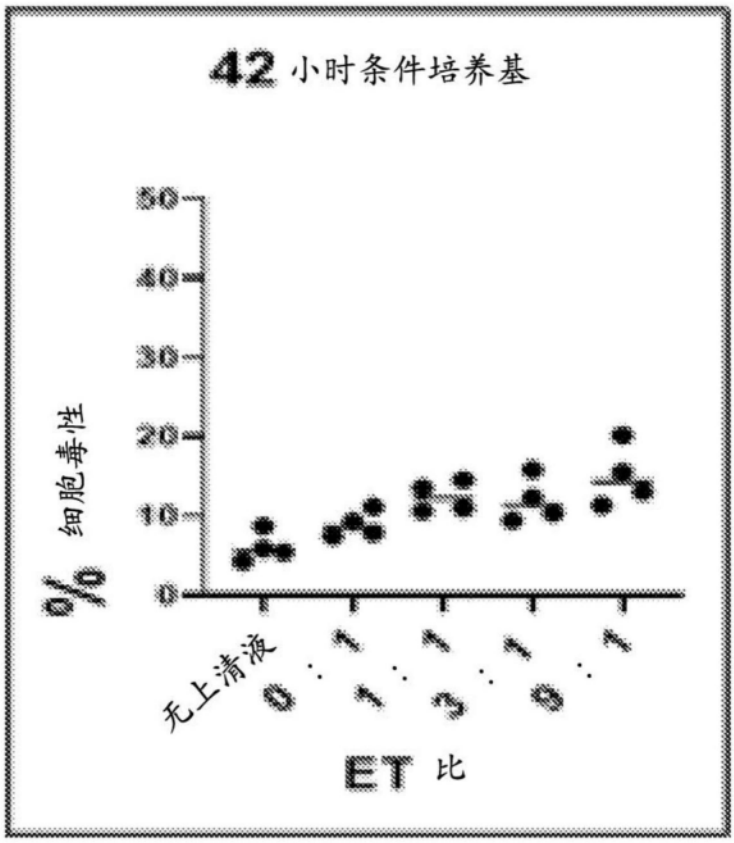


图15

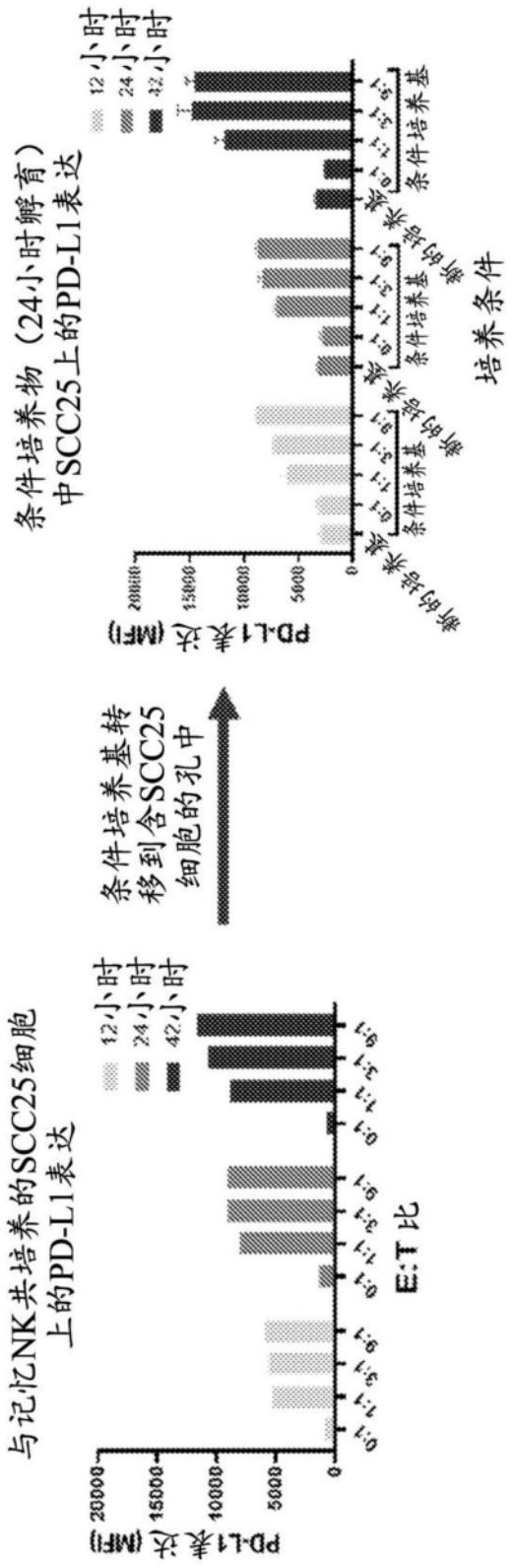
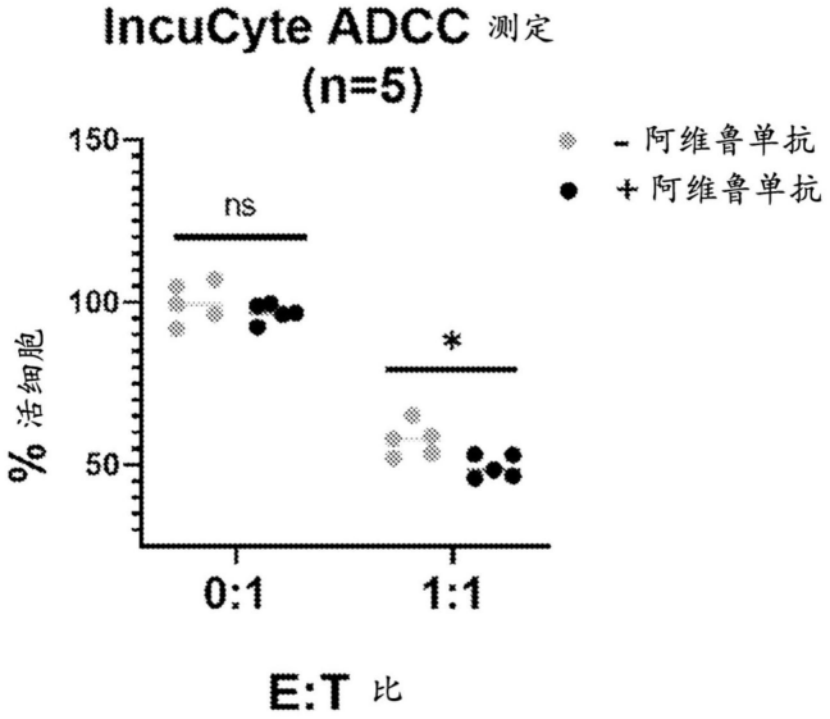

与记忆NK共培养的SCC25细胞
上的PD-L1表达
12小时
24小时
42小时
PD-L1表达(MFI)
20000
15000
10000
5000
0
0:1
1:1
5:1
9:1
E:T 比
条件培养基转
移到含SCC25
细胞的孔中
条件培养物（24小时孵育）
中SCC25上的PD-L1表达
12小时
24小时
42小时
PD-L1表达(MFI)
200000
150000
100000
50000
0
条件培养基
新的处理条件
培养条件

图16



双因素方差分析： E:T 0:1 --- $P = 0.50$
E:T 1:1 --- $P = 0.025$

图17