



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119156403 A

(43) 申请公布日 2024.12.17

(21) 申请号 202380036163.2

(22) 申请日 2023.03.08

(30) 优先权数据

63/317,885 2022.03.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2023/052214 2023.03.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/170606 EN 2023.09.14

(71) 申请人 阿伦蒂斯治疗股份公司

地址 瑞士阿尔施维尔

(72) 发明人 A·托索 R·伊卡内 G·特谢拉

M·迈耶

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书32页
序列表(电子公布) 附图18页

(54) 发明名称

抗紧密连接蛋白-1抗体增加T细胞可用性的
用途

(57) 摘要

本公开涉及一种促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿瘤活性的方法,所述方法包括向所述受试者施用抗紧密连接蛋白-1抗体。

1. 一种促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿瘤活性的方法,所述方法包括向所述受试者施用抗紧密连接蛋白-1抗体。
2. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包括施用免疫检查点抑制剂。
3. 一种治疗患有实体瘤的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体促进所述受试者的肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性。
4. 一种增加免疫检查点抑制剂在患有纤维化肿瘤的受试者中的治疗功效的方法,所述方法包括:
 - a. 向所述受试者施用抗紧密连接蛋白-1抗体,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体促进所述纤维化肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性;以及
 - b. 向所述受试者施用所述免疫检查点抑制剂。
5. 如权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体在施用所述免疫检查点抑制剂之前施用。
6. 如权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体和所述免疫检查点抑制剂同时或依序施用。
7. 如权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体和所述免疫检查点抑制剂在同一组合物中施用。
8. 如权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体和所述免疫检查点抑制剂在不同组合物中施用。
9. 如权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体和/或所述免疫检查点抑制剂以瘤内、静脉内、腹膜内、肌内、鞘内或皮下方式施用。
10. 如权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、TIGIT、VISTA、B7-H3、BTLA和/或Siglec-15的拮抗剂。
11. 如权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是小分子抑制剂。
12. 如权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是抗体。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是选自由以下组成的组的PD-1拮抗剂:纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗和多塔利单抗。
14. 如权利要求12所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是选自由以下组成的组的PD-L1拮抗剂:阿替利珠单抗、度伐鲁单抗和阿维鲁单抗。
15. 如权利要求12所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是选自由以下组成的组的CTLA-4拮抗剂:伊匹木单抗和曲美木单抗。
16. 如权利要求12所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是选自由以下组成的组的TIGIT拮抗剂:替瑞利尤单抗、欧司珀利单抗、东瓦纳利单抗、艾替利单抗和维博利单抗。
17. 如权利要求3所述的方法,其中所述癌症包括纤维化肿瘤。
18. 如权利要求1、2或4至17中任一项所述的方法,其中所述纤维化肿瘤的特征在于相对于参考样品紧密连接蛋白-1的高表达。
19. 如权利要求18所述的方法,其中所述参考样品是来自正常组织的组织样品,其中所述正常组织与所述肿瘤相邻。

20. 如权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述肿瘤选自以下组成的组:头颈肿瘤、肺肿瘤、乳腺肿瘤、黑色素瘤肿瘤、结肠直肠肿瘤、胰腺肿瘤、食管肿瘤、胆管癌和肝细胞肿瘤。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体是包含抗紧密连接蛋白-1单克隆抗体的六个互补决定区(CDR)的单克隆抗体,所述抗紧密连接蛋白-1单克隆抗体由在2008年7月29日以登录号DSMACC2938保藏在DSMZ的杂交瘤细胞系分泌。

22. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体是人源化的。

23. 如权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的VH。

24. 如权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的VL。

25. 如权利要求1至24中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的VH;以及含有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的VL。

26. 如权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的VH;以及含有SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的VL。

27. 如权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)H1、含有SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列的CDR H2和含有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR H3。

28. 如权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)L1、含有氨基酸序列“Gly Ala”的CDR L2和含有SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDR L3。

29. 如权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的重链序列。

30. 如权利要求1至29中任一项所述的方法,其中所述抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链序列。

31. 一种促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿瘤活性的方法,所述方法包括向所述受试者施用抗紧密连接蛋白-1嵌合抗原受体(CAR)T细胞。

32. 如权利要求31所述的方法,所述方法还包括施用免疫检查点抑制剂。

33. 一种治疗患有实体瘤的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的抗紧密连接蛋白-1CAR T细胞和免疫检查点抑制剂,其中所述抗紧密连接蛋白-1CAR T细胞促进所述受试者的肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性。

34. 一种增加免疫检查点抑制剂在患有纤维化肿瘤的受试者中的治疗功效的方法,所述方法包括:

a. 向所述受试者施用抗紧密连接蛋白-1CAR T细胞,其中所述抗紧密连接蛋白-1CAR T细胞促进所述纤维化肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性;以及

b. 向所述受试者施用所述免疫检查点抑制剂。

抗紧密连接蛋白-1抗体增加T细胞可用性的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年3月8日提交的美国临时申请号63/317,885的优先权权益,该美国临时申请据此全文以引用的方式并入。

[0003] 序列列表引用

[0004] 以电子方式提交的序列列表(名称:4872_013PC01_Seqlisting_ST26;大小:24,527字节;并且创建日期:2023年3月6日)的内容以全文引用的方式并入本文。

技术领域

[0005] 根据本公开的各个方面,本公开涉及促进T细胞抗肿瘤活性的方法。

背景技术

[0006] 使用免疫检查点抑制剂的癌症疗法极大地提高了医师治疗受试者的能力。然而,许多癌症已经显示出免疫检查点抑制剂抗性。与免疫检查点抑制剂抗性相关的一种表型是缺乏肿瘤T细胞浸润,也被称为“冷肿瘤”或“T细胞排斥”(参见Shuyue W.等人,Front.Immun.,12:690112(2021);Christian等人,Front.Oncol.,11:712788(2021年10月))。因此,存在开发以允许疗法克服免疫检查点抑制剂抗性的方式治疗冷肿瘤或T细胞排斥的疗法的需要。

发明内容

[0007] 本公开提供了一种促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿瘤活性的方法,该方法包括向受试者施用抗紧密连接蛋白-1抗体。

[0008] 在一些方面,该方法还包括施用免疫检查点抑制剂。

[0009] 在一些方面,本文提供了一种治疗患有实体瘤的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂。在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体促进受试者的肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性。

[0010] 在一些方面,本文提供了一种增加免疫检查点抑制剂在患有纤维化肿瘤的受试者中的治疗功效的方法,该方法包括a)向受试者施用抗紧密连接蛋白-1抗体,其中抗紧密连接蛋白-1抗体促进纤维化肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性;以及b)向受试者施用免疫检查点抑制剂。

[0011] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体在施用免疫检查点抑制剂之前施用。

[0012] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂同时或依序施用。

[0013] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂在同一组合物中施用。

[0014] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂在不同组合物中施用。

[0015] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和/或免疫检查点抑制剂以瘤内、静脉内、腹膜内、肌内、鞘内或皮下方式施用。

[0016] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、TIGIT、

VISTA、B7-H3、BTLA和/或Siglec-15的拮抗剂。

[0017] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是小分子抑制剂。

[0018] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是抗体。

[0019] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是选自以下组成的组的PD-1拮抗剂:纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗和多塔利单抗。

[0020] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是选自以下组成的组的PD-L1拮抗剂:阿替利珠单抗、度伐鲁单抗和阿维鲁单抗。

[0021] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是选自以下组成的组的CTLA-4拮抗剂:伊匹木单抗和曲美木单抗。

[0022] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是选自以下组成的组的TIGIT拮抗剂:替瑞利尤单抗、欧司珀利单抗、东瓦纳利单抗、艾替利单抗和维博利单抗。

[0023] 在一些方面,癌症包括纤维化肿瘤。

[0024] 在一些方面,纤维化肿瘤的特征在于相对于参考样品紧密连接蛋白-1的高表达。

[0025] 在一些方面,参考样品是来自正常组织的组织样品,其中该正常组织与肿瘤相邻。

[0026] 在一些方面,肿瘤选自以下组成的组:头颈肿瘤、肺肿瘤、乳腺肿瘤、黑色素瘤肿瘤、结肠直肠肿瘤、胰腺肿瘤、食管肿瘤、胆管癌和肝细胞肿瘤。

[0027] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体是包含抗紧密连接蛋白-1单克隆抗体的六个互补决定区(CDR)的单克隆抗体,该抗紧密连接蛋白-1单克隆抗体由在2008年7月29日以登录号DSMACC2938保藏在DSMZ的杂交瘤细胞系分泌。

[0028] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体是人源化的。

[0029] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的VH。

[0030] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的VL。

[0031] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的VH;以及含有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的VL。

[0032] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的VH;以及含有SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的VL。

[0033] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)H1、含有SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列的CDR H2和含有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR H3。

[0034] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)L1、含有氨基酸序列“G1y A1a”的CDR L2和含有SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDR L3。

[0035] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的重链序列。

[0036] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链序列。

[0037] 在一些方面,本文提供了一种促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿

瘤活性的方法,该方法包括向受试者施用抗紧密连接蛋白-1嵌合抗原受体(CAR) T细胞。在一些方面,包括施用免疫检查点抑制剂。

[0038] 在一些方面,本文提供了一种治疗患有实体瘤的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞和免疫检查点抑制剂。在一些方面,抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞促进受试者的肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性。

[0039] 在一些方面,本文提供了一种增加免疫检查点抑制剂在患有纤维化肿瘤的受试者中的治疗功效的方法,该方法包括向受试者施用抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞以及向受试者施用免疫检查点抑制剂。在一些方面,抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞促进纤维化肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性。

附图说明

[0040] 图1A至图1B(FIG. 1A-1B)显示了两种不同的纤维化肿瘤类型中的紧密连接蛋白-1(CLDN1)表达。进行免疫组织化学(IHC)染色以测量紧密连接蛋白-1表达(左图)和纤维化标志物(右图)。

[0041] 图2A至图2C(FIG. 2A-2C)显示了头颈癌中的T细胞排斥。图2A显示了许多肿瘤样品中CLDN1的IHC染色,具有例示纤维化阱的对应CD3染色。图2B显示了表现出CLDN1表达的肿瘤样品的百分比。图2C显示了具有不同CLDN1表达水平的肿瘤的免疫表型的分类。免疫表型是热的(免疫细胞在基质中和癌细胞之间)、排斥的(免疫细胞主要在基质中)和冷的(几乎看不到免疫细胞)。

[0042] 图3A至图3D(FIG. 3A-3D)显示了食管癌中的T细胞排斥。图3A显示了具有不同CLDN1表达水平的肿瘤的免疫表型。免疫表型是热的(免疫细胞在基质中和癌细胞之间)、排斥的(免疫细胞在肿瘤内但仅在基质中)和冷的(几乎看不到免疫细胞)。在食管肿瘤样品上对CLDN1(图3B)、T细胞(CD3染色)(图3C)和纤维化组织(天狼星红染色)(图3D)进行IHC染色。

[0043] 图4A至图4B(FIG. 4A-4B)显示了体内肝小鼠肿瘤细胞Hepa 1-6中含小鼠CLDN1的人胞外环的过表达驱动的免疫逃逸(图4A)和T细胞排斥(图4B)。

[0044] 图5(FIG. 5)显示了接种后Hepa 1-6肿瘤的体积。与没有CLDN1表达的样品相比,含小鼠CLDN1的人细胞外环(CLDN1 hECL)的阳性样品显示了更大的肿瘤体积并表现出免疫逃避。

[0045] 图6(FIG. 6)显示了使用具有直接抗纤维化作用的抗CLDN1抗体破坏癌症中的检查点抑制剂抗性的示例性图。

[0046] 图7A(FIG. 7A)显示了在施用检查点抑制剂aPD1后具有高水平或低水平CLDN1的肿瘤(如黑色素瘤)中随时间推移的总体存活概率。

[0047] 图7B(FIG. 7B)显示了CLDN1阳性或CLDN1阴性患者中到达治疗中断时间的时间。

[0048] 图8A(FIG. 8A)显示了肿瘤微环境中CLDN-1靶向疗法的机制模型。

[0049] 图8B(FIG. 8B)显示了机制模型,该机制模型显示了将抗CLDN1抗体施用于具有T细胞排斥的肿瘤的作用。

[0050] 图9(FIG. 9)显示了头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、结肠直肠癌(CRC)、食道癌、鳞状非小细胞肺癌(Sq.NSCLC)、肝内胆管癌(iCCA)、肝细胞癌(HCC)和尿道上皮癌中的CLDN1表达。

[0051] 图10A (FIG. 10A) 显示了在施用单独的抗CLDN1抗体、单独的PD1拮抗剂 (aPD1) 以及抗CLDN1抗体和PD1拮抗剂的组合后Hepa1-6 CLDN1+攻击的小鼠中的肿瘤体积。在第40天再次攻击小鼠。

[0052] 图10B至图10C (FIG. 10B-10C) 显示了测量对照 (图10B) 和用抗CLDN1抗体和PD1拮抗剂处理后 (图10C) 的T细胞树突细胞浸润的免疫细胞化学。

具体实施方式

[0053] I. 定义

[0054] 除非另有定义, 否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。在冲突的情况下, 以本申请 (包括定义) 为准。此外, 除非上下文另有要求, 否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。本文提及的所有出版物、专利和其它参考文献出于所有目的以全文引用的方式并入, 如同每个单独的出版物或专利申请被明确并且单独地指出以全文引用的方式并入一般。

[0055] 虽然可以在本公开的实践或测试中使用与本文所述的方法和材料类似或等效的方法和材料, 但在下文中描述了合适的方法和材料。这些材料、方法和实例仅是说明性的并且不旨在是限制性的。根据详细描述和权利要求书, 本公开的其它特征和优点将显而易见。

[0056] 为了进一步定义本公开, 提供以下术语和定义。

[0057] 除非上下文另外明确指出, 否则单数形式“一种/个 (a)”、“一种/个 (an)”和“所述 (该)”包括多个指代物。术语“一种/个 (a)” (或“一种/个 (an)”) 以及术语“一个或多个”和“至少一个”在本文可以互换使用。在某些方面, 术语“一种/个 (a)”或“一种/个 (an)”是指“单个”。在其它方面, 术语“一种/个 (a)”或“一种/个 (an)”包括“两个或更多个”或“多个”。

[0058] 术语“约”在本文中用于表示大约、粗略地、在…周围或在…的范围中。当术语“约”与数值范围结合使用时, 其通过延伸所示数值的上下边界修饰该范围。通常, 术语“约”在本文中用于将高于和低于所述值的数值向上或向下 (更高或更低) 改变10%。

[0059] 贯穿本公开, 本发明的各个方面以范围形式呈现。应当理解, 范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁, 而不应当被解释为对本发明范围的不灵活的限制。因此, 范围的描述应当被认为具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如, 如1至6的范围的描述应当被认为具体公开了子范围, 如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等, 以及该范围内的单个数字, 例如1、2、3、4、5和6。这不管范围的宽度如何都适用。所列举的数值范围包括定义该范围的数字并且包括所定义范围内的每个整数。

[0060] 单位、前缀和符号以其Système International de Unites (SI) 可接受的形式表示。数值范围将限定范围的数量包括在内。在列举数值范围的情况下, 应理解, 还具体公开了在该范围的列举的上限与下限之间的每个居间整数值及其每个分数, 以及这些值之间的每个子范围。任何范围的上限和下限可以独立地包括在该范围内或从该范围中排除, 并且其中包括任一个、零个或两个极限的每个范围也涵盖在本公开内。因此, 本文所列举的范围应理解为包括所列举端点在内的该范围内的所有值的简略表达。例如, 1至10的范围应理解为包括1、2、3、4、5、6、7、8、9和10组成的组中的任何数字、数字的组合或子范围。

[0061] 在明确列举值的情况下, 应理解, 与所列举的值大约相同的量或数量的值也在本公开的范围。在公开组合的情况下, 该组合的要素的每个子组合也被具体公开并且在本

公开的范围内。相反地,单独公开不同要素或要素组的情况下,也公开了它们的组合。在本公开的任何要素被公开为具有多个替代方案的情况下,在此还公开了该公开的实例,其中每个替代方案被单独排除或与其它替代方案的任何组合被排除;本公开的超过一个要素可具有此类排除,并且在此公开具有此类排除的要素的所有组合。

[0062] 在此使用的术语“和/或”被认为是两个指定特征或组分中的每一个与或不与另一个的具体公开。因此,本文在短语中使用的术语“和/或”诸如“A和/或B”意为包括:“A和B二者”;“A或B”;“A”(单独);和“B”(单独)。同样地,如在短语如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个方面:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0063] 如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指出于治疗目的向受试者施用组合物。

[0064] 术语“人紧密连接蛋白-1(或CLDN1)”是指具有NCBI登录号NP_066924.1中所示的序列的蛋白质,或通常在HCV允许的人群中发现的任何天然存在的变体。紧密连接蛋白是在紧密连接中起重要结构性和功能性作用的大约18种蛋白质的家族。它们是与如以下的其它跨膜蛋白相互作用的跨膜蛋白:连接粘附分子(JAM)和闭锁蛋白,以及支架蛋白ZO-1、ZO-2和ZO-3。紧密连接蛋白-1在上皮细胞中广泛表达,但在间充质组织中,表达似乎限于神经束膜细胞。据报道,在29%至92%的肿瘤中发生紧密连接蛋白-1表达。

[0065] 如本文所用,术语“抗体”是指含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的任何免疫球蛋白。因此,术语抗体不仅涵盖整个抗体分子,而且涵盖抗体片段以及抗体和抗体片段的变体(包括衍生物),只要衍生物和片段保持特异性结合能力即可。该术语涵盖单克隆抗体和多克隆抗体。该术语还涵盖具有与免疫球蛋白结合结构域同源或很大程度上同源的结合结构域的任何蛋白质。这些蛋白质可以来自天然来源,或者部分或全部合成产生。当关于抗体使用时,术语“特异性结合”是指抗体与预定抗原结合。通常,抗体以至少 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 的亲合力结合,并以呈结合非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)的亲合力的至少两倍的亲合力结合预定抗原。

[0066] 术语“单克隆抗体”或其抗原结合片段是指参与单个抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合的同质抗体或抗原结合片段群体。这与通常包括针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体相反。术语“单克隆抗体”或其抗原结合片段涵盖完整和全长单克隆抗体以及抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其它修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”或其抗原结合片段是指以多种方式制备的此类抗体和其抗原结合片段,这些方式包括但不限于杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0067] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指包含来自非人高变区的氨基酸残基和来自人框架区(FR)的氨基酸残基的嵌合抗体。特别地,人源化抗体包含全部或基本上全部的至少一个,通常两个可变结构域,其中全部或基本上全部的互补决定区(CDR)是人抗体的互补决定区。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经经历人源化的抗体。

[0068] 应理解,每当在本文用措辞“包含”来描述方面时,还提供以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其它类似方面。

[0069] 如本文所用,术语“施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种向受试者物理引入包含治疗剂的组合物(例如,抗紧密连接蛋白-1抗体和/或免疫检查点抑制剂的组合)。施用途径包括静脉内、肌内、皮下、腹膜内、脊柱或其它肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所用,短语“肠胃外施用”是指除肠内和局部施用之外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注以及体内电穿孔。其它非肠胃外途径包括局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、经阴道、经直肠、舌下或局部施用。施用也可以例如一次、多次和/或在一个月或多个延长的时间段内进行。

[0070] 术语“有效量”是指提供期望的生物学、治疗和/或预防结果的药剂的量。该结果可以是疾病的一个或多个体征、症状或病因的减少、改善、缓和、减轻、延迟和/或缓解,或生物系统的任何其它期望的改变。关于实体瘤,有效量包括足以引起肿瘤缩小和/或降低肿瘤生长速率(如抑制肿瘤生长)或预防或延迟其它不需要的细胞增殖的量。在一些方面,有效量是足以延迟肿瘤发展的量。在一些方面,有效量是足以预防或延迟肿瘤复发的量。有效量可分一次或多次施用。药物或组合物的有效量可以是:(i)减少癌细胞的数量;(ii)减小肿瘤大小;(iii)在一定程度上抑制、阻滞、减缓并且可能停止癌细胞浸润到外周器官中;(iv)抑制(即,在一定程度上减缓并且可能停止肿瘤转移);(v)抑制肿瘤生长;(vi)预防或延迟肿瘤的发生和/或复发;和/或(vii)在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。在一个实例中,“有效量”是抗紧密连接蛋白-1抗体的量和免疫检查点抑制剂的量的组合,其在临床上被证明影响癌症的显著减少或癌症(如晚期实体瘤)进展的减缓。

[0071] “癌症”是指特征在于体内异常细胞不受控制的生长的广泛的各种疾病。不受调节的细胞分裂和生长导致恶性肿瘤的形成,这些恶性肿瘤侵入邻近组织并且还可以通过淋巴系统或血流转移至身体的远端部分。“癌症”或“癌症组织”可包括肿瘤。

[0072] 如本文所用,术语“肿瘤”是指由过度细胞生长或增殖导致的良性(非癌性)或恶性(癌性)的任何组织块,包括癌前病变。

[0073] 如本文所用,术语“冷肿瘤”是指表现出低水平的免疫浸润,对免疫疗法反应差和/或表现出肿瘤异质性的肿瘤。这些冷肿瘤可具有包括但不限于以下的特征:肿瘤内CD8+T效应细胞的数量和/或活性显著减少或不存在,和/或肿瘤内免疫抑制细胞的数量和/或活性显著增加。冷肿瘤也被称为具有“T细胞排斥”的肿瘤。免疫检查点抑制剂(ICI)的免疫疗法已经极大地提高了恶性肿瘤疗法的临床功效,但是ICI介导的抗肿瘤反应依赖于能够识别和杀死肿瘤细胞的T细胞的浸润。因此,ICI在特征在于缺乏T细胞浸润的“冷肿瘤”中可能无效。

[0074] 术语“紧密连接蛋白-1的高表达”是指被评分为表达紧密连接蛋白-1的测试组织样品中的细胞比例。在一些方面,通过免疫组织化学(IHC)测定紧密连接蛋白-1表达,其中样品中紧密连接蛋白-1的高表达意指测试样品中细胞总数的至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或100%表达紧密连接蛋白-1。

[0075] 如本文所用,“患者”包括患有癌症(例如,纤维化癌症)的任何患者。术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。

[0076] II. 抗紧密连接蛋白-1抗体

[0077] 本发明涉及抗紧密连接蛋白-1抗体用于促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿瘤活性、在患有实体瘤的受试者中治疗癌症以及增加免疫检查点抑制剂在患有纤维化肿瘤的受试者中的治疗功效的用途。

[0078] 先前已经描述了针对人紧密连接蛋白-1的抗体用于治疗丙型肝炎病毒感染、肝细胞癌和某些纤维化疾病,如肺纤维化(参见WO 2010/034812、WO 2016/146809和WO 2021/094469)。可用于本发明实践的抗紧密连接蛋白-1抗体包括针对紧密连接蛋白-1产生的任何抗体。实例公开于WO 2010/034812和WO 2017/162678中。

[0079] 合适的抗紧密连接蛋白-1抗体的其它实例包括在以下中公开的那些:欧洲专利号EP 1 167 389、美国专利第6,627,439号、以第WO 2014/132307号公布的国际专利申请、以第WO 2015/014659号和第WO 2015/014357号公布的国际专利申请,以及Yamashita等人, J.Pharmacol.Exp.Ther., 2015, 353(1):112-118。

[0080] 适合于本发明的抗紧密连接蛋白-1抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。

[0081] 适合根据本发明使用的抗紧密连接蛋白-1抗体也可以是“人源化的”:啮齿动物抗体与人序列之间的序列差异可以通过用单个残基的定点诱变或通过整个区域的移植或通过化学合成替换不同于人序列中的残基来最小化。人源化抗体也可以使用重组方法产生。在抗体的人源化形式中,CDR区外的一些、大部分或全部氨基酸被来自人免疫球蛋白分子的氨基酸替换,而一个或多个CDR区内的一些、大部分或全部氨基酸不变。小添加、缺失、插入、取代或修饰氨基酸是允许的,只要它们不显著修改所得抗体的生物活性即可。合适的人“替代”免疫球蛋白分子包括IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgD或IgE分子和它们的片段。

[0082] 在一些方面,根据本发明使用的人源化抗紧密连接蛋白-1抗体是先前在WO 2017/162678中描述的抗体。本文提供的抗体或抗原结合片段的示例性序列描述于表1中。

[0083] 表1-抗体或抗原结合片段

描述	序列	SEQ ID NO:
[0084] H1L1-重链 #1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSSYGMN WVRQAPGKGLEWVSSISPSGSYFYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPGFNPPF DHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	1

[0085]

H1L1 -轻链	DIQMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGGNVDW YQWKPGQAPRLLIYGASNRYTGIPARFRGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYYCLQYKNNPWTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	2
H1L1 - VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSSYGMN WVRQAPGKGLEWVSSISPSGSYFYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPGFNP PFDHWGQGTLVTVSS	3
H1L1 - VL	DIQMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGGNVD WYQWKPGQAPRLLIYGASNRYTGIPARFRGSGSG TEFTLTISSLQSEDFAVYYCLQYKNNPWTFGQGT KVEIK	4
H1L1/H3L3 - CDR H1	GFSFSSYG	5
H1L1/H3L3 - CDR H2	ISPSGSYF	6
H1L1/H3L3 - CDR H3	ARLPGFNPPFDH	7
H1L1/H3L3 - CDR L1	QNVGGN	8
H1L1/H3L3 - CDR L2	GA	-
H1L1/H3L3 - CDR L3	LQYKNNPWT	10
H3L3 -重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCLGSGFSFSSYGMNW VRQAPGKGLEWVASISPSGSYFYADSVKGRFTISR NSKNTLY LQMTSLRAEDTAIYYCARLPGFNPPFDHWGQGTLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	11

[0086]	H3L3 -轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGGNVDWY QWKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPDRFRGSGSGTDF LTISSLQP EDVATYYCLQYKNNPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	12
	H3L3 - VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCLGSGFSFSSYGM NWVVRQAPGKGLEWVASISPSGSYFYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMTSLRAEDTAIYYCARLPG FNPPFDHWGQGLTVTVSS	13
	H3L3 - VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGGNV DWYQWKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPDRFRGS GSGTDFLTISLQPEDVATYYCLQYKNNPWTF GGGKVEIK	14
	H1L1 -重链 #2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSSYGMN WVRQAPGKGLEWVSSISPSGSYFYADSVKGRFTIS RDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPGFNPPF DHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	21

[0087] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)H1、含有SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列的CDR H2和含有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR H3。

[0088] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)L1、含有氨基酸序列“Gly Ala”的CDR L2和含有SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDR L3。

[0089] 在一些方面,本文公开的互补决定区(CDR)根据IMGT®定义。然而,应了解,也可以使用本领域中定义CDR的其它方法。

[0090] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体的六个互补决定区(CDR)与由杂交瘤细胞系分泌的抗紧密连接蛋白-1单克隆抗体相同,该杂交瘤细胞系在2008年7月29日以登录号DSMACC2938保藏在DSMZ。

[0091] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:3或13所示的氨基酸序列的重链可变区(“VH”)。

[0092] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:4或14所示的氨基酸序列的轻链可变区(“VL”)。

[0093] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体的重链可变区(“VH”)和轻链可变区(“VL”)与由杂交瘤细胞系分泌的抗紧密连接蛋白-1单克隆抗体相同,该杂交瘤细胞系在2008年7月29日以登录号DSMACC2938保藏在DSMZ。

[0094] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体的重链和轻链与由杂交瘤细胞系分泌的抗紧密连接蛋白-1单克隆抗体相同,该杂交瘤细胞系在2008年7月29日以登录号DSMACC2938保藏在DSMZ。

[0095] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的重链序列。

[0096] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链序列。

[0097] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的重链序列。

[0098] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体包含含有如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的轻链序列。

[0099] 人源化抗紧密连接蛋白-1抗体可以是具有选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的同位素的全单克隆抗体。或者,人源化抗紧密连接蛋白-1抗体可以是选自由以下组成的组的单克隆抗体的片段:Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双抗体。

[0100] 适合根据本发明使用的抗紧密连接蛋白-1抗体(或其生物活性变体或片段)可功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其它方式)至一个或多个其它分子实体。用于制备这类修饰的抗体(或缀合抗体)的方法是本领域已知的(参见,例如,“Affinity Techniques.Enzyme Purification:Part B”,Methods in Enzymol.,1974,第34卷,Jakoby和Wilneck(编),Academic Press:New York,NY;以及Wilchek和Bayer,Anal.Biochem.,1988,171:1-32)。优选地,分子实体连接在抗体分子上不干扰所得缀合物的结合特性的位置,例如不参与抗体与其靶标的特异性结合的位置。

[0101] 抗体分子和分子实体可以彼此共价连接、直接连接。或者,抗体分子和分子实体可以通过接头基团彼此共价连接。这可以通过使用本领域熟知的多种稳定的双功能药剂中的任一者来实现,包括同功能和异功能接头。

[0102] 在一些方面,根据本发明使用的抗紧密连接蛋白-1抗体(或其生物活性片段)与可检测药剂缀合。可以使用多种可检测药剂中的任一者,包括但不限于各种配体、放射性核素(例如,³H、¹²⁵I、¹³¹I等)、荧光染料(例如,异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛和荧光胺)、化学发光剂(例如,荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白)、微粒(如,量子点、纳米晶体、磷光体等)、酶(如,ELISA中使用的那些酶,即辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、比色标记、磁性标记和生物素、地高辛或可以获得抗血清或单克隆抗体的其它半抗原和蛋白质。

[0103] 可与本发明的抗紧密连接蛋白-1抗体(或其生物活性片段)缀合的其它分子实体包括但不限于直链或支链亲水性聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酯基团。

[0104] 因此,在本发明的实践中,抗紧密连接蛋白-1抗体可以以全长抗体、其生物活性变体或片段、嵌合抗体、人源化抗体和抗体衍生的分子的形式使用,这些抗体衍生的分子包含至少一个来自抗紧密连接蛋白-1抗体的重链或轻链可变区的互补决定区(CDR),包括如以

下的分子:Fab片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fabc片段、Sc抗体(单链抗体)、双抗体、单个抗体轻链单链、单个抗体重链、抗体链与其它分子之间的嵌合融合体以及抗体缀合物,如与治疗剂或可检测剂缀合的抗体。优选地,根据本发明的抗紧密连接蛋白-1抗体相关分子保留抗体结合其抗原的能力,特别是紧密连接蛋白-1的胞外结构域。

[0105] III. 嵌合抗原受体

[0106] 嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法或CAR T细胞疗法是基于使用被遗传工程化以表达结合肿瘤抗原的合成受体的T细胞的癌症治疗。工程化的CAR T细胞在体外扩增并输注到患者体内以攻击并破坏化疗抗性癌症。

[0107] 术语“嵌合抗原受体”(CAR)是指将针对靶细胞上存在的组分的结合结构域(例如,针对所需抗原(例如肿瘤抗原,如CLDN-1)的基于抗体的特异性)与T细胞受体活化胞内结构域组合以产生表现出特异性抗靶细胞免疫活性的嵌合蛋白的分子。

[0108] 如本文所用,CAR的“信号转导结构域”或“信号传导结构域”负责胞外配体结合结构域与靶标结合后的胞内信号传导,导致免疫细胞的活化和免疫反应。换句话说,信号转导结构域负责活化表达CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“信号转导结构域”是指转导效应子功能信号并指导细胞执行特化功能的蛋白质部分。用于CAR的信号转导结构域的实例可以是T细胞受体和共受体的胞质序列,其协同作用以在抗原受体接合后启动信号转导,以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。在一些情况下,信号传导结构域包含两种不同类型的胞质信号传导序列,即启动抗原依赖性初级活化的那些序列和以抗原非依赖性方式作用以提供次级或共刺激信号的那些序列。初级胞质信号传导序列可包含信号传导基序,其被称为ITAM的基于免疫受体酪氨酸的活化基序。ITAM是在用作syk/zap70类酪氨酸激酶的结合位点的多种受体的胞质内尾中发现的明确的信号传导基序。示例性ITAM包括衍生自以下的那些:TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、FcR ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。在一些方面,CAR的信号转导结构域可以包含CD3 ζ 信号传导结构域(SEQ ID NO:15)。

[0109] CAR是由靶向部分组成的合成受体,该靶向部分与单个融合分子中的一个或多个信号传导结构域相关。通常,CAR的结合部分由单链抗体(scFv)的抗原结合结构域组成,该单链抗体包含通过柔性接头连接的单克隆抗体的轻链和重链可变片段。此分子与包含一个或多个介导T细胞活化的胞内信号传导结构域的胞内信号传导分子连接。第一代CAR的信号传导结构域衍生自CD3 ζ 或Fc受体 γ 链的胞质区(或另一种含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序[ITAM]的蛋白质的胞内信号传导结构域)。第一代CAR已显示成功重定向T细胞毒性。然而,它们不能在体内提供延长的扩增和抗肿瘤活性。已经添加来自共刺激分子的信号传导结构域,以及跨膜和铰链结构域以形成第二代、第三代和第四代的CAR。第二代嵌合受体还并入共刺激胞内结构域(例如4-1BB/CD3 ζ)。含有多个共刺激信号传导模块的第三代CAR。第四代CAR是通过将IL-12添加到第二代构建体的基础上来产生,并且被称为被重定向进行普遍的细胞因子介导的杀伤的T细胞(TRUCK)。TRUCK增强T细胞活化并活化和吸引先天免疫细胞以消除所靶向病变中的抗原阴性癌细胞。在人中使用CAR T细胞疗法的治疗试验已经显示出一些成功。例如,对B细胞分化抗原CD19具有特异性的CAR重定向的T细胞已经在B细胞恶性肿瘤的治疗中显示出显著的功效,而TCR重定向的T细胞已经在患有实体癌的患者中显

示出益处。Stauss等人描述了修饰用于治疗癌症的治疗性CAR和TCR的策略,例如,增强抗原特异性效应子功能和限制工程化的T细胞的毒性(*Current Opinion in Pharmacology* 2015,24:113-118)。

[0110] 在本发明的一些方面包括对在癌细胞表面表达的紧密连接蛋白-1具有特异性的嵌合抗原受体(CAR)。在本发明的一些方面,如本文所述的CAR包含胞外靶特异性结合结构域、跨膜结构域、胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 或FcR γ 的信号传导结构域)和/或衍生自共刺激分子(如但不限于4-1BB)的一个或多个共刺激信号传导结构域。在一些方面,CAR包括胞外结合结构域与跨膜结构域之间的铰链区或间隔区,如CD8 α 铰链。在一些方面,嵌合抗原受体(CAR)包含胞外靶特异性结合结构域,其为抗紧密连接蛋白单链抗体(scFv),并且可以是鼠、人或人源化scFv。可以从对所需靶标具有特异性的杂交瘤的V区基因克隆单链抗体。可用于克隆可变区重链(VH)和可变区轻链(VL)的技术已例如描述于Orlandi等人,PNAS,1989;86:3833-3837中。因此,在一些方面,结合结构域包含抗体衍生的结合结构域,但可以是非抗体衍生的结合结构域。抗体衍生的结合结构域可以是抗体的片段或抗体的一个或多个片段的遗传工程化的产物,该片段参与同抗原的结合。

[0111] 在一些方面,本发明的CAR可以在各种结构域之间包含接头,为分子的适当间隔和构象而添加。例如,在一些方面,在结合结构域VH或VL之间可存在长度为1-10个氨基酸的接头。在一些方面,嵌合抗原受体的任何结构域之间的接头的长度可为1-20个氨基酸或20个氨基酸。在这方面,接头的长度可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。在一些方面,接头的长度可为21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。包括本文所述的数字的范围也包括在本文中,例如长度为10-30个氨基酸的接头。

[0112] 在一些方面,适合用于本文所述的CAR的接头是柔性接头。合适的接头可以容易地选择,并且可以是任何合适的不同长度,如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0113] 示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(其中n是至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,因此可以能够用作融合蛋白的结构域(如本文所述CAR)之间的中性系链。甘氨酸甚至比丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基受到少得多的限制(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。普通技术人员将认识到,CAR的设计可包括全部或部分柔性的接头,使得接头可包括柔性接头以及赋予较少柔性结构以提供所需CAR结构的一个或多个部分。具体的接头包括(G4S)_n接头,其中n=1-3。在一些方面,接头包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0114] CAR的结合结构域之后可以是“间隔区”或“铰链”,其是指将抗原结合结构域移离效应细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和活化的区域(Patel等人,Gene Therapy,1999;6:412-419)。CAR中的铰链区通常在跨膜(TM)与结合结构域之间。在一些方面,铰链区是免疫球蛋白铰链区,并且可以是野生型免疫球蛋白铰链区或改变的野生型免疫球蛋白铰链区。用于本文所述CAR的其它示例性铰链区包括衍生自I型膜蛋白(如CD8 α 、

CD4、CD28和CD7)的胞外区的铰链区,其可以是来自这些分子的野生型铰链区或可以被改变。在一些方面,铰链区包含CD8 α 铰链(SEQ ID NO:18)。

[0115] “跨膜”区或结构域是CAR的一部分,其将胞外结合部分锚定到免疫效应细胞的质膜上,并促进结合结构域与靶抗原的结合。跨膜结构域可以是CD3 ζ 跨膜结构域,然而可以使用的其它跨膜结构域包括从以下获得的那些:CD8 α 、CD4、CD28、CD45、CD9、CD16、CD22、CD33、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。在一些方面,跨膜结构域是CD137的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域是合成的,在这种情况下,其将主要包含疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。

[0116] “胞内信号传导结构域”或“信号传导结构域”是指嵌合抗原受体蛋白质的部分,其参与将CAR与靶抗原有效结合的信息转导至免疫效应细胞内部以引发效应细胞功能,例如活化、细胞因子产生、增殖和细胞毒性活性,包括细胞毒性因子释放至CAR结合的靶细胞,或由抗原与胞外CAR结构域结合引发的其它细胞反应。术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。T细胞的效应子功能例如可以是细胞溶解活性或辅助或活性,包括细胞因子的分泌。因此,本文可互换使用的术语“胞内信号传导结构域”或“信号传导结构域”是指转导效应子功能信号并指导细胞执行特化功能的蛋白质部分。虽然通常可以使用整个胞内信号传导结构域,但在许多情况下未必使用整个结构域。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,可使用这种截短部分代替整个结构域,只要其转导效应子功能信号即可。术语胞内信号传导结构域意指包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短部分。胞内信号传导结构域也被称为“信号转导结构域”,并且通常衍生自人CD3或FcR γ 链的部分。

[0117] 已知单独通过T细胞受体产生的信号不足以完全活化T细胞,以及需要次级或共刺激信号。因此,T细胞活化可以说是由两种不同类型的胞质信号传导序列介导的:通过T细胞受体启动抗原依赖性初级活化的那些(初级胞质信号传导序列)和以抗原非依赖性方式作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞质信号传导序列)。以共刺激方式起作用的胞质信号传导序列可以含有信号传导基序,其被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。

[0118] 含有在本发明中特别有用的初级胞质信号传导序列的ITAM的实例包括衍生自以下的那些:TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。在一个某些方面,本文所述抗BCMACAR的信号传导结构域衍生自CD3 ζ 。在一些方面,信号传导结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0119] 如本文所用,术语“共刺激信号传导结构域”或“共刺激结构域”是指包含共刺激分子的胞内结构域的CAR部分。共刺激分子是除抗原受体或Fc受体之外的细胞表面分子,其在与抗原结合时提供T淋巴细胞的有效活化和功能所需的第二信号。这类共刺激分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS(CD278)、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、B7-H2和特异性结合CD83的配体。因此,虽然本公开提供了衍生自CD3 ζ 和4-1BB的示例性共刺激结构域,但考虑其它共刺激结构域与本文所述的CAR一起使用。包括一个或多个共刺激信号传导结构域可增强表达CAR受体的T细胞的功效和扩增。胞内信号传导和共刺激信号传导结构域可以以任何顺序串联连接到跨膜结构域的车基末端。在一些方面,共刺激结构域包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0120] 在一些方面,本公开的抗紧密连接蛋白-1 CAR包含表2的任何元件。

[0121] 表2-CAR元件

描述	序列	SEQ ID NO:
CD3 ζ 信号传导结构域	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR	15
[0122] (G4S)接头 1	GGGGSGGGGSGGGGS	16
接头 2	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	17
CD8 α 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGL DFACD	18
TM 结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYC	19
共刺激结构域	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGC EL	20

[0123] 尽管被工程改造以含有来自CD3或FCR γ 的信号传导结构域的基于scFv的CAR已显示递送用于T细胞活化和效应子功能的强效信号,但它们不足以在不存在伴随共刺激信号的情况下引发促进T细胞存活和扩增的信号。含有结合结构域、铰链、跨膜和衍生自CD3 ζ 或FcR γ 的信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号传导结构域(例如,衍生自CD28、CD137、CD134和CD278的胞内共刺激结构域)的其它CAR可以更有效地指导体外表达CAR的T细胞中以及动物模型和癌症患者中的抗肿瘤活性以及增加的细胞因子分泌、溶解活性、存活和增殖(Milone等人, *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong等人, *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito等人, *PNAS*, 2009; 106: 3360-3365)。

[0124] 在一些方面,本发明的抗紧密连接蛋白-1 CAR包含:(a)抗紧密连接蛋白-1结合结构域(例如,具有来自表1中鉴定的任何一个或多个序列的结合区(例如,CDR或可变结构域)的scFv), (b)源自人CD8 α 的铰链区, (c)人CD8 α 跨膜结构域,和(d)人T细胞受体CD3 ζ 链(CD3)胞内信号传导结构域,和任选的一个或多个共刺激信号传导结构域,例如4-1BB。在一些方面,不同的蛋白质结构域从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:抗紧密连接蛋白-1结合结构域、铰链区和跨膜结构域。胞内信号传导结构域和任选的共刺激信号传导结构域以任何顺序串联连接到跨膜羧基末端以形成单链嵌合多肽。在一些方面,编码抗紧密连接蛋白-1 CAR的核酸构建体是包含核酸分子的嵌合核酸分子,该核酸分子包含不同的编码序列,例如(5'至3')以下各者的编码序列:抗紧密连接蛋白-1scFv、人CD8 α -铰链、人CD8 α 跨膜结构域和CD3 ζ 胞内信号传导结构域。在一些方面,编码抗紧密连接蛋白-1CAR的核酸构建体是包含核酸分子的嵌合核酸分子,该核酸分子包含不同的编码序列,例如(5'至3')以下各者的编码序列:抗紧密连接蛋白-1scFv、人CD8 α -铰链、人CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 共刺激结构域。

[0125] 在一些方面,将编码本文所述的CAR的多核苷酸插入载体中。为了表达抗紧密连接蛋白-1 CAR,可将载体引入宿主细胞中以允许多肽在宿主细胞内表达。表达载体可以含有多种用于控制表达的元件,包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择标志物和信号序列。如上所述,本领域普通技术人员可以适当地选择这些元件。例如,可以选择启动子序列以促进载体中多核苷酸的转录。合适的启动子序列包括但不限于T7启动子、T3启动子、SP6启动子、 β -肌动蛋白启动子、EF1a启动子、CMV启动子和SV40启动子。可以选择增强子序列以增强多核苷酸的转录。可选择选择标志物以允许从未插入载体的宿主细胞中

选择插入载体的宿主细胞,例如,选择标志物可以是赋予抗生素抗性的基因。可以选择信号序列以允许表达的多肽被转运到宿主细胞外。

[0126] 使用本领域已知的转染和/或转导技术将本发明的CAR引入宿主细胞中。如本文所用,术语“转染”和“转导”是指将外源核酸序列引入宿主细胞中的过程。核酸可以整合到宿主细胞DNA中或可以保持在染色体外。核酸可以是瞬时保持的或可以是稳定引入的。转染可通过本领域已知的多种手段来实现,包括但不限于磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、脂质转染、原生质体融合、逆转录病毒感染和基因枪。转导是指使用病毒或逆转录病毒载体通过病毒感染而不是通过转染来递送基因。

[0127] 如本文所用,术语“遗传工程化的”或“遗传修饰的”是指将DNA或RNA形式的额外遗传物质添加到细胞中的总遗传物质中。术语“遗传修饰的细胞”、“修饰的细胞”和“重定向的细胞”可互换使用。

[0128] 在一些方面,本发明的CAR被引入免疫效应细胞中并在其中表达,以便将它们的特异性重定向到所关注的靶抗原,例如紧密连接蛋白-1。

[0129] 本发明提供了用于制备表达如本文所述的CAR的免疫效应细胞的方法。在一些方面,该方法包括转染或转导从受试者(如具有表达紧密连接蛋白-1的肿瘤细胞的受试者)分离的免疫效应细胞,使得免疫效应细胞表达如本文所述的一种或多种CAR。在一些方面,免疫效应细胞分离自个体并且经遗传修饰而无需进一步体外操纵。然后可将这些细胞直接再施用于个体。在一些方面,在被遗传修饰以表达CAR之前,首先活化和刺激免疫效应细胞以在体外增殖。在这方面,免疫效应细胞可在遗传修饰(即转导或转染以表达如本文所述的CAR)之前或之后培养。

[0130] 在本文所述的免疫效应细胞的体外操纵或遗传修饰之前,可从受试者获得细胞来源。在一些方面,用于与如本文所述的CAR一起使用的免疫效应细胞包含T细胞。T细胞可以从许多来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些方面,T细胞可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术(如FICOLL分离)从收集自受试者的血液单位获得。在一些方面,通过单采血液成分术获得来自个体循环血液的细胞。单采血液成分术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一些方面,可洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以去除血浆部分并将细胞置于适当缓冲液或介质中用于随后处理。在一些方面,用PBS洗涤细胞。在一些方面,洗涤的溶液缺乏钙,并且可能缺乏镁或可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。如本领域普通技术人员将了解,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来实现,如通过使用半自动流通式离心机。洗涤后,可将细胞重悬于各种生物相容性缓冲液或其它含或不含缓冲液的盐水溶液中。在一些方面,可以在直接重悬的细胞培养基中去除单采血液成分术样品中不需要的组分。

[0131] 在一些方面,通过溶解红细胞并消耗单核细胞,例如通过PERC OLL™梯度离心,从外周血单核细胞(PBMC)中分离T细胞。T细胞的特定亚群,如CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+和CD45RO+T细胞,可以通过正选择或负选择技术进一步分离。例如,通过负选择富集T细胞群体可以用针对负选择细胞特有的表面标志物的抗体的组合来实现。用于本文的一种方法是通过使用针对负选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物的负磁性免

疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择。例如,为了通过负选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD1b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。也可使用流式细胞术和细胞分选来分离所关注的细胞群体以用于本发明。

[0132] 使用如本文所述的方法,PBMC可直接用于用CAR的遗传修饰。在一些方面,在分离PBMC之后,进一步分离T淋巴细胞,并且在一些方面,在遗传修饰和/或扩增之前或之后,可以将细胞毒性T淋巴细胞和辅助T淋巴细胞分类为初始T细胞亚群、记忆T细胞亚群和效应T细胞亚群。CD8⁺细胞可以通过使用标准方法获得。在一些方面,通过鉴定与这些类型的CD8⁺细胞中的每一种细胞相关的细胞表面抗原,将CD8⁺细胞进一步分类为初始细胞、中央记忆细胞和效应细胞。在一些方面,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻子集中。用抗CD8和抗CD62L抗体染色后,将PBMC分类为CD62L⁻CD8⁺和CD62L⁺CD8⁺部分。在一些方面,中央记忆TCM的表型标志物的表达包括CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和CD127,并且对于颗粒酶B呈阴性。在一些方面,中央记忆T细胞是CD45RO⁺、CD62L⁺、CD8⁺T细胞。在一些方面,效应T细胞对CD62L、CCR7、CD28和CD127呈阴性,并且对颗粒酶B和穿孔素呈阳性。在一些方面,初始CD8⁺T淋巴细胞的特征在于初始T细胞的表型标志物的表达,包括CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD 127和CD45RA。

[0133] 在一些方面,CD4⁺T细胞进一步分类为亚群。例如,通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群体,可将CD4⁺T辅助细胞分类为初始细胞、中央记忆细胞和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些方面,初始CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺CD4⁺T细胞。在一些方面,中央记忆CD4⁺细胞是CD62L阳性并且CD45RO阳性的。在一些方面,效应CD4⁺细胞是CD62L和CD45RO阴性的。

[0134] 免疫效应细胞(如T细胞)可以在使用已知方法分离后进行遗传修饰,或免疫效应细胞可以在进行遗传修饰之前在体外活化和扩增(或在祖细胞的情况下,分化)。在一些方面,免疫效应细胞(如T细胞)用本文所述的嵌合抗原受体遗传修饰(例如,用包含编码CAR的核酸的病毒载体转导),然后在体外活化和扩增。用于活化和扩增T细胞的方法是本领域已知的,并且描述于例如美国专利第6,905,874号、第6,867,041号、第6,797,514号;WO2012079000中。通常,这类方法包括将PBMC或分离的T细胞与刺激剂和共刺激剂(如抗CD3和抗CD28抗体,通常附着于珠粒或其它表面)在具有适当细胞因子(如IL-2)的培养基中接触。附着于同一珠粒的抗CD3和抗CD28抗体用作“替代”抗原呈递细胞(APC)。在一些方面,可以使用如美国专利第6,040,177号、第5,827,642号;和WO2012129514中描述的方法,用饲养细胞以及适当的抗体和细胞因子活化和刺激T细胞增殖。

[0135] 本发明提供了一种用于治疗患有由表达紧密连接蛋白-1的肿瘤引起的恶性肿瘤的患者的修饰的免疫效应细胞群体,这些修饰的免疫效应细胞包含如本文公开的抗紧密连接蛋白-1 CAR。

[0136] IV. 使用方法

[0137] 本发明的方法可以使用抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段、或包含这种抗体或片段的药物组合物来完成(见下文)。这些方法通常包括向有需要的受试者(即,患有纤维化肿瘤的受试者)施用有效量的抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段或其药物组合物。可以使用本领域技术人员已知的任何施用方法进行施用(参见下文)。

[0138] 纤维化肿瘤通常具有致密的胶原网络,其在间质中引起小的纤维间间距,以延迟

大于10纳米的颗粒的运动 (Netti PA等人 (2000) Cancer Res 60:2497-2503; Pluen A等人 (2001) Proc Natl AcadSci USA 98:4628-4633; Ramanujan S等人 (2002) Biophys J 83:1650-1660; 和Brown E等人 (2003) Nat Med 9:796-800)。在一些方面,本文提供了一种促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿瘤活性的方法,该方法包括向受试者施用抗紧密连接蛋白-1抗体。在一些方面,促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿瘤活性的方法还包括施用免疫检查点抑制剂。

[0139] 在一些方面,本文提供了一种治疗患有实体瘤的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂,其中抗紧密连接蛋白-1抗体促进受试者的肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性。

[0140] 在一些方面,本文提供了一种增加免疫检查点抑制剂在患有纤维化肿瘤的受试者中的治疗功效的方法,该方法包括a) 向受试者施用抗紧密连接蛋白-1抗体,其中抗紧密连接蛋白-1抗体促进纤维化肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性;以及b) 向受试者施用免疫检查点抑制剂。

[0141] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体在施用免疫检查点抑制剂之前施用。

[0142] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂同时或依序施用。

[0143] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂在同一组合物中施用。

[0144] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂在不同组合物中施用。

[0145] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和/或免疫检查点抑制剂以瘤内、静脉内、腹膜内、肌内、鞘内或皮下方式施用。

[0146] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、TIGIT、VISTA、B7-H3、BTLA和/或Siglec-15的拮抗剂。

[0147] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是小分子抑制剂。

[0148] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是抗体或其抗原结合片段。

[0149] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-1拮抗剂。在一些方面,PD-1拮抗剂选自自由以下组成的组:纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗和多塔利单抗。

[0150] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-L1拮抗剂。在一些方面,PD-L1拮抗剂选自自由以下组成的组:阿替利珠单抗、度伐鲁单抗和阿维鲁单抗。

[0151] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是CTLA-4拮抗剂。在一些方面,CTLA-4拮抗剂选自自由以下组成的组:伊匹木单抗和曲美木单抗。

[0152] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是LAG-3拮抗剂(例如,BI754111)。

[0153] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是TIM-3拮抗剂(例如,TSR-022和LY3321367)。

[0154] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是VISTA (T细胞活化的含V结构域免疫球蛋白 (Ig) 的抑制剂) 拮抗剂(例如,CA-170 (抗PD-L1/L2和抗VISTA小分子) 和JNJ-61610588)。

[0155] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是B7-H3拮抗剂。

[0156] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是BTLA拮抗剂。

[0157] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是Siglec-15拮抗剂。

[0158] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是TIGIT拮抗剂(例如,BMS-986207、OMP-313M32、COM902 (CGEN-15137) 和AB154)。在一些方面,TIGIT拮抗剂选自自由以下组成的组:替瑞利尤单抗、欧司珀利单抗、东瓦纳利单抗、艾替利单抗和维博利单抗。

[0159] 在一些方面,癌症包括纤维化肿瘤。

[0160] 在一些方面,纤维化肿瘤的特征在于高表达紧密连接蛋白-1。在一些方面,本文公开的方法还包括检测来自受试者的纤维化肿瘤样品中的紧密连接蛋白-1表达水平。在一些方面,本文公开的方法还包括将紧密连接蛋白-1表达水平与参考样品中的紧密连接蛋白-1表达水平进行比较,其中如果相对于参考样品中的紧密连接蛋白-1表达水平,纤维化肿瘤样品中的紧密连接蛋白-1表达水平增加,则向受试者施用如本文所述的抗紧密连接蛋白-1抗体和/或免疫检查点抑制剂。

[0161] 在一些方面,通过免疫组织化学(IHC)测试来定量纤维化肿瘤样品和/或参考样品中的紧密连接蛋白-1表达水平。在一些方面,通过H-评分法来计算IHC测试(参见例如,Parris,Toshima Z等人,BMC cancer第14卷:324(2014))。在一些方面,H-评分要求每个细胞得到0至+3的评分(0=阴性染色;+1=靶抗原的弱染色或低表达;+2=靶抗原的中等染色或中等表达;并且+3=靶抗原的强染色或高表达)。在一些方面,H-评分在0至300的范围内,其中通过将以下相加来计算H-评分:i)样品中评分为+1的细胞百分比,ii)样品中评分为+2的细胞百分比的两倍,和iii)样品中评分为+3的细胞百分比的三倍(即,H-评分=(1*%1+的细胞)+(2*%2+的细胞)+(3*%3+的细胞))。在一些方面,通过H-评分法分级的紧密连接蛋白-1的高表达在约150至约300之间。在一些方面,通过H-评分法分级的紧密连接蛋白-1的中等表达在约50至约149之间。在一些方面,通过H-评分法分级的紧密连接蛋白-1的低表达在约1至约49之间。

[0162] 在一些方面,当H-评分在约1至约300之间时,认为紧密连接蛋白-1的表达呈阳性。在一些方面,当H-评分在约50至约300之间时,认为紧密连接蛋白-1的表达呈阳性。在一些方面,当H-评分在约150至约300之间时,认为紧密连接蛋白-1的表达呈阳性。

[0163] 为了改善纤维化肿瘤的治疗,在一些方面,本发明提供了将患者鉴定为具有紧密连接蛋白-1的高表达以及提供抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂的免疫疗法。

[0164] 另一方面,本发明涉及将患者鉴定为患有具有紧密连接蛋白-1的高表达的纤维化肿瘤,以及通过施用抗紧密连接蛋白-1抗体或抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂的组合来治疗所述纤维化肿瘤。在一些方面,本发明包括将患者鉴定为患有具有紧密连接蛋白-1的高表达的纤维化肿瘤以及向患者施用抗紧密连接蛋白-1抗体的方法。

[0165] 在一些方面,本发明包括在人类患者中选择纤维化肿瘤用于免疫疗法的方法,该方法包括:(a)测定肿瘤样品中紧密连接蛋白-1表达的水平;和(b)如果肿瘤样品具有紧密连接蛋白-1高表达,则选择该肿瘤用于免疫疗法。

[0166] 在一些方面,本发明包括鉴定人类患者中的纤维化肿瘤符合免疫疗法的方法,该方法包括:(a)测定肿瘤样品中紧密连接蛋白-1表达的水平;和(b)如果肿瘤样品具有紧密连接蛋白-1高表达,则将该肿瘤鉴定为符合免疫疗法。

[0167] 在一些方面,本发明包括鉴定人类患者中可能对免疫疗法有反应的纤维化肿瘤的方法,该方法包括:(a)测定肿瘤样品中紧密连接蛋白-1表达的水平;和(b)如果肿瘤具有紧密连接蛋白-1高表达,则将该肿瘤鉴定为可能对治疗有反应。

[0168] 在一些方面,本发明包括将人类患者中的纤维化肿瘤分类为可能对免疫疗法有反应的方法,该方法包括:(a)测定肿瘤样品中紧密连接蛋白-1表达的水平;和(b)如果肿瘤具有紧密连接蛋白-1高表达,则将肿瘤分类为可能对免疫疗法有反应。在一些方面,免疫疗法

包括使肿瘤与治疗有效量的抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂接触。

[0169] 在一些方面,本发明包括鉴定可能对免疫疗法有反应的患有纤维化肿瘤的患者,该方法包括:(a)测定肿瘤样品中紧密连接蛋白-1表达的水平;和(b)如果肿瘤具有紧密连接蛋白-1高表达,则鉴定可能对治疗有反应的患者。

[0170] 在一些方面,本发明包括选择患有纤维化肿瘤的患者用于免疫疗法的方法,该方法包括:(a)测定肿瘤样品中紧密连接蛋白-1表达的水平;和(b)如果肿瘤具有紧密连接蛋白-1高表达,则选择该患者用于免疫疗法。在一些方面,免疫疗法包括使肿瘤与治疗有效量的抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂接触。

[0171] 在一些方面,该鉴定包括测定纤维化肿瘤中的紧密连接蛋白-1表达。

[0172] 在一些方面,通过接收能够测定紧密连接蛋白-1表达的测定的结果来测定紧密连接蛋白-1表达。

[0173] 为了评估紧密连接蛋白-1表达,在一些方面,从需要疗法的患者获得测试组织样品。在一些方面,测试组织样品包括但不限于任何临床相关组织样品,如肿瘤活检、核心活检组织样品、细针抽吸物或体液样品,如血液、血浆、血清、淋巴液、腹水、囊液或尿液。在一些方面,测试组织样品来自原发性肿瘤。在一些方面,测试组织样品来自转移灶。在一些方面,在多个时间点,例如在治疗之前、治疗期间和/或治疗之后,从受试者获取测试组织样品。在一些方面,从受试者的不同位置获取测试组织样品,例如,来自原发性肿瘤的和来自远处转移灶的样品。

[0174] 在一些方面,测试组织样品是石蜡包埋的固定组织样品。在一些方面,测试组织样品是福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)组织样品。在一些方面,测试组织样品是新鲜组织(例如,肿瘤)样品。在一些方面,测试组织样品是冷冻或冷冻保存的组织样品。在一些方面,测试组织样品是新鲜冷冻(FF)组织(例如,肿瘤)样品。在一些方面,测试组织样品是存档组织样品。在一些方面,测试组织样品是具有已知诊断、治疗和/或结果历史的存档组织样品。在一些方面,样品是组织块。在一些方面,测试组织样品是分散的细胞。在一些方面,样品大小为约1个细胞至约 1×10^6 个细胞或更多。在一些方面,样品大小为约1个细胞至约 1×10^5 个细胞。在一些方面,样品大小为约1个细胞至约10,000个细胞。在一些方面,样品大小为约1个细胞至约1,000个细胞。在一些方面,样品大小为约1个细胞至约100个细胞。在一些方面,样品大小为约1个细胞至约10个细胞。在一些方面,样品大小为单个细胞。

[0175] 在另一方面,可在不获得测试组织样品的情况下实现对紧密连接蛋白-1表达的评估。在一些方面,选择合适的患者包括(i)任选地提供从患有组织癌症的患者获得的测试组织样品,该测试组织样品包含肿瘤细胞和/或肿瘤浸润炎性细胞;和(ii)基于测试组织样品中细胞表面上表达紧密连接蛋白-1的细胞的比例高于预定阈值水平的评估,评估测试组织样品中细胞表面上表达紧密连接蛋白-1的细胞的比例。

[0176] 然而,在包括测量测试组织样品中紧密连接蛋白-1表达的任何方法中,应当理解,包括提供从患者获得的测试组织样品的步骤是任选的步骤。也就是说,在某些方面,该方法包括此步骤,而在其它方面,此步骤不包括在该方法中。还应当理解,在某些方面,鉴定或测定测试组织样品中表达紧密连接蛋白-1的细胞的数量或比例的“测量”或“评估”步骤通过测定紧密连接蛋白-1表达的转化方法进行,例如通过进行逆转录酶-聚合酶链式反应(RT-PCR)测定或IHC测定。在某些其它方面,不涉及转化步骤,并且通过例如检查来自实验室的

测试结果报告来评估紧密连接蛋白-1表达。在一些方面,通过检查来自实验室的免疫组织化学测定的结果来评估紧密连接蛋白-1表达。在某些方面,直至并包括评估紧密连接蛋白-1表达的方法的步骤提供了中间结果,该中间结果可以提供给医师或其他健康护理提供者用于选择适合用于紧密连接蛋白-1抑制剂和免疫检查点抑制剂的组合疗法的候选物。在某些方面,直至并包括评估紧密连接蛋白-1表达的方法的步骤提供了中间结果,该中间结果可以提供给医师或其他健康护理提供者用于选择适合用于免疫检查点抑制剂疗法的候选物。在某些方面,提供中间结果的步骤由执业医师或在执业医师指导下行动的人执行。在其它方面,这些步骤由独立的实验室或由独立的人员(如实验室技术人员)执行。

[0177] 在任何本发明方法的某些方面,通过用于检测紧密连接蛋白-1RNA的存在的测定来评估表达紧密连接蛋白-1的细胞的比例。在另一方面,通过RT-PCR、原位杂交或RNA酶保护检测紧密连接蛋白-1RNA的存在。在一些方面,通过基于RT-PCR的测定检测紧密连接蛋白-1RNA的存在。在一些方面,对基于RT-PCR的测定评分包括相对于预定水平评估测试组织样品中紧密连接蛋白-1RNA表达的水平。

[0178] 在其它方面,通过用于检测紧密连接蛋白-1多肽的存在的测定来评估表达紧密连接蛋白-1的细胞的比例。在另一方面,通过IHC、酶联免疫吸附测定(ELISA)、体内成像或流式细胞术来检测紧密连接蛋白-1多肽的存在。在一些方面,通过IHC测定紧密连接蛋白-1表达。在所有这些方法的其它方面,使用例如IHC或体内成像测定紧密连接蛋白-1的细胞表面表达。

[0179] 在一些方面,在低放大倍数下对免疫组织化学测定进行评分。在一些方面,低放大倍数为约20X。在一些方面,在高放大倍数下对免疫组织化学测定进行评分。在一些方面,高放大倍数为约40X。

[0180] 在一些方面,通过图像分析软件对免疫组织化学测定进行评分。在一些方面,通过病理学家视觉免疫评分对免疫组织化学测定进行评分。在一些方面,手动对免疫组织化学测定进行评分。

[0181] 在一些方面,肿瘤选自由以下组成的组:头颈肿瘤、肺肿瘤、乳腺肿瘤、黑色素瘤肿瘤、结肠直肠肿瘤、胰腺肿瘤、食管肿瘤、胆管癌和肝细胞肿瘤。

[0182] 在一些方面,如本文所述制备的表达CAR的免疫效应细胞可用于根据已知技术的过继免疫疗法的方法和组合物、或基于本公开对本领域技术人员来说将显而易见的其变体。参见例如Gruenberg等人的美国专利申请公开第2003/0170238号;还参见Rosenberg的美国专利第4,690,915号。

[0183] 在一些方面,通过首先从其培养基收获细胞,然后在适于以治疗有效量施用的培养基和容器系统(“药学上可接受的”载剂)中洗涤和浓缩细胞来配制细胞。合适的输注介质可以是任何等渗介质调配物,通常是生理盐水、诺莫索尔R(Normosol R)(Abbott)或勃脉力A(Plasma-Lyte A)(Baxter),但也可以使用5%葡萄糖水溶液或乳酸林格氏液(Ringer's lactate)。输注介质可以补充有人血清白蛋白。

[0184] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1 CAR-T细胞和免疫检查点抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂选自由以下组成的组:CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HVEM、TIM-3、GAL-9、LAG-3、VISTA、KIR、BTLA、TIGIT、IDO和/或Siglec-15抑制剂,如本文所述。

[0185] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-1的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-L1的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-L2的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是CTLA-4的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是LAG-3的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是TIM-3的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是TIGIT的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是VISTA的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是B7-H3的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是B7-H4的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是HVEM的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是GAL-9的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是KIR的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是BTLA的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是IDO的抑制剂,如本文所述。在一些方面,免疫检查点抑制剂是Siglec-15的抑制剂,如本文所述。

[0186] 在一些方面,本发明的表达CAR的免疫效应细胞群体可以单独施用,或作为与稀释剂和/或与其它组分(如本文所述的免疫检查点抑制剂)组合的药物组合物施用。简言之,本发明的药物组合物可包含表达CAR的免疫效应细胞群体(如本文所述的T细胞)与一种或多种药学上或生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的组合。这类组合物可以包含:缓冲液,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选配制用于静脉内施用。

[0187] 在一些方面,通过使用本文所述的方法或本领域已知的其它方法施用本文所述的表达CAR的T细胞在受试者中诱导的抗肿瘤免疫反应可包括由能够杀死感染细胞的细胞毒性T细胞介导的细胞免疫反应、调节T细胞反应和辅助T细胞反应。也可以诱导主要由能够活化B细胞从而导致抗体产生的辅助T细胞介导的体液免疫反应。多种技术可用于分析由本发明的组合物诱导的免疫反应的类型,这些技术在本领域中充分描述;例如,Current Protocols in Immunology, 编辑人:John E.Coligan, Ada M.Kruisbeek, David H.Margulies, Ethan M.Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley&Sons, N.Y., N.Y.

[0188] 在一些方面,本文提供了一种促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿瘤活性的方法,该方法包括向受试者施用抗紧密连接蛋白-1嵌合抗原受体(CAR)T细胞。在一些方面,包括施用免疫检查点抑制剂。

[0189] 在一些方面,本文提供了一种治疗患有实体瘤的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞和免疫检查点抑制剂。在一些方面,抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞促进受试者的肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性。

[0190] 在一些方面,本文提供了一种增加免疫检查点抑制剂在患有纤维化肿瘤的受试者中的治疗功效的方法,该方法包括向受试者施用抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞以及向受试者施用免疫检查点抑制剂。在一些方面,抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞促进纤维化肿瘤中的T细胞介导的抗肿瘤活性。

[0191] V. 免疫检查点抑制剂

[0192] 免疫检查点蛋白与特异性配体相互作用,该配体将抑制T细胞功能的信号发送到T细胞中。癌细胞通过驱动检查点蛋白在其表面上的高水平表达从而抑制抗癌免疫反应来利

用这一点。

[0193] 免疫检查点抑制剂包括能够抑制免疫检查点蛋白的功能的任何化合物。抑制包括功能降低以及完全阻断。在一些方面,免疫检查点蛋白是人检查点蛋白。因此,在一些方面,免疫检查点抑制剂优选是人免疫检查点的抑制剂。

[0194] 在一些方面,检查点蛋白包括但不限于CTLA-4、PD-1(和其配体PD-L1和PD-L2)、B7-H3、B7-H4、HVEM、TIM-3、GAL-9、LAG-3、VISTA、KIR、BTLA、TIGIT、IDO和/或Siglec-15。涉及LAG-3、BTLA、B7-H3、B7-H4、TIM-3和KIR的途径构成类似于CTLA-4和PD-1依赖性途径的免疫检查点途径(参见例如,Pardoll,2012,Nature Rev Cancer 12:252-264;Mellman等人,2011,Nature480:480-489)。在一些方面,免疫检查点抑制剂是CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HVEM、TIM-3、GAL-9、LAG-3、VISTA、KIR、BTLA、TIGIT、IDO和/或Siglec-15的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、TIGIT、VISTA、B7-H3、BTLA和/或Siglec-15的抑制剂。

[0195] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-1的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是PD-L1的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是CTLA-4的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是LAG-3的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是TIM-3的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是TIGIT的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是VISTA的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是B7-H3的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是BTLA的抑制剂。在一些方面,免疫检查点抑制剂是Siglec-15的抑制剂。

[0196] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是抗体。

[0197] 在一些方面,免疫检查点抑制剂包含与选自由以下组成的组的免疫检查点蛋白特异性结合的抗体或其片段:CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HVEM、TIM-3、GAL-9、LAG-3、VISTA、KIR、BTLA、TIGIT、IDO和Siglec-15。在一些方面,免疫检查点抑制剂是能够至少部分拮抗以下的单克隆抗体、完全人抗体、嵌合抗体、人源化抗体或其片段:CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HVEM、TIM-3、GAL-9、LAG-3、VISTA、KIR、BTLA、TIGIT、IDO和/或Siglec-15。

[0198] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是与PD-1特异性结合的抗体或其片段。在一些方面,免疫检查点抑制剂是与PD-L1特异性结合的抗体或其片段。在一些方面,免疫检查点抑制剂是与CTLA-4特异性结合的抗体或其片段。在一些方面,免疫检查点抑制剂是与LAG-3特异性结合的抗体或其片段。在一些方面,免疫检查点抑制剂是与TIM-3特异性结合的抗体或其片段。在一些方面,免疫检查点抑制剂是与TIGIT特异性结合的抗体或其片段。在一些方面,免疫检查点抑制剂是与VISTA特异性结合的抗体或其片段。在一些方面,免疫检查点抑制剂是与B7-H3特异性结合的抗体或其片段。在一些方面,免疫检查点抑制剂是与BTLA特异性结合的抗体或其片段。在一些方面,免疫检查点抑制剂是与Siglec-15特异性结合的抗体或其片段。

[0199] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及CTLA-4抑制剂,优选特异性结合(并抑制)CTLA-4的单克隆抗体。完整的人CTLA-4核酸序列可以在GenBank登录号NG_011502.1下找到。与CTLA-4特异性结合的单克隆抗体包括但不限于:伊匹木单抗(Yervoy[®];BMS)和曲美木单抗(AstraZeneca/MedImmune);以及美国专利申请公开第2005/0201994号、第2002/0039581号和第2002/0086014号中公开的抗体,其各

自的内容以引用的方式并入本文;以及美国专利第5,811,097号、第5,855,887号、第6,051,227号、第6,984,720号、第6,682,736号、第6,207,156号、第5,977,318号、第6,682,736号、第7,109,003号、第7,132,281号和第8,491,895号中公开的抗体,其各自的内容以引用的方式并入本文;或包含任何这些抗体的重链和轻链可变区的抗体。以高亲和力与CTLA-4特异性结合的人单克隆抗体公开于美国专利第6,984,720号中。其它抗CTLA-4单克隆抗体已描述于例如美国专利第7,034,121号和国际公开第WO 2012/122444号、第WO 2007/113648号、第WO 2016/196237号和第WO 2000/037504号中。在一些方面,免疫检查点抑制剂是CTLA-4拮抗剂。在一些方面,CTLA-4拮抗剂选自由以下组成的组:伊匹木单抗和曲美木单抗。

[0200] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及PD-1抑制剂,优选特异性结合(并抑制)PD-1的单克隆抗体。人PD-1的完整核苷酸序列和氨基酸序列可以在GenBank登录号NG_012110.1和NP_005009.2下找到。在一些方面,抗PD-1抗体是纳武利尤单抗。纳武利尤单抗(也被称为“OPDIVO[®]”;BMS-936558;以前称为5C4、BMS-936558、MDX-1106或ONO-4538)是完全人IgG4(S228P)PD-1免疫检查点抑制剂抗体,其选择性地阻止与PD-1配体(PD-L1和PD-L2)的相互作用,从而阻断抗肿瘤T细胞功能的下调(美国专利第8,008,449号;Wang等人,2014Cancer Immunol Res.2(9):846-56)。在另一方面,抗PD-1抗体或其片段与纳武利尤单抗交叉竞争。在其它方面,抗PD-1抗体或其片段与纳武利尤单抗结合相同的表位。在某些方面,抗PD-1抗体具有与纳武利尤单抗相同的CDR。

[0201] 在另一方面,抗PD-1抗体是派姆单抗。派姆单抗是针对人细胞表面受体PD-1(程序性死亡-1或程序性细胞死亡-1)的人源化单克隆IgG4(S228P)抗体。派姆单抗描述于例如美国专利第8,354,509号和第8,900,587号中。

[0202] 适合用于本发明的抗人PD-1抗体(或源自其的VH和/或VL结构域)可使用本领域熟知的方法产生。或者,可使用本领域公认的抗PD-1抗体。例如,可以使用WO 2006/121168中描述的单克隆抗体5C4(本文被称为纳武利尤单抗或BMS-936558)、17D8、2D3、4H1、4A11、7D3和5F4,其教导在此以引用的方式并入。其它已知的PD-1抗体包括WO 2008/156712中描述的兰姆单抗(lambrolizumab)(MK-3475)和WO 2012/145493中描述的AMP-514,其教导在此以引用的方式并入。其它已知的抗PD-1抗体和其它PD-1抑制剂包括WO 2009/014708、WO 03/099196、WO 2009/114335和WO 2011/161699中描述的那些,其教导在此以引用的方式并入。在一些方面,抗PD-1抗体是REGN2810。在一些方面,抗PD-1抗体是PDR001。另一种已知的抗PD-1抗体是匹地利珠单抗(pidilizumab)(CT-011)。也可以使用与任何这些抗体或抑制剂竞争结合PD-1的抗体或其抗原结合片段。

[0203] 其它抗PD-1单克隆抗体已描述于例如以下中:美国专利第6,808,710号、第7,488,802号、第8,168,757号和第8,354,509号;美国公开第2016/0272708号;和PCT公开第WO 2012/145493号、第WO 2008/156712号、第WO 2015/112900号、第WO 2012/145493号、第WO 2015/112800号、第WO 2014/206107号、第WO 2015/35606号、第WO 2015/085847号、第WO 2014/179664号、第WO 2017/020291号、第WO 2017/020858号、第WO 2016/197367号、第WO 2017/024515号、第WO 2017/025051号、第WO 2017/123557号、第WO 2016/106159号、第WO 2014/194302号、第WO 2017/040790号、第WO 2017/133540号、第WO 2017/132827号、第WO 2017/024465号、第WO 2017/025016号、第WO 2017/106061号、第WO 2017/19846号、第WO 2017/024465号、第WO 2017/025016号、第WO 2017/132825号和第WO 2017/133540号,其各

自以引用的方式并入本文。

[0204] 在一些方面,抗PD-1抗体选自由以下组成的组:纳武利尤单抗(也被称为OPDIVO®、5C4、BMS-936558、MDX-1106和ONO-4538)、派姆单抗(Merck;也被称为KEYTRUDA®、兰姆单抗和MK-3475;参见WO2008/156712)、PDR001(Novartis;参见WO 2015/112900)、MEDI-0680(AstraZeneca;也被称为AMP-514;参见WO 2012/145493)、西米普利单抗(Regeneron;也被称为REGN-2810;参见WO 2015/112800)、JS001(TAIZHOU JUNSHIPHARMA;参见Si-Yang Liu等人,J.Hematol.Oncol.10:136(2017))、BGB-A317(Beigene;参见WO 2015/35606和US2015/0079109)、INCSHR1210(Jiangsu Hengrui Medicine;也被称为SHR-1210;参见WO 2015/085847;Si-Yang Liu等人,J.Hematol.Oncol.10:136(2017))、TSR-042(Tesa ro Biopharmaceutical;也被称为ANB011;参见WO2014/179664)、GLS-010(Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals;也被称为WBP3055;参见Si-Yang Liu等人,J.Hematol.Oncol.10:136(2017))、AM-0001(Armo)、STI-1110(Sorrento Therapeutics;参见WO 2014/194302)、AGEN2034(Agenus;参见WO 2017/040790)、MGA012(Macrogenic s,参见WO 2017/19846)和IBI308(Innovent;参见WO 2017/024465、WO 2017/025016、WO 2017/132825和WO 2017/133540),这些参考文献以引用的方式并入本文。

[0205] 另一方面,抗PD-1抗体或其抗原结合片段与派姆单抗交叉竞争。在一些方面,抗PD-1抗体或其抗原结合片段与派姆单抗结合相同的表位。在某些方面,抗PD-1抗体或其抗原结合片段具有与派姆单抗相同的CDR。在另一方面,抗PD-1抗体是派姆单抗。派姆单抗(也被称为“KEYTRUDA®”、兰姆单抗和MK-3475)是针对人表面受体PD-1(程序性死亡-1或程序性细胞死亡-1)的人源化单克隆IgG4抗体。派姆单抗描述于例如美国专利第8,354,509号和第8,900,587号中。派姆单抗已被FDA批准用于治疗复发性或难治性黑色素瘤。

[0206] 在一些方面,PD-1拮抗剂选自由以下组成的组:纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗和多塔利单抗。

[0207] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及PD-L1抑制剂,优选特异性结合(并抑制)PD-L1的单克隆抗体。可以使用任何公认的抗PD-L1抗体。例如,可以使用美国专利第7,943,743号中公开的人抗PD-L1抗体,其内容在此以引用的方式并入。这类抗PD-L1抗体包括3G10、12A4(也被称为BMS-936559)、10A5、5F8、10H10、1B12、7H1、11E6、12B7和13G4。可使用的其它本领域公认的抗PD-L1抗体包括例如以下中描述的那些:美国专利第7,635,757号和第8,217,149号;美国公开第2009/0317368号;和PCT公开第WO 2011/066389号和第WO 2012/145493号,其教导在此也以引用的方式并入。抗PD-L1抗体的其它实例包括阿替利珠单抗(TECENTRIQ;RG7446)或度伐鲁单抗(IMFINZI;MEDI4736)或阿维鲁单抗(Bavencio)。也可以使用与任何这些本领域公认的抗体或抑制剂竞争结合PD-L1的抗体或其抗原结合片段。

[0208] 在某些方面,抗PD-L1抗体是BMS-936559(以前称为12A4或MDX-1105)(参见例如,美国专利第7,943,743号;WO 2013/173223)。在其它方面,抗PD-L1抗体是MPDL3280A(也被称为RG7446和阿替利珠单抗)(参见例如,Herbst等人2013J Clin Oncol 31(增刊):3000;美国专利第8,217,149号)、MEDI4736(Khleif,2013,Proceedings from the European Cancer Congress 2013;2013年9月27日-10月1日;Amsterdam,The Netherlands.Abstract

802)或MSB0010718C(也被称为阿维鲁单抗;参见US2014/0341917)。在某些方面,与上述PD-L1抗体交叉竞争结合人PD-L1或与上述PD-L1抗体结合人PD-L1的相同表位区的抗体是mAb。对于向人受试者施用,这些交叉竞争抗体可以是嵌合抗体,或可以是人源化抗体或人抗体。这类嵌合、人源化或人mAb可以通过本领域熟知的方法制备和分离。在某些方面,抗PD-L1抗体选自由以下组成的组:BMS-936559(也被称为12A4、MDX-1105;参见例如,美国专利第7,943,743号和WO 2013/173223)、阿替利珠单抗(Roche;也被称为**TECENTRIQ®**、MPDL3280A、RG7446;参见US 8,217,149;也参见Herbst et al. (2013) J Clin Oncol 31(增刊):3000)、度伐鲁单抗(AstraZeneca;也被称为IMFINZI™、MEDI-4736;参见WO 2011/066389)、阿维鲁单抗(Pfizer;也被称为**BAVENCIO®**、MSB-0010718C;参见WO 2013/079174)、STI-1014(Sorrento;参见WO2013/181634)、CX-072(Cytomx;参见WO2016/149201)、KN035(3D Med/Alphamab;参见Zhang等人,Cell Discov. 7:3(2017年3月)、LY3300054(Eli Lilly Co.;参见例如,WO 2017/034916)和CK-301(Checkpoint Therapeutics;参见Gorelik等人,AACR:Abstract 4606(2016年4月))。

[0209] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及PD-L2抑制剂,如MIH18(描述于Pfistershammer等人,Eur J Immunol. 36:1104-1113(2006)中。

[0210] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及LAG-3抑制剂。在一些方面,LAG-3抑制剂是抗LAG-3抗体。

[0211] 适合用于本发明的抗人LAG-3抗体(或源自其的VH/VL结构域)可使用本领域熟知的方法产生。或者,可使用本领域公认的抗LAG-3抗体。例如,可以使用US2011/0150892A1中描述的抗人LAG-3抗体,其教导在此以引用的方式并入本文,并且被称为单克隆抗体25F7(也被称为“25F7”和“LAG3.1”)。可以使用的其它本领域公认的抗LAG-3抗体包括US2011/007023中描述的IMP731(H5L7BW)、WO 2016028672中描述的MK-4280(28G-10)、Journal for ImmunoTherapy of Cancer, (2016)第4卷,增刊。增刊1摘要编号P195中描述的REGN3767、WO2017/019894中描述的BAP050、IMP-701(LAG-525)、IMP321(艾加莫德 α (eftilagimod alpha))、Sym022、TSR-033、MGD 013、BI754111、FS118、AVA-017和GSK2831781。在要求保护的本发明中有用的这些和其它抗LAG-3抗体可见于例如以下中:WO2016/028672、WO2017/106129、WO2017/062888、WO2009/044273、WO2018/069500、WO2016/126858、WO2014/179664、WO2016/200782、WO2015/200119、WO2017/019846、WO2017/198741、WO2017/220555、WO2017/220569、WO2018/071500、WO2017/015560、WO2017/025498、WO2017/087589、WO2017/087901、WO2018/083087、WO2017/149143、WO2017/219995、US2017/0260271、WO2017/086367、WO/2017/086419、WO2018/034227和WO2014/140180。这些参考文献各自的内容以引用的方式并入本文。

[0212] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及BLTA抑制剂,如美国专利第8,563,694号中公开的抗体4C7,该文献以引用的方式并入本文。

[0213] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及B7-H4检查点抑制剂,如美国专利申请公开第2014/0294861号(以引用的方式并入本文)中公开的抗体或如美国专利申请公开第2012/0177645号(以引用的方式并入本文)中公开的B7-H4的可溶性重组形式。

[0214] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及B7-

H3检查点抑制剂,如公开为BRCA84D的抗体MGA271或如美国专利申请公开第2012/0294796号(以引用的方式并入本文)中公开的衍生物。

[0215] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及TIM-3检查点抑制剂,如美国专利第8,841,418号(以引用的方式并入本文)中公开的抗体或Jones等人,J.Exp.Med.,205(12):2763-79(2008)所公开的抗人TIM-3阻断性抗体F38-2E2。

[0216] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及KIR检查点抑制剂,如抗体利瑞鲁单抗(lirilumab)(描述于Romagne等人,Blood,114(13):2667-2677(2009)中)。

[0217] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及TIGIT抑制剂。TIGIT检查点抑制剂优选抑制TIGIT与脊髓灰质炎病毒受体(CD155)的相互作用,并且包括但不限于靶向人TIGIT的抗体,如美国专利第9,499,596号(以引用的方式并入本文)和美国专利申请公开第2016/0355589号、第2016/0176963号(以引用的方式并入本文)中公开的那些,以及脊髓灰质炎病毒受体变体,如美国专利第9,327,014号(以引用的方式并入本文)中公开的那些。在一些方面,免疫检查点抑制剂是TIGIT拮抗剂。在一些方面,TIGIT拮抗剂选自由以下组成的组:替瑞利尤单抗、欧司珀利单抗、东瓦纳利单抗、艾替利单抗和维博利单抗。

[0218] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及IDO抑制剂(吡咯胺-吡咯2,3-双加氧酶。IDO被认为是免疫检查点蛋白,其在肿瘤细胞中的表达通过关闭效应T细胞有助于免疫耐受。IDO被认为有助于抗CTLA-4疗法的抗性。在一些方面,用于根据本文所述的方法使用的IDO抑制剂包括但不限于:色氨酸模拟物,如D-1MT(1-甲基-DL-色氨酸(MT)的D同种型)、L-1MT(MT的L同种型)、MTH-trp(甲硫基乙内酰脲-d1-色氨酸;IDO的转录抑制剂)和 β -咔啉;吡咯模拟物,如基于萘醌的药剂S-烯丙基-芸苔宁(brassinin)、S-苜蓿基-芸苔宁、5-溴-芸苔宁,以及基于苯基咪唑的药剂4-苯基咪唑、爱古胺A(exiguamine A)、艾卡噪司他、迷迭香酸、去甲哈尔满和NSC401366。在一些方面,IDO抑制剂包括INCB 024360(艾卡噪司他;N'-(3-溴-4-氟苯基)-N-羟基-4-[2-(氨磺酰基氨基)乙基氨基]-1,2,5-噁二唑-3-甲脒)、吡咯莫德((2R)-2-氨基-3-(1-甲基吡咯-3-基)丙酸)、IDO肽疫苗(Copenhagen University)和NLG919(NewLink Genetics;1-环己基-2-(5H-咪唑并[5,1-a]异吡咯-5-基)乙醇)。在一些方面,IDO抑制剂优选抑制代谢途径并且包括但不限于去甲哈尔满(参见Chiarugi A等人,“Combined inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and nitric oxide synthase modulates neurotoxin release by interferon-gamma-activated macrophages”,Journal of Leukocyte Biology.68(2):260-6.(2000))、迷迭香酸(参见Lee H J等人,“Rosmarinic acid inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells”,Biochemical Pharmacology.73(9):1412-21(2007))、COX-2抑制剂(参见Cesario A等人,“The interplay between indoleamine 2,3-dioxygenase 1(IDO1)and cyclooxygenase(COX)-2in chronic inflammation and cancer”,Current Medicinal Chemistry.18(15):2263-71(2011))、1-甲基色氨酸(Hou D Y等人,“Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses”.Cancer Research.67(2):792-801(2007)和

Chauhan N等人,(April 2009),“Reassessment of the reaction mechanism in the heme dioxygenases”.Journal of the American Chemical Society.131(12):4186-7(2009)),包括例如特定的外消旋体1-甲基-D-色氨酸(称为吡啶莫德)、艾卡噪司他(INCB 24360)、纳沃莫德(navoximod)(GDC-0919)(参见Jochems C等人,“The IDO1 selective inhibitor epacadostat enhances dendritic cell immunogenicity and lytic ability of tumor antigen-specific T cells”,Oncotarget.7(25):37762-37772.(2016))和或BMS-986205。在一些方面,IDO抑制剂选自去甲哈尔满、迷迭香酸、COX-2抑制剂、1-甲基色氨酸、吡啶莫德、艾卡噪司他(INCB24360)、纳沃莫德(GDC-0919)和/或BMS-986205。

[0219] 在一些方面,药物组合物包含抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段以及TIGIT抑制剂。TIGIT检查点抑制剂优选抑制TIGIT与脊髓灰质炎病毒受体(CD155)的相互作用,并且包括但不限于靶向人TIGIT的抗体,如美国专利第9,499,596号(以引用的方式并入本文)和美国专利申请公开第2016/0355589号、第2016/0176963号(以引用的方式并入本文)中公开的那些,以及脊髓灰质炎病毒受体变体,如美国专利第9,327,014号(以引用的方式并入本文)中公开的那些。

[0220] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是IDO1(吡啶胺-2,3-双加氧酶1)的拮抗剂(例如,吡啶莫德(NLG8189、1-甲基-D-TRP)、艾卡噪司他(INCB-024360)、KHK2455、PF-06840003(PCT公开第WO 2016/181348A1号)、吡咯烷-2,5-二酮衍生物(PCT公开第WO 2015/173764A1号)、纳沃莫德(RG6078、GDC-0919、NLG919)和BMS-986205(F001287));KIR(杀伤细胞免疫球蛋白样受体)(例如,利瑞鲁单抗(I-7F9、BMS-980615或IPH2101)和IPH4102(抗KIR3DL2单克隆抗体);TDO(色氨酸2,3-双加氧酶)(例如,4-(吡啶-3-基)-吡啶衍生物(美国专利第9,126,984B2号和美国公开第2016/0263087A1号);3-吡啶取代的衍生物(PCT公开第WO 2015140717 A1号、第WO 2017025868A1号、第WO 2016147144 A1号)、3-(吡啶-3-基)-吡啶衍生物(美国公开第20150225367A1号和PCT公开第WO 2015121812A1号);双IDO/TDO(例如,PCT公开第WO 2015150097 A1号、第WO 2015082499A2号、第WO 2016026772A1号、第WO 2016071283A1号、第WO 2016071293 A2号和第WO 2017007700 A1号)中公开的小分子双IDO/TDO抑制剂);CD40(例如,Lineage BMS3h-56(美国专利第9,475,879号)、鲁卡木单抗(HCD122和CHIR-12.12)、CHIR-5.9和达西珠单抗(huS2C6、PRO 64553、RG 3636、SGN 14、SGN-40));腺苷A2a受体(A2aR)(例如,CPI-444、PBF-509、伊曲茶碱(KW-6002)、瑞德南特(SCH420814)、托扎纳丁(SYN115)、维帕德南(BIIB014)、HTL-1071、ST1535、SCH412348、SCH442416、SCH58261、ZM241385和AZD4635(小分子A2aR抑制剂));CEACAM1(CD66a)(例如,CM-24(MK-6018));CEA(癌胚抗原)(例如,塞土珠单抗阿穆纳勒金(cergutuzumab amunaleukin)(RG7813、RO-6895882)、RG7802(RO6958688));CD47(例如,HuF9-G4、CC-90002、TTI-621、ALX148、NI-1701、NI-1801、SRF231和Effi-DEM);PVRIG(含有脊髓灰质炎病毒受体相关免疫球蛋白结构域的蛋白质,CD122R)(例如,COM701);GARP(主要的糖蛋白A重复)(例如,ARGX-115);CD80(例如,加利昔单抗(IDEC-114)和AV 1142742(瑞德克斯(RhuDex)));CD86;和CD96。

[0221] 在一些方面,免疫检查点抑制剂是STING(IFN基因的刺激物)的激动剂(例如,2'或3'-单氟取代的或2'3'-二氟取代的混合连接2',5'-3',5'环二核苷酸(PCT公开第WO 2017/075477 A1号);2'-氟取代的双-3',5'环二核苷酸和2',2"-diF-Rp,Rp,双-3',5'环二核苷

酸(PCT公开第WO 2016/145102A1号);和氟化环二核苷酸(PCT公开第WO 2016/096174A1号);或CD20(例如,RITUXAN[®]和ABP 798)。

[0222] 如本领域技术人员所知,对于上述某些抗体可以使用替代和/或等效名称。在本发明的上下文中,这类替代和/或等效名称可互换。

[0223] VI. 施用

[0224] 可以通过任何合适的途径向有需要的受试者施用所需剂量的抗紧密连接蛋白-1抗体、其生物活性片段或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞(任选地在用一种或多种适当的药学上可接受的载剂或赋形剂配制后)。在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体、其生物活性片段或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞与如上所述的免疫检查点抑制剂组合递送。各种递送系统是已知的并且可用于施用抗体,包括片剂、胶囊、可注射溶液、于脂质体中的胶囊、微粒、微胶囊等。施用方法包括但不限于皮肤、皮内、肌内、腹膜内、病灶内、静脉内、皮下、鼻内、经肺、硬膜外和口服途径。抗紧密连接蛋白-1抗体、其生物活性片段、抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞或其药物组合物以及免疫检查点抑制剂可以通过任何方便的或其它适当的途径施用,例如通过输注或推注,通过上皮或粘膜内层(例如,口腔粘膜、支气管粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收。施用可以是全身的或局部的。如本领域普通技术人员将了解,在抗体与另外的治疗剂(例如,免疫检查点抑制剂)组合施用的方面,抗体和治疗剂可以通过相同的途径(例如,静脉内)或通过不同的途径(例如,静脉内、口服或皮下)施用。

[0225] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体或抗紧密连接蛋白-1T细胞和免疫检查点抑制剂以瘤内、静脉内、腹膜内、肌内、鞘内或皮下方式施用。

[0226] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞在施用免疫检查点抑制剂之前施用。

[0227] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体、或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞和免疫检查点抑制剂同时或依序施用。

[0228] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体、或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞和免疫检查点抑制剂在同一组合物中施用。

[0229] 在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体、或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞和免疫检查点抑制剂在不同组合物中施用。

[0230] 抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段(任选地在与一种或多种适当的药学上可接受的载剂或赋形剂配制后)、或抗紧密连接蛋白-1CAR T细胞,将以使得递送的量对于预期目的有效的剂量施用。施用途径、配制和施用的剂量将取决于所需的治疗效果、待治疗的病症(如果已经存在)的严重程度、任何感染的存在、患者的年龄、性别、体重和一般健康状况,以及取决于所用抗体或组合物的效力、生物可用性和体内半衰期、伴随疗法的使用(或不使用)和其它临床因素。这些因素可由主治医师在治疗过程中容易地确定。或者或另外,待施用的剂量可以根据使用动物模型(例如,非人灵长类动物或啮齿动物)的研究来确定。基于这些或其它方法调节剂量以实现最大功效在本领域中是众所周知的,并且在受过训练的医师的能力范围内。当使用抗紧密连接蛋白-1抗体或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞进行研究时,将出现关于适当剂量水平和治疗持续时间的进一步信息。

[0231] 根据本发明的治疗可以由单剂量或多剂量组成。因此,抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段、或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞(或其药物组合物)的施用可以持续某一

段时间或周期性施用并且以特定的间隔,例如每小时、每天、每周(或以一些其它多天间隔)、每月、每年(例如,以时间释放形式)施用。或者,递送可以在给定时间段内多次发生,例如每周两次或更多次;每月两次或更多次等。递送可以是持续一段时间的连续递送,例如静脉内递送。

[0232] 通常,所施用的抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段、或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞(或其药物组合物)的量将优选在约1ng/kg至约100mg/kg受试者体重的范围内,例如在约100ng/kg至约50mg/kg受试者体重之间;或在约1 μ g/kg至约10mg/kg受试者体重之间,或在约100 μ g/kg与约1mg/kg受试者体重之间。

[0233] VII. 药物组合物

[0234] 如上所述,抗紧密连接蛋白-1抗体(和相关分子)、或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞,可以单独施用或作为药物组合物施用。因此,本发明提供了药物组合物,其包含有效量的本文所述的抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段和至少一种药学上可接受的载剂或赋形剂。在一些方面,组合物进一步包含一种或多种另外的生物活性剂。在一些方面,一种或多种另外的生物活性剂是免疫检查点抑制剂。

[0235] 在一些方面,药物组合物用于促进患有纤维化肿瘤的受试者的T细胞介导的抗肿瘤活性的方法中。

[0236] 在一些方面,药物组合物用于在患有实体瘤的受试者中治疗癌症的方法中。

[0237] 在一些方面,药物组合物用于增加免疫检查点抑制剂在患有纤维化肿瘤的受试者中的治疗功效的方法中。

[0238] 药物组合物可以以有效实现所需预防和/或治疗效果的任何量和使用任何施用途施用。最佳的药物调配物可取决于施用途和所需剂量而变化。此类调配物可影响所施用活性成分的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。

[0239] 本发明的药物组合物可以配制成易于施用和剂量均匀的剂量单位形式。在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂配制在一起。在一些方面,抗紧密连接蛋白-1抗体和免疫检查点抑制剂分开配制。然而,应理解,组合物的总日剂量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。

[0240] VIII. 试剂盒

[0241] 在另一方面,本发明提供了一种药物包装或试剂盒,其包含一个或多个含有本发明的药物组合物的一种或多种成分的容器(例如,小瓶、安瓿、试管、烧瓶或瓶),从而允许施用抗紧密连接蛋白-1抗体或其生物活性片段、或抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞。

[0242] 药物包装或试剂盒的不同成分可以以固体(例如,冻干)或液体形式供应。每种成分通常适合在其各自的容器中等分或以浓缩形式提供。药物包装或试剂盒可包括用于重构冻干成分的介质。试剂盒的各个容器优选保持紧密封闭以用于商业销售。

[0243] 在一些方面,药物包装或试剂盒包括一种或多种如上所述的另外的治疗剂。任选地,与容器相关联的可以由监管药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通知或包装说明书,该通知反映了该机构对于人类施用的制造、使用或销售的批准。通知或包装说明书可含有根据本文公开的治疗方法的药物组合物的使用说明。

[0244] 标识符(例如条形码、射频、ID标签等)可以存在于试剂盒中或试剂盒上。例如为了质量控制、库存控制、跟踪工作站之间的移动等目的,标识符可用于唯一标识试剂盒。

[0245] 实施例

[0246] 以下实施例是说明性的并且不限制所要求保护的方面的范围。

[0247] 实施例1. 肿瘤微环境中的紧密连接蛋白-1表达

[0248] 高CLDN1表达与免疫低或无活性的肿瘤微环境相关。通过mAb处理的肿瘤细胞表型的改变可能是通过肿瘤细胞分泌蛋白质组和/或金属蛋白酶的改变而导致肿瘤微环境中T细胞的活化(图8A)。图8B显示了施用抗CLDN1抗体能够破坏肿瘤屏障以帮助将肿瘤状态从排斥T细胞转变为允许T细胞浸润的机制。

[0249] 实施例2. 纤维化肿瘤类型中的紧密连接蛋白-1表达

[0250] 通过免疫组织化学对来自12个不同适应症的超过1200个石蜡包埋的肿瘤活检进行染色,分析头颈鳞状细胞癌(HNSCC)、结肠直肠癌(CRC)、食道癌、鳞状非小细胞肺癌(Sq.NSCLC)、肝内胆管癌(iCCA)、肝细胞癌(HCC)和尿道上皮癌中的紧密连接蛋白-1(CLDN1)、T细胞标志物(CD3)的表达和纤维化(天狼星红染色)(参见图9)。使用半定量H-评分法对样品进行评分,其计算侵入性组织组分内阳性染色的肿瘤细胞的百分比和强度的总和(阴性染色=0;弱染色=1+;中等染色=2+;强染色=3+),其中0分表示阴性染色,1-49分表示低表达,50-149分表示中等表达,并且150-300分表示高表达(参见例如,Parris, Parris, Toshima Z等人,BMC cancer第14卷:324(2014))。

[0251] 用Roche Discovery Ultraautostainer自动染色仪对载玻片进行染色。将载玻片在60°C烘烤1小时,随后使用标准自动染色仪方案脱蜡。使用Roche CC1(高pH)在95°C进行热诱导表位修复(HIER)48分钟。施加过氧化物酶抑制剂。将一抗(抗CLDN1, Sigma-Aldrich HPA048319, 1:50)在37°C孵育24分钟。将二抗Roche抗兔HQ在37°C孵育8分钟,随后将Roche抗HQ HRP在37°C孵育8分钟。使用Roche ChromoMap DAB试剂盒施加DAB,随后施加Roche苏木精II。

[0252] 在头颈肿瘤中,分析了60个样品,并且90%被确定为CLDN1阳性肿瘤(图1A)。在食管癌肿瘤中,分析了40个样品,并且78%被确定为CLDN1阳性肿瘤(图1B)。最终确定CLDN1在肝癌以外的不同纤维化肿瘤中过表达。

[0253] 此外,数据显示非连接型CLDN1(NJ-CLDN1)通常在实体瘤中过表达。值得注意的是,肿瘤细胞上的CLDN1表达与T细胞定位到纤维化组织环境中呈正相关。T细胞排斥是描述的阻碍检查点抑制剂(CPI)功效的机制之一。

[0254] 实施例3. 头颈癌中的紧密连接蛋白-1表达和T细胞排斥

[0255] 获得来自患有头颈癌的受试者的肿瘤组织样品。使用免疫组织化学来测量CLDN1的表达和CD3(代表纤维化和“纤维化阱”)(图2A)。90%的所分析的肿瘤样品为CLDN1阳性(图2B)。图2C显示了具有不同CLDN1表达水平的肿瘤的免疫表型的分类。免疫表型是热的(免疫细胞在基质中和癌细胞之间)、排斥的(免疫细胞在肿瘤内但仅在基质中)和冷的(几乎看不到免疫细胞)。此数据显示,T细胞排斥是头颈癌中的主要免疫表型,其中30-80%的CLDN1阳性肿瘤具有T细胞排斥表型。

[0256] 实施例4. 食管癌中的紧密连接蛋白-1表达和T细胞排斥

[0257] 获得来自患有食管癌的受试者的肿瘤组织样品。图3A显示了具有不同CLDN1表达水平的肿瘤的免疫表型。免疫表型是热的(免疫细胞在基质中和癌细胞之间)、排斥的(免疫细胞在肿瘤内但仅在基质中)和冷的(几乎看不到免疫细胞)。使用免疫组织化学来测量

CLDN1表达(图3B)、T细胞存在(图3C)和纤维化组织(图3D)。总之,数据显示,CLDN1表达与癌症中的T细胞排斥相关。

[0258] 实施例5.含有小鼠紧密连接蛋白-1的人胞外环的过表达在体内驱动肝小鼠肿瘤细胞Hepa1-6中的免疫逃逸和T细胞排斥。

[0259] 图4A、图4B和图5中提供的数据显示了紧密连接蛋白-1的过表达在体内驱动免疫逃避和T细胞排斥中的直接作用。在野生型Hepa1-6肿瘤细胞中(无紧密连接蛋白-1;图5,带有正方形标志物的线),肿瘤随着时间推移被免疫系统排斥,而紧密连接蛋白-1(紧密连接蛋白-1hECL;图5,带有三角形标志物的线)的过表达驱动免疫逃避和肿瘤生长。在实验结束(第20天)时,对获取的肿瘤样品进行的抗CD3(T细胞标志物)IHC分析显示,与不表达紧密连接蛋白-1(图4A)相比,紧密连接蛋白-1(Cldn1 hECL)的过表达如何驱动从肿瘤床中排斥T细胞并在基质中积累(图4B)。

[0260] 实施例6.使用抗紧密连接蛋白-1抗体破坏癌症中的检查点抑制剂抗性

[0261] 实施例1-4中提供的数据显示,纤维化是癌症中检查点抑制剂抗性和T细胞排斥的共同特征。向患有纤维化肿瘤的受试者施用抗紧密连接蛋白-1抗体(如本文所述的任何抗体)。抗紧密连接蛋白-1抗体具有直接的抗纤维化作用,其促进T细胞介导的抗肿瘤活性。重要的是,具有高水平CLDN1的肿瘤(如黑色素瘤(图7A)和头颈鳞状细胞癌(图7B))对检查点抑制剂aPD1的反应差。抗紧密连接蛋白-1抗体将与检查点抑制剂aPD1组合施用于肝癌的Hepa1-6协同肿瘤模型中,其中小鼠CLDN1的过表达驱动体内免疫逃逸。另外,将使用用于头颈癌的患者来源的异种移植物(PDX)模型(其中已经确认CLDN1的高表达和T细胞排斥)来显示施用抗紧密连接蛋白-1抗体与检查点抑制剂aPD1的协同作用。在施用抗紧密连接蛋白-1抗体的同时或之后施用免疫检查点抑制剂使得免疫检查点抑制剂在纤维化肿瘤中的治疗功效增加。

[0262] 图10A至图10C中的数据显示,CLDN1在Hepa1-6小鼠肝肿瘤细胞中的过表达促进T细胞排斥和对抗PD1治疗的抗性。重要的是,本公开的抗CLDN1抗体恢复Hepa1-6 CLDN1+肿瘤中的T细胞浸润和抗PD1功效。图10A显示,与同型对照、单独的抗CLDN1抗体和单独的PD1拮抗剂小组相比,抗CLDN1抗体和PD1拮抗剂小组中肿瘤体积急剧减小。图10B和图10C显示,在施用抗CLDN1抗体和PD1拮抗剂组合后,T细胞能够成功地以大得多的数量浸润CLDN1+肿瘤。

[0263] 在机制上,NJ-CLDN1与参与胞外基质重塑的不同组分相互作用,从而建立从肿瘤巢中排斥免疫细胞的物理屏障。抗CLDN1抗体具有干扰CLDN1+肿瘤细胞与基质之间的界面的直接抗纤维化作用,从而恢复免疫细胞浸润。

[0264] 实施例7.抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞的产生(前瞻性)

[0265] T细胞的分离和活化

[0266] 将患者连接至通过一次性管路组移动外周血的装置上。由光学传感器引导的离心力将血液分离成适当的密度带,用于分离和收集所需的细胞层。然后将未采集的血液组分返回给患者。或者,将使用单采血液成分术作为T细胞收集的方法。工程改造的T细胞将从患者中分离并重新引入同一个体(自体疗法),或从供体中分离并随后引入不同的个体(异种疗法)。将对收集的细胞进行低温保存或处理而无需事先冷冻。使用抗体缀合的磁珠进行正或负选择,任选地将分离的细胞进行处理以富集T细胞(特异性T细胞子集)。例如,可以基于

CD62L、CD4和CD8的表达来富集T细胞。将例如通过多克隆刺激,使用可溶性抗CD3抗体或固定的CD3和CD28抗体来活化分离的T细胞。可以通过涂覆组织培养瓶来固定CD3和CD28抗体。也可以用这些抗体涂覆顺磁珠(如戴诺珠粒(Dynabeads));在悬浮液中,涂覆的珠粒为大得多的T细胞培养物提供适当的刺激。在配制最终的细胞产物之前,将去除珠粒,因为如果将它们输注到患者体内它们可能会造成危害。通过搅动破坏T细胞/珠粒聚集体,然后使悬浮液通过强磁场来实现去除,该强磁场保留珠粒但允许细胞流过。或者,使用刺激剂(如Transact),其利用与胶体聚合物纳米基质缀合的人源化抗-CD3抗体和抗CD28抗体。在最终产物配制之前,在离心步骤中洗去纳米基质。或者,将使用类似的T细胞刺激方法,该方法使用并入抗体的水凝胶“刺激基质”,其也可在刺激和扩增后通过洗涤去除。其它方法(如可溶性活化蛋白、脂质微泡、可溶性微球和连接的抗体)也是用于活化分离的T细胞的潜在选择。

[0267] 对分离的T细胞遗传工程化以实现抗紧密连接蛋白-1 CAR的表达

[0268] 活化后,将T细胞进行遗传工程化以表达抗紧密连接蛋白-1CAR。使用病毒系统或者非病毒系统将分离的T细胞遗传工程化。基于质粒的转座子/转座酶系统和病毒载体,包括但不限于 γ -逆转录病毒和慢病毒载体以及基因组编辑(例如,基于CRISPR/Cas9的基因编辑)和裸DNA的电穿孔,将用于将抗紧密连接蛋白-1编码区和相关调节序列的基因递送到分离的T细胞中。

[0269] 抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞的扩增

[0270] 然后,表达抗紧密连接蛋白-1 CAR的工程化的CAR T细胞通过标准培养技术或通过替代方法进行体外扩增,该替代方法包括摇摆运动生物反应器(如Xuri™细胞扩增系统和WAVE™生物反应器系统)(其利用灌注方案以添加营养物以及去除生长抑制物质,从而简化制造过程)。也将用补充的 γ 链细胞因子刺激工程化的抗紧密连接蛋白-1CAR T细胞,这些 γ 链细胞因子包括但不限于IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21。任选地,也将用特异性途径抑制剂处理抗紧密连接蛋白-1 CAR T细胞,这些特异性途径抑制剂包括但不限于GSK3 β 、mTOR、AKT和PI3K。

[0271] 然后在向患者施用之前,将表达抗紧密连接蛋白-1 CAR的工程化的CAR T细胞冷藏用于质量控制测试。

[0272] ***

[0273] 除非另外指示,否则本公开的实践将采用在本领域技术范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术。这类技术在文献中有充分的解释。

[0274] 以上引用的所有参考文献以及本文引用的所有参考文献都以全文引用的方式并入本文。

[0275] 本文提供的任何实施例是以说明而非限制的方式提供。

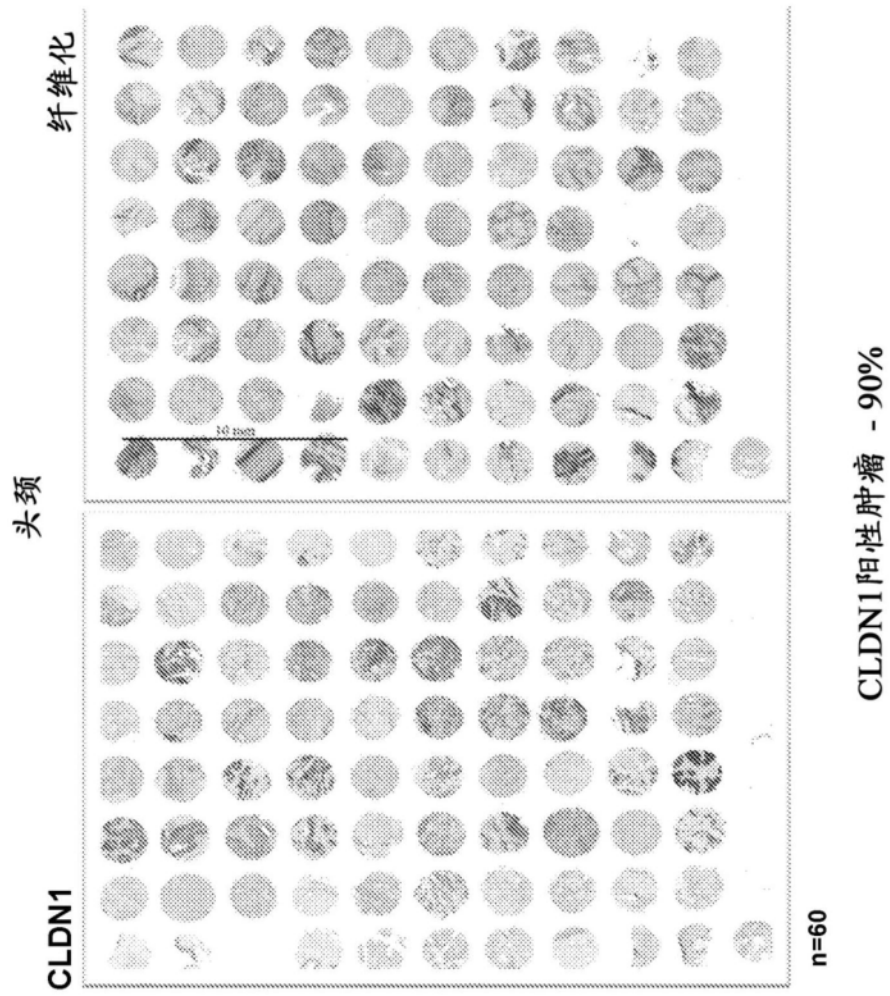


图1A

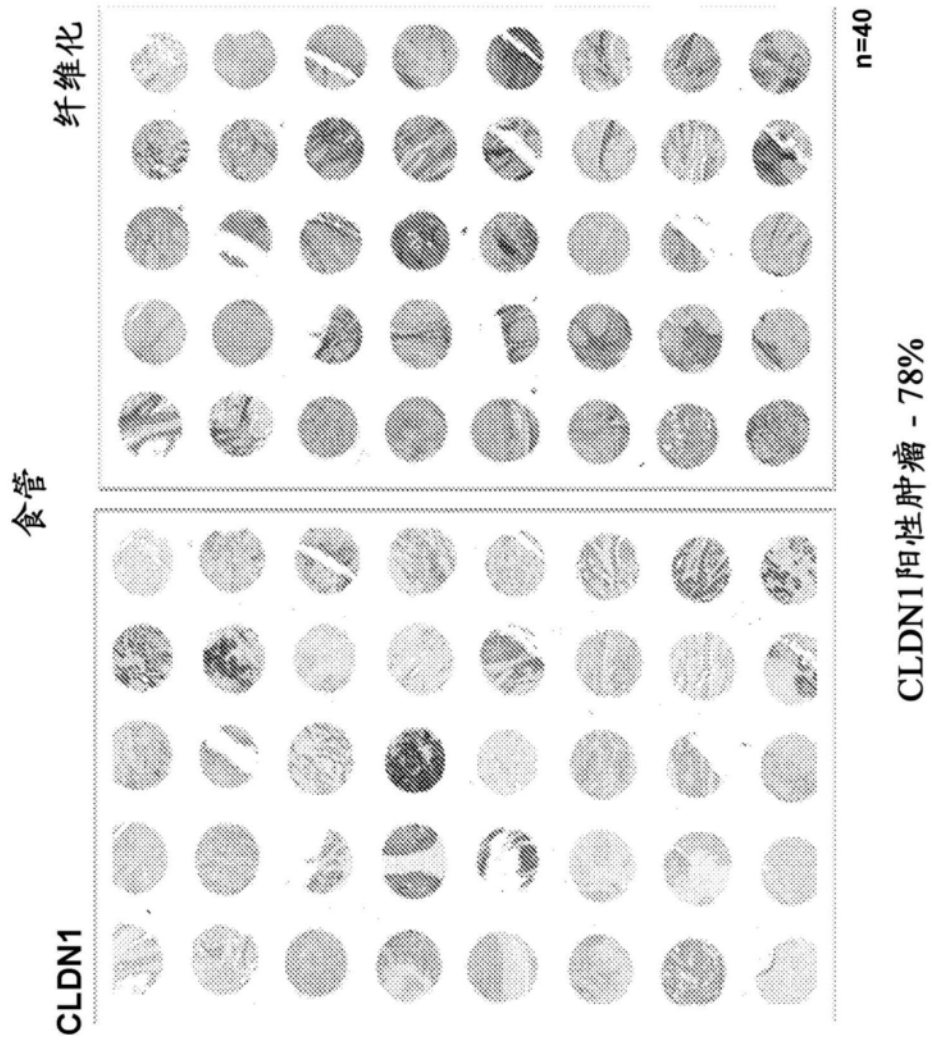


图1B

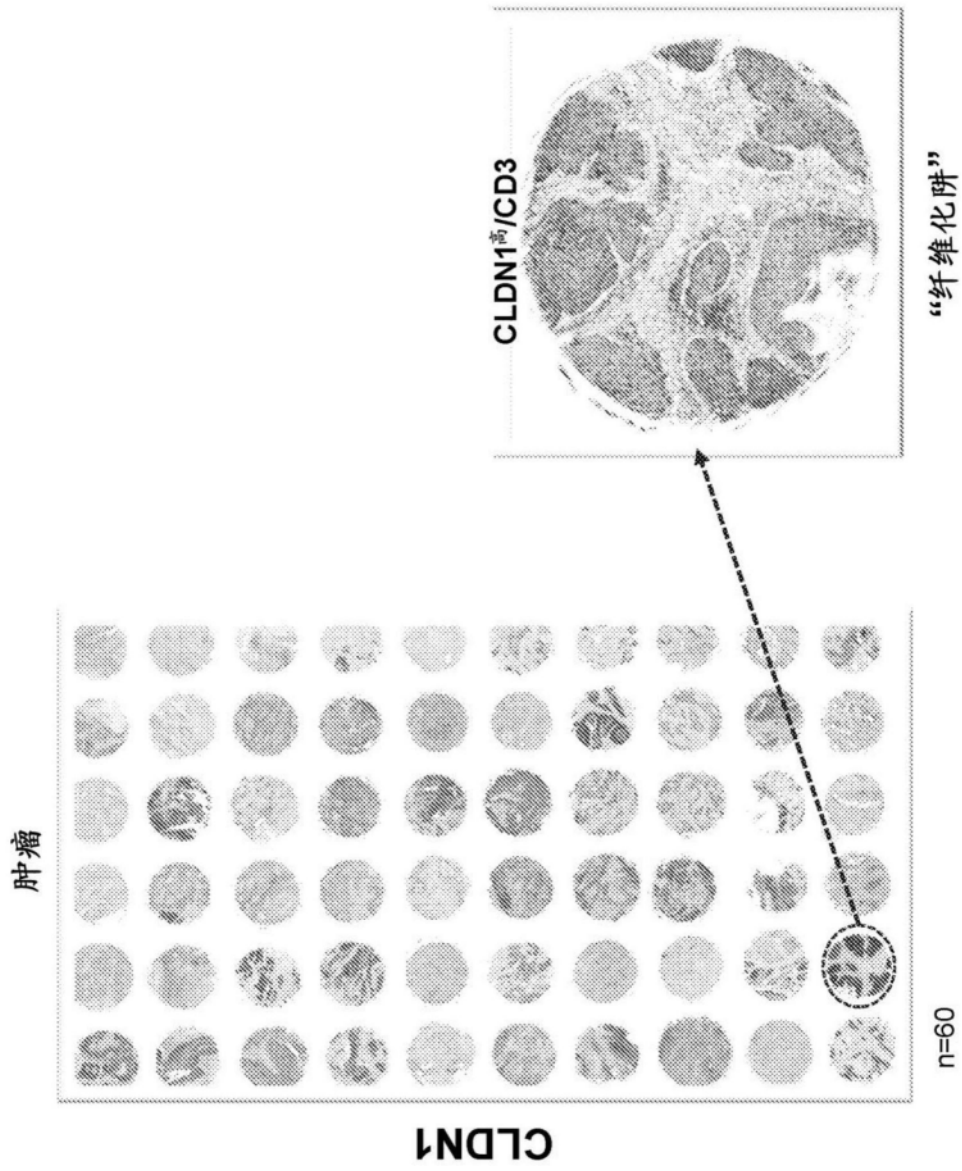


图2A

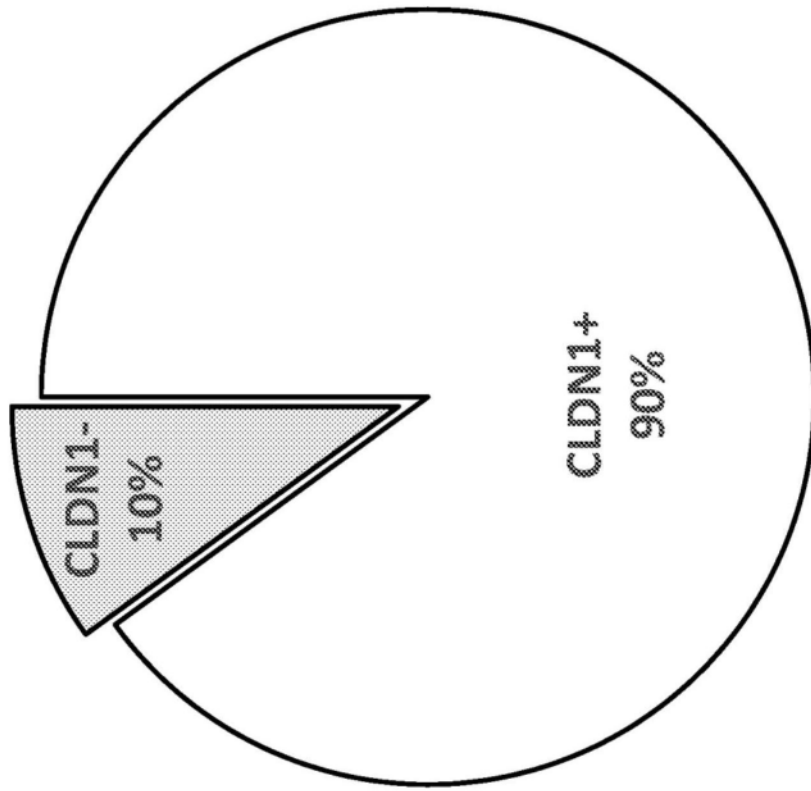


图2B

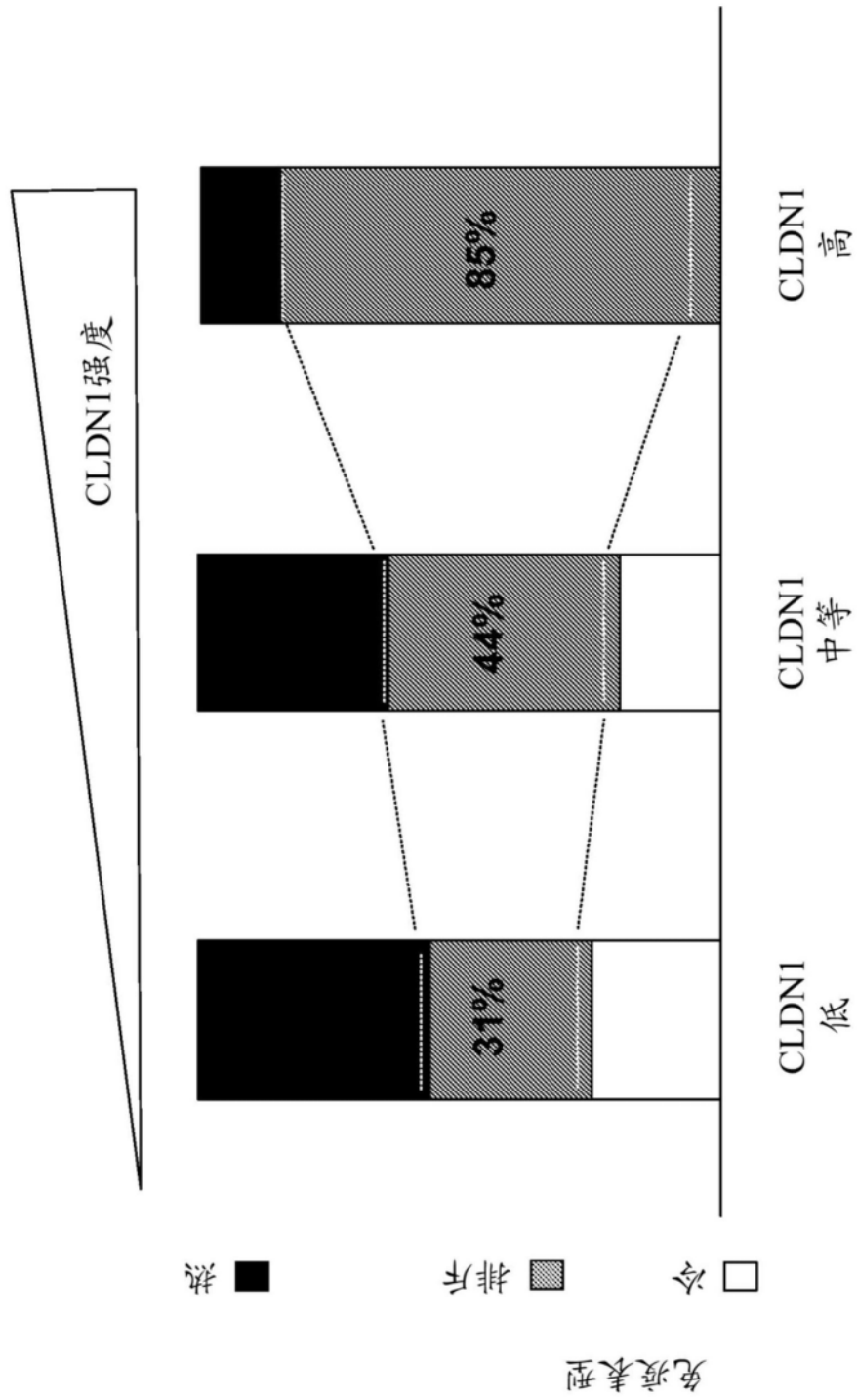


图2C

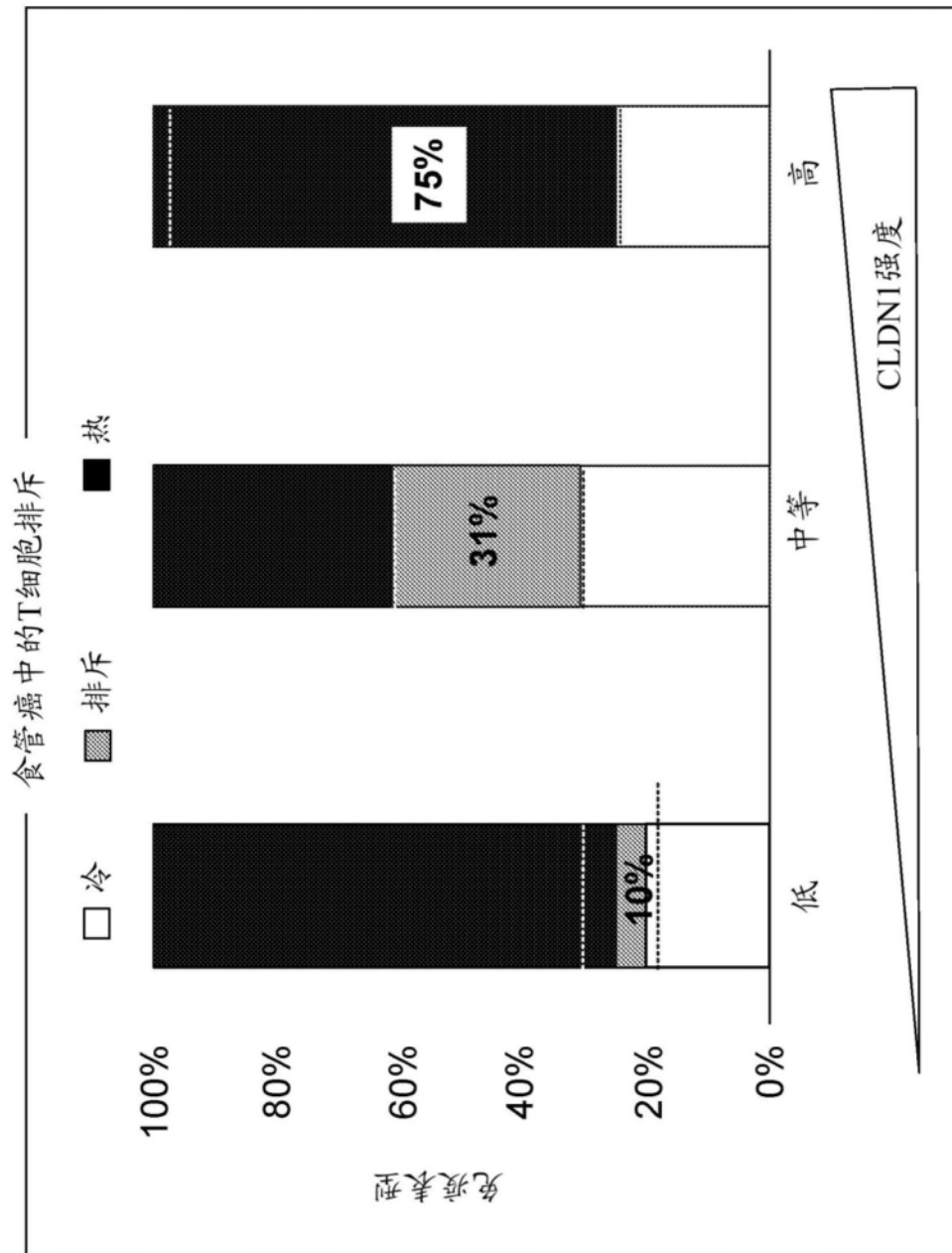


图3A

CLDN1

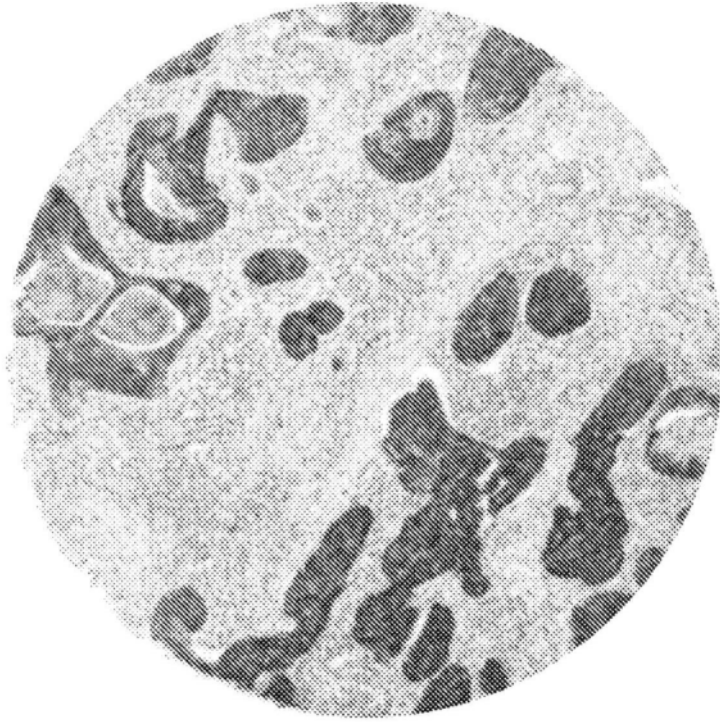


图3B

T细胞

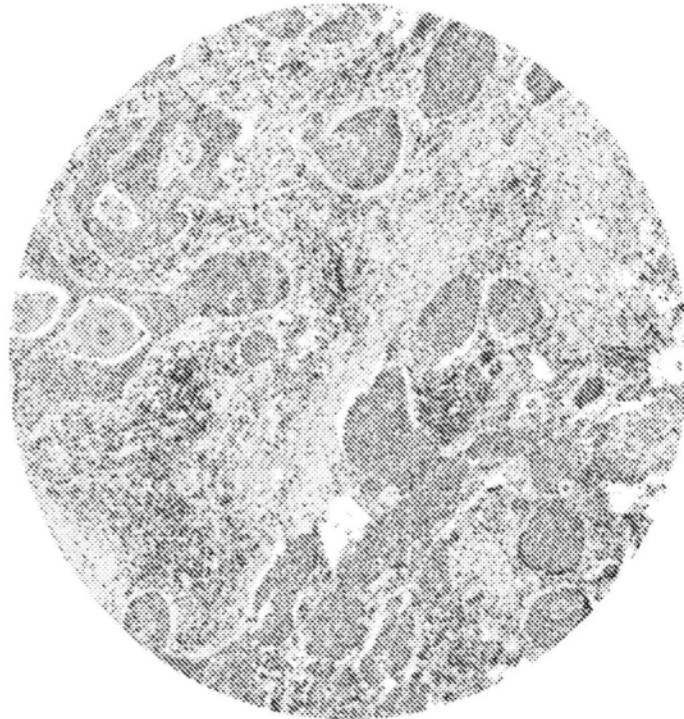


图3C

纤维化组织

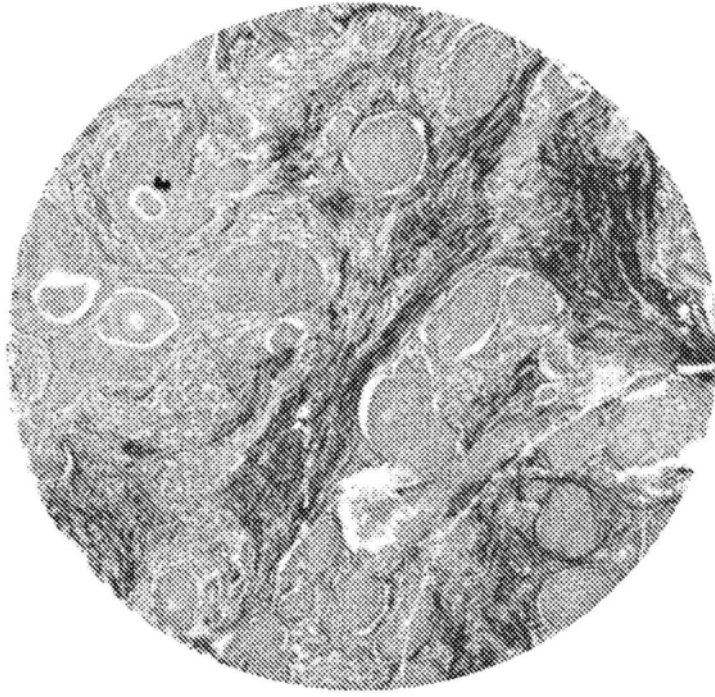


图3D

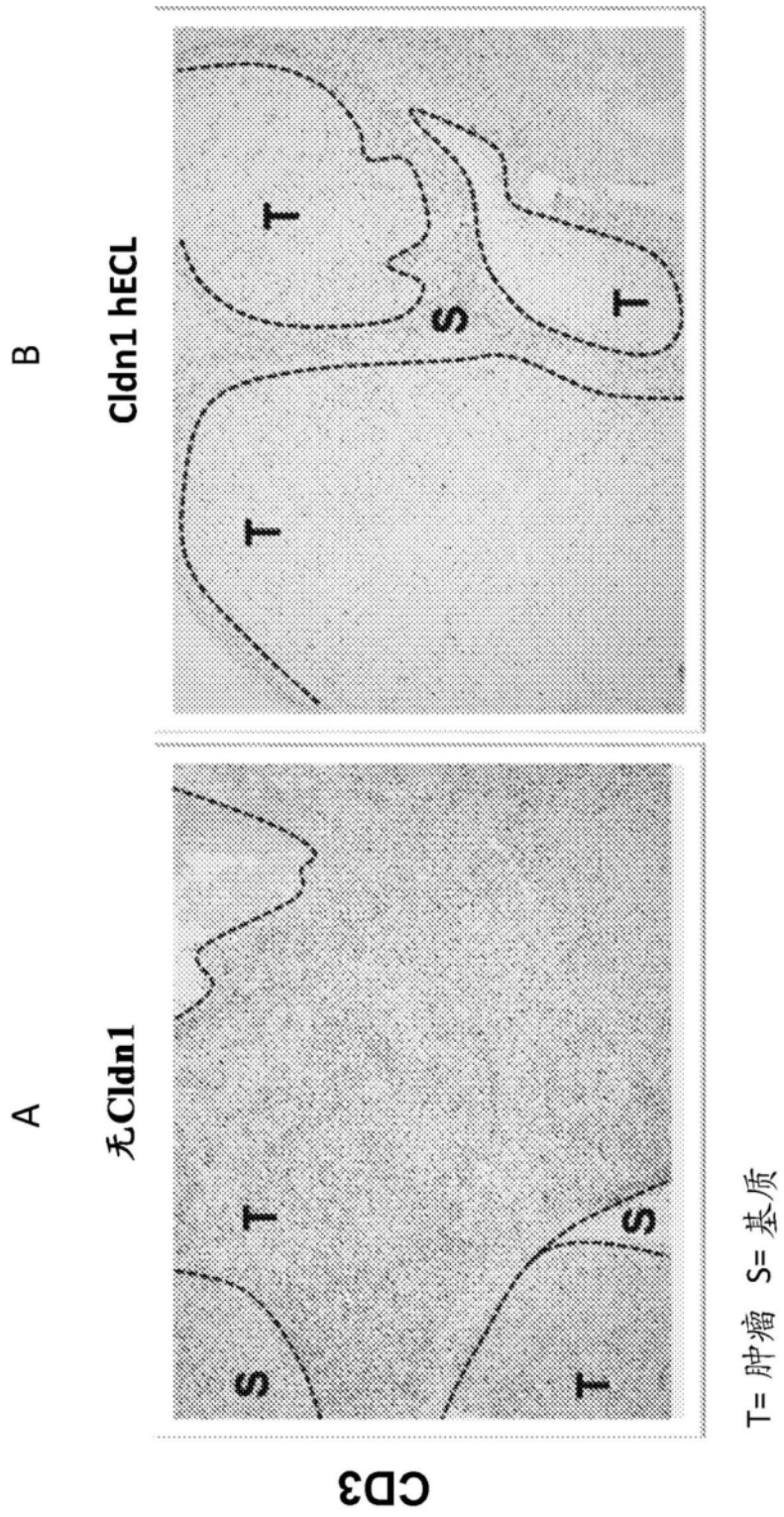


图4

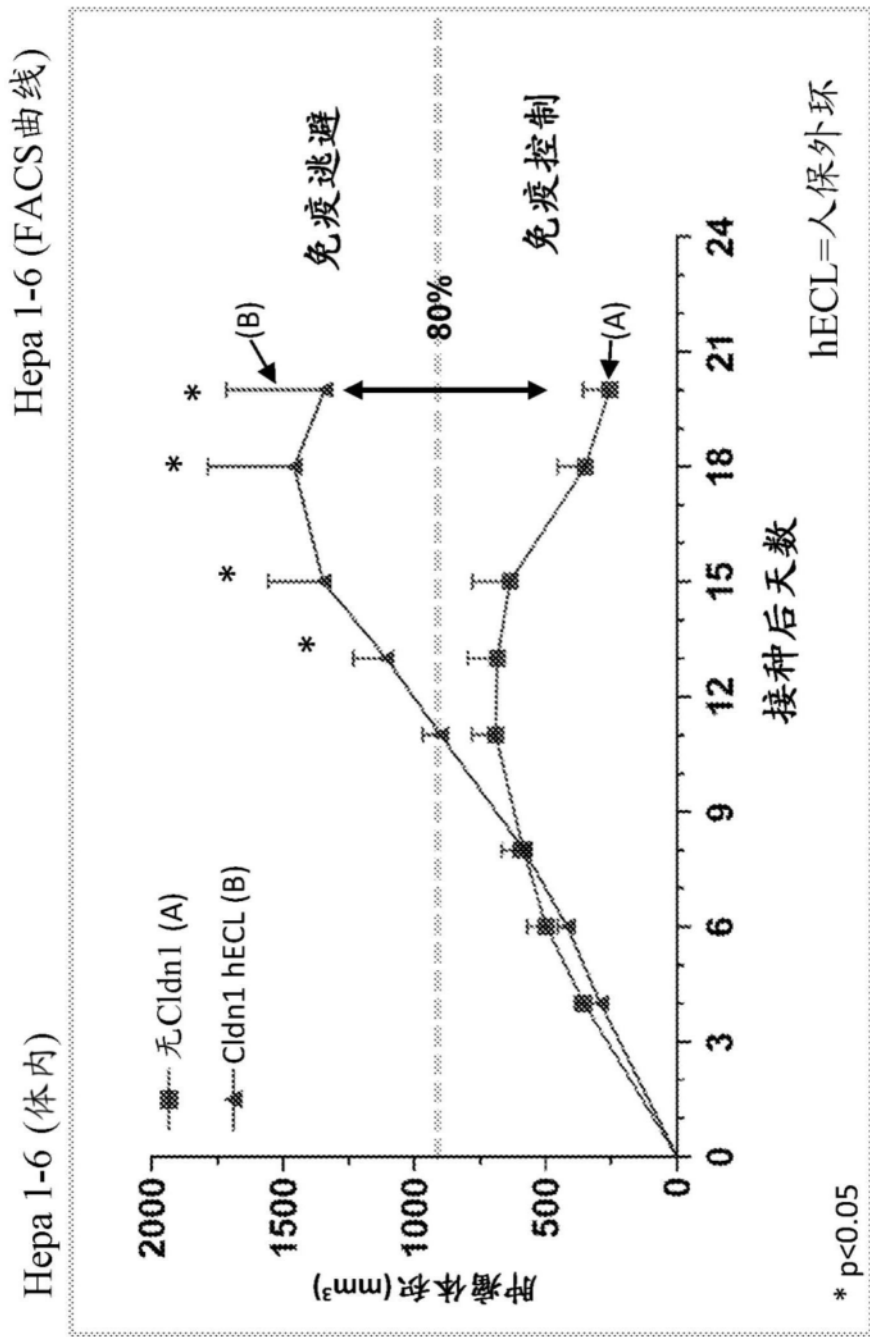


图5

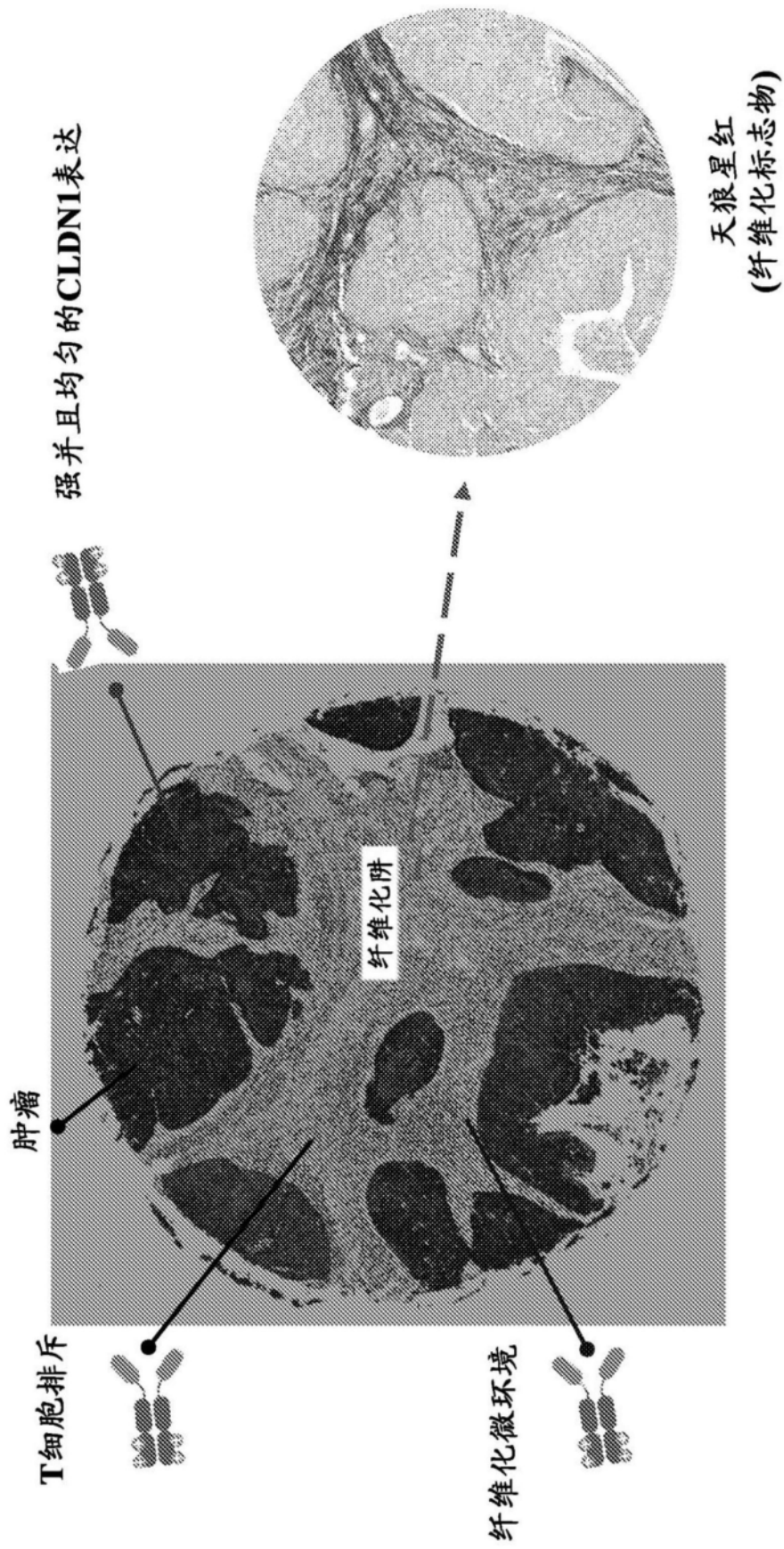


图6

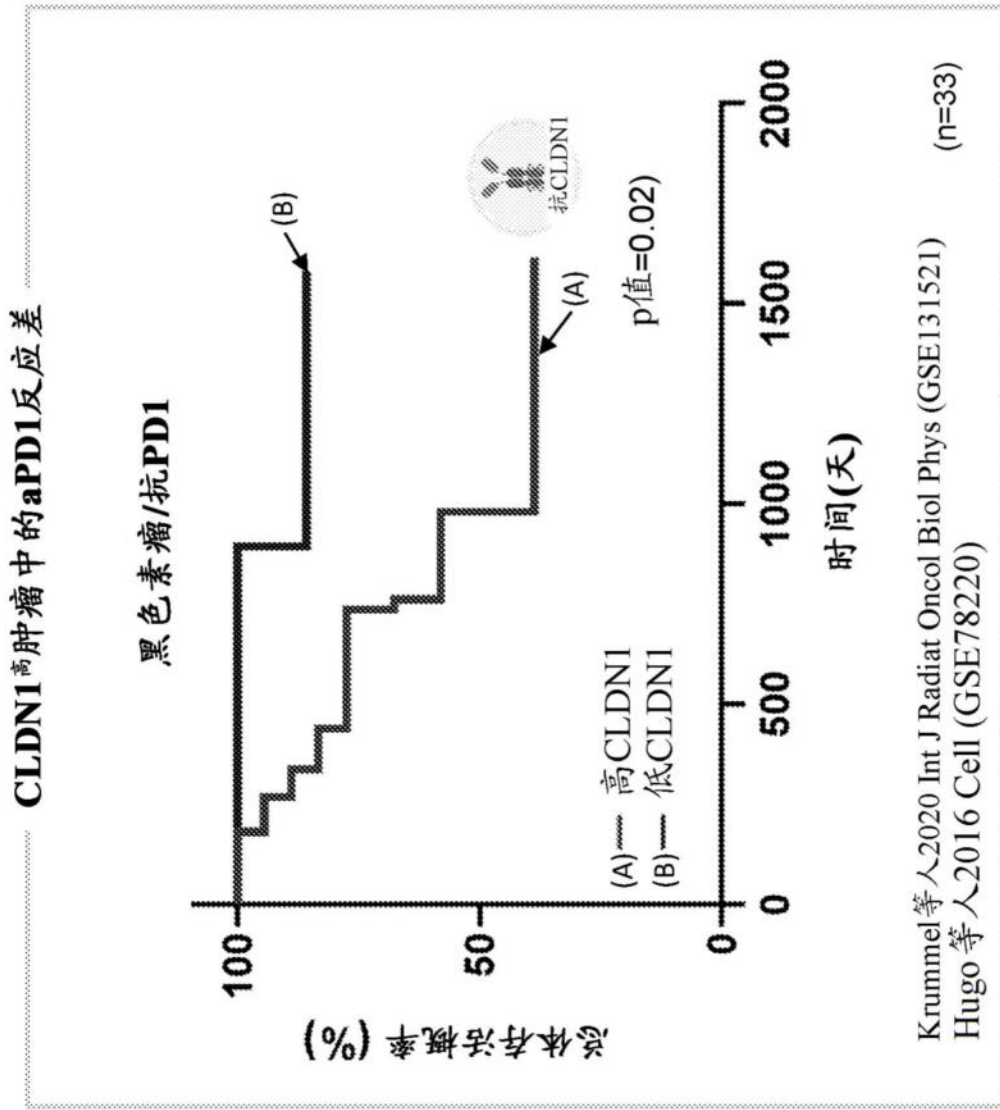


图7A

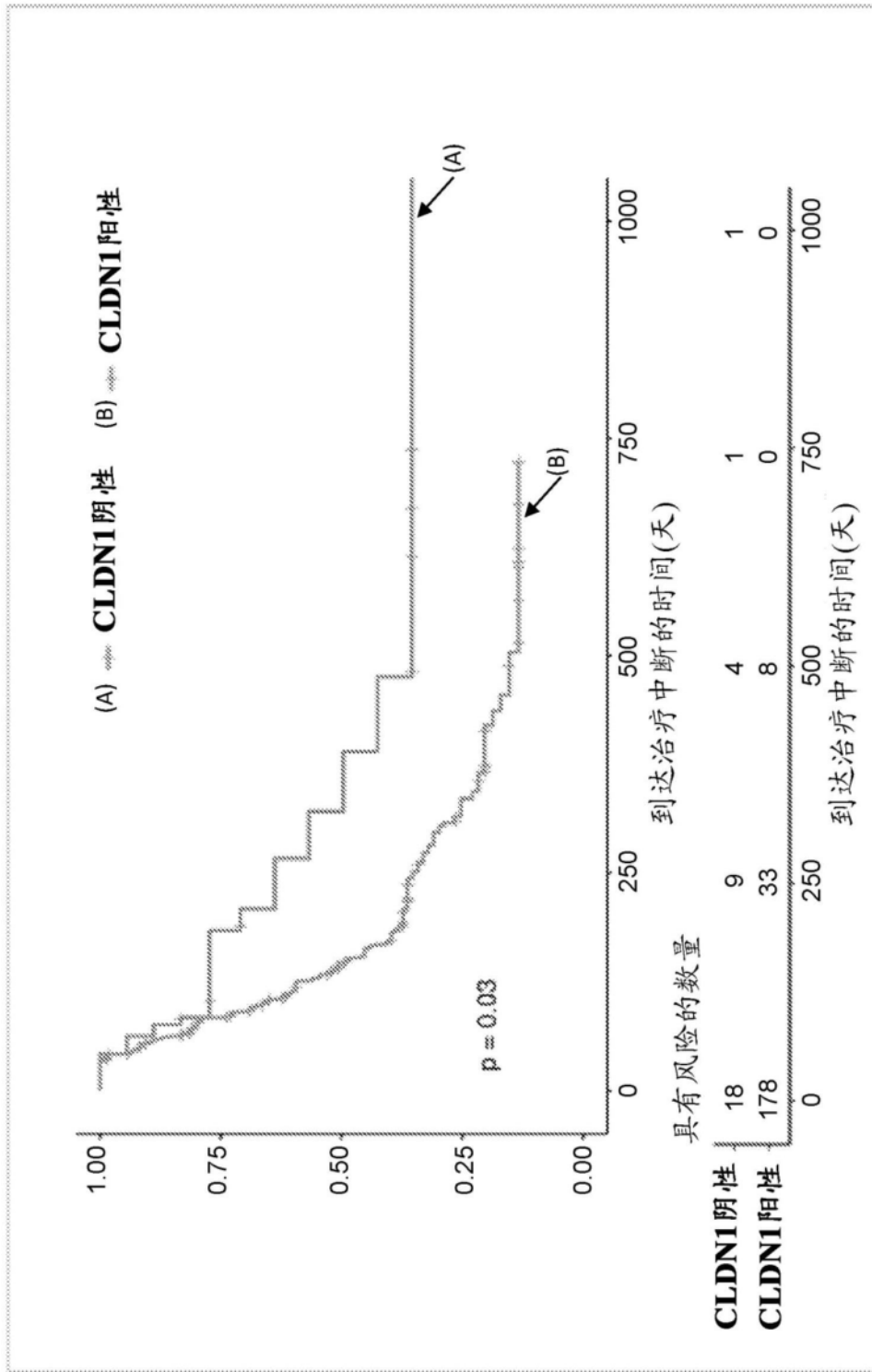


图7B

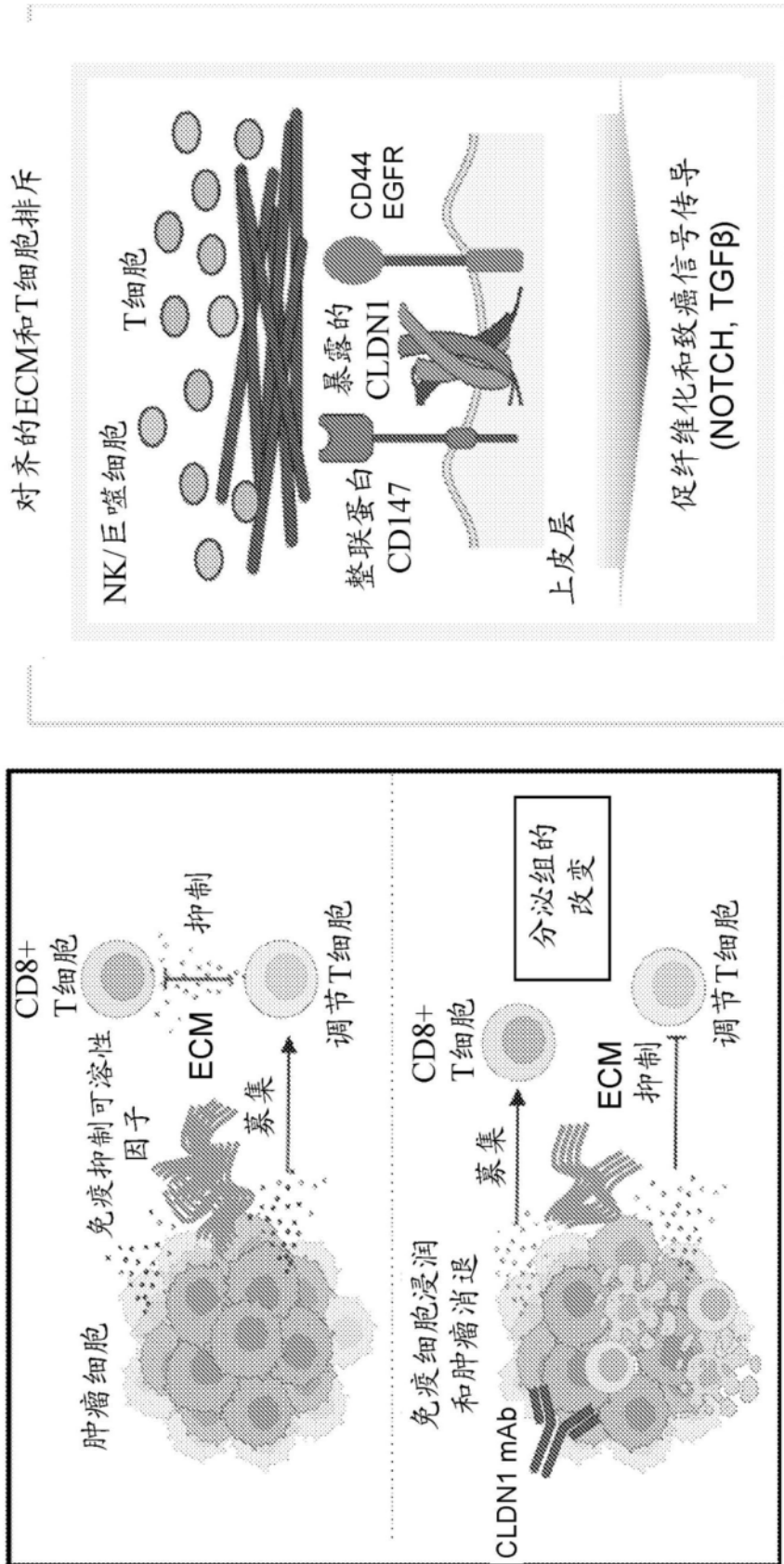


图8A

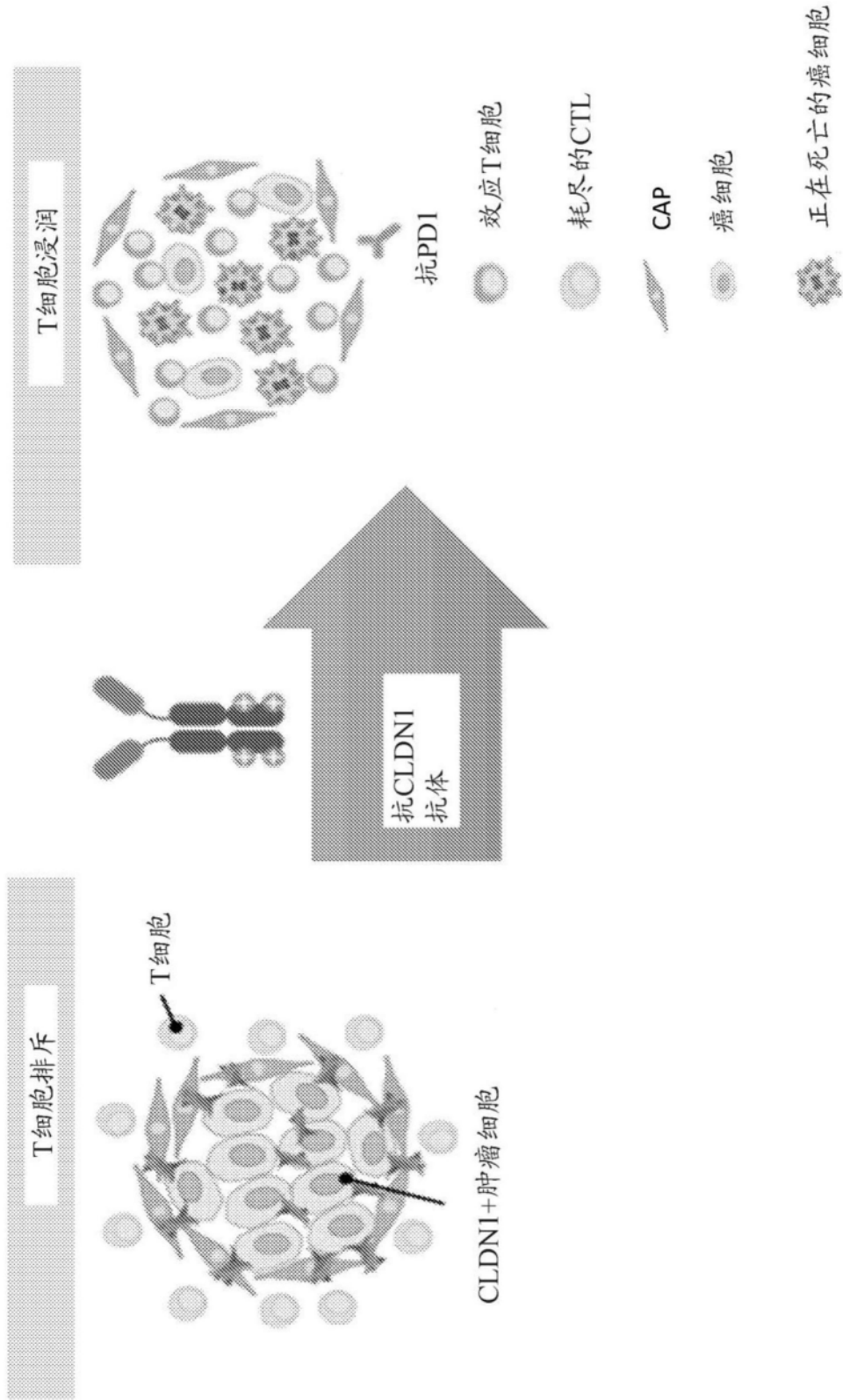


图8B

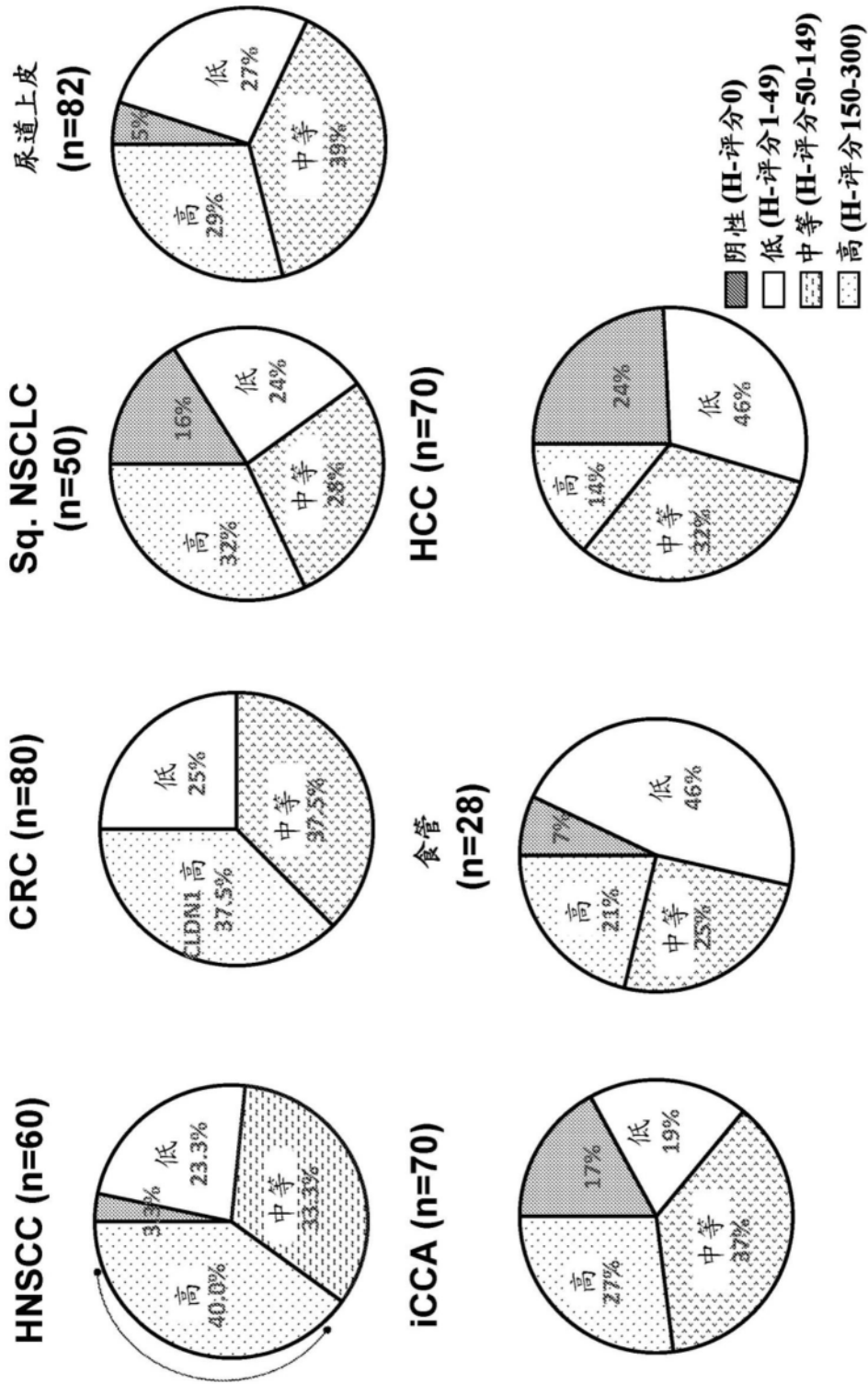


图9

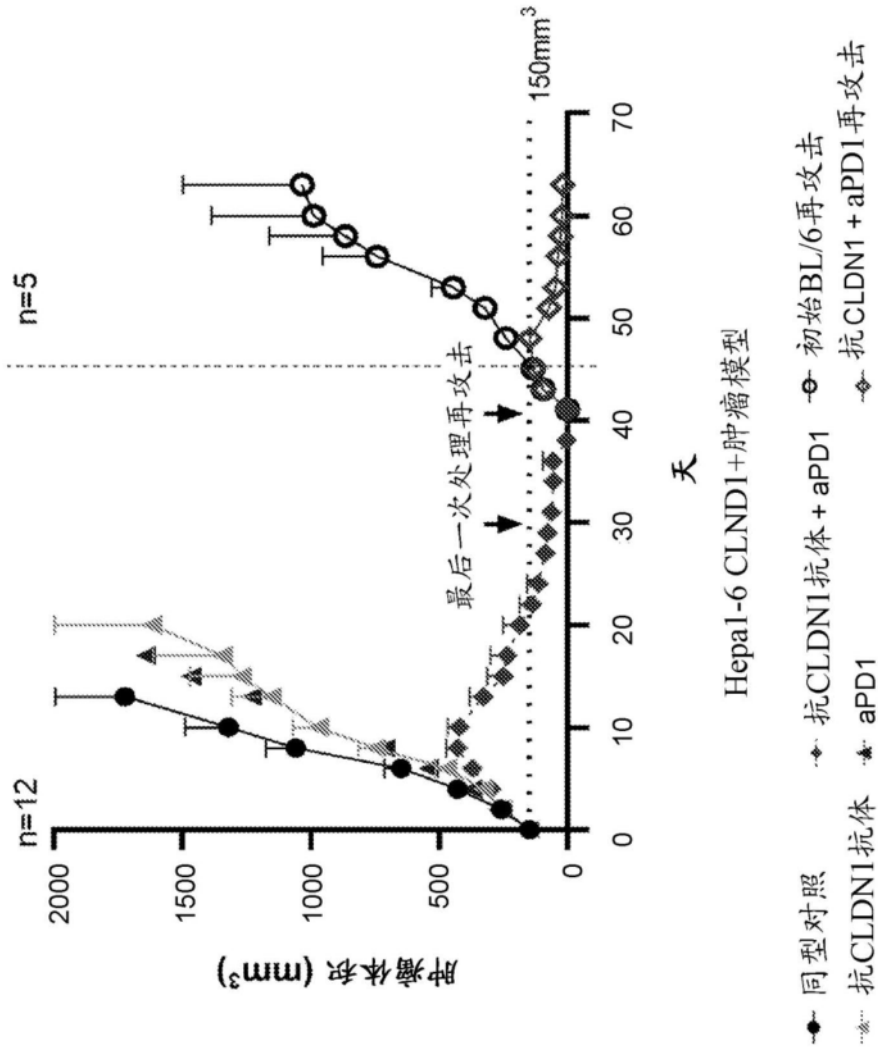


图10A

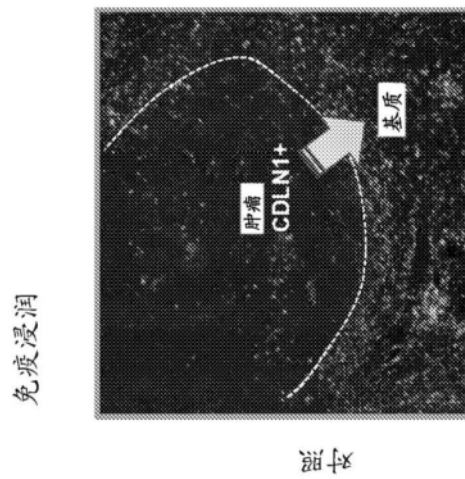
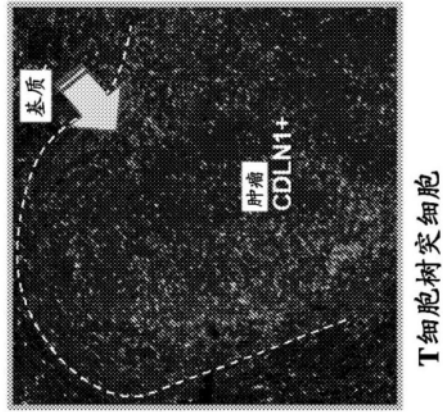


图10B



抗CDLN1抗体+ aPD1

图10C