



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111542544 A

(43)申请公布日 2020.08.14

(21)申请号 201880085048.3

(22)申请日 2018.11.01

(30)优先权数据

62/580,346 2017.11.01 US

62/581,441 2017.11.03 US

62/581,905 2017.11.06 US

62/583,808 2017.11.09 US

62/628,207 2018.02.08 US

62/657,616 2018.04.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/058704 2018.11.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/089921 EN 2019.05.09

(71)申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 M·C·戈德罗 C·高 M·奎格利 P·阿诺尔

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 罗天乐

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书5页 说明书57页

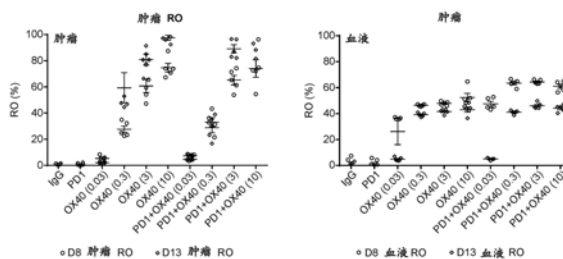
序列表18页 附图88页

(54)发明名称

用于治疗癌症的免疫刺激性激动性抗体

(57)摘要

本发明提供了使用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体治疗癌症的方法,其中,以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率,例如约20%至约80%的受体占据率的量和/或频率施用抗体。还提供了用于确定这种激动性抗体的人体剂量的方法,以及用于监测激动性抗体的受体占据率,以便在例如人患者中维持有效的抗体水平的方法。还提供了测量受试者中可溶性OX40的方法。还提供了治疗癌症的方法,包括对受试者施用有效量的抗OX40抗体和抗PD-1抗体。



1. 一种治疗癌症的方法,包括向有需要的受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中激动性抗体以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率的量或频率施用。

2. 一种减少或耗竭患有癌症的受试者的肿瘤中的T调节细胞数量的方法,包括向受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该激动性抗体以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率的量或频率施用。

3. 一种增加患有癌症的患者中的T细胞中IL-2和/或IFN- γ 产生的方法,包括向受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该激动性抗体以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率的量或频率施用。

4. 一种刺激患有癌症的受试者中的免疫应答的方法,包括向受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中所述激动性抗体以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率的量或频率施用。

5. 一种抑制患有癌症的受试者中肿瘤细胞生长的方法,该方法包括向受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中所述激动性抗体以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率的量或频率施用。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述激动性抗体以足以达到和/或维持约20%至约80%的受体占据率范围的量或频率施用。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述的激动性抗体以足以达到和/或维持约20%至约70%的受体占据率范围的量施用。

8. 根据权利要求5所述的方法,其中所述激动性抗体以足以达到和/或维持约20%至约60%的受体占据率范围的量施用。

9. 根据权利要求5所述的方法,其中所述激动性抗体以足以达到和/或维持约20%至约50%的受体占据率范围的量施用。

10. 根据权利要求5所述的方法,其中所述激动性抗体以足以达到和/或维持约20%至约40%的受体占据率范围的量施用。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中,在使用所述激动性抗体的治疗方案的第1周期后的第1天测量受体占据率和/或受体占据率范围。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中免疫刺激性受体选自下组:LFA-1(CD11a/CD18)、CD2、CD7、CD30、CD40、CD54、CD160、BAFFR、HVEM、LIGHT、NKG2C、SLAMF7和NKp80。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中,所述免疫刺激性受体是共刺激受体。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述共刺激受体是肿瘤坏死因子受体超家族的成员。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述激动性抗体选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述激动性抗体是IgG1抗体。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中,所述激动性抗体包括具有增强的与活化Fc γ R的结合的Fc。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述激动性抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述激动性抗体是双特异性抗体。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症选自下组:膀胱癌、乳腺癌、子宫/宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食道癌、胃肠道癌、胰腺癌、结直肠癌、结肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤、非小细胞肺癌和病毒相关的癌症。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述癌症是转移性癌症、难治性癌症或复发性癌症。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括施用一种或多种附加疗法。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述一种或多种附加疗法包括抗体或小分子。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述一种或多种附加疗法包括抗PD1抗体、LAG-3抗体、CTLA-4抗体、PD-L1抗体或抗TGFβ抗体。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述激动性抗体在施用所述一种或多种附加疗法之前施用。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述激动性抗体在施用所述一种或多种附加疗法之后施用。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述激动性抗体与所述一种或多种附加疗法同时施用。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述激动性抗体配制为药用组合物。

29. 一种为治疗患有癌症的受试者选择特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的有效剂量或抗体施用时间表的方法,该方法包括:

(a) 将所述激动性抗体施用于动物模型;

(b) 从该动物模型获得样品;

(c) 确定所述样品中所述激动性抗体的受体占据率或受体占据率范围;

(d) 使用从步骤(c)获得的受体占据率或受体占据率范围来预测或预计受试者体内的预期受体占据率或受体占据率范围;以及

(e) 根据步骤(d)中获得的预期受体占据率,选择足以在受试者体内达到和/或维持小于约80%的受体占据率的剂量或抗体施用时间表。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中,选择足以达到和/或维持约20%至约80%的受体占据率范围的激动性抗体量。

31. 根据权利要求29所述的方法,其中,选择足以达到和/或维持约20%至约70%的受体占据率范围的激动性抗体量。

32. 根据权利要求29所述的方法,其中,选择足以达到和/或维持约20%至约60%的受体占据率范围的激动性抗体量。

33. 根据权利要求29所述的方法,其中,选择足以达到和/或维持约20%至约50%的受体占据率范围的激动性抗体量。

34. 根据权利要求29所述的方法,其中,选择足以达到和/或维持约20%至约40%的受

体占据率范围的激动性抗体量。

35. 一种治疗癌症的方法,包括施用有效量的特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体或包括该抗体的药物组合物,其中,该激动性抗体要施用的量已根据权利要求29-34中任一项的方法选择。

36. 一种监测正在接受癌症治疗的受试者体内特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的水平的方法,包括

(a) 从受试者获取样品;

(b) 确定该样品中所述激动性抗体的受体占据率;

(c) 如果受体占据率大于约80%,则减少向受试者施用所述激动性抗体的量或频率,或者如果受体占据率小于约20%,则增加所述激动性抗体的量或频率;

(d) 任选地重复步骤(a)-(c),直到达到和/或维持约20%至约80%的受体占据率。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(c)中,如果受体占据率大于约70%,则减少所述激动性抗体的量或频率。

38. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(c)中,如果受体占据率大于约60%,则减少所述激动性抗体的量或频率。

39. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(c)中,如果受体占据率大于约50%,则减少所述激动性抗体的量或频率。

40. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(c)中,如果受体占据率大于约40%,则减少所述激动性抗体的量或频率。

41. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(c)中,如果受体占据率小于约30%,则增加激动性抗体的量或频率。

42. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(c)中,如果受体占据率小于约40%,则增加所述激动性抗体的量或频率。

43. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(c)中,如果受体占据率小于约50%,则增加所述激动性抗体的量或频率。

44. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(c)中,如果受体占据率小于约60%,则增加所述激动性抗体的量或频率。

45. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(d)中,调整激动性抗体的量或频率,直到达到和/或维持约20%至约70%的受体占有率为止。

46. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(d)中,调整激动性抗体的量或频率,直到达到和/或维持约20%至约60%的受体占据率为止。

47. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(d)中,调整激动性抗体的量或频率,直到达到和/或维持约20%至约50%的受体占据率为止。

48. 根据权利要求36所述的方法,其中,在步骤(d)中,调整激动性抗体的量或频率,直到达到和/或维持约20%至约40%的受体占据率为止。

49. 一种治疗癌症的方法,包括向需要的受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和附加疗法,其中所述附加疗法以固定的频率施用,所述激动性抗体以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率的剂量和频率施用。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述激动性抗体的剂量或频率是用权利要求29

的方法确定的。

51. 根据权利要求29-50中任一项所述的方法,其中,所述免疫刺激性受体是共刺激受体。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述共刺激受体是肿瘤坏死因子受体超家族的成员。

53. 一种在施用了特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的受试者中确定癌症治疗的有效性的方法,该方法包括测量受试者体内可溶性OX40的水平。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中,可溶性OX40的水平通过总可溶性OX40生物标记物测定法测定,例如在Meso Scale Discovery平台上测定。

55. 一种治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的下述每一者:

(a) 抗OX40抗体,其包含具有如SEQ ID NO:11中所示序列的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3域,以及具有SEQ ID NO:12中所示序列的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3域,和

(b) 抗PD-1抗体,其包含具有SEQ ID NO:18中所示序列的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:19中所示序列的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,且

其中,所述方法包括至少一个施用周期,其中所述周期为十二周时间,其中,对于所述至少一个周期中的每一个周期,以20、40或80mg的剂量施用一个剂量的抗OX40抗体,并且以480mg的剂量施用三个剂量的抗PD-1抗体。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述抗OX40抗体和抗PD-1抗体以下列剂量施用:

- (a) 20mg抗OX40抗体和480mg抗PD-1抗体;
- (b) 40mg抗OX40抗体和480mg抗PD-1抗体;或
- (c) 80mg抗OX40抗体和480mg抗PD-1抗体。

57. 根据权利要求55或56所述的方法,其中所述抗PD-1抗体和抗OX40抗体配制为静脉内施用。

58. 根据权利要求55至57中任一项所述的方法,其中所述抗PD-1和抗OX40抗体一起配制。

59. 根据权利要求55至57中任一项所述的方法,其中所述抗PD-1抗体和抗OX40抗体分别配制。

60. 根据权利要求55至59中任一项的方法,其中所述抗OX40抗体在施用所述抗PD-1抗体之前施用。

61. 根据权利要求60的方法,其中所述抗OX40抗体在施用所述抗PD-1抗体之前约30分钟内施用。

62. 根据权利要求55至59中的任一项的方法,其中所述抗OX40抗体在施用所述抗PD-1抗体之后施用。

63. 根据权利要求55至59中任一项的方法,其中所述抗OX40抗体与所述抗PD-1抗体同时施用。

64. 根据权利要求55至63中任一项的方法,其中,所述治疗由至多达9个周期组成。

65. 根据权利要求55至64中任一项的方法,其中所述抗OX40抗体在每个周期的第1天施用。

66. 根据权利要求55至65中任一项的方法,其中所述抗PD-1抗体在每个周期的第1、29和57天施用。

67. 根据权利要求55至66中任一项的方法,其中,所述治疗产生选自以下至少一种治疗效果:肿瘤的大小减小、转移灶的数量随时间推移减少、完全缓解、部分缓解和疾病稳定。

68. 根据权利要求55至67中任一项的方法,其中所述癌症选自膀胱癌、宫颈癌、肾细胞癌、睾丸癌、结直肠癌、肺癌、头颈癌和卵巢癌。

69. 根据权利要求68的方法,其中所述癌症是膀胱癌。

70. 根据权利要求55至69中任一项的方法,其中抗OX40抗体包含

- (a) 包含SEQ ID NO:5中所示序列的重链可变区CDR1;
- (b) 包含SEQ ID NO:6中所示序列的重链可变区CDR2;
- (c) 包含SEQ ID NO:7中所示序列的重链可变区CDR3;
- (d) 包含SEQ ID NO:8中所示序列的轻链可变区CDR1;
- (e) 包含SEQ ID NO:9中所示序列的轻链可变区CDR2;以及
- (f) 包含SEQ ID NO:10中所示序列的轻链可变区CDR3。

71. 根据权利要求70所述的方法,其中,所述抗OX40抗体包含:包含SEQ ID NO:11中所示序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:12中所示序列的轻链可变区。

72. 根据权利要求71所述的方法,其中,所述抗OX40抗体包含:包含SEQ ID NO:13中所示序列的重链,和包含SEQ ID NO:14中所示序列的轻链。

73. 根据权利要求55至72中任一项所述的方法,其中,所述抗PD-1抗体包含:

- (a) 包含SEQ ID NO:20中所示序列的重链可变区域CDR1;
- (b) 包含SEQ ID NO:21中所示序列的重链可变区域CDR2。
- (c) 包含SEQ ID NO:22中所示序列的重链可变区域CDR3。
- (d) 包含SEQ ID NO:23中所示序列的轻链可变区域CDR1;
- (e) 包含SEQ ID NO:24中所示序列的轻链可变区域CDR2;以及
- (f) 包含SEQ ID NO:25中所示序列的轻链可变区域CDR3。

74. 根据权利要求73所述的方法,其中,所述抗PD-1抗体包含:包含SEQ ID NO:18中所示序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:19中所示序列的轻链可变区。

75. 根据权利要求74所述的方法,其中,所述抗PD-1抗体包含:包含SEQ ID NO:16中所示序列的重链,和包含SEQ ID NO:17中所示序列的轻链。

用于治疗癌症的免疫刺激性激动性抗体

[0001] 对相关申请的相互援引

[0002] 本PCT申请主张美国临时申请号62/580,346(2017年11月1日提交)、62/581,441(2017年11月3日提交)、62/581,905(2017年11月6日提交)、62/583,808(2017年11月9日提交)、62/628,207(2018年2月8日提交)和62/657,616(2018年4月13日提交)的优先权利益,每项申请均以引用方式在此全文并入。

[0003] 对电子提交的序列表的援引

[0004] 以ASCII文本文件形式与本申请一起提交的电子序列表的内容(名称:3338.115PC06_ST25.txt;大小:30.589字节;创建日期:2018年10月30日)的内容在此以援引方式全部纳入。

[0005] 背景

[0006] 尽管癌症治疗中对许多免疫抑制受体的靶定已获得成功,但由于免疫细胞——如调节性T细胞、效应细胞(如T细胞)和抗原呈递细胞——上表达的刺激性和抑制性受体之间复杂的相互作用,使得预测针对特定免疫受体的抗体是否有效变得十分困难。与靶向免疫抑制性受体的拮抗性抗体(如nivolumab、ipilimumab)最近取得的成功相对的是,靶向免疫刺激性受体的激动性抗体由于例如缺乏疗效和/或毒性等原因,很少有在临床上取得成功。这些抗体是尚未开发的潜在资源,如果能解决其缺乏疗效/毒性的原因并优化其用法,有可能大大扩充可用于对抗肿瘤适应症的治疗手段库。鉴于目前仍需要对癌症等疾病的更好的治疗策略,例如通过强化如T细胞反应等免疫应答,对激活免疫刺激性受体的方法加以优化将带来治疗上的好处。

[0007] 概要

[0008] 在一个方面中,本申请提供了一种治疗癌症的方法,包括向有此需要的受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中,该抗体以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率的量或频率施用。

[0009] 在另一个方面,本申请提供了减少或耗竭患有癌症的受试者的肿瘤中T调节细胞的数量数的方法,该方法包括向受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该抗体以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率的量或频率施用。

[0010] 在另一个方面,本申请提供了一种增加患有癌症的受试者体内T细胞中IL-2和/或IFN- γ 产生的方法,该方法包括向受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该抗体以足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率的量或频率施用。

[0011] 在另一个方面,本申请提供了一种刺激患有癌症的受试者体内的免疫应答的方法,该方法包括向受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该抗体的施用量或频率足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率。

[0012] 在另一个方面,本申请提供了一种抑制患有癌症的受试者体内肿瘤细胞的生长的方法,该方法包括向该受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该抗体的施用量或频率足以达到和/或维持小于约80%的受体占据率。

[0013] 在另一个方面,本申请提供了一种为治疗患有癌症的受试者选择特异性结合免疫

刺激性受体的治疗用激动性抗体的有效剂量或抗体施用时间表的方法,该方法包括

[0014] (a) 将所述激动性抗体施用于动物模型;

[0015] (b) 从该动物模型获得样品;

[0016] (c) 确定所述样品中所述激动性抗体的受体占据率或受体占据率范围;

[0017] (d) 使用从步骤(c)获得的受体占据率或受体占据率范围来预测或预计受试者体内的预期受体占据率或受体占据率范围;以及

[0018] (e) 根据步骤(d)中获得的预期受体占据率,选择足以在受试者体内达到和/或维持小于约80%的受体占据率的抗体或施用剂量时间表。

[0019] 在本发明的另一个方面,本申请提供了一种治疗受试者体内的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体或包含所述抗体的药物组合物,其中,该激动性抗体要施用的量已根据本文中描述的方法选择。

[0020] 在另一个方面,本申请提供了一种监测正在接受癌症治疗的受试者体内特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的水平的方法,该方法包括

[0021] (a) 从受试者获取样品;

[0022] (b) 确定该样品中所述激动性抗体的受体占据率;

[0023] (c) 如果受体占据率大于约80%(例如70%、60%、50%),则减少向受试者施用所述激动性抗体的量或频率,或者如果受体占据率小于约20%(例如30%、40%、50%或60%),则增加该抗体的量或频率。

[0024] (d) 任选地重复步骤(a)-(c),直到达到和/或维持约20%至约80%(例如,约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%)的受体占据率。

[0025] 在另一个方面,本申请提供了一种治疗癌症的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和附加疗法,其中所述附加疗法以固定的频率施用,并且所述激动性抗体以足以达到和/或维持受体占据率小于约80%的剂量和频率施用。

[0026] 在另一个方面,本申请提供了一种在施用了特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的受试者中确定癌症治疗的有效性的方法,该方法包括测量受试者中(例如,在来自受试者的样品中)可溶性OX40的水平。

[0027] 在本文公开的方法的一些实施方案中,所述激动性抗体以足以达到和/或维持约20%至约80%、约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%的受体占据率范围的剂量或频率施用。在某些实施方案中,受体占据率和/或受体占据率范围在治疗方案的第1周期后的第1天测量。

[0028] 在本文所公开的方法的某些实施方案中,所述激动性抗体与免疫刺激性受体,例如共刺激受体结合。在某些实施方案中,所述抗体结合肿瘤坏死因子受体超家族的成员、ICOS、LFA-1(CD11a/CD18)、CD2、CD7、CD30、CD40、CD54、CD160、BAFFR、HVEM、LIGHT、NKG2C、SLAMF7和NKp80。在一个实施方案中,该激动性抗体与OX40结合。

[0029] 在本文公开的方法的某些实施方案中,所述激动性抗体选自由IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。在一些实施方案中,该激动性抗体包含具有增强的与活化的Fc γ R结合的Fc。在一些实施方案中,该激动性抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合体抗体。在一些实施方案中,激动性抗体是双特异性抗体。

[0030] 在本文公开的方法的一些实施方案中,要治疗的癌症选自下组:膀胱癌、乳腺癌、子宫/宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食道癌、胃肠道癌、胰腺癌、结直肠癌、结肠癌、结肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤、非小细胞肺癌和病毒相关的癌症。在一些实施方案中,癌症是转移性的、难治性或复发性的。

[0031] 在本文描述的方法的一些实施方案中,对受试者(例如,人类患者)进一步施用一种或多种附加疗法(例如,抗PD1抗体、抗PDL1抗体、抗LAG3抗体、抗CTLA4抗体、抗TGF β 抗体)。所述一种或多种附加疗法可以在激动性抗体之前、之后或与激动性抗体同时施用。

[0032] 在一些实施方案中,激动性抗体,以及任选的一种或多种附加疗法,配制成药用组合物。

[0033] 附图简要说明

[0034] 图1A和1B是用标示剂量(单位:mg/kg)的IgG与配体阻断性OX40.23(图1A)和配体非阻断性OX40.23(图1B)治疗的CT26小鼠肿瘤模型的肿瘤生长曲线。1

[0035] 图2A和2B分别显示了标示剂量(单位:mg/kg)的OX40.3治疗的小鼠的平均和中位肿瘤体积。图2C和2D分别显示了标示剂量(单位:mg/kg)的OX40.23治疗的小鼠的平均和中位肿瘤体积。

[0036] 图3A是用OX40.23+抗PD1抗体联合治疗的CT26小鼠肿瘤模型的一系列肿瘤生长曲线。图3B是显示该组合治疗在OX40.23抗体的不同剂量下的肿瘤生长抑制百分比的图。

[0037] 图4是用OX40.3+抗PD1抗体联合治疗的CT26小鼠肿瘤模型的一系列肿瘤生长曲线。

[0038] 图5是CT26小鼠肿瘤模型在肿瘤植入后第5天和第12天用标示浓度的OX40.23治疗,并同时或依次(延迟)用抗PD-1抗体治疗后的一系列肿瘤生长曲线。对于同时施用,抗PD1抗体在第5、9和13天施用。对于延迟施用,抗PD1抗体在第10、14和18天施用。

[0039] 图6A是OX40.23作为单一疗法或与抗PD1抗体联合疗法的施用和取样时间表的示意图。图6B是用IgG、PD1、OX40.23(0.3、3和10mg/kg)、抗PD1抗体+OX40.23(0.03、0.3、3和10mg/kg)治疗的小鼠的血液和肿瘤样品中OX40受体占据率(RO)的图。图6C是第8天和第13天肿瘤中OX40受体的总水平和被占据水平的图。图6D是显示百分比肿瘤生长抑制作为OX40 RO的函数的图。

[0040] 图7A是示出施用20mg、40mg、80mg、160mg和320mg OX40.21的人类患者的外周CD4+T细胞和Treg细胞中的%OX40 RO的一系列图。在一个为期2周的周期的C1D1、C1D8和C2D1测定RO。在20mg下,在CD4+ Tregs中观察到的外周OX40 RO为80%,在 \geq 40mg的剂量下被饱和。图7B是显示OX40.21与纳武单抗(nivolumab)联合,OX40.21剂量从20mg到320mg时的OX40.21暴露的图。

[0041] 图8A是一个群体PK (PPK)模型,用于描述观察到的OX40.21浓度数据。图8B是一个数学PK-PD模型,用于描述来自接受OX40.21治疗的人患者的药物浓度(Cmin1:第1个剂量后的谷浓度)和C2D1时CD4+T细胞上的外周血RO的关系,图中有RO的中位数(线段)和95%的置信区间(阴影区域)。

[0042] 图9显示了在不同OX40.21剂量和频率下,预测的CD4+T细胞上血液RO的值(中位数和90%的预测区间)。

[0043] 图10A和10B显示了不同剂量方案下的预测的人体肿瘤RO。图10A提供了平均肿瘤渗透率和平均靶负荷。图10B提供了低肿瘤渗透率和高靶负荷。

[0044] 图11A是显示不同浓度的OX40.21对受体占据率(OX40.21(结合))和对OX40表面表达(OX40.21(总))的影响的图。图11B是汇总%OX40 RO对OX40总表面表达的影响的图。

[0045] 图12A和12B是分别显示标示浓度下的同种型抗体和OX40.21抗体在不同日期(第1、2、3和4日)的OX40表面表达的时间过程的图。

[0046] 图13A和13B是显示OX40.21(图13A)或CD28(图13B)浓度对总表面OX40表达的影响的图。

[0047] 图14是显示T细胞激活情况(由IFN- γ 水平反映)作为OX40 RO(y轴)和OX40.21浓度(x轴)的函数的图。

[0048] 图15A是显示T细胞的增殖情况(由 $^3\text{[H]}$ -胸苷掺入量反映)作为OX40 RO(y轴)和OX40.21浓度(x轴)的函数的图。图15B和15C是分别显示作为%OX40 RO的度量的CD25+T细胞数和增殖T细胞数的图。

[0049] 图16是用于测量可溶性OX40(sOX40)水平的ELISA的示意图。

[0050] 图17是显示当用指示浓度的OX40.21处理细胞时,细胞表面的OX40表达水平的图。

[0051] 图18是显示用指示浓度的OX40.21处理细胞时,可溶性OX40的水平图。

[0052] 图19的一系列图显示当用OX40.21单一疗法或OX40.21+纳武单抗联合治疗人类患者时sOX40.21相对于C1D1的增加倍数,其中纳武单抗以20mg、40mg、80mg、160mg和320mg施用。

[0053] 图20A是显示用同种型抗体、OX40.21、或一种抗CD28抗体处理细胞时,第1、2、3和4天sOX40的总水平的图。图20B是显示用同种型抗体、OX40.21或抗CD28抗体处理细胞时,第1、2、3和4天的结合sOX40水平的图。

[0054] 图21A是显示用OX40.21和一种抗CD28抗体共同刺激细胞时,对sOX40水平的加和性影响的图。图21B是显示在培养第3天将OX40.21加入CD28后,对第4天sOX40水平影响的图。

[0055] 图22是显示OX40内化测定的示意图。

[0056] 图23是显示Tregs用CD3/CD28激活,随后用IgG1、DT、OX40.21(配体阻断性抗体)或OX40.8(配体非阻断性抗体)处理后,这些Tregs中OX40的内化的示意图。

[0057] 图24是显示Fc γ R介导的交联对OX40.21的激动活性的影响的一系列图。

[0058] 图25是用OX40.23作为单一疗法或与抗PD1抗体联合治疗CT26小鼠肿瘤模型的剂量给药和取样时间表的示意图,用于外周药效学标志物评估。

[0059] 图26A的一系列图显示了OX40.23单一疗法或与抗PD1抗体联合治疗对CD4+T细胞和CD8+T细胞中ICOS、Ki67和CD44水平的影响。在OX40单一疗法的小图中,X轴标签从左至右依次为IgG、90mpk、30mpk、10mpk、3mpk、1mpk、0.3mpk、0.1mpk和0.03mpk。在OX40/PD-1组合的小图中,X轴的标签从左至右分别为IgG、PD1、PD1+90mpk、PD1+30mpk、PD1+10mpk、PD1+3mpk、PD1+1mpk、PD1+0.3mpk、PD1+0.1mpk、PD1+0.03mpk和PD1+0.01mpk。图26B显示了用OX40.21(20、40、80、160或320mg)+纳武单抗联合治疗的人类患者的肿瘤基质中,呈Ki67+的CD8+细胞的百分比。图26C示出了用OX40.21(20、40、80、160或320mg)+纳武单抗治疗的人类患者的肿瘤基质中FOXP3+细胞的百分比。图26D示出了用OX40.21(320mg)+纳武单抗

(240mg) 治疗的人类子宫内膜癌患者的肿瘤样品中Ki67+CD8+T细胞的免疫组化分析。图26E示出了来自卵巢浆液性癌(上小图)和卵巢腺癌(下小图)的人类患者肿瘤样品中的FOXP3+细胞的免疫组化分析。

[0060] 图27A和27B是基于非应答者(肿瘤体积 $>100\text{mm}^3$)或应答者(肿瘤体积 $\leq 100\text{mm}^3$)状态,CD8+T细胞中CD44阳性者(图27A)和Ki67阳性者(图27B)的百分比的图。图27C是显示按抗肿瘤活性(肿瘤负荷的最大下降百分比)计算的%Ki67+CD8+T细胞的绝对变化的图。图27D是按抗肿瘤活性显示Ki67+CD8+T细胞的变化(肿瘤负荷的百分比下降)的图。PR:部分缓解,PD:疾病进展,SD:疾病稳定。

[0061] 图28是显示抗ICOS抗体在抗ICOS+抗PD1联合治疗中增加剂量对小鼠模型中肿瘤生长抑制的影响的一系列图。

[0062] 图29是显示mIgG1和mIgG2a单克隆抗OX40抗体在小鼠MC38肿瘤模型中的暴露-应答关系的一系列图。

[0063] 图30展示了OX-40激动性抗体(BMS-986178替代小鼠抗体)对OX-40的作用机制。Fc γ R=Fc γ 受体;FoxP3=叉头框蛋白P3;NK=天然杀伤细胞;BMS-986178:OX40单克隆抗体。

[0064] 图31显示用OX-40激动性抗体(BMS-986178替代小鼠抗体)或同种型抗体处理的CD4+T细胞上的CD25的几何平均荧光强度[GMFI]测量的T细胞活化。

[0065] 图32A和32B是总结用CD137单克隆抗体(图32A)或CD28单克隆抗体(图32B)处理CHO细胞后,与同种型抗体对照相比,%OX40 RO对OX40总表面表达的影响的图。

[0066] 图33A-33I示出了用OX-40激动性抗体处理CHO细胞时,在Treg抑制测定中的钩状效应和剂量依赖性。图33A是该Treg抑制测定的示意图。图33B示出了在CD4+中,在Treg存在下,用不同浓度的BMS-986178(BMS-986178替代小鼠抗体)处理后的IL-2表达。图33C示出了在CD4+中,在无Treg存在下,用不同浓度的BMS-986178(BMS-986178替代小鼠抗体)处理后的IL-2表达。图33D示出了在CD4+中,在Treg存在下,用不同浓度的BMS-986178(BMS-986178代用小鼠抗体)处理后的相应培养物中的Tregs上的OX40表达。图33E显示了在CD4+中,在无Treg存在下,用不同浓度的BMS-986178(BMS-986178代用小鼠抗体)处理后的相应培养物中的Tregs上的OX40表达。图33F显示了在CD8+中,在Treg存在下,用不同浓度的BMS-986178(BMS-986178替代小鼠抗体)处理后的IL-2表达。图33G显示了在CD8+中,在无Treg存在下,用不同浓度的BMS-986178(BMS-986178代用小鼠抗体)处理后的IL-2表达。图33H示出了在CD8+中,在Treg存在下,用不同浓度的BMS-986178(BMS-986178替代小鼠抗体)处理后的相应培养物中的Tregs上的OX40表达。图33I显示了在CD8+中,在无Treg存在下,用不同浓度的BMS-986178(BMS-986178替代小鼠抗体)处理后的相应培养物中的Tregs上的OX40表达。

[0067] 图34A是用0.03mg/kg、0.3mg/kg、0.3mg/kg、3.0mg/kg、10mg/kg的BMS-986178(BMS-986178替代小鼠抗体)或对照组IgG治疗7天后,肿瘤Tregs上OX40 RO的表达。图34B是用0.03mg/kg、0.3mg/kg、3.0mg/kg、3.0mg/kg、10mg/kg的BMS-986178(BMS-986178替代小鼠抗体)或对照组IgG治疗7天后,用平均荧光强度度量的总OX40 RO表达。图34C是用0.5mg/kg BMS-986178(BMS-986178替代小鼠抗体)、5mg/kg BMS-986178(BMS-986178替代小鼠抗体)或对照PD-1单克隆抗体治疗后10天、17天和22天时肿瘤Tregs上OX40 RO的表

达。图34D是用0.5mg/kg BMS-986178 (BMS-986178 替代小鼠抗体)、5mg/kg BMS-986178 (BMS-986178替代小鼠抗体) 或对照PD-1单克隆抗体处理后10天、17天和22天时,以平均荧光强度度量的肿瘤 Tregs上测定的总OX40 RO表达。

[0068] 图35A是显示当用标示浓度的CD28单克隆抗体或同等型抗体对照处理细胞时,可溶性OX40的水平。图35B是显示当用标示浓度的BMS-986178 (BMS-986178替代小鼠抗体) 处理细胞时,总可溶性OX40和药物结合的可溶性OX40的水平。

[0069] 图36是当用0.01nM和100nM的BMS-986178 (BMS-986178替代小鼠抗体) 处理Tregs和CD4+T细胞时,结合于OX40的BMS-986178 (BMS-986178替代小鼠抗体) 的内化的示意图。

[0070] 图37是BMS-986178 (BMS-986178替代小鼠抗体) 剂量、OX40 RO、OX40 表达和PD调制之间的关系的关系的示意模型。

[0071] 图38示出了用对照单克隆抗体 (mIgG1)、BMS-986178 (BMS-986178替代小鼠抗体)、抗PD-1、抗CTLA-4、BMS-986178 (BMS-986178替代小鼠抗体) 与抗PD-1的组合、或BMS-986178 (BMS-986178替代小鼠抗体) 与抗CTLA-4的组合处理的CT26小鼠肿瘤模型中,肿瘤体积和无肿瘤的小鼠数。mIgG = 小鼠免疫球蛋白G; TF = 无肿瘤; 抗PD-1 = 4H2 mIgG1 D265A, 抗CTLA-4 = 9D9 mIgG2b。从植入后第6天 (治疗开始) 开始,每周测量两次肿瘤体积±标准差。

[0072] 图39显示了单一疗法剂量提升 (仅BMS-986178) 与联合治疗 (BMS-986178联合纳武单抗或伊匹单抗) 对比的研究设计。DLT = 剂量限制毒性; ECOG PS = 美国东岸癌症临床研究合作组织 (Eastern Cooperative Oncology Group) 表现状态; IV = 静脉注射; MTD = 最大耐受剂量; Q2W = 每2周一次; Q3W = 每3周一次; RECIST = 实体肿瘤的反应评价标准; RP2D = 推荐的第2期剂量。图40显示了BMS-986178±纳武单抗或伊匹单抗的药代动力学。

[0073] 图41是用20mg、40mg、80mg、160mg或320mg的OX-40.21处理后的外周Tregs上的外周OX40 RO,使用的表面标记为C1D1、C1D8、C2D1或 C5D1。

[0074] 图42是用20mg、40mg、80mg、160mg或320mg的OX-40.21处理后,用平均荧光强度度量的外周Tregs上的总OX40表达,使用的表面标记物为C1D1、C1D8、C2D1或C5D1。

[0075] 图43A示出了不同剂量下单个患者样品中sOX40随时间推移的变化倍数。图43B显示了不同剂量下sOX40的归一化AUC。sOX40的归一化AUC 采用 $(AUC_{0-T_{\text{最后}}}) / T_{\text{最后}}$ 来计算,其考虑了不同随访时间的患者; $AUC_{0-T_{\text{最后}}}$ = 从时间0到最后一次随访的曲线下面积; $T_{\text{最后}}$ = 最后一次随访时间。

[0076] 图44A和44B显示, BMS-986178±纳武单抗或伊匹单抗刺激了IFN- γ (图 44A) 和IP-10 (图44B) 的产生。

[0077] 图45A和45B显示BMS-986178±纳武单抗或伊匹单抗提高了增殖性 (Ki67+) CD4+ (图45A) 和CD8+ (图45B) 效应器记忆T细胞的水平。

[0078] 图46A至46H示出了用于测定人血清中总可溶性OX40水平的人总可溶性OX40生物标记物测定法的验证结果。图46A示出了BMS-986178与两种不同的OX40蛋白 (OX40-His_Sino和OX40-Fc_R&D) 之间的校准曲线。图46B 显示了两个抗体对之间的血清OX40的相关性。图46C和46D显示了血清中 OX40抗体对之间的相关性。图46C和46D分别表示稀释平行度和线性度。图46E示出了BMS-986178的选择性。图46F和46G示出了药物干扰数据。图 46H显示了BMS-986178在5种不同条件下的储存和冻融稳定性。

[0079] 图47示出了在正常健康人和三个不同的癌症受试者 (头颈癌、卵巢癌和宫颈癌) 中

使用人类总可溶性OX40生物标记物测定法测定的可溶性OX40水平。

[0080] 图48显示了OX40.8抗体的药物干扰数据。

[0081] 详述

[0082] 这里提供了以足以达到和/或维持低于约80%的受体占据率的量使用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体来增强免疫应答的方法,其中该抗体单独或与其它免疫刺激剂和/或癌症疗法联合施用。这里描述的方法可用于多种肿瘤学应用,例如,治疗癌症或抑制肿瘤生长。

[0083] 定义

[0084] 为了使下面的说明更容易理解,首先对某些术语进行定义。在说明全文中给出了更多的定义。

[0085] 如本文所使用的,“免疫刺激性受体”是指参与刺激免疫应答的受体。此类受体包括,例如,共刺激受体。

[0086] 如本文所使用的,“共刺激受体”是指向免疫细胞传递共刺激信号的受体。共刺激受体的例子包括,但不限于:肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的成员、ICOS(CD278)、CD28、LIGHT、CD40L、TIM1、SLAM、CD1、CD2、CD226、LFA-1(CD11A、CD18)、CD2、CD5、CD7、CD30、CD54、CD97、CD154、CD160、LIGHT、NKG2C、SLAMF7和NKp80。

[0087] 如本文所使用的,“激动性抗体”指的是作为免疫刺激性受体的激动剂的抗体,例如这样的抗体:它能够刺激某种蛋白质的活性,这种蛋白质继而刺激免疫细胞,从而增强受试者的免疫系统(或免疫应答)。

[0088] 如本文所使用的,“结合免疫刺激性受体的激动性抗体”或同义表达,指的是这样的抗体,其特异性结合免疫刺激性受体(例如,共刺激受体,如肿瘤坏死因子受体超家族的成员),并激活该受体和/或其下游信号通路。

[0089] 如本文所使用的,“肿瘤坏死因子受体超家族”或“TNFRSF”指的是细胞因子受体的一个蛋白质超家族,这些受体在其细胞外结构域中具有富含半胱氨酸的、能与天然配体结合的结构域;该超家族包括TNFR1、TNFR2、HVEM、LTBR、OX40、CD27、CD40、FAS、DCR3、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、FN14、TACI、BAFFR、BCMA、GITR、TROY、DR3(死亡受体3)、DR6(死亡受体6)、XEDAR(表皮细胞增生素A2受体)和NGFR(见,例如Croft等,Nat Rev Drug Discov 2013;12:147-168)。

[0090] 本文中使用的术语“OX40”指的是这样一种受体,它是TNFRSF成员,与OX40配体(OX40-L)结合。OX40也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4)、ACT35、IMD16、TXGP1L和CD134。术语“OX40”包括由细胞自然表达的OX40的任何变体或异构体。

[0091] 人OX40前体(登录号NP_003318.1)的氨基酸序列记载于SEQ ID NO:1。成熟人OX40的胞外域的氨基酸序列记载于SEQ ID NO:2。食蟹猴OX40的氨基酸序列记载于SEQ ID NO:3。人OX40-L的氨基酸序列记载于SEQ ID NO:4。

[0092] 程序性(细胞)死亡蛋白1(“Programmed Death 1”、“Programmed Cell Death 1”、“Programmed Death 1”、“Programmed Cell Death 1”)、蛋白PD-1(“Protein PD-1”)、“PD-1”、“PD1”、“PD1”、“PDCD1”、“hPD-1”、“hPD-I”等术语,是指属于CD28家族的一种免疫抑制性受体。PD-1主要在体内先前已激活的T细胞上表达,并与两种配体——PD-L1和PD-L2结合。本文中使用的术语“PD-1”包括人PD-1(hPD-1)、变体、异构体和hPD-1的物种同源物,以

及与hPD-1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-1序列可以通过GenBank登录号U64863查得。

[0093] “程序性死亡蛋白配体-1 (PD-L1)”是PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体之一(另一种是PD-L2),在与PD-1结合后,可下调T细胞活化和细胞因子分泌。这里使用的术语“PD-L1”包括人PD-L1 (hPD-L1)、hPD-L1的变体、异构体和物种同源物,以及与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-L1序列可以通过GenBank登录号Q9NZQ7查得。

[0094] 术语“细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4”、“CTLA-4”、“CTLA-4”、“CTLA-4”、“CTLA-4抗原”和“CD152”(见,例如,Murata (1999) Am. J. Pathol. 155:453-460)可互换使用,并包括变体、异构体、人CTLA-4的物种同源物,以及与CTLA-4有至少一个共同表位的类似物(见,例如,Balzano (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7:28-32)。人CTLA-4的完整序列载于GenBank登录号L1 5006。

[0095] 本文所用的术语“抗体”可包括完整的抗体和任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或其单链。在一个实施方式中,“抗体”是指由至少两条重链(H)和两条轻链(L)通过二硫键相互连接的糖蛋白,或其抗原结合部分。每条重链由一条重链可变区(此处简称为V_H)和一条重链恒定区组成。在某些天然存在的IgG、IgD和IgA抗体中,重链恒定区由CH₁、CH₂和CH₃三个域组成。在某些天然存在的抗体中,每条轻链包括一个轻链可变区(此处缩写为V_L)和一个轻链恒定区。轻链恒定区由CL一个域组成。V_H和V_L区域可进一步细分为多个具有高可变性的区域,称为互补性决定区(CDR),它们之间穿插着较为保守的区域,称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由3个CDR和4个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR₁、CDR₁、FR₂、CDR₂、FR₃、CDR₃、FR₄。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子结合,包括免疫系统的各种细胞(例如效应物细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0096] 抗体通常以高亲和力特异性地与同源抗原结合,反映在解离常数(K_D)为10⁻⁷至10⁻¹¹M或更小。任何大于约10⁻⁶M的K_D通常被认为是表示非特异性结合。如本文所使用的,与某抗原“特异性结合”的抗体是指这样的抗体,其以高亲和力与该抗原及实质上相同的抗原结合——这意味着K_D为10⁻⁷M或更低的,更优选10⁻⁸M或更低,甚至更优选5×10⁻⁹M或更低,最优选10⁻⁸M至10⁻¹⁰M或更低——但不以高亲和力与不相关的抗原结合。如果一种抗原与给定抗原的序列高度同一,例如,如果该抗原与给定抗原的序列表现出至少80%、至少90%、更优选至少95%、更优选至少97%、甚至更优选至少99%的序列同一,则该抗原与给定抗原“实质上相同”。举例而言,特异性结合人OX40的抗体可以与来自某些非人灵长类动物(例如,食蟹猴)的OX40发生交叉反应,但不与来自其他物种(例如,鼠OX40)的OX40发生交叉反应,也不与OX40以外的抗原发生交叉反应。

[0097] 免疫球蛋白可以来自任何一种常见的同种型,包括但不限于IgA、分泌性IgA、IgG和IgM。在某些物种中,IgG同种型又可划分为亚类:在人类中有IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,在小鼠中有IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3。在某些实施方案中,本文中所述的抗OX40抗体是IgG1或IgG2同种型。免疫球蛋白,例如,IgG1,有多个同种异型存在,这些同种异型彼此至多有几个氨基酸不同。“抗体”可以包括(例如)天然存在的和非天然存在的抗体;单克隆和多克隆抗体;嵌合抗体和人源化抗体;人和非人抗体;全合成抗体;和单链抗体。

[0098] 如本文所用的,术语“抗原结合部分”或“抗原结合片段”指的是抗体的一个或多个

片段,它(们)保留特异性结合抗原(例如,人OX40)的能力。已经证明,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来实现。术语“抗体的抗原结合部分”所涵盖的结合片段的例子包括:(i) Fab片段,由 V_L 、 V_H 、CL和CH1结构域组成的单价片段它由一个 V_H 域组成;(ii) $F(ab')_2$ 片段,其是包含两个Fab片段的二价片段,这两个Fab片段由铰链区中的二硫桥连接;(iii) Fd片段,其由 V_H 和CH1域组成;(iv) Fv片段,其由抗体的单条臂的 V_L 和 V_H 域组成;(v) dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546),其由 V_H 域组成;和(vi) 分离的互补性决定区(CDR);或(vii) 两个或多个分离的CDR的组合,它们任选地通过合成接头连接。此外,尽管Fv片段的两个域 V_L 和 V_H 由不同的基因编码,但它们可以用重组的方法通过合成接头连接起来,使它们作为单独一条蛋白质链产生,其中 V_L 和 V_H 区域配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird et al. (1988) Science 242:423-426;和Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也意图包含在抗体的“抗原结合部分”这一术语中。这些和其他可能的构建体在Chan & Carter (2010) Nat. Rev. Immunol. 10:301中有描述。使用本领域技术人员知晓的常规技术获得这些抗体片段,并且以与完整抗体相同的方式筛选这些片段的效用。抗原结合部分可以通过重组DNA技术,或通过酶解或化学裂解完整的免疫球蛋白来制备。

[0099] “双特异性抗体”或“双功能抗体”是具有两个不同的重/轻链对和两个不同的结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可以通过多种方法产生,包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见,例如,Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)。

[0100] 这里使用的术语“单克隆抗体”是指对特定表位显示出单一结合特异性和亲和力的抗体,或指抗体的组合物,其中所有抗体对特定表位显示出单一结合特异性和亲和力。通常情况下,这种单克隆抗体衍生自编码该抗体的单一细胞或核酸,并不故意引入任何序列改变的情况下加以扩增。相应地,术语“人单克隆抗体”指的是具有从人类免疫球蛋白序列衍生的可变区(以及,任选地,恒定区)的单克隆抗体。在一个实施方式中,人单克隆抗体是通过杂交瘤产生的,杂交瘤例如,通过将转基因的或转染体的非人动物(例如,具有包含人重链转基因和轻链的基因组的转基因小鼠)获得的B细胞与永生化细胞融合而获得的。

[0101] 如本文所用的,术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备,表达,产生或分离的所有人抗体,例如(a) 从以人免疫球蛋白基因转基因或转染色体的动物(例如小鼠)中分离的抗体,或由其制备的杂交瘤,(b) 从被转化以表达抗体的宿主细胞中,例如从转染瘤中分离的抗体,(c) 从重组的组合人抗体库中分离的抗体,和(d) 通过任何其他涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的方式制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体包含利用这样的特定人种系免疫球蛋白序列可变区和恒定区:所述序列由种系基因编码,但包含随后的重排和突变,例如在抗体成熟期间发生的重排和突变。如本领域中已知的(参见,例如,Lonberg (2005) Nature Biotech. 23 (9):1117-1125),可变区包含抗原结合域,抗原结合域由多种不同基因编码,这些不同基因发生重排以形成对外来抗原特异性的抗体。除重排外,可变区还可以进一步通过多个单氨基酸改变(称为体细胞突变或超变)修饰,以增加抗体对外来抗原的亲和力。恒定区在对抗原的进一步应答中会改变(即同种型转换)。因此,响应抗原而发生重排和体细胞突变,以编码轻链和重链免疫球蛋白多肽的核酸序列可能与原始种系序列不是完全相同,而是基本相同或相似(即,具有至少80%同一性)。

[0102] “人”抗体 (HuMAb) 是指具有这样的可变区的抗体: 可变区中的框架区和CDR区均源自人种系免疫球蛋白序列。此外, 如果该抗体包含恒定区, 则恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本文所述的抗体可包括不是被人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基 (例如, 通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变)。然而, 如本文所用的, 术语“人抗体”不意图包括这样的抗体: 其中源自另一哺乳动物物种, 例如小鼠, 的种系的CDR 序列已被嫁接到人框架序列上。术语“人”抗体和“完全人”抗体是同义词。

[0103] “人源化”抗体是指某种非人抗体的CDR域之外的一些、大部分、或全部氨基酸被源自人免疫球蛋白的相应氨基酸替换而成的抗体。在抗体的人源化形式的一个实施方案中, CDR域之外的一些、大部分、或所有氨基酸已被来自人免疫球蛋白的氨基酸替代, 而一个或多个CDR区域内的一些、大部分、或所有氨基酸保持不变。氨基酸的少量添加、缺失、插入、取代或修饰是允许的, 只要它们不消除抗体结合特定抗原的能力即可。“人源化”抗体保留与原始抗体相似的抗原特异性。

[0104] “嵌合抗体”是指这样的抗体, 其中可变区源自一个物种而恒定区源自另一物种, 例如其中可变区源自小鼠抗体并且恒定区源自人抗体的抗体。

[0105] 如本文所用的, “同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别 (例如, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD和IgE抗体)。

[0106] 短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异性的抗体”在本文中与术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

[0107] 如本文所用的, “分离的抗体”意图指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。

[0108] 如本文所用的, “抑制OX40-L与OX40的结合”的抗体意图指抑制OX40-L与OX40的结合的抗体。

[0109] “效应物功能”是指抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用, 或该作用所导致的生物化学事件。示例性的“效应物功能”包括: C1q结合、补体依赖性细胞毒作用 (CDC)、Fc受体结合、Fc γ R介导的效应物功能, 例如ADCC和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (ADCP), 以及细胞表面受体 (例如, B细胞受体; BCR) 的下调。此类效应物功能通常需要Fc区与结合域 (例如抗体可变域) 组合。

[0110] “Fc受体”或“FcR”是与免疫球蛋白的Fc区结合的受体。结合IgG抗体的 FcR包括Fc γ R家族的受体, 包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ R家族由三种激活性受体 (小鼠中为Fc γ RI、Fc γ RIII和Fc γ RIV; 人类中为 Fc γ RIA、Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA) 和一种抑制性受体 (Fc γ RIIB) 组成。表1总结了人类Fc γ R的各种特性。大多数先天性效应细胞类型共表达一种或多种激活性 Fc γ R和抑制性Fc γ RIIB, 而自然杀伤(NK) 细胞在小鼠和人类中选择性表达一种激活性Fc受体 (小鼠中为Fc γ RIII, 人中为Fc γ RIIIA), 而不表达抑制性 Fc γ RIIB。人IgG1与大多数人Fc受体结合, 就其所结合的激活Fc受体的类型而言, 它被认为与鼠IgG2a等同。

[0111] 表1: 人Fc γ R的性质

[0112]	Fc γ	等位基因变体	对人IgG的亲和力	同种型偏好	细胞分布
	Fc γ RI	无记	高(K _D ~10	IgG1=3>4>>2	单核细胞, 巨噬细胞,
[0113]		载	nM)		活化的嗜中性粒细胞, 树突状细胞
	Fc γ RIIA	H131	低到中	IgG1>3>2>4	嗜中性粒细胞, 单核细胞, 巨噬细胞, 嗜酸性粒细胞, 树突状细胞, 血小板
		R131	低	IgG1>3>4>2	
	Fc γ RIIA	V158	中	IgG1=3>>4>2	NK细胞, 单核细胞, 巨噬细胞, 肥大细胞, 嗜酸性粒细胞, 树突状细胞
		F158	低	IgG1=3>>4>2	
	Fc γ RIIB	I232	低	IgG1=3=4>2	B细胞, 单核细胞, 巨噬细胞, 树突状细胞, 肥大细胞
		T232	低	IgG1=3=4>2	

[0114] “Fc区”(片段结晶区)或“Fc域”或“Fc”指的是抗体重链的介导免疫球蛋白与宿主组织或因子结合的C端区域,其中上述结合包括与免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)上的Fc受体或与经典补系统的第一成分(C1q)的结合。因此,Fc区包括抗体的恒定区中除第一恒定区免疫球蛋白域(例如,CH1或CL)之外的区域。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中,Fc区包括抗体的两条重链中的每一条链上的C_{H2}和C_{H3}恒定域;IgM和IgE的Fc区包括每一条多肽链上的三个重链恒定域(C_H域2-4)。对于IgG,Fc区包括免疫球蛋白域C γ 2和C γ 3,以及C γ 1和C γ 2之间的铰链。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能有所不同,但人IgG重链Fc区通常被定义为从C226或P230位置的某个氨基酸残基(或介于这两个氨基酸之间的氨基酸)起,延伸到重链的羧基端止,其中的编号根据Kabat的EU索引。Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD; 另见美国申请公开2008/0248028号的图3C-3F。人IgG Fc区的C_{H2}域从氨基酸231左右延伸至氨基酸340左右,而C_{H3}域在Fc区中位于C_{H2}域的C端侧,即,它从氨基酸341左右延伸至IgG的氨基酸447左右。如本文所使用的,Fc区域可以是天然序列Fc,包括任何异型变体,或变体Fc(例如,非自然发生的Fc)。Fc也可以指孤立存在的该区域,或者包含Fc的蛋白多肽的语境中的该区域,上述包含Fc的蛋白多肽例如“包含Fc区的结合蛋白”,又称“Fc融合蛋白”(例如,抗体或免疫粘附素)。

[0115] 如本文所使用的,术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性结合”和“特异性结合”指的是抗体与预定的抗原上的表位结合,但不与其它抗原结合。通常情况下,抗体(I)当

例如在Biacore 2000表面等离子体共振 (SPR) 仪中,以预定抗原作为分析物,抗体作为配体,使用表面等离子体共振 (SPR) 技术进行测定时,结合的平衡解离常数 (K_D) 约小于 $10^{-7}M$,例如约小于 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$,甚至更低;和 (ii) 与预定抗原结合的亲和力是其与预定抗原以外的非特异性抗原 (例如BSA、酪蛋白) 或与预定抗原或密切相关的抗原结合的亲和力的至少2倍。

[0116] 术语“ k_{assoc} ”或“ k_a ”,如本文所用,意在指特定抗体-抗原相互作用的结合速率常数,而术语“ k_{dis} ”或“ k_d ”,如本文所用,意在指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。本文使用的术语“ K_D ”意指平衡解离常数,该常数从 k_d 与 k_a 的比 (即 k_d/k_a) 得到,并以摩尔浓度 (M) 表示。抗体的 K_D 值可以用本领域中确立的方法来确定。确定抗体的 K_D 值的优选方法是使用表面等离子共振,优选使用生物传感器系统,如 **Biacore®** SPR系统或流式细胞仪和 Scatchard 分析。

[0117] 如本文所使用的,术语“高亲和力”的IgG抗体指的是对靶抗原的 K_D 为 $10^{-8}M$ 或更低,或更优选为 $10^{-9}M$ 或更低,或更优选为 $10^{-10}M$ 或更低的抗体。然而,对于其他抗体同种型的抗体,“高亲和力”结合可能不同。例如,对于IgM同种型而言,“高亲和力”结合是指具有 $10^{-7}M$ 或更低,更优选 $10^{-8}M$ 或更低的 K_D 的抗体。

[0118] 术语“ EC_{50} ”,在使用抗体的体外或体内测定的语境中,是指这样的抗体浓度,该浓度下诱导的反应为最大反应的50%,即最大反应与基线之间的半程。

[0119] “受体占据率”或“受体的占据率”,如本文所使用的,指结合免疫刺激性受体的激动性抗体的量。“%受体占据”或“受体的%占据率”可以用以下公式计算: $([\text{试验的 } \Delta \text{MFI}]/[\text{总的 } \Delta \text{MFI}]) \times 100$ 。 ΔMFI 如下计算:用结合的激动性抗体的平均荧光强度 (MFI) 减去同种型对照抗体的背景染色的MFI。总受体水平如下确定:加入饱和量的激动性抗体以确定特定免疫刺激性受体的最大表达量,从而确定其MFI。计算总受体表达量的另一种方法是使用针对同一免疫刺激性受体、但不与计算受体占据率的激动性抗体竞争的抗体。

[0120] “免疫应答”是指脊椎动物体内对外来介质的生物反应,这种反应可以保护机体免受这些介质和由其引起的疾病的影响。免疫应答是由免疫系统中的某一细胞 (例如,T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞或中性粒细胞) 以及由这些细胞中的任一种或由肝脏产生的可溶性大分子 (包括抗体、细胞因子和补体) 产生的作用,导致选择性地靶向、结合、损伤、破坏和/或从脊椎动物体内清除入侵的病原体、感染病原体的细胞或组织、癌性细胞或其他异常细胞,或者,在自身免疫或病理炎症的情况下,正常人细胞或组织。免疫应答包括,例如,T细胞,例如,效应型T细胞或Th细胞,例如CD4+或CD8+T细胞的激活或抑制,或 Treg细胞的抑制。

[0121] “免疫疗法”是指通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式改变免疫应答的方法,对患有疾病或有感染疾病或疾病复发风险的受试者进行治疗。

[0122] “T效应 (T_{eff})”细胞是指具有细胞溶解活性的T细胞 (例如,CD4+和CD8+ T细胞) 以及T辅助细胞 (Th细胞),它们分泌细胞因子并激活和引导其他免疫细胞,但不包括调节性T细胞 (Treg细胞)。

[0123] 刺激免疫应答或免疫系统的能力增强可能是T细胞共刺激受体的激动剂活性增强和/或抑制性受体的拮抗剂活性增强的结果。刺激免疫应答或免疫系统的能力的增强可通过在用于测量免疫应答的测定法中的 EC_{50} 或最大活性水平的倍数增加来反映,上述用于测

量免疫应答的测定法例如有测量以下各项的变化的测定法：细胞因子或趋化因子释放、细胞溶解活性（直接对靶细胞测定，或通过检测CD107a或粒细胞酶间接测定）、和增殖。刺激免疫应答或免疫系统活性的能力可增强至少10%、30%、50%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。

[0124] 如本文所使用的，“施用”是指使用本领域中熟练者已知的各种方法和递送系统中的任何一种，将包含治疗剂的组合物物理导入受试者。本文所述的抗体的优选施用途径包括静脉内、腹膜内、肌内、肌内、皮下、脊髓或其他肠外施用途径，例如通过注射或输注。这里使用的短语“肠外施用”是指肠内和局部施用以外的施用方式，通常是通过注射的方式，并且包括但不限于静脉内、腹腔内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊髓内、硬膜外、以及胸骨内注射和输注，以及体内电穿孔。可选地，本文所述的抗体可以通过非肠外途径施用，例如，通过局部、表皮或粘膜施用途径，例如，鼻内、口服、阴道、直肠、直肠、舌下或局部施用。施用也可以例如一次进行、多次进行，和 / 或经历一段或多段长时间进行。

[0125] 如本文所使用的，术语“T细胞介导的应答”是指由T细胞，包括效应T细胞（例如，CD8⁺细胞）和辅助T细胞（例如，CD4⁺细胞），所介导的应答。T细胞介导的应答包括，例如，T细胞的细胞毒作用和增殖。

[0126] 如本文所用，术语“细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 应答”是指由细胞毒性T细胞诱导的免疫应答。CTL应答主要是由CD8⁺T细胞介导的。

[0127] 如本文所使用的，术语“抑制”或“阻断”（例如，抑制/阻断OX40-L与细胞上OX40的结合）可互换地使用，并涵盖部分和完全的抑制/阻断。同样，“阻断性抗体”是指阻断配体与其受体的结合的抗体，例如，OX40.21抑制OX40与其配体的结合，因此称为阻断性抗体。相反，不阻断配体与其受体结合的抗体，例如OX40.8，称为“非阻断性抗体”。

[0128] 如本文所用的，术语“抑制肿瘤的生长”包括肿瘤的生长的任何可测量的减少，例如，抑制肿瘤的生长至少约10%，例如，至少约20%，至少约20%，至少约30%，至少约40%，至少约50%，至少约50%，至少约60%，至少约70%，至少约80%，至少约90%，至少约99%，或100%。

[0129] 如本文所使用的，“癌症”是指以体内异常细胞不受控制地生长为特征的一大类疾病。不受调控的细胞分裂可能导致细胞形成恶性肿瘤，恶性肿瘤可侵犯邻近组织，并可能通过淋巴系统或血液转移到身体的远处。

[0130] 这里使用的术语“治疗”指的是对受试者进行任何类型的干预或过程，或对受试者施用活性药物，其目的是逆转、减轻、缓解、抑制或减缓或防止与疾病相关的症状、并发症、病情或生化指标的进展、发展、严重程度或复发。”预防”是指对没有疾病的受试者施用，以预防疾病的发生，或如果疾病发生将其影响降到最低。

[0131] “血液学恶性肿瘤”包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴样恶性肿瘤，以及脾脏和淋巴结的癌症。示例性的淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤（一种B细胞血癌）和T细胞淋巴瘤。B细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和大多数非霍奇金淋巴瘤。B细胞淋巴瘤的非限制性例子包括弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞淋巴瘤（与慢性淋巴细胞白血病重叠）、套细胞淋巴瘤（MCL）、伯基特淋巴瘤、纵隔大B细胞淋巴瘤、Waldenström巨球蛋白血症、结节边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B细胞

淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴样肉芽肿。T细胞淋巴瘤的非限制性例子包括结外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤和血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤。血液学恶性肿瘤还包括白血病,例如但不限于继发性白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病和急性淋巴细胞白血病。血液学恶性肿瘤进一步包括骨髓瘤,例如但不限于多发性骨髓瘤和冒烟型多发性骨髓瘤。其他血液学和/或B细胞或T细胞相关的癌症也涵盖在血液学恶性肿瘤这一术语中。

[0132] 术语“有效剂量”或“足够剂量”被定义为足以达到或至少部分达到所需效果的药物(例如,结合免疫刺激性受体的激动性抗体)的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指药物在单独使用或与另一种治疗剂联合使用时,能促进疾病消退的任何量,疾病消退表现为疾病症状的严重程度减轻、疾病无症状期的频率和持续时间增加,或防止因疾病的病症而造成的障碍或失能。

[0133] 关于实体瘤,有效量包括足以导致肿瘤缩小和/或降低肿瘤的生长速度(例如抑制肿瘤生长)或防止或延迟其他不需要的细胞增殖的量。在某些实施方式中,有效量是足以延迟肿瘤发生的量。在某些实施方式中,有效量是足以防止或延缓肿瘤复发的量。有效量可以以一次或多次施用的方式施用。该药物或组合物的有效量可以:(i)减少癌细胞的数量;(ii)缩小肿瘤的大小;(iii)抑制、阻碍、在一定程度上减缓和可能阻止癌细胞浸润到周边器官;(iv)抑制,即在一定程度上减缓和可能阻止肿瘤转移;(v)抑制肿瘤生长;(vi)防止或延迟肿瘤的出现和/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。

[0134] 如本文所使用的,术语“固定剂量”、“不变剂量”和“固定不变剂量”可互换地使用,指的是不考虑患者的体重或体表面积(BSA)而给患者的剂量。因此,固定剂量或不变剂量不是以mg/kg剂量提供,而是以制剂的绝对量提供。

[0135] 药物的“预防有效量”或“预防有效剂量”,是指将该药物单独施用或与另一种治疗剂联合施用给有发病或复发风险的受试者时,可抑制疾病的发生或复发的剂量。治疗剂或预防剂促进疾病消退或抑制疾病的发生或复发的能力可以使用熟练的从业人员已知的各种方法进行评估,例如通过人类受试者中的临床试验,利用可预测人体疗效的动物模型系统、或者通过测定该药剂在体外测定法中的活性。

[0136] 举例而言,“抗癌剂”是减缓受试者体内癌症进展或促进受试者体内癌症消退的药物。在优选的实施方式中,治疗有效量的药物可促进癌症消退到消除癌症的程度。“促进癌症消退”是指,单独施用或与抗肿瘤剂联合施用有效量的药物,导致肿瘤的生长或大小减少、肿瘤坏死、至少一种疾病症状的严重程度降低、疾病无症状期的频率和持续时间增加、防止因疾病困扰而造成的障碍或失能,或以其他方式改善患者的疾病症状。“药理学有效性”是指药物能促进患者体内的癌症消退。“生理安全性”是指施用药物后,在细胞、器官和/或机体水平上产生的毒性或其他不良生理效应(不良反应)处于可接受的低水平。

[0137] 举治疗肿瘤的例子,相对于未治疗的受试者,治疗有效量或剂量的药物优选将细胞生长或肿瘤生长抑制至少约20%,更优选至少约40%,甚至更优选至少约60%,甚至更优选至少约80%。在最优选的实施方式中,治疗有效量或剂量的药物完全抑制细胞生长或肿瘤生长,即,优选将细胞生长或肿瘤生长抑制100%。可以使用下文描述的检测方法来评估化合物抑制肿瘤生长的能力。或者,可以通过检查化合物抑制细胞生长的能力来评价组合物的这种特性,这样的抑制可以按照本领域技术人员已知的测定法在体外测量。在本文描

述的其他优选实施方式中,肿瘤的消退可以观察到,并且可以持续至少约20天,更优选至少约40天,甚至更优选至少约60天。

[0138] 术语“患者”和“受试者”是指任何接受预防性或治疗性治疗的人类或非人类动物。例如,本文描述的方法和组合物可用于治疗患有癌症,例如晚期实体瘤的受试者或患者。

[0139] 使用可选性用语(例如,“或”)应理解为指可选物中的一种、两种或其任何组合。

[0140] 如本文中使用的,不定冠词“a”或“an”应理解为指任何列举或列举的成分中的“一种或多种”。

[0141] 如本文中使用的,术语“约”在数值或范围的语境中,指所述数值或范围的 $\pm 10\%$ 。

[0142] 除非另有说明,此处所描述的任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括在所述范围内的任何整数的值,以及适当时包括其分数(例如整数的十分之一和百分之一),除非另有说明。

[0143] 本文中描述的各个方面将在下面的各节中进一步详细描述。

[0144] I. 使用方法

[0145] 本申请提供了使用结合免疫刺激性受体的激动性抗体来治疗癌症的方法,该激动性抗体的量(剂量)或频率(抗体施用时间表)足以达到和/或维持非饱和的受体占据(RO)。如实施例中证明的,结合免疫刺激性受体的激动性抗体的饱和剂量或近饱和剂量(导致RO $> 80\%$ 的剂量)与非饱和剂量(导致RO小于约80%的剂量)相比,导致抗肿瘤疗效降低,反映在T细胞活化和增殖的标志物中。这提示,通过施用亚饱和剂量的结合免疫刺激性受体的激动性抗体来治疗患有癌症的受试者,可能提供比以施用饱和剂量更大的治疗效益。

[0146] 因此,本申请提供了一种治疗癌症的方法,该方法包括向有此需要的受试者(例如,人类患者)施用结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该抗体的施用量或频率足以达到和/或维持小于约80%的RO。

[0147] 本申请还提供了一种治疗受试者(例如,人类患者)的癌症的方法,其中,已为该受试者确定了结合免疫刺激性受体的激动性抗体的足够达到和/或维持RO小于约80%的量或频率,该方法包括向受试者施用上述足够量的抗体。

[0148] 本申请还提供了一种减少或耗竭患有癌症的受试者肿瘤中T调节细胞数量的方法,包括向受试者施用结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该抗体以足以达到和/或维持小于约80%的RO的量或频率施用。

[0149] 本申请还提供了一种增加患有癌症的受试者的T细胞中IL-2和/或IFN- γ 产生的方法,包括向受试者施用结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该抗体以足以达到和/或维持小于约80%的RO的量或频率施用。

[0150] 本申请还提供了一种刺激癌症患者的免疫应答的方法,该方法包括向患者施用结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中,其中该抗体以足以达到和/或维持小于约80%的RO的量或频率施用。

[0151] 本申请还提供了一种抑制肿瘤或肿瘤细胞在患有癌症的受试者体内生长的方法,该方法包括向受试者施用结合免疫刺激性受体的激动性抗体,其中该抗体以足以达到和/或维持小于约80%的RO的量或频率施用。

[0152] 在一些实施方式中,激动性抗体以足以达到和/或维持小于约70%的RO,例如,小于约60%、小于约50%、小于约40%或小于约30%的RO的量或频率施用。在某些实施方式

中,施用量足以达到和/或维持约20%至约80%、约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、约20%至约30%、约30%至约70%、约40%至约70%、约50%至约70%、约60%至约70%、约30%至约60%、或约30%至约50%的R0范围。

[0153] 在本文描述的方法的某些实施方式中,激动性抗体以足以达到和/或维持小于约20%的R0,例如,小于约15%、小于约10%、小于约10%、小于约5%、或从约5%到约20%、从约10%到约20%、或从约15%到约20%的R0的量或频率施用。在一些实施方式中,通过对受试者(例如,人类患者)进行间歇性或脉冲施用来达到和/或维持低于20%的R0。例如,脉冲施用可包括激动性抗体和其他药剂的联合治疗,其中激动性抗体每8周或12周施用一次,其他药剂(例如,抗PD1抗体)每4周施用一次。

[0154] 在一些实施方式中,R0在抗体治疗方案中的第1周期后的第1天测量。在一些实施方式中,R0在抗体治疗方案中的周期中期测量。在一些实施方式中,R0是在抗体治疗方案的某个周期开始时测量。在一些实施方式中,R0在抗体治疗方案的一个或多个周期中的多日测量。例如,在一个实施方式中,在一个14日的周期中的第1、7、和/或14日,并且此后按照设定间隔(例如,每2周)测量R0。在某些实施方式中,当抗体浓度接近C_{max}、C_{min}和/或C_{trough},和/或在诱导的免疫应答的高峰(预测此时免疫刺激性受体的表达最高,例如,用药后第7-14日)测量R0。

[0155] 测量R0的方法在本领域中是众所周知的。例如,可以使用荧光标记的感兴趣的抗体通过流式细胞术在生物样品(例如,血液)中测量R0,如实施例7A所述。用于测量受体占据率的方法已在,例如,Liang et al.,*Cytometry B Clin Cytom* 2016;90:117-27, Ciccimaro et al.,*Anal Chem* 2017;89:5115-512中详细综述。也可以使用亲和提取液相色谱-质谱法(AE LC-MS)通过评估感兴趣的免疫刺激性受体的激动性抗体的总水平、免疫刺激性受体的总水平以及复合物的总水平来测量来自外周血以及组织中的R0。

[0156] 在一些实施方式中,结合免疫刺激性受体的激动性抗体的R0可用于为人体剂量选择提供信息。例如,本申请提供了治疗癌症的方法,包括(a)向有此需要的受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的抗体,(b)测量来自该受试者的样品中的R0,和(c)根据测量的R0和/或R0范围确定向受试者施用的抗体的量,或根据测量的R0和/或R0范围确定抗体施用的时间表。

[0157] 在一些实施方式中,本申请提供了为治疗患有癌症的受试者选择特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的有效剂量或抗体施用时间表的方法,该方法包括

[0158] (a) 向受试者施用该抗体;

[0159] (b) 从受试者获取样品(例如血液);

[0160] (c) 测定样品中的细胞上的R0;及

[0161] (d) 选择足以达到和/或维持小于约80%的R0或R0范围(或小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约50%、小于约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、或约20%至约30%)的抗体量或抗体施用时间表。

[0162] 可在临床前动物模型中初步确定激动性抗体的R0,以便为其他哺乳动物中,例如人类中的用药提供信息。例如,在一些实施方式中,本申请提供了为治疗患有癌症的受试者选择特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的有效剂量或抗体施用时间表的方法,该方法包括

[0163] (a) 将所述激动性抗体施用于动物模型(例如,小鼠肿瘤模型,猴肿瘤模型);

[0164] (b) 从该动物模型获得样品(例如血液);

[0165] (c) 确定所述样品中所述抗体的RO;

[0166] (d) 使用从步骤(c)获得的RO来预计/预测受试者体内的预期RO;以及

[0167] (e) 选择足以达到和/或维持小于约80%(或小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约50%、小于约40%、小于约50%、小于约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、或约20%至约30%)的RO或RO范围的抗体量或抗体施用时间表。

[0168] 在某些实施方式中,抗体的有效量是基于抗体表现出治疗功效(例如,抗肿瘤活性)的RO范围来定义的。相应地,本申请还提供了用于确定特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体的有效RO范围的方法,该抗体在该范围内达到治疗效果,例如抗肿瘤活性,该方法包括

[0169] (a) 以不同的量或不同的频率将该抗体施用于例如动物模型(例如,小鼠肿瘤模型)。

[0170] (b) 从所述动物获取样品(例如,血液)。

[0171] (c) 测量所述样品中所述抗体的RO,以获得剂量-反应RO曲线。

[0172] (d) 确定产生治疗效果(例如,抗肿瘤活性)的抗体的施用量或施用频率,并将其与一定范围的RO相关联。

[0173] 在一些实施方式中,该方法进一步包括根据在步骤(d)中确定的RO范围,预计/预测激动性抗体对受试者(例如,人类患者)的预期RO范围的步骤。

[0174] 在一些实施方式中,本申请提供了为治疗患有癌症的受试者选择特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的有效剂量或抗体施用时间表的方法,该方法包括

[0175] (a) 从用该抗体治疗的患者中获取样品(例如,肿瘤活检样品)。

[0176] (b) 测定所述样品中所述抗体的RO。

[0177] (c) 使用从步骤(b)获得的RO来确定受试者体内的预期RO;以及

[0178] (d) 选择足以达到和/或维持小于约80%(或小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约50%、小于约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、约20%至约40%、或约20%至约30%)的抗体量或抗体施用时间表。

[0179] 在一些实施方式中,可根据来自临床前数据的与疗效(例如,抗肿瘤活性)相关的RO和/或RO范围,或通过回顾性分析,来预测/预测人类患者中的预期RO和/或RO范围。

[0180] 在临床前环境中,可以,例如,使用从表面等离子共振确定的解离常数 K_d 或从体外人细胞系获得的结合 EC_{50} 来计算人体RO (Muller PY and Brennan FR, Clin Pharmacol Ther. 2009; 85: 247-58; Saber H et al., Regul Toxicol Pharmacol. 2016; 81: 448-56)。然而,由于各种体外系统的局限性(例如,缺乏竞争性配体),可以通过评估某一动物物种中体外RO与该物种体内观察到的体外RO的相关性如何,来支持人体RO的预测 (Yang Z et al., J Pharmacol Exp Ther. 2015; 355: 506-515)。在临床上,可以进行人群药代动力学-药效动力学 (PK-PD) 建模来确定药物浓度与RO数据之间的关系 (Rosario MC et al., Br J Clin Pharmacol. 2008; 65: 86-94), 从中可以预测不同剂量方案下的人体RO 数据。然后,可以利用预测/预计的RO确定激动治疗性抗体的有效人体剂量或抗体施用时间表,例如,足以达到

和/或维持在人类癌症患者中的RO或RO 范围小于约80% (或小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约50%、小于约40%、小于约50%、约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、约20%至约40%或约20%至约30%)的剂量或频率。

[0181] 用于预计结合免疫刺激性受体的激动性抗体的预期RO和/或RO范围的合适的临床前动物模型包括但不限于小鼠肿瘤模型(例如,CT26小鼠同基因肿瘤模型)、小鼠疫苗接种模型、猴子疫苗接种模型和利用原生人类白细胞群的体外刺激模型系统。

[0182] 为了进行回顾性分析,可以在用结合免疫刺激性受体的激动性抗体治疗的患者的样品中测定RO。来自患者的样品可以是,例如,肿瘤活检、血液和分离的外周血单个核细胞。然后,可以利用通过回顾性分析获得的RO为施用给人类癌症患者的剂量或施用时间表提供信息(例如,足以达到和/或维持小于约80%的RO的剂量或频率)。

[0183] 在一些实施方式中,本申请提供了治疗癌症的方法,包括将特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的有效量或抗体施用时间表施用于有此需要的受试者,其中要施用的抗体的量或抗体施用时间表是根据上述的剂量选择方法选择的。

[0184] 在某些实施方式中,本申请提供了治疗受试者(例如,人类患者)中的癌症的方法,其中已经使用本文描述的方法为该受试者确定了足够达到和/或维持小于约80% (或小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约50%、小于约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、约20%至约30%)的RO和/或RO范围的治疗用激动性抗体的量或抗体施用时间表,包括将所述治疗用激动性抗体的所述足够量或施用时间表施用于该受试者。

[0185] 本申请还提供了一种监测正在接受癌症治疗的受试者体内特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的水平的方法,包括:

[0186] (a) 从受试者中获取样品(例如,血液);

[0187] (b) 确定该样品中的RO(即所述抗体对所述受体的占据率);

[0188] (c) 如果受体占据率大于约80%,则减少向受试者施用所述抗体的量或频率,或者如果受体占据率小于约20%,则增加所述抗体的量或频率;

[0189] (d) 任选地重复步骤(a)-(c),直到达到足以达到和/或维持约20%至约80%、约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、或约20%至约30%的RO的抗体剂量或抗体施用时间表。

[0190] 在另一个实施方式中,本申请提供了一种监测正在接受癌症治疗的受试者体内特异性结合免疫刺激性受体的治疗用激动性抗体的水平的方法,包括:

[0191] (a) 从受试者中获取样品(例如,血液);

[0192] (b) 确定样品中的RO(即所述抗体对所述受体的占据率);

[0193] (c) 建立抗体浓度和RO之间的PK-PD关系,用于预测剂量方案和/或剂量频率的RO;

[0194] (d) 选择这样的剂量和/或抗体施用时间表,其会达到和/或维持约20%至约80%、约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%或约20%至约30%的RO和/或RO范围。

[0195] 本申请还提供了治疗癌症的方法,包括给有此需要的受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和附加疗法。其中,所述附加疗法以固定的频率施用,所述激动性抗体以足以达到和/或维持小于约80% (或小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约

50%、小于约40%、小于约50%、小于约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、或约20%至约30%)的RO和/或RO范围的频率施用。在一些实施方式中,激动性抗体的用药频率是使用上述的剂量选择方法确定的。

[0196] 在本文描述的方法的一些实施方式中,免疫刺激性受体是共刺激受体,例如选自下组的受体:肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)成员、ICOS(CD278)、CD28、LIGHT、CD40L、TIM1、SLAM、CD1、CD2、CD226、LFA-1(CD11A、CD18)、CD2、CD5、CD7、CD30、CD54、CD97、CD154、CD160、LIGHT、NKG2C、SLAMF7和NKp80。

[0197] 在一些实施方式中,共刺激受体是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的成员。相应地,在一些实施方式中,在本文描述的方法中使用的激动性抗体与TNFR1、TNFR2、HVEM、LTβR、OX40、CD27、CD40、FAS、DCR3、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、FN14、TACI、BAFFR、BCMA、GITR、TROY、DR3(死亡受体3)、DR6(死亡受体6)、XEDAR(外异蛋白(ectodysplasin)A2受体)或NGFR。

[0198] 在一个特定的实施方式中,免疫刺激性受体是OX40。相应地,本申请提供了一种治疗癌症的方法,包括给有此需要的受试者施用特异性结合OX40的激动性抗体(例如OX40.21),其中该激动性抗体以足以在受试者体内达到和/或维持小于约80%(或小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约50%、小于约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、或约20%至约30%)的RO和/或RO范围的量或频率施用。

[0199] 在一些实施方式中,本文中所述的治疗癌症的方法包括向有此需要的受试者施用有效量的抗OX40抗体和有效量的抗PD-1抗体,其中抗OX40和抗PD-1抗体至少施用一个施用周期,其中该周期为12周,其中对于该至少一个周期中的每个周期,以约1、3、10、20、40、50、80、100、130、150、180、200、240或280mg的固定剂量施用至少一个剂量的抗OX40抗体,并且以约50、80、100、120、150、180、200、240、480、720或960mg的固定剂量施用至少3个剂量的抗PD-1抗体。在一个实施方式中,对于该至少一个周期中的每个周期,以约20、40或80mg的固定剂量施用一个剂量的抗OX40抗体,并以约480mg的固定剂量施用3个剂量的抗PD-1抗体。在一个实施方式中,对于所述至少一个周期中的每个周期,以约20mg的固定剂量施用一个剂量的抗OX40抗体,并以约480mg的固定剂量施用3个剂量的抗PD-1抗体。在一个实施方式中,对于所述至少一个周期中的每个周期,以约40mg的固定剂量施用一个剂量的抗OX40抗体,并以约480mg的固定剂量施用3个剂量的抗PD-1抗体。在一个实施方式中,对于所述至少一个周期中的每个周期,以约80mg的固定剂量施用一个剂量的抗OX40抗体,以约480mg的固定剂量施用3个剂量的抗PD-1抗体。在一个实施方式中,抗PD-1抗体在每个周期的第1、29和57天施用。在一个实施方式中,抗OX40抗体在每个周期的第1天施用。在一个实施方式中,抗PD-1抗体在每个周期的第1、29和57天施用,抗OX40抗体在每个周期的第1天施用。在一个实施方式中,12周施用周期可以根据需要重复进行。在一个实施方式中,施用由多达9个周期组成。在一个实施方式中,施用包括1、2、3、3、4、5、6、7、8或9个周期。在一个实施方式中,所述OX-40抗体包括OX40.21。在一个实施方式中,所述抗PD-1抗体包括纳武单抗。在一个实施方式中,所述癌症选自膀胱癌、宫颈癌、肾细胞癌、睾丸癌、结直肠癌、肺癌、头颈癌和卵巢癌。在一个实施方式中,所述癌症是膀胱癌。在一个实施方式中,受试者是人类受试者。

[0200] 还提供了结合免疫刺激性受体的激动性抗体与附加药剂的联合疗法。在这样的实施方式中,激动性抗体(例如,抗OX40抗体)的有效量可实质性低于该激动性抗体单独使用的情况(即在单一疗法时)。

[0201] 相应地,本申请提供了一种治疗癌症的方法,包括向有此需要的受试者施用特异性结合OX40的激动性抗体(例如,MEDI6469、MEDI0562、PF-04518600、MOXR0916、GSK3174998和W02016/196228中描述的抗体(例如OX40.21))和附加疗法(非限制性的例子包括抗PD1抗体、抗PDL1抗体、抗LAG3抗体、抗CTLA4抗体、和抗TGF β 抗体),其中所述激动性抗体以足以达到和/或维持小于约80%(或小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约50%、小于约40%、小于约50%、小于约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、或约20%至约30%)的RO和/或RO范围的量或频率施用。

[0202] 在一些实施方式中,所述抗OX40抗体以不同于所述附加疗法的频率施用。例如,所述附加疗法以固定频率施用,而所述抗OX40抗体以足以实现小于约80%(或小于约70%、小于约60%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约50%、小于约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、或约20%至约30%)的RO和/或RO范围的量或频率施用。

[0203] 在一些实施方式中,结合免疫刺激性受体的激动性抗体(例如,抗OX40抗体,如OX40.21)与附加疗法(例如,纳武单抗)联合使用时,该激动性抗体脉冲施用。在一些实施方式中,该激动性抗体的脉冲施用是为了达到和/或维持小于约80%(或小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约50%、小于约40%、小于约50%、小于约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、约20%至约30%)的RO。例如,在一个实施方式中,脉冲施用可涉及激动性抗体与附加药剂的联合疗法,其中激动性抗体每8周或12周施用一次,附加药剂(例如,抗PD1抗体)每4周施用一次。

[0204] 可以在用结合免疫刺激性受体的激动性抗体治疗的受试者中监测T细胞活化的标志物,以确认该激动性抗体正在以有效的剂量或频率施用。其他可供监测(且显示“钩状效应”)的T细胞活化的标志物的例子包括但不限于免疫刺激性受体(例如,OX40)、ICOS、CD44和Ki67的表面表达,以及已知在免疫应答期间被上调的细胞因子(例如,IFN- γ 、IL-2)。测量上述标志物水平的方法在本领域是众所周知的(例如,ELISA)。T细胞增殖可以通过例如³H-胸苷结合试验来监测。

[0205] 当本文描述的方法中靶向的免疫刺激性受体是OX40时,可溶性OX40(sOX40)可作为标志物用于监测激动性抗体治疗的疗效,因为sOX40在高RO水平下表现出所谓的“钩状效应”(参见,例如,实施例8)。实施例8中提供了一种用于测定sOX40水平的示例性方法(ELISA)。

[0206] 可以用本文描述的方法治疗或监测其生长的癌症包括通常对免疫疗法有反应的癌症,以及通常对免疫疗法无反应的癌症。癌症可以是具有实体瘤或血液恶性肿瘤(液态肿瘤)的癌症。用于治疗癌症的非限制性实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非鳞状非小细胞肺癌、胶质瘤、胃肠道癌、肾癌(例如透明细胞癌)、卵巢癌、肝细胞癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如,肾细胞癌(RCC)、前列腺癌(如:激素难治性前列腺癌)、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤(多形性胶质母细胞瘤)、子宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞癌、乳腺癌、结肠癌、和头颈癌(或癌瘤)、胃癌、生殖

细胞瘤、小儿肉瘤、鼻窦天然杀伤、黑色素瘤（如转移性恶性黑色素瘤，如皮肤或眼内恶性黑色素瘤）、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛门区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、小肠炎、内分泌系统癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童期实体瘤、输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统（CNS）肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱轴瘤、脑癌、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱导的癌症（包括石棉诱导的）、病毒相关的癌症或病毒源性癌症（例如人乳头瘤病毒（HPV）相关或HPV起源的肿瘤），以及源自两种主要血细胞谱系，即骨髓细胞系（产生粒细胞、红细胞、血小板细胞、巨噬细胞和肥大细胞）或淋巴细胞系（产生B细胞、T细胞、NK细胞和浆细胞）中的任何一种的血液学恶性肿瘤，如所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤，例如：急性、慢性、淋巴细胞性和/或骨髓性白血病，如急性白血病（ALL）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）和慢性骨髓性白血病（CML）、未分化的AML（M0）、髓细胞性白血病（M1）、髓细胞性白血病（M2；细胞成熟）、早幼粒细胞白血病（M3 或M3变异型[M3V]）、骨髓单核细胞白血病（M4或M4变异型伴有嗜酸性粒细胞增多[M4E]）、单核细胞白血病（M5）、红细胞白血病（M6）、巨细胞白血病（M7）、孤立性粒细胞肉瘤和绿色瘤；淋巴瘤，如霍奇金淋巴瘤（HL）、非霍奇金淋巴瘤（NHL）、B细胞血液恶性肿瘤，如B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞B细胞淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织（MALT）淋巴瘤、间变性（如Ki 1+）大细胞淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠道T细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、前体T淋巴母细胞淋巴瘤、T淋巴细胞；和淋巴瘤/白血病（T-Lbly/T-ALL）、外周T细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、移植后淋巴增生性疾病、真性组织细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性积液性淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤（LBL）、淋巴系造血性肿瘤、急性淋巴母细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞淋巴瘤（DHL）、免疫母细胞大细胞淋巴瘤、前体 B淋巴母细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤（CTLC）（又称蕈样肉芽肿或Sezary 综合征），以及淋巴浆细胞性淋巴瘤（LPL）伴Waldenstrom巨球蛋白血症。骨髓瘤，如IgG型骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤（又称无痛型骨髓瘤）、孤独性浆细胞瘤，以及多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病（CLL）、毛细胞淋巴瘤；骨髓系造血性肿瘤、间质源性肿瘤，包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、中枢神经和周围神经的肿瘤，包括星形细胞瘤、神经鞘瘤；间质源性肿瘤，包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、和骨肉瘤；和其他肿瘤，包括黑色素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌和畸胎瘤；淋巴细胞系的造血性肿瘤，例如T细胞和B细胞肿瘤，包括但不限于T细胞病症，如T-幼淋巴细胞白血病（T-PLL），包括但不限于小细胞型和脑回状细胞型；大粒细胞淋巴细胞白血病（LGL），优选为T细胞型；a/d T-NHL 肝脾性淋巴瘤；外周/胸腺后T细胞淋巴瘤（多形性和免疫母细胞性亚型）；血管中心性（鼻腔）T细胞淋巴瘤；头颈癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌；急性髓系淋巴瘤，以及所述癌症的任何组合。

[0207] 本文所述的方法也可用于治疗转移性癌症、不可切除的和/或难治性癌症（例如，用过往的免疫治疗，例如，用阻断性CTLA-4或PD-1抗体的治疗，难治的癌症），和复发性癌症。

[0208] 在一些实施方式中，要用本文所公开的方法治疗的患者具有晚期实体瘤。例如，在

一个实施方式中,患者具有宫颈癌。在另一实施方式中,患者具有结直肠癌(CRC)。在另一实施方式中,患者患有膀胱癌(例如,不可切除的局部晚期或转移性膀胱癌)。在另一个实施方式中,患者患有卵巢癌(例如,不可切除的局部晚期或转移性卵巢癌)。

[0209] 在一个实施方式中,用本文所述方法治疗的患者具有非小细胞肺癌(NSCLC)。在另一实施方式中,患者具有头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)。在另一实施方式中,患者具有B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)。在另一实施方式中,患者具有骨髓瘤。在另一实施方式中,患者具有黑色素瘤。在另一实施方式中,患者患有弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

[0210] 在一个实施方式中,用本文所述方法治疗的患者具有宫颈癌。在一个实施方式中,宫颈癌是不可切除的、转移性的或复发的宫颈癌,且有记录的疾病进展。

[0211] 在一个实施方式中,用本文所述方法治疗的患者具有肾细胞癌。在一个实施方式中,所述肾细胞癌是转移性肾细胞癌。在一个实施方式中,所述肾细胞癌是具有透明细胞成分的肾细胞癌。

[0212] 在一个实施方式中,用本文所述方法治疗的患者具有睾丸癌。

[0213] 在一个实施方式中,正在用本文所述方法治疗的患者具有结直肠癌。在一个实施方式中,所述结直肠癌是微卫星不稳定性高(MSI-H)结直肠癌。在一个实施方式中,结直肠癌是微卫星稳定的结直肠癌。在一个实施方式中,结直肠癌是错配修复缺陷的结直肠癌。

[0214] 在一个实施方式中,用本文所述方法治疗的患者具有肺癌。

[0215] 在一个实施方式中,用本文所述方法治疗的患者具有头颈癌。在一个实施方式中,所述头颈癌是鳞状细胞癌。

[0216] 在一个实施方式中,用本文所述方法治疗的患者具有卵巢癌。在一个实施方式中,所述卵巢癌是不可切除的局部晚期卵巢癌。在一个实施方式中,所述卵巢癌是转移性卵巢癌。在一个实施方式中,所述卵巢癌是复发性铂敏感卵巢癌。

[0217] 在一些实施方式中,用本文所述方法治疗的患者是具有对先前的治疗(例如,先前的免疫肿瘤学药物治疗)表现出不充分反应的癌症的患者,或者具有难治性或耐药性的癌症的患者,其中该癌症的难治性或耐药性是固有的,或者该难治性或耐药性状态是后天获得的。在一些实施方式中,患者以前没有接受过(即,没有用过)免疫肿瘤学药物,例如,PD-1通路拮抗剂。

[0218] 在一些实施方式中,本文描述的方法可进一步包括标准护理治疗(例如,手术、放疗和化疗)。在其他实施方式中,所述方法可作为维持治疗,例如,意图用于预防肿瘤的发生或复发的治疗。

[0219] 在一些实施方式中,结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体作为辅助治疗给予受试者。在一些实施方式中,结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体用作一线、二线或三线治疗。

[0220] 在一些实施方式中,结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如OX40)的激动性抗体可作为单一疗法施用,或作为唯一的免疫刺激疗法施用。

[0221] 在其他实施方式中,可将结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体作为联合治疗的一部分施用,如下面所述。

[0222] 特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体可以与免疫肿瘤学药剂联合,免疫肿瘤学药剂例如免疫细胞(如T细胞)上的(i)免疫刺激性

(例如,共刺激)分子(例如,受体或配体)的激动剂,和/或(ii)免疫抑制性分子(例如,受体或配体)的拮抗剂,它们均可导致放大免疫应答,例如抗原特异性T细胞反应。在某些方面,免疫肿瘤学药剂是存在于参与先天免疫的细胞上,例如NK细胞上的(i)免疫刺激性(包括共刺激)分子(例如,受体或配体)的激动剂,或(ii)免疫抑制性(包括共抑制)分子(例如,受体或配体)的拮抗剂。这样的免疫肿瘤学药剂通常被称为免疫检查点调节剂,例如,免疫检查点抑制剂或免疫检查点刺激剂。

[0223] 在一些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体与这样的药剂一起施用,所述药剂靶向属于免疫球蛋白超家族成员(IgSF)的刺激性或抑制性分子。在一些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体可与靶向(或特异性结合)B7膜结合配体家族的成员的药剂一起施用,该家族包括B7-1、B7-2、B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)和B7-H6,或特异性结合B7家族成员的共刺激或共抑制受体。

[0224] 在一些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如OX40)也可以与靶向TNF和TNFR家族分子(配体或受体)中的某一成员的药剂一起施用,所述成员例如CD40和CD40L、GITR、GITR-L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT β R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDA1、EDA2、TNFR1、淋巴毒素 α /TNF β 、TNFR2、TNF α 、LT β R、淋巴毒素 α 1 β 2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY和NGFR(见,例如,Tansey(2009) Drug Discovery Today 00:1)。

[0225] 在一些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体与以下一种或多种药剂一起施用:

[0226] (1) 抑制T细胞激活的蛋白质的拮抗剂(抑制剂或阻断剂)(例如免疫检查点抑制剂),这样的蛋白质例如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L1、PD-L2和LAG-3,如上所述,以及下列任何一种蛋白质:TIM-3、半乳凝素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳凝素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、B7-H3、B7-H4、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1和TIM-4;和/或

[0227] (2) 刺激T细胞活化的蛋白质的激动剂,这样的蛋白质例如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、GITR、GITR-L、CD70、CD27、CD40、DR3和CD28H。

[0228] 调节上述蛋白质之一的治疗癌症的示例性药剂包括YervoyTM(ipilimumab 伊匹单抗)或Tremelimumab(抗CTLA-4)、加利昔单抗(galiximab)(抗B7.1)、BMS-936558(抗PD-1)、MK-3475(抗PD-1)、AMP224(抗B7DC)、BMS-936559(抗B7-H1)、MPDL3280A(抗B7-H1)、MEDI-570(抗ICOS)、AMG557(抗B7H2)、MGA271(抗B7H3)、IMB21(抗LAG-3)、BMS-663513(抗CD137)、PF-05082566(抗CD137)、CDX-1127(抗CD27)、阿他西普(Atacicept)(抗TACI)、CP-870893(抗CD40)、鲁卡木单抗(Lucatumumab)(抗CD40)、Dacetuzumab(抗CD40)、莫罗莫那(Muromonab)-CD3(抗CD3)、伊匹单抗(抗CTLA-4)。在一些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体与pidilizumab(CT-011)一起施用。

[0229] 特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体可以联合用于癌症治疗的其他分子包括NK细胞上的抑制性受体的拮抗剂或NK细胞上的激活性受体的激动剂,例如,KIR的拮抗剂(例如,lirilumab)。

[0230] 在某些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,

OX40)的激动性抗体可与抑制T细胞活化的细胞因子的拮抗剂或刺激T细胞活化的细胞因子的激动剂一起施用。

[0231] 在某些实施方案中,特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如OX40)的激动性抗体可以与下述(i)和/或(ii)联合用于刺激免疫应答,例如用于治疗诸如癌症的增生性疾病:(i)“IgSF家族、或B7家族、或TNF家族的抑制T细胞活化的蛋白质”的拮抗剂(或抑制剂或阻断剂);或“抑制T细胞活化的细胞因子(例如IL-6,IL-10,TGF- β ,VEGF;“免疫抑制细胞因子”)”的拮抗剂;和/或(ii)“IgSF家族、B7家族或TNF家族的刺激性受体”的激动剂,或“刺激T细胞活化的细胞因子的受体”的激动剂。

[0232] 其他适用于联合疗法的药剂包括抑制或耗竭巨噬细胞或单核细胞的药剂包括但不限于CSF-1R拮抗剂,例如CSF-1R拮抗剂抗体,包括RG7155(W011/70024、W011/107553、W011/131407、W013/87699、W013/119716、W013/132044);或FPA-008(W011/140249;W013169264;W014/036357)。

[0233] 特异性地结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如OX40)的激动性抗体也可与抑制TGF- β 信号转导的药剂一起施用。

[0234] 用于联合治疗的其他制剂包括增强肿瘤抗原呈递的制剂,例如树突状细胞疫苗、GM-CSF分泌的细胞疫苗、CpG寡核苷酸和咪喹莫特,或增强肿瘤细胞免疫原性的疗法(例如蒽环类药物)。

[0235] 其他可用于联合治疗的疗法包括耗竭或阻断Treg细胞的疗法,例如,特异性结合CD25的药剂。

[0236] 另一类可与特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如OX40)的激动性抗体联合使用的疗法是抑制代谢酶如吲哚胺二恶英酶(IDO)、二恶英酶、精氨酸酶或一氧化氮合成酶的疗法。

[0237] 另一类可与特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(如OX40)等免疫刺激性受体的激动性抗体一起使用的药物包括抑制腺苷的形成或抑制腺苷A2A受体的药物。

[0238] 其他用于联合治疗的疗法包括逆转/防止T细胞无能或衰竭的疗法,以及在肿瘤部位引发天然免疫激活和/或炎症的疗法。

[0239] 在一些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体例如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体可以与一种以上的免疫肿瘤学药剂联合,并且可以与,例如,靶向免疫通路的多个要素的组合策略,例如,以下一种或多种联合:增强肿瘤抗原呈递的疗法(例如,树突状细胞疫苗、GM-CSF分泌细胞疫苗、CpG寡核苷酸、咪喹莫特);抑制负性免疫调节的疗法,例如通过抑制CTLA-4和/或PD1/PD-L1/PD-L2通路和/或耗竭或阻断Tregs或其他免疫抑制细胞;刺激正性免疫调节的疗法,例如,刺激CD-137和/或GITR通路和/或刺激T细胞效应细胞功能的激动剂;系统性地增加抗肿瘤T细胞频率的疗法;耗竭或抑制Tregs例如肿瘤中的Tregs的疗法,例如使用CD25的拮抗剂(如daclizumab)或通过回体抗CD25珠子耗竭;影响肿瘤中抑制性骨髓细胞功能的疗法;提高肿瘤细胞免疫原性的疗法(如蒽环素类药物);采用过继T细胞或NK细胞移植,包括基因修饰细胞,如通过嵌合抗原受体修饰的细胞(CAR-T疗法);抑制代谢酶,如吲哚胺二恶英酶(IDO)、二恶英酶、精氨酸酶或一氧化氮合成酶等的疗法;逆转/防止T细胞无能或衰竭的疗法;触发肿瘤部位的先天性免疫激活和/或炎症的疗

法;施用免疫刺激性细胞因子;或阻断免疫抑制性细胞因子。

[0240] 在一些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如OX40)的激动性抗体可以与以下一种或多种使用:连接正性共刺激受体的激动剂,衰减通过抑制性受体的信号传导的阻断剂,系统性地增加抗肿瘤T细胞频率的拮抗剂和一种或多种药剂,克服肿瘤微环境中独特的免疫抑制途径(例如,阻断抑制性受体接合(例如,PD-L1/PD-1相互作用),耗竭或抑制Tregs(例如,使用抗CD25单克隆抗体(例如,daclizumab)或通过回体抗CD25珠子耗竭)、抑制代谢酶如IDO、或逆转/防止T细胞的无能或衰竭)的药剂;以及在肿瘤部位触发天然免疫激活和/或炎症的药剂。

[0241] 在某些实施方式中,如果受试者为BRAF V600突变阳性,则将特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体与 BRAF抑制剂一起施用。

[0242] 在某些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体与另一种免疫刺激性抗体一起施用,所述另一种免疫刺激性抗体例如拮抗性抗PD1抗体、拮抗性抗PDL1抗体、拮抗性抗CTLA4抗体、拮抗性抗LAG3抗体;所述抗OX40抗体与另一种免疫刺激性抗体一起施用。在一个特定的实施方式中,该联合疗法包括激动性抗OX40抗体和拮抗性抗PD1抗体。

[0243] 用于本文描述的方法中的合适的PD-1拮抗剂包括但不限于配体、抗体(例如,单克隆抗体和双特异性抗体)和多价剂。在一个实施方式中,PD-1拮抗剂是融合蛋白,例如,Fc融合蛋白,例如AMP-244。在一个实施方式中,PD-1拮抗剂是抗PD-1或抗PD-L1抗体。一个示例性的抗PD-1抗体是纳武单抗(BMS-936558)或包括WO 2006/121168中描述的抗体17D8、2D3、4H1、5C4、7D3、5F4和4A11中之一的CDR或可变区的抗体。在某些实施方式中,抗PD1抗体是WO2012/145493中所述的MK-3475(Lambrolizumab);和WO2012/145493中所述的AMP-514。其他已知的PD-1抗体和其他PD-1抑制剂包括WO 2009/014708、WO 03/099196、WO 2009/114335、WO 2011/066389、WO 2011/161699、WO 2012/145493、美国专利号7,635,757和8,217,149以及美国专利公开号2009/0317368中描述的抗体。也可以使用WO2013/173223中公开的任何一种抗PD-1抗体。与这些抗体之一竞争结合PD-1或和/或结合PD-1上的相同表位的抗体也可以用于联合治疗。靶向PD-1受体的另一种途径是由PD-L2(B7-DC)的细胞外域与IgG1的Fc部分融合而成的重组蛋白,称为AMP-224。在某些实施方式中,该抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性。

[0244] 在某些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体如TNF和TNFR家族分子(例如,OX40)的激动性抗体与纳武单抗或抗原结合片段及其变体联合使用,纳武单抗包含分别包括SEQ ID NO:16和17所示的序列的重链和轻链。在某些实施方式中,该抗体具有纳武单抗的重链和轻链CDR或可变区。相应地,在一个实施方式中,该抗体包括具有SEQ ID NO:18所述序列的纳武单抗的VH的CDR1、CDR2和CDR3域,以及具有SEQ ID NO:19所述序列的纳武单抗的VL的CDR1、CDR2和CDR3域。在某些实施方式中,所述抗体包括:分别包含SEQ ID NO:20-22中所示序列的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别包含SEQ ID NO:23-25中所示序列的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在某些实施方式中,该抗体包括分别包含SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的VH和/或VL区域。在某些实施方式中,该抗体与SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19具有至少约90%,例如,至少约90%、95%或99%的可变区同一性。

[0245] 示例性的抗PD-L1抗体包括BMS-936559(在WO 2007/005874和美国专利No.7,943,743中称为12A4),或包括3G10、12A4、10A5、5F8、10H10、1B12、7H1、11E6、12B7和13G4的CDR或可变区的抗体,这些抗体在PCT 公开WO 07/005874和美国专利No.7,943,743中描述。在某些实施方式中,抗PD-L1抗体为MEDI4736(也称为抗B7-H1)、MPDL3280A(也称为RG7446)、MSB0010718C(WO2013/79174)或rHigM12B7。也可以使用WO2013/173223、WO2011/066389、WO2012/145493、美国专利号7,635,757和8,217,149以及美国公开号2009/145493中公开的任何一种抗PD-L1抗体。

[0246] 示例性的抗CTLA-4抗体包括Yervoy™(伊匹单抗或抗体10D1,在PCT 公开WO 01/14424中描述)、tremelimumab(以前称ticilimumab,CP-675,206),或以下出版物中任选描述的抗CTLA-4抗体:WO 98/42752;WO 00/37504;美国专利6,207,156号;Hurwitz et al.(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(17):10067-10071;Camacho et al.(2004)J.Clin.Oncology 22(145):摘要 No.2505(抗体CP-675206);以及Mokyr et al.(1998)Cancer Res.58:5301-5304。也可以使用WO2013/173223中公开的任何一种抗CTLA-4抗体。

[0247] 在某些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体与伊匹单抗结合使用。在某些实施方式中,该抗体具有伊匹单抗的重链和轻链CDR或可变区。相应地,在一个实施方式中,该抗体包括具有SEQ ID NO:26所述序列的伊匹单抗的VH的CDR1、CDR2和CDR3域,以及具有SEQ ID NO:27所述序列的伊匹单抗的VL的CDR1、CDR2和CDR3域。在某些实施方式中,所述抗体包括:分别包含SEQ ID NO:28-30中所述序列的CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别包含SEQ ID NO:31-33中所述序列的CDR1、CDR2和CDR3域。在某些实施方式中,该抗体包含分别包含SEQ ID NO:26和/或SEQ ID NO:27中所述的氨基酸序列VH和/或VL区。在某些实施方式中,该抗体与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27具有至少约90%,例如,至少约90%、95%或99%的可变区同一性。

[0248] 示例性的抗LAG3抗体包括包含抗体25F7、26H10、25E3、8B7、11F2或17E5的CDRs或可变区的抗体,这些抗体在美国专利公开US2011/0150892、WO10/19570和WO2014/008218号中描述。在一个实施方式中,抗LAG-3抗体是BMS-986016。可使用其他本领域公知的抗LAG-3抗体包括IMP731和IMP-321,它们在US2011/007023、WO08/132601和WO09/44273中描述。

[0249] 在某些实施方式中,本文中讨论的治疗性抗体的联合可以作为药学上可接受的载体中的单一组合物同时施用,或者作为每个抗体在药学上可接受的载体中的分别组合物同时施用。在另一个实施方式中,治疗性抗体的联合可以连续施用。此外,如果联合治疗抗体的一个以上的剂量按顺序施用,顺序施用的顺序在每个施用的时间点上可以颠倒或者保持相同,并且顺序施用可以与同时施用相结合,或者其任何组合。

[0250] 在某些实施方式中,对于具有可能受益于刺激免疫系统的疾病,例如癌症或传染性疾病,的受试者,通过向受试者施用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和免疫肿瘤学药剂来治疗。示例性的免疫肿瘤学药剂包括CD137(4-1BB)激动剂(例如,激动性CD137抗体,如urelumab或PF-05082566(WO12/32433));GITR激动剂(例如,激动性抗GITR抗体)、CD40激动剂(例如,激动性CD40抗体);CD40拮抗剂(例如,拮抗性CD40抗体,如urelumab或PF-05082566(WO12/32433));GITR激动剂(例如,一种激动性抗GITR抗体)、CD40激动剂(例如,一种激动性CD40抗体);CD40拮抗剂(例如,一种拮抗性CD40抗体,如lucatumumab

(HCD122)、dacetuzumab (SGN-40)、CP-870,893或Chi Lob 7/4);CD27激动剂(例如,激动性CD27抗体如 varlilumab (CDX-1127))、MGA271(抗B7H3)(W011/109400));KIR拮抗剂(例如lirililumab);IDO拮抗剂(例如,INCB-024360(W02006/122150,W007/75598,W008/36653,W008/36642),吲哚莫德(indoximod),NLG-919(W009/73620,W009/1156652,W011/56652,W012/142237)或F001287);Toll样受体激动剂(例如TLR2/4激动剂(例如,卡介苗);TLR7激动剂(例如,Hiltonol或咪喹莫特);TLR7/8激动剂(例如,瑞喹莫德);或TLR9激动剂(例如,CpG7909));和TGF- β 抑制剂(例如,GC1008、LY2157299、TEW7197或IMC-TR1)。

[0251] 任选地,特异性地结合免疫刺激性受体的激动性抗体,作为唯一的免疫治疗剂,或作为该激动性抗体与一种或多种附加的免疫治疗抗体(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3阻断剂)的联合,可进一步联合免疫原性剂,例如癌性细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和糖分子)、细胞、和转染有编码免疫刺激细胞因子的基因的细胞(He et al., (2004) J. Immunol. 173:4919-28)。可使用的肿瘤疫苗的非限制性例子包括黑色素瘤抗原的肽,例如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶的肽,或被转染以表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞(下文进一步讨论)。特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和一种或多种附加抗体(例如,CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)的联合也可以进一步与标准的癌症治疗方法联合。例如,特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和一种或多种附加抗体(例如,CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)的联合可以有效地与化疗方案联合。在这些情况下,可以减少与该联合一起施用的其他化疗试剂的剂量(Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58:5301-5304)。例如,这样的联合可以包括:特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,联合或不联合附加的抗体(例如,抗CTLA-4抗体和/或抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体和/或抗LAG-3抗体),进一步联合达卡巴嗪或白细胞介素-2(IL-2),用于治疗黑色素瘤。将特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断与化疗结合的科学上的理据是,细胞死亡——这是大多数化疗化合物的细胞毒性作用的结果——应该会导致抗原呈递途径中的肿瘤抗原水平增加。其他可能通过细胞死亡而与特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体联合(其中有或没有CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)产生协同作用的联合疗法包括放射、手术或激素剥夺。这些程序都会在宿主中产生肿瘤抗原的来源。血管生成抑制剂也可以与特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断的联合相结合。抑制血管生成导致肿瘤细胞死亡,这可以是馈入宿主抗原呈递途径的肿瘤抗原的来源。

[0252] 在某些实施方案中,特异性地结合免疫刺激性受体的激动性抗体可以用作唯一的免疫治疗剂,或者与抗OX40抗体和CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断抗体联合,可以与这样的双特异性抗体(美国专利号5,922,845和5,837,243)联合使用,所述双特异性抗体将表达Fc α 或Fc γ 受体的效应细胞靶向肿瘤细胞的。双特异性抗体可用来靶向两种不同的抗原。通过使用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断的联合,这些反应的T细胞臂将得到增强。

[0253] 在另一实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体可以作为唯一的免疫治疗剂,或者特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体与附加的免疫刺激剂的联合,所述附加的免疫刺激剂例如,拮抗性抗CTLA-4抗体和/或拮抗性PD-1抗体和/或拮抗性PD-L1

抗体和/或拮抗性LAG-3剂(例如抗体)可以与抗肿瘤抗体结合使用,抗肿瘤抗体例如美罗华(Rituxan)®(利妥昔单抗)、赫赛汀(Herceptin)®(曲妥珠单抗)、百克沙(Bexxar)®(托西莫单抗)、Zevalin®(替伊莫单抗)、Campath®(阿仑单抗)、Lymphocide®(依帕珠单抗)、Avastin®(贝伐单抗)和特罗凯(Tarceva)®(厄洛替尼)等。作为示例,并且不希望受理论的约束,用抗癌抗体或抗癌抗体与毒素的缀合物治疗可导致癌细胞(例如,肿瘤细胞)死亡,这将增强由免疫刺激剂(例如,拮抗性CTLA-4、PD-1、PD-L1或LAG-3剂,例如,抗体)介导的免疫应答。在一个示例性的实施方式中,增殖性疾病(例如,癌肿瘤)的治疗可以包括:抗癌剂(例如,抗体)与特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,以及任选的附加免疫刺激剂,例如,拮抗性抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3剂(例如,抗体),同时或依次或其任何组合,可增强宿主的抗肿瘤免疫应答。

[0254] 肿瘤通过多种机制逃避宿主免疫监视。这些机制中的许多可以通过灭活由肿瘤表达的、具有免疫抑制作用的蛋白质来克服。这些蛋白质包括TGF- β (Kehr1 et al. (1986) J. Exp. Med. 163:1037-1050)、IL-10 (Howard&O'Garra (1992) Immunology Today 13:198-200)、和Fas配体 (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365)。针对这些实体中每一种的抗体可以进一步与特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体联合,且联合或不联合附加的免疫刺激剂,例如拮抗性抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3剂,如抗体,以抵消免疫抑制剂的作用,并有利于宿主的抗肿瘤免疫应答。

[0255] 可用于激活宿主免疫应答性的其他药剂(例如,抗体)可进一步与特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体(联合或不联合附加的免疫刺激剂,例如拮抗性抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体)联合使用。这些药剂包括树突状细胞表面的可激活DC功能和抗原呈递的分子。抗CD40抗体 (Ridge et al., 同上)可以与特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和任选的附加免疫刺激剂(如抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3剂,如抗体)结合使用。其他激活T细胞共刺激分子的抗体Weinberge et al., 同上, Melero et al. 同上, Hutloff et al., 同上, 也可提供增加的T细胞激活水平。

[0256] 如上文讨论的,骨髓移植目前正被用于治疗各种造血性肿瘤。特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体,单独或联合CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断,可用于提高供体移植的肿瘤特异性T细胞的有效性。

[0257] 一些实验性治疗方案涉及回体激活和扩增抗原特异性T细胞,并将这些细胞过继性转入接受者,以抗原特异性T细胞对抗肿瘤 (Greenberg&Riddell, 同上)。这些方法也可用于激活T细胞对传染性病原体(如CMV)的应答。在特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体存在下的体外激活(有或没有附加免疫刺激疗法,例如拮抗性抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体),可望增加过继性转入的T细胞的频率和活性。

[0258] 本文所述的特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和联合抗体疗法可以与附加治疗联合使用(例如,同时或单独使用),附加治疗例如放射、化疗(例如,使用喜树碱(CPT-11)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂、多柔比星、伊立替康、紫杉醇、吉西他滨、顺铂、紫杉醇、卡铂-紫杉醇(Taxol)、多柔比星、5-FU、或喜树碱+apo21/TRAIL(6X组合))、一种或多种蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米或MG132)、一种或多种Bcl-2抑制剂(如,BH3I-2'(bcl-x1抑制剂)、吡啶胺双加氧酶-1抑制剂(如INCB24360,吡啶莫德,NLG-919,或F001287)、AT-101(R-(-)-棉酚衍生物)、ABT-263(小分子)、GX-15-070(奥巴克拉(obatoclox))或MCL-1(髓

性白血病细胞分化蛋白-1)拮抗剂)、iAP(细胞凋亡蛋白的抑制剂)拮抗剂(如smac7、smac4、小分子smac模拟物、合成smac肽(见Fulda et al., Nat Med 2002;8:808-15)、ISIS23722(LY2181308)或AEG-35156(GEM-640))、HDAC(组蛋白脱乙酰酶)抑制剂、抗CD20抗体(如利妥昔单抗),血管生成抑制剂(如贝伐单抗),针对VEGF和VEGFR的抗血管生成剂(如Avastin),合成三萜类药物(见Hyer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808)、c-FLIP(细胞FLICE-抑制蛋白)调节剂(例如,天然和合成配体的PPAR γ (过氧化物酶体增殖体激活受体 γ)、5809354或5569100)、激酶抑制剂(例如索拉非尼)、曲妥珠单抗、西妥昔单抗(Cetuximab)、替西罗莫司、mTOR抑制剂如雷帕霉素和替西罗莫司、硼替佐米、JAK2抑制剂、HSP90抑制剂、PI3K-AKT抑制剂、来那度胺、GSK3 β 抑制剂、IAP抑制剂和/或基因毒性药物。

[0259] 本文所述的特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体和联合抗体疗法可进一步与一种或多种抗增殖细胞毒药物联合使用。可用作抗增殖性细胞毒剂的化合物类别包括但不限于下列化合物:

[0260] 烷基化剂(包括但不限于氮芥、亚乙基亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲类和三嗪类):尿芥、氮芥、环磷酰胺(CYTOXANTM)、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、三亚乙基密胺, 三亚乙基硫代环磷酰胺,白消安,卡莫司汀,洛莫斯汀,链佐星,达卡巴嗪和替莫唑胺。

[0261] 抗代谢物(包括但不限于叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂):甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、苯妥他汀和吉西他滨。

[0262] 抗增殖剂,包括但不限于:紫杉烷类,紫杉醇(紫杉醇商品名为TAXOLTM)、多西他赛、圆皮海绵内酯(discodermolide)(DDM)、dictyostatin(DCT)、黄柏苷A,埃坡霉素类,埃坡霉素A,埃坡霉素B,埃坡霉素C,埃坡霉素D,埃坡霉素E,埃坡霉素F,埃坡霉素D,脱氧埃坡霉素B1,[17]-脱氢脱氧埃坡霉素B,[18]脱氢脱氧埃坡霉素B,C12,13-环丙基埃坡霉素A,C6-C8桥联埃坡霉素A,反式9,10-脱氢埃坡霉素D,顺式9,10-脱氢埃坡霉素D,16-去甲基埃坡霉素B,埃坡霉素B10,圆皮海绵内酯,帕托皮龙(EPO-906),KOS-862,KOS-1584,ZK-EPO,ABJ-789,XAA296A(圆皮海绵内酯),TZT-1027(soblidotin),ILX-651(盐酸tasidotin),软海绵素(Halichondrin)B,甲磺酸艾瑞布林(E-7389),哈密特林(Hemiasterlin)(HTI-286),E-7974,隐藻素(Cryptophycins),LY-355703,美登木素生物碱免疫缀合物(DM-1),MKC-1,ABT-751,T1-38067,T-900607,SB-715992(伊斯平斯(ispinesib)),SB-743921,MK-0731,STA-5312,eleutherobin,17 β -乙酰氧基-2-乙氧基-6-氧代-B-均-雌激素-1,3,5(10)-三烯-3-醇,环链素(cyclostreptin),异莱利霉素(isolaulimalide),莱利霉素(laulimalide),4-表-7-脱羟基-14,16-二甲基-(+)-圆皮海绵内酯,和 cryptothilone 1,以及本领域已知的其他微管蛋白稳定剂。

[0263] 如果需要使异常增殖的细胞在使用特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体治疗同时或之前静止,也可以对患者施用激素和类固醇(包括合成类似物),如17 α -炔雌醇、己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、丙酸屈他雄酮、睾内酯、醋酸甲地孕酮、甲泼尼龙、甲基-睾酮、泼尼松龙、曲安西龙、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺、托瑞米芬和ZOLADEXTM。当采用本文描述的方法或组合物时,还可以根据需要施用,其他临床上用于调节肿瘤生长或转移的药物,如止吐剂。

[0264] 在某些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体(例如,抗 OX40 抗体如OX40.21)与纳武单抗联合(同时地或分别地)施用,以治疗患有癌症,例如结直肠癌或膀胱癌的患者。

[0265] 在某些实施方式中,特异性结合免疫刺激性受体的激动性抗体(例如,抗 OX40 抗体,如OX40.21)与伊匹单抗联合(同时地或分别地)施用,以治疗患有癌症,例如卵巢癌、膀胱癌或前列腺癌的患者。

[0266] 安全有效地施用化疗剂的方法是本领域技术人员熟知的。此外,标准文献中也描述了它们的施用方法。例如,许多化疗剂的施用方法在《医师参考书》(Physicians' Desk Reference (PDR)),例如,1996年版(Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA)中描述了许多化疗剂的施用方法;其中公开的内容通过引用在此并入其中。

[0267] 化疗剂和/或放疗可以根据本领域中公知的治疗方案进行施用。本领域技术人员可以显见的是,化疗剂和/或放疗对某疾病施用方式可根据正在治疗的疾病和化疗剂和/或放疗对该疾病的已知效果而改变。而且,根据熟练的临床医生的知识,根据所施用的治疗方案(例如,施用量和施用时间)可以根据所施用的治疗剂对患者的观察到的效果,并根据所施用的疾病对所施用的治疗剂的观察到的反应而改变。

[0268] II. 结合免疫刺激性受体的激动性抗体

[0269] 适合用于本文描述的方法(包括联合疗法)的结合免疫刺激性受体的激动性抗体包括新开发的激动性抗体,以及现有技术已知的激动性抗体(包括与这些抗体竞争或结合相同表位的抗体)。靶向免疫刺激性受体的新的激动性抗体可以用标准的抗体生产和筛选技术获得,并且可以用本领域公知测定法检测激动剂活性。

[0270] 在某些实施方式中,用于本文描述的方法的合适的激动性抗体结合并激活免疫刺激性受体及其下游信号通路,从而刺激免疫应答。在一些实施方式中,用于本文所述方法中的结合免疫刺激性受体的激动性抗体表现出“钩状效应”,其中接近饱和浓度或饱和浓度的抗体(例如,导致>80%的RO的浓度),与导致低于80%RO的浓度相比,在功能性体外测定(例如,细胞因子产生、增殖试验、受体表面表达)和/或体内测定(例如,抗肿瘤功效)中的功效降低。

[0271] 在一些实施方式中,激动性抗体结合共刺激受体,例如选自下组的共刺激受体:肿瘤坏死因子受体超家族成员(TNFRSF)、ICOS (CD278)、CD28、LIGHT、CD40L、TIM1、SLAM、CD1、CD2、CD226、LFA-1 (CD11A、CD18)、CD5、CD7、CD30、CD54、CD97、CD154、CD160、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80和TGF- β 。在一些实施方式中,用于本文描述的方法中的结合免疫刺激性受体的激动性抗体表现出“钩状效应”。

[0272] 在一些实施方式中,激动性抗体结合TNFRSF的成员,例如,选自下组的受体:TNFR1、TNFR2、HVEM、LT β R、OX40 (CD134/TNFRSF4)、CD27 (TNFRSF7)、CD40、FAS、DCR3、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、FN14、TACI、BAFFR、BCMA、GITR、TROY、DR3 (死亡受体3)、DR6 (死亡受体6)、XEDAR (外异蛋白A2受体)和NGFR。在一些实施方式中,用于本文描述的方法中的结合TNFRSF成员的激动性抗体表现出“钩状效应”。

[0273] 在一些实施方式中,激动性抗体特异性结合OX40,例如,表现出“钩状效应”的激动性抗OX40抗体。示例性的激动型抗OX40抗体是MEDI6469, MEDI0562, PF-04518600, MOXR0916, GSK3174998, RG-7888 (vonlerolizumab), INCAGN-1949, 以及W02016/196228 (例

如OX40.21);WO/1995/012673; WO199942585;WO/2014/148895;WO15153513;WO15153514;WO/2013/038191;WO2016057667;WO03106498;WO12027328;WO13028231; WO2016200836;WO17063162;WO17134292;WO 17096179;WO 17096281; WO 17096182中描述的抗体;每一个的内容在此通过引用方式将其全部内容并入。在一些实施方式中,激动性抗OX40抗体表现出以下特性:

[0274] (a) 与膜结合的人OX40结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1 nM)的EC₅₀,例如通过FACS测定;

[0275] (b) 与食蟹猴OX40结合,例如,与膜结合的食蟹猴OX40结合,例如,以10nM或更少的EC₅₀(例如,0.01nM至10nM),例如通过FACS测定;

[0276] (c) 与可溶性人OX40结合,例如,以10nM或更低的K_D(例如,0.01nM 至10nM),例如通过BIACORE®SPR分析测定

[0277] (d) 诱导或增强T细胞活化,表现为(i)表达OX40的T细胞中IL-2和/或IFN- γ 分泌增加,和/或(ii)T细胞增殖增强;和

[0278] (e) 抑制OX40配体与OX40的结合,例如,以通过FACS测定的1nM 或更低的EC₅₀,例如,在使用hOX40-293细胞的测定法中。

[0279] 在一些实施方式中,激动性抗OX40抗体结合Fc受体,例如,Fc γ 受体。

[0280] 在一些实施方式中,激动性抗OX40抗体通过多价交联诱导或增强T细胞活化。

[0281] 在一些实施方式中,激动剂抗OX40抗体可通过激活T_{eff}细胞、限制Treg 细胞对T效应细胞的抑制、耗竭和/或抑制肿瘤Treg细胞和/或激活NK细胞,例如在肿瘤中,来刺激或增强免疫应答。例如,激动性抗OX40抗体可激活或共刺激T_{eff}细胞,例如,表现为增强的细胞因子(例如,IL-2和IFN- γ)分泌和/或增强的增殖来证明。在某些实施方式中,激动性抗OX40抗体使IL-2分泌增加50%、100%(即,2倍)、3倍、4倍、4倍、5倍或更多,任选地,最大达10倍、30倍、100倍,如通过,例如在原代人T细胞或表达人OX40的T 细胞上测定的。在某些实施方式中,激动性抗OX40抗体使IFN- γ 分泌增加 50%、100%(即2倍)、3倍、4倍、4倍、5倍或更多,任选地,最大达10倍、30倍、100倍,如通过,例如在原代人T细胞或表达人OX40的T细胞上测定的。

[0282] 在一些实施方式中,激动性抗OX40抗体结合人补体的C1q组分。在一些实施方式中,激动性抗OX40抗体诱导NK细胞介导的活化CD4+T细胞的裂解。在一些实施方式中,激动性抗OX40抗体促进巨噬细胞介导的OX40 表达细胞的吞噬。在一些实施方式中,激动性抗OX40抗体抑制调节性T细胞介导的CD4+T细胞增殖。

[0283] 在一些实施方式中,激动剂抗OX40抗体与人OX40和犬齿状体OX40 结合。

[0284] 在一些实施方式中,激动性抗OX40抗体结合人OX40中的序列 DVVSSKPKPCTWCNLR (SEQ ID NO:15)的全部或部分。

[0285] 在一个特定的实施方式中,本文所述方法中使用的激动性抗OX40抗体是OX40.21。下面提供了OX40.21的重链和轻链序列、可变区序列和CDR序列。

[0286] 表2 OX40.21序列汇总

	SEQ ID	OX40.21序列
	5	VHCDR1 SYAMY
	6	VHCDR2 AIDTDAGTFYADSVRG
	7	VHCDR3 LGEGYFFDY
	8	VLCDR1 RASQSVSSYLA
	9	VLCDR2 DASNRAT
	10	VLCDR3 QQRSNWPPT
[0287]	11	VH EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYWVRQAPGKGLEWV SAITDAGTFYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR LGEGYFFDYWGQGLTVTVSS
	12	VL EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPARFSGSGGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGGGT KVEIK
	13	HC EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYWVRQAPGKGLEWV SAITDAGTFYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR LGEGYFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
[0288]	14	LC EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPARFSGSGGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

[0289] 相应地,在一些实施方式中,抗OX40抗体包括分别在可变重链SEQ ID NO:11和可变轻链SEQ ID NO:12中的三个可变重链CDR和三个可变轻链 CDR。

[0290] 在一些实施方式中,抗OX40抗体包括:分别包含SEQ ID NO:5-7的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:8-10的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0291] 在一些实施方式中,抗OX40抗体包括分别由SEQ ID NO:5-7组成的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别由SEQ ID NO:8-10组成的轻链 CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0292] 在一些实施方式中,抗OX40抗体分别包括SEQ ID NO:11和12所示的重链和轻链可变区序列。

[0293] 在一些实施方式中,抗OX40抗体包括分别在SEQ ID NO:13和14所示的重链和轻链序列。

[0294] 与免疫刺激性受体结合的示例性激动性抗体包括抗4-1BB抗体(例如, urelumab (BMS-663513)和PF-05082566)、抗GITR抗体(例如, TRX518、MK- 4166、MK-1248、GWN323和W02017087678中公开的抗体,该文的内容在此通过引用全部并入)、抗CD27抗体(例如,抗CD27抗体(例如Varlilumab (CDX-1127))、抗ICOS抗体(例如MEDI-570、GSK3359609、JTX-

2011)、抗 DR3 抗体 (例如, PTX-25) 和抗 CD40 抗体 (例如, CP-870, 893、dacetuzumab、Chi Lob 7/4、lucatumumab、APX005M、ADC-1013、JNJ-64457107、SEA-CD40), 以及与和/或与这些抗体竞争和/或结合相同表位的抗体。

[0295] 优选的是, 激动性抗体以高亲和力结合免疫刺激性受体, 例如, 以 10^{-7} M 或更低的 K_D , 10^{-8} M 或更低, 10^{-9} M 或更低, 10^{-10} M 或更低, 10^{-11} M 或更低, 10^{-12} M 或更低, 10^{-12} M 到 10^{-7} M, 10^{-11} M 到 10^{-7} M, 10^{-10} M 到 10^{-7} M, 或 10^{-9} M 到 10^{-7} M 的 K_D 。

[0296] 在一些实施方式中, 结合免疫刺激性受体的激动性抗体是选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的抗体。在一个特定的实施方式中, 该抗体是 IgG1 抗 OX40 抗体, 例如, OX40.21。

[0297] 在某些实施方式中, 结合免疫刺激性受体的激动性抗体包括改变抗体的性质的重链恒定区。例如, 激动性抗体可以包括修饰的重链恒定区, 相对于具有非修饰的重链恒定区的抗体, 该修饰的重链恒定区改变抗体的活性。相应地, 在一些实施方式中, 激动性抗体在重链恒定区中具有增强效应物功能的修饰。在另一些实施方式中, 激动性抗体在重链恒定区中具有降低效应器功能的修饰。Fc 区中的修饰可以用于, 例如, 相对于亲本 (a) 增加或减少抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC), (b) 增加或减少补体介导的细胞毒性 (CDC), (c) 增加或减少对 C1q 的亲和力, 和/或 (d) 增加或减少 Fc 受体的亲和力。可用于生成具有这些特征的变体 Fc 区域的具体修饰 (例如, 氨基酸取代) 在本发明中是众所周知的, 并在例如 W02016/196228 中有总结。

[0298] 在一些实施方式中, 结合免疫刺激性受体的激动性抗体是人的、人源化的或嵌合体抗体。

[0299] 在一些实施方式中, 结合免疫刺激性受体的激动性抗体是双特异性抗体。

[0300] 在一些实施方案中, 结合免疫刺激性受体的激动性抗体是缀合于某种部分的免疫缀合物, 这样的部分如可检测标记 (例如放射性同位素、荧光标记、酶以及其他合适的抗体标签) 或抗癌剂 (例如抗代谢物、烷基化剂、DNA 小槽结合剂、DNA 插层剂、DNA 交联剂、组蛋白脱乙酰化酶抑制剂、核运出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶 I 或 II 抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂)。在一些实施方式中, 免疫缀合物是抗体-药物缀合物 (ADC)。

[0301] III. 组合物

[0302] 本申请还提供了组合物, 例如, 一种药物组合物, 其含有结合免疫刺激性受体 (例如, OX40) 的激动性抗体, 与药学上可接受的载体一起配制, 用于本申请中描述的方法。

[0303] 本申请中描述的药用组合物可以作为单一疗法或联合疗法, 例如本文中描述的联合疗法施用。例如, 联合疗法可以包括联合施用: 结合免疫刺激性受体的激动性抗体, 和至少一种其他抗癌剂和/或 T 细胞刺激 (例如, 激活) 剂。可用于联合疗法的治疗剂的例子在上文中已详细描述。

[0304] 如本文所使用的, “药学上可接受的载体” 包括任何和所有生理上相容的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。优选地, 该载体适合于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊髓或表皮施用 (例如, 通过注射或输注)。根据施用途径的不同, 活性化合物, 即抗体、免疫缀合物或双特异性分子, 可被包覆在某种材料中, 以保护该化合物免受可能使该化合物失活的酸和其它自然条件的作用。

[0305] 本文所述的药用组合物可包括一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留母体化合物的期望的生物活性,且不产生任何不希望的毒理作用的盐(参见例如, Berge, S.M. et al., (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这类盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒的无机酸,如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、氢碘酸、亚磷酸和类似的无机酸,以及衍生自无毒的有机酸,如脂肪族一羧酸和二羧酸、苯取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族酸和芳族磺酸和类似的有机酸的盐。碱加成盐包括衍生自碱土金属,如钠、钾、镁、钙等的盐,以及衍生自无毒的有机胺,如 N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、乙二胺、普鲁卡因等的盐。

[0306] 本文所述的药用组合物还可以包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的例子包括。(1) 水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2) 油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3) 金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0307] 可用于本文中描述的药物组合物中的合适的水性和非水性载体的例子包括:水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、以及其合适的混合物、植物油,例如橄榄油和注射用有机酯,例如油酸乙酯。适当的流动性可以通过例如下述手段来保持:使用包衣材料,如卵磷脂;在分散体的情况下,保持所要求的粒径;以及使用表面活性剂。

[0308] 这些组合物还可以含有辅料,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过灭菌程序(如上述)和加入各种抗菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的存在。还可以在组合物中加入等渗剂,如糖、氯化钠等。此外,可通过加入可延缓吸收的作用剂,如单硬脂酸铝和明胶等,来实现注射用药物形式的吸收延长。

[0309] 药学上可接受的载体包括用于现场制备无菌注射液或分散体的无菌水溶液或分散体和无菌粉末。使用此类介质和作用剂制备药用活性物质是本发明中已知的。任何常规的介质或作用剂均在考虑之内,除非这样的介质或作用剂与活性化合物不相容。药用组合物可以包括防腐剂,也可以不含防腐剂。组合物中可以纳入补充性的活性化合物。

[0310] 治疗性组合物通常在制造和贮存的情况下必须是无菌和稳定的。组合物可以配制成溶液、微乳剂、脂质体或其它适合高药物浓度的有序结构。载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)的溶剂或分散介质,以及其适当的混合物。适当的流动性可以通过例如下述手段来保持:使用包衣材料,如卵磷脂;在分散体的情况下,保持要求的粒径;以及使用表面活性剂。在许多情况下,优选在组合物中加入等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可通过在组合物加入可延缓吸收的作用剂,如单硬脂酸铝和明胶等,来实现注射用药物组合物的吸收延长。

[0311] 无菌注射液可以如下制备:将活性化合物以要求的量与上述列举的一种成分或多种成分一起掺入合适的溶剂中,然后进行灭菌微滤。一般情况下,分散体的制备方法是将活性化合物掺入到含有基本分散介质和本文所列举的其它必需成分的无菌载体中而制备的。对于用来制备无菌注射液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),该方法从预先过滤的溶液中得到活性成分和任何其他附加成分。

[0312] 可与载体材料结合以制备单一剂型的活性成分的量取决于被治疗受试者和特定的施用模式。可与载体材料结合以制备单一剂型的活性成分的量一般是产生治疗效果的组

合物量。一般来说,在100%中,该量一般为活性成分的约0.01%至约99%,优选约0.1%至约70%,最优选约1%至约30%的活性成分与药学上可接受的载体组合。

[0313] 调整剂量方案以提供最佳的期望反应(例如,治疗性反应)。例如,可以施用一次推注,可以在一段时间内施用数个分割剂量,或者也可以根据治疗情况的急迫性需要按比例减少或增加剂量。特别有利的是以剂量单位形式配制胃肠外给药的组合物,以便于施用和剂量均匀。此处使用的剂量单位形式(dosage unit form)是指物理上离散的单位,适合作为待治疗受试者的单元剂量;每个单位含有预定量的活性化合物,该预定量经计算可与必需的载体产生期望的治疗效果。这里描述的剂量单位形式的规格取决于并直接依赖于(a) 活性化合物的独特特性和要达到的特定治疗效果,以及(b) 现有技术对于复配这样的用于治疗个体中的敏感性的固有限制。可使用本文描述的方法确定结合免疫刺激性受体的激动性抗体(例如,抗OX40抗体)的合适剂量。

[0314] 对于抗OX40抗体(例如,OX40.21)的施用,剂量的范围为约0.0001至100mg/kg体重,约0.01至10mg/kg体重,约0.01至5mg/kg体重,约0.1至1mg/kg体重,约0.1至0.5mg/kg体重,或约0.5至0.8mg/kg体重。例如,剂量可以是0.2mg/kg体重、0.3mg/kg体重、0.5mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重,或在1-10mg/kg体重范围内。在某些实施方式中,剂量为0.2mg/kg。在某些实施方式中,剂量为0.25 mg/kg。在其他的实施方式中,剂量为0.5mg/kg。

[0315] 在某些实施方式中,对于抗OX40抗体和抗PD-1或抗CTLA-4抗体的联合治疗,可以以固定剂量施用。相应地,在某些实施方式中,抗OX40抗体以约25至约320mg的固定剂量施用,例如,以约25至约160mg、约25至约80mg、约25至约40mg、约40至约320mg、约40至约160mg、约40至约80mg、约80至约320mg、约30至约160mg或约160至约320mg的固定剂量施用。在一个实施方式中,抗OX40抗体以20mg或约20mg的剂量施用。在另一个实施方式中,抗OX40抗体以40mg或约40mg的剂量施用。在另一个实施方式中,抗OX40抗体以80mg或约80mg的剂量施用。在另一个实施方式中,抗OX40抗体以160mg或约160mg的剂量施用。在另一个实施方式中,抗OX40抗体以320mg或约320mg的剂量施用。一个示例性的治疗方案包括每周施用一次、每两周施用一次、每三周施用一次、每四周施用一次、每四周施用一次、每月施用一次、每3个月施用一次、每4个月施用一次、或每3至6个月施用一次。

[0316] 在一些实施方式中,抗PD-1抗体以约100至300mg的固定剂量施用。例如,免疫肿瘤学药剂的剂量可以是240mg或约240mg,360mg或约360 mg,或480mg或约480mg。在某些实施方式中,抗PD1抗体的剂量范围为约0.0001至约100mg/kg,更通常为约0.01至约5mg/kg宿主体重。例如,剂量可以是0.3mg/kg体重或约0.3mg/kg体重,1mg/kg体重或约1mg/kg体重,3mg/kg体重或约3mg/kg体重,5mg/kg体重或约5mg/kg体重,或10 mg/kg体重或约10mg/kg体重,或在1-10mg/kg的范围内。在一些实施方式中,抗PD-1抗体的剂量为240mg或约240mg,每2周施用一次(Q2W)。该剂量可按比例调整(以每周120mg的剂量)以用于更长或更短的期间,例如,每3周一次施用360mg(Q3W)或每4周一次施用480mg(Q4W)。

[0317] 在一些实施方式中,对于与抗OX40抗体和抗PD-1抗体的联合治疗,抗体可以以固定剂量施用。在一个实施方式中,施用抗-OX40抗体和抗-PD-1抗体至少一个施用周期,其中该周期为12周时间,其中在该至少一个周期的每一个周期中,以约1、3、10、20、40、50、80、100、130、150、180、200、240或280mg的固定剂量施用至少一个剂量的抗-OX40抗体,并且以

约50、80、100、120、150、180、200、240、480、720或960mg的固定剂量施用至少3剂抗PD-1抗体。在一个实施方式中,对于该至少一个周期中的每一个周期,以约20、40或80mg的固定剂量施用1剂抗OX40抗体,并以约480mg的固定剂量施用3剂抗PD-1抗体。在一个实施方式中,对于该至少一个周期中的每一个周期,以约20mg的固定剂量施用1剂抗OX40抗体,并以约480mg的固定剂量施用3剂抗PD-1抗体。在一个实施方式中,对于该至少一个周期中的每一个周期,以约40mg的固定剂量施用1剂抗OX40抗体,并以约480mg的固定剂量施用3剂抗OX40抗体。在一个实施方式中,对于该至少一个周期中的每一个周期,以约80mg的固定剂量施用1剂抗OX40抗体,并以约480mg的固定剂量施用3剂抗PD-1抗体。在一个实施方式中,抗PD-1抗体在每个周期的第1、29和57天施用。在一个实施方式中,抗OX40抗体在每个周期的第1天施用。在一个实施方式中,抗PD-1抗体在每个周期的第1、29和57天施用,抗OX40抗体在每个周期的第1天施用。在一个实施方式中,12周的施用周期可以根据需要重复进行。在一个实施方式中,施用由多达9个周期组成。在一个实施方式中,施用由1、2、3、4、5、6、7、8或9个周期组成。在一个实施方式中,抗OX40抗体包括重链CDR1、CDR2和CDR3序列,其中重链CDR1、CDR2和CDR3序列分别包括SEQ ID NO:5-7,以及轻链CDR1、CDR2和CDR3序列,其中轻链CDR1、CDR2和CDR3序列分别包括SEQ ID NO:8-10。在一个实施方式中,OX-40抗体包括OX40.21。在一个实施方式中,抗PD-1抗体包括纳武单抗。

[0318] 在一些实施方式中,抗CTLA-4抗体以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用。例如,剂量可以是1mg/kg或约1mg/kg宿主体重或约1mg/kg或约3mg/kg或约3mg/kg宿主体重。

[0319] 在某些实施方式中,当在同一天施用,抗OX40抗体在抗PD-1或抗CTLA-4抗体之前施用。在某些实施方式中,当在同一天施用,抗OX40抗体在抗PD-1或抗CTLA-4抗体之后施用。在某些实施方式中,当在同一天施用,抗OX40抗体与抗PD-1或抗CTLA-4抗体同时施用。

[0320] 在某些情况下,同时施用两种或更多种具有不同结合特异性的单克隆抗体,使得每一种抗体的剂量都在上述范围内。此外,抗体通常在多个情形下施用。单次施用之间的间隔时间可以是,例如,每周、每月、每三个月或每年一次。间隔时间也可以是不规则的,通过测量患者体内靶抗原抗体的血药浓度来提示。在一些方法中,调整剂量以达到约1-1000 μ g/ml的血浆抗体浓度,在一些方法中,调整剂量以达到约25-300 μ g/ml的血浆抗体浓度。

[0321] 抗体可以以持续释放制剂的形式施用,在这种情况下,需要施用的频率较低。施用剂量和频率随着抗体在患者体内的半衰期不同而变化。一般来说,人抗体显示的半衰期最长,其后依次是人源化抗体、嵌合体抗体和非人抗体。施用的剂量和频率可根据是预防性治疗还是治疗性治疗而有所不同。在预防性应用中,在较长的时间内,以相对较少的剂量,相对较低频率的间隔施用。有些患者会在余生中持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对较短的时间间隔给予相对较高的剂量,直到疾病的进展减轻或终止,最好是直到患者显示疾病症状的部分或完全缓解。此后,可对患者进行预防性治疗方案。

[0322] 本文所述的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以变化,以便对于特定患者、组合物和施用模式获得有效地达到所需的治疗反应,而不会对患者产生毒性的活性成分的量。所选择的剂量水平将取决于各种药代动力学因素,包括:本文描述的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,所采用的特定化合物的排泄速率,治疗的持续时间,与所采用的特定组合物联合使用的其他药物、化合物和/或材料,被治疗的患者的年

龄、性别、体重、状况、一般健康状况和既往病史,以及医学领域中公知的类似因素。

[0323] 所述的抗体的“治疗性有效剂量”优选地导致疾病症状的严重程度降低,增加疾病无症状期的频率和持续时间,或防止因疾病困扰而造成的损害或残失能。在癌症的语境下,治疗有效的剂量优选地导致提高生存率,和/或防止与癌症相关的实体症状的进一步恶化。癌症的症状在本发明中是公知的,包括,例如,不寻常的痣特征,痣的外观改变,包括不对称、边界、颜色和/或直径的改变,新的色素沉着的皮肤区域,异常的痣,指甲下的黑色区域,乳房肿块,乳头改变,乳房囊肿,乳房疼痛,死亡,体重下降,虚弱,过度疲劳,进食困难,食欲不振,慢性咳嗽,呼吸困难加重,咳血,尿中带血,便中带血,恶心,呕吐,肝转移,肺转移,骨转移,腹胀,腹满,腹膨,腹腔积液,阴道出血,便秘,腹膨,结肠穿孔,急性腹膜炎(感染,发热,疼痛),疼痛,吐血,大汗淋漓,发热、高血压、贫血、腹泻、黄疸、头晕、寒战、肌肉痉挛、结肠转移、肺转移、膀胱转移、肝转移、骨转移、骨转移、肾转移以及胰腺转移、吞咽困难等。

[0324] 治疗上有效的剂量可以预防或延缓癌症的发生,这例如在疾病的早期或初步迹象出现时,可能是期望的。癌症诊断中用到的实验室检查包括化学、血液学、血清学和放射学。相应地,任何可监测前述任何一项的临床或生化测定法均可用于确定特定的治疗方法是否为治疗癌症的有效剂量。本发明的普通技术人员将能够根据受试者的身材、受试者症状的严重程度以及所选择的特定组合物或施用途径等因素来确定这样的量。

[0325] 这里描述的抗体和组合物可以通过一种或多种施用途径施用,使用本领域已知的各种方法中的一种或多种施用途径。本领域技术人员能够理解,施用途径和/或模式将根据所期望的结果而变化。本文所述的抗体的优选施用途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其它胃肠外施用途径,例如通过注射或输注。本文中使用的短语“胃肠外施用”是指肠内和局部施用以外的施用方式,通常是通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、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。

[0326] 或者,本发明的抗体可以通过非胃肠外途径施用,例如通过局部、表皮或粘膜施用途径,例如,鼻内、口服、口服、阴道、直肠、直肠、舌下或局部施用。

[0327] 活性化合物可以用能够保护化合物不被快速释放的载体来制备,这样的载体例如控制释放制剂,包括植入物、经皮贴片和微胶囊施用系统。可以使用可生物降解的、生物相容性好的聚合物,例如乙烯-醋酸乙烯酯、聚酯、聚乙二醇酸、胶原、聚环氧乙烷和聚乳酸。制备这种配方的许多方法是有专利的,或者是本领域的技术人员普遍知道的。参见,例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0328] 抗体组合物可以用本发明中已知的医疗装置施用。例如,在一个实施方式中,该组合物用无针皮下注射装置施用,例如美国专利号5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824;或4,596,556中公开的装置。用于抗体施用的公知的植入物和模块的例子包括:美国专利4,487,603号,该专利公开了一种植入式微输注泵,用于以受控的速率分发药物;美国专利4,486,194号,该专利公开了用于穿过皮肤施用药物的治疗装置;美国专利4,447,233号,该专利公开了一种用于以精确的输注速率投递药物的用药输注泵;美国专利4,447,224号,该专利公开了一种用于连续药物递送的可变流植入式输注设备;美国专利4,439,196号,该专利公开了一种具有多腔区室的渗透压药物递送系统;以及

美国专利4,475,196号,该专利公开了一种渗透压药物递送系统。这些专利通过引用的方式并入本文。许多其他的此类植入物、递送系统和模块是本领域技术人员所知的。

[0329] 在某些实施方式中,配制结合免疫刺激性受体的激动性抗体以确保其在体内适当分布。例如,血脑屏障(BBB)可阻挡许多高亲水性化合物。为了确保抗体能穿过BBB(如果需要的话,例如,用于脑癌),可以例如将其配制成脂质体。关于脂质体的制造方法,参见,例如,美国专利4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可包括一个或多个特定分子部分,它们被选择性地运输到特定的细胞或器官中,从而增强靶向药物递送(参见,例如,V.V.Ranade (1989) *J.Clin.Pharmacol.* 29:685)。示例性的靶向性分子部分包括:叶酸或生物素(参见,例如,美国专利5,416,016号,授予Low等人);甘露糖苷(Umezawa et al., (1988) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 153:1038);抗体(P.G.Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140;M.Owais et al. (1995) *Antimicrob.Agents Chemother.* 39:180);表面活性剂蛋白A受体(Briscoe et al. (1995) *Am.J.Physiol.* 1233:134);p120(Schreier et al. (1994) *J.Biol.Chem.* 269:9090);另参见K. Keinanen;M.L.Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273。

[0330] IV. 试剂盒和单位剂型

[0331] 本发明还提供的试剂盒,其包含药物组合物,该组合物包含与免疫刺激性受体结合的激动性抗体(例如,抗OX40抗体)和药学上可接受的载体,抗体的含量使用本文描述的方法确定,用于例如治疗癌症。该试剂盒可进一步包含至少一种附加的药剂(例如,适合于本文所述的组合疗法的药剂,例如另一种治疗剂)。本发明的试剂盒还任选地包括说明书,例如,包括施用时间表,以容许实施者(例如,医生、护士或患者)能够将其中所包含的组合物施用给患有癌症(例如,实体瘤)的患者。该组合物还可以包括注射器。

[0332] 可选地,本发明的试剂盒包括单剂量药物组合物的多个包装,每个包装均含有用于按照上述提供的方法进行一次施用的有效量的抗体。施用组合物所需的仪器或装置也可包括在试剂盒中。例如,试剂盒可提供一个或多个含有一定量抗体的预填充的注射器。

[0333] 试剂盒通常包括标示该试剂盒内容物的预定用途的标签。术语“标签”包括在试剂盒上提供、与试剂盒一起提供、或以其他方式伴随试剂盒的任何文字或记录材料。

实施例

[0334] OX-40是一种在T细胞激活时上调的共刺激受体。它增加CD4⁺和CD8⁺效应T细胞(Teff)的激活、增殖和存活,同时抑制T细胞(Treg)的阻遏。这里描述了一种全人IgG1激动性单克隆抗体的例子,该抗体以高亲和力结合OX-40,能增强Teff增殖并抑制Treg抑制。图30提供了该激动性单克隆抗体与OX-40的作用机制的描绘。

[0335] 实施例1不同剂量的配体阻断性和配体非阻断性抗OX40抗体的抗肿瘤活性

[0336] 本实施例描述了不同剂量的OX40.23-mIgG1(配体阻断性激动性抗体)和OX40.3-mIgG1(非配体阻断剂)在CT26小鼠肿瘤模型中的效果。

[0337] BalbC小鼠植入 1×10^6 个CT26细胞。在植入后第6天,对已建立CT26肿瘤(75-150mm³)的小鼠用OX40.23 mIgG1或OX40.3 mIgG1以0.03、0.1、0.1、0.3、1、3和10mg/kg的剂量处理(Q7D \times 2,d6)。

[0338] 每个处理组的平均和中位肿瘤生长曲线显示在图1A(IgG对照和OX40.23)和图

1B (OX40.3) 中示出, OX40.23-mIgG1 和 OX40.3-mIgG1 处理的小鼠的平均和中位肿瘤体积显示在图 2A-2D 中。每个处理组的平均和中位肿瘤体积、TGI、以及研究结束时无肿瘤小鼠的数量总结在表 3 中。

[0339] 表 3: OX40.23 和 OX40.3 作为单一疗法的肿瘤体积、TGI 及无肿瘤小鼠数按治疗组别汇总。

组	处理	第 20 日 平均 TV (mm ³)	第 20 日 中值 TV (mm ³)	第 20 日 平均 TGI (%)	第 20 日 中值 TGI (%)	第 66 日 无肿瘤小 鼠数	P 值
1	同种型	2121.1	1787.0	NA	NA	0/10	NA
2	OX40.3-mIgG1 0.03 mg/kg	2042.9	1579.8	-4	4	0/10	0.9997
3	OX40.3-mIgG1 0.1 mg/kg	1290.2	716.1	37	63	0/10	0.1202
4	OX40.3-mIgG1 0.3 mg/kg	1550.4	1076.0	30	54	1/10	0.5159
5	OX40.3-mIgG1 1 mg/kg	771.6	609.7	67	76	1/10	0.0010
[0340]	OX40.3-mIgG1 3 mg/kg	465.2	216.3	78	93	2/10	0.0001
7	OX40.3-mIgG1 10 mg/kg	483.2	124.7	80	98	6/10	0.0001
8	OX40.23-mIgG1 0.03 mg/kg	2927.3	2295.0	-40	-8	0/10	0.1422
9	OX40.23-mIgG1 0.1 mg/kg	2555.2	1817.3	-22	24	0/10	0.8167
10	OX40.23-mIgG1 0.3 mg/kg	1168.0	873.1	47	59	2/10	0.0484
11	OX40.23-mIgG1 1 mg/kg	279.2	235.9	89	91	1/10	0.0001
12	OX40.23-mIgG1 3 mg/kg	462.9	342.0	81	88	3/10	0.0001
13	OX40.23-mIgG1 10 mg/kg	1067.0	603.1	55	73	3/10	0.0205

[0341] 缩写: TGI, 肿瘤生长抑制; TV, 肿瘤体积

[0342] OX40.3 以 1mg/kg、3mg/kg 和 10mg/kg 剂量给药, 与同种型对照组相比, 在第 20 天时表现出明显的肿瘤抑制作用, 中位 TGI 分别为 76%、93% 和 98%, 且在研究结束时 (第 66 天) 的无肿瘤小鼠的中位数分别为 1/10、2/10 和 6/10。OX40.23 以 0.3mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg, 和 10mg/kg 剂量给药, 与同种型对照组相比, 在第 20 天表现出明显的肿瘤抑制, 导致 59%、91%、88% 和 73% 的中位 TGI, 且在研究结束时 (第 66 天) 无肿瘤的小鼠分别为 2/10, 1/10, 3/10 和 6/10。虽然所有接受 0.3mg/kg 以上剂量的 OX40.23 的组均有肿瘤体积缩小, 但 10mg/kg 处理的活性与 1mg/kg 和 3mg/kg 相比较低。这种在高剂量 (10mg/kg) 下的抗肿瘤活性减弱 (“钩状”效应) 在 OX40.3 处理组中没有观察到, 在 OX40.3 处理组中在最高剂量下表现出最大的 TGI 和最多的无瘤小鼠。鉴于 OX40.23 阻断 OX40-OX40L 的相互作用而 OX40.3 不阻断, 这些数据提示, OX40L 的参与可能对高剂量下 OX40.23 的抗肿瘤功效减弱有贡献。

[0343] 实施例 2: 抗 OX40 抗体+抗 PD1 抗体联合治疗的抗肿瘤功效的改变

[0344] 本实施例描述了不同剂量的 OX40.23-mIgG1 与抗 PD1 抗体结合使用的效果。

[0345] 实验条件与实施例1中描述的实验条件基本相同。OX40.23(Q7D x 2)+抗 PD1抗体(IgG1 D265A;Q4D x 3)处理的小鼠的单个肿瘤生长曲线示于图3A 和3B中,而OX40.3+抗PD1抗体处理的小鼠的曲线如图4所示。表4总结了OX40.23+抗PD1处理的小鼠的平均和中位肿瘤体积、TGI和研究结束时各处理组无肿瘤(TF)小鼠数量,表5总结了OX40.3+抗PD1处理小鼠的平均和中位肿瘤体积、TGI和研究结束时无肿瘤(TF)小鼠数量。

[0346] 表4 OX40.23和OX40.3联合抗PD-1抗体的肿瘤体积、TGI及无肿瘤小鼠数分处理组汇总

组	处理	第 19 日 平均 TV (mm ³)	第 19 日 中值 TV (mm ³)	第 19 日平 均 TGI (%)	第 19 日中 值 TGI (%)	第 91 日 无肿瘤小 鼠数	P 值
1	同种型	1639.7	1768.3	NA	NA	0/10	NA
2	抗 PD-1	809.9	691.5	55	65	1/10	NA
3	抗 PD-1 + OX40.23-mIgG1 0.03 mg/kg	794.1	791.9	56	63	1/10	0.9999
4	抗 PD-1 + OX40.23-mIgG1 0.1 mg/kg	170.1	47.4	96	103	8/10	0.0001
5	抗 PD-1 + OX40.23-mIgG1 0.3 mg/kg	38.7	44.3	103	103	9/10	0.0001
6	抗 PD-1 + OX40.23-mIgG1 1 mg/kg	62.2	38.3	102	103	9/10	0.0001
7	抗 PD-1 + OX40.23-mIgG1 3 mg/kg	86.0	48.9	101	103	9/10	0.0001
8	抗 PD-1 + OX40.23-mIgG1 10 mg/kg	507.5	133.8	78	100	6/10	0.2086

[0347] 表5:OX40.3联合抗PD-1抗体的肿瘤体积、TGI及无肿瘤小鼠数按治疗组别汇总。

组数	处理	第 19 日 平均 TV (mm ³)	第 19 日中 值 TV (mm ³)	第 19 日平 均 TGI (%)	第 19 日中 值 TGI (%)	第 124 日 无肿瘤小 鼠	P 值
1	同种型	1353.2	1126.5	NA	NA	0/10	NA
2	抗 PD-1	989.9	695.6	11	32	4/10	NA
3	抗 PD-1 + OX40.3-mIgG1 0.03 mg/kg	990.1	964.8	-1	-31	1/10	0.9999
4	抗 PD-1 + OX40.3-mIgG1 0.1 mg/kg	615.5	302.0	42	80	6/10	0.4596
5	抗 PD-1 + OX40.3-mIgG1 0.3 mg/kg	826.6	468.8	16	64	5/10	0.9678
6	抗 PD-1 + OX40.3-mIgG1 1 mg/kg	547.0	321.7	53	71	4/10	0.2918
7	抗 PD-1 + OX40.3-mIgG1 3 mg/kg	436.5	226.0	65	88	8/10	0.1165
8	抗 PD-1 + OX40.3-mIgG1 10 mg/kg	105.7	0.0	97	109	7/10	0.0046

[0350] 如表4所示,当与抗PD1抗体联合用药时,OX40.23在0.1mg/kg至3 mg/kg的剂量下,表现出明显的抗肿瘤功效改善,研究结束时小鼠无肿瘤率超过80%,而与之相比,抗PD-1抗体单一疗法时的小鼠无肿瘤率为1/10。然而,在最高剂量的OX40.23(10mg/kg)下,平均和中位肿瘤体积均高于低剂量组,研究结束时10只小鼠中只有6只小鼠无肿瘤,表明高剂量时抗肿瘤活性降低,类似于实施例1中OX40.23单一疗法中观察到的现象(“钩状”效应)。

[0351] OX40.23-mIgG1与抗PD1抗体联用的有效剂量为0.1-0.3mg/kg,是 OX40.23-mIgG1单一疗法的有效剂量(1-3mg/kg)的约1/10。

[0352] 如表5所示,OX40.3以3mg/kg和10mg/kg的剂量与抗PD1抗体联用时,与抗PD1抗体单药相比,在研究结束时(第124天)TF小鼠分别为8/10 和7/10只,且更强地抑制了CT26肿瘤的生长,第19天中位TGI超过70%;而与之相比抗PD1抗体单一疗法第124天的中位TGI为4/10只TF小鼠,第 19天中位TGI为32%。当OX40.23与抗PD1抗体联用时,与OX40.23一样,也观察到在较低的剂量下功效发生了类似的成倍变化(图4)。

[0353] 实施例3:抗OX40和抗PD1抗体同时或连续施用的抗肿瘤活性

[0354] 本实施例描述了抗OX40抗体和抗PD1抗体的同时施用与顺序施用的抗肿瘤活性的比较。

[0355] 本实验中使用的的小鼠肿瘤模型基本上如实施例1和2中描述的那样。OX40.23以0.03mg/kg、0.3mg/kg、或3mg/kg的剂量在肿瘤植入后的第5天和第12天施用给小鼠,随后在第5、9和13天同时施用抗PD-1,或在第10、14和18天延迟施用抗PD-1,后者提供了顺序处理。

[0356] 如图5所示,由于CT26肿瘤的快速进展,第10天开始的抗PD-1抗体单独延迟处理,与第5天开始的处理相比,显示出较低的活性,前者没有肿瘤消退,而后者导致10只小鼠中的3只无肿瘤。OX40.23加抗PD-1抗体的同时处理导致抗肿瘤活性显著改善,在0.03mg/kg、

0.3mg/kg和3mg/kg的 OX40.23下,分别有8/10、6/10和10/10只小鼠无肿瘤。OX40.23加延迟的抗 PD-1所致的抗肿瘤活性与同时处理相似,在0.3mg/kg和3mg/kg的OX40.23 下无肿瘤小鼠分别为6/10和7/10。0.03mg/kg的OX40.23与延迟的抗PD-1 处理的联用,与相应的OX40.23或抗PD-1单一疗法相比,没有显示出更好的抗肿瘤活性。这些结果表明,在抗肿瘤活性方面,同时给药与顺序给药类似。

[0357] 此外,基本上如实施例1和2中描述的那样,在本实验中所用的相同小鼠肿瘤模型中测试了抗OX40激动剂与抗PD-1或抗CTLA-4的联用。BMS- 986178单独或与抗PD1或抗CTLA同时给予小鼠。

[0358] 如图38所示,抗OX40激动剂与抗PD-1或抗CTLA-4联合施用显示出增强的抗肿瘤活性。用抗PD-1和BMS-986178处理的10只小鼠中,有10只小鼠无肿瘤,用抗CTLA-4和BMS-986178处理的10只小鼠中,有8只小鼠无肿瘤。

[0359] 实施例1-3总的来看,OX40.23(一种配体阻断性、激动性抗体)在单一疗法中,在3mg/kg达到最大活性;在与抗PD1抗体联合治疗时,在0.3mg/kg 达到最大活性。配体非阻断性抗体OX40.3的功效也观察到类似的剂量变低的倍数变化:在单一疗法中,在10mg/kg实现最大活性;在与抗PD-1抗体的联合疗法中,在3mg/kg实现最大活性。在单一疗法和联合治疗中,当 OX40.23以10mg/kg施用,均观察到“钩状”效应(活性减弱)。然而,在用 OX40.3单独或与抗PD-1抗体联合处理的小鼠中没有观察到这种“钩状”效应,这表明OX40.23在较高剂量下观察到的功效减弱依赖于OX40L-OX40的相互作用。此外,对于联合治疗,同时给药所致的抗肿瘤活性与交错(staggered) 给药方案相当。

[0360] 实施例4:OX40.23作为单药或与抗PD1抗体联合施用的受体占据情况

[0361] 为了更好地了解在小鼠中抗OX40抗体在单一疗法或与抗PD1抗体联合疗法中以高剂量(10mg/kg) 施用,观察到的抗肿瘤功效中的“钩状”效应的潜在机制,评估了血液和肿瘤微环境中OX40受体占据 (RO) 和OX40在CD4+T细胞上的表达。

[0362] 给药和采样时间表如图6A所示。简单地说,BalbC小鼠植入 1×10^6 个 CT26细胞。在植入后的第6天,以标示的剂量对已建立CT26肿瘤(75-150 mm³) 的小鼠进行单一疗法或联合治疗,其中抗PD1抗体以10mg/kg的剂量施用。

[0363] 在肿瘤植入后的第8天和第13天对肿瘤和血液中的受体占据率进行评估,以评估OX40.23单一疗法和与抗PD-1抗体联合疗法导致的CD4亚群中 OX40受体占据率和OX40表面表达的动力学变化。通过心脏穿刺采血到含有乙二胺四乙酸(EDTA)的注射器中。通过Histopaque®-1083 (Sigma-Aldrich) 梯度分离法回收活的白细胞。将2ml的Histopaque-1083加入到15ml锥形离心管中,并将经抗凝处理的全血小心地层叠到组织蛋白培养基之上。在离心过程中,红细胞和中性粒细胞被聚蔗糖聚集并迅速沉降。PBMC停留在血浆-Histopaque 1083界面上。在洗涤步骤中通过低速离心去除大部分无关的血小板。取出肿瘤,称量,并在gentalMACS Octo Dissociator™ (Miltenyi) 上处理;肿瘤处理使用了小鼠肿瘤解离试剂盒(Miltenyi)。解离后,细胞悬液洗净,过滤并计数。

[0364] 将来自单只小鼠的血液和肿瘤的单细胞悬液在两块板上制成一式二份,分别用于测试受体占据率和总受体。为了测试总受体,加入在FACS缓冲液(2%FBS和2mM EDTA溶于PBS中)中制备的过量的OX40.23-生物素抗体至 10g/ml的最终浓度,并在4℃下染色30分钟。然后将样品用FACS缓冲液洗涤3次,然后用PE-链亲和素以0.5g/ml的浓度染色30分钟。

为了测试被占据的受体,只加入PE-链亲和素,以0.5g/ml染色30分钟。然后,将总样品和被占据样品二者洗三次,用流式细胞术抗体进行免疫细胞标志物的染色。在做流式细胞术之前,加入1 μ g/ml的DAPI以区分活细胞和死细胞。在 Fortessa (BD Biosciences) 上通过流式细胞术检测抗体荧光,并使用FlowJo软件(FlowJo,LLC)分析结果。根据以下公式计算每只动物的受体占据率:%RO = ([“测试”的 Δ MFI]/[“总”的 Δ MFI]) x100,其中“测试”是当直接以回体方式评估时被OX40.23占据的受体的量,“总”是从向样品中添加的过量的OX40.23-生物素的添加量确定的受体的总量。

[0365] 如图6B所示,受体占据率依赖于抗体剂量,在肿瘤和外周血中观察到的较高剂量下的受体占据率相似。受体占据率特定在单一疗法和联合治疗之间是相似的。此外,与第8天相比,在第13天OX40受体在外周血中的占据率减少,但在肿瘤中的占据率增加,特别是在3mg/kg和10mg/kg剂量下,提示血液中抗OX40抗体的清除和肿瘤中抗OX40抗体的积累。

[0366] 为了进一步研究OX40受体占据率的调节,独立评估了OX40受体的总水平和占据水平。在整个剂量递增过程中,细胞表面上被占领的OX40受体的分数持续增加,且第8天和第13天之间没有显示明显差异(图6C)。然而,在0.3mg/kg及以上(0.3mg/kg的受体占据率约为40%)的剂量,在第8天(给药后两天)时,细胞表面上的OX40受体总量显示出快速下调,并且直到研究的第13天一直保持在低水平。这些数据提示,在3mg/kg和10mg/kg剂量的OX40.23下观察到的高的计算受体占据率可能是由总OX40受体的下调,而不是由被占据受体量的增加驱动的。

[0367] 百分比肿瘤生长抑制与OX40受体占据率之间的关系显示,对于OX40.23+抗PD1的联合,在20-80%的受体占据率下,达到最大肿瘤生长抑制,而当OX40受体占据率超过80%时,肿瘤生长抑制下降(图6D)。

[0368] 在一个类似的实验中,用BMS-986178或同种型抗体IgG对照处理CT26 肿瘤小鼠。在处理后的指定时间点,通过流式细胞术评估肿瘤样品中的OX40 RO和总表面OX40。

[0369] 如图34A-34D所示,来自携带CT26肿瘤的小鼠的肿瘤样品在BMS-986178处理7天后显示,肿瘤Tregs上的OX40 RO与BMS-986178的剂量相关(图34A),而肿瘤Tregs上的总OX40表达在 \geq 0.3mg/kg的BMS-986178剂量时下降(图34B)。而且,随着mAb占据的OX40随时间推移而减少(BMS-986178处理后的第10天及以后,图34C),OX40的表面表达恢复(图34D)。由此可见,在CT26小鼠模型中,肿瘤Tregs上的OX40的表达随着抗BMS-986178的剂量升高而减少。

[0370] 综合起来,这些数据表明,激动性抗OX40抗体与抗PD1抗体联合用药,与抗PD1抗体单一疗法相比,治疗功效显著提高,该联合用药在远低于100%的OX40受体占据率下即实现了最大抗肿瘤活性。当受体占据率接近40%左右时,在抗体给药后2天内观察到表面OX40的深度下调,该下调至少维持到给药后7天。OX40的这种下调可能解释为什么在10mg/kg的抗OX40剂量下,该联合用药的治疗活性较低。由此可见,需要适当选择抗体剂量和应用频率,以最小化或防止激动性抗OX40抗体在高剂量(例如,10mg/kg)时的抗肿瘤活性降低。

[0371] 实施例5:施用了OX40.21的人类患者中的受体占据率、OX40的表面表达和药物暴露量

[0372] 本实施例展示了在人类患者中,随着受体占据率的增加,OX40的表面表达的损失之间的相关性。

[0373] 在施用了OX40.21 (一种激动性抗OX40抗体) 20mg、40mg、80mg、160mg或320mg的人类患者中,使用实施例4中描述的方法(用于确定RO的“测试”vs.“总”方程与实施例4中的相同,但经过修改以适用于计算人类患者中的OX40.21 RO),测定了CD4+T细胞或Tregs中受体占据率和表面OX40表达。对于每个剂量队列,第1周期第8天和第2周期第1天的CD4+T细胞和Tregs中受体占据率均在80至100%之间。如图7A所示,并且与实施例4的结果一致,在人类患者中,随着OX40.21的受体占据率的增加,OX40的表面表达趋于减少。与CD4+T细胞和Tregs一样,在各队列的外周血中也都观察到类似的受体占据率,其中在>20mg的剂量下观察到>80%的受体占据,并且在第二周期的第一剂量(C2D1)之后有一个平台。

[0374] 在药物暴露量方面,如图7B所示,OX40.21与纳武单抗联合用药时显示出线性PK,在20-320mg范围内,暴露量与剂量相关地增加。

[0375] 实施例6:用于预测受体占据率的PK-PD模型在替代施用计划中的PK-PD模型

[0376] 本实施例描述了一种用于预测人类患者中受体占据率的PK-PD模型。通过一个使用群体PK分析的线性二区隔PK模型描述药物浓度-时间特征。如图8A和图40所示,该PPK模型似乎提供了对观察到的浓度数据的合理描述。根据该PPK模型预测了备选给药时间表中的个体药物暴露量(Cmin1:第一个剂量后的谷浓度),用于随后的PK-PD模型开发。根据16名在20-320mg剂量范围内施用了OX40.21的癌症患者的RO数据,使用了一个Emax模型(下列方程)来描述药物浓度(Cmin1:第一个剂量后的谷浓度)与C2D1的血液RO之间的关系。

$$[0377] \quad RO = \frac{RO_{max} \times \text{药物浓度}}{EC_{50} + \text{药物浓度}}$$

[0378] 其中,“药物浓度”为Cmin1,第一个剂量后的谷浓度,RO_{max}为血液RO的最大百分比,EC₅₀为对应于RO_{max}的50%的药物浓度。根据此项分析,估计药物EC₅₀为0.094μg/ml(图8B)。使用确立的PK-PD关系(Emax模型),同时考虑到PK和PD在受试者间的变异性,实施了试验刺激以预测备选给药时间表下的血液RO(图9)。

[0379] 还预测了肿瘤RO(图10A和10B),该预测基于从不同癌症类型(头颈癌、宫颈癌、尿道上皮癌和结直肠癌)的人类肿瘤活检样品(N=5)产生的数据,测量了在20-320mg的OX40.21剂量下肿瘤匀浆物中的总药物和总OX40浓度。为了预测不同剂量和给药方案下的肿瘤RO,做了如下假设:1)肿瘤RO的EC₅₀与血清中的相同;2)肿瘤药物水平与血清中的药物水平处于平衡状态;3)观察到的肿瘤与血清浓度比的平均值为0.20(范围=0.07-0.47);4)观察到的OX40水平平均值为0.15nM(范围=0.02-0.47nM)。与所使用的情境下,预测的肿瘤RO(图10A)的血液RO一致。然而,当使用0.47nM的高OX40水平,以及0.07的低肿瘤药物穿透比进行肿瘤RO预测时,肿瘤RO偏离了血液RO(图10B)。

[0380] 基于模型的模拟结果显示,OX40.21剂量40mg q4w、40mg q8w、40mg q12w和80mg q12w产生的暴露可能导致血液中受体占据率的较宽范围(例如,RO约20%至约90%,图9),也导致肿瘤中受体占据率的较宽范围(例如,RO约10%至约90%,在平均靶标水平0.15nM和平均肿瘤穿透比0.20下,图10A和10B),因此可以提供一个机会来了解是否可以在较低的施用频率下实现等同乃至更优的PD反应。

[0381] 实施例7:OX40.21浓度与受体占据率之间的关系的体外评估

[0382] 本实施例描述了基于不同浓度的OX40.21评估体外T细胞中的受体占据。

[0383] 简而言之,用Ficoll梯度离心法从人全血中纯化总T细胞。使用Miltenyi CD4+分离试剂盒从PBMC中分离出CD4+T细胞。分离出的T细胞在经辐照的CHO-OKT3-CD32A(人工抗原呈递细胞)和系列稀释的OX40.21或同种型对照的存在下培养。用流式细胞术测定结合的OX40抗体与总表面OX40的比率作为受体占据率。结合的抗体通过在洗涤T细胞后加入荧光缀合的抗人Fc来评估的。总OX40通过向T细胞中加入饱和量的OX40抗体来测定。温育之后,洗涤细胞并通过加入荧光缀合的抗人Fc以进行染色。

[0384] 如图11A和11B所示,完全受体占据率与总表面OX40的下调相关(在 >1 nM的OX40.21下),这反映了“钩状”效应。递增的OX40.21浓度也诱导了CD4+T细胞表面的OX40,且较高的浓度下调了OX40。OX40表面表达的时间过程显示,OX40.21所诱导的“钩状”效应与第4天时OX40表达的最高水平相关(图12A(同种型对照)和图12B(OX40.21))。

[0385] 为了确定该效应是否特异于OX40.21,还评估了CD28抗体对表面OX40水平的影响。简而言之,用Ficoll梯度离心法从人全血中纯化总T细胞。使用Miltenyi CD4+分离试剂盒从PBMC中分离出CD4 T细胞。分离出的T细胞在经辐照的CHO-OKT3-CD32A(人工抗原呈递细胞)和系列稀释的激动性抗OX40抗体、同种型对照或抗CD28抗体(克隆CD28.2)的存在下培养。通过流式细胞术测定总表面OX40与结合的OX40抗体作为受体占据率。结合的抗体通过在洗涤T细胞后加入荧光缀合抗人Fc来评估。总OX40通过在T细胞中加入饱和量的抗OX40抗体来测定。温育之后,将细胞洗净,加入荧光缀合抗人Fc以进行染色。

[0386] 如图13A、13B、32A和32B所示,用抗CD28抗体共刺激T细胞会诱导高水平的OX40表达,而该表达在更高浓度下不会丧失,可见OX40.21对总表面OX40表达的影响是特异于OX40.21的。在这里,针对CD137的单克隆抗体(图13A和32A)和针对CD28的单克隆抗体(图13B和32B)没有显示与“钩状”效应相关的总表面OX40的下调。在这里,当用其他的共刺激性激动性抗体处理CD4+T细胞时,没有观察到OX40表面表达的丧失。

[0387] 进行了进一步的实验以评估干扰素- γ (IFN- γ)分泌(一种T细胞激活的定量标志(readout))及其与受体占据率的关系。实验条件除了在培养细胞4天后收集上清液之外,与上述相同。使用标准的ELISA(BD Biosciences)或均质时间分辨荧光(HTRF)(Cisbios)的IFN- γ 的分泌量进行定量测量。

[0388] 如图14所示,OX40.21诱导了T细胞活化,如IFN- γ 的分泌所反映的。在约20%的受体占据率下获得了最大的IFN- γ 。IFN- γ 的分泌在100%受体占据率下减少,符合“钩状”效应。

[0389] 还评估了T细胞增殖与受体占据率之间的关系。实验条件除了下述内容之外,与上述相同:在培养细胞4天后,通过加入 3 [H]-胸苷掺入细胞中16小时,并计数闪烁,以测试细胞增殖。

[0390] 如图15A-15C所示,OX40.21诱导了T细胞增殖,在20-50%之间的受体占据率下获得了最大增殖。T细胞激活(通过CD4+T细胞上CD25的几何平均荧光强度[GMFI]来量度)在最低剂量的BMS-986178下实现了T细胞的活化,并在40%OX40 R0下达到平台。图31。总的来说,这些数据表明,OX40.21的最大活性——就OX40表面表达、T细胞增殖和细胞因子产生而言——获自20%左右的受体占据率。在100%受体占据率下,观察到“钩状”效应,T细胞的功能性/活化降低。

[0391] 进行了进一步的实验,以评估经BMS-986178处理的T细胞中Tregs的遏制。将人CD4

+T细胞分化成Tregs,并使用Dynabeads (α CD3/ α CD28; Thermo Fisher Scientific)、雷帕霉素和白细胞介素(IL)-2使其扩增。图33A描绘了Treg遏制测定法。如本文中所述地通过流式细胞术确认Treg表型。将纯化的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞在 \pm Treg (5:1)+BMS-986178的条件下培养。然后,通过细胞珠阵列测定法测定IL-2分泌。

[0392] 如图33B和33F所示,BMS-986178处理的CD4⁺和CD8⁺T细胞在Tregs的存在下产生了IL-2,这表明,介由BMS-986178对OX40的激动作用缓解了Treg的遏制。CD4⁺T细胞(图33B)或CD8⁺T细胞(图33F)在Tregs存在下的IL-2产生均显示出钩状效应。另一方面,在约1 μ g/mL BMS-986178下,来自相应培养物(图33D和33H)的Tregs上的OX40表达达到最大值,而>1 μ g/mL的BMS-986178导致OX40表面表达减少。

[0393] 此外,由受刺激的CD4⁺T细胞(图33C)单独产生的IL-2也表现出钩状效应。此外,在0.37 μ g/mL的BMS-986178下,单独培养的CD4⁺T细胞(图33E)和CD8⁺T细胞(图33I)表现出最大的OX40表面表达,而在>1 μ g/mL的BMS-986178下,OX40的表达减少。另一方面,受刺激的CD8⁺T细胞显示出最大的IL-2产生,无论BMS-986178的剂量如何(图33G)。

[0394] 这些数据表明,BMS-986178缓解了CD4⁺和CD8⁺T细胞的Treg遏制,且相对于剂量具有钩状效应。

[0395] 实施例8:可溶性OX40和受体占据率之间的关系体外评估

[0396] 开发了一种对可溶性OX40(sOX40)特异性的ELISA(图16)。简而言之,在该测定法中,首先将一种非阻断性的OX40单克隆抗体(OX40.8)固定在Meso Scale Discovery(MSD)平板上。用含0.5%BSA的PBS封闭板后,将培养上清液施加在板上并温育。洗涤后,使用预先优化的浓度的生物素缀合的抗OX40绵羊多克隆抗体(R&D System)检测被捕获的sOX40。温育和洗涤后,加入碘基标签链亲和素,通过电化学发光检测固定在板上的sOX40-抗体复合物。将该测定法用于评估sOX40水平与受体占据率之间的关系。细胞在与实施例7中描述的相同条件下培养,除了下述不同:在培养4天后,收集上清液并使用上述测定法对sOX40进行定量。

[0397] 如图17和图18所示,增加OX40.21的浓度诱导了OX40在CD4⁺T细胞表面的表达和上清液中的sOX40。在100%受体占据率下,sOX40的损失与细胞表面OX40的损失相关(“钩状”效应)。这一数据提示,sOX40可作为OX40激动作用和/或T细胞激活的定量标志(readout)。同样,在人类患者中,用OX40.21单一疗法和OX40.21+纳武单抗治疗时,sOX40水平也会增加(图19)。

[0398] 如上文所述,使用定制开发的ELISA测定了抗CD28处理的CD4⁺T细胞释放的可溶性OX40(sOX40)。如图35A所示,在用BMS-986178处理过的细胞中观察到的这种钩状效应是独特的,因为抗CD28在较高剂量下达到最大值后,以剂量依赖性的方式诱导sOX40释放。此外,如图35B所示,由CD4⁺T细胞释放的sOX40大部分与BMS-986178结合。由此可见,BMS-986178介导的T细胞激活诱导了sOX40释放,该sOX40释放随着OX40 R0接近100%而减少。

[0399] 还测定了总sOX40和被OX40.21结合的sOX40。简而言之,用Ficoll梯度离心法从人全血中纯化出总T细胞。使用Miltenyi CD4⁺分离试剂盒从PBMC中分离出CD4⁺T细胞。分离出的T细胞在经辐照的CHO-OKT3-CD32A(人工抗原呈递细胞)存在下进行培养,并用系列稀释的激动性抗OX40抗体、同种型对照或抗CD28(克隆28.2)进行测试。在预设的时间点,收集上清液。使用上述ELISA法对可溶性OX40进行定量。

[0400] 如图20A和20B所示,sOX40的水平与OX40的细胞表面表达相关,OX40的切割是细胞活化依赖性的,但对OX40激动剂不具有特异性,且与OX40结合的完整sOX40.21与总可溶性OX40的水平下降相关(即,当检测到sOX40的“钩状”效应时,100%的sOX40结合)。

[0401] 接下来,测试了抗CD28抗体拯救OX40.21介导的“钩状”效应的能力。用Ficoll梯度离心法从人全血中纯化出总T细胞。使用Miltenyi CD4⁺分离试剂盒从PBMC中分离出CD4⁺T细胞。分离出的T细胞在经辐照的CHO-OKT3-CD32A的存在下、以及系列稀释的激动性抗OX40抗体、系列稀释的单独同种型对照、或系列稀释的同种型对照与恒定浓度的抗CD28抗体(克隆CD28.2)的组合的存在下培养。在另一情况下,单独使用恒定浓度的抗CD28抗体,并在72小时(3d)后加入系列稀释的OX40.21抗体或同种型对照,保持18小时。在预定的时间(D4)收集上清液。使用上述的MSD ELISA对可溶性OX40进行定量。

[0402] 如图21A和21B所示,用OX40.21和抗CD28抗体共刺激细胞对sOX40水平有加和作用。然而,CD28共刺激并没有挽救OX40.21诱导的对sOX40的“钩状”效应。用OX40.21处理抗CD28抗体预激活的细胞足以诱导sOX40释放,并观察到对sOX40水平的“钩状”效应。综上所述,这些数据表明,在体外、以及在用免疫刺激性激动剂联合检查点阻断剂治疗的患者中,sOX40均可作为人类T细胞初步活化的生物标志。对于接受结合免疫刺激性受体的激动性抗体作为单一疗法或与检查点阻断剂联合治疗的患者,sOX40的测量值可作为临床生物标志物,用来确定他们的最佳剂量和时间表。此外,sOX40的产生并不是一种能够解释在高于20-40%的RO的OX40.21下OX40从细胞表面丢失的机理,因为在导致RO高于20-80%的最佳范围内的浓度下,sOX40也丢失。这一点提示细胞表面OX40和sOX40的调控方式是类似的。

[0403] 实施例9:体外评估OX40内化的OX40的体外评估

[0404] 本实施例评估了用阻断性(OX40.21)和非阻断性(OX40.8)抗体处理后OX40的内化。该测定的一般示意图如图22所示。

[0405] 更具体地说,将体外产生的CD4⁺Tregs用CD3/CD28 dynabeads激活48小时。将系列稀释的OX40.21、非阻断性OX40.8及同种型对照与细胞在冰上温育2小时,然后加入pH敏感的缀合抗人Fc在37°C下2小时。固定后,用ArrayScan分析细胞内化。

[0406] 如图23所示,OX40.21和OX40.8在Tregs中交联后内化。

[0407] 此外,测定了OX40响应于两种不同剂量(0.01nM和100nM)的BMS-986178的内化。在该测定中,将活化的Tregs或CD4⁺T细胞与同种型对照mAb或BMS-986178一起温育。然后,加入pH值敏感染料(pHrodo)缀合的抗Fc。之后,将细胞固定,在ArrayScan VTI (Thermo Fisher Scientific)上读取。

[0408] 如图36所示,用0.01或100nM的BMS-986178处理的Tregs或CD4⁺T细胞以BMS-986178浓度依赖性的方式内化了药物结合的OX40。

[0409] 实施例10:Fc γ R介导的交联对OX40.21的激动活性的影响

[0410] 本实施例演示了Fc γ R介导的交联对OX40.21的激动活性的影响。简而言之,将CHO细胞工程改造使之表达抗人激动剂CD3克隆OKT3的细胞膜结合的scFv版本,以及人Fc γ RIIa (CD32a-H131)的H131等位基因(+Fc γ R),或者没有该等位基因(-Fc γ R),分别命名为“OKT3scFv”和“hFc γ R”。对CHO细胞进行辐照以限制其增殖,并将其与原代人CD4⁺T细胞和不同量的OX40.21一起培养。在4天的时间里,对原代人CD4⁺T细胞的T细胞增殖和IFN- γ 分泌进行了评估。

[0411] 如图24所示,用BMS-986178治疗以剂量依赖性和交联依赖性的方式诱导CD4+T细胞增殖和IFN- γ 分泌。Fc γ R介导的交联促进了BMS-986178介导的IFN- γ 分泌和T细胞增殖。然而,当CHO细胞缺乏CD32a (CD32a-H131) 时,增殖和IFN- γ 均不存在,这提示BMS-986178的活性需要Fc γ R介导的交联。

[0412] 实施例11抗OX40抗体单一疗法及与抗PD1联合治疗诱导的外周药效学标志物的表征

[0413] 本实施例演示了用OX40.23单一疗法或用OX40.23与抗PD1抗体联合处理的小鼠,以及用OX40.21联合抗PD1抗体(纳武单抗)治疗的人类患者中的某些药效学标志物的诱导。

[0414] 已建立CT26肿瘤的小鼠接受OX40.23单一疗法或与抗PD1抗体联合处理。OX40.23剂量递增从0.01mg/kg开始,3倍递增至90mg/kg。抗PD-1抗体的剂量为10mg/kg(或200ug/小鼠的固定剂量)。OX40.23和抗PD1抗体在第6、13和20日按同样的时间安排施用。在第8、12、15和19日从单只小鼠中收集50ul全血。进行流式分析,以确定在用OX40.23-mIgG1 \pm 抗PD-1治疗后,在CD4+及CD8+T细胞中外周药效学标志物(ICOS、FOXP3、Ki67 和CD44)的诱导。图25是给药时间表的示意图。

[0415] 如图26A所示,CD4+T细胞和CD8+T细胞均表现出CD4效应T细胞和CD8+T细胞上活化标志物(ICOS、CD44、Ki67)的剂量依赖性上调,而在较高剂量下调(“钩状”效应)。

[0416] 同样,在用OX40.21+抗PD1抗体(纳武单抗)治疗的人类患者中,联合治疗增加了增殖性(Ki67+)CD8+T细胞(图26B),减少了肿瘤基质中的FOXP3+细胞(图26C)。

[0417] 来自患者肿瘤样品的免疫组化分析结果是一致的。例如,如图26D所示,来自一名68岁的女性子宫内膜癌患者的样品——该患者接受过3线在先治疗(甲羟孕酮、来曲唑、以及卡铂和紫杉醇),并且在OX40.21(320mg)+纳武单抗(240mg)治疗下取得了部分缓解——显示Ki67+CD8+T细胞数量增加。该联合治疗还减少了来自已达到疾病稳定的卵巢癌患者的肿瘤样品中的FoxP3+细胞。如图26E所示,在一名之前接受过手术和化疗(卡铂和紫杉醇)的59岁女性卵巢浆液性癌患者中(上图),和一名之前接受过手术和化疗(卡铂和紫杉醇)的72岁卵巢腺癌患者中(下图),均观察到FoxP3+细胞的减少。

[0418] 实施例12:早期T细胞活化标志物与肿瘤对抗OX40和抗PD1联合治疗的反应之间的相关性

[0419] 本实施例评估了早期T细胞活化标志物与肿瘤对抗OX40(OX40.23)和抗PD1联合治疗的反应之间的相关性。

[0420] 根据第20天时的肿瘤进展状态将小鼠分为两组。肿瘤体积 $>100\text{mm}^3$ 的小鼠视为非应答者,肿瘤体积 $\leq 100\text{mm}^3$ 的小鼠视为应答者。

[0421] 如图27A和27B所示,第12天(此时肿瘤体积没有明显分离)时的CD44+CD8+T细胞和Ki67+CD8+T细胞的百分比与随后的肿瘤反应呈正相关,这可能有助于确定联合治疗的最佳剂量和时间表。以Ki67+CD8+T细胞的绝对变化对肿瘤负荷的最大%减少作图的数据也显示出肿瘤负担的减少与增殖的CD8+T细胞之间的正相关性(图27C)。同样,在用OX40.21+抗PD1抗体(纳武单抗)治疗的人类患者中,抗肿瘤活性与增殖的Ki67+CD8+T细胞的增加相关(图27D)。

[0422] 实施例13:递增剂量的抗ICOS抗体对肿瘤生长的影响

[0423] 本实施例表明,在抗ICOS+抗PD1联合治疗中,一种激动性抗ICOS抗体在较高剂量

下表现出功效降低(即“钩状效应”)。

[0424] 简而言之,对已建立CT26肿瘤的小鼠(平均重量约20mg)进行抗PD-1单一疗法或与抗ICOS抗体联合治疗。抗ICOS的剂量递增从0.1mg/kg开始,3倍递增至10mg/kg(或一最大剂量:固定剂量约200 μ g/小鼠)。抗PD-1抗体的以10mg/kg剂量给药(或一最大剂量:固定剂量约200 μ g/小鼠)。抗ICOS和抗PD1抗体在肿瘤植入后的同一时间表内施用(即从第7天开始,每4天施用一次)。

[0425] 如图28所示,在抗-ICOS+抗-PD1联合治疗中,观察到最大肿瘤生长抑制(TGI)时的抗-ICOS抗体剂量(3mg/kg)低于测试的最大剂量(10mg/kg),表明在大于3mg/kg的剂量下,TGI下降。这提示,与激动性抗OX40抗体类似,靶向其他免疫刺激性受体如ICOS等的激动性抗体表现出“钩状效应”,并在亚饱和剂量下达到最大功效。

[0426] 实施例14:采用基于药动学/药效学(PK/PD)的方法选择OX40.21的首次人体试验剂量

[0427] 肿瘤药物的首次人体试验(First-in-human,FIH)剂量的通常根据是《国际协调统一会议准则》(International Conference on Harmonisation Guideline),该准则推荐的FIH起始剂量是:来自非啮齿类动物的最高非严重毒剂量(HNSTD)的1/6;或者,对于具有免疫激动性质的生物药物,推荐的剂量为最低预期生物效应水平(MABEL)。然而,基于MABEL的方法无法为患者提供临床获益。本例描述了一种基于PK/PD的方法,来根据抗肿瘤功效,即预期的药理作用,选择FIH起始剂量。

[0428] 简而言之,用流式细胞术测定人和小鼠活化T细胞中的体外结合半最大有效浓度(EC₅₀)值。对于小鼠的PK/PD测定,使用了一种小鼠替代抗体(仓鼠抗小鼠OX40激动性单克隆抗体,重新格式化为小鼠IgG1(mIgG1)和IgG2a(mIgG2a)同种型),这是因为OX40.21不与小鼠OX40结合。对于抗肿瘤功效,使用小鼠MC38和CT26结肠腺癌模型,根据治疗组和对照组中的肿瘤生长曲线下面积的中位值确定了百分比肿瘤生长抑制(%TGI)。使用替代抗体和OX40.21在食蟹猴中进行了PK研究。利用简单的异速缩放(allometry)基于猴子数据预测人的PK,其中清除率和稳态分布量(V_{ss})的幂指数分别为0.85和1。使用“干外套”(dry coat)格式评估了体外细胞因子释放(参见,例如,Finco et al.Cytokine 2014;66:143-55)。用OX40.21在食蟹猴中进行了腺病毒血清型5-猿免疫缺陷病毒(Ad5-SIV)接种研究,在食蟹猴中进行了1个月的重复施用毒理学研究,其中给猴子每周一次30分钟静脉(iv)输注30mg/kg、60mg/kg和120mg/kg的OX40.21,共5周。

[0429] 如表6所示,小鼠替代抗体表现出与OX40.21相似的结合EC₅₀值。

[0430] 表6

活化的T细胞中的结合EC ₅₀ (pM)			
抗体	人T细胞	食蟹猴T cells	小鼠T细胞
[0431] OX40.21 (人)	72	68	无结合
mIgG1 (小鼠)	无结合	无结合	130
mIgG2a (小鼠)	无结合	无结合	220

[0432] 接下来,进行了PK/PD分析,以将第一周的最大药物浓度(C_{max(首周)})或曲线下面积(AUC_{0-首周})与抗肿瘤功效相关联。为了预估对人的功效剂量,并且为了更保守以拓宽患者覆

盖面,此项分析围绕着MC38模型中的抗肿瘤功效来进行,因为与CT26模型相比,该模型对抗肿瘤功效的敏感性较低。由于小鼠替代品的PK来源于仓鼠,在第二周受到免疫原性的显著影响,因此基于激动剂的药理作用是由C_{max}或初始药物暴露驱动的这一假设,在功效测试中使用的各种方案下模拟了第一周的C_{max}和AUC数据。mIgG1和mIgG2单克隆抗体在小鼠MC38肿瘤模型中的暴露-反应关系如图29所示。

[0433] 在食蟹猴中也进行了相应的PK实验,其结果汇总于表7。

[0434] 表7

剂量, mg/kg	AUC _总 , μg/mL x 天	T _{1/2} , 天数	清除率, mL/天/kg	V _{ss} , mL/kg
0.4	86 ± 5	5.6 ± 0.5	4.8 ± 0.2	36 ± 2
4	785 ± 138	6.2 ± 0.6	5.3 ± 1.0	49 ± 12

[0436] 根据上述小鼠和猴的数据,预测人的T_{1/2}期为9天。通过在人体中达到与小鼠中相同的AUC_{0-首周}和C_{max(首周)},预估OX40.21的人体有效剂量为1mg/kg。人体的起始剂量被选定为预估有效剂量的1/4(即0.25mg/kg,或80kg体重下为20mg),以更高效地达到临床相关剂量。

[0437] 获得了额外的辅助数据来为FIH起始剂量选择提供信息,这些数据如下:

[0438] -用OX40.21进行的Ad5-SIV疫苗接种研究,在第1天和第28天给猴子施用OX40.21时,发现在IV剂量为4mg/kg时,疫苗诱导的T细胞应答的增强极小。

[0439] -使用“干外套”格式,在测试的最高浓度下(10μg/孔或33μg/mL,使用0.3mL的温育体积来近似),OX40.21没有诱导细胞因子释放或增加人外周血单核细胞中的表达标志的激活。

[0440] -通过对猴子进行1个月的重复剂量毒理学研究,确定HNSTD或无不良反应水平为120mg/kg/周,算得HNSTD剂量的六分之一为17mg/kg(基于暴露量)或20mg/kg(基于体重)。

[0441] -使用文献中报道的另一种小鼠抗人OX40激动性mAb的临床经验显示,在癌症患者中没有急性毒性,即使在测试的最高剂量下(2mg/kg),人体内的药物浓度(≈40μg/mL)在给药的整个第一周内都能很好地维持(见Curti et al., Cancer Res 2013;73:7189-98)。在2mg/kg时,人的C_{max}约为80μg/mL,或者说是报道的体外结合EC₅₀(48ng/mL或0.3nM)的>1500倍。

[0442] 表8总结了基于PK/PD的FIH起始剂量下的C_{max}余量以及上述的附加支持数据。

[0443] 表8

	基于PK/PD- 的FIH起始 剂量	基于毒理学的 FIH起始 剂量(1/6猴 HNSTD)	干外套细胞因子 释放测定中的无 效应水平 ^a	猴中的最 小疫苗诱 导T细胞应 答	使用以往报 道的抗OX40 激动剂时的 临床耐受的 暴露量
剂量, mg/kg	0.25	17-20	1.3	4	2
C _{max} , μg/mL	6.3	425-500	33	78	80
C _{max} 余量(相 对于基于 PK/PD的FIH 起始剂量)	NA	68-80x	5.3x	13x	2.5x ^b

[0445] NA:不适用

[0446] ^a干外套细胞因子释放测定中的药物浓度用温育体积 (0.3mL) 来近似,人体剂量用无效应药物水平乘以 40mL/kg的血浆量计算

[0447] ^b用结合EC₅₀值中的差异归一化之后计算余量

[0448] 综上所述,成功地使用一种以PK/PD为基础的方法——其聚焦于以抗肿瘤功效作为目的的药理作用——选择了激动性抗OX40抗体OX40.21的FIH 起始剂量,并证明了其合理性。所选择的FIH起始剂量(20mg,假设体重为 80kg的)得到了临床前体外和体内毒理学数据的支持。这种基于PK/PD的FIH 起始剂量选择策略,以及体外和体内毒理学结果,反映了在确保足够的安全性的同时,最大限度地减少接受亚治疗剂量的癌症患者数的意图。

[0449] 实施例15:OX40.21单一疗法和OX40.21+纳武单抗剂量递增试验中的患者特征和治疗相关不良事件

[0450] 本实施例总结了在剂量递增试验中接受OX40.21单一疗法(n=20)Q2W和 OX40.21+纳武单抗联合治疗(n=39)Q2W的患者的基线人口统计学、既往治疗和肿瘤类型及不良事件。表9总结了患者特征,表10总结了不良事件。

[0451] 表9

[0452] OX40.21单一疗法 OX40.21+纳武单抗

中位年龄(范围), 岁		61 (24-80)	61 (32-82)
性别, n	男/女	13/7	20/19
ECOG ps, n	0-1	19	38
	未报告	1	1
种族, n	白人	16	38
	黑人	2	0
	所有其他	2	1
既往治疗次数, n	0	0	4
	1	9	9
	2	3	8
	≥ 3	8	18
既往免疫治疗, n	既往抗 PD-1/PD-L1	6	12
	既往抗 CTLA-4	4	4
	二者都有	4	4
	CRC	7	8
肿瘤类型, n	黑素瘤	4	6
	胰腺癌	4	3
	其他 ^a	5	22

[0455] ^a包括乳腺癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、胃癌、HCC、NSCLC、卵巢癌、前列腺癌、RCC和SCCHN CRC=结直肠癌;CTLA-4=细胞毒性T淋巴细胞抗原-4;ECOG PS=美国东部肿瘤协作组表现状态;HCC=肝细胞癌;NSCLC=非小细胞肺癌;PD-L1=程序性死亡蛋白配体1;RCC=肾细胞癌;SCCHN =头颈部鳞状细胞癌

[0456] 表10

[0457] OX40.21 OX40.21+纳武单抗240mg

	所有单药 n = 20	20 mg n = 7	40 mg n = 8	80 mg n = 8	160 mg n = 8	320 mg n = 8	总 n = 39
任何 TRAE, n	5 ^a	4	3	3	6	4	20
在总联用队列的≥2名患者中1或2级 TRAEs, n							
疲劳	0	0	1	1	3	0	5
发热	1	0	1	2	0	2	5
[0458] 关节痛	0	0	1	1	2	0	4
发冷	0	1	0	0	1	0	2
腹泻	1	1	0	0	1	0	2
甲状腺功能减退	0	0	1	0	0	1	2
呕吐	1	0	0	0	1	1	2
任何 3/4 级 TRAE	1 ^b	0	0	0	1 ^c	0	1 ^c

[0459] 1名患者分别出现严重不良事件,^a2级肺炎(OX40.21 320mg)和^c3级肺炎,导致停药,被认为是DLT;^b1名患者出现3级疲劳。TRAE:治疗相关不良事件

[0460] 没有达到最大耐受剂量,也没有发生治疗相关死亡。OX40.21+纳武单抗的安全性 与纳武单抗单一疗法相似。

[0461] OX40共刺激性激动剂BMS-986178±纳武单抗(NIVO)或伊匹单抗(IPI)在晚期实体瘤患者中的1/2a期研究中OX40受体调节作用

[0462] 实施例16:单一疗法与联合治疗的药代动力学比较

[0463] 下面的实施例按照图39所示的研究设计示意图进行。对人体给予单一疗法剂量的 BMS-986178、递增剂量的BMS-986178与240mg纳武单抗(IV Q2W)的联合、或递增剂量的 BMS-986178与1mg/kg伊匹单抗(IV Q3W)的联合。符合图39中标准的患者均有资格参加研究。

[0464] 为了评估单一疗法与联合治疗相比的药代动力学,在Cyto-Chex BCT(Streck)中采集患者血样。裂解红细胞后,用荧光标记的表面标记物特异性抗体对细胞进行染色。表面染色后,将样品固定,通透化,然后用针对细胞内标记物的抗体染色。染色后的样品在 Beckman Coulter CytoFlex S流式细胞术仪采集,并使用FlowJo软件对所得数据进行分析。

[0465] 在这项研究中,90名患者接受了治疗(BMS-986178单一疗法,n=20; BMS-986178+NIVO,n=38;BMS-986178+IPI,n=32)。如图40所示, BMS-986178单药或与纳武单抗或伊匹单抗联合使用时的PK对于20至 320mg的BMS-986178剂量是线性的。因此,BMS-986178的浓度-时间特征可以用一个线性、两区隔、零阶静脉输液模型和一阶消除很好地描述。

[0466] 实施例17:单一疗法和联合(激动剂BMS-986178±纳武单抗(NIVO)或伊匹单抗

(IPI) 治疗的全血OX40受体占据率 (RO) 评估

[0467] 为了评估全血OX40受体占据率 (RO), 将患者血样与饱和剂量的BMS- 986178温育以测量总OX40的表达, 或者不进行BMS-986178温育以测量结合药物, 然后进行表面标记物C1D1、C1D8、C2D1或C5D1的染色和流式细胞分析。

[0468] 如图41所示, 在用BMS-986178 20mg治疗的患者中, Tregs上的外周 OX40 RO接近饱和, 在剂量 ≥ 40 mg时达到饱和。

[0469] 接下来, 评估用 ≥ 40 mg BMS-986178治疗的患者中外周Tregs是否存在下调。为了测试外周Tregs中的总OX40, 开发了一种测定患者血清中总sOX40 的测定法, 并使用Meso Scale Discovery (MSD) 平台进行了验证 (适合目的)。MSD Gold 96孔链亲和素板用生物素化的捕获抗体包被, 随后与患者血清温育。用钌化检测抗体检测被捕获的sOX40, 并通过MSD SECTOR仪测定电化学发光。

[0470] 如图42所示, 在用 ≥ 40 mg的BMS-986178治疗的患者中观察到Tregs表面OX40表达的下调, 此时RO接近饱和。

[0471] 接下来确定这种趋势是否也在用BMS-986178单一疗法或用BMS- 986178和纳武单抗或伊匹单抗联合治疗的个体患者中观察到。如图43A和 43B所示, 在用BMS-986178 \pm 纳武单抗或伊匹单抗治疗的患者中, T细胞活化的标志物sOX40显示出时间和剂量依赖性的调节, 这证实了BMS-986178 对OX40靶点的接合。在用 ≥ 160 mg的BMS-986178治疗的患者中sOX40水平几乎达到饱和, 这与RO结果 (图42) 和临床前观察结果 (数据未显示) 一致。

[0472] 实施例18: 单一疗法和联合 (激动剂BMS-986178 \pm 纳武单抗 (NIVO) 或伊匹单抗 (IPI) 治疗的血清细胞因子表达

[0473] 在接受BMS-986178单一疗法和联合治疗的患者中测定了干扰素- γ (IFN- γ) 和IP-10。简而言之, 使用基于Luminex的技术 (结合多种人体炎症性MAP 组 [Myriad RBM] 的定制化多分析物谱 [MAP] 组) 测定患者血清中的IFN- γ 和IP- 10。如图44A和44B所示, BMS-986178 \pm NIVO或IPI刺激了TH1相关的细胞因子IFN- γ (图44A) 和促炎症细胞因子10kDa IFN- γ 诱导蛋白IP-10 (图44B) 的产生, 提示外周T细胞激活。此外, 接受BMS-986178+NIVO或IPI的患者中, 更多的患者表现出IFN- γ 和IP-10产生的强健增加。

[0474] 还观察到BMS-986178 \pm NIVO或IPI增加了增殖性 (Ki67+) CD4+和CD8+ 效应记忆T细胞的水平。如图45A和45B所示, 用BMS-986178 \pm NIVO或 IPI治疗的患者表现出增殖性 (Ki67+) CD4+效应记忆T细胞 (图45A) 和 CD8+PD-1+终末效应记忆T细胞 (图45B) 的增殖水平增加。可见, 相比于单独的BMS-986178, BMS-986178+NIVO或IPI在更多数量的患者中显示了增殖性CD4+和CD8+效应记忆T细胞的更深刻的增加。

[0475] 基于上述数据, 不限于特定机制, 图37示出了BMS-986178剂量、OX40 RO、OX40表达和PD调节之间的关系的示意图模型。

[0476] 实施例19人类总可溶性OX40生物标志物测定法的开发和验证

[0477] 如实施例17所述, 利用Meso Scale Discovery (MSD) 平台开发并验证了一种测量患者血清中总sOX40的测定法。采用适合目的 (fit-for-purpose) 的生物标志物验证方法对该测定法进行了验证, 包括准确性和精确度、稀释线性/ 平行度、特异性 (基质效应和药物干扰)、稳定性和选择性。

[0478] 实验结果见图46A至46H和表11-12。如图所示, 人血清总sOX40的测定范围为25~

20,000pg/mL。7个标准曲线点 (n=20) 的准确度在98-103%以内, CV \leq 8%。QC性能在可接受范围内:LQC、MQC、HQC和ULOQ的CV均在14%以下(其中LLOQ的CV为26%)。表11和表12。测定校准物显示出 BMS-986178与市售校准物(即OX40-His_Sino和OX40-Fc_R&D)之间的平行性。图46A。两个不同抗体对之间也有良好的血清OX40相关性。图46B。稀释线性/平行度、特异性、稳定性和选择性均在预期浓度的 \pm 25%范围内。图46C至46E。OX40的储存和冻融稳定性也在性能预期内。图H。最后,观察到受抗OX40抗体、OX40L融合蛋白、纳武单抗和伊匹单抗的干扰极小。图46F、46G和48。这些结果证明了该测定法的高精确度、高灵敏度和对临床样品分析的适用性。

[0479] 表11:校准曲线验证数据摘要

血清中浓度 (pg/mL)	20000	8000	3000	1000	300	100	50	25
平板上浓度 (pg/mL)	10000	4000	1500	500	150	50	25	12.5
[0480]	回算的OX40 (pg/mL)							
n	20	20	20	20	20	20	20	20
均值 (pg/mL)	10180	4008	1488	496	150	51	25	12.3
%CV	8	2	3	2	2	3	5	5
%准确度	102	100	99	99	100	103	100	98

[0481] 表12:QC性能

	LLOQ_A	LLOQ	LQC	MQC1	MQC2	HQC	ULOQ
n	24	40	40	40	40	40	40
均值(pg/mL)	31	61	126	841	2462	15378	20158
%CV_测定内	14	7	7	5	5	5	6
[0482] %CV_测定间	24	13	9	9	9	8	8
%CV	26	14	11	10	10	9	10
均值 \pm 2标准偏差	15-48	43-78	99-153	668-1013	1963-2960	12527-18230	16318-23998

[0483] 一经验证,该测定法被用于测量正常健康志愿者和癌症受试者中的血清 sOX40水平。如图47所示,与正常健康个体相比,癌症患者(头颈癌、卵巢癌或宫颈癌)中的sOX40水平显著升高。这一结果支持使用抗OX40抗体(如BMS-986178)单独或与其他治疗药物如纳武单抗和伊匹单抗等联合来治疗癌症。

[0484] 表13序列汇总

[0485]

SEQ ID	描述	序列
1	人OX40前体	MCV GARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECR PGNGMVSRCRSRQNTVCRPCGPGFYNDVSSKPCPKPCTWCNLRSGSE RKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPGHFSPGDNQAC KPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPIT VQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLLGLLPLAILL ALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
2	成熟人OX40的胞外域	LHCVGDYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSRQNTVCRPCGPGFYNDV VSSKPCPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPG VDCAPCPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDR DPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVA A
3	食蟹猴OX40	MCV GARRLGRGPCAALLLLGLGLSTTAKLHCVGDTYPSNDRCCQECR PGNGMVSRCNRQNTVCRPCGPGFYNDVSSAKPCKACTWCNLRSGSE RKQPCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPGHFSPGDNQAC KPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPPTQPQETQGPPARPIT VQPTEAWPRTSQRPSTRPVEVPRGPAVAAILGLGLALGLLPLAMLL ALLLLRRDQRLPPDAPKAPGGGSFRTPIQEEQADAHSAALAKI
4	人OX40-L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGILLCF TYICLHFSTL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEGGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCIGF YLISLKGYS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRVSNLSMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNNGEL ILIHQNPGEF CVL*
5	OX40.21 VHCDR1	SYAMY
6	OX40.21 VHCDR2	AIDTDAGTFYADSVRG
7	OX40.21 VHCDR3	LGEGYFFDY
8	OX40.21 VLCDR1	RASQSVSSYLA
9	OX40.21 VLCDR2	DASNRA
10	OX40.21 VLCDR3	QQRSNWPPT
11	OX40.21 VH	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYWVRQAPGKGLEW VSAIDTDAGTFYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYF CARLGEGYFFDYWGQGLTVTVSS
12	OX40.21 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL IYDASNRAIGIPARFSGSGSDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNW PPTFGGGTKVEIK
13	OX40.21 HC	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYWVRQAPGKGLEW VSAIDTDAGTFYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYF CARLGEGYFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0486]

14	OX40.21 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL IYDASNRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNW PPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
15	OX40.21所结合的 OX40多肽	DVVSSKPKCKPCTWCNLR
16	重链-纳武单抗	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEW VAVIWDGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVY YCATNDDYWGQGLTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLK
17	轻链-纳武单抗	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL IYDASNRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNW PRTFGQGTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	重链可变区-纳武 单抗	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEW VAVIWDGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVY YCATNDDYWGQGLTQVTVSS
19	轻链可变区-纳武 单抗	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL IYDASNRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNW PRTFGQGTVEIK
20	HCDR1 - 纳武单 抗	NSGMH
21	HCDR2 - 纳武单 抗	VIWYDGSKRYADSVK
22	HCDR3 - 纳武单 抗	NDDY
23	LCDR1 - 纳武单 抗	RASQSVSSYLA
24	LCDR2 - 纳武单 抗	DASNRRAT
25	LCDR3 - 纳武单 抗	QQSSNWPR
26	重链可变区 -伊匹 单抗(自 WO01/014424)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYTMHWVRQAPGKGLEW VTFISYDGNKRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIY YCATRWLGPFDYWGQGLTQVTVSS
27	轻链可变区-伊匹 单抗 (自 WO01/014424)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQGTVEIK
28	HCDR1 -伊匹单抗 (自 WO01/014424)	SYTMH

[0487]	29	HCDR2 –伊匹单抗 (自 WO01/014424)	FISYDGNKYYADSVKG
	30	HCDR3 –伊匹单抗 (自 WO01/014424)	TGWLGPFDY
	31	LCDR1 –伊匹单抗 (自 WO01/014424)	RASQSVGSSYLA
	32	LCDR2 –伊匹单抗 (自 WO01/014424)	GAFSRAT
	33	LCDR3 –伊匹单抗 (自 WO01/014424)	QQYGSSPWT

[0488] 等同方案：

[0489] 本领域技术人员将认识到，或仅用常规实验就能确定本文所披露的具体实施方案的许多等同方案。此类等同方案意在为随附的权利要求所涵盖。

序列表

<110> 百时美施贵宝公司
 <120> 用于治疗癌症的免疫刺激性激动性抗体
 <130> 3338.115PC06
 <150> 62/657,616
 <151> 2018-04-13
 <150> 62/628,207
 <151> 2018-02-08
 <150> 62/583,808
 <151> 2017-11-09
 <150> 62/581,905
 <151> 2017-11-06
 <150> 62/581,441
 <151> 2017-11-03
 <150> 62/580,346
 <151> 2017-11-01
 <160> 33
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人OX40前体
 <400> 1

```

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1           5           10           15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
           20           25           30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
           35           40           45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
           50           55           60
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65           70           75           80
Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
           85           90           95
Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
  
```


65	70	75	80
Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp			
	85	90	95
Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala			
	100	105	110
Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln			
	115	120	125
Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro			
	130	135	140
Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr			
145	150	155	160
Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr			
	165	170	175
Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala			
	180	185	

<210> 3

<211> 277

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 食蟹猴OX40

<400> 3

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu			
1	5	10	15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Thr Ala Lys Leu His Cys Val			
	20	25	30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys Gln Glu Cys Arg Pro			
	35	40	45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Asn Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys			
	50	55	60
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ala Lys Pro			
65	70	75	80
Cys Lys Ala Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys			
	85	90	95
Gln Pro Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly			
	100	105	110
Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys			
	115	120	125
Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp			

	100		105		110										
Val	Asn	Ile	Ser	Leu	His	Tyr	Gln	Lys	Asp	Glu	Glu	Pro	Leu	Phe	Gln
	115		120		125										
Leu	Lys	Lys	Val	Arg	Ser	Val	Asn	Ser	Leu	Met	Val	Ala	Ser	Leu	Thr
	130		135		140										
Tyr	Lys	Asp	Lys	Val	Tyr	Leu	Asn	Val	Thr	Thr	Asp	Asn	Thr	Ser	Leu
145			150		155									160	
Asp	Asp	Phe	His	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Leu	Ile	Leu	Ile	His	Gln	Asn
			165		170									175	
Pro	Gly	Glu	Phe	Cys	Val	Leu									

180

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VHCDR1

<400> 5

Ser Tyr Ala Met Tyr

1 5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VHCDR2

<400> 6

Ala Ile Asp Thr Asp Ala Gly Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly

1 5 10 15

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VHCDR3

<400> 7

Leu Gly Glu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VLCDR1
 <400> 8
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VLCDR2
 <400> 9
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VLCDR3
 <400> 10
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VH
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Asp Thr Asp Ala Gly Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HC

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Ala Ile Asp Thr Asp Ala Gly Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Arg			
	50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala			
	85	90	95
Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
	115	120	125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
	130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
	210	215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
	260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
305	310	315	320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 <210> 14
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LC
 <400> 14
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 15
 Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu
 1 5 10 15
 Arg
 <210> 16
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重链nivolumab
 <400> 16
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

385 390 395 400
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 <210> 17
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 轻链nivolumab
 <400> 17
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HCDR1 nivolumab
 <400> 20
 Asn Ser Gly Met His
 1 5
 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HCDR2 nivolumab
 <400> 21
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 22
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HCDR3 nivolumab
 <400> 22
 Asn Asp Asp Tyr
 1
 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> LCDR1 nivolumab
 <400> 23
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LCDR2 nivolumab
 <400> 24
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LCDR3 nivolumab
 <400> 25
 Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
 1 5
 <210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重链可变区ipilimumab
 <400> 26
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2 ipilimumab

<400> 29

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3 ipilimumab

<400> 30

Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr

1

5

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1 ipilimumab

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr Leu Ala

1

5

10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR2 ipilimumab

<400> 32

Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr

1

5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3 ipilimumab

<400> 33

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1

5

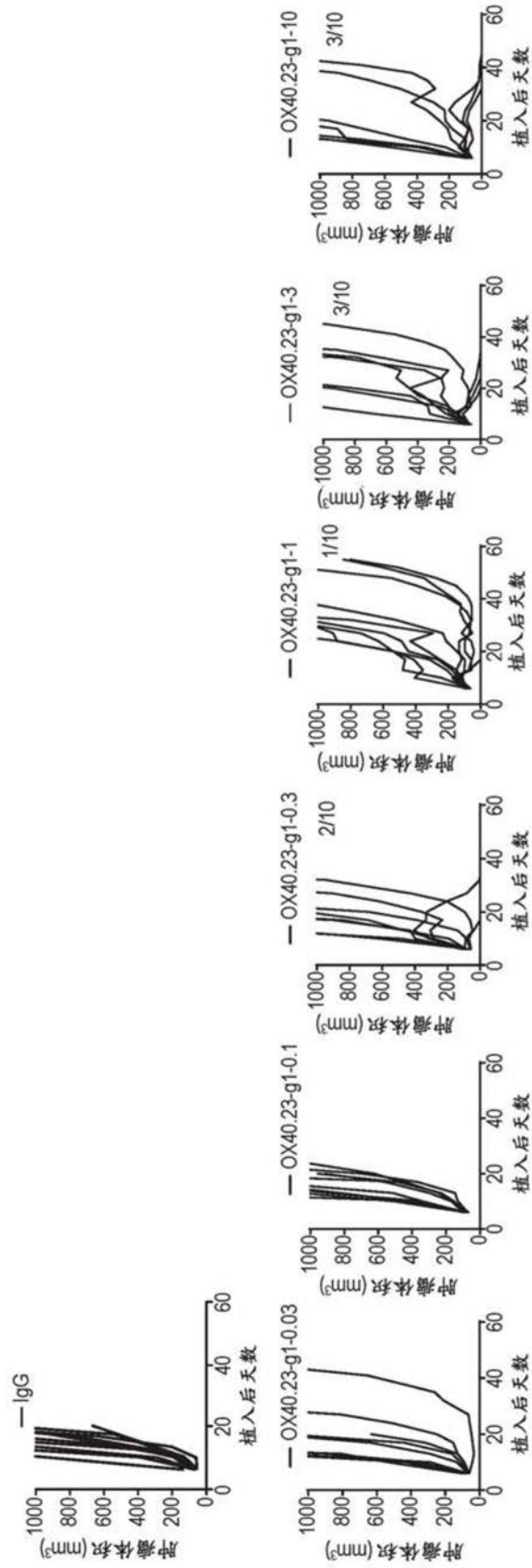


图1A

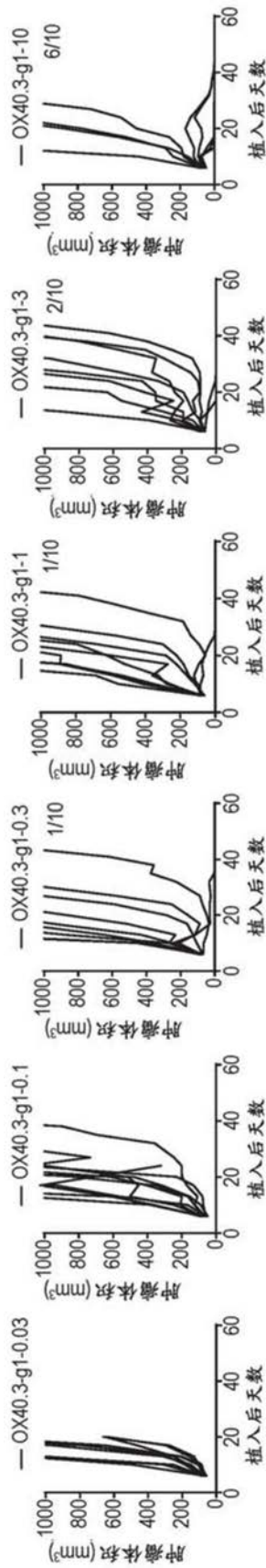


图1B

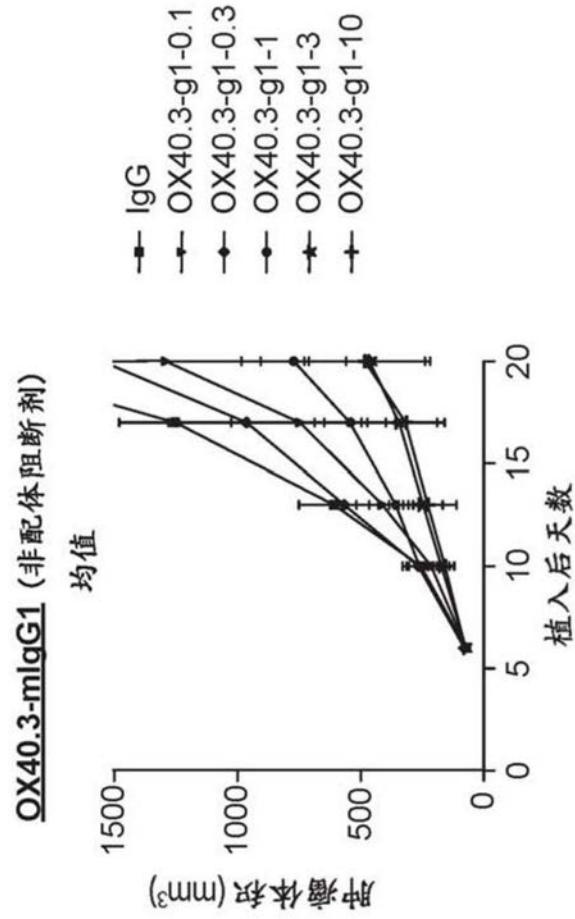


图2A

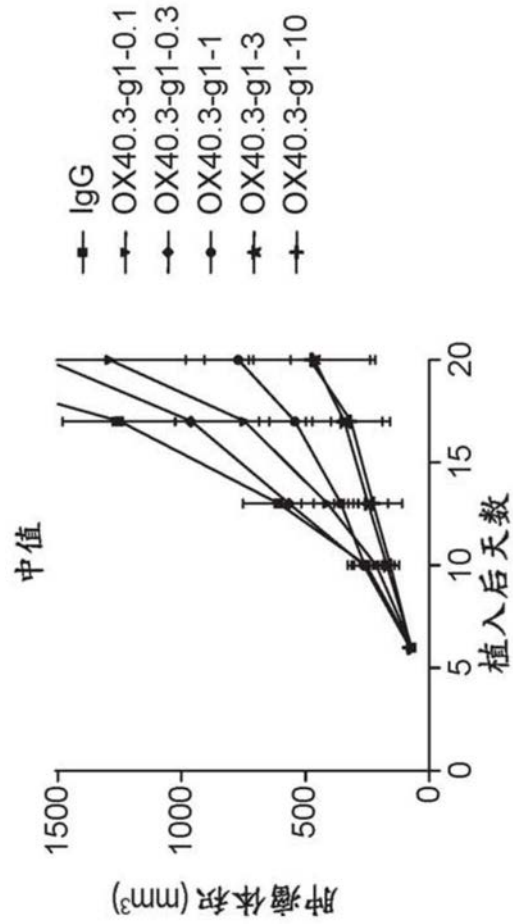


图2B

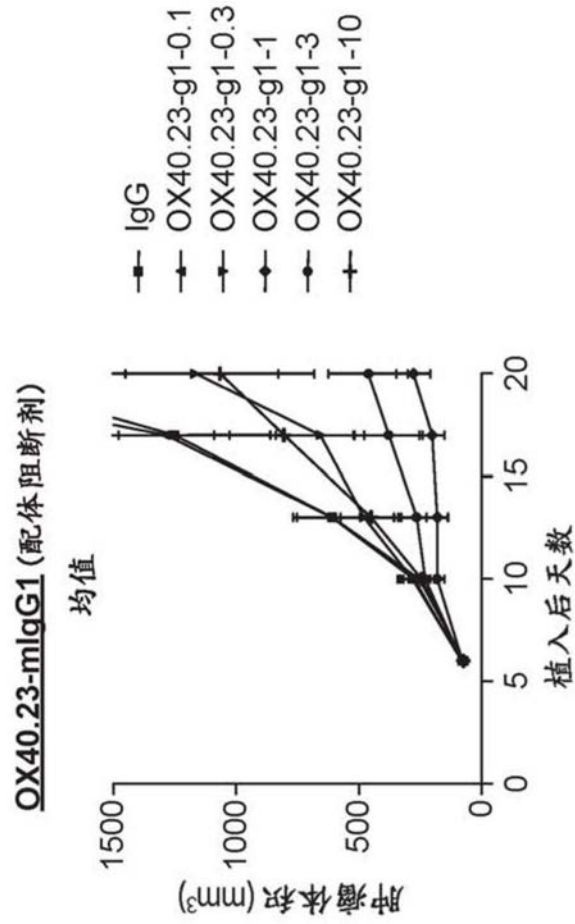


图2C

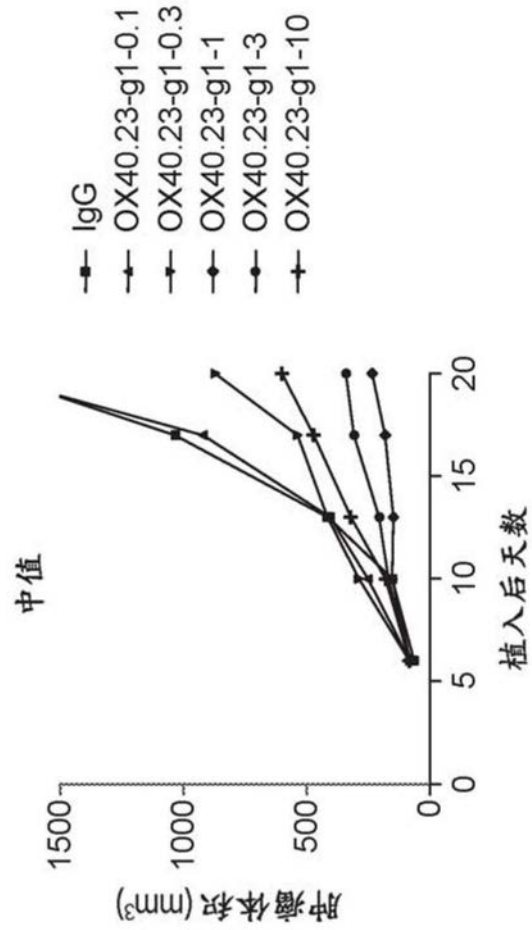


图2D

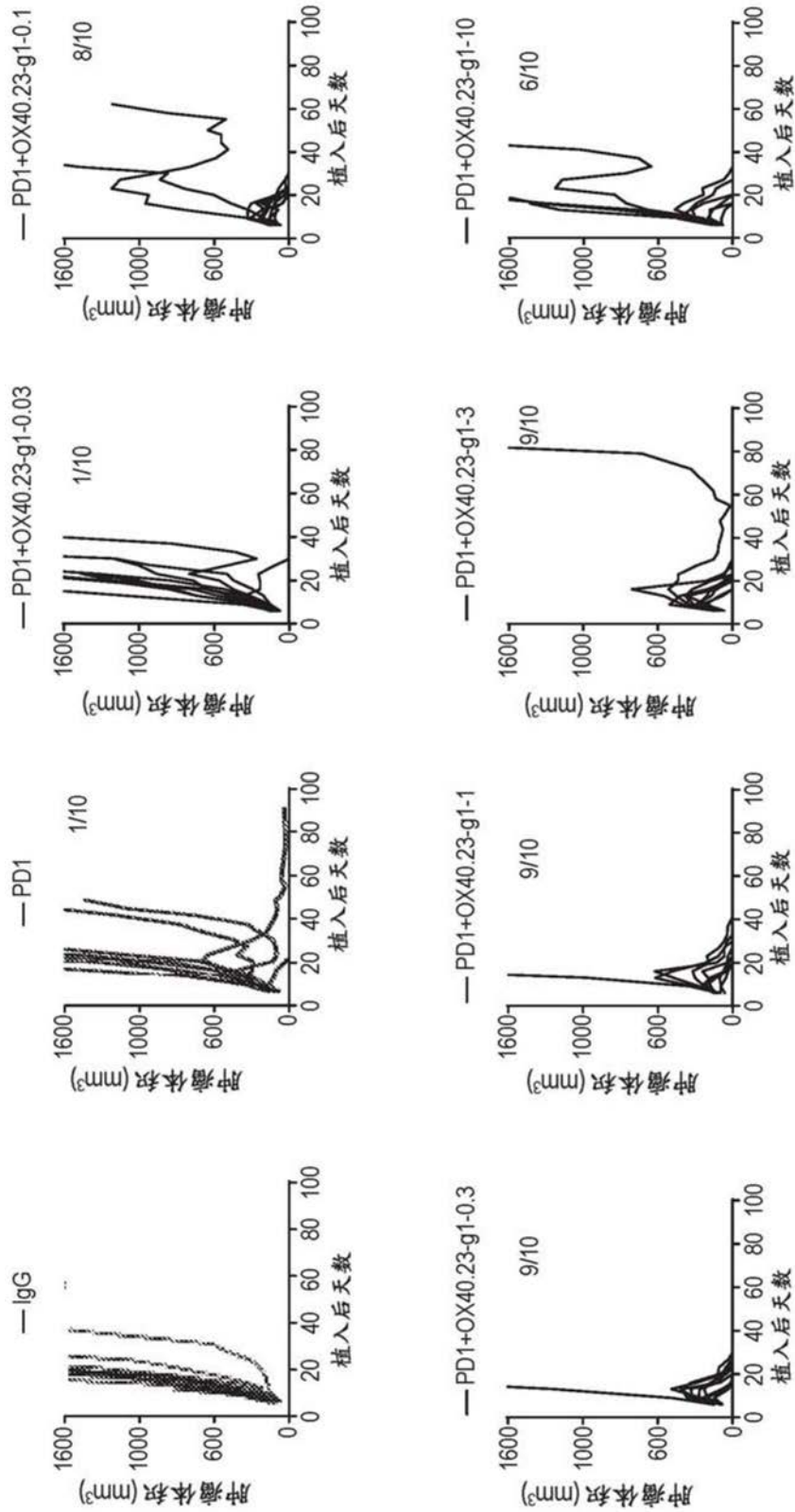


图3A

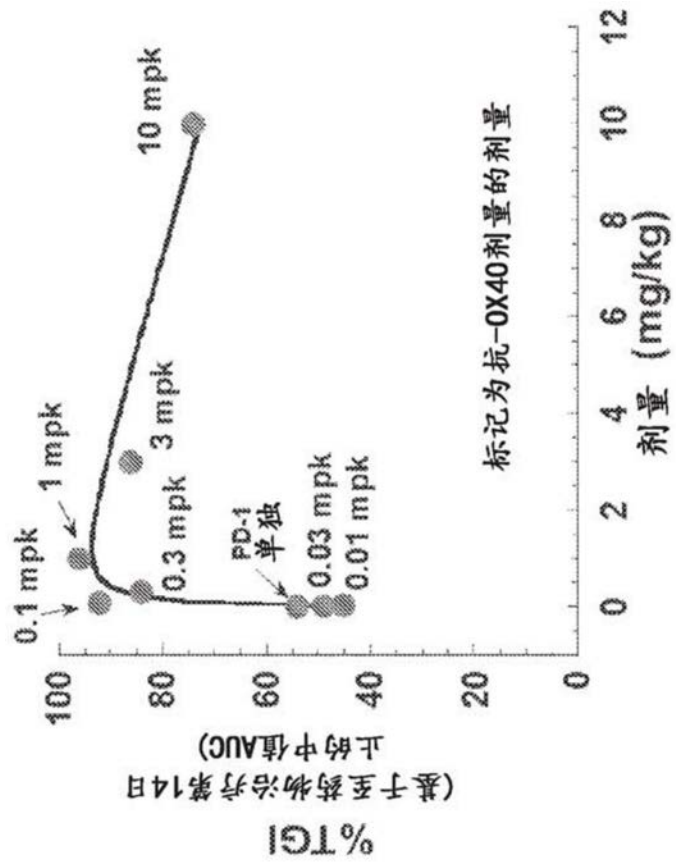


图3B

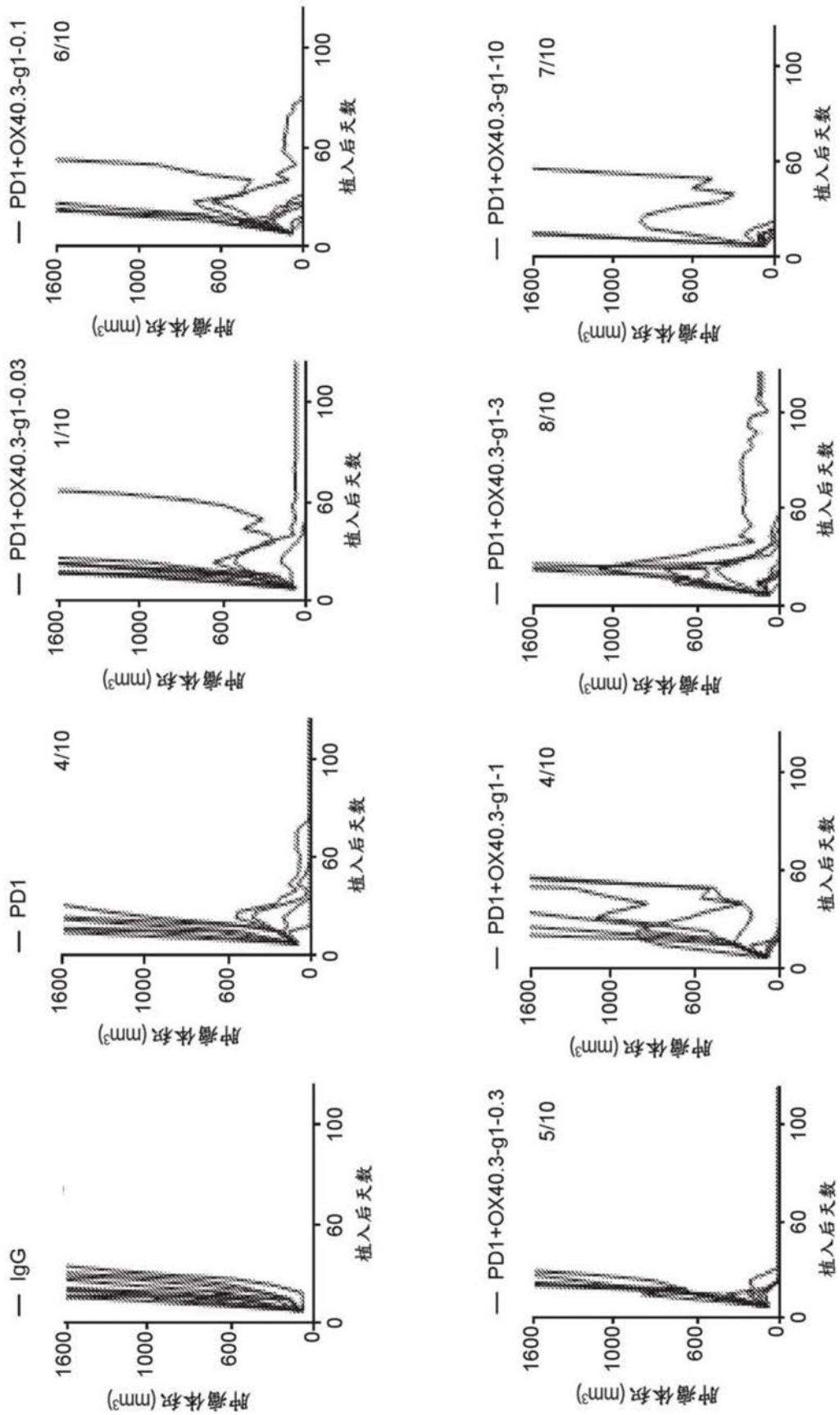


图4

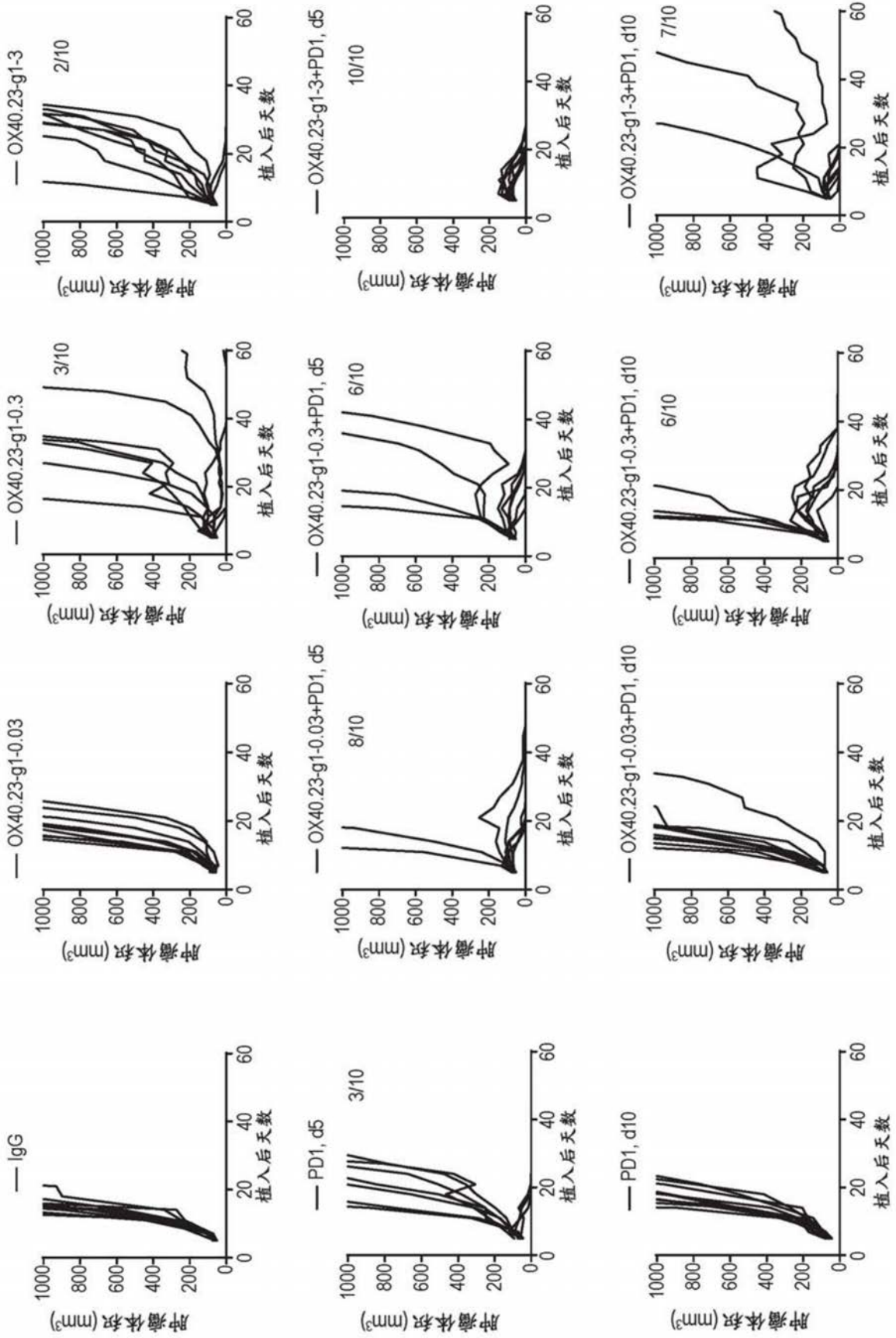


图5

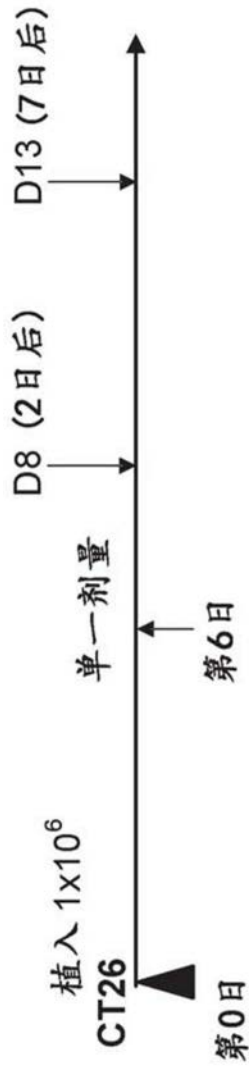


图6A

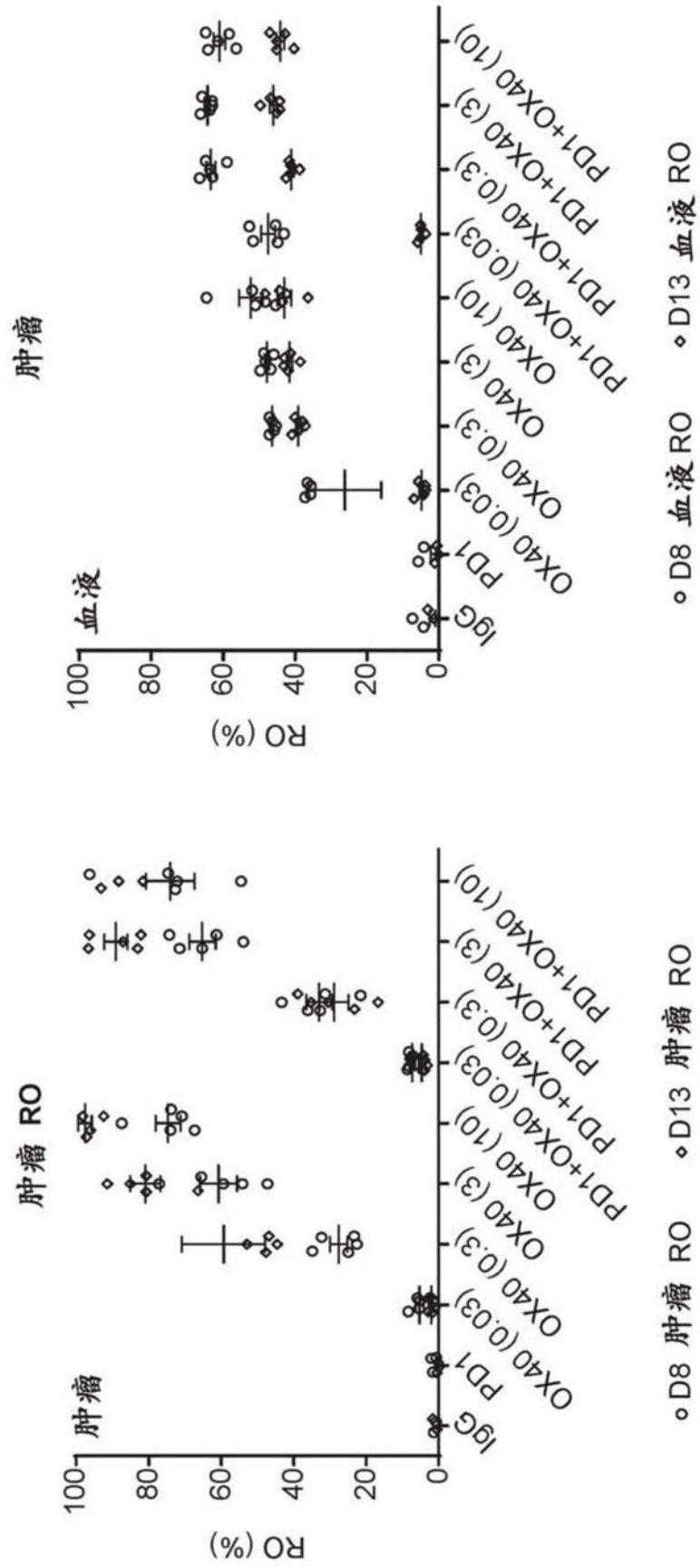


图6B

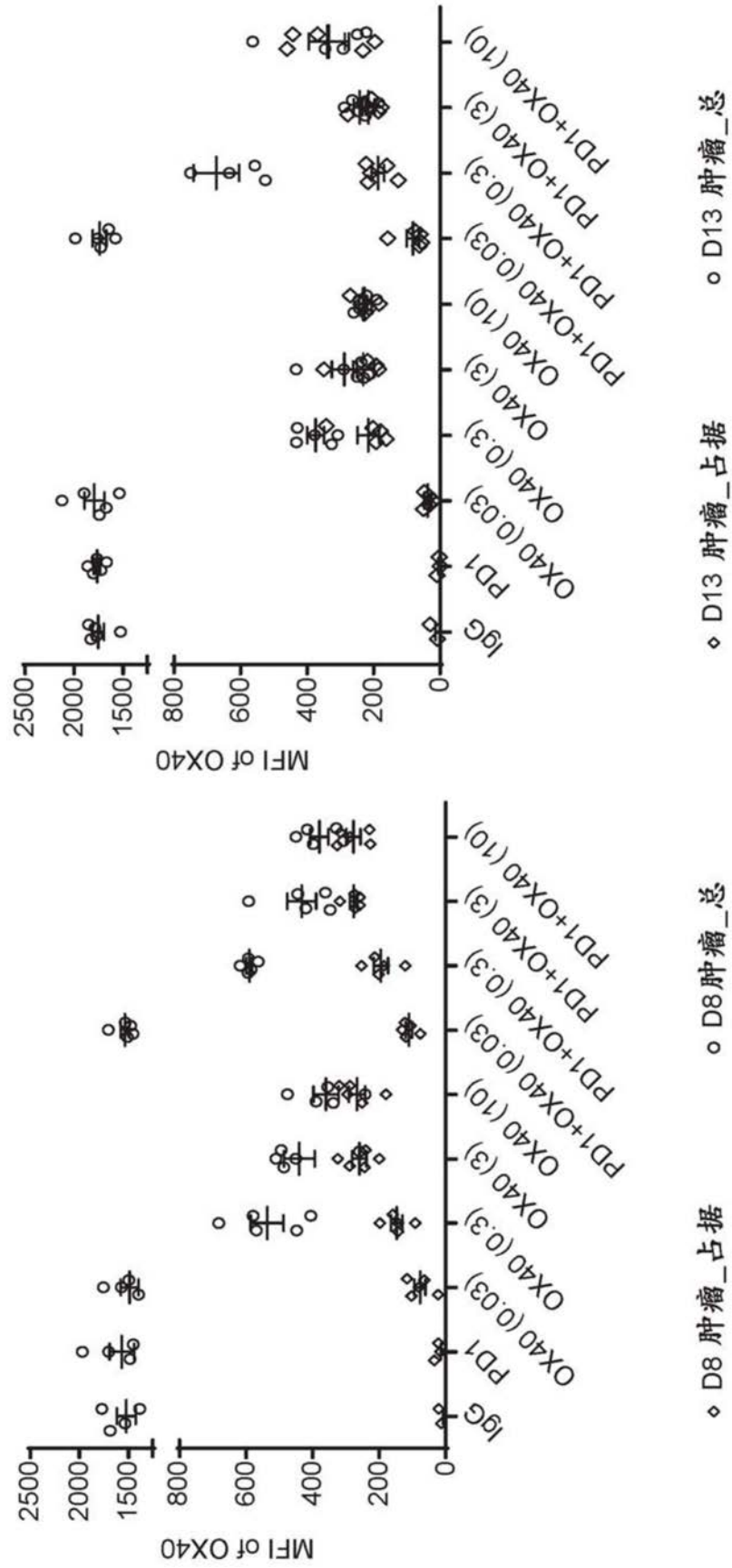


图6C

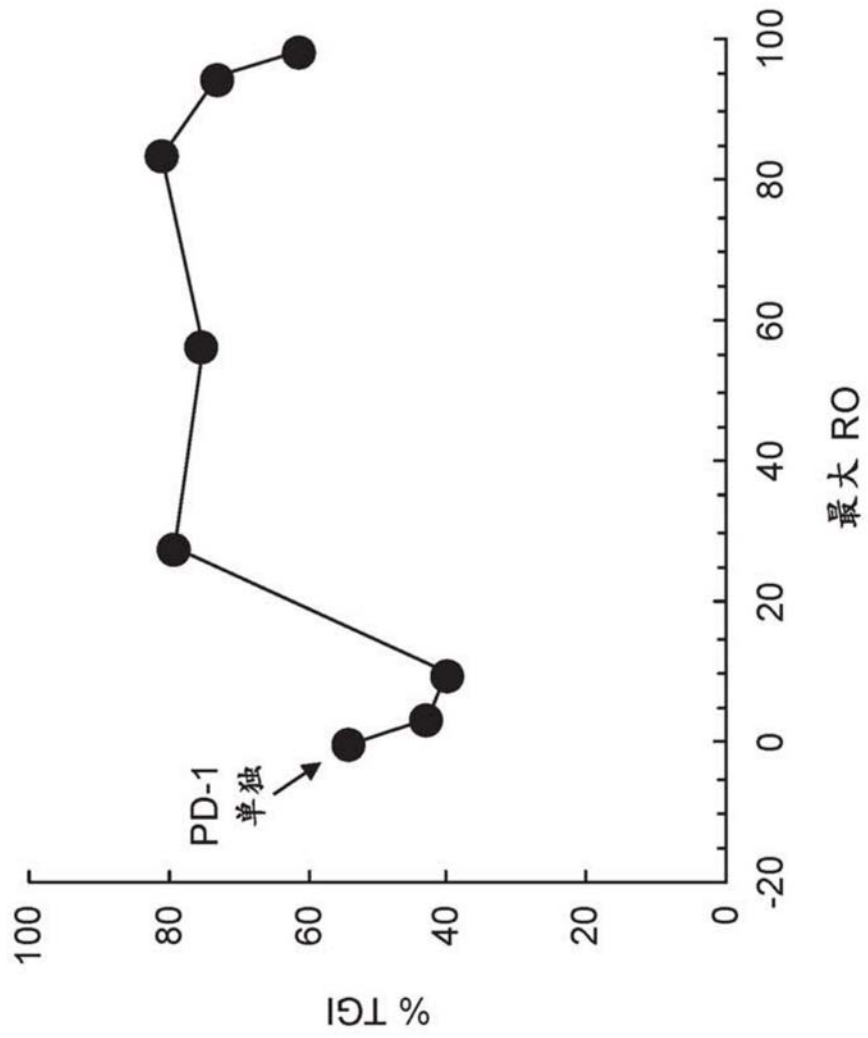


图6D

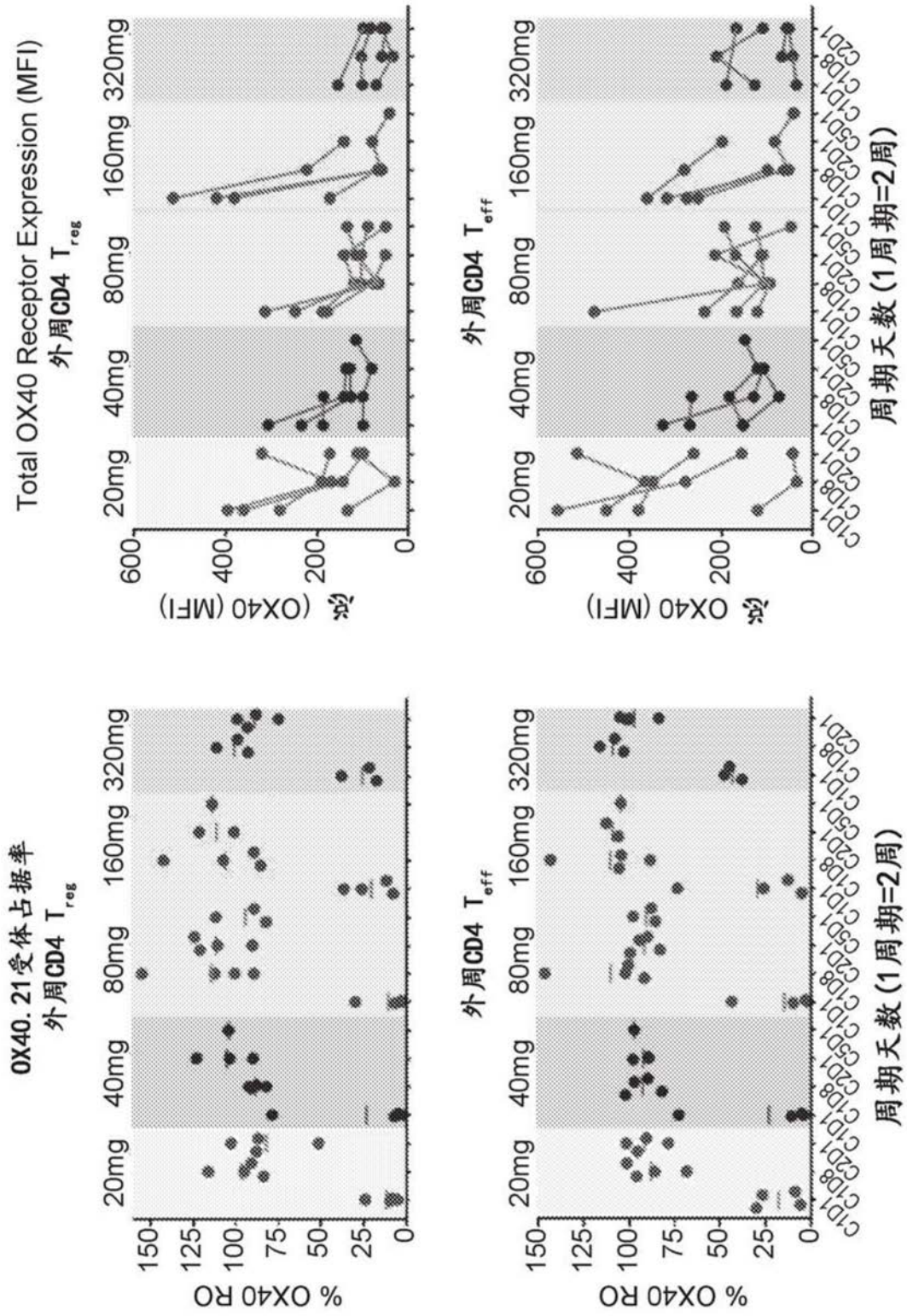


图7A

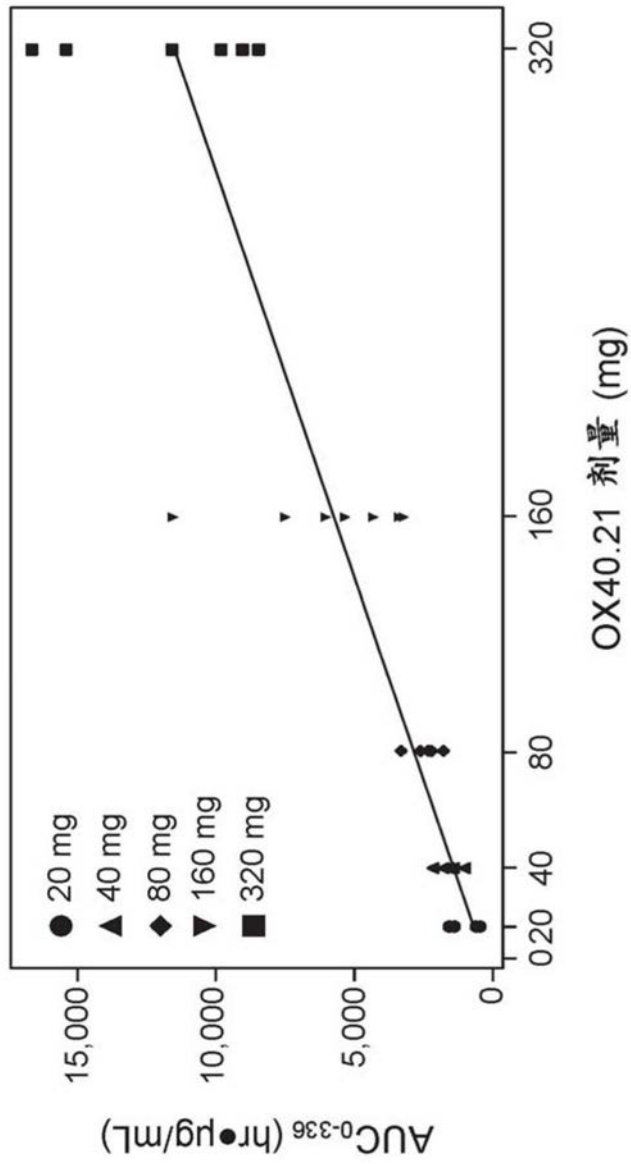


图7B

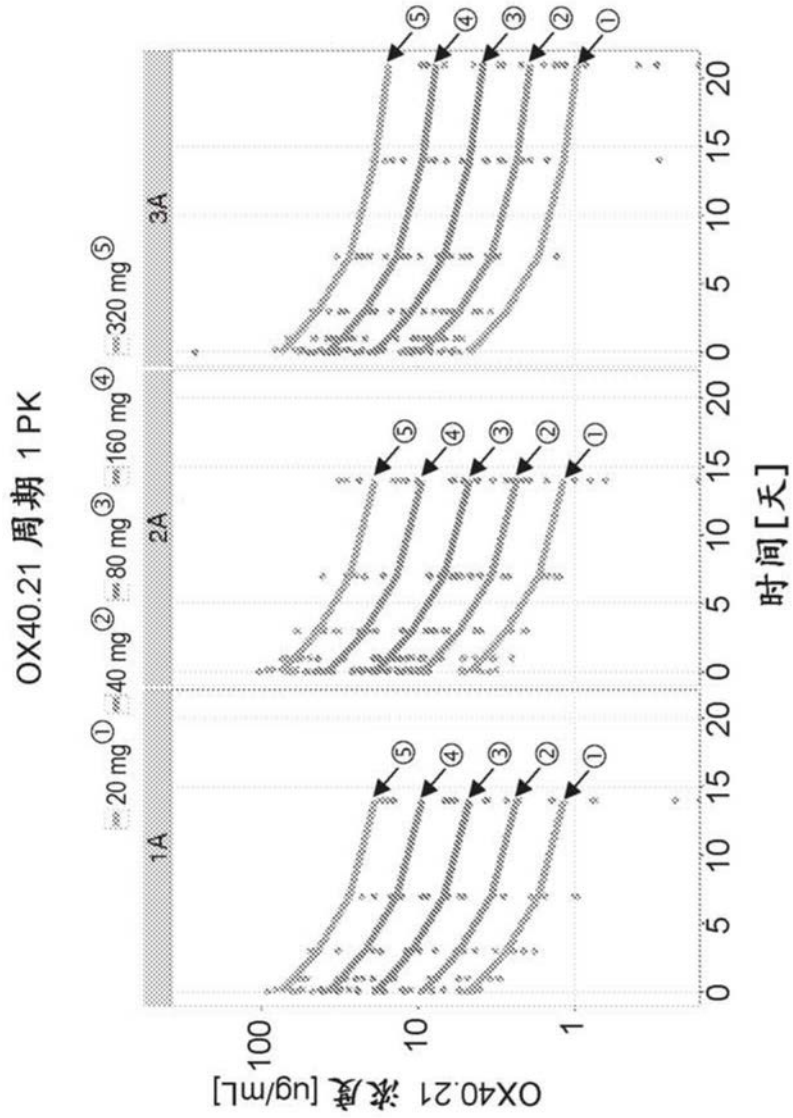


图8A

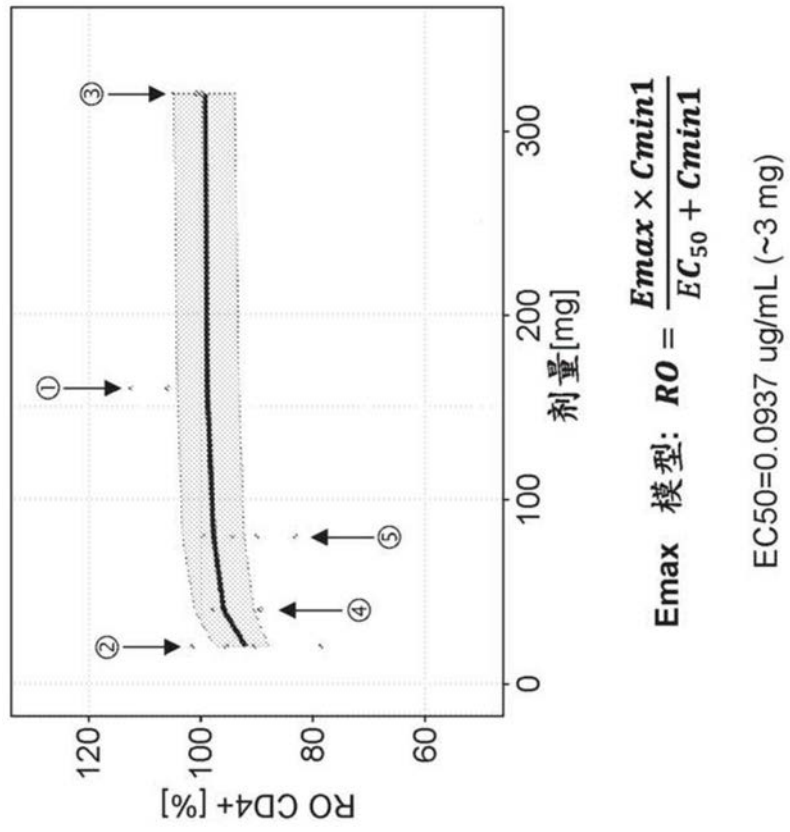


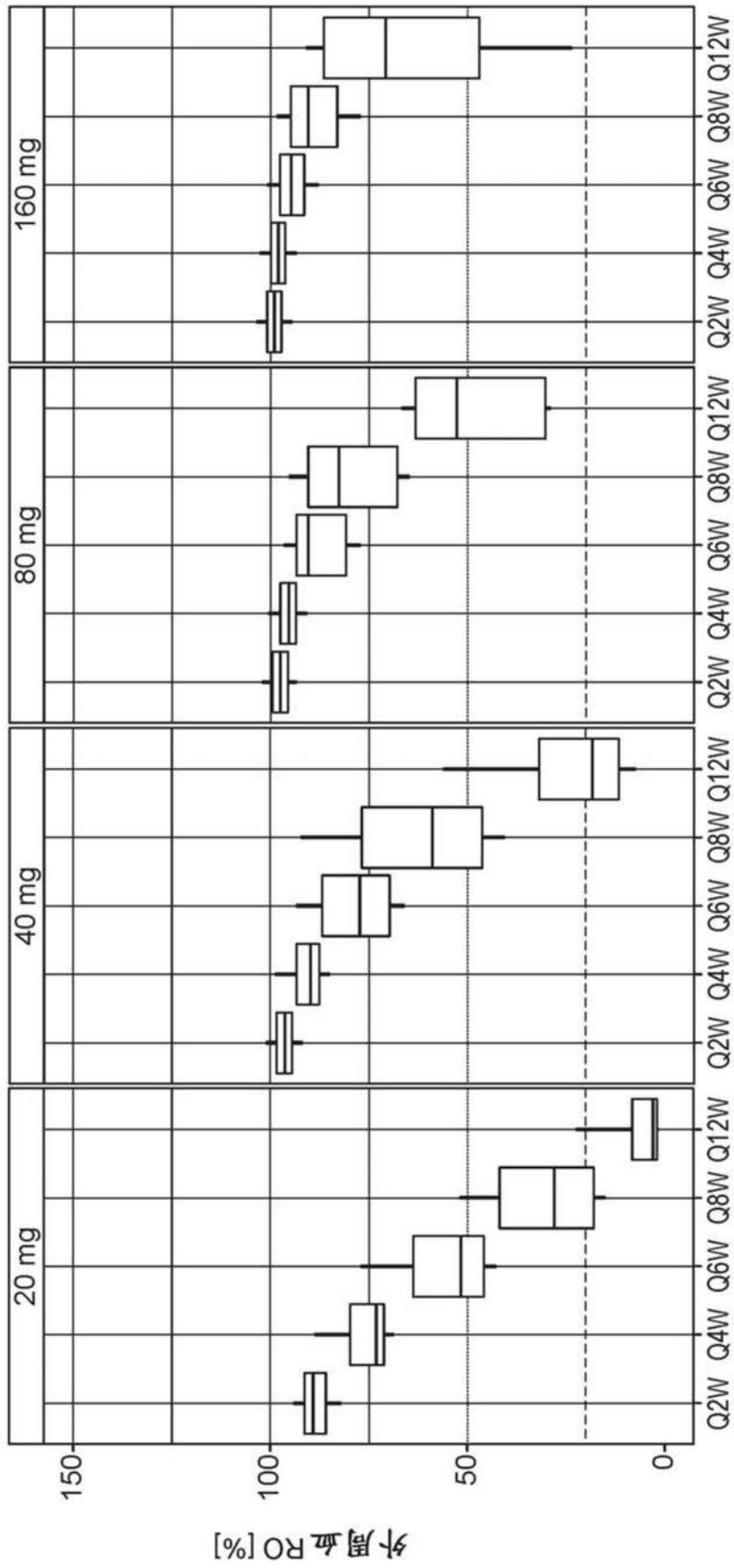
图8B

剂量 [mg]	频率	血液中的预测中值%RO	肿瘤中的预测中值%RO	剂量 [mg]	频率	血液中的预测中值%RO	肿瘤中的预测中值%RO
20	Q2W	89	87	40	Q2W	96	96
	Q4W	73	64		Q4W	90	88
	Q6W	52	35		Q6W	77	70
	Q8W	28	15		Q8W	59	44
	Q12W	3	1		Q12W	18	9
80	Q2W	97	97	160	Q2W	99	99
	Q4W	95	95		Q4W	98	98
	Q6W	90	89		Q6W	95	94
	Q8W	83	78		Q8W	90	89
	Q12W	53	36		Q12W	71	60

图10A

剂量 [mg]	频率	血液中的预测中值%RO	肿瘤中的预测中值%RO	剂量 [mg]	频率	血液中的预测中值%RO	肿瘤中的预测中值%RO
20	Q2W	89	26	40	Q2W	96	65
	Q4W	73	9		Q4W	90	27
	Q6W	52	3		Q6W	77	11
	Q8W	28	1		Q8W	59	5
	Q12W	3	0.1		Q12W	18	0.7
80	Q2W	97	78	160	Q2W	99	93
	Q4W	95	54		Q4W	98	84
	Q6W	90	29		Q6W	95	50
	Q8W	83	15		Q8W	90	29
	Q12W	53	4		Q12W	71	8

图10B



箱形图代表分布的中值(粗线)、25百分位及75百分位。须线表示90% PI

图9

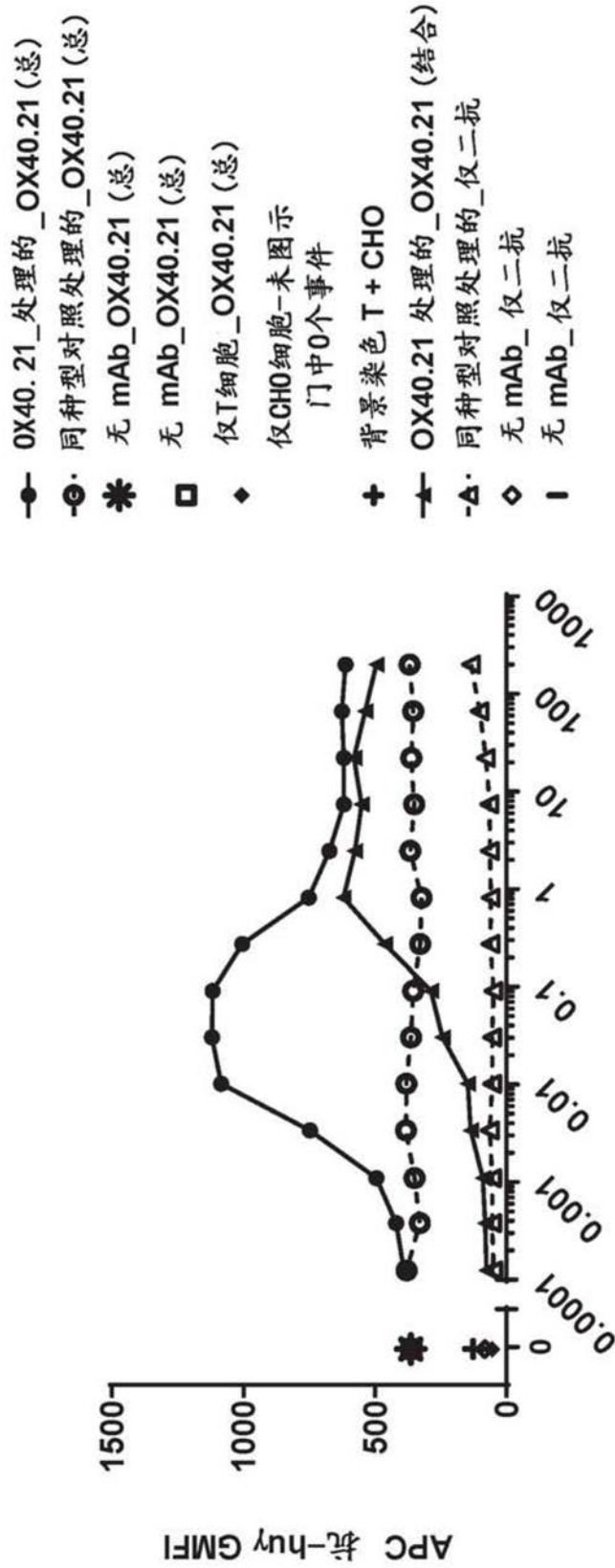


图11A

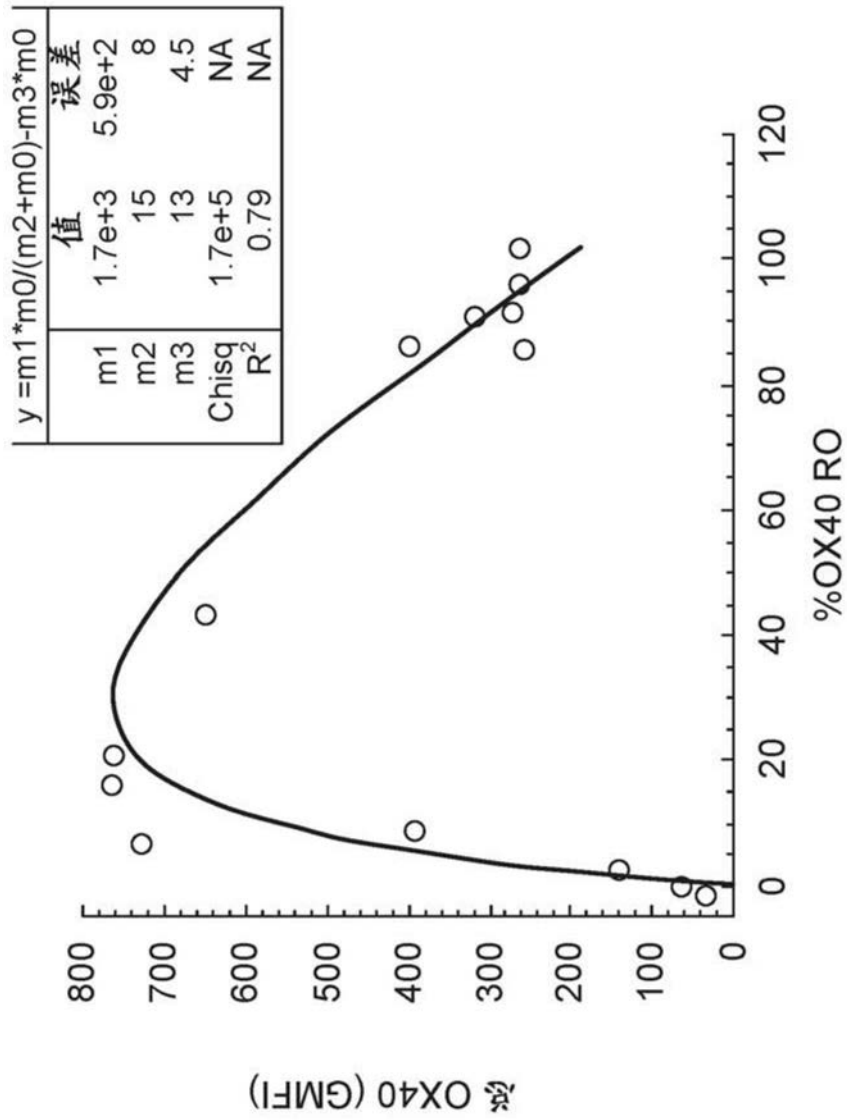


图11B

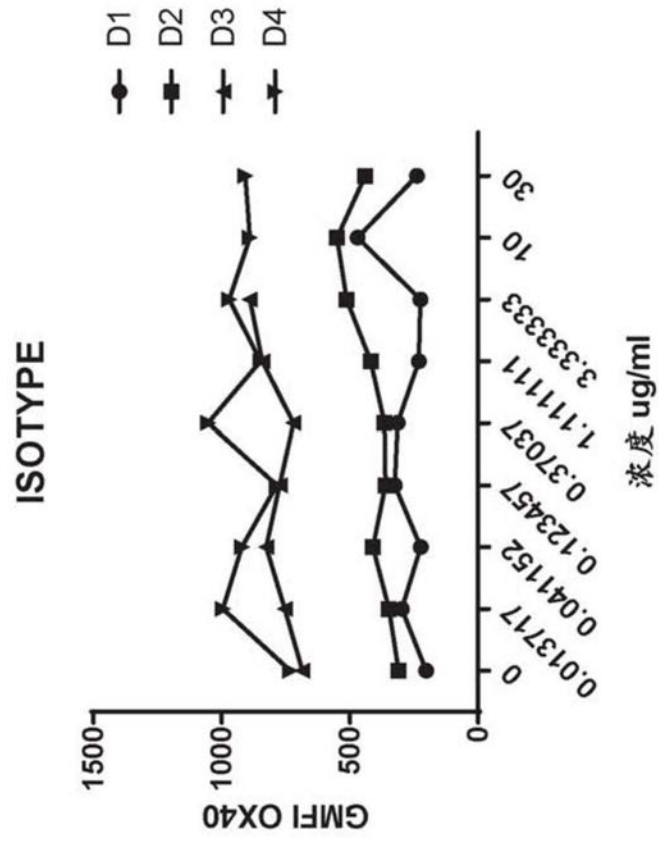


图12A

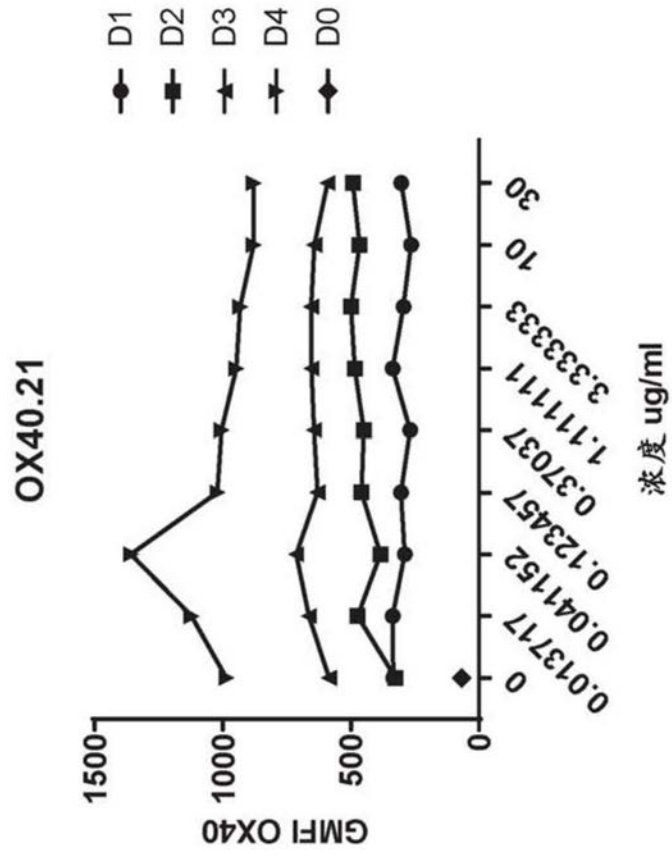


图12B

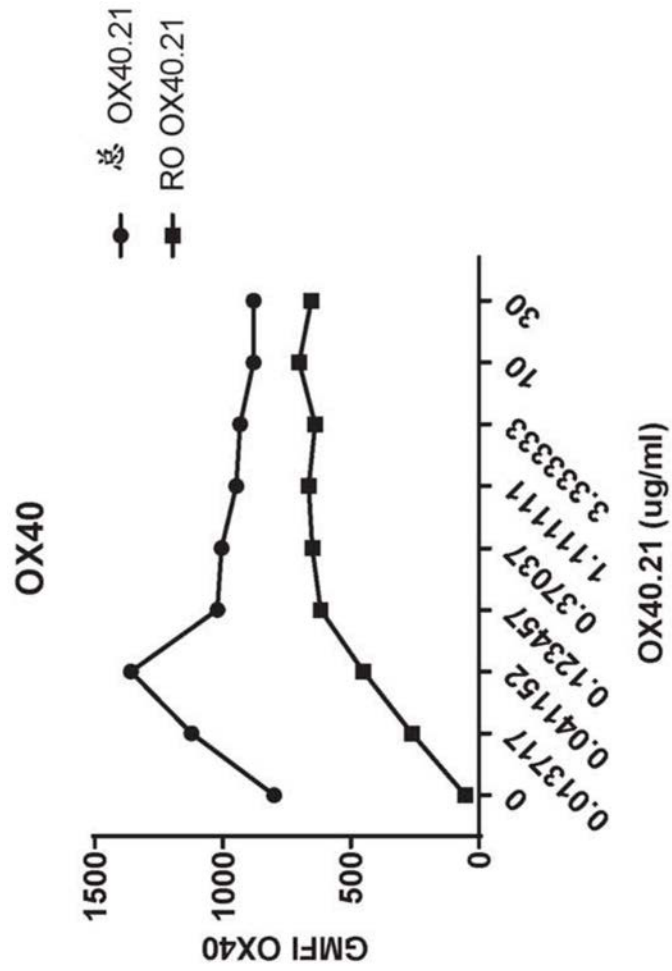


图13A

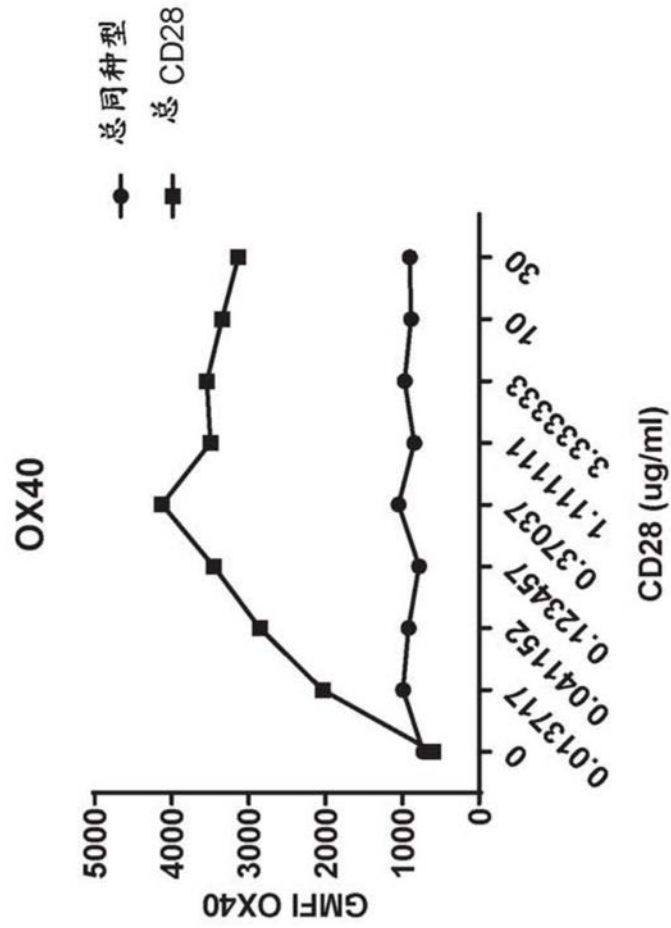


图13B

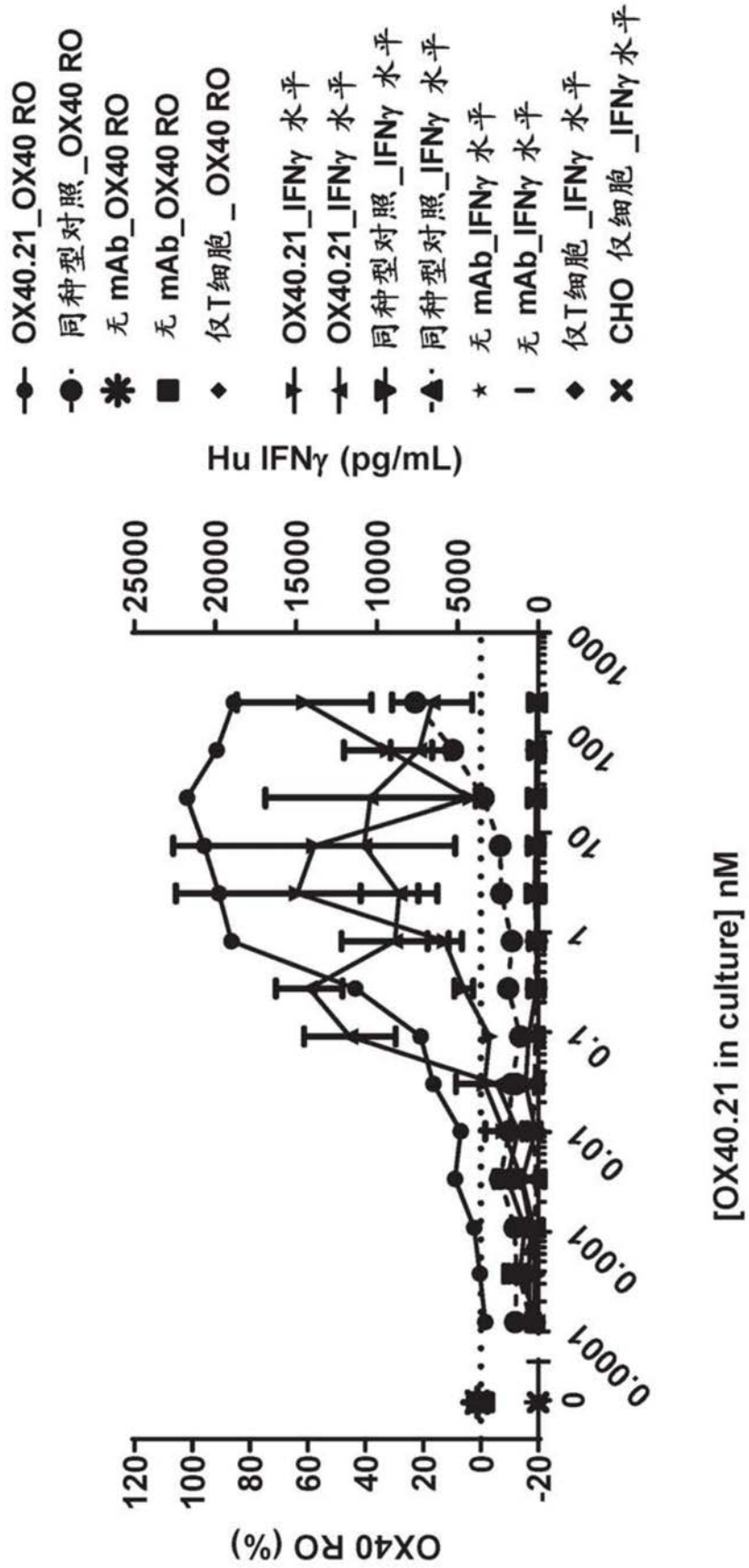


图14

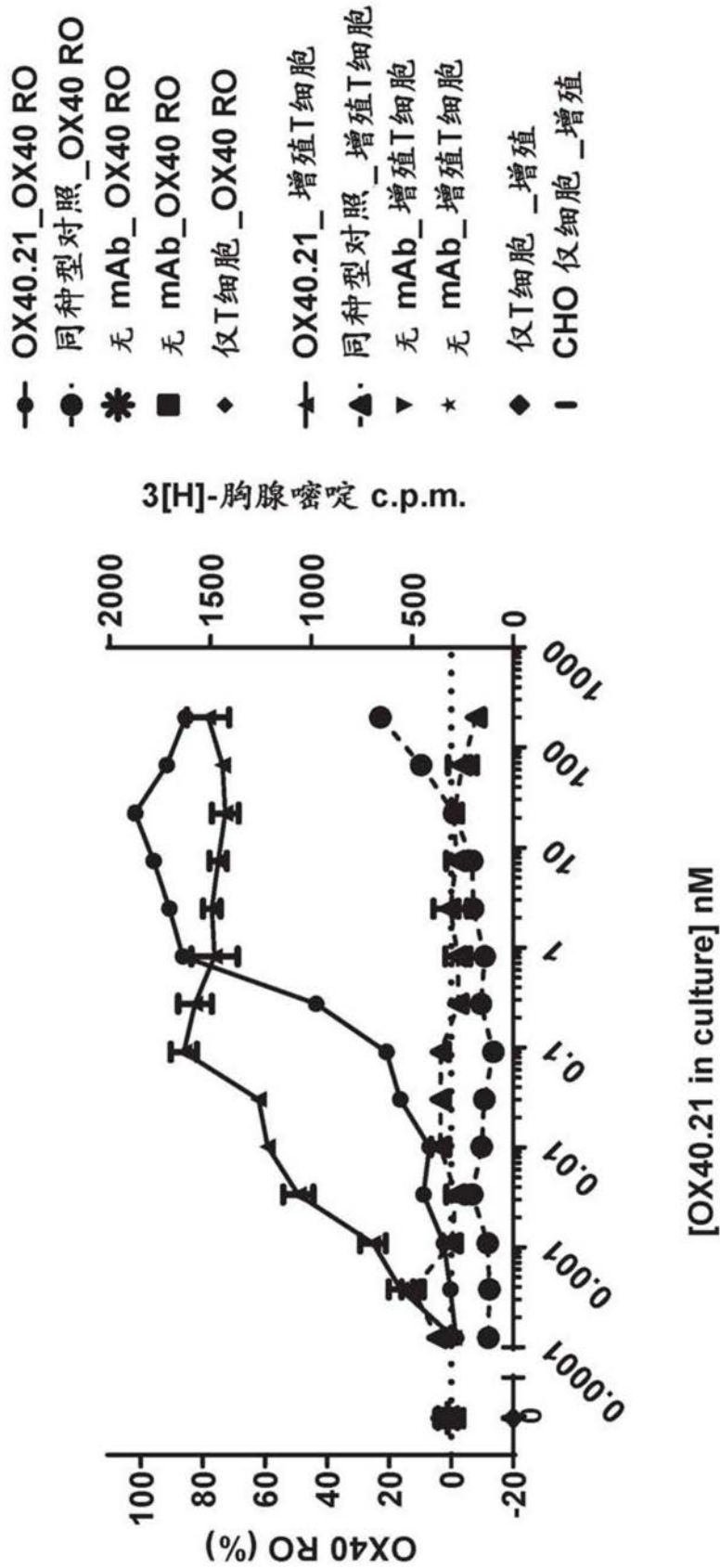


图15A

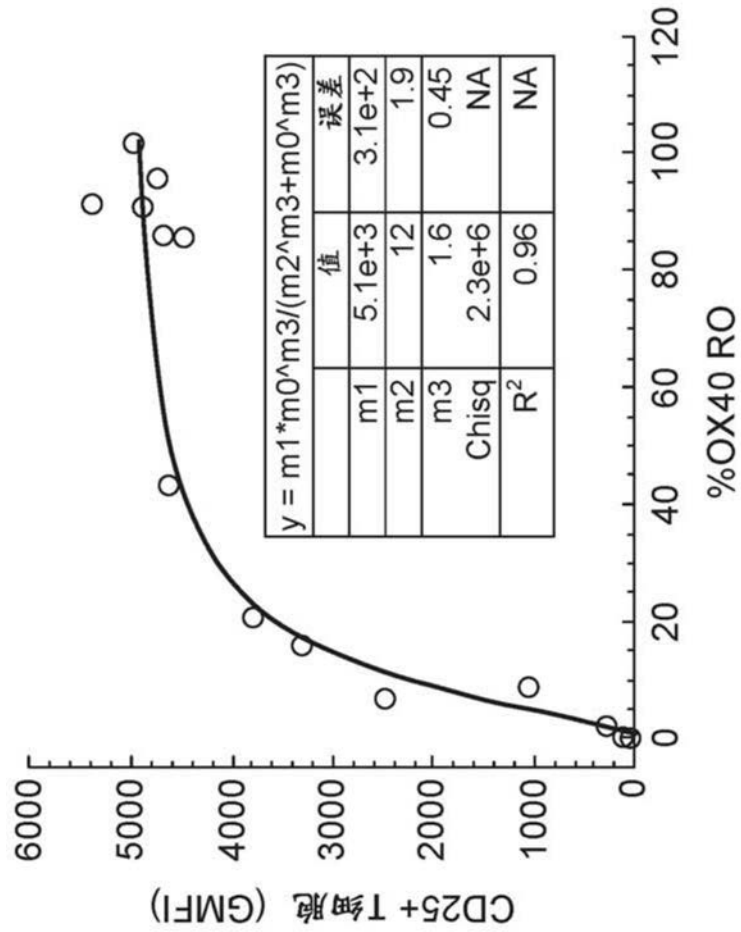


图15B

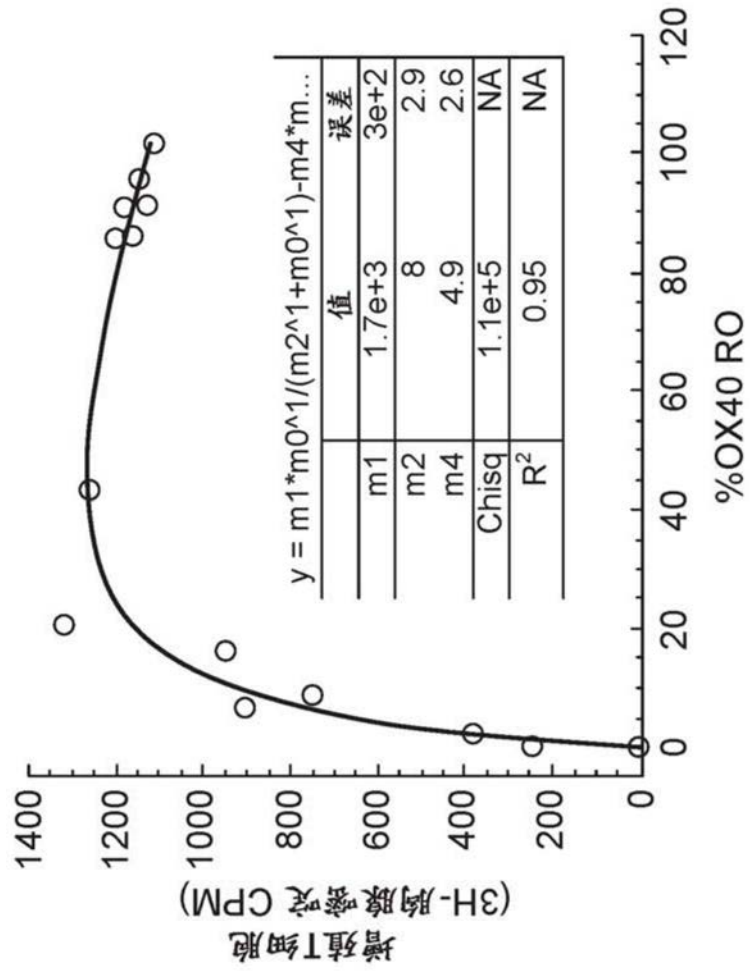


图15C

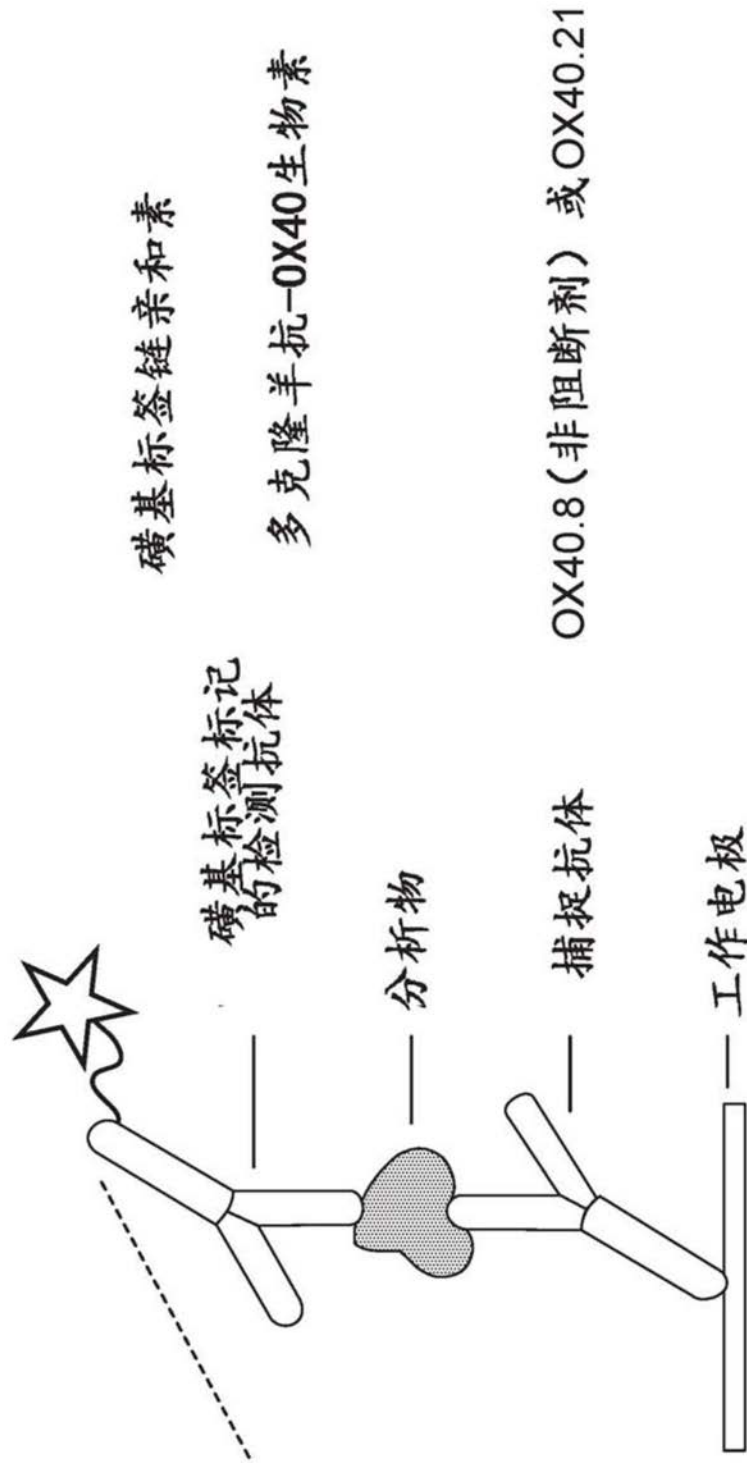


图16

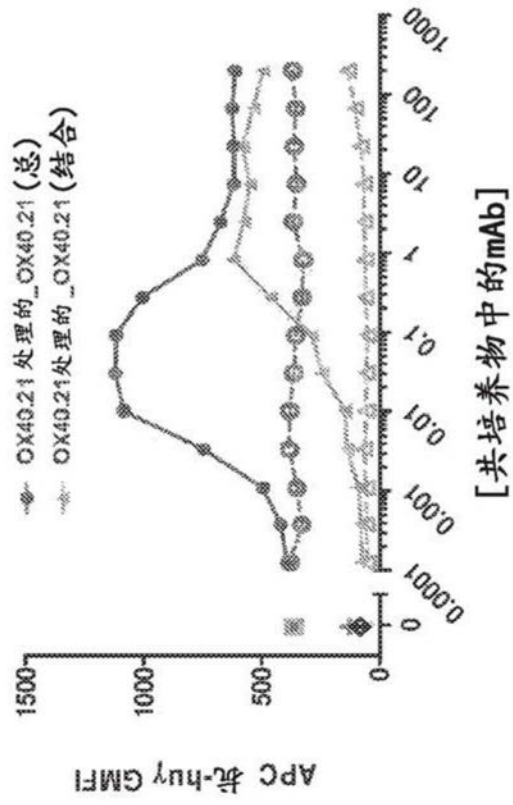


图17

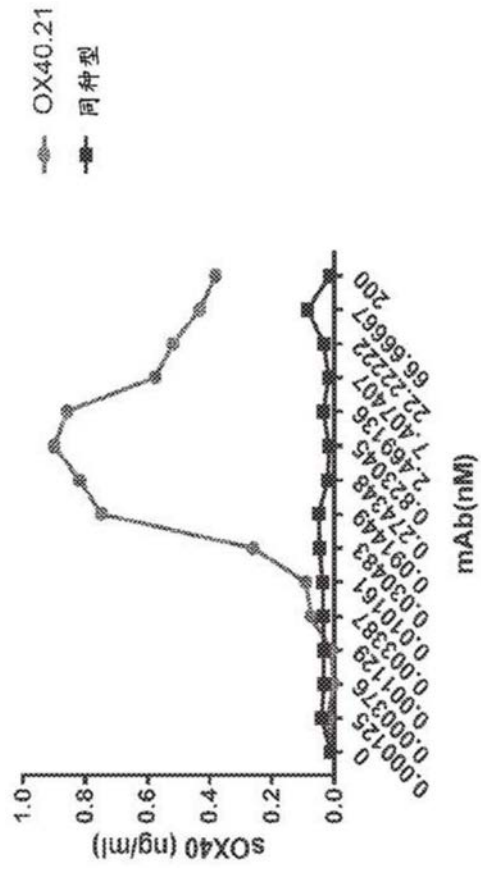


图18

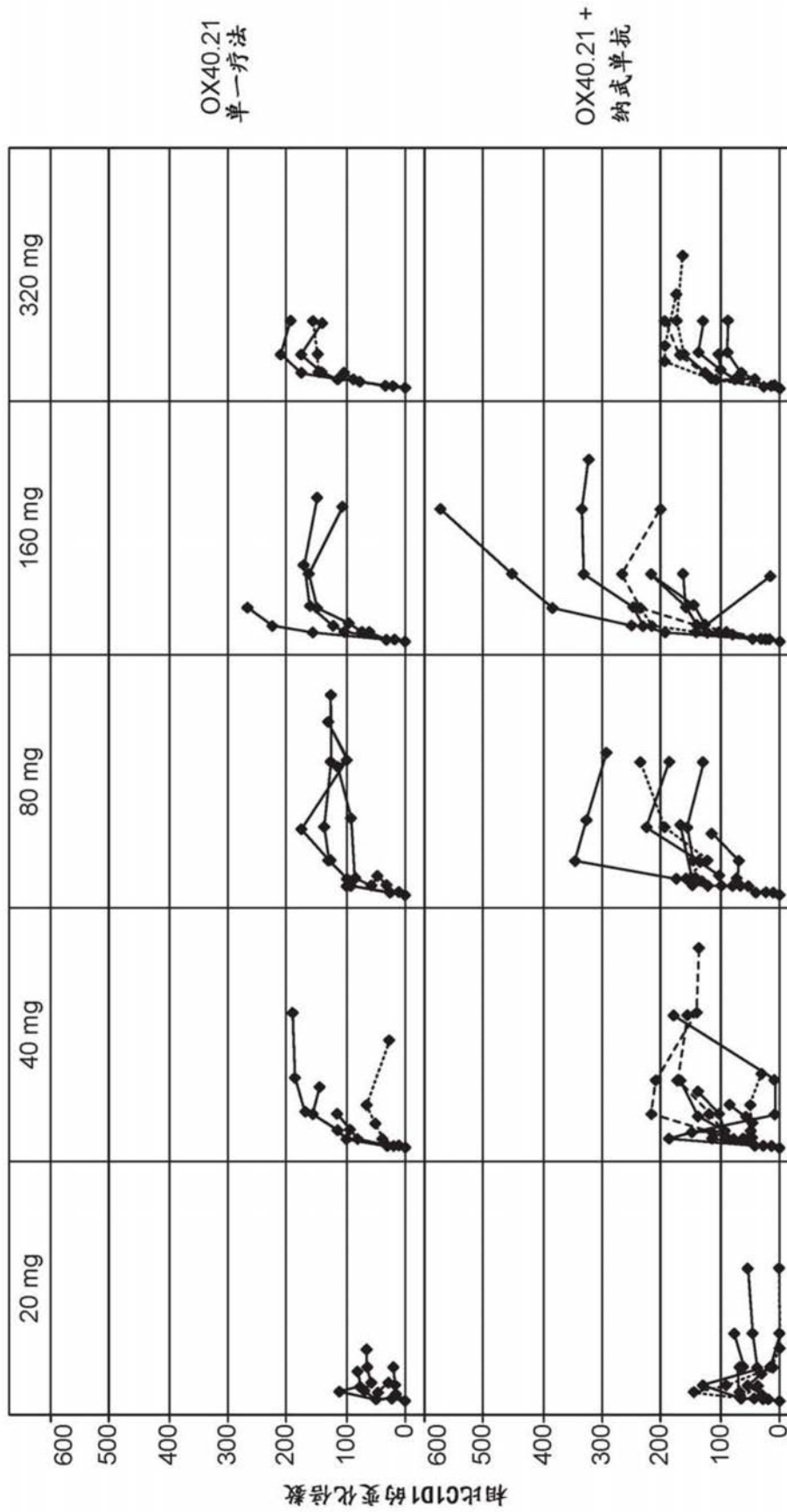


图19

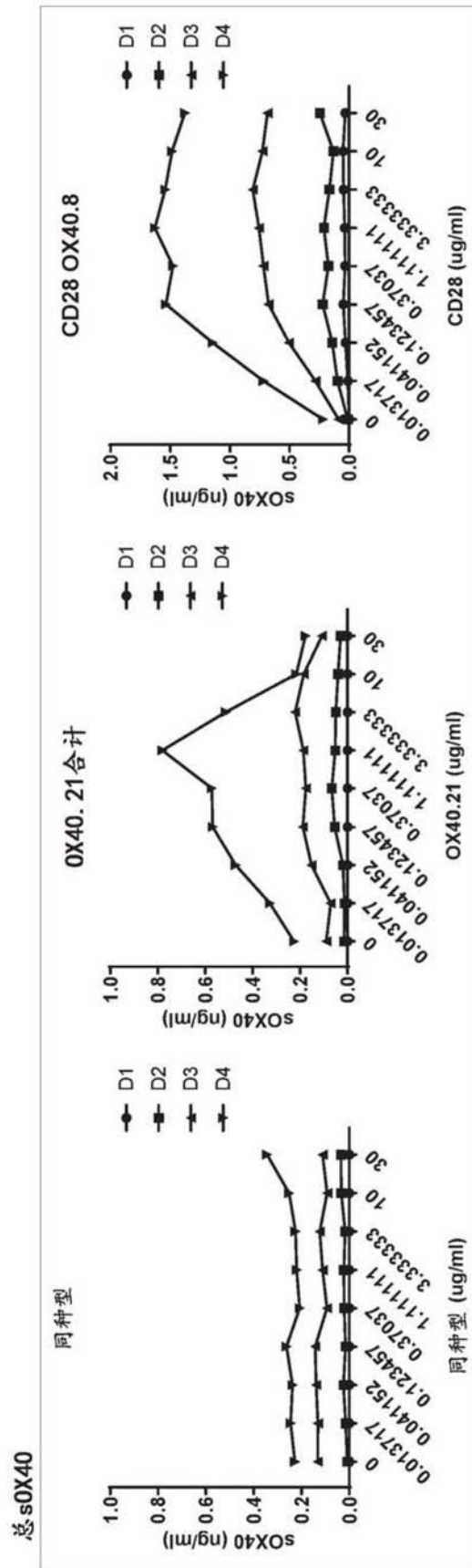


图20A

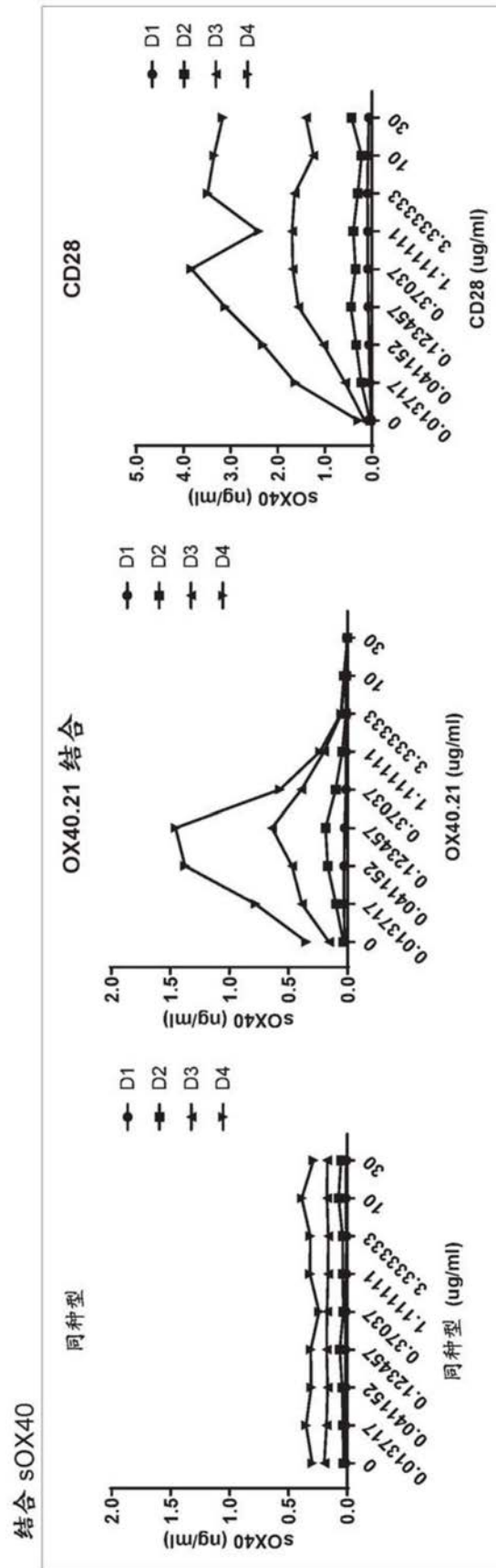


图20B

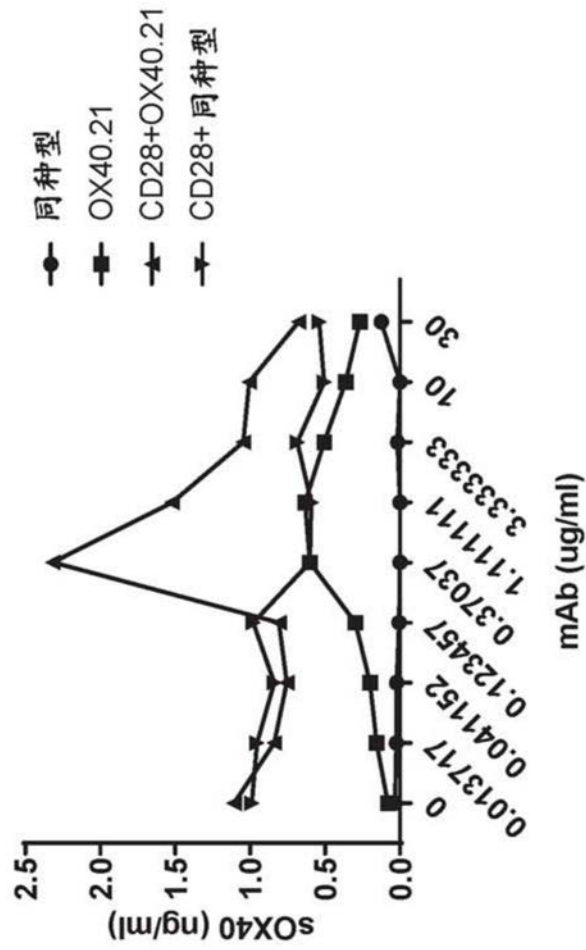


图21A

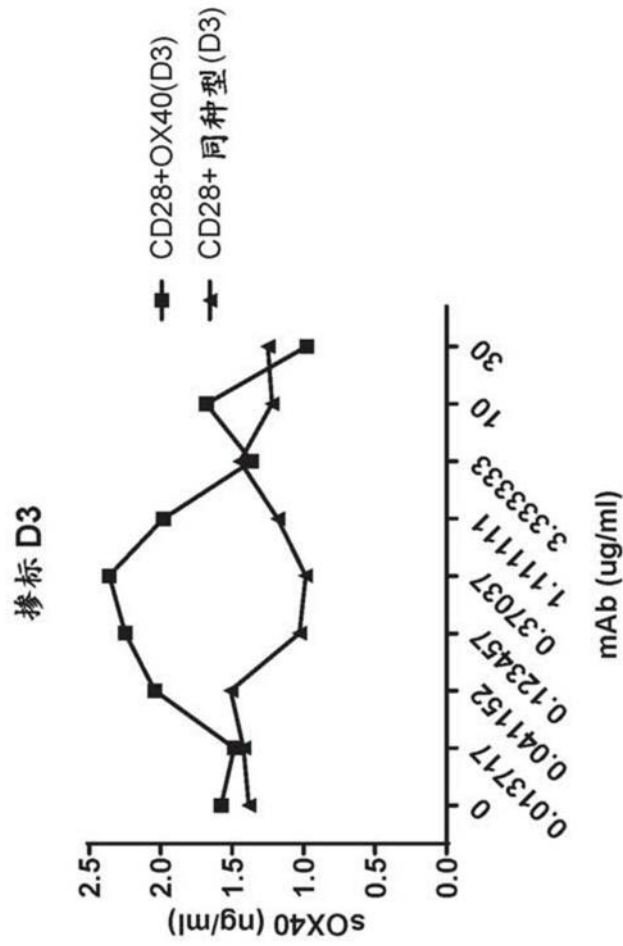


图21B

pH敏感内化测定

测定方案

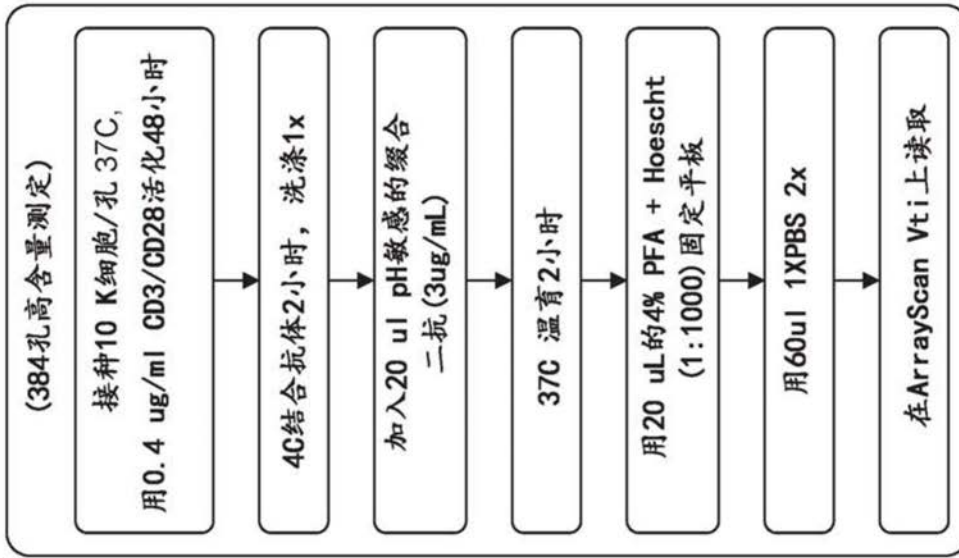


图22

OX40 Treg 6358 48小时 CD3/CD28活化

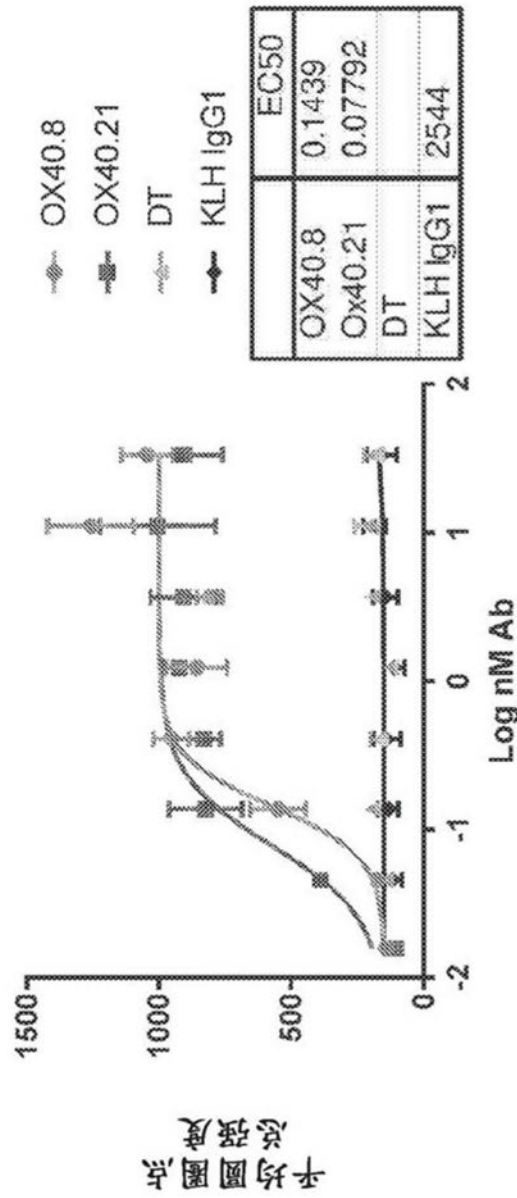


图23

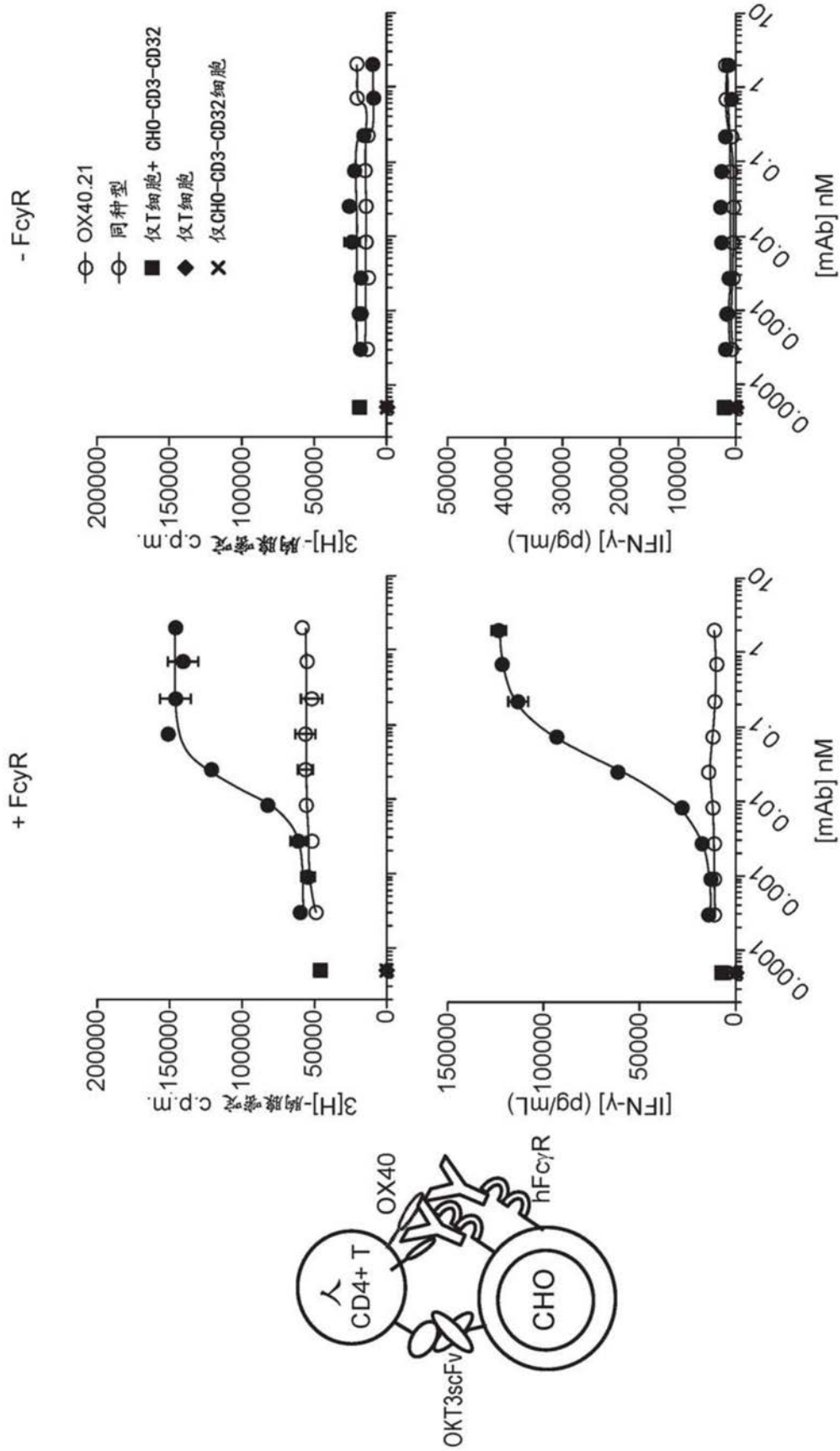


图24

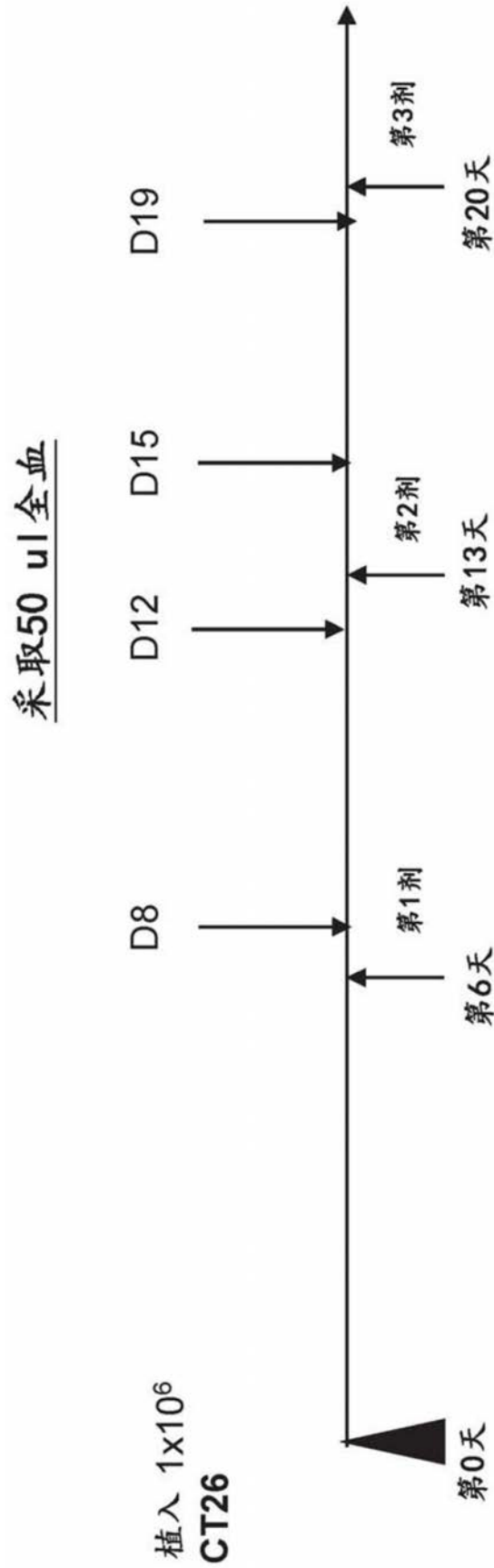


图25

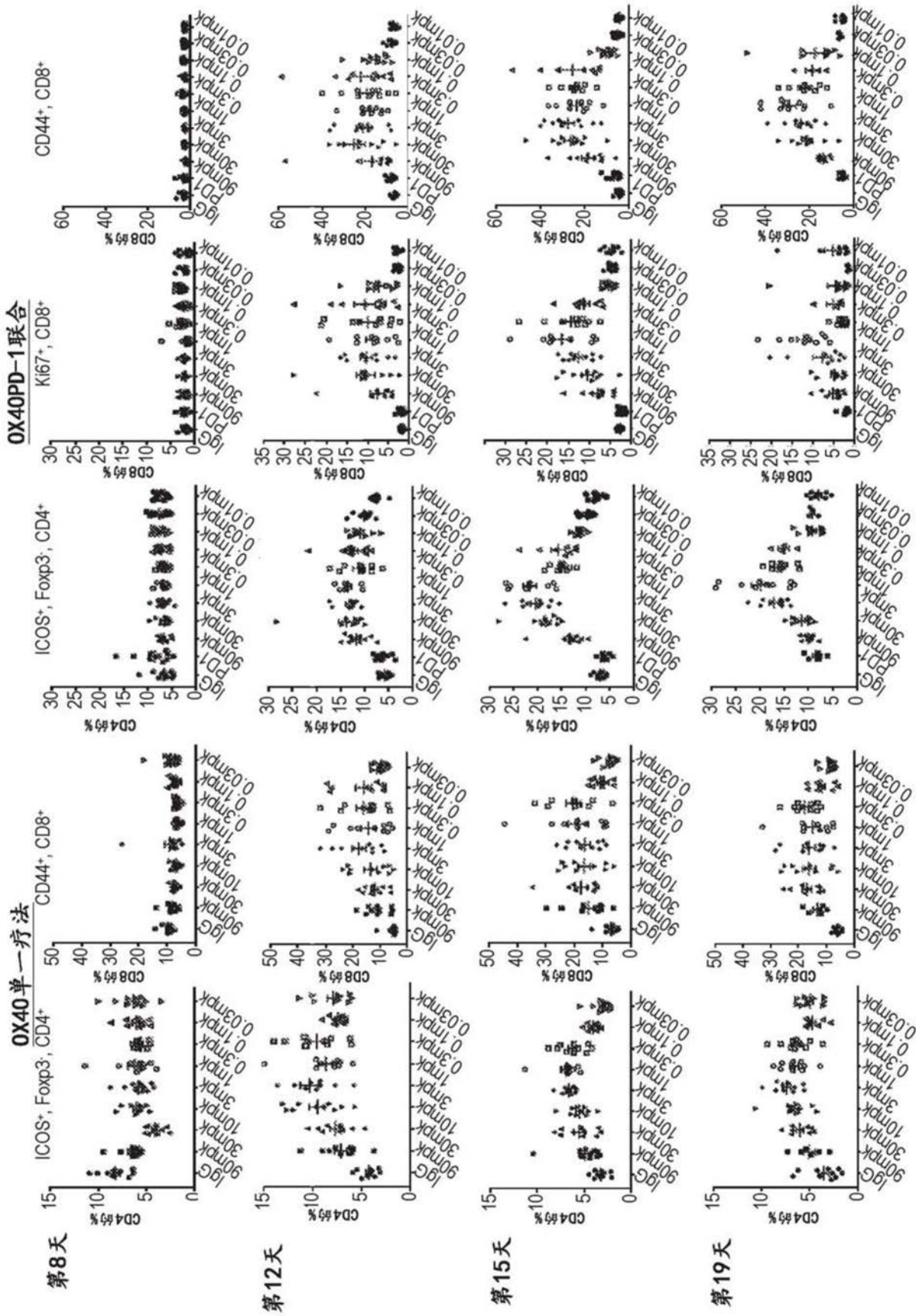


图26A

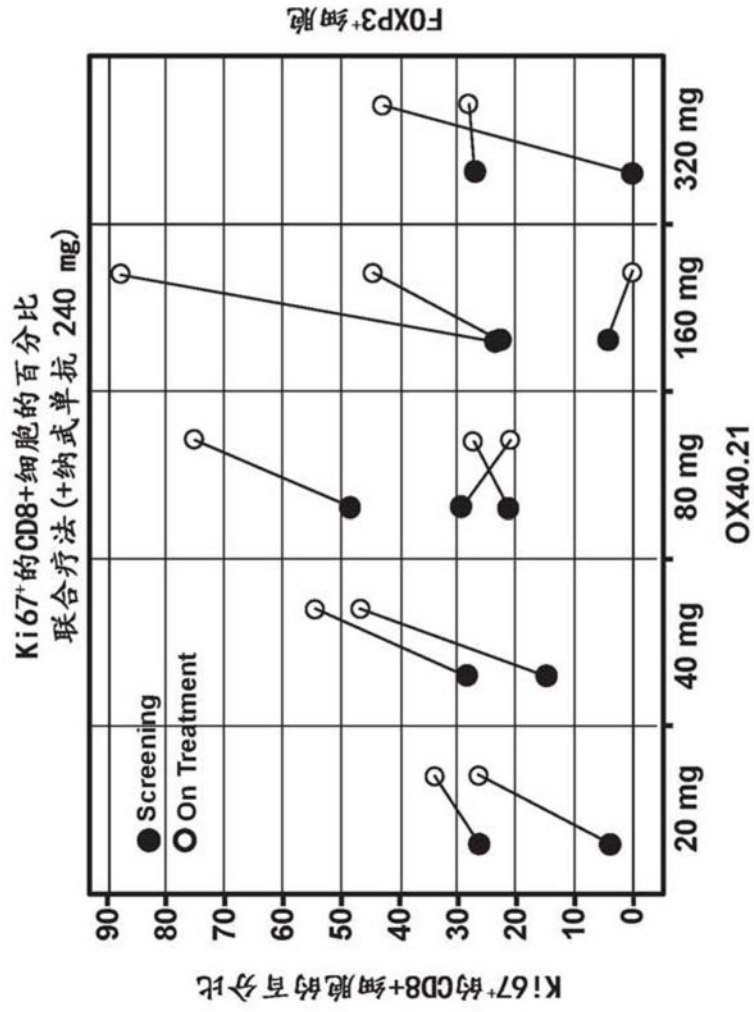


图26B

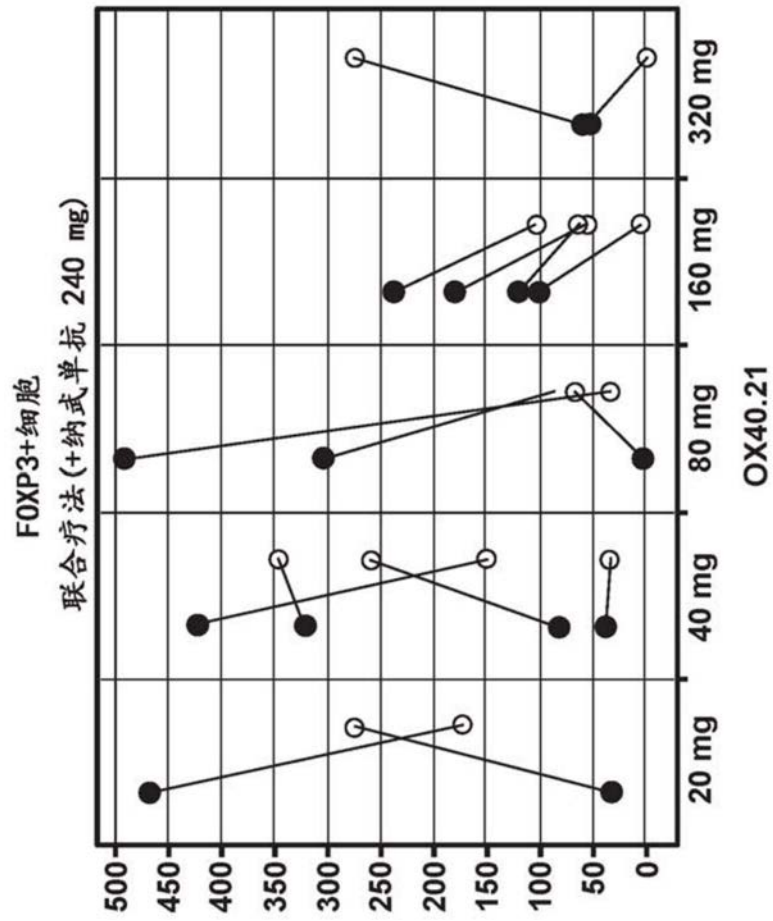


图26C

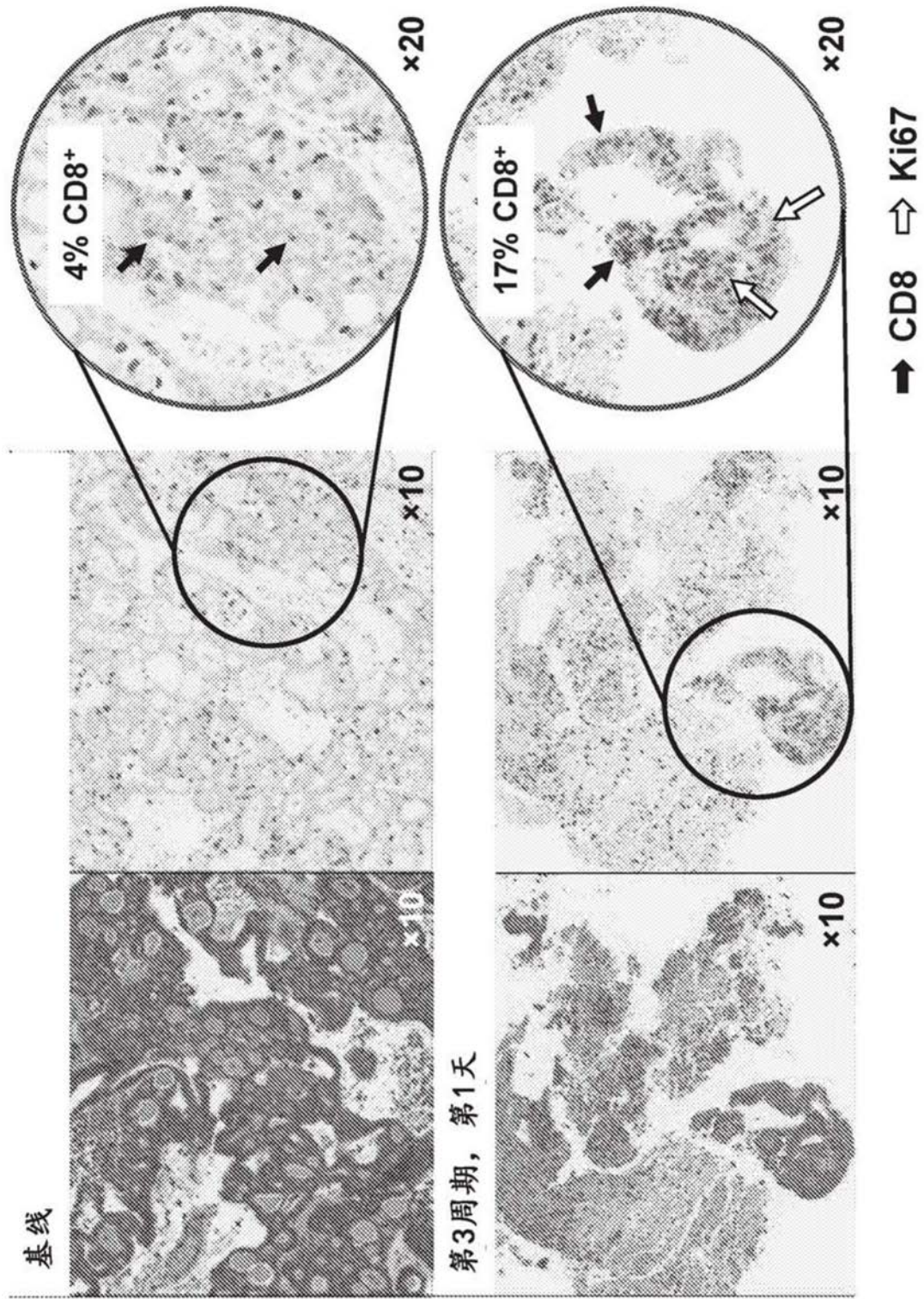


图26D

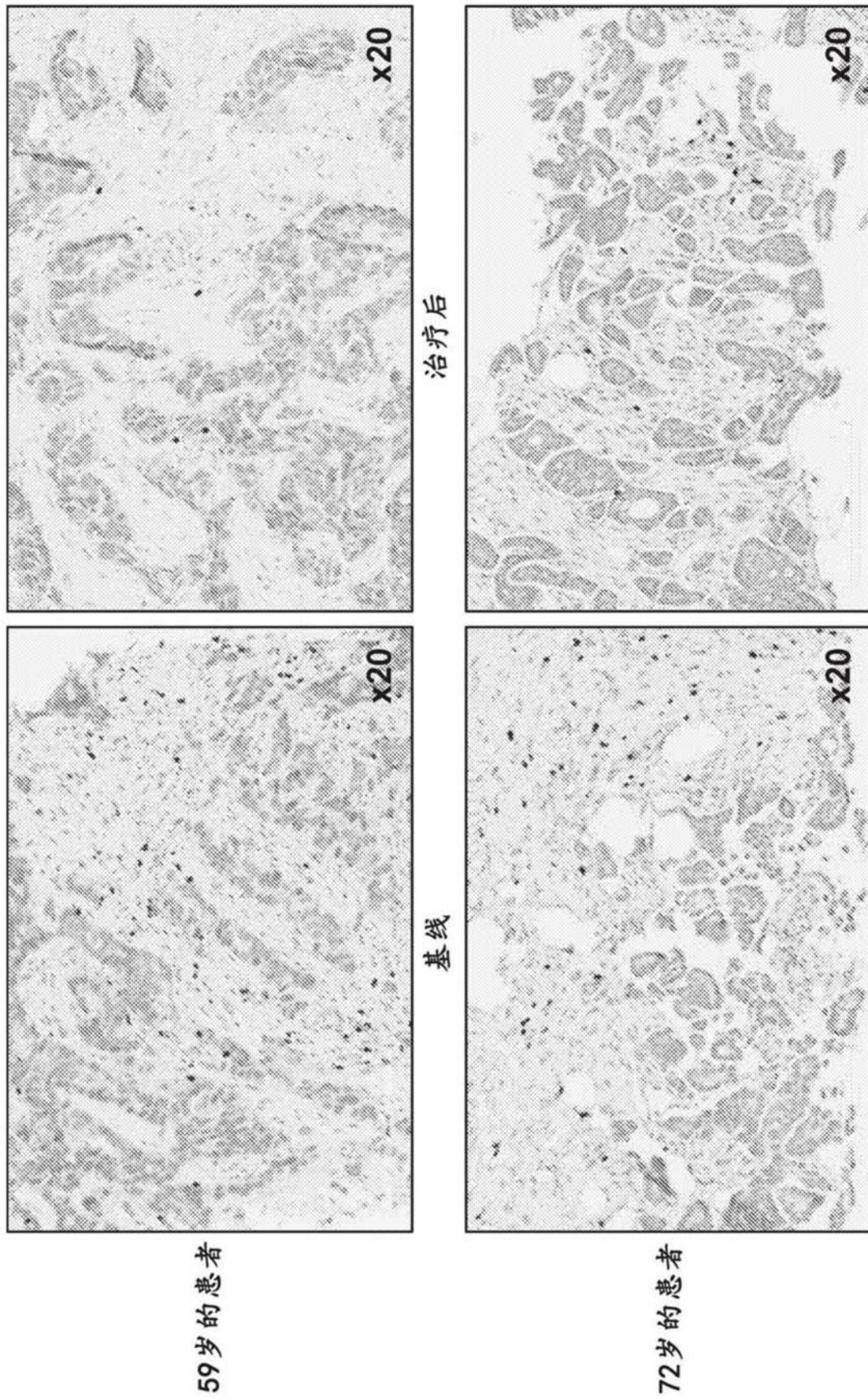


图26E

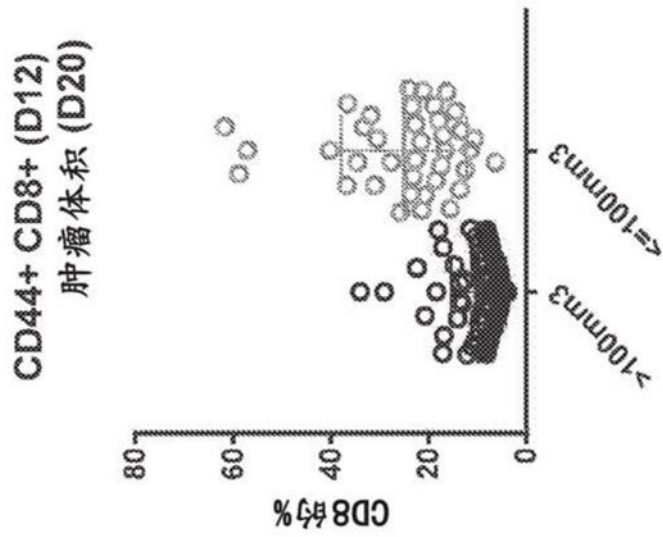


图27A

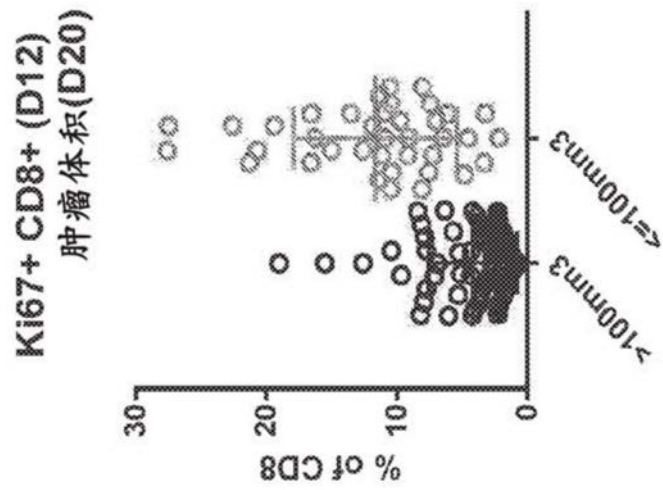
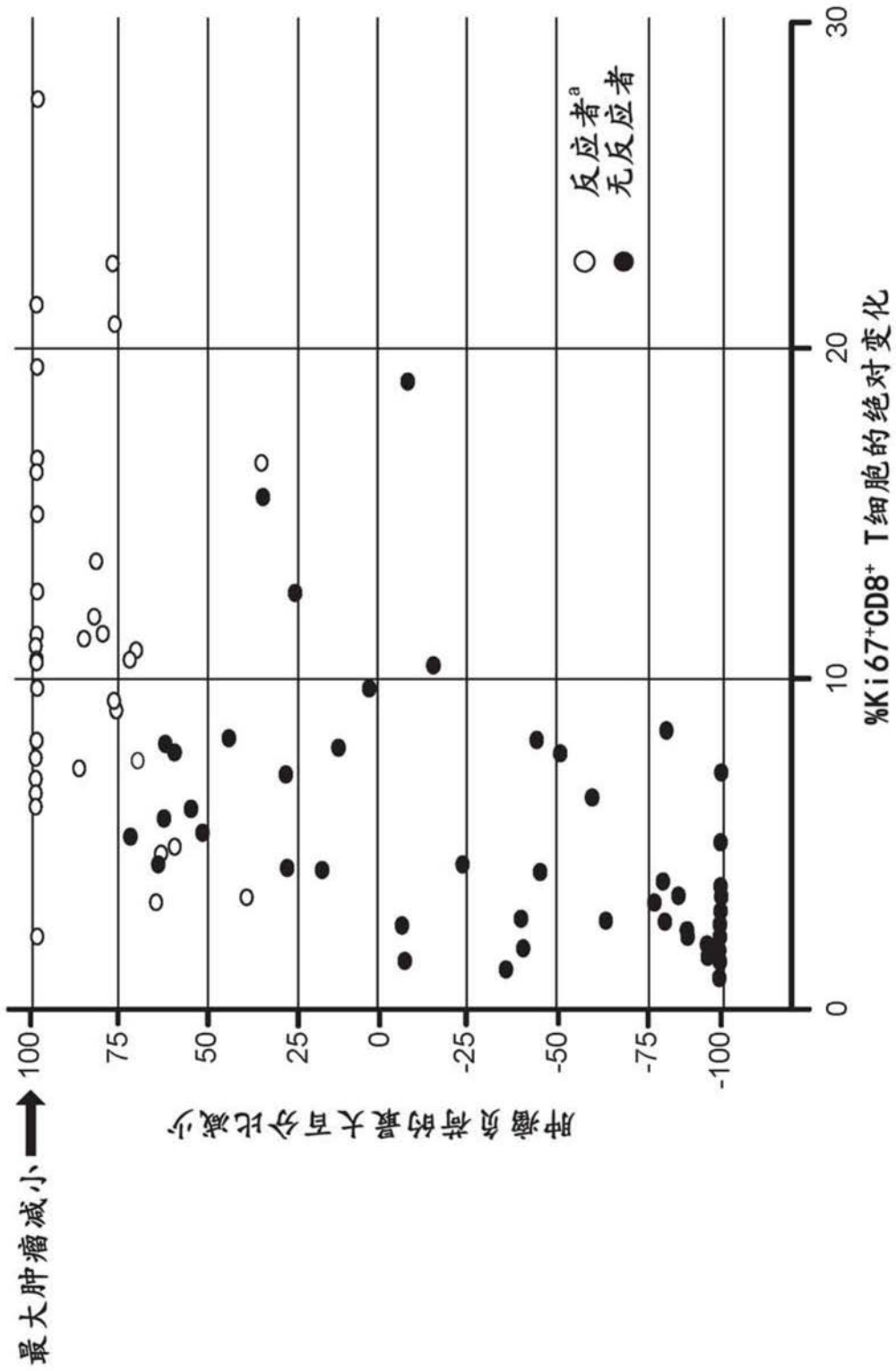


图27B



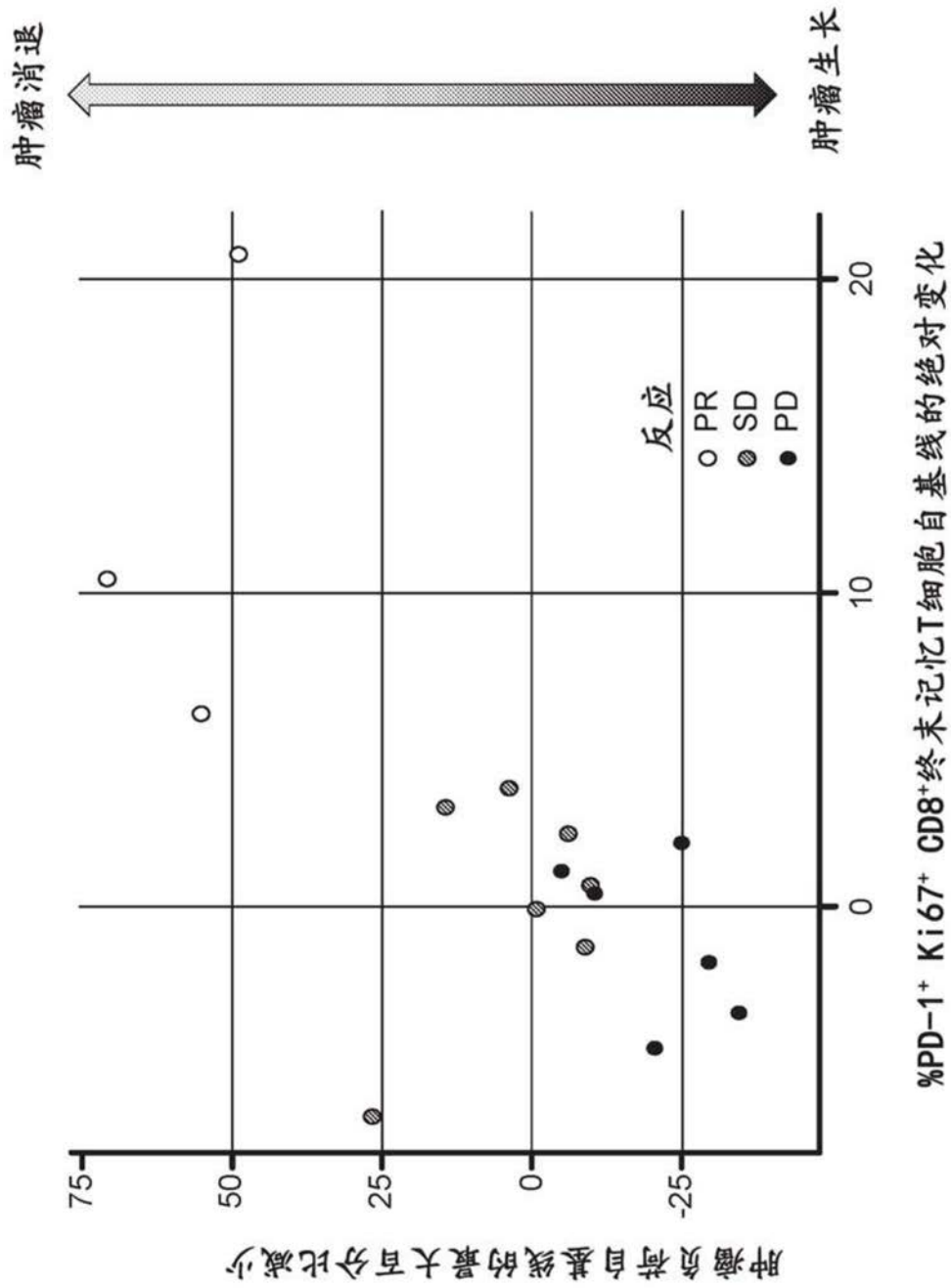


图27D

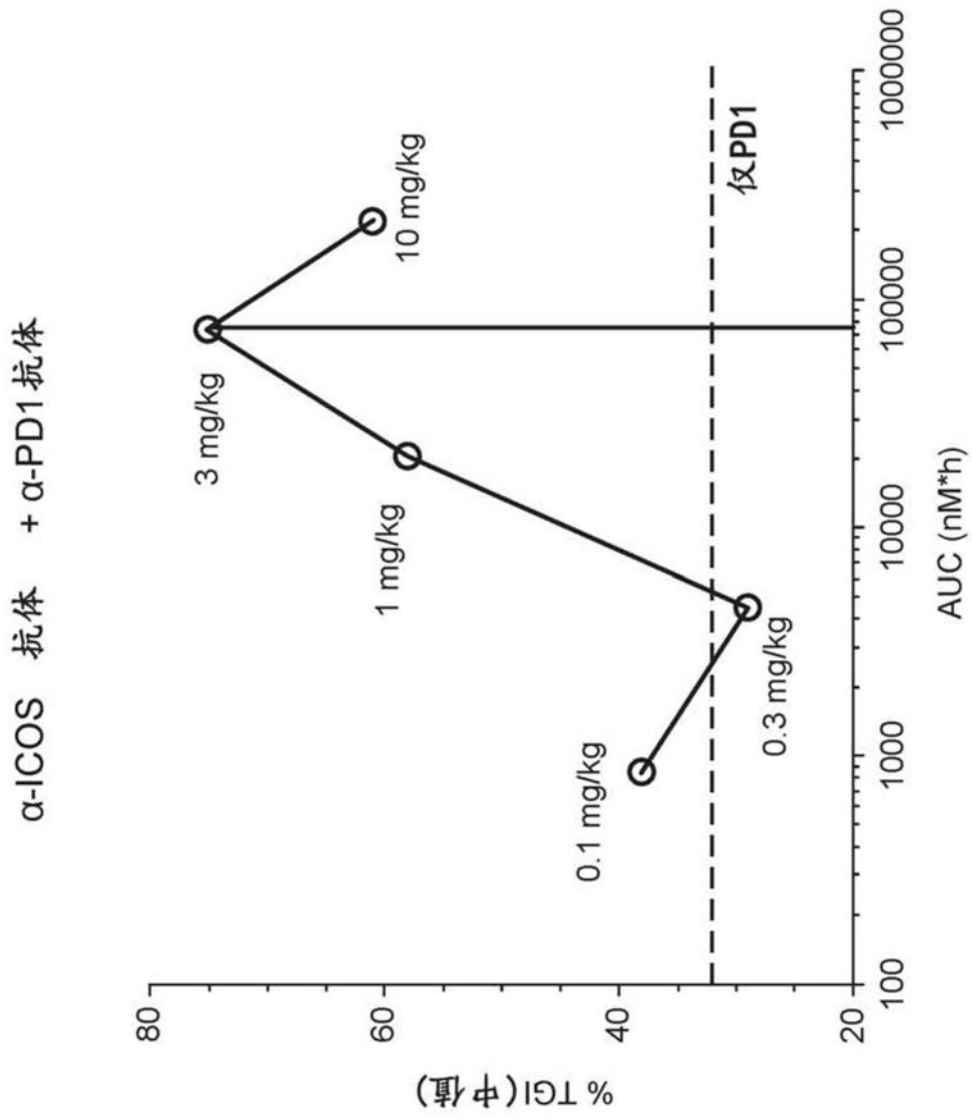


图28

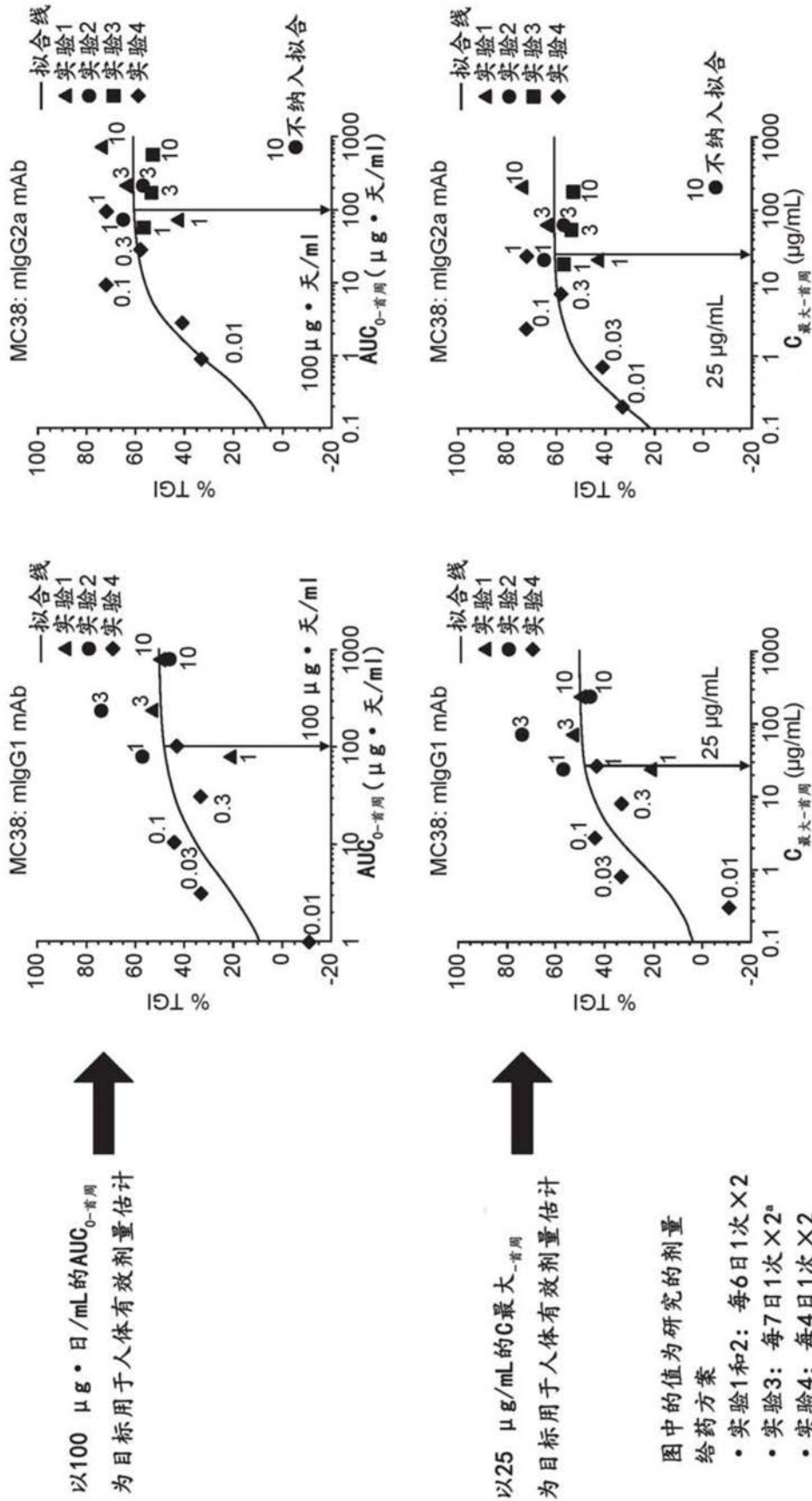


图29

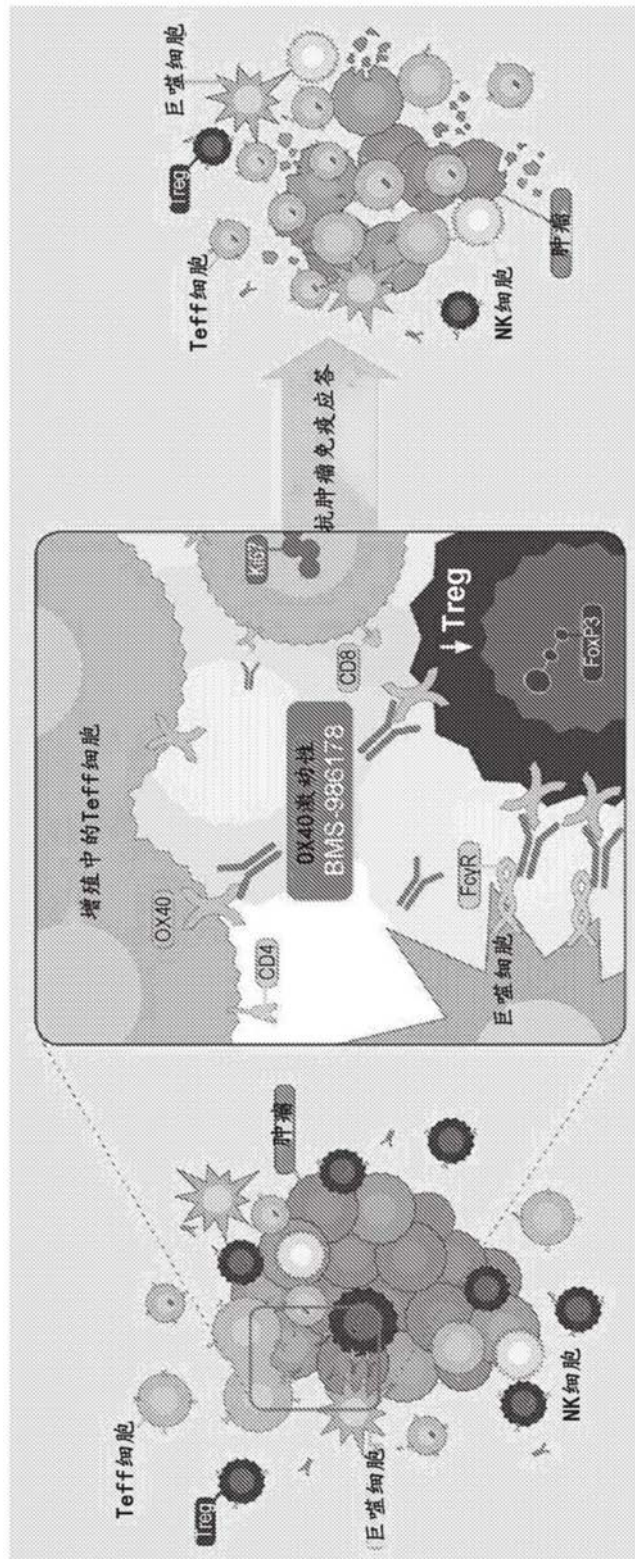


图30

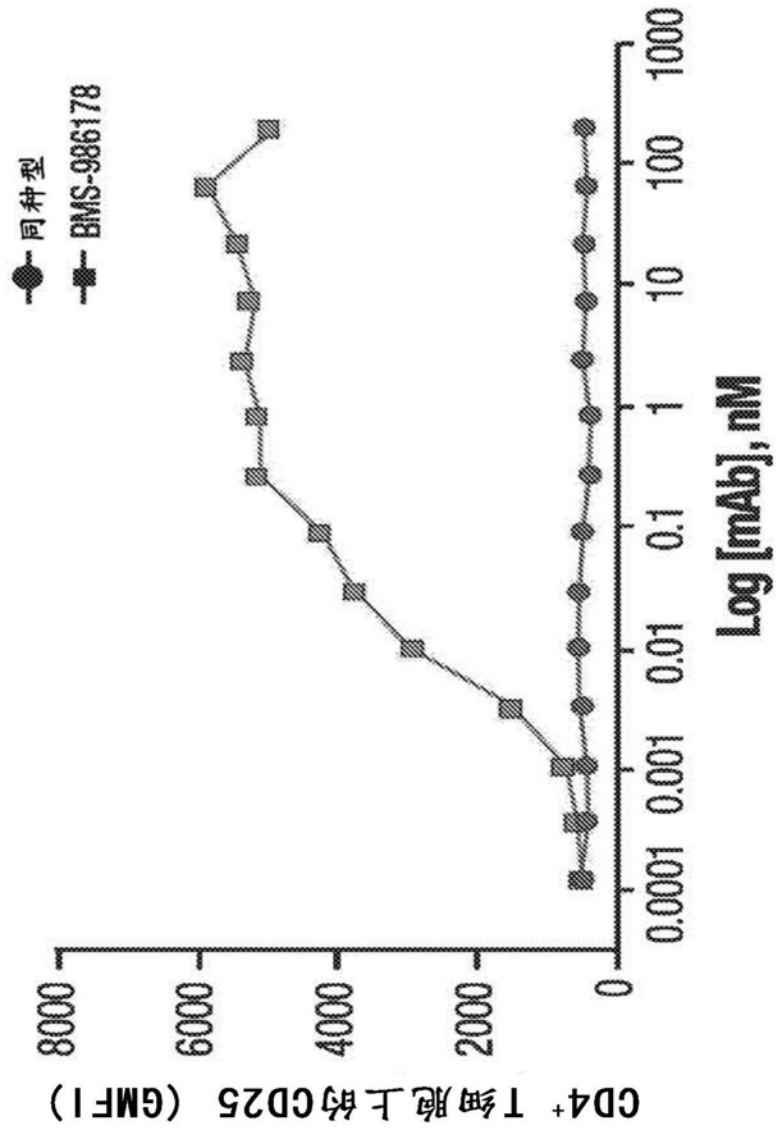


图31

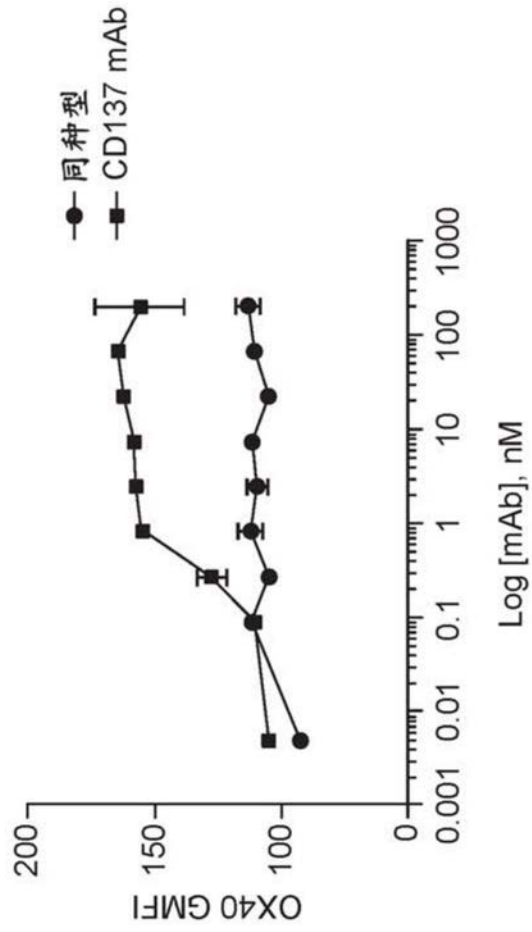


图32A

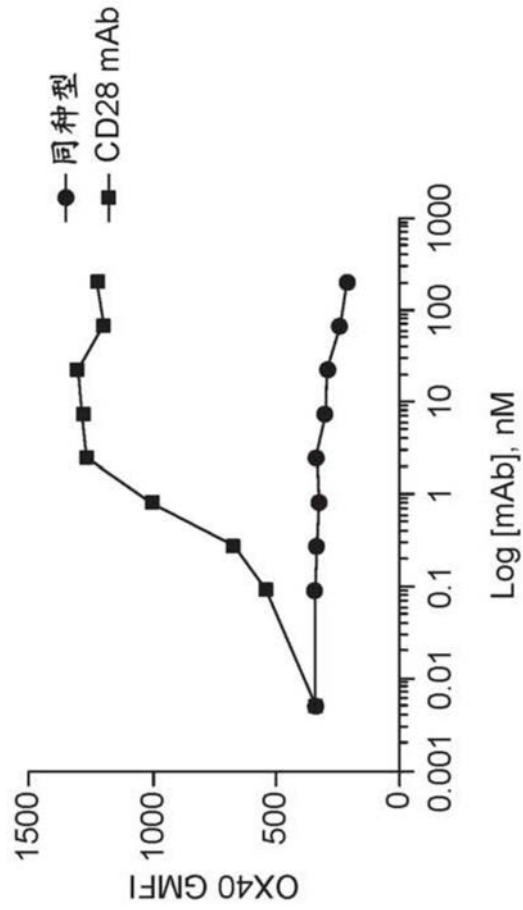


图32B

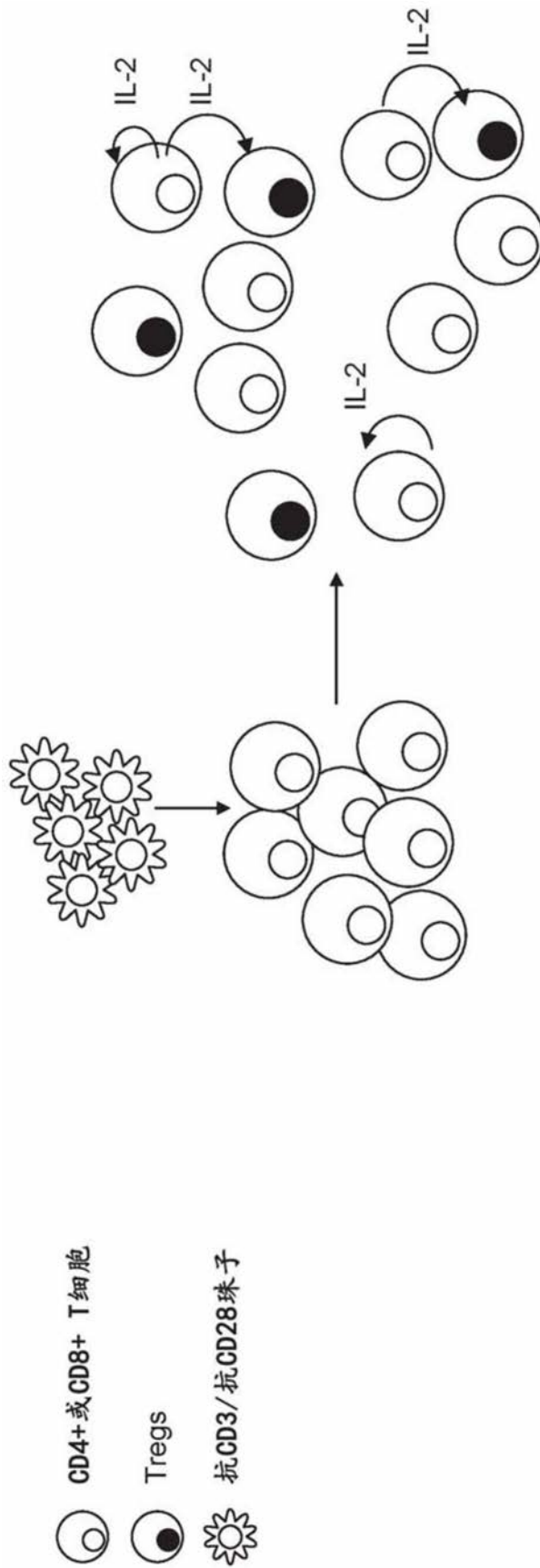


图33A

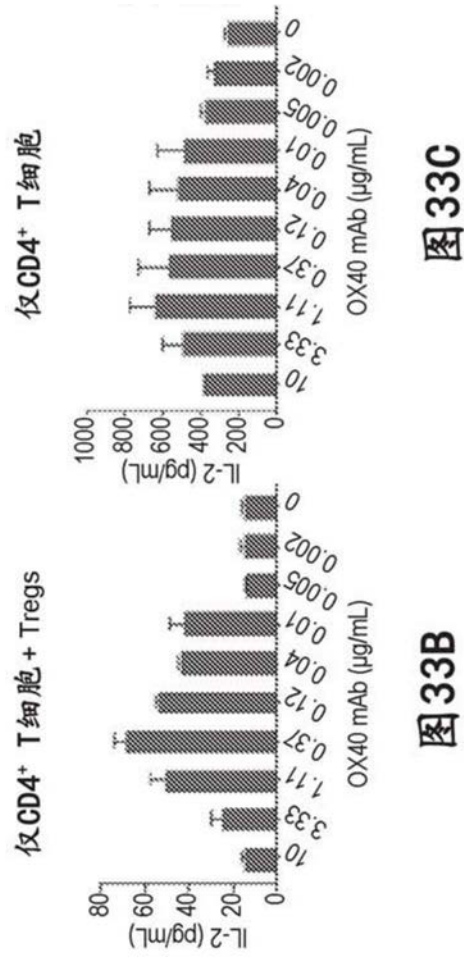


图33B

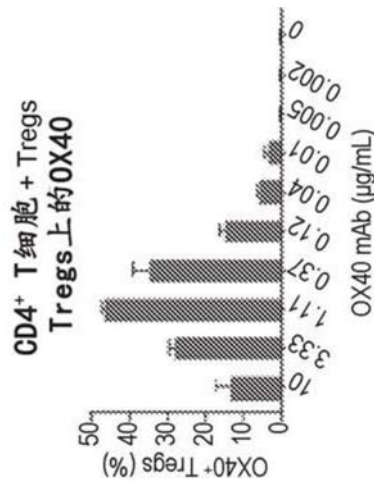


图33D

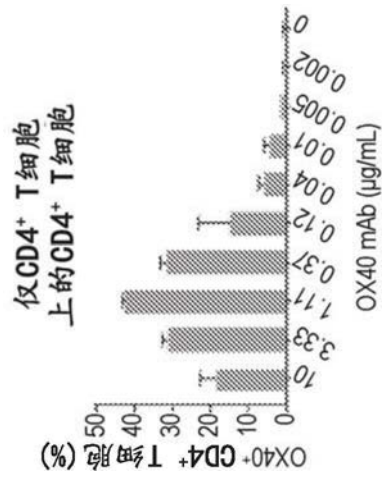


图33E

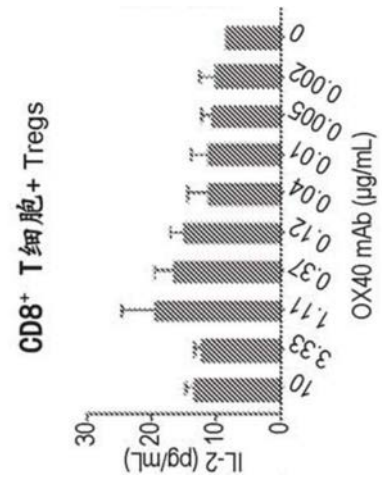


图33F

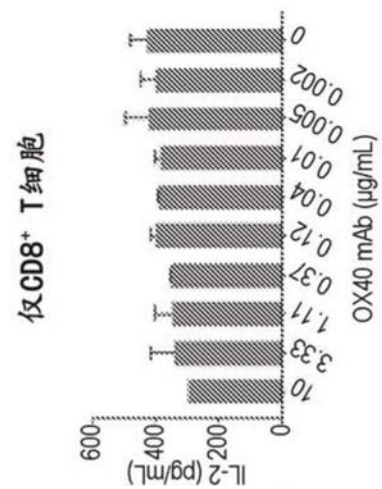


图33G

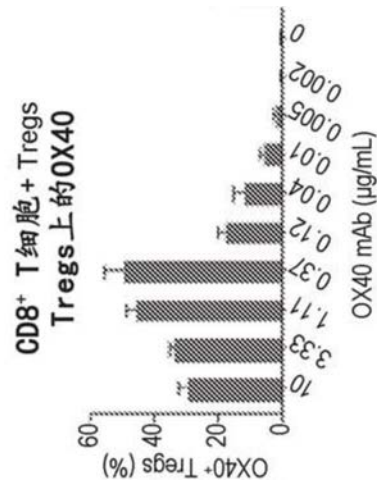


图33H

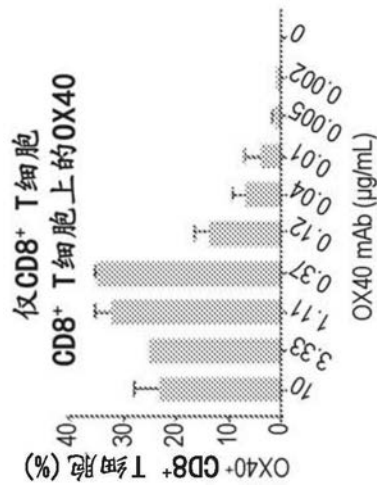


图33I

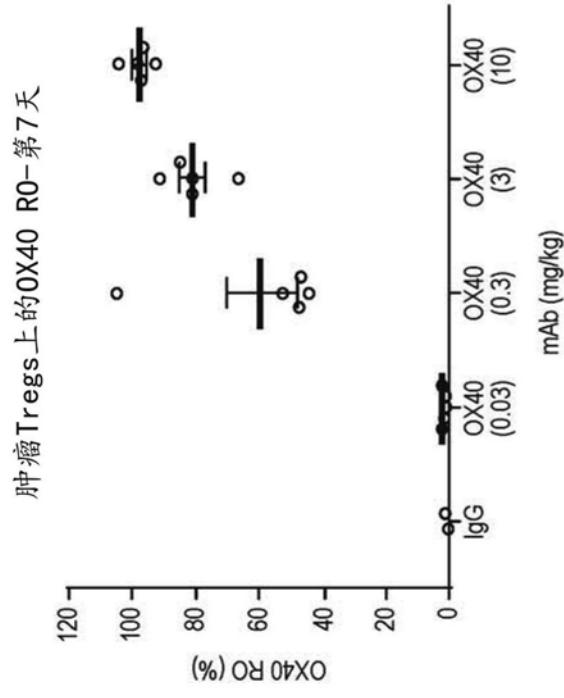


图34A

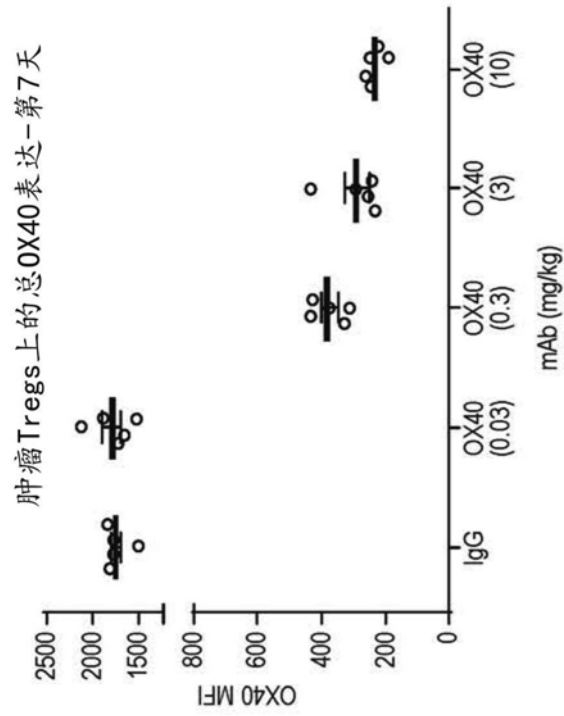


图34B

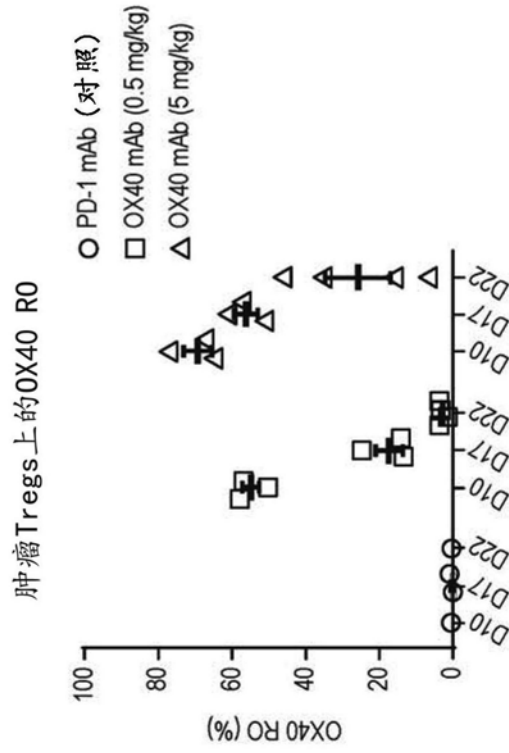


图34C

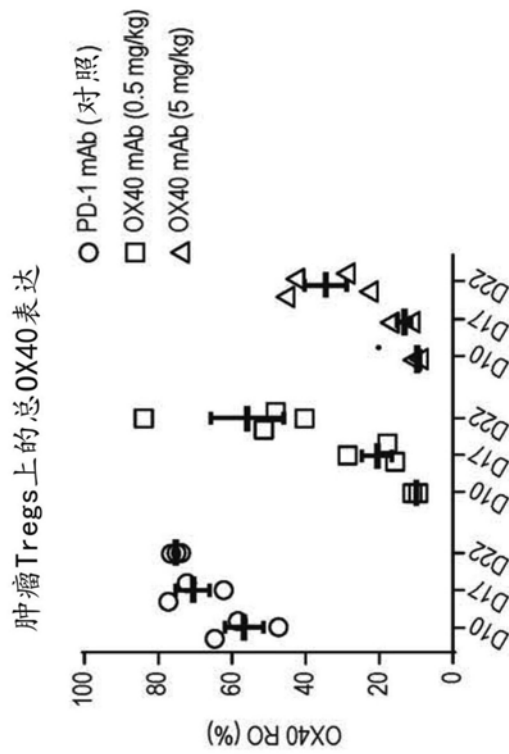


图34D

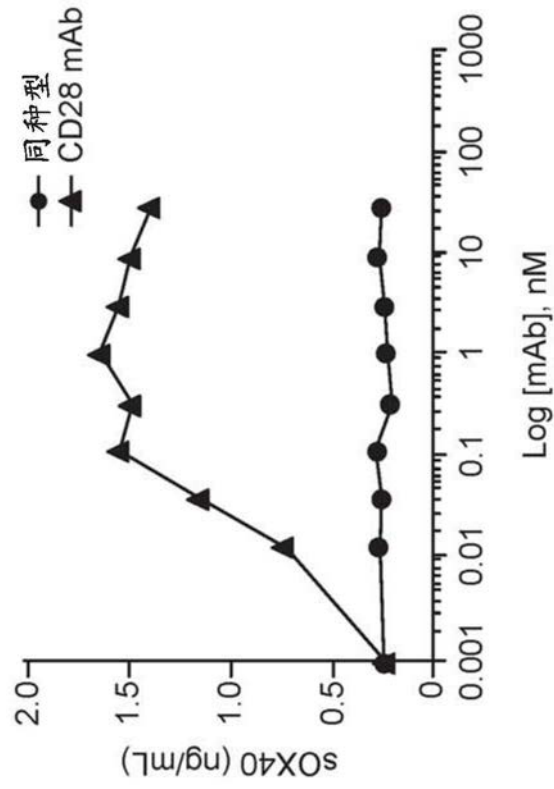


图35A

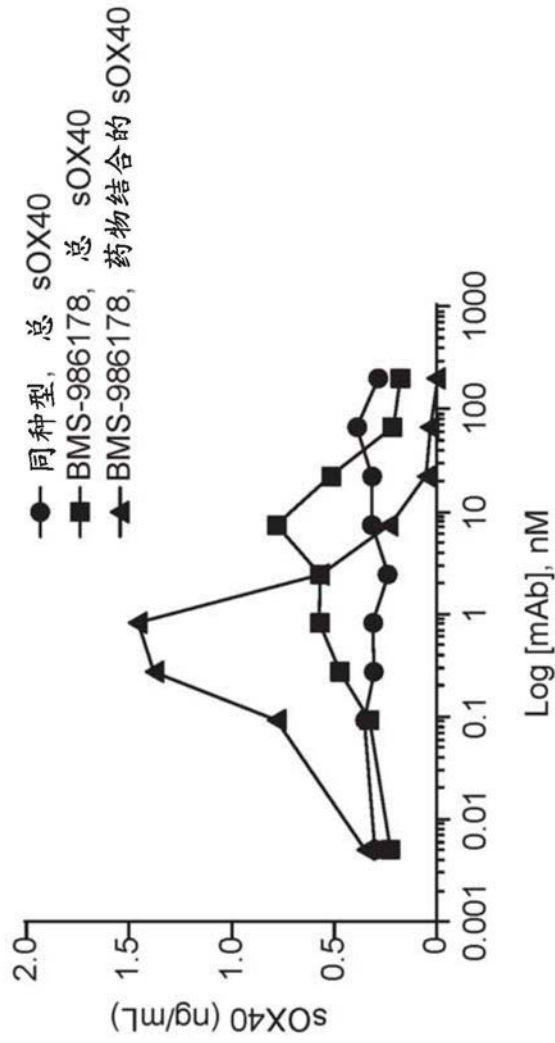


图35B

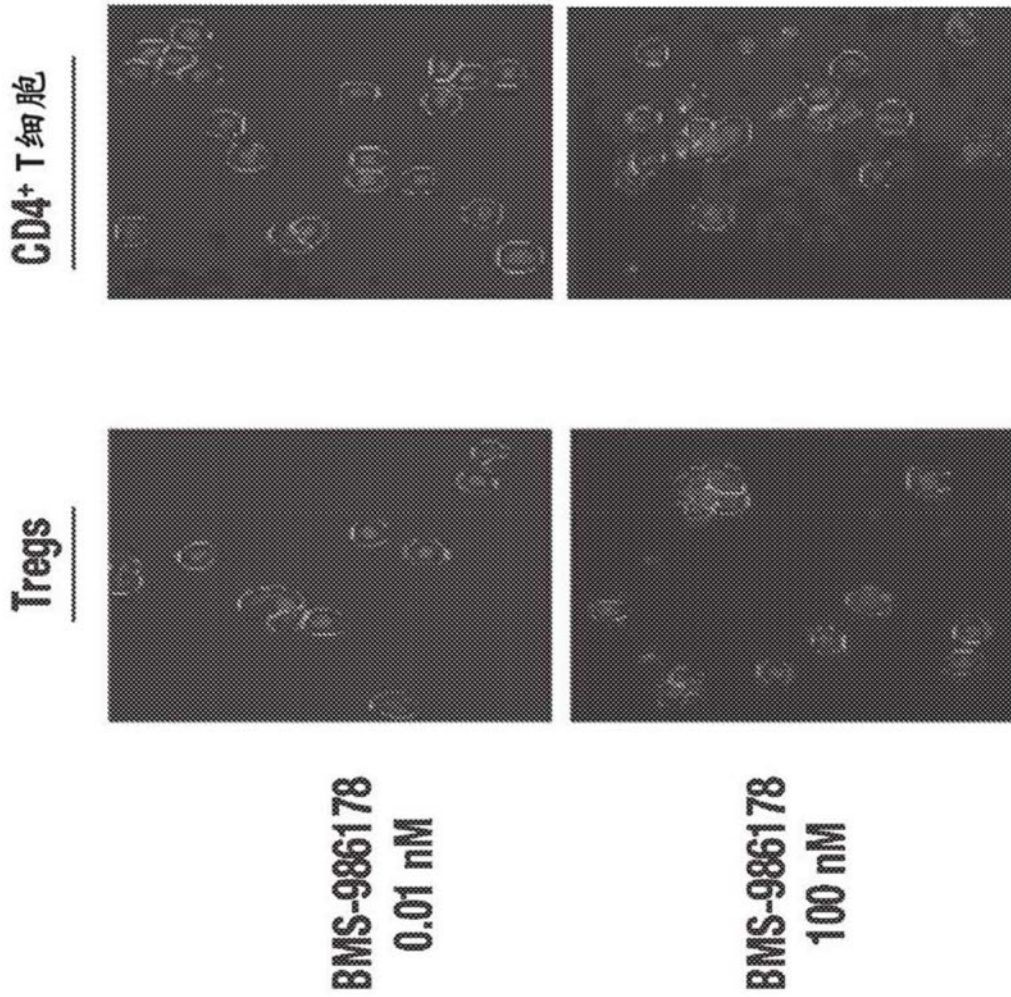


图36

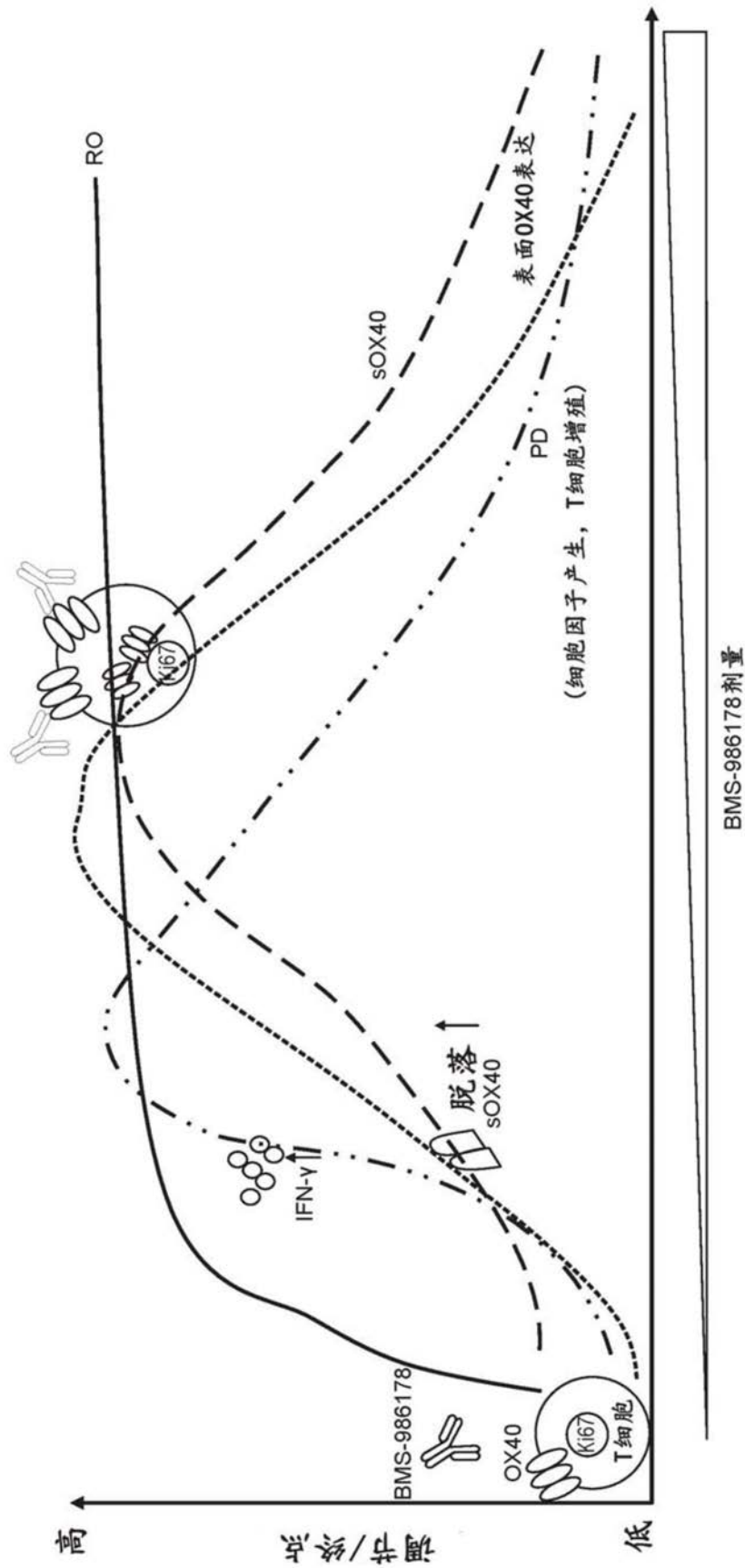


图37

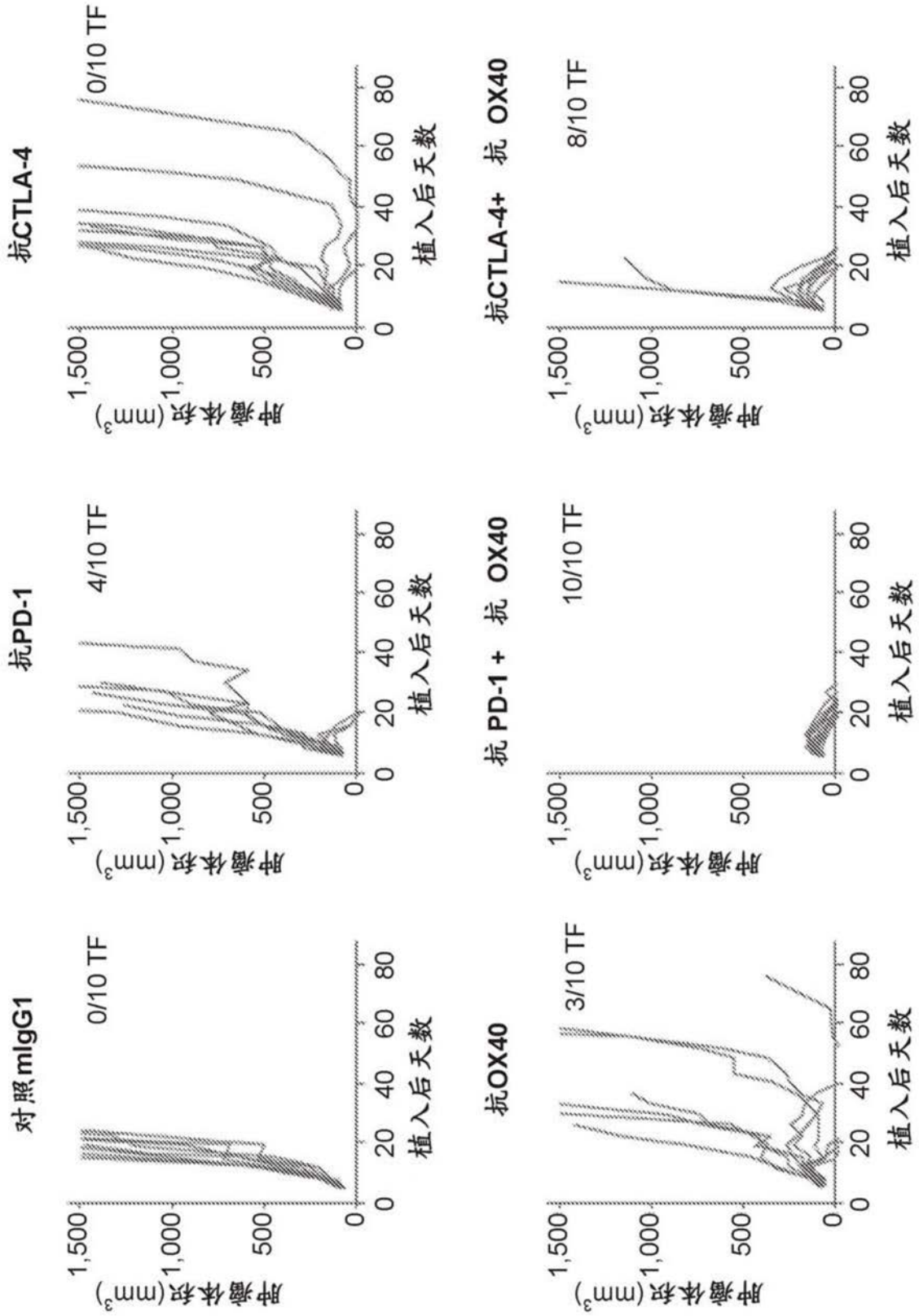
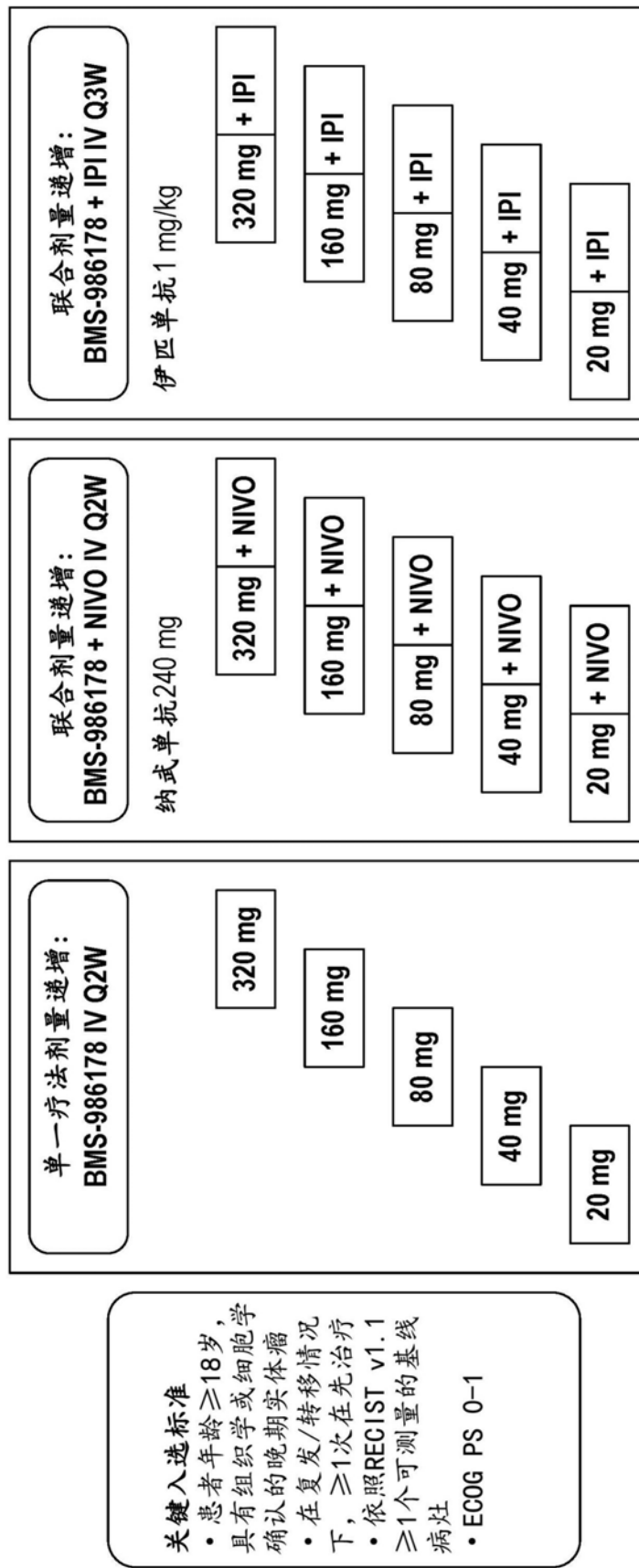


图38



截止日期：2017年8月31日

主要目标：安全性，耐受性，DLT, MTD, RP2D
次要目标：免疫原性，PK, PD, 初步抗肿瘤活性

图39

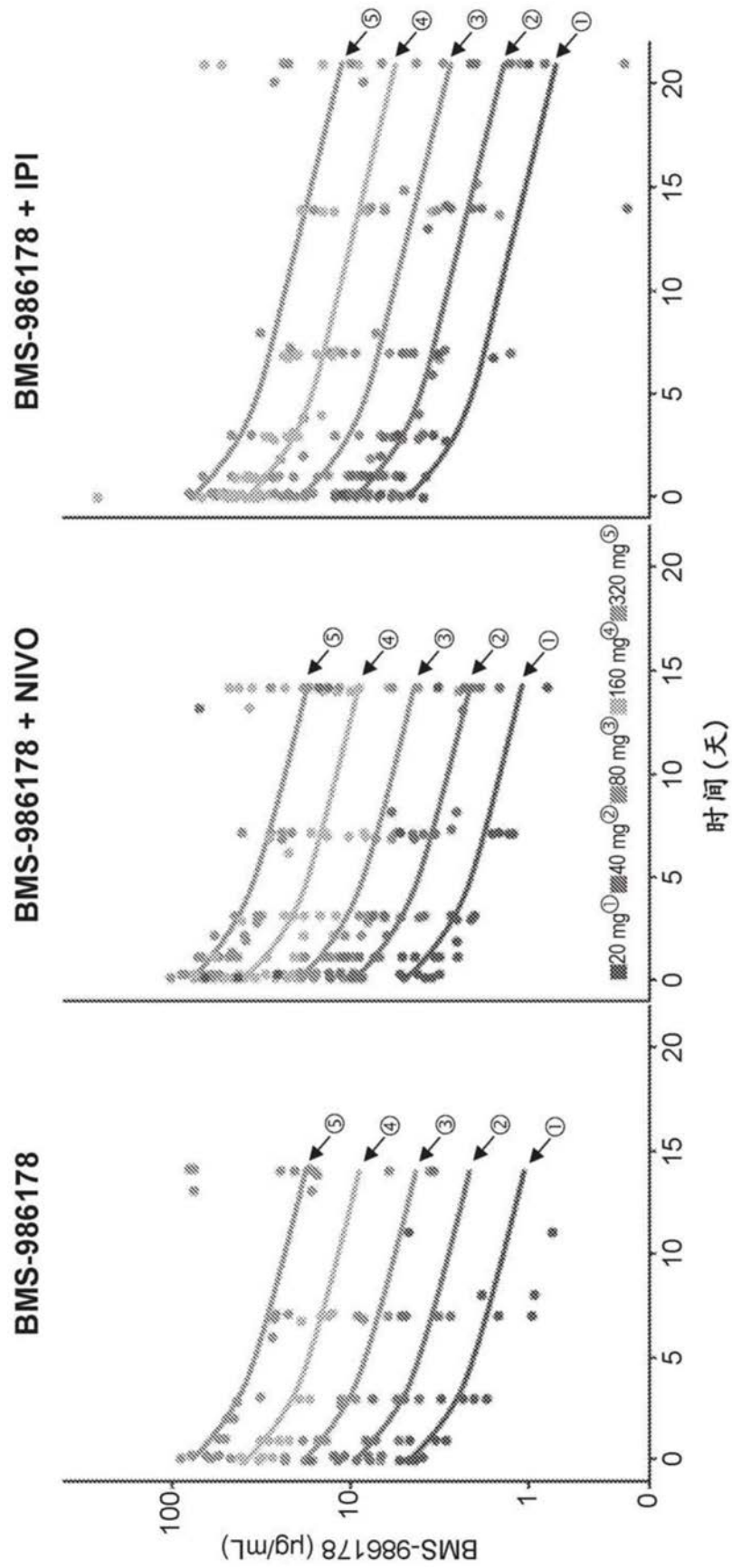


图40

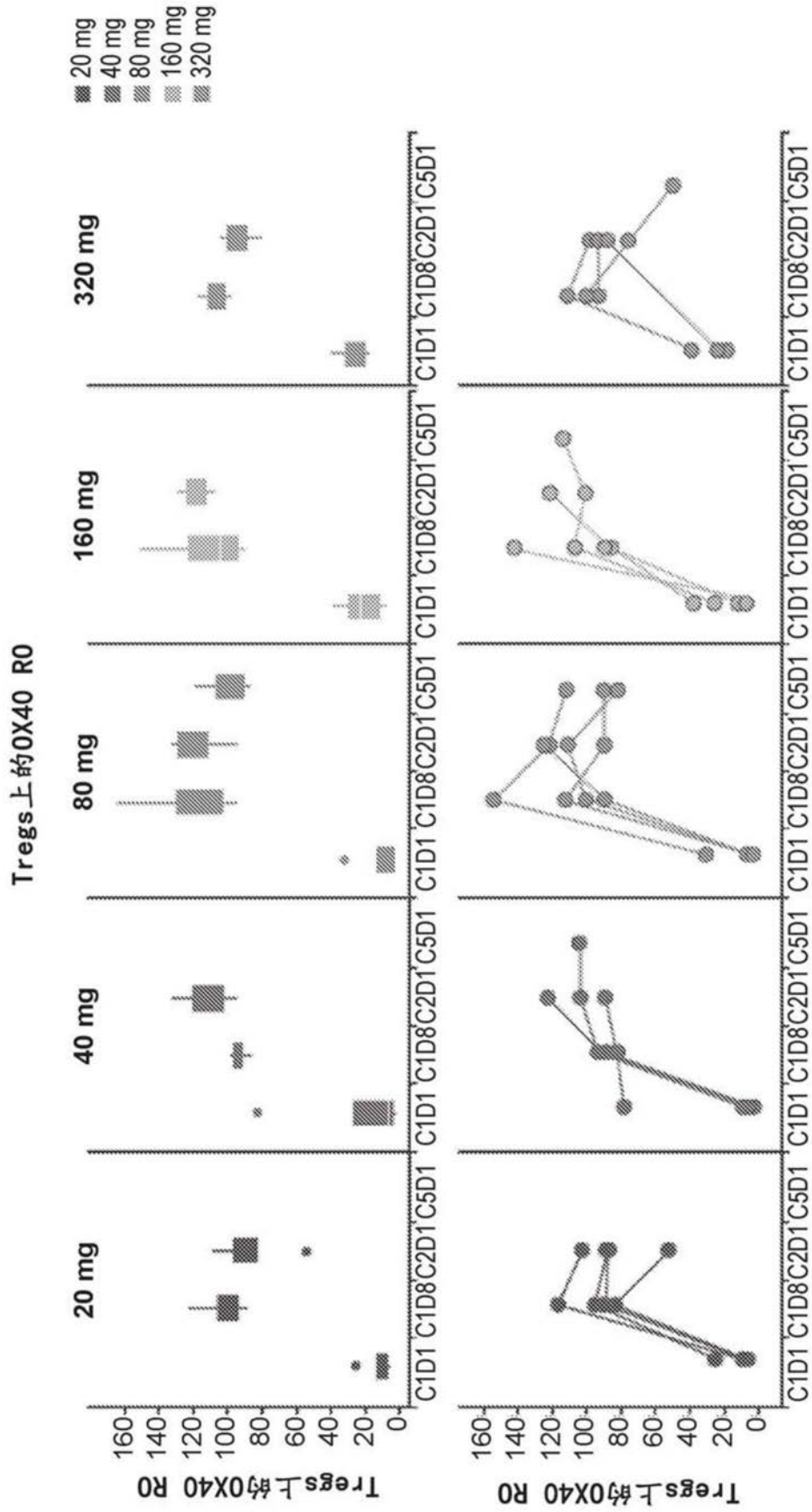


图41

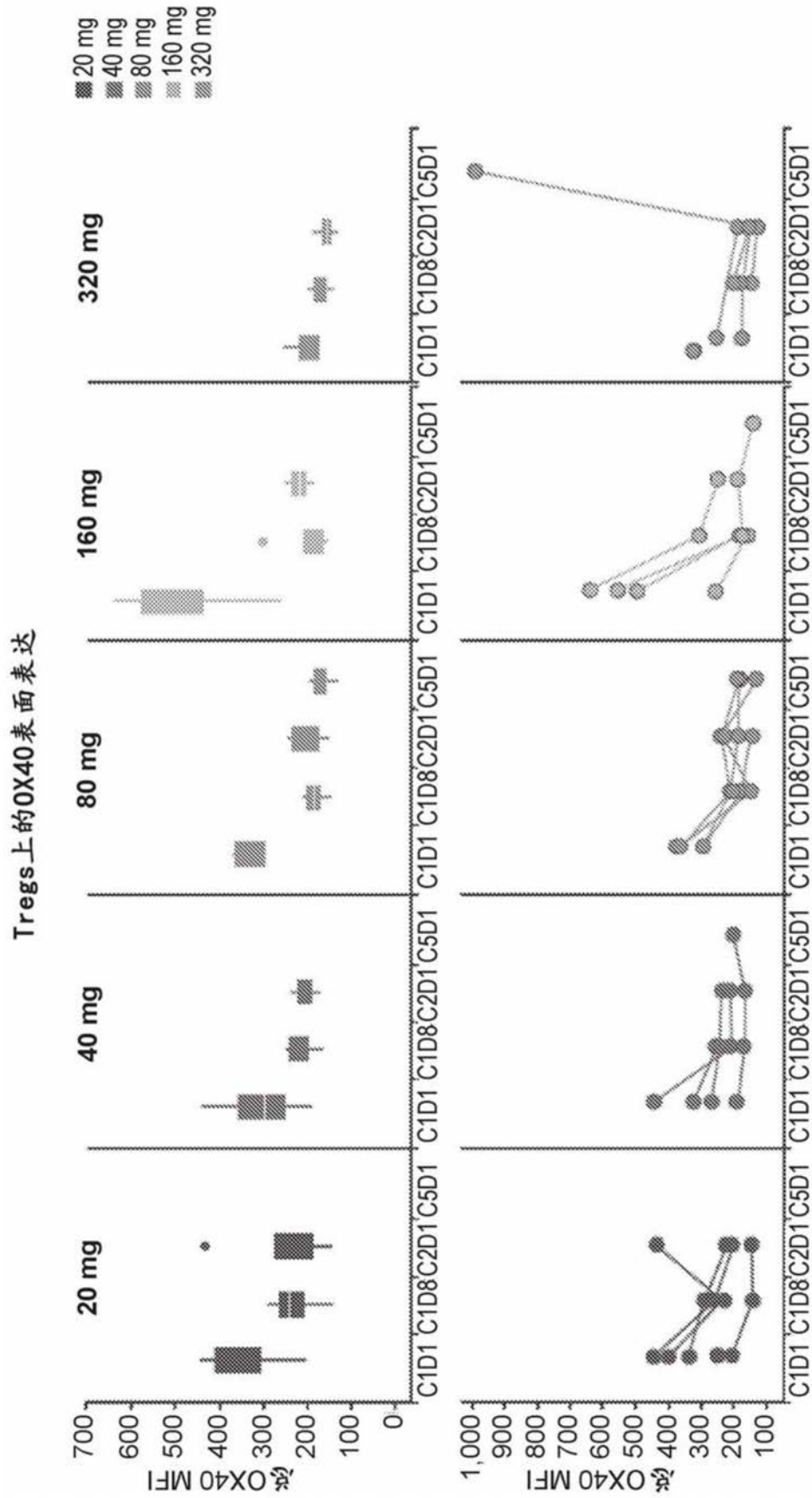


图42

个体患者样品中sOX40随着时间的变化倍数

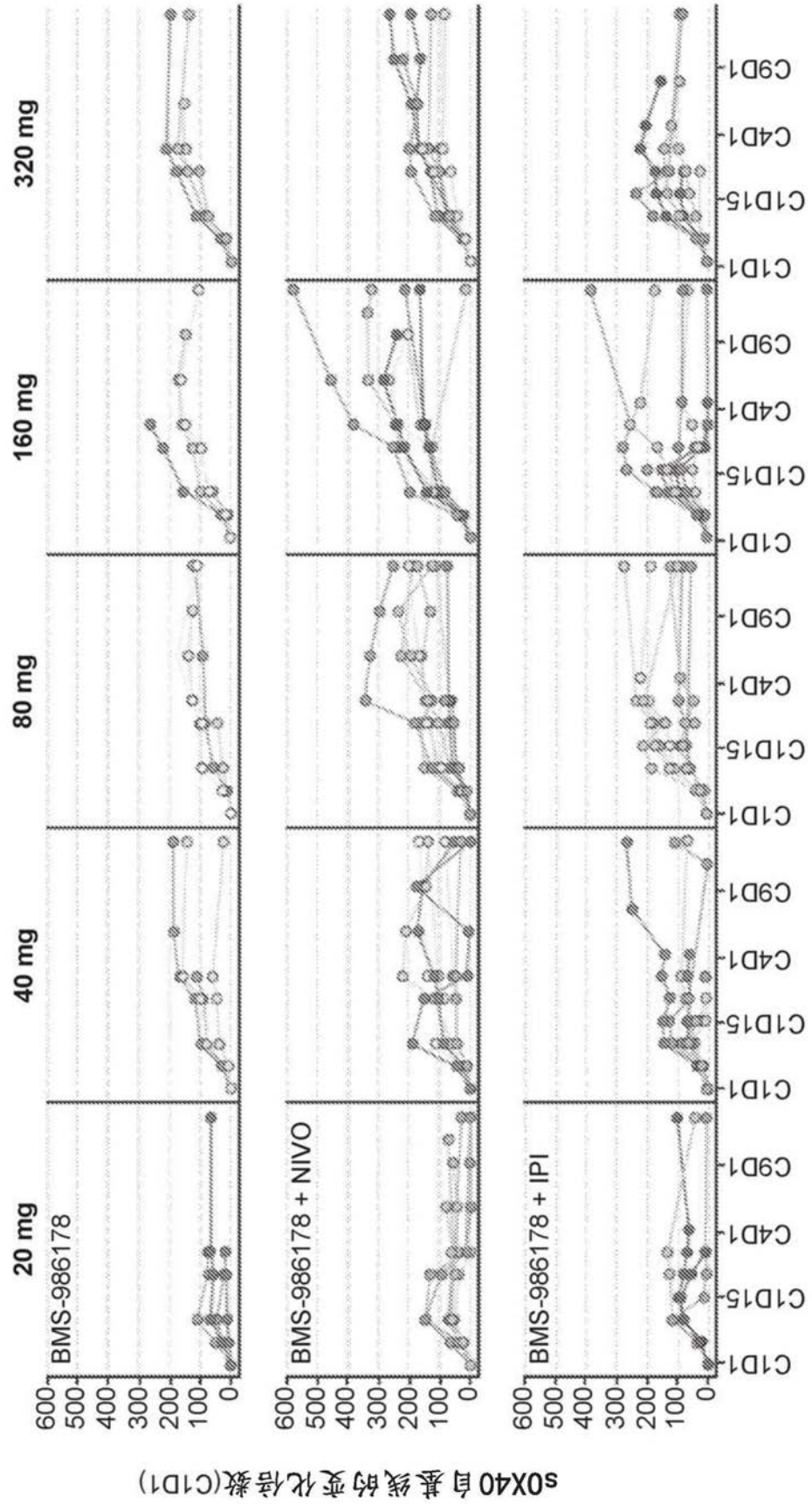


图43A

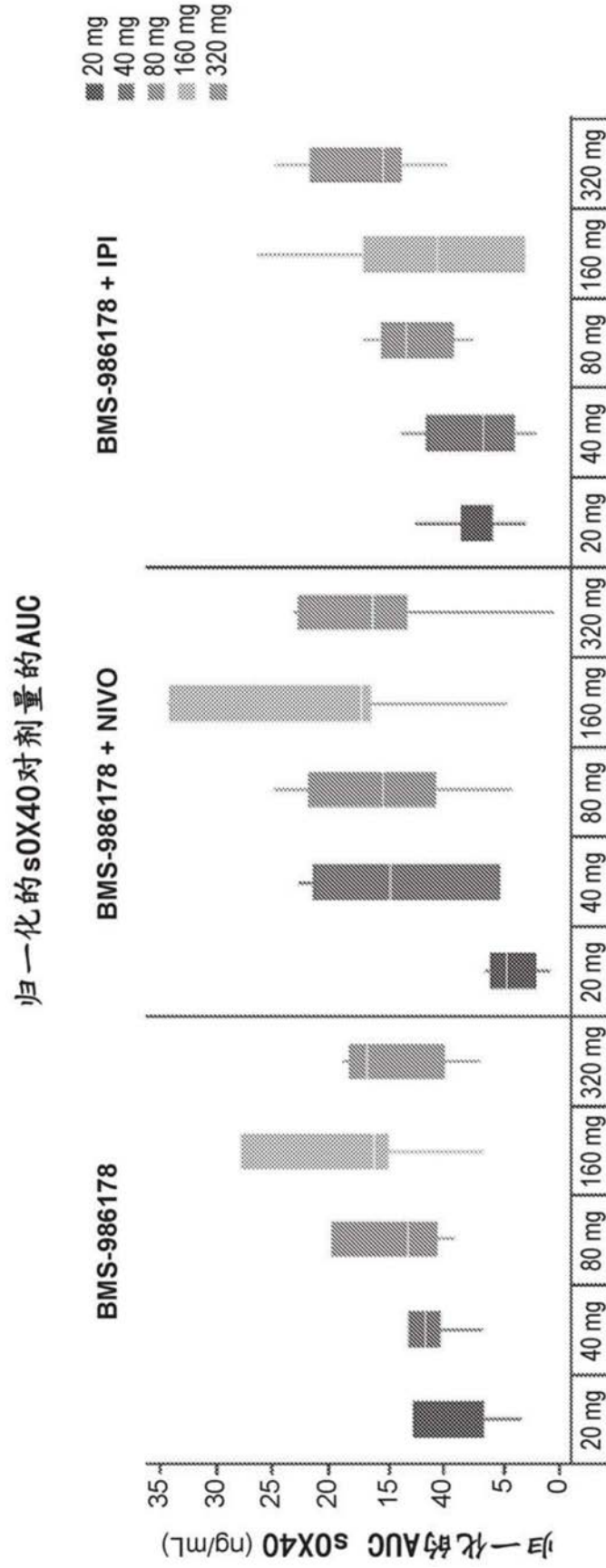


图43B

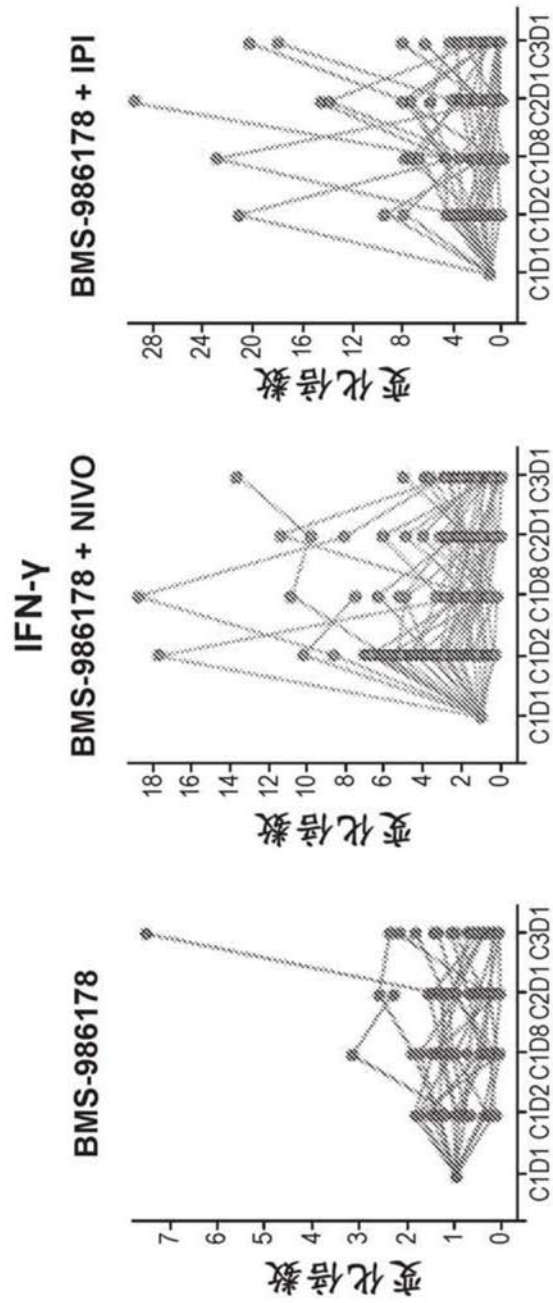


图44A

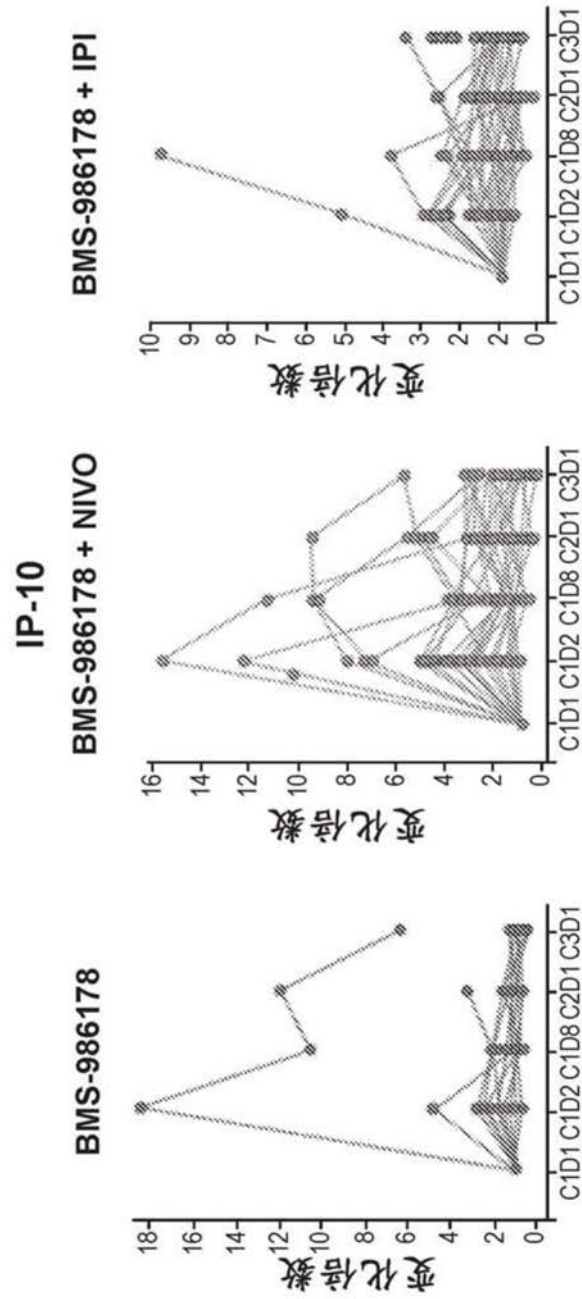


图44B

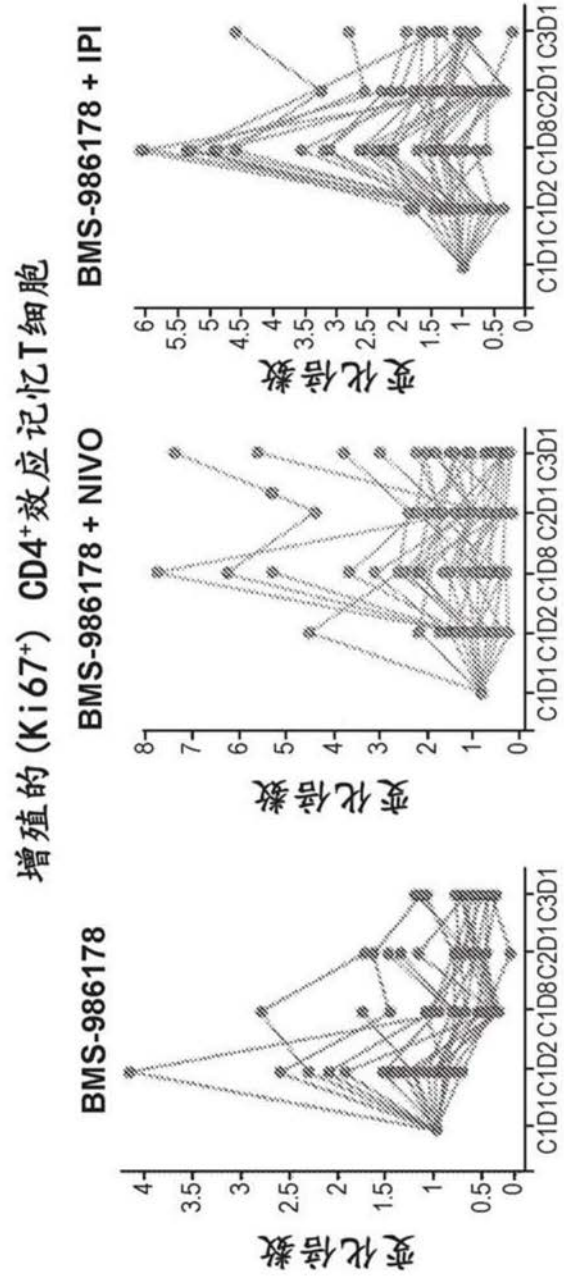


图45A

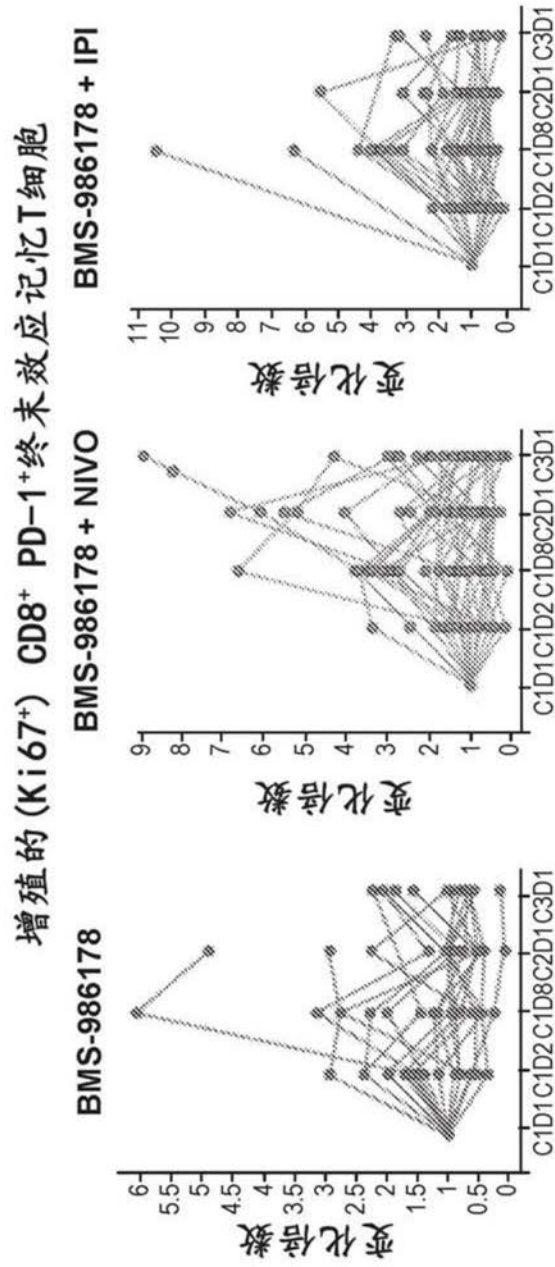


图45B

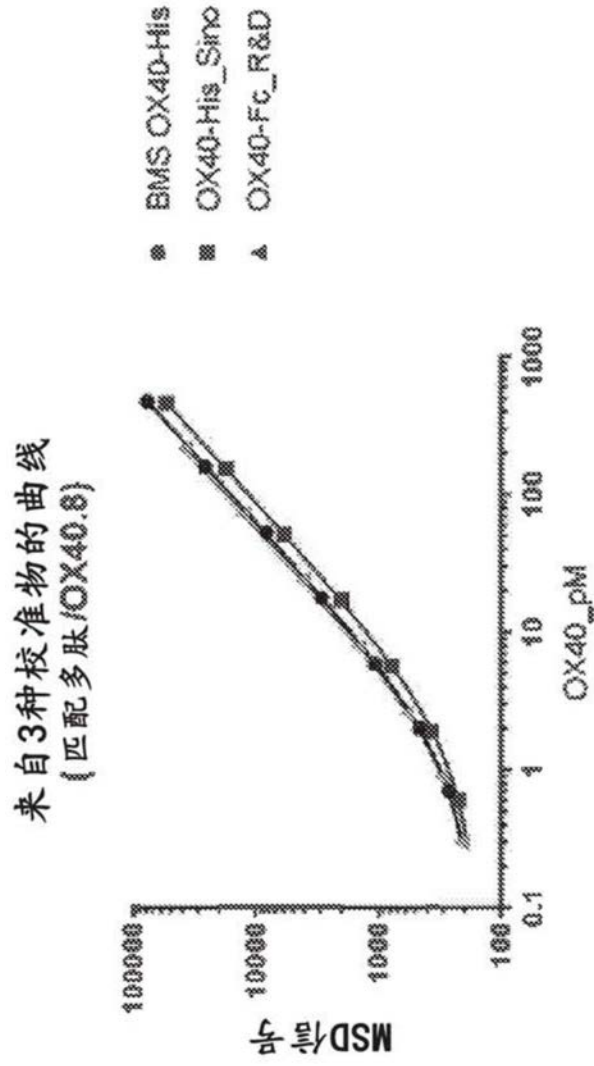


图46A

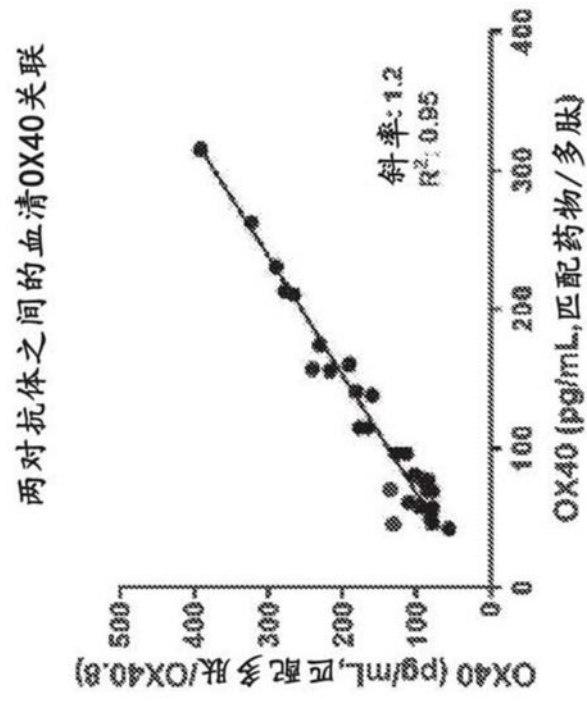


图46B

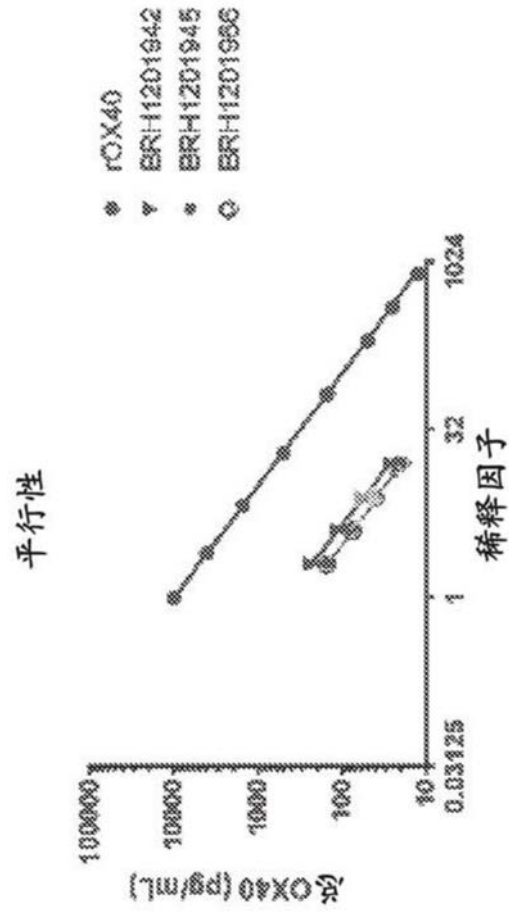


图46C

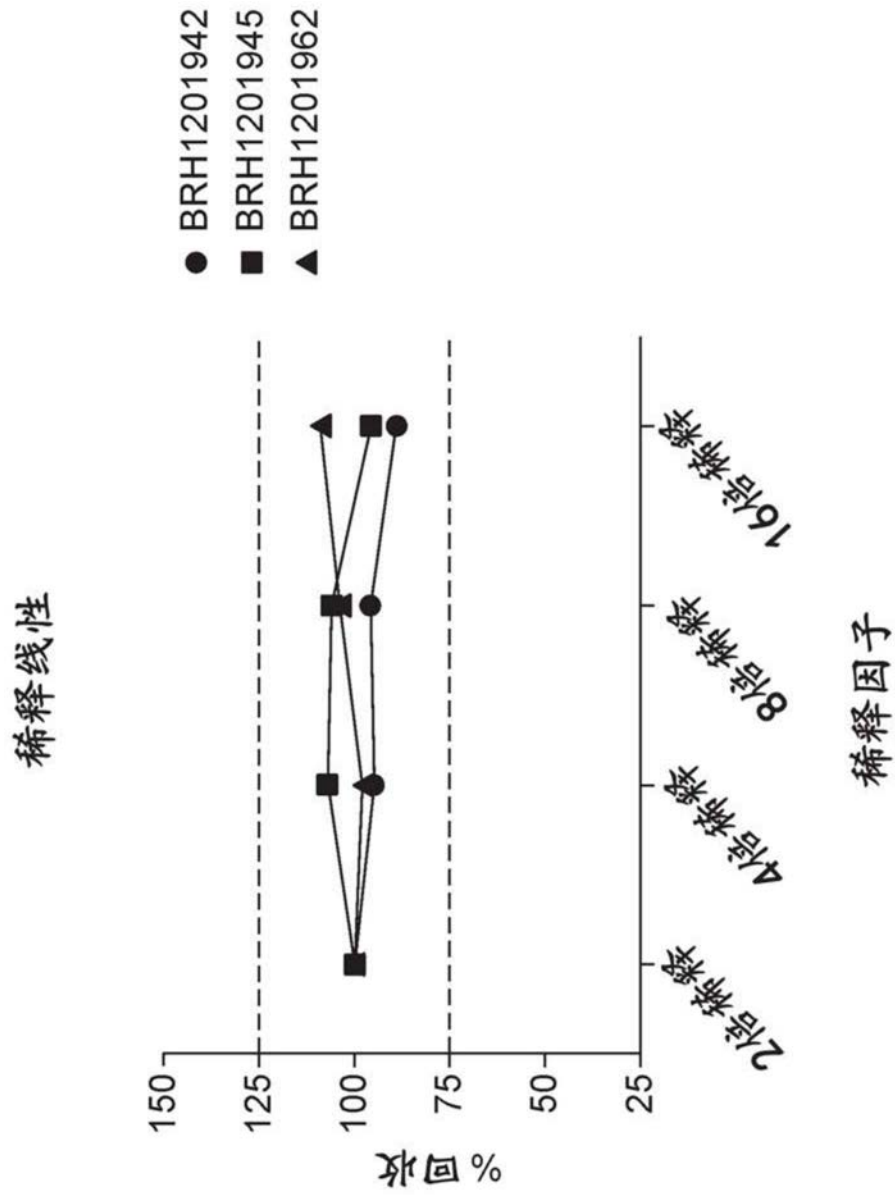


图46D

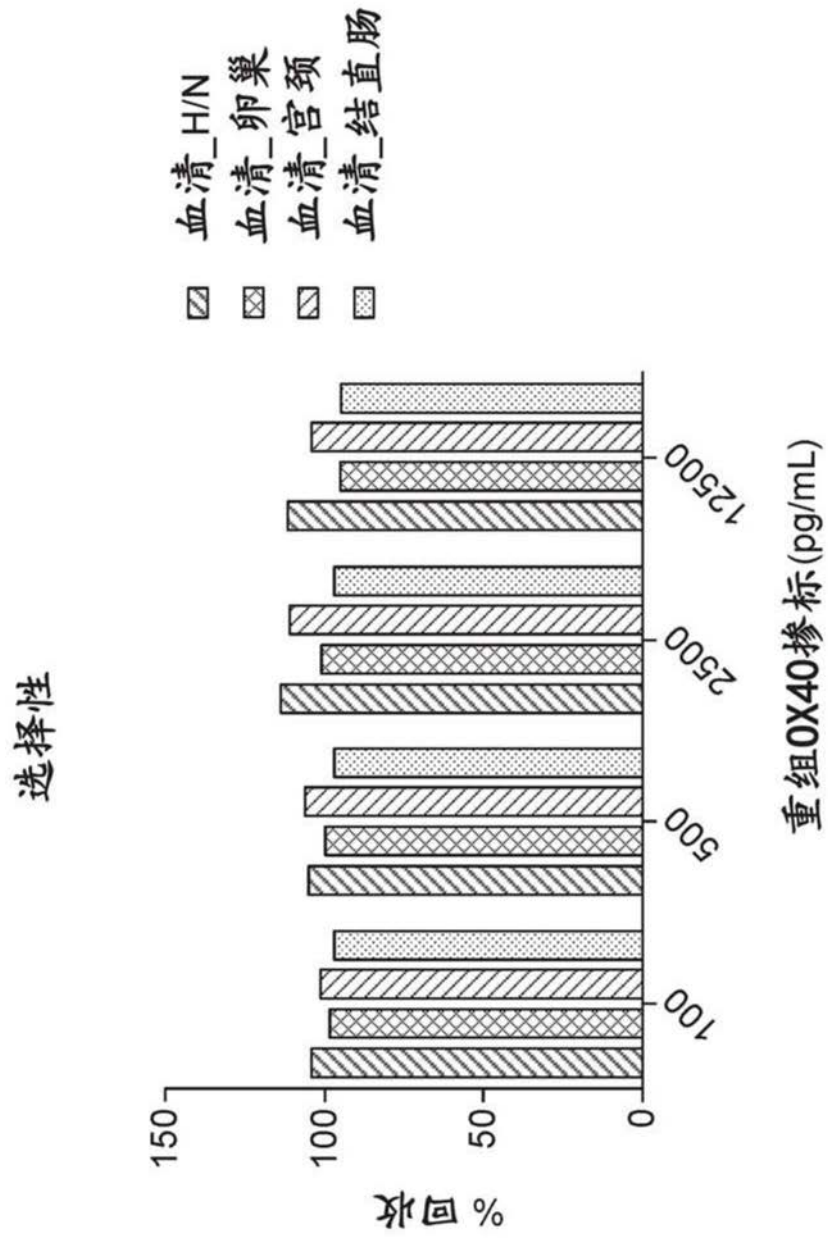


图46E

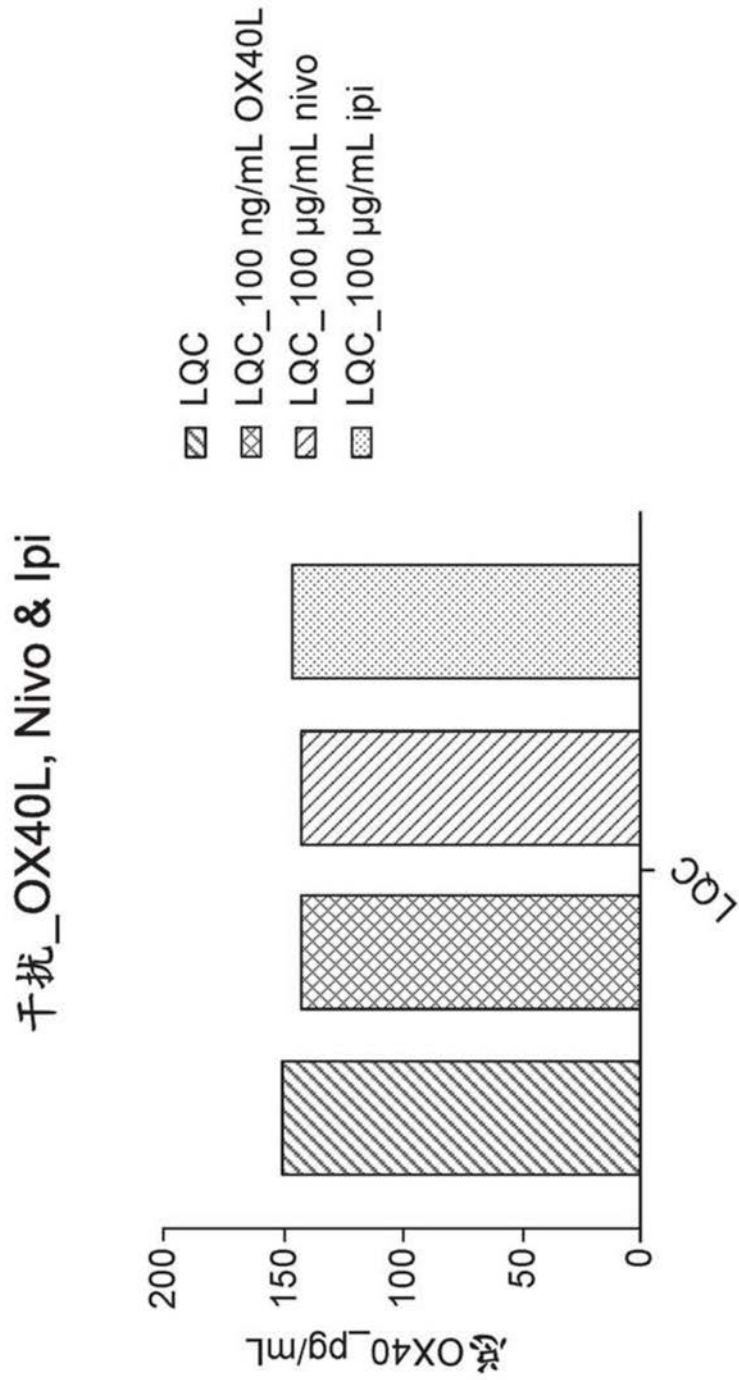


图46F

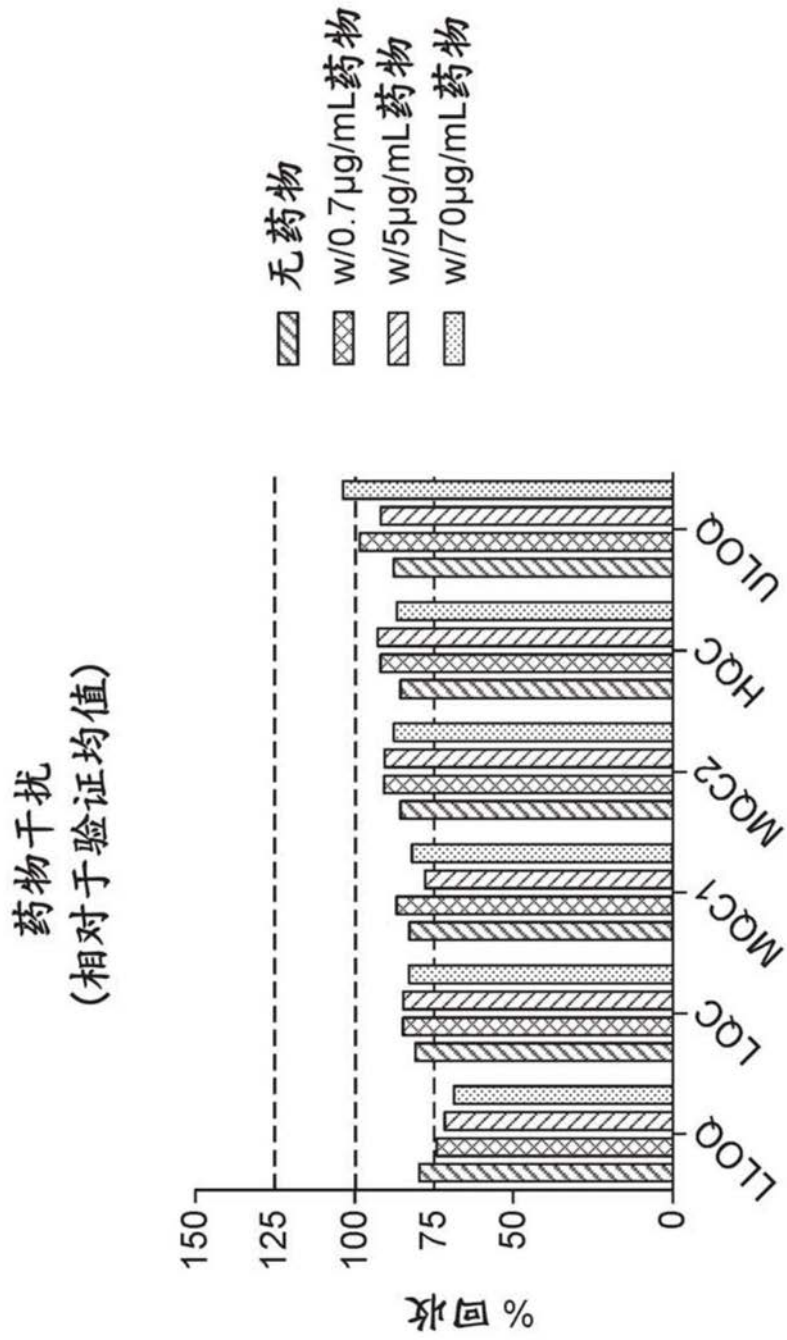


图46G

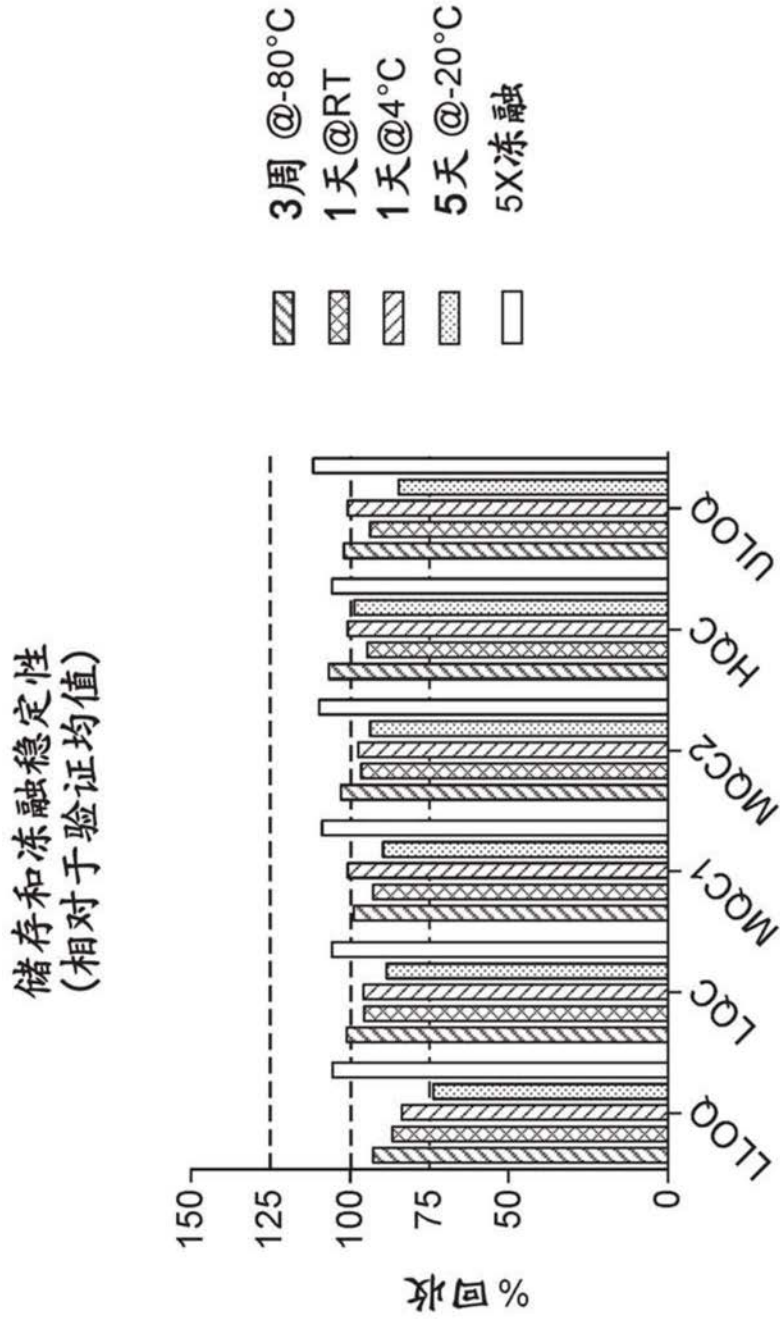


图46H

正常和疾病血清中的OX40水平

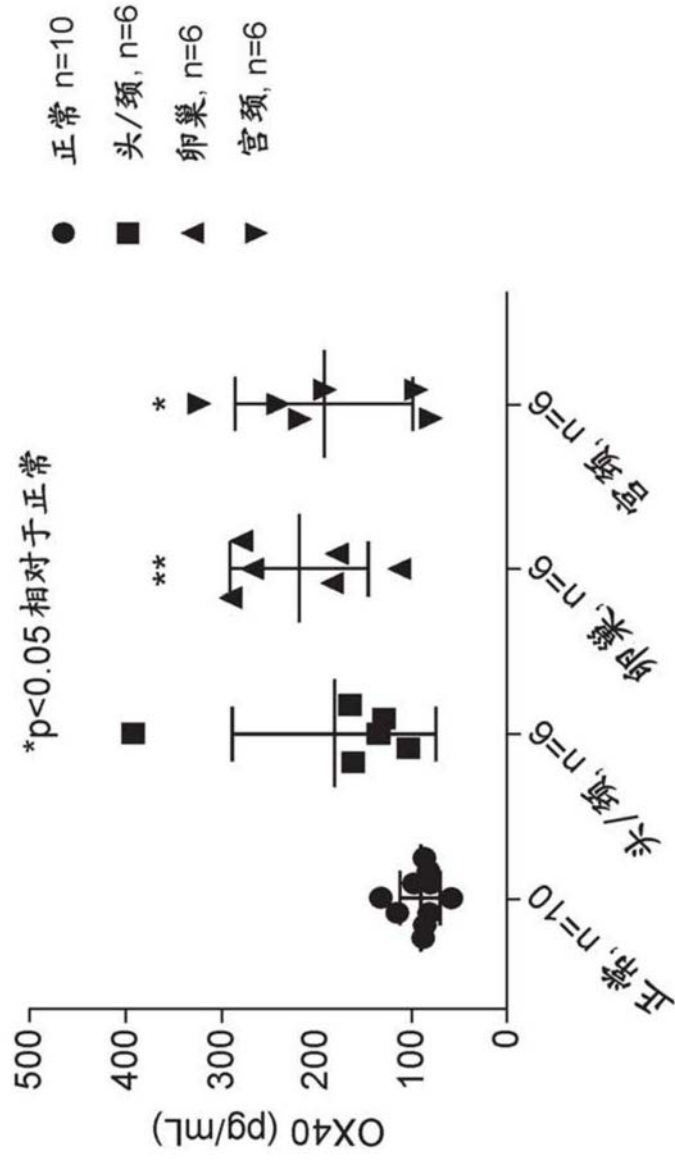


图47

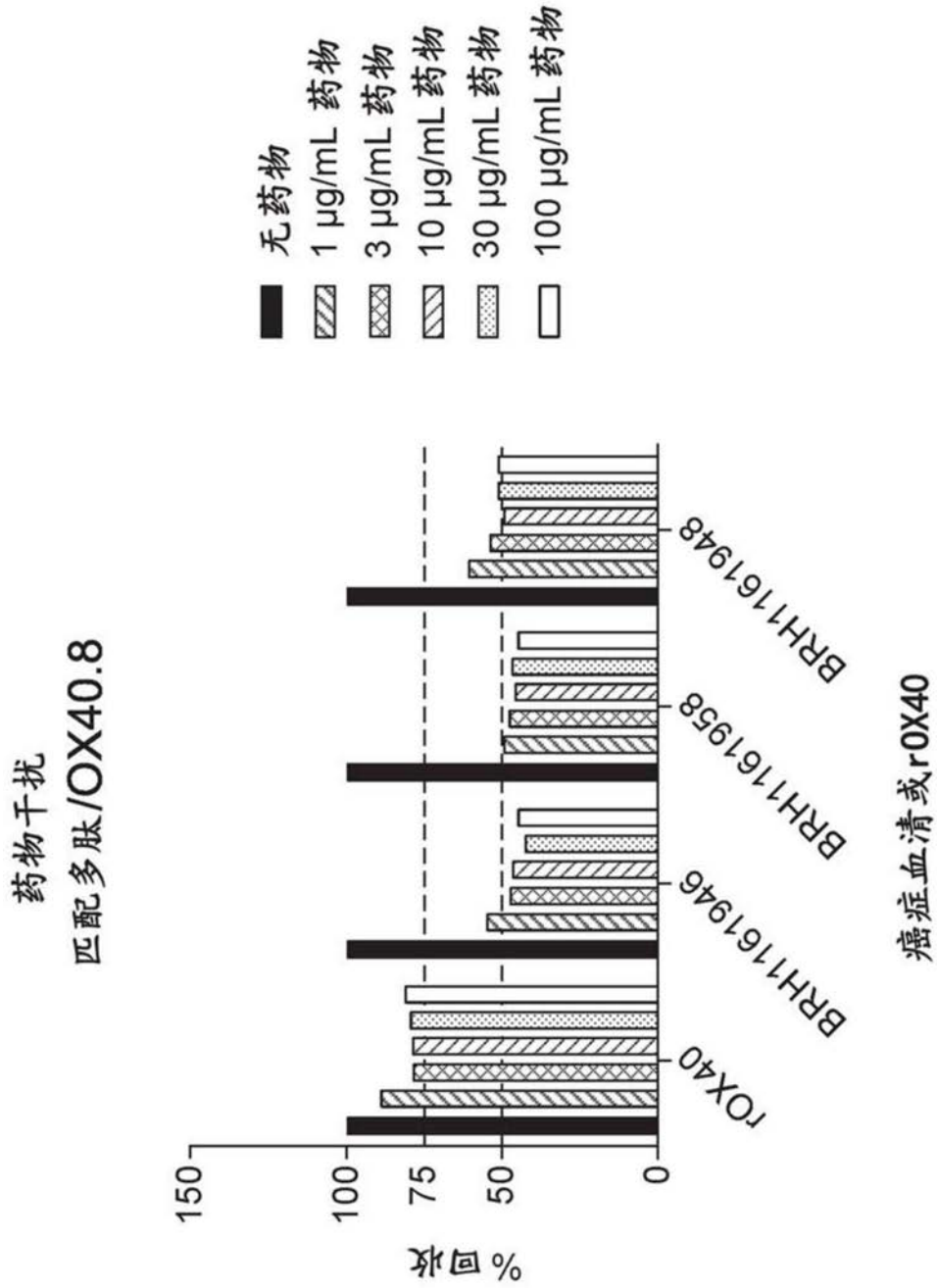


图48