



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116637183 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 25

(21) 申请号 202310218856.5

C07K 16/28 (2006.01)

(22) 申请日 2013.12.03

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/732,760 2012.12.03 US

61/801,187 2013.03.15 US

(62) 分案原申请数据

201380072031.1 2013.12.03

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J·J·恩格尔哈特 A·J·科曼

M·奎格利 M·J·塞尔比 C·王

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 罗天乐

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书1页 说明书50页 附图56页

(54) 发明名称

强化免疫调变性Fc融合蛋白的抗癌活性

(57) 摘要

本公开提供了强化Fc融合蛋白的抗肿瘤效力的方法,该Fc融合蛋白特异性结合患有癌症或者由感染原引起的疾病的受试者体内的T细胞上的靶标,例如配体的共抑制性或共刺激性受体,并改变该免疫调变性靶标的活性,从而增强针对所述癌症的细胞或所述感染原的内源性免疫应答;该方法包括选择、设计或修饰Fc融合蛋白的Fc区,从而强化所述Fc区与激活性Fc受体(FcR)的结合。本公开还提供了通过所述方法产生的Fc融合蛋白。本公开进一步提供了Fc融合蛋白的治疗用途,其中该Fc融合蛋白的Fc区被选择、设计或修饰,从而强化所述Fc区与激活性FcR的结合。

1. 一种用于强化、优化或最大化Fc融合蛋白的抗肿瘤效力的方法,该Fc融合蛋白特异性结合患有癌症或者由感染原引起的疾病的受试者体内的T细胞上的免疫调变性靶标并改变该靶标的活性,藉此增强针对所述癌症的细胞或感染原的内源性免疫应答,其中该方法包括选择、设计或修饰所述Fc融合蛋白的Fc区以强化该Fc区与激活性Fc受体(FcR)的结合。

2. 权利要求1的方法,其中所述Fc融合蛋白是抗体。

3. 权利要求2的方法,其中所述抗体是人IgG抗体。

4. 权利要求3的方法,其中所述人IgG抗体与FcγI、FcγIIa或FcγIIIa受体的结合被强化。

5. 权利要求4的方法,其中所述人IgG抗体与FcγI、FcγIIa或FcγIIIa受体的强化的结合介导肿瘤部位的调节性T细胞(T_{regs})减少。

6. 权利要求4的方法,其中所述人IgG抗体与FcγI、FcγIIa或FcγIIIa受体的强化的结合(a) 不介导肿瘤部位的效应器T细胞(T_{effs})减少,或者(b) 介导肿瘤部位的效应器T细胞(T_{effs})增加。

7. 权利要求1的方法,其中所述靶标在肿瘤部位的 T_{regs} 上的表达水平高于其在肿瘤部位的 T_{effs} 上的表达水平。

8. 权利要求2的方法,其中所述抗体是拮抗性抗体,其阻断T细胞上的共抑制性免疫调变性靶标的活性。

9. 权利要求8的方法,其中所述共抑制性免疫调变性靶标是CTLA或TIGIT。

10. 权利要求2的方法,其中所述抗体是激动性抗体,其增大T细胞上的共刺激性免疫调变性靶标的活性。

强化免疫调变性Fc融合蛋白的抗癌活性

[0001] 本申请是2013年12月3日提交的申请号为201380072031.1、发明名称为“强化免疫调变性Fc融合蛋白的抗癌活性”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本公开涉及免疫调变性Fc融合蛋白的Fc区对抗肿瘤治疗效力的影响,以及用工程化手段改变Fc区以优化效力。

[0003] 发明背景

[0004] 免疫系统能够控制肿瘤发展并介导肿瘤衰退(regression)。这需要产生和激活肿瘤抗原特异性T细胞。多种T细胞共刺激受体和T细胞负调节子,或称共抑制受体,协调一致地发挥作用,控制T细胞活化、增殖、以及效应器功能的获得或丧失。最早得到表征且表征得最好的T细胞共刺激和共抑制分子包括CD28和CTLA-4(Rudd等,2009)。CD28通过与抗原呈递细胞上的B7-1和B7-2配体结合向T细胞受体接合(engagement)提供共刺激信号,而CTLA-4提供负信号,下调T细胞的增殖和功能。CTLA-4也结合B7-1(CD80)和B7-2(CD86)配体,但是比CD28的亲合性更高,通过细胞自主的(或内在的)和细胞不自主的(或外在的)途径对T细胞功能发挥负调节子作用。CD8和CD4 T效应器(T_{eff})功能的内在控制由T细胞活化导致的CTLA-4的诱导性表面表达所介导,并通过B7配体在相对细胞上的多价接合抑制T细胞增殖和细胞因子增殖(Peggs等,2008)。

[0005] 已经鉴定了许多其它可调节T细胞应答的共刺激和抑制受体和配体。刺激性受体的实例包括可诱导T细胞共刺激分子(ICOS),CD137(4-1BB),CD134(OX40),CD27,糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR),和疱疹病毒进入介体(HerpesVirus Entry Mediator)(HVEM),而抑制性受体的实例包括程序性死亡-1(PD-1),B和T淋巴细胞衰减子(Lymphocyte Attenuator)(BTLA),T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3(TIM-3),淋巴细胞激活基因-3(LAG-3),腺苷A2a受体(A2aR),杀伤细胞凝集素样受体G1(KLRG-1),自然杀伤细胞受体2B4(CD244),CD160,具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT),和T细胞活化V-结构域Ig抑制子的受体(VISTA)(Mellman等,2011;Pardoll,2012b;Baitsch等,2012)。这些受体和它们的配体提供了用于旨在刺激免疫应答或者防止免疫应答被抑制从而攻击肿瘤细胞的治疗的靶标(Weber,2010;Flies等,2011;Mellman等,2011;Pardoll,2012b)。刺激性受体或受体配体被激动剂靶定,而抑制性受体或受体配体被阻断剂靶定。阻断所谓的“免疫检查点(immune checkpoints)”是提高免疫疗法抗肿瘤活性最有前途的方法之一,免疫检查点是指一大类调节免疫系统的抑制性信号通路,它们对于维持自身耐受和调变外周组织中生理免疫反应的持续时间和幅度以便使附带的组织损伤最小化是至关重要的(参见,例如Weber,2010;Pardoll 2012b)。因为许多免疫检查站被配体-受体相互作用引发,所以它们能够容易地被抗体阻断或者被重组形式的配体或受体调节。

[0006] 抗CTLA-4抗体当被交联时可体外抑制T细胞的功能(Krummel和Allison,1995;Walunas等,1994)。调节性T细胞(T_{regs})组成性表达CTLA-4,以非细胞自主的方式控制效应T细胞(T_{eff})的功能。CTLA-4缺陷的 T_{regs} 具有受损的抑制能力(Wing等,2008),阻断CTLA-4与

B7相互作用的抗体能够抑制 T_{reg} 的功能(Read等;2000;Quezada等,2006)。更近些时候,有人还显示 T_{effs} 通过外在途径控制T细胞功能(Corse等;2012;Wang等,2012)。 T_{regs} 和 T_{effs} 对T细胞功能的外在控制是通过CTLA-4阳性细胞除去抗原呈递细胞上的B7配体,从而限制它们的共刺激潜力的能力而实现的(Qureshi等;2011;Onishi等,2008)。人们认为,对CTLA-4/B7相互作用进行抗体阻断可以干扰由CTLA-4接合所传送的负信号,从而促进 T_{eff} 活化;这种对T细胞活化和增殖的内在控制能够促进 T_{eff} 和 T_{reg} 二者的增殖(Krummel和Allison,1995;Quezada等,2006)。在使用动物模型的早期研究中,显示CTLA-4的抗体阻断会加剧自身免疫(Perrin等,1996;Hurwitz等,1997)。推广到肿瘤免疫,抗CTLA-4导致建成肿瘤消退的能力为CTLA-4阻断的治疗潜力提供了一个引人注目的实例(Leach等,1996)。

[0007] 针对人CTLA-4的人抗体,易普单抗(ipilimumab)和tremelimumab,被选用于抑制CTLA-4-B7相互作用(Keler等,2003;Ribas等,2007),并在多种临床试验中对多种恶性肿瘤进行了测试(Hoos等,2003;Acierto等,2011)。经常可以观察到肿瘤衰退和疾病稳定化,并且使用这些抗体的治疗会伴随不良事件,如能够影响多种器官系统的炎性浸润。在2011年,易普单抗,其具有IgG1恒定区,被美国和欧盟根据其在先前接受过治疗的晚期黑色素瘤患者的III期临床试验中可提高总体生存(Hodi等,2010)而批准用于治疗不能手术切除的或转移性黑色素瘤。

[0008] 多种不同的抗体已被用于在小鼠模型中证明抗CTLA-4阻断的活性,包括仓鼠抗CTLA-4抗体、9H10(叙利亚仓鼠IgG2b[Krummel和Allison,1995])和4F10(亚美尼亚仓鼠IgG1[Walunas等,1994]),和在入CTLA-4转基因小鼠中产生的小鼠抗-小鼠CTLA-4抗体(9D9-鼠类IgG2b)(Quezada等,2006;Peggs等,2009)。抗CTLA-4 9D9-IgG2b已经在多种小鼠皮下肿瘤模型中被测试,例如Sa1N纤维肉瘤、MC38和CT26结肠腺癌、以及B16黑色素瘤。除了Sa1N之外,抗CTLA-4单一疗法已经显示出少许抗肿瘤活性(Quezada等,2006;Mitsui等,2010)。小鼠IgG2b能够结合免疫球蛋白Fc γ 受体(Fc γ R),包括Fc γ RIIB, Fc γ RIII, 和Fc γ RIV受体(Nimmerjahn和Ravetch,2005)。因此,与T细胞和Fc γ R阳性细胞结合的9D9-IgG2b多价接合CTLA-4有可能导致激动性负信号,并使这种抗体阻断CTLA-4的效力低于没有Fc γ R结合性质的阻断抗体。

[0009] 为了确定小鼠抗CTLA-4抗体抗肿瘤活动的相对强度,生成了对Fc γ R的亲合性不同的一系列9D9同种型变体。本文提供的数据阐明了CTLA-4阻断介导的抗肿瘤效果的机制,这些机制涉及调节性T细胞(T_{regs})的耗竭。这些机制显示适用于T细胞上的某些其它靶标,例如GITR, OX40和ICOS,但不可用于其它靶标,如PD-1。对该生物学的了解的不发展开启了强化可结合T细胞上的免疫调变性靶标并改变其活性的Fc融合蛋白的抗肿瘤活性的新途径,并使人们能够预测哪种免疫调变性受体可以被 T_{reg} 耗竭机制成功地靶定。

发明概要

[0010] 本公开提供了用于强化、优化或最大化Fc融合蛋白的抗肿瘤效力的方法,所述Fc融合蛋白特异性结合患有癌症的或者由感染原引起的疾病的受试者体内的T细胞上的靶标,例如免疫调变性靶标,并改变该靶标的活性,藉此增强针对所述癌症的细胞或感染原的内源性免疫应答,其中该方法包括选择、设计或修饰Fc融合蛋白的Fc区,以强化该Fc区与激活性Fc受体的结合。在某些优选实施方案中,Fc融合蛋白是抗体,例如抗CTLA-4,抗GITR,

抗-0X40,抗-ICOS或抗-CD137抗体。在其它优选实施方案中,所述靶标在肿瘤部位处的 T_{regs} 上的表达水平高于在肿瘤部位处的 T_{effs} 上的表达水平。

[0011] 本公开还提供了Fc融合蛋白,其特异性结合患有癌症或者由感染原引起的疾病的受试者体内的T细胞上的靶标,例如免疫调变性受体蛋白,并改变该靶标的活性,藉此增强针对所述癌症的细胞或感染原的内源性免疫应答,其中该抗体增强内源性免疫应答的能力已经通过如下的方法被强化、优化或最大化:该方法包括选择、设计或修饰Fc融合蛋白的Fc区,以强化所述Fc区与激活性Fc受体的结合。

[0012] 本公开进一步提供了用于增强患有癌症或者由感染原引起的疾病的受试者体内的内源性免疫应答以由此治疗受试者的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的Fc融合蛋白,其中该Fc融合蛋白的Fc区已被选择、设计或修饰以强化所述Fc区与激活性Fc受体的结合。

[0013] 此外,本公开提供了用于免疫治疗患有癌症或由感染原引起的疾病的受试者的方法,该方法包括:(a)选择是免疫疗法的合适候选者的受试者,该选择包括(i)评估测试组织样品中骨髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSC)的存在,和(ii)根据该测试组织样品中MDSC的存在选择该受试者作为合适的候选者;和(b)该选定的受试者施用治疗有效量的免疫调变性Fc融合蛋白。

[0014] 本公开还提供了用于治疗受试者体内的癌症或由感染原引起的疾病的试剂盒,该试剂盒包括:(a)一定剂量的本公开的Fc融合蛋白,其显示强化的增强受试者体内针对癌细胞或感染原的内源性免疫应答的能力;和(b)关于在本文所述的治疗方法中使用Fc融合蛋白的使用说明。

[0015] 鉴于如下的详细说明和实施例将容易想到本公开其它的特征和优点,这些详细说明和实施例不应视为具有限制意义。在此明确通过提述将本申请全文中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容并入本申请。

[0016] 附图简述

[0017] 图1显示了小鼠抗小鼠CTLA-4抗体9D9的不同同种型与CTLA-4⁺细胞的结合。

[0018] 图2显示了抗CTLA-4同种型在C57BL/6小鼠中血清浓度的药代动力学分析。

[0019] 图3显示了小鼠抗小鼠CTLA-4抗体9D9的不同同种型在同基因CT26腺癌小鼠模型中对抗肿瘤活性的影响:A,对照小鼠IgG(具有小鼠IgG1同种型的人抗白喉毒素抗体,也在其它实验中用作对照);B,抗CTLA-4- γ 1D265A;C,抗CTLA-4- γ 2b;D,抗CTLA-4- γ 2a。显示了每组(每组共10只小鼠)中无瘤(TF)小鼠的数目。

[0020] 图4显示了肿瘤内T细胞分析,表示为抗CTLA-4处理的CT26荷瘤小鼠中CD45⁺细胞的百分比:A,CD8⁺T细胞,B,CD4⁺T细胞,C, T_{regs} 。

[0021] 图5显示了抗CTLA-4处理的CT26荷瘤小鼠中的肿瘤内CD8⁺ T_{effs} 对 T_{regs} (A)、与CD4⁺ T_{effs} 对 T_{regs} (B)的比值。

[0022] 图6显示了抗CTLA-4处理的CT26荷瘤小鼠中外周(淋巴结) T_{regs} 的分析。

[0023] 图7显示了4种不同的小鼠抗CTLA-4同种型在MC38结肠腺癌肿瘤模型中的抗肿瘤活性,由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来度量:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗CTLA-4IgG1;C,抗CTLA-4IgG1D265A;D,抗CTLA-4IgG2a;D,抗CTLA-4IgG2b。

[0024] 图8显示了在用不同同种型的小鼠抗CTLA-4抗体处理的小鼠组中,同基因MC38结

肠腺癌肿瘤的平均肿瘤体积(A)和中值肿瘤体积(B)的变化。

[0025] 图9显示了来自用规定的抗CTLA-4抗体处理的小鼠的MC38肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)的流式细胞术分析。A, $CD4^+$ 且为 $CD45^+$ 细胞的百分比;B, $CD45^+$ 且为 $CD8^+$ 细胞的百分比;C, $CD4^+$ 且为Foxp3⁺细胞的百分比。

[0026] 图10显示了在用规定的抗CTLA-4IgG同种型处理的小鼠的MC38肿瘤中CD8与 $CD4^+$ T_{eff} 对 T_{reg} 的比值。A, 来自TIL的 $CD8^+$ T_{eff} 对 T_{reg} 的比值($CD8^+$ 细胞/ $CD4^+$ Foxp3⁺细胞);B, 来自TIL的 $CD4^+$ T_{eff} 与 T_{reg} 的比值($CD4^+$ Foxp3⁻细胞/ $CD4^+$ Foxp3⁺细胞)。

[0027] 图11显示了在同基因Sa1N纤维肉瘤小鼠模型中不同小鼠抗CTLA-4同种型的抗肿瘤活性,由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来量度:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗CTLA-4IgG2a;C,抗CTLA-4IgG1D265A。

[0028] 图12显示了在用不同同种型的小鼠抗CTLA-4抗体处理的小鼠组中,同基因Sa1N纤维肉瘤肿瘤的平均肿瘤体积(A)和中值肿瘤体积(B)的变化。

[0029] 图13显示了来自用规定的抗CTLA-4抗体处理的小鼠的Sa1N TIL的流式细胞术分析。A, $CD45^+$ 且为 $CD8^+$ 细胞的百分比;B, $CD45^+$ 且为 $CD4^+$ 细胞的百分比;C, $CD4^+$ 且为Foxp3⁺细胞的百分比。

[0030] 图14显示了在用规定的抗CTLA-4IgG同种型处理的小鼠的同基因Sa1N肿瘤移植瘤(graft)中CD8和 $CD4^+$ T_{eff} 对 T_{reg} 的比值。A, 来自TIL的 $CD8^+$ T_{eff} 对 T_{reg} 的比值($CD8^+$ 细胞/ $CD4^+$ Foxp3⁺细胞);B, 来自TIL的 $CD4^+$ T_{eff} 对 T_{reg} 的比值($CD4^+$ Foxp3⁻细胞/ $CD4^+$ Foxp3⁺细胞)。

[0031] 图15显示了在用不同抗CTLA-4抗体同种型处理的MC38荷瘤小鼠中同种型依赖性的MDSCs募集(A)和IL-1 α 产生(B)。

[0032] 图16显示了抗CTLA-4同种型对肿瘤内Th1/2细胞因子分泌的影响。A, IFN- γ ;B, IL-13;C, TNF- α ;D, IL-10。

[0033] 图17显示了大鼠抗小鼠GITR抗体DTA-1的不同同种型在MC38结肠腺癌模型中对抗肿瘤活性的影响,由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来度量:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗GITR小鼠IgG1;C,抗GITR大鼠IgG2b;D,抗GITR小鼠IgG2a。显示了每组(每组共10只小鼠)中TF小鼠的数目。

[0034] 图18显示了在用不同同种型的抗GITR抗体处理的小鼠组中,MC38肿瘤的平均(A)和中值肿瘤体积(B)的变化。

[0035] 图19显示了来自用不同抗GITR(DTA-1)和抗CTLA-4(9D9)同种型和所示的对照抗体处理的MC38荷瘤小鼠的脾脏(A-C)和TILs(D-F)的流式细胞术分析。A,脾脏中 $CD8^+$ T细胞的百分比;B,脾脏中 $CD4^+$ 细胞的百分比;C,脾脏中 $CD4^+$ 且为Foxp3⁺的细胞的百分比;D,TIL中 $CD8^+$ T细胞的百分比;E,TIL中 $CD4^+$ 细胞的百分比;F,TIL中 $CD4^+$ 且为Foxp3⁺的细胞的百分比。

[0036] 图20显示了大鼠抗-小鼠GITR抗体DTA-1的不同同种型,经过再工程化以使聚集最小化后,在MC38模型中的对抗肿瘤活性的影响,由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来量度:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗-GITR小鼠IgG1;C,抗-GITR小鼠IgG1-D265A;D,抗GITR小鼠IgG2a;E,抗GITR小鼠IgG2b;F,抗GITR大鼠IgG2b。显示了每组(每组共9只小鼠)中TF小鼠的数目。

[0037] 图21显示了用不同同种型的再工程化抗GITR抗体处理的小鼠组中MC38肿瘤的平均(A)和中值肿瘤体积(B)的变化。

[0038] 图22显示了不同的抗GITR(再工程化的“mGITR”DTA-1或最初工程化的“DTA-1”抗体)和抗CTLA-4(9D9)同种型对来自MC38荷瘤小鼠的脾脏(A)和TIL(B)的Foxp3⁺/CD4⁺T_{regs}的影响的流式细胞术分析。

[0039] 图23显示了在Sa1N纤维肉瘤小鼠模型中不同小鼠抗GITR同种型的抗肿瘤活性,由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来量度:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗-GITR小鼠IgG2a;C,抗-GITR大鼠IgG2b;D,抗GITR小鼠IgG1;E,抗GITR小鼠IgG1-D265A。显示了每组(每组共10只小鼠)中TF小鼠的数目。

[0040] 图24显示了用不同同种型的抗GITR(DTA-1)抗体处理的小鼠组中Sa1N肿瘤的平均(A)和中值肿瘤体积(B)的变化。

[0041] 图25显示了不同抗GITR(DTA-1)和抗CTLA-4(9D9)同种型对来自Sa1N荷瘤小鼠的脾脏(A)和TIL(B)中的Foxp3⁺/CD4⁺T_{regs}的影响。

[0042] 图26显示了在MC38肿瘤模型中抗CTLA-4(9D9)抗体的无岩藻糖基化(afucosylation)对抗肿瘤活性的影响,以用这些抗体处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变为量度:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗CTLA-4IgG1D265A;C,抗CTLA-4IgG2b;D,无岩藻糖基化(NF)的抗CTLA-4IgG2b;E,抗CTLA-4IgG2a;F,抗CTLA-4IgG2a-NF。显示了每组(每组共12只小鼠)中TF小鼠的数目。

[0043] 图27显示了用不同同种型和无岩藻糖基化变体的抗CTLA-4抗体处理的小鼠组中MC38肿瘤的平均(A)和中值肿瘤体积(B)的变化。

[0044] 图28显示了在同基因CT26结肠腺癌小鼠模型中不同抗-OX40同种型的抗肿瘤活性,由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来量度:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗-OX40大鼠IgG1;C,抗-OX40小鼠IgG1;D,抗-OX40小鼠IgG2a。显示了每组(每组共10只小鼠)中TF小鼠的数目,。

[0045] 图29显示了在分阶段的同基因CT26小鼠肿瘤模型中不同抗-OX40同种型的抗肿瘤活性,由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来量度:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗-OX40小鼠IgG1-D265A;C,抗-OX40小鼠IgG1;D,抗-OX40小鼠IgG2a。显示了含有任何TF小鼠的组中(每组共8只小鼠)每组的TF小鼠的数目。

[0046] 图30显示了在同基因Sa1N肉瘤小鼠模型中不同同种型抗-ICOS Fc融合蛋白的抗肿瘤活性,由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来量度:A,对照小鼠IgG1抗体;B,ICOSL-小鼠IgG1融合蛋白;C,ICOSL-人IgG1融合蛋白;D,大鼠IgG2b抗-小鼠ICOS抗体,17G9。显示了每组(每组的最多10只小鼠)中TF小鼠的数目。

[0047] 图31显示了在来自MC38荷瘤小鼠的肿瘤中抗-小鼠ICOS抗体,17G9,对Foxp3⁺/CD4⁺(A)和Foxp3⁺/CD45⁺(B)T_{regs}的影响,与IgG1对照抗体比较。

[0048] 图32显示了在同基因MC38肿瘤小鼠模型中不同同种型的抗-小鼠PD-1抗体的抗肿瘤活性的第一项研究(实验#1),由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来量度:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗-PD-1IgG1;C,抗-PD-1IgG1D265A;D,抗-PD-1IgG2a。显示了每组(每组共11只小鼠)中TF小鼠的数目。

[0049] 图33显示了用不同同种型抗-PD-1抗体处理的小鼠组中MC38肿瘤的平均(A)和中值肿瘤体积(B)的变化(实验#1)。

[0050] 图34显示了在荷瘤小鼠中不同抗-PD-1抗体同种型对浸润MC38肿瘤的T细胞亚群

之百分比的影响的流式细胞术分析:A. $CD8^{+}T_{effs}$;B, $CD4^{+}T_{effs}$;C, $FoxP3^{+}/CD4^{+}T_{regs}$ 。

[0051] 图35显示了在同基因MC38肿瘤小鼠模型中不同同种型抗-小鼠PD-1抗体的抗肿瘤活性的第二项研究(实验#2),由用这些同种型处理的小鼠个体中肿瘤体积的改变来量度:A,对照小鼠IgG1抗体;B,抗-PD-1IgG1;C,抗-PD-1IgG1D265A;D,抗-PD-1IgG2a。显示了每组(每组共11只小鼠)中TF小鼠的数目。

[0052] 图36显示了用不同同种型抗-PD-1抗体处理的小鼠组中MC38肿瘤的平均(A)和中值肿瘤体积(B)的变化(实验#2)。

[0053] 发明详细说明

[0054] 本公开的某些方面涉及用于强化、优化或最大化Fc融合蛋白(例如抗体)的抗肿瘤效力的方法,该Fc融合蛋白特异性结合患有癌症或感染性疾病的患者体内T细胞上的靶标,例如免疫调变性靶标如CTLA-4,GITR或ICOS。然而,该靶标不必是参与调节免疫应答的免疫调变性靶标;更重要地,它是在肿瘤部位的 T_{regs} 上的表达水平高于在肿瘤部位的 T_{effs} 上的表达水平的靶标。此外,该靶标优选地在肿瘤部位 T_{regs} 上的表达水平高于在外周中 T_{regs} 和 T_{effs} 上的表达水平。在某些实施方案中,靶标是免疫调变性受体或配体,并且Fc融合蛋白的结合会改变该靶标的活性,藉此增强针对癌细胞的内源性免疫应答。

[0055] 本公开的方法包括选择、设计或修饰Fc融合蛋白的Fc区,以强化所述Fc区与激活性Fc受体(FcR)的结合。在某些实施方案中,这种与激活性FcR的增加的结合可以选择性介导肿瘤部位的 T_{regs} 的减少,例如通过ADC。这种作用机制涉及肿瘤部位选择性的 T_{regs} 选择性耗竭,首先在多种小鼠肿瘤模型中使用包含相应于不同IgG同种型的变体Fc区的抗小鼠CTLA-4抗体对该机制进行了示例。还已显示,结合其它免疫调变性受体(包括共刺激受体GITR,OX40及ICOS)的Fc融合蛋白也可执行该机制。因此,本方法不仅限于抗CTLA-4抗体,还可应用于可结合多种多样的受体(包括GITR,OX40和ICOS)的抗体和其它Fc融合蛋白。这种 T_{reg} 耗竭现象背后的机制提示:CD137和TIGIT是良好的靶标,而某些受体,包括PD-1,LAG-3,TIM-3和CD27,不可能是合适的靶标。

[0056] 本公开还提供了Fc融合蛋白,其特异性结合患有癌症或由感染原引起的疾病的受试者体内的T细胞上的免疫调变性靶标,并且该Fc融合蛋白的抗肿瘤或抗感染原活性可以通过本文公开的方法加以强化。

[0057] 本文还公开了用于增强患有癌症或者由感染原引起的疾病的患者体内的内源性免疫应答以治疗该受试者的方法,该方法包括向患者施用治疗有效量的抗肿瘤或抗感染原Fc融合蛋白,其中该Fc融合蛋白增强针对癌细胞或抗感染原的内源性免疫应答的能力已通过本文公开的方法被强化。

[0058] 术语

[0059] 为了使本公开更加容易理解,首先对一些术语进行了定义。如本申请中使用的,除非在本文中有明确描述,否则下列的每一个术语应当具有下文所述的含义。其它定义在本申请全文中给出。

[0060] “施用”是指使用任何本领域技术人员已知的各种方法和递送系统来向受试者物理地导入包含治疗剂的组合物。本发明抗体的优选施用途径包括静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、脊柱或其它肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所使用的,语句“肠胃外施用”意思是除肠和局部施用之外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于:静脉内、

腹膜内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注,以及在体内电穿孔。作为替代,本发明的抗体可以通过非肠胃外途径施用,如局部、表皮或粘膜途径施用,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部施用。施用也可以例如进行一次、多次,和/或历时一个或多个长时段来进行。

[0061] “抗体”(Ab)应包括,但不仅限于,糖蛋白免疫球蛋白,其特异性结合抗原并且至少包括通过二硫键相互连接的两个重(H)链和两个轻(L)链,或其抗原结合部分。每个H链包含重链可变区(本文缩写为 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域, C_{H1} , C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。 V_H 和 V_L 区可以进一步细分为高变性的区域,称为互补决定区(CDR),它们之间散在着较为保守的称作框架区(FR)的区域。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR组成,从氨基端向羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。

[0062] 抗体通常以高亲和力特异性结合其关联抗原,这表现为 10^{-5} - 10^{-11} M⁻¹或更小的解离常数(K_D)。任何大于大约 10^{-4} M⁻¹的 K_D 通常被认为指示非特异性结合。如本文所使用的,与抗原“特异性结合”的抗体是指以高亲和力与抗原和基本上相同的抗原结合的抗体,这意味着 K_D 为 10^{-7} M或更小,优选地 10^{-8} M或更小,甚至更优选地 5×10^{-9} M或更小,最优选地 10^{-8} M- 10^{-10} M或更小,但是不会以高亲和力与无关抗原结合。如果抗原与给定抗原显示高度的序列同一性,例如,如果它与给定抗原的序列显示至少80%,至少90%,优选至少95%,更优选至少97%,或甚至更优选至少99%的序列同一性,则该抗原与给定抗原是“基本上相同的”。作为举例,与人CTLA-4特异性结合的抗体也会与来自某些灵长类物种的CTLA-4抗原交叉反应,但是不会与来自某些啮齿动物的CTLA-4抗原或者与除CTLA-4之外的抗原(如人PD-1抗原)交叉反应。

[0063] 免疫球蛋白可能来自任何通常已知的同种型,包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG和IgM。IgG同种型在某些物种中可以被分细为亚类:人类中的IgG1,IgG2,IgG3和IgG4,小鼠中的IgG1,IgG2a,IgG2b和IgG3。“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如IgM或IgG1)。“抗体”包括例如天然存在的和非天然存在的抗体;单克隆和多克隆抗体;嵌合和人源化抗体;人或非人抗体;全合成抗体;和单链抗体。

[0064] “分离的抗体”是指如下的抗体,其基本上不含(free of)具有不同抗原特异性的其他抗体(例如,特异性结合CTLA-4的分离抗体基本上不含特异性结合除CTLA-4之外的抗原的抗体)。然而,特异性结合CTLA-4的分离抗体可能与其它抗原具有交叉反应性,例如来自不同物种的CTLA-4分子。而且,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。相比之下,“分离的”核酸是指与其天然存在的核酸显著不同(即具有截然不同的化学特性、性质和用途)的核酸组合物。例如,分离的DNA与天然DNA不同,是天然DNA的独立部分(free-standing portion),而不是天然存在的更高的结构复合物—染色体—的组成部分。此外,分离的DNA与天然DNA不同,可以用作PCR引物或杂交探针,用于例如测量基因表达和检测生物标志物基因或突变,以诊断疾病或预测治疗手段的功效。分离的核酸也可以是使用本领域众所周知的标准技术纯化的,从而基本上不含其它细胞组分或其它污染物,例如其其它的细胞核酸或蛋白质。

[0065] 语句“抗-抗原抗体”、“识别某抗原的抗体”和“特异针对某抗原的抗体”在本文中可以和“特异性结合某抗原的抗体”互换使用。

[0066] 术语“单克隆抗体”(“mAb”),是指具有单一分子组成的抗体分子(即一级序列基本上相同、并且对特定表位显示单一的结合特异性和亲和性的抗体分子)的制备物。单克隆抗体可以通过杂交瘤、重组、转基因或本领域技术人员已知的其它技术制造。

[0067] “人”抗体(HuMAb)是指这样的抗体,其可变区具有来自人种系免疫球蛋白序列的框架区和CDR区。而且,如果抗体含有恒定区,则恒定区也来自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点突变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”,不意图包括来自其它哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列被嫁接到人框架序列上的抗体。术语“人”抗体和“完全人”抗体被同义使用。

[0068] “人源化”抗体是指其中非人抗体CDR结构域以外的一些、大部分或全部的氨基酸被来自人免疫球蛋白的相应氨基酸所替换的抗体。在人源化形式抗体的一个实施方案中,CDR结构域以外的一些、大部分或全部氨基酸被来自人免疫球蛋白的氨基酸代替,而一个或多个CDR区域内的一些、大部分或全部氨基酸都不变。允许对氨基酸进行小的添加、删除、插入、取代或修饰,只要它们不会消除抗体结合特定抗原的能力即可。“人源化”抗体保留与原始抗体相似的抗原特异性。

[0069] “嵌合抗体”是指可变区来自一个物种而恒定区来自另一个物种的抗体,例如可变区来自小鼠抗体而恒定区来自人抗体的抗体。

[0070] “抗体片段”是指整个抗体的一部分,一般包括完整抗体的“抗原结合部分”(“抗原结合片段”),其保留特异性结合由完整抗体结合的抗原的能力,或者保留FcR结合能力的抗体Fc区。

[0071] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(“ADCC”)是指在体外或体内细胞介导的反应,其中表达FcR的非特异性细胞毒性细胞(如,自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞)识别与靶细胞表面抗原结合的抗体,并随后引起靶细胞的裂解。原则上,任何具有激活性FcR的效应细胞均可以被触发而介导ADCC。

[0072] “结合蛋白”是指以高亲和力特异性结合特定的部分或靶标的蛋白质。结合蛋白的实例包括,但不限于,抗体、抗体的抗原结合片段、adnectin、微型抗体、亲和体(affibodies)、affilin、受体的靶结合区、细胞粘附分子、配体、酶、细胞因子、和趋化因子。在本发明的优选实施方案中,结合蛋白包含抗体的Fc区。

[0073] “癌症”是指一大类以异常细胞在体内不受控制地生长为特征的各种疾病。不受控制的细胞分裂和生长导致形成恶性肿瘤或细胞,它们侵入邻近组织,还可以通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部分。

[0074] “细胞表面受体”是指能够接收信号、并将该信号传送通过细胞质膜的分子和分子复合物。本公开的细胞表面受体的实例包括CTLA-4,GITR,OX40,ICOS,PD-1,CD127,TIGIT和FcRs。

[0075] “效应细胞”是指免疫系统的一种细胞,其表达一种或多种FcR并介导一种或多种效应器功能。优选地,该细胞表达至少一种类型的激活性Fc受体,例如人FcγRIII,并执行ADCC效应器功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括外周血单个核细胞(PBMC)、NK细胞、单核

细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0076] “效应器功能”是指抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用,或者由其导致的生物化学事件。示例性“效应器功能”包括C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、Fc γ R介导的效应器功能如ADCC,和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),并下调细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)。此类效应器功能一般要求Fc区与结合域(例如,抗体可变结构域)相组合。

[0077] “Fc融合蛋白”在本文中可以和“包含Fc区的结合蛋白”互换使用,是指这样的蛋白质,该蛋白质在其结构中包含与Fc区可操作连接的结合蛋白。Fc融合蛋白的非Fc部分介导靶标结合,并且在功能上类似于,例如,抗体的可变区。包含Fc区的结合蛋白的为人熟知的实例包括抗体和免疫粘附素。

[0078] “Fc受体”或“FcR”是结合免疫球蛋白Fc区的受体。结合IgG抗体的FcR包括Fc γ R家族的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ R家族包括三种激活性(在小鼠中是Fc γ RI, Fc γ RIII和Fc γ RIV;在人中是Fc γ RIA, Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA)和一种抑制性(Fc γ RIIB)受体。人Fc γ R的各种性质总结于表1中。大多数天然效应器细胞类型共表达一种或多种激活性Fc γ R和抑制性Fc γ RIIB,而自然杀伤(NK)细胞选择性地表达一种激活性Fc受体(在小鼠中是Fc γ RIII,在人中是Fc γ RIIIA),但在小鼠和人类中不表达抑制性Fc γ RIIB。

[0079] “Fc区”(可结晶片段区域)或“Fc结构域”或“Fc”是指抗体重链的C-末端区域,其介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括与位于免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)上的Fc受体的结合,或者与经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。因此,Fc区是构成(comprising)抗体恒定区中除第一恒定区免疫球蛋白结构域之外的部分的多肽。在IgG, IgA和IgD抗体同种型中,Fc区由来自抗体两条重链的第二(C_{H2})和第三(C_{H2})恒定结构域的两个相同的蛋白片段构成;IgM和IgE的Fc区在每个多肽链中包含三个重链恒定结构域(C_H结构域2-4)。对于IgG,Fc区包含免疫球蛋白结构域C γ 2和C γ 3以及C γ 1和C γ 2之间的铰链。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以变化,但是人IgG重链Fc区通常定义为从重链位置C226或P230的氨基酸残基到羧基端的序列段,其中该编号是根据EU索引,如在Kabat中一样。人IgG Fc区的C_{H2}结构域从大约氨基酸231延伸至大约氨基酸340,而C_{H3}结构域位于Fc区的C_{H2}结构域的C末端侧,即,它从IgG的大约氨基酸341延伸至大约氨基酸447。如本文所使用的,Fc区可以是天然序列Fc或变体Fc。Fc还可以指处于分离状态的这个区域,或者处于包含Fc的蛋白多肽中的这个区域,这样的多肽例如“包含Fc区的结合蛋白”,又称“Fc融合蛋白”(例如,抗体或免疫粘附素)。

[0080] 表1. 人Fc γ Rs的性质

[0081]

Fcy	等位基因 变体	对人 IgG 的 亲和性	同种型偏好	细胞分布
FcyRI	无描述	高(K _D ~10 nM)	IgG1=3>4>>2	单核细胞、巨噬细胞、活 化的中性粒细胞、树突细 胞?
FcyRIIA	H131	低到中等	IgG1>3>2>4	中性粒细胞、单核细胞、 巨噬细胞、嗜酸性粒细 胞、树突细胞、血小板
	R131	低	IgG1>3>4>2	
FcyRIIA	V158	中等	IgG1=3>>4>2	NK 细胞、单核细胞、巨 噬细胞、肥大细胞、嗜酸 性粒细胞、树突细胞
	F158	低	IgG1=3>>4>2	
FcyRIIB	I232	低	IgG1=3=4>2	B 细胞、单核细胞、巨噬 细胞、树突细胞、肥大细 胞
	T232	低	IgG1=3=4>2	

[0082] “血液恶性肿瘤”包括淋巴瘤,白血病,骨髓瘤或淋巴样恶性肿瘤,以及脾和淋巴结的癌症。示例性淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤。B细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和大多数非霍奇金淋巴瘤。B细胞淋巴瘤的非限制性实例包括弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,粘膜相关淋巴组织淋巴瘤,小细胞淋巴母细胞性淋巴瘤(与慢性淋巴细胞性白血病重叠),套细胞淋巴瘤(MCL),伯基特淋巴瘤,纵隔大B细胞淋巴瘤,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤,脾边缘区淋巴瘤,血管内大B细胞淋巴瘤,原发性渗出性淋巴瘤,淋巴瘤样肉芽肿病。T细胞淋巴瘤的非限制性实例包括结外T细胞淋巴瘤,皮肤T细胞淋巴瘤,间变性大细胞淋巴瘤,和血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤。血液恶性肿瘤还包括白血病,例如但不仅限于,继发性白血病,慢性淋巴细胞性白血病,急性骨髓性白血病,慢性骨髓性白血病和急性淋巴细胞白血病。血液恶性肿瘤进一步包括骨髓瘤,例如但不仅限于,多发性骨髓瘤和闷烧多发性骨髓瘤。其它的血液学和/或B细胞或T细胞相关的癌症为术语“血液恶性肿瘤”所涵盖。

[0083] “免疫应答”是指脊椎动物体内针对外来作用介质的生物学应答,该应答可保护生物体免于被这些作用介质或者由其造成的疾病的伤害。免疫应答是由免疫系统的细胞(例如,T淋巴细胞,B淋巴细胞,自然杀伤NK)细胞,巨噬细胞,嗜酸性粒细胞,肥大细胞,树突细胞或嗜中性粒细胞)和由这些细胞的任一种或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体,细胞因子和补体)的作用介导的,其导致脊椎动物机体入侵病原体、细胞或被病原体感染的组织、癌细胞或其它异常细胞,或者,在自身免疫性或病理性炎症中,针对正常的人细胞或组织的选择性靶向、结合、损害、破坏,和/或消除。

[0084] “免疫调变剂”或“免疫调变剂”是指信号传导途径中的组分,其可能参与免疫应答的调变、调节或修饰。“调变”、“调节”或“修饰”免疫应答是指免疫系统的细胞的任何改变或此类细胞的活性的任何改变。此类调变包括免疫系统的刺激或抑制,该刺激或抑制可以表现为多种类型的细胞的数目增加或减少、这些细胞的活性的增加或减少、或者任何其他可能在免疫系统内发生的变化。抑制性和刺激性免疫调变剂均已被鉴定,其中一些在肿瘤微环境中具有强化的功能。在所公开的发明的优选实施方案中,免疫调变剂位于T细胞的表面。“免疫调变性靶标”或“免疫调节性靶标”是这样的免疫调变剂,其被底物、作用介质、部分、化合物或分子作为结合靶标,并且其活性被这些底物、作用介质、部分、化合物或分子的

结合所改变。免疫调变性靶标包括,例如,细胞表面上的受体(“免疫调变性受体”)和受体配体(“免疫调变性配体”)。

[0085] “免疫调变性Fc融合蛋白”或“免疫调变性Fc融合蛋白”是指这样的Fc融合蛋白,其与免疫调变剂结合,并且作为结合的结果,其增加或抑制该免疫调变剂的量或活性。

[0086] “免疫疗法”是指用包括诱导、强化、抑制或者修饰免疫应答的方法对患有疾病、具有发生疾病风险、或者疾病复发的受试者进行治疗。

[0087] “增强内源性免疫应答”意思是强化受试者体内现有的免疫应答的有效性或强度。此类效率和潜力的强化可以通过,例如,克服抑制内源性宿主免疫应答的机制,或者通过刺激强化内源性宿主免疫应答的机制来实现。

[0088] “蛋白质”是指包含至少两个连续连接的氨基酸残基的链,链的长度没有上限。蛋白质中的一个或多个氨基酸残基可以含有修饰,例如但不仅限于,糖基化、磷酸化、或形成二硫键。术语“蛋白质”在本文中可以和“多肽”互换使用。

[0089] “信号转导通路”或“信号通路”是指在将信号从一个细胞发送给另一个细胞,或者从细胞的一个部分发送给细胞的另一个部分的过程中发挥一定作用的两种或多种化学剂及它们之间的生物化学关系。

[0090] “受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于,脊椎动物如非人灵长类动物,绵羊,狗,兔,啮齿动物如小鼠,大鼠和豚鼠,鸟类例如鸡,两栖动物和爬行动物。在优选的实施方案中,受试者是哺乳动物,例如非人灵长类,绵羊,狗,猫,兔,雪貂或啮齿动物。在所公开发明的任何方面的更优选的实施方案中,受试者是人。术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。

[0091] 药物或治疗剂(例如本发明Fc融合蛋白)的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是药物的任何如下所述的量,当单独使用或与另一种治疗剂组合使用该量的药物时,可促进疾病消退,疾病消退表现为疾病症状的严重度降低、无疾病症状期的频率和持续时间增加、或者防止由患病导致的障碍或失能。药物的治疗有效量或剂量包括“预防有效量”或“预防有效剂量”,“预防有效量”或“预防有效剂量”是药物的任何如下所述的量,当将该量的药物单独施用或者与另一种治疗剂组合施用于具有发生疾病的风险或者遭受疾病复发的受试者时,可抑制疾病的发生或复发。治疗剂促进疾病消退或抑制疾病发展或复发的能力可以用技术人员已知的各种方法进行评估,例如在人类受试者的临床试验中,在可预测在人类中的效力的动物模型系统中,或者通过在体外测定系统中测定试剂的活性。

[0092] 作为举例,抗癌剂促进受试者体内的肿瘤消退。在优选的实施方案中,治疗有效量的药物促进癌细胞消退乃至消除癌症。“促进癌症消退”意思是单独施用或与抗肿瘤剂(anti-neoplastic agent)组合施用治疗有效量的药物导致肿瘤生长减少或大小减小、肿瘤坏死、至少一种疾病症状的严重程度降低,无疾病症状期的频率和持续时间增加,防止由患病导致的障碍或失能,或者以其他方式改善患者的疾病症状。此外,术语关于治疗的“有效”和“有效性”包括药理学有效性和生理学安全性二者。药理学有效性是指药物促进患者癌症消退的能力。生理学安全性是指由于药物施用导致的细胞、器官和/或生物体水平上的毒性或者其它不良生理效果(不良作用)的水平。

[0093] 作为肿瘤治疗的例子,与未经治疗的受试者相比,治疗有效量或剂量的药物优选地可以抑制细胞生长或肿瘤生长达至少大约20%,更优选至少大约40%,甚至更优选至少

大约60%，并且还更优选至少大约80%。在最优选的实施方案中，治疗有效量或剂量的药物可完全抑制细胞生长或肿瘤生长，即优选地抑制细胞生长或肿瘤生长达100%。化合物抑制肿瘤生长的能力可以在动物模型系统中进行评价，例如本文描述的CT26结肠腺癌、MC38结肠腺癌和Sa1N纤维肉瘤小鼠肿瘤模型，它们能够预测在人肿瘤中的效力。作为替代，组合物的这一性质可以通过检验化合物抑制细胞生长的能力进行评估，这样的抑制可以通过技术人员已知的测定法在体外加以测量。在本发明的其他优选实施方案中，肿瘤消退可以观察到，并持续至少约20天，更优选至少约40天，或甚至更优选至少约60天的时间。

[0094] 对受试者的“治疗”或“疗法”是指以逆转、减轻、改善、抑制、减缓或防止与疾病有关的症状、并发症、病症或生化指标的出现、进展、发展、严重程度或复发为目的对受试者进行任何类型的干预或处理，或者向其施用活性剂。

[0095] 抗CTLA-4抗体同种型对抗肿瘤效力和T细胞亚群的影响

[0096] 已经商业化的治疗性抗体大多是人IgG1同种型，该同种型与其它人抗体同种型相比具有强的ADCC和CDC。此外，治疗性IgG1抗体通过与新生的Fc受体(FcRn)结合而在血液中具有长期稳定性。若干种治疗性抗体的活性至少部分地是由ADCC介导的，这些抗体包括抗-CD20利妥昔单抗(RITUXAN®)(Dall'Ozzo等,2004)，抗-Her2曲妥珠单抗(HERCEPTIN®)(Gennari等,2004)，抗-肿瘤坏死因子- α (抗-TNF- α)英夫利昔单抗(REMICADE®)(Louis等,2004)，和抗-RhD(Miescher等,2004)。CDC也被认为是利妥昔单抗(Idusogie等,2000)和阿仑单抗(alemtuzumab)(CAMPATH®)(Crowe等,1992)的可能的抗肿瘤机制之一。因此，并不令人惊讶的是，最近强化治疗性抗体的效力的努力集中于强化效应器功能，特别是ADCC和CDC上(Natsume等,2009)。已经有成功的方法被报道，特别是涉及通过在Fc区引入氨基酸突变或者通过修饰Fc连接的寡糖来自强化抗体Fc区与Fc γ RIIIa或C1q的结合活性。

[0097] 然而，在可结合T细胞上免疫调变剂和增强T细胞应答的作用介质，如抗体的情况下，可以说不希望利用对T细胞有细胞毒(例如介由ADCC、CDC或ADCP)的抗体，因为这与在上调免疫应答中增加这些T细胞的数目和活性的目的相悖。例如，美国专利No.6,682,736公开了人抗CTLA-4抗体，tremelimumab，其教导“不优选使用杀死细胞的抗体”，而最好是“直接抑制CTLA-4与其配体结合以减轻T细胞的下调”。该专利进一步鉴定了抗体同种型，包括人IgG1和IgG3，其能够进行CDC，和其它同种型，包括人IgG2和IgG4，其不介导CDC。该专利进一步公开了：不期望的抗体同种型，例如人IgG1或IgG3，可以用本领域中熟知的常规技术转变成期望的IgG2或IgG4同种型。与这些教导一致，美国专利No.6,682,736也公开了：本文中讨论的大部分CTLA-4抗体，包括tremelimumab，是理想的人IgG2同种型，其能够被容易地加以同种型转换，而生成同样期望的IgG4同种型。

[0098] 现在已经认识到，CTLA-4主要通过通过对CD4⁺T细胞的两个主要亚群的不同影响来发挥其生理学功能：(1)下调(downmodulation)辅助T细胞的活性，和(2)强化调节性T细胞(T_{regs})的免疫抑制活性(Lenschow等,1996;Wing等,2008;Peggs等,2009)。已知T_{regs}组成性地表达高水平的表面CTLA-4，并且有人已经提出此类分子是它们的调节功能不可或缺的(Takahashi等,2000;Birebent等,2004)。因此，T_{reg}群体可能对CTLA-4阻断的影响最敏感。

[0099] CTLA-4阻断导致广泛的免疫应答的激活，这些免疫应答依赖于辅助T细胞；反过来，CTLA-4接合到T_{regs}上会强化其抑制功能。因此，在对CTLA4阻断的作用机制的考虑中，强

化效应器CD4⁺T活性和抑制T_{reg}依赖性的免疫抑制可能是重要的因素。一个机制可能是,CTLA-4阻断直接作用于CD4⁺和/或CD8⁺细胞,除去CTLA-4的抑制效果,藉此增强效应器功能。除此之外或在此之上,CTLA-4在T_{regs}上的组成性表达提示CTLA-4阻断的临床效果可能是由于T_{regs}的耗竭或阻断所介导的。在一项旨在解析这些替代机制的研究中,Maker等(2005)得出结论称,CTLA-4阻断的抗肿瘤效应是由于T细胞激活的增加,而非T_{regs}的抑制或耗竭。另见O' Mahony和Janik(2006)以及Rosenberg(2006)。然而,另一项评估CTLA-4阻断T_{eff}或T_{reg}隔室(compartment)的独立贡献的研究得出结论称,通过CTLA-4阻断这两种细胞类型而直接强化T_{eff}功能同时抑制T_{reg}活性,二者的组合对于癌症免疫治疗中介导抗CTLA-4抗体的治疗效果是至关重要的(Peggs等,2009)。

[0100] 本研究的一个方面评价了小鼠抗CTLA-4抗体的同种型对抗体在各种小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤活性的影响。首先,产生小鼠抗-小鼠CTLA-4抗体的四种变体,对应于IgG1、突变的IgG1D265A、IgG2b和IgG2a同种型,并显示这四种变体等效地结合CTLA-4⁺细胞且在小鼠血清中显示相似的药代动力学行为(实施例1)。在CT26结肠腺癌肿瘤模型中测试了小鼠抗CTLA-4的四种同种型的抗肿瘤活性,结果表明,IgG2a处理导致在10只被处理的小鼠中有9只显示完全的肿瘤排斥,而IgG2b同种型造成中度的肿瘤生长抑制,突变的IgG1D265A同种型则表现出极少的活性,类似于对照小鼠IgG(实施例2)。

[0101] 然后在CT26结肠腺癌小鼠肿瘤模型中评估不同抗CTLA-4同种型对肿瘤和肿瘤引流淋巴结(tumor draining lymph node)中亚群T细胞群体的影响。用抗CTLA-4抗体处理小鼠导致肿瘤部位CD8⁺细胞毒性T细胞群体增加,其中IgG2a和IgG2b同种型诱导的增加最大(实施例4),而IgG2a同种型导致CD4⁺T辅助细胞群体减小。关于对T_{regs}的影响,观察到各处理组之间有显著差异。用IgG2a同种型处理显著降低了肿瘤部位T_{regs}的群体,而IgG2b未显示变化,且IgG1D265导致T_{reg}的数目增加。CD8⁺T_{effs}的增加,连同由IgG2a同种型抗CTLA-4抗体所介导的T_{regs}减少,导致了肿瘤部位处T_{eff}对T_{reg}的比值提高,这指示强的抗肿瘤活性。

[0102] 与肿瘤部位处的T细胞亚群的变化相反,所有抗CTLA-4同种型增加肿瘤引流淋巴结中的T_{regs}数目的行为相似(实施例4),鉴于早先的研究(Quezada等,2006;Maker等,2005;Rosenberg,2006),这一点并不令人意外。因此,令人惊奇的结果是证明了在肿瘤部位处选择性的T_{reg}丧失。已证明这一出人意料的结果并不是CT26肿瘤模型的特性,因为在MC38结肠癌小鼠肿瘤模型(实施例5和6)和免疫原性Sa1N纤维肉瘤肿瘤模型(实施例7和8)中也展示了相似的模式。在这两种肿瘤模型中,IgG2a同种型均产生了最显著的肿瘤生长抑制效果,同时介导CD8⁺细胞的百分比显著增加,并伴随着T_{regs}的水平急剧降低。使用其它抗体,包括激动性抗GITR,OX40和ICOS抗体(实施例10-16),也观察到了相同的现象,但抗-PD-1抗体则没有(实施例17)。关于某些IgG2a抗体介导肿瘤部位处T_{regs}的耗竭与诱导淋巴结中T_{reg}数目增加的效果差异的分子基础,可以从本文公开的数据得到阐明。如实施例18所述,多个T细胞靶标,除CTLA-4之外还包括ICOS、GITR、OX40和CD137,不仅在肿瘤部位的T细胞上的表达高于外周T细胞,而且与在CD8和CD4T_{effs}上的表达水平相比,优先在T_{regs}上表达。此外,有证据显示,表达激活性FcR(特别是FcγRIV)的细胞(例如巨噬细胞)在肿瘤部位的存在高于在外周部位的存在(Simpson等,2013)。已经显示此类细胞在抗CTLA-4抗体治疗之后的肿瘤浸润性T_{regs}的耗竭中发挥主要作用(Simpson等,2013)。因此,结合激活性FcR并介导ADCC的Fc融合蛋白(例如抗CTLA-4)的小鼠IgG2a同种型可有效耗竭优先表达抗体的靶标的T细胞,例

如与肿瘤部位处CD8和CD4 T_{effs} 上的表达水平相比差异性表达高水平的CTLA-4的肿瘤部位 T_{regs} 。

[0103] 抗体的同种型差异已被证明对抗体的生物学活性具有深远影响(Nimmerjahn和Ravetch,2005;Nimmerjahn和Ravetch,2008;Nimmerjahn和Ravetch,2010)。在B16鼠黑色素瘤模型中,肿瘤特异性抗原酪氨酸酶相关蛋白-1(Tyrp1;gp75)的TA99抗体的抗肿瘤活性显示需要结合激活性受体FcRIV结合(Nimmerjahn和Ravetch,2005)。随后的研究得到了相互矛盾的结论,Bevaart等(2006)发现了FcγRI扮演必需的角色,但FcγRIII或FcγRIV没有参与,而Albanesi等(2012)的结论是FcγRI和FcγRIII对TA99治疗效果有贡献,而FcγRIV没有参与其中。有趣的是,抗CTLA-4在本文所述的CT26、MC38和Sa1N肿瘤模型中的抗肿瘤活性(实施例2,5和7)暗示抗肿瘤活性需要激活性Fc受体。与激活性受体的结合的强化以及与抑制性受体的结合的降低与抗CTLA-4同种型的抗肿瘤活性相关,具有如下的等级:mIgG2a>>mIgG2b>>mIgG1D265A。该等级与对介导ADCC功能的抗体测定的免疫球蛋白Fc区与激活性Fc受体结合和与抑制性Fc受体结合的活性比(称作A/I比)一致,该活性比由Nimmerjahn和Ravetch(2005)定义。

[0104] 对于抗CTLA-4,最大抗肿瘤活性系通过耗竭或消除肿瘤部位的 T_{regs} 同时激活 T_{effs} 而获得(实施例4,6和8)。值得注意的是,激活性T细胞虽然表达CTLA-4,但并没有被消除,而 T_{reg} 已知表达更高的组成性水平的抗CTLA-4(Read等,2000;Takahashi等,2000;Birebent等,2004),却从肿瘤部位消失。因此,小鼠抗CTLA-4IgG2a同种型与其他同种型相比能够最大限度减少 T_{reg} 的数目,同时不影响介导抗肿瘤应答的激活性 T_{effs} 。因此,IgG2a同种型既能够强化抗肿瘤效应细胞的活性,又特异性减少抑制抗肿瘤应答的细胞群体。这些受IgG2a抗CTLA-4的不同影响的T细胞群对控制肿瘤生长都有核心意义。 T_{effs} 和 T_{regs} 对耗竭的敏感性不同很可能是由于效应细胞的细胞表面上CTLA-4表达水平较低所致(见实施例18;另见Selby等,2013)。

[0105] 这个结果还提示,肿瘤微环境处的细胞的组成、以及它们表达的Fc受体,是抗CTLA-4的抗肿瘤活性的原因。观察到特异定位在肿瘤部位处的 T_{regs} 的数目减少,而淋巴结中的那些 T_{regs} 被所有同种型的抗CTLA-4所激活,这清楚地表明了抗CTLA-4的不同同种型的活性的组织特异性差异。

[0106] 如前所述,抗CTLA-4-IgG2a以及抗CTLA-4-IgG2b(程度小于前者)均介导肿瘤部位 T_{regs} 的消除或耗竭,这与它们结合激活性FcγR的能力一致。该作用的发生伴随着CD8⁺ T_{effs} (和CD8⁺T细胞)的激活和扩增,后者可能是通过抑制CTLA-4-B7的相互作用介导的。然而,本文公开的数据并不排除 T_{eff} 活化纯粹是 T_{reg} 耗竭的结果的可能性。因此,当与其他同种型相比时,抗CTLA-4的小鼠IgG2a同种型能够强有力地减少 T_{reg} 数目,而不影响介导抗肿瘤应答的激活性 T_{effs} 。实际上,发现肿瘤部位处效应器细胞因子分泌的增加(IFNγ, TNFα, 和IL-13, 可能还有IL-10(Emmerich等,2012;Mumm等,2011)与 T_{reg} 抑制的丧失和激活性CD8效应器的增加一致。

[0107] IgG1和IgG1-D265A同种型在MC38和CT26模型的治疗性处理中没有抗肿瘤活性也是值得注意的。抑制CTLA-4-B7与抗CTLA-4IgG1或抗CTLA-4IgG1D265A的相互作用导致 T_{regs} 在外周的激活和扩增,而仅仅阻断 T_{effs} (即,没有消除 T_{reg})不足以促进可检测的抗肿瘤应答。此外,阻断 T_{regs} 上的CTLA-4尽管显示可减小 T_{reg} 的功能(Quezada等,2006;Onishi等,

2008),但也没有明显强化抗肿瘤活性。相反,在B16黑色素瘤模型中,使用抗CTLA-4(仓鼠抗-小鼠CTLA-4 9H10),GVAX疗法,和用表达人或小鼠CTLA-4的T细胞亚群重构被辐照的受体小鼠,小鼠CTLA-4在 T_{effs} 和 T_{regs} 上的表达是发挥完全抗肿瘤活性必需的(Peggs等,2009)。然而,与本文所述的研究不同,在这个模型中靶向 T_{eff} 的抗CTLA-4阻断仅导致部分抗肿瘤效果。

[0108] 除抗CTLA-4抗体之外的Fc融合蛋白的同种型对抗肿瘤效力的影响

[0109] 在证明了某些抗CTLA-4同种型,特别是小鼠IgG2a同种型,以及小鼠IgG2b(程度低于前者),介导肿瘤部位处 T_{regs} 的消除或耗竭,与Fc区结合激活性Fc γ R的能力一致,并且与抗肿瘤效力相关(实施例1-7)之后,对同种型对其它抗体或其它Fc融合蛋白的抗肿瘤活性的影响进行了研究。

[0110] 在同基因的MC38结肠癌和Sa1N肉瘤小鼠模型中评估了不同抗GITR同种型的抗肿瘤活性(实施例10-12)。与抗CTLA-4的结果相似,证明了抗GITR IgG1和IgG1D265A同种型基本上没有抗肿瘤活性,而小鼠IgG2a和大鼠IgG2b同种型(在结合小鼠激活性FcR方面相当于小鼠IgG2a)诱导了最大的肿瘤生长抑制(实施例11)。抗GITR mG2a、mG2b和rG2b同种型对外周 T_{reg} 群体的影响极小,或者诱导外周 T_{reg} 群体少量增加,而在肿瘤环境中诱导显著的 T_{reg} 耗竭,与肿瘤生长抑制相关(实施例11和12)。相反,mIgG2a同种型导致肿瘤部位CD8⁺细胞的百分比增加,而mIgG1和大鼠IgG2b不导致CD8⁺细胞增加或者仅导致略微增加。没有一种同种型对外周CD8⁺细胞的水平具有重要影响。Bulliard等(2013)最近也报道了类似的数据。

[0111] 在同基因CT26肿瘤小鼠模型中测试抗-0X40同种型(实施例14)和在Sa1N和MC38肿瘤模型中测试抗-ICOS同种型(实施例15和16)也获得了基本相似的数据。然而,在MC38肿瘤模型中评估抗-PD-1同种型显示,尽管抗-PD-1IgG2a同种型表现出一些抗肿瘤活性,但是低于抗-IgG1或IgG1D265A同种型所展示的活性(实施例17)。这些结果,其中抗-PD-1IgG2a同种型相对于IgG1和IgG1D265A同种型未能增强抗肿瘤活性,与用抗CTLA-4、GITR、0X40和ICOS IgG2a抗体获得的结果形成了鲜明的对比。而且,与IgG1和IgG1D265A同种型相比,抗-PD-1IgG2a同种型导致肿瘤部位CD8⁺细胞的百分比降低而 T_{regs} 的百分比增加,这与IgG1和IgG1D265A同种型构成了对照:IgG1和IgG1D265A诱导了肿瘤部位CD8⁺细胞少量增加,并且与IgG2a同种型相比,诱导较小的 T_{regs} 百分比增加(实施例17)。

[0112] 对肿瘤部位和外周T细胞亚型上不同受体的表达水平的研究有助于阐明潜在的机制。数据显示,某些T细胞受体,包括ICOS,GITR,CTLA-4,0X40,CD137,CTLA-4和TIGIT,在肿瘤部位的 T_{regs} 上以相对高的水平表达,相比于肿瘤部位的CD8和CD4 T_{effs} 上的表达水平。这些受体在肿瘤部位T细胞亚型上的表达水平也高于在外周相同类型T细胞上的表达水平。相反,其他受体,包括PD-1、LAG-3和TIM-3,在肿瘤部位的CD8和/或CD4 T_{effs} 上的表达水平高于肿瘤部位 T_{regs} 上的表达水平。CD27在肿瘤部位和在外周的不同细胞类型上显示相当恒定的表达水平。

[0113] 因此,结合激活性FcR并介导ADCC的Fc融合蛋白(例如抗CTLA-4)的小鼠IgG2a同种型可有效耗竭优先表达该抗体的靶标的T细胞,例如肿瘤部位的 T_{regs} ,其与肿瘤部位CD8和CD4 T_{effs} 上的表达水平相比,差异性表达高水平的CTLA-4。

[0114] 值得注意的是,增强Fc融合蛋白(如抗体)的抗肿瘤效力的 T_{regs} 耗竭机制对结合共刺激受体的激动抗体和结合共抑制受体的拮抗抗体均有效。数据表明,在T细胞表面上表达

的任何蛋白,无论其功能如何,均可作为靶标用于结合与激活性FcR显示强结合性的Fc融合区,例如小鼠中的IgG2a和人类中的IgG1,以诱导靶细胞的ADCC介导的耗竭。在抗肿瘤Fc融合蛋白(例如抗肿瘤抗体)的情况下,期望靶蛋白差异表达,在肿瘤部位的 T_{regs} 上的表达水平高于在肿瘤部位的 T_{effs} 上的表达水平,使得肿瘤部位存在 T_{regs} 的选择性净耗竭,且同时存在刺激免疫应答。还希望靶蛋白靶蛋白差异表达,在肿瘤部位的 T_{regs} 上的表达水平高于在外周的其它T细胞上的表达水平,使得刺激免疫应答的 T_{reg} 耗竭成分被主要限制于肿瘤部位。因此,靶向ICOS,GITR,CTLA-4,OX40,CD137,CTLA-4和TIGIT的Fc融合蛋白是如本文所述地通过修饰Fc区以强化该Fc区与激活性FcR的结合来强化其抗肿瘤效力的良好候选者。特异性结合CTLA-4但不阻断其共抑制活性的抗CTLA-4Fc融合蛋白(例如抗CTLA-4抗体)是用工程手段(通过选择、设计或修饰Fc区而强化Fc区与激活性Fc受体(FcR)的结合)强化抗肿瘤效力的良好候选者。这样的强化Fc融合蛋白可以表现出高抗肿瘤效力,但没有刺激外周免疫应答的某些副作用。

[0115] 相反,靶向PD-1,LAG-3,TIM-3和CD27的Fc融合蛋白不可能是通过本文所公开的方法强化其抗肿瘤效力的良好候选者,因为这些受体在肿瘤部位 T_{effs} 上的表达水平比在 T_{regs} 上的表达水平更高。在实施例17中用抗-PD-1获得的数据实证了这个观点。

[0116] 用于强化免疫调变性Fc融合蛋白的抗肿瘤效力的方法

[0117] 本文公开的数据暗示了抗CTLA-4抗体和其它结合T细胞上的免疫调变性靶标(包括但不限于共刺激和共抑制受体和受体配体)的Fc融合蛋白在治疗癌症患者中的活性。这些数据还提示了更高效力的抗免疫调变性抗体的潜在设计。

[0118] 易普单抗是一种人抗人CTLA-4单克隆抗体,已被批准用于治疗转移性黑色素瘤,并在接受其它癌症的临床测试(Hoos等,2010;Hodi等,2010;Pardoll,2012a)。易普单抗具有人IgG1同种型,其最佳结合于大多数人Fc受体(表1;Bruhns等,2009),并且在其结合的激活性Fc受体的类型方面被认为与小鼠IgG2a等同。因为IgG1结合人NK细胞和单核细胞表达的激活性受体CD16(Fc γ RIIIa),故易普单抗能够介导ADCC。该IgG1同种型易普单抗最初是直接从杂交瘤中分离的,但随后在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中被克隆和表达。尽管考虑到介导ADCC和/或CDC的同种型可能不适用于旨在上调免疫应答的靶向T细胞上的受体的抗体,但是仍然保留了该抗体的IgG1同种型,这部分是因为它在食蟹猴中会增强疫苗应答,并且被认为是具有功能的。易普单抗已显示可增加血液中激活性T细胞的数目,其证据是,例如,处理后CD4⁺和CD8⁺细胞的表面上HLA-DR的表达显著增加以及绝对淋巴细胞计数增加(Ku等,2010;Attia等,2005;Maker等,2005;Berman等,2009;Hamid等,2009),提示在人的外周中没有发生T细胞耗竭。使用IL-2活化的PBMC作为效应细胞证明易普单抗仅有中等水平的激活性T细胞的ADCC(未发表);然而,没有测试使用 T_{regs} 作为靶标。已经观察到,用易普单抗处理患者的血液中外周 T_{reg} 频率有微小变化(Maker等,2005),但是关于易普单抗对肿瘤内 T_{regs} 的影响的可得信息很少。然而,已有人描述了易普单抗治疗的患者的转移性黑素瘤病灶的组织活检中CD8⁺对 T_{reg} 的高比值与肿瘤坏死之间的正相关性(Hodi等,2008)。来自易普单抗治疗膀胱癌患者的肿瘤组织的CD4⁺Foxp3⁺T细胞的百分比低于来自未经治疗的膀胱癌患者的肿瘤(Liakou等,2008)。这些结果与本文公开的数据一致,即易普单抗介导肿瘤部位处 T_{reg} 的减少。

[0119] 与之形成对照的是,tremelimumab是IgG2同种型,除了Fc γ RIIa变体H131之外,其

不能有效结合Fc受体(Bruhns等,2009)。尽管tremelimumab具有通过阻断CTLA-4和B7之间的相互作用强化T细胞应答的能力,但是本文公开的数据表明,tremelimumab介导肿瘤处 T_{regs} 耗竭的作用可能有限,在此基础上,预期其表现的抗肿瘤活性低于易普单抗。难以直接比较这两种抗体的临床活性,因为它们的给药方案不同(参见,例如,Ascierto等,2011)。tremelimumab与易普单抗相似,具有可证实的抗肿瘤活性(Ribas,2010)。有趣的是,关于tremelimumab作用机制的研究显示,在通过免疫组织化学分析的有限数量的样本中,治疗导致肿瘤浸润性CD8⁺ T细胞增加,而治疗后肿瘤中的Foxp3⁺细胞数目没有变化(Comin-Anduix等,2008;Huang等,2011)。作为替代,抑制 T_{reg} 的功能可以通过阻断CTLA-4/B7相互作用来实现。

[0120] 基于本文公开的关于针对T细胞上靶标的抗体,包括抗CTLA-4,抗GITR,抗-0X40和抗-ICOS抗体,的作用机制的实验数据,本公开提供了用于强化、优化或最大化特异性结合患有癌症或者由感染原引起的疾病的患者体内的T细胞上的靶标的Fc融合蛋白的抗肿瘤效力的方法,其中该方法包括修饰Fc融合蛋白的Fc区以强化所述Fc区与激活性Fc受体(FcR)的结合。抗体与激活性FcR的这种强化的结合,在某些靶标的情况下,已经显示可导致肿瘤环境中 T_{regs} 耗竭,并增加抗体的抗肿瘤活性。在优选的实施方案中,靶标是免疫调变性受体或者配体,并且Fc融合蛋白的结合会改变靶标的活性,藉此增强针对癌症的细胞的内源性免疫应答。

[0121] 本公开发明的各个方面已经用抗CTLA-4、抗GITR、抗-0X40和抗-ICOS抗体进行了举例。然而,本文公开的方法不仅限于抗体或者限于免疫调变性受体靶定。相反,本发明可应用于多种多样的可结合在T细胞表面上表达的各种靶标的Fc融合蛋白。因此,在某些实施方案中,Fc融合蛋白包括与结合蛋白操作连接的Fc区,结合蛋白包括例如:抗体的抗原结合片段,包括单链可变片段(scFv),二价或双价的scFv(di-scFv或bi-scFv),双抗体,三价的三抗体(triobody)或四价的四抗体(tetradbody),微型抗体或分离的CDR(更详细的内容参见Hollinger和Hudson,2005;Olafsen和Wu,2010);adnectin;亲和体;affilin;受体的配体结合区;细胞粘附分子;受体配体;酶;细胞因子;或趋化因子。使用在循环中比完整抗体被更快速地清除的Fc融合蛋白,例如抗体的抗原结合片段的较小衍生物,有助于减轻过度活跃的免疫反应的潜在毒性,和/或使得快速除去诱导性药物成为可能。在某些实施方案中,Fc融合蛋白包括与受体配体操作连接的Fc区。在优选的实施方案中,Fc融合蛋白是抗体。

[0122] 在本方法的某些方面中,抗体是IgG同种型。在其它方面中,抗体是单克隆抗体。在其它方面中,单克隆抗体是嵌合型、人源化或人抗体。在某些优选的实施方案中,单克隆抗体是人IgG抗体。在其它优选的实施方案中,人IgG抗体与激活性FcR的结合被强化。激活性FcR可以是FcγI,FcγIIa或FcγIIIa受体。在某些方面中,人IgG抗体与FcγI,FcγIIa或FcγIIIa受体的结合的强化导致介导肿瘤部位的 T_{regs} 的减少。

[0123] 在本发明方法的某些实施方案中,人IgG抗体与FcγI,FcγIIa或FcγIIIa受体的增强结合(a)不会介导肿瘤部位效应T细胞(T_{effs})的减少,或者(b)介导其增加。在某些优选的实施方案中,靶标在肿瘤部位 T_{regs} 上的表达水平高于在肿瘤部位 T_{effs} 上的表达水平。在其他实施方案中,靶标在肿瘤部位 T_{regs} 上的表达水平高于在外周 T_{regs} 或 T_{effs} 上的表达水平。

[0124] 而且,在本发明的方法中使用的Fc融合蛋白可以结合T细胞上的共刺激或共抑制性免疫调变靶标。用于特异性结合共刺激性靶标的Fc融合蛋白是激动性Fc融合蛋白。例如,

激动性Fc融合蛋白用于靶向T细胞上的共刺激性免疫调变物如GITR,CD134 (OX40), ICOS, CD137 (4-1BB), CD27, CD28或HVEM。激动性Fc融合蛋白与共刺激性免疫调变剂的结合导致免疫应答的上调,特别是T细胞应答的上调。在本方法的某些实施方案中,Fc融合蛋白是激动性抗体,其增强T细胞上的共刺激性免疫调变剂靶标的活性。在优选的实施方案中,共刺激性免疫调变靶标是GITR,OX40,ICOS或CD137。

[0125] 相反,用于特异性结合共抑制靶标的Fc融合蛋白是抑制性或拮抗性Fc融合蛋白。例如,抑制性Fc融合蛋白可用于靶向T细胞上的共抑制性免疫调变剂,例如但不限于:CTLA-4,PD-1,PD-L1,BTLA,TIM-3,LAG-3,A2AR,KLRG-1,CD244,CD160,或VISTA受体。在用于增强融合蛋白的抗肿瘤效力的本发明方法的某些实施方案中,Fc融合蛋白是选自下组的拮抗性抗体:抗CTLA-4抗体,抗-BTLA抗体,抗-VISTA受体抗体,抗-A2aR抗体,抗-KLRG-1抗体,抗-CD244抗体,抗-CD160抗体,和抗-TIGIT抗体。在优选的实施方案中,Fc融合蛋白是拮抗性抗体,其阻断T细胞上的共抑制性免疫调变靶标的活性。在优选的实施方案中,共抑制性免疫调变靶标是CTLA或TIGIT。拮抗性Fc融合蛋白与共抑制性免疫调变剂的结合导致免疫应答的上调,特别是T细胞应答的上调。

[0126] 在某些优选的实施方案中,抗体是抗CTLA-4抗体。在进一步优选的实施方案中,抗CTLA-4抗体是易普单抗或者tremelimumab,或这些抗体的被修饰以增强Fc区与激活性FcR的结合的变体。在其它实施方案中,抗体是抗-PD-1抗体。在本公开的任何方法中,受试者优选地是人。

[0127] 尽管特异性地靶向 T_{regs} 的抗体尚未被制造出来,但是许多处于临床试验中的免疫检查点抗体都可以通过涉及阻断 T_{regs} 的免疫抑制活性的机制强化抗肿瘤免疫(Pardoll, 2012b)。如本文所证实的,小鼠抗CTLA-4(一种免疫检查点抗体)的IgG2a同种型令人惊奇地且出乎意料地介导肿瘤部位选择性的 T_{regs} 耗竭,同时介导肿瘤引流淋巴结内 T_{regs} 的增加,以及肿瘤内 $CD8^+T_{effs}$ 的增加(实施例4、6和8)。尽管 T_{regs} 可以被免疫调变性Fc融合蛋白靶定,但是在本文公开的发明的某些方面中,被靶定的细胞是除 T_{reg} 之外的其他类型的抑制细胞。类似地,尽管本公开的Fc融合蛋白可靶向共抑制性免疫调变剂,例如CTLA-4,但是在本文公开的发明的某些方面中,被靶向的免疫调变剂是共刺激性免疫调变剂如GITR,OX40,CD137或ICOS。因此,在本发明的某些实施方案中,Fc融合蛋白,例如激动性或拮抗性抗体,与在抑制性细胞群上表达的免疫调变靶标(无论是共刺激性或共抑制性靶标)结合,并介导该细胞群的耗竭或消除。在优选的实施方案中,Fc融合蛋白保护性细胞群上表达的免疫调变靶标的结合可强化表达该免疫调变靶标的保护性细胞群体的活性,或者对这样的保护性细胞群体没有有害作用。在某些实施方案中, T_{reg} 或其它免疫抑制性T细胞上的被Fc融合蛋白结合的靶标不是免疫调变性靶标。

[0128] 在靶向免疫检查点的免疫治疗药物的临床试验中观察到了对多种肿瘤类型的持久的临床应答,甚至经过密集预处理的患者中亦是如此,这些肿瘤类型包括相当大一部分的黑色素瘤(MEL),肾细胞癌(RCC),鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)和非鳞状NSCLC患者以及在各种转移部位,包括肝,肺,淋巴结,和骨(参见例如,Pardoll, 2012b; Topalian等, 2012; Brahmer等, 2012; Mellman等, 2011; Flies等, 2011)。在本发明的某些实施方案中,Fc融合蛋白抗癌效力强化的癌症选自下组:骨癌症、胰腺癌症、皮肤癌症、头或颈部的癌症、乳腺癌、肺癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、肾癌症、子宫癌症、卵巢癌症、结肠直肠癌、结肠癌

症、直肠癌、肛门区域的癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道的癌症、小肠的癌症、内分泌系统的癌症、甲状腺的癌症、甲状旁腺的癌症、肾上腺的癌症、软组织肉瘤、尿道的癌症、阴茎的癌症、儿童实体瘤、膀胱的癌症、肾或输尿管的癌症、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 的肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊椎轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌症、鳞状细胞癌症、环境诱导的癌症包括被石棉诱导的癌症,血液恶性肿瘤包括例如,多发性骨髓瘤,B细胞淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤/原发性纵隔B细胞淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,急性骨髓性淋巴瘤,慢性骨髓性白血病,慢性淋巴性白血病,滤泡性淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,伯基特淋巴瘤,免疫母细胞性大细胞淋巴瘤,前体B淋巴母细胞性淋巴瘤,套细胞淋巴瘤,急性淋巴母细胞性白血病,蕈样肉芽肿,间变性大细胞淋巴瘤,T细胞淋巴瘤,和前体T淋巴母细胞淋巴瘤,和所述癌症的任意组合。本发明还适用于治疗转移性癌症。在某些优选的实施方案中,癌症选自MEL, RCC, 鳞状NSCLC, 非鳞状NSCLC, 结肠直肠癌 (CRC), 去势抗性前列腺癌 (CRPC), 头和颈鳞状细胞癌, 和食道、卵巢、胃肠道和乳腺的癌, 卵巢癌症, 胃癌, 肝细胞癌, 胰腺癌, 和血液恶性肿瘤。在其它优选的实施方案中,癌症是MEL。在其它优选的实施方案中,癌症是RCC。在另外的其它优选的实施方案中,癌症是鳞状NSCLC。在其它优选的实施方案中,癌症是非鳞状NSCLC。

[0129] 本文公开的结果清晰地表明,可以强化靶向T细胞上的免疫调变靶标的Fc融合蛋白的临床活性,以供用于人类患者。有多种策略可用来增加癌症治疗用的Fc融合蛋白的ADCC和CDC效应器功能,特别是强化IgG1抗体与V和F同种异型的Fc γ RIIIa的结合(参见例如,Natsume等,2009)。事实上,以强化与Fc γ RIIIa的特异性结合、并藉此增强ADCC为目的对治疗性抗体进行的工程化改造,预期会在具有更高临床效力的下一代治疗性抗体的开发中发挥关键作用(Natsume等,2009;Albanesi等,2012)。但是,虽然效应器功能如ADCC、ADCP和CDC对于治疗性Fc融合蛋白的临床效力的重要性现在已经得到了广泛认识,但是迄今为止人们仍认为,此类效应器功能在使用结合T细胞上的免疫调变性靶标的Fc融合蛋白来上调T细胞应答的策略中是不理想的(见例如,美国专利No.6,682,736)。

[0130] 工程改造人治疗性Fc融合蛋白的一种方法是在IgG1 Fc区中引入一个或多个可强化与激活性Fc γ R结合的突变(Nimmerjahn和Ravetch,2012)。例如,IgG1三重突变体(S298A/E333A/L334A)已显示具有更高的Fc γ RIIIa结合和ADCC活性(Shields等,2001)。其他对Fc γ RIIIa的结合显著强化IgG1变体已经被鉴定,包括具有S239D/I332E和S239D/I332E/A330L突变的变体,其显示对Fc γ RIIIa的亲力的最大增加、Fc γ RIIb结合降低、并且在食蟹猴中具有强细胞毒性(Lazar等,2006)。在抗体如阿仑单抗(CD52特异性)、曲妥单抗(HER2/neu特异性)、利妥昔单抗(CD20特异性)以及西妥昔单抗(表皮生长因子受体特异性)中引入三重突变可大大强化体外ADCC活性,并且S239D/I332E变体在猴体内显示耗竭B细胞的能力强化(Lazar等,2006)。另外,已经鉴定了含有L235V, F243L, R292P, Y300L和P396L突变的IgG1突变体,这些突变体在B细胞恶性肿瘤和乳腺癌模型中在表达人Fc γ RIIIa的转基因小鼠体内显示与Fc γ RIIIa有更强的结合并伴随更强的ADCC活性(Stavenhagen等,2007;Nordstrom等,2011)。

[0131] 还可以突变Fc区以增强IgG与新生Fc受体FcRn的亲合力,这样可以延长抗体的体内半衰期并导致抗肿瘤活性增加。例如,在贝伐单抗(血管内皮生长因子特异性)和西妥昔

单抗(表皮生长因子受体特异性)的Fc区中引入M428L/N434S突变可以增加抗体在猴体内的半衰期,并强化小鼠体内的抗肿瘤应答(Zalevsky等,2010)。

[0132] 抗体与Fc γ R的相互作用也可以通过修饰附着在每个Fc片段N297残基上的聚糖部分来强化。特别地,分支岩藻糖残基缺失强化IgG与激活性Fc γ RIIIA的结合从而导致ADCC大大增强,而不改变抗原结合或CDC(Natsume等,2009)。有令人信服的证据显示,无岩藻糖基化的肿瘤特异性抗体可以在小鼠的体内模型中强化治疗活性(Nimmerjahn和Ravetch,2005;Mossner等,2010;见实施例13)。

[0133] 抗体的糖基化修饰可以通过,例如,在具有被改变的糖基化机制的细胞中表达抗体来实现。具有改变的糖基化机制的细胞在本领域中已有描述,并可用作宿主细胞,供本公开的重组抗体在其中表达,从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,细胞系Ms704、Ms705和Ms709缺少岩藻糖转移酶基因FUT8(α -(1,6)岩藻糖转移酶;见美国公开No.20040110704;Yamane-Ohnuki等,2004),使得在这些细胞系中表达的抗体在糖部分上缺少岩藻糖。作为另一个实例,EP 1176195也描述了具有被功能性破坏的FUT8基因的细胞系以及具有很小或者不具有对结合抗体Fc区的N-乙酰葡萄糖胺添加岩藻糖的活性的细胞系,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0(ATCC CRL 1662)。PCT公开WO 03/035835描述了变体CHO细胞系Lec13,其向Asn(297)-连接的糖附加岩藻糖的能力降低,也导致该宿主细胞内表达的抗体的低岩藻糖化(hypofucosylation)(另见Shields,等,2002)。具有经修饰的糖基化谱的抗体也可以在鸡卵中产生,如PCT公开No.WO 2006/089231中所述。作为替代,具有经修饰的糖基化谱的抗体可以在植物细胞,例如浮萍属中产生(Lemna)(参见,例如美国公开No.2012/0276086)。PCT公开No.WO 99/54342描述了被工程化从而表达糖蛋白修饰性糖基转移酶(例如, β (1,4)-N-乙酰葡萄糖基转移酶III(GnTIII))的细胞系,使得在工程化细胞系内表达的抗体显示增加的两分式(bisecting)GlcNac结构,导致抗体的ADCC活性增加(另见,Umaña等,1999)。作为替代,可以用岩藻糖苷酶将抗体的岩藻糖残基裂解掉。例如, α -L-岩藻糖苷酶这种酶可以从抗体除去岩藻糖残基(Tarentino等,1975)。

[0134] 补体级联的C1q组分与结合于细胞的抗体的Fc区的结合也影响随后补体激活的强度,已经有多种方法已成功地通过强化Fc区与C1q的结合增强了CDC。使用的策略包括将氨基酸突变工程构建到Fc或铰链区内,或者改组(shuffling)重链恒定区内的IgG1和IgG3序列(Natsume等,2009)。

[0135] 本文公开的体内数据表明,当靶向T细胞上的免疫调变受体并增强T细胞应答的各种Fc融合蛋白(抗体)被修饰以增加IgG1与Fc γ RIIIa的结合时,将强化抗肿瘤活性。本文公开的任何用于增强IgG1与Fc γ RIIIa的结合的方法都可以使用。在本发明方法的一个实施方案中,Fc融合蛋白不是IgG1同种型,并且Fc区的修饰将Fc融合蛋白转换成IgG1同种型。作为举例,tremelimumab,一种IgG2抗CTLA-4抗体,的抗肿瘤效力可以通过这样的方法加以增强,该方法包括修饰这些抗体的Fc区以产生表现出更强的经修饰Fc区与Fc γ RIIIa的结合的IgG1同种型。基于本文公开的数据,这样的修饰介导肿瘤部位T_{regs}的耗竭并伴随CD8⁺CTL的增加,导致更高的抗肿瘤效力。

[0136] 在另一个实施方案中,Fc区的选择、设计和修饰导致Fc区低岩藻糖基化或无岩藻糖基化。在另外的实施方案中,Fc区的选择、设计和修饰包括导致Fc区与激活性FcR受体的结合增强的至少一个氨基取代。因此,例如,本发明方法的某些实施方案包括对Fc区进行选

择、设计和修饰,使之包含选自下组的氨基酸突变:S298A/E333A/L334A,S239D/I332E,S239D/I332E/A330L,L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L,和M428L/N434S突变。

[0137] 作为举例,tremelimumab的IgG1同种型的抗肿瘤效力,在可以通过如上所述的同种型转换加以强化的基础上,还可以通过如下方法进一步强化:该方法包括对Fc区进行修饰从而引入至少一个可以增强Fc区与FcγRIIIa的结合的氨基酸取代,和/或对Fc区进行修饰从而产生显示对FcγRIIIa的更强结合的低岩藻糖基化或无岩藻糖基化的Fc区。

[0138] 抗免疫调变剂Fc融合蛋白

[0139] 本公开的Fc融合蛋白是结合蛋白,其包含特异性并高亲和力地结合T细胞上的靶标的Fc区。在优选的实施方案中,Fc融合蛋白与如下的免疫调变靶标结合,该靶标在肿瘤微环境中的 T_{regs} 上的表达水平高于在外周中的 T_{regs} 上的表达水平和在 T_{effs} 上的表达水平。在某些实施方案中,抗免疫调变剂Fc融合蛋白是一种抗CTLA-4结合蛋白,即,它特异性结合CTLA-4。在优选的实施方案中,抗CTLA-4结合蛋白是阻断性抗体。在其它某些实施方案中,免疫调变剂Fc融合蛋白是抗GITR、抗-0X40或抗-ICOS结合蛋白,即,它特异性结合GITR、0X40或ICOS。在优选的实施方案中,抗GITR、抗-0X40或ICOS结合蛋白是一种激动性抗体。

[0140] 识别并结合CTLA-4的细胞外结构域的单克隆抗体在美国专利No.5,977,318中被描述。本公开的人单克隆抗体可以用各种方法产生,例如使用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠,或者使用体外展示技术,例如噬菌体或酵母展示(参见例如Bradbury等,2011)。转基因或转染色体小鼠包括在本文中分别被称作HUMABMOUSE® (Lonberg等,1994)和KMMOUSE® (WO 02/43478)的小鼠。本公开的示例性人抗人CTLA-4抗体的产生在美国专利Nos.6,984,720和7,605,238中有详细描述。在这些专利中被标识为10D1的人IgG1抗CTLA-4抗体也被称作易普单抗(先前也被称作MDX-010和BMS-734016),其作为YERVOY®商品化。本公开的其它示例性人抗CTLA-4抗体在美国专利No.6,682,736中被描述,包括tremelimumab(先前称作ticilimumab;CP-675,206),一种人IgG2抗-人CTLA-4抗体。

[0141] 可以通过本文公开的方法增强的抗GITR Fc融合蛋白包括在PCR公开No.WO 2006/105021和WO2011/028683和日本公开No.2008278814中公开的抗体。

[0142] 可以通过本文公开的方法增强的抗-ICOS Fc融合蛋白包括在美国专利No.7,030,225,7,932,358,6,803,039和7,722,872和美国公开No.2013/0142783中公开的抗体。

[0143] 可以通过本文公开的方法增强的抗-0X40 Fc融合蛋白包括在PCT公开No.WO 95/12673,WO 99/42585,WO 03/106498,WO 2007/062245,WO 2009/079335,WO 2010/096418,WO 2012/027328,WO 2013/028231,WO 2013/008171和WO 2013/038191中公开的抗体。

[0144] 本公开提供了用于强化Fc融合蛋白的抗肿瘤效力的方法,其包括修饰Fc融合蛋白的Fc区以增强所述Fc区与激活性Fc受体的结合。本公开还提供了Fc融合蛋白,其特异性结合患有癌症或者由感染原引起的疾病的患者体内的T细胞上的共抑制性或共刺激性免疫调变受体,并阻断共抑制受体的活性或强化共刺激受体的活性,藉此增强针对癌细胞或感染原的内源性免疫应答,其中抗体增强内源性免疫应答的能力已通过使用本文公开的方法得到强化。在优选的实施方案中,显示强化的增强免疫应答的能力的Fc融合蛋白是抗体(“强化抗体”)。在某些实施方案中,这一抗体是IgG同种型。在某些其他实施方案中,强化抗体是单克隆抗体。在进一步的实施方案中,强化抗体是嵌合的、人源化的或人抗体。

[0145] 在本发明的某些方面中,强化的Fc融合蛋白是人IgG抗体。在此类人IgG抗体的某些实施方案中,与Fc γ I,Fc γ IIa或Fc γ IIIa受体的结合被强化。在其他实施方案中,此类与Fc γ I,Fc γ IIa或Fc γ IIIa受体的强化的结合导致增加的ADCC。在某些优选的实施方案中,经修饰的Fc与Fc γ I,Fc γ IIa或Fc γ IIIa受体的强化的结合介导肿瘤部位 T_{regs} 的减少。此类 T_{regs} 的减少可能由ADCC介导,或者由可以差异性减少肿瘤部位处的 T_{regs} 但不减少外周的 T_{regs} 的其他机制介导。

[0146] 在本Fc融合蛋白的某些实施方案中,人IgG抗体与Fc γ I,Fc γ IIa或Fc γ IIIa受体的强化的结合介导肿瘤部位 T_{regs} 的减少。在其它实施方案中,人IgG抗体与Fc γ I,Fc γ IIa或Fc γ IIIa受体的强化的结合(a)不介导肿瘤部位 T_{effs} 的减少,或者(b)介导肿瘤部位 T_{effs} 的增加。在优选的实施方案中,靶标在肿瘤部位的 T_{regs} 上的表达水平高于在肿瘤部位的 T_{effs} 上的表达水平。在优选的实施方案中,靶标在肿瘤部位的 T_{regs} 上的表达水平高于在外周的 T_{regs} 或 T_{effs} 上的表达水平。在某些其它的实施方案中,Fc融合蛋白是拮抗性抗体,其阻断T细胞上的共抑制性免疫调变靶标的活性。在进一步的实施方案中,共抑制性调节靶标是CTLA或TIGIT。

[0147] 在本发明的某些其它方面中,强化的Fc融合蛋白是激动性抗体,其增强T细胞上的共刺激性免疫调变靶标的活性。在进一步的实施方案中,共刺激性免疫调变靶标是GITR,OX40,ICOS,CD137。在其它实施方案中,强化的抗体是抗CTLA-4抗体、抗GITR抗体、抗-OX40抗体、抗-ICOS受体抗体、抗-KLRG-1抗体、抗-CD244抗体、抗-CD160抗体、或抗-TIGIT抗体。在某些优选的实施方案中,强化的抗体是抗CTLA-4抗体、抗GITR抗体、抗-OX40抗体、抗-ICOS受体抗体。抗CTLA-4抗体可以是,例如,易普单抗的强化变体或tremelimumab的强化变体。在某些实施方案中,这样的强化变体是易普单抗或tremelimumab的无岩藻糖基化或低岩藻糖基化变体。在其他实施方案中,这样的易普单抗或tremelimumab强化变体包括选自下组的氨基酸突变:S298A/E333A/L334A,S239D/I332E,S239D/I332E/A330L,L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L,和M428L/N434S突变。

[0148] 在本发明的其它方面中,强化的Fc融合蛋白是拮抗性抗体,其增强T细胞上共抑制性免疫调变靶标的活性。在某些实施方案中,抗体选自下组:抗CTLA-4抗体、抗BTLA抗体、抗VISTA受体抗体、抗A2aR抗体、抗KLRG-1抗体、抗CD244抗体、抗CD160抗体和抗TIGIT抗体。在优选的实施方案中,抗体是抗CTLA-4抗体或抗TIGIT抗体。

[0149] 在强化的Fc融合蛋白的某些其它方面中,受试者患有选自下组的癌症:骨癌症、胰腺癌症、皮肤癌症、头或颈部的癌症、乳腺癌、肺癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、肾癌症、子宫癌症、卵巢癌症、结肠直肠癌、结肠癌症、直肠癌、肛门区域的癌症、胃癌、睾丸癌症、子宫癌症、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道的癌症、小肠的癌症、内分泌系统的癌症、甲状腺的癌症、甲状旁腺的癌症、肾上腺的癌症、软组织肉瘤、尿道的癌症、阴茎的癌症、儿童实体瘤、膀胱的癌症、肾或输尿管的癌症、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)的肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊椎轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌症、鳞状细胞癌症、环境诱导的癌症包括被石棉诱导的癌症,血液恶性肿瘤包括例如,多发性骨髓瘤,B细胞淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤/原发性纵隔B细胞淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,急性骨髓性淋巴瘤,慢性骨髓性白血病,慢性淋巴性白血病,滤泡性淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,伯基特淋巴瘤,免疫母细胞性大细胞淋巴瘤,前体B淋巴母细胞性淋巴瘤,

套细胞淋巴瘤,急性淋巴母细胞性白血病,蕈样肉芽肿,间变性大细胞淋巴瘤,T细胞淋巴瘤,和前体T淋巴母细胞淋巴瘤,和所述癌症的任意组合。本发明还适用于治疗转移性癌症。在某些优选的实施方案中,癌症选自MEL,RCC,鳞状NSCLC,非鳞状NSCLC,CRC,CRPC,头和颈鳞状细胞癌,和食道、卵巢、胃肠道和乳腺的癌,卵巢癌症,胃癌,肝细胞癌,胰腺癌,和血液恶性肿瘤。

[0150] 编码本发明抗体的核酸分子

[0151] 本公开的另一个方面涉及分离的核酸分子,其编码本公开的任何结合T细胞上靶标(例如免疫调变性受体或配体)的Fc融合蛋白。在优选的实施方案中,这些分离的核酸分子编码靶向并阻断抑制性免疫调变受体的抗体。该核酸可以存在于完整细胞中、细胞裂解物中,或者处于部分纯化或基本上纯的形式。核酸可以是,例如,DNA或RNA,并且可以含有或者不含有内含子序列。在某些实施方案中,DNA是基因组DNA、cDNA或合成的DNA,即DNA在实验室中合成,例如,通过聚合酶链反应或者通过化学合成。在优选的实施方案中,核酸是cDNA。

[0152] 本公开的核酸可以用常规分子生物学技术获得。本公开提供了编码本文公开的任何Fc融合蛋白的分离的核酸。本公开还提供了包含所述分离的核酸的表达载体。本公开进一步提供了包含任何所公开的表达载体的宿主细胞。这样的宿主细胞可用于使用本领域中公知的方法生产任何本文描述的Fc融合蛋白,例如,通过培养该宿主细胞足够的时间以便使宿主细胞内表达Fc融合蛋白,或者更优选地,将抗体分泌到培养该宿主细胞的培养基中。Fc融合蛋白可以使用本领域中熟知的标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0153] 药物组合物

[0154] 本发明的Fc融合蛋白可以构成组合物,例如,药物组合物,其含有结合蛋白,例如抗体或其片段,和药学上可接受的载体。如本文所使用的,“药学上可接受的载体”包括任何和全部的生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选地,载体适合于静脉内、皮下、肌内、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。本发明的药物组合物可以包括一种或多种药学上可接受的盐、抗氧化剂、水和非水性载体,和/或佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

[0155] 调节剂量方案以提供最佳的期望应答,例如治疗性应答或最小的不利影响。典型地,实现一定水平的抗癌效力所需的本公开强化抗体的剂量比未经修饰的抗体低。进一步,这样的较低的剂量通常导致不良效果的发生率或严重程度较低。对于特异性结合T细胞上靶标的本公开抗体的施用,剂量范围是大约0.00001-大约100mg/kg,通常为大约0.0001-大约20mg/kg,更通常地为大约0.001-大约10mg/kg受试者体重。优选地,剂量范围是0.01-10mg/kg体重。例如,剂量可以是0.01,0.05,0.1,0.3,1,3,或10mg/kg体重,更优选地0.1,0.3,1,或3mg/kg体重。剂量方案的典型设计目的是基于抗体的典型药动学性质使得所实现的暴露导致抗体被持续地占据。示例性治疗方案是每周施用一次,每两周一次,每三周一次,每四周一次,每月一次,每3个月一次或每3-6个月一次。

[0156] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以改变,以便获得足以实现对特定患者、组合物或施用模式而言期望的治疗应答,而不会对患者过度有毒的活性成分的量。所选定的剂量水平将会取决于各种药代动力学因素,包括本发明所用特定组合物的活性,给药途径,给药时间,所用特定化合物的排泄速率,治疗的持续时间,与所用特定组合物联

合使用的其它药物、化合物和/或材料,被治疗患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康和先前病史等医学领域熟知的因素。本领域的普通技术人员将能够基于这些因素,如受试者的体格、受试者症状的严重程度、和所选的特定组合物或给药途径,确定合适的剂量。本发明的组合物可以使用本领域公知的各种方法中的一种或多种通过一个或多个给药途径施用。

[0157] 在某些实施方案中,Fc融合蛋白的剂量是统一固定剂量(flat-fixed dose),其是固定的,无论患者的体格或体重如何。例如,Fc融合蛋白可以按照5,20,35,75,200,350,750或1500mg的固定剂量施用,而不考虑患者的体重。如本文所使用的,术语“固定剂量”,“统一剂量”和“统一固定剂量”可以互换使用,指不考虑患者的体重或体表面积而施用于患者的剂量。因此,固定或统一剂量并不表示为mg/kg剂量,而是表示为Fc融合蛋白(例如抗CTLA-4抗体)的绝对量。技术人员将会意识到,给药的剂量、途径和/或模式会随着期望的结果而改变。

[0158] 本发明的治疗用途和方法

[0159] 本公开的Fc融合蛋白、组合和方法具有诸多治疗性用途,包括癌症和感染性疾病的治疗。

[0160] 癌症免疫疗法

[0161] 本公开提供了用于增强患有癌症的受试者体内的内源性免疫应答以便据此治疗受试者的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的任何本文所述Fc融合蛋白,其中该Fc融合蛋白的Fc区已被选择、设计或修饰,以强化所述Fc区与激活性Fc受体的结合。在本文公开的方法中,Fc区不一定被修饰;例如,可以选择或设计结合激活性FcR的合适的Fc区。类似地,与FcR的结合也不一定被增加,而是可以选择或设计为高结合。在某些实施方案中,Fc融合蛋白是抗体。在优选的实施方案中,抗体是IgG同种型。在某些其它的实施方案中,抗体是单克隆抗体。在进一步的实施方案中,单克隆抗体是嵌合的、人源化的、或人抗体。在其他的实施方案中,单克隆抗体是人IgG抗体。在本方法的某些优选的方面中,人IgG抗体与Fc γ I, Fc γ IIa或Fc γ IIIa受体的结合被强化。优选地,人IgG抗体与Fc γ I, Fc γ IIa或Fc γ IIIa受体的增强结合导致ADCC增加。在某些实施方案中,抗体是拮抗性抗体,其阻断T细胞上的共抑制性免疫调变靶标的活性。在优选的实施方案中,共抑制性免疫调变靶标是CTLA或TIGIT。

[0162] 在本免疫治疗方法中,可以使用这样的Fc融合蛋白,其与多种多样的定位于T细胞的靶标结合,例如同时与T细胞上的,优选地T_{regs}或其它免疫抑制细胞上的共刺激和共抑制免疫调变靶标结合。在某些实施方案中,Fc融合蛋白是拮抗性抗体,例如,抗CTLA-4抗体或抗TIGIT抗体。在某些优选的实施方案中,抗体是抗CTLA-4抗体。在进一步优选的实施方案中,抗CTLA-4抗体是易普单抗或tremelimumab。在甚至更优选的实施方案中,抗CTLA-4抗体是这样的抗体,其中Fc融合蛋白的Fc区已被选择、设计或修饰以强化Fc区与激活性Fc受体的结合,例如易普单抗或tremelimumab的强化变体。在某些实施方案中,这样的强化变体是易普单抗或tremelimumab的无岩藻糖基化或低岩藻糖基化的变体。在其他实施方案中,易普单抗或tremelimumab的这些强化变体包括选自下组的氨基酸突变:S298A/E333A/L334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L, 和M428L/N434S突变。

[0163] 在其它实施方案中,抗体是激动性抗体,其增强T细胞上共刺激免疫调变靶标的活性。在优选的实施方案中,共刺激免疫调变靶标是GITR, OX40, ICOS或CD137。在进一步的实

施方案中,抗GITR,OX40,ICOS或CD137抗体是无岩藻糖基化或低岩藻糖基化的变体。在进一步的实施方案中,抗GITR,OX40,ICOS或CD137抗体是包含一种或多种选自下组的氨基酸突变的强化变体:S298A/E333A/L334A,S239D/I332E,S239D/I332E/A330L,L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L,和M428L/N434S突变。

[0164] 在本免疫治疗方法的优选实施方案中,受试者是人。

[0165] 可以使用本公开免疫疗法治疗的其它癌症实例包括:骨癌症、胰腺癌症、皮肤癌症、头或颈部的癌症、乳腺癌、肺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、肾癌症、子宫癌症、卵巢癌症、结肠直肠癌、结肠癌症、直肠癌、肛门区域的癌症、胃癌、睾丸癌症、子宫癌症、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道的癌症、小肠的癌症、内分泌系统的癌症、甲状腺的癌症、甲状旁腺的癌症、肾上腺的癌症、软组织肉瘤、尿道的癌症、阴茎的癌症、血液恶性肿瘤、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱的癌症、肾或输尿管的癌症、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)的肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊椎轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌症、鳞状细胞癌症、环境诱导的癌症包括被石棉诱导的癌症,转移性癌症,和所述癌症的任意组合。在某些优选的实施方案中,癌症选自MEL,RCC,鳞状NSCLC,非鳞状NSCLC,CRC,CRPC,头和颈鳞状细胞癌,和食道、卵巢、胃肠道和乳腺的癌。本发明还适用于治疗转移性癌症。

[0166] 本公开的Fc融合蛋白可以和免疫原性剂组合使用,免疫原性剂例如癌性细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和糖分子)、细胞、和用编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞(He等,2004;Mellman等,2011)。可以使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原的肽,例如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶的肽,或者被转染而表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞。

[0167] 在这些用于治疗癌症患者的方法的某些实施方案中,Fc融合蛋白作为单一疗法施用于受试者,而在其他实施方案中,对免疫调变靶标的刺激或阻断可以与常规的癌症治疗方法有效组合,常规的癌症治疗方法包括化疗方案、放射、手术、激素剥夺和血管生成抑制剂。Fc融合蛋白可以和抗肿瘤剂连接(形成免疫偶联物),或者可以与该作用剂分开给药。在后一种情况下(分开给药),抗体可以在施用该作用剂之前、之后或同时给药,或者可以和其他已知的治疗剂共同施用。化疗剂药物包括,例如,多柔比星(ADRIAMYCIN®),顺铂,卡铂,硫酸博来霉素,卡莫司汀,苯丁酸氮芥(LEUKERAN®),环磷酰胺

(CYTOXAN®; NEOSAR®),来那度胺(REVLIMID®),硼替佐米(VELCADE®),地塞米松,米托蒽醌,依托泊苷,阿糖胞苷,苯达莫司汀(TREANDA®),利妥昔单抗(RITUXAN®),异环磷酰胺,长春新碱(ONCOVIN®),氟达拉滨(FLUDARA®),沙利度胺(THALOMID®),阿仑单抗(CAMPATH®),奥法木单抗(ofatumumab)(ARZERRA®),依维莫司(AFINITOR®, ZORTRESS®),和卡非佐米(carfilzomib)(KYPROLIS™)。将通过不同机制工作的抗癌剂联合给药有助于克服对药物产生耐药性或者肿瘤细胞抗原性的改变。

[0168] 在其它实施方案中,患者可以用调变(例如增强或抑制)FcγR的表达或活性的作用剂额外治疗,例如用细胞因子治疗受试者。优选的在用Fc融合蛋白治疗期间施用的细胞因子包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF),粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),干扰素γ(IFN-γ)和肿瘤坏死因子(TNF)。

[0169] 本发明的一个方面是本公开的任何Fc融合蛋白用于制备药物的用途,所述药物是用于癌症患者的免疫治疗的药物。本公开的任何Fc融合蛋白用于制备药物的用途可广泛适用于本文公开的所有癌症。本公开还提供了本发明的Fc融合蛋白,适用于采用本文描述的Fc融合蛋白的任何治疗方法。

[0170] 感染性疾病的治疗

[0171] 本发明的其它方法用于治疗已暴露于特定毒素或病原体的患者。因此,本发明的另一个方面提供了治疗受试者体内的感染性疾病、例如通过增强患有感染性疾病的受试者体内的内源性免疫应答来治疗受试者体内的感染性疾病的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本公开的Fc融合蛋白,其中该Fc融合蛋白的Fc区被选择、设计或修饰,藉此增强所述Fc区与激活性Fc受体的结合。

[0172] 在某些优选的实施方案中,Fc融合蛋白是抗体。本治疗方法可能特别有用的感染性疾病的实例包括由当前没有有效疫苗的病原体引起的疾病,或者由常规疫苗不能完全有效的病原体引起的疾病。这些包括但不限于HIV,肝炎(甲型、乙型和丙型),流感,疱疹,贾第虫属,疟疾,利什曼原虫,金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌。在某些优选的实施方案中,病原体是病毒病原体。本文所述的免疫治疗方法对于由HIV等在感染过程中会呈现出抗原改变的媒介所导致的感染特别有效。

[0173] 与上述在肿瘤中的应用相似,本文所述的免疫治疗方法可以单独使用,或者作为佐剂与疫苗联合使用,来激发对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。这些方法可以和其它形式的免疫疗法,例如细胞因子治疗(例如,施用干扰素、GM-CSF、G-CSF或IL-2)组合。

[0174] 抗CTLA-4免疫疗法的潜在生物标志物

[0175] 本文公开的数据还提示了潜在的生物标志物,用于预测候选患者对使用抗CTLA-4抗体的免疫疗法的适合性,和/或预测此类抗体的抗肿瘤效力。例如,观察到抗CTLA-4的IgG1同种型介导 T_{reg} 耗竭,暗示FCRG3A (CD16) 多态性可能与易普单抗的活性相关,正如已经对利妥昔单抗(Weng and Levy, 2003; Cartron等, 2004) 和曲妥珠单抗(HERCEPTIN®) (Musolino等, 2008; Tamura等, 2011) 的活性所观察到的一样。如果与Fc γ RIIIa的结合是易普单抗活性必需的,那么可以预期,具有纯合Fc γ RIIIa V158变体(其与IgG1的结合亲和力高于F158变体)的个体将显示出更好的存活和/或应答(Cartron等, 2004)。此外,如果与Fc γ RIIa的结合是易普单抗活性必需的,那么可以预期具有Fc γ RIIa H131变体(其与IgG1的结合亲和力高于R131变体)的个体将显示出更好的存活和/或应答(Weng和Levy, 2003)。

[0176] 本数据还提示,抗CTLA-4的功能在这样的肿瘤中最佳:在肿瘤部位处含有增加数目的 T_{regs} 的肿瘤。 T_{regs} 的存在可能是进行中的针对肿瘤抗原的免疫应答所导致的。事实上,对易普单抗的应答已经被与肿瘤浸润性淋巴细胞的存在联系起来(Hamid等, 2011; Ji等, 2012)。易普单抗疗法也在对肿瘤抗原(例如NY-ESO-1)预先存在应答的患者中更加有效(Yuan等, 2011)。而且, T_{reg} 消除可能依赖于肿瘤微环境中具体细胞类型的存在。本数据表明,肿瘤中存在的巨噬细胞样细胞或其它属于骨髓谱系的细胞,例如携带相关Fc γ 受体的单核细胞、巨噬细胞或NK细胞,是抗CTLA-4的抗肿瘤效果所必需的。

[0177] 因此,本公开提供了用于预测候选患者对于使用Fc融合蛋白如抗CTLA-4抗体的免疫疗法的适合性,和/或预测此类抗体的抗肿瘤效力的方法,包括筛选肿瘤中巨噬细胞样细胞或其它骨髓谱系细胞的存在。

[0178] 本公开还提供了用于免疫治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括:(a)选择是免疫治疗的合适候选者的受试者,该选择包括(i)评估试验组织样品中巨噬细胞样细胞或其它骨髓谱系细胞的存在,和(ii)根据受试组织样品中巨噬细胞样细胞或其它骨髓谱系细胞的存在选择受试者作为合适候选者;和(b)向选定的受试者施用治疗有效量的免疫调变性Fc融合蛋白。在某些优选的实施方案中,免疫调变性Fc融合蛋白是抗CTLA-4、抗TIGIT、抗GITR、抗OX40、抗CD137或抗ICOS抗体。

[0179] 试剂盒

[0180] 本公开的范围内还包括试剂盒,其包括本公开的任何Fc融合蛋白或其组合物,以及使用说明。因此,本公开提供了用于治疗受试者体内的癌症或由感染原引起的疾病的试剂盒,该试剂盒包括(a)一个或多个剂量的本公开的任何经强化的增强针对受试者体内癌细胞或感染原的内源性免疫应答的能力的Fc融合蛋白,和(b)在本文所述的任何治疗方法中使用该Fc融合蛋白的使用说明。例如,在某些实施方案中,试剂盒中的Fc融合蛋白是拮抗性Fc融合蛋白,其阻断T细胞上的共抑制性免疫调变性靶标的活性。在进一步的实施方案中,该共抑制性免疫调变性靶标是CTLA或TIGIT。在其他的实施方案中,该拮抗性Fc融合蛋白是抗体。在进一步的实施方案中,该抗体是抗CTLA-4或抗TIGIT抗体。在进一步的实施方案中,该抗CTLA-4抗体是易普单抗或者tremelimumab的强化变体。

[0181] 在某些其它的实施方案中,Fc融合蛋白是激动性蛋白,其增强T细胞上的共刺激性免疫调变靶标的活性。在进一步的实施方案中,该共刺激性免疫调变靶标是GITR、OX40、ICOS或CD137。在其他的实施方案中,该激动性Fc融合蛋白是抗体。在进一步的实施方案中,该抗体是抗GITR、OX40、ICOS或CD137抗体。

[0182] 试剂盒可以进一步包含一种或多种额外的治疗剂。例如,对于癌症治疗,该一种或多种额外的试剂可以是免疫抑制剂、化疗剂或放射性毒剂,或者一种或多种额外的靶向不同抗原的Fc融合蛋白。

[0183] 试剂盒通常包括标签,其指示试剂盒内容物的预期应用和使用说明。术语“标签”包括提供在试剂盒上、或者与之一并提供、或者以其他方式与试剂盒相伴的任何书面或记录材料。在药物试剂盒的某些实施方案中,Fc融合蛋白可以和其它治疗剂以单位剂量形式共同包装。

[0184] 通过以下实施例进一步举例说明本发明,这些实施例不应当被解释为具有限制作用。本申请明确地通过提述并入本申请全文中引用的所有图和所有参考文献、专利和被公开专利申请的内容。

[0185] 实施例1

[0186] 不同的抗mCTLA-4抗体同种型的产生

[0187] 为了确定不同同种型抗CTLA-4的抗肿瘤活性的相对效力,从CHO转染子或亲本杂交瘤中产生并纯化了小鼠抗小鼠CTLA-4抗体的4种同种型变体。这些抗CTLA-4变体包括:一种含有D265A突变的IgG1同种型(IgG1-D265A),它是一种非Fc γ R性结合突变体(Clynes等,2000);IgG1;IgG2b(9D9的原始同种型,来自杂交瘤);和IgG2a。9D9杂交瘤(由德克萨斯大学,MD Anderson,Houston,Texas的J.Allison惠赠)是一种小鼠抗小鼠CTLA-4抗体,来自用小鼠CTLA-4免疫人CTLA-4转基因小鼠(Peggs等,2009)。9D9阻断鼠CTLA-4-Ig与B7-1-阳性细胞的结合(数据未显示)。

[0188] 为了产生9D9同种型,使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen,Valencia,CA,USA)从9D9杂交瘤细胞制备总RNA。使用SMARTer RACE cDNA扩增和Advantage 2PCR试剂盒(Clontech Laboratories,Inc.,Mountain View,CA,USA)通过5'-RACE方案制备cDNA。使用3'鼠特异性恒定区引物,搭配5'RACE通用引物预混物来扩增可变区。将含有V区的PCR产物克隆到pCR4-TOP0载体(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)中,并转化进入大肠杆菌菌株TOP10(Invitrogen)中。制备Templiphi(GE Healthcare Biosciences,Piscataway,NJ,USA)样品并进行DNA测序(Sequetech,Mountain View,CA,USA)。

[0189] 为了表达重组抗体(小鼠IgG2a,小鼠IgG1,和小鼠IgG1-D265A同种型),通过PCR扩增9D9可变区以引入克隆位点,并克隆到UCOE表达载体(EMD Millipore,Billerica,MA,USA)中,其含有骨连蛋白(osteonectin)信号序列和期望的恒定区。将重链和轻链载体线性化,并共转染到CHO-S细胞(Invitrogen)中。收集稳定的池和/或克隆。对于小鼠IgG2a,使用BALB/C同种异型IgG2a^a(单体型Igh-1^a)序列。

[0190] 收集来自9D9杂交瘤或CHO细胞转化子的培养上清液用于产生抗体。抗体用蛋白A或蛋白G通过标准方法进行纯化,并透析到PBS中。所有抗体均没有内毒素(<0.05EU/mg),并且显示聚集物<5%(通过大小排阻色谱/HPLC确定)。通过流式细胞术评估CTLA-4同种型与组成性表达CTLA-4(58 α - β -CTLA-4/CD3 ζ)的细胞的结合。58 α - β -CTLA-4/CD3 ζ 是表达与CD3 ζ 融合的鼠CTLA-4的鼠T细胞杂交瘤,并且与一种人CTLA-4的类似构建体相似(Keler等,2003)。对于FACS缓冲液(1x DPBS[CellGro],0.02%叠氮化钠,2%FBS[Hyclone],和1mM EDTA)中的细胞(1x10⁵/孔),用连续稀释的抗体(起始为20 μ g/ml)染色,并在4 $^{\circ}$ C温育30分钟。清洗细胞,添加第二抗体(R-PE驴抗小鼠IgG[Jackson ImmunoLabs])并在4 $^{\circ}$ C温育30分钟。然后清洗细胞,并重悬浮在FACS缓冲液中,并在BD FACS Canto流式细胞仪上进行分析。

[0191] 如图1所示,各个抗CTLA-4同种型变体同等地结合组成性表达小鼠CTLA-4的细胞。标记为mIgG1,mIgG2a和mIgG2b的抗体是商业可得的小鼠同种型对照抗体。

[0192] 上述的一般程序也用于构建下述抗体的不同同种型变体:结合小鼠GITR,OX40和ICOS受体的激动性抗体,和结合小鼠PD-1的拮抗性抗体。

[0193] 药代动力学分析

[0194] 为了表征抗CTLA-4抗体的药代动力学,用每种同种型的抗CTLA-4(IgG1,IgG1-D265A,IgG2a,或IgG2b)各10mg/kg腹膜内注射9只雌性C57BL/6小鼠。在1,6,24,48,72,120,168,336,和504h获取血液样品,并通过ELISA对血清进行分析。使用化学发光ELISA测量抗CTLA-4单克隆抗体的血清水平。使用重组小鼠CTLA-4-Ig作为捕获剂(capture),与山羊抗小鼠IgG(轻链特异性)多克隆抗体的HRP偶联物联用。标准品、对照和样品用1%BSA/PBS/0.05%吐温20稀释100倍。用M5平板读数器(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)测量发光强度,使用从相应的抗CTLA-4抗体校准物生成的5-参数对数逻辑(5-PL)校准曲线从发光强度算出小鼠血清样品中抗CTLA-4抗体的浓度。

[0195] 如表2和图2所示,4种同种型的全身暴露量大体上相似,尽管IgG1-D265A(185 μ M \cdot h)和IgG2b(170 μ M \cdot h)的浓度对时间曲线下的面积(AUC)略微高于IgG1(119 μ M \cdot h)和IgG2a(125 μ M \cdot h)。抗体的终末半寿期也相似(156-174h),尽管只有IgG2a在第2周-第3周观察到了加速的终末衰变(terminal decay);这可能是由于Balb/c IgG2a^a恒定区与这里测试的C57BL/6小鼠的相应恒定区之间的异种型差异,导致形成了抗药物抗体(Schreier等,

1981)。因此,抗CTLA-4同种型的抗肿瘤效力差异不能用药物暴露量的差异来解释。

[0196] 表2.抗CTLA4同种型在非荷瘤C57BL/6小鼠中以10mg/kg单次腹膜内注射后的药代动力学参数汇总

	PK 参数	IgG1	IgG1-D265A	IgG2a	IgG2b
	Cmax (μM)	0.56	0.92	0.71	0.96
[0197]	Tmax (h)	6	6	6	6
	AUC0-504h ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	119	185	125	170
	T _{1/2} (h)	156	171	164*	174

[0198] 对于IgG2a,从336h到504h观察到了加速的终末衰变,可能是由于抗药物抗体的形成所导致的(见下文)。注意,IgG2a同种异型来自BALB/c小鼠。504-h时间点被从T_{1/2}的估算中排除。

[0199] 结合亲和力

[0200] 通过表面等离子体共振表征每种抗CTLA-4同种型与可溶形式的Fc γ RI, Fc γ RIIB、Fc γ RIII与Fc γ RIV、和FcRn的结合。确定了不同抗CTLA-4同种型对Fc γ Rs的亲和力与前述的一样(Nimmerjahn and Ravetch, 2005)。各种Fc γ R从R&D Systems公司采购,但Fc γ RI除外。为了表达Fc γ RI,将细胞外域通过PCR扩增并克隆到UCOE表达载体(EMD Millipore, USA)中,与骨连蛋白信号序列和C-末端6xHis标签以及终止密码子合框。CHO-S细胞(Invitrogen)用Amaya Nucleofector II(Lonza Group, AG)转染,选择并扩增稳定的池和克隆,并收集随后的上清用于纯化。通过固定的金属镍亲和色谱(IMAC Life Technologies Corporation)镍带电树脂柱(nickel-charged resin column)使用常规技术纯化可溶性重组蛋白。

[0201] Fc γ R相互作用如下确定:将抗体直接包被在CM5芯片上达到密度为大约1500RU,使8倍浓度的mFcR在固定化抗体上面流过直至达到平衡。使用GraphPad Prism将平衡应答单位(RU)作为FcR浓度的函数进行描点作图,获得平衡K_D。作为替代,将6xHis标记的FcR捕获(至大约200RU)在抗His抗体包被的CM5表面上,并使8倍浓度的抗体在Fc γ R捕获表面上流过。通过此类方法获得的平衡K_D低大约4倍,这是由于缺乏当抗体直接包被在表面上时存在的多价结合。FcRn相互作用如下表征:将500RU的mo FcRn包被在CM5芯片上,并使溶于50mM 2-(N-吗啉代)乙磺酸、150mM NaCl的运行缓冲液、pH 6.0的8倍浓度的抗体在FcRn包被的表面上流过。结合了抗体的表面用pH 8.0Tris缓冲液再生。结合亲和力如表3所示。

[0202] 表3.通过表面等离子体共振评估的抗CTLA-4同种型与鼠Fc γ R蛋白的结合亲和性

抗体	亲和性 K_D (nM)				
	Fc γ RIII	Fc γ RIV	Fc γ RIIB	Fc γ RI	FcRn
9D9-IgG1	1878	NB	479	NB	22.4
[0203] 9D9-IgG1-D256A	NB	NB	NB	NB	24.6
9D9-IgG2a	1497	29.45	1414	32.67	13.46
9D9-IgG2b	2445	56.26	748.4	NB	19.67

[0204] NB=无结合

[0205] 实施例2

[0206] 变体抗CTLA-4同种型在鼠T26结肠腺癌肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0207] 已使用了许多不同的抗体证明抗CTLA-4抗体的活性,包括仓鼠抗CTLA-4抗体,9H10(Krummel and Allison,1995)和4F10(Walunas等,1994),以及小鼠抗小鼠CTLA-4抗体,9D9(Peggs等,2009)。为了确定抗CTLA-4的不同同种型的抗肿瘤活性的相对强度,在同基因CT26结肠腺癌模型中测试了所生成的抗CTLA-4抗体9D9的4种同种型变体中的3种(抗CTLA-4- γ 1D265A,抗CTLA-4- γ 2b,和抗CTLA-4- γ 2a,它们同等良好地结合CTLA-4⁺细胞,如实施例1所述)、以及小鼠IgG1同种型对照的抗肿瘤活性。用于研究的对照抗体是重组人抗白喉毒素抗体,具有小鼠IgG1同种型。

[0208] 在第0天,对10只BALB/c小鼠皮下注射 1×10^6 个CT26肿瘤细胞。在植入后第7天开始处理。测量肿瘤,随机分入治疗组使之具有相当的平均肿瘤体积($45-50\text{mm}^3/2$),然后用指定的抗体($200\mu\text{g}/\text{剂}$)进行腹膜内(IP)处理,然后在第10、14和17天再次处理。每周测量2次肿瘤体积。如图3所示,抗CTLA-4 9D9-IgG2a在10只被处理小鼠的9只中导致肿瘤排斥,而9D9-IgG2b显示中等的肿瘤生长抑制,直到50天后在10只被处理的小鼠中没有一只无瘤。令人惊讶的是,抗CTLA-4 IgG1D265A同种型几乎不显示活性,并且与对照IgG相当(图3)。

[0209] 实施例3

[0210] 抗CTLA-4同种型对CT26肿瘤内T细胞亚群和外周T细胞群体的影响淋巴细胞染色分析

[0211] 为了测量不同抗CTLA-4同种型对T细胞群体的影响,对分离自用不同抗体处理的小鼠的T细胞进行染色,考察CD8,CD4,CD45和Foxp3标志物的存在。在肿瘤植入后第15天处死所有小鼠,收集肿瘤和引流淋巴结用于分析。在24孔板中用注射器尾部解离肿瘤和淋巴结,制备单细胞悬浮液。使细胞悬浮液通过 $70\mu\text{m}$ 滤器,离心沉淀,重悬浮,并计数。然后,将细胞置于96孔板中, 1×10^6 细胞/孔,以便进行染色。用阻断Fc与Fc γ RIIB及Fc γ RIII的结合的24G.2(BioXcell)处理细胞,随后用针对CD8(克隆53-6.7;Biolegend),CD4(克隆GK1.5;Biolegend),和CD45(克隆30-F11;Biolegend)的抗体,或者针对CD11c(克隆N418;eBioscience),CD45,CD8,CD11b(克隆M1/70Biolegend),和Gr-1(克隆Rb6-8C5;eBioscience)的抗体进行染色。对于细胞内染色,将样品固定、透化,并用针对Foxp3(克隆FJK-16s;eBioscience),Ki67(克隆SolA15;eBioscience),和CTLA-4(克隆4F10;BD Pharmingen)的抗体染色。然后,在FACS Canto流式细胞仪(BD)上对样品进行分析。此类一

般的流式细胞术程序也可用于确定不同Fc融合蛋白对不同T细胞群体的影响,如下面的实施例所述。

[0212] CD45是I型跨膜蛋白,其以各种形式在所有分化的造血细胞(红细胞和浆细胞除外)上高水平表达。CD8是T细胞受体(TCR)的共受体(co-receptor),主要在细胞毒性T细胞的表面上表达,虽然它也可以在NK细胞、皮质胸腺细胞和树突状细胞上被发现,而CD4是一种糖蛋白,主要在T辅助细胞上被发现,但是也存在于其他免疫细胞的表面上,例如单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞。Foxp3是属于叉头(forkhead)或翼状(winged)螺旋家族转录因子的一种转录抑制因子,作为 T_{reg} 的特异性标记物,其先前被非特异性标记如CD25 or CD45RB(CD45的同种型,具有外显子5剪接,编码B决定簇(determinant)鉴定。Foxp3被发现所有具有调节活性的 $CD4^+T_{reg}$ 上表达,但对这个标记染色需要固定和透化细胞。

[0213] 抗CTLA-4同种型对T细胞群体的影响

[0214] 鉴于CTLA-4在激活性 T_{eff} /T记忆细胞亚群和 T_{reg} 亚群二者中均有表达并具有功能作用,所以对来自不同部位的多个细胞群体进行监视。先前数据证明,抗CTLA-4抗体阻断导致在处理过的小鼠的淋巴结(LN)中有 T_{reg} 扩增(expansion)(Quezada等,2006)。在CT26结肠腺癌肿瘤荷瘤小鼠中评估CTLA-4抗体同种型对外周 T_{reg} 扩增的影响,方法是在抗体处理后第16天对肿瘤和肿瘤引流淋巴结中的T细胞亚群进行分析。统计学分析使用GraphPad Prism执行。误差线代表使用Prism计算出的平均值的标准误差。具体使用的统计学检验是非配对t检验和单因素方差分析。在每个图中,P值<0.05,0.01和0.001分别记为*,**和***。

[0215] 所有抗体均提高了脾脏或其它外周部位(例如代表性FACS作图中的LN或血液)的 T_{reg} 数目。此外,用抗CTLA-4处理的动物体内的 T_{reg} 还具有更高的Ki-67(一种扩增标志物)表达,提示CTLA-4阻断除去抑制信号,无论抗体的同种型为何。对用每种抗CTLA-4同种型处理的非荷瘤小鼠的LN进行分析,获得了相似的结果(数据未显示)。

[0216] 正如预期的,用抗CTLA-4抗体处理小鼠导致肿瘤部位呈 $CD8^+$ 的 $CD45^+$ 细胞的百分比增加,其中2a和2b同种型诱导的增加最大,而G1D265A组诱导微弱的增加(图4A)。肿瘤部位的总 $CD8^+$ T细胞数目与百分比变化一致(数据未显示)。

[0217] 肿瘤内 $CD4^+$ 细胞百分比分析揭示,2a同种型的抗CTLA-4导致 $CD4^+$ T细胞减少(图4B)。

[0218] 当通过Foxp3和CD4染色来分析肿瘤内T细胞的 T_{reg} 时,观察到每个处理组中有深刻差异(图4C)。用2a同种型的抗CTLA-4处理导致肿瘤处的 T_{reg} 的数目急剧减少,而2b显示没有改变,而IgG1D265导致 T_{reg} 数目增加。

[0219] 由这些抗CTLA-4同种型中的每一种所介导的T效应细胞(T_{eff})和 T_{reg} 数目的改变导致肿瘤内 $CD8^+$ T细胞对 T_{reg} 的比值以及 $CD4^+T_{eff}$ 对 T_{reg} 的比值的显著差异(图5A和B)。抗CTLA-IgG2a同种型显示最高的 T_{eff} 对 T_{reg} 比值。 $CD8^+$ T细胞对 T_{reg} 的高比值被认为反映了强的抗肿瘤活性。

[0220] 与肿瘤内T细胞分析相反,外周的T细胞亚群评估结果几乎没有显示同种型之间的差异。所有抗体均可提高肿瘤引流淋巴结中的 T_{reg} 数目(图6)。这些数据与早先观察到的“抗CTLA-4导致抗CTLA-4处理小鼠LN中的 T_{reg} 扩增”(Quezada等,2006)一致,并且与早先的“CTLA-4阻断的抗肿瘤效果不是由于外周 T_{reg} 的耗竭”的结论基本一致(Maker等,2005; Rosenberg,2006)。在用所有CTLA-4同种型处理的动物体内还观察到了表达ICOS的 $CD4^+$ 细

胞百分比的增加(数据未显示),这表明 T_{effs} 的激活增加不依赖于抗体同种型。总的来说,这些数据证明, T_{reg} 损耗被限制于肿瘤部位。

[0221] 实施例4

[0222] 变体抗CTLA-4同种型在MC38鼠结肠腺癌肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0223] 除了实施例3所述的CT26肿瘤模型之外,还在MC38结肠腺癌肿瘤模型中对不同抗CTLA-4同种型的抗肿瘤活性进行了评估。每只C57BL/6小鼠皮下注射 2×10^6 个MC38肿瘤细胞。7天后,确定肿瘤体积,并将小鼠随机分入处理组,使得具有相当的评价肿瘤体积($44.7-49.2 \text{ mm}^3/2$)。在第7、10和14天以 $200 \mu\text{g}/\text{剂}$ 、 $200 \mu\text{l}$ 的体积IP施用在PBS中配制的4种不同同种型(IgG1, IgG1D265A, IgG2a和IgG2b)的抗CTLA-4抗体。每周记录3次肿瘤体积。

[0224] 图7B和C显示,用IgG1和IgG1D265A抗CTLA-4处理的肿瘤快速生长,其生长速度与用小鼠IgG1对照处理的肿瘤的生长速度相似(图7A)。形成对照的是,用IgG2a抗CTLA-4抗体处理小鼠(图7D)将肿瘤生长速度显著降低,接近完全抑制的水平。IgG2b抗CTLA-4抗体也显著抑制了肿瘤生长(图7E),尽管程度低于IgG2a同种型。

[0225] 图8A和B上作出了用不同抗CTLA-4同种型处理的小鼠组的平均肿瘤体积和中值肿瘤体积的变化的图。这些图确认了图7所示的个体小鼠数据,并且清晰地揭示,IgG2a同种型的抗CTLA-4抗体对MC38肿瘤生长显示最强烈的抑制效果,其次是IgG2b同种型的效果。IgG1和IgG1D265A同种型对肿瘤生长显示很少或者没有抑制,与小鼠IgG1对照相似。4种抗CTLA-4同种型在肿瘤植入后不同时间点的百分比平均肿瘤生长抑制效果如表4所示。

[0226] 总体上,图7和8和表4的数据证明,IgG1和突变的小鼠IgG1抗CTLA-4同种型在这个分阶段的(治疗性)MC38肿瘤模型中与小鼠IgG同种型对照相比不显示抗肿瘤活性。相反,IgG2a和IgG2b同种型显现显著的抗肿瘤活性,前者实现了几乎完全的肿瘤生长抑制,比后者强力得多。

[0227] 表4. 肿瘤移植后MC38肿瘤生长的百分比平均抑制

天	%平均肿瘤生长抑制			
	抗 CTLA-4- mIgG1	抗 CTLA-4- mIgG1D265A	抗 CTLA-4- mIgG2a	抗 CTLA-4- mIgG2b
7	8.2	2.0	-0.1	-1.0
[0228] 9	7.3	-13.6	-17.7	-18.5
11	3.8	-8.5	14.9	11.5
14	-8.1	-15.6	59.8	31.3
16	-7.5	-3.6	75.5	50.9
18	-7.8	0.8	85.4	50.6
21	-17.3	-8.9	92.6	47.0

[0229] 实施例5

[0230] 抗CTLA-4同种型对MC38肿瘤内T细胞亚群的影响

[0231] 在来自用不同抗CTLA-4同种型处理的小鼠的MC38肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)中对T细胞亚群进行分析。与小鼠IgG1同种型对照相比,IgG2a和突变的IgG1D265A同种型导致 CD4^+ 细胞百分比略有增加(图9A)。然而,在分析 CD8^+ 细胞的水平时,与小鼠IgG1同种型和突变的

IgG1抗CTLA-4相比,用IgG2a抗CTLA-4抗体处理导致CD8⁺细胞百分比显著(大约2.5倍)增加(图9B)。与IgG1同种型和突变的IgG1抗CTLA-4相比,IgG2a抗CTLA-4抗体还诱导T_{regs}水平降低至大约1/5(图9C)。

[0232] IgG2a抗CTLA-4同种型介导的CD8⁺T_{effs}增加和T_{regs}降低的组合效果导致T_{eff}对T_{reg}比值(图10A)比用IgG1同种型或IgG1D265A抗CTLA-4抗体处理产生的T_{eff}对T_{reg}比值高得多(超过8倍)(图10A)。正如在CT26结肠腺癌模型中一样,这样的高T_{eff}对T_{reg}比值反映了强健的抗肿瘤活性。用IgG2a抗体处理产生的CD4⁺T_{eff}对T_{reg}比值也是用同种型或IgG1D265A抗体诱导的T_{eff}对T_{reg}比值的大约5倍(图10B)。

[0233] 实施例6

[0234] 变体抗CTLA-4同种型在免疫原性Sa1N鼠纤维肉瘤肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0235] 还在免疫原性Sa1N纤维肉瘤肿瘤模型中进行了抗CTLA-4的抗肿瘤活性评估。A/J小鼠被皮下注射2x10⁶个Sa1N肿瘤细胞。7天后,确定肿瘤体积,并将小鼠随机分入多个处理组中,使它们具有相当的平均肿瘤体积(132.4-146.5mm³/2)。第7、11和14天以200μg/剂量、200μl的体积IP施用配制在PBS中的具有IgG1、突变的IgG1D265A、和IgG2a同种型的抗CTLA-4(9D9)抗体。每周记录2次肿瘤体积。

[0236] 如图11所示,与用IgG1同种型对照处理的肿瘤的无抑制生长(图11A)相比,用IgG2a抗CTLA-4抗体处理小鼠可显著抑制肿瘤生长(图11B),而IgG1D265A处理的肿瘤(图11C)则持续快速生长。用不同抗CTLA-4同种型和对照处理的小鼠组的平均肿瘤体积和中值肿瘤体积的变化如图12A和B所示,这些变化验证了IgG2a抗体对肿瘤生长的显著抑制效果,相比之下,与IgG1D265A同种型和小鼠IgG1对照所显示的对肿瘤生长的抑制相对缺乏。在肿瘤植入后不同时间点受IgG2a和突变的IgG1D265A同种型影响的百分比肿瘤生长抑制的比较如表5所示。

[0237] 表5. 肿瘤移植后Sa1N肿瘤生长的百分比平均抑制

天	%平均肿瘤生长抑制	
	抗 CTLA-4-mIgG1D265A	抗 CTLA-4-mIgG2a
[0238]	7	9.8
	10	3.1
	13	8.2
	17	-20.0
		30.2
		65.3

[0239] 合起来,图11和12和表5的数据证明,IgG2a同种型的抗CTLA-4抗体在这个分阶段的(治疗性)Sa1N肿瘤模型中显示强烈的抗肿瘤活性,相对照的是,突变的IgG1抗CTLA-4抗体缺少抗肿瘤活性,与IgG1同种型对照相似。

[0240] 实施例7

[0241] 抗CTLA-4同种型对Sa1N肿瘤内T细胞亚群的影响

[0242] 对来自用IgG2a处理的小鼠和突变的抗CTLA-4同种型处理的小鼠,以及用IgG1同种型对照处理的小鼠的Sa1N肿瘤TIL中的T细胞亚群进行分析。测试的抗体无一对CD4⁺细胞的百分比产生任何显著的影响(图13A)。与之相对,用具有2a同种型的抗CTLA-4处理导致CD8⁺细胞百分比显著增加(图13B),并伴随T_{regs}的水平显著降低(图13C)。

[0243] 将IgG2a抗CTLA-4同种型介导的 $CD8^+T_{effs}$ 增加和 T_{regs} 降低所导致的 T_{eff} 对 T_{reg} 比值(图14A)相对于用IgG1同种型或IgG1D265A抗CTLA-4抗体处理导致的 T_{eff} 与 T_{reg} 的比值显著增高(至少约6倍高)(图14A)。与CT26和MC38肿瘤模型一致,这样的高 T_{eff} 对 T_{reg} 比值指示了强健的抗肿瘤活性。用IgG2a抗体处理产生的 $CD4^+T_{eff}$ 对 T_{reg} 的比值也比用同种型对照或IgG1D265A抗CTLA-4抗体诱导的 T_{eff} 与 T_{reg} 的比值更高(图14B)。然而,由于IgG2a抗体与IgG1对照或IgG1D265A相比未导致 $CD4^+$ 细胞增加,所以 T_{eff} 与 T_{reg} 的比值增加不如 $CD8^+T_{eff}$ 对 T_{reg} 比值那样显著。

[0244] 鉴于针对CTLA-4(仓鼠;Leach等,1996)和9D9(同种型2b(我们的未公开数据))的抗体先前已显示可以在Sa1N纤维肉瘤中有效地作为单一疗法,即使在肿瘤负荷大时亦然,所以预期 T_{effs} 的激活可能是抗CTLA-4抗体疗法在高免疫原性肿瘤中的抗肿瘤效果的唯一原因。然而,上述数据提示,抗CTLA-4在Sa1N模型中的活性至少部分地是通过某些同种型,特别是IgG2a同种型降低肿瘤部位 T_{regs} 的数量的能力介导的。伴随的 $CD8^+T_{effs}$ 的增加导致 T_{eff} 对 T_{reg} 的比值显著增加。尽管如此,初步数据(未显示)也提示,在荷有低载荷的免疫原性肿瘤(例如同基因Sa1N肿瘤)的小鼠中,抗CTLA-4抗体对抗肿瘤应答的激活,无论同种型如何,可能仅仅是通过阻断CTLA-4介导的。在此情况下,仅 T_{effs} 激活便足以消除肿瘤,而没有任何伴随的 T_{reg} 数目减少。

[0245] 实施例8

[0246] 抗CTLA-4处理对骨髓来源的抑制细胞的影响

[0247] 除了T细胞之外,在用抗CTLA-4处理的MC38荷瘤小鼠的肿瘤和脾脏中,对骨髓来源的抑制细胞(MDSC,由表面标志物CD11b和Gr-1的表达所定义)进行分析。将MC38结肠肿瘤细胞(2×10^6 个)皮下植入到C57BL/6小鼠中。在植入后第7天,将荷瘤小鼠随机分组,并通过每3天腹腔内注射一次(10mg/kg)给予3剂抗体。在植入后第15天,收获肿瘤,将其手工解离成单细胞悬浮液,并通过基于珠子的细胞因子阵列(FlowCytomix;Ebioscience, San Diego, CA)对肿瘤内细胞因子的水平进行评估。

[0248] 图15显示了 $CD45^+$ 细胞中MDSC($CD11b^+Gr-1^+$)的数量的评估(图15A),以及白介素1- α (IL-1 α)的水平评估(图15B)。数据代表了(A)每组 ≥ 3 只小鼠的2次独立实验或者(B) ≥ 5 只小鼠/组/实验的三次独立实验。对于任何抗CTLA-4同种型,脾脏MDSC中没有观察到变化(数据未显示)。然而,与此相反,MDSC数目在用IgG2a同种型处理的小鼠肿瘤中大大增加(图15A)。

[0249] 实施例9

[0250] 应答抗CTLA-4处理的肿瘤内细胞因子表达

[0251] 为了确定肿瘤浸润性 T_{regs} 的减少和伴随的效应器CD8数目的增加是否与T细胞功能的变化有关,对每个MC38荷瘤小鼠处理组中肿瘤微环境内存在的细胞因子水平进行测量。将肿瘤收集到置于24孔板中的1ml完全T细胞培养基中(RPMI-1640,补充10%热失活的胎牛血清(FBS),青霉素/链霉素,和 β -巯基乙醇(Life Technologies, Grand Island, NY),并手工解离成单细胞悬浮液。对细胞和碎片进行离心,收集上清液并冷冻以便进行批量样品处理。解冻后,即使用基于珠子的细胞因子阵列按照制造商的使用说明(FlowCytomix; ebioscience, San Diego, CA)对来自每个样品的25 μ l上清液估测肿瘤内IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27, IP-10, GM-CSF, TNF- α , 和IFN- γ 的浓

度,进行2个重复。

[0252] 抗CTLA-4-IgG2a处理导致辅助T细胞(T_H)₁和 T_H ₂细胞因子的肿瘤内水平最显著增加,并且与其它的每种同种型变体相比,使IFN- γ ,TNF- α ,IL-13,和IL-10显著增加(图16)。有趣的是,与所有其它同种型处理相比,用CTLA-4-IgG2a处理的小鼠肿瘤内IL-1 α 的水平也特异性并且显著地增加(图15B)。该上调是IgG2a变体处理所独有的,而且不仅仅与肿瘤破坏和衰退有关,因为在用抗PD-1和抗CTLA-4-IgG2b的组合—该组合导致相似的抗肿瘤效力和 T_{effs} 扩增(数据未显示)—处理的MC38荷瘤小鼠中没有观察到IL-1 α 增加。

[0253] 实施例10

[0254] 不同抗mGITR抗体同种型的产生

[0255] GITR(糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子(TNF)受体)是一种I型跨膜蛋白,与其它TNF受体家族成员如OX40,CD27和4-1BB同源(Nocentini and Riccardi,2005)。在人类中,GITR通常以低水平表达于静息的 $CD4^+Foxp3^-$ 和 $CD8^+$ T细胞上,但在 $CD4^+CD25^+Foxp3^+T_{regs}$ 上组成性高水平表达。在T细胞激活后,在所有三种亚群上的表达均增加(Cohen等,2010)。我们自己的数据显示,在小鼠中,GITR在所有T细胞亚群上均组成性高水平表达(见实施例18)。

[0256] DTA-1是一种激动性大鼠抗小鼠GITR抗体(Shimizu等,2002;eBioscience, San Diego, CA)。这种IgG2b抗体已显示可以在B16黑色素瘤的治疗过程中调变 T_{regs} 和 T_{effs} 二者。此外,DTA-1完全起效需要 T_{regs} 和 T_{effs} 二者均表达GITR。Cohen等(2010)已提出,尽管DTA-1连接GITR不会全局性地消除 T_{reg} 的抑制活性,但是会阻碍 T_{reg} 肿瘤浸润,并导致肿瘤内 T_{regs} 的Foxp3表达丧失,暗示抑制作用的局部消除。净结果是肿瘤内 $T_{eff}:T_{reg}$ 比值增大,肿瘤中 T_{eff} 的激活和功能更强。

[0257] DTA-1阻断GITR和GITR配体(GITRL)之间的相互作用,并且该可溶性抗体可以在体外有效促进细胞应答。在各种肿瘤模型中,它也可以有效抑制肿瘤生长(参见,例如Turk等,2004;Cohen等,2010)。如实施例1中对于9D9所述,产生了DTA-1的4种同种型变体,即:mIgG1,mIgG1-D265A,mIgG2a,和rIgG2b(原始大鼠同种型,其相当于小鼠IgG2a)。

[0258] 实施例11

[0259] 变体抗GITR同种型在MC38肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0260] 实验MC38#1

[0261] 如实施例4所述,在分阶段的MC38结肠腺癌肿瘤模型中对不同抗GITR(DTA-1)同种型的抗肿瘤活性进行评估。对每只C57BL/6小鼠皮下注射 2×10^6 个MC38肿瘤细胞。7天后,将小鼠随机分入5个处理组,并在第7、10和14天以200 μ g/剂量、以200 μ l的体积IP施用如下的测试抗体:第1组:小鼠IgG1对照(IgG);第2组:抗CTLA-4小鼠IgG2a抗体(9D9-m2a);第3组:抗GITR大鼠IgG2b抗体(DTA-r2b);第4组:抗GITR小鼠IgG1抗体(DTA-mg1);第5组:抗GITR小鼠IgG 2a抗体(DTA-m2a)。在第15天收集肿瘤和脾脏。(生物物理分析(通过SEC)表明,除了DTA-r2b抗体是例外,所有再工程化的DTA-1单克隆抗体均高度聚集,这一结果后来促使我们重复了这个实验,如下文的实验MC38#2详细描述)。

[0262] 图17B显示,IgG1抗GITR处理的肿瘤的生长速度与用小鼠IgG1对照处理的肿瘤相当(图17A),到对小鼠的监测结束为止,10只小鼠中没有一只无瘤的(TF)。然而,与用IgG2a和IgG2b抗CTLA-4抗体时所见的模式相似,DTA-r2b(图17C)和DTA-m2a(图17D)显著降低了肿瘤生长速率,10只小鼠中分别有3只和2只为TF。

[0263] 在图18A和B上作出用不同抗GITR同种型处理的小鼠组的平均肿瘤体积和中值肿瘤体积的变化的图。这些图确认了图17所示的各个小鼠的数据,即IgG2b同种型的抗GITR抗体对MC38肿瘤生长显示出最强的抑制效果,IgG2a同种型显示的效力较之仅略微降低。IgG1同种型对肿瘤生长几乎没有抑制,平均和中值肿瘤体积与用小鼠IgG对照处理的小鼠相似。

[0264] 抗GITR同种型在TIL和脾脏中对MC38 T细胞亚群的影响

[0265] 比较了用不同抗GITR同种型处理的小鼠中MC38 TIL和脾脏中T细胞亚群的群体。在脾脏中,DTA-m2a和DTA-r2b导致CD8⁺细胞水平略微减少,而9D9-m2a和DTA-m1不改变CD8⁺T细胞水平(图19A)。所测试的这些同种型变体对脾脏CD4⁺或CD4⁺Foxp3⁺细胞的百分比均没有显著影响(图19B和C)。

[0266] 在TIL中,与小鼠IgG1对照相比,9D9-m2a导致CD8⁺细胞的百分比增加至少2倍(图19D),与实施例5的结果一致。DTA-m2a的作用没有那么显著,使CD8⁺细胞的百分比增加大约50%,而DTA-m1和DTA-r2b与小鼠IgG1同种型对照相比使CD8⁺细胞的百分比没有增加或者仅有微弱的增加(图19D)。与小鼠IgG1同种型对照相比,9D9-m2a导致CD4⁺细胞的百分比少量增加,而DTA-m1没有导致CD4⁺变化(图19E)。相比之下,DTA-m2a和DTA-r2b与小鼠IgG1同种型相比均使CD4⁺百分比减少40-50%(图19E)。

[0267] 在TIL中,观察到影响最显著的是CD4⁺Foxp3⁺T_{regs}水平。DTA-m1对该T细胞群体没有影响,但是9D9-m2a和DTA-m2a与IgG1同种型和DTA-m1相比诱导CD4⁺Foxp3⁺T_{regs}的水平降低到大约1/6(图19F)。这些数据确证了在实施例5中对IgG2a抗CTLA-4同种型所见的效果,并且证实,抗GITR的IgG2a变体可以类似地特异性降低肿瘤环境中T_{regs}的水平。因此,与IgG2a抗CTLA-4同种型相似,IgG2a抗GITR同种型也诱导肿瘤部位CD8⁺T_{effs}增加和T_{regs}降低,导致增加的T_{eff}对T_{reg}比值,后者指示强健的抗肿瘤活性。与IgG1对照相比,DTA-r2b也诱导CD4⁺Foxp3⁺T_{regs}水平显著降低,尽管降低的程度不如9D9-m2a和DTA-m2a所诱导的那样显著,这与大鼠IgG2b Fc区与鼠激活性FcγR的结合较弱是相符的。这些数据显示,在耗竭活性需要接合激活性FcγR这一点上,激动性抗GITR抗体的行为与拮抗性抗CTLA-4抗体相似。

[0268] MC38 TIL和脾脏中的T细胞不同亚群上的GITR表达水平的流式细胞术测量结果显示,GITR在肿瘤部位的T_{regs}上被最高表达,其表达水平高于外周T_{regs}上或肿瘤部位的CD8⁺T_{effs}上的表达水平,后者进一步显示出高于外周CD8⁺或CD4⁺T_{effs}上的表达水平(见实施例18)。GITR的最低相对表达水平在肿瘤部位的CD4⁺T_{effs}上出现。这些数据表明了一种机制,通过该机制,如果Fc融合蛋白的靶标在肿瘤部位T_{regs}上的表达水平高于在肿瘤部位的T_{effs}上的表达水平,并且Fc融合蛋白与介导靶细胞耗竭的激活性FcR结合,则T细胞耗竭活性将辅助刺激T细胞应答,从而强化Fc融合蛋白的抗肿瘤效力。

[0269] 实验MC38#2

[0270] 因为在DTA-1变体中遭遇了聚集(商购的原始形式的DTA-r2b除外),再工程化了一组新的同种型变体,以获得不会聚集的DTA-1抗体。所观察到的聚集被溯源到意外引入工程化同种型变体轻链中的一个额外氨基酸,去除这个多余的氨基酸减轻了该问题。在实验#2中使用了这些再工程化的抗体。再工程化的抗GITR(DTA-1;GITR.7系列)同种型的抗肿瘤活性用分阶段的MC38模型进行了评估。向每只C57BL/6小鼠皮下植入2x10⁶个MC38细胞。7天后,将小鼠随机分入7个处理组,使得它们具有相当的平均肿瘤体积(大约148mm³/2),在第7、10和14天以200μg/剂量(mIgG对照除外,其施用剂量为200μg) IP施用如下的测试抗体:第

1组:小鼠IgG1对照(mIgG或“同种型”);第2组:抗GITR小鼠IgG1Ab(mGITR.7.mg1);第3组:抗GITR小鼠IgG1D265A同种型(mGITR.7.mg1-D265A);第4组:抗GITR小鼠IgG2a Ab(mGITR.7.mg2a);第5组:抗GITR小鼠IgG2b Ab(mGITR.7.mg2b);第6组:抗GITR大鼠IgG2b Ab(mGITR.7.r2b或DTA-1-rG2b);和第7组:抗CTLA-4小鼠IgG2a Ab(9D9-mg2a)。在第15天收集肿瘤和脾脏。

[0271] 图20B和C显示,用IgG1和IgG1-D265A抗GITR处理的肿瘤的生长速率与用小鼠IgG1对照处理的肿瘤相当(图20A)。在这两种情况下,在植入35天后的小鼠观察结束时,9只小鼠中均没有1只是TF。然而,与实验MC38#1的结果相似,mGITR.7.mg2a(图20D)诱导最大的肿瘤生长抑制,9只小鼠中有2只是TF。小鼠和大鼠抗GITR-2b抗体也以相似的程度显著抑制肿瘤生长速率(图20E和F),尽管在植入后35天,大鼠2b抗体产生了1只TF小鼠,而小鼠2b抗体没有产生任何TF小鼠。

[0272] 图21A和B显示了平均肿瘤体积和中位素肿瘤体积的变化。趋势与在MC38实验1中所见相似,只是与用抗CTLA-4抗体获得的数据相似,IgG2a抗GITR同种型抑制MC38肿瘤生长最强,而IgG2b同种型显示显著的、但较之为低的抑制肿瘤生长效力。与小鼠IgG对照相比,IgG1和IgG1-D265A同种型显示了对肿瘤生长的低水平抑制。

[0273] 抗GITR同种型对MC38肿瘤模型中 T_{reg} 群体的影响

[0274] 不同抗GITR同种型对来自经处理小鼠的TIL和脾脏中 T_{regs} 群体的影响如图22所示。正如在实验#1中观察到的,所测试的同种型变体中无一对脾脏中的 $CD4^+Foxp3^+T_{regs}$ 的百分比有巨大影响:最强的效果是用大鼠抗GITR IgG2b同种型处理诱导的不到40%的增加,而小鼠抗GITR IgG2b同种型略微降低了 $CD4^+Foxp3^+T_{regs}$ 的百分比。所测试的其它抗GITR同种型和抗CTLA-4IgG2a抗体略微增加 T_{regs} 的百分比(图22A)。

[0275] 与之相对,在TIL中,除了与同种型对照相比没有造成改变的IgG1同种型之外,所有测试抗体均诱导 T_{regs} 百分比显著降低。与IgG1同种型相比,抗CTLA-4抗体9D9-mG2a导致 $CD4^+Foxp3^+T_{regs}$ 的水平降低到大约1/4;抗GITR小鼠2a和2b同种型和大鼠2b同种型均使 T_{regs} 水平降低到大约1/2,IgG1-D265A突变体导致略微较少的降低(图22B)。这些数据确认了实验#1中所见的效果,证明抗GITR mG2a,mG2b和rG2b同种型诱导肿瘤环境中显著的 T_{reg} 耗竭,这与肿瘤生长抑制相关。

[0276] 在实验MC38#2中获得的数据与实验#1所得的数据大体上一致,提示抗体的聚集不会过度干扰抗体的活性。有可能,聚集的抗体在小鼠体内被快速冲走,因此抗体聚集不会是这种体内测定中的显著问题。

[0277] 实施例12

[0278] 变体抗GITR同种型在分阶段的Sa1N肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0279] 还在A/J小鼠的Sa1N肉瘤模型中评估了抗GITR的抗肿瘤活性。小鼠被皮下注射 2×10^6 个Sa1N细胞/植入。7天后,确定肿瘤体积,并将小鼠随机分入处理组,使它们具有相当的评价肿瘤体积(大约 $75\text{mm}^3/2$)。被工程化为s具有不同的同种型的抗GITR(DTA-1)抗体,如实施例11实验MC38#1所述,在第7、10和12天以 $200\mu\text{g}/\text{剂量}$ IP施用。

[0280] 对肿瘤生长的效果如图23所示。用IgG2a抗GITR抗体处理完全抑制肿瘤生长,并且到植入后大约第20天为止,全部10只小鼠均为TF(图23B),大鼠IgG2b同种型具有相似的效果,到大约第20天为止,10只小鼠中有9只为TF(图23C)。IgG1(图23D)和IgG1D265A(图23E)

同种型在一定程度上抑制肿瘤,相比之下IgG1同种型对照处理的肿瘤则不受抑制地生长(图23A),但是此类抑制比用mIgG2a和rIgG2b同种型所见的抑制小得多。如图24A和B所示的平均肿瘤体积和中值肿瘤体积的变化确认了mIgG2a和rIgG2b抗体对肿瘤生长的几乎完全的抑制效果,相比之下mIgG1和mIgG1-D265A同种型所展示的肿瘤生长抑制弱得多。

[0281] 合起来,图23和24的数据确认了用MC38肿瘤模型获得的数据(实施例11),表明:抗GITR mIgG2a和rIgG2b同种型与mIgG1(和mIgG1-D265A)同种型相比显示强力的抗肿瘤活性,后者的抗肿瘤活性低得多。

[0282] 抗GITR同种型对Sa1N肿瘤模型中 T_{reg} 群体的影响

[0283] 抗GITR同种型对来自经处理小鼠的Sa1N TIL和脾脏中的 T_{regs} 群体的影响如图25所示。所有测试的抗GITR同种型变体均诱导脾脏中 $CD4^{+}Foxp3^{+}T_{regs}$ 的水平相对较小的增加,大约20-40%。最大的增加是用小鼠抗GITR IgG2a同种型处理诱导的,其导致与抗CTLA-4IgG2b和IgG1-D265A抗体处理相同的增加(图25A)。后一种抗CTLA-4同种型在这个GITR研究中作为阳性对照,因为先前用IgG2b同种型已经观察到了 T_{reg} 耗竭。

[0284] 与外周中 T_{regs} 的效果形成对照的是,抗GITR m2a和r2b同种型以及抗CTLA-4 2b同种型均使肿瘤部位 T_{regs} 的水平降低到至少1/3.5(图25B)。抗GITR IgG1同种型和IgG1-D265A突变体诱导 T_{regs} 百分比均较之为小(约35%),而抗CTLA-4IgG1-D265A突变体并未导致TIL中 T_{regs} 百分比发生变化。由此可见,正如在MC38肿瘤模型中观察到的,抗GITR mG2a和rG2b同种型在肿瘤环境中诱导显著的 T_{reg} 耗竭,比IgG1和IgG1-D265A抗体高得多,这与肿瘤生长抑制相关。

[0285] 实施例13

[0286] 无岩藻糖基化对变体抗CTLA-4同种型在MC38肿瘤模型中的抗肿瘤活性的影响

[0287] 在MC38肿瘤模型中对无岩藻糖基化(NF)的抗CTLA-4(9D9)同种型的抗肿瘤活性进行评估。这些无岩藻糖基化变体是用缺少岩藻糖转移酶的CHO细胞系转染产生的。对C57BL/6小鼠皮下注射 2×10^6 个MC38肿瘤细胞/植入,11天后,将小鼠随机分入处理组,使之具有大约 $230\text{mm}^3/2$ 的平均肿瘤体积。在第11、13和15天以 $200\mu\text{g}/\text{剂量}$ 、 $200\mu\text{l}$ 的体积IP施用抗CTLA-4抗体的4种不同同种型(IgG1D265A, IgG2a, IgG2a-NF, IgG2b和IgG2b-NF)。

[0288] 如先前观察到的(见实施例4),IgG1D265A突变体(图26B)与小鼠IgG1对照(图26A)相比抑制肿瘤生长的效果微弱,而IgG2b同种型则显著抑制肿瘤生长(图26C),尽管程度比IgG2a(图26E)低,后者可强烈降低肿瘤生长速率,导致12只小鼠中有10只为TF。IgG2b同种型的无岩藻糖基化显著增强其肿瘤抑制活性(图26D),导致12只小鼠中有10只为TF,与用IgG2a同种型所见的活性相似。这些数据确认,无岩藻糖基化—已知其可增加Fc区与激活性FcR的结合—可用于增加肿瘤部位 T_{regs} 的耗竭,并提高 T_{reg} 靶向性Fc融合蛋白的抗肿瘤效力。无岩藻糖基化IgG2a同种型(图26F)显示与正常的IgG2a同种型(图26E)相似的肿瘤生长抑制。IgG2a同种型抑制肿瘤生长是如此强烈,以至用IgG2a-NF变体没有观察到强化。

[0289] 图27A和B显示了小鼠处理组中平均和肿瘤体积的变化,验证了图26所示的个体小鼠数据,并且证实了IgG2b-NF, IgG2a和IgG2a-NF同种型与IgG1D265A和IgG1同种型相比的高效力。

[0290] 实施例14

[0291] 变体抗OX40同种型在鼠CT26肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0292] 为了确定激动性抗OX40的不同同种型的相对抗肿瘤效力,工程化了抗OX40抗体OX86(A1-Shamkhani等,1996)的三种同种型变体:抗OX40大鼠IgG1(OX40-rg1),抗OX40-小鼠IgG1(OX40-mg1),和抗OX40小鼠IgG2a(OX40-mg2a)。这些同种型变体与小鼠IgG1同种型对照(一种具有小鼠IgG1同种型的重组人抗白喉毒素抗体)一起进行测试,在同基因CT26结肠腺癌小鼠模型中考察抗肿瘤活性。

[0293] 将BALB/c小鼠皮下注射 1×10^6 个CT26肿瘤细胞。在第3、7和10天以200 μ g/剂量、200 μ l的体积用在PBS中配制的抗体IP处理小鼠。每周测量2次肿瘤体积。

[0294] 如图28所示,抗OX40大鼠IgG1同种型与对照IgG(图28A)相比显示出中等水平的肿瘤生长抑制(图28B),在长达35天后,用OX40-rg1处理的10只小鼠中有3只为TF;而OX40-mg1同种型展现出显著的肿瘤生长抑制,用OX40-mg1处理的10只小鼠中有6只为TF(图28C)。然而,和用抗CTLA和抗GITR抗体观察到的一样,OX40-m2a同种型显示最强的抗肿瘤活性,用OX40-mg2a处理的10只小鼠中有8只为TF(图28D)。这些数据证明,在CT26肿瘤模型中,优先结合激活性小鼠Fc受体的抗mOX40同种型(OX40-mg2a)比优先结合鼠抑制性Fc受体FcRIIb的同种型变体(OX40-rg1和OX40-mg1)显示出更卓越的抗肿瘤效力。在皮下接种 2×10^6 个MC38结肠癌细胞的C57BL/6小鼠中观察到了相似的数据(数据未显示)。

[0295] 用分阶段(治疗性)模型重复该实验,在BALB/c中植入 1×10^6 个CT26肿瘤细胞。7天后,确定肿瘤体积并将小鼠随机分入处理组,使得它们具有相当的平均肿瘤体积(45-50mm³/2)。在第7、10和14天以200 μ g/剂量腹膜内给予抗体(OX40-mG1,OX40-mG1D265A,OX40-mG1和小鼠IgG1同种型对照),每周测量2次肿瘤体积。

[0296] 结果如图29所示,与图28所示的结果一致,只是观察到的肿瘤抑制水平有所降低,因为在施用抗体之前肿瘤被允许生长更长的时间。因此,如先前所见的,OX40-MG1同种型(图29C)与对照IgG(图29A)相比显示出中等水平的肿瘤生长抑制,在长达42天之后,8只小鼠中有2只为TF;OX40-m2a同种型表现出更强的抗肿瘤活性,8只小鼠中有4只为TF(图28D)。这些数据再次确认了这一发现,即优先结合激活性小鼠Fc受体的抗OX40同种型变体比优先结合鼠抑制性Fc受体的同种型抑制肿瘤生长更强。该数据进一步显示,小鼠OX40的抗体介导激动作用(antibody-mediated agonism)依赖于FcR介导的交联,因为抗mOX40抗体在被重构(reformatted)为不能结合Fc受体的变体(OX40-g1D265A)后(图29B),与IgG同种型对照(图29A)相比没有显示抗肿瘤活性。

[0297] 实施例15

[0298] ICOS-靶向的Fc融合蛋白在Sa1N肿瘤模型中的同种型依赖的抗肿瘤活性

[0299] 抗小鼠ICOS抗体17G9是一种大鼠IgG2b激动性单克隆抗体,其阻断ICOS与B7h之间的结合,并已知会增强T细胞应答,包括T细胞增殖和细胞因子产生(McAdam等,2000)。ICOS配体(ICOSL)特异性结合ICOS,并且发挥对T细胞增殖和细胞因子分泌的共刺激信号的作用。产生的ICOSL融合蛋白含有小鼠ICOSL的细胞外域,与鼠IgG1 Fc(ICOSL-muIgG1)或人IgG1Fc(ICOSL-hIgG1)融合。ICOSL-hIgG1和抗体17G9优先与小鼠激活性FcR相互作用,而ICOSL-mIgG1优先与小鼠抑制性FcR相互作用。

[0300] 在Sa1N肉瘤模型中对特异性结合ICOS的Fc融合蛋白的不同同种型的抗肿瘤效力进行研究。对A/J小鼠皮下注射 2×10^6 个Sa1N肿瘤细胞。在植入后第7天,将荷瘤小鼠随机分组,并以10mg/kg剂量的Fc融合蛋白IP注射3次,每3天一次(Q3D x 3)。

[0301] 结果如图30所示。ICOSL-mIgG1 (图30B) 与对照小鼠IgG1 (图30A) 相比没有显示显著的抗肿瘤活性。相反, ICOSL-hIgG1 (其既往已被显示有抗肿瘤效力; 见Ara等, 2003) 和17G9均显示强烈的抗肿瘤活性, 每一个均在10只小鼠中有6只为TF小鼠 (图30C和D)。因此, 在这个小鼠SaN1肿瘤模型中的强抗肿瘤活性与Fc融合蛋白的Fc部分结合小鼠激活性FcR的能力相关。

[0302] 实施例16

[0303] 激动性抗ICOS对MC38肿瘤模型中T_{reg}群体的影响

[0304] 将MC38结肠肿瘤细胞 (2×10^6 细胞/植入) 皮下植入到C57BL/6小鼠中。在植入后第7天, 将荷瘤小鼠随机化, 并用10mg/kg大鼠IgG2b抗体17G9或小鼠IgG1对照抗体通过IP注射Q3D x 3给药。在植入后第15天, 收集肿瘤, 并解离成单细胞悬浮液, 并染色进行流式细胞分析 (见实施例3)。

[0305] 如图31A和B所示, 用17G9处理导致MC38肿瘤的肿瘤部位的Foxp3⁺调节性细胞减少, 表示为CD4⁺细胞的百分比或者CD45⁺总淋巴细胞的百分比。

[0306] 实施例17

[0307] 变体抗PD-1同种型在MC38肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0308] 实验#1

[0309] 在分阶段的MC38结肠肿瘤模型中如前所述地 (实施例4) 对抗小鼠PD-1抗体4H2的不同同种型的抗肿瘤活性进行评估。

[0310] 4H2是一种嵌合大鼠-小鼠抗mPD-1抗体, 它是从一种大鼠IgG2a抗小鼠PD-1抗体构建的, 其中Fc部分被来自小鼠IgG1同种型的Fc部代替 (WO 2006/121168)。它阻断mPD-L1和mPD-L2与mPD-1的结合, 刺激T细胞应答, 并显示抗肿瘤活性。对每只C57BL/6小鼠皮下注射 2×10^6 个MC38肿瘤细胞。7天后, 将小鼠随机分入4个处理组, 并以200μg/剂、200μl体积IP施用如下的测试抗体: 第1组: 小鼠IgG1对照 (IgG); 第2组: 抗PD-1IgG1; 第3组: 抗PD-1IgG1D265A; 第4组: 抗PD-1IgG2a。

[0311] 如图32所示, 3种抗PD-1同种型显示低水平的抗肿瘤活性, 其中IgG1处理在11只小鼠中产生2只TF小鼠 (图32B), IgG1D265A处理也在11只小鼠产生2只TF小鼠, 尽管这种同种型似乎普遍地具有略微更大的抗肿瘤活性 (图32C)。用IgG2a同种型处理在11只小鼠中没有产生TF小鼠 (图32D), 但是普遍地显示比小鼠IgG1对照略微更大的抗肿瘤活性 (图32A)。因此, 尽管抗PD-1IgG2a同种型显示一些抗肿瘤活性, 但是比抗PD-1IgG1或IgG1D265A同种型所显示的要弱。显然, 与用抗CTLA-4, GITR, OX40和ICOS IgG2a抗体所得的结果相反, 抗PD-1IgG2a同种型与G1和G1D265A同种型相比没有增强抗肿瘤活性。

[0312] 图33A和B显示了用不同抗PD-1同种型处理的小鼠组中平均肿瘤体积和中值肿瘤体积的变化。这些图确认了图32所示的个体小鼠数据, 并清楚地显示, IgG1D265A同种型对MC38肿瘤生长显示最强的抑制效果。抗PD-1同种型对TIL中MC38 T细胞亚群的影响

[0313] 比较了用不同抗PD-1同种型处理的小鼠中浸润MC38肿瘤的T细胞亚群的百分比。图34A显示, 4H2-G1和G1D265A同种型与两种小鼠IgG1对照相比分别诱导了CD8⁺细胞百分比少量增加大约20%和50%, 而IgG2a同种型导致CD8⁺细胞的百分比降低大约50%。这3种4H2同种型与小鼠IgG1同种型对照相比几乎没有引起CD4⁺细胞百分比改变 (图34B), 并且诱导CD4⁺FoxP3⁺T_{regs} 百分比少量增加, 其中IgG2a同种型导致的增加最显著 (图34C)。这些结果背

离了用相应的同种型抗CTLA-4,GITR,OX40和ICOS抗体所得的结果。

[0314] 对MC38 TIL中不同的T细胞亚群上的PD-1表达水平的流式细胞测量结果显示,PD-1在CD8⁺T_{effs}上的表达最高,在T_{regs}和CD4⁺T_{effs}上的表达依次降低(见实施例18)。

[0315] 实验#2

[0316] 在MC38肿瘤模型中重复上述的不同抗PD-1同种型抗肿瘤活性的测试,但免疫监视实验除外。图35所示的结果的趋势与实验#1中的趋势相似,但是加强了,并且更清晰地显示了不同同种型在抑制肿瘤生长方面的差异。抗PD-1IgG1(图35B)和IgG1D265A(图35C)处理在10只小鼠中分别产生了5只和6只TF小鼠,而用IgG2a同种型处理在10只小鼠中产生了2只TF小鼠(图35D),相比之下小鼠IgG1对照在10只小鼠中没有产生TF小鼠(图35A)。实验#1和#2之间结果的差异在表6中总结。

[0317] 表6. 抗PD-1同种型在实验#1和#2中的抗肿瘤活性

处理	实验#1	实验#2
	无肿瘤小鼠的数目	无肿瘤小鼠的数目
mIgG	0/11	0/10
抗 PD-1 IgG1	2/11	5/10
抗 PD-1 IgG1	2/11	6/10
抗 PD-1 IgG2a	0/11	2/10

[0319] 图35A和B所示的平均肿瘤体积和中值肿瘤体积的变化也清楚地验证了IgG1D265A同种型对MC38肿瘤生长显示的抑制效果最强,随后是IgG1同种型,IgG2a同种型显示的抗肿瘤活性低得多。

[0320] 实施例18

[0321] 荷瘤小鼠肿瘤和脾脏中T细胞上的受体表达分析

[0322] 肿瘤微环境中T_{regs}和常规的T细胞(T_{conv})均表达多种多样的共刺激和共抑制受体。然而,对T_{regs}上的受体的接合,与对T_{conv}上的相同靶标的接合相比,对细胞功能的影响可能有巨大的不同。例如,针对OX40的激动性抗体增强T_{conv}激活而抑制T_{reg}功能。而且,每种受体的表达水平在不同的T细胞亚群上可能有相当大的差异,并且在肿瘤微环境和外周中的相同类型的T细胞上也有很大不同。

[0323] 表7. 用于T细胞受体表达的流式细胞分析的试剂

标记	荧光染料	克隆	染色浓度(μg/ml)
CD4	700	GK1.5	0.001
Thy1.2	BV510	53-2.1	0.001
Foxp3	GFP	n/a	
生/死	APC/780	n/a	
CD27	PerCP/710	LG.7F9	0.002
CD137	PE	17B5	0.002
GITR	PE/Cy7	DTA-1	0.002
OX-40	BV421	OX-86	0.002
ICOS	APC	C398.4A	0.002

[0325] 测定了在肿瘤部位和脾脏中多种共刺激和共抑制受体在 T_{regs} 和 T_{convs} 上的相对表达水平。为了测量CD27, CD137, GITR, OX40和ICOS的表达水平, 在9只自行选育的雌性Foxp3-GFP小鼠 (C57BL/6背景, JAX#:006772) 的右肋皮下注射溶于100 μ l PBS中的 1×10^6 个MC38细胞。在MC38肿瘤细胞植入14天后处死小鼠。收集脾脏和肿瘤, 并挤压通过100- μ m细胞滤网以产生单细胞悬浮液。用ACK裂解缓冲液(10mM $KHCO_3$, 1mM EDTA, 150mM NH_4Cl , pH7.3)裂解脾脏样品中的红细胞。对细胞进行计数, 并使用表7所示的抗体将来自每个样品的 2×10^6 个活细胞在FACS染色缓冲液(PBS+2%FBS, 2mM EDTA)中4 $^{\circ}C$ 染色30分钟。细胞用FACS染色缓冲液染色2次, 并立即通过流式细胞术进行分析。

[0326] 在平行实验中, 在向A/J小鼠皮下植入 2×10^6 个Sa1N肉瘤细胞之后测量CD27, GITR, OX40, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3和TIGIT的表达水平。在植入后第7天, 将荷瘤小鼠随机分组, 并用10mg/kg抗体通过IP注射Q3D x 3给药。在植入后第15天, 收集肿瘤并解离成单细胞悬浮液, 并染色用于流式细胞分析。来自这次Sa1N实验的数据确认并补充了从MC38肿瘤分析获得的数据。

[0327] 表8中总结了从这两次实验中确定的相对表达水平。对于共刺激性受体ICOS, OX40和CD137, 在 T_{regs} 上的表达水平高于 T_{convs} , 并且在肿瘤中 T_{regs} 上的表达水平高于脾脏中的 T_{regs} , 但是GITR和CD27的表达在肿瘤和脾脏中在CD8 T_{effs} 和 T_{regs} 上差不多一样高。此外, 肿瘤中的Treg上的受体表达普遍要比脾脏中的Treg细胞高。对于共抑制性受体, 在肿瘤中的不同T细胞亚群上的表达水平一般比脾脏中相同类型细胞上的更高。共抑制性受体在CD8 T_{effs} 上的表达水平高于 T_{regs} 或CD4细胞, 但CTLA-4是例外。TIGIT的表达在所有T细胞亚群上均非常低或者检测不到。

[0328] 表8. 受体在肿瘤和脾脏的T细胞上的相对表达水平

受体	共刺激性受体					
	肿瘤			外周(脾脏)		
	T _{reg}	CD8 ⁺	CD4 ⁺	T _{reg}	CD8 ⁺	CD4 ⁺
ICOS	+++	+	+	+	-	+/-
GITR	++++	+++	+	+++	++	++
OX40	++	-	+	+	-	-
CD27	+++	+++	+	+++	+++	+++
CD137	+++	+	-	+	-	-
	共刺激性受体					
CTLA-4	+++	+	+	+	-	-
PD-1	+	++	+/-	-	+/-	-
LAG-3	+	++	+	-	-	-
TIM-3	+	+++	-	-	-	-

[0330]	受体	共刺激性受体					
		肿瘤			外周(脾脏)		
		T _{reg}	CD8 ⁺	CD4 ⁺	T _{reg}	CD8 ⁺	CD4 ⁺
	TIGIT	+/-	-	-	-	-	-

[0331] 参考文献

[0332] Albanesi M等(2012)Cutting Edge:FcγRIII (CD16) and FcγRI (CD64) are responsible for anti-glycoprotein 75monoclonal antibody TA99 therapy for experimental metastatic B16 melanoma.J Immunol 189(12):5513-7.

[0333] Al-Shamkhani A等(1996)OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cell and is the sole receptor for the OX40 ligand.Eur J Immunol 26:1695-9.

[0334] Ara G等(2003)Potent activity of soluble B7RP-1-Fc in therapy of murine tumors in syngeneic hosts.Int J Cancer 103(4):501-7.

[0335] Ascierto PA等(2011)anti-CTLA4 monoclonal antibodies:the past and the future in clinical application.J Transl Med 9:196.

[0336] Attia P等(2005)Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4.J Clin Oncol 23(25):6043-53.

[0337] Baitsch L等(2012)Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation,antigen-specificity and anatomical localization.PloS One 7(2):e30852.

[0338] Berman DM等(2009)Association of peripheral blood absolute lymphocyte count (ALC)and clinical activity in patients(pts)with advanced melanoma treated with ipilimab[abstr]J Clin Oncol 27(suppl):15s.3020.

[0339] Berger R等(2008)Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011,a humanized antibody interacting with PD-1,in patients with advanced hematologic malignancies.Clin Cancer Res 14:3044-51.

[0340] Bevaart L等(2006)The high-affinity IgG receptor,FcγRI,plays a central role in antibody therapy of experimental melanoma.Cancer Res 66:1261-4.

[0341] Birebent B等(2004)Suppressive properties of human CD4+CD25+regulatory T cells are dependent on CTLA-4expression.Eur J Immunol 34:3485-96.

[0342] Bour-Jordan H等(2011)Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family.Immunol Rev 241(1):180-205.

[0343] Bradbury ARM等(2011)Beyond natural antibodies:the power of in vitro display technologies.Nat Biotechnol 29(3):245-54.

[0344] Brahmer J等(2012)Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer.N Engl J Med 366(26):2455-65.

- [0345] Bruhns P等(2009) Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113:3716-25.
- [0346] Bulliard Y等(2013) Activating Fcγ receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med* 210(9):1685-93.
- [0347] Cartron G等(2004) From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104(9):2635-42.
- [0348] Clynes RA等(2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000;6:443-46.
- [0349] Cohen AD等(2010) Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PLoS One* 5(5):e10436.
- [0350] Comin-Anduix B等(2008) Detailed analysis of immunologic effects of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-blocking monoclonal antibody tremelimumab in peripheral blood of patients with melanoma. *J Transl Med* 6:22.
- [0351] Corse E and Allison JP(2012) Cutting edge: CTLA-4 on effector T cell inhibits in trans. *J Immunol* 189:1123-27.
- [0352] Coyle AJ and Gutierrez-Ramos JC(2001) The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2(3):203-9.
- [0353] Crowe JS等(1992) Humanized monoclonal antibody CAMPATH-1H: myeloma cell expression of genomic constructs, nucleotide sequence of cDNA constructs and comparison of effector mechanisms of myeloma and Chinese hamster ovary cell-derived material. *Clin Exp Immunol* 87:105-10.
- [0354] Dall'Ozzo S等(2004) rituximab dependent cytotoxicity by natural killer cell: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 64:4664-9.
- [0355] Driessens等(2009) Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 229(1):126-44.
- [0356] Emmerich J等(2012) IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cell without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Res* 72:3570-81.
- [0357] European Publication No. EP1176195, entitled "Method for controlling the activity of immunologically functional molecule," published January 30, 2002 by Hanai N等
- [0358] Flies DB等(2011) Blockade of the B7-H1/PD-1 Pathway for Cancer Immunotherapy. *Yale J Biol Med* 84:409-21.
- [0359] Gennari R等(2004) Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors

overexpressing HER2.Clin Cancer Res 10:5650-5.

[0360] Hamid O等(2009)Association of baseline and on-study tumor biopsy markers with clinical activity in patients(pts)with advanced melanoma treated with ipilimumab[abstr]J Clin Oncol 27(suppl):15s.9008.

[0361] Hamid O等(2011)A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma.J Transl Med 9:204.

[0362] Harding FA等(1992)CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cell and prevents induction of anergy in T cell clones.Nature 356:607-10.

[0363] Harris NL and Ronchese F(1999)The role of B7 costimulation in T-cell immunity.Immunol Cell Biol 77(4):304-11.

[0364] He YF等(2004)Blocking programmed death-1ligand-PD-1interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine.J Immunol 173:4919-28.

[0365] Hodi FS等(2008)Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4in previously vaccinated cancer patients.Proc Natl Acad Sci USA 105:3005-10.

[0366] Hodi FS等(2010)Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.N Engl J Med 363:711-23.

[0367] Hollinger and Hudson(2005)Engineered antibody fragments and the rise of single domains.Nature Biotech 23(9):1126-36.

[0368] Hoos A等(2010)Development of ipilimumab:contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy.Semin Oncol 37:533-46.

[0369] Huang RR等(2011)CTLA4 blockade induces frequent tumor infiltration by activated lymphocytes regardless of clinical responses in humans.Clin Cancer Res 17(12):4101-9.

[0370] Hurwitz AA等(1996)Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis.J Neuroimmunol 73:57-62.

[0371] Idusogie EE等(2000)Mapping of the C1q binding site on rituxan,a chimeric antibody with a human IgG1 Fc.J Immunol 164:4178-84.

[0372] Ji RR等(2102)An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab.Cancer Immunol Immunother 61:1019-31.

[0373] Keler T等(2003)Activity and safety of CTLA-4blockade combined with vaccines in cynomolgus macaques.J Immunol 171:6251-59.

[0374] Krummel MF and Allison JP(1995)CD28 and CTLA-4have opposing effects on the response of T cell to stimulation.J Exp Med 182:459-65.

[0375] Ku GY等(2010)Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting:lymphocyte count

after 2 doses correlates with survival. *Cancer* 116:1767-75.

[0376] Lazar GA等(2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4005-10.

[0377] Leach DR等(1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271(5256):1734-6.

[0378] Lenschow DJ等(1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-58.

[0379] Liakou CI等(2008) CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4⁺ ICOS⁺ cell to shift the ratio of effector to regulatory T cell in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14987-92.

[0380] Lonberg N等(1994) Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368(6474):856-9.

[0381] Louis E等(2004) Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 19:511-9.

[0382] Maker AV等(2005) Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 175(11):7746-54.

[0383] McAdam AJ等(2000) Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cell. *J Immunol* 165:5035-40.

[0384] Mellman I等(2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480-9.

[0385] Miescher S等(2004) A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the Fc γ RIIA and Fc γ RIIA genes. *Blood* 103:4028-35.

[0386] Mitsui J等(2010) Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin Cancer Res* 16:2781-91.

[0387] Mossner E等(2010) Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115:4393-402.

[0388] Musolino A等(2008) Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26(11):1789-96.

[0389] Mumm JB等(2011) IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell* 20:781-96.

[0390] Natsume A等(2009) Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther* 3:7-16.

- [0391] Nimmerjahn F and Ravetch JV(2005)Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding.Science 310:1510-2.
- [0392] Nimmerjahn F and Ravetch JV(2008)Fcγreceptors as regulators of immune responses.Nat Rev Immunol 8(1):34-47.
- [0393] Nimmerjahn F and Ravetch JV(2010)Antibody-mediated modulation of immune responses.Immunol Rev 236:265-75.
- [0394] Nocentini G and Riccardi C(2005)GITR:a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily.Eur J Immunol 35:1016-22.
- [0395] Nordstrom JL等(2011)anti-tumor activity and toxico-kinetics analysis of MGAH22,an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγreceptor binding properties.Breast Cancer Res 13:R123.
- [0396] Olafsen and Wu(2010)Antibody vectors for imaging.Semin Nucl Med 40 (3):167-81.
- [0397] O' Mahony and Janik(2006)Comment on“Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade.”J Immunol 176(9):5136.
- [0398] Onishi Y等(2008)Foxp3+natural regulatory T cell preferentially form aggregates on dendritic cell in vitro and actively inhibit their maturation.Proc Natl Acad Sci USA 105:10113-18.
- [0399] Pardoll DM(2012a)Immunology beats cancer:a blueprint for successful translation.Nat Immunol 13(12):1129-32.
- [0400] Pardoll DM(2012b)The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy.Nat Rev Cancer 12:252-64.
- [0401] PCT公开No.WO 99/54342,题目为“Glycosylation engineering of antibodies for improving antibody-dependent cellular cytotoxicity,”1999年10月2日公布, UmañaP等
- [0402] PCT公开No.WO 02/43478,题目为“Transgenic transchromosomal rodents for making human antibodies,”2002年6月6日公布,Medarex,Inc.和Kirin Beer Kabushiki Kaisha.
- [0403] PCT公开No.WO 03/035835,题目为“Glycoprotein compositions”,2003年5月1日公布,Genentech,Inc.
- [0404] PCT公开No.WO 2006/089231,题目为“Monoclonal antibodies against prostate specific membrane antigen(PSMA)lacking in fucosyl residues,”,2006年8月24日公布,Medarex,Inc.
- [0405] PCT公开No.WO 2006/121168,题目为“Human monoclonal antibodies to Programmed Death 1(PD-1)and methods for treating cancer using anti-PD-lantibodies alone or in combination with other immunotherapeutics”,2006年11月16日公布,ONO Pharmaceutical Co.,Ltd.and Medarex,Inc.

- [0406] PCT公开No.WO 2009/101611,题目为“Monoclonal antibodies for tumor treatment”,2009年8月20日公布,Curetech Ltd.
- [0407] Peggs KS等(2006)Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer.Curr Opin Immunol 16:206-13.
- [0408] Peggs KS等(2008)Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy.Immunol Rev 224:141-65.
- [0409] Peggs KS等(2009)Blockade of CTLA-4on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4antibodies.J Exp Med 206(8):1717-25.
- [0410] Perrin PJ等(1996)CTLA-4blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis.J Immunol 157:1333-36.
- [0411] Quezada SA等(2006)CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cell.J Clin Invest 116(7):1935-45.
- [0412] Qureshi OS等(2011)Trans-endocytosis of CD80 and CD86:a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4.Science 332:600-03.
- [0413] Read S等(2000)Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4plays an essential role in the function of CD25+CD4(+)regulatory cell that control intestinal inflammation.J Exp Med 192(2):295-302.
- [0414] Ribas A等(2007)Tremelimumab(CP-675,206),a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4blocking monoclonal antibody in clinical development for patients with cancer.Oncologist 12:873-83.
- [0415] Ribas A(2010)Clinical development of the anti-CTLA-4antibody tremelimumab.Semin Oncol 37(5):450-4.
- [0416] Rosenberg SA (2006)Response to comment on“Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4blockade.”J Immunol 176(9):5136.
- [0417] Rudd CE,Taylor A,Schneider H(2009)CD28 and CTLA-4coreceptor expression and signal transduction.Immunol Rev 229:12-26.
- [0418] Salomon B and Bluestone JA(2001)Complexities of CD28/B7:CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation.Annu Rev Immunol 19:225-52.
- [0419] Schreier PH等(1981)Multiple differences between the nucleic acid sequences of the IgG2aa and IgG2ab alleles of the mouse.Proc Natl Acad Sci USA 78:4495-99.
- [0420] Schwartz RH(2003)T cell anergy.Annu Rev Immunol 21:305-34.
- [0421] Selby MJ等(2013)anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cell.Cancer

Immunol Res 1:32-42.

[0422] Shields RL等(2001)High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI,FcγRII,FcγRIII,and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR.J Biol Chem 276:6591-6604.

[0423] Shields RL等(2002)Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity.J Biol Chem 277:26733-40.

[0424] Shimizu J等(2002)Stimulation of CD25+CD4+regulatory T cell through GITR breaks immunological self-tolerance.Nat Immunol 3:135-42.

[0425] Simpson TR等(2013)Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cell co-defines the efficacy of anti-CTLA-4therapy against melanoma.J Exp Med 210:1695-710.

[0426] Stavenhagen JB等(2007)Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cell in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγreceptors.Cancer Res 67: 8882-90.

[0427] Takahashi T等(2000)Immunologic self-tolerance maintained by CD4+CD25+ regulatory T cell constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.J Exp Med 192:303-10.

[0428] Tamura K等(2011)FcγR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer.Ann Oncol 22(6):1302-7.

[0429] Tarentino AL等(1975)The isolation and structure of the core oligosaccharide sequences of IgM.Biochem 14:5516-23.

[0430] Tivol EA等(1995)Loss of CTLA-4leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction,revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4.Immunity 3:541-47.

[0431] Topalian SL等(2012)Safety,activity,and immune correlates of anti-PD-l antibody in cancer.N Engl J Med 366(26):2443-54.

[0432] Turk MJ等(2004)Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cell.J Exp Med 200:771-82.

[0433] Umaña P等(1999)Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity.Nat Biotech 17: 176-80.

[0434] 美国专利No.5,977,318,题目为“CTLA4 receptor and uses thereof”,1999年11月2日授予Linsley PS等

[0435] 美国专利No.6,682,736,题目为“Human monoclonal antibodies to CTLA-4”,2004年1月27日授予Hanson DC等

[0436] 美国专利No.6,984,720,题目为“Human CTLA-4antibodies”,2006年1月10日授予

Korman AJ等

[0437] 美国专利No.7,605,238,题目为“Human CTLA-4antibodies and their uses”,2009年10月20日授予Korman AJ等

[0438] 美国公开No.2004/0110704,题目为“Cells of which genome is modified”,2004年6月10日公布,Yamane N等

[0439] 美国公开No.2012/0276086,题目为“Monoclonal antibodies against CD30 lacking in fucosyl and xylosyl residues”,2012年11月1日公布,Black AN等

[0440] van der Merwe PA等(1997)CD80 (B7-1)binds both CD28 and CTLA-4with a low affinity and very fast kinetics.J Exp Med 185:393-403.

[0441] Walunas TL等(1994)CTLA-4can function as a negative regulator of T cell activation.Immunity 1(5):405-13.

[0442] Wang CJ等(2012)Cutting edge:cell-extrinsic immune regulation by CTLA-4 expressed on conventional T cell.J Immunol 189:1118-22.

[0443] Waterhouse P等(1995)Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4.Science 270:985-8.

[0444] Weber J(2010)Immune checkpoint proteins:a new therapeutic paradigm for cancer-preclinical background:CTLA-4 and PD-1 blockade.Semin Oncol 37(5):430-9.

[0445] Weng WK and Levy R(2003)Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphism independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma.J Clin Oncol 21:3940-7.

[0446] Wing K等(2008)CTLA-4control over Foxp3+regulatory T cell function.Science 322:271-5.

[0447] Yamane-Ohnuki N等(2004)Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cell:an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity.Biotechnol Bioeng 87:614-22.

[0448] Yuan J等(2011)Integrated NY-ESO-1antibody and CD8+T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab.Proc Natl Acad Sci USA 108:16723-28.

[0449] Zalevsky J等(2010)Enhanced antibody half-life improves in vivo activity.Nat Biotechnol 28:157-9.

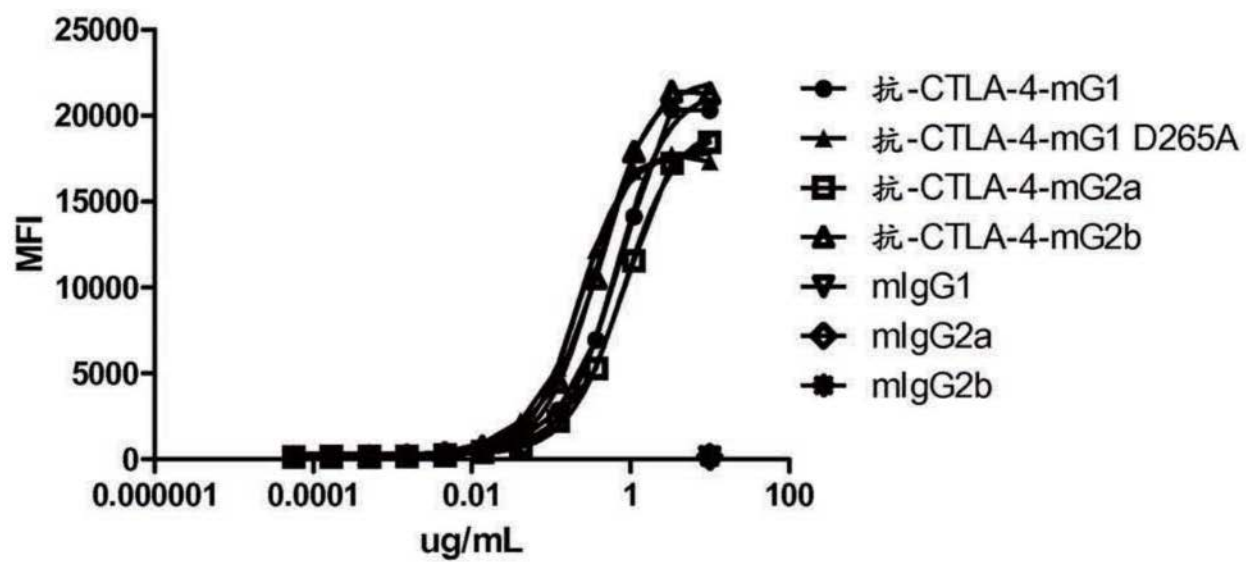


图1

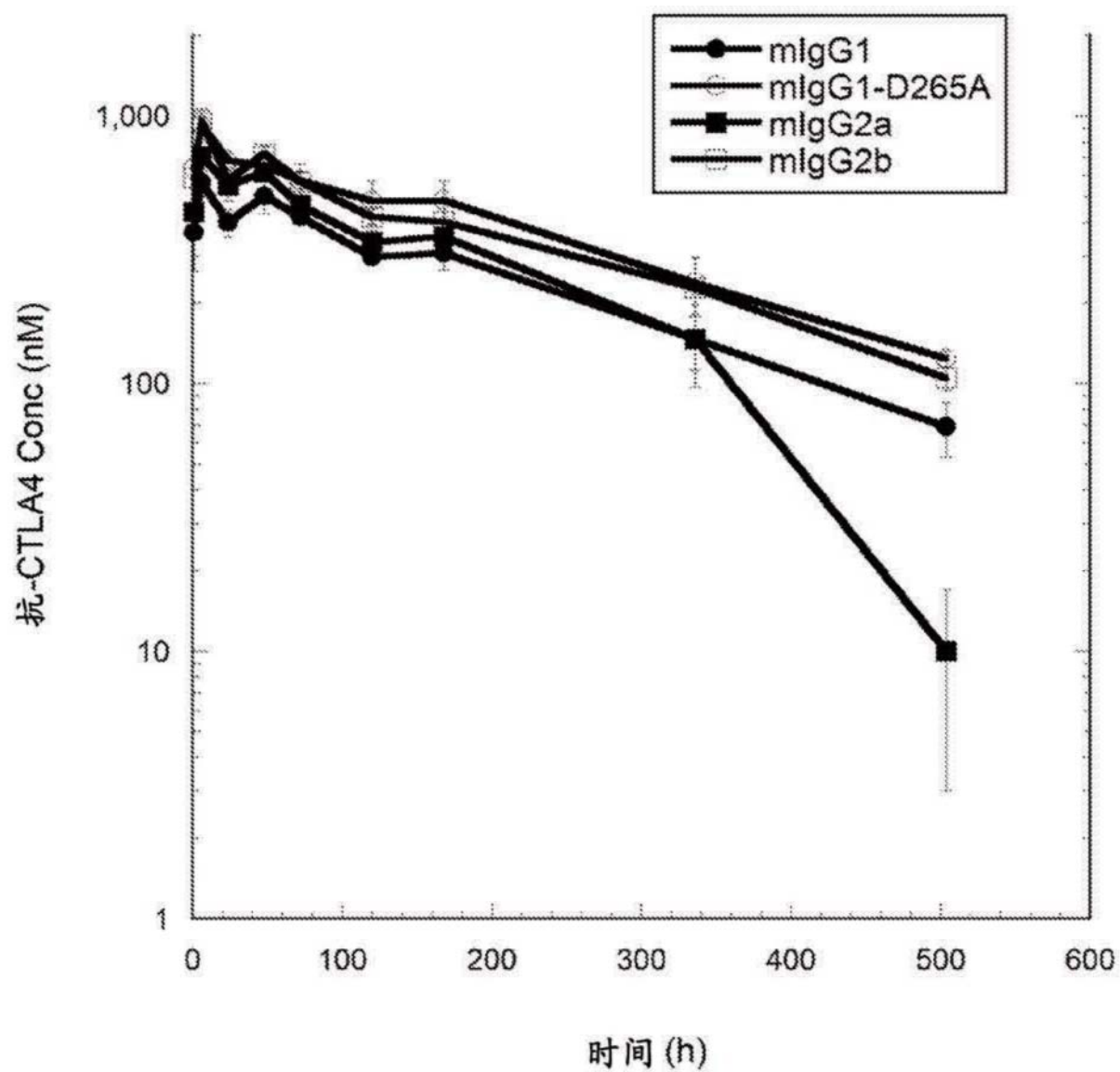


图2

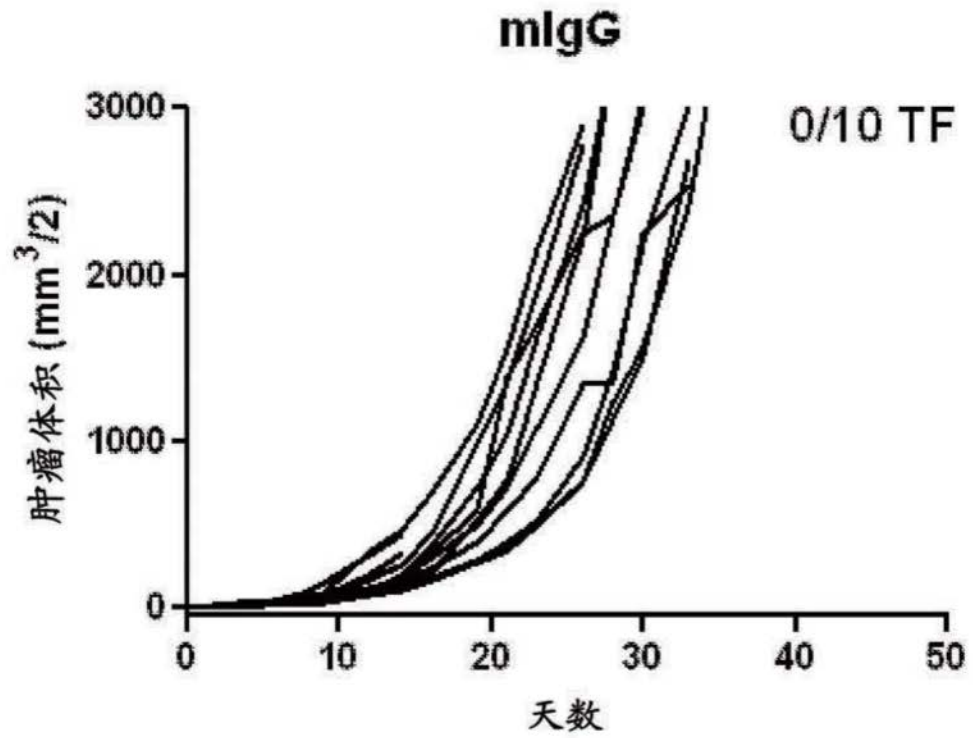
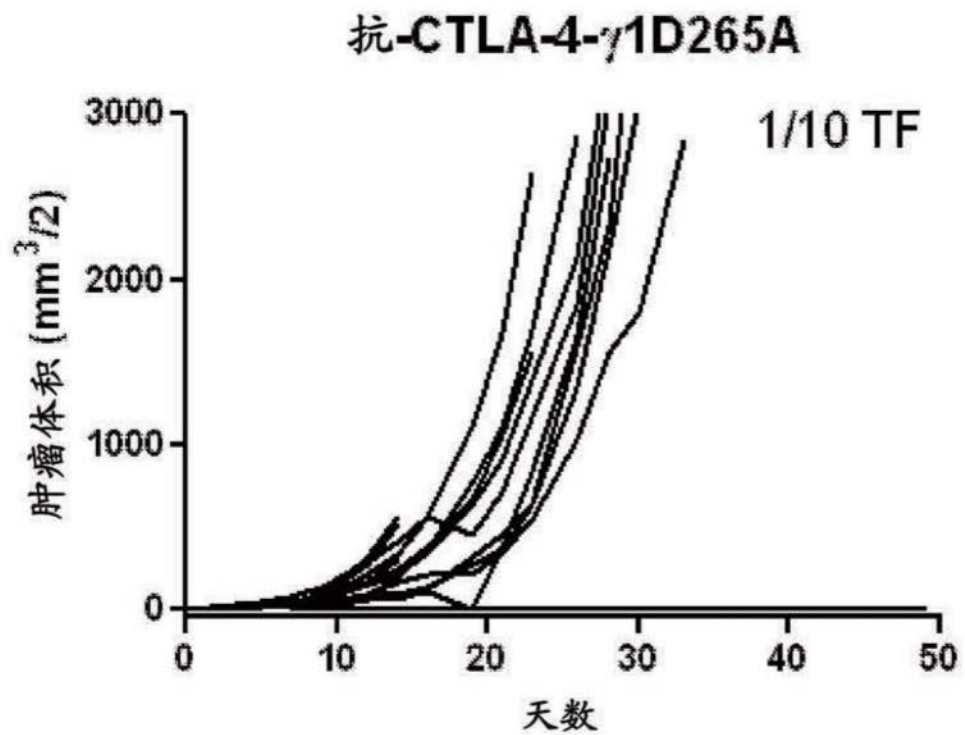
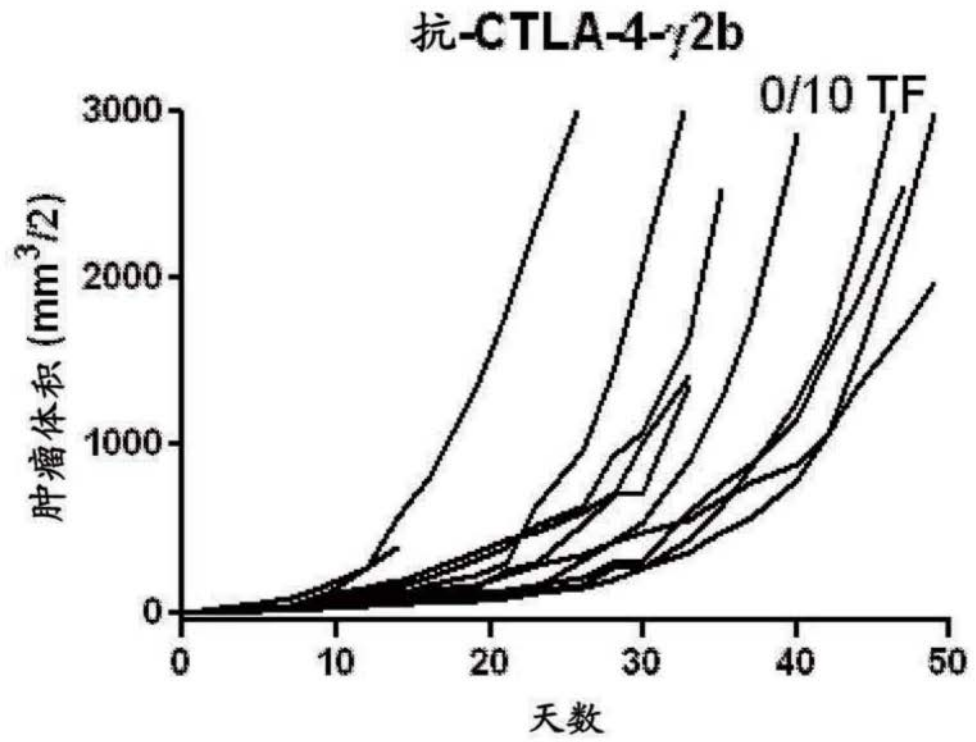
A.**B.**

图3A和B

C.



D.

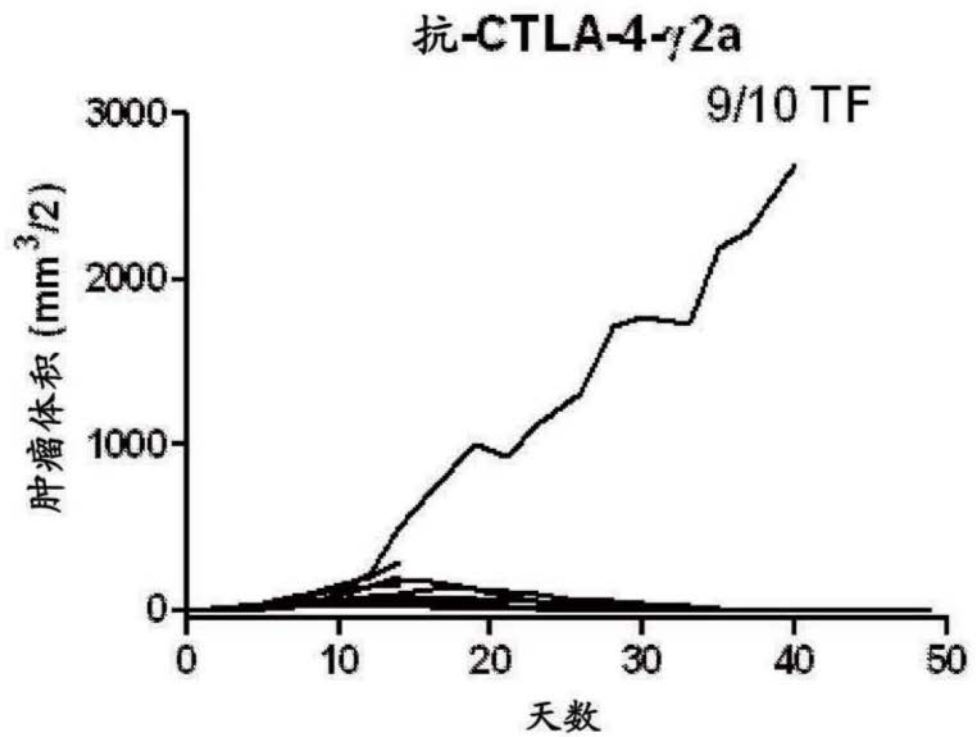


图3C和D

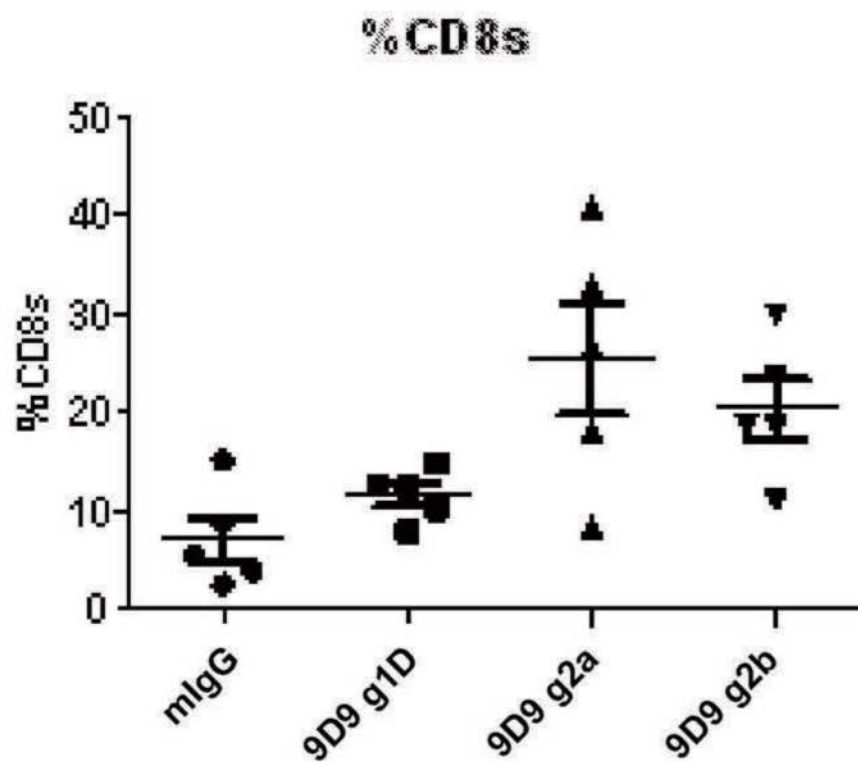
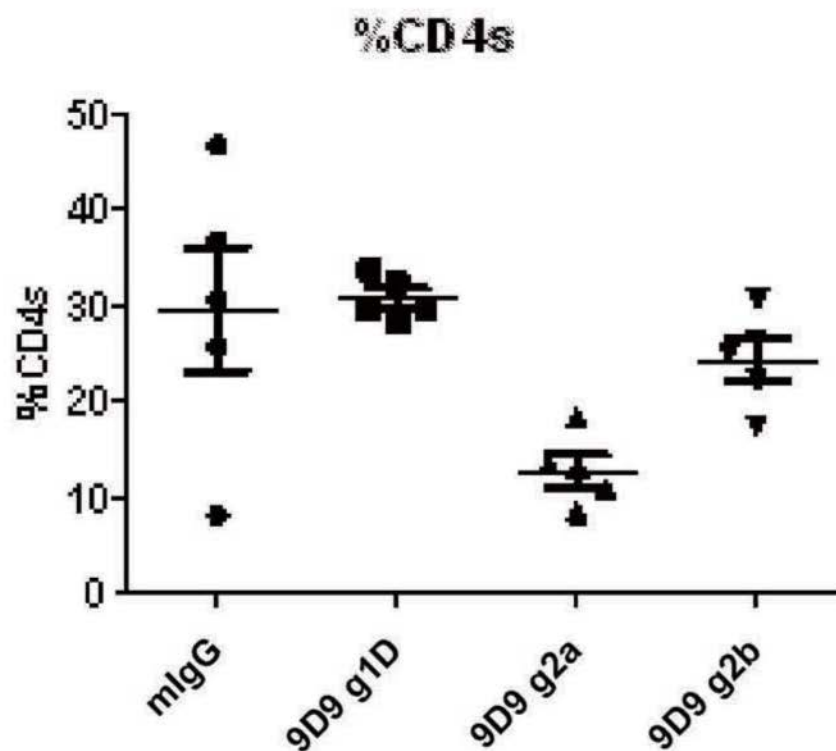
A.**B.**

图4A和B

C.

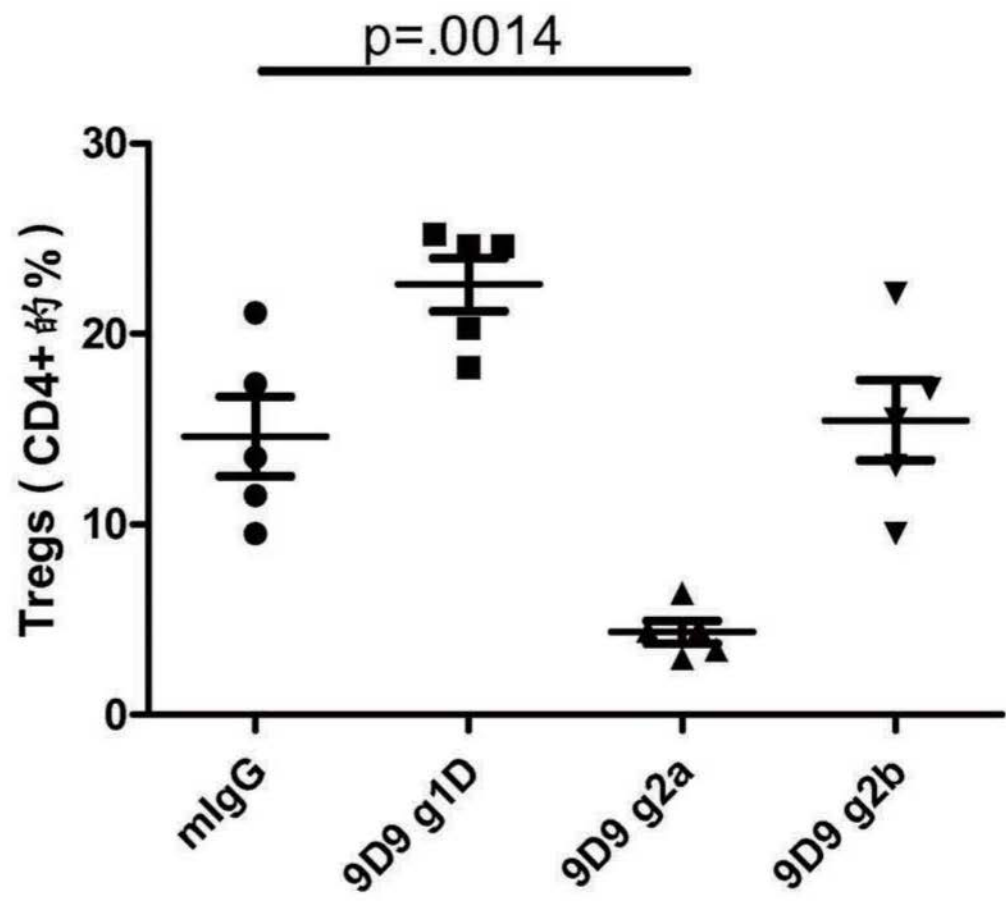


图4C

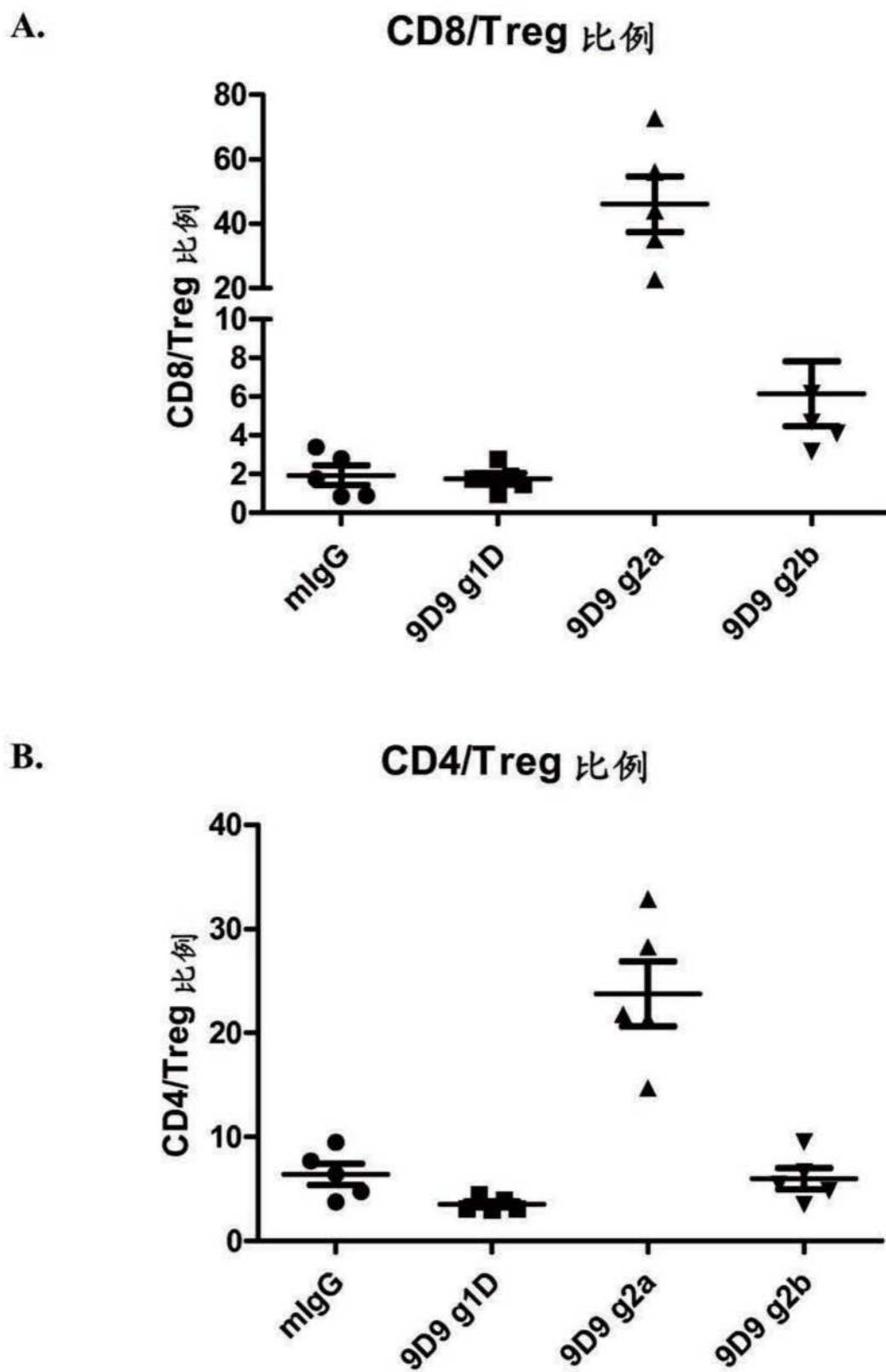


图5A和B

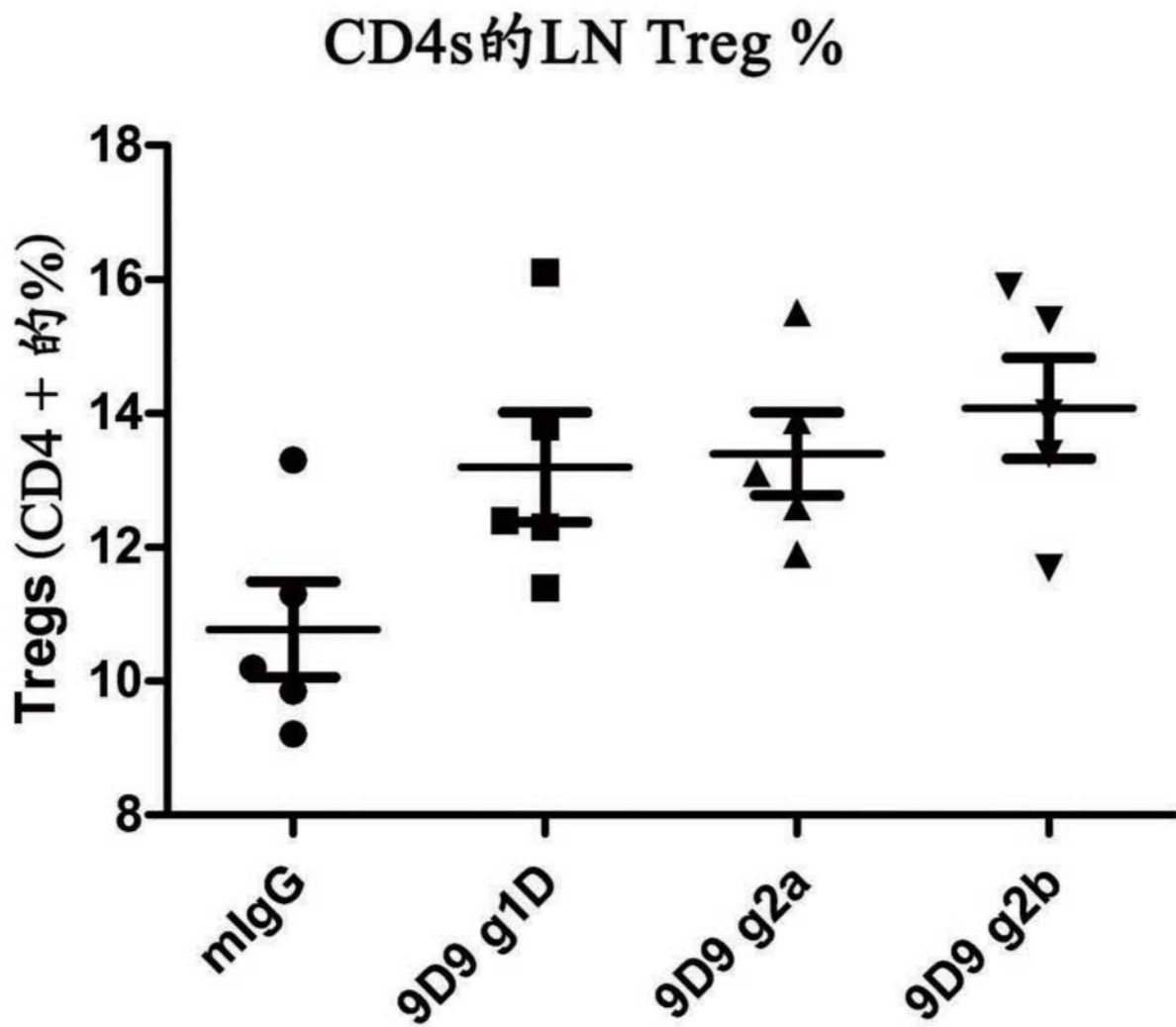


图6

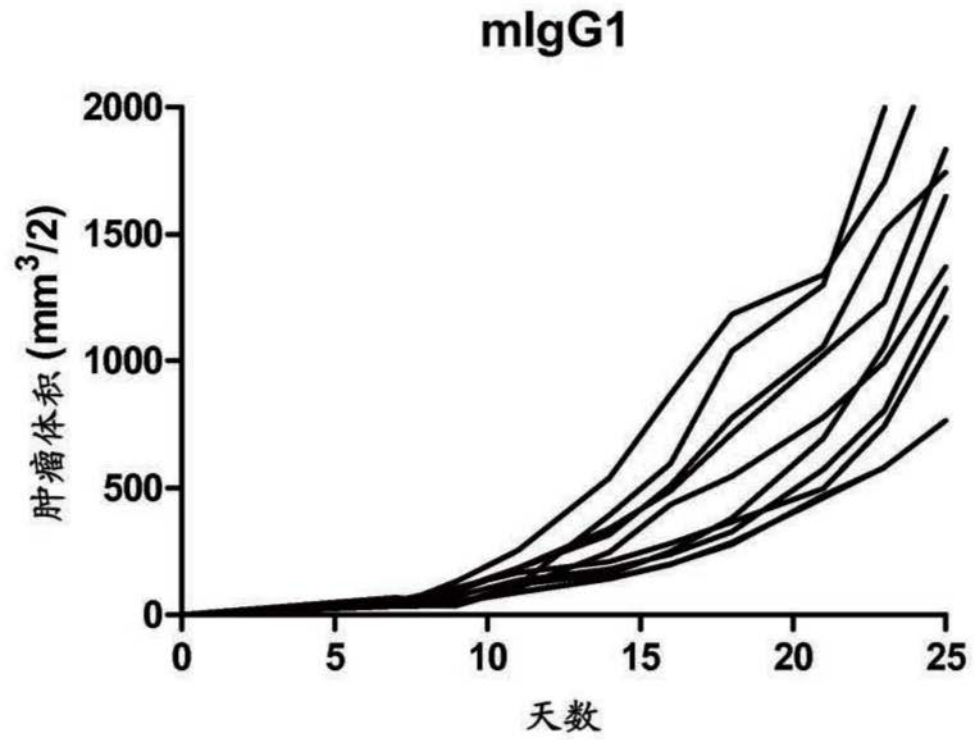
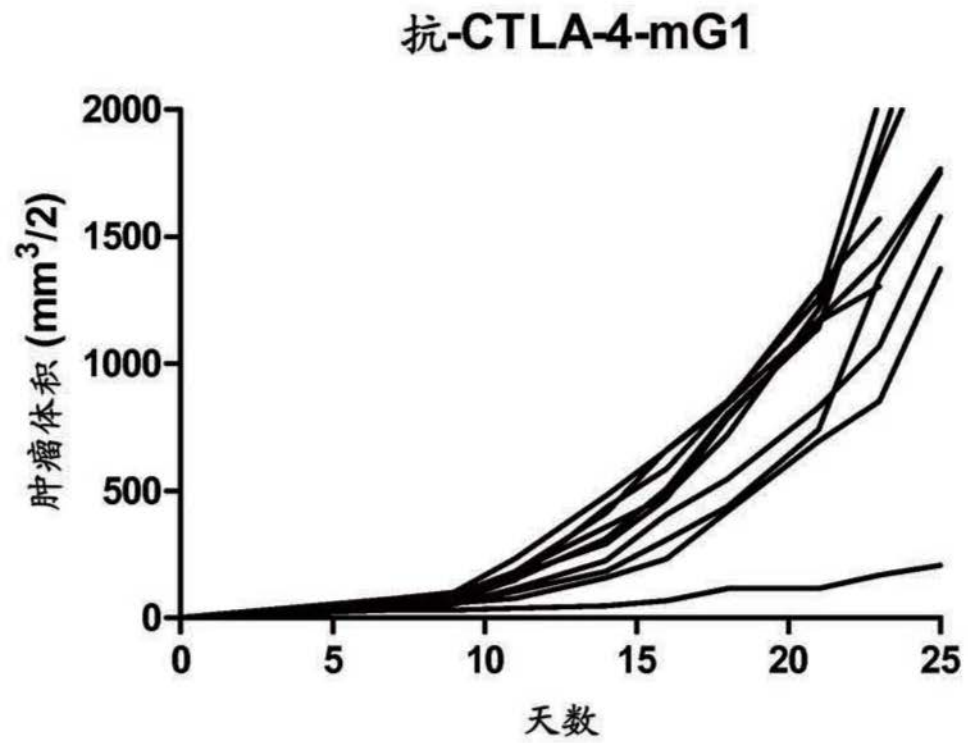
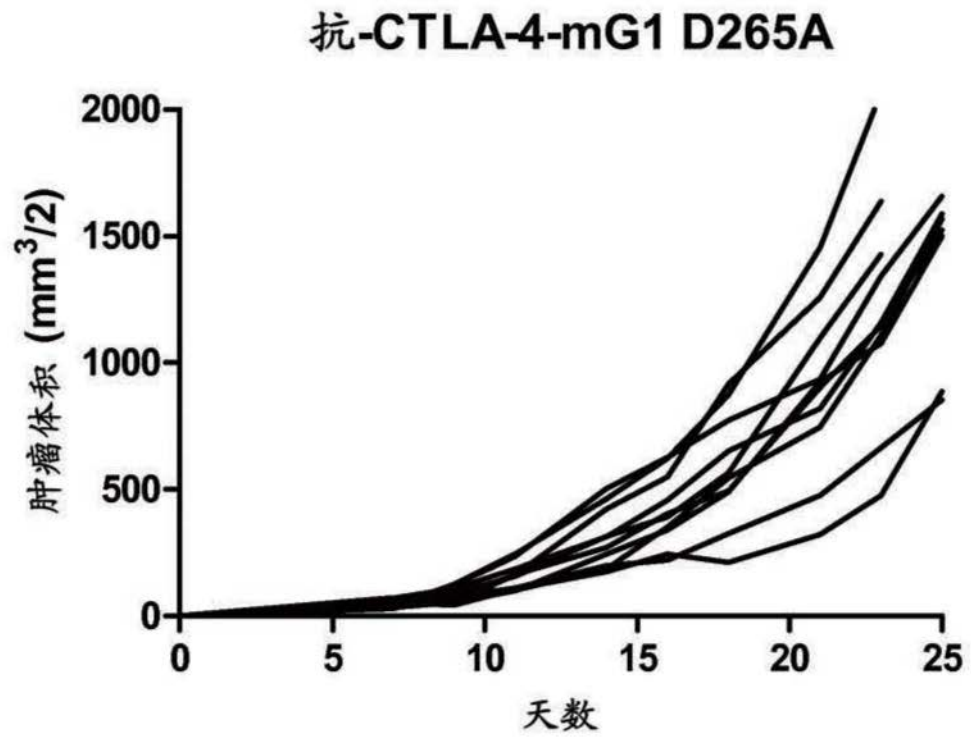
A.**B.**

图7A和B

C.



D.

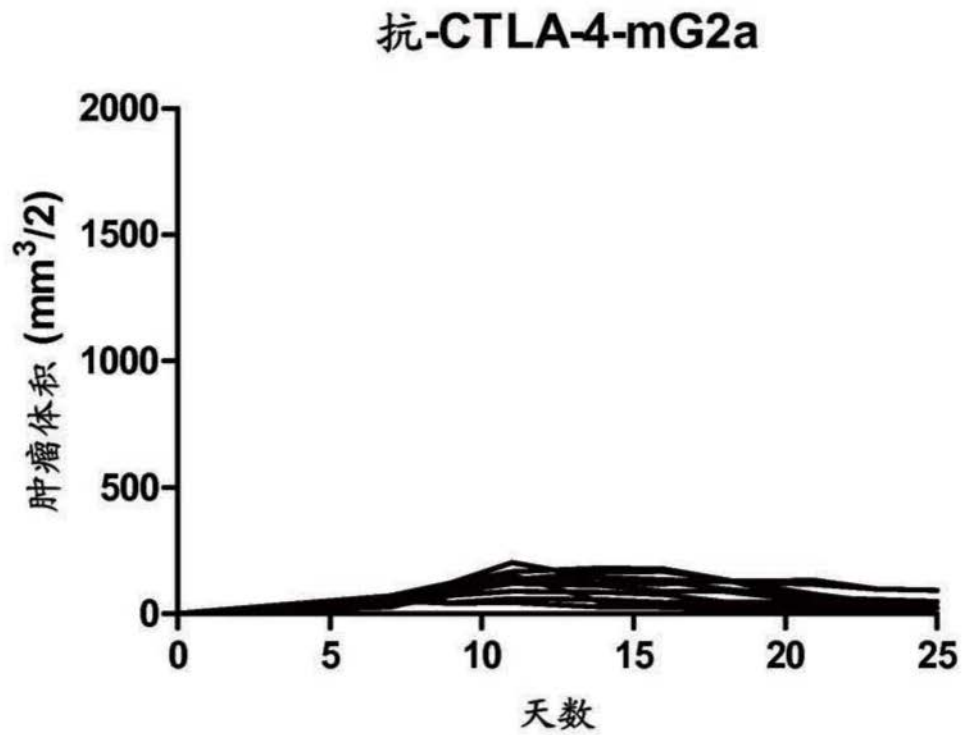


图7C和D

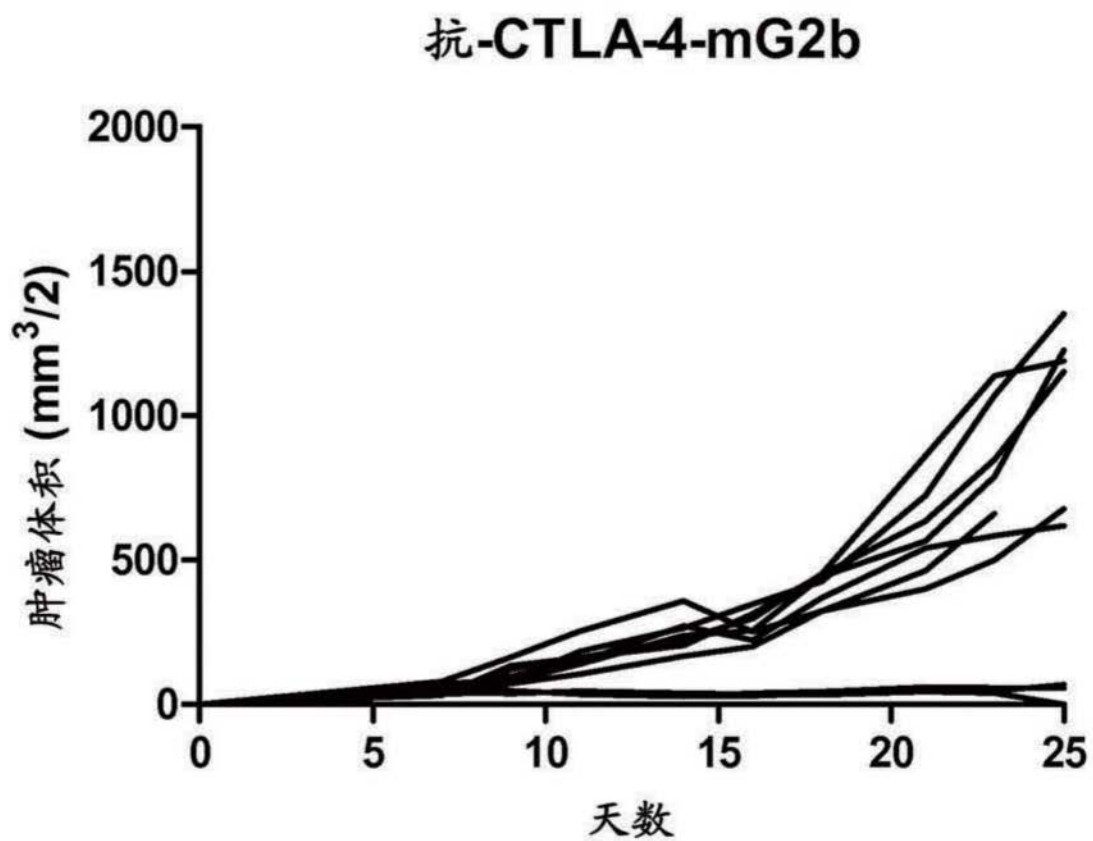
E.

图7E

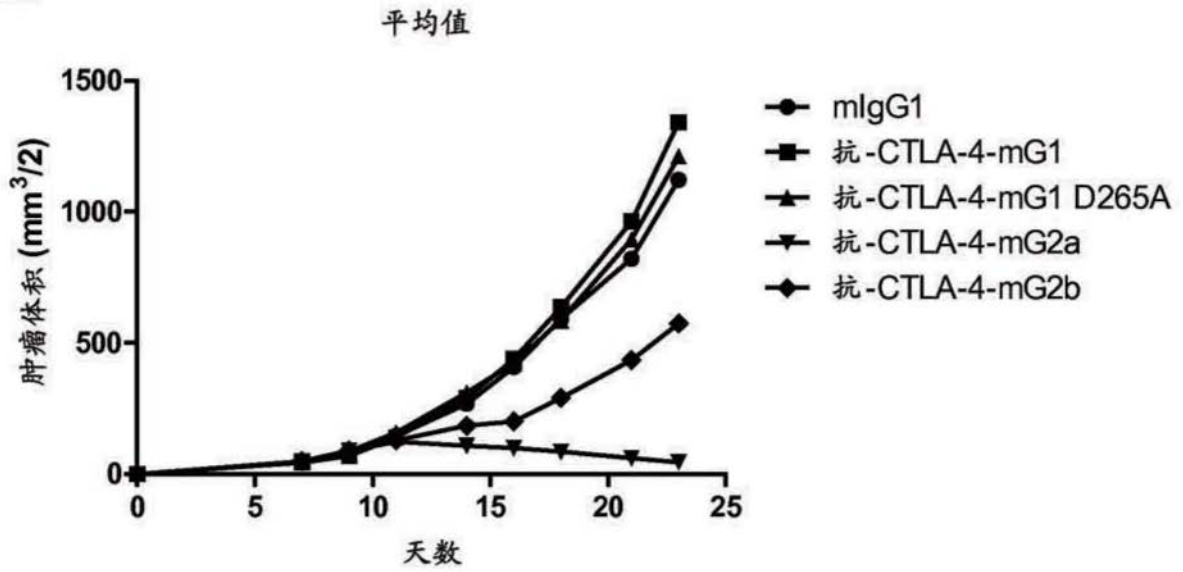
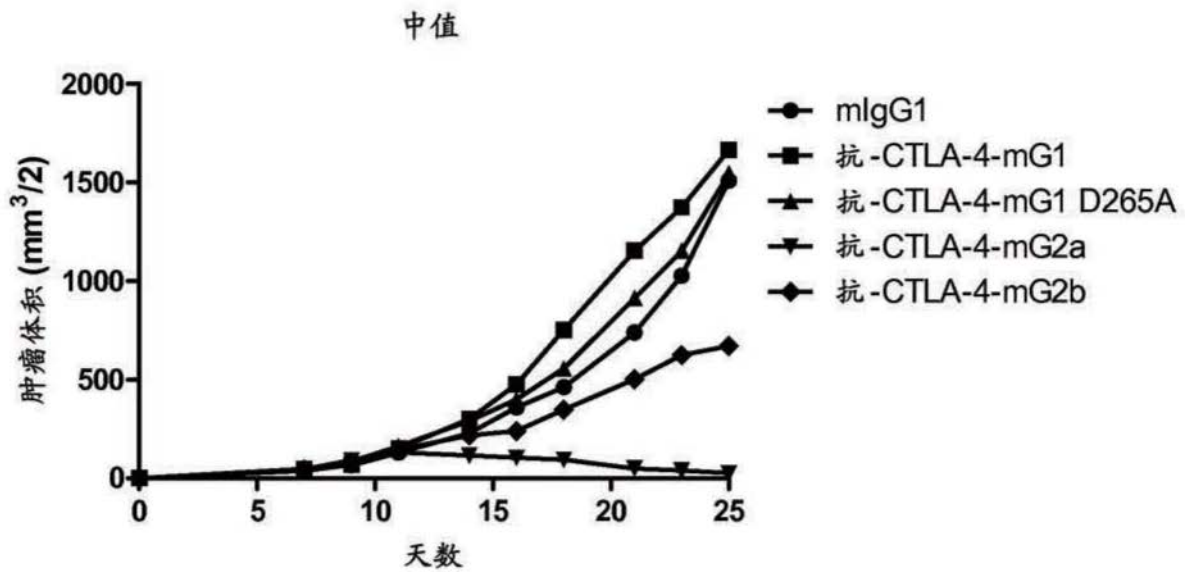
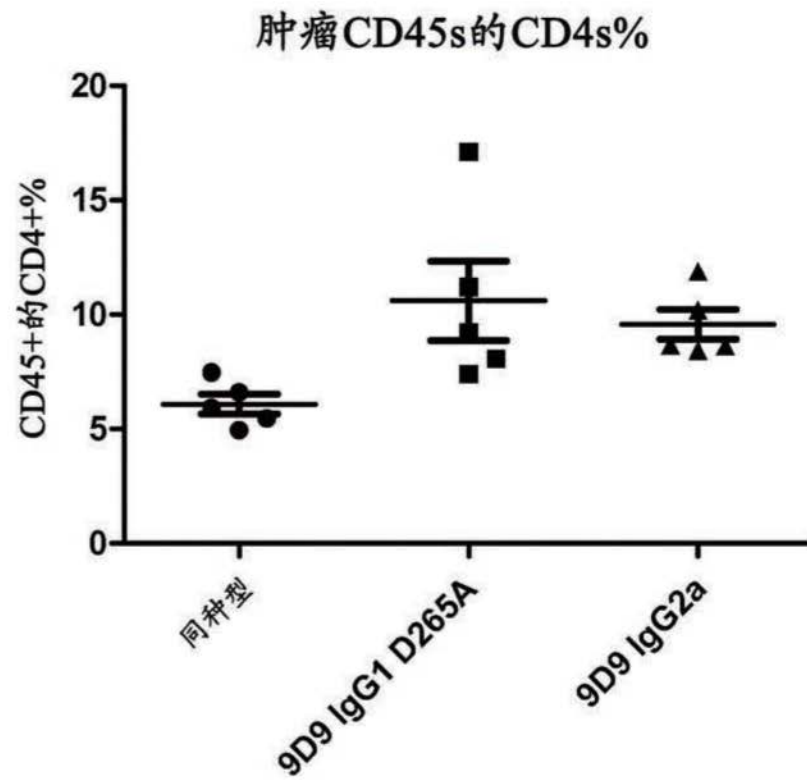
A.**B.**

图8A和B

A.



B.

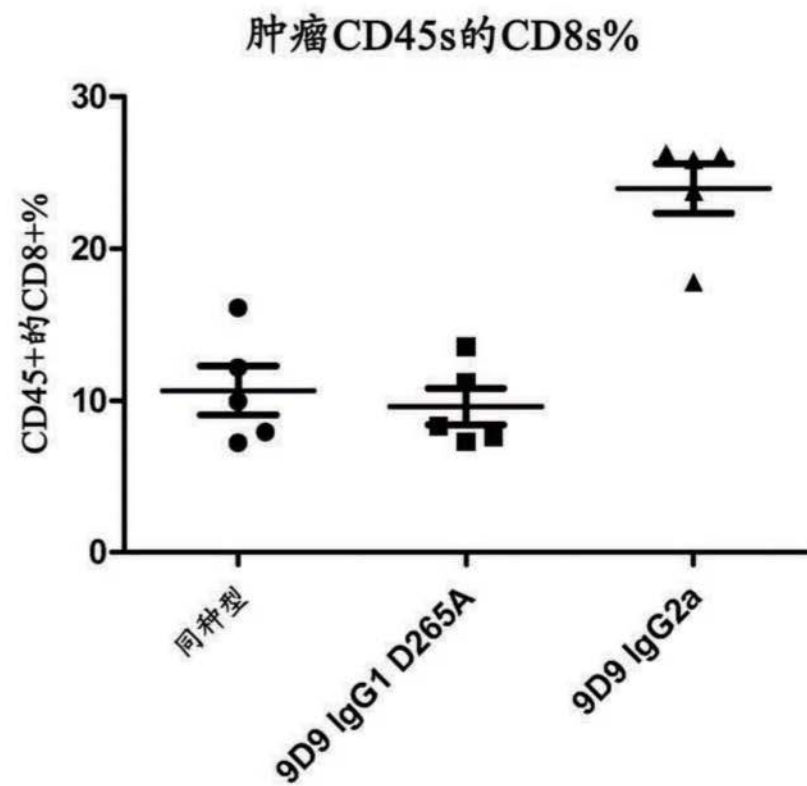


图9A和B

C.

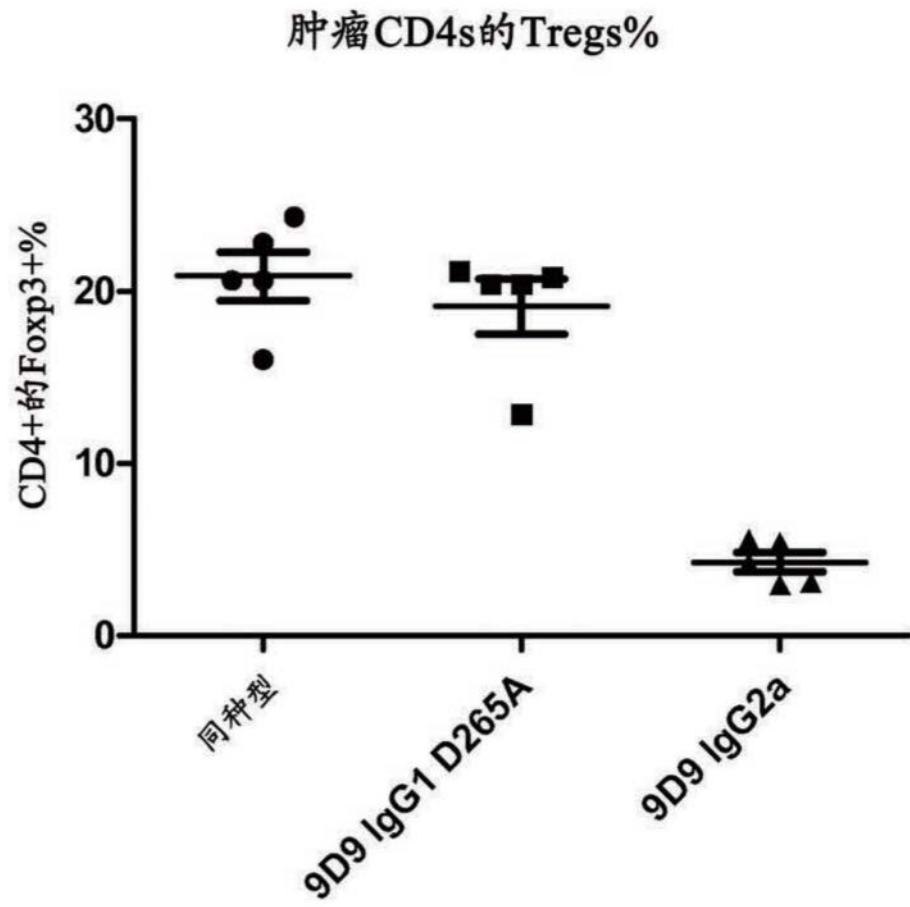


图9C

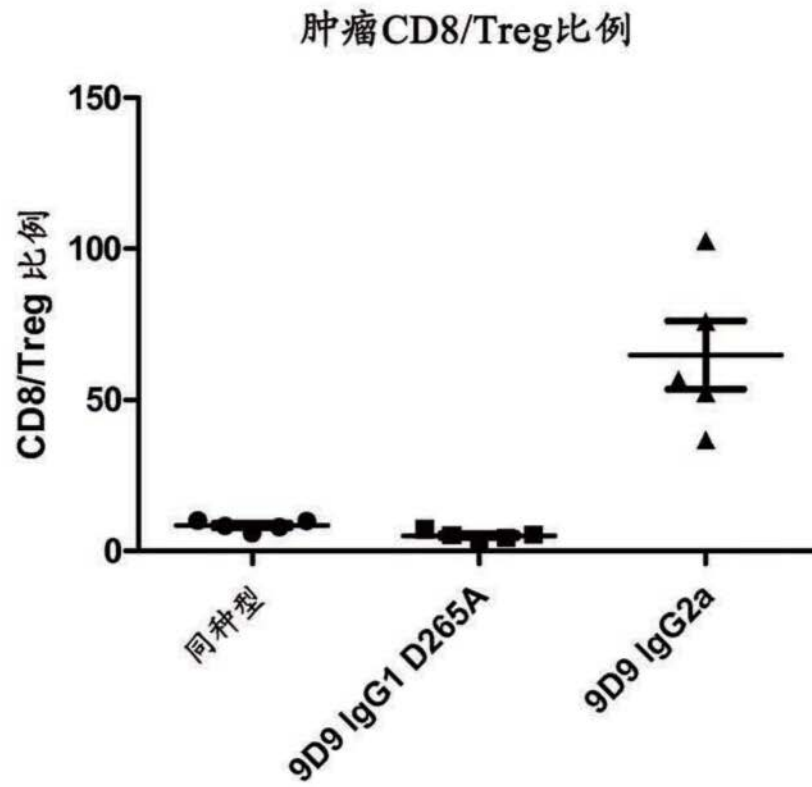
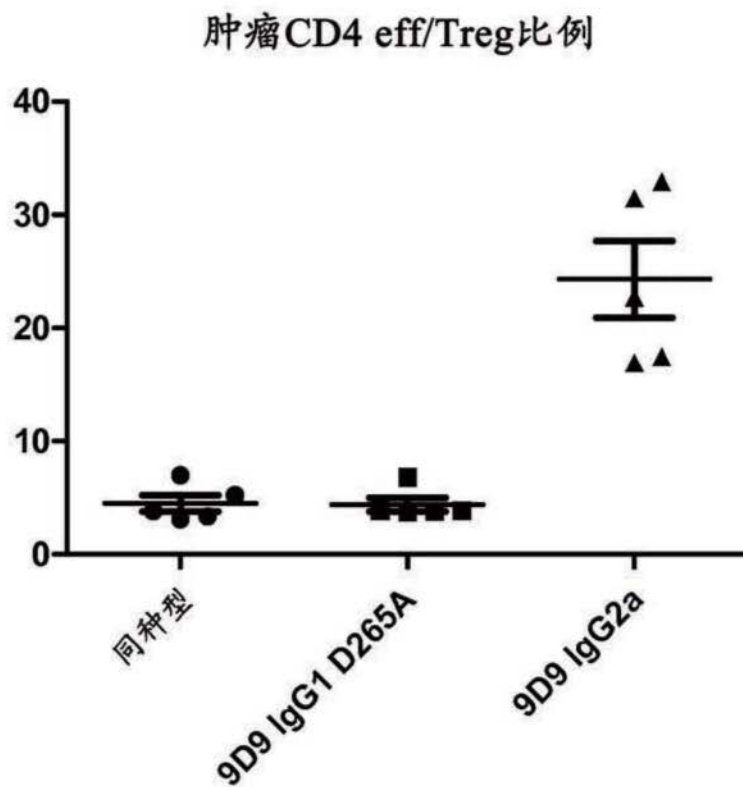
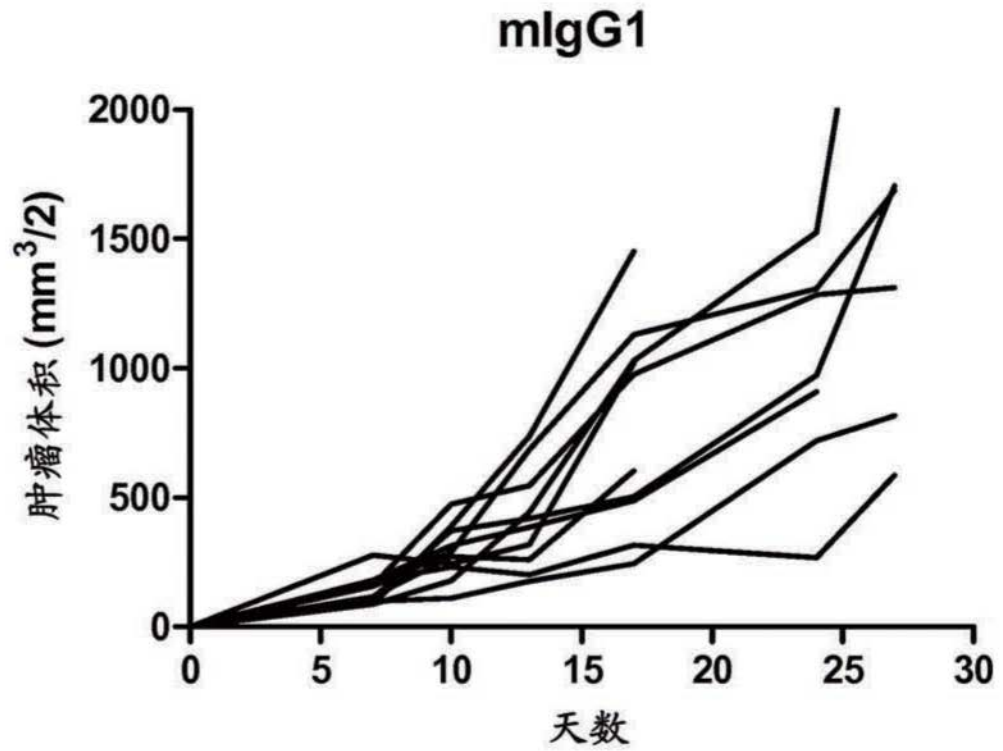
A.**B.**

图10A和B

A.



B.

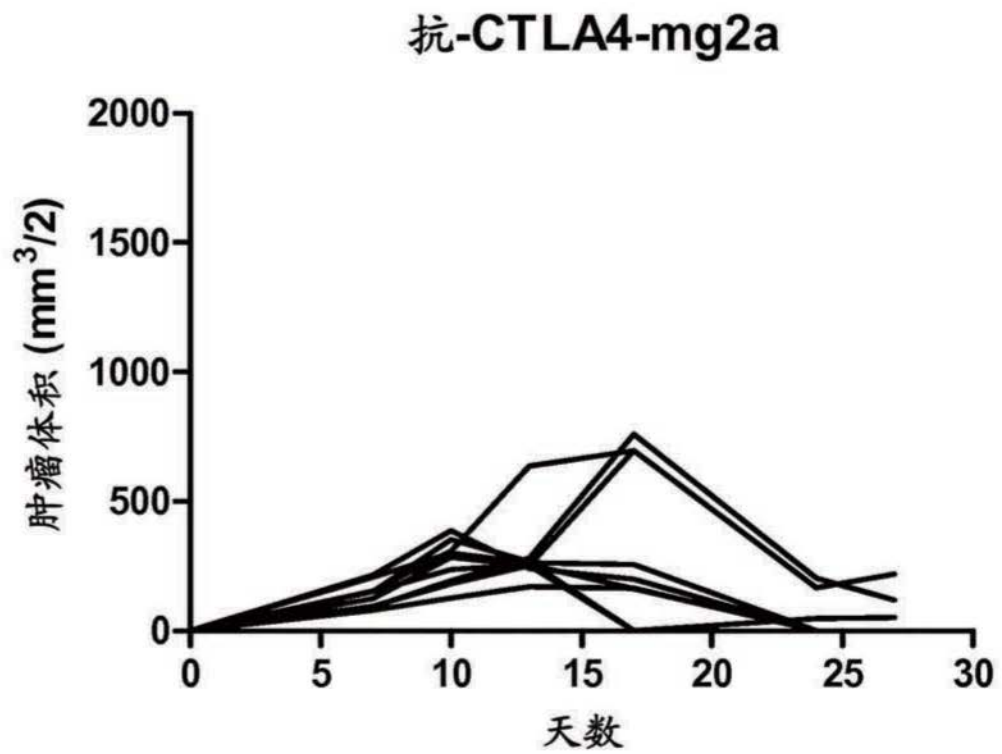


图11A和B

C.

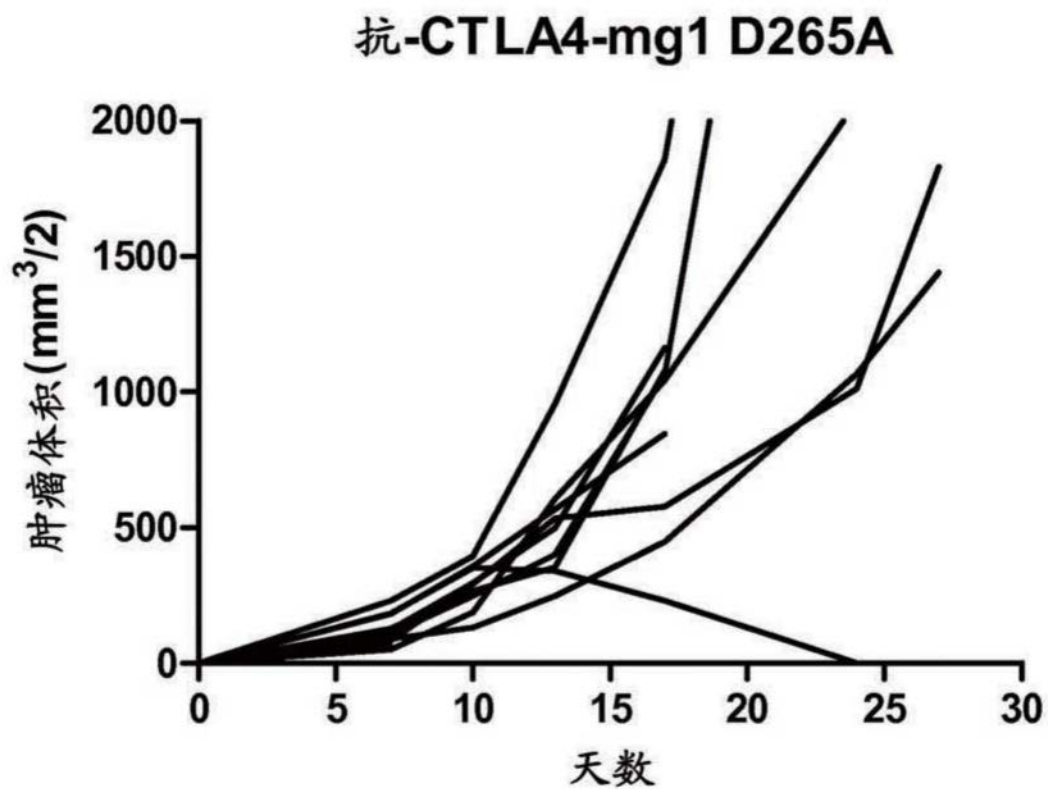


图11C

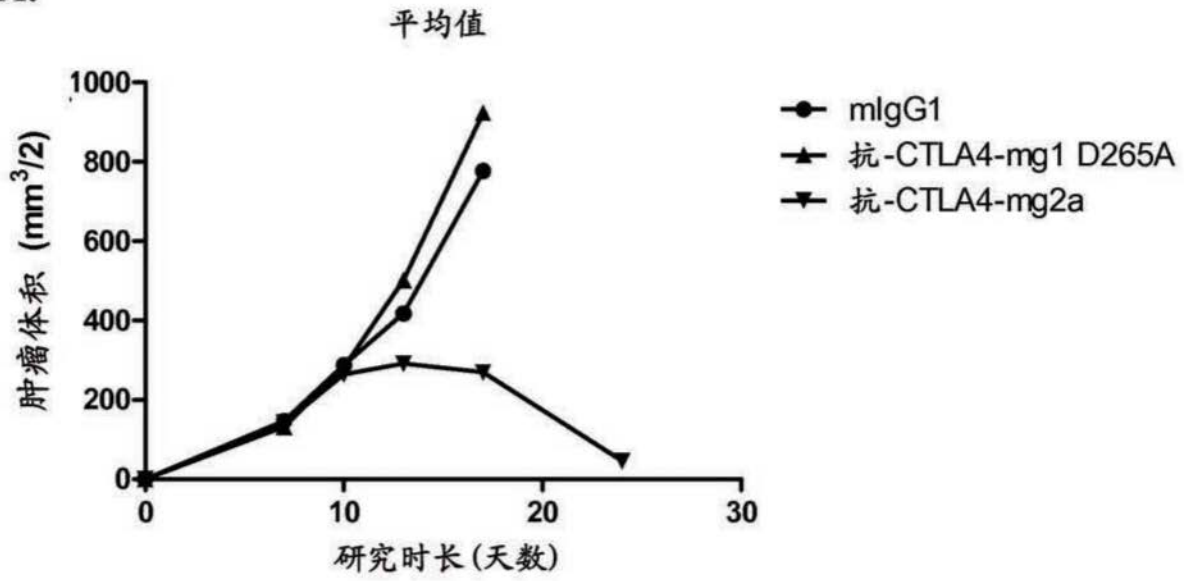
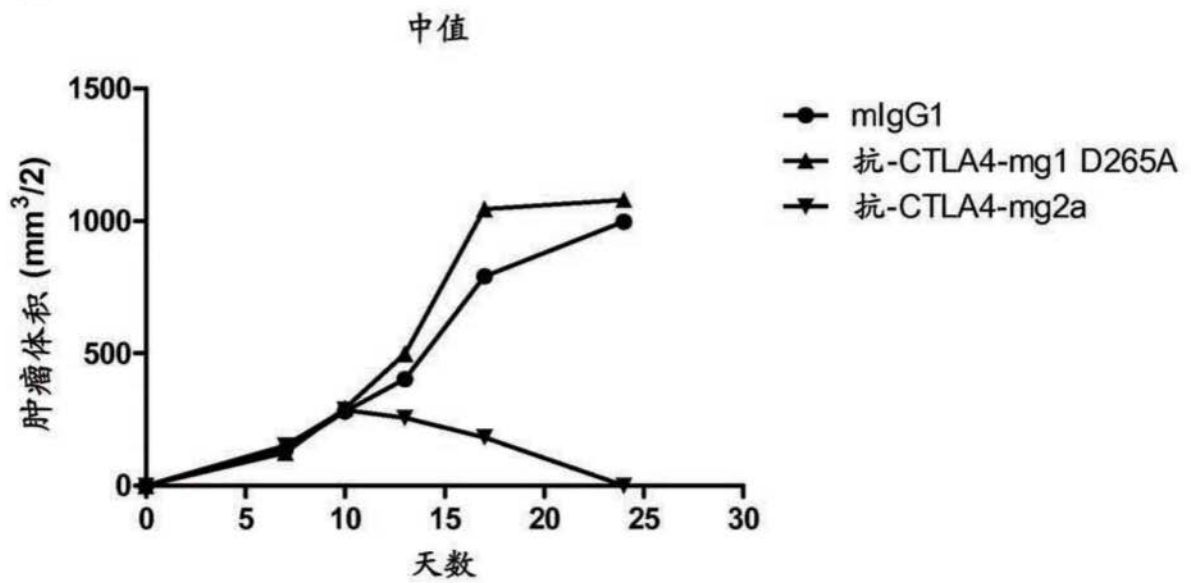
A.**B.**

图12A和B

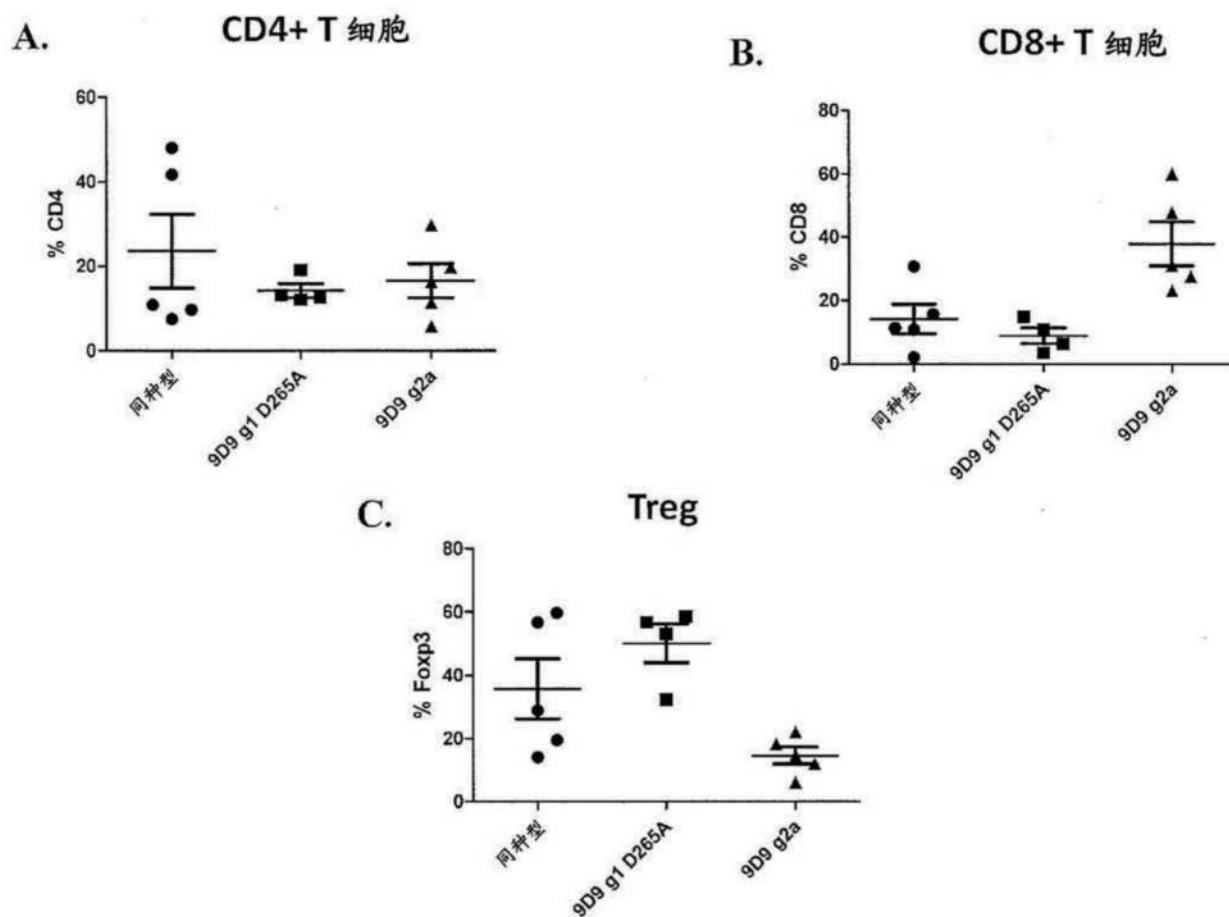


图13A-C

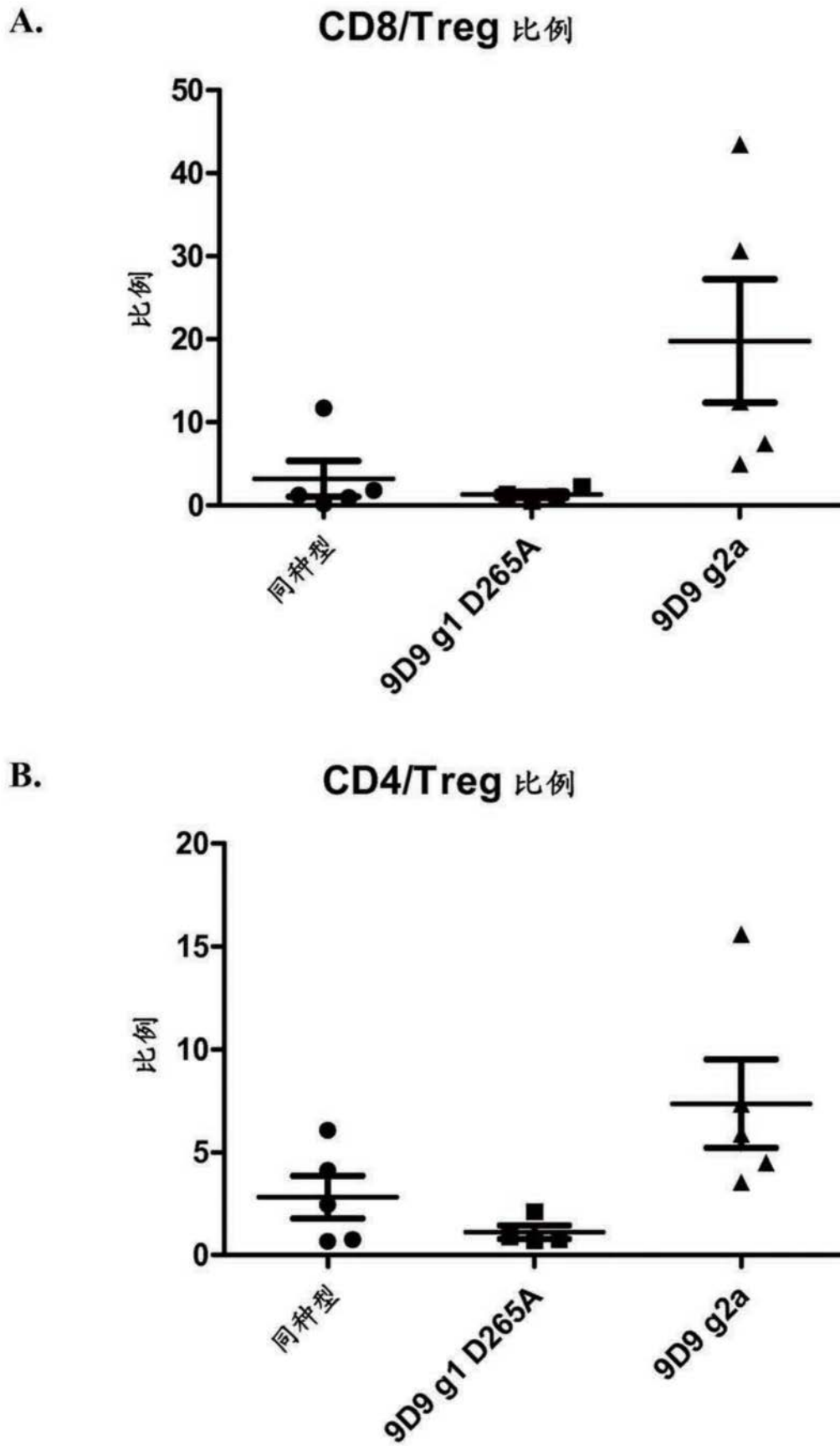


图14A和B

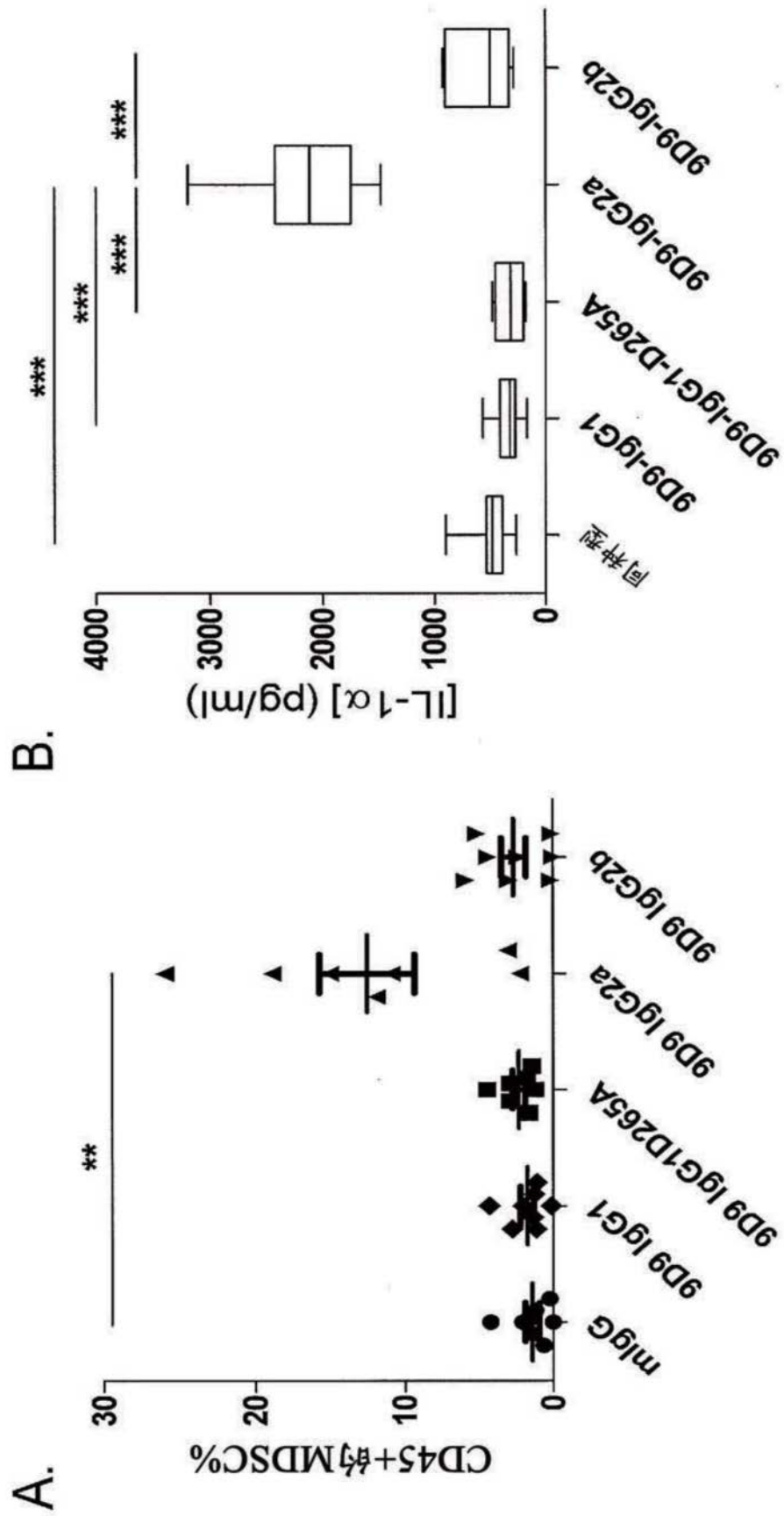


图15A和B

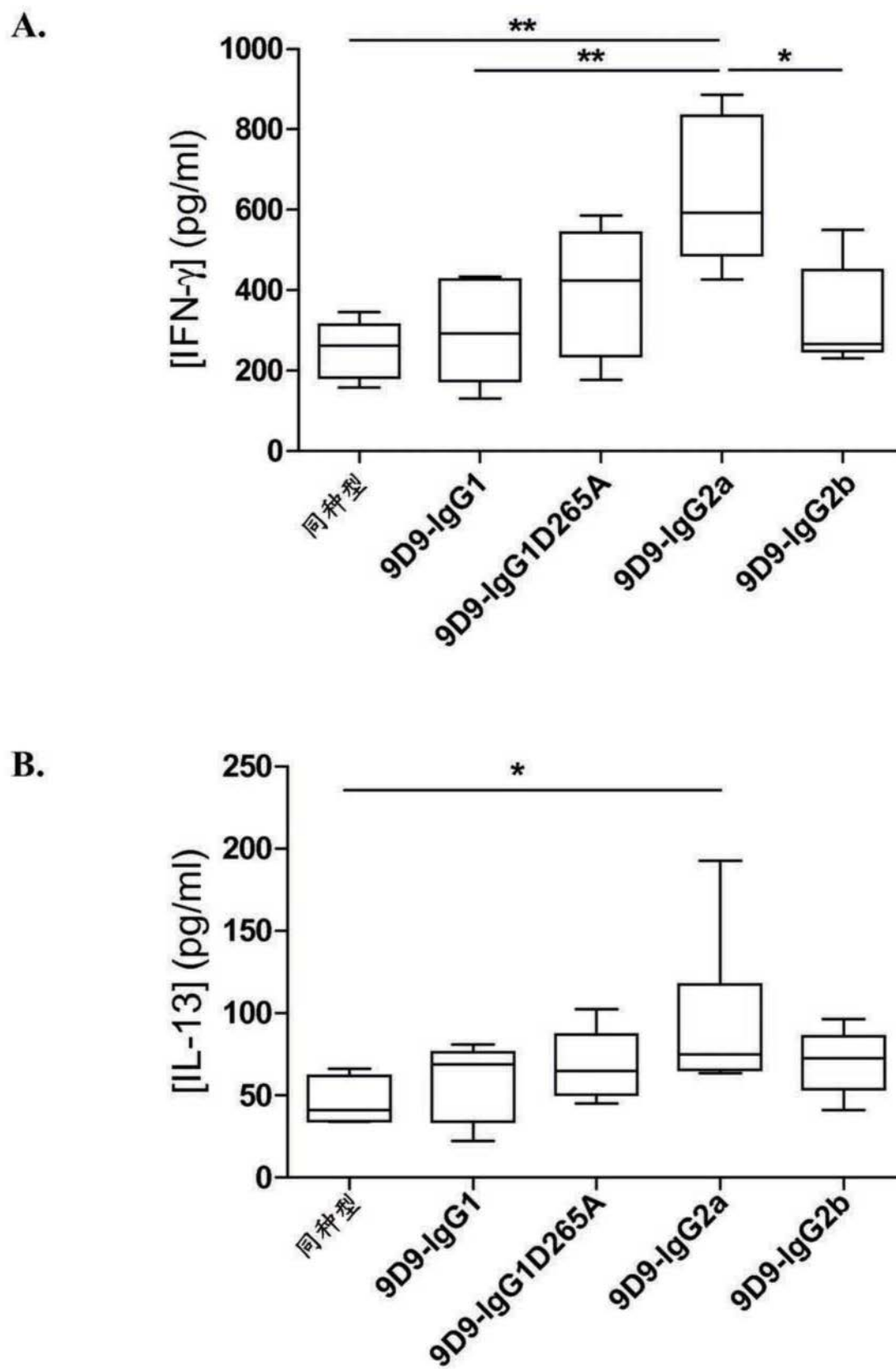
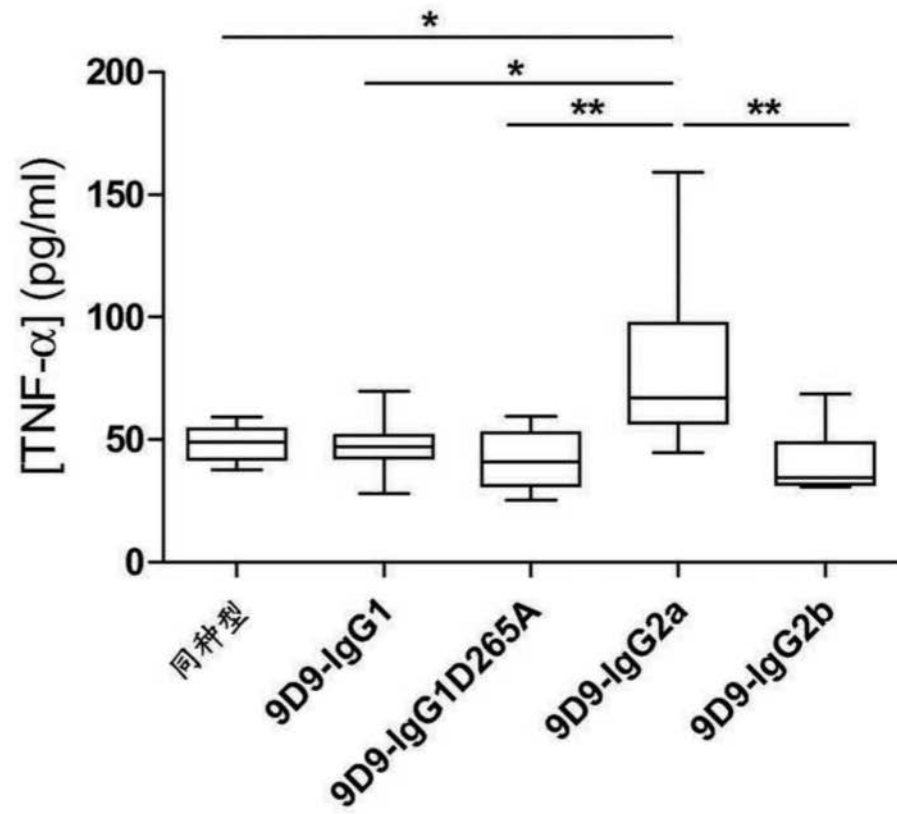


图16A和B

C.



D.

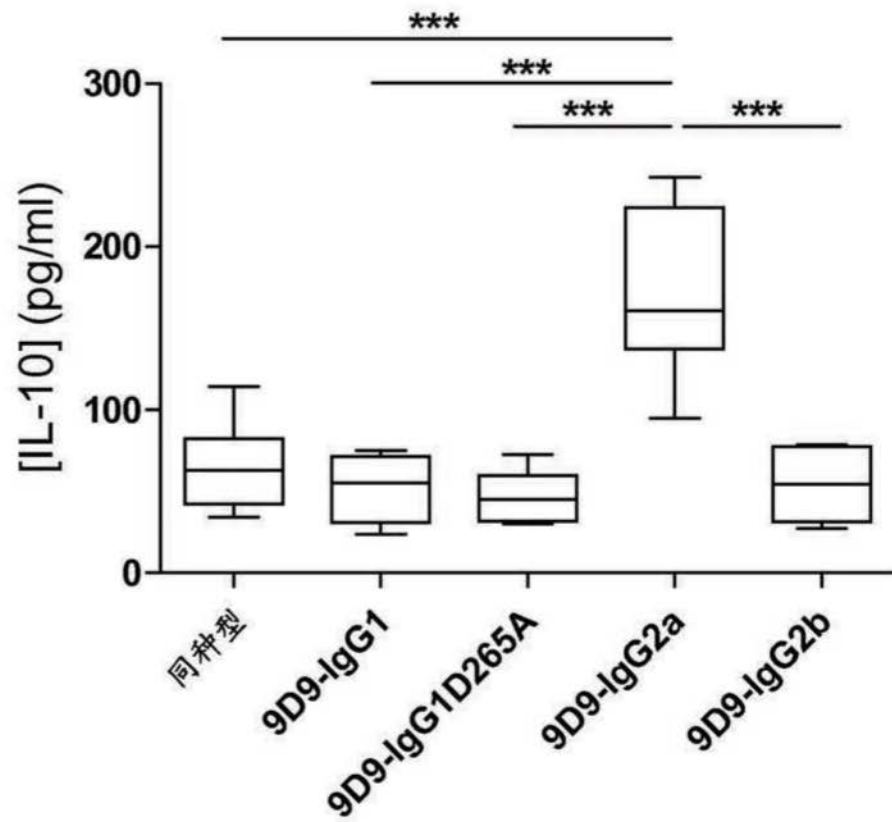
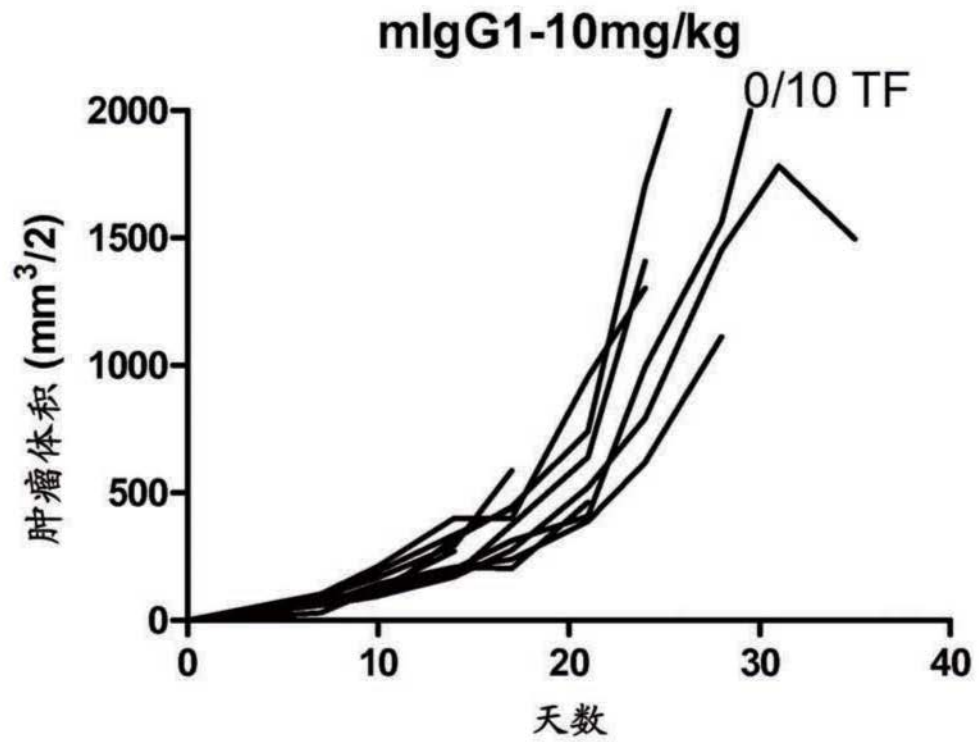


图16C和D

A.



B.

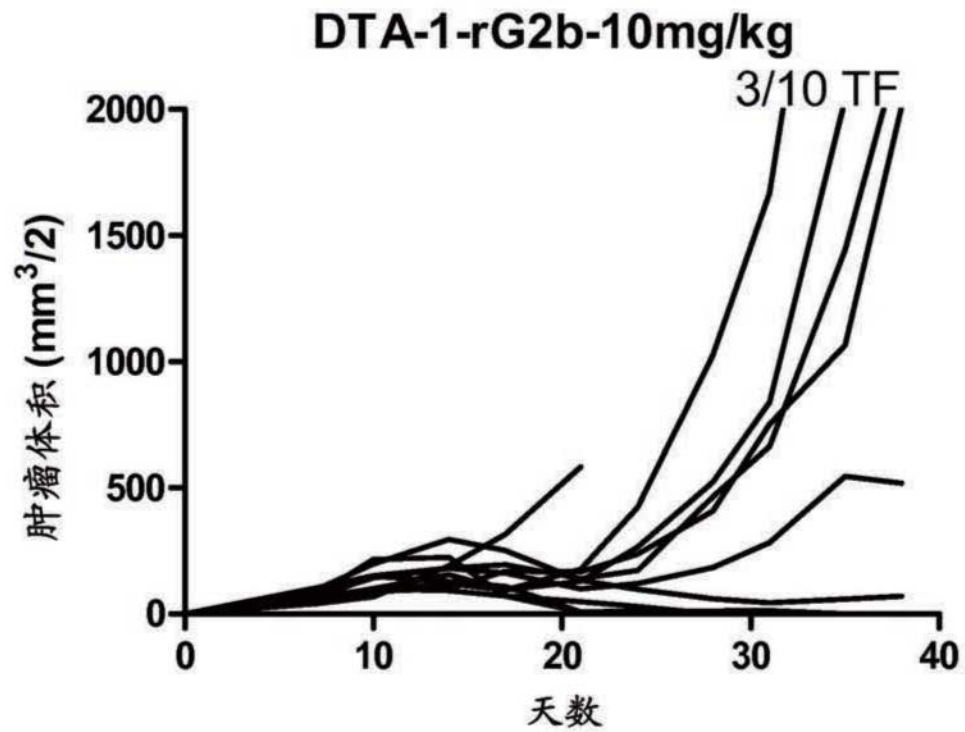
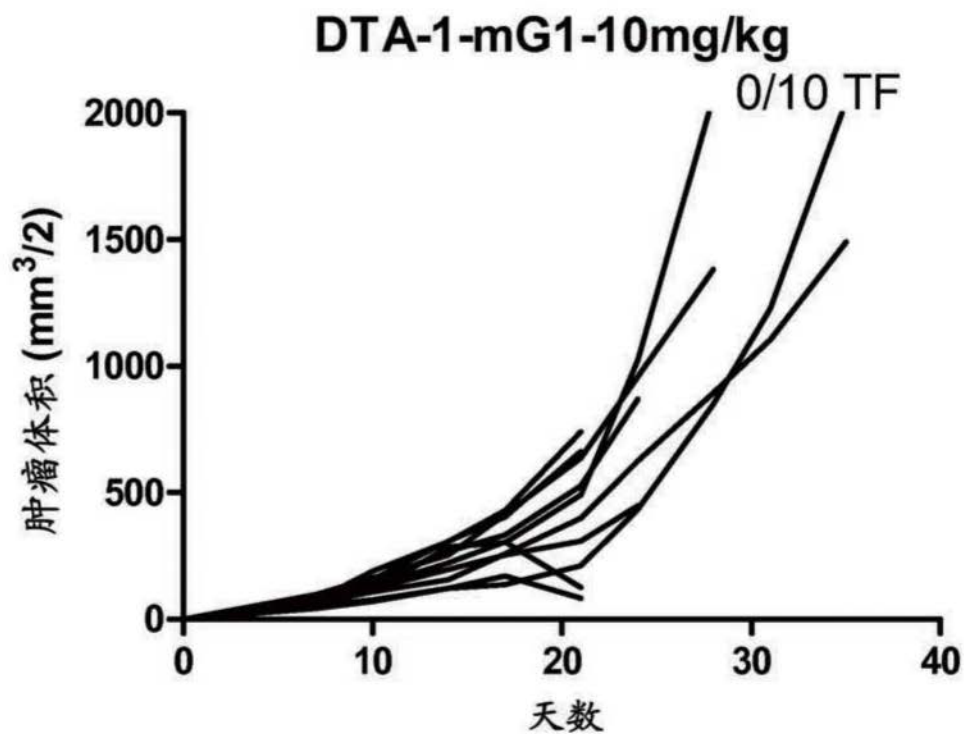


图17A和B

C.



D.

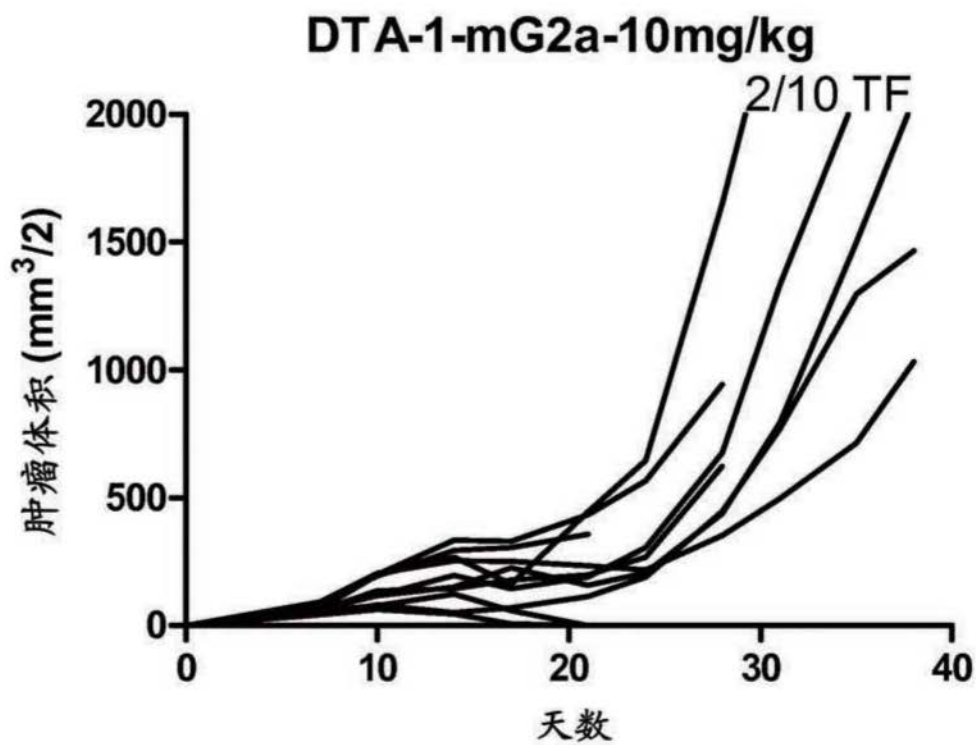
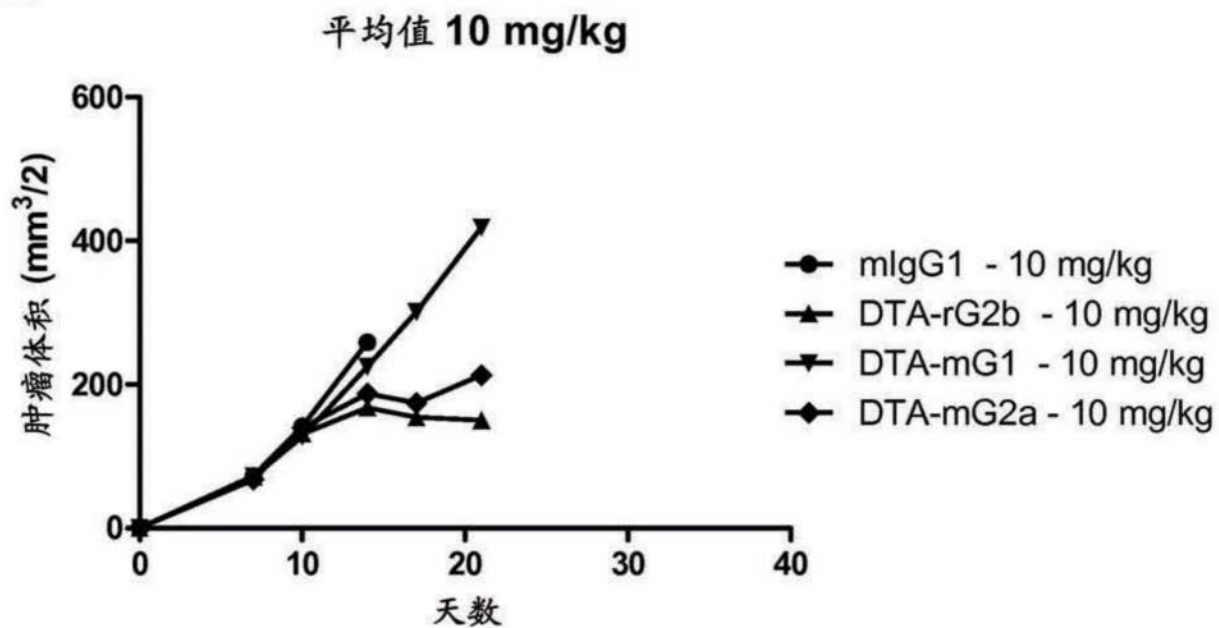


图17C和D

A.



B.

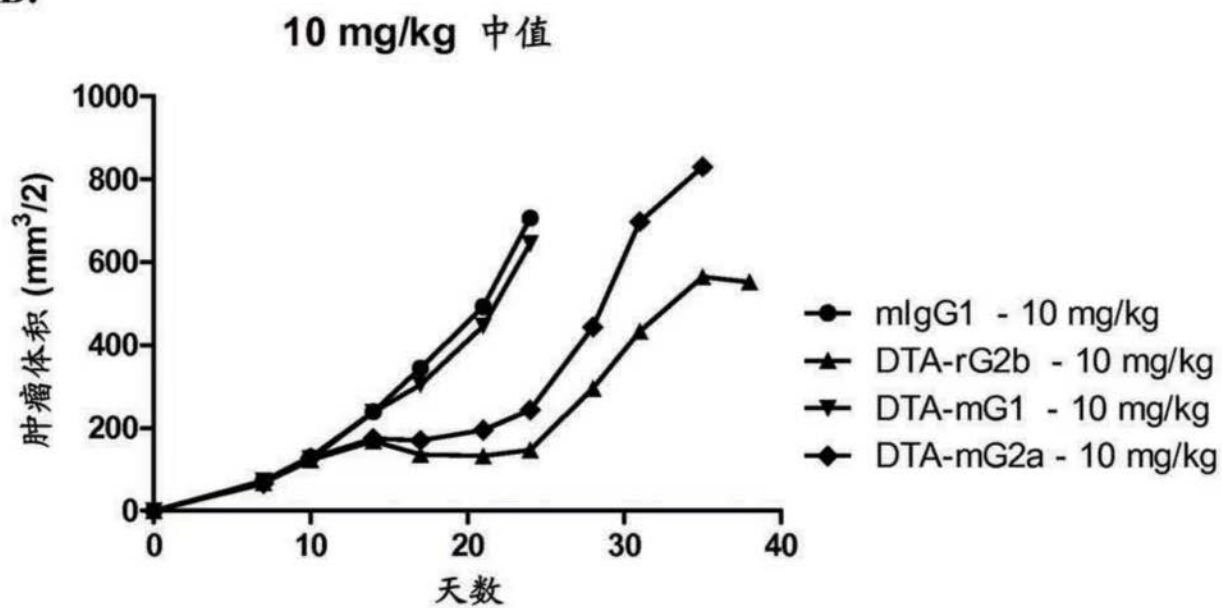


图18A和B

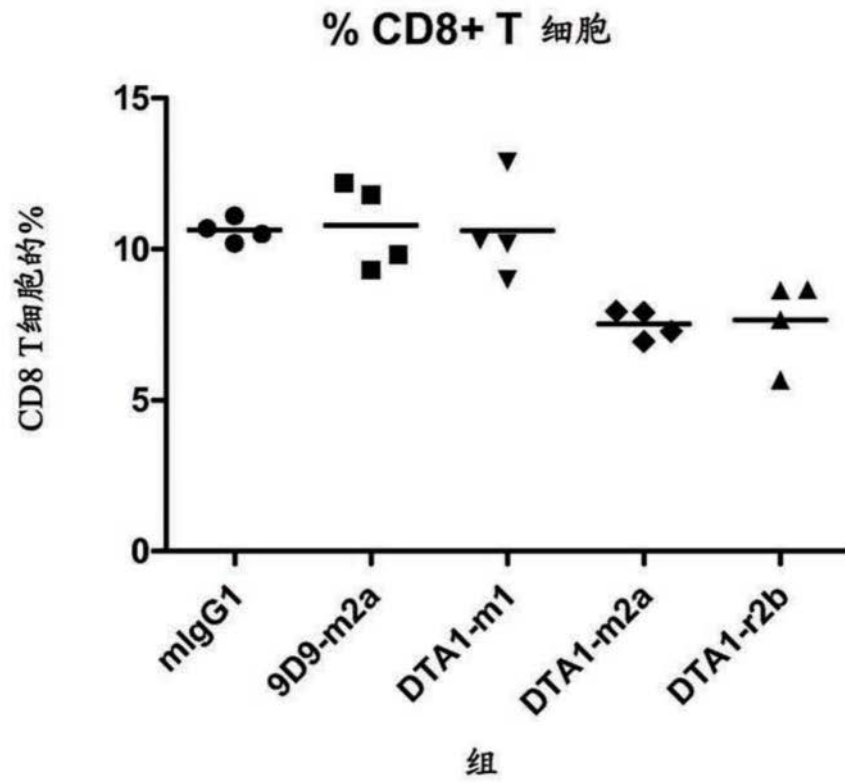
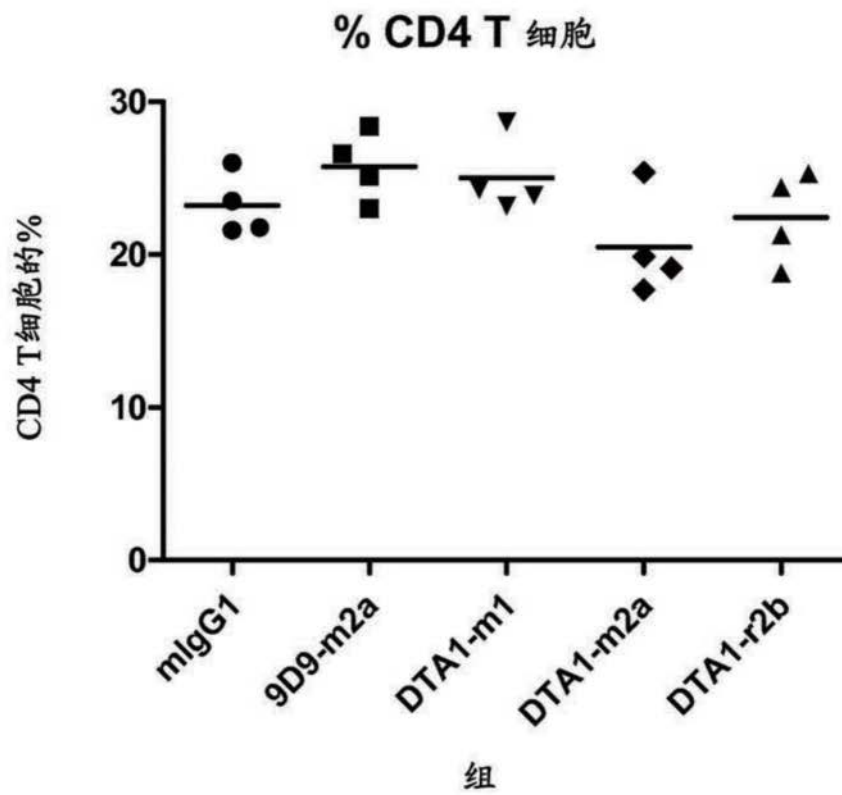
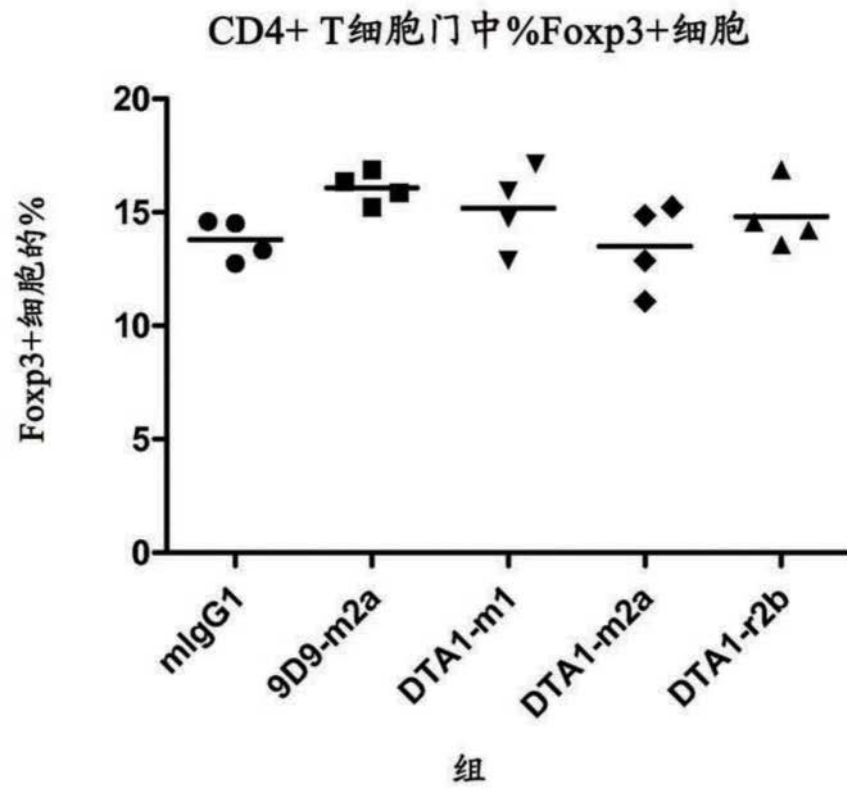
A.**B.**

图19A和B

C.



D.

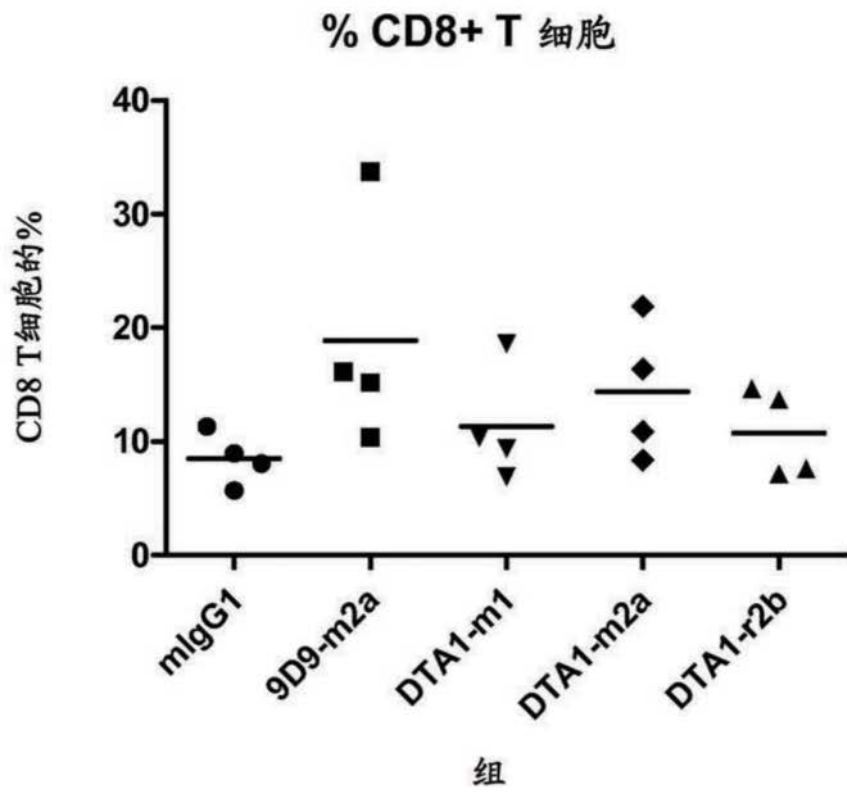


图19C和D

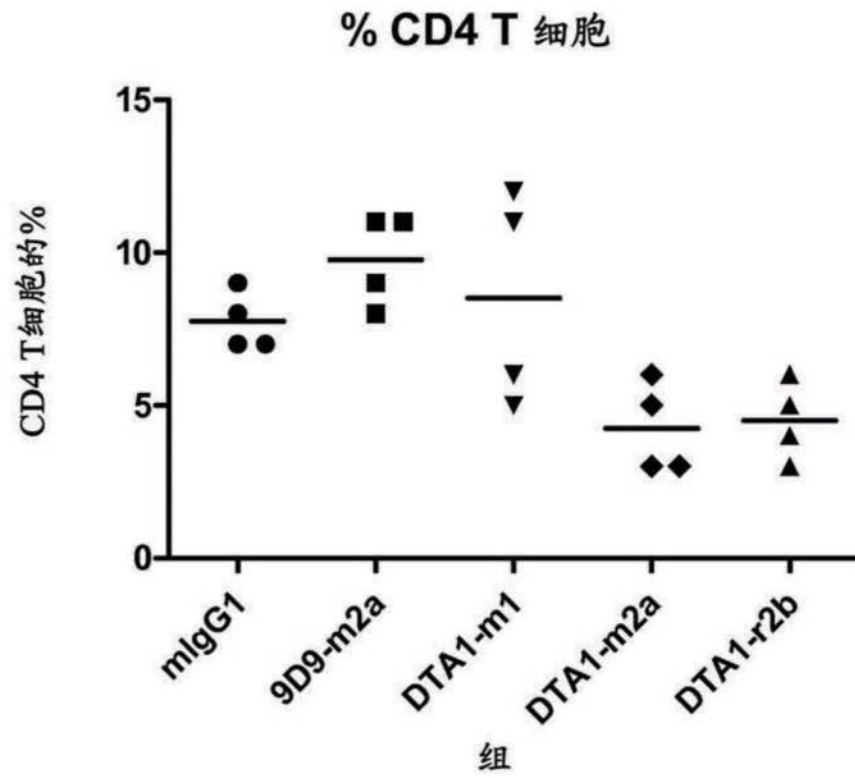
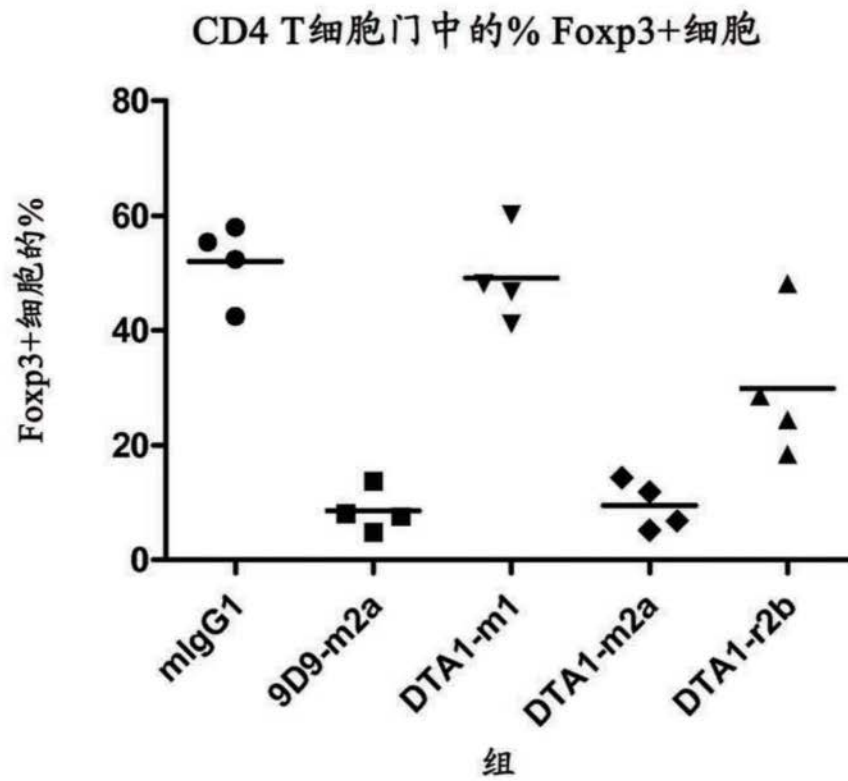
E.**F.**

图19E和F

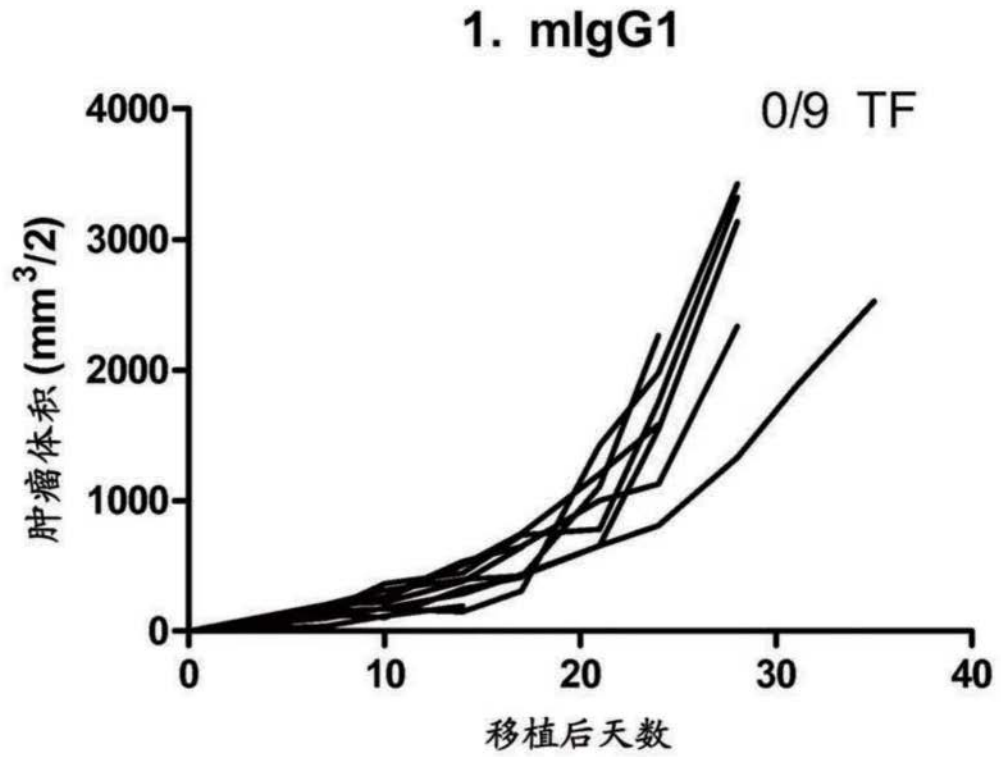
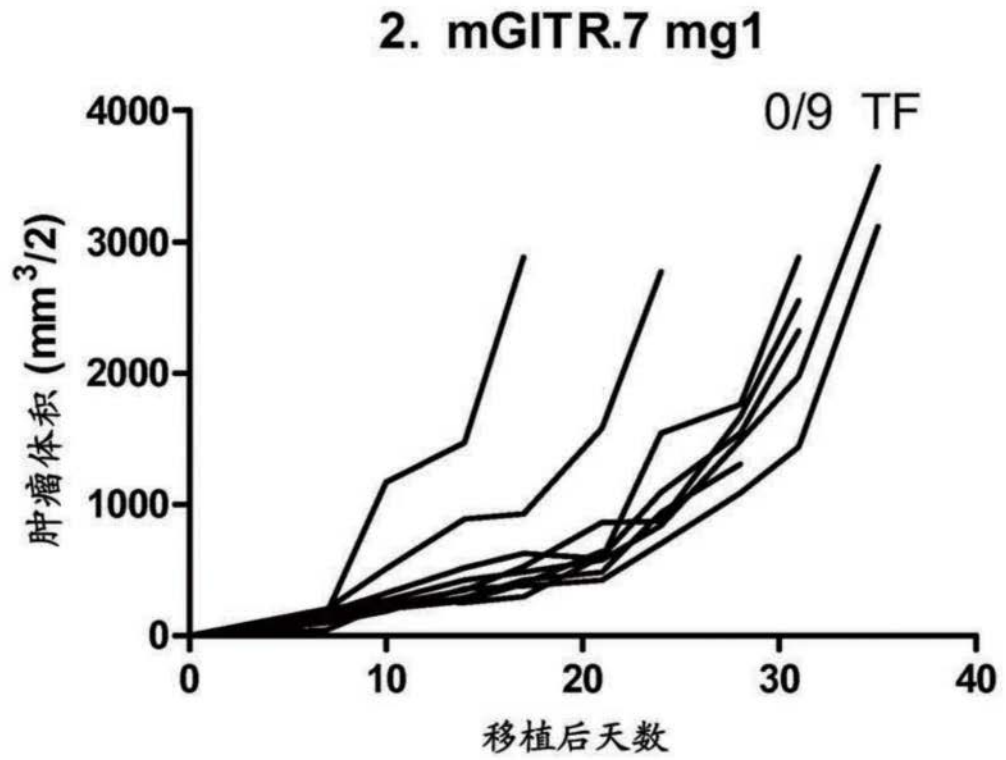
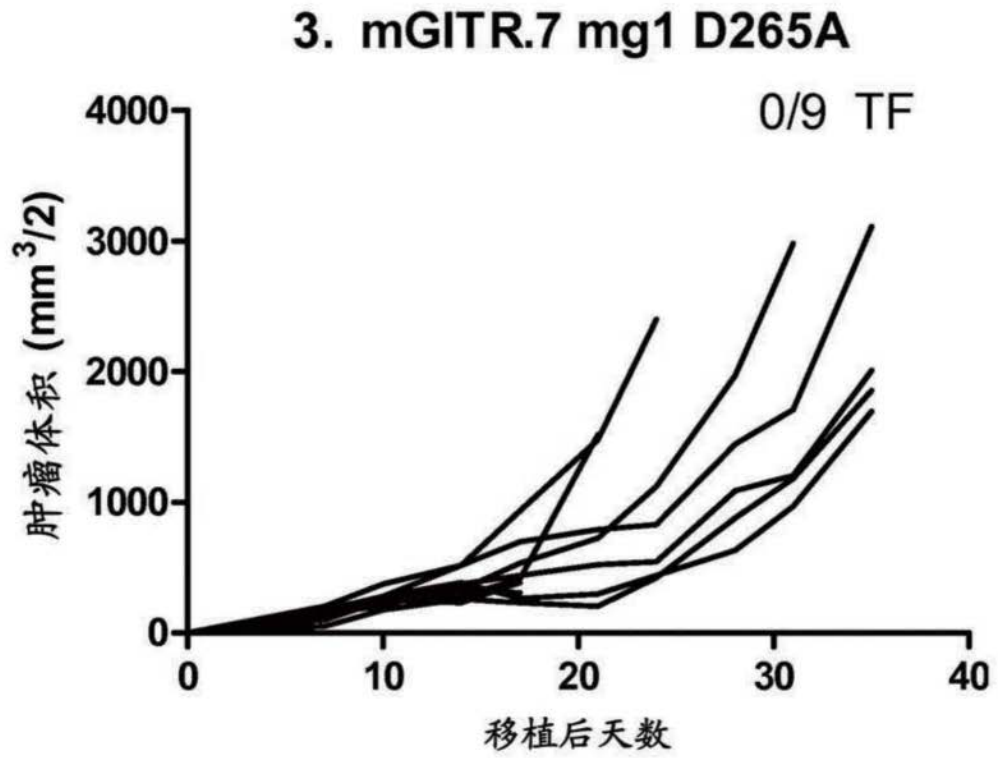
A.**B.**

图20A和B

C.



D.

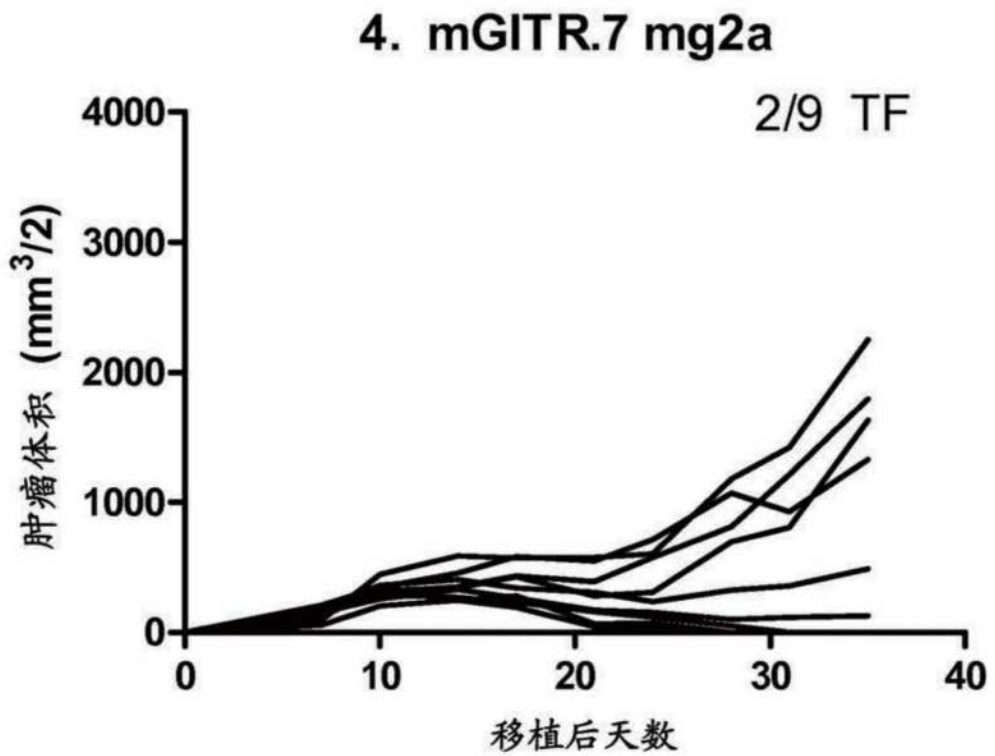


图20C和D

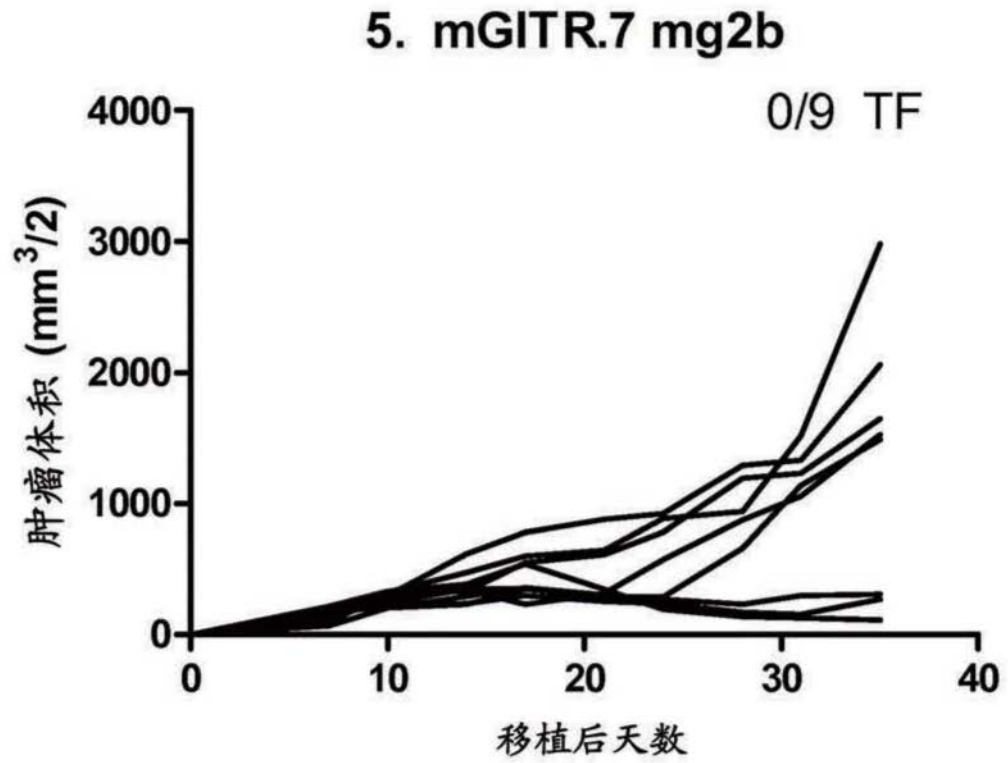
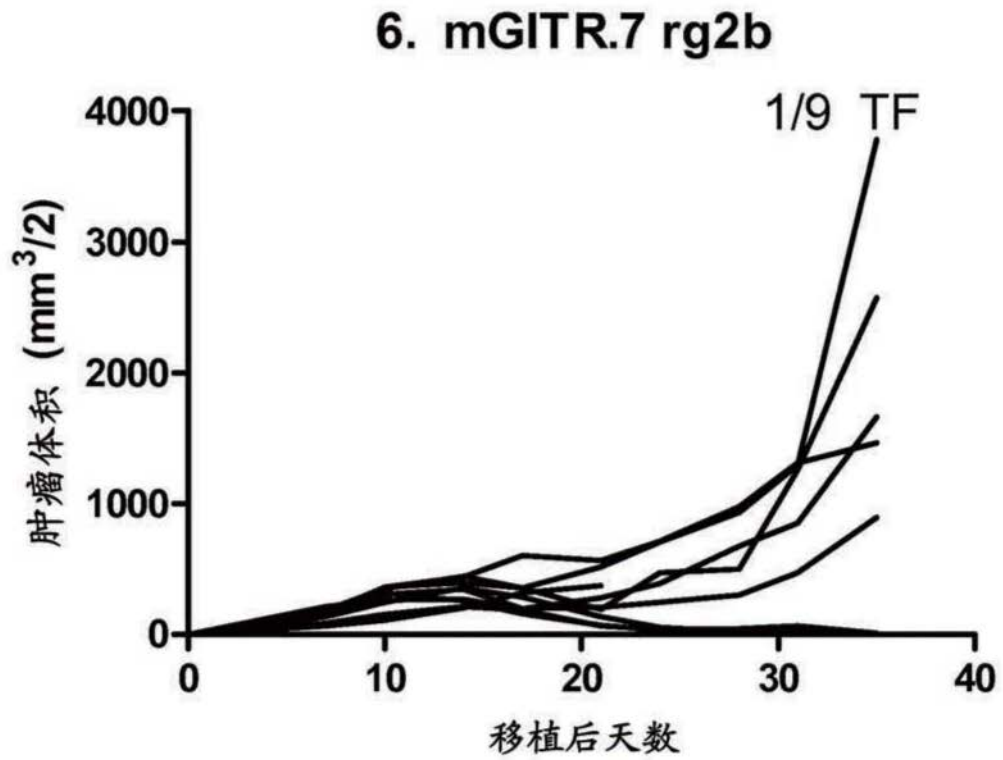
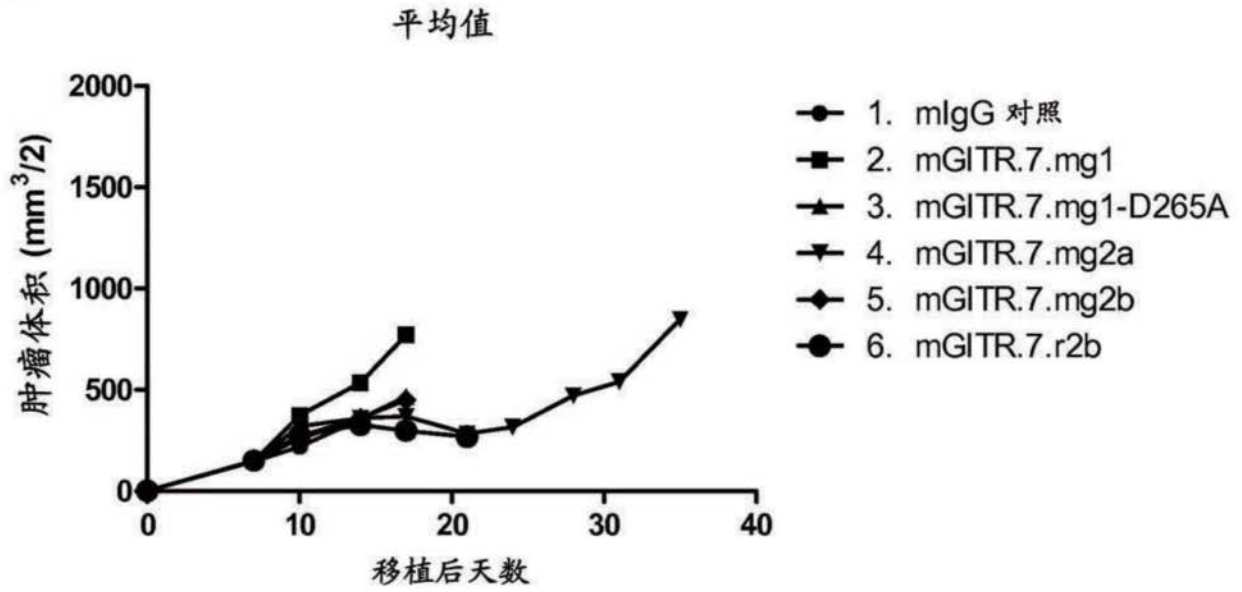
E.**F.**

图20E和F

A.



B.

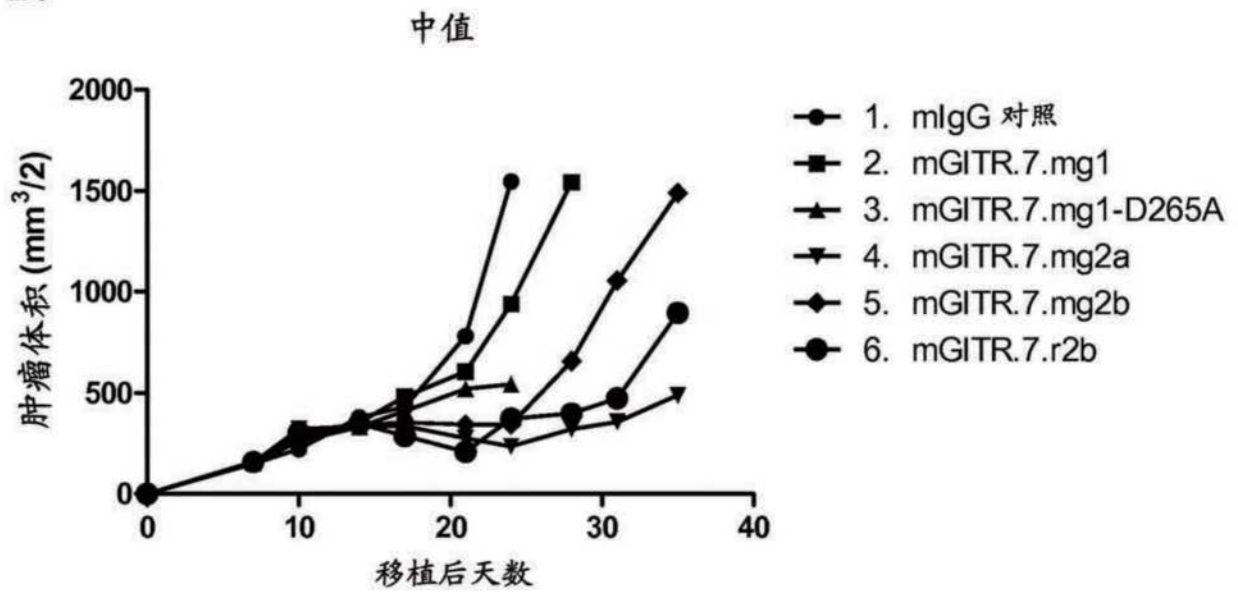


图21A和B

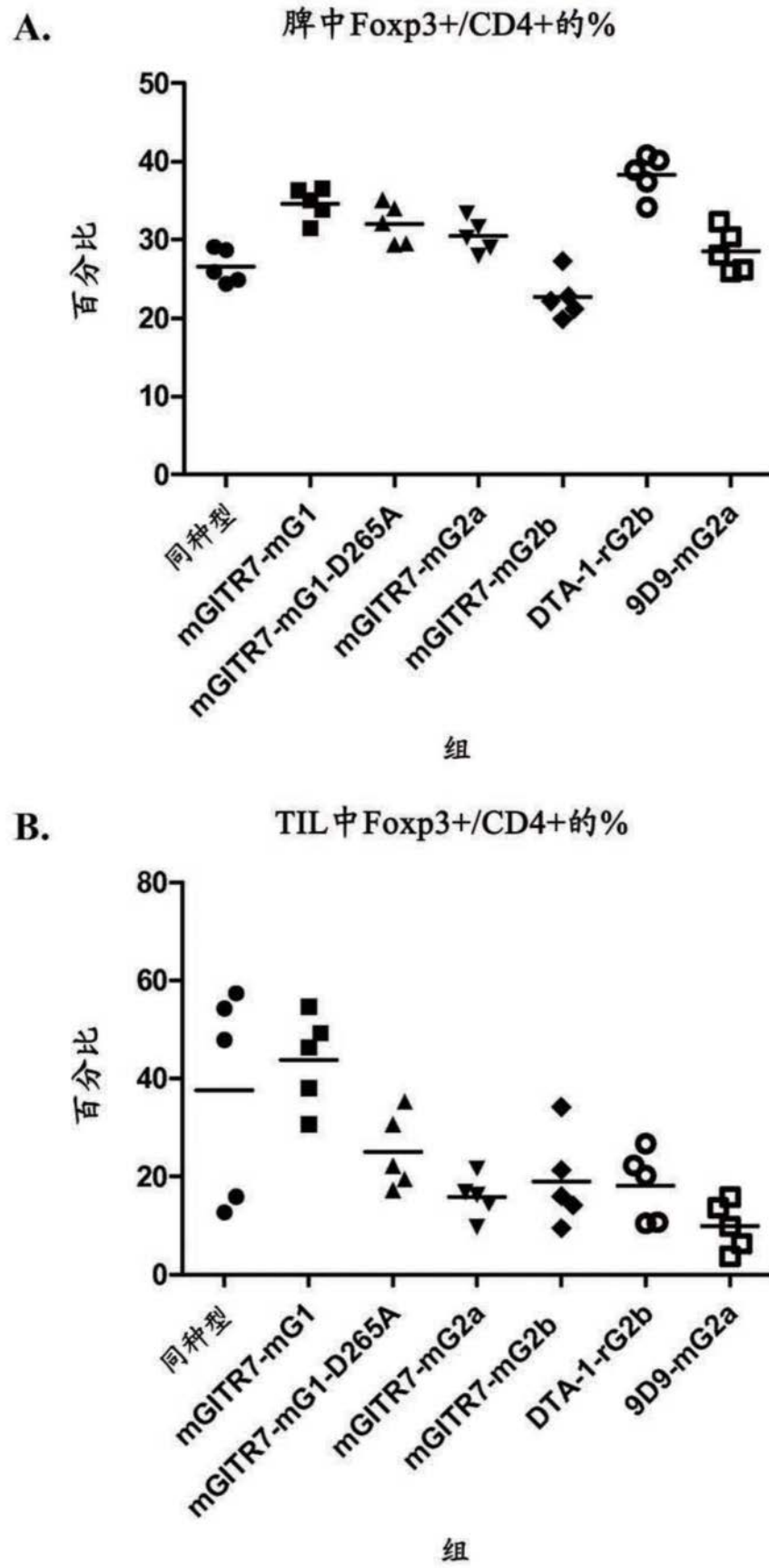


图22A和B

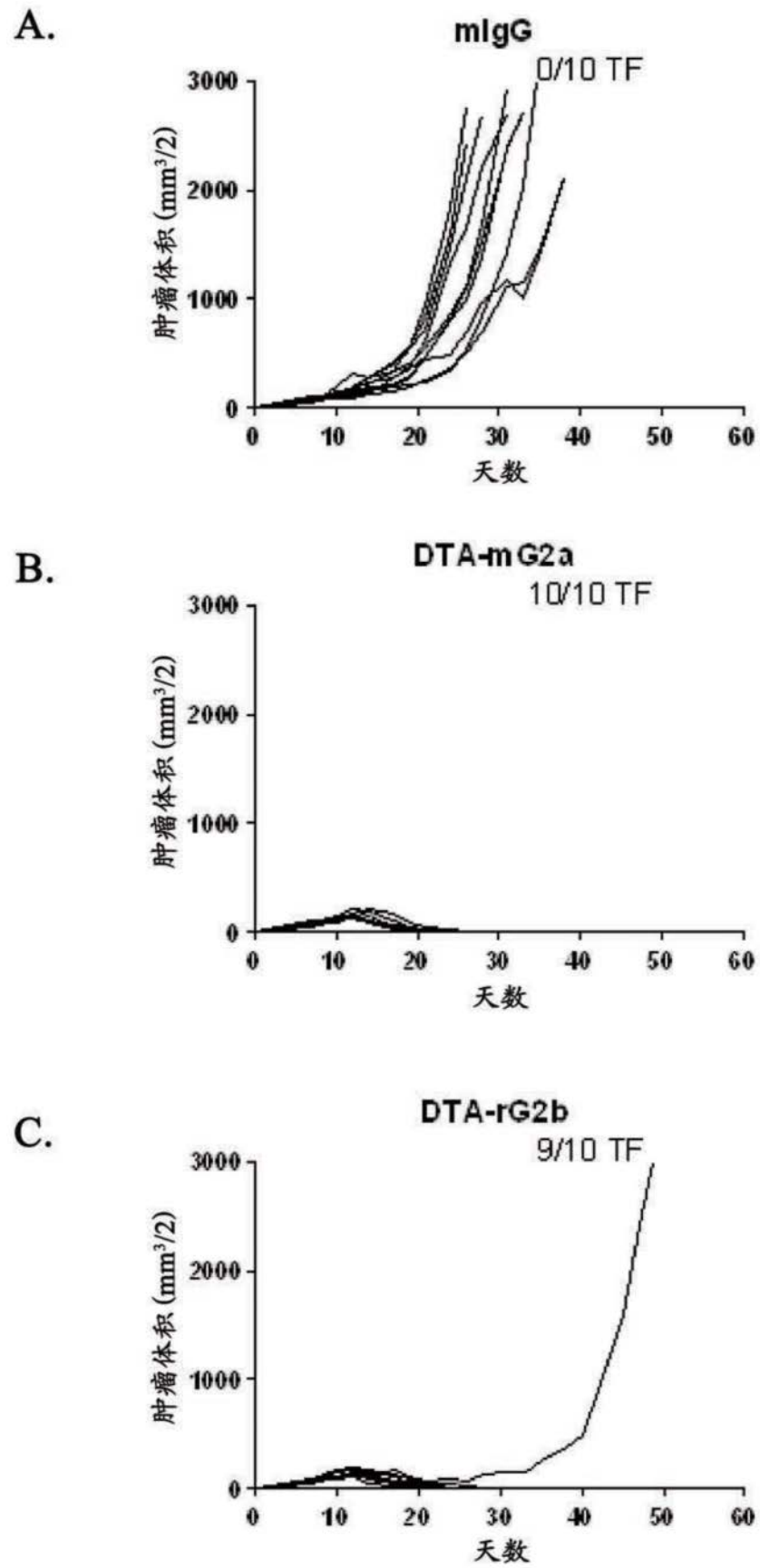
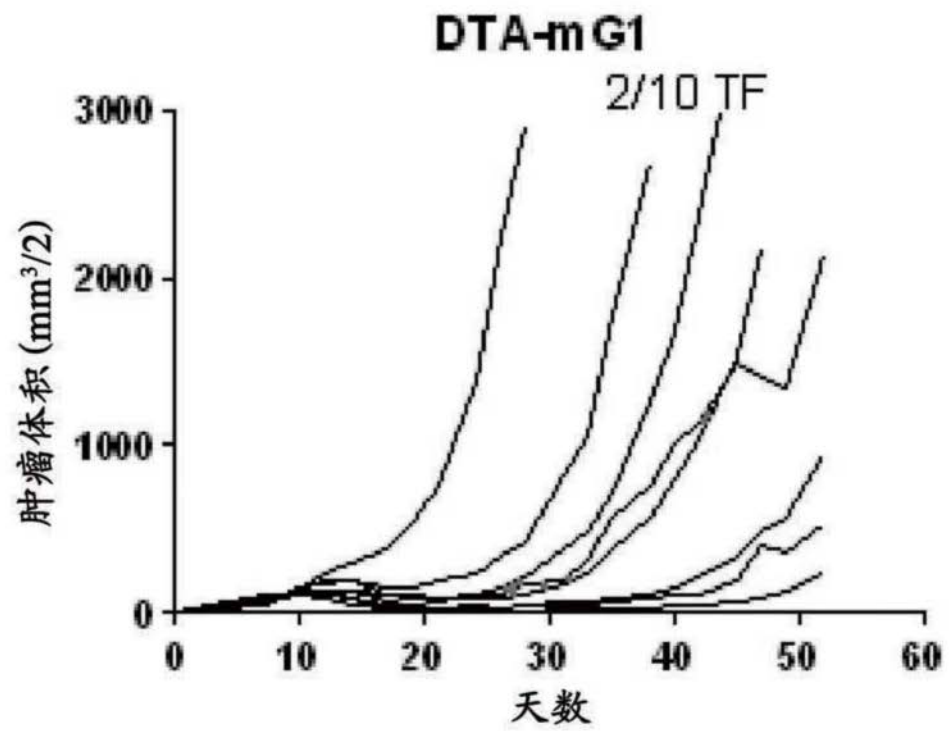


图23A-C

D.



E.

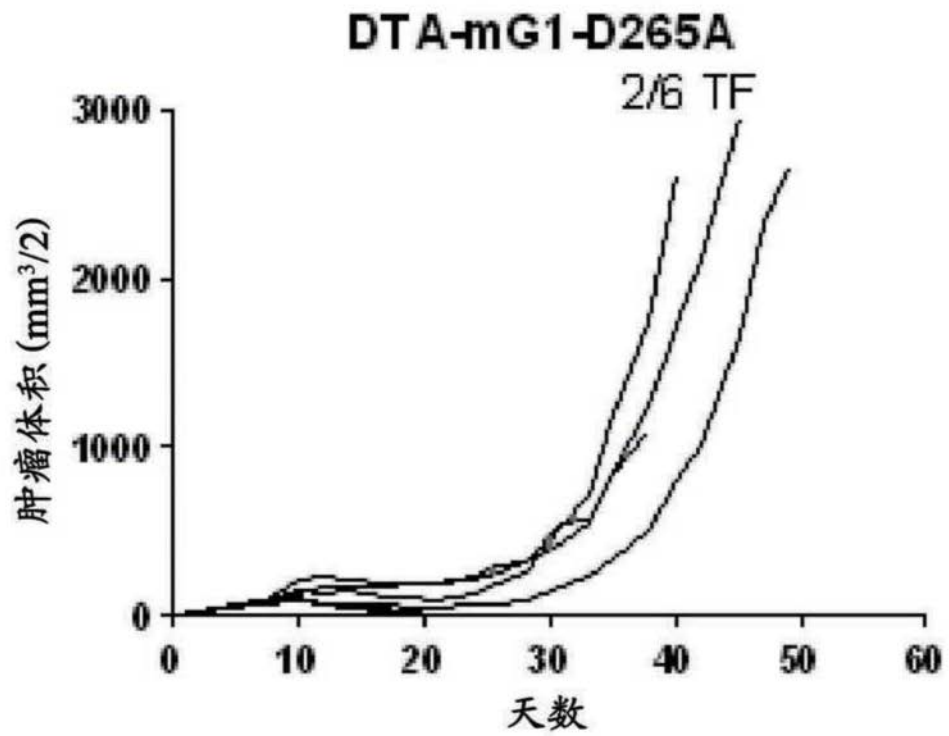
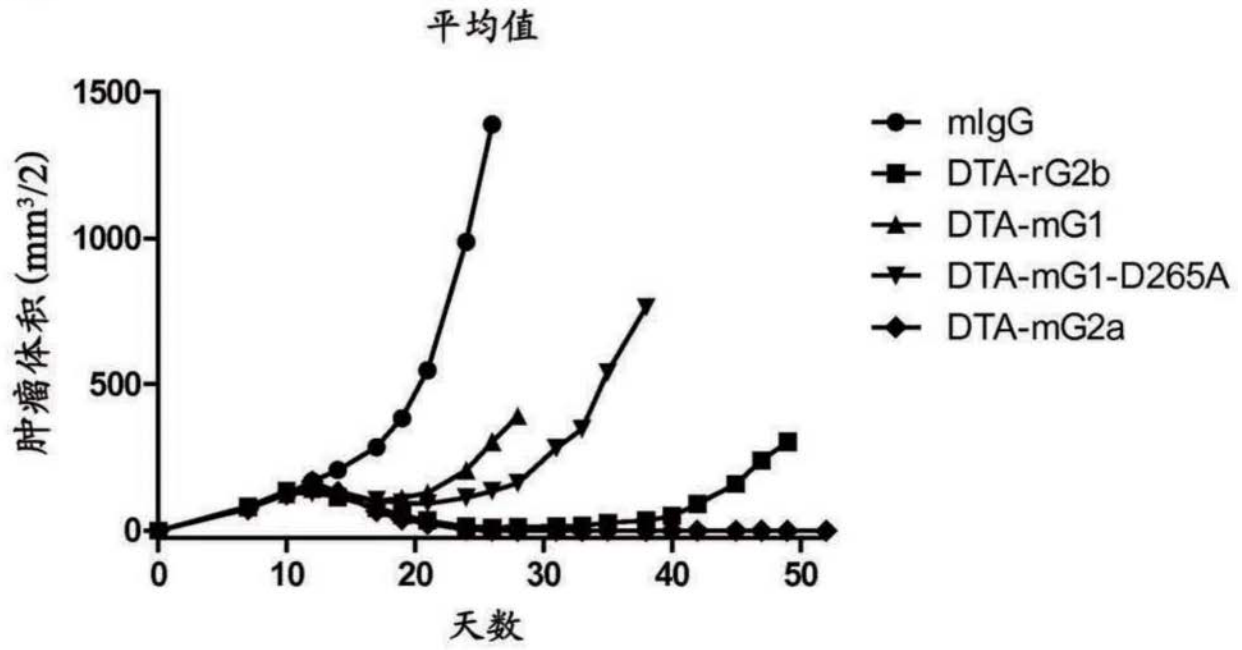


图23D和E

A.



B.

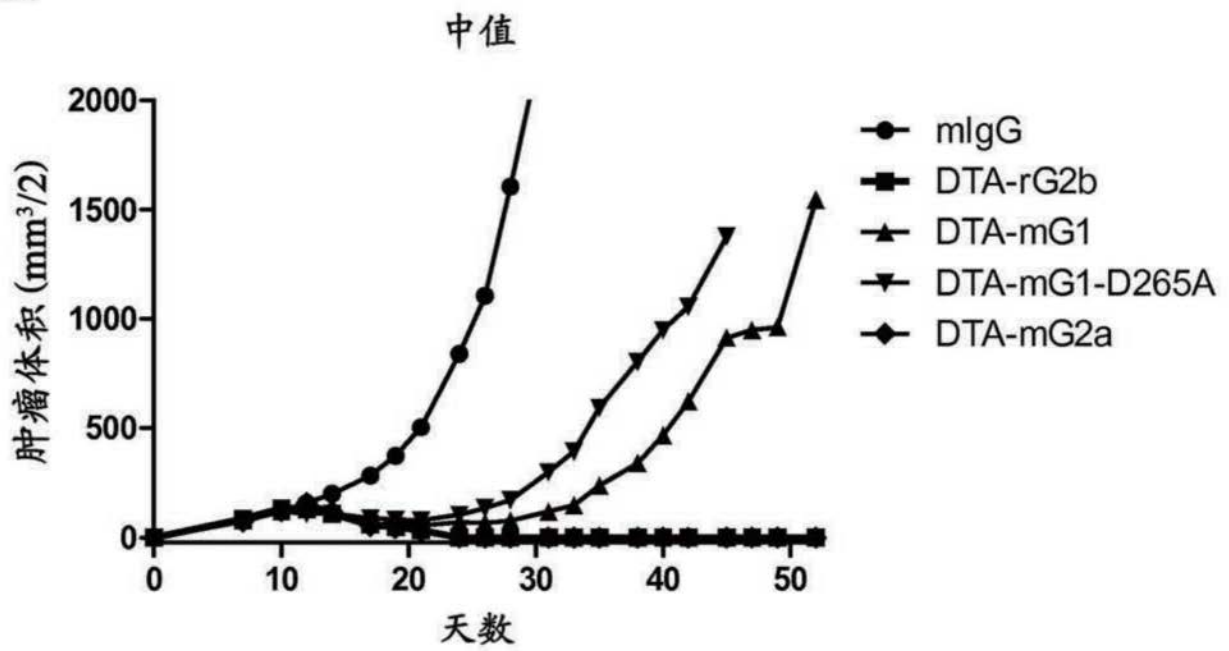


图24A和B

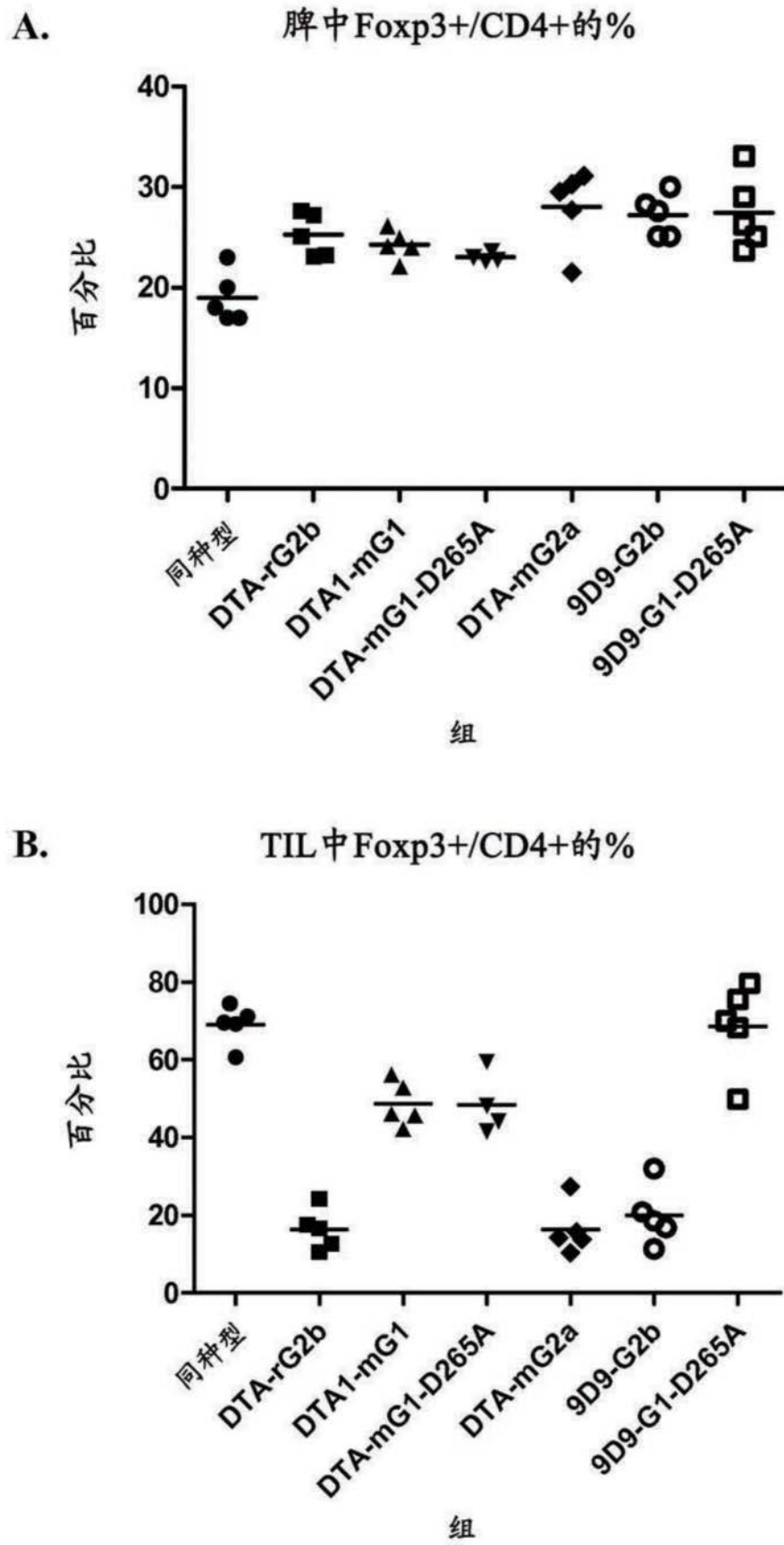


图25A和B

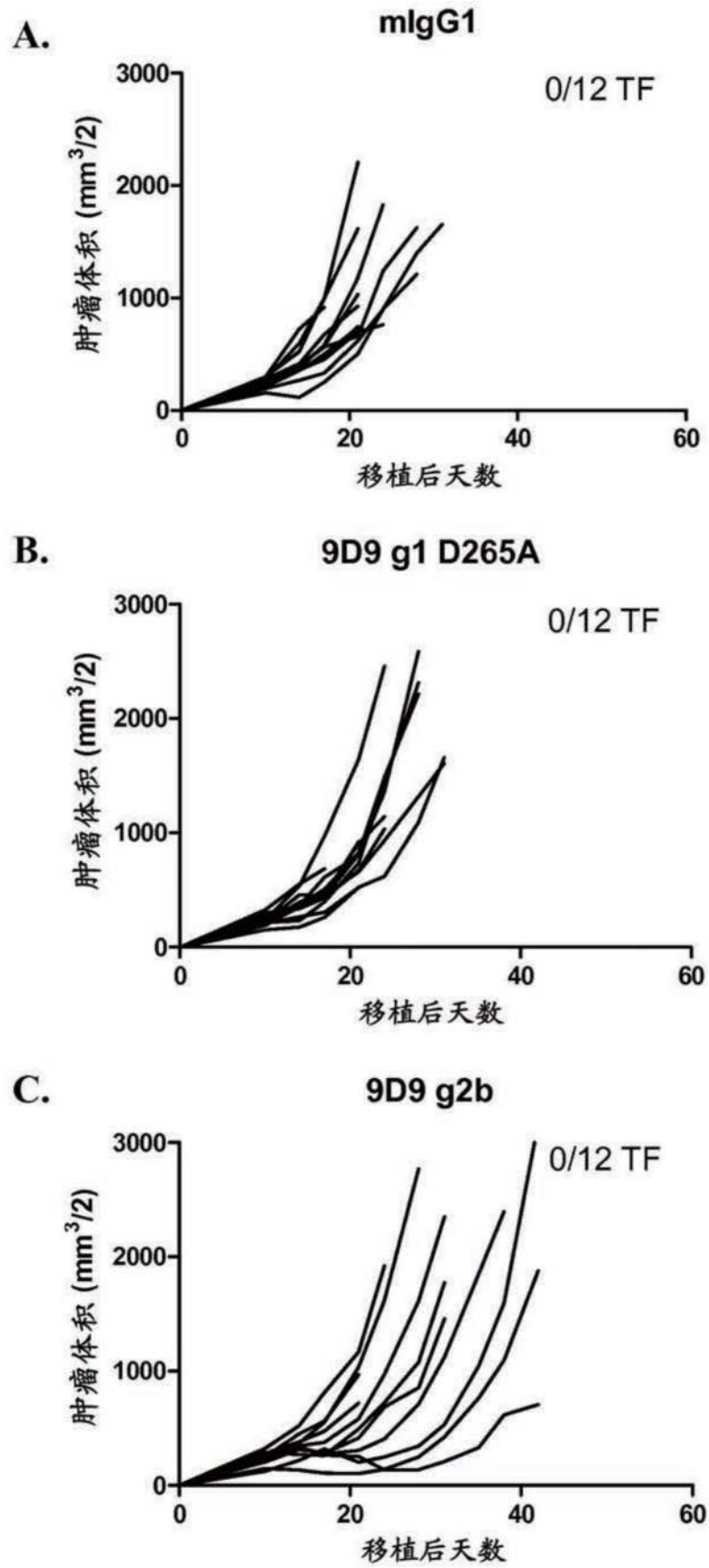


图26A-C

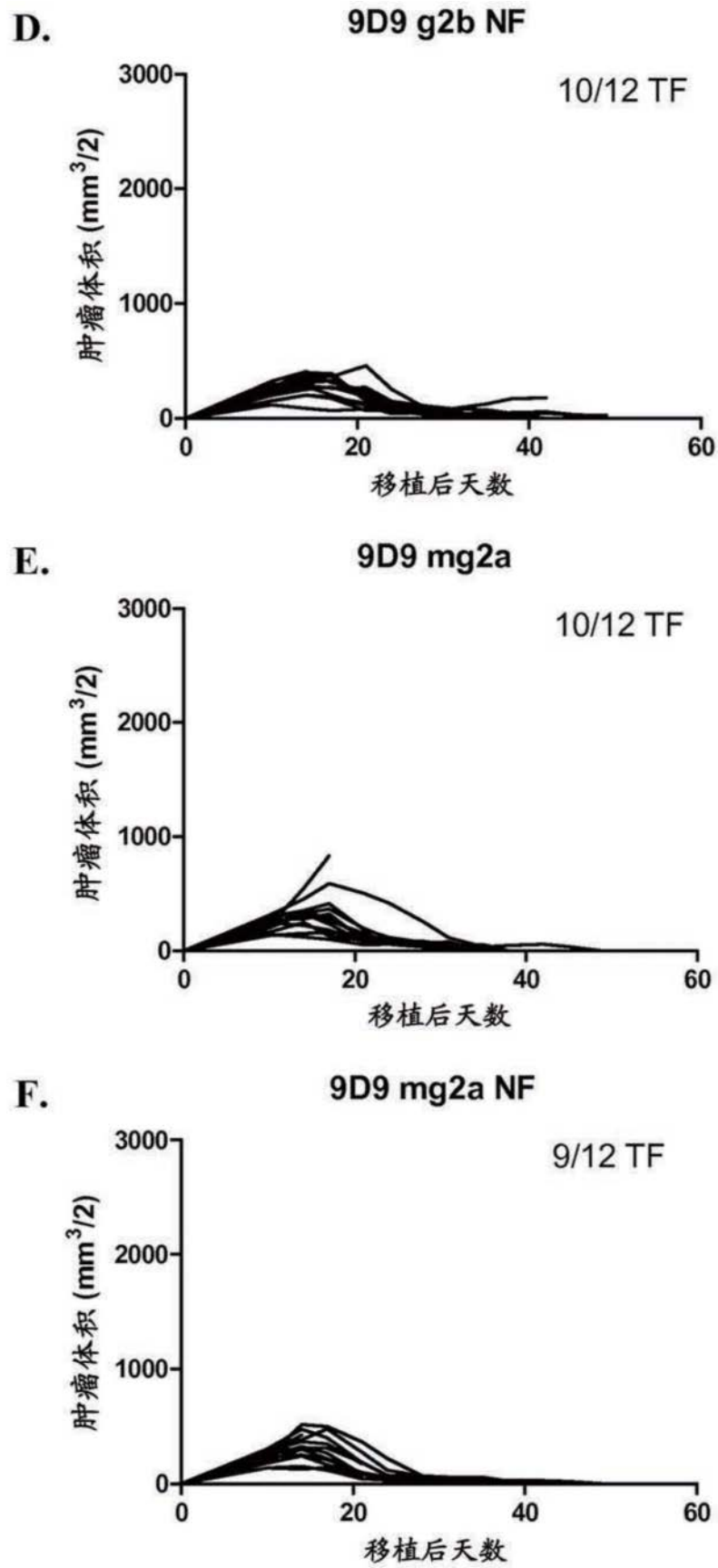
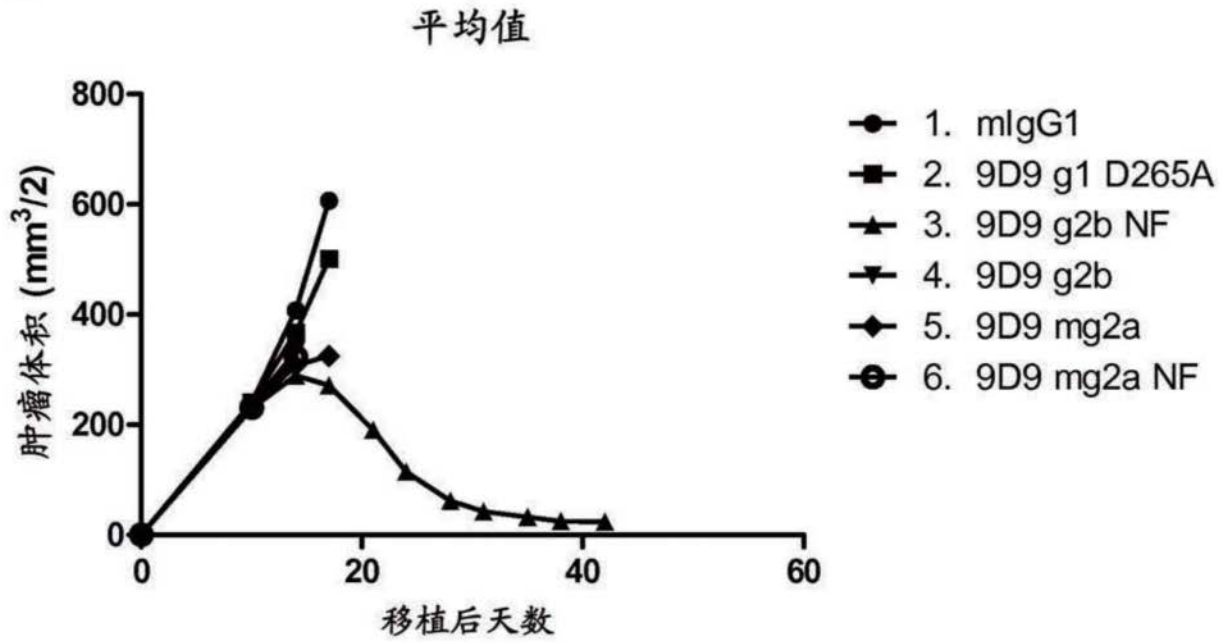


图26D-F

A.



B.

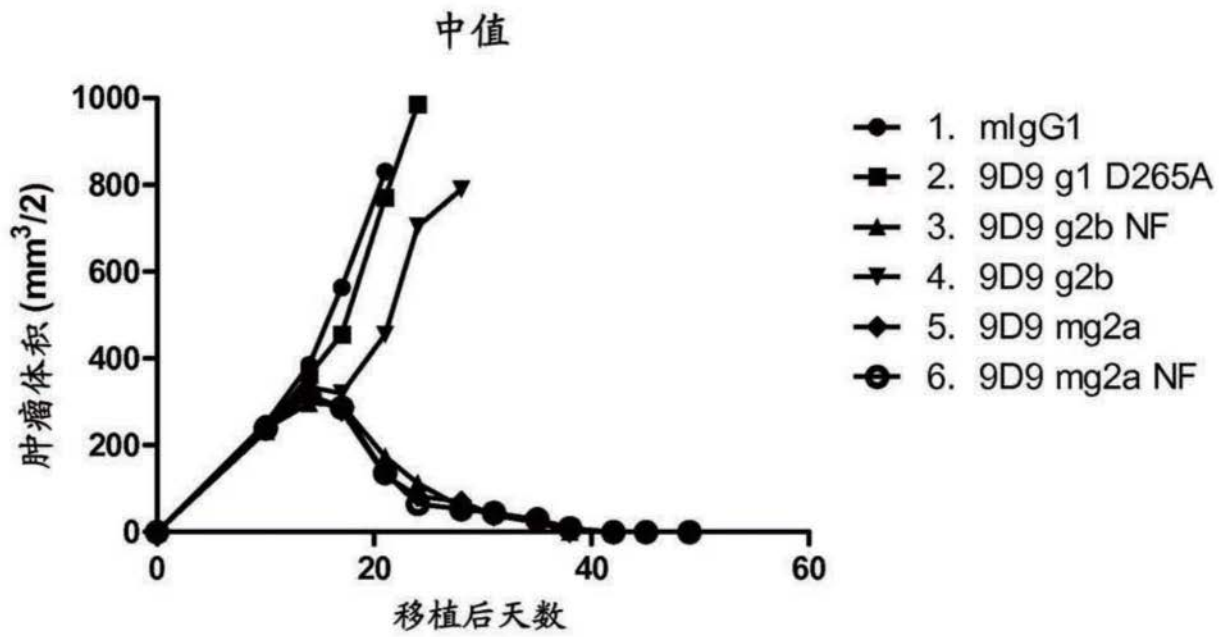


图27A和B

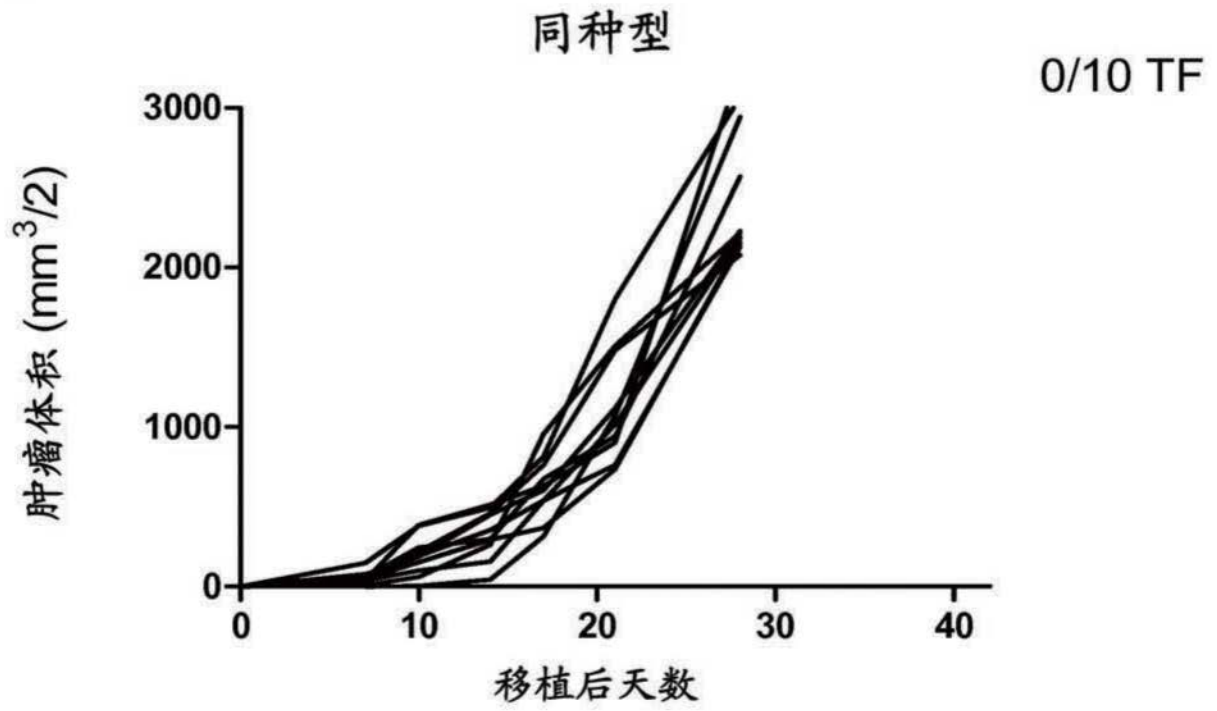
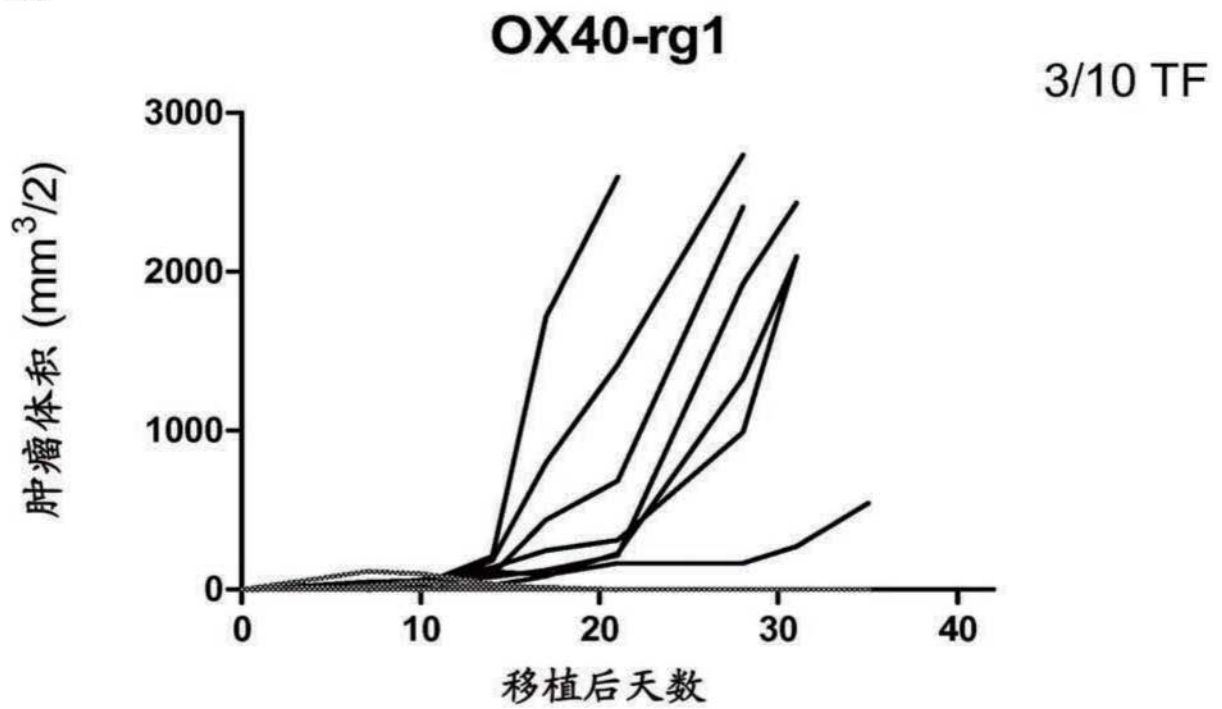
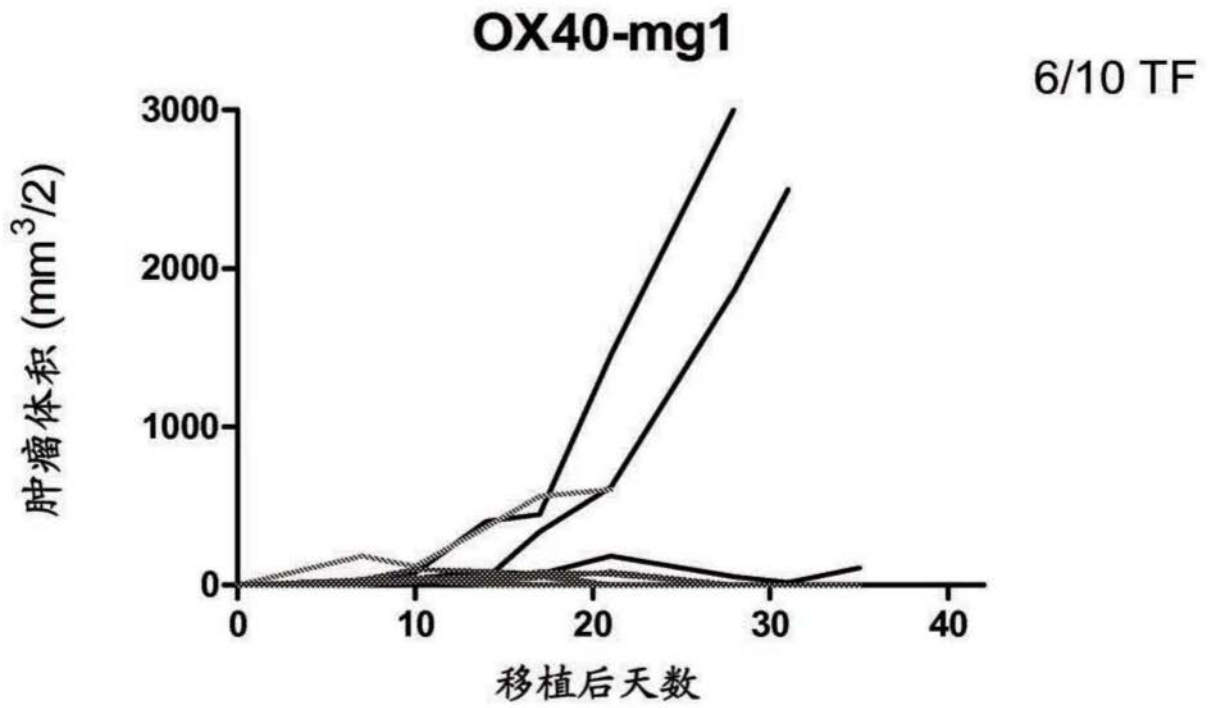
A.**B.**

图28A和B

C.



D.

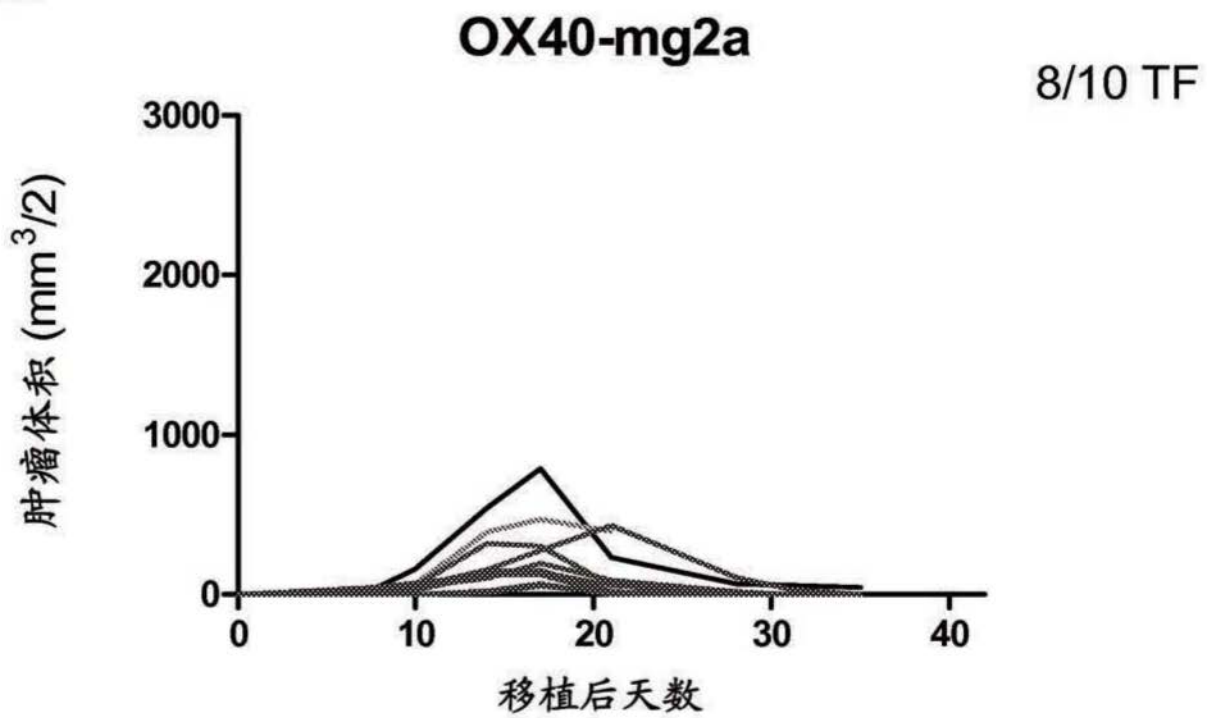
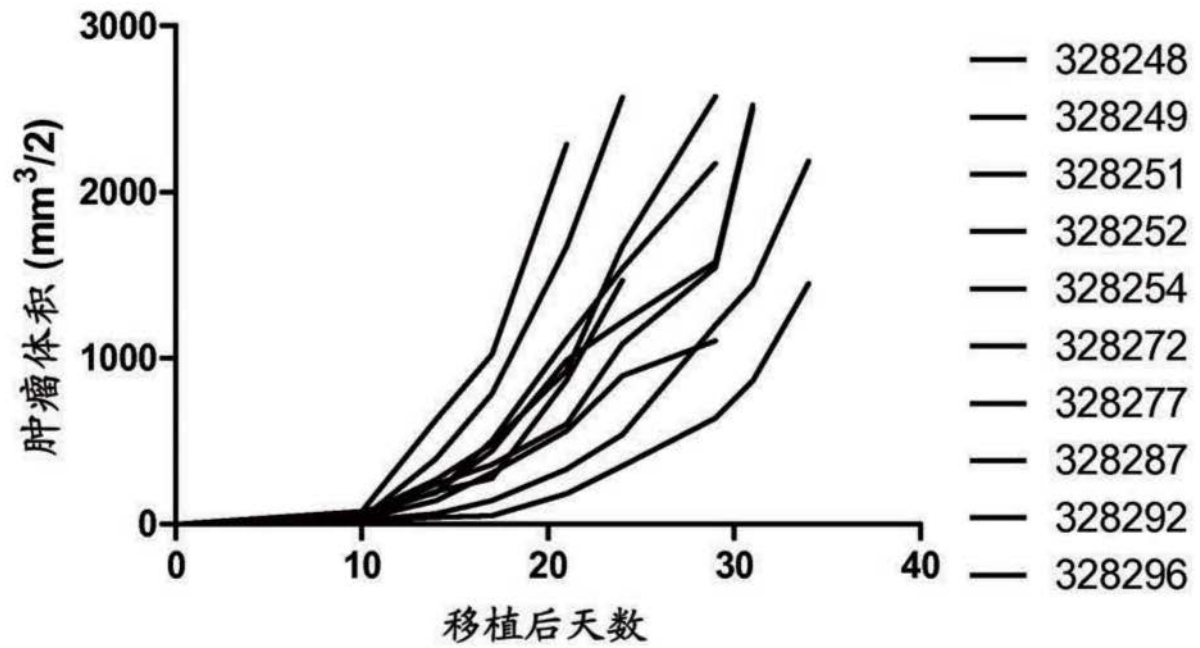


图28C和D

A.

同种型



B.

OX-40-g1D265A

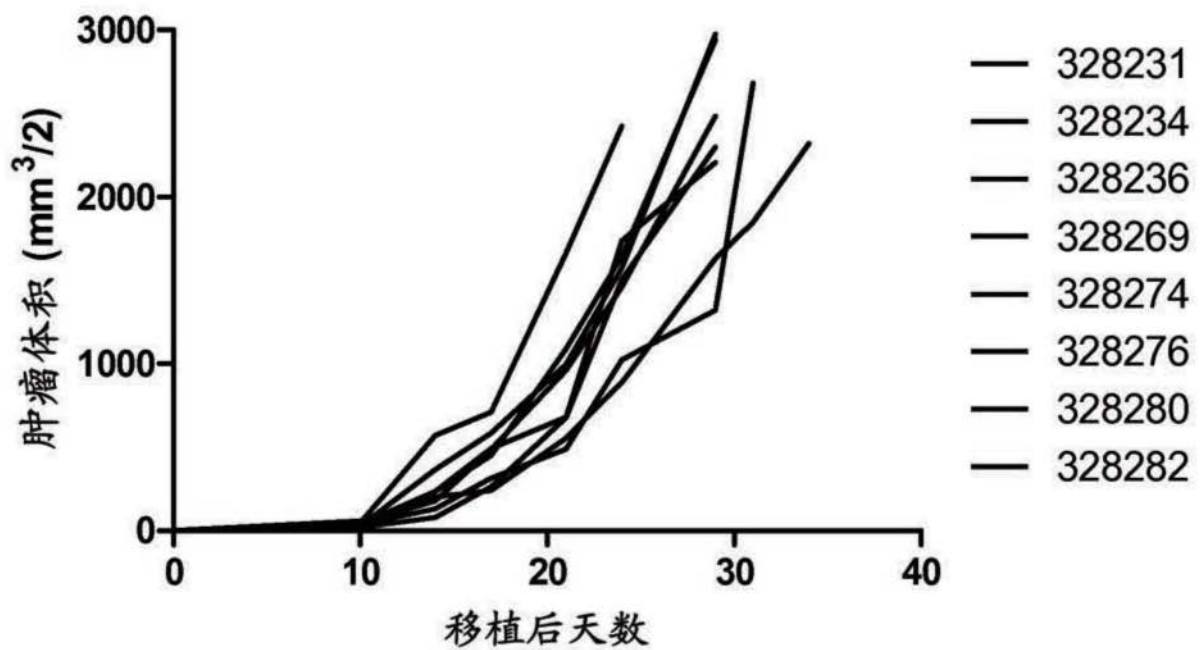
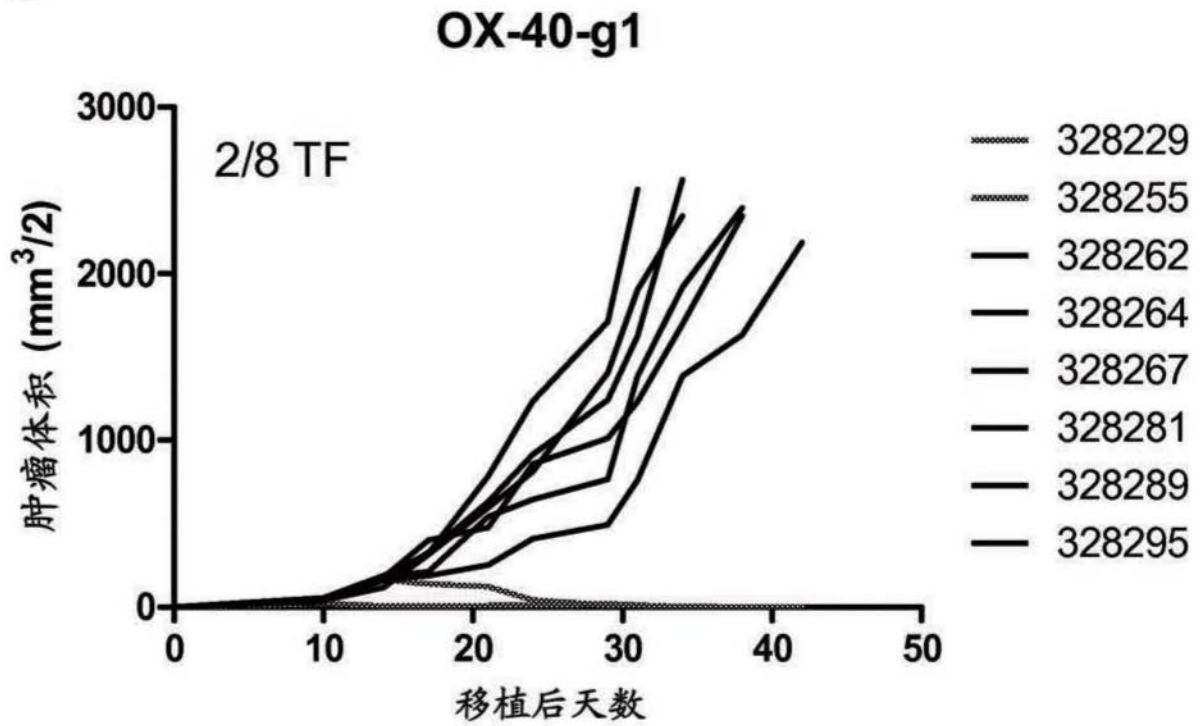


图29A和B

C.



D.

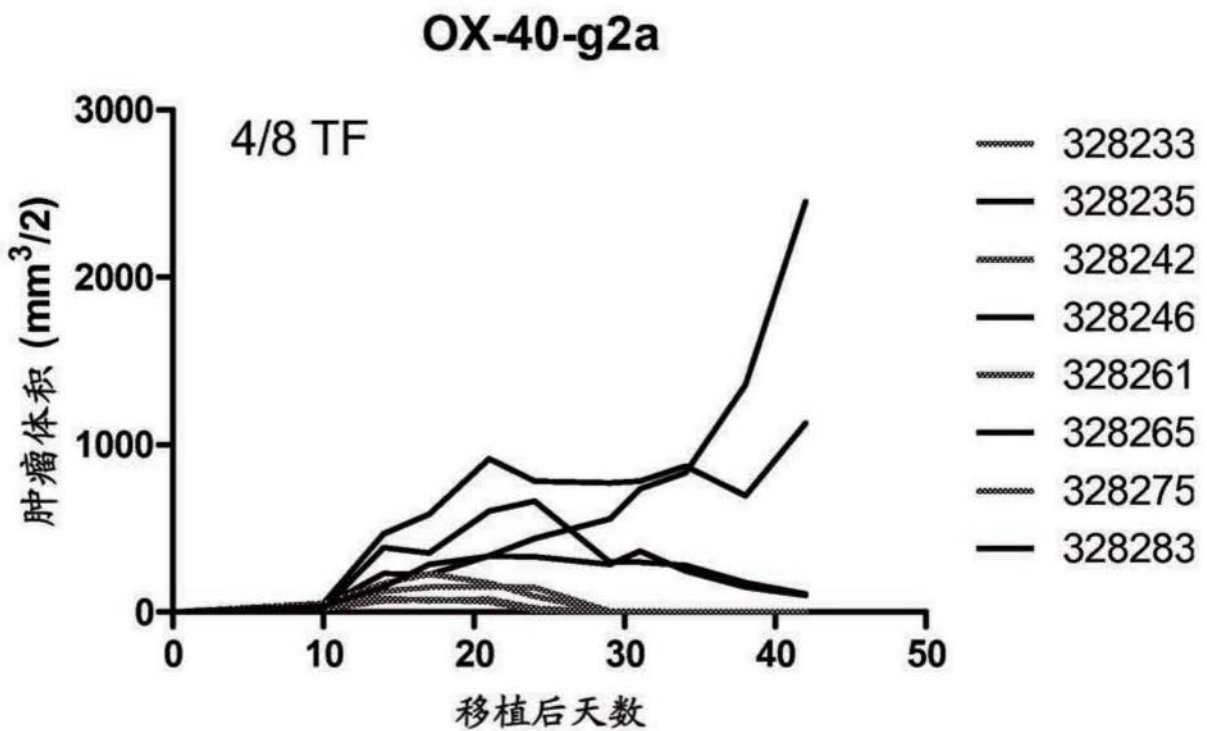
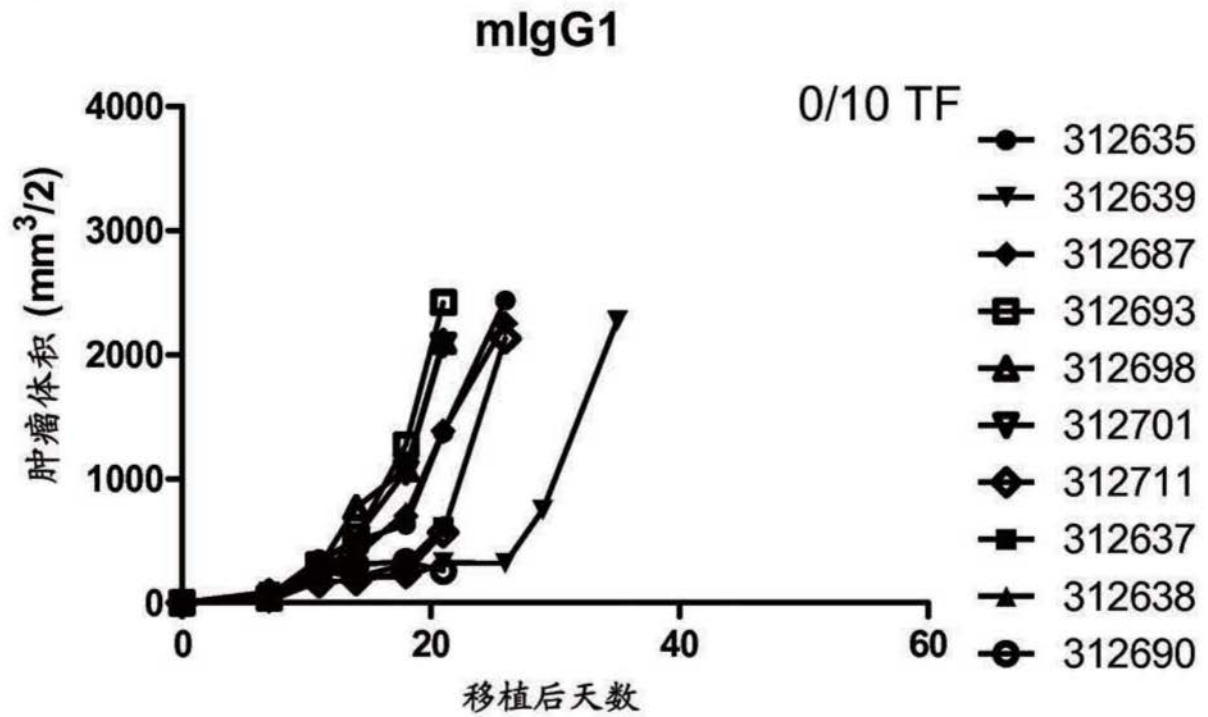


图29C和D

A.



B.

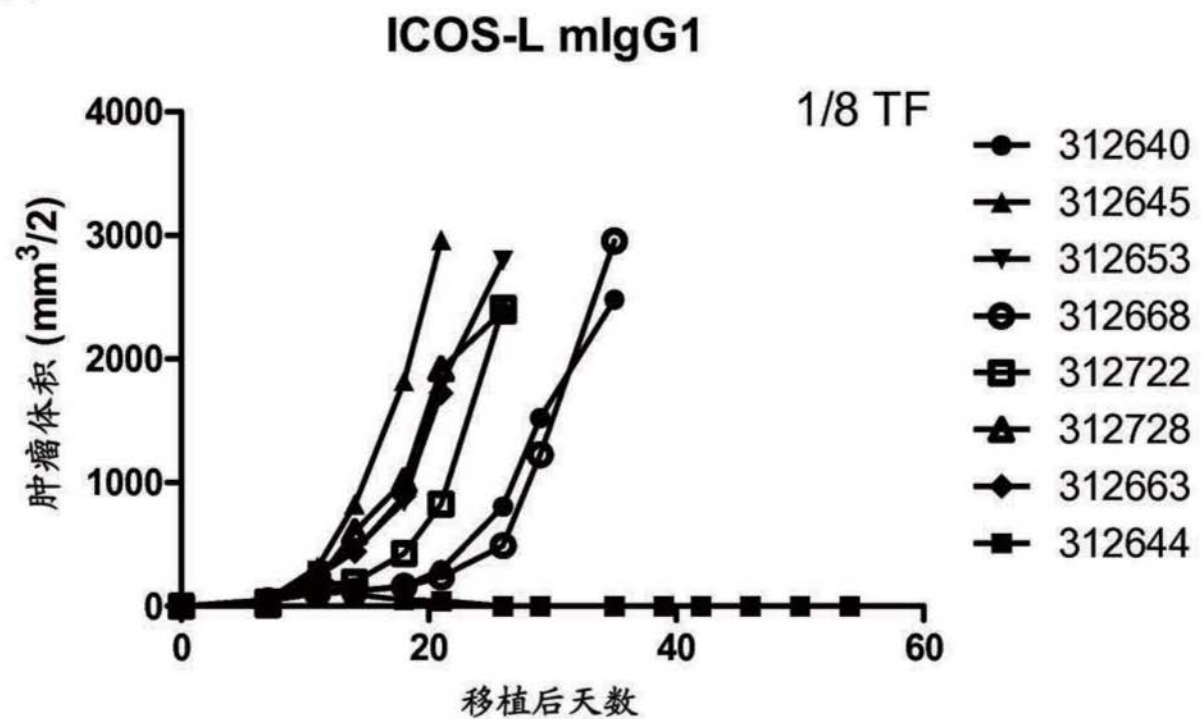
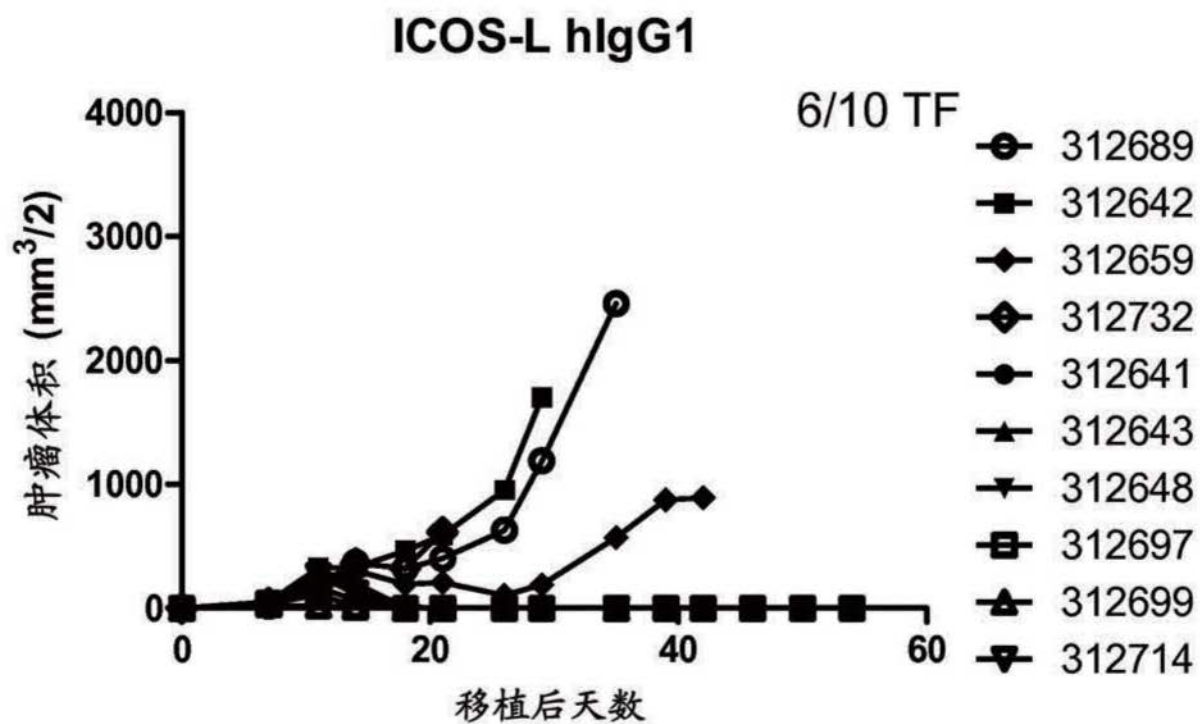


图30A和B

C.



D.

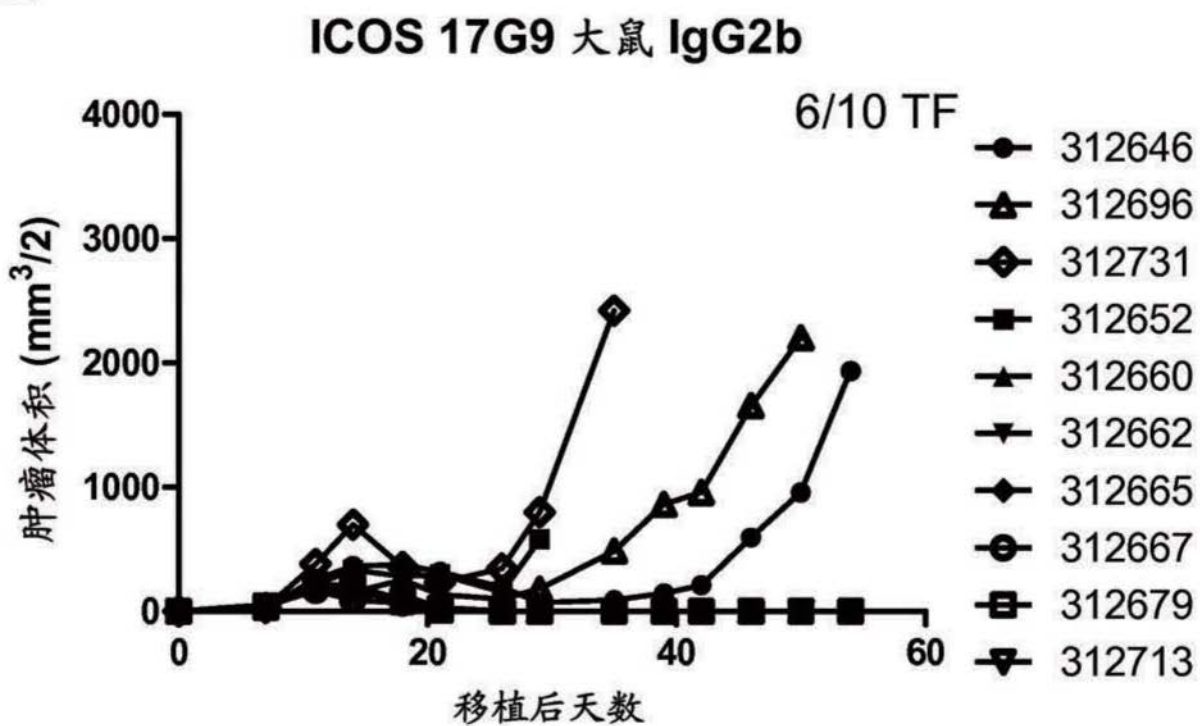


图30C和D

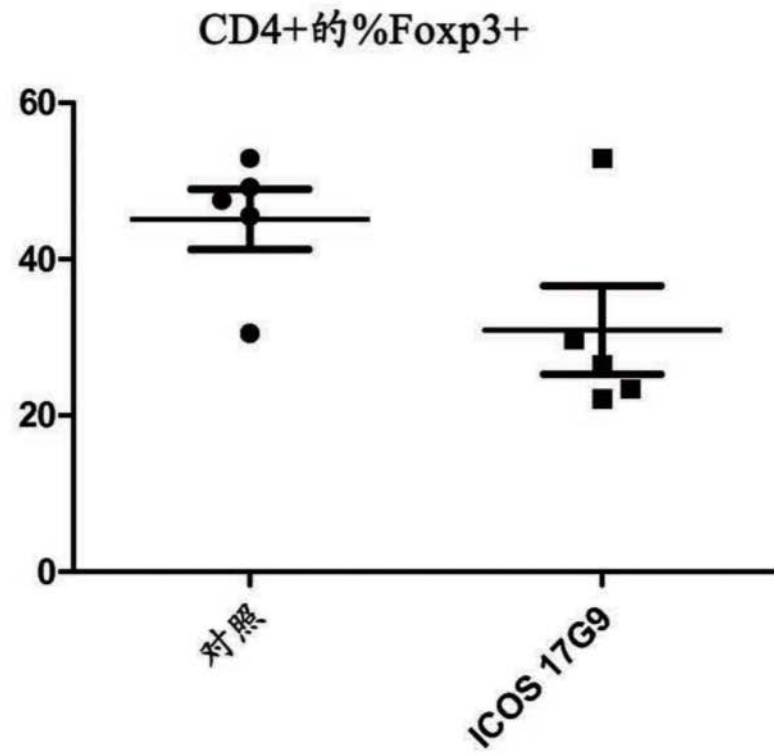
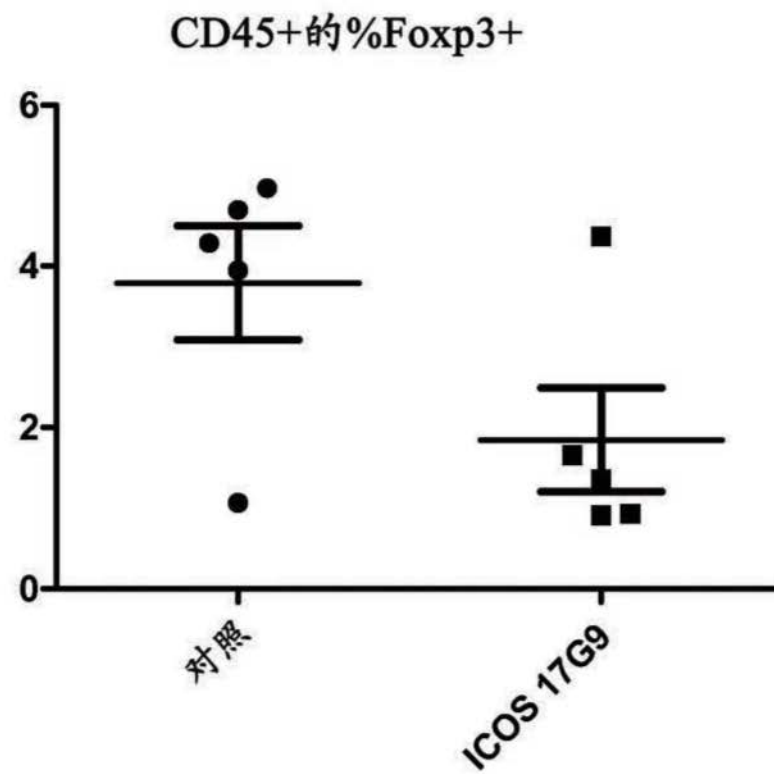
A.**B.**

图31A和B

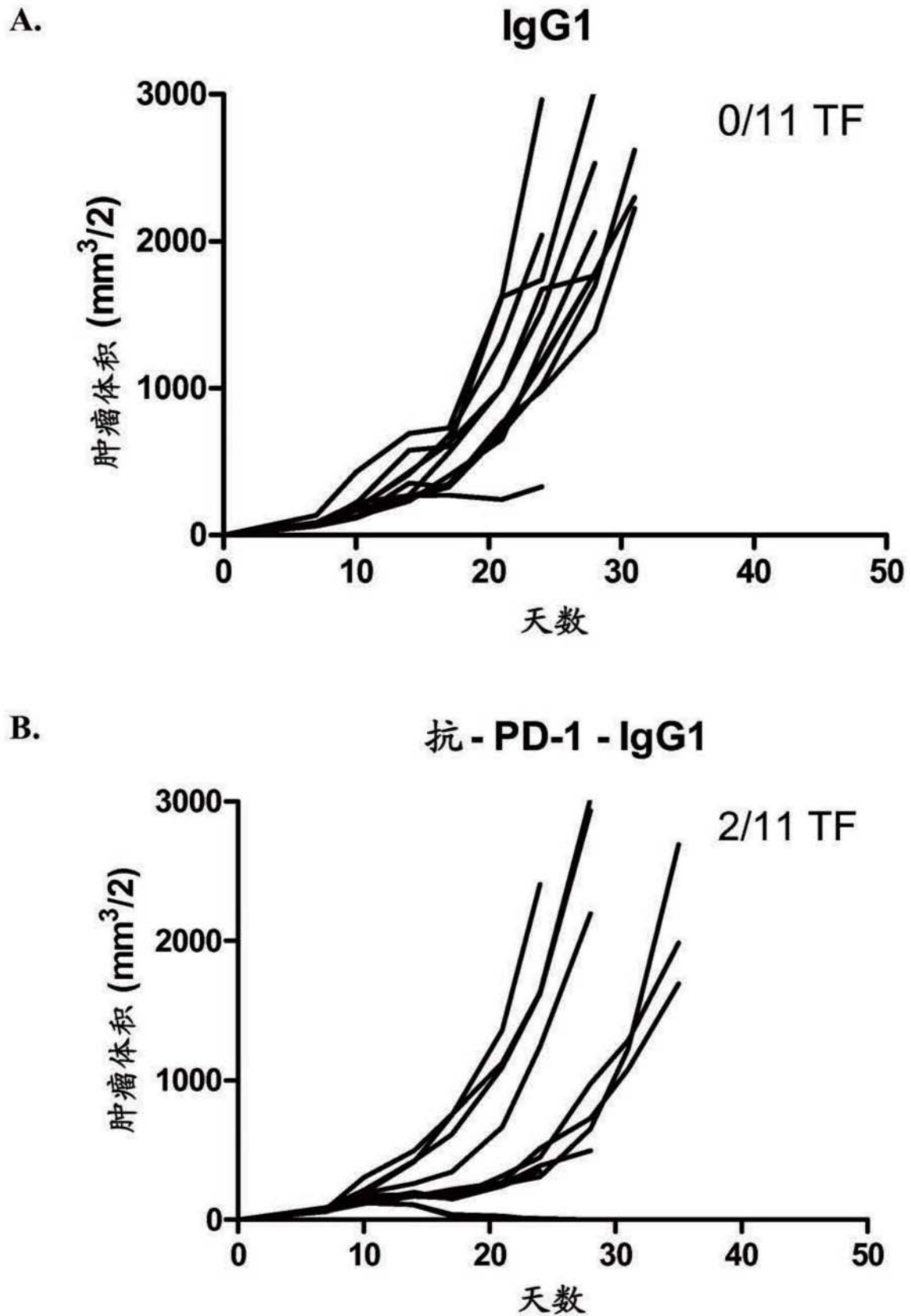
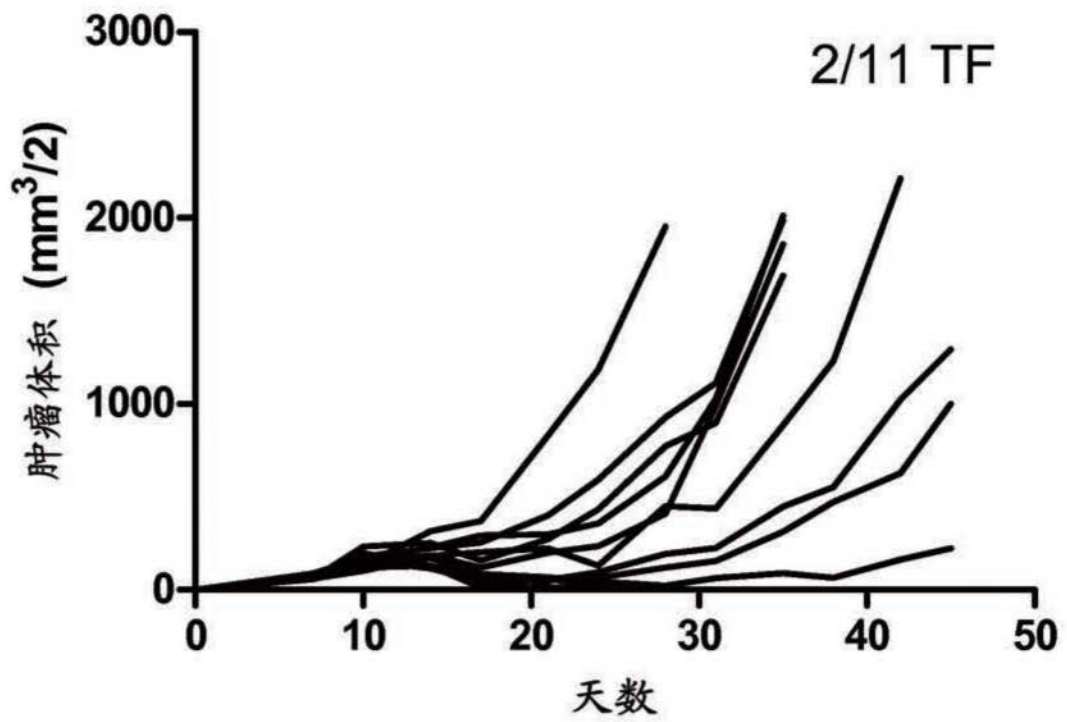


图32A和B

C.

抗 - PD-1 - IgG1 D265A



D.

抗 - PD-1 - IgG2a

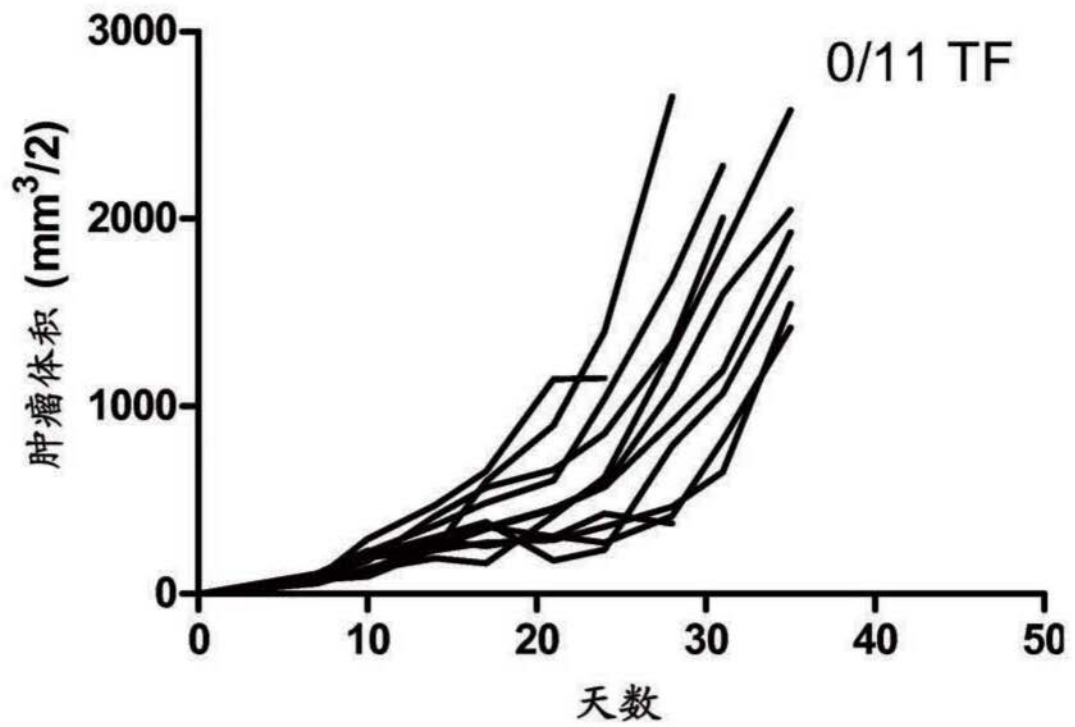
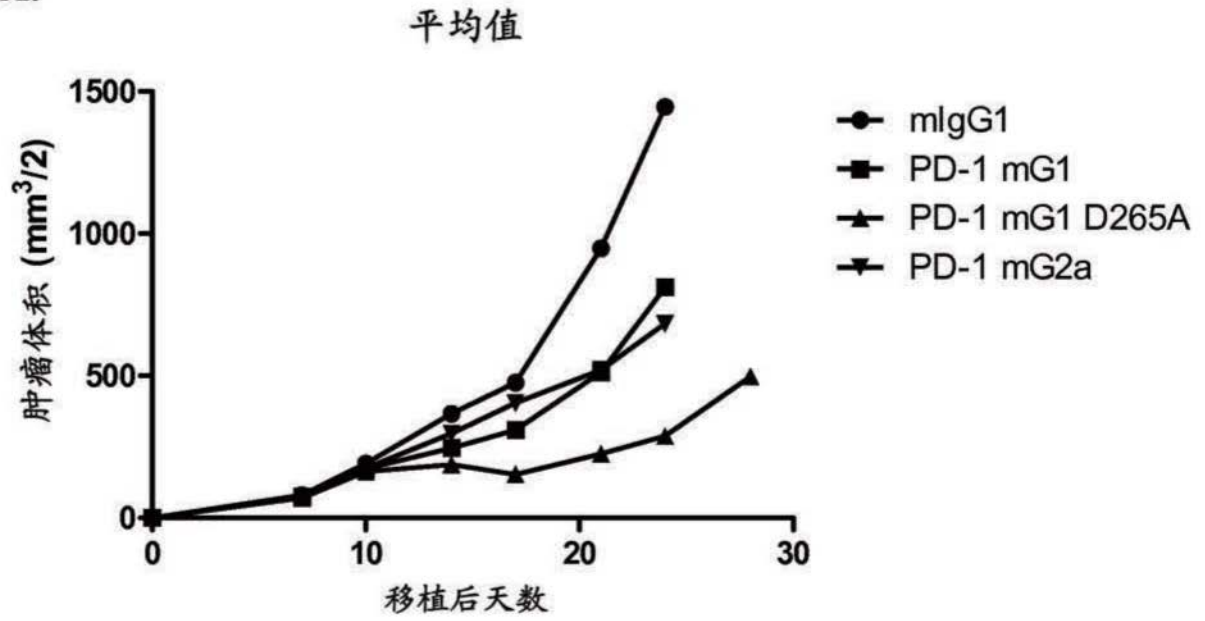


图32C和D

A.



B.

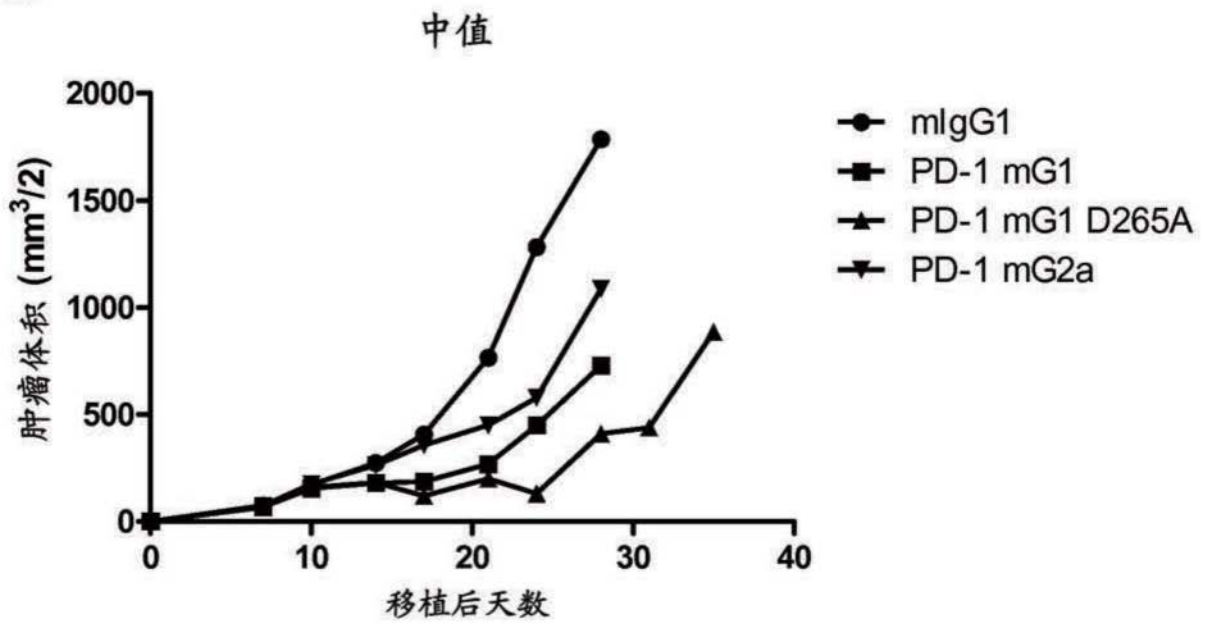


图33A和B

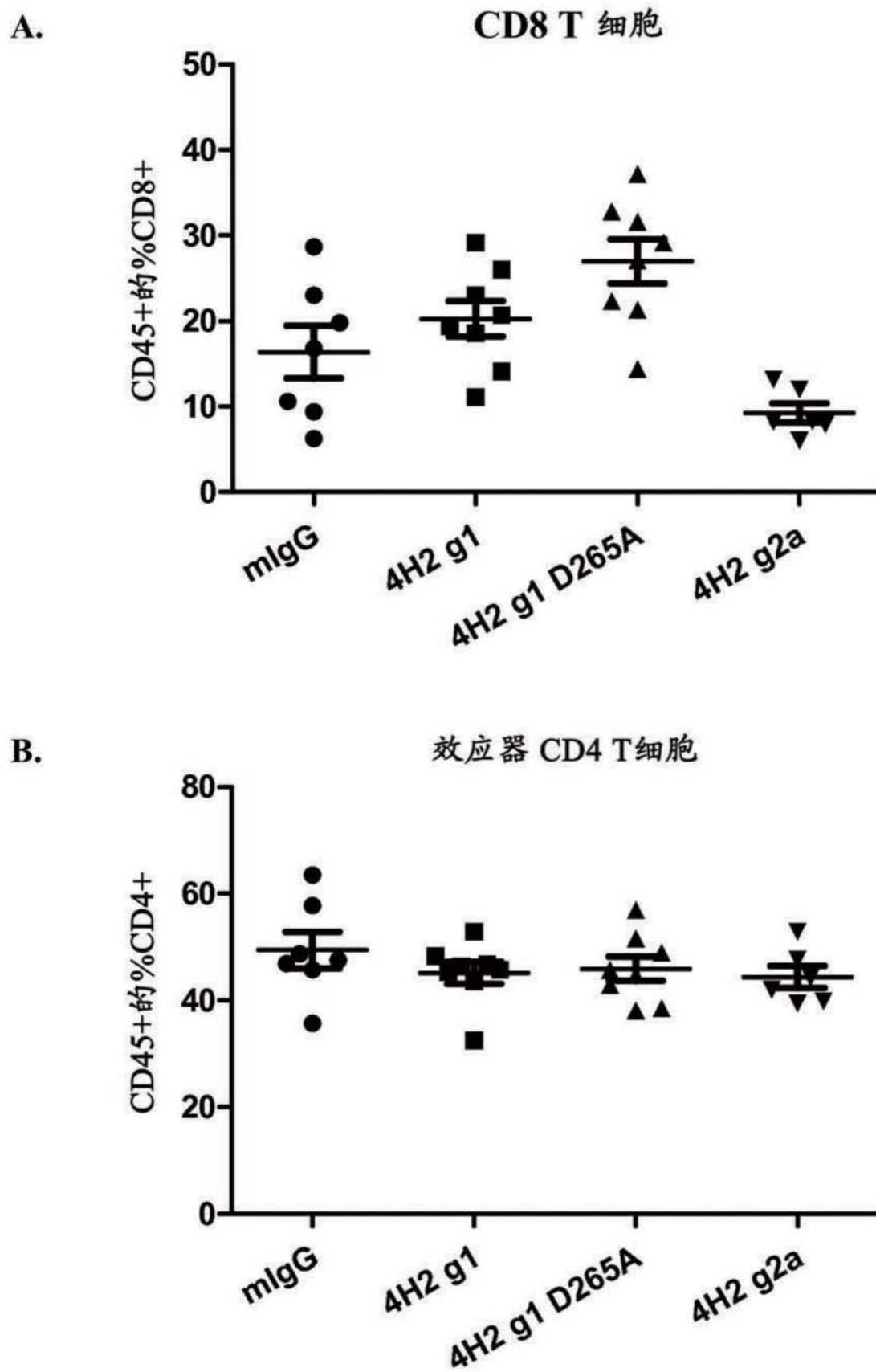


图34A和B

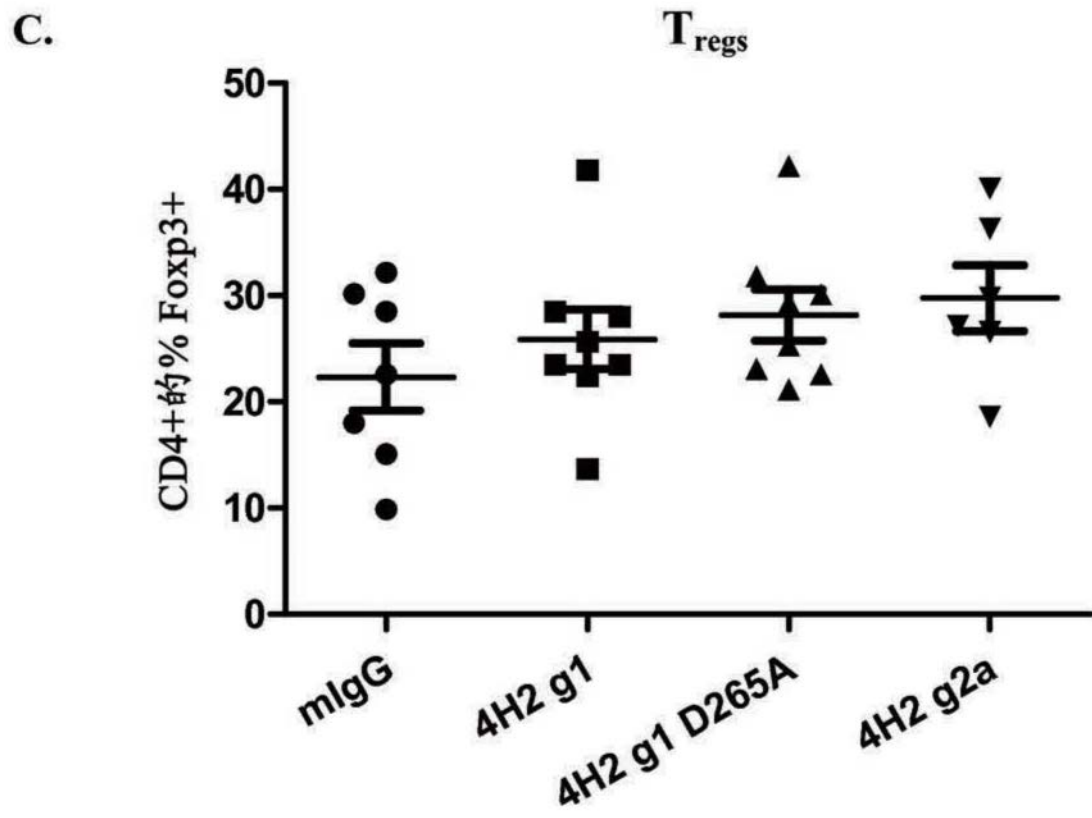


图34C

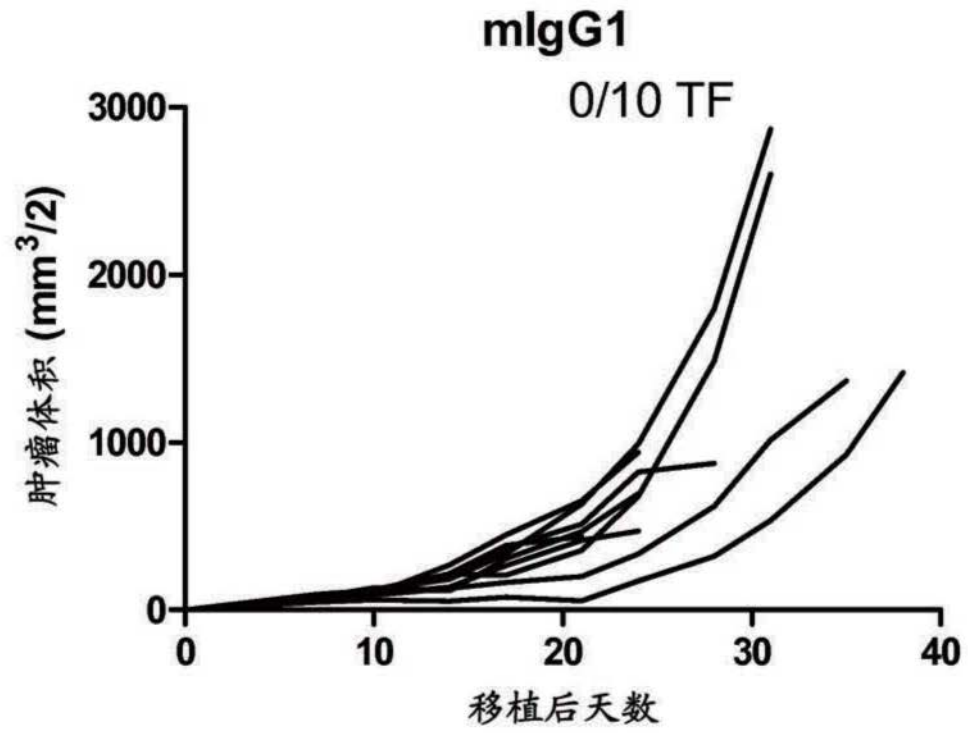
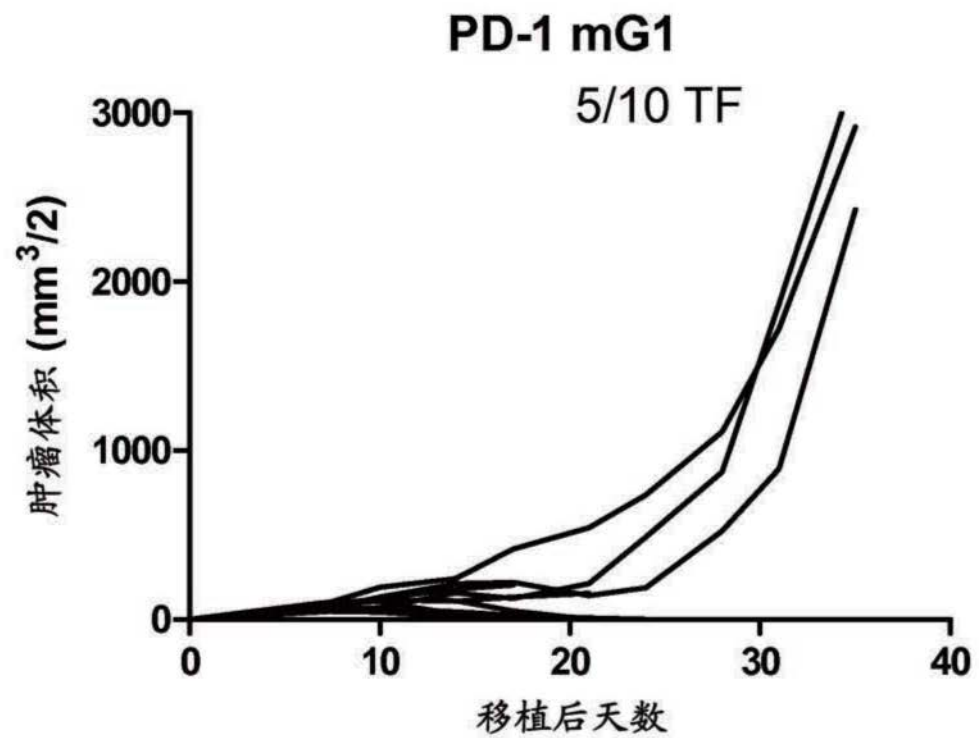
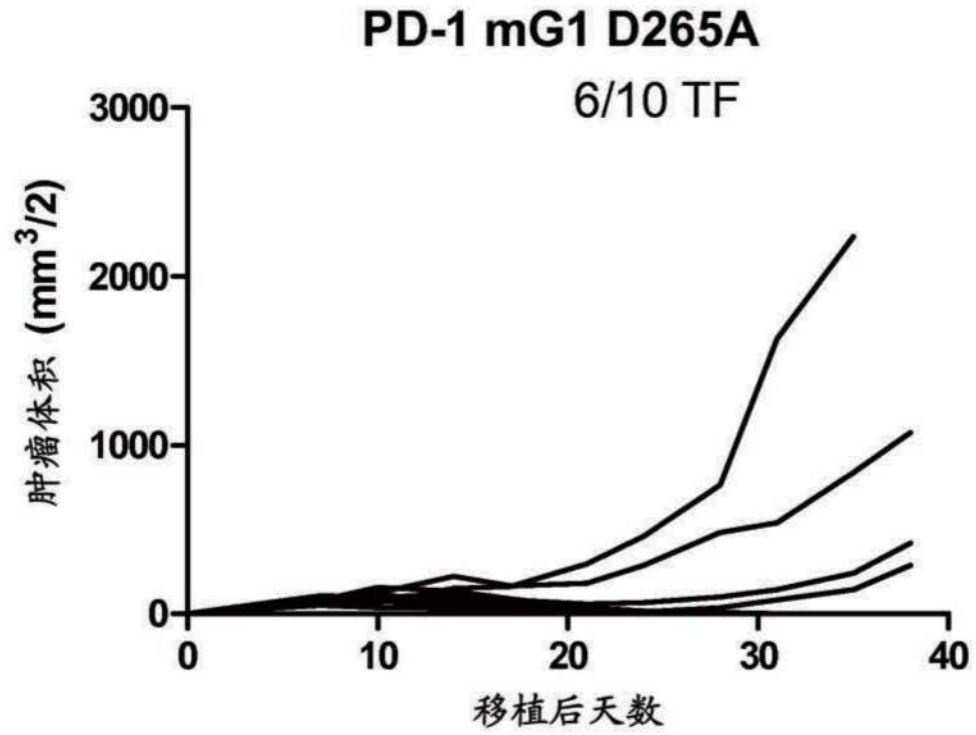
A.**B.**

图35A和B

C.



D.

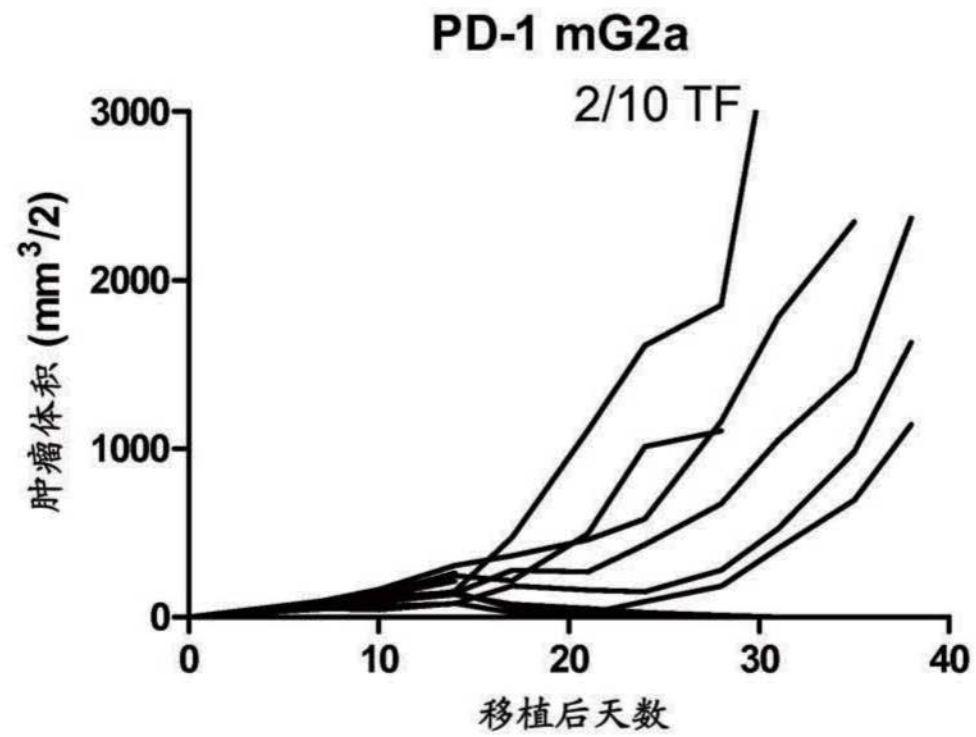
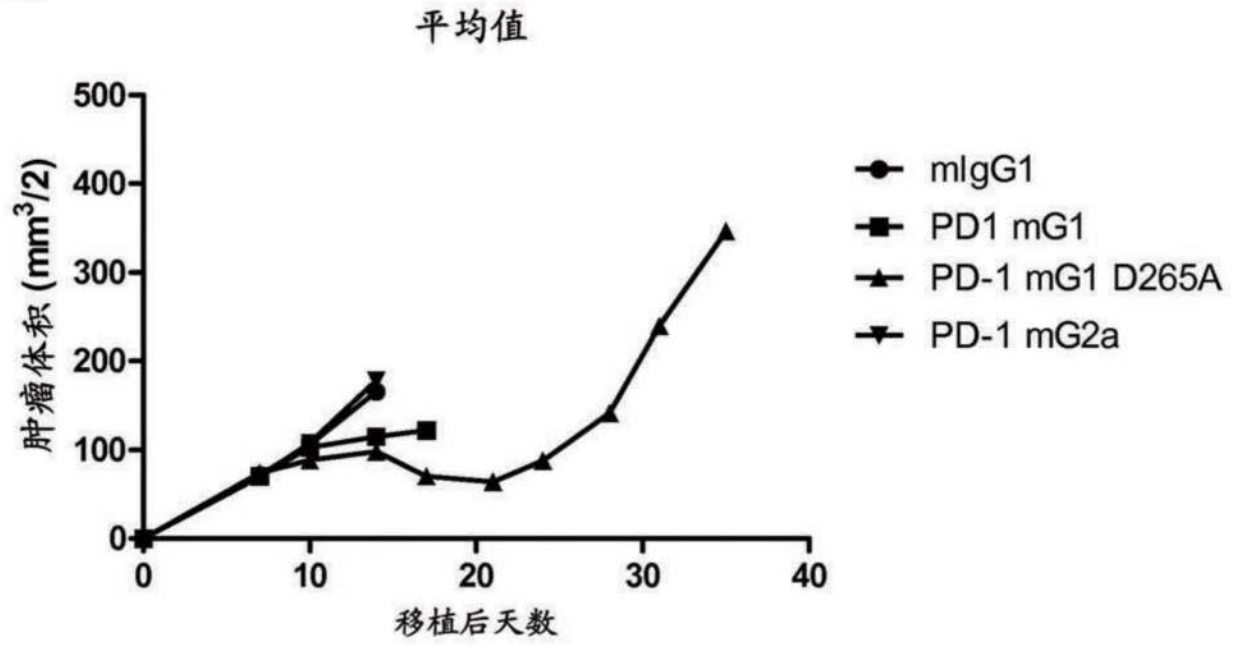


图35C和D

A.



B.

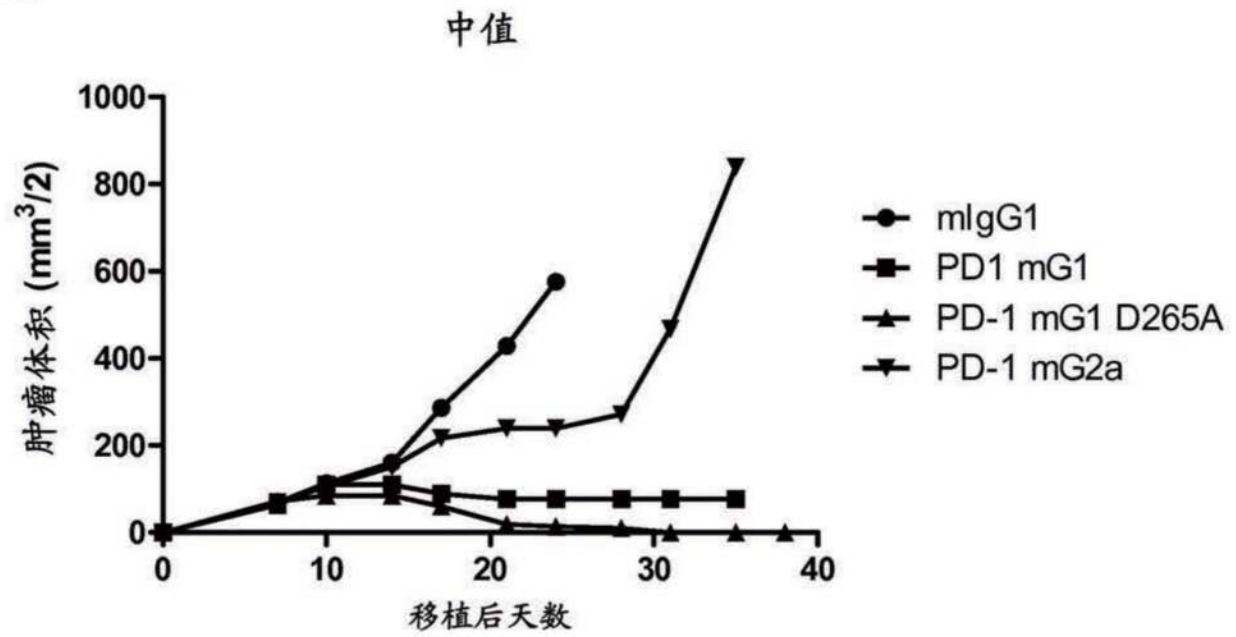


图36A和B