



(21)申請案號：105132561

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 10 月 07 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/10/08 美國

62/239,020

(71)申請人：宏觀基因股份有限公司(美國) MACROGENICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：維索立 詹姆士 VASSELLI, JAMES (US)；微吉頓 強瑪克 WIGGINTON, JON
MARC (US)；波維尼 愛利歐 BONVINI, EZIO (US)；寇尼格 史考特 KOENIG,
SCOTT (US)

(74)代理人：李文賢

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：0 共 83 頁

(54)名稱

用於治療癌症的聯合療法

COMBINATION THERAPY FOR THE TREATMENT OF CANCER

(57)摘要

本發明涉及聯合療法，所述聯合療法包括將特異性結合人 B7-H3 的第一分子和特異性結合人 PD-1 的第二分子施用至受試者，以治療癌症和/或炎症。本發明也涉及藥物組合物，其包括特異性結合人 B7-H3 的第一分子和特異性結合人 PD-1 的第二分子，所述藥物組合物能夠介導，更優選地能夠增強，針對與任何各種人癌症相關的癌細胞的免疫系統的啟動。本發明也涉及這類藥物組合物治療接受受試者中癌症和其他疾病的用途。

The present invention is directed to a combination therapy involving the administration of a first molecule that specifically binds to human B7-H3 and a second molecule that specifically binds to human PD-1 to a subject for the treatment of cancer and/or inflammation. The invention also concerns pharmaceutical compositions that comprise a first molecule that specifically binds to human B7-H3 and a second molecule that specifically binds to human PD-1 that are capable of mediating, and more preferably enhancing, the activation of the immune system against cancer cells that are associated with any of a variety of human cancers. The invention also relates to the use of such pharmaceutical compositions to treat cancer and other diseases in recipient subjects.



201718013

申請日: 105/10/07

【發明摘要】

IPC分類: **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【中文發明名稱】 用於治療癌症的聯合療法

【英文發明名稱】 Combination Therapy for the Treatment of Cancer

5 【中文】

本發明涉及聯合療法，所述聯合療法包括將特異性結合人B7-H3的第一分子和特異性結合人PD-1的第二分子施用至受試者，以治療癌症和/或炎症。本發明也涉及藥物組合物，其包括特異性結合人B7-H3的第一分子和特異性結合人PD-1的第二分子，所述藥物組合物能夠介導，更優選地能夠增強，針對與任何各種人癌症相關的癌細胞的免疫系統的啟動。本發明也涉及這類藥物組合物治療接受受試者中癌症和其他疾病的用途。

【英文】

The present invention is directed to a combination therapy involving the administration of a first molecule that specifically binds to human B7-H3 and a second molecule that that specifically binds to human PD-1 to a subject for the treatment of cancer and/or inflammation. The invention also concerns pharmaceutical compositions that comprise a first molecule that specifically binds to human B7-H3 and a second molecule that specifically binds to human PD-1 that are capable of mediating, and more preferably enhancing, the activation of the immune system against cancer cells that are associated with any of a variety of human cancers. The invention also relates to the use of such pharmaceutical compositions to treat cancer and other diseases in recipient subjects.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於治療癌症的聯合療法

【英文發明名稱】 Combination Therapy for the Treatment of Cancer

5

【技術領域】

【0001】 [相關申請的交叉引用] 本申請要求美國專利申請系列號 62/239,020 (2015 年 10 月 8 日提交；待決)的優先權，該申請通過引用以其整體併入本文。

10

【0002】 [參考序列表] 根據 37 C.F.R. 1.821 以及下面的條款，本申請包括一個或多個序列表，其以電腦-可讀介質公開(檔案名：1301_129PCT_ST25.txt，2016 年 9 月 24 日創建，並且大小為 89,867 位元組)，該檔通過引用以其整體併入本文。

15

【0003】 本發明涉及聯合療法，所述聯合療法包括向受試者施用特異性結合人 B7-H3 的第一分子和特異性結合人 PD-1 的第二分子，用於治療癌症和/或炎症。本發明也涉及藥物組合物，其包括特異性結合人 B7-H3 的第一分子和特異性結合人 PD-1 的第二分子，所述藥物組合物能夠介導，更優選地能夠增強，針對與任何各種人癌症相關的癌細胞的免疫系統的啟動。本發明也涉及這類藥物組合物治療接受受試者中癌症和其他疾病的用途。

20

【先前技術】

25

【0004】 腫瘤的生長和轉移很大程度上取決於它們逃避宿主免疫監視和戰勝宿主防禦的能力。大部分腫瘤表達可被宿主免疫系統不同程度識別的抗原，但是在許多情況下，由於效應 T 細胞的無效啟動而引起不充分的免疫應答(Khawli, L.A.等 (2008) “*Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors*,” Exper. Pharmacol. 181:291-328)。

【0005】 A. B7 超家族和 B7-H3

【0006】 B7 家族成員是具有免疫球蛋白-V 樣和免疫球蛋白-C 樣結構域(例如, IgV-IgC)的免疫球蛋白超家族成員(Sharpe, A.H.等 (2002) “***The B7-CD28 Superfamily***,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。**B7-家族成員的 IgV 和 IgC 結構域各自由單外顯子編碼，另外的外顯子編碼前導序列、跨膜和細胞質結構域。細胞質結構域較短，長度範圍是 19 至 62 個氨基酸殘基並且可由多個外顯子編碼**(Collins, M.等 (2005) “***The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands***,” Genome Biol. 6:223.1-223.7)。**預測 B7 家族的成員在細胞表面形成連續的(back-to-back)、非共價同源二聚體，並且就 B7-1 (CD80)和 B7-2 (CD86)而言，已經發現了這類二聚體。B7-1 (CD80)和 B7-2 (CD86)展示對於刺激性 CD28 受體和抑制性 CTLA-4 (CD152)受體的雙特異性**(Sharpe, A.H.等 (2002) “***The B7-CD28 Superfamily***,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。

【0007】 B7-H3 是獨特的，因為主要的人形式包含兩個細胞外串聯 IgV-IgC 結構域(即， IgV-IgC-IgV-IgC) (Collins, M.等 (2005) “***The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands***,” Genome Biol. 6:223.1-223.7)。**儘管起初認為僅僅包括 2 個 Ig 結構域(IgV-IgC) (Chapoval, A.等 (2001) “***B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production***,” Nature Immunol. 2:269-274 ; Sun, M.等 (2002) “***Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes***,” J. Immunol. 168:6294-6297)，但是已經鑒定了四免疫球蛋白細胞外結構域變體(“4Ig-B7-H3”)，並且發現其是更常見的人形式的蛋白質(Sharpe, A.H.等 (2002) “***The B7-CD28 Superfamily***,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。**但是，天然鼠科形式(2Ig)和人 4Ig 形式展示類似的功能(Hofmeyer, K.等 (2008) “***The Contrasting Role Of B7-H3***,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278)。**4Ig-B7-H3 分子抑制天然殺傷細胞介導的癌細胞的裂解 (Castriconi, R.等 “***Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis***,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34): 12640-12645)。**已經發現人 B7-H3 (2Ig 形式)通過結合啟動 T 細胞上的假定受體而促進 T-細胞啟動和 IFN- γ 產生(Chapoval, A.等 (2001) “***B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ***

Production,” Nature Immunol. 2:269–274 ; Xu, H.等 (2009) “*MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors*,” Cancer Res. 69(15):5275-6281)。當在腫瘤細胞上表達時，B7-H4 和 B7-H1 都是免疫功能有效的抑制劑(Flies, D.B.等 (2007) “*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*,” J. Immunother. 30(3):251-260)。

【0008】 B7-H3 的作用模式的複雜的，因為蛋白質介導 T 細胞共刺激和共抑制二者(Hofmeyer, K.等 (2008) “*The Contrasting Role Of B7-H3*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278 ; Martin-Orozco, N.等 (2007) “*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*,” Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298 ; Subudhi, S.K.等 (2005) “*The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition*,” J. Mol. Med. 83:193-202)。B7-H3 結合(TREM)樣轉錄體 2 (TLT-2)和共刺激 T 細胞啟動，而且也結合仍未確定的受體(一種或多種)，以介導 T 細胞的共抑制。另外，通過與未知受體(一種或多種)的相互作用，B7-H3 是天然殺傷細胞和成骨細胞的抑制劑(Hofmeyer, K.等 (2008) “*The Contrasting Role Of B7-H3*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278)。可通過與主要信號傳導途徑的成員的相互作用進行抑制，通過所述傳導途徑，T 細胞受體(TCR)調節基因轉錄(例如，NFTA、NF- κ B 或 AP-1 因數)。

【0009】 B7-H3 共刺激 CD4⁺和 CD8⁺ T-細胞增殖。B7-H3 也刺激 IFN- γ 產生以及 CD8⁺裂解活性(Chapoval, A.等 (2001) “*B7-H3:A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production*,” Nature Immunol. 2:269–274 ; Sharpe, A.H.等 (2002) “*The B7-CD28 Superfamily*,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。但是，蛋白質也可能通過 NFAT (啟動 T 細胞的核因數)、

NF- κ B (核因數 κ B)以及 AP-1 (活化因數蛋白-1)因數起作用，以抑制 T-細胞啟動 (Yi. K.H.等 (2009) “*Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4*,” Immunol. Rev. 229:145-151)。也認為 B7-H3 體內抑制 Th1、Th2 或 Th17 (Prasad, D.V.等 (2004) “*Murine B7-H3 Is A Negative Regulator Of T Cells*,” J. Immunol. 173:2500-2506 ; Fukushima, A.等 (2007) “*B7-H3 Regulates The Development Of Experimental Allergic Conjunctivitis In Mice*,” Immunol. Lett. 113:52-57 ; Yi. K.H.等 (2009) “*Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4*,” Immunol. Rev. 229:145-151)。若干獨立的研究已經顯示，人惡性腫瘤細胞展示顯著增加的 B7-H3 蛋白質的表達，並且該增加的表達與增加的疾病嚴重程度相關(Zang, X.等 (2007) “*The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition*,” Clin. Cancer Res. 13:5271-5279)，提示 B7-H3 被腫瘤用作免疫逃避途徑(Hofmeyer, K.等 (2008) “*The Contrasting Role Of B7-H3*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278)。

【0010】 阻斷 B7 分子結合 T-細胞受體(例如，CD28)的能力的分子抑制免疫系統，並且已經被建議作為自身免疫性疾病的療法(Linsley, P.S.等 (2009) “*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Co-Stimulation*,” Immunolog. Rev. 229:307-321)。用抗 4Ig-B7-H3 抗體治療的表達 4Ig-B7-H3 的成神經細胞瘤細胞對 NK 細胞更敏感。但是，不清楚該活性是否可僅僅歸因於針對 4Ig-B7-H3 形式的抗體，因為所有報導的針對 4Ig-B7-H3 而產生的抗體也結合兩個 Ig 樣形式的 B7-H3 (Steinberger, P.等 (2004) “*Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3, a Member of the B7 Family with Four Ig-Like Domains*,” J. Immunol. 172(4): 2352-2359 和 Castriconi 等 (2004) “*Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34):12640-12645)。

【0011】 B7-H3 不在靜息 B 或 T 細胞、單核細胞或樹突細胞上表達，但是其在樹突細胞上通過 IFN- γ 被誘導和在單核細胞上通過 GM-CSF 被誘導 (Sharpe, A.H. 等 (2002) “*The B7-CD28 Superfamily*,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。還未充分表徵結合 B7-H3 的受體(一種或多種)。早期的工作提示，
 5 一種這樣的受體需要在啟動之後在 T 細胞上被快速和暫態上調(Loke, P.等 (2004) “*Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells*,” Arthritis Res. Ther. 6:208-214)。最近，在髓樣細胞上表達的 (TREM)樣轉錄體 2 (TLT-2 或 TREML2)受體(King, R.G.等 (2006) “*Trem-Like Transcript 2 Is Expressed On Cells Of The Myeloid/Granuloid And B Lymphoid*
 10 *Lineage And Is Up-Regulated In Response To Inflammation*,” J. Immunol. 176:6012-6021 ; Klesney-Tait, J.等 (2006) “*The TREM Receptor Family And Signal Integration*,” Nat. Immunol. 7:1266–1273 ; Yi. K.H.等 (2009) “*Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4*,” Immunol. Rev. 229:145-151) 已經被證明能夠結合 B7-H3，從而尤其能夠共刺激 CD8+ T 細胞的啟動(Zang, X.等
 15 (2003) “*B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 100:10388–10392 ; Hashiguchi, M.等 (2008) “*Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cell-Like Transcript 2 (TLT-2) Is A Counter-Receptor For B7–H3 And Enhances T Cell Responses*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10495-10500 ; Hofmeyer, K.等 (2008) “*The Contrasting Role*
 20 *Of B7-H3*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278)。

【0012】 除了其在成神經細胞瘤細胞上的表達，人 B7-H3 在寬範圍的癌症和培養的癌症類幹細胞中過表達。尤其地，B7-H3 在許多惡性贅生物上廣泛地過表達，所述惡性贅生物包括：SCCHN，其中水準與遠端轉移的發展和降低的生存率呈正相關(Katayama, A. 等 (2011) “*Expression of B7-H3 in*

hypopharyngeal squamous cell carcinoma as a predictive indicator for tumor metastasis and prognosis,” Int J Oncol 38:1219-26)；膀胱癌(Boorjian, S.A. ,等 (2008) “T Cell Coregulatory Molecule Expression in Urothelial Cell Carcinoma: Clinicopathologic Correlations and Association with Survival,” Clin Cancer Res 14:4800-7)；前列腺癌，其中 B7-H3 的表達與轉移行為和差的結果相關(Chavin, G. 等 (2009) “Expression of immunosuppressive B7-H3 ligand by hormone-treated prostate cancer tumors and metastases’,” Clin Cancer Res 15:2174-80；Zang, X. 等 (2007) “B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome,” Proc Natl Acad Sci U S A 104:19458-63)；腎細胞癌，其中 B7-H3 在腫瘤脈管系統中廣泛地表達(Crispen, P.L. 等 (2008) “Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell Carcinoma,” Clin Cancer Res 14:5150-7)；卵巢癌(Zang, X.等 (2010) “Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas,” Mod Pathol 2010 May 21)；結直腸癌(Sun, J.等 (2010) “Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H3 in human colorectal carcinoma,” Cancer Immunol Immunother, 3 月 24)；胃癌(Wu, C.P.等 (2006) “Relationship between costimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis,” World J Gastroenterol 12:457-9)；非小細胞肺癌，其中原發性腫瘤上的較高水準與較高可能性的轉移疾病相關(Sun, Y.等 (2006) “B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer,” Lung Cancer 53:143-51)；惡性膠質瘤(Modak, S.等(2001) “Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors,” Cancer Res 61:4048-54)；黑素瘤，其中較高的水準與較高的腫瘤階段和更短的生存期相關(Tekle, C.等 (2012) “B7-H3 contributes to the metastatic capacity of

melanoma cells by modulation of known metastasis-associated genes,” Int J Cancer 130:2282-90 ; Wang, L.等(2013) “*B7-H3 mediated tumor immunology: Friend or foe?*,” Int J Cancer Sep 7) ; 和兒童的某些小圓藍細胞瘤 (small round blue cell tumor) , 包括成神經細胞瘤和橫紋肌肉瘤(Gregorio, A.等 (2008) “*Small round blue cell tumours : diagnostic and prognostic usefulness of the expression of B7-H3 surface molecule,*” Histopathology 53:73-80) 。

【0013】 B. PD-1

【0014】 程式性死亡-1 (“PD-1”) 是廣泛地負調節免疫應答的 T-細胞調節劑的擴展的 CD28/CTLA-4 家族的約 31 kD I 型膜蛋白成員(Ishida, Y.等 (1992) “*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,*” EMBO J. 11:3887-3895 ; 美國專利申請公開號 2007/0202100、2008/0311117、2009/00110667 ; 美國專利號 6,808,710、7,101,550、7,488,802、7,635,757、7,722,868 ; PCT 公開號 WO 01/14557) 。

【0015】 PD-1 在啟動的 T-細胞、B-細胞和單核細胞上表達(Agata, Y. 等 (1996) “*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes,*” Int. Immunol. 8(5):765-772 ; Yamazaki, T. 等 (2002) “*Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC,*” J. Immunol. 169:5538-5545) , 並且以低水準在天然殺傷細胞(NK) T-細胞中表達(Nishimura, H.等 (2000) “*Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice,*” J. Exp. Med. 191:891-898 ; Martin-Orozco, N. 等 (2007) “*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,*” Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298) 。

【0016】 PD-1 的細胞外區域由單免疫球蛋白(Ig)V 結構域組成, 所述單免疫球蛋白(Ig)V 結構域與 CTLA4 中等同的結構域具有 23% 的同一性

(Martin-Orozco, N.等 (2007) “*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*,” Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)。細胞外 IgV 結構域之後是跨膜區和細胞內尾區。細胞內尾區包含位於基於免疫受體酪氨酸的抑制基序和基於免疫受體酪氨酸的轉換基序中的兩個磷酸化位點，這表明 PD-1 負調節 TCR 信號(Ishida, Y.等 (1992) “*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*,” EMBO J. 11:3887-3895；Blank, C.等 (2006) “*Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer*,” Immunol. Immunother. 56(5):739-745)。

【0017】 通過結合 PD-L1 和 PD-L2，PD-1 介導其對免疫系統的抑制 (Flies, D.B.等 (2007) “*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*,” J. Immunother. 30(3):251-260；美國專利號 6,803,192、7,794,710；美國專利申請公開號 2005/0059051、2009/0055944、2009/0274666、2009/0313687；PCT 公開號 WO 01/39722、WO 02/086083)。

【0018】 PD-L1 和 PD-L2 在人和鼠科動物組織，比如心臟、胎盤、肌肉、胎肝、脾、淋巴結和胸腺以及鼠科動物肝、肺、腎、胰腺的胰島細胞和小腸的表面上廣泛表達(Martin-Orozco, N.等 (2007) “*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*,” Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)。在人中，已經在人內皮細胞(Chen, Y.等 (2005) “*Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells*,” Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92；de Haij, S.等 (2005) “*Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1*” Kidney Int. 68:2091-2102；Mazanet, M.M.等 (2002) “*B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis*,” J. Immunol. 169:3581-3588)、心肌(Brown, J.A.等 (2003) “*Blockade Of Programmed Death-1*

Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production,” J. Immunol. 170:1257-1266)、合胞滋養層(syncytiotrophoblasts) (Petroff, M.G.等 (2002) “*B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface,*” Placenta 23:S95-S101)中發現了 PD-L1 蛋白質表達。該分子也由一些
5 組織的駐留型巨噬細胞、已經經干擾素(IFN)- γ 或腫瘤壞死因數(TNF)- α 啟動的巨噬細胞表達(Latchman, Y.等 (2001) “*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation,*” Nat. Immunol 2:261-268), 並且在腫瘤中被表達(Dong, H. (2003) “*B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity,*” J. Mol. Med. 81:281-287)。

10 【0019】 已經發現 PD-L1 和 PD-1 之間的相互作用為 T-和 B-細胞提供了重要的負共刺激信號(Martin-Orozco, N.等 (2007) “*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,*” Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298), 並且用作細胞死亡誘導者(Ishida, Y.等 (1992) “*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,*” EMBO J.
15 11:3887-3895 ; Subudhi, S.K.等 (2005) “*The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition,*” J. Molec. Med. 83:193-202)。更具體而言, 已經發現低濃度的 PD-1 受體和 PD-L1 配體之間的相互作用導致強烈抑制抗原特異性 CD8⁺ T-細胞增殖的抑制信號的傳輸; 在較高濃度, 與 PD-1 的相互作用不抑制 T-細胞增殖, 但是顯著減少多種細胞因數的產生(Sharpe, A.H.等 (2002) “*The B7-CD28 Superfamily,*” Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。已經發現, 可溶性 PD-L1-Fc 融合蛋白抑制通過靜息和先前啟動的 CD4 和 CD8 T-細胞以及甚至來自臍帶血液的幼稚 T-細胞的 T-細胞增殖和細胞因數產生(Freeman, G.J.等 (2000) “*Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation,*” J. Exp. Med.
20

192:1-9 ; Latchman, Y.等 (2001) “*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation*,” Nature Immunol. 2:261-268 ; Carter, L.等 (2002) “*PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2*,” Eur. J. Immunol. 32(3):634-643 ; Sharpe, A.H.等 (2002) “*The B7-CD28 Superfamily*,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。

【0020】 PD-L1 和 PD-1 在抑制 T-細胞啟動和增殖中的作用提示這些生物分子可用作治療性靶標，用於治療炎症和癌症。因此，已經建議了抗 PD-1 抗體治療感染和腫瘤以及上調適應性免疫應答的用途(見，美國專利申請公開號 2010/0040614、2010/0028330、2004/0241745、2008/0311117、2009/0217401；美國專利號 7,521,051、7,563,869、7,595,048；PCT 公開號 WO 2004/056875、WO 2008/083174)。

Agata, T.等 (1996) “*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*,” Int. Immunol. 8(5):765-772；和 Berger, R.等 (2008) “*Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011 , A Humanized Antibody Interacting With PD-1 , In Patients With Advanced Hematologic Malignancies*,” Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051 已經報導了能夠特異性結合 PD-1 的抗體(也見，美國專利號 8,008,449 和 8,552,154；美國專利公開號 2007/0166281、2012/0114648、2012/0114649、2013/0017199、2013/0230514 和 2014/0044738；和 PCT 專利公開號 WO 2003/099196、WO 2004/004771、WO 2004/056875、WO 2004/072286、WO 2006/121168、WO 2007/005874、WO 2008/083174、WO 2009/014708、WO 2009/073533、WO 2012/135408、WO 2012/145549 和 WO 2013/014668)。

【0021】 C. 表達 B7-H3 的癌症

【0022】 B7-H3 的過表達發生於大範圍的癌症和培養的癌症類幹細胞中。如上所述，B7-H3 的過表達與增加的疾病復發和差的預後強烈相關。但是，

B7-H3 是抗 B7-H3 藥物的潛在的靶標，包括靶向受體的細胞外結構域的單克隆抗體。已經描述了特異性結合 B7-H3 的抗體和其他分子(見，美國專利號 8,802,091、7,527,969、7,368,554、7,358,354 和 7,279,567；美國專利申請公開號 US 20090087416、US 20090022747、US 20090018315、US2008116219、
5 US20080081346、US 20050202536、US20030103963、US20020168762；PCT 公開號 WO 2011/109400、WO 2008/116219、WO 2006/016276、WO 2004/093894、WO 04/001381、WO 2002/32375、WO 2002/10187 和 WO 2001/094413；EP 1292619B；Modak, S.等(March 1999) “*Disialoganglioside GD2 And Antigen 8H9: Potential Targets For Antibody-Based Immunotherapy Against Desmoplastic Small*
10 *Round Cell Tumor (DSRCT) And Rhabdomyosarcoma (RMS),*” Proceedings Of The American Association For Cancer Research Annual Meeting (美國癌症研究協會年會論文集), Vol. 40:474 (9th Annual Meeting Of The American Association For Cancer Research (第九十屆美國癌症研究協會年會)；Philadelphia, Pennsylvania, US；4 月 10-14, 1999；Modak, S.等 (March 2000) “*Radioimmunotargeting To*
15 *Human Rhabdomyosarcoma Using Monoclonal Antibody 8H9,*” Proc. Am. Assoc. Cancer Res.41:724；Modak, S.等 (2001) “*Monoclonal Antibody 8H9 Targets A Novel Cell Surface Antigen Expressed By A Wide Spectrum Of Human Solid Tumors,*” Cancer Res. 61(10):4048-4054；Steinberger, P.等(2004) “*Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3 , a Member of the B7 Family with Four Ig-Like Domains,*” J.
20 Immunol. 172(4):2352-2359；Xu, H.等(2009) “*MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors,*” Cancer Res. 69(15):5275-6281)。

【0023】 儘管這些進展，但是仍需要改善的療法，用於治療表達 B7-H3 的癌症並且利於或介導針對這類癌症的免疫應答。儘管適應性免疫系統可能是

抵抗癌症和疾病的有效防禦機制，但其通常受到腫瘤微環境中免疫抑制機制，
 比如共抑制分子的表達的阻礙。此外，在腫瘤環境(milieu)中由腫瘤細胞、免疫
 細胞和基質細胞表達的共抑制分子可明顯減弱針對癌細胞的 T-細胞應答。因
 此，進一步地需要新的聯合和治療方案，其特異性識別癌細胞表面上的靶標，
 5 並且可從而介導 T-細胞啟動、免疫應答的刺激和表達 B7-H3 的癌細胞的殺傷。
 本發明的目標是鑒定這類組合物和治療方案。

【發明內容】

【0024】 本發明涉及包括向受試者施用特異性結合人 B7-H3 的第一
 10 分子(即，B7-H3-結合分子)和特異性結合人 PD-1 的第二分子(即，PD-1-結合分
 子)的聯合療法，用於治療癌症和炎症。本發明也涉及藥物組合物，其包括特異
 性結合人 B7-H3 的第一分子和特異性結合人 PD-1 的第二分子，所述藥物組合物
 能夠介導，更優選地能夠增強，針對與各種人癌症相關的癌細胞的免疫系統的
 啟動。本發明也涉及這類藥物組合物治療癌症和其他疾病的用途。

15 【0025】 詳細地，本發明提供了治療癌症的方法，其包括向需要其的
 受試者施用特異性結合 B7-H3 的分子和特異性結合 PD-1 的分子。

【0026】 本發明尤其涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合
 B7-H3 的分子是抗 B7-H3 抗體或其抗原-結合片段，並且特異性結合 PD-1 的分
 子是抗 PD-1 抗體或其抗原-結合片段。

20 【0027】 本發明尤其涉及這類方法的實施方式，其中抗 B7-H3 抗體或
 其抗原-結合片段：

(a)與 BRCA84D、BRCA69D、PRCA157 或與選自表 5 的抗 B7-H3 抗體競爭
 B7-H3 結合；或

(b)具有 BRCA84D、hBRCA84D (1.1)、hBRCA84D (2.2)、hBRCA84D-2、

hBRCA69D (1.1)、hBRCA (2.2)的三個重鏈 CDR 和三個輕鏈 CDR，或具有
選自表 5 的抗 B7-H3 的三個重鏈 CDR 和三個輕鏈 CDR；或

(c)具有 BRCA84D、hBRCA84D (1.1)、hBRCA84D (2.2)、hBRCA84D-2、
hBRCA69D (1.1)、hBRCA (2.2)的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域，或具
5 有選自表 5 的抗 B7-H3 的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域。

【0028】 本發明尤其涉及這類方法的實施方式，其中抗 PD-1 抗體或
其抗原-結合片段：

(a)與尼伏魯單抗(nivolumab)、派姆單抗(pembrolizumab)、匹地利珠單抗
(pidilizumab)、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb7、PD-1
10 mAb 8，或與選自表 6 的抗 PD-1 抗體競爭 PD-1 結合；或

(b)具有尼伏魯單抗、派姆單抗、匹地利珠單抗、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 5、
PD-1 mAb 6、PD-1 mAb7、PD-1 mAb 8 的三個重鏈 CDR 和三個輕鏈 CDR，
或具有選自表 6 的抗 PD-1 抗體的三個重鏈 CDR 和三個輕鏈 CDR；或

(c)具有尼伏魯單抗、派姆單抗、匹地利珠單抗、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 5、
15 PD-1 mAb 6、PD-1 mAb7、PD-1 mAb 8 的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構
域，或具有選自表 6 的抗 PD-1 抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域。

【0029】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中抗 B7-H3 抗體
或其抗原-結合片段包括 Fc 結構域，和/或抗 PD-1 抗體或其抗原-結合片段包括
Fc 結構域。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中抗 B7-H3 抗體或其抗
20 原-結合片段包括變異的 Fc 結構域，其在 Fc 結構域具有一個、兩個、三個、四
個、五個或更多個增強 ADCC 的修飾。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，
其中增強 ADCC 的 Fc 結構域修飾包括 L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L
中的任何一個、任何兩個、任何三個、任何四個或所有五個取代。本發明進一
步涉及這類方法的實施方式，其中抗 PD-1 抗體或其抗原-結合片段包括：(a)變

異的 Fc 結構域，其在 Fc 結構域具有降低或消除 ADCC 活性的至少一個修飾；或(b)IgG4 Fc 結構域。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中降低或消除 ADCC 的 Fc 結構域修飾包括優選地 IgG1 Fc 結構域的 L234A；L235A；或 L234A 和 L235A 的取代。

5 **【0030】** 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中抗 B7-H3 抗體是 hBRCA84D-2 並且抗 PD-1 抗體是尼伏魯單抗、派姆單抗、匹地利珠單抗或 PD-1 mAb 6-ISQ。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中抗 B7-H3 抗體是 hBRCA84D-2 並且抗 PD-1 抗體或其抗原-結合片段包括尼伏魯單抗、派姆單抗、匹地利珠單抗、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7，PD-1
10 mAb 8 或選自表 6 的抗 PD-1 抗體的 VH 和 VL。

【0031】 本發明另外涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 B7-H3 的分子(尤其是抗 B7-H3 抗體)以每週 1-15 mg/kg 體重的劑量被施用和特異性結合 PD-1 的分子(尤其是抗 PD-1 抗體)以每三周 200 mg 的固定劑量被施用。本發明也涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 B7-H3 的分子(尤其是
15 抗 B7-H3 抗體)以每週 1-15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且特異性結合 PD-1 的分子(尤其是抗 PD-1 抗體)以每兩周或三周 1-10 mg/kg 體重的劑量被施用。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 B7-H3 的分子(尤其是抗 B7-H3 抗體)以選自每週 1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 和 15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且特異性結合 PD-1 的分子(尤其是抗 PD-1 抗體)以每三周 200 mg 的固
20 定劑量被施用。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 B7-H3 的分子(尤其是抗 B7-H3 抗體)以選自每週 1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 和 15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且特異性結合 PD-1 的分子(尤其是抗 PD-1 抗體)以選自每兩周或三周 1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg 和 10 mg/kg 體重的劑量被施用。本發明尤其是涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 B7-H3 的分子(尤其是抗

B7-H3 抗體)以選自每週 3 mg/kg、10 mg/kg 和 15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且特異性結合 PD-1 的分子(尤其是抗 PD-1 抗體)以每三周 2 mg/kg 體重的劑量被施用。本發明尤其是涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 B7-H3 的分子(尤其是抗 B7-H3 抗體)以選自每週 3 mg/kg、10 mg/kg 和 15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且特異性結合 PD-1 的分子(尤其是抗 PD-1 抗體)以每兩周 3 mg/kg 體重的劑量被施用。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 B7-H3 的分子(尤其是抗 B7-H3 抗體)和特異性結合 PD-1 的分子(尤其是抗 PD-1 抗體)通過 IV 輸注而被施用。本發明也涉及這類方法的實施方式，其中每兩周或三周在 48-小時的時間內施用特異性結合 B7-H3 的分子(尤其是抗 B7-H3 抗體)和特異性結合 PD-1 的分子(尤其是抗 PD-1 抗體)。

【0032】 本發明尤其涉及這類方法的實施方式，其中癌症是其中表達 B7-H3 的癌症。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中癌症是表達 B7-H3 的頭頸部的鱗狀細胞癌(SCCHN)、膀胱癌、乳腺癌、結直腸癌、胃癌、惡性膠質瘤、腎癌、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、腎細胞癌、小圓藍細胞瘤、成神經細胞瘤或橫紋肌肉瘤。

【0033】 本發明另外涉及這類方法的實施方式，其進一步包括施用第三治療劑的步驟，尤其其中第三治療劑是抗血管生成劑、抗腫瘤劑、化療劑，或細胞毒性劑。

【實施方式】

【0034】 本發明涉及包括向受試者施用特異性結合人 B7-H3 的第一分子和特異性結合人 PD-1 的第二分子的聯合療法，用於治療癌症和/或炎症。本發明也涉及藥物組合物，其包括特異性結合人 B7-H3 的第一分子和特異性結合人 PD-1 的第二分子，所述藥物組合物能夠介導，更優選地能夠增強，針對與任

何各種人癌症相關的癌細胞的免疫系統的啟動。本發明也涉及這類藥物組合物治療接受受試者中癌症和其他疾病的用途。

【0035】 A. 抗體

【0036】 1. 抗體

5 【0037】 “抗體”是能夠通過位於免疫球蛋白分子的可變結構域中的至少一個表位識別位點免疫特異性結合靶標，比如碳水化合物、多核苷酸、脂質、多肽等(“抗原”)的免疫球蛋白分子。因此，當靶分子是“抗原”時，被抗體識別並且與抗體結合的抗原部分是“表位元”。如本文所使用，術語“抗體”不僅僅包括完整的多克隆或單克隆抗體、駱駝源化(camelized)抗體、單鏈抗體和抗特應(抗 Id)抗體(包括，例如，抗 Id 和針對本發明抗體的抗抗 Id 抗體)，而且也包括其突變體，天然產生的變體，包括具有必要的免疫特異性的表位結合位點的融合蛋白、人源化抗體和嵌合抗體，以及包括具有必要的免疫特異性的抗原識別位點的免疫球蛋白分子的任何其他修飾構造。如本文所使用，抗體的“抗原-結合片段”是其氨基酸序列包括對該抗原特異性的抗體的至少一個表位-結合位點的免疫球蛋白。如本文所使用，術語包括片段(例如，Fab、Fab'、F(ab')₂ Fv)、二硫化物連接的雙特異性 Fvs (sdFv)、胞內抗體和單鏈分子(例如，scFv)。尤其地，抗體包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段，即，包含表位-結合位點的分子。免疫球蛋白分子可以屬於任何類型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、類別(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 15 或亞類。

 【0038】 天然抗體(比如 IgG 抗體)包括與兩條重鏈複合的兩條輕鏈。每條輕鏈包含輕鏈可變(VL)結構域和恒定輕鏈(CL)結構域。每條重鏈包含重鏈可變(VH)結構域，三個重鏈恒定結構域(CH1、CH2 和 CH3)和鉸鏈結構域，其位於 CH1 和 CH2 結構域之間。因此，天然存在的免疫球蛋白(例如，IgG)的基

本結構單元是具有兩條輕鏈和兩條重鏈的四聚體，其通常作為約 150,000 Da 的糖蛋白表達。每條多肽鏈的氨基末端部分包括其可變(“V”)結構域，其具有約 100 至 110 或更多個氨基酸，並且主要負責抗原識別。每條多肽鏈的羧基末端部分限定鏈的恒定(“C”)結構域。因此，IgG 分子的輕鏈的結構(在 N-末端至 C-末端方向上)是：**VL-CL**，並且 IgG 重鏈的結構(在 N-末端至 C-末端方向上)是：**VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3**。

【0039】 完整的、未修飾的抗體(例如，IgG 抗體)結合抗原的表位的能力取決於免疫球蛋白輕鏈和重鏈上可變結構域(即，分別為 VL 結構域和 VH 結構域)的存在。抗體輕鏈和抗體重鏈的相互作用，尤其地，其 VL 和 VH 結構域的相互作用形成抗體的表位-結合位點之一。IgG 分子的可變結構域由以下組成：包含與表位接觸的殘基的互補決定區(CDR)和稱為框架區段(FR)的非 CDR 區段，所述非 CDR 區段通常維持結構和確定 CDR 環的定位，以便允許這類接觸(但是某些框架殘基也可接觸抗原)。因此，VL 結構域具有如下結構(在 N-末端至 C-末端方向上)：**FR_L1-CDR_L1-FR_L2-CDR_L2-FR_L3-CDR_L3-FR_L4**，並且 VH 結構域具有如下結構(在 N-末端至 C-末端方向上)：**FR_H1-CDR_H1-FR_H2-CDR_H2-FR_H3-CDR_H3-FR_H4**。作為(或可用作)抗體輕鏈的第一、第二和第三 CDR 的多肽在本文分別命名為 **CDR_L1 結構域**、**CDR_L2 結構域**和 **CDR_L3 結構域**。類似地，作為(或可用作)抗體重鏈的第一、第二和第三 CDR 的多肽在本文分別命名為 **CDR_H1 結構域**、**CDR_H2 結構域**和 **CDR_H3 結構域**。因此，術語 CDR_L1 結構域、CDR_L2 結構域、CDR_L3 結構域、CDR_H1 結構域、CDR_H2 結構域和 CDR_H3 結構域涉及這樣的多肽：所述多肽在併入到蛋白質中時使得蛋白質能夠結合特定表位，無論這類蛋白質是否具有輕鏈和重鏈的抗體或單鏈結合分子(例如，scFv、BiTe 等)，或是另一類型的蛋白質。與這類抗體相對，scFv 構建體包括包含在單多肽鏈中的抗體的 VL 和 VH 結構域，其中結構域被足夠長

度的柔性連接體分開，以使得兩個結構域自組裝成功能性表位-結合位點。在由於連接體長度不足(小於約 12 個氨基酸殘基)而使得 VL 和 VH 結構域的自組裝不可能時，兩個 scFv 結構可彼此相互作用而形成二價分子，其中一條鏈的 VL 與另一條鏈的 VH 締合(在下文中綜述：Marvin 等 (2005) “*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*,” Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658)。

【0040】 除了它們在診斷中的已知用途，抗體已經被證明可用作治療劑。最近幾十年已經看到對抗體的治療潛能的興趣的復興，並且抗體已經成為一種主要類型的生物技術衍生的藥物(Chan, C.E.等 (2009) “*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*,” Singapore Med. J. 50(7):663-666)。將近 200 種基於抗體的藥物已經被批准或正在開發中。

【0041】 術語“單克隆抗體”指同質型(homogeneous)抗體群體，其中單克隆抗體包括參與抗原的選擇性結合的氨基酸(天然產生的和非天然產生的)。單克隆抗體是高度特異性的，直接針對單個表位(或抗原位點)。術語“單克隆抗體”不僅僅包括完整的單克隆抗體和全長單克隆抗體，而且也包括其片段(比如 Fab、Fab'、F(ab')₂ Fv)、單鏈(scFv)、其突變體、包括抗體部分的融合蛋白、人源化的單克隆抗體、嵌合單克隆抗體和包括具有結合表位的必要的免疫特異性和能力的抗原識別位點的免疫球蛋白分子的任何其他修飾構造。就抗體的來源或製備其的方式(例如，通過雜交瘤、噬菌體選擇、重組表達、轉基因動物等)而言，不旨在是限制性的。術語包括完整的免疫球蛋白以及上面根據“抗體”的定義描述的片段等。製備單克隆抗體的方法是本領域已知的。可採用的一種方法是 Kohler, G.等(1975) “Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Preddefined Specificity,” Nature 256:495-497 的方法或其改良。典型地，單克隆抗體在小鼠、大鼠或兔子中開發。通過用免疫原性量的細胞、細胞提取物或包含期望的表位的蛋白質製品免疫動物而產生抗體。免疫原可以是但

不限於原代細胞、培養 d 細胞系、癌細胞、蛋白質、肽、核酸或組織。用於免疫的細胞可被培養一段時間(例如，至少 24 小時)，然後將它們用作免疫原。細胞它們本身或聯合非變性佐劑，比如 Ribi，可用作免疫原 (見，例如，Jennings, V.M. (1995) “*Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production*,” ILAR J. 37(3):119-125)。

【0042】 一般而言，在用作免疫原時，細胞應保持完整並且優選地有活性。相比於破裂的細胞，完整的細胞可允許抗原被免疫的動物更好地檢測。變性或烈性佐劑，例如，弗氏佐劑的使用，可使細胞破裂，因此，其應用受阻。免疫原可以週期性間隔被多次施用，諸如兩週一次或一週一次，或者可以以維持在動物(例如，在組織重組體中)中的生存力這樣的方式被施用。可選地，對於期望的致病表位是免疫特異性的現有單克隆抗體和任意其他等價抗體可被測序，並通過本領域中已知的任意手段重組產生。在一個實施方式中，對這樣的抗體測序，然後將多核苷酸序列克隆至載體中，用於表達或增殖。編碼感興趣的抗體的序列可在宿主細胞中保持在載體中，並且，可然後擴展和冷凍宿主細胞，用於將來的使用。這樣的抗體的多核苷酸序列可用於遺傳操作，以產生嵌合抗體、人源化抗體或犬源化(caninized)抗體，或以改善抗體的親和力或其他特徵。術語“人源化的”抗體指一般使用重組技術製備的嵌合分子，其具有源自來源於非人物種的免疫球蛋白的抗原-結合位點並且保留了基於人免疫球蛋白結構和/或序列的分子的免疫球蛋白結構。這類抗體的可變結構域的多核苷酸序列可用於遺傳操作，以產生這類衍生物和改善這類抗體的親和性或其他特徵。人源化抗體的一般原則涉及保留抗體的抗原-結合部分的基本序列，同時用人抗體序列交換抗體的非人剩餘部分。人源化單克隆抗體有四個一般步驟。這些是：(1) 確定開始抗體輕鏈和重鏈可變結構域的核苷酸和預測的氨基酸序列；(2) 設計人源化抗體或犬源化抗體，即，決定在人源化或犬源化過程中使用哪種抗體框架

區域；(3)實際人源化或犬源化方法/技術；和(4)人源化抗體的轉染和表達。見，例如，美國專利號 4,816,567、5,807,715、5,866,692 和 6,331,415。

【0043】 這類抗體的表位-結合位點可包括融合至恒定結構域的完整可變結構域或僅僅包括移植在可變結構域中適當的框架區上的互補決定區 (CDR)。抗原-結合位點可以是野生型的或通過一個或多個氨基酸取代而被修飾。這消除了人個體中作為免疫原的恒定區，但是保留了對外源可變區的免疫應答的可能性(LoBuglio, A.F.等 (1989) “*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224)。另一方法不僅僅關注提供源自人的恒定區，而且也修飾可變區，以便重塑它們而盡可能地接近人形式。已知重鏈和輕鏈二者的可變區都包含三個互補決定區(CDR)，其回應討論的抗原而變化並且決定結合能力，其側翼是四個框架區(FR)，所述框架區在給定的物種中是相對保守的並且推測為 CDR 提供支架。當針對特定的抗原製備非人抗體時，可通過在待修飾的人抗體中存在的 FR 上移植源自非人抗體的 CDR 而“重塑”或“人源化”可變區。下面的文章已經報導了該方法用於各種抗體：Sato, K.等 (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann ; L.等 (1988) “*Reshaping Human Antibodies for Therapy*,” Nature 332:323-327；Verhoeyen, M.等 (1988) “*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*,” Science 239:1534-1536；Kettleborough, C. A.等 (1991) “*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*,” Protein Engineering 4:773-3783；Maeda, H. 等 (1991) “*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*,” Human Antibodies Hybridoma 2:124-134；Gorman, S. D. 等 (1991) “*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185；Tempest, P.R.等 (1991) “*Reshaping A Human Monoclonal Antibody*

To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,” Bio/Technology 9:266-271 ; Co, M. S.等 (1991) “*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873 ; Carter, P.等 (1992) “*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289 ; 和 Co, M.S.等 (1992) “*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*,” J. Immunol. 148:1149-1154 。在一些實施方式中，人源化抗體保留所有的 CDR 序列(例如，包含所有六個來自小鼠抗體的 CDR 的人源化小鼠抗體)。在其他實施方式中，人源化抗體具有序列相對於初始抗體不同的一個或多個 CDR (一個、兩個、三個、四個、五個或六個)。

【0044】 已經描述了包括源自非人免疫球蛋白的抗原-結合位點的許多“人源化”抗體分子，包括具有齧齒動物或修飾的齧齒動物 V 區域和它們與人恒定結構域融合的締合的互補決定區(CDR)的嵌合抗體(見，例如，Winter 等 (1991) “*Man-made Antibodies*,” Nature 349:293-299 ; Lobuglio 等 (1989) “*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989) ; Shaw 等 (1987) “*Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen*,” J. Immunol. 138:4534-4538 ; 和 Brown 等 (1987) “*Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody*,” Cancer Res. 47:3577-3583)。其他參考文獻描述了移植至人支架框架區(FR)上然後與適當的人抗體恒定結構域融合的齧齒動物 CDR (見，例如，Riechmann, L.等 (1988) “*Reshaping Human Antibodies for Therapy*,” Nature 332:323-327 ; Verhoeyen, M.等 (1988) “*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*,” Science 239:1534-1536 ; 和 Jones 等 (1986) “*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A*

Mouse,” Nature 321:522-525)。另一參考文獻描述了由重組修飾(veneered)的齧齒動物框架區支撐的齧齒動物 CDR。見，例如，歐洲專利公開號 519,596。這些“人源化”分子被設計，以使對齧齒動物抗人抗體分子的不利免疫應答最小化，所述不利免疫應答限制了這些部分在人接受者中治療應用的持續時間和效力。也可使用人源化抗體的其他方法，其公開在以下文獻中：Daugherty 等 (1991) “*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins*,” Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 和美國專利號 6,180,377、6,054,297、5,997,867 和 5,866,692。

【0045】 2.雙特異性抗體

【0046】 天然抗體僅僅能夠結合一個表位種類(即，它們是“單特異性的”)，但是它們可能結合該種類的多個拷貝(即，它們可展示二價或多價)。可通過產生可同時結合兩個分開的和不同的抗原(或相同抗原的不同表位)的基於多特異性抗體的分子和/或通過產生對於相同的表位和/或抗原具有更高價(即，大於兩個結合位點)的基於抗體的分子而增強抗體的功能。

【0047】 已經開發了各種重組雙特異性和三特異性抗體形式(見，例如，美國專利號 8,277,806、6,994,853、6,551,592 和 6,171,586；美國專利公開號 2010-0291112 和 2008-0057054；和 PCT 公開號 WO 2013/070565、WO 2012/156430、WO 2012/009544、WO 2009/132876、WO 2009/018386、WO 2008/003116、WO 2008/003103、WO 2007/146968、WO 2006/072152、WO 2002/020039、WO 2000/018806、WO 1999/042597、WO 1998/006749 和 WO 1998/003670)，其大部分使用連接體肽，以使抗體核心(IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM)與另外的表位-結合位點(例如，scFv、VL、VH 等)融合，或在抗體核心中融合，或使多個表位-結合位點(例如兩個 Fab 片段或 scFv)彼此融合。可選形式

使用連接體肽，以將表位-結合位點(例如，scFv、VL、VH 等)融合至二聚化結構域，比如 CH2-CH3 結構域或可選的多肽(WO 2005/070966、WO 2006/107786A WO 2006/107617A、WO 2007/046893)。PCT 公開號 WO 2013/174873、WO 2011/133886 和 WO 2010/136172 教導了三特異性抗體，其中 CL 和 CH1 結構域
5 從它們各自的天然位置被轉換，並且 VL 和 VH 結構域已經被多樣化(WO 2008/027236、WO 2010/108127)，以允許它們結合大於一種抗原。PCT 公開號 WO 2013/163427 和 WO 2013/119903 公開了修飾 CH2 結構域，以包含包括結合結構域的融合蛋白加合物。PCT 公開號 WO 2010/028797、WO2010028796 和 WO 2010/028795 公開了重組抗體，其 Fc 結構域已經被另外的 VL 和 VH 結構域
10 取代，以便形成三價結合分子。PCT 公開號 WO 2013/006544 公開了多價 Fab 分子，其作為單多肽鏈被合成，並且然後進行蛋白水解，而產生異源二聚化結構。PCT 公開號 WO 2014/022540、WO 2013/003652、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2011/086091、WO 2007/075270、WO 1998/002463、WO 1992/022583 和 WO 1991/003493 公開了添加另外的結合結構域或官能團至抗體
15 或抗體部分(例如，添加另外的 VL 和 VH 結構域至抗體的輕鏈和重鏈，或添加異源融合蛋白或使多個 Fab 結構域彼此連結)。美國專利號 7,695,936 和專利公開 2007/ 0196363 涉及由兩個抗體的重鏈形成的雙特異性抗體，一個抗體具有被工程化至其重鏈的凸起和第二個抗體具有被工程化至其重鏈的互補的腔。相對於包含相同抗體的兩條重鏈的單特異性的同種抗體，這類互補的“杵(knob)”和
20 “臼(hole)”的存在被教導優選形成雙特異性異種抗體(其具有每個這類抗體的一個重鏈)，。

【0048】 3.優選的 Fc 結構域

【0049】 兩條重鏈的 CH2 和 CH3 結構域相互作用而形成 Fc 結構域，其是被細胞 Fc 受體(FcγR)識別的結構域。如本文所使用，術語“Fc 結構域”用

於限定 IgG 重鏈的 C-末端區域。示例性人 IgG1 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:1)：

5

10

231240250260270280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
290300310320330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
340350360370380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
390400410420430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
440447
ALHNHYTQKS LSLSPGX

根據如 Kabat 中闡釋的 EU 索引編號，其中 X 是賴氨酸(K)或不存在。

15

【0050】 示例性人 IgG2 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:2)：

20

25

231240250260270280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
290300310320330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
340350360370380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
390400410420430
WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
440447
ALHNHYTQKS LSLSPGX

根據如 Kabat 中闡釋的 EU 索引編號，其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

30

【0051】 示例性人 IgG3 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:3)：

35

231240250260270280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
290300310320330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
340350360370380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
390400410420430
WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVME
440447
ALHNRFTQKS LSLSPGX

根據如 Kabat 中闡釋的 EU 索引編號，其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

40

【0052】 示例性人 IgG4 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:4)：

	231	240	250	260	270	280
	APEFLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	
		290	300	310	320	330
	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	
5		340	350	360	370	380
	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	
		390	400	410	420	430
	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE	
		440	447			
10	ALHNHYTQKS	LSLSLG	X			

根據如 Kabat 中闡釋的 EU 索引編號，其中，**X** 是賴氨酸(K)或不存在。

【0053】 遍及本說明書，IgG 重鏈的恒定區中殘基的編號是如 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版, Public Health Service, NH1, MD (1991)中 EU 索引的編號，其通過引用明確併入本文。“如 Kabat 中的 EU 索引” 指人 IgG1 EU 抗體的編號。來自免疫球蛋白的成熟的重鏈和輕鏈的可變區的氨基酸根據鏈中氨基酸的位置被命名。Kabat 描述了抗體的許多氨基酸序列，鑒定了每個亞組的氨基酸共有序列，並且為每個氨基酸賦予了殘基編號。通過參考保守氨基酸比對所討論的抗體與 Kabat 中的共有序列之一，Kabat 的編號方案可擴展至未包括在其綱要中的抗體。用於賦予殘基編號的該方法已經成為本領域的標準並且容易鑒定在不同抗體，包括嵌合或人源化的變體中等同位置處的氨基酸。例如，在人抗體輕鏈 50 位的氨基酸佔據與在小鼠抗體輕鏈的 50 位氨基酸等同的位置。

【0054】 儘管邊界可能稍微不同，根據 Kabat 的 EU 編號系統，人 IgG Fc 結構域的 CH2 結構域通常從人 IgG 的氨基酸 231 延伸至氨基酸 341。根據 Kabat 的 EU 編號系統，人 IgG 的 CH3 結構域通常從氨基酸 342 延伸至 447。“鉸鏈區” 或 “鉸鏈結構域” 通常定義為從人 IgG1 的 Glu216 延伸至 Pro230。

【0055】 在抗體恒定區內的許多不同位置(例如，Fc 位置，包括但不限於 270、272、312、315、356 和 358 位，如在 Kabat 闡釋的 EU 索引編號)已經觀察到了多態性，並且因此在呈現的序列和現有技術的序列之間可存在稍微不同。已經表徵了多態形式的人免疫球蛋白。目前，18 種 Gm 同種異型(allotype)

是已知的：G1m (1、2、3、17)或 G1m (a、x、f、z)、G2m (23)或 G2m (n)、G3m (5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28)或 G3m (b1、c3、b3、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5) (Lefranc, 等, The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990) ;

5 Lefranc, G等, 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211)。特別考慮用於本發明方法的抗體可併入任何免疫球蛋白基因的任何同種異型、異同種異型(isoallotype)或單倍型(haplotype)，並且不限於本文提供的序列的同種異型、異同種異型或單倍型。此外，在一些表達體系中，CH3 結構域的 C-末端氨基酸殘基(上面粗體顯示的)可在翻譯後去除。因此，CH3 結構域的 C-末端殘基是本發明提供的 B7-H3 結合分

10 子和 PD-1 結合分子中的任選的氨基酸殘基。本發明具體考慮缺少 CH3 結構域的 C-末端殘基的這類結合分子。本發明也具體考慮包括 CH3 結構域的 C-末端賴氨酸殘基的這類結合分子。

【0056】 當存在時，CH1 結構域和/或鉸鏈區可以是任何同種型(例如，IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)，但是優選地是與期望的 Fc 結構域相同的同種

15 型。

【0057】 示例性人 IgG1 CH1 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:8)：

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

【0058】 示例性人 IgG2 CH1 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID

20 NO:60)：

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

【0059】 示例性人 IgG4 CH1 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:61)：

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

25 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

【0060】 IgG4 CH1 結構域和穩定化的鉸鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO:16)顯示在下方。

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP

【0061】 示例性人 IgG1 鉸鏈區的氨基酸序列是(SEQ ID NO:10)：

EPKSCDKTHTCPPCP

5 【0062】 示例性人 IgG2 鉸鏈區的氨基酸序列是(SEQ ID NO:62)：

ERKCCVECPPERKCCVECPPCP

【0063】 示例性人 IgG4 鉸鏈區的氨基酸序列是(SEQ ID NO:11)：

ESKYGPPCPSCP

【0064】 在它們與 Fc 結構域連接之後，通過 Fcγ 受體(FcγRs)轉導啟
10 動和抑制信號。這些完全相反的功能源自不同受體同等型(isoform)之間的結構差
異。受體的胞質信號傳導結構域中的兩個不同的結構域——稱為基於免疫受體
酪氨酸的啟動基序(ITAMs)或基於免疫受體酪氨酸的抑制基序(ITIMS)——是造
成不同應答的原因。募集不同胞質酶到這些結構中控制了 FcγR-介導的細胞應答
的結果。含有 ITAM 的 FcγR 複合物包括 FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIIA，然而，含
15 ITIM 的複合物僅包括 FcγRIIB。人嗜中性粒細胞表達 FcγRIIA 基因。通過免疫
複合物或特異性抗體交聯的 FcγRIIA 聚類用於使 ITAM 與促進 ITAM 磷酸化的
受體相關的激酶聚集。ITAM 磷酸化充當 Syk 激酶的停泊位點，Syk 激酶的啟動
導致下游底物(例如，PI3K)的啟動。細胞啟動導致促炎性介質的釋放。FcγRIIB
基因在 B 淋巴細胞上表達；其細胞外結構域與 FcγRIIA 是 96%一致的，並且以
20 不能區分的方式結合 IgG 複合物。ITIM 在 FcγRIIB 的胞質結構域中的存在限定
了 FcγR 的這種抑制性亞類。最近，確定了這種抑制的分子基礎。當與啟動 FcγR
共連接時，FcγRIIB 中的 ITIM 變成磷酸化的，並且吸引肌醇聚磷酸鹽 5'-磷酸酶
(SHIP)的 SH2 結構域，肌醇聚磷酸鹽 5'-磷酸酶(SHIP)水解由於含 ITAM 的 FcγR
介導的酪氨酸激酶啟動而釋放的磷酸肌醇信使，從而防止細胞內 Ca⁺⁺的流入。

因此，FcγRIIB 的交聯抑制對 FcγR 連接的啟動應答並抑制細胞應答。B-細胞啟動、B-細胞增殖和抗體分泌因此被中止。另外，與新生 Fc 受體(FcRn)的相互作用介導了 IgG 分子從內體至細胞表面的再迴圈並且釋放至血液中。

【0065】 Fc 結構域的修飾通常導致改變的表型，例如改變的血清半衰期、改變的穩定性、改變的對細胞酶的敏感性或改變的效應子功能。針對效應子功能，可期望修飾用於本發明方法的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子(例如，抗 B7-H3 和抗 PD-1 抗體)的 Fc 結構域，以便增強抗體治療例如癌症的效力。在某些情況下，例如在抗體的作用機制涉及阻斷或對抗，但是不殺死攜帶靶抗原的細胞的情況下，期望減少或消除效應子功能。當被引導至非期望的細胞，比如其中 FcγRs 以低水準表達的腫瘤和外源細胞時，例如，具有低水準 FcγRIIB 的腫瘤特異性 B 細胞(例如，非霍奇金淋巴瘤、CLL 和伯基特淋巴瘤)，通常期望增加效應子功能。

【0066】 用於本發明方法的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子(例如，抗 B7-H3 和抗 PD-1 抗體)的 Fc 結構域可以是完整的 Fc 結構域(例如，完整的 IgG Fc 結構域)或僅僅是完整 Fc 結構域的片段。因此，用於本發明方法的、包含這類結構域的分子的 Fc 結構域可包括完整的 Fc 結構域的一些或所有的 CH2 結構域和/或一些或所有的 CH3 結構域，或可包括變異的 CH2 和/或變異的 CH3 序列(其可包括，例如，相對於完整的 Fc 結構域的 CH2 或 CH3 結構域的一個或多個插入和/或一個或多個缺失)。這類 Fc 結構域可包括非 Fc 多肽部分，或可包括非天然產生的完整的 Fc 結構域的部分，或可包括非天然產生的取向的 CH2 和/或 CH3 結構域(比如，例如，兩個 CH2 結構域或兩個 CH3 結構域，或在 N-末端至 C-末端方向上，與 CH2 結構域連接的 CH3 結構域等)。儘管 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子的 Fc 結構域可具有結合一個或多個 Fc 受體(例如，FcγR(一個或多個))的能力，更優選地，這類 Fc 結構域將導致與 FcγRIA

(CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或 FcγRIIIB (CD16b)改變的結合(相對於野生型 Fc 結構域展示的結合)或基本上消除這類 Fc 結構域與一個或多個 FcγR (例如，抑制性受體)結合的能力。

【0067】 在某些實施方式中，用於本發明方法的分子可包括變異的 Fc 結構域，其具有對於啟動性和/或抑制性 Fcγ 受體改變的親和力。在一個實施方式中，分子包括變異的 Fc 結構域，相對於具有野生型 Fc 結構域的可比較分子，其具有對於 FcγRIIB 增加的親和力和對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 降低的親和力。在另一實施方式中，用於本發明方法的分子包括變異的 Fc 結構域，其相對於具有野生型 Fc 結構域的比較分子具有對於 FcγRIIB 降低的親和性和對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 增加的親和性。在仍另一實施方式中，用於本發明方法的分子包括變異的 Fc 結構域，其相對於具有野生型 Fc 結構域的可比較分子具有對於 FcγRIIB 降低的親和力和對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 降低的親和力。在仍另一實施方式中，用於本發明方法的分子包括變異的 Fc 結構域，其相對於具有野生型 Fc 結構域的可比較分子具有對於 FcγRIIB 不變的親和力和對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 降低的(或增加的)親和力。

【0068】 在某些實施方式中，用於本發明方法的分子包括變異的 Fc 結構域，其具有對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 改變的親和力，以便免疫球蛋白具有增強的效應子功能。效應細胞功能的非限制性例子包括抗體依賴性細胞介導的細胞毒性、抗體依賴性吞噬、吞噬、調理作用、調理吞噬、細胞結合、玫瑰花結(rosetting)、C1q 結合和補體依賴性細胞介導的細胞毒性。

【0069】 變異的 Fc 結構域是本領域熟知的，並且任何已知的變異的 Fc 結構域可用于本發明，以賦予或修飾包括 Fc 結構域(或其部分)的分子展示的效應子功能，如在例如 NK 依賴性或巨噬細胞依賴性試驗中功能測試的。例如，鑒定為改變效應子功能的 Fc 結構域變體公開在 PCT 公開號 WO 04/063351、WO

06/088494、WO 07/024249、WO 06/113665、WO 07/021841、WO 07/106707；
和 WO 2008/140603 中，並且其中公開的任何適當的變體可用在本發明的分子中。

【0070】 表 4 列舉了示例性單、雙、三、四和五 Fc 結構域突變。

表 4			
優選的啟動性 Fc 結構域的變異			
單位點變異			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
雙位點變異			
F243L 和 R292P	F243L 和 Y300L	F243L 和 P396L	R292P 和 Y300L
D270E 和 P396L	R292P 和 V305I	P396L 和 Q419H	P247L 和 N421K
R292P 和 P396L	Y300L 和 P396L	R255L 和 P396L	R292P 和 P305I
K392T 和 P396L			
三位點變異			
F243L、P247L 和 N421K		P247L、D270E 和 N421K	
F243L、R292P 和 Y300L		R255L、D270E 和 P396L	
F243L、R292P 和 V305I		D270E、G316D 和 R416G	
F243L、R292P 和 P396L		D270E、K392T 和 P396L	
F243L、Y300L 和 P396L		D270E、P396L 和 Q419H	
V284M、R292L 和 K370N		R292P、Y300L 和 P396L	
四位點變異			
L234F、F243L、R292P 和 Y300L		F243L、P247L、D270E 和 N421K	
L234F、F243L、R292P 和 Y300L		F243L、R255L、D270E 和 P396L	
L235I、F243L、R292P 和 Y300L		F243L、D270E、G316D 和 R416G	
L235Q、F243L、R292P 和 Y300L		F243L、D270E、K392T 和 P396L	
P247L、D270E、Y300L 和 N421K		F243L、R292P、Y300L 和 P396L	
R255L、D270E、R292G 和 P396L		F243L、R292P、V305I 和 P396L	
R255L、D270E、Y300L 和 P396L		F243L、D270E、P396L 和 Q419H	
D270E、G316D、P396L 和 R416G			
五位點變異			
L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L		F243L、R292P、V305I、Y300L 和 P396L	
L235P、F243L、R292P、Y300L 和 P396L			

5 【0071】 尤其優選的變體包括一個或多個修飾，所送修改選自組 A-AI：

A	228E、228K、228Y 或 228G；
B	230A、230E、230Y 或 230G；

C	231E、231K、231Y、231P 或 231G；
D	232E、232K、232Y、232G；
E	233D；
F	234I 或 234F；
G	235D、235Q、235P、235I 或 235V；
H	239D、239E、239N 或 239Q；
I	240A、240I、240M 或 240T；
J	243R、243、243Y、243L、243Q、243W、243H 或 243I；
K	244H；
L	245A；
M	247G、247V 或 247L；
N	262A、262E、262I、262T、262E 或 262F；
O	263A、263I、263M 或 263T；
P	264F、264E、264R、264I、264A、264T 或 264W；
Q	265F、265Y、265H、265I、265L、265T、265V、265N 或 265Q；
R	266A、266I、266M 或 266T；
S	271D、271E、271N、271Q、271K、271R、271S、271T、271H、 271A、271V、271L、271I、271F、271M、271Y、271W 或 271G；
T	273I；
U	275L 或 275W；
V	281D、281K、281Y 或 281P；
W	284E、284N、284T、284L、284Y or 284M；
X	291D、291E、291Q、291T、291H、291I 或 291G；
Y	299A、299D、299E、299F、299G、299H、299I、299K、299L、 299M、299N、299P、299Q、299R、299S、299V、299W 或 299Y；
Z	302I；
AA	304D、304N、304T、304H 或 304L
AB	305I；
AC	313F；
AD	323I；
AE	325A、325D、325E、325G、325H、325I、325L、325K、325R、 325S、325F、325M、325T、325V、325Y、325W 或 325P；
AF	328D、328Q、328K、328R、328S、328T、328V、328I、328Y、 328W、328P、328G、328A、328E、328F、328H、328M 或 328N；
AG	330L、330Y、330I 或 330V；
AH	332A、332D、332E、332H、332N、332Q、332T、332K、332R、 332S、332V、332L、332F、332M、332W、332P、332G 或 332Y； 和
AI	336E、336K 或 336Y

【0072】 仍更尤其優選的變體包括選自組 1-105 中的一個或多個修

飾：

組	變體	組	變體
1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E
2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E
3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N
9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T
13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E
18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
19	P243L / V264I	72	S239E / D265N
20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
21	L328E / I332E	74	S239E / I332D
22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332 E
28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
32	N297D / S298A / A330Y / I 332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q
35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E
36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D

組	變體	組	變體
37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N
39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E
42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332 E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

【0073】 在尤其優選的實施方式中，本發明包括 B7-H3-結合分子，其包括變異的 Fc 結構域，其中變體賦予或具有增加的 ADCC 活性和/或的與 FcγRIIIA (CD16A)增加的結合，並且也可具有與 FcγRIIB (CD32B)降低的結合。具有與 CD16A 增加的結合並且可另外具有與 CD32B 降低的結合的人 IgG1 Fc 結構域的示例性變體包含 L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I 或 P296L 取代。優選的 B7-H3-結合分子包括變異的 IgG1 Fc 結構域，其包括下述任何 1、2、3、4、5 或 6 個取代：L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L。這些氨基酸取代可以以任何組合出現在人 IgG1 Fc 結構域中。

【0074】 在一個實施方式中，B7-H3-結合分子將包括在 Fc 結構域中具有至少一個修飾的變異的 Fc 結構域。在某些實施方式中，變異的 Fc 結構域包括選自下述的至少一個取代：L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L。

【0075】 在具體的實施方式中，變異的 Fc 結構域包括：

(A)至少一個取代選自 F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L；

(B)至少兩個取代選自：

F243L 和 P396L；

F243L 和 R292P；和

R292P 和 V305I；

(C)至少三取代選自：

5 F243L、R292P 和 Y300L；

F243L、R292P 和 V305I；

F243L、R292P 和 P396L；和

R292P、V305I 和 P396L；

(D)至少四取代選自：

10 F243L、R292P、Y300L 和 P396L；和

F243L、R292P、V305I 和 P396L；或

(E)至少五個取代選自：

F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L；和

L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L。

15 **【0076】** 在另一具體的實施方式中，變異的 Fc 結構域包括下述取代：

(A)F243L、R292P 和 Y300L；

(B)L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L；或

(C)F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L。

【0077】 在某些實施方式中，PD-1-結合分子包括變異的 Fc 結構域，
20 其中相對於野生型 Fc 結構域(**SEQ ID NO:1**))展示的結合，變體賦予或具有降低的(或基本上沒有)對 FcγRIIIA (CD16a)的結合。

【0078】 具有降低的對 FcγRs 的結合的人 IgG1 Fc 結構域的示例性變體包含 L234A、L235A、D265A、N297A 或 N297Q 取代。優選的 PD-1-結合分子包括變異的 IgG1 Fc 結構域，其包括任何 1、2、3、4 或所有 5 個下述取代：

L234A、L235A、D265A、N297A 和 N297Q。這些氨基酸取代可以以任何組合中出現在人 IgG1 Fc 結構域中。

【0079】 在一個實施方式中，PD-1-結合分子將包括變異的 Fc 結構域，其在 Fc 結構域中具有至少一個修飾。在某些實施方式中，變異的 Fc 結構域包括選自下述的至少一個取代：L234A、L235A、D265A 和 N297Q。因為 L234A、L235A、D265A、N297A 和 N297Q 取代消除效應子功能，所以在期望效應子功能的情況下，優選地不採用這些取代。

【0080】 在具體的實施方式中，變異的 Fc 結構域包括下述取代：

L234A、L235A；

10 D265A；

N297A；或

N297Q。

【0081】 用於本發明方法的 PD-1 結合分子的 CH2 和 CH3 結構域的優選 IgG1 序列具有 L234A/L235A 取代(SEQ ID NO:5)：

15 APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

20 其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0082】 在尤其優選的實施方式中，用於本發明方法的包含 Fc 結構域的 PD-1 結合分子的 CH2-CH3 結構域可以是固有地展示對 FcγRIIIA (CD16a) 降低的(或基本上沒有)結合和/或降低的效應子功能(相對於野生型 IgG1 Fc 結構域(SEQ ID NO:1)展示的結合)的 CH2-CH3 結構域。例如，用於本發明方法的包含 Fc 結構域的 PD-1-結合分子的 CH2-CH3 結構域可以是 IgG2 Fc 結構域或 IgG4 Fc 結構域。

【0083】 在優選的實施方式中，用於本發明方法的 PD-1-結合分子包括 IgG4 Fc 結構域。在使用 IgG4 Fc 結構域的情況下，本發明也包括引入穩定化的鉸鏈突變，比如 S228P (例如，ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:12))，如在 Kabat 中闡釋的 EU 索引編號(Lu 等, (2008) “*The Effect Of A Point Mutation On The*
5 *Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation,*” J. Pharm. Sci. 97:960-969)，以降低鏈交換的發生率。本領域已知的其他穩定化突變可被引入到 IgG4 Fc 結構域中(Peters, P 等, (2012) “*Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal*
Stability,” J. Biol. Chem., 287:24525-24533;PCT 專利公開號 WO 2008/145142)。另
10 外，如上所述，當存在時，CH1 結構域和/或鉸鏈優選地與期望的 Fc 結構域屬於相同的同種型。因此，在這樣的實施方式中，PD-1-結合分子(例如抗體)包括 IgG4 CH1 (見，例如，SEQ ID NO:9)、穩定化的 IgG4 鉸鏈(見，例如，SEQ ID NO:12)和 IgG4 CH2-CH3 結構域(見，例如，SEQ ID NO:4)。

【0084】 可通過增加 Fc 結構域對 FcRn 的結合親和力而延長包括 Fc
15 結構域的蛋白質的血清半衰期。如本文使用的術語“半衰期”意思是分子的藥物代謝動力學性質，是對在其施用之後分子的平均生存時間的衡量。半衰期可表示為從受試者的身體(例如，人患者或其他哺乳動物)或其特定區室消除百分之五十(50%)的已知量的分子需要的時間，例如，如在血清中測量的，即，迴圈半衰期，或在其他組織中測量的。一般而言，施用的分子的半衰期的增加導致分
20 子在迴圈中的平均停留時間(MRT)的增加。

【0085】 在一些實施方式中，用於本發明方法的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子包括變異的 Fc 結構域，其中變異的 Fc 結構域相對於野生型 Fc 結構域包括至少一個氨基酸修飾，使得分子具有延長的半衰期(相對於野生型 Fc 結構域的半衰期而言)。

【0086】 在一些實施方式中，用於本發明方法的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子包括變異的 Fc 結構域，其中變異的 Fc 結構域在選自下述的一個或多個位置處包括延長半衰期的氨基酸取代：238、250、252、254、256、257、256、265、272、286、288、303、305、307、308、309、311、312、317、340、
5 356、360、362、376、378、380、382、413、424、428、433、434、435 和 436。能夠延長包含 Fc 結構域的分子的半衰期的許多具體突變是本領域已知的，其包括，例如 M252Y、S254T、T256E 和其組合。例如，見下述文獻中描述的突變：美國專利號 6,277,375、7,083,784、7,217,797、8,088,376；美國公開號 2002/0147311、2007/0148164；和國際公開號 WO 98/23289、WO 2009/058492；
10 和 WO 2010/033279，其通過引用以它們的整體併入本文。具有延長半衰期的包含 Fc 結構域分子也包括在兩個或更多個 Fc 結構域殘基處具有取代的那些：250、252、254、256、257、288、307、308、309、311、378、428、433、434、435 和 436。尤其地，兩個或更多個取代選自：T250Q、M252Y、S254T、T256E、K288D、T307Q、V308P、A378V、M428L、N434A、H435K、Y436I。

15 【0087】 在具體的實施方式中，變異的 Fc 結構域包括下述取代：
M252Y、S254T 和 T256E；
M252Y 和 S254T；
M252Y 和 T256E；
T250Q 和 M428L；
20 T307Q 和 N434A；
A378V 和 N434A；
N434A 和 Y436I；
V308P 和 N434A；或
K288D 和 H435K。

【0088】 本發明進一步包括的變異的 Fc 結構域，其包括：

(A)改變效應子功能和/或 FcγR 的一個或多個突變；和

(B)延長血清半衰期的一個或多個突變。

【0089】 用於本發明方法的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子的

5 兩條包含 Fc 結構域的相互作用的多肽鏈的 CH2-CH3 結構域的兩個 CH2 和/或兩個 CH3 結構域不需要序列一致，並且有利地被修飾而有助於兩條多肽鏈之間的複合(見，例如：WO 98/50431、WO2007/110205、WO2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/06867)。例如，氨基酸取代(首選以包括形成“杵”的大側基的氨基酸例如色氨酸取代)可被引入 CH2 或 CH3 結構域中，以便空間干擾

10 將防止與類似的突變結構域的相互作用並將迫使突變的結構域與其中互補或適應性突變已經被工程化的結構域——即“臼”(例如，用甘氨酸取代)——配對。這樣的突變組可被工程化至本發明包含 Fc 結構域的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子的任何多肽中。蛋白質工程化以相對於同源二聚化利於異源二聚化的方法是本領域熟知的，尤其對於免疫球蛋白樣分子的工程化而言，其包括在本

15 文中(見例如，Ridgway 等 (1996) “*‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,*” Protein Engr. 9:617-621；Atwell 等 (1997) “*Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,*” J. Mol. Biol. 270: 26-35；和 Xie 等 (2005) “*A New Format Of Bi-specific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization,*

20 *Expression And Tumor Cell Lysis,*” J. Immunol. Methods 296:95-101；其每一篇通過引用以其整體併入本文)。首選地“杵”被工程化至一條多肽鏈的 CH2-CH3 結構域中，並且“臼”被工程化至另一包含 CH2-CH3 的多肽鏈的 CH2-CH3 結構域中。因此，“杵”有助於防止第一多肽鏈經其 CH2 和/或 CH3 結構域而同源二聚化。CH2-CH3 “具有臼的”多肽鏈將與 CH2-CH3 “具有杵的”多肽鏈異

源二聚化，並且也與其本身同源二聚化。通過修飾天然 IgG Fc 結構域而包含修飾 T366W 產生優選的杵。通過修飾天然 IgG Fc 結構域而包含修飾 T366S、L368A 和 Y407V 產生優選的臼。為了有助於從優選的異源二聚體分子純化“具有臼的”多肽鏈同源二聚體，“具有臼的”Fc 結構域的 CH2 和 CH3 結構域的蛋白質 A 結合位點優選地通過在 435 位的氨基酸取代(H435R)而被突變。因此，“具有臼的”Fc 結構域同源二聚體不結合蛋白質 A，而用於本發明方法的包含 Fc 結構域的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子將保持其經第一多肽鏈上的蛋白質 A 結合位點而結合蛋白質 A 的能力。

【0090】 包含 Fc 結構域的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1 結合分子的優選的“具有杵的”序列具有序列(SEQ ID NO:6)：

15 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

其中，**X** 是賴氨酸(K)或不存在。

【0091】 用於包含 Fc 結構域的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1 結合分子的優選的“具有臼的”序列具有序列(SEQ ID NO:7)：

20 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPGX

其中，**X** 是賴氨酸(K)或不存在。

25 【0092】 本發明也包括這類 CH2-CH3 結構域，其包括另外的取代，其修飾如上面提供的 Fc 結構域的效應子功能和/或 FcR 結合活性。本發明也包括這類 CH2-CH3 結構域，其進一步包括一個或多個延長半衰期的氨基酸取代。尤其地，本發明包括這類具有臼的和這類具有杵的 CH2-CH3 結構域，其進一步

包括 M252Y/S254T/T256E 取代。

【0093】 B. B7-H3-結合分子

【0094】 本發明包括的特異性結合 B7-H3 的分子包括抗 B7-H3 抗體，其能夠結合人 B7-H3 的連續的或不連續的(例如，構象)部分(表位元)，以及
5 包括這類抗體的表位-結合位點的分子。在本發明的方法和組合物中使用的 B7-H3-結合分子優選地也展示結合一個或多個非人物種，尤其是鼠科動物、齧齒動物、犬科動物和靈長類物種的 B7-H3 分子的能力。對於 B7-H3 特異性的抗體是已知的(見，例如，美國專利號 7,527,969、7,666,424、7,718,774、7,737,258、7,740,845、8,148,154、8,216,570、8,414,892、8,501,471、8,779,098、8,802,091、
10 9,062,110；美國專利公開號 2013/0078234、2010/0143245；和 PCT 專利公開 WO 2004/001381、WO 2008/066691、WO 2008/116219、WO 2011/109400、WO 2012/147713，和表 5)。另外期望的抗體可通過分離使用表達 B7-H3 的細胞；B7-H3 或其肽片段引起的分泌抗體的雜交瘤而被製備。

【0095】 人 B7-H3 以 “2Ig” 形式和 “4Ig” 形式存在。人 B7-H3 的
15 “2Ig” 形式的氨基酸序列(包括 29 個氨基酸殘基信號序列，加底線顯示)是(**SEQ ID NO:17**)：

MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
AQGNASRLRQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
20 PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
LFDVHSVLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHGSVTITGQ PMTFPPEALW
VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGEKSKTALQ
PLKHSDSKED DGQEIA

【0096】 人 B7-H3 的 “2Ig” 形式的氨基酸序列(**SEQ ID NO:17**)完全
25 包括在人 B7-H3 的 “4Ig” 形式中(**SEQ ID NO:18**，29 個氨基酸殘基信號序列，加底線顯示)：

MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL

AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ RSPTGAVEVQ
VPEDPVVALV GTDATLRCSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTEG
5 RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA
AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDTVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDGQ
GVPLTGNVTT SQMANEQGLF DVHSVLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQQDAH
GSVTITGQPM TFPPEALWVT VGLSVCLIAL LVALAFVCWR KIKQSCEEN
AGAEDQDGEG EGSKTALQPL KHSDSKEDDG QEIA

10 **【0097】** 優選的抗 B7-H3-結合分子具有抗人 B7-H3 單克隆抗體
“BRCA84D”、“BRCA69D”、“PRCA1”或表 5 中提供的任何抗 B7-H3 抗
體的 VL 和/或 VH 結構域；並且更優選地具有這類抗 B7-H3 單克隆抗體的 VL
區域的 1、2 或所有 3 個 CDR_L 和/或 VH 結構域的 1、2 或所有 3 個 CDR_H。尤其
優選的是 B7-H3-結合分子，其具有人源化的 VH 和/或 VL 結構域。這類優選的
15 B7-H3-結合分子包括具有變異的 Fc 結構域的抗體、雙特異性(或多特異性)抗
體、嵌合抗體或人源化抗體等

【0098】 1. BRCA84D

【0099】 BRCA84D 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:19)顯示
在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

20 DIAMTQSQKF MSTSVGDRVS VT**CASQNVD** **TNVA**WYQQKP GQSPKALIY**S**
ASYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTINNVQS EDLAEYFC**QQ** **YNNYPFT**FGS
GTKLEIK

【0100】 BRCA84D 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:20)顯示
在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

25 DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS **SFGMH**WVRQA PEKGLEWVAY
ISSDSSAIYY **ADTVKG**RFTI SRDNPKNLTF LQMTSLRSED TAMYCGR**GR**
ENIYYGSRLD **Y**WGQGTTLTV SS

【0101】 a. hBRCA84D

【0102】 下面提供了本文命名為 “hBRCA84D VL1”、“hBRCA84D
30 VL2”、“hBRCA84D VL3”、“hBRCA84D VL4”、“hBRCA84D VL5”、
“hBRCA84D VL6” 的 BRCA84D 的六個示例性人源化 VL 結構域，和本文命

名為“hBRCA84D VH1”、“hBRCA84D VH2”、“hBRCA84D VH3”和
“hBRCA84D VH4”的 BRCA84D 的四個示例性人源化的 VH 結構域。任何人
源化 VL 結構域可與任何人源化的 VH 結構域配對，以產生 B7-H3 結合結構域。
因此，包括與人源化的 VH 結構域配對的人源化 VL 結構域之一的任何抗體通常
5 稱為“hBRCA84D”，並且人源化 VH/VL 結構域的具體組合通過參考具體的
VH/VL 結構域而被提及，例如包括 hBRCA84D VH1 和 hBRCA84D VL2 的人源
化抗體具體稱為“hBRCA84D (1.2)”。

【0103】 hBRCA84D VL1 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:21)

顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

10 DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

【0104】 hBRCA84D VL2 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:22)

顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

15 DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

【0105】 hBRCA84D VL3 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:23)

顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

20 DIQLTQSPSF LSASVGDRVS VTCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

【0106】 hBRCA84D VL4 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:24)

顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

25 DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GQAPKLLIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

【0107】 hBRCA84D VL5 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:25)

顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DIQLTQSPSF LSASVGDRVITTCKASQNVD TNVAWYQQKP GQAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

【0108】 hBRCA84D VL6 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:26)

5 顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DIQLTQSPSF LSASVGDRVITTCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAEYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

【0109】 hBRCA84D VH1 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)

10 顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARGGR
ENIYYGSRLD YWGQGT^{TV}TV SS

【0110】 hBRCA84D VH2 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:28)

15 顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQGT^{TV}TV SS

【0111】 hBRCA84D VH3 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:29)

20 顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAMYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQGT^{TV}TV SS

【0112】 hBRCA84D VH4 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:30)

25 顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRSED TAVYYCARGGR
ENIYYGSRLD YWGQGT^{TV}TV SS

【0113】 2. BRCA69D

30 【0114】 BRCA69D 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:31)顯示
在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DIQMTQTSS LSASLGDRVITSCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTIDNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIK

【0115】 BRCA69D 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:32)顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

5 QVQLQQSGAE LARPGASVKL SCKASGYTFT SYWMQWVKQR PGQGLEWIGT
IYPGDGDTRY TQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARRG
IPRLWYFDVW GAGTTVTVSS

【0116】 a. hBRCA69D

【0117】 下面提供了本文命名為 “hBRCA69D VL1” 和 “hBRCA69D VL2” 的 BRCA69D 的兩個示例性人源化 VL 結構域以及本文命名為 “hBRCA69D VH1” 和 “hBRCA69D VH2” 的 BRCA69D 的兩個示例性人源化的 VH 結構域。注意，hBRCA69D VL2 包括 CDR_L1 和 CDR_L2 中的氨基酸取代，並且 hBRCA69D VH2 包括 CDR_L2 中的氨基酸取代。任何人源化 VL 結構域可與任何人源化的 VH 結構域配對，以產生 B7-H3 結合結構域。因此，包括與人源化 VH 結構域配對的人源化 VL 結構域之一的任何抗體通常稱為 “hBRCA69D” 並且人源化 VH/VL 結構域的特定組合通過參考特定 VH/VL 結構域而被提及，例如包括 hBRCA69D VH1 和 hBRCA69D VL2 的人源化抗體具體稱為 “hBRCA69D (1.2)” 。

【0118】 hBRCA69D VL1 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:33)顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

20 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIK

【0119】 hBRCA69D VL2 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:34)顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

25 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIK

【0120】 hBRCA69D VH1 的 VH 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:35) (CDR_H 殘基加底線顯示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGDGDTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

【0121】 hBRCA69D VH2 的 VH 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID

5 NO:36) (CDR_H 殘基加底線顯示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGGGDTRY TQKFGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

【0122】 3. PRCA157

10 【0123】 PRCA157 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:37)顯示
在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

DIQMTQSPAS LSVSVGETVT ITCRASESIY SYLAWYQQKQ GKSPQLLVYN
TKTLPEGVPS RFSGSGSGTQ FSLKINSLQP EDFGRYYCQH HYGTPPWTFG
GGTNLEIK

15 【0124】 PRCA157 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:38)顯示
在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQQVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT
INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNTLY LQMRSLKSED TAMYCARHD
GGAMDYWGQG TSVTVSS

20 【0125】 4.另外的抗 B7-H3 抗體

【0126】 可用于本發明的方法和組合物的另外的抗 B7-H3 抗體提供
在表 5 中。

表 5：抗 B7-H3 抗體	
B7-H3 抗體	參考文獻
LUCA1、BLA8、PA20 和 SKN2	美國專利號 7,527,969、8,779,098 和 PCT 專利公開 WO 2004/001381
M30、cM30、M30-H1-L1、M30-H1-L2、M30-H1-L3、M30-H1-L4、M30-H1-L5、M30-H1-L6、M30-H1-L7、M30-H4-L1、M30-H4-L2、M30-H4-L3 和 M30-H4-L4	美國專利公開 2013/0078234 和 PCT 專利公開 WO 2012/147713
8H9	美國專利號 7,666,424、7,737,258、7,740,845、8,148,154、8,414,892、8,501,471、9,062,110、美國專利公開 2010/0143245 和 PCT 專利公開 WO 2008/116219

【0127】 5.示例性抗 B7-H3 抗體

【0128】 在某些實施方式中，用於本發明的方法和組合物的 B7-H3 抗體包括上面提供的任何抗體的 VL 和 VH 結構域(例如，hBRCA84D、hBRCA69D、PRCA157 或表 5 中任何抗 B7-H3 抗體的 VL 和 VH 結構域)、κ CL 結構域，以及(相對於野生型 Fc 結構域)具有增強的 ADCC 的變異的 IgG1 Fc 結構域。在一個實施方式中，CH2-CH3 結構域包括 L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L 取代(其中編號是根據如 Kabat 中的 EU 索引)。這類抗體將優選包括 IgG1 CH1 結構域和鉸鏈結構域。

【0129】 κ CL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)顯示在下方。

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC

【0130】 IgG1 CH1 結構域和鉸鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO:14)顯示在下方。

ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP PCP

【0131】 包括 L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L 取代的 IgG1 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:15)顯示在下方。

APELVGGPSV FLLPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PPEEQYNSTL RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPLVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
ALHNHYTQKS LSLSPGK

【0132】 命名為 “hBRCA84D-2” 的示例性抗 B7-H3 抗體包括：具有 BRCA84D VL2 的 VL 結構域(SEQ ID NO:22)和 κ CL (SEQ ID NO:13)的輕鏈和具有 BRCA84D VH2 的 VH 結構域(SEQ ID NO:28)、IgG1 CH1 結構域和鉸鏈 (SEQ ID NO:14)的重鏈、和包括 L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L 取代 (SEQ ID NO:15)的變異的 IgG CH2-CH3 結構域。

【0133】 hBRCA84D-2 的完整輕鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO:39)顯

示在下方。

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSVGVPs RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
5 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEc

【0134】 hBRCA84D-2 的完整重鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO:40)顯

示在下方。

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
10 ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT
QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELV GGPSVFLLP
KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPPEEQ
15 YNSTLRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
LVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK

【0135】 C. PD-1-結合分子

【0136】 本發明包括的特異性結合 PD-1 的分子包括能夠結合人 PD-1

20 的連續的或不連續的(例如，構象)部分(表位)的抗 PD-1 抗體，和包括這類抗體
的表位-結合位點的分子。本發明的方法和組合物中使用的 PD-1-結合分子(例
如，抗體)將優選地也展示結合一個或多個非人物種，尤其是鼠科動物、齧齒動
物、犬科動物和靈長類物種的 PD-1 分子的能力。特異性針對 PD-1 的抗體是已
知的(見，例如，美國專利專利申請號 62/198,867；美國專利號 5,952,136、
25 7,488,802、7,521,051、8,008,449、8,088,905、8,354,509、8,552,154、8,779,105、
8,900,587、9,084,776；PCT 專利公開 WO 2004/056875、WO 2006/121168、WO
2008/156712、WO 2012/135408、WO 2012/145493、WO 2013/014668、WO
2014/179664、WO 2014/194302 和 WO 2015/112800；和表 6)。可通過分離使用
PD-1 或其肽片段引起的分泌抗體的雜交瘤而製備另外期望的抗體。

30 【0137】 人 PD-1 (包括 20 個氨基酸殘基信號序列(加底線顯示)和 268
個氨基酸殘基的成熟蛋白質)具有氨基酸序列(SEQ ID NO:41)：

5 MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

【0138】 用於本發明的方法和組合物的優選的抗 PD-1-結合分子(例如，抗體)具有下述抗體的 VL 和/或 VH 結構域：抗人 PD-1 單克隆抗體 “**PD-1 mAb 1**” (尼伏魯單抗，CAS 登記號:946414-94-4，也稱為 5C4、BMS-936558、
10 ONO-4538、MDX-1106，並且作為 OPDIVO®由 Bristol-Myers Squibb 售賣)；
“**PD-1 mAb 2**” (派姆單抗，(之前稱為蘭羅利珠單抗(lambrolizumab))，CAS 登記號:1374853-91-4，也稱為 MK-3475、SCH-900475 並且作為 KEYTRUDA®由 Merck 售賣)； “**PD-1 mAb 3**” (EH12.2H7；Dana Farber)， “**PD-1 mAb 4**” (匹地利珠單抗，CAS 登記號：1036730-42-3 也稱為 CT-011，CureTech)，或表 6 中
15 的任何抗 PD-1 抗體；並且更優選地具有這類抗 PD-1 單克隆抗體的 VL 區域的 1、2 或所有 3 個 CDR_L 和/或 VH 結構域的 1、2 或所有 3 個 CDR_H。最近已經鑒定了可用于本發明的方法和組合物的、具有獨特的結合特徵的另外的抗 PD-1 抗體(見，美國專利專利申請號 62/198,867)。尤其地，優選的是 PD-1-結合分子，其具有下述抗體的人源化的 VH 和/或 VL 結構域：抗 PD-1 抗體 “**PD-1 mAb 5**”
20 (hPD-1 mAb 2，MacroGenics)； “**PD-1 mAb 6**” (hPD-1 mAb 7，MacroGenics)；
“**PD-1 mAb 7**” (hPD-1 mAb 9，MacroGenics)；或“**PD-1 mAb 8**” (hPD-1 mAb 15，MacroGenics)；和更優選地具有這類人源化的抗 PD-1 單克隆抗體的 VL 區域的 1、2 或所有 3 個 CDR_L 和/或 VH 結構域的 1、2 或所有 3 個 CDR_H。這類優選的抗 PD-1-結合分子包括具有變異的 Fc 結構域的抗體、雙特異性(或多特異性)
25 抗體、嵌合抗體或人源化抗體等

【0139】 1. **PD-1 mAb 1**

【0140】 PD-1 mAb 1 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:42)顯

示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQGTLVT VSS

5 【0141】 PD-1 mAb 1 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:43)顯示
在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPTFGQ
GTKVEIK

10 【0142】 2. PD-1 mAb 2

 【0143】 PD-1 mAb 2 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:44)顯
示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
15 YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

 【0144】 PD-1 mAb 2 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:45)顯示
在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
20 TFGGGGTKVEI K

 【0145】 3. PD-1 mAb 3

 【0146】 PD-1 mAb 3 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:46)顯
示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY
25 IYPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARRWR
DSSGYHAMDY WGQGTSVTVSS

 【0147】 PD-1 mAb 3 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:47)顯示
在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISCRASQSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL
30 LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWEIPY
TFGGGGTKLEI K

 【0148】 4. PD-1 mAb 4

 【0149】 PD-1 mAb 4 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:48)顯

示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGM^YFCVRVG
YDALDYWGQG TLVTVSS

5 【0150】 PD-1 mAb 4 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:49)顯示
在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG
TKLEIK

10 【0151】 5. PD-1 mAb5

 【0152】 PD-1 mAb 5 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:50)顯
示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSGMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTE^D TALYYCASLS
15 DYFDYWGQGT TTVTVSS

 【0153】 PD-1 mAb 5 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:51)顯
示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ
LLIYRVSNRF SGVPDRFGSG GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTTHVP
20 WTFGGQGTKLE IK

 【0154】 6. PD-1 mAb 6

 【0155】 PD-1 mAb 6 的 VH 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:52)顯
示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEW^XGV
25 IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREEH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

其中 X 是 I 或 A。

 【0156】 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:53)顯示
在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRAX₁ESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
30 LIHAASN₂GS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI K

其中：X₁是N或S和X₂是Q或R；或X₁是N和X₂是Q；或X₁是S和X₂是Q；或X₁是S和X₂是R。

【0157】 在具體的實施方式中，PD-1mAb 6 包括：

(a) **SEQ ID NO:52**，其中 X 是 I；和 **SEQ ID NO:53**，其中 X₁是N和X₂是Q；或

(b) **SEQ ID NO:52**，其中 X 是 I；和 **SEQ ID NO:53**，其中 X₁是S和X₂是Q。

【0158】 **7. PD-1 mAb 7**

【0159】 PD-1 mAb 7 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:54**)顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

EVQLVESGGG LX₁RPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVX₂WVRQA PGKGLEWX₃AT
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSX₄RAED TATYYCARYG
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

其中 X₁是V或A；X₂是S或G；X₃是V或T；X₄是L或A；X₁是V，X₂是S，X₃是V，和X₄是L；或X₁是A，X₂是G，X₃是T，和X₄是A。

【0160】 PD-1 mAb 7 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:55**)顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASENIY X₁YLA**WYQQKP GKAPKLLIY**X₂**
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QH HYAVPWT**FGQ
GTKLEIK

其中：X₁是S或N和X₂是N或D；或X₁是S和X₂是N；或X₁是N和X₂是D。

【0161】 在具體的實施方式中，PD-1mAb 7 包括：

(a) **SEQ ID NO:54**，其中 X₁是V，X₂是S，X₃是V，和X₄是L；和 **SEQ ID NO:55**，其中 X₁是S和X₂是N；或

(b) **SEQ ID NO:54**，其中 X₁是A，X₂是G，X₃是T，和X₄是A；和 **SEQ**

ID NO:55，其中 X₁ 是 N 和 X₂ 是 D。

【0162】 8. PD-1 mAb 8

【0163】 PD-1 mAb 8 的 VH 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:56**)顯示在下方(CDR_H 殘基加底線顯示)。

5 EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS SYLISWVRQA PGKGLEWVAA
ISGGGADTTY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG
TYAMDYWGQG TLVTVSS

【0164】 PD-1 mAb 8 的 VL 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:57**)顯示在下方(CDR_L 殘基加底線顯示)。

10 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY NYLAWYQQKP GKAPKLLIYD
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ
GTKLEIK

【0165】 9.另外的抗 PD-1 抗體

【0166】 可在本發明的方法和組合物中使用的另外的抗 PD-1 抗體提
15 供在表 6 中。

表 6：另外抗 PD-1 抗體	
PD-1 抗體	參考文獻
PD1-17、PD1-28、PD1-33、PD1-35 和 PD1-F2	美國專利號 7,488,802、7,521,051 8,088,905；和 PCT 專利公開 WO 2004/056875
17D8、2D3、4H1、5C4、4A11、7D3 和 5F4	美國專利號 8,008,449、8,779,105、9,084,776、和 PCT 專利公開 WO 2006/121168
hPD-1.08A、hPD-1.09A、109A、K09A、409A、h409A11、h409A16、h409A17、密碼子優化的 109A 和密碼子優化的 409A	美國專利號 8,354,509、8,900,587、5,952,136、和 PCT 專利公開 WO 2008/156712
1E3、1E8 和 1H3	美國專利公開 2014/0044738、和 PCT 專利公開 WO 2012/145493
9A2、10B11、6E9、APE1922、APE1923、APE1924、APE1950、APE1963 和 APE2058	PCT 專利公開 WO 2014/179664

表 6：另外抗 PD-1 抗體	
PD-1 抗體	參考文獻
GA1、GA2、GB1、GB6、GH1、A2、C7、H7、SH-A4、SH-A9、RG1H10、RG1H11、RG2H7、RG2H10、RG3E12、RG4A6、RG5D9、RG1H10-H2A-22-1S、RG1H10-H2A-27-2S、RG1H10-3C、RG1H10-16C、RG1H10-17C、RG1H10-19C、RG1H10-21C、和 RG1H10-23C2	美國專利公開 2014/0356363、和 PCT 專利公開 WO 2014/194302
H1M7789N、H1M7799N、H1M7800N、H2M7780N、H2M7788N、H2M7790N、H2M7791N、H2M7794N、H2M7795N、H2M7796N、H2M7798N、H4H9019P、H4xH9034P2、H4xH9035P2、H4xH9037P2、H4xH9045P2、H4xH9048P2、H4H9057P2、H4H9068P2、H4xH9119P2、H4xH9120P2、H4Xh9128p2、H4Xh9135p2、H4Xh9145p2、H4Xh8992p、H4Xh8999p、和 H4Xh9008p	美國專利公開 2015/0203579、和 PCT 專利公開 WO 2015/112800
PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、hPD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、hPD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8、PD-1 mAb 9、hPD-1 mAb 9、PD-1 mAb 10、PD-1 mAb 11、PD-1 mAb 12、PD-1 mAb 13、PD-1 mAb 14、PD-1 mAb 15 和 hPD-1 mAb 15	美國專利專利申請號 62/198,867

【0167】 10.示例性 PD-1 抗體

【0168】 在某些實施方式中，可用于本發明的方法和組合物的 PD-1 抗體包括上面提供的任何抗體(例如，PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8 或表 6 中的任何抗 PD-1 抗體)的 VL 和 VH 結 構域、κ CL 結構域和 IgG4 Fc 結構域，任選地缺少 C-末端賴氨酸殘基。這類抗體將優選地包括 IgG4 CH1 結構域和鉸鏈結構域，並且更優選地包括穩定化的 IgG4 鉸鏈，其包括 S228P 取代(其中編號是根據 Kabat 中的 EU 索引)。

【0169】 κ CL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)已經提供在上方。

10 【0170】 IgG4 CH1 結構域和穩定化的鉸鏈的氨基酸序列(SEQ ID

NO:16)已經提供在上方。

【0171】 IgG4 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:4**)已經提供在上方。

【0172】 命名為 “**PD-1 mAb 6-ISQ**” 的示例性抗 PD-1 抗體包括：具有 PD-1 mAb 6 的 VL 結構域(**SEQ ID NO:53**)，其中 X₁ 是 S 和 X₂ 是 Q，和 κ CL (**SEQ ID NO:13**)的輕鏈；和重鏈，其具有 PD-1 mAb 6 的 VH 結構域(**SEQ ID NO:52**)，其中 X₁ 是 I、IgG4 CH1 結構域、穩定化的 IgG 4 鉸鏈(**SEQ ID NO:16**)和 IgG4 CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:4**)。

【0173】 PD-1 mAb 6-ISQ 的完整輕鏈的氨基酸序列(**SEQ ID NO:58**)顯示在下方。

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV
THQGLSPVPT KSFNRGEC

【0174】 PD-1 mAb 6-ISQ 的完整重鏈的氨基酸序列(**SEQ ID NO:59**)顯示在下方。

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL
DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA
STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG
LYSLSSVVTV PSSSLGKTY TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPCPA PEFLGGPSVF
LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSQEEMTKN
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLG

【0175】 另一示例性抗 PD-1 抗體是 PD-1 mAb 1 (尼伏魯單抗)，其是人抗體，包括：具有 VL 結構域(**SEQ ID NO:43**)和 κ CL 結構域(見例如，**SEQ ID NO:13**)的輕鏈；和具有 VH 結構域(**SEQ ID NO:42**)、IgG4 CH1 結構域(見例如，**SEQ ID NO:9**)、穩定化的 IgG4 鉸鏈(見例如，**SEQ ID NO:12**)和 IgG4 CH2-CH3 結構域(見例如，**SEQ ID NO:4**)的重鏈。

【0176】 另一示例性抗 PD-1 抗體是 PD-1 mAb 2 (派姆單抗)，其是人源化抗體，包括：具有 VL 結構域(SEQ ID NO:45)和 κ CL 結構域(見例如，SEQ ID NO:13)的輕鏈；和具有 VH 結構域(SEQ ID NO:44)、IgG4 CH1 結構域(見例如，SEQ ID NO:9)、穩定化的 IgG4 鉸鏈(見例如，SEQ ID NO:12)和 IgG4 CH2-CH3 結構域(見例如，SEQ ID NO:4)的重鏈。

【0177】 D.產生方法

【0178】 本發明包括的 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子可通過本領域已知的方法產生，例如，經合成或重組產生(見，例如，Kelley, R. F.等 (1990), 在以下中: Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19；Stewart, J.M 等 (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL；也見美國專利號 4,105,603、3,972,859、3,842,067 和 3,862,925；Merrifield, B. (1986) “*Solid Phase Synthesis*,” Science 232(4748):341-347；Houghten, R.A. (1985) “*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135；Ganesan, A. (2006) “*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*,” Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10)。

【0179】 可選地，可通過使用商業上可得的小鼠獲得具有期望的抗 B7-H3 抗體和/或抗 PD-1 抗體的一個或多個 CDR 的適當的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子，所述小鼠已經被工程化以表達特定的人免疫球蛋白蛋白質。被設計以產生更期望的(例如，全人抗體)或更有力的免疫應答的轉基因動物也可用於產生人源化的或人抗體。這類技術的例子是 XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA)和 HuMAb-MOUSE®和 TC MOUSE™ (都來自 Medarex, Inc., Princeton, NJ)。

【0180】 在進一步可選的方法中，這類結合分子可經重組製備並使用本領域已知的任何方法被表達。可通過如下方法經重組製備抗體：首先分離從宿主動物製備的抗體、獲得基因序列和使用基因序列在宿主細胞(例如，CHO 細胞)中重組表達抗體。可採用的另一方法是在植物(例如，煙草)或轉基因奶中表達抗體序列。已經公開了用於在植物或奶中重組表達抗體的合適的方法(見，例如，Peeters 等 (2001) “*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*,” Vaccine 19:2756；Lonberg, N. 等 (1995) “*Human Antibodies From Transgenic Mice*,” Int. Rev. Immunol 13:65-93；和 Pollock 等(1999) “*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*,” J. Immunol Methods 231:147-157)。用於製備抗體衍生物，例如，人源化抗體、雙特異性抗體、單鏈等的適當的方法是本領域已知的。在另一可選方案中，可通過噬菌體展示技術重組製備抗體(見，例如，美國專利號 5,565,332、5,580,717、5,733,743、6,265,150；和 Winter, G. 等 (1994) “*Making Antibodies By Phage Display Technology*,” Annu. Rev. Immunol. 12:433-455)。

【0181】 可將包含編碼感興趣多肽的多核苷酸的載體通過任何許多適當的方式引入到宿主細胞中，所述適當的方式包括電穿孔；採用氯化鈣、氯化銣、磷酸鈣、DEAE-葡聚糖或其他物質的轉染；微彈轟擊(microprojectile bombardment)；脂轉染；和感染(例如，在載體是感染劑諸如牛痘病毒的情況下)。引入載體或多核苷酸的選擇通常取決於宿主細胞的特徵。

【0182】 能夠過表達異源 DNA 的任何宿主細胞均可被使用，用於分離編碼感興趣的抗體、多肽或蛋白質的基因的目的。合適的哺乳動物宿主細胞的非的限制性實例包括但不限於 COS、HeLa 和 CHO 細胞。優選地，相比於宿主細胞中相應的感興趣的內源抗體或蛋白質（如果存在），宿主細胞以約 5-倍，更優選 10-倍，甚至更優選 20-倍的水準表達 cDNA。針對免疫特異性結合 cDNA

表達的靶(例如, B7-H3 或 PD-1) 篩選宿主細胞, 可使用免疫試驗或 FACS 實現。
可鑒定過表達感興趣的抗體或蛋白質的細胞。

【0183】 本發明包括這樣的多肽, 所述多肽包括本文提供的抗 B7-H3
抗體和/或抗 PD-1-抗體的氨基酸序列(優選地表位元結合結構域)。可通過本領域
5 已知的程式製備本發明的多肽。可通過抗體的蛋白水解或其他降解、如上述的
重組方法(即, 單個或融合多肽)或化學合成來產生多肽。抗體的多肽, 尤其地,
上至約 50 個氨基酸的較短的多肽, 通過化學合成被常規製備。

【0184】 本發明包括任何這類 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子
的多肽的修飾, 所述修飾不明顯影響這類分子以及具有增強的或降低活性的變
10 體的特性。多肽的修飾在本領域中是常規操作, 因而不需要在本文詳細描述。
修飾的多肽的實例包括這樣的多肽: 其具有氨基酸殘基的保守取代、未明顯有
害改變功能活性的氨基酸的一個或多個缺失或添加, 或使用化學類似物。可彼
此保守取代的氨基酸殘基包括但不限於: 甘氨酸/丙氨酸; 絲氨酸/蘇氨酸; 纈氨
酸/異亮氨酸/亮氨酸; 天冬醯胺/穀氨醯胺; 天冬氨酸/谷氨酸; 賴氨酸/精氨酸;
15 和苯基丙氨酸/酪氨酸。這些多肽還包括糖基化和非糖基化多肽以及具有其它翻
譯後修飾的多肽, 所述其它翻譯後修飾, 諸如例如, 用不同糖進行糖基化、乙
醯化和磷酸化。優選地, 氨基酸取代應該是保守的, 即, 取代的氨基酸會具有
與原始氨基酸類似的化學性質。這樣的保守取代在本領域中是已知的, 並且已
經在上文提供實例。氨基酸修飾範圍可從改變或修飾一個或多個氨基酸到區域
20 諸如可變結構域的完全重新設計(redesign)。可變結構域中的變化可改變結合親
和力和/或免疫特異性。修飾的其它方法包括利用本領域中已知的偶合技術, 包
括但不限於酶促手段、氧化取代和螯合。修飾可用於例如, 連接標籤用於免疫
分析, 諸如連接放射性部分用於放射免疫分析。修飾的多肽利用本領域中確定
的方法製備, 並且可利用本領域中已知的標準測定來篩選。

【0185】 本發明包括這樣的融合蛋白，所述融合蛋白包括本發明的一種或多種抗體。在一個實施方式中，提供融合多肽，其包括輕鏈、重鏈或輕鏈以及重鏈二者。在另一實施方式中，融合多肽包含異源免疫球蛋白恒定區。在另一實施方式中，融合多肽包含本文提供的或由公開保藏的雜交瘤產生的抗體
5 的 VL 結構域和 VH 結構域。為了本發明的目的，抗體融合蛋白包含免疫特異性結合 B7-H3 和/或 PD-1 的一個或多個表位-結合位點，和免疫特異性結合在天然分子中其未連接的另外的氨基酸序列的一個或多個多肽結構域，所述另外的氨基酸序列，例如，異源序列或來自另一區域的同源序列。

【0186】 E.藥物組合物

10 【0187】 本發明包括組合物，其包括 B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合。本發明的組合物包括原料藥組合物(bulk drug composition)，其可用於製備藥學組合物(例如，不純或非無菌組合物)和可用於製備單位劑型的藥學組合物(即，適於施用給受試者或患者的組合物)。這類組合物包括 B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合以及藥學上可接受的
15 載體。優選地，本發明的組合物包括 B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合、以及藥學上可接受的載體。在優選的方面中，這類組合物基本上是純化的(即，基本上不含限制其作用或產生非期望的副作用的物質)。

【0188】 在施用大於一種治療劑時，所述劑可以一起被配製在相同的製劑中或被可配製成單獨的組合物。因此，在一些實施方式中，B7-H3-結合分
20 子和 PD-1-結合分子在相同的藥物組合物中被配製在一起。在可選的實施方式中，分子被配製在分開的藥物組合物中。

【0189】 B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合的各種製劑可用於施用。除了藥理學活性劑(一種或多種)，本發明的組合物可包含適當的藥學上可接受的載體，其包括賦形劑和助劑，所述藥學上可接受的載體是本

領域熟知的並且是相對惰性物質，有利於施用藥理學上有效的物質或利於將活性化合物加工成可在藥學上用於遞送至作用位點的製劑。例如，賦形劑可賦予形狀或稠度，或用作稀釋劑。適當的賦形劑包括但不限於穩定劑、濕潤劑和乳化劑、用於改變滲透性的鹽、封裝劑、緩衝液和皮膚滲透增強劑。

5 **【0190】** 在具體的實施方式中，術語“藥學上可接受的”表示獲得聯邦政府或州政府管理機構的許可或列於美國藥典(U.S. Pharmacopeia)或其他通常獲得認可的藥典中，供用於動物，特別是用於人類。術語“載體”指與治療劑一起施用的稀釋劑、佐劑(例如弗氏佐劑(完全和不完全)、賦形劑或媒介。這類藥學載體可以是無菌液體，如水和油，包括石油、動物油、植物油或合成來源的油，
10 如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等。當靜脈內施用藥物組合物時，優選水性載體，比如生理鹽水溶液、水性右旋糖和甘油溶液。合適的藥用賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂乳粉(dried skim milk)、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。若需要，組合物也可以含有小量濕潤劑或乳化劑或 pH 緩衝劑。這些組合物可以採用溶液、懸液、乳液、片劑、丸劑、膠囊、粉劑、緩釋製劑等形式。

【0191】 一般而言，本發明組合物的成分被單獨提供或以單位劑型混合在一起，例如作為標明活性劑的量的密封容器中的凍乾粉或無水濃縮物，所述密封容器如安瓿或小袋(sachette)。當通過輸注施用組合物時，其可以用含有無菌的藥學級水或鹽水的輸注瓶分配。如果通過注射施用所述組合物，則可以提供一安瓿注射用無菌水或鹽水，以便可以在施用前混合所述成分。
20

【0192】 可以將本發明的組合物配製為中性或鹽形式。藥學上可接受的鹽包括但不限於用陰離子形成的鹽以及用陽離子形成的鹽，所述陰離子例如來源於鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的陰離子，並且所述陽離子例如來

自氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、
2-乙基氨基乙醇、組氨酸、普魯卡因等的陽離子。

【0193】 優選地，治療劑(即，B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合)在指示分子的量的密封容器，比如安瓿或袋中作為乾燥無菌冷凍
5 粉末被提供。在一個實施方式中，治療劑作為凍幹無菌粉或無水濃縮物提供於密封容器中，並且可以用例如水或鹽水重構至適當濃度，用於施用於受試者。在可選的實施方式中，治療劑在指示治療劑的量和濃度的密封容器中以液體形式被提供。

【0194】 冷凍乾燥治療劑(即，B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合)應在初始容器中儲存在 2°C 和 8°C 之間並且劑應在重構之後 12
10 小時內、優選地 6 小時內、5 小時內、3 小時內或 1 小時內被施用。在可選的實施方式中，治療劑在指示分子(一種或多種)、融合蛋白或綴合分子的量和濃度的密封容器中以液體形式被提供。優選地，這類治療劑當以液體形式時提供時，被提供在密封容器中。

【0195】 本發明也提供了包括一個或多個容器的藥學包裝或試劑
15 盒，所述容器包含 B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合，單獨地或與其他試劑一起，優選地與藥學上可接受的載體一起。另外，用於治療疾病的一種或多種其他預防劑或治療劑也可包括在藥物包裝或試劑盒中。本發明也提供了這樣的藥物包裝或試劑盒，其包括一個或多個容器，所述容器填充本發明藥物組合物的一種或多種成分。任選地與這類容器(一個或多個)關聯的可以是
20 管理藥物或生物產品的製造、使用或銷售的政府機構規定的形式的佈告(notice)，所述佈告反映了管理機構許可用於人類施用的製造、使用或銷售。

【0196】 試劑盒可包括 B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合。試劑盒可在一個或多個容器中進一步包括可用於治療癌症的一種或多種其他預防劑和/或治療劑；和/或試劑盒可進一步包括結合一種或多種癌症抗原

的一種或多種細胞毒性抗體。在某些實施方式中，其他預防劑或治療劑是化療劑。在其他實施方式中，預防劑或治療劑是生物或激素治療劑。

【0197】 F.使用方法

【0198】 如上所討論，特異性結合 B7-H3 的分子和特異性結合 PD-1 的分子在患有癌症或其他疾病的受試者中可用於治療性目的。所以，本發明提供了治療癌症的方法，包括向需要其的受試者施用 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子。尤其地，本發明包括這樣的方法，其中 B7-H3-結合分子包括本文提供的抗 B7-H3 抗體的表位-結合位點，並且其中 PD-1-結合分子包括本文提供的抗 PD-1 抗體的表位-結合位點。在一個實施方式中，B7-H3-結合分子是抗體。在一個實施方式中，PD-1-結合分子是抗體。在進一步的實施方式中，B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子是抗體。

【0199】 在一個實施方式中，同時施用 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子。如本文所使用，這類“同時”施用旨在表示：

(A) 施用包含 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子的單藥物組合物。這類分子可以是相同的分子(例如，雙特異性抗體)，或可以是不同的(例如，抗 B7-H3 抗體或其抗原-結合片段，和抗 PD-1-抗體或其抗原-結合片段)；或 (B) 分開施用兩種或更多種藥物組合物，其中一種組合物包含特異性結合 B7-H3 的分子和另一種組合物包含特異性結合 PD-1 的分子，其中組合物在 48-小時時間內施用。

【0200】 在第二個實施方式中，採用兩種不同的分子，並且“按順序”施用分子(例如，施用抗 B7-H3 抗體，然後稍後提供抗 PD-1 抗體，或反之亦然)。在這樣的順序施用中，在施用第一施用的組合物之後至少 48 小時或更長時間施用第二施用的組合物。

【0201】 提供療法或“治療”指有益的或期望的結果的任何指標：包括

但不限於臨床結果，比如腫瘤尺寸的縮小(在癌症背景下，例如，乳腺、胃癌或前列腺癌的腫瘤)、癌細胞生長的遲緩、轉移發展的延遲、由於疾病導致的症狀的減少、遭受疾病的患者的生活品質的提高、治療疾病需要的其他藥物治療的劑量的減少、另一藥物的效果的提高，比如經靶向和/或內化、疾病的進展的延遲和/或個體的生存的延長。

【0202】 治療的受試者包括動物，最優選哺乳動物物種，比如非靈長類動物(例如，牛、馬、貓科動物、犬科動物、齧齒動物等)或靈長類(例如，猴子，比如，食蟹猴、人等)。在優選的實施方式中，受試者是人。

【0203】 可通過本發明的各種實施方式治療的示例性疾病包括但不限於增殖性疾病、細胞增殖性疾病和癌症(尤其是表達 B7-H3 的癌症)。在各種實施方式中，本發明包括用於治療、預防或管理受試者中疾病或病症的方法和組合物，包括向受試者施用治療有效量的特異性結合 B7-H3 的分子和特異性結合 PD-1 的分子。例如，B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子尤其可用于預防、抑制、減緩原發性腫瘤的生長或復原(regression)，和癌細胞的轉移。儘管不意圖受具體作用機制的限制，但是這類結合分子可介導針對癌細胞的效應子功能、促進免疫系統針對癌細胞的啟動、交聯細胞表面抗原和/或癌細胞上的受體和增強細胞凋亡或負生長調節信號傳導，或其組合，導致腫瘤清除和/或腫瘤減小。

【0204】 如本文所使用，在一個實施方式中，藥物組合物的“有效量”是足以實現有益的或期望的結果的量，包括，但不限於，臨床結果比如減輕由於疾病導致的症狀，減弱感染的症狀(例如，病毒量、發熱、疼痛、膿毒症等)或癌症的症狀(例如，癌細胞的增殖、腫瘤存在、腫瘤轉移等)，從而提高遭受疾病的患者的生活品質、減少治療疾病需要的其他藥物治療的劑量、提高另一藥物的效果，比如經靶向和/或內化、延遲疾病的進展和/或延長個體的生存。當應用于單獨施用的單活性成分時，術語指單獨該成分。當應用于組合時，術

語指產生療效的活性成分的組合的量，無論是否是組合施用、連續施用或同時施用。下面討論具體的劑量。

【0205】 在一個實施方式中，B7-H3-結合分子(例如，抗體)和 PD-1-結合分子(例如，抗體)可用於治療與 B7-H3 的表達相關的任何疾病或病況或特徵

5 在於 B7-H3 的表達的任何疾病或病況。因此，不受限制地，本發明的方法和組合物可用於針對癌症的免疫療法，所述癌症包括特徵在於癌細胞的存在的癌症，所述癌細胞包括但不限於下述的細胞：急性髓細胞樣白血病、腎上腺腫瘤、AIDS 相關的癌症、軟組織腺泡狀肉瘤、星形細胞瘤、膀胱癌、骨癌、腦和脊髓癌症、轉移性腦瘤、乳腺癌、頸動脈體瘤、宮頸癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、嫌色

10 細胞腎細胞癌、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性纖維組織細胞瘤、促結締組織增生小圓細胞瘤、室管膜細胞瘤、尤文氏瘤、骨外粘液樣軟骨肉瘤、不完全性骨纖維生成、骨的纖維發育異常、膽囊癌或膽管癌、胃癌、妊娠滋養層疾病、生殖細胞瘤、頭頸癌、肝細胞癌、惡性膠質瘤、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/惡性的脂肪瘤、肝癌、

15 淋巴瘤、肺癌、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、惡性間皮瘤、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合征、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、非小細胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、甲狀腺乳頭狀癌、甲狀旁腺瘤、兒科癌症、周圍神經鞘瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體瘤、前列腺癌、眼色素層後黑素瘤、罕見血液學疾病、腎細胞癌、腎轉移性癌症、橫紋肌樣瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、

20 皮膚癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌症、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺轉移性癌症和子宮癌。這類免疫療法可，例如，足夠減少癌細胞中的細胞分裂、延遲轉移的發展(例如，發作和程度)和/或促進免疫系統對癌細胞的活性。

【0206】 尤其地，B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子的組合尤其可用

於治療頭頸的磷狀細胞癌(SCCHN)、膀胱癌、乳腺癌、結直腸癌、胃癌、惡性膠質瘤、腎癌、肺癌，包括非小細胞肺癌(NSCLC)、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、腎細胞癌和兒童的小圓藍細胞腫瘤，包括成神經細胞瘤和橫紋肌肉瘤，其每種高度表達 B7-H3。

5 **【0207】** 應理解，以在生理學(例如，體內)條件下促進結合的濃度施用 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子。可與增強或引導個體的自身免疫應答的另外的劑，比如增強 ADCC 或刺激 T-細胞的劑，一起施用 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子(例如，抗 B7-H3 和抗 PD-1 抗體)。

10 **【0208】** 在仍另一實施方式中，B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子可與放射性分子、毒素(例如，加利車黴素)、化療分子、脂質體或包含化療化合物的其他小泡綴合或結合，並且被施用至需要這種治療的個體，以使這些化合物靶向包含被 B7-H3-結合分子識別的抗原的癌症細胞，因此消除癌症或患病的細胞。不限於任何具體的理論，B7-H3-結合分子(例如，抗 B7-H3 抗體)通過在其表面攜帶 B7-H3 的細胞被內化，因此將綴合部分遞送至細胞，以誘導治療作用，並且 PD-1-結合分子促進免疫系統的啟動。

15

【0209】 在仍另一實施方式中，B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子(例如，抗 B7-H3 和抗 PD-1 抗體)可在外科去除腫瘤時用作輔助療法，以便延遲、抑制或預防轉移的發展。也可在外科手術之前施用分子(新輔助療法)，以便減小腫瘤的尺寸，因此確保外科手術能夠進行或簡化外科手術、在外科手術期間節約組織和/或減少任何產生的缺陷。

20

【0210】 具有對 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 增加的親和力，和任選地對 FcγRIIB 降低的親和力的 Fc 結構域分子可在 FcγR 結合時導致增強的啟動應答，因此對於治療和/或預防癌症具有增強的治療效力。因此，包括變異的 Fc 結構域的 B7-H3-結合分子尤其可用于治療和/或預防其中期望 FcγR 介導的效應

細胞功能(例如，ADCC)的疾病或病症(例如，癌症)。例如，具有增強的 FcγRIII 結合的 B7-H3-結合分子可結合細胞-表面抗原和免疫效應細胞(例如，NK 細胞)上的 FcγRIIIA，刺激針對細胞的效應子功能(例如，ADCC、CDC、吞噬、調理作用等)。在一些實施方式中，本文提供的 B7-H3-結合分子尤其適於治療癌症。

5 標準單克隆抗體療法的效力取決於受試者的 FcγR 多態性。Cartron, G.等 (2002) *“Therapeutic Activity Of Humanized Anti - CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcγRIIIa Gene,”* Blood 99:754-758；Weng, W.K.等 (2003) *“Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular*

10 *Lymphoma,”* J Clin Oncol. 21(21):3940-3947。這些受體表達在效應細胞的表面上，並且介導 ADCC。高親和力等位基因改善了效應細胞介導 ADCC 的能力。尤其地，本文提供的 B7-H3-結合分子包括展示對於效應細胞上的 FcγRIIIA 增強的親和力(相對於野生型 Fc 結構域)的變異的 Fc 結構域，該 B7-H3-結合分子是用於患者的更好的免疫療法試劑，無論它們的 FcγR 多態性如何。

15 **【0211】 G.施用和劑量**

【0212】 通過向受試者施用有效量的 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子的組合或包括其的藥物組合物，這類組合可被提供用於治療、預防和改善與癌症或其他疾病或病症相關的一個或多個症狀。在下面的任何實施方式中，癌症首選地是表達 B7-H3 的癌症。

20 **【0213】** 如本文所使用，術語“組合(聯合，combination)”指使用大於一種治療劑(例如，B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子)。術語“組合”的使用不限制將治療劑施用至患疾病的受試者的順序，也不意味著在精確的同一時間施用劑，而是其意思是按順序和在一定的時間隔內向受試者施用劑，以便劑可用於提供比它們以其他方式施用時增加的益處。例如，每種治療劑(例如，(即，

B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子)可同時或以任何順序相繼施用和/或在不同的時間點施用，以便提供期望的治療效果或預防效果。此外，每種試劑不需要在整個治療療程中施用。例如，兩種劑可都被施用一段時間，之後中止一種劑。可分別施用每種治療劑，以任何適當的形式和通過任何適當的途徑，例如，一
5 種通過口服途徑和一種通過腸胃外被施用。

【0214】 用於提供 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子的組合的各種遞送系統和施用路徑是可用的。可用於施用 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子的遞送系統包括但不限於封裝在脂質體中、微粒、微膠囊、能夠表達抗體或融合蛋白的重組細胞、受體-介導內吞作用(見，例如，Wu 等 (1987) “*Receptor-Mediated*
10 *In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System*,” J. Biol. Chem. 262:4429-4432)，構建核酸作為逆轉錄病毒或其他載體的一部分等。施用 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子的方法包括但不限於腸胃外施用(例如皮內、肌肉、腹腔內、靜脈內以及皮下)、硬膜外以及粘膜(例如鼻內和口腔途徑)。在具體實施方式中，分子經肌肉、靜脈內或皮下施用。組合物可以通過任何方便途徑施
15 用，例如通過輸注或彈丸注射、通過上皮或黏膜皮膚被覆(lining) (例如口腔粘膜、直腸和腸粘膜等)吸收，並且可以與其他生物活性劑一起施用。給藥可以是全身的或局部的。另外，也可以應用肺給藥，例如通過使用吸入器或噴霧器，並且與霧化劑一起配製。見，例如，美國專利號 6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540 和 4,880,078；和 PCT 公開號 WO
20 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346；和 WO 99/66903，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0215】 用治療或預防有效量的 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子治療受試者可包括單治療或，優選地，可包括一系列治療。例如，受試者可用 B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子治療，每週一次、每週兩次、每兩週一

次、每三週一次、每四周一次、每六週一次、每兩個月一次，持續約 2 至約 52 周。應該理解，在具體治療的期間，用於治療的分子的有效劑量可增加或減少。如本文提供，B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子不需要同時施用或以相同的間隔施用或持續相同的治療次數。

5 **【0216】** 優選地，使用包括一個或多個劑量的治療方案施用 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子，其中在 1 周、2 周、3 周、4 周、6 周、8 周或大於 8 周內施用治療方案。在某些實施方式中，治療方案包括間歇地施用有效量的這類分子的劑量(例如，在第一周和第四周施用分子的劑量並且在第二周或第三周不施用分子的劑量)。典型地，有 1、2、3、4、5 或大於 5 個治療療程。每個療
10 程可以是相同的方案或不同的方案。

【0217】 施用至患者的 B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合的劑量通常是至少約 1.0 mg/kg 體重、至少約 3 mg/kg 體重、至少約 5 mg/kg 體重、至少約 10 mg/kg 體重、至少約 15 mg/kg 體重或至少約 20 mg/kg。對於本發明包括的抗體，施用至患者的劑量通常是 1.0 mg/kg 至 20 mg/kg 患者的體重。
15 優選地，施用至患者的劑量在 1.0 mg/kg 和 20 mg/kg、1.0 mg/kg 和 10 mg/kg、1.0 mg/kg 和 5 mg/kg、2.0 mg/kg 和 20 mg/kg 或 5 mg/kg 和 20 mg/kg 患者的體重之間。在一個實施方式中，施用至患者的劑量在 1 mg/kg 和 15 mg/kg 體重之間。在另一實施方式中，施用至患者的劑量是 1 mg/kg、2mg/kg、3 mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10 mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、
20 13mg/kg、14mg/kg 或 15 mg/kg、16 mg/kg、17 mg/kg、18 mg/kg、19 mg/kg 或 20 mg/kg 體重。在基線處，基於患者的體重施用計算的劑量。體重由基線或確定的穩定狀態(plateau)重量的顯著($\geq 10\%$)改變將提示重新計算施用的劑量。

【0218】 可選地，將固定劑量的 B7-H3-結合分子、PD-1-結合分子或這類分子的組合施用至患者，無論體重如何。對於本發明包括的抗體，施用至

患者的固定劑量通常在 50 mg 至 500 mg 之間。優選地，施用至患者的固定劑量在 50 mg 和 300 mg、100 mg 和 300 mg 或 100 mg 和 200 mg 之間。在一個實施方式中，施用至患者的固定劑量是 100 mg、200 mg 或 300 mg。

【0219】 在各種實施方式中，可在施用第二(或隨後)治療劑(例如，抗 B7-H3 抗體或抗 PD-1 抗體)至患疾病的受試者之前(例如，5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、45 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、12 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、8 周或 12 周之前)、同時或之後(例如，5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、45 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、12 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、8 周或 12 周之後)施用第一治療劑(例如，抗 B7-H3 抗體或抗 PD-1 抗體)。在優選的實施方式中，在相同患者隨訪期間施用兩種或更多種劑。

【0220】 如本文提供的，可以不同的劑量、不同的濃度、不同時間和/或以不同的方案施用 B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子。

【0221】 如上所討論，儘管可採用各種給藥方案和施用路徑，以便向需要其的接受受試者提供特異性結合 B7-H3 的分子和特異性結合 PD-1 的分子的組合。根據本發明，某些組合、給藥方案和施用路徑對於這類治療是尤其優選的。在這類給藥和施用中，抗 B7-H3 抗體(例如，hBRCA84D-2)，單獨地和與抗 PD-1 抗體(例如，派姆單抗)組合，是尤其優選的。

【0222】 在某些實施方式中，每週施用抗 B7-H3 抗體的劑量，其聯合每兩周或三周施用的抗 PD-1 抗體的劑量(其中這類聯合治療方案的每個施用在本文稱為“迴圈”)。在一個實施方式中，每週施用 1 至 15 mg/kg 患者體重，優選地 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 mg/kg 體重的抗 B7-H3 抗體。在一個實施方式中，每兩周或三週一次施用 1 至 10 mg/kg 患者體重，優選地 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 mg/kg 體重的抗 PD-1 抗體，或

100、200 或 300 mg 固定劑量的抗 PD-1 抗體，直到觀察到疾病或難處理毒性的緩解。

【0223】 在尤其優選的實施方式中，每週通過 IV 輸注將抗 B7-H3 抗體施用至受試者並且每兩周或三周通過 IV 輸注將抗 PD-1 抗體施用至受試者，
5 持續至少 1 個月或更長時間、至少 3 個月或更長時間或至少 6 個月或更長時間或至少 12 個月或更長時間。尤其優選治療持續時間是至少 6 個月或更長時間，或至少 12 個月或更長時間，或直到觀察到疾病或難處理毒性的緩解。在這類每兩周或三週一次的 IV 施用中，抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體可一起施用或順序施用。在尤其優選的實施方式中，以不大於 48 小時間隔，通過 IV 輸注將抗 B7-H3
10 抗體和抗 PD-1 抗體順序施用至受試者。在這類順序施用中，抗 B7-H3 抗體可在施用抗 PD-1 抗體之前或之後施用。

【0224】 尤其優選地，為受試者提供多個劑量的抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體的聯合治療。治療方案可因此包括 1 個迴圈、至少 2 個迴圈或大於 2 個迴圈、至少 3 個迴圈或大於 3 個迴圈、至少 4 個迴圈或大於 4 個迴圈、至少 5
15 個迴圈或大於 5 個迴圈或至少 6 個迴圈或大於 6 個迴圈。每個這樣的迴圈中的每種抗體的劑量可以相同或可與之前施用的劑量不同。在每種這樣的迴圈中，每種抗體的劑量可以相同或可與之前的施用劑量不同。

【0225】 優選地，不以 IV 推注或 IV 團注施用抗體，但是這樣的施用通過 IV 輸注實現。因此，抗體優選地被稀釋至包括適當的稀釋劑，例如，0.9%
20 氯化鈉的輸注袋中。因為可能發生輸注或過敏反應，所以推薦用於預防這類輸注反應的術前用藥並且應在抗體施用期間觀察防範過敏。尤其優選地，在 30 分鐘和 24 小時之間的時期內向受試者施用 IV 輸注。在某些實施方式中，如果受試者不展示不利的輸注反應的徵兆或症狀，IV 輸注優選地在 30-180 分鐘或 30-120 分鐘或 30-90 分鐘內或 60 分鐘或更短的時間段內遞送。

【0226】 因此，提供了優選的治療癌症的方法，該方法包括向需要其的受試者施用抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體的組合，其中抗 B7-H3 抗體以每週 1 至 15 mg/kg 體重的劑量被施用並且抗 PD-1 抗體以每三周 200 mg 的固定劑量被施用。在一個實施方式中，抗 B7-H3 抗體以 1、3、10 或 15 mg/kg 體重的劑量被施用。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體以每週 1 mg/kg 的劑量被施用和抗 PD-1 抗體以每三周 200 mg 的固定劑量被施用。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體以每週 3 mg/kg 體重的劑量被施用和抗 PD-1 抗體以每三周 200 mg 的固定劑量被施用。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體以每週 10 mg/kg 體重的劑量被施用和抗 PD-1 抗體以每三周 200 mg 的固定劑量被施用。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體以每週 15 mg/kg 體重的劑量被施用和抗 PD-1 抗體以每三周 200 mg 的固定劑量被施用。在任何上述實施方式中，通過 IV 輸注施用抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體，並且當在同一周施用時，二者可在 48 小時內，優選地 24 小時內施用。

【0227】 提供了治療癌症的另一優選的方法，該方法包括向需要其的受試者施用抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體的組合，其中抗 B7-H3 抗體的劑量是每週 1 至 15 mg/kg 體重，並且抗 PD-1 抗體的劑量是每兩周或三周 1 至 10 mg/kg 體重。在一個實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 1、3、10 或 15 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 PD-1 抗體的劑量是 1、2、3 或 10 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 1 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 1 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 1 mg/kg 並且抗 PD-1 抗體的劑量是 2 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 1 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 3 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 1 mg/kg 並且抗 PD-1 抗體的劑量是 10 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 3 mg/kg 體重並且抗 PD-1

抗體的劑量是 1 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 3 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 2 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 3 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 3 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 3 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 10 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 10 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 1 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 10 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 2 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 10 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 3 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 10 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 10 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 15 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 1 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 15 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 2 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 15 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 3 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 B7-H3 抗體的劑量是 15 mg/kg 體重並且抗 PD-1 抗體的劑量是 10 mg/kg 體重。在任何上述實施方式中，通過 IV 輸注施用抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體，並且每兩週或三週一次，可在 48 小時、優選地 24 小時時間內施用。

【0228】 在任何上述實施方式中，抗 B7-H3 抗體包括 hBRCA84D、hBRCA69D、PRCA157 的 CDR_L1、CDR_L2、CDR_L3、CDR_H1、CDR_H2 和 CDR_H3 結構域或表 5 中提供的任何抗 B7-H3 抗體的 CDR_L1、CDR_L2、CDR_L3、CDR_H1、CDR_H2 和 CDR_H3 結構域，並且抗 PD-1 抗體包括 PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8 的 CDR_L1、CDR_L2、CDR_L3、CDR_H1、CDR_H2 和 CDR_H3 結構域，或表 6 中提供的任何抗 PD-1 抗體的 CDR_L1、CDR_L2、CDR_L3、CDR_H1、CDR_H2 和 CDR_H3

結構域。在任何上述實施方式中，抗 B7-H3 抗體是 hBRCA84D-2 並且抗 PD-1 抗體選自表 6 中提供的抗體。在優選的實施方式中，抗 B7-H3 抗體是 hBRCA84D-2 並且抗 PD-1 抗體是派姆單抗。在另一優選的實施方式中，抗 B7-H3 抗體是 hBRCA84D-2 並且抗 PD-1 抗體是尼伏魯單抗。在另一優選的實施方式中，抗 B7-H3 抗體是 hBRCA84D-2 並且抗 PD-1 抗體是匹地利珠單抗。在另一優選的實施方式中，抗 B7-H3 抗體是 hBRCA84D-2 並且抗 PD-1 抗體是 PD-1 mAb 6-ISQ。

【0229】 在任何上述實施方式中，將治療劑優選地迴圈施用至受試者。迴圈療法可減少發展對一種或多種療法的抗性，避免或減少一種療法的副作用，和/或改善治療的效力。示例性迴圈是約每週一次，約每 10 天一次，約每兩週一次，和約每三週一次。每個迴圈可包括至少 1 周的休息、至少 2 周的休息、至少 3 周的休息等。施用的迴圈的數量是約 1 至約 12 個迴圈，更通常約 2 至約 10 個迴圈，和更通常約 2 至約 8 個迴圈。

【0230】 如在上面任何實施方式中提供的用於治療劑施用的優選的劑量方案，包括在初始迴圈和一個或多個隨後的迴圈中，向接受受試者施用抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體的這類組合。在上面提供的任何實施方式中，在同一迴圈方案中施用抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體。在這類實施方式中，每個迴圈包括兩周或三周，其中以每週施用向受試者提供抗 B7-H3 抗體，並且在每個 2 周或 3 周週期的第一周向受試者提供抗 PD-1 抗體。可選地，以不同的迴圈方案施用抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體。在這類實施方式中，用於抗 PD-1 抗體的每個迴圈包括兩周或三周，其中在每個 2 周或 3 周週期的第一周向受試者提供抗 PD-1 抗體。在這類實施方式中，用於抗 B7-H3 抗體的初始迴圈優選地包括 8 周，其中，在這樣的 8 周初始週期的前四周，以每週施用向受試者提供抗 B7-H3 抗體，隨後在這樣的 8 周初始週期的 5-8 周的時間，不向受試者施用。每個隨後迴圈優

選地包括 4 周時間段，其中在這樣的 4 周隨後週期的前三周，以每週施用向受試者提供抗 B7-H3 抗體，隨後在這樣的 4 周隨後週期的第 4 周時間段，不向受試者施用。因此，例如，在 1、2、3、4、9、10、11、13、14、15 周等等中，受試者每週將接收 B7-H3 抗體，其中第 1-8 周是初始劑量方案迴圈，第 9-12 周是第一隨後的迴圈，第 13-16 周是第二隨後的迴圈等。

【0231】 聯合療法

【0232】 本發明進一步包括向受試者施用特異性結合 B7-H3 的分子和特異性結合 PD-1 的分子的組合，其進一步與本領域技術人員已知的用於治療或預防癌症、自身免疫性疾病、炎症或感染疾病的其他療法組合，所述其他療法包括但不限於當前的標準和實驗化學療法、激素療法、生物療法、免疫療法、放射療法或外科手術。在一些實施方式中，B7-H3-結合分子和 PD-1-結合分子(例如，抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體)的組合聯合治療或預防有效量的一種或多種另外的治療劑被施用，本領域技術人員已知所述另外的治療劑用於治療和/或預防癌症(尤其是表達 B7-H3 的癌症)。

【0233】 在用於治療細胞增殖性疾病的實施方式中，B7-H3-結合分子和/或 PD-1-結合分子(例如，抗 B7-H3 抗體、抗 PD-1 抗體)與另一治療劑綴合，或進一步聯合另一治療劑施用，所述另一治療劑比如，但不限於烷基化劑(例如，氮芥或順鉑)、血管生成抑制劑、蔥環類抗生素(例如，柔紅黴素/道諾黴素或多柔比星)、抗生素(例如，放線菌素 D、博來黴素或安黴黴素)、抗體(例如，抗 VEGF 抗體比如貝伐單抗(由 Genentech, Inc.以 AVASTIN®出售)、抗 EGFR 抗體比如帕尼單抗(由 Amgen, Inc.以 VECTIBIX™出售)或抗整聯蛋白抗體，比如那他珠單抗(由 Biogen Idec and Elan Pharmaceuticals, Inc.以 TYSABRI®出售))、抗代謝物(例如，氨甲喋呤或 5-氟尿嘧啶)、抗有絲分裂劑(例如，長春新城或紫杉醇)、細胞毒素(例如，細胞抑制劑或殺細胞劑)、激素治療劑(例如，選擇性雌激素受體

調節劑(例如，他莫昔芬或雷洛昔芬)、芳香酶抑制劑、促黃體激素-釋放激素類似物、促孕劑、腎上腺皮質固醇、雌激素、雄激素、抗雌激素試劑、雄激素受體阻斷劑、5- α 還原酶抑制劑、腎上腺產生抑制劑等)、基質金屬蛋白酶抑制劑、放射性元素(例如， α -發射體、 γ -發射體等)或任何其他化療劑。

5 **【0234】** 適當的血管生成抑制劑的非限制性例子包括 ABT-627、血管生長抑制素(血纖維蛋白溶酶原片段)；抗血管生成 RNA 構成酶(angiozyme)；抗血管生成抗凝血酶 III；Bay 12-9566；氟草胺；貝伐單抗；BMS-275291；雙膦酸鹽；軟骨衍生的抑制劑(CDI)；CAI；CD59 補體片段；CEP-7055；Col 3；考布他汀 A-4；內皮抑制素(膠原蛋白 XVIII 片段)；法呢基轉移酶抑制劑(FTI)；纖維連
10 蛋白片段；gro- β ；鹵夫酮；肝素酶；肝素多聚己糖片段；HMOV833；人絨膜促性腺素(hCG)；IM-862；干擾素 $\alpha/\beta/\gamma$ ；干擾素可誘導的蛋白質(IP-10)；白介素-12；絞鏈區 5 (kringle 5) (血纖維蛋白溶酶原片段)；馬立馬司他；金屬蛋白酶抑制劑(TIMPs)；2-甲氧雌二醇；MMI 270 (CGS 27023A)；MoAb IMC-1C11；新伐司他；NM-3；panzem；PI-88；胎盤核糖核酸酶抑制劑；血纖維蛋白溶酶原啟動抑制劑；
15 血小板因數-4 (PF4)；普馬司他；催乳素 16kDa 片段；增殖蛋白相關的蛋白質(PRP)；PTK 787/ZK 222594；類視黃醇；索利司他；角鯊胺；SS 3304；SU 5416；SU6668；SU11248；四氫皮質醇-S；四硫鉬酸鹽；沙利度胺；血小板反應蛋白-1(TSP-1)；TNP-470；轉化生長因數 β (TGF- β)；血管抑制素(vasculostatin)；血管形成抑制素(鈣網蛋白片段)；ZD6126 和 ZD 6474。

20 **【0235】** 用於治療細胞增生性病徵的另外的抗體的非限制性例子包括針對下述的抗體：17-1A、 $\alpha v \beta_3$ 、AFP、CD3、CD18、CD20、CD22、CD33、CD44、CD52、CEA、CTLA-4、DNA 相關的蛋白質、EGF 受體、Ep-CAM、GD2-神經節苷脂、gp IIIb/IIIa、gp72、HLA-DR 10 β 、HLA-DR 抗原、IgE、神經節苷脂 GD3、MUC-1、nuC242、PEM 抗原、SK-1 抗原、腫瘤抗原 CA125、腫瘤抗

原 MUC1、VEGF 和 VEGF-受體。

【0236】 實施例

【0237】 現在已經大體上描述了本發明，通過參考下述實施例，本發明將被更容易理解，通過示例的方式提供實施例而不旨在限制本發明，除非另
5 外指出。

【0238】 實施例 1

【0239】 抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體的組合的劑量遞增研究

【0240】 儘管下面的劑量遞增研究方案詳細描述了示例性抗 B7-H3 抗體 “hBRCA84D-2” 聯合抗 PD-1 抗體 “派姆單抗” 的使用，但是應理解，鑒
10 於本文的教導，可使用本文提供的任何抗 B7-H3 抗體和抗 PD-1 抗體設計類似的組合方案。

【0241】 進行劑量遞增研究，以確定每週施用的遞增劑量的 hBRCA84D-2 聯合每三周施用的 2 mg/kg 劑量的派姆單抗的最大耐受劑量(MTD) 或最大施用劑量(MAD) (如果沒有定義 MTD)。這隨後可以是組擴展階段(cohort
15 expansion phase)，以進一步定義與在劑量遞增研究中確定的 hBRCA84D-2 劑量的組合的安全性和初始效力。每週施用 hBRCA84D-2，並且每 3 週一次施用派姆單抗。每 3 週一次，在同一天施用劑，其中先施用派姆單抗，隨後施用 hBRCA84D-2。但是，在組合劑量超過 2,500 mg 的情況下，應在連續的天數施用抗體。當在連續的天數施用抗體時，可在第一天施用派姆單抗，並且可在接
20 下來的日曆日施用 hBRCA84D-2。療法的每個迴圈限定為 3 周，其中在第 1、8 和 15 天給予 hBRCA84D-2，並且在第 1 天給予派姆單抗。可在研究期間進行腫瘤評估，首選地，在前兩個迴圈結束時，並且在治療的每個隨後三個迴圈結束時(即，在 6 周之後[迴圈 2 結束時]和在 15 周、24 周、33 周等之後[迴圈 5、8、11 結束時等])。

【0242】 可以在組患者中，以三個相繼遞增的劑量，3 mg/kg 體重、10 mg/kg 和 15 mg/kg 體重，聯合 2 mg/kg 派姆單抗評估 hBRCA84D-2。如果確定在第一劑量組中超過了 MTD，則可聯合 2 mg/kg 派姆單抗使用劑量遞減組來評估較低劑量的 hBRCA84D-2 (1 mg/kg)。

5 【0243】 對於組擴展階段，招募另外的患者，其將以從研究的劑量遞增階段確定的 MTD (或 MAD)接收 hBRCA84D-2 聯合 2 mg/kg 的派姆單抗。

10 【0244】 在前兩個 3-周迴圈結束時，仍是臨床上穩定化的並且不經歷迫使永遠終止研究藥物的不可接受的毒性的患者將有資格接收通過 hBRCA84D-2 和派姆單抗的另外的治療。仍是臨床上穩定的、保持對穩定疾病的
15 的應答狀態或更好並且不經歷迫使永遠終止研究藥物的不可接受的毒性的患者，患者可接收 hBRAC84D-2 和派姆單抗的另外的治療迴圈。這類另外的治療可持續約一年，以便患者可接收 51 個劑量的 hBRCA84D-2 和 17 個劑量的派姆單抗。

20 【0245】 本說明書提到的所有出版物和專利通過參考併入本文，達到
15 如同具體和單獨指出每個單個出版物或專利申請通過參考以其整體併入的相同程度。儘管已經結合其具體實施方式描述了本發明，但是應當理解，其能夠被進一步修改，並且本申請旨在覆蓋大體上根據本發明原理並且包括與本公開的偏離的本發明的任何變型、用途或改變，只要在本發明所屬領域的已知或習慣實踐內並且如可應用至本文之前所闡釋的本質特徵。

20 【符號說明】

 【0246】 無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種治療癌症的方法，所述方法包括向需要其的受試者施用：

- (a) 特異性結合 B7-H3 的分子，和
- (b) 特異性結合 PD-1 的分子。

【第2項】如請求項 1 所述的方法，其中所述特異性結合 B7-H3 的分子是抗 B7-H3 抗體或其抗原-結合片段，並且所述特異性結合 PD-1 的分子是抗 PD-1 抗體或其抗原-結合片段。

【第3項】如請求項 2 所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體或其抗原-結合片段：

(a) 與 BRCA84D、BRCA69D、PRCA157 競爭 B7-H3 結合或與選自表 5 的抗 B7-H3 抗體競爭 B7-H3 結合；或

(b) 具有 BRCA84D、hBRCA84D (1.1)、hBRCA84D (2.2)、hBRCA84D-2、hBRCA69D (1.1)、hBRCA (2.2)的三個重鏈 CDR 和三個輕鏈 CDR，或具有選自表 5 的抗 B7-H3 抗體的三個重鏈 CDR 和三個輕鏈 CDR；或

(c) 具有 BRCA84D、hBRCA84D (1.1)、hBRCA84D (2.2)、hBRCA84D-2、hBRCA69D (1.1)、hBRCA (2.2)的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域，或具有選自表 5 的抗 B7-H3 抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域。

【第4項】如請求項 2 至 3 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體或其抗原-結合片段：

(a) 與尼伏魯單抗、派姆單抗、匹地利珠單抗、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb7、PD-1 mAb 8 競爭 PD-1 結合，或與選自表 6 的抗 PD-1 抗體競爭 PD-1 結合；或

(b) 具有尼伏魯單抗、派姆單抗、匹地利珠單抗、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 5、

PD-1 mAb 6、PD-1 mAb7、PD-1 mAb 8 的三個重鏈 CDR 和三個輕鏈 CDR，或具有選自表 6 的抗 PD-1 抗體的三個重鏈 CDR 和三個輕鏈 CDR；或

(c) 具有尼伏魯單抗、派姆單抗、匹地利珠單抗、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb7、PD-1 mAb 8 的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域，或具有選自表 6 的抗 PD-1 抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域。

【第5項】如請求項 2 至 4 中任一項所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體或其抗原-結合片段包括 Fc 結構域，並且所述抗 PD-1 抗體或其抗原-結合片段包括 Fc 結構域。

【第6項】如請求項 5 所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體或其抗原-結合片段包括在 Fc 結構域具有增強 ADCC 的至少一個修飾的變異的 Fc 結構域。

【第7項】如請求項 5 或 6 所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體或其抗原-結合片段包括：

(a) 變異的 Fc 結構域，其在所述 Fc 結構域中具有降低或消除 ADCC 活性的至少一個修飾；或

(b) IgG4 Fc 結構域。

【第8項】如請求項 2 至 7 中任一項所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體是 hBRCA84D-2 並且所述抗 PD-1 抗體是尼伏魯單抗、派姆單抗、匹地利珠單抗或 PD-1 mAb 6-ISQ。

【第9項】如請求項 2 至 8 中任一項所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體以每週 1-15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且所述抗 PD-1 抗體以每兩周或三周 200 mg 的固定劑量或以 1-10 mg/kg 體重的劑量被施用。

【第10項】如請求項 9 所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體以每週 1 mg/kg 體重、3 mg/kg 體重、10 mg/kg 體重或 15 mg/kg 體重的劑量被施用。

【第11項】如請求項 9 或 10 所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體以每週 1 mg/kg 體重、3 mg/kg 體重、10 mg/kg 體重或 15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且所述抗 PD-1 抗體以每兩周或三周 1 mg/kg 體重、2 mg/kg 體重、3 mg/kg 體重或 10 mg/kg 體重的劑量被施用。

【第12項】如請求項 10 或 11 所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體以每週 3 mg/kg 體重、10 mg/kg 體重或 15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且所述抗 PD-1 抗體以每三周 2 mg/kg 體重的劑量被施用。

【第13項】如請求項 10 或 11 所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體以每週 3 mg/kg 體重、10 mg/kg 體重或 15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且所述抗 PD-1 抗體以每兩周 3 mg/kg 體重的劑量被施用。

【第14項】如請求項 10 或 11 所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體以每週 3 mg/kg 體重、10 mg/kg 體重或 15 mg/kg 體重的劑量被施用，並且所述抗 PD-1 抗體以每兩周 10 mg/kg 體重的劑量被施用。

【第15項】如請求項 1 至 11 中任一項所述的方法，其中每兩周施用所述抗 PD-1 抗體。

【第16項】如請求項 1 至 11 中任一項所述的方法，其中每三周施用所述抗 PD-1 抗體。

【第17項】如請求項 2 至 16 中任一項所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體和所述抗 PD-1 抗體通過 IV 輸注被施用。

【第18項】如請求項 1 至 12、16 和 17 中任一項所述的方法，其中每三周在 48 小時時期內施用所述抗 B7-H3 抗體和所述抗 PD-1 抗體。

【第19項】如請求項 2 至 11、13 至 15 或 17 中任一項所述的方法，其中每兩周在 48 小時時期內施用所述抗 B7-H3 抗體和所述抗 PD-1 抗體。

【第20項】如請求項 1 至 19 中任一項所述的方法，其中所述癌症是表達 B7-H3 的癌症。

【第21項】如請求項 20 所述的方法，其中所述表達 B7-H3 的癌症是其中表達 B7-H3 的頭頸部的鱗狀細胞癌(SCCHN)、膀胱癌、乳腺癌、結直腸癌、胃癌、惡性膠質瘤、腎癌、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、腎細胞癌、小圓藍細胞瘤、成神經細胞瘤或橫紋肌肉瘤。

【第22項】如請求項 1 至 21 中任一項所述的方法，其中所述治療進一步包括施用第三治療劑的步驟，其中所述第三治療劑選自抗血管生成劑、抗腫瘤劑、化療劑和細胞毒性劑。

【第23項】如請求項 2 至 22 中任一項所述的方法，其中所述抗 B7-H3 抗體是 hBRCA84D-2。

【第24項】如請求項 2 至 23 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體是派姆單抗。

【第25項】如請求項 2 至 23 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體是尼伏魯單抗。

【第26項】如請求項 2 至 23 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體是匹地利珠單抗。

【第27項】如請求項 2 至 23 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體包括 PD-1 mAb 3 的 VH 結構域和 VL 結構域。

【第28項】如請求項 2 至 23 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體包括 PD-1 mAb 5 的 VH 結構域和 VL 結構域。

【第29項】如請求項 2 至 23 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體包括 PD-1 mAb 6 的 VH 結構域和 VL 結構域。

【第30項】如請求項 29 所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體是 mAb 6 ISQ。

【第31項】如請求項 2 至 23 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體包括 PD-1 mAb 7 的 VH 和 VL。

【第32項】如請求項 2 至 23 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體包括 PD-1 mAb 8 的 VH 結構域和 VL 結構域。

【第33項】如請求項 2 至 23 中任一項所述的方法，其中所述抗 PD-1 抗體選自表 6。