

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880017793.0

[51] Int. Cl.

*C07K 16/28 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2010 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 101679522A

[22] 申请日 2008.3.28

[21] 申请号 200880017793.0

[30] 优先权

[32] 2007. 3.28 [33] US [31] 60/908,645

[86] 国际申请 PCT/US2008/058744 2008.3.28

[87] 国际公布 WO2008/119071 英 2008.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2009.11.27

[71] 申请人 拜奥根 IDEC 公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 K·哈利哈兰 S·赫 S·坦格里  
T·云 A·莫里纳

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所  
代理人 罗菊华

权利要求书 9 页 说明书 33 页 附图 5 页

[54] 发明名称

肿瘤微环境的调控

[57] 摘要

提供了包括靶向 CD80 的治疗剂的组合物和使用这些组合物的方法，以治疗疾病或病症，在所述疾病或病症中表达 CD80 的细胞或调节 T 细胞的功能促成或加重相关的病理学。

1. 一种治疗患有恶性肿瘤的受治疗者的方法，所述恶性肿瘤包括恶性和非恶性细胞的肿瘤微环境，其中调节 T 细胞的功能促成或加重所述恶性肿瘤，所述方法包括对所述受治疗者施用治疗有效量的靶向 CD80 的治疗剂。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述疾病是血液的恶性肿瘤或非血液的恶性肿瘤。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述恶性肿瘤是血液的恶性肿瘤。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其中所述血液的恶性肿瘤是淋巴瘤。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述淋巴瘤是 B 细胞淋巴瘤。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述 B 细胞淋巴瘤是霍奇金氏病。

7. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述恶性肿瘤是非血液的恶性肿瘤。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其中所述非血液的恶性肿瘤是乳腺、结肠、直肠、肺、口咽、下咽、食道、胃、胰腺、肝脏、胆囊、胆管、小肠、包括肾、膀胱和泌尿道上皮的泌尿道、女性生殖道、子宫颈、子宫、卵巢、男性生殖道、前列腺、精囊、睾丸、内分泌腺、甲状腺、肾上腺、垂体腺、皮肤、骨、软组织、血管、脑、神经、眼、脑膜的癌症。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述靶向 CD80 的治疗剂是抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段是嵌合的、人源化的或人抗体。

11. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述抗 CD80 抗体与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体结合的 CD80 表位结合。

12. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述抗 CD80 抗体或其片段与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体竞争结合 CD80。

13. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括来源于 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区的可变区。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区。

15. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的互补决定区 (CDR)。

16. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体是加利昔单抗。

17. 如权利要求 1 所述的方法, 其中调节 T 细胞、Th2 辅助细胞或调节 T 细胞和 Th2 细胞二者的激活被抑制。

18. 如权利要求 1 所述的方法, 其中调节 T 细胞、Th2 辅助细胞或调节 T 细胞和 Th2 细胞二者的增殖被抑制。

19. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述靶向 CD80 的治疗剂阻断 CD80/CD28 信号转导而不阻断 CD80/CTLA4 信号转导。

20. 如权利要求 2 所述的方法, 其中所述肿瘤微环境中的一种或多种炎性细胞因子的产生被减少。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其中所述一种或多种炎性细胞因子选自由白细胞介素-2、白细胞介素-4、白细胞介素-10、白细胞介素-12、转化生长因子  $\beta$  和干扰素- $\gamma$  组成的组。

22. 如权利要求 2 所述的方法, 其中所述肿瘤微环境中的非恶性的表达 CD80 的细胞被减少。

23. 如权利要求 22 所述的方法, 其中所述表达 CD80 的细胞是抗原呈递细胞、源自骨髓的单核细胞或表达 Tie-2 的单核细胞。

24. 如权利要求 2 所述的方法, 其中经由所述肿瘤微环境的非恶性细胞的一种或多种恶性细胞存活信号的产生被减少。

25. 如权利要求 24 所述的方法, 其中所述一种或多种存活信号选自由 CD40/CD40L 信号转导、白细胞介素-1 或白细胞介素-6 组成的组。

26. 如权利要求 2 所述的方法, 其中对所述恶性肿瘤的免疫力在所述

受治疗者中被提高。

27. 如权利要求 2 所述的方法, 其还包括向所述受治疗者施用抗癌剂, 其中所述靶向 CD80 的治疗剂和所述抗癌剂同时地或以任何顺序连续地施用。

28. 如权利要求 27 所述的方法, 其中第二治疗剂选自细胞毒素、放射性同位素、化疗剂、免疫调控或免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促凋亡剂、细胞抑制和细胞溶解酶(例如 RNA 酶)、酶抑制剂(例如蛋白酶体抑制剂)和肿瘤疫苗组成的组。

29. 一种提高受治疗者癌症免疫力的方法, 其包括向所述受治疗者施用治疗有效量的靶向 CD80 的治疗剂。

30. 一种抑制受治疗者肿瘤微环境中调节 T 细胞和 Th2 辅助细胞激活的方法, 其包括向所述受治疗者施用治疗有效量的靶向 CD80 的治疗剂。

31. 如权利要求 30 所述的方法, 其中所述肿瘤微环境包括血液的或非血液的恶性肿瘤的恶性细胞。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 其中所述恶性细胞是血液的恶性肿瘤的细胞。

33. 如权利要求 32 所述的方法, 其中所述血液的恶性肿瘤是淋巴瘤。

34. 如权利要求 33 所述的方法, 其中所述淋巴瘤是 B 细胞淋巴瘤。

35. 如权利要求 34 所述的方法, 其中所述 B 细胞淋巴瘤是霍奇金氏病。

36. 如权利要求 30 所述的方法, 其中所述恶性细胞是非血液的恶性肿瘤的细胞。

37. 如权利要求 36 所述的方法, 其中所述非血液的恶性肿瘤是乳腺、结肠、直肠、肺、口咽、下咽、食道、胃、胰腺、肝脏、胆囊、胆管、小肠、包括肾、膀胱和泌尿道上皮的泌尿道、女性生殖道、子宫颈、子宫、卵巢、男性生殖道、前列腺、精囊、睾丸、内分泌腺、甲状腺、肾上腺、垂体腺、皮肤、骨、软组织、血管、脑、神经、眼、脑膜的癌症。

38. 如权利要求 30 所述的方法, 其中所述靶向 CD80 的治疗剂是抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段。

39. 如权利要求 38 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段是嵌合的、人源化的或人抗体。

40. 如权利要求 38 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体结合的 CD80 表位结合。

41. 如权利要求 38 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体或其片段与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体竞争结合 CD80。

42. 如权利要求 38 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括来源于 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区的可变区。

43. 如权利要求 42 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区。

44. 如权利要求 38 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的互补决定区 (CDR)。

45. 如权利要求 44 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体是加利昔单抗。

46. 如权利要求 30 所述的方法, 借此所述肿瘤微环境中的一种或多种炎性细胞因子的产生被减少。

47. 如权利要求 46 所述的方法, 其中所述一种或多种炎性细胞因子选自由白细胞介素-2、白细胞介素-4、白细胞介素-10、白细胞介素-12、转化生长因子  $\beta$  和干扰素- $\gamma$  组成的组。

48. 如权利要求 30 所述的方法, 借此调节 T 细胞和 Th2 辅助细胞的增殖被减少。

49. 一种抑制受治疗者肿瘤微环境中一种或多种炎性细胞因子的产生的方法, 其包括向所述受治疗者施用治疗有效量的靶向 CD80 的治疗剂。

50. 如权利要求 49 所述的方法, 其中所述一种或多种炎性细胞因子选自由白细胞介素-2、白细胞介素-4、白细胞介素-10、白细胞介素-12、转化生长因子  $\beta$  和干扰素- $\gamma$  组成的组。

51. 如权利要求 49 所述的方法, 其中所述肿瘤微环境包括血液的或非血液的恶性肿瘤的恶性细胞。

52. 如权利要求 51 所述的方法, 其中所述恶性细胞是血液的恶性肿瘤的细胞。

53. 如权利要求 52 所述的方法, 其中所述血液的恶性肿瘤是淋巴瘤。

54. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述淋巴瘤是 B 细胞淋巴瘤。

55. 如权利要求 54 所述的方法, 其中所述 B 细胞淋巴瘤是霍奇金氏病。

56. 如权利要求 52 所述的方法, 其中所述恶性细胞是非血液的恶性肿瘤的细胞。

57. 如权利要求 56 所述的方法, 其中所述非血液的恶性肿瘤是乳腺、结肠、直肠、肺、口咽、下咽、食道、胃、胰腺、肝脏、胆囊、胆管、小肠、包括肾、膀胱和泌尿道上皮的泌尿道、女性生殖道、子宫颈、子宫、卵巢、男性生殖道、前列腺、精囊、睾丸、内分泌腺、甲状腺、肾上腺、垂体腺、皮肤、骨、软组织、血管、脑、神经、眼、脑膜的癌症。

58. 如权利要求 49 所述的方法, 其中所述靶向 CD80 的治疗剂是抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段。

59. 如权利要求 58 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段是嵌合的、人源化的或人抗体。

60. 如权利要求 58 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体结合的 CD80 表位结合。

61. 如权利要求 58 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体或其片段与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体竞争结合 CD80。

62. 如权利要求 58 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括来源于 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区的可变区。

63. 如权利要求 62 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区。

64. 如权利要求 58 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的互补决定区 (CDR)。

65. 如权利要求 64 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体是加利昔单抗。

66. 如权利要求 49 所述的方法, 其中所述肿瘤微环境中的非恶性的表达 CD80 的细胞被减少。

67. 如权利要求 49 所述的方法, 其中所述表达 CD80 的细胞是抗原呈递细胞、源自骨髓的单核细胞或表达 Tie-2 的单核细胞。

68. 一种使受治疗者肿瘤微环境中非恶性的表达 CD80 的细胞耗竭的方法, 其包括向所述受治疗者施用治疗有效量的靶向 CD80 的治疗剂。

69. 如权利要求 68 所述的方法, 其中所述表达 CD80 的细胞是抗原呈递细胞、源自骨髓的单核细胞或表达 Tie-2 的单核细胞。

70. 如权利要求 68 所述的方法, 其中所述肿瘤微环境包括血液的或非血液的恶性肿瘤的恶性细胞。

71. 如权利要求 70 所述的方法, 其中所述恶性细胞是血液的恶性肿瘤的细胞。

72. 如权利要求 71 所述的方法, 其中所述血液的恶性肿瘤是淋巴瘤。

73. 如权利要求 72 所述的方法, 其中所述淋巴瘤是 B 细胞淋巴瘤。

74. 如权利要求 73 所述的方法, 其中所述 B 细胞淋巴瘤是霍奇金氏病。

75. 如权利要求 68 所述的方法, 其中所述恶性细胞是非血液的恶性肿瘤的细胞。

76. 如权利要求 75 所述的方法, 其中所述非血液的恶性肿瘤是乳腺、结肠、直肠、肺、口咽、下咽、食道、胃、胰腺、肝脏、胆囊、胆管、小肠、包括肾、膀胱和泌尿道上皮的泌尿道、女性生殖道、子宫颈、子宫、卵巢、男性生殖道、前列腺、精囊、睾丸、内分泌腺、甲状腺、肾上腺、垂体腺、皮肤、骨、软组织、血管、脑、神经、眼、脑膜的癌症。

77. 如权利要求 68 所述的方法, 其中所述靶向 CD80 的治疗剂是抗

CD80 抗体或其 CD80 结合片段。

78. 如权利要求 77 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段是嵌合的、人源化的或人抗体。

79. 如权利要求 77 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体结合的 CD80 表位结合。

80. 如权利要求 77 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体或其片段与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体竞争结合 CD80。

81. 如权利要求 77 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括来源于 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区的可变区。

82. 如权利要求 81 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区。

83. 如权利要求 77 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的互补决定区 (CDR)。

84. 如权利要求 83 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体是加利昔单抗。

85. 如权利要求 68 所述的方法, 其中经由所述肿瘤微环境的非恶性细胞的一种或多种恶性细胞存活信号的产生被减少。

86. 如权利要求 85 所述的方法, 其中所述一种或多种存活信号选自由 CD40/CD40L 信号转导、白细胞介素-1 或白细胞介素-6 组成的组。

87. 一种治疗患有恶性肿瘤的受治疗者的方法, 所述恶性肿瘤包括恶性和非恶性细胞的肿瘤微环境, 其中非恶性的表达 CD80 的细胞促成或加重所述恶性肿瘤, 所述方法包括对所述受治疗者施用治疗有效量的靶向 CD80 的治疗剂。

88. 如权利要求 87 所述的方法, 其中所述恶性肿瘤是血液的恶性肿瘤或非血液的恶性肿瘤。

89. 如权利要求 88 所述的方法, 其中所述恶性肿瘤是血液的恶性肿瘤。

90. 如权利要求 89 所述的方法, 其中所述血液的恶性肿瘤是淋巴瘤。

91. 如权利要求 90 所述的方法, 其中所述淋巴瘤是 B 细胞淋巴瘤。

92. 如权利要求 91 所述的方法, 其中所述 B 细胞淋巴瘤是霍奇金氏病。

93. 如权利要求 88 所述的方法, 其中所述恶性肿瘤是非血液的恶性肿瘤。

94. 如权利要求 93 所述的方法, 其中所述非血液的恶性肿瘤是乳腺、结肠、直肠、肺、口咽、下咽、食道、胃、胰腺、肝脏、胆囊、胆管、小肠、包括肾、膀胱和泌尿道上皮的泌尿道、女性生殖道、子宫颈、子宫、卵巢、男性生殖道、前列腺、精囊、睾丸、内分泌腺、甲状腺、肾上腺、垂体腺、皮肤、骨、软组织、血管、脑、神经、眼、脑膜的癌症。

95. 如权利要求 87 所述的方法, 其中所述表达 CD80 的细胞是巨噬细胞、树突细胞或源自骨髓的抑制性细胞。

96. 如权利要求 87 所述的方法, 其中所述靶向 CD80 的治疗剂是抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段。

97. 如权利要求 96 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段是嵌合的、人源化的或人抗体。

98. 如权利要求 96 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体结合的 CD80 表位结合。

99. 如权利要求 96 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体或其片段与 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体竞争结合 CD80。

100. 如权利要求 96 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括来源于 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区的可变区。

101. 如权利要求 100 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的可变区。

102. 如权利要求 96 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体包括 ATCC 保藏编号 HB-12119 所产生的抗体的互补决定区 (CDR)。

103. 如权利要求 96 所述的方法, 其中所述抗 CD80 抗体是加利昔单

抗。

104. 如权利要求 87 所述的方法, 其中所述肿瘤微环境中的一种或多种炎性细胞因子的产生被减少。

105. 如权利要求 104 所述的方法, 其中所述一种或多种炎性细胞因子选自由白细胞介素-2、白细胞介素-4、白细胞介素-10、白细胞介素-12、转化生长因子  $\beta$  和干扰素- $\gamma$  组成的组。

106. 如权利要求 87 所述的方法, 其中所述肿瘤微环境中的表达 CD80 的细胞被减少。

107. 如权利要求 87 所述的方法, 其中经由所述肿瘤微环境的非恶性细胞的一种或多种恶性细胞存活信号的产生被减少。

108. 如权利要求 107 所述的方法, 其中所述一种或多种存活信号选自由 CD40/CD40L 信号转导、白细胞介素-1 或白细胞介素-6 组成的组。

109. 如权利要求 87 所述的方法, 其中对所述恶性肿瘤的免疫力在所述受治疗者中被提高。

110. 如权利要求 87 所述的方法, 其还包括向所述受治疗者施用抗癌剂, 其中所述靶向 CD80 的治疗剂和所述抗癌剂同时地或以任何顺序连续地施用。

111. 如权利要求 110 所述的方法, 其中第二治疗剂选自由细胞毒素、放射性同位素、化疗剂、免疫调控或免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促凋亡剂、细胞抑制和细胞溶解酶(例如 RNA 酶)、酶抑制剂(例如蛋白酶体抑制剂)和肿瘤疫苗组成的组。

## 肿瘤微环境的调控

### 相关申请

要求2007年3月28日提交的第60/908,645号美国临时申请的优先权，其整体通过引用并入本文。

### 发明领域

本发明一般涉及基于在肿瘤微环境中对免疫细胞进行调控的癌症疗法。更特别地，本发明涉及靶向或改变非恶性细胞的功能的治疗剂，其中所述非恶性细胞促进肿瘤的生长和存活。

### 发明背景

先天性和适应性免疫系统的细胞随时准备对组织损伤和/或致病性感染快速应答。免疫和炎性应答的静止和激活之间的平衡是被高度调节的平衡，其控制抗病原体和抗肿瘤免疫应答。细胞表面和分泌的蛋白通过正和负反馈机制二者调节此平衡，其中所述反馈机制经设计用以确保适当的应答同时将有害的后果最小化。

在癌症的情况下，构成肿瘤的独特、非生理性的组织微环境包括恶性的和非恶性的细胞二者。当恶性细胞中的转化或致癌性改变清楚地构成未被调节的生长和肿瘤演进的基础时，非恶性细胞和由恶性和非恶性细胞的并存所致的肿瘤微环境在肿瘤起始作用中扮演关键角色。非恶性细胞和肿瘤微环境对于肿瘤的演进也是重要的，其保持支持进一步的遗传不稳定性和升高的突变频率的条件。参见例如 Reynolds 等, *Cancer Res.*, 1996, 56(24):5754-5757。特别地，正常运行以支持炎性和免疫应答的非恶性细胞在某些情况下是在能够例如通过产生直接或间接地支持肿瘤内恶性细胞

生长和生存力的介体，或通过产生直接或间接地抑制恶性细胞生长和生存力的介体，或通过抑制否则将阻碍肿瘤演进的应答而促成肿瘤演进的肿瘤微环境内的。肿瘤微环境还通过在肿瘤部位改变药物代谢或药物代谢动力学和/或促成抗药性的产生而影响肿瘤对治疗干预的接受性。

尽管有越来越多关于肿瘤微环境重要性的理解，但是靶向该生物学的治疗策略仍然是有限的。作为一个例子，已经用靶向骨髓基质的蛋白酶体抑制剂治疗多发性骨髓瘤患者，并因此减少骨转移。参见 Rajkumar 等, *J. Clin. Oncol.*, 2005, 20;23(3):630-399。另外的例子包括调控血管发生、低氧和趋化因子的药物和候选治疗剂。参见例如 Nagasawa 等, *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, 29(12):2335-2342; Giles 等, *Curr. Cancer Drug Targets*, 2006, 6(8):659-670。

鉴于对抗癌疗法的持续需要，本发明提供调控存在于肿瘤微环境中的非恶性细胞的功能从而破坏支持肿瘤生长和存活的条件的方法。特别地，所述被公开的方法包括施用靶向 CD80 的治疗剂以引起免疫调控作用，包括肿瘤微环境中存在的免疫调节或炎性细胞如抗原呈递细胞（例如巨噬细胞、树突细胞、B 细胞）或源自骨髓的抑制性细胞的耗竭，以及起到支持肿瘤演进的作用的 T 细胞亚群（例如调节 T 细胞和 Th2 辅助细胞）的抑制。所述被公开的方法还与另外的病症的治疗有关，在所述病症中调节 T 细胞的抑制促成病理状况的恶化。

### 发明概述

本发明提供在肿瘤微环境中调控非恶性细胞从而抑制肿瘤演进的方法。例如，本发明提供一种治疗患有恶性肿瘤的受治疗者的方法，所述恶性肿瘤包括恶性和非恶性细胞的肿瘤微环境，其中调节 T 细胞的功能促成或加重恶性肿瘤，所述方法包括对受治疗者施用治疗有效量的靶向 CD80 的治疗剂。在本发明另一个方面，提供治疗患有恶性肿瘤的受治疗者的方法，所述恶性肿瘤包括恶性和非恶性细胞的肿瘤微环境，其中非恶性的表达 CD80 的细胞促成或加重恶性肿瘤，所述方法包括对受治疗者施用治疗有效量的靶向 CD80 的治疗剂。如本文所述的靶向 CD80 的治疗剂还可被

用来抑制受治疗者肿瘤微环境中一种或多种炎性细胞因子的产生,和/或使受治疗者肿瘤微环境中非恶性的表达 CD80 的细胞耗竭。

### 附图简述

图 1A 描绘当与受辐射的 SB 淋巴瘤细胞在无处理 (对照, 菱形)、CTLA-4Ig (三角形)、抗 CD86 抗体 (灰色圆圈)、抗 CD80 抗体 (加利昔单抗, 空心圆圈) 或抗 CD86 和抗 CD80 抗体的组合 (黑色圆圈) 的存在下共培养时 CD4+CD25- T 细胞增殖的百分比。

图 1B 描绘当与 LPS 刺激的成熟树突细胞在无处理 (对照, 菱形)、CTLA-4Ig (三角形)、抗 CD86 抗体 (灰色圆圈)、抗 CD80 抗体 (加利昔单抗, 空心圆圈) 或抗 CD86 和抗 CD80 抗体的组合 (黑色圆圈) 的存在下共培养时 CD4+CD25- T 细胞增殖的百分比。

图 2A 描绘当与 LPS 刺激的成熟树突细胞在无处理 (对照, 菱形)、CTLA-4Ig (三角形)、抗 CD86 抗体 (灰色圆圈)、抗 CD80 抗体 (加利昔单抗, 空心圆圈) 或抗 CD86 和抗 CD80 抗体的组合 (黑色圆圈) 的存在下共培养时经由 CD4+CD25- T 细胞的 IFN- $\gamma$  的产生。

图 2B 描绘当与 LPS 刺激的成熟树突细胞在无处理 (对照, 菱形)、CTLA-4Ig (三角形)、抗 CD86 抗体 (灰色圆圈)、抗 CD80 抗体 (加利昔单抗, 空心圆圈) 或抗 CD86 和抗 CD80 抗体的组合 (黑色圆圈) 的存在下共培养时经由 CD4+CD25- T 细胞的白细胞介素-2 的产生。

图 3A 描绘当与受辐射的 SB 淋巴瘤细胞以 1:120 的 SB:T 比在无处理 (对照, 菱形)、人 IgG1 (同种型对照, 正方形)、CTLA-4Ig (三角形)、抗 CD86 抗体 (X)、抗 CD80 抗体 (加利昔单抗, 空心圆圈) 以及抗 CD86 和抗 CD80 抗体的组合 (黑色圆圈) 的存在下共培养时供体 202 的 CD4+CD25+ T 细胞的调节 T 细胞诱导的百分比。还显示的是当与受辐射的 SB 淋巴瘤细胞以 1:10 的 SB:T 比共培养 (加号) 以及不共培养即 CD4+CD25+ T 细胞单独培养 (长方形) 时供体 202 的 CD4+CD25+ T 细胞的调节 T 细胞诱导的百分比。

图 3B 描绘当与受辐射的 SB 淋巴瘤细胞以 1:160 的 SB:T 比在无处理 (对照, 菱形)、人 IgG1 (同种型对照, 正方形)、CTLA-4Ig (三角形)、抗 CD86 抗体 (X)、抗 CD80 抗体 (加利昔单抗, 空心圆圈) 以及抗 CD86 和抗 CD80 抗体的组合 (黑色圆圈) 的存在下共培养时供体 133 的 CD4+CD25+ T 细胞的调节 T 细胞诱导的百分比。还显示的是当与受辐射的 SB 淋巴瘤细胞以 1:10 的 SB:T 比共培养 (加号) 以及不共培养即 CD4+CD25+ T 细胞单独培养 (长方形) 时供体 202 的 CD4+CD25+ T 细胞的调节 T 细胞诱导的百分比。

图 4A-4F 描绘在纯化的人血清骨髓瘤 IgG1 (同种型对照)、抗 CD80 抗体 (加利昔单抗) 或 CTLA-4Ig 的存在下, 经由 CD14+ 单核细胞 (空心柱)、与 Raji 淋巴瘤细胞共培养的 CD14+ 单核细胞 (灰色柱)、与 CD14+ 单核细胞共培养的 CD4+ T 细胞 (阴影柱) 以及与 CD14+ 单核细胞和 Raji 淋巴瘤细胞共培养的 CD4+ T 细胞 (黑色柱) 的白细胞介素-8 (图 4A、4C 和 4E) 和白细胞介素-6 (图 4B、4D 和 4F) 的产生。细胞群体是从供体 A (图 4A-4B)、供体 B (图 4C-4D) 和供体 C (图 4E-4F) 分离的。

### 详述

本发明提供在肿瘤微环境中调控非恶性细胞的方法, 其中所述非恶性细胞正常起作用以调节炎症以及先天性和适应性免疫力, 而且直接或间接地支持肿瘤演进。被公开的方法对于提高癌症免疫力即癌症反应性 T 细胞的抗癌活性也是有用的。被公开的方法使用靶向 CD80 的治疗剂, 其在阻断 CD80 介导的 T 细胞功能调节或内环境稳定方面是有效的, 和/或使支持肿瘤生长、迁移和/或血管发生的表达 CD80 的非恶性细胞耗竭。在本发明的一个方面, 提供了通过对受治疗者施用治疗有效量的靶向 CD80 的治疗剂而治疗患有疾病或病症的受治疗者的方法, 所述疾病或病症中的调节 T 细胞的功能促成疾病病理学。代表性的适应症包括癌症, 其包括血液的以及非血液的恶性肿瘤。在本发明的其他方面, 提供了使用靶向 CD80 的治疗剂在受治疗者中提高癌症免疫力或降低肿瘤演进的免疫或炎性支持的方法, 此过程是通过以下实现的: 调控存在于肿瘤微环境中的免疫细胞,

例如降低存在于肿瘤微环境中的免疫调节或炎性细胞比如抗原呈递细胞（例如巨噬细胞、树突细胞、B 细胞）或源自骨髓的抑制性细胞（例如源自骨髓的单核细胞和表达 tie-2 的单核细胞）的数量，抑制起支持肿瘤演进作用的 T 细胞亚群（例如调节 T 细胞和 Th2 辅助 T 细胞），和/或抑制肿瘤微环境中一种或多种炎性细胞因子的产生。

### I. 肿瘤微环境

本发明基于对直接或间接地促成疾病发病或演进/持续的细胞的调控，其中调节 T 细胞的功能促成疾病。在本发明的一个方面，肿瘤微环境的非恶性细胞被调控以至于那些细胞对肿瘤演进的直接贡献被抑制，而且那些细胞支持调节 T 细胞功能的功能也被抑制。

肿瘤微环境的细胞包括恶性细胞以及支持它们生长和存活的非恶性细胞。所述非恶性细胞，也被称作基质细胞，占据或聚集在与恶性细胞相同的细胞空间中，或与恶性细胞相邻或接近的细胞空间中，其调控肿瘤细胞的生长或存活。肿瘤微环境的非恶性细胞包括成纤维细胞、肌成纤维细胞、神经胶质细胞、上皮细胞、脂肪细胞、脉管细胞（包括血液和淋巴脉管的内皮细胞和周细胞）、驻留型和/或募集型炎性和免疫（例如，巨噬细胞、树突细胞、骨髓抑制性细胞、粒细胞、淋巴细胞等）、能够产生或分化成上述非恶性细胞中的任一种的驻留型和/或募集型干细胞以及本领域已知的上述细胞的任何功能上不同的亚型。这些细胞活跃地参与肿瘤细胞的生长和转移。

在实行本文所公开的方法时，使用下述标准中的一个或多个来鉴定肿瘤微环境：(a) 包括与恶性细胞共享相同生理环境或直接相邻的非恶性细胞的区域；(b) 延伸的肿瘤区域；(c) 环绕或临近于肿瘤的炎症区域；(d) 调节 T 细胞增殖数目或速率被升高的区域；和 (e) 巨噬细胞、树突细胞或源自骨髓的抑制性细胞被升高的区域。在非实体瘤类型的情况中，肿瘤微环境还可由恶性细胞之间以及恶性细胞和任何相邻或附近的非恶性细胞之间的局部细胞-细胞相互作用而确定。这种相互作用可包括例如细胞粘附事件和/或肿瘤微环境中经由一种细胞（恶性或非恶性）所产生的可溶介体对另一种细胞（恶性或非恶性）的旁分泌作用。

当评估上述标准中任一个的水平例如炎症水平或调节 T 细胞的数目时,所述水平是相对于合理的对照水平被评估的。例如,相关的对照可包括从患肿瘤的受治疗者身上和从所述受治疗者对侧相同组织和类似区域取出的样品。作为另一个对照,可以从处于相似状态(年龄、性别、整体的健康等)的无肿瘤的受治疗者的相同组织和类似区域取出样品。就治疗依赖性应答的评估来说,还可通过治疗前对照样品的平行分析来确定治疗后的作用。

当对定义肿瘤微环境的上述标准中的任一种的水平进行定量的时候,在相对于对照水平评估时的差别被鉴定为这样的差别:至少约两倍于对照水平或更少,或至少约五倍于对照水平或更少,或至少约十倍于对照水平或更少,至少约二十倍于对照水平或更少,至少约五十倍于对照水平或更少,或至少约一百倍于对照水平或更少。上述标准中的差别当相对于对照水平被评估时,也可被视为与对照水平相比至少 20%的差别,例如至少 30%,或至少 40%,或至少 50%,或至少 60%,或至少 70%,或至少 80%,或至少 90%,或至少 100%,或更多。例如,升高的调节 T 细胞的数目可相对于无肿瘤患者的调节 T 细胞的已知生理水平被评估。基于上述,本领域普通技术人员(例如肿瘤学临床医师)将能够容易地使用上述标准和适当对照的选择来鉴定构成患者肿瘤微环境的区域。受治疗者还可有一个或多个肿瘤微环境,其中每个与可区分的肿瘤有关。肿瘤微环境的特性可相对于肿瘤的组织部位、肿瘤级别、肿瘤阶段、肿瘤形态或分子表型等而改变。肿瘤微环境也可随肿瘤演进而改变。

调节 T 细胞是肿瘤微环境的非恶性细胞之一,它在许多肿瘤中以较高的频率被观察到,其中所述肿瘤包括霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(Shi 等, *Ai Zheng.*, 2004, 23(5):597-601(只有摘要))、恶性黑素瘤(Viguier 等, *J. Immunol.*, 2004, 173(2):1444-53; Javia 等, *J. Immunother.*, 2003, 26(1):85-93)和卵巢(Woo 等, *Cancer Res.*, 2001, 61(12):4766-72)、胃肠道(Ichihara 等, *Clin Cancer Res.*, 2003, 9(12):4404-4408; Sasada 等, *Cancer*, 2003, 98(5):1089-1099)、乳腺(Liyanage 等, *J Immunol.*, 2002, 169(5):2756-2761)、肺(Woo 等, *Cancer Res.*, 2001, 61(12):4766-72)和胰

腺 ( Liyanage 等, *J Immunol.*, 2002, 169(5):2756-2761 ) 的癌症。调节 T 细胞响应由肿瘤细胞分泌的趋化因子而募集到肿瘤部位。参见例如, Curiel 等, *Nat. Med.*, 2004, 10:942-949。调节 T 细胞数目的增加还可与预后不良相关 ( Curiel 等, *Nat. Med.*, 2004, 10:942-949; Sasada 等, *Cancer*, 2003, 98:1089-1099 )。相反地, 在化学疗法之后观察到调节 T 细胞减少 ( Beyer 等, *Blood*, 2005, 106:2018-2025 )。

据显示, 与肿瘤相联系的巨噬细胞的存在还与肿瘤预后不良和存活相关, 其中所述肿瘤例如乳腺、卵巢、前列腺、子宫颈和肺的癌症 ( Pollard, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, 4:71-77 )。相似的相关性在患有滤泡性淋巴瘤的患者中被观察到 ( Farinha 等, *Blood*, 2005, 15:2169-2174 )。相似地, 源自骨髓的抑制性细胞据说在调节免疫细胞介导的应答中起作用。

被公开的方法作为治疗干预的一个机会靶向肿瘤微环境的非恶性免疫细胞。在本发明的一个方面, 提供了抑制调节 T 细胞和 Th2 辅助 T 细胞功能的方法。这种抑制构成了 T 细胞数目的减少和/或 T 细胞抑制抗肿瘤应答的功能化能力的破坏。例如, 调节 T 细胞的相关功能包括产生促炎性细胞因子例如白细胞介素-2、白细胞介素-4、白细胞介素-10、白细胞介素-12、转化生长因子  $\beta$  和干扰素- $\gamma$ 。参见例如, Mocellin 等, *J. Immunother.*, 2001, 24(5):3920407。产生的炎性肿瘤微环境吸引巨噬细胞, 而巨噬细胞反过来提供带有营养或存活信号的恶性细胞, 促进血管发生, 改变抗原呈递细胞和树突细胞的表型和功能, 扩增调节 T 细胞, 这些共同地导致免疫抑制的细胞环境。Th2 辅助细胞的相关功能相似地包括促进相联系的恶性细胞存活的信号的产生, 其中所述信号例如 CD40/CD40L 信号转导、白细胞介素-1 或白细胞介素-6。Th2 辅助细胞还通过分泌趋化因子而促成炎性肿瘤微环境, 其中所述趋化因子募集抗原呈递细胞 ( 包括巨噬细胞 )。

调节 T 细胞可被鉴定为富集于  $CD4^+CD25^{hi}$  群体中, 而且可被进一步表征为表达细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 ( CTLA4 )、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关基因 ( GITR )、CC 趋化因子受体 4 ( CCR4 )、叉头盒 p3 ( FOXP3 )、CC 趋化因子受体 6 ( CCR6 ) 和/或 CD30。此外, 调节 T 细胞可以是  $CD62L^{hi}$ 、 $CD45RB^{lo}$ 、 $CD45RO^{hi}$  和/或  $CD45RA^-$ 。参见

McHugh 等, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, 110:693-701; Hori 等, *Science*, 2003, 299:1057-1061; Iellem 等, *J. Exp. Med.*, 2001, 194:847-853; 第 2006/0063256 号美国专利申请公布。

辅助 T 细胞包括 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Th1 细胞和 Th2 细胞。Th1 细胞促进细胞免疫力, 即诱导抗原特异性的 CD8<sup>+</sup>细胞毒性 T 细胞。Th2 辅助 T 细胞可抑制 Th1 细胞介导的细胞免疫力, 例如, 通过分泌抑制 Th1 细胞产生干扰素- $\gamma$  的细胞因子 (Fiorentino 等, *J. Exp. Med.*, 1989, 170: 2081-2095)。

CD80-CD28 信号转导是调节 T 细胞和 Th2 辅助细胞分化和维持的主要共调节途径, 而且在不存在 CD80 共刺激时 T 细胞显著地减少。参见 Zheng 等, *J. Immunol.*, 2004, 172:2778-2784; Liang 等, *J. Exp. Med.*, 2005, 201: 127-137; 和 Tang 等, *J. Immunol.*, 2003, 171:3348-3352。如本文所述, 有用的靶向 CD80 的治疗剂包括这样的分子, 其阻断 CD80/CD28 信号转导从而减弱调节 T 细胞和 Th2 辅助 T 细胞的免疫抑制作用, 然后允许肿瘤反应性 T 细胞介导抗肿瘤活性。对 CD80/CD28 信号转导的选择性阻断, 即不存在 CD80/CTLA4 信号转导的阻断, 可提供改善的治疗效力, 假定未破坏 CD80/CTLA4 信号转导对免疫应答的负调控。

调节 T 细胞和 Th2 辅助 T 细胞的激活产生吸引巨噬细胞的炎性肿瘤微环境。所述巨噬细胞通过分泌细胞因子例如 IL-1 和 IL-6 促进恶性细胞的存活。巨噬细胞还分泌趋化因子以将另外的免疫效应细胞募集到肿瘤微环境, 所述趋化因子例如吸引嗜中性粒细胞的 IL-8 和吸引白细胞的 MIP-1 $\alpha$ 。巨噬细胞还分泌血管生成因子, 其促成肿瘤的血管形成。

靶向 CD80 的治疗剂还可直接结合肿瘤微环境的抗原呈递细胞上表达的 CD80。因此, 它们可以通过诱导抗体依赖的细胞毒性 (ADCC)、补体依赖的细胞毒性和/或凋亡而被耗竭。评估这些活性的相关方法是本领域众所周知的。

评估肿瘤微环境的非恶性免疫细胞的变化代表性方法在本文下面关于治疗有效剂量的确定中和实施例中被描述。

## II. 靶向 CD80 的治疗剂

本发明靶向 CD80 的治疗剂包括阻断肿瘤微环境中调节 T 细胞和 Th2 辅助细胞的激活和/或使肿瘤微环境中表达 CD80 的细胞耗竭的分子。耗竭可通过任何诱导细胞破坏的机制发生，其包括凋亡的诱导、细胞生长的抑制或减少和/或抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。因此，靶向 CD80 的治疗剂包括 CD80 拮抗剂以及与细胞毒性剂耦合的 CD80 结合分子。本发明中有用的靶向 CD80 的治疗剂包括具有上述特性的任何合成的、重组的或天然的产物或组合物。代表性的剂包括但不限于肽、蛋白、核酸(例如适体)、小分子(例如化合物)、抗体和核酸-蛋白融合体。

对于结合 CD80 的耦合物，细胞毒性剂可以与结合 CD80 的分子直接或间接相连或结合，例如，使用连接体分子或生物的或合成的基质。细胞毒性剂可与结合 CD80 的分子共价结合，其使用本领域众所周知的技术例如使用异双功能交联试剂。所述连接体分子可以是可裂解的连接体，其促进细胞中细胞毒性药物的释放。例如，可以使用酸性易变连接体、肽酶敏感的连接体、二甲基连接体或含二硫化物的连接体。

有用的细胞毒性剂在本领域是已知的，其包括本文下面所述的任何剂，当与靶向 CD80 的治疗剂如放射性同位素、化疗剂和毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素或其片段)联合时更有用。另外的代表性细胞毒性剂包括细胞抑制剂、烷化剂、抗代谢剂、抗增殖剂、微管蛋白结合剂、激素和激素拮抗剂以及诸如此类。另外的代表性细胞毒素包括抗肿瘤抗生素的烯二炔家族的成员或衍生物，其包括刺孢霉素、埃斯培拉霉素或达内霉素。

## II.A. 抗 CD80 抗体

本发明的靶向 CD80 的治疗剂包括抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段。天然存在的抗体包括两条相同的多肽轻链(每条具有大约 23,000 道尔顿的分子量)以及两条相同的重链(每条具有 53,000-70,000 道尔顿的分子量)。所述四条链联合而形成三个球状结构域，其通过柔性铰链区而连接。轻链( $V_L$ )和重链( $V_H$ )链二者的可变结构域决定抗原的识别和特异性。轻链( $C_L$ )和重链( $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$  或  $C_{H3}$ )的恒定结构域使之具有例如 Fc 受体结合、补体结合以及诸如此类的生物特性。本发明中有用的抗 CD80 抗体可包括多

克隆抗体、单克隆抗体 (mAb)、人源化或嵌合的抗体、含有人恒定区和灵长类(食蟹猕猴(*cynomolgus macaque*))可变区的 PRIMATIZED®抗体、人单克隆抗体、单链抗体、Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、由 Fab 表达库产生的片段、抗独特型(抗 Id)抗体和上述任一个的表位结合片段。这种抗体可具有天然存在的抗体、其多价体形式或其片段的结构。

作为特定抗原的抗体的同源群体的单克隆抗体可以由任何技术获得,所述技术通过培养连续细胞系提供抗体分子的产生。这些包括但不限于 Kohler 和 Milstein, *Nature*, 1975, 256:495-497 和第 4,376,110 号美国专利中的杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术(Kosbor 等, *Immunology Today*, 1983, 4:72; Cote 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80:2026-2030) 和 EBV 杂交瘤技术(Cole 等, 在 *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (《单克隆抗体和癌症疗法》)中, 1995, Alan R. Liss, Inc., New York, 77-96 页)。这种抗体可属于任何免疫球蛋白类及其任何亚类,其中所述免疫球蛋白类包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD。产生单克隆抗体的杂交瘤可以在体外或体内被培养。

嵌合的抗体是其不同部分来源于不同动物物种的分子,例如具有来源于鼠 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些。嵌合的抗体可通过将来自具有适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因和来自具有适当生物活性的人抗体分子的基因剪接在一起而产生(Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81:6851-6855; Takeda 等, *Nature*, 1985, 314:452-454)。

人源化抗体是一种嵌合的抗体,其中负责抗原结合的可变区残基(即互补决定区的残基和参与抗原结合的任何其他残基)来源于非人物种,而余下的可变区残基(即框架区的残基)和恒定区至少部分地来源于人抗体序列。人源化抗体可变区和恒定区的残基还可来源于非人来源。人源化抗体的可变区还被描述为人源化的(即人源化的轻或重链可变区)。非人物种通常是用于以抗原免疫接种的物种,例如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类或其他非人哺乳动物物种。可使用多种方法中的任一种来制备人源化抗体,所述方法包括如下所述的镶饰(veneer)、互补决定区(CDR)的移植、缩短的 CDR 的移植、特异性决定区(SDR)的移植和 Frankenstein 组合。

这些普通步骤可以与标准的致突变作用和合成技术结合以产生具有任何期望序列的 CD80 抗体。

本发明所述抗体还可以是人单克隆抗体，例如由永生化人细胞、SCID-hu 小鼠或其他能够产生人抗体的非人动物所产生的那些。人抗体还可从抗体噬菌体库中被分离，例如如 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 1991, 222:581-597 所述。链改组和重组技术可被用来生产具有增加的抗体多样性的噬菌体库，例如包括具有增加的结合亲和力的抗体的库。参见 Marks 等, *Biotechnology*, 1992, 10:779-783 和 Waterhouse 等, *Nuc. Acids Res.*, 1993, 21:2265-2266。

本发明所述抗体还可包括单链抗体，其通常通过经由氨基酸桥连接 Fv 区的重链和轻链片段产生单链多肽而形成。参见例如第 4,946,778 号美国专利; Bird, *Science*, 1988, 242:423-426; Huston 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85:5879-83 和 Ward 等, *Nature*, 1989, 334:544-546。

本发明中有用的抗体还包括非岩藻糖化的抗体。这种抗体包括 Fc 区和结合至所述 Fc 区的复合的 N-糖苷连接的糖链，其中在所述结合至所述 Fc 区的复合的 N-糖苷连接的糖链的整体中，岩藻糖未结合至所述糖链的还原端的 N-乙酰葡萄糖胺的糖链的比例至少是 20%。与对照岩藻糖化的抗体相比，所述非岩藻糖化的抗体具有增强的 Fc 受体结合以及增强的效应功能。参见 2007 年 3 月 28 日提交的第 60/908,643 号美国临时申请，其整体通过引用并入本文。产生非岩藻糖化的抗体的代表性方法在实施例 1 中被阐述。还参见第 2004/0093621 号美国专利公布、第 6,946,292 号美国专利、第 WO 2006/089232 号 PCT 国际公布和第 1176195 号欧洲公布申请，其中每个也整体通过引用并入本文。

本文所述识别特异性抗原或表面受体的抗体片段可通过已知技术产生。例如，这种片段包括 F(ab')<sub>2</sub> 片段或 Fc 区（其可通过抗体分子的胃蛋白酶消化而产生）和 Fab 片段（其可通过还原 F(ab')<sub>2</sub> 片段的二硫键而产生）。可选择地，可构建 Fab 表达库（Huse 等, *Science*, 1989, 246:1275-1281）以允许具有期望特异性的单克隆 Fab 片段的快速和简单鉴定。

本文所述抗体或抗体片段对抗原的特异性结合指的是在包括多种不

同抗原的异质样品中抗体对抗原的优先结合。基本上缺乏结合描述的是抗体对对照蛋白或样品的结合水平，即表征为非特异性或背景结合的结合水平。抗体与抗原的结合是特异性的，如果结合亲和力至少是约  $10^{-7}$  M 或更高，例如至少约  $10^{-8}$  M 或更高，包括至少约  $10^{-9}$  M 或更高，至少约  $10^{-11}$  M 或更高，或至少约  $10^{-12}$  M 或更高。

本发明中有用的代表性抗 CD80 抗体是加利昔单抗，它可选地被称作 PRIMATIZED® 16C10、IDEC-114 或 PRIMATIZED® 抗体，其具有由美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 登录号为 HB-12119 的杂交瘤所产生的抗体产生的可变区。依据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约 (“布达佩斯条约”) 的条款，于 1996 年 5 月 29 日将 HB-12119 杂交瘤保藏在 ATCC，其目前位于弗吉尼亚州马纳萨斯大学大道 10801 号 (邮编 20110-2209) (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)。加利昔单抗是含有人恒定区和灵长类 (食蟹猕猴) 可变区的 PRIMATIZED® 抗 CD80 免疫球蛋白 (Ig) G1  $\lambda$  单克隆抗体。加利昔单抗和本发明中有用的其他抗 CD80 抗体的氨基酸和核酸序列被公开在第 6,113,898 号美国专利中，其整体通过引用被并入。

另外的代表性抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段包括在结合抑制测定中与 16C10 或加利昔单抗竞争结合 CD80 的抗体和其 CD80 结合片段。这种结合抑制测定是技术人员所熟知的。本发明还包括可以结合至与 16C10 或加利昔单抗相同的 CD80 表位的抗 CD80 抗体和 CD80 结合片段。与加利昔单抗和其他抗 CD80 抗体竞争结合 CD80 的抗 CD80 抗体，例如可以结合至与加利昔单抗相同的表位的抗体，在第 7,153,508 号美国专利中被公开，其整体通过引用被并入。确定抗体结合特异性的方法可由免疫沉淀或体外测定例如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 而确定，这些都是技术人员所熟知的。

本发明还包括那样的抗 CD80 抗体或其 CD80 结合片段——其包括加利昔单抗的可变区或来源于加利昔单抗可变区的可变区，例如通过引入一个或多个氨基酸添加、置换或其他突变。本发明中有用的另外的抗 CD80 抗体和 CD80 结合片段包括具有含加利昔单抗的抗原结合结构域即加利昔

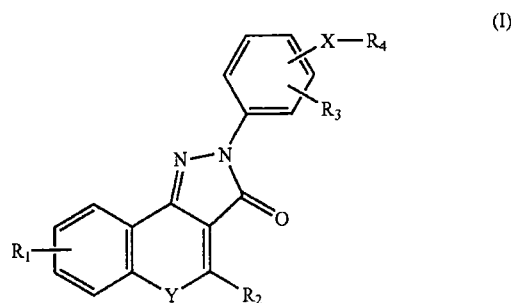
单抗的互补决定区的残基的抗体。

本发明中有用的抗体可以使用标准的技术重组地制备。参见例如, Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (《抗体: 实验室手册》), 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press (冷泉港实验室出版社), Cold Spring Harbor (冷全港), New York (纽约) 和第 4,196,265、4,946,778、5,091,513、5,132,405、5,260,203、5,658,570、5,677,427、5,892,019、5,985,279、6,054,561 号美国专利。生产包括 16C10 可变区的抗体的代表性方法在第 6,113,898 号美国专利中被描述。还参见第 20030103971 和 20030180290 号美国专利申请公布。

可以按照例如第 WO 02/096948 号 PCT 国际公布中所述制备包括两个完整的四聚体抗体的四价抗体 ( $H_4L_4$ ), 其包括同源二聚体和异源二聚体。抗体二聚体还可使用异双功能的交联剂通过在抗体恒定区引入促进链间二硫键形成的半胱氨酸残基 (Wolff 等, Cancer Res., 1993, 53:2560-2565) 或通过重组生产以包含双恒定区 (Stevenson 等, Anticancer Drug Des., 1989, 3:219-230) 而制备。

## II.B. 小分子

本发明还提供可用作靶向 CD80 的治疗剂的小分子。这些分子包括如下所述的式 (I) 和第 11/539,153 号美国专利申请中的杂环化合物。这种化合物抑制 CD80 和 CD28 之间的相互作用, 其是调节 T 细胞和 Th2 辅助细胞的激活所必需的。可在所发明的方法中使用的杂环化合物的例子包括式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐。这些式 (I) 的杂环化合物基本上按照第 7,081,456 号美国专利中所述而制备, 其整体通过引用并入本文。式 (I) 被描绘在下面:



其中

$R_1$  和  $R_3$  独立地代表 H、F、Cl、Br、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、可选地被 F 或 Cl 取代的  $\text{C}_1\text{C}_6$  烷基或可选地被 F 取代的  $\text{C}_1\text{C}_6$  烷氧基；

$R_2$  代表 H 或可选地被取代的  $\text{C}_1\text{C}_6$  烷基、 $\text{C}_3\text{C}_7$  环烷基或可选地被取代的苯基；

Y 代表  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、N-氧化物或  $-\text{N}(\text{R}_5)-$ ，其中  $\text{R}_5$  代表 H 或  $\text{C}_1\text{C}_6$  烷基；

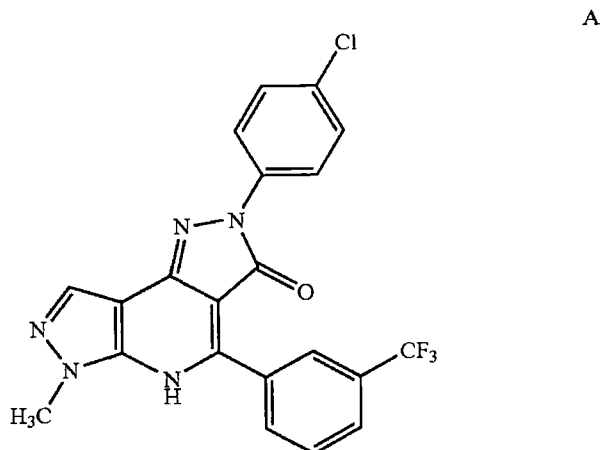
X 代表键或二价的  $\text{C}_1\text{C}_6$  亚烷基基团；

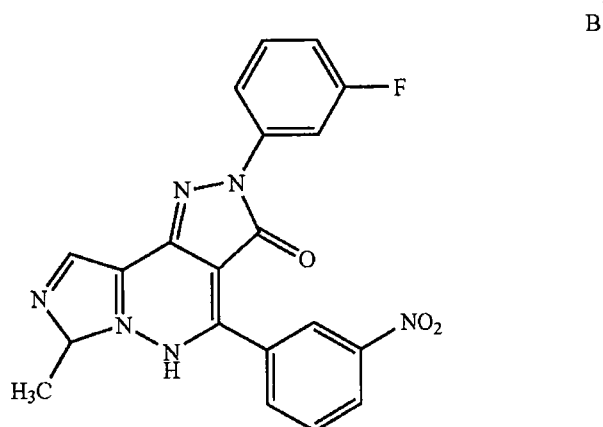
$R_4$  代表  $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_6\text{R}_7$ ，其中  $\text{R}_6$  代表式  $-(\text{Alk})_b-\text{Q}$  的基团，其中 b 是 1 而 Alk 是可选地被取代的二价直链或支链  $\text{C}_1\text{C}_{12}$  亚烷基、 $\text{C}_2\text{C}_{12}$  亚烯基或  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  亚炔基基团，其可被一个或多个不相邻的  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$  或  $-\text{N}(\text{R}_8)-$  基团间断，其中  $\text{R}_8$  代表 H 或  $\text{C}_1\text{C}_4$  烷基、 $\text{C}_3\text{C}_4$  烯基、 $\text{C}_3\text{C}_4$  炔基或  $\text{C}_3\text{C}_6$  环烷基，以及

Q 代表 H、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ ； $-\text{NR}_8\text{R}_8$ ，其中每个  $\text{R}_8$  可以是相同的或不同的；酯基或可选地被取代的苯基、 $\text{C}_3\text{C}_7$  环烷基、 $\text{C}_5\text{C}_7$  环烯基或具有 5 至 8 个环原子的杂环；以及

$\text{R}_7$  代表 H 或  $\text{C}_1\text{C}_6$  烷基，或当与它们所连接的原子合在一起时  $\text{R}_6$  和  $\text{R}_7$  形成可选地被取代的具有 5 至 8 个环原子的杂环。

式(I)的代表性分子包括耦合的吡唑啉酮，其具有下面的结构 A 和 B：





### III. 治疗应用

如本文所述，靶向 CD80 的治疗剂可被用来调控与病理状况相联系的 T 细胞，其中所述病理状况被调节 T 细胞和/或 Th2 辅助细胞的功能所恶化。靶向 CD80 的治疗剂还可用来使肿瘤微环境中的免疫调节和炎性细胞（例如，抗原呈递细胞和源自骨髓的抑制性细胞）耗竭，其中所述细胞支持肿瘤生长、迁移、血管发生等。因此，本文所述靶向 CD80 的治疗剂起作用以增强适应性免疫应答，包括调节 T 细胞的抑制功能的抑制。靶向 CD80 的治疗剂可单独地或与另外的治疗剂联合使用，如下面的进一步描述。受治疗者可接受靶向 CD80 的治疗剂作为一线疗法，或用于复发的或顽固的状况的治疗。

#### III.A. 适应症

在本发明的一个方面，靶向 CD80 的治疗剂可通过靶向肿瘤微环境的非恶性细胞而用来治疗血液的或非血液的恶性肿瘤。靶向 CD80 的治疗剂同样地用于抑制非恶性增殖病症的细胞的生长，所述非恶性增殖病症例如过度增生、组织变形或最特别地发育异常（关于这种异常生长状况的综述，参见 DeVita, Jr. 等, Cancer: Principles and Practice (癌症：原则和实践)，第 6 版, 2001 年, Lippincott Williams & Wilkins )。

例如，本文所述靶向 CD80 的治疗剂可被用来治疗 B 细胞恶性肿瘤，例如白血病和淋巴瘤，包括缓慢进展的、侵入性、低度恶性的、中度恶性的或高度恶性的白血病或淋巴瘤。代表性的 B 细胞恶性肿瘤包括霍奇金氏

淋巴瘤、B 细胞慢性淋巴细胞白血病( B-CLL )、淋巴浆细胞样淋巴瘤( LPL )、外套细胞淋巴瘤( MCL )、滤泡性淋巴瘤( FL )、弥漫性大细胞淋巴瘤( DLCL )、Burkitt 氏淋巴瘤( BL )、AIDS 相关的淋巴瘤、单核 B 细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴结病、小淋巴细胞性淋巴瘤；滤泡性、弥漫性大细胞；弥漫性小裂细胞；大细胞免疫母细胞淋巴瘤母细胞瘤；小的、无裂的：Burkitt 氏和非 Burkitt 氏；滤泡性、有优势的大细胞；滤泡性、有优势的小裂细胞；和滤泡性、混合的小裂和大细胞淋巴瘤。具有上述所鉴定的 B 细胞恶性肿瘤中任一种的受治疗者包括复发的受治疗者或对之前的疗法抵制的受治疗者。

可用公开的靶向 CD80 的治疗剂治疗的另外的癌症包括在乳腺、结肠、直肠、肺、口咽、下咽、食道、胃、胰腺、肝脏、胆囊、胆管、小肠、包括肾、膀胱和泌尿道上皮的泌尿道、女性生殖道、子宫颈、子宫、卵巢、男性生殖道、前列腺、精囊、睾丸、内分泌腺、甲状腺、肾上腺、垂体腺、皮肤、骨、软组织、血管、脑、神经、眼、脑膜中的原发性和转移性肿瘤。其他相关的实体瘤包括有 B 细胞参与的那些。

### III.B. 剂量和施用

从基于细胞的测定和动物研究(通常是啮齿类、兔、狗、猪和/或灵长类)中获得的数据可被用于配制一系列的剂量以用于人。所述动物模型还可用来确定适当的浓度范围和施用途径。这种信息然后可被用来确定在人身上有用的施用剂量和途径。通常地，施用最小剂量，并且在不出现在剂量限制性细胞毒性的情况下升高所述剂量。有效量或剂量的确定和调节，以及对何时和如何进行这种调节的评估，对于医药领域普通技术人员是已知的。

这种化合物的剂量优选地存在于循环浓度范围内，其中所述循环浓度包括具有很少或不具毒性的  $ED_{50}$ 。剂量可在此范围内变化，其取决于所使用的剂型和所用的施用途径。对于本发明的方法中所用的任何当前的靶向 CD80 的治疗组合物，治疗有效量可最初根据细胞培养测定来估计。可在动物模型上配制剂量以获得包括如细胞培养中所确定的  $IC_{50}$ (即，达到症状最大抑制的一半时测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。这种信息

可被用来更准确地确定人中的有用剂量。可以通过例如高效液相色谱法测量血浆中的水平。

抗 CD80 抗体例如加利昔单抗的有效剂量可包括范围从 100 mg/m<sup>2</sup> 至 600 mg/m<sup>2</sup> 的周剂量，例如每周 4 次输注剂量为 125 mg/m<sup>2</sup>、250 mg/m<sup>2</sup>、375 mg/m<sup>2</sup> 或 500 mg/m<sup>2</sup> 的加利昔单抗。抗 CD80 抗体还可以更低或更高剂量被施用，例如，是上面鉴定的加利昔单抗剂量的约 90%，或约 80%，或约 70%，或约 60%，或约 50%，或约 40%，或约 30%，或约 20%，或约 10%，或更少的剂量。例如，有效剂量可包括 10 mg/m<sup>2</sup>、12.5 mg/m<sup>2</sup>、25 mg/m<sup>2</sup>、37.5 mg/m<sup>2</sup> 或 50 mg/m<sup>2</sup> 的周剂量。特别地，具有提高的 ADCC 活性或其他提高的抗肿瘤活性的非岩藻糖化的抗 CD80 抗体当与相同的抗体相比时可以在降低的剂量上有效，其中所述相同的抗体通过不特别去除岩藻糖残基的方式制备。抗 CD80 抗体的剂量还可包括是上面鉴定的加利昔单抗剂量的约 110%，或约 120%，或约 130%，或约 140%，或约 150%，或约 160%，或约 170%，或约 180%，或约 190%，或更多的剂量。

根据本发明所用的药物组合物可使用一种或多种生理学上可接受的载体或赋形剂以常规的方式配制。因此，可配制所述组合物和它们生理学上可接受的盐和溶剂化物以通过吸入或吹入（通过嘴或鼻）或口服、面颊、肠胃外、局部、皮下、腹膜内、静脉内、胸膜内、眼内、动脉内、直肠施用，或在植入物例如基质（例如胶原纤维或蛋白聚合物）内/上，通过细胞轰击，在渗透泵中，在包括适当地转化的细胞的移植物等等中施用。对于实体瘤的治疗，本发明的靶向 CD80 的治疗剂可被直接施用在肿瘤部位。对于 CNS 恶性肿瘤的治疗，靶向 CD80 的治疗剂可被直接施用在 CNS，例如，通过鞘内的或室内的施用。此外，用于促进靶向 CD80 的治疗剂跨越血脑屏障转移的多种技术是可得的，其包括使用外科手术或注射、短暂地打开 CNS 脉管系统内皮细胞之间的粘连触点（adhesion contact）的药物以及促进易位通过这种细胞的化合物破坏血脑屏障。

对于口服施用，所述药物组合物可采取例如通过常规方法以药学上可接受的赋形剂制备的片剂或胶囊剂的形式，所述赋形剂例如粘合剂（例如预胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）、填充剂（例

如，乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙）、润滑剂（例如，硬脂酸镁、滑石或二氧化硅）、崩解剂（例如马铃薯淀粉或淀粉乙醇酸钠）或湿润剂（例如十二烷基硫酸钠）。可以使用本领域众所周知的方法对所述片剂进行包衣。用来口服施用的液体制剂可采用例如溶液、糖浆或悬浮液的形式，或者它们可作为干燥的产品被呈现，以便在使用之前用水或其他适合的媒介物构建。这种液体制剂可通过常规方法使用药学上可接受的添加剂制备，所述添加剂例如悬浮剂（例如，山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂）、乳化剂（例如，卵磷脂或阿拉伯胶）、非水媒介物（例如，杏仁油、油酯、乙醇或分馏的植物油）和防腐剂（例如，对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸）。所述制剂根据情况还可包含缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。

药物组合物还可包含多种缓冲剂（例如，Tris、醋酸盐、磷酸盐）、增溶剂（例如，TWEEN®、聚山梨醇酯）、载体例如人血清白蛋白、防腐剂（硫柳汞（thimerosal）、苯甲醇）和抗氧化剂例如抗坏血酸以稳定药物活性。稳定剂可以是去污剂，例如 TWEEN®-20、TWEEN®-80、NP-40 或 TRITON-X®-100。EBP 还可被掺入聚合物的微粒制剂以在延长的时间段里对患者控制递送。药物组合物中组分的更广泛的研究在 Remington's Pharmaceutical Sciences（《雷明顿制药科学》），1990，第 18 版，A. R. Gennaro，编辑，Mack Publishing, Easton, Pennsylvania（宾夕法尼亚州）中被找到。

除了前面描述的制剂之外，所述化合物还可作为贮库型（depot）制剂被配制。这种长效制剂可以通过植入（例如，皮下地或肌内地）或肌内注射被施用。因此，例如，所述化合物可以用适合的聚合的或疏水的材料（例如，作为可接受的油中的乳剂）或离子交换树脂，或作为略溶的衍生物例如作为略溶的盐而被配制。

如果希望，所述组合物可以被呈现在包装或分散设备中，所述设备可包含一个或多个含有活性成分的单位剂型。所述包装可包括例如金属或塑料箔，例如泡罩包装。所述包装或分散设备可以附带施用说明书。

对于包括靶向 CD80 的治疗剂与一种或多种另外的治疗剂一起施用的组合疗法，可以在任何适于进行所期望疗法的时间框中进行施用。例如，

单独的靶向 CD80 的治疗剂和任何另外的剂可以被大致同时 ( 即作为一个单独的制剂或在几分钟或几小时内 ) 或以任何顺序连续地施用。对于连续的施用, 单个剂以约 10、8、6、4 或 2 个月的干预时间段, 或以 4、3、2 或 1 个星期的干预时间段, 或以约 5、4、3、2 或 1 天的干预时间段被施用。

当与一种或多种另外的治疗剂联合使用时, 所述靶向 CD80 的治疗剂和一种或多种另外的剂可同时地或以任何顺序连续地被施用或与细胞接触。被公开的组合法可引起协同的治疗效应, 即比它们单个效应的总和还大的效应。可测量的治疗效应在本文上面被描述。例如, 协同的治疗效应可以是由单个剂引起的治疗效应或由给定组合中单个剂引起的治疗效应的总和的至少约两倍, 或至少约五倍, 或至少约十倍, 或至少约二十倍, 或至少约五十倍, 或至少约一百倍。协同的治疗效应据观测还可以是与由单个剂引起的治疗效应或由给定组合中单个剂引起的治疗效应的总和相比增加至少 10% 的治疗效应, 或至少 20%, 或至少 30%, 或至少 40%, 或至少 50%, 或至少 60%, 或至少 70%, 或至少 80%, 或至少 90%, 或至少 100%, 或更多。

关于制剂、剂量、施用方案和可测量的治疗结果的另外的指导, 参见 Berkow 等, The Merck Manual of Medical Information (《默克医学信息手册》), 2000, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey ( 新泽西州 ); Ebadi, CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology (《CRC 临床药理学案头参考》), 1998, CRC Press, Boca Raton, Florida; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (《雷明顿: 药剂学的科学与实践》), 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia ( 费城 ), Pennsylvania ( 宾夕法尼亚州 ); Katzung, Basic & Clinical Pharmacology (《基础与临床药理学》), 2001, Lange Medical Books / McGraw-Hill Medical Pub. Div., New York ( 纽约 ); Hardman 等, Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics (《Goodman 和 Gilman 氏治疗的药理学基础》), 2001, The McGraw-Hill Companies, Columbus ( 哥伦布 ), Ohio ( 俄亥俄州 ); Speight & Holford, Avery's Drug Treatment: A Guide to the Properties, Choices,

Therapeutic Use and Economic Value of Drugs in Disease Management(《艾弗里氏药物治疗：药物在疾病处理中的特性、选择、治疗用途和经济价值的指南》), 1997, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia (费城), Pennsylvania (宾夕法尼亚州)。

## II.C. 组合疗法

本文所述靶向 CD80 的治疗剂可与其他治疗剂或其他疗法 (例如, 外科摘除、放射等) 联合使用从而引起增强的治疗效应和/或减少一些治疗剂的肝细胞毒性。当与一种或多种另外的治疗剂联合使用时, 所述靶向 CD80 的治疗剂和一种或多种另外的剂可同时地或以任何顺序连续地被施用或与细胞接触。被公开的组合疗法可引起协同的治疗效应, 即比它们单个效应的总和还大的效应。可测量的治疗效应在本文上面被描述。例如, 协同的治疗效应可以是由单个剂引起的治疗效应或由给定组合中单个剂引起的治疗效应的总和的至少约两倍, 或至少约五倍, 或至少约十倍, 或至少约二十倍, 或至少约五十倍, 或至少约一百倍的效应。协同的治疗效应据观测还可以是与由单个剂引起的治疗效应或由给定组合中单个剂引起的治疗效应的总和相比增加至少 10% 的治疗效应, 或至少 20%, 或至少 30%, 或至少 40%, 或至少 50%, 或至少 60%, 或至少 70%, 或至少 80%, 或至少 90%, 或至少 100%, 或更多。

对于恶性肿瘤的治疗, 对组合疗法有用的代表性的剂包括细胞毒素、放射性同位素、化疗剂、免疫调控或免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促凋亡剂、细胞抑制和细胞溶解酶 (例如 RNA 酶)、酶抑制剂 (例如蛋白酶体抑制剂) 和肿瘤疫苗。另外的剂包括治疗性核酸, 例如编码免疫调控剂、抗血管生成剂、抗增殖剂或促凋亡剂的基因。这些药物描述词不是互斥的, 而且因此可以使用上述术语中的一个或多个来描述治疗剂。本发明的靶向 CD80 的治疗剂还可与使调节 T 细胞耗竭或阻断、抑制或向下调节调节 T 细胞功能的剂联合使用。

术语细胞毒素一般指的是抑制或预防细胞功能和/或导致细胞破坏的剂。代表性的细胞毒素包括抗生素、微管蛋白聚合抑制剂、结合并破坏 DNA 的烷化剂以及破坏蛋白合成或必要的细胞蛋白功能的剂例如蛋白激酶、磷

酸酶、拓扑异构酶、酶和细胞周期蛋白。代表性的细胞毒素包括但不限于多柔比星、柔红霉素、伊达比星、阿柔比星、佐柔比星、米托蒽醌、表柔比星、卡柔比星、诺加霉素、美诺立尔、吡柔比星 (pitarubicin)、戊柔比星、阿糖胞苷、吉西他滨、曲氟尿苷、安西他滨、依诺他滨、阿扎胞苷、去氧氟尿苷、喷司他汀、溴尿苷、卡培他滨、克拉屈滨、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、谷氏菌素、嘌呤霉素、替加氟、噻唑呋林、阿霉素、顺铂、碳铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、长春碱、长春新碱、米托蒽醌、博来霉素、双氯乙基甲胺、泼尼松、丙卡巴肼、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、依托泊苷、紫杉醇、紫杉醇类似物、铂类例如顺铂和碳铂、丝裂霉素、塞替派、紫杉烷、长春新碱、柔红霉素、表柔比星、放线菌素、安曲霉素 (authramycin)、氮丝氨酸、博来霉素、他莫西芬、伊达比星、多拉司他汀/auristatin、哈米特林 (hemiasterlin)、埃斯培拉霉素和类美登醇 (maytansinoid)。

适合于放射疗法的放射性同位素包括但不限于  $\alpha$  发射体、 $\beta$  发射体和俄歇电子。这些放射性同位素通常被偶合至靶抗体而被递送到疾病细胞。例如，放射性标记的抗体可包括放射性同位素例如  $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{65}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{80\text{m}}\text{Br}$ 、 $^{95}\text{Tc}$ 、 $^{97}\text{Tc}$ 、 $^{103}\text{Tc}$ 、 $^{105}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{107}\text{Ag}$ 、 $^{203}\text{Ag}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{126}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{133}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{In}$ 、 $^{105}\text{In}$ 、 $^{101}\text{In}$ 、 $^{186}\text{In}$ 、 $^{188}\text{In}$ 、 $^{121\text{m}}\text{Sb}$ 、 $^{99}\text{Zr}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Sb}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Sb}$ 、 $^{165}\text{Yb}$ 、 $^{167}\text{Yb}$ 、 $^{168}\text{Yb}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $\alpha$  发射体例如  $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Po}$  和  $^{225}\text{Ac}$ ，以及从那里衍生的氮化物或氧化物形式。

免疫调控或免疫调节剂是引起免疫应答的组合物，所述免疫应答包括体液免疫应答（例如，抗原特异性抗体的产生）和细胞介导的免疫应答（例如，淋巴细胞增殖）。代表性的免疫调控剂包括细胞因子、黄嘌呤、白细胞介素、干扰素和生长因子（例如，TNF、CSF、GM-CSF 和 G-CSF）以及激素例如雌激素（己烯雌酚、雌二醇）、雄激素（睾酮、HALOTESTIN®（氟甲睾酮）、孕激素（MEGACE®（醋酸甲地孕酮）、PROVERA®（醋酸甲羟孕酮））和皮质甾类（泼尼松、地塞米松、氢化可的松）。

本发明中有用的免疫调控剂还包括抗激素，其阻断激素对肿瘤的作用；以及免疫抑制剂，其抑制细胞因子产生、向下调节自体抗原表达或者

掩蔽 MHC 抗原。代表性的抗激素包括抗雌激素，其包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制性 4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬 ( keoxifene ) LY 117018、奥那司酮 ( onapnstone ) 和托瑞米芬；以及抗雄激素，例如氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林；以及抗肾上腺剂。代表性的免疫抑制剂包括 2-氨基-6-芳基-5-取代的嘧啶、硫唑嘌呤、环磷酰胺、溴隐定、达那唑、达普松、戊二醛、MHC 抗原和 MHC 片段的抗独特型抗体、环孢菌素 A、类固醇例如糖皮质类固醇、细胞因子或细胞因子受体拮抗剂( 例如抗干扰素抗体、抗 IL10 抗体、抗 TNF $\alpha$  抗体、抗 IL2 抗体 )、链激酶、TGF $\beta$ 、雷帕霉素、T 细胞受体、T 细胞受体片段和 T 细胞受体抗体。

本发明中有用的另外的药物包括抑制血管形成的抗血管生成剂，例如，法呢基转移酶抑制剂、COX-2 抑制剂、VEGF 抑制剂、bFGF 抑制剂、类固醇硫酸酯酶抑制剂 ( 例如，2-甲氧雌二醇双氨基磺酸酯 ( 2-MeOE2bisMATE ) )、白细胞介素-24、血小板反应蛋白、金属底板反应蛋白 ( metallospondin protein )、I 类干扰素、白细胞介素 12、鱼精蛋白、血管他汀、层粘连蛋白、内皮他汀和促乳素片段。

抗增殖剂和促凋亡剂包括 PPAR $\gamma$  活化剂 ( 例如环戊烯酮前列腺素 ( cyPG ) )、类视黄醇、三萜系化合物 ( 例如，环木菠萝烷、羽扇烷、乌斯烷、齐墩果烷、木栓烷、达玛烷、葫芦素和柠檬苦素类化合物三萜系化合物 )、EGF 受体抑制剂 ( 例如 HER4 )、雷帕霉素、CALCITRIOL® ( 1,25-二羟胆钙化固醇 ( 维生素 D ) )、芳香酶抑制剂 ( FEMARA® ( letrozole ) )、端粒酶抑制剂、铁螯合剂 ( 例如 3-氨基吡啶-2-甲醛硫代半卡巴腓 ( Triapine ) )、凋亡蛋白 ( 病毒蛋白 3 - VP3，来自鸡贫血病毒 )、Bcl-2 和 Bcl-X(L) 抑制剂、TNF- $\alpha$ 、FAS 配体、TNF 相关的凋亡诱导配体 ( TRAIL/Apo2L )、TNF- $\alpha$ /FAS 配体 /TNF 相关的凋亡诱导配体 ( TRAIL/Apo2L ) 信号转导活化剂以及 PI3K-Akt 存活途径信号转导抑制剂 ( 例如，UCN-01 和格尔德霉素 )。

可与 CD80 拮抗剂联合使用的另外的剂包括阻断 B 淋巴细胞刺激剂 ( BLyS ) 与它的一个或多个受体、B 细胞活化因子受体 ( BAFF-R )、跨膜

激活剂及钙调亲环素配体相互作用分子 (TACI) 或 B 细胞成熟抗体 (BCMA) 相互作用的剂。例如, 有用的剂包括特异性结合 BLyS 配体的抗体或特异性结合它的一个或多个受体的抗体, 其包括本文所描述的任何抗体类型。还可以使用 BLyS 与它的一个或多个受体相互作用的小分子抑制剂。

本发明的靶向 CD80 的治疗剂还可与其他抗癌治疗抗体和抗体/药物轭合物联合使用。可以以未标记的/未轭合的形式或作为抗体/药物轭合物被使用的代表性抗体包括抗 CD19 抗体、抗 CD20 抗体 (例如, RITUXAN®、ZEVALIN®、BEXXAR®)、抗 CD22 抗体、抗 CD33 抗体 (例如 MYLOTARG®)、抗 CD33 抗体/药物轭合物、抗 Lewis Y 抗体 (例如, Hu3S193、Mthu3S193、AGmthu3S193)、抗 HER-2 抗体 (例如, HERCEPTIN® (曲妥珠单抗)、MDX-210、OMNITARG® (帕妥珠单抗、rhuMAb 2C4))、抗 CD52 抗体 (例如 CAMPATH®)、抗 EGFR 抗体 (例如, ERBITUX® (西妥昔单抗)、ABX-EGF (帕尼单抗))、抗 VEGF 抗体 (例如 AVASTIN® (贝伐单抗))、抗 DNA/组蛋白复合体抗体 (例如 ch-TNT-1/b)、抗 CEA 抗体 (例如 CEA-Cide、YMB-1003)、hLM609、抗 CD47 抗体 (例如 6H9)、抗 VEGFR2 (或含激酶插入结构域的受体, KDR) 抗体 (例如 IMC-1C11)、抗 Ep-CAM 抗体 (例如 ING-1)、抗 FAP 抗体 (例如西罗珠单抗)、抗 DR4 抗体 (例如 TRAIL-R)、抗孕酮受体抗体 (例如 2C5)、抗 CA19.9 抗体 (例如 GIVAREX®) 和抗纤维蛋白抗体 (例如 MH-1)。

本发明的靶向 CD80 的治疗剂还可与全身性抗癌药物例如埃博霉素 (epithilone) (BMS-247550、Epo-906)、紫杉烷的重制剂 (reformulation) (Abraxane、Xyotax)、微管蛋白抑制剂 (MST-997、TTI-237) 等联合使用。

在其他联合疗法中, 靶向 CD80 的治疗剂可与一种或多种化疗剂的组合一同施用, 所述化疗剂例如, 烷化剂例如塞替派和环磷酰胺 (cyclophosphamide); 烷基磺酸酯例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡; 氮丙啶 (aziridine) 例如 benzodopa、卡波醌、meturedopa 和 uredopa; 乙烯亚胺和甲基三聚氰胺 (methyldiamine), 其包括六甲蜜胺、三乙烯三聚氰

胺、三乙烯磷酰胺(trietylenephosphoramide)、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);氮芥例如苯丁酸氮芥(chiorambucil)、萘氮芥、cholophosphamide、雌氮芥、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺(mechiorethamine)、盐酸双氯乙基甲胺氧化物(mechiorethamine oxide hydrochloride)、美法仑、新氮芥、胆甾醇对苯乙酸氮芥、泼尼莫司汀、氯乙环磷酰胺(trofosfarnide)、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲(nitrosureas)例如卡莫司汀、氯脲菌素(chiorozotocin)、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素例如阿克拉希霉素(aclacinomysins)、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、刺孢霉素(calicheamicin)、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他汀、佐柔比星;抗代谢剂例如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物例如二甲叶酸、氨甲蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-EU;雄激素例如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、环戊缩环硫雄烷、睾内酯;抗肾上腺剂例如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂例如亚叶酸(froinic acid);醋葡醛内酯;糖苷醛磷酰胺(aldophospharnide glycoside);氨基果糖酸(aminolevulinic acid);安吡啶;百垂布西(bestrabucil);比生群;依达曲沙(edatraxate);defofamine;地美可辛;地吡酮;依氟鸟氨酸(elfornithine);依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(Ionidamine);米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;二胺硝吡啶;喷司他汀;蛋氨酸氮芥;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙酰肼;丙卡巴肼;雷佐生;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;尿烷;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷例如紫杉醇(TAXOL®), 普林斯顿的 Bristol-Myers Squibb

肿瘤学，新泽西州)和多西紫杉醇(doxetaxel)(TAXOTERE®，Rhone-Poulenc Rorer of Antony，法国)；瘤可宁(chiorambucil)；吉西他滨；6-硫鸟嘌呤；巯基嘌呤；甲氨蝶呤；铂类似物例如顺铂和碳铂；长春碱；铂；依托泊苷(VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本；诺消灵；替尼泊苷；柔红霉素；氨基蝶呤(aminopterin)；希罗达；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；视黄酸；埃斯培拉霉素(esperarnicins)；卡培他滨和治疗剂的组合例如ABVD(亚德利亚霉素、博来霉素、长春新碱、达卡巴嗪)。

为了治疗霍奇金氏病，本发明的靶向CD80的治疗剂可与抗体联合使用，所述抗体与在Hodgkin Reed Sternberg(HRS)细胞或环绕HRS细胞的渗入细胞上表达的抗原结合。这种对HRS细胞的靶向有用的抗原包括CD30、CD40、RANK、TRAIL、Notch、LMP、IL-13、CD20、CD52和CCR4。用来治疗霍奇金氏病的组合疗法的其他有用的剂包括蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米(PS-341；Millennium Pharmaceuticals(千禧制药)) and MG-132(东京都医学研究所)、组蛋白脱乙酰酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors)(例如缩酚酸肽(FK228；Gloucester Pharmaceuticals)和辛二酰苯胺氧肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid)(SAHA；Aton Pharma))和可用来诱导HRS细胞凋亡的小分子和肽，包括三萜系化合物例如CDD(RTA401，Reata Discovery)和17-烯丙基氨基-17-脱甲氧基-格尔德霉素(gledanamycin)(参见例如Kamal等，Trends. Mol. Med., 2004, 10, 283-290)、N-乙酰基-亮氨酸基-leucynil-norleucynal、N-乙酰基-亮氨酸基-leucynil-甲二磺醛、苄氧羰基-亮氨酸基-leucynil-norvalinal、苄氧羰基-亮氨酸基-leucynil-leucynal、 $\beta$ -内酯、bactacystine、硼酸肽、泛素连接酶抑制剂、环孢菌素A和脱氧精脒菌素。

本发明的靶向CD80的治疗剂还可与增强抗肿瘤免疫力的剂例如肿瘤疫苗联合使用。很多这种疫苗是本领域已知的，包括掺入肿瘤特异性的细胞毒素表位以及辅助表位的疫苗。另外的剂可防止CD8<sup>+</sup>细胞溶解T淋巴细胞无反应性的诱导。

更进一步地，本发明的靶向CD80的治疗剂可以与以下联合使用：提

高免疫活性的剂，例如抗 CTLA4 抗体、其他阻断 CTLA4 的剂、抗 PD1 抗体和释放 T 细胞激活和增殖的抑制对照的另外的剂。

在本申请通篇中，各种出版物、专利和发行的专利申请通过可识别的引用被提及。本申请中引用的这些出版物、专利和发行的专利说明书的公开内容由此通过引用并入本公开内容以更全面地描述本发明所涉及领域的技术状态。

下面的实施例被包括以展示本发明的实施方式。下面的实施例的某些方面就本发明共同发明人发现或熟思而得并在本发明实践中有效的技术和程序进行描述。考虑到本公开内容和本领域一般技术水平，技术人员将理解，下面的实施例只预期是示范性的，而且许多变化、修饰和改变可以在不背离本发明的范围下被使用。

## 实施例

### 实施例 1. 用于治疗复发的或顽固的霍奇金氏淋巴瘤的加利昔单抗

挑选患有组织学上确诊的典型霍奇金氏淋巴瘤的成人患者（至少 18 岁）使用抗 CD80 抗体加利昔单抗进行治疗。加利昔单抗是使用 PRIMATIZED® 抗体技术开发的 IgG1  $\lambda$ ，抗 CD80 单克隆抗体，其降低免疫原性。可变区源自食蟹猕猴，而恒定区源自人。为了静脉内注射，加利昔单抗作为 10 mmol/L 柠檬酸钠中的无菌产品被配制，其含有 150 mmol/L 氯化钠和 0.02% 聚山梨醇酯 80，pH 6.5。

患者具有可测量的疾病（例如，至少一处损伤  $\geq 10$  mm）和足够的血液、肾脏和肝脏功能。使用加利昔单抗治疗患者一个月的时间。在加利昔单抗的静脉内输注之前，患者被事前用药，其通过使用输注泵和 0.22 微米低蛋白结合滤器的静脉内输注（IV）或通过嘴施用 50 mg 苯海拉明，以及口服施用 650 mg 醋氨酚。患者每星期接受一次 500 mg/m<sup>2</sup> 加利昔单抗，持续 4 周。加利昔单抗在门诊情况下于一个小时的时间内被施用。加利昔单抗输注完成后对患者进行监测至少一小时。抗体剂量在 150 mL-250 mL 的生理盐水中被稀释。如果发生任何  $\geq 1$  级的输注反应（例如，发热、寒战、

呼吸困难), 制止加利昔单抗的输注。在症状解除之后, 可以之前速率的一半重新开始输注。如果患者再次经历输注相关的不良事件, 则停止加利昔单抗的输注并不在当天再次开始。

在施用上述的诱导疗法之后, 患者按月接受长期的加利昔单抗疗法直到疾病演进。使用输注泵和 0.22 微米低蛋白结合滤器, 患者每四个星期在 60 分钟内接受  $500 \text{ mg/m}^2$  剂量的加利昔单抗。如果患者经历输注相关的毒性, 则延长输注时间。对加利昔单抗有响应的患者被允许继续治疗。在第八个星期然后在每 3 次加利昔单抗治疗 (即每 12 个星期) 后, 检查他们的进展直至疾病演进。从研究中早期撤出的或在 48 个月的研究期间的最后还活着的所有患者以 6 个月的间隔观察响应的继续、其他淋巴瘤疗法的起始、存活状态或死因。加利昔单抗的治疗导致提升肿瘤免疫力的肿瘤微环境中的变化, 其包括适应性免疫应答的增强, 例如, 通过对调节 T 细胞抑制的抑制, 肿瘤微环境中的免疫调节细胞和/或炎性细胞的减少, 支持肿瘤演进的细胞因子和其他因子的向下调节, 肿瘤细胞生长和/或迁移的减少, 肿瘤血管化的减少等。

疾病的评估通过全面的扫描 (计算机断层摄影术、磁共振成像和 X 射线) 和在基线的物理检查 (研究录入) 在加利昔单抗治疗完成后 1 个月 (第 50 天)、之后第 1 和 2 年中每 3 个月和第 3 和 4 年中每 6 个月进行。使用由非霍奇金氏淋巴瘤国际工作组响应标准所定义的临床试验的标准结果测量 (完全响应、未确认的完全响应、部分响应、稳定型疾病和进展型疾病) 来分析治疗的应答。相关的终点包括总响应率、完全缓解率、未确认的完全缓解率、部分缓解率、响应持续时间和演进时间。另外的效力相关指标包括肿瘤微环境的变化, 如实施例 3 中所评价。

## 实施例 2. 加利昔单抗的药物代谢动力学分析

在第八个星期和之后每 12 个星期 (只要患者还留在研究中) 输注加利昔单抗之前, 血清和/或活体解剖样品的获得是在输注前以及输注完成的 10 分钟内 (第 1、8、15 和 22 天)。药物代谢动力学分析包括血浆、肿瘤块、肿瘤结节和/或肿瘤引流淋巴结中加利昔单抗的浓度; 观测到的最大浓

度 (  $C_{max}$  ); 达到观测到的最大浓度的时间 ; 半衰期 ; 以及浓度时间曲线下面积 ( AUC )。使用无房室线性回归法分析数据以使用在研究第 1 天之后采集的所有样品的数据来确定抗体半衰期 , 其中所述样品含有超过测定定量下限的加利昔单抗浓度 ( 250 ng/mL )。使用线性的/对数的梯形方法计算并将时间外推至无穷而确定 AUC。

### 实施例 3. 加利昔单抗对肿瘤微环境中免疫功能的作用

在接受加利昔单抗疗法的患者中 , 在如下时间点获得血清和/或活体解剖样品 : 第 1 天治疗之前 , 在第 4 个星期 ( 诱导完成 ) , 在第 8 个星期 , 和之后患者留在研究的持续时间中的每 12 个星期。活体解剖样品可以从肿瘤块、肿瘤结节和/或肿瘤引流淋巴结中获得。根据本领域已知的方法测定样品中的免疫细胞功能。使用特异性结合感兴趣的细胞因子的抗体来确定细胞因子水平。使用流式细胞分析以及本领域已知的和本文所描述的适合的分子标志物来对调节 T 细胞、Th2 细胞和巨噬细胞进行定量。对于肿瘤微环境的分析 , 首先使用特异性结合肿瘤相关抗原的抗体使恶性细胞从样品中耗竭。本领域技术人员可容易地为被治疗的恶性肿瘤鉴定适合的肿瘤相关抗原。通过鉴定  $CD4^{+}$ 、 $CD25^{hi}$  细胞群体来评估调节 T 细胞含量 , 可选地联合以下中的一种或多种 : 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 ( CTLA4 )、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关的基因 ( GITR )、CC 趋化因子受体 4 ( CCR4 )、叉头盒 p3 ( FOXP3 )、CC 趋化因子受体 6 ( CCR6 )、CD30、 $CD62L^{hi}$ 、 $CD45RB^{lo}$ 、 $CD45RO^{hi}$  和/或  $CD45RA^{-}$ 。Th2 细胞可以是鉴定的  $TCR^{+}$  ( T 细胞受体 )  $CD4^{+}$ 、 $CD25^{-}$  细胞。使用生物标志物对巨噬细胞进行定量 , 其中所述生物标志物包括 TLR5、FCGR1A、SEPT10、LGMN 和/或 C3AR1。还可以使用生物标志物来定量巨噬细胞以计算淋巴细胞相关的巨噬细胞 ( LAM ) 含量 , 例如 , 如 Farinha 等, *Blood*, 2005, 106(16):2169-2174 所述。通过在活体染料例如二醋酸羧基荧光素 ( CFSE ) 的存在下培养细胞来测定调节 T 细胞的增殖。

### 实施例 4. 加利昔单抗对 T 细胞激活的作用

加利昔单抗对正常的人外周血 T 淋巴细胞的激活的作用通过将

CD4+CD25- T 细胞与获自独立供体的 SB 淋巴瘤细胞或成熟树突细胞一起培养而被确定。在两种情况下，通过由 SB 淋巴瘤细胞或成熟树突细胞表达的同种异体的主要组织相容性复合体( MHC )蛋白提供对 T 细胞激活的刺激。MHC 错配的范围没有被进一步表征。

使用标准的菲科-帕克程序( Ficoll-paque procedure )通过密度离心来分离外周血单核细胞( PBMC )。使用 CD4+ T 细胞分离试剂盒( Meltenyi Biotec of Auburn ,加利福尼亚州 )通过对缺乏 CD4 表达的所有细胞进行间接的磁性标记和磁性细胞分离，从 PBMC 群体中阴性选择 CD4+CD25- T 淋巴细胞。表达 CD8、CD14、CD16、CD19、CD36、CD56、CD123、TCR  $\gamma/\delta$  和 CD235a ( 血型糖蛋白 A ) 的细胞的耗竭产生 CD4+ T 淋巴细胞群体，所述 CD4+ T 淋巴细胞对于 CD4 的表达超过 95% 阳性。使用 CD25 微珠 II ( Meltenyi Biotec of Auburn ,加利福尼亚州 )通过阴性选择使此种 CD4+ T 细胞群体中表达 CD25 的细胞被进一步耗竭。所有细胞分离物经由流式细胞术表征以保证所富集的细胞群体的一致性。接着使用可透过细胞的荧光染料羧基荧光素琥珀酰亚胺酯( CFSE )标记 CD4+CD25- T 细胞。通过在 2  $\mu\text{g/ml}$  脂多糖的存在下培养 PBMC 过夜而产生成熟的树突细胞。接着将所述细胞冲洗五次并进行外部  $\gamma$  照射( 2000 拉德 )以使细胞不增殖。CFSE 标记的 CD4+CD25- T 细胞与 SB 淋巴瘤细胞或成熟的树突细胞一同培养五天。在培养物中包含不同浓度的加利昔单抗。此外，为了进行比较，还研究了阻断抗体对 CD86 和 CTLA4-Ig 的作用。通过对 CFSE 荧光染料的强度进行流式细胞术定量来测量 CD4+CD25- T 细胞增殖，其中所述 CFSE 荧光染料在细胞分裂时分布在子细胞之间，导致细胞荧光强度随着细胞分裂周期的增加而逐渐减弱。

由 SB 淋巴瘤细胞或同种异体的树突细胞诱导的 CD4+CD25- T 细胞的增殖在细胞培养物中包含了加利昔单抗之后被显著地抑制( 图 1A-1B )。加利昔单抗对 T 细胞增殖的抑制总是比抗 CD86 或 CTLA4-Ig 抗体介导的抑制小。这与作为支持 T 细胞激活的共刺激分子的 CD80 和 CD86 的相关贡献一致。这些结果证明，在强的 T 细胞激活信号( 即同种异体刺激 )的情况下，加利昔单抗部分地抑制新生的 CD4+CD25- T 淋巴细胞的激活，就

如 T 细胞增殖的抑制所表现的。就 T 淋巴细胞有助于建立肿瘤微环境中存在的独特细胞组成而言，这些结果表明，加利昔单抗能够调控 T 细胞功能并因此改变 T 淋巴细胞对界定肿瘤微环境的贡献。

#### 实施例 5. 加利昔单抗对经由激活的 T 细胞的细胞因子产生的作用

如实施例 4 中所述分离并培养 CD4+CD25<sup>-</sup> T 细胞。使用多重的细胞计数的珠阵列测定 ( BD Biosciences of San Jose , 加利福尼亚州 ) 测量 T 细胞激活时产生的干扰素- $\gamma$  和白细胞介素 2 的水平。简短地，在第 3 天从按照实施例 4 中所述被建立的培养物中收集培养物上清液，并在多个稀释度下测定。通过从同时产生的标准曲线外推而确定浓度 ( 按照制造商的说明书 )。由 CD4+CD25<sup>-</sup> T 淋巴细胞与成熟的、同种异体的树突细胞一起培养而诱导的干扰素- $\gamma$  和白细胞介素-2 二者的产生被加利昔单抗显著地抑制 ( 图 2A-2B )。加利昔单抗和抗 CD86 各自抑制干扰素- $\gamma$  的产生大约 50% ( 图 2A )。加利昔单抗和抗 CD86 的组合导致干扰素- $\gamma$  产生的几乎完全的抑制 ( 图 2A )。CTLA4-Ig 也展示了干扰素- $\gamma$  产生的基本完全的抑制，这与加利昔单抗和抗 CD86 的叠加效应一致，假设 CTLA4-Ig 结合并阻断 CD80 和 CD86 二者 ( 图 2A )。白细胞介素-2 的产生展示了加利昔单抗、抗 CD86、CTLA4-Ig 和加利昔单抗加上抗 CD86 的相似的差异化抑制 ( 图 2B )。这些结果证明，在强的 T 细胞激活信号 ( 即同种异体刺激 ) 的情况下，加利昔单抗部分地抑制新生的 CD4+CD25<sup>-</sup> T 淋巴细胞的激活，就如对干扰素- $\gamma$  和白细胞介素-2 产生的抑制所表现的。就 T 淋巴细胞有助于建立肿瘤微环境中存在的独特细胞因子组合而言，这些结果表明，加利昔单抗能够调控 T 细胞功能并因此改变 T 淋巴细胞对界定肿瘤微环境的贡献。

#### 实施例 6. 加利昔单抗对调节 T 细胞的发育的作用

在离体的共培养系统中研究加利昔单抗对调节 T 细胞的产生的作用，在所述培养系统中 CD4+CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞与同种异体的 SB 淋巴瘤细胞一起培养 3 天。简短地，如实施例 4 中所述分离 PBMC 并通过实施例 4 中所述的阴性选择进一步纯化 CD4<sup>+</sup> 细胞。使用 CD25 微珠 II ( Meltenyi Biotec of Auburn , 加利福尼亚州 ) 通过阳性选择使 CD4+CD25<sup>+</sup> 细胞进一步富集。

通过流式细胞术将调节 T 细胞作为 CD4+CD45RA+CD127-细胞的百分比来测量，其中所述 CD4+CD45RA+CD127-细胞表达高水平的 CD25，即 CD25<sup>hi</sup>。据证实，此细胞群体代表 FOXP3 阳性细胞，其定义调节 T 细胞亚群。

CD4+CD25+ T 细胞与 SB 淋巴瘤细胞以 1:10 的 SB:T 比的培养导致调节 T 细胞被最大诱导至代表测定中 CD4+CD45RA+CD127- T 细胞的大约 37%和 62%的水平（即 CD25<sup>hi</sup>），其中所述测定使用来自两种不同供体的 PBMC（图 3A 和 3B）。使用 1:120 和 1:160 的 SB:T 比分别导致大约 16%和 48%的调节 T 细胞的诱导（图 3A 和 3B）。在两种情况下，单独培养的 T 细胞导致了少于 5%的调节 T 细胞（图 3A 和 3B）。相对于同种型匹配的人 IgG1 对照抗体，一个供体（202）展现了加利昔单抗对调节 T 细胞诱导的显著抑制（图 3A）。在这种情况下，加利昔单抗比抗 CD86 更有效力，其展现对调节 T 细胞诱导的抑制水平与用 CTLA4-Ig 或用加利昔单抗加上抗 CD86 观察到的抑制水平更相似。另一个供体展现了 CTLA4-Ig 而非加利昔单抗对调节 T 细胞诱导的抑制（图 3B）。这些结果表明，加利昔单抗能够抑制调节 T 细胞的诱导。

#### 实施例 7. 加利昔单抗对肿瘤微环境中细胞因子产生的作用

为了进一步研究加利昔单抗在肿瘤微环境情况下的潜在作用，建立了共培养测定以对在不同程度上有助于建立复杂的肿瘤微环境的多种细胞类型的贡献建模。

使用标准的菲科-帕克程序通过密度离心来分离 PBMC。通过对所有非 CD4+或 CD14+细胞进行间接的磁性标记和磁性细胞分离，从 PBMC 群体中阴性选择由 CD4+ T 淋巴细胞或 CD14+单核细胞组成的特定的细胞亚群。使用 CD4+ T 细胞分离试剂盒（Miltenyi Biotec，Auburn，加州），通过使表达 CD8、CD14、CD16、CD19、CD36、CD56、CD123、TCR  $\gamma/\delta$  和 CD235a（血型糖蛋白 A）的细胞耗竭来分离 CD4+ T 淋巴细胞至超过 95%的 CD4 均一性。使用单核细胞分离试剂盒（Miltenyi Biotec of Auburn，加利福尼亚州），通过使表达 CD3、CD7、CD16、CD19、CD56、CD123

和 CD235a(血型糖蛋白 A)的细胞耗竭来分离 CD14+单核细胞至超过 90% 的 CD14 均一性。所有细胞分离物经由流式细胞术表征以保证所富集的细胞群体的一致性。在 96 孔平底微量滴定板中,以每孔 200,000 个细胞,使用纯化的 CD4+ T 淋巴细胞和 CD14+单核细胞,在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基 (Invitrogen of Carlsbad, 加利福尼亚州) 中培养细胞。以每孔 20,000 个细胞培养 Raji 淋巴瘤细胞系。维持培养物 4 天,此时收集培养物上清液。使用多重的细胞计数的珠阵列 (BD Biosciences of San Jose, 加利福尼亚州) 测量存在于培养物上清液中的白细胞介素-12 (p70)、TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-10、白细胞介素-6、白细胞介素-1 $\beta$  和白细胞介素-8 的浓度。纯化的人血清骨髓瘤 IgG1  $\kappa$  (Southern Biotech of Birmingham, 阿拉巴马州) 被用作加利昔单抗的同种型对照。从人工产生的 CHO 细胞系中纯化的 CTLA4-Ig 被用作对照以将完全的阻断 (即 CD80 和 CD86) 与加利昔单抗介导的 CD80 特异性阻断进行比较。脂多糖 (Sigma of St. Louis, 密苏里州) 被用作外周血单核细胞激活的阳性对照。

如图 4A-4D 中所示,分离培养的 CD14+单核细胞展现了白细胞介素-8 和白细胞介素-6 的自发的或组成的产生。与 CD4+ T 细胞或 Raji 细胞共培养导致白细胞介素-8 和白细胞介素-6 产生的减少 (图 4A-4D)。加利昔单抗以及 CTLA4-Ig 抑制了经由 CD14+单核细胞单独或者与 CD4+ T 细胞 (1:1 比例) 或 Raji 细胞 (10:1 比例) 一起培养的 CD14+单核细胞的白细胞介素-8 和白细胞介素-6 的产生 (图 4A-4D)。CD4+ T 细胞、CD14+单核细胞和 Raji 淋巴瘤细胞 (10:10:1 比例) 的三方共培养 (three-way co-culture) 清楚地证明了取决于所有三种细胞类型的存在的不同的生物活性,这由所有三种细胞类型共培养与任何单个细胞类型或两种细胞类型的组合组成的培养相比时的白细胞介素-8 和白细胞介素-6 的产生的显著、协同的增强所证明。在三方共培养中,加利昔单抗显著地抑制白细胞介素-8 和白细胞介素-6 二者增多的产生 (图 4A-4D)。来自一个供体 (供体 A) 的结果显示,加利昔单抗在抑制三方共培养中的白细胞介素-8 和白细胞介素-6 方面与 CTLA4-Ig 同样有效 (图 4A-4B)。来自第二个供体 (供体 B) 的结果显示,CTLA4-Ig 展现更强的效力。在供体 B 中,加利昔单抗抑制了白细胞介素-8 和白细胞介素-6 二者的产生至少 50%。在供体 B 中,加利昔单抗与

CTLA4-Ig 相比在抑制经由单独 CD14+单核细胞的或与 CD4+ T 细胞或 Raji 细胞组合在一起的 CD14+单核细胞的细胞因子产生的方面展现了相似的效力 (图 4C-4D)。因此,就供体 B 来说,CTLA4-Ig 的增强的效力只有在三方共培养条件下是明显的,其中在所述条件下白细胞介素-8 和白细胞介素-6 的产生被显著地增加。

从共培养测定系统中所分析的一个另外的供体 (供体 C) 获得的细胞上观察到了变化 (图 4E-4F)。在这种情况下,加利昔单抗或 CTLA4-Ig 对白细胞介素-8 和白细胞介素-6 的产生都没有任何作用。然而,CD14+单核细胞产生的自发的白细胞介素-8 和白细胞介素-6 的水平至少比使用来源于供体 A 或供体 B 的细胞进行的测定中观察到的水平高一个级数 (图 4A-4D),如表 1 中所概述。此外,使用来自供体 C 的细胞的三方共培养没有导致在来自供体 A 和 B 的细胞上观察到的白细胞介素-8 的产生的协同增加,虽然观察到了白细胞介素-6 的产生的协同增加。这些结果证明,加利昔单抗能显著地影响在肿瘤微环境中表达的直接和间接地支持肿瘤演进的那类细胞因子。

表 1. 经由 CD14+单核细胞的自发的细胞因子产生

| 供体 | 白细胞介素-8 ( pg/ml ) | 白细胞介素-6 ( pg/ml ) |
|----|-------------------|-------------------|
| A  | 8244 +/- 3548     | 144 +/- 3         |
| B  | 1362 +/- 34       | 31 +/- 0          |
| C  | 82094 +/- 10983   | 1633 +/- 530      |

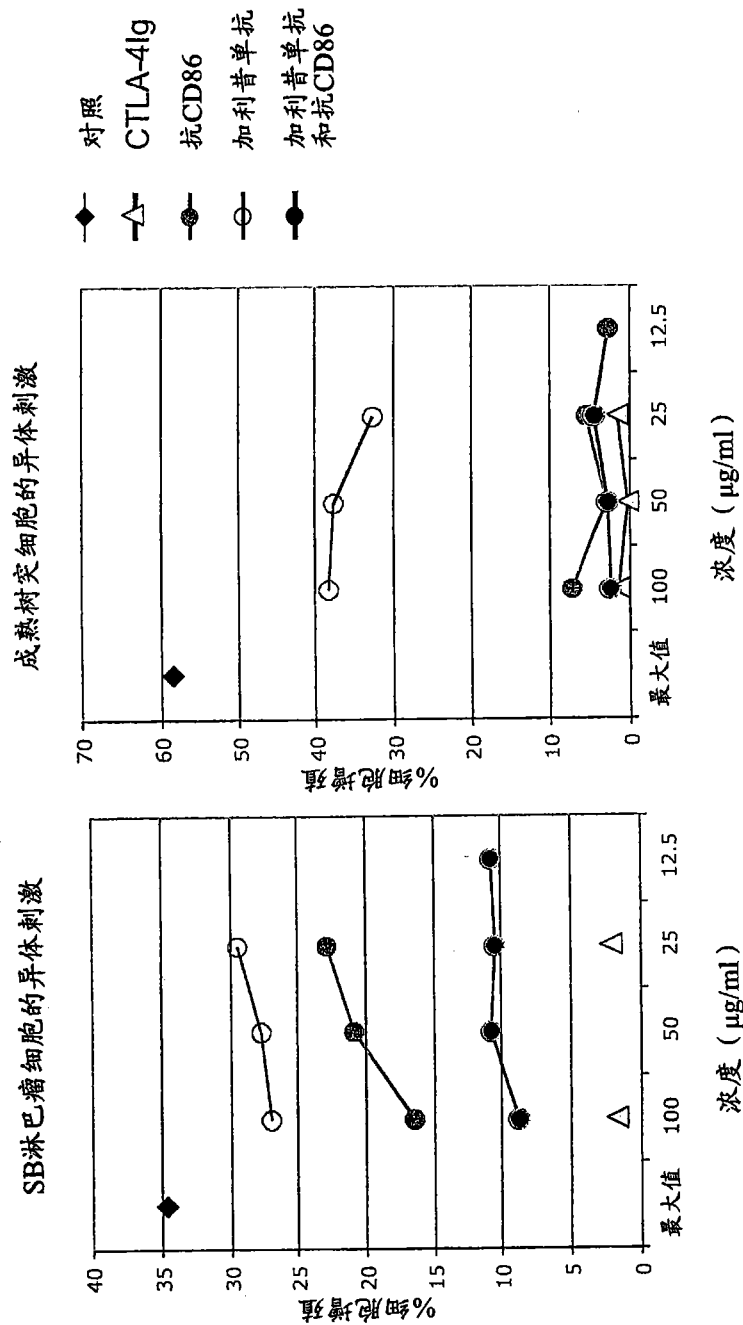


图1B

图1A

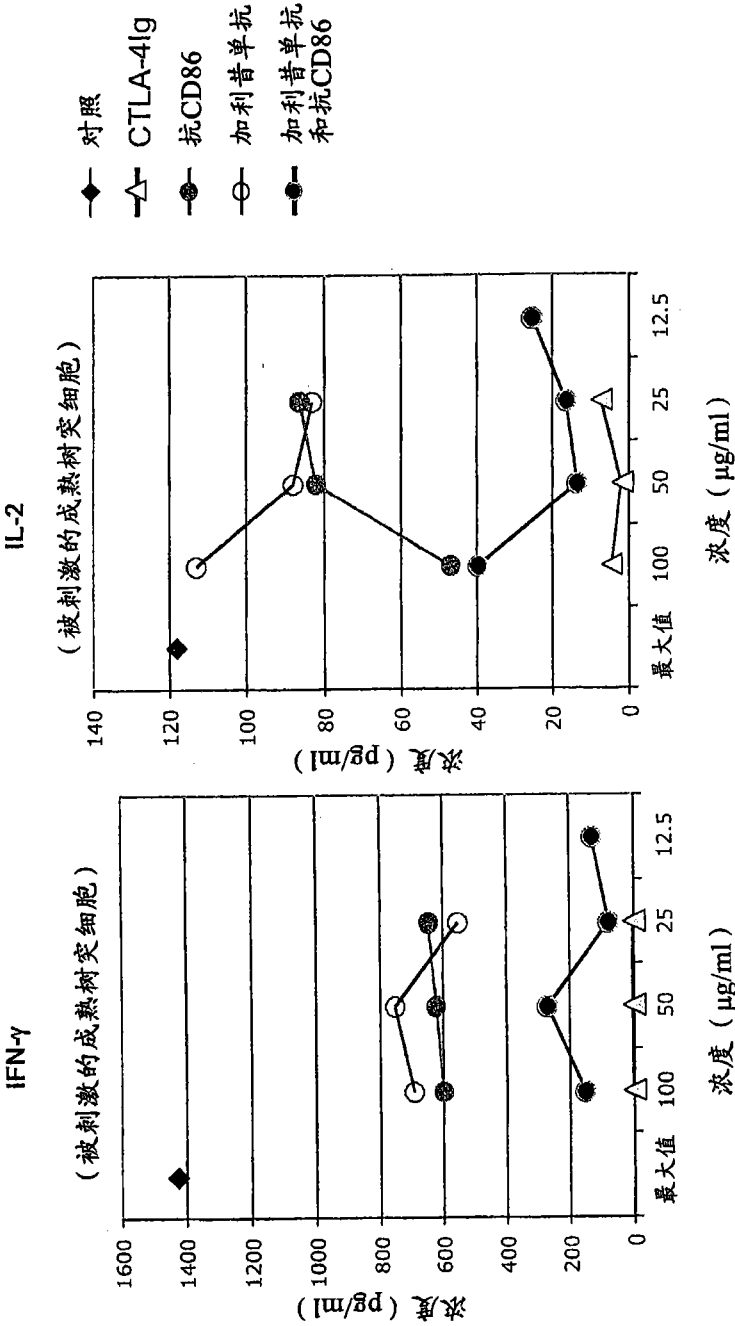


图 2A

图 2B

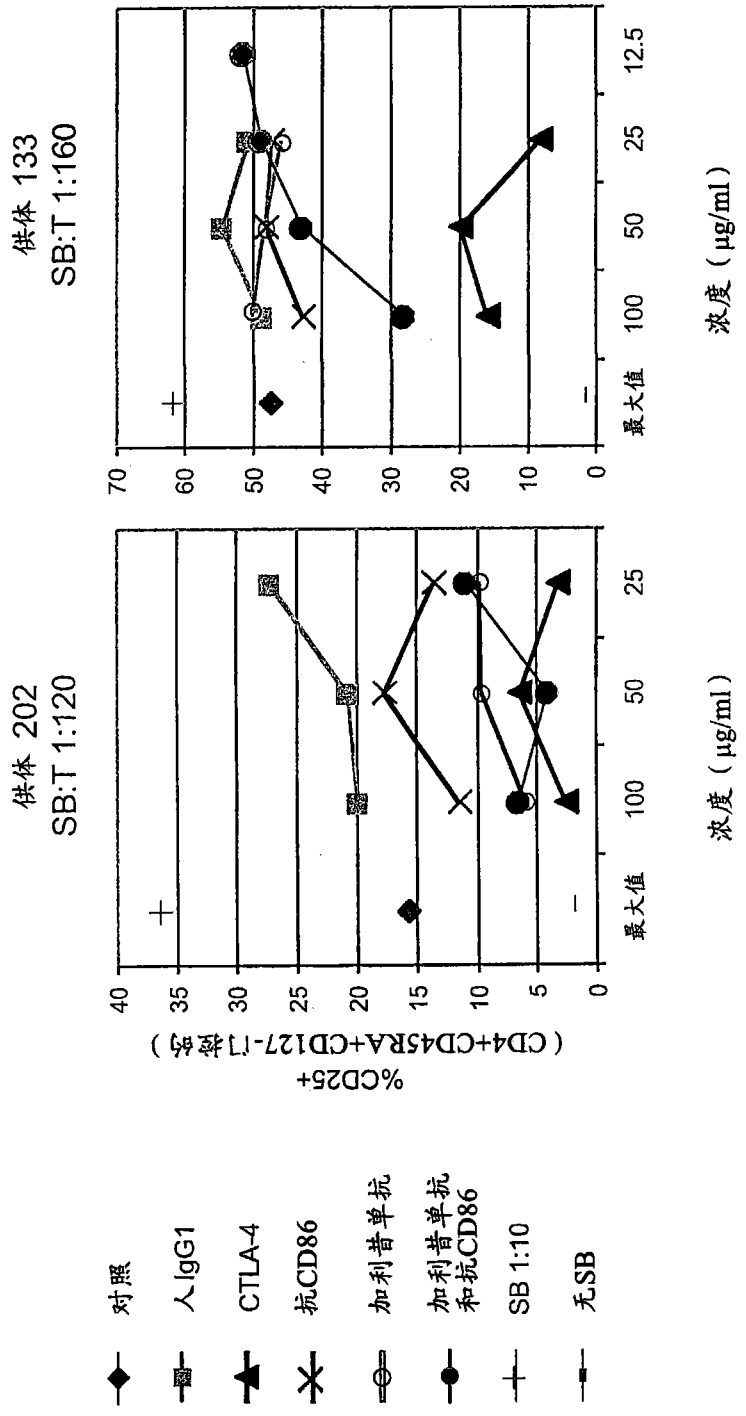


图 3A

图 3B

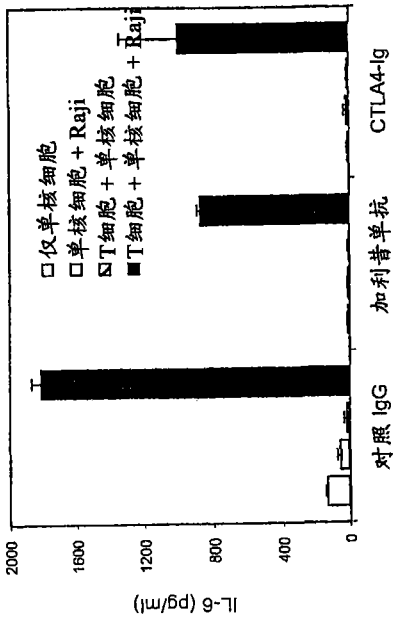


图 4B

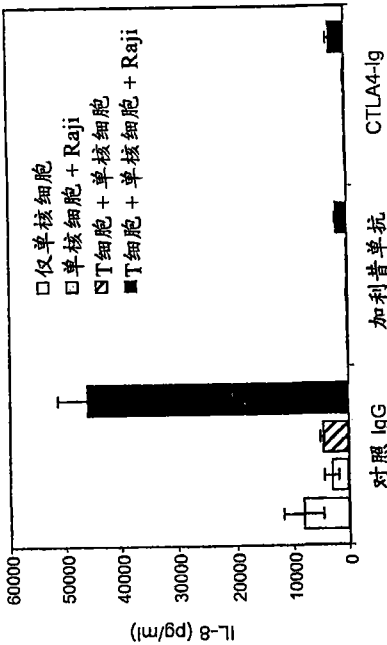


图 4A

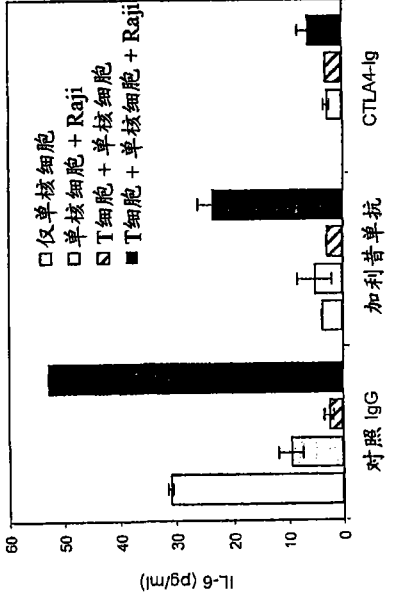


图 4D

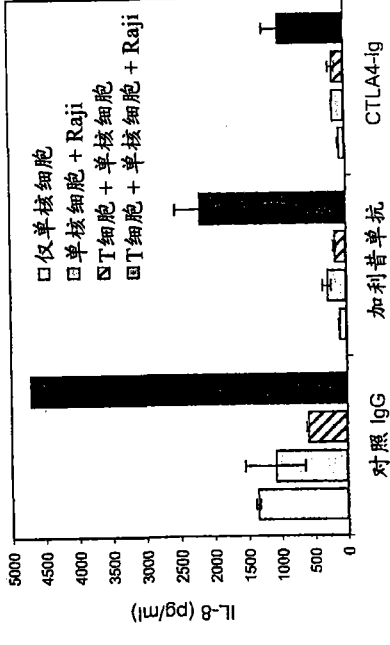


图 4C

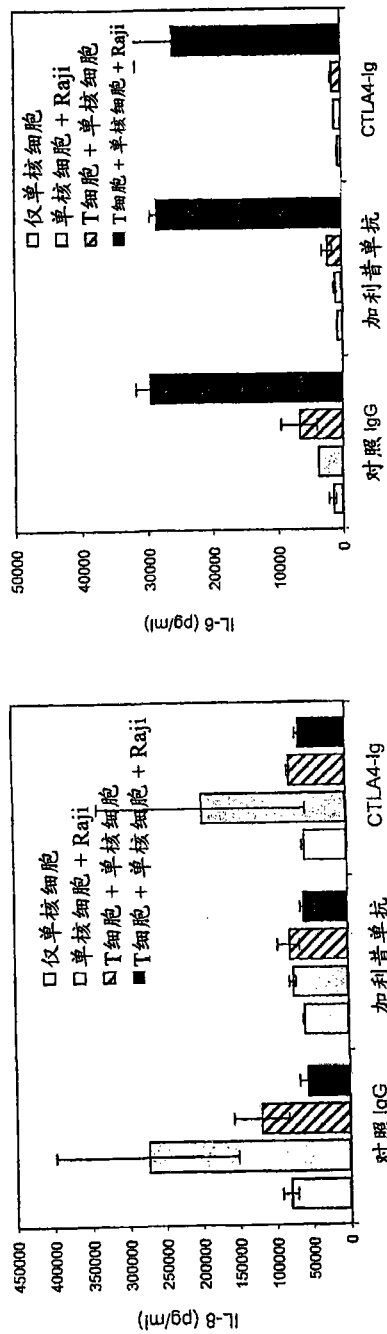


图4F

图4E