(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119161482 A
(43)申请公布日 2024.12.20

(21)申请号 202411416221.7

(22)申请日 2019.09.03

(30)优先权数据
18192311.1 2018.09.03 EP

(62)分案原申请数据
201980055914.9 2019.09.03

(71)申请人 生物发明国际公司
地址 瑞典,隆德
申请人 特兰斯吉恩股份有限公司

(72)发明人 B•弗伦德修斯 英格丽德•泰格
M•塞姆里奇 L•玛藤松
P•霍尔姆奎斯特 J-B•马尔尚
N•西尔韦斯特

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟 王玉

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
C12N 15/863(2006.01)
C12N 7/01(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C12R 1/93(2006.01)

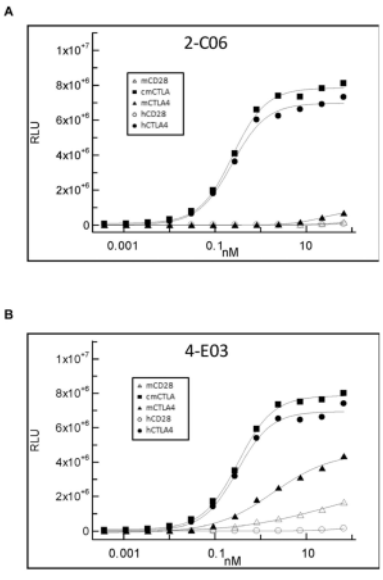
权利要求书3页 说明书55页
序列表（电子公布） 附图51页

(54)发明名称

新颖抗体和核苷酸序列及其用途

(57)摘要

本公开涉及新颖抗体和核苷酸序列及其用途。具体地,本发明描述了新颖的抗CTLA-4抗体分子和核苷酸序列以及编码这类抗体分子的表达载体,如病毒。所述新颖的抗体分子是消耗Treg的抗体分子,并且与伊匹木单抗相比,它们对CTLA-4阳性细胞(如Treg)具有改善的消耗作用。还描述了这类抗体分子或核苷酸序列或病毒在医学中的用途,例如在癌症(如实体瘤)的治疗中的用途。



CN 119161482 A

1.一种抗体分子,所述抗体分子与CTLA-4特异性结合并且与伊匹木单抗相比,对CTLA-4阳性细胞具有改善的消耗作用。

2.根据权利要求1所述的抗体分子,所述抗体分子与伊匹木单抗相比,对CD4阳性细胞具有改善的消耗作用。

3.根据权利要求1或2所述的抗体分子,所述抗体分子与伊匹木单抗相比,对Treg具有改善的消耗作用。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的抗体分子,如果所述抗体分子在以下中给出改善的消耗,则认为所述抗体分子与伊匹木单抗相比,对CTLA-4阳性细胞、CD4阳性细胞和/或Treg具有改善的消耗作用:

(i)体外ADCC测试,所述体外ADCC测试使用经稳定转染以表达CD16-158V等位基因与GFP的NK-92细胞系执行,其中所述ADCC测试包括以下连续步骤:

1)从健康供体的外周血中分离出CTLA-4阳性细胞、CD4阳性细胞或Treg作为靶细胞;

2)然后用CD3/CD28和rhIL-2刺激所述靶细胞;

3)然后将所述靶细胞与所述抗体分子预温育,并且然后与NK细胞混合;

4)然后将所述靶细胞在含有1HEPES缓冲液、丙酮酸钠和FBS低IgG的RPMI 1640+GlutaMAX培养基中温育;

5)通过流式细胞术测定裂解;

6)重复或并行执行步骤1-5,其中使用伊匹木单抗代替步骤3中的所述抗体分子;和

7)将所述抗体分子的所述裂解的结果与伊匹木单抗的所述裂解的结果进行比较,并且所述抗体分子与伊匹木单抗相比改善的裂解表明所述抗体分子对CTLA-4阳性细胞、CD4阳性细胞和/或Treg具有改善的消耗作用;和/或

(ⅱ)在PBMC-NOG/SCID模型中的体内测试,其中所述体内测试包括以下连续步骤:

1)将人PBMC分离、洗涤并重悬于无菌PBS中;

2)向NOG小鼠静脉内注射来自步骤1)的细胞悬浮液;

3)分离来自所述NOG小鼠的脾并制成单细胞悬浮液;

4)将来自步骤3)的所述细胞悬浮液重悬于无菌PBS中;

5)向SCID小鼠腹膜内注射来自步骤4的悬浮液;

6)然后用所述抗体分子、伊匹木单抗或同种型对照单克隆抗体处理所述SCID小鼠;

7)收集所述处理过的SCID小鼠的腹膜内液;

8)使用以下标志物通过FACS鉴定和定量人T细胞亚群:CD45、CD4、CD8、CD25、CD127;

9)将来自用所述抗体分子处理的所述小鼠的所述T细胞亚群的鉴定和定量结果与来自用伊匹木单抗处理的所述小鼠的所述T细胞亚群的鉴定和定量结果以及来自用同种型对照单克隆抗体处理的所述小鼠的所述T细胞亚群的鉴定和定量结果进行比较,并且与来自用伊匹木单抗处理的小鼠的所述腹膜内液中CTLA-4阳性细胞、CD4阳性细胞和/或Treg的数量相比,来自用待测试的所述抗体分子处理的小鼠的所述腹膜内液中CTLA-4阳性细胞、CD4阳性细胞和/或Treg的数量较少表明,与伊匹木单抗相比,所述抗体分子对CTLA-4阳性细胞,CD4阳性细胞和/或Treg具有改善的消耗作用。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子选自由包括CDR中的1至6个的抗体分子组成的组,所述CDR选自由SEQ ID.No:3、6、8、10、12和14组成的组。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子选自由包括CDR VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、和VL-CDR3中的1至6个的抗体分子组成的组,

其中VH-CDR1,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:15、22、29和35组成的组;

其中VH-CDR2,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:16、23、30和36组成的组;

其中VH-CDR3,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:17、24、31和37组成的组;

其中VL-CDR1,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:10和38组成的组;

其中VL-CDR2,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:18、25、32和39组成的组;

其中VL-CDR3,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:19、26和40组成的组。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子包括具有SEQ ID.NO:15、16、17、10、18和19的6个CDR或具有SEQ ID.NO:22、23、24、10、25和26的6个CDR。

8.一种与CTLA-4特异性结合的抗体分子,其中所述抗体分子包括具有SEQID.NO:15、16、17、10、18和19的6个CDR,或具有SEQ ID.NO:22、23、24、10、25和26的6个CDR。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子包括选自由SEQ.ID.NO:20和27组成的组的可变重链和/或选自由SEQ.ID.NO:21和28组成的组的可变轻链。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子包括重链恒定区SEQ ID NO:43和/或轻链恒定区SEQ ID NO:44。

11.根据权利要求1至6中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子是能够与根据权利要求7至10中任一项所述的抗体分子竞争与CTLA-4结合的抗体分子。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子选自由全长IgG抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab、Fv、scFv、Fab'和$(Fab')_2$组成的组。

13.根据权利要求1至13中任一项所述的抗体分子,其与人CTLA-4(hCTLA-4)和/或恒河猴CTLA-4(cmCTLA-4)和/或鼠CTLA-4(mCTLA-4)结合。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的抗体分子,其不与人CD28结合。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子选自由人IgG抗体、人源化IgG抗体和人源的IgG抗体组成的组。

16.根据权利要求15所述的抗体分子,其中所述抗体分子是人IgG1抗体。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子是单克隆抗体。

18.一种分离的核苷酸序列,其编码根据权利要求1至17中任一项所述的抗体分子。

19.根据权利要求18所述的分离的核苷酸序列,其包括以下或由以下组成:选自由SEQ ID 45-52组成的组的序列。

20.一种质粒,其包括根据权利要求18或19所述的核苷酸序列。

21.一种病毒,其包括根据权利要求18或19所述的核苷酸序列或根据权利要求20所述的质粒。

22.根据权利要求21所述的病毒,其是溶瘤病毒,并且优选溶瘤痘病毒。

23.根据权利要求22所述的病毒,其中所述痘病毒属于脊索痘病毒亚科,更优选属于正痘病毒属,优选选自由痘苗病毒、牛痘病毒、金丝雀痘病毒、鼠痘病毒和粘液瘤病毒组成的组。

24.根据权利要求23所述的病毒,其中所述溶瘤病毒是对于胸苷激酶(TK)和/或核糖核

苷酸还原酶(RR)活性均具有缺陷并且包括编码SEQ.ID.NO:20和ID.NO:21或SEQ.ID.NO:53和ID.NO:54的核苷酸序列的痘苗病毒。

25.根据权利要求24所述的病毒,其中所述溶瘤痘苗病毒进一步包括编码GM-CSF的核苷酸序列,且特别偏好人GM-CSF(例如具有SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56)或鼠GM-CSF(例如具有SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58)。

26.根据权利要求21至25中任一项所述的病毒,其中编码所述重链的盒插入J2R基因座处,并且编码所述轻链的盒插入I4L基因座处。

27.一种细胞,其包括根据权利要求18或19所述的核苷酸序列,或根据权利要求20所述的质粒,或根据权利要求21至26中任一项所述的病毒。

28.根据权利要求1至17中任一项所述的抗体分子、根据权利要求18或19所述的核苷酸序列、根据权利要求20所述的质粒、根据权利要求21至26中任一项所述的病毒或根据权利要求27所述的细胞,其用于医学。

29.根据权利要求1至17中任一项所述的抗体分子、根据权利要求18或19所述的核苷酸序列、根据权利要求20所述的质粒、根据权利要求21至26中任一项所述的病毒或根据权利要求27所述的细胞,其用于治疗癌症。

30.一种根据权利要求1至17中任一项所述的抗体分子、根据权利要求18或19所述的核苷酸序列、根据权利要求20所述的质粒、根据权利要求21至26中任一项所述的病毒或根据权利要求27所述的细胞的用途,其用于制造供用于治疗癌症的药物组合物。

31.一种药物组合物,其包括以下或由以下组成:根据权利要求1至17中任一项所述的抗体分子、根据权利要求18或19所述的核苷酸序列、根据权利要求20所述的质粒、根据权利要求21至26中任一项所述的病毒或根据权利要求27所述的细胞,以及任选地药学上可接受的稀释剂、载剂、媒剂和/或赋形剂。

32.根据权利要求31所述的药物组合物,其用于治疗癌症。

33.一种在受试者中治疗癌症的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至17中任一项所述的抗体分子、根据权利要求18或19所述的核苷酸序列、根据权利要求20所述的质粒、根据权利要求21至26中任一项所述的病毒、根据权利要求27的细胞或根据权利要求31所述的药物组合物。

34.一种根据权利要求24所述的供使用的抗体分子、根据权利要求29所述的供使用的核苷酸序列、根据权利要求29所述的供使用的质粒、根据权利要求29所述的供使用的病毒、根据权利要求29所述的供使用的细胞、根据权利要求30所述的用途、根据权利要求32所述的药物组合物或根据权利要求33所述的方法,其中所述癌症是实体癌。

新颖抗体和核苷酸序列及其用途

[0001] 本申请是申请号为2019800559149,申请日为2019年9月3日,发明名称为“新颖抗体和核苷酸序列及其用途”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及新颖的抗CTLA-4抗体分子、核苷酸序列和编码这类抗体分子的表达载体(例如溶瘤病毒),以将其用于癌症治疗。与伊匹木单抗相比,新颖的抗体具有改善的Treg消耗。

背景技术

[0003] 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA-4或CTLA4),也称为CD152,是阻断T细胞激活的B7/CD28家族成员。CTLA-4在激活的T细胞上表达,并向T细胞传递抑制信号。它与T细胞共刺激蛋白CD28同源,并且CTLA-4和CD28都与CD80(也称为B7-1)和CD86(也称为B7-2)结合。CTLA4还存在于调节性T细胞(regulatory T cell,Treg)中,并有助于其抑制功能。CTLA-4蛋白含有胞外V结构域、跨膜结构域和胞质尾区。

[0004] 阻断CTLA-4与其配体B7.1和B7.2相互作用的抗体可以增强免疫反应,并且已显示出能够刺激有效的抗肿瘤免疫力(Korman等人2006,《癌症免疫疗法中的检查点阻断(Checkpoint blockade in cancer immunotherapy)》,《免疫学进展(Adv Immunol.)》90:297-339)。

[0005] 免疫调节性单克隆抗体(mAb)的有前景的临床结果使人们重新相信免疫系统是控制癌症的关键。最近,将这些mAb分类为检查点阻断剂(拮抗剂)或共刺激性分子激活剂(激动剂)引起了质疑,发现这两种类型的实例都可以通过抑制性调节性T细胞(Treg)的消耗来对抗肿瘤。

[0006] 免疫调节性mAb(如伊匹木单抗和其他抗CTLA4抗体)在难以治疗的恶性肿瘤中进行试验时显示出阳性结果,尽管在少数患者中(Hodi,F.S.等人2010,《新英格兰医学杂志(N EnglJMed)》363(8):711-723;Beatty,G.L.等人2011,《科学(Science)》331(6024):1612-1616;Brahmer,J.R.等人2012,《新英格兰医学杂志》366(26):2455-2465;Topalian,S.L.等人2012《新英格兰医学杂志》366(26):2443-2454)。这些有前景的结果有助于重振人们的观念,即免疫系统可以是控制癌症的关键。生成这些mAb以靶向T细胞或抗原递呈细胞(APC)上的关键分子调节剂,并通过阻断抑制信号(检查点阻断剂)或递送共刺激性信号(激动剂)来增强抗癌免疫力。最近,当发现所有均靶向T细胞的抗CTLA4抗体、抗GITR抗体和抗OX40抗体的治疗活性涉及依赖于激活性Fcγ R的共同参与的抑制性CD4+T调节性细胞的消耗时,这种二元分类就引起了质疑(Bulliard,Jolicoeur等人2013,Marabelle,A.等人2013,《临床研究杂志(JClinInvest)》123(6):2447-2463;Simpson,T.R.,等人《实验医学杂志(J Exp Med)》210(9):1695-1710)。

[0007] 单克隆CTLA-4抗体,伊匹木单抗(YERVOY®;先前表示为10D1、BMS-734016、MDX101、MDX-010、MDX-CTLA-4和MDX-CTLA4)已在多个国家获得批准用于治疗黑素瘤,并且正在

针对其他适应症进行临床试验(Weber2008,克服对黑素瘤的免疫耐受性:用伊匹木单抗(MDX-010)靶向CTLA-4(Overcoming immunologic tolerance to melanoma:targeting CTLA-4with ipilimumab(MDX-010))》《肿瘤学家(Oncologist)》,13(增刊4):16-25)。伊匹木单抗是一种通过重组DNA技术在中国仓鼠卵巢细胞中产生的完全人抗CTLA-4单克隆抗体(IgG1κ)。它有477202-00-9和6T8C155666。伊匹木单抗在US9 789 182中进一步定义,其中还列出了伊匹木单抗的重链和轻链的序列(为SEQ ID NO:17和18)、VH和/或VL区的序列(分别为SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20)和CDR序列(如SEQ ID NO:21、22和23中所阐述的重链CDR1、CDR2和CDR3,和如SEQ ID NO:24、25和26中所阐述的轻链CDR1、CDR2和CDR3)。

[0008] 已经在数项临床试验中测试的第二种完全人单克隆抗CTLA-4抗体是替西利姆单抗(tremelimumab)(原名替西木单抗(ticilimumab),CP-675,206)(Ribas 2008,《克服对黑素瘤的免疫耐受性:用替西利姆单抗(CP-675,206)靶向CTLA-4(Overcoming immunologic tolerance to melanoma:targeting CTLA-4with tremelimumab(CP-675,206))》《肿瘤学家》,13(增刊4):10-5;Callahan等人2010,《抗CTLA-4抗体疗法:新颖免疫疗法的临床开发期间的免疫监测。(Anti-CTLA-4Antibody Therapy:Immune Monitoring During Clinical Development of a Novel Immunotherapy.)》《肿瘤学论文集(Semin Oncol.)》37(5):473-484.;Blank等人2015,《抗CTLA-4抗体的治疗用途。(Therapeutic use of anti-CTLA-4antibodies.)》《国际免疫学(International Immunology)》,27(1):3-10)。

[0009] 在一些专利申请和专利中已经描述了抗CTLA-4抗体,包含以下。

[0010] WO 93/00431涉及CTLA4受体蛋白,涉及CTLA4Ig融合蛋白,并涉及使用这样的融合蛋白或单克隆抗体调节细胞相互作用的方法。

[0011] WO 97/20574涉及阻断与CTLA-4信号传导相关联的T淋巴细胞下调,并涉及除CTLA-4胞外结构域抗体以外的CTLA-4阻断剂,所述抗体增加哺乳动物T细胞对抗原性刺激的反应或减少哺乳动物宿主中肿瘤细胞的生长。

[0012] WO 00/37504涉及人抗CTLA-4抗体以及这类抗体在治疗癌症中的用途。WO 00/37504进一步涉及上文提及的人单克隆抗体替西利姆单抗,其在该专利申请中表示为11.2.1。

[0013] WO 01/14424还涉及与人CTLA-4特异性结合的人抗体,并涉及将其用于治疗人类疾病和感染,如癌症。WO 01/14424进一步涉及上文提及并在下文进一步讨论的人单克隆抗体伊匹木单抗,其在该专利申请中表示为10D1。

发明内容

[0014] 本发明涉及抗体分子,所述抗体分子与CTLA-4特异性结合,并且与伊匹木单抗相比,对CTLA-4阳性细胞具有改善的消耗作用。

[0015] 此外,本发明涉及与CTLA-4特异性结合的抗体分子,所述抗体分子包括具有SEQ ID.NO:15、16、17、10、18和19的6个CDR或具有SEQ ID.NO:22、23、24、10、25和26的6个CDR。

[0016] 此外,本发明涉及编码以上抗体分子的分离的核苷酸序列。

[0017] 此外,本发明涉及包括以上核苷酸序列的质粒。

[0018] 此外,本发明涉及包括以上核苷酸序列或以上质粒的病毒,如溶瘤病毒。

[0019] 此外,本发明涉及包括以上核苷酸序列或以上质粒的细胞,如CAR T细胞。

[0020] 此外,本发明涉及以上抗体分子、核苷酸序列、质粒和/或细胞,用于医学。

[0021] 此外,本发明涉及以上抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞,用于治疗癌症。

[0022] 此外,本发明涉及以上抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞的用途,用于制造用于治疗癌症的药物组合物。

[0023] 此外,本发明涉及药物组合物,其包括以上抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞中的至少一种,以及任选地药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。

[0024] 此外,本发明涉及在受试者中治疗癌症的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的以上抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物中的至少一种。

[0025] 此外,本发明涉及如本文参考详细描述、实例和/或附图所描述的抗体分子、供使用的抗体分子、分离的核苷酸序列、供使用的分离的核苷酸序列、质粒、供使用的质粒、病毒、供使用的病毒、细胞、供使用的细胞、用途、药物组合物或治疗方法。

具体实施方式

[0026] CTLA-4阳性细胞包含调节性T细胞、Treg细胞,Treg或T_{reg}(以前被称为抑制T细胞,有时也被称为抑制性调节性T细胞),其是能够在正常和病理性免疫环境中抑制其它免疫细胞的T细胞亚群。Treg是CD4阳性细胞(CD4+细胞)。还有其他不是Treg的CD4+T细胞;然而,Treg可以与非Treg CD4+细胞分离,因为Treg也是FOXP3阳性(FOXP3+),而非Treg CD4+细胞是FOXP3阴性(FOXP3-)。

[0027] 与伊匹木单抗一样,本文所述的抗CTLA-4抗体分子至少部分地通过消耗CTLA-4阳性细胞,如Treg而起作用。此外,与伊匹木单抗一样,本文所述的抗CTLA-4抗体分子阻断CTLA-4与B7.1和B7.2的相互作用。因此,这些抗体可因此帮助克服CTLA-4诱导的对效应T细胞增殖的抑制作用。

[0028] Treg的消耗或Treg消耗,在本文中指的是通过细胞的物理清除来消耗、缺失或消除Treg。具体地说,指的是肿瘤内Treg的消耗。可以通过ADCC,即抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或抗体依赖性细胞毒性,和/或ADCP,即抗体依赖性细胞吞噬作用,来实现Treg的消耗。这意味着当将如本文所述的抗体分子施用于受试者如人时,其与Treg表面上表达的CTLA-4特异性结合,并且这种结合导致Treg的消耗。在一些实施例中,CTLA-4优先在肿瘤微环境中的肿瘤浸润淋巴细胞上或在肿瘤细胞上表达。

[0029] ADCC是一种免疫机制,通过该机制,带有Fc受体的效应细胞可以识别并杀死在其表面上表达肿瘤衍生抗原(即在当前情况下,CTLA-4)的抗体包被的靶细胞。ADCP是一种类似的机制,尽管它导致靶细胞通过吞噬作用而不是细胞毒性被杀死。

[0030] 抗体是免疫学和分子生物学领域的技术人员众所周知的。通常,抗体包括两条重(H)链和两条轻(L)链。在本文中,有时将这种完整抗体分子称为全尺寸(full-size)或全长(full-length)抗体。抗体的重链包括一个可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),并且抗体的分子轻链包括一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)。可变结构域(有时统称为F_V区)与抗体的靶标或抗原结合。每个可变结构域包括三个环,所述环被称为互补决定区(CDR),其负责靶标结合。恒定结构域并不直接参与抗体与抗原的结合,而是表现出各种效应子功能。根据抗体或免疫球蛋白的重链恒定区的氨基酸序列,可以将所述抗

体或免疫球蛋白分为不同类别。免疫球蛋白主要分为五类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且在人类中,这些类别中几类被进一步划分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4;IgA1和IgA2。抗体的另一部分为Fc结构域(也称为片段可结晶结构域),其包括每个抗体重链的恒定结构域中的两个恒定结构域。Fc结构域负责抗体与Fc受体之间的相互作用。

[0031] Fc受体是膜蛋白,其通常发现于免疫系统细胞的细胞表面上(即Fc受体发现于靶细胞膜—也被称为质膜或细胞质膜上)。Fc受体的作用是通过Fc结构域结合抗体,并将抗体内化到细胞中。在免疫系统中,这可能导致抗体介导的吞噬作用和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。

[0032] 如本文所用,术语抗体分子涵盖全长或全尺寸抗体以及全长抗体的功能性片段和这类抗体分子的衍生物。

[0033] 全尺寸抗体的功能性片段具有与对应的全尺寸抗体相同的抗原结合特性,并且包含与对应的全尺寸抗体相同的可变结构域(即,VH和VL序列)和/或相同的CDR序列。功能性片段具有与对应的全尺寸抗体相同的抗原结合特性意味着所述功能性片段与全尺寸抗体结合在靶标上的同一表位。这样的功能性片段可以对应于全尺寸抗体的Fv部分。可替代地,这样的片段可以是Fab,也被称为单价抗原结合片段F(ab)或二价抗原结合片段$F(ab')_2$,所述单价抗原结合片段不含Fc部分而所述二价抗原结合片段含有通过二硫键或F(ab')(即$F(ab')_2$的单价变体)连接在一起的两个抗原结合Fab部分。这样的片段也可以是单链可变片段(scFv)。

[0034] 功能性片段并不总是含有对应的全尺寸抗体的所有六个CDR。应当理解的是,含有三个或更少CDR区(在一些情况下,甚至只是单个CDR或其一部分)的分子能够保留一个或多个CDR所源自的抗体的抗原结合活性。例如,在Gao等人,1994,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》,269:32389-93中,描述了整个VL链(包含所有三个CDR)对其底物具有高亲和力。

[0035] 含有两个CDR区的分子描述于以下文献中:例如,Vaughan和Sollazzo 2001,《组合化学与高通量筛选(Combinatorial Chemistry&High Throughput Screening)》,4:417-430。在第418页(右栏—3我们的设计策略)中,描述了仅包含散布在框架区内的H1和H2 CDR高变区的微抗体。所述微抗体被描述为能够与靶标结合。Vaughan和Sollazzo引用了以下文献:Pessi等人,1993,《自然(Nature)》,362:367-9和Bianchi等人,1994,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,236:649-59,所述文献更详细地描述了H1和H2微抗体及其性质。在Qiu等人,2007,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》,25:921-9中,表明由两个连接的CDR组成的分子能够结合抗原。Quiocho 1993,《自然》,362:293-4提供了“微抗体”技术的总结。Ladner2007,《自然生物技术》,25:875-7指出,含有两个CDR的分子能够保留抗原结合活性。

[0036] 含有单个CDR区的抗体分子描述于以下文献中:例如,Laune等人,1997,《生物化学杂志(JBC)》,272:30937-44,其中表明源自CDR的一系列六肽显示出抗原结合活性,并且注意到完整的单个CDR的合成肽显示出强结合活性。在Monnet等人,1999,《生物化学杂志》,274:3789-96中,示出了一系列12聚体肽和相关框架区具有抗原结合活性,并且指出仅CDR3样肽能够结合抗原。在Heap等人,2005,《普通病毒学杂志(J.Gen.Virol.)》,86:1791-1800中,报道了“微抗体”(含有单个CDR的分子)能够结合抗原,并且示出来自抗HIV抗体的环状肽具有抗原结合活性和功能。在Nicaise等人,2004,《蛋白质科学(Protein Science)》,13:

1882-91中,示出了单个CDR可以赋予抗原结合活性和对其溶菌酶抗原的亲和力。

[0037] 因此,具有五个、四个、三个或更少的CDR的抗体分子能够保留所述CDR所源自的全长抗体的抗原结合性质。

[0038] 抗体分子也可以是全长抗体的衍生物或这样的抗体的片段。衍生物具有与对应的全尺寸抗体相同的抗原结合特性,因为所述衍生物与全尺寸抗体结合于在靶标上的相同表位。

[0039] 因此,如本文所用,术语"抗体分子"包含了所有类型的抗体分子及其功性能片段及其衍生物,包含:单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、可变片段、包含二价单链可变片段(二-scFv)和二硫键连接的可变片段的单链可变片段(scFv片段)、Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fab'片段、抗体重链、抗体轻链、抗体重链的同二聚体、抗体轻链的同二聚体、抗体重链的异二聚体、抗体轻链的异二聚体、这类同二聚体和异二聚体的抗原结合功能性片段。

[0040] 此外,如本文所用,术语"抗体分子"包含所有类的抗体分子和功能性片段,包含:IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgD和IgE。

[0041] 在一些实施例中,抗体是人IgG1。技术人员了解,小鼠IgG2a和人IgG1与激活性Fcγ受体有效地结合并且能够通过用例如ADCP和ADCC激活带有免疫细胞(例如巨噬细胞和NK细胞)的激活性Fcγ受体来激活靶细胞的缺失。因此,尽管小鼠IgG2a是针对小鼠中的缺失的优选同种型,但是人IgG1是针对人中的缺失的优选同种型。相反地,已知TNFR超家族激动剂受体(例如4-1BB、OX40、TNFRII、CD40)的最佳共刺激取决于抑制性FcγRII的抗体参与。在小鼠中,已知优先结合抑制性Fcγ受体(FcγRIIB)且仅与激活性Fcγ受体弱结合的IgG1同种型是针对TNFR超家族靶向性mAb的共刺激活性的最佳选择。虽然在人中没有描述小鼠IgG1同种型的直接等价物,但可以对抗体进行工程改造,从而使得与激活性人Fcγ受体相比,所述抗体对抑制性人Fcγ受体表现出类似的结合增强。在被工程改造为表达人激活性Fcγ受体和人抑制性Fcγ受体的转基因小鼠中,这类经过工程改造的TNFR超家族靶向性抗体在体内的共刺激活性也得到了改善(1}Dahan等人,2016,《激动性人抗CD40单克隆抗体的治疗活性需要选择性的FcγR参与(Therapeutic Activity of Agonistic,Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective FcγR Engagement.)》《癌细胞(Cancer Cell.)》29(6):820-31)。

[0042] 如上所述,抗体分子的不同类型和形式包含在本发明中,并且是免疫学领域技术人员已知的。众所周知,用于治疗目的的抗体经常被修饰抗体分子特性的另外的组分修饰。

[0043] 因此,包含:本发明的抗体分子或根据本发明使用的抗体分子(例如,单克隆抗体分子和/或多克隆抗体分子和/或双特异性抗体分子)包括可检测部分和/或细胞毒性部分。

[0044] "可检测部分"包含一种或多种来自包括以下的组的物质:酶;放射性原子;荧光部分;化学发光部分;生物发光部分。可检测部分允许抗体分子在体外和/或体内和/或离体可见。

[0045] "细胞毒性部分"包含放射性部分和/或酶,例如其中酶是胱天蛋白酶和/或毒素,例如其中毒素是细菌毒素或毒液;其中细胞毒性部分能够诱导细胞裂解。

[0046] 进一步包含:抗体分子可以是分离的形式和/或纯化的形式,和/或可以是聚乙二醇化的。

[0047] 如上所讨论,抗体的CDR与抗体靶标结合。本文所述的每个CDR的氨基酸分配符合根据以下的定义:Kabat EA等人1991,“免疫学上感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immulogical Interest)”第五版,NIH出版号:91-3242,第xv-xvii页。

[0048] 如技术人员将了解的,还存在用于将氨基酸分配给每个CDR的其它方法。例如,国际免疫遗传学信息系统(IMGT(R))(http://www.imgt.org/,以及Lefranc和Lefranc“免疫球蛋白概况(The Immunoglobulin FactsBook)”,由学术出版社(Academic Press)出版,2001年)。

[0049] 在另一个实施例中,本发明或根据本发明使用的抗体分子是能够与本文所述的特异性抗体竞争的抗体分子,如包括SEQ ID.NO:15、16、17、10、18和19或SEQ ID.NO:22、23、24、10、25和26的抗体分子。

[0050] “能够竞争”意味着竞争性抗体能够至少部分地抑制或以其它方式干扰本文定义的抗体分子与特异性靶标的结合。

[0051] 例如,这样的竞争性抗体分子可能能够将本文所述的抗体分子的结合抑制至少约10%(例如至少约20%、或至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约100%)和/或将本文所述的抗体预防或减少与特异性靶标结合的能力抑制至少约10%(例如至少约20%、或至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约100%)。

[0052] 可以通过本领域技术人员所熟知的方法来确定竞争性结合,如酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0053] 可以使用ELISA测定来评估表位修饰或阻断抗体。适合于鉴定竞争性抗体的另外的方法公开于以下文献中:《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,Harlow和Lane,所述文献通过引用并入本文(例如,参见第567页到第569页、第574到第576页、第583页和第590到第612页,1988,CSHL,纽约,ISBN 0-87969-314-2)。

[0054] 众所周知,抗体特异性结合限定的靶分子或抗原,并且这意味着抗体优先且选择性地结合其靶标而不是非靶标的分子。

[0055] 根据本发明的抗体的靶CTLA-4或根据本发明使用的抗体的靶CTLA-4在细胞表面上表达,即所述靶标是细胞表面抗原,其将包含抗体的表位(在此上下文中也被称为细胞表面表位)。细胞表面抗原和表位是免疫学或细胞生物学领域的技术人员容易理解的术语。

[0056] “细胞表面抗原”包含本文描述的抗体分子所暴露的细胞表面抗原或其至少表位在细胞膜的细胞外侧。

[0057] 评估蛋白质结合的方法是生物化学和免疫学领域的技术人员已知的。技术人员将理解,那些方法可用于评估抗体与靶标的结合和/或抗体的Fc结构域与Fc受体的结合;以及相对强度或特异性,或这些相互作用的抑制、预防或减少。可以用于评估蛋白质结合的方法的实例为,例如,免疫测定、BIAcore、蛋白质印迹、放射免疫测定(RIA)和酶联免疫吸附测定(ELISA)(关于抗体特异性的讨论参见《基础免疫学(Fundamental Immunology)》第二版,雷文出版社(Raven Press),纽约;第332-336页(1989))。

[0058] 因此,本文中“特异性结合CTLA-4的抗体分子”和“抗CTLA-4抗体分子”均指特异性结合靶CTLA-4但不与非靶标结合、或比靶标弱得多地(如以较低的亲和力)与非靶标结合的

抗体分子。

[0059] 在一些实施例中,特异性结合CTLA-4的抗体分子(或抗CTLA-4抗体分子)是指与CTLA-4的胞外结构域特异性结合的抗体分子。

[0060] 在一些实施例中,特异性结合CTLA-4的抗体分子(或抗CTLA-4抗体分子)不与CD28交叉反应。在一些实施例中,特异性结合CTLA-4的抗体分子(或抗CTLA-4抗体分子)阻断CTLA-4与CD80和/或CD86的结合,从而抑制CLTA-4信号传导。

[0061] 还包含以下含义:抗体与靶CTLA-4特异性结合的强度是抗体与非靶标特异性结合的强度的至少两倍、或至少五倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍、或至少200倍、或至少500倍、或至少约1000倍。

[0062] 另外,包含以下含义:如果抗体以至少约$10^{-1}K_d$、或至少约$10^{-2}K_d$、或至少约$10^{-3}K_d$、或至少约$10^{-4}K_d$、或至少约$10^{-5}K_d$、或至少约$10^{-6}K_d$、或至少约$10^{-7}K_d$、或至少约$10^{-8}K_d$、或至少约$10^{-9}K_d$、或至少约$10^{-10}K_d$、或至少约$10^{-11}K_d$、或至少约$10^{-12}Kd$、或至少约$10^{-13}K_d$、或至少约$10^{-14}K_d$、或至少约$10^{-15}K_d$的K_d值与靶标结合,则所述抗体与靶CTLA-4特异性结合。

[0063] 如上所提及,与伊匹木单抗相比,本文所述的与CTLA-4特异性结合的抗体分子(或抗CTLA-4抗体分子)对CTLA-4阳性细胞具有改善的消耗作用。

[0064] 抗体分子对CTLA-4阳性细胞具有消耗作用意指在施用于受试者如人后,这样的抗体与在CTLA-4阳性细胞表面上表达的CTLA-4特异性结合,并且这种结合导致这类细胞的消耗。

[0065] 在一些实施例中,CTLA-4阳性细胞是CD4阳性(CD4+)细胞,即表达CD4的细胞。

[0066] 在一些实施例中,CTLA-4阳性细胞为CD4阳性和FOXP3阳性两者,即表达CD4和FOXP3。这些细胞是Treg。CD8阳性T细胞也表达CTLA-4,但Tregs表达的CDLA-4水平明显高于CD8阳性T细胞。与表达较低的CD8+细胞相比,这使Treg更容易消耗。

[0067] 在一些情况下,CTLA-4优先在肿瘤微环境中的免疫细胞(肿瘤浸润细胞,TILS)上表达。

[0068] 因此,在肿瘤微环境中,Treg将是具有最高CTLA-4表达的细胞,从而导致与CTLA-4特异性结合的抗体分子(或抗CTLA-4抗体分子)具有Treg消耗作用。这在下面,例如在实例4中并结合图13更详细地讨论。

[0069] 在一些实施例中,CTLA-4阳性细胞将是实体瘤中的Treg。这类Treg将具有非常高的CTLA-4表达,并且因此施用与CTLA-4特异性结合的抗体分子将优先导致这类Treg的消耗。

[0070] 如上所提及,本文所述的抗CTLA-4抗体分子是Treg消耗抗体分子,这意味着在施用于受试者如人后,这样的抗体分子与在Tregs表面上表达的CTLA-4特异性结合,并且这种结合导致Treg消耗。

[0071] 为了确定抗体分子是否是如本文所指,与伊匹木单抗相比,对CTLA-4阳性细胞具有改善的消耗作用的抗体分子,可以使用体外抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定或在PBMC-NOG/SCID模型中的体内测试。

[0072] 体外ADCC测试,其使用经稳定转染以表达CD16-158V等位基因与GFP的NK-92细胞系执行,其中ADCC测试包括以下连续的七个步骤:

[0073] 1)从健康供体的外周血中分离出CTLA-4阳性细胞、CD4阳性细胞或Treg作为靶细

胞。可以使用CD4+T细胞分离试剂盒(如来自美天旎生物技术有限公司(Miltenyi Biotec)的商业试剂盒)进行此分离。

[0074] 2)然后用CD3/CD28,例如使用CD3/CD28 Dynabeads®和rhIL-2,如50ng/ml rhIL-2,刺激靶细胞例如持续48小时。刺激可以在37℃下进行。

[0075] 3)然后将靶细胞与待测试的抗体分子例如以10μg/ml在4℃下预温育30分钟,并且然后与NK细胞混合。

[0076] 4)然后将靶细胞在含有HEPES缓冲液、丙酮酸钠和FBS低IgG的RPMI 1640+GlutaMAX培养基中温育持续适当的时间,如4小时。RPMI 1640+GlutaMAX培养基可以含有10mM HEPES缓冲液、1mM丙酮酸钠和10％ FBS低IgG,并且效应子与靶细胞的比率可以为2:1。

[0077] 5)通过流式细胞术测定裂解。

[0078] 6)重复或并行执行步骤1-5,其中使用伊匹木单抗代替步骤3中的测试的抗体分子。

[0079] 7)将测试的抗体分子的裂解结果与伊匹木单抗的裂解结果进行比较。测试的抗体分子与伊匹木单抗相比改善的裂解表明测试的抗体分子对CTLA-4阳性细胞、CD4阳性细胞或Treg具有改善的消耗作用,这分别取决于使用哪种靶细胞。

[0080] 在一些实施例中,以上步骤7)中的改善的消耗作用是显著改善的消耗作用。

[0081] 结合图12,在下面实例4中更详细地展示了该测定。

[0082] 体内测试是基于PBMC小鼠和NOG/SCID小鼠的组合使用,这在本文中称为PBMC-NOG/SCID模型。PBMC小鼠和NOG/SCID小鼠都是众所周知的模型。PBMC-NOG/SCID模型中的体内测试包括以下连续的九个步骤:

[0083] 1)将人PBMC(外周血单核细胞)分离、洗涤并重悬于无菌PBS中。在一些实施例中,PBMC以75×10^6个细胞/ml重悬于PBS中。

[0084] 2)向NOG小鼠静脉内(静脉内)注射适当量(如200μl)的来自步骤1)的细胞悬浮液。如果注射200μl,则这对应于15×10^6个细胞/小鼠。

[0085] 3)在注射之后合适的时间,如2周,分离来自NOG小鼠的脾并制成单细胞悬浮液。任选地,从单细胞悬浮液中取出少量样品,以通过FACS确定CTLA-4在人T细胞上的表达,以便确认CTLA-4表达。

[0086] 4)将来自步骤3)的细胞悬浮液重悬于无菌PBS中。在一些实施例中,税悬浮液以50×10^6个细胞/ml重悬于无菌PBS中。如果步骤3中包含了任选的CTLA-4表达确定,则其余的细胞悬浮液将在步骤4中重新悬浮。

[0087] 5)向SCID小鼠腹膜内(腹膜内)注射适当的量(如200μl)的来自步骤4的悬浮液。如果注射200μl,则这对应于10×10^6个细胞/小鼠。

[0088] 6)在步骤5)中的注射之后合适的时间,如1小时,用适当量(如10mg/kg)的待测抗体分子、伊匹木单抗或同种型对照单克隆抗体处理SCID小鼠。

[0089] 7)在步骤6)中的处理之后合适的时间,如24小时,收集经过处理的SCID小鼠的腹膜内液。

[0090] 8)使用以下标志物通过FACS鉴定和定量人T细胞亚群:CD45、CD4、CD8、CD25和/或CD127。

[0091] 9)将来自用测试的抗体分子处理的小鼠的T细胞亚群的鉴定和定量结果与来自用伊匹木单抗处理的小鼠的T细胞亚群的鉴定和定量结果以及来自用同种型对照单克隆抗体处理的小鼠的T细胞亚群的鉴定和定量结果进行比较。与用伊匹木单抗处理的小鼠的腹膜液中的CTLA-4阳性细胞的数量相比,用待测试的抗体分子处理的小鼠的腹膜液中的CTLA-4阳性细胞数量较少,表明与伊匹木单抗相比,抗体分子对CTLA-4阳性细胞具有改善的消耗作用。与用伊匹木单抗处理的小鼠的腹膜液中的CD4阳性细胞数量相比,用待测试的抗体分子处理的小鼠的腹膜液中的CD4阳性细胞数量较少,表明与伊匹木单抗相比,抗体分子对CD4阳性细胞具有改善的消耗作用。与用伊匹木单抗处理的小鼠的腹膜液中的Treg数量相比,用待测试的抗体分子处理的小鼠的腹膜液中的Treg数量较少,表明与伊匹木单抗相比,抗体分子对Treg具有改善的消耗作用。

[0092] 在该体内测试中,在一些实施例中,最感兴趣的是观察步骤7中的Treg消耗。

[0093] 结合图14,在下面实例4中更详细地展示了该测定。

[0094] 如技术人员已知的,也可以在抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)测定中评估Treg消耗。

[0095] 在一些实施例中,与Yervoy相比,抗体分子对CTLA-4与B7.1和B7.2配体的相互作用具有相似的阻断作用。这可以通过ELISA(如图10所示)或在更具功能性的测定中进行评估,在所述更具功能性的测定中,抗CTLA-4抗体响应于用SEB刺激PBMC,增强T细胞的IL-2产生。

[0096] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是人抗体分子。

[0097] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是人源化抗体分子。

[0098] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是人源的抗体分子,这意味着它源自随后被修饰的人抗体分子。

[0099] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是人IgG1抗体。

[0100] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体是呈表现出与一个或几个激活性Fc受体的结合改善和/或经工程改造以改善与一个或几个激活性Fc受体的结合的人IgG1抗体形式的抗体;因此,在一些实施例中,抗CTLA-4抗体是Fc经工程改造的人IgG1抗体。

[0101] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体是鼠或人源化鼠IgG2a抗体。

[0102] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体是与人CTLA-4交叉反应的鼠抗体。

[0103] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体是单克隆抗体。

[0104] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体是多克隆抗体。

[0105] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是包括下表1中呈现的三个替代VH-CDR1序列之一、三个替代VH-CDR2序列之一、两个替代VH-CDR3序列之一、两个VL-CDR1序列之一、两个VL-CDR2序列之一和/或两个替代VL-CDR3序列之一的抗体分子。

[0106] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子选自由包括CDR中的1至6个的抗体分子组成的组,所述CDR选自由SEQ ID.No:3、6、8、10、12和14组成的组。

[0107] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子选自由包括具有SEQ ID.No:3、6、8、10、12和14的CDR的抗体分子组成的组。

[0108] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子选自由包括CDR VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1和VL-CDR3中的1至6个的抗体分子组成的组,

[0109] 其中VH-CDR1,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:15、22、29和35组成的组;

[0110] 其中VH-CDR2,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:16、23、30和36组成的组;

[0111] 其中VH-CDR3,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:17、24、31和37组成的组;

[0112] 其中VL-CDR1,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:10和38组成的组;

[0113] 其中VL-CDR2,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:18、25、32和39组成的组;

[0114] 其中VL-CDR3,如果存在的话,选自由SEQ ID.No:19、26和40组成的组。

[0115] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是选自由包括6个CDR的抗体分子组成的组的抗体分子,所述6个CDR选自由以下组成的组:

[0116] SEQ ID.NO:15、16、17、10、18和19;

[0117] SEQ ID.NO:22、23、24、10、25和26;

[0118] SEQ ID.NO:29、30、31、10、32和26;和

[0119] SEQ ID.NO:35、36、37、38、39和40。

[0120] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是包括具有SEQ ID.NO:15、16、17、10、18和19的6个CDR的抗体分子。

[0121] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是包括具有SEQ ID.NO:22、23、24、10、25和26的6个CDR的抗体分子。

[0122] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是选自由包括VH的抗体分子组成的组的抗体分子,所述VH选自由以下组成的组:SEQ ID.NO:20、27、33和41。

[0123] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是选自由包括VL的抗体分子组成的组的抗体分子,所述VL选自由以下组成的组:SEQ ID.NO:21、28、34和42。

[0124] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是选自由包括VH和VL的抗体分子组成的组的抗体分子,所述VH和VL选自由以下组成的组:SEQ ID.NO:20-21、27-28、33-34和41-42。

[0125] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子包括具有序列SEQ ID.No:20的VH和具有序列SEQ ID.NO:21的VL。

[0126] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子包括具有序列SEQ ID.No:27的VH和具有序列SEQ ID.No:28的VL。

[0127] 表1:本文公开的抗体的一般CDR序列

[0128]

抗体的相关部分	序列	未知氨基酸残基的解释	SEQ.ID.NO
VH-CDR1 替代 1	$FX_1X_2YX_3MX_4WX_5R$ QAPG	X_1 = S 或 K；X_2 = D、S 或 A；X_3 = Y、S 或 A；X_4 = S 或 N；并且 X_5 = V 或 I	1
VH-CDR1 替代 2	$FSX_1YX_2MX_3$WVRQ APG	X_1= D 或 S；X_2 = Y、S 或 A；并且 X_3 = S 或 N	2
VH-CDR1 替代 3	$FSX_1YX_2MX_3$WVRQ APG	X_1= D 或 S；X_2 = Y 或 S；并且 X_3 = S 或 N	3
VH-CDR2，替代 1	$SX_1ISX_2X_3X_4X_5X_6X_7$ X_8X_9ADSVKGR	X_1 = G 或 A；X_2 = W、G 或 N；X_3 = S 或 T；X_4 = S 或 G；X_5 = R 或 G；X_6 = D、S 或 Y；X_7 = K、T 或 I；X_8 = G、Y、H 或 D；X_9 = Y 或 F	4
VH-CDR2，替代 2	$SX_1ISX_2X_3X_4X_5X_6X_7$ X_8YADSVKGR	X_1 = G 或 A；X_2 = W、G 或 N；X_3 = S 或 T；X_4 = S 或 G；X_5 = R 或 G；X_6 = D、S 或 Y；X_7 = K、T 或 I；X_8 = G、Y、H 或 D	5
VH-CDR2，替代 3	$SX_1ISX_2SX_3X_4X_5X_6X_7$ YADSVKGR	X_1 = G 或 A；X_2 = W 或 G；X_3 = S 或 G；X_4 = R 或 G；	6

[0129]

		X_5 = D 或 S; X_6 = K 或 T; X_7 = G 或 Y、H 或 D	
VH-CDR3 替代 1	$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$	X_1 = T 或 A; X_2 = T 或 R; X_3 = D、Y 或 L; X_4 = L、R、S,或 G; X_5 = A、V、S 或 Y; X_6 = R、E、G 或 S; X_7 = Y、M、L 或 G; X_8 = N、H、Y 或无; X_9 = Q、D 或无; X_{10} = W、A、D 或无; X_{11} = L、F、R 或无; X_{12} = A、D、G 或无; X_{13} = D、I、M 或无; X_{14} = D 或无; 并且 X_{15} = V 或无	7
VH-CDR3 替代 2	$X_1X_2DX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$	X_1 = T 或 A; X_2 = T 或 R; X_3 = L 或 R; X_4 = A 或 V; X_5 = R 或 E; X_6 = Y 或 M; X_7 = N 或无; X_8 = Q 或无; X_9 = W 或无; X_{10} = L 或无; X_{11} = A 或无; X_{12} = D 或无	8
VL-CDR1 替代 1	$CX_1GSSSNIGX_2X_3YX_4X_5X_6$	X_1 = T 或 S; X_2 = A 或 S; X_3 = G 或 N; X_4 = D 或 V; X_5 = V 或 Y; X_6 = H 或无	9
VL-CDR1 替代 2	CTGSSSNIGAGYDVH		10
VL-CDR2 替代 1	$X_1NX_2X_3RPS$	X_1 = G、R 或 D; X_2 = D、N 或 S; 并且 X_3 = N、Q 或 K	11
VL-CDR2 替代 2	$X_1NX_2X_3RPS$	X_1 = G 或 R; X_2 = D 或 N; 并且 X_3 = N 或 Q	12
VL-CDR3 替代 1	$CX_1X_2X_3DX_4SLX_5GX_6VX_7$	X_1 = A 或 Q; X_2 = V、A 或 S; X_3 = W 或 Y; X_4 = D 或 S; X_5 = N 或 S; X_6 = V、W 或 P; 并且 X_7 = V 或无	13
VL-CDR3 替代 2	$CAX_1WDDSLNG\ X_2V$	X_1 = V 或 A; 并且 X_2 = V 或 W	14

[0130] 表2:特异性抗CTLA-4抗体分子;CDR序列在完整的VH和VL序列中以粗体标记

[0131]

抗体克隆	**区**	**序列**	**SEQ.ID.NO:**
4-E03	VH-CDR1	FSDYYMSWVR QAPG	15
	VH-CDR2	SGISWSSRDK GYADSVKGR	16
	VH-CDR3	TTDLARY	17

[0132]

	VL-CDR1	CTGSSSNIGA GYDVH	10
	VL-CDR2	GNDNRPS	18
	VL-CDR3	CAVWDDSLNG VV	19
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FS** **DYYMSWVRQA PG**KGLEWV**SG** **ISWSSRDKGY** **ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**TTDL ARY**WGQGTLV TVSS	20
	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CTGSSSNIG** **AGYDVH**WYQQ LPGTAPKLLI Y**GNDNRPS**GV PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYY**C** **AVWDDSLNGV V**FGGGTKLTV LG	21
	人免疫_球蛋白 G1（IgG1）轻链（LC）	**MGWSCIILFLVATATGVHS**QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQL PGTAPKLLIYGNDNRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCAVWDDSLNGVVF GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	53
	人 IgG1 重链（HC）	**MGWSCIILFLVATATGVHS**EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVRQA PGKGLEWVSGISWSSRDKGYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTDL ARYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	54
5-B07	VH-CDR1	FSSYSMNWVRQ APG	22
	VH-CDR2	SAISGSGGST YYADSVKGR	23
	VH-CDR3	ARDRVEMNQW LAD	24
	VL-CDR1	CTGSSSNIGA GYDVH	10
	VL-CDR2	RNNQRPS	25
	VL-CDR3	CAAWDDSLNG WV	26
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FS** **SYSMNWVRQA PG**KGLEWV**SA** **ISGSGGSTYY** **ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**ARDR** **VEMNQWLAD**W GQGTLVTVSS	27

[0133]

	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CTGSSSNIG** **AGYDVH**WYQQ LPGTAPKLLI Y**RNNQRPS**GV PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYY**C** **AAWDDSLNGW V**FGGGTKLTV LG	28
	鼠免疫球蛋白（IgG2a）轻链（LC）	MGWSCIILFLVATATGVHSQSVLTQPPSASGT PGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPG TAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSAS LAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFG GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETNK ATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG METTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARAWER HSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS	62
	鼠免疫球蛋白（IgG2a）重链（HC）	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRV EMNQWLADWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYP LAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVT SSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNN VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ DWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVV HEGLHNHHTTKSFSRTPGK	63
2-C06	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQ APG	29
	VH-CDR2	SGISGSGGYI HYADSVKGR	30
	VH-CDR3	ATYSSGLHDA FDI	31
	VL-CDR1	CTGSSSNIGA GYDVH	10
	VL-CDR2	DNNKRPS	32
	VL-CDR3	CAAWDDSLNG WV	26
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FS** **SYAMSWVRQA PG**KGLEWV**SG** **ISGSGGYIHY** **ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**ATYS SGLHDAFDI**W GQGTLVTVSS	33
	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CTGSSSNIG** **AGYDVH**WYQQ LPGTAPKLLI Y**DNNKRPS**GV PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYY**C** **AAWDDSLNGW V**FGGGTKLTV LG	34
2-F09	VH-CDR1	FKAYSMSWIR QAPG	35
	VH-CDR2	SGISNTGGST DFADSVKGR	36
	VH-CDR3	ARLGYSGYDD RGMDV	37

[0134]

	VL-CDR1	CSGSSSNIGS NYVY	38
	VL-CDR2	GNSNRPS	39
	VL-CDR3	CQSYDSSLSG PVV	40
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FK AYSMSWIRQA PG**KGLEWV**SG ISNTGGSTDF ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAMYYC**ARLG YSGYDDRGMD V**WGQGTLVTV SS	41
	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CSGSSSNIG SNYVY**WYQQL PGTAPKLLIY **GNSNRPS**GVP DRFSGSKSGT SASLAISGLR SEDEADYY**CQ SYDSSLSGPV V**FGGGTKLTV LG	42

[0135] 在一些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体分子还可包括下表3中所呈现的恒定区中的一个或两个。

[0136] 表3:本文公开的抗体的恒定区的序列

[0137]

区	序列	SEQ.ID.NO:
CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	43
CL	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	44

[0138] 在一些实施例中,抗CTLA-4抗体分子是由下表4中所呈现的核苷酸序列之一编码的分子。

[0139] 表4:编码抗CTLA-4抗体分子的特定核苷酸序列

[0140]

克隆	编码	序列	SEQ.ID.NO:
4-E03 γ1 重链	4-E03 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACT ACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCCGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGGCATTAGTTGGAGT AGTCGTGACAAAGGCTATGCGGACTCTGTGAA GGGCCGTTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA	45

[0141]

		GAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTACCA CAGATCTCGCTAGGTACTGGGGCCAGGGTACAC TGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCC TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAATGA	
4-E03 λ 轻链	4-E03 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCT GGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTG CACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTT ATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAA CGGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAATGATAA CCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGG CTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCAT CAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTA TTACTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTGAATGG TGTGGTATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGG TCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCA CTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAG CCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTG ACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGG AAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGT GGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACA ACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTG	46

[0142]

		ACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTA CAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCG TGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCAT GA	
5-B07 γ1重链	5-B07 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATA GCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGT GGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAG AGATCGGGTAGAGATGAACCAGTGGCTGGCCG ACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGC TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	47
5-B07λ轻链	5-B07 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCT GGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTG CACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTT ATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAA CGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATC	48

[0143]

		AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTG GCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA TCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATT ATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATG GTTGGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACG GTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTC ACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAA GCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG GAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAG TGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAAC AACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCT GACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCT ACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACC GTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTC ATGA	
2-C06 γ1 重链	2-C06 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATG CCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGCAG CGGTGGGTACATACACTATGCAGACTCCGTGAA GGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA GAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGA CCTATAGCAGTGGCCTGCATGATGCTTTTGATAT CTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCT CAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC TGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTG GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG	49

[0144]

		ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	
2-C06λ轻链	2-C06 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCT GGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTG CACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTT ATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAA CGGCCCCCAAACTCCTCATCTATGACAATAATA AGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTG GCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA TCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATT ATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATG GTTGGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACG GTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTC ACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAA GCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG GAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAG TGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAAC AACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCT GACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCT ACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACC GTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTC ATGA	50
2-F09γ1 重链	2-F09 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAAAGCCTATA GCATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATCAGTAACAC GGGAGGTAGCACAGACTTCGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACTGCCATGTATTACTGTGCG AGATTGGGATATAGTGGCTACGACGACCGTGGT ATGGACGTCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCAC CGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC	51

[0145]

		CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	
2-F09 λ 轻链	2-F09 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCT GGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTG TTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTA TGTGTACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGGC CCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCG GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTC CAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTA CTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGAGTGGTCC TGTGGTATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGG TCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCA CTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAG CCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTG ACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGG AAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGT GGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACA ACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTG ACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTA CAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCG TGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCAT GA	52

[0146] 在一些实施例中,有利的是抗体分子既与人CTLA-4(hCTLA-4)又与恒河猴CTLA-4(cmCTLA-4或cyno CTLA-4)结合。与恒河猴(也称为食蟹猕猴或短尾猕猴)中的细胞上表达的CTLA-4的交叉反应可能是有利的,因为这使得能够在猴中测试抗体分子而不必使用替代抗体,这特别关注耐受性。

[0147] 在一些实施例中,抗体分子既与人CTLA-4(hCTLA-4)又与鼠CTLA-4(mCTLA-4)结合是有利的。这可能是有利的,因为这使得能够在小鼠中测试抗体分子,特别关注效果和药效学,而不必使用替代抗体。

[0148] 在一些实施例中,抗体分子与所有三个hCTLA-4、cmCTLA-4和mCTLA-4结合。

[0149] 在一些实施例中,有必要使用替代抗体在小鼠的相关体内模型中测试抗体分子的功能活性。为了确保抗体分子在人中的作用与在小鼠中替代抗体的体内结果之间的可比性,必须选择具有与人抗体分子相同的体外特性的功能等效的替代抗体。

[0150] 在一些实施例中,抗体分子不结合人CD28。

[0151] 医学领域的技术人员将了解,可以用不同的添加剂来修饰药物,以例如改变药物被人体吸收的速率;并且可以以不同的形式修饰药物,以例如允许特定的身体施用途径。

[0152] 因此,包含本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞可以与药学上可接受的赋形剂、载剂、稀释剂、媒剂和/或佐剂组合成药物组合物。在此上下文中,术语药物组合物可以与术语药物制剂、药物配制物、治疗组合物、治疗制剂、治疗配制物和治疗实体互换使用。

[0153] 本文所述的药物组合物可包括以下,或在一些实施例中由以下组成:抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒或细胞。

[0154] 在一些实施例中,本文所述的药物组合物可以由质粒组成或包括质粒,所述质粒包括编码上述抗体分子的核苷酸序列或包括上述核苷酸序列。

[0155] 在一些实施例中,药物组合物可包括编码整合在细胞或病毒基因组中或病毒体中的本文所述的抗体分子的部分或完整抗体分子的核苷酸序列。然后,药物组合物可包括细胞或病毒作为本发明的抗体的递送媒剂(或用于编码本发明抗体的核苷酸序列的递送媒剂)。例如,在实施例中,病毒可以呈治疗性溶瘤病毒的形式,所述治疗性溶瘤病毒包括编码本文所述的抗体分子中的至少一个抗体分子的核苷酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括编码全长人IgG抗体的核苷酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括编码scFv、Fab或$F(ab')_2$抗体分子的核苷酸序列。

[0156] 如所附权利要求书所述,在实施例中,本发明涉及包括本发明的核苷酸序列或本发明的质粒的病毒。优选地,病毒是溶瘤病毒,如治疗性溶瘤病毒。如本文所用,术语“溶瘤”是指病毒在分裂细胞(例如,如癌细胞的增殖性细胞)中选择性复制的能力,其目的是在体外或体内减慢所述分裂细胞的生长和/或裂解,而在非分裂(例如正常或健康)细胞中不表现出或表现出极少的复制。“复制(Replication)”(或任何形式的复制,如“复制(replicate)”和“复制(replicating)”等)意指病毒的复制,这可以在核酸水平或优选在传染性病毒颗粒水平发生。可以从目前鉴定的病毒的任何成员获得这样的溶瘤病毒。它可以是天然溶瘤的天然病毒,也可以通过修饰一个或多个病毒基因进行工程改造,从而提高肿瘤选择性和/或在分裂细胞中优先复制,如参与DNA复制、核酸代谢、宿主向性、表面附着、毒力、裂解和扩散的那些(例如,参见Wong等人,2010,《病毒(Viruses)》2:78-106)。还可以设想将一种或多种病毒基因置于事件或组织特异性调控元件(例如启动子)的控制之下。示例性溶瘤病毒包含但不限于呼肠孤病毒、塞内卡谷病毒(SVV)、水疱性口炎病毒(VSV)、新城疫病毒(NDV)、单纯疱疹病毒(HSV)、麻疹病毒、腺病毒、痘病毒、逆转录病毒、麻疹病毒、泡沫病毒、α病毒、慢病毒、流感病毒、辛比斯病毒、粘液瘤病毒、弹状病毒、小核糖核酸病毒、柯萨奇病毒、细小病毒等。这样的病毒是医学和病毒学领域的技术人员已知的。

[0157] 在一些实施例中,这样的溶瘤病毒获自疱疹病毒。疱疹病毒科是一个大家族的DNA病毒,它们都具有相同的结构,并且由相对大的双链线性DNA基因组构成,所述基因组编码被包裹二十面体衣壳内的100-200个基因,所述二十面体衣壳被包膜在脂质双层膜中。尽管

溶瘤疱疹病毒可以衍生自不同类型的HSV,但是特别优选的是HSV1和HSV2。可以对疱疹病毒进行基因修饰,以限制在肿瘤中的病毒复制或降低其在非分裂细胞中的细胞毒性。例如,可以使参与核酸代谢的任何病毒基因失活,如胸苷激酶(Martuza等人,1991,《科学》252:854-6)、核糖核苷酸还原酶(RR)(Mineta等人,1994,《癌症研究(Cancer Res.)》54:3363-66)或尿嘧啶-N-糖基化酶(Pyles等人,1994,《病毒学杂志(J.Virol.)》68:4963-72)。另一方面涉及病毒突变体,其在编码毒力因子的基因如ICP34.5基因的功能上有缺陷(Chambers等人,1995,《美国科学学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》92:1411-5)。溶瘤疱疹病毒的代表性实例包含NV1020(例如Geevarghese等人,2010,《人类基因疗法(Hum.Gene Ther.)》21(9):1119-28)和T-VEC(Harrington等人,2015,《抗癌疗法专家综述(Expert Rev.Anticancer Ther.)》15(12):1389-1403)。

[0158] 在一些实施例中,这样的溶瘤病毒获自腺病毒。方法是本领域可用于工程改造溶瘤腺病毒的。一种有利的策略包含用肿瘤选择性启动子替换病毒启动子或修饰(一种或多种)E1腺病毒基因产物,以使其在肿瘤细胞中改变的与p53或成视网膜细胞瘤(Rb)蛋白的结合功能失活。在自然环境中,腺病毒E1B55kDa基因与另一种腺病毒产物协同作用使p53失活(p53在癌细胞中经常失调),从而防止了细胞凋亡。溶瘤腺病毒的代表性实例包含ONYX-015(例如,Khuri等人,2000,《自然医学(Nat.Med)》6(8):879-85)和也称为Oncorine的H101(Xia等人,2004,《癌症(Ai Zheng)》23(12):1666-70)。

[0159] 在一些实施例中,这样的溶瘤病毒是痘病毒。如本文所用,术语“痘病毒”是指属于痘病毒科的病毒,特别优选属于脊索痘病毒亚科(the Chordopoxviridae subfamily)的痘病毒,并且更优选属于正痘病毒属(the Orthopoxvirus genus)的痘病毒。痘苗病毒、牛痘病毒、金丝雀痘病毒、鼠痘病毒和粘液瘤病毒特别适合于本发明的上下文中。这类痘病毒的基因组序列可在本领域和专门的数据库中获得(例如Genbank,登录号分别为NC_006998、NC_003663或AF482758.2、NC_005309、NC_004105、NC_001132)。

[0160] 在具体和优选的实施例中,这样的溶瘤痘病毒是溶瘤痘苗病毒。痘苗病毒是特征在于200kb双链DNA基因组的痘病毒家族的成员,所述基因组编码多种病毒酶和使病毒能够独立于宿主细胞机制进行复制的因子。大部分痘苗病毒颗粒借助单个脂质包膜在细胞内(对于细胞内成熟病毒体,IMV),并保留在感染细胞的胞液质中直至裂解。另一种传染性形式是双被包膜的颗粒(对于细胞外被包膜的病毒体,EEV),它从被感染的细胞中发芽而不会使其裂解。尽管它可以来源于任何痘苗病毒株,但特别优选埃尔斯特里(Elstree)、怀斯(Wyeth)、哥本哈根(Copenhagen)、利斯特(Lister)和西储(Western Reserve)株。除非另有说明,否则本文所用的基因命名法是哥本哈根痘苗株的命名法。但是,哥本哈根和其他痘苗株之间的对应关系通常可在文献中获得。

[0161] 优选地,通过改变一种或多种病毒基因来修饰这样的溶瘤痘苗病毒。所述(一种或多种)修饰优选导致缺乏合成或缺陷性病毒蛋白的合成,所述缺陷性病毒蛋白不能确保未修饰基因在正常条件下产生的蛋白的活性。在文献中公开了示例性修饰,其目的是改变参与DNA代谢、宿主毒力、IFN途径的病毒基因(例如,Guse等人,2011,《治疗靶标专家意见(Expert Opinion Biol.Ther.)》11(5):595-608)等。用于改变病毒基因座的修饰涵盖病毒基因或其调控元件内一个或多个核苷酸(连续或不连续)的缺失、突变和/或取代。可以通过本领域技术人员已知的多种方式使用常规重组技术进行(一种或多种)修饰。

[0162] 更优选地,通过改变胸苷激酶编码基因(基因座J2R)来修饰这样的溶瘤痘苗病毒。胸苷激酶(TK)酶参与脱氧核糖核苷酸的合成。正常细胞中的病毒复制需要TK,因为这些细胞通常具有低浓度的核苷酸,而在含有高核苷酸浓度的分裂细胞中它是可有可无的。

[0163] 作为溶瘤痘苗病毒的替代或组合,通过改变编码核糖核苷酸还原酶(RR)的至少一个或两个基因来修饰这样的溶瘤痘苗病毒。在自然环境中,该酶催化核糖核苷酸还原为脱氧核糖核苷酸,这是DNA生物合成中的关键步骤。病毒酶的亚基结构与哺乳动物酶相似,由两个异源亚基构成,设计分别由I4L和F4L基因座编码的R1和R2。在本发明的上下文中,可以使I4L基因(编码R1大亚基)或F4L基因(编码R2小亚基)或两者失活(例如,如WO2009/065546和Foloppe等人,2008,《基因疗法Gene Ther.)》,15:1361-71中所述)。J2R、I4L和F4L基因的序列及其在各种痘病毒基因组中的位置可在公共数据库中获得。

[0164] 在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括编码与上表2中列出的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括与上表2中列出的序列具有至少85%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括与上表2中列出的序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括与上表2中列出的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0165] 在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括编码SEQ.ID.NO:20和ID.NO:21的核苷酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括编码SEQ.ID.NO:27和ID.NO:28的核苷酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括编码SEQ.ID.NO:33和ID.NO:34的核苷酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括编码SEQ.ID.NO:41和ID.NO:42的核苷酸序列。

[0166] 在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括与上表4中列出的序列具有至少80%同一性的核苷酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括与上表4中列出的序列具有至少85%同一性的核苷酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括与上表4中列出的序列具有至少90%同一性的核苷酸序列。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括与上表4中列出的序列具有至少95%同一性的核苷酸序列。

[0167] 在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括SEQ.ID.NO:45和46。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括SEQ.ID.NO:47和48。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括SEQ.ID.NO:49和50。在一些实施例中,这样的溶瘤病毒包括SEQ.ID.NO:51和52。

[0168] 一些溶瘤病毒具有容纳足够大的DNA插入以适应全长人抗体序列整合的能力。减毒痘苗病毒和单纯疱疹病毒是治疗性溶瘤病毒的实例,其基因组足够大以允许全长IgG抗体序列的整合(Chan,W.M.等人2014《病毒学年度评论(Annu Rev Virol)》1(1):119-141;Bommareddy,P.K.等人2018《自然免疫学综述(Nat Rev Immunol)》18(8):498-513)。全长IgG抗体已成功整合到溶瘤痘苗病毒中,导致在感染易感染病毒的宿主细胞(例如癌细胞)后,全长IgG抗体表达并向细胞外释放(产生)(Kleinpeter,P.等人2016,《肿瘤免疫学(Oncoimmunology)》5(10):e1220467)。腺病毒也可以被工程改造以编码全长IgG抗体,所述抗体在细胞感染后功能性地产生和分泌(Marino,N.等人.2017《临床研究杂志(J Clin Invest)》123(6):2447-2463)。

[0169] 在优选的实施例中,这样的溶瘤病毒是痘病毒(例如痘苗病毒),所述痘病毒对TK活性有缺陷(由于J2R基因座的改变)或对TK和RR两者活性有缺陷(由于J2R基因座和RR编码的I4L和/或F4L基因座中的至少一个的改变)并且包括(a)编码SEQ.ID.NO:20和ID.NO:21的

核苷酸序列或(b)编码SEQ.ID.NO:27和ID.NO:28的核苷酸序列或(c)编码SEQ.ID.NO:33和ID.NO:34的核苷酸序列或(d)编码SEQ.ID.NO:41和ID.NO:42的核苷酸序列。

[0170] 在适当的时候,可能有利的是插入本文所述的溶瘤病毒中的(一个或多个)核苷酸序列包含促进表达、运输和生物学活性的附加调控元件。例如,可以包含信号肽,以促进在生产者细胞(例如,受感染细胞)外的分泌。通常将信号肽紧接在Met引发剂之后插入编码的多肽的N端。信号肽的选择是广泛的,并且是本领域技术人员可及的。例如,源自另一种免疫球蛋白的信号肽(例如重链IgG)可用于本发明的上下文中,以允许本文所述的抗CTLA4抗体在生产者细胞外分泌。为了说明的目的,可以指的是SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54,其包括本文所述的4-E03抗体的轻链和重链,所述轻链和重链均具有源自IgG的肽信号。

[0171] 特别优选的溶瘤病毒是痘苗病毒(例如,哥本哈根株),所述痘苗病毒对TK和RR活性两者有缺陷(由于J2R基因座和I4L基因座的改变)并且包括编码SEQ.ID.NO:20和SEQ ID.NO:21或SEQ.ID.NO:53和SEQ ID.NO:54的核苷酸序列。

[0172] 在一些实施例中,这样的溶瘤病毒可以进一步包括具有治疗意义(一种或多种)附加核苷酸序列,如编码(一种或多种)免疫调节多肽(即直接或间接参与刺激免疫反应的多肽)的核苷酸序列。合适的免疫调节多肽的代表性实例包含但不限于细胞因子和趋化因子,且特别优选粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)并且特别是人、非人灵长类或鼠GM-CSF。可以通过标准分子生物学技术(例如PCR扩增、cDNA克隆、化学合成)使用本领域可获得的序列数据和本文提供的信息来容易地获得附加核苷酸序列。特别优选的溶瘤病毒是痘苗病毒(例如哥本哈根株),所述痘苗病毒对于TK和RR活性两者有缺陷(由于J2R基因座和I4L基因座的改变)并且包括编码SEQ.ID.NO:20和ID.NO:21或SEQ.ID.NO:53和SEQ ID.NO:54的核苷酸序列和编码GM-CSF的核苷酸序列,且特别优选人GM-CSF(例如具有SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56)或鼠GM-CSF(例如具有SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58)。

[0173] 另外,可以通过修饰一个或多个密码子来优化要插入这样的溶瘤病毒中的核苷酸序列,以在特定宿主细胞或受试者中提供高水平表达。此外,为了优化密码子使用,还可以设想各种修饰,以防止在集中区域中存在稀有、非最佳密码子的聚类和/或抑制或修饰预期对表达水平有负面影响的“负”序列元件。这样的负序列元件包含但不限于具有非常高(>80%)或非常低(<30%)GC含量的区;富含AT或富含GC的序列延伸;不稳定的正向或反向重复序列;RA二级结构;和/或内部隐秘调控元件,如内部TATA盒、chi位点、核糖体进入位点和/或剪接供体/受体位点。

[0174] 在一些实施例中,将(一个或多个)核苷酸序列置于合适的调控元件的控制下,以使其在宿主细胞或受试者中正确表达。如本文所用,术语“调控元件”是指允许、贡献或调节编码(一个或多个)核苷酸序列在给定宿主细胞或受试者中的表达的任何元件,包含其复制、复制、转录、剪接、翻译、稳定性和/或在表达细胞内或外的运输。本领域技术人员将理解,调控元件的选择可以取决于如核苷酸序列本身、其被插入其中的病毒、宿主细胞或受试者、所需表达水平等因素。启动子特别重要。在本发明的上下文中,它可以是它在许多类型的宿主细胞中控制的或特定于某些宿主细胞或响应于特定事件或外源因素(例如,通过温度、营养添加剂、激素等)或根据病毒周期的阶段(例如晚期或早期)调节的核苷酸序列的组成型指导表达。适于病毒介导的表达的启动子是本领域已知的。溶瘤痘病毒表达的代表性实例包含但不限于痘苗p7.5K、pH5.R、p11K7.5、TK、p28、p11、pB2R、pA35R、K1L和pSE/L启动

子(Erbs等人,2008,《癌症基因疗法(Cancer Gene Ther.)》15(1):18-28;Orubu等人2012,《科学公共图书馆综合(PloS One)》7:e40167)、早期/晚期嵌合启动子和合成启动子(Chakrabarti等人,1997,《生物科技(Biotechniques)》23:1094-7;Hammond等人,1997,《病毒学方法杂志(J.Virol Methods)》66:135-8;以及Kumar和Boyle,1990,Virology 179:151-8)。在优选的实施例中,将本文所述的抗体的轻链和重链的核苷酸序列分别置于具有相同转录强度的启动子的控制下,优选地置于相同启动子(例如p7.5K如SEQ ID NO:59中所述的启动子或pH5.R如SEQ ID NO:60中所述的启动子)的控制下,以对于两条链获得相似的表达水平,并且因此抗体作为异四聚体蛋白进行最佳组装(即避免过多的非缔合链)。可以将附加核苷酸序列(例如编码GM-CSF)置于不同的启动子(例如pSE/L如SEQ ID NO:61中所述的启动子)的控制下。

[0175] 通过常规方法,使用适当的限制酶或优选通过同源重组,在这样的溶瘤病毒的基因组中插入(一个或多个)核苷酸序列(可能装备有适当的调控元件)。(一个或多个)核苷酸序列可以独立地插入病毒基因组的任何位置。可以考虑各种插入位点,例如在这样的溶瘤病毒的基因组的非必需病毒基因、基因间区域或非编码部分中。J2R基因座和/或I4L基因座特别适合于作为痘病毒的溶瘤病毒(例如溶瘤痘苗病毒)。在将(一个或多个)核苷酸序列插入病毒基因组中后,插入位点的病毒基因座可至少部分缺失。在一个实施例中,这种缺失或部分缺失可导致由全部或部分缺失的基因座编码的病毒基因产物的表达受到抑制,从而导致对于所述病毒功能的有缺陷病毒。特别优选的溶瘤病毒是包括编码插入J2R基因座的重链的盒和编码插入I4L基因座的轻链的盒的TK和/或RR缺陷性痘苗病毒。可以将编码附加GM-CSF编码的核苷酸序列的盒插入病毒基因组的另一个位置或J2R或I4L基因座中,且优选插入I4L基因座处。

[0176] 本发明还提供了将本文所述的这样的溶瘤病毒,并且特别是溶瘤痘病毒生成到合适的宿主细胞(生产者细胞)中的方法。在一些实施例中,这样的方法包括病毒基因组和转移质粒之间同源重组的一个或多个步骤,所述转移质粒包括要插入的(一个或多个)核苷酸序列(可能带有调控元件),所述核苷酸序列侧接5'和3',且病毒序列分别存在于插入位点的上游和下游。所述转移质粒可以通过常规技术(例如通过转染)生成并引入宿主细胞中。可以通过感染将病毒基因组引入宿主细胞中。每个侧翼病毒序列的大小可以在核苷酸序列的每一侧上至少100bp到至多1500bp之间变化(优选200至550bp并且更优选250至500bp)。允许产生这样的溶瘤病毒的同源重组优选在培养的细胞系(例如赫拉(HeLa)、韦罗(Vero))或从胚卵获得的鸡胚成纤维细胞(CEF)细胞中进行。

[0177] 在一些实施例中,可以通过使用选择和/或可检测基因来促进对掺入了抗CTLA4编码核苷酸序列以及可能的附加核苷酸序列(例如GM-CSF)的溶瘤病毒的鉴定。在优选的实施例中,转移质粒进一步包括对GPT基因(编码鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶)具有特定偏好的选择标志物,其允许在选择性培养基(例如在麦考酚酸、黄嘌呤和次黄嘌呤的存在下)或编码可检测的基因产物如GFP、e-GFP或mCherry的可检测基因中生长。另外,还可以考虑使用能够在所述选择或可检测基因中能够提供双链断裂的核酸内切酶。所述核酸内切酶可以是蛋白质形式或由表达载体表达。

[0178] 一旦生成,可以使用常规技术将这样的溶瘤病毒扩增到合适的宿主细胞中,所述常规技术包含在合适的条件下培养转染或感染的宿主细胞,以允许产生和回收感染性颗

粒。

[0179] 本发明还涉及用于产生本文所述的溶瘤病毒的方法。优选地,所述方法包括以下步骤:a)制备生产者细胞系,b)用溶瘤病毒转染或感染制备的生产者细胞系,c)在合适的条件下培养转染或感染的生产者细胞系,以便产生病毒,d)从所述生产者细胞系的培养物中回收产生的病毒,并任选e)纯化所述回收的病毒。

[0180] 在一些实施例中,生产者细胞选自由以下组成的组:哺乳动物(例如人或非人)细胞如赫拉细胞(例如ATCC-CRM-CCL-2™或ATCC-CCL-2.2™)、HER96、PER-C6(Fallaux等人,1998《人类基因疗法(Human Gene Ther.)》9:1909-17)、仓鼠细胞系如BHK-21(ATCC CCL-10)等以及禽类细胞如WO2005/042728、WO2006/108846、WO2008/129058、WO2010/130756、WO2012/001075中所述的那些以及从受精卵获得的鸡胚制备的原代鸡胚成纤维细胞(CEF)。生产者细胞优选在适当的培养基中培养,如果需要,所述培养基可以补充血清和/或(一种或多种)合适的生长因子或不补充(例如化学成分确定的培养基,优选不含动物或人类来源的产物)。取决于生产者细胞,本领域技术人员可以容易地选择适当的培养基。这类培养基是可商购的。在感染前,优选在包括在+30℃和+38℃之间的温度下(更优选在约+37℃下)培养生产者细胞持续1和8天之间。如果需要,可以进行1至8天的几次传代,以增加细胞总数。

[0181] 在步骤b)中,在适当的条件下,使用适当的感染复数(MOI),通过溶瘤病毒感染生产者细胞,以允许生产者细胞的生产性感染。为了说明的目的,适当的MOI范围为10^{-3}至20,且特别优选MOI包括0.01至5,并且更优选0.03至1。感染步骤在可以与用于生产者细胞培养的培养基相同或不同的培养基中进行。

[0182] 在步骤c)中,然后在本领域技术人员熟知的适当条件下培养感染的生产者细胞,直到产生子代病毒颗粒。感染的生产者细胞的培养还优选在+32℃和+37℃之间的温度下在可以与用于生产者细胞的培养和/或感染步骤的培养基/培养基相同或不同的培养基中执行,持续1至5天。

[0183] 在步骤d)中,从培养上清液和/或生产者细胞中收集在步骤c)中产生的病毒颗粒。从生产者细胞中回收可能需要允许破坏生产者细胞膜以允许释放病毒的步骤。可以通过本领域技术人员熟知的各种技术来诱导生产者细胞膜的破坏,包含但不限于冷冻/融化、低渗裂解、超声处理、微流化、高剪切(也称为高速)均质化或高压均质化。

[0184] 回收的溶瘤病毒可以在按剂量分布并如本文所述使用前至少部分地纯化。本领域可获得大量的纯化步骤和方法,包含例如澄清、酶处理(例如核酸内切酶、蛋白酶等)、色谱和过滤步骤。在本领域中描述了适当的方法(参见例如WO2007/147528;WO2008/138533、WO2009/100521、WO2010/130753、WO2013/022764)。

[0185] 在一个实施例中,本发明还提供了被本文所述溶瘤病毒感染的细胞。

[0186] 本发明还涵盖药物组合物,所述药物组合物包括病毒,如上文所讨论的溶瘤病毒,以及药学上可接受的稀释剂、媒剂和/或佐剂。

[0187] 在一些实施例中,药物组合物可以是携带本文所述的部分或完整抗体序列作为编码其嵌合抗原T细胞受体的序列的一部分的CAR-T细胞的形式。

[0188] 本发明还涵盖药物组合物,所述药物组合物包括上文所讨论的CAR-T细胞和药学上可接受的稀释剂、媒剂和/或佐剂。

[0189] 本发明还涵盖其他治疗方式或药物的“形状”,如抗体药物偶联物、融合蛋白等,以

及包括这类治疗方式的药物组合物。

[0190] 本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物可以适合于肠胃外施用,包含水性和/或非水性无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂和/或缓冲剂和/或抑菌剂和/或使配制物与预期接受者的血液等渗的溶质;和/或水性和/或非水性无菌悬浮液,其可以包含悬浮剂和/或增稠剂。本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器(例如,密封的安瓿瓶和小瓶)中,并且可以在仅需要在使用前一刻添加无菌液体载剂(例如,注射用水)的冷冻干燥(冻干)条件下储存。

[0191] 可以由前述种类的无菌粉末和/或颗粒和/或片剂制备临时注射溶液和悬浮液。

[0192] 对于人类患者的肠胃外施用而言,单次或分次施用的抗CTLA-4抗体分子的每日剂量水平通常为1mg/kg患者体重至20mg/kg,或者在一些情况下甚至高达100mg/kg。在特殊情况下,例如在结合长期施用的情况下,可以使用更低的剂量。在任何情况下,医生将确定最适合于任何个体患者的实际剂量,并且所述实际剂量将随着特定患者的年龄、体重和反应而变化。以上剂量是一般情况的示例。当然,在个别情况下,应使用更高或更低的剂量范围,并且这些剂量范围处于本发明的范围内。

[0193] 通常,本文所述的包括抗体分子的药物组合物(或药物)将含有浓度在约2mg/ml和150mg/ml之间或在约2mg/ml和200mg/ml之间的抗CTLA-4抗体分子。在一些实施例中,药物组合物将含有浓度为10mg/ml的抗CTLA-4抗体分子。

[0194] 通常,药物组合物(或药物)将含有浓度在10^3至10^{12}vp(病毒颗粒)、iu(感染单位)或pfu(噬菌斑形成单位)之间的本文所述的溶瘤病毒,这取决于病毒和定量技术。样品中存在的pfu的量可以通过计数感染许可细胞(例如CEF或韦罗细胞)以获得噬菌斑形成单位(pfu)滴度后的噬菌斑数量来确定,通过测量A260吸光度来确定vp的量,并且通过定量免疫荧光(例如使用抗病毒抗体)来确定iu的量。作为一般指导,适合于包括溶瘤痘病毒的药物组合物的单独剂量范围为约10^3pfu至约10^{10}pfu,有利地约10^3pfu至约10^9pfu,优选约10^4pfu至约10^8pfu;并且更优选约10^4pfu至约10^7pfu。

[0195] 通常,在人类中,口服或肠胃外施用本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物是优选的途径,是最方便的。对于兽用,本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物本根据普通兽医实践以适当可接受的配制物施用,并且兽医将确定将最适合特定动物的给药方案和施用途径。因此,本发明提供了药物配制物,其包括一定量的有效治疗各种病况的本发明的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞(如上文和下文进一步描述的)。优选地,本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物适于通过选自包括以下的组的途径递送:静脉内;肿瘤内;肌内;皮下。施用可以是单次注射或多次重复注射的形式(例如在相同或不同的施用部位以相同或不同的剂量,用相同或不同的途径)。为了说明的目的,包括约10^4、5×10^4、10^5、5×10^5、10^6、5×10^6、10^7、5×10^7、10^8、5×10^8、10^9、5×10^9或10^{10}pfu的溶瘤痘病毒(例如,本文所述的TK和RR缺陷性痘苗病毒)的单独剂量特别适合于肿瘤内施用。

[0196] 本发明还包含本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物,其包括本发明的多肽结合部分的药学上可接受的酸或碱加成盐。用于制备可用于本发明的上述碱化合物的药学上可接受的酸加成盐的酸是形成无毒酸加成盐的酸,即含有药学

上可接受的阴离子的盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、乙酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、酒石酸氢盐、琥珀酸盐、马来酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、蔗糖酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐[即,1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3萘甲酸酯)]盐,等等。也可以使用药学上可接受的碱加成盐来产生根据本发明所述的药剂的药学上可接受的盐形式。可用作试剂以制备本发明药剂的药学上可接受的碱盐的化学碱是与此类化合物形成无毒碱盐的化学碱,所述碱盐本质上是酸性的。这类无毒碱盐包含但不限于:衍生自这类药学上可接受的阳离子的碱盐,如碱金属阳离子(例如,钾和钠)和碱土金属阳离子(例如,钙和镁)的碱盐;铵或水溶性胺加成盐,如N-甲基葡糖胺-(葡甲胺);以及低级链烷醇铵和药学上可接受的有机胺的其它碱盐,等等。本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞在使用前,可以冻干以储存并在合适的载剂中重构。可以采用任何合适的冻干方法(例如,喷雾干燥、滤饼干燥(cake drying))和/或重构技术。本领域的技术人员将理解,冻干和重构可能导致不同程度的抗体活性损失(例如,对于常规免疫球蛋白,IgM抗体往往比IgG抗体具有更大的活性损失),并且可能必须向上调整使用水平以进行补偿。在一个实施例中,当再水化时,冻干的(冷冻干燥的)多肽结合部分损失其活性(在冻干之前)的不超过约20%、或不超过约25%、或不超过约30%、或不超过约35%、或不超过约40%、或不超过约45%、或不超过约50%。

[0197] 在一些实施例中,将病毒组合物适当地缓冲在生理或稍微碱性的pH下(例如,从约pH 7至约pH 9,且特别优选pH在7和8.5之间,并且更特别是接近8)。在病毒组合物中还包含单价盐以确保适当的渗透压可能是有益的。所述单价盐尤其可以选自NaCl和KCl,优选地,所述单价盐是NaCl,优选地浓度为10至500mM(例如50mM)。合适的病毒组合物包括50g/L的蔗糖、50mM的NaCl、10mM的Tris-HCl和10mM的pH8的谷氨酸钠。还可以配制组合物以便包含用于在低储存温度下保护溶瘤病毒的冷冻保护剂。合适的冷冻保护剂包含但不限于蔗糖(或蔗精)、海藻糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、山梨糖醇和甘油,优选浓度为0.5%至20%(以g计重量/以L计体积,称为w/v),以及高分子量聚合物,如右旋糖酐或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。

[0198] 本文所述的抗CTLA-4抗体分子、核苷酸序列和药物组合物可用于治疗受试者的癌症。

[0199] 包含,受试者可以是哺乳动物或非哺乳动物。优选地,哺乳动物受试者是人类,或是非哺乳动物,如马、牛、羊、猪、骆驼、狗或猫。最优选地,哺乳动物受试者是人类。

[0200] "表现"包含:受试者表现出癌症症状和/或癌症诊断标志物、和/或所述癌症症状和/或癌症诊断标志物可以被测量和/或评估和/或量化。

[0201] 对于医学领域的技术人员而言,容易理解的是:癌症症状和癌症诊断标志物将是什么以及如何测量和/或评估和/或量化癌症症状的严重程度是否降低或增加、或癌症诊断标志物是否减少或增加;以及如何可以使用那些癌症症状和/或癌症诊断标志物来形成癌症的预后。

[0202] 癌症治疗通常作为疗程来进行,也就是说,在一段时间内施用治疗剂。疗程的时间长短取决于许多因素,这些因素可以包含所施用的治疗剂的类型、所治疗的癌症的类型、所治疗的癌症的严重程度以及受试者的年龄和健康状况,以及其它原因。

[0203] "在治疗期间"包含:受试者当前正在接受疗程、和/或正在接受治疗剂、和/或正在

接受治疗剂疗程。

[0204] 在一些实施例中,根据本发明的待治疗的癌症是实体瘤。

[0205] 在一些实施例中,癌症选自由以下组成的组:晚期实体瘤、黑素瘤和其他皮肤恶性肿瘤、滑膜肉瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、膀胱癌、前列腺癌、间皮瘤、卵巢癌、乳腺癌、肾细胞癌、肝细胞癌、头颈癌和结直肠癌。

[0206] 上述癌症中的每一种都是众所周知的,并且症状和癌症诊断标志物以及用于治疗所述癌症的治疗剂也得到了很好的描述。因此,用于治疗上述癌症类型的症状、癌症诊断标志物和治疗剂是医学领域的技术人员已知的。

[0207] 对大量癌症的诊断、预后和进展的临床定义依赖于被称为分期的某些分类。那些分期系统用于核对大量不同的癌症诊断标志物和癌症症状,以提供关于癌症的诊断和/或预后和/或进展的概述。肿瘤学领域的技术人员将了解如何使用分期系统评估癌症的诊断和/或预后和/或进展,以及应该使用哪些癌症诊断标志物和癌症症状来进行评估。

[0208] “癌症分期”包含:Rai分期,其包含0期、I期、II期、III期和IV期;和/或Binet分期,其包含A期、B期和C期;和/或安娜堡(Ann Arbour)分期,其包含I期、II期、III期和IV期。

[0209] 已知的是,癌症可以引起细胞形态的异常。这些异常通常可再现地发生在某些癌症中,这意味着检查这些形态变化(也被称为组织学检查)可以用于癌症的诊断或预后。用于使样品可视化以检查细胞形态并制备用于可视化的样品的技术在本领域中是众所周知的;例如,光学显微镜或共聚焦显微镜。

[0210] “组织学检查”包含:存在小型成熟淋巴细胞;和/或存在具有狭窄细胞质边界的小型成熟淋巴细胞;存在具有缺乏可辨别的核仁的致密核的小型成熟淋巴细胞;和/或存在具有狭窄细胞质边界且具有缺乏可辨别的核仁的致密核的小型成熟淋巴细胞;和/或存在非典型细胞和/或裂解的细胞和/或幼淋巴细胞。

[0211] 众所周知,癌症是细胞DNA突变的结果,所述突变可能导致细胞避免细胞死亡或不可控制地增殖。因此,检查这些突变(也被称为细胞遗传学检查)可能是用于评估癌症诊断和/或预后的有用工具。这一点的实例是染色体位置13q14.1的缺失,这是慢性淋巴细胞性白血病的特性。用于检查细胞的突变的技术是本领域中众所周知的;例如,荧光原位杂交(FISH)。

[0212] “细胞遗传学检查”包含细胞中的DNA,并且具体地染色体的检查。细胞遗传学检查可以用于鉴定DNA的变化,所述变化可能与难治性癌症和/或复发性癌症的存在相关。此类变化可能包含:13号染色体长臂中的缺失;和/或染色体位点13q14.1的缺失;和/或12号染色体的三体性;和/或12号染色体长臂中的缺失;和/或11号染色体长臂中的缺失;和/或11q的缺失;和/或6号染色体长臂中的缺失;和/或6q的缺失;和/或17号染色体短臂中的缺失;和/或17p缺失;和/或t(11:14)易位;和/或(q13:q32)易位;和/或抗原基因受体重排;和/或BCL2重排;和/或BCL6重排;和/或t(14:18)易位;和/或t(11:14)易位;和/或(q13:q32)易位;和/或(3:v)易位;和/或(8:14)易位;和/或(8:v)易位;和/或t(11:14)和(q13:q32)易位。

[0213] 已知的是,患有癌症的受试者表现出某些身体症状,这通常是由于癌症对身体的负担所致。这些症状通常在同一癌症中再次发生,因此可以作为疾病的诊断和/或预后和/或进展的特征。医学领域的技术人员将理解哪些身体症状与哪些癌症相关,以及评估那些

身体症状如何与疾病的诊断和/或预后和/或进展相互关联。“身体症状”包含肝肿大和/或脾肿大。

附图说明

[0214] 在下文的实例中,参考以下附图:

[0215] 图1:本发明的抗体特异性结合CTLA-4

[0216] ELISA示出抗体与人和恒河猴CTLA-4结合,但不结合人CD28蛋白。将2-C06(图1的A)、4-E-03(图1的B)、5-B07(图1的C)的结合与Yervoy(图1的D)的结合进行比较。

[0217] 图2:抗CTLA-4mAb与hCTLA-4转染的细胞的剂量依赖性结合

[0218] 抗CTLA-4mAb(图2的A-D)示出与表达CTLA-4的293T细胞的强结合,与Yervoy相似(图2的E)。

[0219] 图3:抗CTLA-4mAb与体外激活的人CD4+T细胞结合

[0220] 从外周血中获得的CD4+T细胞在体外受到刺激。通过FACS分析抗CTLA-4mAb的结合(实线,顶行),并与Yervoy(虚线,顶行)和市售FACS抗体(底行)进行比较。

[0221] 图4:体外激活的CD4+T细胞上的结合区

[0222] 人类体外激活的CD4+T细胞用Alexa 647标记的抗CTLA-4mAb(黑线)染色。抗体结合被rhCTLA-4-Fc蛋白(灰色线)阻断。

[0223] 图5:与体外激活的恒河猴CD4+T细胞结合

[0224] 在体外用CD3/CD28 dynabeads刺激从外周恒河猴血中获得的CD4+T细胞。通过FACS分析抗CTLA-4mAb的结合(实线,顶行),并与Yervoy(虚线,顶行)和市售FACS抗体(底行)进行比较。

[0225] 图6:人和恒河猴CTLA-4蛋白对细胞的结合阻断

[0226] 293T-CTLA-4细胞用Alexa 647标记的抗CTLA-4mAb(黑线)染色。抗体结合被rhCTLA-4-Fc蛋白(浅灰线)和rcmCTLA-4-Fc蛋白(深灰线)阻断。

[0227] 图7:与表达恒河猴CTLA-4的293T细胞结合

[0228] 293T细胞用恒河猴CTLA-4瞬时转染,并通过FACS分析了不同浓度的抗CTLA-4mAb的结合。

[0229] 图8:预期缺乏与静止的人/恒河猴PBMC结合

[0230] 如通过FACS分析,4-E03以及2-C06、5-B07和2-F09(数据未示出)没有显示与人(顶行)和恒河猴(底行)PBMC中不同细胞亚群的任何非特异性结合。

[0231] 图9:预期缺乏直接激动活性

[0232] 用包被的抗CD3加上可溶性抗CTLA-4mAb或抗CD28刺激来自健康供体的CFSE标记的CD4+T细胞。3天后通过FACS确定%分裂细胞(CFSElow CD25+细胞)。(A)一个代表性实验的FACS图,(B)总结了6个供体的图。

[0233] 图10:CD80/CD86阻断活性

[0234] 如ELISA所示,抗CTLA-4mAb阻断了CD80(图8的A)和CD86(图8的B)与其配体CTLA-4的结合。

[0235] 图11:体外功能性配体阻断

[0236] 用SEB加上滴定剂量的抗CTLA-4抗体刺激PBMC。通过MSD确定上清液中分泌的IL-2

的量。在该图中,示出了6个代表性供体中的1个。

[0237] 图12:对体外激活的CD4+T细胞的ADCC测定

[0238] 将以10μg/ml的抗CTLA-4mAb预调理的健康供体的体外激活CD4+T细胞与NK细胞(NK-92细胞系)以2:1的比率共培养。如下所述,通过FACS评估ADCC活性。该图示出了4-8个供体的平均值+SD。

[0239] 图13:CTLA-4在肿瘤驻留Treg细胞上表达最高。

[0240] 从手术患者处获得新鲜切除的卵巢肿瘤和血液样品。从具有不同癌症适应症的患者收集腹水。将这种患者材料上的CTLA表达与健康PBMC进行比较。将肿瘤样品切碎并消解。通过离心分离外周血单核细胞。通过流式细胞术评估CTLA-4在CD4+CD25+CD127-Treg细胞、CD4+非Treg细胞和CD8+效应T细胞上的表达。数据表示个体患者/供体,其中对于健康PBMC,n=12,对于腹水,n=20,对于肿瘤,的n=9,并且对于患者血液,n=5。

[0241] 还分析了人T细胞上的CTLA-4表达,所述T细胞在NOG小鼠体内被激活,然后从这些小鼠的脾中分离出来(见图14)。

[0242] 图14:抗CTLA-4mAb在体内介导Treg消耗。

[0243] 将人PBMC静脉内注射到NOG小鼠中。在大约2周后,取出脾,并通过FACS分析CTLA-4在人Treg细胞和CD8+T细胞上的表达。从NOG小鼠中分离出的脾细胞腹膜内转移到SCID小鼠中。1小时后,用CTLA-4hIgG1或对照mAb腹膜内处理小鼠。24小时后收集腹膜内液,并通过流式细胞术测定人T细胞亚群的频率(图14的A:Treg和图14的B:CD8+T细胞)。

[0244] 图15:汇总抗CTLA-4抗体的特性的表

[0245] 图16:图16:小鼠替代抗CTLA-4mAb的表征

[0246] 图16的A-B:用m5-B07执行阻断ELISA以评估配体阻断特性。抗体以剂量依赖性方式阻断图16的A)CD80和图16的B)CD86与其配体CTLA-4的结合。

[0247] 图16的C-D:5-B07在CT26肿瘤模型中以小鼠IgG2a形式介导的Treg缺失。向Balb/c小鼠皮下注射1×10^6CT26细胞,并在肿瘤大小约为7x7 mm时开始治疗。3次注射10mg/kg抗体后,通过FACS分析肿瘤单细胞悬浮液的免疫细胞含量。图16的C:配体阻断替代抗体5-B07引起Treg消耗。如图16的D所描绘,这导致$CD8^+$/Treg T细胞比率的偏移。

[0248] 图17:COPTG19384和COPTG19385的生成

[0249] 本研究中使用的COPTG19384和COPTG19385的示意表示。COPTG19385含有由p7.5K驱动的抗CTLA-4的重链替换的TK基因座中的J2R基因缺失,以及由p7.5K驱动的抗CTLA-4的轻链替换的RR基因座中的I4L基因缺失。COPTG19384含有由p7.5K驱动的抗CTLA-4的重链替换的TK基因座中的J2R基因缺失,以及由p7.5K驱动的抗CTLA-4的轻链和由pSE/L驱动的GM-CSF替换的RR基因座中的I4L基因缺失。

[0250] 图18:4-E03单克隆抗体在感染COPTG19384的CEF细胞上清液中的表达分析

[0251] A)通过蛋白质印迹:将CEEF细胞以MOI 0.05一式三份地用COPTG19384感染。48小时后收获细胞上清液,并在非还原条件下电泳后并且使用抗Ig(左印迹)或抗轻链(右印迹)HRP偶联抗体通过WB进行分析。

[0252] B)通过ELISA:将CEF细胞以MOI 0.05一式三份地用COPTG19384或VVTG17137感染。48小时后收获细胞上清液,并通过ELISA分析以检测4-E03单克隆抗体。

[0253] 图19:通过ELISA的感染COPTG19384的CEF细胞上清液中GM-CSF的表达分析

[0254] 将CEF细胞以MOI 0.05一式三份地用COPTG19384主要研究原种或VVTG17137感染。48小时后收获细胞上清液,并通过ELISA分析以检测GM-CSF。

[0255] 图20:COP WT\COPTG19384(两个批次)和VVTG17137(两个批次)在正常和肿瘤肝细胞上的复制研究

[0256] A)在正常人肝细胞上的复制率。

[0257] B)在恶性HepG2上的复制率。

[0258] C)根据在HepG2和肝细胞上测得的复制率计算的治疗指数。

[0259] 图21:COPTG19384和VVTG17137在重建的人皮肤中的复制

[0260] 在7天后且在接种量从10至10^5pfu不等的情况下评估COPTG19384和VVTG17137的复制。结果是三次测量的平均值和SEM。

[0261] 图22:COPTG19384和VVTG17137在三种人肿瘤细胞系MIA PaCa-2(A)、LoVo(B)和HepG2(C)中的溶瘤活性

[0262] 图23:4-E03单克隆抗体和GM-CSF在(A)感染的HepG2和LoVo的上清液和(B)5种不同的感染的人肿瘤细胞系的上清液中的表达水平

[0263] A)温育5天后,对于COPTG19384,以MOI为10^{-5}至10^{-2}并且对于用作阴性对照的VVTG17137,以MOI为10^{-2}评估4-E03和GM-CSF表达水平。

[0264] B)在以MOI 0.05,被COPTG19384感染后48小时,评估4-E03和GM-CSF表达水平。

[0265] 图24:不同批次的4-E03与CTLA-4蛋白的结合

[0266] 通过ELISA,将由CHO(4-E03研究批次)或HEK(4-E03毒理批次)细胞重组产生的4-E03与(A)人和(B)恒河猴重组蛋白的结合与从感染的MIA PaCa-2肿瘤细胞的上清液中纯化的4-E03(4-E03 TG)的结合进行比较。

[0267] 图25:不同批次的4-E03与表达CTLA-4的细胞的结合

[0268] 通过流式细胞术,将由CHO(4-E03研究批次)或HEK(4-E03毒素批次)细胞重组产生的4-E03与(A)人和(B)恒河猴CTLA-4表达细胞的结合与从感染的MIA PaCa-2肿瘤细胞的上清液中纯化的4-E03(4-E03 TG)的结合进行比较。

[0269] 图26:LoVo异种移植肿瘤中病毒积累的动力学

[0270] 在LoVo异种移植肿瘤中,在以两种不同剂量(10^4或10^5pfu)单次胸腔内注射COPTG19384或VVTG17137后,评估病毒积累的动力学。实线或虚线表示在每个时间点确定的三个值的中位数。

[0271] 图27:LoVo异种移植肿瘤中4-E03 mAb和GM-CSF积累的动力学

[0272] A)在以两种不同剂量(10^4或10^5pfu)单次胸腔内注射COPTG19384或VVTG17137或单次腹膜内注射3mg/kg的4-E03单克隆抗体后,评估LoVo异种移植肿瘤中4-E03 mAb积累的动力学。实线或虚线表示三个值的中位数。

[0273] B)在以两种不同剂量单次胸腔内注射COPTG19384(10^4或10^5pfu)或VVTG17137(10^5pfu)后,评估LoVo异种移植肿瘤中病毒积累的动力学。实线表示在每个时间点确定的三个值的中位数。

[0274] 图28:LoVo异种移植小鼠血清中4-E03 mAb和GM-CSF浓度的动力学

[0275] A)在LoVo异种移植肿瘤中,在以两种不同剂量(10^4或10^5pfu)单次胸腔内注射COPTG19384或VVTG17137后或在单次腹膜内注射3mg/kg的4-E03单克隆抗体后,评估血清中

4-E03 mAb浓度的动力学。实线表示三个值的中位数。

[0276] B)在LoVo异种移植肿瘤中,在以两种不同剂量(10^4或10^5pfu)单次胸腔内注射COPTG19384或VVTG17137(10^5pfu)后,评估血清中GM-CSF浓度的动力学。虚线表示在每个时间点确定的三个值的中位数。

[0277] 图29:CT26肿瘤中病毒积累的动力学

[0278] 在以10^7pfu/注射三次胸腔内注射(在第0天、第2天和第4天)VVTG18058、COPTG19421或COPTG19407后,评估CT26肿瘤中病毒积累的动力学。

[0279] 图30:CT26肿瘤中m5-B07 mAb和mGM-CSF积累的动力学

[0280] A)在三次胸腔内注射VVTG18058、COPTG19421或COPTG19407(10^7pfu/注射)期间或后或者在单次腹膜内注射3mg/kg的m5-B07单克隆抗体后,评估CT26肿瘤中m5-B07 mAb浓度的动力学。实线表示三个值的中位数。

[0281] B)在三次胸腔内注射VVTG18058、COPTG19421或COPTG19407(10^7pfu/注射)期间或后或者在单次腹膜内注射3mg/kg的m5-B07单克隆抗体后,评估CT26肿瘤中mGM-CSF浓度的动力学。实线表示在每个时间点确定的三个值的中位数。

[0282] 图31:CT26模型的血清中m5-B07 mAb浓度的动力学

[0283] 在CT26肿瘤中,在三次胸腔内注射VVTG18058、COPTG19421或COPTG19407(10^7pfu/注射)后或在单次腹膜内注射3mg/kg的m5-B07单克隆抗体后,评估血清中m5-B07 mAb浓度的动力学。实线表示在每个时间点确定的三个值的中位数。

[0284] 图32:CT26模型中的抗肿瘤活性:COPTG19347+/-抗PD1对CT26肿瘤生长(A)和小鼠存活率(B)的影响

[0285] 在第7天,将CT26细胞皮下注射到BalB/c小鼠中。在第0天、第2天和第4天,胸腔内注射COPTG19347(10^7pfu)、VVTG18058(10^7pfu)、VVTG18058或缓冲液,可能随后在第7天、第10天、第14天、第17天和第21天腹膜内注射250μg/小鼠的抗PD1 RMPI-14。

[0286] 图33:CT26模型中的剂量效应评估(在COPTG19407、COPTG19421和VVTG18058处理后观察到的存活率数据汇总)

[0287] 图34:在CT26肿瘤模型中与VVTG18058加m5-B07相比的COPTG19407的抗肿瘤活性

[0288] 将CT26细胞皮下注射到Balb/C小鼠中。当肿瘤达到约100mm^3时,开始小鼠的处理。在第0天、第2天和第5天,向小鼠注射COPTG19407(8.5×10^6pfu,胸腔内)、VVTG18058(8.5×10^6pfu,胸腔内)、m5-B07(10mg/kg,腹膜内)或VVTG18058(8.5×10^6pfu,胸腔内)加m5-B07(10mg/kg,腹膜内)的组合。图30的A-D:肿瘤生长,和图16:存活率随时间变化。

[0289] 图35:带有皮下A20肿瘤的BALB/c小鼠的个体肿瘤体积曲线。

[0290] 将A20细胞皮下注射到Balb/C小鼠中。当肿瘤达到80-100mm^3时,开始小鼠的处理。在第0天、第2天和第4天,向小鼠注射媒剂(胸腔内)、COPTG19407(4.75×10^6pfu,胸腔内)、VVTG18058(4.75×10^6pfu,胸腔内)、RMP1-14(anti-mPD-1)(250μg/小鼠,腹膜内)或COPTG19407(4.75×10^6pfu,胸腔内)加上RMP1-14(250μg/小鼠,腹膜内)的组合。

[0291] A)用媒剂处理的第1组动物

[0292] B)用VVTG18058处理的第2组动物

[0293] C)用COPTG19407处理的第3组动物

[0294] D)用鼠抗PD1处理的第4组动物

[0295] E)用COPTG19407和鼠抗PD1处理的第5组动物

[0296] 图36:带有皮下A20肿瘤的BALB/cN小鼠的平均肿瘤体积曲线。

[0297] 每个点表示每组记录的肿瘤体积的平均值。在64天内监测所有动物的肿瘤体积。小鼠用媒剂(第1组)、VVTG18058(第2组)、COPTG19407(第3组)、鼠抗PD1抗体RMP1-14(BioXCell)(第4组)以及COPTG19407和RMP1-14(第5组)处理。在第7天将动物随机化,并且在第7天至第31天期间处理动物。最后,小鼠在第61天处死。

[0298] 图37:A20模型中的抗肿瘤活性:COPTG19407+/-抗PD1对A20肿瘤生长(A)和小鼠存活率(B)的影响

[0299] 将A20细胞皮下注射到Balb/C小鼠中。当肿瘤达到80-100mm^{3}时,开始小鼠的处理。小鼠用媒剂(胸腔内)(第1组)、抗PD-1(第2组)、同种型(第3组)、VVTG18058(10^5pfu,胸腔内)(第4组)、VVTG18058(10^5pfu,胸腔内)+同种型(第5组)、VVTG18058(10^5pfu,胸腔内)+抗PD-1(第6组)、VVTG19407(10^5pfu,胸腔内)(第7组)、VVTG19407(10^5pfu,胸腔内)+同种型(第8组)和VVTG19407(10^5pfu,胸腔内)+抗PD-1(第9组)处理。

[0300] 图38:带有皮下C38肿瘤的C57BL/6小鼠的个体肿瘤体积曲线。

[0301] 将C38细胞皮下注射到C57bl/6小鼠中。当肿瘤达到80-100mm^{3}时,开始小鼠的处理。在第0天、第2天和第4天,向小鼠注射媒剂(胸腔内)、COPTG19407(4.75×10^6pfu,胸腔内)、VVTG18058(4.75×10^6pfu,胸腔内)、RMP1-14(anti-mPD-1)(250μg/小鼠,腹膜内)或COPTG19407(4.75×10^6pfu,胸腔内)加上RMP1-14(250μg/小鼠,腹膜内)的组合。

[0302] A)用媒剂处理的第1组动物

[0303] B)用VVTG18058处理的第2组动物

[0304] C)用COPTG19407处理的第3组动物

[0305] D)用鼠抗PD1处理的第4组动物

[0306] E)用COPTG19407和鼠抗PD1处理的第5组动物

[0307] 图39:带有皮下C38肿瘤的C57BL/6小鼠的平均肿瘤体积曲线。

[0308] 每个点表示每组记录的肿瘤体积的平均值。在61天内监测所有动物的肿瘤体积。用媒剂(第1组)、VVTG18058(第2组)、COPTG19407(第3组)、鼠抗PD1抗体RMP1-14(BioXCell)(第4组)以及COPTG19407和RMP1-14(第5组)处理小鼠。在第7天将动物随机化,并且在第7天至第31天期间处理动物。最后,小鼠在第61天处死。

[0309] 图40:带有皮下EMT6肿瘤的BALB/c小鼠的个体肿瘤体积曲线。

[0310] 将EMT6细胞皮下注射到Balb/C小鼠中。当肿瘤达到80-100mm^{3}时,开始小鼠的处理。在第0天、第2天和第4天,向小鼠注射媒剂(胸腔内)、COPTG19407(4.75×10^6pfu,胸腔内)、VVTG18058(4.75×10^6pfu,胸腔内)、RMP1-14(anti-mPD-1)(250μg/小鼠,腹膜内)或COPTG19407(4.75×10^6pfu,胸腔内)加上RMP1-14(250μg/小鼠,腹膜内)的组合。

[0311] A)用媒剂处理的第1组动物

[0312] B)用VVTG18058处理的第2组动物

[0313] C)用COPTG19407处理的第3组动物

[0314] D)用鼠抗PD1处理的第4组动物

[0315] E)用COPTG19407和鼠抗PD1处理的第5组动物

[0316] 图41:带有皮下EMT6肿瘤的BALB/c小鼠的平均肿瘤体积曲线。

[0317] 每个点表示每组记录的肿瘤体积的平均值。在61天内监测所有动物的肿瘤体积。用媒剂(第1组)、VVTG18058(第2组)、COPTG19407(第3组)、鼠抗PD1抗体RMP1-14(BioXCell)(第4组)以及COPTG19407和RMP1-14(第5组)处理小鼠。在第7天将动物随机化,并且在第7天至第31天期间处理动物。最后,小鼠在第56天处死。在超过20%的小鼠死亡后,曲线停止。

[0318] 具体实施方式

[0319] 实例

[0320] 现在将描述体现本发明的某些方面的具体的非限制性实例。在实例中,rh蛋白表示人重组蛋白(例如rhIL-2表示人重组IL-2蛋白),并且rcm蛋白表示恒河猴重组蛋白(例如rcmCTLA4表示恒河猴重组CTLA-4蛋白)。

[0321] 除了上文提到的序列外,实例中还使用了一些附加序列,并且这些序列在下表5中列出。

[0322] 表5:实例中使用的附加序列

[0323]

	序列	SEQ.ID.NO
没有信号肽的人GM-CSF	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQTITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE	55
带有信号肽的人GM-CSF	MWLQSLLLLGTVACSISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQTITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE	56
没有信号肽的鼠GM-CSF	APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPVQK	57
带有信号肽的鼠GM-CSF	MWLQNLLFLGIVVYSLSAPTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPVQK	58
启动子p7.5K	CCACCCACTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAAT	59

[0324]

	ATATTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAGTAGAATCATAAAGAACAGT	
启动子pH5.R	TTTATTCTATACTTAAAAAATGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTG	60
启动子pSE/L	AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGAATATAAATA	61

[0325] 实例1-CTLA-4特异性抗体的生成

[0326] scFv抗体片段的分离

[0327] n-CoDeR® scFv库(BioInvent;SöderlindE等人《自然生物科技(Nat Biotechnol.)》2000;18(8):852-6)用于分离识别人CTLA-4的scFv抗体片段。

[0328] 在针对重组人蛋白的三个连续淘选中使用噬菌体库。在噬菌体温育后,洗涤细胞以除去未结合的噬菌体。用胰蛋白酶洗脱结合的噬菌体,并在大肠杆菌(E.coli)中扩增。将所得噬菌体原种转化为scFv格式。大肠杆菌被带有scFv的质粒转化并且表达单独的scFv克隆。

[0329] 独特的CTLA-4结合scFv的鉴定

[0330] 使用均质FMAT分析(应用生物系统(Applied Biosystems),美国加利福尼亚州卡尔斯巴德(Carlsbad,CA,USA)),测定来自第三次淘选的转化的scFv与表达人CTLA-4或非靶蛋白的转染的293FT细胞的结合。

[0331] 简而言之,将转染的细胞与表达板中含scFv的上清液(按1:7稀释)、小鼠抗His Tag抗体(0.4μg/ml;安迪系统(R&D Systems))和APC偶联的山羊抗小鼠抗体(0.2μg/ml;产品目录号115-136-146,杰克逊免疫研究(Jackson Immunoresearch))一起添加到底部透明板中。在读数前,将FMAT板在室温(约20-25℃)下温育9小时。靶标特异性细菌克隆被归类为活性物质,并且将cherry挑选到入96孔板中。

[0332] ELISA中IgG与CTLA-4的结合

[0333] 将96孔板(Lumitrac 600LIA板,葛雷纳(Greiner))在4℃下涂覆1pmol/孔的重组人CTLA-4-Fc蛋白(安迪系统)、1pmol/孔的重组恒河猴(cm)CTLA-4-Fc蛋白(安迪系统)、0.3pmol/孔的重组小鼠CTLA-4-Fc蛋白(安迪系统)、1pmol/孔的重组人CD28-Fc蛋白(安迪系统)或0.3pmol/孔的重组小鼠CD28-Fc蛋白(安迪系统)过夜。在洗涤后,使0μg/ml至0.06ng/ml(66nM至0.3pM)的滴定剂量的抗CTLA-4mAb结合1小时。然后再次洗涤板,并用稀释至50ng/ml的抗人F(ab)-HRP二抗(杰克逊免疫研究)检测结合的抗体。将Super Signal ELISA Pico(赛默科技(Thermo Scientific))用作底物,并使用Tecan Ultra Microplate读板器分析板。

[0334] 如通过ELISA测定,显示所有抗体均与人和恒河猴CTLA-4蛋白结合,但不与人CD28蛋白结合。此外,显示5-B07与小鼠CTLA-4结合,但不与小鼠CD28结合(见图1)。

[0335] 流式细胞术中IgG与表达CTLA-4的293T细胞结合

[0336] 分析转化的IgG克隆与表达CTLA-4的293T细胞(购自中美冠科生物技术有限公司(Crownbio))的结合。将细胞与不同浓度的抗CTLA-4mAb(如图2所示)在4℃下温育20分钟,然后洗涤并用APC标记的山羊抗人二抗(产品目录号109-136-088,杰克逊免疫研究)染色。

使用Fixable Viability Dye eFluor780(eBiosciences)从分析物中排除死细胞。在FACSVerse(BD生物科学(BD Biosciences),新泽西州富兰克林湖(Franklin Lakes,NJ))上执行数据采集,并用FlowJo软件(Tree Star,俄勒冈州阿什兰(Ashland,OR))进行分析。

[0337] 显示抗CTLA-4mAb以剂量依赖性方式与表达人CTLA-4的293T细胞结合,且EC50值与Yervoy相似(图2)。

[0338] 用人CTLA-4稳定转染的293T细胞、用恒河猴CTLA-4、天然人或恒河猴PBMC瞬时转染的293T细胞、体外激活的人或恒河猴CD4+T细胞与一定浓度的抗CTLA-4mAb在4℃下温育20分钟,然后洗涤并用APC标记的抗人二抗(杰克逊免疫研究)染色。

[0339] 实例2-抗CTLA-4mAb特异性结合表达人和恒河猴CTLA-4的(原代)细胞

[0340] CTLA-4特异性mAb结合原代人和恒河猴体外激活的CD4+T细胞中,但不结合从健康供体中分离的天然PBMC

[0341] 从血沉棕黄层中分离出PBMC。简而言之,将血沉棕黄蛋白1:3稀释在PBS中,并装载到Ficoll-Paque Plus(安玛西亚(Amersham))垫子上。样品在20℃下以800xg离心20分钟。除去上层含血浆的相,并从血浆/Ficoll间相的明显白带中分离出单核细胞。

[0342] 使用MACS CD4 T-细胞分离试剂盒(美天旎生物科技(Miltenyi Biotec))通过阴性选择来纯化人外周$CD4^+$T细胞。CD4+T细胞在R10培养基(含有2mM谷氨酰胺、1mM丙酮酸盐、100IU/ml青霉素(glutamine)和链霉素(streptomycin)和10％ FBS(生命科技(Life Technologies)的GIBCO))中用CD3/CD28 dynabeads(生命科技)加上50ng/ml rhIL-2(安迪系统)体外激活3天,以上调CTLA-4表达。使用非人类CD4微珠(美天旎生物科技)分离恒河猴CD4+T细胞,并与50ng/ml PMA(西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich))和100ng/ml碘霉素(Ionomycin)(西格玛奥德里奇)温育3天。

[0343] 天然人或恒河猴PBMC、体外激活的人或恒河猴CD4+T细胞与指定浓度的抗CTLA-4mAb在4℃下温育20分钟,然后洗涤并用APC标记的抗人二抗(杰克逊免疫研究)染色。使用BD FACS Verse通过FACS分析抗CTLA-4mAb的结合。

[0344] 显示抗体与体外激活的人(图3)和恒河猴(图5)CD4+T细胞结合,但不与静止的PBMC结合(图8)。与内源性表达CTLA-4的T细胞的结合与用Yervoy(图3,顶行,虚线)合作为阳性对照的来自BD生物科学的商业抗CTLA-4FACS抗体(克隆BNI3;图3,底行)染色相似。

[0345] 如图4所示,人体外激活的CD4+T细胞的染色(黑线)可以完全被rhCTLA-4-Fc(灰线)阻断,表明了抗体的特异性。在这种竞争性结合测定中,在与表达CTLA-4的细胞温育之前,将2μg/ml Alexa 647标记的抗CTLA-4mAb与重组人CTLA-4-Fc蛋白(50μg/ml)混合。通过FACS检测IgG结合。

[0346] 表达人和恒河猴CTLA-4的转染的293T细胞证实了所测试抗体的恒河猴交叉反应性(cynocrossreactive)

[0347] 在转染的表达CTLA-4的293T细胞上进一步证实了抗体的恒河猴交叉反应性。

[0348] 如图6所展示,CTLA-4特异性抗体与表达人CTLA-4的转染的细胞的结合可以被人和恒河猴重组蛋白(均安迪系统)抑制。还显示抗体与表达恒河猴CTLA-4的转染的细胞结合(图7,上行)。这种结合可以被恒河猴重组蛋白再次阻断(底行,灰线)。

[0349] 执行与上述实例2中结合图4所述的竞争性测定相似的实验。

[0350] 预期缺乏直接的激动活性

[0351] 执行体外增殖测定以排除未预期的直接激动活性(例如由于非特异性结合)。

[0352] 使用MACS CD4 T细胞分离试剂盒(美天旎生物科技)通过阴性选择从健康的PBMC中纯化人外周CD4+T细胞,然后用CFSE(2μM,分子探针(Molecular Probes))标记。在室温下将抗体与$F(ab')_2$山羊抗人IgG(Fc γ片段特异性)或$F(ab')_2$山羊抗小鼠IgG(Fc γ片段特异性)以$IgG:F(ab')_2=1.5:1$的摩尔比交联1小时。在37℃下用板结合的抗CD3(0.5μg/ml;克隆UCHT1,安迪系统)和4μg/ml可溶性交联抗CTLA-4或交联抗CD28(克隆CD28.2(生物传奇(BioLegend))刺激1×10^5个纯化的人CD4+T细胞72小时。洗涤细胞,并用BV421缀合的抗CD25抗体(克隆M-A251,BD生物科学)染色。通过FACS分析CD25+/CFSE低分裂细胞的百分比。

[0353] 图9展示,与抗CD28刺激相反,所测试的抗CTLA-4mAb均不诱导T细胞增殖。

[0354] 实例3-CD80/CD86的抗CTLA-4mAb嵌段配体结合

[0355] 配体阻断ELISA

[0356] 通过ELISA评估抗CTLA-4IgG的配体阻断活性。为此,将重组人CTLA-4-Fc蛋白(安迪系统)以1pmol/孔涂覆到96孔板(Lumitrac 600LIA板,葛雷纳)上。洗涤后,使滴定剂量的抗CTLA-4mAb结合1小时。分别以200nM和100nM(rhCD80和rhCD86;安迪系统)添加带有His标签的配体,并将板进一步温育15分钟。洗涤后,用HRP标记的抗His抗体(安迪系统)检测结合的配体。将Super Signal ELISA Pico(赛默科技)用作底物,并使用Tecan Ultra Microplate读板器分析板。

[0357] 如图10所示,测试的抗CTLA-4抗体示出与Yervoy相似的配体阻断活性。

[0358] 体外功能性配体阻断

[0359] 对于SEB PBMC测定,将来自健康供体的全部PBMC接种在96孔板(1×10^5个细胞/孔)中,并在滴定剂量的抗CTLA-4IgG存在下用1μg/ml葡萄球菌肠毒素B(Staphylococcus enterotoxin B,SEB,西格玛奥德里奇)刺激。根据制造商的说明,在第3天通过MSD(Mesoscale)测量IL-2分泌。

[0360] 显示抗体4-E03和2-C06增强IL-2产生,并且显示其效力与Yervoy的效力相似。在图11中,显示了6个中的一个表示性供体。

[0361] 实例4-抗CTLA-4mAb在体外和体内消耗表达CTLA-4的细胞

[0362] 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)

[0363] 使用经稳定转染以表达CD16-158V等位基因和GFP的NK-92细胞系执行ADCC测定(购自Conkwest,加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA);Binyamin,L.等人,2008,《在抗淋巴瘤治疗模型中,阻断NK细胞抑制性自我识别促进抗体依赖性细胞的细胞毒性(Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy.)》《免疫学杂志(Journal of immunology)》180,6392-6401)。使用CD4+T细胞分离试剂盒(美天旎生物科技)从健康供体的外周血中分离出CD4+靶T细胞。在37℃下用CD3/CD28 dynabeads(生命科技,塞默飞世尔(Thermo Fisher))和50ng/ml rhIL-2(安迪系统)刺激细胞48小时。将靶细胞与10μg/ml mAB一起在4℃下预温育30分钟,然后与NK细胞混合。将细胞在含有10mM HEPES缓冲液、1mM丙酮酸钠和10% FBS低IgG的RPMI 1640+GlutaMAX培养基(英杰公司(Invitrogen))中以2:1效应子:靶细胞比率温育4小时。通过流式细胞术测定裂解。简而言之,在温育结束时,将细胞悬浮液用BV510偶联的抗CD4(克隆RPA-T4,BD生物科学)以及10nM SYTOX Red死细胞染色

剂(英杰公司)或可修复活力染料eFluor780(eBioscience)在黑暗中于4℃下染色20分钟,并且然后使用FACSVerse(BD生物科学)分析细胞。

[0364] 与Yervoy相比,4-E03显示在体外CTLA-4+T细胞的缺失明显改善(图12)。

[0365] 原代患者材料上的CTLA-4表达

[0366] 为了验证以上发现对抗CTLA-4mAb消耗活性的翻译潜力,在原代患者材料上检查了CTLA-4表达。

[0367] 斯科讷大学医院伦理委员会(the Ethics Committee of SkåneUniversity Hospital)已获得了使用临床样品的伦理批准。根据赫尔辛基宣言(the Declaration of Helsinki)提供了知情同意书。通过隆德斯科讷大学医院的妇产科和肿瘤科获得了样品。将腹水评估为已分离的单细胞悬浮液。将肿瘤材料切成小块,并与DNase I(西格玛奥德里奇)和Liberase™(罗氏诊断(Roche Diagnostics))在R10中于37℃下温育20分钟。机械破碎剩余的组织,并与细胞悬浮液一起通过70μm细胞过滤器。对从腹水和肿瘤分离的细胞进行染色。为了鉴定不同的T细胞亚群,使用了以下抗体:CD4-BV510(RPA-T4)、CD25-BV421(M-A251)、抗CD127-FITC(HIL-7R-M21)、CTLA-4-PE(BNI3)、CD8-PeCy7(RPA-T8)、CD3-APC(UCHT1)、CD45-PercP-Cy5.5(HI30)、小鼠IgG2a同种型、κ对照-PE(G155-178;全部来自BD生物科学)。使用FACSVerse执行数据采集,并使用FlowJo分析数据。

[0368] 如图13所示,CTLA-4在肿瘤内Treg细胞上表达最高,这使其成为消耗CTLA-4特异性抗体的良好靶标。

[0369] PBMC-NOG/SCID模型

[0370] 为了证实CTLA-4特异性抗体的消耗活性的体外发现,在体内PBMC-NOG/SCID模型中分析了抗CTLA-4mAb的消耗能力。该模型基于完善的hu-PBMC-NOG模型(SøndergaardH.等人,《临床实验免疫学(Clin Exp Immunol.)》2013年5月;172(2):300-10.doi:10.1111/cei.12051;Cox J H等人,《科学公共图书馆综合》2013年12月23日;8(12):e82944.doi:10.1371/journal.pone.0082944.eCollection 2013),并如下所述在内部进行了修改。

[0371] 根据内政部的指导方针,将小鼠饲养并保存在当地的设施中。八周大的雌性CB17scid(Bosma GC等人,《自然》1983年2月10日;301(5900):527-30)和NOG(NOD/Shi-scid/IL-2Rγ^{null};Ito M等人,2002,*NOD/SCID/γ$_c^{null}$*小鼠:用于植入人类细胞的优秀受体小鼠模型(NOD/SCID/γmouse:an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells.)《血液(Blood)》100(9):3175-3182)小鼠由泰康利(Taconic)(丹麦邦霍特(Bomholt,Denmark)))提供,并保存在当地的动物设施中。对于PBMC-NOG/SCID(原代人异种移植)模型,使用Ficoll Paque PLUS分离人PBMC,并且洗涤后将细胞以75×10^{6}个细胞/ml重悬于无菌PBS中。向NOG小鼠静脉注射200μl细胞悬浮液,对应于15×10^{6}个细胞/小鼠。注射后2周,将脾分离并制成单细胞悬浮液。此后,取少量样品以通过FACS确定CTLA-4在人T细胞上的表达。如图13所指示,与其他T细胞相比,CTLA-4在Treg细胞上的表达更高,反映了人类患者的情况。将大多数细胞以50×10^{6}个细胞/ml重悬于无菌PBS中。向SCID小鼠腹膜内注射200μl悬浮液,对应于10×10^{6}个细胞/小鼠。1小时后,将小鼠用10mg/kg的抗CTLA-4hIgG1、Yervoy或同种型对照单抗处理。24小时后收集小鼠的腹膜内液。使用以下标志物通过FACS鉴定和定量人T细胞亚群:CD45、CD4、CD8、CD25、CD127(均来自BD生物科学)。

[0372] 所有测试的抗体均显示与Yervoy相似或更好的Treg消耗活性。其他T细胞群体,如CD8+效应T细胞,未受到影响(图14)。

[0373] 实例5-选择的替代抗体m5-B07显示与4-E03相同的功能特性

[0374] 在一些实例中,特别是在体内实例中,已经使用了mIgG2a形式的抗体克隆5-B07(也表示为m5-B07)。这是小鼠抗体,是本文公开的人抗体的替代抗体。由于它结合鼠CTLA-4并因此阻断了配体结合,因此已被选择为替代抗体(图16的A-B)。此外,它还显示了Treg消耗活性(图16的C-D)。

[0375] 配体阻断ELISA

[0376] 通过ELISA评估5-B07的配体阻断活性。为此,将重组小鼠CTLA-4-Fc蛋白(北京义翘神州生物技术有限公司(Sino Biological Inc.))以1pmol/孔涂覆到96孔板(Lumitrac 600LIA板,葛雷纳)上。洗涤后,使滴定剂量的抗CTLA-4mAb结合1小时。分别以200nM和100nM(rmCD80和rmCD86;北京义翘神州生物技术有限公司)添加带有His标签的配体,并将板进一步温育15分钟。洗涤后,用HRP标记的抗His抗体(安迪系统)检测结合的配体。将Super Signal ELISA Pico(赛默科技)用作底物,并使用Tecan Ultra Microplate读板器分析板。

[0377] 如图16所示,抗体阻断(A)CD80和(B)CD86与其配体CTLA-4的结合。

[0378] 体内Treg消耗活性

[0379] 如下所述,在CT26肿瘤模型中研究了CTLA-4特异性抗体对体内肿瘤中T细胞亚群的影响。

[0380] 根据内政部的指导方针,将小鼠饲养并保存在当地的设施中。泰康利(丹麦邦霍特)提供六到八周大的雌性Balb/C,并保存在当地的动物设施中。CT26细胞(ATCC)在补充10% FCS的谷氨酰胺(glutamax)缓冲的RPMI中生长。当细胞半汇合时,将它们与胰蛋白酶分离,并以10×10^6个细胞/ml重悬于无菌PBS中。向小鼠皮下注射100μl细胞悬浮液,对应于1×10^6个细胞/小鼠。如图所示,当肿瘤达到约7×7mm时,每周两次用10mg/kg的所示抗体腹膜内处理小鼠。第三次施用后,将肿瘤切开,机械地分成小块,并用100μg/ml释放酶(罗氏(Roche))和100μg/ml脱氧核糖核酸酶(西格玛)的混合物于37℃下消解2×5分钟,之间放置Vortex。然后用含有10% FBS的PBS洗涤细胞悬浮液(400g,10分钟)。之后,将细胞重悬于MACS缓冲液中,并用抗体组染色的CD45、CD3、CD8、CD4和CD25(均来自BD生物科学)染色。染色前,使用100μg/ml IVIG阻断细胞的非特异性结合。使用FACS Verse(BD生物科学)分析细胞。小鼠Treg细胞被鉴定为$CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+$细胞。

[0381] 如图16的C所示,与其他CTLA-4特异性n-CoDeR抗体和众所周知的市售克隆9H10相比,小鼠IgG2a格式的5-B07介导与D)增加的CD8/Treg比率相关的肿瘤中的Treg缺失。

[0382] 实例6-表达抗CTLA4 mAb(COPTG19385)或抗CTLA4 mAb和GM-CSF

[0383] (COPTG19384)的病毒的生成、转基因表达和遗传稳定性的表征

[0384] COPTG19384和COPTG19385是编码单克隆抗体抗CTLA4(4-E03)的痘苗病毒(哥本哈根株)。COPTG19384进一步编码人类GM-CSF。更具体地说,COPTG19384和COPTG19385都对胸苷激酶(TK,J2R基因座)和核糖核苷酸还原酶(RR,I4L基因座)活性有缺陷。如图17所示,在p7.5K启动子(SEQ ID NO:59)的控制下编码4-E03重链(HC;SEQ ID NO:54)的表达盒插在J2R基因座处,并在p7.5K启动子SEQ ID NO:59的控制下编码4-E03 IgG的轻链(LC,SEQ ID NO:53)的表达盒置于I4L基因座。对于COPTG19384,在pSE/L启动子(SEQ ID NO:61)的控制

下,编码人GM-CSF(SEQ ID NO:56)的表达盒也置于I4L基因座。

[0385] 使用相同的启动子(p7.5K)控制HC和LC的表达,以使两条链达到相同的表达水平,并且因此将抗体作为异四聚体蛋白进行最佳组装(即避免过量的非相关链)。然而,抗体两条链的相同启动子不能将它们插入相同的基因座(相同的DNA序列会增加重组的风险,然后消除转基因)。因此,编码4-E03 HC的盒插在J2R基因座处,并且编码4-E03 LC的盒插在I4L基因座处。但在不同启动子(pSE/L)下编码GM-CSF转基因的盒也插入I4L基因座中,就像抗体轻链一样。

[0386] COPTG19384的生成

[0387] 痘苗病毒转移质粒pTG19339和pTG19341被设计为允许通过同源重组分别在痘苗病毒基因组的J2R和I4L基因座中插入核苷酸序列。它们源自质粒pUC18,在其中克隆了J2R(pTG19339)或I4L(pTG19341)基因座周围的侧翼序列(BRG和BRD)。每个质粒还含有p7.5K启动子。

[0388] 产生了含有4-E03抗体的HC基因的1436bp的名为“片段HC”的合成片段。在pSE/L控制下通过合成方式产生含有4-E03抗体的LC基因和hGM-CSF基因的片段“LC片段”并插入质粒载体中。编码序列针对人密码子使用进行了优化,在ATG起始密码子之前添加了Kozak序列(ACC),在终止密码子之后添加了转录终止子(TTTTTNT)。此外,排除了一些模式:TTTTNTT、GGGGG、CCCCC,它们在痘病毒中表达有害。

[0389] 通过同源重组将HC片段插入受Pvu II限制的pTG19339中,得到pTG19367。携带LC的质粒受到SnaB1的限制,并且通过同源重组将所得片段“LC-GMCSF”插入受Pvu II限制的pTG19341中,得到pTG19384。在该质粒中,将表达盒从头到尾插入重组臂之间,从而在痘苗病毒基因组的I4L基因座中实现同源重组。

[0390] COPTG19384是在鸡胚成纤维细胞(CEF)上通过两次连续同源重组以连续插入I4L和J2R基因座中并通过使用COPTG19156作为亲本病毒以及两个转移质粒pTG19367和pTG19384生成的。从12天大的SPF胚卵(查尔斯河(Charles River))中分离出CEF。机械地撕开胚胎,溶解在Tryple Select溶液(英杰)中,并在补充有5% FCS(Gibco)和2mM L-谷氨酰胺的MBE(基于伊格尔的培养基;Gibco)中进行培养。

[0391] 转移质粒和亲本痘苗病毒之间的同源重组使得能够生成失去GFP和mCherry表达盒并获得抗体和GM-CSF表达盒的重组痘苗病毒。COPTG19156在其I4L基因座中含有mCherry基因的表达盒,并且在其J2R基因座中含有GFP基因的表达盒。转移质粒pTG19367与亲本COPTG19156之间的同源重组使得能够生成失去其GFP表达盒并获得4-E03重链表达盒的重组痘苗病毒,并且通过分离红色荧光噬菌斑来执行选择。这种中间重组病毒(COPTG19367)被用作亲本病毒进行了第二轮与pTG19384作为转移质粒的同源重组,以生成失去其mCherry表达盒并获得4-E03轻链和GM-CSF表达盒的重组痘苗病毒。COPTG19384(图17)的选择是通过分离白色非荧光噬菌斑来执行的。

[0392] 在两个F175烧瓶中的CEF上扩增COPTG19384的病毒原种,以生成适当的病毒原种,将其等分并储存在-80℃下直至使用。在CEF细胞上滴定病毒原种并且感染滴度以pfu/mL表示,并用下式计算:裂解区域数×稀释倍数×4。为了说明目的,产生的病毒原种滴定6.8×10^{6}pfu/mL。通过PCR使用适当的引物对来分析该原种以验证表达盒和重组臂的完整性。还通过对两个表达盒的测序来分析原种。测序结果的比对显示与理论预期序列的100%同源

性。如果需要,使用常规技术(例如,如WO2007/147528中所述)纯化病毒制剂。

[0393] COPTG19385的生成

[0394] 痘苗病毒转移质粒pTG19339和pTG19341被设计为允许通过同源重组分别在痘苗病毒基因组的J2R和I4L基因座中插入核苷酸序列。它们源自质粒pUC18,在其中克隆了J2R(pTG19339)或I4L(pTG19341)基因座周围的侧翼序列(BRG和BRD)。每个质粒还含有p7.5K启动子。

[0395] 产生了含有4-E03抗体的HC基因的1436bp的名为"片段HC"的合成片段。编码序列针对人密码子使用进行了优化,在ATG起始密码子之前添加了Kozak序列(ACC),在终止密码子之后添加了转录终止子(TTTTTNT)。此外,排除了一些模式:TTTTNTT、GGGGG、CCCCC,它们在痘病毒中表达有害。

[0396] 通过同源重组将HC片段插入受PvuII限制的pTG19339中,得到pTG19367。

[0397] 通过在质粒pTG19384(如上所述)中在pSE/L的控制下消除编码hGM-CSF基因的盒,获得含有仅编码4-E03轻链的表达盒的质粒。pTG19384受NheI和XbaI(相容的内聚末端)限制,并重新连接,得到pTG19385。

[0398] COPTG19385是在鸡胚成纤维细胞(CEF)上通过两次连续同源重组以连续插入J2R和I4L基因座中并通过使用COPTG19156作为亲本病毒以及两个转移质粒pTG19367和pTG19385生成的。从12天大的SPF胚卵(查尔斯河)中分离出CEF。机械地撕开胚胎,溶解在Tryple Select溶液(英杰)中,并在补充有5% FCS(Gibco)和2mM L-谷氨酰胺的MBE(基于伊格尔的培养基;Gibco)中进行培养。

[0399] 转移质粒和亲本痘苗病毒之间的同源重组使得能够生成失去GFP和mCherry表达盒并获得抗体表达盒的重组痘苗病毒。COPTG19156在其I4L基因座中含有mCherry基因的表达盒,并且在其J2R基因座中含有GFP基因的表达盒。转移质粒pTG19367与亲本COPTG19156之间的同源重组使得能够生成失去其GFP表达盒并获得4-E03重链表达盒的重组痘苗病毒,并且通过分离红色荧光噬菌斑来执行选择。这种中间重组病毒(COPTG19367)被用作亲本病毒,进行了第二轮与pTG19385作为转移质粒的同源重组,以生成失去其mCherry表达盒并获得4-E03轻链表达盒的重组痘苗病毒。COPTG19385的选择是通过分离白色非荧光噬菌斑来执行的。

[0400] 在两个F175烧瓶中的CEF上扩增COPTG19385的病毒原种,以产生适当的病毒原种,将其等分并保存在-80℃下直至使用。在CEF细胞上滴定病毒原种,并且感染滴度以pfu/mL表示,并通过下式计算:裂解区域数×稀释倍数×4。为了说明目的,产生的病毒原种滴定1.04×10^{7}pfu/mL。通过PCR使用适当的引物对来分析该原种以验证表达盒和重组臂的完整性。还通过对两个表达盒的测序来分析原种。测序结果的比对显示与理论预期序列的100%同源性。如果需要,使用常规技术(例如,如WO2007/147528中所述)纯化病毒制剂。

[0401] 转基因的表达

[0402] 通过蛋白质印迹(WB)在被COPTG19384感染的CEF细胞的上清液中评估了4-E03单克隆抗体的病毒介导的表达,并与重组产生的抗体(40ng 4-E03)进行比较。WB可以允许可视化不结合CTLA4的非功能性分子(例如,分子链装配不完整的分子、聚集体)的存在。CEF细胞以MOI 0.05一式三份地被COPTG19384病毒原种感染。48小时后收获细胞上清液,并在非还原条件下电泳后并使用抗Ig(左印迹)或抗轻链(右印迹)HRP偶联抗体通过WB进行分析。

图18的A中所示的结果表明,在非还原条件下,感染的CEF产生的mAb的WB图谱与纯化的4-E03的WB图谱接近,表观大小介于100至150kDa之间,表明正确的链折叠和组装。

[0403] 用ELISA对功能性分泌的4-E03抗体和GM-CSF的上清液进行定量。ELISA允许定量地测量细胞上清液中产生的功能性多肽的量。VVTG17137用作阴性对照。它是在J2R和I4L基因座中缺失、编码自杀基因FCU1的痘苗病毒(哥本哈根毒株)(在WO2009/065546中进行了描述)。

[0404] 为了估计4-E03抗体,通过在4℃下过夜温育,将微孔板涂覆100μL/孔的0.25μg/mL的CTLA4-Fc。温育后,弃去涂覆溶液,添加阻断溶液,并将板在室温下温育1至2小时,然后洗涤。将4-E03校准标准品(0.097至100ng/mL)或稀释在阻断溶液中的样品(一式三份)添加到孔中,并将板在37℃下温育2小时,然后洗涤。将稀释在阻断溶液中的HRP偶联抗体添加到每个孔中,并将板在37℃下温育1小时,然后洗涤。与TMB溶液在室温下在黑暗中温育30分钟后,添加$H_2SO_4$2M(终止溶液)以终止酶促反应。在微孔板读取仪上于450nm读取吸光度。将吸光度对校准标准品的抗体浓度作图。如图18的B所示,在被COPTG19384感染的细胞中产生功能性4-E03mAb,达到浓度接近1μg/mL。

[0405] 还使用Quantikine®ELISA(安迪系统Ref SGM00)在相同的上清液中评估了病毒介导的GM-CSF表达。简而言之,此测定使用两种抗hGM-CSF抗体。用于捕获样品中的hGM-CSF的第一抗体涂覆在96孔板的孔表面上。将第二抗体偶联并添加到溶液中的板中以检测捕获的hGM-CSF。然后通过从用试剂盒提供的一些纯化的hGM-CSF建立的校准曲线中内插来计算样品中的hGM-CSF的浓度。如图19所示,GM-CSF的表达水平约为6μg/mL。

[0406] 总之,检测到两种转基因的浓度均等于或高于1μg/mL,表明令人满意的表达水平。

[0407] 遗传稳定性:

[0408] 病毒在无血清培养基中的CEF上传代五次,感染复数(MOI)为10^{-4}后,执行遗传稳定性测试。将P5代稀释并接种在60mm培养皿中的CEF细胞上,以获得每个培养皿20至40个病毒噬菌斑。分离出一百个病毒噬菌斑并传代培养。一个扩增循环后,将分离的病毒噬菌斑接种在CEF细胞上,并通过PCR和ELISA进行测试。PCR分析和转基因表达显示,超过90%的克隆具有正确的特征。由于产品临床开发的接受标准是遗传稳定性优于或等于90%,因此COPTG19384被认为具有遗传稳定性。

[0409] 实例7-COPTG19384的体外表征

[0410] 肝细胞中的复制研究:表达抗CTLA4 mAb和GM-CSF的病毒的肿瘤选择性

[0411] COPTG19384携带两个基因缺失,它们编码参与核苷酸代谢的病毒酶(TK和RR)。当起作用时,这些酶可使病毒在大多数细胞的细胞质中复制,包含处于静止状态的细胞(即可用的核苷酸库低)。在原代和恶性细胞中执行了宿主范围研究,以验证不同转基因在J2R和I4L基因座中的插入不会改变宿主范围的选择性。在正常的原代人细胞(肝细胞,由Biopredic制备)和来自相同器官的肿瘤细胞(来自肝癌的HepG2,HBCC-8065™)上评估COPTG19384的复制。对于非选择性痘苗病毒和重组双缺失VVTG17137病毒(在J2R和I4L基因中缺失,且自杀FCU1基因代替J2R插入),计算复制率和治疗指数,并与作为参考物的野生型哥本哈根痘苗(COP WT,无任何缺失的病毒)的复制率和治疗指数进行比较。测定了两个批次,一个研究批次(批次1)和一个以GMP方式产生的批次(批次2)。将复制速率确定为温育结束时总感染颗粒/初始感染颗粒(接种物)的比率。每种病毒的治疗指数确定为比率:HepG2

细胞上的复制率/肝细胞上的复制率。该比率越高,病毒对肿瘤细胞的选择性越好。

[0412] 原代肝细胞在补充有用于肝细胞培养基的1.6%添加剂的基础肝细胞培养基中生长。HepG2以4E+05个细胞/孔接种在12孔板中,并与5% CO_2于37℃下温育24小时。在感染之前,除去培养基,并将70pfu/孔的对于肝细胞在PBS中或对于HepG2在补充FCS的PBS中的病毒添加到每个孔中。将感染的细胞与5% CO_2于37℃下温育30分钟,然后添加1.5mL/孔的培养基。将板在37℃下与5% CO_2温育3天,然后储存在-80℃下。然后,将板解冻,并在韦罗细胞上滴定之前,以40%的振幅超声处理孔30秒。

[0413] 正常人肝细胞中的复制率:

[0414] 选择正常的肝细胞来监测COPTG19384在正常人细胞中的能力,因为这些原代细胞可以直接从供体中定期获得。在那些细胞中,COP WT传播良好,复制率超过50,000(图20的A)。换句话说,每个初始感染病毒颗粒产生约50,000个新病毒。在两种重组双缺失病毒(即VVTG17137和COPTG19384)的情况下,根据病毒或病毒的批次,该复制速率显著降低到5至15(图20的A)。最后的结果表明在VVTG17137和COPTG19384之间保留了由两个缺失导致的向正常细胞的减毒复制。

[0415] 肿瘤细胞HepG2中的复制率:

[0416] 选择HepG2细胞来监测COPTG19384在肿瘤人细胞中复制的能力,因为这些细胞是正常肝细胞的恶性对应物。在那些细胞中,无论测试的初始病毒是什么,测试的五种病毒的复制率都非常相似,达到约100,000个新病毒(图20的B)。因此,VVTG17137和COPTG19384中的双重缺失以及转基因的载体化都不会损害它们在恶性细胞中复制的能力。

[0417] 治疗指数:

[0418] 如图20的C所示,COP WT的计算指数仅为二,表明COP WT对肿瘤细胞与正常细胞的选择性差。相反,对于VVTG17137和COPTG19384(以及两份测试的病毒),该指数从8.2E+03至1.8E+04不等。这证实了两种重组病毒对肿瘤细胞与正常细胞具有相同的良好选择性。

[0419] 这些结果表明,COPTG19384和VVTG17137在肿瘤细胞和健康细胞上都具有非常相似的复制特性。与COP WT相比,它们在肿瘤Hep G2上的复制是相似的,而在健康肝细胞上则受到很大的损害。因此,两个基因(J2R和I4L)的缺失限制了缺失的病毒向包含肿瘤细胞在内的增殖细胞(即具有高核苷酸库)的复制。由于转基因表达和复制紧密相连,因此COPTG19384是用于选择性地将治疗性蛋白质递送到肿瘤中的有效载体。

[0420] 在CEF和LoVo上的复制测定:

[0421] 在从11或12天大的无特定病原的胚卵(查尔斯河)分离的CEF(生产者细胞)和肿瘤人细胞系(LoVo;ATCC® CCL-229™)上评估COPTG19384的复制。将CEF和LoVo细胞制成悬浮液,并且对于CEF以MOI为10^{-3}且对于LoVo为10^{-2}进行感染(每个细胞和每个时间点三个孔)。在不同的温育时间之后,在韦罗细胞(CCL-81™)上进行病毒滴定。将COPTG19384复制与作为基准的VVTG17137的复制进行比较。结果显示,COPTG19384和VVTG17137的复制在CEF和LoVo中均相似(数据未示出)。

[0422] 在重建的人皮肤上的复制测定:

[0423] 还在重建的人皮肤(T-Skin™/人体全厚度皮肤模型)上评估COPTG19384的复制。从(EPISKIN SA)获得的三十六个T-Skin™样品在6孔板中培养,并保存在新鲜的培养基中。将VVTG17137和COPTG19384分配到每个孔中(一式三份),以参与的最终的浓度(即10^1至

10^5pfu/孔)。还测试了不含病毒的培养基的阴性对照(模拟物)。将板在37℃下与5% CO_2温育7天并且收集T-Skin™样品并切成两片。使用韦罗细胞进行病毒滴定,在两片之一上确定感染滴度。图21显示COPTG19384在重建皮肤中的复制程度与基准VVTG17137相同,支持GM-CSF和4-E03 mAb的载体化都不会改变痘苗病毒在人重建皮肤上的复制行为这一事实。

[0424] 溶瘤测定

[0425] 溶瘤活性表示所测试的病毒样品对肿瘤细胞的裂解活性。通过在不同肿瘤细胞系上温育5天后对细胞活力进行定量来评估:人大肠腺癌细胞系LoVo(ATCC® CCL-229™)、人胰腺肿瘤细胞系MIA PaCa-2(ATCC® CCL-1420)和人肝癌细胞系HepG2(ATCC® HBCC-8065™)。COPTG19384溶瘤活性与作为基准的VVTG17137的溶瘤活性进行比较。还接种了对应于未感染细胞的阴性对照(模拟物感染的细胞)。

[0426] 制备细胞、分配在艾本德(Eppendorf)管中(1.2×10^6个细胞/管),然后以MOI为10^{-5}至10^{-2}感染病毒并在37℃下温育30分钟。将适当的完全培养基添加到艾本德管中,并将该悬浮液的等分试样添加到含有2mL适当的完全培养基的6孔板的每个孔中(一式三份)。将板在37℃下与5% CO_2温育5天,并在Vi-Cell计数器上测定细胞活力。结果表示为模拟物感染的细胞的细胞活力的百分比。还回收细胞上清液用于确定4-E03 mAb和GM-CSF的浓度。图22显示,在所评估的三种肿瘤细胞系中,COPTG19384和VVTG17137的溶瘤活性相似。

[0427] 转基因的表达水平

[0428] 通过ELISA(如实例6中所述)在溶瘤活性确定(以可变MOI感染5天)后回收的HepG2和LoVo细胞的培养上清液中测量4-E03单克隆抗体和GM-CSF的表达水平。

[0429] 还通过ELISA(见实例6)在分别在以下条件下培养的5种细胞系的上清液中测量4-E03和GM-CSF的表达水平:人胃癌细胞系Hs-746 T(ATCC®HTB-135™)、人卵巢肿瘤细胞系SK-OV-3(ATCC®HTB-77™)、人胰腺癌细胞系MIA PaCa-2(ATCC® CCL-1420)、人结肠直肠腺癌细胞系LoVo(ATCC® CCL-229™)和人结肠直肠癌细胞系HCT 116(ATCC® CCL-247™)。将每种细胞系在6孔板(10^6个细胞/孔)中培养(一式三份)并在37℃下与5% CO2温育24小时,然后以MOI 0.05感染。然后在感染后48小时回收细胞上清液,用于确定4-E03 mAb和GM-CSF的浓度。如预期的那样,MOI、感染后时间和细胞系是影响感染细胞的上清液中转基因表达水平的重要参数。图23的A显示,当被COPTG19384感染时,相当许可复制(HepG2)和相当抵抗的(LoVo)肿瘤细胞系能够在其培养上清液中产生大约相同量的4-E03 mAb和GM-CSF。然而,HepG2的最大表达量要比LoVo低MOI 10倍。此外,对于测试的5种肿瘤细胞系,对于4-E03 mAb和GM-CSF,转基因的表达分别高于0.1和高于1μg/mL(图23的B)。要注意的是,用于测量4-E03 mAb浓度的ELISA测定使用抗原CTLA4捕获抗体。换句话说,通过这种测定法测量的抗体是至少部分功能性的(即识别其抗原,抗体的其他功能由Fc部分承担),

[0430] 4-E03 mAb的纯化和糖基化特征分析

[0431] 为了从感染的细胞中产生大量的4-E03 mAb,将含约4.7 10^7Mia-PACA细胞/瓶的15个F175烧瓶以MOI 0.01用COPTG19384感染,并温育72小时。收获MIA Paca-2细胞培养上清液(约450mL,含670μg mAb 4-E03,如通过ELISA确定),汇集并通过离心进行澄清,以除去大部分细胞碎片。将澄清的上清液在0.2μm过滤器上过滤,并添加2mM EDTA(以抑制可能的金属蛋白酶)和20mM Tris pH7.5(以提高pH)。然后将过滤的上清液通过protA Hitrap色谱柱(GE医疗(GE Healthcare),编号17-5079-01)。转移色谱柱并连接到Purifier FPLC(GE医

疗)并应用净化程序(THM/ProtA1mL注射循环frac bleu)。在添加含或不含β-巯基乙醇(用于还原或不还原mAb的二硫键)的Laemlli缓冲液(伯乐(Biorad))后,将含有mAb的洗脱级分装载到NuPage Bis-Tris凝胶4-12%(Thermo NP0323)上。凝胶用InstantBlue(Expedeon,ISB1L)染色。汇集对应于洗脱主峰的三个级分,并且在针对配制缓冲液透析之后,通过在280nm处的吸光度确定抗体浓度。纯化的mAb的最终浓度为0.29mg/mL。

[0432] 第一个表征是在还原和非还原条件下通过电泳评估链组装。在非还原条件下,2条轻链和2条重链组装以形成天然和功能性抗体。看起来,来自感染的MIA PaCa-2的纯化的4-E03和重组产生的4-E03在还原和非还原条件下均具有不可区分的电泳图谱。换句话说,来自感染的MIA PaCa-2的纯化的4-E03具有预期的轻链和重链比,并正确组装为2个轻链和2个重链异四聚体。质谱分析也证实了该异四聚体的存在。对纯化的mAb进行质谱分析,以进行糖基化分析。简而言之,用IdeS蛋白酶消解或不消解mAb,所述IdeS蛋白酶特异性裂解铰链处的IgG(产生F(ab')$_2$和Fc部分)。确定携带N-糖基化的整个抗体或Fc部分的质量,并且将每个质量与根据Fc的一级序列和糖基化模式计算的理论质量拟合。从感染的MIA PaCa-2纯化的4-E03 mAb的糖基化图谱与重组产生的和纯化的4-E03以及作为临床中使用的人IgG1的基准的MabThera的糖基化图谱进行比较。结果显示,从感染的MIA PaCa2产生的4-E03的糖基化图谱与两种抗体参考物的糖基化图谱不同,其中大多数G0F(88%),而重组4-E03和MabThera具有典型的G0F、G1F和G2F分布的相似糖基化图谱。然而,MIA PaCa-2被怀疑是纯化的4-E03 mAb中低G1F和G2F物种的原因,因为低水平的Beta-1,4-半乳糖基转移酶1转录物可能是缺乏在MIA PaCa-2中表达的4-E03的半乳糖基部分的原因(因此缺少G1f和G2F)。

[0433] 还从在CEF上产生的COPTG19384的纯化期间回收的渗透物中执行了相同类型的纯化,随后是质量分析。结果显示,来自感染的CEF的4-E03的糖基化图谱与MabThera或重组4-E03的糖基化图谱非常十分相似。这一最新结果表明,所用细胞系比感染本身对抗体的糖基化图谱影响更大。

[0434] 从感染的MIA PaCa-2细胞的上清液纯化的4-E03(4-E03 TG)还表现出与通过CHO(研究批次)或HEK(毒素批次)细胞重组产生的4-E03相同的结合特性(图24和25)。通过ELISA(实例1中所述)以测试与重组人(图24的A)人和(图24的B)恒河猴CTLA-4蛋白的结合表明这一点。其中测试了与(图25的A)人和(图25的B)恒河猴CTLA-4表达细胞的结合(见实例1和2)的FACS分析证实了不同的4-E03批次具有相似的交叉反应性和结合亲和力。

[0435] GM-CSF糖基化和二硫键模式

[0436] 为了研究糖基化模式和一些二硫键的存在,用COPTG19384感染了不同的人肿瘤细胞系,并用相同的WB方法对其上清液进行分析。以MOI 0.01感染MIA-Paca-2、LoVo、HepG2和HCT116细胞,并在无血清的培养基中温育72小时。收获培养上清液,通过离心进行澄清,然后在0.2μm过滤器上过滤。将上清液储存在-20℃下直至分析。通过添加8μl Rapid PNGase F缓冲液5X进行处理,随后在75℃下温育5分钟。然后添加一μL PNGase F(以从糖蛋白中去除N-聚糖),并将混合物在50℃下温育30分钟。在进行蛋白质印迹之前,通过添加5μL含或不含β-巯基乙醇(还原和非还原条件)Laemmli缓冲液×4来制备二十五μL样品。使用Amersham ECL Prime Western Blotting检测免疫复合物,并用Molecular Imager ChemiDOC XRS(伯乐)记录化学发光。

[0437] 来自感染的HCT116、LoVo和MIA PaCa-2的GM-CSF展示出相同的糖基化模式,而感染的HepG2产生的GM-CSF作为非N-糖基化分子迁移。这些结果表明,由COPTG19384感染的人肿瘤细胞产生的GM-CSF具有预期的翻译后修饰(即二硫键和N-糖基化)。然而,这些修饰可能因用于感染的肿瘤细胞系及其特定的代谢状态而异。

[0438] 实例8:肿瘤内注射COPTG19384后的药代动力学

[0439] 在LoVo异种移植模型中肿瘤内(胸腔内)注射痘苗病毒后,抗CTLA4抗体、GM-CSF和病毒在肿瘤和血流中的表达的动力学。

[0440] 方案

[0441] 将5×10^6个细胞LoVo细胞植入瑞士裸鼠(法国查尔斯河(Charles River,France))的右侧腹。约两周后当肿瘤体积达到约120mm^3时,将小鼠随机分为6组,每组15只动物。

[0442] • 来自第1组的小鼠在第0天(治疗的第一天)接受胸腔内施用剂量为1×10^4pfu/小鼠的COPTG19384。

[0443] • 来自第2组的小鼠在第0天接受胸腔内施用剂量为1×10^5pfu/小鼠的COPTG19384。

[0444] • 来自第3组的小鼠在第0天接受胸腔内施用剂量为1×10^4pfu/小鼠的VVTG17137。

[0445] • 来自第4组的小鼠在第0天接受胸腔内施用剂量为1×10^5pfu/小鼠的VVTG17137。

[0446] • 来自第5组的小鼠在第0天接受腹膜内(i.p.)施用剂量为3mg/kg的4-E03。

[0447] • 来自第6组的小鼠在第0天接受腹膜内施用剂量为3mg/kg的伊匹木单抗(Yervoy)。

[0448] 在第1、3、6、10和20天收集3只动物的肿瘤和血液。称重肿瘤并均质化以立即处理。收集四分之一的均质化肿瘤用于病毒滴定,并将剩余的悬浮液离心,并将上清液储存在-20℃下直至使用。将血液分为两部分:将一部分添加到肝素管(25IU/100μL的血液)中进行滴定测定,并于-80℃下冷冻直至分析。从另一部分产生澄清的血清,并储存在-20℃下直至使用。通过在韦罗细胞上滴定来确定肿瘤和血液样本中的病毒滴度。

[0449] LoVo模型中病毒复制的动力学:

[0450] 在LoVo模型中,其中以两种剂量(1×10^4或1×10^5pfu)注射COPTG19384一次,监测病毒复制并与在相同条件下注射的VVTG17137进行比较。图26中展示的结果显示,在每个时间点测得的病毒滴度的三个值的重大分散。无论如何,结果还显示,从注射后的第3天到最多20天,两种病毒和两种剂量的病毒均会在肿瘤中复制并维持相对高的滴度/g肿瘤。对给定的时间点,病毒的两种剂量之间或所用的两种病毒之间的病毒滴度没有明显差异。有趣的是,除了一个样品,其中仅检测到13pfu/mL(数据未示出)(VVTG17137,在第10天的剂量:1×10^7pfu)之外,所有血液样品均对病毒检测呈阴性。

[0451] 这些结果一起表明,一次胸腔内注射1×10^4或1×10^5pfu后,病毒的复制在LoVo肿瘤中维持了至少20天,并且在血流中几乎检测不到。必须指出的是,LoVo异种移植模型非常有利于病毒复制,因为它使用了免疫系统严重受损且因此抗病毒活性有限的人肿瘤细胞和瑞士裸鼠。

[0452] LoVo模型中转基因表达的动力学:

[0453] 如预期的那样,对于4-E03 mAb(图27的A)和GM-CSF(图27的B),在肿瘤中转基因表达的动力学紧随病毒复制的动力学,在第6天或第10天达到最大浓度(Cmax)。在单次注射4-E03 mAb(或伊匹木单抗)的情况下,在第一个时间点(第1天)观察到肿瘤和血液中的Cmax,并且此后测得的mAb浓度与小鼠中人IgG1的药代动力学一致(图28)。

[0454] 此外,COPTG19384处理后(对于两种剂量),在Cmax及其后(即注射后6-10至20天)进入肿瘤的4-E03浓度比以治疗剂量为3mg/kg单次注射4-E03后高约10倍(图27的A)。相反,在COPTG19384处理后,mAb的血液浓度始终低于腹膜内注射3mg/kg的4-E03后测得的浓度(图28的A)。该结果表明,mAb的载体化允许在肿瘤中达到高浓度而不会超过或甚至达到在mAb的治疗剂量下获得的血液浓度。

[0455] COPTG19384处理后,GM-CSF的表达动力学遵循用4-E03观察到的动力学(图27的B)。有趣的是,对于相同样品,测得的肿瘤中GM-CSF的水平低于4-E03的水平,但是被COPTG19384感染的体外LoVo表达的GM-CSF比4-E03高两倍。与4-E03相比,GM-CSF的血液浓度也非常低(图28的B)。该结果与GM-CSF的体内半衰期一致,GM-CSF的体内半衰期与人IgG1的体内半衰期相比非常短。

[0456] 这些结果表明,在以最小的全身暴露量胸腔内注射COPTG19384后,载体化的抗体和GM-CSF主要在肿瘤中表达。这些结果证实,载体化特别适合于具有毒理学(例如抗CTLA4)或药代动力学(例如GM-CSF)问题的转基因。

[0457] 在CT26同基因模型中肿瘤内注射痘苗病毒后,抗CTLA4抗体、GM-CSF和病毒在肿瘤和血流中的表达的动力学

[0458] 在CT26具有免疫能力的鼠模型中评估病毒活性需要生成几种编码带有或不带有鼠GM-CSF的鼠抗mCTLA4的替代病毒:

[0459] • COPTG19407是痘苗病毒(哥本哈根株),其含有在J2R基因座处在p7.5启动子下编码鼠m5-B07 IgG2的重链(SEQ ID NO:63)的表达盒,以及在I4L基因座处在p7.5启动子下编码m5-B07的轻链(SEQ ID NO:62)和在pSE/L启动子下编码鼠GM-CSF(SEQ ID NO:58)的表达盒。

[0460] • COPTG19421是一种痘苗病毒(哥本哈根株),其含有在J2R基因座处在p7.5启动子下编码m5-B07重链的表达盒,以及在I4L基因座处在p7.5启动子下编码m5-B07的轻链的表达盒。

[0461] • 用作基准的VVTG18058是在J2R和I4L基因中缺失而没有任何转基因(“空”病毒)的痘苗病毒(哥本哈根株)。

[0462] 按照实例6中所述的方法,至于人对应物,通过在J2R(TK)和然后I4L(RR)基因座的两次连续同源重组,生成这些痘苗病毒。量化m5-B07抗体和mGM-CSF的ELISA法与上述相似(实例6,4-E03和GM-CSF的“转基因表达”),不同之处在于:使用鼠CTLA4-Fc抗原捕获鼠抗体,并使用Quantikine ELISA试剂盒鼠GM-CSF(安迪系统)来量化mGM-CSF。还在各种细胞系(一种肉瘤:MCA205和两种结肠癌CT26和MC38)中评估了这些病毒的溶瘤活性,并且发现与VVTG18058相似,显示带有或不带有mGM-CSF的鼠抗体的载体化均不影响牛痘苗病毒的溶瘤能力(数据未示出)。

[0463] 方案:将CT26细胞(2×10^5个细胞)植入Balb/c小鼠(法国查尔斯河)的右侧腹。约

一周后,当肿瘤体积达到25-50mm^{3}时,将小鼠随机分为3组,每组20只动物(第1至3组)和10只动物的第4组。按照对于LoVo模型所述收集和处理肿瘤和血液,不同之处在于前3组在第1、4、8和10天收集,而第4组在第1天收集。

[0464] • 来自第1组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为1×10^{7}pfu/小鼠的VVTG18058。

[0465] • 来自第2组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为1×10^{7}pfu/小鼠的COPTG19407。

[0466] • 来自第3组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为1×10^{7}pfu/小鼠的COPTG19421。

[0467] • 来自第4组的小鼠在第0天接受腹膜内施用剂量为3mg/kg的m5-B07。

[0468] CT26模型中病毒复制的动力学:

[0469] 在CT26模型中,其中三次注射两种替代病毒(1×10^{7}pfu/注射),监测病毒复制并与在相同条件下注射的VVTG18058病毒复制进行比较。对于LoVo模型,图29中展示的结果显示,在每个时间点测得的病毒滴度的三个值的重大分散。然而,这三种病毒的滴度一直持续到10天,这表明这两种转基因至少在此时间窗口内不会影响病毒的清除或复制。在任何血样中均未检测到病毒感染颗粒(数据未示出)。

[0470] CT26模型中转基因表达的动力学

[0471] 像LoVo模型一样,转基因在肿瘤中的表达反映了病毒的复制。换句话说,在监测的10天中,在肿瘤中检测到恒定水平的m5-B07抗体(图30的A)和mGM-CSF(图30的B)。

[0472] 在单克隆抗体的情况下,COPTG19421或COPTG19407注射后达到的Cmax比单次腹膜内注射3mg/mL的m5-B07抗体所观察到的Cmax低约10倍(图30的A)。在血清中,与以3mg/kg注射m5-B07的情况相比,病毒处理后m5-B07的循环浓度低约100倍,差异更加明显(图31)。

[0473] 对于GM-CSF,只有通过COPTG19407进行的处理才能在CT26肿瘤中产生可测量的mGM-CSF浓度,表明测得的细胞因子具有重组来源,而不是内源来源。像在LoVo模型中一样,在肿瘤中测得的mGM-CSF浓度低于m5-B07(图30的B)。此外,由肿瘤产生的mGM-CSF在任何血清样品中均无法检测到,这可能是由于该分子的半衰期短,妨碍任何全身性积累。

[0474] 实例9:抗肿瘤活性研究

[0475] COPTG19347是在J2R和I4L基因中缺失并且编码识别鼠CTLA4抗原的完整鼠抗体(即m5-B07(重链和轻链)的痘苗病毒(哥本哈根株)。COPTG19421与COPTG19347均表达m5-B07,但在不同的启动子下:分别为p7.5K和pH5.R。在感染的细胞上清液中评估m5-B07的定量,达到在以MOI 10^{-1}感染的CT26中约1μg/mL至在以MOI 10^{-2}感染的MCA205细胞中约4μg/mL。对于mGM-CSF,在被COPTG19407感染的细胞的培养上清液中也观察到了MCA205相对于CT26的更高表达(数据未示出)。

[0476] 与抗PD1组合的小鼠携带CT26模型中的抗肿瘤活性

[0477] 方案:

[0478] 将CT26细胞(2×10^{5}个细胞)植入Balb/c小鼠(法国查尔斯河)的右侧腹。当肿瘤达到25-50mm^{3}的体积时,将小鼠随机分为五组,每组十只。简而言之,通过三次胸腔内施用(隔2天)病毒,随后一周两次腹膜内处理鼠抗PD1(RMP1-14BioXcell)持续三周,来处理小鼠。更具体地说,

[0479] • 来自第1组的小鼠接受媒剂;

[0480] • 来自第2组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用1×10^7pfu的COPTG19347;

[0481] • 来自第3组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用1×10^7pfu的COPTG19347并且在第7天、第11天、第14天、第18天和第22天接受腹膜内腹膜内施用250μg/小鼠的RMP1-14;

[0482] • 来自第4组的小鼠在第7天、第11天、第14天、第18天和第22天接受腹膜内施用250μg/小鼠的RMP1-14;

[0483] • 来自第5组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用1×10^7pfu的VVTG18058。

[0484] 一周两次用卡尺测量肿瘤尺寸,并使用公式(Π/6)(长×宽^2)计算其体积。当肿瘤体积达到2000mm^{3}时,对动物实施安乐死。

[0485] CT26模型中COPTG19347的抗肿瘤活性:

[0486] 如图32所示,COPTG19347处理不仅产生了肿瘤生长抑制(图32A),而且还产生了肿瘤消退,这最终转化为存活时间长达100天的无肿瘤小鼠(图32B)。用COPTG19347处理产生在第100天60%无肿瘤小鼠。与抗PD-1抗体共同处理并未显著改善肿瘤生长抑制或长时间存活小鼠的百分比(第100天时约70%无肿瘤小鼠)。相比之下,RPMI-14处理没有提供任何抗肿瘤作用(行为与未处理的小鼠相同(在前40天内全部死亡),而VVTG18058的活性较差(在第100天约10%无肿瘤小鼠)。

[0487] CT26模型中的剂量效应评估:

[0488] 比较了三种替代病毒(不同启动子驱动m5-B07以及是否带有m-GM-CSF)并且执行和了COPTG19407与VVTG18058的剂量递增(7.5×10^4、7.5×10^5或7.5×10^6pfu)。除了省略与抗PD1的共同处理以外,实验条件与上述条件完全相同。

[0489] 两项独立实验的结果清楚地表明,测试的三种病毒COPTG19407、COPTG19421和COPTG19347在7.5×10^6pfu的剂量下均具有强的抗肿瘤活性。这证实了在COPTG19407中编码的mGM-CSF,或者在COPTG19421和COPTG19407中使用最弱的启动子都不会损害武装病毒的抗肿瘤活性。在最高测试剂量下(即7.5×10^6pfu),在80天时无肿瘤小鼠的数量在5/10和7/10之间,具体取决于病毒和实验,而用空病毒处理的小鼠则为0/10,如下表所汇总。

[0490] 表6:在胸腔内注射后替代病毒COPTG19407、COPTG19421和COPTG19347对肿瘤生长的影响

[0491]

病毒名称	TK 基因座	RR 基因座	剂量(pfu)	第 100 天时无肿瘤小鼠的数量
COPTG19407	p7.5K -HC*	p7.5K -LC*; pSE/L-GM-CSF	7.5×10^6	7/10
COPTG19421	p7.5K -HC*	p7.5K -LC*	7.5×10^6	5/10
COPTG19347	pH5.R -HC*	pH5.R -LC*	7.5×10^6	7/10
VVTG18058	-	-	7.5×10^6	0/10
模拟物			-	0/10

[0493] *HC和LC分别表示m5-B07鼠抗mCTLA4抗体的重链和轻链

[0494] 此外,对“空”病毒(VVTG18058)和COPTG19384替代物(COPTG19407)进行的剂量递增表明,即使在相对低剂量(7.5×10^4pfu)下,表达病毒的抗体仍具有明显的抗肿瘤活性,其中在80-98天有4/10和2/10无肿瘤小鼠,而在相同的低剂量下用VVTG18058处理为0/10,如下表所示。

[0495] 表7:在胸腔内注射后COPTG19407或VVTG18058的剂量对肿瘤生长的影响

[0496]

病毒名称	TK 基因座	RR 基因座	剂量(pfu)	第 100 天时无肿瘤小鼠的数量
COPTG19407	p7.5K -HC*	p7.5K -LC*; pSE/L-GM-CSF	7.5×10^6	7/10
			7.5×10^5	8/10
			7.5×10^4	4/10
VVTG18058	-	-	7.5×10^6	0/10
			7.5×10^5	0/10
			7.5×10^4	0/10

[0497] *HC和LC分别表示m5-B07鼠抗mCTLA4抗体的重链和轻链

[0498] 存活率数据的汇编(由两项独立研究汇编的全球存活率图)呈现于图33中。使用对数秩检验进行了统计分析,以找出各组之间的存活率是否存在显著差异。

[0499] 与VVTG18058和m5-B07的组合相比,COPTG19407的抗肿瘤活性

[0500] 如先前所述(实例5)建立带有CT26肿瘤的小鼠。简而言之,将CT26细胞皮下注射到Balb/C小鼠中。当肿瘤达到约100mm^3时,开始小鼠的处理。然后在第0天、第2天和第5天向小鼠注射COPTG19407(8.5×10^6pfu,胸腔内)、VVTG18058(8.5×10^6pfu,胸腔内)、m5-B07(10mg/kg,腹膜内)或VVTG18058(8.5×10^6pfu,胸腔内)加上m5-B07(10mg/kg,腹膜内)的组合。然后一周两次测量肿瘤尺寸,并且当肿瘤达到2000mm^3时对小鼠实施安乐死。如图34的A至34的D所示,当用表达抗CTLA-4和GM-CSF的病毒COPTG19407处理小鼠时,肿瘤生长被显著抑制,而无武装病毒加上抗CTLA4 m5-B07的组合未导致与单药剂使用相比改善的治疗。在仅用m5-B07、仅用病毒VVTG18058或m5-B07和VVTG18058的组合处理的组中,在第70天后仅存活20%的小鼠(图34的E)。相反,施用COPTG19407后90%的小鼠存活超过100天,这表明了载体化策略的效力。

[0501] 在带有A20皮下鼠B细胞淋巴瘤的小鼠中VVTK-RR编码的抗CTLA-4和GM-CSF的抗肿瘤活性

[0502] A20细胞系是来源于老BALB/cAnN小鼠中发现的自发网状质细胞赘生物的BALB/cB细胞淋巴瘤(ATCC TIB-208™)。

[0503] 方案(1):

[0504] 通过将5×10^6的A20细胞皮下注射到雌性Balb/cN小鼠(法国查尔斯河)的右侧腹中来诱导肿瘤。当肿瘤的平均体积达到95mm^3时,将50只小鼠随机分为5组,每组十只动物。

[0505] • 来自第1组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用媒剂,

[0506] • 来自第2组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为4.75×10^6pfu的VVTG18058,

[0507] • 来自第3组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为4.75×10^6pfu的COPTG19407,

[0508] • 来自第4组的小鼠在第7天、第10天、第14天、第17天、第21天和第24天接受腹膜内施用剂量为250μg的抗PD-1抗体，

[0509] • 来自第5组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为4.75×10^6pfu的COPTG19407，连同在第7天、第10天、第14天、第17天、第21天和第24天接受腹膜内施用剂量为250μg的抗PD-1抗体。

[0510] 抗肿瘤活性：

[0511] 在整个研究过程中监测所有动物的肿瘤体积。治疗的抗肿瘤活性基于对肿瘤倍增时间、肿瘤生长延迟和肿瘤生长抑制(T/C％)的标准的评估。

[0512] 第1、2和4组的肿瘤倍增时间相似，范围从5.14天(第1组)到6.37天(第2组)。对于第3组，与第1、2和第4组相比，由于肿瘤没有按指数增长表明治疗效果增加，因此无法精确计算肿瘤倍增时间。类似地，第5组中只使用一只动物来计算肿瘤倍增时间。在第3组的10只小鼠中，有9只肿瘤在第15天消退，并且从第25天直到第64天研究结束，体积都未实质性生长。在第64天，这9只小鼠的肿瘤体积范围为4mm^3(肿瘤检测的技术极限)至59.77mm^3。类似地，在第5组中，开始治疗后，有9只小鼠的肿瘤消退，在第64天研究结束时，达到范围为7.24至63.21mm^3的值。从呈现每组治疗的个体肿瘤体积曲线的图35可以看出(第1至5组对应于图35的A至E)，在接受COPTG19407的第3组和第5组动物中，肿瘤并未生长，证实了具有或不具有抗PD1的表达抗体的病毒的强抗肿瘤活性。

[0513] 通过估计肿瘤达到平均目标体积300mm^3所花费的时间来计算肿瘤生长延迟。结果与通过肿瘤倍增时间获得的结果相似，因为只能针对达到目标体积300mm^3的肿瘤计算此参数，而第3组和第5组中的大多数动物却不是这种情况。第1、2和4组的平均肿瘤生长延迟分别为16、21和17天，彼此之间无显著差异。此外，第3组(n＝2)的平均肿瘤延迟为14天，这表明该组中确实生长的肿瘤以与第1、2和4组相同的速度生长，但是这些肿瘤实际上在动物中都消退。相比之下，第5组(n＝1)中生长的单个肿瘤的肿瘤生长延迟比所有其他组显著($p\leq0.0026$)长，为43天。

[0514] 通过比较媒剂处理的第1组与其他处理组的中值肿瘤体积来计算肿瘤生长抑制(T/C％)。第2组在第22天具有最佳T/C％，为34％，表明有短暂的边缘抗肿瘤活性，但到第31天，该值增加到71％。在第4组中观察到中等的抗肿瘤活性(10-30％ T/C％)。相比之下，第3和5组从第27天到第31天均显示出显著抗肿瘤活性(T/C％小于10％)(最后可计算的T/C％值)。

[0515] 图36示出携带皮下A20肿瘤的BALB/cN小鼠的平均肿瘤体积曲线，表明表达抗CTLA4和Gm-CSF的病毒COPTG19407在有或没有抗PD1的情况下对肿瘤生长的显著影响。

[0516] 方案(2)：

[0517] 通过将5×10^6的A20细胞皮下注射到雌性BALB/cN小鼠的右侧腹来诱导肿瘤。当肿瘤达到80-100mm^3的平均体积时，将90只动物随机分为9组，每组10只动物。

[0518] • 来自第1组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用媒剂

[0519] • 来自第2组的小鼠在第0天、第4天、第7天、第10天、第14天和第17天接受腹膜内施用剂量为250μg/小鼠/注射的抗PD-1抗体

[0520] • 来自第3组的小鼠在第0天、第4天、第7天、第10天、第14天和第17天接受腹膜内施用剂量为250μg/小鼠/注射的同种型

[0521] • 来自第4组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为1×10^5pfu的VVTG18058

[0522] • 来自第5组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为1×10^5pfu的VVTG18058,并且在第0天、第4天、第7天、第10天、第14天和第17天接受腹膜内施用剂量为250μg/小鼠/注射的同种型

[0523] • 来自第6组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为1×10^5pfu的VVTG18058,并且在第0天、第4天、第7天、第10天、第14天和第17天接受腹膜内施用剂量为250μg/小鼠/注射的抗PD-1抗体

[0524] • 来自第7组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为1×10^5pfu的COPTG19407

[0525] • 来自第8组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为1×10^5pfu的COPTG19407,连同在第0天、第4天、第7天、第10天、第14天、第17天和第24天接受腹膜内施用剂量为250μg/小鼠/注射的同种型。

[0526] • 来自第9组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为1×10^5pfu的COPTG19407,连同在第0天、第4天、第7天、第10天、第14天和第17天接受腹膜内施用剂量为250μg/小鼠/注射的抗PD-1抗体。

[0527] 抗肿瘤活性:

[0528] COPTG19407剂量次优,并且在肿瘤体积和小鼠存活率方面均展示出与抗PD-1处理相似的轻度抗肿瘤活性。

[0529] 相反,COPTG19407与抗PD-1的组合显示出强抗肿瘤活性,与其他组相比,肿瘤体积小,如图37的A所示(与分别接受单独的抗PD-1或单独的COPTG19407的小鼠在第24天为约630mm^3和750mm^3相比,在第36天约为290mm^3),并且动物的存活率好得多,如图37的B所呈现(在第9组中,在第57天有7只动物活着,而在第2或第7组中分别只有两只或一只)。

[0530] 在携带C38皮下结肠肿瘤细胞的小鼠中VVTK-RR-编码的抗CTLA-4和GM-CSF的抗肿瘤活性研究

[0531] C38是来源于美国标准生物品收藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC CRL-2779™)的鼠结肠腺癌。

[0532] 方案:

[0533] 将肿瘤碎片(30-50mg)皮下植入雌性C57BL/6J小鼠(法国Janvier)的右侧腹。当肿瘤的平均体积达到约60mm3时,将50只动物随机分为五组,每组十只。

[0534] • 来自第1组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用媒剂,

[0535] • 来自第2组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为4.75×10^6pfu的VVTG18058,

[0536] • 来自第3组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为4.75×10^6pfu的COPTG19407,

[0537] • 来自第4组的小鼠在第7天、第10天、第14天、第17天、第21天和第24天接受腹膜内施用剂量为250μg的鼠抗PD-1抗体,

[0538] • 来自第5组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为4.75×10^6pfu的COPTG19407,连同在第7天、第10天、第14天、第17天、第21天和第24天接受腹膜内施用剂

量为250μg的抗PD-1抗体。

[0539] 抗肿瘤活性：

[0540] 如前，在整个研究过程中监测所有动物的肿瘤体积。第1组和第2组的肿瘤倍增时间相似，约为6.7天。第4组(n＝5)的肿瘤倍增时间较长(10.4天)，但各组之间无显著差异。对于第3组和第5组，肿瘤倍增时间是可计算的，但动物数量较少(n＝2)，因为与第1、2和4组相比，这些组中小鼠的大部分肿瘤并未按指数增长，表明治疗功效增加。从图38可以看出，在第3组的10只小鼠中，有8只肿瘤从第15天消退，并且体积没有实质性生长，且在第61天研究结束时，有五只小鼠没有可检测到的肿瘤。类似地，在第5组中，在开始治疗后，有8只小鼠的肿瘤消退，在第61天研究结束时，达到范围为0(n＝2)到47.82mm^3的值。

[0541] 通过估计肿瘤达到平均目标体积300mm^3所花费的时间来计算肿瘤生长延迟。结果与通过肿瘤倍增时间获得的结果相似，因为只能针对达到目标体积300mm^3的肿瘤计算此参数，而第3组和第5组中的大多数动物却不是这种情况。各组之间无显著差异。第1、2和4组(n＝5)的平均肿瘤生长延迟分别为23至27天。此外，第3组(n＝2)和第5组(n＝3)的平均生长延迟分别为18天和24天。这表明在这两组中确实生长的肿瘤以与第1、2和4组中相似的速率生长。

[0542] 通过比较媒剂处理的第1组与其他处理组的中值肿瘤体积来计算肿瘤生长抑制(T/C％)。第2组未显示任何肿瘤生长抑制，因为在研究的持续期间，T/C％保持高于100％。相比之下，第3、4和5组从第31天(仅第3组)到第42天都显示出显著的抗肿瘤活性(T/C％小于10％)(最后可计算的T/C％值)。

[0543] 图39示出了带有皮下C38肿瘤的C57BL/6小鼠的平均肿瘤体积曲线，表明表达抗CTLA4/GM-CSF的病毒COPTG19407在有或没有抗PD1的情况下对肿瘤生长的显著影响。

[0544] 在携带EMT6皮下乳腺肿瘤细胞的小鼠中VVTK-RR-编码的抗CTLA-4和GM-CSF的抗肿瘤活性研究

[0545] EMT6是来源于ATTC(ATCC CRL-2755™)的鼠乳腺癌。

[0546] 方案：

[0547] 通过在雌性BALB/cByJ小鼠(法国查尔斯河)中皮下注射1×10^6EMT6细胞来诱导肿瘤。当肿瘤的平均体积达到约51mm^3时，将五十只小鼠按个体肿瘤体积随机分为五组，每组十只。

[0548] • 来自第1组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用媒剂，

[0549] • 来自第2组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为4.75×10^6pfu的VVTG18058，

[0550] • 来自第3组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为4.75×10^6pfu的COPTG19407，

[0551] • 来自第4组的小鼠在第7天、第10天、第14天、第17天、第21天和第24天接受腹膜内施用剂量为250μg的抗PD-1抗体，

[0552] • 来自第5组的小鼠在第0天、第2天和第4天接受胸腔内施用剂量为4.75×10^6pfu的COPTG19407，连同在第7天、第10天、第14天、第17天、第21天和第24天接受腹膜内施用剂量为250μg的抗PD-1抗体。

[0553] 在整个研究中，通过评估肿瘤倍增时间、肿瘤生长延迟和肿瘤生长抑制(T/C％)的

标准来监测所有动物的肿瘤体积。

[0554] 抗肿瘤活性：

[0555] 第1、2和4组的肿瘤倍增时间相似，约为5.4天。对于第3组，无法计算肿瘤加倍时间，因为与第1、2和4组相比，大多数肿瘤并未按指数生长，表明治疗功效增加。在第5组中观察到类似的效果，其中仅一只动物用于计算肿瘤倍增时间。从个体肿瘤体积的图上可以看出(图40)，在第3组的10只小鼠中，有8只肿瘤从第15天消退，并且体积没有实质性生长，且在第61天研究结束时，有七只小鼠没有可检测到的肿瘤。类似地，在第5组中，在开始治疗后，有9只小鼠的肿瘤消退，在第56天研究结束时，达到范围为0(n＝8)到13.24mm^3的值。

[0556] 通过估计肿瘤达到平均目标体积200mm^3所花费的时间来计算肿瘤生长延迟。结果与通过肿瘤倍增时间获得的结果相似，因为只能针对达到目标体积200mm^3的肿瘤计算此参数，而第3组和第5组中的大多数动物却不是这种情况。第1、2和4组的平均肿瘤生长延迟约为19天。此外，第3和5组(两组均n＝2)的平均生长延迟分别为24天和12天。这表明在这两组中确实生长的肿瘤以与第1、2和4组中相似的速率生长。各组之间无显著差异。

[0557] 通过比较媒剂处理的第1组与其他处理组的中值肿瘤体积来计算肿瘤生长抑制(T/C％)。第2组在第28天显示短暂的边缘性肿瘤生长抑制，但在第31天增加至79％。第4组未显示抗肿瘤活性，在研究的持续期间T/C％>60％。相比之下，第3和5组从第24天到第31天均显示出显著抗肿瘤活性(T/C％小于10％)(最后可计算的T/C％值)。

[0558] 图41示出了携带皮下EMT6肿瘤的BALB/cByJ小鼠的平均肿瘤体积曲线，表明表达抗CTLA4/GM-CSF的病毒COPTG19407在有或没有抗PD1的情况下对肿瘤生长的显著影响。

[0559] CT26再攻击

[0560] 在用10^4、10^5或10^6pfu的COPTG19421或者10^6pfu的COPTG19407处理存活的用CT26肿瘤细胞攻击的Balb/c小鼠用与CT26肿瘤细胞再攻击或用RENCA细胞(肾腺癌细胞:对照)攻击，以便研究是否提高特异性抗肿瘤免疫反应。

[0561] 表8:用CT26肿瘤细胞再攻击或用Renca肿瘤细胞攻击对无肿瘤小鼠数量的影响

[0562]

组	无肿瘤/小鼠总数
CT26对照天然	0/5
VVTG18058 10^5+CT26再攻击	0/1
COPTG19421 10^6+CT26再攻击	3/3
COPTG19421 10^6+RenCa攻击	0/2
COPTG19407 10^4+CT26再攻击	1/1
COPTG19407 10^4+RenCa攻击	0/1
COPTG19407 10^5+CT26再攻击	1/2
COPTG19407 10^5+RenCa攻击	0/2
COPTG19407 10^6+CT26再攻击	2/4
COPTG19407 10^6+RenCa攻击	0/3

[0563] 表8中呈现的结果显示，在RenCa攻击后接受COPTG19421或COPTG19407的0/8小鼠无肿瘤，而在CT26再攻击后接受COPTG19421或C OPTG19407的7/10小鼠无肿瘤。这表明COPTG19421和COPTG19407提高了针对CT26细胞的特异性免疫记忆。

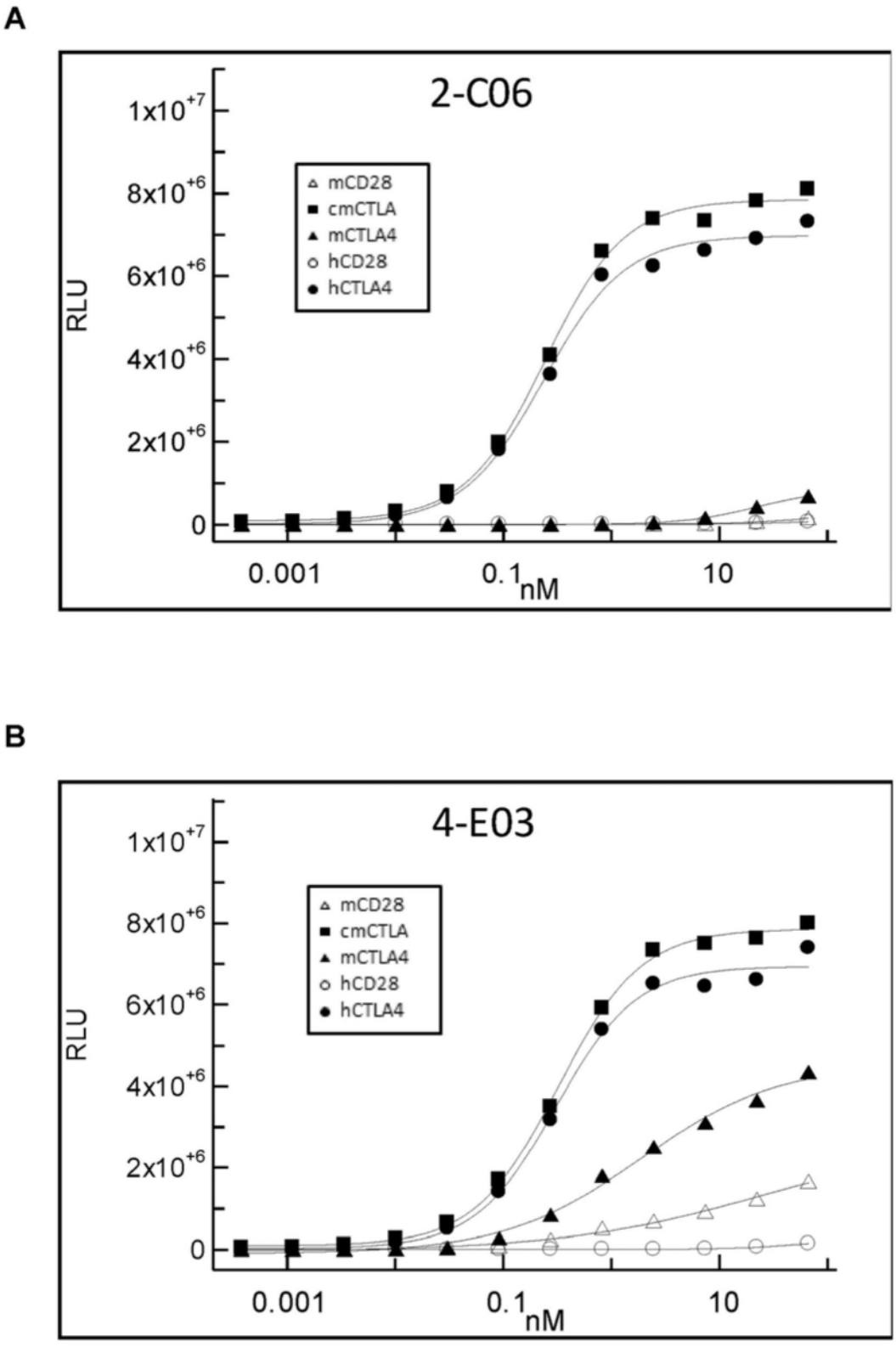
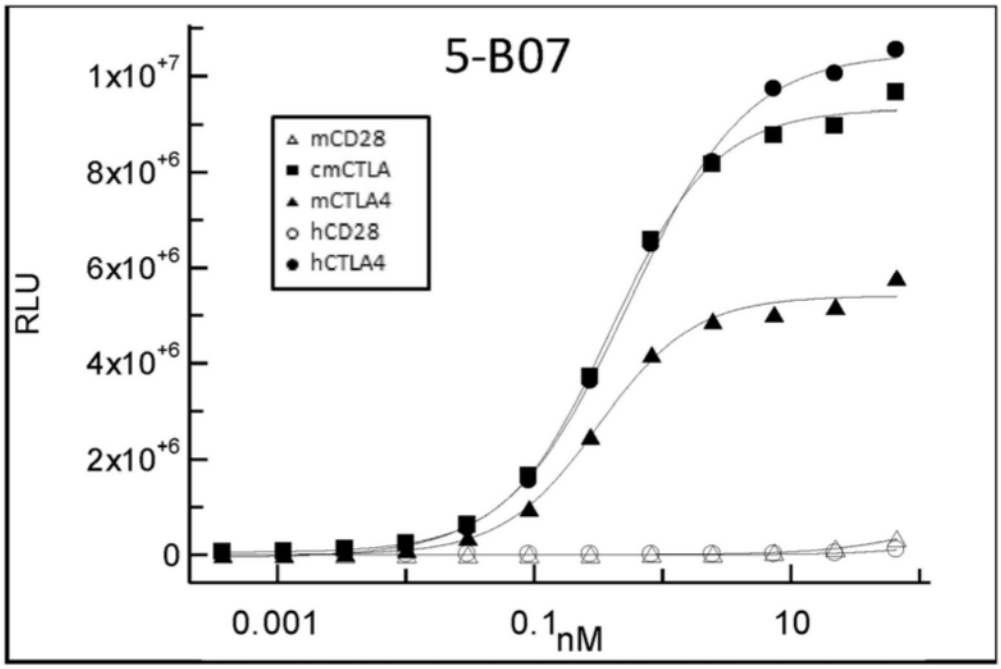

A
2-C06
RLU
1x10+7
8x10+6
6x10+6
4x10+6
2x10+6
0
mCD28
cmCTLA
mCTLA4
hCD28
hCTLA4
0.001
0.1
nM
10
B
4-E03
RLU
1x10+7
8x10+6
6x10+6
4x10+6
2x10+6
0
mCD28
cmCTLA
mCTLA4
hCD28
hCTLA4
0.001
0.1
nM
10

图1

C


5-B07
RLU
1x10+7
8x10+6
6x10+6
4x10+6
2x10+6
0
mCD28
cmCTLA
mCTLA4
hCD28
hCTLA4
0.001
0.1nM
10

D

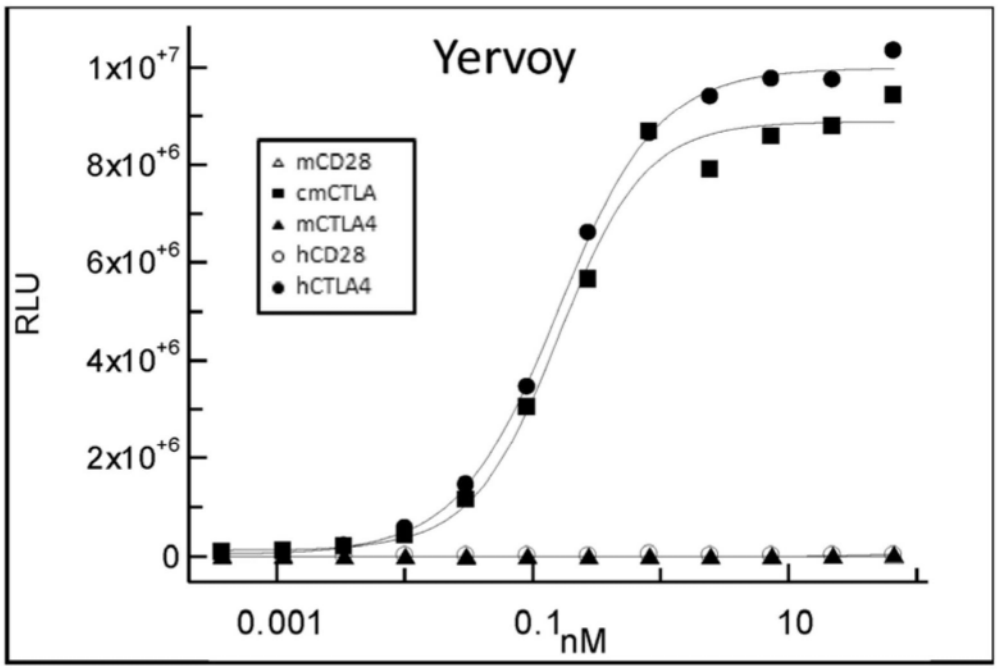

Yervoy
RLU
1x10+7
8x10+6
6x10+6
4x10+6
2x10+6
0
mCD28
cmCTLA
mCTLA4
hCD28
hCTLA4
0.001
0.1nM
10

图1续

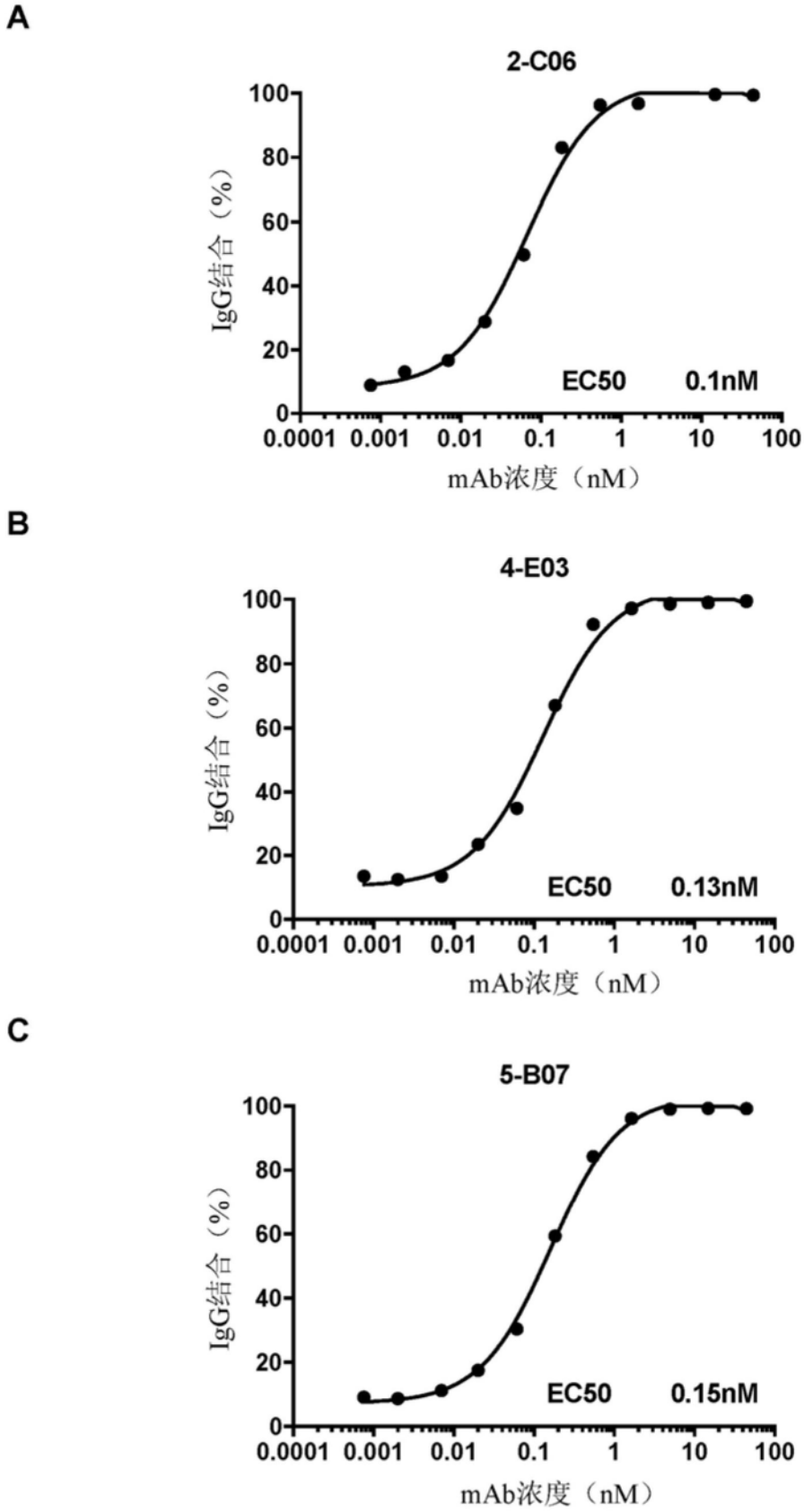
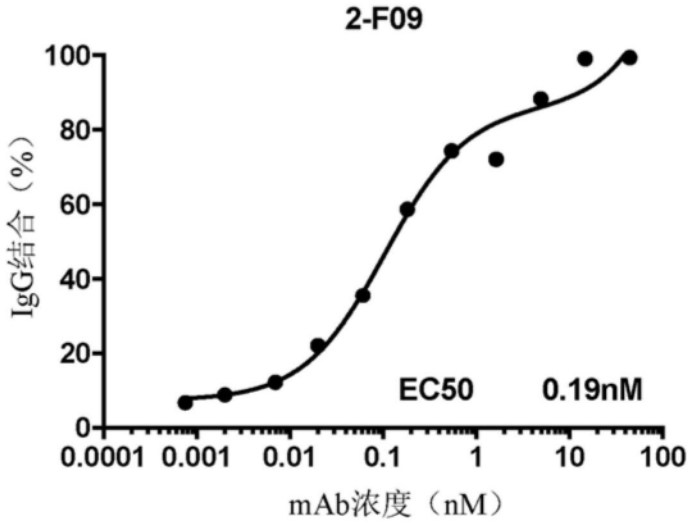

A
2-C06
IgG结合（%）
100
80
60
40
20
0
EC50 0.1nM
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
mAb浓度（nM）
B
4-E03
IgG结合（%）
EC50 0.13nM
mAb浓度（nM）
C
5-B07
IgG结合（%）
EC50 0.15nM
mAb浓度（nM）

图2

D


2-F09
IgG结合（%）
100
80
60
40
20
0
EC50 0.19nM
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
mAb浓度（nM）

E

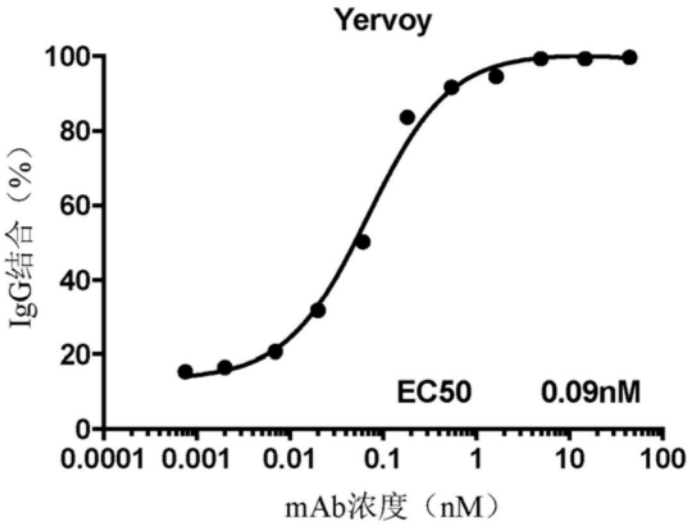

Yervoy
IgG结合（%）
100
80
60
40
20
0
EC50 0.09nM
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
mAb浓度（nM）

图2续

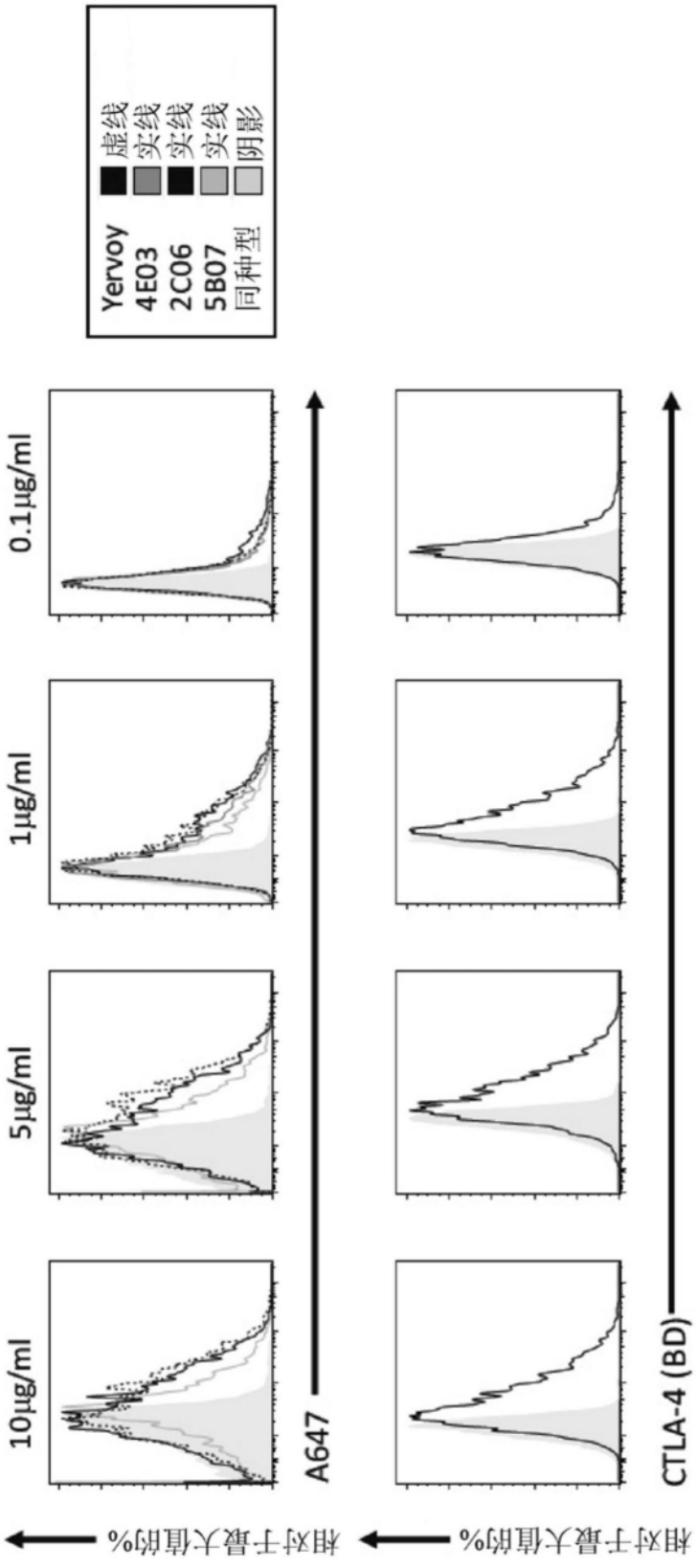

Yervoy
4E03
2C06
5B07
同种型
虚线
实线
实线
实线
阴影
0.1μg/ml
1μg/ml
5μg/ml
10μg/ml
A647
CTLA-4 (BD)
相对于最大值的%
相对于最大值的%

图3

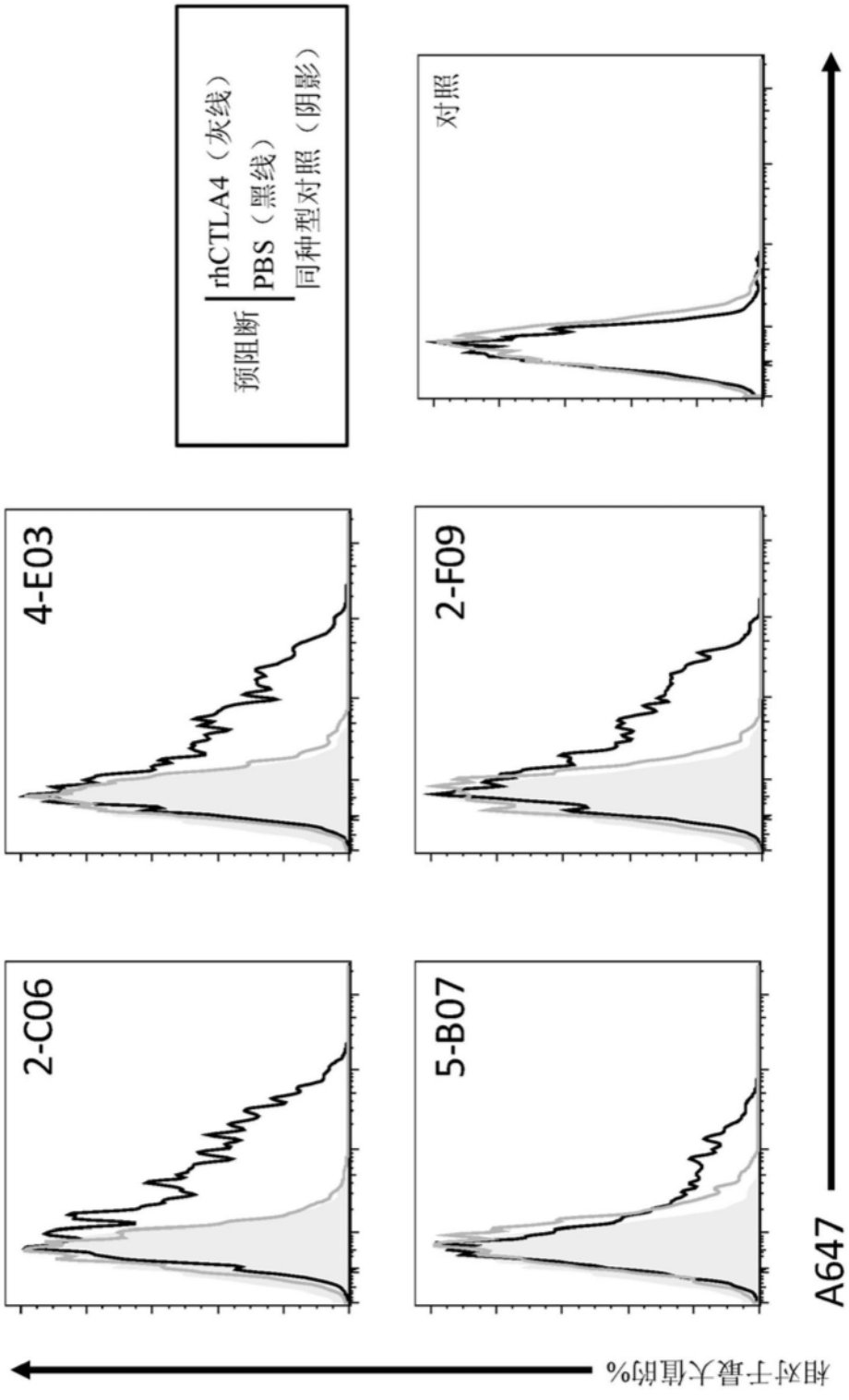

预阻断
rhCTLA4（灰线）
PBS（黑线）
同种型对照（阴影）
对照
4-E03
2-F09
2-C06
5-B07
相对于最大值的%
A647

图4

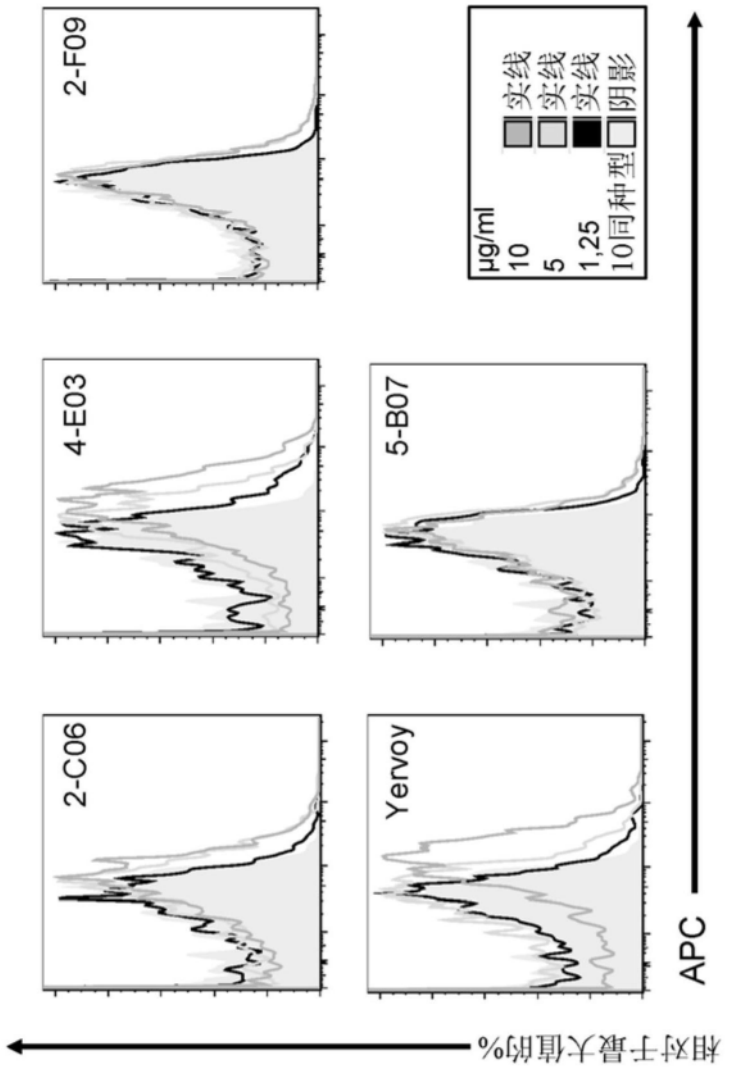

2-F09
4-E03
5-B07
2-C06
Yervoy
μg/ml
10
5
1,25
10同种型
实线
实线
实线
阴影
APC
相对于最大值的%

图5

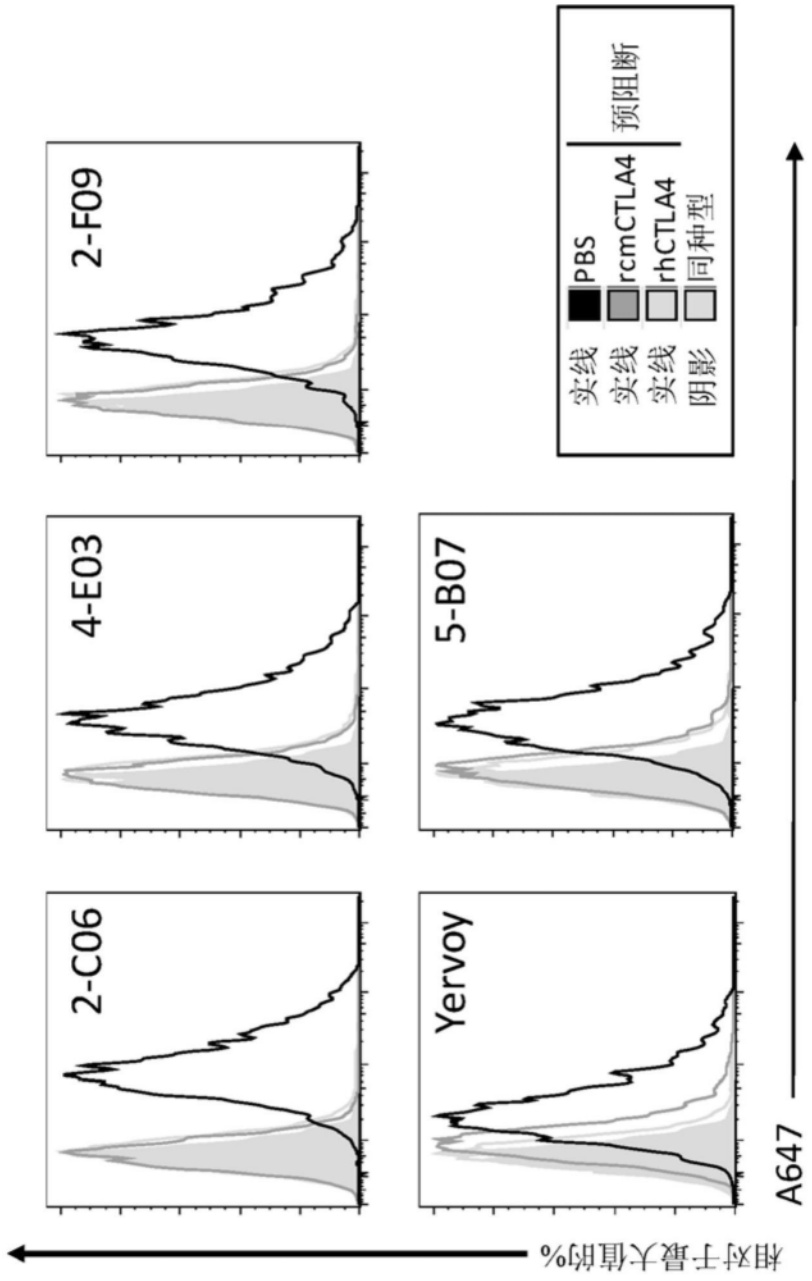

2-F09
4-E03
5-B07
2-C06
Yervoy
PBS
rcmCTLA4
rhCTLA4
同种型
预阻断
实线
实线
实线
阴影
A647
相对于最大值的%

图6

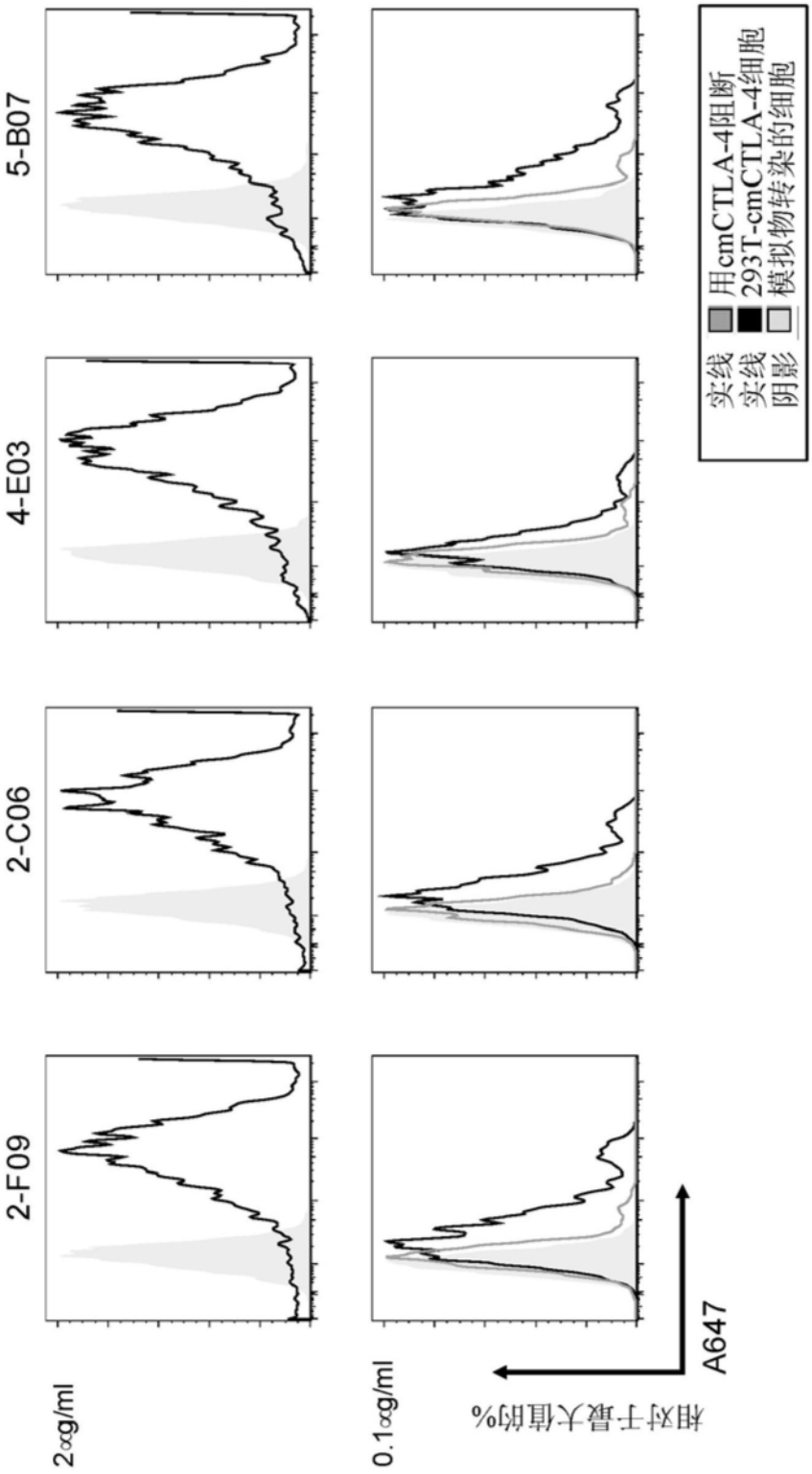

2-F09
2-C06
4-E03
5-B07
2∝g/ml
0.1∝g/ml
相对于最大值的%
A647
实线 用cmCTLA-4阻断
实线 293T-cmCTLA-4细胞
阴影 模拟物转染的细胞

图7

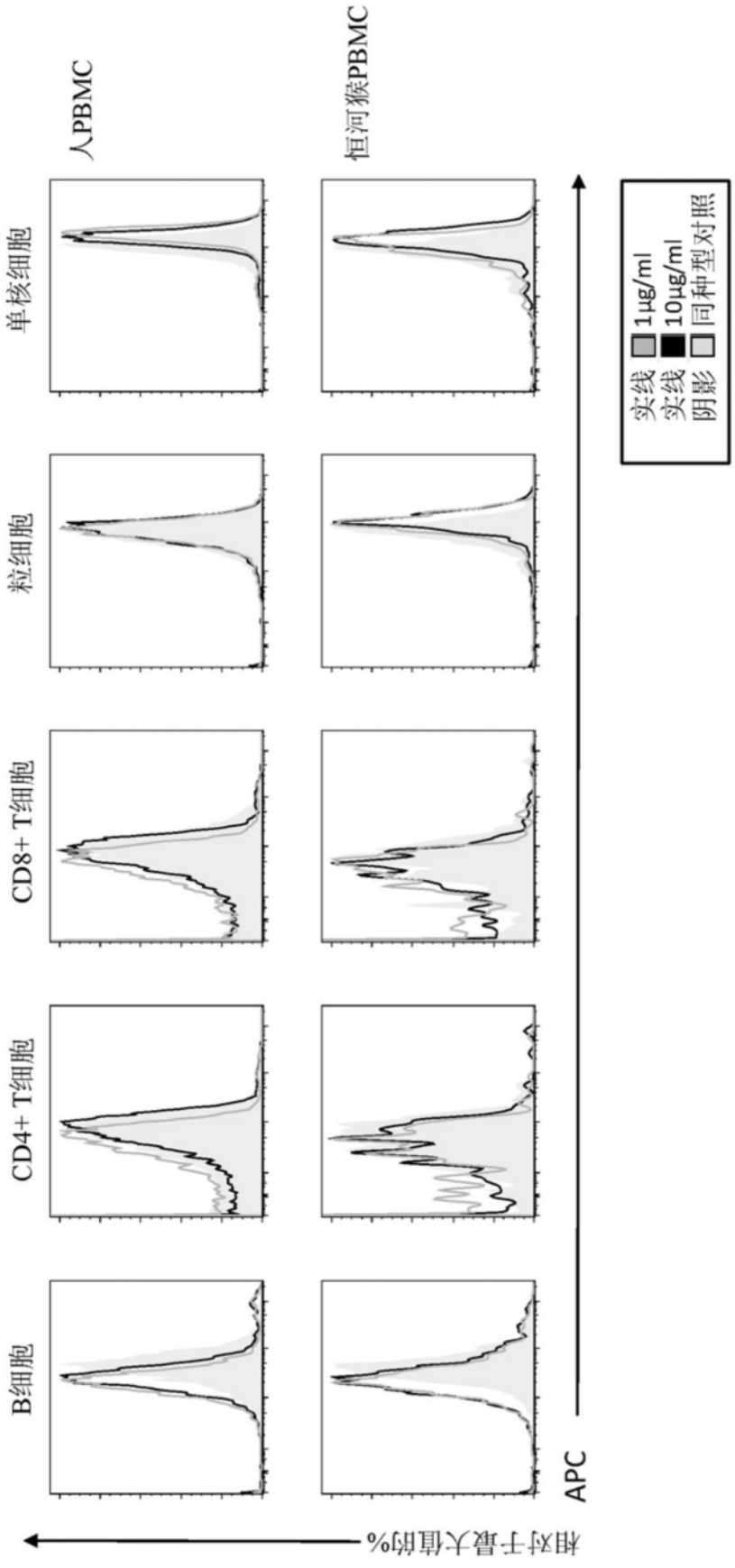

人PBMC
恒河猴PBMC
单核细胞
粒细胞
CD8+ T细胞
CD4+ T细胞
B细胞
实线 1μg/ml
实线 10μg/ml
阴影 同种型对照
APC
相对于最大值的%

图8

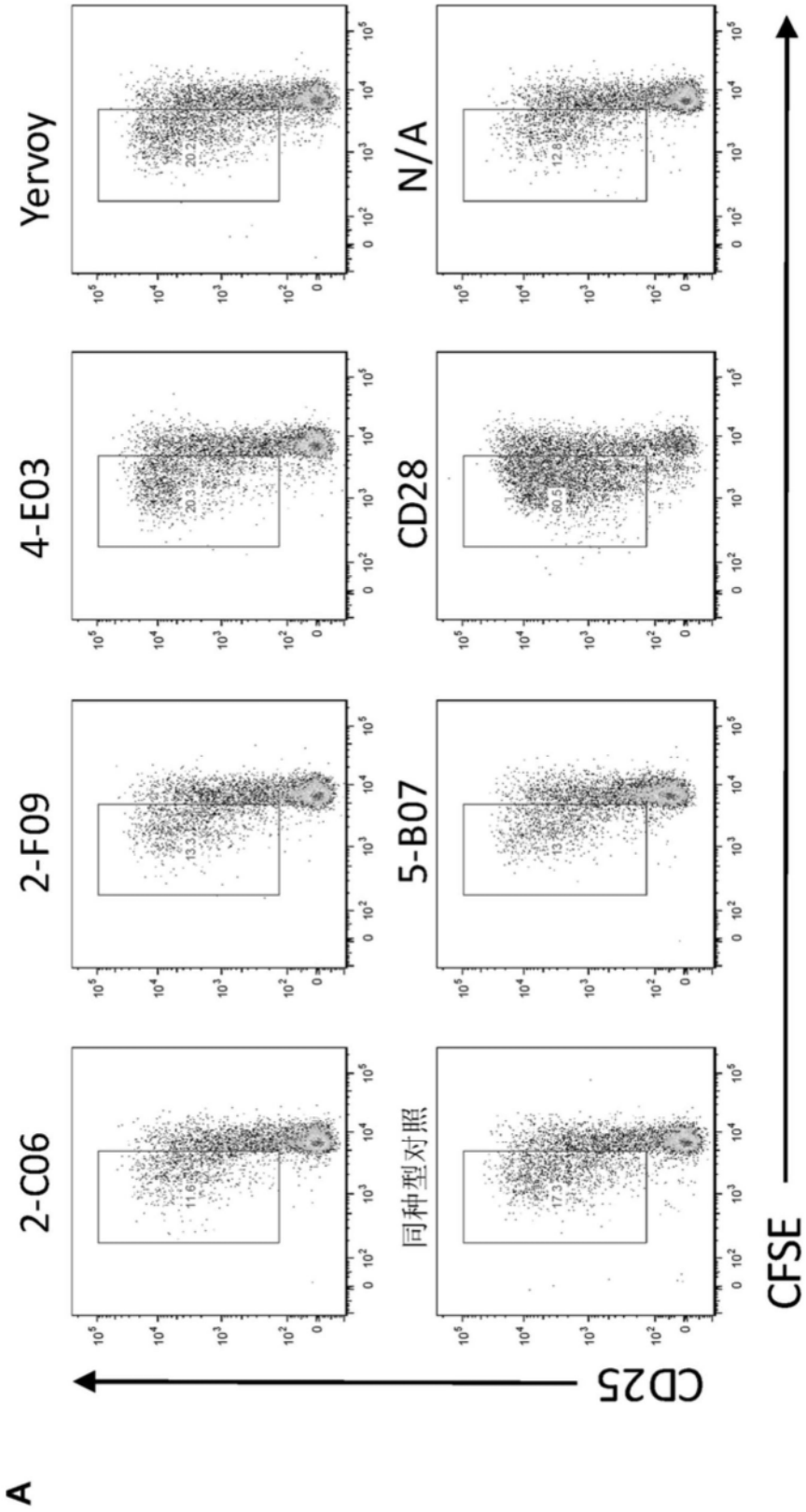

A
CD25
CFSE
2-C06
2-F09
4-E03
Yervoy
同种型对照
5-B07
CD28
N/A
11.6
13.3
20.3
20.2
17.3
13
60.5
12.8

图9

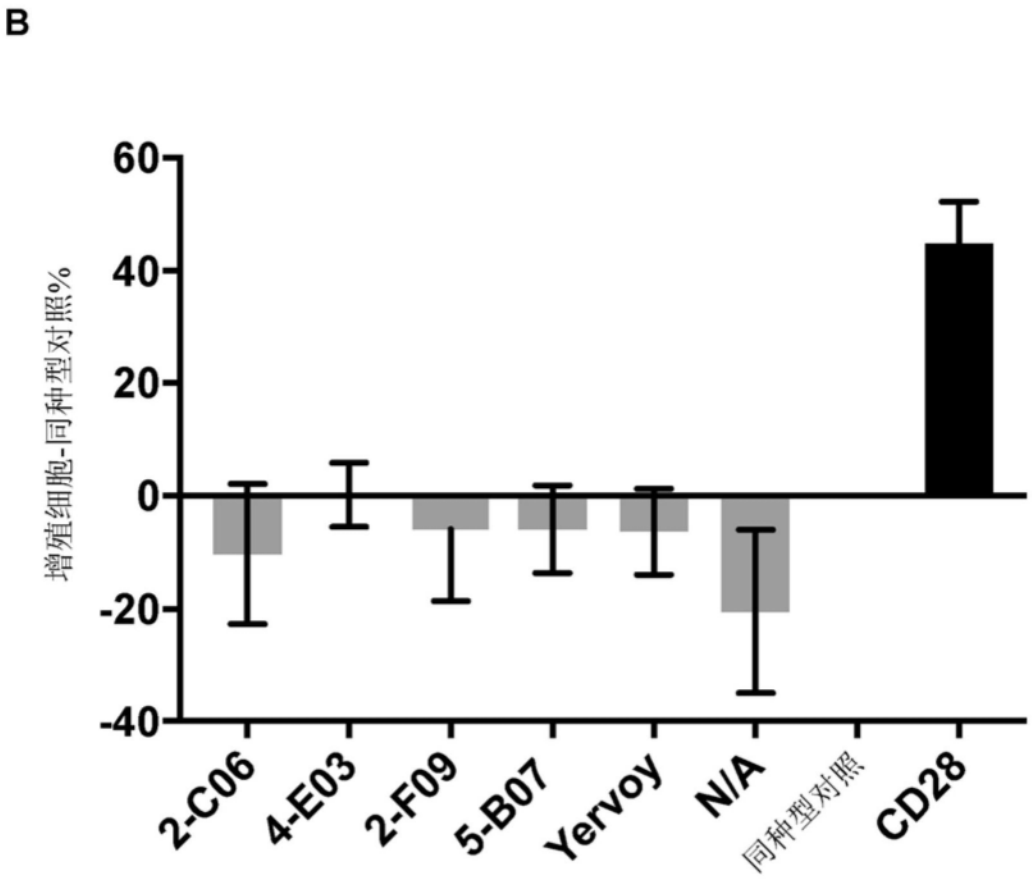

B
增殖细胞-同种型对照%
60
40
20
0
-20
-40
2-C06
4-E03
2-F09
5-B07
Yervoy
N/A
同种型对照
CD28

图9续

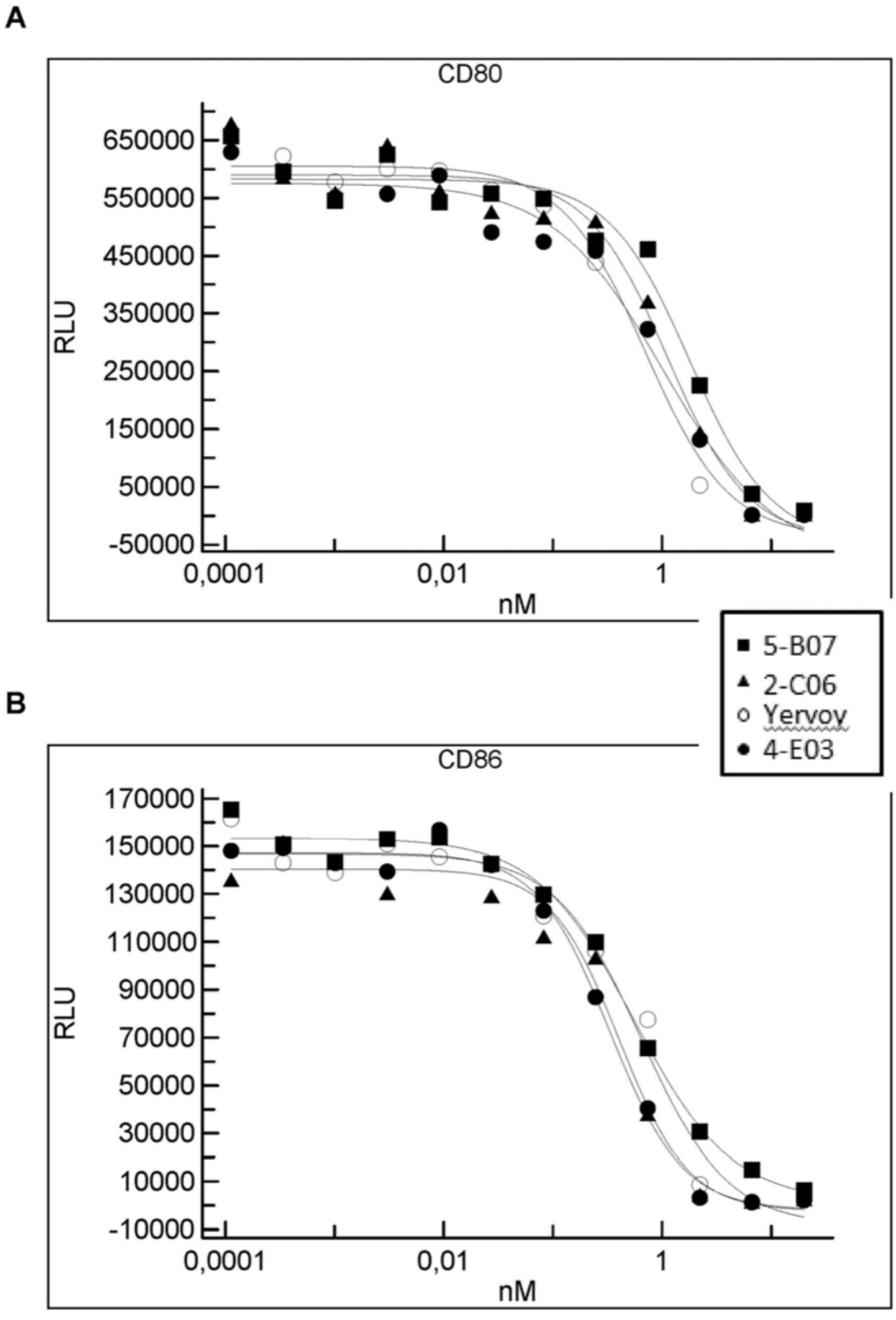

A
CD80
650000
550000
450000
350000
250000
150000
50000
-50000
RLU
0,0001
0,01
1
nM
5-B07
2-C06
Yervoy
4-E03
B
CD86
170000
150000
130000
110000
90000
70000
50000
30000
10000
-10000
RLU
0,0001
0,01
1
nM

图10

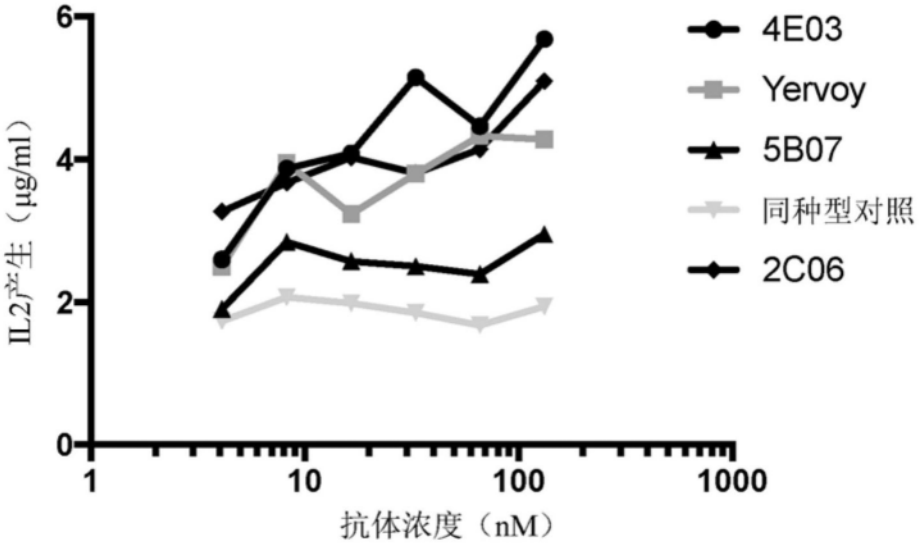

6
4
2
0
1
10
100
1000
IL2产生（μg/ml）
抗体浓度（nM）
4E03
Yervoy
5B07
同种型对照
2C06

图11

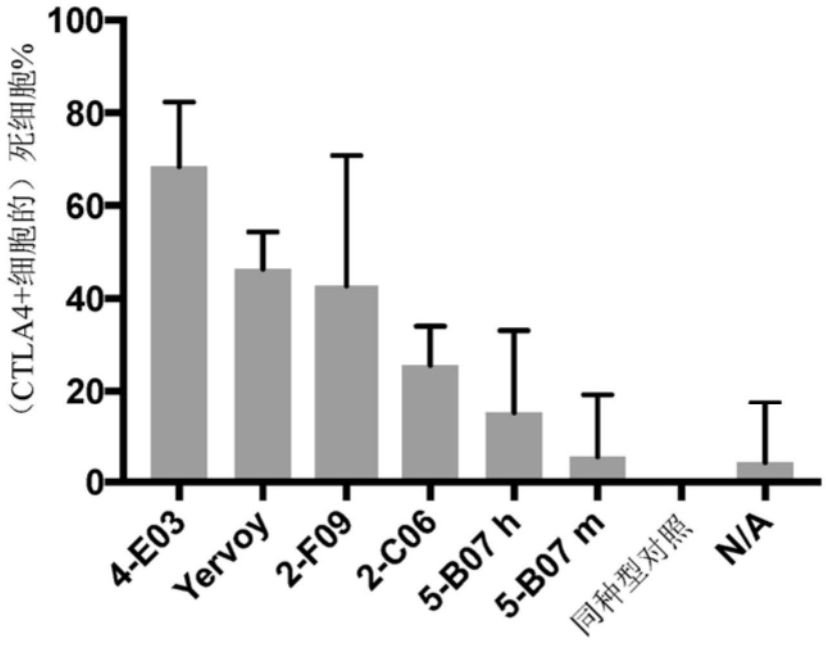

100
80
60
40
20
0
（CTLA4+细胞的）死细胞%
4-E03
Yervoy
2-F09
2-C06
5-B07 h
5-B07 m
同种型对照
N/A

图12

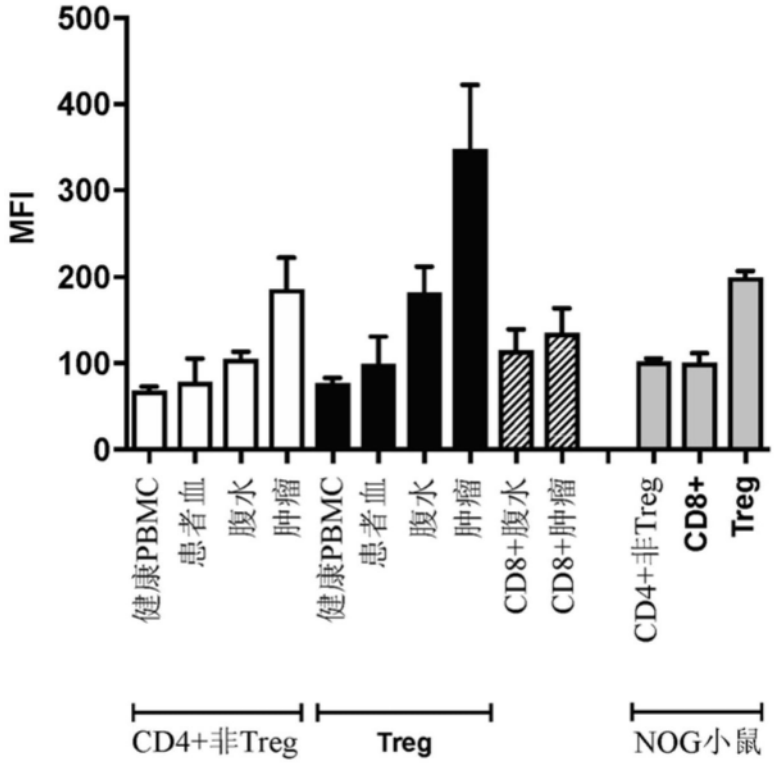

500
400
300
200
100
0
MFI
健康PBMC
患者血
腹水
肿瘤
健康PBMC
患者血
腹水
肿瘤
CD8+腹水
CD8+肿瘤
CD4+非Treg
CD8+
Treg
CD4+非Treg
Treg
NOG小鼠

图13

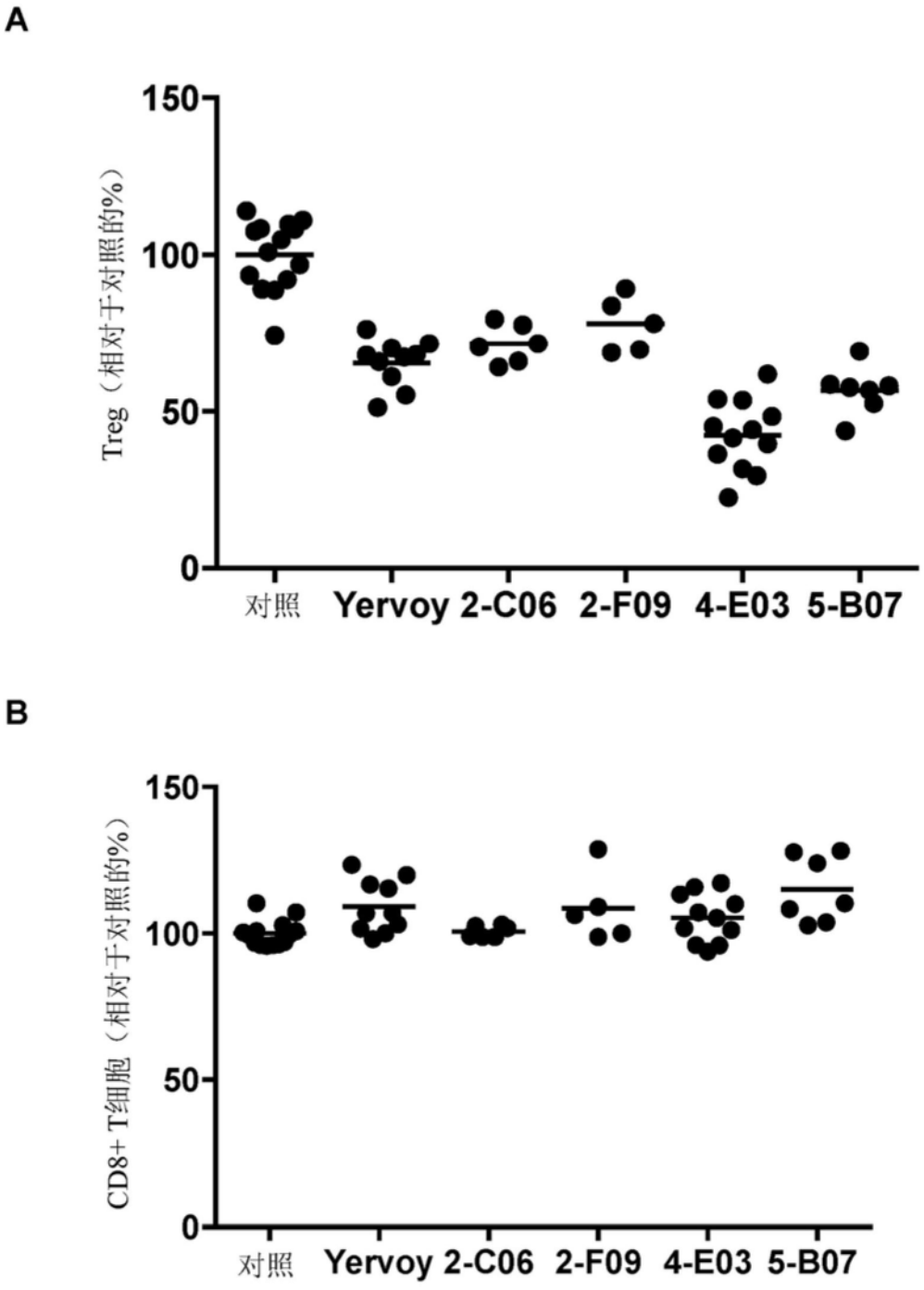

A
150
100
50
0
Treg（相对于对照的%）
对照
Yervoy
2-C06
2-F09
4-E03
5-B07
B
150
100
50
0
CD8+ T细胞（相对于对照的%）
对照
Yervoy
2-C06
2-F09
4-E03
5-B07

图14

克隆	细胞结合 EC50	恒河猴细胞结合	结合被cm蛋白阻断	蛋白结合					阻断			ADCC (CTLA4+的%)
				hCTLA4	hCD28	cmCTLA4	mCTLA4	mCD28	hCD80	hCD86	mCD80	mCD86	
002-C06	0.2	弱	是	0.2	未结合	0.2	未结合	未结合	完全	完全	N/A	N/A	25.6
004-E03	0.1	是	是	0.3	未结合	0.2	3.1	7.1	完全	完全	N/A	N/A	68.5
002-F09	0.19	否	是	0.3	未结合	0.2	未结合	未结合	完全	完全	N/A	N/A	42.8
5-B07	0.15	否	是	0.5	未结合	0.4	0.3	未结合	完全	完全	N/A	N/A	15.1
Yervoy	0.13	是	是	0.2	未结合	0.2	未结合	未结合	完全	完全	N/A	N/A	46.3

图15

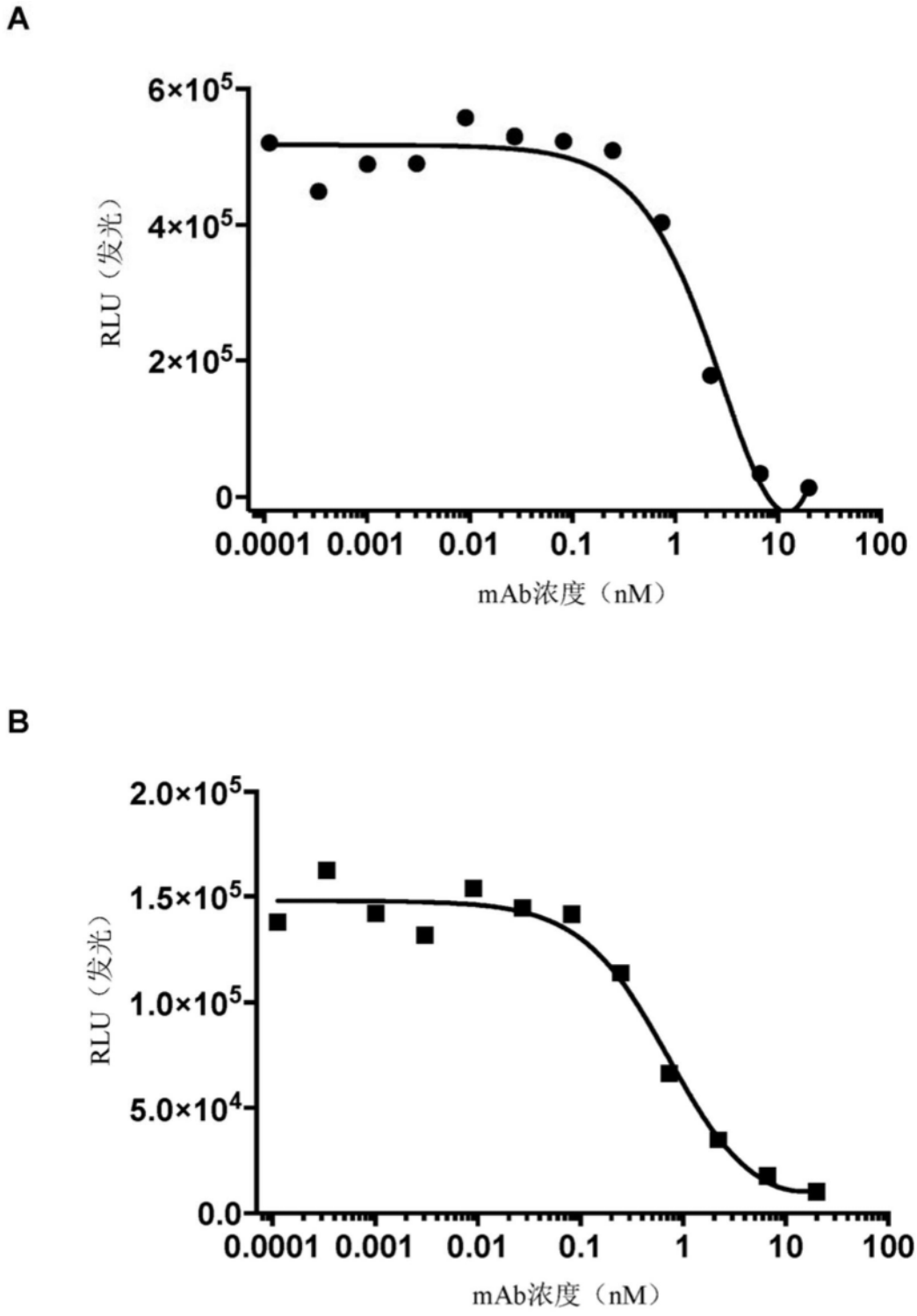

A
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
RLU（发光）
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
mAb浓度（nM）
B
2.0×10^5
1.5×10^5
1.0×10^5
5.0×10^4
0.0
RLU（发光）
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
mAb浓度（nM）

图16

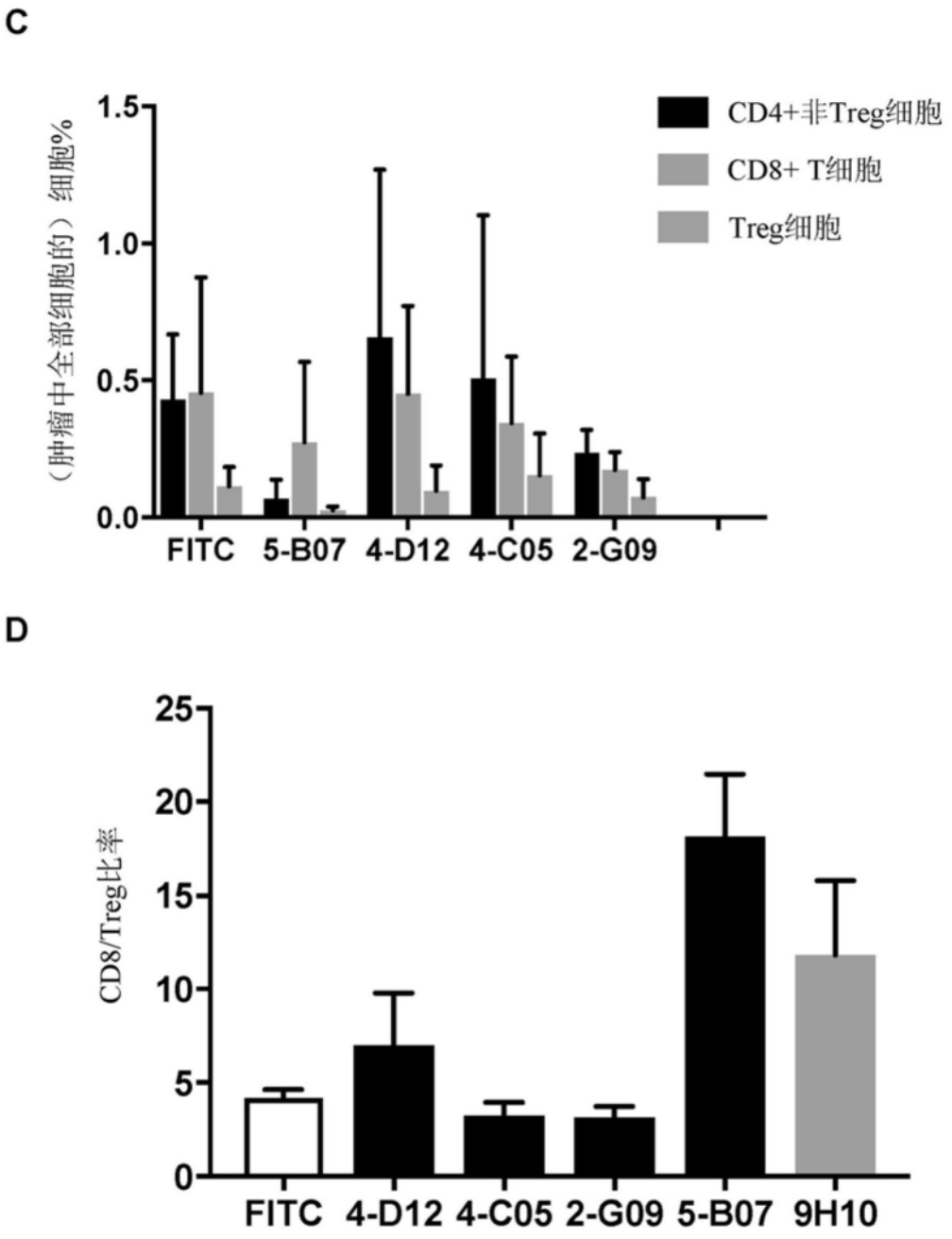

C
1.5
1.0
0.5
0.0
（肿瘤中全部细胞的）细胞%
CD4+非Treg细胞
CD8+ T细胞
Treg细胞
FITC
5-B07
4-D12
4-C05
2-G09
D
25
20
15
10
5
0
CD8/Treg比率
FITC
4-D12
4-C05
2-G09
5-B07
9H10

图16续

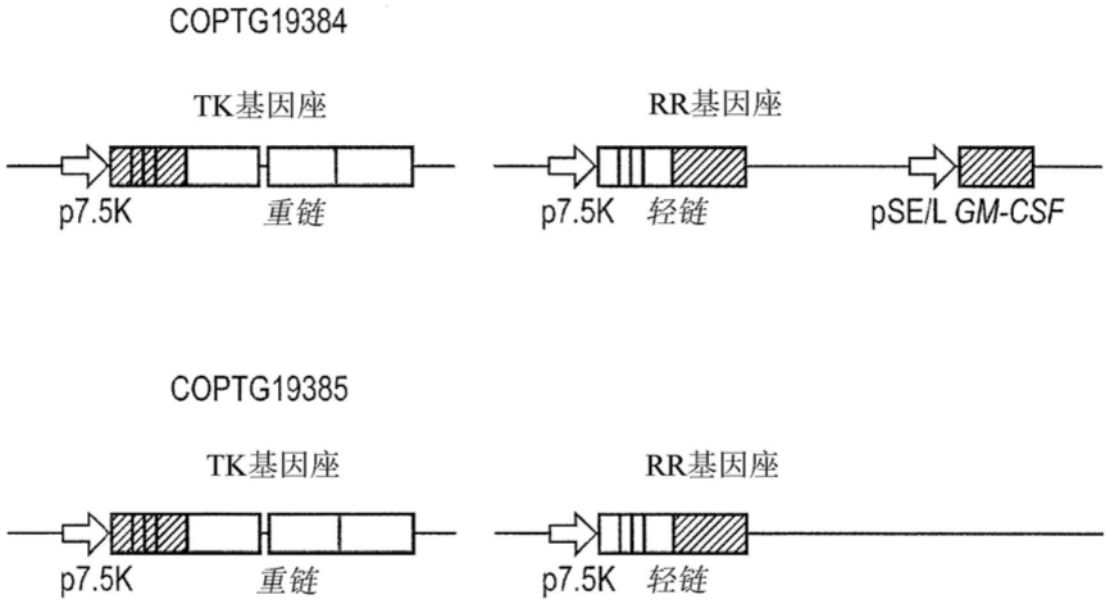

COPTG19384
TK基因座
RR基因座
p7.5K
重链
p7.5K
轻链
pSE/L GM-CSF
COPTG19385
TK基因座
RR基因座
p7.5K
重链
p7.5K
轻链

图17

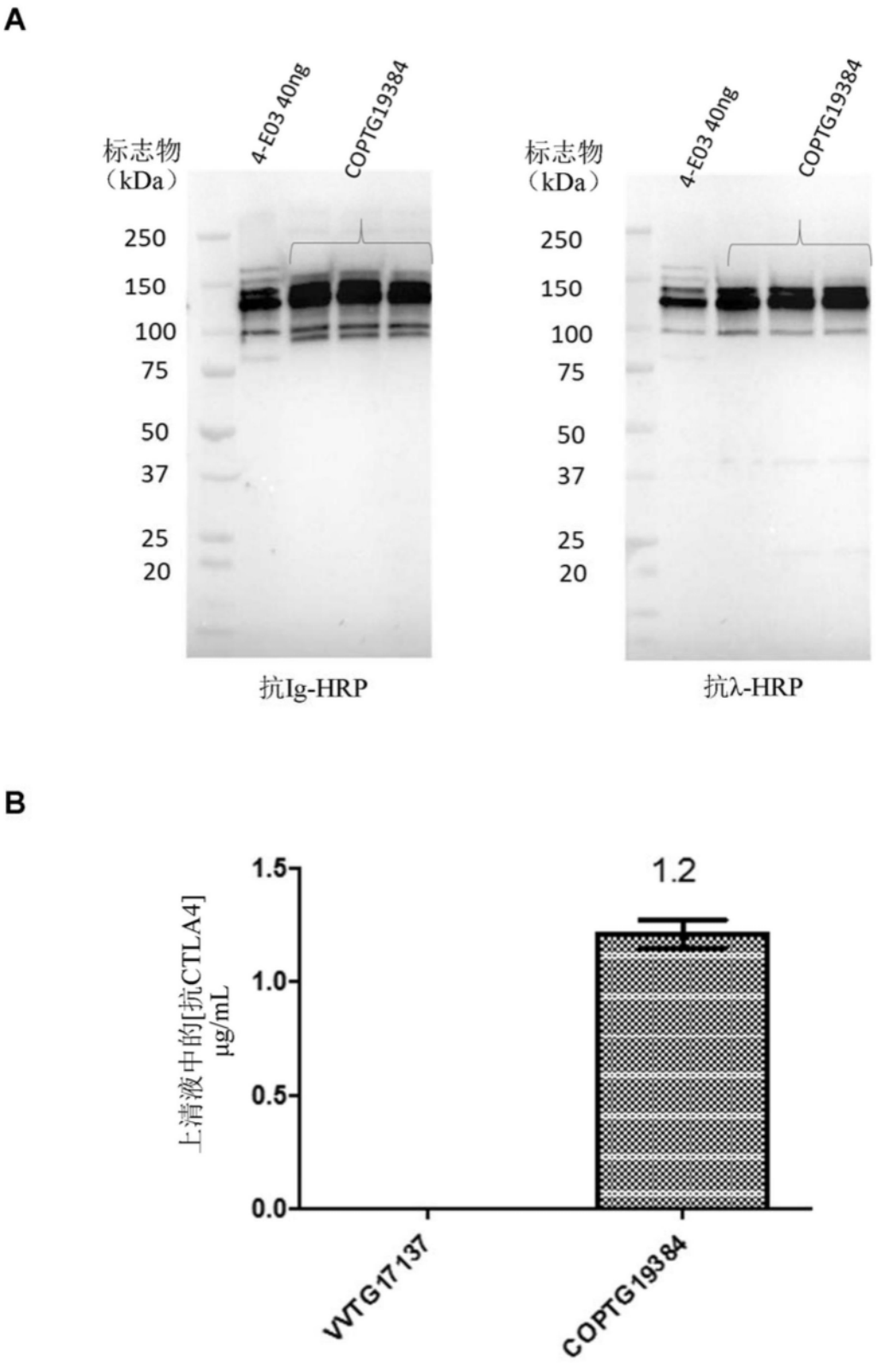

A
标志物
（kDa）
4-E03 40ng
COPTG19384
250
150
100
75
50
37
25
20
抗Ig-HRP
抗λ-HRP
B
上清液中的[抗CTLA4]
μg/mL
1.5
1.0
0.5
0.0
1.2
VVTG17137
COPTG19384

图18

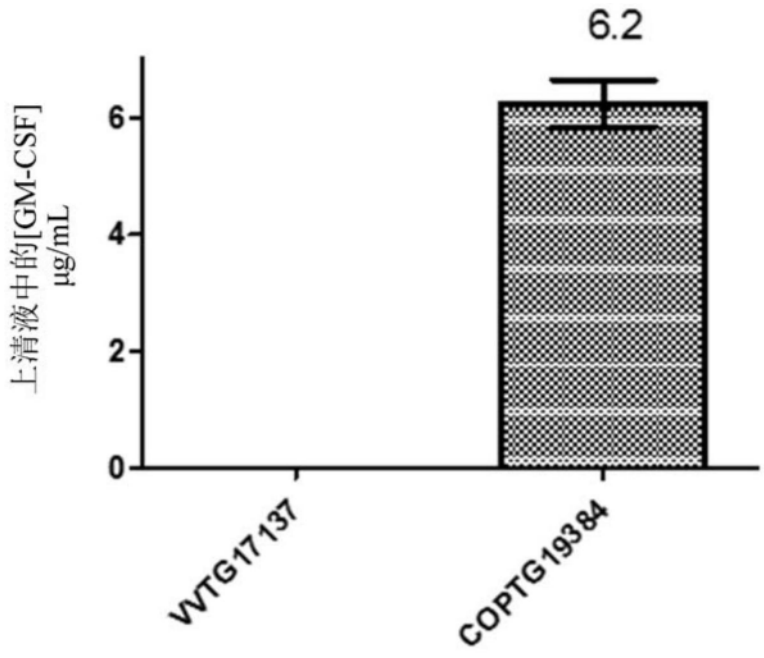
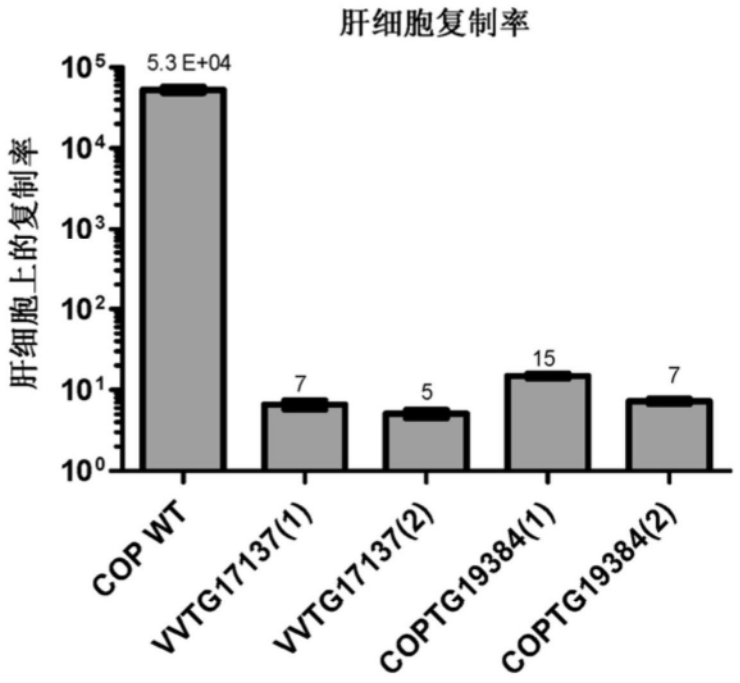


图19

A


肝细胞复制率
肝细胞上的复制率
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
5.3 E+04
7
5
15
7
COP WT
VVTG17137(1)
VVTG17137(2)
COPTG19384(1)
COPTG19384(2)

B

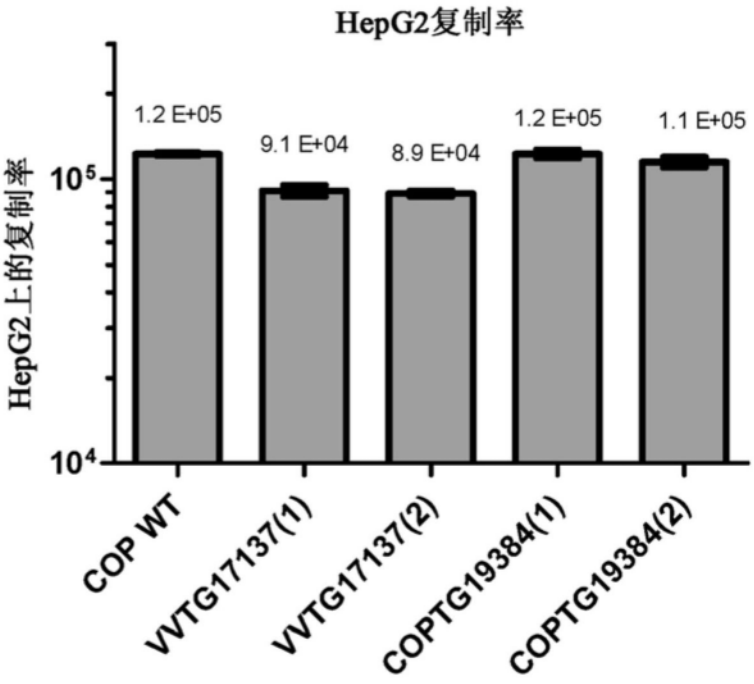

HepG2复制率
HepG2上的复制率
10^5
10^4
1.2 E+05
9.1 E+04
8.9 E+04
1.2 E+05
1.1 E+05
COP WT
VVTG17137(1)
VVTG17137(2)
COPTG19384(1)
COPTG19384(2)

图20

C

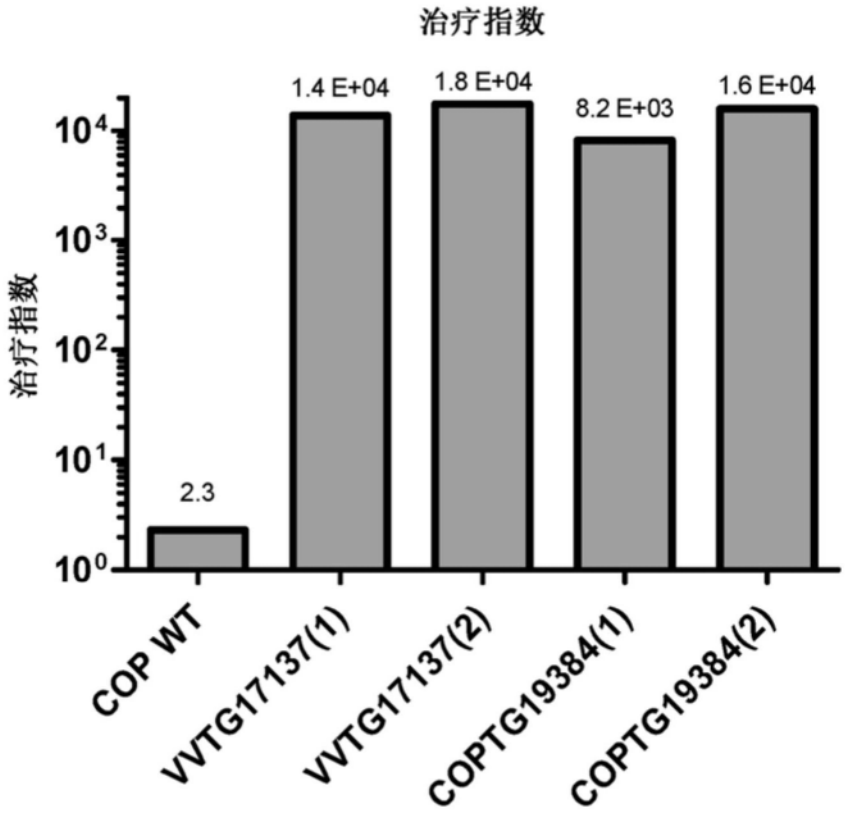

治疗指数
1.4 E+04
1.8 E+04
8.2 E+03
1.6 E+04
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
治疗指数
2.3
COP WT
VVTG17137(1)
VVTG17137(2)
COPTG19384(1)
COPTG19384(2)

图20续

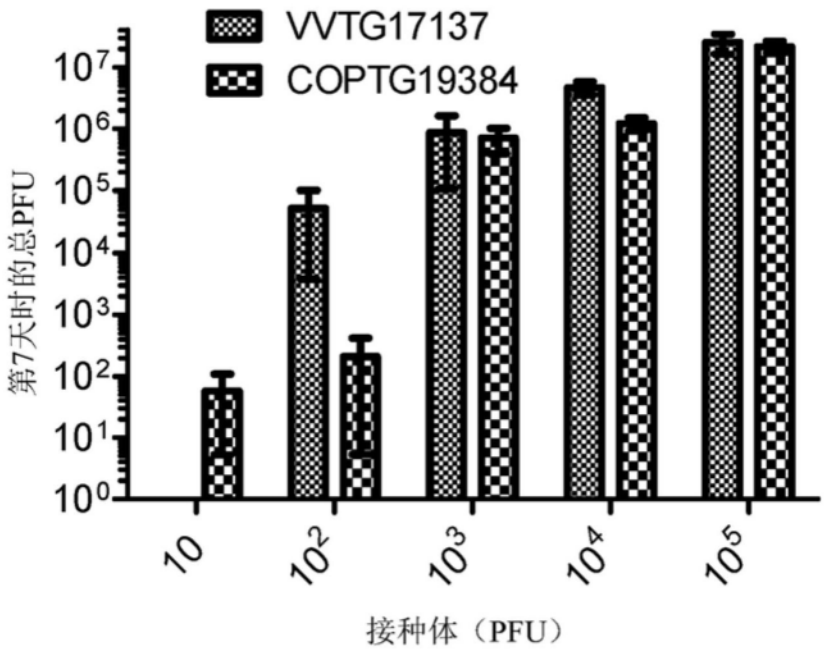

VVTG17137
COPTG19384
第7天时的总PFU
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
10
10^2
10^3
10^4
10^5
接种体（PFU）

图21

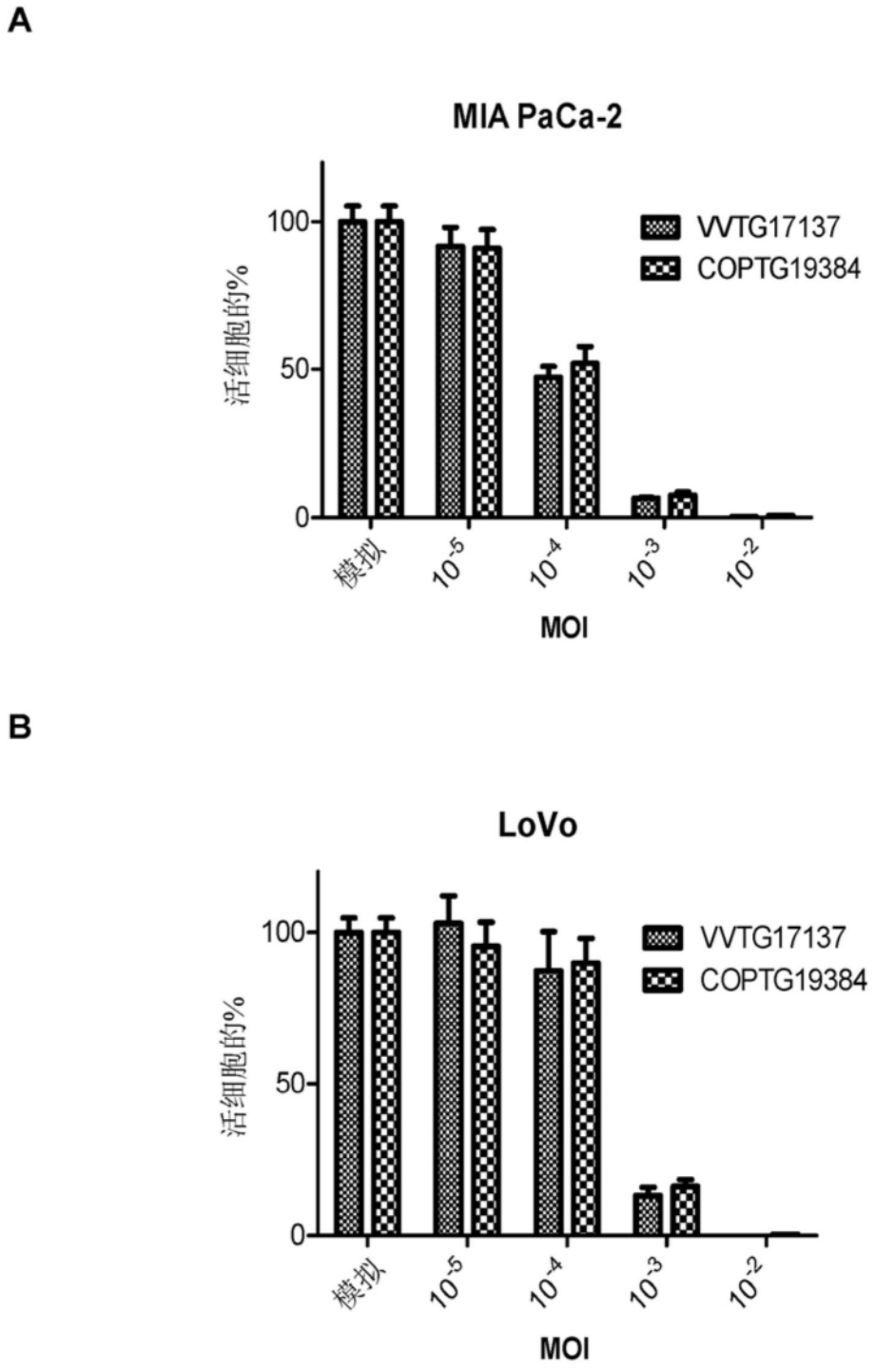

A
MIA PaCa-2
活细胞的%
100
50
0
VVTG17137
COPTG19384
模拟
10-5
10-4
10-3
10-2
MOI
B
LoVo
活细胞的%
100
50
0
VVTG17137
COPTG19384
模拟
10-5
10-4
10-3
10-2
MOI

图22

C

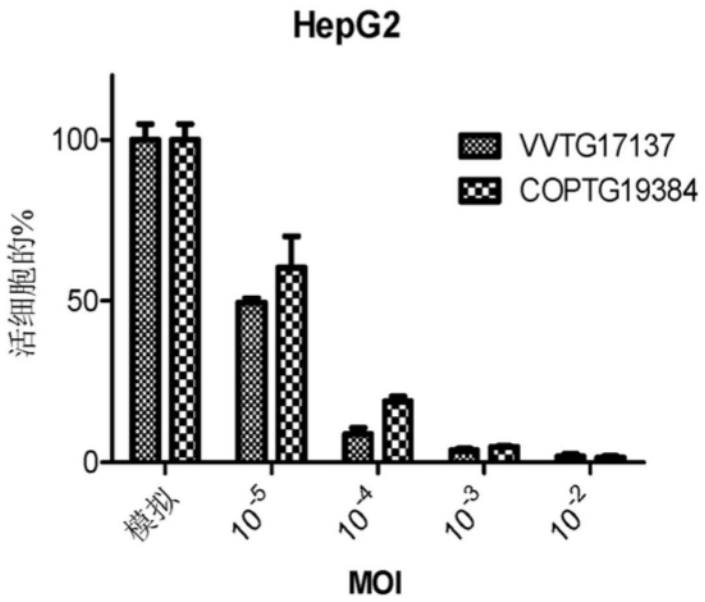

HepG2
VVTG17137
COPTG19384
活细胞的%
100
50
0
模拟
10-5
10-4
10-3
10-2
MOI

图22续

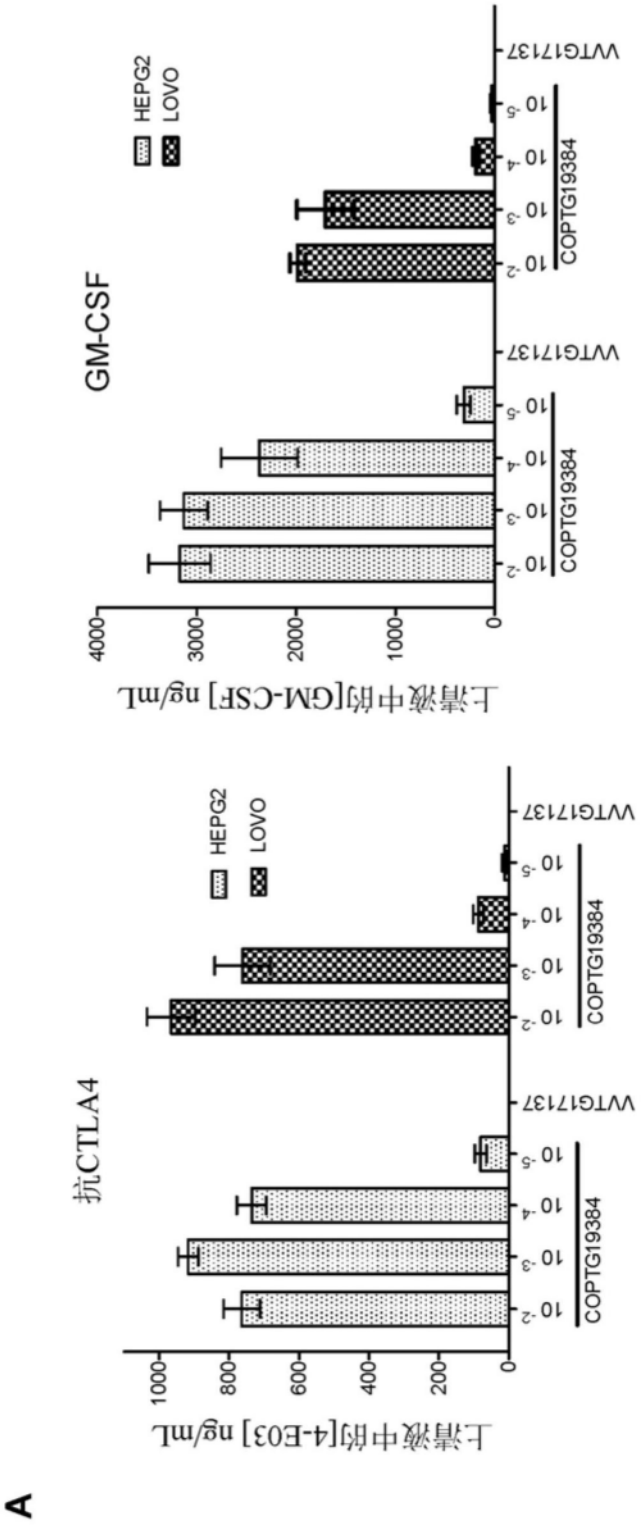
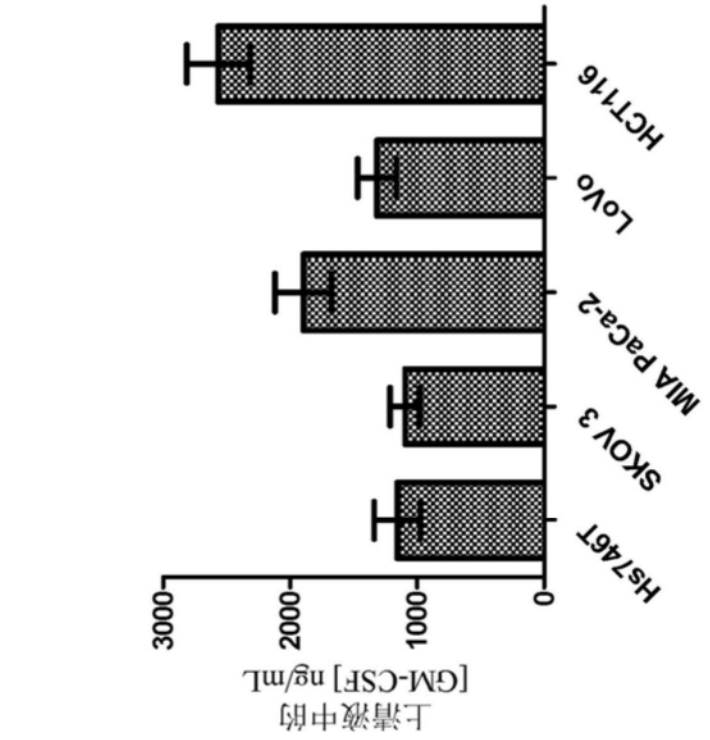

A
抗CTLA4
上清液中的[4-E03] ng/mL
1000
800
600
400
200
0
HEPG2
LOVO
VVTG17137
COPTG19384
10-2
10-3
10-4
10-5
GM-CSF
上清液中的[GM-CSF] ng/mL
4000
3000
2000
1000
0

图23


上清液中的
[GM-CSF] ng/mL
3000
2000
1000
0
HS746T
SKOV 3
MIA PaCa-2
LoVo
HCT116

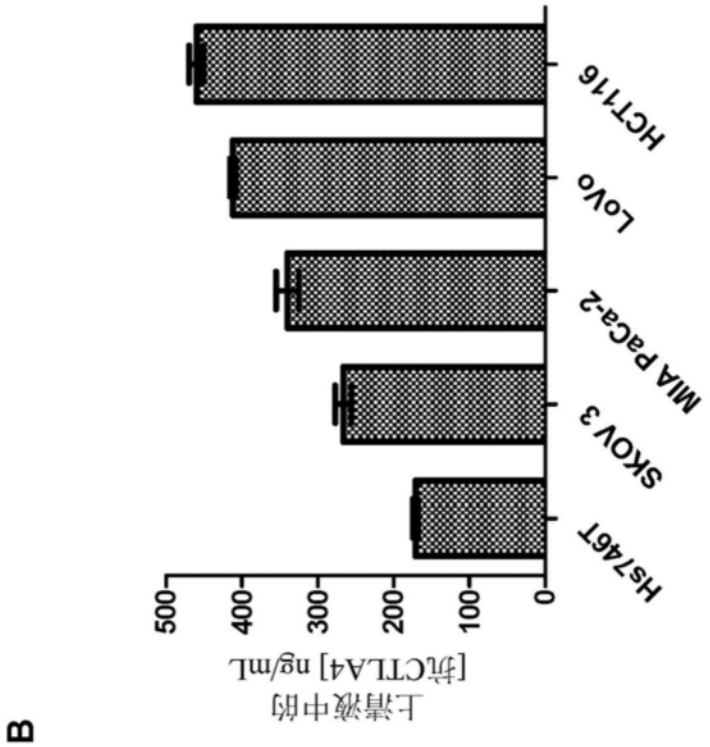

B
上清液中的
[抗CTLA4] ng/mL
500
400
300
200
100
0
HS746T
SKOV 3
MIA PaCa-2
LoVo
HCT116

图23续

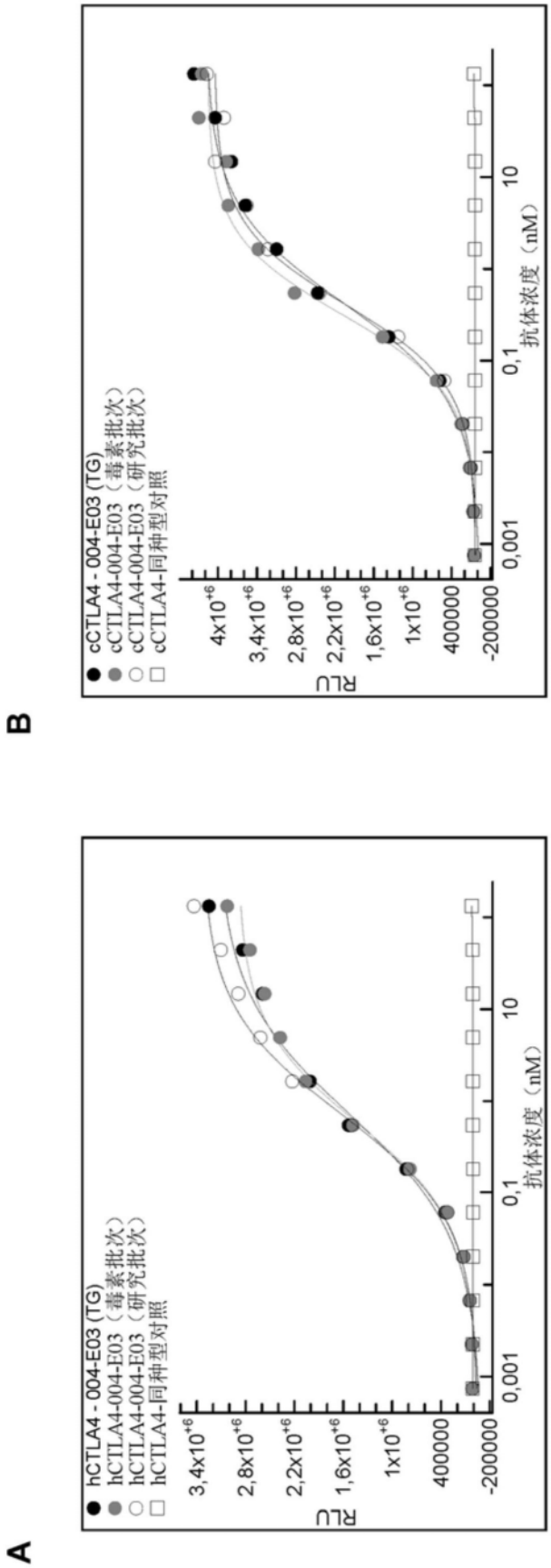

B
cCTLA4 - 004-E03 (TG)
cCTLA4-004-E03（毒素批次）
cCTLA4-004-E03（研究批次）
cCTLA4-同种型对照
RLU
4x10+6
3,4x10+6
2,8x10+6
2,2x10+6
1,6x10+6
1x10+6
400000
-200000
0,001
0,1
10
抗体浓度（nM）
A
hCTLA4 - 004-E03 (TG)
hCTLA4-004-E03（毒素批次）
hCTLA4-004-E03（研究批次）
hCTLA4-同种型对照
RLU
3,4x10+6
2,8x10+6
2,2x10+6
1,6x10+6
1x10+6
400000
-200000
0,001
0,1
10
抗体浓度（nM）

图24

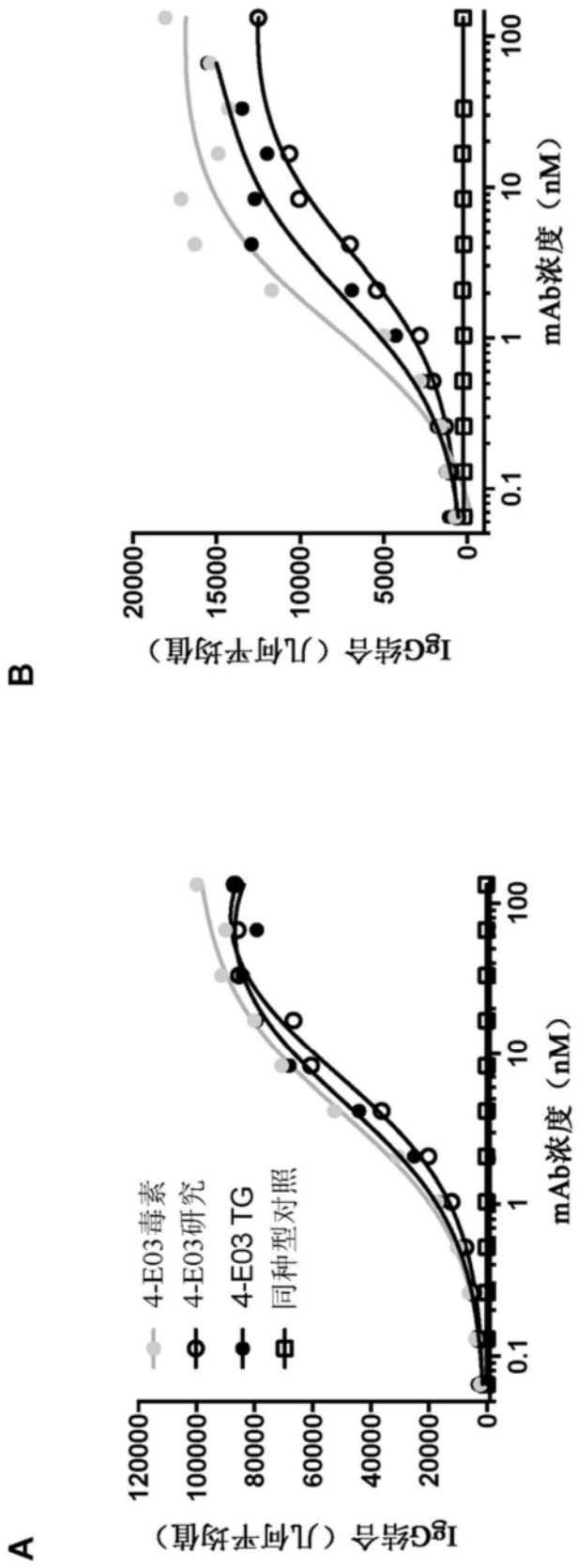

A
IgG结合（几何平均值）
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.1
1
10
100
mAb浓度（nM）
4-E03毒素
4-E03研究
4-E03 TG
同种型对照
B
IgG结合（几何平均值）
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
mAb浓度（nM）

图25

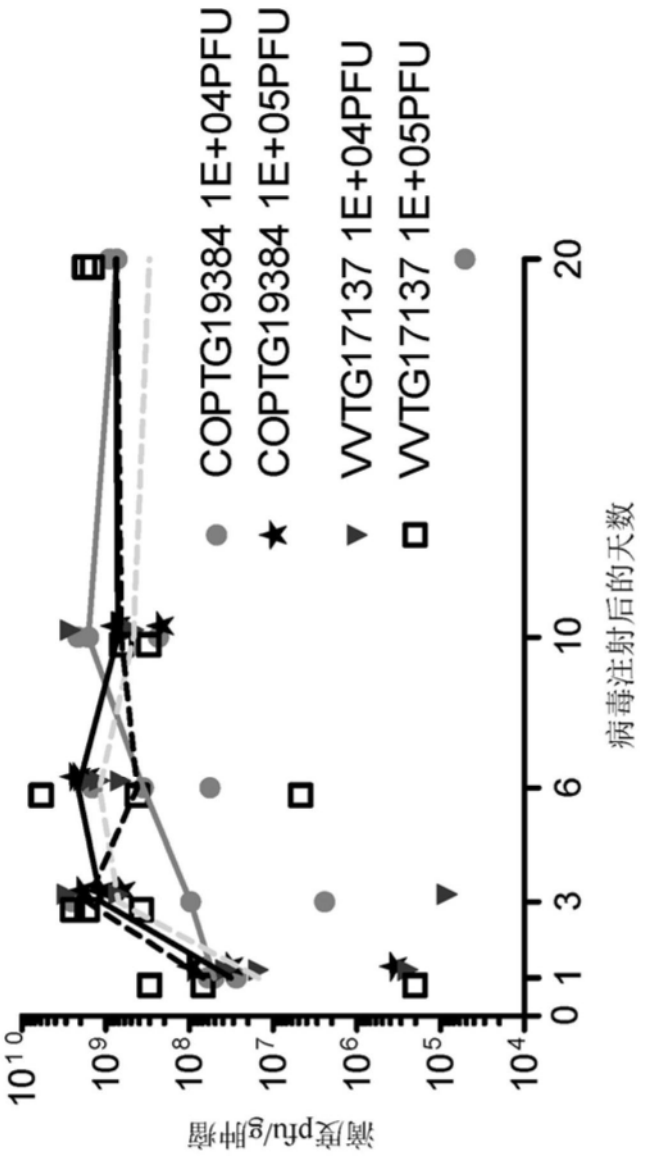

COPTG19384 1E+04PFU
COPTG19384 1E+05PFU
VVTG17137 1E+04PFU
VVTG17137 1E+05PFU
滴度pfu/g肿瘤
病毒注射后的天数
0 1 3 6 10 20
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4

图26

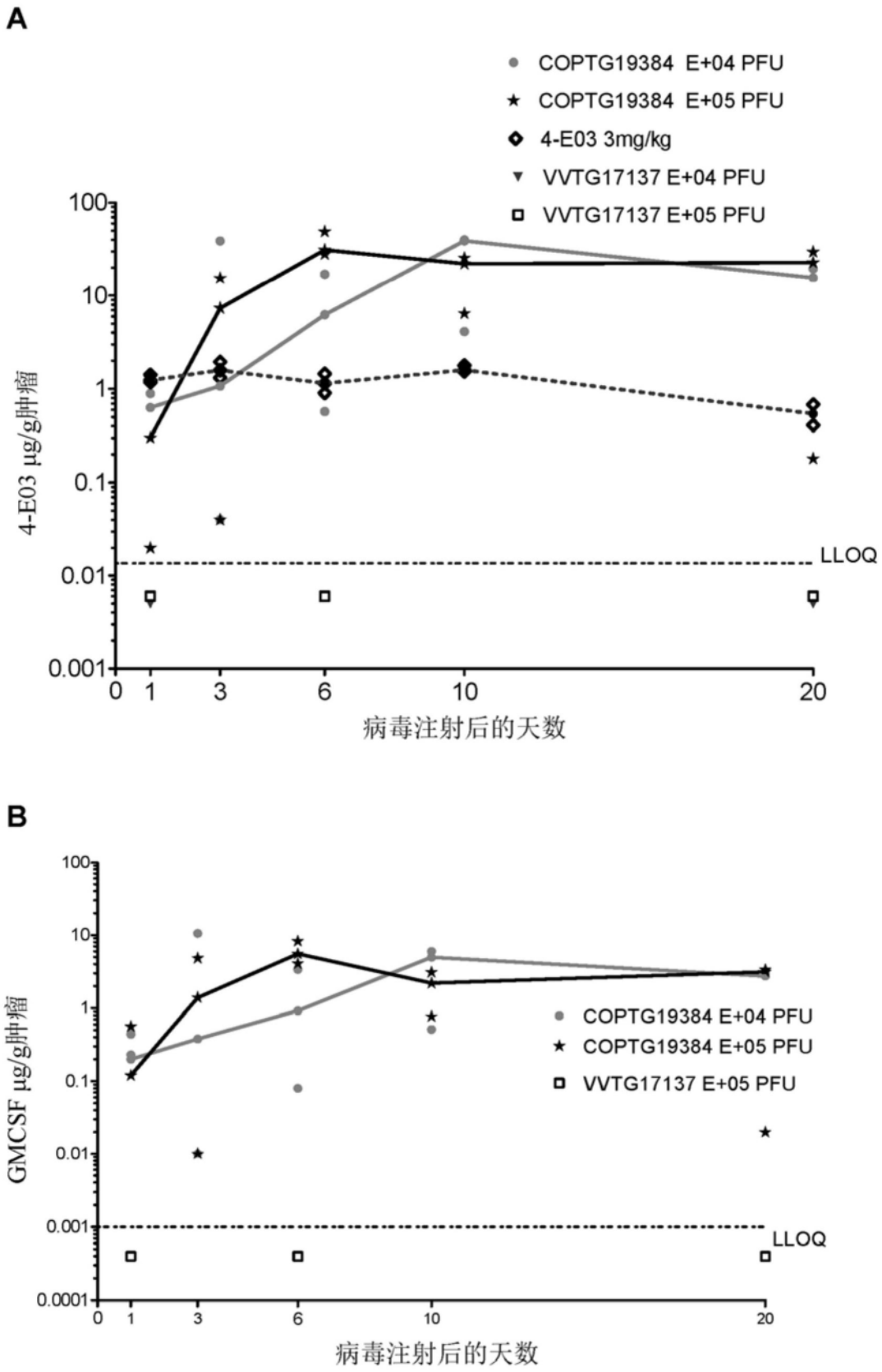

A
COPTG19384 E+04 PFU
COPTG19384 E+05 PFU
4-E03 3mg/kg
VVTG17137 E+04 PFU
VVTG17137 E+05 PFU
4-E03 μg/g肿瘤
100
10
1
0.1
0.01
0.001
LLOQ
0 1 3 6 10 20
病毒注射后的天数
B
GMCSF μg/g肿瘤
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
COPTG19384 E+04 PFU
COPTG19384 E+05 PFU
VVTG17137 E+05 PFU
LLOQ
0 1 3 6 10 20
病毒注射后的天数

图27

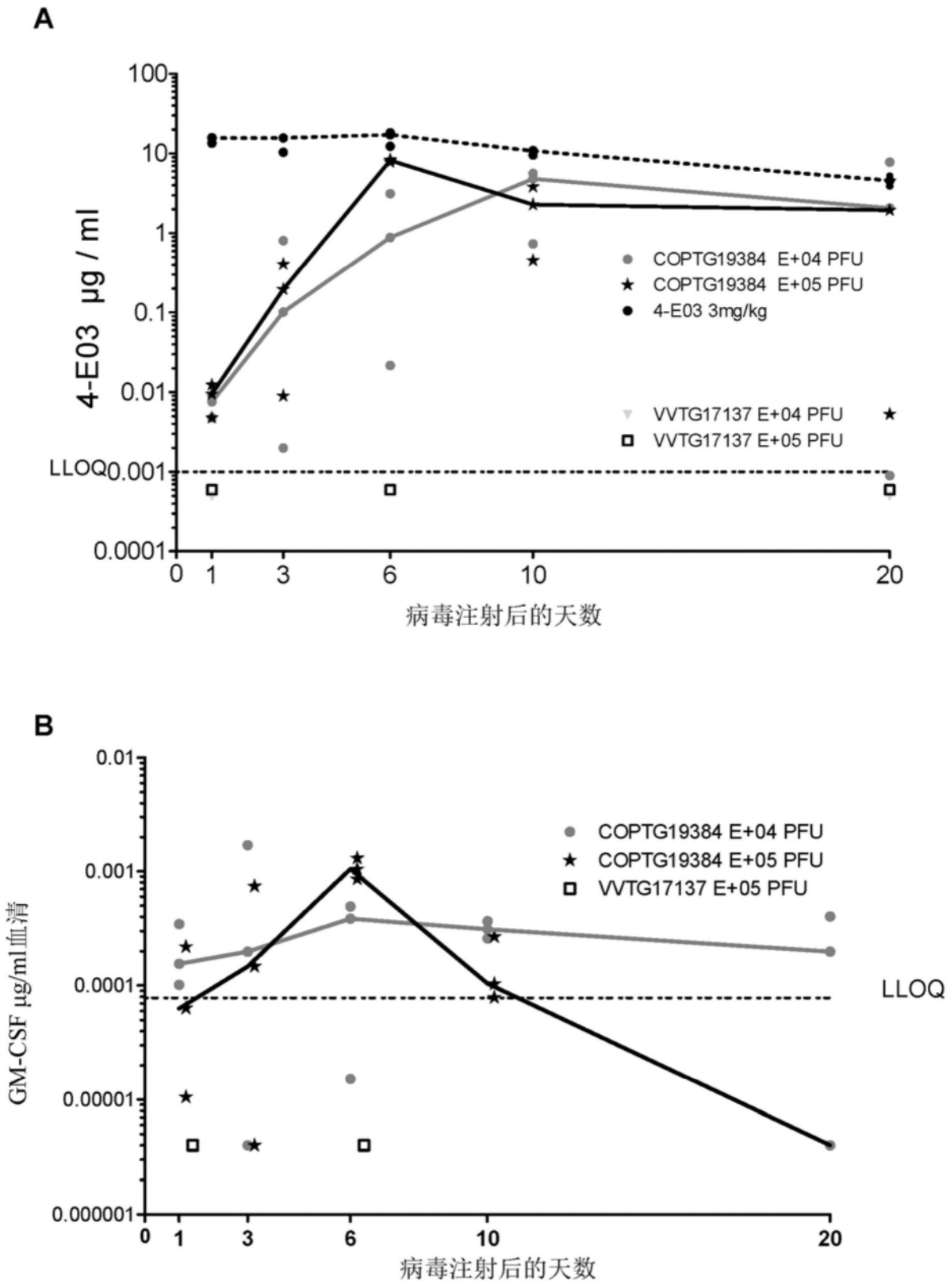

A
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
LLOQ
4-E03 µg / ml
COPTG19384 E+04 PFU
COPTG19384 E+05 PFU
4-E03 3mg/kg
VVTG17137 E+04 PFU
VVTG17137 E+05 PFU
0 1 3 6 10 20
病毒注射后的天数
B
0.01
0.001
0.0001
0.00001
0.000001
GM-CSF µg/ml血清
COPTG19384 E+04 PFU
COPTG19384 E+05 PFU
VVTG17137 E+05 PFU
LLOQ
0 1 3 6 10 20
病毒注射后的天数

图28

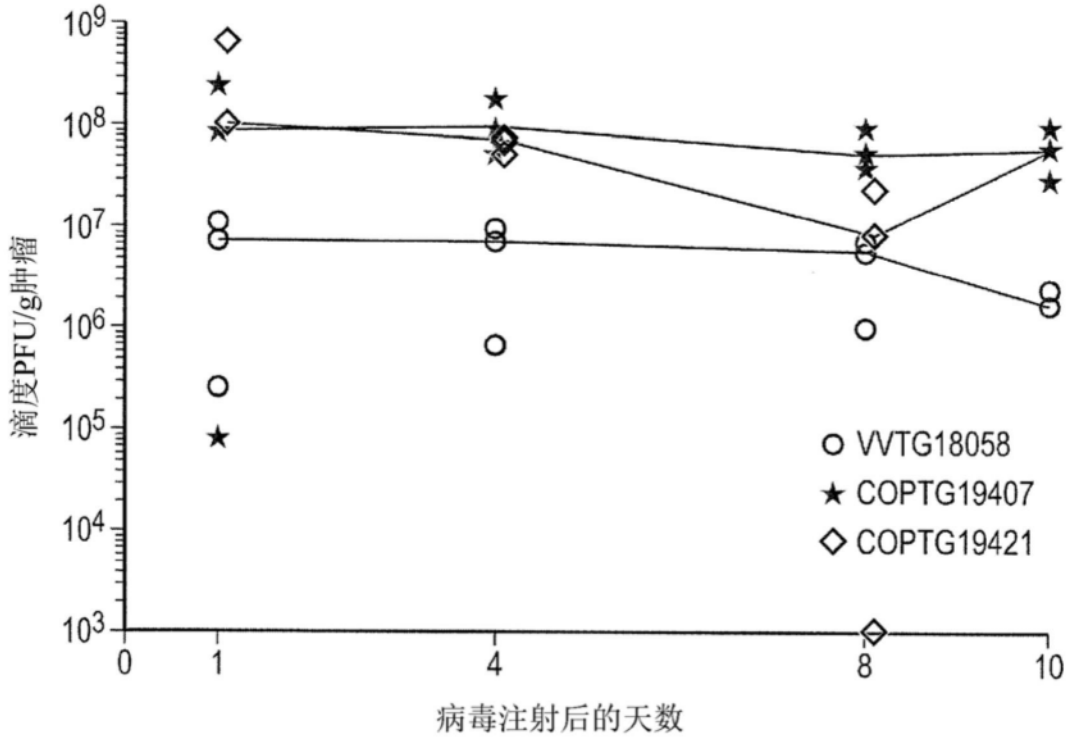

滴度PFU/g肿瘤
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
0
1
4
8
10
病毒注射后的天数
VVTG18058
COPTG19407
COPTG19421

图29

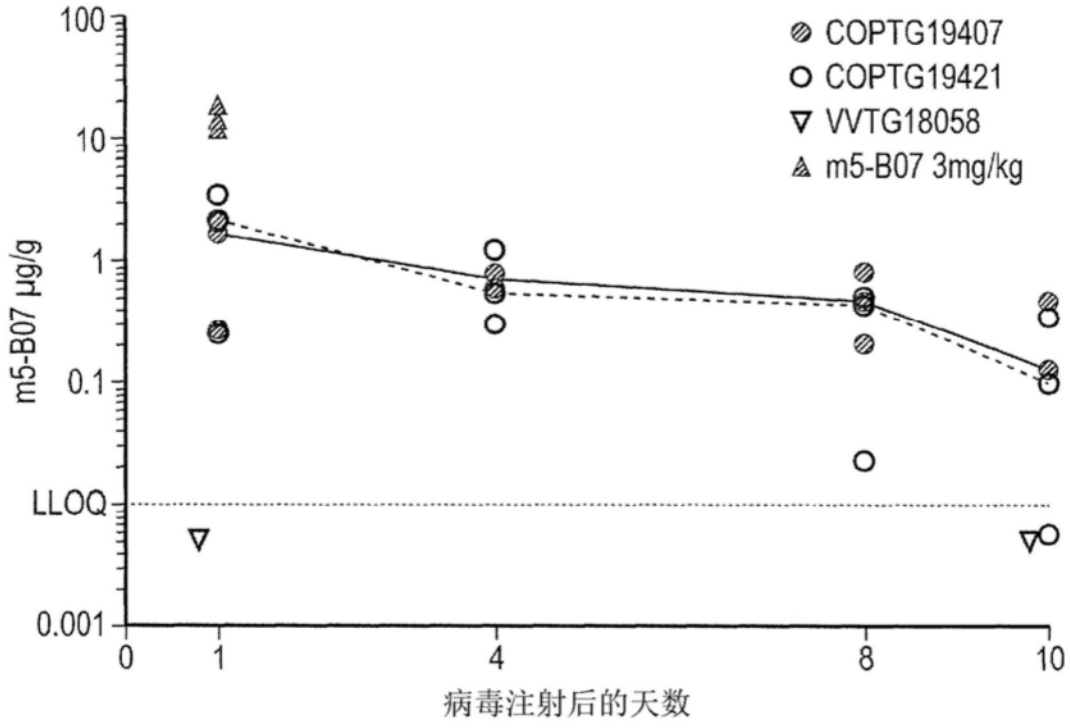

m5-B07 μg/g
100
10
1
0.1
LLOQ
0.001
0
1
4
8
10
病毒注射后的天数
COPTG19407
COPTG19421
VVTG18058
m5-B07 3mg/kg

图30A

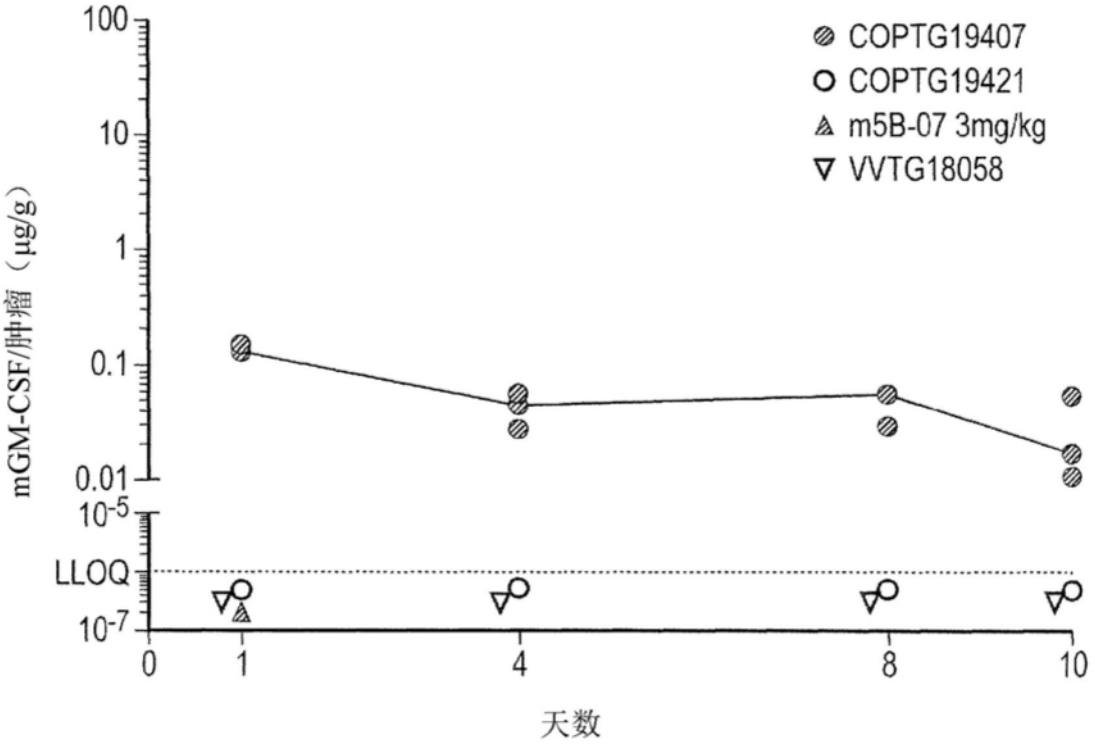

COPTG19407
COPTG19421
m5B-07 3mg/kg
VVTG18058
mGM-CSF/肿瘤（μg/g）
100
10
1
0.1
0.01
10-5
LLOQ
10-7
0
1
4
8
10
天数

图30B

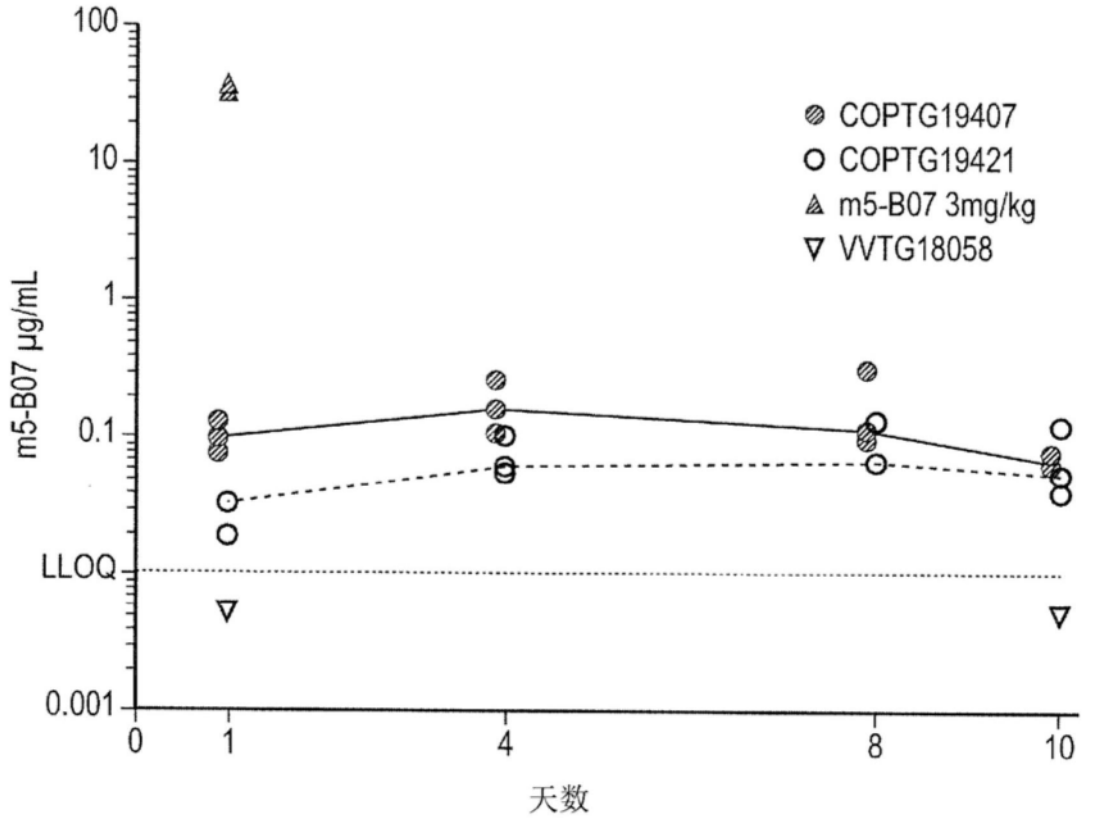

COPTG19407
COPTG19421
m5-B07 3mg/kg
VVTG18058
m5-B07 μg/mL
100
10
1
0.1
LLOQ
0.001
0
1
4
8
10
天数

图31

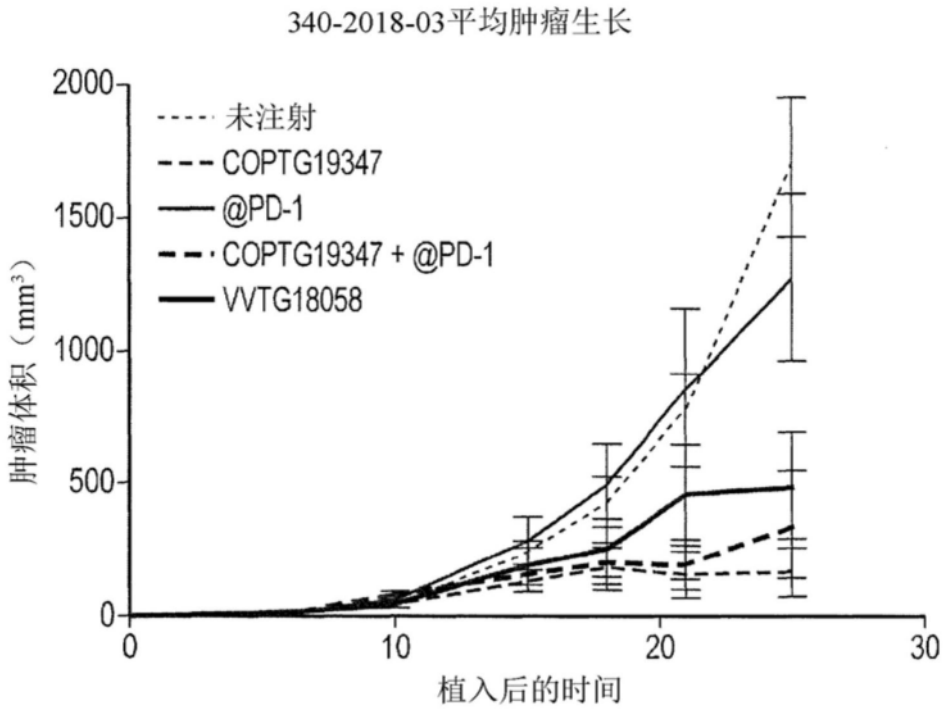

340-2018-03平均肿瘤生长
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积（mm³）
未注射
COPTG19347
@PD-1
COPTG19347 + @PD-1
VVTG18058
0
10
20
30
植入后的时间

图32A

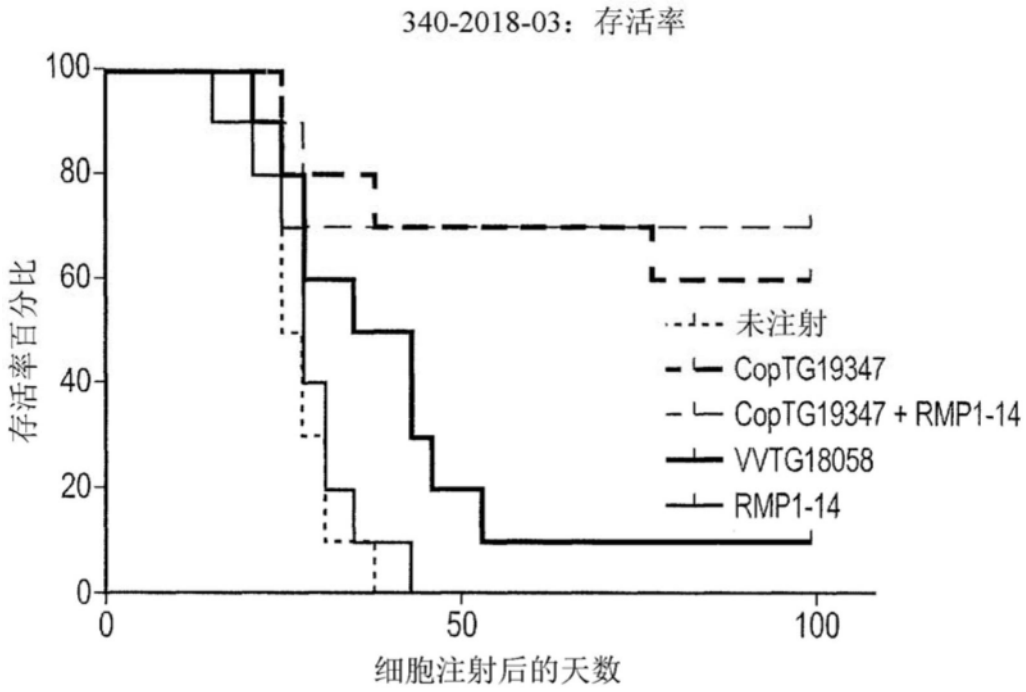

340-2018-03：存活率
100
80
60
40
20
0
存活率百分比
未注射
CopTG19347
CopTG19347 + RMP1-14
VVTG18058
RMP1-14
0
50
100
细胞注射后的天数

图32B

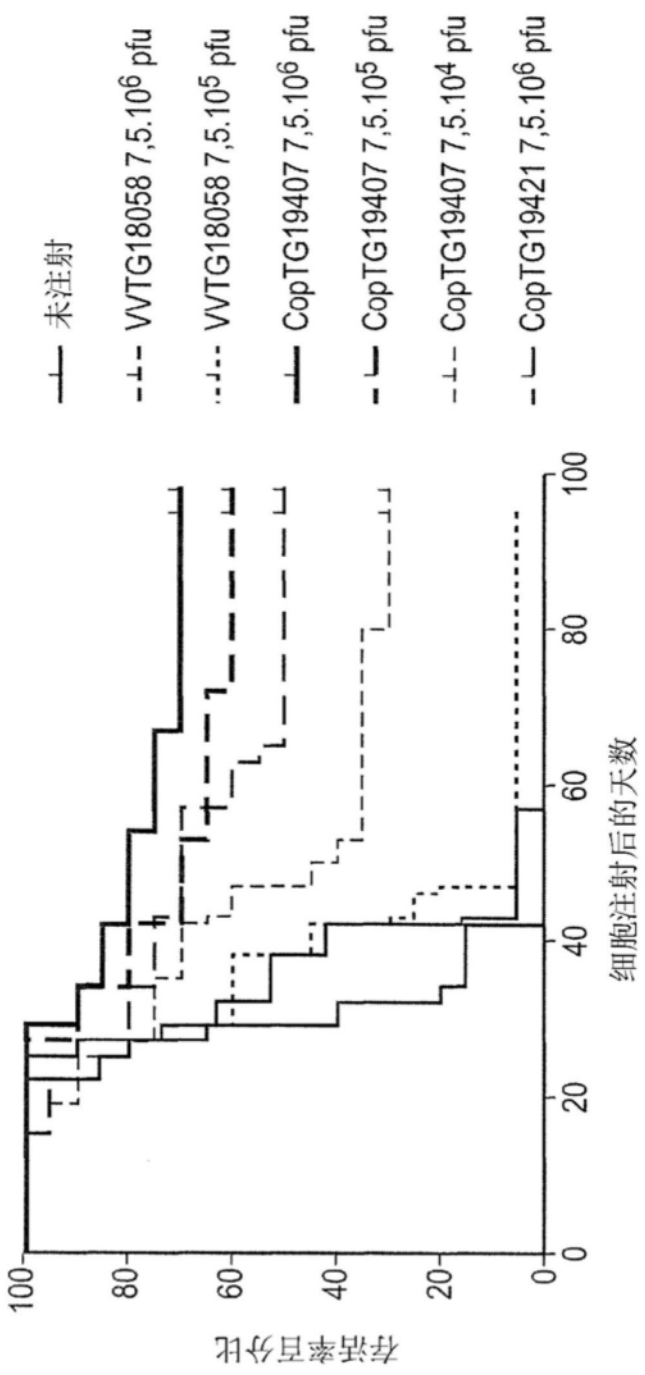

未注射
VVTG18058 7,5.10^6 pfu
VVTG18058 7,5.10^5 pfu
CopTG19407 7,5.10^6 pfu
CopTG19407 7,5.10^5 pfu
CopTG19407 7,5.10^4 pfu
CopTG19421 7,5.10^6 pfu
存活率百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
细胞注射后的天数

图33

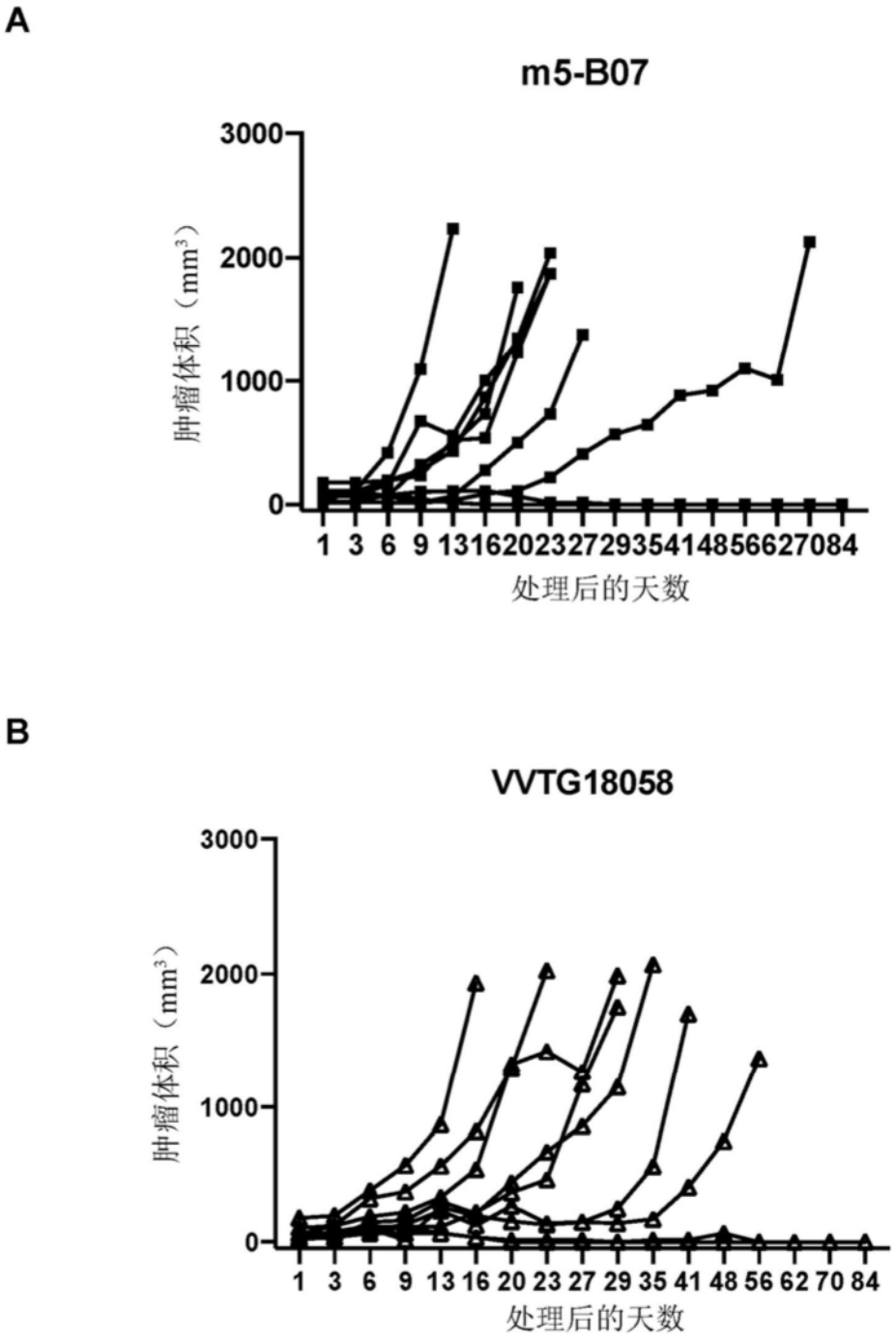
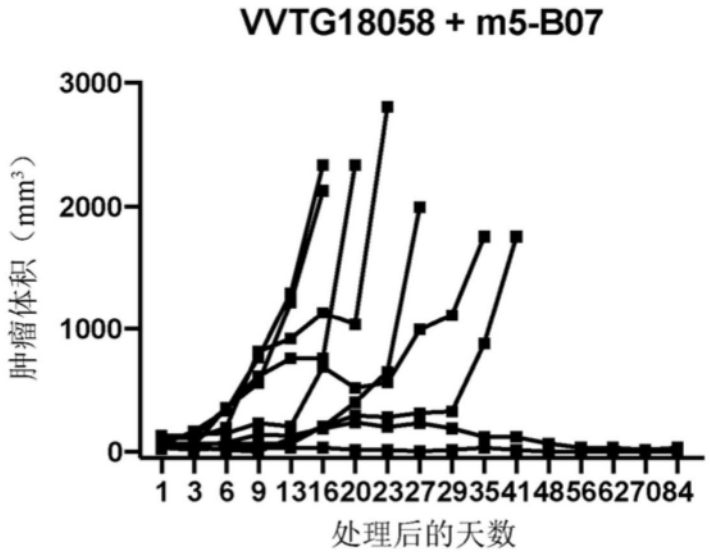

A
m5-B07
3000
2000
1000
0
肿瘤体积（mm³）
1 3 6 9 13162023272935414856627084
处理后的天数
B
VVTG18058
3000
2000
1000
0
肿瘤体积（mm³）
1 3 6 9 13 16 20 23 27 29 35 41 48 56 62 70 84
处理后的天数

图34

C


VVTG18058 + m5-B07
3000
2000
1000
0
肿瘤体积（mm³）
1 3 6 9 13162023272935414856627084
处理后的天数

D

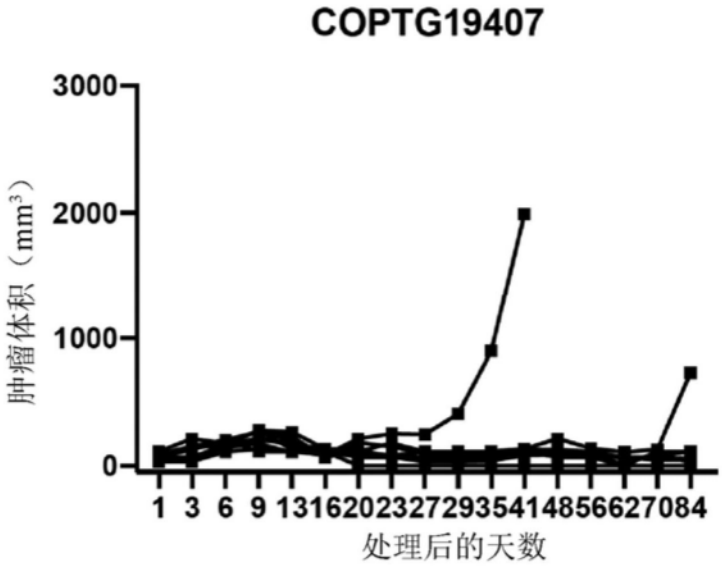

COPTG19407
3000
2000
1000
0
肿瘤体积（mm³）
1 3 6 9 13162023272935414856627084
处理后的天数

图34续

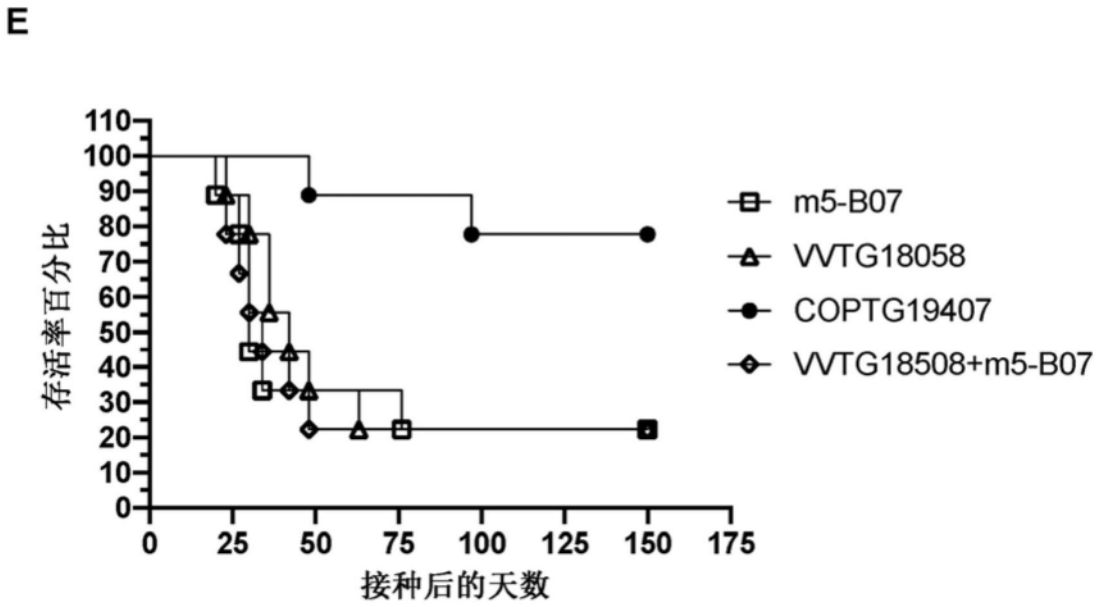

E
存活率百分比
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
25
50
75
100
125
150
175
接种后的天数
m5-B07
VVTG18058
COPTG19407
VVTG18508+m5-B07

图34续

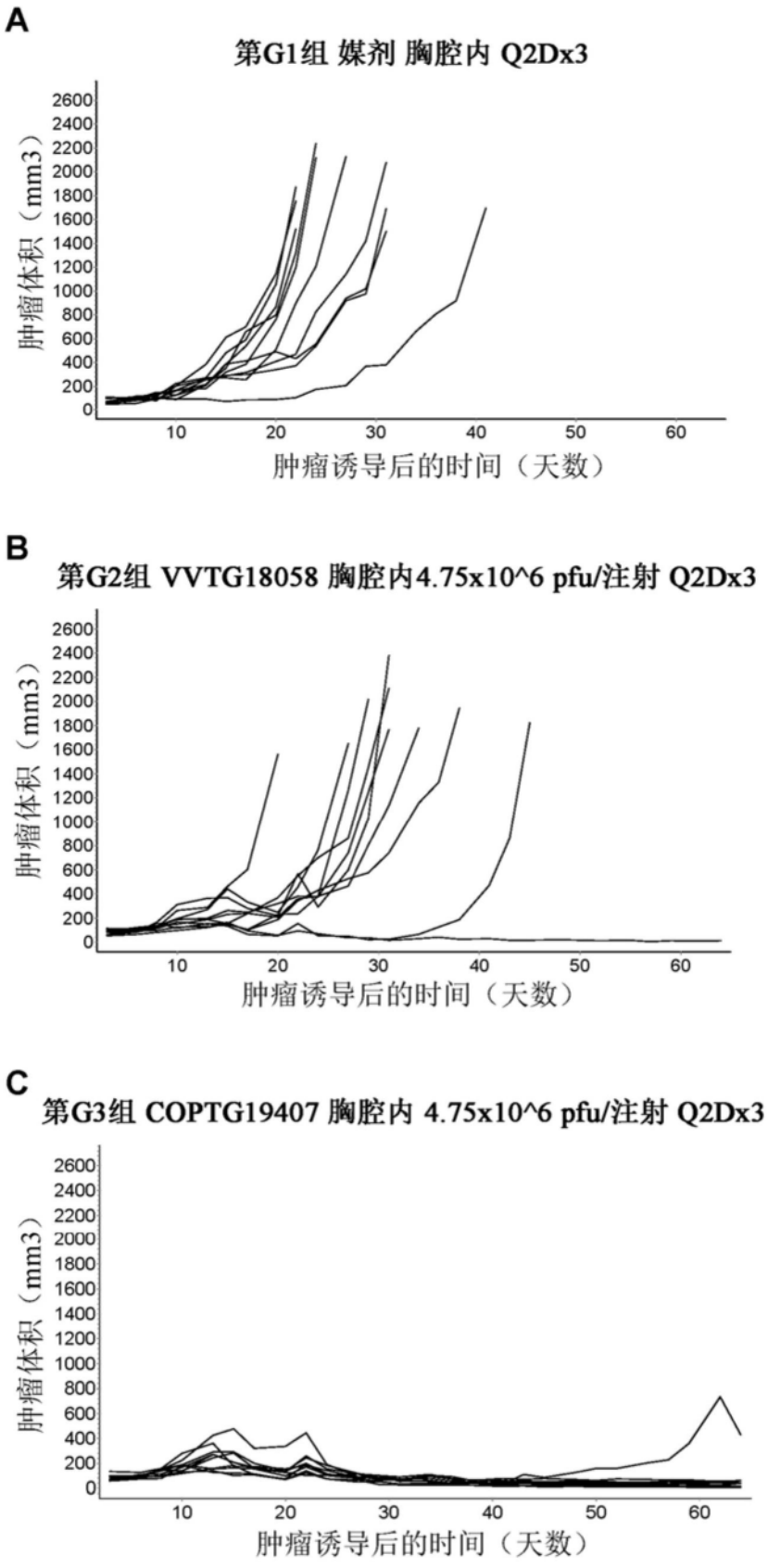
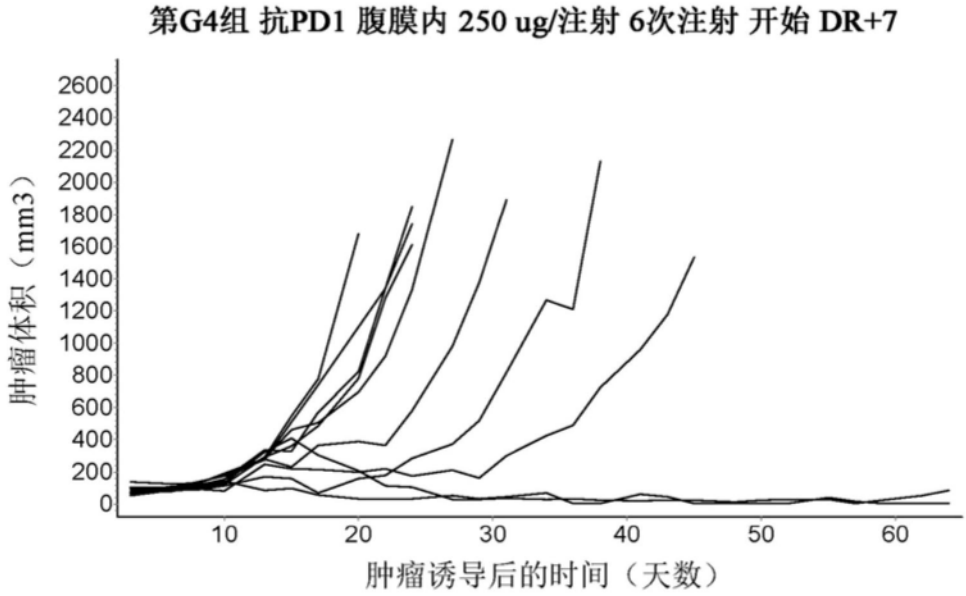

A
第G1组 媒剂 胸腔内 Q2Dx3
肿瘤体积（mm3）
肿瘤诱导后的时间（天数）
B
第G2组 VVTG18058 胸腔内4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
肿瘤体积（mm3）
肿瘤诱导后的时间（天数）
C
第G3组 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
肿瘤体积（mm3）
肿瘤诱导后的时间（天数）

图35

D


第G4组 抗PD1 腹膜内 250 ug/注射 6次注射 开始 DR+7
肿瘤体积（mm3）
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
60
肿瘤诱导后的时间（天数）

E

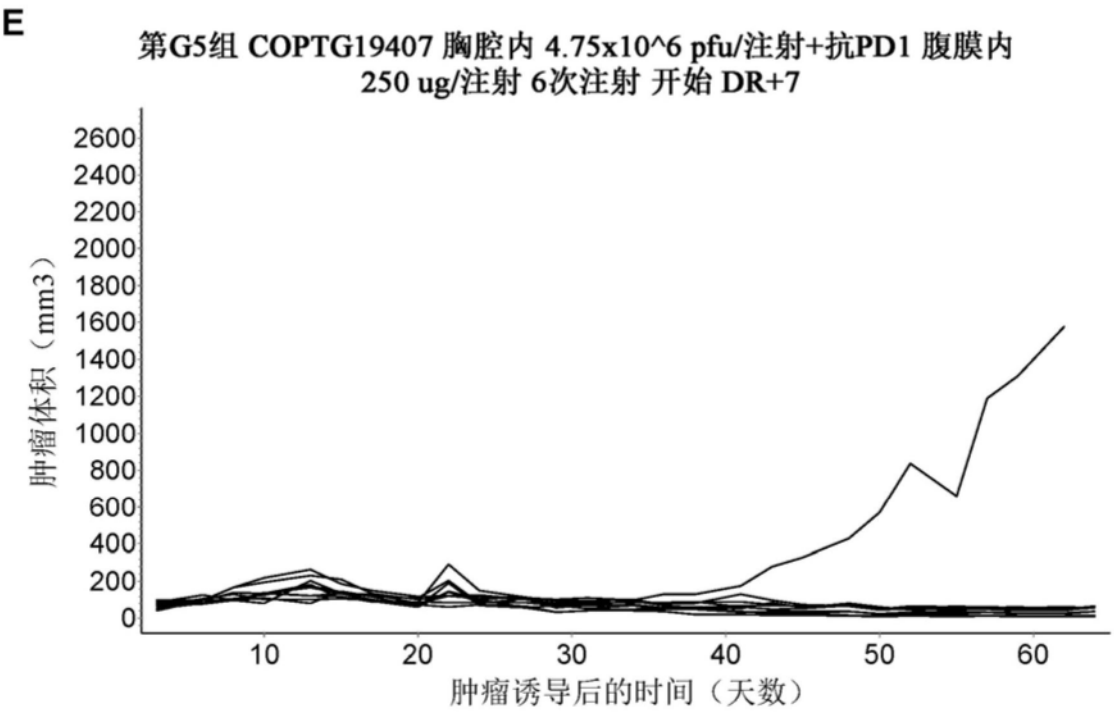

第G5组 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射+抗PD1 腹膜内
250 ug/注射 6次注射 开始 DR+7
肿瘤体积（mm3）
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
60
肿瘤诱导后的时间（天数）

图35续

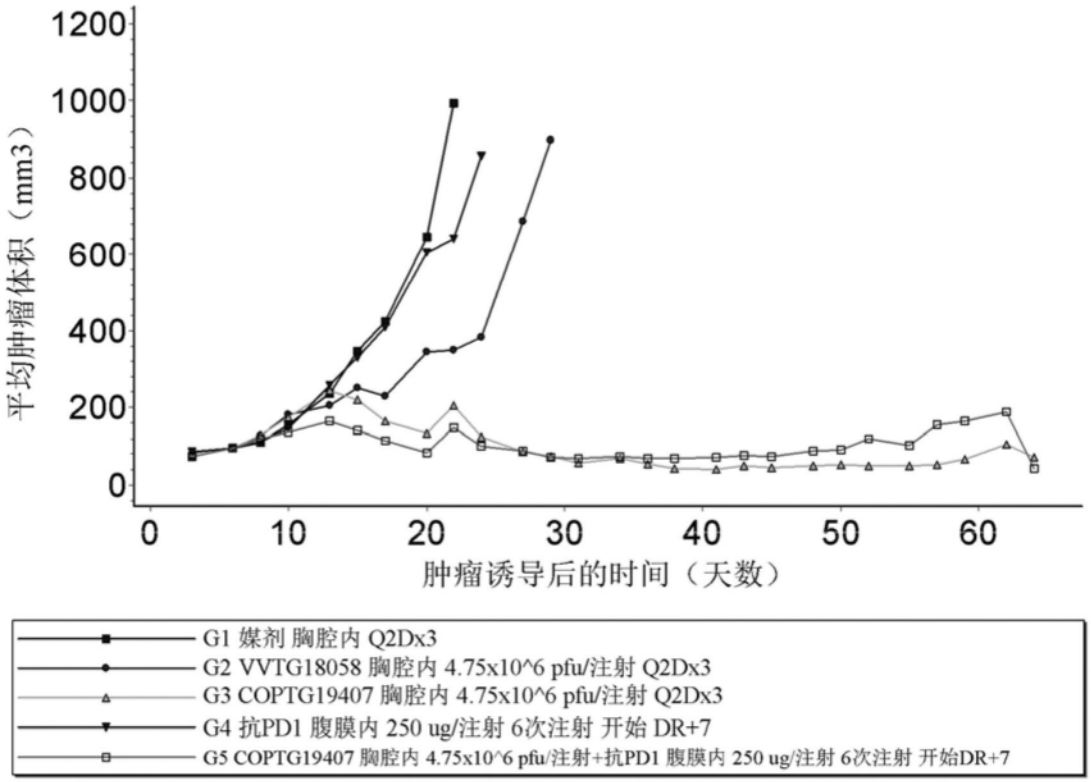

1200
1000
800
600
400
200
0
平均肿瘤体积（mm3）
0
10
20
30
40
50
60
肿瘤诱导后的时间（天数）
G1 媒剂 胸腔内 Q2Dx3
G2 VVTG18058 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
G3 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
G4 抗PD1 腹膜内 250 ug/注射 6次注射 开始 DR+7
G5 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射+抗PD1 腹膜内 250 ug/注射 6次注射 开始DR+7

图36

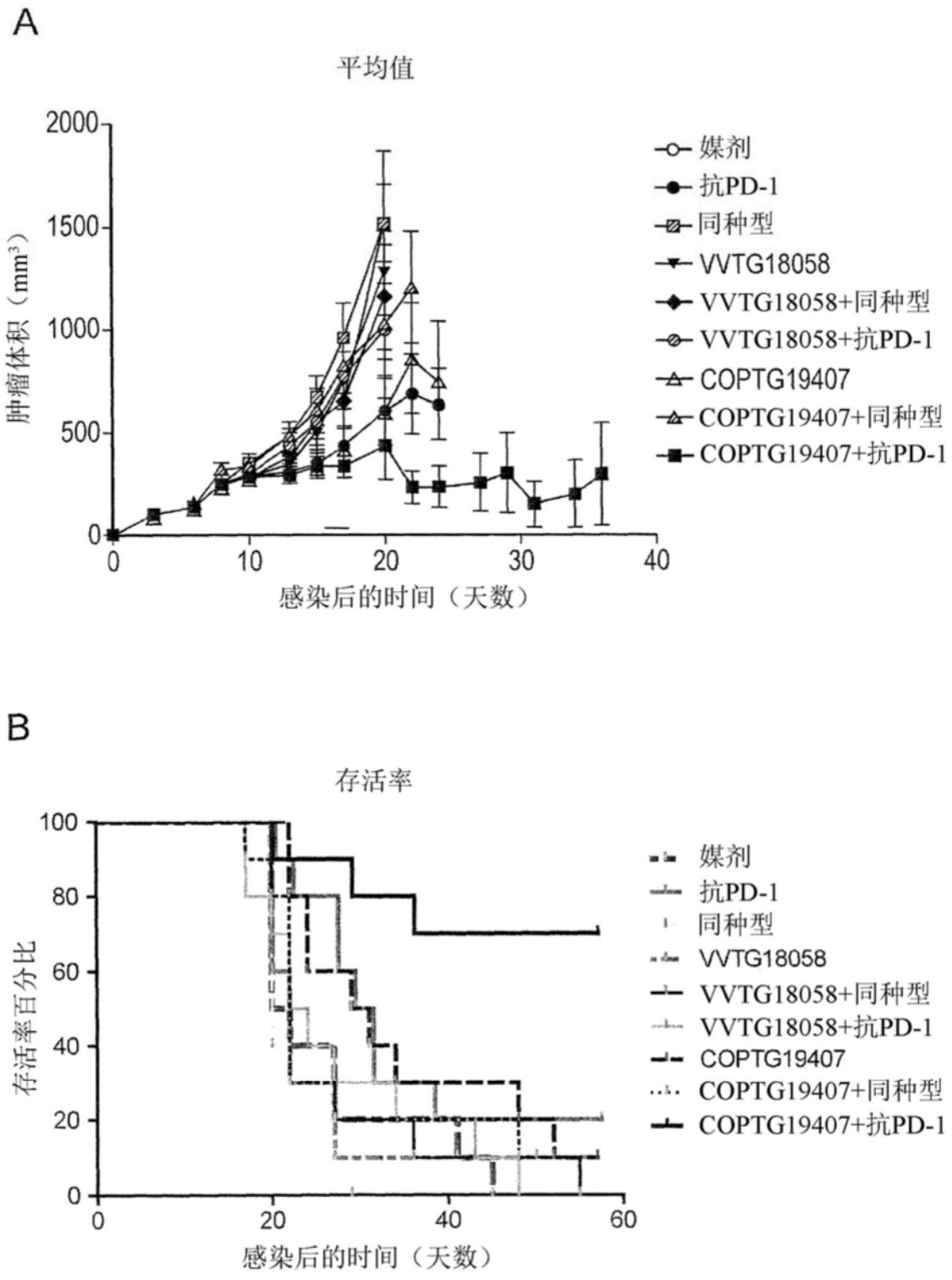

A
平均值
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
感染后的时间（天数）
媒剂
抗PD-1
同种型
VVTG18058
VVTG18058+同种型
VVTG18058+抗PD-1
COPTG19407
COPTG19407+同种型
COPTG19407+抗PD-1
B
存活率
存活率百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
感染后的时间（天数）
媒剂
抗PD-1
同种型
VVTG18058
VVTG18058+同种型
VVTG18058+抗PD-1
COPTG19407
COPTG19407+同种型
COPTG19407+抗PD-1

图37

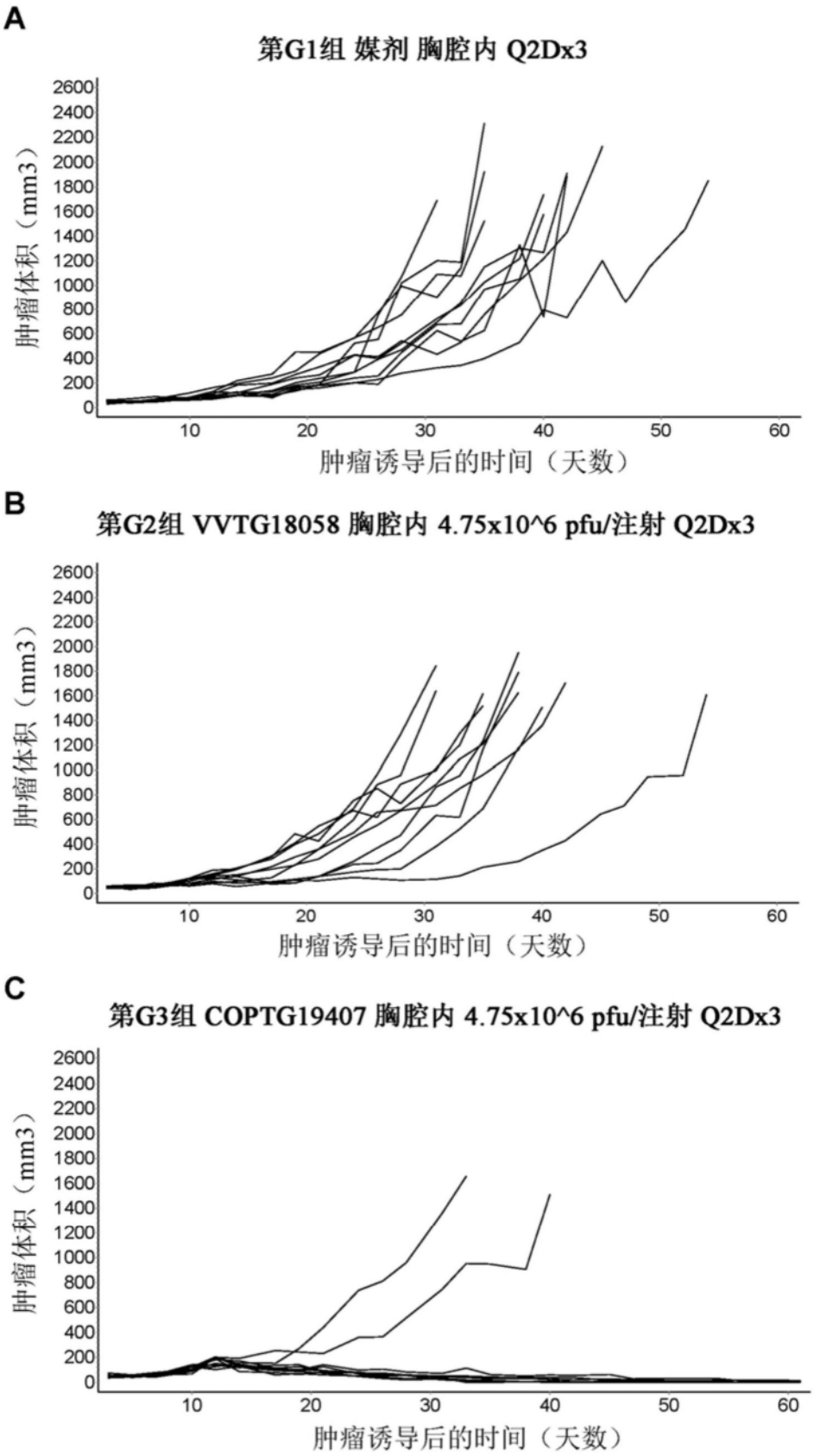
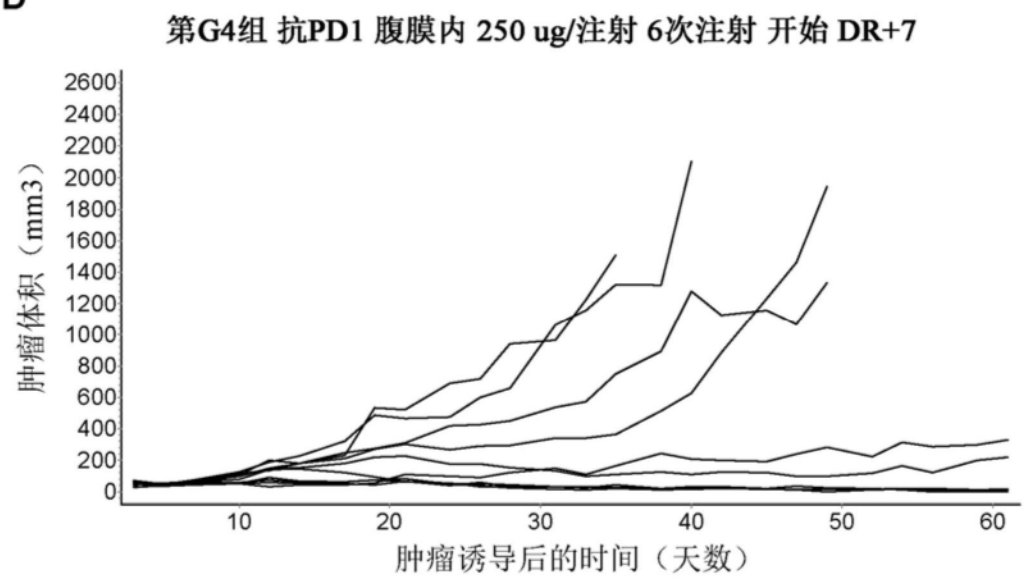

A
第G1组 媒剂 胸腔内 Q2Dx3
肿瘤体积（mm3）
肿瘤诱导后的时间（天数）
B
第G2组 VVTG18058 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
肿瘤体积（mm3）
肿瘤诱导后的时间（天数）
C
第G3组 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
肿瘤体积（mm3）
肿瘤诱导后的时间（天数）

图38

D


第G4组 抗PD1 腹膜内 250 ug/注射 6次注射 开始 DR+7
肿瘤体积（mm3）
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
60
肿瘤诱导后的时间（天数）

E

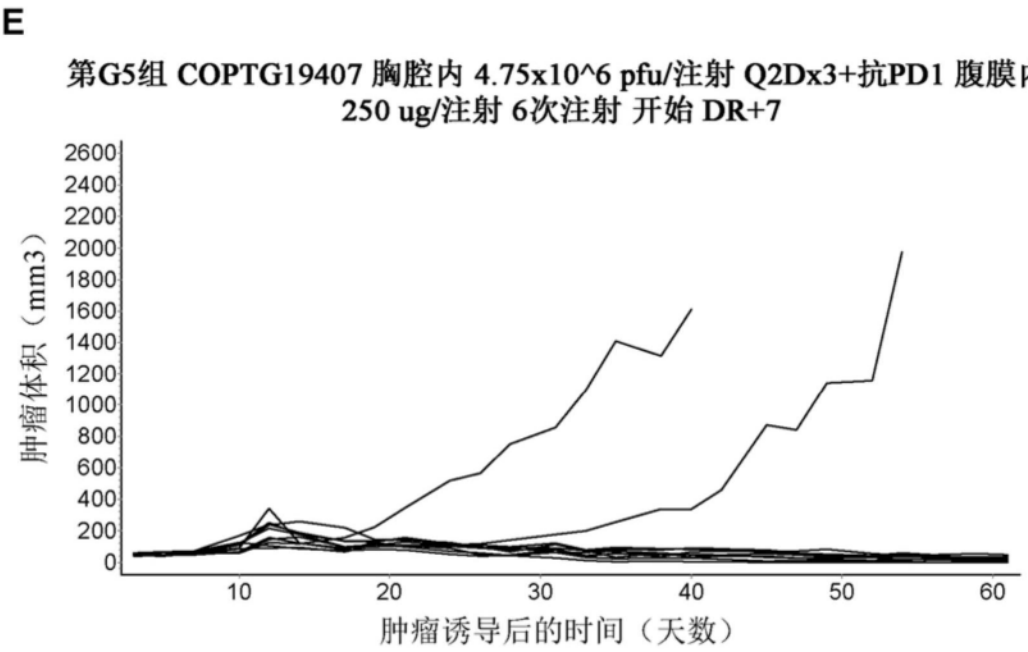

第G5组 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3+抗PD1 腹膜内
250 ug/注射 6次注射 开始 DR+7
肿瘤体积（mm3）
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
60
肿瘤诱导后的时间（天数）

图38续

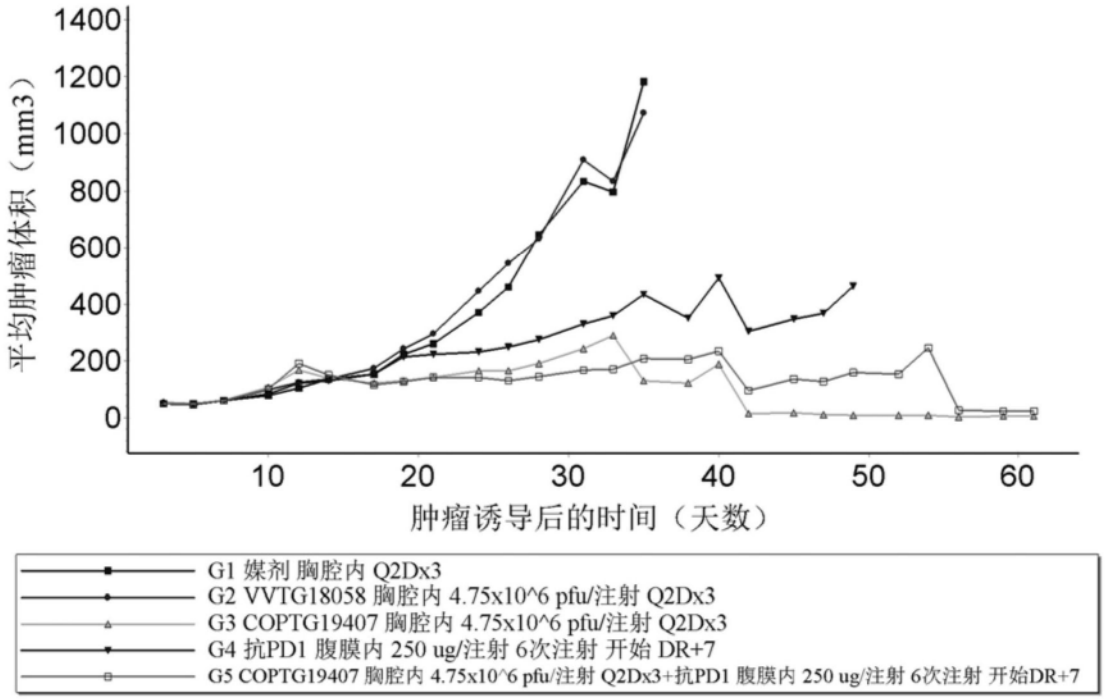

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
平均肿瘤体积（mm3）
10
20
30
40
50
60
肿瘤诱导后的时间（天数）
G1 媒剂 胸腔内 Q2Dx3
G2 VVTG18058 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
G3 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
G4 抗PD1 腹膜内 250 ug/注射 6次注射 开始 DR+7
G5 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3+抗PD1 腹膜内 250 ug/注射 6次注射 开始DR+7

图39

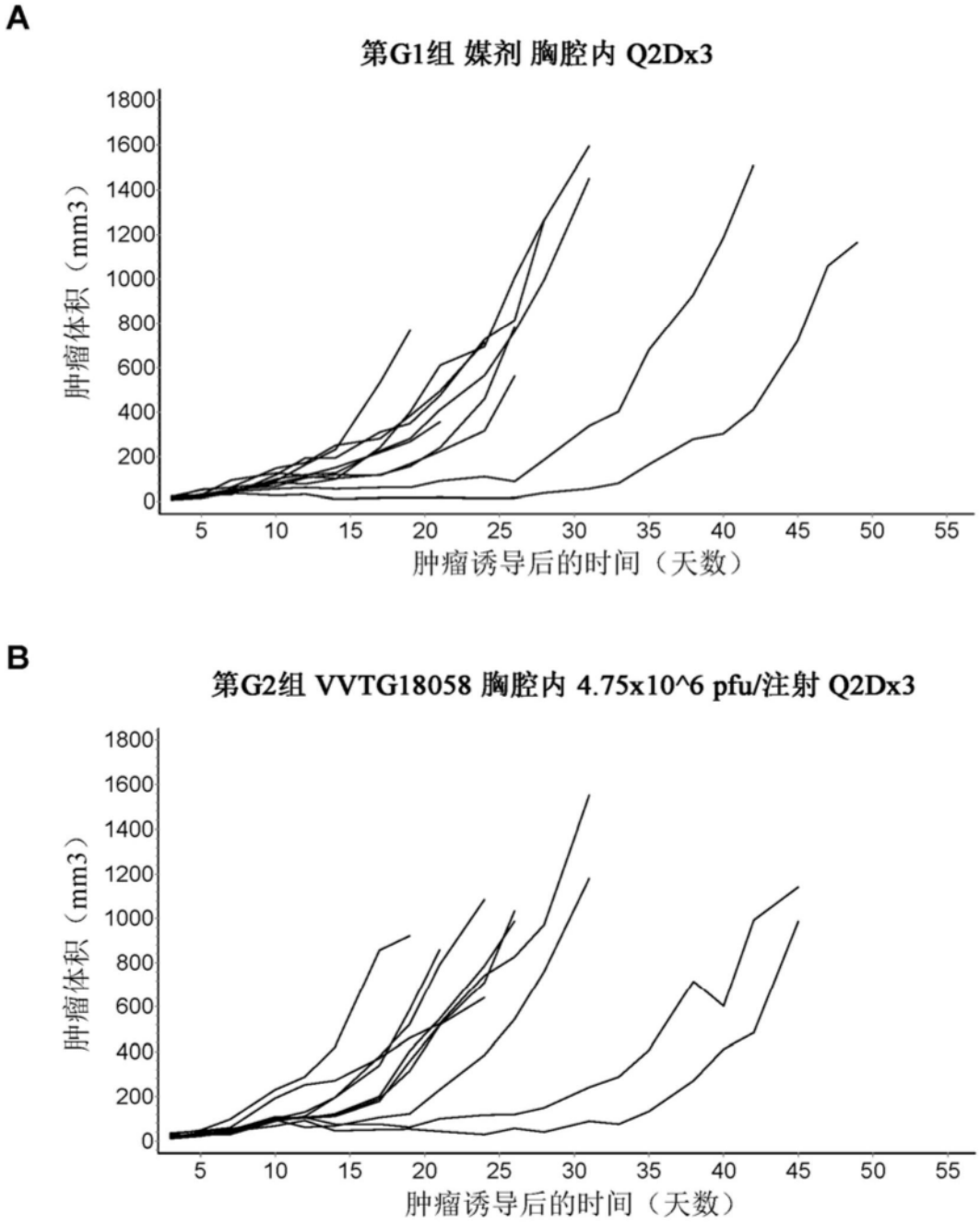
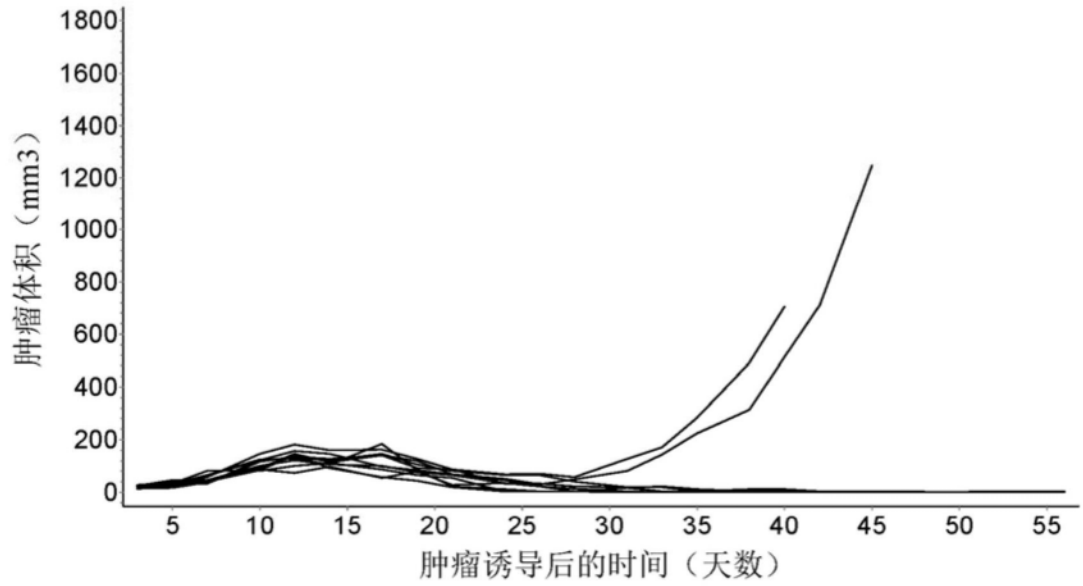

A
第G1组 媒剂 胸腔内 Q2Dx3
肿瘤体积（mm3）
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
肿瘤诱导后的时间（天数）
B
第G2组 VVTG18058 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
肿瘤体积（mm3）
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
肿瘤诱导后的时间（天数）

图40

C


第G3组 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
肿瘤体积（mm3）
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
肿瘤诱导后的时间（天数）

D

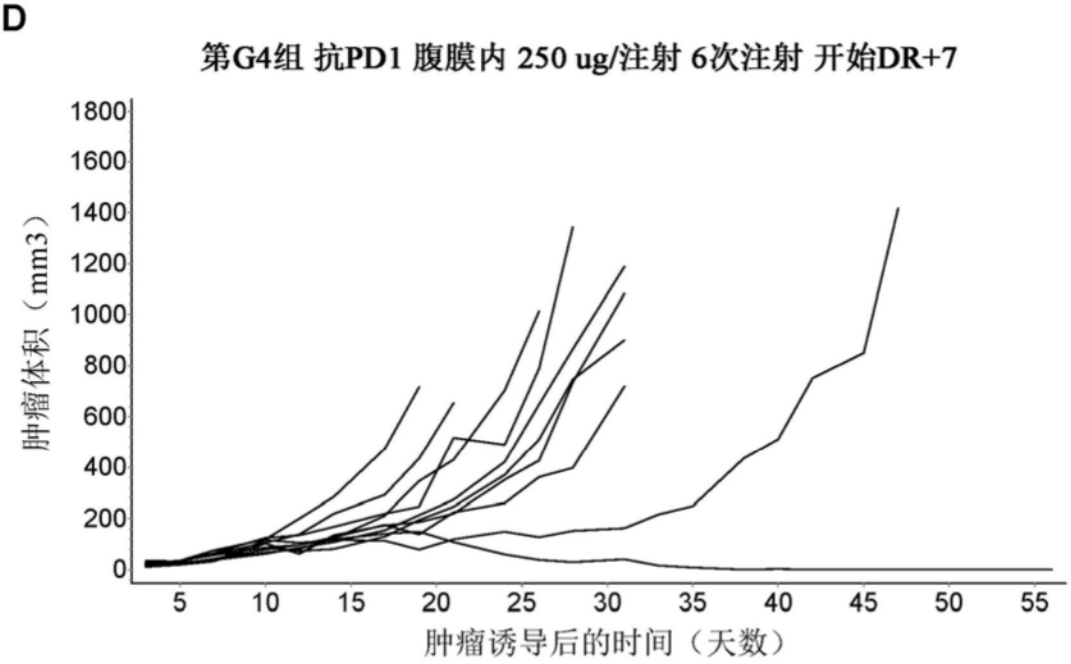

第G4组 抗PD1 腹膜内 250 ug/注射 6次注射 开始DR+7
肿瘤体积（mm3）
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
肿瘤诱导后的时间（天数）

图40续

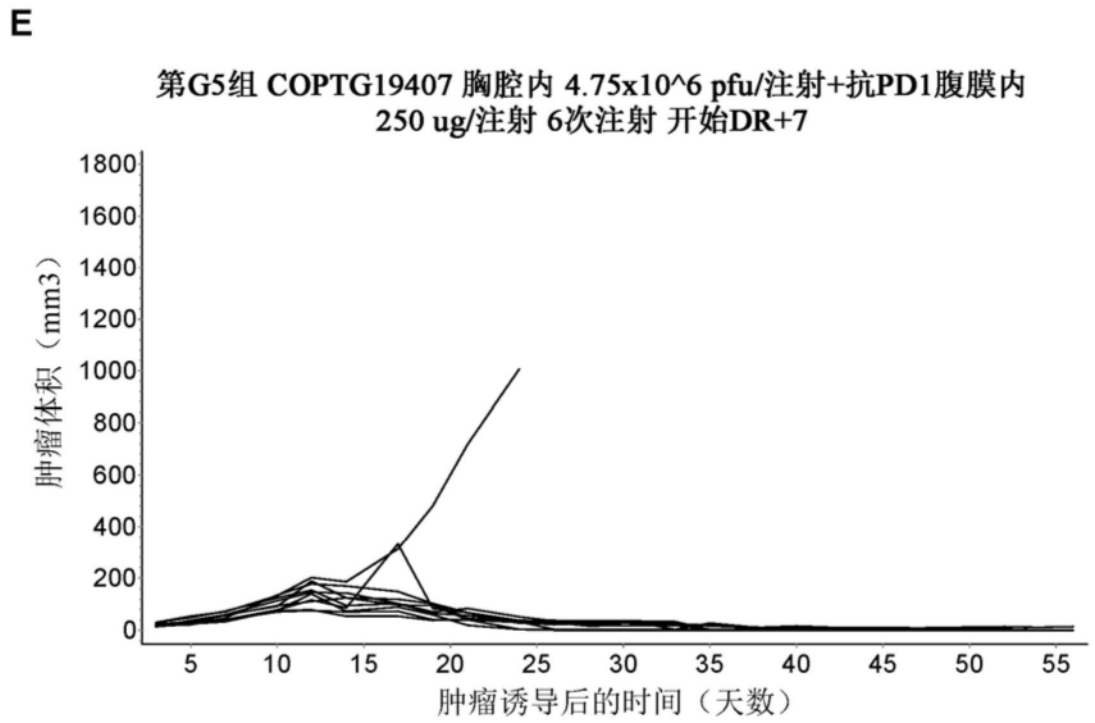

E
第G5组 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射+抗PD1腹膜内
250 ug/注射 6次注射 开始DR+7
肿瘤体积（mm3）
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
肿瘤诱导后的时间（天数）

图40续

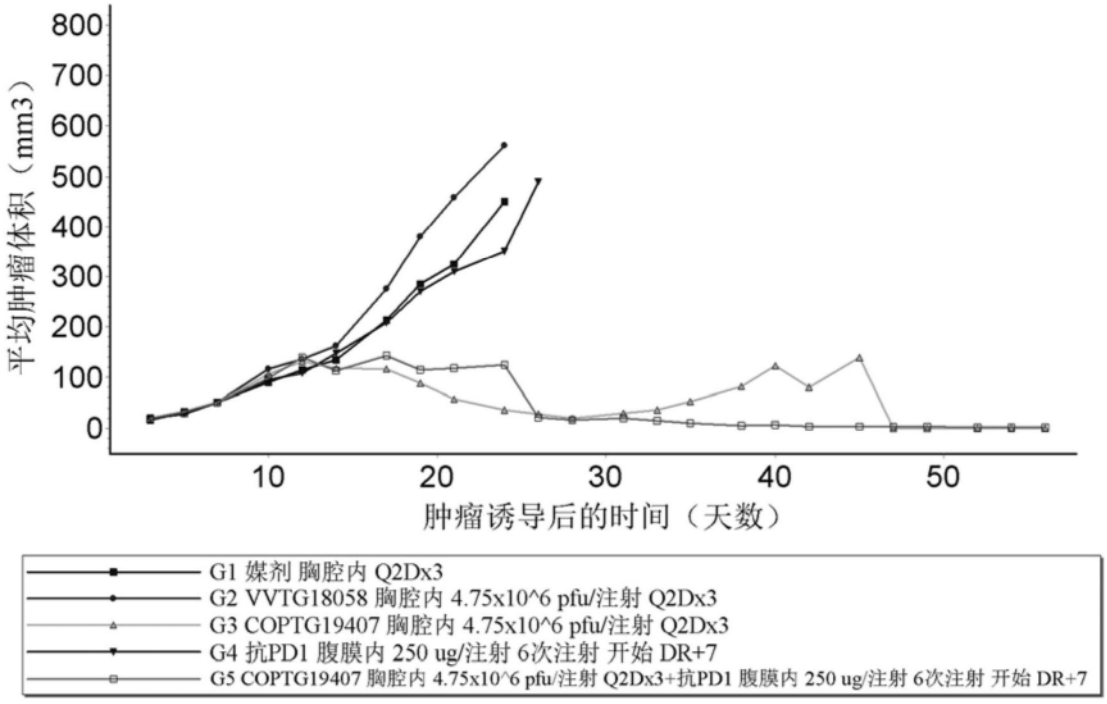

平均肿瘤体积（mm3）
800
700
600
500
400
300
200
100
0
10
20
30
40
50
肿瘤诱导后的时间（天数）
G1 媒剂 胸腔内 Q2Dx3
G2 VVTG18058 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
G3 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3
G4 抗PD1 腹膜内 250 ug/注射 6次注射 开始 DR+7
G5 COPTG19407 胸腔内 4.75x10^6 pfu/注射 Q2Dx3+抗PD1 腹膜内 250 ug/注射 6次注射 开始 DR+7

图41