

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480021421.7

[43] 公开日 2006 年 9 月 6 日

[11] 公开号 CN 1829530A

[22] 申请日 2004.7.23

[21] 申请号 200480021421.7

[30] 优先权

[32] 2003.7.24 [33] US [31] 60/489,489

[86] 国际申请 PCT/IB2004/002636 2004.7.23

[87] 国际公布 WO2005/009465 英 2005.2.3

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.24

[71] 申请人 依奈特制药公司

地址 法国马赛

共同申请人 佩鲁贾研究大学

[72] 发明人 安德烈亚·韦拉尔迪

弗朗索瓦·罗马涅

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

代理人 章社杲 张 英

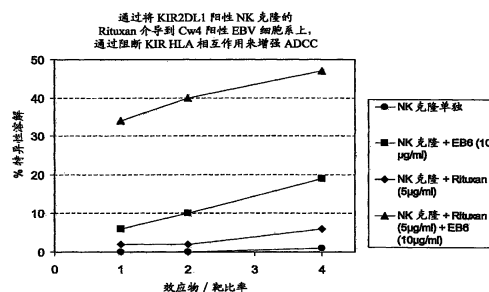
权利要求书 8 页 说明书 53 页 附图 4 页

[54] 发明名称

使用 NK 细胞增效化合物提高治疗性抗体功效的方法和组合物

[57] 摘要

本发明总体上涉及用于增加治疗性抗体功效的方法和组合物。通过提高 ADCC 机制来增强它们的疗效。更具体而言，本发明涉及将治疗性抗体与阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激其活性受体的化合物联合使用，从而增加治疗性抗体在人类患者体内的治疗功效。



1. 一种在有需要的人类患者体内治疗疾病的方法，包括：
 - a) 对所述患者施用一种阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激 NK 细胞的活化受体的化合物；并且
 - b) 对所述者施用一种能够通过 CD16 结合的治疗性抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述治疗性抗体具有一个人 IgG1 或 IgG3 Fc 的部分。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述化合物是一抗体、或包括它的一个抗原结合片段。
4. 根据权利要求 1 到 3 所述的方法，其中所述治疗性抗体是一单克隆抗体、或包括它的一个抗原结合片段。
5. 根据上述任一权利要求所述的方法，其中所述治疗性抗体不与放射性部分或毒性部分结合。
6. 根据上述任一权利要求所述的方法，其中所述化合物抑制 NK 细胞的抑制性受体。
7. 根据权利要求 1-5 所述的方法，其中所述化合物刺激 NK 细胞的活化受体。
8. 根据上述任一权利要求所述的方法，其中所述化合物是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体，或包括它们的一个抗原结合片段。

9. 根据上述任一权利要求所述的方法, 其中所述治疗性抗体是一人抗体、人源化抗体或嵌合抗体, 或包括它们的一个抗原结合片段。
10. 根据上述任一权利要求所述的方法, 其中所述治疗性抗体是利妥昔单抗或坎帕斯。
11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述抗体是利妥昔单抗, 并且所述抗体以每周少于 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用。
12. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述抗体是坎帕斯, 并且所述抗体以每周少于 90mg 的剂量施用。
13. 根据上述任一权利要求所述的方法, 其中所述化合物与 NKG2、KIR2DL 或 KIR3DL 人受体中的至少一种结合, 并且抑制相关的所述 NKG2、KIR2DL 或 KIR3DL 介导的 NK 细胞的细胞毒性的抑制作用。
14. 根据上述任一权利要求所述的方法, 其中所述化合物阻断选自包括 KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR3DL1、KIR3DL2、KIR3DL3、LILRB1、NKG2A、NKG2C、NKG2E 和 LILRB5 的一组 NK 细胞抑制性受体。
15. 根据上述任一权利要求所述的方法, 其中所述化合物与 KIR2DL 人受体的一个共同决定簇结合, 并且抑制 KIR2DL-介导的 NK 细胞的细胞毒性抑制作用。
16. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述化合物与 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 人受体的一个共同决定簇结合, 并且抑

制 KIR2DL1-、KIR2DL2-和 KIR2DL3-介导的 NK 细胞的细胞毒性抑制作用。

17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中所述化合物抑制在第 80 位具有赖氨酸残基的 HLA-C 等位基因分子与人 KIR2DL1 受体结合、以及在第 80 位具有天冬酰胺残基的 HLA-C 等位基因分子与人 KIR2DL2 和 KIR2DL3 受体结合。
18. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述化合物结合的抗原决定簇与由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200、或单克隆抗体 EB6 相同。
19. 根据权利要求 13-17 所述的方法, 其中所述化合物与由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200、或单克隆抗体 EB6 相竞争而结合在人 NK 细胞表面的 KIR 受体上。
20. 根据权利要求 13-17 所述的方法, 其中所述化合物是由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200 或其片段或衍生物、或单克隆抗体 EB6 或其片段或衍生物。
21. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述化合物是一抗体、或包括它的一个抗原结合片段。
22. 根据权利要求 7 或 21 所述的方法, 其中所述化合物与包括 NKp30、NKp44、NKp46 和 NKG2D 的一组受体中任选的一个相结合。
23. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中所述化合物衍生于包括 AZ20、A76、Z25、Z231 和 BAB281 的一组单克隆抗体中任选的一个、或与其竞争。

24. 根据上述任一权利要求所述的方法, 其中所述治疗性抗体和所述化合物同时施用于所述患者。
25. 根据上述任一权利要求所述的方法, 其中所述化合物在施用所述治疗性抗体一周内施用于所述患者。
26. 根据上述任一权利要求所述的方法, 其中所述疾病是癌、传染性疾病或免疫性疾病。
27. 根据上述任一权利要求所述的方法, 进一步包括一附加步骤, 其中在施用所述化合物之前或之后测定所述患者 NK 细胞的活性或数量。
28. 根据权利要求 27 所述的方法, 其中所述附加步骤包括
 - i) 在所述施用之前由所述患者获得 NK 细胞;
 - ii) 在存在一种或多种可被所述治疗性抗体识别的靶细胞、存在/不存在所述化合物的情况下, 孵育所述 NK 细胞; 以及
 - iii) 测定所述化合物对于所述 NK 细胞消除所述靶细胞能力的影响;其中测出所述化合物增强所述 NK 细胞消除所述靶细胞的能力时, 表明所述化合物适用于所述方法、并且所述方法适用于所述患者。
29. 一种药物组合物, 包括:
 - (a) 一种能够通过 CD16 结合的治疗性抗体, (b) 一种阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激 NK 细胞的活化受体的化合物, 以及 (c) 一种药物学上可接受的载体。

30. 根据权利要求 29 所述的组合物，其中所述治疗性抗体具有一个人或非人灵长类的 IgG1 或 IgG3 Fc 部分。
31. 根据权利要求 29 或 30 所述的组合物，其中所述化合物是一抗体、或包括它的一个抗原结合片段。
32. 根据权利要求 29 或 30 所述的组合物，其中所述化合物是一单克隆抗体、或包括它的一个抗原结合片段。
33. 根据权利要求 29-32 任一项所述的组合物，其中所述化合物是一人抗体、人源化抗体或嵌合抗体，或包括它们的一个抗原结合片段。
34. 根据权利要求 29-33 任一项所述的组合物，其中所述治疗性抗体是一单克隆抗体、或包括它的一个抗原结合片段。
35. 根据权利要求 34 所述的组合物，其中所述治疗性抗体是一人抗体、人源化抗体或嵌合抗体，或包括它们的一个抗原结合片段。
36. 根据权利要求 34 或 35 所述的组合物，其中所述抗体不与放射性部分或毒性部分结合。
37. 根据权利要求 29-36 任一项所述的组合物，其中所述化合物抑制 NK 细胞的抑制性受体。
38. 根据权利要求 29-36 任一项所述的方法，其中所述化合物刺激 NK 细胞的活化受体。
39. 根据权利要求 29-38 任一项所述的组合物，其中所述治疗性抗体是利妥昔单抗或坎帕斯。

40. 根据权利要求 29-37 和 39 任一项所述的组合物, 其中所述化合物阻断包括 KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR3DL1、KIR3DL2、KIR3DL3、LILRB1、NKG2A、NKG2C、NKG2E 和 LILRB5 的一组的 NK 细胞抑制性受体中任选的一个。
41. 根据权利要求 29 所述的组合物, 其中所述化合物与 KIR2DL 人受体的一个共同决定簇结合, 并且抑制 KIR2DL-介导的 NK 细胞的细胞毒性抑制作用。
42. 根据权利要求 41 所述的组合物, 其中所述化合物与 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 人受体的一个共同决定簇结合, 并且抑制 KIR2DL1-、KIR2DL2-和 KIR2DL3-介导的 NK 细胞的细胞毒性抑制作用。
43. 根据权利要求 41 所述的组合物, 其中所述化合物抑制在第 80 位具有赖氨酸残基的 HLA-C 等位基因分子与人 KIR2DL1 受体的结合、以及在第 80 位具有天冬酰胺残基的 HLA-C 等位基因分子与人 KIR2DL2 和 KIR2DL3 受体的结合。
44. 根据权利要求 29 或 40-43 任一项所述的组合物, 其中所述化合物结合的抗原决定簇与由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200、单克隆抗体 NKVSF1 或单克隆抗体 EB6 相同。
45. 根据权利要求 29 或 40-43 任一项所述的组合物, 其中所述化合物与由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200、单克隆抗体 NKVSF1、或单克隆抗体 EB6 相竞争而结合在人 NK 细胞的表面 KIR 受体上。
46. 根据权利要求 29 或 40-43 任一项所述的组合物, 其中所述化合物是由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200 或其片段或

衍生物、单克隆抗体 NKVSF1 或其片段或衍生物、或单克隆抗体 EB6 或其片段或衍生物。

47. 根据权利要求 38 所述的组合物，其中所述化合物结合于包括 NKp30、NKp44、NKp46 和 NKG2D 的一组受体中任选的一个。

48. 一种选择与治疗性抗体联合施用的化合物的方法，所述方法包括：

i) 提供一种抑制 NK 细胞的抑制性受体或刺激 NK 细胞的活化受体的待测化合物；

ii) 在存在 NK 细胞、并在存在/不存在所述待测化合物的情况下，将所述治疗性抗体与可被所述治疗性抗体特异性识别的靶细胞一同孵育；

iii) 测定所述化合物对于所述 NK 细胞消除所述靶细胞能力的影响；

其中测出所述化合物增强所述 NK 细胞消除所述靶细胞的能力时，表明所述化合物适用于所述方法。

49. 根据权利要求 48 所述的方法，其中所述化合物将所述治疗性抗体摧毁所述靶细胞的能力增强 30%。

50. 根据权利要求 48 所述的方法，其中所述化合物将所述治疗性抗体摧毁所述靶细胞的能力增强 50%。

51. 根据权利要求 48-50 任一项所述的方法，其中所述化合物选自包括抗体、抗体片段、单克隆抗体、单克隆抗体片段、人源化抗体、嵌合抗体和人抗体的一组物质。

52. 根据权利要求 48-51 任一项所述的方法，其中所述靶细胞是癌细胞、病毒感染的细胞或构成自身免疫疾病基础的细胞。

-
53. 根据权利要求 48-52 任一项所述的方法，其中所述治疗性抗体是利妥昔单抗或坎帕斯。
 54. 一种增加涉及对患者施用可以由 CD16 结合的治疗性抗体的治疗功效的方法，所述方法包括在施用所述治疗性抗体之前、同时、或之后对所述患者施用一种阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激 NK 细胞的活化受体的有效治疗量的化合物。
 55. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述化合物通过强化所述患者的 ADCC 来增加所述治疗功效。

使用 NK 细胞增效化合物提高 治疗性抗体功效的方法和组合物

技术领域

本发明总体上涉及提高治疗性抗体功效的方法和组合物。更具体而言，本发明涉及治疗性抗体与阻断自然杀伤细胞的抑制性受体或刺激自然杀伤细胞的活化受体的化合物的联合使用，从而使得哺乳动物患者的自然杀伤细胞的细胞毒性效用增强，尤其是通过提升 ADCC 机制以增强在人类患者中的治疗功效。

背景技术

人类的许多治疗方案都是建立在使用治疗性抗体的基础之上。这些包括，例如使用已开发的治疗性抗体来使靶细胞衰竭，特别是病态细胞如病毒侵染的细胞、肿瘤细胞或其它病源细胞。这些抗体是典型的 IgG 类的单克隆抗体，典型的是具有人 IgG1 或 IgG3 Fc 部分。这些抗体可以是天然抗体或重组抗体，并且通常是“人源化”的小鼠抗体（即，包括来自各种物种的功能域，典型的是人或非人灵长类的 Fc 部分、并带有小鼠源的可变区或互补决定区（CDR））。可选替代的是，该单克隆抗体可以在具有人 Ig 位点的转基因的小鼠中通过免疫作用而完全人源化，或通过由衍生自人类细胞的 cDNA 文库获得。

该治疗性抗体的一个特殊的例子是利妥昔单抗（rituximab）（美罗华 Mabthera[®]，Rituxan[®]），它是一种由人 $\gamma 1$ 和 κ 恒定区（因而带有人 IgG1 Fc 部分）与带有 CD20 特异性的鼠可变区连接成的嵌合

抗-CD20 单克隆抗体。在过去的几年中，利妥昔单抗已经极大地改变了对 B 淋巴细胞增生性癌变，尤其是非霍奇金淋巴瘤（NHL）的治疗方案。人源化的 IgG1 抗体的其它例子包括用于治疗 B 细胞恶性肿瘤（癌变）的阿来组单抗（alemtuzumab）（Campath-1H[®]）、和用于治疗乳腺癌的曲妥珠单抗（trastuzumab）（Herceptin[®]）。开发中的治疗性抗体的其它例子正在本领域中出现。

治疗性抗体的作用机制仍然是一个争论的话题。注入抗体，导致带有被该抗体特异性识别抗原的细胞的衰竭。该衰竭作用可以通过至少 3 种机制来介导：抗体介导的细胞毒性（ADCC）、补体依赖型溶解、和通过作为抗体靶标的抗原给出的信号对肿瘤生长的直接抗肿瘤抑制。

尽管这些抗体代表了一种人类治疗，尤其是对于治疗肿瘤，的全新和有效的方法，但是它们并不都具有很强的疗效。例如，尽管利妥昔单抗单独施用（给予）或与化疗药物联合施用（给予）显示出对于治疗中低度和高度 NHL 有效，但是 30%至 50%的低度 NHL 患者对于利妥昔单抗没有临床反应。有人提出淋巴细胞表面上的 CD20 表达水平、治疗期间存在的高肿瘤负荷、或血清中利妥昔单抗的低浓度可以解释为什么在一些患者中利妥昔单抗没有疗效。然而，治疗失败的实际原因在很大程度上仍然是未知的。

另外，由于施用治疗性抗体的副作用，使得治疗性抗体的使用受到了限制。例如，在患者中出现的发热、头痛、恶心、低血压、哮喘、皮疹、感染和许多其它可能出现的副作用潜在地限制了施用抗体的可能剂量或频率。

因此，提高治疗性抗体的疗效或者能够减少抗体的使用剂量来实现疗效从而尽量减少可能产生的副作用，是令人感兴趣的。本发明将着手解决这些问题及其它需要。

发明内容

本发明披露了增强治疗性抗体功效的新方法。无须受下述理论的限制，我们认为使用本发明方法所得到惊人的结果是由于：当注入治疗性抗体时，它们在体内能够强化 ADCC 机制。实际上，本发明提供的全新的组合物和方法能够克服目前与治疗性抗体疗效相关的困难。在本发明中可以看到来自个体的 NK 细胞由于缺少 NK 细胞的活化，即通过在抑制 NK 细胞上的抑制受体，而具有很差的治疗性单克隆抗体 (mAb) 介导的 ADCC。优选地，ADCC 机制的提高是通过施用阻断在自然杀伤细胞上的抑制受体或刺激在自然杀伤细胞上的活化受体的化合物，从而促进哺乳动物患者增强自然杀伤细胞的细胞毒性作用来实现的。优选的化合物是抗体或其片段。

所述抗体或其它化合物可以与 NK 细胞的抑制性受体（例如杀伤细胞抑制性受体 (KIR 或 NKG2A/C) 分子进行反应，或与其活化受体（例如 NK 细胞上的 NKp30、NKp44 或 NKp46 这样的 NCR）反应，从而中和细胞的抑制作用并且增加了其 ADCC 活性。

更具体而言，本发明披露了治疗患者的方法，其中阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的化合物，优选是抗体或其片段，与治疗性抗体联合施用于患者。本文中发明人证明了治疗性抗体通过如共注射方式与优选为抗体或其片段的这类化合物联合施用，通过例如阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激 NK 细胞的活化受体而克服了 NK 细胞的抑制，从而可以极大地增强其治疗功效。

本发明还涉及包括治疗性抗体和阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激 NK 细胞活化受体的化合物的药物组合物，该化合物优选为抗体或其片段。本发明还涉及包括治疗性抗体和阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激 NK 细胞的活化受体的化合物的试剂盒，该化合物优选为抗体或其片段。

本发明还涉及将阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激 NK 细胞的活化受体的化合物（优选为抗体或其片段）用于增加治疗性抗体的治疗功效，或用于提高用治疗性抗体进行治疗的患者体内的 ADCC 的应用。

本发明还涉及阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的化合物（优选为抗体或其片段）和治疗性抗体用于制备治疗疾病的药物中的应用。更具体而言，该疾病的治疗需要消除（耗尽）靶细胞，优选为患病的细胞，如病毒感染的细胞、肿瘤细胞或其它病原细胞。优选地，该疾病是癌、传染性疾病或免疫疾病。更优选的是，该疾病选自包括癌症、自身免疫疾病、炎症、和病毒性的一组病症。该疾病还涉及移植排斥，更为具体的是同种异体移植排斥和移植物抗宿主疾病（GVHD）。

本发明还包括用于减少治疗性抗体（例如通过 Fc γ 受体结合的抗体，优选为 CD16（Fc γ RIIIa））剂量的方法。例如，治疗性抗体与阻断 NK 细胞上的抑制性受体或刺激 NK 细胞上的活性受体的化合物的联合施用可以允许使用低剂量的治疗性抗体。这类抗体可以以比没有该化合物时的推荐剂量少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更低的剂量使用。

另外，本发明提供了用于测定治疗性抗体（例如由 CD16 结合的抗体）的有效治疗量和减小剂量的方法。该方法包括：i）将第一浓度的治疗性抗体与靶细胞和 NK 细胞共同孵育，并且没有阻断 NK 细胞上的抑制性受体或刺激其上的活化受体的化合物存在；ii）将第二较低浓度的治疗性抗体与靶细胞和 NK 细胞共同孵育，并且存在阻断 NK 细胞上的抑制性受体或刺激其上的活化受体的化合物；iii）测定步骤 ii）中所观察到的靶细胞的消除（耗竭）是否与步骤 i）中所观察到的消除一样多。如果观察到步骤 ii）与步骤 i）同样有效，那么可以改变化合物和治疗性抗体的相对浓度，并且观察消除（耗

竭)情况,从而确定适用于特定患者的不同条件,例如针对患者的不同需要最大程度地消除靶细胞,并尽量减少治疗性抗体的剂量或尽量减少化合物的剂量。

在一个特定方面,本发明提供了一种在有需要的人类患者体内治疗疾病的方法,包括:a)对所述患者施用阻断NK细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的化合物;以及b)对所述患者施用可以通过CD16进行结合的治疗性抗体。

在一个实施例中,将该治疗性抗体和化合物同时施用于患者。在另一实施例中,在施用治疗性抗体1周内、4日内、3日内或同日内(即24小时内)将该化合物施用于该患者。在另一实施例中,该疾病是癌、传染性(感染性)疾病或免疫疾病。

在一个实施例中,该方法进一步包括一个附加步骤,其中在施用该化合物之前或之后测量患者体内的NK细胞的活性或数量。在另一个实施例中,该附加步骤包括:i)在施药之前从患者体内获得NK细胞;ii)在有该化合物/无该化合物的情况下,将NK细胞在存在一种或多种可被该治疗性抗体识别的靶细胞的情况下孵育;以及iii)测量该化合物对NK细胞消除(消耗)靶细胞能力的影响;当发现该化合物增强了NK细胞消除靶细胞的能力时表明该化合物适用于该方法,并且该方法适用于该患者。

在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,包括:一治疗性抗体(例如可以通过CD16结合的抗体),一个抑制NK细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的化合物,以及药物可接受的一个载体。另一方面,本发明提供了一种试剂盒,包括:一治疗性抗体(例如通过CD16结合的抗体),以及一种或多种阻断NK细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的化合物。

对于任何上述方法、组合物、或试剂盒，在一个实施例中该治疗性抗体具有人 IgG1 或 IgG3 Fc 片段。在另一个实施例中，该化合物是抗体或其片段。在另一个实施例中，该治疗性抗体是单克隆抗体或其片段。在另一个实施例中，该治疗性抗体不与放射性部分或毒性部分结合。在另一个实施例中，该化合物抑制 NK 细胞的抑制性受体。在另一个实施例中，该化合物刺激 NK 细胞的活化受体。在另一个实施例中，该化合物是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体，或其片段。在另一个实施例中，该治疗性抗体或化合物可以是如 Fab 片段、Fab'2 片段、CDR 和 ScFv 的抗体片段或衍生物。

在一个实施例中，该治疗性抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体，或其片段。在另一个实施例中，该治疗性抗体是利妥昔单抗（rituximab）或坎帕斯（Campath）。在另一个实施例中，该抗体是利妥昔单抗，并且所述抗体以每周少于 375mg/m² 的剂量施用。在另一个实施例中，该抗体是坎帕斯，并且该抗体以每周少于 90mg 的剂量施用。

在一个实施例中，该化合物与 NKG2、KIR2DL 或 KIR3DL 人受体中的至少一个结合，并且抑制相关的 NKG2-、KIR2DL-或 KIR3DL-介导的 NK 细胞的细胞毒性抑制作用。在另一个实施例中，该化合物阻断选自包括 KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR3DL1、KIR3DL2、KIR3DL3、LILRB1、NKG2A、NKG2C、NKG2E 和 LILRB5 的一组 NK 细胞的抑制性受体。在另一个实施例中，该化合物与 KIR2DL 人受体的共同决定簇结合，并且抑制 KIR2DL 介导的 NK 细胞细胞毒的抑制作用。在另一个实施例中，该化合物与 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 人受体的共同决定簇结合，并且抑制 KIR2DL1-、KIR2DL2-和 KIR2DL3-介导的 NK 细胞的细胞毒性抑制作用。在另一个实施例中，该化合物抑制在第 80 位（位点 80）具有赖氨酸（Lys）残基的 HLA-C 等位基因分子与人 KIR2DL1 受体的结合，并且抑制在第 80 位（80 位

点)具有天冬酰胺(Asn)残基的HLA-C等位基因分子与人KIR2DL2和KIR2DL3受体的结合。在另一个实施例中,该化合物与由杂交瘤DF200产生的单克隆抗体DF200结合到同一抗原决定簇上。在另一个实施例中,该化合物与由杂交瘤DF200产生的单克隆抗体DF200竞争结合到人NK细胞在表面的KIR受体上。在另一个实施例中,该化合物是由杂交瘤DF200产生的单克隆抗体DF200或其片段。

在一个实施例中,该化合物与选自包括NKp30、NKp44、NKp46和NKG2D的一组中的一个受体结合。在另一实施例中,该化合物是选自包括AZ20、A76、Z25、Z231、和BAB281的一组中的一个单克隆抗体衍生的,或与之竞争。

另一方面,本发明提供了一种选择用于与治疗性抗体联合施用的化合物的方法,所述方法包括: i) 提供一种抑制NK细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的待测化合物; ii) 在NK细胞存在的条件下,在有/无该待测化合物时,将治疗性抗体与可被该治疗性抗体特异性识别的靶细胞一起孵育; 以及 iii) 测定该化合物对于NK细胞消除靶细胞能力的影响; 其中测出该化合物增强NK细胞消除靶细胞的能力时,则表明该化合物适用于该方法。

在一个实施例中,该化合物将该治疗性抗体摧毁靶细胞的能力增强50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%或更高。在另一个实施例中,该化合物选自包括抗体、抗体片段、单克隆抗体、单克隆抗体片段、人源化抗体、嵌合抗体和人抗体的一组物质。在另一个实施例中,该靶细胞是癌细胞、病毒感染的细胞、或构成自身免疫疾病基础的细胞。在另一个实施例中,该治疗性抗体是利妥昔单抗(rituximab)或坎帕斯(CAMPATH)。

另一方面，本发明提供了一种提高施用于患者体内可以由 CD16 结合的治疗性抗体的治疗功效的方法，所述方法包括在施用所述治疗性抗体之前、同时或之后对所述患者施用阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的有效治疗量的化合物。在一个实施例中，该化合物通过增强所述患者的 ADCC 提高了治疗功效。

附图说明

图 1: 单克隆抗体 DF200 与不同人 KIR2DL 受体的一个共同决定簇相结合。

图 2: 用抗 KIR2DL 单克隆抗体(抗 KIR2DL mAb)在 C1R Cw4 靶上以效应物/靶比率为 4/1 进行溶解重构。单克隆抗体 DF200 抑制 KIR2DL-介导的在 Cw4 阳性靶细胞上的 KIR2DL1 阳性 NK 细胞的细胞毒性(重构溶解)的抑制作用。

图 3: 通过将一个 KIR2DL1 阳性 NK 克隆的 Rituxan 介导到一个 Cw4 阳性 EBV 细胞系上，通过阻断 KIR/HLA 相互作用来增强 ADCC。针对在 5ug/ml 抗 CD20 抗体(美罗华, Rituxan)和 10ug/ml EB6 抗体(抗 KIR2DL1)存在下; Rituxan 单独作用; EB6 单独作用; 或没有任何抗体存在下，以各种效应物/靶比率(从 1 到 4)对于 Cw4 阳性 EBV 转化的(CD20 阳性)靶细胞系测试 KIR2DL1 的 NK 克隆细胞溶解关系。当存在抗 KIR2DL 抗体(EB6)时，极大地增强了 ADCC。

图 4: 通过将一个 KIR2DL1 阳性 NK 克隆的坎帕斯(Campath)介导到一个 Cw4 阳性 EBV 细胞系上，通过阻断 KIR/HLA 相互作用来增强 ADCC。针对在坎帕斯和 100ug/ml EB6 抗体(抗 KIR2DL1)存在下; 坎帕斯单独作用; EB6 单独作用; 或没有任何抗体存在下，对 Cw4 阳性 EBV 转化的(CD20 阳性)靶细胞系测试 KIR2DL1 的

NK 克隆细胞溶解关系。当存在抗 KIR2DL1 抗体 (EB6) 时, 极大地增强了 ADCC。

具体实施方式

本发明提供了一种用于增加治疗性抗体功效的方法。本发明尤其披露了一种化合物的应用, 该化合物优选为抗体或其片段, 它可增强 NK 细胞的效力, 优选通过阻断 NK 细胞的抑制性受体或激活其活化受体可以显著提高治疗性抗体的功效。实际上, 本发明人证明了多种治疗性抗体的疗效可以通过直接作用于 NK 细胞受体 (如, 抑制性受体) 上抗体的共同作用而极大地增强。

因此, 本发明涉及一种在有需要的患者体内治疗疾病的方法, 包括:

a) 给所述患者施用一种可以阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的化合物, 优选为一种抗体或它的一个片段; 以及

b) 对所述患者施用一种治疗性抗体。

所述治疗性抗体可以通过 NK 细胞的 CD16 结合, 优选通过它的 Fc 区域结合。

优选地, 所述治疗性抗体具有人 IgG1 和 IgG3 Fc 部分, 特别是单克隆抗体或它的片段, 进一步优选为人源化抗体、人抗体或嵌合抗体, 或其片段, 例如利妥昔单抗 (rituximab)。

所希望的是阻断 NK 细胞的抑制性受体的化合物, 优选为抗体或其片段, 可以在施用 (给予) 治疗性抗体之前、同时、或之后施用于 (给予) 患者。不同抗体的施用方法依赖于它们的生物利用率和药物代谢动力学。优选在施用该化合物一周内施用治疗性抗体,

该阻断 NK 细胞的抑制性受体的化合物优选为抗体或其片段，更优选是在 5 天或 2 天内施用。优选地，该治疗性抗体在施用阻断 NK 细胞的抑制性受体的化合物之前或同时施用，优选为抗体或其片段。

另一方面，本发明涉及一种在接受治疗性抗体治疗的患者体内提高 ADCC 的方法，所述方法包括对所述患者施用所述治疗性抗体之前、同时或之后施用足够量的提高 ADCC 的化合物，该化合物阻断 NK 细胞的抑制性受体，优选为抗体或其片段。所述治疗性抗体可以通过 NK 细胞上的 CD16 结合，优选通过它的 Fc 区域结合。优选地，所述治疗性抗体是人 IgG1 或 IgG3 片段，特别是单克隆抗体或其片段，更优选为个人抗体、人源化抗体或嵌合抗体，或其片段，例如利妥昔单抗。

另一方面，本发明涉及一种提高患者体内的治疗性抗体功效的方法，所述方法包括对所述患者施用所述治疗性抗体之前、同时或之后施用一定量的阻断 NK 细胞的抑制性受体的化合物，优选为抗体或其片段，该剂量足以提高所述治疗性抗体的功效。所述治疗性抗体可以通过 CD16 结合，优选通过其 Fc 区域结合。优选地，所述治疗性抗体是人 IgG1 或 IgG3 Fc 片段，特别是单克隆抗体或其片段，更优选人抗体，人源化抗体或嵌合抗体，或其片段，例如利妥昔单抗。

定义

在本文中，除非另有说明下面的术语具有其界定的含义。

本文中，“NK”细胞是指与非常规性免疫相关的淋巴细胞亚群。NK 细胞可以通过一定的特征和生物性能来加以识别：如特异性表面抗原（包括 CD16、CD56 和/或 CD57）的表达，在细胞表面上 α/β 或 γ/δ TCR 复合物的缺乏，联接到不表达“自体”MHC/HLA 抗原

的细胞并通过激活特异性的细胞溶解酶杀死细胞的能力，杀死用于表达 NK 活化受体的配体的肿瘤细胞或其它病态细胞的能力，以及释放被称作细胞因子的蛋白分子以刺激或抑制免疫应答的能力。利用本领域熟知的方法，任何这些特征和活性都可以用于识别 NK 细胞。

本文中使用的术语“抗体”是指多克隆或单克隆抗体。依赖于重链上恒定区的类型，抗体可分为 5 个主要类别：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。这些类别中的一些可以进一步划分为亚类或同种型，如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等等。一种典型的免疫球蛋白（抗体）结构单元包括一个四聚物（四聚体）。每个四聚物由两对同样的多肽链对构成，每对（多肽链）具有一个“轻”链（约 25kDa）和一个“重”链（约 50-70kDa）。每个链的 N 末端定义一个约 100-110 或更多氨基酸的可变区，该可变区主要负责抗原识别。可变轻链（V_L）和可变重链（V_H）两术语分别是指这些轻链和重链。相应于不同种类的免疫球蛋白的重链恒定区分别称作“α、”“δ、”“ε、”“γ、”和“μ”。不同类别的免疫球蛋白的亚单位（亚基）结构和三维构象已为所公知。IgG 和/或 IgM 是本发明中优选的抗体类别，特别优选为 IgG，由于它们是在生理条件下是最常见的抗体，由于它们在实验室条件下最容易制备，并且由于 IgG 可以被 Fc γ 受体特异性识别。优选地，本发明的抗体是单克隆抗体。特别优选的是人源化抗体、嵌合抗体、人抗体、或其它的-人-适宜的抗体。

在本发明的上下文中，术语“治疗性的一个抗体或多个抗体”特别是指具有能够消除（凋亡）患者体内靶细胞功能的任何抗体。尤其是，治疗性抗体特异性结合到存在于靶细胞表面的抗原上，如肿瘤特异性抗原主要或唯一出现在肿瘤细胞上。优选地，治疗性抗体包括人 Fc 部分或能够与人 Fc 受体相互作用。治疗性抗体可以通过如 ADCC 或其它各种方法（手段）对准靶细胞，并且可以是“裸露

的”，即不带有连接部分（conjugated moieties），或与诸如放射性标记物或毒素这些化合物结合。

术语“特异性结合到”是指抗体在竞争性结合测试中优选可以结合到结合伴侣（binding partner）上，例如当用蛋白或其抗原决定部位的重组形式、或分离的 NK 或相关靶细胞的表面上存在的天然蛋白进行测试时的活性 NK 受体如 NKp30、NKp44 或 NKp46，或人 Fc γ 受体。竞争性结合测试及用于测定特异性结合的其它方法在下文中会进一步描述，同时也是本领域所公知的。

“适用于人的”抗体是指可以安全用于人，例如本文中所描述的治疗方法中的任何抗体、衍生抗体、或抗体片段。适用于人的抗体包括所有类型的人源化抗体、嵌合抗体、或完全的人抗体，或任何至少抗体的一部分来源于人的抗体或者是经过修饰后的抗体从而避免当使用天然的非-人抗体时诱发免疫应答。

“免疫原性片段”在本文中是指能够激发免疫应答的任意多肽或肽片段，如（i）抗体结合所述片段和/或结合含有所述片段的任何形式的分子（包括膜联受体及由其衍生的突变体）的产生，（ii）涉及 T-细胞与包括任何 MHC 分子及由所述片段衍生的肽的双分子复合物反应的 T-细胞应答的刺激，（iii）转染的载体（如表达编码哺乳动物免疫球蛋白基因的噬菌体或细菌）的结合。可选替代的，免疫原性片段也可以指能够激发免疫应答如上文所述的任何结构，如通过共价连接子（共价连接物）结合到载体蛋白上的肽片段，在氨基酸序列中包括所述肽片段的嵌合重组体多肽结构，以及尤其包括用 cDNA 转染的细胞，该 cDNA 的序列中包括所述片段的编码。

对于本发明的目的，“人源化”抗体是指这样的一个抗体，其中由一种或多种人免疫球蛋白的恒定结构区和可变结构区通过如 CDR 这样的结合区与一种动物免疫球蛋白融合在一起。设计这样的

人源化抗体是为了保持非人抗体的结合特异性，从中导出各个结合区，但要避免对于非人抗体的免疫反应。

“嵌合抗体”是指一种抗体分子，其中 (a) 恒定区或其一部分已经被改变、替代或交换使得抗原结合位点 (可变区) 是与一个不同的或改变后的类、效应物功能和/或种、或者一个完全不同的分子的恒定区相连，这些分子可以为嵌合抗体如酶、毒素、激素、生长因子、药物等赋予全新的性能；或 (b) 可变区或其一部分被改变、替代或与一种具有不同的或经改变的抗原特异性的可变区进行交换。在本发明的优选实施例中，嵌合抗体仍保存免疫球蛋白的 Fc 区域，优选为人 Fc 区域，从而可以与靶细胞表面上的人 Fc 受体相互作用。

在本发明的上下文中，“增强、”“活性、”或“活化的”NK 细胞是指生物活性的 NK 细胞，更特殊的是指具有溶解靶细胞能力的 NK 细胞。例如一种“活性”NK 细胞能够杀死表达 NK 活化受体-配体，并且不表达“自身”MHC/HLA 抗原 (KIR 不相容细胞) 的细胞。用于重新导向杀伤实验的适宜的靶细胞的实例有 P815 细胞和 K562 细胞，但是很多细胞类型也可以使用并且是本领域所公知的 (参见，如 Sivori et al. (1997) J. Exp. Med. 186: 1129-1136; Vitale et al. (1998) J. Exp. Med. 187: 2065-2072; Pessino et al. (1998) J. Exp. Med. 188: 953-960; Neri et al. (2001) Clin. Diag. Lab. Immun. 8: 1131-1135)。“增强、”“活性、”或“活化的”细胞也可以通过任何与 NK 活性相关的其它性能或本领域公知的活性来识别，如细胞因子 (例如 IFN- γ 和 TNF- α) 产生的细胞内游离钙含量的增加。针对本发明的目的，“增强、”“活性、”或“活化的”NK 细胞尤其是指体内的没有通过刺激抑制性受体而被抑制的 NK 细胞、或在该细胞中例如通过刺激活化受体来克服这样的抑制作用的 NK 细胞。

如本文中所使用的，术语“活性 NK 受体”是指 NK 细胞表面上的任意分子，当受刺激时，其引起与 NK 活性相关的、本领域所公知的性能或活性的可测量的增加，如细胞因子（如 IFN- γ 和 TNF- α ）的产生、细胞内游离钙含量的增加、在本说明书中的其它处描述的在重新导向杀伤实验中导向靶细胞的能力、或刺激 NK 细胞增殖的能力。术语“活性 KIR 受体”包括但不限于：NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、IL-12R、IL-15R、IL-18R 和 IR-21R。如在本文中所使用的，术语“活性 NK 受体”不包括 IL-2 受体（IL-2R）。确定 NK 细胞是否有活性或增殖与否的方法在下文中将详细描述，并且对本领域技术人员是公知的。

如在本文中所使用的，术语“抑制”或“抑制性”NK 受体是指 NK 细胞表面上的任意分子，当受刺激时，其引起与 NK 活性相关的、领域所公知的特性或活性的可测量的减少，如细胞因子（如 IFN- γ 和 TNF- α ）的产生、细胞内游离钙含量的增加、或在本说明书中的其它处描述的在重新导向杀伤实验中溶解靶细胞的能力。这样的受体的实例包括：KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR3DL1、KIR3DL2、KIR3DL3、LILRB1、NKG2A、NKG2C、NKG2E 和 LILRB5。确定 NK 细胞是否有活性的方法在下文中将加以详细描述，并且对本领域技术人员是公知的。

在本发明中，术语“阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激其活化受体”是指某些化合物（优选为抗体、其片段或衍生物）的能力，优选是指直接与至少一种如 KIR、NKG2A/C、NKp30、NKp44、NKp46 或其它本文中所列的抑制性或活性 NK 细胞受体的相互作用、或者中和来自受体的抑制性信号（在抑制性受体的情况下）或来自受体的刺激信号（在活化受体的情况下）。对于抑制性受体，优选的化合物为能够阻断 HLA 和受体之间的相互作用的化合物，优选为抗体或其片段。当该化合物是抗体时，该抗体可以是多克隆抗体、或优选为单克隆抗体。它们可以通过杂交瘤或通过基因工程化的用

以表达所需的可变区和恒定区的重组（体）细胞来产生。该抗体可以是单链抗体或保留该抗原特异性以及如 Fab 片段、Fab'2 片段、CDR 和 ScFv 这些更低级的铰链区或其可变区的其它抗体衍生物。这些可以是多功能抗体、重组（体）抗体、人源化抗体或它们的变体。

在本发明的上下文中，“共同决定簇”是指由一组相关受体如人 KIR2DL 受体组的多个成员共有的决定簇或抗原决定部分（簇）。该决定簇或抗原决定部分（簇）可以表现为由所述成员共有的肽片段或构象抗原决定部分（簇）。在一个特定实施例中，该共同决定簇包括被单克隆抗体 DF200、NKVSF1 或 EB6 所识别的抗原决定部分（簇）。

在本发明的上下文中，术语抗体与一个共同决定簇的“结合”是指一个抗体与所述的决定簇具有特异性和/或亲和性的结合，例如位于人 NK 细胞表面上的其它不相关的构象或决定簇或结构基本上是不通过高亲和性或特异性结合的。更具体而言，根据本发明单克隆抗体对所述决定簇的结合可以与所述抗体与其它抗原决定部分或决定簇的结合区分开来。

能够结合于 NK 细胞的抑制性受体并阻止其刺激作用的化合物从而成为“中和”或“抑制性”化合物，优选为抗体，在这个意义上它们阻断，至少部分阻断通过 NK 细胞的抑制性受体（如 KIR 或 NKG2A/C 受体）所介导的抑制性信号通路。更为重要的是，该抑制性活性可以对于几种类型的 KIR 或 NKG2A/C 受体表现出来，从而这些化合物（优选为抗体）可以用于各种患者，并且具有很高的疗效。

术语“重组（体）”，当用于如细胞、或核酸、蛋白、或载体时，是指该细胞、核酸、蛋白、或载体通过引入外源的核酸或蛋白或经

改造的天然核酸或蛋白而已经被修饰，或该细胞衍生自经这样修改过的细胞。从而，例如，重组（体）细胞表达的基因在天然（非重组）形式的细胞中未发现，或表达的天然基因本应为异常表达、低量表达或完全不表达。

在本发明的上下文中，病人或患者包括各种哺乳动物患者或病人，更优选为人类患者或病人。

治疗性抗体

本发明涉及 NK 细胞增效化合物与治疗性抗体的联合使用。大量治疗性抗体中的任意一种都可以用于本发明。基本上，任何抗体，无论是“裸露的”或与放射性标记物、毒素、或其它部分（moiety）结合的，或无论是全长或片段，或无论是真抗体或抗体的修饰衍生物都可以使用。优选地，该方法是用以增强治疗功效，在其中 NK 细胞的活性对所施用治疗性抗体的疗效起一定作用 - 但不必是唯一的，并且优选的抗体或片段自然应包括、或经修改后包括人 Fc 区域或能够被人 Fc 受体（如 Fc γ 受体）特异性抗体识别的其它区域。

本发明的化合物能用于增强治疗性抗体消除表达被该治疗性抗体特异性识别的抗原的靶细胞的能力。相应地，至少部分是由能够被治疗性抗体作为靶标的细胞所引起或恶化的任何疾病或病症都可以用本文中描述的方法来治疗。靶细胞的特定例子包括：与过敏、自身免疫疾病、同种异体反应等相关的肿瘤细胞、病毒感染的细胞、同种异体细胞、病态的免疫活性细胞（如 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、呈现抗原的细胞等），或甚至是健康的细胞（如在抗血管生成治疗方案中的内皮细胞）。在本发明的上下文中，最优选的靶细胞是肿瘤细胞和病毒感染的细胞。该治疗性抗体可以，例如，介导细胞毒性作用或细胞溶解，特别是通过抗体依赖型细胞介导的细胞毒性作用（ADCC）。

ADCC 需要用于 IgG 的 Fc 部分的白细胞受体 (FcγR), 其功能是将 IgG 致敏的+抗原与带有 FcγR 的细胞毒性细胞结合, 并且用以启动细胞活化机制。因此, 该治疗性抗体能够形成免疫复合物。例如, 免疫复合物可以是被治疗性抗体覆盖的肿瘤靶点。更具体而言, 该抗体能够通过 CD16 结合, 优选通过它的 Fc 区域结合。确定治疗性抗体是否与 CD16 这样的 Fcγ 受体相结合可以使用任何适宜的方法来测试, 例如通过确定与重组产生的 CD16 多肽或其片段的结合, 可选固定在一个载体 (支撑物) 上, 或例如通过确定该治疗性抗体与已知表达 CD16 或怀疑其表达 CD16 的细胞的结合。

该治疗性抗体可以是多克隆、或优选为单克隆。它们可以由杂交瘤或通过基因工程化的用于表达所需的可变区和固定区的重组 (体) 细胞来产生。该抗体可以是单链抗体或保留有抗原特异性和低级铰链区的其它抗体衍生物, 或它们的变体。这些可以是多功能抗体、重组抗体、人源化抗体, 它们的片段或变体。所述的其片段或衍生物优先选自 Fab 片段、Fab'2 片段、CDR 和 ScFv。优选的片段是抗原结合片段。包括抗原片段的治疗性抗体也可以包括但不限于双特异性抗体; 一种适宜的双特异性抗体的例子是包括一个对 CD16 特异的抗原结合区和一个对肿瘤抗原特异的抗原结合区。其它的包括多片段的抗体形式包括将两个不同抗体的结合区结合到一个单独的多肽链上的重组 (体) 双特异性抗体衍生物, 也称作 BiTE™ (Kufer P, et al TRENDS in Biotechnology 2004; 22 (5): 238-244; 和 Baeuerle et al, Current Opinion in Molecular Therapeutics 2003; 5 (4): 413-419, 其披露的内容通过引证合并于本文中。)

治疗性抗体通常对表面抗原 (例如膜抗原) 具有特异性。最优选的治疗性抗体是对肿瘤抗原 (例如被肿瘤细胞特异性表达的分子) 如 CD20、CD52、ErbB2 (或 HER2/Neu)、CD33、CD22、CD25、MUC-1、CEA、KDR、αVβ3 等, 特别是对淋巴瘤抗原 (例如 CD20)

具有特异性。该治疗性抗体具有优选为人或非人灵长类的 IgG1 或 IgG3 Fc 部分，更优选为人 IgG1。

在一个实施例中，该抗体包括在其 Fc 部分的修饰，它们在 ADCC 时增强抗体与 NK 细胞的相互作用。这样经修饰的治疗性抗体（“经改变的抗体”）通常包括优选在 Fc 区域的修饰，它们可以改进该抗体与一种或多种 FcγR 的结合亲和性。用于改变抗体对于一种或多种 FcγR 的改变的结合方法在本领域是公知的，可以参见如 PCT 申请公开号为 WO 2004/016750（国际申请号为 PCT/US2003/025399）、WO 99/158572、WO 99/151642、WO 98/123289、WO 89/107142、WO 88/107089 和美国专利第 5,843,597 号和第 5,642,821 号，将它们的全部内容通过引证合并于本申请中。

本发明中确认的治疗性抗体，如用于治疗风湿性关节炎的 D2E7（Cambridge Antibody Technology Group, plc（Cambridge, UK）/BASF（Ludwigshafen, Germany））、或英利昔单抗（Infliximab）（Centocor, Inc., Malvern, PA；用于治疗克隆氏病（Crohn's disease）和风湿性关节炎）、或在国际专利申请 PCT/US2003/025399（将全部内容以参考文献方式合并于本申请中作为参考）中披露的抗体可以用在本专利申请的上下文中教导的方法加以修饰或改进，并且用于治疗典型的使用这些抗体治疗的疾病中。在一些实施例中，本发明提供了经改变的抗体，它们对于活性 FcγR（即 FcγRIII）具有改变了的亲和性（更高或更低的亲和性）。在某些优选的实施例中，提供了对于 FcγR 具有更高亲和性的经改变的抗体。优选的是这样的修改也具有改变的 Fc-介导的效应物（效应因子）功能。

影响 Fc-介导的效应物（效应因子）功能的修改是本领域所公知的（参见，如美国专利第 6,194,351 号，将其全部内容通过引证合并于本文中）。可以修饰的氨基酸包括但不限于：脯氨酸 329、脯氨酸 331 和赖氨酸 322。脯氨酸 329 和/或 331 和赖氨酸 322 可以优选被

丙氨酸取代，然而，也可考虑用其它氨基酸取代。参见国际申请公开号 WO 00/142072 和美国专利第 6,194,551 号，将其全部内容通过引证合并于本文中。

因此，Fc 区域的修改可以包括对在抗体 Fc 区域发现的氨基酸进行的一种或多种改变。这样的改变可以导致抗体具有改进的抗体介导的效应物（效应子）功能、对其它 Fc 受体（如 Fc 活性受体）改进的结合能力、改进的 ADCC 活性、改进的 Clq 结合活性、改进的补体依赖型细胞毒活性、或它们的任意组合。

在一个实施例中，该抗体被 Fc γ 受体特异性识别，这样的 Fc γ 受体如 FCGR3A（也称作 CD16、FCGR3、免疫球蛋白 G Fc 受体 III；IGFR3、对于 IgG 的 Fc 片段的受体、低亲和性 IIIa；参见如 OMIM 146740），FCGR2A（也称作 CD32、CDw32、对于 IgG 的 Fc 片段的受体、低亲和性 IIa、FCG2、免疫球蛋白 G Fc 受体 II；参见如 OMIM 146790）；FCGR2B（也称作 CD32、对于 IgG 的 Fc 片段的受体、低亲和性 IIb；FCGR2B、FC- γ -RIIB；参见如 OMIM 604590），FCG1RA（也称作 CD64；对于 IgG 的 Fc 片段的受体、高亲和性 Ia；IGFR1；参见如 OMIM 146760；IgG 的 FCGR1 片段、高亲和性 Ic、免疫球蛋白 G Fc 受体 IC、IGFRC；参见如 OMIM 601503）；或 FCGR1B（也称作 CD64、对于 IgG 的 Fc 片段的受体、高亲和性 Ib；免疫球蛋白 G Fc 受体 IB；IGFRB；参见如 OMIM 601502）。

本发明典型的治疗性抗体是利妥昔单抗（rituximab）、阿来组单抗（alemtuzumab）和曲妥珠单抗（trastuzumab）。这些抗体可以根据已经批准用于人类患者的临床规范进行使用。治疗性抗体的其它特定的例子包括：例如，抗 CD22 单克隆抗体（epratuzumab）、巴利昔单抗（basiliximab）、达利珠单抗（daclizumab）、西妥昔单抗（cetuximab）、labetuzumab、司韦单抗（sevirumab）、tuvurimab、帕利珠单抗（palivizumab）、英利昔单抗（infliximab）、奥马佐单抗

(omalizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、那他珠单抗(natalizumab)、克立昔单抗(clenoliximab)等。可选地,当刺激NK细胞的活化受体的化合物是细胞因子时,该治疗性抗体是除利妥昔单抗(rituximab)或赫赛汀(herceptin)之外的抗体,或者可选的是除抗-CD20或抗-HER2/神经鞘(neu)抗体之外的抗体。根据本发明,优选的治疗性抗体的其它例子包括:抗-铁蛋白抗体(美国专利申请第2002/0106324号)、抗-p140和抗-sc5抗体(WO 02/50122)、和抗-KIR(杀伤细胞抑制性受体)抗体(该KIR受体在Carrington和Norman的The KIR Gene Cluster, May 3, 2003中加以描述,可以在以下网址得到:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>),将上述每一文献披露的内容通过引证合并于本文中。治疗性抗体的其它例子列于下表中,其中任意一种(和其它种)都可以用于本方法。应该明了,无论是否列于下表中或在本说明书的其它地方描述过,任何能够消除靶细胞的抗体,优选通过ADCC,都可从本方法受益,并且下表1对其中所列的抗体、所列的靶目标或抗体的表示说明均不是穷举的。

表 1: 治疗性抗体

抗体(Ab)特异性	DCI	商品名称	典型的表示(说明)
抗-CD20	利妥昔单抗 (rituximab)	MabThera®、 Rituxan®	非霍奇金淋巴瘤 B(NHL B)
抗-CD20		Zevalin	非霍奇金淋巴瘤(NHL)
抗-CD20		Bexocar	非霍奇金淋巴瘤(NHL)
抗-CD52	阿来组单抗 (alemtuzumab)	CAMPATH-1H ®	慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、同种异体移植
抗-CD33		SMART-M195	急性粒细胞性白血病 (AML)
抗-CD33		Zamyl™	急性骨髓性白血病
抗-HLA-DR		SMART-ID10	非霍奇金淋巴瘤(NHL)
抗原			
抗-HLA-DR		Remitogen™	非霍奇金淋巴瘤 B(NHL B)
抗-CD22	抗 CD22 单克隆抗 体(epratuzumab)	LymphoCide™	非霍奇金淋巴瘤 B(NHL B)
抗-HER2		MDX-210	前列腺癌及其它癌症

抗-erbB2 (HER-2/neu)	曲妥珠单抗 (trastuzumab)	Herceptin®,	转移性乳腺癌
抗-CA125		OvaRex	卵巢癌
抗-MUC1		TriAb	转移性乳腺癌
抗-MUC1		BravaRex	转移性癌症
抗-PEM 抗原		Theragyn, Therex	卵巢癌、乳腺癌
抗抗-CD44	巴利昔单抗 (bivatuzumab)		头颈癌
抗-gp72	MAb, idiotypic 105AD7		结肠直肠癌
抗-EpCAM	抗-EpCAM; MT201	IS-IL2	癌症
抗-VEGF	MAb-VEGF		转移性非小细胞肺癌 (NSCLC)、结肠直肠癌
抗-CD18	AMD Fab		与年龄相关的黄斑变性
抗-CD18	Anti-CD18		心肌梗死
抗-VEGF 受体	IMC-1cl I		结肠直肠癌
抗-nuC242	nuC242-DMI		结肠直肠癌、胃癌及胰癌
抗-EGFR	MAb425		癌症
抗-EGFR	ABX-EGF		癌症
抗-EGFR (HER-1, erbB1)	西妥昔单抗 (cetuximab)		耳鼻喉(ENT)癌和结肠直 肠癌
抗-MUC-1		Therex®	乳腺癌和上皮癌
抗-CEA		CEA Vac	结肠直肠癌
抗-CEA	labetuzumab	CEA-Cide™	实体肿瘤
抗- $\alpha V\beta 3$		Vitaxin	平滑肌瘤、结肠直肠癌及其 它癌症(抗血管生成)
抗-KDR (VEGFR2)			癌症(抗血管生成)
抗-VRS 融合	帕利珠单抗 (palivizumab)	Synagis®	病毒性疾病
蛋白(蛋白质)			
同上		Numax™	同上
巨细胞病毒 (CMV)	司韦单抗 (sevirumab)	Protovir	巨细胞病毒感染 (CMV Infection)
镰状细胞性贫血 血红蛋白(HBs)	tuvirumab	Ostavir™	乙型肝炎
抗-CD25	巴利昔单抗 (basiliximab)	Simulect®	预防/治疗同种异体移植物 排斥
抗-CD25	达利珠单抗 (daclizumab)	Zénapax®	防止/治疗同种异体移植物 排斥
抗-TNF- α	英利昔单抗 (infliximab)	Remicade™	克隆氏病、类风湿性关节炎

抗-CD80	IDEC-114		银屑病 (牛皮癣)
抗-IgE		E-26	变应性哮喘及鼻炎
抗-IgE	奥马佐单抗 (omalizumab)	Xolair™	哮喘
抗-IgE	Rhu-mAb E25		变态反应 (过敏反应) /哮喘
抗-整联蛋白 α L (CD11a, LFA-1)	依法珠单抗 (efalizumab)	Xanelim™	银屑病 (牛皮癣)
抗- β 2 整联蛋白	LDP-01		中风、同种异体移植物排斥
抗-整联蛋白 α L (CD11a, LFA-1)	抗-CD11a		银屑病 (牛皮癣)
抗-CD4	Keliximab(抗CD4 单克隆抗体)、 siplizumab (人源 化抗CD2单克隆 抗体)、MEDI-507		移植物抗宿主病(GVHD)、 银屑病 (牛皮癣)
抗-CD4	OKT4A		同种异体移植物排斥
抗-CD3	OKT3		同种异体移植物排斥
抗-CD3	SMART-aCD3		自身免疫性疾病、同种异体 移植物排斥、牛皮癣 (银屑病)
抗-CD64			贫血
抗-CD147			移植物抗宿主病 (GvHD)
抗-整联蛋白 α 4 (α 4 β 1- α 4 β 7)	那他珠单抗 (natalizumab)	Antegren®	多发性硬化、克隆氏病
抗-整联蛋白 β 7			克隆氏病、溃疡性结肠炎
α 4 β 7	LDP-02		溃疡性结肠炎
抗-HLA-DR10 β		Oncolym	非霍奇金淋巴瘤 (NHL)
抗-CD3		Nuvion	T细胞恶性肿瘤
抗-GD2 神经 节苷脂		Trigem	转移性黑色素瘤和小细胞 肺癌
抗-SK-1 抗原			结肠直肠癌和胰癌
抗-CD4*	克立昔单抗 (clenoliximab)		
抗-IL-8	ABX-IL8		牛皮癣 (银屑病)
抗-VLA-4		Antegren	多发性硬化 (MS)
抗-CD40L		Antova	全身性红斑狼疮 (SLE)、 同种异体移植物的排斥
抗-CD40L	IDEC-131		多发性硬化 (MS)、全身性 (系统性)红斑狼疮 (SLE)
抗-E-选择蛋白	CDP850		银屑病 (牛皮癣)
抗-CD11/CD18	Hu23F2G		多发性硬化症 (MS)、中风
抗-ICAM-3	ICM3		牛皮癣 (银屑病)

抗-CBL	ABX-CBL		移植物抗宿主病 (GVHD)
抗-CD147			
抗-CD23	IDEC-152		哮喘、过敏反应(变态反应)
抗-CD25		Simulect	同种异体移植物的排斥
抗-T1-ACY	ACY-110		乳腺癌
抗-TTS	TTS-CD2		胰癌、肾癌
抗-TAG72	AR54		乳腺癌、卵巢癌、肺癌
抗-CA19.9	GivaRex		结肠直肠癌、胰癌、胃癌
抗-PSA	ProstaRex		前列腺癌
抗-HMFG1	R1550		乳腺癌、胃癌
	pemtumomab	Theragyn	胃癌、卵巢癌
抗-人绒毛膜促性腺激素 (hCG)	CTP-16, CTP-21		多发性癌
抗胶原蛋白类型 1-V	HU177; HUIV26; XL313		多发性癌
抗-CD46		Crucell/J&J	多发性癌
抗-17A-1	依决洛单抗 (Edrecolomab)	Panorex	结肠直肠癌
抗-HM1.24	AHM		多发性骨髓瘤
抗-CD38	抗-CD38		多发性骨髓瘤
抗-IL15 受体	HuMax 淋巴瘤		淋巴瘤
抗-IL6	B-E8		淋巴瘤
抗-TRAIL-R1	TRM-1		多发性癌
抗-VEGF2			多发性癌
抗-BlyS	Lymphostat		多发性癌
抗-SCLC、CEA 和 DTPA	Pentacea		肺癌
抗-CD52	坎帕斯 (CAMPATH)		白血病、淋巴瘤
抗-Lewis Y 抗原	IGN311		上皮癌
抗-VE 钙粘着蛋白	E4G10		多发性癌
抗-CD56	BB10901, huN901DC1		结肠直肠癌、肺癌
抗-mertansine/粘蛋白	Cantuzumab		结肠直肠癌、肺癌、胰癌
抗-AFP	AFP-cide		肝癌
抗-CSAp	Mu-9		结肠直肠癌
抗-CD30	MDX-060		黑色素瘤、霍奇金氏病
抗-PSMA	MDX-070		前列腺癌
抗-CD15	MDX-11		白血病
抗-TAG72	MDX-020		结肠直肠癌
抗-CD19、CD3 双特异性的	MT103		淋巴瘤

抗-间皮蛋白 (mesothelin)抗原	SS1-PE38		脑癌和卵巢癌 (overian cancer)、间皮癌
抗-DNA 和组蛋白	Cotara (一种放射性单克隆抗体)		结肠直肠癌、胰癌、肉瘤、脑癌和其它癌症
抗-a5B1 整联蛋白	抗-a5 B1		多发性癌
抗-p97	SGN17/19		黑色素瘤
抗-CD5	Genimmune		白血病、淋巴瘤

化合物调节 NK 细胞活性

NK 细胞活性是通过复杂的机制调节的, 其涉及刺激信号和抑制信号。相应地, 有效的 NK 细胞介导的治疗既可通过刺激这些细胞也可通过中和抑制性信号来实现。应该注意到任何具有阻断、抑制或其它的向下调节 NK 细胞的抑制性受体作用的化合物或激活、刺激或其它的促进 NK 细胞的活化受体的活性或表达作用的化合物都是可以使用的。这包括能够结合于 NK 细胞受体并且直接阻断或刺激它们的化合物, 如细胞因子、以及小分子、多肽, 和抗体。还应该注意到, 受体被阻断或被刺激的机制对于本发明所提供的优点不是最重要的。例如, 该化合物可以增加活化受体的表达、或抑制抑制性受体的表达, 该化合物可以阻止配体与抑制性受体之间的相互作用或增强配体与活化受体之间的相互作用, 或者该化合物可以直接结合到受体上并抑制它们 (在抑制性受体的情况下) 或激活它们 (在活化受体的情况下)。重要的参数是该化合物在体内对治疗性抗体消除靶细胞能力的作用。

任何 NK 细胞表面上的抑制性受体都可以作为本发明的化合物的靶标。NK 细胞通过主要组织相容性复合体 (MHC) 类型 I-特异抑制性受体进行负调节 (Karre et al., 1986; Öhlen et al., 1989; 将其披露的内容通过引证合并于本文中)。这些特异性受体结合于主要组织相容性复合体 (MHC) 类型 I 分子或 HLA 的多态决定簇, 并且抑制自然杀伤 (NK) 细胞溶解。在人体中, 称作杀伤细胞 Ig-样受体 (KIRs) 的受体家族识别 HLA 类型 I 等位基因组。

有多个 KIR 受体组，包括 KIR2DL、KIR2DS、KIR3DL 和 KIR3DS。具有两个 Ig 结构域（KIR2D）的 KIR 受体识别 HLA-C 同种异型：KIR2DL2（以前命名为 p58.1）或紧密相关的基因产物 KIR2DL3 识别与组 2 HLA-C 同种异型（Cw1、3、7 和 8）共享的抗原决定部位，相反 KIR2DL1（p58.2）识别与互补的（reciprocal）组 1 HLA-C 同种异型（Cw2、4、5 和 6）共享的抗原决定部位。被 KIR2DL1 识别表明 HLA-C 等位基因的第 80 位（位点）存在赖氨酸（Lys）残基。KIR2DL2 和 KIR2DL3 的识别表明在第 80 位（位点）存在天冬酰胺（Asn）残基。很重要的一点是大多数 HLA-C 等位基因在第 80 位（位点）具有天冬酰胺（Asn）或赖氨酸（Lys）残基。具有 3 个 Ig 结构域的一个 KIR，KIR3DL1（p70），识别一个与 HLA-Bw4 等位基因共享的抗原决定部位。最后，一种具有三个 Ig 结构域的同源二聚体分子 KIR3DL2（p140）识别 HLA-A3 和 HLA-A11。

尽管 KIR 和其它类型-I 抑制性受体（Moretta et al, 1997; Valiante et al, 1997; Lanier, 1998; 将其披露的内容通过引证合并于本文中）可以被 NK 细胞共同表达，但是在任意一个特定个体的 NK 表达谱（repertoire）中，有表达单独 KIR 的细胞，因此相应的 NK 细胞仅仅只被表达的一类特异性类型 I 等位基因组的细胞阻断。相应地，如下文所述，当抑制性受体作为靶标时，本方法将经常涉及施用将多个抑制性受体作为靶标的化合物，从而确保广泛地影响达到最大范围的 NK 细胞。

在某些实施例中，该化合物，优选为抗体或其片段，阻断 NK 细胞的抑制性受体，中和从包括 KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR3DL1、KIR3DL2、NKG2A 和 NKG2C 的一组中任选的至少一个抑制性受体的抑制性信号。更优选地，该阻断 NK 细胞的抑制性受体的化合物，优选为抗体或其片段，是中和 KIR2DL2、KIR2DL3 和/或 KIR2DL1 的抑制性信号的化合物，优选为抗体或其片段。

本发明也可以考虑使用多种阻断 NK 细胞的不同抑制性受体的化合物的组合，该化合物优选为抗体或其片段。优选地，阻断 NK 细胞的抑制性受体的化合物是从包括 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2、NKG2A 和 NKG2C 的一组中任选的一种特异性的抑制性受体，并且能够抑制相关的 KIR-或 NKG2A/2C-介导的 NK 细胞的细胞毒性抑制作用，该化合物优选为抗体或其片段。例如，阻断 NK 细胞的抑制性受体的化合物可以包括一种对于 KIR2DL 具有特异性的抗体和另一种对于 KIR2DL2 和/或 KIR2DL3 具有特异性的抗体。更优选，该阻断 NK 细胞抑制性受体的化合物的组合能够抑制 KIR2DL1-、KIR2DL2-、和 KIR2DL3-介导的 NK 细胞的细胞毒性抑制作用。在其它实施例中，可以施用将一种或多种抑制性受体作为靶标的一种或多种化合物，以及将一种或多种活化受体作为靶标的的一种或多种化合物的混合剂。

例如，对于 KIR2DL1 特异性的单克隆抗体已经显示出能够阻断 KIR2DL1 Cw4（或类似的）等位基因（Moretta et al., 1993；将其披露的内容通过引证合并于本文中）。在另一个实例中，抗 KIR2DL2/3 的单克隆抗体也已经被描述能阻断 KIR2DL2/3 HLACw3（或类似的）等位基因（Moretta et al., 1993）。抗 NKG2A 抗体也已经显示出能够阻断 NKG2A 和 HLA-E 之间的抑制性相互作用。

可选地，该抗体可以选自：GL183（KIR2DL2、L3，可获自 Immunotech, France and Beckton Dickinson, USA）；EB6（KIR2DL1，可获自 Immunotech, France and Beckton Dickinson, USA）；AZ138（KIR3DL1，可获自 Moretta et al, Univ. Genova, Italy）；Q66（KIR3DL2，可获自 Immunotech, France）；Z270（NKG2A，可获自 Immunotech, France）；P25（NKG2A/C，可获自 Moretta et al, Univ. Genova, Italy）和 DX9, Z27（KIR3DL1，可获自 Immunotech, France and Beckton Dickinson, USA）。

在一优选方面，本发明使用单克隆抗体及其片段和衍生物，其中所述抗体、片段或衍生物与 NK 细胞表面上的多个 KIR 或 NKG2A/C 受体交叉反应并且中和它们的抑制性信号。

在一个实施例中，本发明使用单克隆抗体，其结合人 KIR2DL 受体的共同决定簇并且抑制相应的抑制性通道。优选地，本发明使用单克隆抗体，其结合人 NK 细胞表面上的 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 受体，并且抑制 KIR2DL1-和 KIR2DL2/3-介导的 NK 细胞细胞毒的抑制作用。该抗体特异性地抑制 HLA-c 分子结合于 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 受体。更优选，该抗体在体内促进 NK 细胞活性。由于 KIR2DL1 和 KIR2DL3（或 KIR2DL2）足以覆盖大多数的 HLA-C 同种异型，其分别是组 1 HLA-C 同种异型和组 2 HLA-C 同种异型，因此这样的抗体可以用于增加在大多数人类个体中治疗性抗体的功效，通常是在大约 90%或更多的人类个体中。在这样一个实施例中，于 2004 年 7 月 1 日提交的、名称为“Composition and methods for regulating NK cell activity（用于调节 NK 细胞活性的组合物和方法）”的 PCT 专利申请 PCT/FR 04/01702 中描述的任何抗体都可以相应地用于本发明，将其披露的内容通过引证合并于本文中。

在本发明的一个特定目的中，该阻断 NK 细胞的抑制性受体的抗体是单克隆抗体，其中所述抗体结合 KIR2DL 人受体的共同决定簇，并且抑制 KIR2DL-介导的 NK 细胞细胞毒性的抑制作用。该抗体更特异性地结合于与分别由杂交瘤 DF200 或 NKVSF1 产生的单克隆抗体 DF200 或 NKVSF1 相同的抗原决定部位，和/或与分别由杂交瘤 DF200 或 NKVSF1 产生的单克隆抗体 DF200 或 NKVSF1 竞争结合于人 NK 细胞表面上的 KIR 受体。如所讨论的，抗体的例子、功能性测试以及确定抗体是否与所述抗体竞争结合的测试在 PCT 专利申请 PCT/FR 04/01/01702 中加以描述。

在一个特定实施例中,该单克隆抗体是由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200。在另一实施例中,该单克隆抗体是 EB6,或该抗体结合于与单克隆抗体 EB6 相同的抗原决定部位,或与单克隆抗体 EB6 竞争结合。在其它实施例中,该抗体是抗体 DF200 或 EB6 的片段或衍生物。产生抗体 DF200 的杂交瘤已经在 CNCM 培养物保藏中心保藏(CNCM culture collection)、识别号(Identification no.)

“DF200”、登记号 CNCM I-3224、于 2004 年 6 月 10 日登记, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France。抗体 NKVSF1 可从 Serotec (Cergy Sainte-Christophe, France) 获得,目录标号 (Catalog ref no.) MCA2243。

在本发明的另一个实施例中,用于增强治疗性抗体功效的化合物刺激 NK 细胞的活化受体。可以使用任何活化受体,如 NKp30(参见如 PCT WO 01/36630, 将其披露的全部内容通过引证合并于本文中)、NKp44(参见如 Vitale et al.(1998) J. Exp. Med. 187: 2065-2072, 将其披露的内容通过引证合并于本文中)、NKp46(参见如 Sivori et al.(1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136; Pessino et al.(1998) J. Exp. Med. 188: 953-960; 将其披露的内容通过引证合并于本文中)、NKG2D(参见如 OMIM 602892)、IL-12R、IL-15R、IL-18R、IL-21R 或活化的 KIR 受体,例如 KIR2DS4 受体(Carrington and Norman, The KIR Gene Cluster, May 3, 2003 可获自: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>), 或存在于 NK 细胞的主要片段上的任何其它抗体,并且它的活性导致细胞激活或增殖,优选的是该细胞以前已经被如抑制性 KIR 受体这样的抑制性受体所抑制。该化合物可以是任何分子实体,包括多肽、小分子、和抗体。示例的化合物包括任何自然、重组或合成的配体,它们可以与活化受体相互作用。例如一种刺激 NK 细胞活化受体的化合物可以是如与 IL-12 受体(IL-12R)相互作用的 IL-12、与 IL-15 受体(IL-15R)相互作用的 IL-15、与 IL-18 受体(IL-18R)相互作用的 IL-18、与 IL-21

受体 (IL-21R) 相互作用的 IL-21 等细胞因子。这样的化合物已知来自 IL-12 (Research Diagnostics, NJ, DI-212)、IL-15 (Research Diagnostics, NJ, RDI-215)、IL-21 (Asano et al, FEBS Lett. 2002; 528:70-6)。优选刺激 NK 细胞活化受体的化合物是除 IL-2 之外的化合物。其它刺激 NK 细胞活化受体的示例性化合物包括结合 NK 细胞受体的、选自由 NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、KIR2DS4 和其它活化的 KIR 受体组成的组中的抗体。

在某些优选实施例中, 该活化的受体是在 NK 细胞上发现的自然细胞毒性受体 (NCR), 优选的 NCR 选自 NKp30、NKp44 或 NKp46, 并且该刺激活化受体的化合物是与选自 AZ20、A76、Z25、Z231 和 BAB281 的任意单克隆抗体结合于同一抗原决定部位、或与之竞争结合。

可以通过利用各种标准方法中的任意一种来测定任一化合物结合于本文所描述的任一 NK 细胞受体。例如, 比色 ELISA-类型测量方法可以用于测量免疫沉淀和放射性免疫分析。可以使用竞争测试, 例如比较待测化合物和已知化合物结合于 NK 细胞受体的结合性能, 其中对照 (例如 BAB281, 其特异性结合于 NKp46) 和待测化合物经混合 (或预吸收) 并施用于含有包含抗原决定部位的蛋白 (如在 BAB281 的情况下为 NKp46) 的样本中。基于酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射性免疫分析、蛋白质印迹法 (Western blotting) 和 BIACORE 的实验方法适用于这种简单的竞争研究, 并且为本领域所公知。

对于 KIR-或 NKG2A/C-介导的 NK 细胞的细胞毒性抑制作用的抑制, 或对于 NKp30、NKp44、NKp46 或 NKG2D-介导的激活 NK 细胞的刺激作用可以用各种检验或测试进行测定, 如结合测试、细胞毒测试、或其它分子测试或细胞测试。

在一种特定的变化方案中，抑制性活性通过所述化合物（优选为抗体）在 HLA-C 或 HLA-E 阳性靶目标上分别重构 KIR 或 NKG2A/C 阳性 NK 克隆的溶解能力来加以说明。在另一个特定实施例中，该化合物（优选为抗体）以抑制 HLA-C 分子结合于 KIR2DL1 和 KIR2DL3（或紧密相关的 KIR2DL2）受体来加以限定，更优选地，以其改变由选自 Cw1、Cw3、Cw7 和 Cw8（或选自在第 80 位具有天冬酰胺（Asn）残基的 HLA-c 分子）的 HLA-C 分子结合于 KIR2DL2/3 的能力以及由选自 Cw2、Cw4、Cw5 和 Cw6（或选自在第 80 位具有赖氨酸（Lys）残基的 HLA-c 分子）的 HLA-C 分子结合于 KIR2DL1 的能力来加以限定。

本发明的化合物（优选为抗体）的抑制性活性或增强的活性，可以用众多方法中的任意一种来测定，例如通过如在 Sivori et al. (1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136 所述的其对细胞外游离钙离子的作用，将其披露的内容通过引证合并于本文中。NK 细胞活性也可以利用基于细胞的细胞毒性测试进行检测，例如测定铬的释放，如测量抗体刺激 NK 细胞杀伤如 P815、K562 或其它如在 Sivori et al. (1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136; Vitale et al. (1998) J. Exp. Med. 187:2065-2072; Pessino et al. (1998) J. Exp. Med. 188: 953-960; Neri et al. (2001) Clin. Diag. Lab. Immun. 8: 1131-1135; Pende et al. (1999) J. Exp. Med. 190: 1505-1516 中所披露的适宜的肿瘤细胞这样的靶细胞的能力，将其披露的全部内容通过引证合并于本文中。在本发明说明书的实施例部分也给出了适宜的细胞毒测试。在一个优选的实施例中，该抗体引起 NK 细胞毒至少 10% 的增强，优选引起 NK 细胞毒至少 40% 或 50% 的增强，或更优选引起 NK 细胞毒至少 70% 的增强。

NK 细胞活性也可以用细胞因子-释放测试进行说明，其中将 NK 细胞与抗体孵育以刺激 NK 细胞的细胞因子产生（例如 IFN- γ 和 TNF- α 的产生）。在一个示例性的方案中，由 PBMC 产生的 IFN- γ

用细胞表面和胞质内染色方法测定，并且在培养 4 天后用流式细胞计数法分析。简单而言，将布雷菲德菌素 A (Brefeldin A, Sigma Aldrich) 以终浓度为 5 μ g/ml 加入并培养至少 4 小时。然后，在渗透性作用 (IntraPrepTM; Beckman Coulter) 之前，将该细胞与抗-CD3 和抗-CD56 的单克隆抗体 (mAb) 孵育，并且用 PE-抗-IFN- γ 或 PE-IgG1 (Pharmingen) 染色。由多克隆活性 NK 细胞产生的 GM-CSF 和 IFN- γ 的量可以用 ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN; IFN- γ : OptE1A set, Pharmingen) 测量上清液得到。

在一个优选的实施例中，测定抗体对激活的人 NK 细胞的作用能力，当能够激活人 NK 细胞的能力至少与激活非人 NK 细胞的能力一样好时，表明该化合物适用于本发明。尤其是可以测定化合物用于增强治疗性抗体在体内或体外直接通过 NK 细胞消除 (耗竭) 适宜的靶细胞的能力。

本发明的化合物 (优选为抗体) 可以具有部分抑制性或部分刺激活性，例如部分减少 KIR2DL-介导的 NK 细胞细胞毒的抑制作用，或通过不同程度地刺激 NCRs 或其它受体而部分激活 NK 细胞。大多数优选的化合物都能够抑制 (或在活化受体的情况下刺激) 至少 20% (优选为至少 30%、40%或 50%或更高) 的 NK 细胞活性，如在细胞毒测定中与没有该化合物时的细胞进行比较。优选地，该化合物还能使消除靶细胞程度相对于不存在该化合物时提高 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、1000%或更多。可选替换地，本发明优选的化合物 (优选为抗体) 能够诱导匹配的或 HLA 相容的或自体靶细胞群的溶解，即在不存在所述抗体时不能被 NK 细胞有效溶解的细胞群。相应地，本发明的化合物也可以用促进 NK 细胞在体内的活性来限定。

本发明也可以包括这样的实施例，其中刺激 NK 细胞活化受体或优选阻断其抑制性受体的化合物是具有基本上相同的抗原特异性的单克隆抗体片段，其包括但不限于 Fab 片段、Fab'2 片段、CDR 和 ScFv。而且，该单克隆抗体可以是人源化的、人的或嵌合的（例如双特异性或功能化的抗体）。虽然刺激活化受体的抗体也可以是片段，但优选是全长的。衍生物（例如带有修饰序列或带有结合的杂源官能团或其它化合物）可以用于本文中所描述的任何抗体。

根据本发明，阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的抗体可以用本领域公知的各种技术方法来制备。通常是通过用包括 KIR、NKG2A/C、NCR（例如 NKp30、NKp44、NKp46）或 NKG2D 的多肽或任意这些多肽的免疫原片段的免疫原来免疫非人动物，并收集脾细胞（与适当的细胞系通过融合来产生杂交瘤）来制备的。从各物种产生单克隆抗体的方法是本领域技术人员所公知的（参见，如 Harlow et al., “Antibodies: A laboratory Manual” CSFH Press, 1988; Goding, “Monoclonal Antibodies: Principles and Practice” Academic Press, 1986; 将其披露的内容通过引证合并于本文中）。更具体而言，这些方法包括用抗原来免疫非人动物，随后回收脾细胞，然后与获得免疫（永生化的）细胞，如骨髓瘤细胞融合。得到的杂交瘤产生单克隆抗体，并且通过限制性稀释用以分离单独的克隆来进行选择。也可以通过选择免疫球蛋白组合文库来产生抗体，例如 Ward et al（1989）所述；将其披露的内容通过引证合并于本文中。

根据本发明，优选的阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的抗体通过用包括如 KIR2DL 多肽、更优选为人 KIR2DL 多肽的活性或抑制性 NK 细胞受体的免疫原免疫来制备。该 KIR2DL 多肽可以包括人 KIR2DL 多肽的全长序列或其片段或衍生物，典型的免疫原片段，即包括抗原决定部分的多肽的一部分，优选为 T 或 B 细胞抗原决定部分。这样的片段通常含有其成熟多肽序列中的至少 7 个连续的氨基酸，更优选的为至少其 10 个连续的氨基酸。它们基

本上来自受体的细胞外结构域。在一个优选的实施例中，该免疫原包括野生型人 KIR2DL、NCR、或其它脂膜中的多肽，通常位于细胞的表面。在一个特定的实施例中，该免疫原包括完整的 NK 细胞，特别是完整的人 NK 细胞，可选的是处理过或溶解过的。

虽然治疗性抗体可以具有经修饰的 Fc 区域以便增强它们通过如 CD16 这样的受体的结合，但在某些实施例中 NK 细胞增强的抗体将具有改变的 Fc 区以便降低其对 Fc 受体的亲和性，从而减少 NK 细胞被抗体结合的可能性，这将导致其自身被结合并溶解。

阻断 NK 细胞的 KIR2DL 受体的抗体可以用以下方法制备，该方法包括：i) 用包括 KIR2DL 多肽的免疫原来免疫非人哺乳动物；ii) 由所述经免疫的动物制备单克隆抗体，其中所述单克隆抗体结合所述 KIR2DL 多肽；iii) 从步骤 ii) 中选择与至少两个不同血清型的 KIR2DL 多肽交叉反应的单克隆抗体；以及 iv) 选择抑制 KIR2DL-介导的 NK 细胞抑制作用的 (c) 的单克隆抗体。

步骤 (iii) 和 (iv) 的顺序可以改变。可选择的是，如下所述，该方法可以进一步包括制造该单克隆抗体片段或衍生物的附加步骤。

在另一个变化方案中，该方法包括：i) 由文库或表达谱中选择一种与至少两个不同血清型的 KIR2DL 多肽交叉反应的单克隆抗体、或其片段或衍生物；并且从步骤 i) 中选出抑制 KIR2DL-介导的 NK 细胞的抑制作用的抗体。

应该注意到，这些方法的任意一种都可以用于选择对共有一种或多种抗原决定部位的任何种类（抑制性或活性）的 NK 细胞受体具有特异性的抗体或抗体片段。例如，类似的方法可以用于制备阻

断 NK 细胞的 KIR3DL 或 NKG2A/C 受体或刺激 NK 细胞活化受体的抗体。

一个优选的实施例中，这些方法中使用，或用于产生本文所述的任何抗体的非人动物是哺乳类的，如啮齿类（如小鼠、大鼠等）、牛、猪、马、兔、山羊、绵羊等。

此外，任何本文中所描述的抗体都可以通过遗传修饰或基因工程化以适用于人类，如人源化抗体、嵌合抗体或人抗体。用于人源化抗体的方法是本领域所公知的。一般而言，根据本发明的人源化抗体具有一个或多个由原始抗体引入的氨基酸残基。这些鼠类或其它非人类氨基酸残基通常被称作“引入”残基，它们通常是来自“引入”可变区。人源化基本上可以通过实施 Winter 及同事的以下方法来实现（Jones et al. (1986) Nature 321:522; Riechmann et al. (1998) Nature 332:323; Verhoeyen et al. (1998) Science 239:1534 (1998)）。在一些情况下，这样的“人源化”抗体是嵌合抗体（Cabilly et al. 美国专利第 4,816,567 号），其中至少一个完整的人可变区已经基本上被来自原始抗体的相应序列所取代。实际上，根据本发明的人源化抗体是典型的人抗体，其中有一些 CDR 残基以及可能有一些 FR 残基已经被来自原始抗体中的类似位点的残基所取代。

制造“人源化”单克隆抗体的另一种方法是用 XenoMouse®（Abgenix, Fremont, CA）作为用于免疫的小鼠。XenoMouse 是具有被功能性人免疫球蛋白基因取代的免疫球蛋白基因的鼠类宿主。因此，由该鼠或其杂交瘤产生的由该鼠的 B 细胞制造的抗体是已经被人源化的。XenoMouse 在美国专利第 6,162,963 中加以描述，将其披露的全部内容通过引证合并于本文中。一种类似的方法可以利用 HuMAb-MouseTM（Medarex）来实现。

人抗体也可以用各种其它的免疫技术来产生，如使用其它能够表达人抗体表达谱的已经被基因工程化的转基因动物 (Jakobovitz et al., Nature 362 (1993) 255)，或用噬菌体显示法选择抗体表达谱。这种技术对于本领域技术人员是公知的，并且可以由本发明披露的单克隆抗体开始实施。

本发明的抗体也可以被推广到“嵌合”抗体(免疫球蛋白)，其中重链和/或轻链的一部分与原始抗体中的相应序列一致或同源，而链的其余部分与来自其它种属的抗体或属于另一抗体类或亚类、以及这些抗体的片段的相应序列一致或同源，只要它们呈现出所需的生物学活性 (Cabilly et al., supra; Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851)。

还应该注意到，当该阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激 NK 细胞活化受体的化合物是抗体时，这种抗体可以是多克隆或优选是单克隆。该抗体可以由杂交瘤或通过基因工程化的重组体细胞表达所需的可变区和恒定区而得到。该抗体可以是单链抗体或保留抗原特异性和低级铰链区的其它抗体衍生物或其变体。该抗体可以是多功能抗体、重组抗体、人源化抗体或其片段或衍生物。其所述片段或衍生物优先选自 Fab 片段、Fab'2 片段、CDR 和 ScFv。优选的片段是抗原结合片段。包括抗体片段的抗体也可以包括但不限于双特异性抗体。一个实例是包括一个对活化受体的特异性抗原结合区和一个对肿瘤抗原的特异性抗原结合区的双特异性抗体 (参见 PCT 申请公开第 WO 01/71005 号，将其披露的内容通过引证合并于本文中)。

组合物和施用 (给药)

本发明涉及一种组合物，包括至少一种阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的化合物 (优选为抗体或其片段)，和一种治疗性抗体，使用该组合物用于提高该治疗性抗体的疗效、用于提高用

治疗性抗体治疗的患者体内的 ADCC、或用于治疗带病的患者，尤其是需要消除（耗竭）作为靶标的细胞（优选为病态的细胞，如病毒感染细胞、癌细胞或其它病原细胞）的疾病。优选地，该疾病选自癌（症）、自身免疫性疾病、炎症、病毒性疾病。该疾病还涉及移植排斥，更优选为同种异体移植排斥、和移植物抗宿主疾病（GVHD）。

更具体而言，该疾病的治疗需要消除作为靶标的细胞，优选为如病毒感染的细胞、肿瘤细胞或其它病原细胞这样的病态细胞。优选地，该疾病是癌症、传染性或免疫疾病。更优选，该疾病选自自由癌症、自身免疫疾病、炎症、病毒性疾病组成的组。该疾病还涉及移植排斥，更优选为同种异体移植排斥和移植物抗宿主疾病（GVHD）。

所述疾病包括造血细胞的赘生性增殖（neoplastic proliferation）。可选地，所述疾病可以选自包括淋巴性白血病、急性或慢性骨髓性白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、骨髓增生异常综合症、多发性骨髓瘤、和慢性淋巴细胞白血病的一组疾病。所述疾病还包括耳鼻喉（ENT）癌、结肠直肠癌、乳腺癌、上皮癌。所述疾病包括巨细胞病毒（CMV）感染和乙型肝炎。所述疾病包括克隆氏病、风湿性关节炎、哮喘、银屑病（牛皮癣）、多发性硬化症或糖尿病。尤其是可以治疗前文表中所列举的任何疾病。

所述治疗性抗体可以通过 CD16 结合，优选通过其 Fc 区域结合。优选地，所述治疗性抗体具有人 IgG1 或 IgG3 Fc 部分，尤其是单克隆抗体或其片段，更优选的是如利妥昔单抗这样的人抗体、人源化抗体或嵌合抗体，或其片段。

所述阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的化合物（优选为抗体或其片段）与 KIR、KNG2A/C、NCR 或 NKG2D 人受体中

的至少一种结合，并且或者抑制相关的 KIR2DL、KIR3DL 和/或 NKG2A/C-介导的 NK 细胞的细胞毒性的抑制作用，或者刺激相关的 NCR 或 NKG2D-介导的 NK 细胞的细胞毒性的活化作用。在一个优选的实施例中，使用了一个 KIR2DL 人受体，例如选自包括 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3 的一组人受体，或使用了一个 KIR3DL 人受体，例如选自包括 KIR3DL1 和 KIR3DL2 的一组人受体。

在一个优选的实施例中，该 NK 细胞增效化合物结合至少一个 KIR2DL 人受体并且抑制相关的 KIR2DL-介导的 NK 细胞的细胞毒性的抑制作用。优选地，该 KIR2DL 人受体选自包括 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3 的一组人受体。在一个优选的实施例中，该化合物优选为抗体或其片段，结合 KIR2DL 人受体的共同决定簇并且抑制 KIR2DL-介导的 NK 细胞的细胞毒性的抑制作用。更优选的是，所述化合物，优选为抗体，结合 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3 人受体的共同决定簇并且抑制 KIR2DL1-、KIR2DL2-、KIR2DL3-介导的 NK 细胞的细胞毒性的抑制作用。在一个特定实施例中，所述化合物（优选为抗体）抑制在第 80 位具有赖氨酸（Lys）残基的 HLA-C 等位基因分子结合于人 KIR2DL1 受体，以及在第 80 位具有天冬酰胺（Asn）残基的 HLA-C 等位基因分子结合于人 KIR2DL2 和 KIR2DL3 受体。在另一个特定实施例中，这种抗体结合于与由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200 相同的抗原决定部位。可以选择地，该抗体与由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200 竞争结合于人 NK 细胞表面上的 KIR 受体。在一个优选的实施例中，该抗体是由杂交瘤 DF200 产生的单克隆抗体 DF200。在另一个实施例中，该抗体竞争结合或结合于与单克隆抗体 EB6 相同的抗原决定部位。

根据本发明，该组合物可以包括多种抑制 NK 细胞的不同抑制性受体和/或刺激 NK 细胞的一种或多种活化受体的化合物的组合，

优选为抗体或其片段。优选地，阻断 NK 细胞抑制性受体的化合物，优选为抗体或其片段，对选自 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2、NKG2A 和 NKG2C 的抑制性受体具有特异性，并且能够抑制相关的 KIR-或 NKG2A/C-介导的 NK 细胞的细胞毒性的抑制作用。更优选地，“中和”化合物的组合能够抑制 KIR2DL1-、KIR2DL2-和 KIR2DL3-介导的 NK 细胞的细胞毒性的抑制作用。通过提供化合物的组合，会在最大数量的患者中阻断最大数量的不同抑制性受体。同样，可以使用刺激不同活性化合物的（或在抑制性受体存在时，结合于单一受体中的不同抗原决定部位）化合物组合，例如对选自 NKp30、NKp44、NKp46 和 NKG2D 组成的组中的两种或更多种受体的任意组合一起产生活化作用的化合物。此外，也可以使用包括一种或多种阻断抑制性受体的化合物和一种或多种刺激活化受体的化合物的组合。如下所述，在一个优选的实施例中，在使用本方法之前可以从患者处获得一份 NK 细胞样本，并且例如在存在靶细胞和治疗性抗体时可以测定 NK 细胞对于不同的化合物组合的反应。

本发明的组合物可以包括任何药物可接受的载体或赋形剂、常用的缓冲液、等渗液、水性悬浮液、可选添加的稳定剂、防腐剂等。常用的剂型包括盐溶液，以及可选的保护或稳定分子，如高分子量蛋白（例如人血清白蛋白）。

也可以提供包括一种或多种治疗性抗体，一种或多种 NK 细胞增效化合物的任意组合，以及优选具有它们的使用说明的试剂盒。

根据本发明的方法和组合物，阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的化合物，优选为抗体或其片段，以及治疗性抗体以“有效”或“有效治疗”量施用（给予）。

施用于接受者的治疗性抗体的有效量可以是约 0.1mg/kg 至约 20mg/kg。然而，抗体的有效量依赖于抗体的形式（全 Ig、或片断），对每种特定的抗体必须测定单克隆抗体（mAb）的亲合性和药物动力学参数。

阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的化合物（优选为抗体或其片段）施用于接受者的有效量，可以在约 0.1mg/kg 到约 20mg/kg 之间。然而，抗体的有效量依赖于抗体的形式（全 Ig、或片断），对每种特定的抗体必须测定单克隆抗体（mAb）的亲合性和药物动力学参数。

在本发明的一个重要的实施例中，使用本发明的化合物可以在降低的治疗性抗体剂量的条件下达到治疗效果。治疗性抗体的使用（例如剂量、给药处方）可能由于副作用而被限制，例如在施用利妥昔单抗的情况下出现的发热、头痛、哮喘、血压降低、及其它症状。相应地，本文中描述的 NK 细胞增效化合物可以与标准剂量（即，无任何其它化合物时的推荐剂量）的治疗性抗体联合施用于许多患者，从而增强了在原来需要更大疗效的患者中标准剂量的疗效，在另一些患者中，例如那些受副作用严重影响的患者，施用本化合物会使其在降低的治疗性抗体剂量的条件下达到治疗效果，从而避免了副反应。实际上，一个熟练的医疗从业人员对于给定的患者能够决定该治疗性抗体和 NK 细胞增效化合物的理想剂量和施用处方，例如该治疗方案对于患者的特殊需要和患者的整体病情而言都会是最适宜的。大量的参考文献可用于指导决定治疗性抗体和 NK 细胞增效化合物的适宜剂量，例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, by Gennaro (2003), ISBN: 0781750253; Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, by Hardman, Limbird & Gilman (2001), ISBN: 0071354697; Rawlins E. A., editor, "Bentley's Textbook of Pharmaceutics", London: Bailliere, Tindall and Cox, (1997); 以及其它文献。

在一个实施例中，医疗从业人员可以逐步减少与任意一种本发明的 NK 细胞增效化合物联合施用的给定的治疗性抗体的量、或施药剂量或施药频率，并且监控该治疗性抗体的疗效，例如监控 NK 细胞活性，监控患者体内存在的靶细胞，监控各种临床指标，或通过其它方法，并且相应于监控结果调节治疗性抗体和/或 NK 增效化合物的相对浓度或施药模式，从而使治疗效果最佳并抑制副作用。

在另一组实施例中，在施用治疗性抗体和 NK 细胞增效化合物之前（以及如果合适，在治疗期间）将从患者处获得 NK 细胞，并且测量，用以确定要使用的理想的化合物或化合物组的最大疗效。例如 NK 细胞上存在的抑制性或活化受体的特征可以被确认，并且所施用的化合物其特异性地针对最重要的受体。可选替换地，所得到的 NK 细胞可以与治疗性抗体和靶细胞一起孵育，并且可以测定一种或多种化合物用以增强靶细胞消除的能力。无论一种或多种化合物的哪一种在增强体外消除（耗竭）能力最有效时，都可以被选择用于本治疗方法。

化合物和/或治疗性抗体适宜的剂量一般也可以在体外或在动物模型中加以确定，例如在体外通过将各种浓度的治疗性抗体在靶细胞、NK 细胞（优选为人 NK 细胞）、可选的其它免疫细胞存在下孵育，并改变一种或多种 NK 细胞增效化合物的浓度，并且用标准的测定方法（例如如实施例部分所描述的方法）测定在不同条件下靶细胞消除的程度和速率。可选地，随着改变本文所描述的化合物的剂量而改变可用抗体（例如在利妥昔单抗情况下用于 NHL 的动物模型）治疗的疾病的动物模型所给予的治疗性抗体的剂量，并测定治疗动物中抗体的疗效（例如由适宜的临床、细胞或分子测定或标准来确定）。

根据本发明的组合物可以直接注入患者，一般是通过静脉内、腹腔内、动脉内、肌肉内或经皮途径注入。一些单克隆抗体在临床

上显示出疗效, 如 Rituxan (利妥昔单抗) 或 Xolair (奥马佐单抗), 以及类似的施药 (给药) 方案 (如剂型和/或剂量和/或施药方法) 可以用于本发明的组合物。

此外, 本发明的组合物可以进一步包括或可与其它活性试剂或治疗方案联合施用, 如与化疗或其它免疫疗法, 同时或随后施用。

在一些优选的实施例中, 本发明的方法进一步包括一次或多次注射两种或多种阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的化合物。因此, 这两种或多种化合物可以联合使用。这可以用作引起 ADCC 和治疗性抗体疗效的更大增加, 和/或可以用作减少特定的阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的化合物的剂量。例如, 已知如 IL-2 这样的化合物增加剂量使用时是有毒性的。因此, 本发明优先提供一种在有需要的患者体内治疗疾病的方法, 包括: a) 对所述患者施用至少两种阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的优选为抗体或其片段的化合物; 以及 b) 对所述患者施用一种治疗性抗体。例如, 一种优选的方案为所述两种化合物是 (i) 第一化合物选自由刺激 NCR 或 NKG2D 受体或活化的 KIR 受体的抗体、以及阻断抑制性 KIR 受体或 NKG2A 的抗体组成的组中, 以及 (ii) 第二化合物选自由 IL-12、IL-15、IL-18 和 IL-21 组成的组中。因此, 本发明进一步提供了一种在有需要的患者体内治疗疾病的方法, 包括: a) 根据本发明对所述患者施用一种阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的优选为抗体或其片段的化合物; 并且 b) 对所述患者使用一种治疗性抗体; 以及 c) 对所述患者施用 IL-2。IL-2 可以从 Research Diagnostics, NJ, RDI-202, 或 Chiron Corp. (Emeryville, CA) 得到。

根据任意适宜的施用方案可以施用细胞因子, 并且可以在施用阻断 NK 细胞抑制性受体或刺激其活化受体的化合物之前、同时和/或之后施用, 以及在施用治疗性抗体之前、同时和/或之后施用。在

一个典型的例子中，该细胞因子在首次注射阻断 NK 细胞的抑制性受体或刺激其活化受体的化合物的同一天被首次注射，并在 5-10 天内每日施药。所述方法可能包括由皮下途径 1 或 2 次/天注射细胞因子。

细胞因子的剂量选择依赖于待治疗患者的病况。在一个优选的实施例中，可以使用相对低剂量的细胞因子。例如，当含有细胞因子的药物组合物用于每日的皮下注射时，有效剂量的 a 通常低于 1 百万单位细胞因子/ m^2 /天。在一个优选的实施例中，IL-2 以每日剂量低于 1 百万单位/ m^2 皮下注射 5-10 天。使用细胞因子的更详细的情况参见国际专利申请公开 PCT/EP/0314716 和美国专利申请第 60/435,344 号，名称为 “Pharmaceutical compositions having an effect on the proliferation of NK cells and a method using the same”，将其披露的内容以引用方式合并于本文中。应该注意到治疗性抗体和 NK 细胞增效化合物可以一同施用，例如同时注射，或可以同时施用但是以不同的剂型，或可以单独施用，例如在化合物施用之前或之后数小时、数天、或数周施用该化合物。

本发明的进一步的方面和优点在下面的试验部分中加以公开，这应当理解的是对本发明的例证但不限制本发明的范围。

实施例

实施例 1: 全 KIR2DL 抗体的产生

PBL 的纯化及多克隆或克隆 NK 细胞系的产生

PBL 通过 Ficoll Hypaque 梯度法以及弃去贴壁细胞 (plastic adherent cell) 而得自健康的供者。为了获得富集的 NK 细胞，PBL 用抗 CD3、抗 CD4 和抗 HLA-DR 的单克隆抗体 (mAbs) 孵育 (4°C 下 30 分钟)，随后用羊抗鼠磁珠 (Dynal) (4°C 下 30 分钟) 并用本

领域已知的方法 (Pende et al., 1999) 进行免疫磁珠分选。将 CD3 缺陷细胞- (CD3 minus cell)、CD4 缺陷细胞-、DR 缺陷细胞在照射过的喂养细胞、和 100U/ml 白介素 2 (白细胞介素 2) (Proleukin, Chiron Corporation) 及 1.5ng/ml 植物血凝素 A (Gibco BRL) 上培养, 从而得到多克隆 NK 细胞族。NK 细胞通过限制性稀释来克隆, 并且 NK 细胞的克隆通过用于细胞表面受体表达的流式细胞计数法进行识别。

如下的克隆用于本研究中:

CP11、CN5 和 CN505 是 KIR2DL1 的阳性克隆, 并且被 EB6 或 XA-141 抗体染色。CN12 和 CP 502 是 KIR2DL3 的阳性克隆, 并且被 GL183 抗体染色。

流式细胞计数法分析

所使用的单克隆抗体 (mAb) 是在本实验室中制备的 JT3A (IgG2a、抗 CD3)、EB6 和 GL183 (分别是 IgG1 抗 KIR2DL1 和抗 KIR2DL3)、XA-141 IgM 抗 KIR2DL1 (与 EB6、抗 CD4 (HP2.6)、抗 DR(DR1.12、IgG2a) 相比具有相同的特异性)。除了 JT3A、HP2.6、DR1.12, 具有相同特异性的可商购自加利福尼亚州富勒敦市的 Beckman coulter 公司的单克隆抗体可以用于实施例 1 中。EB6 和 GL183 是可以从加利福尼亚州富勒敦市的 Beckman coulter 公司商购的。XA-141 是不可商购的, 但是 EB6 可以用于控制在文献 (Moretta et al., 1993) 中所描述的溶解的重构。

流式细胞计数法

将细胞用适当的抗体染色 (4℃ 下 30 分钟), 随后通过 PE 或 FITC 结合多克隆抗鼠抗体 (Southern Biotechnology Associates Inc)。将样

品在 FACSAN 设备上 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 通过细胞荧光测定分析法进行分析测试。

细胞毒性实验

NK 克隆的细胞溶解活性通过标准的 4 小时 ^{51}Cr 释放试验进行检测。其中将效应物 NK 细胞在已知的对 NK 细胞溶解敏感的 Cw3 或 Cw4 阳性细胞系上进行测试。在微量滴定板的每个孔中所有靶细胞的用量约为 5000 个细胞,而在靶细胞上的效应物的比率在图中示出 (通常每个靶细胞对应 4 个效应物)。在有或无所示的以 1/2 稀释所述单克隆抗体上清的条件下进行细胞溶解试验。该过程基本上与在文献 (Moretta et al., 1993) 中所描述的一致。

新的单克隆抗体的产生

单克隆抗体通过用如在文献 (Moretta et al., 1990; 将其披露的内容以引用方式合并于本文中) 中所描述的活化的多克隆或单克隆 NK 细胞系免疫 5 周的 Balb C 小鼠产生。当不同的细胞融合后,单克隆抗体由于它们能够与 EB6 和 GL183 阳性 NK 细胞系和克隆交叉反应从而首先被挑选出来。阳性单克隆抗体由于能够重构分别由 Cw4 或 Cw3 阳性靶细胞的 EB6 阳性或 GL183 阳性 NK 克隆造成的溶解,从而进一步被筛选出来。

DF200, 一种作用于 KIR2DL 人 NK 受体的共用决定区的新的单克隆抗体

一种单克隆抗体 DF200mAb, 经发现能与包括 KIR2DL1、KIR2DL2/3 的 KIR 家族各成员反应。对于用 DF200mAb (KIR2DL1+和 KIR2DL2/3+细胞) 染色的 NK 细胞被明亮地着色。(图 1)

表达一种或另一种（或甚至两种）HLA 类 I 特异性抑制性受体的 NK 克隆用作表达一种或多种 HLA-C 等位基因的靶细胞的效应物。正如所料，KIR2DL1+NK 克隆对表达 HLA-Cw4 的靶细胞显示出即便有也是极小的细胞溶解活性，同样，KIR2DL3+NK 克隆对 Cw3 阳性靶细胞也显示出极小或没有活性。然而，当存在 DF200mAb（用于掩蔽它们的 KIR2DL 受体）时，NK 克隆变得不能够识别它们的 HLA-C 配体，并且在 Cw3 或 Cw4 靶上显示出很强的细胞溶解活性。

例如，C1R 细胞系（CW4+EBV 细胞系，ATCC n°CRL 1993）没有被 KIR2DL1+NK 克隆（CN5/CN505）杀死，但是该抑制作用通过使用 DF200 或传统的抗 KIR2DL1 mAb 可以被有效逆转。另一方面，表达 KIR2DL2/3+KIR2DL1-表型的 NK 克隆（CN12）有效地杀死 C1R，而且这种致死不受 DF200mAb 的影响（图 2）。相似的结果可以用在 Cw3 阳性靶上的 KIR2DL2-或 KIR2DL3-阳性 NK 克隆得到。

DF200 mAb/KIR 2DL1 和 DF200 mAb/KIR 2DL3 相互作用的 Biacore 分析

材料和方法

重组体蛋白的生产及纯化。KIR2DL1 和 KIR2DL3 重组体蛋白在编码 KIR2 DL 和 KIR 2DL3 全部细胞外结构域的 *E. coli*. cDNA 中产生，该 KIR2DL 和 KIR 2DL3 分别由 pCDM8 克隆 47.11 载体（Blassoni et al., 1993；将其披露的内容以引用方式合并于本文中）和 RSVS (gpt) 183 克隆 6 载体（Wagtman et al., 1995；将其披露的内容以引用方式合并于本文中），使用如下引物得到：

有 义 (引 物) :
5'-GGAATTCCAGGAGGAATTTAAAATGCATGAGGGAGTCC
ACAG-3'

反 义 (引 物) :
5'-CCCAAGCTTGGGTTATGTGACAGAAACAAGCAGTGG-3'.

它们在阅读框中用编码生物素化信号的序列克隆在 pML1 表达载体中 (Saulquin et al., 2003; 将其披露的内容以引用方式合并于本文中)。

在 BL21 (DE3) 菌株 (Invitrogen) 内完成蛋白表达。转染的细菌在补充有氨苄西林 (100ug/ml) 的培养液中于 37℃ 生长到 $OD_{600}=0.6$, 并用 1mM IPTG 诱导。

在变性条件下 (8M 脲) 从包含体中回收蛋白质。重组蛋白的再折叠在含有 L-精氨酸 (400mM, Sigma) 和 β -巯基乙醇 (1mM) 的三羧甲基氨基甲烷 (Tris) 20mM、pH7.8、NaCl 150mM 缓冲液中在室温下通过在六步透析 (分别是 4、3、2、1、0.5 和 0M 脲) 中逐渐减少脲浓度来实现。在 0.5 和 0M 脲透析步骤时加入经还原及氧化的谷胱甘肽 (分别是 5mM 和 0.5mM, Sigma)。最后, 将蛋白在三羧甲基氨基甲烷 (Tris) 10mM、pH7.5、NaCl 150mM 缓冲液中充分透析。将可溶性的再折叠蛋白经浓缩后在 Superdex 200 排阻层析柱上纯化 (Pharmacia; AKTA 系统)。

Biacore 分析。在一台 Biacore 设备上 (Biacore) 进行表面等离子共振测定。在所有的 Biacore 试验中, 用补充有 0.05% 表面活性剂 P20 的 HBS 缓冲液作为运行缓冲液。

蛋白固定。将重组体 KIR2DL1 和 KIR2DL3 蛋白共价固定于在传感器芯片 CM5 (Sensor Chip CM5) (Biacore) 上的葡聚糖层中的

羧基基团。该传感器芯片表面用 EDC/NHS (N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基丁二酰亚胺, Biacore) 活化。将在结合缓冲液 (10mM 乙酸盐, pH4.5) 中的蛋白注入。用 100mM、pH 为 8 的乙醇胺 (Biacore) 进行剩余的活性基团的失活。

亲和力测量。为了进行动力学测量, 将不同浓度的可溶性抗体 (10^{-7} 到 4×10^{-10} M) 施加到该经固定的样本上。以 20ul/min 的连续流速进行测量。对于每一循环, 通过注入 5 μ l 的 10mM、pH 为 11 的 NaOH 对感应芯片的表面进行再生。

将 BIAlogue 动力学评价程序 (BIAevaluation 3.1, Biacore) 用于数据分析。

结果

将 DF200 mAb 结合于经固定的 KIR 2DL1 和 KIR 2DL3 的 BIAcore 分析。

	KD (10^{-9} M)
KIR 2DL1	10.9+/-3.8
KIR 2DL3	2.0+/-1.9

KD: 离解常数。

将可溶性分析物 (在不同浓度下为 40 μ l) 以在 HBS 缓冲液中 20 μ l/min 的流速注入到分别含有 KIR 2DL1 和 KIR 2DL3 为 500 或 540 反射单位 (RU)、以及 1000 或 700RU 的葡聚糖层上。数据代表 6 个独立的实验。

实施例 2: 美罗华 (Rituxan) 和抗 KIR 单克隆抗体 (抗 KIR mAb) 联合使用增强 ADCC

制备人 NK 克隆。将用阴性抗 CD3 免疫磁选择方法 (Miltenyi) 去掉 T 细胞的血单核细胞在限制性稀释的条件下铺板, 用植物血凝

素 A (PHA) (Biochrom KG, Berlin, Germany) 活化, 用白介素 2 (IL-2) (Chiron B. V., Amsterdam, Netherlands) 和照射过的喂养细胞培养。在所有的供体中克隆效率都是相等的, 占铺板的 NK 细胞的 1/5 到 1/10 之间。克隆的 NK 细胞通过对 Epstein-Barr 病毒转染的、已知的 HLA 类型的 B 淋巴母细胞系以效应物对靶细胞比率为 10:1 作用的标准 ^{51}Cr 释放细胞毒(性)来筛选同种异体反应性。显示 $\geq 30\%$ 溶解的克隆被认为是具有同种异体反应性的。作为判定标准, 克隆指或者具有 $< 5\%$ 的显示或者具有 $> 40\%$ 的溶解。

用美罗华 (Rituxan) 增强由 KIR2DL1 阳性 NK 细胞克隆介导的 ADCC

用标准 4hr ^{51}Cr 释放测试测定 NK 细胞的细胞溶解活性, 其中效应物 NK 细胞在 Cw4 或 Cw3 阳性 EBV 细胞系 (CD20 阳性) 上进行测试, 了解其对 NK 细胞溶解的敏感性。所有的靶细胞在微量滴定板以每孔 5000 个细胞以及效应物 (NK 细胞克隆) 在靶细胞上的比率如图 3 中所示来使用。在一些实验中, 该治疗性嵌合抗 CD20 利妥昔单抗 (Rituxan, Idec) 以 $5\mu\text{g/ml}$ 加入到该效应物靶细胞混合物中。在一些实验中, EB6 抗体 (抗 KIR2DL1) 以 $10\mu\text{g/ml}$ 加入到效应物靶细胞混合物中。

本实验显示出单独的美罗华 (Rituxan) 基本上不介导通过在 Cw4 阳性靶目标上 KIR2DL1 阳性 NK 克隆的 ADCC。存在抗 KIR2DL1 抗体时, KIR2DL1 阳性克隆的 ADCC 被极大地增强了。

实施例 3: 由坎帕斯 (Campath) 通过 KIR2DL1 阳性 NK 细胞克隆介导的 ADCC 的增强

在与实施例 2 所描述的类似的实验中, 将自体同源 Cw4+PHA 胚细胞在 NK 细胞加上阿来组单抗 (alumtuzumab) (Campath,

Berlex)、EB6 抗体 (100 μ g/ml) 存在时, 或坎帕斯 (Campath) 和 EB6 存在时孵育。如图 4 所示, 结果显示 EB6 的存在极大地增强了 NK 细胞消除自体同源细胞的能力: 坎帕斯 (Campath) 单独存在时大约 4% 的靶细胞溶解, 然而坎帕斯 (Campath) 加上 EB6 存在时超过 30% 的细胞溶解。

参考文献

Biassoni R, Verdiani S, Cambiaggi A, Romeo PH, Ferrini S, Moretta L. Human CD3-CD16⁺ natural killer cells express the hGATA-3 T cell transcription factor and unrearranged 2.3-kb TcR delta transcript. *Eur J Immunol*. 1993 May; 23(5):1083-7.

Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R, (1986) "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy" *Nature* 319:675-8.

Lanier LL (1998) "NK cell receptors" *Annu Rev Immunol* 16:359-93.

Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E., and et al. (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16⁺ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 172, 1589-1598.

Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., and Moretta, L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 178, 597-604.

Moretta A, Moretta L (1997) «HLA class I specific inhibitory receptors» *Curr Opin Immunol* 9:694-701.

Ohlen C, Kling G, Hoglund P, Hansson M, Scangos G, Bieberich C, Jay G, Karre K (1989) "Prevention of allogeneic bone marrow graft rejection by H-2 transgene in donor mice" *Science* 246:666-8.

Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., *et al.* (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1505-1516.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., *et al.* (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097-2100.

Sauquin X, Gastin LN, Vivier E. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j) *J Exp Med*. 2003 Apr 7;197(7):933-8.

Valiante NM, Lienert K, Shilling HG, Smits BJ, Parham P(1997) «Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution» *Immunol Rev* 155:155-64.

Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, Bottino C, Moretta L, Moretta A, Long EO. Molecular clone of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains *Immunity*. 1995 May; 2(5):439-49.

Ward et al (*Nature* 341 (1989)) 544.

本说明书中引用的所有公开出版物和专利申请均以它们完整的形式结合在此，如同每个单独公开出版物或专利申请被特定或各自指出的那样通过引证合并入本文中。

尽管上述发明是为了清楚理解的目的以图表和举例的方式作了一定程度的详细描述，很显然本领域的普通技术人员在本发明的教导下可以对其作一定的改变和修正而不背离所附的权利要求的精神或保护范围。

除非在本文中另作说明或与本文的内容明显矛盾，在其所有可能的变化中，上述要素的任何组合都涵盖在本发明中。

除非在本文中另作说明或与本文的内容明显矛盾，在描述本发明的上下文中所使用的术语“一”和“该”以及类似的指代词应理解为包括单数和复数。

除非在本文中另作说明，在本文中数量范围的描述仅仅是作为落入该范围内的单独涉及到的各离散值的简略表达方法，并且将各离散值合并入本说明书中如同在本文中单独说明的那样。除非另作说明，本文中给出的所有确定值是相应的近似值的代表（例如相对于一个特定因子或测量值所提供的所有的示例性准确数值也可以被认为是提供相应的近似测量值，恰当的时候，可以修改为“约”）。

本文中描述的所有方法可以按任何适宜的顺序实施，除非在本文中另作说明或明显与本文内容相矛盾。

除非另作说明，本文中使用的任意和所有的实施例（例子、实例）、或示例性语言（例如“如”、“例如”）仅仅用于更好地描述本发明，并不对本发明的范围造成限制。除非作明确表述，本说明书中没有词语可以被解释为任何一个要素是完成本发明所必需的。

本文中专利文献的引用和结合在此仅仅是为了方便起见，并不反映对这些专利文献的有效性、可专利性和/或可实施性的观点。

在本发明的任何一个方面或实施例的描述中，相对于一种要素或多种要素使用术语如“包括”、“具有”、“包括”或“含有”是为“由……组成”，“基本上由……组成”或“主要包括”该特定要素或多种要素的本发明的类似方面或实施例提供支持，除非在其它处加以说明或明显与本文内容相矛盾（例如，本文中所描述的包括特定成分的组合物也应当理解为描述了一种由该成分组成的组合物，除非在其它处加以说明或明显与本文内容相矛盾）。

本发明包括由可适用法律最大限度允许的、在本提交的各个方面或权利要求中所叙述的发明主题的所有变化和等效物。

SEQUENCE LISTING

P7176RWS.ST25

<110> 依奈特制药公司
佩鲁贾研究大学

<120> 使用NK细胞增效化合物提高治疗性抗体功效的方法和组合物

<130> P7176RWS

<140> PCT/IB2004/002636
<141> 2004-07-23

<150> US 60/489,489
<151> 2003-07-24

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 42
<212> DNA
<213> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(42)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(42)
<223> 引物—有义—5' 至3'

<400> 1
ggaattccag gaggaattta aatgcatga gggagtccac ag 42

<210> 2
<211> 36
<212> DNA
<213> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(36)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(36)
<223> 引物—反义—5' 至3'

<400> 2
cccaagcttg ggttatgtga cagaaacaag cagtgg 36

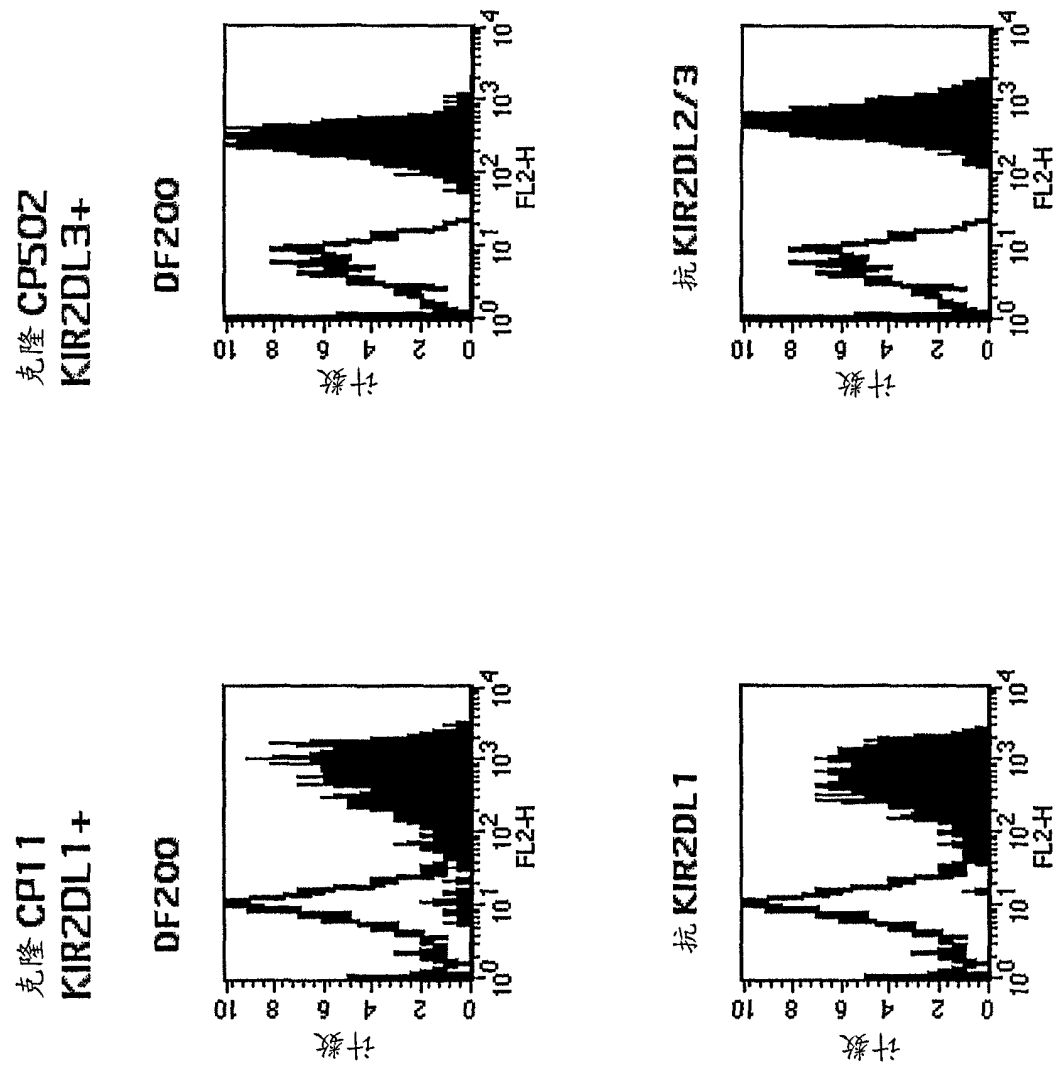


图 1

用抗 KIR2DL 单克隆抗体在 CIR Cw4
靶上以效应物 / 靶比率为 4/1 进行溶解重构

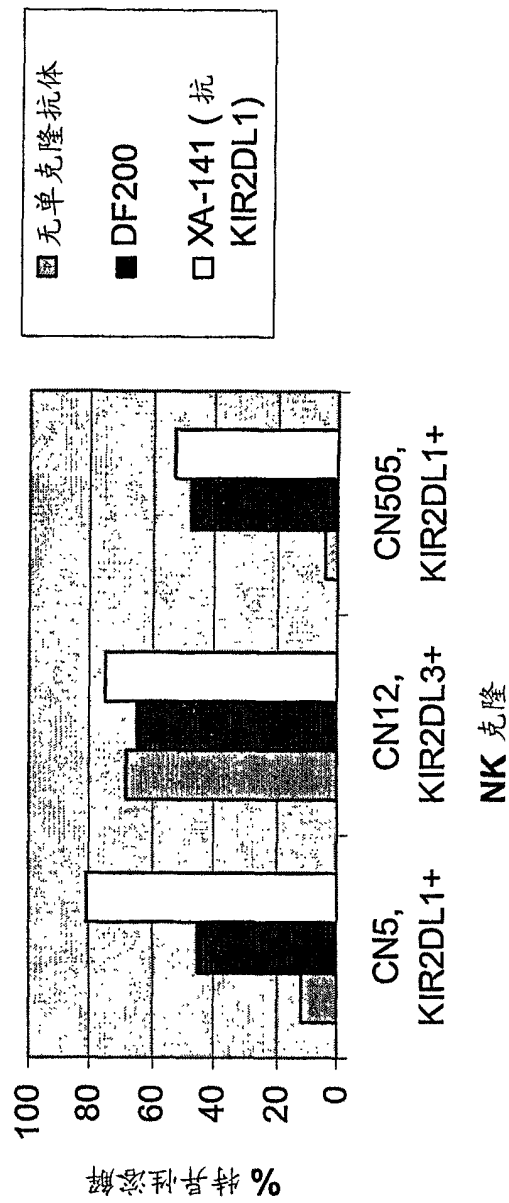


图 2

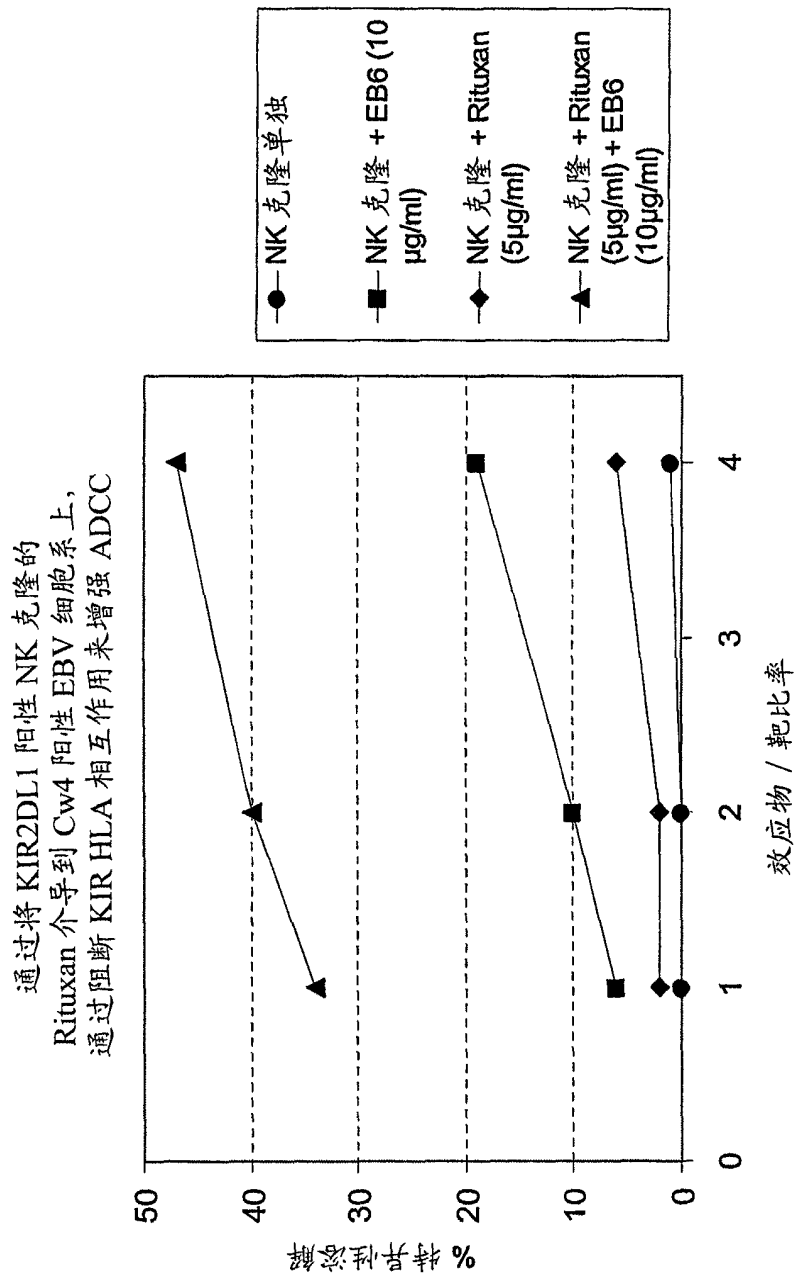


图 3

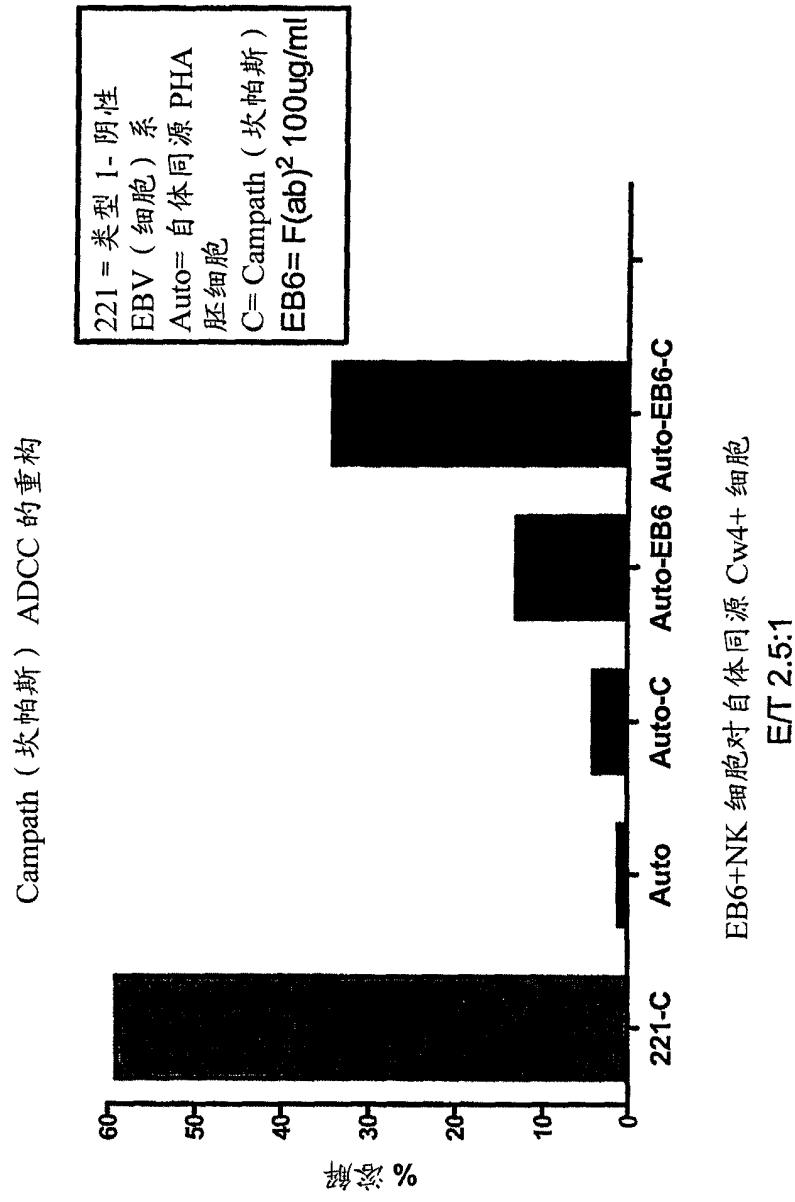


图 4