



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109476748 B

(45) 授权公告日 2023. 05. 23

(21) 申请号 201780045938.7
(22) 申请日 2017.08.07
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109476748 A
(43) 申请公布日 2019.03.15
(30) 优先权数据
 16183245.6 2016.08.08 EP
 17150273.5 2017.01.04 EP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2019.01.24
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2017/069884 2017.08.07
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/029124 EN 2018.02.15
(73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
 地址 瑞士巴塞尔
(72) 发明人 C.克雷恩 L·科达里迪克
(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
 专利代理师 岑晓东
(51) Int.Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
(56) 对比文件
 US 2010203056 A1, 2010.08.12

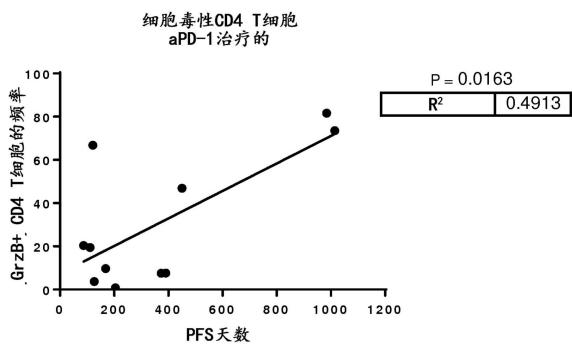
WO 2016109546 A2, 2016.07.07
CN 103842030 A, 2014.06.04
Todd W Kelley. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. 《Am J Clin Pathol》. 2007, 第128卷(第6期),
H Aneagawa等. Upregulation of granzyme B and interferon- γ mRNA in responding lesions by treatment with nivolumab for metastatic melanoma: a case report. 《J Eur Acad Dermatol Venereol》. 2015, 第30卷(第12期),
Stephen M Ansell等. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. 《N Engl J Med》. 2015, 第372卷(第4期),
Camilla A Lindqvist等. Both CD4+ FoxP3+ and CD4+ FoxP3- T cells from patients with B-cell malignancy express cytolytic markers and kill autologous leukaemic B cells in vitro. 《Immunology》. 2011, 第133卷(第3期), (续)

审查员 谭小飞

权利要求书2页 说明书64页
序列表21页 附图12页

(54) 发明名称
 用于癌症的治疗和诊断方法

(57) 摘要
 本发明提供用于癌症和用于在具有癌症的个体中增强免疫功能的治疗和诊断方法和组合。本发明提供治疗方法, 用于确定罹患癌症的个体是否有可能响应包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗方法, 预测罹患癌症的个体对包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗的响应性的方法, 和为罹患癌症的个体选择疗法的方法。



[转续页]

CN 109476748 B

[接上页]

(56) 对比文件

Yongshu Li等.A Mini-Review for Cancer Immunotherapy: Molecular Understanding of PD-1/PD-L1 Pathway & Translational

Blockade of Immune Checkpoints.《Int J Mol Sci》.2016,第17卷(第7期),

支旺旺等.靶向T细胞共信号的肿瘤免疫治疗研究进展.《药学进展》.2015,第39卷(第9期),

1. 荧光标记的针对粒酶B的抗体、荧光标记的针对FOXP3的抗体和荧光标记的针对CD4的抗体在制造供一种用于预测罹患癌症的个体对包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗的响应性的方法使用的用于癌症的诊断组合物中的用途,该方法包括:

确定自该个体获得的样品中粒酶B⁺CD4⁺T细胞和FOXP3⁺CD4⁺T细胞之间的比率,其中1或更大的粒酶B⁺CD4⁺T细胞和FOXP3⁺CD4⁺T细胞之间的比率指示该个体是很可能响应包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗。

2. 权利要求1的用途,其中该样品是在该个体已经接受至少一剂PD-1轴结合拮抗剂之后自该个体获得的。

3. 荧光标记的针对粒酶B的抗体、荧光标记的针对FOXP3的抗体和荧光标记的针对CD4的抗体在制造供一种用于为罹患癌症的个体选择疗法的方法使用的用于癌症的诊断组合物中的用途,该方法包括:

确定自该个体获得的样品中粒酶B⁺CD4⁺T细胞和FOXP3⁺CD4⁺T细胞之间的比率,并基于该样品中1或更大的粒酶B⁺CD4⁺T细胞和FOXP3⁺CD4⁺T细胞之间的比率为该个体选择包含PD-1轴结合拮抗剂的疗法。

4. (1) 荧光标记的针对粒酶B的抗体、荧光标记的针对FOXP3的抗体和荧光标记的针对CD4的抗体和(2) 有效量的PD-1轴结合拮抗剂在制造供一种用于治疗罹患癌症的个体的方法使用的用于癌症的治疗和诊断组合物中的用途,其中自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺T细胞和FOXP3⁺CD4⁺T细胞之间的比率已经确定为1或更大。

5. (1) 荧光标记的针对粒酶B的抗体、荧光标记的针对FOXP3的抗体和荧光标记的针对CD4的抗体和(2) PD-1轴结合拮抗剂在制造供一种用PD-1轴结合拮抗剂在具有黑素瘤的个体中增强免疫功能的方法使用的用于癌症的治疗和诊断组合物中的用途,该方法包括:

对该个体施用有效量的该PD-1轴结合拮抗剂,其中自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺T细胞和FOXP3⁺CD4⁺T细胞之间的比率已经确定为1或更大。

6. 权利要求5的用途,其中自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺T细胞的数目相对于在施用该PD-1轴结合拮抗剂前是增多的。

7. 权利要求5的用途,其中自该个体获得的血液样品中FOXP3⁺CD4⁺T细胞的数目相对于在施用该PD-1轴结合拮抗剂前是减少的。

8. 权利要求6的用途,其中自该个体获得的血液样品中FOXP3⁺CD4⁺T细胞的数目相对于在施用该PD-1轴结合拮抗剂前是减少的。

9. 权利要求5至8任一项的用途,其中T细胞耗竭相对于在施用该PD-1轴结合拮抗剂前是降低的。

10. (1) 荧光标记的针对粒酶B的抗体、荧光标记的针对FOXP3的抗体和荧光标记的针对CD4的抗体和(2) PD-1轴结合拮抗剂在制造供一种为治疗选择个体和在个体中治疗癌症或延迟其进展的方法使用的用于癌症的治疗和诊断组合物中的用途,该方法包括

- a. 自该个体获得血液样品,其中该个体已经接受至少一剂PD-1轴结合拮抗剂;
- b. 确定自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺T细胞和FOXP3⁺CD4⁺T细胞之间的比率;
- c. 如果粒酶B⁺CD4⁺T细胞和FOXP3⁺CD4⁺T细胞之间的比率是1或更大的话为包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗选择该个体;并
- d. 将该PD-1轴结合拮抗剂施用于该个体。

11. 权利要求1、3、4和10任一项的用途,其中该癌症选自由膀胱癌,鳞状细胞癌,肺癌,腹膜癌,肝细胞癌,胃癌,胰腺癌,成胶质细胞瘤,宫颈癌,卵巢癌,肝癌,肝瘤,乳腺癌,结肠癌,直肠癌,子宫内膜或子宫癌,唾液腺癌,肾癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肛门癌,阴茎癌,梅克尔细胞癌,睾丸癌,食管癌,胆道肿瘤,头和颈癌和血液学恶性组成的组。

12. 权利要求1、3、4和10任一项的用途,其中该癌症选自由小细胞肺癌(SCLC),非小细胞肺癌(NSCLC),肺的腺癌,肺的鳞癌,胃肠癌和结肠直肠癌组成的组。

13. 权利要求1、3、4、5和10任一项的用途,其中该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。

14. 权利要求13的用途,其中该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1对PD-1的结合。

15. 权利要求13的用途,其中该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1对PD-1和B7-1二者的结合。

16. 权利要求13的用途,其中该PD-L1结合拮抗剂是抗体。

17. 权利要求14的用途,其中该PD-L1结合拮抗剂是抗体。

18. 权利要求15的用途,其中该PD-L1结合拮抗剂是抗体。

19. 权利要求16-18任一项的用途,其中该抗体选自由阿特殊单抗(atezolizumab)(MPDL3280A),YW243.55.S70,MDX-1105,MEDI4736(度伐单抗(durvalumab)),和MSB0010718C(阿维单抗(avelumab))组成的组。

20. 权利要求19的用途,其中该抗体包含包含SEQ ID NO:19的HVR-H1序列,SEQ ID NO:20的HVR-H2序列,和SEQ ID NO:21的HVR-H3序列的重链;和包含SEQ ID NO:22的HVR-L1序列,SEQ ID NO:23的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:24的HVR-L3序列的轻链。

21. 权利要求20的用途,其中该抗体包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。

22. 权利要求1、3、4、5和10任一项的用途,其中该PD-1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。

23. 权利要求22的用途,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对PD-L1的结合。

24. 权利要求23的用途,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对PD-L1和PD-L2二者的结合。

25. 权利要求22的用途,其中该PD-1结合拮抗剂是抗体。

26. 权利要求23的用途,其中该PD-1结合拮抗剂是抗体。

27. 权利要求24的用途,其中该PD-1结合拮抗剂是抗体。

28. 权利要求25-27任一项的用途,其中该抗体选自由MDX-1106(纳武单抗(nivolumab)),MK-3475(派姆单抗(pembrolizumab)),MEDI-0680(AMP-514),PDR001,REGN2810,和BGB-108组成的组。

29. 权利要求22的用途,其中该PD-1结合拮抗剂是Fc融合蛋白。

30. 权利要求23的用途,其中该PD-1结合拮抗剂是Fc融合蛋白。

31. 权利要求24的用途,其中该PD-1结合拮抗剂是Fc融合蛋白。

32. 权利要求29-31任一项的用途,其中该Fc融合蛋白是AMP-224。

用于癌症的治疗和诊断方法

发明领域

[0001] 本文中提供的是用于病理学状况,诸如癌症(例如黑素瘤)的治疗和诊断方法和组合物,和使用PD-1轴结合拮抗剂的方法。特别地,本发明提供监测对治疗的响应的方法,治疗方法,制品和试剂盒。

[0002] 发明背景

[0003] 癌症仍然是人类健康的最致命威胁之一。癌症或恶性肿瘤以不受控制的方式快速生长和转移,使得及时检测和治疗极其困难。

[0004] 编程性死亡1多肽(PD-1)结合包括PD-L1和PD-L2在内的配体。编程性死亡配体1(PD-L1)已经与慢性感染,妊娠,组织同种异体移植,自身免疫病,和癌症期间免疫系统应答的遏制联系起来。大多数肿瘤浸润性T淋巴细胞优势表达PD-1,与正常组织和外周血中的T淋巴细胞形成对比。认为PD-L1/PD-1和PD-L1/B7-1复合物的形成负调节T细胞受体信号传导,导致后续下调CD8⁺ T细胞活化和CD8⁺ T细胞介导的肿瘤细胞杀伤。聚焦于肿瘤微环境内的CD8⁺ T细胞隔室的研究至今未能揭示抗PD-1免疫疗法的作用机制,尽管实质部分(大致30%)接受治疗的患者有明显临床益处。虽然研究很大程度上聚焦于CD8⁺ T细胞,但是最近观察到微卫星不稳定肿瘤中的肿瘤浸润性CD4⁺ T细胞表达比微卫星稳定肿瘤中的那些要高水平的PD-1(Llosa and Cruise, Cancer discovery 5(1):43-51(2015))。另外,在黑素瘤中,肿瘤浸润性CD4⁺ T细胞频繁识别突变的抗原(Linnemann and van Buuren, Nature medicine 21(1):81-85(2015))。与这些研究一致,在结肠直肠癌和黑素瘤的动物模型中实施的实验证明MHC II类限制的T细胞应答能在肿瘤控制中发挥重要作用(Kreiter et al., Nature 520(7549):692-696(2015)),而且肿瘤反应性CD4⁺ T细胞能形成细胞毒性和根除已建立的大肿瘤(Quezada et al., J Exp. Med., 207(3):637-650(2010))。在本文中报告的研究前,不知道PD-1阻断剂(例如抗PD-1抗体)在人癌症背景中是否和如何影响CD4⁺ T细胞。

[0005] 对于各种癌症(例如黑素瘤)的治疗,稳定,预防,和/或延迟进展,仍然需要监测和优化包括阻断PD-1受体/配体相互作用的治疗策略。具体而言,仍然需要鉴定很可能响应此类治疗的患者和用于快速监测正在进行的治療的有效性的方法。

[0006] 发明概述

[0007] 此发明涉及用于癌症的治疗和诊断方法和组合物。一方面,本发明特征在于一种用于在个体中治疗癌症或延迟其进展的方法,其包括对该患者施用治疗有效量的PD-1轴结合拮抗剂,其中自该患者获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率已经确定为1或更大。

[0008] 一方面,本发明涉及用于确定罹患癌症的个体是否响应包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗的方法,该方法包括确定自该个体获得的样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率,其中该样品中1或更大的粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率指示该个体响应包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗。

[0009] 在上述方面的一些实施方案中,该样品是血液样品。在一些实施方案中,该样品是

全血样品或外周血单个核细胞样品。在一些实施方案中,该血液样品是在最后一次用该PD-1拮抗剂的治疗后不晚于2个月自该个体收集的。在一些实施方案中,该个体正在接受或已经接受包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗。在一些实施方案中,该癌症选自膀胱癌,鳞状细胞癌,肺癌包括小细胞肺癌(SCLC),非小细胞肺癌(NSCLC),肺的腺癌,肺的鳞癌,腹膜癌,肝细胞癌,胃的癌或胃癌包括胃肠癌,胰腺癌,成胶质细胞瘤,宫颈癌,卵巢癌,肝癌,肝瘤,乳腺癌,结肠癌,直肠癌,结肠直肠癌,子宫内膜或子宫癌,唾液腺癌,肾癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肝的癌,肛门癌,阴茎癌,梅克尔细胞癌,睾丸癌,食管癌,胆道肿瘤,头和颈癌和血液学恶性组成的组。在一些实施方案中,该癌症是黑色素瘤。在一些实施方案中,该癌症是尿路上皮膀胱癌。在一些实施方案中,该尿路上皮膀胱癌是转移性尿路上皮膀胱癌。在一些实施方案中,该尿路上皮膀胱癌是局部晚期尿路上皮膀胱癌。在一些实施方案中,该个体中的癌细胞表达PD-L1。

[0010] 在一些实施方案中,PD-L1表达是通过免疫组织化学(IHC)测定法测定的。在一些实施方案中,该个体已经接受两种或更少用于局部晚期或转移性癌症的在先细胞毒性治疗方案(例如0,1,或2种在先细胞毒性治疗方案)。在一些实施方案中,该个体从未具有用于局部晚期或转移性癌症的在先靶向系统治疗。在一些实施方案中,该个体对该治疗的响应是完全响应。在一些实施方案中,该个体对该治疗的响应是部分响应。在一些实施方案中,该个体对该治疗的响应是在该治疗停止后的持久响应。

[0011] 在一些实施方案中,粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率是4。在一些实施方案中,粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率是45。

[0012] 在上述方面的一些实施方案中,该PD-L1轴结合拮抗剂选自PD-L1结合拮抗剂,PD-1结合拮抗剂,和PD-L2结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-L1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1对它的配体结合配偶中一种或多种的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1对PD-1的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1对B7-1的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1对PD-1和B7-1二者的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该抗体选自阿特珠单抗(atezolizumab)(MPDL3280A),YW243.55.S70,MDX-1105,MEDI4736(度伐单抗(durvalumab)),和MSB0010718C(阿维单抗(avelumab))组成的组。在一些实施方案中,该抗体包含包含SEQ ID NO:19的HVR-H1序列,SEQ ID NO:20的HVR-H2序列,和SEQ ID NO:21的HVR-H3序列的重链;和包含SEQ ID NO:22的HVR-L1序列,SEQ ID NO:23的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:24的HVR-L3序列的轻链。在一些实施方案中,该抗体包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。

[0013] 在一些实施方案中,该PD-L1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对它的配体结合配偶中一种或多种的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对PD-L1的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对PD-L2的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对PD-L1和PD-L2二者的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该抗体选自MDX-1106(纳武单抗(nivolumab)),MK-3475(派姆单抗(pembrolizumab)),MEDI-0680(AMP-514),PDR001,REGN2810,和BGB-108组成的组。

[0014] 在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂是Fc融合蛋白。在一些实施方案中,该Fc融合蛋白是AMP-224。

[0015] 在上述方面的任何前述实施方案中,该个体正在接受或已经接受有效量的第二治疗剂。在一些实施方案中,该第二治疗剂选自细胞毒剂,生长抑制剂,放射疗法药剂,抗血管发生剂,和其组合组成的组。在一些实施方案中,该细胞毒剂是化疗剂。在一些实施方案中,该化疗剂是紫杉烷。在一些实施方案中,该紫杉烷是在该PD-1轴结合拮抗剂之前,与该PD-1轴结合拮抗剂同时,或在该PD-1轴结合拮抗剂之后施用的。在一些实施方案中,该紫杉烷是nab-帕利他赛(ABRAXANE®),帕利他赛(paclitaxel),或多西他赛(docetaxel)。在一些实施方案中,该个体已经在用基于铂的化疗剂的治疗后进展。

[0016] 在上述方面的任何前述实施方案中,粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率是通过测定表达粒酶B蛋白质的CD4⁺ T细胞的数目和表达FOXP3蛋白质的CD4⁺ T细胞的数目而确定的。在一些实施方案中,粒酶B和FOXP3中至少一种的蛋白质表达水平是使用选自由免疫组织化学(IHC),免疫荧光,流式细胞术,和Western印迹组成的组的方法测定的。在一些实施方案中,粒酶B和FOXP3中至少一种的蛋白质表达水平是使用流式细胞术测定的。在一些实施方案中,粒酶B和FOXP3中至少一种的表达水平是mRNA表达水平。在一些实施方案中,粒酶B和FOXP3中至少一种的mRNA表达水平是使用选自由定量聚合酶链式反应(qPCR),逆转录qPCR(RT-qPCR),RNA测序,微阵列分析,原位杂交,和基因表达连续分析(SAGE)组成的组的方法测定的。

[0017] 另一方面,本发明特征在于一种用于预测罹患癌症的个体对包含PD-L1轴结合拮抗剂的治疗的响应性的方法,该方法包括确定自该个体获得的样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率,其中1或更大的粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率指示该个体很可能响应包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗。在一些实施方案中,该样品是在该个体已经接受至少一剂PD-L1轴结合拮抗剂之后自该个体获得的。

[0018] 另一方面,本发明特征在于一种用于为罹患癌症的个体选择疗法的方法,该方法包括确定自该个体获得的样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率,并基于该样品中1或更大的粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率为该个体选择包含PD-L1轴结合拮抗剂的疗法。

[0019] 另一方面,本发明特征在于供在治疗罹患癌症的个体中使用的PD-L1轴结合拮抗剂,其中自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率已经确定为1或更大。

[0020] 另一方面,本发明特征在于有效量的PD-1轴结合拮抗剂在制造用于治疗罹患癌症的个体的药物中的用途,其中自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率已经确定为1或更大。

[0021] 另一方面,本发明特征在于一种组合物,其包含有效量的PD-1轴结合拮抗剂,供在一种治疗罹患癌症的个体的方法中使用,其中自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率已经确定为1或更大。

[0022] 另一方面,本发明特征在于一种用PD-1轴结合拮抗剂在具有黑素瘤的个体中增强免疫功能的方法,其包括:对该个体施用有效量的该PD-1轴结合拮抗剂,其中自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率已经确定为1或更大。在一

个实施方案中,自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞的数目相对于在施用该PD-1轴结合拮抗剂前是增多的。在一个实施方案中,自该个体获得的血液样品中FOXP3⁺CD4⁺ T细胞的数目相对于在施用该PD-1轴结合拮抗剂前是减少的。在一个实施方案中,T细胞耗竭相对于在施用该PD-1轴结合拮抗剂前是降低的。

[0023] 另一方面,本发明特征在于一种为治疗选择个体和在个体中治疗癌症或延迟其进展的方法,该方法包括(a)自该个体获得血液样品;(b)确定自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率;(c)如果粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率是1或更大的话为包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗选择该个体;并(d)将该PD-1轴结合拮抗剂施用于该个体。

[0024] 另一方面,本发明特征在于一种试剂盒,其包含包含PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂的药物,和包含说明书的包装插页,该说明书关于施用该药物用于在个体中治疗癌症或延迟其进展,其中自该个体获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率已经确定为1或更大。在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂是MPDL3280A。在一些实施方案中,该药物包含约840mg的剂量的MPDL3280A。在一些实施方案中,该包装插页包含关于将该药物每两周一次施用于该个体的说明书。

[0025] 在前述方面任一中,该PD-1轴结合拮抗剂可以选自下组:PD-1结合拮抗剂,PD-L1结合拮抗剂,和PD-L2结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1结合其配体结合配偶。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1结合PD-L1。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1结合PD-L2。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1结合PD-L1和PD-L2二者。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂选自下组:MDX 1106(纳武单抗),MK-3475(派姆单抗),MEDI-0680(AMP-514),PDR001,REGN2810,和BGB-108。在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1结合PD-1。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1结合B7-1。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1结合PD-1和B7-1二者。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该抗体选自下组:MPDL3280A(阿特珠单抗),YW243.55.S70,MDX-1105,MEDI4736(度伐单抗),和MSB0010718C(阿维单抗)。在一些实施方案中,该抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:19的HVR-H1序列,SEQ ID NO:20的HVR-H2序列,和SEQ ID NO:21的HVR-H3序列,该轻链包含SEQ ID NO:22的HVR-L1序列,SEQ ID NO:23的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:24的HVR-L3序列。在一些实施方案中,该抗体包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在一些实施方案中,该抗体包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0026] 要理解,可以组合本文所述各个实施方案的一个,一些,或所有特性以形成本发明的其它实施方案。本发明的这些和其它方面对本领域技术人员会变得显而易见。通过下面的详述进一步描述本发明的这些和其它实施方案。

[0027] 附图简述

[0028] 申请文件含有至少一幅彩色绘制的图。专利局会在请求并支付必要费用后提供此专利或专利申请带彩图的拷贝。

[0029] 图1A和B显示在mMLR测定法中单独的CD4⁺ T细胞中(图1A)和CD4⁺ T细胞及同种异基因DC中(图1B)的PD-1表达。y轴指示PD-1表达而x轴指示CFSE表达。图1B显示鉴定为CFSE低群体的同种特异性CD4⁺ T细胞中的PD-1表达概况。

[0030] 图2显示PD-1阻断提高CD4⁺ T细胞的IFN- γ 分泌。在有或没有抗PD-1阻断性抗体或同种型对照的情况下与同种DC共培养的CD4⁺ T细胞的上清液中存在的IFN- γ 的水平。每个数据点(圆形,方形或三角形)代表来自每项独立实验的一名供体。

[0031] 图3A-C显示PD-1阻断提高CD4⁺ T细胞的粒酶B生成。图3A和B显示代表性FACS图,对CD4门控,描绘单独的mMLR测定法中(图3A)或在PD-1阻断5天之后(图3B)粒酶B阳性CFSE低CD4⁺ T细胞的频率。y轴:粒酶B;x轴:CFSE。图3C显示汇总在有或没有抗PD-1阻断性抗体或有同种型对照抗体的情况下与同种DC共培养5天后生成粒酶B的CD4⁺ T细胞的频率的图。每个数据点(圆形,方形或三角形)代表来自每项独立实验的一名供体。

[0032] 图4A-B显示与基线(不对培养物添加抗体,“-”)相比用抗PD-1抗体0376,MDX-1106和MK-3475或同种型对照实现的IFN- γ 和粒酶B⁺CD4⁺ T细胞的诱导的比较。虽然抗PD-1抗体0376,MDX-1106和MK-3475引发相似量的IFN- γ 分泌(图4A),但是0376在诱导粒酶B⁺CD4⁺ T细胞方面是显著卓越的(P=0.02)(图4B)。

[0033] 图5A-B显示抗PD-L1处理诱导IFN- γ 和粒酶B生成。在有或没有抗PD-1阻断性抗体或抗PDL-1的情况中与同种DC共培养的CD4⁺ T细胞的上清液中存在的IFN- γ 的水平(图5A)和CD4⁺ T细胞的粒酶B表达(图5B)。每个数据点(圆形,方形或三角形)代表来自每项独立实验的一名供体。在所测试的条件中,PD-1阻断比PDL-1阻断诱导更多IFN- γ 分泌和略微更多粒酶B表达。

[0034] 图6A和B显示用纳武单抗治疗的黑素瘤患者的外周血中的CD4⁺ T细胞概况。图6A和B显示在两个不同时间点来自相同黑素瘤患者的CD4⁺ T细胞内调节性T细胞(FOXP3⁺)对粒酶B⁺的频率:图6A显示患者响应抗PD-1(MDX-1106)疗法时的结果而图6B显示4个月后复发期间相同患者的结果。

[0035] 图7显示用纳武单抗治疗的黑素瘤患者的外周血中CD4⁺ T细胞群体内粒酶B⁺和Treg细胞之间的比率。粒酶B⁺对FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率(y轴)突显两名具有较高的细胞毒性CD4⁺ T细胞频率和降低的Treg的黑素瘤患者具有按比例更久无疾病存活时段而其他患者具有恒定恶化疾病。

[0036] 图8显示健康供体(HD),未治疗的和抗PD-1治疗的黑素瘤患者中细胞毒性CD4⁺ T细胞的频率。每个点代表一名供体。此图显示抗PD-1治疗的黑素瘤患者的外周血中升高的细胞毒性CD4⁺ T细胞的频率(P=0.04)。

[0037] 图9显示来自用抗PD-1疗法治的黑素瘤患者的粒酶B⁺CD4⁺ T细胞的频率对以天计期间疾病没有进展的时段。外周血中的细胞毒性CD4⁺ T细胞频率与黑素瘤患者对抗PD1疗法的响应有关。

[0038] 图10显示用抗PD-1疗法治的黑素瘤患者中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞/Treg比率对无进展时段。外周血中细胞毒性CD4⁺ T细胞和Treg频率之间的比率与黑素瘤患者对抗PD1疗法的响应有关。

[0039] 图11显示外周血中细胞毒性CD4⁺ T⁺细胞和Treg频率之间的比率鉴定抗PD-1治疗的患者和治疗响应。粒酶B⁺CD4⁺ T细胞/Treg比率在用抗PD-1拮抗剂治疗的黑素瘤患者中升高且在响应者组中甚至更高。黑素瘤未治疗组描绘没有接受抗PD-1的患者而患者在先疗法(基线组)基于临床结局分成PD=进展者和PR=响应者。HD指示健康供体。每个点代表一名供体。

[0040] 发明详述

[0041] I. 定义

[0042] 在详细描述本发明之前,应当理解本发明不限于特定组合物或生物学系统,它们当然可以有所变化。还应理解本文中所使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并非意图对其进行限制。

[0043] 如本说明书和所附权利要求中使用的,单数形式“一个”,“一种”和“该”包括复数所指物,除非另有明确说明。如此,例如,提及“一个/种分子”任选包括两个/种或更多个/种此类分子的组合,诸如此类。

[0044] 如本文中使用的,术语“约”指技术领域技术人员容易知道的相应数值的常规误差范围。本文中提到“约”数值或参数包括(且描述)涉及该数值或参数本身的实施方案。

[0045] 理解的是,本文所述发明的各个方面和实施方案包括“包含”,“由……组成”,和“基本上由……组成”方面和实施方案。

[0046] 术语“PD-1轴结合拮抗剂”是指如下的分子,其抑制PD-1轴结合配偶与一种或多种它的结合配偶相互作用,从而去除源自PD-1信号传导轴上的信号传导的T细胞功能障碍—一项结果是恢复或增强T细胞功能(例如增殖,细胞因子生成,和/或靶细胞杀伤)。如本文中使用的,PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂,PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0047] 术语“PD-1结合拮抗剂”指如下的分子,其降低,阻断,抑制,消除或干扰源自PD-1与一种或多种它的结合配偶(诸如PD-L1和/或PD-L2)相互作用的信号转导。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1结合一种或多种它的结合配偶的分子。在一个特定方面,PD-1结合拮抗剂抑制PD-1结合PD-L1和/或PD-L2。例如,PD-1结合拮抗剂包括降低,阻断,抑制,消除或干扰源自PD-1与PD-L1和/或PD-L2相互作用的信号转导的抗PD-1抗体,其抗原结合片段,免疫粘附素,融合蛋白,寡肽和其它分子。在一个实施方案中,PD-1结合拮抗剂降低由或经由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负面共刺激信号(经由PD-1介导信号传导),从而使得功能障碍性T细胞不太功能障碍性(例如增强对抗原识别的效应器应答)。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体。在一个具体方面,PD-1结合拮抗剂是本文所述MDX-1106(纳武单抗(nivolumab))。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂是本文所述MK-3475(派姆单抗(pembrolizumab))。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂是本文所述MEDI-0680(AMP-514)。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂是本文所述PDR001。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂是本文所述REGN2810。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂是本文所述BGB-108。

[0048] 术语“PD-L1结合拮抗剂”指如下的分子,其降低,阻断,抑制,消除或干扰源自PD-L1与一种或多种它的结合配偶(诸如PD-1和/或B7-1)相互作用的信号转导。在一些实施方案中,PD-L1结合拮抗剂是抑制PD-L1结合它的结合配偶的分子。在一个特定方面,PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1结合PD-1和/或B7-1。在一些实施方案中,PD-L1结合拮抗剂包括降低,

阻断,抑制,消除或干扰源自PD-L1与一种或多种它的结合配偶(诸如PD-1和/或B7-1)相互作用的信号转导的抗PD-L1抗体,其抗原结合片段,免疫粘附素,融合蛋白,寡肽和其它分子。在一个实施方案中,PD-L1结合拮抗剂降低由或经由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负面共刺激信号(经由PD-L1介导信号传导),从而使得功能障碍性T细胞不太功能障碍性(例如增强对抗原识别的效应器应答)。在一些实施方案中,PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在一个具体方面,抗PD-L1抗体是本文所述MPDL3280A(阿特珠单抗(atezolizumab))。在另一个具体方面,抗PD-L1抗体是本文所述MDX-1105。在仍有另一个具体方面,抗PD-L1抗体是本文所述YW243.55.S70。在仍有另一个具体方面,抗PD-L1抗体是本文所述MEDI4736(度伐单抗(durvalumab))。在仍有另一个具体方面,抗PD-L1抗体是本文所述MSB0010718C(阿维单抗(avelumab))。

[0049] 术语“PD-L2结合拮抗剂”指如下的分子,其降低,阻断,抑制,消除或干扰源自PD-L2与一种或多种它的结合配偶(诸如PD-1)相互作用的信号转导。在一些实施方案中,PD-L2结合拮抗剂是抑制PD-L2结合一种或多种它的结合配偶的分子。在一个特定方面,PD-L2结合拮抗剂抑制PD-L2结合PD-1。在一些实施方案中,PD-L2拮抗剂包括降低,阻断,抑制,消除或干扰源自PD-L2与一种或多种它的结合配偶(诸如PD-1)相互作用的信号转导的抗PD-L2抗体,其抗原结合片段,免疫粘附素,融合蛋白,寡肽和其它分子。在一个实施方案中,PD-L2结合拮抗剂降低由或经由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负面共刺激信号(经由PD-L2介导信号传导),从而使得功能障碍性T细胞不太功能障碍性(例如增强对抗原识别的效应器应答)。在一些实施方案中,PD-L2结合拮抗剂是免疫粘附素。

[0050] 如本文中使用的,“紫杉烷”是可结合微管蛋白,促进微管组装和稳定化和/或防止微管解聚的二萜。本文中包括的紫杉烷包括类紫杉烷,10-脱乙酰基浆果赤霉素(baccatin) III和/或其衍生物。例示性紫杉烷包括但不限于帕利他赛(即TAXOL®, CAS#33069-62-4),多西他赛(即TAXOTERE®, CAS#114977-28-5),拉洛他赛(larotaxel),卡巴他赛(cabazitaxel),米拉他赛(milataxel),tesetaxel,和/或orataxel。在一些实施方案中,该紫杉烷是清蛋白包被的纳米颗粒(例如纳米清蛋白结合的(nab)-帕利他赛,即ABRAXANE®和/或nab-多西他赛,ABI-008)。在一些实施方案中,该紫杉烷是nab-帕利他赛(ABRAXANE®)。在一些实施方案中,该紫杉烷是在CREMAPHOR®(例如TAXOL®)和/或吐温诸如聚山梨酯80(例如TAXOTERE®)中配制的。在一些实施方案中,该紫杉烷是脂质体封装的紫杉烷。在一些实施方案中,该紫杉烷是前药形式和/或缀合形式的紫杉烷(例如DHA共价缀合至帕利他赛,聚谷氨酸帕利他赛(paclitaxel poliglumex),和/或碳酸亚油酯-帕利他赛)。在一些实施方案中,该帕利他赛是在基本上没有表面活性剂的情况下配制的(例如在CREMAPHOR和/或吐温缺失下,诸如TOCOSOL®帕利他赛)。

[0051] 术语“功能障碍”在免疫功能障碍的背景中指降低的对抗原性刺激的免疫响应性的状态。该术语包括可以发生抗原识别,但是随后的免疫应答对于控制感染或肿瘤生长无效的“耗竭”和/或“无反应性”二者的共同要件。

[0052] 如本文中使用的,术语“功能障碍”还包括对抗原识别的不感受或不响应,特别地,将抗原识别转化成下游T细胞效应器功能,诸如增殖,细胞因子生成(例如IL-2)和/或靶细

胞杀伤的能力受损。

[0053] 如本文中使用的,“细胞毒性CD4⁺ T细胞”指细胞毒性粒酶B⁺CD4⁺ T细胞。术语“细胞毒性CD4⁺ T细胞”,“CD4⁺细胞毒性T细胞”,和“细胞毒性粒酶B⁺CD4⁺ T细胞”同义使用。这些细胞可通过本领域知道的方法来鉴定,例如通过用荧光标记的针对CD4和粒酶B的抗体对细胞染色和使用荧光激活细胞分选,对CD4阳性细胞和粒酶B双重阳性细胞的门控。

[0054] 如本文中使用的,调节性T细胞或Treg指FOXP3⁺CD4⁺ T细胞。术语“调节性T细胞”,“Treg”,和“FOXP3⁺CD4⁺ T细胞”同义使用。这些细胞可通过本领域知道的方法来鉴定,例如通过用荧光标记的针对CD4和FOXP3的抗体对细胞染色和使用荧光激活细胞分选,对CD4阳性细胞和FOXP3双重阳性细胞门控。

[0055] 如本文中使用的,“粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率”指CD4阳性细胞群体内粒酶B⁺CD4⁺ T细胞除以FOXP3⁺CD4⁺ T细胞的频率。

[0056] “增强T细胞功能”意指诱导,引起或刺激T细胞具有持续或放大的生物学功能,或者恢复或再活化耗竭的或无活性的T细胞。增强T细胞功能的例子包括:相对于干预前的此类水平,升高的来自CD8⁺ T细胞的 γ -干扰素分泌,升高的增殖,升高的抗原响应性(例如病毒,病原体,或肿瘤清除)。在一个实施方案中,增强的水平是至少50%,或者60%,70%,80%,90%,100%,120%,150%,或200%增强。测量此增强的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0057] “T细胞功能障碍性病症”是以降低的对抗原性刺激的响应性为特征的T细胞病症或状况。在一个具体的实施方案中,T细胞功能障碍性病症是明确与经由PD-1的不适当升高的信号传导有关的病症。在另一个实施方案中,T细胞功能障碍性病症是如下的病症,其中T细胞是无反应性的或者具有降低的分泌细胞因子,增殖,或者执行细胞裂解活性的能力。在一个具体的方面,降低的响应性导致对表达免疫原的病原体或肿瘤的无效控制。以T细胞功能障碍为特征的T细胞功能障碍性病症的例子包括未分辨的急性感染,慢性感染和肿瘤免疫。

[0058] “肿瘤免疫”指肿瘤逃避免疫识别和清除的过程。如此,作为治疗概念,肿瘤免疫在此类逃避减弱时得到“治疗”,并且肿瘤被免疫系统识别并攻击。肿瘤识别的例子包括肿瘤结合,肿瘤收缩和肿瘤清除。

[0059] “免疫原性”指特定物质引发免疫应答的能力。肿瘤是免疫原性的,并且增强肿瘤免疫原性有助于通过免疫应答清除肿瘤细胞。增强肿瘤免疫原性的例子包括用PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷处理。

[0060] “持续应答”指在停止处理后对降低肿瘤生长的持续影响。例如,与施用阶段开始时的大小相比,肿瘤大小可以保持为相同或更小。在一些实施方案中,持续应答具有与处理持续时间至少相同的持续时间,处理持续时间的至少1.5倍,2.0倍,2.5倍,或3.0倍长度。

[0061] 如本文中使用的,“降低或抑制癌症复发”意指降低或抑制肿瘤或癌症复发或肿瘤或癌症进展。如本文中公开的,癌症复发和/或癌症进展包括但不限于癌症转移。

[0062] 如本文中使用的,“完全响应”或“CR”指所有靶损伤的消失。

[0063] 如本文中使用的,“部分响应”或“PR”指将基线SLD视为参照,靶损伤的最长直径和(SLD)的至少30%降低。

[0064] 如本文中使用的,“稳定疾病”或“SD”指将治疗开始起的最小SLD视为参照,既没有

足够的靶损伤收缩以符合PR,也没有足够的增加以符合PD。

[0065] 如本文中使用的,“进行性疾病”或“PD”指将从治疗开始起记录的最小SLD视为参照,靶损伤的SLD的至少20%增加或一种或多种新损伤的存在。

[0066] 如本文中使用的,“无进展存活”(PFS)指治疗期间和治疗后,所治疗疾病(例如癌症)不变坏的时间长度。无进展存活可以包括患者已经经历完全响应或部分响应的的时间量,及患者已经经历稳定疾病的时间量。

[0067] 如本文中使用的,“总体响应率”或“客观响应率”(ORR)指完全响应(CR)率和部分响应(PR)率的总和。

[0068] 如本文中使用的,“总体存活(OS)”指组中在特定持续时间后有可能存活的个体的百分比。

[0069] 术语“药物配制剂”指如下形式的制备物,使得允许活性组分的生物学活性有效,且不含别的对会施用配制剂的受试者有不可接受的毒性的成分。此类配制剂是无菌的。“药学可接受”赋形剂(媒介,添加剂)为那些可合理施用于受试哺乳动物以提供有效剂量的所采用的活性组分。

[0070] “药学可接受载剂”指药物配制剂中除了活性组分以外对受试者无毒的组分。药学可接受载剂包括但不限于缓冲剂,赋形剂,稳定剂,或防腐剂。

[0071] 如本文中使用的,术语“治疗/处理”指设计用于改变临床病理学过程期间所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预。治疗的期望效果包括降低疾病进展速率,改善或减轻疾病状态,和消退或改善的预后。例如,若一种或多种与癌症有关的症状是减轻或消除的,包括但不限于对癌性细胞的降低增殖(或破坏),减少源自疾病的症状,提高那些患有疾病的个体的生命质量,降低治疗疾病需要的其它药物的剂量,和/或延长个体存活,则个体得到成功“治疗”。

[0072] 如本文中使用的,“延迟疾病的进展”意指推迟,阻碍,减缓,延迟,稳定,和/或延缓疾病(诸如癌症)的形成。根据疾病史和/或治疗的个体,此延迟可以是不同时间长度的。如对于本领域技术人员明显的是,充分或显著的延迟实质上可以涵盖预防,因为个体不形成疾病。例如,可以延迟晚期阶段癌症,诸如转移的形成。

[0073] “有效量”或“治疗有效量”至少是实现特定病症的可测量改善或预防需要的最小量。本文中的有效量可以随诸如患者的疾病状态,年龄,性别,和重量,和药剂引发个体中期望的应答的能力等因素而变化。有效量也是治疗有益效果超过治疗的任何毒性或不利效果的量。为了预防性使用,有益或期望的结果包括如下的结果,诸如消除或降低风险,减轻严重性,或者延迟疾病的发作,包括疾病的生物化学,组织学和/或行为症状,其并发症和疾病形成期间呈现的中间病理学表型。为了治疗性使用,有益或期望的结果包括临床结果,诸如减少源自疾病的一种或多种症状,提高那些患有疾病的对象的生命质量,降低治疗疾病需要的其它药物的剂量,和增强另一种药物的效果(诸如经由靶向),延迟疾病的进展,和/或延长存活。在癌症或肿瘤的情况中,药物的有效量在减少癌细胞的数目;降低肿瘤大小;抑制(即在一定程度上减缓或者期望地停止)癌细胞浸润入外周器官中;抑制(即在一定程度上减缓且期望地停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减轻一种或多种与病症有关的症状中可以具有效果。可以在一次或多次施用中施用有效量。出于本发明的目的,药物,化合物,或药物组合物的有效量是足以直接或间接实现预防或治疗性

处理的量。如在临床背景中理解的,药物,化合物,或药物组合物的有效量可以与或不与另一种药物,化合物,或药物组合物一起实现。如此,可以在施用一种或多种治疗剂的背景中考虑“有效量”,并且若与一种或多种其它药剂一起,可以实现期望的结果或者实现了期望的结果,则可以认为单一药剂以有效量给予。

[0074] 如本文中使用的,“与……联合/组合/一起”指在一种治疗形态外施用另一种治疗形态。因而,“与……联合/组合/一起”指在对个体施用一种治疗形态之前,期间,或者之后施用另一种治疗形态。

[0075] “病症”为会受益于治疗/处理的任何状况,包括但不限于慢性和急性病症或疾病,包括那些使哺乳动物易患所讨论病症的病理状况。

[0076] 术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症指癌症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症是肿瘤。

[0077] 术语“肿瘤”在用于本文时指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”,“癌性”,“细胞增殖性病症”,“增殖性病症”和“肿瘤”在本文中提及时并不互相排斥。

[0078] 术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。此定义中包括良性和恶性癌症。“早期癌症”或“早期肿瘤”指非侵入性的或转移性的,或者归为0,1,或2期癌症的癌症。癌症的例子包括但不限于癌,淋巴瘤,母细胞瘤(包括髓母细胞瘤和视网膜母细胞瘤),肉瘤(包括脂肪肉瘤和滑膜细胞肉瘤),神经内分泌肿瘤(包括类癌瘤,胃泌素瘤,和胰岛细胞癌),间皮瘤,施旺氏细胞瘤(包括听神经瘤),脑膜瘤,腺癌,黑素瘤,和白血病或淋巴样恶性。此类癌症的更具体例子包括膀胱癌(例如尿路上皮膀胱癌(例如移行细胞或尿路上皮癌,非肌肉侵入性膀胱癌,肌肉侵入性膀胱癌,和转移性膀胱癌)和非尿路上皮膀胱癌),鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌),肺癌包括小细胞肺癌(SCLC),非小细胞肺癌(NSCLC),肺的腺癌和肺的鳞癌,腹膜癌,肝细胞癌,胃的癌或胃癌包括胃结肠癌,胰腺癌,成胶质细胞瘤,宫颈癌,卵巢癌,肝癌,肝瘤,乳腺癌(包括转移性乳腺癌),结肠癌,直肠癌,结肠直肠癌,子宫内膜或子宫癌,唾液腺癌,肾癌或肾的癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肝的癌,肛门癌,阴茎癌,梅克尔细胞癌,蕈样真菌病,睾丸癌,食管癌,胆道肿瘤,以及头和颈癌和造血恶性。在一些实施方案中,癌症是三重阴性转移性乳腺癌,包括任何经组织学确认的具有局部复发性或转移性疾病的三重阴性(ER-,PR-,HER2-)乳腺腺癌(其中局部复发性疾病不适合具有治愈目的的切除术)。在一些实施方案中,癌症是膀胱癌。在具体实施方案中,膀胱癌是尿路上皮膀胱癌。

[0079] 如本文中使用的,术语“样品”意指自感兴趣的受试者和/或个体获得或衍生的组合物,其含有有待根据例如物理,生化,化学,和/或生理特点来表征和/或鉴定的细胞和/或其它分子实体。例如,短语“疾病样品”或其变体指自感兴趣的受试者获得的任何样品,预计或已知其含有有待表征的细胞和/或分子实体。样品包括但不限于组织样品,原代或培养的细胞或细胞系,细胞上清液,细胞裂解物,血小板,血清,血浆,玻璃体液,淋巴液,滑液,滤泡液(follicular fluid),精液,羊水,乳,全血,血液衍生的细胞,尿液,脑脊髓液,唾液,痰,泪,汗液,粘液,肿瘤裂解物,和组织培养液(tissue culture medium),组织提取物诸如匀浆化的组织,肿瘤组织,细胞提取物,和其组合。

[0080] “组织样品”或“细胞样品”意指自受试者或个体的组织获得的相似细胞的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织如来自新鲜,冷冻和/或保存的器官,组织样品,活检,和/或抽吸物;血液或任何血液成分如血浆;体液诸如脑脊髓液,羊水,腹膜液,或间隙液(interstitial fluid);来自受试者的妊娠或发育中任意时间的细胞。组织样品还可以是原代或培养的细胞或细胞系。任选地,组织或细胞样品自疾病组织/器官获得。例如,“肿瘤样品”是自肿瘤或其它癌性组织获得的组织样品。组织样品可以含有多种细胞类型(例如肿瘤细胞和非肿瘤细胞,癌性细胞和非癌性细胞)的混合群体。组织样品可以含有在自然界中不天然与组织混杂的化合物,诸如防腐剂,抗凝血剂,缓冲剂,固定剂,营养物,抗生素,等等。

[0081] 术语“检测”包括任何检测手段,包括直接和间接检测。

[0082] 如本文中使用的,术语“生物标志物”指可在样品中检测的指示物,例如预测性,诊断性,和/或预后性的指示物。生物标志物可以充当由某些分子,病理学,组织学,和/或临床特征表征的疾病或病症(例如癌症)的特定亚型的指示物。在一些实施方案中,生物标志物是一种基因。生物标志物包括但不限于多核苷酸(例如DNA和/或RNA),多核苷酸拷贝数目改变(例如DNA拷贝数),多肽,多肽和多核苷酸修饰(例如翻译后修饰),碳水化合物,和/或基于糖脂的分子标志物。

[0083] 如本文中使用的,术语“细胞毒剂”指任何对细胞有害(例如引起细胞死亡,抑制增殖,或以其它方式阻碍细胞功能)的药剂。细胞毒剂包括但不限于放射性同位素(例如 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 和Lu的放射性同位素);化疗剂;生长抑制剂;酶及其片段诸如溶核酶;和毒素诸如小分子毒素或细菌,真菌,植物或动物起源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体。例示性的细胞毒剂可选自抗微管剂,铂配位复合物,烷化剂,抗生剂,拓扑异构酶II抑制剂,抗代谢物,拓扑异构酶I抑制剂,激素和激素类似物,信号转导途径抑制剂,非受体酪氨酸激酶血管发生抑制剂,免疫治疗剂,促凋亡剂,LDH-A的抑制剂,脂肪酸生物合成的抑制剂,细胞周期信号传导抑制剂,HDAC抑制剂,蛋白酶体抑制剂,和癌代谢的抑制剂。在一个实施方案中,细胞毒剂是基于铂的化疗剂。在一个实施方案中,细胞毒剂是EGFR的拮抗剂。在一个实施方案中,细胞毒剂是N-(3-乙炔基苯基)-6,7-二(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-胺(例如厄洛替尼(erlotinib), TARCEVATM)。在一个实施方案中,细胞毒剂是RAF抑制剂。在一个实施方案中,RAF抑制剂是BRAF和/或CRAF抑制剂。在一个实施方案中,RAF抑制剂是维罗非尼(vemurafenib)。在一个实施方案中,细胞毒剂是PI3K抑制剂。

[0084] 如本文中使用的,术语“化疗剂”包括在治疗癌症中有用的化合物。化疗剂的例子包括厄洛替尼(erlotinib) (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), 硼替佐米(bortezomib) (VELCADE®, Millennium Pharm.), 双硫仑(disulfiram), 没食子酸表没食子儿茶精(epigallocatechin gallate), salinosporamide A, carfilzomib, 17-AAG(格尔德霉素(geldanamycin)), 根赤壳菌素(radicicol), 乳酸脱氢酶A(LDH-A), 氟维司群(fulvestrant) (FASLODEX®, AstraZeneca), 舒尼替尼(sunitib) (SUTENT®, Pfizer/Sugen), 来曲唑(letrozole) (FEMARA®, Novartis), 甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate) (GLEEVEC®, Novartis), finasunate (VATALANIB®, Novartis), 奥沙利铂(oxaliplatin) (ELOXATIN®, Sanofi), 5-FU(5-氟尿嘧啶), 甲酰

四氢叶酸 (leucovorin), 雷帕霉素 (rapamycin) (西罗莫司 (Sirolimus), **RAPAMUNE®**, Wyeth), 拉帕替尼 (lapatinib) (**TYKERB®**, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafamib (SCH 66336), 索拉非尼 (sorafenib) (**NEXAVAR®**, Bayer Labs), 吉非替尼 (gefitinib) (**IRESSA®**, AstraZeneca), AG1478, 烷化剂类 (alkylating agents), 诸如塞替派 (thiotepa) 和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 磺酸烷基酯类 (alkyl sulfonates), 诸如白消安 (busulfan), 英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (pipsulfan); 氮丙啶类 (aziridines), 诸如苯佐替派 (benzodopa), 卡波醌 (carboquone), 美妥替派 (meturedopa), 和乌瑞替派 (uredopa); 乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine), 三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine), 三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate), 三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylomelamine); 番荔枝内酯类 (acetogenins) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); 喜树碱 (camptothecin) (包括托泊替康 (topotecan) 和伊立替康 (irinotecan)); 苔藓抑素 (bryostatin); calystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin), 卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 隐藻素类 (cryptophycins) (特别是隐藻素1和隐藻素8); 肾上腺皮质类固醇类 (adrenocorticosteroids), 包括泼尼松 (prednisone) 和泼尼松龙 (prednisolone); 醋酸环丙孕酮 (cyproterone acetate); 5 α -还原酶, 包括非那雄胺 (finasteride) 和度他雄胺 (dutasteride); vorinostat, romidepsin, panobinostat, 丙戊酸 (valproic acid), mocetinostat 多拉司他汀 (dolastatin); 阿地白介素 (aldesleukin), 滑石 (talc) duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil), 萘氮芥 (chlomaphazine), 胆磷酰胺 (chlorophosphamide), 雌莫司汀 (estramustine), 异环磷酰胺 (ifosfamide), 双氯乙基甲胺 (mechlorethamine), 盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride), 美法仑 (melphalan), 新氮芥 (novembichin), 苯芥胆甾醇 (phenesterine), 泼尼莫司汀 (prednimustine), 曲磷胺 (trofosfamide), 尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine), 氯脲菌素 (chlorozotocin), 福莫司汀 (fotemustine), 洛莫司汀 (lomustine), 尼莫司汀 (nimustine), 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素 (例如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ 11 和加利车霉素 ω 11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994))); 蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括 dynemicin A; 二膦酸盐类 (bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐 (clodronate); 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团), 阿克拉霉素 (aclacinomysins), 放线菌素 (actinomycin), 氨茴霉素 (authramycin), 偶氮丝氨酸 (azaserine), 博来霉素 (bleomycin), 放线菌素 C (cactinomycin), carabycin, 洋红霉素 (caminomycin), 嗜癌霉素 (carzinophilin), 色霉素 (chromomycinis), 放线菌素 D (dactinomycin), 柔红霉素 (daunorubicin), 地托比星 (detorubicin), 6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸, **ADRIAMYCIN®** (多柔比星 (doxorubicin)), 吗啉代多柔比星, 氰基吗啉代多柔比星, 2-吡咯代多柔比星和

脱氧多柔比星),表柔比星(epirubicin),依索比星(esorubicin),伊达比星(idarubicin),麻西罗霉素(marcellomycin),丝裂霉素(mitomycin)诸如丝裂霉素C,霉酚酸(mycophenolic acid),诺拉霉素(nogalamycin),橄榄霉素(olivomycin),培洛霉素(peplomycin),泊非霉素(porfiromycin),嘌呤霉素(puromycin),三铁阿霉素(quelamycin),罗多比星(rodorubicin),链黑菌素(streptonigrin),链佐星(streptozocin),杀结核菌素(tubercidin),乌苯美司(ubenimex),净司他丁(zinostatin),佐柔比星(zorubicin);抗代谢物类,诸如甲氨蝶呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(flourouracil) (5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸(denopterin),甲氨蝶呤,蝶酰三谷氨酸(pteropterin),三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine),6-巯基嘌呤(mercaptopurine),硫咪嘌呤(thiamiprine),硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine),阿扎胞苷(azacitidine),6-氮尿苷,卡莫氟(carmofur),阿糖胞苷(cytarabine),双脱氧尿苷(dideoxyuridine),去氧氟尿苷(doxifluridine),依诺他滨(enocitabine),氟尿苷(floxuridine);雄激素类,诸如卡鲁睾酮(calusterone),丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate),表硫雄醇(epitio stanol),美雄烷(mepitio stanol),睾内酯(testolactone);抗肾上腺类,诸如氨鲁米特(aminogluthetamide),米托坦(mitotane),曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸(frolic acid);醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酸胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);bestabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatrexate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吡醌(diaziquone);elfomithine;依利醋铵(elliptinium acetate);epothilone;依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟脲(hydroxyurea);香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱类(maytansinoids),诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍脲(mitoguanazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吡啶(nitraerine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼(ethylhydrazide);丙卡巴肼(procabazine);**PSK®**多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,Oreg.);雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西索菲兰(sizofuran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢菌素类(trichothecenes)(尤其是T-2毒素,疣孢菌素(verrucurin)A,杆孢菌素(roridin)A和蛇行菌素(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷(arabinoside) (“Ara-C”);环磷酸胺(cyclophosphamide);塞替派(thiotepa);紫杉烷(taxanes);苯丁酸氮芥(chlorambucil);**GEMZAR®**(吉西他滨(gemcitabine));6-硫鸟嘌呤(thioguanine);巯基嘌呤(mercaptopurine);甲氨蝶呤(methotrexate);长春碱(vinblastine);依托泊苷(etoposide) (VP-16);异环磷酸胺(ifosfamide);米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);**NAVELBINE®**(长春瑞滨(vinorelbine));能灭瘤(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素(daunomycin);氨基蝶呤

(aminopterin); 卡培他滨(capecitabine)(**XELODA®**); 伊本膦酸盐(ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMF0); 类视黄酸(retinoids), 诸如视黄酸(retinoic acid); 及任何上述各项的药学可接受盐, 酸或衍生物。

[0085] 化疗剂还包括“基于铂的”化疗剂, 其包含含有铂作为该分子的组成部分的有机化合物。通常, 基于铂的化疗剂是铂的配位络合物。基于铂的化疗剂在本领域中有时称作“铂剂”。基于铂的化疗剂的例子包括但不限于卡铂, 顺铂, 和奥沙利铂。

[0086] 化疗剂还包括 (i) 起调节或抑制激素对肿瘤作用的作用的抗激素剂, 诸如抗雌激素类和选择性雌激素受体调控物类(SERM), 包括例如他莫昔芬(tamoxifen)(包括**NOLVADEX®**; 柠檬酸他莫昔芬), 雷洛昔芬(raloxifene), 屈洛昔芬(droloxifene), iodoxyfene, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬(trioxifene), 那洛昔芬(keoxifene), LY117018, 奥那司酮(onapristone), 和**FARESTON®**(柠檬酸托瑞米芬(toremifine citrate)); (ii) 抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂, 诸如例如4(5)-咪唑, 氨鲁米特(aminoglutethimide), **MEGASE®**(醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)), **AROMASIN®**(依西美坦(exemestane); Pfizer), 福美坦(formestane), 法倔唑(fadrozole), **RIVISOR®**(伏罗唑(vorozole)), **FEMARA®**(来曲唑(letrozole); Novartis), 和**ARIMIDEX®**(阿那曲唑(anastrozole); AstraZeneca); (iii) 抗雄激素类, 诸如氟他米特(flutamide), 尼鲁米特(nilutamide), 比卡米特(bicalutamide), 亮丙瑞林(leuprolide) 和戈舍瑞林(goserelin); 布舍瑞林(buserelin), 曲普瑞林(tripterelin), 醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate), 己烯雌酚(diethylstilbestrol), 倍美力(premarin), 氟甲睾酮(fluxymesterone), 全反式视黄酸, 芬维A胺(fenretinide), 以及曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); (iv) 蛋白质激酶抑制剂; (v) 脂质激酶抑制剂; (vi) 反义寡核苷酸, 特别是抑制牵涉异常细胞增殖的信号传导途经中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如PKC- α , Ralf和H-Ras; (vii) 核酶, 诸如VEGF表达抑制剂(例如**ANGIOZYME®**) 和HER2表达抑制剂; (viii) 疫苗, 诸如基因疗法疫苗, 例如**ALLOVECTIN®**, **LEUVECTIN®**, 和**VAXID®**; **PROLEUKIN®**, rIL-2; 拓扑异构酶1抑制剂, 诸如**LURTOTECAN®**; **ABARELIX®** rmRH; 和 (ix) 任何上述药剂的药学可接受盐, 酸和衍生物。

[0087] 化疗剂还包括抗体, 诸如阿仑珠单抗(alemtuzumab)(Campath), 贝伐珠单抗(bevacizumab)(**AVASTIN®**, Genentech); 西妥昔单抗(cetuximab)(**ERBITUX®**, Imclone); 帕尼单抗(panitumumab)(**VECTIBIX®**, Amgen), 利妥昔单抗(rituximab)(**RITUXAN®**, Genentech/Biogen Idec), 帕妥珠单抗(pertuzumab)(**OMNITARG®**, 2C4, Genentech), 曲妥珠单抗(trastuzumab)(**HERCEPTIN®**, Genentech), 托西莫单抗(tositumomab)(Bexxar, Corixa), 和抗体药物缀合物, 吉妥珠单抗奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin)(**MYLOTARG®**, Wyeth)。具有作为与本发明化合物组合的药剂的治疗潜力的别的人源化单克隆抗体包括: 阿泊珠单抗(apolizumab), 阿塞珠单抗(aselizumab), atlizumab, 巴匹珠单抗(bapineuzumab), bivatuzumab mertansine, 莫坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine), 西利珠单抗(cedelizumab), 培舍珠单抗(certolizumab

pegol), cidfusituzumab, cidtuzumab, 达克珠单抗 (daclizumab), 依库珠单抗 (eculizumab), 依法珠单抗 (efalizumab), 依帕珠单抗 (epratuzumab), 厄利珠单抗 (erlizumab), 非维珠单抗 (felvizumab), 芳妥珠单抗 (fontolizumab), 吉妥珠单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin), 英妥珠单抗奥佐米星 (inotuzumab ozogamicin), 伊匹木单抗 (ipilimumab), 拉贝珠单抗 (labetuzumab), 林妥珠单抗 (lintuzumab), 马妥珠单抗 (matuzumab), 美泊利单抗 (mepolizumab), 莫维珠单抗 (motavizumab), motovizumab, 那他珠单抗 (natalizumab), 尼妥珠单抗 (nimotuzumab), nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, 奥马珠单抗 (omalizumab), 帕利珠单抗 (palivizumab), 帕考珠单抗 (pascolizumab), pecfusituzumab, pectuzumab, 培克珠单抗 (pexelizumab), ralivizumab, 雷珠单抗 (ranibizumab), reslivizumab, 瑞利珠单抗 (reslizumab), resyvizumab, 罗维珠单抗 (rovelizumab), 卢利珠单抗 (ruplizumab), 西罗珠单抗 (sibrotuzumab), 西利珠单抗 (siplizumab), 索土珠单抗 (sontuzumab), tacatuzumab tetraxetan, tadocizumab, 他利珠单抗 (talizumab), 特非珠单抗 (tefibazumab), 托珠单抗 (tocilizumab), 托利珠单抗 (toralizumab), tucotuzumab 西莫白介素 (celmoleukin), tucosituzumab, umavizumab, 乌珠单抗 (urtioxazumab), 优特克单抗 (ustekinumab), 维西珠单抗 (visilizumab), 和抗白介素-12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories), 其为经遗传修饰以识别白介素-12p40蛋白的重组专有人序列全长IgG₁λ抗体。

[0088] 化疗剂还包括“EGFR抑制剂”, 其指结合EGFR或以其它方式直接与EGFR相互作用并阻止或降低其信号传导活性的化合物, 其另外还称作“EGFR拮抗剂”。此类药剂的例子包括结合EGFR的抗体和小分子。结合EGFR的抗体的例子包括MAb 579 (ATCC CRL HB8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (参见美国专利No. 4,943,533) 及其变体, 诸如嵌合化的225 (C225或西妥昔单抗; ERBUTIX®) 和重构的人225 (H225) (参见例如W096/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, 一种完全人的EGFR靶向抗体 (Imclone); 结合II型突变体EGFR的抗体 (美国专利No. 5,212,290); 结合EGFR的人源化和嵌合抗体, 如美国专利No. 5,891,996中所述; 和结合EGFR的人抗体, 诸如ABX-EGF或帕尼单抗 (Panitumumab) (参见W098/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto et al., Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), 一种针对EGFR且与EGF和TGF-α二者竞争EGFR结合的人源化EGFR抗体 (EMD/Merck); 人EGFR抗体, HuMax-EGFR (GenMab); 称作E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3和E7.6.3且描述在US 6,235,883中的完全人抗体; MDX-447 (Medarex Inc); 和mAb 806或人源化mAb 806 (Johns et al., J. Biol. Chem. 279 (29):30375-30384 (2004))。抗EGFR抗体可与细胞毒剂缀合, 由此产生免疫缀合物 (参见例如EP 659,439 A2, Merck Patent GmbH)。EGFR拮抗剂包括小分子, 诸如美国专利No. 5,616,582, 5,457,105, 5,475,001, 5,654,307, 5,679,683, 6,084,095, 6,265,410, 6,455,534, 6,521,620, 6,596,726, 6,713,484, 5,770,599, 6,140,332, 5,866,572, 6,399,602, 6,344,459, 6,602,863, 6,391,874, 6,344,455, 5,760,041, 6,002,008, 和 5,747,498, 以及PCT公开文本W098/14451, W098/50038, W099/09016, 和W099/24037中描述的化合物。具体的小分子EGFR拮抗剂包括OSI-774 (CP-358774, 厄洛替尼 (erlotinib), TARCEVA®, Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-丙烯酰胺, N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[3-(4-吗啉基)丙氧基]-6-喹唑啉基]-, 二氢氯化物,

Pfizer Inc.); ZD1839, 吉非替尼 (gefitinib) (**IRESSA®**) 4-(3'-氯-4'-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉代丙氧基) 喹唑啉, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-氨基-4-(3-甲基苯基-氨基)-喹唑啉, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-氯-4-氟-苯基)-N2-(1-甲基-哌啶-4-基)-嘧啶并[5,4-d]嘧啶-2,8-二胺, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-苯基乙基)氨基]-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚); (R)-6-(4-羟基苯基)-4-[(1-苯基乙基)氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶); CL-387785 (N-[4-[(3-溴苯基)氨基]-6-喹唑啉基]-2-丁炔酰胺); EKB-569 (N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-3-氰基-7-乙氧基-6-喹啉基]-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺) (Wyeth); AG1478 (Pfizer); AG1571 (SU 5271; Pfizer); 双重EGFR/HER2酪氨酸激酶抑制剂, 诸如拉帕替尼 (lapatinib) (**TYKERB®**, GSK572016或N-[3-氯-4-[(3-氟苯基)甲氧基]苯基]-6-[5-[[[2-甲基磺酰基]乙基]氨基]甲基]-2-呋喃基]-4-喹唑啉胺)。

[0089] 化疗剂还包括“酪氨酸激酶抑制剂”, 包括前一段中提到的EGFR靶向药物; 小分子HER2酪氨酸激酶抑制剂, 诸如可从Takeda获得的TAK165; CP-724,714, 一种口服ErbB2受体酪氨酸激酶选择性抑制剂 (Pfizer和OSI); 优先结合EGFR但抑制HER2和EGFR过表达细胞二者的双重HER抑制剂, 诸如EKB-569 (可从Wyeth获得); 拉帕替尼 (lapatinib) (GSK572016; 可从Glaxo-SmithKline获得), 一种口服HER2和EGFR酪氨酸激酶抑制剂; PKI-166 (可从Novartis获得); 泛HER抑制剂, 诸如卡奈替尼 (canertinib) (CI-1033; Pharmacia); Raf-1抑制剂, 诸如可从ISIS Pharmaceuticals获得的, 抑制Raf-1信号传导的反义药剂ISIS-5132; 非HER靶向酪氨酸激酶抑制剂, 诸如甲磺酸伊马替尼 (**GLEEVEC®**, 可从Glaxo SmithKline获得); 多靶向酪氨酸激酶抑制剂, 诸如舒尼替尼 (sunitinib) (**SUTENT®**, 可从Pfizer获得); VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂, 诸如瓦他拉尼 (vatalanib) (PTK787/ZK222584, 可从Novartis/Schering AG获得); MAPK胞外调控激酶I抑制剂CI-1040 (可从Pharmacia获得); 喹唑啉类, 诸如PD 153035, 4-(3-氯苯胺基) 喹唑啉; 吡啶并嘧啶类; 嘧啶并嘧啶类; 吡咯并嘧啶类, 诸如CGP 59326, CGP 60261和CGP 62706; 吡唑并嘧啶类, 4-(苯基氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶类; 姜黄素 (二阿魏酰甲烷, 4,5-双(4-氟苯胺基)-酞酰亚胺); 含有硝基噻吩模块的tyrphostine; PD-0183805 (Warner-Lambert); 反义分子 (例如那些与编码HER的核酸结合的反义分子); 喹啉类 (美国专利No.5,804,396); tryphostins (美国专利No.5,804,396); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); 泛HER抑制剂, 诸如CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); 甲磺酸伊马替尼 (**GLEEVEC®**); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Pfizer); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone), 雷帕霉素 (西罗莫司, **RAPAMUNE®**); 或任何下列专利公开文本中描述的: 美国专利No.5,804,396; W01999/09016 (American Cyanamid); W01998/43960 (American Cyanamid); W01997/38983 (Warner Lambert); W01999/06378 (Warner Lambert); W01999/06396 (Warner Lambert); W01996/30347 (Pfizer, Inc); W01996/33978 (Zeneca); W01996/3397 (Zeneca) 和W01996/33980 (Zeneca)。

[0090] 化疗剂还包括地塞米松 (dexamethasone), 干扰素, 秋水仙素 (colchicine), 氯苯氨啉 (metoprine), 环孢霉素 (cyclosporine), 两性霉素 (amphotericin), 甲硝唑

(metronidazole),阿仑单抗(alemtuzumab),阿利维A酸(alitretinoin),别嘌醇(allopurinol),氨磷汀(amifostine),三氧化二砷(arsenic trioxide),天冬酰胺酶(asparaginase),活的BCG,贝伐珠单抗(bevacuzimab),贝沙罗汀(bexarotene),克拉屈滨(cladribine),里本灵(clofarabine),darbepoetin alfa,地尼白介素(denileukin),右雷佐生(dexrazoxane),阿法依伯汀(epoetin alfa),厄洛替尼(elotinib),非格司亭(filgrastim),醋酸组氨瑞林(histrelin acetate),ibritumomab,干扰素 α -2a,干扰素 α -2b,lenalidomide,左旋咪唑(levamisole),美司钠(mesna),甲氧沙林(methoxsalen),诺龙(nandrolone),奈拉滨(nelarabine),诺非单抗(nofetumomab),奥普瑞白介素(oprelvekin),palifermin,帕米膦酸盐(pamidronate),培加酶(pegademase),培门冬酶(pegaspargase),PEG非格司亭(pegfilgrastim),培美曲塞二钠(pemetrexed disodium),普卡霉素(plicamycin),卟吩姆钠(porfimer sodium),喹纳克林(quinacrine),拉布立酶(rasburicase),沙格司亭(sargramostim),替莫唑胺(temozolomide),VM-26,6-TG,托瑞米芬(toremifene),tretinoin,ATRA,戊柔比星(valrubicin),唑来膦酸盐(zoledronate),和唑来膦酸(zoledronic acid),及其药学可接受盐。

[0091] 化疗剂还包括氢化可的松(hydrocortisone),醋酸氢化可的松(hydrocortisone acetate),醋酸可的松(cortisone acetate),替可的松匹伐酯(tixocortol pivalate),曲安奈德(triamcinolone acetonide),曲安西龙醇(triamcinolone alcohol),莫米松(mometasone),安西奈德(amcinonide),布地奈德(budesonide),地奈德(desonide),fluocinonide,fluocinolone acetonide,倍他米松(betamethasone),倍他米松磷酸钠(betamethasone sodium phosphate),地塞米松(dexamethasone),地塞米松磷酸钠(dexamethasone sodium phosphate),氟可龙(flucortolone),氢化可的松-17-丁酸盐(hydrocortisone-17-butyrate),氢化可的松-17-戊酸盐(hydrocortisone-17-valerate),aclometasone dipropionate,戊酸倍他米松(betamethasone valerate),二丙酸倍他米松(betamethasone dipropionate),泼尼卡酯(prednicarbate),氯倍他松-17-丁酸盐(clobetasone-17-butyrate),氯倍他松-17-丙酸盐(clobetasol-17-propionate),己酸氟考龙(flucortolone caproate),特戊酸氟考龙(flucortolone pivalate)和醋酸氟甲叉龙(fluprednidene acetate);免疫选择性抗炎肽(ImSAID),诸如苯丙氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸(FEG)及其D-异构体形式(feG)(IMULAN BioTherapeutics,LLC);抗风湿药物,诸如硫唑嘌呤(azathioprine),环孢素(ciclosporin)(环孢霉素(cyclosporine)A),D-青霉胺,金盐,羟氯喹,来氟米特(leflunomide)米诺环素(minocycline),柳氮磺吡啶(sulfasalazine),肿瘤坏死因子 α (TNF α)阻断剂,诸如依那西普(etanercept)(Enbrel),英夫利昔单抗(infliximab)(Remicade),阿达木单抗(adalimumab)(Humira),certolizumab pegol(Cimzia),golimumab(Simponi),白介素-1(IL-1)阻断剂,诸如阿那白滞素(anakinra)(Kineret),T细胞共刺激阻断剂,诸如abatacept(Orencia),白介素-6(IL-6)阻断剂,诸如tocilizumab(ACTEMERA®);白介素-13(IL-13)阻断剂,诸如lebrikizumab;干扰素 α (IFN)阻断剂,诸如rontalizumab; β 7-整联蛋白阻断剂,诸如rhuMAb Beta7;IgE途径阻断剂,诸如抗M1 prime;分泌型同三聚LTa3和膜结合型异三聚LTa1/ β 2阻断剂,诸如抗淋巴毒素 α (LTa);放射性同位素,例如At²¹¹,I¹³¹,I¹²⁵,Y⁹⁰,Re¹⁸⁶,Re¹⁸⁸,Sm¹⁵³,Bi²¹²,Pb²¹²和Lu放射性同位素;混杂调查性药剂,诸如thioplatin,PS-341,丁酸苯酯,ET-18-OCH₃,或

法尼基转移酶抑制剂 (L-739749, L-744832; 多酚, 诸如槲皮素 (quercetin), 白藜芦醇 (resveratrol), piceatannol, 没食子酸表没食子儿茶精 (epigallocatechin gallate), 茶黄素 (theaflavin), 黄烷醇 (flavanol), 原花青素 (procyanidins), 白桦脂酸 (betulinic acid) 及其衍生物; 自噬抑制剂, 诸如氯喹; δ -9-四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚 (dronabinol), **MARINOL®**); β -拉帕醌 (lapachone); 拉帕醇 (lapachol); 秋水仙素类 (colchicines); 白桦脂酸 (betulinic acid); 乙酰喜树碱, 东莨菪亭 (scopolectin), 和 9-氨基喜树碱; 鬼臼毒素 (podophyllotoxin); 替加氟 (tegafur) (**UFTORAL®**); 贝沙罗汀 (bexarotene) (**TARGRETIN®**); 二膦酸盐类 (bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐 (clodronate) (例如 **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**), 依替膦酸钠 (etidronate) (**DIDROCAL®**), NE-58095, 唑来膦酸/唑来膦酸盐 (zoledronic acid/zoledronate) (**ZOMETA®**), 阿伦膦酸盐 (alendronate) (**FOSAMAX®**), 帕米膦酸盐 (pamidronate) (**AREDIA®**), 替鲁膦酸盐 (tiludronate) (**SKELID®**), 或利塞膦酸盐 (risedronate) (**ACTONEL®**); 和表皮生长因子受体 (EGF-R); 疫苗, 诸如 **THERATOPE®** 疫苗; 哌立福辛 (perifosine), COX-2 抑制剂 (例如塞来考昔 (celecoxib) 或艾托考昔 (etoricoxib)), 蛋白体抑制剂 (例如 PS341); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; Bcl-2 抑制剂, 诸如 oblimersen sodium (**GENASENSE®**); pixantrone; 法尼基转移酶抑制剂, 诸如 lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); 及任何上述各项的药学可接受盐, 酸或衍生物; 以及两种或更多种上述各项的组合, 诸如 CHOP (环磷酰胺, 多柔比星, 长春新碱, 和泼尼松龙联合疗法的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 联合 5-FU 和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

[0092] 化疗剂还包括具有止痛, 退热和消炎效果的非类固醇消炎药。NSAID 包括酶环氧合酶的非选择性抑制剂。NSAID 的具体例子包括阿司匹林 (aspirin), 丙酸衍生物诸如布洛芬 (ibuprofen), 非诺洛芬 (fenoprofen), 酮洛芬 (ketoprofen), 氟比洛芬 (flurbiprofen), 奥沙普秦 (oxaprozin) 和萘普生 (naproxen), 乙酸衍生物诸如吲哚美辛 (indomethacin), 舒林酸 (sulindac), 依托度酸 (etodolac), 双氯芬酸 (diclofenac), 烯醇酸衍生物诸如吡罗昔康 (piroxicam), 美洛昔康 (meloxicam), 替诺昔康 (tenoxicam), 屈恶昔康 (droxicam), 氯诺昔康 (lornoxicam) 和伊索昔康 (isoxicam), 灭酸衍生物诸如甲灭酸 (mefenamic acid), 甲氯芬那酸 (meclofenamic acid), 氟芬那酸 (flufenamic acid), 托芬那酸 (tolfenamic acid), 和 COX-2 抑制剂诸如塞来考昔 (celecoxib), 依托考昔 (etoricoxib), 罗美考昔 (lumiracoxib), 帕瑞考昔 (parecoxib), 罗非考昔 (rofecoxib), 罗非昔布 (rofecoxib), 和伐地考昔 (valdecoxib)。NSAID 可被指示用于诸如类风湿性关节炎, 骨关节炎, 炎性关节病, 强直性脊柱炎, 银屑病关节炎, 莱特尔氏综合征, 急性痛风, 痛经, 骨转移疼痛, 头痛和偏头痛, 手术后疼痛, 由于炎症和组织损伤引起的轻至中度疼痛, 发热, 肠梗阻, 和肾绞痛等疾患的症状缓解。

[0093] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞生长的化合物或组合物。在一个实施方案中, 生长抑制剂是阻止或降低表达抗体所结合的抗原的细胞增殖的生长抑制性抗体。在另一个实施方案中, 生长抑制剂可以是显著降低处于 S 期的细胞百分比的药

剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(处于S期以外的位置)的药剂,诸如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春药类(vincas)(长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine)),紫杉烷类(taxanes),和拓扑异构酶II抑制剂诸如多柔比星(doxorubicin),表柔比星(epirubicin),柔红霉素(daunorubicin),依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。那些阻滞G1的药剂也溢出进入S期停滞,例如DNA烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen),泼尼松(prednisone),达卡巴嗪(dacarbazine),双氯乙基甲胺(mechlorethamine),顺铂(cisplatin),甲氨蝶呤(methotrexate),5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和ara-C。更多信息可参见Mendelsohn和Israel编,《The Molecular Basis of Cancer》,第1章,题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”,Murakami等人,WB Saunders, Philadelphia, 1995,例如第13页。

[0094] “放射疗法”或“放疗”指使用定向伽马射线或贝塔射线来诱发对细胞的足够损伤,以限制细胞正常发挥功能的能力或全然破坏细胞。应当领会,本领域知道许多方式来确定治疗的剂量和持续时间。典型的治疗作为一次施用来给予,而典型的剂量范围为每天10-200个单位(戈瑞(Gray))。

[0095] 用于治疗目的的“个体”或“受试者”指归入哺乳类的任何动物,包括人,家畜和牲畜,及动物园动物,体育运动用动物,或宠物动物,诸如犬,马,猫,牛等。个体或受试者可以是患者。在特定实施方案中,个体或患者是人。

[0096] 本文中术语“抗体”以最广义使用,明确覆盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体),多克隆抗体,多特异性抗体(例如双特异性抗体),及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。

[0097] “分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指将会干扰该抗体的研究,诊断或治疗用途的物质,可包括酶,激素,和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在有些实施方案中,将抗体纯化至(1)根据例如Lowry法的测定,抗体重量超过95%,而在有些实施方案中,重量超过99%,(2)足以通过使用例如转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)根据还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE及使用例如考马斯蓝或银染色,达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0098] “天然抗体”指通常由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链间有变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫桥。每条重链在一端具有一个可变域(V_H),接着是多个恒定域。每条轻链在一端具有一个可变域(V_L),而另一端是一个恒定域;轻链的恒定域与重链的第一恒定域排列在一起,而轻链的可变域与重链的可变域排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链与重链可变域之间形成界面。

[0099] 术语“恒定域”指免疫球蛋白分子中的如下部分,其相对于免疫球蛋白的其它部分,即含有抗原结合位点的可变域,具有更加保守的氨基酸序列。恒定域含有重链的 C_H1 , C_H2 和 C_H3 域(合称CH)及轻链的 CHL (或 CL)域。

[0100] 抗体的“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变域

可以称为“ V_H ”。轻链的可变域可以称为“ V_L ”。这些结构域一般是抗体的最易变部分且包含抗原结合位点。

[0101] 术语“可变的”指可变域中的某些部分在抗体间序列差异广泛且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而,变异性并非均匀分布于抗体的整个可变域。它集中于轻链和重链可变域中称作高变区(HVR)的三个区段。可变域中更加高度保守的部分称作框架区(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR区,它们大多采取 β -折叠片构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的三个HVR连接。每条链中的HVR通过FR区非常接近的保持在一起,并与另一条链的HVR一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体在抗体依赖性细胞毒性中的参与。

[0102] 根据其恒定域的氨基酸序列,来自任何哺乳动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可归入两种截然不同的型中的一种,称作卡帕(“ κ ”)和拉姆达(“ λ ”)。

[0103] 如本文中使用的,术语IgG“同种型”或“亚类”意指由其恒定区的化学和抗原特征定义的任何免疫球蛋白亚类。

[0104] 根据其重链恒定域的氨基酸序列,抗体(免疫球蛋白)可归入不同的类。免疫球蛋白有五大类:IgA, IgD, IgE, IgG和IgM,其中有些可进一步分为亚类(同种型),例如IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁和IgA₂。将与不同类的免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作 α , δ , ϵ , γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的,一般性描述于例如Abbas et al., Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)。抗体可以是抗体与一种或多种其它蛋白质或肽共价或非共价连接而形成的更大融合分子的一部分。

[0105] 术语“全长抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用,指基本上完整形式的抗体,而非下文定义的抗体片段。该术语具体指重链包含Fc区的抗体。

[0106] “裸抗体(裸露的抗体)”为本发明目的指未缀合细胞毒性模块或放射性标记物的抗体。

[0107] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。在一些实施方案中,本文所述抗体片段是抗原结合片段。抗体片段的例子包括Fab, Fab', F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0108] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各自具有一个抗原结合位点,及一个剩余的“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个F(ab')₂片段,它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

[0109] “Fv”是包含完整抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施方案中,双链Fv种类由紧密,非共价联合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)种类中,一个重链可变域和一个轻链可变域可以通过柔性肽接头共价相连接,使得轻链和重链可以在与双链Fv种类类似的“二聚体”结构中相联合。正是在这种构造中,每个可变域的三个HVR相互作用而在 V_H - V_L 二聚体表面上限定了一个抗原结合位点。六个HVR一起赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或是只包含对抗原特异性的三个HVR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是亲和力低于完整结合位点。

[0110] Fab片段包含重链和轻链可变域,而且还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于重链CH1结构域的羧基末端增加了少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带游离巯基的Fab'的称谓。F(ab')₂抗体片段最初是作为在Fab'片段之间有铰链半胱氨酸的成对Fab'片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0111] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于一条多肽链上。一般而言,scFv多肽在VH与VL结构域之间进一步包含多肽接头,其使得scFv能够形成结合抗原的期望结构。关于scFv的综述参见例如Plückthun,于《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,1994,第269-315页。

[0112] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的抗体片段,该片段在同一条多肽链(VH-VL)中包含相连的重链可变域(VH)和轻链可变域(VL)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对,迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。双抗体可以是二价的或双特异性的。双抗体更完整的记载于例如EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson et al.,Nat.Med.9:129-134(2003);及Hollinger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三抗体(Triabody)和四抗体(tetrabody)也记载于Hudson et al.,Nat.Med.9:129-134(2003)。

[0113] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,例如构成群体的各个抗体相同,除了可能以极小量存在的可能的突变,例如天然存在的突变。如此,修饰语“单克隆”表明抗体不是分立的抗体的混合物的特征。在某些实施方案中,此类单克隆抗体典型的包括包含结合靶物的多肽序列的抗体,其中靶物结合多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择单一靶物结合多肽序列在内的过程得到的。例如,选择过程可以从众多克隆诸如杂交瘤克隆,噬菌体克隆或重组DNA克隆的集合中选择独特克隆。应当理解,所选择的靶物结合序列可进一步改变,例如为了提高对靶物的亲和力,将靶物结合序列人源化,提高其在细胞培养物中的产量,降低其在体内的免疫原性,创建多特异性抗体等,而且包含改变后的靶物结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性外,单克隆抗体制备物的优势在于它们通常未受到其它免疫球蛋白的污染。

[0114] 修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如,依照本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术来生成,包括例如杂交瘤法(例如Kohler and Milstein,Nature,256:495-97(1975);Hongo et al.,Hybridoma,14(3):253-260(1995),Harlow et al.,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版1988);Hammerling et al.,In: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier,N.Y.,1981)),重组DNA法(参见例如美国专利No.4,816,567),噬菌体展示技术(参见例如Clackson et al.,Nature 352:624-628(1991);Marks et al.,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Sidhu et al.,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee et al.,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);Lee et al.,

J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)),及用于在具有部分或整个人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中生成人或人样抗体的技术(参见例如WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551(1993);Jakobovits et al.,Nature 362:255-258(1993);Bruggemann et al.,Year in Immuno.7:33(1993);美国专利No.5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016;Marks et al.,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg et al.,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-813(1994);Fishwild et al.,Nature Biotechnol.14:845-851(1996);Neuberger, Nature Biotechnol.14:826(1996);Lonberg et al.,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。

[0115] 单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(参见例如美国专利No.4,816,567;Morrison et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。嵌合抗体包括“灵长类化”抗体,其中抗体的抗原结合区衍生自通过例如用感兴趣抗原免疫猕猴而生成的抗体。

[0116] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在一个实施方案中,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的HVR残基用具有期望特异性,亲和力和/或能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠,大鼠,家兔,或非人灵长类动物的HVR残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的FR残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。可以进行这些修饰来进一步改进抗体的性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个,通常两个基本上整个如下可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见例如Jones et al.,Nature 321:522-525(1986);Riechmann et al.,Nature 332:323-329(1988);和Presta, Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还可参见例如Vaswani and Hamilton, Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle and Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);及美国专利No.6,982,321和7,087,409。

[0117] “人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom and Winter,J.Mol.Biol.227:381(1991);Marks et al., J.Mol.Biol.222:581(1991))。还可用于制备人单克隆抗体的是以下文献中记载的方法: Cole et al.,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77(1985); Boerner et al.,J.Immunol.147(1):86-95(1991)。还可参见van Dijk and van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.,5:368-74(2001)。可通过给已经修饰以应答抗原性攻击而生成抗体但其内源基因座已经失能的转基因动物例如经过免疫的异种小鼠(xenomice)

施用抗原来制备人抗体(参见例如美国专利6,075,181和6,150,584,关于XENOMOUSE™技术)。还可参见例如Li et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,103:3557-3562(2006),关于经人B-细胞杂交瘤技术生成的人抗体。

[0118] 术语“高变区”,“HVR”或“HV”在用于本文时指抗体可变域中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环的区域。通常,抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1,H2,H3),三个在VL中(L1,L2,L3)。在天然抗体中,H3和L3展示这六个HVR的最大多样性,而且认为特别是H3在赋予抗体以精密特异性中发挥独特作用。参见例如Xu et al.,*Immunity* 13:37-45(2000); Johnson and Wu,*In:Methods in Molecular Biology* 248:1-25(Lo,ed.,Human Press,Totowa,NJ,2003)。事实上,仅由重链组成的天然存在camelid抗体在缺乏轻链时是有功能的且稳定的。参见例如Hamers-Casterman et al.*Nature* 363:446-448,(1993);Sheriff et al.*Nature Struct.Biol.*3:733-736,(1996)。

[0119] 本文中使用且涵盖许多HVR的叙述。Kabat互补决定区(CDR)是以序列变异性为基础的,而且是最常用的(Kabat et al.,*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。Chothia改为指结构环的位置(Chothia and Lesk *J.Mol.Biol.*196:901-917(1987))。AbM HVR代表Kabat HVR与Chothia结构环之间的折衷,而且得到Oxford Molecular的AbM抗体建模软件的使用。“接触”HVR是以对可获得的复合物晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些HVR中每一个的残基。

	环	Kabat	AbM	Chothia	接触
	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
[0120]	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat编号)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia编号)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0121] HVR可包括如下“延伸的HVR”:VL中的24-36或24-34(L1),46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3)及VH中的26-35(H1),50-65或49-65(H2)和93-102,94-102或95-102(H3)。对于这些定义中的每一个,可变域残基是依照Kabat等,见上文编号的。

[0122] “框架”或“FR”残基指可变域中除本文中所定义的HVR残基外的那些残基。

[0123] 术语“依照Kabat的可变域残基编号方式”或“依照Kabat的氨基酸位置编号方式”及其变化形式指Kabat et al.,见上文中的用于抗体重链可变域或轻链可变域编辑的编号系统。使用此编号系统,实际的线性氨基酸序列可包含较少或另外的氨基酸,对应于可变域FR或HVR的缩短或插入。例如,重链可变域可包含H2残基52后的单一氨基酸插入(依照Kabat为残基52a)及重链FR残基82后的插入残基(例如依照Kabat为残基82a,82b和82c等)。给定抗体的Kabat残基编号方式可通过将抗体序列与“标准”Kabat编号序列比对同源区来确定。

[0124] Kabat编号系统一般在提及可变域中的残基(大约是轻链残基1-107和重链残基1-

113)时使用(例如Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。“EU编号系统”或“EU索引”一般在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用(例如Kabat et al., 见上文中报道的EU索引)。“如Kabat中的EU索引”指人IgG1 EU抗体的残基编号方式。

[0125] 表述“线性抗体”指Zapata et al. (1995) Protein Eng, 8(10):1057-1062中所描述的抗体。简言之,这些抗体包含一对串联的Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),该区段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的,或者是单特异性的。

[0126] 如本文中使用的,术语“结合”,“特异性结合”或“对…特异性的”指可测量且可再现的相互作用,诸如靶物和抗体之间的结合,其确定在存在分子(包括生物学分子)的异质群体的情况中靶物的存在。例如,结合或特异性结合靶物(其可以是表位)的抗体是以比其结合其它靶物更大的亲和力,亲合力,更容易,和/或以更大的持续时间结合此靶物的抗体。在一个实施方案中,抗体结合无关靶物的程度小于抗体结合靶物的约10%,如例如通过放射性免疫测定法(RIA)测量的。在某些实施方案中,特异性结合靶物的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗体特异性结合蛋白质上在来自不同物种的蛋白质间保守的表位。在另一个实施方案中,特异性结合可以包括但不需要排他结合。

[0127] II. PD-1轴结合拮抗剂

[0128] 本文中提供的是治疗罹患癌症的患者的方法,该方法包括对该患者施用治疗有效量的PD-1轴结合拮抗剂,其中自该患者获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率已经确定为1或更大。本文中还提供的是用于确定罹患癌症的患者是否很可能响应包含PD-1轴结合拮抗剂的治疗的方法。例如,PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂,PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。PD-1(编程性死亡1)在本领域中也称作“编程性细胞死亡1”,“PDCD1”,“CD279”和“SLEB2”。一种例示性人PD-1显示于UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q15116。PD-L1(编程性死亡配体1)在本领域中也称作“编程性细胞死亡1配体1”,“PDCD1LG1”,“CD274”,“B7-H”,和“PDL1”。一种例示性人PD-L1显示于UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9NZQ7.1。PD-L2(编程性死亡配体2)在本领域中也称作“编程性细胞死亡1配体2”,“PDCD1LG2”,“CD273”,“B7-DC”,“Btde”,和“PDL2”。一种例示性人PD-L2显示于UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9BQ51。在一些实施方案中,PD-1,PD-L1,和PD-L2是人PD-1,PD-L1和PD-L2。

[0129] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合配偶结合的分子。在一个具体的方面,PD-1配体结合配偶是PD-L1和/或PD-L2。在另一个实施方案中,PD-L1结合拮抗剂是抑制PD-L1与其结合配偶结合的分子。在一个具体的方面,PD-L1结合配偶是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PD-L2结合拮抗剂是抑制PD-L2与其结合配偶结合的分子。在一个具体的方面,PD-L2结合配偶是PD-1。拮抗剂可以是抗体,其抗原结合片段,免疫粘附素,融合蛋白,或寡肽。

[0130] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体(例如人抗体,人源化抗体,或嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体选自下组:MDX-1106(纳武单抗),MK-3475(派姆单抗),MEDI-0680(AMP-514),PDR001,REGN2810,和BGB-108。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如包含融合至恒定区(例如免疫球蛋白序列的Fc区)的PD-L1或PD-

L2的胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是AMP-224。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体选自下组:MPDL3280A,YW243.55.S70,MDX-1105,MEDI4736(度伐单抗),和MSB0010718C(阿维单抗)。抗体YW243.55.S70是WO 2010/077634中描述的抗PD-L1。MDX-1105,也称作BMS-936559,是WO2007/005874中描述的抗PD-L1抗体。MEDI4736是WO2011/066389和US2013/034559中描述的抗PD-L1单克隆抗体。MDX-1106,也称作MDX-1106-04,ONO-4538,BMS-936558,或纳武单抗,是一种在WO2006/121168中描述的抗PD-1抗体。MK-3475,也称作lambrolizumab,是一种在WO2009/114335中描述的抗PD-1抗体。AMP-224,也称作B7-DCIg,是一种在WO2010/027827和WO2011/066342中描述的PD-L2-Fc融合可溶性受体。

[0131] 在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体能够抑制PD-L1和PD-1之间和/或PD-L1和B7-1之间的结合。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体是选自下组的抗体片段:Fab,Fab'-SH,Fv,scFv,和(Fab')₂片段。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体是人抗体。

[0132] 在本发明的方法中有用的抗PD-L1抗体的例子及其生成方法描述于PCT专利申请WO 2010/077634,WO 2007/005874,WO 2011/066389,和US 2013/034559,其通过援引收入本文。在本发明中有用的抗PD-L1抗体,包括含有此类抗体的组合物,可以与紫杉烷组合使用来治疗癌症。

[0133] 抗PD-1抗体

[0134] 在一些实施方案中,抗PD-1抗体是MDX-1106。“MDX-1106”的备选名称包括MDX-1106-04,ONO-4538,BMS-936558或纳武单抗。在一些实施方案中,抗PD-1抗体是纳武单抗(CAS登记号:946414-94-4)。在仍有又一个实施方案中,提供一种分离的抗PD-1抗体,其包含包含来自SEQ ID NO:1的重链可变区氨基酸序列的重链可变区和/或包含来自SEQ ID NO:2的轻链可变区氨基酸序列的轻链可变区。在仍有又一个实施方案中,提供一种分离的抗PD-1抗体,其包含重链和/或轻链序列,其中:

[0135] (a) 该重链序列与下述重链序列具有至少85%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%序列同一性:

[0136] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:1),和

[0137] (b) 该轻链序列与下述轻链序列具有至少85%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%序列同一性:

[0138] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG

TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:2)。

[0139] 抗PD-L1抗体

[0140] 在一些实施方案中,配制剂中的抗体在重和/或轻链序列中包含至少一个(例如至少两个,至少三个,或至少四个)色氨酸。在一些实施方案中,氨基酸色氨酸在抗体的HVR区,框架区和/或恒定区中。在一些实施方案中,抗体在HVR区中包含两个或三个色氨酸残基。在一些实施方案中,配制剂中的抗体是抗PD-L1抗体。PD-L1(编程性死亡配体1),也称作PDL1, B7-H1, B7-4, CD274, 和B7-H, 是跨膜蛋白, 而且它与PD-1的相互作用抑制T细胞活化和细胞因子生成。在一些实施方案中,本文所述抗PD-L1抗体结合人PD-L1。可用于本文所述方法的抗PD-L1抗体的例子记载于PCT专利申请WO 2010/077634 A1和美国专利No.8,217,149,其通过援引完整收入本文。

[0141] 在一些实施方案中,抗PD-L1抗体能够抑制PD-L1和PD-1之间和/或PD-L1和B7-1之间的结合。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体是选自下组的抗体片段: Fab, Fab' -SH, Fv, scFv, 和 (Fab')₂ 片段。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体是人抗体。

[0142] WO 2010/077634A1和US 8,217,149中描述的抗PD-L1抗体可用于本文所述方法。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包含SEQ ID NO:3的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:4的轻链可变区序列。在仍有又一个实施方案中,提供一种分离的抗PD-L1抗体,其包含重链可变区和/或轻链可变区序列,其中:(a) 该重链序列与下述重链序列具有至少85%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%序列同一性:

[0143] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:3), 和

[0144] (b) 该轻链序列与下述轻链序列具有至少85%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%序列同一性:

[0145] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)。

[0146] 在一个实施方案中,抗PD-L1抗体含有重链可变区,其包含HVR-H1, HVR-H2和HVR-H3序列,其中:

[0147] (a) HVR-H1序列是GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:5);

[0148] (b) HVR-H2序列是AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:6);

[0149] (c) HVR-H3序列是RHWPGGFDY (SEQ ID NO:7);

[0150] 进一步其中:X₁是D或G;X₂是S或L;X₃是T或S。在一个具体的方面,X₁是D;X₂是S且X₃是T。

[0151] 在另一个方面,多肽进一步包含依照下式的HVR间并置的可变区重链框架序列:(HC-FR1) - (HVR-H1) - (HC-FR2) - (HVR-H2) - (HC-FR3) - (HVR-H3) - (HC-FR4)。在又一个方面,框架序列自人共有框架序列衍生。在另一个方面,框架序列是VH亚组III共有框架。在又一

个方面,至少一个框架序列如下:

[0152] HC-FR1是EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:8)

[0153] HC-FR2是WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:9)

[0154] HC-FR3是RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:10)

[0155] HC-FR4是WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:11)。

[0156] 在又一个方面,重链多肽与可变区轻链进一步组合,所述可变区轻链包含HVR-L1, HVR-L2和HVR-L3,其中:

[0157] (a) HVR-L1序列是RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:12);

[0158] (b) HVR-L2序列是SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:13);

[0159] (c) HVR-L3序列是QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:14);

[0160] 其中:X₄是D或V;X₅是V或I;X₆是S或N;X₇是A或F;X₈是V或L;X₉是F或T;X₁₀是Y或A;X₁₁是Y,G,F,或S;X₁₂是L,Y,F或W;X₁₃是Y,N,A,T,G,F或I;X₁₄是H,V,P,T或I;X₁₅是A,W,R,P或T。在又一个方面,X₄是D;X₅是V;X₆是S;X₇是A;X₈是V;X₉是F;X₁₀是Y;X₁₁是Y;X₁₂是L;X₁₃是Y;X₁₄是H;X₁₅是A。

[0161] 在又一个方面,轻链进一步包含依照下式的HVR间并置的可变区轻链框架序列:(LC-FR1) - (HVR-L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。在又一个方面,框架序列自人共有框架序列衍生。在又一个方面,框架序列是VLκI共有框架。在又一个方面,至少一个框架序列如下:

[0162] LC-FR1是DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)

[0163] LC-FR2是WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)

[0164] LC-FR3是GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)

[0165] LC-FR4是FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:18)。

[0166] 在另一个实施方案中,提供了分离的抗PD-L1抗体或抗原结合片段,其包含重链和轻链可变区序列,其中:

[0167] (a) 重链包含HVR-H1,HVR-H2和HVR-H3,其中进一步:

[0168] (i) HVR-H1序列是GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:5),

[0169] (ii) HVR-H2序列是AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:6)

[0170] (iii) HVR-H3序列是RHWPGGFDY (SEQ ID NO:7),且

[0171] (b) 轻链包含HVR-L1,HVR-L2和HVR-L3,其中进一步:

[0172] (i) HVR-L1序列是RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:12),

[0173] (ii) HVR-L2序列是SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:13),和

[0174] (iii) HVR-L3序列是QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:14)

[0175] 其中:X₁是D或G;X₂是S或L;X₃是T或S;X₄是D或V;X₅是V或I;X₆是S或N;X₇是A或F;X₈是V或L;X₉是F或T;X₁₀是Y或A;X₁₁是Y,G,F,或S;X₁₂是L,Y,F或W;X₁₃是Y,N,A,T,G,F或I;X₁₄是H,V,P,T或I;X₁₅是A,W,R,P或T。在一个具体的方面,X₁是D;X₂是S且X₃是T。在另一个方面,X₄是D;X₅是V;X₆是S;X₇是A;X₈是V;X₉是F;X₁₀是Y;X₁₁是Y;X₁₂是L;X₁₃是Y;X₁₄是H;X₁₅是A。在又一个方面,X₁是D;X₂是S且X₃是T,X₄是D;X₅是V;X₆是S;X₇是A;X₈是V;X₉是F;X₁₀是Y;X₁₁是Y;X₁₂是L;X₁₃是Y;X₁₄是H且X₁₅是A。

[0176] 在另一个方面,重链可变区包含如下的HVR间并置的一个或多个框架序列:(HC-

FR1) - (HVR-H1) - (HC-FR2) - (HVR-H2) - (HC-FR3) - (HVR-H3) - (HC-FR4), 并且轻链可变区包含如下的HVR间并置的一个或多个框架序列: (LC-FR1) - (HVR-L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。在又一个方面, 框架序列自人共有框架序列衍生。在又一个方面, 重链框架序列自Kabat亚组I, II, 或III序列衍生。在又一个方面, 重链框架序列是VH亚组III共有框架。在又一个方面, 一个或多个重链框架序列如SEQ ID NO:8, 9, 10和11所列。在又一个方面, 轻链框架序列自Kabat κ I, II, II或IV亚组序列衍生。在又一个方面, 轻链框架序列是VL κ I共有框架。在又一个方面, 一个或多个轻链框架序列如SEQ ID NO:15, 16, 17和18所列。

[0177] 在又一个具体的方面, 抗体进一步包含人或鼠恒定区。在又一个方面, 人恒定区选自下组: IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4。在又一个具体的方面, 人恒定区是IgG1。在又一个方面, 鼠恒定区选自下组: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3。在又一个方面, 鼠恒定区是IgG2A。在又一个具体的方面, 抗体具有降低的或最小的效应器功能。在又一个具体的方面, 最小效应器功能源自“效应器较小 (effector-less) 的Fc突变”或无糖基化 (aglycosylation)。在又一个实施方案中, 效应器较小的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A替代。

[0178] 在又一个实施方案中, 提供了抗PD-L1抗体, 其包含重链和轻链可变区序列, 其中:

[0179] (a) 重链进一步包含与GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:19), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:20) 和RHWPGGFDY (SEQ ID NO:21) 分别具有至少85%序列同一性的HVR-H1, HVR-H2和HVR-H3序列, 或

[0180] (b) 轻链进一步包含与RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:22), SASFLYS (SEQ ID NO:23) 和QQYLYHPAT (SEQ ID NO:24) 分别具有至少85%序列同一性的HVR-L1, HVR-L2和HVR-L3序列。

[0181] 在一个具体的方面, 序列同一性是86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%。

[0182] 在另一个方面, 重链可变区包含如下的HVR间并置的一个或多个框架序列: (HC-FR1) - (HVR-H1) - (HC-FR2) - (HVR-H2) - (HC-FR3) - (HVR-H3) - (HC-FR4), 且轻链可变区包含如下的HVR间并置的一个或多个框架序列: (LC-FR1) - (HVR-L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。在又一个方面, 框架序列自人共有框架序列衍生。在又一个方面, 重链框架序列自Kabat亚组I, II, 或III序列衍生。在又一个方面, 重链框架序列是VH亚组III共有框架。在又一个方面, 一个或多个重链框架序列如SEQ ID NO:8, 9, 10和11所列。在又一个方面, 轻链框架序列自Kabat κ I, II, II或IV亚组序列衍生。在又一个方面, 轻链框架序列是VL κ I共有框架。在又一个方面, 一个或多个轻链框架序列如SEQ ID NO:15, 16, 17和18所列。

[0183] 在又一个具体的方面, 抗体进一步包含人或鼠恒定区。在又一个方面, 人恒定区选自下组: IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4。在又一个具体的方面, 人恒定区是IgG1。在又一个方面, 鼠恒定区选自下组: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3。在又一个方面, 鼠恒定区是IgG2A。在又一个具体的方面, 抗体具有降低的或最小的效应器功能。在又一个具体的方面, 最小效应器功能源自“效应器较小的Fc突变”或无糖基化。在又一个实施方案中, 效应器较小的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A替代。

[0184] 在又一个实施方案中, 提供了分离的抗PD-L1抗体, 其包含重链和轻链可变区序列, 其中:

[0185] (a) 重链序列与下述重链序列具有至少85%序列同一性:

[0186] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:25), 和/或

[0187] (b) 轻链序列与下述轻链序列具有至少85%序列同一性:

[0188] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)。

[0189] 在一个具体的方面,序列同一性是86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,
94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%。在另一个方面,重链可变区包含如下的HVR间并
置的一个或多个框架序列:(HC-FR1) - (HVR-H1) - (HC-FR2) - (HVR-H2) - (HC-FR3) - (HVR-H3) -
(HC-FR4),且轻链可变区包含如下的HVR间并置的一个或多个框架序列:(LC-FR1) - (HVR-
L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。在又一个方面,框架序列自人共
有框架序列衍生。在又一个方面,重链框架序列自Kabat亚组I,II,或III序列衍生。在又一个
方面,重链框架序列是VH亚组III共有框架。在又一个方面,一个或多个重链框架序列如
SEQ ID NO:8,9,10和WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:27) 所列。

[0190] 在又一个方面,轻链框架序列自Kabat κ I,II,III或IV亚组序列衍生。在又一个方
面,轻链框架序列是VL κ I共有框架。在又一个方面,一个或多个轻链框架序列如SEQ ID
NO:15,16,17和18所列。

[0191] 在又一个具体的方面,抗体进一步包含人或鼠恒定区。在又一个方面,人恒定区选
自下组:IgG1,IgG2,IgG2,IgG3,IgG4。在又一个具体的方面,人恒定区是IgG1。在又一个方
面,鼠恒定区选自下组:IgG1,IgG2A,IgG2B,IgG3。在又一个方面,鼠恒定区是IgG2A。在又一
个具体的方面,抗体具有降低的或最小的效应器功能。在又一个具体的方面,最小的效应器
功能源自原核细胞中的生成。在又一个具体的方面,最小的效应器功能源自“效应器较小的
Fc突变”或无糖基化。在又一个实施方案中,效应器较小的Fc突变是恒定区中的N297A或
D265A/N297A替代。

[0192] 在又一个方面,重链可变区包含如下的HVR间并置的一个或多个框架序列:(HC-
FR1) - (HVR-H1) - (HC-FR2) - (HVR-H2) - (HC-FR3) - (HVR-H3) - (HC-FR4),且轻链可变区包含如
下的HVR间并置的一个或多个框架序列:(LC-FR1) - (HVR-L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-
FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。在又一个方面,框架序列自人共有框架序列衍生。在又一个方
面,重链框架序列自Kabat亚组I,II,或III序列衍生。在又一个方面,重链框架序列是VH亚
组III共有框架。在又一个方面,一个或多个重链框架序列如下:

[0193] HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:29)

[0194] HC-FR2 WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:30)

[0195] HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:10)

[0196] HC-FR4 WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:27)。

[0197] 在又一个方面,轻链框架序列自Kabat κ I,II,III或IV亚组序列衍生。在又一个方
面,轻链框架序列是VL κ I共有框架。在又一个方面,一个或多个轻链框架序列如下:

[0198] LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)

[0199] LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)

[0200] LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)

[0201] LC-FR4 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:28)。

[0202] 在又一个具体的方面,抗体进一步包含人或鼠恒定区。在又一个方面,人恒定区选自下组:IgG1,IgG2,IgG2,IgG3,IgG4。在又一个具体的方面,人恒定区是IgG1。在又一个方面,鼠恒定区选自下组:IgG1,IgG2A,IgG2B,IgG3。在又一个方面,鼠恒定区是IgG2A。在又一个具体的方面,抗体具有降低的或最小的效应器功能。在又一个具体的方面,最小的效应器功能源自“效应器较小的Fc突变”或无糖基化。在又一个实施方案中,效应器较小的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A替代。

[0203] 在又一个实施方案中,提供了包含重链和轻链可变区序列的抗PD-L1抗体,其中:

[0204] (c) 重链进一步包含与GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:19),AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:20) 和RHWPGGFDY (SEQ ID NO:21) 分别具有至少85%序列同一性的HVR-H1,HVR-H2和HVR-H3序列,和/或

[0205] (d) 轻链进一步包含与RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:22),SASFLYS (SEQ ID NO:23) 和QQYLYHPAT (SEQ ID NO:24) 分别具有至少85%序列同一性的HVR-L1,HVR-L2和HVR-L3序列。

[0206] 在一个具体的方面,序列同一性是86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%。

[0207] 在另一个方面,重链可变区包含如下的HVR间并置的一个或多个框架序列:(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4),且轻链可变区包含如下的HVR间并置的一个或多个框架序列:(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)。在又一个方面,框架序列自人共有框架序列衍生。在另一个方面,重链框架序列自Kabat亚组I,II,或III序列衍生。在又一个方面,重链框架序列是VH亚组III共有框架。在又一个方面,一个或多个重链框架序列如SEQ ID NO:8,9,10和WGQGTLLTVSSASTK (SEQ ID NO:31) 所列。

[0208] 在又一个方面,轻链框架序列自Kabat κI,II,III或IV亚组序列衍生。在又一个方面,轻链框架序列是VL κI共有框架。在又一个方面,一个或多个轻链框架序列如SEQ ID NO:15,16,17和18所列。在仍有又一个具体的方面,抗体进一步包含人或鼠恒定区。在又一个方面,人恒定区选自下组:IgG1,IgG2,IgG2,IgG3,IgG4。在又一个具体的方面,人恒定区是IgG1。在又一个方面,鼠恒定区选自下组:IgG1,IgG2A,IgG2B,IgG3。在又一个方面,鼠恒定区是IgG2A。在又一个具体的方面,抗体具有降低的或最小的效应器功能。在又一个具体的方面,最小的效应器功能源自“效应器较小的Fc突变”或无糖基化。在又一个方面,效应器较小的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A替代。

[0209] 在仍有又一个实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链可变区序列,其中:

[0210] (a) 重链序列与下述重链序列具有至少85%序列同一性:

[0211] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSASTK (SEQ ID NO:26),或

[0212] (b) 轻链序列与下述轻链序列具有至少85%序列同一性:

[0213] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)。

[0214] 在一些实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链可变区序列,其

中该轻链可变区序列与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少85%，至少86%，至少87%，至少88%，至少89%，至少90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或100%序列同一性。在一些实施方案中，提供分离的抗PD-L1抗体，其包含重链和轻链可变区序列，其中该重链可变区序列与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少85%，至少86%，至少87%，至少88%，至少89%，至少90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或100%序列同一性。在一些实施方案中，提供分离的抗PD-L1抗体，其包含重链和轻链可变区序列，其中该轻链可变区序列与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少85%，至少86%，至少87%，至少88%，至少89%，至少90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%，或100%序列同一性，且该重链可变区序列与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少85%，至少86%，至少87%，至少88%，至少89%，至少90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%，或100%序列同一性。在一些实施方案中，可以在重和/或轻链N端删除，替代或修饰一个，两个，三个，四个或五个氨基酸残基。

[0215] 在仍有又一个实施方案中，提供分离的抗PD-L1抗体，其包含重链和轻链序列，其中：

[0216] (a) 该重链序列与下述重链序列具有至少85%序列同一性：

[0217] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHCTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:32)，和/或

[0218] (b) 该轻链序列与下述轻链序列具有至少85%序列同一性：

[0219] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:33)。

[0220] 在一些实施方案中，提供分离的抗PD-L1抗体，其包含重链和轻链序列，其中该轻链序列与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少85%，至少86%，至少87%，至少88%，至少89%，至少90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，或至少99%序列同一性。在一些实施方案中，提供分离的抗PD-L1抗体，其包含重链和轻链序列，其中该重链序列与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少85%，至少86%，至少87%，至少88%，至少89%，至少90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，或至少99%序列同一性。在一些实施方案中，提供分离的抗PD-L1抗体，其包含重链和轻链序列，其中该轻链序列与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少85%，至少86%，至少87%，至少88%，至少89%，至少90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，或至少99%序列同一性且

该重链序列与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少85%，至少86%，至少87%，至少88%，至少89%，至少90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，或至少99%序列同一性。

[0221] 在一些实施方案中，分离的抗PD-L1抗体是无糖基化的。抗体的糖基化通常是N连接的或O连接的。N连接指碳水化合物模块附着至天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸（其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸）是碳水化合物模块酶促附着至天冬酰胺侧链的识别序列。如此，这些三肽序列任一在多肽中的存在创建潜在的糖基化位点。O连接的糖基化指糖N-乙酰基半乳糖胺，半乳糖，或木糖之一附着至羟基氨基酸，最常见丝氨酸或苏氨酸，尽管也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。通过改变氨基酸序列，使得去除上文所述三肽序列（用于N连接的糖基化位点）之一，方便地实现自抗体去除糖基化位点。可以通过将糖基化位点内的天冬酰胺，丝氨酸或苏氨酸残基用另一种氨基酸残基（例如甘氨酸，丙氨酸或保守氨基酸替代）替代来进行改变。

[0222] 在本文中的任何实施方案中，分离的抗PD-L1抗体能结合人PD-L1（例如UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9NZQ7.1中所示人PD-L1）或其变体。

[0223] 在仍有又一个实施方案中，提供了分离的核酸，其编码本文中描述的任何抗体。在一些实施方案中，核酸进一步包含适合于表达核酸的载体，所述核酸编码先前描述的任何抗PD-L1抗体。在又一个具体的方面，载体在适合于表达核酸的宿主细胞中。在又一个具体的方面，宿主细胞是真核细胞或原核细胞。在又一个具体的方面，真核细胞是哺乳动物细胞，诸如中国仓鼠卵巢（CHO）细胞。

[0224] 可以使用本领域中已知的方法，例如通过如下的方法生成抗体或其抗原结合片段，所述方法包括在适合于生成此类抗体或片段的条件下培养含有核酸的宿主细胞，并回收抗体或片段，所述核酸编码适合于表达的形式的先前描述的任何抗PD-L1抗体或抗原结合片段。

[0225] III. 抗体制备

[0226] 使用本领域用来生成抗体的可用技术来制备本文所述抗体，下面各节中更为详细地描述了其例示性方法。

[0227] 抗体针对感兴趣抗原（例如PD1（诸如人PD1），PD-L1（诸如人PD-L1），PD-L2（诸如人PD-L2），等）。优选地，对罹患病症的哺乳动物施用抗体能在该哺乳动物中导致治疗好处。

[0228] 在某些实施方案中，本文中提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ ， $\leq 150\text{nM}$ ， $\leq 100\text{nM}$ ， $\leq 50\text{nM}$ ， $\leq 10\text{nM}$ ， $\leq 1\text{nM}$ ， $\leq 0.1\text{nM}$ ， $\leq 0.01\text{nM}$ ，或 $\leq 0.001\text{nM}$ （例如 10^{-8}M 或更少，例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ，例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M ）的解离常数（Kd）。

[0229] 在一个实施方案中，Kd是通过如下测定法所述用Fab型式的感兴趣抗体及其抗原实施的放射性标记抗原结合测定法（RIA）测量的。通过在存在未标记抗原的滴定系列的情况下用最小浓度的（ ^{125}I ）标记抗原平衡Fab，然后用抗Fab抗体包被板捕捉结合的抗原来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力（参见例如Chen et al., J.Mol.Biol.293:865-881（1999））。为了建立测定法的条件，将MICROTITER®多孔板（Thermo Scientific）用50mM碳酸钠（pH 9.6）中的5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕捉用抗Fab抗体（Cappel Labs）包被过夜，随后用PBS中的2%（w/v）牛血清清蛋白于室温（大约23℃）封闭2-5小时。在非吸附板（Nunc#269620）中，将100pM或26pM [^{125}I]-抗原与连续稀释的感兴趣Fab混合。然后将感兴趣Fab温育过夜；然

而,温育可持续更长时段(例如约65个小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕捉板,于室温温育(例如1小时)。然后除去溶液,并用PBS中的0.1%聚山梨酯20 (TWEEN-20®)洗板8次。板干燥后,添加150 μ l/孔闪烁液(MICROSCINT-20™;Packard),然后在TOPCOUNT™伽马计数器(Packard)上对板计数10分钟。选择各Fab给出小于或等于最大结合之20%的浓度用于竞争性结合测定法。

[0230] 依照另一个实施方案,Kd是使用表面等离子共振测定法使用BIAcore®-2000或BIAcore®-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)于25℃使用固定化抗原CM5芯片在大约10个响应单位(RU)测量的。简言之,依照供应商的用法说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠pH 4.8稀释至5 μ g/ml(大约0.2 μ M),然后以5 μ l/分钟的流速注射以获得大约10个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后,注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了动力学测量,于25℃以大约25 μ l/分钟的流速注入在含0.05%聚山梨酯20 (TWEEN-20™)表面活性剂的PBS (PBST)中两倍连续稀释的Fab(0.78nM至500nM)。使用简单一对朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore® Evaluation软件版本3.2)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(Kd)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,那么可使用荧光淬灭技术来测定结合速率,即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯进行的测量,在存在浓度渐增的抗原的情况下,测量PBS pH 7.2中20nM抗抗原抗体(Fab形式)于25℃的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的升高或降低。

[0231] (i) 抗原制备

[0232] 可溶性抗原或其片段(任选缀合有其它分子的)可作为免疫原用于生成抗体。对于跨膜分子,诸如受体,它们的片段(例如受体的胞外结构域)可用作免疫原。或者,表达跨膜分子的细胞可用作免疫原。此类细胞可衍生自天然来源(例如癌细胞系),或者可以是经重组技术转化而表达跨膜分子的细胞。对于制备抗体有用的其它抗原及其形式对于本领域技术人员会是显而易见的。

[0233] (ii) 某些基于抗体的方法

[0234] 多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂来生成。使用双功能或衍生化试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合),N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基),戊二醛,琥珀酸酐, $SOCl_2$ 或 $R^1N=C=NR$,其中R和 R^1 是不同的烃基,将相关抗原与在待免疫物种中有免疫原性的蛋白质缀合可能是有用的,例如匙孔虫凝血蛋白,血清清蛋白,牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0235] 通过将例如100 μ g或5 μ g蛋白质或缀合物(分别用于兔或小鼠)与3倍体积的弗氏完全佐剂混和并将该溶液皮内注射于多个部位,将动物针对抗原,免疫原性缀合物或衍生物进行免疫。一个月后,通过多个部位的皮下注射,用弗氏完全佐剂中初始量1/5-1/10的肽或缀合物对动物进行加强免疫。7-14天后,采集动物的血液,并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫,直到滴度达到平台(plateau)。优选的是,将动物用相同抗原但与不同蛋白质和/或通过不同交联剂缀合得到的缀合物进行加强免疫。缀合物还可在重组细胞培养中

作为蛋白质融合物来制备。同样,适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。

[0236] 本发明的单克隆抗体可使用杂交瘤方法来生成,其首先记载于Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), 并进一步记载于例如Hongo et al., Hybridoma, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), 和Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265-268 (2006), 关于人-人杂交瘤。别的方法包括那些记载于例如U.S. Pat. No. 7,189,826 的, 其关于自杂交瘤细胞系生成单克隆人天然IgM抗体。人杂交瘤技术(三元杂交瘤(Trioma)技术)记载于Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20 (3): 927-937 (2005) 和Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27 (3): 185-91 (2005)。

[0237] 关于各种其它杂交瘤技术, 参见例如美国专利公开文本No. 2006/258841; 2006/183887 (完全人的抗体); 2006/059575; 2005/287149; 2005/100546; 和2005/026229; 和美国专利No. 7,078,492和7,153,507。一种使用杂交瘤方法来生成单克隆抗体的例示性方案记载如下。在一个实施方案中, 免疫小鼠或其它适宜宿主动物(诸如仓鼠)以引发生成或能够生成会特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射本发明的多肽或其片段和佐剂诸如单磷脂酰脂质A (MPL)/海藻糖二棒分枝菌酸酯(TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT), 在动物中生成抗体。本发明的多肽(例如抗原)或其片段可使用本领域公知方法来制备, 诸如重组方法, 其中一些在本文中有进一步描述。对来自经免疫动物的血清测定抗抗原抗体, 并任选施用加强免疫。自生成抗抗原抗体的动物分离淋巴细胞。或者, 在体外免疫淋巴细胞。

[0238] 然后使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞。参见例如Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)。可使用高效融合, 支持选定的抗体生成细胞稳定地高水平生成抗体, 且对培养基诸如HAT培养基敏感的骨髓瘤细胞。例示性的骨髓瘤细胞包括但不限于鼠骨髓瘤系, 诸如那些衍生自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤(可得自索尔克(Salk)研究所细胞分发中心, San Diego, Calif. USA)的, 及SP-2或X63-Ag8-653细胞(可得自美国典型培养物保藏中心, Rockville, Md. USA)的。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也记载用于生成人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0239] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养, 例如含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质的培养基。例如, 若亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT), 则用于杂交瘤的培养基典型的会含有次黄嘌呤, 氨基嘌呤和胸苷(HAT培养基), 这些物质阻止HGPRT缺陷细胞生长。优选地, 使用无血清杂交瘤细胞培养方法来降低动物衍生血清的使用, 诸如胎牛血清, 如记载于例如Even et al., Trends in Biotechnology, 24 (3), 105-108 (2006)。

[0240] 作为提高杂交瘤细胞培养物生产力的工具的寡肽记载于Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111-122 (2005)。具体地, 标准培养基富含某些氨基酸(丙

氨酸,丝氨酸,天冬酰胺,脯氨酸)或蛋白质水解产物级分,而且可通过由3-6个氨基酸残基构成的合成寡肽来显著遏制凋亡。所述肽以毫摩尔或更高浓度存在。

[0241] 可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养液测定结合本发明抗原的单克隆抗体的生成。可通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,诸如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。单克隆抗体的结合亲和力和力可通过例如Scatchard分析来测定。参见例如Munson et al.,*Anal.Biochem.*107:220 (1980)。

[0242] 在鉴定得到生成具有期望特异性,亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,该克隆可通过有限稀释规程进行亚克隆并通过标准方法进行培养(参见例如Goding,见上文)。适于这一目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水瘤进行体内培养。可通过常规免疫球蛋白纯化规程,诸如例如蛋白A-Sepharose,羟磷灰石层析,凝胶电泳,透析或亲和层析,将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养液,腹水或血清适当分开。一种用于自杂交瘤细胞分离蛋白质的规程记载于US 2005/176122和U.S.Pat.No.6,919,436。该方法包括在结合过程中最低限度地使用盐,诸如易溶盐,而且优选还在洗脱过程中使用少量的有机溶剂。

[0243] (iii) 文库衍生的抗体

[0244] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体来分离本发明的抗体。例如,用于生成噬菌体展示文库及对此类文库筛选拥有期望结合特征的抗体的多种方法是本领域中已知的。别的方法综述于例如Hoogenboom et al.,in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al.,ed.,Human Press,Totowa,NJ,2001),并且进一步记载于例如McCafferty et al.,*Nature* 348:552-554;Clackson et al.,*Nature* 352:624-628 (1991);Marks et al.,*J.Mol.Biol.*222:581-597 (1992);Marks and Bradbury,in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo,ed.,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu et al.,*J.Mol.Biol.*338(2):299-310 (2004);Lee et al.,*J.Mol.Biol.*340(5):1073-1093 (2004);Fellouse,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101(34):12467-12472 (2004);及Lee et al.,*J.Immunol.Methods* 284(1-2):119-132 (2004)。

[0245] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因的全集分别通过聚合酶链式反应(PCR)克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以对所述噬菌体文库筛选抗原结合噬菌体,如记载于Winter et al.,*Ann.Rev.Immunol.*12:433-455 (1994)。噬菌体通常以单链Fv(scFv)片段或以Fab片段展示抗体片段。来自经免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以(例如自人)克隆未免疫全集以在没有任何免疫的情况中提供针对一大批非自身和还有自身抗原的抗体的单一来源,如由Griffiths et al.,*EMBO J.* 12:725-734 (1993)描述的。最后,也可以通过自干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区并在体外实现重排来合成生成未免疫文库,如由Hoogenboom and Winter,*J.Mol.Biol.*227:381-388 (1992)所描述的。描述人抗体噬菌体文库的专利公开文本包括例如:美国专利No.5,750,373及美国专利公开文本No.2005/0079574,2005/0119455,2005/0266000,2007/0117126,2007/0160598,2007/0237764,2007/0292936和2009/0002360。

[0246] 认为自人抗体文库分离的抗体或抗体片段是本文中的人抗体或人抗体片段。

[0247] (iv) 嵌合抗体, 人源化抗体和人抗体

[0248] 在某些实施方案中, 本文中提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体记载于例如美国专利No.4,816,567; 及Morrison et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855 (1984)。在一个例子中, 嵌合抗体包含非人可变区(例如自小鼠, 大鼠, 仓鼠, 家兔, 或非人灵长类, 诸如猴衍生的可变区) 和人恒定区。在又一个例子中, 嵌合抗体是“类转换的”抗体, 其中类或亚类已经自亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0249] 在某些实施方案中, 嵌合抗体是人源化抗体。通常, 将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性, 同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地, 人源化抗体包含一个或多个可变域, 其中HVR, 例如CDR(或其部分) 自非人抗体衍生, 而FR(或其部分) 自人抗体序列衍生。任选地, 人源化抗体还会至少包含人恒定区的一部分。在一些实施方案中, 将人源化抗体中的一些FR残基用来自非人抗体(例如衍生HVR残基的抗体) 的相应残基替代, 例如为了恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0250] 人源化抗体及其生成方法综述于例如Almagro and Fransson, Front.Biosci.13:1619-1633 (2008), 并且进一步记载于例如Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033 (1989); 美国专利No.5,821,337, No.7,527,791, No.6,982,321, 和No.7,087,409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (记载SDR(a-CDR) 嫁接); Padlan, Mol.Immunol.28:489-498 (1991) (记载“重修表面”); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (记载“FR改组”); 及Osborn et al., Methods 36:61-68 (2005) 及Klimka et al., Br.J.Cancer 83:252-260 (2000) (记载FR改组的“引导选择”办法)。

[0251] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于: 使用“最佳拟合(best-fit)”方法选择的框架区(参见例如Sims et al., J.Immunol.151:2296 (1993)); 自轻或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生的框架区(参见例如Carter et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285 (1992); 及Presta et al., J.Immunol.151:2623 (1993)); 人成熟的(体细胞突变的) 框架区或人种系框架区(参见例如Almagro and Fransson, Front.Biosci.13:1619-1633 (2008)); 和通过筛选FR文库衍生的框架区(参见例如Baca et al., J.Biol.Chem.272:10678-10684 (1997) 及Rosok et al., J.Biol.Chem.271:22611-22618 (1996))。

[0252] 在某些实施方案中, 本文中提供的抗体是人抗体。可以使用本领域中已知的多种技术来生成人抗体。一般地, 人抗体记载于van Dijk and van de Winkel, Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74 (2001) 及Lonberg, Curr.Opin.Immunol.20:450-459 (2008)。

[0253] 可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体, 所述转基因动物已经修饰为响应抗原性攻击而生成完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有整个或部分人免疫球蛋白基因座, 其替换内源免疫球蛋白基因座, 或者其在染色体外存在或随机整合入动物的染色体中。在此类转基因小鼠中, 一般已经将内源免疫球蛋白基因座灭活。关于自转基因动物获得人抗体的方法的综述参见Lonberg, Nat.Biotech.23:1117-1125 (2005)。还可参见例如美国专利No.6,075,181和No.6,150,584, 其描述了XENOMOUSE™技术; 美国专利No.5,770,429, 其描述了HUMAB®技术; 美国专利No.7,041,870, 其描述了K-M

MOUSE® 技术, 和美国专利申请公开文本 No. US 2007/0061900, 其描述了 VELOCIMOUSE® 技术。可以例如通过与不同人恒定区组合进一步修饰来自此类动物生成的完整抗体的人可变区。

[0254] 也可以通过基于杂交瘤的方法生成抗体。已经描述了用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(参见例如 Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及 Boerner et al., J. Immunol. 147:86 (1991))。经由人 B 细胞杂交瘤技术生成的人抗体也记载于 Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562 (2006)。其它方法包括那些记载于例如美国专利 No. 7,189,826 (其描述了自杂交瘤细胞系生成单克隆人 IgM 抗体) 及 Ni, Xiandai Mianyixue 26 (4):265-268 (2006) (其描述了人-人杂交瘤) 的。人杂交瘤技术 (Trioma 技术) 也记载于 Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology 20 (3):927-937 (2005) 及 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (3):185-91 (2005)。

[0255] 也可以如下生成抗体, 即分离自人衍生的噬菌体展示文库选择的 Fv 克隆可变域序列。然后, 可以将此类可变域序列与期望的人恒定域组合。下文描述了自抗体文库选择抗体的技术。

[0256] (v) 抗体片段

[0257] 抗体片段可以通过传统手段来生成, 诸如酶促消化, 或者通过重组技术来生成。在某些情况中, 使用抗体片段, 而不是完整抗体有优势。片段的较小尺寸容许快速清除, 而且可导致更易于到达实体瘤。某些抗体片段的综述参见 Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134。

[0258] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上, 通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如 Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); 及 Brennan et al., Science 229:81 (1985))。然而, 现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。Fab, Fv 和 scFv 抗体片段都可在大肠杆菌中表达和由大肠杆菌分泌, 如此容许容易地生成大量的这些片段。可从上文讨论的噬菌体抗体库中分离抗体片段。或者, 可直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段并化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。依照另一种方法, 可直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。包含补救受体结合表位残基, 具有延长的体内半衰期的 Fab 和 F(ab')₂ 片段记载于美国专利 No. 5,869,046。用于生成抗体片段的其它技术对于熟练从业人员会是显而易见的。在某些实施方案中, 抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见例如 WO 93/16185; 美国专利 No. 5,571,894; 及 5,587,458。Fv 和 scFv 是具有完整结合位点, 缺少恒定区的唯一类型; 如此, 它们可能适于在体内使用时降低非特异性结合。可构建 scFv 融合蛋白以生成效应器蛋白质在 scFv 的氨基或羧基末端的融合。参见 Antibody Engineering, Borrebaeck 编, 见上文。抗体片段还可以是“线性抗体”, 例如如美国专利 No. 5,641,870 中所记载的。此类线性抗体可以是单特异性的或双特异性的。

[0259] (vi) 多特异性抗体

[0260] 多特异性抗体具有对至少两种不同表位的结合特异性, 其中所述表位通常来自不

同抗原。尽管此类分子通常只结合两种不同表位(即双特异性抗体, BsAb), 但是此表述在用于本文时涵盖具有额外特异性的抗体, 诸如三特异性抗体。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段(例如 $F(ab')_2$ 双特异性抗体)。

[0261] 用于构建双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达, 其中两种链具有不同的特异性(参见例如 Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配, 这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))生成10种不同抗体分子的潜在混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦且产物产量低。类似的规程披露于W0 93/08829及Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)。

[0262] 本领域已知的用于生成双特异性抗体的一种办法是“节-入-穴”或“隆起-入-空腔”办法(参见例如美国专利No. 5, 731, 168)。在这种办法中, 两条免疫球蛋白多肽(例如重链多肽)各自包含一个界面。一条免疫球蛋白多肽的界面与另一免疫球蛋白多肽上的对应界面相互作用, 由此容许两条免疫球蛋白多肽联合。可以改造这些界面, 使得位于一条免疫球蛋白多肽的界面中的“节”或“隆起”(这些术语在本文中可互换使用)对应于位于另一免疫球蛋白多肽的界面中的“穴”或“空腔”(这些术语在本文中可互换使用)。在一些实施方案中, 穴具有与节相同或相似的尺寸, 而且位置恰当, 使得当两个界面相互作用时, 一个界面的节可位于另一界面的对应穴中。不希望受理论束缚, 认为这稳定异二聚体且有利于异多聚体形成胜过其它种类, 例如同多聚体。在一些实施方案中, 这种办法可用于促进两种不同免疫球蛋白多肽的异多聚化, 创建包含具有针对不同表位的结合特异性的两条免疫球蛋白多肽的双特异性抗体。

[0263] 在一些实施方案中, 节可以通过将小氨基酸侧链用更大侧链替换来构建。在一些实施方案中, 穴可以通过将大氨基酸侧链用更小侧链替换来构建。节或穴可以存在于原始界面中, 或者可以合成引入。例如, 可以通过改变编码界面的核酸序列, 将至少一个“原始”氨基酸残基用至少一个“输入”氨基酸残基替换来合成引入节或穴。用于改变核酸序列的方法可包括本领域公知的标准分子生物学技术。下文表中显示了各种氨基酸残基的侧链体积。在一些实施方案中, 原始残基具有较小侧链体积(例如丙氨酸, 天冬酰胺, 天冬氨酸, 甘氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 或缬氨酸), 而用于形成节的输入残基是天然发生氨基酸, 而且可以包括精氨酸, 苯丙氨酸, 酪氨酸, 和色氨酸。在一些实施方案中, 原始残基具有较大侧链体积(例如精氨酸, 苯丙氨酸, 酪氨酸, 和色氨酸), 而用于形成穴的输入残基是天然发生氨基酸, 而且可以包括丙氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 和缬氨酸。

[0264] 表1: 氨基酸残基的特性

	氨基酸	单字母缩写	质量 ^a (道尔顿)	体积 ^b (Å ³)	可及表面积 ^c (Å ²)
[0265]	丙氨酸(Ala)	A	71.08	88.6	115
	精氨酸(Arg)	R	156.20	173.4	225
	天冬酰胺(Asn)	N	114.11	117.7	160
	天冬氨酸(Asp)	D	115.09	111.1	150
	半胱氨酸(Cys)	C	103.14	108.5	135
	谷氨酰胺(Gln)	Q	128.14	143.9	180
	谷氨酸(Glu)	E	129.12	138.4	190
	甘氨酸(Gly)	G	57.06	60.1	75
	组氨酸(His)	H	137.15	153.2	195
	异亮氨酸(Ile)	I	113.17	166.7	175
	亮氨酸(Leu)	L	113.17	166.7	170
	赖氨酸(Lys)	K	128.18	168.6	200
	甲硫氨酸(Met)	M	131.21	162.9	185
	苯丙氨酸(Phe)	F	147.18	189.9	210
	脯氨酸(Pro)	P	97.12	122.7	145
	丝氨酸(Ser)	S	87.08	89.0	115
[0266]	苏氨酸(Thr)	T	101.11	116.1	140
	色氨酸(Trp)	W	186.21	227.8	255
	酪氨酸(Tyr)	Y	163.18	193.6	230
	缬氨酸 (Val)	V	99.14	140.0	155

[0267] ^a氨基酸的分子量减去水的分子量。数值来自Handbook of Chemistry and Physics, 43rd ed., Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961。

[0268] ^b数值来自A.A.Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972。

[0269] ^c数值来自C.Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975。可及表面积在此参考文献的图6-20定义。

[0270] 在一些实施方案中,基于异多聚体的三维结构鉴定用于形成节或穴的原始残基。本领域已知的用于获得三维结构的技术可以包括X射线结晶学和NMR。在一些实施方案中,界面是免疫球蛋白恒定域的CH3域。在这些实施方案中,人IgG1的CH3/CH3界面涉及每个域上位于四条反平行β链上的16个残基。不希望受理论束缚,突变的残基优选位于两条中央反平行β链上以最小化节会被周围溶剂,而非配偶CH3域中的补充穴容纳的风险。在一些实施方案中,两条免疫球蛋白多肽中形成对应节和穴的突变对应于下文表中提供的一对或多对。

[0271] 表2:对应节和穴形成突变的例示性套组

[0272]	第一免疫球蛋白的CH3	第二免疫球蛋白的CH3
	T366Y	Y407T
	T366W	Y407A
	F405A	T394W
	Y407T	T366Y
	T366Y:F405A	T394W:Y407T
	T366W:F405W	T394S:Y407A
	F405W:Y407A	T366W:T394S
	F405W	T394S

[0273] 通过原始残基,接着是使用Kabat编号系统的位置,然后是输入残基来表示突变(所有残基以单字母氨基酸代码给出)。多重突变以冒号分开。

[0274] 在一些实施方案中,免疫球蛋白多肽包含包含一处或多处上文表2中列出的氨基酸替代的CH3域。在一些实施方案中,双特异性抗体包含第一免疫球蛋白多肽,其包含包含一处或多处表2左栏中列出的氨基酸替代的CH3域,和第二免疫球蛋白多肽,其包含包含一处或多处表2右栏中列出的对应氨基酸替代的CH3域。

[0275] 如上所述突变DNA后,可以使用标准重组技术和本领域已知的细胞系统,表达编码具有一处或多处对应节或穴形成突变的经修饰免疫球蛋白多肽的多核苷酸,并纯化。参见例如美国专利No.5,731,168;5,807,706;5,821,333;7,642,228;7,695,936;8,216,805;美国公开文本No.2013/0089553;和Spiess et al.,Nature Biotechnology 31:753-758, 2013。可以使用原核宿主细胞,诸如大肠杆菌,或真核宿主细胞,诸如CHO细胞生成经修饰免疫球蛋白多肽。可以作为异多聚体一起在共培养物中在宿主细胞中表达携带对应节和穴的免疫球蛋白多肽,并纯化,或者可以在多个单培养物中表达,分开纯化,并在体外组装。在一些实施方案中,使用本领域已知的标准细菌培养技术共培养两株细菌宿主细胞(一株表达具有节的免疫球蛋白多肽,另一株表达具有穴的免疫球蛋白多肽)。在一些实施方案中,可以以特定比例混合两种株,例如为了在培养物中实现相等的表达水平。在一些实施方案中,可以以50:50,60:40,或70:30比例混合两种株。在多肽表达后,可以一起裂解细胞,并可以提取蛋白质。本领域已知的容许测量同多聚体对异多聚体种类丰度的标准技术可以包括大小排阻层析。在一些实施方案中,使用标准重组技术分开表达每一种经修饰免疫球蛋白多肽,并可以在体外将它们组装到一起。可以例如通过纯化每一种经修饰免疫球蛋白多肽,以相等的质量将它们一起混合并温育,还原二硫化物(例如通过用二硫苏糖醇处理),浓缩,并重氧化多肽来实现组装。可以使用标准技术(包括阳离子交换层析)来纯化形成的双特异性抗体,并使用标准技术(包括大小排阻层析)来测量。对于这些方法更加详细的描述,参见Speiss et al.,Nat Biotechnol 31:753-8,2013。在一些实施方案中,可以在CHO细胞中分开表达经修饰免疫球蛋白多肽,并使用上文所述方法在体外组装。

[0276] 依照一种不同的方法,将具有期望结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。优选的是,与包含至少部分铰链,CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定域进行融合。通常在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物和,在需要时,免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体中,并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等

时提供最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比例表达导致高产量时或在该比例没有特别意义时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体。

[0277] 在该方法的一个实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了便利的分离途径,因此发现这种不对称结构便于将期望的双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法披露于W0 94/04690。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)。

[0278] 依照W096/27011中记载的另一种方法,可改造一对抗体分子间的界面,以将从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。一种界面包含抗体恒定域的至少部分 C_H3 结构域。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过将大氨基酸侧链用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

[0279] 双特异性抗体包括交联的或“异源缀合的”抗体。例如,可以将异源缀合物中的一种抗体与亲合素偶联,而将另一种抗体与生物素偶联。此类抗体已经建议用于例如将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利No. 4,676,980)和用于治疗HIV感染(WO 91/00360, WO 92/200373, 和EP 03089)。异源缀合抗体可以使用任何方便的交联方法来制备。合适的交联剂连同许多交联技术是本领域众所周知的,而且披露于美国专利No. 4,676,980。

[0280] 文献中还记载了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) 记载了通过蛋白水解切割完整抗体以生成 $F(ab')_2$ 片段的规程。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将 $Fab'-TNB$ 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 $Fab'-$ 硫醇,并与等摩尔量的另一种 $Fab'-TNB$ 衍生物混合,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

[0281] 最新的进展便于从大肠杆菌直接回收 $Fab'-SH$ 片段,这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) 记载了完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的生成。由大肠杆菌分开分泌每种 Fab' 片段,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。

[0282] 还记载了从重组细胞培养物直接生成和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原以形成单体,然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) 记载的“双抗体”技术提供了构建双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L),所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结

构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链Fv (sFv) 二聚体构建双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)。

[0283] 用于生成双特异性抗体片段的另一种技术是“双特异性T细胞衔接器”(engager)或BiTE®办法(参见例如W02004/106381, W02005/061547, W02007/042261, 和W02008/119567)。这种办法利用在单一多肽上排列的两种抗体可变域。例如,单一多肽链包括两个单链Fv (scFv) 片段,每个具有由多肽接头分开的一个可变重链(V_H)域和一个可变轻链(V_L)域,多肽接头的长度足以容许两个域之间的分子内联合。此单一多肽进一步包括两个scFv片段之间的多肽间隔物序列。每个scFv识别不同的表位,而且这些表位可以是不同细胞类型特异性的,使得当每种scFv啮合其关联表位时两种不同细胞类型的细胞变成紧密接近或系留。这种办法的一个具体实施方案包括识别由免疫细胞表达的细胞表面抗原(例如T细胞上的CD3多肽)的scFv连接识别由靶细胞(诸如恶性或肿瘤细胞)表达的细胞表面抗原的另一scFv。

[0284] 因为它是单一多肽,所以双特异性T细胞衔接器可以使用本领域已知的任何原核或真核细胞表达系统(例如CHO细胞系)来表达。然而,特定纯化技术(参见例如EP1691833)对于分开单体双特异性T细胞衔接器与其它多聚体种类(其可能具有与单体的预定活性不同的生物学活性)可能是必需的。在一种例示性纯化方案中,首先对含有分泌多肽的溶液进行金属亲和层析,并用咪唑浓度的梯度洗脱多肽。使用阴离子交换层析进一步纯化此洗出液,并使用氯化钠浓度的梯度洗脱多肽。最后,对此洗出液进行大小排阻层析以分开单体与多聚体种类。

[0285] 设想了具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。参见例如Tuft et al., J. Immunol., 147:60 (1991)。

[0286] (vii) 单域抗体

[0287] 在有些实施方案中,本发明的抗体是单域抗体(single-domain antibody)。单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域或者整个或部分轻链可变域的单一多肽链。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体(Domantis, Inc., Waltham, Mass.; 参见例如美国专利No. 6,248,516 B1)。在一个实施方案中,单域抗体由抗体的整个或部分重链可变域组成。

[0288] (viii) 抗体变体

[0289] 在有些实施方案中,涵盖本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过将适宜的变化引入编码抗体的核苷酸序列或通过肽合成制备的。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基删除和/或插入和/或替代。可进行任何删除,插入和替代组合以获得最终的构建物,倘若最终的构建物具有期望的特征。可在制备序列时将氨基酸改变引入受试抗体的氨基酸序列。

[0290] (ix) 替代,插入,和删除变体

[0291] 在某些实施方案中,提供具有一处或多处氨基酸替代的抗体变体。替代诱变感兴趣的位点包括HVR和FR。优选替代在表3中在“优选的替代”的标题下显示。更实质的变化在表3中在“例示性替代”的标题下提供,并且如下文参照氨基酸侧链类别进一步描述的。可以将氨基酸替代引入感兴趣的抗体中,并且对产物筛选期望的活性,例如保留/改善的抗原结合,降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC。

[0292] 表3:例示性替代

[0293]	初始残基	例示性替代	优选的替代
	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
[0294]	Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0295] 依照共同的侧链特性,氨基酸可以如下分组:

[0296] a. 疏水性的:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0297] b. 中性,亲水性的: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0298] c. 酸性的: Asp, Glu;

[0299] d. 碱性的: His, Lys, Arg;

[0300] e. 影响链取向的残基: Gly, Pro;

[0301] f. 芳香族的: Trp, Tyr, Phe。

[0302] 非保守替代会需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的。

[0303] 一类替代变体牵涉替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般地,为进一步研究选择的所得变体相对于亲本抗体会具有某些生物学特性的改变(例如改善)(例如升高的亲和力,降低的免疫原性)和/或会基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。一种例示性替代变体是亲和力成熟抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲合力成熟技术诸如本文中所描述的那些技术来方便地生成。简言之,将一个或多个HVR残基

突变,并将变体抗体在噬菌体上展示,并对其筛选特定的生物学活性(例如结合亲和力)。

[0304] 可以在HVR中做出变化(例如替代),例如为了改善抗体亲和力。可以在HVR“热点”即由在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子编码的残基(参见例如Chowdhury, *Methods Mol.Biol.* 207:179-196 (2008))和/或SDR(a-CDR)中做出此类变化,对所得变体VH或VL测试结合亲和力。通过次级文库的构建和再选择进行的亲和力成熟已经记载于例如Hoogenboom et al., in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR,链改组,或寡核苷酸指导的诱变)任一将多样性引入为成熟选择的可变基因。然后,创建次级文库。然后,筛选文库以鉴定具有期望亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法牵涉HVR指导的办法,其中将数个HVR残基(例如一次4-6个残基)随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性鉴定牵涉抗原结合的HVR残基。特别地,经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0305] 在某些实施方案中,可以在一个或多个HVR内发生替代,插入,或删除,只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中做出保守变化(例如保守替代,如本文中提供的),其没有实质性降低结合亲和力。此类变化可以在HVR“热点”或SDR以外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR或是未改变的,或是含有不多于1, 2或3处氨基酸替代。

[0306] 一种可用于鉴定抗体中可作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如记载于Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)。在这种方法中,鉴定一个残基或一组靶残基(例如带电荷的残基,诸如Arg, Asp, His, Lys, 和Glu),并用中性或带负电荷的氨基酸(例如丙氨酸或多丙氨酸)替换以测定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在对初始替代表明功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的替代。或者/另外,利用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原之间的接触点。作为替代的候选,可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基。可以筛选变体以确定它们是否含有期望特性。

[0307] 氨基酸序列插入包括长度范围为1个残基至含有100或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N或C端与酶(例如对于ADEPT)或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0308] (x)糖基化变体

[0309] 在某些实施方案中,改变本文中提供的抗体以提高或降低抗体糖基化的程度。可以通过改变氨基酸序列,使得创建或消除一个或多个糖基化位点来方便地实现对抗体添加或删除糖基化位点。

[0310] 在抗体包含Fc区的情况中,可以改变附着于Fc区的碳水化合物。由哺乳动物细胞生成的天然抗体通常包含分支的,双触角寡糖,其一般通过N连接附着于Fc区的CH2域的Asn297。参见例如Wright et al., *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如甘露糖, N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc), 半乳糖, 和唾液酸, 以及附着于双触角寡糖结构“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以对本发明抗体中的寡糖进行修饰以创建具有某些改良特性的抗体变体。

[0311] 在一个实施方案中,提供包含如下Fc区的抗体变体,其中附着于Fc区的碳水化合

物结构具有减少的岩藻糖或缺乏岩藻糖,这可改善ADCC功能。具体而言,本文中涵盖如下的抗体,其具有相对于在野生型CHO细胞中生成的相同抗体上岩藻糖的量减少的岩藻糖。就是说,它们特征在于具有比如果由天然CHO细胞(例如生成天然糖基化样式的CHO细胞,诸如含有天然FUT8基因的CHO细胞)生成的话它们会具有的量降低的量的岩藻糖。在某些实施方案中,该抗体是如下的抗体,其上少于约50%,40%,30%,20%,10%,或5%的N连接的聚糖包含岩藻糖。例如,此类抗体中的岩藻糖的量可以是1%至80%,1%至65%,5%至65%或20%至40%。在某些实施方案中,该抗体是如下的抗体,其上无一N连接的聚糖包含岩藻糖,即其中该抗体完全没有岩藻糖,或者没有岩藻糖或是无岩藻糖基化的。通过相对于附着于Asn297的所有糖结构(例如复合的,杂合的和高甘露糖的结构)的总和,计算Asn297处糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖量,如通过MALDI-TOF质谱术测量的,例如如记载于WO 2008/077546的。Asn297指位于Fc区中的约第297位(Fc区残基的EU编号方式)的天冬酰胺残基;然而,Asn297也可以由于抗体中的微小序列变异而位于第297位上游或下游约 ± 3 个氨基酸,即在第294位和第300位之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开文本No.US 2003/0157108(Presta,L.);US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。涉及“脱岩藻糖基化的”或“岩藻糖缺乏的”抗体变体的出版物的例子包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO 2005/053742;WO 2002/031140;Okazaki et al.,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki et al.,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够生成脱岩藻糖基化抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka et al.,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请No US 2003/0157108 A1;及WO 2004/056312 A1,尤其在实施例11),和敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki et al.,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.et al.,Biotechnol.Bioeng.94(4):680-688(2006);及WO 2003/085107)。

[0312] 进一步提供具有两分型寡糖的抗体变体,例如其中附着于抗体Fc区的双触角寡糖是通过GlcNAc来两分的。此类抗体变体可具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的例子记载于例如WO 2003/011878;美国专利No.6,602,684;US 2005/0123546;及Ferrara et al.,Biotechnology and Bioengineering,93(5):851-861(2006)。还提供在附着于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可具有改善的CDC功能。此类抗体变体记载于例如WO 1997/30087;WO 1998/58964;及WO 1999/22764。

[0313] 在某些实施方案中,包含本文所述Fc区的抗体变体能够结合Fc γ RIII。在某些实施方案中,包含本文所述Fc区的抗体变体在人效应细胞存在下具有ADCC活性或在人效应细胞存在下具有与包含人野生型IgG1Fc区的其它方面相同的抗体相比升高的ADCC活性。

[0314] (xi)Fc区变体

[0315] 在某些实施方案中,可以将一处或多处氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的Fc区中,由此生成Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰(例如替代)的人Fc区序列(例如人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4 Fc区)。

[0316] 在某些实施方案中,本发明涵盖拥有一些但不是所有效应器功能的抗体变体,所述效应器功能使其成为如下应用的期望候选物,其中抗体的体内半衰期是重要的,而某些效应器功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定法以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消减。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定法以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此有可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI,Fc γ RII和Fc γ RIII。在Ravetch and Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页上的表3中汇总了造血细胞上的FcR表达。评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性例子记载于美国专利No.5,500,362(参见例如Hellstrom et al.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))及Hellstrom,I.et al.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann et al.,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。或者,可以采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTITM非放射性细胞毒性测定法(CellTechnology,Inc.,Mountain View,CA;和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定法(Promega,Madison,WI))。对于此类测定法有用的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外,可以在体内评估感兴趣分子的ADCC活性,例如在动物模型中,诸如披露于Clynes et al.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)的。也可以实施C1q结合测定法以确认抗体不能结合C1q,并且因此缺乏CDC活性。参见例如W0 2006/029879和W0 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以实施CDC测定法(参见例如Gazzano-Santoro et al.,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg et al.,Blood 101:1045-1052(2003);及Cragg et al.,Blood 103:2738-2743(2004))。也可以使用本领域中已知的方法来实施FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如Petkova et al.,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0317] 具有降低的效应器功能的抗体包括那些具有Fc区残基238,265,269,270,297,327和329中的一个或多个的替代的(美国专利No.6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265,269,270,297和327中的两处或更多处具有替代的Fc突变体,包括残基265和297替代成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利No.7,332,581)。

[0318] 描述了具有改善的或降低的对FcR的结合的某些抗体变体(参见例如美国专利No.6,737,056;W0 2004/056312;及Shields et al.,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0319] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有改善ADCC的一处或多处氨基酸替代(例如Fc区位置298,333,和/或334(EU残基编号方式)的替代)的Fc区。在一个例示性实施方案中,抗体在它的Fc区中包含下述氨基酸替代:S298A,E333A,和K334A。

[0320] 在一些实施方案中,在Fc区中做出改变,其导致改变的(即改善的或降低的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如记载于美国专利No.6,194,551;W0 99/51642;及Idusogie et al.,J.Immunol.164:4178-4184(2000)的。

[0321] 具有延长的半衰期和改善的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体记载于US 2005/0014934 A1(Hinton等),新生儿Fc受体(FcRn)负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer et al.,J.Immunol.117:587(1976)及Kim et al.,J.Immunol.24:249(1994))。那些抗体包含具有改善Fc区对FcRn的结合的一处或多处替代的Fc区。此类Fc变体包括那些在Fc区残基

238,256,265,272,286,303,305,307,311,312,317,340,356,360,362,376,378,380,382,413,424或434中的一处或多处具有替代(例如Fc区残基434的替代)的(美国专利No.7,371,826)。还可参见Duncan and Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利No.5,648,260;美国专利No.5,624,821;及WO 94/29351,其关注Fc区变体的其它例子。

[0322] (xii) 抗体衍生物

[0323] 可进一步修饰本发明的抗体以包含本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质模块。在某些实施方案中,适于抗体衍生化的模块是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG),乙二醇/丙二醇共聚物,羧甲基纤维素,右旋糖苷,聚乙烯醇,聚乙烯吡咯烷酮,聚-1,3-二氧戊环,聚-1,3,6-三口恶烷,乙烯/马来酸酐共聚物,聚氨基酸(均聚物或随机共聚物),右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇,丙二醇均聚物,环氧丙烷/环氧乙烷共聚物,聚氧乙烯化多元醇(例如甘油),聚乙烯醇,及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量,而且可以是分支的或不分支的。附着于抗体的聚合物数目可以变化,而且如果附着了超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可根据下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于待改进抗体的具体特性或功能,抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

[0324] (xiii) 载体,宿主细胞,和重组方法

[0325] 也可以使用重组方法来生成抗体。为了重组生产抗抗原抗体,分离编码抗体的核酸,并将其插入可复制载体,用于进一步克隆(DNA扩增)或表达。可使用常规规程容易的分离编码抗体的DNA并测序(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针)。可利用许多载体。载体构件通常包括但不限于下列一种或多种:信号序列,复制起点,一种或多种标志基因,增强子元件,启动子,和转录终止序列。

[0326] (a) 信号序列构件

[0327] 本发明的抗体不仅可以直接重组生产,而且可以作为与异源多肽的融合多肽重组生产,所述异源多肽优选是成熟蛋白质或多肽的N-末端处的信号序列或具有特异性切割位点的其它多肽。所选择的异源信号序列优选是受到宿主细胞识别并加工(例如受到信号肽酶切割)的。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,所述信号序列用例如选自碱性磷酸酶,青霉素酶,1pp或热稳定肠毒素II前导序列的原核信号序列取代。为了酵母分泌,天然信号序列可以用例如酵母转化酶前导序列, α 因子前导序列(包括糖酵母属和克鲁维氏酵母属 α 因子前导序列),酸性磷酸酶前导序列,白色假丝酵母葡萄糖淀粉酶前导序列,或WO 90/13646中记载的信号取代。在哺乳动物细胞表达中,可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹gD信号。

[0328] (b) 复制起点

[0329] 表达和克隆载体都包含能够使载体在一种或多种所选择的宿主细胞中复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,这种序列是能够使载体不依赖于宿主染色体DNA而复制的序列,包括复制起点或自主复制序列。众所周知多种细菌,酵母和病毒的此类序列。来自质粒pBR322的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适合于酵母,而各种病毒起点(SV40,多瘤病毒,腺病毒,VSV或BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。一般而言,哺乳动物表达载体不需要复制起点构件(SV40起点的使用通常可能只是因为它包含早期启动

子)。

[0330] (c) 选择基因构件

[0331] 表达和克隆载体可包含选择基因,也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a) 赋予抗生素或其它毒素抗性,例如氨基糖苷类,新霉素,甲氨蝶呤,或四环素;(b) 补足营养缺陷;或(c) 提供不能由复合培养基获得的关键营养物,例如编码芽孢杆菌D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0332] 选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质,因而幸免于选择方案。此类显性选择的实例使用药物新霉素,霉酚酸和潮霉素。

[0333] 适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个例子是能够鉴定有能力摄取抗体编码核酸的细胞的选择标志,诸如DHFR,谷氨酰胺合酶(GS),胸苷激酶,金属硫蛋白-I和-II优选灵长类金属硫蛋白基因,腺苷脱氨酶,鸟氨酸脱羧酶等。

[0334] 例如,通过将转化子在含有甲氨蝶呤(Mtx)(DHFR的一种竞争性拮抗剂)的培养基中进行培养来鉴定经DHFR基因转化的细胞。在这些条件下,DHFR基因与任何其它共转化的核酸一起扩增。可使用内源DHFR活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(例如ATCC CRL-9096)。

[0335] 或者,通过将转化子在含有L-甲硫氨酸亚砷亚胺(Msx)(L-methionine sulfoximine)(GS的一种抑制剂)的培养基中进行培养来鉴定经GS基因转化的细胞。在这些条件下,GS基因与任何其它共转化的核酸一起扩增。可以与上文描述的DHFR选择/扩增系统组合地使用GS选择/扩增系统。

[0336] 或者,可以通过在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷类抗生素例如卡那霉素,新霉素,或G418的培养基中的细胞生长来选择经编码感兴趣抗体,野生型DHFR基因,和另一种选择标志诸如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)的DNA序列转化或共转化的宿主细胞(特别是包含内源DHFR的野生型宿主)。参阅美国专利4,965,199。

[0337] 适用于酵母的选择基因因为存在于酵母质粒YRp7中的trp1基因(Stinchcomb et al.,Nature 282:39(1979))。trp1基因因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株,例如ATCC No.44076或PEP4-1提供了选择标志。Jones,Genetics 85:12(1977)。酵母宿主细胞基因组中存在trp1损害随之提供了用于通过在不存在色氨酸下生长来检测转化的有效环境。类似的,用携带Leu2基因的已知质粒补足Leu2缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)。

[0338] 此外,衍生自1.6 μ m环状质粒pKD1的载体可用于转化克鲁维氏酵母属酵母。或者,报导了用于在乳酸克鲁维氏酵母中大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。Van den Berg,Bio/Technology 8:135(1990)。还披露了用于通过克鲁维氏酵母属的工业菌株分泌成熟重组人血清蛋白的稳定多拷贝表达载体。Fleer et al.,Bio/Technology 9:968-975(1991)。

[0339] (d) 启动子构件

[0340] 表达和克隆载体一般包含受到宿主生物体识别的启动子,而且它与编码抗体的核酸可操作连接。适用于原核宿主的启动子包括phoA启动子, β -内酰胺酶和乳糖启动子系统,碱性磷酸酶启动子,色氨酸(trp)启动子系统,和杂合启动子诸如tac启动子。然而,其它已知的细菌启动子也是合适的。用于细菌系统的启动子还将包含与编码抗体的DNA可操作连

接的Shine-Dalgarno (S.D.) 序列。

[0341] 已知真核细胞的启动子序列。事实上,所有真核基因都具有富含AT区,它位于起始转录的位点上游大约25至30个碱基处。在许多基因的转录起点上游70至80个碱基处找到的另一种序列是CNCAAT区,其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'端是AATAAA序列,它可能是向编码序列的3'端添加聚腺苷酸尾的信号。所有这些序列合适地插入真核表达载体。

[0342] 适用于酵母宿主的启动子序列的例子包括3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子,诸如烯醇酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,己糖激酶,丙酮酸脱羧酶,磷酸果糖激酶,葡萄糖-6-磷酸异构酶,3-磷酸甘油酸变位酶,丙酮酸激酶,磷酸丙糖异构酶,磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0343] 作为具有通过生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶2,异细胞色素C,酸性磷酸酶,与氮代谢有关的降解酶,金属硫蛋白,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步记载于EP 73,657。酵母增强子也可以有利的与酵母启动子一起使用。

[0344] 抗体在哺乳动物宿主细胞中自载体的转录可通过例如从病毒诸如多瘤病毒,禽痘病毒,腺病毒(诸如腺病毒2),牛乳头瘤病毒,禽类肉瘤病毒,巨细胞病毒,逆转录病毒,乙肝病毒,猿猴病毒40 (SV40) 基因组,或从异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,及从热休克启动子获得的启动子来控制,倘若此类启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0345] 方便的以SV40限制性片段的形式获得SV40病毒的早期和晚期启动子,该片段还包含SV40病毒复制起点。方便的以HindIII E限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利No.4,419,446中披露了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。美国专利No.4,601,978中记载了该系统的一种改良。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素cDNA还可参见Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)。或者,可以使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0346] (e) 增强子元件构件

[0347] 常常通过将增强子序列插入载体来提高高等真核细胞对编码本发明抗体的DNA的转录。现在知道来自哺乳动物基因(球蛋白,弹性蛋白酶,清蛋白,甲胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而,通常使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括SV40复制起点晚期一侧的增强子(bp 100-270),巨细胞病毒早期启动子增强子,多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子,和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)。可以将增强子剪接到载体中,位于抗体编码序列的5'或3'位置,但是优选位于启动子的5'位点。

[0348] (f) 转录终止构件

[0349] 用于真核宿主细胞(酵母,真菌,昆虫,植物,动物,人或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还将包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可以从真核或病毒DNA或cDNA非翻译区的5'端和偶尔的3'端获得。这些区域包含在编码抗体的mRNA的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛

生长激素聚腺苷酸化区。参见WO 94/11026及其中披露的表达载体。

[0350] (g) 宿主细胞的选择和转化

[0351] 适于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞是上文描述的原核生物,酵母或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科,诸如埃希氏菌属(*Escherichia*) 例如大肠埃希氏菌或大肠杆菌(*E.coli*), 肠杆菌属(*Enterobacter*), 欧文氏菌属(*Erwinia*), 克雷伯氏菌属(*Klebsiella*), 变形菌属(*Proteus*), 沙门氏菌属(*Salmonella*) 例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*), 沙雷氏菌属(*Serratia*) 例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*), 志贺氏菌属(*Shigella*), 以及芽孢杆菌属(*Bacilli*) 诸如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*) 和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*) (例如1989年4月12日公布的DD 266,710中披露的地衣芽孢杆菌41P), 假单胞菌属(*Pseudomonas*) 诸如铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*), 和链霉菌属(*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294 (ATCC 31,446), 尽管其它菌株诸如大肠杆菌B, 大肠杆菌X1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌W3110 (ATCC 27,325) 也是合适的。这些例子是例示性的,而不是限制性的。

[0352] 可以在细菌中生产全长抗体,抗体融合蛋白,和抗体片段,特别是在不需要糖基化和Fc效应器功能时,诸如在将治疗性抗体缀合至自身在肿瘤细胞破坏方面显示出效力的细胞毒剂(例如毒素)时。全长抗体在循环中具有较长的半衰期。大肠杆菌中的生成是较快的且较合算的。对于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如美国专利No.5,648,237 (Carter et.al.), 美国专利No..5,789,199 (Joly et al.), 美国专利No.5,840,523 (Simmons et al.), 其描述了使表达和分泌优化的翻译起始区(TIR)和信号序列。还可参见Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 卷248 (B.K.C.Lo, 编, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp.245-254, 其描述了在大肠杆菌中表达抗体片段。表达后,可以在可溶性级分中自大肠杆菌细胞浆液分离抗体,并可以通过例如蛋白A或G柱(取决于同种型)来纯化抗体。可以实施最终的纯化,其类似于用于纯化在例如CHO细胞中表达的抗体的工艺。

[0353] 在原核生物以外,真核微生物(诸如丝状真菌或酵母)也是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。啤酒糖酵母或酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常用的面包酵母在最常用的低等真核宿主微生物之中。然而,通常可获得许多其它属,种和菌株且可用于本发明,诸如粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*) 宿主,诸如例如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*), 脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC 12,424), 保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045), 威克克鲁维酵母(*K.wickerhamii*) (ATCC 24,178), *K.waltii* (ATCC 56,500), 果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*) (ATCC 36,906), 耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母(*K.marxianus*);亚罗酵母属(*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母属(*Candida*);瑞氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*), 诸如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌,诸如例如脉孢菌属(*Neurospora*), 青霉属(*Penicillium*), 弯颈霉属(*Tolypocladium*), 和曲霉属(*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉(*A.nidulans*) 和黑曲霉(*A.niger*)。关于讨论酵母和丝状真菌用于生产治疗性蛋白质的用途的综述参见例如Gerngross, *Nat.Biotech.*22:1409-1414 (2004)。

[0354] 可选择如下的某些真菌和酵母株,其中糖基化途径已经“人源化”,导致具有部分或完全人的糖基化样式的抗体的生成。参见例如Li et al.,Nat.Biotech.24:210-215 (2006) (记载了巴斯德毕赤氏酵母中糖基化途径的人源化);及Gerngross et al.,见上文。

[0355] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞,它们来自诸如草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫),埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子),白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子),黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (果蝇)和家蚕(*Bombyx mori*)等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染,例如苜蓿尺蠖*Autographa californica* NPV的L-1变体和家蚕*Bombyx mori* NPV的Bm-5株,而且此类病毒可依照本发明用作本文中的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。

[0356] 还可利用棉,玉米,马铃薯,大豆,矮牵牛,番茄,浮萍(Leninaceae),苜蓿(*M.truncatula*),和烟草的植物细胞培养物作为宿主。参见例如美国专利No.5,959,177;6,040,498;6,420,548;7,125,978;和6,417,429(描述用于在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0357] 可使用脊椎动物细胞作为宿主,而且培养(组织培养)中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规规程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子是经SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾系(293或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的293细胞,Graham et al.,J.Gen Virol.36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1,ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳瘤(MMT 060562,ATCC CCL 51);TRI细胞(Mather et al.,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982);MRC5细胞;FS4细胞;和人肝瘤系(Hep G2)。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系,诸如NS0和Sp2/0。关于适合于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参阅例如Yazaki and Wu,Methods in Molecular Biology,卷248(B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),pp.255-268。

[0358] 用上文所述用于生产抗体的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在为了诱导启动子,选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当更改的常规营养培养基中进行培养。

[0359] (h) 培养宿主细胞

[0360] 可以在多种培养基中培养用于生产本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如Ham氏F10(Sigma),极限必需培养基(MEM,Sigma),RPMI-1640(Sigma),和Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基(DMEM,Sigma)适于培养宿主细胞。另外,可以使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基:Ham et al.,Meth.Enz.58:44(1979);Barnes et al.,Anal.Biochem.102:255(1980);美国专利No.4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利Re.30,985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素,运铁蛋白或表皮生长因子),盐(诸如氯化钠,钙,镁和磷酸盐),缓冲剂(诸如HEPES),核苷酸(诸如腺苷和胸苷),抗生素(诸如

GENTAMYCINTM药物),痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物),和葡萄糖或等能源。还可以以适宜浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件(诸如温度,pH等)就是先前为表达而选择用于宿主细胞的,这对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0361] (xiv) 抗体的纯化

[0362] 在使用重组技术时,可以在细胞内,在周质空间中生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,通过例如离心或超滤除去宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter et al.,Bio/Technology 10:163-167 (1992) 记载了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的规程。简单的说,在存在乙酸钠(pH 3.5),EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)时使细胞糊融化约30分钟。可通过离心除去细胞碎片。如果将抗体分泌到培养基中,那么一般首先使用商品化蛋白质浓缩滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元浓缩来自此类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括蛋白酶抑制剂诸如PMSF来抑制蛋白水解,而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

[0363] 可以使用例如羟磷灰石层析,疏水相互作用层析,凝胶电泳,透析和亲和层析来纯化由细胞制备的抗体组合物,其中亲和层析是通常优选的纯化步骤之一。蛋白A作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark et al.,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。蛋白G推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss et al.,EMBO J.5:1567-1575(1986))。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能够获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含C_H3结构域,则可使用Bakerbond ABXTM树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,NJ)进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱上的分级,乙醇沉淀,反相HPLC,硅土上的层析,肝素SEPHAROSETM上的层析,阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析,层析聚焦,SDS-PAGE,和硫酸铵沉淀。

[0364] 一般而言,用于制备供研究,测试,和临床中使用的抗体的各种方法学是本领域完善建立的,与上文所述方法学一致,和/或是本领域技术人员认为适合于特定的感兴趣抗体的。

[0365] (xv) 选择生物学活性抗体

[0366] 可以对如上文所述生成的抗体进行一项或多项“生物学活性”测定法以选择从治疗前景看具有有益特性的抗体或选择保留抗体的生物学活性的配制剂和条件。可以对抗体测试其结合抗原的能力(该抗体就是针对该抗原生成的)。例如,可以使用本领域已知的方法(诸如ELISA,Western Blot,等)。

[0367] 例如,对于抗PD-L1抗体,可以在检测结合PD-L1的能力的测定法中评估抗体的抗原结合特性。在一些实施方案中,例如,可以通过饱和结合;ELISA;和/或竞争测定法(例如RIA)来测定抗体的结合。还有,可以对抗体进行其它生物学活性测定法,例如为了评估其作为治疗剂的有效性。此类测定法是本领域已知的,而且依赖于靶抗原和抗体的预定用途。例如,可以在CD8⁺T细胞,淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)小鼠模型和/或同基因肿瘤模型中评估通过抗体阻断PD-L1的生物学影响,例如如美国专利8,217,149中描述的。

[0368] 为了筛选结合感兴趣抗原上特定表位的抗体(例如那些阻断实施例的抗PD-L1抗

体结合PD-L1的),可以实施常规交叉阻断测定法,诸如Antibodies,A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow and David Lane(1988)中描述的。或者,可以实施表位作图来测定抗体是否结合感兴趣表位,例如如Champe et al., J.Biol.Chem.270:1388-1394(1995)中描述的。

[0369] IV. 药物组合物和配制剂

[0370] 本文中还提供包含本文所述PD-1轴结合拮抗剂和/或抗体(诸如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)和任选的药理学可接受载体的药物组合物和配制剂。

[0371] 可以通过混合具有期望纯度的活性组分(例如PD-1轴结合拮抗剂)与一种或多种任选的药理学可接受载体(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编(1980))以冻干配制剂或水性溶液形式制备如本文中所描述的药物组合物和配制剂。一般地,药理学可接受载体在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括但不限于缓冲剂,诸如磷酸盐,柠檬酸盐,和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵,苯索氯铵;酚,丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨醇;成盐相反离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。本文中的例示性的药理学可接受载体进一步包含间质药物分散剂诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20(HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。某些例示性的sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20记载于美国专利公开文本No.2005/0260186和2006/0104968。在一方面,将sHASEGP与一种或多种别的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0372] 例示性的冻干抗体配制剂记载于美国专利No.6,267,958。水性抗体配制剂包括那些记载于美国专利No.6,171,586和W02006/044908的,后一种配制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0373] 本文中的组合物和配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性组分,优选那些活性互补且彼此没有不利影响的。合适地,此类活性组分以对于意图的目的有效的量组合存在。

[0374] 活性成分可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),在胶状药物投递系统中(例如脂质体,清蛋白微球体,微乳剂,纳米颗粒和纳米胶囊),或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编(1980)。

[0375] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适的例子包括含有抗体(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体)的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形商品形式,例如膜,或微胶囊。用于体内施用的配制剂一般是无菌的。无菌性可容易地实现,例如通过穿过无菌滤膜过滤。

[0376] IV. 治疗方法

[0377] 本文中提供用于在个体中治疗癌症(例如黑素瘤)或延迟其进展的方法,其包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂,其中自该患者获得的血液样品中粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率已经确定为1或更大。在一些实施方案中,治疗在治疗后在个体中导致响应。在一些实施方案中,响应是部分响应。在一些实施方案中,响应是完全响应。在一些实施方案中,治疗在该治疗停止后在个体中导致持久响应(例如持久部分响应或完全响应)。本文所述方法可用于治疗期望增强免疫原性的状况,诸如为了治疗癌症提高肿瘤免疫原性。本文中还提供在具有黑素瘤的个体中增强免疫功能的方法,其包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂(例如纳武单抗,派姆单抗,阿特珠单抗,或阿维单抗)。方法中可以使用本领域已知的或本文中描述的任何PD-1轴结合拮抗剂。

[0378] 在一些情况中,本文中提供的方法包括施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂,其选自下组:PD-1结合拮抗剂,PD-L1结合拮抗剂,和PD-L2结合拮抗剂。在一些情况中,PD-L1结合拮抗剂是抗体,诸如能够抑制PD-L1结合PD-1和B7.1,但是不破坏PD-1结合PD-L2的抗体。在一些情况中,PD-L1结合拮抗剂抗体是MPDL3280A,其可以以约700mg至约900mg每两周(例如约750mg至约900mg每两周,例如约800mg至约850mg每两周)的剂量施用。在一些实施方案中,MPDL3280A以约840mg每两周的剂量施用。

[0379] 作为一般性建议,可以施用于人的PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)的治疗有效量会在约0.01至约50mg/kg患者体重的范围中,无论是通过一次或多次施用。在一些实施方案中,例如,以例如每天施用约0.01至约45mg/kg,约0.01至约40mg/kg,约0.01至约35mg/kg,约0.01至约30mg/kg,约0.01至约25mg/kg,约0.01至约20mg/kg,约0.01至约15mg/kg,约0.01至约10mg/kg,约0.01至约5mg/kg,或约0.01至约1mg/kg的剂量施用该拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)。在一些实施方案中,以15mg/kg施用该拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)。然而,其它剂量方案可能是有用的。在一个实施方案中,以约100mg,约200mg,约300mg,约400mg,约500mg,约600mg,约700mg,约800mg,约900mg,约1000mg,约1100mg,约1200mg,约1300mg,约1400mg,或约1500mg的剂量将PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)施用于人。在一些实施方案中,以约800mg至约850mg每两周的剂量施用PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)。在一些实施方案中,以约840mg每两周的剂量施用PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)。可以作为单剂或作为多剂(例如2或3剂)施用剂量,诸如输注。抗体在组合治疗中施用的剂量可以与单一治疗相比降低。在一些实施方案中,例如,用于在个体中治疗局部晚期或转移性乳腺癌或延迟其进展的方法包括包含多个治疗周期的剂量给药方案,其中在每个周期的第1和15天以约840mg的剂量对该个体施用人PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A),其中每个周期是28天(即,每28天重复每个周期)。

[0380] 此疗法的进展通过本文中描述的方法来监测。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞群体内细胞毒性粒酶B⁺CD4⁺ T细胞群体的大小预示响应的持久性。例如,观察为无疾病达3个月的患者具有粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和Treg的比率4而观察为无疾病达6个月的患者具有比率45。如此,更大的粒酶B⁺CD4⁺ T细胞的群体大小指示更久的无疾病响应。

[0381] 在一些实施方案中,方法进一步包括施用有效量的至少一种别的治疗剂。

[0382] 在一些实施方案中,别的治疗剂是靶向PI3K/AKT/mTOR途径的药剂,HSP90抑制剂,微管蛋白抑制剂,凋亡抑制剂,和/或化学预防剂。别的治疗剂可以是一种或多种本文所述

化疗剂。在一些情况中,化疗剂是基于铂的化疗剂,诸如卡铂。

[0383] 在一些情况中,化疗剂是紫杉烷(例如nab-帕利他赛(ABRAXANE®),帕利他赛,或多西他赛)。在一些情况中,紫杉烷是nab-帕利他赛(ABRAXANE®)。在一些情况中,以约100mg/m²至约125mg/m²每周的剂量将nab-帕利他赛(ABRAXANE®)施用于该个体。在一些情况中,以约100mg/m²每周的剂量将nab-帕利他赛(ABRAXANE®)施用于该个体。作为一般性建议,施用于人的紫杉烷(例如nab-帕利他赛(ABRAXANE®))的治疗有效量会在约25至约300mg/m²(例如约25mg/m²,约50mg/m²,约75mg/m²,约100mg/m²,约125mg/m²,约150mg/m²,约175mg/m²,约200mg/m²,约225mg/m²,约250mg/m²,约275mg/m²,或约300mg/m²)的范围中,无论是通过一次或多次施用。例如,在一些实施方案中,施用约100mg/m²的nab-帕利他赛(ABRAXANE®)。在一些实施方案中,以100mg/m²一周一次施用nab-帕利他赛(ABRAXANE®)。在一些实施方案中,施用约125mg/m²的帕利他赛。在一些实施方案中,以200mg/m²每三周施用帕利他赛。在一些实施方案中,可以一周一次,每2周,每3周,每4周,在每个21天周期的第1,8和15天,或在每个28天周期的第1,8,和15天施用紫杉烷(例如nab-帕利他赛(ABRAXANE®))。

[0384] 在一些情况中,在单一剂量给药方案中施用PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)和紫杉烷(例如nab-帕利他赛(ABRAXANE®))。在该剂量给药方案的背景中这些药剂的施用可以是并行或分开的。例如,在一些情况中,本文中提供的方法包括包含多个治疗周期的剂量给药方案,其中在每个周期的第1和15天以约840mg的剂量对该个体施用PD-1轴结合拮抗剂,并在每个周期的第1,8,和15天以约100mg/m²的剂量对该个体施用紫杉烷,每28天重复每个周期。

[0385] 在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体罹患黑素瘤。在一些实施方案中,个体罹患肺癌,例如非小细胞肺癌。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体罹患胰腺癌。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体罹患胃癌。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体罹患结肠直肠癌。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体罹患肾细胞癌。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体罹患胰腺癌。在一些实施方案中,个体罹患局部晚期或转移性乳腺癌。在一些实施方案中,转移性乳腺癌是mTNBC。在一些实施方案中,个体已经具有两种或更少用于癌症的在先细胞毒性治疗方案。在一些实施方案中,个体从未具有用于癌症的在先靶向系统治疗。在一些实施方案中,个体具有对一种或多种癌症疗法有抗性的癌症。在一些实施方案中,对癌症疗法的抗性包括癌症复发或顽固性癌症。复发可以指治疗后癌症在原始部位或新部位的再出现。在一些实施方案中,对癌症疗法的抗性包括用抗癌疗法治疗期间癌症的进展。在一些实施方案中,对癌症疗法的抗性包括不响应治疗的癌症。癌症可以是在开始治疗时有抗性的,或者可以在治疗期间变成有抗性的。在一些实施方案中,癌症处于早期阶段或晚期阶段。

[0386] 可以以本领域已知的任何合适方式施用PD-1轴结合拮抗剂和第二治疗剂,例如紫杉烷(例如nab-帕利他赛(ABRAXANE®))。例如,可以序贯(在不同时间)或并行(在相同

时间)施用PD-1轴结合拮抗剂和第二治疗剂,例如紫杉烷。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂与第二治疗剂在分开的组合物中。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂与第二治疗剂在相同的组合物中。

[0387] 在一些实施方案中,可以通过相同施用路径或通过不同施用路径来施用PD-1轴结合拮抗剂和第二治疗剂,例如化疗剂,例如紫杉烷。在一些实施方案中,静脉内,肌肉内,皮下,表面,口服,经皮,腹膜内,眼窝内,通过植入,通过吸入,鞘内,室内,或鼻内施用PD-1轴结合拮抗剂。在一些实施方案中,静脉内,肌肉内,皮下,表面,口服,经皮,腹膜内,眼窝内,通过植入,通过吸入,鞘内,室内,或鼻内施用紫杉烷。可以施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和任选的第二治疗剂来预防或治疗疾病。可以基于要治疗的疾病的类型,PD-1轴结合拮抗剂和第二治疗剂的类型,疾病的严重程度和过程,个体的临床状况,个体的临床史和对治疗的响应,和主治医师的斟酌来确定PD-1轴结合拮抗剂和/或第二治疗剂的适宜剂量。

[0388] 在一些实施方案中,方法可以进一步包括另外的疗法。另外的疗法可以是放射疗法,手术(例如乳房肿瘤切除术和乳房切除术),化学疗法,基因疗法,DNA疗法,病毒疗法,RNA疗法,免疫疗法,骨髓移植,纳米疗法,单克隆抗体疗法,或前述的组合。另外的疗法可以是辅助或新辅助疗法的形式。在一些实施方案中,另外的疗法是施用小分子酶抑制剂或抗转移剂。在一些实施方案中,另外的疗法是施用副作用限制剂(例如意图减少治疗副作用的发生和/或减轻治疗副作用的严重程度的药剂,诸如治恶心药等)。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法。在一些实施方案中,另外的疗法是手术。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法和手术的组合。在一些实施方案中,另外的疗法是 γ 照射。

[0389] 在一些实施方案中,方法进一步包括与PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷一起施用基于铂的化疗剂。在一些实施方案中,基于铂的化疗剂是卡铂。卡铂的剂量和施用是本领域公知的。卡铂的一种例示性剂量以6mg/ml的目标曲线下面积(AUC)施用。在一些实施方案中,每3周静脉内施用卡铂。

[0390] 不希望受理论束缚,认为通过促进活化性共刺激分子或通过抑制消极共刺激分子,增强T细胞刺激可促进肿瘤细胞死亡,由此治疗癌症或延迟癌症进展。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-1,例如MDX-1106(纳武单抗,Bristol-Myers Squibb)或MK-3475(派姆单抗,Merck),或抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A(阿特珠单抗)或阿维单抗)可以与针对活化性共刺激分子的激动剂联合施用。在一些实施方案中,活化性共刺激分子可包括CD40,CD226,CD28,OX40,GITR,CD137,CD27,HVEM,或CD127。在一些实施方案中,针对活化性共刺激分子的激动剂是结合CD40,CD226,CD28,OX40,GITR,CD137,CD27,HVEM,或CD127的激动性抗体。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-1抗体,例如MDX-1106或MK-3475,或抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)可以与针对抑制性共刺激分子的拮抗剂联合施用。在一些实施方案中,抑制性共刺激分子可包括CTLA-4(也称作CD152),PD-1,TIM-3,BTLA,VISTA,LAG-3,B7-H3,B7-H4,IDO,TIGIT,MICA/B,或精氨酸酶。在一些实施方案中,针对抑制性共刺激分子的拮抗剂是结合CTLA-4,PD-1,TIM-3,BTLA,VISTA,LAG-3,B7-H3,B7-H4,IDO,TIGIT,MICA/B,或精氨酸酶的拮抗性抗体。

[0391] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-1抗体,例如MDX-1106或MK3475或抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)可以与针对CTLA-4(也称作CD152)的拮抗剂(例如阻断性抗体)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与ipilimumab(也称作MDX-

010,MDX-101,或YERVOY®)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与tremelimumab(也称作ticilimumab或CP-675,206)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与针对B7-H3(也称作CD276)的拮抗剂(例如阻断性抗体)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与MGA271联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与针对TGFβ的拮抗剂(例如metelimumab(也称作CAT-192),fresolimumab(也称作GC1008),或LY2157299)联合施用。

[0392] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与包含过继转移表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(例如细胞毒性T细胞或CTL)的治疗联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与包含过继转移包含显性阴性TGFβ受体,例如,显性阴性TGFβII型受体的T细胞的治疗联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与包含HERCREEM方案的治疗(参见例如ClinicalTrials.gov Identifier NCT00889954)联合施用。

[0393] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与针对CD137(也称作TNFRSF9,4-1BB,或ILA)的激动剂(例如活化性抗体)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与urelumab(也称作BMS-663513)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对CD40(例如活化性抗体)的激动剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与CP-870893联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对OX40(也称作CD134)的激动剂(例如活化性抗体)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗OX40抗体(例如AgonOX)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对CD27的激动剂(例如活化性抗体)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与CDX-1127联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)的拮抗剂联合施用。在一些实施方案中,IDO拮抗剂是1-甲基-D-色氨酸(也称作1-D-MT)。

[0394] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗体-药物缀合物联合施用。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物包含米他齐(mertansine)或单甲基奥瑞司他汀(auristatin)E(MMAE)。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗NaPi2b抗体-MMAE缀合物(也称作DNIB0600A或RG7599)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与trastuzumab emtansine(也称作T-DM1,ado-trastuzumab emtansine,或KADCYLA®,Genentech)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与DMUC5754A联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向内皮缩血管肽B受体(EDNBR)的抗体-药物缀合物(例如与MMAE缀合的针对EDNBR的抗体)联合施用。

[0395] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与血管发生抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对VEGF(例如VEGF-A)的抗体联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)和紫杉烷(例如nab-帕利他赛(ABRAXANE®))可以与贝伐珠单抗(也称作AVASTIN®,Genentech)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对血管生成素2(也称作Ang2)的抗体联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与MEDI3617联合施用。

[0396] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗肿瘤剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CSF-1R(也称作M-CSFR或CD115)的药剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗CSF-1R(也称作IMC-CS4)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与干扰素(例如干扰素 α 或干扰素 γ)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与Roferon-A(也称作重组干扰素 α -2a)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与GM-CSF(也称作重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子,rhuGM-CSF,沙格司亭(sargramostim),或LEUKINE®)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-2(也称作阿地白介素(aldesleukin)或PROLEUKIN®)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-12联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CD20的抗体联合施用。在一些实施方案中,靶向CD20的抗体是obinutuzumab(也称作GA101或GAZYVA®)或利妥昔单抗(rituximab)。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向GITR的抗体联合施用。在一些实施方案中,靶向GITR的抗体是TRX518。

[0397] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与癌症疫苗联合施用。在一些实施方案中,癌症疫苗是肽癌症疫苗,其在一些实施方案中是个人化肽疫苗。在一些实施方案中肽癌症疫苗是多价长肽,多重肽,肽混合物,杂合肽,或经肽脉冲的树突细胞疫苗(参见例如Yamada et al.,Cancer Sci,104:14-21,2013)。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与辅助剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与包含TLR激动剂,例如Poly-ICLC(也称作HILTONOL®),LPS,MPL,或CpG ODN的治疗联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与肿瘤坏死因子(TNF) α 联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-1联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与HMGB1联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-10拮抗剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-4拮抗剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-13拮抗剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与HVEM拮抗剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与ICOS激动剂,例如通过施用ICOS-L,或针对ICOS的激动性抗体联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CX3CL1的治疗联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CXCL9的治疗联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CXCL10的治疗联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CCL5的治疗联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与LFA-1或ICAM1激动剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与选择蛋白激动剂联合施用。

[0398] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向疗法联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与B-Raf抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与vemurafenib(也称作ZELBORAF®)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与dabrafenib(也称作TAFINLAR®)

联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与厄洛替尼(erlotinib)(也称作**TARCEVA®**)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与MEK抑制剂,诸如MEK1(也称作MAP2K1)或MEK2(也称作MAP2K2)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与cobimetinib(也称作GDC-0973或XL-518)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与trametinib(也称作**MEKINIST®**)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与K-Ras抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与c-Met抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与onartuzumab(也称作MetMAb)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与A1k抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与AF802(也称作CH5424802或alectinib)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)的抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与BKM120联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与idelalisib(也称作GS-1101或CAL-101)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与哌立福辛(perifosine)(也称作KRX-0401)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与Akt抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与MK2206联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与GSK690693联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与GDC-0941联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与mTOR抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与西罗莫司(sirolimus)(也称作雷帕霉素(rapamycin))联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与坦西莫司(temsirolimus)(也称作CCI-779或**TORISEL®**)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与依维莫司(everolimus)(也称作RAD001)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与地磷莫司(ridaforolimus)(也称作AP-23573,MK-8669,或deforolimus)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与OSI-027联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与AZD8055联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与INK128联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与双重PI3K/mTOR抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与XL765联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与GDC-0980联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与BEZ235(也称作NVP-BEZ235)联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与BGT226联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与GSK2126458联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与PF-04691502联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与PF-05212384(也称作PKI-587)联合施用。

[0399] 本文中描述的新颖方法可用于在能检测到肿瘤收缩之前确定包含PD-L1轴结合拮抗剂的治疗的功效。而且,通过区分治疗时的进展性疾病和假进展,本文中描述的新颖方法可用于确定包含PD-L1轴结合拮抗剂的治疗的功效。在一些情况中,肿瘤尺寸最初在包含PD-L1轴结合拮抗剂的治疗疗法后增大。这种增大事实上不是由于肿瘤负荷的增大,而是说,肿瘤尺寸的暂时增大是治疗的结果,例如免疫细胞的流入和/或扩充,常常称作“假进

展”。本文中描述的方法能区分此类假进展和进展性疾病。

[0400] V. 制品或试剂盒

[0401] 在本发明的另一个实施方案中,提供包含PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体,例如MPDL3280A)和包含说明书的包装插页的制品或试剂盒,该说明书关于自该个体获得的血液样品中具有1或更大的粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率的个体中使用该PD-1轴结合拮抗剂或在自该个体获得的血液样品中具有1或更大的粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和FOXP3⁺CD4⁺ T细胞之间的比率的个体中增强免疫功能。该制品或试剂盒中可以包括本文所述任何PD-1轴结合拮抗剂。

[0402] 对于制品或试剂盒合适的容器包括例如瓶,管形瓶,袋和注射器。容器可用各种材料制成,诸如玻璃,塑料(诸如聚氯乙烯或聚烯烃),或金属合金(诸如不锈钢或哈氏合金)。在一些实施方案中,容器装有配制剂,而且该容器上或关联的标签可指示使用说明。制品或试剂盒可进一步包括从商业和用户立场看想要的其它材料,包括其它缓冲剂,稀释剂,过滤器,针头,注射器,和印有使用说明的包装插页。在一些实施方案中,制品进一步包括一种或多种另外的药剂(例如化疗剂和抗肿瘤剂)。对于所述一种或多种药剂合适的容器包括例如瓶,管形瓶,袋和注射器。

[0403] 认为本说明书足以使得本领域技术人员实施本发明。根据上述描述,在本文所示和所述之外对本发明的各种更改对本领域技术人员会变得显然,且落在所附权利要求的范围之内。

实施例

[0404] 通过参考下述实施例,会更加全面地理解本发明。然而,它们不应解释为限制本发明的范围。要理解,本文中描述的实施例和实施方案只是出于例示目的,而且根据它们,本领域技术人员会想到各种变更和变化,而且它们被包括在本申请的精神和范围及所附权利要求的范围内。

[0405] 实施例1:mMLR测定法中的CD4⁺ T细胞和同种异基因DC

[0406] 为了揭示PD-1阻断根本的机制,我们开发了一种聚焦于CD4⁺ T细胞的体外功能测定法,其中CD4⁺ T细胞能识别同种异基因MHCII并发起可检测的免疫应答。这种测定法,称作最小限度MLR (mMLR),我们共培养自健康供体获得的分选的CD4T细胞与来自无关供体的单核细胞衍生的成熟树突细胞。

[0407] 最小限度混合淋巴细胞反应

[0408] 我们开发了一种测定法,其中将新鲜纯化的CD4⁺ T细胞在单核细胞衍生的同种异基因成熟树突细胞(mDC)存在下共培养5天。经由塑料粘附,继以去除非粘附细胞,在共培养前1周自新鲜PBMC分离单核细胞。我们然后通过将单核细胞在含有GM-CSF (50ng/ml) 和IL-4 (100ng/ml) 的培养基中培养5天,自单核细胞生成未成熟DC (iDC)。为了诱导iDC成熟,我们将TNF- α , IL-1 β 和IL-6 (各50ng/ml) 添加至培养培养基达另外2天。我们然后通过经由流式细胞术(LSRFortessa, BD Biosciences) 测量它们的主要组织相容性复合物II类(MHCII, eBioscience), CD80, CD83和CD86 (均来自BD Biosciences) 表面表达,评估DC成熟。在最小限度混合淋巴细胞反应(mMLR) 那天,经由微珠试剂盒(Miltenyi Biotec) 从自无关供体获得的10⁸个PBMC富集CD4⁺ T细胞。用5 μ M羧基-荧光素-琥珀酰亚胺基酯(CFSE) 标记在先培养

物,CD4⁺ T细胞。然后在阻断性抗PD-1抗体(或是0376或是MDX-1106,以10μg/ml的浓度)存在或缺失下在96孔U底板中一起分配10⁵个CD4T细胞与成熟同种DC(5:1)。

[0409] mMLR容许我们到自共培养起第5天在大多数同种特异性CD4⁺ T细胞上诱导高PD-1表达水平(图1)。

[0410] 统计

[0411] **对应于P<0.01而***对应于P<0.001,以单因素ANOVA(GraphPad Prism)计算。

[0412] 实施例2:PD-1阻断提高CD4⁺ T细胞的IFN-γ分泌和粒酶B生成

[0413] 我们接下测定添加至如实施例1中描述的mMLR培养物的抗PD-1阻断性抗体的效果。

[0414] 细胞因子细胞内染色和ELISA

[0415] 在自mMLR共培养起第5天,我们收集细胞培养物上清液,用于通过ELISA(R&D systems,遵循制造商的说明书)测量IFN-γ水平,并将细胞于37℃在高尔基栓(布雷非德菌素A,BD Bioscience)和高尔基终止物(莫能菌素,BD Bioscience)存在下放置另外5小时。然后清洗细胞,用抗人CD4抗体和活/死可固定染料Aqua(Invitrogen)在表面上染色,之后用固定/透化缓冲液(BD Bioscience)固定/透化。我们然后实施针对粒酶B(BD Bioscience),IFN-γ和IL-2(两种抗体均来自eBioscience)的细胞内染色。通过在共培养之后第1天添加抗PD-1阻断性抗体(Roche 0376),当与单独的共培养物和在同种型对照存在下相比,我们能提高到第5天在上清液中释放的IFN-γ的量(图2),而且令人惊讶地诱导显著的CD4⁺ T细胞的粒酶B生成(图3)。

[0416] 表4:抗PD-1抗体0376的HVR和重和轻链可变区氨基酸序列。

[0417]

名称	序列	SEQ ID NO.
重链 HVR-H1	GFSFSSY	34
重链 HVR-H2	GGR	35
重链 HVR-H3	TGRVYFALD	36
轻链 HVR-L1	SESVDTSDNSF	37
轻链 HVR-L2	RSS	38
轻链 HVR-L3	NYDVPW	39

[0418]	变体-重链 可变域VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSY TMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVTVSS	40
	变体-轻链 可变域VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTS DNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSSTLESGVPD RFGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQNY DVPWTFGQGTKVEIK	41

[0419] 表5:抗PD-L1抗体序列(PD-L1 mulgG1DAPG)。

名称	序列	SEQ ID NO.
[0420]	重链 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD SWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSAAKT TPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFP EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKI VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEV HTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLN GKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQ VYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITV EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYS KLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTE KSLSHSPGK	42
	轻链 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHP ATFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLT GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQN GVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYER	43
[0421]	HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	

[0422] 实施例3:响应各种抗PD-1轴阻断性抗体的细胞毒性CD4⁺ T细胞诱导

[0423] 在本质上如实施例2中所述实施的mMLR测定法中比较抗PD-1抗体0376,MDX-1106(纳武单抗,Bristol-Myers Squibb)和MK-3475(派姆单抗,Merck)。虽然测试的所有抗体在最小限度MLR测定法中在诱导CD4⁺ T细胞的IFN- γ 分泌方面相当(图4A),但是0376在扩充和/或诱导细胞毒性粒酶B⁺CD4⁺ T细胞出现方面显示卓越效果(图4B)。

[0424] 我们还在最小限度MLR测定法中评估用抗PD-L1抗体(表5的PD-L1muIgG1 DAPG)阻断PD-1配体PD-L1是否对CD4⁺ T细胞具有相似效果。所有抗PD-1抗体(0376,MDX-1106和MK-3475)和抗PD-L1抗体均诱导CD4⁺ T细胞的IFN- γ 分泌(图4A,图5A)。抗PD-L1抗体还诱导细胞毒性粒酶B⁺CD4⁺ T细胞的出现(图4B和图5B)。

[0425] 实施例4:用纳武单抗治疗的黑素瘤患者的外周血中的CD4⁺ T细胞概况

[0426] 黑素瘤患者PBMC的离体表型和功能表征

[0427] 在融化之后,在高尔基栓(布雷非德菌素A,BD Bioscience)和高尔基终止物(莫能菌素,BD Bioscience)存在下以范围为 2×10^5 至 10^6 个每ml的浓度在RPMI 10%FBS中重悬浮PBMC并于37°C温育12小时。然后清洗PBMC并用抗CD3(BD Horizon,BD Biosciences),抗CD8(BD Biosciences)和抗CD4抗体(BioLegend)表面染色,继以用FOXP3/转录因子缓冲液套组(eBioscience)透化/固定。将细胞针对FOXP3(eBioscience),粒酶B(BD Bioscience),IFN- γ ,IL-2(均来自eBioscience)和Ki67(BD Pharmingen)进行细胞内染色并在流式细胞仪(LSRFortessa,BD Biosciences)上获取。

[0428] 细胞毒性CD4⁺ T细胞已有描述在健康个体的外周血中以很低频率存在且数目在病毒感染期间增多,其中它们在抗病毒免疫应答中发挥至关重要作用(Appay, Clin.Exp.Immunol.138(1):10-13(2004))。

[0429] 为了在体内确认我们的体外观察结果,我们评估来自未治疗或用抗PD-1抗体(MDX-1106)治疗一小队黑素瘤患者的PBMC的功能和表型概况,寻找细胞毒性CD4⁺ T细胞(粒酶B⁺CD4⁺ T细胞)。在将细胞因子分泌阻断过夜之后,我们用谱系标志物对细胞染色并针对粒酶B实施细胞内染色。在用抗PD-1抗体(MDX-1106)治疗的患者中在最后一次治疗之后最晚2个月收集的PBMC中我们能显著($P=0.04$)检测到细胞毒性CD4⁺ T细胞群体。这种CD4⁺ 细胞毒性T细胞群体在健康供体中实际上缺失或仅以很低频率存在(图8)。

[0430] 在一个特别案例中,我们在一名黑素瘤患者(HG15443)中当他无进展时能检测到细胞毒性粒酶B⁺CD4⁺ T细胞,但是在一个稍晚的时间点(HG15952)一旦肿瘤逃脱免疫监督在相同患者中未能检测到粒酶B⁺CD4⁺ T细胞亚群(图6A和B)。

[0431] 我们还在用抗PD-1抗体治疗的患者中观察到调节性T细胞(Treg,FOXP3⁺CD4⁺ T细胞)频率的降低,与细胞毒性粒酶B⁺CD4⁺ T细胞群体升高平行(图6A)。因而,我们计算细胞毒性CD4⁺ T细胞对Treg的比率。我们发现两名具有3和5.6个月无疾病存活的抗PD-1抗体治疗的患者分别具有粒酶B⁺:Treg比率4和45,指示大于1的粒酶B⁺CD4⁺ T细胞和Treg的比率和抗PD-1疗法的临床益处之间的正相关。与之对比,健康供体和未治疗的黑素瘤患者具有等于或小于1的粒酶B⁺:Treg比率(图7)。还有,粒酶B⁺CD4⁺ T细胞群体相对于Treg群体的量度似乎预示响应的持久性。具有比率4的患者观察为无疾病达3个月而观察为无疾病达6个月的患者具有比率45(图7)。如此,更大的粒酶B⁺CD4⁺ T细胞群体大小预示更久的无疾病响应。

[0432] 就申请人所知,这是首次阐明PD-1阻断的机制。本文中呈现的发现对于用PD-1轴

结合分子(诸如抗PD1和抗PD-L1抗体)的治疗具有重要意义。评估粒酶B⁺CD4⁺ T细胞能充当生物标志物来纵向监测患者对抗PD-1疗法的响应。重要的是,该细胞可以自外周血分离,使得不必经由侵入性活检来分离细胞或组织。评估粒酶B⁺CD4⁺ T细胞,和更加特别的如本文所述计算粒酶B:Treg比率可以由医师应用来快速监测患者是否响应用PD-1轴结合分子(诸如抗PD-1或抗PD-L1抗体)的治疗。

[0433] 将细胞毒性CD4⁺ T细胞的频率对无进展存活(PFS)时段绘图揭示细胞毒性CD4⁺ T细胞群体的大小和期间疾病稳定或消退的时段之间的显著关联(P=0.0163)(图9)。这一发现指示细胞毒性CD4⁺ T细胞的存在和抗PD-1疗法的临床益处之间的正关联。

[0434] 出乎意料的是,在用抗PD-1抗体治疗的患者中我们还能观察到调节性T细胞(Treg)频率的降低,与细胞毒性CD4⁺ T细胞升高平行。因此,我们计算细胞毒性CD4⁺ T细胞对Treg的比率并联系无疾病存活时段描绘它。有趣的是,我们发现细胞毒性CD4⁺ T细胞/Treg比率和疾病进展延迟之间高度显著的关联(P=0.0013)(图10)。

[0435] 基于治疗和对治疗的响应的患者分层揭示当与以基线标示的治疗前时间点相比时抗PD-1疗法对响应者组诱导细胞毒性CD4⁺ T细胞较之Treg的显著升高(P=0.02)。另外,在那些响应抗PD-1疗法的患者较之那些具有进展性疾病的患者中有细胞毒性CD4⁺ T细胞对Treg有害物升高的明显趋势(图11)。

[0436] 这一发现不仅照亮PD-1阻断的支撑机制,而且提供有用生物标志物,用于通过简单收集少量外周血来纵向监测患者对抗PD-1疗法的响应。这种工具最终会容许医生跟踪并以及时的方式评估患者是否响应抗PD-1治疗并选择特别的组合策略以提高患者发起有效肿瘤特异性免疫应答的机会。

[0437] 其它实施方案

[0438] 虽然为了清楚理解的目的已经通过举例说明较为详细地描述了前述发明,但是描述和例子不应解释为限制本发明的范围。通过援引明确完整收录本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 豪夫迈·罗氏有限公司(F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)
 [0003] <120> 用于癌症的治疗和诊断方法
 [0004] <130> P33752
 [0005] <150> EP16183245.6
 [0006] <151> 2016-08-08
 [0007] <150> EP17150273.5
 [0008] <151> 2017-01-04
 [0009] <160> 43
 [0010] <170> PatentIn version 3.5
 [0011] <210> 1
 [0012] <211> 440
 [0013] <212> PRT
 [0014] <213> 人工序列
 [0015] <220>
 [0016] <223> 合成构建物
 [0017] <400> 1
 [0018] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [0019] 1 5 10 15
 [0020] Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 [0021] 20 25 30
 [0022] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0023] 35 40 45
 [0024] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0025] 50 55 60
 [0026] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 [0027] 65 70 75 80
 [0028] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0029] 85 90 95
 [0030] Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 [0031] 100 105 110
 [0032] Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 [0033] 115 120 125
 [0034] Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 [0035] 130 135 140
 [0036] Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 [0037] 145 150 155 160
 [0038] Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

[0039]					165				170				175					
[0040]	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys		
[0041]					180				185				190					
[0042]	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp		
[0043]					195				200				205					
[0044]	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala		
[0045]					210				215				220					
[0046]	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro		
[0047]	225								230								240	
[0048]	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val		
[0049]					245				250				255					
[0050]	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val		
[0051]					260				265				270					
[0052]	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln		
[0053]					275				280				285					
[0054]	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln		
[0055]	290								295				300					
[0056]	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly		
[0057]	305								310								320	
[0058]	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro		
[0059]					325				330				335					
[0060]	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr		
[0061]					340				345				350					
[0062]	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser		
[0063]					355				360				365					
[0064]	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr		
[0065]	370								375				380					
[0066]	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr		
[0067]	385								390								400	
[0068]	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe		
[0069]					405				410				415					
[0070]	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys		
[0071]					420				425				430					
[0072]	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys										
[0073]					435				440									
[0074]	<210> 2																	
[0075]	<211> 214																	
[0076]	<212> PRT																	
[0077]	<213> 人工序列																	

[0078]	<220>
[0079]	<223> 合成构建物
[0080]	<400> 2
[0081]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0082]	1 5 10 15
[0083]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
[0084]	20 25 30
[0085]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[0086]	35 40 45
[0087]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[0088]	50 55 60
[0089]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0090]	65 70 75 80
[0091]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
[0092]	85 90 95
[0093]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[0094]	100 105 110
[0095]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[0096]	115 120 125
[0097]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[0098]	130 135 140
[0099]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[0100]	145 150 155 160
[0101]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[0102]	165 170 175
[0103]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[0104]	180 185 190
[0105]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[0106]	195 200 205
[0107]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0108]	210
[0109]	<210> 3
[0110]	<211> 118
[0111]	<212> PRT
[0112]	<213> 人工序列
[0113]	<220>
[0114]	<223> 合成构建物
[0115]	<400> 3
[0116]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0117]	1	5	10	15
[0118]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser			
[0119]	20	25	30	
[0120]	Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0121]	35	40	45	
[0122]	Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[0123]	50	55	60	
[0124]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr			
[0125]	65	70	75	80
[0126]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0127]	85	90	95	
[0128]	Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
[0129]	100	105	110	
[0130]	Leu Val Thr Val Ser Ala			
[0131]	115			
[0132]	<210> 4			
[0133]	<211> 108			
[0134]	<212> PRT			
[0135]	<213> 人工序列			
[0136]	<220>			
[0137]	<223> 合成构建物			
[0138]	<400> 4			
[0139]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0140]	1	5	10	15
[0141]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala			
[0142]	20	25	30	
[0143]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[0144]	35	40	45	
[0145]	Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0146]	50	55	60	
[0147]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0148]	65	70	75	80
[0149]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala			
[0150]	85	90	95	
[0151]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
[0152]	100	105		
[0153]	<210> 5			
[0154]	<211> 10			
[0155]	<212> PRT			

[0156] <213> 人工序列
 [0157] <220>
 [0158] <223> 合成构建物
 [0159] <220>
 [0160] <221> Xaa
 [0161] <222> (6) .. (6)
 [0162] <223> Xaa 是 D 或 G
 [0163] <400> 5
 [0164] Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His
 [0165] 1 5 10
 [0166] <210> 6
 [0167] <211> 18
 [0168] <212> PRT
 [0169] <213> 人工序列
 [0170] <220>
 [0171] <223> 合成构建物
 [0172] <220>
 [0173] <221> Xaa
 [0174] <222> (4) .. (4)
 [0175] <223> Xaa 是 S 或 L
 [0176] <220>
 [0177] <221> Xaa
 [0178] <222> (10) .. (10)
 [0179] <223> Xaa 是 T 或 S
 [0180] <400> 6
 [0181] Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0182] 1 5 10 15
 [0183] Lys Gly
 [0184] <210> 7
 [0185] <211> 9
 [0186] <212> PRT
 [0187] <213> 人工序列
 [0188] <220>
 [0189] <223> 合成构建物
 [0190] <400> 7
 [0191] Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 [0192] 1 5
 [0193] <210> 8
 [0194] <211> 25

[0195]	<212>	PRT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
--------	-------	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0234]	<211>	11
[0235]	<212>	PRT
[0236]	<213>	人工序列
[0237]	<220>	
[0238]	<223>	合成构建物
[0239]	<220>	
[0240]	<221>	Xaa
[0241]	<222>	(5) .. (5)
[0242]	<223>	Xaa 是 D 或 V
[0243]	<220>	
[0244]	<221>	Xaa
[0245]	<222>	(6) .. (6)
[0246]	<223>	Xaa 是 V 或 I
[0247]	<220>	
[0248]	<221>	Xaa
[0249]	<222>	(7) .. (7)
[0250]	<223>	Xaa 是 S 或 N
[0251]	<220>	
[0252]	<221>	Xaa
[0253]	<222>	(9) .. (9)
[0254]	<223>	Xaa 是 A 或 F
[0255]	<220>	
[0256]	<221>	Xaa
[0257]	<222>	(10) .. (10)
[0258]	<223>	Xaa 是 V 或 L
[0259]	<400>	12
[0260]	Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala	
[0261]	1	5 10
[0262]	<210>	13
[0263]	<211>	7
[0264]	<212>	PRT
[0265]	<213>	人工序列
[0266]	<220>	
[0267]	<223>	合成构建物
[0268]	<220>	
[0269]	<221>	Xaa
[0270]	<222>	(4) .. (4)
[0271]	<223>	Xaa 是 F 或 T
[0272]	<220>	

[0273] <221> Xaa
[0274] <222> (6) .. (6)
[0275] <223> Xaa 是 Y 或 A
[0276] <400> 13
[0277] Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
[0278] 1 5
[0279] <210> 14
[0280] <211> 9
[0281] <212> PRT
[0282] <213> 人工序列
[0283] <220>
[0284] <223> 合成构建物
[0285] <220>
[0286] <221> Xaa
[0287] <222> (3) .. (3)
[0288] <223> Xaa 是 Y, G, F, 或 S
[0289] <220>
[0290] <221> Xaa
[0291] <222> (4) .. (4)
[0292] <223> Xaa 是 L, Y, F, 或 W
[0293] <220>
[0294] <221> Xaa
[0295] <222> (5) .. (5)
[0296] <223> Xaa 是 Y, N, A, T, G, F, 或 I
[0297] <220>
[0298] <221> Xaa
[0299] <222> (6) .. (6)
[0300] <223> Xaa 是 H, V, P, T, 或 I
[0301] <220>
[0302] <221> Xaa
[0303] <222> (8) .. (8)
[0304] <223> Xaa 是 A, W, R, P, 或 T
[0305] <400> 14
[0306] Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
[0307] 1 5
[0308] <210> 15
[0309] <211> 23
[0310] <212> PRT
[0311] <213> 人工序列

[0312]	<220>
[0313]	<223> 合成构建物
[0314]	<400> 15
[0315]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0316]	1 5 10 15
[0317]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
[0318]	20
[0319]	<210> 16
[0320]	<211> 15
[0321]	<212> PRT
[0322]	<213> 人工序列
[0323]	<220>
[0324]	<223> 合成构建物
[0325]	<400> 16
[0326]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
[0327]	1 5 10 15
[0328]	<210> 17
[0329]	<211> 32
[0330]	<212> PRT
[0331]	<213> 人工序列
[0332]	<220>
[0333]	<223> 合成构建物
[0334]	<400> 17
[0335]	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[0336]	1 5 10 15
[0337]	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
[0338]	20 25 30
[0339]	<210> 18
[0340]	<211> 11
[0341]	<212> PRT
[0342]	<213> 人工序列
[0343]	<220>
[0344]	<223> 合成构建物
[0345]	<400> 18
[0346]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[0347]	1 5 10
[0348]	<210> 19
[0349]	<211> 10
[0350]	<212> PRT

[0351]	<213>	人工序列
[0352]	<220>	
[0353]	<223>	合成构建物
[0354]	<400>	19
[0355]	Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His	
[0356]	1	5 10
[0357]	<210>	20
[0358]	<211>	18
[0359]	<212>	PRT
[0360]	<213>	人工序列
[0361]	<220>	
[0362]	<223>	合成构建物
[0363]	<400>	20
[0364]	Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[0365]	1	5 10 15
[0366]	Lys Gly	
[0367]	<210>	21
[0368]	<211>	9
[0369]	<212>	PRT
[0370]	<213>	人工序列
[0371]	<220>	
[0372]	<223>	合成构建物
[0373]	<400>	21
[0374]	Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr	
[0375]	1	5
[0376]	<210>	22
[0377]	<211>	11
[0378]	<212>	PRT
[0379]	<213>	人工序列
[0380]	<220>	
[0381]	<223>	合成构建物
[0382]	<400>	22
[0383]	Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala	
[0384]	1	5 10
[0385]	<210>	23
[0386]	<211>	7
[0387]	<212>	PRT
[0388]	<213>	人工序列
[0389]	<220>	

[0390]	<223>	合成构建物
[0391]	<400>	23
[0392]	Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser	
[0393]	1	5
[0394]	<210>	24
[0395]	<211>	9
[0396]	<212>	PRT
[0397]	<213>	人工序列
[0398]	<220>	
[0399]	<223>	合成构建物
[0400]	<400>	24
[0401]	Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr	
[0402]	1	5
[0403]	<210>	25
[0404]	<211>	118
[0405]	<212>	PRT
[0406]	<213>	人工序列
[0407]	<220>	
[0408]	<223>	合成构建物
[0409]	<400>	25
[0410]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0411]	1	5 10 15
[0412]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser	
[0413]	20	25 30
[0414]	Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0415]	35	40 45
[0416]	Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[0417]	50	55 60
[0418]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	
[0419]	65	70 75 80
[0420]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0421]	85	90 95
[0422]	Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
[0423]	100	105 110
[0424]	Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0425]	115	
[0426]	<210>	26
[0427]	<211>	122
[0428]	<212>	PRT

[0429]	<213>	人工序列
[0430]	<220>	
[0431]	<223>	合成构建物
[0432]	<400>	26
[0433]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0434]	1 5 10 15	
[0435]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser	
[0436]	20 25 30	
[0437]	Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0438]	35 40 45	
[0439]	Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[0440]	50 55 60	
[0441]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	
[0442]	65 70 75 80	
[0443]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0444]	85 90 95	
[0445]	Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
[0446]	100 105 110	
[0447]	Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys	
[0448]	115 120	
[0449]	<210>	27
[0450]	<211>	11
[0451]	<212>	PRT
[0452]	<213>	人工序列
[0453]	<220>	
[0454]	<223>	合成构建物
[0455]	<400>	27
[0456]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0457]	1 5 10	
[0458]	<210>	28
[0459]	<211>	10
[0460]	<212>	PRT
[0461]	<213>	人工序列
[0462]	<220>	
[0463]	<223>	合成构建物
[0464]	<400>	28
[0465]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0466]	1 5 10	
[0467]	<210>	29

81

[0507]	Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[0508]			35					40					45			
[0509]	Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[0510]		50					55					60				
[0511]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
[0512]	65					70					75					80
[0513]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0514]				85						90					95	
[0515]	Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
[0516]				100					105					110		
[0517]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
[0518]			115					120					125			
[0519]	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
[0520]		130					135					140				
[0521]	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
[0522]	145					150					155					160
[0523]	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
[0524]				165						170					175	
[0525]	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
[0526]			180						185					190		
[0527]	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
[0528]		195					200						205			
[0529]	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
[0530]		210					215					220				
[0531]	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
[0532]	225					230					235					240
[0533]	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
[0534]			245							250					255	
[0535]	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
[0536]			260						265					270		
[0537]	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
[0538]		275						280					285			
[0539]	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
[0540]		290					295					300				
[0541]	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
[0542]	305					310					315					320
[0543]	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
[0544]				325						330				335		
[0545]	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu

[0546]	340	345	350
[0547]	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[0548]	355	360	365
[0549]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[0550]	370	375	380
[0551]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[0552]	385	390	395
[0553]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[0554]	405	410	415
[0555]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[0556]	420	425	430
[0557]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0558]	435	440	445
[0559]	<210> 33		
[0560]	<211> 214		
[0561]	<212> PRT		
[0562]	<213> 人工序列		
[0563]	<220>		
[0564]	<223> 合成构建物		
[0565]	<400> 33		
[0566]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0567]	1	5	10
[0568]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala		
[0569]	20	25	30
[0570]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0571]	35	40	45
[0572]	Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0573]	50	55	60
[0574]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0575]	65	70	75
[0576]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala		
[0577]	85	90	95
[0578]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
[0579]	100	105	110
[0580]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
[0581]	115	120	125
[0582]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
[0583]	130	135	140
[0584]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		

[0585]	145	150	155	160
[0586]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
[0587]	165	170	175	
[0588]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
[0589]	180	185	190	
[0590]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
[0591]	195	200	205	
[0592]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[0593]	210			
[0594]	<210> 34			
[0595]	<211> 7			
[0596]	<212> PRT			
[0597]	<213> 人工序列			
[0598]	<220>			
[0599]	<223> 0376 HVR-H1			
[0600]	<400> 34			
[0601]	Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr			
[0602]	1	5		
[0603]	<210> 35			
[0604]	<211> 3			
[0605]	<212> PRT			
[0606]	<213> 人工序列			
[0607]	<220>			
[0608]	<223> 0376 HVR-H2			
[0609]	<400> 35			
[0610]	Gly Gly Arg			
[0611]	1			
[0612]	<210> 36			
[0613]	<211> 9			
[0614]	<212> PRT			
[0615]	<213> 人工序列			
[0616]	<220>			
[0617]	<223> 0376 HVR-H3			
[0618]	<400> 36			
[0619]	Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp			
[0620]	1	5		
[0621]	<210> 37			
[0622]	<211> 11			
[0623]	<212> PRT			

[0624]	<213>	人工序列
[0625]	<220>	
[0626]	<223>	0376 HVR-L1
[0627]	<400>	37
[0628]		Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe
[0629]	1	5 10
[0630]	<210>	38
[0631]	<211>	3
[0632]	<212>	PRT
[0633]	<213>	人工序列
[0634]	<220>	
[0635]	<223>	0376 HVR-L2
[0636]	<400>	38
[0637]		Arg Ser Ser
[0638]	1	
[0639]	<210>	39
[0640]	<211>	6
[0641]	<212>	PRT
[0642]	<213>	人工序列
[0643]	<220>	
[0644]	<223>	0376 HVR-L3
[0645]	<400>	39
[0646]		Asn Tyr Asp Val Pro Trp
[0647]	1	5
[0648]	<210>	40
[0649]	<211>	120
[0650]	<212>	PRT
[0651]	<213>	人工序列
[0652]	<220>	
[0653]	<223>	0376 VH
[0654]	<400>	40
[0655]		Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0656]	1	5 10 15
[0657]		Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
[0658]		20 25 30
[0659]		Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0660]		35 40 45
[0661]		Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
[0662]		50 55 60

[0663]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0664]	65 70 75 80
[0665]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0666]	85 90 95
[0667]	Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
[0668]	100 105 110
[0669]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0670]	115 120
[0671]	<210> 41
[0672]	<211> 111
[0673]	<212> PRT
[0674]	<213> 人工序列
[0675]	<220>
[0676]	<223> 0376 VL
[0677]	<400> 41
[0678]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0679]	1 5 10 15
[0680]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
[0681]	20 25 30
[0682]	Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
[0683]	35 40 45
[0684]	Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
[0685]	50 55 60
[0686]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[0687]	65 70 75 80
[0688]	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
[0689]	85 90 95
[0690]	Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0691]	100 105 110
[0692]	<210> 42
[0693]	<211> 442
[0694]	<212> PRT
[0695]	<213> 人工序列
[0696]	<220>
[0697]	<223> aPDL1 HC
[0698]	<400> 42
[0699]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0700]	1 5 10 15
[0701]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser

[0702]	20							25							30													
[0703]	Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val												
[0704]	35							40							45													
[0705]	Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val												
[0706]	50							55							60													
[0707]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr												
[0708]	65							70							75							80						
[0709]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys												
[0710]	85							90							95													
[0711]	Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr												
[0712]	100							105							110													
[0713]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro												
[0714]	115							120							125													
[0715]	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly												
[0716]	130							135							140													
[0717]	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn												
[0718]	145							150							155							160						
[0719]	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln												
[0720]	165							170							175													
[0721]	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr												
[0722]	180							185							190													
[0723]	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser												
[0724]	195							200							205													
[0725]	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro												
[0726]	210							215							220													
[0727]	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro												
[0728]	225							230							235							240						
[0729]	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys												
[0730]	245							250							255													
[0731]	Val	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp												
[0732]	260							265							270													
[0733]	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu												
[0734]	275							280							285													
[0735]	Glu	Gln	Ile	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met												
[0736]	290							295							300													
[0737]	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser												
[0738]	305							310							315							320						
[0739]	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly												
[0740]	325							330							335													

[0741]	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln
[0742]				340						345					350	
[0743]	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asn	Phe	Phe
[0744]				355						360					365	
[0745]	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu
[0746]				370						375					380	
[0747]	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe
[0748]				385						390					395	
[0749]	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn
[0750]										405					410	
[0751]	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr
[0752]										420					425	
[0753]	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys						
[0754]										435					440	
[0755]	<210> 43															
[0756]	<211> 214															
[0757]	<212> PRT															
[0758]	<213> 人工序列															
[0759]	<220>															
[0760]	<223> aPDL1 LC															
[0761]	<400> 43															
[0762]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0763]	1				5					10					15	
[0764]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
[0765]					20					25					30	
[0766]	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
[0767]					35					40					45	
[0768]	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0769]					50					55					60	
[0770]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
[0771]					65					70					75	
[0772]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala
[0773]										85					90	
[0774]	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala
[0775]										100					105	
[0776]	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly
[0777]										115					120	
[0778]	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile
[0779]										130					135	
															140	

[0780]	Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
[0781]	145 150 155 160
[0782]	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
[0783]	165 170 175
[0784]	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
[0785]	180 185 190
[0786]	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
[0787]	195 200 205
[0788]	Phe Asn Arg Asn Glu Cys
[0789]	210

单独的CD4 T细胞

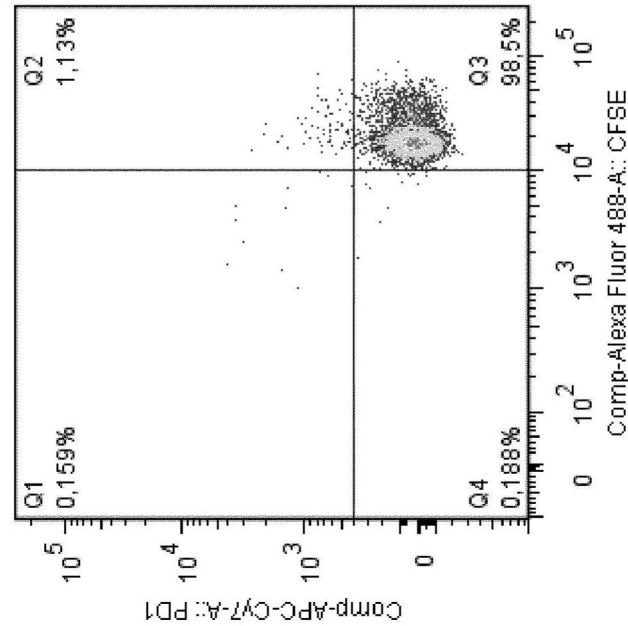


图1A

CD4 T细胞+同种mDC

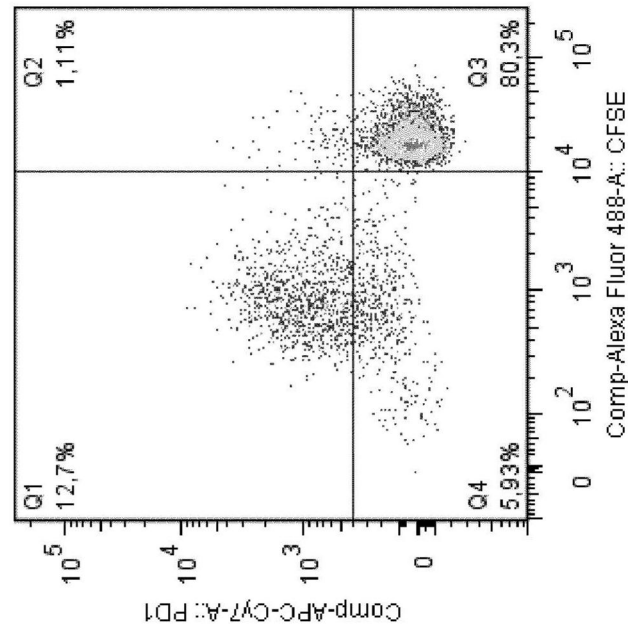


图1B

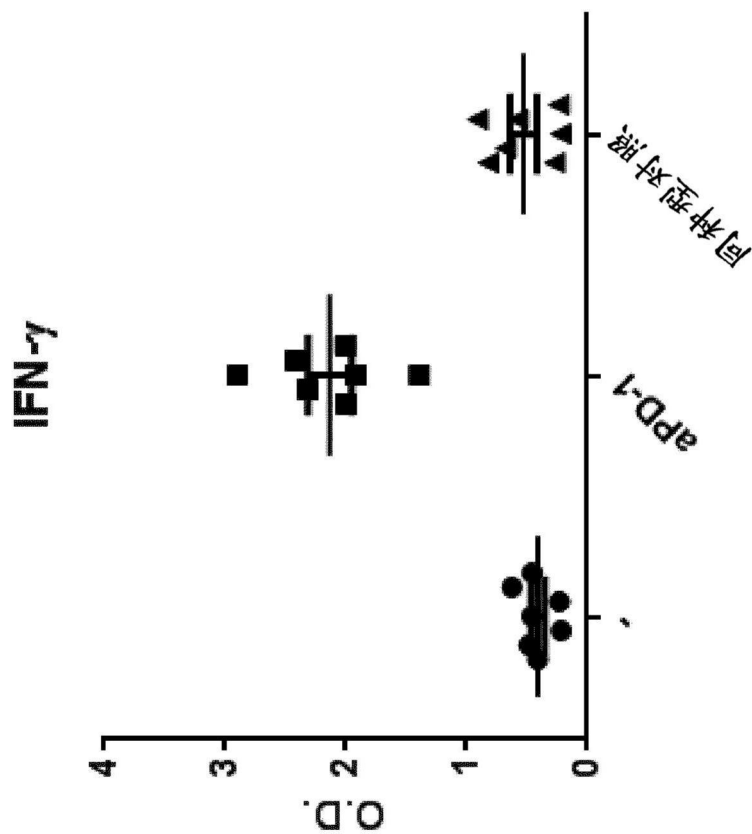


图2

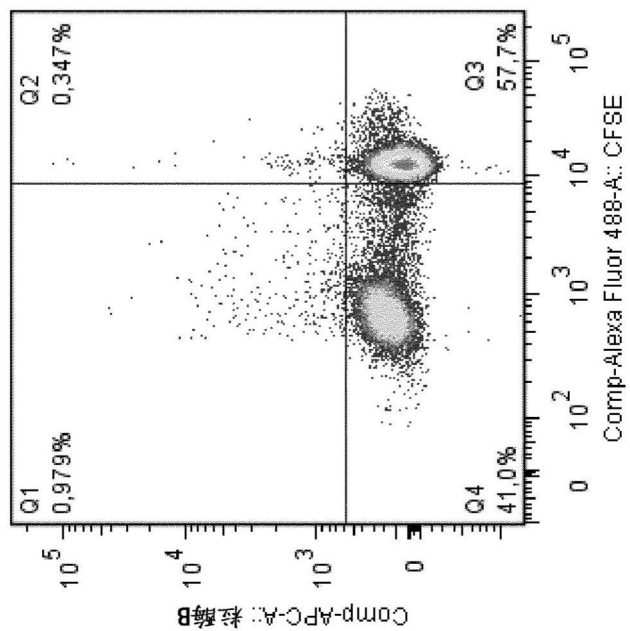


图3A

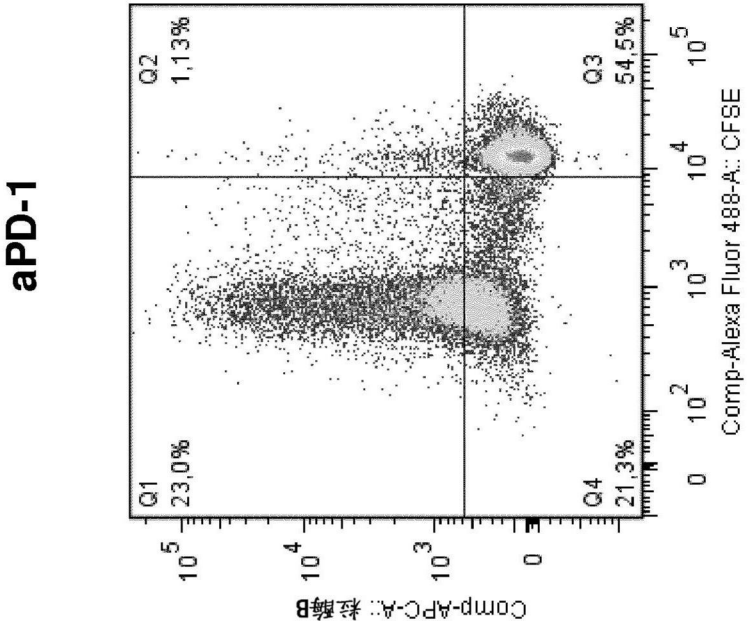


图3B

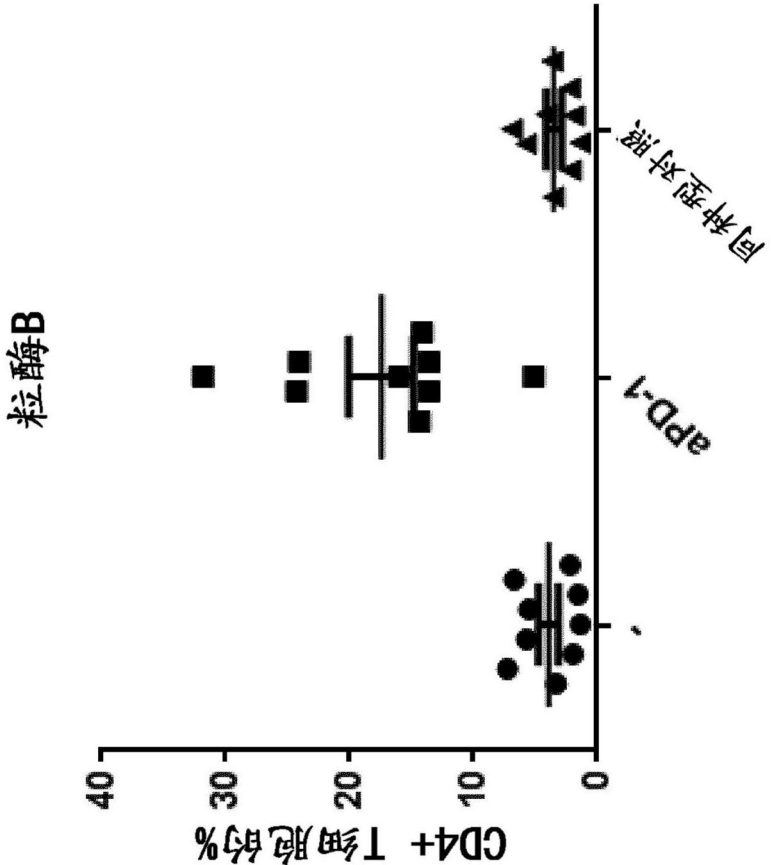


图3C

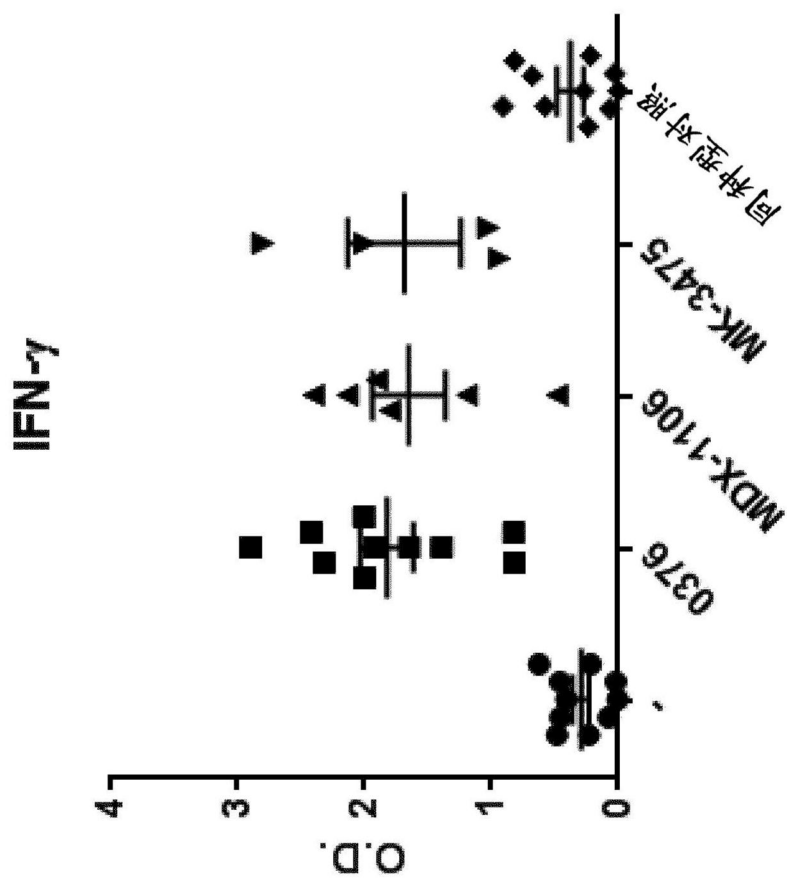


图4A

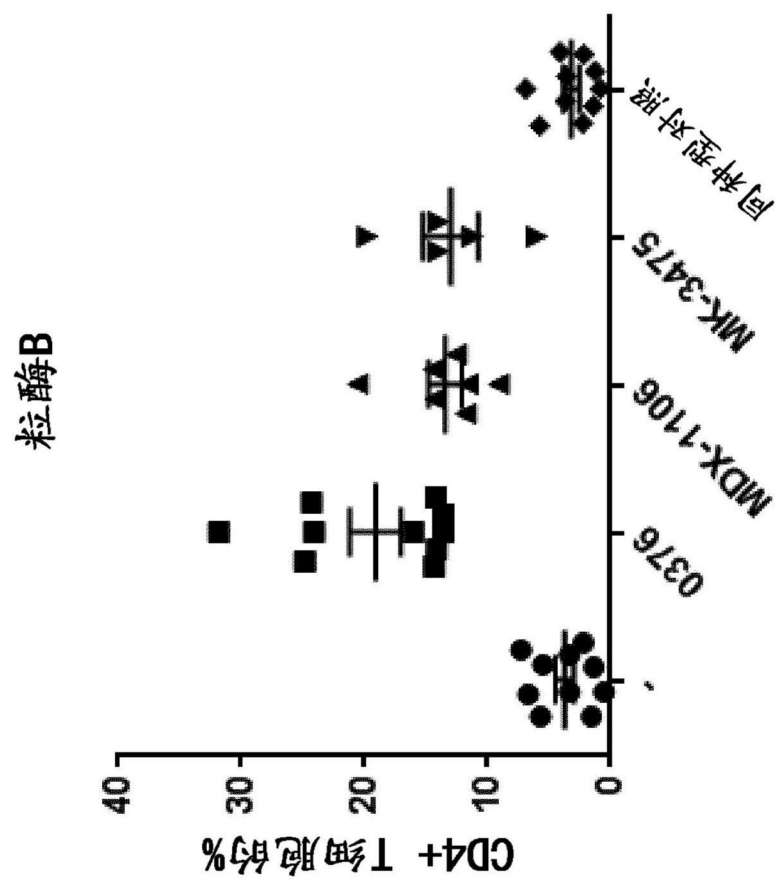


图4B

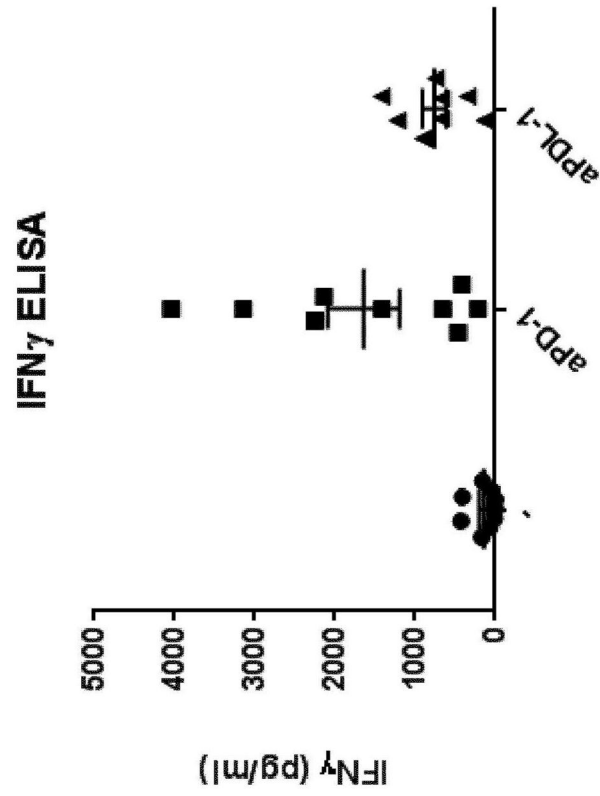


图5A

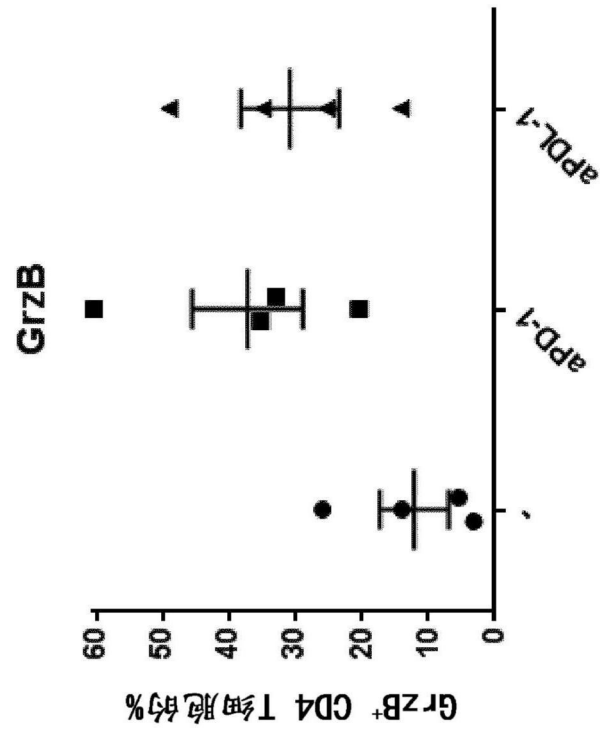


图5B

黑色素瘤患者 HG15443

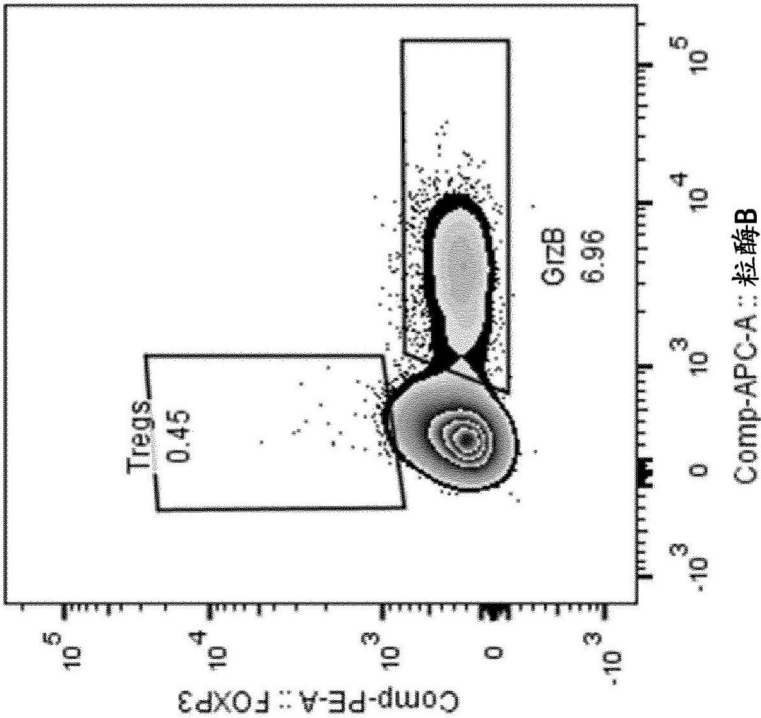


图6A

黑色素瘤患者 HG15952

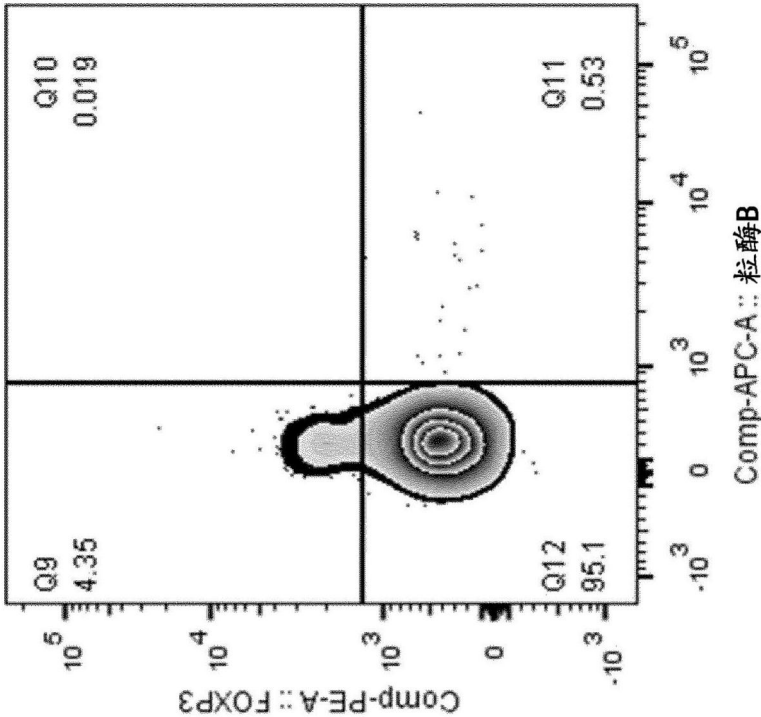


图6B

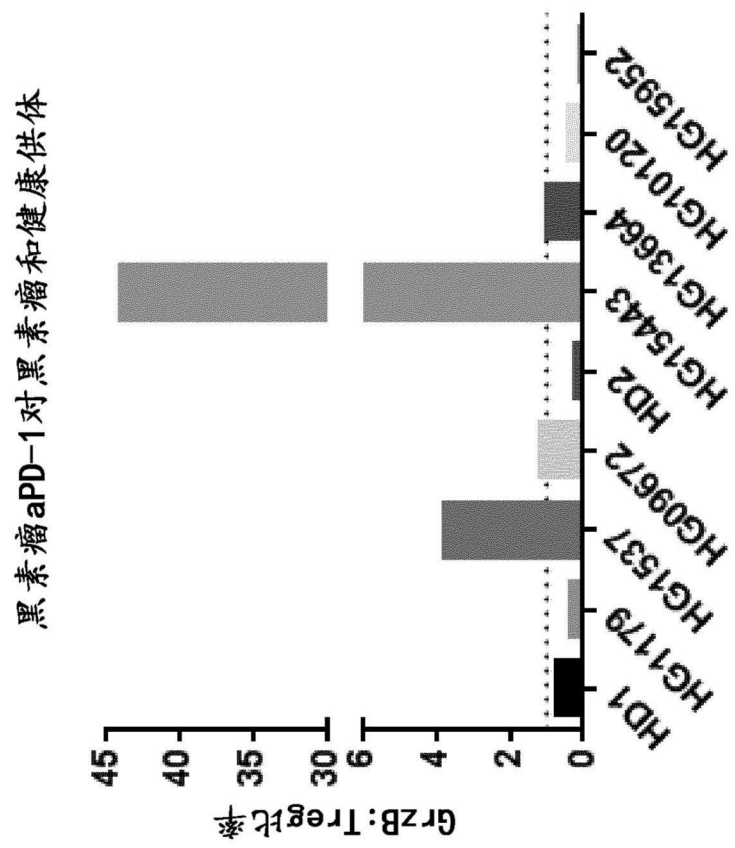


图7

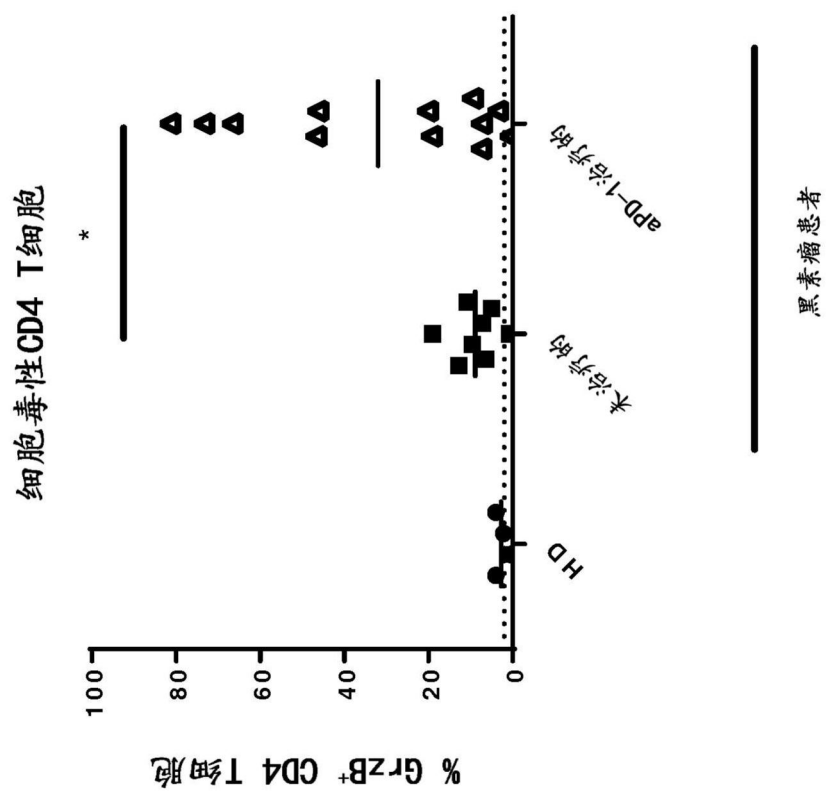


图8

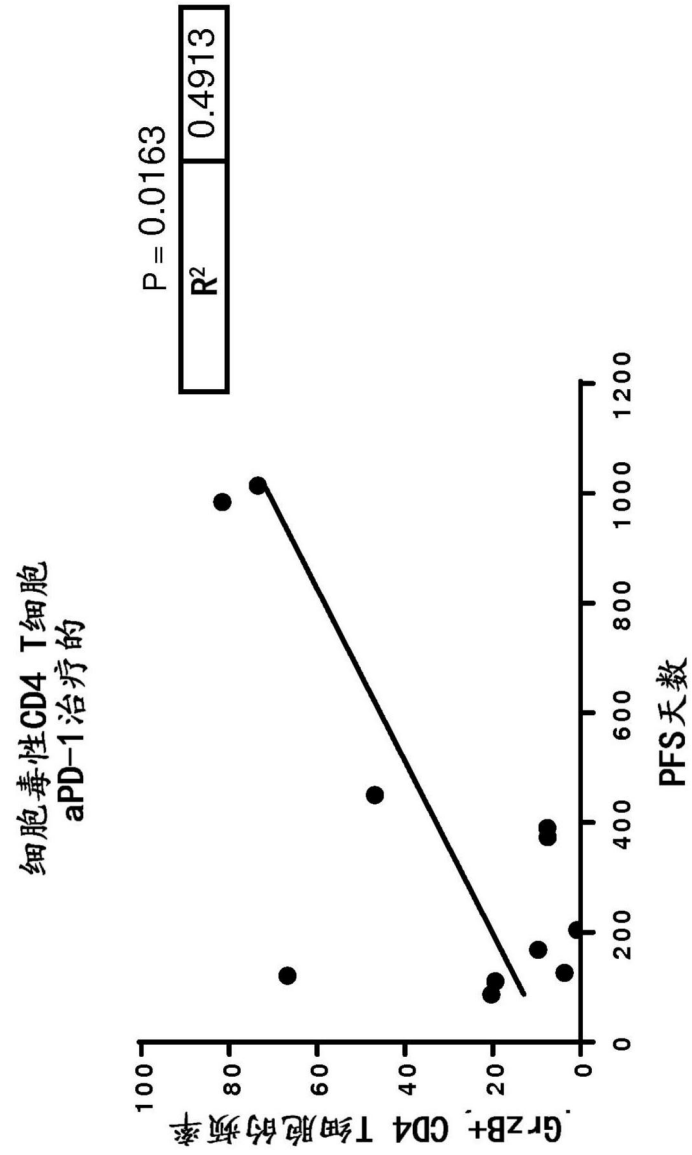


图9

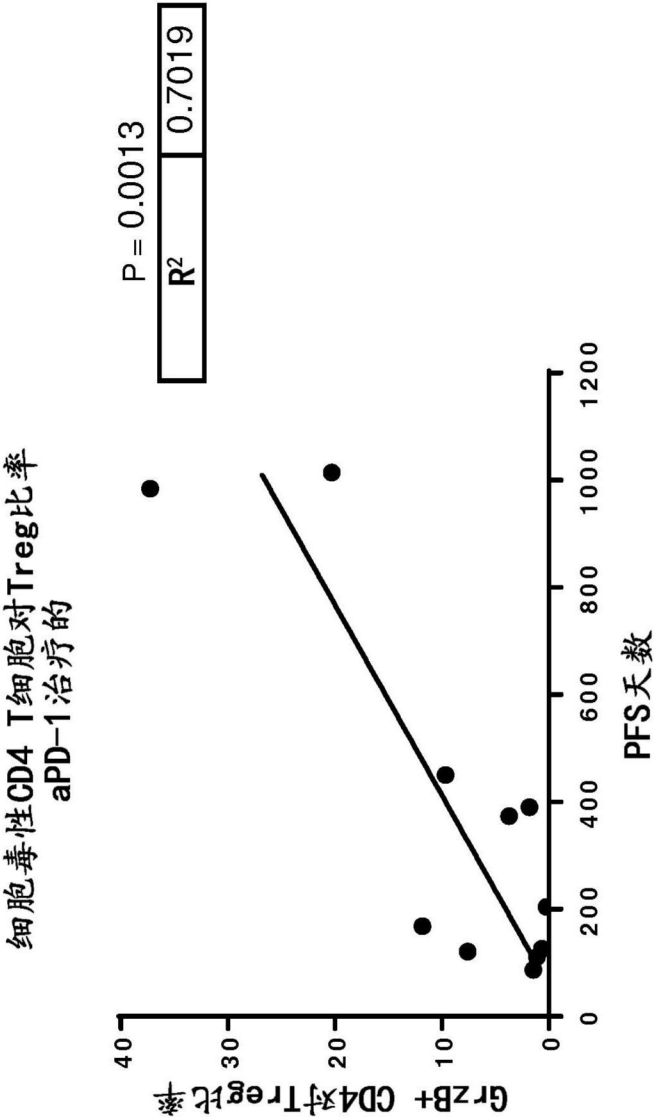


图10

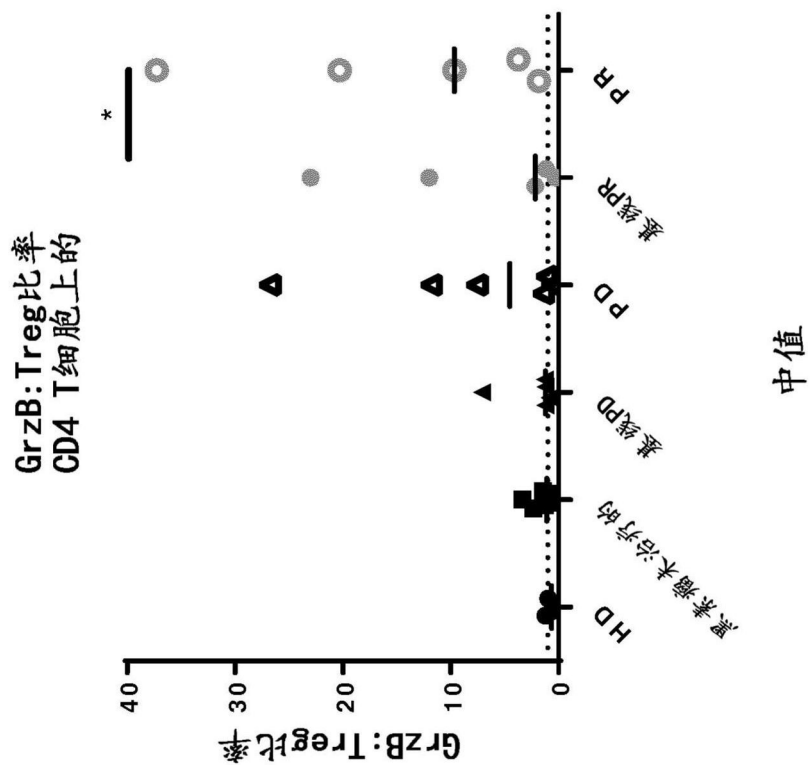


图11