



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119587690 A

(43) 申请公布日 2025.03.11

(21) 申请号 202411004231.X

A61K 45/06 (2006.01)

(22) 申请日 2018.11.02

A61K 38/05 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/20 (2006.01)

62/581,380 2017.11.03 US

A61K 38/17 (2006.01)

62/592,778 2017.11.30 US

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201880085205.0 2018.11.02

(71) 申请人 精密生物制品股份有限公司

地址 美国

(72) 发明人 P·M·阿兰 K·Y·曾

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理人 刘晓东

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书2页 说明书35页

序列表(电子公布) 附图16页

(54) 发明名称

用于治疗人瘤瘤的单克隆抗体NEO-201

(57) 摘要

NEO-201是针对来自许多不同瘤瘤的大多数肿瘤组织具有高反应性的人源化IgG1单克隆抗体(mAb)，所述瘤瘤包括结肠癌、胰腺癌、胃癌、肺癌、乳腺癌和子宫癌，但绝大多数正常组织不被这种抗体识别。功能测定揭示NEO-201能够介导针对肿瘤细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)两者。此外，通过单独使用NEO-201以及与作为ADCC的效应细胞来源的人外周血单核细胞(PBMC)组合使用NEO-201进行治疗，体内人胰腺异种移植物瘤的生长大大减弱。在携带人肿瘤异种移植物的小鼠中的体内生物分布研究揭示，NEO-201优先在瘤瘤而不是器官组织中积聚。在非人灵长类动物中的单剂量毒性研究证明了NEO-201的安全性和耐受性，因为循环嗜中性粒细胞的短暂减少是所观察到的唯一相关副作用。

CN 119587690 A

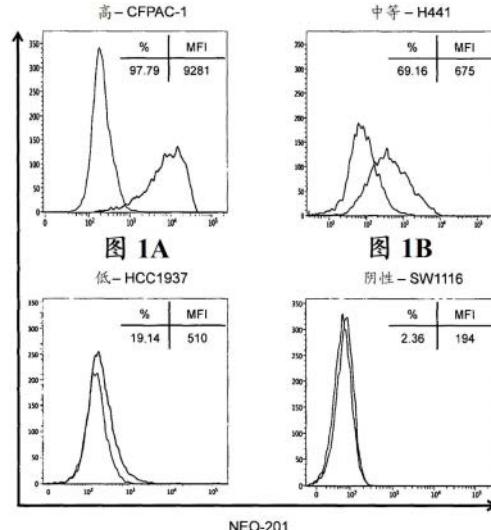


图 1C

图 1D

CN

1. 一种抗体在制备用于在癌瘤患者中杀伤癌瘤细胞的药物中的用途,所述患者已被确定为自然杀伤细胞(“NK”)消减型,从而所述患者中NK细胞占其外周血单核细胞(PBMC)的少于5%,和/或其中所述患者已经被确定为具有NK细胞缺乏症(NKD),并且其中所述抗体的应用在所述NK细胞消减型或NK细胞缺乏型患者中刺激ADCC-和CDC-介导的癌瘤细胞杀伤;

其中所述抗体包含:(i)含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-470的重链和含有SEQ ID NO:29的氨基酸20-233的轻链,或者SEQ ID NO:38的重链可变区和SEQ ID NO:39的轻链可变区,和(ii)人IgG1恒定区。

2. 一种抗体在制备用于在有需要的患者中治疗癌瘤的药物中的用途,所述患者已被确定为自然杀伤细胞(“NK”)消减型,从而所述患者中NK细胞占其外周血单核细胞(PBMC)的少于5%,和/或其中所述患者已经被确定为具有NK细胞缺乏症(NKD),并且其中所述抗体的应用在所述NK细胞消减型或NK细胞缺乏型患者中刺激ADCC-和CDC-介导的癌瘤细胞杀伤;

其中所述抗体包含:(i)含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-470的重链和含有SEQ ID NO:29的氨基酸20-233的轻链,或者SEQ ID NO:38的重链可变区和SEQ ID NO:39的轻链可变区,和(ii)人IgG1恒定区。

3. 一种抗体在制备用于在有需要的患者中预防癌瘤复发的药物中的用途,所述患者已被确定为自然杀伤细胞(“NK”)消减型,从而所述患者中NK细胞占其外周血单核细胞(PBMC)的少于5%,和/或其中所述患者已经被确定为具有NK细胞缺乏症(NKD),并且其中所述抗体的应用在所述NK细胞消减型或NK细胞缺乏型患者中刺激ADCC-和CDC-介导的癌瘤细胞杀伤;

其中所述抗体包含:(i)含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-470的重链和含有SEQ ID NO:29的氨基酸20-233的轻链,或者SEQ ID NO:38的重链可变区和SEQ ID NO:39的轻链可变区,和(ii)人IgG1恒定区。

4. 一种抗体在制备用于在有需要的患者中降低患有癌瘤的患者的肿瘤负荷的药物中的用途,所述患者已被确定为自然杀伤细胞(“NK”)消减型,从而所述患者中NK细胞占其外周血单核细胞(PBMC)的少于5%,和/或其中所述患者已经被确定为具有NK细胞缺乏症(NKD),并且其中所述抗体的应用在所述NK细胞消减型或NK细胞缺乏型患者中刺激ADCC-和CDC-介导的癌瘤细胞杀伤;

其中所述抗体包含:(i)含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-470的重链和含有SEQ ID NO:29的氨基酸20-233的轻链,或者SEQ ID NO:38的重链可变区和SEQ ID NO:39的轻链可变区,和(ii)人IgG1恒定区。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中所述患者已被确定为在所述施用之前或在所述施用时是重度NK消减型。

6. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中所述患者已被确定为患有NK细胞缺乏症(NKD),包括CNKD(例如,CNKD1、CNKD2)或FNKD(例如,FNKD1)。

7. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中所述患者由于另一种疗法而为NK消减型或重度NK消减型。

8. 如权利要求7所述的用途,其中所述另一种疗法是化学疗法或放射疗法。

9. 如权利要求8所述的用途,其中所述化学疗法包括一种或多种蛋白酶体抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、遗传毒性剂、GSK抑制剂、BET抑制剂、HSP90抑制剂、微管装配抑制剂和/

或免疫调节药物。

10. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中在施用所述药物之前或在施用所述药物时,所述患者中NK细胞占其外周血单核细胞(PBMC)的少于5%。

11. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中在施用所述药物之前或在施用所述药物时,所述患者中NK细胞占其外周血单核细胞(PBMC)的少于3%。

12. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中在施用所述药物之前或在施用所述药物时,所述患者中少于70%的PBMC NK细胞是CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞。

13. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中在施用所述药物之前或在施用所述药物时,所述患者中少于50%的PBMC NK细胞是CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞。

14. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中所述NEO-201抗体包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-470的重链和含有SEQ ID NO:29的氨基酸20-233的轻链,以及人IgG1恒定结构域。

15. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中所述药物还包括细胞因子激动剂以增强或刺激对癌瘤细胞的杀伤。

16. 如权利要求15所述的用途,其中所述细胞因子或细胞因子激动剂包括白介素2(IL-2)、白介素21(IL-21)、IL-15激动剂,任选地ALT-803、检查点抑制剂、抗PD1、抗PDL1、抗CTLA-4、抗41BB、抗OX40、抗Tim-3或它们的组合。

17. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中所述药物还包括补体调控蛋白(CRP)拮抗剂以增强或刺激对癌瘤细胞的杀伤。

18. 如权利要求17所述的用途,其中所述CRP拮抗剂拮抗CD46、CD55或CD59中的一者或多者。

19. 如权利要求17或18所述的用途,其中所述CRP拮抗剂包括抗体或其抗原结合片段。

## 用于治疗人癌瘤的单克隆抗体NEO-201

[0001] 本申请是申请日为2018年11月2日、发明名称为“用于治疗人癌瘤的单克隆抗体NEO-201”的中国发明专利申请No.201880085205.0的分案申请。

[0002] 相关申请公开内容

[0003] 本申请要求2017年11月30日提交的美国临时申请序列号62/592,778和2017年11月3日提交的美国临时申请序列号62/581,380的权益，所述临时申请各自特此以引用的方式整体并入。

[0004] 序列表信息

[0005] 本申请包括作为其公开内容的一部分的名称为“43282o4402.txt”的文件形式的生物序列表，所述生物序列表在2018年11月2日创建，大小为32,563字节，所述生物序列表特此以引用的方式整体并入。

### 背景技术

[0006] 癌症代表全球范围内最常见的死亡原因之一，预期早至2025年每年估计有2000万例新病例(Ferlay等人,2015)。治疗癌症的常规方法如手术、放射和化学疗法经常引发严重的副作用，而不能治愈大多数患有晚期疾病的患者，从而导致复发(Bodey等人,1996)。最近的治疗模式已经发展至选择性地靶向癌性细胞，同时在很大程度上避开正常的健康组织。其中，免疫疗法已成为癌症患者的重要治疗选择，因为它彻底改变癌症医学领域。

[0007] 癌症免疫疗法的潜在原理被称为免疫编辑(Mittal等人,2014)，免疫编辑是仅在细胞转化已经发生和癌症遏制的内在机制已经失败之后起始的癌症遏制的外在机制。免疫编辑过程在三个阶段中发生：消除、平衡和逃避。在消除和平衡阶段，癌细胞的免疫排斥分别占主导地位抑或与癌细胞增殖平衡以控制恶性生长。然而，在逃避阶段，一旦保持在检查中，癌细胞就可由于对免疫效应机制不敏感和/或在肿瘤微环境中诱导免疫遏制而逃避免疫识别。逃避免疫识别的癌细胞然后能够更自由地增殖并且生长为临幊上明显的疾病(Dunn等人,2004)。肿瘤免疫疗法的目的是通过产生和/或增大抗肿瘤免疫应答以抵消肿瘤生长、延迟肿瘤复发并延长存活来使癌细胞保持在消除期和/或平衡期(Carter,2001;Hodge等人,2006;Vergati等人,2010;Gabitzsch等人,2015)。治疗方法包括用检查点抑制性抗体、抗肿瘤疫苗和嵌合抗原受体(CAR)-T细胞治疗患者，所有这些利用T细胞的适应性免疫。然而，先天性免疫也可产生并增强抗肿瘤应答，并且肿瘤靶向单克隆抗体(mAb)可用于刺激先天性抗肿瘤免疫(Topalian等人,2011)。

[0008] NEO-201是针对Hollinshead同种异体结肠直肠癌疫苗平台产生的新颖人源化IgG1 mAb(Hollinshead等人,1970;Hollinshead等人,1972)。这种疫苗的免疫原性组分是源自从79名结肠癌患者手术切除的标本汇集的肿瘤细胞膜级分的肿瘤相关抗原(TAA)(Hollinshead等人,1985)。对这些细胞膜级分进行半纯化，针对结肠癌患者对比健康志愿者中迟发型超敏反应(DTH)进行筛选，并且在患有难治性结肠直肠癌的临床试验中进行评价(Hollinshead等人,1985;Hollinshead,US4810781,1989;Bristol和Kantor,美国专利号7829678,2010)。这些试验报告了在除了针对疫苗的细胞介导的应答外还发展持续IgG应答

的患者中如由抗肿瘤应答和总体存活的显著延长定义的临床益处,从而表明所述疫苗含有能够产生抗肿瘤抗体的免疫原性组分(Hollinshead, 1991)。这种原始结肠直肠癌疫苗用于在小鼠中产生单克隆抗体,从而产生先前描述的恩司昔单抗(NPC-1C/NEO-102)(Luka等人, 2011; Patel等人, 2013; Beg等人, 2016; Kim等人, 2017)和NEO-201。初步调查研究表明,NEO-201可结合CEACAM家族成员的肿瘤相关变体(Zeligs等人, 2017),并且正在努力进一步表征由NEO-201识别的一种或多种抗原和一种或多种特定表位。

[0009] 人癌胚抗原(CEA)家族由在染色体19q13.2上串联排列的29种基因组成。基于核苷酸同源性,这些基因被分类为两种主要亚科,CEACAM和妊娠特异性糖蛋白亚组。CEACAM编码的蛋白质包括CEA(CEACAM5)、CEA相关的细胞粘附分子(CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM6、CEACAM7和CEACAM8)。CEACAM家族属于Ig超家族。在结构上,人CEACAM中的每一者含有一个N-末端结构域,所述N-末端结构域包含108-110个氨基酸并且与Ig可变结构域同源,随后是不同数目(0至6)的Ig C2型恒定样结构域。所述CEACAM蛋白可彼此同嗜性地和异嗜性地相互作用。CEACAM1是这一家族中的独特蛋白质,因为它在其细胞质结构域中含有ITIM(基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序)样PD1。通过用ITIM磷酸化酪氨酸残基触发这种抑制作用,这导致含有Src同源性2结构域的酪氨酸磷酸酶-1和-2的募集。所述CEACAM1蛋白在多种免疫细胞上表达,所述免疫细胞包括单核细胞、粒细胞、活化的T细胞、B细胞和NK细胞。CEACAM1作为若干同种型出现,两种主要的同种型是分别具有长(L)或短(S)细胞质结构域的CEACAM1-L和CEACAM1-S。CEACAM1-S表达在人白细胞中完全缺乏。CEACAM1-L在对CD16呈阴性、但对CD56呈阳性的活化的人NK细胞的亚群上表达。

[0010] 单克隆抗体(mAb)由对给定mAb具有特异性的独特抗原结合区域(抗原结合片段,Fab)和为相同同种型的所有mAb所共有的恒定区(可结晶片段,Fc)。Fc区能够通过与特定免疫细胞类型的表面上表达的Fc受体(FcR)家族成员接合来调节免疫细胞活性。特别地,人IgG1mAb可与巨噬细胞和NK细胞上表达的Fc $\gamma$ 受体IIIa受体(Fc $\gamma$ RIIIa,CD16)相互作用。这种相互作用可刺激巨噬细胞吞噬经mAb调理的癌细胞,并且可活化NK细胞以通过已知为抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的机制使癌细胞脱粒并溶解。ADCC已被证明是许多临床前研究中的体内抗肿瘤作用的关键介质,并且在用于癌症疗法的若干mAb的作用机制中发挥重要作用(Seidel等人, 2013)。临幊上批准的可介导ADCC的mAb的实例包括曲妥珠单抗,其靶向乳腺癌的HER2受体(Seidel等人, 2013; Petrićević等人, 2013);利妥昔单抗,其靶向淋巴瘤的pan-B细胞标志物CD20(Seidel等人, 2013; Dall' Ozzo等人, 2004);西妥昔单抗,其靶向结肠直肠癌和头颈癌的表皮生长因子受体(EGFR)(Seidel等人, 2013; Levy等人, 2009; Kawaguchi等人, 2007; Lopez-Albaitero等人, 2009);以及阿维鲁单抗,其靶向梅克尔细胞瘤和膀胱癌的免疫遏制性配体PD-L1(Boyerinas等人, 2015)。另外,Fc区可潜在地与C1复合物相互作用以激活补体依赖性细胞毒性(CDC),其中在细胞质膜中形成空隙(造成被抗体靶向的细胞的裂解)时蛋白质水解级联达到顶峰。即使已经在体外证明抗肿瘤CDC的情况下,抗肿瘤CDC对于癌症的mAb疗法的临床功效是否至关重要仍然存在争议(Meyer等人, 2014)。

[0011] 申请人的先前美国专利号5,688,657、7,314,622、7,491,801、7,763,720、7,829,678、8,470,326、8,524,456、8,535,667、8,802,090、9,034,588、9,068,014、9,371,375、9,592,290、9,718,866和RE39,760(其各自特此以引用的方式整体并入)公开了各种抗癌抗

体、癌症抗原以及相关技术。

## 发明内容

[0012] 本文实施例中描述的研究评估NEO-201在临床前模型中的体外结合特征以及体内活性和定位。NEO-201表现出针对一系列人癌瘤(carcinoma)细胞系和肿瘤组织的广泛反应性,但未观察到结合大多数健康组织。此外,NEO-201在体外表现出针对人癌瘤细胞的ADCC和CDC活性,并且在很大程度上在体内单独和与作为ADCC的效应细胞来源的人外周血单核细胞(PBMC)组合减弱人胰腺异种移植物肿瘤的生长。最后,在非人灵长类动物中的单剂量毒性研究证明了NEO-201的安全性和耐受性,因为循环嗜中性粒细胞的短暂减少是所观察到的唯一副作用。这些研究提供了NEO-201作为用于各种各样的实体瘤的治疗的新治疗剂的潜在临床效用的基本原理。此外,主题抗体的所观察到的CDC活性开启了治疗免疫功能受损的患者的机会,在所述患者中ADCC预期不会有效,例如在因为他们的疾病或作为放射、化学疗法和其他疾病治疗的作用而免疫功能受损的患者中。

[0013] 先前报告了针对Hollinshead同种异体结肠直肠癌疫苗平台所产生的mAb(称为恩司昔单抗(NPC-1C/NEO-102))的临床前抗肿瘤活性(Patel等人,2013)以及临床安全性和功效(Beg等人,2016;Kim等人,2017)。这份报告描述了源自同一疫苗平台的第二肿瘤抗原靶向mAb(称为NEO-201)的表征。NEO-201被示出在体外阳性染色多种人癌瘤细胞系,包括源自多种肿瘤类型、组织学亚型和突变谱的细胞。NEO-201阳性更频繁地在源自肺腺癌对比鳞状细胞癌瘤的肿瘤细胞系和HER2阳性乳腺癌细胞系对比三阴性癌细胞系的肿瘤细胞系中观察到。人肿瘤样品的染色证明,各种各样的癌瘤组织对于NEO-201为染色阳性,包括结肠、胰腺、胃、肺、乳腺和子宫肿瘤。施用较大样品量的扩展调查研究可揭示,NEO-201可区分各种癌瘤中的组织学亚型与分子亚型。令人感兴趣的是,与培养的癌细胞系相比,较高比例的肿瘤组织与NEO-201反应。这一观察结果可指示,与体外相比,由NEO-201识别的靶标更容易在体内表达,这将表明靶标表达至少部分地取决于与来自局部微环境内的因子的肿瘤细胞相互作用。目前正在实验以进一步表征由NEO-201识别的一种或多种抗原和一种或多种表位,并且确定控制其在肿瘤组织而不是正常组织中的表达的已知或多种调控控制机制。

[0014] 此调查研究还揭示,NEO-201在其染色谱中是显著肿瘤特异性的,因为绝大多数健康正常组织和邻近肿瘤组织的正常组织被发现是对于NEO-201呈阴性。虽然NEO-201阳性在正常舌头和宫颈外组织中观察到,但染色强度弱,并且微阵列表示仅最小样品量(n=2)。将进行对正常组织样品中NEO-201染色的进一步扩展分析以确认这些观察结果。此外,NEO-201施用并未在小鼠中诱导任何可观察到的严重毒性,并且当施用至非人灵长类动物时是良好耐受的。非人灵长类动物中的嗜中性粒细胞的所观察到的消减表明,与NEO-201反应的一种或多种抗原在这些免疫细胞上表达,并且进行NEO-201与造血细胞类型的反应性的评估。这些令人鼓舞的结果表明,1)NEO-201可在区分来自患者活检的癌性组织与良性组织中具有诊断效用;并且2)NEO-201可有效地靶向肿瘤而不引起显著毒性或除嗜中性粒细胞减少以外的脱靶效应。目前正在努力进一步评价NEO-201的安全性和耐受性,并且正在计划使用NEO-201治疗癌瘤的临床试验。

[0015] 先天性免疫效应机制已证明在促进和增强宿主抗肿瘤免疫中起主要作用。众所周知,人IgG1 mAb的Fc部分活化针对受调理的靶标的先天性免疫,从而潜在介导ADCC和/或

CDC (Strome等人, 2007; Hayes J, 等人, 2017)。特别地,介导ADCC的能力被认为是批准用于治疗癌症的各种人IgG1 mAb的治疗功效的关键组成部分 (Boyerinas等人, 2015; Seidel等人, 2013; Petricevic等人, 2013; Dall' Ozzo等人, 2004; Levy等人, 2009; Kawaguchi等人, 2007; Lopez-Albaitero等人, 2009)。重要的是,FCGR3A基因(编码Fc  $\gamma$  RIIla)的V158F多态性与对于人IgG1 mAb的差别性亲和力相关 (Koene等人, 1997; Wu等人, 1997), 其中来自供体的具有高亲和力V/V基因型的免疫细胞在体外表现出更大的曲妥珠单抗介导的ADCC活性 (Musolino等人, 2008)。所述V/V基因型也显示与用曲妥珠单抗治疗的乳腺癌患者中的客观应答率和无进展存活显著相关 (Musolino等人, 2008), 从而提供ADCC在基于mAb的疗法中的作用的间接临床证据。NEO-201可在体外介导ADCC, 因为用NEO-201处理肿瘤细胞使NK细胞的细胞毒性活性增强2-5倍, 并且ADCC活性在甚至低浓度的抗体 (0.1 $\mu$ g/mL) 下保留。这些数据提高了以下可能性:具有V/V基因型的患者可从NEO-201治疗获得增加的益处。另外一种前景是增强ADCC活性的潜力, 并且可能地通过增强NK细胞功能与细胞因子刺激而增强NEO-201的潜在临床益处。众所周知IL-2是NK细胞的强效活化因子 (Hank等人, 1990), 并且IL-21显示增强由曲妥珠单抗和西妥昔单抗介导的ADCC活性 (Watanabe等人, 2010)。IL-15信号传导的新颖融合蛋白超激动剂(称为ALT-803)的最近临床前研究表现出大大增强的NK细胞(和CD8+T细胞)的增殖、活化和溶解能力, 从而在癌症的各种动物模型中产生显著抗肿瘤活性 (Han等人, 2011; Gomes-Giacaria等人, 2014; Mathios等人, 2016; Rhode等人, 2016; Kim等人, 2016; Felices等人, 2017)。有趣的是, 发现ALT-803显著增强体外NK细胞脱颗粒、IFN- $\gamma$ 产生以及针对B细胞淋巴瘤细胞系和原发性滤泡性淋巴瘤细胞的利妥昔单抗介导的ADCC, 并且在两种B细胞淋巴瘤模型中用ALT-803和利妥昔单抗组合治疗在体内产生显著降低的肿瘤细胞负荷和改善的存活 (Rosario等人, 2016)。

[0016] 由mAb潜在接合的另一种先天性免疫效应机制是补体系统的活化以促进CDC, 并且发现NEO-201具有介导CDC以杀伤肿瘤细胞的能力。CDC对mAb的治疗功效的贡献是有争议的, 但已提出对癌症疗法是有益的, 至少在一些特定情况下 (Meyer等人, 2014)。另外, 若干不同的补体调控蛋白(CRP)起作用来抑制补体活化, 并且据报告某些膜结合的CRP如CD46、CD55、CD59在各种癌症中异常表达 (Seya等人, 1994; Niehans等人, 1996; Donin等人, 2003), 这可能赋予对CDC的抗性。未来的调查研究将确定阻断CRP的策略是否能够增强NEO-201介导的抗性肿瘤细胞的CDC。

[0017] 体内NEO-201的评价揭示当与活化的人免疫效应细胞组合给药时的极大抗肿瘤作用。这种组合甚至导致来自两个组合组的一些小鼠 (5/20, 25%) 的全面消退。此外, 据发现NEO-201优先定位至异种移植植物肿瘤组织, 但不定位至各种健康组织。这些数据证实, NEO-201针对肿瘤的作用机制是先天免疫细胞对肿瘤细胞的ADCC依赖性溶解。然而, 应该指出, 在不向免疫缺陷小鼠添加人免疫细胞的情况下在单独NEO-201情况下也观察到抗肿瘤活性。这种现象可能是在体内遇到的条件特异的, 因为用NEO-201处理CFPAC-1肿瘤细胞在体外ADCC测定中未诱导显著毒性。在不存在免疫效应细胞情况下NEO-201活性的一种假设可以是CDC的诱导。NEO-201的CDC活性直接在实施例3中描述的进一步实验中证明。

[0018] 综上所述, 本调查研究表明, NEO-201是能够接合先天免疫效应机制(包括ADCC和CDC两者)以杀伤肿瘤细胞的显著肿瘤特异性抗体。此外, NEO-201在胰腺癌的体内异种移植模型中展示了安全性和抗肿瘤功效, 以及在非人灵长类动物中的耐受性。这些发现为

NEO-201作为患有各种各样的瘤的患者的诊断和治疗剂的临床发展提供支持性基本原理。所述结果也支持NEO-201用于免疫功能受损的患者(具有低NK细胞水平)中,因为即使在不存在稳健ADCC活性的情况下,抗肿瘤作用也可由CDC产生。

## 附图说明

[0019] 图1A-1D:结合至人瘤细胞系的NEO-201的流式细胞术。具有各种水平的NEO-201抗原表达的代表性人瘤细胞系,(图1A)胰CFPAC-1(高),(图1B)NSCLC H441(中等),(图1C)乳腺HCC1937(低),以及(图1D)结肠SW1116(阴性)。对于每种细胞系,结果表示为NEO-201阳性%和平均荧光强度(MFI)。红色,NEO-201染色的细胞;黑色,未染色的细胞。NEO-201阳性被定义为阳性% $\geq 10\%$ 。

[0020] 图2A-2C:NEO-201对人肿瘤样品的IHC染色。(图2A)代表性NEO-201来自结肠、胰腺、胃和肺样品的邻近正常组织和恶性组织染色。在100X下获得所有图像。(图2B)来自各种肿瘤组织的人肿瘤微阵列样品的NEO-201阳性染色的定量。(图2C)来自邻近肿瘤组织的正常组织的人肿瘤微阵列样品的NEO-201阳性染色的定量。 $n=$ 样品数。

[0021] 图3A-3C:NEO-201介导针对人肿瘤细胞系的ADCC和CDC。(图3A)使用CFPAC-1或ASPC-1细胞作为靶细胞的ADCC活性。将细胞用 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的NEO-201或人IgG1(阴性对照)进行处理。来自两个健康供体的纯化的NK细胞在所指示的E:T比率下用作效应细胞.\*，通过T检验统计上显著的( $p<0.05$ )。(图3B)用增加剂量的NEO-201处理的CFPAC-1细胞的ADCC测定从健康供体分离的NK细胞在12.5:1的E:T比率下用作效应细胞。所述图描绘经NEO-201处理肿瘤细胞对比用 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 人IgG1处理的对照细胞的特异性溶解的倍数增加(%).\*,通过T检验统计上显著的( $p<0.05$ )。(图3C)使用用所指示剂量的NEO-201处理持续所指示的持续时间的ASPC-1细胞的CDC测定.\*，通过T检验得出为统计上显著的( $p<0.05$ )。

[0022] 图4A-4D:NEO-201在CFPAC-1肿瘤异种移植物中的抗肿瘤功效。(图4A)在不同时间点来自每个处理组的CFPAC-1异种移植物的肿瘤体积测量值。在肿瘤细胞植入后第13、17和20天向小鼠( $n=10$ 只动物/组)腹膜内给予盐水溶液、人IgG1( $250\mu\text{g}$ )或NEO-201( $100$ 和 $250\mu\text{g}$ )。还在第14、18和21天向小鼠腹膜内给予约 $1.0\times 10^7$ 个IL-2活化的PBMC。(图4B)在第36天仍然携带可触及肿瘤的小鼠数目的定量。(图4C)NEO-201处理的对比盐水处理的携带肿瘤的小鼠的代表性图像。(图4D)在研究期间的不同时间点携带肿瘤的小鼠的体重测量值。

[0023] 图5A-5B:携带CFPAC-1异种移植物的小鼠中的NEO-201生物分布。来自静脉内给予放射性标记的NEO-201的携带CFPAC-1肿瘤的雌性(图5A)和雄性(图5B)小鼠的所指示的组织的标准化的放射性的测量。 $n=4$ 只动物/时间点。第1天、第2天、第4天和第7天表示放射性标记的抗体注射与尸检之间的时间量。

[0024] 图6A-6C:来自用NEO-201处理的食蟹猴的体重和嗜中性粒细胞计数。(图6A)在以所指示的剂量水平接受单剂量的NEO-201后7天和14天时测量猴的体重相对于基线(第-1天)的变化百分比。 $n=4$ 只动物/组(2名雌性,2名雄性)。(图6B)来自以所指示的剂量水平用单剂量的NEO-201处理的猴的血液的嗜中性粒细胞水平相对于基线(第-7天)的变化百分比。 $n=4$ 只动物/组(2名雌性,2名雄性)。(图6C)对于每个剂量和时间点,嗜中性粒细胞水平对比 $0\text{mg}/\text{kg}$ 对照的p值.\*通过T检验统计上显著的( $p<0.05$ )。

[0025] 图7A-7C:使用NEO-201的haNK ADCC测定(4小时)。靶细胞= $3000$ 个细胞/孔。(图

6A-6B) 在4小时用NEO-201(上部线,正方形符号)或IgG1阴性对照(下部线条,圆形符号)处理的H520肺癌瘤(图6A)或OV90卵巢癌瘤(图6B)细胞的随效应物:靶标(E:T)比率变化的特异性溶解百分比。E:T比率是6.25:1、12.5:1或25:1。mAb浓度是10 $\mu$ g/mL。所示的值是3次重复的平均值+/-SD。星号(\*)指示对比IgG阴性对照的统计学显著性( $p<0.01$ ,双尾t检验)。(图6C)在25:1的恒定E:T比率下在四小时用NEO-201(右,浅灰色条)或阴性对照IgG(左,实心黑色条)处理的肺、(H520,HCC827)、乳腺、(ZR-75-1)和卵巢(OV90)癌瘤细胞的特异性溶解百分比。mAb浓度是10 $\mu$ g/mL。所示的值是3次重复的平均值+/-SD。星号(\*)指示对比IgG阴性对照的统计学显著性( $p<0.01$ ,双尾t检验)。

[0026] 图8:用ALT-803处理增强由NEO-201介导的ADCC活性。将分离自两个正常供体的NK细胞用ALT-803(25ng/ml)或培养基对照处理48小时,并且用作使用Celigo成像血细胞计数器的4小时非放射性ADCC测定中的效应细胞。将CF-PAC1(人胰腺癌细胞系)细胞用钙黄绿素AM染色并且在3,000个细胞/孔下用作靶标。结果以特异性溶解%(SE)表示。

[0027] 图9:用ALT-803处理增强了人NK细胞上TIM-3和NKG2D的表达。将来自正常供体的纯化的人NK细胞在有或没有ALT-803(25ng/ml)的情况下培养48小时。结果以阳性细胞(MFI)的%表示。

[0028] 图10:用ALT-803处理增强了人NK细胞上TIM-3和NKG2D的表达。将来自另一正常供体的纯化的人NK细胞在有或没有ALT-803(25ng/ml)的情况下培养48小时。结果以阳性细胞(MFI)的%表示。

[0029] 图11:用ALT-803处理增强由低浓度的NEO-201介导的ADCC活性。将分离自正常供体(ND#6)的NK细胞用ALT-803(25ng/ml)或培养基对照处理48小时,并且用作使用Celigo成像血细胞计数器的4小时非放射性ADCC测定中的效应细胞。NEO-201以三种不同的浓度(10 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml和0.1 $\mu$ g/ml)使用。将CF-PAC1(人胰腺癌细胞系)细胞用钙黄绿素AM染色并且在3,000个细胞/孔下用作靶标。E:T=25:1。结果以特异性溶解%(SE)表示。\*统计上显著的( $p<0.01$ )。

[0030] 图12:用ALT-803处理增强由NEO-201介导的具有最低ADCC活性的正常供体(ND#8)的ADCC活性,并且所述活性可通过抗CD16和抗TIM-3抗体阻断。将分离自具有最低ADCC活性的正常供体的NK细胞用ALT-803(25ng/ml)或培养基对照处理48小时,并且用作使用Celigo成像血细胞计数器的4小时非放射性ADCC测定中的效应细胞。抗CD16和抗TIM-3在30 $\mu$ g/ml和15 $\mu$ g/ml的浓度下使用。在添加NEO-201和效应细胞之前将NK细胞用抗CD16或抗TIM-3预处理2小时。将CF-PAC1(人胰腺癌细胞系)细胞用钙黄绿素AM染色并且在3,000个细胞/孔下用作靶标。NEO-201在10 $\mu$ g/ml的浓度下使用。E:T=25:1。结果以特异性溶解%(SE)表示。\*与无ALT-803处理相比统计上显著的( $p<0.01$ )。#与无抗CD16和抗TIM-3处理相比统计上显著的( $p<0.01$ )。

[0031] 图13:使用NEO-201的NK-92杀伤测定(16小时)。将靶肿瘤细胞(ASPC-1、BxPC-3、CFPAC-1或LS174T)以3000个细胞/孔接种。然后将细胞用10 $\mu$ g/mL的人IgG1同种型对照抗体或NEO-201处理,并且然后以1.5625:1、3.125:1、6.25:1和12.5:1的效应物与靶标(E:T)比率添加自然杀伤(NK)细胞系NK-92。在37°C下16小时孵育后,使用Celigo成像血细胞计数器和GraphPad Prism 7软件定量细胞活力。计数每个孔的活靶细胞(钙黄绿素AM+/PI-),并且计算特异性溶解。以图形方式示制出结果并且对于每种肿瘤细胞类型在下文。\*统计

上显著的( $p<0.05$ )。

### 具体实施方式

[0032] 在一方面,本公开提供了一种杀伤癌瘤细胞的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体。

[0033] 在一方面,本公开提供了一种治疗癌瘤的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体。

[0034] 在一方面,本公开提供了一种预防癌瘤复发的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体。

[0035] 在一方面,本公开提供了一种降低患有癌瘤的患者的肿瘤负荷的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体。

[0036] 所述抗体可介导补体介导的细胞毒性(CDC),从而杀伤所述患者体内的癌瘤细胞。

[0037] 在所述施用之前或在所述施用时,所述患者可为自然杀伤细胞("NK")消减型。在所述施用之前或在所述施用时,所述患者可为重度NK消减型。所述患者可患有NK细胞缺乏症(NKD),如CNKD(例如,CNKD1、CNKD2)或FNKD(例如,FNKD1)。所述患者可由于另一种疗法,例如癌症疗法(如化学疗法或放射疗法)而可为NK消减型或重度NK消减型。可用一种或多种蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米,MG132)、组蛋白脱乙酰酶抑制剂(例如,丙戊酸、曲古抑菌素A、辛二酰苯胺-异羟肟酸(SAH)、丁酸钠)、遗传毒性剂(例如,阿霉素、美法仑、顺铂、Ara-C、阿非迪霉素、丝裂霉素、甲氨蝶呤、依托泊苷)、GSK抑制剂(例如,Lic1、B10、SB21)、BET抑制剂(例如,JQ1)、HSP90抑制剂(例如,根赤壳菌素)、17-AAG)、微管装配抑制剂(例如,长春新碱、细胞松弛素D、诺考达唑、多西他赛)和/或免疫调节药物(例如,来那度胺)治疗所述患者。

[0038] 所述方法可包括在所述施用之前或在所述施用时,确定所述患者是否为NK消减型。

[0039] 所述方法可包括在所述施用之前或在所述施用时,确定所述患者是否为重度NK消减型。

[0040] 在所述方法中,在所述施用之前或在所述施用时,NK细胞可占所述个体中的外周血单核细胞(PBMC)的少于5%。

[0041] 在所述方法中,在所述施用之前或在所述施用时,NK细胞可占所述个体中的外周血单核细胞(PBMC)的少于3%。

[0042] 在所述方法中,在所述施用之前或在所述施用时,所述患者中少于70%的PBMC NK细胞可以是CD56dimCD16+NK细胞。

[0043] 在所述方法中,在所述施用之前或在所述施用时,所述患者中少于50%的PBMC NK细胞可以是CD56dimCD16+NK细胞。

[0044] 所述NEO-201抗体可包含SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29中含有的CDR序列中的至少一个、两个、三个、四个、五个或全部六个。

[0045] 所述NEO-201抗体可包含与SEQ ID NO:38具有至少90%同一性的可变重链序列。

[0046] 所述NEO-201抗体可包含与SEQ ID NO:39具有至少90%同一性的可变轻链序列。

[0047] 所述NEO-201抗体可包含与SEQ ID NO:38具有至少90%同一性的可变重链序列和

与SEQ ID NO:39具有至少90%同一性的可变轻链序列。

[0048] 所述NEO-201抗体可包含与SEQ ID NO:28的氨基酸20-470具有至少90%同一性的重链序列和与SEQ ID NO:29的氨基酸20-233具有至少90%同一性的轻链序列。

[0049] 所述NEO-201抗体可包含SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29中含有的CDR序列中的全部六个。

[0050] 所述NEO-201抗体可包含人IgG1恒定结构域。

[0051] 所述NEO-201抗体可以是人源化抗体。

[0052] 所述NEO-201抗体可缀合至另一部分。

[0053] 所述NEO-201抗体可缀合至另一细胞毒性部分、标记、放射性部分或亲和标签。

[0054] 所述方法还可包括向所述患者施用有效量的细胞因子激动剂以增强或刺激对所述癌瘤的细胞的杀伤。所述细胞因子激动剂可包括白介素2(IL-2)、白介素21(IL-21)、ALT-803、IL-15抑制剂、检查点抑制剂、抗PD1、抗PDL1、抗CTLA-4、抗41BB、抗OX40、抗Tim-3或它们的组合。

[0055] 所述方法还可包括向所述患者施用有效量的补体调控蛋白(CRP)拮抗剂以增强或刺激对所述癌瘤的细胞的杀伤。所述CRP拮抗剂可拮抗CD46、CD55或CD59中的一者或多者。所述CRP拮抗剂可包含抗体或其抗原结合片段。

[0056] 所述细胞因子激动剂可包括IL-15激动剂或IL-15超激动剂。

[0057] 所述细胞因子激动剂可包括由结合至IL-15受体 $\alpha$ /IgG1 Fc融合蛋白的IL-15突变体(IL-15N72D)组成的复合物，如ALT-803。

[0058] 与在无所述细胞因子激动剂的情况下单独用NEO-201抗体治疗相比，所述NEO-201抗体的有效剂量可降低。

[0059] 所述癌瘤可包括结肠癌。所述癌瘤可包括胰腺癌。所述癌瘤可包括卵巢癌。所述癌瘤可包括胃癌。所述癌瘤可包括肺癌。所述癌瘤可包括乳腺癌。所述癌瘤可包括子宫癌。

[0060] 在另一个实施方案中，本公开提供了一种杀伤癌瘤细胞的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体，其中在所述施用之前或在所述施用时，所述患者为自然杀伤细胞(“NK”)消减型。所述NK消减可包括在源自患者的样品中，例如血液样品中，所述患者的小于5%或小于3%的外周血单核细胞(PBMC)是NK细胞。或者或此外，在所述施用之前或在所述施用时，所述患者中少于70%(或任选地少于50%)的PBMC NK细胞可以是CD56dimCD16+NK细胞。

[0061] 在另一个实施方案中，本公开提供了一种治疗癌瘤的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体，其中在所述施用之前或在所述施用时，所述患者为自然杀伤细胞(“NK”)消减型。

[0062] 在另一个实施方案中，本公开提供了一种预防癌瘤的复发的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体，其中在所述施用之前或在所述施用时，所述患者为自然杀伤细胞(“NK”)消减型。

[0063] 在另一个实施方案中，本公开提供了一种降低患有癌瘤的患者的肿瘤负荷的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体，其中在所述施用之前或在所述施用时，所述患者为自然杀伤细胞(“NK”)消减型。

[0064] 在前述方法中，所述抗体可介导CDC，从而杀伤所述患者中的癌瘤细胞，例如，尽管

由于患者为NK消减型而不存在有效ADCC。在所述施用时，所述患者可为重度NK消减型。任选地，所述方法还包括例如在所述施用时或所述施用之前的一段时间内，如在之前1或2周内确定所述患者为NK消减型还是重度NK消减型。NK消减型或重度NK消减型状态也可从患者的病史推断，如消减NK细胞的另一种疗法的之前或同时使用。例如所述患者已经历或同时经历癌症疗法，如放射疗法或化学疗法。所述癌症疗法可包括施用一种或多种蛋白酶体抑制剂（例如，硼替佐米，MG132）、组蛋白脱乙酰酶抑制剂（例如，丙戊酸、曲古抑菌素A、辛二酰苯胺-异羟肟酸（SAH）、丁酸钠）、遗传毒性剂（例如，阿霉素、美法仑、顺铂、Ara-C、阿非迪霉素、丝裂霉素、甲氨蝶呤、依托泊苷）、GSK抑制剂（例如，LiCl、BIO、SB21）、BET抑制剂（例如，JQ1）、HSP90抑制剂（例如，根赤壳菌素（radicicola））、17-AAG）、微管装配抑制剂（例如，长春新碱、细胞松弛素D、诺考达唑、多西他赛）和/或免疫调节药物（例如，来那度胺）。

[0065] 所述患者可患有NK细胞缺乏症（NKD），如CNKD（例如，CNKD1、CNKD2）或FNKD（例如，FNKD1）。

[0066] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中，所述NEO-201抗体可包含SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29中含有的CDR序列中的至少一个、两个、三个、四个、五个或全部六个。

[0067] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中，所述NEO-201抗体可包含与SEQ ID NO:38具有至少80%、至少85%、至少90%或最优先至少95%同一性的可变重链序列。具有所述序列同一性百分比的所述可变重链可包含SEQ ID NO:38中含有的CDR序列中的全部3个。

[0068] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中，所述NEO-201抗体可包含与SEQ ID NO:39具有至少80%、至少85%、至少90%或最优先至少95%同一性的可变轻链序列。所述可变轻链可包含SEQ ID NO:39中含有的CDR序列中的全部3个。

[0069] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中，所述NEO-201抗体可包含与SEQ ID NO:38具有至少80%、至少85%、至少90%或最优先至少95%同一性的可变重链序列和与SEQ ID NO:39具有至少80%、至少85%、至少90%或最优先至少95%同一性的可变轻链序列。所述可变轻链可包含SEQ ID NO:39中含有的CDR序列中的全部3个，并且具有所述序列同一性百分比的所述可变重链可包含SEQ ID NO:38中含有的CDR序列中的全部3个。

[0070] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中，所述NEO-201抗体可包含与SEQ ID NO:28的氨基酸20-470具有至少80%、至少85%、至少90%或最优先至少95%同一性的重链序列和与SEQ ID NO:29的氨基酸20-233具有至少80%、至少85%、至少90%或最优先至少95%同一性的轻链序列。所述轻链可包含SEQ ID NO:29中含有的CDR序列中的全部3个，并且具有所述序列同一性百分比的所述重链可包含SEQ ID NO:28中含有的CDR序列中的全部3个。

[0071] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中，所述NEO-201抗体可包含SEQ ID NO:28中含有的重链可变区序列和SEQ ID NO:29中含有的轻链可变区序列。

[0072] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中，所

述NEO-201抗体可包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-470的重链序列和含有SEQ ID NO:29的氨基酸20-233的轻链序列。

[0073] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述NEO-201抗体包含人IgG1恒定结构域。

[0074] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述NEO-201抗体可以是人源化抗体。

[0075] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述NEO-201抗体可缀合至另一部分,如另一细胞毒性部分、标记、放射性部分或亲和标签。

[0076] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述方法还可包括向所述患者施用有效量的细胞因子激动剂以增强或刺激对所述瘤的细胞的杀伤。所述细胞因子激动剂可包括白介素2(IL-2)、白介素21(IL-21)、ALT-803、IL-15抑制剂、检查点抑制剂、抗PD1、抗PDL1、抗CTLA-4、抗41BB、抗OX40、抗Tim-3或它们的组合。

[0077] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述方法还可包括向所述患者施用有效量的补体调控蛋白(CRP)拮抗剂以增强或刺激对所述瘤的细胞的杀伤。所述CRP拮抗剂可拮抗CD46、CD55或CD59中的一者或多者。所述CRP拮抗剂可包含抗体或其抗原结合片段。所述细胞因子激动剂可包括IL-15激动剂或IL-15超激动剂。所述细胞因子激动剂可包括由结合至IL-15受体 $\alpha$ /IgG1 Fc融合蛋白的IL-15突变体(IL-15N72D)组成的复合物。所述细胞因子激动剂可包括ALT-803。

[0078] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,与在无所述细胞因子激动剂的情况下单独用NEO-201抗体治疗相比,所述NEO-201抗体的有效剂量降低。

[0079] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述瘤可表达NEO-201抗原。NEO-201抗原的所述表达可通过检测所述瘤的样品中的NEO-201抗原来确定。所述检测可通过包括但不限于以下的技术来进行:组织学染色、流式细胞仪术、RT-PCR、点印迹、蛋白质印迹、RNA印迹以及本领域中已知的其他技术。在复发性或转移性瘤的情况下,NEO-201抗原的表达还可通过原发性瘤中NEO-201的表达或通过原发性瘤对NEO-201抗体疗法的应答性来推断。

[0080] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述瘤可包括结肠癌。

[0081] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述瘤可包括胰腺癌。

[0082] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述瘤可包括卵巢癌。

[0083] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述瘤可包括胃癌。

[0084] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述瘤可包括肺癌。

[0085] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述瘤可包括乳腺癌。

[0086] 在可与前述或以下实施方案中的任一项一起使用的本发明的优选实施方案中,所述癌症可包括子宫癌。

[0087] 定义

[0088] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的那些含义相同的含义。尽管可在本发明中或本发明的测试中使用与本文所述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料,但本文描述了适合的方法和材料。所述材料、方法和实施例仅是说明性的并且不意图具有限制性。

[0089] 除非上下文另有明确指示,否则如在本文的描述和随后的整个权利要求中所使用的“一个/种(a/an)”和“所述”的含义包含复数指示物。

[0090] 如本文所用的“氨基酸”在广义上是指天然存在的氨基酸和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及随后经修饰的那些氨基酸,例如,羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和D-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构的化合物,所述基本化学结构即结合至氢的a碳、羧基、氨基和R基团,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。此类类似物具有经修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构、但其作用的方式类似于天然存在的氨基酸的化学化合物。

[0091] 如本文所用的术语“NK消减型”或“自然杀伤细胞消减型”是指相对于正常范围,患者具有低自然杀伤(NK)细胞水平。NK细胞是细胞毒性的先天性免疫淋巴细胞。通常,NK细胞占健康个体中的外周血单核细胞(PBMC)的5% - 20%。具有占PMBC的少于5%的NK细胞的患者被称为NK消减型。另外,如果NK细胞占PMBC的少于3%,则患者被称为重度NK细胞消减型。另外,在正常个体中,至多90%的PBMC NK细胞是CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞,并且这些被认为是毒性最高的亚群。如果少于70%的PBMC NK细胞是CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞,则所述患者被称为NK消减型。另外,如果少于50%的PBMC NK细胞是CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞,则所述患者被称为重度NK消减型。给定患者可基于满足这些个别标准中的一个或两个而被称为NK消减型或重度NK消减型。一般来说,通过测试从患者取得的样品,例如血液样品,例如,在一周或两周之前以内获得并进行测试的样品来确定患者的状态为NK消减型或重度NK消减型。也可从疾病诊断和/或与NK细胞的这种消减相关的治疗过程来推断患者的状态为NK消减型或重度NK消减型。

[0092] NK消减型还包括患有NK细胞缺乏症(NKD)的受试者。示例性Nkd条件包括经典Nkd(CNkd),其特征在于在外周血淋巴细胞中不存在NK细胞和它们的功能;功能性Nkd(FNkd),其特征在于外周血淋巴细胞内存在NK细胞,具有缺陷型NK细胞活性。在CNkd和FNkd两者中,NK细胞异常是主要免疫缺陷,其导致ADCC应答不足。CNkd和FNkd可基于患者特征,如一种或多种致病基因的身份和其他患者特征进行进一步细分。CNkd包括CNkd亚型1(CNkd1),其是常染色体显性并且与GATA2基因中的缺陷相关;以及CNkd亚型2(CNkd2),其是常染色体隐性并且与MCM4基因中的缺陷相关。FNkd包括FNkd1,其是常染色体隐性并且与FCCR3A基因中的缺陷相关。

[0093] 如本文所用的术语“抗体”在广义上是指具有与表位配合且识别表位的特定形状

的任何含多肽链分子结构,其中一种或多种非共价结合相互作用使分子结构与表位之间的复合物稳定。典型抗体分子是免疫球蛋白,并且来自所有来源(例如人、啮齿动物、兔、母牛、绵羊、猪、狗、鸡)的所有类型的免疫球蛋白IgG、IgM、IgA、IgE、IgD都视为“抗体”。抗体包括但不限于嵌合抗体、人抗体和其他非人哺乳动物抗体、人源化抗体、单链抗体(scFv)、骆驼抗体、纳米抗体、IgNAR(自鲨鱼获得的单链抗体)、小分子免疫药物(SMIP)和抗体片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>)。已经描述了许多抗体编码序列;并且其他抗体编码序列可通过本领域中熟知的方法来产生。参见Streltsov,等人(2005)Protein Sci.14(11):2901-9;Greenberg,等人(1995)Nature374(6518):168-173;Nuttall,等人(2001)Mol Immunol.38(4):313-26;Hamers-Casterman,等人(1993)Nature 363(6428):446-8;Gill,等人(2006)Curr Opin Biotechnol.17(6):653-8。

[0094] “NEO-201抗体”是指含有SEQ ID NO:28和29的重链和轻链或其中含有的可变区任选地连同恒定区,以及它们的片段和变体。此类变体包括含有SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29中含有的CDR序列中的一个、两个、三个、四个、五个或优选全部六个的序列,所述CDR序列即SEQ ID NO:32的重链CDR1、SEQ ID NO:33的重链CDR2、SEQ ID NO:34的重链CDR3、SEQ ID NO:35的轻链CDR1、SEQ ID NO:36的轻链CDR2以及SEQ ID NO:37的轻链CDR3。所述抗体可以是人源化抗体。所述抗体可表达为含有一个或多个前导序列,所述前导序列可在抗体的表达和/或加工和分泌过程中除去。所述抗体可以一价、二价或更高的多价形式呈现,包括但不限于含有所述NEO-201抗体序列和不同抗体的结合片段的双特异性或多特异性抗体。通常,所述抗体特异性地结合至瘤细胞并且与包含SEQ ID NO:38的可变重链和SEQ ID NO:39的可变轻链或包含SEQ ID NO:28的重链和SEQ ID NO:29的轻链的抗体竞争结合至瘤细胞。SEQ ID NO:28和/或SEQ ID NO:29中含有的那些CDR序列中的一个或多个可被变体序列取代,所述变体序列如SEQ ID NO:1或4的轻链CDR1;SEQ ID NO:2或5的轻链CDR2;SEQ ID NO:3或6的轻链CDR3;SEQ ID NO:7的重链CDR1;SEQ ID NO:8、10、30或31的重链CDR2;SEQ ID NO:9或11或SEQ ID NO:30-31的重链CDR3。所述轻链可包含SEQ ID NO:14、16、17、18、19、20、21或29的轻链序列中含有的CDR。所述重链可包含SEQ ID NO:15、22、23、24、25、26、27或29的重链序列中含有的CDR。所述抗体可包含与SEQ ID NO:38具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的可变重链序列和/或与SEQ ID NO:39具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的可变轻链序列,任选地其中所述重链和/或轻链序列含有SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29中含有的CDR序列中的一个、两个、三个、四个、五个或优选全部六个,所述CDR序列即SEQ ID NO:32的重链CDR1、SEQ ID NO:33的重链CDR2、SEQ ID NO:34的重链CDR3、SEQ ID NO:35的轻链CDR1、SEQ ID NO:36的轻链CDR2以及SEQ ID NO:37的轻链CDR3。所述抗体可缀合至另一部分,如细胞毒性部分、放射性部分、标记或纯化标签。

[0095] 如本文所用,“抗原”在广义上是指能够被抗体结合的分子或分子的一部分,所述抗原另外能够诱导动物产生能够结合至所述抗原的表位的抗体。抗原可具有一个表位,或者具有多个表位。本文提及的特异性反应指示,抗原将以高度选择性的方式与其相应的抗体反应,并且不与可被其他抗原诱发的多种其他抗体反应。抗原可以是肿瘤特异性的(例如,由胰腺癌瘤和结肠癌瘤的赘生性细胞表达。)

[0096] 如本文所用的“癌症”在广义上是指特征在于异常和不受控制的细胞分裂、从而引

起恶性生长或肿瘤的任何肿瘤性疾病(无论是侵入性还是转移性)。

[0097] 如本文所用的“嵌合抗体”在广义上是指这样的抗体分子,其中恒定区或其一部分被改变、置换或交换以使得抗原结合位点(可变区)连接至不同或改变类别、效应子功能和/或物种、或将新的性质赋予嵌合抗体的完全不同的分子(例如,酶、毒素、激素、生长因子、药物)的恒定区;或可变区或其一部分被改变、置换或与具有不同或改变的抗原特异性的可变区交换。

[0098] 如本文所用,“经保守修饰的变体”应用至氨基酸序列和核酸序列,并且关于特定核酸序列,在广义上是指经保守修饰的变体,是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者当核酸不编码氨基酸序列时是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,很多功能上相同核酸编码任何给定蛋白质。此类核酸变异是“沉默变异”,所述变异使经保守修饰的变异的一个种类。本文中编码多肽的每个核酸序列还说明每种可能的核酸沉默变异。技术人员将认识到在核酸中的每个密码子(除了通常为甲硫氨酸的仅有密码子的AUG和通常为色氨酸的仅有密码子的TGG)都可进行修饰以便产生功能上相同的分子。

[0099] 如本文使用的,“互补决定区”、“高变区”或“CDR”在广义上是指在抗体的轻链或重链的可变区中发现的一个或多个高变或互补决定区(CDR)。参见Kabat,等人(1987)  
*“Sequences of Proteins of Immunological Interest”*National Institutes of Health, Bethesda, MD。这些表述包括如由Kabat,等人(1983)  
*“Sequences of Proteins of Immunological Interest”*U.S.Dept.of Health and Human Services定义的高变区或抗体的3维结构中的高变环。Chothia和Lesk(1987)*J Mol.Biol.*196:901-917。每条链中的CDR通过框架区保持紧密靠近,并且与来自另一链的CDR一起促进抗原结合位点的形成。在CDR内,存在已描述为选择性决定区(SDR)的选择氨基酸,其代表由CDR在抗体-抗原相互作用中使用的关键接触残基。Kashmiri(2005)*Methods* 36:25-34。

[0100] 如本文所用,“对照量”在广义上是指标志物可以是有待与标志物的测试量进行比较的任何量或一系列的量。例如,标志物的对照量可以是患有特定疾病或疾患的患者或不患有这种疾病或疾患的人中的标志物的量。对照量可以是绝对量(例如,微克/ml)抑或相对量(例如,信号的相对强度)。

[0101] 如本文所用,“有差异地存在”在广义上是指与取自不患有疾病或疾患之一的患者的可比较的样品相比,存在于取自患有所述疾病或疾患的患者的样品中的标志物的量或质量上的差异。例如,如果一种样品中的核酸片段的量显著不同于另一种样品中的核酸片段的量,则核酸片段可任选地有差异地存在于所述两种样品之间,例如如通过杂交和/或基于NAT的测定所测量的。如果一种样品中的多肽的量显著不同于另一种样品中的多肽的量,则多肽可任选地有差异地存在于所述两种样品之间。应该指出的是,如果所述标志物在一种样品中是可检测的并且在另一种样品中是不可检测的,则可认为这种标志物是有差异地存在的。任选地,相对低量的上调可充当标志物。

[0102] 如本文所用,“诊断”在广义上是指鉴定病理性疾患的存在或性质。诊断方法在其敏感性和特异性方面存在不同。诊断测定的“灵敏度”是测试呈阳性的患病个体的百分比(“真阳性”的百分比)。未通过所述测定检测的患病个体是“假阴性”。未患病并且在所述测定中测试呈阴性的受试者被称为“真阴性”。诊断测定的“特异性”是1减去假阳性率,其中“假阳性”率被定义为测试呈阳性但不患有所述疾病的那些的比例。尽管特定诊断方法可能

不提供疾患的明确诊断,但是如果所述方法提供有助于诊断的阳性指示,它就是合格的。

[0103] 如本文所用,“诊断”在广义上是指将疾病或症状分级,确定疾病的严重性,监测疾病进展,预测疾病的后果和/或恢复的前景。术语“检测”还可任选地涵盖前述任一项。在一些实施方案中,根据本发明的疾病的诊断可受到确定从受试者获得的生物样品中的本发明的多核苷酸或多肽的水平的影响,其中所确定的水平可与对所述疾病的易感性、或所述疾病的存在或不存在有关。应该指出的是,“从受试者获得的生物样品”还可任选地包括未从所述受试者身体上移除的样品。

[0104] 如本文所用的“有效量”在广义上是指当施用至患者以用于治疗疾病时足以实现所述疾病的这种治疗的化合物、抗体、抗原或细胞的量。有效量可以是有效用于防治(*prophylaxis*)的量,和/或有效用于预防(*prevention*)的量。有效量可以是有效减少的量,有效预防体征/症状的发生、降低体征/症状的发生的严重程度、消除体征/症状的发生、减缓体征/症状的发生的发展、预防体征/症状的发生的发展和/或有效防治体征/症状的发生的量。“有效量”可取决于待治疗的患者的疾病及其严重程度以及年龄、体重、病史、易感性和先前存在的疾患而变化。出于本发明的目的,术语“有效量”与“治疗有效量”同义。

[0105] 如本文所用,“表达载体”在广义上是指用于在任何细胞,包括原核细胞、酵母细胞、真菌细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞中在体外或体内组成性地或诱导性地表达本发明的核酸序列的目的的任何重组表达系统。所述术语包括线性或环状表达系统。所述术语包括保持游离或整合到宿主细胞基因组中的表达系统。所述表达系统可具有自我复制或不自我复制(即驱动在细胞中的仅瞬时表达)的能力。所述术语包括仅含有重组核酸的转录所需的最少元件的重组表达盒。

[0106] 如本文所用,“框架区”或“FR”在广义上是指在抗体的轻链或重链的可变区内的一个或多个框架区。参见Kabat,等人(1987)“*Sequences of Proteins of Immunological Interest*”National Institutes of Health, Bethesda, MD。这些表述包括插入在抗体的轻链和重链的可变区内的CDR之间的那些氨基酸序列区。

[0107] 如本文所用,“异源”在广义上是指核酸的部分,指示核酸包含彼此在性质上未找出相同关系的两个或更多个子序列。例如,核酸通常重组地产生,从而使来自不相关基因的两个或更多个序列被安排,以便制备新的功能性核酸,例如,来自一种来源的启动子和来自另一种来源的编码区。相似地,异源蛋白指示蛋白质包含彼此在性质上未找出相同关系的两个或更多个子序列(例如,融合蛋白)。

[0108] 如本文所用,“高亲和力”在广义上是指抗体对靶抗原具有至少 $10^{-8}$ M、更优选至少 $10^{-9}$ M且甚至更优选至少 $10^{-10}$ M的KD。然而,对于其他抗体同种型,“高亲和力”结合可发生变化。例如,对于IgM同种型,“高亲和力”结合是指具有至少 $10^{-7}$ M、更优选至少 $10^{-8}$ M的KD的抗体。

[0109] 如本文所用,“同源性”在广义上是指核酸序列与参考核酸序列之间或多肽序列与参考多肽序列之间的相似性程度。同源性可以是部分的或完全的。完全同源性指示所述核酸或氨基酸序列是相同的。部分同源的核酸或氨基酸序列是与参考核酸或氨基酸序列不相同的核酸或氨基酸序列。同源性的程度可通过序列比较来确定。术语“序列同一性”可与“同源性”互换使用。

[0110] 如本文所用,“宿主细胞”在广义上是指含有表达载体并且支持所述表达载体的复

制或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞如大肠杆菌,或真核细胞如酵母、昆虫(例如, SF9)、两栖动物或哺乳动物细胞如CHO、HeLa、HEK-293,例如,培养的细胞、外植体和体内细胞。

[0111] 如本文所用,“杂交”在广义上是指互补(包括部分互补)的多核苷酸链通过在所述链被布置成彼此反向平行时在互补核苷酸之间形成氢键的物理相互作用。

[0112] 如本文所用,术语“K-assoc”或“Ka”在广义上是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率;而如本文所用,术语“Kdiss”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用,术语“KD”意图是指解离常数,其获自Kd与Ka的比值(即,Kd/Ka)并且被表示为摩尔浓度(M)。抗体的KD值可使用本领域完善建立的方法来确定。

[0113] 如本文所用,“免疫测定”在广义上是指使用特异性地结合抗原的抗体的测定。免疫测定的特征可在于使用特定抗体的特异性结合性质来分离、靶向和/或定量所述抗原。

[0114] 如本文所用,“分离的”在广义上是指从其所天然存在的原始环境中移除并且因此通过人工从其天然环境改变的材料。分离的材料可以是,例如,载体系统中包含的外源核酸、宿主细胞内所含外源核酸或者已经从其原始环境移除且因此人工改变的任何材料(例如,“分离的抗体”)。

[0115] 如本文所用,“标记”或“可检测部分”在广义上是指可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理方式检测的组合物。

[0116] 如本文所用,“低严格度”、“中等严格度”、“高严格度”或“极高严格度条件”在广义上是指用于核酸杂交和洗涤的条件。用于进行杂交反应的指导可在Ausubel,等人(2002) *Short Protocols in Molecular Biology*(5<sup>th</sup> Ed.) John Wiley&Sons, NY中找到。示例性的特异性杂交条件包括但不限于:(1)在约45℃下在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中、随后至少在50℃下在0.2XSSC、0.1% SDS中洗涤2次的低严格度杂交条件(对于低严格度条件,洗涤的温度可增加至55℃);(2)在约45℃下在6XSSC中、随后在60℃下在0.2XSSC、0.1% SDS中洗涤一次或多次的中等严格度杂交条件;(3)在约45℃下在6XSSC中、随后在65℃下在0.2XSSC、0.1% SDS中洗涤一次或多次的高严格度杂交条件;以及(4)极高严格度杂交条件是在65℃下0.5M磷酸钠、7% SDS,随后在65℃下在0.2XSSC、1% SDS中洗涤一次或多次。

[0117] 如本文所用,“哺乳动物”在广义上是指哺乳纲的任何和所有温血脊椎动物,包括人,其特征在于皮肤上覆盖毛发,并且在雌性中产乳乳腺用于养育幼崽。哺乳动物的实例包括但不限于羊驼、犰狳、水豚、猫、骆驼、黑猩猩、毛丝鼠、牛、狗、山羊、大猩猩、仓鼠、马、人、狐猴、美洲鸵、小鼠、非人灵长类动物、猪、鼠、绵羊、鼩、松鼠和貘。哺乳动物包括但不限于牛科动物、犬科动物、马科动物、猫科动物、鼠科动物、羊科动物、猪科动物、灵长类动物以及啮齿类动物物种。哺乳动物还包括由华盛顿特区的国家自然历史博物馆,史密森学会保持的世界哺乳动物物种上列出的任何和所有哺乳动物。

[0118] 如本文所用,“核酸”或“核酸序列”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸寡核苷酸。所述术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,即寡核苷酸。所述术语还涵盖具有合成主链的核酸样结构。除非另外指示,否则特定核酸序列也隐含地涵盖它的经保守性修饰的变体(例如,简并密码子取代)和互补序列,以及明确指示的序列。术语核酸可与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸以及多核苷酸互换使用。

[0119] 如本文所用,术语“可操作地连接”在广义上是指将两个DNA片段连接以使得由所

述两个DNA片段编码的氨基酸序列仍然在框架内。

[0120] 如本文所用,“互补位”在广义上是指识别抗原的抗体的一部分(例如,抗体的抗原结合位点。)互补位可以是抗体的Fv区的小区域(例如,15-22个氨基酸),并且可含有抗体的重链和轻链的部分。参见Goldsby,等人Antigens (Chapter3) Immunology(第5版)New York: W.H.Freeman and Company,第57-75页。

[0121] 如本文所用,“患者”在广义上是指需要治疗以减轻疾病状态或预防疾病状态的发生或复发的任何动物。此外,如本文所用,“患者”在广义上是指具有先前诊断的风险因素、病史、易感性、症状、体征,或处于疾病的风险或者是疾病的患者群体的成员的任何动物。患者可以是临床患者,如人或兽医患者,如伴侣动物、家养动物、家畜、珍奇动物或动物园动物。术语“受试者”可与术语“患者”互换使用。

[0122] “多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用并且在广义上是指氨基酸残基的聚合物。所述术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的类似物或模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物。所述术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。多肽可例如通过添加碳水化合物残基以形成糖蛋白来进行修饰。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”包括糖蛋白以及非糖蛋白。

[0123] 如本文所用,“启动子”在广义上是指指导核酸的转录的核酸序列。如本文所用,“启动子”包括转录起始位点附近的必需核酸序列,如在II型聚合酶启动子的情况下为TATA元件。启动子还任选地包括远端增强子或阻遏子元件,其可位于离转录起始位点远至数千碱基对的位置。“组成型”启动子是在大多数环境和发育条件下呈活性的启动子。“诱导型”启动子是在环境或发育调节情况下呈活性的启动子。

[0124] 如本文所用,“防治有效量”在广义上是指当施用至患者以用于防治疾病或预防疾病的复发时足以实现对所述疾病或复发的这种防治的化合物的量。防治有效量可以是有效预防体征和/或症状的发生的量。“防治有效量”可取决于待治疗的患者的疾病及其严重程度以及年龄、体重、病史、对疾患的易感性、先前存在的疾患而变化。

[0125] 如本文所用,“防治”在广义上是指治疗过程,其中体征和/或症状不存在于患者中、处于缓解或先前存在于患者中。防治包括预防继患者的疾病的治疗后发生的疾病。此外,预防包括治疗可潜在发展疾病的患者,尤其是易患所述疾病的患者(例如,患者群体的成员,具有风险因素的患者,或处于发展疾病的风险的患者)。

[0126] 如本文所用,关于产物,“重组”在广义上是指例如细胞或核酸、蛋白质或载体,指示所述细胞或核酸、蛋白质或载体已通过引入异源核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质来进行修饰,或者指示细胞源自如此修饰的细胞。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式中未发现的基因或者表达以其他形式异常表达、表达不充分或完全未表达的天然基因。

[0127] 如本文所用,“特异性地(或选择性地)结合”至抗体或“与……特异性地(或选择性地)免疫反应”或“特异性地相互作用或结合”在广义上是指蛋白质或肽(或其他表位),在一些实施方案中是指确定蛋白质以及其他生物制剂的异质群体中的蛋白质的存在的结合反应。例如,在指定的免疫测定条件下,特异性抗体与特定蛋白质的结合比背景(非特异性信号)大至少两倍,并且不以显著的量实质性地与所述样品中存在的其他蛋白质结合。通常,

特异性或选择性反应将是至少两倍背景信号或背景噪声，并且更通常大于约10倍至100倍背景。

[0128] 如本文所用，“可特异性杂交”和“互补”在广义上是指核酸可通过传统沃森-克里克(Watson-Crick)类型或其他非传统类型与另一核酸序列形成一个或多个氢键。核酸分子与其互补序列的结合自由能足够允许进行所述核酸的相关功能，例如RNAi活性。测定核酸分子的结合自由能在本领域中是熟知的。参见例如，Turner, 等人(1987) *CSH Symp. Quant. Biol.* LII:123-33; Frier, 等人(1986) *PNAS* 83:9373-77; Turner, 等人(1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109:3783-85。互补性百分比指示核酸分子中可与第二核酸序列形成氢键(例如沃森-克里克碱基配对)的连续残基的百分比(例如，10个中的至少约5、6、7、8、9、10个是至少约50%、60%、70%、80%、90%和100%互补的)。“完全互补”或100%互补性在广义上是指核酸序列的所有连续残基与第二核酸序列中的相同数目的连续残基进行氢键合。“实质性互补性”是指将多核苷酸链的被选择以便为非互补性的区域，如突出端除外，多核苷酸链展现至少约90%互补性。特异性结合需要足够互补性程度以避免寡聚化合物与非靶标序列在需要特异性结合的条件下(即在体内测定或治疗性治疗的情况下的生理条件下，或在体外测定的情况下在进行测定的条件下)的非特异性结合。非靶序列通常可因至少5个核苷酸而不同。

[0129] 如本文所用，疾病的“体征”在广义上是指指示疾病的、患者检查时可发现的任何异常；与疾病的主观指示的症状相比是疾病的客观指示。

[0130] 如本文所用，“固体支持物”、“支持物”和“基底”在广义上是指提供另一种材料可附着的固体或半固体结构的任何材料，包括但不限于光滑支持物(例如，金属、玻璃、塑料、硅和陶瓷表面)以及纹理化和多孔材料。

[0131] 如本文所用的“受试者”在广义上是指适于根据本发明进行治疗的受试者，包括但不限于禽类和哺乳动物受试者，并且优选哺乳动物。本发明的哺乳动物包括但不限于犬、猫、牛、山羊、马、绵羊、猪、啮齿动物(例如大鼠和小鼠)、兔类动物、灵长类动物、人。需要根据本发明治疗的任何哺乳动物受试者是适合的。两种性别和处于任何发育阶段(即，新生儿、婴儿、少年、青年、成年)的人受试者能够根据本发明来治疗。本发明也可出于兽医学目的和出于药物筛选和药物开发目的在动物受试者，特别是哺乳动物受试者，如小鼠、大鼠、狗、猫、牛、山羊、绵羊和马上进行。“受试者”可与“患者”互换使用。

[0132] 如本文所用的疾病的“症状”在广义上是指患者经历且指示疾病的，相对于正常结构、功能或感觉的任何病理现象或偏离。

[0133] 如本文所用，“疗法(Therapy)”、“治疗性(therapeutic)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”在广义上是指治疗疾病，遏制或减少疾病或其临床症状的发展，和/或缓解疾病，从而使疾病或其临床症状消退。疗法涵盖防治(prophylaxis)、治疗、补救、减少、减轻和/或使疾病、疾病的体征和/或症状缓解。疗法涵盖具有发展中的疾病体征和/或症状(例如，肿瘤生长、转移)的患者的体征和/或症状的减轻。疗法还涵盖“防治”。出于疗法目的，术语“减少”在广义上是指体征和/或症状的临床显著减少。疗法包括治疗复发或复发性体征和/或症状(例如，肿瘤生长、转移)。疗法涵盖但不限于排除任何时候体征和/或症状的出现以及减少现有体征和/或症状和消除现有体征和/或症状。疗法包括治疗慢性疾病(“维持”)和急性疾病。例如，治疗包括治疗或预防复发或体征和/或症状(例如，肿瘤生长、转移)

的复发。

[0134] 如本文所用，“可变区”或“VR”在广义上是指抗体中的各对轻链和重链内直接参与抗体与抗原的结合的结构域。每条重链在一端具有可变结构域( $V_H$ )，接着是多个恒定结构域。每个轻链在一端具有可变结构域( $V_L$ )且在它的另一端具有恒定结构域；轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准，并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对准。

[0135] 如本文所用，“载体”在广义上是指能够在宿主细胞中自主复制并且特征在于一个或少量限制性核酸内切酶识别位点的质粒、粘粒、噬菌粒、噬菌体DNA或其他DNA分子，在所述限制性核酸内切酶识别位点处可以可确定的方式切割此类DNA序列而不丧失载体的基本生物学功能，并且DNA可插入所述限制性核酸内切酶识别位点中以便带来它的复制和克隆。载体还可含有适合在用载体转化的细胞的鉴定中使用的标志物。

[0136] 所述技术和程序通常根据本领域中熟知的常规方法和贯穿本说明书中引用且论述的各种通用和更特定的参考文献中所述来进行。参见例如，Sambrook, 等人(2001) Molec. Cloning: Lab. Manual [第3版] Cold Spring Harbor Laboratory Press。标准技术可用于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养以及转化(例如电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术可根据制造商的说明书或如本领域中通常实现或如本文所述来进行。关于本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学使用的命名法和本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学的实验室程序和技术是本领域中熟知的并且通常使用的。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及治疗患者。

#### [0137] 实施例

[0138] 现已总体上描述本发明，参考以下实施例将更容易理解本发明，所述实例被包括仅出于说明本发明的某些方面和实施方案的目的并且不意图限制本发明。

#### [0139] 实施例1

##### [0140] NEO-201结合至各种人瘤瘤细胞系

[0141] 流式细胞术分析用于剖析一组人瘤瘤细胞系的NEO-201结合。染色谱总结于表1中，并且来自具有高、中、低和负染色的细胞系的代表性直方图在图1A-1C中示出。对NEO-201的结合活性的评估揭示，3/6 (50%) 结肠癌细胞系和4/5 (80%) 胰腺癌细胞系是高度阳性的。当对各种组织学亚型的非小细胞肺癌瘤(NSCLC) 细胞系进行谱分析时，确定3/5 (60%) 的腺癌细胞系与NEO-201反应，而仅1/4 (25%) 的鳞状细胞瘤细胞系被发现为阳性。还进行了乳腺癌细胞系的筛选。在表达雌激素受体(ER) 或孕激素受体(PR) 的细胞系中，无论单独使用还是与HER2结合，2/4 (50%) 对NEO-201染色为阳性。在HER2+细胞系中，无论单独使用还是与ER或PR组合，3/4 (75%) 由NEO-201识别。然而，NEO-201染色在仅1/4 (25%) 的三阴性乳腺癌细胞系上以低水平发现。总计，15/30 (50%) 的所测试的肿瘤细胞系由NEO-201识别。这些数据表明，NEO-201针对广泛范围的体外培养的肿瘤细胞系具有反应性，并且表明，抗体反应性中的明显差异可基于肿瘤亚型发生。

#### [0142] 实施例2

##### [0143] NEO-201组织染色是高度肿瘤特异性的

[0144] 使用代表每种癌症类型的许多样品的组织微阵列，使用免疫组织化学研究来研究来自人肿瘤样品的NEO-201反应性。如图2A所示，与NEO-201的免疫反应性7,829,678在正常结肠、胰腺和肺组织中完全不存在，但在来自这些器官的肿瘤组织中为高度阳性。引人注目

的是,染色被发现仅在肿瘤细胞上,因为周围基质细胞未被染色(图2A)。微阵列样品的IHC染色确定NEO-201针对结肠癌(72%)、胰腺癌(80%)、胃癌(71%)、肺癌(61%)、乳腺癌(55%)和子宫癌(54%)具有高反应性。另外,相当多的少数卵巢癌(26%)样品也表现出阳性染色,但在前列腺癌组织(图2B)中未观察到染色。总体上,258/345(74.7%)的取样的肿瘤组织对NEO-201染色呈阳性。重要的是,NEO-201反应性是来自正常健康组织(表2)和来自正常正常肿瘤相邻组织中几乎完全不存在(一些子宫和卵巢样品除外)(图2C)。然而,在此组子宫和卵巢组织中组织的数量有限(分别5个和9个样品)。总之,这些数据表明,NEO-201识别来自各种各样的肿瘤的肿瘤组织并且是高度肿瘤特异性的。

[0145] 实施例3

[0146] NEO-201介导ADCC和CDC以杀伤肿瘤细胞

[0147] 作为人源化IgG1抗体,NEO-201在理论上能够介导ADCC以杀伤表达NEO-201抗原的肿瘤细胞。为了研究这种潜在作用机制,对对于NEO-201染色呈高度阳性的细胞系进行ADCC测定,所述ADCC测定利用从来自两个不同的健康供体的PBMC中分离的人自然杀伤(NK)细胞(CFPAC-1和ASPC-1)。观察到用NEO-201处理使CFPAC-1和ASPC-1的杀伤增强至大于对照IgG1处理的肿瘤细胞的杀伤2至6倍的水平(图3A)。还进行了滴定实验,并且揭示NEO-201在低至0.1 $\mu$ g/mL的剂量下保留显著诱导ADCC能力(图3B)。

[0148] CDC是以膜攻击复合物的活化(其溶解抗体结合的靶细胞)告终的蛋白水解裂解的复杂级联。某些人IgG1抗体能够介导CDC,然而,CDC依赖于抗体的抗原特异性。CDC测定揭示,NEO-201以依赖于mAb剂量和孵育时间两者的方式诱导补体介导的ASPC-1细胞的溶解(图3C)。总之,这些数据表明,NEO-201有效接合先天性免疫效应机制以在体外特异地溶解抗体结合的肿瘤细胞。

[0149] 实施例4

[0150] NEO-201单独和与人PBMC效应细胞组合减少肿瘤异种移植物的生长

[0151] 为了确定NEO-201的潜在抗肿瘤功效,使CFPAC-1细胞作为肿瘤异种移植物在免疫功能受损的NU/NU裸鼠体内生长。这些细胞基于它们的高NEO-201抗原表达水平和对NEO-201介导的ADCC的高灵敏度进行选择。一旦CFPAC-1肿瘤生长至大约100mm<sup>3</sup>的大小,就向携带肿瘤的小鼠注射三次盐水、250 $\mu$ g人IgG1、100 $\mu$ g NEO-201或250 $\mu$ g NEO-201,随后注射三次1.0×10<sup>7</sup>IL-2活化的(200U/mL)人PBMC,以充当介导ADCC的效应细胞。如图4A所示,与盐水+PBMC或人IgG+PBMC对照组相比,NEO-201+PBMC在两种剂量水平下诱导肿瘤生长的显著减少。而没有来自对照组的小鼠在第36天无肿瘤,分别从NEO-201 100 $\mu$ g+PBMC和NEO-201 250 $\mu$ g+PBMC组剩余的10只中的1只(10%)和10只中的4只(40%)小鼠无可触及的肿瘤(图4B)。此外,向另一组小鼠给予NEO-201而不添加人PBMC,并且观察到相对于对照组肿瘤生长的显著减少(图4A,4C)。重要的是,监测携带肿瘤的小鼠的体重揭示任何处理组中没有重量降低(图4D)。总的来说,这些结果表明,NEO-201能够通过ADCC和非ADCC机制(如CDC)两者显著减少肿瘤生长,而不在小鼠中诱导显著毒性。

[0152] 实施例5

[0153] NEO-201定位在异种移植物肿瘤部位

[0154] 在具有建立的CFPAC-1异种移植物肿瘤的雌性和雄性NU/NU裸鼠中利用放射性标记的NEO-201进行了生物分布研究。将这些小鼠静脉内注射放射性标记的抗体,并且然后在

注射后的不同时间点收获血液、器官和肿瘤用于分析。在所有时间点在雄性和雌性小鼠中在胰腺、脾、肾、肝、胃、肠和肺中发现低水平的放射性(图5A,5B)。然而,放射性的标准化吸收在所有时间点在肿瘤中对比所有其他组织显著更高,到第7天肿瘤放射性逐步上升至比血液的放射性高20-30倍的水平(图5A,5B)。对于雌性和雄性小鼠获得定量上相似的结果。这些结果表明,NEO-201优先定位至表达靶抗原的恶性组织,并且在正常组织中不积聚。

[0155] 实施例6

[0156] 非人灵长类动物中的NEO-201药代动力学和毒性评价

[0157] 在有目的繁殖的食蟹猴中进行了单剂量研究以确定NEO-201药代动力学和相关的毒性。选择食蟹猴,因为这一物种是在系统发育和生理方面与人密切相关,并且是通常用于非临床毒性评价的物种。雌性和雄性动物接受单次静脉内输注5mg/kg、20mg/kg和49mg/kg剂量水平的稀释于盐水中的NEO-201,这是每输液体积可达到的最高剂量。在注射前和注射后的不同时间点在所有动物中抽取血液样品直至14天,并且通过ELISA评估血清制剂的NEO-201水平。如表3中所描绘的,通过最后收集时间点观察到NEO-201的可量化和剂量依赖性血清浓度(剂量后14天)。如所预期对于静脉内施用,对于来自所有组的大多数动物,T<sub>max</sub>值到10分钟达到峰值(10/12,83%),各自来自5mg/kg组的一只雄性和一只雌动物除外。在所评价的剂量范围内,峰值(C<sub>max</sub>)暴露与剂量成比例;总(AUC)暴露在最低剂量下大于剂量比例并且从20mg/kg至49mg/kg大致成比例。在最低剂量下暴露的差异归因于大约2倍更大的平均清除率(CL)和较小的分布体积(V<sub>d</sub>)。在较高剂量下平均半衰期(HL)是167(20mg/kg)或170(49mg/kg)小时,比5mg/kg剂量下(46.2小时)大大约3.7倍。未观察到性别差异。

[0158] 用于确定14天研究过程内的毒性的观察和检查包括1)定期临床评价;2)食物消耗和体重的测量;和3)尿液和血液评价,包括尿液分析、血液学、凝血试验、血清化学和毒代动力学。如图6A所示,没有任何剂量水平组经历了与它们的注射前重量相比体重变化>3%,并且没有单独猴经历了变化>7%。食物消耗仍然对于所有动物保持不变,但5mg/kg剂量组中的两只动物在第11天仅具有低消耗。血清化学、尿液分析或凝血试验中的任一者中从基线(NEO-201注射前)至第15天不存在显著变化(详情参见材料和方法)。血细胞计数的主要实验室变化是相对于基线嗜中性粒细胞计数的下降(图6B)。下降具有变化幅度,在从轻微至显著的范围内,并且明确剂量应答并不明显。对于大多数动物,这是短暂发现,因为改善通常到第8天注意到(图6B)。到第15天,对于5mg/kg组或20mg/kg和49mg/kg组,分别观察到嗜中性粒细胞计数几乎全部或部分恢复(图6B)。到第15天嗜中性粒细胞计数的恢复反映在与0mg/kg动物的统计比较中,对于所有3种剂量水平在第2天其显著不同(p<0.05),但对于三个剂量组中的两个,在8天和15天没有显著不同(p>0.05)(图6C)。

[0159] 实施例7

[0160] 材料与方法

[0161] 细胞系和培养

[0162] 从美国典型培养物保藏中心(Manassas,VA)获得以下人癌瘤细胞系:结肠(COLO 205、HT-29、LS174T、SW1116、SW1463、SW480、SW620)、胰腺(ASPC-1、CFPAC-1、PANC-1)、乳腺(AU-565、BT-474、BT-549、HCC1500、HCC1937、HCC38、MDA-MB-231、MDA-MB-468、SK-BR-3、T-47D、ZR-75-1)和肺(CALU-1、H1703、H226、H441、H520、H522、H596、HCC4006、HCC827、SK-LU-1)。所有细胞培养物保持在如由供应商指定的RPMI 1640、DMEM或IMDM培养基(Corning,

Corning, NY) 中进行繁殖和维持。培养基补充有10% USA来源的且热灭活的HyClone胎牛血清限定的(GE Healthcare Life Sciences, Issaquah, WA, USA)、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素(Corning Life Science, Manassas, VA, USA)。在适当的机构审查委员会批准和知情同意下从美国国立卫生研究院临床中心血库(NCT00001846)获得来自健康志愿者供体的PBMC。

[0163] 人源化NEO-201单克隆抗体的产生

[0164] Hollinshead结肠癌特异性疫苗用作免疫原性材料,以在小鼠中产生单克隆抗体。用于制备肿瘤相关蛋白质和肽的方法先前已进行了描述(Hollinshead, US4810781, 1989)。简言之,将癌症组织切碎并用于产生单细胞悬浮液,然后将单细胞悬浮液进行低渗盐水膜萃取、一系列离心步骤和随后低频超声处理。将所得膜萃取的蛋白质在Sephadex G-200树脂上或通过电泳法分级分离,然后浓缩并进行定量(Hollinshead等人, 1970; Hollinshead等人, 1972; Hollinshead等人, 1985)。将TAA制剂与完全弗氏佐剂共混,并皮下注射在BALB/c小鼠中。这之后是间隔2-3周的不完全弗氏佐剂中的3次加强注射。通过ELISA测试小鼠血清的针对免疫抗原的抗体应答,并且通过将来自脾的小鼠B细胞与SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞系融合并选择生长且产生小鼠免疫球蛋白(IgG)的细胞将具有有效应答的小鼠用于产生永生化的杂交瘤细胞。从这些小鼠IgG,基于如通过ELISA所确定的与源自LS174T或HT-29细胞的结肠肿瘤细胞膜提取物的反应性选择鼠16C3克隆(m16C3)。从分离自杂交瘤克隆16C3 E12的RNA确定编码重链和轻链IgG1的cDNA并且显示是独特的(Bristol&Kantor, US7829678, 2010)。将m16C3蛋白质序列人源化为h16C3并且指定为NEO-201。通过用人Fab序列置换重链和和轻链蛋白质的Fab区的互补决定区(CDR)之外的小鼠序列并且保留来自每个链的三个小鼠CDR序列在计算机中进行人源化。从在其他人源化批准的mAb产品中使用的人IgG1同种型选择重链和轻链的Fc区。将氨基酸序列回译成DNA,将所述DNA针对CHO细胞中的蛋白质表达进行优化。然后化学合成重链和轻链h16C3的DNA,克隆到哺乳动物表达质粒中且转染到哺乳动物细胞系(HEK293T和CHO)中。获得表达重组h16C3的若干稳定CHO细胞系并储备入库。纯化的重组h16C3在研究中进行重新测试,其确认人源化16C3抗体与原始m16C3抗体具有相似的特征(Bristol和Kantor, US7829678, 2010)。

[0165] 在这些实施例中使用的NEO-201抗体序列包含在以下图示中:H16C3-Abb\*重链

[0166] MGWSCHIFLVATATGVHS/QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKAS**GYTFTDYA**  
**MHWVRQAPGQRLEWMGLISTYSGDTKYNQNFOGRVTMTVDKSASTAYMELS**  
 SLRSEDTAVYYCAR**GDYSGSRYWFAY**WGQQGTLTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSK  
 STSGGTAALGCLVKDGYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPNAVLSQSSGLYSLSSVVTV  
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:28)

[0167] H16C3-Abb\*轻链

[0168] MGVPTQLLLWLTVVVVRC/DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**QASENIY GALN**  
 WYQRKPGKSPKLLIY**GASNLAT**GMPSRFSGSQGTDTFTISSLQPEDIATYYC  
**QQLLSSPY**TFGGGTKEIKR/TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPRE  
 AKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:29)

[0169] 在每个序列中表达前导序列、可变区与恒定区之间的边界通过前斜线（“/”）限定，并且CDR序列以粗体、加下划线的文本显示。所使用的抗体序列包含所示的可变区和恒定区。这些包括SEQ ID NO:32的重链CDR1、SEQ ID NO:33的重链CDR2、SEQ ID NO:34的重链CDR3、SEQ ID NO:35的轻链CDR1、SEQ ID NO:36的轻链CDR2以及SEQ ID NO:37的轻链CDR3。

#### [0170] 流式细胞术

[0171] 通过流式细胞术分析NEO-201与人癌瘤细胞系的结合。在4℃下将细胞( $1.0 \times 10^6$ 个)与每测试 $1\mu\text{L}$ 的1X磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的LIVE/DEAD Fixable Aqua(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)一起孵育30分钟,以完成活细胞对比死细胞区分。然后将细胞离心,用冷PBS洗涤两次,且然后在4℃下用1X PBS+1% BSA(Teknova,Hollister,CA,USA)中的太平洋蓝(Pacific Blue)缀合的NEO-201抗体(BioLegend, San Diego, CA)染色30分钟。在染色后,将细胞用冷PBS洗涤两次,并使用FACSVersa流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)检查。使用BD FACSuite软件(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)进行细胞荧光的分析。染色值>10%阳性被认为对于NEO-201表达呈阳性。将阳性细胞系根据其量化的表达水平(阳性% $\times$ MFI)排序,且然后分类到低(<200)、中等(200-1000)和高(<1000)表达的组中。

#### [0172] 免疫组织化学(IHC)

[0173] 结肠样品(C0808、C0951)的组织微阵列获自USBiomax(Rockville,MD),并且结肠(A303(I))、胰腺(A207(II)、A307)、胃(A209)、肺(A206(V)、A306)、乳腺(A202(VI)、A712)、子宫(A212)、卵巢(A212、A213(II))、前列腺(A302(IV))和各种正常(A103(VII))样品的AccuMax组织微阵列获自Accurate Chemical and Scientific Corporation(Westbury, NY)。使用生物素蛋白标记试剂盒(Roche, Basel, Switzerland)按照制造商的说明书将NEO-201生物素化。将载玻片在60℃下烘烤20分钟,用二甲苯脱蜡,并用梯度乙醇系列再水合。然后使用Peroxidized I溶液(Biocare Medical, Concord, CA)使载玻片进行过氧化物封闭2分钟,使用抗生物素蛋白溶液(Biocare Medical, Concord, CA)进行抗生物素蛋白封闭10分钟,使用生物素溶液(Biocare Medica, Concord, CA)进行生物素封闭10分钟,并且使用CAS-封闭组织化学试剂(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)进行蛋白质封闭10分钟。然后在室温下将载玻片与阴性对照在1X PBS中稀释的 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的生物素化的人IgG1κ(Ancell, Bayport, MN)或生物素化的NEO-201一起孵育2小时。用1:300的Dako链霉抗生物素蛋白-HRP缀合物(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)进行检测30分钟,与DAB过氧化物酶底物(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)一起孵育1-3分钟,并用苏木精复染色。使用以下标度通过光学显微镜评价每个微阵列组织斑点的细胞染色强度:0(阴性),±(模棱两可),1+(弱),2+(中等),3+(强烈)。如果组织斑点含有强度 $\geq 1$ 的染色的细胞,则所述组织斑点被记录为阳性。

#### [0174] 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定

[0175] 使用先前描述的程序的修改进行ADCC测定(Boyerinas等人,2015)。使用EasySep人NK细胞分离试剂盒(StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada)根据制造商的方案进行从正常人供体PBMC阴性选择NK细胞。将纯化的NK细胞在补充有L-谷氨酰胺、10% FBS和抗生素的RPMI-1640培养基中孵育过夜。在测定当天,将靶细胞(CFPAC-1、ASPC-1)用 $10\mu\text{M}$ 钙黄绿素AM细胞渗透性染料(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)标记30分钟,且

然后以 $3.0 \times 10^3$ 个细胞/孔一式三份接种到黑壁平底96孔培养板 (#655090Greiner bio-one, Germany) 中。然后将肿瘤细胞用 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人 IgG1同种型对照抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 或NEO-201(除非另有说明) 进行处理,且然后以12.5:1和25:1的效应物与靶标 (E:T) 比率添加NK细胞。在37°C下孵育4小时后,将 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 添加至每个孔中,并将板成像且使用 Celigo成像仪 (Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA, USA) 进行分析。计数每个孔的活靶细胞(钙黄绿素AM+/PI-) ,并如下计算特异性ADCC溶解:特异性溶解% =  $100 - [(\text{平均活靶标计数}_{\text{实验值}} / \text{平均活靶标计数}_{\text{对照}}) \times 100]$ 。

[0176] 补体依赖性细胞毒性(CDC) 测定

[0177] 使用先前描述的程序的修改进行CDC测定 (Konishi等人, 2008)。如上所述将ASPC-1靶细胞用钙黄绿素AM标记,并且以 $5.0 \times 10^3$ 个细胞/孔接种到黑底96孔板中。然后在37°C下将细胞用0.5或 $5.0\mu\text{g}/\text{mL}$  NEO-201处理在15分钟以调理细胞,且然后将纯化的兔补体 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) 添加至1:8稀释每个孔中。在37°C下孵育30、60或120分钟后,添加碘化丙啶,将板成像并使用Celigo成像血细胞计数器进行分析,并且如上文对于ADCC活性所述计算特异性溶解。

[0178] 异种移植植物抗肿瘤测定

[0179] 在6周龄雌性无胸腺NU/NU裸小鼠 (Charles River Laboratories International, Wilmington, MA) 中通过在小鼠的右侧腹皮下植入培养的肿瘤细胞于1X PBS中的悬浮液来建立肿瘤。一旦肿瘤达到约 $100\text{mm}^3$ 的大小,就将小鼠通过肿瘤体积进行分选并随机分成5组 ( $n=10$ 只动物)。在植入后第13、17和20天向小鼠腹膜内注射单独媒介物(盐水溶液)、人 IgG1 (250 $\mu\text{g}$ ) 或NEO-201 (100和250 $\mu\text{g}$ )。小鼠还在第14、18和21天接受了大约 $1.0 \times 10^7$ 个作为免疫效应细胞来源的用IL-2活化的人PBMC (在培养物中200U/mL处理过夜) 的腹膜内注射。将一组小鼠用NEO-201类似处理,但未接受人PBMC。每2-3天用数字卡尺测量肿瘤,并且根据下式计算肿瘤体积 (宽度 $^2 \times$ 长度) / 2 =  $\text{mm}^3$ ,其中宽度是两个测量值的较短者。小鼠也每周一次称重作为总体健康的总量度。将肿瘤体积 $>2000\text{mm}^3$ 的小鼠根据IACUC指南处死。

[0180] 生物分布分析

[0181] 使用先前描述的程序 (Patel等人, 2013) 使用放射性标记的NEO-201 (Comparative Biosciences, Sunnyvale, CA) 在携带肿瘤的小鼠中评价生物分布研究。简言之,将雄性和雌性无胸腺NU/NU裸小鼠 (Charles River Laboratories International, Wilmington, MA) 在侧腹中皮下注射 $4.0 \times 10^6$ 个CFPAC-1细胞于1X PBS中的200 $\mu\text{L}$ 悬浮液。在移植后第14天,将小鼠静脉内注射 $20\mu\text{Ci}$ 的 $^{125}\text{I}$ -标记的NEO-201,且然后在1、2、4或7天之后进行尸体剖检。在每个时间点收获血液、肿瘤组织和内脏器官(肺、肾、肝、脾、胰腺、肠和胃) ( $n=4$ 只动物),将所有组织称重,并用 $\gamma$ 计数器测量组织中的放射性。每只小鼠的数据首先计算为cpm/mg组织,且然后将组织cpm值相对于血液cpm值标准化。

[0182] 食蟹猴中的单剂量毒性研究

[0183] 在有目的繁殖的食蟹猴中进行了单剂量毒性研究以测试在单剂量的NEO-201之后,NEO-201的药代动力学和毒性。所述研究的持续时间是从剂量施用15天,在剂量施用之前另外14天隔离以使猴适应研究室。使用输液泵和具有导管延伸管的塑料一次性注射器通

过缓慢静脉内输注(大约30分钟±5分钟输注)以0mg/kg、5mg/kg、20mg/kg和49mg/kg的剂量水平向八只雄性和八只雌性动物(2只动物/性别/组)给予稀释于盐水溶液中的NEO-201,所述剂量水平是抗体可达到的最高浓度。在以下时间点在接受NEO-201的所有动物中抽取血液样品:剂量前,10分钟,1、2、4、6、24、48、72、96、168和336小时。从用于药代动力学和毒理学分析的血液样品制备血清。全血用于细胞分析。使用人治疗性IgG1 ELISA试剂盒(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)按照制造商的说明书通过ELISA测量血清中的NEO-201水平。

[0184] 实验室测试包括血液学和凝血(基线(BL)、第2天、第8天、第15天):CBC和差别、活化部分促凝血酶原激酶时间、纤维蛋白原和凝血酶原时间;血清化学(BL、第2天、第8天、第15天):白蛋白、碱性磷酸酶、ALT、AST、总胆红素、钙、总胆固醇、肌酸激酶、肌酸酐、葡萄糖、无机磷、总蛋白质、甘油三酯、钠、钾、氯、球蛋白、白蛋白/球蛋白比率、BUN;尿液分析(BL、第15天):颜色、透明度、葡萄糖、酮、潜血、蛋白质、胆红素、亚硝酸盐、pH值、尿胆素原、白细胞、体积、比重;生物分析(使用ELISA)-(BL,10分钟,1、2、4、6小时、24、48、72、96、168和336小时)从组2至4使用Phoenix WinNonlin 6.1版软件(Certara USA, Princeton, NJ)。记录动物体重测量值(BL、7和14),并且评估嗜中性粒细胞计数(BL、第2天、第8天、第15天)。

#### [0185] 统计分析

[0186] 使用GraphPad Prism(GraphPad Software, La Jolla, CA)分析数据。两组之间的比较通过T检验进行,并且 $p < 0.05$ 被认为是统计上显著的。图描绘来自一式三份进行的代表性实验的平均值±SD。

#### [0187] 实施例8

##### [0188] ALT-803增强由NEO-201介导的ADCC

[0189] ALT-803是由结合至IL-15受体 $\alpha$ /IgG1 Fc融合蛋白的IL-15突变体(IL-15N72D)组成的新IL-15超激动剂复合物。此实施例测试ALT-803调节由NEO-201介导的ADCC的能力。

#### [0190] 方法

[0191] NK细胞从正常供体分离并在用作效应细胞之前用不同浓度的ALT-803处理48小时,并且表达NEO-201抗原的人瘤细胞系用作体外非放射性ADCC测定中的靶标。分别通过流式细胞术和通过使用Nanostring分析来评价ALT-803影响NK细胞的表型和调节NK细胞基因表达的能力。

#### [0192] 结果

[0193] 用ALT-803处理显著增强由NEO-201介导的针对NEO-201阳性瘤细胞的ADCC活性(图8,图11)。ALT-803的作用是剂量依赖性的并且与媒介物对照处理相比,在所测试的所有剂量下实现统计学显著性。用ALT-803处理NK细胞增强了也来自具有最小ADCC活性的供体的ADCC活性,并且与未处理的NK细胞相比,降低了起始ADCC应答所需的NEO-201的有效剂量(图12)。此外,可通过使用抗CD16和抗TIM3阻断性抗体阻断ADCC活性(图12)。

[0194] 用25ng/ml的ALT-803处理48小时的NK细胞的表型分析显示,ALT-803增强了CD16/CD56阳性NK细胞中TIM3和NKG2D的表达以及颗粒酶B和CD107a的平均荧光强度(MFI)(图9)。

[0195] 对用不同浓度的ALT-803处理48小时的人NK细胞的Nanostring分析显示,ALT-803能够调节62种基因的mRNA表达(与媒介物对照相比 $1.61 \log_2$ 倍数变化被认为是显著的)。

[0196] ALT-803处理上调43种基因(包括NK活化受体、参与NK细胞活性的因子、细胞因子和它们的受体)的mRNA表达,并且下调19种基因(包括NK抑制受体和参与细胞凋亡的活化的

因子)的mRNA表达。

[0197] 因此,ALT-803增强了由NEO-201介导的针对人瘤细胞的ADCC活性。ADCC活性的增强可部分地由于TIM3、NKG2D、粒酶B和CD107a阳性NK细胞的表达增加,以及由于对参与NK活化和细胞毒性的转录物的调节。

[0198] 总之,用ALT-803处理从正常供体分离的NK细胞可增强由NEO-201介导的ADCC活性。对ALT-803处理的从正常供体分离的NK细胞的表型分析证明,ALT-803可增强CD16/CD56阳性NK细胞上TIM-3和NKG2D的表达。用ALT-803处理正常NK细胞还可增加CD16/CD56阳性NK细胞中颗粒酶B的MFI。用ALT-803处理正常NK细胞还可增加所测试的两个供体之一中的CD16/CD56阳性NK细胞中CD107a的MFI。TIM-3是增强干扰素 $\gamma$ 产生的诱导型人NK细胞受体。它还是成熟标志物。在用ALT-803处理后由NEO-201介导的ADCC活性的增强可部分地由于TIM-3阳性、NKG2D阳性、颗粒酶B阳性和CD107a阳性NK细胞的表达增加,尽管这种理论不意图是限制性的。用ALT-803处理NK细胞可增强由较低浓度的NEO-201介导的ADCC活性。当用ALT-803处理NK细胞时,较低浓度的Mab可用于介导ADCC活性并且可产生与在无ALT-803处理的情况下使用较高浓度的NEO-201的NK细胞相比等效水平的细胞毒性。这一结果表明,更小剂量的Mab可与ALT-803组合用于治疗癌症的临床试验中。

[0199] 实施例9

[0200] NEO-201通过阻断抑制性CEACAM5/CEACAM1免疫检查点途径而增强对肿瘤细胞的NK细胞依赖性杀伤。

[0201] 使用靶向效应细胞抑制性受体如PD-1和CTLA-4的检查点阻断抗体的免疫疗法已经在若干肿瘤类型中引发一些显著且持久的应答。癌胚抗原相关细胞粘附分子1(CEACAM1)是由免疫细胞和肿瘤细胞表达的细胞表面蛋白质,并且它可类似于PD-1和CTLA-4抑制T细胞功能。CEACAM1还是自然杀伤(NK)细胞功能的有效抑制剂;NK细胞上的CEACAM1与肿瘤细胞上的CEACAM1或CEACAM5之间的结合抑制由NKG2D进行的活化信号传导,其防止NK细胞细胞溶解并允许肿瘤细胞逃避NK杀伤。

[0202] NEO-201结合至CEACAM家族的成员,并且可活化先天性免疫机制,如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)以杀伤肿瘤细胞。设计这项研究以确定NEO-201是否阻断CEACAM1抑制途径以恢复NK细胞的抗肿瘤功能性。

[0203] 方法

[0204] 进行使用人肿瘤细胞系的体外测定以鉴定由NEO-201结合的CEACAM家族成员。进行功能测定以评估NEO-201增强NK细胞系NK-92(其表达CEACAM1并且缺乏CD16)对肿瘤细胞的体外杀伤的能力和介导ADCC的能力。

[0205] 使用先前描述的程序的修改进行杀伤测定(David等人,2017)。简言之,将源自胰腺(ASPC-1、BxPC-3、CFPAC-1)和结肠(LS174T)瘤的靶细胞用10 $\mu$ M钙黄绿素AM细胞渗透性染料(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)标记30分钟,且然后以 $3.0 \times 10^3$ 个细胞/孔一式三份接种到黑壁平底96孔培养板中。然后将肿瘤细胞用10 $\mu$ g/mL的人IgG1同种型对照抗体(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)或NEO-201处理,且然后以1.5625:1、3.125:1、6.25:1和12.5:1的效应物与靶标(E:T)比率添加自然杀伤(NK)细胞系NK-92。在37°C下16小时孵育后,将碘化丙啶(PI;Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)以1.67 $\mu$ g/mL的最终浓度添加至每个孔,并且将板离心,使用Celigo成像血细胞计数器

(Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA, USA) 进行成像, 并使用GraphPad Prism 7软件 (GraphPad Software, La Jolla, CA) 进行分析。计数每个孔的活靶细胞(钙黄绿素AM+/PI-) , 并如下计算特异性溶解: 特异性溶解% = 100 - [(平均活靶标计数<sub>实验值</sub>/平均活靶标计数<sub>对照</sub>) × 100]。

#### [0206] 结果

[0207] 据发现NEO-201与CEACAM5和CEACAM6的不同变体反应, 但与CEACAM1或CEACAM8不反应。表达谱分析揭示, 各种NEO-201+细胞系细胞表达不同水平的天然形式的CEACAM5/6对比这些分子的NEO-201反应性变体形式。在功能上, NEO-201处理增强了NK-92细胞针对表达CEACAM5的NEO-201+肿瘤细胞的细胞溶解活性, 而没有增强针对仅表达CEACAM6的NEO-201+细胞的细胞溶解活性(图13)。

#### [0208] 结论

[0209] NEO-201与CEACAM5/6的肿瘤相关变体反应, 并且能够阻断肿瘤细胞CEACAM5与NK细胞CEACAM1之间的相互作用, 以逆转NK细胞毒性的CEACAM1依赖性抑制。

#### [0210] 缩写

[0211] 抗体依赖性细胞毒性(ADCC), 从时间0至无穷大的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC<sub>inf</sub>), 从时间0至无穷大的剂量标准化的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC<sub>inf/D</sub>), 基线(BL), 补体依赖性细胞毒性(CDC), 清除率(CL), 观察到的最大血浆浓度(C<sub>max</sub>), 剂量标准化的测量的最大血浆浓度(C<sub>max/D</sub>), 雌激素受体(ER), 半衰期(HL), 免疫组织化学(IHC), 自然杀伤细胞(NK), 非小细胞肺癌(NSCLC), 外周血单核细胞(PBMC), 孕激素受体(PR), 肿瘤相关抗原(TAA), 观察到的最大血浆浓度的时间(T<sub>max</sub>), 分布体积(V<sub>d</sub>)。

#### [0212] 参考文献

- [0213] 本文引用的每个文件(包括以下列表中的每一个)都特此以引用的方式整体并入。
- [0214] 1.Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1; 136(5):E359-86.
- [0215] 2.Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE. Human cancer detection and immunotherapy with conjugated and non-conjugated monoclonal antibodies. *Anticancer Res.* 1996 Mar-Apr; 16(2):661-74.
- [0216] 3.Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014 Apr; 27:16-25. doi:10.1016/j.coim.2014.01.004.
- [0217] 4.Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:329-60.
- [0218] 5.Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* 2001 Nov; 1(2):118-29.
- [0219] 6.Hodge JW, Greiner JW, Tsang KY, Sabzevari H, Kudo-Saito C, Grosenbach DW, Gulley JL, Arlen PM, Marshall JL, Panicali D, Schlom J. Costimulatory molecules as adjuvants for immunotherapy. *Front Biosci.* 2006 Jan 1; 11:788-803.
- [0220] 7.Vergati M IC, Huen NY, Schlom J, Tsang KY. Strategies for cancer

- vaccine development.J Biomed Biotechnol.2010;2010(596432) .
- [0221] 8.Gabitzsch ES TK,Palena C,David JM,Fantini M,Kwilas A,Rice AE,Latchman Y,Hodge JW,Gulley JL,Madan RA,Heery CR,Balint JP Jr,Jones FR,Schlom J.The generation and analyses of a novel combination of recombinant adenovirus vaccines targeting three tumor antigens as an immunotherapeutic.O ncotarget.2015;6(31) :31344-59.
- [0222] 9.Topalian SL,Weiner GJ,Pardoll DM.Cancer immunotherapy comes of age.J Clin Oncol.2011 Dec 20;29(36) :4828-36.
- [0223] 10.Hollinshead A,Glew D,Bunnag B,Gold P,Herberman R.Skin-reactive soluble antigen from intestinal cancer-cell-membranes and relationship to carcinoembryonic antigens.Lancet.1970;1(7658) :1191-1195.
- [0224] 11.Hollinshead AC,McWright CG,Alford TGD,Gold P,Herberman RB.Separation of skin reactive intestinal cancer antigen from the carcinoembryonic antigen of Gold.Science.1972;177(4052) :887-889.
- [0225] 12.Hollinshead A,Elias EG,Arlen M,Buda B,Mosley M,Scherrer J.Specific active immunotherapy in patients with adenocarcinoma of the colon utilizing tumor-associated antigens(TAA) .A phase I clinical trial.Cancer.1985;56(3) :480-489.
- [0226] 13.Hollinshead AC.Methods of preparing epitopes of tumor associated antigens.US4810781.1989.
- [0227] 14.Bristol JA,Kantor JA.Recombinant monoclonal antibodies and corresponding antigens for colon and pancreatic cancers.US7829678.2010.
- [0228] 15.Hollinshead A.Active specific immunotherapy and immunochemotherapy in the treatment of lung and colon cancer.Semin Surg Oncol.1991 Jul-Aug;7(4) :199-210.
- [0229] 16.Luka J,Arlen PM,Bristol A.Development of a serum biomarker assay that differentiates tumor-associated MUC5AC(NPC-1C ANTIGEN) from normal MUC5AC.J Biomed Biotechnol.2011;2011:934757.doi:10.1155/2011/934757.Epub 2010 Dec 16.PubMed PMID:21197415
- [0230] 17.Patel SP,Bristol A,Saric O,Wang XP,Dubeykovskiy A,Arlen PM,Morse MA.Anti-tumor activity of a novel monoclonal antibody,NPC-1C,optimized for recognition of tumor antigen MUC5AC variant in preclinical models.Cancer Immunol Immunother.2013 Jun;62(6) :1011-9.
- [0231] 18.Beg MS,Azad NS,Patel SP,Torrealba J,Mavroukakis S,Beatson MA,Wang XP,Arlen PM,Morse MA.A phase 1 dose-escalation study of NEO-102 in patients with refractory colon and pancreatic cancer.Cancer Chemother Pharmacol.2016 Sep;78(3) :577-84.
- [0232] 19.Kim RD,Arlen PM,Tsang KY,Mavroukakis SA,Zaki A,Cui K,Azad NS,Tan Jr.BR,Poplin E,Morse MA,Beg MS.Ensituximab(E) in patients(pts)with refractory

metastatic colorectal cancer(mCRC):Results of a phase 1/2 clinical trial.J Clin Oncol 35,2017(suppl;abstr 3081).

[0233] 20.Zeligs K,Arlen PM,Tsang K,Hernandez L,Fantini M,Annunziata CM.Abstract 3025:Preclinical characterization of a novel monoclonal antibody targeting a neo-antigen expressed in ovarian and GI malignancies.Cancer Res July 1 2017(77) (13Supplement)3025.

[0234] 21.Seidel UJ,Schlegel P,Lang P.Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies.Front Immunol.2013 Mar 27;4:76.

[0235] 22.Petricevic B,Laengle J,Singer J,Sachet M,Fazekas J,Steger G,Bartsch R,Jensen-Jarolim E,Bergmann M.Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients.J Transl Med.2013 Dec 12;11:307.

[0236] 23.Dall'Ozzo S,Tartas S,Paintaud G,Cartron G,Colombat P,Bardos P,Watier H,Thibault G.Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship.Cancer Res.2004 Jul 1;64(13):4664-9.

[0237] 24.Levy EM,Sycz G,Arriaga JM,Barrio MM,von Euw EM,Morales SB,González M,Mordoh J,Bianchini M.Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells.Innate Immun.2009 Apr;15(2):91-100.

[0238] 25.Kawaguchi Y,Kono K,Mimura K,Sugai H,Akaike H,Fujii H.Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma.Int J Cancer.2007 Feb 15;120(4):781-7.

[0239] 26.López-Albaitero A,Lee SC,Morgan S,Grandis JR,Gooding WE,Ferrone S,Ferris RL.Role of polymorphic Fc gamma receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated,NK cell dependent in vitro cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells.Cancer Immunol Immunother.2009 Nov;58(11):1853-64.doi:10.1007/s00262-009-0697-4.

[0240] 27.Boyerinas B,Jochems C,Fantini M,Heery CR,Gulley JL,Tsang KY,Schlom J.Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab(MSB0010718C) on Human Tumor Cells.Cancer Immunol Res.2015 Oct;3(10):1148-57.

[0241] 28.Meyer S,Leusen JH,Boross P.Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer.MAbs.2014;6(5):1133-44.

[0242] 29.Strome SE,Sausville EA,Mann D.A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related

effects. *Oncologist*. 2007 Sep; 12(9) :1084-95.

[0243] 30. Hayes J, Frostell A, Karlsson R, Müller S, Millan-Martin S, Pauers M, Reuss F, Cosgrave E, Anneren C, Davey GP, Pudd PM. Identification of Fc gamma receptor glycoforms that produce differential binding kinetics for rituximab. *Mol Cell Proteomics*. 2017 Jun 2. pii: mcp.M117.066944. doi: 10.1074/mcp.M117.066944. [Epub ahead of print]

[0244] 31. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*. 1997 Aug 1; 90(3) :1109-14. PubMed PMID: 9242542.

[0245] 32. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. A novel polymorphism of FcgammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1; 100(5) :1059-70. PubMed PMID: 9276722

[0246] 33. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzone A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 10; 26(11) :1789-96.

[0247] 34. Hank JA, Robinson RR, Surfus J, Mueller BM, Reisfeld RA, Cheung NK, Sondel PM. Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer Res*. 1990 Sep 1; 50(17) :5234-9.

[0248] 35. Watanabe M, Kono K, Kawaguchi Y, Mizukami Y, Mimura K, Maruyama T, Fujii H. Interleukin-21 can efficiently restore impaired antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2010 Feb 2; 102(3) :520-9.

[0249] 36. Han KP, Zhu X, Liu B, Jeng E, Kong L, Yovandich JL, Vyas VV, Marcus WD, Chavaillaz PA, Romero CA, Rhode PR, Wong HC. IL-15: IL-15 receptor alpha superagonist complex; high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine*. 2011 Dec; 56(3) :804-10.

[0250] 37. Gomes-Giacaria E, Miyake M, Goodison S, Sriharan A, Zhang G, You L, Egan JO, Rhode PR, Parker AS, Chai KX, Wong HC, Rosser CJ. Intravesical ALT-803 and BCG treatment reduces tumor burden in a carcinogen induced bladder cancer rat model; a role for cytokine production and NK cell expansion. *PLoS One*. 2014 Jun 4; 9(6) :e96705.

[0251] 38. Mathios D, Park CK, Marcus WD, Alter S, Rhode PR, Jeng EK, Wong HC, Pardoll DM, Lim M. Therapeutic administration of IL-15 superagonist complex ALT-803 leads to long-term survival and durable antitumor immune response in a

murine glioblastoma model. *Int J Cancer.* 2016 Jan 1;138(1):187-94.

[0252] 39. Rhode PR, Egan JO, Xu W, Hong H, Webb GM, Chen X, Liu B, Zhu X, Wen J, You L, Kong L, Edwards AC, Han K, Shi S, Alter S, Sacha JB, Jeng EK, Cai W, Wong HC. Comparison of the Superagonist Complex, ALT-803, to IL15 as Cancer Immunotherapeutics in Animal Models. *Cancer Immunol Res.* 2016 Jan;4(1):49-60.

[0253] 40. Kim PS, Kwilas AR, Xu W, Alter S, Jeng EK, Wong HC, Schlom J, Hodge JW. IL-15superagonist/IL-15R $\alpha$ Sushi-Fc fusion complex(IL-15SA/IL-15R $\alpha$ Su-Fc;ALT-803) markedly enhances specific subpopulations of NK and memory CD8+T cells, and mediates potent anti-tumor activity against murine breast and colon carcinomas. *Oncotarget.* 2016 Mar 29;7(13):16130-45.

[0254] 41. Felices M, Chu S, Kodal B, Bendzick L, Ryan C, Lenvik AJ, Boylan KLM, Wong HC, Skubitz APN, Miller JS, Geller MA. IL-15 super-agonist (ALT-803) enhances natural killer (NK) cell function against ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2017 Jun;145(3):453-461.

[0255] 42. Rosario M, Liu B, Kong L, Collins LI, Schneider SE, Chen X, Han K, Jeng EK, Rhode PR, Leong JW, Schappe T, Jewell BA, Keppel CR, Shah K, Hess B, Romee R, Piwnica-Worms DR, Cashen AF, Bartlett NL, Wong HC, Fehniger TA. The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances Fc $\gamma$ RIIIa-Triggered NK Cell Responses and In Vivo Clearance of B Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2016 Feb 1;22(3):596-608.

[0256] 43. Seya T, Matsumoto M, Hara T, Hatanaka M, Masaoka T, Akedo H. Distribution of C3-step regulatory proteins of the complement system, CD35 (CR1), CD46 (MCP), and CD55 (DAF), in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma.* 1994 Feb;12(5-6):395-400.

[0257] 44. Niehans GA, Cherwitz DL, Staley NA, Knapp DJ, Dalmasso AP. Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). *Am J Pathol.* 1996 Jul;149(1):129-42.

[0258] 45. Donin N, Jurianz K, Ziporen L, Schultz S, Kirschfink M, Fishelson Z. Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid. *Clin Exp Immunol.* 2003 Feb;131(2):254-63.

[0259] 46. Hsu YF, Ajona D, Corrales L, Lopez-Picazo JM, Gurpide A, Montuenga LM, Pio R. Complement activation mediates cetuximab inhibition of non-small cell lung cancer tumor growth in vivo. *Mol Cancer.* 2010 Jun 7;9:139.

[0260] 47. Konishi E, Kitai Y, Kondo T. Utilization of complement-dependent cytotoxicity to measure low levels of antibodies: application to nonstructural protein 1 in a model of Japanese encephalitis virtus. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Jan;15(1):88-94.

[0261] 48. David JM, Dominguez C, McCampbell KK, Gulley JL, Schlom J, Palena C.A

novel bifunctional anti-PD-L1/TGF- $\beta$  Trap fusion protein (M7824) efficiently reverts mesenchymalization of human lung cancer cells. *Oncol Immunology*. 2017 Jul 13; 6(10): e1349589.

[0262] 表1:NEO-201与源自各种类型的实体瘤的培养的肿瘤细胞系的结合的流式细胞仪分析对于每种细胞系详述阳性细胞和平均荧光强度(MFI)值的百分比。NEO-201阳性细胞系以粗体显示。NEO-201阳性被定义为阳性%>10%。

细胞系	肿瘤类型	阳性%	MFI
<b>COLO 205</b>	结肠	<b>10.33</b>	<b>245</b>
<b>HT-29</b>	结肠	<b>38.40</b>	<b>352</b>
<b>LS174T</b>	结肠	<b>46.46</b>	<b>345</b>
SW1116	结肠	2.36	194
[0263] SW1463	结肠	1.23	278
SW480	结肠	1.70	575
<b>ASPC-1</b>	胰腺	<b>79.26</b>	<b>8927</b>
<b>BxPC-3</b>	胰腺	<b>97.25</b>	<b>2584</b>
<b>CAPAN-2</b>	胰腺	<b>29.69</b>	<b>327</b>
<b>CFPAC-1</b>	胰腺	<b>97.79</b>	<b>9281</b>
PANC-1	胰腺	3.29	289
<b>H441</b>	NSCLC(腺癌)	<b>69.16</b>	<b>675</b>
H522	NSCLC(腺癌)	1.38	238
<b>HCC4006</b>	NSCLC(腺癌)	<b>99.27</b>	<b>9899</b>
<b>HCC827</b>	NSCLC(腺癌)	<b>77.46</b>	<b>692</b>
SK-LU-1	NSCLC(腺癌)	1.77	685
CALU-1	NSCLC(鳞状)	4.22	571
H1703	NSCLC(鳞状)	4.16	111
H226	NSCLC(鳞状)	4.83	209
<b>H520</b>	NSCLC(鳞状)	<b>61.78</b>	<b>443</b>
<b>AU-565</b>	乳腺(HER2+)	<b>50.04</b>	<b>227</b>
<b>BT-474</b>	乳腺(PR+/HER2+)	<b>68.79</b>	<b>591</b>
HCC1500	乳腺(ER+/PR+)	1.53	597
SK-BR-3	乳腺(HER2+)	1.61	329
T-47D	乳腺(ER+/PR+)	8.00	161
<b>ZR-75-1</b>	乳腺(ER+/PR+/HER2+)	<b>68.80</b>	<b>550</b>
BT-549	乳腺(ER-/PR-/HER2-)	1.47	477
<b>HCC1937</b>	乳腺(ER-/PR-/HER2-)	<b>19.14</b>	<b>510</b>
HCC38	乳腺(ER-/PR-/HER2-)	2.15	226
MDA-MB-468	乳腺(ER-/PR-/HER2-)	6.33	344

[0265] 表2:正常人微阵列组织的NEO-201染色的IHC谱。

组织类型	阳性/总计	组织类型	阳性/总计
大脑皮层	0/2	脾	0/2
小脑	0/2	淋巴结	0/2
基底神经节	0/2	扁桃体	0/2
海马	0/2	胸腺	0/2
脊髓	0/2	Paratoid 腺	0/2
心脏	0/2	骨骼肌	0/2
[0266] 肺	0/2	输尿管	0/2
支气管	0/2	外宫颈	2/2, 弱
舌	2/2, 弱	宫颈内膜	0/2
食道	0/2	Pro-子宫内膜	0/2
胃	0/2	Sec-子宫内膜	0/2
乳腺	0/2	子宫肌层	0/2
肝	0/2	脐带	0/2
前列腺	0/2	软组织	0/2
睾丸	0/2	胎盘:羊膜	0/2
[0267] 卵巢	0/2	胎盘; 绒毛膜	0/2
输卵管	0/2	胎盘; 基板	0/2

[0268] 表3:食蟹猴中单剂量NEO-201施用的药代动力学结果。向八只雄性和八只雌性动物(2只动物/性别/组)静脉内注射0mg/kg(盐水溶液)或5mg/kg、20mg/kg或49mg/kg的NEO-201。在不同时间点(剂量前,剂量后10分钟、1、2、4、6、24、48、72、96、168和336小时)在接受NEO-201的所有动物中抽取血液样品,并通过ELISA获得来自血清制剂的药代动力学测量值。表中的值代表来自2只动物/性别/组(M,F)或来自全部4只动物(全部)的平均值。

[0269] 缩写:从时间0至无穷大的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC<sub>inf</sub>) ;从时间0至无穷大的剂量标准化的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC<sub>inf/D</sub>) ;清除率(CL) ;观察到的最大血浆浓度(C<sub>max</sub>) ;剂量标准化的测量的最大血浆浓度(C<sub>max/D</sub>) ;半衰期(HL) ;观察到的最大血浆浓度的时间(T<sub>max</sub>) ;分布体积(V<sub>d</sub>) 。

剂量水平	性别	HL (h)	Tmax (h)	Cmax ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Cmax/D ( $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{mg}$ )	AUCinf ( $\text{h} \times \mu\text{g}/\text{mL}$ )	AUCinf/D ( $\text{h} \times \mu\text{g}/\text{mL}/\text{mg}$ )	CL (mL/h)	Vz (mL)
<b>5 mg/kg</b>	M	58.5	0.584	135	10.4	8,210	640	1.67	137
	F	34.0	0.584	142	12.4	8,230	720	1.41	69.8
	全部	46.2	0.584	138	11.4	8,220	680	1.54	103
<b>[0270] 20 mg/kg</b>	M	176	0.167	639	12.3	77,600	1,500	0.669	171
	F	158	0.167	518	10.1	62,700	1,230	0.823	187
	全部	167	0.167	579	11.2	70,100	1,360	0.746	179
<b>49 mg/kg</b>	M	122	0.167	1,460	11.6	126,000	1,000	1.00	174
	F	219	0.167	1,470	11.9	187,000	1,520	0.658	208
	全部	170	0.167	1,470	11.8	157,000	1,260	0.830	191

[0271] 本发明涉及以下实施方式：

[0272] 1. 一种杀伤癌瘤细胞的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体。

[0273] 2. 一种治疗癌瘤的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体。

[0274] 3. 一种预防癌瘤复发的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体。

[0275] 4. 一种降低患有癌瘤的患者的肿瘤负荷的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的NEO-201抗体。

[0276] 5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体介导补体介导的细胞毒性(CDC),从而杀伤所述患者中的癌瘤细胞。

[0277] 6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述施用之前或在所述施用时,所述患者为自然杀伤细胞(“NK”)消减型。

[0278] 7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述施用之前或在所述施用时,所述患者为重度NK消减型。

[0279] 8. 如权利要求6所述的方法,所述方法还包括在所述施用之前或在所述施用时,确定所述患者是否为NK消减型。

[0280] 9. 如权利要求6所述的方法,所述方法还包括在所述施用之前或在所述施用时,确定所述患者是否为重度NK消减型。

[0281] 10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述患者患有NK细胞缺乏症(NKD),所述NK细胞缺乏症任选地包括CNKD(例如,CNKD1、CNKD2)或FNKD(例如,FNKD1)。

[0282] 11. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述患者由于另一种疗法而为NK消减型或重度NK消减型。

[0283] 12. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述患者正在经历癌症疗法。

[0284] 13. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述患者正在经历化学疗法或放射疗法。

[0285] 14. 如权利要求13所述的方法,其中所述化学疗法包括施用一种或多种蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米, MG132)、组蛋白脱乙酰酶抑制剂(例如,丙戊酸、曲古抑菌素A、辛二酰苯胺-异羟肟酸(SAH)、丁酸钠)、遗传毒性剂(例如,阿霉素、美法仑、顺铂、Ara-C、阿非迪霉素、丝裂霉素、甲氨蝶呤、依托泊苷)、GSK抑制剂(例如,LiCl、BIO、SB21)、BET抑制剂(例如,JQ1)、HSP90抑制剂(例如,根赤壳菌素)、17-AAG)、微管装配抑制剂(例如,长春新碱、细胞松弛素D、诺考达唑、多西他赛)和/或免疫调节药物(例如,来那度胺)。

[0286] 15. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述施用之前或在所述施用时,NK细胞占所述个体中的外周血单核细胞(PBMC)的少于5%。

[0287] 16. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述施用之前或在所述施用时,NK细胞占所述个体中的外周血单核细胞(PBMC)的少于3%。

[0288] 17. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述施用之前或在所述施用时,所述患者中少于70%的PBMC NK细胞是CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞。

[0289] 18. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述施用之前或在所述施用时,所述患者中少于50%的PBMC NK细胞是CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞。

[0290] 19. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29中含有的CDR序列中的至少一个、两个、三个、四个、五个或全部六个。

[0291] 20. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含与SEQ ID NO:38具有至少90%同一性的可变重链序列。

[0292] 21. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含与SEQ ID NO:39具有至少90%同一性的可变轻链序列。

[0293] 21. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含与SEQ ID NO:38具有至少90%同一性的可变重链序列和与SEQ ID NO:39具有至少90%同一性的可变轻链序列。

[0294] 22. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含SEQ ID NO:38的可变重链序列和SEQ ID NO:39的可变轻链。

[0295] 23. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含与SEQ ID NO:28的氨基酸20-470具有至少90%同一性的重链序列和与SEQ ID NO:29的氨基酸20-233具有至少90%同一性的轻链序列。

[0296] 24. 如权利要求22或23所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29中含有的CDR序列中的全部六个。

[0297] 25. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含SEQ ID NO:28中含有的重链可变区序列和SEQ ID NO:29中含有的轻链可变区序列。

[0298] 26. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-470的重链序列和含有SEQ ID NO:29的氨基酸20-233的轻链序列。

[0299] 27. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体包含人IgG1恒定结构域。

[0300] 28. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体是人源化的。

[0301] 29. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体缀合至另一部分。

[0302] 30. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述NEO-201抗体缀合至另一细胞毒性部分、标记、放射性部分或亲和标签。

[0303] 31. 如前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述患者施用有效量的细胞因子激动剂以增强或刺激对所述瘤瘤的细胞的杀伤。

[0304] 32. 如权利要求31所述的方法,其中所述细胞因子激动剂包括白介素2(IL-2)、白介素21(IL-21)、ALT-803、IL-15抑制剂、检查点抑制剂、抗PD1、抗PDL1、抗CTLA-4、抗41BB、抗OX40、抗Tim-3或它们的组合。

[0305] 33. 如前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述患者施用有效量的补体调控蛋白(CRP)拮抗剂以增强或刺激对所述瘤瘤的细胞的杀伤。

[0306] 34. 如权利要求33所述的方法,其中所述CRP拮抗剂拮抗CD46、CD55或CD59中的一者或多者。

[0307] 35. 如权利要求33或34所述的方法,其中所述CRP拮抗剂包括抗体或其抗原结合片段。

[0308] 36. 如权利要求31所述的方法,其中所述细胞因子激动剂包括IL-15激动剂或IL-15超激动剂。

[0309] 37. 如权利要求31所述的方法,其中所述细胞因子激动剂包括由结合至IL-15受体 $\alpha$ /IgG1 Fc融合蛋白的IL-15突变体(IL-15N72D)组成的复合物。

[0310] 38. 如权利要求37所述的方法,其中所述细胞因子激动剂包括ALT-803。

[0311] 39. 如权利要求31-38中任一项所述的方法,其中与在无所述细胞因子激动剂的情况下单独用所述NEO-201抗体治疗相比,所述NEO-201抗体的有效剂量降低。

[0312] 40. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症包括结肠癌。

[0313] 41. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症包括胰腺癌。

[0314] 42. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症包括卵巢癌。

[0315] 43. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症包括胃癌。

[0316] 44. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症包括肺癌。

[0317] 45. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症包括乳腺癌。

[0318] 46. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症包括子宫癌。

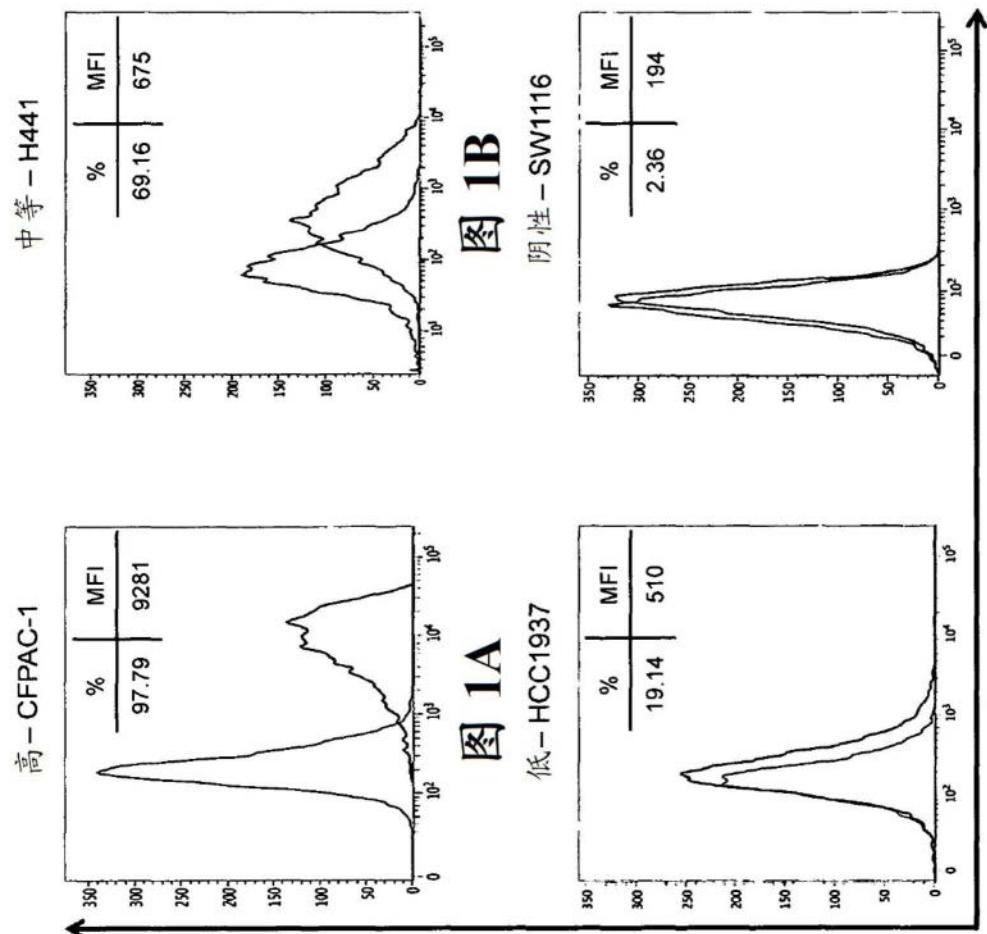


图1

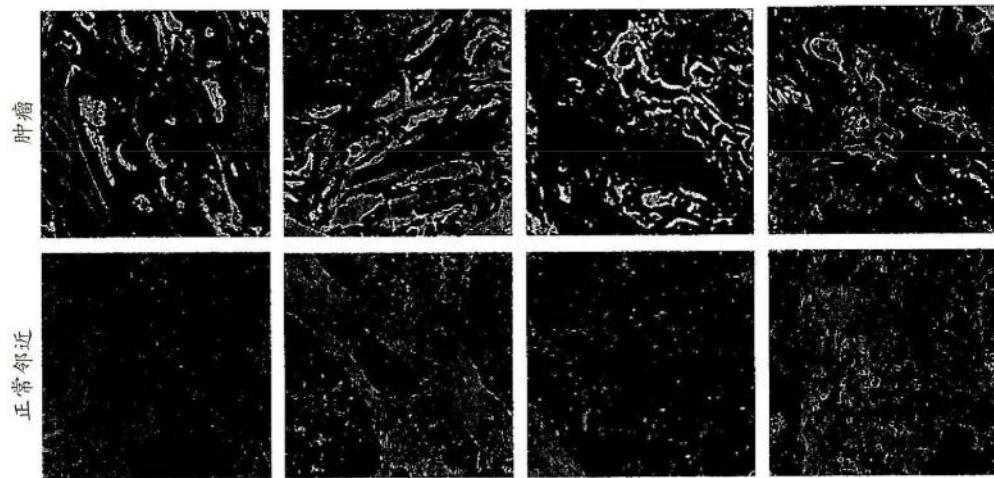


图2A

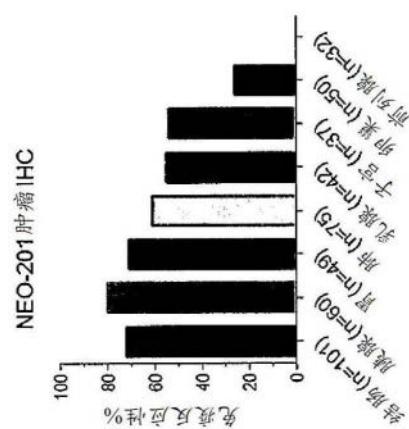


图2B

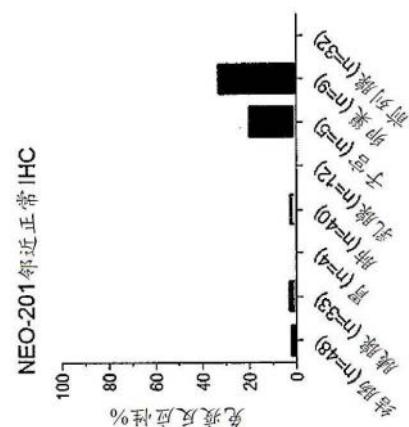


图2C

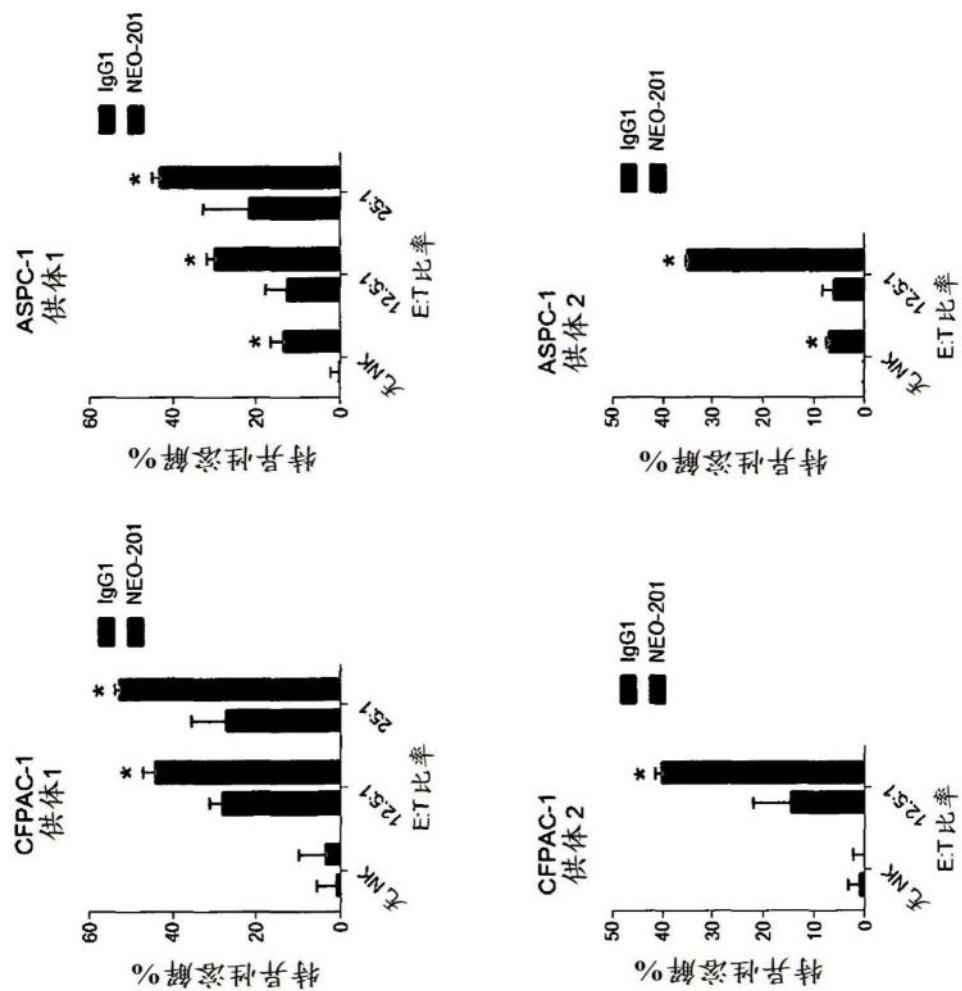


图3A

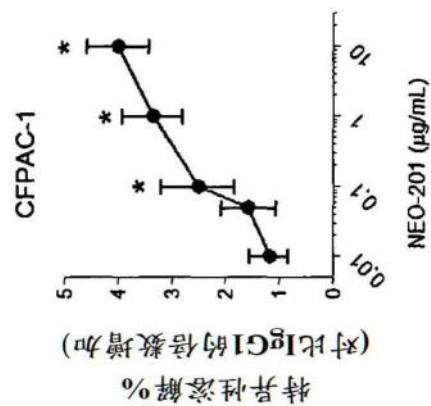


图3B

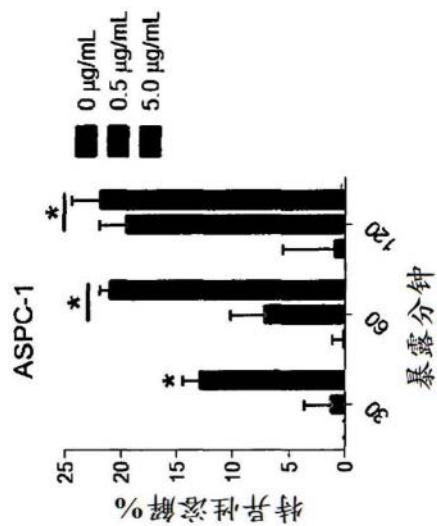


图3C

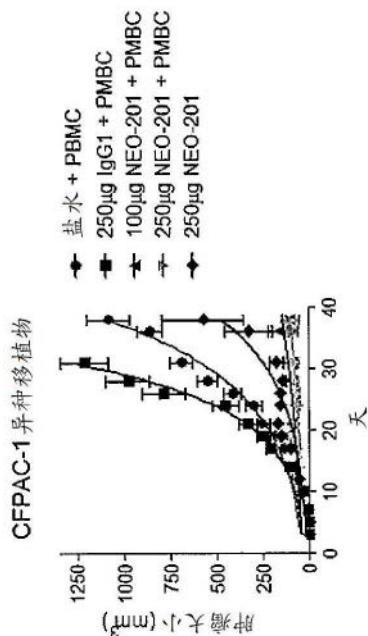


图4A

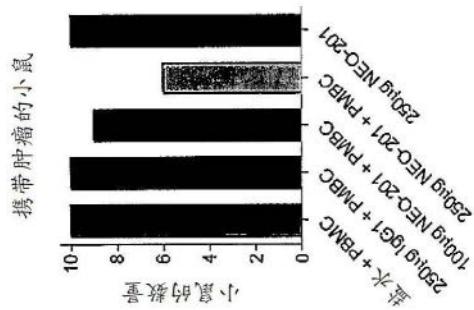


图4B



图4C

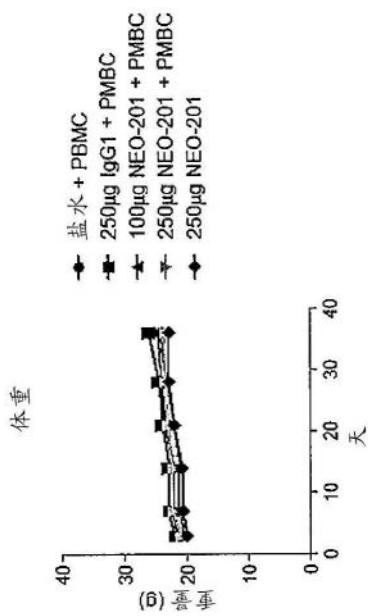


图4D

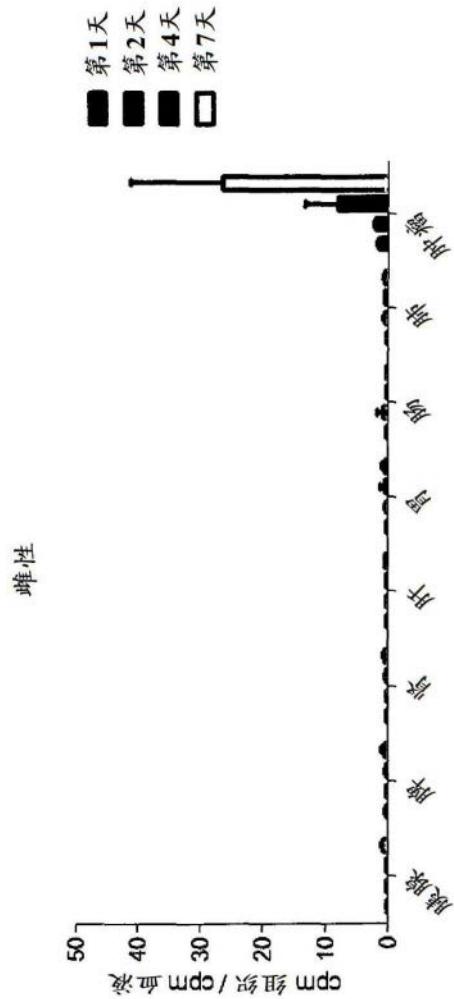


图5A

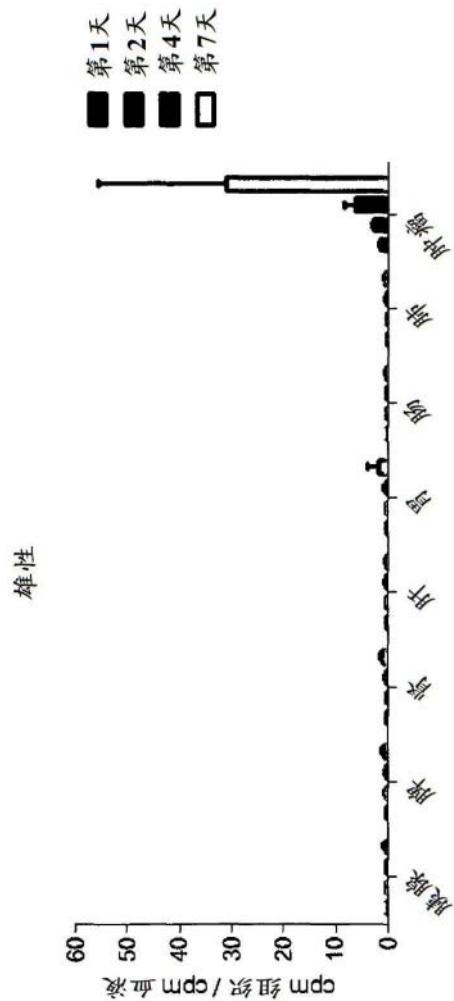


图5B

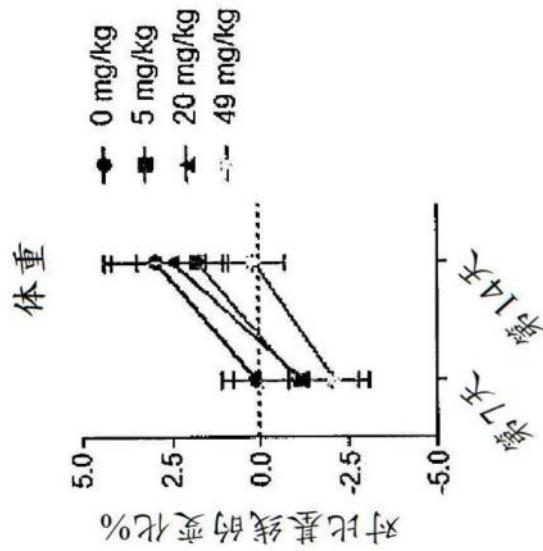


图6A

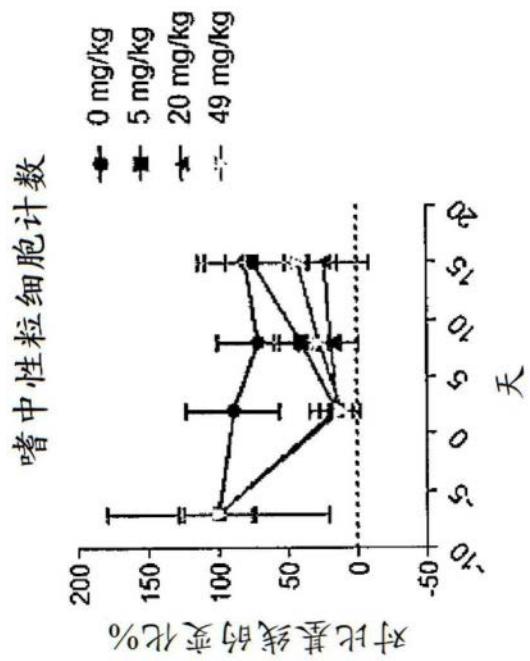


图6B

剂量	对比0 mg/kg的p值		
	第-7天	第2天	第8天
5mg/kg	0.4444	<b>0.0135*</b>	0.0836
20mg/kg	0.8312	<b>0.0164*</b>	<b>0.0376*</b>
49mg/kg	0.9215	<b>0.0159*</b>	0.0816
			0.2754

图6C

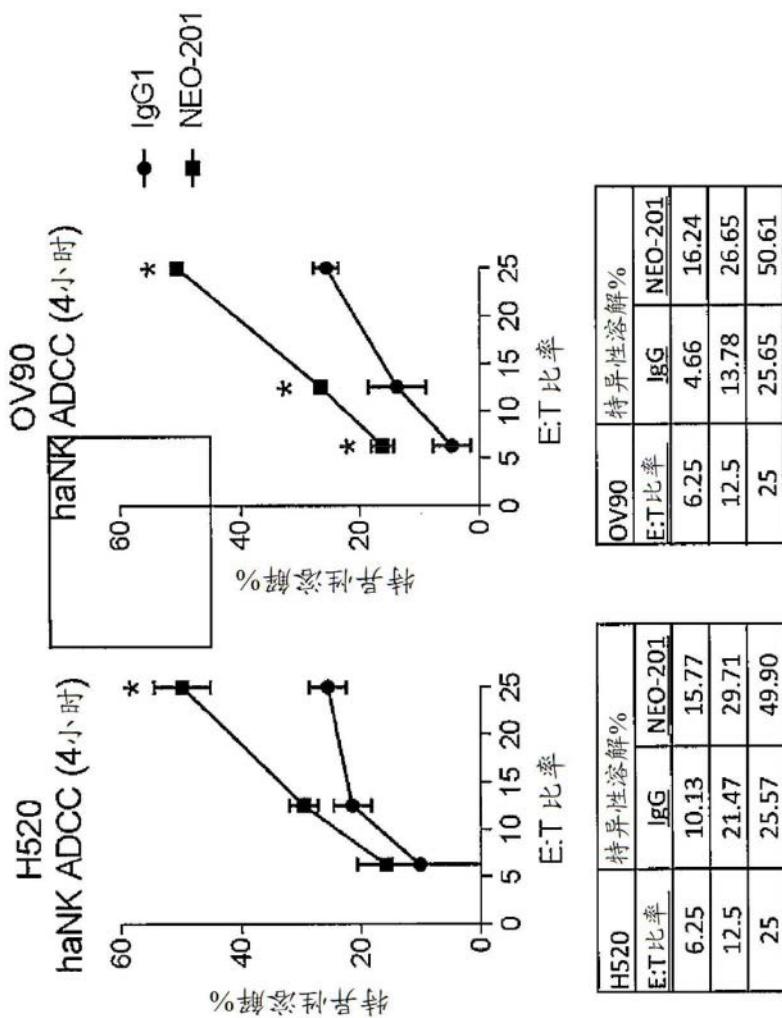


图 7A

图 7B

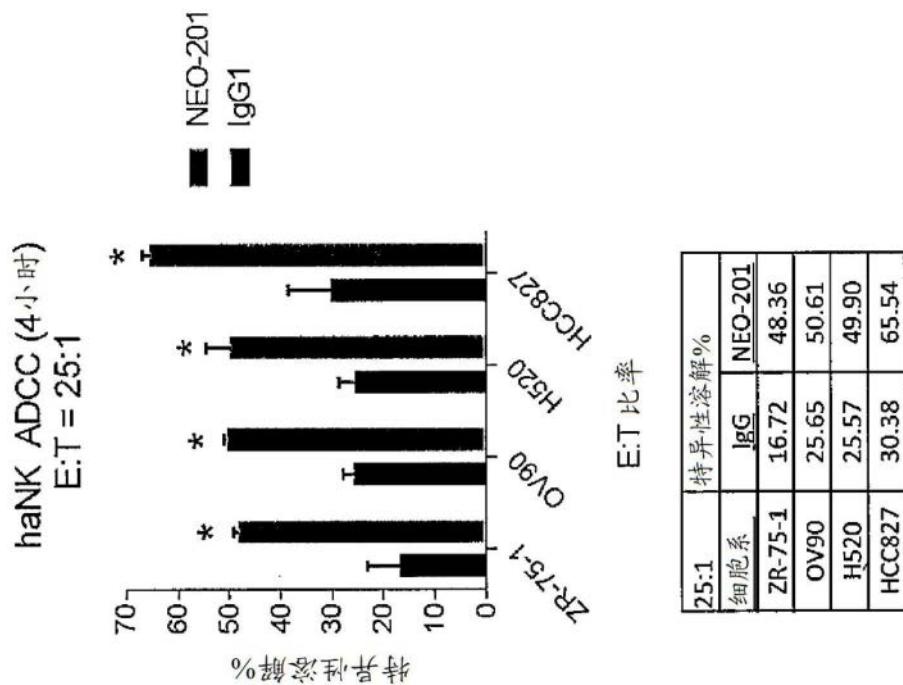


图7C

	<b>ALT-803 (25ng/ml)</b>	<b>抗体 (10µg/ml)</b>	<b>E:T = 25:1</b>	<b>E:T = 12.5:1</b>	<b>E:T = 6.25:1</b>
ND#1	-	NEO-201	19.4 (0.9)	ND	ND
ND#1	+	NEO-201	30.3 (1.3)	ND	ND
ND#2	-	NEO-201	69.1 (1.9)	47.6 (1.5)	29.3 (1.0)
ND#2	+	NEO-201	87.6 (2.8)	79.0 (1.6)	65.1 (2.8)

图8

标志物	未处理的	用 ALT-803 处理 48 小时 (25ng/ml)
CD16 <sup>-</sup> /CD56 <sup>+</sup>	9.51 (52/3,457)	9.03 (84/15,419)
CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	89.27 (7,434/1,048)	90.97 (6,915/3,605)
TIM-3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	42.87 (843/8,078/1,197)	81.56 (2,972/6,039/2,820)
NKG2D <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	87.99 (317/7,341/1,070)	78.33 (590/5,829/2,463)
TIM-3 <sup>+</sup> /NKG2D <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	43.95 (799/307/8,028/1,204)	74.68 (3,011/500/6,123/2,937)
CD107a <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	99.99 ( 887/7,439/1,050)	99.91 (2,711/5,739/2,305)
颗粒酶 B <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	98.84 (474/7,512/1,045)	99.88 (1,346/5,743/2,305)
PD-1 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	12.82 (907/3,770/532)	16.18 (1,272/4,749/674)
CD158d <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	14.58 (167/6,302/2,654)	17.68 (1,064/2,951/3,237)

图9

标志物	未处理的	用 ALT-803 处理 48 小时 (25ng/ml)
CD16-/CD56 <sup>+</sup>	12.27 (83/908)	13.23 (91/757)
CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	87.73 (6,425/3,043)	86.77 (5,848/7,810)
TIM-3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	33.92 (827/6,901/3,040)	92.14 (2,462/5,903/8,080)
NKG2D <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	79.46 (465/6,444/3,094)	95.40 (1,152/5,939/8,074)
TIM-3 <sup>+</sup> /NKG2D <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	24.85 (853/511/6,925/3,117)	85.30 (2,517/1,190/6,051/8,385)
CD107a <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	99.95 (13,775/6,425/3,043)	100 (10,365/5,848/7,810)
颗粒酶 B <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	99.75 (1,157/6,430/3,042)	100 (2,457/5,848/7,810)
PD-1 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	5.36 (211/7,113/3,278)	3.87 (229/5,976/5,872)
CD158d <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	12.72 (227/19,155/4,833)	11.00 (219/9,661/8,955)

图10

抗体	ALT-803 (25ng/ml)	抗体 (10μg/ml)	抗体 (1μg/ml)	抗体 (0.1μg/ml)
NEO-201	-	23.8 (1.7)	24.8 (1.3)	14.9 (2.9)
NEO-201	+	37.3 (1.5)*	37.4 (1.3)*	37.4 (1.5)*

图11

<b>ALT-803 (25ng/ml)</b>	<b>无 (30μg/ml)</b>	<b>抗 CD16 (15μg/ml)</b>	<b>抗 CD16 (30μg/ml)</b>	<b>抗 TIM-3 (15μg/ml)</b>
-	1.3 (1.4)	0.1 (1.9)	1.8 (2.5)	3.2 (2.5)
+	12.3 (1.1)*	4.4 (0.9)*	6.3 (2.3)*	5.7 (2.7)*

图12

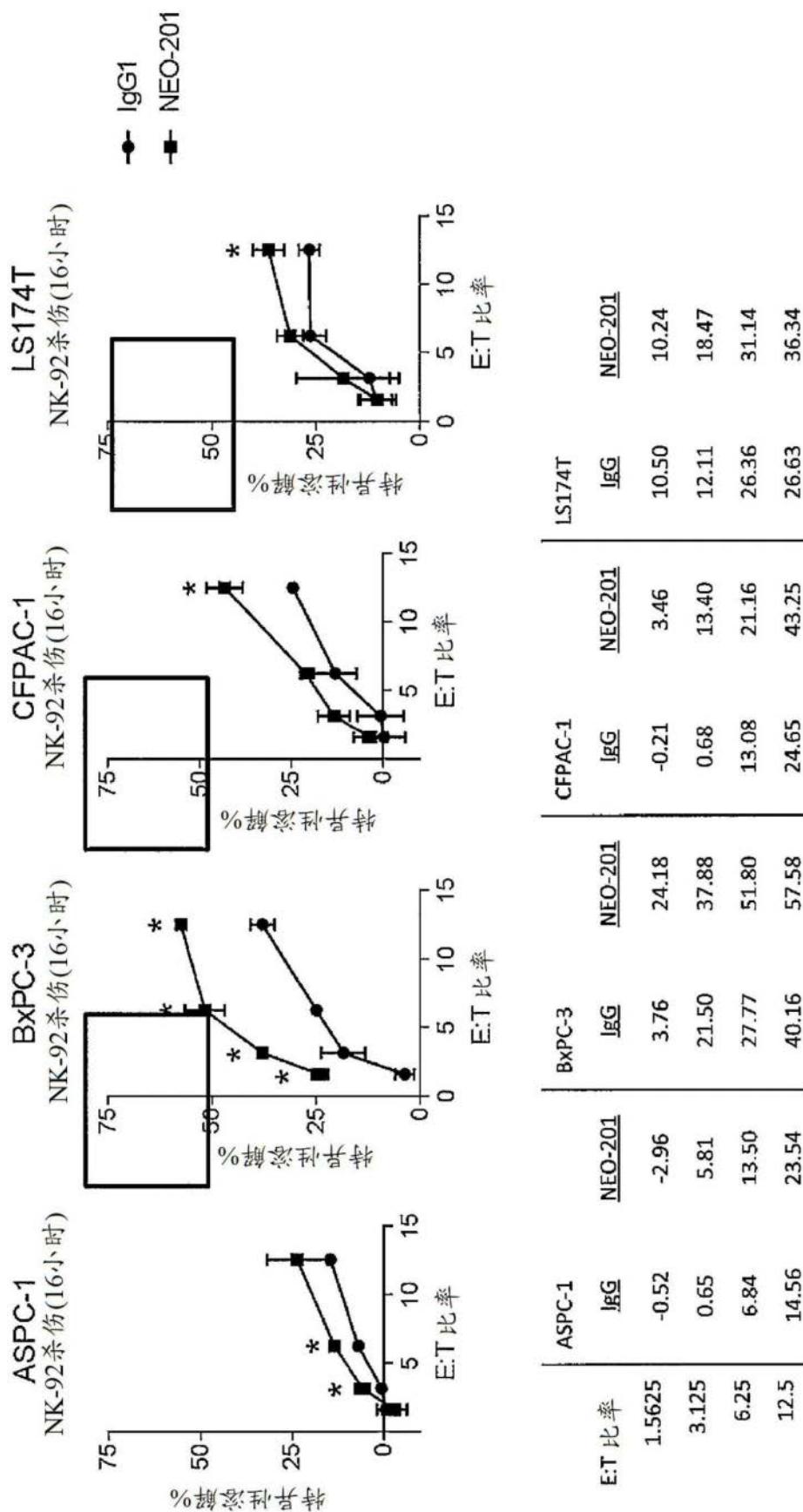


图13