(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118059232 A
(43)申请公布日 2024.05.24

(21)申请号 202410192503.7

(22)申请日 2018.10.29

(30)优先权数据
62/580,232 2017.11.01 US

(62)分案原申请数据
201880077692.6 2018.10.29

(71)申请人 南特生物科学公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 派翠克·松吉翁 卡伊万·尼亚兹 田中志保 乔恩·托马斯·万莱 克利福德·安德斯·奥尔森 菲利普·T·刘

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
专利代理师 回振海 王春伟

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/24(2006.01)
A61K 31/00(2006.01)
A61K 38/19(2006.01)
A61K 38/20(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)

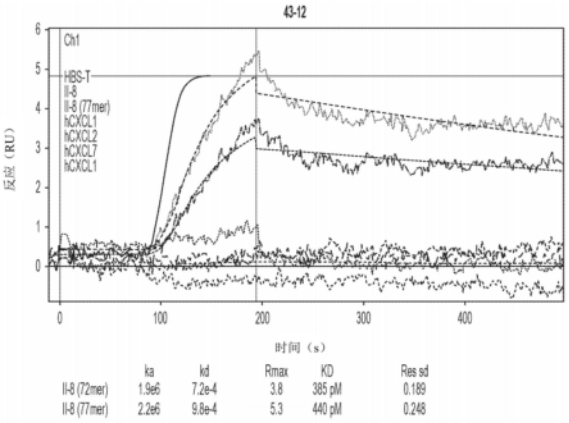
权利要求书2页 说明书16页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

阻断EMT途径并克服癌干细胞的IL8

(57)摘要

提出了靶向肿瘤表达的或内源性的IL-8的重组重组IL-8抗体、其片段或对IL-8具有高亲和力的单链可变片段(scFv)的组合物、方法和用途。优选地,该重组IL-8抗体或scFv片段包括包含选自SEQ ID NO.1-15、31-32的第一氨基酸序列的VH区段,和/或包含选自SEQ ID NO.16-30、33-34的第二氨基酸序列的VL区段。该重组IL-8抗体或scFv片段可被配制成药物组合物,以施用于患有肿瘤的患者以减少该肿瘤的转移、减少肿瘤微环境中的免疫抑制或减少Th2介导的免疫反应。



CN 118059232 A

1.抗体、其结合片段或单链可变片段(scfv)肽在制备用于治疗三阴性乳腺癌(TNBC)的药物组合物中的用途,其中:

该抗体、其结合片段或scfv肽包含:

由SEQ ID NO.8的第一氨基酸序列组成的V_H区段,和由SEQ ID NO.23的第二氨基酸序列组成的V_L区段;或其中该第一氨基酸序列具有SEQ ID NO.10的氨基酸序列且该第二氨基酸序列具有SEQ ID NO.25的氨基酸序列;或其中该第一氨基酸序列具有SEQ ID NO.31的氨基酸序列且该第二氨基酸序列具有SEQ ID NO.33的氨基酸序列;或其中该第一氨基酸序列具有SEQ ID NO.32的氨基酸序列且该第二氨基酸序列具有SEQ ID NO.34的氨基酸序列;并且

该药物组合物被配制为以有效治疗该TNBC的剂量和方案施用至患者。

2.如权利要求1所述的用途,其中该V_H区段和V_L区段经接头肽偶联。

3.如权利要求2所述的用途,其中该接头肽是富含甘氨酸的肽。

4.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中该药物组合物进一步包含以下的至少一种:氟维司群、阿多柔比星、多西他赛、靶向肿瘤坏死的抗体。

5.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中该单链可变片段肽对IL-8的结合亲和力小于10^{-7}M。

6.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中该TNBC包含从组织分泌的内源性IL-8。

7.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中该TNBC包含并非来源于组织的外源性IL-8。

8.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中该TNBC包括IL-8作用,并且其中该IL-8作用包括触发细胞移行。

9.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中该TNBC包括IL-8作用,并且其中该IL-8作用包括触发髓源性抑制细胞(MDSC)在该肿瘤的微环境中积聚。

10.如权利要求9所述的用途,其中该IL-8作用包括减少Th2介导的免疫反应。

11.包含抗体的药物组合物在制备用于通过使肿瘤对自然杀伤(NK)细胞介导的裂解敏感来治疗患有肿瘤的患者的药物中的用途,其中:

提供包含抗体的药物组合物;

其中该抗体包含:由SEQ ID NO.8的第一氨基酸序列组成的V_H区段,和由SEQ ID NO.23的第二氨基酸序列组成的V_L区段;或其中该第一氨基酸序列具有SEQ ID NO.10的氨基酸序列且该第二氨基酸序列具有SEQ ID NO.25的氨基酸序列;或其中该第一氨基酸序列具有SEQ ID NO.31的氨基酸序列且该第二氨基酸序列具有SEQ ID NO.33的氨基酸序列;或其中该第一氨基酸序列具有SEQ ID NO.32的氨基酸序列且该第二氨基酸序列具有SEQ ID NO.34的氨基酸序列;并且

该药物组合物被配制为以有效敏感化该肿瘤的剂量和方案施用至该患者。

12.如权利要求11所述的用途,其中该药物组合物还包含活化的或经修饰的免疫细胞。

13.如权利要求12所述的用途,其中该活化的或经修饰的免疫细胞包括NKT细胞、T细胞或NK细胞。

14.如权利要求11-13中任一项所述的用途,其中该药物组合物进一步包含以下的至少一种:氟维司群、阿多柔比星、多西他赛、靶向肿瘤坏死的抗体、检查点抑制剂或免疫刺激细胞因子。

15.如权利要求11-14中任一项所述的用途,其中该肿瘤是以下的至少一种:胰腺癌、三阴性乳腺癌、成胶质细胞瘤。

16.如权利要求11所述的用途,其中该抗体对IL-8的结合亲和力小于10^{-7}M。

17.如权利要求14所述的用途,其中该免疫刺激细胞因子选自IL-2、IL-12、IL-15、IL-15超激动剂、IL-21、IPS1和LMP1。

18.如权利要求14所述的用途,其中该检查点抑制剂结合至选自CTLA-4、PD-L1、PD-1、TIM1、2B4和CD160的受体。

19.包含抗体、其结合片段或单链可变片段(scfv)肽的药物组合物在制备用于减少患者肿瘤细胞的上皮-间质转化的药物中的用途,其中:

提供包含该抗体、其结合片段或scfv肽的药物组合物;

其中该抗体、其结合片段或scfv肽包含:由SEQ ID NO.8的第一氨基酸序列组成的V_H区段,和由SEQ ID NO.23的第二氨基酸序列组成的V_L区段;或其中该第一氨基酸序列具有SEQ ID NO.10的氨基酸序列且该第二氨基酸序列具有SEQ ID NO.25的氨基酸序列;或其中该第一氨基酸序列具有SEQ ID NO.31的氨基酸序列且该第二氨基酸序列具有SEQ ID NO.33的氨基酸序列;或其中该第一氨基酸序列具有SEQ ID NO.32的氨基酸序列且该第二氨基酸序列具有SEQ ID NO.34的氨基酸序列;并且

该药物组合物被配制为以有效减少该肿瘤细胞的上皮-间质转化的剂量和方案施用至该患者。

20.如权利要求19所述的用途,其中该V_H区段和V_L区段经接头肽偶联。

21.如权利要求20所述的用途,其中该接头肽是富含甘氨酸的肽。

22.如权利要求19-22中任一项所述的用途,其中该药物组合物进一步包含以下的至少一种:氟维司群、阿多柔比星、多西他赛和靶向肿瘤坏死的抗体。

23.如权利要求19-22中任一项所述的用途,其中该肿瘤是以下的至少一种:胰腺癌、三阴性乳腺癌、或成胶质细胞瘤。

24.如权利要求19-23中任一项所述的用途,其中该抗体、其结合片段或scfv肽对IL-8的结合亲和力小于10^{-7}M。

25.如权利要求19-24中任一项所述的用途,其中该药物组合物还包含选自IL-2、IL-12、IL-15、IL-15超激动剂、IL-21、IPS1和LMP1的免疫刺激细胞因子。

阻断EMT途径并克服癌干细胞的IL8

[0001] 本申请是申请号为201880077692.6、申请日为2018年10月29日、发明名称为“阻断EMT途径并克服癌干细胞的IL8”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明的领域是用于治疗患有肿瘤的患者以减少肿瘤转移或减少肿瘤微环境中的免疫抑制的重组scFv或抗白细胞介素8(IL-8)抗体的组合物、方法和用途。

背景技术

[0003] 背景描述包括可用于理解本发明的信息。并不承认本文提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明相关,也不承认具体地或隐含地引用的任何出版物是现有技术。

[0004] 本文中的所有出版物和专利申请都通过引用并入,其程度如同每个单独的出版物或专利申请被具体地且单独地指明通过引用并入一样。在并入的参考文献中的术语的定义或用法与本文提供的该术语的定义不一致或相反的情况下,适用本文提供的该术语的定义,而不适用该术语在该参考文献中的定义。

[0005] 白细胞介素-8(IL-8),也称为中性粒细胞趋化因子,主要由巨噬细胞和上皮细胞产生,并且已知通过将免疫细胞(例如,中性粒细胞)募集到感染部位而在免疫系统中起关键作用。近来,对鉴定肿瘤产生的IL-8与肿瘤发展之间的关系的兴趣日益增长,特别是在肿瘤转移和肿瘤微环境中免疫抑制的机制方面。例如,几项研究发现,肿瘤产生的IL-8在转移性肿瘤细胞中高表达,并且确实能够诱导肿瘤细胞的上皮-间质转化,从而产生肿瘤起始细胞(例如,肿瘤干细胞)。其他研究显示,肿瘤产生的IL-8吸引髓源性抑制细胞(MDSC),这些髓源性抑制细胞可通过干扰肿瘤微环境中T细胞介导的免疫反应而在肿瘤周围提供免疫抑制性微环境。

[0006] 为了减轻IL-8在肿瘤发展中的作用,已经努力通过提供针对IL-8的人抗体或人源化抗体、针对IL-8的反义寡核苷酸或微RNA来中和肿瘤表达的或内源性的IL-8。例如,授予Bar-Eli的美国专利公开号2003/0068319披露了通过完全人源化和分离的单克隆或多克隆IL-8来抑制血管生成和肿瘤转移。在另一个实例中,授予Petrzkowski的美国专利号5,849,903传授了针对IL-8的有效减缓黑素瘤或肺癌生长的20个碱基对长度的反义寡核苷酸。然而,反义寡核苷酸或微RNA的作用可以根据肿瘤类型以及此类组合物的递送方法而改变。而且,分离的人或人源化抗体在一些肿瘤微环境中可能无效,在这些肿瘤微环境中分离的人或人源化抗体被肿瘤微环境中的内源金属蛋白酶裂解。

[0007] 因此,虽然已经研究了几种抑制肿瘤微环境中的IL-8表达或活性的方法,但使用重组IL-8抗体或具有对IL-8有高亲和力的氨基酸序列的单链可变片段(scFv)靶向IL-8在很大程度上尚未被研究。因此,仍然需要靶向肿瘤微环境中肿瘤表达的或内源性的IL-8以促进癌症治疗效果的重组IL-8抗体或单链可变片段(scFv)的改良组合物、方法和用途。

发明内容

[0008] 本发明的主题涉及靶向肿瘤表达的或内源性的IL-8并中和IL-8在促进肿瘤细胞EMT(上皮-间质转化)和/或肿瘤微环境中的免疫抑制方面的作用的重组IL-8抗体、单链可变片段(scFv)或对IL-8具有亲和力的其他抗体部分(包括融合产物,特别是在TxM中)的多种组合物、方法和用途。

[0009] 因此,该主题的一个方面包括单链可变片段(scFv)肽。scFv肽包括包含第一氨基酸序列的V_H区段和/或包含第二氨基酸序列的V_L区段。第一氨基酸序列和第二氨基酸序列分别选自SEQ ID NO.1-15、31-32或SEQ ID NO.16-30、33-34。

[0010] 在本发明主题的另一方面,诸位发明人考虑了一种用于治疗患有癌症的患者的药物组合物。该药物组合物包括单链可变片段(scFv),该单链可变片段具有包含第一氨基酸序列的V_H区段和/或包含第二氨基酸序列的V_L区段。第一氨基酸序列和第二氨基酸序列分别选自SEQ ID NO.1-15、31-32或SEQ ID NO.16-30、33-34。优选地,scFv肽存在于药理学可接受的载体中。

[0011] 本发明主题的另一方面涉及一种重组核酸。该重组核酸包括第一核酸区段和/或第二核酸区段,该第一核酸区段编码具有选自由SEQ ID NO.1-15、31-32组成的组的第一氨基酸序列的V_H区段,该第二核酸区段编码具有选自由SEQ ID NO.16-30、33-34组成的组的第二氨基酸序列的V_L区段。任选地,该第一区段和第二区段存在于同一阅读框中。

[0012] 在本发明主题的又一个方面,诸位发明人考虑了一种重组分离的抗体或其片段。重组分离的抗体或其片段包括具有相应的第一氨基酸序列和第二氨基酸序列的V_H结构域和/或V_L结构域。优选地,第一氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.1-15、31-32组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同,并且第二氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.16-30、33-34组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同。

[0013] 在本发明主题的另一方面,诸位发明人还考虑了一种降低组织中IL-8作用的方法。在该方法中,提供了具有包含第一氨基酸序列的V_H区段和/或V_L区段的单链可变片段(scFv)。优选地,第一氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.1-15、31-32组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同,并且第二氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.16-30、33-34组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同。该方法继续进行如下步骤:用scFv肽以有效降低组织中IL-8作用的剂量和方案治疗组织。

[0014] 在本发明主题的又一方面,诸位发明人考虑了一种治疗患有肿瘤的患者的方法。在该方法中,提供了一种药物组合物,该药物组合物包括具有包含第一氨基酸序列的V_H区段和/或V_L区段的单链可变片段(scFv)。优选地,第一氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.1-15、31-32组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同,并且第二氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.16-30、33-34组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同。该药物组合物以有效治疗肿瘤的剂量和方案施用给患者。

[0015] 在本发明主题的又一方面,诸位发明人考虑了一种减少患有肿瘤的患者的免疫抑制的方法。在该方法中,提供了一种药物组合物,该药物组合物包括具有包含第一氨基酸序列的V_H区段和/或V_L区段的单链可变片段(scFv)。优选地,第一氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.1-15、31-32组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同,并且第二氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.16-30、33-34组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同。以有效减少肿瘤微环

境中髓源性抑制细胞的存在的剂量和方案向患者施用该药物组合物。

[0016] 在本发明主题的又一方面,诸位发明人考虑了一种减少患有肿瘤的患者中Th-2介导的免疫反应的方法。在该方法中,提供了一种药物组合物,该药物组合物包括具有包含第一氨基酸序列的V_H区段和/或V_L区段的单链可变片段(scFv)。优选地,第一氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.1-15、31-32组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同,并且第二氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.16-30、33-34组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同。以有效减少患者中Th-2介导的免疫反应的剂量和方案向患者施用该药物组合物。

[0017] 在本发明主题的又一方面,诸位发明人考虑了一种减少患者中肿瘤细胞的上皮-间质转化的方法。在该方法中,提供了一种药物组合物,该药物组合物包括具有包含第一氨基酸序列的V_H区段和/或V_L区段的单链可变片段(scFv)。优选地,第一氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.1-15、31-32组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同,并且第二氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.16-30、33-34组成的组的第三氨基酸序列至少95%相同。以有效减少肿瘤细胞的上皮-间质转化的剂量和方案向患者施用该药物组合物。

[0018] 在本发明主题的又一方面,诸位发明人考虑了上述scFv肽用于减少患有肿瘤的患者中Th-2介导的免疫反应的用途。同样,诸位发明人考虑了上述scFv肽用于减少患者中肿瘤细胞的上皮-间质转化的用途。另外,诸位发明人还考虑了上述scFv肽用于减少患有肿瘤的患者中的肿瘤转移的用途。

[0019] 本发明主题的多个对象、特征、方面和优点将根据以下关于优选实施例的详细描述以及附图而变得更清楚。

附图说明

[0020] 图1A示出了其中一种scFv肽(43-12)与IL-8或IL-8直系同源物或旁系同源物之间的结合动力学图。

[0021] 图1B示出了其中一种scFv肽(49-31)与IL-8或IL-8直系同源物或旁系同源物之间的结合动力学图。

[0022] 图2A-D示出了在IL-8处理(2A、2C)以及scFv肽与IL-8共同处理(2B、2D)时中性粒细胞移行的图。

[0023] 图3示出了在IL-8处理(CTRL)以及scFv肽与IL-8共同处理(43-2、43-12)时中性粒细胞移行的图。

[0024] 图4A-C示出了其中一种scFv肽(43-12)与IL-8在特定pH条件下的结合动力学图(4A),以及所选亲和力成熟的变体scFv肽(43-12a和43-12b)在特定pH条件下的结合动力学图。

具体实施方式

[0025] 诸位发明人现在发现,各种IL-8介导的作用,包括肿瘤发展,特别是通过上皮-间充质转化途径进行的IL-8介导的肿瘤转移,可以通过减轻IL-8作用而显著降低或甚至消除。通过使用重组IL-8抗体或其片段(例如,针对IL-8的对IL-8具有高亲和力的scFv片段),捕集或以其他方式结合肿瘤微环境中的IL-8,可以实现这样的减轻作用。

[0026] 为此,诸位发明人发现,可以产生各种重组抗体或其片段,诸如针对IL-8具有高亲

和力的scFv,使得重组抗体或其片段或scFv片段可以捕集肿瘤微环境中肿瘤产生的或内源性的IL-8。认为结合或截留来自肿瘤微环境的IL-8会降低IL-8对肿瘤细胞的触发肿瘤细胞转移的作用。同样,结合或截留IL-8可以降低IL-8经由积聚髓源性抑制细胞(MDSC)而增加肿瘤微环境中的免疫抑制的作用。此外,结合或截留IL-8可以降低IL-8增加肿瘤微环境中Th2介导的免疫反应的作用,这可有助于在肿瘤微环境中募集髓源性抑制细胞。虽然不希望受任何特定理论或假设所束缚,但考虑到与抗体或片段结合的IL-8可能由于位阻效应而不再能够发挥其生物信号传导功能。此外,当在颗粒或其他表面上介导结合从而截留IL-8时,可以降低信号传导所需的IL-8浓度,从而降低或消除IL-8作用。因此,术语结合和截留在本文中可互换使用。

[0027] 如本文所用,术语“肿瘤”是指以下各项并且可与以下各项互换使用:一种或多种癌细胞、癌组织、恶性肿瘤细胞或恶性肿瘤组织,它们可以位于或者发现于人体的一个或多个解剖位置中。

[0028] 如本文所用,术语“结合”是指术语以K_D等于或小于10^{-3}M、10^{-4}M、10^{-5}M、10^{-6}M或等于或小于10^{-7}M的高亲和力“识别”和/或“检测”两个分子之间的相互作用,并且可以与该术语互换使用。

[0029] 如本文所用,术语“提供”是指并且包括制造、产生、放置、使得能使用或准备使用的任何行为。

[0030] 在本发明主题的一个示例性且特别优选的方面,诸位发明人考虑了具有V_H区段和V_L区段的与IL-8结合的单链可变片段(scFv)肽。虽然考虑到scFv的肽序列可以是对IL-8提供期望的结合亲和力的任何合适的序列,但诸位发明人发现scFv肽可以使用表1:SEQ ID:1-34中的至少一种或多种肽序列产生。

[0031] 替代性地和另外,诸位发明人还考虑到表1中呈现的V_H区段和/或V_L区段的氨基序列可用于产生重组、分离的抗体或其片段。如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。因此,“抗体及其片段”包括完整的免疫球蛋白分子(例如,全尺寸的完整IgG_1等)、完整抗体分子的片段。因此,其片段可以包括但不限于scFv、Fab片段、Fab’片段、F(ab’)2、二硫键连接的Fv(sdFv)、Fv和包含任一V_H区段和/或V_L区段的任何片段。在抗体是免疫球蛋白的情况下,考虑免疫球蛋白可以包括任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)和任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)的重链或恒定结构域以构成不同类型的免疫球蛋白。另外,“抗体”可以包括但不限于人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体。因此,应当理解,可以使用本领域公知的方法将表1所示的V_H和/或V_L结构域移植到任何现有的(通常是人或人源化的)抗体或抗体片段中。

[0032] 诸位发明人进一步考虑到,表1中呈现的V_H区段和/或V_L区段的氨基序列可以与载体蛋白偶联使用以产生在其表面上具有V_H区段和/或V_L区段的杂交蛋白,使得IL-8可以被杂交蛋白捕获。考虑了可以稳定地携带V_H区段和/或V_L区段并且优选提供进入肿瘤微环境的入口的载体蛋白的任何合适形式。一种特别优选的载体蛋白包括与一个或多个V_H区段和/或V_L区段偶联的白蛋白、重折叠的白蛋白和对抗体部分具有亲和力的其他蛋白(例如,蛋白A、蛋白G、蛋白Z)。

[0033] 通常,V_H区段和/或V_L区段与锚定分子偶联,V_H区段和/或V_L区段可以通过锚定分子

与载体蛋白偶联。例如,在载体蛋白是白蛋白的情况下,锚定分子可以是任何合适大小的疏水肽或糖脂,以适合白蛋白的Sudlow位点I和II位中的一个或白蛋白的任何其他疏水区。例如,如上所述的针对IL-8的重组免疫球蛋白可以经由其Fc结构域与载体蛋白偶联。在其他实施例中,锚定分子可以包括疏水肽(长度为至少10个氨基酸、15个氨基酸、20个氨基酸、30个氨基酸等)。在这些实施例中,可以考虑V_H区段和/或V_L区段(例如,作为scFv形式)和疏水肽的各种构型。例如,单价scFv结构域可以直接与疏水肽连接,或者多价scFv可以直接与疏水肽连接。替代性地,一个scFv结构域可以直接与多个疏水肽连接,或者多个scFv结构域可以直接与多个疏水肽连接。

[0034] 替代性地或另外,一个或多个V_H区段和/或V_L区段可与具有锚定部分的中间分子偶联以与载体蛋白结合。在一个优选的实施例中,诸位发明人考虑到中间分子为V_H区段和/或V_L区段提供了多个结合位点,使得可以经由载体蛋白上的单个结合位点携带多个靶标识别结构域。合适的中间分子可以包括不会对原初组织产生任何显著毒性的任何蛋白、糖脂、有机分子或无机分子。例如,合适的中间分子可以包括纳米颗粒(例如,量子点、金纳米颗粒、磁性纳米颗粒、纳米管、聚合物纳米颗粒、树枝状聚合物等)或珠粒(例如,聚苯乙烯珠粒、乳胶珠粒、dynabead等)。优选地,纳米颗粒和/或珠粒的尺寸低于1μm,优选低于100nm。纳米颗粒可以与疏水尾交联或被疏水尾部分包被,该疏水尾为载体蛋白(例如,白蛋白)提供锚。一个或多个V_H区段和/或V_L区段也可以与纳米颗粒交联或部分包被在纳米颗粒上(例如,经由连接至靶标识别结构域的额外尾部结构域进行交联等)。

[0035] 在另一个实例中,合适的中间分子可包括与针对载体蛋白的抗体偶联的珠粒(例如,聚苯乙烯珠粒、乳胶珠粒、dynabead等)。因此,在载体蛋白是白蛋白的情况下,珠粒可以与α-白蛋白抗体偶联(例如,交联、包被等),使得珠粒可以高亲和力和特异性与载体蛋白结合。一个或多个V_H区段和/或V_L区段也可以与珠粒交联或部分包被在珠粒上(例如,经由连接至靶标识别结构域的额外尾部结构域进行交联,硫醇介导的交联等)。

[0036] 在一些实施例中,scFv肽可以形成包含或模拟ALT-803(IL-15超激动剂复合物,参见例如,Blood[血液]2015 126:1957)或TxM(基于靶向ALT-803的骨架平台,参见例如,URL altorbioscience.com/our-science/il-15-protein-superagonist-and-scaffold-technology/)结构的重组免疫球蛋白复合物。优选地,诸位发明人考虑到,在免疫球蛋白复合物模拟TxM结构的情况下,scFv肽可以直接地(或经由接头间接地)偶联至一个或多个白细胞介素-15(IL-15)结合基序,和/或IL-15结合基序的一个或多个配体(例如,IL-15、IL-15N72D等)。因此,在重组免疫球蛋白质复合物模拟TxM IgG1结构的情况下,重组免疫球蛋白复合物可包括1-4个针对IL-8的scFv肽。

[0037] 另外,模拟具有一个或多个与IL-15结合基序或其配体偶联的scFv肽的TxM结构的重组免疫球蛋白复合物还可包括针对肿瘤特异性抗原或患者和肿瘤特异性新表位的结合结构域(例如,针对新表位的scFv肽等)。例如,重组免疫球蛋白复合物可包括与两个IL-15结合基序偶联的两个针对IL-8的scFv肽,以及与两个IL-15结合基序配体偶联的两个针对新表位的ScFv肽。优选地,该新表位是患者特异性的和肿瘤特异性的,其通过如US2012/0059670A1和US2012/0066001A1中披露的序列数据的组学分析而鉴定。

[0038] 在一些实施例中,可以使用SEQ ID No.1-15、31-32中编码V_H区段的一个序列来产生scFv、重组抗体或其片段。在其他实施例中,可以使用SEQ ID No.16-30、33-34中编码V_L

区段的一个序列来产生scFv、重组抗体或其片段。在还有其他实施例中,可以使用SEQ ID No.1-15、31-32中编码V_H区段的一个序列以及SEQ ID No.16-30、33-34中编码V_L区段的一个序列来产生scFv、重组抗体或其片段。在这些实施例中,优选地编码V_H区段的序列和编码V_L区段的序列是成对的序列(例如,对于scFv 49-31而言是SEQ ID NO.1和16,对于scFv 49-22而言是SEQ ID NO.2和17,对于scFv 49-7而言是SEQ ID NO.3和18,等等)。然而,考虑到可以通过从SEQ ID No.1-15、31-32中选择一个序列并且从SEQ ID No.16-30、33-34中选择一个序列来产生任一对V_H区段和V_L区段。

[0039]

SEQ ID No.	序列名称	氨基酸序列
1	49-31 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMHWVRQAPGKGLEWVSAIS GGGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLRIFEG RDAGFDVWGQGTLVTVS
2	49-22 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLDMFV PFWPAFDVWGQGTLVTVSS
3	49-7 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIS NSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAENTAVYYCARDLMRW WIDGFDVWGQGTLVTVSS
4	49-32 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIY GNGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLYTIEP REAFDVWGQGTLVTVSS
5	49-34 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLGSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRDTVSI EVGFDVWGQGTLVTVSS
6	49-18 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIS WSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLYAG

[0040]

		YWGFDVWGQGTLVTVSS
7	49-3 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSVIS GSGGSTRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRKFPY VQFFRNGFDVWGQGTLVTVSS
8	43-2 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGKTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDREAPF YTVYVTGFDVWGQGTLVTVSS
9	49-37 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIS YSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLWLG WWGFDVWGQGTLVTVSS
10	43-12 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYLMHWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDREGWF WHSYGFDVWGQGTLVTVSS
11	49-10 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGWLS RLFAGFDVWGQGTLVTVSS
12	49-1 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVSAIS WSGGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLTWW VQAFDVWGQGTLVTVSS
13	49-6 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYAMHWVRQAPGKGLEWVSAID GNGTSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRDTAL ETGFDVWGQGTLVTVSS
14	49-12 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMHWVRQAPGKGLEWVSAIS NSGGSTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLWWL PAFDVWGQGTLVTVSS

[0041]

15	49-25 V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIS WSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLYDG VWGFDVWGQGTLVTVSS
16	49-31 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQDDDVPWTFGQGTKVEIK
17	49-22 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQASDTPLTFGQGTKVEIK
18	49-7 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQSYDIPLTFGQGTKVEIK
19	49-32 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQDYTSPLTFGQGTKVEIK
20	49-34 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQDSAFPLTFGQGTKVEIK
21	49-18 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQDYGYPLTFGQGTKVEIK
22	49-3 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQHTNGPFTFGQGTKVEIK
23	43-2 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQDADTPLTFGQGTKVEIK
24	49-37 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYNTIPYTFGQGTKVEIK
25	43-12 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQVYSGPWTFGQGTKVEIK

[0042]

26	49-10 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQDYGYPLTFGQGTKVEIK
27	49-1 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQVDDSPLTFGQGTKVEIK
28	49-6 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQDNAFPLTFGQGTKVEIK
29	49-12 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQSSGWPFTFGQGTKVEIK
30	49-25 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYSSYPFTFGQGTKVEIK
31	43-12a V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYLMHWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDREGWF WHSYGFDVWGQGTLVTVSS
32	43-12b V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYLMHWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDREGWF WHSYGFDVWGQGTLVTVSS
33	43-12a V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQVYSGPWTFGQGTKVEIK
34	43-12b V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQTYSGPWTFGQGTKVEIK

[0043] 表1

[0044] 诸位发明人还考虑到scFv、重组抗体或其片段可以用编码V_H区段和/或V_L区段的，分别与SEQ ID No.1-15、31-32中的任一个或与SEQ ID No.16-30、33-34中的任一个至少85％相同，优选至少90％相同，更优选至少95％相同的氨基酸序列产生。在这样的实施例中，优选该scFv肽、重组抗体或其片段的结合亲和力是用SEQ ID No.1-15、31-32中的任一个或SEQ ID No.1-15、31-32中的任一个产生的scFv肽、重组抗体或其片段的结合亲和力的不小于60％，优选不小于70％，更优选不小于80％。实际上，并且如下面进一步详细讨论的，诸位发明人使用了选定的scFv(43-12)，并且经由对VH和VL的CDR区中的随机诱变使scFv经受亲和力成熟。值得注意的是，在其他结合剂中，从亲和力成熟过程中分离了两个具有改善的结合特性的scFv(43-12a和43-12b)。

[0045] 最典型地,scFv肽、重组抗体或其片段中的V_H区段和V_L区段经由接头或间隔区偶联,该接头或间隔区通常在5-40个氨基酸之间,优选在10-30个氨基酸之间酸,更优选在20-30个氨基酸之间。在一些实施例中,接头可以偶联V_H区段的N端和V_L区段的C端。在其他实施例中,接头可以偶联V_H区段的N端和V_L区段的C端。诸位发明人考虑到,优选接头的富含甘氨酸的序列(例如,$(G_4S)_n$,n在1-5之间,等等)以在V_H区段和V_L区段之间提供结构柔性。还考虑到接头包括一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基以增加scFv肽、重组抗体或其片段的溶解性。有许多本领域已知的接头和制备scFv的方法,并且所有此类已知方法均被认为适合在本文中使用。

[0046] 另外,scFv肽可包括多个V_H区段和V_L区段以形成二价或多价scFv。在一些实施例中,该多个V_H区段和/或V_L区段可以具有相同的氨基序列(例如,多价scFv具有三个V_H区段和三个V_L区段,并且所有V_H区段均具有49-31V_H(SEQ ID.No.1)且所有V_L区段均具有49-31V_L(SEQ ID.No.16)。在其他实施例中,V_H区段和/或V_L区段中的至少两个可以具有不同的氨基酸序列(例如,多价scFv具有三个V_H区段和三个V_L区段,并且其中两个V_H区段为49-31V_H(SEQ ID.No.1)和其中一个V_H区段为49-22V_H(SEQ ID.No.2),并且其中两个V_L区段为49-31V_L(SEQ ID.No.16)和其中一个V_H区段为49-22V_L(SEQ ID.No.17)。

[0047] 优选地,在25℃至37℃之间的温度下测量以及在5.5-7.5之间的pH范围内测量的,scFv、重组抗体或其片段对IL-8(72-mer和77-mer IL-8中的至少一种)的结合亲和力(Kd)至少小于$1x10^{-7}$ M,优选小于$1x10^{-8}$ M,并且更优选小于$1x10^{-9}$ M。诸位发明人考虑到,即使使用相同氨基酸序列的V_H区段和/或V_L区段产生scFv、重组抗体或其片段,由于结构差异,scFv、重组抗体或其片段对IL-8的结合亲和力也可能不同。例如,表2提供了几种克隆物的scFv和重组抗体(IgG1)的不同亲和力(以KD值测量)。克隆物49-31是使用编码V_H区段(SEQ ID No.1)和V_L区段(SEQ ID No.16)的氨基酸序列产生的scFv或重组抗体(IgG1),克隆物43-2是使用编码V_H区段(SEQ ID No.8)和V_L区段(SEQ ID No.23)的氨基酸序列产生的scFv或重组抗体(IgG1),并且克隆物43-12是使用编码V_H区段(SEQ ID No.10)和V_L区段(SEQ ID No.25)的氨基酸序列产生的scFv或重组抗体(IgG1)。通过表面等离子体共振测量来测定初步K_D值,并示出最高值和最低值以估计对IL-8的亲和力范围。表2中所有Kd值的单位都是10^{-9}M。

[0048]

克隆物	scFv	IgG1(25°C, pH 7.4)	IgG1 (25°C, pH 6.0	IgG1 (37°C, pH 7.4)
49-31	0.009-0.048	0.009-0.25	0.21-0.22	0.117
43-2	1.41	0.79	0.30-0.96	0.72-0.89
43-12	1.50	0.43-0.78	3.46-6.7	0.31

[0049] 表2

[0050] 表3提供了具有如表1所示序列的分子的进一步示例性数据。这里,使用所示序列制备scFv和相应的人源化IgG_1,并且使用SPR以固定化IL-8作为芯片表面上的分析物来测定KD。所有值均表示为所示温度下的nM值。

[0051]

克隆物	scFv(25℃)	IgG1(25℃)	IgG(37℃)
49-31	0.009-0.048	0.099-0.25	0.12
49-22	0.11-0.114		

49-7	0.087-0.17		
49-32	0.21-0.24	0.77-0.87	0.33-0.36
49-34	0.44-0.62		
49-18	0.41-0.89		
49-3	1.26	2.14	9.19
43-2	1.41	0.79	0.72-0.89
49-37	1.12-1.46		
43-12	1.50	0.43-0.78	0.31
49-10	1.65	2.21	3.45
49-1	2.66		
49-6	4.8		
49-12	10.1		
49-25	25.0		

[0052] 表3

[0053] 进一步考虑到scFv肽(或抗体或其片段的V_H区段和V_L区段)可以由单个重组核酸编码。在该实施例中,重组核酸包括至少两个核酸区段:编码V_H区段的第一核酸区段(序列元件)和编码V_L区段的第二核酸区段。优选将第一核酸区段选择为编码SEQ ID.No 1-15、31-32中的至少一个氨基酸序列,并且将第二核酸区段选择为编码SEQ ID.No 16-30、33-34中的至少一个氨基酸序列。然而,还考虑到第一核酸区段和第二核酸区段分别编码与SEQ ID No.1-15、31-32中的任一个或与SEQ ID No.16-30、33-34中的任一个至少85%相同,优选至少90%相同,更优选至少95%相同的V_H区段和V_L区段。最优选地,该两个核酸区段在同一阅读框中,使得两个核酸区段可以翻译成具有两个肽区段的单个蛋白。

[0054] 另外,重组核酸可第一核酸区段和第二核酸区段之间包含编码接头肽(优选富G肽或其他柔性接头肽)的第三核酸区段,该区段通常在5-40个氨基酸之间,优选在10-30个氨基酸之间,更优选在20-30个氨基酸之间。在该实施例中,特别优选该三个核酸区段在同一阅读框中,使得三个核酸区段可以翻译成具有三个肽区段的单个蛋白。

[0055] 在一些实施例中,重组核酸可以包括多组第一核酸区段和第二核酸区段,其中每一组包括第一核酸区段和第二核酸区段各一个。在这些实施例中,重组核酸优选包括位于每组第一核酸区段和第二核酸区段之间的编码连接肽的第四核酸区段。因此,一个示例性的重组核酸可以包括[第一组]-编码连接肽的第四核酸-[第二组]-编码连接肽的第四核酸-[第三组],其中第一组、第二组和第三组中的每一个均包括[编码V_H区段的第一核酸-编码接头的第三核酸-编码V_L区段的第二核酸],其中第一核酸和第二核酸的位置可以彼此交替。连接肽的序列可以根据单个肽中的组数而改变。优选地,连接肽可以在5-50个氨基酸之间,优选在10-40个氨基酸之间,更优选在20-30个氨基酸之间。诸位发明人还考虑到,优选富含甘氨酸的序列(例如,G_4S等),以在V_H和V_L区段组之间提供连接肽的柔性。

[0056] 诸位发明人进一步考虑到,scFv肽、抗体或其片段可被配制成药物组合物,以便可以将其施用给患有肿瘤的患者以减少或抑制IL-8的内源性作用。因此,考虑到可以对治疗配制品而言每剂量单位至少1ml,优选至少5ml,更优选至少20ml的量,将scFv肽、抗体或其片段配制在任何药学上可接受的载体中(例如,配制成无菌注射组合物)。然而,替代性配制

品也被认为适用于本文,并且本文考虑了所有已知的施用途径和方式。如本文所用,术语“施用”是指本文所考虑到的化合物和组合物的直接和间接施用,其中直接施用通常由医疗保健专业人员(例如,医师、护士等)进行,而间接施用通常包括提供或制备医疗保健专业人员可用的化合物和组合物以便直接施用的步骤。

[0057] 在一些实施例中,经由全身注射施用药物配制品,该全身注射包括皮下、真皮下注射或静脉内注射。在其他实施例中,在全身注射可能无效时(例如,对于脑肿瘤等),考虑经由肿瘤内注射来施用配制品。

[0058] 包括含上述V_H和V_L区段的scFv肽、抗体或其片段的药物组合物的一种示例性方法和用途是降低靶组织中IL-8介导的作用。如本文所用,IL-8介导的作用是指因组织中或组织微环境中IL-8的存在直接或间接诱导的任何生物学后果。因此,IL-8作用可来源于组织中的肿瘤细胞和/或非肿瘤细胞(例如,免疫活性细胞诸如淋巴细胞等)释放(或分泌)的或组织外部(例如,肿瘤附近的健康组织等)的以及在任何给定时间存在于肿瘤微环境中的IL-8。

[0059] 在特别考虑的实施例中,诸位发明人考虑到特别是在患者的肿瘤微环境中,IL-8介导的作用包括但不限于:触发细胞移行,触发肿瘤的上皮-间质转化,触发肿瘤转移,增加肿瘤微环境中的免疫抑制,刺激MDSC发展,以及触发肿瘤微环境中Th2偏向的免疫反应。因此,不希望受特定理论所束缚,诸位发明人考虑到通过捕集游离IL-8(未与IL-8受体结合的IL-8)来减少来自肿瘤微环境的IL-8的量会降低IL-8对肿瘤细胞的作用或甚至逆转IL-8对肿瘤细胞的作用:减少肿瘤的上皮-间充质转化,减少或预防肿瘤转移,减少Th2偏向的免疫反应或重新平衡Th1和Th2介导的免疫反应,以及减少或预防肿瘤微环境中的免疫抑制。特别是,相对于相应的健康组织,在特定类型的癌症(例如,胰腺癌、三阴性乳腺癌、成胶质细胞瘤等)中,显示IL-8表达过度或异常增加(或积聚)时,预期结合或截留IL-8可以更有效地改变那些类型的癌症的预后。

[0060] 关于向患者施用药物组合物的剂量和方案,考虑剂量和/或方案可以根据肽的类型(例如,scFv、抗体、抗体片段、那些中的任何两种的组合、全部的组合等)、疾病的类型和预后(例如,肿瘤类型、大小、位置)、患者的健康状况(例如,包括年龄、性别等)改变。虽然可以改变,但是可以选择和调整剂量和方案,使得配制品不会对宿主正常细胞产生任何显著的毒性作用,但足以在少于3小时、6小时、12小时、24小时、72小时或一周内使肿瘤微环境中的IL-8作用降低至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,最优选至少50%。

[0061] 在一些实施例中,IL-8的作用和IL-8作用的降低可以通过组织中游离IL-8(72-mer或77-mer)的量来测量。在这些实施例中,通常调节施用条件以使72-mer或77-mer游离IL-8中至少一种的量或浓度在施用药物组合物后少于3小时、6小时、12小时、24小时、72小时或一周内降低至少30%,更优选至少40%,最优选至少50%。在其他实施例中,IL-8的作用和IL-8作用的降低可通过体外或体内测量生物活性来测量。例如,可以通过IL-8的体外细胞迁移测定来确定用于减少肿瘤细胞迁移或转移的剂量和治疗方案。在该实施例中,通常调整施用条件以在用药物组合物(或不含药学上可接受的载体的scFv、抗体或其片段)治疗后1小时、3小时、6小时、12小时内,使从原始位置迁移的细胞数量减少或使迁移细胞的迁移距离减小至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,最优选至少50%。对于其他实例,可以通过测量肿瘤中髓源性抑制细胞的积聚或存在来确定用于减少髓源性抑制细胞的免疫

抑制的剂量和治疗方案。因此,在该实施例中,通常调节施用条件以在施用药物组合物后3小时、6小时、12小时、24小时、72小时或一周内使髓源性抑制细胞的数量(整个肿瘤组织中或每cm^2肿瘤组织中)减少至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,最优选至少50%。

[0062] 在还有其他实施例中,可以经由测量局部细胞因子分子的量或浓度来测量IL-8的作用和IL-8作用的降低。例如,可以通过测量肿瘤微环境中IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-19和IL-13中的至少一种的量或浓度来确定用于减少Th-2介导的免疫反应的剂量和治疗方案。因此,在该实施例中,通常调节施用条件以在施用药物组合物后3小时、6小时、12小时、24小时、72小时或一周内使IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-19和IL-13中的至少一种的量或浓度降低至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,最优选至少50%。

[0063] 在还有其他实施例中,IL-8的作用和IL-8作用的降低可经由测量一种或多种细胞标志物的体外或体内表达水平来测量。例如,可以通过测量肿瘤细胞中E-钙粘蛋白上皮标志物和N-钙粘蛋白间质标志物的表达来确定用于减少肿瘤细胞上皮-间质转化的剂量和治疗方案。因此,通常调节施用条件以在施用药物组合物后3小时、6小时、12小时、24小时、72小时或一周内使N-钙粘蛋白间质标志物的表达水平降低至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,最优选至少50%,或在施用药物组合物后3小时、6小时、12小时、24小时、72小时或一周内使E-钙粘蛋白上皮标志物的表达水平(仅与IL-8治疗相比)提高至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,最优选至少50%。还考虑到肿瘤细胞中N-钙粘蛋白和E-钙粘蛋白表达的比率也可以是IL-8作用和IL-8作用降低的指标。在该实施例中,通常调节施用条件以在施用药物组合物后3小时、6小时、12小时、24小时、72小时或一周内使E-钙粘蛋白:N-钙粘蛋白表达水平的比率提高至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,最优选至少50%。

[0064] 从不同的角度看,体内IL-8介导的作用的降低也可以通过生理现象进行观察。例如,可以通过肿瘤细胞EMT(上皮-间质转化)的减少或消除以及相关信号传导途径的减少而观察到降低的IL-8浓度。类似地,正如可以通过适当的干细胞标志物容易地观察到的,患者体内且尤其是肿瘤微环境中降低的IL-8浓度将使肿瘤细胞的干性降低。在IL-8降低的其他生理效应中,通常会降低MDSC的发育,以及肿瘤内T细胞中Th2偏向的免疫反应(从而使Th1/Th2平衡转向Th1型反应)。

[0065] 另外,诸位发明人考虑到,通过共同施用一种或多种癌症药剂,可以加强针对IL-8的scFv、抗体或其片段减少特定癌症类型中肿瘤细胞的上皮-间质转化的作用。癌症药剂包括但不限于氟维司群(Fulvestrant)、阿多柔比星(Aldoxorubicin)、多西他赛(Docetaxel)、肿瘤坏死治疗剂(例如^{131}I-chTNT-3等)、阿维单抗(Avelumab)(阻断PD-L1与其受体之间的相互作用的人单克隆IgG_1抗体)、Brachyury靶向疫苗(例如,ETBX-051(Ad5[E1-、E2b-]-Brachyury))、Her2靶向疫苗(例如,ETBX-021等)、MUC-1靶向疫苗(例如,ETBX-061(Ad5[E1-、E2b-]-MUC1)和酵母疫苗(例如GI-4000(GI-4014、GI-4015、GI-4016、GI-4020)、GI-6207、GI-6301)。这些癌症药剂的详情在PCT/US17/40297中有描述,其作为参考整体并入本文。

[0066] 在一些实施例中,诸位发明人考虑到scFv、抗体或其片段针对IL-8的作用可以通过一种或多种检查点抑制剂的共同施用而加强。关于干扰或下调检查点抑制的蛋白,考虑到与检查点受体结合的任何合适的肽配体。最典型地,结合将抑制或至少减少经由受体的信号传导,并且特别考虑的受体包括CTLA-4(尤其是针对$CD8^+$细胞)、PD-1(尤其是针对$CD4^+$

细胞)、TIM1受体、2B4和CD160。例如,合适的肽结合剂可包括特异性结合受体的抗体片段以及尤其是scFv,还有小分子肽配体(例如,经由RNA展示或噬菌体淘选分离)。再次,应当理解,肽分子的表达将优选地是协同的,使得新表位或多表位与一种或多种肽配体同时表达。因此,典型地预期,例如,使用内部核糖体进入位点或2A序列,从单个转录物(可以包括或可以不包括编码多表位的序列部分)或从多个转录物产生肽配体。

[0067] 在其他实施例中,诸位发明人考虑可以共同施用一种或多种免疫刺激细胞因子来调节scFv、抗体或其片段针对IL-8的作用。例如,可以基于所需的免疫反应或CD4+T细胞/原初Th细胞极化的方向来选择免疫刺激细胞因子。例如,在需要从原初CD4+T细胞极化Treg细胞的实施例中,可以将免疫刺激细胞因子选择为包括IL-2和TGF-β。在需要从原初CD4+T细胞极化Th17细胞的另一个实施例中,可以将免疫刺激细胞因子选择为包括IL-6和TGF-β。同样,用于Th1细胞极化的免疫刺激细胞因子可以包括IL-12和IFN-γ,并且用于Th2细胞极化的免疫刺激细胞因子可以包括IL-4。另外,用于Tfh细胞(卵泡辅助T细胞)极化的免疫刺激细胞因子可以包括IL-6和IL-12,而用于CD4+细胞毒性T细胞极化的免疫刺激细胞因子可以包括IL-2。

[0068] 诸位发明人进一步考虑到,针对IL-8的scFv、抗体或其片段可以与活化或经修饰的免疫细胞一起共同治理(或共同施用给)癌症患者,这些免疫细胞可以通过降低肿瘤微环境中肿瘤细胞或髓源性抑制细胞的免疫抑制为针对IL-8的scFv、抗体或其片段提供更好的进入肿瘤微环境的入口,使得针对IL-8的scFv、抗体或其片段的作用可以最大化。例如,活化或经修饰的免疫细胞可以包括表达嵌合蛋白或T细胞受体复合物的原初NKT细胞或经遗传修饰的NKT细胞,以诱导NKT细胞免疫反应,和/或改变肿瘤微环境(例如,通过抑制髓源性抑制细胞的活性)。优选地,经遗传修饰的NKT细胞的嵌合蛋白或T细胞受体结合肿瘤(新)表位、肿瘤相关抗原或肿瘤细胞上呈递的自身脂质。再例如,经修饰的免疫细胞可以包括经遗传修饰为优选在其细胞表面上表达CD40L和Fas-L中的至少一种的NKT细胞。经遗传修饰的和/或原初、活化的NKT细胞减少癌症微环境中的免疫抑制的详情在国际申请号PCT/US18/53506(及其相应公开的美国国家阶段申请)中有描述,该申请整体并入本文。同样,活化或经修饰的免疫细胞可以包括表达嵌合蛋白或T细胞受体复合物的原初T细胞或经遗传修饰的T细胞,以诱导T细胞免疫反应,和/或改变肿瘤微环境(例如,通过抑制髓源性抑制细胞的活性)。优选地,经遗传修饰的NKT细胞的嵌合蛋白或T细胞受体结合肿瘤(新)表位、肿瘤相关抗原或肿瘤细胞上呈递的自身脂质。

[0069] 又例如,活化或经修饰的免疫细胞可以包括表达杀伤细胞活化受体(KAR)的经遗传修饰的NK细胞,杀伤细胞活化受体靶向可溶性NK细胞受体配体(例如,NKG2D、Nkp-30、Nkp-44、Nkp-46等),通过充当NK细胞受体的诱饵配体来阻止有效的NK细胞活性。具有KAR的经遗传修饰的NK细胞的详情在美国批准的申请号62/569503中有描述,该申请整体并入本文。

[0070] 在一些实施例中,可以将一种或多种上述癌症药剂、免疫刺激细胞因子、检查点抑制剂和/或原初或经遗传修饰的NK细胞或NKT细胞与针对IL-8的scFv、抗体或其片段一起配制在同一药物组合物中。在其他实施例中,可以将癌症药剂配制在单独的药物组合物中,该药物组合物可以与scFv、抗体或其片段的药物组合物一起提供,或者在向患者施用scFv、抗体或其片段的药物组合物之前施用。

[0071] 因此,应当理解,本文提出的IL-8结合分子可以形成包括施用本文提出的IL-8结合分子的治疗方案。例如,考虑可以以精心策划的方式进行对癌症患者(例如,胰腺癌、三阴性乳腺癌、成胶质细胞瘤)的治疗,其中施用第一药物(例如,氟维司群)将EMT逆转为MET(间质-上皮转化),并且其中施用第二药物(例如,阿多柔比星)以特异性靶向肿瘤缺氧微环境。认为这样的治疗方案可减少免疫抑制环境并增加肿瘤细胞中的细胞应激,从而导致肿瘤细胞对免疫系统的免疫原性增加。而且,治疗还可包括靶向肿瘤坏死的抗体,这些抗体将会"标记"坏死肿瘤细胞,从而增加对NK细胞和/或细胞毒性T细胞攻击的敏感性。如上所述,共同施用本文提出的IL-8结合分子以进一步抑制IL-8介导的免疫抑制作用。另外,在如上所述降低免疫抑制条件时,然后患者可以接受通常使用表达brachyury、肿瘤或癌症相关抗原和/或患者和肿瘤特异性新抗原中的一种或多种的重组疫苗进行的免疫疗法。因此,癌症治疗将包括以下的至少两种(或至少三种或至少四种):如本文所提出的靶向肿瘤坏死的药物、靶向肿瘤缺氧微环境的药物、将EMT逆转为MET的药物、疫苗组分(重组病毒、酵母和/或细菌)和IL-8结合分子。

[0072] 实例

[0073] 诸位发明人使用编码V_H区段的SEQ ID No.10(43-12V_H)和编码V_L区段的SEQ ID No.25(43-12V_L)的核酸序列产生了scFv分子(43-12),并测定了与IL-8(72-mer和77-mer)的结合亲和力以及与IL-8的其他直系同源物或旁系同源物的交叉反应性。如图1A所示,43-12scFv分子对IL-8的72-mer和77-mer都表现出很强的亲和力(KD为385pM和440pM),而与旁系同源物(hCXCL1、hCXCL2、hCXCL7)或直系同源物(mCXCL1)的交叉反应性极低(如果有的话)。

[0074] 诸位发明人还使用编码V_H区段的SEQ ID No.1(49-31V_H)和编码V_L区段的SEQ ID No.16(49-31V_L)的核酸序列产生了scFv分子(49-31),并测定了与IL-8(72-mer和77-mer)的结合亲和力以及与IL-8的其他直系同源物或旁系同源物的交叉反应性。如图1B所示,49-31scFv分子对IL-8的72-mer和77-mer都表现出很强的亲和力(KD为147pM和120pM),而与旁系同源物(hCXCL1、hCXCL2、hCXCL7)或直系同源物(mCXCL1)的交叉反应性极低(如果有的话)。

[0075] 接下来,诸位发明人测试了这样产生的scFv分子(43-2、43-12、49-31等,全部也列于表3中)以确定其对IL-8的中和作用。在一组示例性实验中,从血液中分离出原代人中性粒细胞,以评估scFv分子(此处为:43-2、43-12、49-31)中和IL-8介导的中性粒细胞趋化性的能力。如左图所示,在3mM孔径的transwell板中,将1nM重组人IL-8与滴定抗体一起孵育,并将50,000个钙黄绿素-AM标记的中性粒细胞添加到上部腔室中,保持1.5和3小时。通过测定底部腔室中的总荧光并针对仅有空白培养基的孔减去背景来评估中性粒细胞的移行。图2中的图A-D示出了表示单独的IL-8(图2A、图2C)以及IL-8和一种scFv分子(43-2、43-12、49-31)处理1.5小时(图2B)或3小时(图2D)时体外中性粒细胞迁移的图。如图2B和2D所示,所有scFv分子(43-2、43-12、49-31)均可以小于1uM的浓度在1.5小时和3小时内使中性粒细胞的移行减少30-70%,表明所有scFv分子(43-2、43-12、49-31)通过将游离IL-8截留在血清(或培养基)中来有效减轻IL-8的作用。

[0076] 图3示出了指示在单独的IL-8(CTRL)以及IL-8和1nM浓度的一种scFv分子(43-2、43-12)处理时中性粒细胞移性的图。两种scFv分子(43-2、43-12)都可以完全逆转IL-8的作

用,使得用scFv分子(43-2、43-12)处理的中性粒细胞迁移水平与单独的培养基相似或几乎相同,而单独的IL-8处理与单独的培养基相比,可以使中性粒细胞迁移增加近三倍。

[0077] 在另一组实验中,诸位发明人使用了一种先前鉴定的IL-8结合物(此处为:43-12,表1中的序列)的亲和力成熟(此处为:VH和VL链中CDR区的随机诱变和mRNA展示选择),并使用两种不同的pH条件(pH 7.4和pH 6.0)对选定的突变体形式进行SPR分析。从图4A-C中的结果可以看出(图4A描绘了亲本scFv 43-12的结果),两种衍生突变体形式均具有比亲本scFv改善的结合。具体地说,图4B示出了43-12a(表1中所示的序列)的示例性结果并且图4C示出了43-12b(表1中所示的序列)的示例性结果。

[0078] 对于本领域技术人员应当清楚的是,在不脱离本文的发明构思的情况下,除了已经描述的那些之外的更多修改是可能的。因此,除了在所附权利要求的范围中之外,本发明主题不受限制。此外,在解释说明书和权利要求书时,所有术语应当以与上下文一致的尽可能广泛的方式解释。特别地,术语“包括”和“包含”应被解释为以非排他性方式指代要素、组分或步骤,从而指示所提及的要素、组分或步骤可以与未明确提及的其他要素、组分或步骤一起存在、或使用、或组合。如本文的说明书和贯穿随后的整个权利要求中所使用,“一个”、“一种”以及“该”的含义包括复数参照物,除非上下文清楚地另外指明。而且,如本文的说明书中所使用,“在……中”的含义包括“在……中”和“在……上”,除非上下文另有明确说明。在说明书权利要求涉及选自由A、B、C……和N组成的组中的至少一种的情况下,该文字应被解释为只需要该组中的一个元素,而不是A加N、或B加N等。

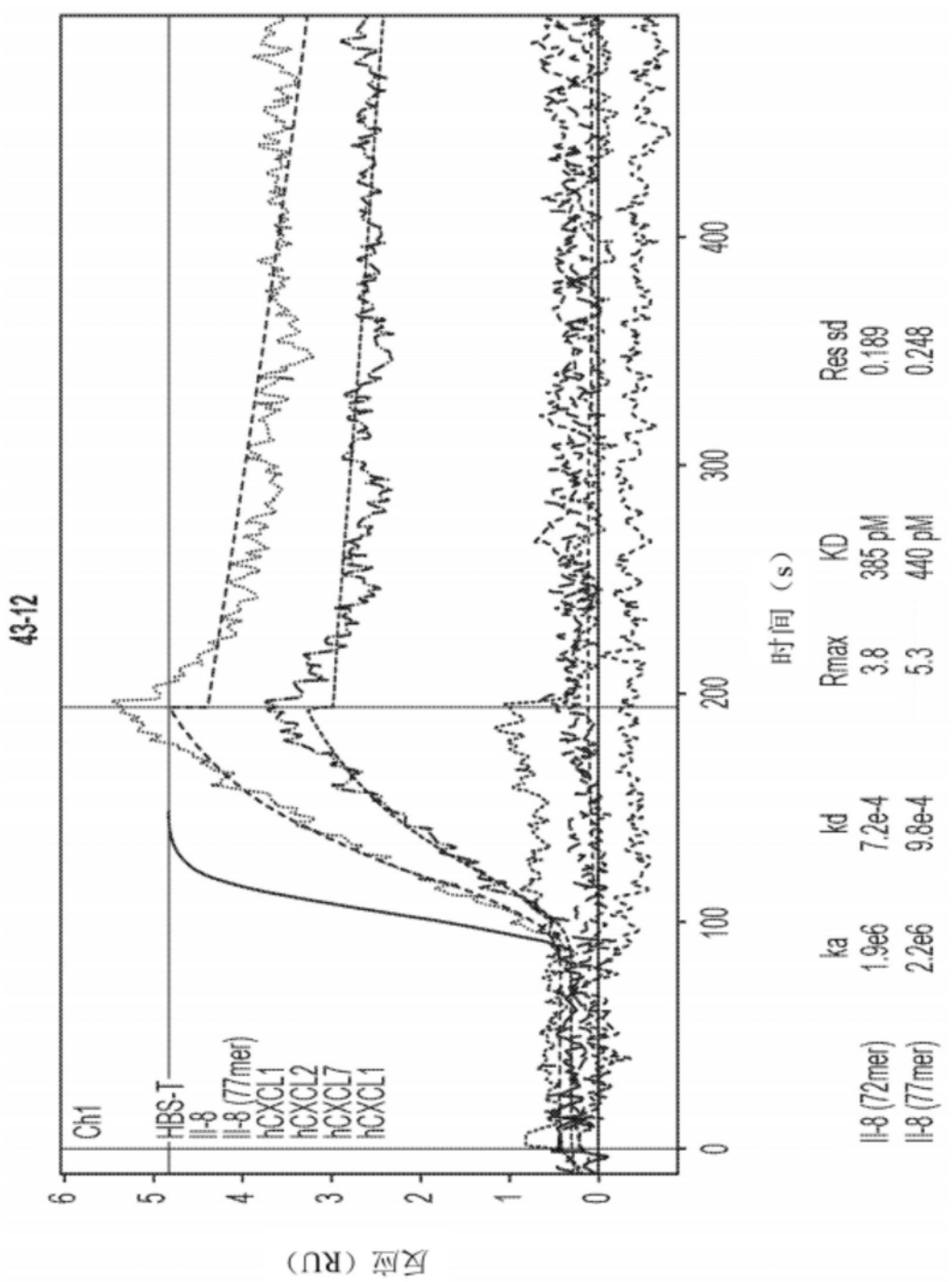

43-12
Ch1
HBS-T
II-8
II-8 (77mer)
hCXCL1
hCXCL2
hCXCL7
hCXCL1
反应（RU）
时间（s）
ka kd Rmax KD Res sd
II-8 (72mer) 1.9e6 7.2e-4 3.8 385 pM 0.189
II-8 (77mer) 2.2e6 9.8e-4 5.3 440 pM 0.248

图1A

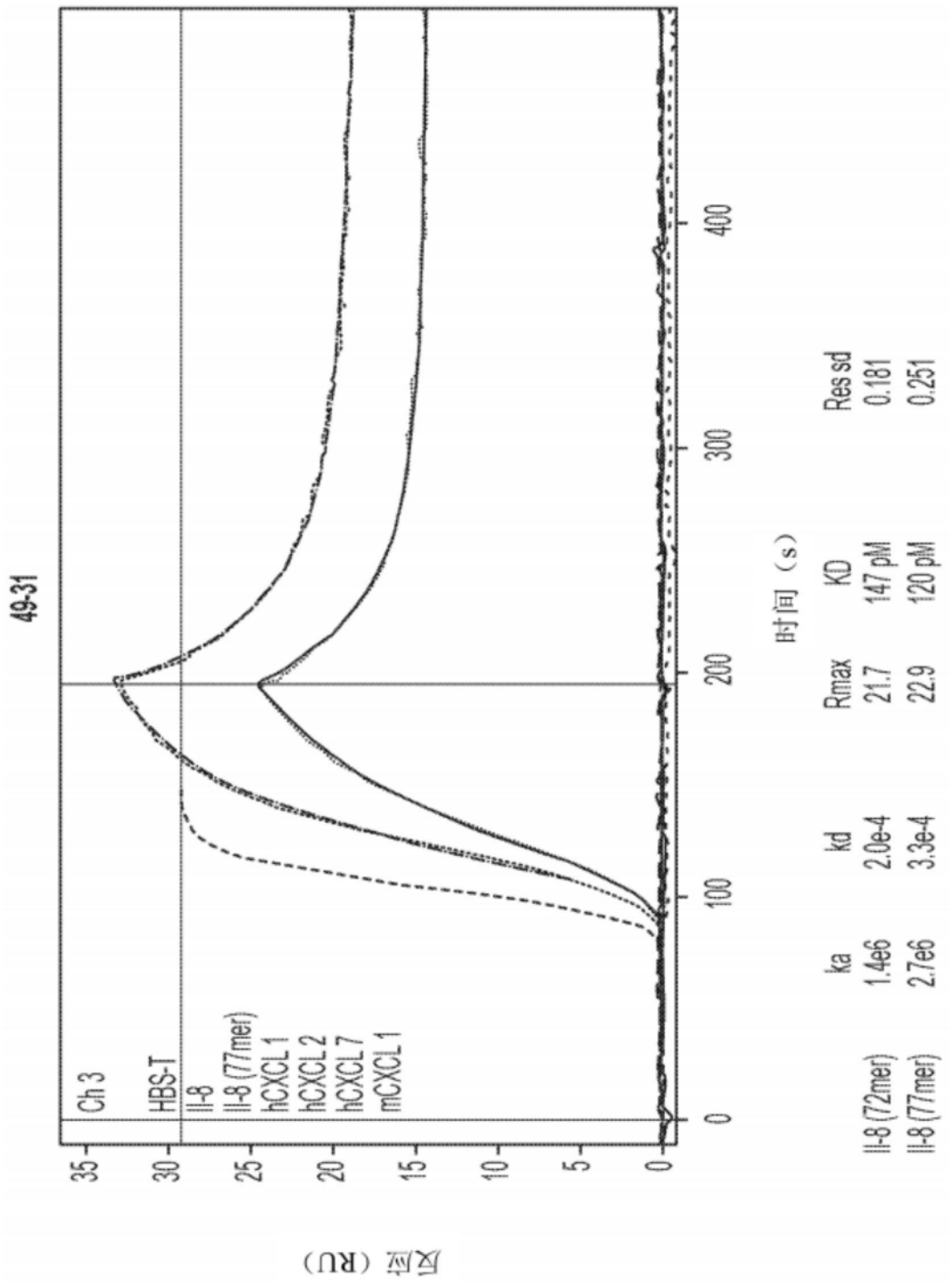

49-31
Ch 3
HBS-T
Il-8
Il-8 (77mer)
hCXCL 1
hCXCL 2
hCXCL 7
mCXCL 1
反应（RU）
时间（s）
ka kd Rmax KD Res sd
Il-8 (72mer) 1.4e6 2.0e-4 21.7 147 pM 0.181
Il-8 (77mer) 2.7e6 3.3e-4 22.9 120 pM 0.251

图1B

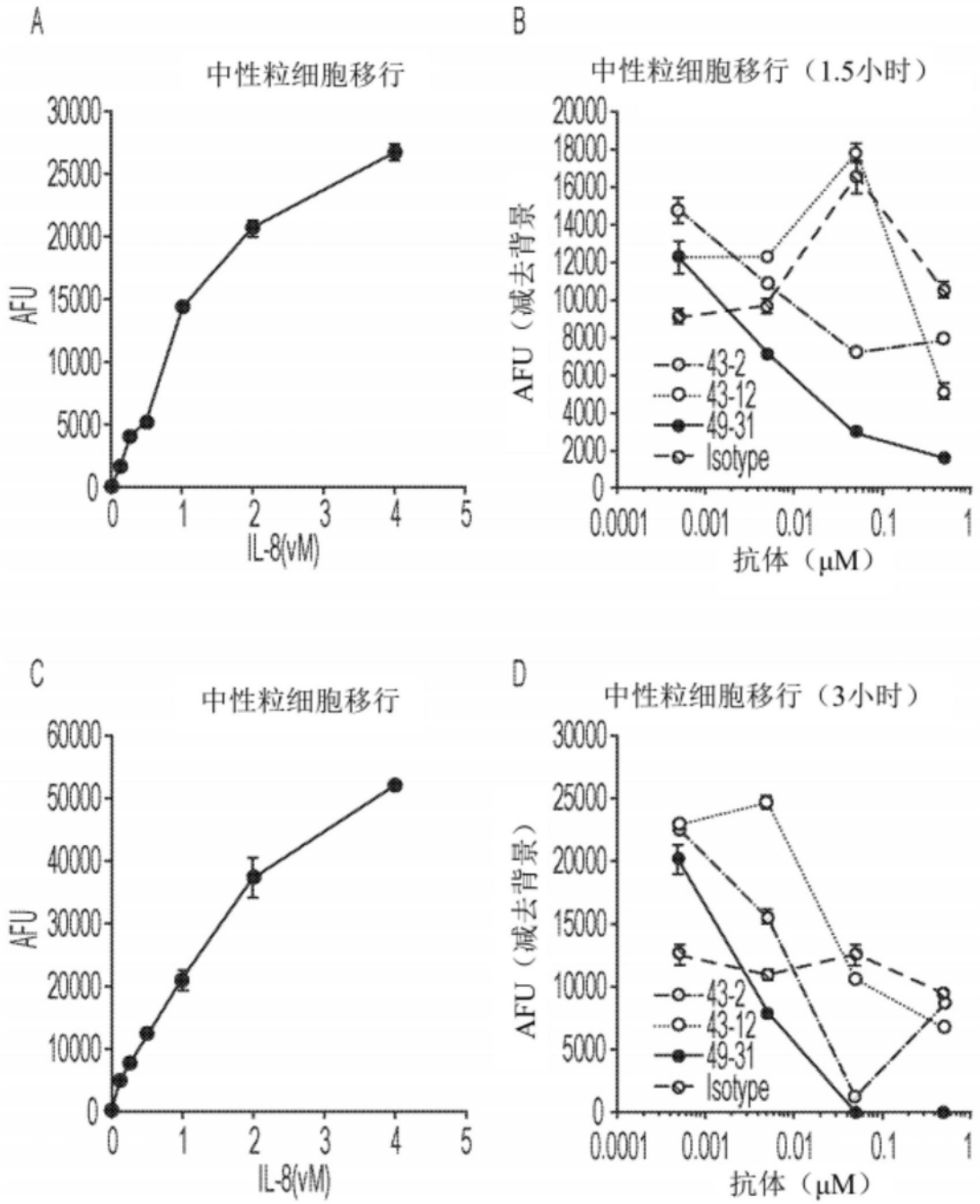

A
中性粒细胞移行
AFU
IL-8(vM)
B
中性粒细胞移行（1.5小时）
AFU（减去背景）
抗体（μM）
43-2
43-12
49-31
Isotype
C
中性粒细胞移行
AFU
IL-8(vM)
D
中性粒细胞移行（3小时）
AFU（减去背景）
抗体（μM）
43-2
43-12
49-31
Isotype

图2

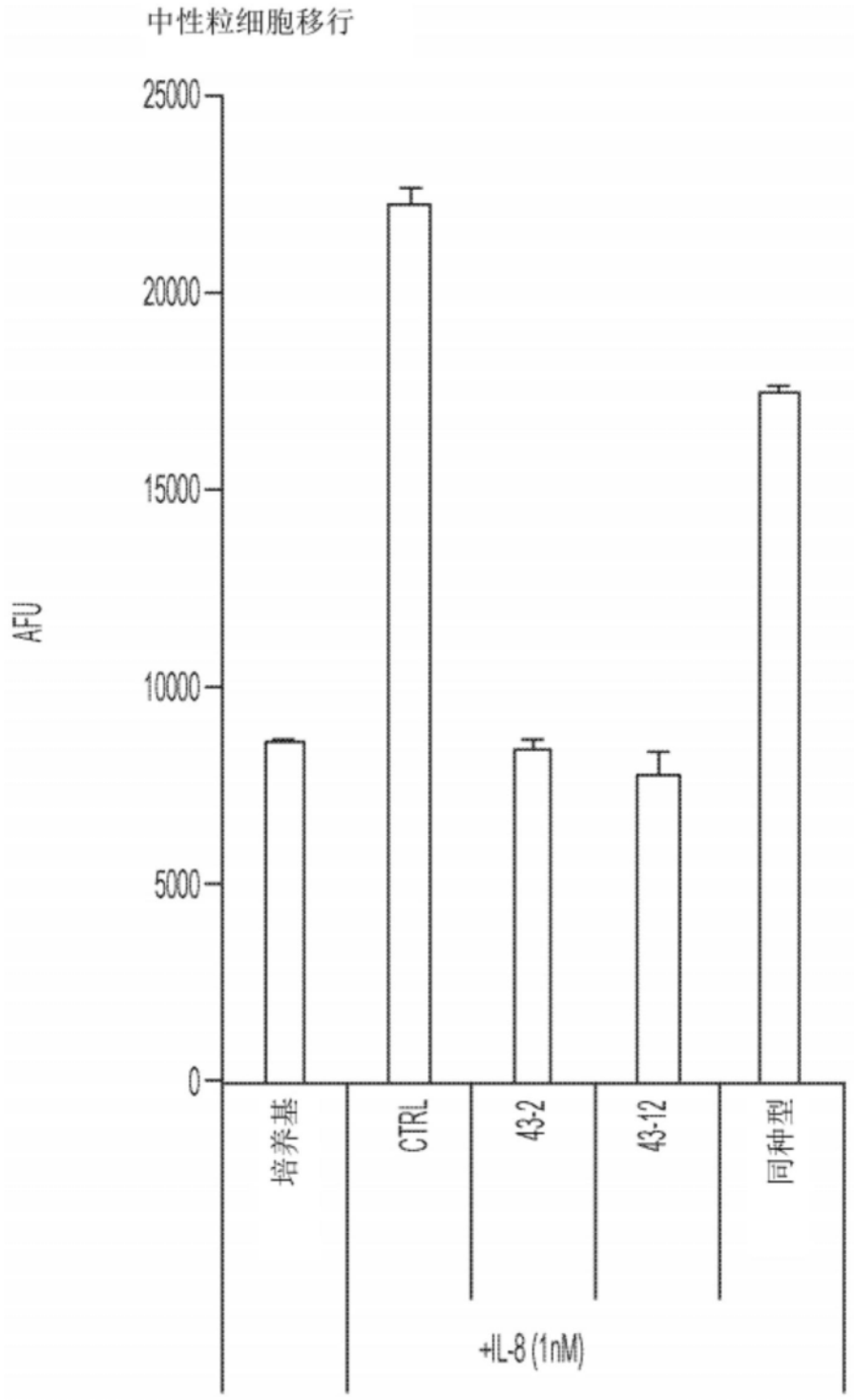

中性粒细胞移行
25000
20000
15000
10000
5000
0
AFU
培养基
CTRL
43-2
43-12
同种型
±IL-8 (1nM)

图3

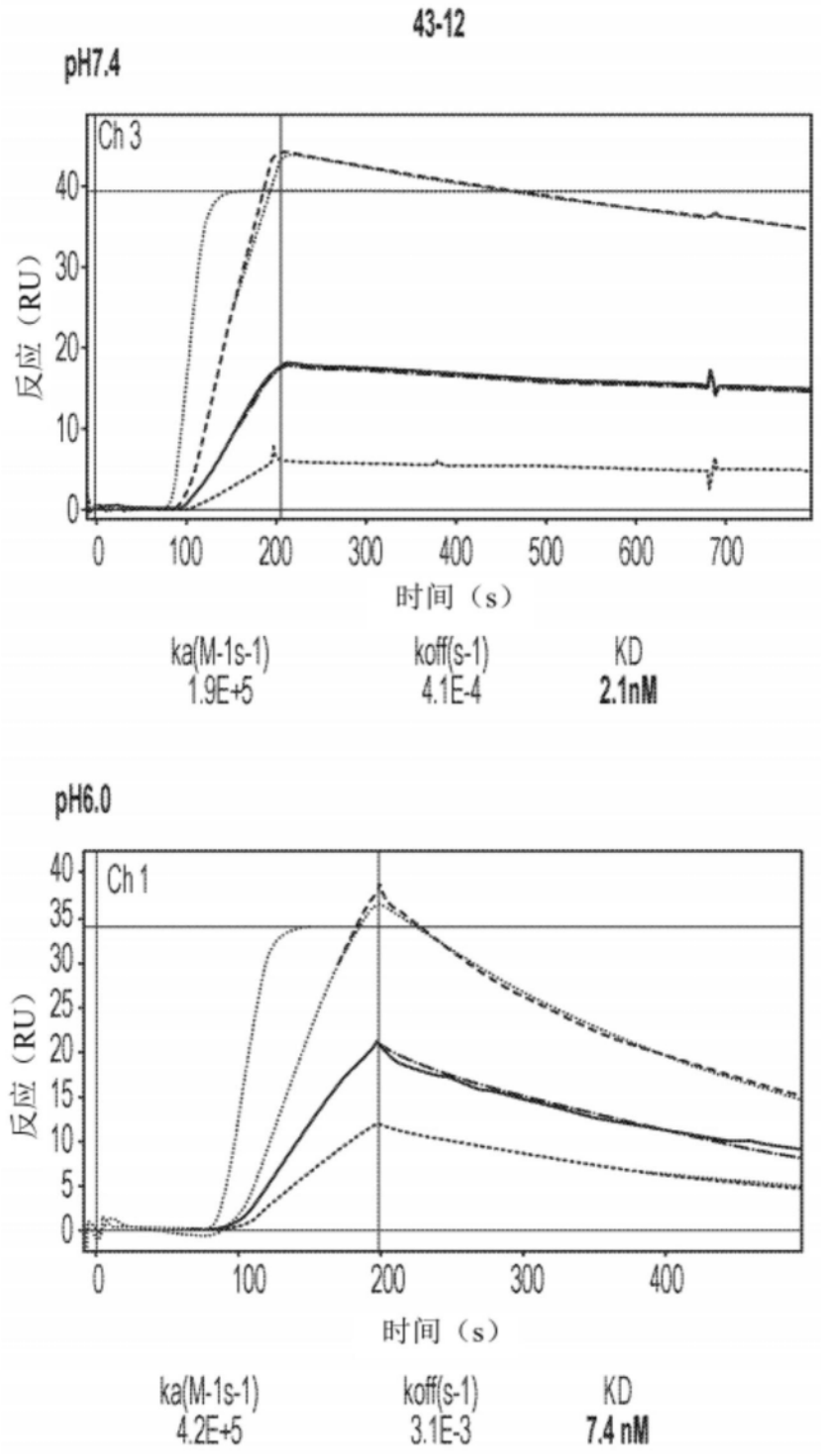

43-12
pH7.4
Ch 3
反应（RU）
时间（s）
ka(M-1s-1)
1.9E+5
koff(s-1)
4.1E-4
KD
2.1nM
pH6.0
Ch 1
反应（RU）
时间（s）
ka(M-1s-1)
4.2E+5
koff(s-1)
3.1E-3
KD
7.4 nM

图4A

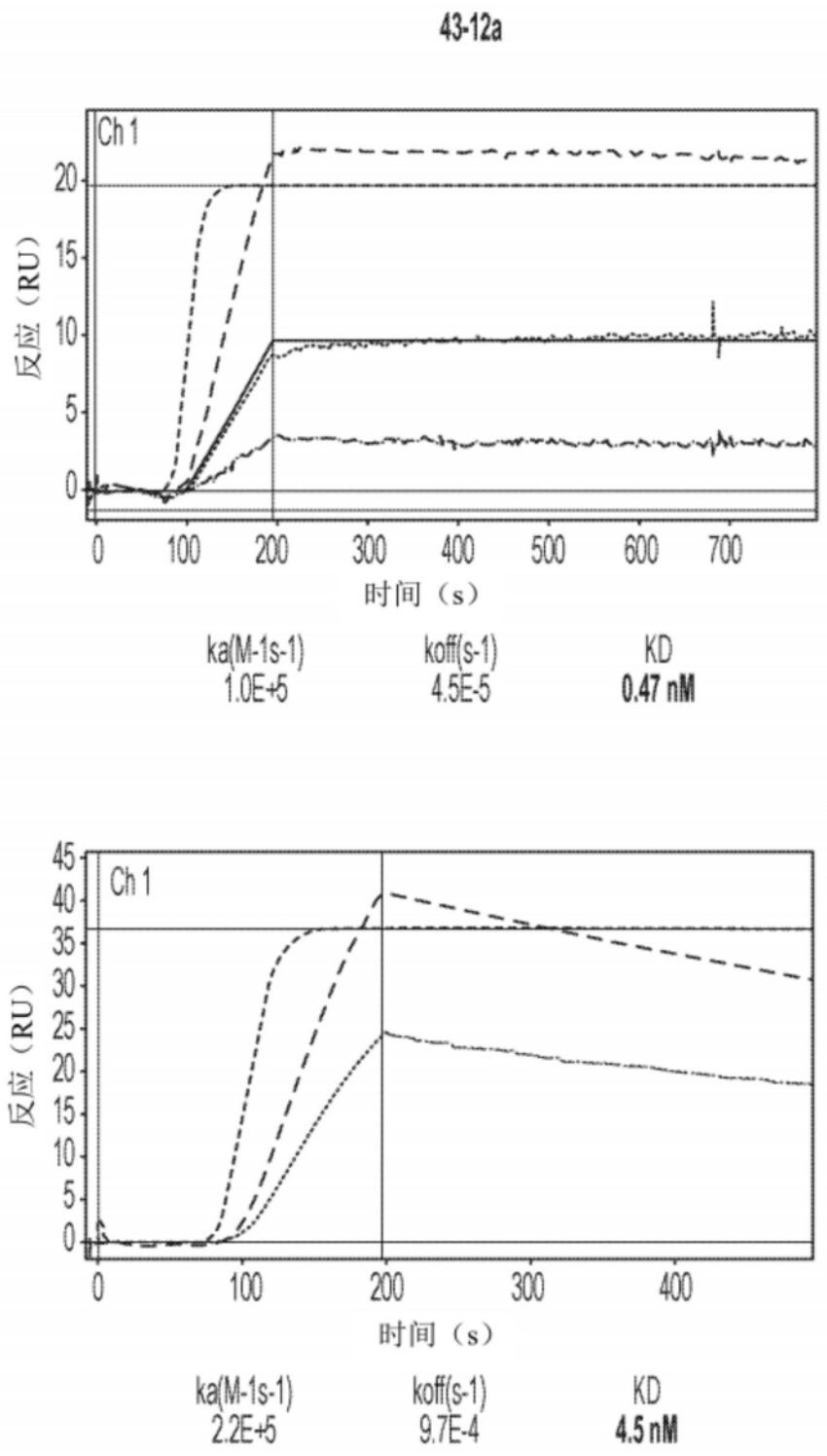

43-12a
Ch 1
反应（RU）
时间（s）
ka(M-1s-1)
1.0E+5
koff(s-1)
4.5E-5
KD
0.47 nM
Ch 1
反应（RU）
时间（s）
ka(M-1s-1)
2.2E+5
koff(s-1)
9.7E-4
KD
4.5 nM

图4B

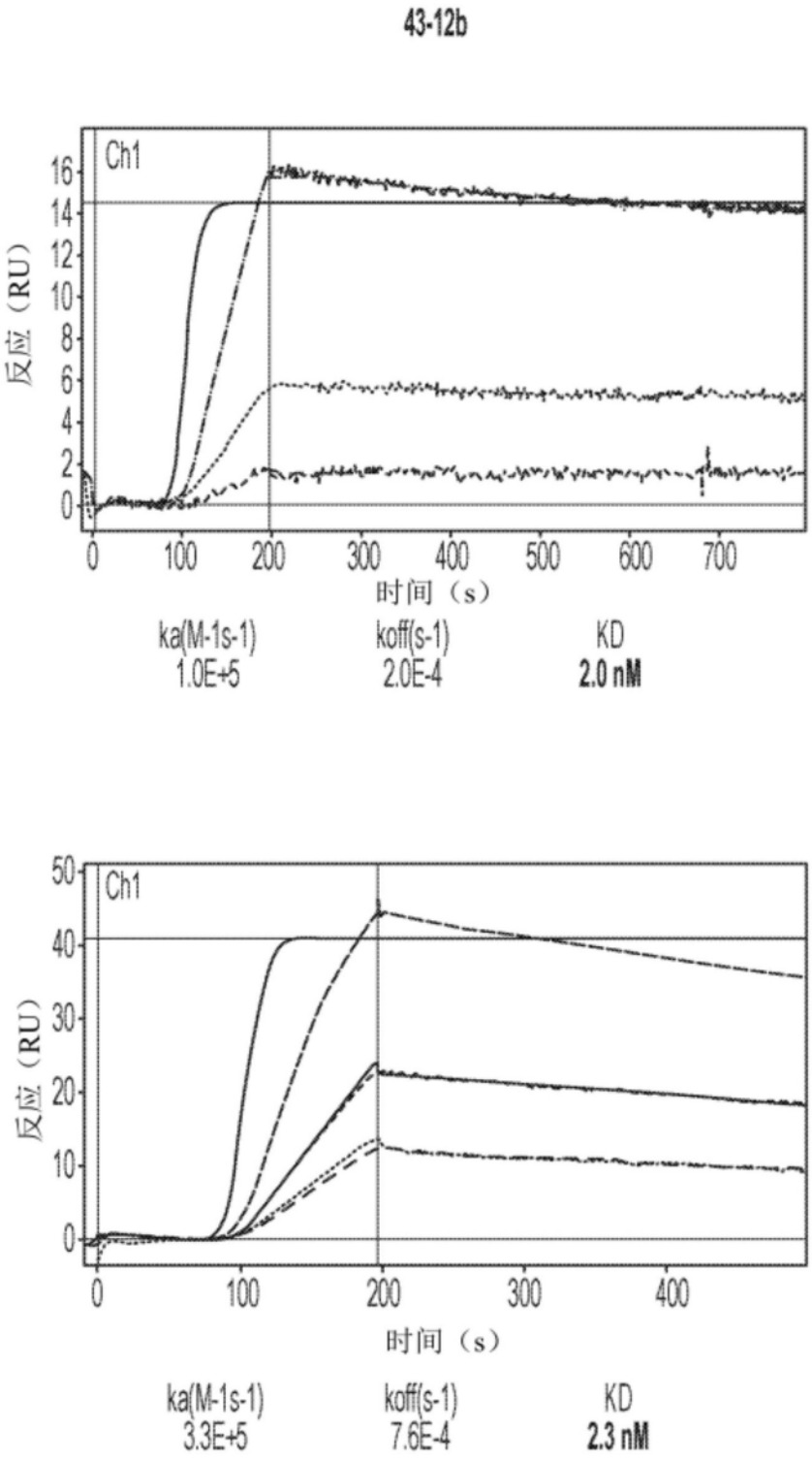

43-12b
Ch1
反应（RU）
时间（s）
ka(M-1s-1)
1.0E+5
koff(s-1)
2.0E-4
KD
2.0 nM
Ch1
反应（RU）
时间（s）
ka(M-1s-1)
3.3E+5
koff(s-1)
7.6E-4
KD
2.3 nM

图4C