



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107106677 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580046617.X

(22)申请日 2015.08.28

(30)优先权数据

14182708.9 2014.08.28 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.02.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2015/050600 2015.08.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/032334 EN 2016.03.03

(71)申请人 莱顿大学学术医院以LUMC的名义运
作

地址 荷兰莱顿

(72)发明人 舒尔德·范德·伯格

托尔巴尔德·范海尔

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 张英 宫传芝

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书29页 附图10页

(54)发明名称

CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B抗体、疫苗组
合

(57)摘要

CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B抗体、疫苗组
合。本公开尤其提供用于在治疗有需要的受试者
中使用的疫苗与CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结
合抗体的组合,其中所述疫苗包括用于引发针对
抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的
核酸分子。

1. 一种用于在治疗对其有需要的受试者中使用的疫苗与CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的组合,其中,所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。

2. 如权利要求1所述的组合,其中,所述免疫原是肿瘤抗原。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的组合,其中,所述免疫原是肿瘤特异性抗原。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的组合,其中,所述CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分在结合到表达CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B的T细胞或自然杀伤(NK)细胞时减少CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B的信号传导。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的组合,其中,所述CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分阻断CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B配体HLA-E与表达CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B的T细胞或自然杀伤(NK)细胞的结合。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的组合,其中,所述CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分是人类抗体或人源化抗体或所述人类抗体或人源化抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分,优选亚类IgG4的抗体。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的组合,其中该组合另外包括至少一种抗体,该至少一种抗体选自CLTA4结合抗体、PD-1结合抗体;PD-L1结合抗体;LAG-3结合抗体;VISTA抗体和TIM3结合抗体,或选自所述抗体的CTLA4结合、PD-L1结合、LAG-3结合、VISTA结合或TIM3结合部分。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的组合,其中该受试者是癌症患者。

9. 如权利要求8所述的组合,其中所述受试者的癌症是癌症,优选为选自以下的实体癌:卵巢癌、头颈癌、黑色素瘤、子宫颈癌、胰腺癌、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、病毒诱导的癌和结肠直肠癌。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的组合,其中,进一步向该受试者提供免疫细胞移植。

11. 一种药物组合物,其包括疫苗以及CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分,其中,所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。

12. 如权利要求11所述的药物组合物,其中,所述免疫原是肿瘤抗原。

13. 一种多部分的试剂盒,包括疫苗组合物和包含CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的组合物,其中,所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。

14. CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分以及免疫原在产生含有移植用细胞产物的免疫细胞中的用途。

15. 一种在受试者中刺激免疫应答的方法,该方法包括将疫苗以及CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分给予对其有需要的该受试者,其中,所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子,并且其中,优选地进一步向所述受试者提供免疫细胞移植。

CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B抗体、疫苗组合

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫疗法领域。本发明具体来说涉及CD94/NKG2A/B拮抗剂,优选为拮抗性CD94/NKG2A/B抗体与刺激免疫应答的疫苗或免疫原的组合。本发明尤其但非排外地可用于癌症治疗中。

背景技术

[0002] 针对肿瘤浸润性T细胞上的CTLA-4和PD-1的免疫检查点阻断抗体已在晚期癌症患者中产生显著临床反应。CTLA-4在若干个T细胞亚组和活化细胞上表达,如负反馈环路所证实。抗CTLA-4抗体代表市场首见新型(first-in-class)治疗剂的实例。使用抗PD1和抗PD-L1抗体的临床试验也显示临床结果。

[0003] 在本发明中观察到,经活化CD8 T细胞(CTL)和自然杀伤(NK)细胞表达抑制性受体CD94/NKG2A。该抑制性受体的配体是保守HLA-E分子。CD94/NKG2A的独特特征在于,其为CTL和NK细胞上的负调节物,这两种细胞都参与直接肿瘤控制。另外观察到,肿瘤的HLA-E表达与CD8细胞浸润肿瘤的较差存活(否则显示良好存活)相关。

[0004] 在实验部分中,尤其提供CD94/NKG2A阻断容许肿瘤内CTL和NK细胞对肿瘤的良好反应的证据。具有高NKG2A阳性CTL数的VIN患者具有更佳无进展存活。头颈癌、卵巢癌和子宫颈癌中高达50%的肿瘤浸润性CTL表达NKG2A。30%左右的这些NKG2A阳性CTL不表达其他共抑制性受体TIM3、CTLA-4或PD-1。肿瘤中的NKG2A阳性CTL的频率在治疗性疫苗接种时增加。NKG2A配体在肿瘤细胞上的表达水平在治疗性疫苗接种时提高。

发明内容

[0005] 本发明提供用于在治疗有需要的受试者中使用的疫苗与CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的组合,其中所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。

[0006] 本发明进一步提供包括疫苗和CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的药物组合物,其中所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。

[0007] 本发明进一步提供多部分的试剂盒,这些部分包括疫苗组合物和包含CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的组合物,其中所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。

[0008] 本发明还提供CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分和免疫原在产生含有移植用细胞产物的免疫细胞中的用途。

[0009] 本发明还提供用于制备含有细胞产物的免疫细胞的方法,该方法包括在免疫原和CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分存在下培养包括T细胞和/或NK细胞的细胞集合,该方法进一步包括在所述培养后收集T细胞

和/或NK细胞。

[0010] 本发明进一步提供在受试者中刺激免疫应答的方法,该方法包括将疫苗和CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分给予对其有需要的受试者,其中所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。

[0011] 本发明进一步提供用于在治疗有需要的受试者中使用的疫苗与CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的组合,其中所述疫苗包括抗肿瘤淋巴细胞;用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原;编码所述免疫原的核酸分子或上述各者的组合。

[0012] 本发明进一步提供用于治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向需要该方法的个体给予疫苗和CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分,其中该疫苗包括抗肿瘤淋巴细胞;用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原;编码所述免疫原的核酸分子或上述各者的组合。

具体实施方式

[0013] 疫苗是包括生物分子的制剂,该生物分子是例如蛋白质、或编码蛋白质的核酸分子、碳水化合物、脂质或上述各者的组合,该疫苗改善针对该生物分子和/或含有该生物分子的细胞的免疫应答。疫苗通常但并非必须改善针对具体疾病的免疫力。疫苗通常含有免疫原或编码该免疫原的核酸分子,该免疫原类似于引发疾病的病原体、蛋白质、细胞或上述各者的部分。免疫原刺激身体的免疫系统识别如外来的致病因子,破坏该致病因子,并保持该致病因子的记录,使得免疫系统可更容易地识别并破坏或灭活其后来遇到的任何相同致病因子。

[0014] 存在预防性和治疗性疫苗。术语疫苗通常是指给予受试者的产品,即包含佐剂(若存在)、载体蛋白质(若存在)、稳定剂或其他赋形剂。在本发明中,术语疫苗包含所提到的产品,但还包含含有免疫原和/或编码该免疫原的一种或多种核酸分子的制剂本身。如本文中使用的术语疫苗并不限于市售疫苗。如本文中所使用的术语疫苗并不暗示制剂在预防疾病或治愈疾病中有效。术语疫苗包括所有含有免疫原和/或编码该免疫原的一种或多种核酸分子的制剂。

[0015] 抗原是可由免疫系统中的组分(抗体、淋巴细胞)特异性结合的任何物质。尽管事实上所有抗原都由特异性淋巴细胞或由抗体识别,但并非每种抗原都可诱发免疫应答。在本发明中,那些能诱导免疫应答的抗原被阐述为具有免疫原性且被称为免疫原。

[0016] 免疫原是能诱导体液和/或细胞介导的免疫应答而不是免疫耐受性的任何抗原。这种能力被称为免疫原性。当受试者在被给予免疫原后产生针对该免疫原的体液或细胞应答时,该免疫原被阐述为可在受试者中引发针对抗原的免疫应答。

[0017] 术语“免疫原”在本文中定义为完整抗原,其由大分子载体和一个或多个可诱导免疫应答的表位(决定簇)组成。

[0018] 大分子载体和一个或多个表位可含于单一分子(例如蛋白质)中,存在于颗粒(例如细胞或其部分或片段)中。也可将表位提供到单独载体上。非限制性实例是半抗原。半抗原是可由抗体结合但无法引发免疫应答的低分子量化合物。因此,半抗原本身无免疫原性,

并且其无法诱发免疫应答,直到其与较大载体免疫原性分子结合为止。与游离半抗原不同,半抗原-载体复合物可起免疫原的作用并且可诱导免疫应答。

[0019] 本发明提供如本文中所述的方式、方法和用途,其中术语疫苗由词组“免疫原或编码该免疫原的核酸分子”替代。

[0020] NKG2基因家族命名为NKG2A、C、D和E,其最初是通过筛选富集NK细胞特异性转录物和T细胞特异性转录物的消减文库来鉴别。NKG2A基因编码两种亚型,NKG2A和NKG2B,其中NKG2B缺少茎部区域。cDNA序列的染色体定位和分析显示,如同CD94,NKG2基因定位于染色体12上的NK复合物中,并且由这些基因编码的蛋白质是C型凝集素家族的成员。NKG2A是CD94的配偶体。NKG2A和CD94形成异二聚体,这些异二聚体在NK细胞和其他免疫细胞的细胞表面上表达。NKG2B也与CD94形成异二聚体。在CD94交联后的抑制信号的传输与NK细胞克隆对NKG2A的表达相关。CD94/NKG2A异二聚体和CD94/NKG2B异二聚体可将抑制信号递送到NK细胞和其他表达CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B的免疫细胞,据推测由NKG2A/B的胞质结构域介导(A.G.布鲁克斯(A.G.Brooks)等人(1997)实验医学杂志(J. Exp. Med.)第185卷,第795-800页)。术语“CD94/NKG2A”是指人类中的异二聚体并且是指其他哺乳动物物种中的直系同源物的异二聚体。特定哺乳动物的直系同源物可以不同科学名称为人所知。如本文中所使用的该术语涵盖这些直系同源物。结合到人类CD94/NKG2A异二聚体的人类CD94/NKG2A异二聚体和抗体是优选的。在人类中,CD94还称为杀伤细胞凝集素样受体亚家族D,成员1(KLRD1;UniGene 1777996)。NKG2A/B还称为杀伤细胞凝集素样受体亚家族C,成员1(KLRC1;UniGene 903323)。术语“CD94/NKG2B”是指人类中的异二聚体并且是指其他哺乳动物物种中的直系同源物的异二聚体。特定哺乳动物的直系同源物可以不同科学名称为人所知。如本文中所使用的该术语涵盖这些直系同源物。结合到人类CD94/NKG2B异二聚体的人类CD94/NKG2B异二聚体和抗体是优选的。

[0021] 在提及NKG2A/B时,所提及者包含NKG2A、NKG2B或二者。

[0022] CD94/NKG2A/B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分结合到CD94/NKG2A/B异二聚体受体的细胞外部分。抗体通常通过该抗体的抗原结合位点结合靶标。抗原结合位点通常由抗体的可变结构域形成并且存在于该可变结构域中。可变结构域含有抗原结合位点。结合抗原的可变结构域是包括结合该抗原的抗原结合位点的可变结构域。

[0023] 在一个实施例中,本发明的抗体可变结构域包括重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。抗原结合位点可存在于合并的VH/VL可变结构域中,或仅存在于VH区中或仅存在于VL区中。在抗原结合位点仅存在于可变结构域的两个区的一个区中时,相对应可变区可有助于结合可变区的折叠和/或稳定性,但不会显著促成抗原本身的结合。

[0024] 如本文中所使用,抗原结合是指抗体对其抗原的典型结合能力。结合到CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B的抗体结合到CD94/NKG2A/B,但在其他都相同的条件下,至少100倍低地结合到相同物种的CD94/NKG2C或CD94/NKG2D受体。CD94/NKG2A抗体在CD94/NKG2A上的表位通常存在于异二聚体的NKG2A部分上。该表位也可部分位于CD94上。CD94/NKG2B抗体在CD94/NKG2B上的表位通常存在于异二聚体的NKG2B结合部分上。该表位也可部分位于CD94上。结合NKG2A的抗体也可结合NKG2B,并且反之亦然。考虑到CD94/NKG2A/B是细胞表面受体,通常在表达一种或多种受体的细胞上评价结合。本发明的抗体结合到CD94/NKG2A和/或

CD94/NKG2B异二聚体的细胞外部分。抗体与抗原的结合可以按多种方式来评价。一种方式是将抗体与抗原(优选地表达抗原的细胞)一起孵育,移除未结合抗体(优选地通过洗涤步骤)并借助结合到结合抗体的经标记抗体检测结合抗体。

[0025] 抗体的抗原结合通常通过抗体的互补区来介导,并且抗原和可变结构域二者的特定三维结构使得这两种结构可精确地结合在一起(类似于锁和钥匙的相互作用),这与抗体的随机非特异性粘合相反。由于抗体通常识别抗原的表位,且由于该表位也可存在于其他化合物中,所以如果这些其他化合物含有相同表位,根据本发明的结合CD94/NKG2A的抗体也可识别其他蛋白质。因此,术语“结合”不排除抗体与含有相同表位的另外一种蛋白质或多种蛋白质的结合。如本发明中所定义的CD94/NKG2A抗体通常不结合到出生后的优选成年的人类中的细胞膜上的其他蛋白质。根据本发明的抗体通常能以至少 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 的结合亲和力结合CD94/NKG2A,如下文更详细地概括。

[0026] 如本文中所使用的术语“干扰结合”意指,抗体或其NKG2A/B结合部分是针对CD94/NKG2A/B上的表位,并且该抗体或其NKG2A/B结合部分与配体竞争结合到CD94/NKG2A/B。HLA-E是人类中CD94/NKG2A/B异二聚体的被识别配体。小鼠直系同源物通常以名称Qa1为人所知。CD94/NKG2A/B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分优选地干扰HLA-E与CD94/NKG2A/B受体的结合。抗体或其结合部分可减少配体结合,在配体已结合到CD94/NKG2A/B时代替配体,或该抗体或其结合部分可例如借助位阻至少部分防止该配体结合到CD94/NKG2A/B。

[0027] 如本文中所使用的术语“抗体”意指蛋白质性分子,优选地属于蛋白质的免疫球蛋白类别,含有一个或多个结合抗原上的表位的可变结构域,其中此类结构域源自抗体的可变结构域或与该抗体的可变结构域共享序列同源性。用于治疗性用途的抗体优选地尽可能地接近待治疗的受试者的天然抗体(例如用于人类受试者的人类抗体)。抗体结合可以就特异性和亲和力方面表现。特异性决定结合结构域特异性结合哪种抗原或该抗原的表位。亲和力是结合到具体抗原或表位的强度的量度。结合或特异性结合定义为以至少 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、更优选地 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、更优选地高于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 的亲和力(KD)结合。通常,用于治疗性应用的抗体的亲和力高达 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更高。CD94/NKG2A/B结合抗体可为单特异性抗体或双特异性抗体。在双特异性抗体中,VH/VL组合中的至少一者结合CD94/NKG2A/B。抗体、例如本发明的双特异性抗体通常包括天然抗体的恒定结构域。本发明的抗体通常是全长抗体,优选为人类IgG亚类。本发明的CD94/NKG2A/B结合抗体优选为人类IgG1亚类。本发明的这些抗体具有良好的ADCC和/或CDCC特性。这一抗体可用于杀伤表达CD94/NKG2A/B的细胞,由此去除来自系统的这些细胞的免疫应答削弱性效应。在优选实施例中,CD94/NKG2A/B结合抗体属于人类IgG4亚类或另一IgG亚类,例如不展现ADCC或CDCC的IgG2。还可获得IgG1的具有降低的ADCC和/或CDCC的衍生物。此类抗体无法有效标记所结合细胞以供破坏。此类抗体通常在本发明中是优选的,因为这些抗体在结合时至少减少CD94/NKG2A/B的信号传导。

[0028] 在优选实施例中,CD94/NKG2A/B抗体减少表达CD94/NKG2A/B的自然杀伤细胞上的CD94/NKG2A/B的信号传导。在优选实施例中,CD94/NKG2A/B抗体减少表达CD94/NKG2A/B的自然杀伤细胞上的CD94/NKG2A/B的配体诱导的信号传导。在人类情况下,优选地在表达HLA-E的细胞的情况下,优选配体是HLA-E。配体诱导的受体信号传导被减少至少20%,优选地至少30%、40%、50%、60%或至少70%,在特别优选的实施例中,配体诱导的受体信号传

导被减少80%，更优选地被减少90%。该减少优选地通过在如本文中所提到的CD94/NKG2A/B结合抗体的存在下测定配体诱导的受体信号传导来测定。优选地在其他都相同的条件下将该信号传导与该抗体不存在下的信号传导相比较。条件至少包括HLA-E配体或(适用时)其直系同源物的存在。存在的配体的量优选地是在CD94/NKG2A/B阳性细胞系中诱导半最大信号传导的量。信号传导优选地是通过测定细胞活化来测定。细胞活化可用增殖、细胞因子(包括IFN- γ)的产生或表面显示标记物(包含CD69或CD137)来测量。在优选实施例中，CD94/NKG2A/B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分抑制表达CD94/NKG2A/B的自然杀伤细胞上的CD94/NKG2A/B的信号传导。对信号传导的抑制暗示将信号传导减少至少90%，优选地至少95%。优选地在NK细胞上测量信号传导的减少作为抗体活性的量度。减少NK细胞上的信号传导的抗体也减少其他表达CD94/NKG2A/B的免疫细胞上的信号传导。

[0029] 在优选实施例中，CD94/NKG2A/B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分减少表达CD94/NKG2A/B的T细胞上的CD94/NKG2A/B的信号传导。在优选实施例中，CD94/NKG2A/B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分减少表达CD94/NKG2A/B的T细胞上的CD94/NKG2A/B的配体诱导的信号传导。在人类情况下，优选地在表达HLA-E的细胞的情况下，优选配体是HLA-E。配体诱导的受体信号传导被减少至少20%，优选地至少30%、40%、50%、60%或至少70%，在特别优选的实施例中，配体诱导的受体信号传导被减少80%，更优选地被减少90%。该减少优选地通过在如本文中所提到的CD94/NKG2A/B结合抗体的存在下测定配体诱导的受体信号传导来测定。优选地在其他都相同的条件下将该信号传导与该抗体不存在下的信号传导相比较。条件至少包括HLA-E配体或(适用时)其直系同源物的存在。存在的配体的量优选地是在CD94/NKG2A/B阳性细胞系中诱导半最大信号传导的量。信号传导优选地是通过测定细胞活化来测定。细胞活化可用增殖、细胞因子(包括IFN- γ)的产生或表面显示标记物(包含CD69或CD137)来测量。在优选实施例中，CD94/NKG2A/B抗体抑制表达CD94/NKG2A/B的T细胞上的CD94/NKG2A/B的信号传导。对信号传导的抑制暗示将信号传导减少至少90%，优选地至少95%。优选地在T细胞上测量信号传导的减少作为抗体活性的量度。减少T细胞上的信号传导的抗体也减少其他表达CD94/NKG2A/B的免疫细胞上的信号传导。

[0030] 减少和/或抑制信号传导的CD94/NKG2A/B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分可与配体竞争结合到CD94/NKG2A异二聚体或可不竞争。在优选实施例中，CD94/NKG2A/B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分不与配体显著竞争结合到CD94/NKG2A/B异二聚体。结合竞争可通过在配体存在或不存在下进行抗体的结合研究来测定。

[0031] 在优选实施例中，CD94/NKG2A抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分与如在EP2628753(诺和诺德(Novo Nordisk AS))中所述的抗体Z199竞争结合到CD94/NKG2A。在优选实施例中，抗体是所提到的Z199，或Z199的人源化形式，或Z199的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分。在另一优选实施例中，CD94/NKG2A抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分不与配体竞争结合到CD94/NKG2A异二聚体。在优选实施例中，抗体或其结合部分与如在EP2628753(诺和诺德)中所述的抗体Z270竞争结合到CD94/NKG2A。在优选实施例中，抗体是所提到的Z270或其人源化形式。

[0032] 结合这一抗体的CD94/NKG2A或CD94/NKG2A结合部分的抗体在本发明的方式、方法和用途中是优选的。结合到CD94/NKG2A的抗体或其CD94/NKG2A结合部分优选地结合到CD94/NKG2A,但在其他都相同的条件下,至少100倍低地结合到CD94/NKG2B。

[0033] 结合分子可为抗体。在本发明中,抗体是全长抗体或全长抗体的一部分。适宜部分在种类方面,而非必须在数量方面保留抗体的抗原结合能力。适宜抗体部分是单链Fv片段、单体(monobody)、VHH和Fab片段。这些特异性结合分子的共同特点是存在重链可变结构域,并且对于这些特异性结合分子中的多者,共同特点还有存在相应轻链可变结构域。抗体的一部分可含有另外的氨基酸序列,例如但不限于用于降低原本这些部分从血流中快速清除的序列。单链Fv片段的适宜载体尤其是人类血清白蛋白。本发明抗体优选地是“全长”抗体。根据本发明的术语‘全长’定义为包括基本上全部抗体,但其并非必须具有完整抗体的所有功能。为免生疑问,全长抗体含有两条重链和两条轻链。每条链含有恒定区(C)和可变区(V),这些区域可分解为命名为CH1、CH2、CH3、VH以及CL、VL的结构域。抗体通过Fab部分中所含的可变结构域结合到抗原,并且在结合后可通过恒定结构域、主要通过Fc部分与免疫系统的分子和细胞相互作用。术语‘可变结构域’、‘VH/VL对’、‘VH/VL’在本文中可互换使用。根据本发明的全长抗体涵盖其中可存在提供所需特征的突变的抗体。这些突变应该不是任何区域的实质部分的缺失。然而,其中一个或若干个氨基酸残基缺失且不本质上改变所得抗体的结合特征的抗体包括在术语“全长抗体”内。例如,IgG抗体可在恒定区中具有1-20个氨基酸残基插入、缺失或插入与缺失的组合。例如,抗体的ADCC活性可在抗体本身具有低ADCC活性时通过略微修饰抗体的恒定区来改进(基蒂莱T.T.(Junttila,T.T.)、K.帕森斯(K.Parsons)等人(2010)，“无岩藻糖基化曲妥珠单抗在HER2扩增的乳腺癌的治疗中的优越体内功效(Superior In vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer)”,癌症研究(Cancer Research)70(11):4481-4489)。另一方面,ADCC活性可通过修饰抗体的恒定区来降低。

[0034] 全长IgG抗体由于其有利的半衰期和出于免疫原性的原因需要保持接近完全自体(人类)分子而是优选的。为了防止在人类中的任何免疫原性,根据本发明的IgG抗体优选地是人类IgG4。在优选实施例中,IgG4被工程化为使得其具有降低的二硫键异质性和/或增加的Fab结构域热稳定性(S.J彼得斯(S.J Peters)等人(2012),生物化学杂志(J.of Biol.Chem.)第287卷:第24525-24533页)。

[0035] 抗体可源自不同动物物种。一些抗体至少关于重链可变区具有鼠类背景。人源化这些(例如)鼠类重链可变区是惯例。这可通过多种方式来实现。可能将CDR移植到人类重链可变区中,该人类重链可变区具有匹配鼠类重链可变区的3D结构的3D结构;可优选地通过从鼠类重链可变区去除已知的或疑似的T细胞表位或B细胞表位将鼠类重链可变区去免疫化。该去除通常是通过用表位中的氨基酸的一个或多个取代另一(通常是保守的)氨基酸来进行,使得表位序列被修饰,使得该表位不再是T细胞表位或B细胞表位。

[0036] 这些去免疫化的鼠类重链可变区在人类中的免疫原性低于初始鼠类重链可变区。优选地,本发明的可变区或结构域被进一步人源化,例如比如被镶饰。通过使用镶饰技术,选择性地用人类残基替代免疫系统容易遇到的外部残基,以提供包括弱免疫原性或基本上无免疫原性的被镶饰表面的杂合分子。如本发明中所使用的动物优选地是哺乳动物,更优选地是灵长类动物,最优选地是人类。

[0037] 疫苗中免疫原的浓度优选地介于1ng/ml与10mg/ml之间,优选地介于10ng/ml与1mg/ml之间,更优选地介于100ng/ml与100mcg/ml之间,例如介于1mcg/ml与100mcg/ml之间。该浓度优选地是至少1ng/ml以确保蛋白质在被给予个体时的浓度足以发挥其治疗效应。然而,该浓度应优选地不超过10mg/ml,以防止或减少与将所述蛋白质给予受试者相关的可能副作用的发生。

[0038] 编码疫苗中的免疫原的核酸可以是RNA、DNA或RNA、DNA的类似物。核酸分子可与病毒蛋白质(通常例如病毒衣壳)结合,以用于将该核酸分子有效递送到细胞。

[0039] 疫苗与CD95/NKG2A/B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的组合可存在于一个配方中,一起给予受试者。在一个实施例中,本发明因此提供药物组合物,该药物组合物包括疫苗和CD94/NKG2A/B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分,其中所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。药物组合物优选地包括佐剂和/或一或多种适宜赋形剂,例如稳定剂、缓冲液、盐等。在优选实施例中,药物组合物中的免疫原是肿瘤抗原。

[0040] 在优选实施例中,疫苗和抗体是在分开的容器中并且分开给予受试者。疫苗和抗体可在基本上相同的时间或依序被给予。抗体优选地在疫苗之前或在基本上相同的时间被给予。为此,本发明进一步提供多部分的试剂盒,所述部分包括疫苗组合物和包含CD94/NKG2A/B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的组合物,其中所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。在疫苗组合物组合物的情况下,组合物可进一步包括佐剂。两种组合物可进一步包括一或多种适宜赋形剂,例如稳定剂、缓冲液、盐等。

[0041] 待处理的受试者优选地是人类受试者。

[0042] 治疗优选地包括癌症治疗。在这个实施例中,疫苗优选地是癌症疫苗。在这个实施例中,免疫原优选地是肿瘤抗原,优选地是肿瘤特异性抗原。

[0043] 肿瘤抗原是肿瘤细胞中产生的抗原性物质。包括肿瘤的宿主可引发针对抗原的免疫应答,或抗原可在优选地借助本发明方法对宿主进行疫苗接种后具有免疫原性。肿瘤抗原是可用于用诊断性测试鉴别肿瘤细胞的肿瘤标记物并且用于癌症疗法中。从发现第一种肿瘤抗原起,已鉴别许多不同的其他抗原。已鉴别可使肿瘤细胞产生肿瘤抗原的若干种机制。身体中的正常蛋白质通常(但并非必须)由于自身耐受性而不具有抗原性,自身耐受性是这样一个过程,其中在初级淋巴组织(BM)中“中心地”和在次级淋巴组织(对于T细胞主要是胸腺,对于B细胞主要是脾/淋巴结)中“外周地”剔除自身反应性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和产生自身抗体的B淋巴细胞。因此,任何不暴露于免疫系统的蛋白质触发免疫应答。这可包含与免疫系统充分隔离的正常蛋白质,以极少量正常产生的蛋白质,仅在某些发育阶段正常产生的蛋白质,或结构由于突变、不同加工、不同折叠等而被修改的蛋白质。

[0044] 肿瘤抗原可基于其表达模式大概归类为两个种类:肿瘤特异性抗原(TSA),其在受试者患有肿瘤时仅存在于该受试者中的肿瘤细胞上且不存在于任何其他细胞上;以及肿瘤相关抗原(TAA),其存在于肿瘤细胞以及还有一些正常细胞上。在不同于患有肿瘤时的时间,肿瘤特异性抗原可(已)在受试者中表达。例如,一些肿瘤特异性抗原在胚胎发生期间表达。目前识别多个类别的肿瘤抗原。突变癌基因和肿瘤抑制基因的产物;其他突变基因过表达或异常表达细胞蛋白质的产物;致癌病毒产生的肿瘤抗原;癌胚胎抗原;被改变的细胞表

面糖脂和糖蛋白；细胞类型特异性分化抗原。这个列表并非旨在是限制性的。

[0045] 肿瘤细胞中产生的由于突变、不同翻译后修饰、折叠等而具有异常结构的任何蛋白质可用作肿瘤抗原。这些异常蛋白质可因有关基因的突变或不同产生量或不同加工而产生。导致异常蛋白质产生的原癌基因和肿瘤抑制基因的突变可为肿瘤的病因，并且此类异常蛋白质称为肿瘤特异性抗原。肿瘤特异性抗原的实例包含ras和p53基因的异常产物。其他实例包含组织分化抗原、突变体蛋白质抗原、致癌病毒抗原、癌-睾丸抗原和血管或间质特异性抗原。组织分化抗原是对某一类型的组织具有特异性的抗原。突变体蛋白质抗原可能对癌细胞特异性更高，因为正常细胞应该不含有这些蛋白质。正常细胞将在其MHC分子上显示正常蛋白质抗原，而癌细胞将显示突变体形式。一些病毒蛋白质涉及到形成癌症(肿瘤形成)中，并且一些病毒抗原也是癌症抗原。癌-睾丸抗原是主要在睾丸生殖细胞中而且也在胎儿卵巢和滋养层中表达的抗原。一些癌细胞异常地表达这些蛋白质并且因此呈递这些抗原，从而允许对这些抗原具有特异性的T细胞的攻击。此类型的实例抗原是CTAG1B和MAGEA1。

[0046] 正常产生量极低但其产量在肿瘤细胞中显著增加的蛋白质触发免疫应答。这种蛋白质的实例是产生黑色素所需的酶酪氨酸酶。通常酪氨酸酶以微小量产生，但其水平在黑色素瘤细胞中非常多地升高。

[0047] 癌胚抗原是肿瘤抗原的另一重要类别。实例是甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA)。这些蛋白质通常在胚胎发育早期产生并且在免疫系统完全发育好时消失。因此不会产生针对这些抗原的自身耐受性。

[0048] 被致癌病毒感染和转化的细胞也产生异常蛋白质，例如EBV、HBV、HCV和HPV。被这些病毒感染的细胞含有病毒RNA和/或DNA，所述病毒RNA和/或DNA被转录并且所得的蛋白质产生免疫应答。

[0049] 在肿瘤细胞中，除了蛋白质以外，其他物质(如细胞表面糖脂和糖蛋白)也可具有异常结构，并且因此可作为免疫系统的靶标。

[0050] 肿瘤抗原和其在用于治疗癌症的疫苗中的使用尤其综述于梅利夫(Melief)等人(临床研究杂志(J. of Clinical Investigation) 2015; 第9卷: 第3401-3412页)和拉宾(Lampen)和万豪(van Hall)(免疫学新见(Current opinion in Immunology)) 2011; 第23卷: 第293-298页)中。制备和使用肿瘤抗原的所述方式和方法通过引用包含于本文中。

[0051] 在一个实施例中，疫苗包括包含免疫原的细胞。在优选实施例中，细胞包括肿瘤抗原，优选地肿瘤特异性抗原。在一个实施例中，疫苗包括肿瘤细胞。疫苗中的细胞可为活细胞，然而，更通常地，细胞在并入疫苗中之前或在给予受试者之前被灭活。细胞有多种灭活方法，例如但不限于甲醛或辐照。

[0052] 在肿瘤疫苗接种情况中发现，在提供疫苗后，肿瘤中表达CD94/NKG2A的细胞数增加。表达C94/NKG2A的NK细胞数增加。具体来说，表达CD94/NKG2A的T细胞数增加。发现表达CD94/NKG2A的T细胞的大部分不表达CTLA4、PD-1或TIM3。发现肿瘤中的NKG2A配体Qa-1的表达水平在疫苗接种后增加。在优选实施例中，疫苗与CD94/NKG2A结合抗体的组合进一步包括至少一种选自以下各项的抗体：CTLA4结合抗体、PD-1结合抗体、PD-L1结合抗体；LAG-3结合抗体；VISTA抗体和TIM3结合抗体或所述抗体的抗原结合部分。抗体或其抗原结合部分优选地抑制CTLA4、PD-1、PD-L1、LAG、VISTA和/或TIM3的信号传导。本领域中已知多种CTLA4、

PD-1、PD-L1、LAG、VISTA和/或TIM3信号传导抑制性抗体。在优选实施例中，疫苗与CD94/NKG2A结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的组合进一步包括至少一种选自以下各项的抗体：CTLA4结合抗体、PD-1结合抗体和TIM3结合抗体或所述结合抗体的抗原结合部分。与此类抗体或所述抗体的抗原结合部分中的一或多者以及如本文中所述的CD94/NKG2A/B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分相组合，展现改进的效应。不受限于理论，人们认为，这是由于大量不显著表达CTLA4、PD-1或TIM3的表达CD94/NKG2A/B的T细胞所致。

[0053] 受试者可为被病原体感染的受试者。受试者还尤其可为患有癌症的受试者。在优选实施例中，受试者是癌症患者。受试者的癌症优选为实体癌。癌症优选为卵巢癌、头颈癌、黑色素瘤、子宫颈癌、胰腺癌、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、病毒诱导的癌或结肠直肠癌。此癌症包含原发性肿瘤和/或所述癌症的转移或早期增生。病毒诱导的癌尤其包括由人乳头瘤病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和艾伯斯坦-巴尔病毒(Epstein barr virus) (分别为HPV、HBV、HCV、EBV) 诱导的癌。

[0054] 本发明进一步提供CD94/NKG2A/B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分和免疫原用于产生含有移植用细胞产物的免疫细胞的用途。本发明还提供用于制备含有细胞产物的免疫细胞的方法，该方法包括在免疫原和CD94/NKG2A/B抗体或所述抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分存在下培养包括T细胞和/或NK细胞的细胞集合，该方法进一步包括在所述培养后收集T细胞和/或NK细胞。免疫细胞可在体外在T细胞和/或NK细胞连同抗原呈递细胞和免疫原一起的培养物中产生。免疫原可照原样提供。免疫原的抗原将由抗原呈递细胞来呈递。在优选实施例中，培养物包括癌细胞或癌细胞的包括免疫原的部分。适宜的免疫细胞产生方法尤其阐述于以下文件和所述文件中的参考文献中：开发用于癌症的过继T细胞疗法的治疗潜力(Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer.) 欣里希斯CS(Hinrichs CS)、罗森堡SA.(Rosenberg SA.) 免疫学评论(Immunol Rev.) 2014年1月;257(1):56-71.doi:10.1111/imr.12132;过继细胞转移：通往有效癌症免疫疗法的临床途径(Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy). 罗森堡SA、瑞斯帝佛NP(Restifo NP)、杨JC(Yang JC)、摩根RA(Morgan RA)、达得利ME(Dudley ME). 癌症自然评论(Nat Rev Cancer). 2008年4月;8(4):299-308.doi:10.1038/nrc2355;同种反应性自然杀伤细胞的临床产生和治疗性应用(Clinical production and therapeutic applications of alloreactive natural killer cells). 麦克纳DH(McKenna DH)、卡迪德洛DM(Kadidlo DM)、库利S(Cooley S)、米勒JS(Miller JS). 分子生物学方法(Methods Mol Biol.) 2012; 882:491-507.doi:10.1007/978-1-61779-842-9_28。

[0055] 本发明还提供在受试者中刺激免疫应答的方法，该方法包括将疫苗和CD94/NKG2A/B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分给予对其有需要的受试者，其中所述疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。疫苗和CD94/NKG2A/B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分是基本上同时提供/给予。

[0056] 本发明进一步提供免疫细胞移植与CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合抗体或所述结合抗体的CD94/NKG2A和/或CD94/NKG2B结合部分的组合，该组合用于在治疗对其有需

要的受试者中使用。该组合优选地进一步包括疫苗,该疫苗包括用于引发针对抗原的免疫应答的免疫原或编码所述免疫原的核酸分子。免疫细胞移植物优选为如上文所述的含有细胞产物的免疫细胞。免疫细胞移植物目前主要用于治疗患有癌症的受试者。免疫细胞移植物可包括包含T细胞和/或NK细胞的细胞集合。用于制备T细胞移植物以及用这些T细胞移植物治疗受试者的方式和方法尤其描述于罗森堡和瑞斯帝佛(2015;科学(Science)第348卷:第62-68页)中。将这篇参考文献和其中引用的参考文献通过引用并入本文中。免疫细胞移植物中的细胞优选为肿瘤反应性淋巴细胞,优选为CD8⁺ T细胞。这些细胞可自然地具有肿瘤反应性或通过遗传修饰而具有(额外)肿瘤反应性。该修饰通常涉及肿瘤特异性T细胞受体或所谓的嵌合抗原受体(CAR)的异源性表达,如例如上文中引用的罗森堡-瑞斯帝佛参考文献中所述。免疫细胞移植物也称为过继细胞疗法。本发明中的过继细胞疗法优选地用于癌症治疗中。优选地用于黑色素瘤、病毒诱导的癌、卵巢癌、肺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、胆管癌和神经母细胞瘤的治疗中。

附图说明

[0057] 图1. 在VIN病灶中,NKG2A与较佳临床结果相关。

[0058] A. CD3(红色)和NKG2A(绿色)的免疫荧光组织切片染色。在VIN病灶中可视化CD8⁺ T细胞和NK细胞上的NKG2A表达。

[0059] B. 通过组织切片染色测定NKG2A⁺ T细胞数并除以总T细胞(CD3⁺ NKG2A⁻)数。这个比率在这个VIN患者群组中对于无复发存活时间具有预后价值。恶性肿瘤中T细胞上抑制性受体的表达具有预后价值并且显现指示局部T细胞的活化状态。

[0060] 图2. 来自头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD8⁺ T细胞上的NKG2A表达。

[0061] A. 健康受试者血液中表达CD94和NKG2A的CD8⁺ T细胞的频率为5%左右。这个频率非常高于HNSCC样品的TIL中的频率。

[0062] B. 8色染色图的流式细胞术图,其被设计为测定淋巴细胞亚组上的抑制性受体共表达谱。CD94⁺ NKG2A⁺ CD8⁺ T细胞是分析其他抑制性受体TIM-3和PD-1的表达的其他闸门。抑制性受体在淋巴细胞上嵌合式表达,产生若干个具有增加的受体数的不同亚组。

[0063] C. 来自图B.的数据呈现指示HNSCC患者样品的TIL(右侧饼图)或健康受试者的PBMC(左侧饼图)中不表达抑制性受体、表达单一抑制性受体或表达多种抑制性受体的CD8⁺ T细胞的频率。这些癌症中约30%的NKG2A⁺ CD8⁺ T细胞不共表达TIM-3、PD-1或CTLA-4。

[0064] 图3. NKG2A和Qa-1(=小鼠HLA-E)在免疫疗法后显著增加。

[0065] A. B16F10黑色素瘤的治疗方案。注入具有针对gp100的转基因TCR的肿瘤特异性pme1 T细胞并通过用合成长肽进行两次疫苗接种来在体内活化。

[0066] B. 显示荷瘤小鼠的未治疗组和免疫疗法治疗组的肿瘤生长曲线和存活曲线。

[0067] C. B16F10黑色素瘤细胞上Qa-1(=小鼠HLA-E)的表达水平,这些B16F10黑色素瘤细胞是从小鼠移除、经过分散并染色用于流式细胞术。免疫疗法使Qa-1的水平显著增加。

[0068] D. 针对抑制性受体CD94/NKG2A的表达,肿瘤内CD8⁺ T细胞(CTL)和NK细胞的流式细胞术。一起取脾源淋巴细胞作为对照染色。在小鼠已用免疫疗法治疗时,平均60%的CTL表达抑制性受体。在生长到最大尺寸后,移除肿瘤。

- [0069] 图4.NKG2A和Qa-1(=小鼠HLA-E)在免疫疗法后显著增加。
- [0070] A. HPV诱导的TC-1癌的治疗方案。用矿物油中的包括合成长肽的HPV对荷瘤小鼠进行一次疫苗接种。
- [0071] B. 显示荷瘤小鼠的未治疗组和免疫疗法治疗组的肿瘤生长曲线和存活曲线。
- [0072] C. TC-1癌细胞上的Qa-1(=小鼠HLA-E)的表达水平,这些TC-1癌细胞是从小鼠移除、经过分散并染色用于流式细胞术。免疫疗法使Qa-1的水平显著增加。
- [0073] D. 图C中所示数据的量化。绘示平均荧光值和该平均值的标准误差。
- [0074] E. 针对抑制性受体CD94/NKG2A的表达,肿瘤内CD8⁺ T细胞(CTL)和NK细胞的流式细胞术。一起取脾源淋巴细胞作为对照染色。在小鼠已用免疫疗法治疗时,平均75%的CTL表达抑制性受体。在肿瘤接种的第19天移除肿瘤。
- [0075] F. 图E中所示数据的量化。所有CTL细胞和所有NK细胞中NKG2A⁺细胞的频率。
- [0076] G. CTL上的NKG2A的表达与肿瘤特异性相关,如用HPV16E7-四聚体(HPV_{TM})所测量。
- [0077] H. 用合成长肽进行治疗性疫苗接种将CTL和NK细胞募集到肿瘤位点。
- [0078] 图5. 阻断CD8⁺ T细胞克隆上的抑制性受体NKG2A增加体外反应性。
- [0079] A. 实验设置将抗原特异性CD8⁺ T细胞克隆与抗NKG2A抗体(20d5用于小鼠;Z199用于人类)一起孵育并与表达高水平CD94/NKG2A配体的载肽抗原呈递细胞(LPS母细胞用于小鼠;B-LCL细胞用于人类)一起孵育。在20h孵育时间后测量反应性(IFN γ 释放针对小鼠;CD137显示针对人类)。
- [0080] B. 小鼠CD8⁺ T细胞克隆一致地表达CD94和NKG2A链并将该细胞克隆在增加浓度的阻断性NKG2A抗体存在下与对照肽或同源刺激肽一起孵育。通过如在ELISA中所测定的IFN γ 释放测量T细胞反应性。显著增加的CTL反应性可通过阻断NKG2A观察到。
- [0081] C. 人类CD8⁺ T细胞克隆显示CD94和NKG2A的不均匀表达。将这个混合群体与载肽B-LCL细胞一起孵育并且在流式细胞术中通过诱导细胞表面的CD137(4-1BB)测量基于逐个细胞的CTL反应性。可通过阻断抗体,但并非NKG2A阴性CTL来增强表达NKG2A的CTL的反应性。
- [0082] 图6: 在肺腺癌中肿瘤浸润性CD8⁺ T细胞、 β 2-微球蛋白、HLA-A、HLA-B/C和HLA-E的染色。
- [0083] 高(A)和低(B)间质和上皮内CD8⁺ T细胞浸润的实例;
- [0084] 具有高 β 2-微球蛋白表达的肿瘤(C);HLA-A(D)、HLA-B/C(E)和HLA-E(F)染色的实例。原始放大倍数x200。
- [0085] 图7. CD8⁺ T细胞浸润和HLA表达与OS的关联。
- [0086] 具有低或高上皮内CD8⁺ T细胞的患者的存活曲线(A);间质CD8⁺ T细胞(B)和总CD8⁺ T细胞(C)
- [0087] 呈现HLA-A(D)、HLA-B/C(E)和HLA-E(F)的功能性(即对于HLA和 β 2-M二者阳性染色)表达的存活曲线。观察到低HLA-E表达与改善的存活之间的显著相关($p=0.042$)(F)。
- [0088] 图8. 经典HLA I类表达和CD8⁺ T细胞浸润对OS的效应。
- [0089] (A、B)在HLA-A表达情况下的总CD8⁺ T细胞浸润不具有预后影响。
- [0090] (C、D)具有高总CD8⁺ T细胞浸润的HLA-B/C阳性肿瘤显示较佳OS(D),而在具有低HLA-B/C表达的肿瘤中未观察到这种效应(C)。

[0091] (E、F) 在高总CD8⁺ T细胞浸润存在时,对于具有HLA-A和HLA-B/C二者的高表达的肿瘤确立改善的OS (F),而相反地,在HLA-A和HLA-B/C表达低的肿瘤中未见到这种效应 (E)。

[0092] 图9.在具有高CD8⁺ T细胞浸润的HLA-E阴性肿瘤中的预后益处。

[0093] (A、B) 在具有低HLA-E表达的肿瘤中,高间质CD8⁺ T细胞浸润与较佳OS显著相关 (A)。有趣的是,高间质CD8⁺ T细胞浸润物的临床益处被高HLA-E表达中和 (B)。

[0094] (C、D) 相反地,在具有高间质CD8⁺ T细胞流入的患者中,高HLA-E表达导致较差OS (C)。在具有间质CD8⁺ T细胞的低存在的患者中,HLA-E表达对OS无效应 (D)。

[0095] 图10.间质CD8⁺ T细胞的基于三分位的分组和对OS的影响。

[0096] 间质CD8⁺ T细胞浸润作为单一决定因素对临床结果具有积极影响,但几乎没有统计学显著性 (图7B,对数秩检验 $p=0.068$)。然而,在将CD8⁺ T细胞计数/mm²肿瘤基于三分位而不是平均值来二分,对于具有原发性肿瘤中的间质CD8⁺ T细胞的高 (即分类在中和高三分位中) 存在的患者,观察到显著效应 (对数秩检验 $p=0.046$)。

[0097] 图11.HLA表达和该HLA表达与原发性肿瘤中总CD8⁺ T细胞浸润的关系。

[0098] 在高CD8⁺ T细胞数与经典HLA-A以及HLA-B/C之间存在显著关联 (曼-惠特尼U检验 (Mann-Whitney U test), $p<0.05$),但高CD8⁺ T细胞数与非经典HLA-E之间不存在显著关联。

[0099] 实例

[0100] 实例1

[0101] 材料和方法

[0102] 肿瘤浸润性淋巴细胞的流式细胞术

[0103] 将最初切除的人类肿瘤切碎并用温和MACS消化。用IL-2将肿瘤浸润性淋巴细胞扩增7天,之后通过流式细胞术进行免疫分型。使用以下抗人类抗体:抗CD3 (DAKO; 克隆UCHT1)、抗CD4 (BD; 克隆RPA-T4)、抗CD8 (BD; SK1)、抗CD56 (BD; 克隆B159)、抗CD94 (R&D系统 (R&D systems); 克隆131412)、抗NKG2A (贝克曼库尔特 (Beckman Coulter); 克隆z199)、抗CTLA-4 (BD; 克隆BN13)、抗PD1 (百进生物科技 (Biolegend); 克隆EH12.2H7)、抗TIM3 (百进生物科技; 克隆F38-2E2)、抗CD69 (BD; 克隆L78) 和抗CD137 (BD; 4B4-1)。用福特萨 (Fortessa) 流式细胞仪 (BD生物科技 (BD Biosciences)) 采集样品并用FlowJo软件 (树星 (TreeStar)) 分析。将来自FlowJo软件的多参数流式细胞术数据输入SPICE软件中以供多变量分析 (路易侯德 (Roederer) 2011细胞计量术A (Cytometry A))。

[0104] 在肿瘤超过1000mm³时 (B16黑色素瘤) 以及肿瘤激发后第19天 (TC-1) 从原发性肿瘤分离小鼠肿瘤细胞和浸润淋巴细胞。在消化前冲洗TC-1肿瘤。随后,将切除的肿瘤切碎并使用释放酶 (Liberase) (罗氏 (Roche)) 消化。在红血细胞溶解后获得脾细胞。在Fc阻断剂 (BD; 克隆2.4g2) 后使用以下荧光标记的抗体将表面抗原染色:抗CD45.2 (百进生物科技; 克隆104)、抗CD3 (百进生物科技; 克隆145-2C11)、抗CD4 (亿生物科技 (eBioscience); 克隆GK1.5)、抗CD8 (亿生物科技; 克隆53-6.7)、抗NK1.1 (百进生物科技; 克隆PK136)、抗CD94 (亿生物科技; 克隆18D3)、抗NKG2A/C/E (BD; 克隆20D5)、抗NKG2A (百进生物科技; 克隆16A11) 和抗Qa1 (BD; 克隆6A8.6F10.1A6)。含有来自HPV16E7 (aa49-57) 的免疫显性肽的MHC-I-四聚体是在内部产生。用福特萨 (Fortessa) 流式细胞仪 (BD生物科技 (BD Biosciences)) 采集样品并用FlowJo软件 (树星 (TreeStar)) 分析。

[0105] NKG2A阻断分析

[0106] 对于阻断人类免疫细胞上的NKG2A受体,使用磁性活化细胞分选,使用PE标记的含有M1源肽GILGFVFTF的HLA-A2四聚体,从HLA-A2阳性供体分离流感M1特异性CD8⁺T细胞。如先前所述在体外扩增这些流感特异性CD8系(可在病毒清除后很久检测流感基质1特异性人类CD4⁺FOXP3⁺和FOXP3(-)调节性T细胞(Influenza matrix 1-specific human CD4⁺FOXP3⁺ and FOXP3(-)regulatory T cells can be detected long after viral clearance)。皮尔斯玛SJ (Piersma SJ)、范德许尔斯特JM (van der Hulst JM)、万鹏博格KM (Kwappenberg KM)、古德曼R (Goedemans R)、范德敏纳CE (van der Minne CE)、范德伯格SH (van der Burg SH)。欧洲免疫学杂志 (Eur J Immunol)。2010年11月;40 (11):3064-74。doi:10.1002/eji.200940177)。对于NKG2A阻断实验,将100,000个M1特异性CD8⁺T细胞与10,000个HLA-A2⁺B-LCL以及增加浓度的z199抗体(贝克曼库尔特)共培养。在预孵育2小时后,添加M1肽并且共孵育过夜。随后,用荧光标记抗体将细胞染色,通过流式细胞术测量并分析作为T细胞活化的标记物的CD137的表达。

[0107] 对于阻断小鼠免疫细胞上的NKG2A受体,如先前所述培养对Trh4抗原具有特异性的CTL克隆(肽转运蛋白TAP在竞争性抗原来源之间介导,生成独特的表面MHC I类肽谱 (Peptide transporter TAP mediates between competing antigen sources generating distinct surface MHC class I peptide repertoires)。奥利弗拉CC (Oliveira CC)、奎尔里多B (Querido B)、斯鲁伊特M (Sluijter M)、德宾斯基J (Derbinski J)、范德伯格SH、万豪T。欧洲免疫学杂志。2011年11月;41 (11):3114-24。doi:10.1002/eji.201141836)。对于抗体阻断,用20D5杂交瘤上清液将2,000个CTL/孔预处理1小时,之后添加5,000个细胞/孔的载肽LPS母细胞作为靶细胞。在孵育24小时后收集培养上清液。如先前所述对培养上清液进行IFN- γ ELISA (肽转运蛋白TAP在竞争性抗原来源之间介导,生成独特的表面MHC I类肽谱。奥利弗拉CC、奎尔里多B、斯鲁伊特M、德宾斯基J、范德伯格SH、万豪T。欧洲免疫学杂志。2011年11月;41 (11):3114-24。doi:10.1002/eji.201141836)。所示数据代表从一式三份测试孔获得的平均值,并且误差棒代表这些值的标准偏差。

[0108] 小鼠、细胞系和试剂

[0109] C57BL/6jico小鼠购自查尔斯河(Charles River)(里尔,法国)并在8周龄使用。Pmel-1TCR转基因小鼠(Thy1.1背景)具有gp100₂₅₋₃₃/D^b特异性受体,所述转基因小鼠繁殖并饲养于莱顿大学医学中心(Leiden University Medical Center)的动物设施中的特殊无病原体条件下。实验由当地大学的实验动物照护委员会(动物实验委员会(Dier Experimenten Commissie))根据国立卫生研究院(National Institutes of Health)的准则来批准。B16F10黑色素瘤细胞系最初是从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)获得并维持在组织培养中,如在(T细胞转移后的肽疫苗接种引起大量克隆扩增、肿瘤根除和可管理细胞因子风暴 (Peptide vaccination after T-cell transfer causes massive clonal expansion, tumor eradication, and manageable cytokine storm)李LV (Ly LV)、斯鲁伊特M、维斯鲁斯M (Versluis M)、卢伊滕GP (Luyten GP)、范思迪东MJ (van Stipdonk MJ)、范德伯格SH、梅利夫CJ、亚赫MJ (Jager MJ)、万豪T。癌症研究。2010年11月1日;70 (21):8339-46。doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2288)中所述。TC-1癌细胞系含有HPV16E6和E7癌基因并且是从TC吴(TC Wu)(约翰霍普金斯医学院

(Johns Hopkins Medical Institute), 巴尔的摩, 美国) 获得。

[0110] 肿瘤模型

[0111] B16F10黑色素瘤模型。在同系C57BL/6小鼠中皮下注射致死剂量的 3×10^4 个B16F10黑色素瘤细胞。应用预先确立的用于转移pmel-1 T细胞和用20-mer长gp100肽疫苗接种的方案(T细胞转移后的肽疫苗接种引起大量克隆扩增、肿瘤根除和可管理细胞因子风暴。李LV、斯鲁伊特M、维斯鲁斯M、卢伊滕GP、范思迪东MJ、范德伯格SH、梅利夫CJ、亚赫MJ、万豪T. 癌症研究. 2010年11月1日; 70 (21) : 8339-46. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2288)。HPV16阳性TC-1模型。在同系C57BL/6小鼠中皮下注射(1×10^5)肿瘤细胞。如先前所述在肿瘤接种后第8天用在IFA中乳化的长合成肽进行疫苗接种(疫苗诱导的效应-记忆 $CD8^+$ T细胞反应预示针对癌症的治疗效力(Vaccine-induced effector-memory $CD8^+$ T cell responses predict therapeutic efficacy against tumors)。范德奎德S(van Duikeren S)、弗朗森MF(Fransen MF)、雷德克A(Redeker A)、魏莱兹B(Wieles B)、裴勒滕伯格G(Platenburg G)、克雷伯WJ(Krebber WJ)、奥森道F(Ossendorp F)、梅利夫CJ、阿伦斯R(Arens R)。免疫学杂志(J Immunol)。2012年10月1日; 189 (7) : 3397-403)。仅应用一次疫苗接种。一周两次通过用测径器测量三维来监测肿瘤生长。

[0112] 结果与讨论

[0113] 抑制性受体CD94/NKG2A作为活化T细胞的标记物。

[0114] 首先, 认为通过T细胞表达抑制性受体(包含PD-1和TIM-3)可鉴别功能上‘耗竭的’T细胞。然而, 这个概念已被研究驳倒, 这些研究显示, 这些抑制性标记物主要在活化CTL上表达, 作为正常免疫调节的一部分(格罗斯A(Gros A)、罗宾斯PF(Robbins PF)、姚X(Yao X)、李YF(Li YF)、特科特S(Turcotte S)、陈E(Tran E)、文德利希JR(Wunderlich JR)、米克松A(Mixon A)、法里德S(Farid S)、达德利ME等人: PD-1鉴别浸润人类肿瘤的患者特异性 $CD8^+$ 肿瘤反应性谱(PD-1 identifies the patient-specific $CD8^+$ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors)。临床研究杂志(J Clin Invest)。2014; 雷加A(Legat A)、斯百瑟DE(Speiser DE)、佩切H(Pircher H)、希恩D(Zehn D)、福爱尔兰克斯马拉克SA(Fuertes Marraco SA): 抑制性受体表达比人类 $CD8^+$ T细胞的‘耗竭’更主要依赖于分化和活化(Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than ‘Exhaustion’ of Human $CD8^+$ T Cells)免疫学前沿(Front Immunol.)第4卷; 2013: 455)。因此活化T细胞上的抑制性受体不局限于慢性刺激的情况, 但只反映抗原经历的状态。这些受体甚至可用于富集有效肿瘤特异性CTL以供顺利进行过继性T细胞疗法(伊诺祖T(Inozume T)、花田K-I(Hanada K-I)、王QJ(Wang QJ)、艾哈迈德扎德M(Ahmadzadeh M)、文德利希JR、罗森堡SA、杨JC: 在新鲜人类黑色素瘤中选择 $CD8^+$ PD-1⁺淋巴细胞富集肿瘤反应性T细胞(Selection of $CD8^+$ PD-1⁺ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells)。免疫治疗杂志(J Immunother.)第33卷; 2010: 956-964)。已显示NKG2A在TCR接合后变得在CTL上表达(贾布尔B(Jabri B)、谢尔比JM(Selby JM)、尼古莱耶斯库H(Negulescu H)、李L(Lee L)、罗伯茨AI(Roberts AI)、比维斯A(Beavis A)、洛佩斯-波特M(Lopez-Botet M)、埃伯特EC(Ebert EC)、温彻斯特RJ(Winchester RJ): TCR特异性指示人类CTL的CD94/NKG2A表达(TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL)。免疫力。第17卷; 2002:

487-499), 强调这种受体是真实CTL的正常调节反馈机制的一部分。已在43个VIN病灶中通过免疫荧光使用针对CD3⁺的抗体(抗CD3, 兔, 克隆ab828; 艾博抗(Abcam) 1:100)和针对NKG2A的抗体(抗NKG2A, 山羊, 克隆N19; 圣克鲁斯(Santa Cruz) 1:50)测定NKG2A⁺T细胞的浸润(图1A)。在这些恶性肿瘤中观察到NKG2A⁺T细胞的显著上皮内和间质浸润。重要的是, 作为所有浸润T细胞的一部分的NKG2A⁺T细胞的枚举揭露与临床结果的关联。对于那些具有较高NKG2A⁺T细胞频率的病灶, 观察到延长的无复发存活时间, 支持这种抑制性受体反映活化T细胞的见解(图1B)。TIM-3表达的测定得到极为相当的特征(未显示)。因此, NKG2A绝对是在活化T细胞上发现的抑制性受体家族的严格成员并且NKG2A可被阻断抗体靶向以释放肿瘤反应性T细胞的全部能力。

[0115] 随后, 分析包含NKG2A在内的抑制性受体在肿瘤浸润性淋巴细胞上的分布。9个抗体和活/死标记物的流式细胞术组被设计为在口咽癌的14-21天TIL培养物中测定表达共抑制性受体的组合特征的CD8⁺T细胞亚组的频率。抑制性受体NKG2A的表达在5%-60%(平均25%)的肿瘤内CD8⁺T细胞的范围内, 而血液频率很少超过5%(图2A)。所有这些淋巴细胞都共表达配偶体CD94以得到功能性受体。这些频率与在子宫颈癌中的先前研究中发现的频率十分相当(古登MJM(Gooden MJM)、拉宾M、卓达诺瓦ES(Jordanova ES)、莱佛士N(Leffers N)、特里伯斯JB(Trimbos JB)、范德伯格SH、尼曼H(Nijman H)、万豪T(van Hall T): 妇科癌症的HLA-E表达限制肿瘤浸润性CD8⁺T淋巴细胞(HLA-E expression by gynecological cancers restrains tumor-infiltrating CD8⁺T lymphocytes). 美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A.) 第108卷; 2011:10656-10661)。多色流式细胞术分析揭露, 在NKG2A⁺CD8⁺T细胞群内, 约35%不表达抑制性受体CTLA-4、PD-1或TIM3(图2B和C), 表明这些细胞可仅被NKG2A的检查点(而不是所测试的其他已知免疫检查点)阻断所靶向。当然, 已显示检查点阻断剂的组合最可能由于补偿机制而介导出色的临床效应(科林MA(Curran MA)、蒙塔尔沃W(Montalvo W)、尤吉塔H(Yagita H)、艾莉森JP(Allison JP): 在B16黑色素瘤内PD-1和CTLA-4组合阻断扩增浸润T细胞并减少调节性T细胞和骨髓细胞(PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors), 美国国家科学院院刊. 第107卷; 2010:4275-4280。沃尔彻克JD(Wolchok JD)、克吕热H(Kluger H)、卡拉汉MK(Callahan MK)、博斯特MA(Postow MA)、里兹维NA(Rizvi NA)、耶瑟森AM(Lesokhin AM)、西格尔NH(Segal NH)、阿里扬CE(Ariyan CE)、戈登R-A(Gordon R-A)、里德K(Reed K)等人: 晚期黑色素瘤中的尼沃鲁单抗加伊匹单抗(Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma). 新英格兰医学杂志(N Engl J Med). 第369卷; 2013:122-133)。因此, 对TIL亚组的初步数据分析把NKG2A-HLA-E轴描述为抗肿瘤免疫力的主要负调节剂并且是肿瘤学临床产生NKG2A阻断抗体的基础。

[0116] 在不同小鼠肿瘤模型中, HLA-E和NKG2A⁺T细胞在免疫疗法后显著增加。

[0117] 免疫疗法在我们部门中的临床应用面向于HPV诱导的癌症子宫颈癌和口咽癌以及转移性黑色素瘤。HPV诱导的癌症(TC-1)和黑色素瘤(B16F10)的小鼠模型已在这些临床举措的研发中起作用。现在在两种小鼠模型中研究CD94/NKG2A在T细胞免疫力和治疗诱导的肿瘤控制中的作用。用TCR转基因pme1 T细胞的过继性转移治疗已建立的B16F10黑色素瘤, 所述TCR转基因pme1 T细胞随后在体内通过肽疫苗接种活化(图3A、B)。这个方案在一些动

物中得到完全肿瘤控制,并且在其他动物中使肿瘤生长显著延迟。Qa-1(小鼠HLA-E同系物)在体外培养的B16F10细胞和来自体内生长肿瘤的B16F10细胞上的表达几乎无法检测(图3C),而来自用免疫疗法治疗的小鼠的肿瘤细胞显示显著提高的Qa-1水平。这指示,免疫活化导致Qa-1上调,与针对PD-L1所发现的十分相似。这些抑制性配体的增加最可能由IFN γ 作为负反馈的方式介导,以保护免疫病理学组织。在完全相同的肿瘤中,分析NKG2A和CD94在浸润CTL上的表达。未治疗的对照肿瘤含有10%-20%之间的NKG2A⁺CD8⁺T细胞(图3D),这个百分比在如在人类癌症中发现的范围内。然而,免疫疗法将这个频率显著增加到高达65%。NKG2A⁺NK细胞的频率未被免疫疗法改变,但已高于50%。值得注意,这些染色是用熟知的也检测NKG2家族的其他家族成员的‘20d5’抗体进行,但是用对NKG2A特异性更强的抗体16A11来确认。

[0118] 在HPV诱导的TC1肿瘤模型中获得非常相当的数据,其中用合成长肽进行的疫苗接种是作为免疫疗法形式来应用(图4)。TC1肿瘤细胞表面上Qa-1的水平通过免疫疗法显著增加,并且NKG2A⁺T细胞的频率在这个模型中也显著增加(图4A-F)。治疗性疫苗接种不仅增加肿瘤浸润性CD8⁺T细胞数,还使大多数肿瘤浸润性CD8⁺T细胞上的NKG2A表达(图4F),指示局部免疫活化和促炎性细胞因子的释放在该NKG2A中触发抑制性反馈机制。在TC1肿瘤模型中另外观察到与旁活化的CD8⁺T细胞相比,肿瘤特异性CD8⁺T细胞诱导NKG2A的优先性,并且最后,该治疗性疫苗接种将大量NKG2A⁺NK细胞积极募集到肿瘤位点(图4G-H)。

[0119] 这些数据显示,B16F10和TC-1肿瘤模型非常适合于研究作为单一药剂或与若干种其他形式的(免疫)疗法组合的NKG2A阻断的免疫治疗潜力。这些来自小鼠模型的数据一起坚定地强调,尤其在强疫苗组合时,针对NKG2A的阻断抗体发动NK和CD8⁺T细胞的细胞毒力的巨大治疗潜力。

[0120] 阻断NKG2A受体在体外增强CTL功能

[0121] 作为阻断抑制性受体NKG2A是否确实会解除CD8⁺T细胞活化的中断的第一指示,选择具有已知特异性的小鼠和人类CTL克隆。将这些T细胞在体外在针对NKG2A的阻断抗体(20d5用于小鼠且Z199用于人类)存在或不存在的条件下与用于TCR介导的活化的载肽靶细胞一起孵育。用抗体20D5阻断NKG2A以剂量依赖性方式增加小鼠CTL反应性(图5A-B)。阻断抗体的最高浓度导致IFN γ 的三倍释放。类似地,将人类CTL克隆与同源肽和针对NKG2A的阻断抗体一起孵育导致反应性增加。有趣的是,人类CTL克隆未均一地表达CD94/NKG2A,并且在单细胞水平用流式细胞术对T细胞活化的测量显示,仅展示抑制性受体的CTL的反应性可在NKG2A被阻断时增强。此培养物内的NKG2A阴性T细胞亚组在这个系统中不受影响,证实抗体的中靶特异性(图5C)。因此,这些数据表明,NKG2A⁺CTL与NKG2A⁻CTL相比具有更高的活化潜力。

[0122] 实例2

[0123] 为研究在HLA-A、B和C以及HLA-E情况下CD8⁺肿瘤浸润性T细胞的预后价值和该预后价值与总体存活(OS)的关联,以追溯方式研究一组197名患有非小细胞肺癌(NSCLC)的患者。聚焦于肺腺癌不仅是因为它是NSCLC的主要组织学亚型(赫布斯特(Herbst)2008、阿尔伯格(Alberg)2005),还因为已报道相比在NSCLC的另一主要亚型即鳞状细胞癌中,肺腺癌中的HLA损失频率更低(巴巴(Baba)2013、花桐(Hanagiri)2013a、花桐2013b、菊池(Kikuchi)2007、克考罗婆罗(Korkolopoulou)1996),并且因此预期肺腺癌从活性T细胞介

导的免疫疗法中获益最多。我们的数据揭露,肿瘤细胞的HLA-E表达对于OS是独立预后因子。HLA-E的高表达中和了NSCLC中高间质CD8⁺ T细胞浸润的阳性预后价值。

[0124] 材料和方法

[0125] 研究群体

[0126] 在2000年与2013年之间,在莱顿大学医学中心(LUMC)以追溯方式鉴别197名被诊断患有非小细胞肺癌(NSCLC)腺癌亚型的患者。所有患者都经历术前分期并归类为I/II期NSCLC,并且随后经历使用系统性淋巴结清扫进行的原发性肿瘤的手术切除。在手术移除肿瘤和肿瘤引流淋巴结后,将患者视为无疾病。收集所有患者的肿瘤组织、临床数据和随访数据。NSCLC的分期是根据TNM(肿瘤、结节、转移)分类使用国际肺癌研究协会(International Association for the Study of Lung Cancer,IASLC)的最新准则来确定(田上(Tanoue)2009)。档案肿瘤块是根据荷兰医学研究协会联合会(Dutch Federation of Medical Research Association)的准则使用。因为这个追溯性研究不在人类主体的医学研究法案(Medical Research Involving Human Subjects Act,WMO)的范围内,该研究未由医学伦理委员会(Medical Ethical Committee)进行事前审查,并且未获得书面知情同意书。然而,患者数据是匿名的。

[0127] 抗体

[0128] 使用小鼠单克隆抗体HCA-2(抗HLA-A,1:1000)和HC-10(抗HLA B/C,1:500)检测HLA I类分子的游离重链的表达。分别使用兔抗人类 β 2-微球蛋白(抗 β 2M;克隆A-072,DAKO,1:2000)和小鼠抗人类HLA-E(克隆MEM-E/02;赛洛泰克(Serotec),德国[1:200])抗体来检测轻链和非经典HLA-E重链。使用小鼠单克隆CD8抗体(克隆IA5,徕卡生物系统(Leica Biosystems),德国[1:500])检测CD8⁺ T细胞。

[0129] 免疫化学

[0130] 使用切片将福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤块切成4 μ m切片并在二甲苯中去除石蜡。使用0.3%过氧化氢/甲醇将内源过氧化物酶活性阻断20分钟。随后将样品在70%和50%乙醇中再水化,并通过在柠檬酸盐缓冲液(pH 9.0或pH 6.0,DAKO,格洛斯楚普,丹麦)中将样品加热到97 $^{\circ}$ C持续10分钟进行抗原修复。将抗体在含有1%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS,费森尤斯卡比(Fresenius Kabi),帕特洪堡,德国)中稀释并在室温下孵育过夜。将载玻片在室温下用辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗小鼠IgG(DAKO envision)以免疫组织化学方式染色30分钟。应用诺瓦红(NovaRed)(伟特(Vector),伯灵格姆,美国)作为色原体,之后用迈尔(Mayer's)苏木精(科林巴斯(Klinipath))进行复染色。所有洗涤步骤都是用PBS进行。所有载玻片都是用普泰克(Pertex)封固介质(西斯特实验室(HistoLab),瑞典)封固。

[0131] HCA2、HC10、 β 2M和HLA-E染色的显微评估和分析是由两个事先不知道临床或组织病理学参数的独立观察者进行(1号观察者,100%的群组;2号观察者,20%的群组)。通过计算科恩 κ 系数(Cohen's kappa coefficient)来评价观察者间一致性,所有染色都得到>0.70的系数,指示观察者间基本一致。

[0132] 肿瘤分化程度是基于免疫组织化学染色的载玻片来确定,并划分为分化不良、中度分化或分化良好。根据勒伊特(Ruiter)等人提出的评分系统(勒伊特1998)评价先前所述的抗体的表达模式。使用这种方法筛选整个载玻片并将阳性肿瘤细胞百分比划分为:不

存在0%，散发性1%-5%，局部6%-25%，偶然性25%-50%，多数51%-75%和绝大多数76%-100% (1-6)。另外，这个评分包含染色强度，将染色强度划分为阴性、低、中和高(0-3)。记录所有抗体的强度，但CD8除外，因为对其始终观察到高强度。最终评分是基于强度和百分比二者并且分类为1-4(低表达)和5-9(高表达)。

[0133] 浸润性CD8⁺ T细胞的量化

[0134] 通过筛选每个载玻片的五个随机拍摄的高分辨率(200X)图像来评价CD8⁺ T细胞浸润。使用NIH-ImageJ软件(1.48版)标记并计算肿瘤巢面积和间质面积。CD8⁺ T细胞是根据面积来计数并表示为每mm²肿瘤面积的细胞数，上皮内与间质CD8⁺ T细胞之间具有差别。计算肿瘤浸润性CD8⁺ T细胞的上皮内、间质平均数和总数，并基于所有患者的平均CD8⁺ T细胞浸润将患者二分为高或低CD8⁺ T细胞浸润。

[0135] 统计分析

[0136] 使用非参数曼-惠特尼检验比较患者组之间的连续变量，并通过双尾x²检验进行分类数据的组间比较。总体存活(OS)定义为手术日期直至因任何原因死亡的日期，或最后一次随访的日期，最长随访时间为5年。在基于HLA表达评价存活时，HLA的低和高表达指示功能性HLA分子的存在，即分别是β2M以及HLA-A、HLA-B/C和HLA-E的HLA重链二者的高表达。通过使用卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)方法估计存活，并使用对数秩检验比较两个曲线。使用单变量Cox比例风险模型来研究单一决定因素对OS的效应。使用在单变量分析中达到统计学显著性的变量来进行多变量Cox回归分析。采用逐步回归来估计最终模型。将双侧P值<0.05视为具有统计学显著性。应用邦弗朗尼校正(Bonferroni correction)用于多重检验。使用统计学软件包SPSS 20.0 (SPSS, 芝加哥, 伊利诺州) 进行数据分析。使用GraphPad Prism 6.02 (格拉夫帕德软件(Graphpad Software), 拉霍亚, 加利福尼亚州) 估计存活曲线。

[0137] 结果与讨论

[0138] 间质CD8⁺ T细胞浸润与总体存活最为相关。

[0139] 评估197名肺腺癌患者的群组。将肿瘤分化程度划分为不良(50%)、中度(33%)或良好分化(17%)。在31%的病例中，患者患有晚期疾病(III/IV期)，但基于术前诊断模态归类为I/II期(表1)。平均年龄为66岁(在37-90岁范围内)并且男性(n=99)和女性(n=98)数目均匀分布。

[0140] 通过枚举肿瘤切片中的上皮内和间质CD8⁺ T细胞来研究CD8⁺ T细胞浸润程度。CD8⁺ T细胞的代表性免疫组织化学染色的实例展示于图6中。总体上皮内CD8⁺ T细胞浸润在7至1460个细胞/mm²肿瘤范围内(平均值194;中值150)，间质CD8⁺ T细胞在35至1332个细胞/mm²肿瘤范围内(平均值348;中值320)，且总CD8⁺ T细胞在32至1008个细胞/mm²肿瘤范围内(平均值271;中值246)。男性与女性之间的总CD8⁺ T细胞肿瘤浸润性无差异(卡方检验, p=0.267)。基于所有患者的CD8⁺ T细胞计数平均值将患者分为具有低或高CD8⁺ T细胞浸润的两组，并绘制与OS的关联性的曲线。相对强的间质CD8⁺ T细胞浸润显示与有益临床结果具有最佳关联(对数秩检验, p=0.068;图7A-C)。低间质CD8⁺ T细胞浸润的负面效应在将患者基于三分位划分时被放大，其中在低三分位中的患者被定义为具有低CD8⁺间质T细胞浸润，并且其他患者被定义为具有高间质CD8⁺ T细胞浸润(p=0.046,图10)，与先前所报道的类似(阿尔-希伯里(AI-Shibli) 2008、布雷尼斯(Bremnes) 2011、杰尼迪(Djenidi) 2015、多恩

(Donnem) 2015、平冈 (Hiraoka) 2006)。

[0141] 经典HLA I类表达与CD8⁺ T细胞之间的相互作用。

[0142] 可令人感兴趣的是鉴别管控CD8⁺ T细胞顺利攻击NSCLC的因素,如以下事实所说明:a)超过40%的NSCLC患者对检查点抑制剂疗法有反应(加龙(Garon) 2015、盖廷杰(Gettinger) 2015、贾(Jia) 2015);和b)尤其是那些体内肿瘤已生成针对CD8⁺ T细胞的新抗原的患者可能有反应(里兹维(Rizvi) 2015)。这个过程的关键分子之一是将肿瘤特异性肽呈递到T细胞所需的HLA分子的表达。在用泛HLA I类抗体测量时,在几乎一半肺腺癌患者中观察到HLA损失(巴巴2013、花桐2013a、花桐2013b、菊池2007、菊池2008)。使用抗体区分HLA-A与HLA-B/C的表达以更详细地将HLA损失制成图表。使用针对β2-M、HLA-A和HLA-B/C的抗体实施对经典HLA I类分子的表达的评价(图6)。β2-M在76%的病例中表达,但HLA-A和HLA-B/C分别仅在56%和25%的病例中表达(表1)。因此,发现HLA-A在约40%的患者中减少,而HLA-B/C表达的减少甚至高达75%,这仅与另外一个明确报道关于NSCLC中的HLA-B/C损失的研究一致(拉姆纳斯(Ramnath) 2006)。

[0143] 随后,评价肿瘤病期、HLA I类分子与CD8⁺ T细胞浸润之间的关联(表3)。HLA-A的高表达与HLA-B/C的高表达显著相关($p=0.0001$)。在功能性HLA I类表达的存在或不存在与肿瘤浸润性CD8⁺ T细胞的总数之间存在明确相关。HLA-A ($p=0.012$) 或HLA-B/C ($p=0.018$) 下调的肿瘤显示平均更低的肿瘤浸润性T细胞总数(表3和图11)。

[0144] 在将患者根据HLA-A或HLA-B/C的低或高表达来分组时,卡普兰-迈耶曲线未揭露经典HLA I类表达对临床结果的任何直接影响(图7D和7E)。然而,肿瘤组织中的经典HLA表达与总CD8⁺ T细胞浸润之间的相互作用分析揭露HLA-B/C阳性肿瘤(HR 0.212,95%CI 0.074-0.606, $p=0.004$)或HLA-A和HLA-B/C阳性肿瘤(HR 0.215,95%CI 0.069-0.673, $p=0.008$)中的密集CD8⁺ T细胞浸润对OS的明显有益效应(表2和图8)。这与仅在HLA-A表达的情况下分析CD8⁺ T细胞浸润时的情形不同。因此,HLA表达与CD8⁺ T细胞浸润的相互作用分析导致新的观察,即密集CD8⁺ T细胞肿瘤浸润的预后效应仅在肿瘤显示经典HLA I类、特别是HLA-B/C的高表达时保持(图8)。

[0145] HLA-E表达是OS的强负性决定因素。

[0146] 管控NSCLC中的T细胞的顺利攻击的其他关键分子是所谓的检查点(潘(Pan) 2015)。非经典HLA-E分子是抑制受体CD94/NKG2A的配体并且代表重要免疫检查点(寇肯(Kochan) 2013、万豪(van Hal1) 2010)。在超过70%的肺腺癌病例中,观察到HLA-E的高表达(图6F和表1)。HLA-E的高表达与较差OS相关联(HR 0.632,95%CI 0.406-0.984, $p=0.042$;表2和图7F)。这个研究首次显示非经典HLA-E分子的高表达影响NSCLC中的总体存活。

[0147] 由于间质CD8⁺ T细胞浸润和HLA-E表达二者都作为单一决定因素显示对总体存活具有最强效应(图7B和7F、图10),随后进行分析以研究这两种因素之间的相互作用。显然,在HLA-E阴性肿瘤中,密集间质CD8⁺ T细胞浸润显示强阳性预后价值(HR 0.303,95%CI 0.124-0.741, $p=0.009$;图9A和9B)。然而,密集间质CD8⁺ T细胞浸润的这种有益效应在具有HLA-E的高表达的患者中消失(HR 1.004,95%CI 0.550-1.835, $p=0.989$;图9C和9D)。总之,肿瘤浸润性间质CD8⁺ T细胞显示的有益效应在肿瘤高度表达HLA-E时受阻。HLA-E的表达可在HLA-E接合CD94/NKG2A时抑制T淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞的功能(寇肯2013、万豪2010、阿尔布雷希特(Ulbrecht) 1999),并且可在HLA-E接合CD94/NKG2C时活化这些细胞

(古玛 (Guma) 2005)。在乳腺癌和子宫颈腺癌中的几个研究已报道表达HLA-E的肿瘤的存活益处(德克鲁伊夫 (de Kruijf) 2010、斯潘 (Spaans) 2012), 而其他研究与本研究类似, 报道在卵巢癌、结肠直肠癌和胃癌中HLA-E对OS的负面效应(古登2011、博萨德 (Bossard) 2012、石垣 (Ishigami) 2015、甄 (Zhen) 2013)。CD8⁺ T细胞表达的HLA-E的受体类型可能是以这种差异为基础。在卵巢癌和结肠直肠癌中, 显示T细胞表达抑制性受体CD94/NKG2A(古登2011、博萨德2012)。与先前在NSCLC中的研究一致, 密集间质CD8⁺ T细胞肿瘤浸润与较长OS相关(图7和图10)(阿尔-希伯里2008、布雷尼斯2011、杰尼迪2015、多恩2015、平冈2006、希尔博 (Schalper) 2015)。在本发明研究中, 肿瘤细胞中HLA-E的高表达明显对CD8⁺ T细胞具有负面效应。间质CD8⁺ T细胞对OS的正面预后效应仅在患者的肿瘤细胞上具有HLA-E的低表达的患者中是明显的。HLA-E的高肿瘤表达完全消除了CD8⁺ T细胞浸润的预后效应(表2和图9)

[0148] 在肺腺癌中HLA-E表达是OS的独立决定因素。

[0149] 为评价各单一变量对死亡的相对风险的效应, 进行单变量和多变量Cox比例风险分析来量化存活差异(表2)。之前已将肿瘤病期和男性性别报道为肺腺癌中OS的负性风险因子[32], 并且实际上在本发明群组中高病期肿瘤(I/II期相对于III/IV期, HR 0.619, 95%CI 0.399-0.961, p=0.033)以及男性性别(HR 1.834, 95%CI 1.184-2.839, p=0.007)与较差OS相关联。在单变量分析中, 在这个群组中, 肿瘤细胞中非经典HLA-E的低表达与显著降低的死亡风险相关联(HR 0.632, 95%CI 0.406-0.984, p=0.042)。高间质CD8⁺ T细胞的存在与改善的OS相关并且达到接近显著性(HR 1.560, 95%CI 0.962-2.530, p=0.072), 并且因此与肿瘤病期、性别和HLA-E表达一起被包含于多变量分析中。

[0150] 与单变量分析类似, 在多变量分析中间质CD8⁺ T细胞对OS的正面效应接近统计学显著性(HR 1.613, 95%CI 0.993-2.620, p=0.054)。除了肿瘤病期和性别以外, HLA-E的增加的表达与OS显著相关联(HR 0.612, 95%CI 0.392-0.956, p=0.031), 指示在肺腺癌中低HLA-E表达是OS的独立正性预后因子。

[0151] 结果显示, 约70%的肺腺癌显示HLA-E的高表达(表1)。鉴于其对T细胞和NK细胞二者的效应, 阻断HLA-E和/或其CD94-NKG2A抑制性受体可形成用于NSCLC的免疫疗法的有价值的靶标。显示在体外使用抗NKG2A单克隆抗体治疗可克服HLA-E介导的对抗肿瘤细胞毒性的抑制(利维 (Levy) 2009、迪尔 (Derre) 2006), 并且这已导致目前正在进行的I/II期试验, 其中用抗NKG2A单克隆抗体治疗患有晚期头颈部癌症的患者(ClinicalTrials.gov, 标识符: NCT02331875)。

[0152] 表1

	手术-病理学期 (数目, %)	
	I	62 (31%)
	II	74 (38%)
	III	35 (18%)
	IV	26 (13%)
	分化 (数目, %)	
	不良	98 (50%)
	中度	66 (33%)
	良好	33 (17%)
	β 2-M (数目, %)	
	低	47 (24%)
[0153]	高	150 (76%)
	HLA-A (数目, %)	
	低	87 (44%)
	高	110 (56%)
	HLA-B/C (数目, %)	
	低	148 (75%)
	高	49 (25%)
	HLA-E (数目, %)	
	低	55 (28%)
	高	142 (72%)
	总 CD8+ (数目, %)	
	低	96 (59%)
	高	68 (41%)
	肿瘤中的 CD8+ (数目, %)	
	低	104 (64%)
	高	59 (36%)
[0154]	间质中的 CD8+ (数目, %)	
	低	92 (56%)
	高	71 (44%)

[0155] 表1肺腺癌的病期、分化和免疫组织化学表达模式的概述。

[0156]

变量	单变量分析		多变量分析	
	HR (95% CI)	p值	HR (95% CI)	p值
病期	1.0		1.0	
性别				
男相对于女	1.834 (1.184 - 2.839)	0.007	1.785 (1.152 - 2.765)	0.009
分化				
不良相对于中/良好	1.423 (0.928 - 2.182)	0.106		
β2-微球蛋白				
低相对于高	0.762 (0.442 - 1.314)	0.328		
HLA-A				
低相对于高	0.703 (0.462 - 1.084)	0.112		
HLA-B/C				
低相对于高	0.822 (0.498 - 1.358)	0.443		
HLA-E				
低相对于高	0.632 (0.406 - 0.984)	0.042	0.612 (0.392 - 0.956)	0.031
上皮内CD8				
低相对于高	0.682 (0.427 - 1.087)	0.108		
间质CD8				
低相对于高	1.560 (0.962 - 2.530)	0.072	1.613 (0.993 - 2.620)	0.054
总CD8				
低相对于高	1.130 (0.705 - 1.812)	0.659		
HLA-E低				
高相对于低间质CD8	0.303 (0.124 - 0.741)	0.009		
HLA-E高				
高相对于低间质CD8	1.004 (0.550 - 1.835)	0.989		
间质CD8高				
高相对于低HLA-E	3.282 (1.308 - 8.232)	0.011		
间质CD8低				
高相对于低HLA-E	1.032 (0.585 - 1.818)	0.914		
HLA-B/C高				
高相对于低总CD8	0.212 (0.074 - 0.606)	0.004		
HLA-A和B/C高				
高相对于低总CD8	0.215 (0.069 - 0.673)	0.008		

表2. 单变量和多变量Cox比例风险分析。
显著差异 (p<0.05) 以粗体指示

[0157] 表3

		HLA-A		P 值	HLA-B/C		P 值	HLA-E		P 值
		高	低		高	低		高	低	
病期										
	I	36	26	0.621	17	450.872		44	180.777	
	II	43	31		16	58		56	18	
	III	16	19		9	26		25	10	
	IV	15	11		7	19		17	9	
β2-M										
	低	18	29	0.007	8	390.179		32	15	0.576
	高	92	58		41	109			110	40
HLA-A										
	低				6	810.0001		60	27	0.426
[0158]	高				43	67		82	28	
HLA-B/C										
	低								106	42 0.856
	高								36	13
总 CD8+										
	低	41	55	0.012*	16*	80	0.018*	64	32	0.480*
	高	45	23		25	43		53	15	
间质中的 CD8+										
	低	45	47	0.819*	19	73 0.444*		66 26		0.990*
	高	41	30		22	49		51	20	
肿瘤中的 CD8+										
	低	50	54	0.426*	21	83	0.186*	68	36	0.057*
[0159]	高	36	23		20	39		49	10	
[0160]	表3:肺腺癌中的肿瘤特征与HLA表达和CD8+ T细胞表达的关系。									
[0161]	显著性结果 (p<0.050) 以粗体指示。*邦弗朗尼校正的p值									
[0162]	实例2中的引用文献									

[0163] 阿尔伯格AJ (Alberg AJ)、布罗克MV (Brock MV)、萨梅特JM (Samet JM). 肺癌流行病学: 展望未来 (Epidemiology of lung cancer: looking to the future). 临床肿瘤学杂志 (J Clin Oncol) 2005; 23: 3175-85。

[0164] 阿尔-希伯里KI (Al-Shibli KI)、多恩T (Donnem T)、阿尔萨德S (Al-Saad S)、佩尔松M (Persson M)、布雷尼斯RM (Bremnes RM)、布松德LT (Busund LT). 非小细胞肺癌中上皮和间质淋巴细胞浸润的预后效应 (Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer). 临床癌症研究 (Clin Cancer Res) 2008; 14: 5220-7。

[0165] 巴巴T (Baba T)、四田H (Shiota H)、黑田K (Kuroda K)、重松Y (Shigematsu Y)、市来Y (Ichiki Y)、浦本H (Uramoto H) 等人, 人类白细胞抗原损失和黑色素瘤相关抗原4表达在非小细胞肺癌患者的吸烟者中的临床意义 (Clinical significance of human leukocyte antigen loss and melanoma-associated antigen 4 expression in smokers of non-small cell lung cancer patients). 国际临床肿瘤学杂志 (Int J Clin Oncol) 2013; 18: 997-1004。

[0166] 博萨德C (Bossard C)、毕泽奥S (Bezieau S)、马蒂西亚克-布德尼克T (Matysiak-Budnik T)、沃特奥C (Volteau C)、拉波易斯CL (Laboisie CL)、乔特罗F (Jotereau F) 等人, 结肠直肠癌中的HLA-E/ β 2微球蛋白过表达与抑制性免疫细胞的募集和肿瘤进展相关联 (HLA-E/ β 2microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression). 国际癌症杂志 (Int J Cancer) 2012; 131: 855-63。

[0167] 布雷尼斯RM (Bremnes RM)、阿尔-希伯里K (Al-Shibli K)、多恩T (Donnem T)、西雷拉R (Sirera R)、阿尔萨德S (Al-Saad S)、安德森S (Andersen S) 等人, 肿瘤浸润性免疫细胞和肿瘤位点的慢性炎症对癌症发展、进展和预后的作用: 重点在于非小细胞肺癌 (The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer). 胸部肿瘤学杂志 (J Thorac Oncol) 2011; 6: 824-33。

[0168] 卡罗塞拉ED (Carosella ED)、侯王印KY (HoWangYin KY)、法耶B (Favier B)、乐玛特J (LeMaoult J). HLA-G依赖性抑制细胞: 因性质、功能和显著性而不同 (HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance). 人类免疫学 (Hum Immunol) 2008; 69: 700-7。

[0169] 迪尔L (Derre L)、柯威吉耶M (Corvaisier M)、查理奥B (Charreau B)、莫罗A (Moreau A)、戈德福罗伊E (Godefroy E)、莫罗-奥布里A (Moreau-Aubry A) 等人, 黑色素瘤细胞和黑色素细胞中HLA-E的表达和释放: 对细胞毒性效应细胞的反应的潜在影响 (Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells). 免疫学杂志 (J Immunol) 2006; 177: 3100-7。

[0170] 德克鲁伊夫EM (de Kruijf EM)、萨吉特A (Sajet A)、范奈斯JG (van Nes JG)、纳塔诺夫R (Natanov R)、普特H (Putter H)、施密特VT (Smit VT) 等人, 经典HLA I类阴性肿瘤中的HLA-E和HLA-G表达对早期乳腺癌患者的临床结果具有预后价值 (HLA-E and HLA-G

expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients). 免疫学杂志2010;185:7452-9。

[0171] 杰尼迪F(Djenidi F)、亚当J(Adam J)、葛巴A(Goubar A)、杜吉奥A(Durgeau A)、默里斯G(Meurice G)、德M,V(de M,V)等人,CD8+CD103+肿瘤浸润性淋巴细胞是肿瘤特异性组织驻留的记忆T细胞和肺癌患者存活的预后因子(CD8+CD103+tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients). 免疫学杂志2015;194:3475-86。

[0172] 多恩T(Donnem T)、哈尔德SM(Hald SM)、保尔森EE(Paulsen EE)、理查德森E(Richardson E)、阿尔萨德S(Al-Saad S)、吉尔弗TK(Kilvaer TK)等人,间质CD8+ T细胞密度-对非小细胞肺癌的TNM分期的有前景的补充(Stromal CD8+ T-cell Density-A Promising Supplement to TNM Staging in Non-Small Cell Lung Cancer). 临床癌症研究(Clin Cancer Res)2015。

[0173] 加龙EB(Garon EB)、里兹维NA(Rizvi NA)、许R(Hui R)、莉N(Leighl N)、巴尔曼努京AS(Balmanoukian AS)、伊登JP(Eder JP)等人,用于治疗非小细胞肺癌的派姆单抗(Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer). 新英格兰医学杂志(N Engl J Med)2015;372:2018-28。

[0174] 盖廷杰SN(Gettinger SN)、霍恩L(Horn L)、甘地L(Gandhi L)、斯皮格DR(Spigel DR)、安东尼娅SJ(Antonia SJ)、里兹维NA(Rizvi NA)等人,纳武单抗(抗程序化死亡1抗体、BMS-936558,ONO-4538)在患有先前经治疗的晚期非小细胞肺癌的患者中的总体存活和长期安全性(Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer). 临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol)2015;33:2004-12。

[0175] 古登M(Gooden M)、拉宾M(Lampen M)、卓达诺瓦ES(Jordanova ES)、莱佛士N(Leffers N)、特里伯斯JB(Trimbos JB)、范德伯格SH(van der Burg SH)等人,妇科癌症的HLA-E表达限制肿瘤浸润性CD8(+)T淋巴细胞(HLA-E expression by gynecological cancers restrains tumor-infiltrating CD8(+)T lymphocytes). 美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A)2011;108:10656-61。

[0176] 古玛M(Guma M)、布什LK(Busch LK)、萨拉查-弗安塔娜LI(Salazar-Fontana LI)、贝罗希罗B(Bellosillo B)、摩鲁特C(Morte C)、加西亚P(Garcia P)等人,CD94/NKG2C杀伤细胞凝集素样受体构成CD8+T细胞亚组的替代活化途径(The CD94/NKG2C killer lectin-like receptor constitutes an alternative activation pathway for a subset of CD8+ T cells). 欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol)2005;35:2071-80。

[0177] 花桐T(Hanagiri T)、重松Y(Shigematsu Y)、筱原S(Shinohara S)、竹中M(Takenaka M)、山S(Oka S)、近石Y(Chikaishi Y)等人,在患有I期非小细胞肺癌的患者中,癌症/睾丸抗原的表达和HLA I类的下调的临床意义(Clinical significance of expression of cancer/testis antigen and down-regulation of HLA class-I in

patients with stage I non-small cell lung cancer). 抗癌研究 (Anticancer Res) 2013a;33:2123-8。

[0178] 花桐T(Hanagiri T)、重松Y(Shigematsu Y)、黑田K(Kuroda K)、巴巴T(Baba T)、四田H(Shiota H)、市来Y(Ichiki Y)等人,在经历手术切除非小细胞肺癌的患者中人类白细胞抗原I类表达的预后意义(Prognostic implications of human leukocyte antigen class I expression in patients who underwent surgical resection for non-small-cell lung cancer). 外科研究杂志(J Surg Res) 2013b;181:e57-e63。

[0179] 赫布斯特RS(Herbst RS)、海马克JV(Heymach JV)、李普曼SM(Lippman SM)。肺癌(Lung cancer)。新英格兰医学杂志 2008;359:1367-80。

[0180] 平冈K(Hiraoka K)、宫本M(Miyamoto M)、赵Y(Cho Y)、铃木M(Suzuoki M)、押切T(Oshikiri T)、中洼Y(Nakakubo Y)等人,在非小细胞肺癌中CD8+ T细胞和CD4+T细胞的并行浸润是有利预后因子(Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma)。英国癌症杂志(Br J Cancer) 2006;94:275-80。

[0181] 石垣S(Ishigami S)、折纸T(Arigami T)、奥村H(Okumura H)、池多Y(Uchikado Y)、北Y(Kita Y)、藏原(Kurahara H)等人,胃癌中的人类白细胞抗原(HLA)-E和HLA-F表达(Human Leukocyte Antigen(HLA)-E and HLA-F Expression in Gastric Cancer)。抗癌研究(Anticancer Res) 2015;35:2279-85。

[0182] 贾M(Jia M)、冯W(Feng W)、康S(Kang S)、张Y(Zhang Y)、沈J(Shen J)、何J(He J)等人,抗PD-1和抗PD-L1抗体在非小细胞肺癌(NSCLC)治疗中的效力和安全性的评估:综合分析(Evaluation of the efficacy and safety of anti-PD-1and anti-PD-L1antibody in the treatment of non-small cell lung cancer(NSCLC):a meta-analysis)。胸部疾病杂志(J Thorac Dis) 2015;7:455-61。

[0183] 约翰逊DB(Johnson DB)、里奥斯MJ(Rioth MJ)、霍恩L。NSCLC中的免疫检查点抑制剂(Immune checkpoint inhibitors in NSCLC)。肿瘤学最新治疗方法(Curr Treat Options Oncol) 2014;15:658-69。

[0184] 菊池E(Kikuchi E)、山崎K(Yamazaki K)、鸟越T(Torigoe T)、赵Y(Cho Y)、宫本M(Miyamoto M)、大泉S(Oizumi S)等人,HLA I类抗原表达与早期非小细胞肺癌中的有利预后相关(HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer)。癌症科学(Cancer Sci) 2007;98:1424-30。

[0185] 菊池E(Kikuchi E)、山崎K(Yamazaki K)、中山E(Nakayama E)、佐藤S(Sato S)、上中A(Uenaka A)、山田N(Yamada N)等人,患有表达XAGE-1b和HLA I类抗原的肺腺癌的患者延长存活(Prolonged survival of patients with lung adenocarcinoma expressing XAGE-1b and HLA class I antigens)。癌症免疫力(Cancer Immun) 2008;8:13。

[0186] 寇肯G(Kochan G)、伊斯科D(Escors D)、布列克波特K(Breckpot K)、格雷罗-塞塔D(Guerrero-Setas D)。非经典MHC I类分子在癌症免疫抑制中的作用(Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression)。肿瘤免疫学(Oncoimmunology) 2013;2:e26491。

[0187] 克考罗婆罗P (Korkolopoulou P)、卡克拉马尼斯L (Kaklamanis L)、佩泽拉F (Pezzella F)、哈里斯AL (Harris AL)、甘特KC (Gatter KC). 肺癌中抗原呈递分子(MHC I类和TAP-1)的损失(Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer). 英国癌症杂志(Br J Cancer) 1996;73:148-53。

[0188] 里鹏EJ (Lepin EJ)、巴斯廷JM (Bastin JM)、艾伦DS (Allan DS)、罗卡多尔G (Roncador G)、布劳德VM (Braud VM)、梅森DY (Mason DY) 等人, HLA-F的功能表征以及HLA-F四聚体与ILT2和ILT4受体的结合(Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors). 欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol) 2000;30:3552-61。

[0189] 利维EM (Levy EM)、塞兹G (Sycz G)、艾瑞加JM (Arriaga JM)、巴里奥MM (Barrio MM)、范埃乌EM (Von Euw EM)、莫拉莱斯SB (Morales SB) 等人, 西妥昔单抗介导的细胞毒性受结肠癌细胞中HLA-E膜表达抑制(Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells). 先天免疫力(Innate Immun) 2009;15:91-100。

[0190] 林A (Lin A)、张X (Zhang X)、鲁安YY (Ruan YY)、王Q (Wang Q)、周WJ (Zhou WJ)、严WH (Yan WH). 在非小细胞肺癌患者中HLA-F表达是预后因子(HLA-F expression is a prognostic factor in patients with non-small-cell lung cancer). 肺癌(Lung Cancer) 2011;74:504-9。

[0191] 梅利夫CJ (Melief CJ)、范德伯格SH (van der Burg SH). 合成长肽疫苗对已确立恶变(前)疾病的免疫治疗(Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines). 癌症自然评论(Nat Rev Cancer) 2008;8:351-60。

[0192] 潘ZK (Pan ZK)、叶F (Ye F)、吴X (Wu X)、安HX (An HX)、吴JX (Wu JX). 程序化细胞死亡配体1 (PD-L1) 表达在非小细胞肺癌患者中的临床病理学和预后重要性: 综合分析(Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis). 胸部疾病杂志(J Thorac Dis) 2015;7:462-70。

[0193] 希尔博KA (Schalper KA)、布朗J (Brown J)、卡瓦哈尔-赫斯多夫D (Carvajal-Hausdorf D)、麦克劳克林J (McLaughlin J)、沃尔彻第V (Velcheti V)、希里格斯KN (Syrigos KN) 等人, 非小细胞肺癌中的TIL的客观测量和临床重要性(Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer). 国立癌症研究院杂志(J Natl Cancer Inst) 2015;107。

[0194] 樱井H (Sakurai H)、浅村H (Asamura H)、戈雅T (Goya T)、江口K (Eguchi K)、中西Y (Nakanishi Y)、泽畑N (Sawabata N) 等人, 被切除非小细胞肺癌根据性别的存活差异: 在日本肺癌注册研究中对12,509个病例的追溯性分析(Survival differences by gender for resected non-small cell lung cancer: a retrospective analysis of 12,509 cases in a Japanese Lung Cancer Registry study). 胸部肿瘤学杂志(J Thorac Oncol) 2010;5:1594-601。

[0195] 西格尔R (Siegel R)、德桑蒂斯C (DeSantis C)、弗戈K (Virgo K)、斯泰因K (Stein K)、马里奥托A (Mariotto A)、史密斯T (Smith T) 等人, 癌症治疗和生存统计(Cancer

treatment and survivorship statistics), 2012. 临床肿瘤杂志 (CA Cancer J Clin) 2012;62:220-41。

[0196] 斯潘VM (Spaans VM)、彼得斯AA (Peters AA)、弗鲁伦GJ (Fleuren GJ)、卓达诺瓦ES (Jordanova ES). 子宫颈腺癌中的HLA-E表达:与改良的长期存活的相关性 (HLA-E expression in cervical adenocarcinomas: association with improved long-term survival). 转化医学杂志 (J Transl Med) 2012;10:184。

[0197] 田上LT (Tanoue LT)、德特贝克FC (Detterbeck FC). 用于非小细胞肺癌的新TNM分类 (New TNM classification for non-small-cell lung cancer). 抗癌疗法的专家评论 (Expert Rev Anticancer Ther) 2009;9:413-23。

[0198] 托雷斯LA (Torre LA)、布雷F (Bray F)、西格尔RL、费尔利J (Ferlay J)、洛尔泰-提尔林特J (Lortet-Tieulent J)、杰马尔A (Jemal A). 全球癌症统计 (Global cancer statistics), 2012. 临床肿瘤杂志 (CA Cancer J Clin) 2015;65:87-108。

[0199] 拉姆纳斯N (Ramnath N)、陈D (Tan D)、李Q (Li Q)、海兰德BL (Hylander BL)、博涅P (Bogner P)、莱斯L (Ryes L) 等人, 人类非小细胞肺癌中的MHC I类抗原表达是否与延长存活相关? (Is downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival?) 癌症免疫学, 免疫疗法 (Cancer Immunol Immunother) 2006;55:891-9。

[0200] 里兹维NA (Rizvi NA)、赫尔曼MD (Hellmann MD)、斯奈德A (Snyder A)、维斯伯格P (Kvistborg P)、马卡罗夫V (Makarov V)、哈维尔JJ (Havel JJ) 等人, 癌症免疫学 (Cancer immunology) 在非小细胞肺癌中突变图谱决定对PD-1阻断的敏感性 (Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer) 科学 (Science) 2015;348:124-8。

[0201] 勒伊特DJ (Ruiter DJ)、费里尔CM (Ferrier CM)、范迈尔耶GN (van Muijen GN)、汉森-洛格曼斯SC (Henzen-Logmans SC)、肯尼迪S (Kennedy S)、克雷默MD (Kramer MD) 等人, 对肿瘤相关纤溶酶原活化剂和相关组分的免疫组织化学评估的质量控制 (Quality control of immunohistochemical evaluation of tumour-associated plasminogen activators and related components). 关于蛋白酶在肿瘤侵袭和转移中的临床关联的欧洲BIOMED-1联合行动组织 (European BIOMED-1 Concerted Action on Clinical Relevance of Proteases in Tumour Invasion and Metastasis) 欧洲癌症杂志 (Eur J Cancer) 1998;34:1334-40。

[0202] 阿尔布雷希特M (Ulbrecht M)、库蒂里耶A (Couturier A)、马尔蒂诺基S (Martinozzi S)、波拉M (Pla M)、斯利瓦斯塔瓦R (Srivastava R)、彼得森PA (Peterson PA) 等人, HLA-E的细胞表面表达:与人类 β 2-微球蛋白的相互作用和等位基因差异 (Cell surface expression of HLA-E: interaction with human beta2-microglobulin and allelic differences). 欧洲免疫学杂志 1999;29:537-47。

[0203] 范德瑞夫特MA (van der Drift MA)、凯里木-科斯HE (Karim-Kos HE)、西斯灵S (Siesling S)、葛瑞恩HJ (Groen HJ)、沃特斯MW (Wouters MW)、高贝克JW (Coebergh JW) 等人, 过去20年间荷兰标准照护疗法的进展和非小细胞肺癌患者治疗中的适度存活益处 (Progress in standard of care therapy and modest survival benefits in the

treatment of non-small cell lung cancer patients in the Netherlands in the last 20years). *胸部肿瘤学杂志 (J Thorac Oncol)* 2012;7:291-8。

[0204] 范阿尔泽特EM (van Esch EM)、图默斯B (Tummers B)、巴特曼斯V (Baartmans V)、奥赛EM (Osse EM)、特尔HN (Ter HN)、特里斯齐MD (Trietsch MD) 等人, 复发型和进展型HPV诱导的通常型外阴上皮瘤样病变中经典和非经典HLA表达的改变以及对免疫疗法的意义 (Alterations in classical and nonclassical HLA expression in recurrent and progressive HPV-induced usual vulvar intraepithelial neoplasia and implications for immunotherapy). *国际癌症杂志 (Int J Cancer)* 2014;135:830-42。

[0205] 万豪T. (van Hall T.)、奥利弗拉CC (Oliveira CC)、尤思顿S (Joosten SA)、奥滕霍夫TH (Ottenhoff TH)。Qa-1和HLA-E的另一雅努斯之面: 在应激情况中的不同肽谱 (The other Janus face of Qa-1 and HLA-E: diverse peptide repertoires in times of stress) *微生物与感染 (Microbes Infect)* 2010;12:910-8。

[0206] 肖SM (Yie SM)、杨H (Yang H)、叶SR (Ye SR)、李K (Li K)、董DD (Dong DD)、林XM (Lin XM) 人类白血病抗原G (HLA-G) 的表达与非小细胞肺癌的预后相关 (Expression of human leucocyte antigen G (HLA-G) is associated with prognosis in non-small cell lung cancer) *肺癌 (Lung Cancer)* 2007;58:267-74。

[0207] 甄ZJ (Zhen ZJ)、凌JY (Ling JY)、蔡Y (Cai Y)、罗WB (Luo WB)、何YJ (He YJ)。在患有III期结肠直肠癌的患者中HLA-E基因多型性对肿瘤细胞中的HLA-E表达和预后的影响 (Impact of HLA-E gene polymorphism on HLA-E expression in tumor cells and prognosis in patients with stage III colorectal cancer). *医学肿瘤学 (Med Oncol)* 2013;30:482。

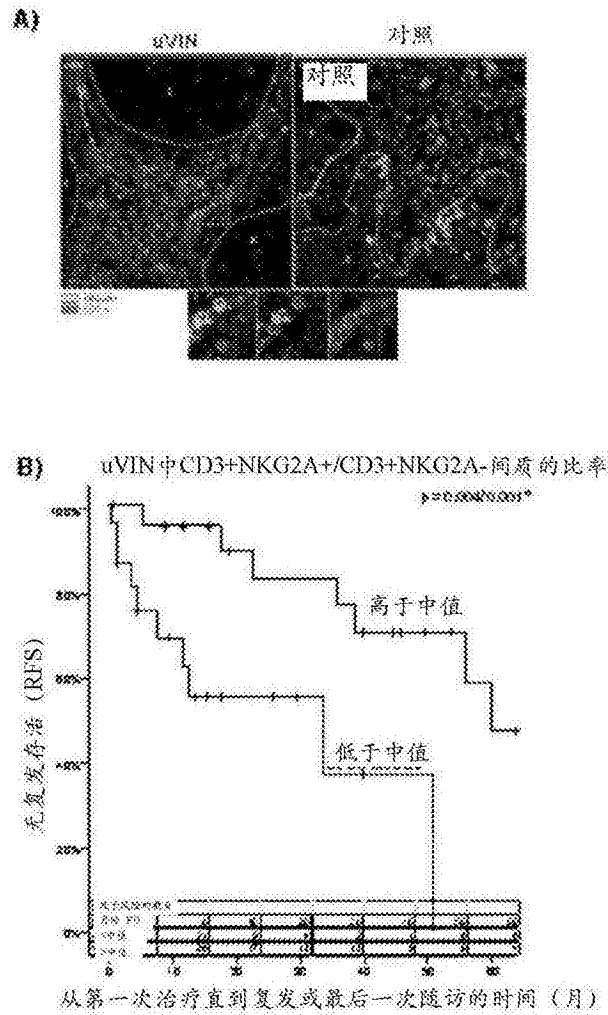


图1. 在VIN病灶中, NKG2A与较佳临床结果相关
 A. CD3 (红色) 和NKG2A (绿色) 的免疫荧光组织切片染色。在VIN病灶中可视化CD8 T细胞和NK细胞上的NKG2A表达。
 B. 通过组织切片染色测定NKG2A+ T细胞数并除以总T细胞 ('CD3+NKG2A-') 数。这个比率在这个VIN患者群组中对于无复发存活时间具有预后价值。恶性肿瘤中T细胞上抑制性受体的表达具有预后价值并且显现指示局部T细胞的活化状态。

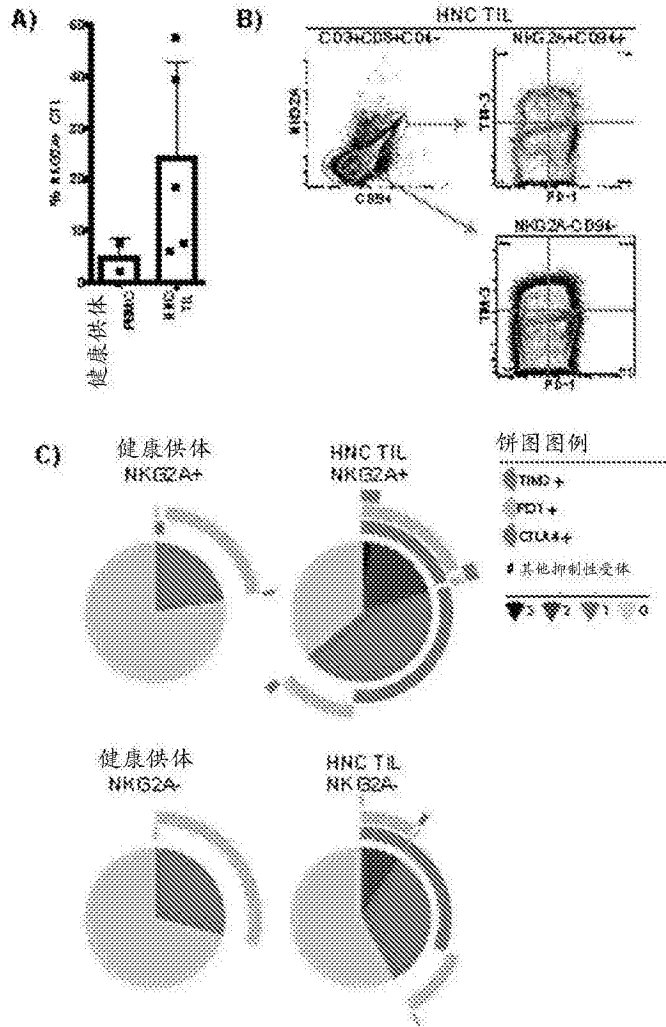


图2.来自头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 的肿瘤浸润淋巴细胞的CD8 T细胞上的NKG2A表达。
 A. 健康受试者血液中表达CD94和NKG2A的CD8 T细胞的频率为5%左右。这个频率非常高于HNSCC样品的TIL中的频率。
 B. 8色染色图的流式细胞术图，其被设计为测定淋巴细胞亚组上的抑制性受体共表达谱。CD94+NKG2A+ CD8+ T细胞是分析其他抑制性受体TIM-3和PD-1的表达的其他闸门。抑制性受体在淋巴细胞上嵌合式表达，产生若干个具有增加的受体数的不同亚组。
 C. 来自图B的数据呈现指示HNSCC患者样品的TIL (右侧饼图) 或健康受试者的PBMC (左侧饼图) 中不表达抑制性受体、表达单一抑制性受体或表达多种抑制性受体的CD8 T细胞的频率。这些癌症中约30%的NKG2A+ CD8 T细胞不共表达TIM-3、PD-1或CTLA-4。

B16 黑色素瘤模型

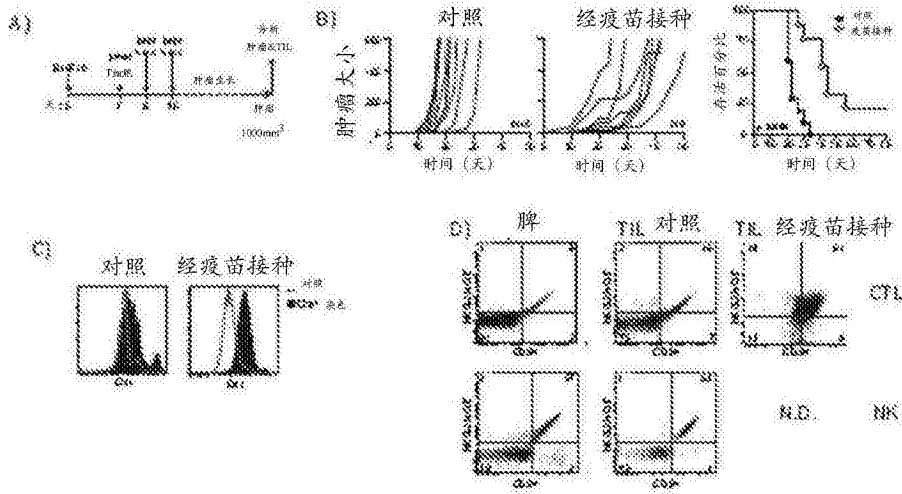


图3. NKG2A和Qa-1 (=小鼠HLA-E) 在免疫疗法后显著增加。

A. B16F10黑色素瘤的治疗方案。注入具有针对gp100的转基因TCR的肿瘤特异性pmel T细胞并通过用合成长肽进行两次疫苗接种来在体内活化。

B. 显示荷瘤小鼠的未治疗组和免疫疗法治疗组的肿瘤生长曲线和存活曲线。

C. B16F10黑色素瘤细胞上Qa-1 (=小鼠HLA-E) 的表达水平, 这些B16F10黑色素瘤细胞是从小鼠移除、经过分散并染色用于流式细胞术。免疫疗法使Qa-1的水平显著增加。

D. 用于表达抑制性受体CD94/NKG2A的肿瘤内CD8 T细胞 (CTL) 和NK细胞的流式细胞术。一起取脾源淋巴细胞作为对照染色。在小鼠已用免疫疗法治疗时, 平均60%的CTL表达抑制性受体。在生长到最大尺寸后, 移除肿瘤。

TC-1 HPV诱导的癌症模型

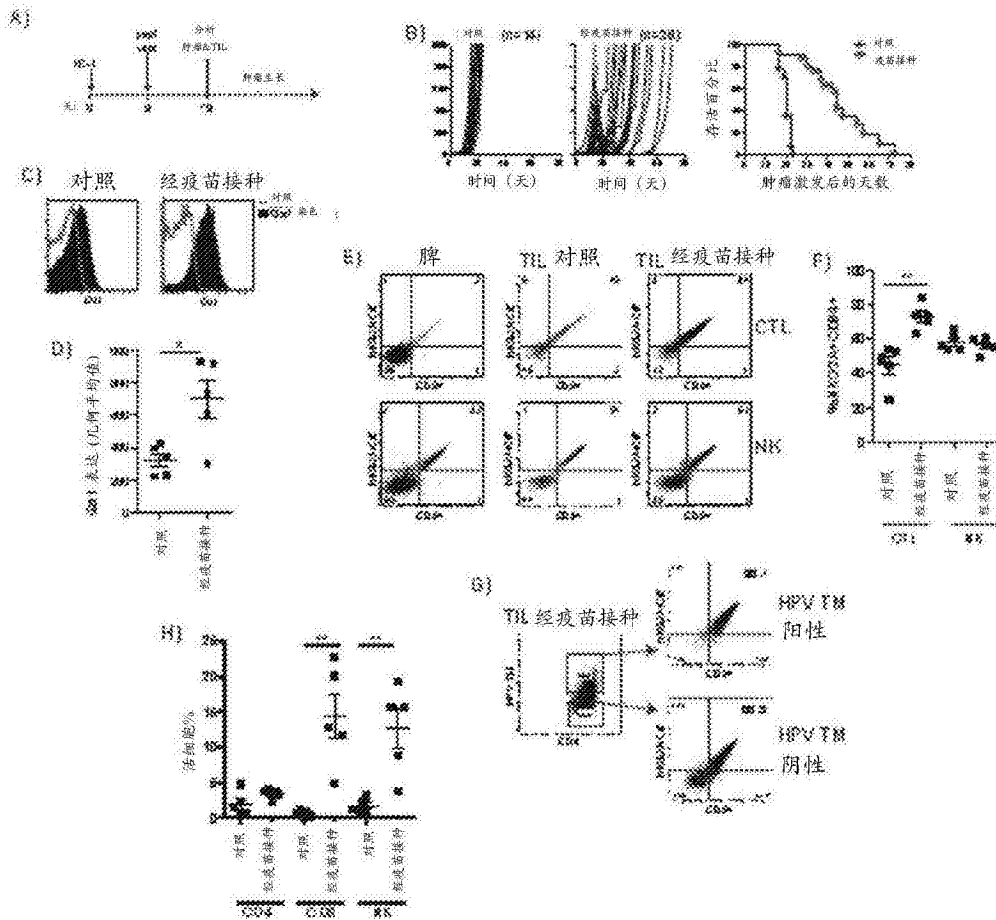


图4.NKG2A和Qa-1 (=小鼠HLA-E) 在免疫疗法后显著增加。

- A. HPV诱导的TC-1癌的治疗方案。用矿物油中的包括合成长肽的HPV对荷瘤小鼠进行一次疫苗接种。
- B. 显示荷瘤小鼠的未治疗组和免疫疗法治疗组的肿瘤生长曲线和存活曲线。
- C. TC-1癌细胞上的Qa-1 (=小鼠HLA-E) 的表达水平，这些TC-1癌细胞从小鼠移除、经过分散并染色用于流式细胞术。免疫疗法使Qa-1的水平显著增加。
- D. 图C中所示数据的量化。绘示平均荧光值和该平均值的标准误差。
- E. 针对抑制性受体CD94/NKG2A的表达，肿瘤内CD8 T细胞 (CTL) 和NK细胞的流式细胞术。一起取脾源淋巴细胞作为对照染色。在小鼠已用免疫疗法治疗时，平均75%的CTL表达抑制性受体。在肿瘤接种的第19天移除肿瘤。
- F. 图E中显示的数据的量化。所有CTL细胞和所有NK细胞中NKG2A+细胞的频率。
- G. CTL上的NKG2A的表达与肿瘤特异性相关，如用HPV16 E7-四聚体 (HPV TM) 所测量。
- H. 用合成长肽进行治疗性疫苗接种将CTL和NK细胞募集到肿瘤位点。

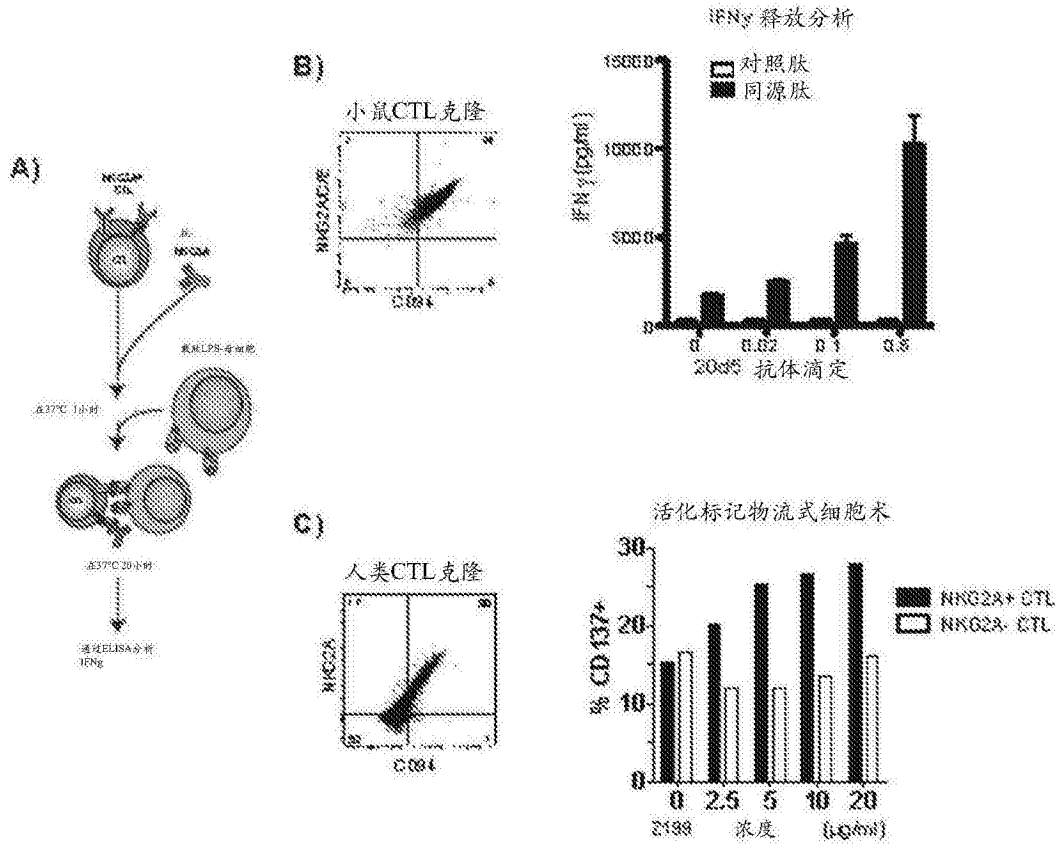


图5. 阻断CD8 T细胞克隆上的抑制性受体NKG2A增加体外反应性。
 A. 实验设置将抗原特异性CD8 T细胞克隆与抗NKG2A抗体（20d5用于小鼠；Z199用于人类）一起孵育并与表达高水平CD94/NKG2A配体的载肽抗原呈递细胞（LPS母细胞用于小鼠；B-LCL细胞用于人类）一起孵育。在20h孵育时间后测量反应性（IFN γ 释放针对小鼠；CD137显示针对人类）。
 B. 小鼠CD8 T细胞克隆一致地表达CD94和NKG2A链并将该细胞克隆在增加浓度的阻断性NKG2A抗体存在下与对照肽或同源刺激肽一起孵育。通过如在ELISA中所测定的IFN γ 释放测量T细胞反应性。显著增加CTL反应性可通过阻断NKG2A观察到。
 C. 人类CD8 T细胞克隆显示CD94和NKG2A的不均匀表达。将这个混合群体与载肽B-LCL细胞一起孵育并且在流式细胞术中通过诱导细胞表面的CD137（4-1BB）测量基于逐个细胞的CTL反应性。可通过阻断抗体，但并非NKG2A阴性CTL来增强表达NKG2A的CTL的反应性。

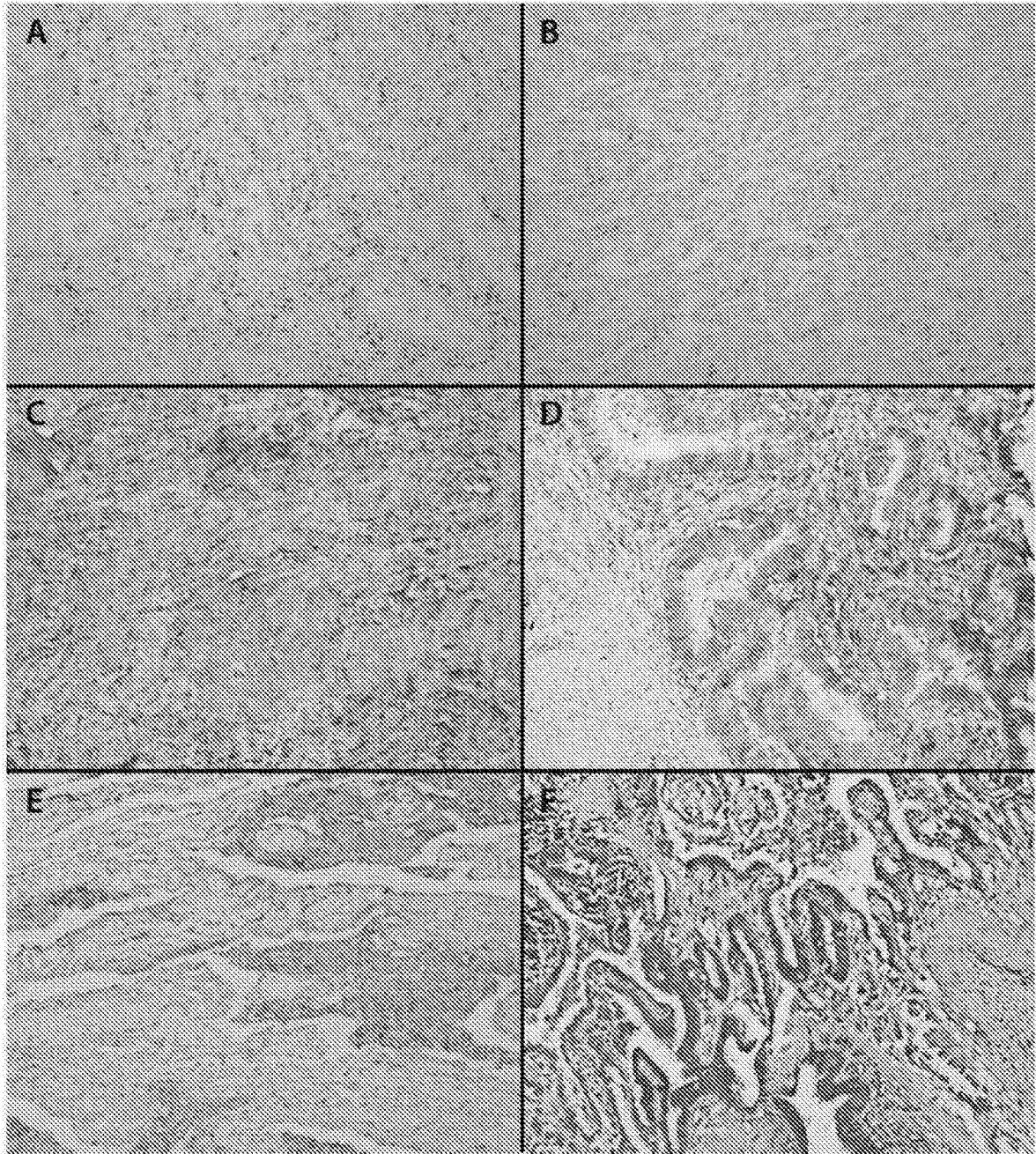


图6

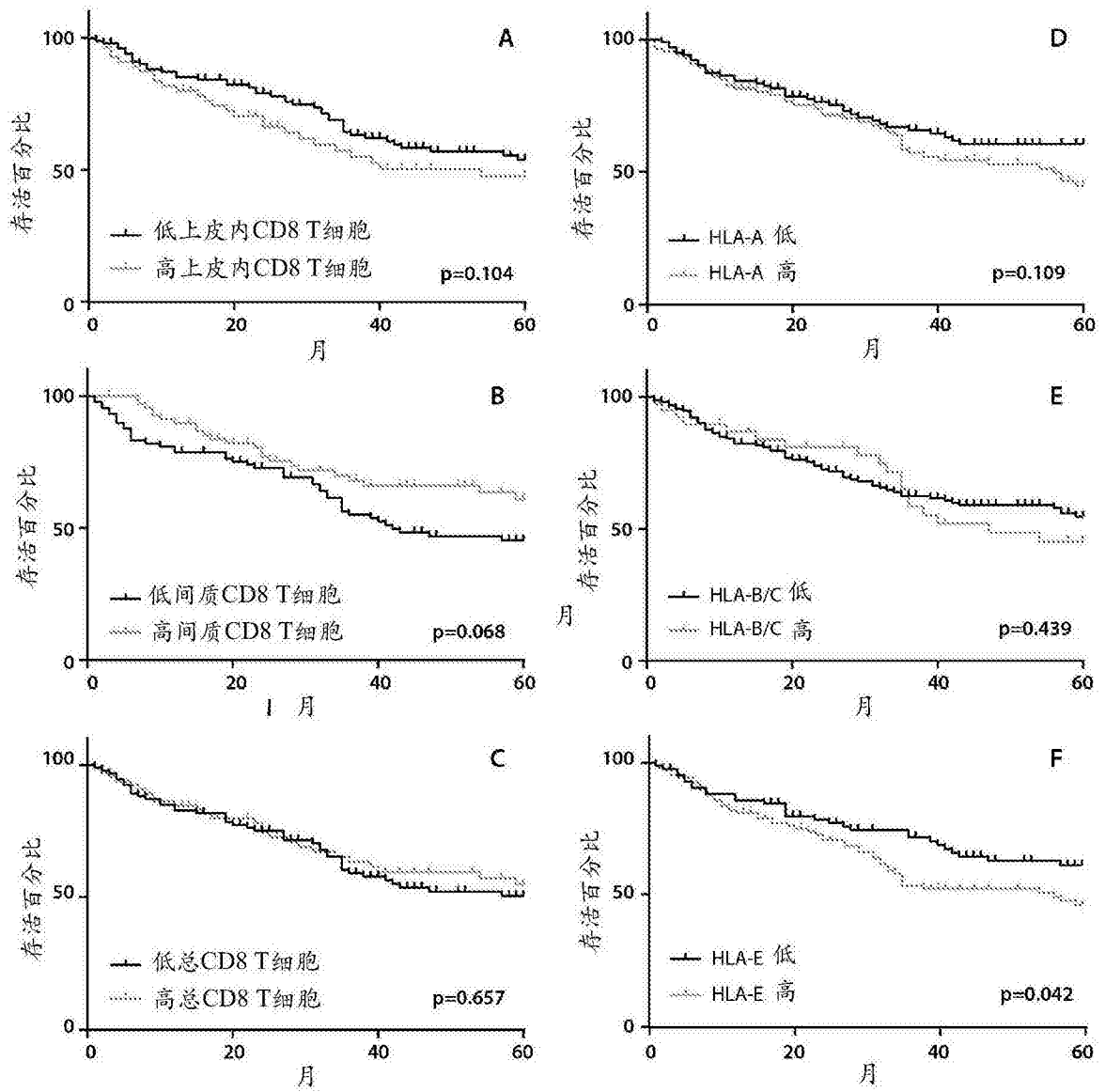


图7

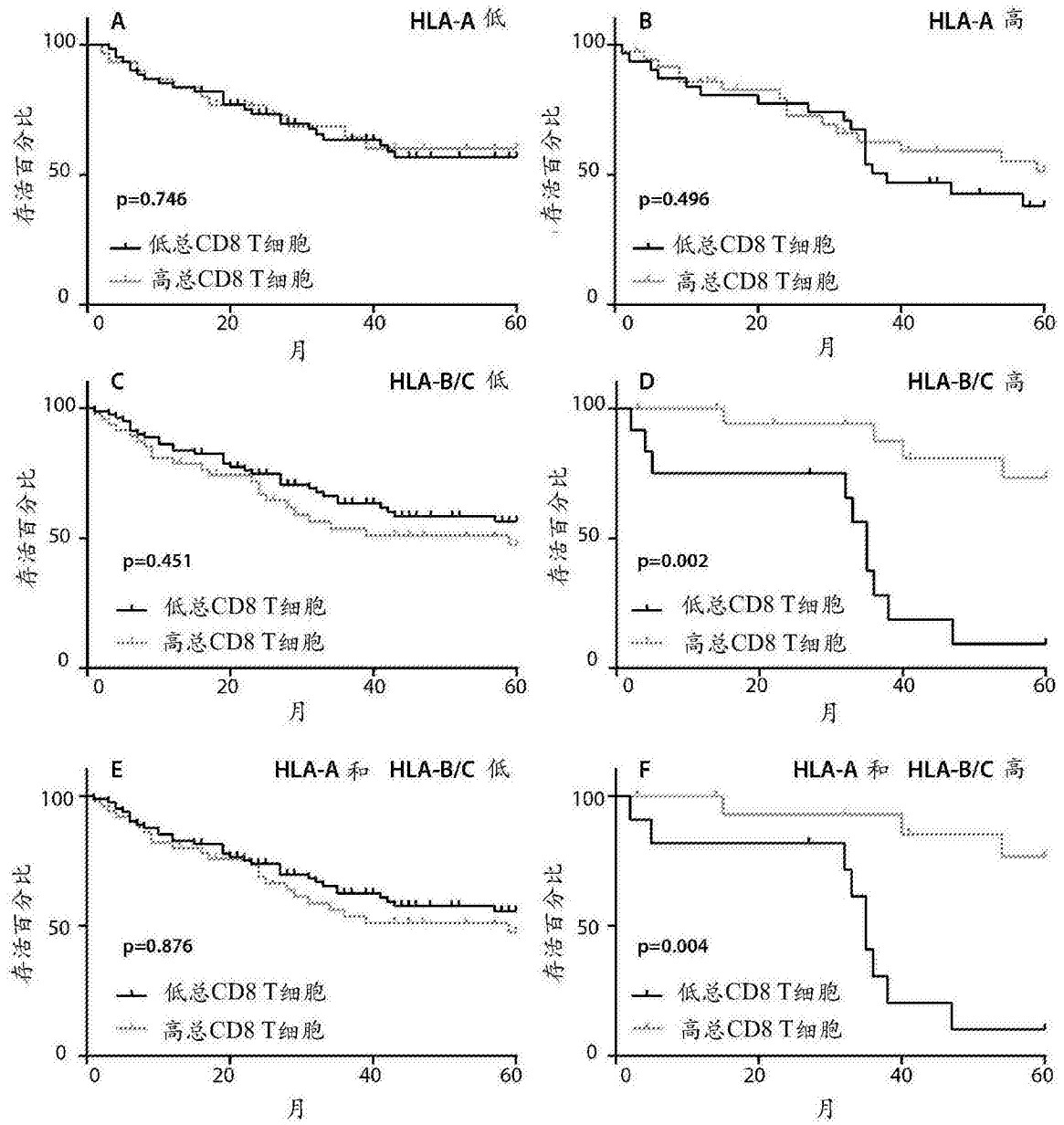


图8

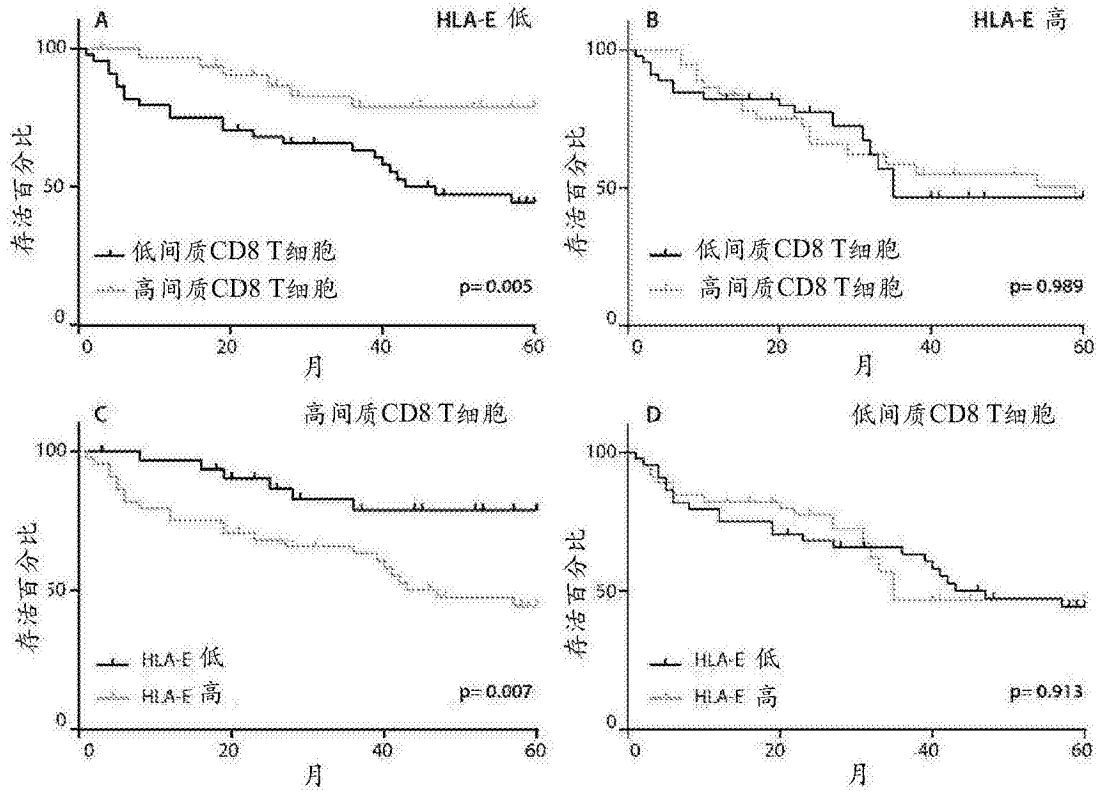


图9

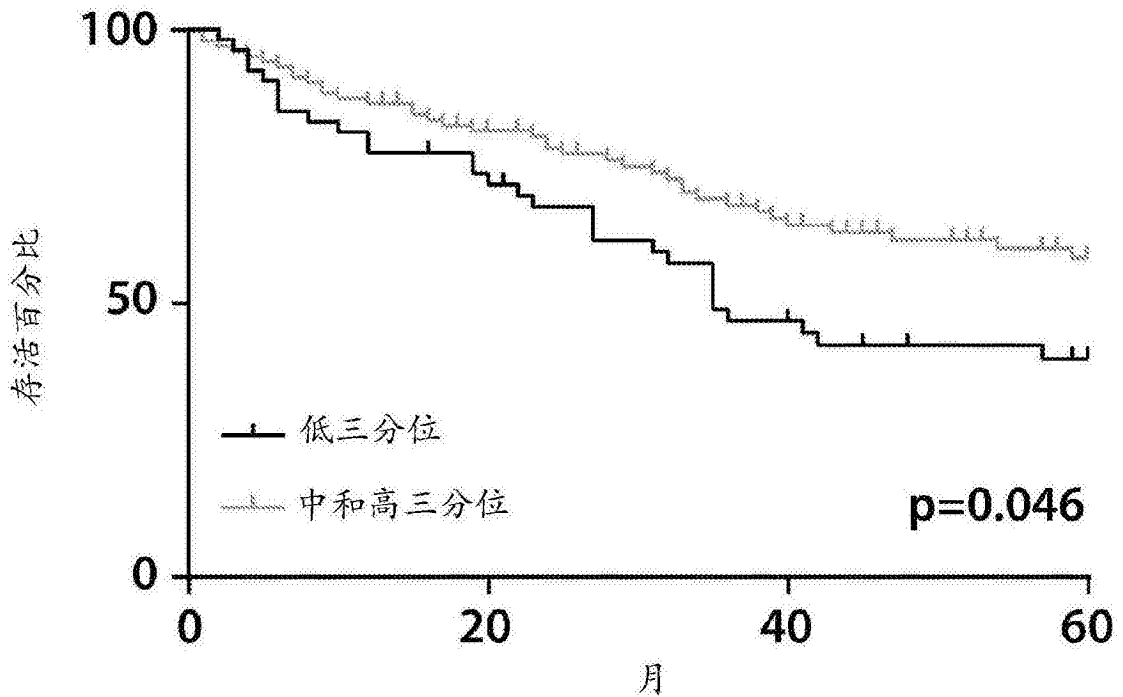


图10

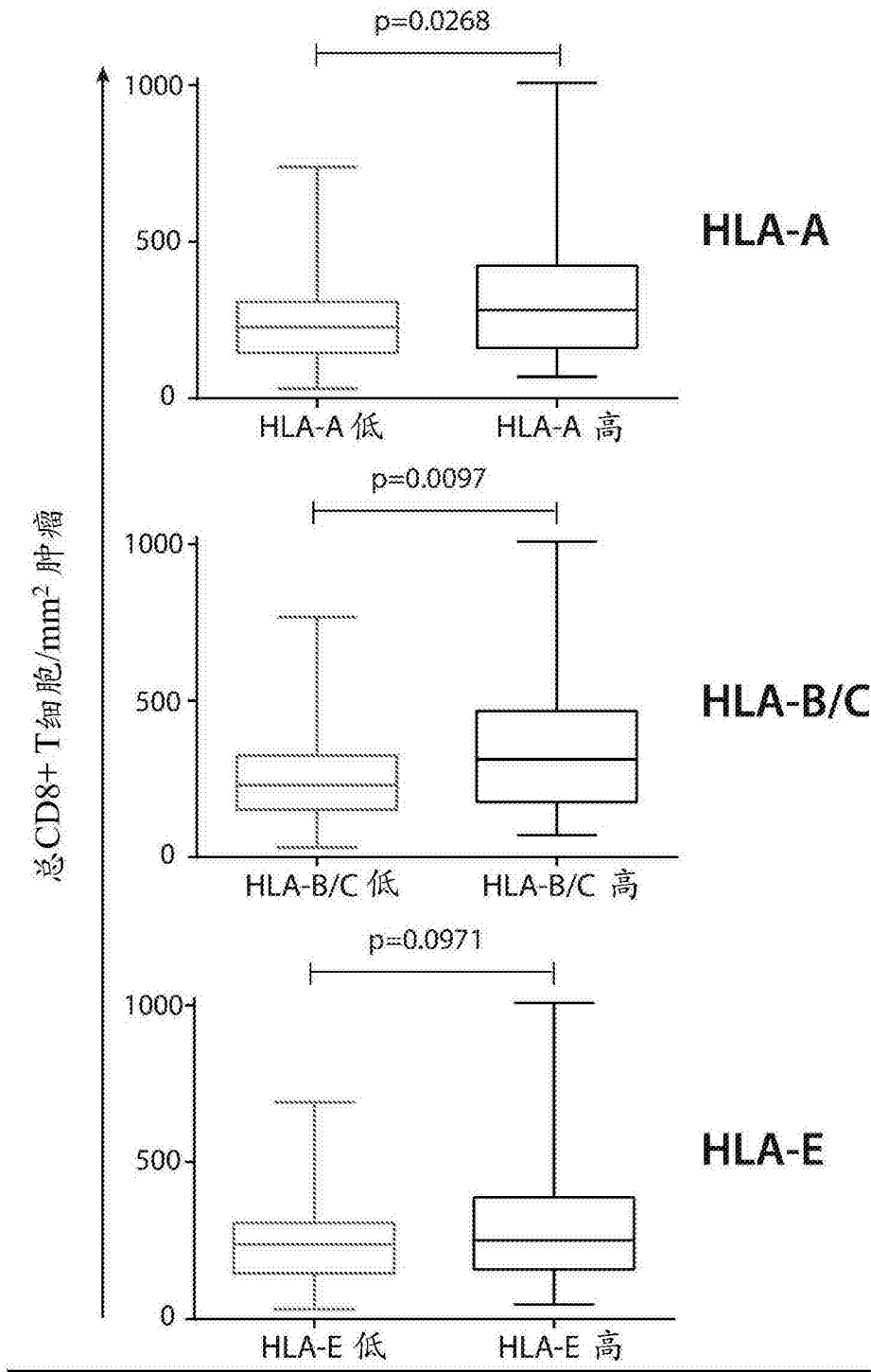


图11