



(12) 发明专利

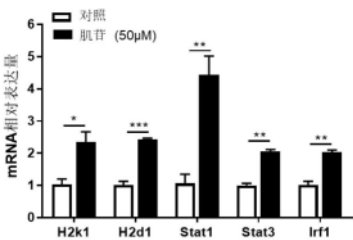
(10) 授权公告号 CN 114040768 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 29

|   |  |
|---|--|
| (21) 申请号 202080023387.6                           | (72) 发明人 袁向亮 何宝坤   |
| (22) 申请日 2020.03.19                               | (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100  |
| (65) 同一申请的已公布的文献号<br>申请公布号 CN 114040768 A         | 专利代理师 韦东   |
| (43) 申请公布日 2022.02.11                             | (51) Int.Cl.<br>A61K 31/708 (2006.01)<br>A61K 31/522 (2006.01)<br>C07K 16/28 (2006.01)   |
| (30) 优先权数据<br>62/822,524 2019.03.22 US            | (56) 对比文件<br>CA 3086040 A1,2019.06.27<br>CN 105287617 A,2016.02.03<br>王雪蕾;等.肿瘤免疫治疗中免疫检查点阻断剂的研究进展.《免疫学杂志》.2016,第32卷(第32期),540-547页. |
| (85) PCT国际申请进入国家阶段日<br>2021.09.22                 | 审查员 程心旻  |
| (86) PCT国际申请的申请数据<br>PCT/US2020/023483 2020.03.19 | 权利要求书1页 说明书16页 附图8页  |
| (87) PCT国际申请的公布数据<br>W02020/197905 EN 2020.10.01  |  |
| (73) 专利权人 免疫闪耀生物科技有限责任公司<br>地址 美国德克萨斯州休斯敦         |  |

(54) 发明名称  
肌苷在肿瘤免疫治疗中的制药用途

(57) 摘要  
该发明专利披露了用于治疗肿瘤的制剂,包括肌苷或相关化合物联合免疫检查点抑制剂,包括但不限于免疫检查点阻断结合剂(包括抗CTLA4、抗PD1、抗LAG-3、抗TIM-3、抗TIGIT、抗CD47、抗VISTA和抗PD-L1抗体药物),并且还包含增强免疫应答的增强剂,包括CAR-T、CAR-NK、肿瘤疫苗、溶瘤病毒疫苗、TLR7/8激动剂、抗CD47抗体或IL-2受体激动剂,并且还包括其它具有药理学活性的免疫增强剂。



1. 肌苷或异丙肌苷和免疫检查点阻断结合剂在制备通过增强抗肿瘤免疫力来治疗乳腺癌和/或黑色素瘤的药物中的用途,其中所述免疫检查点阻断结合剂是以下抗体克隆的人的、嵌合的、人源化的抗体或其抗原结合区:抗CTLA4抗体克隆9H10或抗PD1抗体克隆RPM1-14。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述乳腺癌和/或黑色素瘤是4T1乳腺癌或B16黑色素瘤。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述乳腺癌和/或黑色素瘤的细胞对免疫检查点抑制剂敏感或耐药。

4. 一种用于治疗对免疫检查点阻断剂敏感或耐药的肿瘤或癌症的制剂,由肌苷或异丙肌苷和免疫检查点阻断结合剂组成,所述免疫检查点阻断结合剂是以下抗体克隆的人的、嵌合的、人源化的抗体或其抗原结合区:抗CTLA4抗体克隆9H10或抗PD1抗体克隆RPM1-14。

5. 如权利要求4所述的制剂,还包括保护剂、稀释剂或抗生素。

6. 如权利要求4所述的制剂,其中所述制剂是冻干的制剂。

7. 一种药物组合物,包含权利要求4所述的制剂和药学上可接受的赋形剂或稳定剂。

## 肌苷在肿瘤免疫治疗中的制药用途

### [0001] 发明背景

[0002] 以阻断免疫检查点为代表的新型免疫疗法,已被证明对部分肿瘤患者表现出明显的疗效(Ansel等,2015;Carbone等,2017),在临床应用中取得显著进展。免疫检查点阻断剂(ICB)通过阻断细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)和程序性细胞死亡1抗原(PD-1)等天然免疫调节因子来提高机体抗肿瘤免疫力(Migden等,2018年;Motzer等,2018年;Tawbi等,2018年)。

[0003] 免疫检查点阻断剂的治疗原理是使用治疗性抗体破坏负调控免疫调节检查点,并释放机体预先存在的抗肿瘤免疫反应。此类疗法可阻断由某些免疫系统细胞(如T细胞)和某些癌细胞产生的称为“检查点”的蛋白质。这些检查点有助于防止免疫反应过强,有时还可以防止T细胞杀死癌细胞。当这些检查点被阻断时,T细胞可以更有效地杀死癌细胞。在T细胞或癌细胞上发现的检查点蛋白包括PD-1/PD-L1和CTLA-4/B7-1/B7-2等,例如肿瘤细胞上的PD-L1和T细胞上的PD-1,PD-L1与PD-1的结合可防止T细胞杀死体内的肿瘤细胞,有助于控制免疫反应。用免疫检查点抑制剂(例如抗PD-L1或抗PD-1抗体药物)阻断PD-L1与PD-1的结合,可使T细胞杀死肿瘤细胞。另外,当T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)上的抗原和主要组织相容性复合体(MHC)蛋白结合,且CD28与APC上的B7-1/B7-2结合时,可以激活T细胞。然而,B7-1/B7-2与CTLA-4的结合使T细胞处于非活动状态,导致T细胞无法杀死肿瘤细胞。用免疫检查点抑制剂(一种抗CTLA-4抗体)阻断B7-1/B7-2与CTLA-4的结合,可以激活T细胞并杀死肿瘤细胞。因此,目前一些免疫检查点抑制剂用于治疗癌症。

[0004] 然而,目前的证据表明:单个免疫检查点抑制剂对许多患者无效,已经报道发现单药免疫疗法存在先天性或适应性耐药性(Pitt等,2016年;Sharma等,2017年)。因此,临床上对有效、无毒联合治疗策略的需求未得到满足,这些联合用药策略可以大大提高患者群体对单个免疫检查点抑制剂的反应率(George等,2018年)。值得注意的是,许多新兴(“第二代”)疗法将CTLA-4和PD-1检查点抑制剂作为“主干”与其他免疫疗法或非免疫疗法协同组合,这些协同疗法包括靶向制剂例如酪氨酸激酶抑制剂、表观遗传调节剂等,以及共刺激mAb、疫苗、过继T细胞疗法和溶瘤病毒等。

[0005] 近期,许多代谢通路例如色氨酸、精氨酸和嘌呤代谢等,也已被证明对肿瘤的免疫逃避至关重要,并可作为免疫治疗的共同靶点。在嘌呤代谢中,嘌呤核苷如腺苷及其主要代谢产物肌苷,是参与各种细胞内生化过程的低分子量分子。腺苷的半衰期很短(大约10秒)并且会迅速脱氨基为肌苷(半衰期约为15小时)。炎症、缺氧和组织损伤等事件会导致腺苷的降解和代谢产物肌苷的生成。

[0006] 另外,肌苷是食物的常见成分,以前被认为是一种无活性的分解产物,很少有人注意到它的生理作用。然而,最近的研究表明:肌苷具有神经保护、心脏保护和免疫调节作用(Hasko等,2004)。以前的研究发现:腺苷可以与腺苷受体(AR)结合并启动细胞内信号传导,通过腺苷受体起作用的腺苷在体内发挥广泛的抗炎和免疫调节作用(Hasko等,2004)。然而,肌苷也可以通过激活腺苷受体(主要是A<sub>2A</sub>R和A<sub>3</sub>R)减少了促炎细胞因子的表达以及内毒素和2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的炎症。然而,也有一些研究表明:肌苷不能激活腺苷

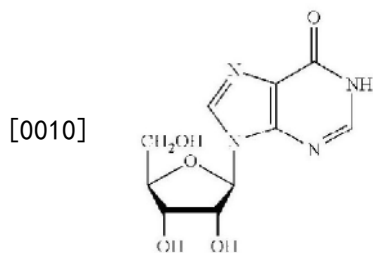
受体,其体内免疫调节作用并不完全依赖于激活A<sub>2A</sub>R(Welihinda等,2016年)。值得注意的是,肌苷对肿瘤细胞的影响尚未完全阐明,尤其肌苷与免疫检查点阻断剂或其它免疫活性剂的协同效应尚不清楚。鉴于体内肌苷的稳定性,之前没有意识到肌苷可以改善ICB在体内的抗肿瘤功效。

## 发明内容

[0007] 本发明涉及用于治疗癌症的制剂,包括肌苷或衍生物与免疫检查点抑制剂(免疫细胞抑制受体的阻断剂)组合。包括但不限于免疫检查点抑制剂抗体药物(包括抗CTLA4、抗PD1、抗PD-L1、抗B7-1和抗B7-2、抗LAG-3、抗TIM-3、抗TIGIT和抗VISTA抗体药物),并且还包括增强免疫反应的增强剂,包括CAR-T、CAR-NK、肿瘤疫苗、溶瘤病毒疫苗、TLR7/8激动剂、抗CD47或IL-2受体激动剂等以及其它免疫增强剂。市售的抗PD1抗体包括nivolumab、pembrolizumab、Cemiplimab、Toripalimab、Sintilimab、Camrelizumab、Tislelizumab等,市售的PD-L1抑制剂包括atezolizumab、avelumab、durvalumab等,可商购的CTLA4抑制剂包括ipilimumab等。所有此类抗体药物(统称为下文所述的术语“结合剂”)及其组合均适用于本发明的制剂。

[0008] 本发明涉及以下发现:肌苷和衍生物可以通过增强肿瘤免疫原性,使肿瘤细胞对免疫细胞的溶细胞作用更敏感。基于此,肌苷和衍生物与免疫检查点抑制剂协同作用,在肿瘤存在的情况下激活抗肿瘤免疫反应。肌苷和衍生物可与免疫检查点抑制剂一起联合治疗对单独免疫检查点抑制剂耐药或对常规免疫疗法耐药的肿瘤。

[0009] 本发明包括:通过给予有效量的免疫检查点抑制剂治疗对免疫检查点抑制剂敏感或耐药的癌症或肿瘤。肌苷和衍生物预期在相同的治疗作用和相同的组合物和制剂中起作用肌苷和衍生物包括具有相似结构的嘌呤核苷肌苷(IUPAC名称:9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-1H-purin-6-one,具有一下结构:



[0011] 预期有效的具有类似结构的衍生物包括具有与上述羟甲基不同的醇的所有化合物,其中羟甲基中的甲基被支链或未支链的烷烃、烯烃或炔烃取代的醇,链上有两个或多个碳原子。此类具有相似结构的化合物还包括次黄嘌呤、黄嘌呤、羟基-脱氧鸟苷、2',3'-双脱氧肌苷、2'-脱氧肌苷、肌苷酸、肌苷二磷酸盐,肌苷三磷酸,肌苷酸钠,异丙肌苷,脱氧肌苷,3'-脱氧-3'-氟肌苷,1-甲基肌苷,肌苷5'-甲基单磷酸,和肌苷-3',5'-环状单磷酸酯等。使用一种或多种此类化合物以增强免疫应答并增强免疫检查点抑制剂或其它免疫增强剂的效力也在本发明的范围内。

[0012] 附图的简要说明

[0013] 专利或申请文件至少包含一张彩色绘图。本专利或专利申请出版物的带有彩色附图的副本将由专利局根据要求和支付必要费用提供。

[0014] 图1A肌昔联合免疫检查点抑制剂(ICB)处理对小鼠体内B16肿瘤生长的影响(标记为“ICB”是指免疫检查点阻断/抑制剂:抗CTLA4抗体加抗PD-1抗体)。将黑色素瘤B16细胞皮下注射到八周大小的雌性C57BL/6小鼠( $2 \times 10^5$ 细胞/只)。在第7、10、13和16天经腹腔注射抗CTLA4抗体(每只小鼠100 $\mu$ g)和抗PD-1抗体(每只小鼠200 $\mu$ g)。从第4天开始每天对小鼠进行口服给药肌昔(400mg/kg剂量)。结果显示,在B16荷瘤小鼠中观察到肌昔联合ICB组与对照组、肌昔或单独的ICB组相比,肿瘤生长被显著抑制(其中\*\*表示 $P < 0.01$ )。

[0015] 图1B显示在使用图1A中的治疗方案的B16荷瘤小鼠第19天的平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。肿瘤体积结果表明肌昔和ICB的组合比单独的肌昔或ICB更好的治疗。(其中\*\*表示 $P < 0.01$ ;\*\*\*表示 $P < 0.001$ )。

[0016] 图1C显示了用对照肌昔治疗、用ICB治疗或用肌昔联合ICB治疗的B16荷瘤动物的生存期。存活被定义为肿瘤 $< 2,500\text{mm}^3$ 的小鼠。结果表明,与单独使用肌昔或ICB治疗相比,肌昔和ICB联合治疗显著延长了B16荷瘤小鼠的生存期。使用对数秩(Mantel-Cox)检验计算的生存统计数据。(其中\* $P < 0.05$ ;\*\*\* $P < 0.001$ )。

[0017] 图2A显示了使用对照或肌昔处理的B16肿瘤细胞的增殖能力。MTT测定用于确定用对照载体处理的B16肿瘤细胞的细胞活力;指示肌昔的浓度,其中“Ino-10”表示10 $\mu$ M肌昔;“Ino-50”表示50 $\mu$ M肌昔,“Ino-200”表示200 $\mu$ M肌昔。数据表明肌昔在体外不会抑制B16肿瘤细胞的增殖。

[0018] 图2B显示了用对照或肌昔(与图2A中相同的浓度)给药的凋亡肿瘤细胞的体外定量分析。数据表明单独的肌昔不会在体外诱导B16肿瘤细胞的凋亡。

[0019] 图2C显示了在用对照或50 $\mu$ M肌昔处理的B16肿瘤细胞中抗原呈递相关基因(H2k1、H2d1)和IFN信号基因(Stat1、Stat3、Irf1)的mRNA基因相对表达。数据表明,肌昔处理增加了B16肿瘤细胞中抗原呈递相关基因和IFN信号基因的表达。

[0020] 图2D显示了使用对照或50 $\mu$ M肌昔处理的B16中MHC-I(H2kb)的表达情况。使用流式细胞术检测B16细胞的膜MHC-I表达水平。结果表明肌昔处理增加了B16肿瘤细胞中MHC-I的膜蛋白水平。

[0021] 图3A显示了代表性流式细胞术分析在肿瘤接种15天不同治疗处理组的B16肿瘤浸润性CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>T细胞的数量( $n=5$ )。分离不同治疗组的肿瘤组织经机械切碎后分离浸润淋巴细胞。对分离的单个细胞进行计数和染色以进行流式细胞术,以确定CD45<sup>+</sup>免疫细胞总数中CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的百分比。结果表明,肌昔和抗CTLA4抗体和抗PD1抗体(“ICB”)的联合治疗比单独的肌昔或ICB治疗可显著增加肿瘤浸润性CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0022] 图3B显示了对照、肌昔、ICB(抗CTLA4 Ab和抗PD-1Ab),肌昔和ICB联合治疗的B16肿瘤中CD8<sup>+</sup>T细胞群的定量分析。该数据表明,与对照或ICB或单独肌昔( $n=5$ )相比,肌昔和ICB联合治疗组中CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞显著增加。结果显示为平均值 $\pm$ SEM(\* $P < 0.05$ ;\*\* $P < 0.01$ ),统计数据使用非配对t检验和Welch校正计算。

[0023] 图4A显示了在用对照、肌昔、ICB(抗CTLA4 Ab和抗PD-1Ab)或肌昔联合ICB处理的小鼠中,在B16-GM肿瘤细胞接种(x轴)后随时间推移的肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ,y轴)。将B16-GM细胞皮下注射到8周的雌性C57BL/6小鼠( $2 \times 10^5$ /小鼠)中。在第7、10、13和16天腹膜内注射抗CTLA4抗体(每只小鼠100 $\mu$ g)和抗PD-1抗体(每只小鼠200 $\mu$ g)。从第4天开始,每天给与小鼠口服400 $\mu$ g/kg肌昔至第21天。结果显示,与对照组或单独肌昔或ICB治疗相比,肌昔联合ICB

治疗可显著使B16-GM荷瘤小鼠的肿瘤消退。

[0024] 图4B显示了在给与相应治疗的B16-GM荷瘤小鼠的第18天平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) (如图4A所示)。这些结果表明肌昔和ICB联合治疗在抑制肿瘤进展方面优于肌昔或ICB单独治疗(其中 $*P<0.05$ ;  $**P<0.01$ ;  $***P<0.001$ )。

[0025] 图4C描绘了如图4A所示的不同治疗处理后B16-GM肿瘤的大小。结果显示,肌昔+ICB治疗组小鼠的肿瘤要小于其他治疗处理组的肿瘤。

[0026] 图4D描绘了不同治疗处理组的肿瘤重量(如图4A中治疗处理),显示肌昔与抗CTLA4抗体和抗PD1抗体(“ICB”)联合免疫疗法的B16-GM肿瘤显着减小。结果显示为平均值 $\pm$ SEM( $**P<0.01$ ;  $****P<0.0001$ )。使用非配对t检验和Welch校正计算肿瘤重量统计数据。

[0027] 图5显示了对照、肌昔、抗CTLA4抗体和抗PD1抗体(“ICB”),以及肌昔+ICB治疗的B16-GM荷瘤小鼠的单个肿瘤生长曲线。结果表明,肌昔+ICB治疗在抑制肿瘤生长方面比单独使用肌昔或ICB治疗更有效。值得注意的是,肌昔+ICB联合治疗的五只小鼠中有两只小鼠的肿瘤完全消退。

[0028] 图6A显示了在第18天用对照、肌昔、抗CTLA4抗体和抗PD1抗体(“ICB”)、肌昔和+ICB处理的B16-GM荷瘤小鼠肺部的代表性H&E(苏木精和伊红)染色切片情况。

[0029] 图6B显示了定量分析不同治疗处理组B16-GM荷瘤小鼠的第18天肺转移的情况,如图6A所示。这些结果表明,与单独的对照、肌昔、ICB相比,肌昔和ICB联合治疗显着抑制了B16-GM肿瘤的肺转移。使用非配对t检验和Welch校正计算肺转移性结节统计数据。结果显示为平均值 $\pm$ SEM( $**P<0.01$ )。

[0030] 图7显示了接受对照、肌昔、抗CTLA4抗体和抗PD1抗体(“ICB”)、或肌昔+ICB治疗的B16-GM荷瘤小鼠的生存曲线。对于生存曲线,当肿瘤体积达到 $2500\text{mm}^3$ 时,小鼠被视为死亡。这些结果表明,与单独使用肌昔或ICB处理相比,肌昔+ICB处理显着延长了B16-GM荷瘤小鼠的存活时间。使用对数秩(Mantel-Cox)检验进行统计分析(其中 $*P<0.05$ ;  $**P<0.01$ ;  $***P<0.001$ )。

[0031] 图8A显示了在用对照、肌昔、抗CTLA4抗体和抗PD1抗体(“ICB”)、或肌昔和+ICB治疗的小鼠中,4T1乳腺癌细胞接种(x轴)后随时间推移的平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ , y轴)。将4T1细胞注射到8周龄的雌性Balb/c小鼠( $2 \times 10^5$ /小鼠)的乳腺脂肪垫中。在第7、10、13和16天经腹腔注射抗CTLA4抗体(每只小鼠 $100\mu\text{g}$ )和抗PD-1抗体(每只小鼠 $200\mu\text{g}$ )。第4天至第21天每天给予小鼠口服 $400\text{mg/kg}$ 的肌昔。结果表明,与单独用肌昔或ICB治疗的对照组相比,肌昔和ICB联合治疗显著抑制了4T1荷瘤小鼠的肿瘤进展。结果显示为平均值 $\pm$ SEM。( $***$ 表示 $P<0.001$ )。

[0032] 图8B显示了4T1荷瘤小鼠第24天的平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ),如图8A所示。这些结果表明,肌昔和ICB联合治疗抑制了4T1荷瘤小鼠的肿瘤生长,但单独肌昔或ICB不会显着影响肿瘤生长。使用非配对t检验和Welch校正计算肿瘤体积统计数据( $***P<0.001$ )。

[0033] 图8C描绘了不同治疗处理组4T1肿瘤的代表性肿瘤大小,如图8A所示处理。这些数据显示与其他组相比,用肌昔和ICB联合治疗的小鼠的肿瘤尺寸相对较小。

[0034] 图8D与图8A所示的治疗处理后肿瘤的重量分析,以毫克为单位。显示使用肌昔和ICB免疫疗法的显著减少4T1肿瘤大小。使用非配对t检验和Welch校正计算肿瘤重量统计数据。结果显示为平均值 $\pm$ SEM( $**P<0.01$ ;  $***P<0.001$ )。

[0035] 图9显示了如图8A所示经对照、肌苷、抗CTLA4抗体和抗PD1抗体(“ICB”)或肌苷+ICB联合治疗后4T1荷瘤小鼠的单个肿瘤生长曲线。结果表明,肌苷+ICB治疗在治疗4T1肿瘤方面比单独使用肌苷或ICB治疗更有效。值得注意的是,肌苷+ICB治疗的组合完全抑制了六个肿瘤中的三个(50%)的生长。

[0036] 图10A显示了在用对照、异丙肌苷(Iso)、抗CTLA4抗体和抗PD1抗体(“ICB”),或异丙肌苷联合ICB的4T1荷瘤小鼠的肿瘤生长曲线。将4T1细胞注射到8周龄雌性Ba1b/c小鼠( $2 \times 10^5$ /小鼠)的乳腺脂肪垫中。在第7、10、13和16天经腹腔注射抗CTLA4抗体(每只小鼠100 $\mu$ g)和抗PD-1抗体(每只小鼠200 $\mu$ g)。从第5天到第20天对小鼠进行给与口服400mg/kg的异丙肌苷(Iso)。结果表明,与单独用异丙肌苷或ICB治疗的对照组相比,异丙肌苷(Iso)和ICB联合治疗对4T1荷瘤小鼠的肿瘤消退具有显著影响。结果显示为平均值 $\pm$ SEM。(\*\*表示 $P < 0.01$ )

[0037] 图10B显示了小鼠中4T1肿瘤细胞接种后第22天的平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ),如图10A所示。这些结果表明异丙肌苷(Iso)和ICB联合治疗组合在减少4T1荷瘤小鼠的肿瘤生长方面具有协同作用。使用非配对t检验和Welch校正计算肿瘤体积统计数据( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ )。

[0038] 图10C显示了如图10A中所示,经对照、异丙肌苷(Iso)、ICB或Iso+ICB处理的小鼠中单个4T1荷瘤小鼠的个体肿瘤生长曲线。结果表明,异丙肌苷+ICB治疗4T1肿瘤的疗效显著优于单独的异丙肌苷或单独的ICB治疗。

[0039] 详细说明

[0040] 应当理解,除非上下文另有明确规定,单数形式“一个”、“一个”和“该”包括复数形式。术语“结合剂”包括如下所述的抗体和抗体的衍生物,以及与本文所述的抗体结合相同靶标的蛋白质和其他分子。

[0041] 上述结果表明肌苷增强免疫检查点抑制剂(又名“ICB”代表“免疫检查点阻断”)的抗肿瘤作用,包括针对免疫检查点分子的抗体,如抗PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、TIGIT和VISTA抗体药物。本发明包括肌苷和衍生物与靶向CTLA-4、PD-1或PD-L1、LAG-3、TIM-3、TIGIT和VISTA等的结合剂联合用于肿瘤治疗。

[0042] 通常,抗体具有重链和轻链。每条重链和轻链都包含一个恒定区和一个可变区(分别为VH和VL)。这些区域也称为“域”。轻链和重链可变区包含一个被三个高变区中断的“框架”区,也称为“互补决定区”或“CDR”。不同轻链或重链的框架区序列在物种内相对保守。抗体的框架区,即组成轻链和重链的组合框架区,用于在三维空间中定位和排列CDR。CDR主要负责结合抗原表位。每条链的CDR通常称为CDRI、CDR2和CDR3,从N端开始依次编号,并且通常还通过特定CDR所在的链来识别。因此,VH CDR3位于其中发现它的抗体重链的可变域中,而VL CDR1是来自其中发现它的抗体轻链可变域的CDRI。

[0043] 在一个优选的实施方案中,抗CTLA-4、抗PD-1或抗PD-L1单克隆抗体(通常在小鼠或其他啮齿动物中产生)或其片段是嵌合、人源化或人抗体。通常,人源化抗体具有从非人源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基通常称为输入残基,通常取自输入可变域。人源化基本上可以按照Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-327(1988);或Verhoeyen等,Science 239:1534-1536(1988),通过用啮齿动物CDR或CDR序列替换人抗体的相应序列。因此,此类人源化抗体是嵌合抗体(美国专利号

4,816,567), 其中基本上少于一个完整的人可变域已被来自非人物种的相应序列取代。在实践中, 人源化抗体通常是人抗体, 其中一些CDR残基和可能的一些FR残基被啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。

[0044] 在一些实施方案中, “人抗体”是指除人框架和恒定区之外还包含人高变区的免疫球蛋白。这种抗体可以使用本领域已知的各种技术产生。例如, 体外方法涉及使用在噬菌体上展示的人抗体片段的重组文库(例如, McCafferty等, 1990, *Nature* 348:552-554; Hoogenboom&Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991); 和Marks等, *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991))、酵母细胞(Boder and Wittrup, 1997, *Nat Biotechnol* 15:553-557)或核糖体(Hanes and Pluckthun, 1997, *Proc Natl Acad* 94:4937-4942)。类似地, 可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物中来制备人抗体, 例如, 内源性免疫球蛋白基因已部分或完全失活的小鼠。受到挑战后, 会观察到人类抗体的产生, 这在所有方面都与人类非常相似, 包括基因重排、组装和抗体库。这种方法在例如美国专利No. 5,200,100中有所描述。第6,150,584、5,545,807号; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 以及以下科学出版物: (例如Jakobavits, *Drug Deliv Rev.* 31:33-42 (1998), Marks et al, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Lonberg&Huszar, *Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。它在所有方面都与人类非常相似, 包括基因重排、组装和抗体库。这种方法在例如美国专利No. 5,200,100中有所描述。第6,150,584、5,545,807号; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 以及以下科学出版物: (例如Jakobavits, *Drug Deliv Rev.* 31:33-42 (1998), Marks et al, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Lonberg&Huszar, *Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。它在所有方面都与人类非常相似, 包括基因重排、组装和抗体库。这种方法在例如美国专利No. 5,200,100中有所描述。第6,150,584、5,545,807号; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 以及以下科学出版物: (例如Jakobavits, *Drug Deliv Rev.* 31:33-42 (1998), Marks et al, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Lonberg&Huszar, *Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 以及以下科学出版物: (例如Jakobavits, *Drug Deliv Rev.* 31:33-42 (1998), Marks et al, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826



(1996);Lonberg&Huszar,.Rev.Immunol.13:65-93(1995)。

[0045] 在某些实施方案中,本文公开的抗体或其片段包含或为上述ICB抗体的F(ab)'<sub>2</sub>、Fab、Fv或单链Fv片段。

[0046] 在一些实施方案中,“抗体片段”是指包含完整抗体的一部分的分子,通常是完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab)'<sub>2</sub>和Fv片段;单域抗体(参见,例如Wesolowski,Med Microbiol Immunol. (2009) 198(3):157-74;Saerens,et al.,Curr Opin Pharmacol. (2008) 8(5):600-8;Harmsen and de Haard,Appl Microbiol Biotechnol. (2007) 77(1):13-22));螺旋稳定的抗体(参见,例如,Arndt等,J Mol Biol 312:221-228(2001);双抗体(参见下文);单链抗体分子(“scFvs”,参见,例如,美国专利号..5,888,773);二硫键稳定的抗体(“dsFvs”,参见例如美国专利号5,747,654和6,558,672)和域抗体(“dAbs”,参见例如Holt等,Trends Biotech 21(11):484-490(2003),Ghahroudi等,FEBS Lett.414:521-526(1997),Lauwereys等,EMBO J 17:3512-3520(1998),Reiter等,J.Mol.生物.290:685-698(1999),Davies and Riechmann,Biotechnology,13:475-479(2001))。

[0047] 美国专利第5,932,448号公开了制备具有通过亮氨酸拉链连接的Fab'部分的双特异性抗体;美国专利美国专利号7,538,196公开了双特异性抗体的制备,其中部分与接头连接;美国专利美国专利号8,148,496公开了一种多特异性Fv抗体构建体,该构建体具有至少四个通过肽接头彼此连接的可变域。双特异性抗体的一个臂可以靶向ICB,另一臂靶向肿瘤标志物。

[0048] 美国公开号20170335281描述了表达CAR的基因修饰T细胞的制备,所述CAR包含结合癌症相关抗原的抗原结合结构域。可以应用相同的通用技术来修饰T细胞或其他免疫效应细胞以表达抗原结合结构域的CDR1、CDR2和CDR3中的一个或多个,用于癌症治疗。CAR多肽分子的抗原结合域可包括任何抗体、抗体片段、scFv、Fv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、单域抗体(SDAB,公开于WO 9404678和Hamers-Casterman,C.et al.(1993)Nature363:446-448),VH或VL结构域,或VHH结构域。这种表达CAR的T细胞可以与本文所述的疗法组合使用,或者抗原结合域可以是ICB域高亲和力抗体变体。

[0049] 具有高亲和力的ICB抗体的制备如下所述。

[0050] 抗体应该是人源化的,保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了实现该目标,根据优选方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常可用。可以使用计算机程序来说明和显示选定的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基的分析。

[0051] 要修饰的框架区残基的例子包括那些直接非共价结合靶标的残基(Amit等,Science233:747-753(1986));与CDR的构象相互作用/影响CDR的构象(Chothia et al.J.Mol.Biol.196:901-917(1987));和/或参与VL-VH接口(EP 239 400B1)。在某些实施方案中,一个或多个这样的框架区残基的修饰导致抗体对感兴趣靶标的结合亲和力的增强。

[0052] 编码氨基酸序列变体的核酸分子通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括

但不限于寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和盒式诱变对较早制备的变体或非变体形式的物种依赖性抗体。产生变体的优选方法是寡核苷酸介导的合成。在某些实施方案中,抗体变体将仅具有单个高变区残基取代,例如约两个至约十五个高变区取代。

[0053] 产生变体文库的一种方法是通过寡核苷酸介导的合成。可以跨整个轻链或重链可变区合成每个约100个核苷酸的三个寡核苷酸。每个寡核苷酸可包含:(1)由三联体(NNK)<sub>20</sub>产生的60个氨基酸的片段其中N是任何核苷酸,K是G或T,以及(2)大约15-30个核苷酸与下一个寡核苷酸或每个末端的载体序列重叠。在PCR反应中这三个寡核苷酸退火后,聚合酶将填充相反的链,产生完整的双链重链或轻链可变区序列。三联体的数量可以调整为任何长度的重复,并且可以选择它们在寡核苷酸内的位置以便仅取代给定CDR或框架区中的氨基酸。通过使用(NNK),所有二十个氨基酸在编码变体的每个位置都是可能的。5-10个氨基酸(15-30个核苷酸)的重叠序列不会被替换,但可以选择落在框架的堆叠区域内,或者可以被单独的或后续的合成轮次取代。合成寡核苷酸的方法是本领域公知的并且也是可商购的。从这些寡核苷酸产生抗体变体的方法也是本领域众所周知的,例如PCR。重链和轻链变体文库在其序列中随机位置不同,可以在任何表达载体中构建,例如噬菌体,每个表达载体都包含编码特定重链和轻链变体的DNA。

[0054] 在产生抗体变体之后,确定变体相对于亲本抗体的生物活性。如上所述,这涉及确定变体对ICB靶标的结合亲和力。有多种高通量方法可用于快速筛选抗体变体结合目标靶标的能力。

[0055] 然后可以针对相对于亲本抗体增强的结合亲和力来筛选选自该初始筛选的一种或多种抗体变体。确定结合亲和力的一种常用方法是使用BIAcore表面等离子共振系统(BIAcore公司)评估结合和解离速率常数。根据制造商(BIAcore)的说明,激活生物传感器芯片以实现目标的共价偶联。然后将靶标稀释并注射到芯片上,以在固定材料的响应单位(RU)中获得信号。由于RU中的信号与固定材料的质量成正比,这代表了基质上固定目标密度的范围。解离数据适合单点模型以获得 $k_{off} \pm \text{sd}$ (测量的标准偏差)。计算每条关联曲线的伪一级速率常数( $k_s$ ),并将其绘制为蛋白质浓度的函数以获得 $k_{on} \pm \text{se}$ (拟合标准误差)。结合的平衡解离常数 $K_d$ 由SPR测量值计算为 $k_{off}/k_{on}$ 。由于平衡解离常数 $K_d$ 与 $k_{off}$ 成反比,因此可以假设结合率( $k_{on}$ )是所有变体的常数,则可以估计亲和力提高。

[0056] 可以任选地对所得具有高亲和力的候选物进行一种或多种进一步的生物活性测定,以确认具有增强的结合亲和力的抗体变体仍保留所需的治疗属性,如可在以下描述的测定中测试的上面的数字。最佳抗体变体保留了以显着高于亲本抗体的结合亲和力结合ICB靶标的能力。

[0057] 如此选择的抗体变体可以根据抗体的预期用途经常进行进一步修饰。此类修饰可涉及氨基酸序列的进一步改变、与异源多肽的融合和/或共价修饰,例如下文详述的那些。例如,任何不参与维持抗体变体正确构象的半胱氨酸残基可以被替换,通常用丝氨酸替换,以提高分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,(a)半胱氨酸键可以添加到抗体中以提高其稳定性(特别是当抗体是抗体片段如Fv片段时)。

[0058] “结合剂”是指如上所述的所有抗体和抗体的片段或衍生物,以及除抗体和抗体的片段或衍生物以外的靶向免疫检查点阻断蛋白或可以抑制免疫检查点阻断的蛋白质和分子,其中任何一种可以使用与上述技术类似的技术进行修改和测试,使其成为对ICB具有高

亲和力的结合剂。

#### [0059] 配方

[0060] 在制备合适的结合剂后,可以将其制备成用于施用于受试者的制剂,与肌苷或者肌苷-相关化合物。结合剂优选冻干制剂,其作为第一步,需要制备预冻干制剂。考虑到所需的剂量体积、给药方式等来确定预冻干制剂中结合剂的量。结合剂通常存在于溶液中。例如,结合剂可以存在于pH为约4-8,优选约5-7的pH缓冲溶液中。示例性缓冲液包括组氨酸、磷酸盐、Tris、柠檬酸盐、琥珀酸盐和其他有机酸。缓冲液浓度可为约1mM至约20mM,或约3mM至约15mM,这取决于例如缓冲液和制剂(例如重构制剂)的所需等渗性。优选的缓冲液是组氨酸,因为它可以具有冻干保护特性。琥珀酸盐也是一种有用的缓冲剂。

[0061] 冻干保护剂被添加到预冻干制剂中。在优选的实施方案中,冻干保护剂是非还原糖,例如蔗糖或海藻糖。预冻干制剂中冻干保护剂的量通常使得在重构时所得制剂将是等渗的,如优选的,尽管高渗重构制剂也可能是合适的。此外,冻干保护剂的量不能太低以致在冻干时发生不可接受量的结合剂降解/聚集。当冻干保护剂是糖(例如蔗糖或海藻糖)并且结合剂是抗体时,冻干前制剂中的示例性冻干保护剂浓度为约10mM至约400mM,优选约30mM至约300mM,最优选约50mM至约100mM。为每种结合剂和冻干保护剂组合选择结合剂与冻干保护剂的比例。在抗体作为结合剂和糖(例如,蔗糖或海藻糖)作为冻干保护剂以产生具有高蛋白质浓度的等渗重构制剂的情况下,冻干保护剂与抗体的摩尔比可为约100至约1500冻干保护剂对1摩尔抗体,优选约200至约1000摩尔冻干保护剂对1摩尔抗体,包括约200至约600摩尔冻干保护剂对1摩尔抗体。

[0062] 在优选的实施方案中,已经发现将表面活性剂添加到预冻干制剂中是合乎需要的。或者或另外,可将表面活性剂加入冻干制剂和/或重构制剂中。示例性的表面活性剂包括非离子表面活性剂,例如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或80);泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188);海卫一;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-肌氨酸;亚油基-、肉豆蔻基-或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺丙基、椰油酰胺丙基、亚油酰胺丙基、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺丙基);肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-二甲胺;甲基椰油酰基-钠,或甲基油基牛磺酸二钠;和MONAQUAT™系列(Mona Industries, Inc., Paterson, NJ)、聚乙二醇、聚丙二醇以及乙二醇和丙二醇的共聚物(例如Pluronic、PF68等)。加入的表面活性剂的量应能减少重构蛋白质的聚集并使重构后颗粒的形成最小化。例如,表面活性剂可以以约0.001-0.5%,优选约0.005-0.05%的量存在于预冻干制剂中。加入的表面活性剂的量应能减少重构蛋白质的聚集并使重构后颗粒的形成最小化。例如,表面活性剂可以以约0.001-0.5%,优选约0.005-0.05%的量存在于预冻干制剂中。加入的表面活性剂的量应能减少重构蛋白质的聚集并使重构后颗粒的形成最小化。例如,表面活性剂可以以约0.001-0.5%,优选约0.005-0.05%的量存在于预冻干制剂中。

[0063] 冻干前制剂的制备中可以使用冻干保护剂(例如蔗糖或海藻糖)和填充剂(例如甘露醇或甘氨酸)的混合物。填充剂可以允许生产均匀的冻干饼,其中没有过多的囊。其他药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,例如在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. Ed. 中描述的那些。(1980)可以包含在预冻干制剂(和/或冻干制剂和/或重构制

剂)中,前提是它们不会不利地影响制剂的所需特性。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,包括:额外的缓冲剂;防腐剂;共溶剂;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;螯合剂如EDTA;金属配合物(例如锌-蛋白质配合物);可生物降解的聚合物,如聚酯;和/或成盐抗衡离子,如钠。

[0064] 本文所述的药物组合物和制剂优选是稳定的,以在储存时保持其物理和化学稳定性和完整性。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术是本领域可用的,并且在Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, Pubs中有综述(1991)和Jones, A. Adv. 药物递送修订版10:29-90(1993)。可以在选定的温度下在选定的时间段内测量稳定性。

[0065] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。这很容易通过在冻干和重构之前或之后通过无菌过滤膜过滤来实现。或者,整个混合物的无菌可通过将除蛋白质之外的成分在约120°C下高压灭菌约30分钟来实现。

[0066] 在结合剂、冻干保护剂和肌苷(或相关化合物)混合在一起,制剂被冻干。许多不同的冷冻干燥机可用于此目的,例如Hu1150®(Hu11, 美国)或GT20®(Leybold-Heraeus, 德国)冷冻干燥机。冷冻干燥是通过冷冻制剂并随后在适合初级干燥的温度下从冷冻的内容物中升华冰来完成的。在此条件下,产品温度低于配方的共晶点或崩塌温度。

[0067] 通常,用于初级干燥的搁板温度将在合适的压力下在大约-30至25°C的范围内(假设产品在初级干燥期间保持冷冻),通常在大约50至250mTorr的范围内。容纳样品的容器(例如玻璃瓶)的配方、尺寸和类型以及液体的体积将主要决定干燥所需的时间,其范围可以从几小时到几天(例如40-60小时)。二次干燥阶段可在约0-40°C下进行,主要取决于容器的类型和大小以及所用蛋白质的类型。例如,贯穿整个冻干脱水阶段的搁板温度可为约15-30°C(例如,约20°C)。二次干燥所需的时间和压力将是产生合适的冻干饼的时间和压力,取决于,例如,温度和其他参数。二次干燥时间取决于产品中所需的残留水分含量,通常需要至少约5小时(例如10-15小时)。压力可以与初级干燥步骤中采用的压力相同。冷冻干燥条件可以根据配方和小瓶尺寸而变化。

[0068] 在一些情况下,可能需要在容器中冻干蛋白质制剂,在其中进行蛋白质的重构以避免转移步骤。在这种情况下的容器可以是例如3、5、10、20、50或100cc的小瓶。作为一般建议,冻干将导致其中水分含量小于约5%,优选小于约3%的冻干制剂。

[0069] 在所需的阶段,通常是在将制剂施用于患者时,可以用稀释剂重构冻干制剂,使得重构制剂中的结合剂浓度优选类似于冻干前制剂的浓度。重构通常在约25°C的温度下进行以确保完全水合,但可根据需要采用其他温度。重构所需的时间将取决于例如稀释剂的类型、赋形剂和蛋白质的量。示例性稀释剂包括无菌水、注射用抑菌水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或葡萄糖溶液。稀释剂任选地包含防腐剂。示例性防腐剂已在上文描述,芳族醇例如苄醇或酚醇是优选的防腐剂。使用的防腐剂的量是通过评估不同的防腐剂浓度与蛋白质和防腐剂功效测试的相容性来确定的。例如,可以使用非冻干制剂,包括结合剂,肌苷或相关化合物,以及本文描述的和本领域众所周知的任何众所周知的载体、赋形剂、缓冲剂、稳定剂、防腐剂、佐剂和其他添加剂。

[0070] 剂量和给药方法

[0071] 上述制剂可以通过合适的途径给予需要治疗的受试者(例如人),例如通过静脉

内、肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、皮内、关节内、滑膜内、鞘内、皮内、瘤内、结内、髓内、口服、吸入或局部途径；或者它可以通过口服、吸入喷雾、局部、直肠、鼻腔、口腔、阴道或通过植入的贮液器给药；在任何情况下，作为推注或在一段时间内连续输注；或通过注射贮库给药途径，例如使用1个月、3个月或6个月贮库注射或生物可降解材料和方法。

[0072] 用于液体制剂的市售雾化器，包括喷射雾化器和超声雾化器可用于给药。液体制剂可直接雾化，冻干粉剂可复溶后雾化。或者，抗体可以使用碳氟化合物制剂和定量吸入器雾化，或作为冻干和研磨的粉末吸入。在本发明中部署CAR的情况下，免疫效应细胞（例如，T细胞、NK细胞）的组合物可以直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位或其他地方。

[0073] 待通过本文所述方法治疗的受试者可以是哺乳动物，更优选人。哺乳动物包括但不限于农场动物、运动动物、宠物、灵长类动物、马、狗、猫、小鼠和大鼠。

[0074] “有效量”是指单独或与一种或多种其他活性剂组合赋予受试者治疗效果所需的活性剂的量。有效量取决于所治疗的特定病症、病症的严重程度、个体患者参数，包括年龄、身体状况、体型、性别和体重、治疗持续时间、同时治疗的性质（如果有）、具体的给药途径和类似因素，所有这些都是本领域普通技术人员众所周知的，只需常规实验即可解决。通常优选使用单个组分或其组合的最大剂量，即根据合理的医学判断的最高安全剂量。

[0075] 经验考虑，例如抗体半衰期，通常将有助于确定剂量。例如，与人免疫系统相容的抗体，如人源化抗体或全人抗体，可用于延长抗体的半衰期并防止抗体受到宿主免疫系统的攻击。给药频率可以在治疗过程中确定和调整，并且通常但不一定基于胃癌的治疗和/或抑制和/或改善和/或延迟。或者，抗体的持续持续释放制剂可能是合适的。用于实现持续释放的各种制剂和装置是本领域已知的。

[0076] 在一个例子中，结合剂和肌苷或衍生物的剂量，如本文所述，可以在已经给予一次或多次制剂给药的个体中凭经验确定。个体被给予递增剂量的制剂。为了评估制剂的功效，可以根据常规实践跟踪疾病的指标（例如，肿瘤生长）。通常，对于本文描述的任何制剂的施用，初始候选剂量可以从上述实验外推。基于包括例如个体的年龄和体重、需要治疗的病症、病症的严重性、组合物的性质和给药途径在内的因素。例如，本领域技术人员可以从可以增加的低剂量开始直到达到期望的治疗结果或结果。或者，本领域技术人员可以从高剂量开始，该高剂量可以降低直到达到达到所需治疗结果或结果所需的最小剂量。示例性的合适剂量肌苷并且相关化合物在人体中每天可包括约0.5g至约5g。在进一步的实施方案中，可以给予个体肌苷与ICB联用，剂量为肌苷人类每天约50-100mg/kg。示例性的异丙肌苷合适剂量可包括每天约0.5g至约5g。PD1抑制剂的一种示例性合适剂量可包括约1.0 $\mu$ M。在进一步的实施方案中，个体可以联合施用PD1抑制剂和肌苷或约5mg/kg PD1抑制剂剂量。PD-L1抑制剂的一种示例性合适剂量可包括约1.0 $\mu$ M。在进一步的实施方案中，个体可以联合施用PD-L1抑制剂和肌苷或约5mg/kg PD-L1抑制剂剂量。CTLA-4抑制剂的一种示例性合适剂量可包括约1.0 $\mu$ M。在进一步的实施方案中，个体可以联合施用CTLA-4抑制剂和肌苷或CTLA-4抑制剂剂量为约3mg/kg。在进一步的实施方案中，可以将异丙基肌苷与ICB组合施用给个体，剂量为人类每天约100mg/kg。

[0077] 对于数天或更长时间的重复给药，取决于病症，治疗持续直至出现所需的症状抑制或直至达到足够的治疗水平以减轻癌症。另一种示例性给药方案包括给予初始较高剂量，随后给予较低维持剂量。然而，其他剂量方案可能有用，这取决于从业者希望达到的药

代动力学衰减模式。例如,考虑每天或每周给药一到四次。在一些实施方案中,给药频率是每天、每周、每2周、每4周、每5周、每6周、每7周、每8周、每9周或每10周一次;或每月一次、每2个月或每3个月或更长时间。这种疗法的进展很容易通过常规技术和分析进行监测。给药方案(包括所用的结合剂)可随时间变化。

[0078] 根据治疗目标和癌症部位,可以使用医学领域普通技术人员已知的常规方法向受试者施用药物组合物。

[0079] 可注射组合物可包含各种载体,例如植物油、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、乙醇和多元醇(甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)。

[0080] 对于静脉注射,水溶性抗体可以通过滴注法给药,由此注入含有制剂和生理学上可接受的赋形剂的药物制剂。生理上可接受的赋形剂可包括例如5%葡萄糖、0.9%盐水、林格氏溶液或其他合适的赋形剂。肌肉制剂,例如抗体的合适的可溶性盐形式的无菌制剂,可以溶解并施用在药物赋形剂中,例如注射用水、0.9%盐水或5%葡萄糖溶液。

[0081] 在一种实施方式中,该制剂通过位点特异性或靶向局部递送技术给药。位点特异性或靶向局部递送技术的实例包括抗体或局部递送导管的各种可植入贮库源,例如输液导管、留置导管或针导管、合成移植物、外膜包裹物、分流器和支架或其他可植入的设备、特定地点的载体、直接注入或直接应用。参见,例如,WO 00/53211和美国专利。第5,981,568号。

[0082] 在本专利公开的另一个实施方案中,提供了一种制品,其包含本文所述的任何药物组合物和制剂(例如,包含结合剂和肌苷或衍生物)并提供其使用和/或重构的说明。制品包括容器。合适的容器包括例如瓶子、小瓶(例如双室小瓶)、注射器(例如双室注射器)和试管。容器可以由多种材料形成,例如玻璃或塑料。容器保持制剂和容器上的或与容器相关的标签可以指示重构和/或使用的方向。例如,标签可以表明该制剂被重构为特定的蛋白质浓度。容纳制剂的容器可以是多用途小瓶,其允许重构制剂的重复给药(例如,2-6次给药)。制品还可包括包含合适稀释剂(例如BWFI)的第二容器。在稀释剂和冻干制剂混合后,重构制剂中的最终蛋白质浓度通常至少为50mg/mL。制品还可以包括从商业和用户的角度来看所需的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和带有使用说明的包装插页。

[0083] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。

[0084] 应当理解,本公开专利的药物组合物可以进一步包括用于减轻、介导、预防和治疗所述疾病、病症和病症的另外的已知治疗剂、药物、将合成化合物修饰为前药等。

[0085] 另一方面,本公开专利一般涉及用于增强肿瘤免疫原性和增强抗肿瘤作用的组合物的施用。因此,包括以下组合的组合物肌苷(或衍生物)和ICB可以给予“有需要”的个体,该术语是指有患任何癌症的风险或患有任何癌症的个体,特别是前列腺癌、皮肤癌、卵巢癌中的一种或多种;非淋巴实质器官的癌症,包括心脏、胎盘、骨骼肌和肺;乳腺癌;头颈部癌症,包括各种淋巴瘤,例如套细胞淋巴瘤、非霍奇金B细胞淋巴瘤、腺瘤、鳞状细胞癌、喉癌、唾液腺癌、胸腺瘤和胸腺癌;白血病;视网膜癌;食道癌;多发性骨髓瘤;黑色素瘤;结直肠癌;肺癌;宫颈癌;子宫内膜癌;胆囊癌;肝癌;甲状腺滤泡癌;胃癌;非小细胞肺癌;胶质瘤;尿路上皮癌;膀胱癌;前列腺癌;肾细胞癌;浸润性导管癌;和多形性胶质母细胞瘤。

[0086] “有需要的个体”可以是人或非人灵长类动物或其他哺乳动物,包括小鼠、大鼠、兔、

牛、猪和其他类型的研究和/或本领域技术人员已知的相关动物。

[0087] 本公开专利的这些和其他实施例的各种功能和优点将从以下所示的示例中更充分地理解。实施例旨在说明本公开的益处,但并不举例说明本公开的全部范围。

[0088] 结果和结论

[0089] 本发明评估了肌苷单独或联用免疫检查点抑制剂(ICB)对黑色素瘤B16荷瘤小鼠的肿瘤生长的影响。ICB抑制了B16荷瘤小鼠的肿瘤生长,表明该小鼠模型对ICB治疗敏感(图1A)。肌苷不仅在体内抑制肿瘤生长,还增强了ICB的抗肿瘤功效,延长了B16荷瘤小鼠的存活时间(图1B,C)。然而,肌苷在体外没有抑制肿瘤细胞增殖和促进细胞凋亡,这意味着肌苷对肿瘤细胞没有直接杀伤作用。这表明,肌苷的体内疗效不依赖于其对肿瘤细胞的直接杀伤作用(图2A,B)。还发现肌苷刺激肿瘤细胞中的干扰素信号传导和抗原呈递相关基因的表达(图2C),从而增强MHC-I在肿瘤细胞上的表达(图2D)。通过MHC I类呈递抗原的肿瘤细胞可以被细胞毒性T淋巴细胞(CTL)识别并杀死。此外,肌苷增加细胞毒性CD8<sup>+</sup> T浸润到肿瘤微环境中(图3A,B)。总之,这些发现表明:肌苷不仅具有抗肿瘤作用,而且还能增强ICB对B16荷瘤小鼠的抗肿瘤作用。

[0090] 为了判断肌苷是否克服了众所周知的免疫疗法耐药性,使用肌苷或ICB来治疗B16-GM荷瘤小鼠,这是一种已知对免疫疗法具有抗性的转移性肿瘤模型。肌苷减小了肿瘤大小,但ICB并未显著改变B16-GM荷瘤小鼠的肿瘤生长(图4A,B)。肌苷和ICB联合治疗显著降低了B16-GM荷瘤小鼠的肿瘤生长(图4A、B、C、D)。这些结果表明:肌苷+ICB联合治疗比单独肌苷或ICB治疗更有效。值得注意的是,肌苷+ICB联合治疗使五个肿瘤中的两个被完全抑制(图5)。有意思的是,肌苷联合ICB不仅完全抑制了肿瘤的生长,而且减少了肿瘤的转移,观察到肺转移显著减少(图6A,B)。与单独治疗组相比,肌苷+ICB联合治疗显著延长了B16-GM荷瘤小鼠的存活时间(图7)。总的来说,这些发现表明:肌苷克服了B16-GM荷瘤小鼠对ICB的耐药性。

[0091] 进一步测试是否肌苷足以克服对免疫疗法的抵抗,使用肌苷或ICB来治疗对免疫疗法具有抗性的4T1荷瘤小鼠。单独使用ICB并没有减少4T1荷瘤小鼠的肿瘤大小(图8A,B),表明该小鼠模型对免疫检查点抑制剂具有耐药性。然而,肌苷联合ICB完全抑制肿瘤生长,并减轻肿瘤重量(图8C,D)。这些结果表明,肌苷+ICB治疗4T1荷瘤小鼠比单独肌苷或ICB治疗更有效。值得注意的是,六个肿瘤中的三个(50%)的肿瘤生长被肌苷+ICB处理完全抑制(图9)。总之,这些结果表明肌苷克服了4T1荷瘤小鼠对ICB的耐药性。接下来,本发明研究了具有类似结构或组分的其他相关类似化合物的作用,异丙肌苷(又称为肌苷醋苯二胺)是N,N-二甲氨基-2-丙醇的对乙酰氨基苯甲酸盐和肌苷摩尔比为3:1。异丙肌苷和ICB联合治疗显著减少了4T1荷瘤小鼠的肿瘤大小(图10)。结果表明,异丙肌苷和ICB的组合对4T1肿瘤生长具有协同作用(图10A、10B、10C)。这表明肌苷的衍生物异丙肌苷也能增强免疫检查点抑制剂的免疫治疗效果。

[0092] 总之,采用了三个临床前小鼠模型,共同证明了肌苷及其衍生物克服了不同小鼠肿瘤模型对ICB的耐药性。使用肌苷或衍生物的新治疗策略克服了对ICB免疫疗法的抵抗。

[0093] 方法和材料

[0094] 细胞系

[0095] B16-F0鼠黑色素瘤细胞系(简称B16)、B16-F10和4T1鼠乳腺癌细胞系(4T1)获自

美国典型培养物保藏中心 (National Cancer Institute)。如前所述,通过逆转录病毒介导的基因转移产生分泌GM-CSF (称为B16-GM) 的B16-F10细胞。根据酶联免疫吸附试验 (ELISA; BD) 测定,GM-CSF分泌约为每24小时150ng/10<sup>6</sup>个细胞。B16-GM细胞系被用作免疫原性肿瘤模型,增加肿瘤的树突状细胞和巨噬细胞的数量,引发全身抗肿瘤免疫。所有细胞系均被证实为无支原体污染。使用含有10%胎牛血清 (Corning) 和1% Pen/Strep (Life Technologies) 的DMEM (Corning) 培养细胞。将细胞在维持在37°C和5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。收集75-80%生长融合度的肿瘤细胞用于原位注射。抗CTLA4抗体 (克隆9H10) 和抗PD-1抗体 (克隆RPM1-14) 购自BioXCell (西黎巴嫩,新罕布什尔州,美国)。

#### [0096] 肿瘤模型

[0097] 对于黑色素瘤模型,使用0.25%胰蛋白酶 (Corning) 消化并悬浮在磷酸盐缓冲液中,收集2×10<sup>5</sup>B16或B16-GM细胞用于原位注射到C57BL/6J小鼠 (6-8周) 的皮下。对于乳腺癌模型,使用0.25%胰蛋白酶 (Corning) 消化并悬浮在1:1比例的基质胶中和磷酸盐缓冲液中,收集2×10<sup>5</sup> 4T1细胞用于原位注射到Balb/c小鼠 (6-8周) 的乳腺脂肪垫中。

#### [0098] 处理实验

[0099] 单一药剂或按以下方案组合给予治疗。肌苷 (Sigma-Aldrich) 溶解在无菌水中,终浓度为40mg/ml,并以400mg/kg每天一次通过口服给药。治疗在第4天开始并在肿瘤植入后第21天结束。对照组小鼠给与口服水处理。将抗CTLA4抗体 (每只小鼠100μg,克隆号9H10, BioXCell) 和抗PD-1抗体 (每只小鼠200μg,克隆号RPM1-14, BioXCell) 腹膜内注射 (i.p) 治疗组第7、10、13和16天。对照组腹膜内 (i.p) 接受同种型对照抗体 (克隆号LTF-2)。每三天用卡尺测量肿瘤大小,并通过评估最长尺寸 (长度, L) 和最长垂直尺寸 (宽度, W) 手动评估测量值:  $(L \times W^2) / 2$ 。

#### [0100] 细胞增殖试验

[0101] 根据制造商的说明,使用细胞增殖试剂盒I (MTT; Sigma) 在0、24、48、72和96小时检查细胞增殖能力。将细胞以2×10<sup>3</sup>细胞/孔的浓度一式三份接种在96孔板中。在指定的日期,去除培养基并将MTT溶液加入孔中。四小时后,加入DMSO并将细胞在37°C轻轻摇动下进一步温育10分钟。最后,使用酶标仪在550nm处测量每个孔的光密度。

#### [0102] 细胞凋亡检测

[0103] 将肿瘤细胞接种在6孔板中并生长24小时。然后用对照 (载体) 或1、10、50、100μM处理细胞肌苷。处理48小时后,通过胰蛋白酶消化收集细胞,以10<sup>6</sup>细胞/ml重悬于1×膜联蛋白V结合缓冲液 (BD Biosciences) 中,并将100μl (10<sup>5</sup>细胞) 加入到每个流式检测样本管中。细胞用7-AAD (5μl/100μl, BD Biosciences, 以评估细胞死亡) 和APC偶联的膜联蛋白V (5μl/100μl, BD Biosciences, 以评估细胞凋亡) 染色30分钟,然后通过BD FACSCanto II流式细胞仪进行分析。使用FACSDiva (BD Biosciences) 软件获取流式分析数据并使用FlowJo软件 (Tree Star) 进行数据分析,并获得凋亡APC<sup>+</sup>细胞的百分比。

#### [0104] 逆转录定量PCR

[0105] 肿瘤细胞cDNA的制备和提取采用1μg RNA和qScript cDNA合成试剂盒 (Bio-Rad)。使用H2k1、H2d1、Stat1、Stat3和Irf1的引物进行基于SYBR的定量PCR反应。相对拷贝数通过计算在检测基因相对于管家基因18sRNA并报告为相对mRNA表达 ( $\Delta \Delta C_t = 2^{-(\Delta C_t \text{实验组} - \Delta C_t \text{对照组})}$ ) 变化。定量检测在Applied Biosystems 7300定量PCR机器上进行。



#### [0106] 流式细胞术

[0107] 对于肿瘤细胞的MHC-I表达流分析,每种条件下有一百万个细胞用PE标记抗小鼠H-2Kb抗体(Biolegend公司产品)在PBS和2%FBS中稀释,并在冰上保持30分钟。匹配的同种型对照抗体作为对照进行。小鼠肿瘤样品用剪刀切碎,然后与解离缓冲液(2mg/ml A型胶原酶,0.02mg/ml DNase,在含有5%血清的RPMI1640细胞培养基中)一起在37°C搅拌孵育45分钟。通过重复移液使肿瘤样品均质化,并通过70 $\mu$ m尼龙过滤器(BD Biosciences)在补充有10%胎牛血清的细胞培养基中过滤以产生单细胞悬浮液。细胞悬液用完全RPMI洗涤一次。红细胞裂解后,单细胞悬液在冰上用抗CD16/32(Biolegend)封闭20分钟,然后用适当的抗体在冰上孵育30分钟:抗CD45-APC-Cy7、CD3-FITC,CD8-PerCP-Cy5.5,CD4-PE。根据前向和侧向散射以及可固定活力染料eFluor450(eBioscience)排除死细胞和双联体。

[0108] 本文所述的具体方法、程序、制剂、抗体、蛋白质和化合物是优选实施方案的代表,并且是示例性的,并不旨在限制本发明的范围。考虑到本说明书,本领域技术人员将想到其他目的、方面和实施例,并且这些目的、方面和实施例包含在由权利要求的范围限定的本发明的精神内。对本领域技术人员来说显而易见的是,在不脱离本发明的范围和精神的情况下,可以对本文公开的发明进行各种替换和修改。此处说明性描述的本发明可以在不存在此处未具体公开为必要的任何要素或限制或限制的情况下适当地实施。此处说明性描述的方法和过程可以以不同的步骤顺序适当地实施,并且它们不必限于此处或权利要求中指出的步骤顺序。在任何情况下都不得将专利解释为限于本文具体公开的具体示例或实施例或方法。在任何情况下,专利都不得解释为受任何审查员或专利商标局的任何其他官员或雇员所作的任何声明的限制,除非该声明是由申请人在响应性书面材料中明确采用的,并且没有限制或保留。并且它们不一定限于此处或权利要求中指示的步骤顺序。在任何情况下,不得将专利解释为限于本文具体公开的具体示例或实施例或方法。在任何情况下,专利都不得解释为受任何审查员或专利商标局的任何其他官员或雇员所作的任何声明的限制,除非该声明是由申请人在响应性书面材料中明确采用的,并且没有限制或保留。并且它们不一定限于此处或权利要求中指示的步骤顺序。在任何情况下,不得将专利解释为限于本文具体公开的具体示例或实施例或方法。在任何情况下,专利都不得解释为受任何审查员或专利商标局的任何其他官员或雇员所作的任何声明的限制,除非该声明是由申请人在响应性书面材料中明确采用的,并且没有限制或保留。

[0109] 本发明已经在本文中广泛地和一般性地进行了描述。属于一般公开内容的每个较窄的物种和亚属组也构成本发明的一部分。已使用的术语和表达被用作描述而非限制,并且使用此类术语和表达无意排除所示和描述的特征或其部分的任何等效物,但应认识到在所要求保护的本发明的范围内可以进行各种修改。因此,应当理解,虽然本发明已经通过优选实施例和可选特征具体公开,但是本领域技术人员可以对这里公开的概念进行修改和变化,

#### [0110] 参考文献:

[0111] Ansell, S.M., Lesokhin, A.M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E.C., Gutierrez, M., Schuster, S.J., Millenson, M.M., Cattry, D., Freeman, G.J., et al. (2015). PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. The New England journal of medicine 372, 311-319. Carbone, D.P., Reck,

M., Paz-Ares, L., Creelan, B., Horn, L., Steins, M., Felip, E., van den Heuvel, M.M., Ciuleanu, T.E., Badin, F., et al. (2017). First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* 376, 2415-2426. George, S., Rini, B.I., and Hammers, H.J. (2018). Emerging Role of Combination Immunotherapy in the First-line Treatment of Advanced Renal Cell Carcinoma: A Review. *JAMA oncology*.

[0112] Hasko, G., Sitkovsky, M.V., and Szabo, C. (2004). Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci* 25, 152-157.

[0113] Migden, M.R., Rischin, D., Schmults, C.D., Guminski, A., Hauschild, A., Lewis, K.D., Chung, C.H., Hernandez-Aya, L., Lim, A.M., Chang, A.L.S., et al. (2018). PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 379, 341-351.

[0114] Motzer, R.J., Tannir, N.M., McDermott, D.F., Aren Frontera, O., Melichar, B., Choueiri, T.K., Plimack, E.R., Barthelemy, P., Porta, C., George, S., et al. (2018). Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 378, 1277-1290.

[0115] Pitt, J.M., Vetizou, M., Daillere, R., Roberti, M.P., Yamazaki, T., Routy, B., Lepage, P., Boneca, I.G., Chamaillard, M., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2016). Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity* 44, 1255-1269.

[0116] Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707-723.

[0117] Tawbi, H.A., Forsyth, P.A., Algazi, A., Hamid, O., Hodi, F.S., Moschos, S.J., Khushalani, N.I., Lewis, K., Lao, C.D., Postow, M.A., et al. (2018). Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *The New England journal of medicine* 379, 722-730.

[0118] Welihinda, A.A., Kaur, M., Greene, K., Zhai, Y., and Amento, E.P. (2016). The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A2A receptor with a unique signaling bias. *Cell Signal* 28, 552-560.

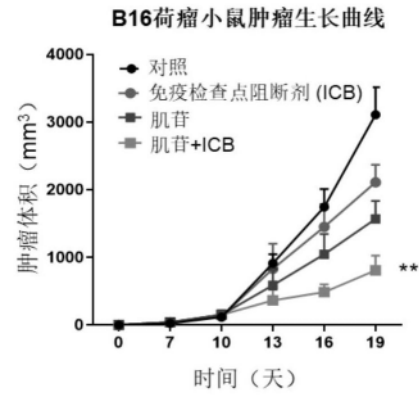


图1A

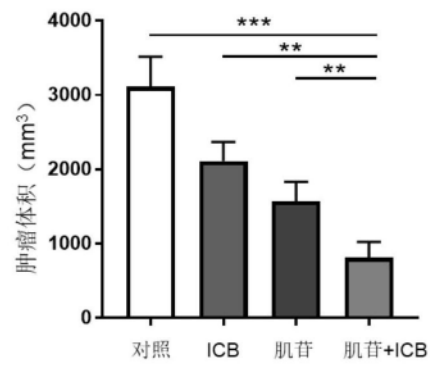


图1B

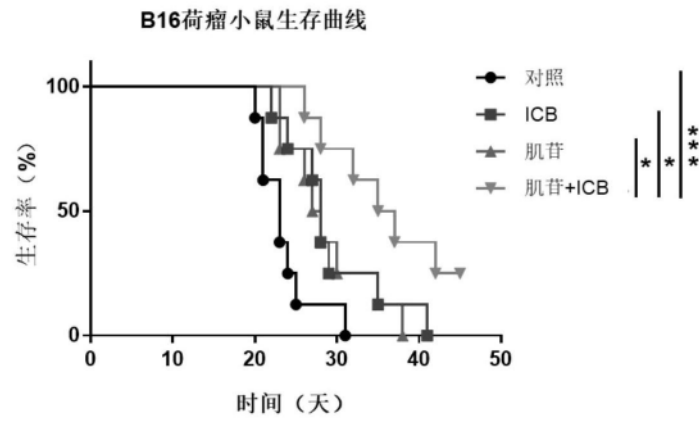


图1C

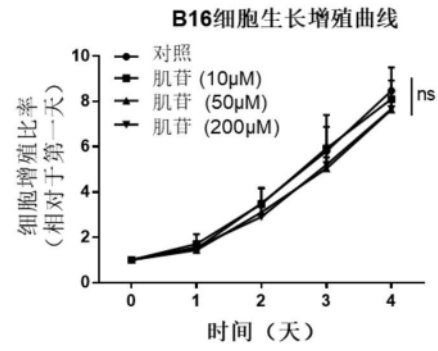


图2A

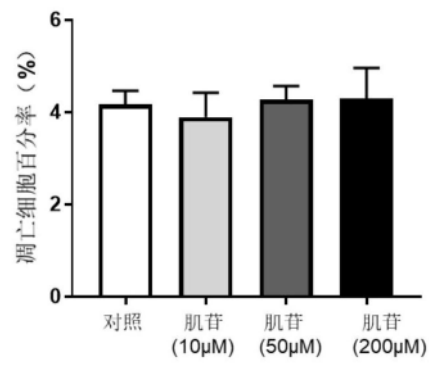


图2B

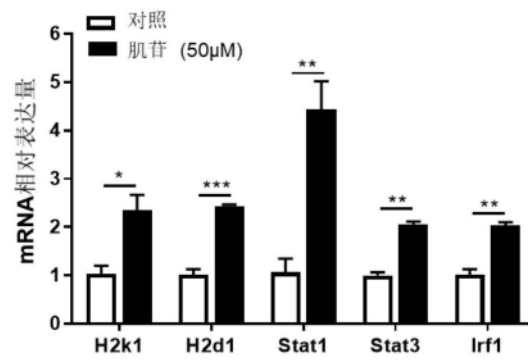


图2C

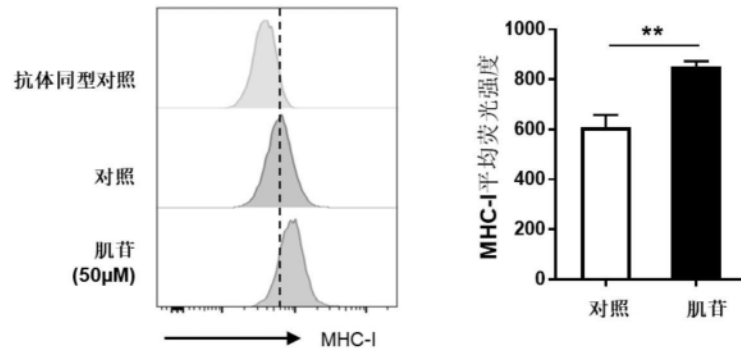


图2D

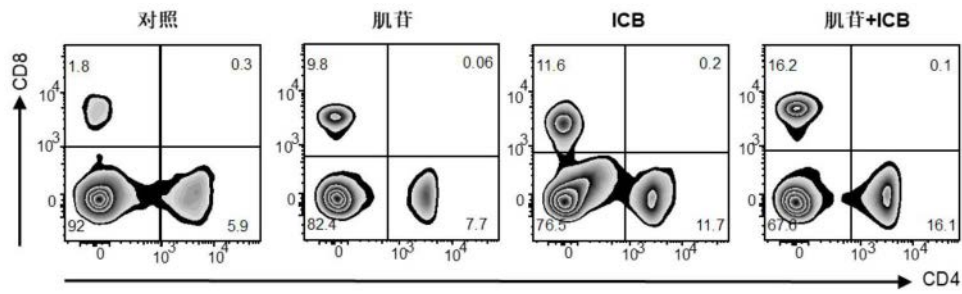


图3A

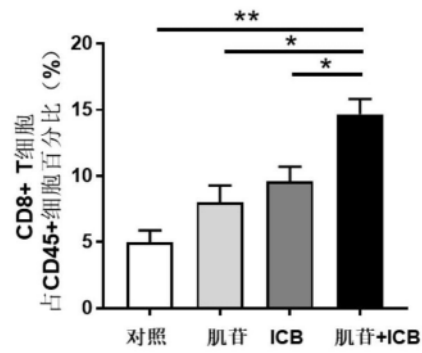


图3B

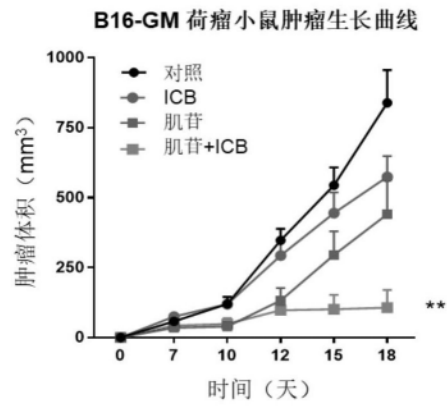


图4A

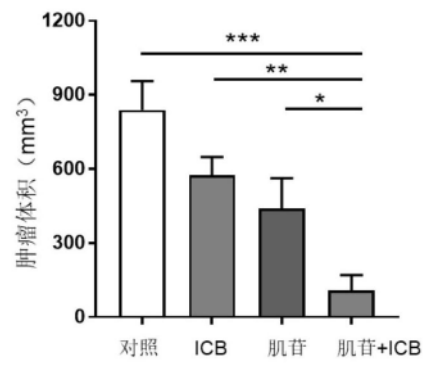


图4B

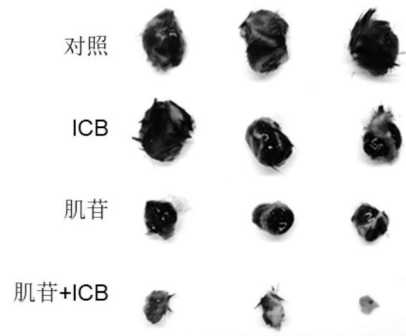


图4C

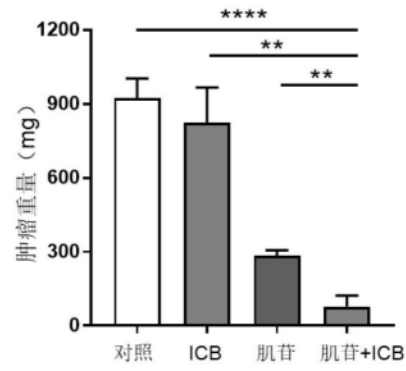


图4D

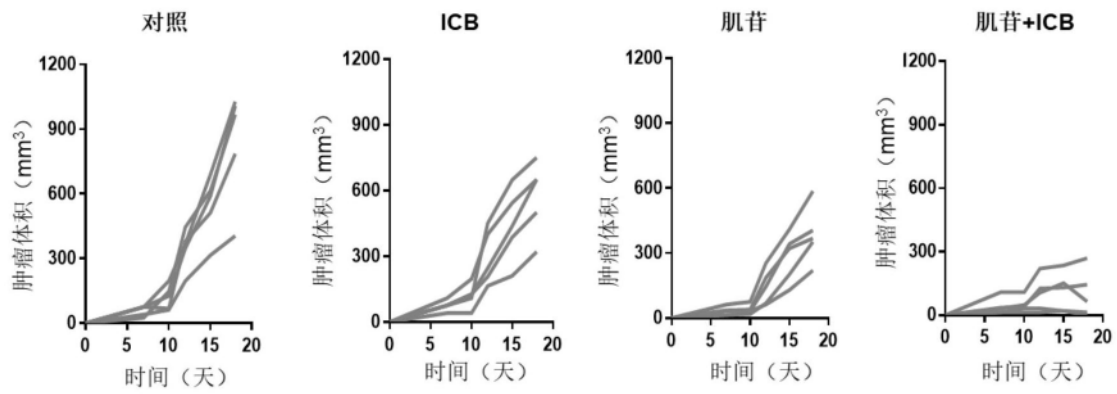


图5

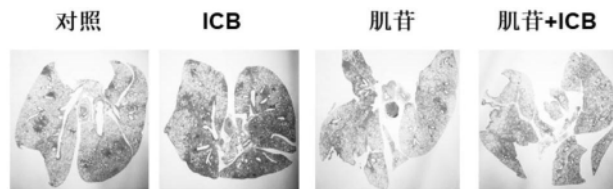


图6A

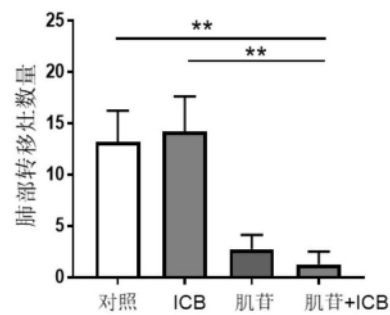


图6B

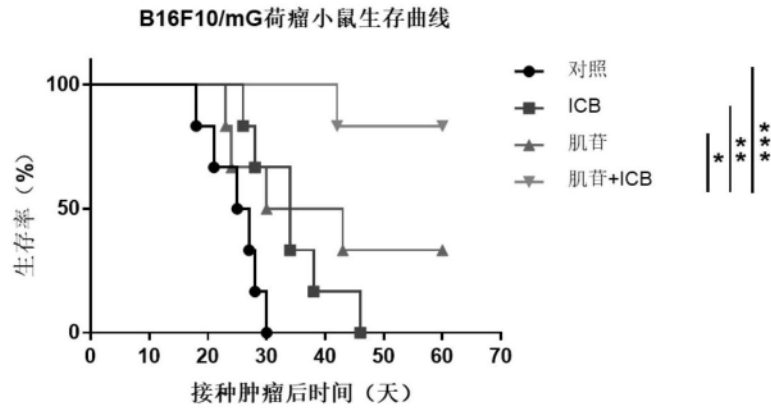


图7

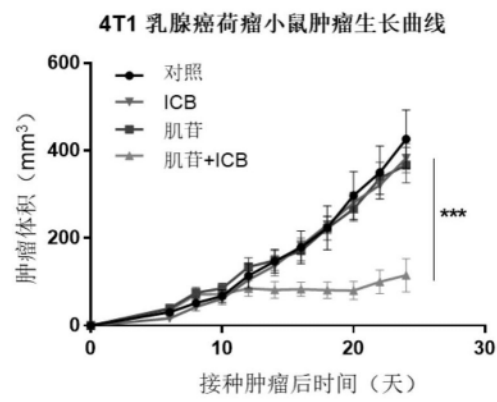


图8A

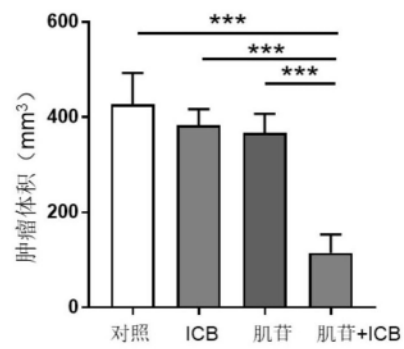


图8B



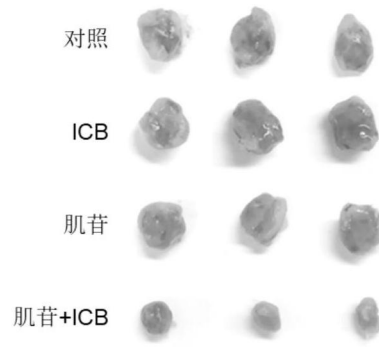


图8C

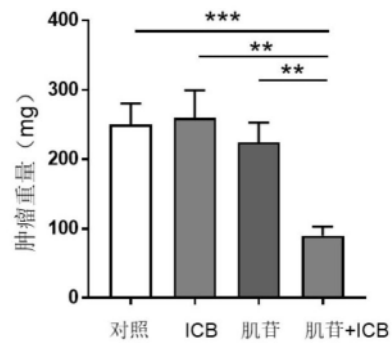


图8D

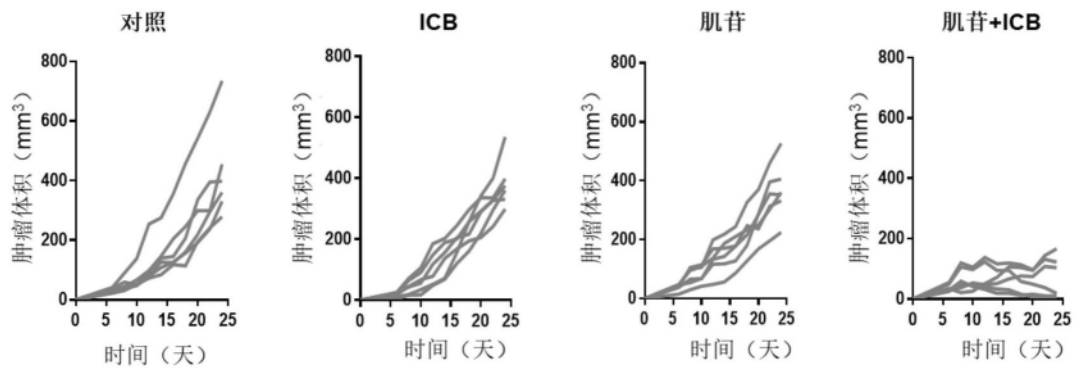


图9

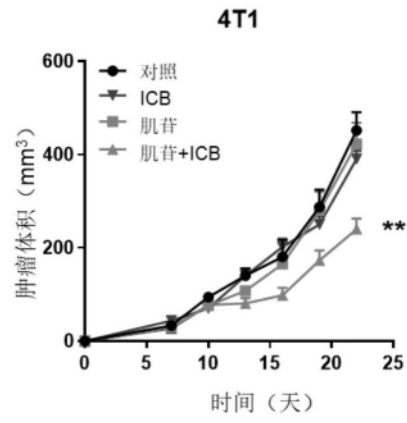


图10A

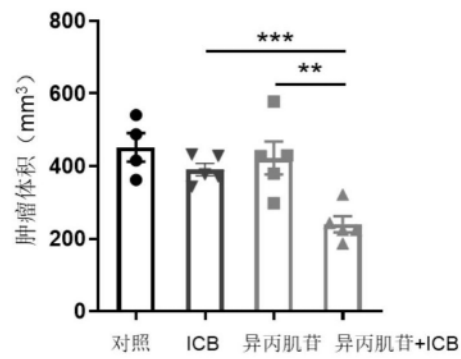


图10B

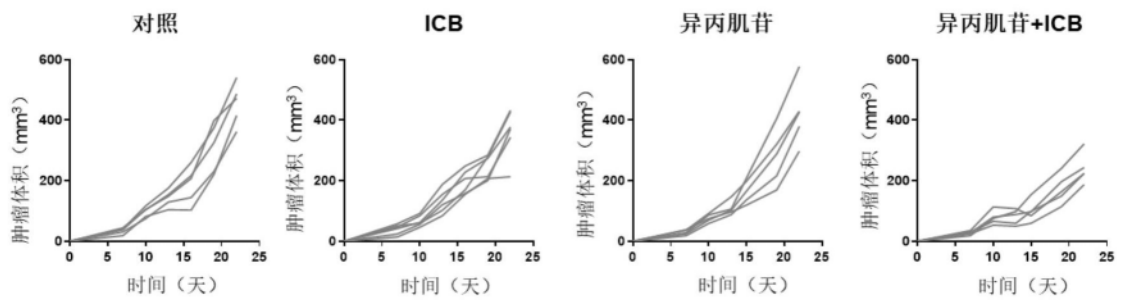


图10C